

**Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого
Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций
Кафедра медицинской физики**

На правах рукописи

Максимова Елена Михайловна

**Молекулярный механизм ингибирования трансляции антибиотиком
амикумацином А**

03.06.01 "Физика и астрономия"
03.01.02_12 "Биофизика"

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

об основных результатах научно-квалификационной работы (диссертации)

Научный руководитель:
кандидат физико-математических наук
А.Л. Коневега

Санкт-Петербург, 2018

Научно-квалификационная работа выполнена в ВШ/на кафедре Института физики, нанотехнологий и телекоммуникаций федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»

Заведующий кафедрой:

Власова Ольга Леонардовна,
доктор физико-математических наук,
доцент, заведующий кафедрой
«Медицинская физика»

Научный руководитель:

Коневега Андрей Леонидович,
кандидат физико-математических наук,
кафедра биофизики Института физики,
нанотехнологий и телекоммуникаций,
старший научный сотрудник

Рецензент:

Сумбатян Наталия Владимировна,
кандидат химических наук, доцент,
лаборатория химии белка кафедра
химии природных соединений
химического факультета МГУ имени
М.В. Ломоносова,
старший научный сотрудник

С научным докладом можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» и на сайте Электронной библиотеки СПбПУ по адресу: <http://elib.spbstu.ru>

Общая характеристика работы

Актуальность работы. Одной из существенных проблем современной медицины является возникновение устойчивости у многих видов патогенных бактерий к антибиотикам, применяемым в терапии. Ввиду этого, существует потребность в поиске новых и эффективных противомикробных агентов. Для решения этой проблемы, как правило, используется два подхода. Первый – это создание химическим способом препаратов, на основе уже хорошо изученных и используемых антибиотиков. Однако, в этом направлении, исследователи сталкиваются с рядом трудностей, таких, например, как дороговизна и сложность химического синтеза. Второй подход – это обращение к естественным антибиотикам, открытым достаточно давно, но еще не применяемым в клинической практике. Одним из таких антибиотиков, открытых около 40 лет назад, является амикумацин А. Для него было показано, помимо сильного противомикробного действия, также противовоспалительное, противоязвенное и даже противоопухолевое действие. Не так давно было показано, что основным процессом в клетке, который ингибирует амикумацин А, является биосинтез белка. Тем не менее, молекулярный механизм ингибирования антибиотиком до сих пор остается неизученным.

Другим крайне важным аспектом при создании эффективных противомикробных агентов и аналогов на их основе является изучение молекулярных механизмов резистентности, возникающих в бактериальной клетке. Для амикумацина А были выявлены мутации в генах, кодирующих рРНК и белки, участвующие в синтезе полипептида, однако, молекулярный механизм устойчивости к антибиотику, осуществляемый клеткой, в геноме которой имеются мутации, не был выявлен.

Цель работы – с применением методов стационарной кинетики и флуоресцентной спектроскопии изучить молекулярный механизм ингибирования трансляции антибиотиком амикумацином А, роль отдельных структурных элементов рибосомы в транслокации, изучить детали перемещения транспортных РНК в рибосоме при транслокации, а также исследовать молекулярный механизм устойчивости к амикумацину А, реализуемый при появлении мутаций в гене, кодирующем элонгационный фактор EF-G.

Задачи исследования.

1. Изучить влияние амикумацина А на этап инициации трансляции.
2. Изучить влияние амикумацина А на этап декодирования (связывание аминоацил-тРНК в А сайт рибосомы) и реакцию транспептидации.
3. Изучить влияние амикумацина А на реакцию транслокации.
4. Изучить влияние отдельных структурных элементов прокариотической рибосомы на кинетику транслокации.
5. Провести сравнительное изучение элонгационного фактора EF-G из мезофильного *Escherichia coli* и термофильного *Thermus thermophilus* организмов.
6. Изучить компенсаторный механизм аминокислотных замен (G542V или G581A) или вставки (ins544K) в IV домене элонгационного фактора EF-G на кинетику транслокации и на ингибирующее действие антибиотика.

Научная новизна. На сегодняшний день амикумацин А остается малоизученным антибиотиком, для которого известны его структурные особенности взаимодействия с

бактериальной и эукариотической рибосомой. Однако детальный молекулярный механизм его ингибирующего действия не был показан. В данной работе изучается не только влияние антибиотика на отдельные этапы трансляции полипептида, но и предлагается общий механизм его ингибирования. Кроме того, мы впервые показываем молекулярный механизм резистентности к амикумацину А, возникающей за счет появления мутаций в гене, кодирующем элонгационный фактор EF-G. Такой механизм ранее не был показан ни для одного известного антибиотика.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные в данной работе результаты, а также представленные механизмы ингибирования трансляции антибиотиком и резистентности к нему, представляют практический интерес, так как амикумацин А является потенциальным противомикробным и противораковым препаратом. Однако, дальнейшее использование антибиотика, также, как и создание других фармакологических препаратов на его основе, невозможно без понимания молекулярного механизма его действия. Представленные в данном исследовании результаты, имеют и теоретический интерес, так как помогают лучше понять функционирование рибосомы на отдельных этапах трансляции полипептида, в том числе транслокации, а также впервые показывают новый способ устойчивости к антибиотикам с помощью аминокислотных замен в одном из функционально значимых доменов EF-G.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Амикумацин не оказывает существенного влияния на этапы инициации трансляции, связывания аминоацил-тРНК в А сайт рибосомы, образование пептидной связи
2. Основной этап трансляции, который ингибирует амикумацин А – этап транслокации. На этом этапе антибиотик значительно снижает скорость перемещения пептидил-тРНК из А в Р сайт рибосомы.
3. Ранее выявленные мутации в гене, кодирующем элонгационный фактор EF-G, приводят к значительным изменениям кинетики реакции транслокации и к изменению конформационной динамики комплекса тРНК-рибосома при транслокации.

Апробация работы и публикации. Результаты работы были представлены на российских и международных конференциях, а также опубликованы в международных журналах. По материалам исследования опубликованы 11 печатных работ, в том числе в рецензируемых научных журналах – 1, в сборниках тезисов – 10.

1. Обзор литературы

Амикумацин А относится к небольшой группе антибиотиков, являющихся изокумариновыми производными (Shmimojima *et al.*, 1982) (Рис. 1А). Впервые он был выделен из морского организма *Bacillus pumilus* еще в 1981 г. (Itoh *et al.*, 1981). Позже были найдены и другие представители этой группы, имеющие очень схожую структуру (Li *et al.*, 2012; Shmimojima *et al.*, 1982). Однако, лишь для амикумацина А были выявлены сильные противомикробные свойства (Itoh *et al.*, 1982; Li *et al.*, 2012). Дальнейшее исследование антибиотика, показало, что он обладает также противовоспалительной, противоязвенной (Itoh *et al.*, 1982) и противоопухолевой активностями (Li *et al.*, 2012; Prokhorova *et al.*, 2016).

Однако, несмотря на всю привлекательность амикумацина А, как фармацевтического агента, он был мало изучен. Лишь в 2012 г. было показано, что присутствие антибиотика могло вызывать в бактериальной клетке активацию большого количества генов участвующих в различных метаболических путях, в том числе ответственных за трансляцию полипептида (Lama *et al.*, 2012). В 2014 г. было показано, что амикумацин А может ингибировать биосинтез белка, связываясь с рибосомой в Е сайте 30S субчастицы (Polikanov *et al.*, 2014). Так, определенная методом рентгеноструктурного анализа кристаллическая структура комплекса бактериальной рибосомы с антибиотиком, показала, что он образует контакты с консервативными нуклеотидами спиралей h23, h24 и h45 16S рРНК, а также с нуклеотидами мРНК в районе стартового AUG кодона (Рис. 1Б и 1В). Тем не менее, никаких контактов антибиотика с Е-сайтовой тРНК не обнаружено. Полученная чуть позже, в 2016 г., структура комплекса амикумацина А с эукариотической рибосомой не показала существенных различий в особенностях взаимодействия между антибиотиком и рибосомами из про- и эукариот (Prokhorova *et al.*, 2016).

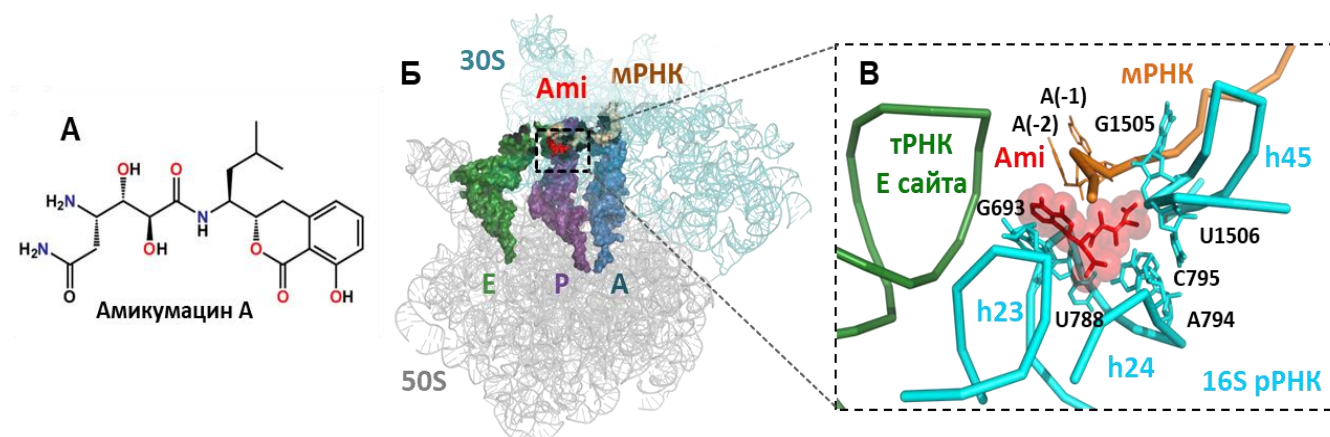


Рис. 1. А. Структура амикумацина А. Б. Участок связывания амикумацина А в бактериальной 70S рибосоме. В. Приближенное изображение участка связывания антибиотика в Е сайте рибосомы, а также его контакты с лигандами и структурными элементами рибосомы (PDB 4W2F). Зеленым цветом обозначена Е-сайтовая тРНК, фиолетовым – Р-сайтовая, синим – А-сайтовая.

Тем не менее, амикумацин А не единственный антибиотик способный связываться в Е сайте 30S субчастицы (Arenz and Wilson, 2016). Известно, что в этом участке связываются еще несколько антибиотиков, таких как эдеин, касугамицин и пактамицин, различающихся по структуре, способам взаимодействия со структурными элементами рибосомы и ее лигандами, а также их способности подавлять те или иные стадии трансляции. Так, например, связывающийся в этом участке пептидоподобный антибиотик эдеин, способен подавлять инициацию трансляции, за счет возможности связывания с Р-сайтовой тРНК (Dinos *et al.*, 2004). Другой антибиотик касугамицин, относящийся к классу аминогликозидов, также подавляет инициацию трансляции, однако, в отличие от эдеина, он не способен взаимодействовать с Р-сайтовой тРНК, оказывая влияние только на мРНК в районе стартового кодона (Schluenzen *et al.*, 2006). Пактамицин же является аминоциклопентитольным антибиотиком, который способен вытеснять мРНК из ее участка связывания с рибосомой в Е сайте, оказывая тем самым ингибирующее действие на инициацию трансляции (Kappen and Goldberg, 1976; Polikanov *et al.*

al., 2014). Однако, для этого антибиотика была также показана способность ингибировать и этап транслокации за счет подавления перемещения мРНК-тРНК комплекса (Dinos *et al.*, 2004).

Характерной особенностью всех рассмотренных антибиотиков, в отличие от амикумацина А, является их способ взаимодействия с мРНК, при котором они стремятся вытеснить ее в районе стартового кодона, конкурируя с ней за участок связывания с 16S рРНК (Polikanov *et al.*, 2014). Амикумацин А – наоборот, выступает агентом, способствующим связыванию мРНК с 30S субчастицей, тем самым стабилизируя их в определенных конформациях. Возможно, именно такая особенность взаимодействия амикумацина А с рибосомой и обуславливает его влияние на способность рибосомы синтезировать полипептид. Так, в начальных исследованиях, было показано, что амикумацин А, в отличие от других антибиотиков этого участка связывания, не оказывает заметного воздействия на инициацию трансляции, однако, значительно подавляет транслокацию (Polikanov *et al.*, 2014; Prokhorova *et al.*, 2016). Тем не менее, точный механизм ингибирования трансляции амикумацином А остается неясным. Понимание этого механизма важно не только для дальнейшего применения антибиотика в медицине, но и для создания более эффективных аналогов на его основе. В данной работе мы постараемся раскрыть механизм действия антибиотика на отдельные этапы трансляции полипептида бактериальной рибосомы.

