

На правах рукописи



МАКСИМОВА ЕЛЕНА МИХАЙЛОВНА

Ингибирование транслокации антибиотиком амикумацином А и механизм устойчивости к нему

03.01.03 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Гатчина – 2022

Работа выполнена в Лаборатории биосинтеза белка Отделения молекулярной и радиационной биофизики Федерального государственного бюджетного учреждения «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова» Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»

Научный руководитель:

Коневега Андрей Леонидович, кандидат физико-математических наук

Официальные оппоненты:

Юсупов Марат Миратович, доктор химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории структурного анализа биомакромолекул, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук»

Смирнов Иван Витальевич, профессор, доктор химических наук, заведующий лабораторией химии протеолитических ферментов, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»

Защита состоится **«26» мая 2022 г.** в 11:00 на заседании диссертационного совета **У.03.01.03** федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» (195251, г. Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29) по адресу: г. Санкт-Петербург, ул. Хлопина 11, корп. 1, Высшая школа биомедицинских систем и технологий, ауд. 209.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте https://www.spbstu.ru/science/the-department-of-doctoral-studies/defences-calendar/the-degree-of-candidate-of-sciences/maksimova_elena_mikhaylovna/ ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого».

Автореферат разослан: « ____ » _____ 2022 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
к.ф.-м.н.

Забродская Яна Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Распространение устойчивости к антибиотикам среди бактерий стало серьезнейшей проблемой на сегодняшний день [Christaki и др., 2020; Baral, Mozafari, 2020]. За длительное время использования антибиотиков многие бактерии выработали разнообразные способы борьбы с ними так, что применяемые ранее антибиотики потеряли свою эффективность. Поэтому возникла необходимость в поиске новых противомикробных агентов или обращение к тем из них, которые ранее не были использованы в клинической практике. Одним из таких антибиотиков, открытых еще в 1980-ых гг., но никогда не применявшихся для лечения инфекционных заболеваний, является амикумацин А [Itoh и др., 1981]. Он был отнесен к небольшой группе изокумариновых производных. Тогда же было показано, что амикумацин А обладает не только сильными противомикробными свойствами, но также противовоспалительными, гастропротекторными и даже противоопухолевыми свойствами [Itoh и др., 1982; Li и др., 2012]. Тем не менее долгое время об этом антибиотике ничего не было известно. Лишь в 2014 г., с возросшим интересом к антибиотикам, было показано, что ингибирующее действие амикумацина А направлено на подавление функционирования рибосомы – основной мишени для действия антибиотиков [Polikanov и др., 2014; Witzky и др., 2019]. Оказалось, что, связываясь в E сайте бактериальной 30S субчастицы рибосомы, амикумацин А взаимодействует с ней и рибосомными лигандами способом, значительно отличающимся от тех, что используют известные антибиотики того же сайта связывания. В 2016 г., было показано, что антибиотик, связываясь с эукариотической рибосомой, мог действительно избирательно подавлять рост клеток раковых линий человека, по сравнению с теми, которые не несли патологии [Prokhorova и др., 2016]. Однако молекулярный механизм ингибирования трансляции амикумацином А как в том, так и в другом случае представлен не был.

Тем не менее поиск новых антибиотиков становится малоэффективным без понимания самих механизмов резистентности. Поэтому еще одним направлением борьбы с распространением устойчивости к антибиотикам является раскрытие механизмов резистентности, которые использует бактериальная клетка. Так, и для амикумацина А были найдены мутации в гене, кодирующем элонгационный фактор EF-G, которые приводили к устойчивости против антибиотика [Lama и др., 2012; Polikanov и др., 2014]. Фактор элонгации EF-G ответственен за ускорение одного из фундаментальных процессов трансляции – транслокации. Интересно, что все найденные изменения в EF-G относятся к его домену IV, который участвует во взаимодействии с комплексом мРНК-тРНК, и любое изменение в этом участке может приводить к серьезным нарушениям процесса транслокации [Savelsbergh и др., 2000; Holtkamp и др., 2014; Liu и др., 2014; Zhang и др., 2015; Peng и др., 2019]. Возможность резистентности за счет подобных изменений в EF-G, а тем более молекулярный механизм

устойчивости, ранее не были показаны ни для одного антибиотика. Использование бактериальной клеткой такого необычного механизма резистентности также может указывать на достаточно сложный механизм ингибирования амикумацином А.

Степень разработанности темы исследования. На сегодняшний день в литературе имеется очень мало информации об амикумацине А: немного известно о путях его биосинтеза в клетках штаммов-продуцентов, мишенях действия и возможном механизме ингибирования [Li и др., 2015; Lama и др., 2012; Gao и др., 2017; Polikanov и др., 2014; Prokhorova и др., 2016]. Представленная лишь недавно пространственная структура комплекса бактериальной рибосомы с амикумацином А показала, что антибиотик взаимодействует в Е сайте 30S субчастицы с консервативными нуклеотидами спиралей h23, h24 и h45 16S рРНК, а также с мРНК в районе стартового кодона (-1 и -2 положения нуклеотидов), но не образует контактов ни с Е-, ни с Р-сайтовой тРНК [Polikanov и др., 2014]. Причем такое расположение антибиотика направлено на стабилизацию мРНК в рибосоме, а не на вытеснение ее или молекул тРНК, что присуще касугамицину, эдеину и пактамицину, связывающих в том же участке рибосомы [Polikanov и др., 2014]. Аналогичное положение антибиотик занимает и в эукариотической рибосоме [Prokhorova и др., 2016]. Тем не менее представленные структуры комплексов показывают статическое положение амикумацина А и на основании этих данных можно лишь предположить механизм ингибирования трансляции антибиотиком. Проведенные немногочисленные функциональные исследования также не смогли раскрыть его механизма действия [Polikanov и др., 2014; Prokhorova и др., 2016]. Однако основываясь на этих данных, было выдвинуто предположение, что основное действие антибиотика может быть направлено на подавление этапа транслокации.

Исследование мутаций в генах, приводящих к устойчивости против амикумацина А на примере *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*, показало, что такие мутации могут относиться к гену 16S рРНК, метилтрансферазы KsgA и EF-G [Lama и др., 2012; Polikanov и др., 2014]. Механизмы резистентности за счет найденных нуклеотидных замен в 16S рРНК и за счет изменений аминокислотной последовательности KsgA, приводящих к нарушению ее функционирования, ранее были хорошо изучены на примере других антибиотиков, таких как пактамицин и касугамицин [Helser и др., 1972; Mankin, 1997]. Найденные же мутации в гене EF-G, приводили у *S. aureus* к одиночным аминокислотным заменам G542V или G543S (нумерация для *E. coli*), а у *E. coli* – к аминокислотным заменам G542V, G581A или вставке дополнительного валина перед V544 (ins544V). Все эти изменения относятся к домену IV фактора EF-G и пространственно очень близко располагаются к двум функционально важным петлям I и II этого домена, которые, как считается, образуют непосредственные контакты с комплексом мРНК-тРНК и сопровождают его в рибосоме при перемещении [Gao и др., 2009; Lin и др., 2015]. Тем не менее проведенные исследования показали, что любые изменения в петлях I и II, и особенно при

H584, могут приводить к существенным нарушениям процесса транслокации [Savelsbergh и др., 2000; Holtkamp и др., 2014; Liu и др., 2014; Zhang и др., 2015; Peng и др., 2019]. Все это указывает на достаточно сложный механизм резистентности к антибиотику за счет найденных изменений, который только предстоит раскрыть.

Однако понимание механизма ингибирования транслокации антибиотиком и механизма устойчивости к нему, который также связан с этим процессом трансляции, невозможно без понимания особенностей самой транслокации. В осуществлении транслокации принимают участие разнообразные структурные элементы рибосомы. Одним из них является А-сайтоступ (ASF) 50S субчастицы рибосомы. Он представляет собой петлю H38 23S рРНК, которая контактирует с молекулами тРНК при их перемещении [Yusupov и др., 2001]. Ранее были сделаны попытки определить роль ASF в транслокации: изучалось влияние ASF на перемещение комплекса мРНК-тРНК, связывание молекул тРНК в А и Р сайтах, ГТФазную активность EF-G и др. [Sergiev и др., 2005; Komoda и др., 2006]. Однако вопрос о роли этого элемента рибосомы в транслокации так и остался открытым.

Не менее важным вопросом является и роль самого EF-G в транслокации. Известно, что рибосома может транслоцировать комплекс мРНК-тРНК без участия фактора, присутствие EF-G приводит к значительному ускорению этого процесса (> 1000 раз) [Katunin и др., 2002]. Известно также, что EF-G является одним из самых высококонсервативных белков [Margus и др., 2007]. Возникает вопрос, будет ли изменяться транслокация, если использовать гетерологичный EF-G, например, в трансляционной системе *E. coli* использовать фактор из *Thermus thermophilus*. С одной стороны оба фактора очень схожи, но с другой, как было упомянуто выше, даже единичные аминокислотные замены могут приводить к существенному понижению скорости транслокации (> 25 раз) [Savelsbergh и др., 2000; Holtkamp и др., 2014; Peng и др., 2019]. Изучение данного вопроса является важным для понимания фундаментальных основ процесса транслокации.

