

УДК 577.217.563

РОЛЬ ФАКТОРОВ ТЕРМИНАЦИИ В ГИДРОЛИЗЕ СЛОЖНОЭФИРНОЙ СВЯЗИ ПЕПТИДИЛ-тРНК У БАКТЕРИЙ

Мини-обзор

© 2021 С.М. Баласанянц, Е.В. Александрова, Ю.С. Поликанов*

*Департамент Биологических Наук, Университет штата Иллинойс в Чикаго,
60607 Чикаго, США; электронная почта: yuryp@uic.edu*

Поступила в редакцию 15.05.2021

После доработки 16.06.2021

Принята к публикации 16.06.2021

Факторы терминации первого класса (RF1 и RF2) распознают стоп-кодона в последовательностях матричных РНК и необходимы для гидролиза сложноэфирной связи пептидил-тРНК в Р-сайте рибосомы на завершающем этапе биосинтеза белка у бактерий, в результате чего готовый белок выходит из рибосомы. Ключевую роль в данной реакции высвобождения готового полипептида играет высококонсервативный мотив GGQ в аминокислотной последовательности этих факторов, некоторые мутации которого значительно понижают скорость гидролиза или даже полностью ингибируют его. Ранее было высказано предположение, что аминокислоты GGQ-фрагмента непосредственно координируют молекулу воды, которая располагается вблизи карбонильной группы пептидил-тРНК и непосредственно участвует в гидролизе сложноэфирной связи. Однако имеющиеся структуры терминационных комплексов бактериальной рибосомы не позволяют идентифицировать молекулу воды в активном центре рибосомы и определить точное расположение сложноэфирной связи пептидил-тРНК относительно GGQ и, следовательно, выяснить детальный механизм реакции, равно как и роль этой последовательности. Данный обзор суммирует опубликованные данные, а также высказанные ранее гипотезы о роли GGQ в реакции гидролиза пептидил-тРНК. Кроме того, в настоящей работе рассмотрены основные причины, препятствующие получению структурных данных высокого разрешения, необходимых для выяснения детального механизма катализа.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: факторы терминации трансляции, рибосома, 70S, пептидил-тРНК, гидролиз, структурный анализ.

DOI: 10.31857/S0320972521090074

ВВЕДЕНИЕ

Для фундаментального понимания функционирования рибосомы необходимо знание детальных структур всех компонентов биосинтеза белка и понимание их взаимодействия на атомном уровне. Терминация трансляции является заключительной стадией биосинтеза белка в клетке, в основе которой лежит гидролиз сложноэфирной связи пептидил-тРНК в Р-сайте рибосомы с последующим высвобождением полипептидной цепи и деацелированной тРНК из рибосомы. Данный процесс катализируется факторами терминации первого класса (RF, release factor), которых у бактерий два – RF1 и RF2. Данные белки состоят из примерно 350–360 аминокислотных остатков и обладают молекулярной массой около 40 кДа [1–3]. Терминационный фактор RF1 распознает стоп-ко-

доны UAA и UAG, в то время как RF2 специфичен в отношении стоп-кодонов UAA и UGA [3]. Оба фактора терминации, RF1 и RF2, состоят из четырёх доменов и, связываясь в А-сайте рибосомы, по форме имитируют молекулу тРНК (рис. 1, *a* и *b*). За распознавание стоп-кодона отвечают сближенные друг с другом домены II и IV (рис. 1, *c*) [4, 5], в то время как в гидролизе пептидил-тРНК участвует домен III, содержащий высококонсервативный мотив GGQ (Gly-Gly-Gln) (рис. 1, *c*) [6–9]. Домен I терминационных факторов RF1 и RF2 (рис. 1, *c*) необходим для взаимодействия с терминационным фактором второго класса, RF3, который способствует высвобождению RF1/2 из рибосомы после реакции гидролиза [10, 11].

В то время как механизм распознавания стоп-кодонов факторами терминации первого класса детально изучен, роль данных факторов в каталитическом механизме гидролиза сложноэфирной связи пептидил-тРНК до сих пор остается невыясненной. Многочисленные исследования выявили критическую роль консерватив-

Принятые сокращения: ПТЦ – пептидилтрансферазный центр; RF – фактор терминации.

* Адресат для корреспонденции.