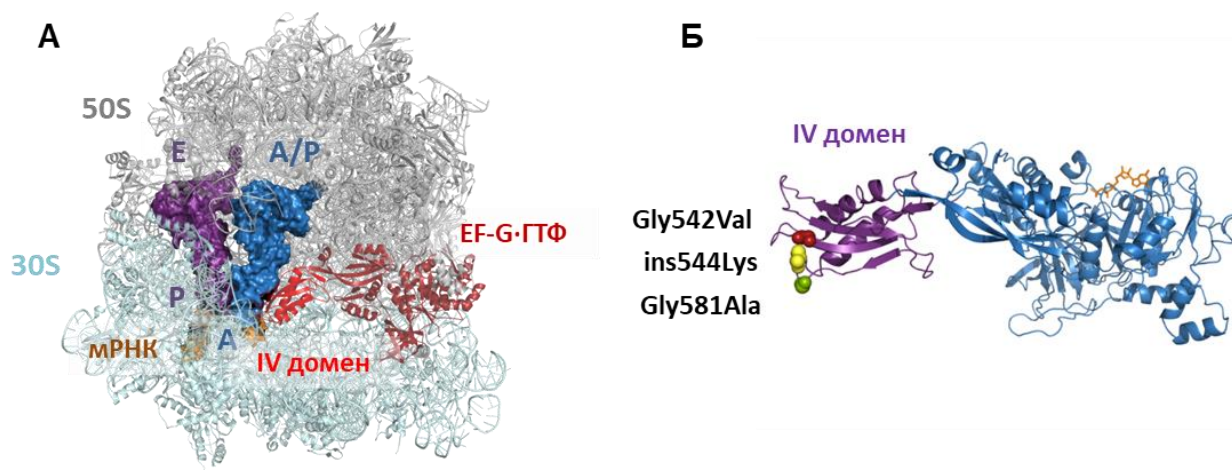


Рис. 2. А. Участок связывания элонгационного фактора EF-G на рибосоме (PDB code: 4V7D). Фиолетовым цветом обозначена деацилированная тРНК, синим – пептидил-тРНК. Б. Модель структуры EF-G из *E. coli* (PDB code: 4V9O).

Кроме того, другой нашей задачей является исследовать механизм резистентности к амикумацину А. В настоящее время накоплено большое количество информации о возникновении у многих патогенных микроорганизмов устойчивости к известным и давно применяемым в клинической практике антибиотикам. Поэтому, наряду с поиском новых эффективных антимикробных агентов и исследованием их ингибирующего действия, возникает необходимость и в изучении механизмов, с помощью которых бактериальная клетка может обходить пагубное воздействие этих антимикробных агентов. Так, и для амикумацина А был выявлен ряд мутаций в генах, кодирующих 16S рРНК и EF-G, приводящих к ослаблению его ингибирующего действия (Lama *et al.*, 2012; Polikanov *et al.*, 2014). Выявленные мутации 16S

pРНК, известны достаточно давно, и их компенсаторный эффект был описан и для ряда других антибиотиков (Mankin A.S., 1997; Vila-Sanjurjo, 1999). Напротив, механизм устойчивости к антибиотикам, связанный с появлением мутаций в гене, кодирующем EF-G, ранее не был описан. Так, было показано, что одиночные замены аминокислот в 542 (Gly542Val) и 581 (Gly581Ala) положениях, а также вставка аминокислоты лизина в положении 544 а.о. (ins544K) IV домена EF-G могла приводить к устойчивости клеток против амикумацина А (Рис. 2). В настоящей работе, мы также исследовали возможный механизм компенсации этих мутаций EF-G на ингибирующее действие антибиотика.

2. Материалы и методы

Реактивы. Все инициаторные факторы были выделены согласно методике, описанной ранее (Milon *et al.*, 2007), с некоторыми изменениями. Так, очистку IF1 проводили в два этапа, вначале с помощью катионообменной хроматографии на колонке HiTrap® SP HP 5 ml (GE Healthcare, США) в градиенте концентрации KCl от 5 до 800 mM, а затем с помощью гель-фильтрационной хроматографии на колонке объемом 200 мл (100 см × 1.6 см), со смолой Toyopearl HW-50S (Tosoh Bioscience LLC, Япония). Очистку IF2 также проводили в два этапа, с помощью аффинной хроматографии на смоле Protino® Ni-IDA (MACHEREY-NAGEL, Германия) и гель-фильтрационной хроматографии на колонке объемом 200 мл (100 см × 1.6 см), со смолой Toyopearl HW-50S. Очистку IF3 проводили в один этап с помощью катионообменной хроматографии на колонке HiTrap® SP HP 5 ml в градиенте концентрации KCl от 100 до 1100 mM.

Очистку элонгационных факторов EF-G из *E. coli* и *T. thermophilus* проводили в один этап с помощью аффинной хроматографии с использованием смолы Protino® Ni-IDA.

Элонгационный фактор EF-Tu (Wieden *et al.*, 2002), ВРУ-Met-tRNA^{fMet} (Holtkamp *et al.*, 2014), Val-tRNA^{Val}, [¹⁴C]Phe-tRNA^{Phe} (Sampson and Uhlenbeck, 1988), а также плазмидный вектор, несущий ген, кодирующий мРНК с последовательностью Met-Val-Phe-... были получены в Лаборатории биосинтеза белка, НИЦ «КИ» - ПИЯФ, Гатчина, согласно описанным ранее методикам.

70S рибосомы, 30S и 50S рибосомные субчастицы были выделены с помощью зонального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы 10-40%, согласно опубликованной ранее методике (Milon *et al.*, 2007). Рибосомы, содержащие делеции в А-сайте пальца ("A site finger", ASF) большой субчастицы были предоставлены Гаврилюком В.В., Тартусский университет, Эстония.

fMet-tRNA^{fMet} (Rodnina *et al.*, 1994), Phe-tRNA^{Phe} (Sampson and Uhlenbeck, 1988), Phe-tRNA^{Phe}(Prf16/17) (Katunin *et al.*, 2002) были получены согласно опубликованным ранее методикам.

мРНК, содержащая последовательность 5'-...AUG·UUU·ACG·AUU·ACU·ACG...-3', кодирующая соответственно **Met-Phe-Thr-Ile-Thr-Thr-...**, а также с измененным на UUC стартовым кодоном, и мРНК, содержащая последовательность 5'-...AUG·GUU·UUU·AUU·ACU·ACG...-3', кодирующая **Met-Val-Phe-Ile-Thr-Thr-...**, были выделены согласно описанной ранее методике (Calogero *et al.*, 1988). Для получения матрицы,

содержащей измененный на UUC стартовый кодон, был использован сайт-направленный мутагенез вектора для матрицы с последовательностью Met-Phe-Thr..., согласно протоколу QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, США).

Методы. Основными методами, используемыми в данной работе, являются методы флуоресцентной спектроскопии и метод остановленного потока, который позволяет изучать престаационарную кинетику энзиматических реакций, таких, например, как катализируемый EF-G переход рибосомы из пре- в посттранслокационное состояние. В нашей работе мы использовали спектрометр остановленного потока SX-20 (Applied Photophysics, UK). Прибор позволяет осуществлять быстрое (<1 мс) смешивание двух реактивов из двух шприцов (например, EF-G – фермент, и претранслокационный комплекс – субстрат). После смешивания раствор поступает в кювету, а избыток раствора выталкивается в останавливающий шприц, поршень которого и запускает сбор данных детектором (Рис. 3). Для отслеживания происходящих изменений между ферментом и субстратом используют различные флуоресцентные метки, ковалентно присоединенные к строго определенным сайтам исследуемых биомолекул.

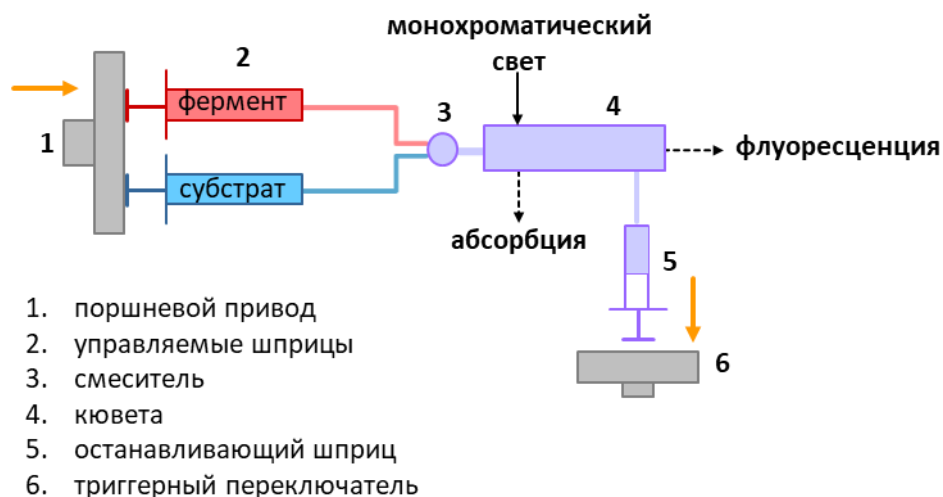


Рис. 3. Схема устройства спектрометра остановленного потока.

В данной работе применялись два типа претранслокационных комплексов, содержащие в Р сайте деацелированную tRNA^{fMet}, в А сайте ВРУ-Met-Phe-tRNA^{Phe} (Holtkamp *et al*, 2014) или fMet-Phe-tRNA^{Phe}(Prf16/17) (Katunin *et al*, 2002) (Рис. 4). Быстрое смешивание EF-G с претранслокационным комплексом приводит к характеристическому изменению интенсивности флуоресцентного сигнала, которое можно описать экспоненциальным уравнением

$$F = F_{\infty} + A * \exp(-kt) \quad (1), \text{ где}$$

F – интенсивность флуоресценции; A – амплитуда, которую можно выразить как A=F₀-F_∞; F₀ и F_∞ это интенсивность флуоресценции в начальный и конечный момент времени соответственно; t – время.

Исходя из данного уравнения производили расчет кажущихся констант скорости первого порядка k_1 и k_2 , которые характеризовали изменение процесса транслокации в присутствии антибиотика или без него.

С помощью данного метода также изучали связывание аминоктил-тРНК в А сайт рибосомы (Pare *et al.*, 1998). Для этого использовались два типа комплексов: 1) инициаторный комплекс, содержащий в Р сайте ВРУ-Met-tRNA^{fMet}, и тройной комплекс EF-Tu·ГТФ·Phe-tRNA^{Phe}; 2) инициаторный комплекс, содержащий в Р сайте fMet-tRNA^{fMet}, и тройной комплекс EF-Tu·ГТФ·Phe-tRNA^{Phe}(Prf16/17).

