

УДК 577.12

ПУТЬ К РАСШИФРОВКЕ АТОМНЫХ СТРУКТУР ПРОКАРИОТИЧЕСКОЙ И ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ РИБОСОМ

Обзор

© 2021 Г.Ж. Юсупова¹, М.М. Юсупов^{1,2*}

¹ Институт генетики, молекулярной и клеточной биологии (IGBMC),
67400 Илькириш-Граффенштаден, Страсбург, Франция

² Казанский (Приволжский) федеральный университет,
420008 Казань, Россия; электронная почта: marat@igbmc.fr

Поступила в редакцию 06.05.2021

После доработки 08.06.2021

Принята к публикации 08.06.2021

Первые кристаллические структуры прокариотической и эукариотической рибосом были решены нашей группой, будучи при этом основаны на знаниях, накопленных за десятилетия исследований, начиная с получения G. Palade в 1955 г. первых электронно-микроскопических изображений рибосомы. В 1983 г. Александр Сергеевич Спиринов, директор Института белка АН СССР, инициировал первые исследования, направленные на решение структуры рибосом с помощью рентгеноструктурного анализа. В 1999 г. наша группа в сотрудничестве с Н. Noller опубликовала первую кристаллическую структуру целой бактериальной рибосомы в комплексе с основными функциональными лигандами, включая матричную РНК и три транспортных РНК – в А-, Р- и Е-сайтах. В 2011 г. наша лаборатория опубликовала первую атомарную структуру эукариотической рибосомы, решенную методом рентгеноструктурного анализа. Была подтверждена консервативность структурной организации главных функциональных участков рибосомы, таких как декодирующий и пептидилтрансферазный центры, и описаны эукариот-специфичные элементы, определяющие различия с прокариотическим протагонистом. С помощью рентгеноструктурного анализа мы исследовали общие принципы ингибирования биосинтеза белка на эукариотических рибосомах, механизмы устойчивости к антибиотикам, а также показали структурные детерминанты, определяющие разницу в ингибировании между рибосомами бактерий и эукариот. Эти и последующие структуры функционирующей рибосомы впервые продемонстрировали на атомарном уровне, как рибосома связывается с матричной и транспортными РНК, представляя собой первый шаг к пониманию того, как структура рибосомы определяет ее функции.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рибосома, структура, рентгеноструктурный анализ, крио-ЭМ.

DOI: 10.31857/S0320972521080054

ВВЕДЕНИЕ

Синтез белка осуществляется с помощью рибосом, универсальных рибонуклеопротеиновых комплексов, которые считывают генетическую информацию, закодированную в матричной РНК (мРНК), и катализируют формирование пептидных связей между аминокислотами в запрограммированном порядке, что приводит к формированию новых пептидных цепей [1]. Эти гигантские органеллы, имеющие молекулярную массу ~2,5 МДа у бактерий и до 4,5 МДа – у высших эукариот, состоят из множества различных

белков и длинных цепей рибосомальных РНК (рРНК). Несмотря на то что рибосома и ее основные функции были описаны более 60 лет назад, большой размер и высокодинамичная природа этой макромолекулы затрудняли ее структурные исследования. В то же время было очевидно, что теоретически только один метод мог обеспечить получение структурной информации атомарного разрешения, которая в конечном счете требовалась исследователям рибосом – это рентгеноструктурный анализ.

Наши знания о трехмерной структуре рибосомы в 90-е гг. сводились в основном к фрагментарной информации, полученной с помощью ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и рентгеноструктурного анализа малых субдоменов рРНК и 10 индивидуальных рибосомных белков [2–6]. Взаимосвязи между структурой и функциями рибосомы продолжали определять на ос-

Принятые сокращения: крио-ЭМ – криоэлектронная микроскопия; мРНК – матричная РНК; рРНК – рибосомальная РНК; тРНК – транспортная РНК; ПТЦ – пептидилтрансферазный центр.

* Адресат для корреспонденции.

нове моделей, полученных с помощью методов электронной микроскопии (ЭМ), нейтронной дифракции и молекулярного моделирования, базирующихся на результатах биофизических и биохимических исследований [7–9]. Позднее были получены кристаллы и решены структуры доменов рибосомы, содержащие фрагменты рРНК и рибосомные белки [3, 5].

Лаборатории Виктора Васильева и James Lake впервые предложили модели несимметричной структуры 30S субчастицы («V-образная» модель) и 50S субчастицы («коронаобразная» модель) бактериальной рибосомы [10–12]. Позднее был достигнут значительный прогресс в исследовании структуры рибосом и рибосомных комплексов низкого разрешения при использовании трехмерной реконструкции ЭМ-изображений рибосом, замороженных в тонком слое жидкости (крио-ЭМ) [13, 14]. К концу 1990-х гг. две исследовательские группы независимо друг от друга использовали подход крио-ЭМ для получения структуры бактериальной рибосомы *E. coli*. Диаметр бактериальной рибосомы, составляющий ~ 220 Å, и все описанные ранее классические особенности структуры, в том числе «голова», «шея», «щели» и «платформа» малой субъединицы, а также три выступа в верхней части большой субъединицы, получили подтверждение при разрешении 25 Å [11, 15]. Таким образом, были описаны размеры и формы субъединиц, общая геометрия их ассоциации друг с другом. При этом разрешении некоторые спирали РНК казались различимы, но в целом нельзя было четко отличить белки от РНК. Дальнейшее развитие метода и исследование более сложных комплексов рибосомы позволило впервые визуализировать расположение транспортных РНК (тРНК) на внутренней поверхности рибосомных субчастиц. В этих работах было впервые в очевидном виде показано наличие E-участка связывания тРНК [7].

Взаиморасположение рибосомных белков, выявление соседних белков, идентификация взаимодействующих с белками последовательностей рРНК, а также участков рРНК и белков, участвующих в организации функциональных центров рибосомы – все эти задачи решались с помощью методов белок-белковых или РНК-белковых сшивок, аффинных сшивок и модификаций [16–18]. К сожалению, эти подходы для изучения структуры рибосомы не могли предоставить однозначную информацию, т.к. они основаны на анализе малой доли рибосом (иногда < 1%) исследуемого образца, который не может быть полностью структурно гомогенным. Однако, основываясь на результатах таких экспериментов, было предложено несколько моде-

лей рибосомных субчастиц, которые оказались важными стимуляторами научной активности, включая поиск подтверждений указанных моделей. Например, модель 30S субчастицы, предложенная А. Спириным, В. Васильевым и И. Сердюком, была основана на результатах ЭМ рибосомных субчастиц, а также на данных исследований иммунно-электронной микроскопии и белок-белковых сшивок. Модель проверялась экспериментально методом нейтронного и рентгеновского рассеиваний в растворе [19]. Другой подход, молекулярное моделирование малой рибосомной субчастицы, был основан на филогенетически предсказанной вторичной структуре 16S РНК [20, 21].

Одним из важнейших достижений в области исследования структуры рибосом являлась опубликованная карта положения центров масс 21 рибосомного белка малой субъединицы, решенная методом нейтронного рассеивания [22]. Этот подход позволяет измерить расстояния между центрами масс двух белков в рибосоме. Предложенная на основе этих результатов модель, хотя и оказалась позднее во многом ошибочной, тем не менее инициировала исследования по ее проверке и дискуссии в «рибосомном» сообществе.

Эксперименты с поэтапной экстракцией белков с рибосомных субчастиц путем обработки LiCl в повышающихся концентрациях с последующим ЭМ-анализом полученных рибонуклеиновых частиц показали, что рРНК определяет форму рибосомы [23, 24]. Результаты этих исследований были использованы как при моделировании малой рибосомной субчастицы, так и третичной структуры субчастиц, исходя из предсказанной вторичной структуры рРНК [25].

Для моделирования РНК в структуре 30S субчастицы использовали интегрированный подход на основе филогенетически определенной вторичной структуры 16S РНК [25, 26], нейтронной карты положения центров масс белков 30S субчастицы [27], химического зондирования рРНК на разных этапах сборки субчастицы [20, 28, 29] и результатов UV-сшивок рРНК [30].

В результате продолжительных исследований в конце 1990-х – начале 2000-х гг. были получены первые рентгеновские структуры целых бактериальных рибосом, 30S бактериальных и 50S архейных субчастиц, которые вызвали лавину новых работ в области рибосомного биосинтеза белка, значительно расширивших наше понимание функционирования этой молекулярной машины [31–33].

Значительные знания по экспериментальной биохимии и гидродинамике рибосом, на-

копленные во время работы в Институте белка в лаборатории А. С. Спирина, позволили нашей группе проводить разработку новых методов выделения и кристаллизации бактериальных, а затем и эукариотических рибосом. В настоящей статье мы описываем стратегию и ключевые этапы исследований, проведенных в первую очередь в нашей лаборатории, которые привели к определению первой кристаллической структуры прокариотической рибосомы и её функциональных комплексов, а также к нашему недавнему прогрессу в определении первой кристаллической структуры эукариотической рибосомы [33–38]. Решение первой кристаллической структуры эукариотической 80S рибосомы представляет собой прорыв в структурно-функциональных исследованиях эукариотических рибосом и позволяет рационализировать существующую биохимическую и генетическую информацию, что в конечном итоге стимулирует разработку будущих экспериментальных моделей для изучения различных аспектов биосинтеза белка.

КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ И РЕШЕНИЕ СТРУКТУРЫ БАКТЕРИАЛЬНОЙ РИБОСОМЫ

Бактериальные рибосомы, имеющие коэффициент седиментации 70S, состоят из малой и большой субчастиц (30S и 50S соответственно). Каждая субчастица рибосомы состоит из рРНК, которая составляет две трети массы субчастицы, и рибосомных белков, составляющих одну треть. Большая субчастица 50S содержит две рРНК, 5S (120 нуклеотидов) и 23S рРНК (~ 2900 нуклеотидов), в то время как малая субчастица 30S содержит только одну 16S рРНК (~ 1500 нуклеотидов). Белковая часть 30S субчастицы состоит из 21 индивидуального белка, а 50S – из 33 белков [1].

В 1980-х гг. были предприняты первые попытки получить трехмерные кристаллы рибосомных субчастиц, пригодные для исследования методом рентгеноструктурного анализа. В Институте им. Макса Планка (Max Planck) в Берлине группа Ada Yonath в сотрудничестве с Heinz-Günter Wittman получила первые кристаллы 50S рибосомных субчастиц, выделенных из *Bacillus stearothermophilus* и *Haloarcula marismortui* [39, 40]. Эти пионерские работы показали потенциальную возможность исследования рибосом методом рентгеноструктурного анализа [41]. В это время по инициативе Александра Сергеевича Спирина, директора Института белка Академии наук СССР, была организована на-

ша группа, цель которой состояла в поиске подходов для решения структуры рибосомы. В 1983 г. был инициирован проект «Кристаллография рибосомы» в рамках сотрудничества между Институтом белка и Институтом кристаллографии АН СССР.

Сегодня, по прошествии почти 40 лет после начала проекта, можно с уверенностью сказать, что сложнейшей и наиболее длительной его частью (что характерно для любого кристаллографического проекта) был поиск условий для получения дифрагирующих кристаллов рибосомы и ее субчастиц. Мы разработали методы очистки и кристаллизации рибосом из нового для лабораторных исследований организма, бактерии *Thermus thermophilus*, которая растет в экстремальных условиях – температура 75 °С является для нее оптимальной [42–44]. Позже эта экспериментальная модель была использована для решения структуры малой 30S субчастицы [32, 45] и полной 70S рибосомы с функциональными лигандами, такими как тРНК и мРНК [33, 46, 47], и по сей день остается полезной моделью в современных кристаллографических и крио-ЭМ исследованиях трансляции и механизмов ее регуляции [48–50].

