

## РИБСОМА КАК ТРАНСЛОКАЗА И ХЕЛИКАЗА

### Обзор

© 2021 Ч. Бао, Д.Н. Ермоленко\*

*Department of Biochemistry & Biophysics, School of Medicine and Dentistry  
and Center for RNA Biology, University of Rochester, Rochester, NY, USA;  
e-mail: Chen\_Bao@urmc.rochester.edu; dmitri\_ermolenko@urmc.rochester.edu*

Поступила в редакцию 10.05.2021

После доработки 21.05.2021

Принята к публикации 21.05.2021

В процессе синтеза белка рибосома передвигается вдоль молекулы мРНК, считывая один кодон за другим. Транслокация рибосомы индуцируется консервативным белком, фактором элонгации G (EF-G) у бактерий и фактором элонгации 2 (EF-2) у эукариот. Индуцируемая фактором элонгации EF-G транслокация приводит к раскручиванию внутримолекулярных вторичных структур мРНК на три пары оснований одновременно, что превращает транслирующую рибосому в процессивную хеликазу. Профессор Александр Сергеевич Спирина внёс значительный вклад в понимание молекулярного механизма транслокации. В настоящем обзоре рассмотрены идеи Спирина о транслокации рибосом и последние достижения в этой области, которые стали возможны благодаря новаторской работе Спирина. Мы также обсудим нерешённые проблемы, касающиеся транслоказной и хеликазной активности рибосомы.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** рибосома, транслокация, хеликаза, рабочий ход, броуновский храповик.

**DOI:** 10.31857/S0320972521080108

### ВВЕДЕНИЕ

На стадии элонгации биосинтеза белка рибосома производит декодирование нуклеотидной последовательности кодонов, связывающихся с антикодоном молекулы тРНК, несущей аминокислотные остатки. И малые (30S – у бактерий), и большие (50S – у бактерий) субъединицы содержат три сайта связывания тРНК: сайты А (аминоацил), Р (пептидил) и Е (выход). В начале каждого цикла элонгации вновь поступившая аминоксил-тРНК связывается с А-сайтом рибосомы. После реакции переноса пептидила образующиеся пептидил-тРНК и деацилированная тРНК вместе с ассоциированными кодонами мРНК транслоцируются из сайтов А и Р в сайты Р и Е соответственно (рис. 1, *a–f*). Этот процесс катализируется универсально консервативным белковым фактором EF-G (EF-2 – у эукариот). Молекулярный механизм транслокации интересовал учёных с момента зарождения области синтеза белков и оставался одним из основных направлений исследований в лаборато-

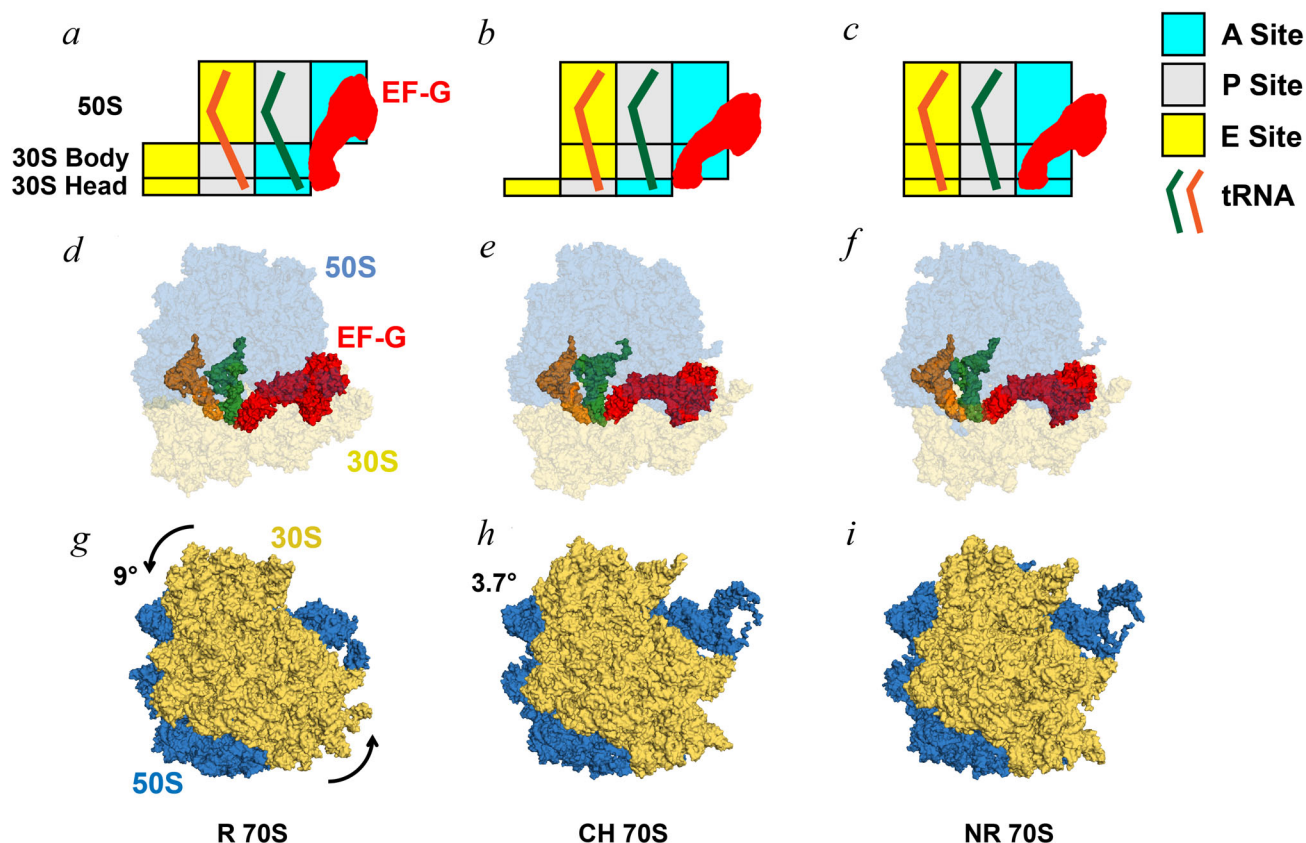
рии Александра Спирина на протяжении более 50 лет [1–6]. Лаборатория Спирина открыла ряд важных аспектов механизма транслокации [7–11]. Спиринские модели рибосомной транслокации со «смыканием–размыканием» [2, 6] и «броуновским храповиком» [4, 12, 13] оказали большое влияние и заложили основу для исследований транслокации на протяжении десятилетий. Ниже мы рассмотрим ключевой вклад лаборатории Александра Спирина и недавний прогресс в исследованиях рибосомной транслокации, основанный на идеях Спирина. Более подробные обзоры современного состояния понимания механизма транслокации можно найти в других источниках [14–16].

### РОЛЬ EF-G И МОЛЕКУЛ тРНК В ТРАНСЛОКАЦИИ РИБСОМЫ ВДОЛЬ МОЛЕКУЛЫ мРНК

Универсально консервативная ГТФаза EF-G ускоряет транслокацию рибосом примерно на 4 порядка по сравнению с некатализируемой реакцией [18–20]. Гидролиз ГТФ под действием EF-G активируется в результате взаимодействия G-домена этого белка с сарцин-рициновой петлей (SRL) 23S рРНК [21, 22]. Роль гидролиза ГТФ в транслокации была установлена в работах

Принятые сокращения: ASL – антикодоны «стебель–петля»; EF-G – фактор элонгации G; EF-2 – фактор элонгации 2; R, NR и CH – повёрнутое, неповёрнутое и химерное состояния 50S- и 30S-субъединиц рибосомы.

\* Адресат для корреспонденции.



**Рис. 1.** Движение тРНК и конформационные перестройки рибосомы в составе комплекса EF-G–рибосома. *a–c* – Блок-диаграммы, показывающие положения пептидил-тРНК (зелёный) и деацелированной (оранжевый) тРНК относительно сайтов А (бирюзовый), Р (серый) и Е (жёлтый) на 50S-субъединице и головке и теле 30S-субъединицы. *d–f* – Вид структуры со стороны интерфейса 70S-субъединицы рибосомы, связанной с тРНК и EF-G, на котором 50S- и 30S-субъединицы показаны светло-голубым и светло-жёлтым цветом соответственно, а две тРНК – темно-оранжевым и темно-зелёным, EF-G – темно-красным. *g–i* – Межсубъединичное вращение, сопровождающее транслокацию и наблюдаемое со стороны 30S-субъединицы, обращённой к растворителю. 50S- и 30S-субъединицы показаны синим и жёлтым цветом соответственно. Стрелками обозначено вращение против часовой стрелки 30S-субъединицы относительно 50S-субъединицы. Значения углов межсубъединичного вращения (согласно статье Mohan et al. [17]), измеренные относительно структуры невращающейся рибосомы (PDBID 4V51). *a, d и g* – Повёрнутая (R) рибосома перед транслокацией связана с EF-G и тРНК в гибридных состояниях А/Р и Р/Е (PDBID 4V7D). *b, e и h* – Частично повёрнутая рибосома, содержащая тРНК в химерных (CH) состояниях ар/Р и ре/Е молекул тРНК (PDBID 4W29). *c, f и i* – Рибосома, связанная с EF-G после транслокации, в неповёрнутой (NR) конформации (PDBID 4V5F), которая содержит тРНК, связанные в классических Р/Р и Е/Е состояниях

сотрудников лабораторий Казиро и Спирина [9, 23–25]. Они продемонстрировали, что EF-G индуцирует эффективную транслокацию в ГТФ-связанной форме. В присутствии ГДФ или при отсутствии нуклеотидов EF-G не способствует транслокации. Замены ГТФ на негидролизующие аналоги сохраняли способность EF-G индуцировать транслокацию, оцениваемую по повышению чувствительности пептидил-тРНК к пурамицину или по высвобождению деацелированной тРНК из рибосомы. Однако негидролизующие аналоги ГТФ удерживают EF-G на рибосоме. Эти результаты позволили сделать предположение о том, что гидролиз GTP не требуется для транслокации, но необходим для высво-

бождения EF-G. Результаты экспериментов Спирина и Казиро были подтверждены более поздними кинетическими исследованиями, показавшими, что негидролизующие аналоги ГТФ не изменяют путь транслокации [26, 27]. Более того, замена ГТФ на негидролизующие аналоги лишь умеренно влияла на скорость одного раунда транслокации, снижая её в 2–50 раз в зависимости от условий эксперимента [19, 26, 28, 29].

