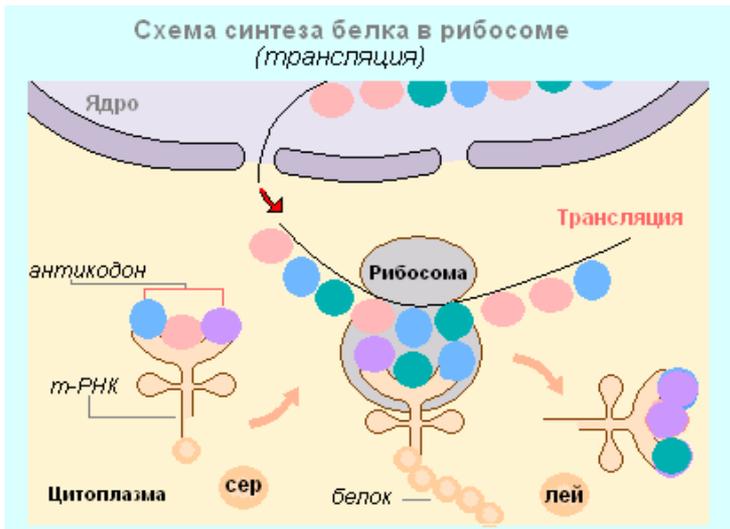


Лекция 10-11. Трансляция белка



Вопросы к рассмотрению:

Общий механизм и стадии трансляции:
активация, инициация, элонгация, терминация.

Строение и состав прокариотических и эукариотических рибосом.
Рибосомные центры и их взаимодействие в ходе трансляции.

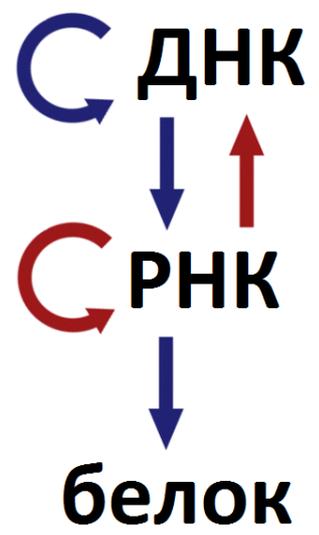
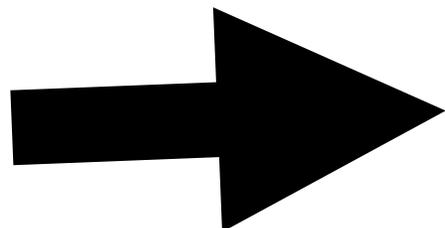
Полирибосомы, их роль в ускорении трансляции.
Два этапа и ферменты активации аминокислот.

Множественные функции РНК в процессе трансляции.
Транспортная РНК и ее функции.

Акцепторная и адапторная роль тРНК.
Информационная РНК.

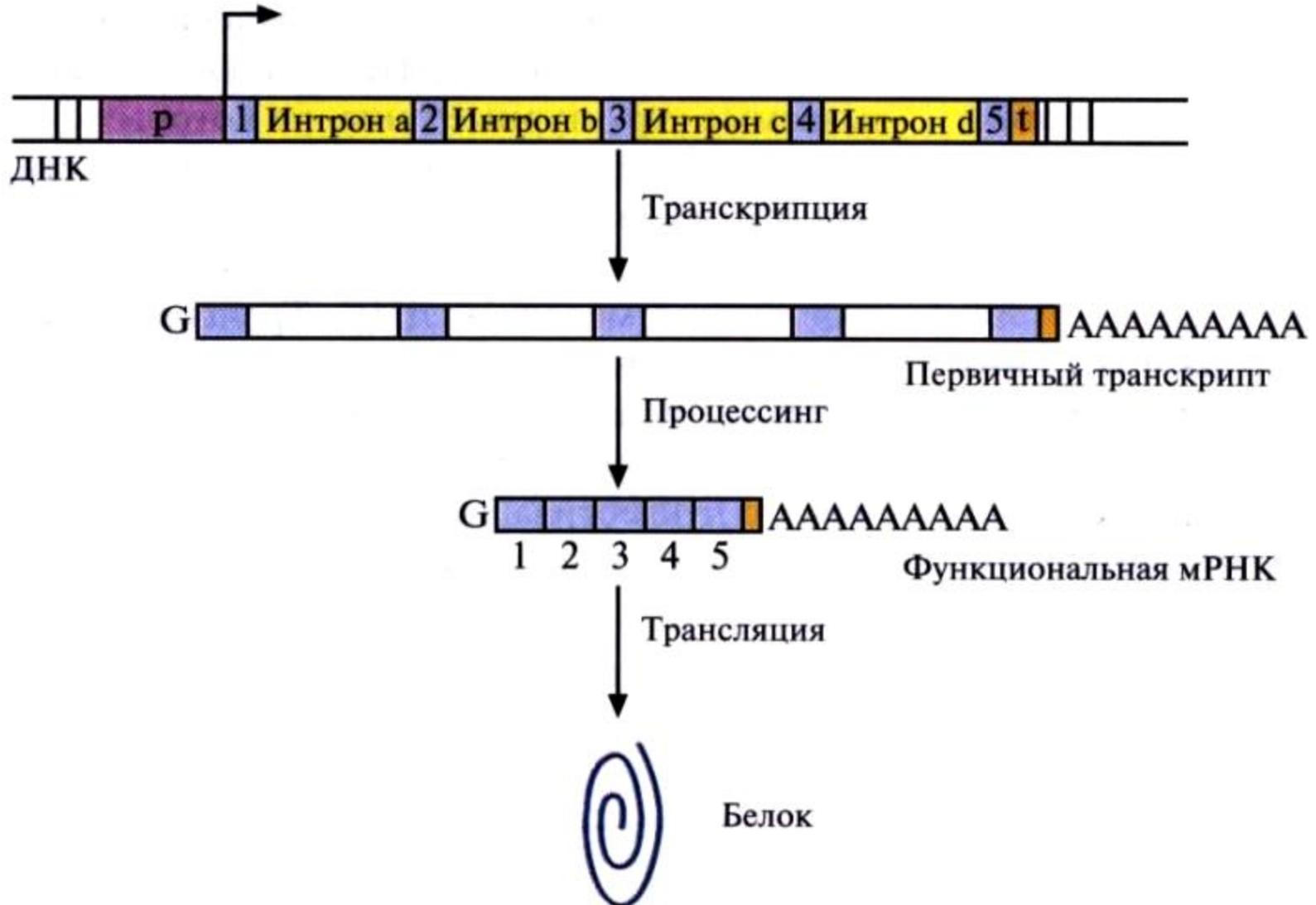
Различия эписикла и особенности инициации трансляции у про- и эукариот.
Эффективность трансляции и способы ее регуляции.

ТРАНСЛЯЦИЯ

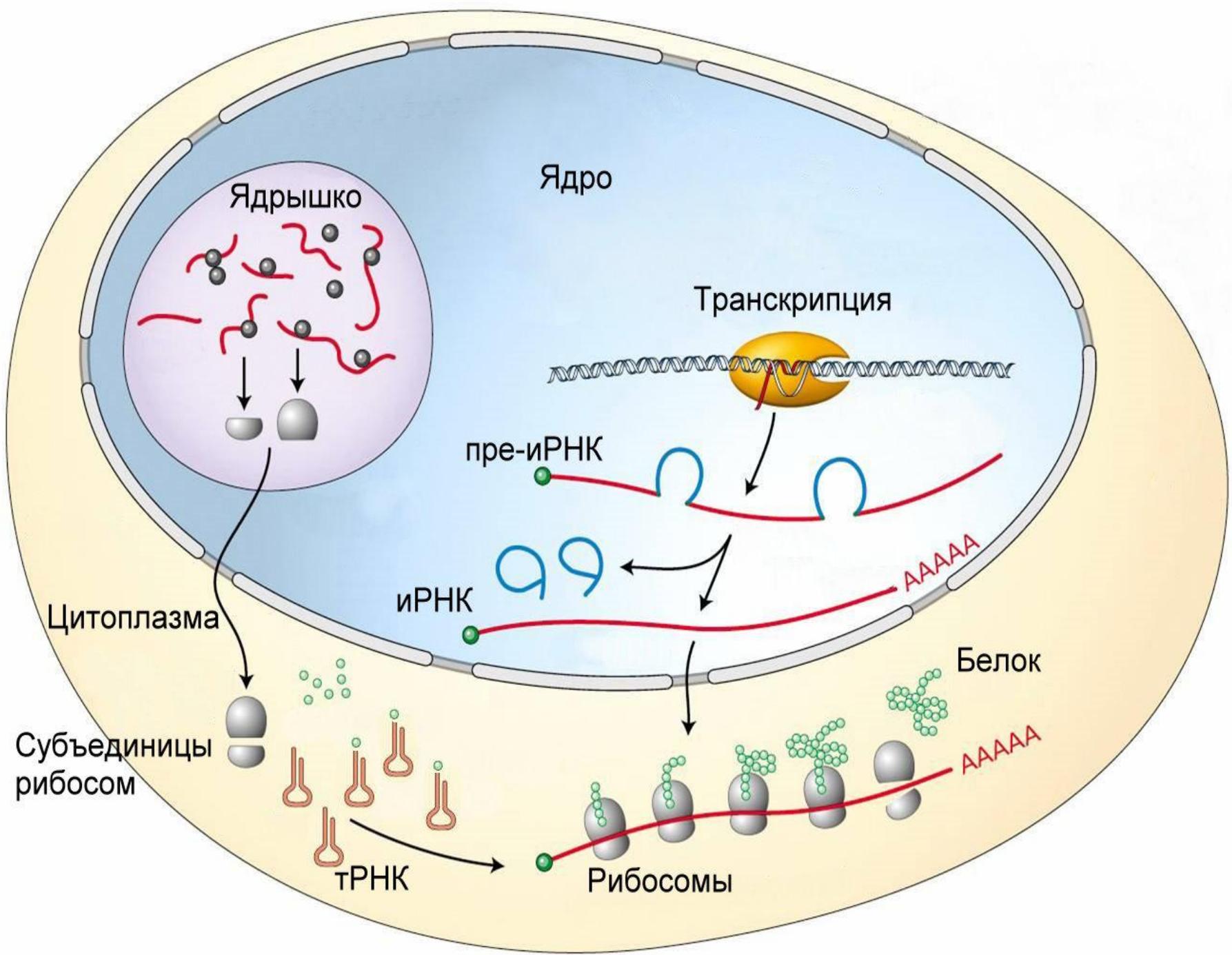


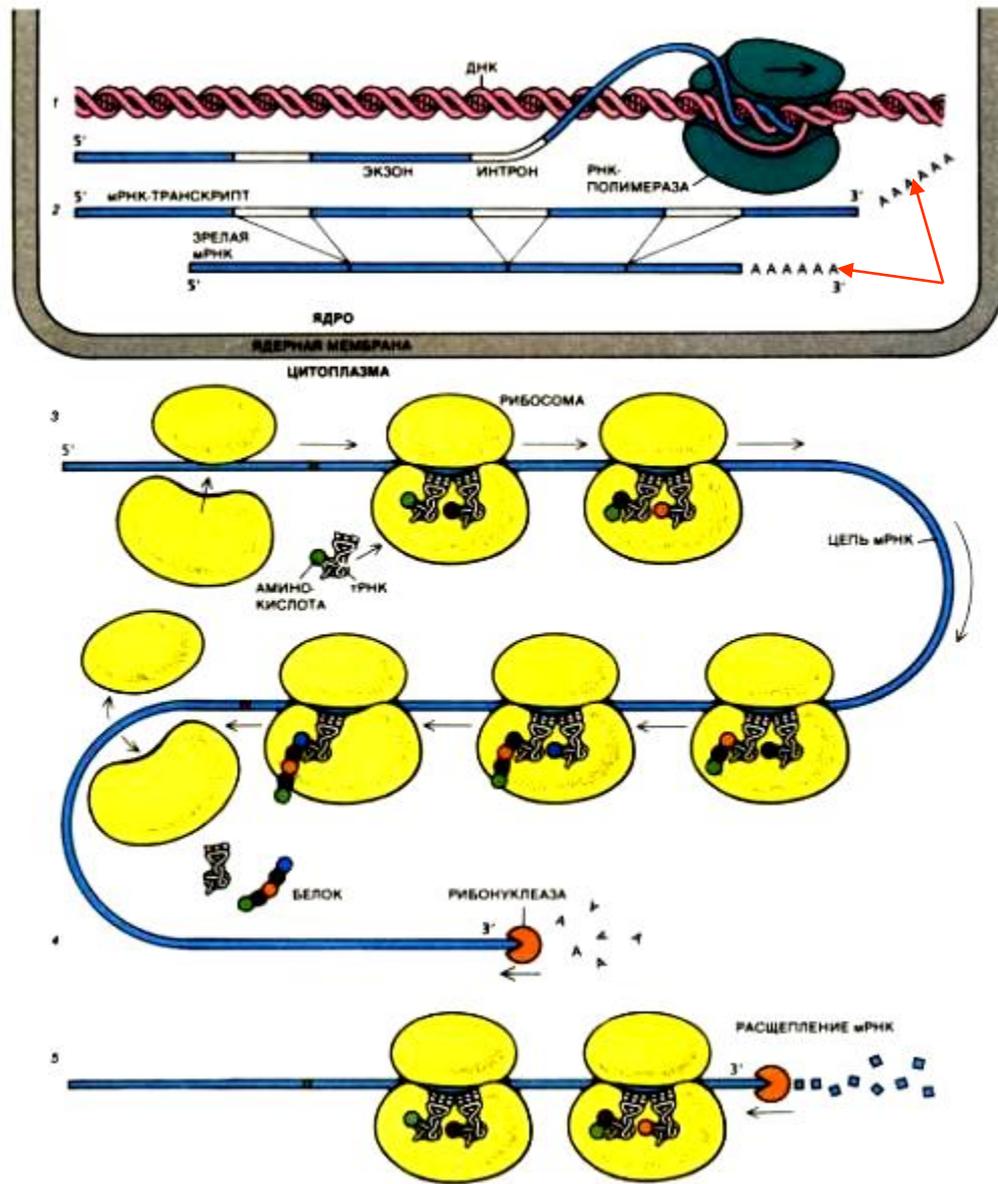
- общие
- специальные

Схема биосинтеза белка



р - промотор

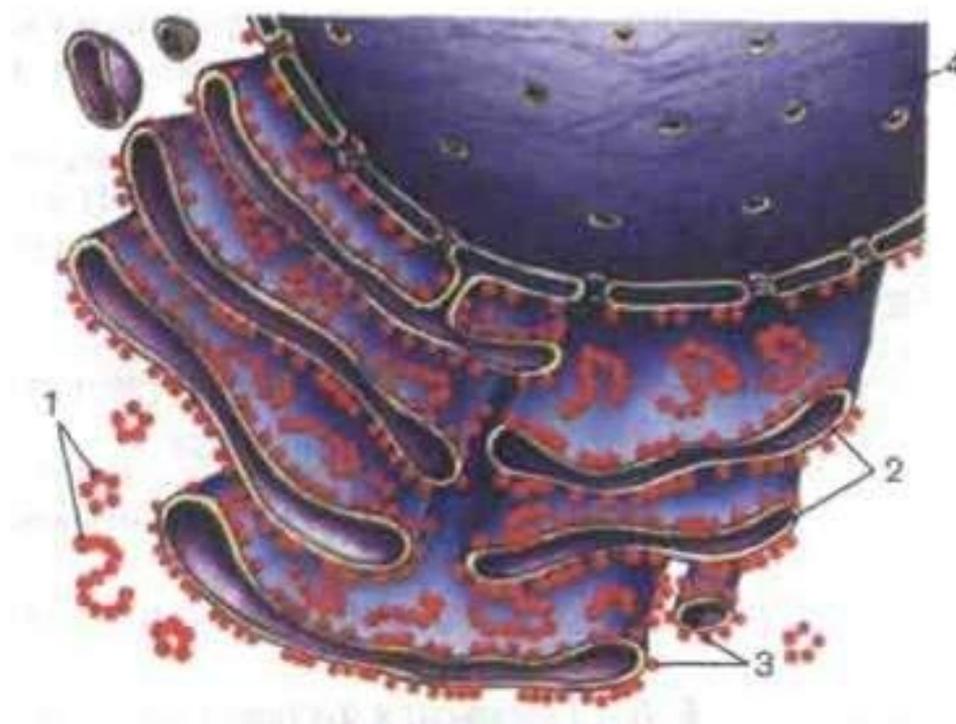




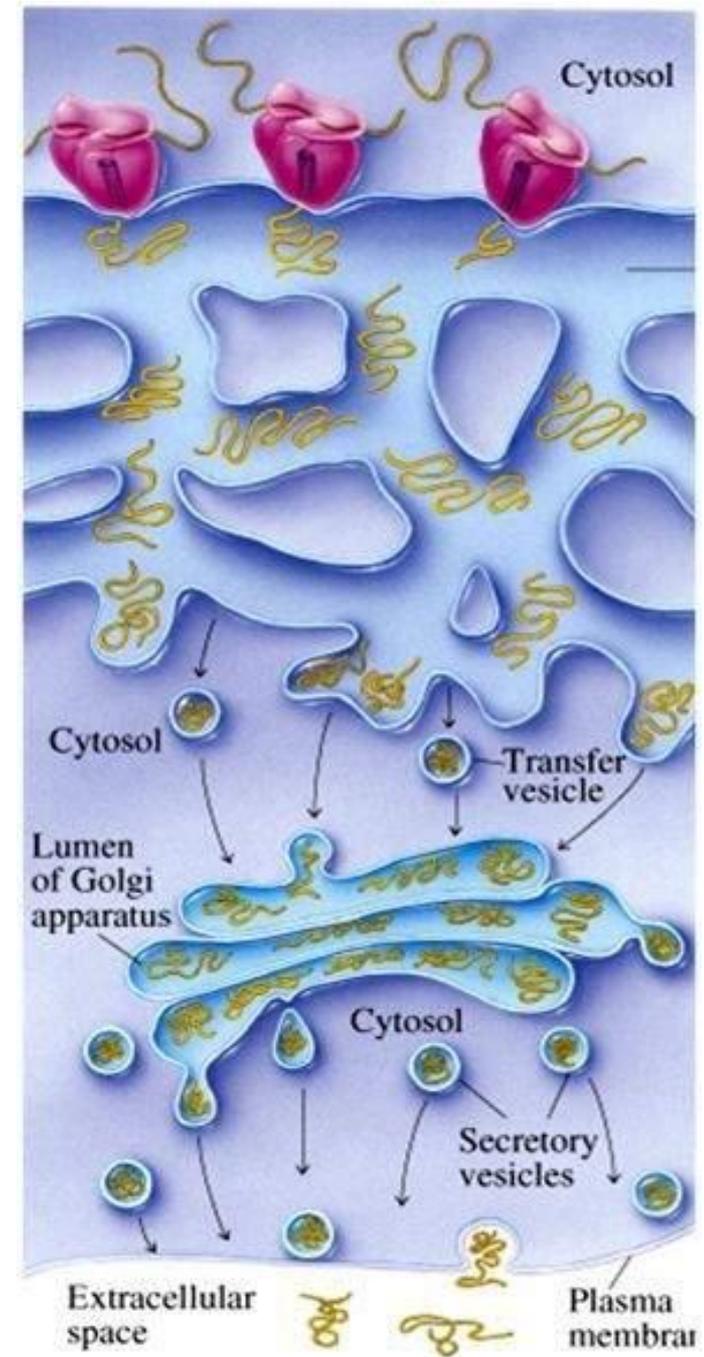
После удаления интронов иРНК становится «зрелой» и переносится в цитоплазму. Там с ней связываются рибосомы, которые одна за другой двигаются вдоль иРНК и при участии молекул тРНК синтезируют первичную цепь белка из аминокислот согласно информации, записанной в кодирующем участке иРНК. По прошествии некоторого времени иРНК разрушается под действием ферментов – **рибонуклеаз**.

Первым подвергается деградации хвост **poly (A)**, который присоединяется к иРНК в процессе транскрипции и не удаляется при сплайсинге.

Синтез полипептидной цепи на матрице иРНК, может происходить в свободных рибосомах цитоплазмы или на шероховатой эндоплазматической сети.



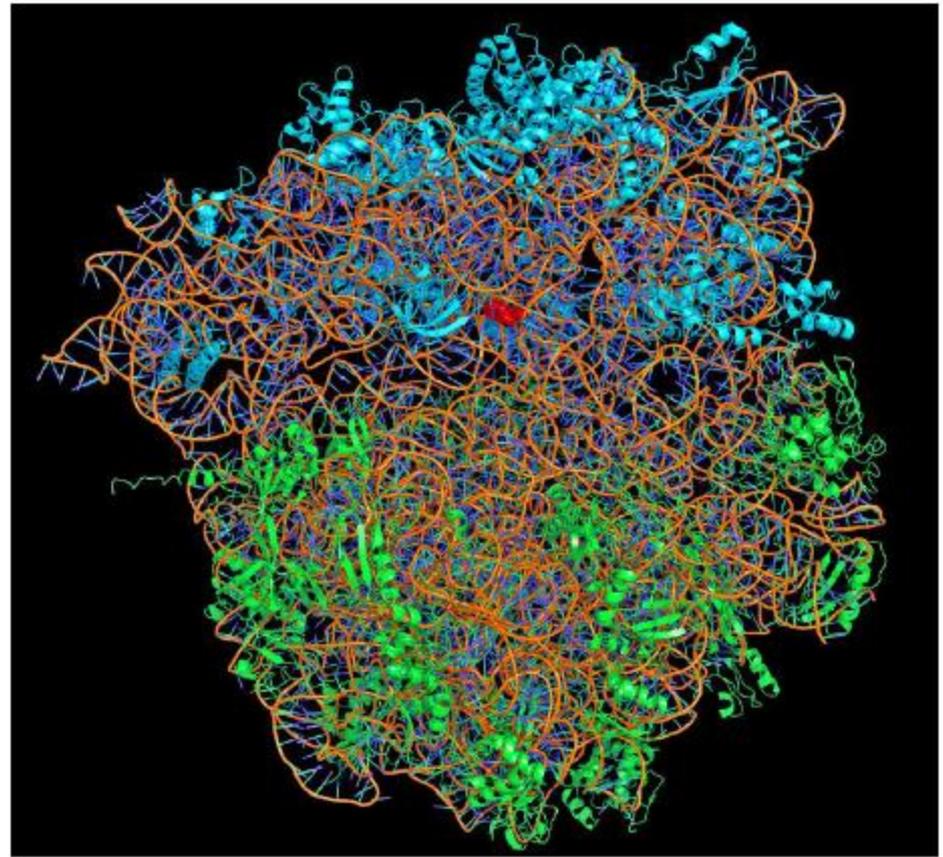
В цитоплазме синтезируются белки для собственных нужд клетки, белки, синтезируемые на ЭПС, транспортируются по ее каналам в комплекс Гольджи и выводятся из клетки.



Трансляция

(от лат. translatio — перевод) — процесс синтеза белка из аминокислот на матрице РНК, осуществляемый рибосомой.

- Главный участник трансляции - *рибосома*



Основные этапы трансляции

- **Инициация** — узнавание рибосомой стартового кодона и начало синтеза.
- **Элонгация** — синтез белка.
- **Терминация** — узнавание стоп-кодона и отделение продукта.

Трансляция

Chemistry



The Nobel Prize in Chemistry 2009

"for studies of the structure and function of the ribosome"



Photo: MRC Laboratory of Molecular Biology

Venkatraman Ramakrishnan

🕒 1/3 of the prize

United Kingdom

MRC Laboratory of Molecular Biology
Cambridge, United Kingdom



Credits: Michael Marsland/Yale University

Thomas A. Steitz

🕒 1/3 of the prize

USA

Yale University
New Haven, CT, USA;
Howard Hughes Medical Institute



Credits: Micheline Pelletier/Corbis

Ada E. Yonath

🕒 1/3 of the prize

Israel

Weizmann Institute of Science
Rehovot, Israel

Трансляция

Трансляция – синтез полипептидной цепи на матрице РНК.