При разработке метода выделения и очистки рибосом *T. thermophilus* принципиальными оказались два этапа. Первый этап – это очистка рибосом через высокоплотностную подушку, содержащую CsCl и сахарозу; данный вариант был предложен сотрудником Института белка Зурабом Гогиа. Второй этап – это гидрофобная хроматография рибосом на колонке TOYOPEARL Butyl («Tosoh Bioscience», Германия), с помощью которой получают рибосомы с прочно сцепленными субчастицами, которые пригодны для кристаллизации; эта часть протокола была предложена сотрудником Института кристаллографии Сергеем Трахановым.

Этот основной протокол из двух этапов был использован с незначительными изменениями для кристаллизации трех типов кристаллов рибосом. Первая кристаллическая форма рибосом была получена в Институте белка; ее создание подтвердило принципиальную возможность использования рентгеновского излучения для исследования структуры рибосом и ее функциональных комплексов [42–44]. Вторая кристаллическая форма была использована для первого определения структуры рибосомы, содержащей мРНК и тРНК, с разрешением 7,8 Å [46], а затем – 5,5 Å [33, 47]. Это исследование было проведено в сотрудничестве с Harry Noller в Центре молекулярной биологии РНК в Калифорнийском университете Санта-Круз (UCSC). Третья кристаллическая форма была получена в лабо-

ратории Venki Ramakrishnan и использована для определения структуры рибосомы с разрешением 2,8 Å [51]. Ранее структура рибосомы *E. coli* была определена с разрешением 3,5 Å в лаборатории Jamie Cate [52].

Наша группа также впервые получила кристаллы 30S субчастицы рибосомы *T. thermophilus* [53, 54]. После оптимизации условий роста кристаллов и сбора рентгеновских данных эта форма была использована для первого решения структуры 30S субчастицы в лабораториях Venki Ramakrishnan и Ada Yonath [32, 45]. Таким же образом кристаллы 50S субчастицы, ранее полученные в лаборатории Ada Yonath [55], после оптимизации роста кристаллов и сбора данных были использованы Peter Moore и Thomas Steitz для решения структуры 50S субъединицы из *H. marismortui* [31, 56].

Эти кристаллы отдельных рибосомных субчастиц (30S и 50S) были использованы для изучения функциональных комплексов с лигандами, мимикрирующими молекулы мРНК и тРНК, а также для исследования декодирующего и пептидилтрансферазного центров рибосомы [57, 58]. Структуры субчастиц высокого разрешения 30S *T. thermophilus* [32] и 50S *H. marismortui* [31] и экспериментальные карты электронной плотности полной 70S рибосомы были использованы нашей группой для моделирования полной рибосомы *T. thermophilus* [33, 46].

КРИСТАЛЛИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА БАКТЕРИАЛЬНОЙ РИБОСОМЫ

Трехмерные структуры рибосомы 70S и ее субчастиц были охарактеризованы при использовании различных методов электронной микроскопии в 1980-е гг. [10, 11]. В общей морфологии малой субчастицы выделены такие основные блоки как «голова» и «тело» субчастицы. Тело образовано «плечом» и «платформой», структурный элемент перехода «головы» в «тело» назван «шеей» малой субчастицы (рис. 1). Большая субчастица представляет собой более компактную конструкцию, состоящую из округлого основания с тремя выступами, названными «L1-выступ», «центральный выступ» и «стебель L7/L12». Значительное улучшение разрешения было достигнуто в 1990-е гг. с введением метода реконструкции изображений, полученных с помощью крио-ЭМ [59].

Кристаллографическое исследование бактериальных рибосом показало, что выступ на «голове» малой субъединицы состоит исключительно из спирали h33, а «центральный выступ» (или «центральный протуберанец») большой рибосомной субчастицы состоит из 5S рРНК, части 23S рРНК, а также рибосомных белков L5, L18, L25 и L33. Более подробный анализ структур субчастиц позволил выявить назначение доменов вторичной структуры рРНК. Например,

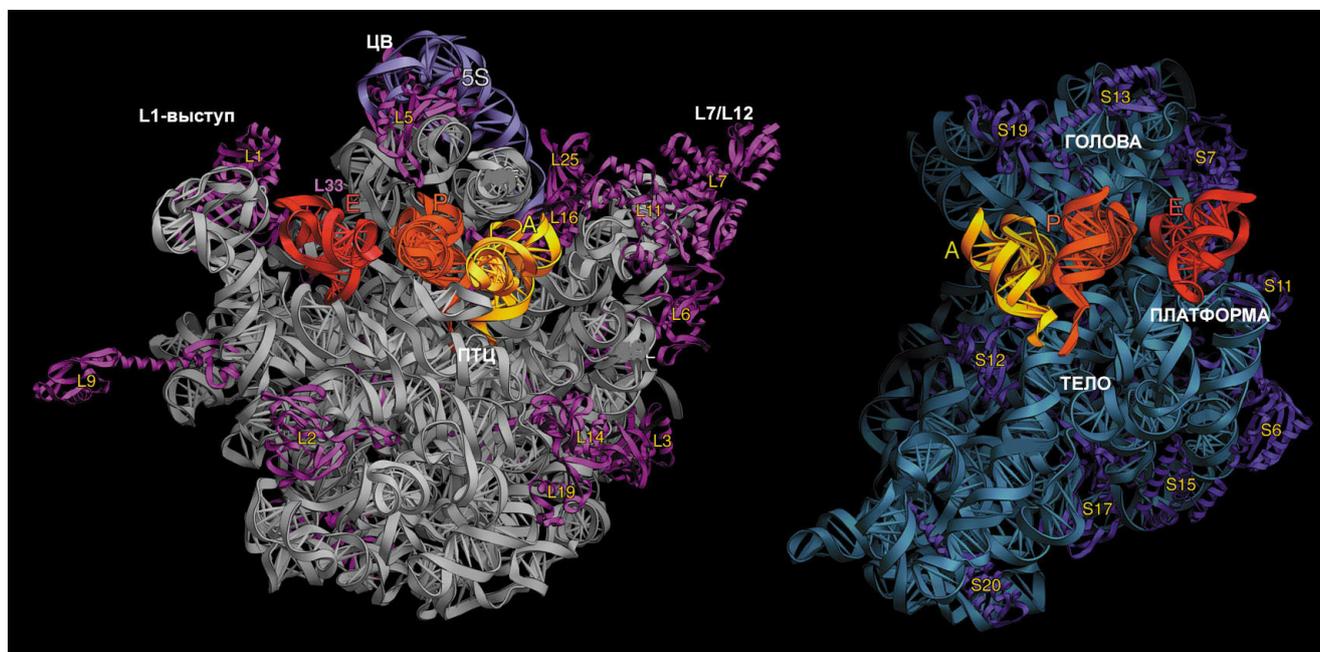


Рис. 1. Структура рибосомных субчастиц *T. thermophilus* по данным рентгеноструктурного анализа. Вид внутренней поверхности субчастиц с тРНК в А- (желтый), Р- (оранжевый) и Е-сайтах (красный). На большой субчастице (слева) обозначены «L1-выступ», «центральный выступ» (ЦВ), «стебель L7/L12» и положение пептидилтрансферазного центра (ПТЦ). На малой субчастице (справа) обозначены «голова», «тело» и «платформа»

5'-домен 16S РНК образует «тело» малой рибосомной субчастицы, средняя часть 16S РНК – «платформу», а 3'-домен – «голову» субчастицы. В целом кристаллическая структура рибосомы подтвердила правильность предсказанной вторичной структуры рибосомальных РНК [33].

Таким образом, решение кристаллических структур бактериальных рибосомных субчастиц и полной 70S рибосомы привело к описанию более 50 структур индивидуальных рибосомных белков и точной их локализации. Особенностью большинства рибосомных белков является наличие глобулярного домена, который обычно находится на поверхности субчастицы, и длинной неструктурированной аминокислотной последовательности, которая проникает глубоко вовнутрь субчастицы в её так называемое «ядро», состоящее практически полностью из рРНК. Анализ структур показал, что рибосомные белки, связываясь с разными спиралями рРНК, соединяют таким образом различные структурные домены рибосомы между собой.

Пожалуй, одним из самых больших сюрпризов в ходе анализа кристаллической структуры полной рибосомы явилось отсутствие рибосомных белков на контактной поверхности субчастиц, означающее, что функциональные центры рибосомы организованы только из рибосомальной РНК. Ранее, по аналогии с клеточными ферментами, предполагалось, что энзиматическая активность рибосомы обеспечивается именно белками. Впервые отсутствие рибосомных белков на контактной поверхности субчастиц было показано нами в 1986 г. методом триптической бомбардировки поверхности рибосом [60].

Первая кристаллическая структура полной 70S рибосомы содержала три транспортные РНК в А-, Р- и Е-участках (сайтах) связывания и фрагмент матричной РНК длиной 24 нуклеотида, стабилизированный в рибосоме между ее субчастицами [33, 47]. На основании этих и последующих кристаллографических исследований рибосомы, осуществленных нашей группой, было описано атомарное строение функциональных центров рибосомы, таких как центры взаимодействия с тРНК [33, 61, 62]. Сайты связывания мРНК и три сайта связывания тРНК (А, Р и Е) расположены на интерфейсе субчастиц, где находится и центр декодирования малой субчастицы, в котором происходит спаривание кодона и антикодона, обеспечивающее точность декодирования мРНК. Анализ полученных нами структур показал, что мРНК проникает на интерфейс рибосомы через туннель, расположенный между «головой» и «плечом», обвиваясь вокруг «шеи» малой субчастицы [47]; место выхода мРНК (5'-конец мРНК) расположено между «головой» и «платформой». В том же исследовании продемонстрировано, как мРНК образует изгиб между А- и Р-кодонами, определяющий возможность одновременного связывания двух тРНК. Кроме того, было описано, как последовательность Шайна–Дальгарно (ШД) на мРНК взаимодействует с анти-ШД участком рРНК, фиксируя таким образом точное положение рамки считывания мРНК (рис. 2), и как мРНК с этим новообразованным дуплексом перемещается во время первых этапов синтеза белка [63–65].

В последующем цикле работ мы с помощью рентгеноструктурного анализа продемонстрировали молекулярные причины нарушения точ-

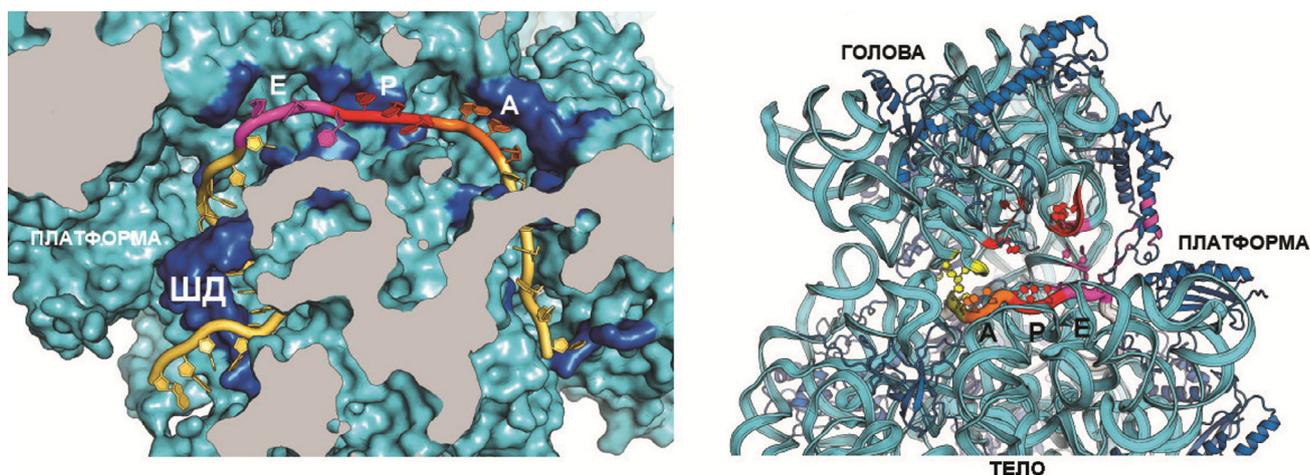


Рис. 2. Расположение мРНК на малой субчастице. *a* – Срез субчастицы на уровне мРНК: последовательность Шайна–Дальгарно (ШД) мРНК взаимодействует с анти-ШД участком рРНК; *b* – проход мРНК вокруг «шеи» малой субчастицы между «головой» и «телом». Показана ориентация кодонов в А-, Р- и Е-сайтах на внутренней поверхности субчастицы

ности декодирования на рибосоме, приводящие к включению «неправильных» аминокислот в синтезируемый белок, и предложили механизм ошибочного декодирования, «геометрической мимикрии», основанный на комбинации протонирования и редкой таутомеризации нуклеотидов в кодон-антикодонных дуплексах [66–71]. С использованием такой передовой технологии, как длинноволновая макромолекулярная кристаллография, мы впервые смогли напрямую точно локализовать сотни ионов калия в функционирующей рибосоме [49]. Мы показали, что ионы калия участвуют не только в формировании структуры комплекса рРНК и рибосомных белков, но также играют важнейшую роль в функциях рибосомы, таких как декодирование и пептидилтрансферазная реакция.