Ещё один фундаментальный аспект механизма транслокации был обнаружен в лаборатории Спирина в ходе экспериментов, показавших, что молекулы тРНК могут перемещаться в рибосоме при отсутствии мРНК [10, 11]. На основании этих результатов было сделано предпо-

ложение о том, что мРНК приводится в движение транслокацией антикодонов «стебель–петля» (ASL) в тРНК, находящихся на А- и Р-сайтах. Более поздние исследования показали, что для транслокации мРНК необходимо присутствие ASL в сайте А и полноразмерной тРНК — на сайте Р пре-транслокационной рибосомы [30]. Идея о транслокации мРНК, движимой тРНК, была подтверждена с помощью методов измерения одиночных молекул, показавших, что мРНК за один раз перемещает три нуклеотида без каких-либо промежуточных этапов [31]. Поскольку тРНК взаимодействует как с 30S-, так и с 50S-субъединицей (рис. 1, *a–f*), движимый молекулами тРНК механизм транслокации означает, что в этом процессе участвуют обе субъединицы рибосомы.

### ПЕРЕСТРОЙКА СТРУКТУРЫ РИБОСОМЫ: ГИПОТЕЗА СМЫКАНИЯ–РАЗМЫКАНИЯ

В 1968–1969 гг., основываясь на субъединичной структуре рибосомы, Спириин предложил модель транслокации, основанную на смыкании–размыкании [1, 2, 6]. Эта модель предполагала, что: 1) транслокация тРНК включает переход рибосомы из «сомкнутой» конформации в «разомкнутую», что способствует диффузии тРНК через рибосому; 2) реакция с пептидилтрансферазой запускает образование промежуточного соединения транслокации, при котором тРНК сдвигаются в большой субъединице, но ещё не перемещаются в малой субъединице; 3) транслокация включает перемещение рибосомных субъединиц друг относительно друга. Сходные идеи были независимо от Спириина представлены М.С. Бретчером [32]. Как будет обсуждаться ниже, многие аспекты этой модели оказались пророческими. По сей день этап, ограничивающий скорость транслокации, часто называют «размыкание».

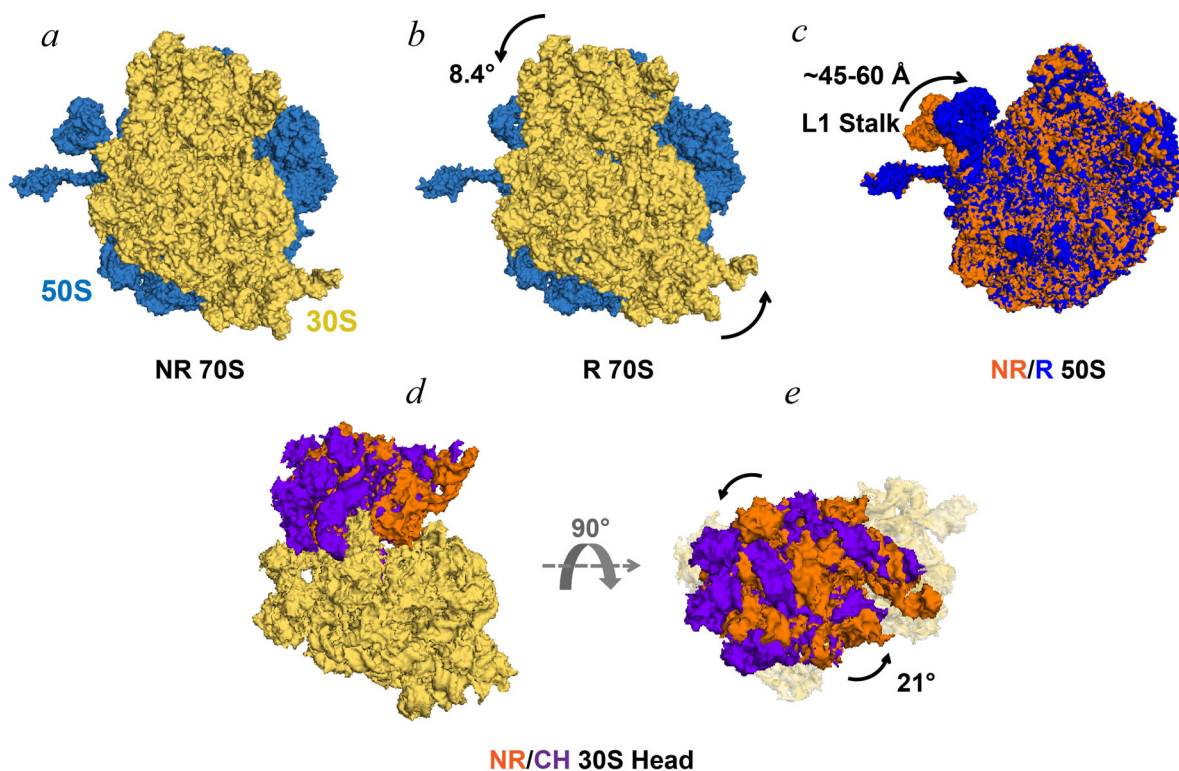
С помощью метода нейтронного рассеивания Спириин, Сердюк и Мэй получили первые косвенные доказательства межсубъединичных перестроек, сопровождающих транслокацию [33, 34]. Тем не менее дальнейшая проверка ключевых предсказаний, вытекающих из модели «смыкания–размыкания», заняла несколько десятилетий и потребовала разработки новых экспериментальных подходов, таких как химическое зондирование структуры РНК, криоэлектронная микроскопия (cryo-EM) и микроскопия, основанная на Фёрстеровском индуктивном резонансном переносе энергии электронного возбуждения одиночных макромолекул (smFRET) [35].

Через двадцать лет после появления модели «смыкания–размыкания» Данеш Моазед и Гарри Ноллер использовали химическое зондирование для картирования сайтов связывания тРНК, чтобы показать, что реакция транспептидации запускает спонтанную транслокацию акцепторных ветвей пептидил-тРНК и деацелированной тРНК из сайтов А и Р в сайты Р и Е большой субъединицы соответственно, тогда как ASL тРНК остаются в исходных сайтах А и Р малой субъединицы [36]. Таким образом, были обнаружены промежуточные гибридные состояния связывания тРНК, А/Р и Р/Е (рис. 1, *a* и *d*). Было показано, что для завершения транслокации тРНК в малую субъединицу требуются EF-G и ГТФ (рис. 1, *a–g*).

Прошло ещё десять лет, прежде чем было получено подтверждение другого предсказания модели «смыкания–размыкания». Иоахим Франк и Раджендра Агравал изучили комплекс EF-G и рибосомы с помощью cryo-EM [37]. В этих экспериментах было показано, что связывание EF-G вызывает вращение малой 30S-субъединицы относительно большой 50S-субъединицы параллельно плоскости межсубъединичного интерфейса (рис. 1, *g–i*; рис. 2, *a–b*). За открытиями гибридного промежуточного состояния и межсубъединичного вращения последовали многочисленные структурные и одномолекулярные исследования, которые принесли беспрецедентное понимание структурных перестроек рибосом, тРНК и EF-G, сопровождающих транслокацию [38, 39].

Эксперименты с использованием методов cryo-EM и smFRET показали, что межсубъединичное вращение на 6–10° связано с переходом пептидил-тРНК и деацелированной тРНК в гибридные состояния А/Р и Р/Е (рис. 2, *a–b*) [38, 40–43]. Эти данные установили тождественность исходной (неповёрнутой) и повёрнутой конформаций с классическим и гибридным состояниями связывания тРНК соответственно. Использование методов cryo-EM и smFRET также позволило показать, что образование повёрнутого гибридного состояния рибосомы сопровождается движением внутрь подвижного домена большой субъединицы рибосомы, называемого L1-выступом (рис. 2, *c*), который включает рибосомный белок uL1 и спиральные структуры 76, 77 и 78 23S рРНК [35, 39]. При переходе от открытой к закрытой конформации конец L1-выступа перемещается на целых 60 Å и становится связанным с локтем тРНК в сайте Р/Е.