Цели и задачи. Целью данного исследования является определение молекулярного механизма ингибирования трансляции антибиотиком амикумацином А, а также механизма устойчивости к нему за счет изменений в домене IV фактора EF-G. Исходя из поставленной цели, задачами данного исследования являются:

1. Изучить влияние амикумацина А на основные стадии цикла элонгации: связывание аминоацил-тРНК в А сайте рибосомы (декодирование), образование пептидной связи и транслокацию.
2. Определить влияние аминокислотных замен G542V, G581A или вставки ins544V фактора EF-G на транслокацию.

3. Изучить компенсаторное влияние найденных изменений EF-G на ингибирующее действие антибиотика.
4. Провести сравнительное изучение транслокации, катализируемой элонгационным фактором EF-G из мезофильного (*E. coli*) и термофильного (*T. thermophilus*) микроорганизмов.
5. Изучить влияние структурного элемента 50S субчастицы бактериальной рибосомы А-сайтового пальца (ASF) на транслокацию.

Научная новизна. В нашей работе мы впервые показали молекулярный механизм ингибирования трансляции амикумацином А. Кроме того, нами был впервые представлен механизм резистентности к антибиотику за счет изменений в домене IV фактора EF-G. Еще одним результатом данной работы является доказательство того, что для процесса транслокации важны не только петли I и II домена IV, но и другие его структурные элементы, не участвующие в непосредственном контакте с комплексом мРНК-тРНК. С использованием гетерологичной трансляционной системы показано, что кинетика транслокации не зависит от температурного оптимума элонгационного фактора EF-G. Кроме того, мы также подтвердили, что укорочение ASF не влияет на перемещение комплекса мРНК-тРНК и в большей степени оказывает влияние на изменение конформации рибосомы.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость работы состоит в уникальности продемонстрированного механизма ингибирования трансляции амикумацином А, принципиально отличающимся от механизмов ингибирования антибиотиками того же сайта связывания на рибосоме. Кроме того, представленный механизм устойчивости к антибиотику расширяет представление о разнообразии способов резистентности, которые может применять бактериальная клетка. Полученные данные об отдельных аспектах транслокации углубляют представление об этом процессе трансляции. Практическая значимость работы состоит в возможности использования данных о механизме ингибирования и устойчивости к амикумацину А для создания фармакологических препаратов на его основе, направленных не только для борьбы с инфекционными, но и, возможно, с противоопухолевыми заболеваниями.

Методология и методы исследования. Для того, чтобы установить механизмы ингибирования и резистентности к амикумацину А, мы определяли кинетические и термодинамические параметры отдельных стадий трансляции. Так как все эти стадии являются очень быстрыми (не превышают доли секунды), то в нашей работе мы использовали метод остановленного потока, который позволял нам определять престаационарную кинетику этих процессов. Определение кинетики реакций осуществляли с помощью детекции флуоресценции от флуоресцентных репортеров ковалентно связанных со строго определенными участками на молекулах тРНК. Такой подход позволял нам проследить не только за изменениями в этих участках тРНК, но и в

соответствующих участках на рибосоме. Кроме того, для установления кинетических параметров, нами был использован метод погашенного потока, а также функциональные тесты *in vitro*, такие, например, как пурамициновая реакция, стабильность связывания тРНК с рибосомой и др. Для этих методов нами были использованы радиоактивно меченные тРНК, также содержащие метку в строго определенных участках.

Положения, выносимые на защиту.

1. Основное ингибирующее действие амикумацина А связано с процессом транслокации. Амикумацин А на этапе транслокации значительно снижает скорость перемещения комплекса мРНК-тРНК и способность рибосом вовлекаться в последующие циклы элонгации.
2. Найденные изменения EF-G приводят к существенному нарушению процесса транслокации, но это обеспечивает сохранение функциональной активности рибосом, связавших амикумацин А, и их способности участвовать в последующих циклах элонгации.
3. Скорость транслокации не зависит от принадлежности фактора EF-G к термофильному (*T. thermophilus*) или мезофильному (*E. coli*) организму, скорость-лимитирующими факторами процесса транслокации являются взаимодействия молекул тРНК с рибосомой.
4. Участие ASF в транслокации непосредственно не связано с перемещением комплекса мРНК-тРНК и в большей степени обусловлено его влиянием на конформацию рибосомы.

Степень достоверности и апробация результатов. В работе были использованы методы для изучения кинетических и термодинамических параметров отдельных этапов трансляции, успешно применяемые на протяжении уже более 30 лет, и которые полностью соответствуют поставленным задачам. Все представленные данные были выполнены на современном оборудовании, являются результатом 3-4 повторов, а также имеют положительные и отрицательные контроли. Полученные результаты о действии антибиотика, функционировании рибосомы и ее лигандов согласуются с данными, описанными ранее в литературе.

Результаты работы были представлены на 9 российских и международных конференциях, а также по результатам исследования было опубликовано 3 статьи в ведущих международных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus.

Личный вклад автора. Все представленные в работе результаты, а также их анализ, были произведены лично автором. Интерпретация полученных результатов, а также их подготовка к публикации были осуществлены совместно с сотрудниками лаборатории биосинтеза белка НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ и коллабораторами научных проектов.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 119 страницах, содержит 33 рисунка и 6 таблиц. Структура диссертации включает введение, обзор литературы, материалы и методы,

результаты и обсуждение, заключение, выводы, благодарности, список сокращений, список литературы и приложение. Список литературы содержит 257 источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Влияние амикумацина А на связывание аминоксил-тРНК в А сайте и образование пептидной связи

Поскольку все стадии трансляции являются достаточно быстрыми, то для их изучения мы, в основном, применяли метод остановленного потока, который позволял нам получать данные о престаационарной кинетике этих стадий. Вычисление кинетических параметров осуществляли с помощью детекции флуоресценции от меченных флуоресцентными репортерами молекул тРНК. Для этого репортер профлавин мы ковалентно связывали с молекулами тРНК путем замещения дигидроуридина в 16 или 17 положении элонгаторной тРНК (fMet-Phe-tRNA^{Phe}(Prf16/17)) или в 20 положении инициаторной тРНК (fMet-tRNA^{fMet}(Prf20)); репортер BODIPY-FL (ВРУ) связывали с N-концевым метионином тРНК (ВРУ-Met-Phe-tRNA^{Phe}) [Pan и др., 2008; Savelsbergh и др., 2000; Holtkamp и др., 2014]. Таким образом, расположение профлавина в тРНК позволяло следить за изменениями в ее локтевом участке, а также изменениями в центральной части рибосомы; положение ВРУ – за изменениями акцепторного конца тРНК и пептидилтрансферазного центра рибосомы.

Как известно, в результате многократного повторения цикла элонгации происходит удлинение полипептидной цепи в соответствии с генетической информацией, закодированной на мРНК. Первая стадия цикла элонгации подразумевает связывание соответствующей аминоксил-тРНК со свободным кодоном мРНК в А сайте рибосомы при участии элонгационного фактора EF-Tu в форме тройного комплекса аминоксил-тРНК·EF-Tu·ГТФ. Поэтому, чтобы проверить влияние амикумацина А на эту стадию, мы использовали инициаторный комплекс, содержащий инициаторную флуоресцентномеченую fMet-tRNA^{fMet}(Prf20) в Р сайте, который быстро смешивали с тройным комплексом Phe-tRNA^{Phe}·EF-Tu·ГТФ (Рис. 1 А). Как оказалось, амикумацин А не влиял на связывание аминоксил-тРНК в А сайте рибосомы. Антибиотик не изменял характер и амплитуду флуоресцентной кривой, а скорость реакции составляла $k_{app}(\text{без Ami}) = 5,0 \pm 0,1 \text{ c}^{-1}$; $k_{app}(\text{Ami}) = 4,3 \pm 0,1 \text{ c}^{-1}$.

После корректной аккомодации аминоксил-тРНК в А сайте, сразу же наступает следующий этап цикла элонгации – образование пептидной связи. Чтобы оценить влияние антибиотика на эту стадию, к инициаторным комплексам, содержащим fMet-tRNA^{fMet} в Р сайте, добавляли тройной комплекс [¹⁴C]Phe-tRNA^{Phe}·EF-Tu·ГТФ и вычисляли количество образуемого дипептида fMet-[¹⁴C]Phe. Присутствие амикумацина А в рибосоме не влияло и на эту стадию

трансляции. Количество дипептида в присутствии антибиотика составило $72 \pm 7 \%$, а без его участия составило $73 \pm 8 \%$.

