

УДК 577.21;579.23

Механизмы контроля качества бактериальной трансляции

А. С. Зареченская¹, П. В. Сергиев^{2,3,4}, И. А. Остерман^{2,4,5*}

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, 119991 Россия

²Сколковский институт науки и технологии, Центр наук о жизни, Сколково, 143028 Россия

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Институт функциональной геномики, Москва, 119991 Россия

⁴Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991 Россия

⁵Научно-технологический университет «Сириус», Научный центр генетики и наук о жизни, Сочи, 354340 Россия

*E-mail: i.osterman@skoltech.ru

Поступила в редакцию 02.04.2021

Принята к печати 13.05.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11401

РЕФЕРАТ Остановки рибосом, возникающие в процессе трансляции, приводят к значительному снижению жизнеспособности клеток, которые вынуждены тратить ресурсы на синтез новых рибосом, поэтому все бактерии выработали те или иные механизмы спасения рибосом. Обычно высвобождению рибосом предшествует гидролиз связи тРНК–пептид, однако в ряде случаев рибосома оказывается способной продолжить трансляцию благодаря действию определенных факторов. В данном обзоре описаны механизмы высвобождения рибосом в ходе *транс*-трансляции, активности факторов ArfA, ArfB, BrfA, ArfT, HflX и RqcP/H, а также возобновления трансляции под действием EF-P, EF-4 и EttA. Несмотря на возможность некоторых систем дублировать друг друга, большинство из них играют собственную функциональную роль, связанную с контролем качества бактериальной трансляции при определенных нарушениях, возникших в результате мутаций, стрессовых условий культивирования или действия антибиотиков.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА трансляция, бактерии, контроль качества, терминация, *транс*-трансляция.

ВВЕДЕНИЕ

В бактериальной клетке синтез белка происходит при помощи 70S рибосомы, в состав которой входят малая 30S и большая 50S субчастицы (рис. 1) [1–3]. Инициация трансляции начинается с взаимодействия 30S субъединицы в комплексе с фактором IF3 с участком посадки рибосомы на мРНК. Затем фактор инициации IF2 в комплексе с GTP доставляет инициаторную fMet-тРНК в Р-сайт, а IF1 связывается в А-сайте. Завершается инициация связыванием 50S субъединицы, гидролизом GTP и уходом факторов инициации. В ходе элонгации с А-сайтом рибосомы связывается тройной комплекс aa-тРНК (аминоацил-тРНК)–EF-Tu–GTP. В случае правильного распознавания кодона антикодоном тРНК GTP подвергается гидролизу. Ацилированный конец тРНК перемещается в пептидилтрансферазный центр (ПТЦ), а EF-Tu высвобождается. Посредством транспептидазной реакции, катализируемой большой субчастицей рибосомы, пептидная цепь переносится на аминоксил-

тРНК, занимающую А-сайт. Фактор EF-G катализирует перемещение рибосомы на один кодон вперед по мРНК, вследствие чего деацилированная тРНК перемещается в Е-сайт, а пептидил-тРНК занимает Р-сайт, освобождая тем самым А-сайт для следующей aa-тРНК. После диссоциации EF-G цикл элонгации повторяется. Когда в А-сайт попадает стоп-кодон, его узнают факторы терминации класса I, RF1 или RF2, что запускает остановку синтеза белка. Оба фактора содержат консервативный мотив GGQ, который катализирует гидролиз связи пептидил-тРНК и тем самым высвобождает новосинтезированный пептид. Фактор терминации класса II, RF3, также обладающий GTPазной активностью, обеспечивает диссоциацию комплекса RF1 или RF2 с рибосомой. Далее белки RRF и EF-G способствуют разборке 30S и 50S субъединиц рибосомы, а последующее присоединение IF3 к малой субъединице освобождает ее от тРНК и мРНК. Таким образом цикл трансляции завершается.

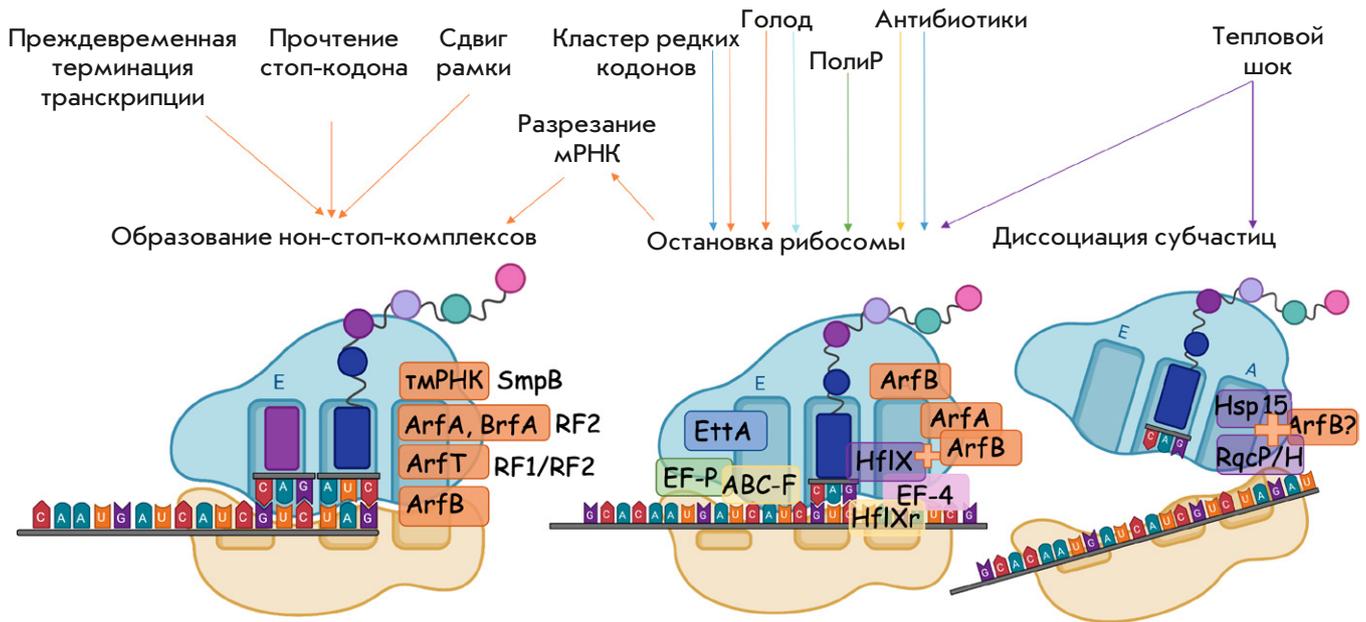


Рис. 1. Основные причины остановки трансляции и пути их решения. Схематично изображены возможные причины остановки биосинтеза белка в бактериальной клетке и факторы, используемые клеткой для решения этой проблемы. Слева – образовавшийся в процессе трансляции нон-стоп-комплекс. Такой тип субстрата распознается факторами, вызывающими аварийную терминацию с последующим гидролизом пептидил-тРНК (tmRNA, ArfA, BrfA, ArfB, ArfT). В центре – заблокированный комплекс на интактной матрице. В случае голода такая рибосома стабилизируется в состоянии гибернации при помощи EttA, при прохождении полипролиновой последовательности возобновлению трансляции способствует EF-P. Возобновление трансляции также обеспечивает EF-4. Если такой комплекс образуется под действием антибиотика, он может быть субстратом для ряда белков ABC-F, а также HflX и, возможно, HflXr. Если же причиной остановки был кластер редких кодонов мРНК, то, вероятнее всего, с рибосомой связывается ArfB. Справа – незапланированная диссоциация рибосомных субчастиц. Высвобождению 50S субъединицы могут способствовать факторы RqcP/H и Hsp15. (Все иллюстрации выполнены при помощи BioRender.com)

В отличие от эукариот, в клетках которых трансляции предшествует процессинг мРНК, бактерии практически не имеют возможности контролировать качество матрицы перед началом синтеза белка. Трансляция в бактериальной клетке происходит одновременно с транскрипцией. Подобное сопряжение двух важнейших процессов во времени и пространстве, с одной стороны, является преимуществом: оно не только позволяет клетке производить белки с большей скоростью, но и лежит в основе регуляторного механизма аттенуации. С другой стороны, отсутствие какой-либо проверки мРНК перед трансляцией неизбежно приводит к остановкам рибосомы в случае синтеза белка на матрице, поврежденной ввиду различных обстоятельств. Наиболее распространенной причиной подобных ситуаций является застревание рибосомы на поврежденной мРНК и образование так называемого нон-стоп-комплекса [3]. Список проблем, которые могут возникнуть в ходе трансляции, не ограничивается только отсутствием стоп-кодона в мРНК (рис. 1). Продвижение ри-

босомы может остановиться и на неповрежденной матрице, например, при трансляции «редких» кодонов, полипролиновых участков [4] или в условиях аминокислотного голода. Остановки рибосомы также возникают при действии на клетку антибактериальных агентов, нарушающих биосинтез белка [5]. Безусловно, такой широкий спектр возможных проблем привел к появлению разнообразных механизмов, направленных на их решение. В некоторых случаях остановка трансляции используется для регуляции экспрессии генов и тогда она не должна восприниматься клеткой как проблема, требующая специального решения [6]. В настоящем обзоре рассмотрены основные причины возникновения проблем при биосинтезе белка в бактериальной клетке и способы, при помощи которых бактерии высвобождают застрявшие рибосомы. Изучение некоторых из них представляет высокую практическую значимость, поскольку действие ряда систем спасения лежит в основе механизмов устойчивости к антибиотикам.