Исследования smFRET также показали, что при отсутствии EF-G пре-транслокационная рибосома спонтанно совершает произвольные переходы между неповёрнутой (классичес-



**Рис. 2.** Межсубъединичное вращение, движение L1-стебля и поворот головки 30S-субъединицы, наблюдаемые в рибосомах, свободных от EF-G. Структуры комплекса 70S-рибосомы и тРНК (PDBID 4V9D) в неповёрнутом (NR) классическом состоянии (*a*) и в повёрнутом (R) гибридном состоянии (*b*) 50S- и 30S-субъединицы рибосомы показаны синим и желтым цветом соответственно. Обе структуры рибосомы показаны со стороны, обращённой к растворителю 30S-субъединицы. Вращение против часовой стрелки 30S-субъединицы относительно 50S-субъединицы показано изогнутыми стрелками. *c* – L1-выступ в 50S-субъединицах NR (оранжевый) и R (синий) рибосом (PDBID 4V9D) наложенный путём структурного выравнивания 23S рРНК. *d* и *e* – Поворот домена головки 30S-субъединицы показан структурным выравниванием доменов тела и платформы (жёлтый) 16S рРНК рибосом NR (PDBID 4V51) и химерного состояния (CH) (PDBID 4W29). 30S-субъединица показана со стороны растворителя (*d*) и со стороны «вершины» головки 30S-субъединицы (*e*). Домены головки 30S-субъединицы рибосомы в NR- и CH-состояниях показаны оранжевым и фиолетовым цветом соответственно. Поворот головки 30S-субъединицы в состоянии CH и межсубъединичное вращение в состоянии R (согласно статье Mohan et al. [17]) были измерены относительно 70S-рибосомы в состоянии NR (PDBID 4V51)

кой) и повёрнутой (гибридное состояние) конформациями (рис. 2, *a–b*) [38, 44–46]. Связывание EF-G • ГТФ временно стабилизирует повёрнутую конформацию в гибридном состоянии (рис. 1, *a, d* и *g*). Транслокация мРНК и тРНК на малой субъединице сопряжена с обратным переходом в конформацию неповёрнутого, классического состояния (рис. 1, *c, f* и *i*) [26, 40, 47].

Кроме межсубъединичных перестроек и движения L1-выступа, транслокация сопровождается большими структурными изменениями внутри малой субъединицы рибосомы. Малая субъединица состоит из трёх структурных доменов: головка, тело и платформа. Структурные исследования показали, что головка 30S-субъединицы поворачивается на угол до 20° относительно остальной части малой субъединицы вокруг ортогональной оси межсубъединичного вращения (рис 2, *d–e*) [48, 49]. В связанном

с EF-G промежуточном состоянии транслокации, визуализируемом с помощью рентгеновской кристаллографии и cryo-EM, в котором 30S-головка наблюдается в повёрнутой конформации, две тРНК перемещаются вдоль 50S-субъединицы и 30S-платформы/тела, но ещё не перемещаются относительно 30S-головки (рис. 1, *b, e* и *h*) [50, 51]. В этих положениях, которые обозначаются как химерные состояния ар/Р и ре/Е, тРНК находятся на полпути между гибридными (состояния А/Р и Р/Е) и пост-транслокационными классическими (состояния Р/Р и Е/Е) состояниями и, вероятно, представляют собой позднее промежуточное состояние транслокации.

Конец домена IV фактора элонгации EF-G играет ключевую роль в транслокационной активности EF-G и поддержании рамки считывания [19, 52–54]. Когда EF-G связан с пре-транс-

локационной рибосомой в конформации повернутого гибридного состояния, домен IV EF-G располагается рядом с ASL тРНК А/Р (рис. 1, *a* и *d*) [55]. После транслокации домен IV EF-G стыкуется с сайтом А малой субъединицы, освобожденной от пептидил-тРНК (рис. 1, *c* и *f*) [38, 56]. Следовательно, при обратном межсубъединичном вращении и обратном повороте 30S-субъединицы домен IV EF-G вытесняет ASL пептидил-тРНК и предотвращает его обратное движение.

Не совсем понятно, какая из вышеперечисленных конформационных перестроек лимитирует скорость транслокации, «размыкает» рибосому (по терминологии Спирина) и облегчает транслокацию тРНК. Реакция транспептидации «размыкает» рибосому в том смысле, что она делает возможным спонтанное межсубъединичное вращение и колебания тРНК между классическим и гибридным состояниями [44–46]. Однако при отсутствии EF-G эти колебания бесполезны и не приводят к классической транслокации тРНК и мРНК [44–46]. Согласно нескольким линиям доказательств, домен IV EF-G дестабилизирует взаимодействия А-сайта тРНК с 16S рРНК [57–61]. Следовательно, вызванные EF-G изменения в сайте А могут «разомкнуть» рибосому. Наконец, другой вероятной «размыкающей» перестройкой является поворот головки 30S-субъединицы, который открывает путь для передвижения тРНК из Р-сайта в Е-сайт, которое в противном случае ограничено [49]. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы установить полную последовательность структурных перестроек, сопровождающих транслокацию, и определить лимитирующую стадию в этом процессе.

## ЭНЕРГЕТИКА ТРАНСЛОКАЦИИ И МОДЕЛЬ БРОУНОВСКОГО ХРАПОВИКА

Хотя EF-G значительно ускоряет процесс трансляции, в лабораториях Спирина и Пестки было показано, что транслокация может также происходить спонтанно при отсутствии белковых факторов [7, 8, 62]. В лаборатории Спирина было обнаружено, что спонтанная транслокация стимулируется модификацией универсально консервативного рибосомного белка uS12 30S-субъединицы тиол-специфичными реагентами, которые при добавлении инактивируют фактор элонгации EF-G и таким образом исключают присутствие следовых количеств этого белка [7, 63, 64]. В более поздних исследованиях было показано, что удаление 30S-белков uS12 и uS13 вызывает усиление бесфакторной транс-

локации, возможно, за счёт ослабления взаимодействия тРНК с сайтами А и Р на 30S-субъединице соответственно [65]. Кроме того, сообщалось, что однократная транслокация без факторов элонгации может быть вызвана антибиотиками спарсомицином, линкомицином и хлорамфениколом, которые связываются с сайтом А на 50S-субъединице и таким образом дестабилизируют связывание тРНК на А-сайте [20, 66].

Основываясь на наблюдениях бесфакторной транслокации, Спирина постулировал, что этот процесс является неотъемлемым свойством рибосомы и что энергии пептидил-трансферазных реакций вполне достаточно для того, чтобы способствовать движению тРНК [3]. Однако низкая скорость спонтанной транслокации и наблюдение спонтанной обратной транслокации в некоторых контекстах тРНК/мРНК позволяют предположить, что реакция транспептидации – не единственный источник энергии для транслокации, и ей также способствует энергия, запасённая в виде EF-G•ГТФ. Действительно, было подсчитано, что движимая транспептидацией транслокация будет нуждаться в примерно 80% эффективности конверсии химической энергии в механическое движение [67]. Такая высокая эффективность нетипична для макромолекулярных моторов [67].

Две альтернативные идеализированные модели, рабочий ход и броуновский храповик, используются для описания преобразования химической энергии в механическую работу макромолекулярными двигателями [68, 69]. Химическая энергия может быть преобразована в упругую энергию или в конформационный переход, который вызывает большое конформационное изменение макромолекулы, т.е. рабочий ход. В качестве альтернативы можно использовать энергию химической реакции для смещения случайных движений макромолекулы под действием тепла в однонаправленное движение. Таким образом, химическая реакция играет роль собачки, управляющей движением колеса механической трещотки. Химическое изменение либо строго предшествует изменению конформации (рабочий ход), либо следуют за ним (броуновский храповик) [68]. Эти два механизма можно различить, исследуя зависимость молекулярного моторного движения от нагрузки [68].

Несколько групп исследователей предположили, что транслокация тРНК опосредована рабочим ходом домена IV EF-G, управляемым гидролизом ГТФ [19, 70, 71]. Эта гипотеза подтверждается кинетическими данными, предполагающими, что гидролиз ГТФ фактором элон-

гации EF-G предшествует транслокации [19]. Однако эксперименты, выполненные в лабораториях Спирина и Казиры, и более поздние кинетические измерения показывают, что транслокация происходит быстро и эффективно при отсутствии гидролиза ГТФ, если заменить ГТФ на его негидролизуемые аналоги [9, 19, 23–26, 28, 29]. Эти данные предполагают, что гидролиз ГТФ с помощью EF-G не связан с транслокацией, и противоречат механизму рабочего хода, который реализовывался бы за счёт гидролиза ГТФ.

Основываясь на наблюдениях спонтанной транслокации при отсутствии факторов элонгации, Спирин пришёл к выводу, что броуновское движение тРНК является достаточным для объяснения транслокации без индукции рабочего хода с помощью EF-G [3, 12, 13]. Эта гипотеза была дополнительно подтверждена данными smFRET, продемонстрировавшими спонтанное межсубъединичное вращение и колебания тРНК между классическим и гибридным состояниями [44–46]. Идеи Спирина, в конечном итоге, были подкреплены измерениями с помощью одномолекулярного оптического твизера транслокации рибосомы против приложенной силы, показавшими, что катализируемая EF-G транслокация также лучше всего описывается моделью броуновского храповика [67].