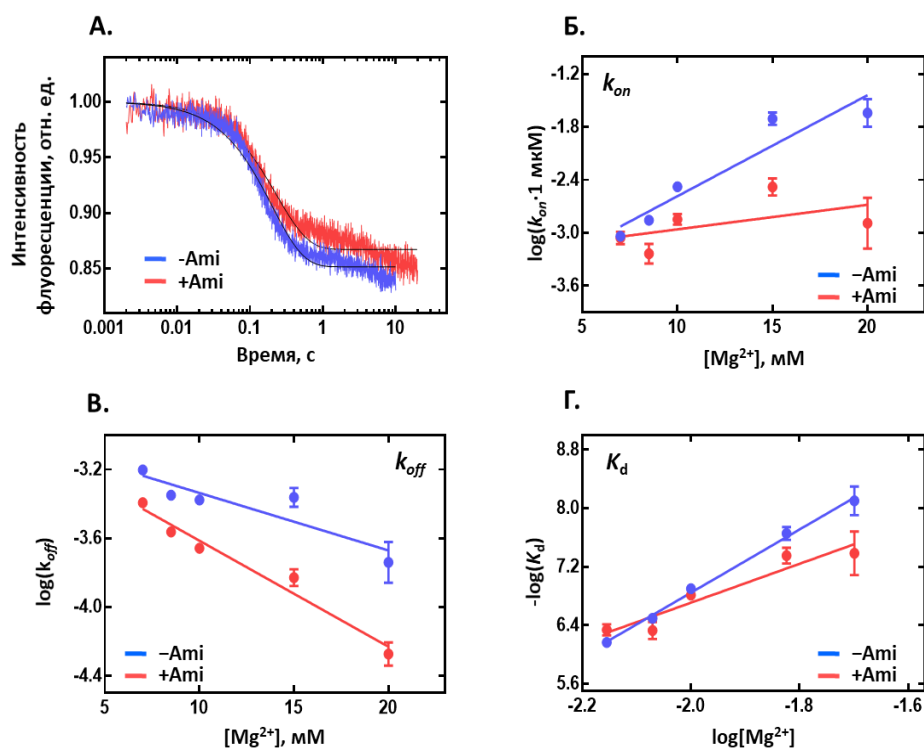


Рисунок 1 – А. Влияние амикумацина А на связывание аминоктил-тРНК в А сайте рибосоме. Б. и В. Зависимости скорости ассоциации (Б.) и диссоциации (В.) пептидил-тРНК в А сайте рибосомы от концентрации ионов Mg^{2+} . Г. Вычисленные значения константы диссоциации на основе данных Б. и В.

Образование пептидной связи завершается формированием претранслокационного комплекса, содержащего деацелированную тРНК в Р сайте и пептидил-тРНК в А сайте рибосомы. Несмотря на отсутствие влияния антибиотика на две предшествующие стадии трансляции, он может оказывать влияние на состояние претранслокационного комплекса и, как следствие, следующего этапа трансляции – транслокацию. Чтобы проверить влияние амикумацина А на стабильность связывания пептидил-тРНК в А сайте претранслокационного комплекса, мы построили зависимость скорости диссоциации (k_{off}) и ассоциации (k_{on}) fMet-[^{14}C]Val-tRNA^{Val} в А сайт претранслокационного комплекса от концентрации ионов Mg^{2+} и на основе полученных данных вычислили равновесную константу диссоциации (K_d) (Рис. 1 Б, В, Г). Как оказалось, при физиологической концентрации ионов Mg^{2+} (7 мМ), присутствие антибиотика практически не изменяет значений k_{off} и k_{on} , а также аффинность пептидил-тРНК к А сайту ($K_d(\text{без Ami}) = 688 \pm 88$ нМ; $K_d(\text{Ami}) = 461 \pm 81$ нМ). Эти значения изменяются только при повышенной концентрации ионов Mg^{2+} (до 20 мМ). Амикумацин А также не влиял на основное энергетическое состояние претранслокационного комплекса. Вычисленное значение свободной энергии (ΔG^0), из полученных значений K_d , в отсутствие антибиотика составляло $\Delta G^0 = -8,74 \pm 0,08$ ккал/моль, а в присутствии $\Delta G^0 = -8,98 \pm 0,11$ ккал/моль. То есть претранслокационные комплексы, содержащие амикумацин А, вступают в транслокацию с той же свободной энергией основного энергетического состояния, что и без него.

2. Влияние амикумадина А на транслокацию

2.1. Влияние амикумадина А на единичный раунд транслокации

Стадия транслокации включает процесс перемещения молекул тРНК в соседние сайты и смещение мРНК на один кодон. Это дает возможность освободиться А сайту для связывания соответствующей аминоксил-тРНК со следующим кодоном мРНК в новом раунде элонгации. Чтобы проверить влияние амикумадина А на единичный раунд транслокации мы использовали два типа претранслокационных комплексов, содержащих деацелированную tRNA^{fMet} в Р сайте и пептидил-тРНК с флуоресцентным репортером в районе локтя (fMet-Phe-tRNA^{Phe}(Prf16/17)) или акцепторного конца (ВРУ-Met-Phe-tRNA^{Phe}) в А сайте рибосомы. По изменению флуоресцентного сигнала при добавлении элонгационного фактора EF-G, ускоряющего реакцию, мы могли изучать престабионарную кинетику транслокации. Изменение интенсивности флуоресценции от каждого из двух репортеров описывается двухэкспоненциальной моделью, соответствующей быстрой (k_1) и медленной (k_2) фазе транслокации. Поскольку амплитуда флуоресценции быстрой фазы составляет более 80% от общей интенсивности флуоресценции, то в дальнейшем мы будем приводить значения констант скорости только для этой фазы, как наиболее значимой.

Изучение влияния амикумадина А на престабионарную кинетику транслокации показало, что он уменьшал скорость перемещения пептидил-тРНК из А в Р сайт рибосомы как в районе локтя, так и в районе акцепторного конца тРНК примерно в 2 раза, при этом не влияя на амплитуду флуоресцентного сигнала и не меняя соотношение быстрой и медленной фаз транслокации (Рис. 2). Вычисленные значения констант скорости в случае флуоресцентного сигнала от Prf-репортера составили $k(\text{без Ami}) = 43,6 \pm 0,4 \text{ с}^{-1}$, $k(\text{Ami}) = 22,3 \pm 0,2 \text{ с}^{-1}$, для ВРУ-репортера $k(\text{без Ami}) = 21,7 \pm 0,2 \text{ с}^{-1}$; $k(\text{Ami}) = 12,6 \pm 0,1 \text{ с}^{-1}$; соотношение амплитуд (А) быстрой и медленной фаз транслокации в обоих случаях составили $A_1 > 85\%$, A_2 около 10%.

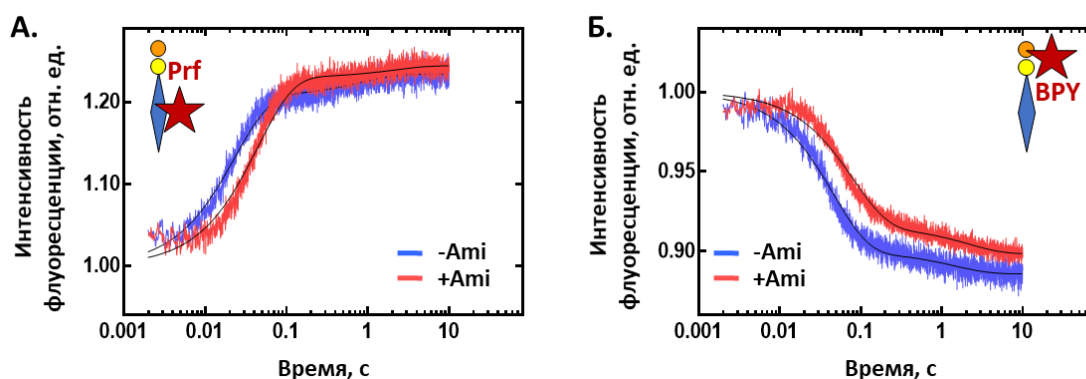


Рисунок 2 – Влияние амикумадина А на престабионарную кинетику транслокации при насыщающей концентрации EF-G (5 мкМ) и с использованием претранслокационных комплексов, у которых пептидил-тРНК содержит флуоресцентный репортер в центральной части (А.) или на акцепторном конце (Б.).

Такое влияние амикумадина А на транслокацию указывает на то, что антибиотик замедляет передвижение пептидил-тРНК, но не изменяет ее конформационную динамику, чтобы это подтвердить, мы посмотрели какой эффект оказывает антибиотик на транслокацию при изменении двух ее важных факторов – концентрации ионов Mg^{2+} и температуры. При повышении концентрации ионов Mg^{2+} (до 20 мМ) амикумадин А оказывал эффект аналогичный тому, что наблюдался при физиологических условиях (7 мМ Mg^{2+}). Антибиотик замедлял скорость передвижения пептидил-тРНК в 3 раза как в районе локтя, так и акцепторного конца, при этом не меняя характер флуоресцентной кривой и соотношение быстрой и медленной фаз транслокации.

2.2. Влияние температуры на транслокацию

Что касается влияния амикумадина А на транслокацию при изменении температуры, то для этого анализа мы использовали EF-G из термофильного микроорганизма *T. thermophilus*, так как он более адаптивен к высоким температурам, чем EF-G из *E. coli*. Однако, прежде чем провести анализ, мы сравнили эти два фактора в их влиянии на транслокацию.