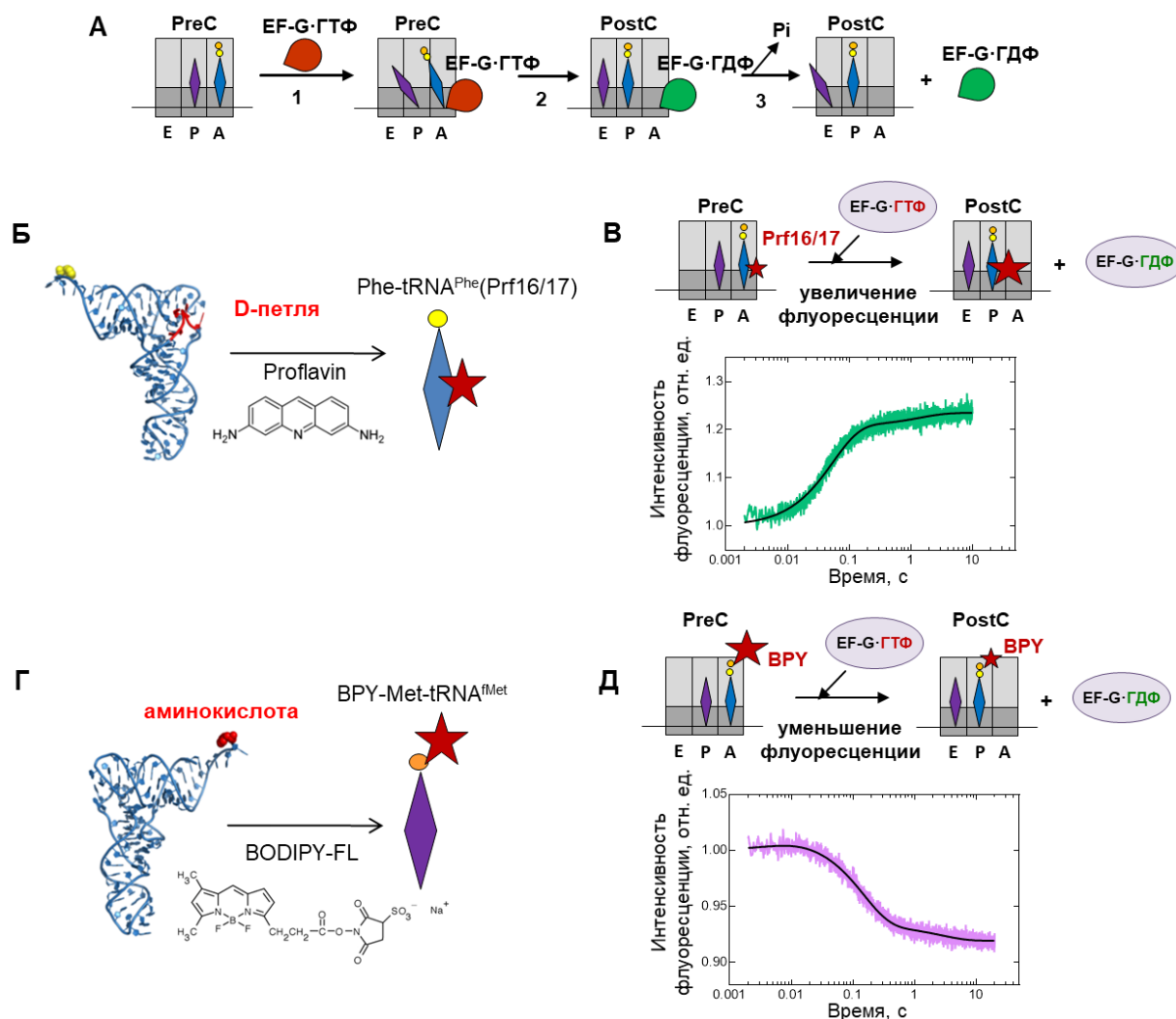


Рис. 4. А. Общая схема транслокации. На первом этапе (1) происходит связывание EF-G·ГТФ, которое приводит к переходу тРНК в гибридные состояния. На втором этапе (2) происходит перемещение мРНК-тРНК комплекса и гидролиз ГТФ. На заключительном этапе (3), диссоциация неорганического фосфата (Pi), способствует диссоциации EF-G·ГДФ, а деацилированная тРНК уходит с Е сайта через ряд гибридных состояний. Б. Расположение флуоресцентного репортера Prf (профлавин) на тРНК (PDB code: 1OБ2), позволяющее следить за движением ее локтя. В. Изменение флуоресцентного сигнала при транслокации fMet-Phe-tRNA^{Phe}(Prf16/17). Г. Расположение флуоресцентного репортера ВРУ (BODIPY-FL) на тРНК (PDB code: 1OБ2), позволяющее следить за движением ее акцепторного конца. Д. Изменение флуоресцентного сигнала при транслокации ВРУ-Met-Phe-tRNA^{Phe}. PreC – претранслокационный комплекс, PostC – посттранслокационный комплекс.

Другой метод, используемый в работе – это анализ эффективности образования пептидной связи, который мы проводили согласно опубликованной ранее методике (Rodnina *et*

al., 1995). Для анализа образования пептидной связи при синтезе дипептида, претранслокационные комплексы формировали на матрице, кодирующей MFT-..., содержащей канонический AUG инициаторный кодон, или с замененным на UUC инициаторный кодон, где в Р сайте находилась деацелированная tRNA^{fMet}, в А сайте fMet-[¹⁴C]Phe-tRNA^{Phe}; для анализа образования пептидной связи при синтезе трипептида претранслокационные комплексы формировали на матрице, кодирующей MVP-..., где в Р сайте находилась деацелированная tRNA^{Val}, в А сайте fMet-Val-[¹⁴C]Phe-tRNA^{Phe}. Из сформированных комплексов проводили экстракцию образованных дипептидов fMet-[¹⁴C]Phe или трипептидов fMet-Val-[¹⁴C]Phe. Затем с помощью обратно-фазовой хроматографии на колонке LiChroCART 250-4 LiChrosorb® RP-8 (5µm) (Merck, Германия) в градиенте концентрации ацетонитрила 0-65% разделяли пептиды от свободной радиоактивно меченой аминокислоты. Эффективность образования пептидной связи определяли по количеству радиоактивной метки, включенной в образовавшийся пептид.

Еще один метод, используемый в работе – это быстрая пурамициновая реакция, которая проводилась согласно методике, опубликованной ранее (Savelsbergh *et al.*, 2000). В основе этого метода лежит способность антибиотика пурамицина (Pmn) связываться в А сайте 50S субчастицы и акцептировать на себе растущий полипептид от пептидил-тРНК, находящегося в Р сайте. Сродство образующегося пептидил-пурамицина к А сайту рибосомы очень низкое, поэтому он легко диссоциирует из рибосомного комплекса, тем самым останавливая трансляцию полипептида. В нашей работе это свойство пурамицина мы применяли для оценки способности рибосомы транслацировать пептидил-тРНК из А сайта в Р сайт рибосомы. Для этого формировали претранслокационный комплекс, содержащий в Р сайте деацелированную tRNA^{fMet}, в А сайте fMet-[¹⁴C]Phe-tRNA^{Phe}. Далее, после добавления каталитических количеств EF-G, рибосома переходила в пост-транслокационное состояние. Через определенные промежутки времени из реакционной смеси отбирались равные аликвоты и проводилась пурамициновая реакция. По количеству включившейся радиоактивной метки в образовавшийся fMet-[¹⁴C]Phe-Pmn оценивали способность рибосом транслацировать пептидил-тРНК.

3. Результаты

3.1. Инициация

Так как амикумацин А потенциально может оказывать влияние на инициацию, как и другие антибиотики того же сайта связывания на рибосоме, мы проверили его влияние на способность инициаторной fMet-tRNA^{fMet} связываться в Р сайт рибосомы, а также способность 30S и 50S рибосомных субчастиц ассоциировать в присутствии антибиотика. Для этого мы формировали 30S инициаторные комплексы, содержащие мРНК и флуоресцентно меченую ВРУ-fMet-tRNA^{fMet} в присутствии антибиотика или без него, а затем ассоциировали его с 50S субчастицей, образуя таким образом 70S инициаторный комплекс. Сформированные рибосомные комплексы анализировали с помощью гель-фильтрационной хроматографии, где связывание инициаторной тРНК в рибосому оценивали по совпадению пиков поглощения света рибосомами и флуоресценции тРНК. При этом использовали матричные РНК двух типов: с каноническим инициаторным AUG кодоном или замененным на UUC, для того чтобы

проследить возможное влияние антибиотика на стабилизацию тРНК в Р сайте с некорректным антикодоном (Рис. 5).

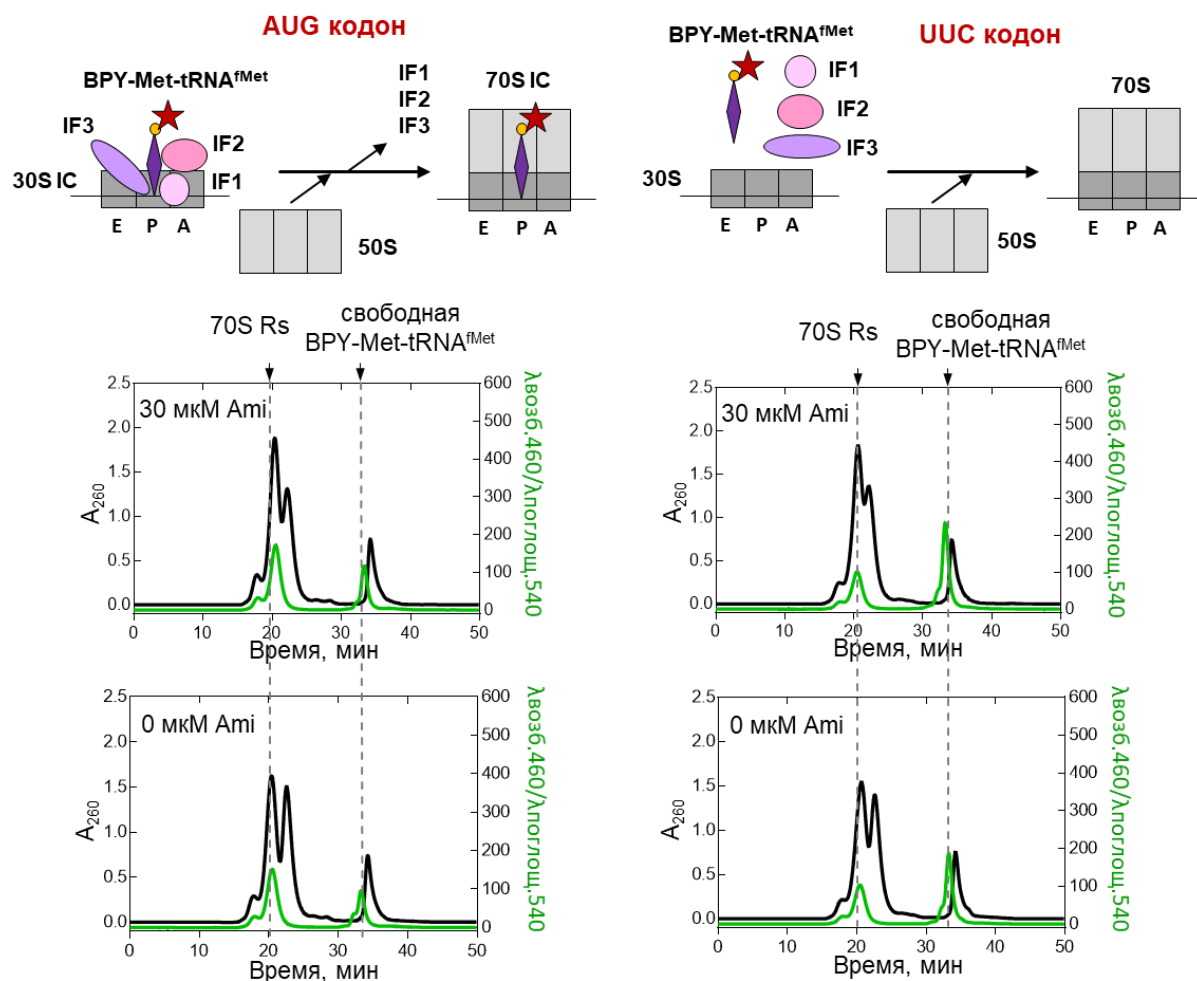


Рис. 5. Анализ связывания инициаторной тРНК в Р сайт 30S рибосомы и ассоциации субчастиц с помощью гель-фильтрационной хроматографии. Измерение поглощения проводили на длине волны 260 нм (черная кривая), детекцию флуоресценции проводили на длине волны возбуждения 460 нм и эмиссии 540 нм (зеленая кривая). Rs - рибосомы, Aми - амикумацин А, IC – инициаторный комплекс.

На мРНК с AUG кодоном, как в присутствии антибиотика, так и без него, инициаторная тРНК эффективно связывается с рибосомами. Об этом говорит совпадение пиков интенсивности поглощения 70S рибосом и флуоресценции связавшейся BPY-Met-tRNA^{fMet}, а также то, что в обоих случаях соотношение связавшейся и свободной BPY-Met-tRNA^{fMet} не отличается. Однако, в присутствии антибиотика примерно в два раза увеличивается количество ассоциированных субчастиц, о чем говорит изменение соотношения пиков интенсивности поглощения 70S рибосом и свободных субчастиц. На матрице с инициаторным UUC кодоном, также можно наблюдать, что антибиотик не увеличивает количество связавшейся инициаторной тРНК, но приводит к увеличению ассоциированных субчастиц.

Таким образом, амикумацин А не оказывает влияние на связывание инициаторной тРНК в Р сайт рибосомы и не приводит к стабилизации тРНК в Р сайте с ошибочным кодон-антикодоновым взаимодействием, однако, он оказывает влияние на ассоциацию субчастиц. Это, в свою очередь, может приводить к формированию неактивных функциональных комплексов

или же антибиотик может формировать комплексы с инициаторной тРНК, изменяя ее конформацию таким образом, что дальнейшее корректное функционирование рибосомы окажется невозможным. Поэтому далее было изучено влияние антибиотика на следующий этап трансляции полипептида – образование пептидной связи.

3.2. Образование пептидной связи

Так как антибиотик оказывал влияние на ассоциацию рибосомных субчастиц, для анализа образования пептидной связи мы использовали два типа инициаторных комплексов – сформированных на 30S субчастице с последующим добавлением 50S субчастиц или сформированных на 70S рибосоме, с использованием двух матриц, содержащих AUG или UUC инициаторный кодон. Выяснилось, что на матрице с AUG кодоном, присутствие антибиотика, как в случае с 30S, так и в случае 70S инициаторными комплексами не влияло на эффективность образования пептидной связи (Таблица 1). То же самое мы наблюдали и в случае с матрицей, содержащей UUC кодон. То есть присутствие антибиотика не изменяет конформацию инициаторной тРНК и не приводит к формированию функционально неактивных рибосомных комплексов, о чем говорит отсутствие снижения эффективности образования пептидной связи на матрице с AUG кодоном и отсутствие повышения – на матрице с UUC кодоном. Влияние антибиотика на ассоциацию рибосомных субчастиц, по-видимому, не приводит к формированию неактивных функциональных комплексов, так как ни на одной из матриц мы не наблюдали разницы в эффективности образования пептидной связи, как для 30S, так и для 70S инициаторных комплексов.

