

УДК 577.21

РАЗЛИЧИЯ И СХОДСТВО ПРОЦЕССОВ ТЕРМИНАЦИИ ТРАНЛЯЦИИ И СПАСЕНИЯ РИБОСОМЫ В БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ И В МИТОХОНДРИЯХ И ЦИТОПЛАЗМЕ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

Обзор

© 2021 А.А. Коростелев

*RNA Therapeutics Institute, Department of Biochemistry and Molecular Pharmacology, UMass Medical School,
Worcester, MA, USA; e-mail: Andrei.Korostelev@umassmed.edu*

Поступила в редакцию 24.05.2021

После доработки 24.05.2021

Принята к публикации 17.06.2021

Когда рибосома встречает стоп-кодон на молекуле мРНК, она прекращает процесс трансляции, высвобождает вновь синтезированный белок и разбирается на субъединицы, чтобы инициировать процесс трансляции на новой мРНК. Терминация трансляции является высоко динамичным процессом, в котором рилизинг-факторы (RF1 и RF2 у бактерий и eRF1 • eRF3 • ГТФ у эукариот) координируют высвобождение пептида с крупномасштабными молекулярными перестройками рибосомы. Рибосомы, остановившиеся на аберрантных мРНК, освобождаются и рециклируются различными бактериальными, митохондриальными или цитоплазматическими механизмами контроля качества. Эти механизмы работают при участии факторов спасения, обладающих пептидил-тРНК гидролазной активностью (бактериальные факторы ArfA • RF2 и ArfB, митохондриальные факторы ICT1 и mtRF-R и цитоплазматический фактор Vms1), которые отличаются друг от друга и от рилизинг-факторов. Тем не менее в результате проведённых недавно структурных исследований было показано замечательное сходство между механизмами терминации трансляции и спасения рибосомы. В этом обзоре описывается, как в этих механизмах используется внутренняя динамика рибосомы, подчёркивая активную роль рибосомы на всех этапах процесса трансляции.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: трансляция, терминация, рибосома, спасение.

DOI: 10.31857/S0320972521090062

ВВЕДЕНИЕ

Трансляция мРНК в белок начинается со стартового кодона (обычно кодона AUG) и заканчивается одним из трёх стоп-кодонов: UAA, UAG или UGA [1, 2]. Для своевременного биосинтеза белков, рециклизации рибосомы и инициации трансляции необходим точный и эффективный процесс терминации [3, 4]. В отличие от смысловых кодонов, которые распознаются различными аминоксил-тРНК, стоп-кодонами распознаются рилизинг-факторами: RF1 или RF2 у бактерий и aRF1/eRF1 у архей/эукариот [5–9]. Кроме того, в процессе терминации принимают участие рилизинг-факторы с ГТФазной активностью, такие как несущественный фактор RF3 у некоторых бактерий и не-

заменяемые факторы aRF3/eRF3 у архей/эукариот. Показано, что они выполняют различные функции в этих доменах жизни. Понимание подробных структурных механизмов терминации трансляции имеет большое значение в связи с фундаментальной ролью процесса терминации в биосинтезе белка, проиллюстрированной катастрофическими последствиями мутаций или других изменений структуры мРНК, которые приводят к аберрантному высвобождению. Например, большая часть генетических нарушений вызвана преждевременными стоп-кодонами, приводящими к образованию укороченных белков и деградации мРНК [10].

Кроме рилизинг-факторов, в бактериальных и эукариотических митохондриальных и цитоплазматических системах трансляции недавно были идентифицированы различные RF-подобные белки, которые могут смягчать трансляционный стресс. В их число входят механизмы спасения рибосом и контроля качества, которые способствуют рециклизации рибосом, остано-

Принятые сокращения: крио-ЭМ – криогенная электронная микроскопия; DC – центр декодирования; H69 – 23S-спираль 69; PTS – пептидил-трансферазный центр; RF – рилизинг-фактор.

вившихся на aberrантных молекулах мРНК. Последние включают укороченные мРНК и мРНК с неоптимальными (редкими) кодонами или структурными особенностями (например, вторичной структурой мРНК или сайтами связывания с белками), которые предотвращают процесс элонгации рибосом. Распознавание, высвобождение пептида и рециклинг остановленных рибосом достигается независимыми путями, включая участие ArfA и ArfB у бактерий, mtRF1a и mtRF-R в митохондриях и Dom34 и Vms1 в цитоплазме эукариот. Недавние биофизические и структурные исследования продемонстрировали ключевую роль динамики рибосомы в процессах трансляции, терминации и спасения самой рибосомы. Механика перестройки рибосом переключается с моделями, предложенными Александром Спириным для транслокации рибосом вдоль мРНК, включая крупномасштабные перестройки субъединиц рибосомы [11, 12]. Эти данные подчеркивают, что рибосома играет основную механическую роль на всех этапах трансляции, включая терминацию и спасение рибосом.

ТЕРМИНАЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ У БАКТЕРИЙ И МИТОХОНДРИЙ

Рилизинг-факторы являются бифункциональными белками: они распознают стоп-кодон и катализируют гидролиз сложноэфирной связи в пептидил-тРНК. Бактериальные рилизинг-факторы RF1/RF2 независимо распознают кодоны UAA, UAG/UAA и UGA соответственно. Эти белки длиной ~350–380 а.о. включают супердомен распознавания кодонов (домены 2 и 4), который связывается с малой 30S-субъединицей рибосомы, и каталитический домен 3, который связывается с большой 50S-субъединицей рибосомы (рис. 1, a–c). Подвижный домен 1 взаимодействует с периферическим L11-выступом на 50S-субъединице (рис. 1, b–c), способствуя связыванию RF с рибосомой [13, 14]. Супердомен распознавания кодонов содержит консервативный мотив P¹⁸⁴X^T¹⁸⁶ (где X часто представлен A, V или другой короткой аминокислотой) в RF1 или мотив S²⁰⁶P^F²⁰⁸ в RF2 [15, 16], которые взаимодействуют со стоп-кодонами (для бактериальных белков и РНК приводит-

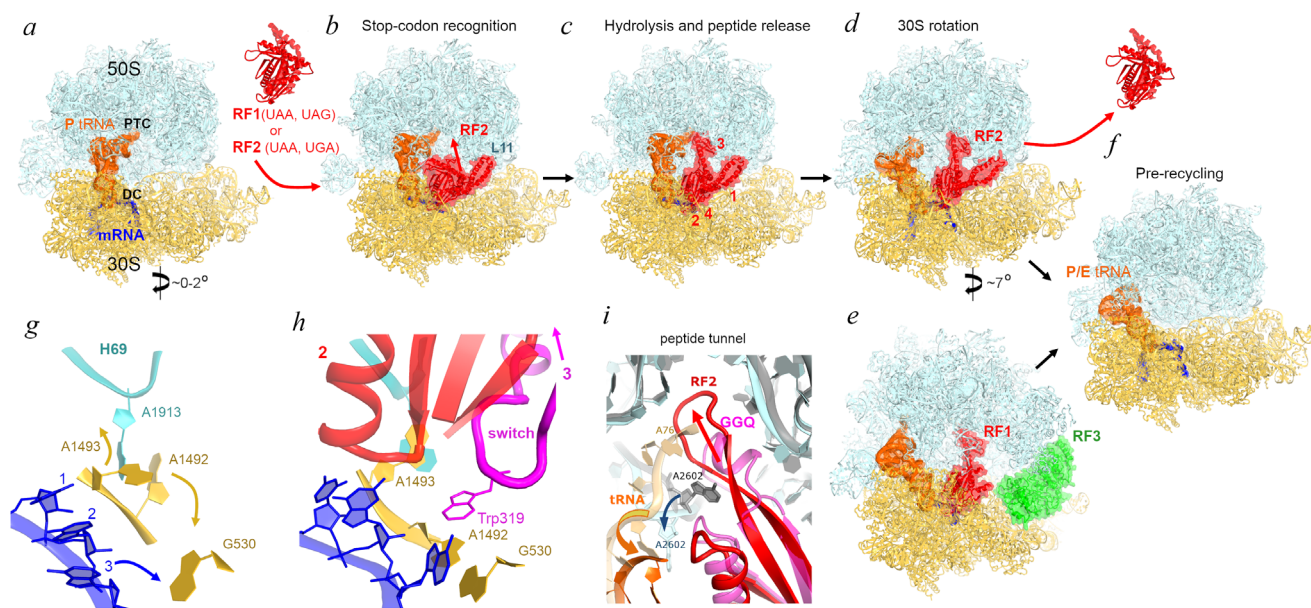


Рис. 1. Терминация трансляции у бактерий происходит вследствие крупномасштабных конформационных изменений. a–d – Крио-ЭМ-структуры, демонстрирующие перестройки рилизинг-факторов и межсубъединичное вращение бактериальной 70S-рибосомы после распознавания стоп-кодона и высвобождения пептида. Показан белок RF2 *E. coli*: панели (b и c) [51] и d [61]. Центр декодирования (DC) и пептидил-трансферазный центр (PTC) отмечены на панели (a). Кристаллическая структура свободного RF2 показана между панелями (a) и (b) [40]. Доменная организация RF1/RF2 показана арабскими цифрами на панели (c). e – Крио-ЭМ-структура RF1 и RF3 на рибосоме *E. coli* с P/E тРНК и повернутой 30S-субъединицей [58]. f – Крио-ЭМ-структура рибосомы *E. coli* до рециклинга с P/E тРНК и повернутой 30S-субъединицей после диссоциации факторов высвобождения [61]. g и h – Перемещение кодона и DC после связывания RF2 (Структура II в [61]). Стоп-кодон и DC на панели g были смоделированы на основе Структуры I в [54]. i – Перемещение RF2 в PTC [61]. Каталитическая конформация RF2 с GGQ-несущей α -спиралью показана розовым цветом, и рибосома окрашена в серый цвет. Конформация β -шпильки RF2 (красный) совпадает с перемещением A2602 и отходом тРНК (оранжевый) из PTC (сине-зеленый)

ся цифровое обозначение остатков, характерное для *Escherichia coli*, если не указано иное) [17–20]. В биохимических исследованиях и с помощью мутационного анализа были установлены другие аминокислотные остатки домена 2, имеющие важное значение для обеспечения специфичности связывания рилизинг-факторов со стоп-кодонами [21, 22].

Каталитический домен 3 содержит длинную α -спираль, заканчивающуюся универсально консервативным мотивом GGQ (рис. 1, с и 2, с), который, как было показано в ранних исследованиях, играет ключевую роль в катализе [23, 24]. Замены глицина в бактериальных и эукариотических рилизинг-факторах вызывали их инактивацию [24–26]. Напротив, замены остатков глутамина RF не влияли на каталитическую активность [25, 27, 28], за исключением мутантных форм с мотивом GGP, которые были неактивными [18, 29]. Эти исследования показывают, что уникальная конформация GGQ очень важна для проявления каталитической активности рилизинг-факторов.

Кристаллографические исследования высокого разрешения позволили получить подробную картину процесса распознавания стоп-кодонов и каталитического механизма действия рилизинг-факторов на все три стоп-кодона [17–20] (см. обзоры [30–34]). Последние достижения в области криогенной электронной микроскопии (крио-ЭМ) позволяют определять ранее недостижимые переходные состояния макромолекул с разрешением, близким к атомному. Вместе с результатами биохимических и биофизических исследований [35–38], недавние структурные исследования позволяют почти полностью реконструировать динамический механизм терминации – от начального распознавания стоп-кодона до гидролиза пептидил-тРНК и диссоциации RF.