Факторы, решающие проблему остановленной трансляции, можно разделить на два типа:

1. Факторы, вызывающие аварийную терминацию трансляции, в первую очередь, с последующим гидролизом пептидил-тРНК и высвобождением рибосомы.

2. Факторы, вызывающие реактивацию трансляции в аварийных условиях.

Рассмотрим подробнее причины остановки трансляции и системы спасения, работающие в каждом конкретном случае.

ФАКТОРЫ, ВЫЗЫВАЮЩИЕ АВАРИЙНУЮ ТЕРМИНАЦИЮ ТРАНСЛЯЦИИ, С ПОСЛЕДУЮЩИМ ГИДРОЛИЗОМ ПЕПТИДИЛ-ТРНК И ВЫСВОБОЖДЕНИЕМ РИБОСОМЫ

Одной из наиболее распространенных проблем, с которой рибосома может встретиться в процессе трансляции мРНК, – отсутствие стоп-кодона [3]. Подобная ошибка может возникнуть вследствие целого ряда причин. Среди них выделяют преждевременную терминацию транскрипции, сдвиг рамки считывания, активность эндо- и экзонуклеаз, а также прочитывание стоп-кодона в качестве смыслового [3]. Нон-стоп-комплексы могут образовываться и в результате действия некоторых эндорибонуклеазных токсинов, необходимых для остановки трансляции при неблагоприятных стрессовых условиях [7]. Образование и накопление нон-стоп-комплексов токсично для клетки, и отсутствие специальных механизмов ликвидации таких комплексов приводит к быстрому снижению способности клетки синтезировать белки [3, 8, 9]. В таком случае на жизнеспособности клетки сказывается не только недостаток белков, синтез которых внезапно прервался, но и в большей степени – нехватка рибосом для осуществления трансляции других мРНК. Обычно рибосомы не могут легко диссоциировать, будучи частью нон-стоп-комплекса, так как взаимодействия между пептидил-тРНК, рибосомой и мРНК прочно удерживают комплекс вместе [1, 10]. Поэтому перед бактериями стоит первоочередная задача спасения рибосом, попавших в аварию. Ее сложность продиктована необходимостью избирательного гидролиза нужных пептидил-тРНК. Иными словами, механизм должен достаточно точно отличать нон-стоп-комплексы от рибосом, осуществляющих нормальную элонгацию.

***транс*-Трансляция**

Наиболее распространенным механизмом спасения подобного рода комплексов рибосом является *транс*-трансляция, осуществляемая при помощи транспортно-матричной РНК (тмРНК), которую кодирует ген *ssrA*, и белка SmpB. Строение тмРНК и механизм *транс*-трансляции подробно описаны в ряде работ

[3, 11–14]. тмРНК получила свое название благодаря способности сочетать функции как транспортной, так и матричной РНК. 5'- и 3'-концы тмРНК образуют структуру, напоминающую Ala-тРНК, которая распознается аланил-тРНК-синтетазой. Помимо тРНК-подобного домена, тмРНК содержит два–четыре псевдоузла и специализированную рамку считывания, кодирующую короткий пептид длиной 8–35 аминокислот в зависимости от вида. Она не имеет старт-кодона, что делает невозможным ее обычную трансляцию [3].

Для осуществления своей функции тмРНК необходим белок SmpB [15]. SmpB стабилизирует тмРНК, способствует ее распознаванию аланил-тРНК-синтетазой, а также обеспечивает присоединение EF-Tu, необходимого для доставки тмРНК к рибосоме. Взаимодействие тмРНК с EF-Tu аналогично связыванию EF-Tu и aa-тРНК, что подтверждается стабилизацией этого комплекса на рибосоме под действием кирромицина [16].

На первом шаге *транс*-трансляции комплекс тмРНК–SmpB–EF-Tu–GTP связывается в А-сайте рибосомы. В отличие от тройного комплекса, который взаимодействует с мРНК в А-сайте, комплекс тмРНК–SmpB–EF-Tu–GTP взаимодействует с пустым А-сайтом. В таком случае кодон-антикодонное взаимодействие заменяется на взаимодействие SmpB с участком рибосомы в ходе стандартного протекания трансляции, связывающего мРНК с 3'-стороны от Р-сайта. При этом комплекс тмРНК–SmpB–EF-Tu запускает гидролиз GTP. Если канал мРНК пуст, то тмРНК остается в А-сайте для продолжения трансляции по кодирующей части тмРНК. Если в канале находится мРНК, то взаимодействие не происходит из-за стерического перекрытия. Таким образом, механизм *транс*-трансляции не затрагивает транслирующие рибосомы [17].

Появление комплекса тмРНК–SmpB в А-сайте приводит к переносу полипептидной цепи на Ala-тмРНК и сопровождается последующей транслокацией деацилированной тРНК из Р-сайта в Е-сайт и пептидил-тмРНК–SmpB из А-сайта в Р-сайт. Во время транслокации рамка считывания тмРНК входит в канал мРНК так, что ее первый кодон, известный как «кодон возобновления», вытесняет С-концевую часть SmpB из декодирующего центра. *транс*-Трансляция продолжается до тех пор, пока не будет достигнут стоп-кодон тмРНК, который узнают канонические факторы терминации RF1 или RF2, прекращающие трансляцию и высвобождающие полипептид с довеском, закодированным в тмРНК. Далее полипептид распознается несколькими протеазами, включая ClpXP, ClpAP, HflB и Tsp13, что приводит к его быстрой деградации (рис. 2) [3, 18].

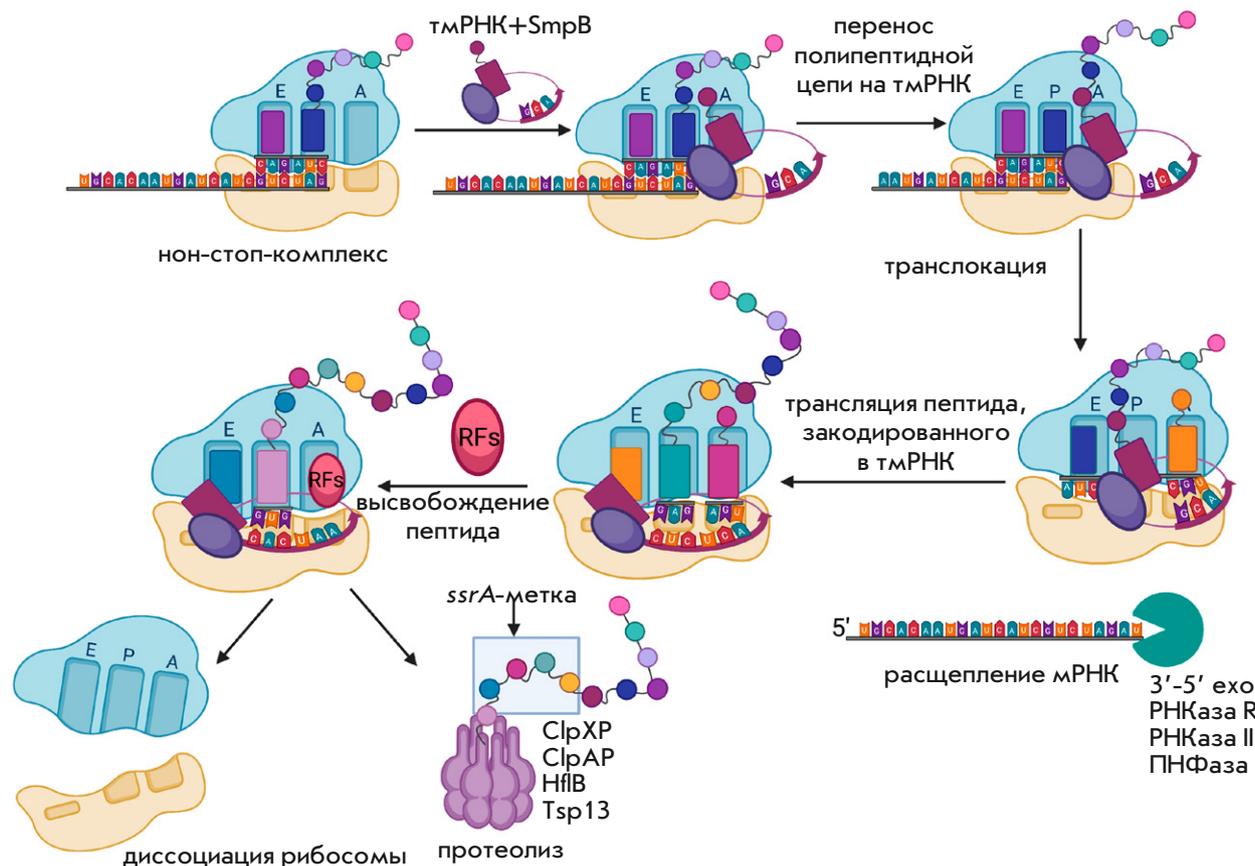


Рис. 2. Освобождение рибосомы путем *транс*-трансляции. Комплекс тмРНК–SmpB распознает рибосому в составе нон-стоп-комплекса, связывается в свободном А-сайте. Появление комплекса тмРНК–SmpB в А-сайте приводит к переносу полипептидной цепи на Ala-тмРНК и сопровождается последующей транслокацией деацелированной тРНК из Р-сайта в Е-сайт и пептидил-тмРНК–SmpB из А-сайта в Р-сайт. *транс*-Трансляция продолжается до тех пор, пока не будет достигнут стоп-кодон тмРНК, который узнают канонические факторы терминации RF1 или RF2, прекращающие трансляцию и высвобождающие полипептид с довеском, закодированным в тмРНК. Далее полипептид распознается несколькими протеазами, включая ClpXP, ClpAP, HflB и Tsp13, что приводит к его быстрой деградации [3, 11–14]

Взаимодействие протеазы и *ssrA*-метки обеспечивает белок-посредник SspB. Деградации подвергается также исходная мРНК, входившая в нон-стоп-комплекс, во избежание повторной трансляции и повторения аварийных ситуаций [3]. В клетках *Escherichia coli* данный процесс осуществляет РНКаза R, которую привлекает тмРНК–SmpB [19]. Таким образом, тмРНК играет в жизнедеятельности клетки три важные роли: участвует в спасении рибосом, в контроле качества белка и мРНК [13].

