

## ساختار ریبوزوم و مکانیسم ترجمه

انتشار ساختارهای بلوری از S50 و S30 زیرواحد ریبوزومی و ریبوزوم S70 دست نخورده، درک ما از سنتز پروتئین را متحول نموده است. این بررسی، تلاشی برای مرتبط نمودن ساختارها با داده های بیوشیمیایی و ژنتیکی برای شناسایی شکاف ها و محدودیت ها در دانش فعلی ما از مکانیسم های درگیر در ترجمه است.

### مقدمه

در ترجمه، ترتیب و توالی کدون ها در mRNA، سنتز یک زنجیره پلی پپتیدی را هدایت می کند. این فرایند در ریبوزوم رخ می دهد، و حرکت tRNA و mRNA از طریق ریبوزوم، یک فرایند پیچیده است که ترکیبی از سرعت بالا با دقت بالا است. (بازنگری شده در Green and Noller, 1997). ریبوزوم، یک ذره ریبو-نوکلئوپروتئین بزرگ، شامل دو زیر واحد در تمام نمونه ها می شود. در باکتری ها، این زیر واحدها، S30 و S50 تعیین شده هستند، و با هم ریبوزوم S70 را تشکیل می دهند. هر زیر واحد ریبو دارای سه محل اتصال برای tRNA، تعیین شده A (آمینو اسیل) است، که tRNA را آمینو اسیل ورودی می پذیرد. P (پپتیدیل)، که tRNA را با زنجیره پپتید در حال تولد نگه می دارد؛ و E (خروجی) که tRNA دی استیله شده را قبل از اینکه ریبوزوم را ترک کند، نگه می دارد. این زیر واحد S30، mRNA و حلقه-ساقه آنتی کدون tRNA را متصل می کند و با نظارت بر جفت شدن باز بین کدون و آنتی کدون در فرایند رمزگشایی به راحت و کاربر پسند بودن ترجمه کمک می کند. این زیر واحد S50، بازوهای پذیرنده tRNA را می بندد و تشکیل پیوند پپتیدی بین اسید آمینه های دریافتی در A-سایت tRNA و زنجیره پپتید در حال تولد متصل به P-سایت tRNA را کاتالیز می کند. هر دو زیرواحد در انتقال درگیر هستند که در آن tRNAها و mRNA دقیقاً از طریق ریبوزوم، یک کدون در یک زمان، حرکت می کنند. ترجمه نه تنها ریبوزوم، بلکه عوامل پروتئین های اضافی را درگیر می کند که بسیاری از آنها GTPases فعال ریبوزوم می باشند. مطالعه ریبوزوم نیز به دلایل پزشکی مهم است، چرا که هدف بسیاری از آنتی بیوتیک ها است.

طرح کلی از ترجمه حدود چهار دهه پیش انجام شد، اما ثابت شده است که درک دقیق مکانیکی ترجمه به چند دلیل دست نیافتنی است. از آنجا که ریبوزوم برای تجزیه و تحلیل ساختاری با وضوح بالا بیش از حد بزرگ تا همین اواخر در نظر گرفته شد، و ابزارهای بیوشیمیایی و ژنتیکی به صورت پیچیده همانند حال حاضر در دسترس نبود، پیشرفت کیفی به سمت درک درست از این مکانیسم دشوار بود. در نتیجه، بعد از عصر طلایی در دهه 1960 و 9170، ترجمه، به دیگر مسائل در بیولوژی مولکولی بعد پیوست.

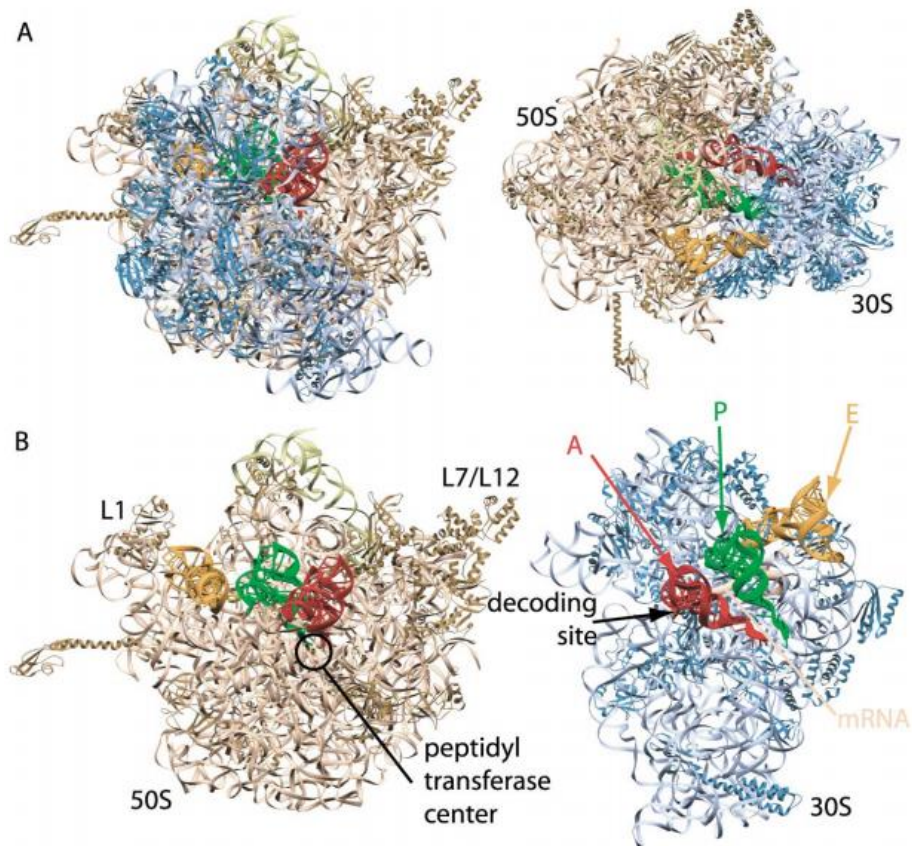
هرچند، در دهه اخیر، پیشرفت سریعی ناشی از همگرایی رویکردهای مختلف صورت گرفته است. ابزارهای ژنتیکی و بیوشیمیایی خبره به طور فزاینده برای ترجمه اعمال شده اند. روند پیش از حالت پایدار، تشریح مراحل را در مسیر ترجمه میسر نموده است (Pape et al., 1998; Rodnina et al., 1997). (بازنگری شده در Agrawal and cryoelectron (Frank, 1999; van Heel, 2000). ظهور تکنیک های بازسازی ذرات، همراه با میکروسکوپ cryoEM) تصاویری را از ریبوزوم با افزایش جزئیات ارائه نمود. از آنجا که هیچ کریستالی مورد نیاز نیست و میزان مواد مورد نیاز در مقایسه با کریستالوگرافی کم است، این روش برای تعیین ساختار ریبوزوم در ترکیب با tRNA و mRNA مربوط به لیگاند و عوامل مختلف استفاده می شود (بازنگری شده در Frank, 1999; van Agrawal و Heel, 2000).

در نهایت، نزدیک به دو دهه پس از اولین گزارش از کریستالهای زیر واحد S50 (Yonath و همکاران، 1980)، پیشرفت های سریعی در بلورشناسی ریبوزوم صورت گرفت. این مورد نه تنها نیاز به کریستال های بهبود یافته از هر دو زیر واحد و کل ریبوزوم، بلکه نیاز به بر طرف شدن تعدادی از مشکلات کریستالوگرافی دارد (بررسی شده در Ramakrishnan and Moore, 2001). در نتیجه، ساختارهای اتمی هر دو زیر واحد و مدل مولکولی در 5.5 A از ریبوزوم 70S کلی اخیراً منتشر شده است. همراه با هم این ساختارهای کریستالی، میزان زیادی از اطلاعات را در مورد معماری کلی و جزئیات تعاملات پروتئین-RNA در هر زیر واحد و جزئیات تعامل ریبوزوم با لیگاندها مانند عوامل اولیه، mRNA و tRNA فراهم می کنند.

این بازنگری تلاش می کند تا داده های بیوشیمیایی اخیر و کلاسیک را در پرتوی ساختارها و در زمینه مسیر ترجمه بازبینی نماید. همانطور که توسط ماهیت حفاظت شده قابل توجه نواحی حیاتی ریبوزوم و ساختار کلی tRNAها قضاوت شده است، بسیاری از فرآیندهای مرکزی مانند شناخت tRNA، تشکیل پیوند پپتید و تغییر موقعیت ممکن، احتمالاً در طول عمر باید یکسان باشند. هرچند، ترجمه یوکاریوتی، پیچیده تر است و فراتر از آن تحت تنظیمات است. در این بازنگری، ما به طور کلی روی ترجمه در باکتری ها تمرکز می کنیم که در آن بیشتر اطلاعات بیوشیمیایی از کار استفاده از E.coli می آید و ما از شماره گذاری E.coli برای باقیمانده ها استفاده می کنیم مگر اینکه بیان شده باشد.

### ساختارهای کریستالی ریبوزوم

مشخص کردن ساختارهای مختلف کریستال ریبوزومی که همراه با محدودیت های آن مشخص شده است، در ابتدا می تواند مفید باشد. اول از همه ساختار ریبوزوم با وضوح بالا که باید منتشر شود، ساختار 2.4 زیر واحد S 50 از آرکتن *Haloarcula marismortui* (Ban و همکاران، 2000) بود. این ساختار شامل بسیاری از زیر واحدهای S50، از جمله تمام مرکز های مهم ترانسفراز پپتیدیل، اما در وضوح بالا، ویژگی های برجسته مانند ساقه L1، منطقه L11-RNA، و ساقه L7/L12 می شود که همه آنها از نظر عملکردی در عوامل اتصال و انتقال که مختل شده به نظر می رسند، مهم هستند. برخی از حلقه های بنیادی RNA که در ارتباط با زیر واحد S30 دخیل هستند نیز بی نظم می باشند. این زیر واحد S Haloarcula 50 تنها ساختار تا به امروز با وضوح کافی برای دیدن مولکول های آب، یون های فلزی، و تغییرات پایه با هر درجه از یقین است. به احتمال زیاد آنها برای درک ما از تا شدن و پایداری RNA حیاتی هستند و می توانند نقش هایی حیاتی را بازی کنند.



شکل 1. ساختارهای کریستال ریبوزوم

ساختار ریبوزوم 70S نشان داده شده توسط ساختار اتمی، 30S و 50S زیر واحد (متن) تسهیل شد.

(A) دو دیدگاه از ریبوزوم 70S ترکیب شده با mRNA و tRNA (Yusupov و همکاران، 2001)، با نمایش "بالا" در سمت چپ و مشخصات 30S در سمت راست.

(B) دیدگاه انفجاری از 50S (سمت چپ) و 30S (سمت راست) زیر واحد در ریبوزوم 70S، نشان دادن مکان های A، P، و E-tRNA. این و اشکال مولکولی دیگر در این مقاله با استفاده از روبان (Carson، 1991) و یا RASTER3D (Merritt و Bacon، 1997) و MOLSCRIPT (Kraulis، 1991) ساخته شده است.

اخیراً، ساختار زیر واحد 50S در تفکیک 3.1A از یک باکتری مزوفیلیک *Deinococcus radiodurans* گزارش شده است (Harms et al., 2001). RNA در این 50S دارای تطابق بسیار مشابه با RNA گزارش شده اصلی برای *Haloarcula* 50S است، اما این ساختار شامل نواحی می شود که در *Haloarcula* 50S مختل شده اند، مانند L1 stalk, the L11 ناحیه RNA و برخی از حلقه های بنیادی RNA که پل هایی را به زیر واحد 30S می زند.

دو ساختار مستقل از زیرواحد 30S از باکتری *Thermus thermophilus*، یکی در 3.3 A از یک گروه در موسسات Max Planck/Weizmann (Schluenzen et al., 2000) و دیگری در 3.05 A از یک گروه در MRC (Wimberly et al., 2000) در آخر سال گزارش شد. تفاوت ها بین دو ساختار در جایی دیگر مورد بررسی قرار گرفته است (Ramakrishnan and Moore, 2001). به طور خلاصه، ساختار MRC نشاندهنده یک مدل اتمی کامل ضروری زیرواحد 30S است و تعدادی از تفاوت های چشمگیر در تفسیر RNA و اجزای پروتئین بین دو ساختار وجود دارد. هرچند، ساختارهای اخیر از گروه Max Planck/Weizmann (Pioletti et al., 2001) در توافق خوبی با ساختار MRC قرار دارند، به طور اورجینال منتشر شده اند.

ساختارهای زیرواحد، نشان دادن جزئیات آنتی بیوتیک های متصل به ریبوزوم را از داده های کریستال شناسی در مورد ترکیبات زیرواحد-آنتی بیوتیک ممکن می سازد (Brodersen et al., 2000; Carter et al., 2000; Schluenzen et al., 2001; Pioletti et al., 2001). آنها مطالعه را با تفکیک بالا در مورد تعاملات لیگاندهای وظیفه ای و عوامل با زیرواحدهای 30S و 50S (Ter et al., 2001; Nissen et al., 2000; Ogle et al., 2001; Car Pioletti et al., 2001; Schmeing et al., 2002).

در هر چیز بدتر از حدود 3.5 A، به طور نرمال، ساخت یک مدل دقیق از ماکرومولکول *de novo* امکانپذیر نخواهد بود. هرچند، موجودیت ساختارهای اتمی در زیرواحدها، ساخت یک مدل را برای RNA و ستون فقرات پروتئین در ریبوزوم *Thermus thermophilus* 70S در تفکیک 5.5A تسهیل نمود (Yusupov et al., 2001) (شکل 1). بسیاری از بخش های زیرواحد 50S که در ساختار *Haloarcula* 50S در ریبوزوم 70S مرتبه بندی شده است، مختل شد. علاوه بر این، ساختار 70S، یک ترکیب با mRNA و tRNA است، بنابراین تعاملات با این لیگاندها و تعاملات زیرواحدها با عبارات مولکولی تفسیر شده است. ساختار 70S منتشر شده، یک ترکیب از دو ساختار است. اولی، یک ساختار 5.5A از 70S با mRNA و tRNA در محل های P و E است. دومی، یک ساختار با تفکیک 6.5 A است که با اضافه نمودن RNA محل A به کریستال های کار شده از ریبوزوم 70S با tRNA های محل E و P به دست می آید. این منجر به افت غیرایزومورفیک و افت های بعد از انکسار در زمان مقایسه با ساختار

اصلی شد، اما دارای این مزیت است که جهت گیری های نسبی سه tRNA را می تواند در زمینه ریبوزوم تعیین نمود. ساختارهای ریبوزوم 70S در حضور tRNA، اما با یا بدون mRNA نیز تعیین شده است (Yusupova و همکاران، 2001). این کار، تجسم بخش های نظم یافته ضعیف از mRNA را از نگاشت های تفاضلی فوریه میسر می سازد به طوری که مسیر گسترده mRNA در ریبوزوم می تواند دیده شود.

