

УДК 577.21

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА У БАКТЕРИЙ, АССОЦИИРОВАННЫЙ С РИБОСОМАМИ

Обзор

© 2021 М.С. Светлов

Center for Biomolecular Sciences, Department of Pharmaceutical Sciences,
University of Illinois at Chicago, 60607 Chicago, Illinois, USA; e-mail: msvet2@uic.edu

Поступила в редакцию 14.05.2021

После доработки 14.05.2021

Принята к публикации 14.05.2021

Трансляция генетической информации в белки, выполняемая рибосомой, является ключевым процессом, происходящим в клетках всех живых организмов. Трансляция обычно происходит без затруднений, но, к сожалению, нежелательные события могут привести к остановке транслирующих рибосом. Чтобы спасти эти дефектные остановившиеся рибосомы, бактериальные клетки используют три хорошо охарактеризованные системы контроля качества: тмРНК, ArfA и ArfB. Недавно в клетках *Bacillus subtilis* был обнаружен дополнительный механизм спасения рибосом. В отличие от «канонических» систем, нацеленных на 70S-рибосомы, этот механизм сначала разбирает полную рибосому на малую (30S) и большую (50S) субъединицы, а затем очищает образовавшуюся большую субъединицу от неполного полипептида. В настоящей работе я расскажу о последних микробиологических, биохимических и структурных данных, касающихся функционирования этой новой системы спасения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: трансляция, остановка рибосом, контроль качества, образование полиаланинового хвостового участка.

DOI: 10.31857/S0320972521080066

КАНОНИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ СПАСЕНИЯ РИБОСОМ У БАКТЕРИЙ

Рибосомы осуществляют синтез белка во всех живых клетках с помощью процесса, известного как трансляция (рис. 1). Рибосомы начинают синтез белка с распознавания стартового кодона (обычно это кодон AUG и реже – кодоны GUG или UUG) на молекуле информационной РНК (мРНК) (рис. 1, а). За этой стадией инициации следует несколько циклов элонгации, в процессе которых рибосомы перемещаются вдоль открытой рамки считывания мРНК (сегмент мРНК, кодирующей специфический белок), считывая её нуклеотидную последовательность и переводя (транслируя) её в аминокислотную последовательность синтезируемого белка (рис. 1, в). Каждый цикл элонгации начинается с доставки соответствующей

аминоацил-тРНК в А-сайт рибосомы, за которой следует её реакция с пептидил-тРНК, расположенной в Р-сайте, и заканчивается транслокацией вновь образованной пептидил-тРНК из А- в Р-сайт. Полный цикл элонгации и его основные участники показаны на рис. 1, а и в. И наконец, рибосомы прекращают трансляцию и высвобождают зрелый белок, когда они достигают один из трёх стоп-кодонов (UAA, UAG или UGA) (рис. 1, а).

У активно растущих бактерий катализируемая рибосомами полимеризация полипептидных цепей происходит со скоростью около 15 аминокислот в секунду [1, 2]. Примечательно, что эта скорость непостоянна, и быстрое передвижение рибосомы вдоль мРНК может прерываться паузами. Во многих случаях паузы рибосом во время процесса трансляции являются нормальным и необходимым явлением, так как они могут играть важную роль, например, в ко-трансляционном сворачивании и химической модификации белков или их сортировке по соответствующим компартментам [3, 4]. С другой стороны, рибосомные паузы могут быть вредными для клетки, если они вызваны трансляцией повреждённых мРНК или полимеризацией проблемных аминокислотных последова-

Принятые сокращения: САТ-хвост – С-концевой хвостовой участок из остатков аланина и треонина; EF – фактор элонгации; IF – фактор инициации; NEMF – фактор-посредник ядерного экспорта; РТС – пептидил-трансферазный центр; RF – фактор терминации; RRF – фактор рециклинга рибосомы; RQC – система контроля качества, ассоциированная с рибосомами (Ribosome-associated Quality Control); тмРНК – транспортная-матричная РНК.

тельностью в синтезируемых белках. Клетки используют несколько дополнительных факторов трансляции, чтобы смягчить влияние этих нежелательных пауз. Например, бактериальный фактор элонгации P (EF-P) и его гомолог в клетках архей и эукариот, eIF5A, нивелируют трансляционные паузы, вызванные последовательностями полипролина в синтезируемых полипептидах [5, 6]. С этой целью факторы стабилизируют пептидил-тРНК в продуктивной конформации, способной вступить в реакцию с Pro-тРНК^{Pro}, расположенной в А-сайте рибосомы [7]. Другой фактор элонгации трансляции, EF4 (LepA), как предполагается, способствует «смягчению» трансляционных пауз, возникающих при неблагоприятных условиях, таких как высокие концентрации магния или низкая температура [8]. Однако в некоторых случаях тран-

ляционные паузы трудно или даже невозможно устранить, и транслирующие рибосомы могут «застопориться» на специфическом месте в молекуле мРНК. Подобное явление особенно усиливается при различных стрессах, таких как недостаток аминокислот [9], изменение температуры [10] и обработка клеток ингибиторами, воздействующими на рибосомы [11]. В этих условиях рибосомы могут остановиться на 3'-конце укороченных мРНК, лишённых стоп-кодона. Такие no-stop мРНК обычно появляются в клетке в результате преждевременного прекращения транскрипции или расщепления полноразмерных транскриптов мРНК нуклеазой. Остановка транслирующих рибосом может также происходить и на интактных мРНК, приводя к накоплению no-stop или no-go комплексов рибосом. No-stop комплексы (которые по структуре иден-