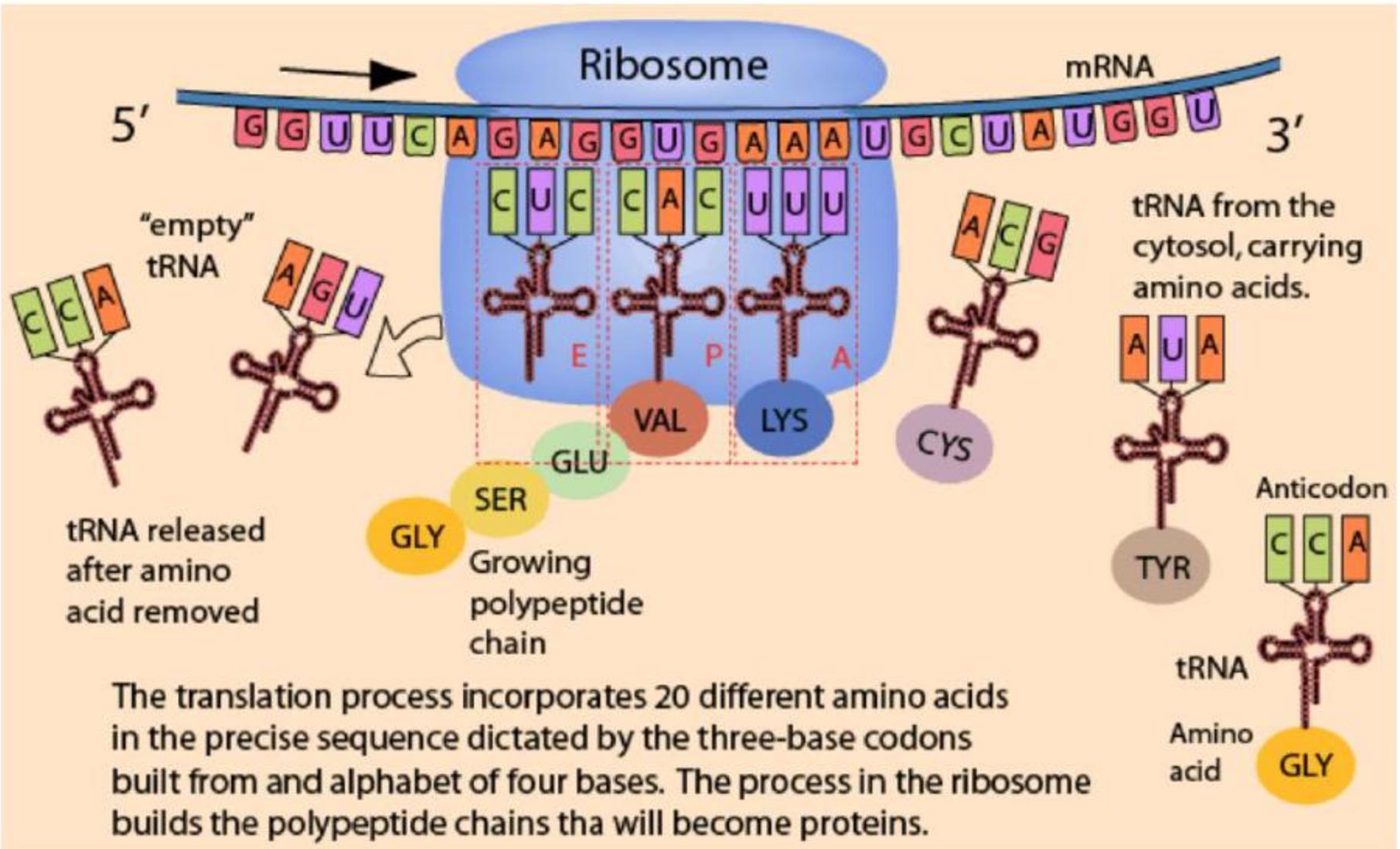
Принцип:

Матричность

Условия:

- мРНК
- Рибосомы
- Аминокислоты
- тРНК
- Ферменты, факторы трансляции
- Энергия (АТФ, ГТФ)
- Среда

Основные участники трансляции



Генетический код

Генетический код – это система записи последовательности аминокислот полипептидной цепи в виде последовательности нуклеотидов ДНК или РНК.

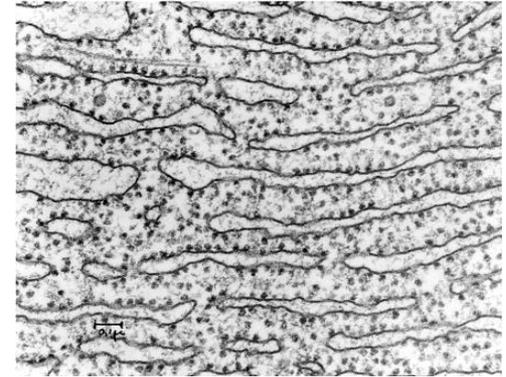
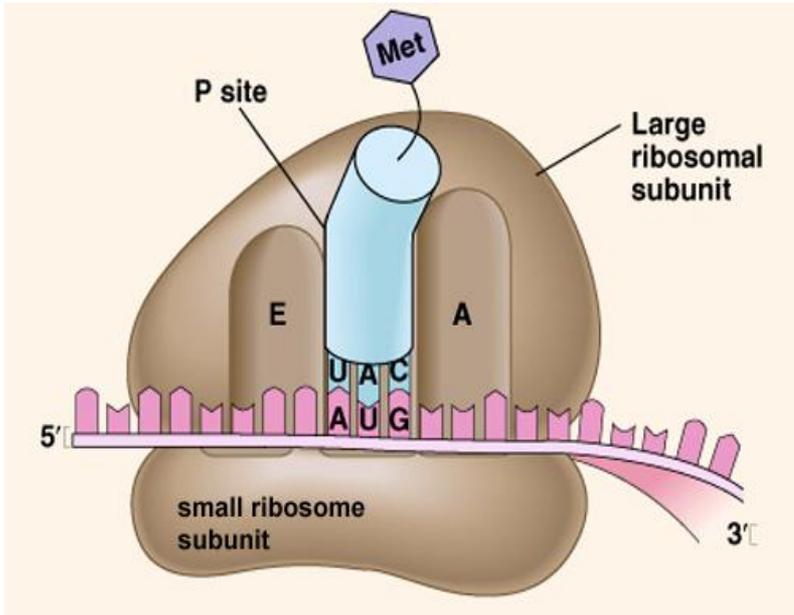
Свойства генетического кода

- Триплетность
- Вырожденность (избыточность)
- Однозначность
- Неперекрываемость
- Непрерывность
- Универсальность

Таблица генетического кода

	U	C	A	G	
U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } <u>UAA Stop</u> <u>UAG Stop</u>	UGU } Cys UGC } <u>UGA Stop</u> UGG Trp	U C A G
C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G
A	AUU } AUC } Ile AUA } <u>AUG Met</u>	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G
G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G

Рибосома



tonylam2011.wix.com

<http://blogs.scientificamerican.com>

Впервые описаны Дж. Паладе в 1950-х



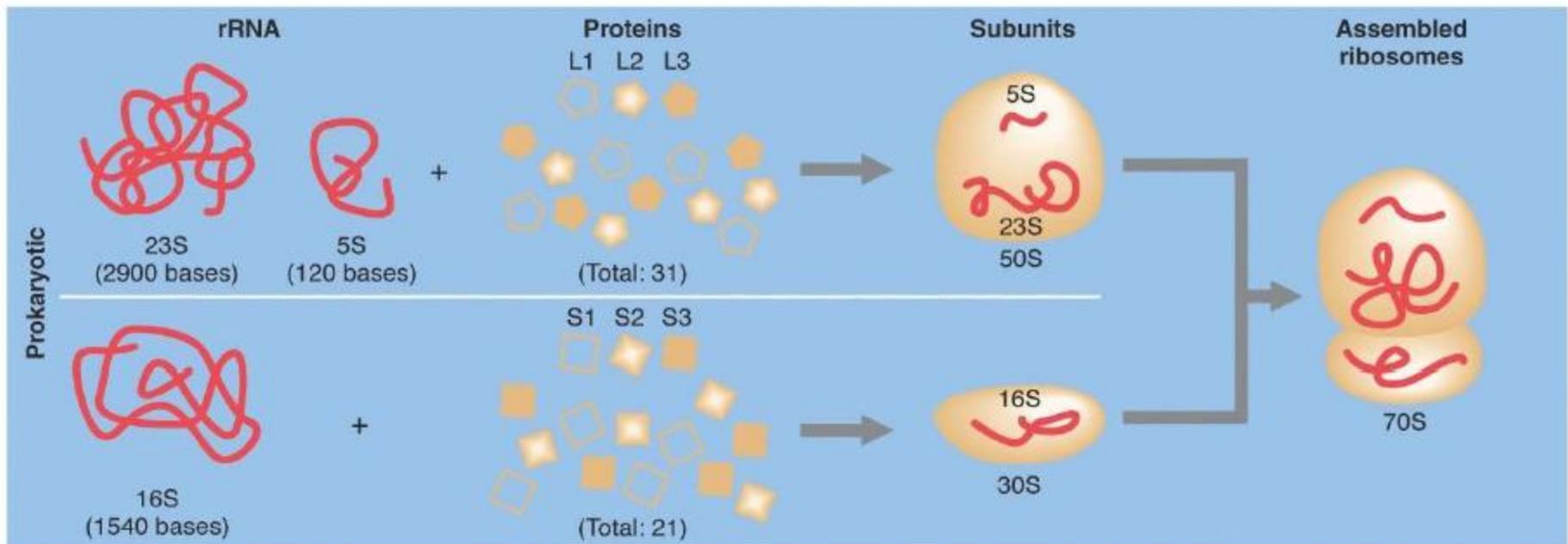
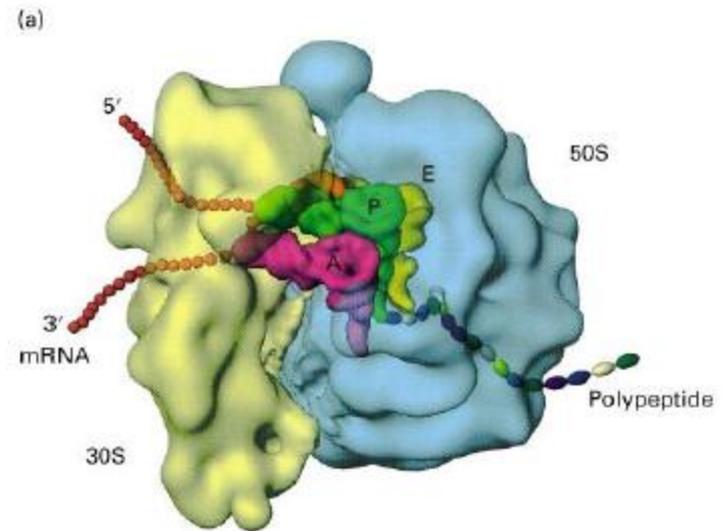
Дж. Паладе (1912-2008)



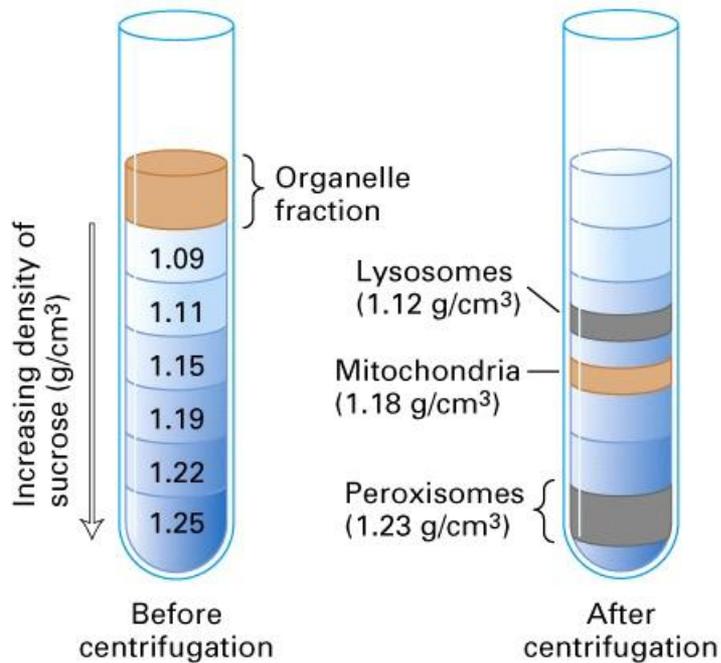
Нобелевская премия по физиологии и медицине 1974 г.

Рибосома

- Рибосомы представляют собой нуклеопротеид, в составе которого отношение РНК/белок составляет 50/50 у высших животных и (60-65)/(35-40) у бактерий
- Рибосомная РНК составляет около 70 % всей РНК клетки.
- Константа седиментации (скорость оседания в ультрацентрифуге) рибосом эукариотических клеток равняется 80S (большая субъединица - 60S и малая - 40S), бактериальных клеток — 70S (большая субъединица - 50S и малая - 30S).



Ультрацентрифугирование



www.pha.jhu.edu

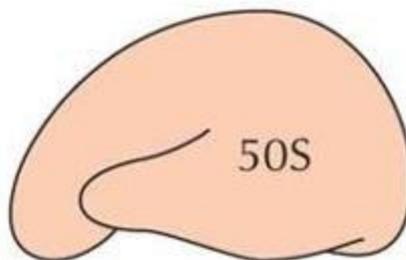
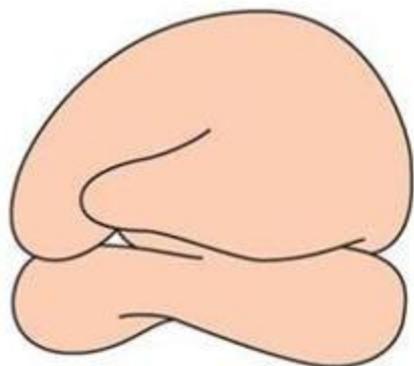


Теодор Сведберг
(1884-1971)
изобрел ультра-
центрифугу

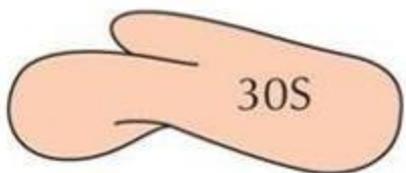


Коэффициент седиментации выражают в единицах Сведберга (S)

70S рибосома
(прокариоты)

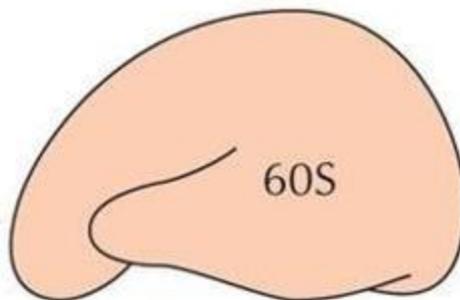
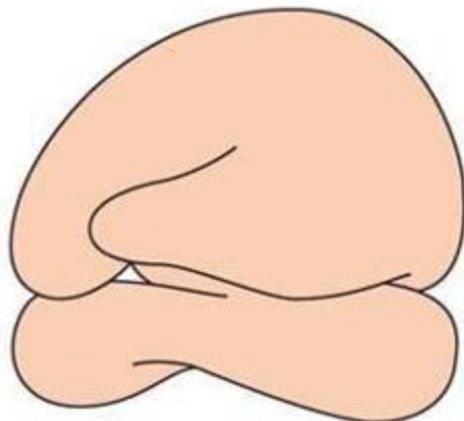


23S рРНК,
5S рРНК,
34 белка

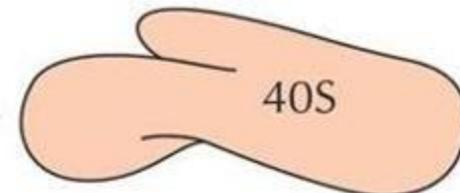


16S рРНК,
21 белок

80S рибосома
(эукариоты)



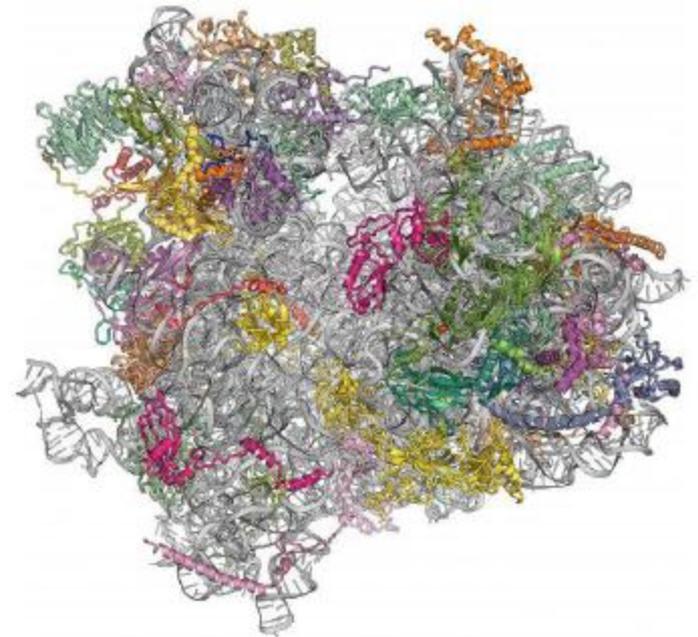
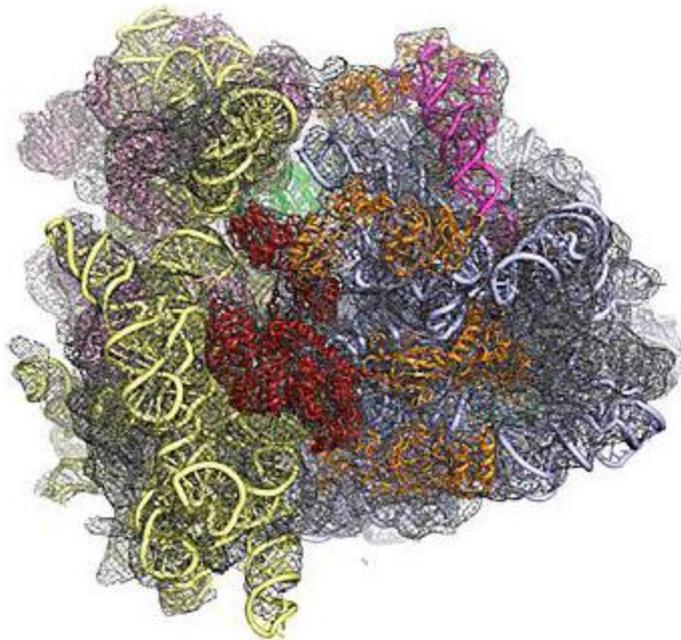
28S рРНК,
5S рРНК,
5,8S рРНК,
45-50 белков



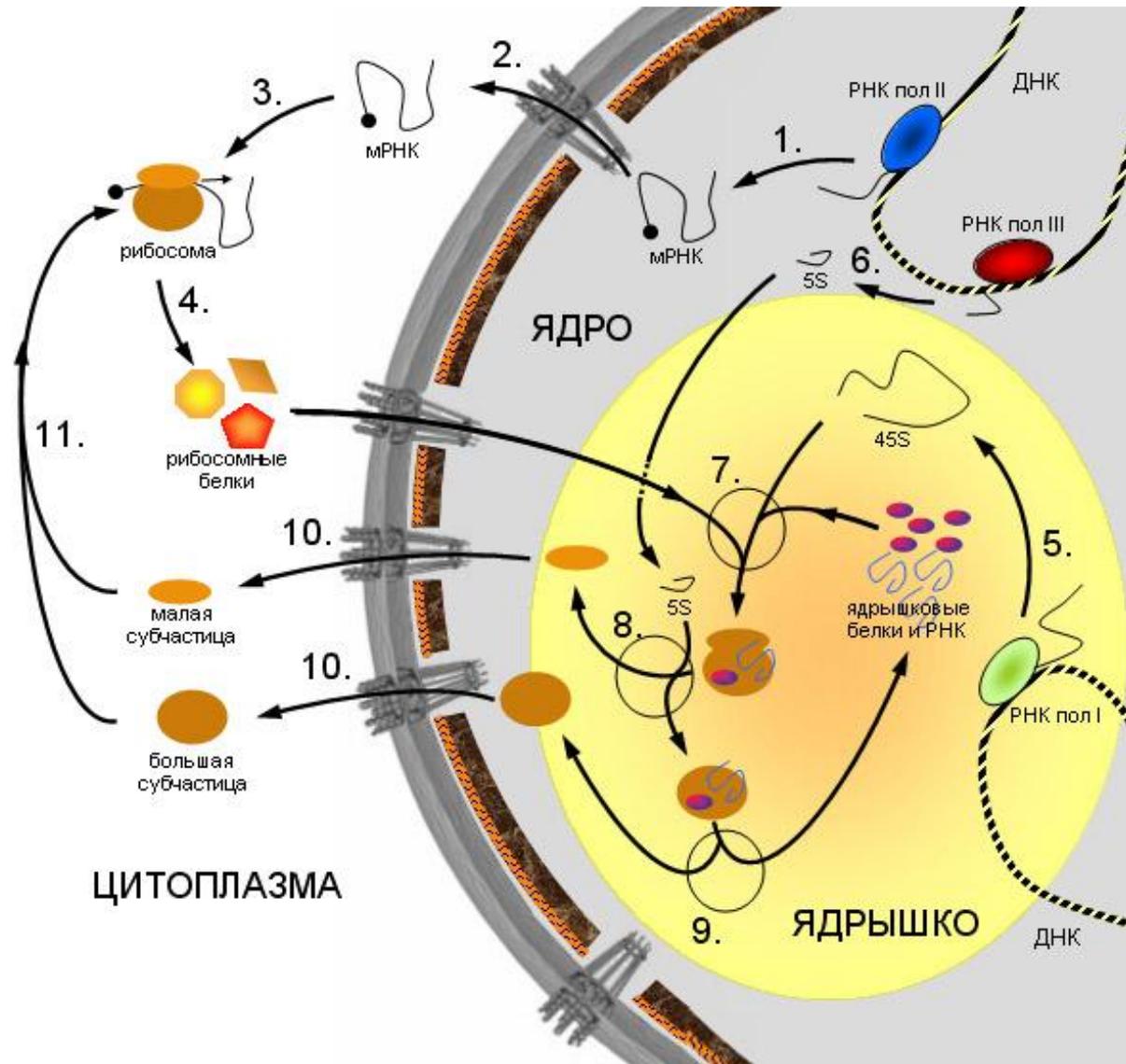
18S рРНК,
30-35 белков

Рибосома

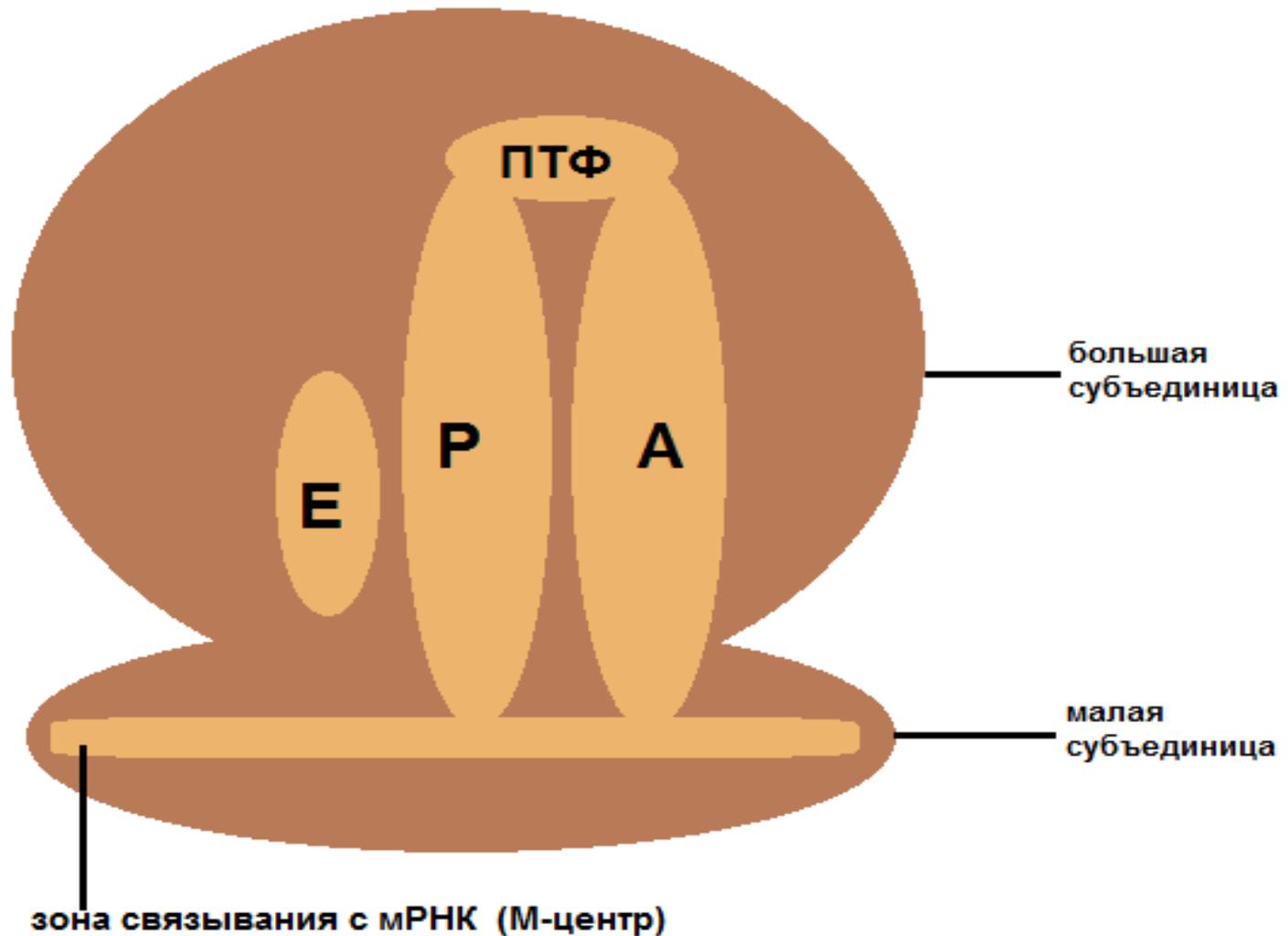
- Рибосомы эукариот включают четыре молекулы рРНК, из них 18S, 5.8S и 28S рРНК
- Они синтезируются в ядрышке РНК полимеразой I в виде единого предшественника (45S), который затем подвергается модификациям и нарезанию.
- 5S рРНК синтезируется РНК полимеразой III в другой части генома и не нуждаются в дополнительных модификациях.
- Почти вся рРНК находится в виде магниевой соли, что необходимо для поддержания структуры;
- При удалении ионов магния рибосома подвергается диссоциации на субъединицы.
- Синтез рибосом у эукариот происходит в специальной внутриядерной структуре — ядрышке.