Значения констант скорости быстрой фазы транслокации при перемещении локтя пептидил-тРНК практически не различались для двух этих факторов ни при высоких, ни при низких температурах. Тем не менее участие EF-G из термофильного организма приводило к некоторому замедлению перемещения акцепторного конца пептидил-тРНК (Рис. 3 А, Б, В). Разница в скорости транслокации увеличивалась до 2 раз при понижении температуры до 15 °С. Аналогичный эффект наблюдался при использовании антибиотиков, специфично ингибирующих транслокацию, которые иногда используются для изучения элементарных шагов этого этапа трансляции. Присутствие гетерологичного EF-G приводило к идентичному изменению характера флуоресцентных кривых, что и в присутствии EF-G из *E. coli*. Кроме того, гетерологичный EF-G не изменял скорость передвижения пептидил-тРНК в районе локтя, но замедлял движение ее акцепторного конца в 1,5 – 2 раза (Таблица 1). То есть влияние, оказываемое гетерологичным фактором на конформацию рибосомы, является достаточным для совершения акта транслокации пептидил-тРНК, хоть и приводит к некоторому замедлению ее перемещения в пептидилтрансферном центре.

Наблюдаемое небольшое различие в функционировании двух типов EF-G, значительно отличалось от того, что было представлено для другого элонгационного фактора EF-Tu [Paleskava и др., 2021]. Связывание аминоксил-тРНК в А сайт рибосомы замедлялось примерно в 10 раз при участии EF-Tu из термофильного организма. Все это указывает на то, что связывание аминоксил-тРНК является фактор-специфичным, в то время как транслокация в большей степени обусловлена взаимодействием молекул тРНК с рибосомой.

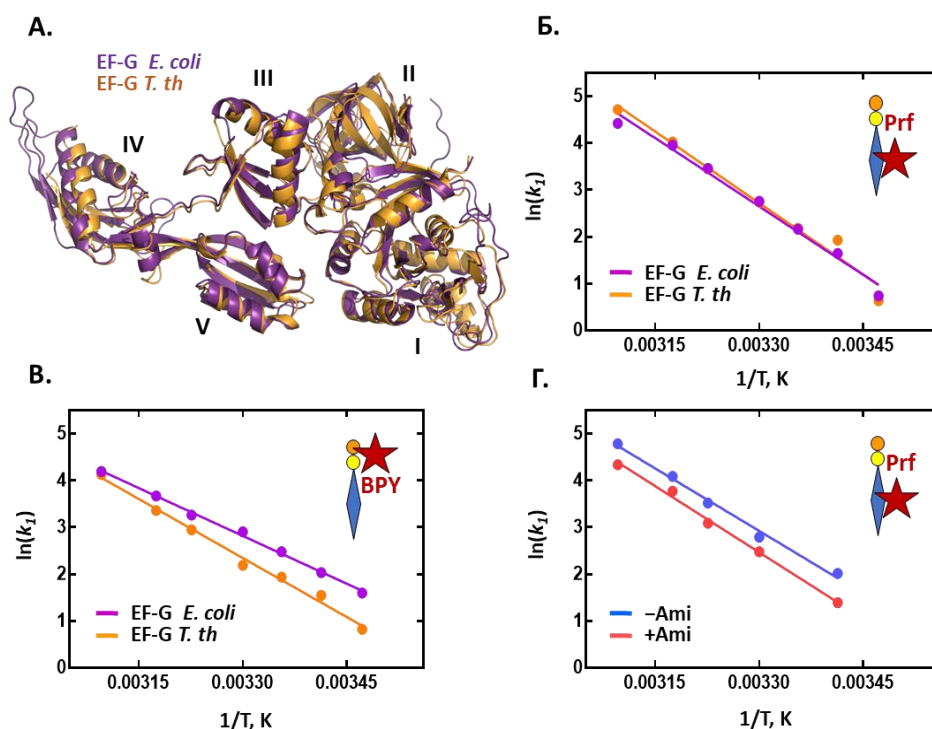


Рисунок 3. – А. Наложение пространственной структуры EF-G из *E. coli* (обозначен фиолетовым цветом, PDB ID: 4V9O) на структуру EF из *T. thermophilus* (обозначен оранжевым цветом, PDB ID: 4V9H). Цифрами указаны домены белков. Гомология аминокислотной последовательности факторов составляет около 60% [Яхнин и др., 1990] Б. и В. Зависимость константы скорости быстрой фазы транслокации (k_1) от температуры (15 – 50 °С) для EF-G из *E. coli* и *T. thermophilus* и претранслокационных комплексов, содержащих пептидил-тРНК, меченную по центральной части (Б.) или по акцепторному концу (В.) Г. Влияние амикумаина А на перемещение пептидил-тРНК при участии EF-G из *T. thermophilus*. Все эксперименты были выполнены при насыщающей концентрации EF-G (5 мкМ).

Таблица 1 – Константы скорости быстрой фазы транслокации, полученные с использованием различных антибиотиков, в присутствии EF-G из мезофильного и термофильного организмов¹.

Антибиотик	Константы скорости перемещения центральной части тРНК (Prf(16/17)) ²		Константы скорости перемещения акцепторного конца тРНК (BPy) ²	
	EF-G <i>E. coli</i>	EF-G <i>T. th.</i>	EF-G <i>E. coli</i>	EF-G <i>T. th.</i>
Без антибиотика	35,4 ± 0,5	33,4 ± 0,4	22,7 ± 0,2	14,2 ± 0,2
Спектиномицин	52,8 ± 1,8	33,4 ± 1,4	43,1 ± 0,3	28,9 ± 0,2
Гигромицин Б	0,0165 ± 0,0005	0,0540 ± 0,0007	33,1 ± 0,3	17,7 ± 0,2
Виомицин	–	–	33,1 ± 0,3	15,5 ± 0,2
Стрептомицин	8,0 ± 0,2	9,9 ± 0,1	14,5 ± 0,2	6,8 ± 0,1

¹ Эксперименты выполнены при 37 °С и насыщающей концентрации EF-G (5 мкМ).

² Значения указаны в с⁻¹

Так как EF-G из *T. thermophilus* оказывал наименьшее влияние на передвижение локтевой части пептидил-тРНК, то для дальнейшего исследования влияния температуры на транслокацию в присутствии амикумаина А, мы использовали претранслокационные

комплексы с пептидил-тРНК, содержащей флуоресцентный репортер в районе локтя. Как оказалось, температура не изменяла влияния антибиотика на единичный раунд транслокации (Рис. 3 Г, таблица 2). При всех температурах от 20 до 50 °С сохранялось понижение скорости перемещения центральной части пептидил-тРНК в 1,5 – 2 раза. При этом соотношение быстрой и медленной фаз транслокации, а также амплитуда флуоресцентного сигнала оставались неизменными.

Таблица 2 – Константы скорости быстрой фазы транслокации в присутствии амикумацина А при различных температурах¹.

Температура, °С	Константы скорости в отсутствии амикумацина А ²	Константы скорости в присутствии амикумацина А ²
20	7,5 ± 0,2	4,0 ± 0,1
30	16,3 ± 0,1	11,9 ± 0,1
37	33,7 ± 0,3	21,9 ± 0,2
42	59,4 ± 0,5	43,3 ± 0,4
50	119,5 ± 2,1	76,4 ± 1,8

¹ Эксперименты выполнены с использованием насыщающей концентрации EF-G *T. thermophilus* (5 мкМ). Константы скорости вычислены из кривых флуоресценции при перемещении fMet-Phe-tRNA^{Phe}(Prf 16/17).