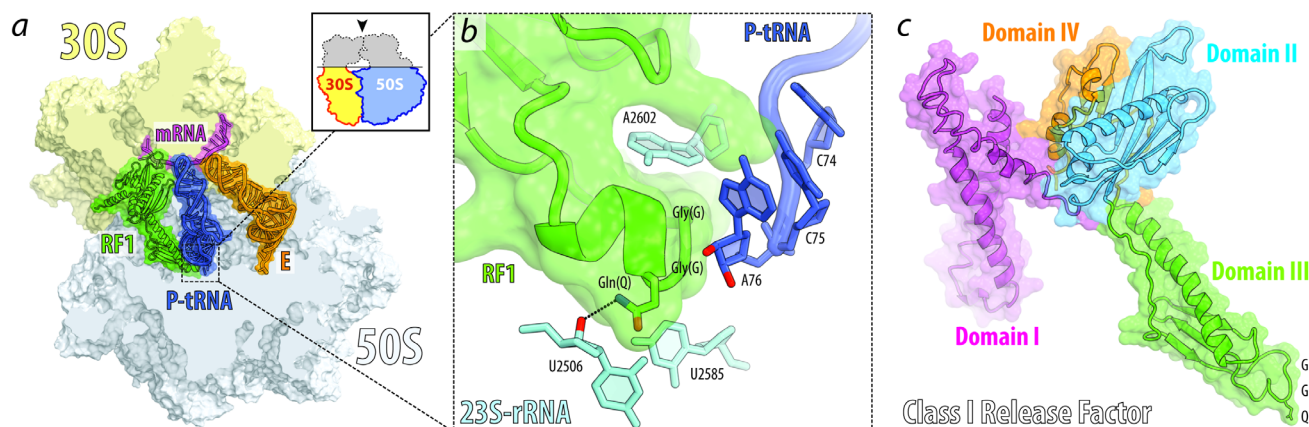


Рис. 1. Структура пост-терминационного комплекса 70S-рибосомы (*a* и *b*) и доменная организация терминационного фактора (*c*). Малая субъединица рибосомы (30S) показана светло-жёлтым, большая субъединица – голубым, мРНК – фиолетовым, терминационный фактор RF1 – зеленым, деацелированные тРНК в Р- и Е-сайтах – синим и оранжевым соответственно. Нумерация нуклеотидов 23S рРНК указана для *Escherichia coli*. Структура взята из Protein Data Bank (accession code 4V63 [5])

ной аминокислотной GGQ-последовательности факторов терминации первого класса в гидролизе пептидил-тРНК (рис. 1, *b*). При этом GGQ-мотив имеется у терминационных факторов первого класса не только бактерий [12], но и эукариот, включая человека [6, 13]. Однако, несмотря на обилие опубликованных структур факторов терминации в комплексе с бактериальной рибосомой, определить точное положение каталитической молекулы воды в активном центре, а также роль GGQ в этом процессе пока не удалось [4, 5, 14–19]. Более того, расположение сложноэфирной связи пептидил-тРНК относительно фрагмента GGQ в пептидилтрансферазном центре (ПТЦ) рибосомы также не известно. Предложен ряд гипотез, объясняющих механизм гидролиза сложноэфирной связи, и вклад GGQ-мотива факторов терминации в этот процесс. Данная работа посвящена краткому обзору известных гипотез, а также спектру задач, сопряжённых с изучением этой фундаментальной проблемы.

ВАЖНОСТЬ ФРАГМЕНТА GGQ В ГИДРОЛИЗЕ ПЕПТИДИЛ-тРНК

Высококонсервативная и функционально значимая последовательность GGQ расположена в факторах терминации RF1/2 в неструктурированной петле домена 3, которая обращена к ПТЦ и 3'-концу молекулы тРНК в Р-сайте (рис. 1, *b*) [20, 21]. Боковая цепь остатка глутамина в этой последовательности метилирована по атому азота специфичной для факторов терминации метилтрансферазой PrmC/HemK

[22–24]. При этом, с одной стороны, отсутствие метилирования остатка глутамина GGQ либо не снижает активности терминационных факторов, как у RF1 из *Escherichia coli*, либо незначительно снижает скорость, как у RF2 [23]. С другой стороны, метилирование глутамина GGQ примерно на 2 порядка ускоряет высвобождение синтезированных пептидов, связанных с тРНК через остаток глицина или пролина [18]. Кроме того, скорость гидролиза пептидил-тРНК существенно (на 4 порядка) снижается только при замене данного остатка на аспарагин (GGN), аспарагиновую кислоту (GGD) или пролин (GGP), в то время как все остальные замены оказывают незначительный эффект (в пределах одного порядка) [9]. В случае замены одного из остатков глицина в GGQ на другие аминокислоты скорость реакции существенно падает (примерно на 4 порядка), что свидетельствует о важной роли этих аминокислот в катализе [9]. Очевидно, за счёт расположения в гибкой петле остатка глицина формируют уникальную конформацию, которая, скорее всего, невозможна для других аминокислот.