Динамические рилизинг-факторы имеют важное значение для правильной терминации трансляции. В клетке RF могут стохастически связываться с А-сайтом рибосомы, содержащим смысловой или стоп-кодон. Для точности терминации гидролазная функция должна быть строго координирована с распознаванием стоп-кодона. Эта координация достигается путем предотвращения вставки каталитического домена 3 в пептидил-трансферазный центр (РТС), если только супердомен распознавания кодонов не размещён в А-сайте, содержащем стоп-кодон. Кристаллические структуры и исследования в растворах показали, что свободные рилизинг-факторы принимают компактную конформацию [39–42], при которой каталитический домен упакован в домен распознавания кодо-

на (рис. 1, а и b). Однако в ранних структурных исследованиях было показано, что в рибосоме RF находятся в раздвинутой («открытой») конформации (рис. 1, с), в которой RF1 или RF2 в А-сайте рибосомы соединяют 30S- и 50S-субъединицы [17–20, 43, 44]. На основании этих результатов была предложена привлекательная гипотеза о том, что рилизинг-факторы выбирают А-сайт рибосомы, находясь в компактной конформации, при которой мотив GGQ располагается далеко от РТС. Было высказано предположение, что «открытие» рилизинг-фактора происходит после распознавания стоп-кодона [17, 43, 45–47]. Структурные доказательства такого перехода были получены лишь недавно. Кристаллографические исследования со сверхточным мутантом RF1 и антибиотиком бластицидином S (BlaS) зафиксировали кодон-распознающий супердомен в А-сайте, в то время как каталитический домен был в неупорядоченном состоянии в межсубъединичном пространстве в связи с динамическими перестройками рилизинг-факторов на рибосоме [48]. Последующие крио-ЭМ-исследования визуализировали компактный RF2 на рибосоме, связанный с альтернативным рилизинг-фактором А (ArfA; [49]), и мутантом ArfA [50], что подчёркивает сродство компактизованных рилизинг-факторов к рибосоме (рис. 2, а). ArfA помогает RF2 распознавать рибосомы без стоп-кодонов (обсуждается ниже), поэтому структурная динамика RF на терминирующей рибосоме оставалась неясной до недавнего исследования крио-ЭМ в реальном времени [51]. В этом исследовании удалось получить как RF1, так и RF2 в компактной неактивной конформации в ранние моменты реакции терминации (рис. 1, b). Они перестроились в каталитически активную открытую конформацию в более поздние моменты времени (рис. 1, с; [51]). Открытие RF сопряжено с локальной перестройкой DC рибосомы (т.е., А-сайта 30S-субъединицы) и РТС на 50S-субъединице, что совместно обеспечивает высокую точность терминации трансляции.

Локальные перестройки в центре декодирования и пептидил-трансферазном центре. DC образован универсально консервативными остатками малой рибосомной РНК (G530, A1493 и A1493 16S рРНК *E. coli*), которые определяют точность декодирования мРНК. Во время элонгации эти нуклеотиды стабилизируют спаривание оснований Уотсона–Крика между кодоном мРНК и антикодоном тРНК и обеспечивают точность элонгации [52–54]. Эти нуклеотиды также необходимы во время терминации, поскольку они способствуют открытию рилизинг-фактора для катализа высвобождения пепти-

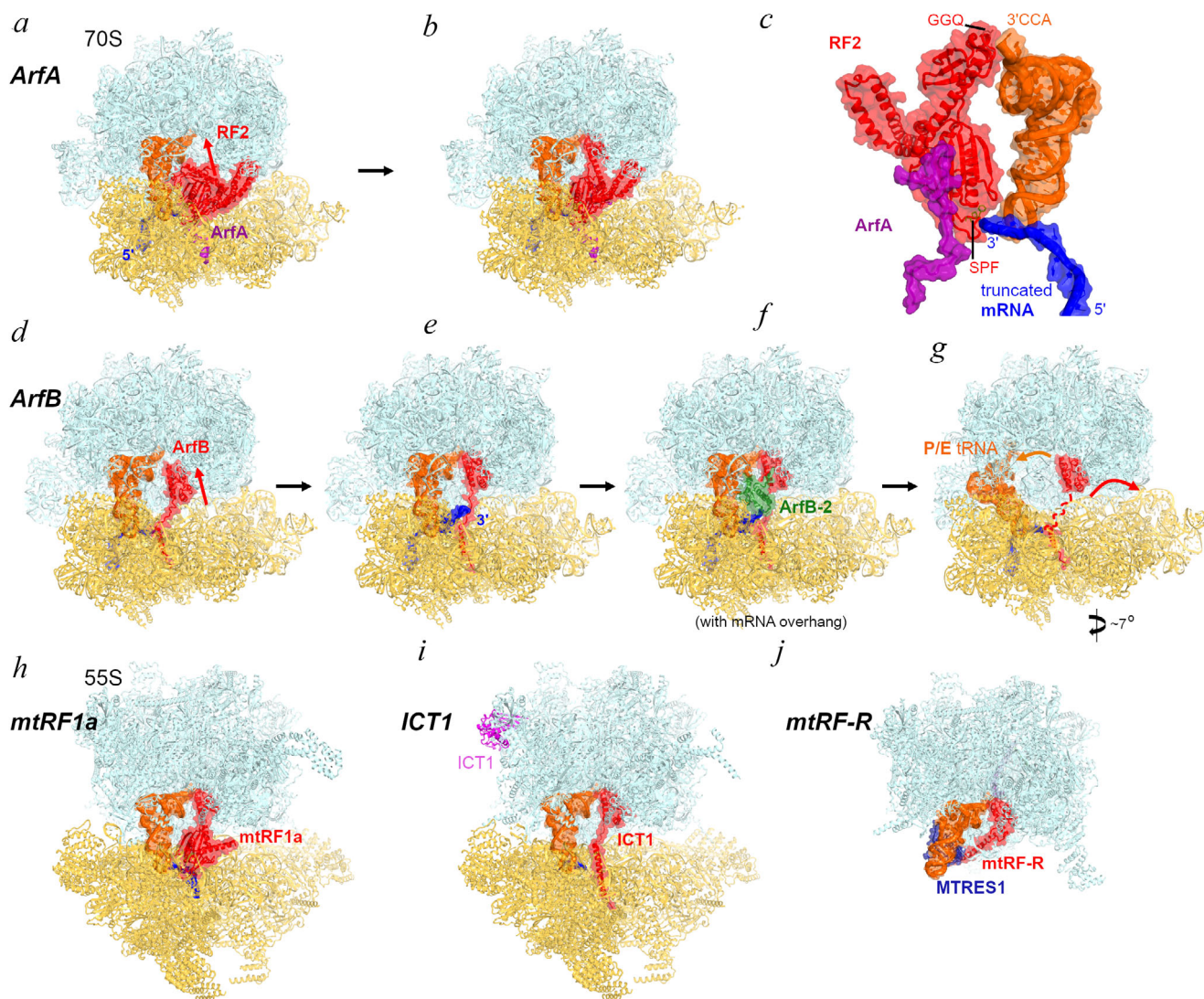


Рис. 2. Механизмы спасения и высвобождения рибосом с участием бактериальных факторов ArfA и ArfB и митохондриальных факторов mtRF1a, ICT1 и mtRF-R. *a* и *b* – Крио-ЭМ-структуры рибосом *E. coli* с укороченной мРНК, ArfA и компактным (*a*) или развёрнутым (*b*) RF2 [49]. *c* – Крупный план взаимодействия между ArfA, RF2, мРНК и тРНК в Р-сайте рибосомы. *d–g* – Крио-ЭМ-структуры рибосом *E. coli* с укороченной мРНК (с выступом длиной 0 или 9 нуклеотидов после кодона Р-сайта) и ArfB [110, 111]. *h* – Крио-ЭМ-структура терминирующего комплекса 55S митохондрий свиньи с mtRF1a, связанным со стоп-кодоном [87], очень напоминает бактериальные терминальные комплексы с RF1. *i* – Крио-ЭМ-структура митохондриального комплекса спасения 55S с ICT1 [87] очень напоминает бактериальный комплекс 70S с ArfB [сравните с панелью (*e*)]. *j* – Крио-ЭМ-структура большой митохондриальной субъединицы, связанной с фактором спасения человека mtRF-R и вспомогательным фактором MTRES1 [98]

да (рис. 1, *g* и *h*; [17]). В частности, «терминирующая» конформация DC может вмещать гибкий линкерный участок между кодон-распознающим и каталитическим доменами RF (рис. 1, *h*), который называется петлёй переключения (а.о. ~290–305 в RF1 и а.о. ~310–325 в RF2) и обладает гибкостью в компактизованном рилизинг-факторе [51]. Распознавание стоп-кодона RF приводит к стекингу третьего нуклеотида стоп-кодона на G530 и перемещению A1492 и A1493 в специфичную для терминации конформацию (рис. 1, *g* и *h*). Упаковка петли пере-

ключения (с Trp319 в RF2) против A1492 и A1493 направляет домен 3 в РТС, приводя к активации развёрнутого RF (рис. 1, *h*). В соответствии с основной ролью переключающей петли, её мутации нарушают динамику открытия RF и изменяют точность процесса терминации [19, 48].

В пептидил-трансферазном центре мотив GGQ располагается таким образом, чтобы катализировать гидролиз сложноэфирной связи, связывающей образующийся пептид с тРНК в Р-сайте [17]. Кристаллические структуры, выполненные при высоком разрешении, показали,

что A2602, необходимый для эффективности терминации [55–57], содействует докингу мотива GGQ в РТС за счёт стекинга на консервативном остатке Arg256 (RF1). Мотив GGQ образует короткую α -спираль (рис. 1, *i*), в которой амид основной цепи глутамин расположен рядом с рибозой концевого нуклеотида Р-тРНК A76. NH-группа расположена таким образом, чтобы стабилизировать промежуточное переходное состояние и уходящую группу [17], в соответствии с основной каталитической ролью глутаминового остова [29].

После гидролиза пептидил-тРНК и пептид, и рилизинг-фактор должны диссоциировать из рибосомы, чтобы позволить ей разделиться на субъединицы и начать новый раунд трансляции. Два крио-ЭМ-исследования сообщили о нескольких структурах, которые предполагают конформационные перестройки, приводящие к диссоциации RF1 и RF2. Был визуализирован комплекс рибосомы со связанным RF1 с использованием Api137 [58], который связывается с рибосомным туннелем и задерживает RF1 на рибосоме [59]. Этот комплекс образовывался в присутствии ГТФазы RF3, которая стимулирует диссоциацию RF1 [35, 60]. В другом исследовании были получены структуры комплекса со связанным RF2 и без RF3, что соответствует независимой от RF3 диссоциацией RF2 [35]. Структуры визуализировали ретракцию деацилированного 3'-конца тРНК ССА из РТС, связанную с поворотом A2602 из его GGQ-координирующего положения (рис. 1, *i*). GGQ-несущий мотив RF2 был перемещён в длинную β -спираль, которая простиралась в рибосомный туннель, как если бы закупоривала РТС (рис. 1, *i*). Это говорит о том, что верхушка каталитического домена может перестраиваться таким образом, чтобы смещать диффузию вновь формируемого белка в направлении выхода из туннеля, облегчая высвобождение белка из рибосомы.

Межсубъединичное вращение после высвобождения пептида сопряжено с диссоциацией RF. Во время трансляции рибосома подвергается ряду межсубъединичных перестроек. На стадии элонгации тРНК и мРНК перемещаются внутри рибосомы, поскольку малая субъединица спонтанно поворачивается на $\sim 10^\circ$ и связывает ГТФазную транслоказу EF-G в бактериях или eEF2 у эукариот [33, 62–66]. Напротив, крупномасштабные перестройки рибосомы не считались частью механизма терминации. Действительно, исследования FRET и рентгеновская кристаллография показали, что RF связывают и стабилизируют не повёрнутую рибосому [35–37, 67] как в пред-реакционных [68], так и

в пост-реакционных состояниях [17–20]. Однако недавние биофизические наблюдения показали, что взаимодействие рилизинг-факторов с рибосомой ассоциировано с крупномасштабной динамикой рибосомы [35]. Последующие крио-ЭМ-исследования визуализировали RF1 [58] и RF2 [61], связанные с рибосомой в различных вращательных состояниях, отличных от ранее определенных кристаллических структур. Были получены изображения того, как перестройки рибосом облегчают диссоциацию RF из рибосомы.