Резервные пути высвобождения рибосомы с помощью ArfA и BrfA

Когда активность *транс*-трансляции ограничена, для спасения рибосомы используется запасной план – резервный путь высвобождения при помощи белка ArfA (от *англ.* alternative ribosome rescue

factor A). ArfA действует путем привлечения к рибосоме RF2, который в свою очередь гидролизует пептидил-тРНК в нон-стоп-комплексах (*рис. 3*) [20, 21].

Компенсируя отсутствие стоп-кодона в А-сайте, ArfA позволяет RF2 гидролизовать пептидил-тРНК [22]. Таким образом, в высвобождении рибосом с помощью ArfA основную роль играет мотив GGQ RF2, гидролизующий пептидил-тРНК, а мотив SPF, распознающий стоп-кодон, не имеет большого значения [23]. В отличие от *транс*-трансляции, действие ArfA приводит только к высвобождению рибосом, но не сопровождается последующей деградацией растущих полипептидов или мРНК [20–24]. Интересно, что ArfA привлекает исключительно RF2, но не RF1. RF2 сам по себе способен высвобождать арестованные рибосомы с достаточно низкой активностью,

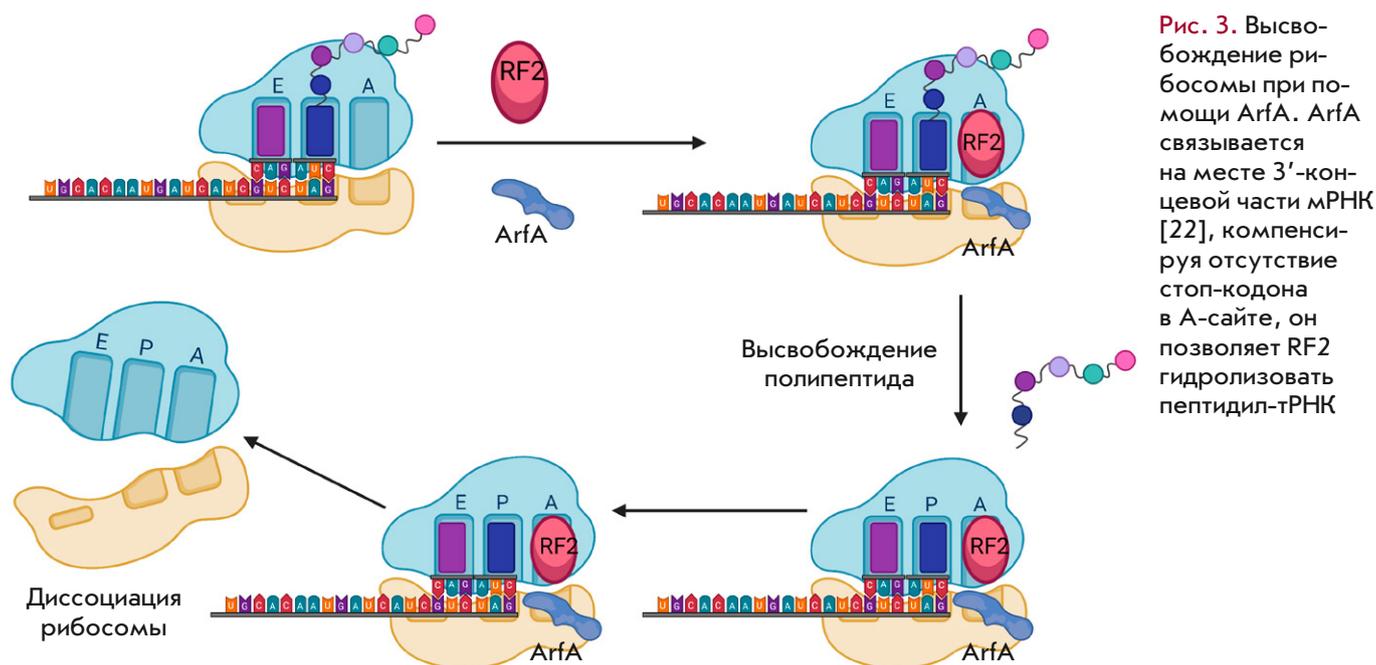


Рис. 3. Высвобождение рибосомы при помощи ArfA. ArfA связывается на месте 3'-концевой части мРНК [22], компенсируя отсутствие стоп-кодона в А-сайте, он позволяет RF2 гидролизовать пептидил-тРНК

а ArfA усиливает эту активность [25] за счет непосредственного взаимодействия с RF2 [26].

Стоит отметить, что ArfA синтезируется с нон-стоп-мРНК и его экспрессия прямо регулируется работой системы *транс*-трансляции [27]. мРНК ArfA *E. coli* принимает структуру шпильки и содержит сайт расщепления РНКазой III, которая удаляет стоп-кодон и последние 18 кодонов открытой рамки считывания. Ген *arfA* *Neisseria gonorrhoeae* не имеет сайта расщепления РНКазой III, однако шпилька способствует термации транскрипции перед стоп-кодомом, тем самым обеспечивая ингибирование синтеза ArfA [28]. Застрявшие на мРНК ArfA рибосомы высвобождаются в ходе *транс*-трансляции, а белок подвергается быстрому протеолизу [29]. В отдельных случаях мРНК ArfA может сохранить стоп-кодон, тогда осуществляется классический вариант термации трансляции с образованием полноразмерного продукта, но на С-концевом участке полноразмерного ArfA находится гидрофобный участок, вследствие чего белок образует агрегаты и при этом все-таки расщепляется внутриклеточными протеазами. Если же активность *транс*-трансляции ограничена или нарушена, то образуется укороченный ArfA без доведка, вызывающего деградацию *ssrA*. Такой укороченный продукт приходит на замену системе тмРНК-SmpB. Подобный механизм регуляции делает ArfA истинной резервной системой спасения рибосом, функционирующей только тогда, когда активность *транс*-трансляции низкая или отсутствует [27].

Стратегию высвобождения рибосомы при помощи белка ArfA используют только грамотрицательные

бактерии. В клетках грамположительных бактерий реализуются другие механизмы. Долгое время считали, что канонические факторы высвобождения не принимают в них участие. Однако недавно описан способ спасения рибосом в клетках *Bacillus subtilis*, аналогичный действию ArfA [30]. Центральную роль в нем играет белок BrfA (от *англ.* *Bacillus rescue factor A*). Подобно ArfA он узнает нон-стоп-комплексы и привлекает к застрявшей рибосоме фактор термации RF2. С-Концевой участок белка также связывается с каналом мРНК, только если он не занят частью мРНК с 3'-конца от Р-сайта. Сходство с ArfA проявляется и на уровне регуляции: BrfA синтезируется с нон-стоп-мРНК, а его экспрессия зависит от активности *транс*-трансляции. Тем не менее, белки ArfA и BrfA не имеют структурного сходства и эволюционно далеки друг от друга. Кроме того, несмотря на то что оба они привлекают на помощь RF2, взаимодействие каждого из этих белков с RF2 различно [30]. Вероятно, у грамположительных и грамотрицательных бактерий параллельно сформировались резервные механизмы высвобождения рибосом, позволяющие подстраховать систему *транс*-трансляции.

ArfB: альтернативная спасательная система

Альтернативный способ спасения заблокированных рибосом обеспечивает белок ArfB (от *англ.* *alternative ribosome rescue factor B*). Ген *arfB* был впервые идентифицирован как супрессор летальности у мутанта *E. coli*, в котором отсутствовала как *транс*-трансляция, так и белок ArfA [24].