Синтез рибосом у эукариот

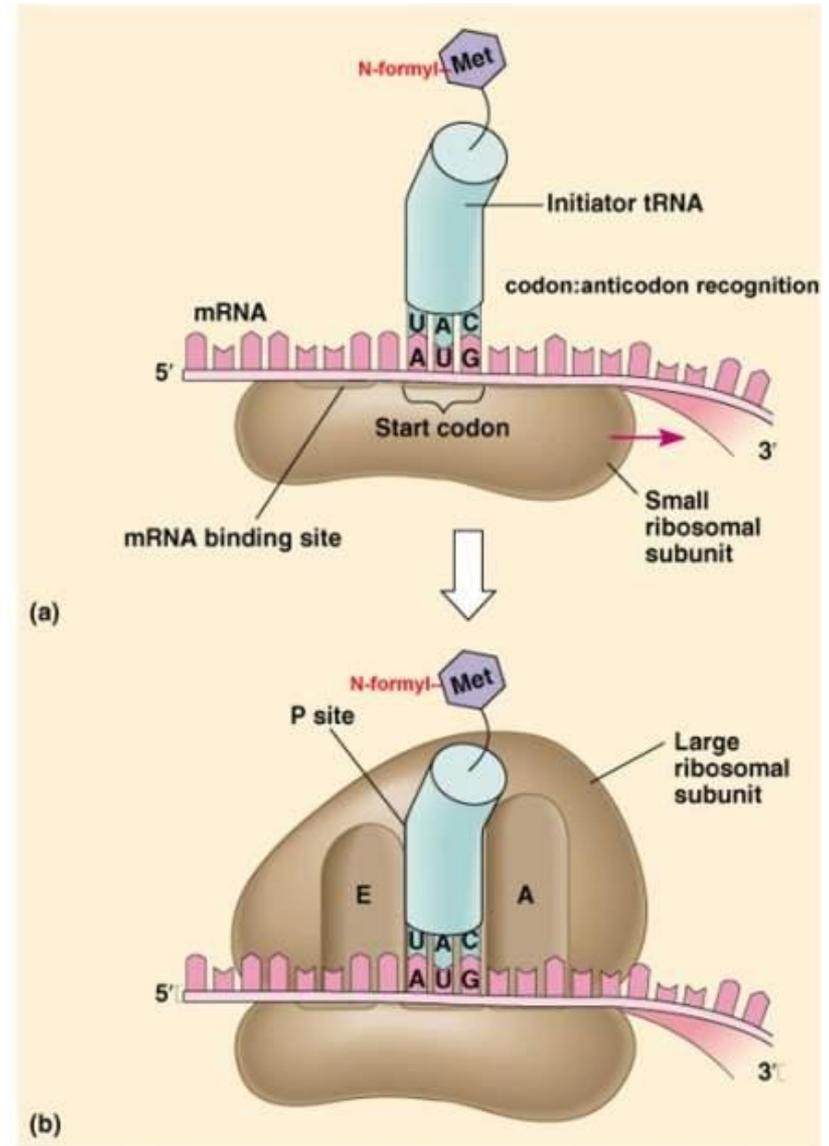


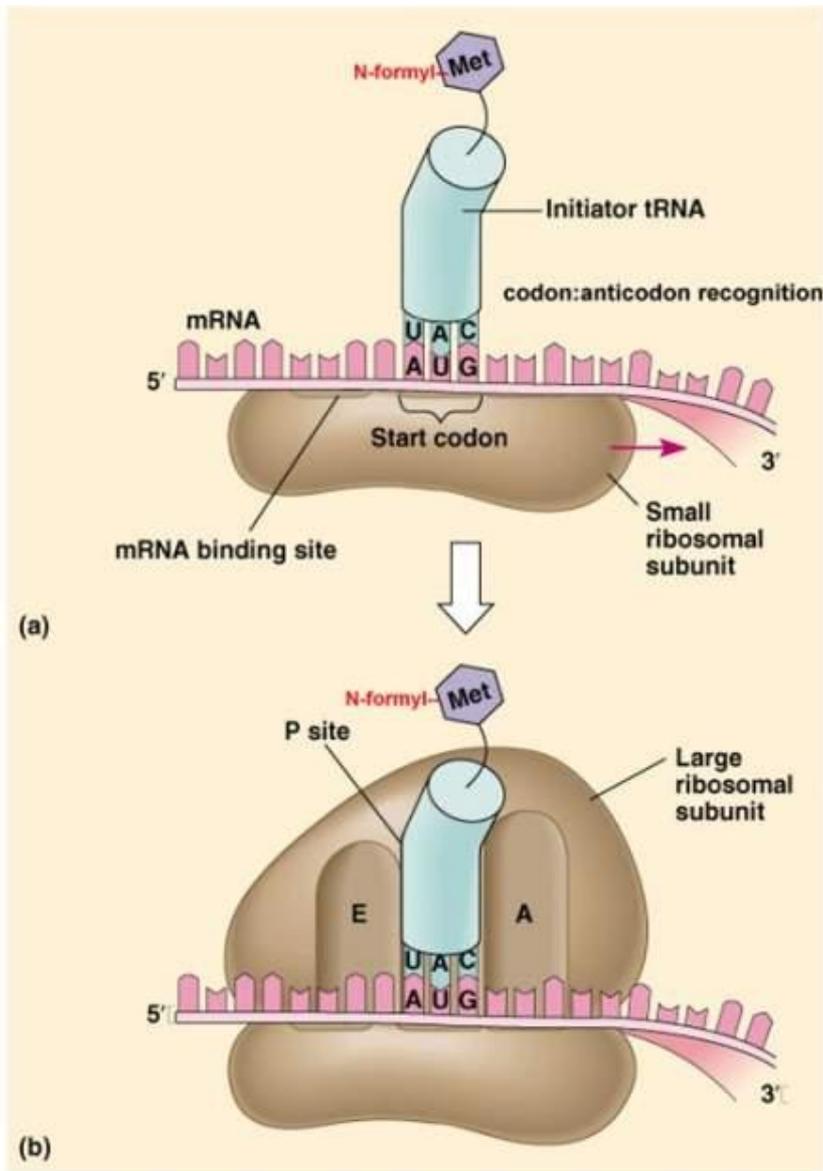
Структура рибосомы



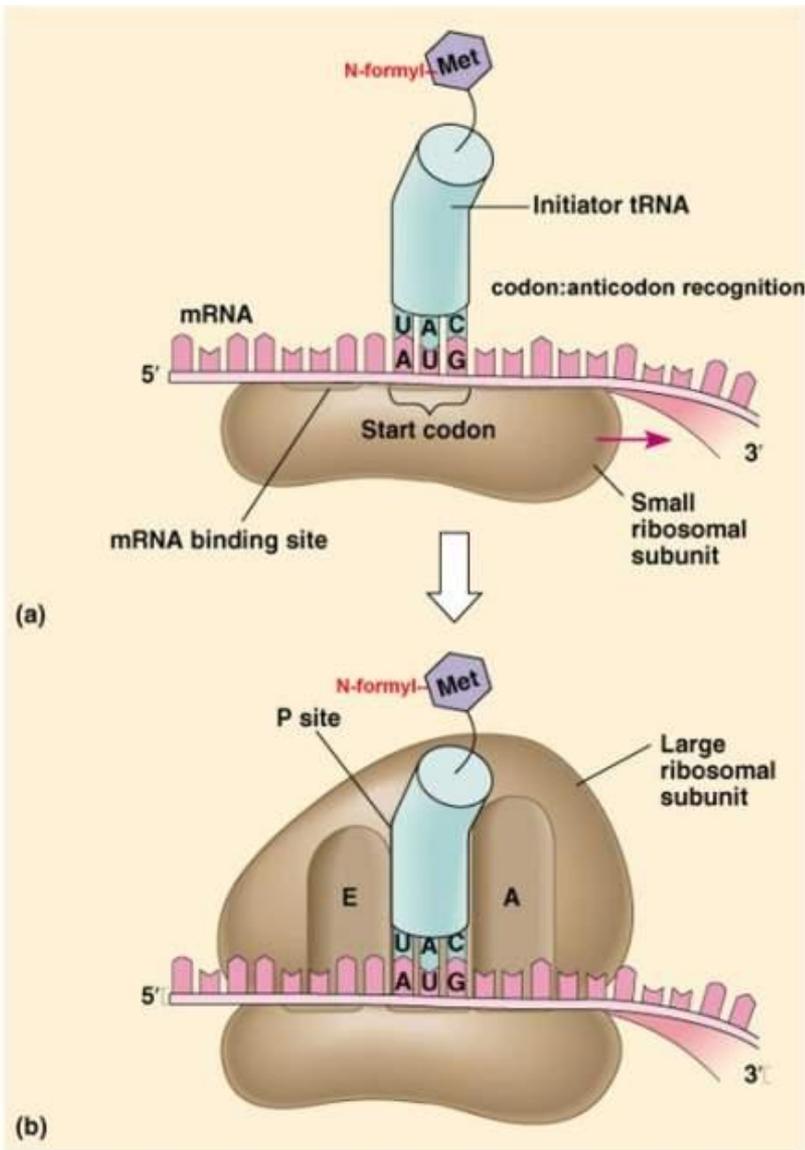
Рибосомы

В малой субъединице рибосомы расположен функциональный центр рибосомы (ФЦР) с двумя участками – пептидильным (Р-участок) и аминоацильным (А-участок). В ФЦР может находиться шесть нуклеотидов и-РНК, три - в пептидильном и три - в аминоацильном участках.



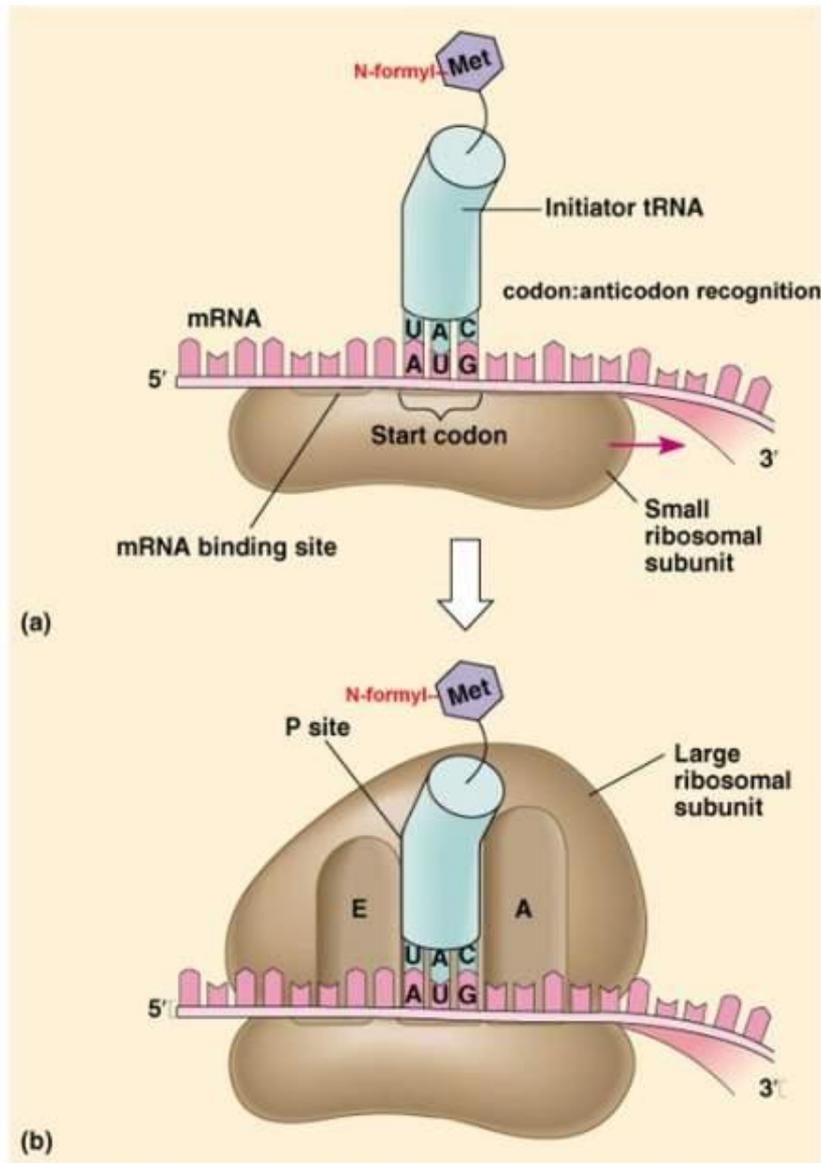


Синтез белка начинается с того момента, когда к 5'-концу и-РНК присоединяется малая субъединица рибосомы, в Р-участок которой заходит метиониновая *t*-РНК.



За счет АТФ происходит передвижение инициаторного комплекса (малая субъединица рибосомы, т-РНК с метионином) по нетранслируемой области (НТО) до метионинового кодона АУГ.

Этот процесс называется *сканированием*.



Как только в Р-участок сканирующего комплекса попадает кодон АУГ, происходит присоединение большой субъединицы рибосомы. В А-участок ФЦР поступает вторая т-РНК, чей антикодон комплементарно спаривается с кодоном и-РНК, находящимся в А-участке.

Пептидилтрансферазный центр большой субъединицы катализирует образование пептидной связи между метионином и второй аминокислотой. Отдельного фермента, катализирующего образование пептидных связей, не существует.



После образования пептидной связи, рибосома передвигается на следующий кодовый триплет и-РНК, метиониновая т-РНК отсоединяется от метионина и выталкивается в цитоплазму.



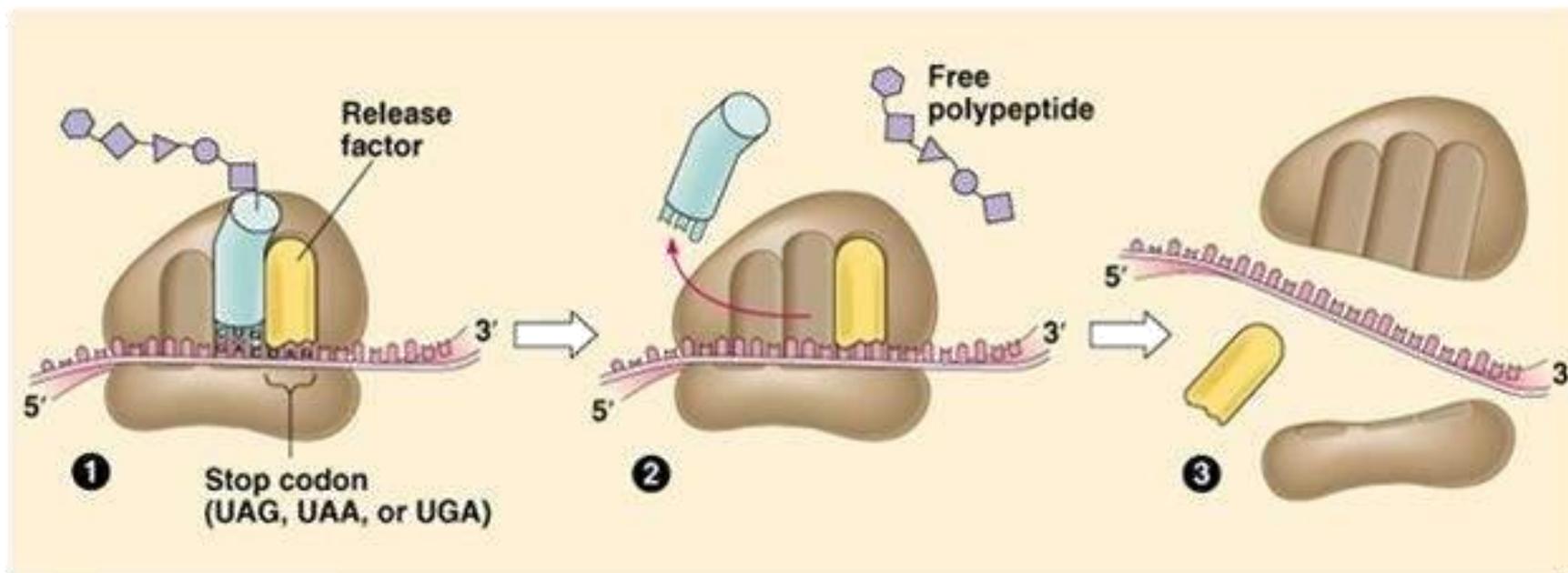
В А-участок заходит третья тРНК, и образуется пептидная связь между второй и третьей аминокислотами.



Скорость передвижения рибосомы по и-РНК - 5–6 триплетов в секунду, на синтез белковой молекулы, состоящей из сотен аминокислотных остатков, клетке требуется несколько минут.

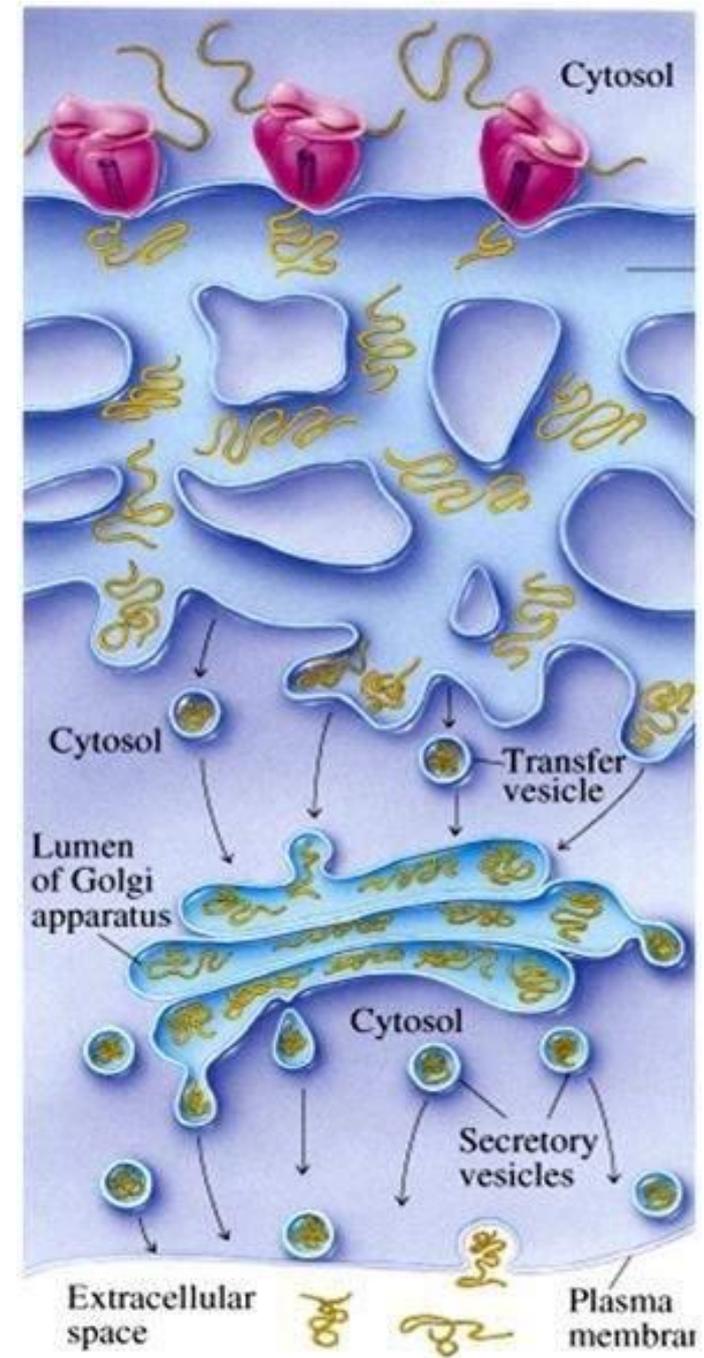
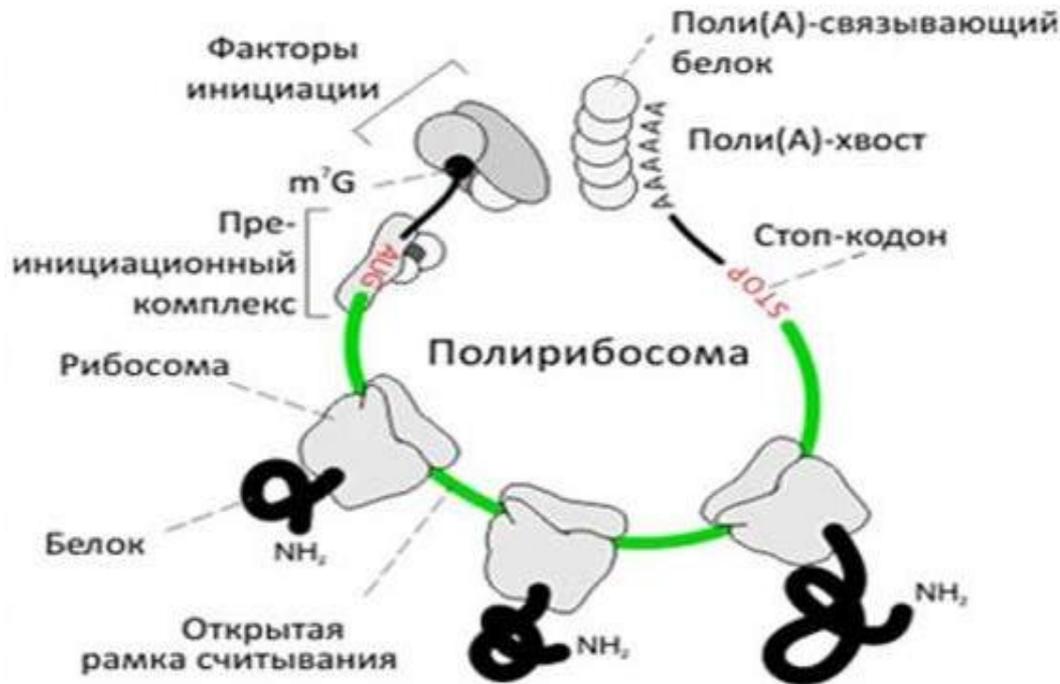


Когда в А-участок попадает кодон-терминатор (УАА, УАГ или УГА), с которым связывается особый белковый фактор освобождения, полипептидная цепь отделяется от т-РНК и покидает рибосому. Происходит диссоциация, разъединение субъединиц рибосомы.