После гидролиза пептидил-тРНК рибосома содержит деацилированную тРНК в Р-сайте и рилизинг-фактор в А-сайте (рис. 1, *c*). Благодаря пониженному сродству деацил-тРНК к Р-сайту на 50S-субъединице (в сравнении со сродством пептидил-тРНК) и повышенному сродству к Е-сайту на 50S-субъединице, тРНК может принимать гибридное состояние Р/Е, в котором акцепторное плечо переносится на большую субъединицу. Исследования FRET и крио-ЭМ показали, что деацил-тРНК может спонтанно колебаться на развёрнутой рибосоме между классическим Р/Р- и гибридным Р/Е-состояниями, совпадая с не повёрнутой и повёрнутой конформациями рибосомы соответственно [37, 69–74]. Подобные колебания могут происходить в присутствии RF [58, 61]. Постепенное вращение малой субъединицы связано с движением каталитического домена рилизинг-фактора из РТС, в то время как домен распознавания кодонов остаётся прикреплённым к DC [61]. При повороте малой субъединицы примерно на 7° наблюдается равновесие структур со связанным RF2 и без него, это позволяет предположить, что RF2 диссоциирует в основном из повёрнутой конформации рибосомы (рис. 1, *d* и *f*). Точно так же RF1 диссоциирует в присутствии ГТФазы RF3 (рис. 1, *e*), которая стабилизирует конформацию повёрнутой рибосомы [58, 75–78]. Примечательно, что RF3 не консервативен у бактерий [79], и он незаменим для роста *E. coli* [80, 81]. Это означает, что RF1 может осуществлять терминацию и диссоциировать без RF3, и что диссоциация как RF1, так и RF2 управляется перестройками рибосом. Дестабилизация RF на малой субъединице сопряжена с разборкой центрального межсубъединичного мостика, образованного 23S-спиралью 69 (H69) и декодирующим центром (рис. 1, *h*). В повёрнутой рибосоме без RF2 H69 отделяется от DC и прикрепляется к 50S-субъединице вблизи A2602, указывая тем самым, что реструктуризация рибосомы совпадает с локальными перестройками РТС после высвобождения пептида [61]. В этом положении H69 будет конфлик-

товать с RF2 в соответствии с состоянием после диссоциации RF2. В случае отделения H69 от малой субъединицы рибосома становится субстратом, с которым связывается фактор рециклинга рибосомы RRF [82, 83], расщепляющий рибосому на субъединицы с помощью EF-G.

Митохондрии кодируют два RF-подобных белка, mtRF1a и mtRF1, но только для mtRF1a было показано, что он катализирует процесс терминации трансляции [84]. Как и бактериальный RF1, mtRF1a человека (HMRF1L) содержит мотив P²⁰⁶KT²⁰⁸ и катализирует высвобождение пептида на стоп-кодонах UAA и UAG [85, 86] (для эукариотических белков используются номера аминокислотных остатков в белках человека, если не указано иное). Недавняя крио-ЭМ-работа визуализировала комплекс терминации митохондрий свиньи с mtRF1a (рис. 2, *h*; [87]). Взаимодействия домена распознавания кодонов, петли переключения и домена 3 с рибосомой демонстрируют, что структурные механизмы распознавания кодонов и терминации с помощью mtRF1a сходны с механизмами действия RF1. Хотя диссоциацию mtRF1a ещё предстоит визуализировать, сохранение межсубъединичных перестроек в миторибосомах [88, 89] указывает на то, что диссоциация mtRF1a при отсутствии митохондриального ортолога RF3 может быть сходна с диссоциацией RF2.

Напротив, остаётся неясной функция mtRF1 [84]. Этот биоинформатически идентифицированный гомолог RF1, состоящий из ~445 а.о. [90], имеет *N*-концевое удлинение домена 1 (~70 а.о.), которое может влиять на связывание с рибосомой. Более того, супердомен распознавания кодонов существенно отличается от такового в RF1 и содержит мотив P²⁶⁴EVGLS²⁶⁹ и другие расширения, которые, вероятно, несовместимы с кодонами мРНК в А-сайте [91, 92]. Было высказано предположение, что mtRF1 распознает кодоны аргинина (AGA и AGG), которые, как полагали, были переназначены как кодоны терминации в митохондриях [93]. Однако не удалось обнаружить связывающую или каталитическую активность mtRF1 на рибосомах с мРНК, содержащих стоп-кодонами или кодонами аргинина. В результате этот белок не может компенсировать делецию гомолога функционального RF у дрожжей [85–87]. В последующей работе было показано, что терминация на кодонах аргинина в митохондриях человека происходит вследствие отсутствия тРНК, способных декодировать эти кодоны, приводящие к сдвигу рамки –1, который позиционирует кодон UAG в А-сайте для канонической терминации с помощью

mtRF1a [94]. Поскольку mtRF1 несёт консервативный каталитический домен с мотивом GGQ, mtRF1 может участвовать в механизме контроля качества, который распознает специфическую конформацию А-сайта рибосомы [92] и/или требует дополнительных факторов, которые ещё предстоит определить.

СПАСЕНИЕ ОСТАНОВИВШИХСЯ РИБОСОМ С ПОМОЩЬЮ МЕХАНИЗМОВ ТЕРМИНАЦИИ У БАКТЕРИЙ И МИТОХОНДРИЙ

Рибосомы останавливаются на молекулах мРНК, которые либо укорочены, не содержат стоп-кодон, либо же останавливают рибосомы с помощью других механизмов [95]. Недавние исследования выявили системы спасения рибосомы, которые высвобождают пептиды из остановившихся рибосом. У бактерий альтернативные факторы спасения А (ArfA) и В (ArfB) представляют собой независимые молекулярные механизмы, которые дополняют транс-трансляционную систему спасения [95–97]. Недавно в структурных исследованиях были визуализированы структурные механизмы этих факторов спасения. В митохондриях две системы спасения рибосомы включают RF-подобные белки, которые недавно были визуализированы с помощью крио-ЭМ: ICT1, который напоминает бактериальный ArfB и действует на миторибосомы, несущие укороченные молекулы мРНК [87], и mtRF-R (кодируемый *c12orf65*), который кооперирует с MTRES1 (кодируемый *cborf203*) в распознавании большой митохондриальной субъединицы с остановившейся пептидил-тРНК [98].

Бактериальный альтернативный фактор спасения А (ArfA). ArfA (ранее называвшийся YhdL) — это небольшой белок, состоящий из 70 а.о., который рекрутирует RF2 для высвобождения из рибосом пептидов, остановившихся на укороченных мРНК, не содержащих стоп-кодон (рис. 2, *a–c*; [99–101]). Пять крио-ЭМ-исследований продемонстрировали, что положительно заряженный С-концевой хвост ArfA связывается с мРНК-туннелем, образованным преимущественно рибосомной 16S РНК, таким образом «чувствуя» рибосомы, туннель которых свободен из-за укороченной молекулы мРНК [49, 50, 102–104]. *N*-Концевая часть белка сворачивается с образованием компактного домена вблизи декодирующего центра и взаимодействует с доменом распознавания кодонов RF2, хотя для этого взаимодействия не требуется консервативный мотив SPF белка RF2 (рис. 2, *c*). Во всех

этих исследованиях ArfA был связан с RF2 в открытой, каталитически компетентной конформации, сходной с конформацией рилизинг-факторов на стоп-кодоне (рис. 2, *b*). В этой конформации петля переключения RF2 стабилизируется гидрофобными взаимодействиями остатка Trp319 с ArfA. Кроме того, в двух исследованиях был обнаружен компактный RF2 (рис. 2, *a*), домен распознавания кодонов которого находится примерно на 5 Å дальше от А-сайта [49, 50]. Хотя взаимодействия RF2 с ArfA отличаются от взаимодействий RF2 со стоп-кодоном, полученные структуры подчёркивают сходство механизма активации RF через открытие RF2 после распознавания специфического сигнала в DC. Список ArfA-подобных факторов спасения продолжает расти, выявляя родовые особенности механизмов контроля качества [105]. Например, если BrfA *Bacillus subtilis* зависит от RF2 и подобен ArfA [106], то ArfT *Francisella tularensis* может рекрутировать как RF1, так и RF2 для высвобождения пептидов из остановленных рибосом [107, 108].

Бактериальный альтернативный фактор спасения В (ArfВ). ArfВ (ранее называвшийся YaeJ) — это рилизинг-фактор (~140 а.о.), который содержит как С-концевой хвост, связывающийся с рибосомным туннелем, так и RF-подобный каталитический домен, несущий мотив GGQ (рис. 2, *d–g*). Биохимические исследования показали, что ArfВ может спасти не только рибосому с мРНК, укороченной сразу после кодона Р-сайта, но также и рибосомы с большими удлинениями мРНК [109], хотя каталитическая активность ArfВ снижается по мере увеличения длины мРНК и может зависеть от последовательности выступа мРНК [110, 111]. Кристаллографическая структура показала, что положительно заряженный хвост образует α -спираль в свободном туннеле, тогда как каталитический N-концевой домен стыкуется с РТС подобно тому, как это происходит у канонических RF [112]. Связывание ArfВ с не повернутой рибосомой напоминает связывание рилизинг-факторов, что соответствует распознаванию субстрата с остановленной пептидил-тРНК. Поскольку туннель для мРНК не может быть занят одновременно ArfВ и более длинным выступом мРНК, при исследованиях крио-ЭМ была получена структура 70S-рибосомы с ArfВ и мРНК, выступающей на 2 или 9 нуклеотидов за пределы Р-сайта [110, 111]. Показано, что нуклеотиды декодирующего центра (A1492 и A1493) взаимодействуют с ArfВ и мРНК, обеспечивая аккомодацию различных выступов мРНК посредством различных конформаций [111]. Эти результаты подчёркивают структурную пластичность DC

рибосомы и позволяют предположить, что другие пути спасения, такие как ArfA у бактерий и Dom34 у эукариот (обсуждается ниже), могут обнаруживать рибосомы с более широким диапазоном выступов и/или последовательностей мРНК.

В комплексах с мРНК, выступающей за пределы кодона Р-сайта, α -спиральный хвост ArfВ связывается в туннеле с мРНК, в то время как +9-выступ мРНК удалён из туннеля и либо не упорядочен в межсубъединичном пространстве [110], либо стабилизируется второй копией белка ArfВ (рис. 2, *e* и *f*) [111]. Эти наблюдения указывают на то, что ArfВ может обнаруживать остановившиеся рибосомы разными путями в зависимости от последовательности мРНК или структурной динамики, допускающей экскурсы мРНК за пределы туннеля. Кроме того, классификация данных крио-ЭМ выявила набор структур с каталитическим N-концевым доменом ArfВ внутри или вне РТС (рис. 2, *d* и *e*) [111]. Эта динамика согласуется с биохимическими наблюдениями и указывает на то, что механизм распознавания субстрата напоминает механизм канонических рилизинг-факторов, которые сначала распознают DC на малой субъединице, а затем перегруппировываются, чтобы закрепить каталитический домен рядом с расщепляемой связью в пептидил-тРНК.

С помощью крио-ЭМ на рибосомах были идентифицированы ArfВ с различной степенью межсубъединичного вращения в сочетании с образованием гибридного состояния Р/Е деацелированной тРНК (рис. 2, *f–g*). Было показано, что степень связывания димера ArfВ понижается по мере увеличения вращения 30S-субъединицы. Сильно повернутые рибосомы обнаруживают равновесие между частицами с мономерным ArfВ-связанным и вакантным А-сайтом (рис. 2, *g*) [111]. Спираль 69 свободных рибосом диссоциирует из DC и, скорее всего, будет мешать связыванию ArfВ с большой субъединицей. Эти результаты подтверждают, что ArfВ, подобно каноническим RF, диссоциирует после спонтанного межсубъединичного вращения и нарушения мостика H69–DC. Хотя компоненты параллельного пути спасения с участием ArfA и RF2 были визуализированы только на не повернутой рибосоме, консервативная рибосомная динамика комплексов, связанных с RF и ArfВ, предполагает, что аналогичный механизм может быть использован для высвобождения ArfA и RF2 и подготовки рибосомы к рециклингу.

Митохондриальный фактор спасения ICT1 (~200 а.о.), близкий гомолог бактериального ArfВ, катализирует высвобождение пептидов из остановившихся рибосом [113]. ICT1 («imma-

ture colon carcinoma transcript-1», также обозначаемый как MRPL58) необходим для роста клеток [113–115], и нарушение регуляции его синтеза связано с туморогенезом [116]. Интересно, что одна молекула ICT1 связывается с центральным выступом митохондриальной рибосомы [117], но эта позиция далека от А-сайта, указывая на то, что эта молекула не катализирует спасение рибосомы (рис. 2, *i*). Центральным выступом большой субъединицы взаимодействует с малой субъединицей и с молекулами тРНК, что делает его структуру критичной для правильной сборки рибосом и их функционирования во всех царствах жизни [118–122]. Хотя архитектурная функция ICT1 может частично вносить вклад в регуляцию митохондриальной трансляции, именно каталитическая функция другой – временно связанной – молекулы ICT1 важна для митохондриальной трансляции. Значимость каталитической функции была продемонстрирована с использованием мутационного анализа, показавшего прекращение роста клеток после изменения мотива GGQ в ICT1 [113].