Таблица. 1. Влияние амикумацина А на образование пептидной связи¹

Инициаторный кодон	30S+50S		70S	
	0 мкМ Ami ²	30 мкМ Ami	0 мкМ, Ami	30 мкМ, Ami
AUG	46	45	64	58
UUC	13	2	8.3	6.6

¹Все значения указаны в процентах от радиоактивно меченой аминокислоты (Phe), включенной в образовавшийся дипептид.

²Ami – амикумацин А

Этапу образования пептидной связи предшествует еще один важный процесс – связывание аминоацил-тРНК в А сайт рибосомы. Для изучения престаационарной кинетики этого процесса мы использовали два типа инициаторных и тройных комплексов. Первый инициаторный комплекс, который в Р сайте содержит fMet-tRNA^{fMet}, и тройной комплекс EF-Tu·ГТФ·Phe-tRNA^{Phe}(Prf16/17), позволял следить за движением аминоацил-тРНК от EF-Tu в А сайт рибосомы (Рис. 6). Изменению флуоресцентного сигнала от метки профлавина соответствуют две фазы: первая – кодон-антикодоновое узнавание, вторая – аккомодация аминоацил-тРНК (Pape *et al.*, 1998; Mittelstaet *et al.*, 2011). Эксперименты по изучению престаационарной кинетики аккомодации показали, что антибиотик не оказывал значительного влияния ни на одну из этих фаз (без антибиотика $k_1=24\pm 2\text{ c}^{-1}$, $k_2=2.9\pm 0.2\text{ c}^{-1}$, в присутствии

антибиотика $k_1=19\pm 1 \text{ c}^{-1}$, $k_2=4.9\pm 0.4 \text{ c}^{-1}$). Использование же второго набора комплексов, где в Р сайте инициаторного комплекса находилась ВРУ-Met-tRNA^{fMet}, а тройной комплекс включал EF-Tu·ГТФ·Phe-tRNA^{Phe}, позволяло следить за движением пептида из Р в А сайт пептидилтрансферазного центра рибосомы. Антибиотик здесь также не оказывал влияние на перемещение пептида в процессе образования пептидной связи ($k_1=7.5\pm 0.1 \text{ c}^{-1}$ без антибиотика, $k_1=6.5\pm 0.1 \text{ c}^{-1}$ в присутствии антибиотика), однако уменьшал амплитуду флуоресцентного сигнала. Полученные данные могут указывать на то, что амикумацин А не влияет на образование пептидной связи, что доказывается анализом эффективности образования пептидной связи и престаионарной кинетикой, но влияет на конечную конформацию пептидил-тРНК в А сайте рибосомы.

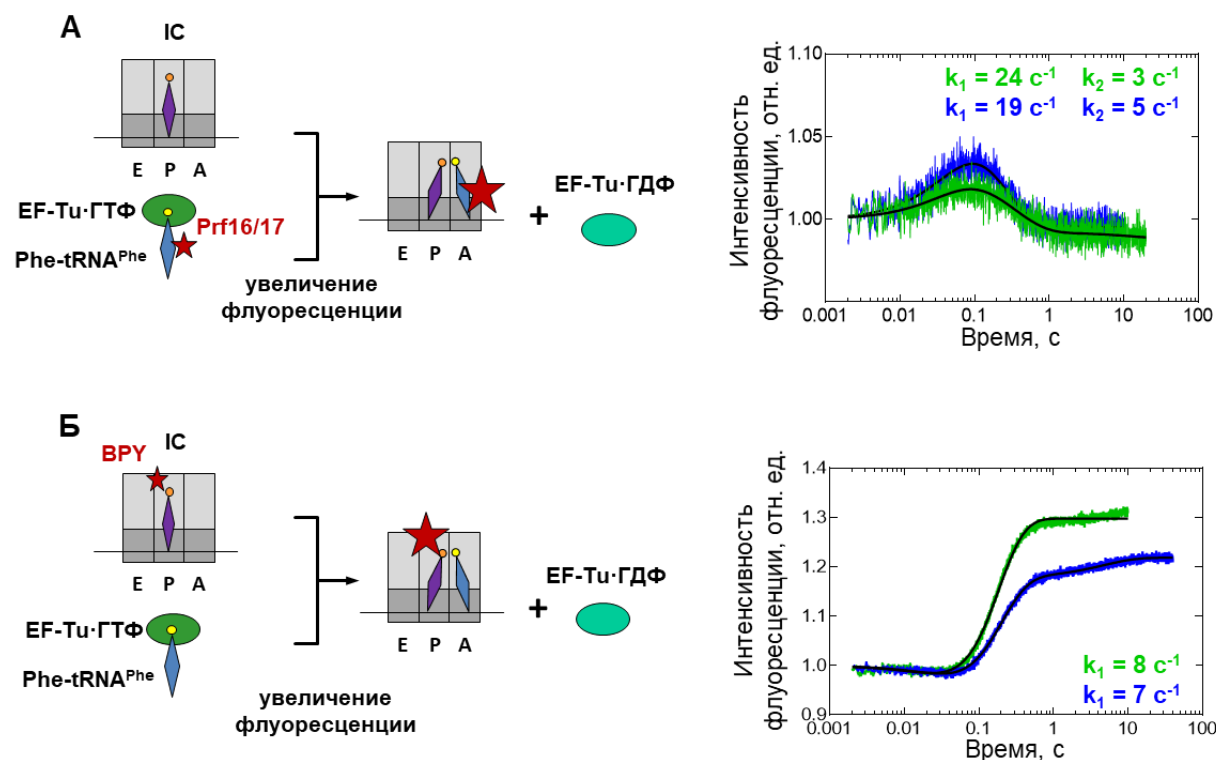


Рис. 6. Престаионарная кинетика связывания аминоксил-тРНК в А сайт рибосомы. **А.** Взаимодействие тройного комплекса EF-Tu·ГТФ·Phe-tRNA^{Phe}(Prf16/17) с инициаторным комплексом, содержащим в Р сайте fMet-tRNA^{fMet}. **Б.** Связывание тройного комплекса EF-Tu·ГТФ·Phe-tRNA^{Phe} с инициаторным комплексом, содержащим в Р сайте ВРУ-Met-tRNA^{fMet}. Кинетика связывания выполнена в присутствии 0 мкМ (зеленая кривая) или 30 мкМ (синяя кривая) амикумацина А. IC – инициаторный комплекс.

Проведенный анализ стабильности связывания пептидил-тРНК в А сайте рибосомы, подтвердил это предположение. Так, в присутствии антибиотика, при понижении концентрации ионов Mg^{2+} , количество пептидил-тРНК, диссоциировавшей из претранслокационных комплексов, значительно меньше, чем в условиях без антибиотика (Рис. 7). Таким образом, амикумацин А увеличивает стабильность связывания пептидил-тРНК в А сайте рибосомы, что может объясняться изменением конформации тРНК под его воздействием. Однако, изменение конформации пептидил-тРНК в претранслокационных комплексах может оказывать влияние и на следующий этап трансляции полипептида – транслокацию.

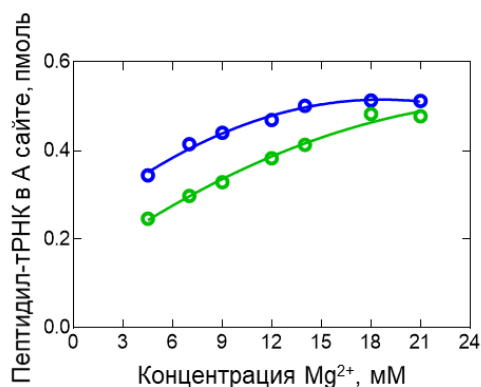


Рис. 7. Стабильность связывания пептидил-тРНК в А сайте рибосомы. Анализ был проведен с использованием претранслокационных комплексов, содержащих в Р сайте деацелированную tRNA^{fMet}, в А сайте fMet-[¹⁴C]Phe-tRNA^{Phe}, в присутствии 0 мкМ (зеленая кривая) или 30 мкМ (синяя кривая) амикумаина А.

3.3. Транслокация

Анализ, проведенный с использованием быстрой пурамициновой реакции, показал, что в присутствии антибиотика, количество транслоцированной пептидил-тРНК из А в Р сайт рибосомы значительно уменьшалось (Рис. 8). В эксперименте использовали каталитические концентрации EF-G (1, 3 и 10 нМ) и две концентрации антибиотика (10 и 30 мкМ). Как оказалось, только при пониженной концентрации антибиотика (10 мкМ) рибосомы могли достигать максимального количества транслоцированной пептидил-тРНК, однако это можно было наблюдать только при высоких концентрациях EF-G (10 нМ), и для этого требовалось больше времени, чем без антибиотика. При более высокой концентрации антибиотика (30 мкМ), используемой для всех концентраций EF-G, количество транслоцированной пептидил-тРНК всегда оставалось очень низким и не достигало максимального значения.

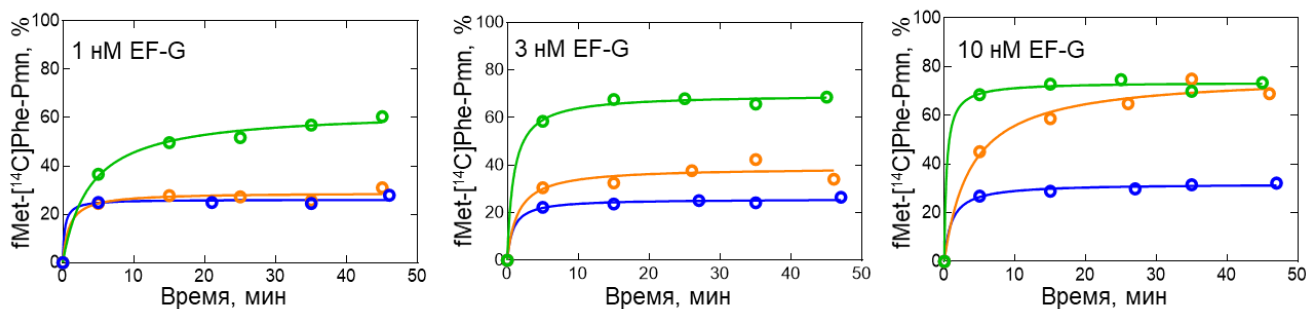


Рис. 8. Количество транслоцированной пептидил-тРНК из А в Р сайт рибосомы с использованием каталитических количеств EF-G (1, 3 или 10 нМ), в присутствии 0 мкМ (зеленая кривая), 10 мкМ (оранжевая кривая) и 30 мкМ (синяя кривая) амикумаина А.

Поскольку такие данные указывают на сложный механизм ингибирования транслокации амикумаином А, далее была изучена престаационарная кинетика реакции транслокации в присутствии антибиотика. Для этого мы использовали два типа претранслокационных комплексов, содержащих деацелированную tRNA^{fMet} в Р сайте и ВРУ-Met-Phe-tRNA^{Phe} или fMet-Phe-tRNA^{Phe}(Prf16/17) в А сайте рибосомы. Использование в первом случае флуоресцентной метки ВРУ на аминокислоте, позволило нам следить за движением

акцепторного конца пептидил-тРНК, при ее перемещении из А в Р сайт рибосомы, использование же другой метки Prf – за движением локтя пептидил-тРНК.

Так как, в нашей работе мы использовали форму EF-G, содержащую His-tag, на N-конце белка, что несколько отличается от того, что было описано ранее в литературе (His-tag содержался на С-конце), то, в первую очередь, мы охарактеризовали способность такой формы EF-G транслоцировать пептидил-тРНК. Изменение флуоресцентного сигнала, как от ВРУ, так от Prf репортера при транслокации тРНК описывается двухэкспоненциальным уравнением,

$$y = A_0 + A_1 * \exp(-k_1 x) + A_2 * \exp(-k_2 x) \quad (2),$$

которое характеризует быструю (k_1) и медленную (k_2) фазы изменения флуоресценции (Рис. 9). Построение графика зависимости константы скорости k_1 (которая характеризует процесс транслокации) от увеличивающейся концентрации EF-G, позволила вычислить, что максимальная скорость реакции, для комплексов, содержащих тРНК с репортером Prf составила $k_1 = 53 \pm 1 \text{ с}^{-1}$, что несколько выше по сравнению, с представленной в литературе. Так, при насыщающей концентрации EF-G 4 мкМ скорость транслокации составляла примерно 28 с^{-1} , в нашем случае около 42 с^{-1} (Savelsbergh *et al.*, 2000; Holtkamp *et al.*, 2014). Максимальные значения скорости для комплексов с ВРУ репортером составили $k_1 = 37 \pm 1 \text{ с}^{-1}$, что совпадает с литературными данными. Такое различие в скорости может объясняться тем, что используемая нами конструкция содержит His-tag вдали от функциональных центров EF-G, что несколько улучшает его свойства.