В броуновском храповом механизме транслокации, катализируемой EF-G, EF-G•ГТФ, по-видимому, действует как собачка храпового механизма, который смещает диффузию тРНК через рибосому и связывает транслокацию с динамикой рибосомы [14, 15]. Полученная структура повернутой пре-трансляционной рибосомы с EF-G (рис. 1, *a* и *d*) продемонстрировала основу для сопряжения межсубъединичного вращения и транслокации тРНК/мРНК [55]. Непродуктивные спонтанные колебания рибосомы между повернутой и неповёрнутой конформациями приводят к возвращению пептидил-тРНК из гибридного состояния А/Р в классическое состояние А/А. Однако, когда EF-G связывается с повернутой пре-транслокационной рибосомой, домен IV фактора EF-G создаёт стерические помехи для возвращения пептидил-тРНК из гибридного состояния А/Р в классическое состояние А/А [55]. Сходным образом домен IV фактора EF-G стерически препятствует возвращению пептидил-тРНК из химерного состояния ар/Р в классическое состояние А/А после обратного поворота головки 30S-субъединицы [72]. Кроме того, после транслокации пептидил-тРНК из сайта А на сайт Р малой субъединицы домен фактора элонгации EF-G связывается с А-сайтом 30S-субъединицы, что

делает движение тРНК необратимым (рис. 1, *c* и *f*).

### РОЛЬ ТРАНСЛОКАЦИИ РИБОСОМЫ В РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ: РИБОСОМА В РОЛИ ХЕЛИКАЗЫ

В то время как в результате проведения структурных исследований и биофизических измерений одиночных молекул были получены беспрецедентные данные о механизме транслокации, остаётся не до конца ясным, как скорость транслокации модулируется в живых клетках, чтобы регулировать удлинение трансляции. Было показано, что эукариотическая транслоказа EF-2 подавляется в стрессовых условиях в результате фосфорилирования [73–75]. Кроме того, EF-2 может быть инактивирована АДФ-рибозилированием, катализируемым дифтерийным токсином [76]. Ряд антибиотиков препятствуют росту клеток, препятствуя транслокации в бактериях [14]. По-видимому, наименее понятным и наиболее интересным аспектом регуляции транслокации является модуляция скорости транслокации вторичной структурой мРНК.

Вычислительный анализ показывает, что большинство (если не все) молекул мРНК склонны к образованию по всей последовательности обширных внутримолекулярных вторичных структур, включая и открытую рамку считывания (ORF) [77]. Сворачивание мРНК приводит к образованию компактных структур с близко расположенными концевыми участками [78]. Работы по зондированию структуры РНК *in vivo* на уровне транскрипта [79–84] показали, что по крайней мере до некоторой степени молекулы мРНК сворачиваются в живых клетках, несмотря на присутствие РНК-хеликаз и других РНК-связывающих белков, которые могут нарушать вторичную структуру РНК. В соответствии с идеей о том, что мРНК обладает развитой вторичной структурой *in vivo*, было показано, что отдельные элементы структуры мРНК регулируют инициацию трансляции, в том числе бактериальные рибоперехватчики [85], индуцирующие сдвиг рамки считывания «шпильки», и псевдоузлы эукариотических вирусов [86], а также IRES (Internal Ribosome Entry Sites) [87] и IRE (Iron Response Elements), расположенные на 5'-UTR-транскриптов, кодирующих белки, участвующие в метаболизме железа [88] и CITE (Cap-Independent Translational Enhancers) [89]. Кроме того, было обнаружено, что связывание белков и мРНК с мРНК регулируется структурой

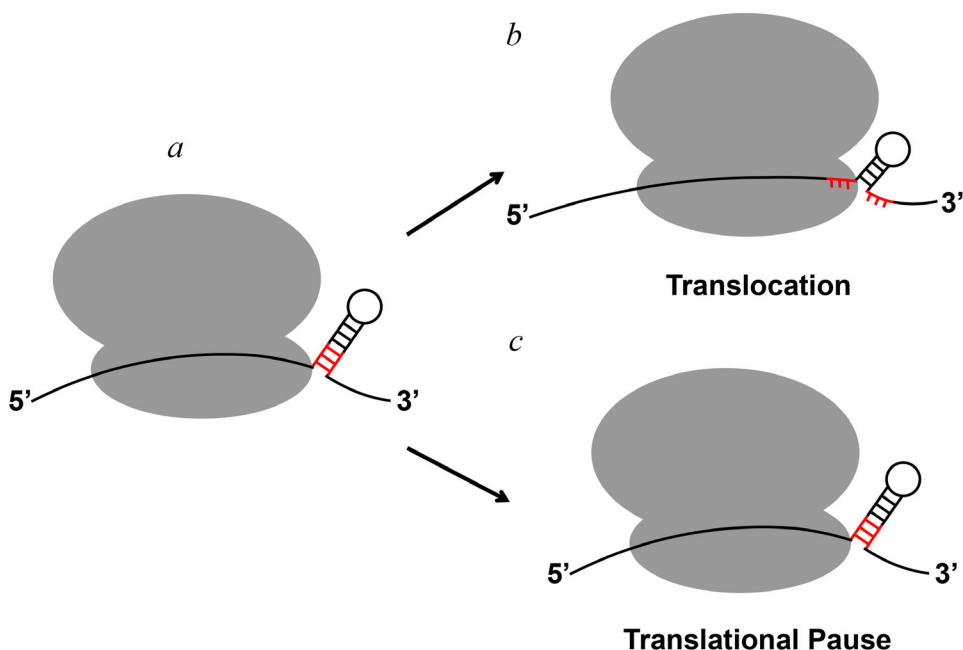
РНК [90–95], что даёт дополнительные доказательства важности вторичной структуры мРНК.

С помощью биохимических методов и методов исследования одиночных макромолекул было показано, что транслирующая рибосома является очень эффективной хеликазой [96, 97], которая расплетает три пары оснований за один шаг транслокации (рис. 3). Транслирующая рибосома разрушает вторичную структуру мРНК, так как узкий канал для мРНК на малой субъединице рибосомы может принять только одноцепочечную мРНК [96, 98–101]. Наряду с демонстрацией хеликазной активности рибосом, анализ профиля рибосомы по всему транскриптому демонстрирует, что большинство элементов вторичной структуры в кодирующих областях мРНК не влияют на скорость элонгации трансляции [102]. Большинство структурированных элементов мРНК, которые регулируют трансляцию, находятся в 5'- или 3'-UTR.

Хеликазная активность рибосомы, по-видимому, играет основную роль в ремоделинге структуры мРНК и в регулировании взаимодействия мРНК с РНК-связывающими белками [103]. Например, при трансляции мРНК полирибосомами благодаря хеликазной активности рибосомы происходит разрушение вторичной структуры открытой рамки считывания (ORF) мРНК [103–105]. Первый этап трансляции мРНК рибосомой, которая вытес-

няет белки комплекса сращивания экзонов (EJC) и другие белки, располагающиеся на мРНК внутри ядра [106], может способствовать сворачиванию мРНК в компактные структуры после завершения синтеза белка. В самом деле, исследования флуоресцентной гибридизации *in situ* с мономолекулярным разрешением (smFISH) и исследования лигирования проксимальных групп показывают отсутствие взаимодействий между отдалёнными сегментами ядерных мРНК, связанных с белками комплекса сращивания экзонов (EJC) [104, 107]. Напротив, для 5'- и 3'-концевых участков цитоплазматических мРНК, которые не подвергаются активной трансляции, характерна совместная локализация благодаря образованию внутримолекулярной вторичной структуры [104, 105], которая сближает концы мРНК [78, 108].

Как это ни парадоксально, несмотря на хеликазную активность рибосомы, определенные структуры РНК, такие как «стебель–петля», могут индуцировать торможение движения рибосомы, приводящее к накоплению укороченных полипептидов [109] и разрушению остановившихся мРНК (No-Go) (рис. 3) [110]. Более того, эволюционно консервативные структуры «стебель–петля» молекул мРНК и псевдоузлы запускают запрограммированные трансляционные паузы [111] и стимулируют –1 запрограммированный сдвиг рамки считывания рибо-



**Рис. 3.** Структуры «стебель–петля» в молекуле мРНК могут либо быстро разворачиваться рибосомой, либо вызывать паузу в трансляции. Находясь в канале входа мРНК, определённые вторичные регуляторные структуры мРНК вызывают паузу в её продвижении по рибосоме, несмотря на хеликазную активность рибосомы. Три пары оснований структуры «стебель–петля», примыкающие к каналу входа мРНК, которые разворачиваются на этапе транслокации, показаны красным

сом (PRF), который контролирует экспрессию различных белков бактерий, вирусов и эукариот [112]. В частности,  $-1$  PRF регулирует синтез ДНК-полимеразы III у бактерий [113], рецептора цитокинов вируса иммунодефицита человека *ccr5* у высших эукариот [114], белков *gag-pol* ретровирусов, включая вирус иммунодефицита человека (HIV) [115], и удлинённого на C-конце полипротеина коронавируса, в том числе SARS-CoV-2, который вызвал пандемию COVID-19 [116, 117].