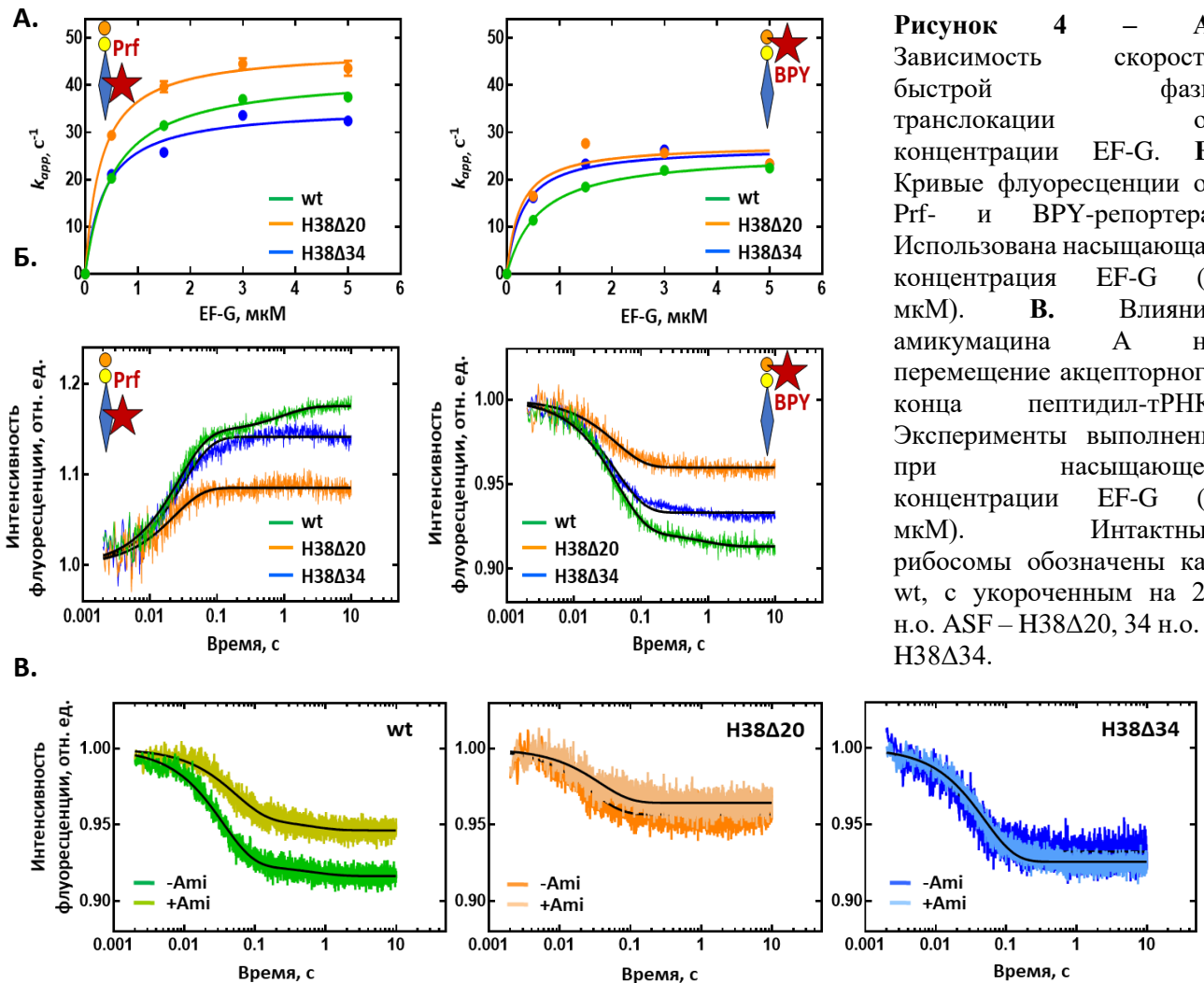
² Значения указаны в с⁻¹

2.3. Участие А-сайтового выступа (ASF) в транслокации

Данные с изменением факторов транслокации подтверждают, что в присутствии амикумацина А происходит замедление передвижения пептидил-тРНК, но не изменяется ее конформационная динамика. Тем не менее влияние антибиотика на транслокацию может быть связано и с изменением конформации рибосомы. Чтобы проверить это утверждение мы исследовали стационарную кинетику транслокации с использованием рибосом, содержащих укороченную концевую часть спирали H38 23S рРНК. Данный структурный элемент также известен как «А-site finger» (ASF) и включает нуклеотиды с 827 по 942 H38. Он взаимодействует с D- и Т-петлями А-сайтовой тРНК, составляющие ее локтевую часть [Yusupov и др., 2001]. Особое расположение ASF в рибосоме, а также ряд биохимических исследований, позволили предположить, что данный структурный элемент 50S субчастицы выступает регулятором транслокации, участвуя в координации 30S субчастицы, пептидилтрансферазного центра и центра связывания ГТФаз [Sergiev и др., 2005; Komoda и др., 2006].

Для анализа мы использовали рибосомы с практически полностью удаленным ASF (872-905 н.о., H38Δ34) или укороченным наполовину (879-898 н.о., H38Δ20). Для характеристики мутантных рибосом мы построили зависимости констант скорости быстрой фазы транслокации от концентрации EF-G с участием претранслокационных комплексов, содержащих два типа флуоресцентномеченых пептидил-тРНК. Как оказалось, укорочение ASF не приводит к существенному замедлению скорости передвижения пептидил-тРНК ни в районе локте, ни в

районе акцепторного конца. При насыщающей концентрации EF-G (5 мкМ) скорости быстрой фазы транслокации составили для Prf: $k(\text{wt}) = 37,5 \pm 0,8 \text{ c}^{-1}$, $k(\text{H38}\Delta 20) = 43,6 \pm 1,6 \text{ c}^{-1}$, $k(\text{H38}\Delta 34) = 32,4 \pm 0,6 \text{ c}^{-1}$; для ВРУ: $k(\text{wt}) = 22,4 \pm 0,4 \text{ c}^{-1}$, $k(\text{H38}\Delta 20) = 23,4 \pm 0,7 \text{ c}^{-1}$, $k(\text{H38}\Delta 34) = 23,3 \pm 0,3 \text{ c}^{-1}$. Тем не менее подобное укорочение ASF приводило к понижению амплитуды флуоресцентного сигнала. Для рибосом с H38Δ20 амплитуда понижалась примерно в два раза, а для рибосом с H38Δ34 на 20-30%, в случае обоих репортеров (Рис. 4 А, Б).



Полученные ранее данные указывают на то, что укорочение ASF, вероятно, приводит к нарушению конформационных изменений рибосомы на этапе транслокации, но не оказывает критического влияния на другие параметры реакции [Sergiev и др., 2005; Komoda и др., 2006]. Полученные нами данные также указывают на то, что укорочение ASF не приводит к нарушению перемещения комплекса мРНК-тРНК, а наблюдаемое понижение амплитуды флуоресцентного сигнала в большей степени связано с конформационными изменениями рибосомы.

Так как укорочение ASF приводило к одинаковому эффекту на перемещение пептидил-тРНК как в районе локтя, так и акцепторного конца, то для дальнейшего изучения влияния

амикумацина А на транслокацию мы использовали претранслокационные комплексы, содержащие пептидил-тРНК с флуоресцентным репортером на акцепторном конце. Как оказалось, присутствие рибосом с укороченным ASF приводило к нивелированию эффектов, оказываемых амикумацином А на транслокацию. Присутствие антибиотика понижало скорость перемещения пептидил-тРНК только на 30% и также не изменяло соотношение фаз транслокации и амплитуду флуоресцентного сигнала от ВРУ-репортера (Рис. 4 В) [$k(\text{wt без Ami}) = 28,5 \pm 0,3 \text{ с}^{-1}$, $k(\text{wt Ami}) = 19,0 \pm 0,4 \text{ с}^{-1}$; $k(\text{H38}\Delta 20 \text{ без Ami}) = 36,8 \pm 0,7 \text{ с}^{-1}$, $k(\text{H38}\Delta 20 \text{ Ami}) = 26,9 \pm 0,6 \text{ с}^{-1}$; $k(\text{H38}\Delta 34 \text{ без Ami}) = 28,0 \pm 0,4 \text{ с}^{-1}$, $k(\text{H38}\Delta 34 \text{ Ami}) = 20,1 \pm 0,2 \text{ с}^{-1}$]. То есть укорочение ASF, координирующего важнейшие структурные элементы рибосомы, приводило к отсутствию в ней необходимых конформационных изменений, что, в свою очередь, позволяло осуществлять транслокацию в присутствии амикумацина А без заметных нарушений. Это указывает на то, что влияние антибиотика на транслокацию связано не только с понижением скорости транслокации, но и с влиянием на конформацию рибосомы.

3. Влияние амикумацина А на последующие циклы элонгации

Чтобы показать вклад амикумацина А в изменение конформации рибосом, мы проверили его влияние на возможность вовлечения рибосом и EF-G в несколько раундов транслокации. Для этого к претранслокационным комплексам (0,2 мкМ), содержащим в Р сайте деацелированную tRNA^{fMet} и в А сайте fMet-[¹⁴C]Val-tRNA^{Val}, мы добавляли EF-G в каталитическом количестве (3 нМ) (Рис. 5 А). С помощью образования fMet-[¹⁴C]Val-P_{rib} в пурамициновой реакции мы могли отслеживать количество транслоцируемой пептидил-тРНК из А в Р сайт рибосомы. Как оказалось, присутствие антибиотика приводит к тому, что скорость перемещения пептидил-тРНК понижается в 5 раз [$k(\text{без Ami}) = 0,103 \pm 0,010 \text{ мин}^{-1}$; $k(\text{Ami}) = 0,020 \pm 0,005 \text{ мин}^{-1}$], а количество транслоцируемой пептидил-тРНК уменьшается в 3 раза. При этом получаемое значение количества транслоцируемой пептидил-тРНК не достигает максимального значения даже при длительной инкубации. Полученные данные указывают на то, что амикумацин А, наиболее вероятно, влияет на вовлеченность рибосом в транслокацию.