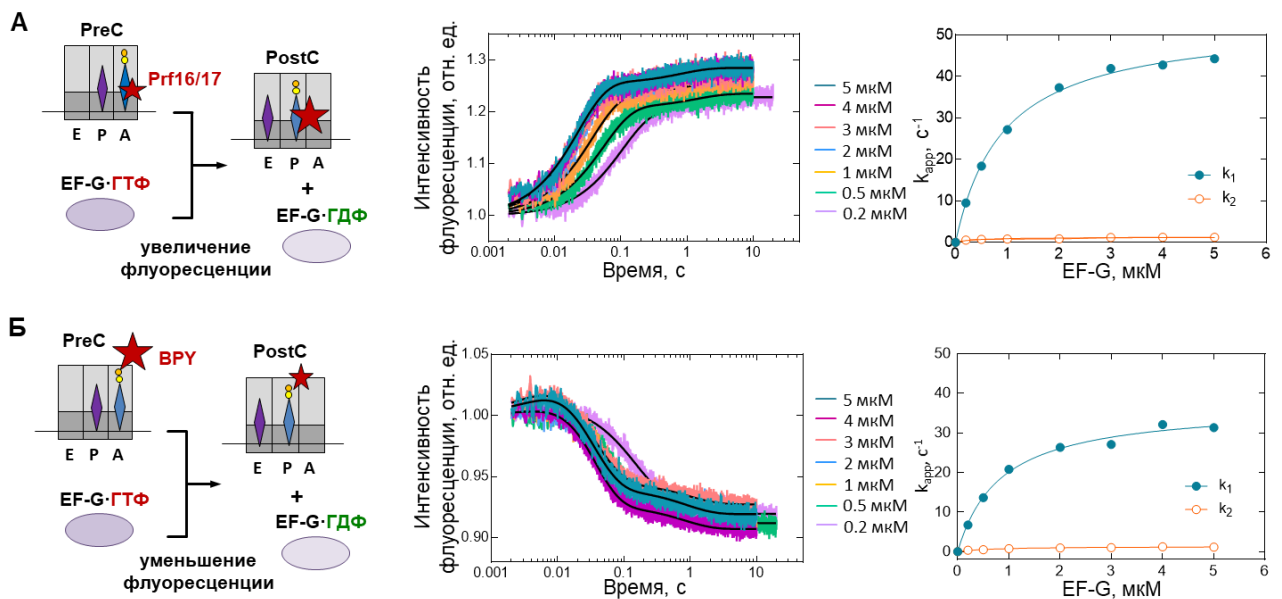


Рис. 9. Характеристика престаационарной кинетики транслокации для выделенного EF-G с использованием флуоресцентно меченых пептидил-тРНК fMet-Phe-tRNA^{Phe}(Prf16/17) (А) или ВРУ-Met-Phe-tRNA^{Phe}. (Б). Слева на право: схема эксперимента; кривые транслокации пептидил-тРНК при разных концентрациях EF-G; зависимость констант скорости k_1 и k_2 от концентрации EF-G. PreC – претранслокационный комплекс, PostC – посттранслокационный комплекс.

Влияние же амикумаина А на кинетику транслокации, для комплексов, содержащих тРНК с репортером Prf, показало, что он понижает скорость перемещения локтя пептидил-тРНК

из А в Р сайт рибосомы в два раза, при этом не влияя на характер и амплитуду кривой (без антибиотика $k_1=44.0\pm 0.4 \text{ c}^{-1}$, в присутствии антибиотика $k_1=22.0\pm 0.2 \text{ c}^{-1}$) (Рис. 10А). Так как ионы Mg^{2+} играют важную роль в стабилизации структуры рРНК рибосомы, то мы провели кинетику транслокации в условиях с повышенным содержанием концентрации ионов Mg^{2+} (20 мМ). Такое изменение условий может приводить не только к более сильному связыванию антибиотика на 30S субчастице, усиливая его ингибирующий эффект, но и понижать скорость самой транслокации. Тем не менее, в этих условиях скорость транслокации в присутствии антибиотика также понижалась в два раза, не изменяя характер и амплитуду сигнала флуоресценции (без антибиотика $k_1=11.1\pm 0.2 \text{ c}^{-1}$, в присутствии антибиотика $k_1=3.85\pm 0.03 \text{ c}^{-1}$). Так как расположение антибиотика в рибосоме предполагает его влияние на Е-сайтовую тРНК, то мы проверили влияние дополнительной деацелированной тРНК в Е сайте рибосомы на кинетику транслокации. Как оказалось, и в этом случае скорость транслокации понижается в два раза (без антибиотика $k_1=1.2\pm 0.1 \text{ c}^{-1}$, в присутствии антибиотика $k_1=0.60\pm 0.05 \text{ c}^{-1}$).

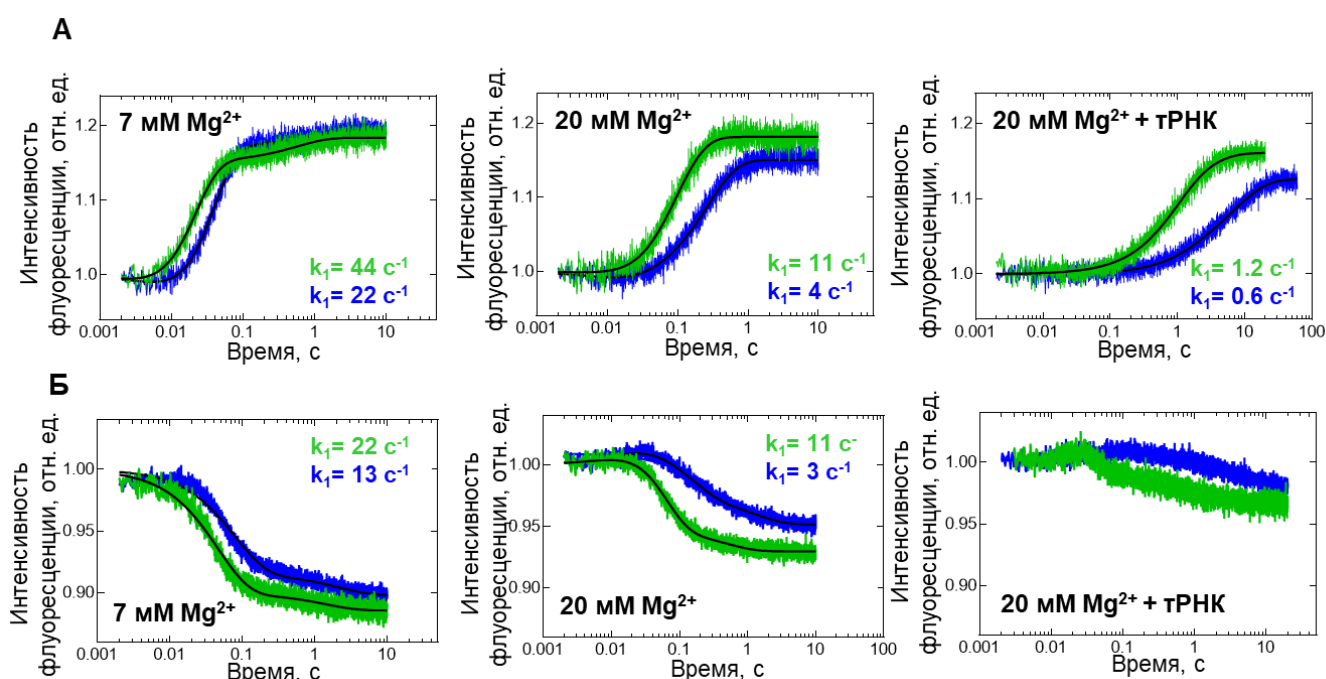


Рис. 10. Влияние антибиотика на кинетику транслокации fMet-Phe-tRNA^{Phe}(Prf16/17) (А) или VPY-Met-Phe-tRNA^{Phe} (Б) в присутствии 7 мМ или 20 мМ концентрации ионов магния, а также дополнительной тРНК в Е сайте. Зеленым цветом обозначены кривая изменения флуоресцентного сигнала в отсутствие антибиотика, синим – в присутствии 30 мкМ амикумацина А.

Влияние же антибиотика на перемещение акцепторного конца пептидил-тРНК, также показало, что в присутствии 7 мМ концентрации ионов Mg^{2+} он уменьшает скорость транслокации в 1.5 - 2 раза (без антибиотика $k_1=22.0\pm 0.2 \text{ c}^{-1}$, с антибиотиком $k_1=12.6\pm 0.1 \text{ c}^{-1}$), а в присутствии 20 мМ – в три раза (без антибиотика $k_1=11.0\pm 0.1 \text{ c}^{-1}$, с антибиотиком $k_1=3.40\pm 0.07 \text{ c}^{-1}$), при этом не изменяя характер и амплитуду флуоресцентного сигнала (Рис. 10Б). Мы также проверили влияние дополнительной деацелированной тРНК в Е сайте на скорость транслокации, но полученный флуоресцентный сигнал был очень низким и не подлежал расчету констант скоростей.

Так как не менее важным для транслокации является, не только концентрация ионов Mg^{2+} в реакционной смеси, но и температура реакции, то мы проверили влияние антибиотика на скорость транслокации, при температурах от 20 до 50 °С. Для этой цели мы использовали EF-G из термофильного организма *T. thermophilus*, так как он более устойчив к действию высоких температур. Сравнение констант скоростей транслокации пептидил-тРНК в районе локтя факторами EF-G из *E. coli* и *T. thermophilus* при температурах от 15 до 50 °С показало, что между факторами нет существенной разницы (Рис. 11А). Существенной разницы в скорости транслокации между факторами не наблюдалось и в присутствии таких антибиотиков как виомицин, спектиномицин, стрептомицин и гигромицин В. Что же касается амикумацина А, то присутствие антибиотика приводило к понижению скорости транслокации в 1.5 - 2 раза как при высоких, так и при низких температурах (Рис. 11Б).

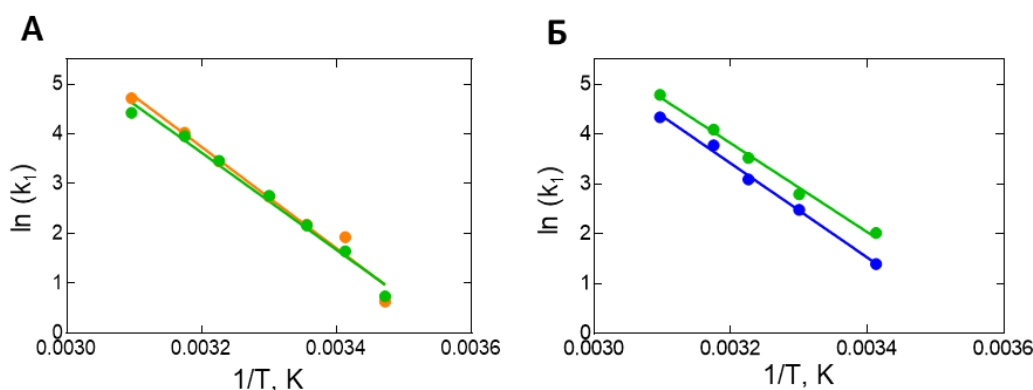


Рис. 11. А. Сравнение зависимости скорости транслокации fMet-Phe-tRNA^{Phe}(Prf16/17) факторами EF-G из *E. coli* (прямая обозначена зеленым цветом) и *T. thermophilus* (оранжевым) от температуры. Б. Влияние антибиотика на зависимость скорости транслокации fMet-Phe-tRNA^{Phe}(Prf16/17) от температуры (зеленая прямая – в присутствии 0 мкМ амикумацина А, синяя – 30 мкМ). Для экспериментов использован EF-G из *T. thermophilus*.

Все полученные выше данные указывают, на то, что пептидил-тРНК не меняет свою конформацию при транслокации. Чтобы убедиться в этом, мы также исследовали престаационарную кинетику транслокации с использованием рибосом с укороченным А-сайтовым пальцем.

Так, А-сайтовым пальцем ("A site finger", ASF) называют 38 петлю II домена 23S рРНК большой субчастицы, которая, как считается, играет важную роль в координации пептидил-тРНК при ее перемещении из А в Р сайт рибосомы (Komoda *et al.*, 2006). В нашей работе мы использовали рибосомы с укороченным на 34 (делеция с 872 по 905 нуклеотидный остаток, Н38Δ34) или 20 (делеция с 879 по 898 нуклеотидный остаток, Н38Δ20) нуклеотидов участка ASF, который непосредственно образует контакт с тРНК (Рис. 12). В первую очередь мы проверили влияние этих укорочений на перемещение пептидил-тРНК из А в Р сайт рибосомы в районе локтя и акцепторного конца (Рис. 13). Оказалось, что данные делеции не влияют на скорость перемещения пептидил-тРНК ни в районе локтя, ни в районе акцепторного конца, однако, они значительно понижают амплитуду флуоресцентного сигнала. Присутствие же амикумацина А понижало скорость транслокации пептидил-тРНК примерно в 1.5 раза, как для интактных, так и для мутантных форм рибосом, не оказывая влияния на амплитуду и характер флуоресцентного сигнала (Таблица 2). То есть, характер конформационной динамики

пептидил-тРНК при перемещении из А в Р сайт рибосомы не менялся, при укорочении ASF, координирующего структурного элемента рибосомы.