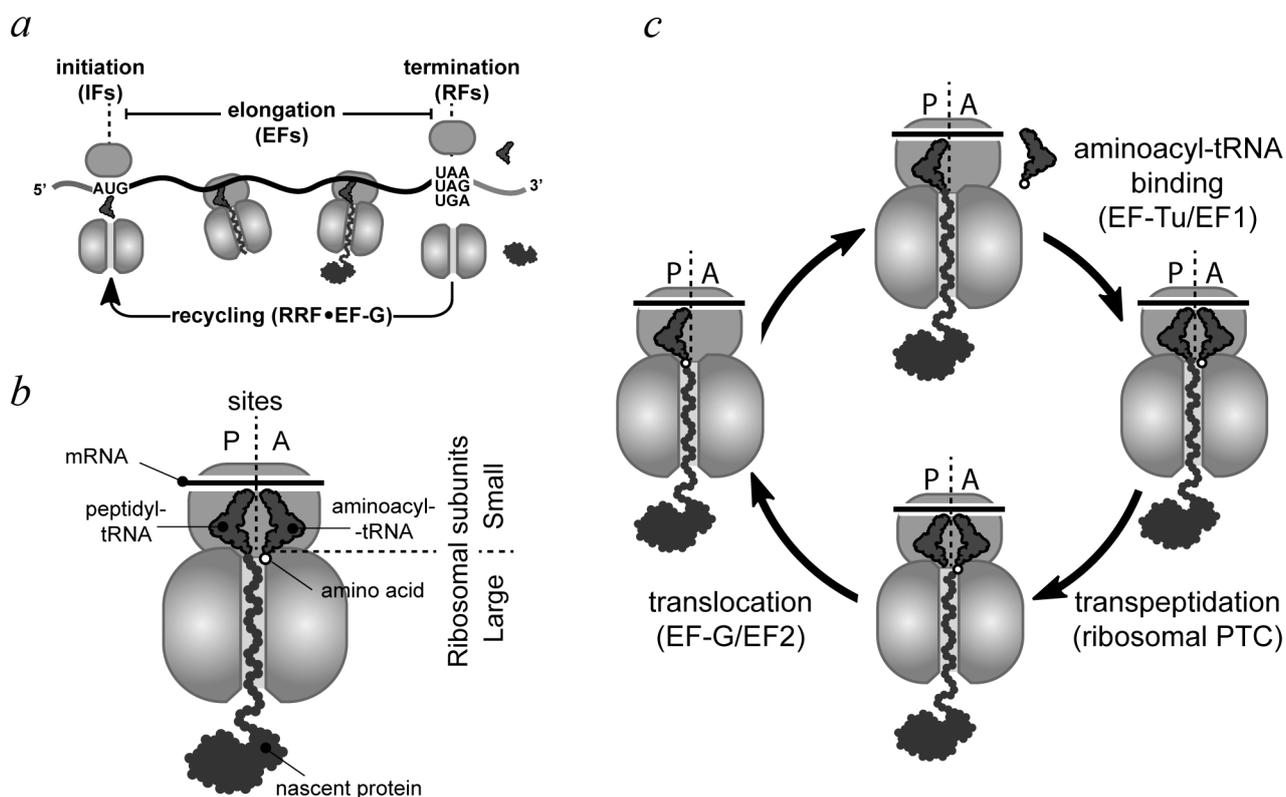


Рис. 1. Трансляционный цикл у бактерий. *a* – С помощью факторов инициации (IF) малая (30S) и большая (50S) субъединицы соединяются с образованием полной 70S-рибосомы на стартовой позиции на мРНК (кодоны AUG, GUG или UUG). Факторы элонгации (EF) помогают рибосоме полимеризовать аминокислоты в белок на стадии элонгации. Полноразмерный белок с помощью факторов терминции (RF) высвобождается из рибосомы, когда она достигает стоп-кодона (UAA, UAG или UGA). После терминции факторы рециклинга (RRF и EF-G у бактерий) разбирают рибосому на субъединицы, чтобы она могла инициировать новый раунд трансляции. *b* – Схематическое изображение элонгирующей рибосомы на стадии пре-транспептидации. Эта рибосома несёт транслируемую мРНК (расположена на малой субъединице), аминоацил-тРНК (находится в А-сайте рибосомы) и пептидил-тРНК (находится в Р-сайте). *c* – Обзор элонгационного цикла. Цикл состоит из трёх последовательных этапов: 1) EF-Tu-опосредованное связывание аминоацил-тРНК, комплементарной кодону мРНК, с А-сайтом рибосомы; 2) реакция аминоацил-тРНК с Р-сайтевой пептидил-тРНК, катализируемая рибосомным пептидил-трансферазным центром (PTC) и 3) EF-G-опосредованная транслокация вновь образованной пептидил-тРНК, удлинённой на один аминокислотный остаток, из А-сайта в Р-сайт

тичны комплексам, образующимся на укороченных мРНК) накапливаются в том случае, когда рибосомы ошибочно прочитывают стоп-кодона как значащие (то есть кодирующие аминокислоту) и затем застревают на 3'-концах неповреждённых мРНК. Отсутствие кодона в А-сайте рибосомы является отличительной чертой этих комплексов, распознаваемых «каноническими» бактериальными системами спасения. В отличие от *no-stop* комплексов *no-go* рибосомы останавливаются внутри кодирующих частей транслируемых мРНК. «Канонические» системы не способны освободить такие рибосомы из-за того, что в их мРНК-каналах находятся цепи мРНК. В качестве первого шага к разборке *no-go* комплексов, бактериальный токсин RelE (эндонуклеаза, активируемая аминокислотным голоданием) связывается с ними и вносит разрыв в цепь мРНК, находящуюся в А-сайте рибосомы. В результате расщепления эндонуклеазой RelE *no-go* комплексы превращаются в *no-stop* остановленные рибосомы, которые могут служить мишенью для направленного действия «канонических» систем спасе-

ния (рис. 2, *a*). Механизм действия этих систем, включающих SmpB • тмРНК-опосредованную транс-трансляцию, ArfA и ArfB, были ранее подробно рассмотрены [12–14], и я лишь кратко опишу их ниже.

Транс-трансляция – это основной механизм, который спасает *no-stop* рибосомы в бактериях [15]. Этот механизм основан на действии двух внутриклеточных факторов: небольшого белка SmpB и транспортной-матричной РНК (тмРНК), гибрида тРНК, содержащей остаток аланина, и мРНК, кодирующей специальный короткий пептид, служащий сигналом для протеолитической деградаци (дегрон) (рис. 2, *b*). SmpB и тмРНК образуют комплекс, который с помощью фактора EF-Tu доставляется на *no-stop* рибосому [16]. После доставки на рибосому SmpB взаимодействует с малой субъединицей и «подтверждает», что канал для мРНК и А-сайт пусты, в то время как тмРНК, имитируя аминоксил-тРНК, связывается с рибосомой и размещает свой ССА-конец, аминокислотированный аланином, в пептидил-трансферазном центре рибосомы (ПТС), где она вступает в реакцию с