В недавно созданной крио-ЭМ-структуре связанного с ICT1 спасательного комплекса [87] положительно заряженная С-концевая спираль ICT1 обнаруживается в мРНК-туннеле (рис. 2, *i*). Каталитический N-концевой домен стыкуется с РТС аналогично ArgV. Положение мотива GGQ поддерживает каталитическую роль остова глутамин, аналогичную роли RF. Крио-ЭМ-исследование было выполнено с использованием укороченной мРНК в Р-сайте. Остаётся визуализировать: если/как ICT1 распознает рибосомы с более длинными выступами мРНК [123] и отражает ли склонность изолированного ICT1 к димеризации [124] механистический сценарий, аналогичный сценарию димерного ArgV, который может стабилизировать длинные выступы мРНК [111].

Митохондриальный рилизинг-фактор mtRF-R (~170 а.о.) представляет собой митохондриальную пептидил-тРНК гидролазу, которая необходима для жизнеспособности клеток [125]. Мутации или дисрегуляция этого белка нарушают трансляцию в митохондриях и ассоциируются с заболеваниями [126–128]. Недавнее исследование крио-ЭМ визуализировало человеческий mtRF-R с пептидил-тРНК на большой митохондриальной субъединице рибосомы [98]. Связыванию mtRF-R в А-сайте способствует MTRES1, закреплённый со стеблем антикодона тРНК (рис. 2, *j*). Как ожидалось, каталитический домен mtRF-R входит в РТС и выдвигает мотив GGQ вблизи концевой нуклеотида Р-тРНК. Удивительно, но пептидил-тРНК остаётся

интактной, вероятно, из-за уникальной конформации концевой остатка лизина образующегося пептида, который, как было показано, является сигнатурой остановившихся рибосом [129, 130]. Хотя mtRF-R вместе с MTRES1 может гидролизовать пептидил-тРНК в модельных 50S-комплексах *E. coli in vitro* [98], ещё предстоит показать, спасает ли и как mtRF-R остановленные митохондриальные субъединицы с лизил-тРНК. Диссоциация mtRF-R и MTRES1 из большой субъединицы, необходимая для рециклинга рибосомы, вероятно, сопряжена с диссоциацией деацил-тРНК после гидролиза пептидил-тРНК. Не исключено, что в разборке этого спасательного комплекса помогают дополнительные факторы. Будущие исследования определяют субстратную специфичность mtRF-R и механизм диссоциации mtRF-R/MTRES1.

ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ ТЕРМИНАЦИЯ И СПАСЕНИЕ РИБОСОМЫ У ЭУКАРИОТ

Терминация трансляции с участием eRF1 • eRF3. Эукариотический фактор eRF1 (~440 а.о.) структурно отличается от бактериальных рилизинг-факторов, и его каталитическая функция зависит от ГТФазной активности eRF3 [23, 131–133]. Домен распознавания кодонов eRF1 (домен N) сложен иначе, чем у бактериальных RF, и несёт консервативные участки аминокислот, такие как мотив T⁵⁸ASNIKS⁶⁴, который необходим для распознавания всех трёх стоп-кодонов [134–136]. Кроме того, в отличие от бактериальных рилизинг-факторов, eRF1 распознает тетрануклеотид, включающий 3 нуклеотида стоп-кодона и последующий нуклеотид [137–139]. Профилирование рибосом и другие исследования показали, что стоп-кодон, за которым следует пиримидин, приводит к интенсивному считыванию аннотированного стоп-кодона [140] в соответствии с более низкой каталитической активностью eRF1 на тетрануклеотиде с концевым пиримидином [138]. Эта зависимость способствует переназначению стоп-кодонов в смысловые кодоны у инфузорий, хотя «четвёртый» нуклеотид не является исключительной детерминантой переназначения [141–143]. Дополнительные характеристики мРНК, такие как последовательность и структура вокруг стоп-кодона и ниже него, играют роль в эффективности терминации эукариот [144–147].

Несмотря на различия между эукариотическими и бактериальными рилизинг-факторами, эукариотическая терминация сходна с бактери-

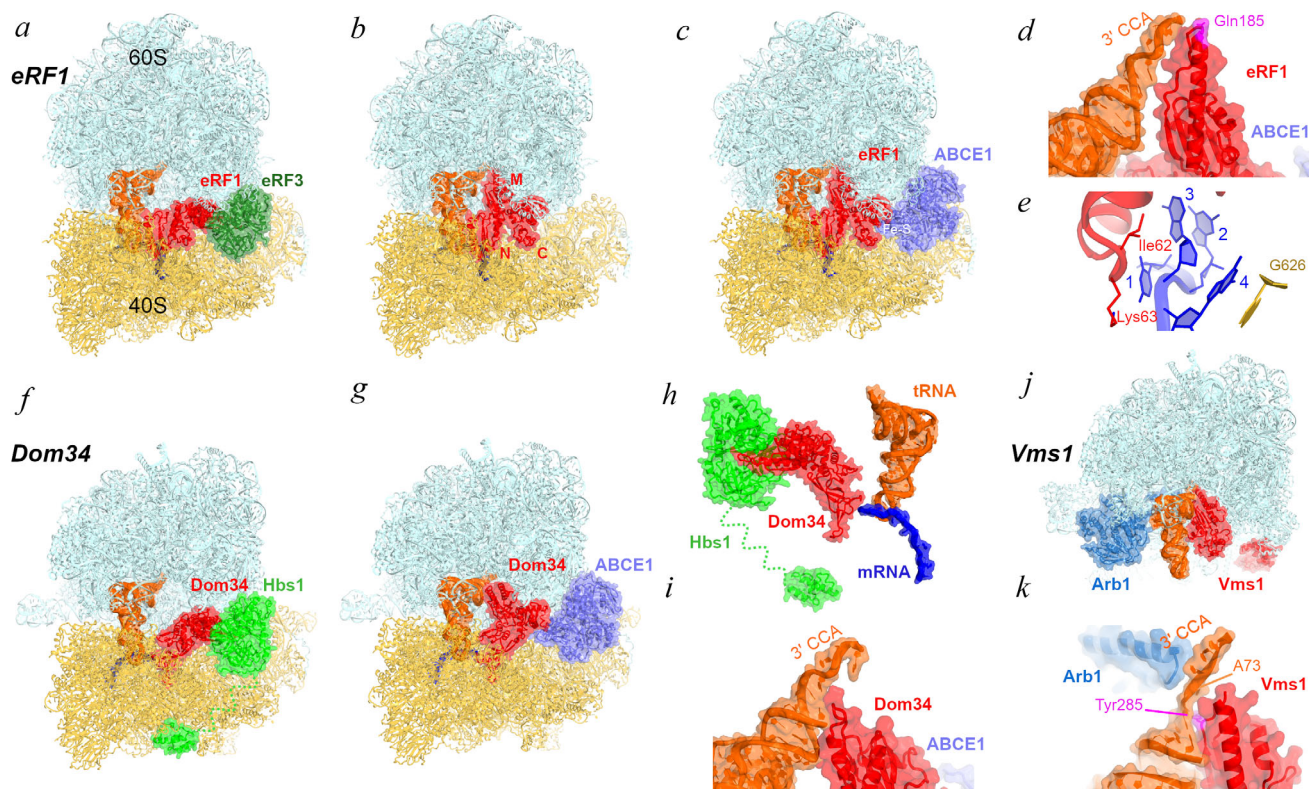


Рис. 3. Терминация трансляции эукариот и механизмы спасения цитоплазматических рибосом. *a–c* – Перестройка рилизинг-фактора eRF1 на 80S-рибосоме со стоп-кодоном после гидролиза ГТФ на eRF3 (*a–b*), и взаимодействие с фактором рециклинга ABCE1 (*c*; Rli1 у дрожжей). *d* – Взаимодействие каталитической конформации eRF1 с тРНК в Р-сайте [137]. *e* – Распознавание 4-нуклеотидного стоп-сигнала eRF1 происходит при участии аминокислотных остатков мотива TASNICKS (показаны Ile62 и Lys63) и G626 18S рРНК [137]. *f* и *g* – Перестройка Pelota (Dom34 у дрожжей) на 80S-рибосоме с укороченной мРНК после гидролиза ГТФ на Hbs1 [163] и связывания ABCE1 [164]. *h* – Распознавание укороченной мРНК белком Dom34 [163]. *i* – Взаимодействие открытой конформации Dom34 с тРНК в Р-сайте [164]. *j* – Спасательный 60S-комплекс с пептидил-тРНК гидролазой Vms1 и Arb1 [165]. *k* – Взаимодействие Vms1 и Arb1 с тРНК

альной тем, что её точность контролируется крупномасштабными конформационными изменениями белка eRF1. Крио-ЭМ-исследования показали eRF1 на рибосоме в трёх функциональных состояниях (рис. 3, *a–c*): с eRF3 (с компактным eRF1, неактивным в высвобождении пептида) [148–150], без eRF3 (с удлинённым eRF1, активированным для высвобождения пептида) [139, 151] и с АТФ-связывающим касетным белком ABCE1 (Rli1 в дрожжах) [137, 148, 152], фактором рециклинга, который разбирает рибосомы на субъединицы [153–155]. Эти структуры в сочетании с биохимическими и биофизическими данными позволяют реконструировать большинство этапов терминации у эукариот. После связывания eRF1•eRF3•ГТФ со стоп-кодом А-сайта рибосомы [156] (рис. 3, *a*) гидролиз ГТФ высвобождает eRF3 и приводит к встраиванию каталитического домена М eRF1 с мотивом GGQ в РТС (рис. 3, *b* и *d*). Гидролиз ГТФ катализируется сарцин-рициновой петлёй большой субъединицы, где eRF3

связывается аналогично другим трансляционным ГТФазам, таким как факторы элонгации EF-Tu и eEF1A. Аминокислотные остатки распознавания кодонов eRF1 взаимодействуют со всеми четырьмя нуклеотидами сигнала терминации на мРНК, которая принимает конформацию U-поворота (рис. 3, *e*), приводящую к перемещению мРНК в рибосомный туннель [157]. Интересно, что несмотря на дивергенцию структуры и последовательности от бактериальной терминации (рис. 1, *c*), терминация эукариот и бактерий имеет сходные аспекты распознавания стоп-кодона, такие как распознавание пурина в положении 3 (R3) консервативными остатками Thr58 и Ile62 TASNICKS-мотива eRF1 (рис. 3, *e*; [137]) и Thr198 и Ile196 белка RF1 *E. coli* [158]. Кроме того, последний пурин в сигнале терминации (R4 у эукариот или R3 у бактерий) стабилизируется с нуклеотидом G626 (G530 у *E. coli*) декодирующего центра в соответствии с предпочтением пурина перед пиримидином в этом положении (рис. 1, *h* и 3, *e*).

В открытой каталитической конформации С-домен eRF1, который связывает N- и M-домены, может взаимодействовать с Fe-S-доменом ABCE1 и инициировать рециклинг рибосомы (рис. 3, с; [148, 152]). ABCE1, конформационная динамика которого контролируется двумя сайтами связывания АТФ [159] и который обладает сродством как к 80S-рибосоме, так и к 40S-субъединице [160–162] помогает в расщеплении посттерминационной рибосомы через промежуточные состояния диссоциации eRF1. Эти состояния необходимо будет визуализировать.

Спасение остановившихся рибосом с помощью Dom34 • Hbs1 и Vms1. Хотя эукариотических аналогов ArgA или ArgB пока не выявлено, было обнаружено несколько механизмов контроля качества, которые напоминают эукариотическую систему терминации [166]. Dom34 (Pelota у млекопитающих) и ГТФаза Hbs1 образуют гетеродимер, который спасает рибосомы, остановившиеся на укороченных мРНК, структурированные мРНК или 3'-UTR мРНК [167–170]. Dom34 и Hbs1 очень похожи на eRF1 и eRF3 соответственно (рис. 3, f и g). Однако у Dom34 отсутствует каталитический мотив GGQ, поэтому он не гидролизует пептидил-тРНК, а вместо этого способствует диссоциации субъединиц [170]. Кримо-ЭМ-структуры показали, что связывание Dom34 и Hbs1 с рибосомой аналогично связыванию eRF1 и eRF3 [148, 163, 171]. ГТФазный домен Hbs1 стыкуется с сарцин-рициновой петлёй, в то время как длинный N-концевой хвост Hbs1 достигает туннеля входа мРНК (рис. 3, f и h), принимая участие в распознавании остановившихся мРНК-субстратов [163, 171]. β-Шпилька Dom34 входит в декодирующий центр, отдаленно напоминая бактериальные факторы спасения, которые связываются в свободном мРНК-туннеле (рис. 3, h). Сравнение структуры рибосомы, связанной с тРНК, eRF1 и Dom34, выявило различную конформацию DC [148], подчёркивая пластичность эукариотического DC, напоминающую пластичность бактериальных рибосом [111]. Более того, Dom34 может быть связан в присутствии более длинных мРНК, включая поли-А-хвост, благодаря перенаправлению выступа мРНК в межсубъединичное пространство [148]. Это напоминает комплексы спасения бактерий с ArgB [110, 111] и объясняет, как Dom34 может распознавать ряд субстратов, не ограничиваясь мРНК, укороченными после кодона Р-сайта. После открытия Dom34 (рис. 3, g) M-домен связывает ножку акцепторного плеча тРНК, чтобы способствовать вытеснению тРНК из рибосомы (рис. 3, i). Аналогично канонической

терминации, разборка связанных с Dom34 рибосом происходит с участием ABCE1 [172], который взаимодействует с Dom34 после диссоциации Hbs1 (рис. 3, g; [148, 164]). Будущие исследования приведут к пониманию подробностей механизмов разборки рибосомы после канонической терминации и связывания Dom34, которые, вероятно, происходят в результате меж- и внутрисубъединичных структурных перестроек.

