

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 577.217;577.22

КОРРЕКЦИЯ БИОСИНТЕЗА БЕЛКА ТЕСНО СВЯЗАНА С НАЛИЧИЕМ БЕСФАКТОРНОГО РИБОСОМНОГО СИНТЕЗА

© 2019 г. А. В. Финкельштейн^{a, b, *}, Л. П. Гаврилова^a

^aИнститут белка Российской академии наук, Пушкино, Московская обл., 142290 Россия

^bБиологический факультет Московского государственного университета
им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

*e-mail: afinkel@vega.protres.ru

Поступила в редакцию 19.07.2018 г.

После доработки 14.08.2018 г.

Принята к публикации 16.08.2018 г.

Несмотря на то, что биосинтез белка изучался в течение десятилетий, все еще возникают некоторые важные вопросы, касающиеся этого процесса. В данной работе выявлена тесная связь между контролем качества синтезируемой рибосомой аминокислотной последовательности при нормальном, зависящем от факторов элонгации биосинтезе белка рибосомой, и существованием бесфакторного процесса синтеза полипептидной цепи на рибосоме: биологическую роль контроля качества играет процесс, обратный бесфакторному присоединению Аа-тРНК к рибосоме – удаление по тому же пути Аа-тРНК, некомплементарной экспонируемому рибосомой кодону мРНК.

Ключевые слова: биосинтез полипептидов, рибосома, фактор элонгации Tu, GTP, бесфакторный процесс, параллельные реакции, свободная энергия, опознавание кодона, редактирование

DOI: 10.1134/S0026898419020046

Необходимость “контроля качества” (proof-reading) синтезируемой аминокислотной последовательности была предсказана еще в 1950-х годах Л. Полингом. Сейчас известно, что такой контроль действует на двух ключевых этапах [1, 2]:

(1) При получении только “правильных” молекул аминоксил-тРНК (Аа-тРНК) путем контроля “зарядки” каждой тРНК соответствующей ей аминокислотой; этот этап, рассмотрен в многочисленных публикациях (см., например, [1, 3, 4]) и нами обсуждаться не будет.

(2) На стадии включения в растущую на рибосоме полипептидную цепь только тех аминокислот, которые строго соответствуют экспонируемому рибосомой кодам мРНК [2, 5, 6].

В нашей работе будет рассмотрена тесная связь именно второго этапа контроля качества полипептидной цепи с существованием – наряду с классическим биосинтезом *in vivo*, осуществляемым рибосомой с помощью факторов элонгации (EF-Tu, EF-G) и молекул GTP [1] – возможности бесфакторного синтеза полипептида рибосомой [2, 7–12].

Точнее, мы рассмотрим связь контроля качества биосинтеза с существованием двух путей посадки Аа-тРНК на экспонируемый рибосомой кодон мРНК (рис. 1): факторзависимого пути, на котором при помощи фактора элонгации Tu (т.е.

EF-Tu) расщепляется высокоэнергетическая молекула GTP, стимулирующая ход по этому пути, и бесфакторного, не поддержанного дополнительной свободной энергией гидролиза GTP.

Как известно, каждой реакции соответствует обратная ей. Связывание Аа-тРНК с рибосомой в присутствии несущего GTP фактора элонгации Tu практически необратимо, так как оно сопровождается гидролизом GTP, при котором стандартная свободная энергия падает на ≈ 7 ккал/моль [1] (что много больше характерной энергии спонтанной тепловой флуктуации, $kT \approx 0.6$ ккал/моль при комнатной температуре, и это исключает спонтанную обратную реакцию Tu : GDP + P-зависимого распада комплекса Аа-тРНК с рибосомой). Реакция же бесфакторного присоединения Аа-тРНК к рибосоме обратима, так как она не сопровождается столь высокоэнергетическим эффектом (рис. 2).

Более того, если комплекс рибосома : Аа-тРНК нестабилен, то бесфакторный путь является естественным путем его распада.

Поэтому, в принципе, комплекс рибосома : Аа-тРНК может образовываться по факторному пути (что и происходит *in vivo*), а распадаться (если комплекс рибосома : Аа-тРНК нестабилен) – по бесфакторному.