Последующие структурные исследования новых функциональных комплексов продолжают углублять наши знания о механизме связывания тРНК в присутствии фактора элонгации Tu (EF-Tu), о процессах декодирования мРНК и образования пептидных связей, о механизме гидролиза GTP, транслокации, терминации и рециклинга рибосом [37, 38, 72–75].

СТРУКТУРА ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ РИБОСОМЫ

Информация, полученная на основе решений кристаллических структур прокариотических рибосом высокого разрешения, несомненно расширила наши знания о синтезе белков в бактериях, но в то же время понимание молекулярных основ функционирования эукариотических рибосом оставалось сильно ограниченным. Было известно, что в результате эволюции эукариотические рибосомы имеют примерно на 40% большую массу (у низших эукариот) по сравнению с прокариотическими рибосомами [35, 76] и, несмотря на присутствие консервативных участков в рРНК и ряда общих белков, рибосомы про- и эукариот имеют значительные различия. Эти различия обусловлены присутствием примерно 30 дополнительных эукариот-специфических белков и > 50 нуклеотидных последовательностей, называемых сегментами расширения РНК, которые входят в эволюционно консервативное ядро рРНК. До 2010 г. наши знания о структурной организации эукариотической рибосомы базировались лишь на ЭМ-изображениях низкого разрешения. При этом использование рентгеноструктурного анализа, который мог обеспечить получение структурной информации на атомарном уровне, считалось экспериментально не достижимым: каза-

лось невозможным получить кристаллы такой гигантской макромолекулы (с молекулярным весом ~3,3 МДа у низших эукариот), дающие дифракционную картину высокого разрешения.

Первые свидетельства того, что эукариотическая рибосома способна кристаллизоваться, были получены еще в 1966 г., когда в тканях куриных эмбрионов при гипотермии были обнаружены двумерные кристаллы рибосом [77]. Тем не менее попытки кристаллизовать эукариотические рибосомы до недавнего времени не были успешными, несмотря на высокую конкуренцию в области структурной биологии.

В 2010 г. нашей группе удалось закристаллизовать полную эукариотическую 80S рибосому из *Saccharomyces cerevisiae* и получить первую рентгеновскую структуру эукариотической рибосомы, сначала с разрешением 4,15 Å, а затем — 3,0 Å [34, 78]. Успешная кристаллизация рибосомы, выделенной из дрожжей, была основана на разработке нового метода очистки интактных эукариотических рибосом. Во-первых, мы использовали известный экспериментальный факт, что глюкозное голодание растущих дрожжевых клеток ингибирует инициацию трансляции и приводит к накоплению однородных рибосом, не содержащих никаких лигандов. Таким образом, на начальном этапе клетки проходили стадию глюкозного голодания для увеличения исходного количества рибосомных мономеров. Во-вторых, был разработан очень мягкий протокол очистки рибосом, который гарантировал присутствие всех компонентов в составе рибосом в неповрежденном виде. Adam Ben-Shem ввел фракционирование клеточного экстракта S30 полиэтиленгликолем 20 000 с последующей очисткой 80S рибосом в градиенте сахарозы в недиссоциирующих условиях [78]. Таким образом были выделены высокооднородные образцы рибосомного препарата, кристаллизация которых привела к получению хорошо дифрагирующих кристаллов.

Кристаллические структуры эукариотической рибосомы из *S. cerevisiae* значительно расширили понимание механизмов синтеза белка и регуляции трансляции в клетке. Например, анализ структуры рибосомы дрожжей, выделенной из подвергнутых глюкозному голоданию клеток, показал, что нерибосомный белок Stm1 оказался связанным с рибосомой 80S, создавая таким образом дополнительный «мост» между двумя рибосомными субчастицами и приводя к повышению стабильности рибосомы в условиях кристаллизации. Функциональная роль «стрессового» белка заключалась в полном блокировании связывания основных функциональных лигандов, таких как мРНК и тРНК, путем перекрытия мест их связывания с рибосомой.

Кристаллографическое решение структур комплексов эукариотической рибосомы с эукариот-специфическими ингибиторами, а также ингибиторами широкого спектра не только позволили исследователям определить общие принципы ингибирования белкового синтеза и резистентности к нему, но и позволили улучшить качество кристаллов и сбор рентгеновских данных с разрешением 2,8 Å [79–83].

Рибосомные субчастицы 40S и 60S эукариотического организма *Tetrahymena thermophila* были успешно кристаллизованы с белковыми факторами в лаборатории Nenad Ban и определены с разрешением 3,8 и 3,6 Å соответственно [84, 85].

Рибосома 80S представляет собой асимметричный комплекс из 80 различных белков и 4 цепей РНК (рис. 3). Каждый рибосомный компонент имеет одну копию, за исключением белков Р-стебля, которые имеют по четыре копии. Эксперименты также показали, что бактериальные и эукариотические рибосомы имеют общее структурное ядро, состоящее из 34 консервативных белков (15 – в малой субчастице, 19 – в большой) и ~ 4400 нуклеотидных оснований РНК, которые вместе образуют основные функциональные центры рибосом, включая сайт декодирования, пептидилтрансферазный центр и сайты связывания тРНК [76].

Эволюционно консервативное ядро рибосомы может быть структурно определено путем сравнения модели 80S рибосомы дрожжей с ее бактериальным аналогом (рис. 4) [34, 76]. Подавляющее большинство ~1,35 МДа эукариот-специфических частей расположено на поверхности рибосомы, окружая эволюционно консервативное ядро: 350 кДа составляют сегменты экспансии (расширения) рРНК, 800 кДа белков вообще отсутствует у бактерий, 200 кДа представляют эукариот-специфичные домены, присутствующие в консервативных белках (рис. 4).

Рибосома дрожжей содержит 46 специфичных для эукариот белков (18 – в 40S субчастице, 28 – в 60S субчастице), а также эукариот-специфичные «вставки» в большинстве основных белков. Рибосомальная РНК содержит несколько сегментов экспансии в своих консервативных цепях с общей длиной более 900 оснований [34]. Большинство из этих сегментов экспансии рРНК и «вставок» белков окружают ядро со стороны растворителя и доступны для потенциальных взаимодействий с молекулярными партнерами, такими как факторы трансляции и белки-шапероны. В различных организмах эукариот размер рибосомы 80S колеблется в пределах 0,5–1,0 МДа, что в значительной степени объясняется размером вставок в сегменты экспансии ES7L, ES15L, ES27L и ES39L в 25S–28S рРНК [76].

Малая субчастица рибосомы 40S имеет те же структурные элементы, как и прокариотическая 30S, известные как «голова», «тело» и «платформа» (рис. 3). Информация о функциональных сайтах эукариотических рибосом получена путем их сопоставления с данными по кристаллической структуре функциональных комплексов бактериальных рибосом [33, 62].

Большая рибосомная субчастица имеет коронообразную форму, она включает «центральный выступ», «L1-выступ» и «Р-стебель» (рис. 3). На внутренней стороне большой рибосомной субчастицы расположены 3 сайта связывания тРНК (А, Р и Е) и пептидилтрансферазный центр, где катализируется образование пептидных связей. Последний примыкает ко входу в туннель, по которому продвигается цепь зарождающегося белка, прежде чем выйти из рибосомы со стороны растворителя.

При сравнении рибосомных структур прокариот и эукариот стало очевидным отсутствие класс-специфичных фрагментов на внутренних поверхностях субчастиц, что согласуется с консервативностью универсальных функций рибосомы (рис. 4). Указанная консервативность структуры наблюдается в декодирующем центре, пептидилтрансферажном центре и вокруг пептидного туннеля на стороне растворителя, который используется для ассоциации рибосомы с мембранами во время синтеза белка. Значительные различия в структурной организации малой и большой рибосомной субчастицы на стороне, обращенной к раствору, по-видимому, связаны со значительно более сложным путем инициации трансляции в эукариотических клетках по сравнению с прокариотами.

В целом можно отметить, что полученная нами модель первой и на сегодняшний день единственной кристаллографической структуры эукариотической рибосомы высокого разрешения включает ~90,5% из всех (~13 000) аминокислотных остатков рибосомных белков и ~95,5% нуклеотидов рРНК (из ~5500). Эта атомная модель продемонстрировала уникальную топографию эукариот-специфичных элементов и картину их взаимодействия с универсальным консервативным ядром, в том числе все эукариот-специфичные мосты между двумя рибосомными субчастицами.

НОВАЯ НОМЕНКЛАТУРА РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ

Для облегчения сравнения рибосом разных видов была принята номенклатурная система, основанная на названиях семейств белков