Механизм остановки рибосомы, индуцируемой вторичной структурой мРНК, до конца неясен. Ряд опубликованных исследований, выполненных на уровне единичных молекул, предполагает, что медленное раскручивание вторичной структуры, которое часто связывают с трансляционной паузой, вряд ли можно связать со степенью ингибирования трансляции, вызванного определенными структурами типа «стебель–петля» молекулы мРНК [31, 118, 119]. Транслокация через три пары оснований GC происходит лишь в 2–3 раза медленнее, чем транслокация вдоль одноцепочечного кодона [31, 118, 119]. Это указывает на то, что стабильность трех пар оснований, прилегающих к каналу для входа мРНК, оказывает относительно умеренное влияние на скорость транслокации. Напротив, было показано, что индуцирующие сдвиг рамки считывания структуры «стебель–петля» и псевдоузлы вызывают длительные паузы в рибосомах [120–127].

Похоже, что вместо того, чтобы создавать простую механическую преграду на пути движения рибосомы, структуры «стебель–петля» мРНК индуцируют запрограммированные паузы движения рибосомы, специфически взаимодействуя с ней. Недавние исследования показывают, что структуры «стебель–петля» мРНК, индуцирующие сдвиг рамки считывания могут нарушать элонгацию трансляции путём докинга А-сайта 30S-субъединицы, препятствующего связыванию тРНК [128]. Более того, при расположении у входа в канал мРНК 30S-субъединицы «стебли–петли» и псевдоузлы, индуцирующие сдвиг рамки считывания, ингибируют скорость рибосомной транслокации более чем на один порядок, что показано в ряде экспериментов с кинетическим ансамблем и с одиночными молекулами [120, 121, 126–129]. Недавно было

показано, что при встрече с элементами вторичной структуры мРНК рибосома перемещается по двум альтернативным (быстрому и медленно) путям [31]. Взаимодействия структур «стебель–петля», индуцирующих сдвиг рамки считывания, или псевдоузлов с каналом входа мРНК могут увеличивать поток через медленный путь и, таким образом, снижать среднюю скорость транслокации рибосом [31].

Многие гениальные идеи Спирина о механизме транслокации рибосомы были подтверждены за последнюю пару десятилетий успехами, достигнутыми благодаря структурам рибосомы с высоким разрешением и биофизическим экспериментам с одиночными молекулами. Тем не менее транслокация рибосомы вдоль молекулы мРНК по-прежнему остается одним из наиболее интересных аспектов биосинтеза белка. Полная картина, воссоздающая структурные перестройки рибосомы, EF-G и тРНК во время транслокации, пока еще не создана. Лишь только начинает формироваться более полное представление о том, как транслокация рибосомы ремоделирует вторичную структуру мРНК и модулирует взаимодействия мРНК с различными регуляторными белками. Механизмы регуляции транслокации рибосомы с помощью вариаций во вторичной структуре мРНК ждут дальнейшего изучения.

**Финансирование.** Работа лаборатории Ермоленко была поддержана Национальным Институтом Здоровья (гранты №№ R01GM099719 и R01GM132041).

**Благодарности.** Эта статья посвящена памяти профессора Спирина, который был руководителем дипломной работы одного из авторов статьи (Д.Н. Ермоленко). Д.Н. Ермоленко выражает благодарность Александру Сергеевичу Спирину за его бесценные уроки критического мышления и строгого подхода к проведению научных исследований. Авторы благодарят Грегори Балларда за его комментарии, касающиеся настоящей статьи.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** В статье не содержатся материалы работ, выполненных кем-либо из авторов, с участием людей или животных.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Spirin, A. S. (1968) How does the ribosome work? A hypothesis based on the two subunit construction of the ribosome, *Curr. Mod. Biol.*, **2**, 115–127, doi: 10.1016/0303-2647(68)90017-8.
2. Spirin, A. S. (1969) A model of the functioning ribosome: locking and unlocking of the ribosome subparticles, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **34**, 197–207, doi: 10.1101/sqb.1969.034.01.026.



3. Spirin, A. S. (1985) Ribosomal translocation: facts and models, *Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.*, **32**, 75-114, doi: 10.1016/s0079-6603(08)60346-3.
4. Spirin, A. S. (2009) The ribosome as a conveying thermal ratchet machine, *J. Biol. Chem.*, **284**, 21103-21119, doi: 10.1074/jbc.X109.001552.
5. Finkelstein, A. V., Razin, S. V., and Spirin, A. S. (2018) Intersubunit mobility of the ribosome, *Mol. Biol. (Mosk.)*, **52**, 921-934, doi: 10.1134/S0026898418060083.
6. Spirin, A. S. (1968) On the mechanism of ribosome function. The hypothesis of locking-unlocking of subparticles [in Russian], *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **179**, 1467-1470.
7. GavriloVA, L. P., and Spirin, A. S. (1971) Stimulation of "non-enzymic" translocation in ribosomes by p-chloromercuribenzoate, *FEBS Lett.*, **17**, 324-326, doi: 10.1016/0014-5793(71)80177-1.
8. GavriloVA, L. P., and Spirin, A. S. (1974) "Nonenzymatic" translation, *Methods Enzymol.*, **30**, 452-462, doi: 10.1016/0076-6879(74)30045-6.
9. Belitsina, N. V., Glukhova, M. A., and Spirin, A. S. (1975) Translocation in ribosomes by attachment-detachment of elongation factor G without GTP cleavage: evidence from a column-bound ribosome system, *FEBS Lett.*, **54**, 35-38, doi: 10.1016/0014-5793(75)81062-3.
10. Belitsina, N. V., Tnalina, G. Z., and Spirin, A. S. (1981) Template-free ribosomal synthesis of polylysine from lysyl-tRNA, *FEBS Lett.*, **131**, 289-292, doi: 10.1016/0014-5793(81)80387-0.
11. Belitsina, N. V., Tnalina, G. Z., and Spirin, A. S. (1982) Template-free ribosomal synthesis of polypeptides from aminoacyl-tRNAs, *Biosystems*, **15**, 233-241, doi: 10.1016/0303-2647(82)90008-9.
12. Spirin, A. S. (2002) Ribosome as a molecular machine, *FEBS Lett.*, **514**, 2-10, doi: 10.1016/s0014-5793(02)02309-8.
13. Spirin, A. S. (2004) The ribosome as an RNA-based molecular machine, *RNA Biol.*, **1**, 3-9, doi: 10.4161/rna.1.1.889.
14. Ling, C., and Ermolenko, D. N. (2016) Structural insights into ribosome translocation, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **7**, 620-636, doi: 10.1002/wrna.1354.
15. Noller, H. F., Lancaster, L., Zhou, J., and Mohan, S. (2017) The ribosome moves: RNA mechanics and translocation, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **24**, 1021-1027, doi: 10.1038/nsmb.3505.
16. Rodnina, M. V., Peske, F., Peng, B. Z., Belardinelli, R., and Wintermeyer, W. (2019) Converting GTP hydrolysis into motion: versatile translational elongation factor G, *Biol. Chem.*, **401**, 131-142, doi: 10.1515/hsz-2019-0313.
17. Mohan, S., Donohue, J. P., and Noller, H. F. (2014) Molecular mechanics of 30S subunit head rotation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 13325-13330, doi: 10.1073/pnas.1413731111.
18. GavriloVA, L. P., Kostiashekina, O. E., Koteliansky, V. E., Rutkevitch, N. M., and Spirin, A. S. (1976) Factor-free ("non-enzymic") and factor-dependent systems of translation of polyuridylic acid by *Escherichia coli* ribosomes, *J. Mol. Biol.*, **101**, 537-552, doi: 10.1016/0022-2836(76)90243-6.
19. Rodnina, M. V., Savelsbergh, A., Katunin, V. I., and Wintermeyer, W. (1997) Hydrolysis of GTP by elongation factor G drives tRNA movement on the ribosome, *Nature*, **385**, 37-41, doi: 10.1038/385037a0.
20. Fredrick, K., and Noller, H. F. (2003) Catalysis of ribosomal translocation by sparsomycin, *Science*, **300**, 1159-1162, doi: 10.1126/science.1084571.
21. Parmeggiani, A., and Sander, G. (1981) Properties and regulation of the GTPase activities of elongation factors Tu and G, and of initiation factor 2, *Mol. Cell. Biochem.*, **35**, 129-158, doi: 10.1007/BF02357085.
22. Moazed, D., Robertson, J. M., and Noller, H. F. (1988) Interaction of elongation factors EF-G and EF-Tu with a conserved loop in 23S RNA, *Nature*, **334**, 362-364, doi: 10.1038/334362a0.
23. Inoue-Yokosawa, N., Ishikawa, C., and Kaziro, Y. (1974) The role of guanosine triphosphate in translocation reaction catalyzed by elongation factor G, *J. Biol. Chem.*, **249**, 4321-4323, doi: 10.1016/S0021-9258(19)42519-2.
24. Belitsina, N. V., Glukhova, M. A., and Spirin, A. S. (1976) Stepwise elongation factor G-promoted elongation of polypeptides on the ribosome without GTP cleavage, *J. Mol. Biol.*, **108**, 609-613, doi: 10.1016/s0022-2836(76)80140-4.
25. Belitsina, N. V., Glukhova, M. A., and Spirin, A. S. (1979) Elongation factor G-promoted translocation and polypeptide elongation in ribosomes without GTP cleavage: use of columns with matrix-bound polyuridylic acid, *Methods Enzymol.*, **60**, 761-779, doi: 10.1016/s0076-6879(79)60070-8.
26. Ermolenko, D. N., and Noller, H. F. (2011) mRNA translocation occurs during the second step of ribosomal intersubunit rotation, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **18**, 457-462, doi: 10.1038/nsmb.2011.
27. Flis, J., Holm, M., Rundlet, E. J., Loerke, J., Hilal, T., et al. (2018) tRNA Translocation by the eukaryotic 80S ribosome and the impact of GTP hydrolysis, *Cell Rep.*, **25**, 2676-2688.e7, doi: 10.1016/j.celrep.2018.11.040.
28. Pan, D., Kirillov, S. V., and Cooperman, B. S. (2007) Kinetically competent intermediates in the translocation step of protein synthesis, *Mol. Cell*, **25**, 519-529, doi: 10.1016/j.molcel.2007.01.014.
29. Salsi, E., Farah, E., and Ermolenko, D. N. (2016) EF-G activation by phosphate analogs, *J. Mol. Biol.*, **428**, 2248-2258, doi: 10.1016/j.jmb.2016.03.032.
30. Joseph, S., and Noller, H. F. (1998) EF-G-catalyzed translocation of anticodon stem-loop analogs of transfer RNA in the ribosome, *EMBO J.*, **17**, 3478-3483, doi: 10.1093/emboj/17.12.3478.
31. Desai, V. P., Frank, F., Lee, A., Righini, M., Lancaster, L., et al. (2019) Co-temporal force and fluorescence measurements reveal a ribosomal gear shift mechanism of translation regulation by structured mRNAs, *Mol. Cell*, **75**, 1007-1019.e5, doi: 10.1016/j.molcel.2019.07.024.
32. Bretscher, M. S. (1968) Translocation in protein synthesis: a hybrid structure model, *Nature*, **218**, 675-677, doi: 10.1038/218675a0.
33. Spirin, A. S., Baranov, V. I., Polubesov, G. S., Serdyuk, I. N., and May, R. P. (1987) Translocation makes the ribosome less compact, *J. Mol. Biol.*, **194**, 119-126, doi: 10.1016/0022-2836(87)90720-0.
34. Serdyuk, I., Baranov, V., Tsalkova, T., Gulyamova, D., Pavlov, M., et al. (1992) Structural dynamics of translating ribosomes, *Biochimie*, **74**, 299-306, doi: 10.1016/0300-9084(92)90107-p.
35. Frank, J., and Gonzalez, R. L., Jr. (2010) Structure and dynamics of a processive Brownian motor: the translating ribosome, *Annu. Rev. Biochem.*, **79**, 381-412, doi: 10.1146/annurev-biochem-060408-173330.
36. Moazed, D., and Noller, H. F. (1989) Intermediate states in the movement of transfer RNA in the ribosome, *Nature*, **342**, 142-148, doi: 10.1038/342142a0.
37. Frank, J., and Agrawal, R. K. (2000) A ratchet-like intersubunit reorganization of the ribosome during translocation, *Nature*, **406**, 318-322, doi: 10.1038/35018597.
38. Valle, M., Zavialov, A., Sengupta, J., Rawat, U., Ehrenberg, M., and Frank, J. (2003) Locking and unlocking of ribosomal motions, *Cell*, **114**, 123-134, doi: 10.1016/S0092-8674(03)00476-8.
39. Korostelev, A., Ermolenko, D. N., and Noller, H. F. (2008) Structural dynamics of the ribosome, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **12**, 674-683, doi: 10.1016/j.cbpa.2008.08.037.
40. Ermolenko, D. N., Majumdar, Z. K., Hickerson, R. P., Spiegel, P. C., Clegg, R. M., and Noller, H. F. (2007) Observation of intersubunit movement of the ribosome in solution using FRET, *J. Mol. Biol.*, **370**, 530-540, doi: 10.1016/j.jmb.2007.04.042.
41. Ermolenko, D. N., Spiegel, P. C., Majumdar, Z. K., Hickerson, R. P., Clegg, R. M., and Noller, H. F. (2007)