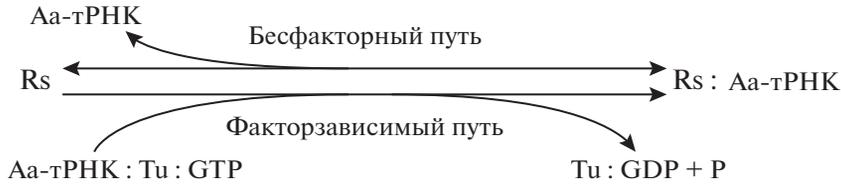


Рис. 1. Схема двух параллельных путей включения новой, приносимой аминокил-тРНК (Аа-тРНК) аминокислоты в растущую на рибосоме (Rs) полипептидную цепь. Факторзависимый путь (внизу) поддержан, а бесфакторный (вверху) — не поддержан свободной энергией гидролиза GTP, осуществляемой с помощью фактора элонгации Ту.

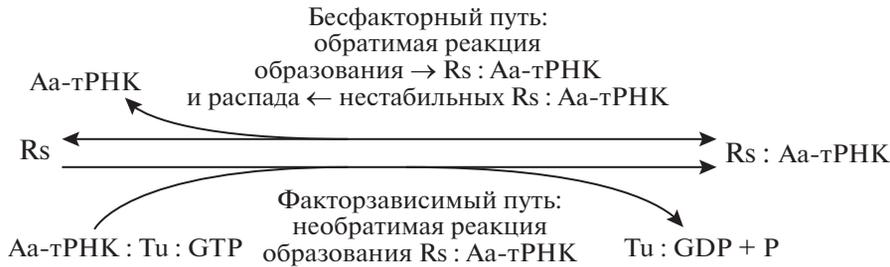


Рис. 2. Обратимость бесфакторного пути, не связанного с гидролизом GTP, и вызванная гидролизом GTP необратимость факторного пути присоединения Аа-тРНК к рибосоме.

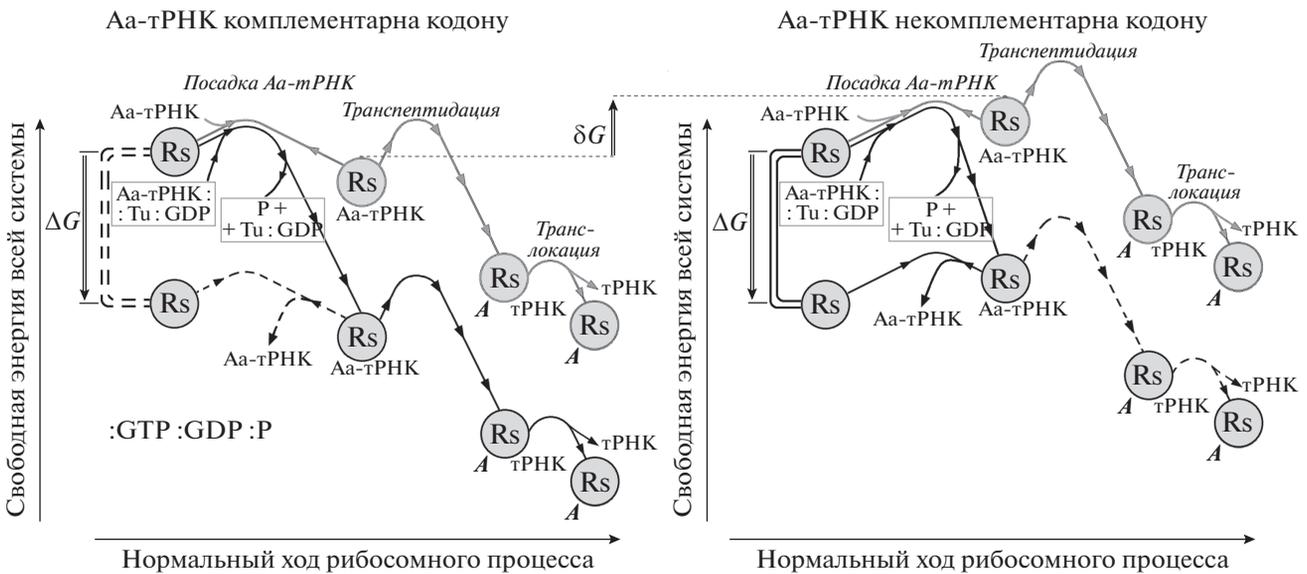


Рис. 3. Схема изменения свободной энергии при бесфакторном (серая сплошная линия) и факторзависимом (черная сплошная линия) синтезе полипептида. Пунктирные черные линии показывают менее вероятные (из-за более высоких свободно-энергетических барьеров), но все же возможные пути реакции. Двойной линией показано замыкание футильного цикла. δG — разность свободных энергий между связыванием рибосомой (и мРНК) некомплементарной и комплементарной Аа-тРНК. ΔG — свободная энергия распада комплекса Аа-тРНК : Ту : GTP на Аа-тРНК + Ту : GDP + P. А — аминокислотный остаток, принесенный Аа-тРНК и включенный в растущий пептид.