## راه اندازی

راه اندازی در باکتری شامل تعامل زیرواحد 30S با دنباله Shine-Dalgarno روی mRNA می شود که مکمل انتهای 3' در 16S RNA است. این فرایند شامل سه عامل اره اندازی نیز می شود 1F1,1F2,1F3 (بازنگری شده در Gualerzi and Pon, 1990). 1F3 برای اتصال قوی به زیرواحد 30S و جلوگیری از ارتباط آن با زیرواحد 50S شناخته شده است. همچنین به انتخاب راه انداز tRNA (fMet fMet-tRNA) با ناپایداری نمودن اتصال دیگر tRNAها در محل P از ریبوزوم کمک می کند (Hartz et al., 1990). در یک تابع مرتبط ممکن، IF3 با tRNA دی استیله از زیرواحد 30S در آخرین گام از خاتمه ارتباطی ندارد، قبل از اینکه در راند جدید سنتز پروتئین بازیافت شود (Karimi و همکاران، 1999). IF2 یک GTPase است که ترجیحاً به fmet fmet-tRNA متصل می شود و پیوستگی آن برای ریبوزوم بوسیله IF1 افزایش می یابد (Zucker and Hershey, 1986). به طرز شگفت آوری، داده های جنبشی اخیر نشان می دهد که فعالیت GTPase از IF2 برای جایگذاری مناسب tRNA راه انداز در محل P و برای آزادسازی IF2 نیاز نمی شود (Tomsic و همکاران 2000). ساختارهای IF1 باکتریایی (Sette و همکاران 1997)، IF3 (Biou et al., 1995; Garcia et al., 1995a, 1995b) و یک آرکئی باکتریایی (Roll-Mecak et al., 2000) حل می شوند (Figure 2a)

ساختاری کریستالی ترکیب 30S-IF1 نشان می دهد که IF1 به محل A برای زیرواحد ریبوزومی 30S سازگار با داده های بیوشیمیایی قبلی متصل می شود (Carter و همکاران 2001). در انجام این کار، اتصال tRNA در محل A جلوگیری می کند، اما همچنین یک تغییر تطابقی را القا می کند که می تواند نشان دهنده حالت گذرا در تعادل

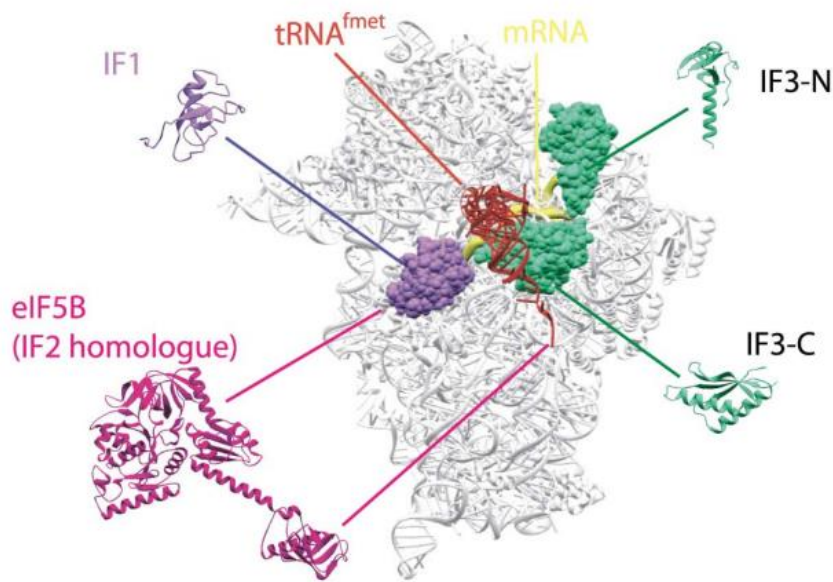
بین ارتباط و عدم ارتباط باشد. موقعیت IF3 متناقض است. چگالی تفضلی توزیع شده به IF3 در یک مطالعه cryoEM در سمت واسطه پلت فرم و گردنه 30S واقع شد (McCutcheon و همکاران 1999). تمام چگالی تفضلی و موقعیت مفروض حوزه ترمینال C (اما نه ترمینال N) با نتایج به دست آمده اخیر از داده های رادیکال هیدروکسیل تقسیمی سازگار هستند (Dallas and Noller, 2001). این موقعیت، یک توضیح مستقیم را برای نقش IF3 در جلوگیری از ارتباط زیرواحد فراهم می کند، زیرا سمت واسطه پلت فرم در تماس های در تماس های گسترده با زیرواحد 50S درگیر می شود. هرچند، نگاشت های تفضلی فوریه از بلورشناسی اشعه در کریستال های زیرواحد 30S خیسانده شده با حوزه ترمینال C از IF3 نشان داد که این حوزه در سمت مخالف پلت فرم، دور از واسطه قرار دارد (Pioletti et al., 2001). این مورد دلالت بر این دارد که اثر آن روی ارتباط زیرواحد، غیرمستقیم، سازگار با برخی داده های اخیر بیوشیمیایی است (Petrelli و همکاران 2001). نتیجه بلورشناسی مشخص نیست زیرا محل اتصال IF3 نشان داده شده توسط cryoEM و ردپا با تماس های بسته بندی شبکه ای در این شکل بلور مسدود شده است، به طوریکه موقعیت تعیین شده از نظر بلور شناسی می تواند یک محل اتصال غیرمشخص باشد. بلوری شدن همزمان یک ترکیب از IF3 با زیرواحد 30S باید برای حل و فصل این سوال بدون ابهام انجام شود. هیچ موقعیت مستقیمی از IF2 تعیین نشده است، اما چون اتصال امینواسیل از tRNA راه انداز در محل P و تعامل با IF1 شناخته شده است، یک مدل می تواند پیشنهاد شود که در آن روی IF1 در محل A وصل می شود (Rollmeca و همکاران 2000). به علاوه، حوزه GTPase در مجاورت عامل اتصال محل 50S زیرواحد اتصال پیدا می کند که در آن حوزه های متناظر از عوامل طویل شدن G و Tu (EF-G و EF-Tu) متصل می شوند، زیرا ردپای برخی از باقیمانده های یکسان در 23S RNA شناخته شده است (La Teana و همکاران 2001).

زمانی که ترکیب داده های بیوشیمیایی و ساختاری کنونی صورت می گیرد، یک دیدگاه پدیدار می شود که در آن IF1 در محل A متصل می شود، IF2 روی محل A متصل می شود، محل P توسط راه اندازه tRAN اشغال می شود و IF3 محل E را اشغال می کند (شکل 2b). بنابراین تمام محل های tRAN در مجموعه راه اندازی، با فرض تنظیم

تطابق درست 30S برای راه اندازی سنتز پروتئین اشغال می شوند. هرچند، این مورد تعدادی از سوالات را مطرح می کند. چرا تمام محل های اتصال tRNA باید اشغال شوند؟ چگونه IF3 ترجیحاً tRNA های طویل کننده را ناپایدار می کند؟ اگر فعالیت GTPase از IF2 برای اتصال tRNA محل P یا برای آزادسازی IF2 نیاز شود (Tomsic و همکاران)، نقش آن چیست؟ چه زمانی که زیر واحد 50S با مجموعه راه اندازی مرتبط می شود؟ در نهایت، برخلاف کارهای انجام شده در طول این سال ها، نظمی که در آن عوامل متصل می شوند و در محیط آزمایشگاهی آزادسازی می شوند و آنچه آنها باید با تطبیق ریبوزوم انجام دهند، به طور قطع مشخص نشده است.

### مروری کلی بر چرخه طویل شدن

انتهای فرآیند راه اندازی، یک راه انداز tRNA آمینو اسیلاته شده را در محل P ریبوزوم و یک محل خالی A را بر جای می گذارد که برای آغاز شدن چرخه طویل شدن به کارگیری می شود.



شکل 2. ساختار و تعامل از شروع عوامل با زیر واحد 30S ساختار IF1 (Sette و همکاران 1997)، IF2 (Mecak و همکاران، 2000)، و IF3 (Biou و همکاران، 1995) همراه با مکان خود را در نشان داده شده است زیر واحد 30S. ساختار بلوری پیچیده 30S-IF1 (30) (همکاران، 2001) است که با جهت گیری تقریبی IF3 به



دست آمده از نشان داده شده است داده ها رخ هیدروکسیل رادیکال (دالاس و Noller، 2001)، در حالی که تعامل از IF2 ها نشان داد. محل P- (آغازگر) tRNA (قرمز) و mRNA ژن (زرد) مشتق شده از ساختار S70 در شکل 1 می باشد.

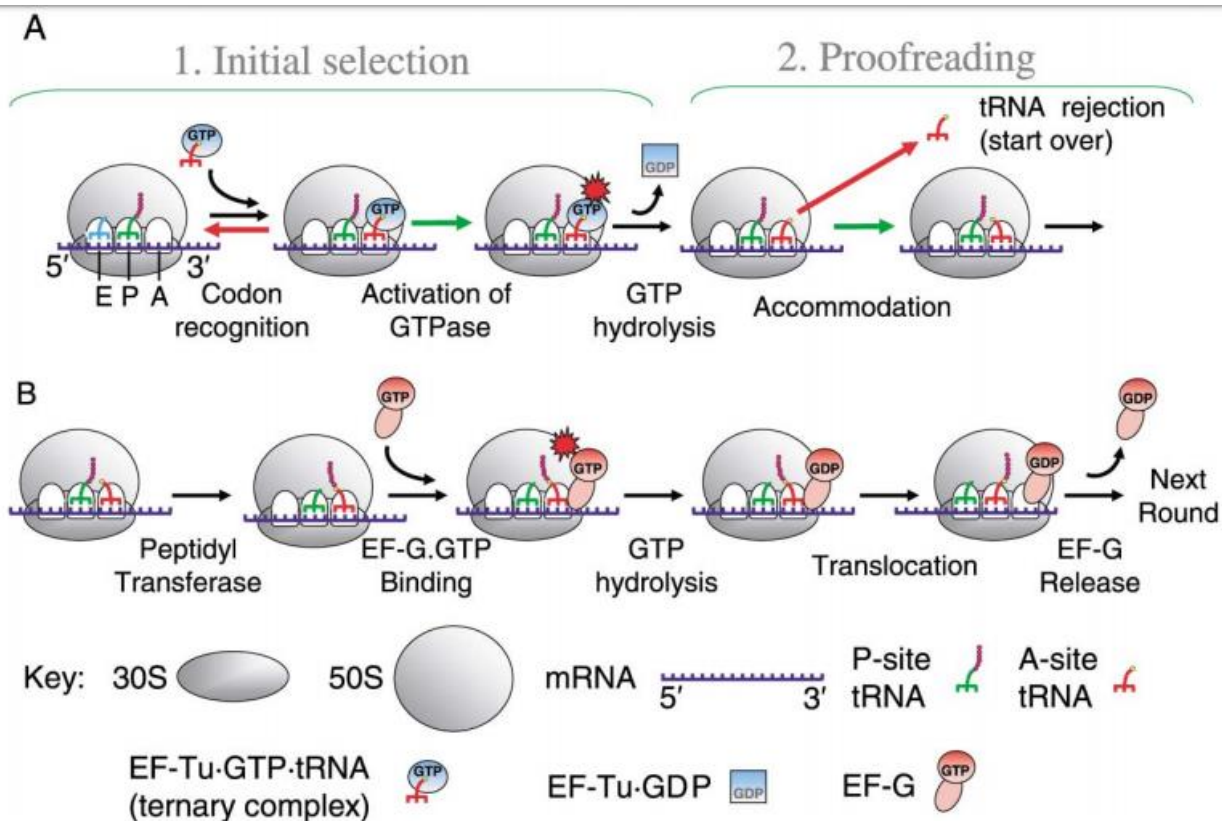
یک طرح کلی چرخه طویل شدن در شکل 3 نشان داده شده است. به طور خلاصه، آمینو استیله شده tRNA به محل A به صورت یک مجموعه سه تایی با tu-EF و GTP آورده می شود. فعل و انفعالات آنتی کدون-کدون منجر به تغییرات تطبیقی در ریبوزوم می شود که به اتصال tRNA و تحریک هیدرولیز GTP توسط Tu-EF ثبات می بخشد. این منجر به انتشار انتهای آمینو اسیل از A-محل tRNA توسط Tu-EF می شود؛ سپس tRNA به محل ترانسفراز پپتیدیل از زیر واحد S50 در یک فرآیند به نام اقامت، نوسان می کند. تشکیل پیوند پپتید، که شامل دی استیله شدن tRNA محل P و انتقال زنجیره پپتید به tRNA محل A می شود، لزوماً خود به خودی است. بعد از ترانسفراز پپتیدیل، ریبوزوم دارای یک tRNA دی استیله شده در محل P و tRNA پپتیدیل در محل A است. جابجایی tRNA ها و mRNA با EF-G تسهیل می شود که یک GTPase است. نتیجه یک ریبوزوم آماده برای راند بعدی طویل شدن با tRNA دی استیله شده در محل E، tRNA پپتیدیل در محل P و یک محل A خالی است که برای دریافت ترکیب سومی بعدی هم جنس، آماده است.

### کدگشایی

جفت شدن باز بین کدون در mRNA و آنتی کدون در tRNA، پایه نهایی برای انتخاب tRNA صحیح برای مشارکت در اضافه شدن یک آمینو اسید جدید به زنجیره پلی پپتید در حال رشد است. هرچند، تفاوت انرژی در جفت شدن باز tRNA هم جنس، که دارای تطبیق کامل با کدون و tRNA نزدیک به هم جنس است، که به طور کلی تنها دارای یک عدم تطابق تک است، برای در نظر گرفتن دقت انتخاب بسیار کم است که دارای نرخ خطای ... است. به طور مثال، انرژی آزاد برای تشکیل یک جفت باز GU غیرمرکزی در اولین موقعیت باید بسیار شبیه به جفت AU باشد، هرچند ریبوزوم قادر به تمایز قائل شدن دقیق بین این دو مورد است. علاوه بر این، از جفت شدن باز به

تنهایی، تعامل بین کدون UUU فنیلالانین و آنتی کدون GAA از tRNA باید واقعاً از جفت شدن ناصحیح بین کدون سرین UGC و آنتی کدون GCG برای tRNA کمتر پایدار باشد، زیرا جفت های قوی تر GC در مورد آخر باید بیشتر برای جفت غیرکانونی GU در اولین موقعیت جبران شود. هنوز ریبوزوم به شدت، یک tRNA صحیح را به یک tRNA غیر صحیح ترجیح می دهد.