Полисома

Через и-РНК могут одновременно проходить несколько рибосом, последовательно транслирующие один и тот же белок. Такую структуру, называют полисомой.



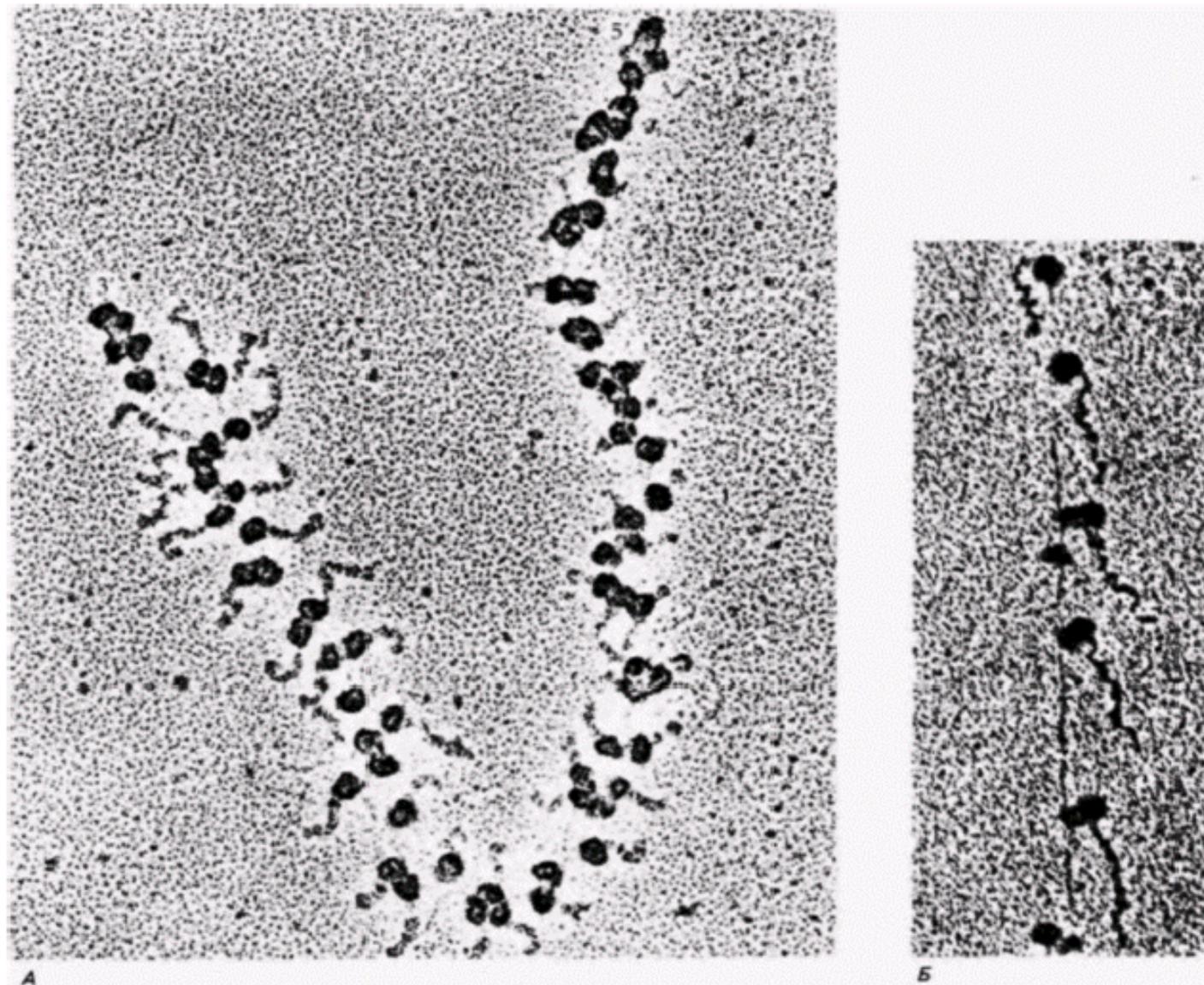


Рис. 14.3. Индивидуальная полисома, транскрибирующая гигантскую мРНК пуфа BR2 из клеток слюнных желез *Chironomus tentans*. А. Электронная микрофотография полисомы, состоящей из 74 рибосом. Можно видеть синтезируемые белки, выходящие из рибосом и растущие по мере движения рибосом от 5'- к 3'-концу мРНК. Около 3'-конца располагаются рибосомы, от которых белок уже отделился. Б. Фотография полисомы при большем увеличении; полисома была растянута в ходе приготовления препарата. Можно видеть расположение мРНК относительно рибосомных субъединиц и синтезируемого полипептида. (Из Francke et al., 1982; фотография с любезного разрешения J.E.Edstrom.)

Весь цикл процессов, связанных с синтезом одной белковой молекулы, занимает в среднем 1-3 с. После завершения синтеза мРНК распадается на нуклеотиды.

Активация геномов зародышей и продолжительность функционирования материнской мРНК

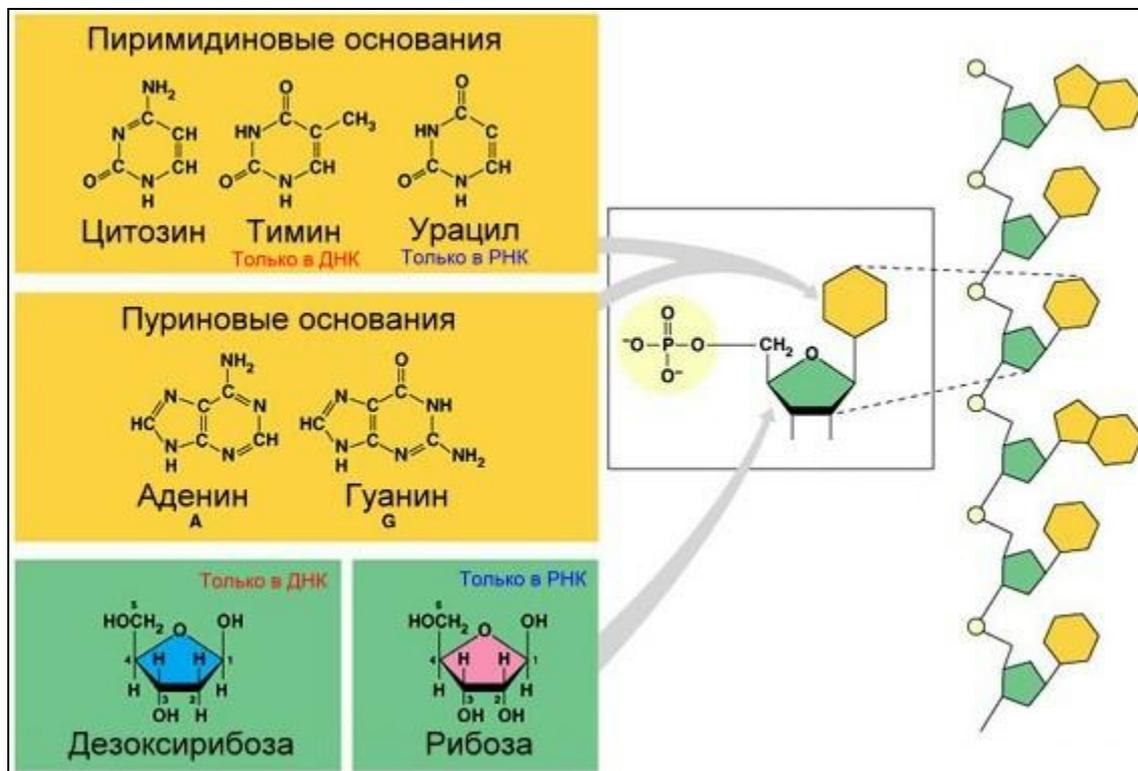
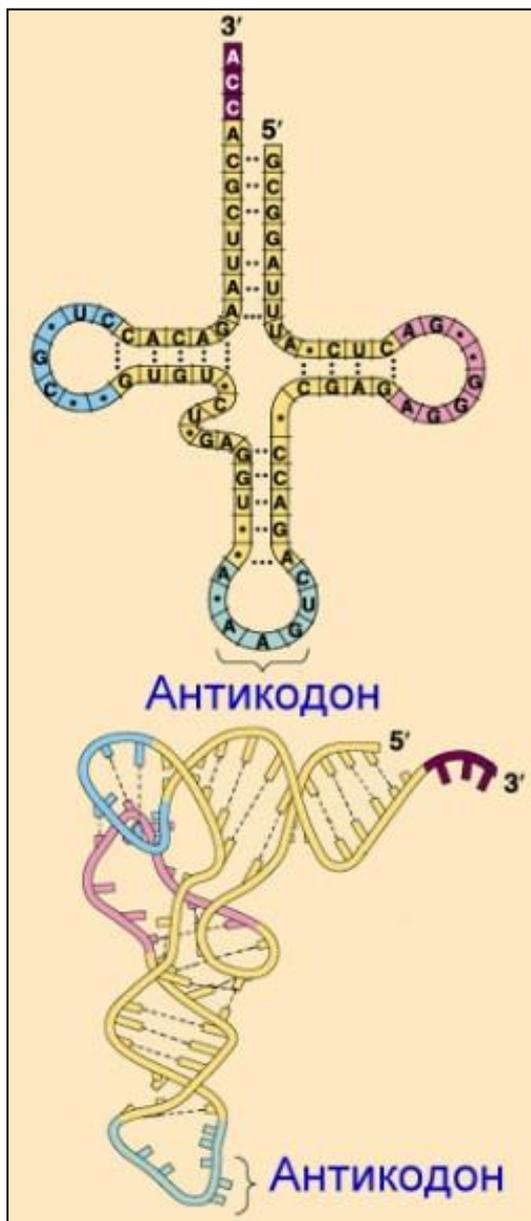
Организм	Время регистрации первых транскриптов в ядрах	Время основной волны синтеза новых транскриптов в ядрах	Продолжительность функционирования материнских мРНК
Млекопитающие (<i>Mus musculus</i>)	Поздняя фаза одноклеточной стадии (11–17 ч)	Ранняя морула (от 8 до 16 клеток) (3 сут)	Четырехклеточная стадия (2–4 сут)
Амфибии (<i>Xenopus laevis</i>)	12-е деление дробления (4000 клеток) средней бластулы (7 ч) ¹⁾	12-е деление дробления (4000 клеток) средней бластулы (7 ч)	Стадия нейрулы (15–30 ч)
Иглокожие (<i>S. purpuratus</i> и другие морские ежи)	Зигота (стадия пронуклеусов) (<0,5 ч)	Средняя бластула (~128 клеток) (11 ч)	Поздняя бластула (15 ч)
Насекомые (<i>Drosophila melanogaster</i>)	Синцитиальная бластодерма после 10-го деления ядер (2,5 ч)	Клеточная бластодерма после 14-го деления ядер (3,5 ч)	Средняя фаза органогенеза (~15 ч)

Источники: Will, 1964; Poccia, et al., 1985; Weir, Kornberg, 1985; Clegg, Piko, 1983; Gilbert, Solter, 1985; Woodland, Ballentine, 1980; Davidson, 1986; Edgar, Schubiger, 1986.

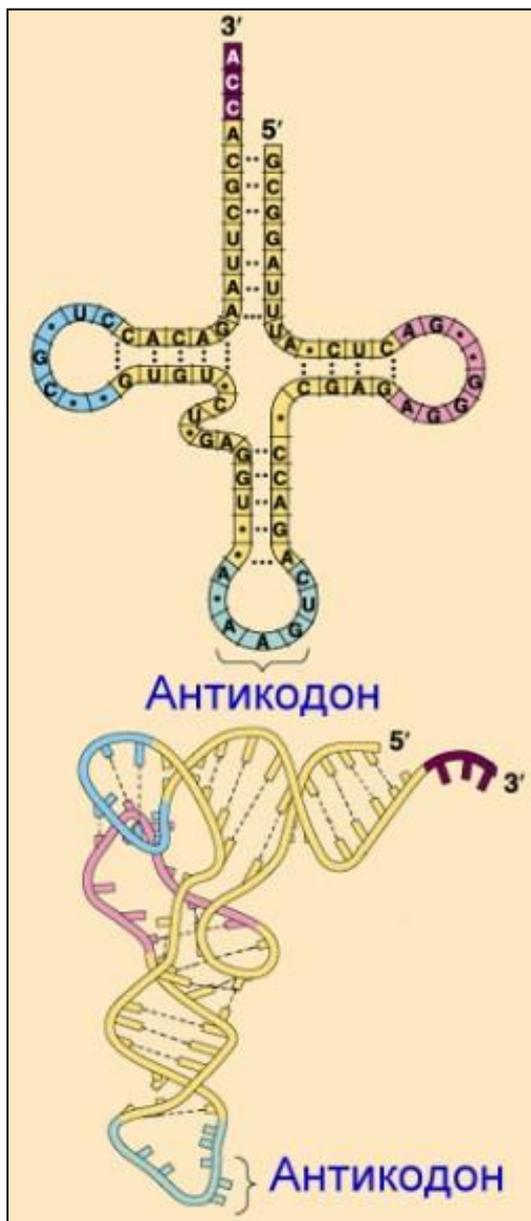
¹⁾ Время указывает продолжительность инкубации при соответствующей температуре. Крайне низкий уровень синтеза РНК наблюдается у *Xenopus* уже на стадии 6-го деления дробления (64 клетки, 3,5 ч), если бластомеры инкубируются в специальных условиях (Nakakura et al., 1987).

Характеристика РНК

Молекулы РНК являются полимерами, мономерами которых являются **рибонуклеотиды**, образованные: остатком пятиуглеродного сахара — рибозы; остатком одного из азотистых оснований: пуриновых — аденина, гуанина; пиримидиновых — урацил, цитозина; остатком фосфорной кислоты.

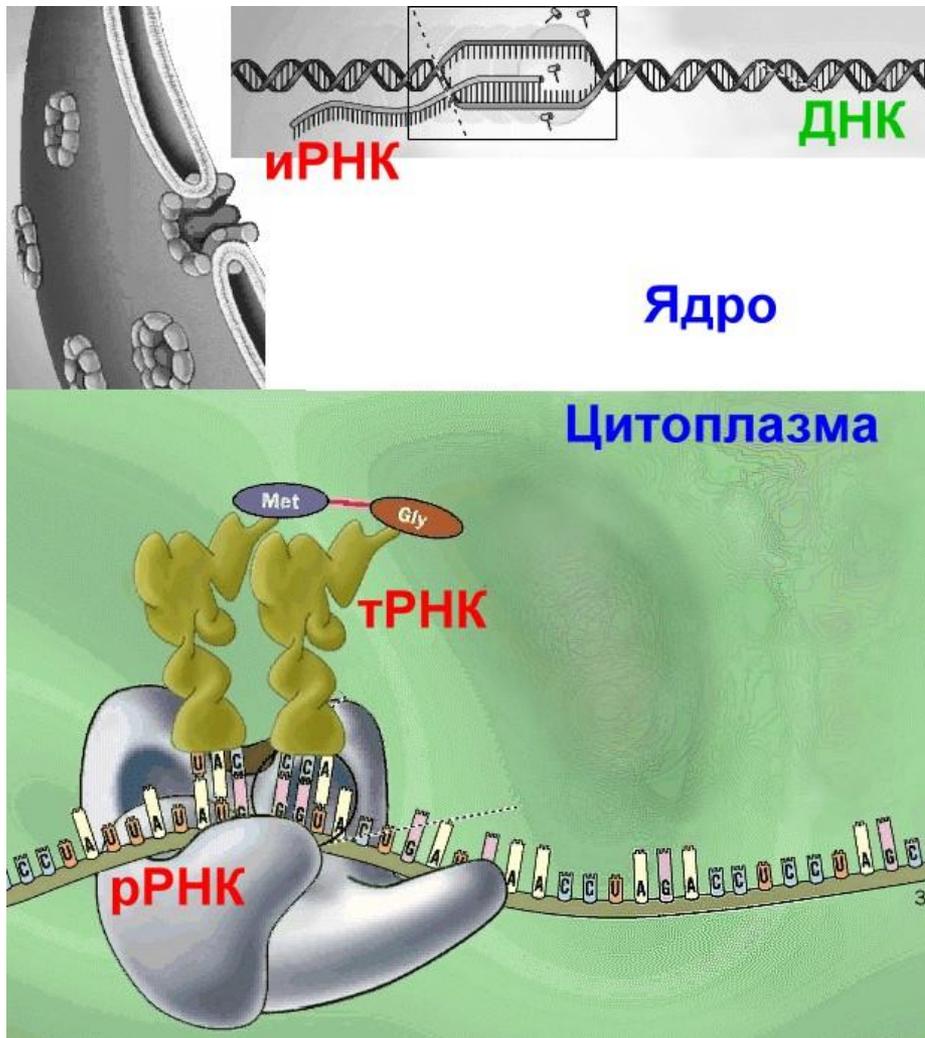


Характеристика РНК



Молекула РНК представляет собой неразветвленный полинуклеотид, который может иметь первичную структуру – последовательность нуклеотидов, вторичную – образование петель за счет спаривания комплементарных нуклеотидов, или третичную структуру – образование компактной структуры за счет взаимодействия спирализованных участков вторичной структуры.

Характеристика РНК



Содержание РНК в любых клетках в 5 – 10 раз превышает содержание ДНК. Существует три основных класса рибонуклеиновых кислот:

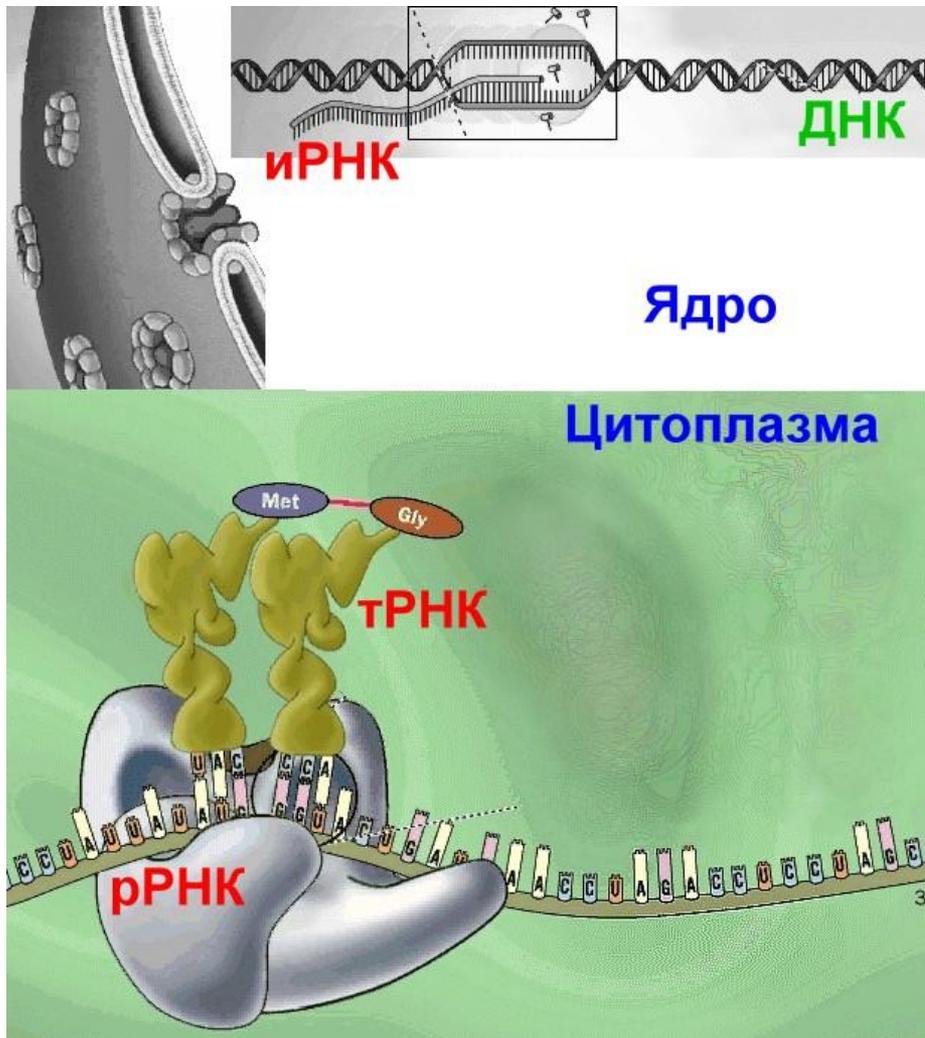
Информационные (матричные) РНК — иРНК (5%);

транспортные РНК — тРНК (10%);

рибосомальные РНК — рРНК (85%).

Все виды РНК обеспечивают биосинтез белка.

Характеристика РНК

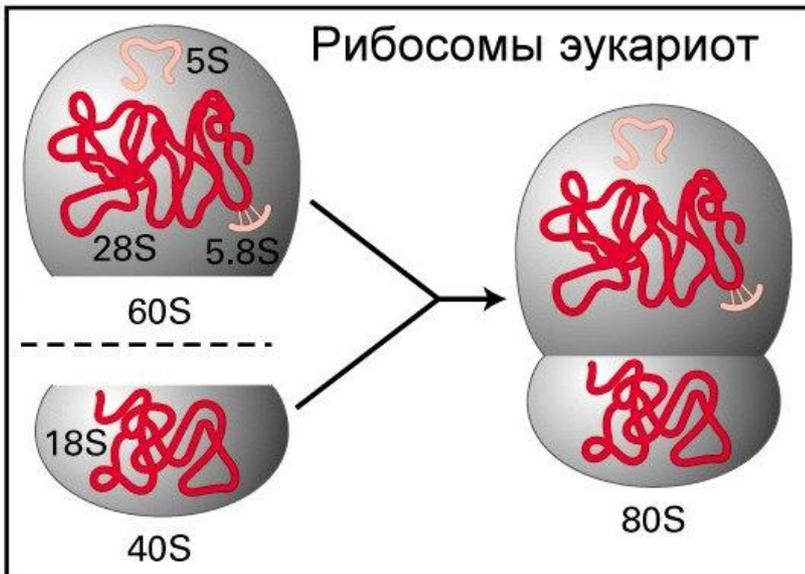
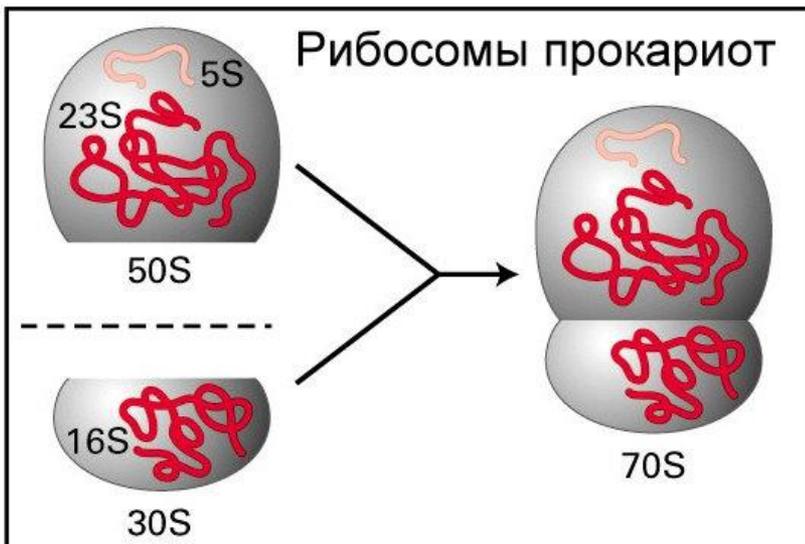


Информационная РНК.