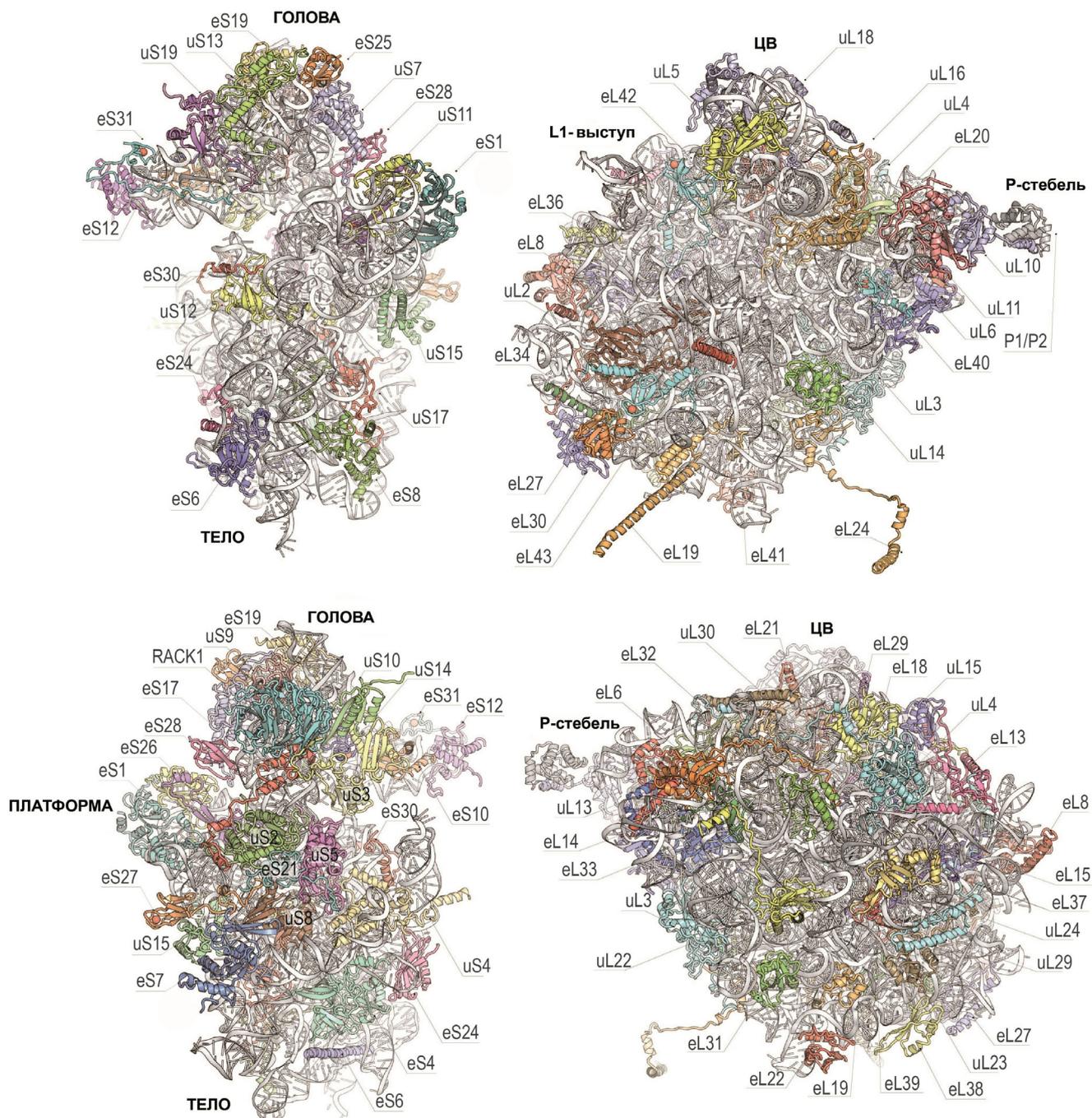


Рис. 3. Структура рибосомных субчастиц дрожжей (40S субчастица – слева, 60S субчастица – справа). Вверху показан вид внутренней поверхности субчастиц, внизу – вид внешней поверхности субчастиц (с использованием новой номенклатуры белков). Ориентиры включают «голову», «тело» и «платформу» 40S субчастицы, а также «центральный выступ» (ЦВ), «L1-выступ» и «P-стебель» 60S субчастицы

(рис. 3). Поскольку первыми были выделены и полностью секвенированы рибосомные белки из *E. coli*, их архейным и эукариотическим гомологам были присвоены соответствующие названия. Белки, обнаруженные в рибосомах всех трех доменов (бактерии, археи и эукариоты),

имеют префикс «u» (universal), за которым следуют их названия из *E. coli*. Бактериальные белки, не имеющие эукариотических гомологов, обозначаются префиксом «b» (bacterial); соответственно эукариот-специфические белки имеют префикс «e» (eukaryotic) [86].

СЕКМЕНТЫ ЭКСПАНСИИ РИБОСОМАЛЬНОЙ РНК

Секменты экспансии рибосомальной РНК расположены преимущественно на внешней поверхности обеих субчастиц эукариотической

рибосомы (рис. 4, 5, а). Интерфейс между субчастицами рибосом, а также область входа мРНК и туннель выхода полипептида очень консервативны и практически не содержат секментов экспансии и эукариот-специфичных белков. Субчастицы заметно различаются

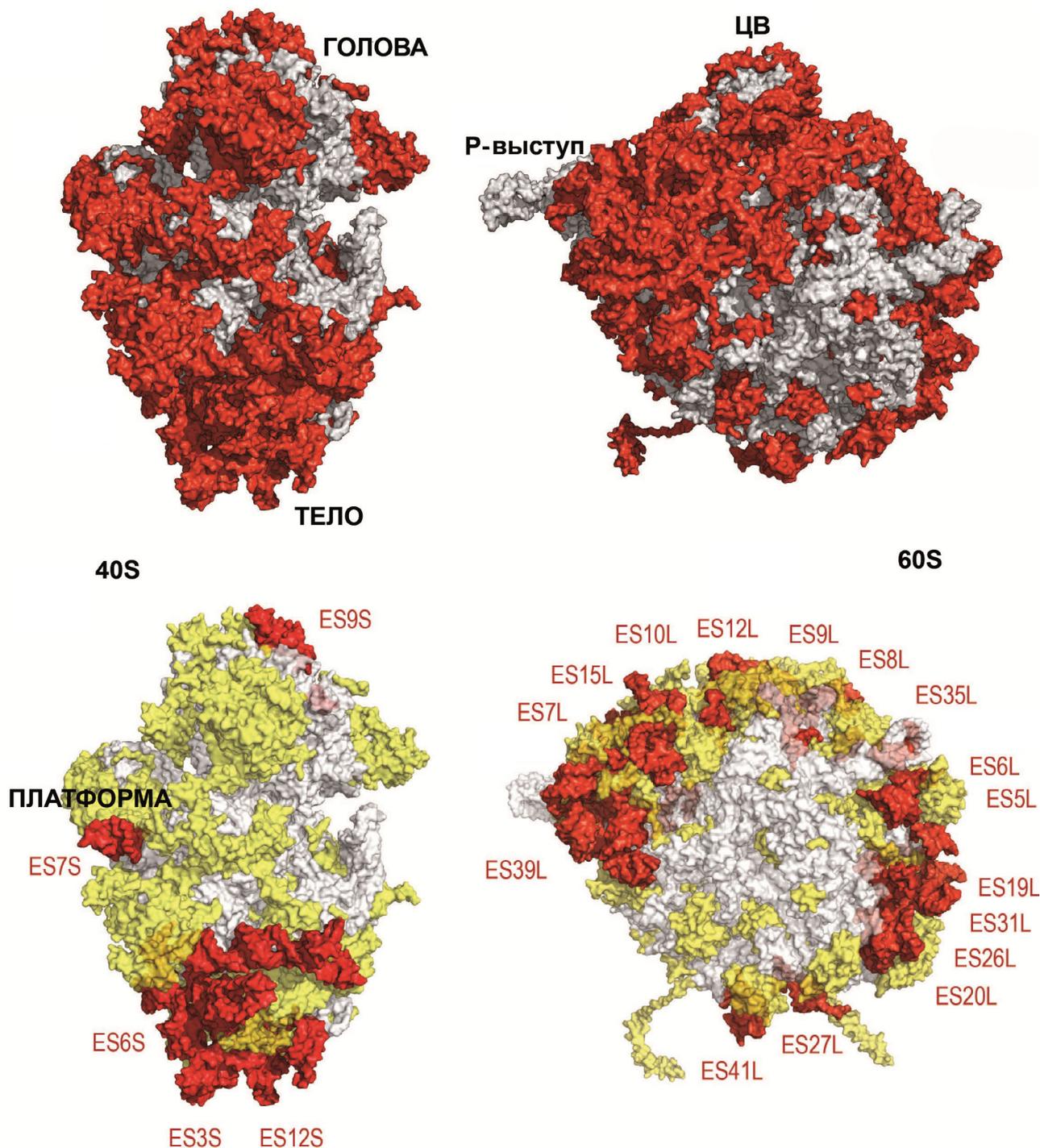


Рис. 4. Характеристика внешней поверхности рибосомных субчастиц дрожжей. Вверху – консервативное ядро субчастицы показано серым цветом; специфичные элементы рибосом эукариот показаны красным. Внизу – специфичные для эукариот белковые фрагменты (желтые), сегменты экспансии рРНК (красные; ES, expansion segments)

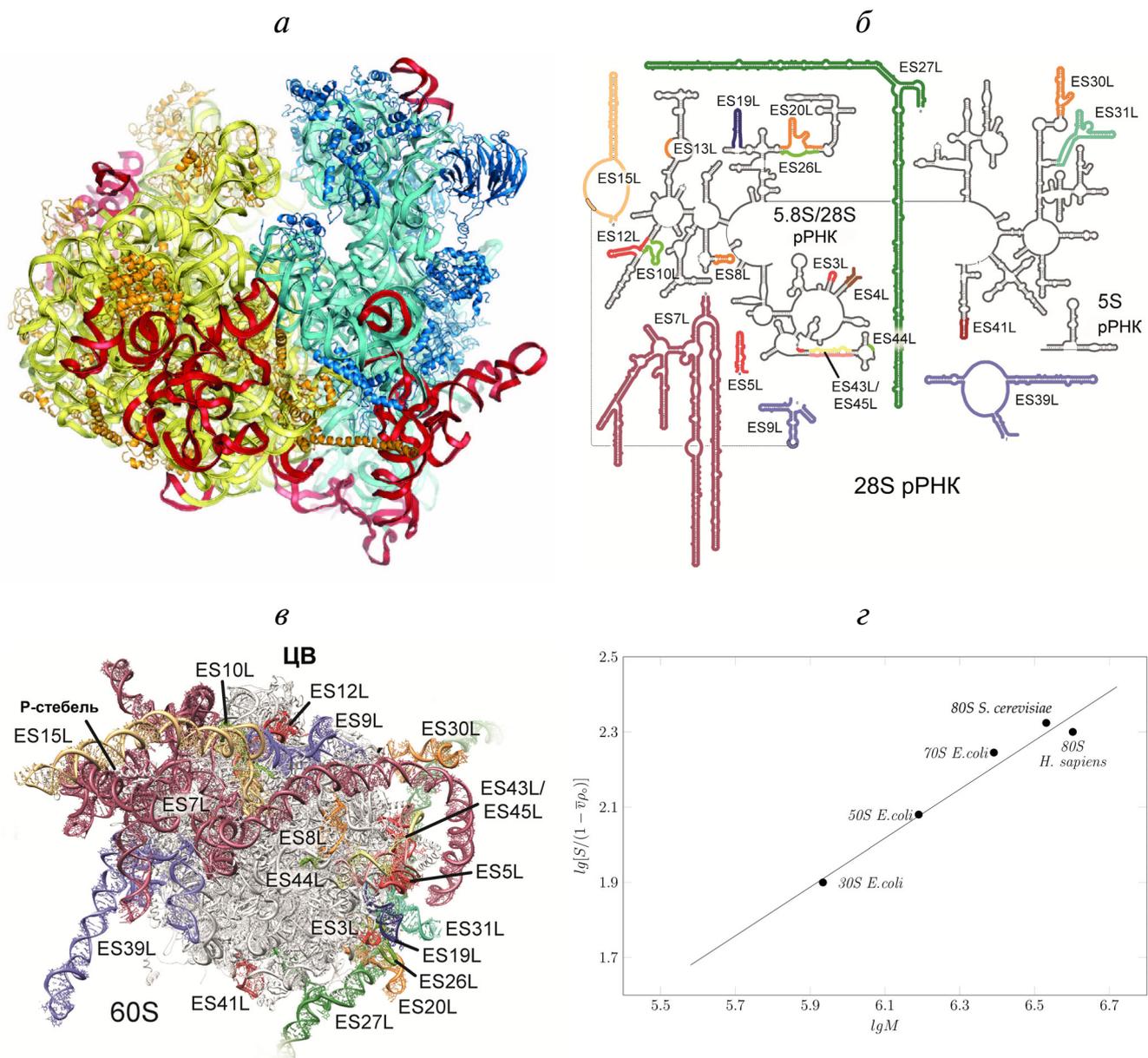


Рис. 5. Сегменты экспансии рибосомальной РНК. *а* – Структура рибосомы дрожжей, где сегменты экспансии показаны красным; модель основана на данных по электронной плотности, полученных методом рентгеноструктурного анализа. *б* – Вторичная структура 28S РНК человека, цветом показаны сегменты экспансии ES3S, ES6S, ES7L, ES15L, ES27L, ES30L и ES39L, которые не могли быть интерпретированы в крио-ЭМ реконструкциях из-за их неструктурированной формы. *в* – Пример молекулярной модели 60S субчастицы рибосомы человека с теоретически предсказанными сегментами экспансии рРНК, не имеющими экспериментального подтверждения [87]. Ориентиры включают центральный выступ (ЦВ), L1-выступ и Р-стебель. Рисунок 60S субчастицы рибосомы человека любезно предоставлен D. Wilson. *г* – Зависимость коэффициента седиментации рибосомной частицы от молекулярной массы; график любезно предоставлен С. Агаларовым

пространственным распределением сегментов экспансии рРНК. Например, в малой субчастице большая часть эукариот-специфичных рРНК сконцентрирована в нижней части, где происходит активное взаимодействие двух больших сегментов экспансии ES3S и ES6S. Напротив, в большой субчастице многочисленные сегменты экспансии образуют почти непрерывное кольцо, которое охватывает туннель для выхода по-

липептида и тянется от Р-стебля по направлению к белку L1.