باز و مبنای انتخاب ریبوزوم چیست؟ پیشنهاد شده است که ریبوزوم دارای یک محل کدگشایی است که هندسه جفت باز آنتی کدون-کدون را می شناسد و در برابر عدم تطبیقات مشخص می شود، بیشتر به گونه ای که آنزیم در مقابل یک زیرلایه مشخص می شود که تقریباً صحیح است (Davise et al, 1964; Potapov, 1982). در یک دیدگاه ثانویه که اغلب تصحیح جنبشی نامیده می شود، این دقت از تقسیم مرحله انتخاب به انتخاب اولیه و مرحله تصحیح می آید (Hopfield, 1974; Ninio, 1975)، که توسط یک مرحله غیرقابل عکس شدن جداسازی می شوند، مانند هیدرولیز GTP توسط EF-TU. در این طرح، tRNA دارای دو شانس برای قطع ارتباط (فلش های قرمز در شکل 3) در زمان انتخاب اولیه و بعد از هیدرولیز است. اما چون غلظت سلولی tRNA آمینو اسیل آزاد کم است، tRNA تنها می تواند در آغاز دنباله، به عنوان بخشی از ترکیب سه گانه وارد ریبوزوم شود و باید از طریق دنباله کلی برای پیش بینی ترانسفراز پپتیدیل، متصل باقی بماند.



شکل 3 مروری کلی بر مسیر طولی شدن

برای سادگی، تمام مراحل مشخص شده در آزمایشات جنبشی نشان داده شده اند.

به لحاظ نظری، این فرآیند منجر به این انتخاب می شود که محصول انتخاب در هر مرحله است. اما در عمل، نرخ نسبی واکنش مستقیم و نرخ عدم ارتباط tRNA در هر مرحله تعیین می کند که چقدر انتخاب می تواند استفاده شود. هرچند شناخت اولیه و تصحیح جنبشی اغلب به عنوان دو امکان متمایز تصور می شوند، کارهای اخیر (زیر را ببینید) نشان می دهد که آنها تقریباً به طور مشخص کار هماهنگی هستند. احتمالش کم است که تمایز انرژی ذاتی در جفت شدن باز به تنها بتواند برای دقت سنتز پروتئین حتی با تصحیح جنبشی در نظر گرفته شود.

آزمایشات جنبشی پیش از حالت پایدار، فرآیند انتخاب را تشریح نموده اند (Pape et al 1999). یک نتیجه چشمگیر از این مطالعات اینست که علاوه بر داشتن نرخ های عدم ارتباط کمتر، tRNA هم جنس دارای نرخ های ارسال سریع تر برای فعالسازی GTPase و تطبیق نسبت به tRNA نزدیک به هم جنس است (فلش های سبز در شکل 3). بر اساس این نتیجه، پیشنهاد شد که tRNA هم جنس، یک تغییر تطبیقی را در ریبوزوم القا می کند. یک

تغییر القایی تطبیقی نیز، ویژگی سه مدل محل است (Nierhaus, 1990). در این مدل، پیوستگی های tRNAهای محل E و A به طور متقابل جفت می شوند. در حضور tRNA محل E، تنها ترکیب سه گانه هم جنس دارای پیوستگی کافی برای محل A برای القای یک تغییر تطبیقی در ریبوزوم روی پیوند است که منجر به آزادسازی tRNA محل E می شود.

سه باز حفظ شده کلی S RNA—G53016، A1492 و A1493، توسط tRNA محل A ردیابی می شوند (Moazed and Noller, 1986) و برای دوام در E.Coli نیاز می شوند. ( Powers and Noller, 1994 ) (Yoshizawa et al., 1999). A1492 و A1493 در یک حلقه داخلی برای مارپیچ 44 در 16S RNA قرار می گیرد که محل اتصال برای آمینو گلیکوسیدها مانند پارومومیسین است که سبب سطوح افزایش یافته از ترکیب آمینواسیدها از tRNA نزدیک به هم جنس می شود. آزمایشات بیوشیمیایی نیز نشاندهنده یک تعامل مستقیم از N1 در این آدنین ها با 2' OH برای mRNA است (Yoshizawa et al., 1999)، اما همانطور که در زیر نشان داده شده است، این توسط داده های ساختاری اخیر متحمل شده است. یک ساختار NMR از یک تکه RNA از یک مارپیچ 44 با پارومومیسین نشان داد که آنتی بیوتیک یک تطابق ریبوزوم را القا می کند که از شکل مرزی tRNA تقلید می کند (Fourmy et al., 1996)، در حالیکه آزمایشات جنبشی نشان داد که پارومومیسین، پیوستگی و نرخ فعالیت GTPase را برای tRNA نزدیک به هم جنس افزایش می دهد (Pape و همکاران، 2000)، هرچند، تا همین اواخر، اساس ساختاری برای شناخت tRNA هم جنس توسط ریبوزوم، نامشخص بود.

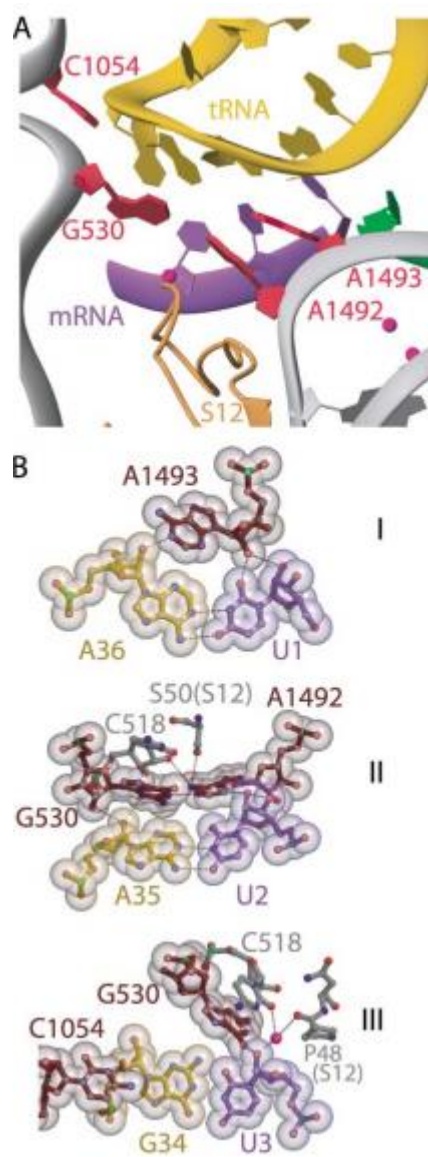
در ساختار کریستالی 30S در ترکیب با آنتی بیوتیک ها (Carter و همکاران 2000)، پارومومیسین، به حلقه داخلی مارپیچ 44 تقریباً در توافق با ساختار اولیه NMR اتصال یافت (Fourmy و همکاران، 1996). هرچند، به جای جابجایی میانه در شیار آینه همانند ساختار NMR، A1492 و A1493 به طور کامل خارج از مارپیچ بودند به طوری که آنها در موقعیت تعامل مستقیم با شیار کمینه مارپیچ کدون-آنتی کدون در محل A قرار گرفتند. پیشنهاد شد که اتصال tRNA هم جنس، یک فلپ مشابه را در این پایه های القا می کند که هیدروژن را با دو رشته از شیار کمینه مارپیچ کدون-آنتی کدون به روشی پیوند می دهد که حساس به جفت شدن باز Watson-Crick خواهد بود.

چنین تعاملات سه گانه ای از آدنین های ذخیره شده در شیارهای کمینه برای مارپیچ های مجاوز، در هر جایی در ساختار 16S RNA دیده می شود. این ایده ها در ساختار اخیر زیرواحد 30S در ترکیب با الیگونوکولئوتید برای mRNA و حلقه بنیادی آنتی کدون از tRNA هم جنس آزمایش شده است. (Ogle و همکاران 2001). این ساختار نشان می دهد که پیوند tRNA هم جنس، یک تغییر تطابقی را در A1492 و A1493 القا می کند، اما به طور غیرقابل انتظار، سبب یک فلیپ G530 از یک سین به یک غیرتطابقی می شود. (شکل 4). نتیجه اینست که A1493 با شیار کمینه در اولین جفت پایه کدون-آنتی کدون برای تشکیل مایه اصلی کمی نوع A I یافت شده در هر جایی دیگر در تعاملات سه گانه در ساختارهای RNA بزرگ تعامل دارد. (Nissen, Doherty et al., 2001, et al., 2001). A1492 و G530 به شدت در دومین جفت باز از مارپیچ کدون-آنتی کدون بسته بندی شده اند. برخلاف دو جفت اول، جفت باز سوم بین کدون و آنتی کدون تقریباً توسط ریبوزوم نظارت نمی شود. فساد کد ژنتیک در موقعیت سوم در اصل منجر به فرضیه تکان خوردن شد که همان tRNA می تواند کدون هایی را بشناسید که در موقعیت سوم با جفت باز سوم که اغلب شامل جفت های باز معین غیرکانونی است تفاوت دارند مانند (Nissen et al., 2001, Crick, 1966). سازگار با این مورد، این ساختار نشان می دهد که ریبوزوم، بر جفت باز در دو موقعیت اول نظارت می کند اما قادر به تحمل جفت های باز غیرکانونی مانند یک جفت باز GU است که ریبوزوم نقشی اصلی را در انتخاب tRNA توسط شناخت مستقیم هندسه جفت شدن باز کدون-آنتی کدون ایفا می کند.

### نقش EF-Tu

هرچند این کار حیاتی است، شناخت ساختاری جفت شدن باز کدون-آنتی کدون تنها به جنبه فرایند کدگشایی می پردازد. در ترجمه، انتخاب tRNA با اتصال ترکیب سه گانه EF-Tu آغاز می شود که tRNA را به محل کدگشایی در زاویه ای بسیار متفاوت نشان می دهد (Nissen et al., 2001)، همانطور که در شکل 7B دیده می شود. داده های زیرنویس نشان می دهند که همین سه پایه توسط tRNA محل A، صرفه نظر از اینکه آیا ترکیب سه گانه یا

tRNA به تنهایی محدود است، جایگذاری می شوند (Powers و Noller 1994). این نشان می دهد که انتخاب اولیه شامل همان مد شناخت توسط این پایه ها می شود، اما آنها باید در چرخاندن با آنتی کدون tRNA توانمند باشند، زمانی که به محل ترانسفراز پپتیدیل بعد از آزادسازی توسط EF-Tu می چرخد. بررسی این ساختار نشان می دهد که چنین تغییری در جهت گیری پایه ها ممکن است، اما یک ساختار با تفکیک بالا برای ترکیب سه گانه EF-Tu محدود به ریبوزوم 70S برای حل و فصل این مسئله نیاز می شود. دومین و سوال مشکل تر اینست که چگونه شناخت کدون-آنتی کدون، هیدرولیز GTP را توسط EF-Tu تحریک می کند. این مرحله نیاز به انتقال یک سیگنال از محل کدگشایی در زیرواحد 30S دارد که در آن تعاملات کدون-آنتی کدون برای زیرواحد 50S شناخته می شوند که در آن حوزه GTPase از EF-Tu متصل می شود. چنین سیگنالی می تواند نه تنها از طریق ریبوزوم بلکه از طریق خود tRNA انتقال یابد، زیرا tRNA سالم برای این فرآیند نیاز می شود (Piepenburg و همکاران 2000). ماهیت انتقال سیگنال، و اینکه دقیقاً چگونه این منجر به فعالسازی هیدرولیز GTP می شود، هر دو، سوالی سخت بوده اند. در حضور کیرومیسین، EF-Tu قادر به هیدرولیز GTP است اما tRNA را آزاد می کند یا از ریبوزوم جدا می شود. در حضور آئورودوکس (مرتبط با کیرومیسین) و GDP، ساختار EF-Tu مشابه با ترکیب آن با GTP است، به جای GDP، که نشاندهنده اینست که کیرومومسین احتمالاً از تغییر تطبیقی در EF-Tu روی هیدرولیز GTP جلوگیری می کند (Vogele et al., 2001). این نشان می دهد که ساختار ترکیب کیرومیسین-پرور شده از EF-Tu با ریبوزوم (Stark et al 1997) یک بعد از هیدرولیز GTP است اما قبل از جاسازی.



شکل 4. شناخت تعاملات کدون-آنتی کدون توسط ریبوزوم

(A) کارتون سایت رمزگشایی از زیر واحد S30، نشان از کدون-A محل (آبی رنگ) و tRNA آنتی کدون ساقه حلقه (طلا). پایگاه های انتقادی از S RNA 16 که به پیچیده tRNA از mRNA متصل به رنگ قرمز نشان داده شده است. حوزه های قرمز احتمالا یون منیزیم است.

(B) اطلاعات شناختن شیار کوچک در اول (I)، دوم (II)، و سوم (III) جفت باز بین کدون و آنتی کدون. ارقام با

کسب اجازه از Ogle و همکاران تکثیر شده است. (2001).

در مدت جاسازی یا مرحله تصحیح، tRNA دارای شانس دومی برای قطع ارتباط است. تجزیه تحلیل ژنتیک نشان می دهد که مارپیچ 27 از 16S RNA می تواند، ریبوزوم را از یک حالت بسیار دقیق سویچ نماید که پیوستگی را برای tRNA به یک حالت مجاز کاهش می دهد دارای پیوستگی بیشتری برای tRNA است (Lodmell and Dahlberg, 1997). تغییراتی که ترجیحاً یک یا دیگر اشکال را پایدار می کند، دارای تطابقات مجزا به نظر می رسد (Gabashvili و همکاران). هرچند، این ناحیه عمدتاً محافظت شده است، تغییرات مشابه در مارپیچ 27 در یک سیستم یوکاریوتی یک فنوتیپ ram را نشان نمی دهد بلکه دقت را افزایش می دهد (Velichutina et al., 2000).

یک واسطه گسترده در زیرواحد 30S بین حوزه های شانه و پلت فرم تشکیل می شود. تغییراتی که یک انتهای واسطه را ناپایدار می کنند، مانند تقابلات ram در S4 و S5، منجر به فنوتیپ مستعد در خطا می شوند، در حالیکه تقابلاتی که دیگر انتها را ناپایدار می کنند، مانند S12 یا در مارپیچ 27 (Lodmell and Dahlberg, 1997; Velichutina et al., 2000)، منجر به فنوتیپ با دقت بسیار بالا می شوند. در مقابل، به نظر می رسد انتی بیوتیکی بفرمول C21 H39 N7 o12، نرخ فنوتیپ خطای فزاینده را پایداری می کند. تمام اینها نشان می دهد که حرکت نسبی دو حوزه در مرحله جاسازی یا تصحیح درگیر می شود و اینکه طول عمر حالات مختلف و مانع فعالسازی در مدت فرآیند در دقت سهم دارد. هرچند، نه تنها ما نمی دانیم که ماهیت تغییرات ساختاری مرتبط چیست، بلکه حتی نمی دانیم که در چه جایی ram مفروض و حالات محدودکننده روی مسیر جنبشی قرار می گیرند. علاوه بر داده های ساختار با تفکیک بالا در مورد حالات مختلف، اندازه گیری انرژی جنبشی برای تقابلات مختلف در حضور و غیاب انتی بیوتیکی بفرمول C21 H39 N7 o12 و مرتبط نمودن آن با داده های ساختاری مهم خواهد بود.