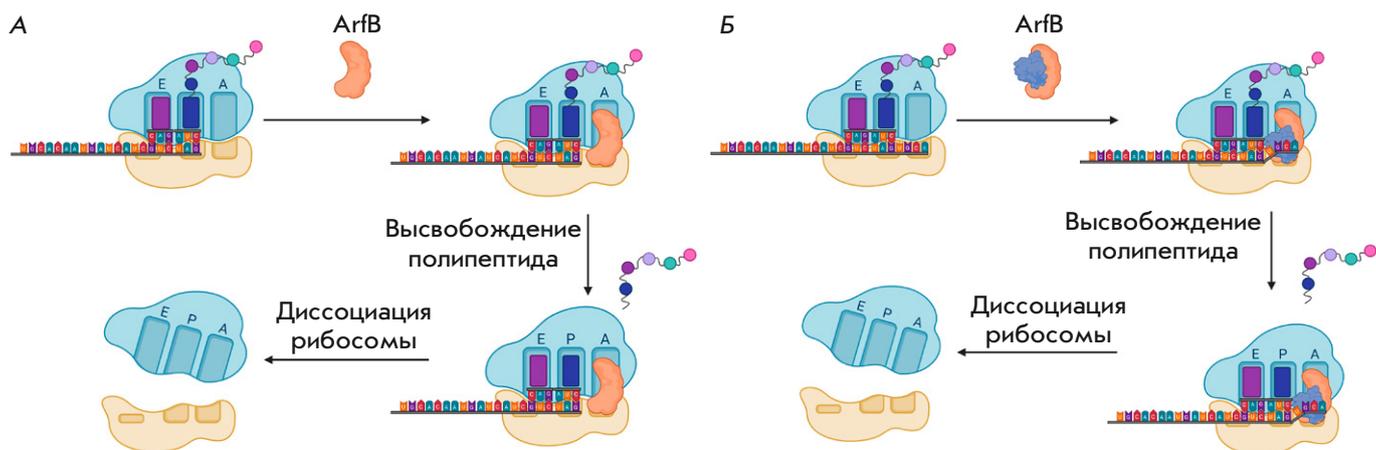


Рис. 4. А – ArfB связывается в тоннеле мРНК рибосомы в составе нон-стоп-комплекса. После его связывания гибкий линкерный участок белка позволяет N-концевому домену проникнуть в ПТЦ для высвобождения пептида. Далее комплекс ArfB и рибосомы диссоциирует [24]. Б – сценарий спасения рибосомы при помощи ArfB при занятом А-сайте. Если протяженный фрагмент мРНК выступает из Р-сайта, то этот фрагмент перемещается за пределы мРНК тоннеля в межсубъединичное пространство и стабилизируется там при помощи дополнительной копии белка ArfB [35]. Каталитический ArfB при этом выполняет функцию гидролиза пептидил-тРНК. Далее комплекс ArfB и рибосомы диссоциирует

Гомологи гена *arfB* обнаружены в 34% секвенированных геномов как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий [31]. В отличие от ArfA, гомологи ArfB присутствуют также в клетках эукариот [32].

N-Концевой домен ArfB гомологичен каталитическим доменам RF1 и RF2. Этот домен содержит мотив GGQ, который играет решающую роль в ArfB-опосредованном гидролизе пептидил-тРНК. При этом несколько важных аминокислотных остатков, необходимых для распознавания задержанного комплекса и связывания застрявшей рибосомы, располагаются вовсе не в N-, а напротив, в C-концевом домене белка. Домен, способный осуществлять взаимодействие со стоп-кодоном, у ArfB отсутствует [33]. Очищенный ArfB из *E. coli* и *C. crescentus* способен гидролизовать пептидил-тРНК в нон-стоп-комплексах *in vitro* в отсутствие факторов терминации RF1 и RF2 (рис. 4А) [24, 31].

Субстратом тмРНК и ArfA служит рибосома со свободным А-сайтом, аналогичная ситуация предполагалась и для ArfB, однако выяснилось, что ArfB способен взаимодействовать с рибосомами и в том случае, когда небольшой отрезок мРНК выступает из Р-сайта [34]. В такой ситуации нуклеотиды декодирующего центра перестраиваются, что приводит к расширению тоннеля мРНК. Подобная пластичность позволяет избежать стерического перекрытия С-концевого домена ArfB и короткого фрагмента мРНК, способствуя тем самым высвобождению рибосомы. С-Концевой домен служит своеобразным сенсо-

ром, распознающим рибосомы со свободным А-сайтом или перестроенным декодирующим центром. После его связывания в тоннеле мРНК гибкий линкерный участок белка позволяет N-концевому домену проникнуть в ПТЦ для высвобождения пептида. Далее вращение субчастиц рибосомы друг относительно друга приводит к перемещению деацелированного ССА-конца тРНК в Е-сайт. Комплекс ArfB и рибосомы диссоциирует, а ее последующей разборке способствует релизинг-фактор RRF [35]. Как и в случае ArfA, действие ArfB высвобождает рибосому, не вызывая деградацию синтезированного пептида.

Субстратами ArfB могут быть и рибосомы с достаточно протяженным фрагментом мРНК (рис. 4Б) [35]. В этом случае нуклеотиды центра декодирования не изменяют своего положения, и работает совершенно иной механизм. Выступающая мРНК перемещается за пределы мРНК тоннеля в межсубъединичное пространство и стабилизируется там при помощи дополнительной копии белка ArfB, в то время как каталитический ArfB выполняет функцию гидролиза. Таким образом, ArfB способен функционировать как в мономерной, так и в мультимерной форме, что позволяет ему эффективно распознавать две группы субстратов. Это придает ему способность высвобождать застрявшие рибосомы не только при обрыве матрицы, но и в случае набора редких кодонов или полипролиновых участков. В этом проявляется сходство ArfB с его эукариотическим гомологом – белком ICT1, высвобождающим, по некоторым данным, митохондриальные рибосо-

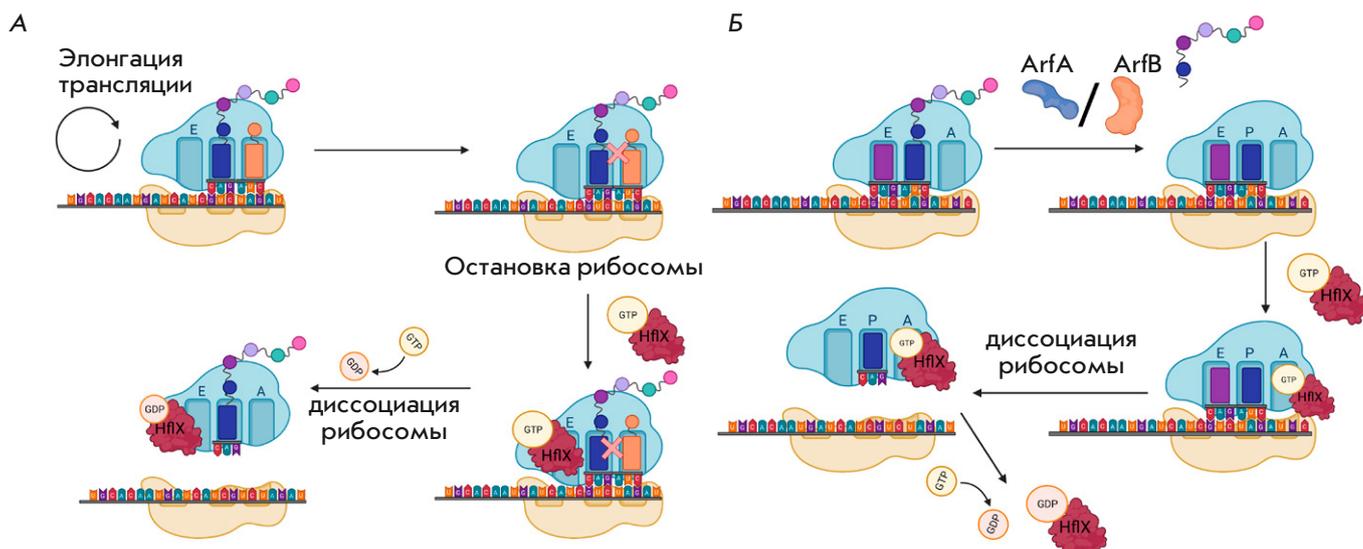


Рис. 5. Возможные механизмы работы HflX. А – HflX может связываться со свободным E-сайтом [38]. Застопорившийся пептид в ПТЦ является для HflX сигналом к гидролизу GTP. Далее HflX расщепляет 70S рибосому на 50S и 30S субчастицы, которые впоследствии могут быть использованы в другом раунде трансляции. Б – HflX способен связаться в A-сайте застопорившейся рибосомы [39]. Предварительно в такой модели пептид высвобождается при помощи фактора спасения ArfA или ArfB. Далее HflX–GTP связывается с A-сайтом и вызывает диссоциацию рибосомных субчастиц

мы, застрявшие при трансляции кластера редких кодонов [32].

Удаление *arfB* у *C. crescentus* не сказывается на жизнеспособности, однако в сочетании с делецией *ssrA* оно летально [31]. Тем не менее, ArfB не может полностью компенсировать потерю *транс*-трансляции, так как штамм *C. crescentus* Δ *ssrA* имеет выраженный дефект роста [3]. Кроме того, в отличие от ArfA, синтез самого ArfB не связан с *транс*-трансляционной активностью, поэтому он, скорее всего, не функционирует исключительно как резервная система *транс*-трансляции [24, 31]. Действие ArfB, как и ArfA, высвобождает рибосому, но не приводит к последующей направленной деградации синтезированного пептида или мРНК. Возможно ArfB необходим для распознавания и других возможных нарушений трансляции, например, высвобождения рибосомы из *нон-стоп-комплексов*, образованных под действием теплового шока [3, 35].

ArfT высвобождает рибосомы, используя иной механизм

Необычный способ спасения рибосом обнаружен у возбудителя туляремии *Francisella tularensis*. Данная бактерия не содержит ArfA и ArfB, и тем не менее инактивация системы *ssrA/SmpB* не является летальной мутацией. Транспозонный мутагенез с последующим глубоким секвенированием выявил новый альтернативный фактор спасения рибосомы, получивший название ArfT [36].