Информация о структуре сегментов экспансии была получена в последующих крио-ЭМ экспериментах по анализу 80S рибосом дрозофилы и человека [87, 88]. Были предложены теоретические модели всех сегментов экспансии, включающие 9 сегментов в 40S субчастице и 21 – в 60S субчастице (рис. 5, б, в). Сегменты

экспансии 28S РНК рибосомы человека по составу подобны дрожжам, однако имеют значительно большую длину. Например, ES3S, ES7L, ES9L, ES15L, ES27L и ES39L в дрожжах составляют приблизительно 110, 200, 70, 20, 160 и 140 нуклеотидов соответственно, а те же сегменты у человека длиннее на 50, 670, 40, 170, 550 и 100 нуклеотидов соответственно. При этом сегменты экспансии рРНК человека ES3S, ES6S, ES7L, ES15L, ES27L, ES30L и ES39L не могут быть интерпретированы в крио-ЭМ реконструкциях из-за их неструктурированной гибкости (формы). Таким образом, в модели рибосомы представлены структуры рРНК, полученные вычислительным методом определения вторичной и третичной структур нуклеиновых кислот, основывающимся на ее первичной структуре (рис. 5, б, в).

Сравнение коэффициентов седиментации субчастиц бактериальной рибосомы 50S и 30S, полной бактериальной рибосомы 70S, дрожжевой и человеческой рибосомы 80S показало, что рибосома человека являлась частично развернутой (рис. 5, г): для рибосомы человека и дрожжей этот коэффициент был равен 78S и 80S соответственно. Тем не менее молекулярная масса рибосомы человека примерно на 500 000 Да больше по сравнению с рибосомой дрожжей по причине длинных сегментов экспансии 28S РНК. Очевидно, что частично развернутая структура сегментов экспансии рибосомы человека затрудняла как кристаллизацию этой рибосомы, так и другие структурно-функциональные исследования.

МЕЖСУБЧАСТИЧНЫЕ МОСТЫ

Важность межсубчастичных мостов не вызывает вопросов, поскольку они поддерживают структурную целостность полной рибосомы, а также осуществляют коммуникационные сообщения между малой и большой субчастицами в процессе синтеза белка. В ходе трансляции рибосома подвергается глобальным конформационным перестройкам, необходимым для транслкации (передвижения) мРНК и тРНК, терминции синтеза и других процессов. Эти изменения включают в себя межсубчастичное вращение, например, поворот головного домена малой субчастицы. Исследованная нами кристаллографическая структура рибосомы 80S демонстрирует эту органеллу именно в состоянии поворота [78].

Первые несколько эукариот-специфичных мостов были обнаружены в крио-ЭМ исследованиях дрожжевой рибосомы с низким разрешением [89, 90]. Наша модель при атомарном раз-

решении 3,0 Å обеспечила более точное и детальное представление о молекулярных компонентах, опосредующих эти контакты между субчастицами. Особенно примечательной является эволюционная консервативность межсубчастичных мостов в ядре рибосомы. Обнаружено семь «консервативных» мостов, а также несколько мостов, специфичных для бактерий и эукариот [33, 34, 51, 52]; практически все компоненты дополнительных мостов обеих субчастиц являются эукариот-специфичными. Интересно отметить, что в отличие от рибосом бактерий, у эукариот именно белки играют доминирующую роль в формировании специфичных межсубчастичных мостов [33]. Эукариот-специфичные мосты расположены на периферии интерфейса субчастиц, что значительно увеличивает поверхность их взаимодействия [34, 90, 91].

Существует только один специфичный для эукариот межсубчастичный мост, расположенный в центре рибосомы – мост eV14. Он образован самым маленьким белком дрожжевых клеток (25 а.о.) eL41 (рис. 3), состоящим из одной альфа-спирали. eL41 выступает из 60S субчастицы и касается 40S субчастицы в непосредственной близости от центра декодирования и почти полностью погружен в связывающий карман, состоящий из спиралей h27, h45 и h44. В организации этого моста примечательны два аспекта. Во-первых, связывающий карман eL41 в малой субчастице высококонсервативен у эукариот и бактерий. Во-вторых, в контексте полной рибосомы eL41 гораздо сильнее связан с субчастицей 40S, чем с 60S. Тем не менее, несмотря на лишь незначительные контакты eL41 с субчастицей 60S, он остается частью большой субчастицы при диссоциации рибосомы. У бактерий есть только один пример такого необычного моста, который образуется рибосомным белком большой субчастицы и связывается с малой субчастицей через функционально значимые части их структур [62]. Этот необычный мост образован белком bL31, который консервативен среди бактерий и соединяет центральный выступ большой субчастицы с лабильным головным доменом малой субчастицы. Эукариот-специфичной отличительной чертой являются два моста большой субчастицы, eV12 и eV13, образованные длинными альфа-спиралями белков eL19 и eL24 (рис. 3).

ИНГИБИРОВАНИЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ РИБОСОМЫ

Десятилетия исследований антибактериальных средств (антибиотиков) продемонстрирова-

ли разнообразие молекулярных механизмов ингибирования синтеза белка [92]. Атомарные структуры прокариотических рибосом стали основой для разработки новых ингибиторов рибосом, которые могут использоваться не только в фармакологических целях, но и служить важными инструментами для изучения механизмов синтеза белка в бактериях. Аналогично эукариотическая рибосома является основной мишенью для эукариот-специфических ингибиторов природного происхождения. Несмотря на ограниченное понимание их молекулярных механизмов, специфичные для эукариот ингибиторы все чаще используются в исследованиях и потенциально могут функционировать в качестве новых терапевтических средств против широкого спектра инфекционных и онкологических заболеваний, генетических нарушений [93–96]. Некоторые специфичные для эукариот ингибиторы были исследованы с использованием кристаллов из субчастицы 50S архей *H. marismortui* ввиду ее близкого (хотя и не полного) сходства с некоторыми частями эукариотической рибосомы [97, 98].

В наших первых исследованиях механизмов ингибирования эукариотических рибосом с помощью рентгеноструктурного анализа было изучено 16 комплексов рибосомы *S. cerevisiae* с эукариот-специфичными ингибиторами (рис. 6) [79]. Ингибиторы широкого спектра действия нацелены на пептидилтрансферазный центр на большой субчастице (бластицидин S), декодирующий центр (генетицин/G418) и сайт связывания мРНК–тРНК на малой субчастице (пактамицин, эдеин). Впервые было показано, что существует принципиальное отличие механизма ингибирования белкового синтеза у эукариот и прокариот – по E-сайту связывания тРНК, полностью отсутствующему у бактерий. В итоге были описаны специфичные для эукариот ингибиторы: а) циклогексимид, лактимидомицин и филлантозид, взаимодействующие с E-сайтом связывания тРНК, б) токсин Т-2, дезоксиниваленол, веррукарин, нарциклазин, ликорин, нагилактон С, анизомицин, гомогаррингтонин и бластицидин, взаимодействующие с пептидилтрансферазным центром (рис. 6). Глутаримидные ингибиторы циклогексимид и лактимидомицин располагались в E-сайте, образованном высококонсервативными нуклеотидами 25S рРНК и участком специфичного для эукариот белка eL42. Из них лактимидомицин несет дополнительное лактонное кольцо, которое расположено поверх eL42 и направлено к интерфейсу субъединицы. Филлантозид, несмотря на различия с глутаримидами по химическим свойствам, вступает в контакт с теми же нуклеотидами

рРНК и взаимодействует с eL42 способом, напоминающим взаимодействие с ССА-концом тРНК. Строгая селективность ингибиторов E-сайта по отношению к эукариотам объясняется наличием двух специфичных остатков рРНК, которые формируют связывающий карман. Несмотря на то что циклогексимид и лактимидомицин связываются с одним и тем же сайтом и, вероятно, конкурируют с тРНК, они влияют на трансляцию по-разному. Лактимидомицин преимущественно ингибирует работу рибосомы в процессе образования первой пептидной связи, тогда как циклогексимид останавливает рибосому во время продолжающейся трансляции [99, 100].

Пептидилтрансферазный центр состоит исключительно из нуклеотидов рРНК, он расположен на большой субчастице. Образование пептидных связей требует, чтобы два субстрата, пептидил-тРНК и аминоксил-тРНК, были правильно выровнены в A- и P-сайтах соответственно. В то время как бластицидин S связывается с P-участком большой субчастицы схожим образом у эукариот, бактерий и архей, было обнаружено, что многочисленные эукариот-специфичные ингибиторы связываются с A-участком ПТЦ (рис. 4). При этом с точки зрения химии ингибиторы имеют сходный способ связывания внутри кармана. Все ингибиторы A-сайта при ассоциации с рибосомой индуцируют сходные структурные перестройки в непосредственной близости, а также на расстоянии до 15 Å от ПТЦ. Показано, что нуклеотиды U2873 (U2504 в *E. coli*) и C2824 (C2452 в *E. coli*) участвуют во взаимодействии с ингибиторами в дрожжах. Различные ориентации этих нуклеотидов в бактериях, обусловленные отличной организацией во «вторичном» и, может быть, следующих слоях связывающего «кармана», препятствуют связыванию прокариотических рибосом с ингибиторами [79, 101].