Изначально была высказана гипотеза о том, что боковая цепь остатка глутамина в GGQ координирует каталитически активную молекулу воды вблизи от сложноэфирной связи пептидил-тРНК [14], тем самым ускоряя и контролируя процесс гидролиза. Однако имеющиеся структурные данные не подтверждают эту гипотезу. Более того, боковая цепь остатка глутамина в имеющихся структурах направлена в сторону от реакционного центра и, следовательно, физически не может участвовать в координации каталитической молекулы воды. Присутствие в

терминационном комплексе конкурентного нуклеофила гидросиламина подтверждает гипотезу, что N⁵-метилглутамин не участвует в катализе напрямую, а лишь является своеобразным фильтром, не позволяющим попасть в реакционный центр никаким нуклеофилам, кроме воды [9]. Этим же эффектом можно объяснить сохраняющуюся каталитическую активность у таких разных мутантов RF1/RF2, как GGF, GGK и GGW.

Исключив участие боковой цепи глутамина непосредственно в катализе гидролиза пептидил-тРНК, возникает вопрос об её иной возможной роли. В связи с этим было высказано предположение, что атом азота пептидной связи между остатками глицина и глутамина в GGQ играет в катализе ключевую роль, стабилизируя короткоживущий оксианион переходного состояния путём образования с ним водородной связи [5]. Это предположение косвенно подтверждается результатами экспериментов, показывающих, что мутантный вариант RF2 из *E. coli*, содержащий изменённую аминокислотную последовательность GGP, не обладает каталитической активностью, но при этом связывается с 70S-рибосомой аналогично нативному RF2 [17]. Очевидно, что азот главной цепи остатка пролина, не будучи донором водородной связи, не способен стабилизировать оксианион, и поэтому не может катализировать гидролиз пептидил-тРНК [15]. Однако ни одна из опубликованных работ не может объяснить практически полное отсутствие активности терминационных факторов при замене остатка глутамина в GGQ на химически сходный аспарагин (GGN) или аспарагиновую кислоту (GGD). Ответ на этот важный для понимания каталитического механизма терминации вопрос могли

бы дать до сих пор отсутствующие структуры высокого разрешения рибосомы в комплексе с пептидил-тРНК и нормальными или мутантными факторами терминации.

ОКРУЖЕНИЕ РЕАКЦИОННОГО ЦЕНТРА

Каталитический центр рибосомы (ПТЦ) катализирует две химические реакции — транспептидацию и гидролиз пептидил-тРНК, которые, по сути, очень похожи и различаются только участвующими в реакции нуклеофилами (рис. 2). При транспептидации нуклеофилом является аминогруппа аминоксил-тРНК, локализованной в А-сайте, которая осуществляет нуклеофильную атаку на углерод карбонильной группы пептидил-тРНК в Р-сайте, что приводит к образованию новой пептидной связи между азотом аминоксил-тРНК и углеродом карбонильной группы и переходу растущей полипептидной цепи на остаток новой аминокислоты в А-сайте (рис. 2, а) [25–27]. Таким образом, реакция транспептидации является аминолизом, который отличается от реакции гидролиза пептидил-тРНК только нуклеофилом, которым в случае гидролиза является молекула воды (рис. 2, б) [28]. По сравнению с аминоксил-тРНК молекула воды является значительно более слабым нуклеофилом и, следовательно, требует «активации», что создаёт необходимость правильного молекулярного окружения для эффективного протекания реакции гидролиза. Ранее высказанное предположение, что именно боковая цепь глутамина в GGQ активирует молекулу воды [14], не подтверждается структурными и биохимическими данными [9]. Необходимо подчеркнуть, что, кроме факторов