Распад комплекса рибосома : Аа-тРНК по бесфакторному пути не происходит, когда Аа-тРНК комплементарна экспонируемому рибосомой кодону мРНК, т.е. сильно связана с ним. Но связывание рибосомы (и сидящей на ней мРНК) с Аа-тРНК, не комплементарной экспонируемому рибосомой кодону мРНК, значительно слабее. И такой некомплементарный комплекс рибосомы с Аа-тРНК может с высокой вероятностью распа-

даться по бесфакторному пути (рис. 3). Это должно приводить к уменьшению скорости включения не кодируемых мРНК аминокислот в синтезируемый полипептид и, как следствие, к резкому уменьшению числа ошибок трансляции. Оба эти явления наблюдаются на опыте [13, 14].

Следует заметить, что факторзависимое формирование комплекса Аа-тРНК : Rs (и для комплементарной, и для некомплементарной Аа-тРНК) и

последующее бесфакторное исторжение некомплементарной Аа-тРНК были отмечены еще Хопфилдом [5]. Селективность этих процессов была изучена экспериментально [6] и методами молекулярной динамики [15], но связь пути удаления некомплементарной Аа-тРНК с частью пути бесфакторного синтеза полипептида во всех этих работах не рассматривалась.

Таким образом, бесфакторный (не требующий гидролиза GTP) путь присоединения Аа-тРНК к рибосоме играет важную биологическую роль — при его помощи осуществляется редактирование (proofreading) аминокислотной последовательности. Точнее, биологическую роль играет процесс, *обратный* бесфакторному присоединению Аа-тРНК к рибосоме, — удаление по тому же пути Аа-тРНК, *некомплементарной* экспонируемому рибосомой кодону мРНК.

При этом (см. рис. 2) появляется возможность возникновения катализируемого рибосомой футильного (т.е. “холостого”, в котором только высвобождается тепловая энергия гидролиза GTP) цикла образования комплекса *некомплементарная* Аа-тРНК : Tu : GTP и его распада на части — *некомплементарная* Аа-тРНК + Tu : GDP + P. Такой футильный цикл с многократным увеличением расхода GTP при использовании *некомплементарных* Аа-тРНК обнаружен в работах [16, 17].

Контроль качества растущей аминокислотной последовательности, как показывает рис. 3, может осуществляться как (1) за счет различной скорости посадки на рибосому + мРНК комплементарной и *некомплементарной* Аа-тРНК, так и, далее (2), за счет отторжения рибосомой + мРНК *некомплементарной* Аа-тРНК. Первый из этих процессов — факторзависимый, а второй — факторнезависимый, что соответствует результатам, описанным в работе [6].

В заключение отметим, что если бы существовал только один, факторный, путь присоединения Аа-тРНК к рибосоме, то при удалении *некомплементарной* Аа-тРНК должна была бы синтезироваться GTP из GDP и фосфата, что термодинамически практически невозможно (при заданных концентрациях GDP и фосфата в клетке). Тогда попадание в рибосому *некомплементарной* Аа-тРНК вело бы к необратимому сбою биосинтеза. Наличие же бесфакторного, не вовлекающего GTP, пути присоединения (а значит, и удаления) Аа-тРНК делает возможным удаление *некомплементарной* (и потому плохо связанной с рибосомой) Аа-тРНК без синтеза GTP (рис. 3). Так что путь, используемый *in vivo* для предотвращения ошибок биосинтеза, может использоваться *in vitro* для бесфакторного (точнее, без-EF-Tu) синтеза полипептидов.