Наиболее разнообразный по размерам и стабильности класс. Все они являются **переносчиками генетической информации из ядра в цитоплазму**. Они служат матрицей для синтеза молекулы белка, т.к. определяют аминокислотную последовательность первичной структуры белковой молекулы. Размеры – в зависимости от размеров белка – до 30 000 нуклеотидов.

На долю иРНК приходится до 5% от общего содержания РНК в клетке.

Характеристика РНК



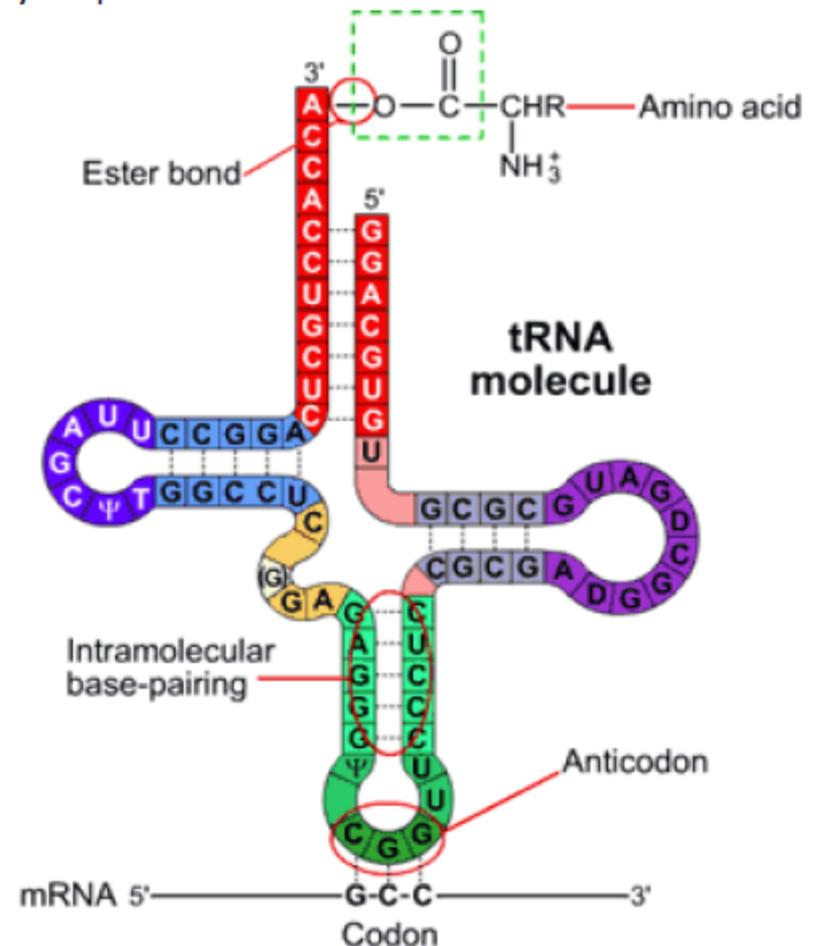
Рибосомная РНК

На долю рибосомальной РНК (рРНК) приходится 80-85% от общего содержания РНК в клетке, состоит из 3 000 – 5 000 нуклеотидов.

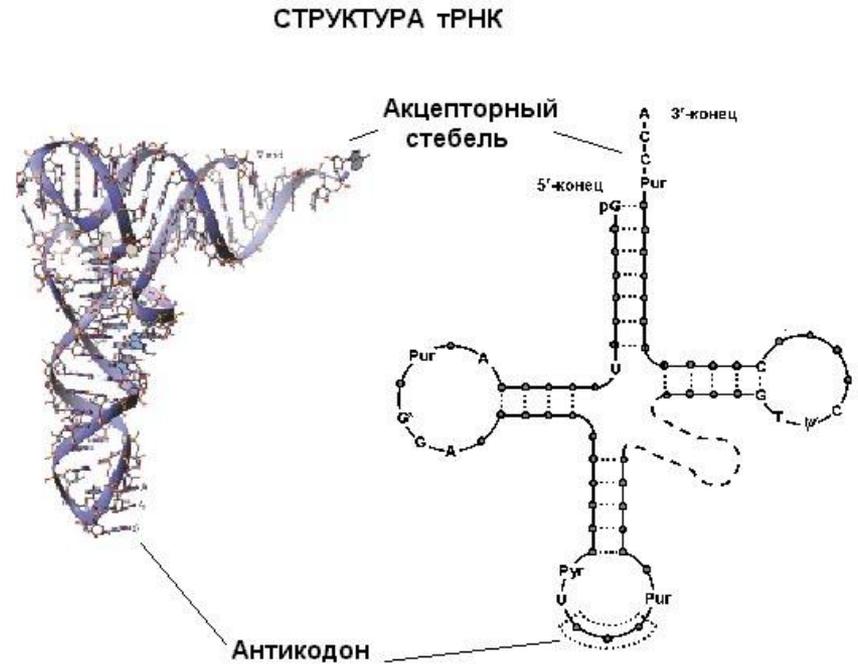
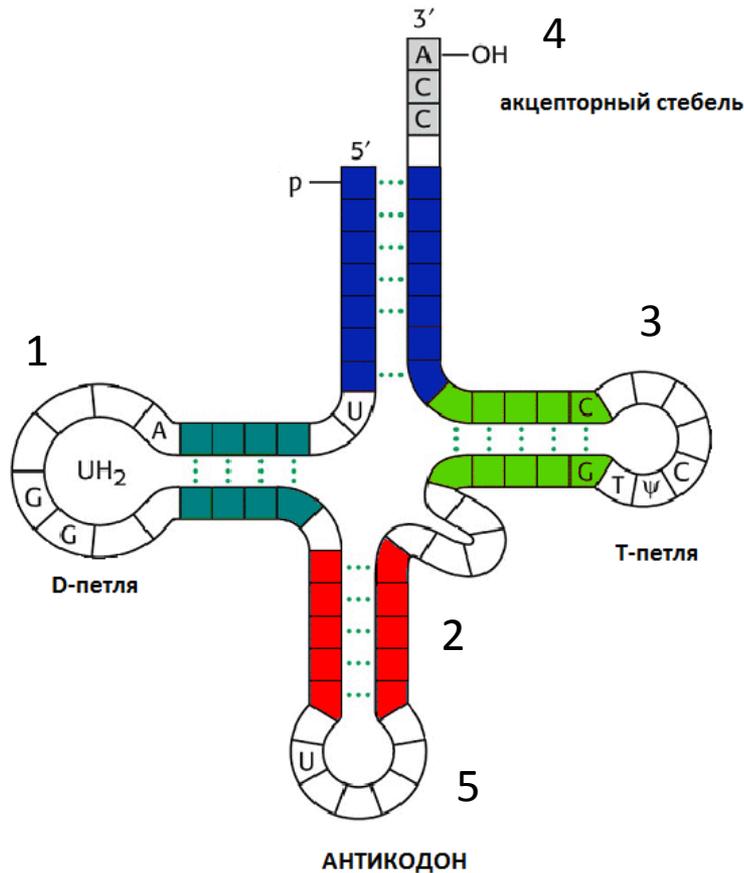
Цитоплазматические рибосомы содержат 4 разных молекулы РНК. В малой субъединице одна молекула, в большой – три молекулы РНК. В рибосоме около 100 белковых молекул.

tРНК - транспортная РНК

- тРНК — рибонуклеиновая кислота, функцией которой является транспортировка аминокислот к месту синтеза белка
- Имеет длину от 73 до 93 нуклеотидов
- На участке С находится антикодон, соответствующий аминокислоте
- Транскрипты генов тРНК подвергаются многостадийному процессингу, который в конце концов приводит к формированию типичной для тРНК пространственной структуры:
 - удаление 5'-лидерной нуклеотидной последовательности;
 - удаление 3'-концевой последовательности;
 - добавление последовательности ССА на 3'-конец;
 - вырезание интронов (у эукариот и архей);
 - модификации отдельных нуклеотидов



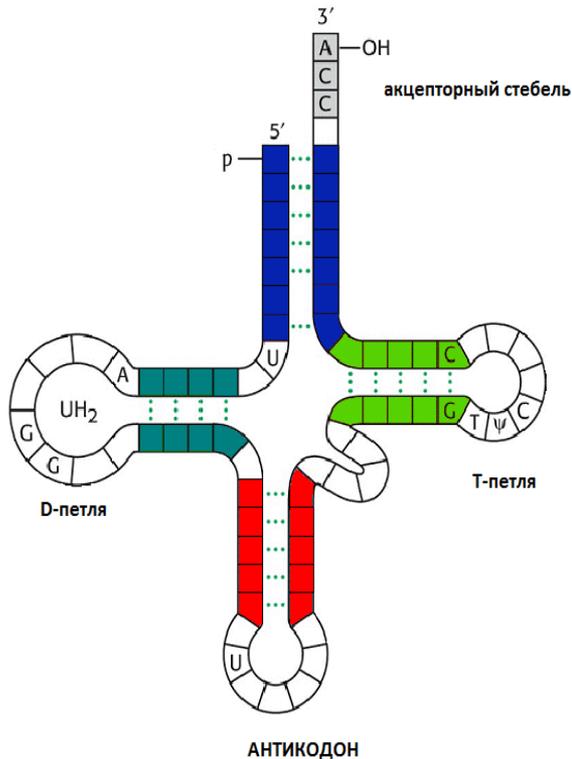
Транспортная РНК



В клетке содержится более 30 видов тРНК. на долю тРНК приходится до 10% от общего содержания РНК в клетке.

Каждый вид тРНК имеет характерную только для него последовательность нуклеотидов. Однако, у любой тРНК есть петля для контакта с рибосомой (1), антикодонная петля (2), петля для контакта с ферментом (3), акцепторный стебель (4), антикодон (5).

Транспортная РНК. Первичная и вторичная структура.



-5'-фосфат.

-акцепторный стебель 7 пн формируется за счет спаривания 5'- и 3'-концевых нуклеотидов (на 3'-конце неспаренные ССА для прикрепления аминокислоты).

-D-петля стабилизирована 4 п.н. и содержит дигидроуридин.

-Антикодоновая петля стабилизирована 5 п.н. и содержит антикодон.

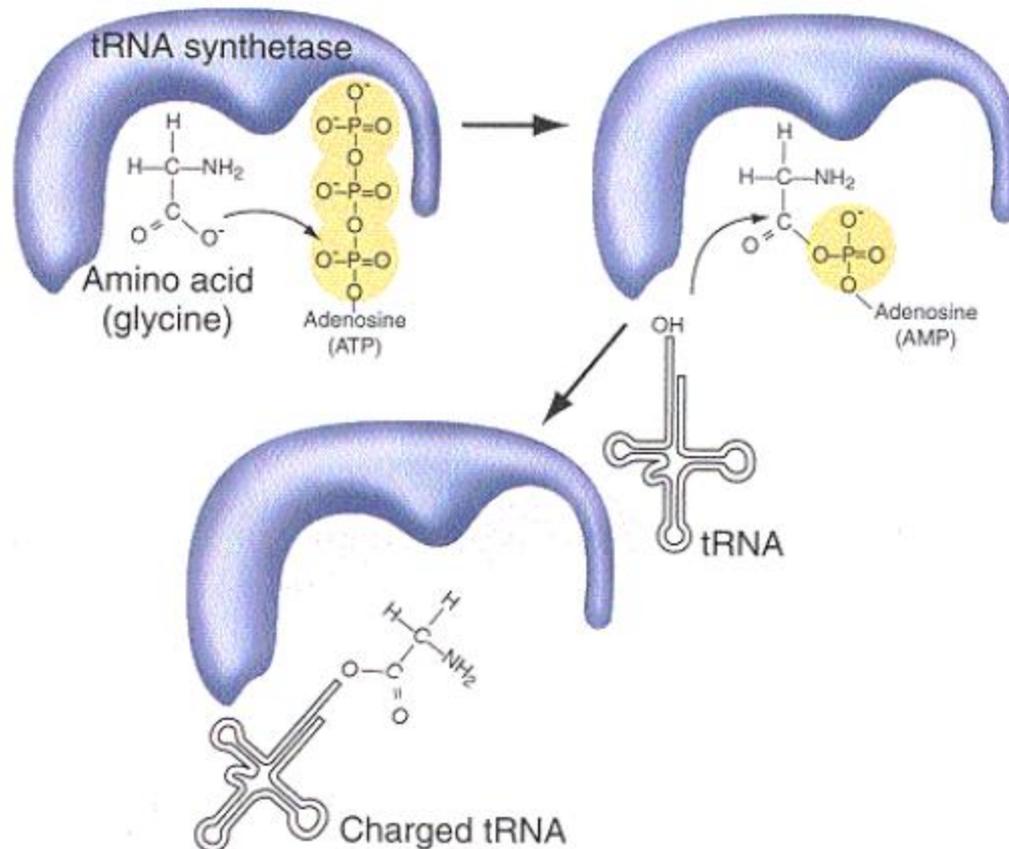
-Т-петля стабилизирована 5 п.н. и содержит ТΨС последовательность, где Ψ - псевдоуридин.

-В нескольких положения основания модифицированы метилированием .

-Первое основание антикодона часто модифицировано и представляет собой инозин, псевдоуридин или лизидин.

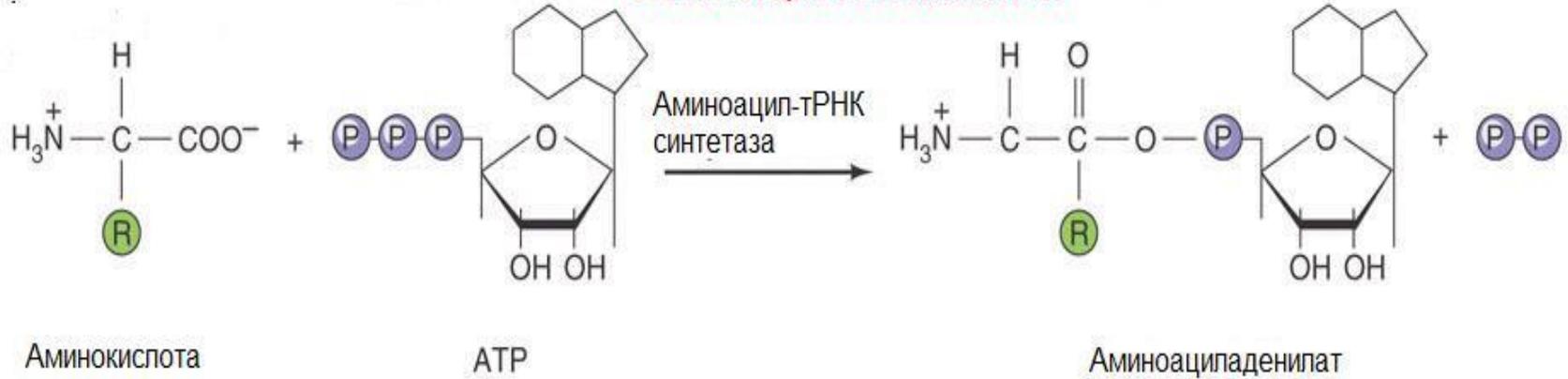
Аминоацил-тРНК-синтетаза

- Для каждой аминокислоты существует своя тРНК
- Аминокислота ковалентно присоединяется к 3'-концу молекулы с помощью специфичного для каждого типа тРНК фермента **аминоацил-тРНК-синтетазы**
- **Для каждой аминокислоты существует своя аминоацил-тРНК-синтетаза.**

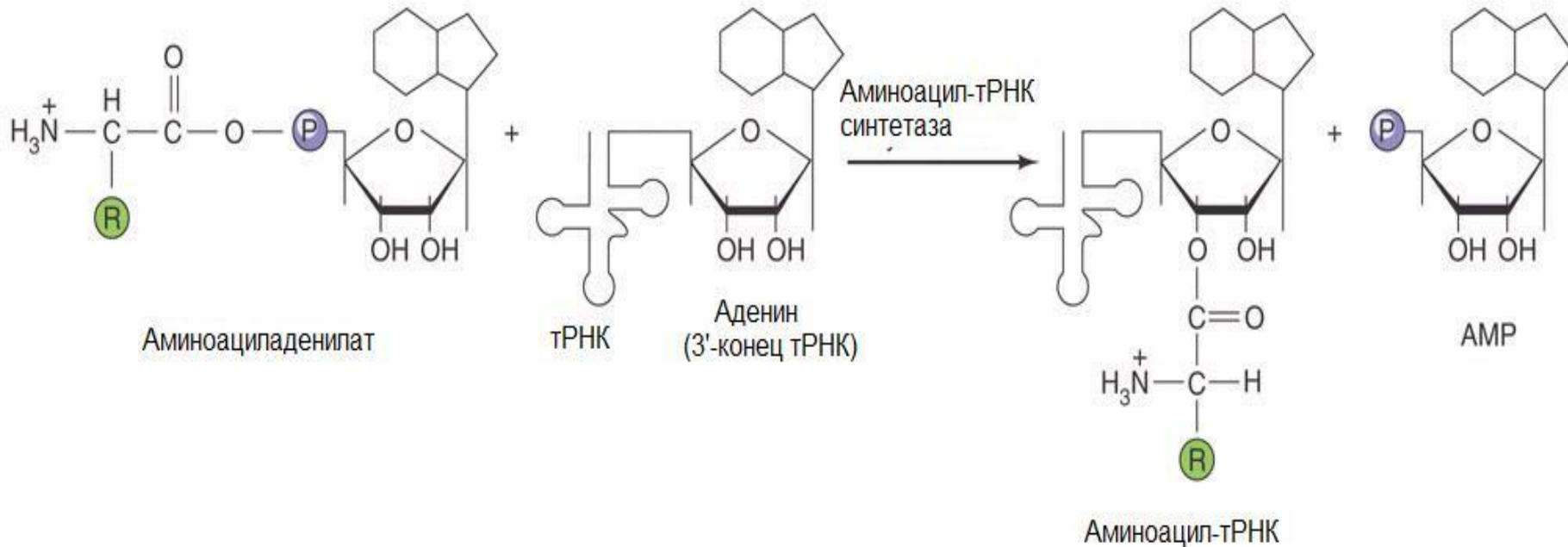


Образование аминокцил-тРНК

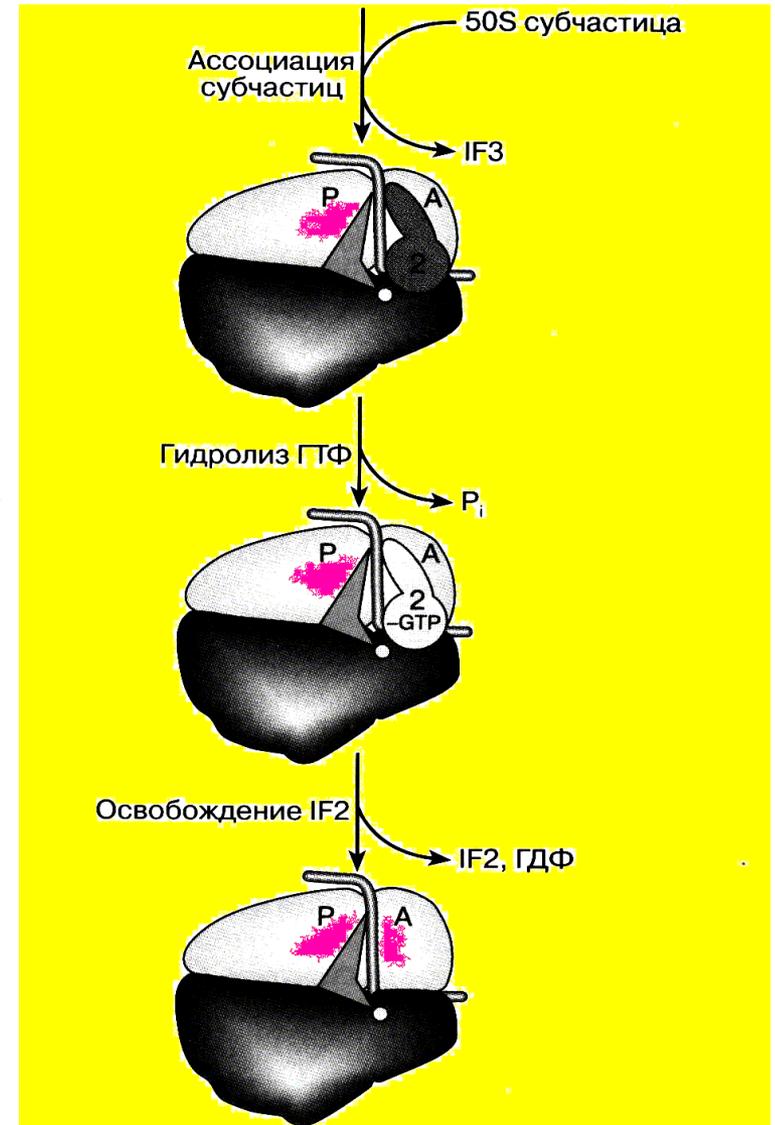
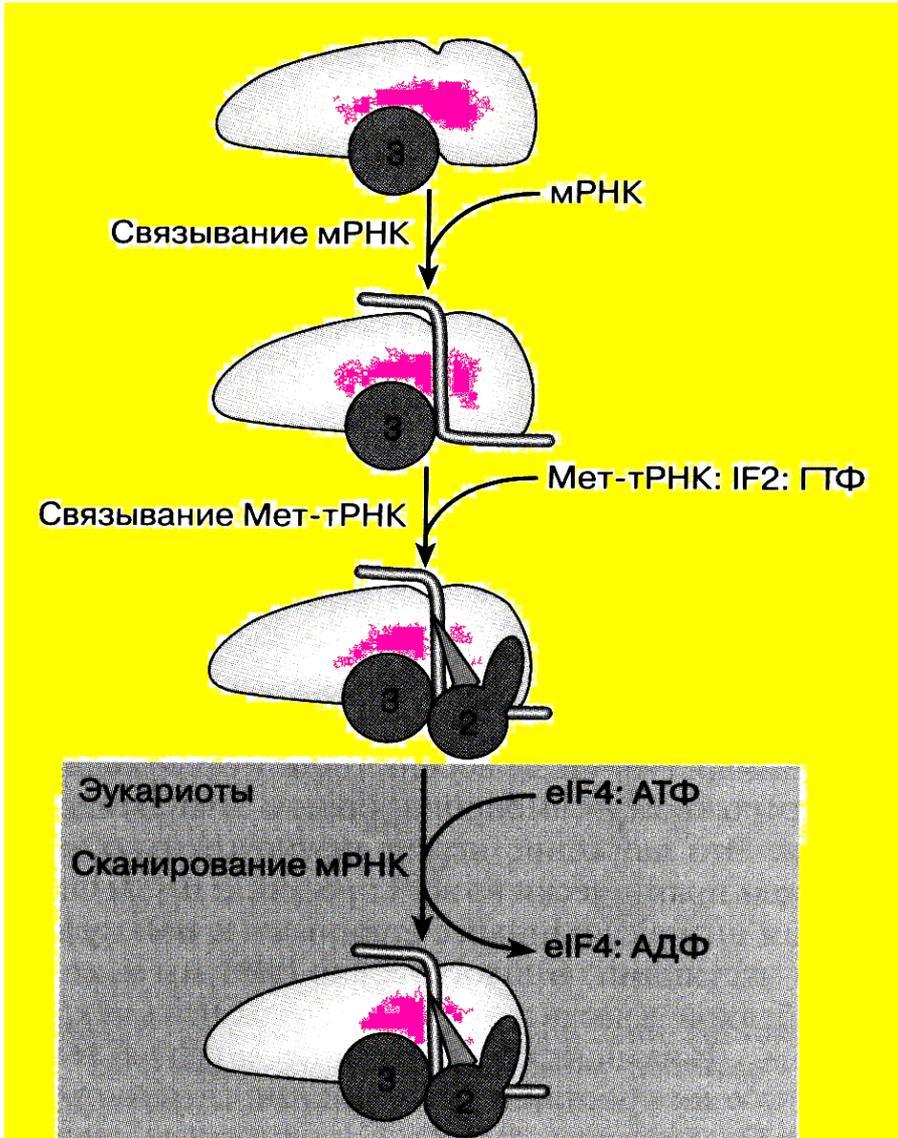
1. Активация аминокислоты



2. Присоединение к тРНК



Инициация трансляции



Инициация трансляции

(прокариоты)

1. Образование формил-метионил-тРНК (fmet-тРНК)
2. $30\text{ S} + \text{IF3} \rightarrow$ диссоциация рибосомы
3. + мРНК
4. Доставка fmet-тРНК к старт-кодону **AUG** ($\text{IF2/GTP} \rightarrow \text{IF2/GDP}$)
5. Образование водородных связей между кодоном **AUG** и антикодоном **UAC** (fmet-тРНК)
6. + **IF1** (вспомогательный фактор, блокирующий А-центр)
7. + $50\text{ S} \rightarrow 70\text{ S}$ (ассоциация рибосомы)
8. Отсоединение факторов инициации (IF1,2,3)
9. fmet-тРНК находится в Р-центре рибосомы, А-центр свободен

Рамка считывания устанавливается благодаря последовательности **Шайна-Дальгарно**.