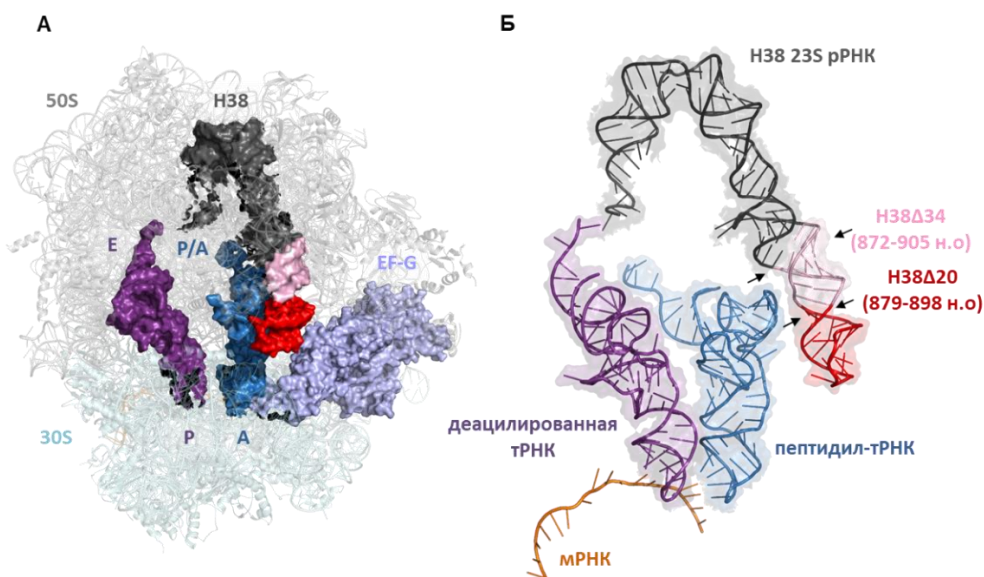


Рис. 12. Расположение А-сайтового пальца (ASF) 23S рРНК на рибосоме (А) и его приближенное изображение (Б). (PDB code: 4V9O). Синим цветом обозначена пептидил-тРНК в гибридном А/Р состоянии, фиолетовы – деацилированная тРНК в гибридном Р/Е состоянии, темно-серым – Н38.

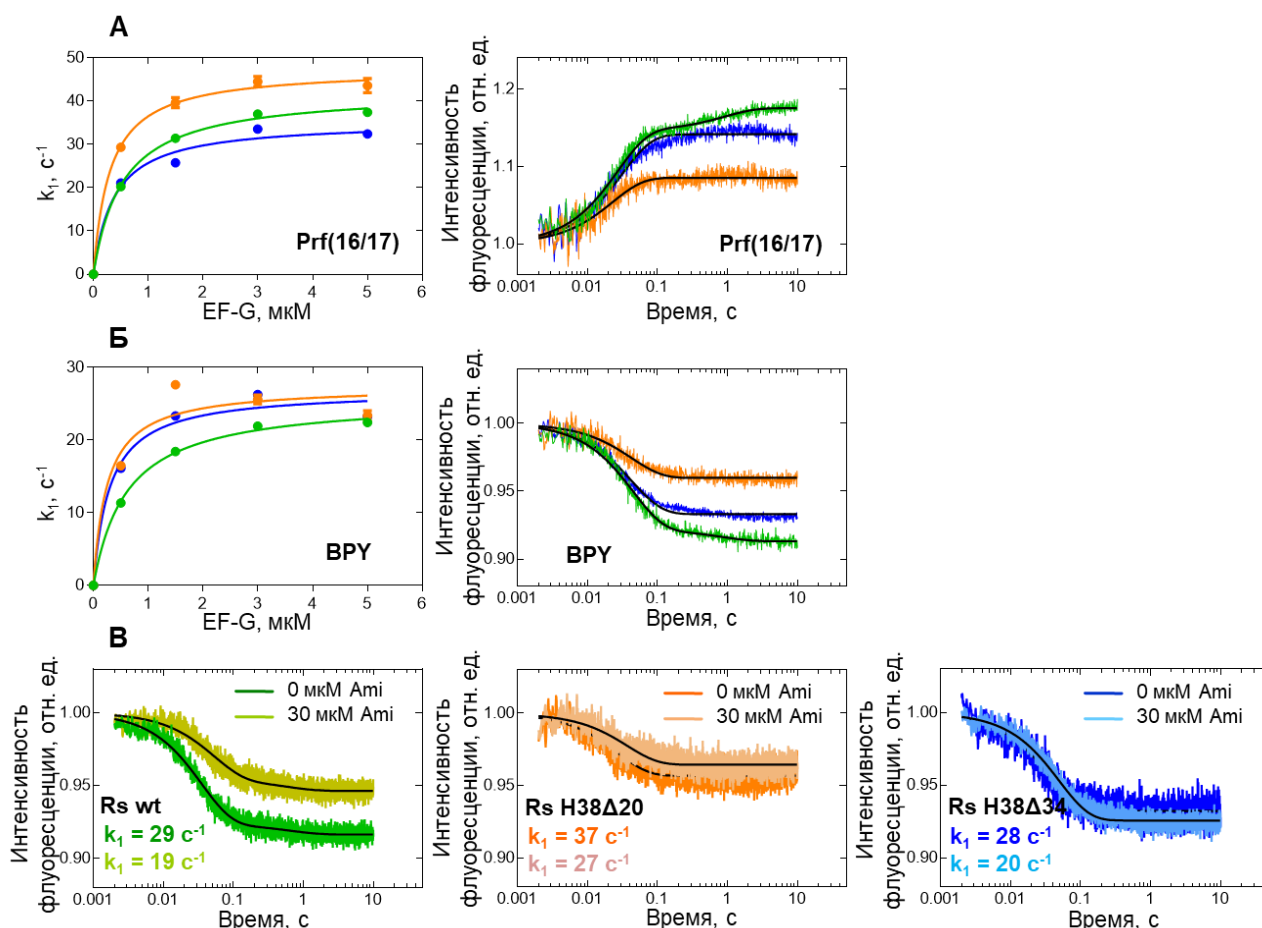


Рис. 13. Влияние укорочения ASF на зависимость константы скорости быстрой фазы транслокации k_1 от концентрации EF-G, а также характер кривой флуоресценции, при насыщающей концентрации EF-G (5 мкМ) для fMet-Phe-tRNA^{Phe} (Prf16/17) (А) или BPY-Met-Phe-tRNA^{Phe} (Б). Синим цветом отмечены кривые кинетики транслокации для интактных рибосом, оранжевым – для рибосом, содержащих делецию H38Δ20, зеленым – для рибосом, содержащих делецию H38Δ34. В. Влияние амикумаина А на транслокацию BPY-Met-Phe-tRNA^{Phe} интактными рибосомами или содержащими одну из делеций в ASF. Ami – амикумаин А, Rs – рибосомы.

Таблица. 2. Влияние амикумадина А на константу скорости транслокации k_1 для интактной формы рибосом и содержащих делецию 20 или 34 нуклеотидов в ASF.¹

Тип рибосом	Концентрация амикумадина А	
	0 мкМ	30 мкМ
wt	28.5±0.3	19.0±0.4
H38Δ20	36.8±0.7	26.9±0.6
H38Δ34	28.0±0.4	20.1±0.2

¹Значения указаны для констант скоростей реакции транслокации (при использовании флуоресцентно меченой ВРУ-Met-Phe-tRNA^{Phe}) в с⁻¹, при насыщающей концентрации EF-G (5 мкМ);

²wt – интактная форма рибосом.

Таким образом, во всех рассмотренных случаях, амикумадин А изменяет лишь скорость перемещения пептидил-тРНК, не изменяя при этом ни характер, ни амплитуду флуоресцентного сигнала. При этом он понижает скорость перемещения как локтя, так и акцепторного конца пептидил-тРНК на одинаковую величину. Это может указывать на то, что влияние антибиотика, в целом, не связано с изменением конформационной динамики пептидил-тРНК, а обнаруженное замедление ее движения, возможно, связано с конформационными изменениями 30S субчастицы.

3.4. Мутации в гене, кодирующем элонгационный фактор EF-G

Как было сказано выше, некоторые замены аминокислот в IV домене EF-G (G542V, G581A, ins544K) могут компенсировать ингибирующее действие антибиотика, приводя к устойчивости против него. В первую очередь мы проверили способность мутантных форм EF-G катализировать транслокацию пептидил-тРНК с помощью быстрой пурамициновой реакции. Как оказалось, мутантные формы EF-G также эффективно транслоцируют пептидил-тРНК из А в Р сайт рибосомы, как и нативная форма EF-G, не содержащая мутаций. Так как между мутантными формами EF-G не наблюдалось разницы в способности транслоцировать тРНК, мы проверили способность одной из них (EF-G ins544K) транслоцировать пептидил-тРНК в присутствии антибиотика. Как оказалось, в отличие от интактной формы EF-G, в присутствии EF-G ins544K количество транслоцированной тРНК практически не уменьшалось, при всех используемых концентрациях EF-G, в присутствии как низкой, так и высокой концентрации антибиотика (Рис. 14).

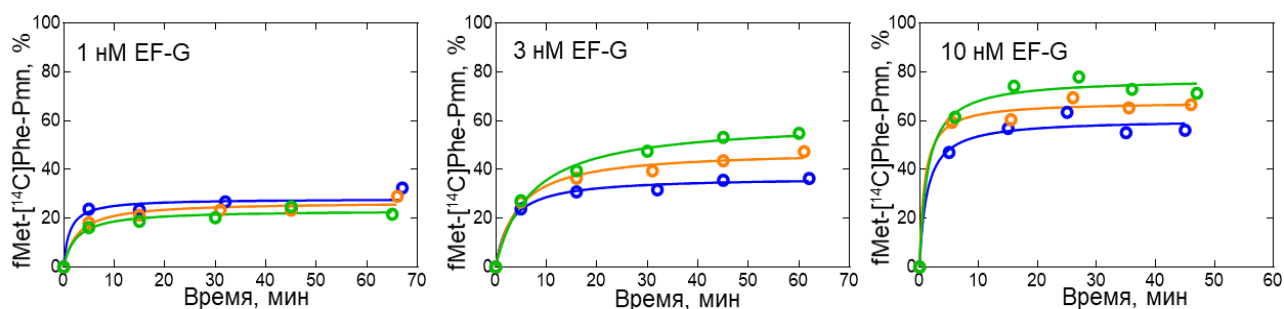


Рис. 14. Количество транслоцированной пептидил-тРНК из А в Р сайт рибосомы с использованием каталитических количеств EF-G ins544K (1, 3 или 10 нМ), в присутствии 0 мкМ (зеленая кривая), 10 мкМ (оранжевая кривая) и 30 мкМ (синяя кривая) амикумадина А.

Тем не менее, сравнительная характеристика кинетики транслокации мутантными формами EF-G, показала, что она значительно отличается от интактной формы (Рис. 15). Так, мутантные формы EF-G, такие как EF-G ins544K, EF-G G581A понижали скорость перемещения пептидил-тРНК в районе локтя примерно в 10 - 12 раз (максимальные значения быстрой фазы транслокации для EF-G ins544K $k_1=5.4\pm 0.5 \text{ c}^{-1}$, EF-G G581A $k_1=4.5\pm 0.8 \text{ c}^{-1}$, по сравнению с интактной формой EF-G $k_1=53.0\pm 1 \text{ c}^{-1}$), а EF-G G542V примерно в 30 раз ($k_1=2.0\pm 0.2 \text{ c}^{-1}$). Характер и амплитуда изменения флуоресцентных сигналов не изменялись. Однако, данные модификации не оказывали влияние ни на скорость перемещения акцепторного конца пептидил-тРНК, ни на характер и амплитуду флуоресцентного сигнала (максимальное значение быстрой фазы транслокации для EF-G ins544K $k_1=40\pm 1 \text{ c}^{-1}$, EF-G G581A $k_1=31\pm 1 \text{ c}^{-1}$, EF-G G542V $k_1=43\pm 1 \text{ c}^{-1}$, где для интактной формы EF-G, $k_1=37\pm 1 \text{ c}^{-1}$). Такое различие в скорости перемещения пептидил-тРНК в районе локтя и акцепторного конца, указывает на изменение конформации тРНК, которое она приобретает при перемещении из А в Р сайт рибосомы. Ранее, подобный эффект наблюдался и для некоторых замен 583 а.о. в EF-G, который также располагается в IV домене EF-G и пространственно очень близко расположен к исследуемым аминокислотам (Savelsbergh *et al.*, 2000; Holtkamp *et al.*, 2014).