Установлено, что удаление гена *arfT* приводит к потере жизнеспособности только у мутантов *F. tularensis*, не способных к *транс*-трансляции. Сверхэкспрессия ArfT, напротив, способствует интенсивному росту таких клеток [36]. ArfT имеет некоторое сходство с ArfA, и эти два фактора, возможно, распознают *нон-стоп-комплексы* похожим образом. С-Концевой «хвост» ArfA связывается в пустом канале мРНК застрявших рибосом, используя несколько остатков лизина и аргинина, включая консервативный мотив KGKGS. Ни один из этих остатков сам по себе не важен для активности ArfA, однако замена отдельных остатков снижает активность спасения рибосомы *in vitro*. Последовательность KKGSTNKK вблизи С-конца ArfT содержит, как и ArfA, ряд положительно заряженных остатков, поэтому, по-видимому, ArfT может использовать эту последовательность для связывания рибосомы [37]. ArfT вызывает гидролиз пептидил-тРНК, работая совместно с факторами терминации, однако в отличие от ArfA, привлекающего только RF2, ArfT взаимодействует как с RF2, так и с RF1. Так, в ходе *in vitro* моделирования аварийной трансляции добавление к *нон-стоп-комплексу* ArfT и RF1 *F. tularensis* привело к гидролизу пептидил-тРНК с эффективностью 95%, а добавление ArfT и RF2 *F. tularensis* – к гидролизу с эффективностью 84% [36].

Несмотря на сходство С-концевой последовательности ArfT и ArfA, способность ArfT активировать как RF1, так и RF2 может означать, что ArfT взаимо-

действует с факторами высвобождения иначе, нежели ArfA. Кроме того, стоит отметить, что образование ArfT не регулируется посредством терминации трансляции.

ФАКТОРЫ, ВЫЗЫВАЮЩИЕ АВАРИЙНУЮ ТЕРМИНАЦИЮ ТРАНСЛЯЦИИ, НЕ СВЯЗАННУЮ С ГИДРОЛИЗОМ ПЕПТИДИЛ-ТРНК

HflX

Тепловой шок – еще одна причина остановки трансляции. При этом системам спасения приходится иметь дело с 70S рибосомой с пептидил-ТРНК в Р-сайте и неповрежденной мРНК в А-сайте. Одним из факторов, способных распознать подобный субстрат, является белок HflX *E. coli*.

Известно несколько вариантов возможного механизма работы HflX. Согласно одному из них, HflX может связываться со свободным Е-сайтом (рис. 5А) [38]. Застопорившийся пептид в ПТЦ служит сигналом к гидролизу GTP HflX. Далее HflX расщепляет 70S рибосому на 50S и 30S субчастицы, которые впоследствии могут использоваться в другом раунде трансляции. После расщепления рибосомы HflX может связываться с А-сайтом, чтобы предотвратить повторное связывание 50S и 30S субчастиц и блокировать присоединение других GTPаз [38]. Также показано, что HflX способен связаться в А-сайте застопорившейся рибосомы (рис. 5Б) [39]. Предварительно в такой модели пептид высвобождается при помощи фактора спасения ArfA или ArfB. Далее HflX-GTP связывается с А-сайтом и вызывает диссоциацию рибосомных субчастиц.

HflXr

В основе механизма действия значительного количества антибактериальных агентов лежит подавление трансляции. Многие из них связываются с ПТЦ, тем самым ингибируя пептидилтрансферазную реакцию [40]. Устойчивость к такого рода антибиотикам, как правило, обусловлена присутствием в бактериальной клетке эффлюксной помпы либо механизмов, модифицирующих или инактивирующих молекулу антибиотика [41]. Кроме того, недавно обнаружили, что делеция гена *hflX* у патогенной бактерии *Mycobacterium abscessus* приводит к усилению чувствительности к антибактериальным агентам класса макролидов. Продукт данного гена способен разбирать рибосомы, заблокированные под действием макролидов, и таким образом играет важную роль в развитии антибиотикорезистентности у некоторых патогенов [42].

Нетривиальный механизм резистентности, связанный, возможно, с работой белка HflXr, описан у *Listeria monocytogenes* [5, 43]. Этот белок являет-

ся гомологом HflX *E. coli*, функция которого заключается в разборке остановленной рибосомы [5]. Хотя HflXr также способен разбирать рибосомные субчастицы, нельзя утверждать, что его действие прямо связано с вытеснением антибиотика. Так, несмотря на то что делеция гена *hflXr* делает бактерии более чувствительными к эритромицину и линкомицину, фенотип чувствительности проявлялся только при одновременной делеции еще одного гена – *lmo0919* [5].

Высвобождение рибосомы с помощью RqcH и RqcP

Среди причин внезапной остановки биосинтеза белка есть и достаточно необычная – преждевременная диссоциация рибосомных субчастиц. Высвобождение 50S субъединицы из комплекса с пептидил-ТРНК осуществляется при этом с помощью нескольких механизмов. Один из них реализуется белками RqcH и RqcP (рис. 6) [44]. Действие данных белков частично дублирует активность ssgA/тМРНК, поскольку также приводит к навешиванию на полипептид метки, распознаваемой внутриклеточными протеазами.

RqcH, обнаруженный у *B. subtilis* (от *Rqc2 homolog*), является гомологом эукариотического фактора контроля качества трансляции Rqc2. В модели, представленной на рис. 6, белок RqcP связывается с 50S субъединицей рибосомы и стабилизирует ТРНК в Р-сайте [44, 45]. RqcH доставляет к 50S заряженную аланиновую ТРНК, которая занимает свободный А-сайт. RqcH специфично связывает Ala-ТРНК благодаря тому, что нуклеотиды G35 и C36 антикодона ТРНК и аминокислотные остатки NFACT-N-домена RqcH образуют взаимодействия наподобие уотсон-криковских [46]. Далее происходит перенос полипептидной цепи. Затем RqcP теряет сродство к рибосоме, что способствует ее перемещению наподобие транслокации: деацилированная ТРНК при этом передвигается в Е-сайт, пептидил-ТРНК – в Р-сайт. Позже для стабилизации пептидил-ТРНК в Р-сайте RqcP присоединяется вновь. RqcH либо диссоциирует, либо, будучи присоединенным к рибосоме, привлекает Ala-ТРНК. Далее цикл подобной «элонгации» может повторяться до момента, пока фактор RqcH не диссоциирует и полипептид не будет высвобожден. Фактор, который при таком развитии событий проводит гидролиз пептидил-ТРНК, на данный момент точно не установлен. Предполагается, что такую роль может выполнять ArfB [44].

Hsp15

Белки RqcH и RqcP отсутствуют у актинобактерий и гамма-протеобактерий. Однако стоит отметить, что белок RqcP является гомологом белка Hsp15 *E. coli* [44]. Обратим внимание, что, как и RqcH/RqcP, Hsp15 связывается с 50S субчастицей, заблокиро-

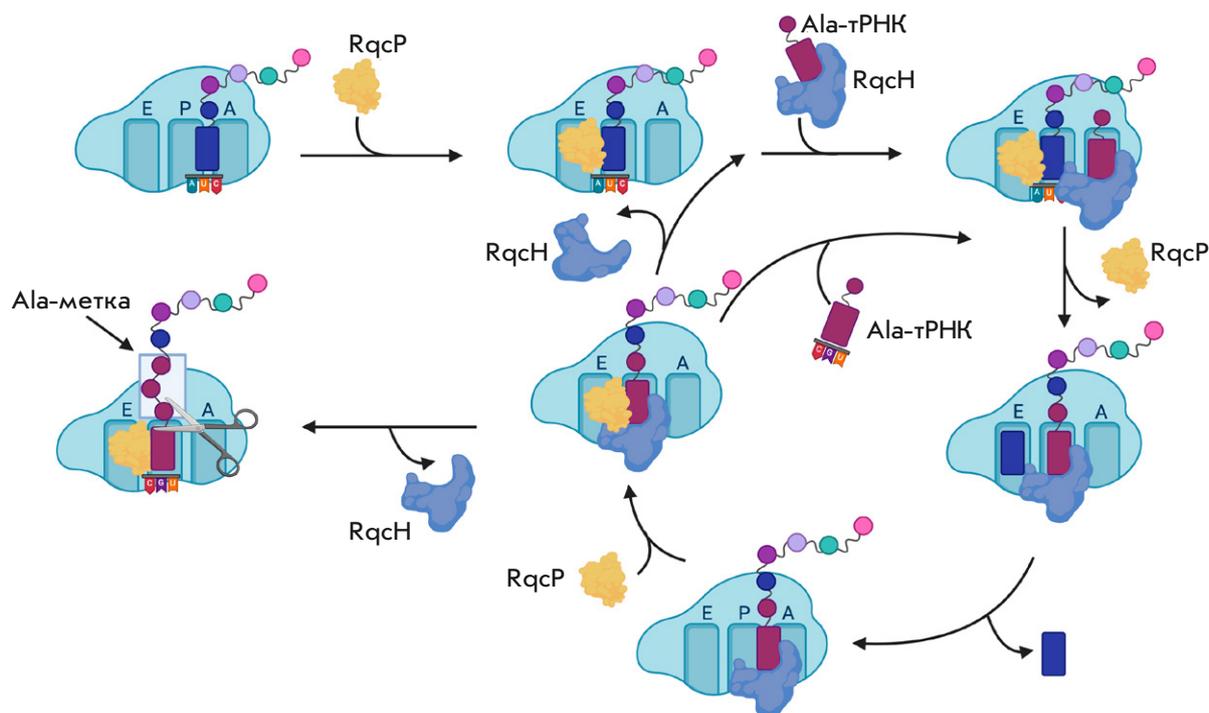


Рис. 6. Механизм действия белков RqcP и RqcH (YabO). RqcP связывается с 50S субъединицей рибосомы и стабилизирует тРНК в Р-сайте [44, 45]. RqcH доставляет к 50S заряженную аланиновую тРНК, которая занимает свободный А-сайт. Далее происходит перенос полипептидной цепи. Затем RqcP теряет стродство к рибосоме, что способствует ее перемещению наподобие транслокации: деацилированная тРНК при этом передвигается в Е-сайт, пептидил-тРНК – в Р-сайт. Позже для стабилизации пептидил-тРНК в Р-сайте RqcP присоединяется вновь. Присоединенный к рибосоме RqcH привлекает Ala-тРНК. Далее цикл подобной «элонгации» может повторяться до момента, пока фактор RqcH не диссоциирует и полипептид не будет высвобожден. Фактор, который при таком развитии событий проводит гидролиз пептидил-тРНК, на данный момент точно не установлен. Такую роль, по-видимому, может выполнять ArfB