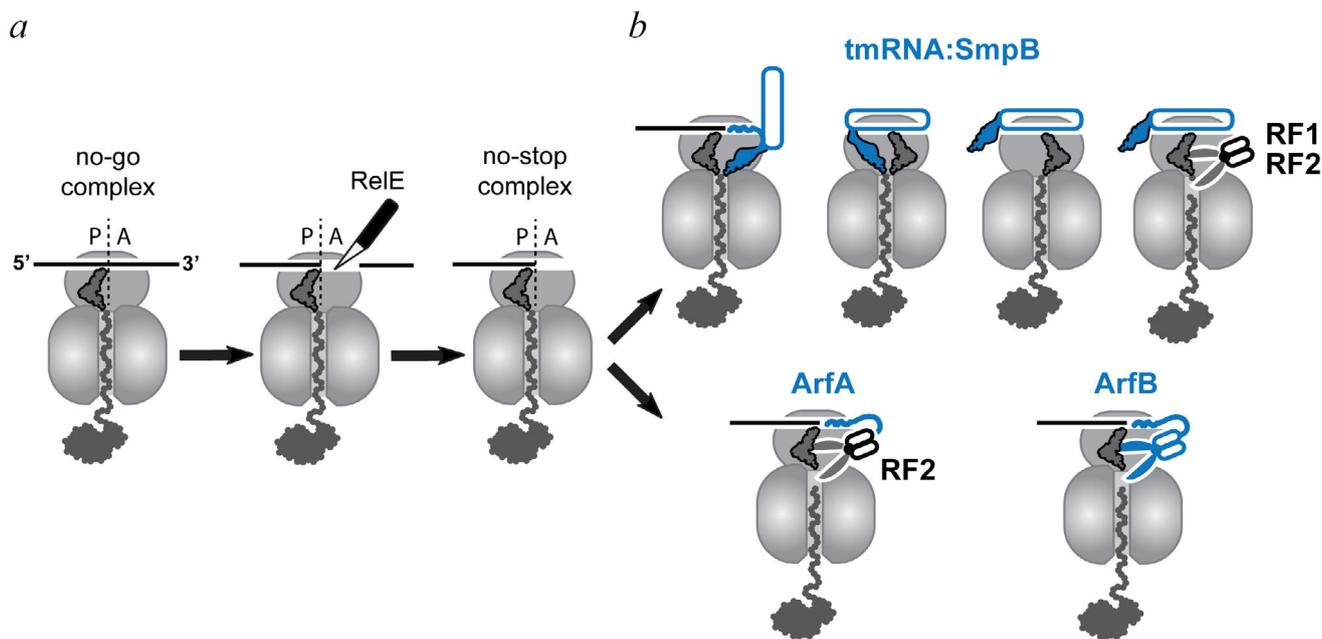


Рис. 2. Освобождение остановившихся рибосом каноническими бактериальными системами спасения. *a* – Остановка движения рибосом может привести к образованию *no-stop* или *no-go* комплексов. Канонические системы спасения могут непосредственно распознавать только *no-stop* рибосомы с вакантными (пустыми) мРНК-каналами, в то время как для рециклизации *no-go* рибосом необходимо сперва их перевести в *no-stop* рибосомы с помощью эндонуклеазы RelE. *b* – Образовавшиеся *no-stop* рибосомы высвобождаются в ходе процесса транс-трансляции, опосредованной транспортной-матричной РНК (тмРНК) в комплексе с белком SmpB. Трансляция мРНК-подобного сегмента тмРНК прекращается в результате действия канонических факторов терминирования, RF1 или RF2. Если действие этой системы контроля качества затруднено, пептидил-тРНК может быть гидролизован фактором RF2, рекрутированным белком ArfA, или независимым от стоп-кодонов фактором терминирования ArfB. Все три канонические бактериальные системы спасения, SmpB • тмРНК, ArfA и ArfB (показано синим цветом), распознают *no-stop* рибосомы, содержащие пустой или частично заполненный мРНК канал в малой субъединице

пептидил-тРНК. После переноса пептида на тмРНК остановленная рибосома начинает трансляцию сегмента тмРНК, кодирующего дегрон. Прекращение трансляции тмРНК на стоп-кодоне, расположенном в конце кодирующей последовательности, приводит к рециклизации рибосомы по стандартному механизму, а высвободившийся пептид, несущий дегрон на С-конце, подвергается протеолитической деградации.

Хотя компоненты системы транс-трансляции были обнаружены во всех секвенированных видах бактерий, нарушение работы этой системы обычно не является летальным для клетки [17] благодаря существованию у некоторых бактерий двух вспомогательных механизмов спасения, ArfA и ArfB. Эти системы поддерживают рост бактерий, когда активность комплекса SmpB • тмРНК нарушена или недостаточна. ArfA – это небольшой белок, который связывается с А-сайтом в малой субъединице рибосомы, когда он не содержит кодона мРНК, а затем рекрутирует фактор терминации 2 (RF2) на застопоренную рибосому для гидролиза пептидил-тРНК [18, 19] (рис. 2, b). Интересно, что такая избирательность в отношении RF2 не присуща всем бактериям. Так, у *Francisella tularensis* небольшой аналогичный ArfA белок, ArfT, может рекрутировать как RF1, так и RF2 на no-stop рибосомы [20]. ArfB (ранее известный как YaeJ) является гомологом факторов терминации (RF), чья пептидил-тРНК гидролазная активность не зависит от стоп-кодонов [21, 22] (рис. 2, b). Подобно ArfA, ArfB связывается только с рибосомой, расположенной на 3'-конце мРНК и при отсутствии кодона мРНК в А-сайте. Интересно, что обе резервные системы спасения отличают остановленные от активно транслирующих рибосом, подобно тому как это делает комплекс SmpB • тмРНК: они связываются с пустым каналом для входа мРНК на малой субъединице рибосомы, в норме занятым транслируемой мРНК, чтобы инициировать освобождение рибосомы. Учитывая существование этих резервных систем спасения у многих бактерий, недавнее открытие совершенно другого механизма, освобождающего остановившиеся рибосомы у *Bacillus subtilis*, стало неожиданным и приятным сюрпризом. Ещё более поразительным является тот факт, что этот механизм спасения напоминает систему контроля качества, связанную с рибосомами (RQC), которая существует у эукариот. Чтобы понять сходство бактериальных и эукариотических систем RQC, я кратко опишу, как застопорившиеся в процессе трансляции рибосомы освобождаются в эукариотических клетках.

ОСВОБОЖДЕНИЕ ОСТАНОВИВШИХСЯ РИБОСОМ У ЭУКАРИОТ

В то время как вышеупомянутые бактериальные механизмы спасения нацелены на интактные остановившиеся 70S-рибосомы, длительные трансляционные паузы у эукариот вызывают разборку рибосомы 80S на составляющие её субъединицы (малая, 40S, и большая, 60S) с последующей их независимой рециклизацией для участия в следующих раундах трансляции [13]. Модель освобождения остановленной 80S-рибосомы представлена на рис. 3, a. Разборка рибосомы требует согласованного действия трёх факторов: Hbs1L (у дрожжей Hbs1p), который связывается в непосредственной близости от незанятого мРНК канала, eRF1 паралога, Pelota (у дрожжей Dom34p), который занимает пустой А-сайт «застопоренной» рибосомы, и АТФазы ABCE1 (у дрожжей Rli1p), которая рекрутируется на рибосому с помощью Pelota после диссоциации Hbs1L, чтобы разобрать её на субъединицы (рис. 3, a, стадия разборки). После разборки рибосомы мРНК высвобождается из 40S-субъединицы и подвергается деградации 5'–3'-экзонуклеазой Xrn1 и 3'–5'-экзосомой [23], а затем свободная от мРНК субъединица рециклизуется с участием ABCE1 [24]. Одновременно, поскольку у Pelota/Dom34p отсутствует пептидил-тРНК гидролазная активность, 60S-субъединица диссоциирует в виде комплекса с пептидил-тРНК. Дальнейшая судьба комплекса 60S • пептидил-тРНК зависит от длины пептида, конъюгированного с тРНК. Если пептид относительно короткий, то пептидил-тРНК может спонтанно диссоциировать с большой субъединицы [25]. Напротив, если же конъюгированный с тРНК пептид достаточно длинный, чтобы установить стабильные взаимодействия внутри туннеля выхода пептида или свернуться за пределами рибосомы, пептидил-тРНК остаётся прочно связанной с 60S-субъединицей. В этой ситуации большая субъединица рибосомы, заблокированная пептидил-тРНК, распознаётся и «спасается» белками специального пути, называемого RQC [26] (рис. 3). Путь RQC запускается селективным связыванием фактора-посредника ядерного экспорта (NEMF/дрожжевой Rqc2) с интерфейсом между 60S-субъединицей и пептидил-тРНК, где этот белок играет по крайней мере три роли: 1) он предотвращает соединение 40S-субъединицы с комплексом 60S • пептидил-тРНК; 2) он рекрутирует E3 убиквитинлигазу Listerin (у дрожжей Ltn1p) для убиквитинирования синтезируемой полипептидной цепи; 3) он рекрутирует Ala-tRNA^{Ala} и Thr-tRNA^{Thr} на