Пептидил-тРНК, связанная с большой 60S-субъединицей в результате действия механизмов контроля качества рибосомы, разделяется такими механизмами, как добавление С-концевых аланил-треониновых повторов (CAT-хвост) к пептиду с помощью Rqc2, и его убиквитинирование с помощью Ltn1 (Листерин у млекопитающих [173]) и расщепление пептидил-тРНК. Белок Vms1 (ANKZF1 у млекопитающих) представляет собой большую (~600–750 а.о.) пептидил-тРНК гидролазу, которая катализирует диссоциацию комплексов 60S • пептидил-тРНК [174, 175]. Последовательность его каталитического домена напоминает последовательность eRF1 и содержит мотив GXQ (где X – это Ser294 у *Saccharomyces cerevisiae*) с функционально важным остатком глутамина [165, 174, 175]. Несмотря на это сходство и на некоторое сходство с митохондриальным mtRF-R [98], Vms1 не гидролизует сложноэфирную связь в пептидил-тРНК. Вместо этого Vms1 расщепляет фосфодиэфирную связь между нуклеотидами 73 и 74 в тРНК, отделяя ССА-пептид от остальной тРНК [176, 177]. Фрагмент тРНК подвергается репарации с помощью ELAC1 и ССА-добавляющего фермента TRNT1 [176, 178]. Кримо-ЭМ визуализировала Vms1, связанный с 60S-субъединицей, с АТФазой Arbl ABCF-типа вблизи тРНК (рис. 3, j) [165]. Arbl, вероятно, способствует позиционированию субстрата пептидил-тРНК, тем самым повышая эффективность реакции [165]. Каталитический домен Vms1 находится рядом с тРНК (рис. 3, k), подобно M-домену Dom34 (рис. 3, i). Петля GSQ не упорядочена вблизи ССА-конца тРНК. Консервативный соседний остаток Tyr285 образует стэкинг-взаимодействие с нуклеотидом 72 молекулы тРНК, вытесняя нуклеотид 73 и экспонируя подлежащую расщеплению фосфодиэфирную связь для гидролиза (рис. 3, k). Vms1 охватывает большую площадь на межсубъединичном интерфейсе 60S-субъединицы в соответствии с ролью Vms1 в координации гидролиза пептидил-тРНК и деградации аномального пептида. Домены типа анкириновый повтор и спирализованная спираль (coiled-coil) направлены на выход из рибосомного туннеля, где VIM-домен, вероятно, способствует Cdc48-опосредованной

экстракции и клиренсу пептида протеасомой [179–181]. Будущие исследования позволят получить подробности того, как Vms1 кооперирует с другими белками в диссоциации ССА-пептида и фрагмента тРНК из 60S-субъединицы, позволяя рециркулировать последнюю для трансляции новой мРНК.

ВЫВОДЫ

Недавние исследования раскрыли многие детали механизмов терминации трансляции и спасения рибосомы во всех царствах жизни. Они продемонстрировали разнообразие сценариев высвобождения пептидов, катализируемых белками с различной архитектурой. Некоторые аспекты этих сценариев ещё предстоит визуализировать, однако ясно, что распознавание и принятие решения относительно терминации и судьбы остановившихся комплексов рибосомы

сильно зависит от её конформации и структурных перестроек, превращающих рибосому в активного участника всех этапов процесса трансляции и контроля качества образующейся молекулы белка.

Благодарности. Я благодарен Анне Лавлэнд и Даррилу Конте мл. за комментарии к данной статье.

Финансирование. Данная работа выполнена при финансовой поддержке Фонда кистозного фиброза (грант № 670773) и Национального Института Здоровья (грант № R35 GM127094).

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов в финансовой или иной сфере.

Соблюдение этических норм. В настоящей статье не содержится описание исследований с участием людей или животных, выполненных автором.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Brenner, S., Barnett, L., Katz, E. R., and Crick, F. H. (1967) UGA: a third nonsense triplet in the genetic code, *Nature*, **213**, 449-450.
- Brenner, S., Stretton, A. O., and Kaplan, S. (1965) Genetic code: the “nonsense” triplets for chain termination and their suppression, *Nature*, **206**, 994-998.
- Spirin, A. S. (1999) Termination of translation, in *Ribosomes. Cellular Organelles*, Springer, Boston, MA, pp. 261-270.
- Sogorin, E. A., Agalarov, S., and Spirin, A. S. (2016) Interpolysomal coupling of termination and initiation during translation in eukaryotic cell-free system, *Sci. Rep.*, **6**, 24518, doi: 10.1038/srep24518.
- Tompkins, R. K., Scolnick, E. M., and Caskey, C. T. (1970) Peptide chain termination. VII. The ribosomal and release factor requirements for peptide release, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **65**, 702-708.
- Scolnick, E., Tompkins, R., Caskey, T., and Nirenberg, M. (1968) Release factors differing in specificity for terminator codons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **61**, 768-774.
- Capecchi, M. R. (1967) Polypeptide chain termination in vitro: isolation of a release factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **58**, 1144-1151.
- Capecchi, M. R. (1967) A rapid assay for polypeptide chain termination, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28**, 773-778.
- Nakamura, Y., Ito, K., Matsumura, K., Kawazu, Y., and Ebihara, K. (1995) Regulation of translation termination: conserved structural motifs in bacterial and eukaryotic polypeptide release factors, *Biochem. Cell. Biol.*, **73**, 1113-1122.
- Frischmeyer, P. A., and Dietz, H. C. (1999) Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease, *Hum. Mol. Genet.*, **8**, 1893-1900.
- 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.
- Gavrilova, L. P., and Spirin, A. S. (1972) Mechanism of translocation in ribosomes. II. Activation of spontaneous (nonenzymic) translocation in ribosomes of *Escherichia coli* by *p*-chloromercuribenzoate, *Mol. Biol.*, **6**, 248-254.
- Van Dyke, N., and Murgola, E. J. (2003) Site of functional interaction of release factor 1 with the ribosome, *J. Mol. Biol.*, **330**, 9-13.
- Bouakaz, L., Bouakaz, E., Murgola, E. J., Ehrenberg, M., and Sanyal, S. (2006) The role of ribosomal protein L11 in class I release factor-mediated translation termination and translational accuracy, *J. Biol. Chem.*, **281**, 4548-4556.
- Ito, K., Uno, M., and Nakamura, Y. (2000) A tripeptide “anticodon” deciphers stop codons in messenger RNA, *Nature*, **403**, 680-684.
- Oparina, N. J., Kalinina, O. V., Gelfand, M. S., and Kisselev, L. L. (2005) Common and specific amino acid residues in the prokaryotic polypeptide release factors RF1 and RF2: possible functional implications, *Nucleic Acids Res.*, **33**, 5226-5234, doi: 10.1093/nar/gki841.
- Laurberg, M., Asahara, H., Korostelev, A., Zhu, J., Trakhanov, S., and Noller, H. F. (2008) Structural basis for translation termination on the 70S ribosome, *Nature*, **454**, 852-857.
- Korostelev, A., Asahara, H., Lancaster, L., Laurberg, M., Hirschi, A., et al. (2008) Crystal structure of a translation termination complex formed with release factor RF2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 19684-19689.
- Korostelev, A., Zhu, J., Asahara, H., and Noller, H. F. (2010) Recognition of the amber UAG stop codon by release factor RF1, *EMBO J.*, **29**, 2577-2585, doi: 10.1038/emboj.2010.139.
- Weixlbaumer, A., Jin, H., Neubauer, C., Voorhees, R. M., Petry, S., et al. (2008) Insights into translational termination from the structure of RF2 bound to the ribosome, *Science*, **322**, 953-956.
- Korkmaz, G., and Sanyal, S. (2017) R213I mutation in release factor 2 (RF2) is one step forward for engineering an omnipotent release factor in bacteria *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **292**, 15134-15142, doi: 10.1074/jbc.M117.785238.
- Field, A., Hetrick, B., Mathew, M., and Joseph, S. (2010) Histidine 197 in release factor 1 is essential for a site bind-