Это богатая пуринами 5-8-нуклеотидная последовательность на мРНК (**AGGAGG**), комплементарная полипиримидиновому участку 16S рРНК.

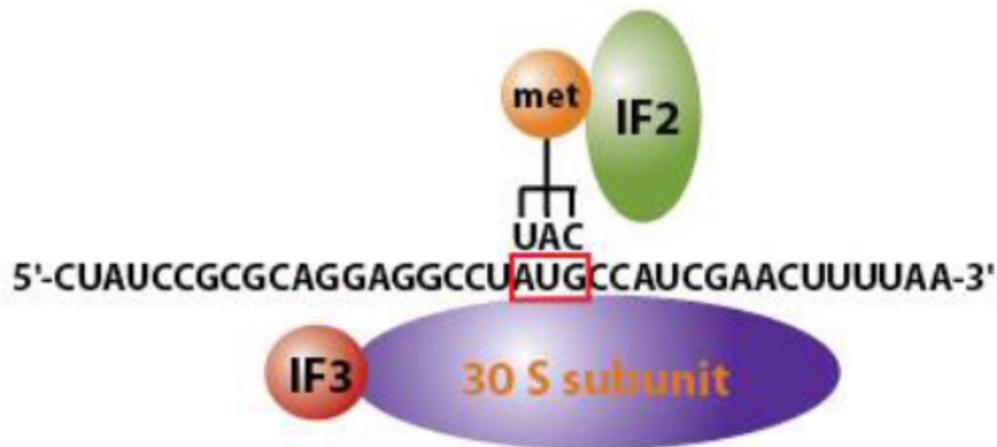
Инициация трансляции у прокариот

- Последовательность Шайна — Дальгарно — сайт связывания рибосом на молекуле мРНК прокариот, обычно на расстоянии около 10 нуклеотидов до стартового кодона AUG
- Исследована австралийскими учёными Джоном Шайном и Линн Дальгарно.
- Консенсусом является последовательность из шести нуклеотидов AGGAGG
- Комплементарная последовательность CCUCCU (анти-Шайна — Дальгарно) располагается на 3'-конце молекулы 16S рибосомной РНК. Комплементарное взаимодействие между последовательностями Шайна — Дальгарно и анти-Шайна — Дальгарно служит для помещения старт-кодона мРНК в Р-сайт рибосомы для начала биосинтеза белка
- Мутации в последовательности Шайна — Дальгарно снижают эффективность трансляции.



Инициация трансляции у прокариот

- В момент образования комплекса последовательности Шайна — Дальгарно и анти-Шайна — Дальгарно, с 30S-рибосомной субъединицей связываются и **факторы инициации трансляции IF2-GTP, IF1, IF3**, а также инициаторная формилметионил-тРНК (fMet-tRNA).
- К образовавшемуся преинициаторному комплексу затем присоединяется 50S-рибосомная субъединица



- ❑ *Время необходимое для посадки рибосом порядка секунд*
- ❑ *Рибосомы транслируют мРНК со скоростью приблизительно 12 аминокислот в секунду*

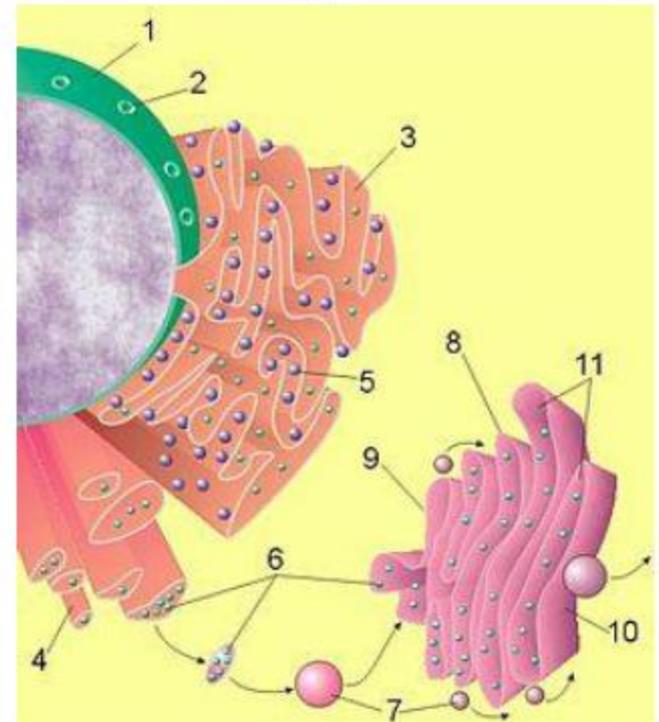
- Инициаторные факторы IF1 и IF3 отсоединяются, тогда как IF2 фактор стимулирует взаимодействие с 50S рибосомной субъединицей.
- После сборки рибосомы IF2 покидает комплекс. Во время этого процесса GTP связанный с IF2 гидролизуется до GDP и P_i.
- Образованный 70S инициаторный комплекс готов к элонгации трансляции.

Рибосома

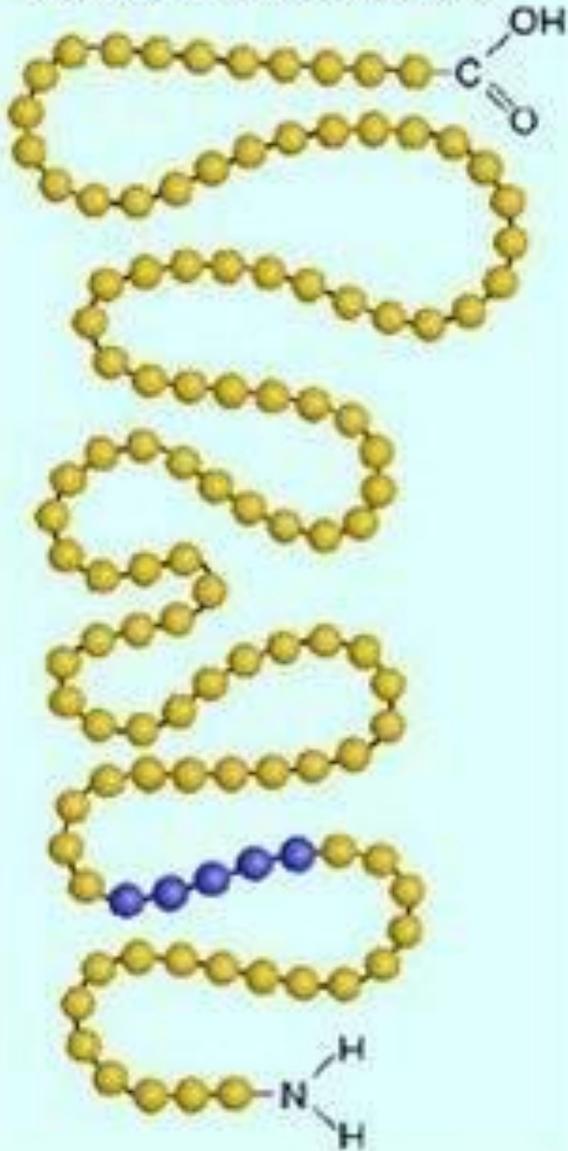
Существует гипотеза, что трансляция у эукариот происходит не во всей цитоплазме клетки, а в отдельных областях цитоплазмы, условно называемых «трансляционными компартментами»:

- Трансляция мРНК секреторных и мембранных белков (3—15 % от всех синтезируемых клеткой белков) происходит на рибосомах, связанных с гранулярной эндоплазматической сеткой
- По классическим представлениям, ещё 35—45 % рибосом связаны с цитоскелетом
- Оставшиеся 20—40 % рибосом находятся в несвязанном состоянии в цитозоле.

Компартментализация трансляции обеспечивает высокую скорость биосинтеза белка и широкие возможности регуляции этого процесса.



Первичная структура
(цепочка аминокислот)



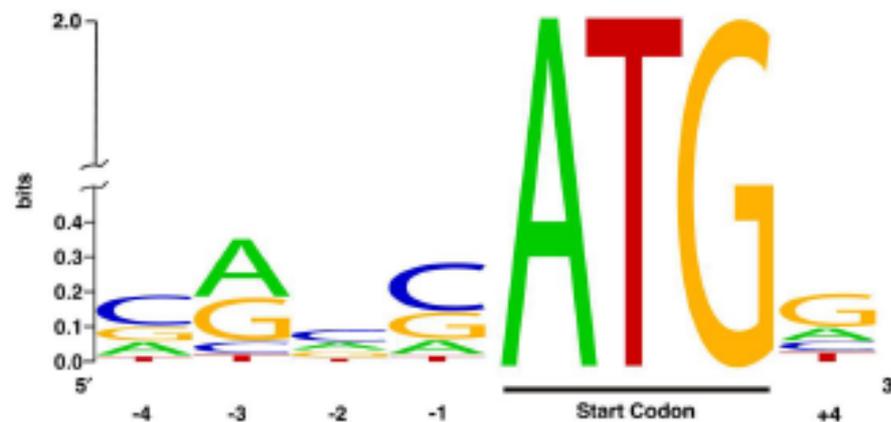
Многие белки имеют лидерную последовательность (ЛП) – 15-25 аминокислотных остатков, «паспорт» белка, определяющий его локализацию в клетке – в митохондрию, в хлоропласты, в ядро. В дальнейшем ЛП удаляется.

Инициация трансляции у эукариот

- Трансляция большинства мРНК эукариот, имеющих КЭП и поли(А)-хвост, требует участия, по крайней мере, 13 общих эукариотических факторов инициации (eIF)
- Инициация трансляции включает события между диссоциацией рибосомы во время терминации в предыдущем цикле трансляции и сборкой рибосомы, готовой к элонгации, на старт-кодоне мРНК
- Во время инициации происходят следующие основные события:
 - диссоциация и антиассоциация рибосомных субъединиц;
 - выбор инициаторной метионил-тРНК (Met-tRNAⁱMet);
 - связывание 5'-кэпа, связывание поли(А), сканирование;
 - выбор правильного старт-кодона;
 - объединение рибосомных субъединиц на старт-кодоне

Инициация трансляции у эукариот

- У эукариот сайт-старт трансляции обычно, но не всегда, является первым AUG кодон, в зависимости от нуклеотидного контекста вокруг AUG.
- Консенсусная последовательность Козак, играющая важную роль в инициации трансляции у эукариот, включает четыре-шесть нуклеотидов, предшествующих старт-кодону, и один-два нуклеотида непосредственно после старт-кодона.
- Оптимальный нуклеотидный контекст AUG кодона, коррелирует с высоким уровнем синтеза белка с соответствующей мРНК *in vivo* и является характеристикой так называемой "сильной" (эффективно иницирующей трансляцию) последовательности Козак.
- Последовательность Козак не является сайтом связывания рибосомы (англ. ribosomal binding site, RBS), в отличие от прокариотической последовательности Шайна-Дальгарно.



Инициация трансляции у эукариот

У эукариот существуют два основных механизма нахождения рибосомой стартового AUG:

Кэп-зависимый (сканирующий)

При сканирующем механизме малая субъединица рибосомы садится на 5'-конец мРНК в области кэпа и движется вдоль молекулы мРНК, «сканирует» кодоны в поисках инициаторного AUG.

Кэп-независимый (внутренняя инициация)

- Механизм внутренней инициации осуществляется за счет элементов IRES (англ. Internal Ribosomal Entry Site) — участок мРНК, обладающий выраженной вторичной структурой, позволяющей ему направлять рибосомы на стартовый AUG.
- 10–15% всех мРНК способны к КЭП-независимой трансляции

		IRESite: The database of experimentally verified IRES structures							
Home	Browse	Search	Contribute	Literature	Associated ribosomal proteins	Data Submission	About	Login	Guest

The IRESite database presents information about the experimentally studied RNA-Dependent Internal Ribosomal Entry Site (IRES) segments. IRES regions are known to attract eukaryotic ribosomes for initiation of protein synthesis and thus provide translation reinitiation capability in the presence of the cap-bound 40S ribosomal subunit. It is not yet clear whether the IRES site is essential for a complete IRES activity or if a complete IRES activity is shared by IRES and 5' cap. IRES site is essential for IRES activity in some cases.

- IRES вирусов - 44
- клеточные IRES - 70
- факторы ITAF - 25

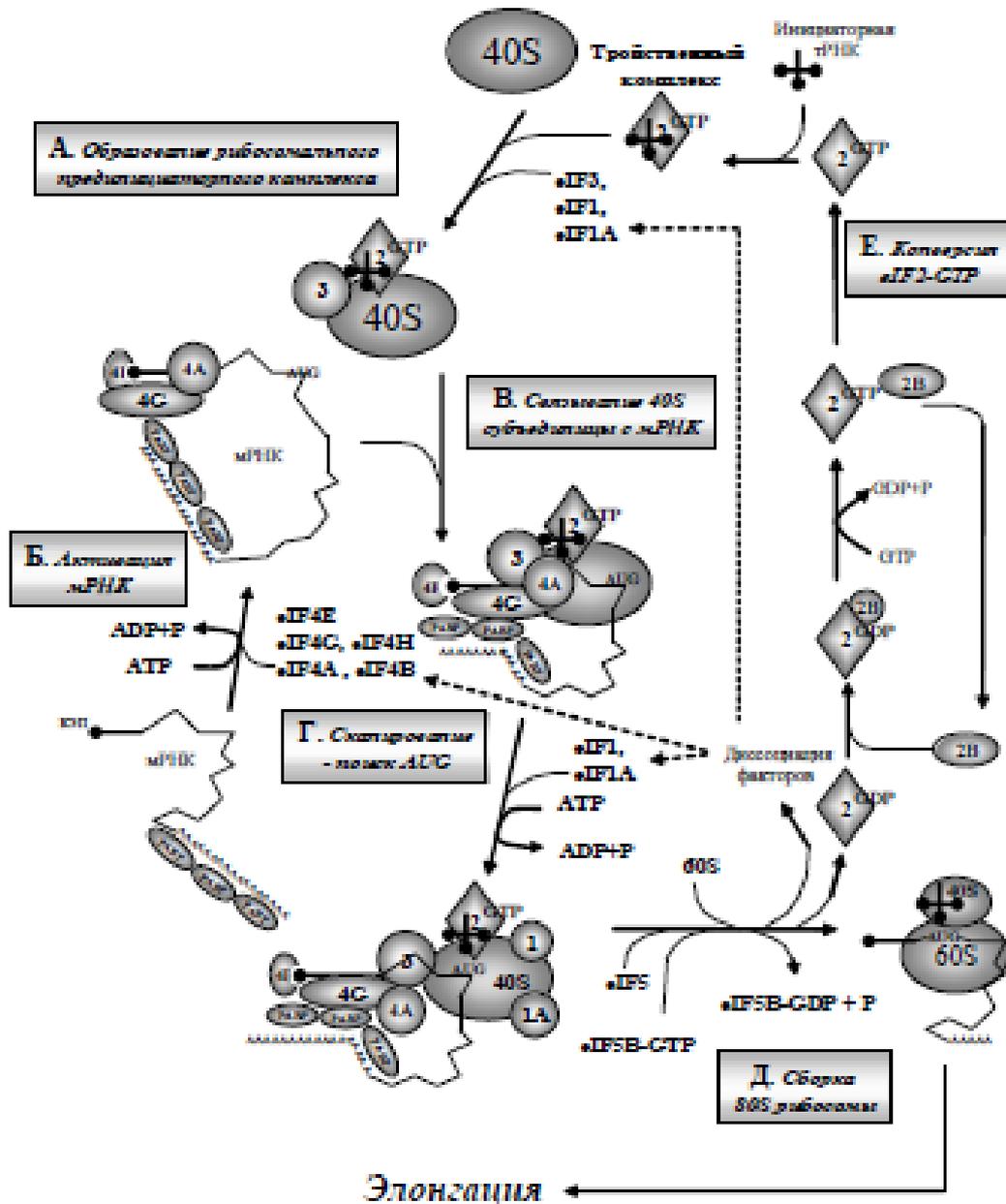


Схема кэп-зависимой инициации трансляции у эукариот

Сканирование мРНК в поисках инициаторного кодона АУГ

Кэп-независимая инициация трансляции у эукариот

За 20 лет обнаружено множество IRES в самых разных мРНК представителей всех царств эукариот, НО:

- Не существует единого механизма функционирования всех участков внутренней посадки рибосом
- Не существует элемента структуры (первичной, вторичной или третичной), общего для всех IRES
- Нет заметной гомологии в последовательности

Кэп-независимая инициация трансляции у эукариот

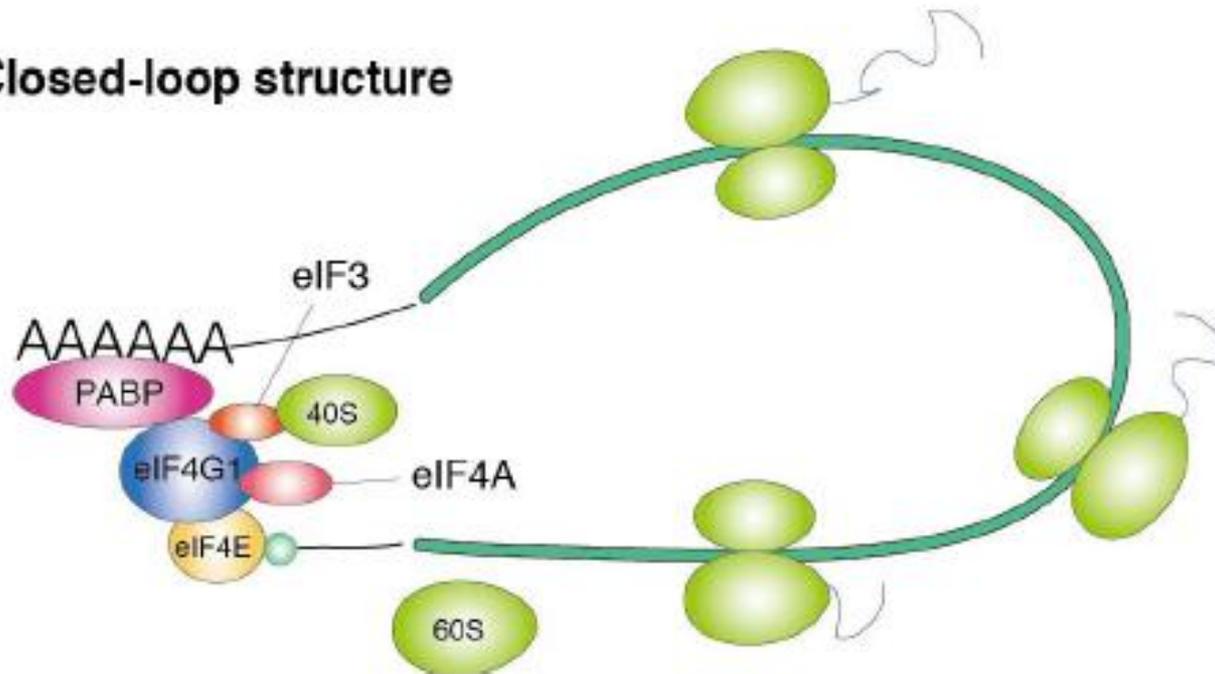
IRES : механизм трансляции при клеточном стрессе

- Клеточный стресс вызывает изменения в белковом составе клетки и делает невозможным cap-dependent инициацию
- Эти изменения активируют механизм внутренней инициации

Реинициация трансляции у эукариот

- У эукариот возможна реинициация трансляции, когда после окончания трансляции рибосома с белковыми факторами не диссоциирует от мРНК, а перескакивает с 3' на 5' конец мРНК и начинает инициацию ещё раз.
- Это возможно благодаря т.н. циклизации мРНК в цитоплазме, то есть физическому сближению старт- и стоп-кодонов с помощью специальных белков.