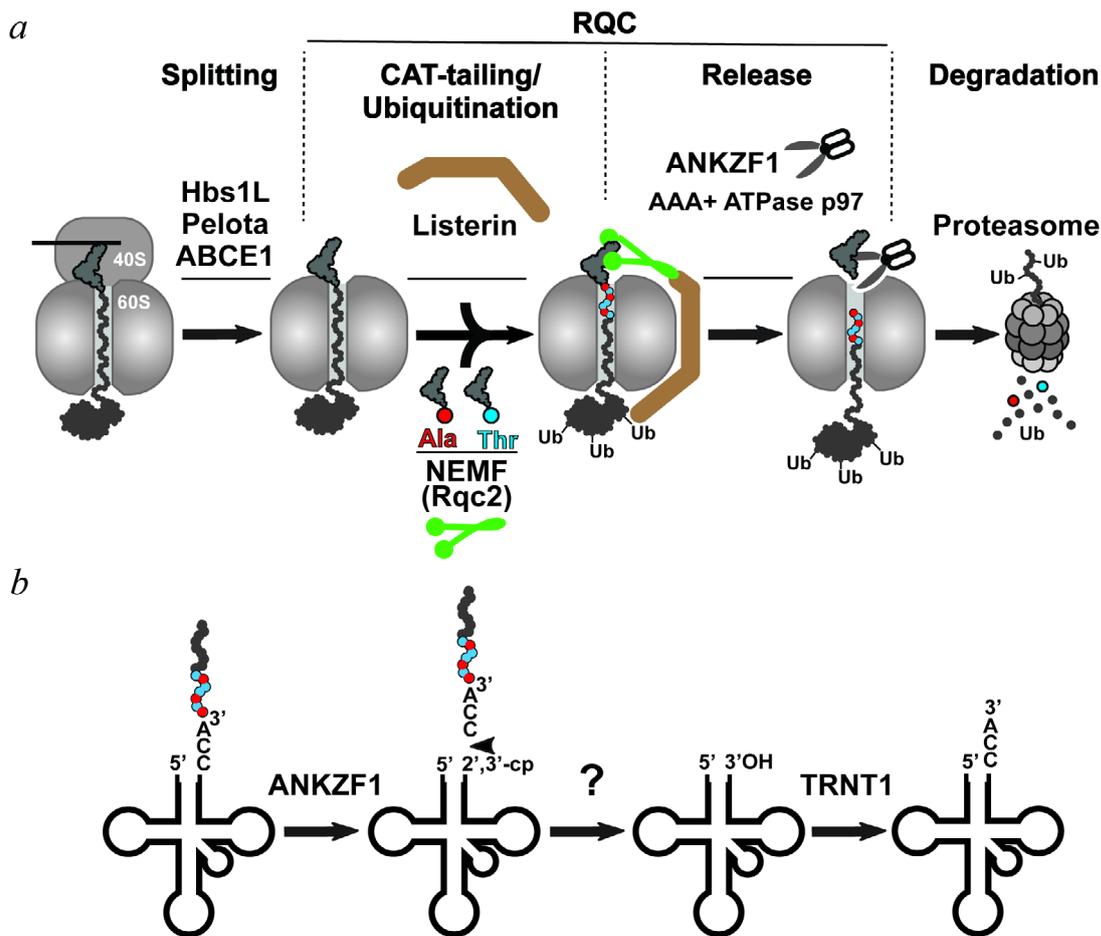


Рис. 3. Эукариотический путь контроля качества, связанный с эукариотическими рибосомами. *a* – Контролю качества, связанному с рибосомами (RQC), предшествует разборка остановившейся 80S-рибосомы с помощью трёх белков: Pelota, Hbs1L и ABCE1. Затем NEMF (зелёный) и Listerin (коричневый) связываются с образовавшимся комплексом 60S • пептидил-тРНК и модифицируют неполный пептид. NEMF удлиняет С-конец образующегося пептида за счёт остатков аланина/треонина (CAT-хвост), чтобы экспонировать остатки лизина, которые, в противном случае, были бы скрыты туннелем выхода из рибосомы, для катализируемого Listerin'ом убиквитинилирования. Образующийся пептид высвобождается из 60S-субъединицы с помощью эндонуклеазы ANKZF1, гидролизующей пептидил-тРНК, и доставляется с помощью AAA+ АТФазы p97 в протеасому для последующей деградации. *b* – Модель рециклизации тРНК после ANKZF1-опосредованного высвобождения образующегося пептида. ANKZF1 вырезает 3'-ССА-конец пептидил-тРНК, вызывая высвобождение конъюгата ССА–пептид, который подвергается деградации протеасомой, и образование укороченной тРНК, несущей 2',3'-циклический фосфат. После удаления циклического фосфата с помощью ELAC1 фермент TRNT1 рециклирует молекулу тРНК, добавляя нуклеотид 3'-ССА на её 3'-конец

застопоренную рибосому и способствует мРНК-независимому добавлению остатков аланина и треонина к С-концу неполного пептида (С-концевое удлинение, называемое CAT-хвостом), приводящее, по-видимому, к экспозиции остатков лизина в его цепи (которые, в противном случае, были бы скрыты туннелем выхода 60S-субъединицы) для Listerin-опосредованного убиквитинирования (рис. 3, *a*, CAT-хвост/стадия убиквитинилирования) [27]. Образующийся убиквитин-модифицированный пептид затем отщепляется от тРНК с помощью эндонуклеазы, называемой белок 1, содержащий анкириновый повтор и домен цинкового пальца

(ANKZF1/дрожжевой Vms1p) [28] (рис. 3, *a*, стадия высвобождения). Следует отметить, что, в отличие от высвобождения пептида во время обычной терминации трансляции, когда канонические факторы терминации провоцируют РТС рибосомы на осуществление гидролиза сложноэфирной связи между тРНК и пептидом в пептидил-тРНК, ANKZF1 избирательно отщепляет его концевой 3'-ССА-нуклеотид [29]. Образующийся при этом конъюгат ССА и пептида экстрагируется из комплексов RQC с помощью AAA+ АТФазы p97 (Cdc48p у дрожжей) и её кофакторов, UFD1 и NPLOC4 (у дрожжей это Ufd1p и Npl4p), и затем доставляется ими в

протеасому для последующей деградации (рис. 3, стадия деградации). Одновременно укороченная тРНК, генерируемая ANKZF1, диссоциирует от 60S-субъединицы и рециклируется через двухэтапный процесс, который включает удаление 2',3'-циклического фосфата гомологом РНКазы Z млекопитающих, ELAC1 [30], с последующим восстановлением 3'-ССА-конца ферментом TRNT1, добавляющим ССА [29] (рис. 3, *b*). В завершение, большая субъединица рибосомы, свободная от тРНК и пептида, может принять участие в новых раундах трансляции.

RQC-ПОДОБНАЯ СИСТЕМА СПАСЕНИЯ У БАКТЕРИЙ

До недавнего времени считалось, что механизм RQC действует исключительно у эукариот (eRQC), в то время как освобождение остановившихся рибосом у бактерий достигается исключительно с помощью «канонических» специфичных для бактерий систем, таких как SmpB • тмРНК, ArfA/ArfT и ArfB. Этот вывод был основан на нескольких фактах, включая следующие:

1. У многих бактерий комбинированное удаление «канонических» систем спасения в целом является летальным [31, 32], что предполагает отсутствие каких-либо других резервных систем спасения у изученных видов.

2. У бактерий нет очевидных гомологов ключевых факторов eRQC, таких как разбирающая триада Pelota-Hbs1-ABCE1, убиквитинлигаза E3 Ltn1 и 60S-зависимая пептидил-тРНК эндонуклеаза ANKZF1/Vms1p.

3. Активность системы eRQC тесно связана с убиквитинированием неполного пептида на застопоренной 60S-субъединице – модификацией, которая не распространена среди бактерий.

Тем не менее, хотя большинство факторов RQC являются специфическими для эукариот, гомологи NEMF/Rqc2 обнаружены у архей, а также у некоторых видов бактерий, где они известны как члены семейства факторов вирулентности фибронектин-связывающего белка А (FbpA) [33]. Было высказано предположение, что белки FbpA, продуцируемые патогенными бактериями, связываются с фибронектином, присутствующим во внеклеточном матриксе, что способствует их адгезии на поверхности клеток организма-хозяина [34]. Однако Lytvynenko et al. [35] недавно показали, что гомолог NEMF/Rqc2 из *B. subtilis*, RqcH, принимает непосредственное участие в освобождении остановившихся рибосом. Было обнаружено,

что RqcH может избирательно связывать и доставлять Ala-тРНК^{Ala} (UGC) на 50S-субъединицу рибосомы, несущую пептидил-тРНК (разборка остановившейся 70S-рибосомы, вероятно, осуществляется неизвестным фактором спасения), для облегчения присоединения полиаланинового хвоста к С-концу неполного пептида. Эта модификация пептида напоминает добавление САТ-хвоста, опосредованное NEMF/Rqc2 у эукариот. Однако в отличие от eRQC, где САТ-хвост косвенно вовлечён в деградацию пептида, способствуя его убиквитинированию, С-концевая модификация полиаланинами у бактерий непосредственно действует как сигнал деградации пептида, распознаваемый протеазой ClpXP (рис. 4, *a*).