Чтобы проверить влияние антибиотика на снижение функциональной активности рибосом после единичного раунда транслокации и, как следствие, снижение вероятности их участия в последующих циклах элонгации, мы проанализировали образование трипептида fMet-Val-Phe в присутствии амикумацина А. Для этого мы использовали претранслокационные комплексы (0,4 мкМ), содержащие в Р сайте деацелированную tRNA^{fMet}, а в А сайте fMet-[¹⁴C]Val-tRNA^{Val}, к которым одновременно добавляли EF-G в насыщающей концентрации (5 мкМ) и тройной комплекс Phe-tRNA^{Phe}·EF-Tu·ГТФ (1,6 мкМ), через определенные промежутки времени (Рис. 6 А). Как оказалось, образование трипептида в присутствии антибиотика

характеризуется двухфазной кривой, в отличие от однофазной кривой, получаемой в отсутствие антибиотика, где на долю быстрой фазы приходится примерно половина от амплитуды кривой. При этом скорость быстрой фазы имеет то же значение, что и скорость образования трипептида в отсутствие антибиотика и составляет $k(\text{без Ami}) = 0,86 \pm 0,08 \text{ c}^{-1}$; $k(\text{Ami}) = 0,87 \pm 0,14 \text{ c}^{-1}$, однако быстрая фаза достигает только половины (35%) максимального значения образуемых трипептидов (75%), а сама кривая не достигает максимально ожидаемого насыщения даже при длительном инкубировании (максимум насыщения кривой 61%, вместо 73%).

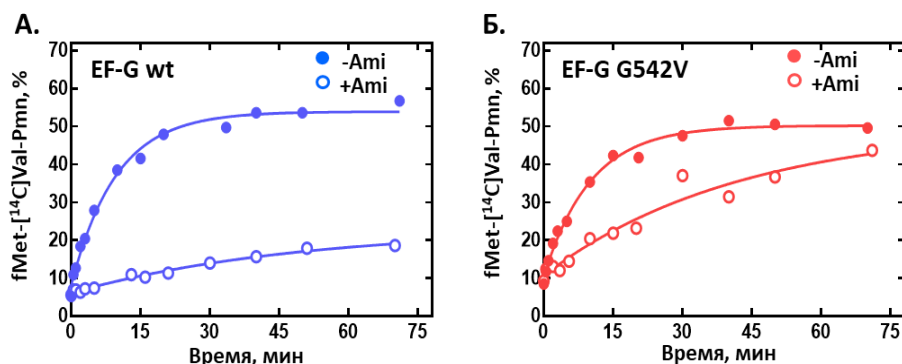


Рисунок 5 – Влияние амикумацина А на несколько раундов транслокации с участием интактной формы EF-G wt (А.) и мутантной формы EF-G G542V (Б.). Pmn – пуромицин.

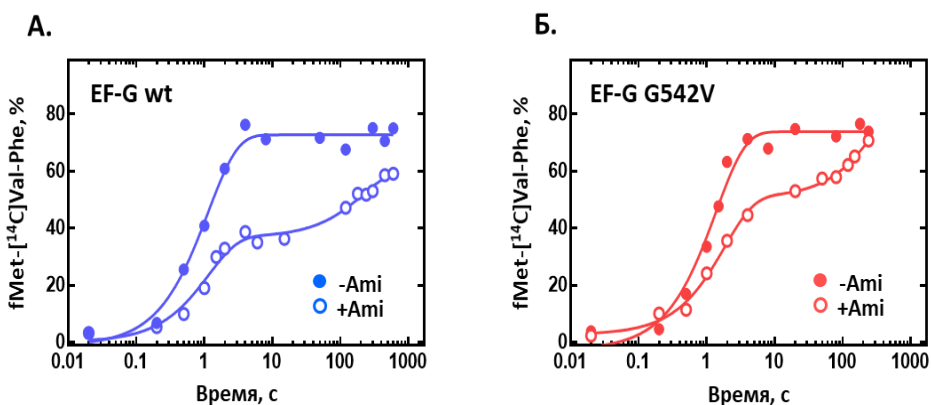


Рисунок 6 – Влияние амикумацина А на способность рибосом образовывать трипептид fMet-Val-Phe с участием интактной формы EF-G wt (А.) или мутантной формы EF-G G542V (Б.).

Таким образом, на этапе транслокации амикумацин А снижает не только скорость перемещения пептидил-тРНК, но и способность рибосом вовлекаться в следующий, после транслокации, цикл элонгации. Такой эффект антибиотика, вероятно, связан со значительным изменением конформации рибосом, которую они приобретают на этапе транслокации, и которая не позволяет им совершать переход на последующие этапы трансляции.

4. Резистентность к амикумацину А за счет изменений в EF-G

Чтобы показать компенсаторное влияние на действие амикумацина А за счет найденных изменений в EF-G, мы прежде всего охарактеризовали такие мутантные формы EF-G. Как оказалось, подобные изменения в EF-G приводили к существенным нарушениям в единичном раунде транслокации. Для анализа мы использовали два типа претранслокационных комплексов, содержащих пептидил-тРНК с флуоресцентной меткой в районе локтя или на акцепторном конце. График зависимости быстрой фазы транслокации от концентрации EF-G показал, что замена

G581A ($k = 4,1 \pm 0,1 \text{ c}^{-1}$) и вставка ins554V ($k = 5,2 \pm 0,2 \text{ c}^{-1}$) в факторе снижают скорость перемещения пептидил-тРНК в районе локтя в 10 – 12 раз, а замена G542V в 25 раз ($k = 2,1 \pm 0,1 \text{ c}^{-1}$) (относительно EF-G wt $k = 43,6 \pm 0,4 \text{ c}^{-1}$) (Рис. 7 А). При этом снижается доля быстрой фазы транслокации до 60%, увеличивая вклад медленной фазы транслокации, для всех мутантных форм EF-G. Однако изменения EF-G не оказывали влияние на скорость и соотношение фаз при перемещении акцепторного конца пептидил-тРНК (EF-G wt $k = 21,7 \pm 0,2 \text{ c}^{-1}$, EF-G G581A $k = 26,3 \pm 0,4 \text{ c}^{-1}$, EF-G ins544V $k = 24,4 \pm 0,3 \text{ c}^{-1}$, EF-G G542V $k = 25,7 \pm 0,3 \text{ c}^{-1}$). Такой эффект значительного замедления скорости перемещения центральной части пептидил-тРНК, при неизменной скорости перемещения акцепторного конца, указывает на то, что аминокислотные замены G581A, G542V или вставка ins554V в EF-G приводят не только к замедлению передвижения пептидил-тРНК, но к существенному изменению ее конформационной динамики.

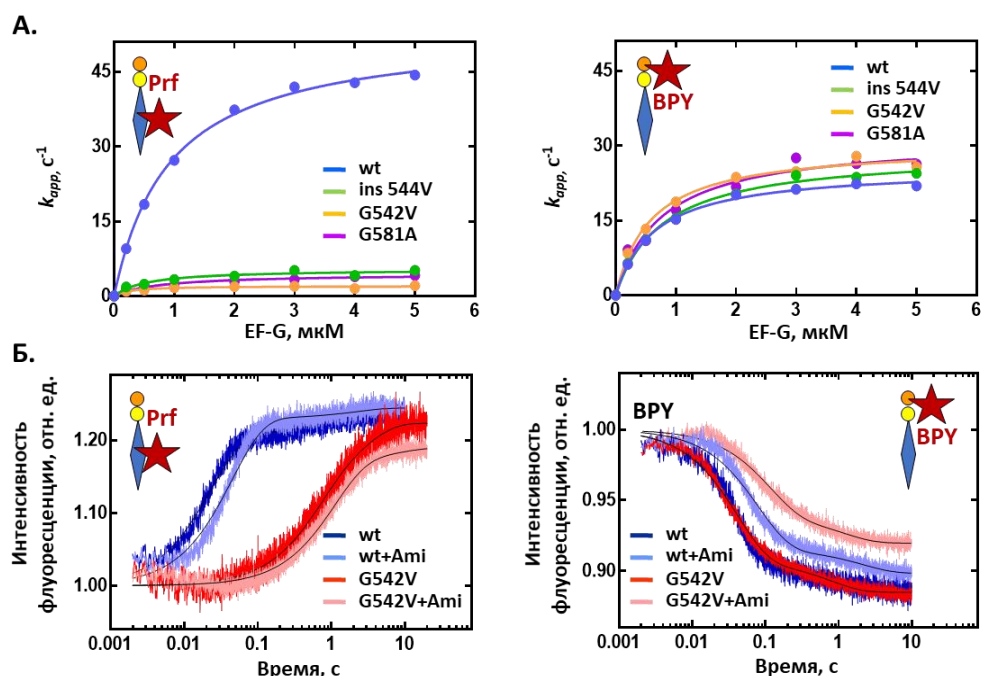


Рисунок 7 – Престационарная кинетика транслокации с участием интактной (wt) или мутантных форм EF-G. **А.** Зависимость быстрой фазы транслокации от концентрации EF-G. **Б.** Влияние амикумацина А на престационарную кинетику транслокации с участием интактной формы EF-G wt или мутантной формы EF-G G542V в насыщающей концентрации (5 мкМ).