### ترانسفراز پپتیدیل

زمانی که انتهای آمینو اسیل از tRNA در محل A وارد مرکز ترانسفراز پپتیدیل می شود، تشکیل پیوند پپتید به سرعت و به طور لحظه ای رخ می دهد ((Pape et al., 1998)). برای یک زمان طولانی، تصور می شود که



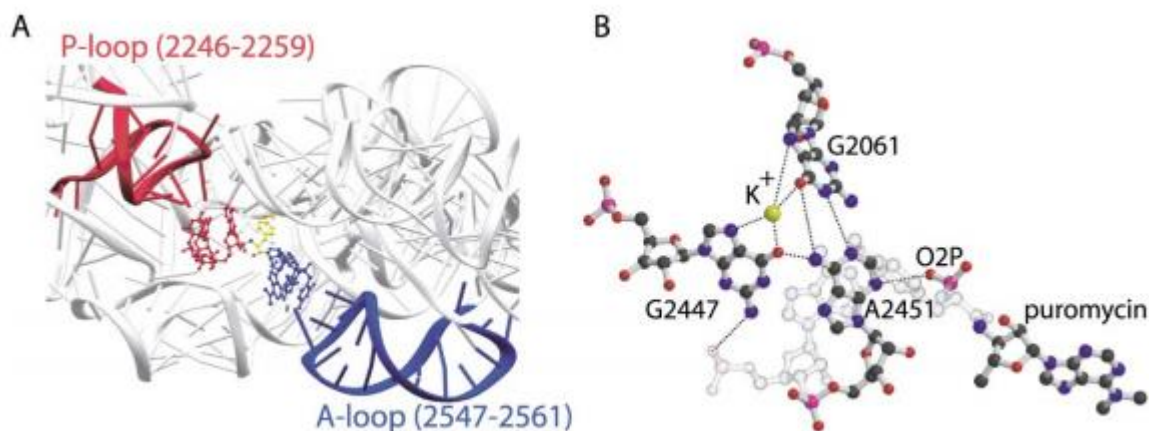
اسیدهای نوکلئیک در کاتالیز نمودن توانمند نیستند، بنابراین این نکته که RNA ریبوزومی می تواند ترانسفراز پپتیدیل را کاتالیز نماید، به طور جدی برخلاف اشارات مخالف آن، اتخاذ نمی شود. این کار اکتشاف RNA کاتالیتیک را تغییر داد (Zaug et al., 1982; Kruger et al., 1983) و شواهد بیوشیمیایی برای نقش 23S RNA در ترانسفراز پپتیدیل شروع به تجمع نمود (بازنگری شده در Green and Noller, 1997). در قابل توجه ترین این آزمایشات، زیرواحدهای 50S از *Thermus aquaticus* با فنول بعد از پرداخت با پروتئین K در حضور SDS استخراج شد و بیشتر فعالیت ترانسفراز پپتیدیل آنها حتی بعد از دست دادن بیش از 80٪ ترکیب پروتئین حفظ شد که به شدت یک نقش کاتالیزوری را برای RNA نشان می دهد (Noller et al., 1992). هرچند، حتی بعد از چنین پرداخت سختی، زیرواحدهای 50S برخی از پروتئین ها و تکه های پپتید را حفظ نمودند (Khaitovich et al., 1999)؛ در میان اینها، L2 و L3 قرار داشت، پروتئین هایی که قبلاً در میان پروتئین های مورد نیاز برای بازسازی فعالیت ترانسفراز پپتیدیل نشان داده شدند (Hampl و همکاران، 1981). حذف کامل پروتئین ها می تواند تنها تحت شرایط زیر انجام شود که RNA جدا شود و منجر به افت فعالیت ترانسفراز پپتیدیل می شود. بنابراین در این مطالعات بیوشیمیایی مختلف، یک نقش کاتالیزوری قطعی برای RNA نمی تواند ایجاد شود.

بنابراین، ساختارهای بلوری با تفکیک بالا از زیرواحد 50S و ترکیب آن با ممانعت کننده قوی ترانسفراز پپتیدیل به نام ممانعت کننده Yarus نشاندهنده یک پیشروی عمده بود (Ban et al., 2000; Nissen et al., 2000). در بسیاری ملاحظات، ممانعت کننده Yarus، C-C-dA-phosphoramidate-puromycin، از یک حالت گذار آنالوگ تقلید می کند (Welch et al., 1995)، برنایان موقعیت آن، محل ترانسفراز پپتیدیل را تعریف می کند. یک نتیجه غیرمبهم فوری از این ساختار اینست که هیچ قسمت پروتئین قابل مشاهده در حدود 18A از این محل وجود ندارد. همطور که برخی اوقات انتظار می ورد. ریبوزوم یک ریبوزوم است.

بر اساس این ترکیب با ممانعت کننده Yarus و آنالوگ زیرلایه محل A، تعداد سهم ممکن برای کاتالیز که دارای همتهایی در آنزیم های پروتئین است پیشنهاد شد (Nissen et al., 2000)، انتقال پپتیدیل از نظری انرژی یک واکنش رو به پایین است و همانطور که برای مدت طولانی برای آنزیم ها نشان داده شده است، پیشنهاد شد که یک

ارتقای کاتالیزوری مناسب برای ترانسفراز پپتیدیل می تواند تنها از جهت گیری دقیق زیرلایه ها بیاید (Nierhaus et al., 1980). در توافق با کار اولیه بیوشیمیایی (بازنگری شده 1997 Green and Noller)، این ساختارها نشان می دهند که ریبوزوم دقیقاً انتهای CCA از tRNAهای محل P و A را از طریق تعامل با حلقه های A و P عمدتاً حفظ شده به ترتیب برای 23S RNA (شکل 5a) موقعیت یابی می کند. منبع ثانویه از کاتالیز نشان داده شده توسط ترکیب ممانعت کننده Yarus، پایداری حالت گذار است. منبع سوم از ارتقای کاتالیزوری، برای درگیری مشارکت مستقیم دو باقیمانده A2451 and G2447 در کاتالیز نمودن باز-اسید پیشنهاد شد. در این ساختار، N3 از A2451 به صورت 3A دورتر یافت شد و هیدروژن متصل به آن، یکی از اکسیژن های فسفیرامید گیرپل برای ممانعت کننده Yarus است (شکل 5b). این مورد نیاز به این دارد که N3 از A2451 پروتون دار شود که منجر به این پیشنهاد می شود که می توان یک پروتون را از گروه آمینو برای amino acyl tRNA حذف نمود و آن را به گروه OH 2' از tRNA پپتیدیل داد. پروتئین N3 از A2451 نیاز به pKa به طور غیرمعمول بالای پیشنهاد شده به صورت تسهیل شده توسط شبکه رله-شارژ دارد که G2447 را درگیر می کند. وابستگی pH از آزمایشات اصلاح سولفات دی متیل (DMS)، چنین pKa ارتقا یافته برای N3 را از A2451 پیشنهاد داد.

اخیراً تعدادی از آزمایشات در مورد نقش مستقیم برای این بازها در انتقال پپتیدیل سوال نموده است. وابستگی pH برای اصلاح DMS از A2451 که در بالا ذکر شده است تنها در زیرواحدهای E.Coli 50S در یک تطابق غیرفعال رخ می دهد (Bayfield et al., 2001). علاوه بر این، این اصلاح احتمالاً در N1 رخ می دهد نه موقعیت N3. و بنابراین تطابق آدنین را تحریک می کند نه حالت پروتون دار شدن در اتم N3 ان (Muth et al., 2001). دو گزارش نشان می دهد که ریبوزوم ها که در ان A2451 و G2447 به دیگر باقیمانده در تقابل هستند، در ترانسفراز پپتیدیل فعال هستند (Polacek et al., 2001; Thompson et al., 2001). هرچند، N3 از گوانین یا O2 از پیریمیدین ها می توانند نقشی مشابه مانند N3 یا A2451 را داشته باشند، بنابراین داده های متقابل نمی توانند به عنوان نتیجه در نظر گرفته شوند. داده های ساختاری برای دیدن این مورد بسیار مفید خواهند بود که آیا ویژگی های پیشنهاد شده که برای کاتالیز نمودن ضروری هستند واقعاً در تقابل های در هم گسیخته می شوند یا خیر.



شکل 5. نقش ریبوزوم در پپتیدیل انتقال

(A) مرکز peptidyl ترانسفراز در ساختار زیر واحد S50 از *Haloarcula marismortui* از همکاران، (2000). حلقه P و یک حلقه از S RNA23 در قرمز و آبی نشان داده شده است. مختصات از مهار کننده Yarus (ولش و همکاران، 1995) با کسانی که از ترکیب شده است

بستر A-سایت برای نشان دادن CCA به ترتیب از P- و A-tRNA های سایت به رنگ قرمز و آبی.

(B) اطلاعات از تعامل از پایگاه های کلیدی S RNA23 با مهار کننده Yarus (به متن مراجعه کنید).

مرکز ترانسفراز پپتیدیل در ساختار *D. radio durans* 50S بسیار شباهه با *Haloarcula* 50S است، اما تفاوت هایی در جهت گیری بازهای کلیدی، شامل A2451 وجود دارد که می تواند از نظر وظیفه ای چشمگیر باشد (Harms et al, 2001). از طرف دیگر، در تمام ساختارهای محصول/زیرلایه برای زیر واحد *Haloarcula* 50S به دست آمده تا به حال (Nissen et al., 2000, Schmeing et al 2002)، A2451 حیاتی در همان موقعیت است و این موقعیت سازگار با پیوند هیدروژن آن به زیرلایه ها از طریق N3 آن است. به علاوه، فعالیت ترانسفراز پپتیدیل را می توان در خود کریستال نشان داد (Schmeing et al., 2002). نهایتاً، تقابلات A2451 به فنوتیپ غالب-مهلک منجر می شود (Thompson و همکاران 2001)، بنابراین حتی اگر نقش دقیق آن به عنوان یک مورد قابل بحث باقی مانده باشد، برای ترجمه حیاتی است.

در حالیکه بحث در مورد جزئیات مکانیزم کاتالیزوری هنوز ادامه دارد، این مورد متحیرکننده است که به چه سرعت و چشمگیری، ساختاری زیرواحد 50S، مطالعه ترانسفراز پپتیدیل را تغییر داده است. به جای بحث در مورد سوالات گسترده مانند اینکه RNA یا پروتئین، کاتالیزور هستند و کدام بخش های ریبوزوم درگیر می شوند، مطالعه جدید شامل نوعی تجزیه تحلیل مکانیزمی می شود که برای آنزیم های کوچک مانند پروتئاز سرین اعمال می شود. هرچند، دیدن این مورد هشیارانه است که یک واسطه کووالانس در عمل لیسوزیم که امسال نشان داده شده است (Vocadlo et al., 2001)، حدود 35 سال بعد از ساختار آنزیم تعیین شده است.

### جابجاشدگی

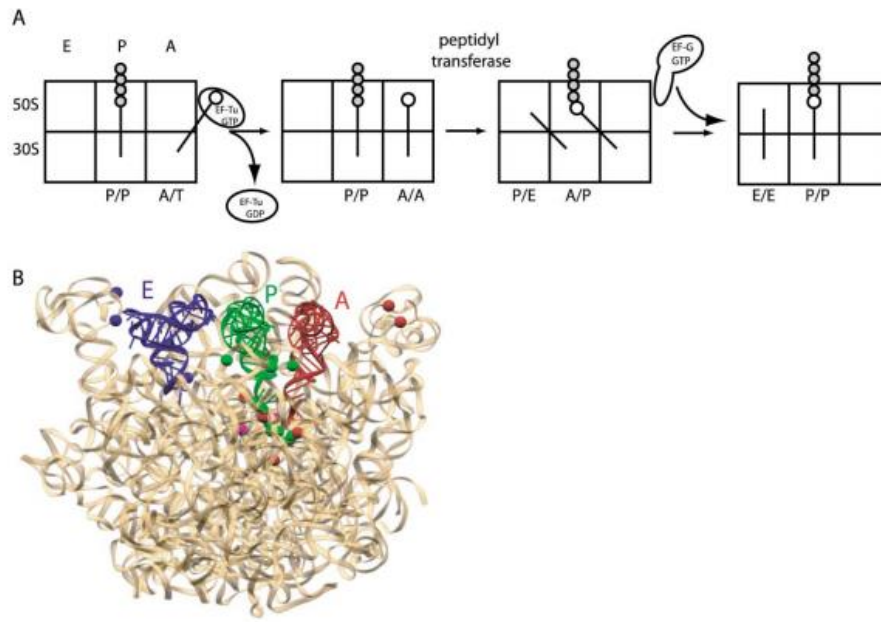
بعد از ترانسفراز پپتیدیل، tRNA محل P دی استیله می شود و tRNA محل A دارای یک زنجیره پپتیدی می شود که دارای یک باقیمانده اضافی است. برای آماده سازی ریبوزوم برای یک راند جدید از طویل شدن زنجیره پپتید، tRNAها باید حرکت کنند: tRNA دی استیله شده باید از محل P به محل E حرکت کنند و نهایتاً از ریبوزوم بیرون بیایند، در حالیکه tRNA پپتیدیل باید از محل A به محل P حرکت نماید. علاوه بر این، این حرکت باید دقیق باشد و چارچوب خواندن روی mRNA باید ذخیره شود.

### مدل هایی برای جابجاشدگی

پیشنهاد شده بود که جابجاشدگی شامل یک حرکت نسبی از دو زیرواحد می شود و ممکن است در مراحل جداگانه نسبت به زیرواحدهای 50S و 30S رخ دهد (Bretcher, 1968). این منجر به حالات هیبریدی از مولکول های tRNA می شود که در محل A از 30S و محل P از 50S محدود خواهد بود. این مدل دارای این مزیت است که تنها یک انتهای ترکیب tRNA-mRNA باید در هر مرحله حرکت کند، در حالیکه دیگر انتهای ثابت به عنوان یک لنگر باقی بماند. این مورد همچنین وجود کلی دو زیرواحد را در تمام نمونه ها استدلال می کند. چون این مقاله به طور کلی نظری بوده است، هیچ شواهدی برای این مورد وجود ندارد که آیا این حرکت ابتدا نسبت به زیرواحد 30S رخ داده است یا 50S. علاوه بر این، در زمانی که این مدل پیشنهاد شده بود، محل E کشف نشده بود. اخیراً یک

حرکت نسبی بین زیرواحدهای توسط مقایسه اشکال آزاد و محدودی EF-G برای ریبوزوم استنباط شد. ( Frank and Agrawal, 2000).