Декодирующий центр рибосомы локализован на малой субчастице и представляет собой жестко зафиксированный «карман», в котором проходит точный отбор по антикодону аминоксил-тРНК, комплементарному расположенному в A-сайте кодону мРНК. У бактерий аминокликозидные антибиотики снижают точность трансляции и ингибируют транслокацию тРНК, приводя к нарушению конформации нуклеотидов декодирующего центра. В дополнение к использованию аминокликозидов против грамотрицательных бактерий их способность к подавлению преждевременной остановки трансляции, приводящему к абортации пептида, может найти применение в терапии наследственных болезней, вызванных нонсенс-мута-

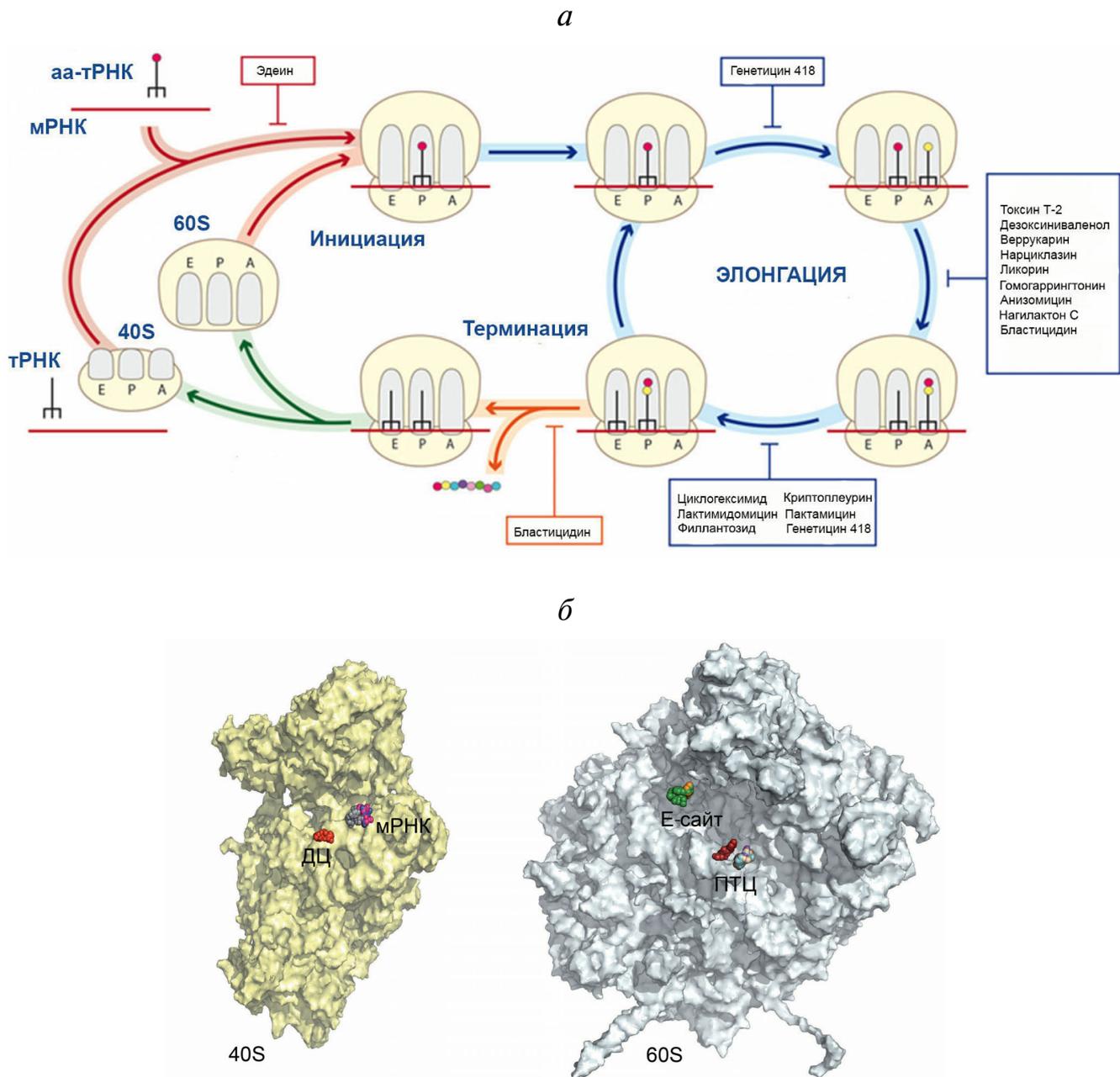


Рис. 6. Ингибирование функционирования эукариотической рибосомы. *a* – Схема стадий синтеза белка у эукариот с указанием участков связывания ряда ингибиторов; *б* – сайты связывания ингибиторов в функциональных центрах на внутренней поверхности малой (слева) и большой (справа) рибосомных субчастиц. ДЦ – декодирующий центр (генетицин/G418), мРНК – проход матричной РНК (пактамицин, криптоплеурин, эдеин), Е-сайт – участок связывания тРНК (циклогексимид, лактимидомицин, филлантозид), ПТЦ – пептидилтрансферазный центр (бластицидин S, токсин Т-2, дезоксиниваленол, веррукарин, нарциклазин, ликорин, нагилактон С, анизомицин, гомогаррингтонин)

циями [96, 102]. Канонический сайт связывания аминогликозидов находится в верхней части спирали h44 18S рРНК и содержит консервативные нуклеотиды декодирующего центра A1755 и A1756 (A1492 и A1493 в *E. coli* соответственно). В непосредственной близости находятся два нуклеотида, которые различаются между бакте-

риями и эукариотами, но идентичны в дрожжах и у людей: G1645 (A1408 в *E. coli*) и A1754 (G1491 в *E. coli*). В наших работах было продемонстрировано, как это различие нуклеотидов в декодирующем участке объясняет специфичность ряда аминогликозидных антибиотиков, способных к ингибированию рибосом бактерий

в организме человека [79]. Мы также показали, что аминогликозидные антибиотики, например, паромомицин, G418, ТС007 и гентамицин, обладают способностью связывания и с другими участками на эукариотической рибосоме, помимо декодирующего центра [103].

В исследованиях с использованием рентгеноструктурного анализа мы продемонстрировали, что такие ингибиторы, как пактамицин, криптоплеурин и эдеин, связываются в канале мРНК в Е-сайте малой субчастицы и взаимодействуют только с 18S рРНК [79]. При этом пактамицин и эдеин являются ингибиторами широкого спектра действия. У бактерий и эукариот описан консервативный сайт связывания пактамицина; в случае эдеина связывание также идет в консервативном сайте, однако принимаемая ингибитором конфигурация различается в дрожжах и бактериальной малой субчастице. Криптоплеурин, напротив, был описан как специфичный для эукариот ингибитор [104]. Тем не менее получение структуры комплекса криптоплеурина с рибосомой дрожжей пока не смогло объяснить природу его специфичности. Положение эдеина, пактамицина и криптоплеурина в ассоциации с рибосомой позволяет предположить, что они влияют на транслокацию деацелированной тРНК из Р-сайта в Е-сайт и, предположительно, на инициацию трансляции у эукариот. При использовании полученной ранее модели эукариотической рибосомы мы продолжаем рентгеноструктурные исследования новых ингибиторов, проявляющих антираковое действие [80–83].

ВЫВОДЫ

Прогресс в развитии новых технологий в области рентгеноструктурной кристаллографии и крио-ЭМ создал уникальную возможность для глубокого исследования механизмов функционирования рибосом в различных организмах,

включая патогенные, и открывает новые возможности для поиска путей борьбы с патогенами, такими как *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* и другими.

К сожалению, функционирование рибосом выскоразвитых эукариот, включая рибосомы человека, недостаточно изучено и требует дополнительных биохимических и гидродинамических исследований, включая получение подходящих кристаллов для рентгеноструктурного анализа. Основное отличие рибосом человека (молекулярный вес 4,5 МДа) от рибосом низших эукариот (дрожжей, 3,3 МДа) связано с появлением сегментов расширения рибосомальной РНК, локализованных в основном на поверхности 60S субчастицы и обладающих особенной подвижностью. В недавних крио-ЭМ исследованиях рибосом человека было показано, что значительная часть этих сегментов расширения рРНК (~1 МДа) оказалась не структурирована и, следовательно, не могла быть подвергнута рентгеноструктурному анализу [87, 88, 105]. Таким образом, на сегодняшний день мы, к сожалению, не имеем полных данных об атомарном строении рибосомы человека.

Вопрос разработки методов стабилизации рибосом высших организмов для проведения структурных исследований остается открытым.

Благодарности. Мы благодарим Султана Агаларова (Институт белка АН РАН, Россия) и Даниэля Уилсона (Гамбургский университет, Германия) за любезное предоставление рис. 3.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-65-47031).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Spirin, A. S. (2002) Ribosome as a molecular machine, *FEBS Lett.*, **514**, 2-10.
2. Fourmy, D., Recht, M. I., Blanchard, S. C., and Puglisi, J. D. (1996) Structure of the A site of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic, *Science*, **274**, 1367-1371, doi: 10.1126/science.274.5291.1367.
3. Agalarov, S. C., Sridhar Prasad, G., Funke, P. M., Stout, C. D., and Williamson, J. R. (2000) Structure of the S15, S6, S18-rRNA complex: assembly of the 30S ribosome central domain, *Science*, **288**, 107-113, doi: 10.1126/science.288.5463.107.
4. Ramakrishnan, V., and White, S. W. (1998) Ribosomal protein structures: insights into the architecture, machinery and evolution of the ribosome, *Trends Biochem. Sci.*, **23**, 208-212, doi: 10.1016/s0968-0004(98)01214-6.
5. Wimberly, B. T., White, S. W., and Ramakrishnan, V. (1997) The structure of ribosomal protein S7 at 1.9 Å resolution reveals a beta-hairpin motif that binds double-stranded nucleic acids, *Structure*, **5**, 1187-1198, doi: 10.1016/s0969-2126(97)00269-4.
6. Bocharov, E. V., Gudkov, A. T., Budovskaya, E. V., and Arseniev, A. S. (1998) Conformational independence of N- and C-domains in ribosomal protein L7/L12 and in the complex with protein L10, *FEBS Lett.*, **423**, 347-350, doi: 10.1016/s0014-5793(98)00121-5.
7. Agrawal, R. K., Penczek, P., Grassucci, R. A., Li, Y., Leith, A., et al. (1996) Direct visualization of A-, P-, and