Поскольку все мутантные формы EF-G не отличались по их влиянию на транслокацию, то для дальнейшего анализа мы выбрали форму EF-G G542V, так как ранее на примере не только *E. coli*, но и *S. aureus*, было показано, что она может оказывать компенсаторный эффект на ингибирующее действие амикумацина А. Влияние амикумацина А на единственный раунд транслокации с участием EF-G G542V показало, что в присутствии мутантной формы EF-G, также как и интактной, скорость перемещения пептидил-тРНК из А в Р сайт рибосомы как в районе локтя, так и акцепторного конца понижается на одинаковую величину, а именно в 2-3 раза, практически не влияя на соотношение фаз транслокации [Prf: $k(\text{без Ami}) = 1,65 \pm 0,07 \text{ c}^{-1}$;

$k(\text{Ami}) = 0,92 \pm 0,02 \text{ c}^{-1}$; ВРУ: $k(\text{без Ami}) = 24,5 \pm 0,2 \text{ c}^{-1}$; $k(\text{Ami}) = 8,9 \pm 0,2 \text{ c}^{-1}$) (Рис. 7 Б)]. Это указывает на то, что мутантная форма EF-G приводит к сильному изменению конформационной динамики пептидил-тРНК при ее перемещении из А в Р сайт рибосомы, амикумацин А лишь замедляет скорость перемещения такой пептидил-тРНК.

Сравнение EF-G G542V с интактной формой в нескольких раундах транслокации показало, что такая аминокислотная замена действительно может приводить к компенсаторному эффекту (Рис. 5 Б). Так, анализ образования fMet-[^{14}C]Val-Pmn с участием мутантной формы EF-G, также как и интактной, приводит к понижению скорости перемещения пептидил-тРНК в 4 раза [$k(\text{без Ami}) = 0,099 \pm 0,009 \text{ мин}^{-1}$; $k(\text{Ami}) = 0,024 \pm 0,009 \text{ мин}^{-1}$]. Однако именно участие мутантной формы EF-G позволяет достигнуть максимального значения транслоцируемой пептидил-тРНК в присутствии антибиотика. Наблюдаемый эффект указывает на то, что в присутствии мутантной формы EF-G гораздо большее число рибосом может вовлекаться в несколько раундов транслокации, в сравнении с интактной формой.

Это подтверждает и анализ образования трипептида с участием мутантной формы. Кривая формирования трипептида fMet-[^{14}C]Val-Phe без антибиотика с участием EF-G G542V является однофазной, так же, как и в случае интактной формы EF-G, однако скорость процесса в этом случае несколько замедляется [$k(\text{без Ami}) = 0,73 \pm 0,08 \text{ c}^{-1}$] (Рис. 6 Б). Присутствие антибиотика так же, как и в случае интактной формы, приводит к формированию двухфазной кривой. При этом скорость быстрой фазы становится еще ниже [$k(\text{Ami}) = 0,55 \pm 0,06 \text{ c}^{-1}$], по сравнению с кривой, полученной в отсутствие антибиотика, однако ее амплитуда достигает 70% от максимально допустимого значения образуемого трипептида. Кроме того, в отличие от интактной формы EF-G, кривая формирования трипептида способна достигать насыщения за гораздо меньшее время (примерно в 2 раза быстрее).

Таким образом, аминокислотные замены G542V, G581A или вставка ins544V EF-G на этапе транслокации приводят к существенному изменению конформационной динамики пептидил-тРНК и замедлению скорости ее перемещения. Однако участие именно таких мутантных форм EF-G позволяет перейти на следующий, после транслокации, цикл элонгации большему числу рибосом, связавших амикумацин А, чем в присутствии интактной формы EF-G. Вероятно, изменения, вносимые мутантными формами EF-G в транслокацию, позволяют сохранить функциональную активность рибосом, связавших антибиотик.

5. Механизм ингибирования транслокации амикумацином А и резистентности к нему

Таким образом, на этапе транслокации амикумацин А замедляет процесс перемещения пептидил-тРНК, при этом не изменяя ее конформационную динамику, однако после акта транслокации значительно снижается доля рибосом, способных перейти на следующий цикл

элонгации. Вероятно, такой эффект амикумадина А связан с существенной потерей рибосомами функциональной активности из-за нарушения их конформации. Как известно из рентгеноструктурного анализа комплекса рибосомы с амикумадином А, антибиотик, связываясь между головой и платформой 30S субчастицы, способен одновременно связывать мРНК и консервативные нуклеотиды обоих доменов, что может приводить к стабилизации положения 5'-концевой части мРНК, а также фиксации головы к платформе [Polikanov и др., 2014; Prokhorova и др., 2016]. Такая особенность взаимодействия антибиотика с рибосомой, очевидно, не оказывает влияния на предшествующие транслокации этапы трансляции, такие как связывание аминоацил-тРНК в А сайте и образование пептидной связи. На этапе транслокации, эта особенность, вероятно, также не влияет на прямой поворот головы и тела малой субчастицы, сопровождаемые перемещением комплекса мРНК-тРНК, но из-за фиксации головы к платформе и удержанию мРНК, обратный поворот головы и тела субчастицы становится затруднительным или невозможным, что и приводит к потере рибосомой функциональной активности.

Механизм ингибирования трансляции амикумадином А отличается от всех известных механизмов для антибиотиков, связывающихся в том же сайте рибосомы. Амикумадин А способен оказывать влияние на два этапа трансляции – инициацию и транслокацию. На этапе инициации, в отличие от эдеина и касугамицина, приводящих к вытеснению 5'-конца мРНК из Е сайта и нарушению связывания инициаторной тРНК в Р сайте [Dinos и др., 2004; Schlutzen и др., 2006], амикумадин А стабилизирует положение мРНК и замедляет аккомодацию инициаторной тРНК, а также ассоциацию 50S субчастицы к инициаторному комплексу [Maksimova и др., 2021]. На этапе транслокации, в отличие от пактамицина [Dinos и др., 2004], амикумадин А не препятствует перемещению комплекса мРНК-тРНК, а замедляет его перемещение и, вероятно, приводит к серьезному нарушению конформации рибосомы таким образом, что рибосома теряет свою функциональную активность и не может участвовать в последующих этапах трансляции.

Как уже было сказано выше, все найденные изменения домена IV фактора EF-G, приводящие к устойчивости против амикумадина А, очень близко располагаются к петлям I и II этого домена. Ранее было показано, что даже единичные аминокислотные замены в этих петлях могли приводить к серьезному нарушению конформационной динамики пептидил-тРНК [Savelsbergh и др., 2000; Holtkamp и др., 2014]. Позже было показано, что такое нарушение является результатом изменения конформации рибосомы. При этом изменении происходит увеличение скорости прямого поворота головы и тела 30S субчастицы с сопутствующим передвижением молекул тРНК, с измененной конформационной динамикой, в соседние сайты, а далее к замедлению обратного поворота головы и тела субчастицы и, в итоге, к рассинхронизации их движения с движением молекул тРНК [Liu и др., 2014; Zhang и др., 2015; Peng и др., 2019]. Найденные изменения EF-G, приводящие к устойчивости против амикумадина

A, как было показано в этой работе, действительно могут сохранять функциональную активность рибосом, связавших антибиотик, и позволяют им участвовать в дальнейших циклах элонгации. Изменения EF-G приводят к идентичному влиянию на конформационную динамику пептидил-тРНК, что и в случае петель I и II. Вероятно, они будут иметь аналогичное влияние и на конформацию рибосомы. Такие изменения приводят к заметному искажению процесса транслокации, но именно они, возможно, уменьшают стабилизирующий эффект, оказываемый амикумацином A, что, в свою очередь, и позволяет сохранить функциональную активность рибосом, связавших антибиотик.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе мы впервые показали молекулярный механизм ингибирования трансляции антибиотиком амикумацином A. Согласно этому механизму, основным этапом, на который оказывает влияние антибиотик, является транслокация. На этом этапе амикумацин A не только замедляет перемещение комплекса мРНК-тРНК, но и уменьшает количество рибосом, способных участвовать в последующих циклах элонгации. Наблюдаемое нарушение функциональной активности рибосом объясняется, вероятно, изменением их конформации таким образом, что дальнейшее вовлечение в трансляцию становится невозможным. Это подтверждается многочисленными функциональными тестами, проведенными в данной работе, в том числе: изучением престаационарной кинетики транслокации при изменении важнейших факторов этого процесса – концентрации ионов Mg^{2+} и температуры; использованием рибосом с укороченным ASF – структурным элементом, который выступает координатором функционально важных центров рибосомы; анализом способности рибосом образовывать пептидную связь после завершеного акта транслокации. Представленный механизм ингибирования трансляции амикумацином A является уникальным и значительно отличается от таковых для антибиотиков, связывающихся в том же участке на рибосоме [Dinos и др., 2004; Schlutzen и др., 2006].