شواهد آزمایشگاهی برای ماهیت حرکت tRNA در مدت جابجاشدگی باید منتظر توسعه تکنیک های ردپاگذاری باز برای ریبوزوم باقی بماند که پیشتر این مورد Noller و همکارانش هستند. در یک مقاله برجسته، ردپاهای مشخصه tRNA در هر محل برای دنبال نمودن حرکت tRNA از طریق چرخه طویل شدن استفاده شد (شکل 6) (Moazed and Noller, 1989). زمانی که پورومیسین (یک تقلید از آمینواسیل tRNA در محل A) به ریبوزوم ها با یک tRNA آمینو استیله در محل P اضافه می شود، جای پای tRNA روی 50S محو می شود و با یک جای پای محل E جایگزین می شود، در حالیکه جای پا در زیرواحد 30S بدون تغییر باقی می ماند که نشان دهد tRNA در یک حالت هیبریدی P/E است. تا زمانی که tRNA محل A درگیر است، اولاً یک هیبرید A/T وجود دارد که نشاندهنده محدودیت ترکیب سه گانه به محل A به ریبوزوم است که در آن انتهای آمینواسیل از tRNA به EF-Tu متصل می شود. در آزادسازی توسط EF-Tu، بازوی پذیرنده tRNA به محل ترانسفراز پپتیدیل از 50S نوسان می کند که نتیجه آن، جای پای مشخصه tRNA در حالت غیرهیبریدی A/A است. هرچند، بعد از ترانسفراز پپتیدیل، tRNAها روی محل های P و A مورد نظر روی زیرواحد 30S اثر خود را می گذارد، اما بازوی پذیرنده آنها به محل های E و P روی زیرواحد 50S حرکت می کند که سازگار با حالت هیبرید A/P و P/E برای tRNA است.



شکل 6. ترکیبی ایالات مدل برای جابجایی

(A) کارتون مدل ایالات ترکیبی از انتقال به عنوان معاضد و (Noller 1989) ارائه شده، اما در حال حاضر از جمله یک سایت E در زیر واحد S30.

(B) محل های E ، P ، و A-tRNA های در زیر واحد S50 از ساختار S 70 (Yusupov و همکاران، 2001)، نشان داده شده است به رنگ آبی، سبز و قرمز بود.

رد پای پایه از هر tRNA (Moazed و Noller، 1989) بر روی ساختار S70 نقشه برداری و نشان داده شده است به عنوان حوزه از رنگ مربوطه. دو حوزه های قرمز پایگاه های تحت تاثیر هر دو محل های A و P-tRNA می باشد. به طرز جالبی، این حالت با پورومیسین واکنش نشان نمی دهد، حتی اگر محل A 50S با یک tRNA پپتیدیل در محل S50 P خالی شود. بعد از جابجاشدگی توسط EF-G، نتیجه، یک محل خالی A است و tRNA در محل های P و E است. حرکات نسبی tRNA با توجه به هر زیرواحد در این مدل می تواند شامل حرکت یک زیرواحد نسبت به دیگری باشد همانطور که در cryoEM دیده می شود.

یک مدل جایگزین "α-ε" برای جابجاشدگی توسط Nierhaus و همکارانش پیشنهاد شده است (Spahn و Nierhaus 1998). با اندازه گیری حفاظت توسط ریبوزوم برای tRNA های فسفردار در مقابل تقسیمات با واسطه

ید، آنها به این نتیجه رسیدند که الگوی مشخصه حفاظت tRNAها در محل های A و P در مدت جابجاشدگی تغییر نمی کند (Dabrowski et al., 1998)، که نشان می دهد که تماس های ریبوزومی از tRNAها در محل های P و A در مدت جابجاشدگی تغییر نمی کند. این نشان می دهد که حوزه های قابل حرکت در ریبوزوم وجود دارد که tRNAها را از طریق ریبوزوم حمل و نقل می کند.

بازدید از این ایده ها در پرتوی ساختار کریستالی ریبوزوم 70S اطلاع دهنده است که دقیقاً، تماس های ریبوزومی از tRNAها را در محل های A، P و E تعریف می کند (Yusupov et al., 2001). یک مشاهده جالب اینست که محل E توسط tRNA درون زاد اشغال می شود که با ریبوزوم های استفاده شده برای بلوری سازی همزمان خالص سازی می شود که دلالت بر این دارد که از طریق رویه های گسترده خالص سازی، به طرز پایداری محدود به ریبوزوم باقی می ماند. جای پاهای کم باز که برای tRNA در محل E در زیرواحد 50S مشاهده می شود از تماس های مستقیم با آرنج آن یا انتهای CCA می آید. دو ویژگی محل E در ساختار کریستالی نیز به عدم قطعیت های قبلی می پردازد. ابتداً دیگر هیچ شکی وجود ندارد که زیرواحد 30S دارای یک محل E باشد. وجود آن قبلاً زیر سوال رفته است زیرا دارای یک جای پای باز روی 16S RNA نیست، بلکه مشخص است که به این علت که تمام تماس ها با 30S با ستون فقرات RNA S16 یا با پروتئین های S7 و S11 رخ می دهند (Yusupov et al., 2001). ثانیاً به نظر می رسد، tRNA محل E در ریبوزوم به واسطه ساقه L1 در 50S و پروتئین S7 در زیرواحد 30S قفل شود. جهت گیری های مختلف ساقه L1 در مطالعات cryoEM دیده شده است (Agrawal et al., 1999a). ساقه L1 دارای یک جهت گیری مختلف در ریبوزوم در مقایسه با زیرواحدهای 50S جدا شده است (Harms et al 2001)، که در آن tRNA محل E از جدا شدن بلوکه نمی شود که نشان می دهد که یک حرکت محوری در این ساقه ممکن است برای آزادسازی tRNA محل E نیاز شود. کار قبلی در E.Coli در مورد پایداری محل E tRNA متناقض بوده است، اما ساختار Thermus 70S از یک دیدگاه حمایت می کند که tRNA محل E به طور پایداری محدود می شود و نیاز به یک تغییر تطبیقی در ریبوزوم برای آزادسازی خود دارد، همانطور که در مدل سه محل allosteric نشان داده شده است (Nierhaus, 1990). این سوال که آیا تعامل کدون-آنتی کدون

در محل E در صورت نیاز رخ می دهد، توسط این مدل هنوز پاسخ داده نشده است. در ساختاری کریستالی، تنها یک جفت باز ممکن تک بین کدون و آنتی کدون وجود دارد، اما tRNA محل E در کریستال احتمالاً ترکیبی از tRNAهای درونزاد است نه یک tRNA هم جنس تک.

جای پاهای tRNA محل A و P روی زیرواحد 30S موافقت خوبی با جای پای باز و داده های ارتباطی متقابل دارد (Carter et al., 2000; Ogle et al., 2001; Yusu et al., 2001). در زیرواحد 50S، جای پاهای محل A و P مشخصه دارای یک توزیع فضایی هستند که همپوشانی دارد اما مجزا نیست، به طوری که آن جای پاها که از تماس مستقیم مانند یک حلقه A و P می آید باید از جای پاهایی متمایز شود که به طور ممکن نتیجه تغییرات تطابقی غیرمستقیم هستند. در حالیکه جای پاهای باز عمدتاً از انتهای CCA در tRNA می آیند، 50S نیز تماس ها را در سراسر بازوی پذیرنده و زانویی tRNAهای محل های A و P گسترده می سازد (به خصوص مورد آخر). به طرز جالبی، آنها شامل حلقه های بنیادی از 23S RNA می شوند که پل هایی را با زیرواحد 30S تشکیل می دهد که بسیاری از آنها در ساختار Haloarcula 50S مختل می شوند که نشان می دهد که آنها می توانند در مدت جابجاشدگی حرکت نمایند. این تماس ها، چون آنها شامل ستون فقرات 23S RNA و tRNA می شوند، نمی توانند توسط اندازه گیری حفاظت باز تحریک شوند. تماس های گسترده برای ریبوسام با tRNA نیز از حفاظت tRNA سفری شده در مقابل تقسیم یدی به صورت بحث شده قبلی استنباط می شوند (Dabrowski et al., 1998)، اما یک مقایسه نزدیک نشاندهنده اختلاف با تماس ها در ساختار کریستالی است.

چگونه این داده ها به مدل های مختلف برای جابجاشدگی می پردازد؟ ابتدا، حفاظت های باز محل 50S به طور کامل با این ساختار سازگار هستند. چون این حفاظت ها همراه با حفاظت های محل P 30S بعد از واکنش پورومسین دیده می شوند، این شواهدی قوی برای یک حالت ترکیبی P/E است. به طور عجیبی، عناصر انتهای 3' و tRNA محل P برای جابجاشدگی وابسته EF-G نیاز می شوند (Lill et al., 1989). این عناصر اخیراً به عنوان گروه های OH 2' در موقعیت های 71 و 76 تعریف می شوند (Feinberg and Joseph, 2001). این گروه ها تماسی با ریبوسام در محل P صورت نمی دهد، اما اگر tRNA به صورت یک ترکیب P/E حضور داشته باشند، آنها با



1892 و 2433-2434 در محل 23S RNA E تعامل خواهند داشت. بنابراین یک روش برای منطقی سازی نتیجه، با قیاس منطقی است که یک حالت ترکیبی P/E برای تابع EF-F نیاز می شود. این ممکن است به الزام آزادسازی پپتید و مفهوم یک tRNA دی استیله در یک حالت P/E برای تابع RF3 مرتبط باشد. (زیر را ببینید). از نظر ساختاری، یک حالت ترکیبی P/E برای tRNA دی استیله در محل P تحت برخی شرایط بافر دیده شده است (Agrawal et al., 1999b)، بلکه این حقیقت است که نمی توان هرگز شواهدی دید که بتواند در مدت جابجاشدگی رخ دهد.

این وضعیت با هیبرید A/P کمتر سراسر است. داده های حفاظت از باز که یک هیبرید A/P را قیاس منطقی می کند عمدتاً از انتهای CCA در tRNA می آید (شکل 6B). بنابراین، آنها به این سوال اساسی نمی پردازند که چگونه و چه زمانی تماس های گسترده ستون فقرات tRNA با ریبوسام شکسته می شوند و همانطور که از محل A به محل P می آید، دوباره شکل می گیرند. زمانبندی حرکت در زیرواحد 50S نیز مشخص نیست. یک ساختار cryoEM نشان می دهد که تنها یک جنبش مختصر در انتهای CCA به سمت محل P از محل A فوراً بعد از ترانسفرز پپتیدیل وجود دارد (Agrawal et al., 2000). مطالعات متقابل با انتهای 3' از tRNA محل P (Wower et al., 2000) نتیجه گرفت که حرکت به محل E فوراً از ترانسفرز پیروی نمی کند. نهایتاً، یک ساختار کریستالی اخیر 50S نشان می دهد که محصول بعد از ترانسفرز پپتیدیل محدود به حلقه A باقی می ماند (Schmeing et al., 2002). بنابراین، جابجاشدگی tRNAها در زیرواحد 50S ممکن است نیاز به برخی مراحل اضافی بعد از ترانسفرز پپتیدیل داشته باشد. در این ارتباط، جالب است که ریبوسام، بعد از ترانسفرز پپتیدیل، پورومسین واکنشی است، اما غیره، عمل EF-G می شود (Borowski et al., 1996).

اگر عدم قطعیت ها با جنبه های مدل حالت هیبریدی وجود داشته باشند، این برای دیگر امکانات صحیح است. اگر علاوه بر این یک ماشین جعبه ای قابل حرکت وجود داشته باشد که tRNAها را از طریق ریبوسام حمل و نقل نماید، همانطور که در مدل اپسیلون  $\alpha$  پیشنهاد شده است، شامل چه چیزی می شود؟ یک نماینده، ماریچ 44 در زیرواحد 30S است که برای در نظر گرفتن حرکت چشمگیر حول ناحیه محدودکننده tRNA آن شناخته شده است

(VanLoock et al., 2000). دیگری مارپیچ 69 در زیرواحد 50s است، اما در یک تطبیق متفاوت در 70S و ساختارهای 50S باکتریایی قرار دارد (Harms et al., 2001; Yusupov et al., 2001). هرچند، از این ساختار مشخص نیست که چگونه این و عناصر دیگر می توانند با یک tRNA از یک محل به محل دیگر بدون شکستن تماس حرکت نمایند.

الزام مفروض برای پیوند tRNA دی استیله شده در محل E از زیرواحد 50S برای تابع EF-G کارآمد یا تابع RF3 نشان می دهد که تغییرات تطبیقی در 50S مرتبط با اشغال محل E وجود دارد که در مجاورت محل پیوند عامل روی ساختار اثر می گذارد، که در آن EF-Tu نیز محدود می شود. این نیز سازگار با این ایده خواهد بود که برخی تزویجات بین محل های E و A از ریبوسام وجود دارد. ما نیز نمی دانیم که چه چیزی چرخ ضامن دار را برای بازگرداندن ریبوسام به حالت پیش از جابجاشدگی خود دوباره روشن می نماید. در مدل  $\alpha$ -E، تصور می شود که این توسط پیوند ترکیب سه گانه در محل A تحریک می شود که یک تغییر تطبیقی را القا می کند و tRNA محل E را از طریق تزویج منفی بین محل های E و A آزادسازی می کند (Spahn and Nierhaus, 1998).

حالات هیبریدی و مدل های  $\alpha$ -E برخی اوقات به طور متقابل منحصر به فرد در نظر گرفته شده است، اما آنها در حقیقت می توانند پرداختن به جنبه های مختلف مسئله جابجاشدگی باشد. همانطور که می توانیم ببینیم، داده های ساختاری اخیر، حمایتی را برای برخی جنبه ها از هر دو مدل فراهم می کند. اما تاکنون داده ها به طور مشخص نشان نمی دهد که چگونه tRNA می شکند و تماس های ریبوسامی را همانطور که از یک محل به بعدی حرکت می کند، مشخص می نماید.

مکانیزم جابجاشدگی mRNA حتی کمتر مشخص است. این مشاهده که جابجاشدگی می تواند حتی در غیاب پیام آور RNA رخ می دهد (Belitsina et al., 1981) نشان می دهد که tRNA، نقش اولیه در جابجاشدگی را ایفا می کند که حتی الامکان mRNA را با آنها می کشد. یک پیچ و تاب بین کدون های محل P و A وجود دارد (Ogle et al., 2001; Yusupov et al., 2001) و این امکان وجود دارد که این، برخی نقش ها را در نگهداری چارچوب خواندن بازی نماید.