Авторы благодарят А.С. Спирина и В.И. Агола за критическое чтение рукописи.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (№ 14–24–00157).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fersht A. (2017) *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*. NJ: World Scientific.
2. Spirin A.S. (1999) *Ribosomes*. New York: Kluwer Acad. Publ./Plenum Press.
3. Moras D. (2010) Proofreading in translation: Dynamics of the double-sieve model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**, 21949–21950.
4. Hussain T., Kamarthapu V., Kruparani S.P., Deshmukh M.V., Sankaranarayanan R. (2010) Mechanistic insights into cognate substrate discrimination during proofreading in translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**, 22117–22121.
5. Hopfield J.J. (1974) Kinetic proofreading: a new mechanism for reducing errors in biosynthetic processes requiring high specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **71**, 4135–4139.
6. Leong K.-W., Uzun Ü., Selmer M., Ehrenberg M. (2016) Two proofreading steps amplify the accuracy of genetic code translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **113**, 13744–13749.
7. Pestka S. (1968) Studies on the formation of transfer ribonucleic acid–ribosome complexes. III. The formation of peptide bonds by ribosomes in the absence of supernatant enzymes. *J. Biol. Chem.* **243**, 2810–2820.
8. Pestka S. (1969) Studies on the formation of transfer ribonucleic acid–ribosome complexes. VI. Oligopeptide synthesis and translocation on ribosomes in the presence and absence of soluble transfer factors. *J. Biol. Chem.* **244**, 1533–1539.
9. Гаврилова Л.П., Смолянинов В.В. (1971) Изучение механизма транслокации в рибосоме. I. Синтез полифенилаланина в рибосомах *E. coli* без участия GTP и белковых факторов трансляции. *Молекуляр. биология*. **5**, 883–891.
10. Gavrilova L.P., Spirin A.S. (1971) Stimulation of “non-enzymic” translocation in ribosomes by *p*-chloromercuribenzoate. *FEBS Lett.* **17**, 324–326.
11. Lucas–Lenard J., Lipmann F. (1971) Protein biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **40**, 409–448.
12. Gavrilova L.P., Spirin A.S. (1972) A modification of the 30S ribosomal subparticle is responsible for stimulation of “non-enzymic” translocation by *p*-chloromercuribenzoate. *FEBS Lett.* **22**, 91–92.
13. Gavrilova L.P., Rutkevitch N.M. (1980) Ribosomal synthesis of poly-leucine on polyuridylic acid as a template: contribution of the elongation factors. *FEBS Lett.* **120**, 135–140.
14. Gavrilova L.P., Perminova I.N., Spirin A.S. (1981) Elongation factor Tu can reduce translation errors in poly(U)-directed cell-free systems. *J. Mol. Biol.* **149**, 69–78.
15. Noel J.K., Whitford P.C. (2016) How EF-Tu can contribute to efficient proofreading of aa-tRNA by the ribosome. *Nat. Commun.* **7**, 13314.

16. Gavrilova L.P., Kakhniashvili D.G., Smailov S.K. (1984) Stoichiometry of GTP hydrolysis in a poly(U)-dependent cell-free translation system. Determination of GTP/peptide bond ratios during codon-specific elongation and misreading. *FEBS Lett.* **178**, 283–287.
17. Kakhniashvili D.G., Smailov S.K., Gavrilova L.P. (1986) The excess GTP hydrolyzed during mistranslation is expended at the stage of EF-Tu-promoted binding of non-cognate aminoacyl-tRNA. *FEBS Lett.* **196**, 103–107.

PROTEIN BIOSYNTHESIS PROOFREADING IS CLOSELY ASSOCIATED WITH EXISTENCE OF THE FACTOR-FREE RIBOSOMAL SYNTHESIS

A. V. Finkelstein^{1,2, *}, L. P. Gavrilova¹

¹*Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

²*Biological Department, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

*e-mail: afinkel@vega.protres.ru

Despite the protein biosynthesis being studied for decades, some major questions concerning this process are still to be addressed. Here we elucidate a close connection between the proofreading of the emerging amino acid sequence during its normal, elongation factor-dependent ribosomal biosynthesis and the existence of the factor-free synthesis of a polypeptide chain on a ribosome: a biological role of proofreading is played by a process opposite to the non-factorial addition of Aa-tRNA to the ribosome, namely, a removal, of that Aa-tRNA, which is not complementary to the mRNA codon exhibited by the ribosome.

Keywords: biosynthesis of polypeptides, ribosome, elongation factor Tu, GTP, factor-free process, parallel reactions, free energy, codon recognition, proofreading