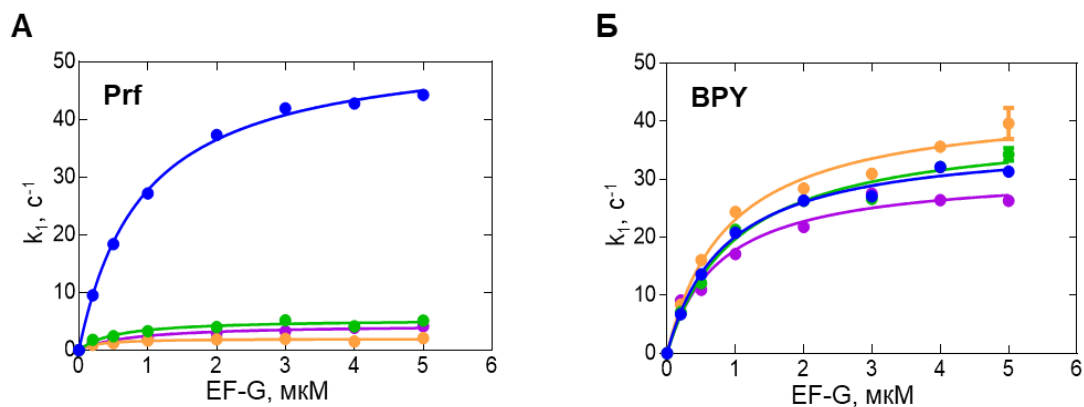


Рис. 15. Влияние мутаций EF-G на транслокацию пептидил-тРНК в районе локтя (А) или акцепторного конца (Б). Кривая зависимости константы скорости k_1 от концентрации интактной формы EF-G представлена синим цветом, оранжевым – EF-G G542V, зеленым – EF-G ins544K, фиолетовым – EF-G G581A.

Однако присутствие амикумадина А оказывало схожий эффект на кинетику транслокации мутантными формами EF-G по сравнению с тем, что мы наблюдали для интактной формы. Так, в присутствии 7 мМ концентрации ионов Mg^{2+} , антибиотик понижал скорость транслокации локтя пептидил-тРНК мутантными формами EF-G в два раза (Рис. 16 и Таблица 3). В присутствии же 20 мМ концентрации ионов Mg^{2+} , скорость транслокации практически не менялась. Добавление же дополнительной деацилированной тРНК в Е сайт рибосомы, снова приводило к снижению скорости транслокации примерно в три раза. Кроме того, антибиотик снижал скорость транслокации акцепторного конца пептидил-тРНК также в два раза (Рис. 17 и Таблица 3). При этом во всех рассматриваемых случаях, характер и амплитуда флуоресцентного сигнала не изменялись.

Таблица 3. Влияние амикумацина А на константу скорости транслокации k_1 для интактной (wt) и мутантных форм EF-G.¹

Форма EF-G	Ami ² , мкМ	Prf16/17			BPY
		7 мМ Mg ²⁺	20 мМ Mg ²⁺	20 мМ Mg ²⁺ +tPHK	7 мМ Mg ²⁺
wt ³	0	44.0±0.4	11.1±0.2	1.2±0.1	21.7±0.2
	30	22.0±0.2	3.85±0.03	0.59±0.05	12.6±0.1
ins544K	0	4.5±0.1	0.63±0.01	0.319±0.004	21.7±0.2
	30	2.4±0.1	0.46±0.01	0.090±0.001	11.5±0.1
G542V	0	2.0±0.1	0.298±0.003	0.194±0.004	30.5±0.4
	30	0.92±0.02	0.235±0.002	0.066±0.002	16.3±0.4
G581A	0	3.7±0.1	0.46±0.01	0.276±0.003	35.8±0.8
	30	2.0±0.1	0.385±0.004	0.098±0.001	22.6±0.6

¹Значения указаны для транслокации fMet-Phe-tRNA^{Phe}(Prf16/17) в присутствии 7 мМ или 20 мМ концентрации ионов Mg²⁺, а также в присутствии дополнительной деацелированной tRNA^{fMet} в Е сайте рибосомы; BPY-Met-Phe-tRNA^{Phe} в присутствии 7 мМ концентрации ионов Mg²⁺.

²Ami – амикумацин А.

³wt – интактная форма EF-G

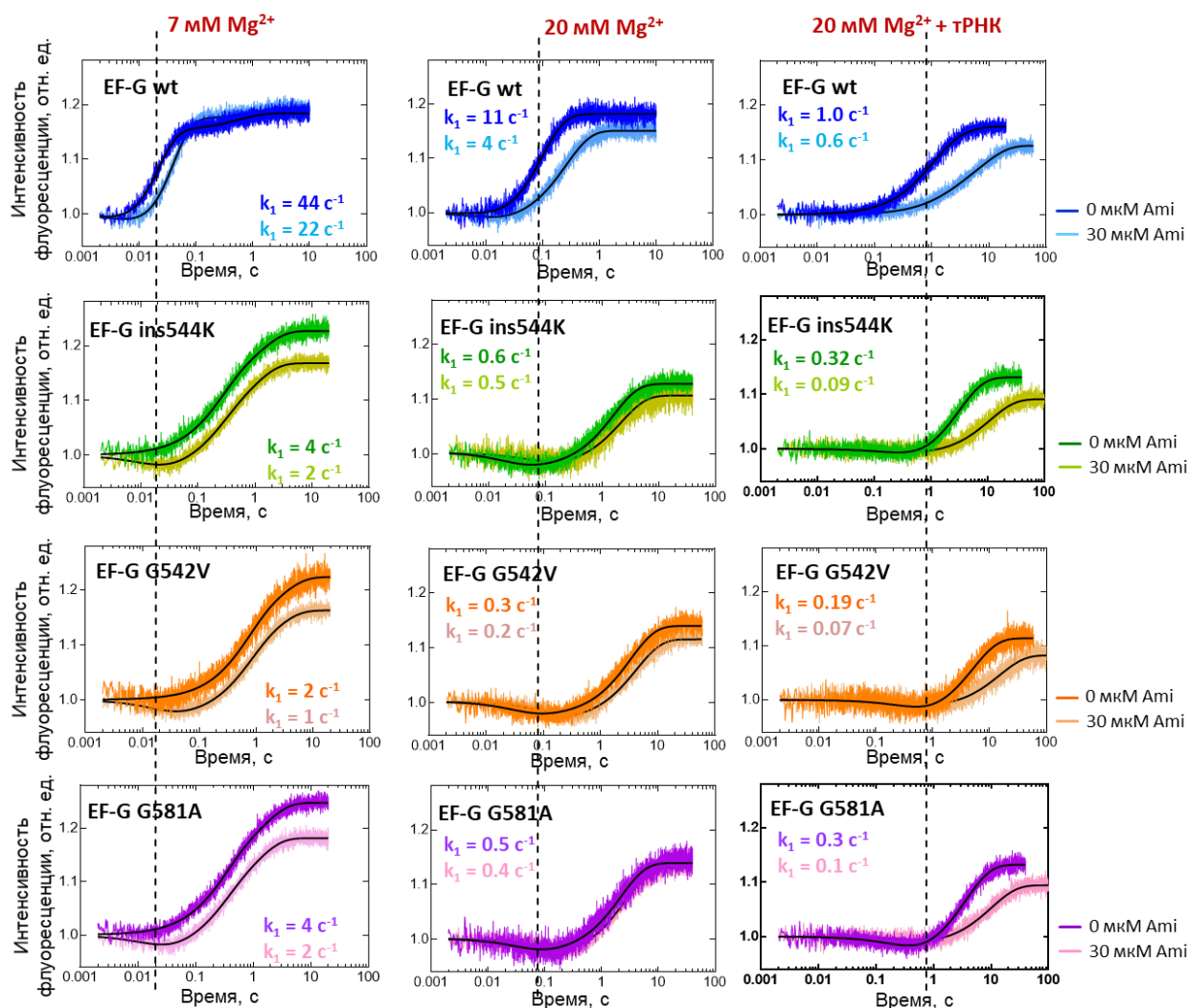


Рис. 16. Влияние амикумацина А на транслокацию fMet-Phe-tRNA^{Phe} (Prf16/17) в присутствии интактной (wt) и мутантных формам EF-G при разных концентрациях ионов Mg²⁺ (7 мМ или 20 мМ), а также в присутствии дополнительной деацелированной tRNA^{fMet} в Е сайте рибосомы. Ami – амикумацин А.

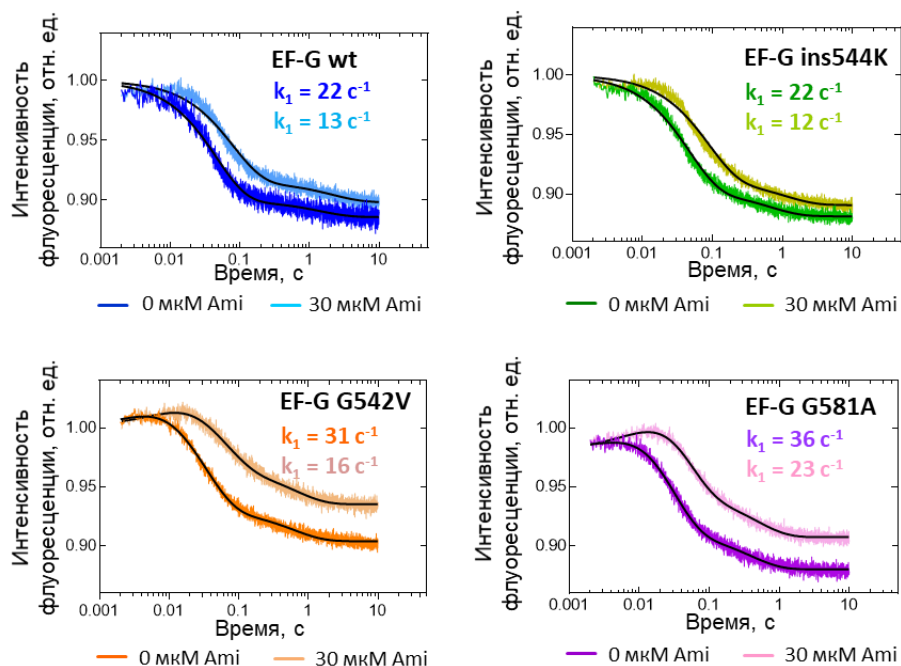


Рис. 17. Влияние амикумацина А на транслокацию ВРУ-Met-Phe-tRNA^{Phe} интактной (wt) и мутантными формами EF-G в присутствии 7 мМ концентрации ионов Mg²⁺. Ami – амикумацин А.

Таблица. 4. Влияние амикумацина А на образование трипептида fMet-Val-Phe.

Форма EF-G	Ами ¹ , мкМ	Трипептид, % ²
wt ³	0	72
	30	36
G542V	0	80
	30	69
ins544K	0	75
	30	74
G581A	0	72
	30	59

¹Ами – амикумацин А.

²Все значения указаны в процентах от радиоактивно меченой аминокислоты (Phe), включенной в образовавшийся трипептид.

³wt – интактная форма EF-G.

Таким образом, мутантные формы EF-G изменяют конформационную динамику пептидил-тРНК при ее перемещении из А в Р сайт рибосомы. Однако присутствие антибиотика не изменяет эту конформационную динамику тРНК, так как скорость ее перемещения как в районе локтя, так в районе акцепторного конца, изменяется на одну и ту же величину. То есть антибиотик лишь приводит к замедлению передвижения пептидил-тРНК.

Поскольку наблюдаемый эффект мутантных форм EF-G может приводить к компенсации ингибирующего действия антибиотика, мы проверили его влияние на следующий, после транслокации, этап трансляции полипептида – образование следующей пептидной связи. Как оказалось, после транслокации интактной формой EF-G, количество образуемого трипептида понижалось в два раза (Таблица 4). После же транслокации любой из мутантных форм EF-G,

количество трипептида оставалось прежним. Это означает, что в присутствии амикумацина А после транслокации интактной формой EF-G только половина рибосом может перейти на следующий этап трансляции, в то время как мутантные формы EF-G сохраняют способность рибосомы к эффективному переходу на следующий этап трансляции полипептида.

4. Механизм ингибирования трансляции полипептида амикумацином А и резистентности к нему

Полученные нами данные указывают на то, что, в отличие от других антибиотиков, того же участка связывания на рибосоме, что и амикумацин А, он не влияет на этап инициации трансляции, что согласуется с данными, полученным ранее (Polikanov *et al*, 2014). Так, антибиотик не мешает связыванию инициаторной тРНК в Р сайт рибосомы, не нарушает ее конформацию и не способствует неправильному кодон-антикодновому узнаванию, которое может приводить к ошибкам трансляции. Наблюдаемое влияние антибиотика на ассоциацию субчастиц, может объясняться изменением конформации 30S субчастицы или дестабилизацией одного из инициаторного факторов, что приводило бы к сдвигу равновесия между 30S инициаторным комплексом и 70S инициаторным комплексом. Тем не менее, функциональная активность образованных комплексов сохранялась.