## نقش EF-G

جابجاشدگی توسط EF-G کاتالیز می شود، یک GTPase فعال شده ریوسام. هرچند، جابجاشدگی در غیاب عوامل افزوده مشاهده می شود (Gavrilova et al., 1976). این نشان می دهد که جابجاشدگی یک ویژگی ذاتی برای ریوسام است و اینکه EF-G می تواند توسط کاهش یک مانع جنبشی روی پیوند برای ریوسام عمل نمایند. سازگار با این مورد، مشخص شده است که راندهای تک برای جابجاشدگی می تواند حتی با آنالوگ های غیرقابل هیدرولیز از GTP رخ دهد که نشان می دهد که هیدرولیز GTP برای جابجاشدگی نیاز می شود، اما ممکن است برای آزادسازی EF-G نیاز شود. هرچند، آزمایشات جنبشی نشان داده اند که هیدرولیز GTP بر جابجاشدگی پیشی می گرد که نشان می دهد که انرژی هیدرولیز احتمالاً برای تحریک جابجاشدگی استفاده می شود (Rodnina et al., 1997). جابجاشدگی بسیار کندتر از آنالوگ های غیرقابل هیدرولیز نسبت به GTP است. این نتایج با دیدگاهی جایگزینی سازگار هستند که EF-G یک پروتئین موتور است که جابجاشدگی را هدایت می کند، اما برای اثبات این کار، باید مشخص شود که یک نیرو با استفاده از هیدرولیز GTP اعمال شود و ماهیت ضربه موتور را تعریف نماید.

دو آنتی بیوتیک برای تشریح عمل EF-G روی ریوسام مفید است. اسید فوسیدیک، هیدرولیز GTP را میسر می سازد اما از گردش EF-G جلوگیری می کند. در اصل تصور می شد که این thiostrepton که به ترکیب L11-23S RNA حتی در جداسازی وصل می شود، یک ممانعت کننده برای GTPase بود. هرچند آزمایشات جنبشی نشان میدهد که thiostrepton از هیدرولیز GTP به واسطه EF-G جلوگیری نمی کند (Rodnina et al., 1999). در عوض، این کار روی مراحل بعدی تاثیر می گذارد، شامل آزادسازی فسفات غیرآلی و آزادسازی بعدی EF-G. Thiostrepton از تغییر تطبیقی در ریوسام جلوگیری می کند که برای این مراحل بعدی نیاز می شود و در مرحله اولیه نسبت به اسید فوسیدیک عمل می کند. علاوه بر تغییرات تطبیقی در ریوسام، تغییرات در تطبیق EF-G نیز مورد نیاز به نظر می رسد. یک مولکول EF-G با دی سولفیدهای درون مولکولی پیشرو در هیدرولیز GTP فعال بود، اما نمی تواند جابجاشدگی را تسهیل نماید و نمی تواند گردش نماید (Peske et al., 2000).

ساختارهای EF-G با و بدون GDP توسط کریستالوگرافی حل می شود (Aevansson et al., 1994); آنها یک شکل عجیب غریب را برای EF-G با یک حوزه طولانی IV با تحمیل بدنه یک حوزه GTPase کلی تر نشان دادند (شکل 7A). زمانی که ساختار ترکیب سه گانه EF-Tu با tRNA و GTP متعاقباً تعیین شد (Nissen et al., 1995) مشخص شد که اشکال EF-G و ترکیب سه گانه بسیار مشابه با آنهایی است که یک مورد تقلیدی مولکولی را پیشنهاد دادند. حوزه IV از EF-G از حلقه-بنیادی آنتی کدون tRNA در ترکیب سه گانه در شکل و توزیع تغییر کلی تقلی می کند. نکایت EF-G روی ریبوسام توسط تکنیک تحریک رادیکال هیدروکسیل از Fe چهارتایی روی سیستئین های پیشرو (Wilson and Noller, 1998) از این دیدگاه حمایت نمود که EF-G تقریباً به روشی مشابه با روش ترکیب مشاهده شده توسط cryoEM محدود شده است (Stark et al., 1997) (شکل 7B).

در طول دو دهه اخیر، چندین ترکیب به دام افتاده در حالت های پیش از جابجاشدگی و پس از جابجاشدگی توسط cryoEM مطالعه شده است. Frank و همکاران ساختارهای 70S را با دو مرز tRNA با EF-G در حضور یک آنالوگ GTP غیرقابل هیدرولیز تعیین نمودند (نشاندنده حالت پیش از جابجاشدگی) و با اسید فوسیدیک (نشاندنده حالت ژس از جابجاشدگی) (Agrawal et al., 1999a). مقایسه دو ساختار نشان داد که EF-G به طور تقریبی در همان مکان محدود می شود، اما تغییرات تطبیقی چشمگیر در هر دو ریبوسام و EF-G وجود دارند که به طور قابل توجهی در ساختار L7/L12 stalk.

Wintermeyer, van Heel و همکاران نیز ترکیب های tRNA-ریبوسام-EF-G را مطالعه نمودند اما در حضور thiostrepton (قبل و بعد از جابجاشدگی) و اسید فوسیدیک (Stark et al., 2000). ترکیب اسید فوسیدیک تقریباً دارای همان جهتگیری برای EF-G به صورت ساختار متناظر از گروه Frnak است. هرچند، تطبیق و جهت گیری EF-G در حضور thiostrepton قبل و بعد از جابجاشدگی به طور مشخصی متفاوت است. و هر یک از موردی در ترکیب اسید فوسیدیک متفاوت است. تطابقات شامل یک تغییر درجه تقریبی 270 در جهت گیری حوزه EF-G IV و محل اتصال مختلف روی ریبوسام قبل و بعد از جابجاشدگی است. چنین تغییر تطبیقی چشمگیر در

مقیاس بزرگ در EF-G، و حرکت آن از یک موقعیت به دیگری روی ریبوسام، فراعادی است. فضای کافی بین زیرواحدهای 30S و 50S برای جاسازی چنین چرخش چشمگیری در حوزه EF-G به نظر نمی رسد، بنابراین فضای داخل زیرواحد باید باز باشد. دوماً، ساختارهای تعریف شده توسط گروه Frank، EF-G با یک آنالوگ غیرقابل هیدرولیز و یک با اسید فوسیدیک احتمالاً نشاندهنده نقطه آغازین و انتهایی درگیری EF-G با ریبوسام است. چون آنها محدود به همان محل 70S یک تطبیق تقریبی مشابه هستند، توسط گروه Wintermeyer/van Heel مشخص شد که حالات میانه نشان داده شده توسط ترکیبات EF-G، thiostrepton محدود به محل های مختلف روی ریبوسام در تطبیقات مختلف شگفت انگیز است. تفکیک در بازسازی های cryoEM به گونه ای است که انتساب حوزه های پروتئین تا حدودی ذهنی است. یک اولویت بالا باید برای رسیدن به یک تفکیک وجود داشته باشد که در آن عناصر ساختار ثانویه حوزه های پروتئین فردی می تواند متمایز شود، به طور یکه انتساب و جهت گیری حوزه ها غیرمبهم خواهد بود. در گذر، ما خاطر نشان می کنیم که تعریف تفکیک توسط Frank و گروه های van Heel با گروه Frank یکسان نیست که یک معیار محافظه کارانه تر را اعمال می کند که منجر به مقدار نامی بدتر برای توصیف همان تفکیک واقعی می شود.

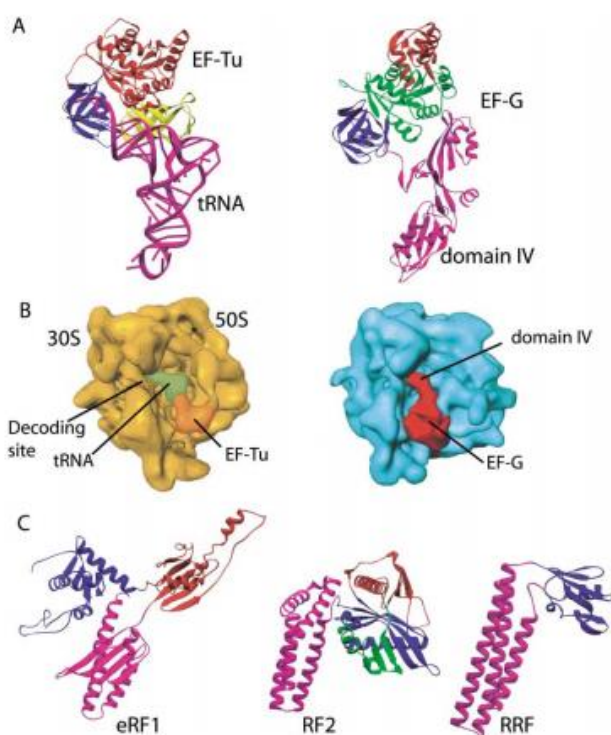
برخلاف این عدم قطعیت ها، ساختارهای cryoEM یک چارچوب گسترده راب رای درک نقش EF-G فراهم می کند. مشخص است که حوزه IV وارد محل 30S از A می شود که در آن حداقل برخی حالات، می تواند به طور مستقیم tRNA را جابجا نماید. یک دیدگاه ساده انگارانه که جابجاشدگی به کندی حتی بدون فاکتورها رخ می دهد و EF-G، با محدود نمودن به محل A، از واکنش بسته ای در اضافه نمودن برای کاهش هر مانع جنبشی جلوگیری می کند. اما ما یک روش طولانی را از درک نقش دقیق EF-G در جابجاشدگی داریم.

### خاتمه

فرآیند خاتمه زمانی شروع می شود که یک کدون توقف روی mRNA در محل A مواجهه می شود (شکل 8). در باکتری، شناخت کدون توقف شامل دو عامل آزادسازی کلاس I، RF1 و RF2 می شود (در kis selev and Buckingham, 2000 بازنگری شده است). هر دو عامل، UAA را شناسایی نمودند. هرچند، UAG توسط RF1

شناخته می شود در حالیکه UGA توسط RF2 شناسایی می شود. در یوکاریوتی ها، یک عامل تک، eRF1، تمام سه کدون توقف را شناسایی می کند. یک عامل آزادسازی کلاس II، RF3، متصل ترکیب به RF1/2 با ریبوسام است و یک GTPase است.

متصل شدن RF1/2 به ریبوسام با کدون توقف مناسب در محل A، هیدرولیز و آزادسازی زنجیره پپتید را از tRNA در محل P تحریک می کند.



شکل 7. ترجمه در میان عوامل ترجمه

(A) ساختارهای کریستال (سمت چپ) ترکیب سه گانه EF-Tu، tRNA و GDPNA (Nissen et al., 1995) و

(سمت راست) EF-G (Aevansson et al., 1994; Czworkowski et al., 1994)

(B) بازسازی های CryoEM (سمت چپ) برای ریبوسام با ترکیب سه گانه (Stark et al., 1997) و EF-G

(Agrawal et al., 1998).. بازسازی شده با اجازه

(C) ساختارهای عوامل آزادسازی کلاس I، eRF1 و RF2 و عامل بازیافتی ریبوسام RFF. حوزه هایی که تصور می

شود از tRNA تقلید می کند، در ماگنتا نشان داده می شوند، همانطور که حوزه IV از EF-G در (A) است.

مشخص نیست که آیا RF1/2 به طور مستقیم در کاتالیزوی مشارکت می کند یا اینکه آیا کاتالیزگری را با ریبوسام القا می کند. RF3، عدم ارتباط سریع RF1 و RF2 را ترویج می دهد. در اصل، تصور می شد اتصال RF3 به ریبوسام، فعالیت GTPase آن را با آزادسازی پیوسته RF1/2 تحریک می کند. هرچند کار اخیر نشان می دهد که هیدرولیز tRNA پپتیدیل توسط RF1/2 برای اتصال GTP به RF3 روی ریبوسام نیاز می شود. این به نوبه خود منجر به تطبیق RF3 با پیوستگی بالا برای ریبوسامها و عدم ارتباط RF1/2 می شود (Zavialov et al., 2001). هیدرولیز GTP برای عدم ارتباط بعدی RF3 نیاز می شود. به طور شگفت آوری، RF3 در باکتری ها ضروری نیست و RF1/2 را خارج از ریبوسام محدود نمی کند (Kisselev and Buckingham, 2000).

آزمایشات ژنتیک نشان می دهد که عوض یک تری پپتید حفظ شده بین RF1 و RF2 می تواند مشخصات کدون توقف آنها را عوض نماید (Ito et al., 2000)، که نشان می دهد که تری پپتید از یک آنتی کدون در tRNA تقلید می کند؛ تصور می شود که این تری پپتید در نوک یک حوزه آنتی کدون قرار می گیرد.

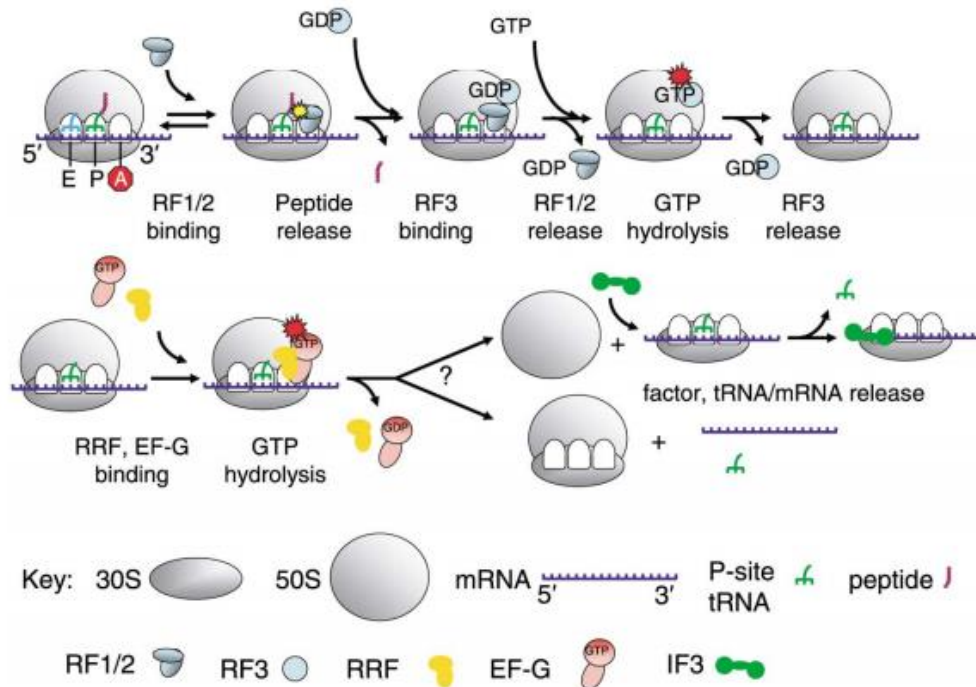
ظهور ساختارهای کریستالی از عوامل آزادسازی (شکل 7C) نشان می دهد که این تصویر نسبتاً سراسر است. یک ساختار از eRF1 انسانی نشان داد که این پروتئین می تواند از tRNA تقلید نماید (Song et al., 2000). این مورد می تواند مدلسازی شود به طوری که یک مایه اصلی GGQ نزدیک به انتهای CCA در محل P در tRNA، سازگار با الزام مایه اصلی برای فعالیت آزادسازی پپتید در عوامل آزادسازی کلاس I خواهد بود (Frolova et al., 1999; Song et al., 2000). اما از این ساختار مشخص نیست که چگونه عناصر این پروتئین، کدون توقف را کدگشایی می کند. ساختار RF2 از E.Coli اخیراً تعیین شده است (Vestergaard et al., 2001). این دارای ساختار کاملاً متفاوت از eRF1 سازگار با فقدان هومولوژی دنباله بین این دو خواهد بود، اما یک شباهت بیشتر را به tRNA حمل می کند. هرچند، این تری پپتید که مشخصه را سوییچ می کند (Ito et al., 2000) نسبتاً از نوک دور است که از حلقه بنیادی آنتی کدون تقلید می کند که نشان می دهد که نمی تواند نقش آنتی کدون را به طور مستقیم ایفا نماید. مشخص نیست که این ساختار بتواند در ریبوسام 70S به روشی سازگار با تماس ها از داده های تقسیم

رادیکال-هیدروکسیل مدلسازی شود. بنابراین، سوالات حیاتی برای مکانیزم کاتالیزوری آزادسازی پپتید و شناخت کدون توقف بدون پاسخ باقی می ماند.