- E-site transfer RNAs in the *Escherichia coli* ribosome, *Science*, **271**, 1000-1002, doi: 10.1126/science.271.5251.1000.
8. Svergun, D. I., Burkhardt, N., Pedersen, J. S., Koch, M. H., Volkov, V. V., et al. (1997) Solution scattering structural analysis of the 70 S *Escherichia coli* ribosome by contrast variation. I. Invariants and validation of electron microscopy models, *J. Mol. Biol.*, **271**, 588-601, doi: 10.1006/jmbi.1997.1190.
 9. Green, R., and Noller, H. F. (1997) Ribosomes and translation, *Annu. Rev. Biochem.*, **66**, 679-716, doi: 10.1146/annurev.biochem.66.1.679.
 10. Vasiliev, V. D. (1974) Morphology of the ribosomal 30S subparticle according to electron microscopic data, *Acta Biol. Med. Ger.*, **33**, 779-793.
 11. Lake, J. A. (1976) Ribosome structure determined by electron microscopy of *Escherichia coli* small subunits, large subunits and monomeric ribosomes, *J. Mol. Biol.*, **105**, 131-139.
 12. Vasiliev, V. D., Selivanova, O. M., Baranov, V. I., and Spirin, A. S. (1983) Structural study of translating 70S ribosomes from *Escherichia coli*. I. Electron microscopy, *FEBS Lett.*, **155**, 167-172, doi: 10.1016/0014-5793(83)80232-4.
 13. Frank, J. (1989) Image analysis of single macromolecules, *Electron. Microsc. Rev.*, **2**, 53-74, doi: 10.1016/0892-0354(89)90010-5.
 14. Stark, H., Mueller, F., Orlova, E. V., Schatz, M., Dube, P., et al. (1995) The 70S *Escherichia coli* ribosome at 23 Å resolution: fitting the ribosomal RNA, *Structure*, **3**, 815-821, doi: 10.1016/s0969-2126(01)00216-7.
 15. Vasiliev, V. D., and Kotliansky, V. E. (1977) The 30 S ribosomal subparticle retains its main morphological features after removal of half the proteins, *FEBS Lett.*, **76**, 125-128.
 16. Sergiev, P., Leonov, A., Dokudovskaya, S., Shpanchenko, O., Dontsova, O., et al. (2001) Correlating the X-ray structures for halo- and thermophilic ribosomal subunits with biochemical data for the *Escherichia coli* ribosome, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **66**, 87-100, doi: 10.1101/sqb.2001.66.87.
 17. Graifer, D., and Karpova, G. (2015) Interaction of tRNA with eukaryotic ribosome, *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 7173-7194, doi: 10.3390/ijms16047173.
 18. Graifer, D., and Karpova, G. (2015) Roles of ribosomal proteins in the functioning of translational machinery of eukaryotes, *Biochimie*, **109**, 1-17, doi: 10.1016/j.biochi.2014.11.016.
 19. Spirin, A. S., Serdyuk, I. N., Shpungin, J. L., and Vasiliev, V. D. (1979) Quaternary structure of the ribosomal 30S subunit: model and its experimental testing, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4867-4871, doi: 10.1073/pnas.76.10.4867.
 20. Stern, S., Powers, T., Changchien, L. M., and Noller, H. F. (1989) RNA-protein interactions in 30S ribosomal subunits: folding and function of 16S rRNA, *Science*, **244**, 783-790, doi: 10.1126/science.2658053.
 21. Brimacombe, R. (1991) RNA-protein interactions in the *Escherichia coli* ribosome, *Biochimie*, **73**, 927-936, doi: 10.1016/0300-9084(91)90134-m.
 22. Moore, P. B., Engelman, D. M., Langer, J. A., Ramakrishnan, V. R., Schindler, D. G., et al. (1984) Neutron scattering and the 30S ribosomal subunit of *E. coli*, *Basic Life Sci.*, **27**, 73-91, doi: 10.1007/978-1-4899-0375-4_4.
 23. Vasiliev, V. D., Selivanova, O. M., and Kotliansky, V. E. (1978) Specific selfpacking of the ribosomal 16S RNA, *FEBS Lett.*, **95**, 273-276, doi: 10.1016/0014-5793(78)81009-6.
 24. Vasiliev, V. D., and Zalite, O. M. (1980) Specific compact selfpacking of the ribosomal 23S RNA, *FEBS Lett.*, **121**, 101-104, doi: 10.1016/0014-5793(80)81275-0.
 25. Noller, H. F. (1984) Structure of ribosomal RNA, *Annu. Rev. Biochem.*, **53**, 119-162, doi: 10.1146/annurev.bi.53.070184.001003.
 26. Woese, C. R., Gutell, R., Gupta, R., and Noller, H. F. (1983) Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids, *Microbiol. Rev.*, **47**, 621-669.
 27. Capel, M. S., Engelman, D. M., Freeborn, B. R., Kjeldgaard, M., Langer, J. A., et al. (1987) A complete mapping of the proteins in the small ribosomal subunit of *Escherichia coli*, *Science*, **238**, 1403-1406, doi: 10.1126/science.3317832.
 28. Stern, S., Moazed, D., and Noller, H. F. (1988) Structural analysis of RNA using chemical and enzymatic probing monitored by primer extension, *Methods Enzymol.*, **164**, 481-489, doi: 10.1016/s0076-6879(88)64064-x.
 29. Powers, T., and Noller, H. F. (1995) A temperature-dependent conformational rearrangement in the ribosomal protein S4.16S rRNA complex, *J. Biol. Chem.*, **270**, 1238-1242, doi: 10.1074/jbc.270.3.1238.
 30. Brimacombe, R., Gornicki, P., Greuer, B., Mitchell, P., Osswald, M., et al. (1990) The three-dimensional structure and function of *Escherichia coli* ribosomal RNA, as studied by cross-linking techniques, *Biochim. Biophys. Acta*, **1050**, 8-13, doi: 10.1016/0167-4781(90)90133-m.
 31. Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution, *Science*, **289**, 905-920, doi: 10.1126/science.289.5481.905.
 32. Wimberly, B. T., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Jr., Morgan-Warren, R. J., Carter, A. P., et al. (2000) Structure of the 30S ribosomal subunit, *Nature*, **407**, 327-339, doi: 10.1038/35030006.
 33. Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., et al. (2001) Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution, *Science*, **292**, 883-896, doi: 10.1126/science.1060089.
 34. Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2011) The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution, *Science*, **334**, 1524-1529, doi: 10.1126/science.1212642.
 35. Yusupova, G., and Yusupov, M. (2014) High-resolution structure of the eukaryotic 80S ribosome, *Annu. Rev. Biochem.*, **83**, 467-486, doi: 10.1146/annurev-biochem-060713-035445.
 36. Yusupova, G., and Yusupov, M. (2015) Ribosome biochemistry in crystal structure determination, *RNA*, **21**, 771-773, doi: 10.1261/rna.050039.115.
 37. Jenner, L., Melnikov, S., Garreau de Loubresse, N., Ben-Shem, A., Iskakova, M., et al. (2012) Crystal structure of the 80S yeast ribosome, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **22**, 759-767, doi: 10.1016/j.sbi.2012.07.013.
 38. Demeshkina, N., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2010) Interactions of the ribosome with mRNA and tRNA, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **20**, 325-332, doi: 10.1016/j.sbi.2010.03.002.
 39. Yonath, A., Mussig, J., and Wittmann, H. G. (1982) Parameters for crystal growth of ribosomal subunits, *J. Cell Biochem.*, **19**, 145-155, doi: 10.1002/jcb.240190205.
 40. Makowski, I., Frolow, F., Saper, M. A., Shoham, M., Wittmann, H. G., and Yonath, A. (1987) Single crystals of large ribosomal particles from *Halobacterium marismortui* diffract to 6 Å, *J. Mol. Biol.*, **193**, 819-822, doi: 10.1016/0022-2836(87)90362-7.
 41. Von Bohlen, K., Makowski, I., Hansen, H. A., Bartels, H., Berkovitch-Yellin, Z., et al. (1991) Characterization and

- preliminary attempts for derivatization of crystals of large ribosomal subunits from *Haloarcula marismortui* diffracting to 3 Å resolution, *J. Mol. Biol.*, **222**, 11-15, doi: 10.1016/0022-2836(91)90730-t.
42. Trakhanov, S., Yusupov, M., Shirokov, V., Garber, M., Mitschler, A., et al. (1989) Preliminary X-ray investigation of 70S ribosome crystals from *Thermus thermophilus*, *J. Mol. Biol.*, **209**, 327-328, doi: 10.1016/0022-2836(89)90282-9.
 43. Yusupova, G., Yusupov, M., Spirin, A., Ebel, J. P., Moras, D., Ehresmann, C., and Ehresmann, B. (1991) Formation and crystallization of *Thermus thermophilus* 70S ribosome/tRNA complexes, *FEBS Lett.*, **290**, 69-72, doi: 10.1016/0014-5793(91)81228-z.
 44. Yusupov, M. M., Garber, M. B., Vasiliev, V. D., and Spirin, A. S. (1991) *Thermus thermophilus* ribosomes for crystallographic studies, *Biochimie*, **73**, 887-897, doi: 10.1016/0300-9084(91)90130-s.
 45. Schluenzen, F., Tocilj, A., Zarivach, R., Harms, J., Gluehmann, M., et al. (2000) Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution, *Cell*, **102**, 615-623, doi: 10.1016/s0092-8674(00)00084-2.
 46. Cate, J. H., Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Earnest, T. N., and Noller, H. F. (1999) X-ray crystal structures of 70S ribosome functional complexes, *Science*, **285**, 2095-2104, doi: 10.1126/science.285.5436.2095.
 47. Yusupova, G. Z., Yusupov, M. M., Cate, J. H., and Noller, H. F. (2001) The path of messenger RNA through the ribosome, *Cell*, **106**, 233-241, doi: 10.1016/s0092-8674(01)00435-4.
 48. Flyggaard, R. K., Boegholm, N., Yusupov, M., and Jenner, L. B. (2018) Cryo-EM structure of the hibernating *Thermus thermophilus* 100S ribosome reveals a protein-mediated dimerization mechanism, *Nat. Commun.*, **9**, 4179, doi: 10.1038/s41467-018-06724-x.
 49. Rozov, A., Khusainov, I., El Omari, K., Duman, R., Mykhaylyk, V., et al. (2019) Importance of potassium ions for ribosome structure and function revealed by long-wavelength X-ray diffraction, *Nat. Commun.*, **10**, 2519, doi: 10.1038/s41467-019-10409-4.
 50. Hussain, T., Llacer, J. L., Wimberly, B. T., Kieft, J. S., and Ramakrishnan, V. (2016) Large-scale movements of IF3 and tRNA during bacterial translation initiation, *Cell*, **167**, 133-144.e113, doi: 10.1016/j.cell.2016.08.074.
 51. Selmer, M., Dunham, C. M., Murphy, F. V., Weixlbaumer, A., Petry, S., et al. (2006) Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA, *Science*, **313**, 1935-1942, doi: 10.1126/science.1131127.
 52. Schuwirth, B. S., Borovinskaya, M. A., Hau, C. W., Zhang, W., Vila-Sanjurjo, A., et al. (2005) Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution, *Science*, **310**, 827-834, doi: 10.1126/science.1117230.
 53. Yusupov, M. M., Trakhanov, S. D., Barinin, V. V., Boroviagin, B. D., Garber, M. B., et al. (1987) Crystallization of the 30S subunits of *Thermus thermophilus* ribosomes, *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **292**, 1271-1274.
 54. Trakhanov, S. D., Yusupov, M., Agalarov, S., Garber, M., Ryazantzev, S., et al. (1987) Crystallization of 70S ribosomes and 30S ribosomal subunits from *Thermus thermophilus*, *FEBS Lett.*, **220**, 319-322.
 55. Harel, M., Shoham, M., Frolov, F., Eisenberg, H., Mevarech, M., et al. (1988) Crystallization of halophilic malate dehydrogenase from *Halobacterium marismortui*, *J. Mol. Biol.*, **200**, 609-610, doi: 10.1016/0022-2836(88)90547-5.
 56. Ban, N., Freeborn, B., Nissen, P., Penczek, P., Grassucci, R. A., et al. (1998) A 9 Å resolution X-ray crystallographic map of the large ribosomal subunit, *Cell*, **93**, 1105-1115, doi: 10.1016/s0092-8674(00)81455-5.
 57. Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2000) The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis, *Science*, **289**, 920-930, doi: 10.1126/science.289.5481.920.
 58. Ogle, J. M., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Jr., Tarry, M. J., Carter, A. P., and Ramakrishnan, V. (2001) Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit, *Science*, **292**, 897-902, doi: 10.1126/science.1060612.
 59. Frank, J., Penczek, P., Grassucci, R., and Srivastava, S. (1991) Three-dimensional reconstruction of the 70S *Escherichia coli* ribosome in ice: the distribution of ribosomal RNA, *J. Cell Biol.*, **115**, 597-605.
 60. Yusupov, M. M., and Spirin, A. S. (1986) Are there proteins between the ribosomal subunits? Hot tritium bombardment experiments, *FEBS Lett.*, **197**, 229-233, doi: 10.1016/0014-5793(86)80332-5.
 61. Jenner, L., Demeshkina, N., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2010) Structural rearrangements of the ribosome at the tRNA proofreading step, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17**, 1072-1078, doi: 10.1038/nsmb.1880.
 62. Jenner, L. B., Demeshkina, N., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2010) Structural aspects of messenger RNA reading frame maintenance by the ribosome, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17**, 555-560, doi: 10.1038/nsmb.1790.
 63. Yusupova, G., Jenner, L., Rees, B., Moras, D., and Yusupov, M. (2006) Structural basis for messenger RNA movement on the ribosome, *Nature*, **444**, 391-394, doi: 10.1038/nature05281.
 64. Jenner, L., Romby, P., Rees, B., Schulze-Briese, C., Springer, M., et al. (2005) Translational operator of mRNA on the ribosome: how repressor proteins exclude ribosome binding, *Science*, **308**, 120-123, doi: 10.1126/science.1105639.
 65. Jenner, L., Rees, B., Yusupov, M., and Yusupova, G. (2007) Messenger RNA conformations in the ribosomal E site revealed by X-ray crystallography, *EMBO Rep.*, **8**, 846-850, doi: 10.1038/sj.embor.7401044.
 66. Demeshkina, N., Jenner, L., Westhof, E., Yusupov, M., and Yusupova, G. (2012) A new understanding of the decoding principle on the ribosome, *Nature*, **484**, 256-259, doi: 10.1038/nature10913.
 67. Demeshkina, N., Jenner, L., Westhof, E., Yusupov, M., and Yusupova, G. (2013) New structural insights into the decoding mechanism: translation infidelity via a G•U pair with Watson-Crick geometry, *FEBS Lett.*, **587**, 1848-1857, doi: 10.1016/j.febslet.2013.05.009.
 68. Rozov, A., Demeshkina, N., Westhof, E., Yusupov, M., and Yusupova, G. (2015) Structural insights into the translational infidelity mechanism, *Nat. Commun.*, **6**, 7251, doi: 10.1038/ncomms8251.
 69. Rozov, A., Westhof, E., Yusupov, M., and Yusupova, G. (2016) The ribosome prohibits the G•U wobble geometry at the first position of the codon-anticodon helix, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 6434-6441, doi: 10.1093/nar/gkw431.
 70. Rozov, A., Demeshkina, N., Khusainov, I., Westhof, E., Yusupov, M., and Yusupova, G. (2016) Novel base-pairing interactions at the tRNA wobble position crucial for accurate reading of the genetic code, *Nat. Commun.*, **7**, 10457, doi: 10.1038/ncomms10457.
 71. Rozov, A., Wolff, P., Grosjean, H., Yusupov, M., Yusupova, G., and Westhof, E. (2018) Tautomeric G•U pairs within the molecular ribosomal grip and fidelity of decoding in bacteria, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 7425-7435, doi: 10.1093/nar/gky547.
 72. Voorhees, R. M., and Ramakrishnan, V. (2013) Structural basis of the translational elongation cycle, *Annu. Rev. Biochem.*, **82**, 203-236, doi: 10.1146/annurev-biochem-113009-092313.