Антибиотик не оказывает влияния и на следующие этапы синтеза полипептида, не нарушая ни связывание аминоацил-тРНК в А сайт, ни образование пептидной связи. Однако, он изменял конформацию образовавшейся после реакции транспептидации пептидил-тРНК. Этот результат подтверждается изменением амплитуды флуоресцентного сигнала от ВРУ репортера при связывании аминоацил-тРНК в А сайт, а также повышением стабильности связывания пептидил-тРНК в этом сайте.

Основной этап, на который оказывает влияние антибиотик – транслокация. Согласно данным, полученным из экспериментов по изучению престаационарной кинетики транслокации, антибиотик снижает скорость перемещения пептидил-тРНК из А в Р сайт рибосомы, не изменяя ее конформационную динамику. Однако, количество транслоцированной тРНК при этом значительно понижается, на что указывают данные пурамициновой реакции. Более того, анализ образования пептидной связи, после этапа транслокации, показывает, что только половина рибосом может эффективно вовлекаться в следующий этап трансляции полипептида. Такие нарушения могут быть связаны как с изменением конформации самой рибосомы, так и EF-G.

Механизм же резистентности мутантными формами EF-G обуславливается изменением конформационной динамики пептидил-тРНК при ее перемещении из А в Р сайт рибосомы. В присутствии антибиотика, мутантные формы EF-G каким-либо образом дополнительно не изменяют конформацию тРНК. В данном случае лишь понижается скорость ее перемещения, также, как и с участием нативной формы EF-G. Однако, именно такое изменение динамической конформации пептидил-тРНК при транслокации позволяет сохранить функциональную активность рибосомы, что подтверждается данными трипептидного анализа и пурамициновой реакции.

Таким образом, амикумацин А способствует снижению скорости транслокации пептидил-тРНК из А в Р сайт рибосомы, а также снижению способности рибосомы эффективно

переходить на следующий этап трансляции полипептида, что усиливается с каждым раундом транслокации. Резистентность к антибиотику, обеспечивается за счет аминокислотных замен G542V, G581A или вставки ins544K фактора EF-G, которые приводят к изменению конформационной динамики пептидил-тРНК при ее перемещении из А в Р сайт, что сохраняет функциональную активность рибосомы.

ВЫВОДЫ

1. Амикумацин А не нарушает связывания и не изменяет конформацию инициаторной тРНК в Р сайте рибосомы.
2. Присутствие антибиотика не нарушает связывание аминоацил-тРНК в А сайт рибосомы и не влияет на образование пептидной связи.
3. Амикумацин А понижает скорость транслокации пептидил-тРНК в два раза, но при этом не изменяет ее конформацию. После транслокации, в присутствии антибиотика, только часть рибосом способна вовлекаться в следующий цикл элонгации.
4. Укорочение ASF структурного элемента не влияет на скорость транслокации пептидил-тРНК из А в Р сайт рибосомы, а присутствие антибиотика лишь понижает скорость ее перемещения, не влияя на конформацию.
5. Кинетика транслокации фактором EF-G из термофильного *T. thermophilus* и мезофильного *E. coli* организмов не имеет существенных различий. Антибиотик понижает скорость транслокации на одну и ту же величину, как при высоких, так и при низких температурах.
6. Конформационная динамика пептидил-тРНК в процессе транслокации различается, в зависимости от того какой тип элонгационного фактора (нативная или мутантные формы) EF-G катализируют транслокацию.
7. При реакции транслокации, катализируемой мутантными формами EF-G, значительно снижается скорость перемещения пептидил-тРНК, наблюдаемая по изменению флуоресценции репортерной группы находящейся в районе локтя тРНК. При этом не наблюдается значительных изменений в скорости перемещения пептидил-тРНК, наблюдаемой по репортерной группе, находящейся на акцепторном участке тРНК.
8. Присутствие антибиотика не приводит к какому-либо дополнительному или иному изменению конформации пептидил-тРНК при транслокации мутантными формами EF-G и лишь понижает скорость ее перемещения.
9. Мутантные формы EF-G, в присутствии антибиотика, позволяют рибосоме эффективно перейти на следующий, после транслокации, этап синтеза полипептида.

Таким образом, амикумацин А способствует снижению скорости транслокации пептидил-тРНК из А в Р сайт рибосомы. С каждым раундом транслокации амикумацин А также снижает долю рибосом, компетентных для перехода на следующий цикл элонгации. Аминокислотные замены G542V, G581A или вставка ins544K в факторе EF-G приводят к изменению конформационной динамики пептидил-тРНК при ее перемещении и способствует сохранению функциональной активности рибосом.

Список работ, опубликованных по теме исследования

Публикации в рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК

1. The ribosomal A-site finger is crucial for binding and activation of the stringent factor RelA / P. Kudrin, I. Dzhygyr, K. Ishiguro, J. Beljantseva, **E. Maksimova**, S.R.A. Oliveira, V. Varik, R. Payoe, A.L. Konevega, T. Tenson, T. Suzuki, V. Hauryliuk // *Nucleic Acid Research* - 2018. V. 46, № 4. - 1973-1983.

Тезисы международных и всероссийских конференций

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. July, 2015. FEBS Letters, 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. // 2-ая конференция молодых ученых и специалистов. Гатчина, Россия. Ноябрь, 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. Ингибирование трансляции рибосомы антибиотиком амикумацином А за счет связывания в Е сайте. // 50-ая зимняя школа ПИЯФ. Санкт-Петербург, Россия. Март, 2016
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. Механизм ингибирования трансляции рибосомы антибиотиком амикумацином А. // 5 съезд биохимиков России. Дагомыс, Россия. Октябрь, 2016. Спецвыпуск Acta Naturae, T. 2, стр. 24
5. **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. Ноябрь, 2016, стр. 39
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. Амикумацин А: необычный механизм ингибирования трансляции. // 21-ая международная Пушинская школа-конференция молодых ученых "Биология – наука 21 века". Пушино, Россия. Апрель, 2017, стр. 112
7. **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. Сентябрь, 2017. Спецвыпуск Acta Naturae, стр. 91
8. **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*. // 52-ая зимняя школа ПИЯФ. Санкт-Петербург, Россия. Февраль, 2018
9. **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. May, 2018, p.40

10. **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. July, 2018. FEBS Open Bio, V. 8, Is. Sup. S. 1, p. 217

Список литературы

1. Arenz S., Wilson D.N. (2016) Blast from the past: reassessing forgotten translation inhibitors, antibiotic selectivity, and resistance mechanisms to aid drug development. *Mol. Cell.*, *61(1)*, 3-14.
2. Calogero R.A., Pon C.L., Canonaco M.A., Gualerzi C.O. (1988). Selection of the mRNA translation initiation region by *Escherichia coli* ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, *85(17)*, 6427-6431.
3. Dinos G., Wilson D.N., Teraoka Y., Szaflarski W., Fucini P., Kalpaxis D., Nierhaus K.H. (2004) Dissecting the ribosomal inhibition mechanisms of edeine and pactamycin: the universally conserved residues G693 and C795 regulate P-site RNA binding. *Mol. Cell.* *13(1)*, 113-124.
4. Holtkamp W., Cunha C.E., Peske F., Konevega A.L., Wintermeyer W., Rodnina M.V. (2014). GTP hydrolysis by EF-G synchronizes tRNA movement on small and large ribosomal subunits. *EMBO J.* *33*, 1073-1085
5. Itoh J., Omoto S., Shomura T., Nishizawa N., Miyado S., Yuda Y., Shibata U., Inouye S. (1981). Amicoumacin-A, a new antibiotic with strong antiinflammatory and antiulcer activity. *J. Antibiot. (Tokyo)*, *34(5)*, 611-613.
6. Itoh J., Shomura T., Omoto S., Miyado S., Yuda Y., Shibata U., Inouye S. (1982) Isolation, physicochemical properties and biological activities of amicoumacins produced by *Bacillus pumilus*. *Agric. Biol. Chem.*, *46(5)*, 1255-1259.
7. Kappen L.S., Goldberg I.H. (1976). Analysis of the twosteps in polypeptide chain initiation inhibited by pactamycin. *Biochemistry*, *15(4)*, 811-818.
8. Katunin V.I., Savelsbergh, A., Rodnina, M.V., Wintermeyer, W. (2002). Coupling of GTP hydrolysis by elongation factor G to translocation and factor recycling on the ribosome. *Biochemistry*, *41*, 12806–12812
9. Komoda T., Sato N.S., Phelps S.S., Namba N., Joseph S., Suzuki T. (2006). The A-site finger in 23S rRNA acts as a functional attenuator for translocation. *J. Biol. Chem.*, *281(43)*, 32303-32309.
10. Lama A., Pané-Farré J., Chon T., Wiersma A.M., Sit C.S., Vederas J.C., Hecker M., Nakano M.M. (2012). Response of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to amicoumacin A. *PLoS One*, *7(3)*, e34037.
11. Li Y., Xu Y., Liu L., Han Z., Lai P.Y., Guo X., Zhang X., Lin W., Qian P.Y. (2012) Five new amicoumacins isolated from a marine-derived bacterium *Bacillus subtilis*. *Mar. Drugs*, *10(2)*, 319-328.
12. Mankin A.S. (1997) Pactamycin resistance mutations in functional sites of 16S rRNA. *J. Mol. Biol.*, *274(1)*, 8-15.

13. Milon P., Konevega A.L., Peske F., Fabbretti A., Gualerzi C.O., Rodnina M.V. (2007). Transient kinetics, fluorescence, and FRET in studies of initiation of translation in bacteria. *Methods Enzymol.* *430*, 1-30.
14. Mittelstaet J., Konevega A.L., Rodnina M.V. (2011) Distortion of tRNA upon near-cognate codon recognition on the ribosome. *J. Biol. Chem.*, *286*(10), 8158-8164.
15. Pape T., Wintermeyer W., Rodnina M.V. (1998) Complete kinetic mechanism of elongation factor Tu-dependent binding of aminoacyl-tRNA to the A site of the *E. coli* ribosome. *EMBO J.* *17*(24), 7490-7497.
16. Polikanov Y.S., Osterman I.A., Szal T., Tashlitsky V.N., Serebryakova M.V., Kusochek P., Bulkley D., Malanicheva I.A., Efimenko T.A., Efremenkova O.V., Konevega A.L., Shaw K.J., Bogdanov A.A., Rodnina M.V., Dontsova O.A., Mankin A.S., Steitz T.A., Sergiev P.V. (2014). Amicoumacin A inhibits translation by stabilizing RNA interaction with the ribosome. *Mol. Cell.* *56*(4), 531-540
17. Prokhorova I.V., Akulich K.A., Makeeva D.S., Osterman I.A., Skvortsov D.A., Sergiev P.V., Dontsova O.A., Yusupova G., Yusupov M.M., Dmitriev S.E. (2016). Amicoumacin A induces cancer cell death by targeting the eukaryotic ribosome. *Sci. Rep.* *6*, 27720.
18. Rodnina M.V., Semenov Y.P., Wintermeyer W. (1994) Purification of fMet-tRNA(fMet) by fast protein liquid chromatography. *Anal. Biochem.* *219*, 380–381
19. Rodnina M.V., Wintermeyer W. (1995). GTP consumption of elongation factor Tu during translation of heteropolymeric mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, *92*, 1945–1949
20. Savelsbergh A., Matassova N.B., Rodnina M.V., Wintermeyer W. (2000). Role of domains 4 and 5 in elongation factor G functions on the ribosome. *J. Mol. Biol.*, *300*(4), 951-961.
21. Sampson J.R., Uhlenbeck O.C. (1988). Biochemical and physical characterization of an unmodified yeast phenylalanine transfer RNA transcribed in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, *85*(4), 1033-1037.
22. Schlutzen F., Takemoto C., Wilson D.N., Kaminishi T., Harms J.M., Hanawa-Suetsugu K., Szaflarski W., Kawazoe M., Shirouzu M., Nierhaus K.H., Yokoyama S., Fucini P. (2006). The antibiotic kasugamycin mimics mRNA nucleotides to destabilize tRNA binding and inhibit canonical translation initiation. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, *13*(10), 871-878
23. Shimojima Y., Hayashi H., Ooka T., Shibukawa M. (1982). (Studies on AI-77s, microbial products with pharmacological activity) structures and the chemical nature of AI-77s. *Tetrahedron Letters*, *23* (51), 5435-5438.
24. Vila-Sanjurjo A., Squires C.L., Dahlberg A.E. (1999). Isolation of kasugamycin resistant mutants in the 16S ribosomal RNA of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, *293*(1), 1-8.
25. Wieden H.J., Gromadski K., Rodnin D., Rodnina M.V. (2002). Mechanism of elongation factor (EF)-Ts catalyzed nucleotide exchange in EF-Tu. Contribution of contacts at the guanine base. *J. Biol. Chem.*, *277*(8), 6032-6036.