ванной после внезапной разборки рибосомы. Hsp15 не взаимодействует с 70S рибосомами, поскольку присутствие малой субчастицы препятствует его связыванию. При незапланированной разборке рибосомы большая субчастица оказывается доступной для Hsp15. При этом пептидил-тРНК может располагаться в А-сайте ввиду отсутствия субъединицы 30S. Однако это неблагоприятная ситуация, поскольку при занятом А-сайте фактор высвобождения не способен связаться с 50S субчастицей. Установлено, что белок Hsp15 способствует перемещению пептидил-тРНК из А-сайта в Р-сайт. Далее высвобождение полипептидной цепи предположительно может осуществлять ArfB. Существенное отличие данного механизма от действия белков RqcH и RqcP состоит в том, что синтезированная полипептидная цепь не направляется на деградацию [47].

PrfH

В 1992 году был идентифицирован участок генома *E. coli* K-12, кодирующий аминокислотную последовательность, обладающую значительным сходством

с последовательностью RF1 и RF2 [48]. Этот элемент получил название *prfH* (от *англ.* protein release factor homologue). Позже выяснилось, что значительное количество геномов бактерий, даже эволюционно далеких друг от друга, содержат ортологи данного гена. Белок PrfH имеет много общего с факторами терминации трансляции RF1 и RF2 и рассматривается как их паралог [49].

Существует несколько предложений относительно функции PrfH и того, какой комплекс рибосомы может быть его субстратом. Наиболее вероятной все же остается гипотеза о том, что PrfH является фактором спасения рибосомы [49].

Так, обнаружено, что сверхэкспрессия *prfH* увеличивает устойчивость бактерий *Pseudomonas aeruginosa* к действию азитромицина [50]. Кроме того, при помощи репортерной системы показано, что сверхэкспрессия *prfH* приводит к снижению числа задержанных комплексов рибосомы и модельной мРНК, образованных под влиянием азитромицина.

Тем не менее, роль PrfH на данный момент остается неизвестной и подлежит дальнейшему изучению.

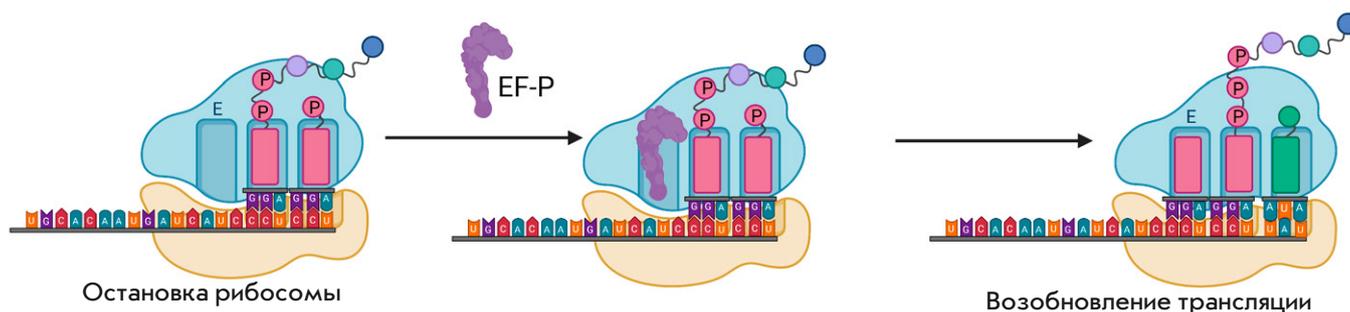


Рис. 7. Механизм действия фактора EF-P. Связывание EF-P стимулирует элонгацию *in vivo* и *in vitro*, когда рибосомы останавливаются на полипролиновых участках. EF-P связывается между E- и P-сайтами на субъединице 50S в непосредственной близости от пептидил-тРНК. Считается, что EF-P способствует стабилизации продуктивной для пептидилтрансферазной реакции конформации субстратов ПТЦ [4]

ФАКТОРЫ, ВЫЗЫВАЮЩИЕ РЕАКТИВАЦИЮ ТРАНСЛЯЦИИ

Фактор элонгации P

Стоит отметить, что не всегда причиной остановки рибосомы при трансляции являются повреждения матрицы – зачастую рибосомы застревают на неповрежденных мРНК. Подобная ситуация может развиваться по двум сценариям: либо элонгация возобновляется, либо мРНК разрезается с образованием нон-стоп-комплекса. Методом рибосомного профайлинга показано, что такие остановки краткосрочны, поскольку они не блокируют продвижение других рибосом, транслирующих ту же матрицу, и не нарушают экспрессию генов [51, 52]. Множество подобных случаев вызвано задержками элонгации, например, из-за нехватки необходимой аминоксил-тРНК. Кроме того, к задержке могут приводить псевдоузлы и некоторые элементы последовательности мРНК [52].

Застывшие рибосомы способны к спонтанному возобновлению элонгации или терминации трансляции, однако помощь в этом часто оказывают специализированные факторы трансляции. Один из них – EF-P – высококонсервативный белок, гомолог эукариотического eIF5A, способствует синтезу полипролиновых последовательностей [4, 53, 54]. Ортологи EF-P у разных групп организмов содержат модифицированные аминокислотные остатки, идентичность которых может отличаться у разных таксонов [53]. Так, EF-P *E. coli* содержит остаток лизинил-гидроксилизина, создаваемый ферментами YfcM [55], YjeK и YjeA [56–58]. EF-P *P. aeruginosa* содержит остаток рамнозы [59, 60], а соответствующий остаток в EF-P *B. subtilis* – это 5-аминопентанол [61]. В клетках эукариот eIF5A, ортолог EF-P, несет остаток гипузина [62].

Формирование пептидной связи между аминокислотными остатками пролина затруднено и зачастую может привести к остановке синтеза белка

[63]. Показано, что подобные затруднения возникают при прохождении рибосомой участка из трех и более пролинов подряд [64]. Такой мотив встречается, в частности, в высококонсервативной валин-тРНК-синтетазе [63].

Структурные исследования EF-P на рибосоме показывают, что EF-P связывается между E-сайтом и P-сайтом на субъединице 50S в непосредственной близости от пептидил-тРНК. Связывание EF-P стимулирует элонгацию *in vivo* и *in vitro*, когда рибосомы останавливаются на последовательностях полипролина (рис. 7). Считается, что EF-P способствует стабилизации, продуктивной для пептидилтрансферазной реакции конформации субстратов ПТЦ. Несмотря на то что EF-P устраняет небольшой набор аварийных ситуаций, он достаточно важен для физиологии бактериальной клетки. Так, штаммы *E. coli* и *S. enterica*, в которых отсутствует EF-P, имеют дефекты целостности мембраны, а также повышенную чувствительность к действию некоторых антибактериальных агентов [64].

EF-4 (LepA)

Широко известный консервативный фактор трансляции EF-4, также называемый LepA, как предполагалось, способствует элонгации путем катализа обратной транслокации попавших в аварию рибосом [3]. Тем не менее, данные рибосомного профайлинга показывают, что EF-4 принимает участие в основном на стадии инициации, и пока не известно, играет ли этот белок роль в высвобождении рибосом [65]. Кроме того, показано, что EF-4 ремоделирует тРНК A-сайта, вызывая смещение акцепторного стебля тРНК от ПТЦ. Для понимания функционального значения A/L-искажения тРНК A-сайта требуются дополнительные исследования [66].