- The antibiotic viomycin traps the ribosome in an intermediate state of translocation, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 493-497, doi: 10.1038/nsmb1243.
42. Agirrezabala, X., Lei, J., Brunelle, J. L., Ortiz-Meoz, R. F., Green, R., and Frank, J. (2008) Visualization of the hybrid state of tRNA binding promoted by spontaneous ratcheting of the ribosome, *Mol. Cell*, **32**, 190-197, doi: 10.1016/j.molcel.2008.10.001.
  43. Julian, P., Konevega, A. L., Scheres, S. H., Lazaro, M., Gil, D., et al. (2008) Structure of ratcheted ribosomes with tRNAs in hybrid states, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 16924-16927, doi: 10.1073/pnas.0809587105.
  44. Blanchard, S. C., Kim, H. D., Gonzalez, R. L., Jr., Puglisi, J. D., and Chu, S. (2004) tRNA dynamics on the ribosome during translation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 12893-12898, doi: 10.1073/pnas.0403884101.
  45. Cornish, P. V., Ermolenko, D. N., Noller, H. F., and Ha, T. (2008) Spontaneous intersubunit rotation in single ribosomes, *Mol. Cell*, **30**, 578-588, doi: 10.1016/j.molcel.2008.05.004.
  46. Fei, J., Kosuri, P., MacDougall, D. D., and Gonzalez, R. L., Jr. (2008) Coupling of ribosomal L1 stalk and tRNA dynamics during translation elongation, *Mol. Cell*, **30**, 348-359, doi: 10.1016/j.molcel.2008.03.012.
  47. Marshall, R. A., Aitken, C. E., and Puglisi, J. D. (2009) GTP hydrolysis by IF2 guides progression of the ribosome into elongation, *Mol. Cell*, **35**, 37-47, doi: 10.1016/j.molcel.2009.06.008.
  48. 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.
  49. 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.
  50. Ramrath, D. J., Lancaster, L., Sprink, T., Mielke, T., Loerke, J., et al. (2013) Visualization of two transfer RNAs trapped in transit during elongation factor G-mediated translocation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 20964-20969, doi: 10.1073/pnas.1320387110.
  51. Zhou, J., Lancaster, L., Donohue, J. P., and Noller, H. F. (2014) How the ribosome hands the A-site tRNA to the P site during EF-G-catalyzed translocation, *Science*, **345**, 1188-1191, doi: 10.1126/science.1255030.
  52. Martemyanov, K. A., and Gudkov, A. T. (1999) Domain IV of elongation factor G from *Thermus thermophilus* is strictly required for translocation, *FEBS Lett.*, **452**, 155-159, doi: 10.1016/S0014-5793(99)00635-3.
  53. Niblett, D., Nelson, C., Leung, C. S., Rexroad, G., Cozy, J., et al. (2021) Mutations in domain IV of elongation factor EF-G confer frameshifting, *RNA*, **27**, 40-53, doi: 10.1261/rna.077339.120.
  54. Peng, B. Z., Bock, L. V., Belardinelli, R., Peske, F., Grubmuller, H., and Rodnina, M. V. (2019) Active role of elongation factor G in maintaining the mRNA reading frame during translation, *Sci. Adv.*, **5**, eaax8030, doi: 10.1126/sciadv.aax8030.
  55. Brilot, A. F., Korostelev, A. A., Ermolenko, D. N., and Grigorieff, N. (2013) Structure of the ribosome with elongation factor G trapped in the pretranslocation state, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 20994-20999, doi: 10.1073/pnas.1311423110.
  56. Salsi, E., Farah, E., Dann, J., and Ermolenko, D. N. (2014) Following movement of domain IV of elongation factor G during ribosomal translocation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 15060-15065, doi: 10.1073/pnas.1410873111.
  57. Gao, Y. G., Selmer, M., Dunham, C. M., Weixlbaumer, A., Kelley, A. C., and Ramakrishnan, V. (2009) The structure of the ribosome with elongation factor G trapped in the posttranslocational state, *Science*, **326**, 694-699, doi: 10.1126/science.1179709.
  58. Khade, P. K., and Joseph, S. (2011) Messenger RNA interactions in the decoding center control the rate of translocation, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **18**, 1300-1302, doi: 10.1038/nsmb.2140.
  59. Liu, G., Song, G., Zhang, D., Zhang, D., Li, Z., et al. (2014) EF-G catalyzes tRNA translocation by disrupting interactions between decoding center and codon-anticodon duplex, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **21**, 817-824, doi: 10.1038/nsmb.2869.
  60. Abeyrathne, P. D., Koh, C. S., Grant, T., Grigorieff, N., and Korostelev, A. A. (2016) Ensemble cryo-EM uncovers inchworm-like translocation of a viral IRES through the ribosome, *Elife*, **5**, e14874, doi: 10.7554/eLife.14874.
  61. Taylor, D. J., Nilsson, J., Merrill, A. R., Andersen, G. R., Nissen, P., and Frank, J. (2007) Structures of modified eEF2 80S ribosome complexes reveal the role of GTP hydrolysis in translocation, *EMBO J.*, **26**, 2421-2431, doi: 10.1038/sj.emboj.7601677.
  62. Pestka, S. (1968) Studies on the formation of transfer ribonucleic acid-ribosome complexes. 3. The formation of peptide bonds by ribosomes in the absence of supernatant enzymes, *J. Biol. Chem.*, **243**, 2810-2820, doi: 10.1016/S0021-9258(18)93445-9.
  63. Gavrilo, L. P., Koteliansky, V. E., and Spirin, A. S. (1974) Ribosomal protein S12 and 'non-enzymatic' translocation, *FEBS Lett.*, **45**, 324-328, doi: 10.1016/0014-5793(74)80872-0.
  64. Gavrilo, L. P., and Spirin, A. S. (1974) Interaction of SH-reagents with the ribosomal 30 S subparticle and 'non-enzymatic' translocation, *FEBS Lett.*, **39**, 13-16, doi: 10.1016/0014-5793(74)80005-0.
  65. Cukras, A. R., Southworth, D. R., Brunelle, J. L., Culver, G. M., and Green, R. (2003) Ribosomal proteins S12 and S13 function as control elements for translocation of the mRNA:tRNA complex, *Mol. Cell*, **12**, 321-328, doi: 10.1016/s1097-2765(03)00275-2.
  66. Ermolenko, D. N., Cornish, P. V., Ha, T., and Noller, H. F. (2013) Antibiotics that bind to the A site of the large ribosomal subunit can induce mRNA translocation, *RNA*, **19**, 158-166, doi: 10.1261/rna.035964.112.
  67. Liu, T., Kaplan, A., Alexander, L., Yan, S., Wen, J. D., et al. (2014) Direct measurement of the mechanical work during translocation by the ribosome, *Elife*, **3**, e03406, doi: 10.7554/eLife.03406.
  68. Howard, J. (2006) Protein power strokes, *Curr. Biol.*, **16**, R517-519, doi: 10.1016/j.cub.2006.06.045.
  69. Hwang, W., and Karplus, M. (2019) Structural basis for power stroke vs. Brownian ratchet mechanisms of motor proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 19777-19785, doi: 10.1073/pnas.1818589116.
  70. Peske, F., Matassova, N. B., Savelsbergh, A., Rodnina, M. V., and Wintermeyer, W. (2000) Conformationally restricted elongation factor G retains GTPase activity but is inactive in translocation on the ribosome, *Mol. Cell*, **6**, 501-505, doi: 10.1016/S1097-2765(00)00049-6.
  71. Chen, C., Cui, X., Beausang, J. F., Zhang, H., Farrell, I., et al. (2016) Elongation factor G initiates translocation through a power stroke, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 7515-7520, doi: 10.1073/pnas.1602668113.
  72. Ratje, A. H., Loerke, J., Mikolajka, A., Brunner, M., Hildebrand, P. W., et al. (2010) Head swivel on the ribosome facilitates translocation by means of intra-subunit tRNA hybrid sites, *Nature*, **468**, 713-716, doi: 10.1038/nature09547.
  73. Ryazanov, A. G., Natapov, P. G., Shestakova, E. A., Severin, F. F., and Spirin, A. S. (1988) Phosphorylation of the elongation factor 2: the fifth Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent system of protein phosphorylation, *Biochimie*, **70**, 619-626, doi: 10.1016/0300-9084(88)90245-3.
  74. Ryazanov, A. G., Shestakova, E. A., and Natapov, P. G. (1988) Phosphorylation of elongation factor 2 by EF-2