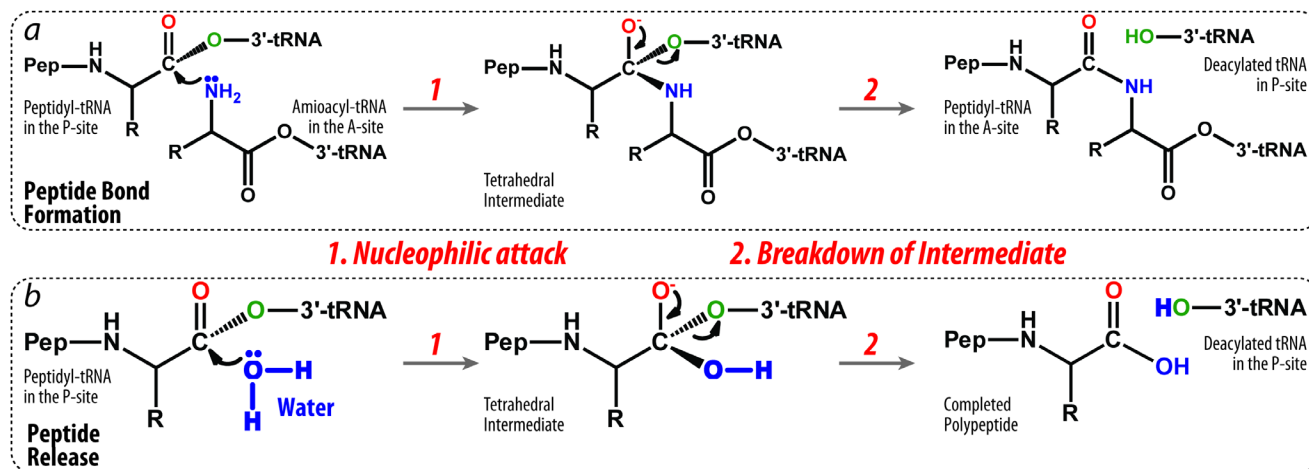


Рис. 2. Сравнение механизмов реакции транспептидации (а) и гидролиза пептидил-тРНК (б)

терминации первого класса, важную роль в реакции гидролиза пептидил-тРНК играют нуклеотиды C2063, A2451, U2506, U2585, A2602, входящие в состав 23S рРНК [29, 30], а также 2'-гидроксил последнего нуклеотида A76 в пептидил-тРНК [28, 31]. Мутации этих нуклеотидов рРНК, а также отсутствие 2'-гидроксила на A76 пептидил-тРНК свидетельствуют о том, что нуклеотид A2602, а также 2'-ОН A76 пептидил-тРНК являются ключевыми участниками реакции терминации, без которых процесс не протекает совсем. Интересно, что мутация A2602C специфически подавляет только гидролиз сложноэфирной связи, но не реакцию транспептидации (аминолиз) [30]. Данные факты позволяют предположить, что нуклеотид A2602, а также 2'-ОН пептидил-тРНК наравне с GGQ, скорее всего, формируют микроокружение карбонильной группы пептидил-тРНК, внутри которого возможно нахождение каталитической молекулы воды.

НЕДОСТАТКИ ПРЕДЫДУЩИХ РАБОТ

В настоящий момент существуют две ключевые проблемы, препятствующие использованию опубликованных структур терминационных факторов RF1/2 в комплексе с 70S-рибосомой для детального анализа механизма гидролиза пептидил-тРНК. Во-первых, подавляющее большинство имеющихся структур содержат деацилированную тРНК в Р-сайте и, таким образом, представляют собой пост-терминационные комплексы, в которых реакция гидролиза пептидил-тРНК уже произошла [4, 5, 14–18]. Не удивительно, что в таких структурах не удалось обнаружить каталитическую молекулу воды, поскольку она является одним из участников реакции, а не её продуктом (рис. 2). Более того, имеющиеся структуры рибосомных комплексов, содержащих только один продукт реакции (деацилированную тРНК в Р-сайте), априори не могут предоставить информацию о роли GGQ в механизме катализа за счёт возможных изменений пространственного расположения участвующих элементов до и после реакции. Кроме того, спонтанный гидролиз сложноэфирной связи за время роста рибосомных кристаллов (1–2 недели) делает невозможным использование нативных аминокислот- либо пептидил-тРНК в качестве субстратов для рибосомного Р-сайта при получении пре-терминационных комплексов. Данная проблема может быть решена за счёт замены нативной пептидил-тРНК на модифицированную пептидил-тРНК, в которой сложноэфирная связь заменена амид-

ной, не гидролизуемой в условиях, используемых для кристаллизации рибосом [26, 27, 32]. Использование таких пре-терминационных комплексов рибосомы для рентгеноструктурного анализа позволило бы локализовать точное расположение пептидил-тРНК и её молекулярное окружение, а также зафиксировать ПТЦ непосредственно перед началом реакции гидролиза и, вероятно, понять механизм запуска данной реакции.