Кроме того, в данной работе были получены результаты, важные не только для понимания способов ингибирования транслокации антибиотиками, но и понимания самого этого процесса. Так, сравнение двух типов EF-G из *E. coli* и *T. thermophilus* показало, что тип EF-G (термофильный/мезофильный) не оказывает существенного влияния на скорость перемещения пептидил-тРНК. Наблюдаемый эффект кардинально отличался от того, что был продемонстрирован для другого фундаментального процесса трансляции – декодирования, где связывание аминоксил-тРНК в A сайте значительно зависит от типа EF-Tu [Paleskava и др., 2021]. Еще одним важным результатом для понимания транслокации явилось то, что укорочение ASF не влияет на скорость перемещения пептидил-тРНК. Полученные ранее данные лишь косвенно

указывали на это [Sergiev и др., 2005; Komoda и др., 2006]. В нашей работе мы показали, что укорочение не влияет на перемещение комплекса мРНК-тРНК и в большей степени связано с изменением конформации рибосомы. Наблюдаемый эффект еще раз подтвердил предположение о том, что ASF выступает координатором функционально важных центров рибосомы на этапе транслокации [Sergiev и др., 2005; Komoda и др., 2006].

Также в нашей работе мы впервые показали молекулярный механизм резистентности к амикумацину А за счет найденных изменений в домене IV фактора EF-G. Подобный механизм, а также сама возможность резистентности за счет таких изменений, ранее не были описаны ни для одного из известных антибиотиков. Найденные изменения относятся к наиболее значимому участку домена IV, где даже единичные аминокислотные замены приводят к существенному нарушению транслокации [Savelsbergh и др., 2000; Holtkamp и др., 2014; Liu и др., 2014; Zhang и др., 2015; Peng и др., 2019]. Мы подтвердили, что аминокислотные замены G542V, G581A или вставка ins544V EF-G действительно приводят к серьезному понижению скорости перемещения комплекса мРНК-тРНК и изменению конформационной динамики пептидил-тРНК, что, вероятно, является результатом существенного нарушения конформации рибосомы. Наблюдаемые эффекты были практически идентичны с теми, что были получены для петель I и II домена IV. Подобный эффект демонстрирует, что для корректного осуществления транслокации важны не только указанные петли, но и другие структурные элементы этого домена. Такие особенности транслокации нами были описаны впервые и расширяют представление об этом фундаментальном процессе. Тем не менее несмотря на существенные изменения, которые вносили мутантные формы EF-G в транслокацию, именно эти изменения помогали сохранять функциональную активность рибосом, связавших антибиотик, и позволяли им участвовать в последующих циклах элонгации. Применение бактериальной клеткой такого сложного механизма ингибирования может указывать на достаточно сильное влияние амикумацина А на транслокацию.

Все полученные в этой работе данные не только расширяют наше представление о разнообразии механизмов ингибирования трансляции и способов, которые может использовать бактериальная клетка, чтобы им противостоять, но и наше представление о таком фундаментальном процессе, как транслокация. Кроме того, эти данные могут иметь и прикладное значение. Так как амикумацин А имеет высокий потенциал в качестве противомикробного агента, то полученные данные будут также необходимы для создания эффективных фармакологических препаратов на его основе.

ВЫВОДЫ

1. Амикумацин А не влияет на связывание аминоксил-тРНК в А сайте и образование пептидной связи. На этапе транслокации амикумацин А замедляет перемещение пептидил-тРНК из А в Р сайт рибосомы и уменьшает долю рибосом, способных перейти на следующий цикл элонгации.
2. Найденные аминокислотные замены G542V, G581A и вставка ins544V в домене IV фактора EF-G, обеспечивающие резистентность к антибиотику, существенно замедляют скорость перемещения пептидил-тРНК и изменяют ее конформационную динамику.
3. Участие измененных форм EF-G сохраняет функциональную активность рибосом, связавших амикумацин А, что позволяет большему количеству рибосом перейти на следующий цикл элонгации.
4. Изучение *in vitro* реакции транслокации, катализируемой гетерологичным фактором EF-G из *T. thermophilus* и гомологичным фактором из *E. coli*, не выявило различий в кинетических характеристиках перемещения пептидил-тРНК и изменений ее конформационной динамики.
5. Укорочение ASF, структурного элемента 50S субчастицы, не влияет на скорость перемещения комплекса мРНК-тРНК при транслокации.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science или Scopus

1. **Maksimova, E.M.**, Vinogradova, D.S., Osterman, I.A., Kasatsky, P.S., Nikonov, O.S., Milón, P., Dontsova, O.A., Sergiev, P.V., Paleskava, A., Konevega, A.L. Multifaceted Mechanism of Amicoumacin A Inhibition of Bacterial Translation // *Front Microbiol.* – 2021. – V. 12. – P. 618857.
2. Kudrin, P., Dzhygyr, I., Ishiguro, K., Beljantseva, J., **Maksimova, E.**, Oliveira, S.R.A., Varik, V., Payoe, R., Konevega, A.L., Tenson, T., Suzuki, T., Hauryliuk, V. The ribosomal A-site finger is crucial for binding and activation of the stringent factor RelA // *Nucleic Acid Research.* – 2018. – V. 46, N. 4. – P. 1973-1983.
3. Paleskava, A., **Maksimova, E.M.**, Vinogradova, D.S., Kasatsky, P.S., Kirillov, S.V., Konevega, A.L. Differential Contribution of Protein Factors and 70S Ribosome to Elongation // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – V. 22, N. 17. – P. 9614.

Тезисы докладов на конференциях

1. **Maksimova, E.**, Kasatsky, P., Makhno, V., Osterman, I., Rodnina, M., Dontsova, O., Sergiev, P., Konevega, A. Inhibition of translation elongation by antibiotic amicoumacin A. // 40th FEBS congress "The Biochemical Basis of Life". Berlin, Germany – *FEBS Journal.* – 2015. – V. 282, Is. Sup. S.1 – P. 371.

2. **Максимова, Е.М.**, Полесскова, Е.В., Касацкий, П.С., Махно, В.И., Остерман, И.А., Роднина, М.В., Донцова, О.А., Сергиев, П.В., Коневега, А.Л. Амикумацин А: необычный механизм действия антибиотика на бактериальную рибосому. // «КМУС-2015» 2-ая конференция молодых ученых и специалистов. Гатчина, Россия – Сборник тезисов. – 2015. – стр. 44.
3. **Максимова, Е.М.**, Полесскова, Е.В., Касацкий, П.С., Махно, В.И., Остерман, И.А., Роднина, М.В., Донцова, О.А., Сергиев, П.В., Коневега, А.Л. Механизм ингибирования трансляции рибосомы антибиотиком амикумацином А. // 5 съезд биохимиков России. Дагомыс, Россия. – Спецвыпуск ActaNaturae. – 2016. – Т. 2. – стр. 24.
4. **Максимова, Е.М.**, Полесскова, Е.В., Касацкий, П.С., Махно, В.И., Остерман, И.А., Роднина, М.В., Донцова, О.А., Сергиев, П.В., Коневега, А.Л. Необычный механизм ингибирования трансляции бактериальной рибосомы амикумацином А. // 3-ий ежегодный Молодежный научный форум "OpenScience". Гатчина, Россия – Сборник тезисов. – 2016. – стр. 39.
5. **Максимова, Е.М.**, Виноградова, Д.С., Полесскова, Е.В., Касацкий, П.С., Остерман, И.А., Донцова, О.А., Сергиев, П.В., Коневега, А.Л. Амикумацин А: необычный механизм ингибирования трансляции. // 21-ая международная Пуштинская школа-конференция молодых ученых "Биология – наука 21 века". Пушкино, Россия – Сборник тезисов. – 2017. – стр. 112.
6. **Максимова, Е.М.**, Виноградова, Д.С., Полесскова, Е.В., Касацкий, П.С., Остерман, И.А., Донцова, О.А., Сергиев, П.В., Коневега, А.Л. Влияние антибиотика амикумацина А на различные этапы биосинтеза белка на прокариотических рибосомах. // 8-ой Российский симпозиум "Белки и пептиды". Москва, Россия – Спецвыпуск ActaNaturae. – 2017. – стр. 91.
7. **Максимова, Е.М.**, Виноградова, Д.С., Касацкий, П.С., Коневега, А.Л. Сравнение факторов трансляции из мезофильных и термофильных микроорганизмов в гетерологичной белоксинтезирующей системе *in vitro*. // 19-ая зимняя школа ПИЯФ. Санкт-Петербург, Россия – Сборник тезисов. – 2018. – стр. 149-150.
8. **Maksimova, E.M.**, Vinogradova, D.S., Paleskava, A., Kasatsky, P.S., Osterman, I.A., Dontsova, O.A., Sergiev, P.V., Konevega, A.L. The unusual inhibition mechanism of bacterial ribosome translation by the antibiotic amicoumacin A // Ribosomes and translation. St. Petersburg, Russia – Abstract. – 2018. – P. 40.
9. **Maksimova, E.M.**, Vinogradova, D.S., Paleskava, A., Kasatsky, P.S., Osterman, I.A., Dontsova, O.A., Sergiev, P.V., Konevega, A.L. Amicoumacin A: the molecular mechanism of translation inhibition and antibiotic resistance // 18th Young Scientist Forum and 43rd FEBS Congress. Prague, Czech Republic – FEBS Open Bio. – V. 8, Is. Sup. S. 1 – 2018. – P. 217.