Closed-loop structure



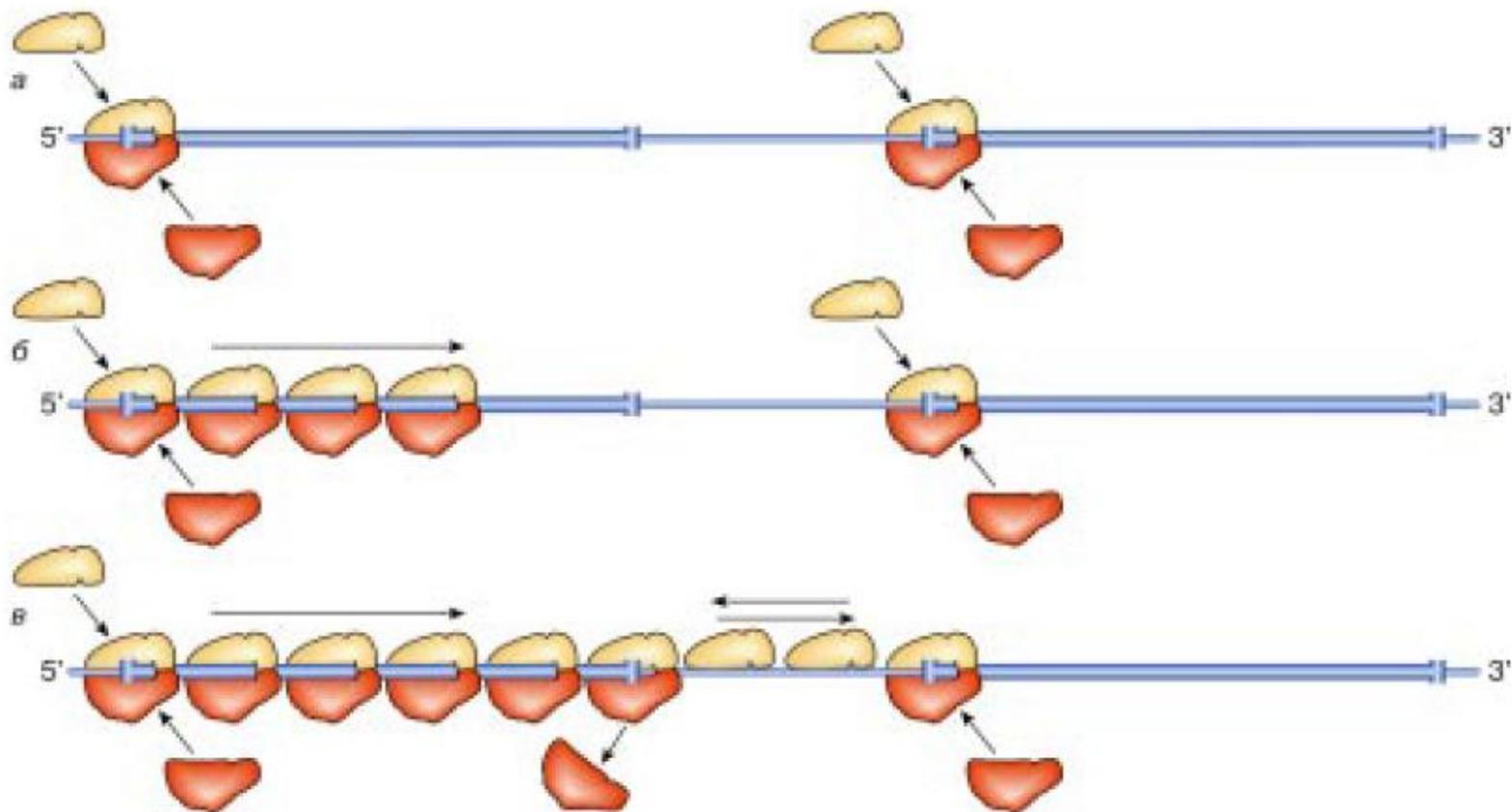


Рис. 2. Независимая и сопряженная инициация трансляции последовательных цистронов (белкокодирующих последовательностей) прокариотических мРНК: *а* – независимая инициация трансляции: свободные рибосомные частицы связываются с началом каждого цистрона независимо от трансляции другого цистрона; *б* – инициация трансляции, зависимая от трансляции предшествующего цистрона: инициаторный участок второго цистрона открывается для свободных рибосомных частиц только при трансляции первого цистрона; *в* – реинициация: инициаторный участок второго цистрона вообще недоступен для свободных иницирующих рибосомных частиц (30S субчастиц) и трансляцию второго цистрона иницируют лишь частицы, закончившие трансляцию первого цистрона и не успевшие диссоциировать от мРНК

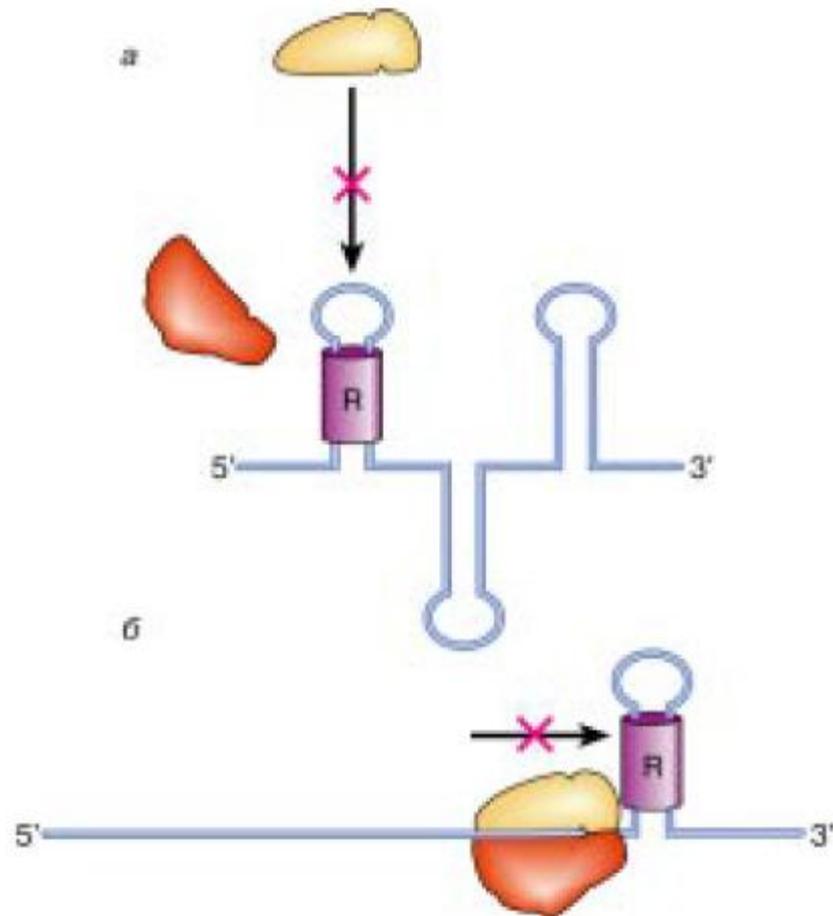
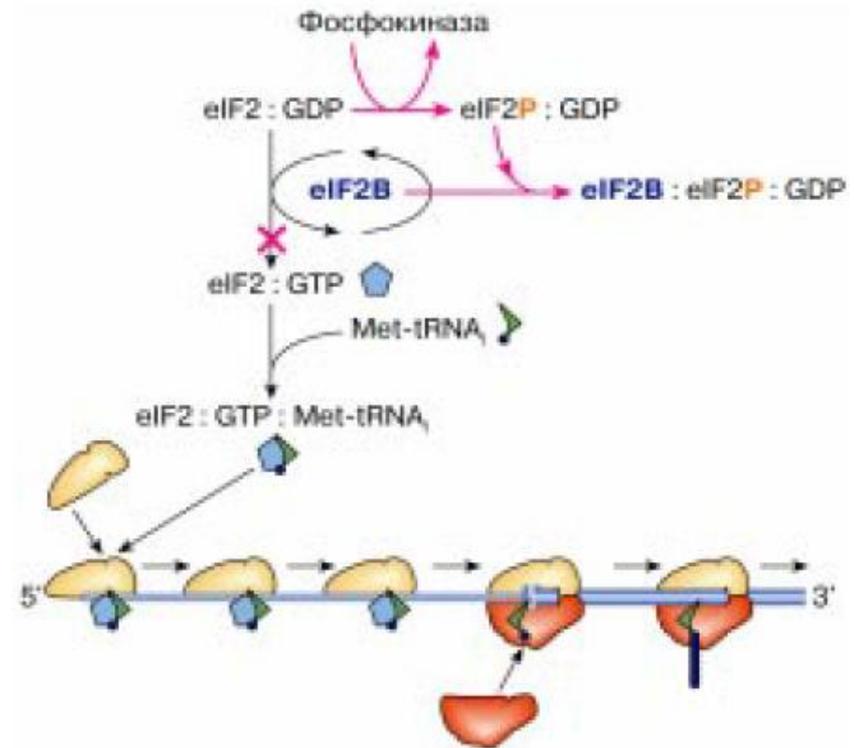


Рис. 3. Трансляционная репрессия. Белок-репрессор (R) имеет специфическое сродство к участку мРНК в районе инициации трансляции (часто к участку с нестабильной вторичной структурой) и, связываясь с ним (и стабилизируя его), создает барьер либо для посадки иницирующих рибосомных частиц (а), либо для движения рибосомы к месту инициации (б)

Наиболее обычный путь тотальной регуляции белкового синтеза у эукариот, во всяком случае у животных и грибов, – это активация специальной фосфокиназы, которая фосфорилирует фактор инициации eIF2 (см. [2]), что приводит к подавлению инициации трансляции всех мРНК клетки. Сигналами для активации фосфокиназы в клетке являются тепловой шок и другие виды стрессовых воздействий, недостаток ростовых факторов, аминокислотное голодание, недостаток железа, вирусные инфекции. Сильное подавление синтеза белка в этих условиях есть следствие именно активации фосфокиназы и катализируемого ею фосфорилирования eIF2. Степень подавления белкового синтеза может варьировать в зависимости от уровня стресса.



БИОЛОГИЯ

БИОСИНТЕЗ БЕЛКА: РЕГУЛЯЦИЯ НА УРОВНЕ ТРАНСЛЯЦИИ

А. С. СПИРИН

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

ВНУТРЕННЯЯ ИНИЦИАЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ – РАЗНООБРАЗИЕ МЕХАНИЗМОВ И ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ В ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ КЛЕТКИ

• 2005 г.

М. В. СКУЛАЧЕВ

*Кафедра вирусологии биологического факультета
МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва*

I. Введение. II. Кэп-зависимая инициация трансляции – основной механизм инициации белкового синтеза у эукариот. III. Альтернативные механизмы инициации трансляции. IV. Трансляция в условиях стресса. Значение внутренней инициации трансляции. V. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

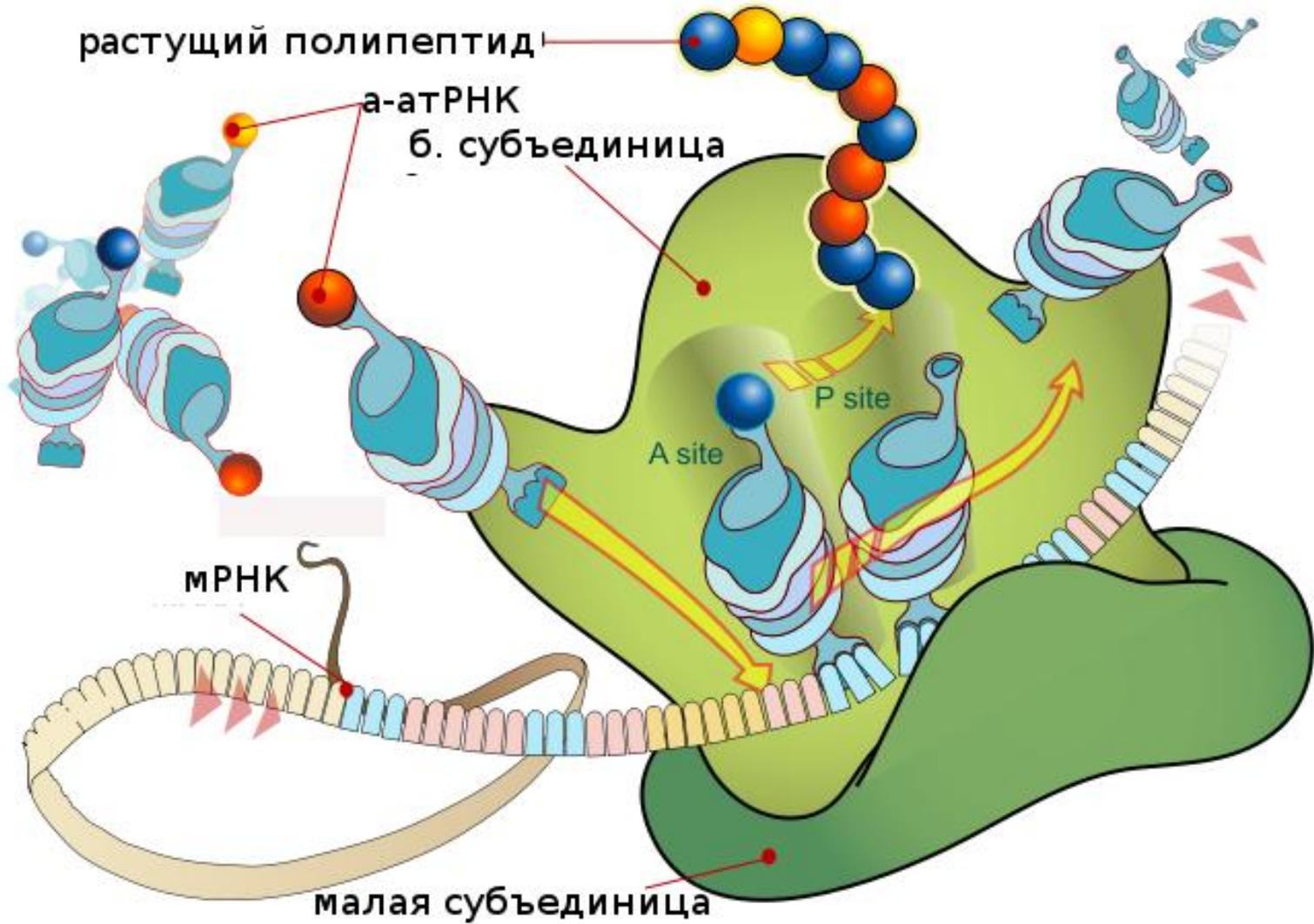
Реализация генетической информации в клетке проходит в несколько этапов. Одной из важнейших стадий в этом процессе является трансляция – биосинтез белка, с помощью которого происходит «перекодирование» информации, записанной в нуклеиновых кислотах, в аминокислотную последовательность полипептида. Трансляция подразделяется на три фазы – инициация, элонгация и терминация. В эукариотической клетке главной лимитирующей стадией синтеза

Принятые сокращения: 4E-BP – 4E binding protein, 4E связывающий белок; Araf-1 – apoptosis protease activating protein, белок-активатор протеаз при апоптозе; BVDV – bovine viral diarrhoea virus, вирус вирусной диареи рогатого скота; CP – coat protein, белок оболочки; CrPV – cricket paralysis virus, вирус паралича сверчка; CrTMV – crucifer tobamovirus, тобамовирус крестоцветных; CSFV – classical swine fever virus, вирус классической лихорадки свиней; DAP5 – Death-associated protein 5, смерть-ассоциированный белок 5); eIF – eukaryotic translation initiation factor, эукариотический фактор инициации трансляции; EMCV – encephalomyocarditis virus, вирус энцефаломиокардита; FMDV – foot and mouth disease virus, вирус ящура; HCV – hepatitis C virus, вирус гепатита C; IRES – internal ribosome entry site, область внутренней посадки рибосомы; ITAF – IRES trans-acting factor, действующий *in trans* фактор работы IRES; (продолжение - см. сл. стр.)

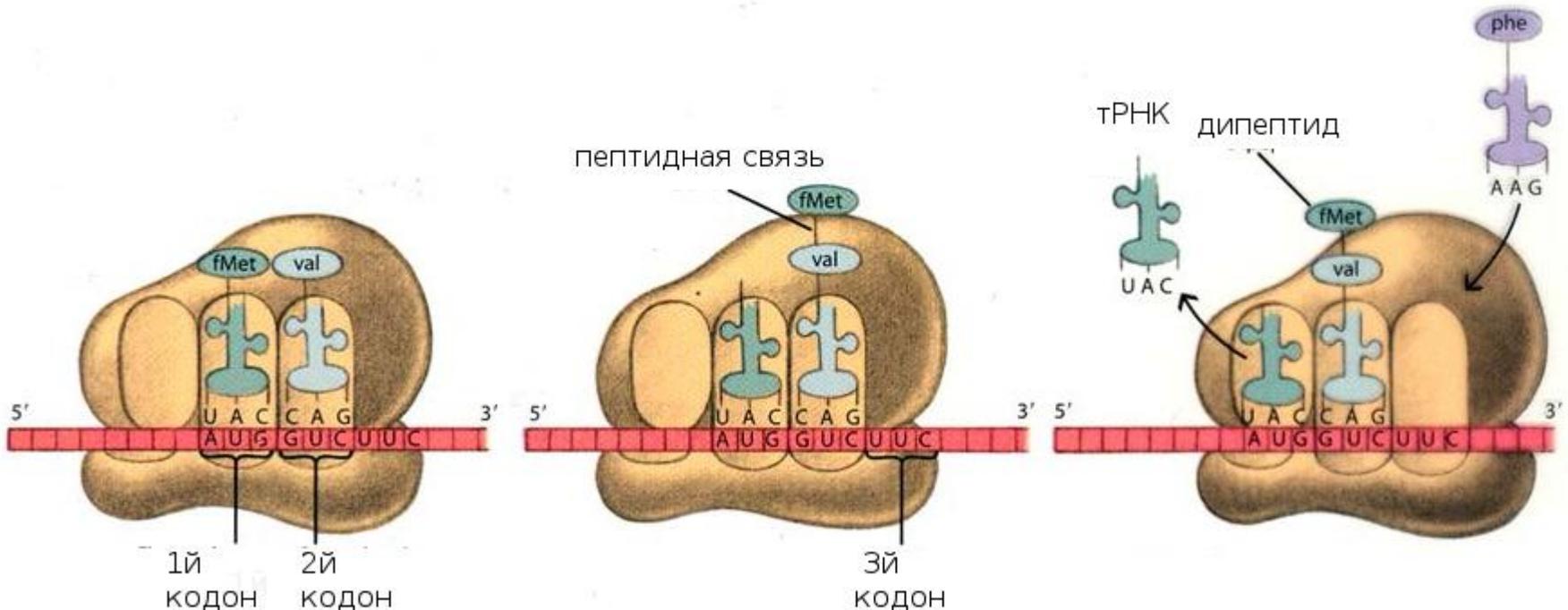
Адрес для корреспонденции: max@genebee.msu.su

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 05-04-62037-д, 02-04-48308а и 03-04-52008б.

Элонгация



Элонгация



1) Аминоацил-тРНК попадает в А сайт рибосомы.

2) Рибосома катализирует перенос пептида, связанного с тРНК в Р-сайте и образование пептидной связи с находящимся в А сайте аминокислотным остатком.

3) Происходит транслокация — перемещение рибосомы по мРНК на один триплет.

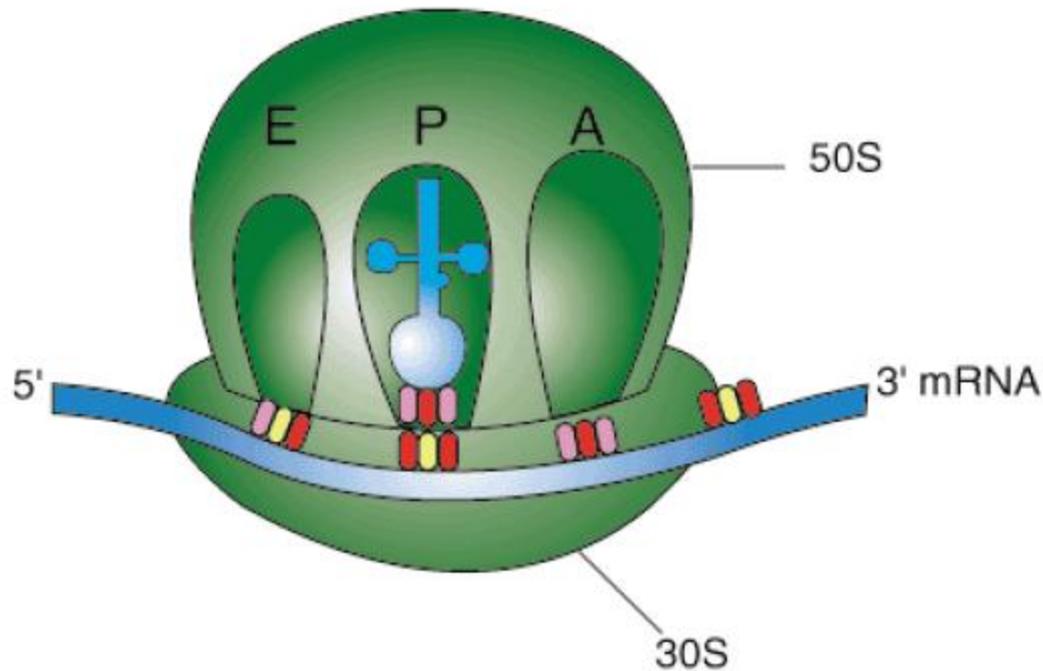
В результате пептидил-тРНК оказывается опять в Р-сайте, а «пустая» тРНК из Р-сайта переходит в Е-сайт.

Элонгация трансляции

(прокариоты)

1. Образование следующего комплекса аминоацил-тРНК
2. Доставка аминоацил-тРНК в А-центр рибосомы
($Tu/GTP \rightarrow Tu/GDP$)
3. Образование водородных связей между кодоном и антикодоном в А-центре
4. Образование пептидной связи между аминокислотами в Р- и А-центрах (пептидилтрансферазная активность 23 S рРНК)
5. Транслокация рибосомы на 1 кодон
($G/GTP \rightarrow G/GDP$)
6. Восстановление комплекса Tu/GTP:
 $Tu/GDP + Ts \rightarrow Tu/Ts + GDP$
 $Tu/Ts + GTP \rightarrow Tu/GTP + Ts$

Элонгация трансляции у прокариот

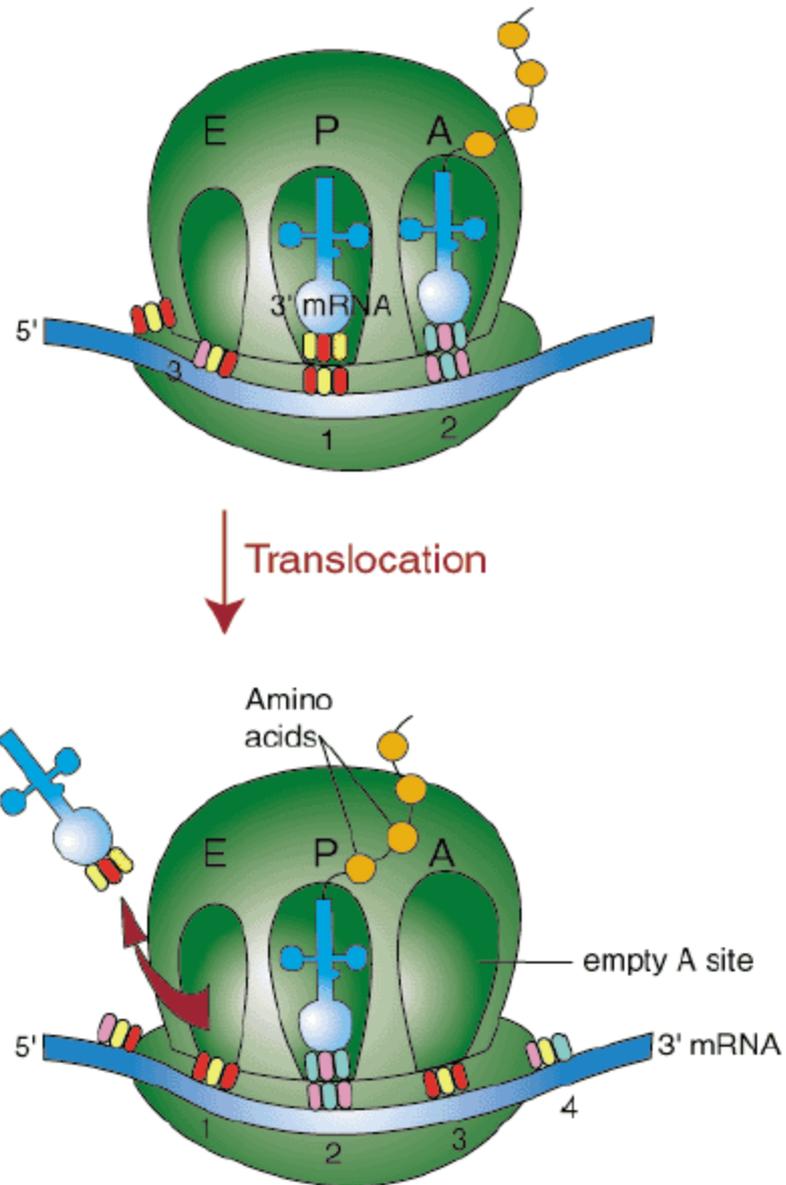


A – аминоацил тРНК связывающий сайт (акцепторный участок)

P – пептидил тРНК связывающий сайт (донорный участок)