Второй важной проблемой является низкое разрешение всех опубликованных на сегодняшний день структур терминационных комплексов (3–5 Å), не позволяющее однозначно определить ориентацию субстратов или продуктов реакции терминации относительно друг друга [4, 5, 14–19]. Увидеть координированные молекулы воды при таком разрешении крайне сложно. Поэтому для понимания взаимного расположения карбонильной группы и атакующей её молекулы воды необходимы структуры с высоким разрешением 2,5–2,7 Å, которые не только позволили бы визуализировать молекулы воды в активном центре, но также существенно расширили бы наши представления о роли GGQ в гидролизе пептидил-тРНК.

Единственная структура пре-терминационного комплекса с негидролизуемым аналогом аминокислот-тРНК в Р-сайте, полученная более 10 лет назад методом рентгеноструктурного анализа [19], потенциально могла бы прояснить взаимные ориентации субстратов реакции в ПТЦ. Однако невысокое разрешение данной структуры (3,1 Å) и, что более важно, плохое качество электронной плотности не позволяют сделать однозначные выводы (рис. 3) [19]. Серьезным недостатком данной работы является то, что авторы смоделировали карбонильную группу пептидил-тРНК не на основе экспериментально полученной карты электронной плотности, а на основе предположения о том, что эта группа должна быть расположена так же, как и при реакции транспептидации, а каталитическая молекула воды должна располагаться в той же точке, что и атакующий её амин, аминокислот-тРНК. Несмотря на всю логичность подобного предположения, никаких экспериментальных данных, указывающих на его правильность, до сих пор не получено. Поэтому, вполне возможно, что карбонильная группа и атакующая её молекула воды при терминации располагаются в ПТЦ совсем не так, как карбонил и атакующий амин при транспептидации. Таким образом, получение структуры сходного комплекса с улучшенной картой электронной плотности при более высоком разрешении (как минимум 2,7 Å) позволило бы явным и единственно верным об-

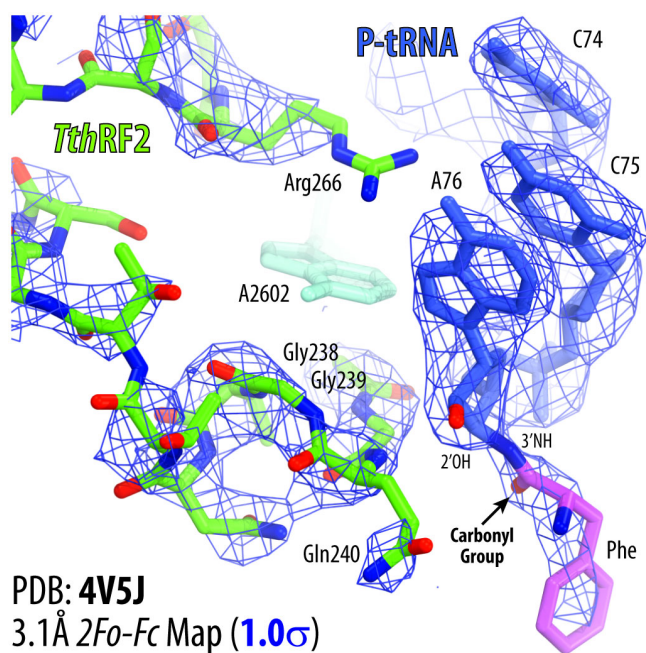


Рис. 3. Карта электронной плотности пре-терминационного комплекса 70S-рибосомы [19]

разом определить взаимное расположение всех участников реакции (прежде всего, карбонильной группы) и подтвердить или опровергнуть данную гипотезу.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то, что до сих пор не существует чёткого понимания того, как именно протекает гидролиз сложноэфирной связи пептидил-тРНК во время терминации трансляции, очевидны основные направления дальнейших ис-