- ing and peptide release, *Biochemistry*, **49**, 9385-9390, doi: 10.1021/bi1012047.
23. Frolova, L., Le Goff, X., Rasmussen, H. H., Cheperegin, S., Drugeon, G., et al. (1994) A highly conserved eukaryotic protein family possessing properties of polypeptide chain release factor, *Nature*, **372**, 701-703.
 24. Frolova, L. Y., Tsivkovskii, R. Y., Sivolobova, G. F., Oparina, N. Y., Serpinsky, O. I., et al. (1999) Mutations in the highly conserved GGQ motif of class 1 polypeptide release factors abolish ability of human eRF1 to trigger peptidyl-tRNA hydrolysis, *RNA*, **5**, 1014-1020.
 25. Shaw, J. J., and Green, R. (2007) Two distinct components of release factor function uncovered by nucleophile partitioning analysis, *Mol. Cell*, **28**, 458-467.
 26. Zavialov, A. V., Mora, L., Buckingham, R. H., and Ehrenberg, M. (2002) Release of peptide promoted by the GGQ motif of class 1 release factors regulates the GTPase activity of RF3, *Mol. Cell*, **10**, 789-798.
 27. Seit Nebi, A., Frolova, L., Ivanova, N., Poltarau, A., and Kiselev, L. (2000) Mutation of a glutamine residue in the universal tripeptide GGQ in human eRF1 termination factor does not cause complete loss of its activity, *Mol. Biol. (Mosk.)*, **34**, 899-900.
 28. Seit-Nebi, A., Frolova, L., Justesen, J., and Kisselev, L. (2001) Class-1 translation termination factors: invariant GGQ minidomain is essential for release activity and ribosome binding but not for stop codon recognition, *Nucleic Acids Res.*, **29**, 3982-3987.
 29. Santos, N., Zhu, J., Donohue, J. P., Korostelev, A. A., and Noller, H. F. (2013) Crystal structure of the 70S ribosome bound with the Q253P mutant form of release factor RF2, *Structure*, **21**, 1258-1263, doi: 10.1016/j.str.2013.04.028.
 30. Korostelev, A. A. (2011) Structural aspects of translation termination on the ribosome, *RNA*, **17**, 1409-1421.
 31. Dunkle, J. A., and Cate, J. H. (2010) Ribosome structure and dynamics during translocation and termination, *Annu. Rev. Biophys.*, **39**, 227-244, doi: 10.1146/annurev.biophys.37.032807.125954.
 32. Ramakrishnan, V. (2011) Structural studies on decoding, termination and translocation in the bacterial ribosome, in *Ribosomes: Structure, Function, and Dynamics* (Rodnina, M., Wintermeyer, W., and Green, R., eds.) Springer, pp. 19-30.
 33. Rodnina, M. V. (2018) Translation in prokaryotes, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **10**, doi: 10.1101/cshperspect.a032664.
 34. Youngman, E. M., McDonald, M. E., and Green, R. (2008) Peptide release on the ribosome: mechanism and implications for translational control, *Annu. Rev. Microbiol.*, **62**, 353-373.
 35. Adio, S., Sharma, H., Senyushkina, T., Karki, P., Maracci, C., et al. (2018) Dynamics of ribosomes and release factors during translation termination in *E. coli*, *Elife*, **7**, doi: 10.7554/eLife.34252.
 36. Prabhakar, A., Capece, M. C., Petrov, A., Choi, J., and Puglisi, J. D. (2017) Post-termination ribosome intermediate acts as the gateway to ribosome recycling, *Cell Rep.*, **20**, 161-172, doi: 10.1016/j.celrep.2017.06.028.
 37. Sternberg, S. H., Fei, J., Prywes, N., McGrath, K. A., and Gonzalez, R. L., Jr. (2009) Translation factors direct intrinsic ribosome dynamics during translation termination and ribosome recycling, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **16**, 861-868, doi: 10.1038/nsmb.1622.
 38. Indrisiunaite, G., Pavlov, M. Y., Heurgue-Hamard, V., and Ehrenberg, M. (2015) On the pH dependence of class-1 RF-dependent termination of mRNA translation, *J. Mol. Biol.*, **427**, 1848-1860, doi: 10.1016/j.jmb.2015.01.007.
 39. Shin, D. H., Brandsen, J., Jancarik, J., Yokota, H., Kim, R., and Kim, S. H. (2004) Structural analyses of peptidyl release factor 1 from *Thermotoga maritima* reveal domain flexibility required for its interaction with the ribosome, *J. Mol. Biol.*, **341**, 227-239.
 40. Vestergaard, B., Van, L. B., Andersen, G. R., Nyborg, J., Buckingham, R. H., and Kjeldgaard, M. (2001) Bacterial polypeptide release factor RF2 is structurally distinct from eukaryotic eRF1, *Mol. Cell*, **8**, 1375-1382.
 41. Zoldak, G., Redecke, L., Svergun, D. I., Konarev, P. V., Voertler, C. S., et al. (2007) Release factors 2 from *Escherichia coli* and *Thermus thermophilus*: structural, spectroscopic and microcalorimetric studies, *Nucleic Acids Res.*, **35**, 1343-1353.
 42. JCSG (2005) *Crystal structure of Peptide chain release factor 1 (RF-1) (SMU.1085) from Streptococcus mutans at 2.34 Å resolution*, Protein Data Bank.
 43. Rawat, U. B., Zavialov, A. V., Sengupta, J., Valle, M., Grassucci, R. A., et al. (2003) A cryo-electron microscopic study of ribosome-bound termination factor RF2, *Nature*, **421**, 87-90.
 44. Petry, S., Brodersen, D. E., Murphy, F. V., Dunham, C. M., Selmer, M., et al. (2005) Crystal structures of the ribosome in complex with release factors RF1 and RF2 bound to a cognate stop codon, *Cell*, **123**, 1255-1266.
 45. He, S. L., and Green, R. (2010) Visualization of codon-dependent conformational rearrangements during translation termination, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17**, 465-470.
 46. Hetrick, B., Lee, K., and Joseph, S. (2009) Kinetics of stop codon recognition by release factor 1, *Biochemistry*, **48**, 11178-11184.
 47. Trappl, K., and Joseph, S. (2016) Ribosome induces a closed to open conformational change in release factor 1, *J. Mol. Biol.*, **428**, 1333-1344, doi: 10.1016/j.jmb.2016.01.021.
 48. Svidritskiy, E., and Korostelev, A. A. (2018) Conformational control of translation termination on the 70S ribosome, *Structure*, **26**, 821-828.
 49. Demo, G., Svidritskiy, E., Madireddy, R., Diaz-Avalos, R., Grant, T., et al. (2017) Mechanism of ribosome rescue by ArfA and RF2, *Elife*, **6**, doi: 10.7554/eLife.23687.
 50. James, N. R., Brown, A., Gordiyenko, Y., and Ramakrishnan, V. (2016) Translational termination without a stop codon, *Science*, **354**, 1437-1440, doi: 10.1126/science.aai9127.
 51. Fu, Z., Indrisiunaite, G., Kaledhonkar, S., Shah, B., Sun, M., et al. (2019) The structural basis for release-factor activation during translation termination revealed by time-resolved cryogenic electron microscopy, *Nat. Commun.*, **10**, 2579, doi: 10.1038/s41467-019-10608-z.
 52. Fislage, M., Zhang, J., Brown, Z. P., Mandava, C. S., Sanyal, S., et al. (2018) Cryo-EM shows stages of initial codon selection on the ribosome by aa-tRNA in ternary complex with GTP and the GTPase-deficient EF-TuH84A, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 5861-5874, doi: 10.1093/nar/gky346.
 53. Ogle, J. M., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Jr., Tarry, M. J., Carter, A. P., and Ramakrishnan, V. (2001) Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit, *Science*, **292**, 897-902.
 54. Loveland, A. B., Demo, G., Grigorieff, N., and Korostelev, A. A. (2017) Ensemble cryo-EM elucidates the mechanism of translation fidelity, *Nature*, **546**, 113-117, doi: 10.1038/nature22397.
 55. Amort, M., Wotzel, B., Bakowska-Zywicka, K., Erlacher, M. D., Micura, R., and Polacek, N. (2007) An intact ribosome moiety at A2602 of 23S rRNA is key to trigger peptidyl-tRNA hydrolysis during translation termination, *Nucleic Acids Res.*, **35**, 5130-5140, doi: 10.1093/nar/gkm539.
 56. Polacek, N., Gomez, M. J., Ito, K., Xiong, L., Nakamura, Y., and Mankin, A. (2003) The critical role of

- the universally conserved A2602 of 23S ribosomal RNA in the release of the nascent peptide during translation termination, *Mol. Cell*, **11**, 103-112.
57. Youngman, E. M., Brunelle, J. L., Kochaniak, A. B., and Green, R. (2004) The active site of the ribosome is composed of two layers of conserved nucleotides with distinct roles in peptide bond formation and peptide release, *Cell*, **117**, 589-599.
 58. Graf, M., Huter, P., Maracci, C., Peterek, M., Rodnina, M. V., and Wilson, D. N. (2018) Visualization of translation termination intermediates trapped by the Apidaecin 137 peptide during RF3-mediated recycling of RF1, *Nat. Commun.*, **9**, 3053, doi: 10.1038/s41467-018-05465-1.
 59. Florin, T., Maracci, C., Graf, M., Karki, P., Klepacki, D., et al. (2017) An antimicrobial peptide that inhibits translation by trapping release factors on the ribosome, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **24**, 752-757, doi: 10.1038/nsmb.3439.
 60. Freistroffer, D. V., Pavlov, M. Y., MacDougall, J., Buckingham, R. H., and Ehrenberg, M. (1997) Release factor RF3 in *E. coli* accelerates the dissociation of release factors RF1 and RF2 from the ribosome in a GTP-dependent manner, *EMBO J.*, **16**, 4126-4133, doi: 10.1093/emboj/16.13.4126.
 61. Svidritskiy, E., Demo, G., Loveland, A. B., Xu, C., and Korostelev, A. A. (2019) Extensive ribosome and RF2 rearrangements during translation termination, *Elife*, **8**, e46850, doi: 10.7554/eLife.46850.
 62. Ling, C., and Ermolenko, D. N. (2016) Structural insights into ribosome translocation, *WIREs RNA*, **7**, 620-636, doi: 10.1002/wrna.1354.
 63. 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.
 64. Voorhees, R. M., and Ramakrishnan, V. (2013) Structural basis of the translational elongation cycle, *Annu. Rev. Biochem.*, **82**, 203-236, doi: 10.1146/annurev-biochem-113009-092313.
 65. Chen, J., Tsai, A., O'Leary, S. E., Petrov, A., and Puglisi, J. D. (2012) Unraveling the dynamics of ribosome translocation, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **22**, 804-814, doi: 10.1016/j.sbi.2012.09.004.
 66. 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.
 67. Casy, W., Prater, A. R., and Cornish, P. V. (2018) Operative binding of Class I release factors and YaeJ stabilizes the ribosome in the nonrotated state, *Biochemistry*, **57**, 1954-1966, doi: 10.1021/acs.biochem.7b00824.
 68. Jin, H., Kelley, A. C., Loakes, D., and Ramakrishnan, V. (2010) Structure of the 70S ribosome bound to release factor 2 and a substrate analog provides insights into catalysis of peptide release, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 8593-8598.
 69. Wasserman, M. R., Alejo, J. L., Altman, R. B., and Blanchard, S. C. (2016) Multiperspective smFRET reveals rate-determining late intermediates of ribosomal translocation, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **23**, 333-341, doi: 10.1038/nsmb.3177.
 70. 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.
 71. Sharma, H., Adio, S., Senyushkina, T., Belardinelli, R., Peske, F., and Rodnina, M. V. (2016) Kinetics of spontaneous and EF-G-accelerated rotation of ribosomal subunits, *Cell Rep.*, **16**, 2187-2196, doi: 10.1016/j.celrep.2016.07.051.
 72. 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.
 73. Agirrezabal, 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.
 74. 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.
 75. Zhou, J., Lancaster, L., Trakhanov, S., and Noller, H. F. (2012) Crystal structure of release factor RF3 trapped in the GTP state on a rotated conformation of the ribosome, *RNA*, **18**, 230-240, doi: 10.1261/rna.031187.111.
 76. 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.
 77. Gao, H., Zhou, Z., Rawat, U., Huang, C., Bouakaz, L., et al. (2007) RF3 induces ribosomal conformational changes responsible for dissociation of class I release factors, *Cell*, **129**, 929-941, doi: 10.1016/j.cell.2007.03.050.
 78. Jin, H., Kelley, A. C., and Ramakrishnan, V. (2011) Crystal structure of the hybrid state of ribosome in complex with the guanosine triphosphatase release factor 3, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 15798-15803, doi: 10.1073/pnas.1112185108.
 79. Leipe, D. D., Wolf, Y. I., Koonin, E. V., and Aravind, L. (2002) Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases, *J. Mol. Biol.*, **317**, 41-72, doi: 10.1006/jmbi.2001.5378.
 80. Mikuni, O., Ito, K., Moffat, J., Matsumura, K., McCaughan, K., et al. (1994) Identification of the prfC gene, which encodes peptide-chain-release factor 3 of *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 5798-5802.
 81. Grentzmann, G., Brechemier-Baey, D., Heurgue, V., Mora, L., and Buckingham, R. H. (1994) Localization and characterization of the gene encoding release factor RF3 in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 5848-5852.
 82. Pai, R. D., Zhang, W., Schuwirth, B. S., Hirokawa, G., Kaji, H., et al. (2008) Structural insights into ribosome recycling factor interactions with the 70S ribosome, *J. Mol. Biol.*, **376**, 1334-1347, doi: 10.1016/j.jmb.2007.12.048.
 83. Borovinskaya, M. A., Pai, R. D., Zhang, W., Schuwirth, B. S., Holton, J. M., et al. (2007) Structural basis for aminoglycoside inhibition of bacterial ribosome recycling, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 727-732, doi: 10.1038/nsmb1271.
 84. Ayyub, S. A., Gao, F., Lightowlers, R. N., and Chrzanowska-Lightowlers, Z. M. (2020) Rescuing stalled mammalian mitoribosomes – what can we learn from bacteria? *J. Cell Sci.*, **133**, doi: 10.1242/jcs.231811.
 85. Soleimanpour-Lichaei, H. R., Kuhl, I., Gaisne, M., Passos, J. F., Wydro, M., et al. (2007) mtRF1a is a human mitochondrial translation release factor decoding the major termination codons UAA and UAG, *Mol. Cell*, **27**, 745-757.
 86. Nozaki, Y., Matsunaga, N., Ishizawa, T., Ueda, T., and Takeuchi, N. (2008) HMRFL is a human mitochondrial translation release factor involved in the decoding of the termination codons UAA and UAG, *Genes Cells*, **13**, 429-438.
 87. Kummer, E., Schubert, K. N., Schoenhut, T., Scaiola, A., and Ban, N. (2021) Structural basis of translation termination, rescue, and recycling in mammalian mitochondria, *Mol. Cell*, doi: 10.1016/j.molcel.2021.03.042.