Структурные исследования проливают свет на некоторые аспекты механизма модификации неполных пептидов, связанных с 50S-субъединицей, полиаланиновым деграданом у бактерий [36, 37] (рис. 4, *b*). Полученные с помощью криоэлектронной микроскопии (Крио-ЭМ) структуры комплексов RQC *B. subtilis* показали, что входящая Ala-тРНК формирует многочисленные взаимодействия со связанным с рибосомой белком RqcH. В то время как D- и T-петли Ala-тРНК^{Ala} взаимодействуют с положительно заряженным участком на поверхности RqcH, два нуклеотида антикодона (G35 и C36) участвуют в формировании специфической сети взаимодействий с несколькими остатками RqcH (рис. 4, *b*). Такое RqcH-опосредованное декодирование тРНК определяет высокую избирательность комплексов RQC в отношении Ala-тРНК^{Ala}. Структурные, биохимические и генетические данные дополнительно идентифицировали гомолог Hsp15, YabO, в качестве важного партнера RqcH в процессе модификации пептида полиаланином (рис. 4, *b* и *c*). Этот небольшой белок стабилизирует колеблющуюся пептидил-тРНК в Р-сайте 50S-субъединицы (и поэтому белок YabO был переименован в RqcP) в «продуктивной» конформации, необходимой для её реакции с Ala-тРНК^{Ala}, доставляемой белком RqcH в А-сайт рибосомы. Наконец, структуры RQC-комплексов, полученные на различных стадиях прикрепления полиаланинового деградана, позволили предложить модель того, как эта реакция протекает на рибосоме (рис. 4, *c*). Согласно этой модели, после расщепления застопоренной рибосомы синтезируемый пептид RqcP-стабилизированной пептидил-тРНК переносится на Ala-тРНК^{Ala}, рекрутируемую фактором RqcH, в А-сайт, удлиняя С-конец пептида на один остаток аланина. Диссоциация RqcP из комплекса RQC позволяет деацелированной тРНК, находящейся в Р-сайте, пе-

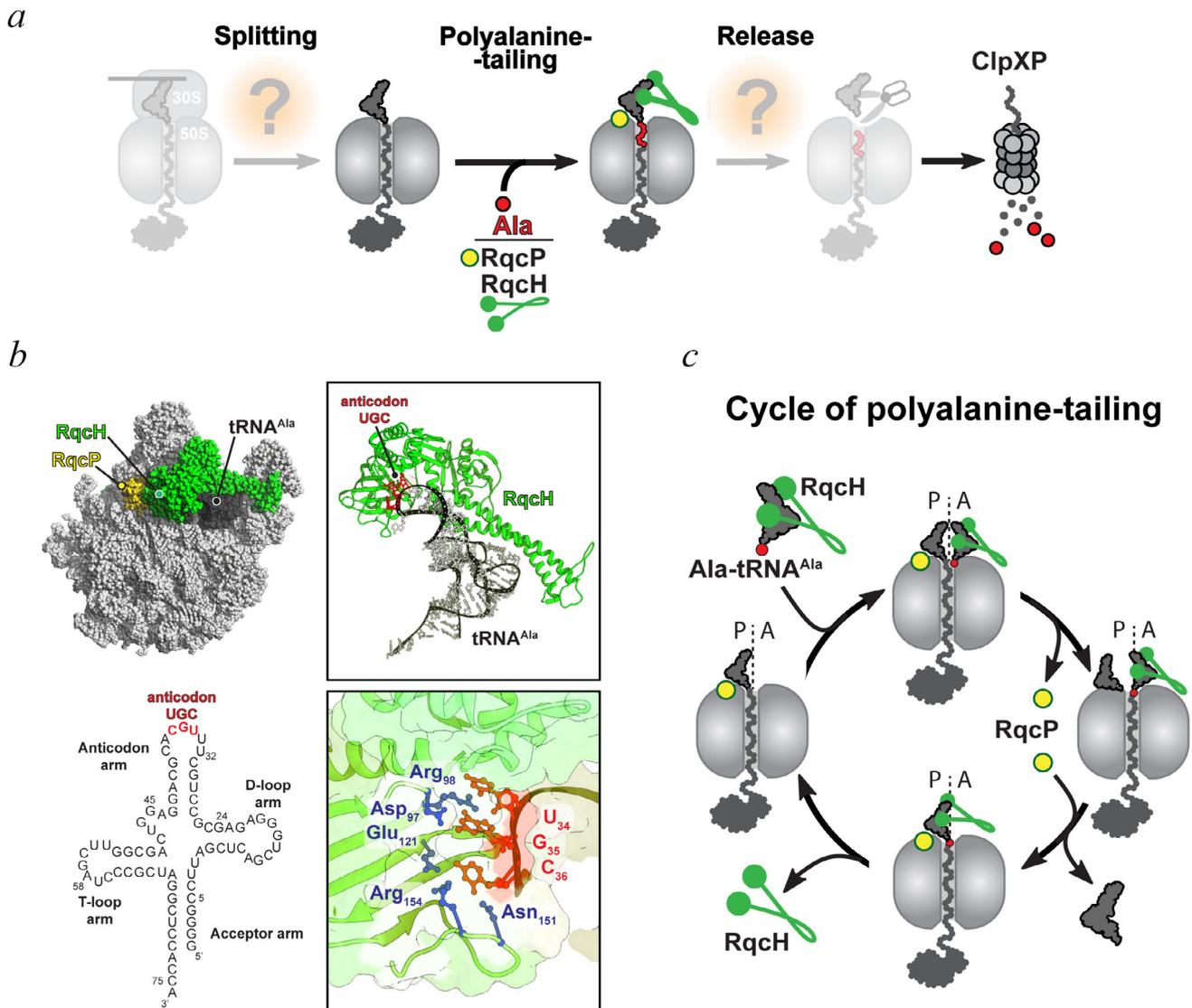


Рис. 4. Бактериальный RQC-подобный путь. *a* – В целом, бактериальный RQC-подобный путь состоит из тех же основных стадий, что и аналогичный путь у эукариот (см. рис. 3). Однако единственной хорошо изученной стадией этого механизма является добавление полиаланинового дегрона к *C*-концу неполного пептида, связанного с 50S-субъединицей. У *B. subtilis* эта стадия осуществляется при помощи RqcH, являющегося гомологом NEMF/Rqc2, и небольшого белка RqcP. *b* – Крио-ЭМ-структура бактериального комплекса RQC из *B. subtilis* (PDB: 7AS8). Комплекс RQC состоит из 50S-субъединицы (светло-серый), тРНК^{Ala} (темно-серый, её вторичная структура показана под крио-ЭМ-структурой), RqcH (зелёный) и RqcP (жёлтый). В этом комплексе остатки Asp97, Arg98, Glu121, Asn151 и Arg154 (показаны синим) RqcH распознают нуклеотиды G35 и C36 (показаны красным) антикодона UGC в тРНК^{Ala}. *c* – Цикл прикрепления полиаланинового дегрона у *B. subtilis* (см. подробности в тексте статьи)

реместиться в Е-сайт, и вновь образованная пептидил-тРНК принимает А/Р-подобную гибридную конформацию. Последующая спонтанная диссоциация деацилированной тРНК из Е-сайта позволяет RqcP снова связаться с комплексом, после чего происходит перемещение пептидил-Ala-тРНК^{Ala} из А/Р-сайта в Р-сайт и завершение цикла элонгации. Этот цикл элонгации с добавлением аланина повторяется несколько раз, приводя к присоединению полиала-

нинового дегрона к *C*-концу неполного пептида. Наконец, модифицированный пептид высвобождается из 50S-субъединицы другим ещё неизвестным фактором в цитозоль, где он расщепляется протеазой ClpXP (рис. 4, *a*).