### عامل بازیافتی ریبوسام

بعد از آزادسازی زنجیره پپتید، ریبوسام با mRNA و یک tRNA دی استیله شده در محل P باقی می ماند (شکل 8). این ترکیب باید برای آماده سازی ریبوسام برای یک راند جدید از سنتز پروتئین باز شود. عامل دیگر به نام عامل بازیافت ریبوسام (RRF) همراه با EF-G برای این فرآیند نیاز می شود (بازنگری شده در Janosi et al., 1996). یک مطالعه اخیر نشان می دهد که RRF و EF-G منجر به قطع ارتباط ریبوسام ها در زیرواحدها روی هیدرولیز GTP می شود (Karimi et al., 1999). متعاقباً، عامل راه اندازی IF3 برای حذف tRNA دی استیله شده از زیرواحد 30S نیاز می شود. هرچند، Kaji و کارگران اخیراً نشان داده اند که هیدرولیز GTP در ترکیب ریبوسام RRF-Ef-G منجر به قطع ارتباط ریبوسام سالم از mRNA و tRNA می شود (Kaji et al., 2001). با توجه به مسیر پیام از طریق ریبوسام 70S (Yusupova et al., 2001)، این نیاز به تغییر تطبیقی در مقیاس بزرگ دارد که تعداد چشمگیری از تماس های داخل زیرواحد را به توپولژی ممکن تجزیه می کند. همانطور که توسط Kaji et al., پیشنهاد شده است، این امکان وجود دارد که آیا قطع ارتباط زیرواحد یا آزادسازی mRNA رخ می دهد، در ابتدا ممکن است وابسته به پیوستگی دنباله mRNA خاص برای ریبوسام باشد.





شکل 8. مروری کلی بر خاتمه در ترجمه

ساختار RRF (Selmer et al., 1999)، نزدیک ترین در شکل و توزیع تغییر برای tRNA در هر یک از عوامل تعیین شده تا کنون است که از پیشنهاداتی که در محل A تقلید می کند، حمایت می کند. نیاز به تابع EF-G به همان روشی که حداقل حلقه بنیادی آنتی کدون در tRNA در محل A برای جابجاشدگی توسط EF-G نیاز می شود، الزامی است (Joseph and Noller, 1998).

### نتایج

ساختارهای کریستالی ریبوسام قبلاً، حوزه سنتز پروتئین را با فراهم نمودن یک مرجع سه بعدی برای تفسیر داده های ژنتیک و بیوشیمیایی موجود و طراحی آزمایشات جدید متحول نموده است، اما سوالاتی در هر مرحله باقی مانده است.

زمانی که این مسئله به طور مناسب موقعیت یابی شود، مانند ترانسفراز پپتیدیل یا شناخت جفت شدن باز کدون-آنتی کدون، یک تغییر چشمگیر در درک ما وجود دارد. اما مراحل دیگر مانند تحریک هیدرولیز GTP به واسطه عوامل، یا جابجا شدگی، مرموز خواهد بود. امید این است که این پیشرفت در این حوزه ها تسریع خواهد شد.

هرچند، ما تنها در حال شروع درک مکانیزم های بنیادی مسیر ترجمه باکتریایی هستیم. علاوه بر این، در این بررسی، ما برخی از پدیده های بیگانه را در ترجمه لمس نکردیم، مانند جابجایی چارچوب برنامه ریزی شده، رازک در آوردن یا ترکیب سلنوسیتین. برای پروتئین هایی که دارای یک دنباله سیگنال می باشند، یک پیچیدگی اضافه شده از تعاملات با جزء شناخت سیگنال و ترانسلوکون وجود دارد که در پروتئین های متحرک در یا از طریق غشاها درگیر می شوند. درک ترجمه یوکاریوتی، چالش های عمده اضافی را مطرح می کند.

کارهای آینده لزوماً شامل رویکردهای مختلف می شود. ساختارهای ترکیبات 70S نشاندهنده نقاط تعریف شده مشخص در مسیر ترجمه است که راهی طولانی را برای مشخص نمودن ماهیت تغییرات ساختاری طی می کند، زمانی که ریبوزوم از یک مرحله به بعدی می رود. اولاً، اینها تقریباً به طور قطع از cryoEM می آید، اما زمانی که سوالاتی جزئی تر و مکانیزمی مطرح می شود، متأسفانه هیچ جایگزینی برای بلورشناسی با تفکیک بالا وجود ندارد، تکنیکی که در گروهی دستیابی به بلورهای مناسب است. اغلب ادعا می شود که ما نیاز به فیلم برای ترجمه داریم نه چند فریم که ما داریم. هرچند، هیچ دوربینی وجود ندارد که به اندازه کافی برای خلق این فیلم سریع باشد. حتی ساختار مفصل ریبوزوم در دو حالت تعریف شده تنها به این مورد اشاره می کند که چگونه از یک حالت به حالت بعدی می رود، شامل تجزیه تحلیل بیوشیمیایی و ژنتیک، مانند ترکیب داده های متقابل با تجزیه تحلیل جنبشی و ساختاری. با ظهور تکنیک های مولکولی ساده شامل آشکارسازی تغییرات تطبیقی از طریق اندازه گیری مستقیم یا فلورسانت از نیورها، به احتمال زیاد نقشی مهم را ایفا می کند. با توجه به نقش مرکزی ترجمه در بیولوژی، این یک دلیل صادقانه به نظر می رسد.

## تقدیرات

به علت محدودیت های فضا و تعداد مراجع، من از ذکر نکردن کمک های اصلی مهم عذرخواهیم می کنم. من از D.E. Brodersen برای ارائه اشکال استفاده شده در اینجا و همکاران LMB خود و بسیاری از اعضای جامعه ریبوزوم برای انتقادات و بررسی های مفید ممنون هستم.

## References

- Aevansson, A., Brazhnikov, E., Garber, M., Zheltonosova, J., Chirgadze, Y., al-Karadaghi, S., Svensson, L.A., and Liljas, A. (1994). Three-dimensional structure of the ribosomal translocase: elongation factor G from *Thermus thermophilus*. *EMBO J.* 13, 3669–3677.
- Agrawal, R.K., and Frank, J. (1999). Structural studies of the translational apparatus. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9, 215–221.
- Agrawal, R.K., Penczek, P., Grassucci, R.A., and Frank, J. (1998). Visualization of elongation factor G on the *Escherichia coli* 70S ribosome: the mechanism of translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6134–6138.
- Agrawal, R.K., Heagle, A.B., Penczek, P., Grassucci, R.A., and Frank, J. (1999a). EF-G-dependent GTP hydrolysis induces translocation accompanied by large conformational changes in the 70S ribosome. *Nat. Struct. Biol.* 6, 643–647.
- Agrawal, R.K., Penczek, P., Grassucci, R.A., Burkhardt, N., Nierhaus, K.H., and Frank, J. (1999b). Effect of buffer conditions on the position of tRNA on the 70S ribosome as visualized by cryoelectron microscopy. *J. Biol. Chem.* 274, 8723–8729.
- Agrawal, R.K., Spahn, C.M., Penczek, P., Grassucci, R.A., Nierhaus, K.H., and Frank, J. (2000). Visualization of tRNA movements on the *Escherichia coli* 70S ribosome during the elongation cycle. *J. Cell Biol.* 150, 447–460.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* 289, 905–920.
- Bayfield, M.A., Dahlberg, A.E., Schulmeister, U., Dörner, S., and Barta, A. (2001). A conformational change in the ribosomal peptidyl transferase center upon active/inactive transition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 10096–10101.
- Belitsina, N.V., Tnalina, G.Z., and Spirin, A.S. (1981). Template-free ribosomal synthesis of polylysine from lysyl-tRNA. *FEBS Lett.* 137, 289–292.
- Biou, V., Shu, F., and Ramakrishnan, V. (1995). X-ray crystallography shows that translational initiation factor IF3 consists of two compact  $\alpha/\beta$  domains connected by an  $\alpha$ -helix. *EMBO J.* 14, 4056–4064.
- Borowski, C., Rodnina, M.V., and Wintermeyer, W. (1996). Truncated elongation factor G lacking the G domain promotes translocation of the 3' end but not of the anticodon domain of peptidyl-tRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 4202–4206.
- Bretscher, M.S. (1968). Translocation in protein synthesis: a hybrid structure model. *Nature* 218, 675–677.
- Brodersen, D.E., Clemons, W.M., Carter, A.P., Morgan-Warren, R.J., Wimberly, B.T., and Ramakrishnan, V. (2000). The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell* 103, 1143–1154.
- Carson, M. (1991). Ribbons 2.0. *J. Appl. Crystallogr.* 24, 958–961.
- Carter, A.P., Clemons, W.M., Brodersen, D.E., Morgan-Warren, R.J., Wimberly, B.T., and Ramakrishnan, V. (2000). Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* 407, 340–348.
- Carter, A.P., Clemons, W.M., Jr., Brodersen, D.E., Morgan-Warren, R.J., Hartsch, T., Wimberly, B.T., and Ramakrishnan, V. (2001). Crystal structure of an initiation factor bound to the 30S ribosomal subunit. *Science* 291, 498–501.
- Crick, F.H.C. (1966). Codon—anticodon pairing: the wobble hypothesis. *J. Mol. Biol.* 19, 548–555.
- Czworkowski, J., Wang, J., Steitz, T.A., and Moore, P.B. (1994). The crystal structure of elongation factor G complexed with GDP, at 2.7 Å resolution. *EMBO J.* 13, 3661–3668.
- Dabrowski, M., Spahn, C.M., Schafer, M.A., Patzke, S., and Nierhaus, K.H. (1998). Protection patterns of tRNAs do not change during ribosomal translocation. *J. Biol. Chem.* 273, 32793–32800.
- Dallas, A., and Noller, H.F. (2001). Interaction of translation initiation factor 3 with the 30S ribosomal subunit. *Mol. Cell* 8, 855–864.
- Davies, J., Gilbert, W., and Gorini, L. (1964). Streptomycin, suppression, and the code. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 51, 883–890.
- Doherty, E.A., Batey, R.T., Masquida, B., and Doudna, J.A. (2001). A universal mode of helix packing in RNA. *Nat. Struct. Biol.* 8, 339–343.
- Feinberg, J.S., and Joseph, S. (2001). Identification of molecular interactions between P-site tRNA and the ribosome essential for translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 11120–11125.
- Fourmy, D., Recht, M.I., Blanchard, S.C., and Puglisi, J.D. (1996). Structure of the A site of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. *Science* 274, 1367–1371.
- Frank, J., and Agrawal, R.K. (2000). A ratchet-like inter-subunit reorganization of the ribosome during translocation. *Nature* 406, 319–322.
- Frolova, L.Y., Tsivkovskii, R.Y., Sivolobova, G.F., Oparina, N.Y., Serpinsky, O.I., Blinov, V.M., Tatkov, S.I., and Kisselev, L.L. (1999). Mutations in the highly conserved GGQ motif of class 1 polypeptide release factors abolish ability of human eRF1 to trigger peptidyl-tRNA hydrolysis. *RNA* 5, 1014–1020.
- Gabashvili, I.S., Agrawal, R.K., Grassucci, R., Squires, C.L., Dahlberg, A.E., and Frank, J. (1999). Major rearrangements in the 70S ribosomal 3D structure caused by a conformational switch in 16S ribosomal RNA. *EMBO J.* 18, 6501–6507.
- Garcia, C., Fortier, P.L., Blanquet, S., Lallemand, J.Y., and Dardel, F. (1995a). 1H and 15N resonance assignments and structure of the N-terminal domain of *Escherichia coli* initiation factor 3. *Eur. J. Biochem.* 228, 395–402.
- Garcia, C., Fortier, P.L., Blanquet, S., Lallemand, J.Y., and Dardel, F. (1995b). Solution structure of the ribosome-binding domain of *E. coli* translation initiation factor IF3. Homology with the U1A protein of the eukaryotic spliceosome. *J. Mol. Biol.* 254, 247–259.
- Gavrilova, L.P., Kostiashekina, O.E., Koteliansky, V.E., Rutkevitch, N.M., and Spirin, A.S. (1976). Factor-free (“non-enzymic”) and factor-dependent systems of translation of polyuridylic acid by *Escherichia coli* ribosomes. *J. Mol. Biol.* 101, 537–552.
- Green, R., and Noller, H.F. (1997). Ribosomes and translation. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 679–716.
- Gualerzi, C.O., and Pon, C.L. (1990). Initiation of mRNA translation in prokaryotes. *Biochemistry* 29, 5881–5889.
- Hampfl, H., Schulze, H., and Nierhaus, K.H. (1981). Ribosomal components from *Escherichia coli* 50S subunits involved in the reconstitution of peptidyltransferase activity. *J. Biol. Chem.* 256, 2284–2288.
- Harms, J., Schluenzen, F., Zarivach, R., Bashan, A., Gat, S., Agmon, I., Bartels, H., Franceschi, F., and Yonath, A. (2001). High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell* 107, 679–688.
- Hartz, D., Binkley, J., Hollingsworth, T., and Gold, L. (1990). Domains of initiator tRNA and initiation codon crucial for initiator tRNA selection by *Escherichia coli* IF3. *Genes Dev.* 4, 1790–1800.
- Hopfield, J.J. (1974). Kinetic proofreading: a new mechanism for