следований для решения этой проблемы. В первую очередь необходимо получить структуры пре-терминационных комплексов рибосомы с высоким разрешением (не менее 2,5–2,7 Å) для детального понимания локализации каталитической молекулы воды относительно карбонильной группы пептидил-тРНК непосредственно перед началом реакции гидролиза. Подобная структура также позволила бы ответить на вопрос о том, участвует ли GGQ в координации молекулы воды или данный элемент нужен только для надежного закоривания терминационных факторов в А-сайте рибосомы. Дополнительная информация о роли N⁵-метилглутамина GGQ в терминации может быть получена из структур высокого разрешения 70S-рибосомы в комплексе с неактивными мутантами терминационных факторов, в частности GGN и GGD. Также необходимо обосновать на структурном уровне полученные ранее биохимические данные о роли N⁵-метильной группы глутамина GGQ в гидролизе сложноэфирной связи [18]. Таким образом, получение структур физиологически значимых функциональных пре-терминационных комплексов рибосомы с высоким (вблизи атомного) разрешением позволит ответить на большинство нерешённых вопросов, связанных с терминацией биосинтеза белка в живых организмах.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Illinois State Start-up Funds, а также National Science Foundation.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Capecchi, M. R. (1967) Polypeptide chain termination *in vitro*: isolation of a release factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **58**, 1144-1151, doi: 10.1073/pnas.58.3.1144.
2. Capecchi, M. R., and Klein, H. A. (1969) Characterization of three proteins involved in polypeptide chain termination, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **34**, 469-477, doi: 10.1101/sqb.1969.034.01.053.
3. 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.
4. 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, doi: 10.1016/j.cell.2005.09.039.
5. 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, doi: 10.1038/nature07115.
6. 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.
7. 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.