88. Aibara, S., Singh, V., Modelska, A., and Amunts, A. (2020) Structural basis of mitochondrial translation, *Elife*, **9**, doi: 10.7554/eLife.58362.
89. Kummer, E., and Ban, N. (2020) Structural insights into mammalian mitochondrial translation elongation catalyzed by mtEFG1, *EMBO J.*, **39**, e104820, doi: 10.15252/embj.2020104820.
90. Zhang, Y., and Spremulli, L. L. (1998) Identification and cloning of human mitochondrial translational release factor 1 and the ribosome recycling factor, *Biochim. Biophys. Acta*, **1443**, 245-250, doi: 10.1016/s0167-4781(98)00223-1.
91. Lind, C., Sund, J., and Aqvist, J. (2013) Codon-reading specificities of mitochondrial release factors and translation termination at non-standard stop codons, *Nat. Commun.*, **4**, 2940, doi: 10.1038/ncomms3940.
92. Huynen, M. A., Duarte, I., Chrzanowska-Lightowlers, Z. M., and Nabuurs, S. B. (2012) Structure based hypothesis of a mitochondrial ribosome rescue mechanism, *Biol. Direct.*, **7**, 14, doi: 10.1186/1745-6150-7-14.
93. Young, D. J., Edgar, C. D., Murphy, J., Fredebohm, J., Poole, E. S., and Tate, W. P. (2010) Bioinformatic, structural, and functional analyses support release factor-like MTRF1 as a protein able to decode nonstandard stop codons beginning with adenine in vertebrate mitochondria, *RNA*, **16**, 1146-1155.
94. Temperley, R., Richter, R., Dennerlein, S., Lightowlers, R. N., and Chrzanowska-Lightowlers, Z. M. (2010) Hungry codons promote frameshifting in human mitochondrial ribosomes, *Science*, **327**, 301.
95. Ito, K., Chadani, Y., Nakamori, K., Chiba, S., Akiyama, Y., and Abo, T. (2011) Nascentome analysis uncovers futile protein synthesis in *Escherichia coli*, *PLoS One*, **6**, e28413, doi: 10.1371/journal.pone.0028413.
96. Hayes, C. S., and Keiler, K. C. (2010) Beyond ribosome rescue: tmRNA and co-translational processes, *FEBS Lett.*, **584**, 413-419, doi: 10.1016/j.febslet.2009.11.023.
97. Keiler, K. C. (2015) Mechanisms of ribosome rescue in bacteria, *Nat. Rev. Microbiol.*, **13**, 285-297, doi: 10.1038/nrmicro3438.
98. Desai, N., Yang, H., Chandrasekaran, V., Kazi, R., Minczuk, M., and Ramakrishnan, V. (2020) Elongational stalling activates mitoribosome-associated quality control, *Science*, **370**, 1105-1110, doi: 10.1126/science.abc7782.
99. 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, doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08190.x.
100. Shimizu, Y. (2012) ArfA recruits RF2 into stalled ribosomes, *J. Mol. Biol.*, **423**, 624-631, doi: 10.1016/j.jmb.2012.08.007.
101. Zeng, F., and Jin, H. (2016) Peptide release promoted by methylated RF2 and ArfA in nonstop translation is achieved by an induced-fit mechanism, *RNA*, **22**, 49-60, doi: 10.1261/rna.053082.115.
102. Huter, P., Muller, C., Beckert, B., Arenz, S., Berninghausen, O., et al. (2017) Structural basis for ArfA-RF2-mediated translation termination on mRNAs lacking stop codons, *Nature*, **541**, 546-549, doi: 10.1038/nature20821.
103. Ma, C., Kurita, D., Li, N., Chen, Y., Himeno, H., and Gao, N. (2017) Mechanistic insights into the alternative translation termination by ArfA and RF2, *Nature*, **541**, 550-553, doi: 10.1038/nature20822.
104. Zeng, F., Chen, Y., Remis, J., Shekhar, M., Phillips, J. C., et al. (2017) Structural basis of co-translational quality control by ArfA and RF2 bound to ribosome, *Nature*, **541**, 554-557, doi: 10.1038/nature21053.
105. Muller, C., Crowe-McAuliffe, C., and Wilson, D. N. (2021) Ribosome rescue pathways in bacteria, *Front. Microbiol.*, **12**, 652980, doi: 10.3389/fmicb.2021.652980.
106. Shimokawa-Chiba, N., Muller, C., Fujiwara, K., Beckert, B., Ito, K., et al. (2019) Release factor-dependent ribosome rescue by BrfA in the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*, *Nat. Commun.*, **10**, 5397, doi: 10.1038/s41467-019-13408-7.
107. 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**, doi: 10.1128/mBio.02436-18.
108. 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**, doi: 10.3390/ijms20081981.
109. 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, doi: 10.1093/nar/gkq1097.
110. Chan, K. H., Petrychenko, V., Mueller, C., Maracci, C., Holtkamp, W., et al. (2020) Mechanism of ribosome rescue by alternative ribosome-rescue factor B, *Nat. Commun.*, **11**, 4106, doi: 10.1038/s41467-020-17853-7.
111. Carbone, C. E., Demo, G., Madireddy, R., Svidritskiy, E., and Korostelev, A. A. (2020) ArfB can displace mRNA to rescue stalled ribosomes, *Nat. Commun.*, **11**, 5552, doi: 10.1038/s41467-020-19370-z.
112. 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, doi: 10.1126/science.1217443.
113. Richter, R., Rorbach, J., Pajak, A., Smith, P. M., Wessels, H. J., et al. (2010) A functional peptidyl-tRNA hydrolase, ICT1, has been recruited into the human mitochondrial ribosome, *EMBO J.*, **29**, 1116-1125.
114. Handa, Y., Hikawa, Y., Tochio, N., Kogure, H., Inoue, M., et al. (2010) Solution structure of the catalytic domain of the mitochondrial protein ICT1 that is essential for cell vitality, *J. Mol. Biol.*, **404**, 260-273.
115. Feaga, H. A., Quickel, M. D., Hankey-Giblin, P. A., and Keiler, K. C. (2016) Human cells require non-stop ribosome rescue activity in mitochondria, *PLoS Genet.*, **12**, e1005964, doi: 10.1371/journal.pgen.1005964.
116. Pan, X., Tan, J., Weng, X., Du, R., Jiang, Y., et al. (2021) ICT1 Promotes osteosarcoma cell proliferation and inhibits apoptosis via STAT3/BCL-2 pathway, *Biomed. Res. Int.*, **2021**, 8971728, doi: 10.1155/2021/8971728.
117. Greber, B. J., Boehringer, D., Leitner, A., Bieri, P., Voigts-Hoffmann, F., et al. (2014) Architecture of the large subunit of the mammalian mitochondrial ribosome, *Nature*, **505**, 515-519, doi: 10.1038/nature12890.
118. Kater, L., Mitterer, V., Thoms, M., Cheng, J., Berninghausen, O., et al. (2020) Construction of the central protuberance and L1 stalk during 60S subunit biogenesis, *Mol. Cell*, **79**, 615-628.e615, doi: 10.1016/j.molcel.2020.06.032.
119. Nikolay, R., Hilal, T., Qin, B., Mielke, T., Burger, J., et al. (2018) Structural visualization of the formation and activation of the 50S ribosomal subunit during *in vitro* reconstitution, *Mol. Cell*, **70**, 881-893.e883, doi: 10.1016/j.molcel.2018.05.003.
120. Davis, J. H., Tan, Y. Z., Carragher, B., Potter, C. S., Lyumkis, D., and Williamson, J. R. (2016) Modular assembly of the bacterial large ribosomal subunit, *Cell*, **167**, 1610-1622.e1615, doi: 10.1016/j.cell.2016.11.020.
121. Huang, S., Aleksashin, N. A., Loveland, A. B., Klepacki, D., Reier, K., et al. (2020) Ribosome engineering reveals the importance of 5S rRNA autonomy for ribosome assembly, *Nat. Commun.*, **11**, 2900, doi: 10.1038/s41467-020-16694-8.

122. Waltz, F., Soufari, H., Bochler, A., Giege, P., and Hashem, Y. (2020) Cryo-EM structure of the RNA-rich plant mitochondrial ribosome, *Nat. Plants*, **6**, 377-383, doi: 10.1038/s41477-020-0631-5.
123. Akabane, S., Ueda, T., Nierhaus, K. H., and Takeuchi, N. (2014) Ribosome rescue and translation termination at non-standard stop codons by ICT1 in mammalian mitochondria, *PLoS Genet.*, **10**, e1004616, doi: 10.1371/journal.pgen.1004616.
124. Vaishya, S., Kumar, V., Gupta, A., Siddiqi, M. I., and Habib, S. (2016) Polypeptide release factors and stop codon recognition in the apicoplast and mitochondrion of *Plasmodium falciparum*, *Mol. Microbiol.*, **100**, 1080-1095, doi: 10.1111/mmi.13369.
125. Kogure, H., Hikawa, Y., Hagihara, M., Tochio, N., Koshiha, S., et al. (2012) Solution structure and siRNA-mediated knockdown analysis of the mitochondrial disease-related protein C12orf65, *Proteins*, **80**, 2629-2642, doi: 10.1002/prot.24152.
126. Antonicka, H., Ostergaard, E., Sasarman, F., Weraarpachai, W., Wibrand, F., et al. (2010) Mutations in C12orf65 in patients with encephalomyopathy and a mitochondrial translation defect, *Am. J. Hum. Genet.*, **87**, 115-122, doi: 10.1016/j.ajhg.2010.06.004.
127. Wesolowska, M., Gorman, G. S., Alston, C. L., Pajak, A., Pyle, A., et al. (2015) Adult onset leigh syndrome in the intensive care setting: a novel presentation of a C12orf65 related mitochondrial disease, *J. Neuromuscul. Dis.*, **2**, 409-419, doi: 10.3233/JND-150121.
128. Zorkau, M., Albus, C. A., Berlinguer-Palmini, R., Chrzanowska-Lightowlers, Z. M. A., and Lightowlers, R. N. (2021) High-resolution imaging reveals compartmentalization of mitochondrial protein synthesis in cultured human cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, doi: 10.1073/pnas.2008778118.
129. Chandrasekaran, V., Juszkievicz, S., Choi, J., Puglisi, J. D., Brown, A., et al. (2019) Mechanism of ribosome stalling during translation of a poly(A) tail, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **26**, 1132-1140, doi: 10.1038/s41594-019-0331-x.
130. Tesina, P., Lessen, L. N., Buschauer, R., Cheng, J., Wu, C. C., et al. (2020) Molecular mechanism of translational stalling by inhibitory codon combinations and poly(A) tracts, *EMBO J.*, **39**, e103365, doi: 10.15252/embj.2019103365.
131. Frolova, L., Le Goff, X., Zhouravleva, G., Davydova, E., Philippe, M., and Kisselev, L. (1996) Eukaryotic polypeptide chain release factor eRF3 is an eRF1- and ribosome-dependent guanosine triphosphatase, *RNA*, **2**, 334-341.
132. Alkalaeva, E. Z., Pisarev, A. V., Frolova, L. Y., Kisselev, L. L., and Pestova, T. V. (2006) *In vitro* reconstitution of eukaryotic translation reveals cooperativity between release factors eRF1 and eRF3, *Cell*, **125**, 1125-1136.
133. Salas-Marco, J., and Bedwell, D. M. (2004) GTP hydrolysis by eRF3 facilitates stop codon decoding during eukaryotic translation termination, *Mol. Cell Biol.*, **24**, 7769-7778.
134. Frolova, L., Seit-Nebi, A., and Kisselev, L. (2002) Highly conserved NIKS tetrapeptide is functionally essential in eukaryotic translation termination factor eRF1, *RNA*, **8**, 129-136.
135. Muramatsu, T., Heckmann, K., Kitanaka, C., and Kuchino, Y. (2001) Molecular mechanism of stop codon recognition by eRF1: a wobble hypothesis for peptide anticodons, *FEBS Lett.*, **488**, 105-109, doi: 10.1016/s0014-5793(00)02391-7.
136. Bulygin, K. N., Popugaeva, E. A., Repkova, M. N., Meschaninova, M. I., Ven'yaminova, A. G., et al. (2007) The C domain of translation termination factor eRF1 is close to the stop codon in the A site of the 80S ribosome, *Mol. Biol.*, **41**, 781-789.
137. Brown, A., Shao, S., Murray, J., Hegde, R. S., and Ramakrishnan, V. (2015) Structural basis for stop codon recognition in eukaryotes, *Nature*, **524**, 493-496, doi: 10.1038/nature14896.
138. Brown, C. M., Stockwell, P. A., Trotman, C. N., and Tate, W. P. (1990) Sequence analysis suggests that tetranucleotides signal the termination of protein synthesis in eukaryotes, *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6339-6345.
139. Matheisl, S., Berninghausen, O., Becker, T., and Beckmann, R. (2015) Structure of a human translation termination complex, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 8615-8626, doi: 10.1093/nar/gkv909.
140. Jungreis, I., Lin, M. F., Spokony, R., Chan, C. S., Negre, N., et al. (2011) Evidence of abundant stop codon readthrough in *Drosophila* and other metazoa, *Genome Res.*, **21**, 2096-2113, doi: 10.1101/gr.119974.110.
141. Swart, E. C., Serra, V., Petroni, G., and Nowacki, M. (2016) Genetic codes with no dedicated stop codon: context-dependent translation termination, *Cell*, **166**, 691-702, doi: 10.1016/j.cell.2016.06.020.
142. Heaphy, S. M., Mariotti, M., Gladyshev, V. N., Atkins, J. F., and Baranov, P. V. (2016) Novel ciliate genetic code variants including the reassignment of all three stop codons to sense codons in *Condyllostoma magnum*, *Mol. Biol. Evol.*, **33**, 2885-2889, doi: 10.1093/molbev/msw166.
143. Zahonova, K., Kostygov, A. Y., Sevcikova, T., Yurchenko, V., and Elias, M. (2016) An unprecedented non-canonical nuclear genetic code with all three termination codons reassigned as sense codons, *Curr. Biol.*, **26**, 2364-2369, doi: 10.1016/j.cub.2016.06.064.
144. Anzalone, A. V., Zairis, S., Lin, A. J., Rabadan, R., and Cornish, V. W. (2019) Interrogation of eukaryotic stop codon readthrough signals by *in vitro* RNA selection, *Biochemistry*, **58**, 1167-1178, doi: 10.1021/acs.biochem.8b01280.
145. Firth, A. E., Wills, N. M., Gesteland, R. F., and Atkins, J. F. (2011) Stimulation of stop codon readthrough: frequent presence of an extended 3' RNA structural element, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 6679-6691, doi: 10.1093/nar/gkr224.
146. Bonetti, B., Fu, L., Moon, J., and Bedwell, D. M. (1995) The efficiency of translation termination is determined by a synergistic interplay between upstream and downstream sequences in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Mol. Biol.*, **251**, 334-345.
147. Harrell, L., Melcher, U., and Atkins, J. F. (2002) Predominance of six different hexanucleotide recoding signals 3' of read-through stop codons, *Nucleic Acids Res.*, **30**, 2011-2017, doi: 10.1093/nar/30.9.2011.
148. Shao, S., Murray, J., Brown, A., Taunton, J., Ramakrishnan, V., and Hegde, R. S. (2016) Decoding mammalian ribosome-mRNA states by translational GTPase complexes, *Cell*, **167**, 1229-1240.e1215, doi: 10.1016/j.cell.2016.10.046.
149. Muhs, M., Hilal, T., Mielke, T., Skabkin, M. A., Sanbonmatsu, K. Y., et al. (2015) Cryo-EM of ribosomal 80S complexes with termination factors reveals the translocated cricket paralysis virus IRES, *Mol. Cell*, **57**, 422-432, doi: 10.1016/j.molcel.2014.12.016.
150. Des Georges, A., Hashem, Y., Unbehaun, A., Grassucci, R. A., Taylor, D., et al. (2014) Structure of the mammalian ribosomal pre-termination complex associated with eRF1.eRF3.GDPNP, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 3409-3418, doi: 10.1093/nar/gkt1279.
151. Li, W., Chang, S. T., Ward, F. R., and Cate, J. H. D. (2020) Selective inhibition of human translation termination by a drug-like compound, *Nat. Commun.*, **11**, 4941, doi: 10.1038/s41467-020-18765-2.