73. 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.
74. Rozov, A., Demeshkina, N., Westhof, E., Yusupov, M., and Yusupova, G. (2016) New structural insights into translational miscoding, *Trends Biochem. Sci.*, **41**, 798-814, doi: 10.1016/j.tibs.2016.06.001.
75. Noller, H. F., Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., and Cate, J. H. (2002) Translocation of tRNA during protein synthesis, *FEBS Lett.*, **514**, 11-16.
76. Melnikov, S., Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2012) One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **19**, 560-567, doi: 10.1038/nsmb.2313.
77. Milligan, R. A., and Unwin, P. N. (1982) *In vitro* crystallization of ribosomes from chick embryos, *J. Cell Biol.*, **95**, 648-653, doi: 10.1083/jcb.95.2.648.
78. Ben-Shem, A., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2010) Crystal structure of the eukaryotic ribosome, *Science*, **330**, 1203-1209, doi: 10.1126/science.1194294.
79. Garreau de Loubresse, N., Prokhorova, I., Holtkamp, W., Rodnina, M. V., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2014) Structural basis for the inhibition of the eukaryotic ribosome, *Nature*, **513**, 517-522, doi: 10.1038/nature13737.
80. Pellegrino, S., Meyer, M., Konst, Z. A., Holm, M., Voora, V. K., et al. (2019) Understanding the role of intermolecular interactions between lissoclimides and the eukaryotic ribosome, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 3223-3232, doi: 10.1093/nar/gkz053.
81. Pellegrino, S., Meyer, M., Zorbas, C., Bouchta, S. A., Saraf, K., et al. (2018) The Amaryllidaceae alkaloid haemanthamine binds the eukaryotic ribosome to repress cancer cell growth, *Structure*, **26**, 416-425.e414, doi: 10.1016/j.str.2018.01.009.
82. Konst, Z. A., Szklarski, A. R., Pellegrino, S., Michalak, S. E., Meyer, M., et al. (2017) Synthesis facilitates an understanding of the structural basis for translation inhibition by the lissoclimides, *Nat. Chem.*, **9**, 1140-1149, doi: 10.1038/nchem.2800.
83. McClary, B., Zinshteyn, B., Meyer, M., Jouanneau, M., Pellegrino, S., et al. (2017) Inhibition of eukaryotic translation by the antitumor natural product agelastatin A, *Cell Chem. Biol.*, **24**, 605-613.e605, doi: 10.1016/j.chembiol.2017.04.006.
84. Klinge, S., Voigts-Hoffmann, F., Leibundgut, M., Arpagaus, S., and Ban, N. (2011) Crystal structure of the eukaryotic 60S ribosomal subunit in complex with initiation factor 6, *Science*, **334**, 941-948, doi: 10.1126/science.1211204.
85. Rabl, J., Leibundgut, M., Ataide, S. F., Haag, A., and Ban, N. (2011) Crystal structure of the eukaryotic 40S ribosomal subunit in complex with initiation factor 1, *Science*, **331**, 730-736, doi: 10.1126/science.1198308.
86. Ban, N., Beckmann, R., Cate, J. H., Dinman, J. D., Dragon, F., et al. (2014) A new system for naming ribosomal proteins, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **24**, 165-169, doi: 10.1016/j.sbi.2014.01.002.
87. Armache, J. P., Jarasch, A., Anger, A. M., Villa, E., Becker, T., et al. (2010) Cryo-EM structure and rRNA model of a translating eukaryotic 80S ribosome at 5.5 Å resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 19748-19753, doi: 10.1073/pnas.1009999107.
88. Armache, J. P., Jarasch, A., Anger, A. M., Villa, E., Becker, T., et al. (2010) Localization of eukaryote-specific ribosomal proteins in a 5.5 Å cryo-EM map of the 80S eukaryotic ribosome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 19754-19759, doi: 10.1073/pnas.1010005107.
89. Spahn, C. M., Beckmann, R., Eswar, N., Penczek, P. A., Sali, A., et al. (2001) Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae*—tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions, *Cell*, **107**, 373-386, doi: 10.1016/s0092-8674(01)00539-6.
90. Spahn, C. M., Gomez-Lorenzo, M. G., Grassucci, R. A., Jorgensen, R., Andersen, G. R., et al. (2004) Domain movements of elongation factor eEF2 and the eukaryotic 80S ribosome facilitate tRNA translocation, *EMBO J.*, **23**, 1008-1019, doi: 10.1038/sj.emboj.7600102.
91. Budkevich, T., Giesebrecht, J., Altman, R. B., Munro, J. B., Mielke, T., et al. (2011) Structure and dynamics of the mammalian ribosomal pretranslocation complex, *Mol. Cell*, **44**, 214-224, doi: 10.1016/j.molcel.2011.07.040.
92. Wilson, D. N. (2014) Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance, *Nat. Rev. Microbiol.*, **12**, 35-48, doi: 10.1038/nrmicro3155.
93. Hobbie, S. N., Kaiser, M., Schmidt, S., Shcherbakov, D., Janusic, T., et al. (2011) Genetic reconstruction of protozoan rRNA decoding sites provides a rationale for paromomycin activity against *Leishmania* and *Trypanosoma*, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **5**, e1161, doi: 10.1371/journal.pntd.0001161.
94. Lu, W., Roongsawang, N., and Mahmud, T. (2011) Biosynthetic studies and genetic engineering of pactamycin analogs with improved selectivity toward malarial parasites, *Chem. Biol.*, **18**, 425-431, doi: 10.1016/j.chembiol.2011.01.016.
95. Santagata, S., Mendillo, M. L., Tang, Y. C., Subramanian, A., Perley, C. C., et al. (2013) Tight coordination of protein translation and HSF1 activation supports the anabolic malignant state, *Science*, **341**, 1238303, doi: 10.1126/science.1238303.
96. Bidou, L., Allamand, V., Rousset, J. P., and Namy, O. (2012) Sense from nonsense: therapies for premature stop codon diseases, *Trends Mol. Med.*, **18**, 679-688, doi: 10.1016/j.molmed.2012.09.008.
97. Gurel, G., Blaha, G., Steitz, T. A., and Moore, P. B. (2009) Structures of triacetyloleandomycin and mycalamide A bind to the large ribosomal subunit of *Haloarcula marismortui*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **53**, 5010-5014, doi: 10.1128/AAC.00817-09.
98. Gurel, G., Blaha, G., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2009) U2504 determines the species specificity of the A-site cleft antibiotics: the structures of tiamulin, homoharringtonine, and bruceantin bound to the ribosome, *J. Mol. Biol.*, **389**, 146-156, doi: 10.1016/j.jmb.2009.04.005.
99. Schneider-Poetsch, T., Ju, J., Eyler, D. E., Dang, Y., Bhat, S., et al. (2010) Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin, *Nat. Chem. Biol.*, **6**, 209-217, doi: 10.1038/nchembio.304.
100. Ingolia, N. T., Ghaemmaghami, S., Newman, J. R., and Weissman, J. S. (2009) Genome-wide analysis *in vivo* of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling, *Science*, **324**, 218-223, doi: 10.1126/science.1168978.
101. Mailliot, J., Garreau de Loubresse, N., Yusupova, G., Meskauskas, A., Dinman, J. D., and Yusupov, M. (2016) Crystal structures of the uL3 mutant ribosome: illustration of the importance of ribosomal proteins for translation efficiency, *J. Mol. Biol.*, **428**, 2195-2202, doi: 10.1016/j.jmb.2016.02.013.
102. Shulman, E., Belakhov, V., Wei, G., Kendall, A., Meyron-Holtz, E. G., et al. (2014) Designer aminoglycosides that selectively inhibit cytoplasmic rather than mitochondrial ribosomes show decreased ototoxicity: a strategy for the treatment of genetic diseases, *J. Biol. Chem.*, **289**, 2318-2330, doi: 10.1074/jbc.M113.533588.
103. Prokhorova, I., Altman, R. B., Djumagulov, M., Shrestha, J. P., Urzhumtsev, A., et al. (2017) Aminoglycoside interactions and impacts on the eukaryotic ribosome, *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E10899-E10908, doi: 10.1073/pnas.1715501114.
104. Dolz, H., Vazquez, D., and Jimenez, A. (1982) Quantitation of the specific interaction of [14a-3H]cryptopleurine with 80S and 40S ribosomal species from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochemistry*, **21**, 3181-3187, doi: 10.1021/bi00256a023.
105. Khatter, H., Myasnikov, A. G., Natchiar, S. K., and Klaholz, B. P. (2015) Structure of the human 80S ribosome, *Nature*, **520**, 640-645, doi: 10.1038/nature14427.

THE PATH FOR DETERMINATION OF THE ATOMIC STRUCTURES OF PROKARYOTIC AND EUKARYOTIC RIBOSOMES

Review

G. Yusupova¹ and M. Yusupov^{1,2*}

¹ *Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), INSERM U964, CNRS UMR7104, Université de Strasbourg, 67404 Illkirch, France*

² *Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, 420008 Kazan, Russia; e-mail: marat@igbmc.fr*

The first crystal structures of prokaryotic and eukaryotic ribosomes were solved by our group and based on the knowledge accumulated over decades, starting with the first electron microscopic images of the ribosome obtained by J. Pallade in 1955. In 1983, A. Spirin, director of the Protein Institute of the USSR Academy of Sciences, initiated the first studies aimed at solving the structure of ribosomes using X-ray structural analysis. In 1999 our group in collaboration with H. Noller published the first crystal structure of an entire bacterial ribosome in complex with major functional ligands, including messenger RNA and three transport RNAs at the A, P, and E sites. In 2011 our laboratory published the first atomic structure of the eukaryotic ribosome solved by X-ray diffraction analysis. The conservative structure of the main functional areas of ribosome, such as decoding and peptidyl transferase centers, was confirmed to be true, while eukaryotic-specific elements were also described. Using X-ray structural analysis we investigated the general principles of protein biosynthesis inhibition on eukaryotic ribosomes along with the mechanisms of antibiotic resistance. Structural differences between bacterial and eukaryotic ribosomes that determine functional differences in inhibition were shown. These and subsequent structures of the functioning ribosome demonstrated for the first time at the atomic level the ribosome binding to the messenger and transport RNAs that deliver amino acids to the growing peptide, representing a first step towards understanding how ribosome structure ultimately determines its functions.

Keywords: ribosome, structure, X-ray, cryo-EM