Открытие RqcH- и RqcP-опосредованной модификации синтезируемых пептидов полиаланином выявило существование RQC-подобной системы спасения рибосом по крайней мере у некоторых бактерий. Тем не менее многие

аспекты функционирования этой системы остаются неизвестными. Неясно, какие условия способствуют разборке остановившихся рибосом на субъединицы и какой фактор(-ы) в бактериальных клетках стимулирует эту разборку. Также неизвестно, каким образом «спасение» большой субъединицы, несущей пептидил-тРНК, осуществляется у гамма-протеобактерий и актинобактерий, где отсутствует ключевой фактор С-концевой модификации полиаланином, RqcH. Также ещё предстоит установить, что служит сигналом для прекращения присоединения остатков аланина к неполному пептиду и какой клеточный фактор осуществляет гидролиз образовавшейся пептидил-тРНК. Некоторые важные вопросы, касающиеся механизмов RQC-подобного освобождения остановившихся рибосом у бактерий, на которые пока нет ответов, обсуждаются ниже.

КАК ПРОИСХОДИТ РАЗБОРКА ОСТАНОВИВШИХСЯ РИБОСОМ У БАКТЕРИЙ?

Разборка остановившихся рибосом на субъединицы является шагом, который запускает RQC-опосредованный механизм спасения. Условия, вызывающие такую разборку у бактерий, и внутриклеточные факторы, участвующие в этом процессе, пока неизвестны. Интересно, что было показано, что включение в синтезируемый пептид нескольких остатков аспартата и глутамата подряд может дестабилизировать транслирующую рибосому и индуцировать её фактор-независимую диссоциацию на субъединицы [38].

Несмотря на то что этот пример иллюстрирует возможность спонтанной разборки транслирующей рибосомы на малую и большую субъединицы, подобные события, по-видимому, не являются распространёнными в клетке, так как они провоцируются специфическими и, следовательно, очень редкими аминокислотными мотивами в синтезируемых полипептидах, которые должны вытесняться эволюционным отбором из существующих белков [39]. Следовательно, существование фактора(ов), специализирующихся на распознавании и активной разборке остановившихся рибосом в бактериальных клетках, остаётся вполне вероятным.

При нормально протекающей трансляции у бактерий факторы рециклинга рибосом RRF и EF-G разбирают рибосомы после завершения трансляции и высвобождения зрелого белка. Однако маловероятно, что эти белки диссоциируют остановившиеся рибосомы, несущие пеп-

тидил-тРНК, так как в экспериментах *in vitro* было четко показано, что способность комплекса RRF • EF-G диссоциировать рибосомы ограничена исключительно рибосомами, прошедшими стадию терминации и несущими деацелированную тРНК [40].

Стоит отметить, что увеличение случаев длительных трансляционных пауз происходит при определенных экстремальных условиях, таких как тепловой шок. Показано, что бактериальная ГТФаза теплового шока, HflX, способна разбирать на субъединицы свободные и связанные с мРНК рибосомы, несущие деацелированную тРНК в Р-сайте [41]. Основываясь на этих данных, было высказано предположение, что HflX может служить альтернативным фактором разборки, который рециклирует рибосомы после терминации трансляции (генерируемые посредством регулярного или вызванного одной из систем спасения высвобождения пептида) при условиях, таких как тепловой шок, когда активность рециклирующего комплекса RRF • EF-G снижена. Хотя диссоциирующая активность HflX установлена, ещё предстоит проверить его способность разбирать остановившиеся рибосомы, несущие пептидил-тРНК. Гомологи HflX, рибосомо-зависимая АТФаза YchF и ГТФаза ObgE, также могут быть потенциальными кандидатами на наличие способности разбирать рибосомы у бактерий [42, 43].

КАК ПРОИСХОДИТ ОСВОБОЖДЕНИЕ БОЛЬШОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ РИБОСОМЫ ОТ НЕПОЛНОГО ПЕПТИДА В БАКТЕРИЯХ, У КОТОРЫХ ОТСУТСТВУЕТ RqcH?

У *B. subtilis* совместное действие RqcH и RqcP способствует модификации С-конца неполного пептида полиаланиновой последовательностью. Примечательно, что способность Hsp15 *E. coli* (гомолога RqcP) связываться с 50S-субъединицей, несущей пептидил-тРНК, хорошо задокументирована [44]. Тем не менее филогенетический анализ не выявил наличие гомолога RqcH у актинобактерий и гамма-протеобактерий (таких как *E. coli*), что ставит вопрос о том, каким образом у этих видов бактерий происходит освобождение большой субъединицы рибосомы от неполного пептида. Было высказано предположение, что Hsp15 *E. coli* может стабилизировать такую конформацию пептидил-тРНК в Р-сайте 50S-субъединицы, которая делает возможным её гидролиз некоторым фактором [45, 46]. Если это так, то механизм освобождения остановившихся рибосом у актинобактерий и гамма-протеобактерий может, в принци-

пе, происходить минуя стадию добавления полиаланина. Альтернативно, добавление полиаланинового дегрона у этих видов может быть обусловлено согласованным действием Hsp15 и некоторого не родственного RqcH белка. Остается выяснить, по какому из двух сценариев у этих видов происходит разборка комплексов 50S • пептидил-тРНК.

КАК НЕПОЛНЫЙ ПЕПТИД ВЫСВОБОЖДАЕТСЯ ИЗ 50S-СУБЪЕДИНИЦЫ РИБОСОМЫ?

Независимо от модификации неполного пептида полиаланиновой последовательностью сложноэфирная связь в молекуле пептидил-тРНК, ассоциированной с большой субъединицей, должна быть гидролизована, а образовавшийся пептид должен быть высвобожден. «Канонические» системы спасения бактерий (SmpB • тмРНК, ArfA/ArfT и ArfB) запускают гидролитическую активность РТС рибосомы, приводящую к гидролизу пептидил-тРНК. Однако, так как эти механизмы работают исключительно с целой 70S-рибосомой, они вряд ли используются при высвобождении пептидов в процессе RQC-опосредованного спасения. Пептидил-тРНК гидролаза, важный белок, который гидролизует свободную от рибосом пептидил-тРНК [47, 48], и RF-гомолог, PrfH, функция которого в клетке остаётся невыясненной [49], могут быть кандидатами на искомую релиз-активность. Наконец, нельзя исключить наличие в бактериях некоторой тРНК-специфической эндонуклеазы с Vms1/ANKZF1-подобной активностью.

МЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ RQC

Инфекционные заболевания, вызываемые патогенными бактериями, обычно лечат антибиотиками, которые представляют собой небольшие молекулы, подавляющие жизненно важные процессы в бактериальных клетках и тем самым предотвращающие их размножение [50]. По-

скольку RQC-подобный механизм не критически важен для жизнеспособности *B. subtilis* [35], может показаться, что он не может служить достаточно хорошей мишенью для антибиотиков. Однако известно, что гомологи RqcH необходимы для вирулентности некоторых патогенов, включая *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* и *Listeria monocytogenes* [51–54]. Этот факт делает бактериальные RQC привлекательной мишенью для разработки принципиально нового класса лекарственных средств. В отличие от традиционных антибиотиков, которые подавляют рост или убивают бактерии, эти препараты должны сдерживать патогены, нейтрализуя их вирулентность. Теоретически, эта стратегия должна значительно снизить склонность патогенов к развитию устойчивости к действию лекарств. Дальнейшие исследования систем спасения рибосом у бактерий, включая RQC путь, могут выявить новые молекулярные мишени внутри клеток для разрабатываемых противоиных средств. Перспективность этой стратегии подтверждается недавним открытием ациламинооксидазолов (включая так называемое соединение KKL-35), как ингибиторов транс-трансляции с ярко выраженными антибактериальными свойствами [55, 56].

Финансирование. Выполнение данной работы было поддержано Национальным Институтом Здоровья (грант № R21-AI137584).

Благодарности. Я хочу выразить глубочайшую благодарность моему учителю, профессору Александру Сергеевичу Спирину, и сотрудникам Института Белка в Пушкино, где я получил бесценный опыт в области биосинтеза белка и изучения рибосом. Я благодарен Александру Ричардсону, доктору Юрию Поликанову, доктору Норе Васкез-Ласлоп и доктору Александру Манкину за тщательное прочтение моей статьи и её плодотворное обсуждение.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии у него конфликта интересов.

Соответствие этическим стандартам. В настоящей статье не содержатся данные каких-либо работ с участием людей или животных, которые были выполнены автором.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Dai, X., Zhu, M., Warren, M., Balakrishnan, R., Patsalo, V., et al. (2016) Reduction of translating ribosomes enables *Escherichia coli* to maintain elongation rates during slow growth, *Nat. Microbiol.*, **2**, 16231.
- Zhu, M., Dai, X., and Wang, Y.-P. (2016) Real time determination of bacterial *in vivo* ribosome translation elongation speed based on LacZa complementation system, *Nucleic Acid Res.*, **44**, e155.
- Jha, S., and Komar, A. A. (2011) Birth, life and death of nascent polypeptide chains, *Biotechnol. J.*, **6**, 623-640.
- Samatova, E., Dabberger, J., Liutkute, M., and Rodnina, M. V. (2021) Translational control by ribosome pausing in

- bacteria: how a non-uniform pace of translation affects protein production and folding, *Front. Microbiol.*, **11**, 619430.
5. Doerfel, L. K., Wohlgemuth, I., Kothe, C., Peske, F., Urlaub, H., and Rodnina, M. V. (2013) EF-P is essential for rapid synthesis of proteins containing consecutive proline residues, *Science*, **339**, 85-88.
 6. Ude, S., Lassak, J., Starosta, A. L., Kraxenberger, T., Wilson, D. N., and Jung, K. (2013) Translation elongation factor EF-P alleviates ribosome stalling at polyproline stretches, *Science*, **339**, 82-85.
 7. Huter, P., Arenz, S., Bock, L. V., Graf, M., Frister, J. O., et al. (2017) Structural basis for polyproline-mediated ribosome stalling and rescue by the translation elongation factor EF-P, *Mol. Cell*, **68**, 515-527.
 8. Pech, M., Karim, Z., Yamamoto, H., Kitakawa, M., Qin, Y., and Nierhaus, K. H. (2011) Elongation factor 4 (EF4/LepA) accelerates protein synthesis at increased Mg²⁺ concentrations, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 3199-3203.
 9. Betney, R., de Silva, E., Krishnan, J., and Stansfield, I. (2010) Autoregulatory systems controlling translation factor expression: thermostat-like control of translational accuracy, *RNA*, **16**, 655-663.
 10. Shalgi, R., Hurt, J. A., Krykbaeva, I., Taipale, M., Lindquist, S., and Burge, C. B. (2013) Widespread regulation of translation by elongation pausing in heat shock, *Mol. Cell*, **49**, 439-452.
 11. Vazquez-Laslop, N., and Mankin, A. S. (2018) How macrolide antibiotics work, *Trends Biochem. Sci.*, **43**, 668-684.
 12. Muller, C., Crowe-McAuliffe, C., and Wilson, D. N. (2021) Ribosome rescue pathways in bacteria, *Front. Microbiol.*, **12**, 652980.
 13. Buskirk, A. R., and Green, R. (2017) Ribosome pausing, arrest and rescue in bacteria and eukaryotes, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **372**, 20160183.
 14. Keiler, K. C. (2015) Mechanisms of ribosome rescue in bacteria, *Nat. Rev. Microbiol.*, **13**, 285-297.
 15. Keiler, K. C., Waller, P. R., and Sauer, R. T. (1996) Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA, *Science*, **271**, 990-993.
 16. Karzai, A. W., Susskind, M. M., and Sauer, R. T. (1999) SmpB, a unique RNA-binding protein essential for the peptide-tagging activity of SsrA (tmRNA), *EMBO J.*, **18**, 3793-3799.
 17. Himeno, H., Nameki, N., Kurita, D., Muto, A., and Abo, T. (2015) Ribosome rescue systems in bacteria, *Biochimie*, **114**, 102-112.
 18. Chadani, Y., Ito, K., Kutsukake, K., and Abo, T. (2012) ArfA recruits release factor 2 to rescue stalled ribosomes by peptidyl-tRNA hydrolysis in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.*, **86**, 37-50.
 19. Shimizu, Y. (2012) ArfA recruits RF2 into stalled ribosomes, *J. Mol. Biol.*, **423**, 624-631.
 20. Goralski, T. D. P., Kirimanjeswara, G. S., and Keiler, K. C. (2018) A new mechanism for ribosome rescue can recruit RF1 or RF2 to nonstop ribosomes, *mBio*, **9**, e02436-18.
 21. Handa, Y., Inaho, N., and Nameki, N. (2011) YaeJ is a novel ribosome-associated protein in *Escherichia coli* that can hydrolyze peptidyl-tRNA on stalled ribosomes, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 1739-1748.
 22. Gagnon, M. G., Seetharaman, S. V., Bulkley, D., and Steitz, T. A. (2012) Structural basis for the rescue of stalled ribosomes: structure of YaeJ bound to the ribosome, *Science*, **335**, 1370-1372.
 23. Shoemaker, C. J., and Green, R. (2012) Translation drives mRNA quality control, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **19**, 594-601.
 24. Pisarev, A. V., Skabkin, M. A., Pisareva, V. P., Skabkina, O. V., Rakotondrafara, A. M., et al. (2010) The role of ABCe1 in eukaryotic post-termination ribosomal recycling, *Mol. Cell*, **37**, 196-210.
 25. Shoemaker, C. J., Eyler, D. E., and Green, R. (2010) Dom34:Hbs1 promotes subunit dissociation and peptidyl-tRNA drop-off to initiate no-go decay, *Science*, **330**, 369-372.
 26. Joazeiro, C. A. P. (2019) Mechanisms and functions of ribosome-associated protein quality control, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **20**, 368-383.
 27. Shen, P. S., Park, J., Qin, Y., Li, X., Parsawar, K., et al. (2015) Rqc2p and 60S ribosomal subunits mediate mRNA-independent elongation of nascent chains, *Science*, **347**, 75-78.
 28. Verma, R., Reichermeier, K. M., Burroughs, A. M., Oania, R. S., Reitsma, J. M., et al. (2018) Vms1/ANKZF1 peptidyl-tRNA hydrolases releases nascent chains from stalled ribosomes, *Nature*, **557**, 446-451.
 29. Yip, M. C. J., Keszei, A. F. A., Feng, Q., Chu, V., McKenna, M. J., and Shao, S. (2019) Mechanism for recycling tRNAs on stalled ribosomes, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **26**, 343-349.
 30. Yip, M. C. J., Savickas, S., Gygi, S. P., and Shao, S. (2020) ELAC1 repairs tRNA cleaved during ribosome-associated quality control, *Cell Rep.*, **30**, 2106-2114.
 31. Chadani, Y., Ono, K., Kutsukake, K., and Abo, T. (2011) *Escherichia coli* YaeJ protein mediates a novel ribosome-rescue pathway distinct from SsrA- and ArfA-mediated pathways, *Mol. Microbiol.*, **80**, 772-785.
 32. Keiler, K. C., and Feaga, H. A. (2014) Resolving nonstop translation complexes is a matter of life or death, *J. Bacteriol.*, **196**, 2123-2130.
 33. Burroughs, A. M., and Aravind, L. (2014) Analysis of two domains with novel RNA-processing activities throws light on the complex evolution of ribosomal RNA biogenesis, *Front. Genet.*, **5**, 424.
 34. Henderson, B., Nair, S., Pallas, J., and Williams, M. A. (2011) Fibronectin: a multidomain host adhesin targeted by bacterial fibronectin-binding proteins, *FEMS Microbiol. Rev.*, **35**, 147-200.
 35. Lytvynenko, I., Paternoga, H., Thrun, A., Balke, A., Muller, T. A., et al. (2019) Alanine tails signal proteolysis in bacterial ribosome-associated quality control, *Cell*, **178**, 76-90.
 36. Filbeck, S., Cerullo, F., Paternoga, H., Tsapraillis, G., Joazeiro, C. A. P., and Pfeffer, S. (2021) Mimicry of canonical translation elongation underlies alanine tail synthesis in RQC, *Mol. Cell*, **81**, 104-114.
 37. Crowe-McAuliffe, C., Takada, H., Murina, V., Polte, C., Kasvandik, S., et al. (2021) Structural basis for bacterial ribosome-associated quality control by RqcH and RqcP, *Mol. Cell*, **81**, 115-126.
 38. Chadani, Y., Niwa, T., Izumi, T., Sugata, N., Nagao, A., et al. (2017) Intrinsic ribosome destabilization underlies translation and provides an organism with a strategy of environmental sensing, *Mol. Cell*, **68**, 528-539.
 39. Chadani, Y., Sugata, N., Niwa, T., Ito, Y., Iwasaki, S., and Taguchi, H. (2021) Nascent polypeptide within the exit tunnel ensures continuous translation elongation by stabilizing the translating ribosome, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2021.02.02.429294.
 40. Peske, F., Rodnina, M. V., and Wintermeyer, W. (2005) Sequence of steps in ribosome recycling as defined by kinetic analysis, *Mol. Cell*, **18**, 403-412.
 41. Zhang, Y., Mandava, C. S., Cao, W., Li, X., Zhang, D., et al. (2015) HflX is a ribosome-splitting factor rescuing stalled ribosomes under stress conditions, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **22**, 906-913.