- reducing errors in biosynthetic processes requiring high specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 4135–4139.
- Ito, K., Uno, M., and Nakamura, Y. (2000). A tripeptide 'anticodon' deciphers stop codons in messenger RNA. *Nature* 403, 680–684.
- Janosi, L., Hara, H., Zhang, S., and Kaji, A. (1996). Ribosome recycling by ribosome recycling factor (RRF)—an important but overlooked step of protein biosynthesis. *Adv. Biophys.* 32, 121–201.
- Joseph, S., and Noller, H.F. (1998). EF-G-catalyzed translocation of anticodon stem-loop analogs of transfer RNA in the ribosome. *EMBO J.* 17, 3478–3483.
- Kaji, A., Kiel, M.C., Hirokawa, G., Muto, A., Inokuchi, Y., and Kaji, H. (2001). The fourth step of protein synthesis: disassembly of the post-termination complex is catalyzed by elongation factor G and ribosome recycling factor, RRF, a near perfect mimic of tRNA. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, in press.
- Karimi, R., Pavlov, M.Y., Buckingham, R.H., and Ehrenberg, M. (1999). Novel roles for classical factors at the interface between translation termination and initiation. *Mol. Cell* 3, 601–609.
- Khaitovich, P., Mankin, A.S., Green, R., Lancaster, L., and Noller, H.F. (1999). Characterization of functionally active subribosomal particles from *Thermus aquaticus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 85–90.
- Kisselev, L.L., and Buckingham, R.H. (2000). Translational termination comes of age. *Trends Biochem. Sci.* 25, 561–566.
- Kraulis, P. (1991). MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* 24, 946–950.
- Kruger, K., Grabowski, P.J., Zaug, A.J., Sands, J., Gottschling, D.E., and Cech, T.R. (1982). Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell* 31, 147–157.
- La Teana, A., Gualerzi, C.O., and Dahlberg, A.E. (2001). Initiation factor IF2 binds to the alpha-sarcin loop and helix 89 of *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA. *RNA* 7, 1173–1179.
- Lill, R., Robertson, J.M., and Wintermeyer, W. (1989). Binding of the 3' terminus of tRNA to 23S rRNA in the ribosomal exit site actively promotes translocation. *EMBO J.* 8, 3933–3938.
- Lodmell, J.S., and Dahlberg, A.E. (1997). A conformational switch in *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA during decoding of messenger RNA. *Science* 277, 1262–1267.
- McCutcheon, J.P., Agrawal, R.K., Phillips, S.M., Grassucci, R.A., Gerchman, S.E., Clemons, W.M., Jr., Ramakrishnan, V., and Frank, J. (1999). Location of translational initiation factor IF3 on the small ribosomal subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 4301–4306.
- ribosomal subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 4301–4306.
- Merritt, E.A., and Bacon, D.J. (1997). Raster3D: photorealistic molecular graphics. *Methods Enzymol.* 277, 505–524.
- Moazed, D., and Noller, H.F. (1986). Transfer RNA shields specific nucleotides in 16S ribosomal RNA from attack by chemical probes. *Cell* 47, 985–994.
- Moazed, D., and Noller, H.F. (1989). Intermediate states in the movement of transfer RNA in the ribosome. *Nature* 342, 142–148.
- Muth, G.W., Ortoleva-Donnelly, L., and Strobel, S.A. (2000). A single adenosine with a neutral pKa in the ribosomal peptidyl transferase center. *Science* 289, 947–950.
- Muth, G.W., Chen, L., Kosek, A.B., and Strobel, S.A. (2001). pH-dependent conformational flexibility within the ribosomal peptidyl transferase center. *RNA* 7, 1403–1415.
- Nierhaus, K.H. (1990). The allosteric three-site model for the ribosomal elongation cycle: features and future. *Biochemistry* 29, 4997–5008.
- Nierhaus, K.H., Schulze, H., and Cooperman, B.S. (1980). Molecular mechanisms of the ribosomal peptidyltransferase center. *Biochem. Int.* 1, 185–192.
- Ninio, J. (1975). Kinetic amplification of enzyme discrimination. *Biochimie* 57, 587–595.
- Nissen, P., Kjeldgaard, M., Thirup, S., Polekhina, G., Reshetnikova, L., Clark, B.F., and Nyborg, J. (1995). Crystal structure of the ternary complex of Phe-tRNA<sup>Phe</sup>, EF-Tu, and a GTP analog. *Science* 270, 1464–1472.
- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* 289, 920–930.
- Nissen, P., Ippolito, J.A., Ban, N., Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2001). RNA tertiary interactions in the large ribosomal subunit: the A-minor motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 4899–4903.
- Noller, H.F., Hoffarth, V., and Zimniak, L. (1992). Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures. *Science* 256, 1416–1419.
- Ogle, J.M., Brodersen, D.E., Clemons, W.M., Jr., Tarry, M.J., Carter, A.P., and Ramakrishnan, V. (2001). Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science* 292, 897–902.
- Pape, T., Wintermeyer, W., and 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, 7490–7497.
- Pape, T., Wintermeyer, W., and Rodnina, M. (1999). Induced fit in initial selection and proofreading of aminoacyl-tRNA on the ribosome. *EMBO J.* 18, 3800–3807.
- Pape, T., Wintermeyer, W., and Rodnina, M.V. (2000). Conformational switch in the decoding region of 16S rRNA during aminoacyl-tRNA selection on the ribosome. *Nat. Struct. Biol.* 7, 104–107.
- Peske, F., Matassova, N.B., Savelsbergh, A., Rodnina, M.V., and Wintermeyer, W. (2000). Conformationally restricted elongation factor G retains GTPase activity but is inactive in translocation on the ribosome. *Mol. Cell* 6, 501–505.
- Petrelli, D., LaTeana, A., Garofalo, C., Spurio, R., Pon, C.L., and Gualerzi, C.O. (2001). Translation initiation factor IF3: two domains, five functions, one mechanism? *EMBO J.* 20, 4560–4569.
- Piepenburg, O., Pape, T., Pleiss, J.A., Wintermeyer, W., Uhlenbeck, O.C., and Rodnina, M.V. (2000). Intact aminoacyl-tRNA is required to trigger GTP hydrolysis by elongation factor Tu on the ribosome. *Biochemistry* 39, 1734–1738.
- Pioletti, M., Schlunzen, F., Harms, J., Zarivach, R., Gluhmann, M., Avila, H., Bashan, A., Bartels, H., Auerbach, T., Jacobi, C., et al. (2001). Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3. *EMBO J.* 20, 1829–1839.
- Polacek, N., Gaynor, M., Yassin, A., and Mankin, A.S. (2001). Ribosomal peptidyl transferase can withstand mutations at the putative catalytic nucleotide. *Nature* 411, 498–501.
- Potapov, A.P. (1982). A stereospecific mechanism for the aminoacyl-tRNA selection at the ribosome. *FEBS Lett.* 146, 5–8.
- Powers, T., and Noller, H.F. (1994). Selective perturbation of G530 of 16 S rRNA by translational miscoding agents and a streptomycin-dependence mutation in protein S12. *J. Mol. Biol.* 235, 156–172.
- Ramakrishnan, V., and Moore, P.B. (2001). Atomic structures at last: the ribosome in 2000. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11, 144–154.
- Rodnina, M.V., Savelsbergh, A., Katunin, V.I., and Wintermeyer, W. (1997). Hydrolysis of GTP by elongation factor G drives tRNA movement on the ribosome. *Nature* 385, 37–41.
- Rodnina, M.V., Savelsbergh, A., Matassova, N.B., Katunin, V.I., Semenov, Y.P., and Wintermeyer, W. (1999). Thiostrepton inhibits the turnover but not the GTPase of elongation factor G on the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 9586–9590.
- Roll-Mecak, A., Cao, C., Dever, T.E., and Burley, S.K. (2000). X-Ray structures of the universal translation initiation factor IF2/eIF5B: conformational changes on GDP and GTP binding. *Cell* 103, 781–792.
- Schlunzen, F., Tocilj, A., Zarivach, R., Harms, J., Gluehmann, M., Janell, D., Bashan, A., Bartels, H., Agmon, I., Franceschi, F., and Yonath, A. (2000). Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 Å resolution. *Cell* 102, 615–623.
- Schlunzen, F., Zarivach, R., Harms, J., Bashan, A., Tocilj, A., Albrecht, R., Yonath, A., and Franceschi, F. (2001). Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature* 413, 814–821.
- Schmeing, T.M., Seila, A.C., Hansen, J.L., Freyborn, B., Soukup, J.K.,

- Scaringe, G.A., Strobel, S.A., Moore, P.D., and Steitz, T.A. (2002). The structure of a new intermediate state in peptide bond formation chosen by enzymatically active crystals. *Nat. Struct. Biol.*, in press.
- Selmer, M., Al-Karadaghi, S., Hirokawa, G., Kaji, A., and Liljas, A. (1999). Crystal structure of *Thermotoga maritima* ribosome recycling factor: a tRNA mimic. *Science* 286, 2349–2352.
- Sette, M., van Tilborg, P., Spurio, R., Kaptein, R., Paci, M., Gualerzi, C.O., and Boelens, R. (1997). The structure of the translational initiation factor IF1 from *E.coli* contains an oligomer-binding motif. *EMBO J.* 16, 1436–1443.
- Song, H., Mugnier, P., Das, A.K., Webb, H.M., Evans, D.R., Tuite, M.F., Hemmings, B.A., and Barford, D. (2000). The crystal structure of human eukaryotic release factor eRF1—mechanism of stop codon recognition and peptidyl-tRNA hydrolysis. *Cell* 100, 311–321.
- Spahn, C.M., and Nierhaus, K.H. (1998). Models of the elongation cycle: an evaluation. *Biol. Chem.* 379, 753–772.
- Stark, H., Rodnina, M.V., Rinke-Appel, J., Brimacombe, R., Wintermeyer, W., and van Heel, M. (1997). Visualization of elongation factor Tu on the *Escherichia coli* ribosome. *Nature* 389, 403–406.
- Stark, H., Rodnina, M.V., Wieden, H.J., van Heel, M., and Wintermeyer, W. (2000). Large-scale movement of elongation factor G and extensive conformational change of the ribosome during translocation. *Cell* 100, 301–309.
- Thompson, J., Kim, D.F., O'Connor, M., Lieberman, K.R., Bayfield, M.A., Gregory, S.T., Green, R., Noller, H.F., and Dahlberg, A.E. (2001). Analysis of mutations at residues A2451 and G2447 of 23S rRNA in the peptidyltransferase active site of the 50S ribosomal subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 9002–9007.
- Tomsic, J., Vitali, L.A., Daviter, T., Savelsbergh, A., Spurio, R., Striebeck, P., Wintermeyer, W., Rodnina, M.V., and Gualerzi, C.O. (2000). Late events of translation initiation in bacteria: a kinetic analysis. *EMBO J.* 19, 2127–2136.
- van Heel, M. (2000). Unveiling ribosomal structures: the final phases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 259–264.
- VanLoock, M.S., Agrawal, R.K., Gabashvili, I.S., Qi, L., Frank, J., and Harvey, S.C. (2000). Movement of the decoding region of the 16 S ribosomal RNA accompanies tRNA translocation. *J. Mol. Biol.* 304, 507–515.
- Velichutina, I.V., Dresios, J., Hong, J.Y., Li, C., Mankin, A., Synetos, D., and Liebman, S.W. (2000). Mutations in helix 27 of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* 18S rRNA affect the function of the decoding center of the ribosome. *RNA* 6, 1174–1184.
- Vestergaard, B., Van, L.B., Andersen, G.R., Nyborg, J., Buckingham, R.H., and Kjeldgaard, M. (2001). Bacterial polypeptide release factor RF2 is structurally distinct from eukaryotic eRF1. *Mol. Cell* 8, 1375–1382.
- Vocadlo, D.J., Davies, G.J., Laine, R., and Withers, S.G. (2001). Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate. *Nature* 412, 835–838.
- Vogele, L., Palm, G.J., Mesters, J.R., and Hilgenfeld, R. (2001). Conformational change of elongation factor Tu (EF-Tu) induced by antibiotic binding. Crystal structure of the complex between EF-Tu.GDP and aureodox. *J. Biol. Chem.* 276, 17149–17155.
- Welch, M., Chastang, J., and Yarus, M. (1995). An inhibitor of ribosomal peptidyl transferase using transition-state analogy. *Biochemistry* 34, 385–390.
- Wilson, K.S., and Noller, H.F. (1998). Mapping the position of translational elongation factor EF-G in the ribosome by directed hydroxyl radical probing. *Cell* 92, 131–139.
- Wilson, K.S., Ito, K., Noller, H.F., and Nakamura, Y. (2000). Functional sites of interaction between release factor RF1 and the ribosome. *Nat. Struct. Biol.* 7, 866–870.
- Wimberly, B.T., Brodersen, D.E., Clemons, W.M., Morgan-Warren, R.J., Carter, A.P., Vornrhein, C., Hartsch, T., and Ramakrishnan, V. (2000). Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* 407, 327–339.
- Wower, J., Kirillov, S.V., Wower, I.K., Guven, S., Hixson, S.S., and Zimmermann, R.A. (2000). Transit of tRNA through the *Escherichia coli* ribosome. Cross-linking of the 3' end of tRNA to specific nucleotides of the 23 S ribosomal RNA at the A, P, and E sites. *J. Biol. Chem.* 275, 37887–37894.
- Yonath, A., Mussig, J., Tesche, B., Lorenz, S., Erdmann, V.A., and Wittmann, H.G. (1980). Crystallization of the large ribosomal subunits from *Bacillus stearothermophilus*. *Biochem. Int.* 1, 428–435.
- Yoshizawa, S., Fourmy, D., and Puglisi, J.D. (1999). Recognition of the codon-anticodon helix by ribosomal RNA. *Science* 285, 1722–1725.
- Yusupov, M.M., Yusupova, G.Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T.N., Cate, J.H., and Noller, H.F. (2001). Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* 292, 883–896.
- Yusupova, G.Z., Yusupov, M.M., Cate, J.H., and Noller, H.F. (2001). The path of messenger RNA through the ribosome. *Cell* 106, 233–241.
- Zaug, A.J., Grabowski, P.J., and Cech, T.R. (1983). Autocatalytic cyclization of an excised intervening sequence RNA is a cleavage-ligation reaction. *Nature* 301, 578–583.
- Zavialov, A.V., Buckingham, R.H., and Ehrenberg, M. (2001). A post-termination ribosomal complex is the guanine nucleotide exchange factor for peptide release factor rf3. *Cell* 107, 115–124.
- Zucker, F.H., and Hershey, J.W.B. (1986). Binding of *Escherichia coli* protein synthesis initiation factor IF1 to 30S ribosomal subunits measured by fluorescence polarization. *Biochemistry* 25, 3682–3690.