Etta

В качестве защиты рибосомы от действия антибиотиков особый интерес представляют белки

Факторы и механизмы высвобождения остановленных рибосом

Причина остановки	Фактор спасения	Механизм высвобождения рибосом	Распространенность
Образование аварийных комплексов	<i>транс</i> -Трансляция (тмРНК/SmpB)	Возобновление трансляции при помощи тмРНК. Мечение полипептида и мРНК	99% бактериальных геномов
	ArfA	Привлечение фактора RF2	Грамотрицательные
	BrfA	Привлечение фактора RF2	<i>Bacillus subtilis</i>
	ArfT	Привлечение RF или RF2	<i>Francisella tularensis</i>
	ArfB	Самостоятельный гидролиз пептидил-тРНК	Грамотрицательные и грамположительные
	HflX	Разборка рибосомных субчастиц	Грамотрицательные и грамположительные
Внезапная диссоциация субчастиц	RqcH/RqcP + ArfB (?)	Имитация элонгации трансляции для присоединения Ala-метки к полипептиду. Гидролиз	Кроме гамма-протеобактерий и актинобактерий
	Hsp15 + ArfB(?)	Перемещение пептидил-тРНК в Р-сайт. Гидролиз	Грамотрицательные и грамположительные
Кластер редких кодонов, полипролиновый участок, вторичная структура	EF-P	Помощь в образовании пептидной связи при прохождении сложного участка	Грамотрицательные и грамположительные
	EF-4	Помощь при прохождении сложного участка	Грамотрицательные и грамположительные
	ArfB	Гидролиз пептидил-тРНК	Грамотрицательные и грамположительные
Действие антибиотиков	HflXr	Разборка рибосомы	<i>Listeria monocytogenes</i>
	ABC-F-белки	Диссоциация антибиотика	Грамположительные
	PrfH-?	Неизвестен	Грамотрицательные и грамположительные

АТФ-связывающей кассеты (ABC) типа F, которые связываются с рибосомами и способствуют диссоциации комплекса рибосомы и антибиотика [43, 67, 68]. Отдельного упоминания заслуживает EttA – белок ABC-F, обнаруженный у *E. coli* [69]. EttA не способствует приобретению устойчивости к антибиотикам, но при этом действует как фактор трансляции, ограничивая активность рибосом в ответ на низкий уровень АТФ [70, 71]. При высоких концентрациях ADP EttA связывается с 70S рибосомой в Р-сайте, стабилизируя ее в так называемом состоянии гибернации. Это связывание препятствует синтезу белка и позволяет перенести неблагоприятные условия при помощи ограничения трансляции.

Также действие некоторых белков ABC-F лежит в основе механизмов устойчивости к антибиотикам. Подробный обзор белков ABC-F, защищающих рибосому от антибиотиков, представлен в работе [40]. Такие белки ABC-F связываются в Е-сайте рибосомы. Связывание вызывает небольшое вращение 30S субъединицы против часовой стрелки относительно 50S, что приводит к сдвигу тРНК и позволяет ARD-домену белка проникнуть в ПТЦ, вызывая диссоциацию антибиотика. Предположительно, это происходит потому, что связывание белка вызывает аллостерические конформационные изменения в нуклеотидах ПТЦ, которые содержат сайт связывания антибиотика. Белки ABC-F, обнаруженные у многих

бактерий, таких, как, например, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *B. subtilis*, придают этим организмам устойчивость к широкому спектру антибиотиков [40].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Способность высвобождать рибосомы, застрявшие на мРНК в процессе трансляции, заметно повышает жизнеспособность и поэтому закрепилась в процессе отбора (таблица). Большинству бактерий для жизни необходим по крайней мере один механизм спасения рибосом. При этом наибольшее распространение получила система *транс*-трансляции – гены *ssrA* и *smpB* обнаружены более чем у 99% видов бактерий [3]. Поскольку компоненты системы *транс*-трансляции представлены практически во всех бактериальных геномах, а мутации в генах, кодирующих такие белки, снижают жизнеспособность клеток, белки-участники данной системы рассмотрены как привлекательные мишени для новых антибактериальных препаратов. Эти соображения подкреплялись также тем, что *транс*-трансляция специфична для бактериальных клеток, что снижает вероятность возможных побочных эффектов. Методом высокопроизводительного скрининга отобраны несколько соединений – потенциальных ингибиторов высвобождения нон-стоп-комплексов посредством *транс*-трансляции [8]. В основе механизма одного из них

лежит предотвращение мечения полипептида, тогда как другие ингибируют протеолиз белков, содержащих метку. Одно из соединений ингибирует как присоединение метки, так и последующий протеолиз белка.

Клетки практически всех исследованных видов бактерий, способных выживать в отсутствие *транс*-трансляции, содержат альтернативный фактор высвобождения [72]. Так, при делеции *ssrA* жизнеспособность клеток *E. coli* поддерживает *arfA*, *B. subtilis* – *brfA*, *F. tularensis* – *arfT*, а в клетках *S. crescentus* – *arfB*. *Shigella flexneri* и *N. gonorrhoeae* не способны выживать без *транс*-трансляции [27]. Возможно, данный факт объясняется тем, что эти патогены не содержат гомолога *ArfA E. coli*, способного заменить систему тмРНК–*SmpB* [27, 73]. Отметим, что *ArfT* взаимодействует с RF1/2 *F. tularensis*, но не способен связаться с RF1/2 *E. coli*. Фактор *BrfA* взаимодействует исключительно с RF2 *B. subtilis*. Таким образом, описанные выше системы спасения рибосом, не являются взаимозаменяемыми у разных видов [26]. При этом в отсутствие *транс*-трансляции абсолютно все альтернативные спасательные системы не обеспечивают достаточной активности. Делеция *ssrA* или *smpB* приводит к проявлению множества различных фенотипов. Так, лишённые *ssrA* мутанты могут обладать повышенной чувствительностью к действию антибиотиков, колебаниям температуры, а также иметь дефекты вирулентности [27, 74]. *транс*-Трансляция сохраняется у всех бактерий, ни один вид не приспособился использовать исключительно *ArfA*, *ArfB* или другие системы. Активность тмРНК/*smpB* не только высвобождает

застрявшие рибосомы, но и способствует удалению недосинтезированных полипептидных цепей и поврежденных мРНК, что также дает ей значительное преимущество перед резервными системами спасения. Частичным аналогом *транс*-трансляции в каком-то смысле можно назвать систему RqcH–RqcP, работа которой также приводит к деградации неправильного полипептида.

Дополнительные системы спасения рибосом как резервные, так и самостоятельные сложно назвать механизмами контроля качества биосинтеза белка. В результате работы этих систем «некачественные» мРНК и синтезированные на их основе полипептиды не направляются на деградацию специально. Поскольку при всем разнообразии резервных механизмов ни один из них не дублирует *транс*-трансляцию, возникает предположение, что в случае остановки трансляции первоочередную задачу представляет именно спасение рибосом. Безусловно, *транс*-трансляция наиболее выгодна, так как избавляет клетку от нежелательных и потенциально токсичных молекул. Однако, когда ее активность ограничена или отсутствует, реализуется главная потребность – спасение заблокированных рибосомных субчастиц для осуществления последующих раундов синтеза белка. Таким образом, бактерии приобрели разнообразные системы спасения трансляции, направленные главным образом не на контроль качества мРНК, а на высвобождение рибосомных субчастиц. ●

Работа выполнена при поддержке гранта
РНФ № 20-74-10031.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Schmeing T.M., Ramakrishnan V. // Nature. 2009. V. 461. № 7268. P. 1234–1242.
- Laursen B.S., Sorensen H.P., Mortensen K.K., Sperling-Petersen H.U. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2005. V. 69. № 1. P. 101–123.
- Keiler K.C. // Nat. Rev. Microbiol. 2015. V. 13. № 5. P. 285–297.
- Rajkovic A., Ibbá M. // Annu. Rev. Microbiol. 2017. V. 71. № 1. P. 117–131.
- Duval M., Dar D., Carvalho F., Rocha E.P.C., Sorek R., Cossart P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2018. V. 115. № 52. P. 13359–13364.
- Ito K., Chiba S. // Annu. Rev. Biochem. 2013. V. 82. P. 171–202.
- Bandyra K.J., Luisi B.F. // RNA Biol. 2013. V. 10. № 4. P. 627–635.
- Ramadoss N., Alumasa J.N., Chang H., Brinker A., Keiler K.C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. № 25. P. 10282–10287.
- Chadani Y., Ono K., Ozawa S., Takahashi Y., Takai K., Nanamiya H., Tozawa Y., Kutsukake K., Abo T. // Mol. Microbiol. 2010. V. 78. № 4. P. 796–808.
- Ivanova N., Pavlov M.Y., Ehrenberg M. // J. Mol. Biol. 2005. V. 350. № 5. P. 897–905.
- Komine Y., Yokogawa T., Nishikawa K., Inokuchi H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 9223–9227.
- Atkins J.F., Gesteland R.F. // Nature. 1996. V. 379. № 6568. P. 3105–3114.
- Janssen B.D., Hayes C.S. // Adv. Protein Chem. Struct. Biol. 2012. V. 86. P. 151–191.
- Abo T., Ueda K., Sunohara T., Ogawa K., Aiba H. // Genes Cells. 2002. V. 7. № 7. P. 629–638.
- Kyoko Hanawa-Suetsugu M.T., Inokuchi H., Himeno H., Muto A. // Nucl. Acids Res. 2002. V. 30. № 7. P. 1620–1629.
- Shimizu Y., Ueda T. // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. № 23. P. 15987–15996.
- Neubauer C., Gillet R., Kelley A.C., Ramakrishnan V. // Science. 2012. V. 335. № 6074. P. 1366–1369.
- Keiler K.C., Waller P.R., Sauer R.T. // Science. 1996. V. 271. № 5251. P. 990–993.
- Richards J., Mehta P., Karzai A.W. // Mol. Microbiol. 2006. V. 62. № 6. P. 1700–1712.
- Demo G., Svidritskiy E., Madireddy R., Diaz-Avalos R., Grant T., Grigorieff N., Sousa D., Korostelev A.A. // Elife. 2017. V. 6. P. e23687.
- Kurita D., Chadani Y., Muto A., Abo T., Himeno H. // Nucl. Acids Res. 2014. V. 42. № 21. P. 13339–13352.
- Huter P., Muller C., Beckert B., Arenz S., Berninghausen