42. Tomar, S. K., Kumar, P., and Prakash, B. (2011) Deciphering the catalytic machinery in a universally conserved ribosome binding ATPase YchF, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **408**, 459-464.
43. Feng, B., Mandava, C. S., Guo, Q., Wang, J., Cao, W., et al. (2014) Structural and functional insights into the mode of action of a universally conserved Obg GTPase, *PLoS Biol.*, **12**, e1001866.
44. Korber, P., Stahl, J. M., Nierhaus, K. H., and Bardwell, J. C. (2000) Hsp15: a ribosome-associated heat shock protein, *EMBO J.*, **19**, 741-748.
45. Jiang, L., Schaffitzel, C., Bingel-Erlenmeyer, R., Ban, N., Korber, P., et al. (2009) Recycling of aborted ribosomal 50S subunit-nascent chain-tRNA complexes by the heat shock protein Hsp15, *J. Mol. Biol.*, **386**, 1357-1367.
46. Starosta, A. L., Lassak, J., Jung, K., and Wilson, D. N. (2014) The bacterial translation stress response, *FEMS Microbiol. Rev.*, **38**, 1172-1201.
47. Das, G., and Varshney, U. (2006) Peptidyl-tRNA hydrolase and its critical role in protein biosynthesis, *Microbiology*, **152**, 2191-2195.
48. Sharma, S., Kaushik, S., Sinha, M., Kushwaha, G. S., Singh, A., et al. (2014) Structural and functional insights into peptidyl-tRNA hydrolase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1844**, 1279-1288.
49. Burroughs, A. M., and Aravind, L. (2019) The origin and evolution of release factors: implications for translation termination, ribosome rescue, and quality control pathways, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 1981.
50. Lewis, K. (2020) The science of antibiotic discovery, *Cell*, **181**, 29-45.
51. Holmes, A. R., McNab, R., Millsap, K. W., Rohde, M., Hammerschmidt, S., et al. (2001) The pavA gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a fibronectin-binding protein that is essential for virulence, *Mol. Microbiol.*, **41**, 1395-1408.
52. Pracht, D., Elm, C., Gerber, J., Bergmann, S., Rohde, M., et al. (2005) PavA of *Streptococcus pneumoniae* modulates adherence, invasion, and meningeal inflammation, *Infect. Immun.*, **73**, 2680-2689.
53. Singh, K. V., La Rossa, S. L., Somarajan, S. R., Roh, J. H., and Murray, B. E. (2015) The fibronectin-binding protein EfbA contributes to pathogenesis and protects against infective endocarditis caused by *Enterococcus faecalis*, *Infect. Immun.*, **83**, 4487-4494.
54. Dramsi, S., Bourdichon, F., Cabanes, D., Lecuit, M., Fsihi, H., and Cossart, P. (2004) FbpA, a novel multifunctional *Listeria monocytogenes* virulence factor, *Mol. Microbiol.*, **53**, 639-649.
55. Ramadoss, N. S., Alumasa, J. N., Cheng, L., Wang, Y., Li, S., et al. (2013) Small molecule inhibitors of translation have broad-spectrum antibiotic activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 10282-10287.
56. Aron, Z. D., Mehrani, A., Hoffer, E. D., Connolly, K. L., Srinivas, P., et al. (2021) *trans*-Translation inhibitors bind to a novel site on the ribosome and clear *Neisseria gonorrhoeae* in vivo, *Nat. Commun.*, **12**, 1799.

RIBOSOME-ASSOCIATED QUALITY CONTROL IN BACTERIA

Review

M. S. Svetlov

Center for Biomolecular Sciences, Department of Pharmaceutical Sciences, University of Illinois at Chicago, 60607 Chicago, Illinois, USA; e-mail: msvet2@uic.edu

Translation of the genetic information into proteins, performed by the ribosome, is a key cellular process in all organisms. Translation usually proceeds smoothly, but, unfortunately, undesirable events can lead to stalling of translating ribosomes. To rescue these faulty arrested ribosomes, bacterial cells possess three well-characterized quality control systems, tmRNA, ArfA, and ArfB. Recently, an additional ribosome rescue mechanism has been discovered in *Bacillus subtilis*. In contrast to the “canonical” systems targeting the 70S bacterial ribosome, this latter mechanism operates by first splitting the ribosome into the small (30S) and large (50S) subunits to then clearing the resultant jammed large subunit from the incomplete nascent polypeptide. Here, I will discuss the recent microbiological, biochemical, and structural data regarding functioning of this novel rescue system.

Keywords: translation, ribosome stalling, quality control, polyalanine-tailing