- kinase affects rate of translation, *Nature*, **334**, 170-173, doi: 10.1038/334170a0.
75. Ryazanov, A. G., Rudkin, B. B., and Spirin, A. S. (1991) Regulation of protein synthesis at the elongation stage. New insights into the control of gene expression in eukaryotes, *FEBS Lett.*, **285**, 170-175, doi: 10.1016/0014-5793(91)80798-8.
  76. Davydova, E. K., and Ovchinnikov, L. P. (1990) ADP-ribosylated elongation factor 2 (ADP-ribosyl-EF-2) is unable to promote translocation within the ribosome, *FEBS Lett.*, **261**, 350-352, doi: 10.1016/0014-5793(90)80589-B.
  77. Ermolenko, D. N., and Mathews, D. H. (2021) Making ends meet: new functions of mRNA secondary structure, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **12**, e1611, doi: 10.1002/wrna.1611.
  78. Lai, W. C., Kayedkhordeh, M., Cornell, E. V., Farah, E., Bellaousov, S., et al. (2018) mRNAs and lncRNAs intrinsically form secondary structures with short end-to-end distances, *Nat. Commun.*, **9**, 4328, doi: 10.1038/s41467-018-06792-z.
  79. Ding, Y., Tang, Y., Kwok, C. K., Zhang, Y., Bevilacqua, P. C., and Assmann, S. M. (2014) *In vivo* genome-wide profiling of RNA secondary structure reveals novel regulatory features, *Nature*, **505**, 696-700, doi: 10.1038/nature12756.
  80. Rouskin, S., Zubradt, M., Washietl, S., Kellis, M., and Weissman, J. S. (2014) Genome-wide probing of RNA structure reveals active unfolding of mRNA structures *in vivo*, *Nature*, **505**, 701-705, doi: 10.1038/nature12894.
  81. Aw, J. G., Shen, Y., Wilm, A., Sun, M., Lim, X. N., et al. (2016) *In vivo* mapping of eukaryotic RNA interactomes reveals principles of higher-order organization and regulation, *Mol. Cell*, **62**, 603-617, doi: 10.1016/j.molcel.2016.04.028.
  82. Lu, Z., Zhang, Q. C., Lee, B., Flynn, R. A., Smith, M. A., et al. (2016) RNA Duplex map in living cells reveals higher-order transcriptome structure, *Cell*, **165**, 1267-1279, doi: 10.1016/j.cell.2016.04.028.
  83. Sharma, E., Sterne-Weiler, T., O'Hanlon, D., and Blencowe, B. J. (2016) Global mapping of human RNA-RNA interactions, *Mol. Cell*, **62**, 618-626, doi: 10.1016/j.molcel.2016.04.030.
  84. Ziv, O., Gabrylska, M. M., Lun, A. T. L., Gebert, L. F. R., Sheu-Gruttadauria, J., et al. (2018) COMRADES determines *in vivo* RNA structures and interactions, *Nat. Methods*, **15**, 785-788, doi: 10.1038/s41592-018-0121-0.
  85. Roth, A., and Breaker, R. R. (2009) The structural and functional diversity of metabolite-binding riboswitches, *Annu. Rev. Biochem.*, **78**, 305-334, doi: 10.1146/annurev.biochem.78.070507.135656.
  86. Giedroc, D. P., and Cornish, P. V. (2009) Frameshifting RNA pseudoknots: structure and mechanism, *Virus Res.*, **139**, 193-208, doi: 10.1016/j.virusres.2008.06.008.
  87. Mauger, D. M., Siegfried, N. A., and Weeks, K. M. (2013) The genetic code as expressed through relationships between mRNA structure and protein function, *FEBS Lett.*, **587**, 1180-1188, doi: 10.1016/j.febslet.2013.03.002.
  88. Leipuviene, R., and Theil, E. C. (2007) The family of iron responsive RNA structures regulated by changes in cellular iron and oxygen, *Cell. Mol. Life Sci.*, **64**, 2945-2955, doi: 10.1007/s00018-007-7198-4.
  89. Simon, A. E., and Miller, W. A. (2013) 3' cap-independent translation enhancers of plant viruses, *Annu. Rev. Microbiol.*, **67**, 21-42, doi: 10.1146/annurev-micro-092412-155609.
  90. Shao, Y., Chan, C. Y., Maliyekkel, A., Lawrence, C. E., Roninson, I. B., and Ding, Y. (2007) Effect of target secondary structure on RNAi efficiency, *RNA*, **13**, 1631-1640, doi: 10.1261/rna.546207.
  91. Lu, Z. J., and Mathews, D. H. (2008) Efficient siRNA selection using hybridization thermodynamics, *Nucleic Acids Res.*, **36**, 640-647, doi: 10.1093/nar/gkm920.
  92. Lu, Z. J., and Mathews, D. H. (2008) Fundamental differences in the equilibrium considerations for siRNA and antisense oligodeoxynucleotide design, *Nucleic Acids Res.*, **36**, 3738-3745, doi: 10.1093/nar/gkn266.
  93. Tafer, H., Ameres, S. L., Obernosterer, G., Gebeshuber, C. A., Schroeder, R., et al. (2008) The impact of target site accessibility on the design of effective siRNAs, *Nat. Biotechnol.*, **26**, 578-583, doi: 10.1038/nbt1404.
  94. Li, X., Quon, G., Lipshitz, H. D., and Morris, Q. (2010) Predicting *in vivo* binding sites of RNA-binding proteins using mRNA secondary structure, *RNA*, **16**, 1096-1107, doi: 10.1261/rna.2017210.
  95. Li, X., Kazan, H., Lipshitz, H. D., and Morris, Q. D. (2014) Finding the target sites of RNA-binding proteins, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **5**, 111-130, doi: 10.1002/wrna.1201.
  96. Takyar, S., Hickerson, R. P., and Noller, H. F. (2005) mRNA helicase activity of the ribosome, *Cell*, **120**, 49-58, doi: 10.1016/j.cell.2004.11.042.
  97. Wen, J. D., Lancaster, L., Hodges, C., Zeri, A. C., Yoshimura, S. H., et al. (2008) Following translation by single ribosomes one codon at a time, *Nature*, **452**, 598-603, doi: 10.1038/nature06716.
  98. 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.
  99. Balakin, A., Skripkin, E., Shatsky, I., and Bogdanov, A. (1990) Transition of the mRNA sequence downstream from the initiation codon into a single-stranded conformation is strongly promoted by binding of the initiator tRNA, *Biochim. Biophys. Acta*, **1050**, 119-123, doi: 10.1016/0167-4781(90)90151-q.
  100. De Smit, M. H., and van Duin, J. (1990) Secondary structure of the ribosome binding site determines translational efficiency: a quantitative analysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 7668-7672, doi: 10.1073/pnas.87.19.7668.
  101. Poot, R. A., Tsareva, N. V., Boni, I. V., and van Duin, J. (1997) RNA folding kinetics regulates translation of phage MS2 maturation gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 10110-10115, doi: 10.1073/pnas.94.19.10110.
  102. Del Campo, C., Bartholomaeus, A., Fedyunin, I., and Ignatova, Z. (2015) Secondary Structure across the bacterial transcriptome reveals versatile roles in mRNA regulation and function, *PLoS Genet.*, **11**, e1005613, doi: 10.1371/journal.pgen.1005613.
  103. Khong, A., and Parker, R. (2020) The landscape of eukaryotic mRNPs, *RNA*, **26**, 229-239, doi: 10.1261/rna.073601.119.
  104. Adivarahan, S., Livingston, N., Nicholson, B., Rahman, S., Wu, B., Rissland, O. S., and Zenklusen, D. (2018) Spatial organization of single mRNPs at different stages of the gene expression pathway, *Mol. Cell*, **72**, 727-738.e5, doi: 10.1016/j.molcel.2018.10.010.
  105. Khong, A., and Parker, R. (2018) mRNP architecture in translating and stress conditions reveals an ordered pathway of mRNP compaction, *J. Cell Biol.*, **217**, 4124-4140, doi: 10.1083/jcb.201806183.
  106. Maquat, L. E., Tarn, W. Y., and Isken, O. (2010) The pioneer round of translation: features and functions, *Cell*, **142**, 368-374, doi: 10.1016/j.cell.2010.07.022.
  107. Metkar, M., Ozadam, H., Lajoie, B. R., Imakaev, M., Mirny, L. A., et al. (2018) Higher-order organization principles of pre-translational mRNPs, *Mol. Cell*, **72**, 715-726.3, doi: 10.1016/j.molcel.2018.09.012.
  108. Cetin, B., Song, G. J., and O'Leary, S. E. (2020) Heterogeneous dynamics of protein-RNA interactions across transcriptome-derived messenger RNA populations, *J. Am. Chem. Soc.*, **142**, 21249-21253, doi: 10.1021/jacs.0c09841.