- O., Beckmann R., Wilson D.N. // *Nature*. 2017. V. 541. № 7631. P. 546–549.
23. Chadani Y., Ito K., Kutsukake K., Abo T. // *Mol. Microbiol.* 2012. V. 86. № 1. P. 37–50.
24. Chadani Y., Ono K., Kutsukake K., Abo T. // *Mol. Microbiol.* 2011. V. 80. № 3. P. 772–785.
25. Himeno H., Nameki N., Kurita D., Muto A., Abo T. // *Biochimie*. 2014. V. 114. P. 102–112.
26. Kurita D., Abo T., Himeno H. // *J. Biol. Chem.* 2020. V. 295. № 38. P. 13326–13337.
27. Abo T., Chadani Y. // *Front. Microbiol.* 2013. V. 5. P. 156.
28. Schaub R.E., Poole S.J., Garza-Sanchez F., Benbow S., Hayes C.S. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 35. P. 29765–29775.
29. Garza-Sanchez F., Schaub R.E., Janssen B.D., Hayes C.S. // *Mol. Microbiol.* 2011. V. 80. № 5. P. 1204–1219.
30. Shimokawa-Chiba N., Muller C., Fujiwara K., Beckert B., Ito K., Wilson D.N., Chiba S. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 5397.
31. Feaga H.A., Viollier P.H., Keiler K.C. // *mBio*. 2014. V. 5. № 6. P. e01916.
32. Akabane S., Ueda T., Nierhaus K.H., Takeuchi N. // *PLoS Genet.* 2014. V. 10. № 9. P. e1004616.
33. Burroughs A.M., Aravind L. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 8. P. 1981.
34. Müller C., Crowe-McAuliffe C., Wilson D.N. // *Front. Microbiol.* 2021. V. 12. P. 652980.
35. Carbone C.E., Demo G., Madireddy R., Svidritskiy E., Korostelev A.A. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 5552.
36. Goralski T.D.P., Kirimanjeswara G.S., Keiler K.C. // *mBio*. 2018. V. 9. № 6. P. e02436–02418.
37. James N.R., Brown A., Gordiyenko Y., Ramakrishnan V. // *Science*. 2016. V. 354. № 6318. P. 1437–1440.
38. Coatham M.L., Brandon H.E., Fischer J.J., Schummer T., Wieden H.J. // *Nucl. Acids Res.* 2016. V. 44. № 4. P. 1952–1961.
39. Zhang Y., Mandava C.S., Cao W., Li X., Zhang D., Li N., Zhang Y., Zhang X., Qin Y., Mi K., et al. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2015. V. 22. № 11. P. 906–913.
40. Ero R., Kumar V., Su W., Gao Y.G. // *Protein Sci.* 2019. V. 28. № 4. P. 684–693.
41. Blair J.M., Webber M.A., Baylay A.J., Ogbolu D.O., Piddock L.J. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2015. V. 13. № 1. P. 42–51.
42. Rudra P., Hurst-Hess K.R., Cotten K.L., Partida-Miranda A., Ghosh P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2020. V. 117. № 1. P. 629–634.
43. Wilson D.N., Hauryliuk V., Atkinson G.C. // *Nat. Rev.* 2020. V. 18. № 11. P. 637–648.
44. Crowe-McAuliffe C., Takada H., Murina V., Polte C., Kasvandik S., Tenson T., Ignatova Z., Atkinson G.C., Wilson D.N., Hauryliuk V. // *Mol. Cell*. 2021. V. 81. № 1. P. 115–126.
45. Lytvynenko I., Paternoga H., Thrun A., Balke A., Muller T.A., Chiang C.H., Nagler K., Tsapraillis G., Anders S., Bischofs I., et al. // *Cell*. 2019. V. 178. № 1. P. 76–90.
46. Filbeck S.C.F., Paternoga H., Tsapraillis G., Joazeiro C., Pfeffer S. // *Mol. Cell*. 2021. V. 81. № 1. P. 1–11.
47. Jiang L., Schaffitzel C., Bingel-Erlenmeyer R., Ban N., Korber P., Koning R.I., de Geus D.C., Plaisier J.R., Abrahams J.P. // *J. Mol. Biol.* 2009. V. 386. № 5. P. 1357–1367.
48. Herman J., Pel M.R., Grivell L.A. // *Nucl. Acids Res.* 1992. V. 20. № 17. P. 4423–4442.
49. Baranov P.V., Vestergaard B., Hamelryck T., Gesteland R.F., Nyborg J., Atkins J.F. // *Biol. Direct*. 2006. V. 1. P. 28.
50. Shi J.L.Y., Zhang Y., Jin Y., Bai F., Cheng Z., Jin S., Wu W. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2018. V. 62. № 2. P. e01867–01817.
51. Li G.-W., Oh E., Weissman J.S. // *Nature*. 2012. V. 484. № 7395. P. 538–541.
52. Schrader J.M., Zhou B., Li G.-W., Lasker K., Childers W.S., Williams B., Long T., Crosson S., McAdams H.H., Weissman J.S., et al. // *PLoS Genet.* 2014. V. 10. № 7. P. e1004463.
53. Hummels K.R., Kearns D.B. // *FEMS Microbiol. Rev.* 2020. V. 44. № 2. P. 208–218.
54. Katz A., Solden L., Zou S.B., Navarre W.W., Ibba M. // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. № 5. P. 3261–3271.
55. Peil L., Starosta A.L., Virumae K., Atkinson G.C., Tenson T., Remme J., Wilson D.N. // *Nat. Chem. Biol.* 2012. V. 8. № 8. P. 695–697.
56. Park J.H., Johansson H.E., Aoki H., Huang B.X., Kim H.Y., Ganoza M.C., Park M.H. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 4. P. 2579–2590.
57. Roy H., Zou S.B., Bullwinkle T.J., Wolfe B.S., Gilreath M.S., Forsyth C.J., Navarre W.W., Ibba M. // *Nat. Chem. Biol.* 2011. V. 7. № 10. P. 667–669.
58. Navarre W.W., Zou S.B., Roy H., Xie J.L., Savchenko A., Singer A., Edvokimova E., Prost L.R., Kumar R., Ibba M., et al. // *Mol. Cell*. 2010. V. 39. № 2. P. 209–221.
59. Lassak J., Keilhauer E.C., Furst M., Wuichet K., Godeke J., Starosta A.L., Chen J.M., Sogaard-Andersen L., Rohr J., Wilson D.N., et al. // *Nat. Chem. Biol.* 2015. V. 11. № 4. P. 266–270.
60. Rajkovic A., Erickson S., Witzky A., Branson O.E., Seo J., Gafken P.R., Frietas M.A., Whitelegge J.P., Faull K.F., Navarre W., et al. // *mBio*. 2015. V. 6. № 3. P. e00823.
61. Rajkovic A., Hummels K.R., Witzky A., Erickson S., Gafken P.R., Whitelegge J.P., Faull K.F., Kearns D.B., Ibba M. // *J. Biol. Chem.* 2016. V. 291. № 21. P. 10976–10985.
62. Schnier J., Schwelberge H.G., Smit-McBride Z., Kang H.A., Hershey J.W. // *Mol. Cell Biol.* 1991. V. 11. № 6. P. 3105–3114.
63. Starosta A.L., Lassak J., Peil L., Atkinson G.C., Woolstenhulme C.J., Virumae K., Buskirk A., Tenson T., Remme J., Jung K., et al. // *Cell Rep.* 2014. V. 9. № 2. P. 476–483.
64. Peil L., Starosta A.L., Lassak J., Atkinson G.C., Virumae K., Spitzer M., Tenson T., Jung K., Remme J., Wilson D.N. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. № 38. P. 15265–15270.
65. Balakrishnan R., Oman K., Shoji S., Bundschuh R., Fredrick K. // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. № 21. P. 13370–13383.
66. Gagnona M.G., Lina J., Steitz T.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016. V. 113. № 18. P. 4994–4999.
67. Sharkey L.K.R., O'Neill A.J. // *ACS Infect. Dis.* 2018. V. 4. № 3. P. 239–246.
68. Crowe-McAuliffe C., Graf M., Huter P., Takada H., Abdelshahid M., Nováček J., Murina V., Atkinson J.C., Hauryliuk V., Wilson D.N. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018. V. 115. № 36. P. 8978–8983.
69. Chen B., Boel G., Hashem Y., Ning W., Fei J., Wang C., Gonzalez R.L.Jr., Hunt J.F., Frank J. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2014. V. 21. № 2. P. 152–159.
70. Meir M., Rozenblit A., Fliger S., Geffen Y., Barkan D. // *BMC Microbiol.* 2020. V. 20. № 1. P. 288.
71. Murina V., Kasari M., Takada H., Hinno M., Saha C.K., Grimshaw J.W., Seki T., Reith M., Putrins M., Tenson T., et al. // *J. Mol. Biol.* 2019. V. 431. № 18. P. 3568–3590.
72. Korostelev A.A. // *RNA*. 2011. V. 17. № 8. P. 1409–1421.
73. Ramadoss N.S., Zhou X., Keiler K.C. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 2. P. e57537.
74. Keiler K.C., Shapiro L. // *J. Bacteriol.* 2003. V. 185. № 2. P. 573–580.