8. Mora, L., Heurgue-Hamard, V., Champ, S., Ehrenberg, M., Kisselev, L. L., and Buckingham, R. H. (2003) The essential role of the invariant GGQ motif in the function and stability *in vivo* of bacterial release factors RF1 and RF2, *Mol. Microbiol.*, **47**, 267-275.
9. Shaw, J. J., and Green, R. (2007) Two distinct components of release factor function uncovered by nucleophile partitioning analysis, *Mol. Cell*, **28**, 458-467, doi: 10.1016/j.molcel.2007.09.007.
10. 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.
11. Zavialov, A. V., Buckingham, R. H., and Ehrenberg, M. (2001) A posttermination ribosomal complex is the guanine nucleotide exchange factor for peptide release factor RF3, *Cell*, **107**, 115-124, doi: 10.1016/s0092-8674(01)00508-6.
12. Baranov, P. V., Vestergaard, B., Hamelryck, T., Gesteland, R. F., Nyborg, J., and Atkins, J. F. (2006) Diverse bacterial genomes encode an operon of two genes, one of which is an unusual class-I release factor that potentially recognizes atypical mRNA signals other than normal stop codons, *Biol. Direct.*, **1**, 28, doi: 10.1186/1745-6150-1-28.
13. Heurgue-Hamard, V., Champ, S., Mora, L., Merkulova-Rainon, T., Kisselev, L. L., and Buckingham, R. H. (2005) The glutamine residue of the conserved GGQ motif in *Saccharomyces cerevisiae* release factor eRF1 is methylated by the product of the *YDR140w* gene, *J. Biol. Chem.*, **280**, 2439-2445, doi: 10.1074/jbc.M407252200.
14. 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, doi: 10.1126/science.1164840.
15. 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, doi: 10.1073/pnas.0810953105.
16. 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.
17. 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.
18. Pierson, W. E., Hoffer, E. D., Keedy, H. E., Simms, C. L., Dunham, C. M., and Zaher, H. S. (2016) Uniformity of peptide release is maintained by methylation of release factors, *Cell Rep.*, **17**, 11-18, doi: 10.1016/j.celrep.2016.08.085.
19. 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, doi: 10.1073/pnas.1003995107.
20. 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, doi: 10.1038/nature01224.
21. Rawat, U., Gao, H., Zavialov, A., Gursky, R., Ehrenberg, M., and Frank, J. (2006) Interactions of the release factor RF1 with the ribosome as revealed by cryo-EM, *J. Mol. Biol.*, **357**, 1144-1153, doi: 10.1016/j.jmb.2006.01.038.
22. Graille, M., Heurgue-Hamard, V., Champ, S., Mora, L., Scrima, N., et al. (2005) Molecular basis for bacterial class I release factor methylation by PrmC, *Mol. Cell*, **20**, 917-927, doi: 10.1016/j.molcel.2005.10.025.
23. Dincbas-Renqvist, V., Engstrom, A., Mora, L., Heurgue-Hamard, V., Buckingham, R., and Ehrenberg, M. (2000) A post-translational modification in the GGQ motif of RF2 from *Escherichia coli* stimulates termination of translation, *EMBO J.*, **19**, 6900-6907, doi: 10.1093/emboj/19.24.6900.
24. Heurgue-Hamard, V., Champ, S., Engstrom, A., Ehrenberg, M., and Buckingham, R. H. (2002) The *hemK* gene in *Escherichia coli* encodes the N(5)-glutamine methyltransferase that modifies peptide release factors, *EMBO J.*, **21**, 769-778, doi: 10.1093/emboj/21.4.769.
25. Schmeing, T. M., Huang, K. S., Strobel, S. A., and Steitz, T. A. (2005) An induced-fit mechanism to promote peptide bond formation and exclude hydrolysis of peptidyl-tRNA, *Nature*, **438**, 520-524, doi: 10.1038/nature04152.
26. Polikanov, Y. S., Steitz, T. A., and Innis, C. A. (2014) A proton wire to couple aminoacyl-tRNA accommodation and peptide-bond formation on the ribosome, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **21**, 787-793, doi: 10.1038/nsmb.2871.
27. Svetlov, M. S., Syroegin, E. A., Aleksandrova, E. V., Atkinson, G. C., Gregory, S. T., et al. (2021) Structure of Erm-modified 70S ribosome reveals the mechanism of macrolide resistance, *Nat. Chem. Biol.*, **17**, 412-420, doi: 10.1038/s41589-020-00715-0.
28. Brunelle, J. L., Shaw, J. J., Youngman, E. M., and Green, R. (2008) Peptide release on the ribosome depends critically on the 2'-OH of the peptidyl-tRNA substrate, *RNA*, **14**, 1526-1531, doi: 10.1261/rna.1057908.
29. 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.
30. 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.
31. Zaher, H. S., Shaw, J. J., Strobel, S. A., and Green, R. (2011) The 2'-OH group of the peptidyl-tRNA stabilizes an active conformation of the ribosomal PTC, *EMBO J.*, **30**, 2445-2453, doi: 10.1038/emboj.2011.142.
32. Gamper, H., and Hou, Y. M. (2018) tRNA 3'-amino-tailing for stable amino acid attachment, *RNA*, doi: 10.1261/rna.068015.118.

**THE ROLE OF RELEASE FACTORS IN HYDROLYSIS
OF ESTER BOND OF PEPTIDYL-tRNA****Mini-Review****S. M. Balasanyants, E. V. Aleksandrova, and Y. S. Polikanov****University of Illinois at Chicago, Department of Biological Sciences, College of Liberal Arts and Sciences,
Chicago, Illinois, 60607, USA; e-mail: yuryp@uic.edu*

Bacterial class I release factors (RFs) recognize stop codons in the sequences of mRNAs and are required for hydrolysis of the peptidyl-tRNA in the ribosomal P site during the final step of protein synthesis resulting in the release of the complete polypeptide chain from the ribosome. A key role in this process is played by the extremely conservative GGQ motif of the RFs. Various mutations of this element can either reduce the rate of hydrolysis or even completely inhibit it. Previously it was hypothesized that the amino acid residues of GGQ (especially the glutamine) are required for proper coordination of the water molecule for subsequent hydrolysis of the ester bond. However, the available structures of the 70S ribosome termination complexes do not allow to unambiguously identify the exact orientation of the carbonyl group of the peptidyl-tRNA relative to the GGQ, as well as the position of the catalytic water molecule in the PTC. This mini-review summarizes key facts and previously proposed hypotheses on the role of GGQ in the catalysis of peptide release and also discusses and suggests the future experiments that will produce high-quality structural data allowing us to decipher the exact mechanism of catalysis by RFs.

Keywords: release factors, ribosome, 70S, peptidyl-tRNA, hydrolysis, structural analysis