109. Yan, S., Wen, J. D., Bustamante, C., and Tinoco, I., Jr. (2015) Ribosome excursions during mRNA translocation mediate broad branching of frameshift pathways, *Cell*, **160**, 870-881, doi: 10.1016/j.cell.2015.02.003.
110. Doma, M. K., and Parker, R. (2006) Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation, *Nature*, **440**, 561-564, doi: 10.1038/nature04530.
111. Young, J. C., and Andrews, D. W. (1996) The signal recognition particle receptor alpha subunit assembles co-translationally on the endoplasmic reticulum membrane during an mRNA-encoded translation pause *in vitro*, *EMBO J.*, **15**, 172-181.
112. Caliskan, N., Peske, F., and Rodnina, M. V. (2015) Changed in translation: mRNA recoding by -1 programmed ribosomal frameshifting, *Trends Biochem. Sci.*, **40**, 265-274, doi: 10.1016/j.tibs.2015.03.006.
113. Tsuchihashi, Z., and Kornberg, A. (1990) Translational frameshifting generates the gamma subunit of DNA polymerase III holoenzyme, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 2516-2520, doi: 10.1073/pnas.87.7.2516.
114. Belew, A. T., Meskauskas, A., Musalgaonkar, S., Advani, V. M., Sulima, S. O., et al. (2014) Ribosomal frameshifting in the CCR5 mRNA is regulated by miRNAs and the NMD pathway, *Nature*, **512**, 265-269, doi: 10.1038/nature13429.
115. Jacks, T., Power, M. D., Masiarz, F. R., Luciw, P. A., Barr, P. J., and Varmus, H. E. (1988) Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression, *Nature*, **331**, 280-283, doi: 10.1038/331280a0.
116. Kelly, J. A., Olson, A. N., Neupane, K., Munshi, S., San Emeterio, J., et al. (2020) Structural and functional conservation of the programmed -1 ribosomal frameshift signal of SARS coronavirus 2 (SARS-CoV-2), *J. Biol. Chem.*, **295**, 10741-10748, doi: 10.1074/jbc.AC120.013449.
117. Kelly, J. A., Woodside, M. T., and Dinman, J. D. (2021) Programmed -1 ribosomal frameshifting in coronaviruses: a therapeutic target, *Virology*, **554**, 75-82, doi: 10.1016/j.virol.2020.12.010.
118. Qu, X., Wen, J. D., Lancaster, L., Noller, H. F., Bustamante, C., and Tinoco, I., Jr. (2011) The ribosome uses two active mechanisms to unwind messenger RNA during translation, *Nature*, **475**, 118-121, doi: 10.1038/nature10126.
119. Chen, C., Zhang, H., Broitman, S. L., Reiche, M., Farrell, I., et al. (2013) Dynamics of translation by single ribosomes through mRNA secondary structures, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **20**, 582-588, doi: 10.1038/nsmb.2544.
120. Chen, J., Petrov, A., Johansson, M., Tsai, A., O'Leary, S. E., and Puglisi, J. D. (2014) Dynamic pathways of -1 translational frameshifting, *Nature*, **512**, 328-332, doi: 10.1038/nature13428.
121. Kim, H. K., Liu, F., Fei, J., Bustamante, C., Gonzalez, R. L., Jr., and Tinoco, I., Jr. (2014) A frameshifting stimulatory stem loop destabilizes the hybrid state and impedes ribosomal translocation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 5538-5543, doi: 10.1073/pnas.1403457111.
122. Tu, C., Tzeng, T. H., and Bruenn, J. A. (1992) Ribosomal movement impeded at a pseudoknot required for frameshifting, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 8636-8640, doi: 10.1073/pnas.89.18.8636.
123. Somogyi, P., Jenner, A. J., Brierley, I., and Inglis, S. C. (1993) Ribosomal pausing during translation of an RNA pseudoknot, *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 6931-6940, doi: 10.1128/mcb.13.11.6931-6940.1993.
124. Lopinski, J. D., Dinman, J. D., and Bruenn, J. A. (2000) Kinetics of ribosomal pausing during programmed -1 translational frameshifting, *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 1095-1103, doi: 10.1128/mcb.20.4.1095-1103.2000.
125. Kontos, H., Naphine, S., and Brierley, I. (2001) Ribosomal pausing at a frameshifter RNA pseudoknot is sensitive to reading phase but shows little correlation with frameshift efficiency, *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 8657-8670, doi: 10.1128/MCB.21.24.8657-8670.2001.
126. Caliskan, N., Katunin, V. I., Belardinelli, R., Peske, F., and Rodnina, M. V. (2014) Programmed -1 frameshifting by kinetic partitioning during impeded translocation, *Cell*, **157**, 1619-1631, doi: 10.1016/j.cell.2014.04.041.
127. Caliskan, N., Wohlgemuth, I., Korniy, N., Pearson, M., Peske, F., and Rodnina, M. V. (2017) Conditional switch between frameshifting regimes upon translation of dnaX mRNA, *Mol. Cell*, **66**, 558-567.e554, doi: 10.1016/j.molcel.2017.04.023.
128. Bao, C., Loerch, S., Ling, C., Korostelev, A. A., Grigorieff, N., and Ermolenko, D. N. (2020) mRNA stem-loops can pause the ribosome by hindering A-site tRNA binding, *Elife*, **9**, e55799, doi: 10.7554/eLife.55799.
129. Choi, J., O'Loughlin, S., Atkins, J. F., and Puglisi, J. D. (2020) The energy landscape of -1 ribosomal frameshifting, *Sci. Adv.*, **6**, eaax6969, doi: 10.1126/sciadv.aax6969.

## RIBOSOME AS A TRANSLOCASE AND HELICASE

### Review

C. Bao and D. N. Ermolenko\*

*Department of Biochemistry & Biophysics, School of Medicine and Dentistry  
and Center for RNA Biology, University of Rochester, Rochester, NY, USA;  
e-mail: Chen\_Bao@URMC.Rochester.edu; dmitri\_ermolenko@urmc.rochester.edu*

During protein synthesis, ribosome moves along mRNA to decode one codon after the other. Ribosome translocation is induced by a universally conserved protein, elongation factor G (EF-G) in bacteria and elongation factor 2 (EF-2) in eukaryotes. EF-G-induced translocation results in unwinding of the intramolecular secondary structures of mRNA by three base pairs at a time that renders the translating ribosome a processive helicase. Professor Alexander Sergeevich Spirin has made numerous seminal contributions to understanding the molecular mechanism of translocation. Here, we review Spirin's insights into the ribosomal translocation and recent advances in the field that stemmed from Spirin's pioneering work. We also discuss key remaining challenges in studies of translocase and helicase activities of the ribosome.

**Keywords:** ribosome, translocation, helicase, power stroke, Brownian ratchet