152. Preis, A., Heuer, A., Barrio-Garcia, C., Hauser, A., Eyler, D. E., et al. (2014) Cryoelectron microscopic structures of eukaryotic translation termination complexes containing eRF1-eRF3 or eRF1-ABCE1, *Cell Rep.*, **8**, 59-65, doi: 10.1016/j.celrep.2014.04.058.
153. Pisarev, A. V., Skabkin, M. A., Pisareva, V. P., Skabkina, O. V., Rakotondrafara, A. M., et al. (2010) The role of ABCE1 in eukaryotic posttermination ribosomal recycling, *Mol. Cell*, **37**, 196-210.
154. Annibaldis, G., Domanski, M., Dreos, R., Contu, L., Carl, S., et al. (2020) Readthrough of stop codons under limiting ABCE1 concentration involves frameshifting and inhibits nonsense-mediated mRNA decay, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 10259-10279, doi: 10.1093/nar/gkaa758.
155. Young, D. J., Guydosh, N. R., Zhang, F., Hinnebusch, A. G., and Green, R. (2015) Rli1/ABCE1 recycles terminating ribosomes and controls translation reinitiation in 3'-UTRs *in vivo*, *Cell*, **162**, 872-884, doi: 10.1016/j.cell.2015.07.041.
156. Lawson, M. R., Lessen, L. N., Wang, J., Prabhakar, A., Corsepilus, N. C., et al. (2021) Mechanisms that ensure speed and fidelity in eukaryotic translation termination, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2021.04.01.438116.
157. Kryuchkova, P., Grishin, A., Eliseev, B., Karyagina, A., Frolova, L., and Alkalaeva, E. (2013) Two-step model of stop codon recognition by eukaryotic release factor eRF1, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 4573-4586, doi: 10.1093/nar/gkt113.
158. Svidritskiy, E., Demo, G., and Korostelev, A. A. (2018) Mechanism of premature translation termination on a sense codon, *J. Biol. Chem.*, **293**, 12472-12479, doi: 10.1074/jbc.AW118.003232.
159. Gouridis, G., Hetzert, B., Kiosze-Becker, K., de Boer, M., Heinemann, H., et al. (2019) ABCE1 controls ribosome recycling by an asymmetric dynamic conformational equilibrium, *Cell Rep.*, **28**, 723-734.e726, doi: 10.1016/j.celrep.2019.06.052.
160. Heuer, A., Gerovac, M., Schmidt, C., Trowitzsch, S., Preis, A., et al. (2017) Structure of the 40S-ABCE1 post-splitting complex in ribosome recycling and translation initiation, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **24**, 453-460, doi: 10.1038/nsmb.3396.
161. Mancera-Martinez, E., Brito Querido, J., Valasek, L. S., Simonetti, A., and Hashem, Y. (2017) ABCE1: a special factor that orchestrates translation at the crossroad between recycling and initiation, *RNA Biol.*, **14**, 1279-1285, doi: 10.1080/15476286.2016.1269993.
162. Kratzat, H., Mackens-Kiani, T., Ameisemeier, M., Potocnjak, M., Cheng, J., et al. (2021) A structural inventory of native ribosomal ABCE1-43S pre-initiation complexes, *EMBO J.*, **40**, e105179, doi: 10.15252/embj.2020105179.
163. Hilal, T., Yamamoto, H., Loerke, J., Burger, J., Mielke, T., and Spahn, C. M. (2016) Structural insights into ribosomal rescue by Dom34 and Hbs1 at near-atomic resolution, *Nat. Commun.*, **7**, 13521, doi: 10.1038/ncomms13521.
164. Becker, T., Franckenberg, S., Wickles, S., Shoemaker, C. J., Anger, A. M., et al. (2012) Structural basis of highly conserved ribosome recycling in eukaryotes and archaea, *Nature*, **482**, 501-506, doi: 10.1038/nature10829.
165. Su, T., Izawa, T., Thoms, M., Yamashita, Y., Cheng, J., et al. (2019) Structure and function of Vms1 and Arb1 in RQC and mitochondrial proteome homeostasis, *Nature*, **570**, 538-542, doi: 10.1038/s41586-019-1307-z.
166. Inada, T. (2020) Quality controls induced by aberrant translation, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 1084-1096, doi: 10.1093/nar/gkz1201.
167. Van den Elzen, A. M., Schuller, A., Green, R., and Seraphin, B. (2014) Dom34-Hbs1 mediated dissociation of inactive 80S ribosomes promotes restart of translation after stress, *EMBO J.*, **33**, 265-276, doi: 10.1002/embj.201386123.
168. Guydosh, N. R., and Green, R. (2014) Dom34 rescues ribosomes in 3'-untranslated regions, *Cell*, **156**, 950-962, doi: 10.1016/j.cell.2014.02.006.
169. Passos, D. O., Doma, M. K., Shoemaker, C. J., Muhrad, D., Green, R., et al. (2009) Analysis of Dom34 and its function in no-go decay, *Mol. Biol. Cell*, **20**, 3025-3032, doi: 10.1091/mbc.E09-01-0028.
170. 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, doi: 10.1126/science.1192430.
171. Becker, T., Armache, J. P., Jarasch, A., Anger, A. M., Villa, E., et al. (2011) Structure of the no-go mRNA decay complex Dom34-Hbs1 bound to a stalled 80S ribosome, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **18**, 715-720, doi: 10.1038/nsmb.2057.
172. Pisareva, V. P., Skabkin, M. A., Hellen, C. U., Pestova, T. V., and Pisarev, A. V. (2011) Dissociation by Pelota, Hbs1 and ABCE1 of mammalian vacant 80S ribosomes and stalled elongation complexes, *EMBO J.*, **30**, 1804-1817, doi: 10.1038/emboj.2011.93.
173. Kostova, K. K., Hickey, K. L., Osuna, B. A., Hussmann, J. A., Frost, A., et al. (2017) CAT-tailing as a fail-safe mechanism for efficient degradation of stalled nascent polypeptides, *Science*, **357**, 414-417, doi: 10.1126/science.aam7787.
174. Verma, R., Reichermeier, K. M., Burroughs, A. M., Oania, R. S., Reitsma, J. M., et al. (2018) Vms1 and ANKZF1 peptidyl-tRNA hydrolases release nascent chains from stalled ribosomes, *Nature*, **557**, 446-451, doi: 10.1038/s41586-018-0022-5.
175. Zurita Rendon, O., Fredrickson, E. K., Howard, C. J., Van Vranken, J., Fogarty, S., et al. (2018) Vms1p is a release factor for the ribosome-associated quality control complex, *Nat. Commun.*, **9**, 2197, doi: 10.1038/s41467-018-04564-3.
176. 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, doi: 10.1038/s41594-019-0211-4.
177. Kuroha, K., Zinoviev, A., Hellen, C. U. T., and Pestova, T. V. (2018) Release of ubiquitinated and non-ubiquitinated nascent chains from stalled mammalian ribosomal complexes by ANKZF1 and Ptrh1, *Mol. Cell*, **72**, 286-302.e288, doi: 10.1016/j.molcel.2018.08.022.
178. Yip, M. C. J., Savickas, S., Gygi, S. P., and Shao, S. (2020) ELAC1 repairs tRNAs cleaved during ribosome-associated quality control, *Cell Rep.*, **30**, 2106-2114.e2105, doi: 10.1016/j.celrep.2020.01.082.
179. Defenouillere, Q., Yao, Y., Mouaikel, J., Namane, A., Galopier, A., et al. (2013) Cdc48-associated complex bound to 60S particles is required for the clearance of aberrant translation products, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 5046-5051, doi: 10.1073/pnas.1221724110.
180. Verma, R., Oania, R. S., Kolawa, N. J., and Deshaies, R. J. (2013) Cdc48/p97 promotes degradation of aberrant nascent polypeptides bound to the ribosome, *Elife*, **2**, e00308, doi: 10.7554/eLife.00308.
181. Brandman, O., Stewart-Ornstein, J., Wong, D., Larson, A., Williams, C. C., et al. (2012) A ribosome-bound quality control complex triggers degradation of nascent peptides and signals translation stress, *Cell*, **151**, 1042-1054, doi: 10.1016/j.cell.2012.10.044.

DIVERSITY AND SIMILARITY OF TERMINATION AND RIBOSOME RESCUE IN BACTERIAL, MITOCHONDRIAL, AND CYTOPLASMIC TRANSLATION

Review

A. A. Korostelev

RNA Therapeutics Institute, Department of Biochemistry and Molecular Pharmacology, UMass Medical School, Worcester, MA, USA; E-mail: Andrei.Korostelev@umassmed.edu

When a ribosome encounters the stop codon of an mRNA, it terminates translation, releases the newly made protein, and is recycled to initiate translation on a new mRNA. Termination is a highly dynamic process in which release factors (RF1 and RF2 in bacteria; eRF1 • eRF3 • GTP in eukaryotes) coordinate peptide release with large-scale molecular rearrangements of the ribosome. Ribosomes stalled on aberrant mRNAs are rescued and recycled by diverse bacterial, mitochondrial, or cytoplasmic quality control mechanisms. These are catalyzed by rescue factors with peptidyl-tRNA hydrolase activity (bacterial ArfA • RF2 and ArfB, mitochondrial ICT1 and mtRF-R, and cytoplasmic Vms1), that are distinct from each other and from release factors. Nevertheless, recent structural studies demonstrate a remarkable similarity between translation termination and ribosome rescue mechanisms. This review describes how these pathways rely on inherent ribosome dynamics, emphasizing the active role of the ribosome in all translation steps.

Keywords: translation, termination, ribosome, rescue