E – участок отсоединения тРНК от рибосомы

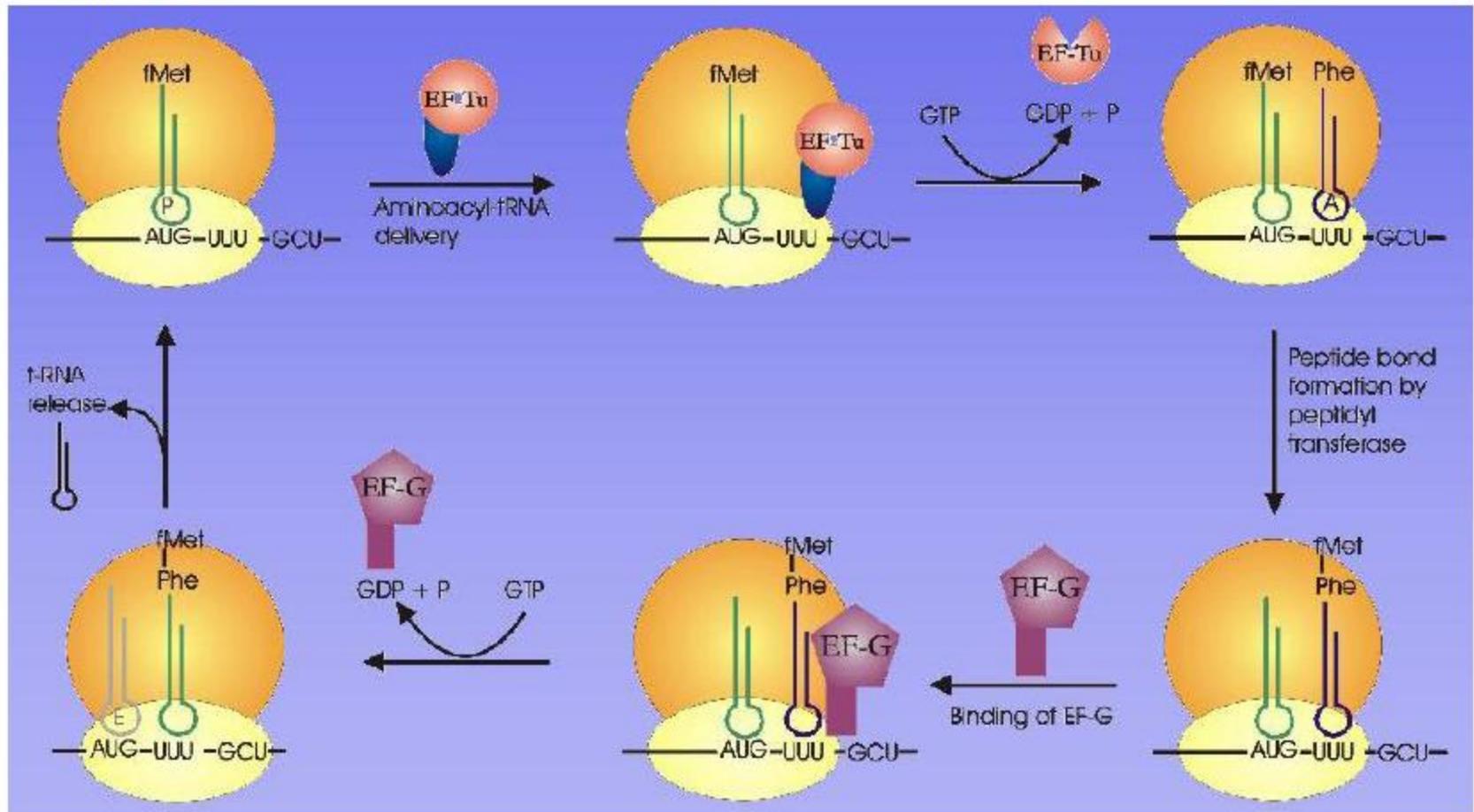
Элонгация трансляции у прокариот



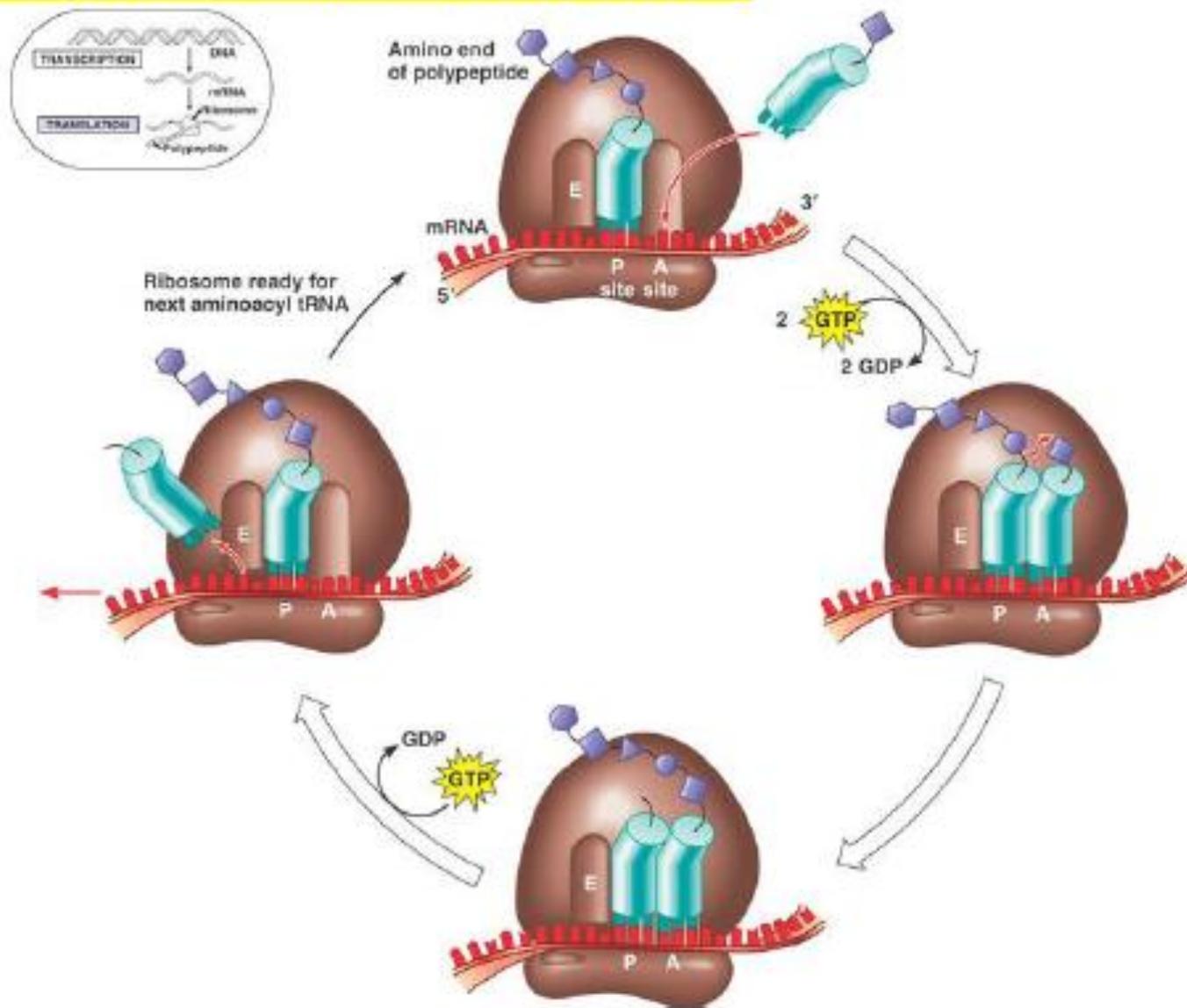
Элонгация трансляции у прокариот

Факторы элонгации трансляции - регуляторные белки, взаимодействующие с рибосомами и обеспечивающие процесс элонгации трансляции.

- **EF-Tu** (elongation factor thermo unstable) осуществляет вход аминоацил-tPHK в свободный сайт рибосомы
- **EF-Ts** выступает в качестве фактора нуклеотидного обмена на EF-Tu, катализируя освобождение GDP от EF-Tu
- **EF-G** катализирует перемещение tPHK и мPHK в рибосоме в конце каждого раунда полипептидной элонгации.

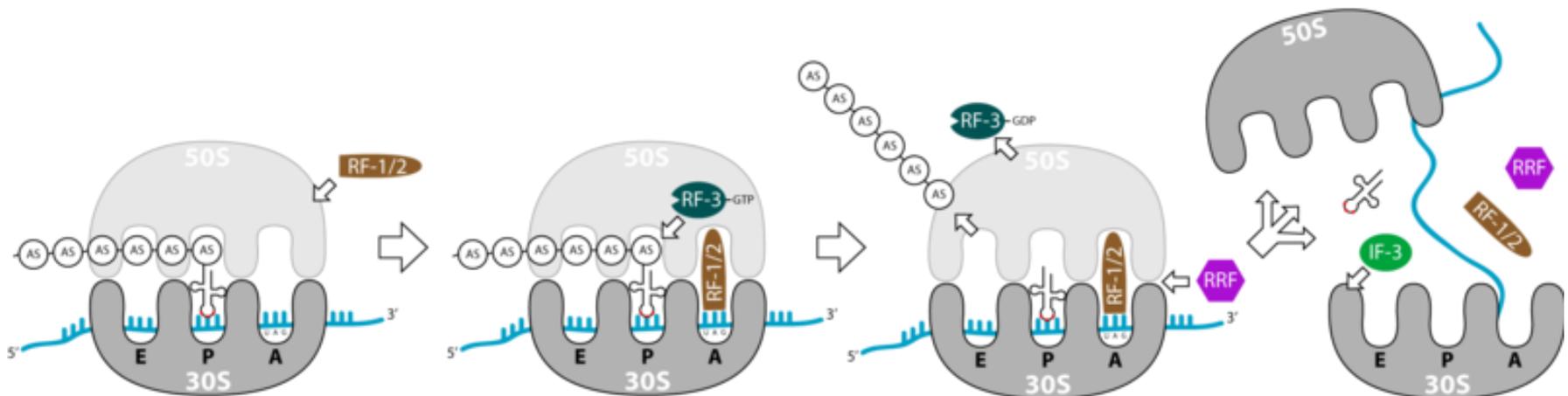


Элонгация трансляции у эукариот



Терминация трансляции

- 1) В А-участок попадает кодон терминации (**UAG, UAA** или **UGA**).
- 2) Завершенный полипептид остается ковалентно связанным с тРНК.
- 3) Происходит гидролиз связи между тРНК и полипептидом и полипептид освобождается из рибосомы.
- 4) Рибосома диссоциирует на субчастицы.
- 5) Малая субчастица может оставаться в ассоциации с мРНК и скользить вдоль нее, находя следующий кодон инициации (реинициация следующей кодирующей последовательности в полицистронных мРНК).



Терминация трансляции

(прокариоты)

- Стоп-кодоны: **UAA, UAG, UGA**
- Факторы терминации: RF1, RF2, RF3, RRF
- RF1 распознает кодоны UAG и UAA
- RF2 распознает кодоны UGA и UAA
- RF3 облегчает работу других факторов, обладает GTP-азной активностью.
- RRF фактор способствует высвобождению последней тРНК.

Терминация трансляции у прокариот

Факторы терминации:

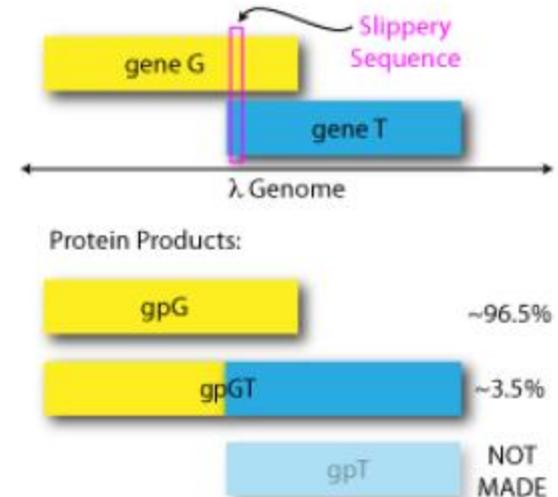
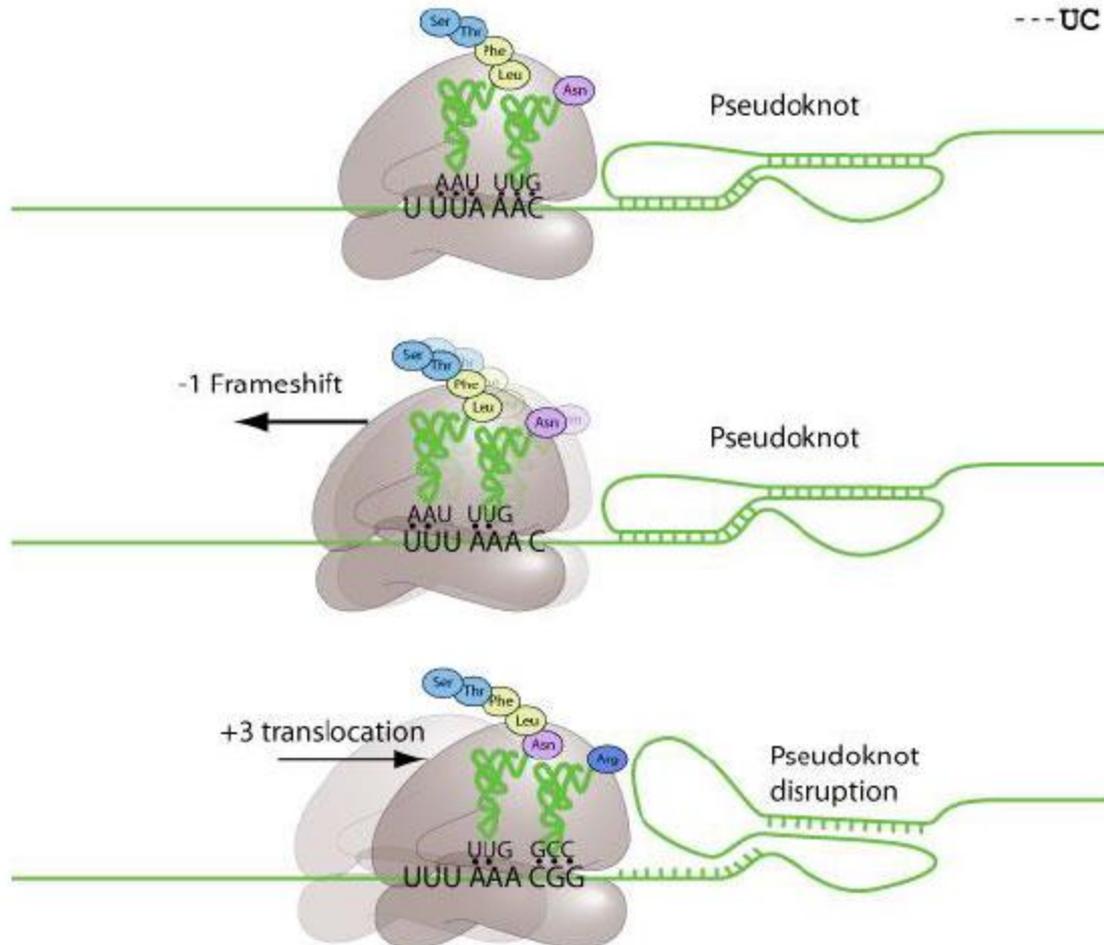
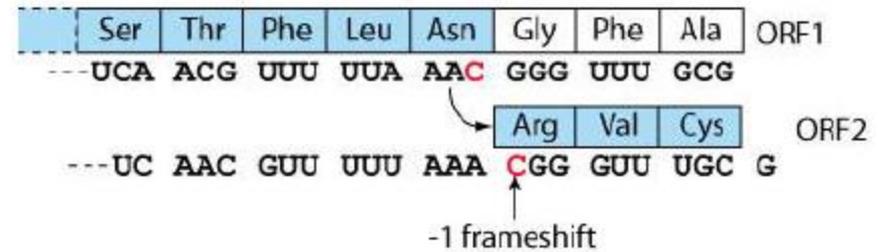
- RF-1 вызывает отделение полипептидной цепи при считывании кодонов UAA и UAG;
- RF-2 действует аналогичным образом при считывании UAA и UGA,
- EF-3 может облегчить работу двух других факторов.

Этапы терминации трансляции:

- В А-участке оказывается один из трех терминирующих кодонов – UAG, UAA или UGA.
- Из-за отсутствия тРНК, отвечающих этим кодоном, полипептидил-тРНК остается связанной с Р-участком.
- RF-1 и RF-2 катализируют отсоединение полипептидной цепи от тРНК, отделение их обоих от рибосомы, а 70S-рибосомы – от мРНК.
- RF-1 узнает в А-участке кодон UAA или UAG
- RF-2 включается в том случае, когда в А-участке оказывается UAA или UGA;
- RF-3 облегчает работу двух других факторов.
- Если терминирующим кодоном является UAA, то эффективность процесса терминации оказывается наибольшей, поскольку этот кодон узнают оба фактора – RF-1 и RF-2.

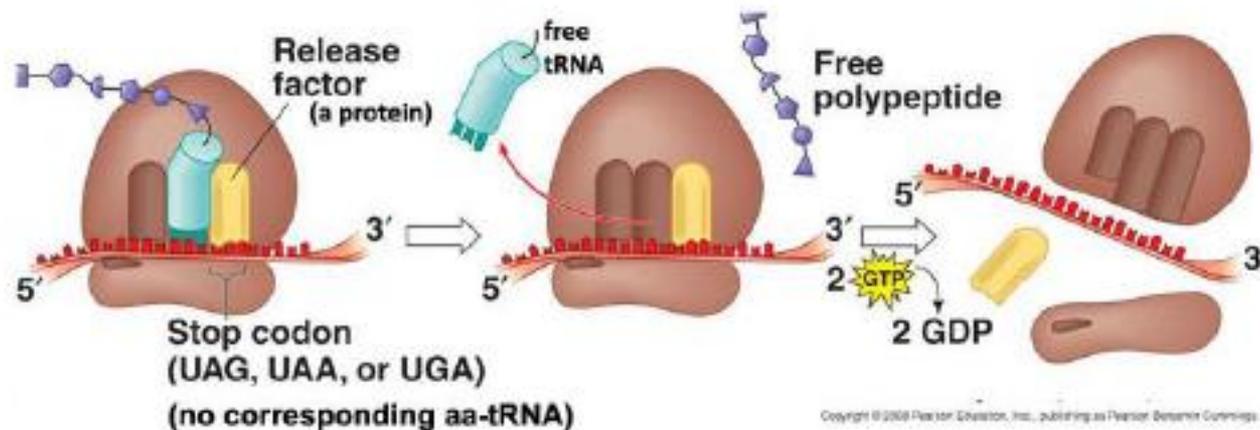
Программируемый фреймшифтинг у прокариот

Программированный фреймшифтинг встречается как в +1, так и в -1 сдвиге рамки считывания.



Терминация трансляции у эукариот

- У эукариот найден только один фактор терминации трансляции – eRF, способный «читать» все три терминирующих кодона
- На эффективность терминации трансляции у эукариот влияют последовательности нуклеотидов в окрестностях терминирующих кодонов и структура С-концевой части строящейся полипептидной цепи.
- Терминирующие кодоны дрожжей по частоте их использования можно расположить в следующий ряд: UAA(53%) > UGA(27%) > UAG(20%).
- Если анализировать только активно экспрессирующиеся гены, то частота использования UAA оказывается еще большей - 87%.



Особенности трансляции

прокариоты

эукариоты

- | | | |
|--|---------------------------------------|---|
| ➤ Рибосомы | 70S (30S, 50S) | 80S (40S, 60S) |
| ➤ Стартовая аминокислота | формилметионин (fmet) | метионин (met) |
| ➤ Факторы инициации | IF1, 2, 3 | eIF 1, 2, 3, 4A, 4B, 4C, 4E, 5 и др. (всего 12) |
| ➤ Выбор
старт-кодона | Последовательность
Шайна-Дальгарно | КЭП (гипотеза
сканирования);
последовательность Козак |
| ➤ Последовательность
сборки комплекса | 30S + мРНК + fmet-тРНК | 40S + met-тРНК + мРНК |

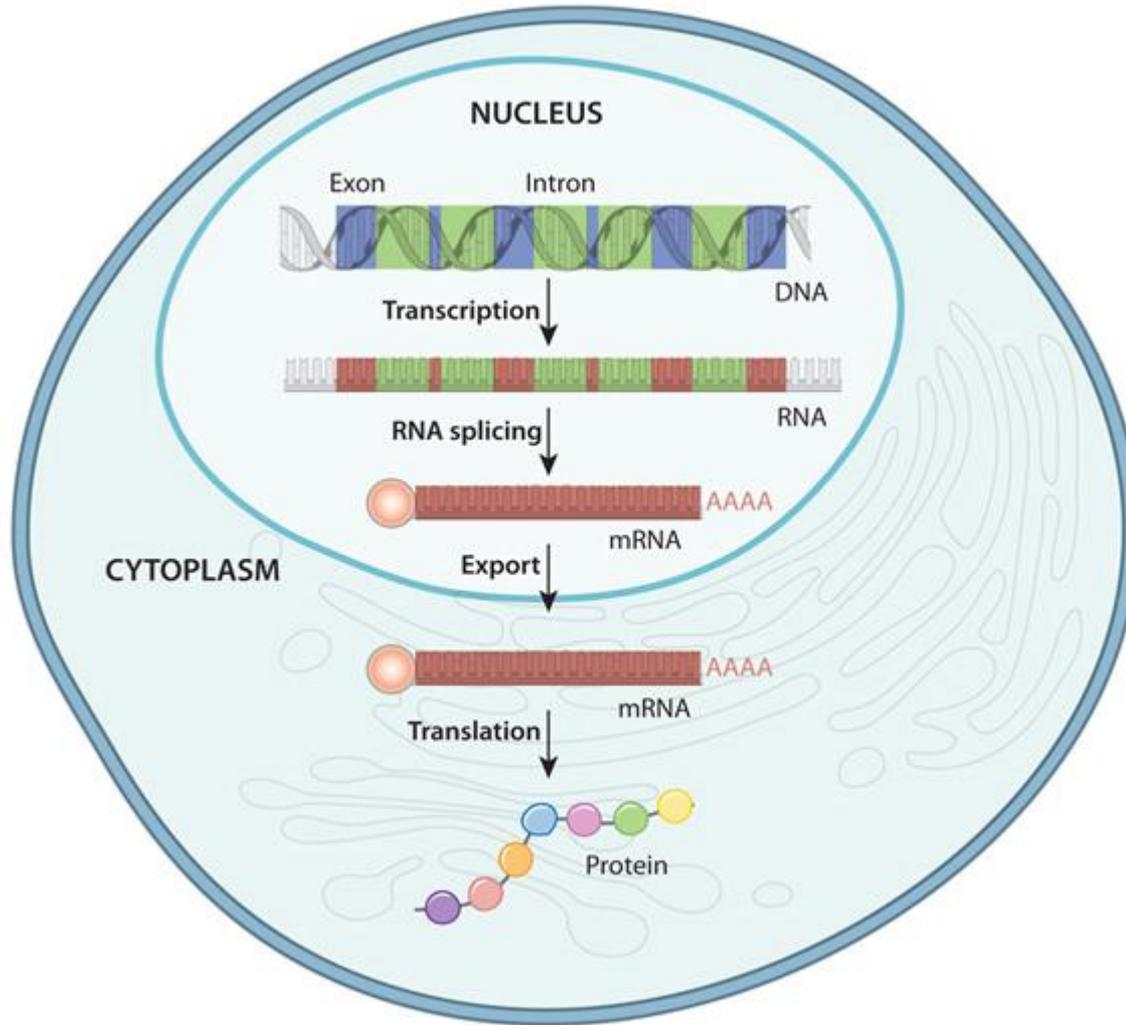
Особенности трансляции

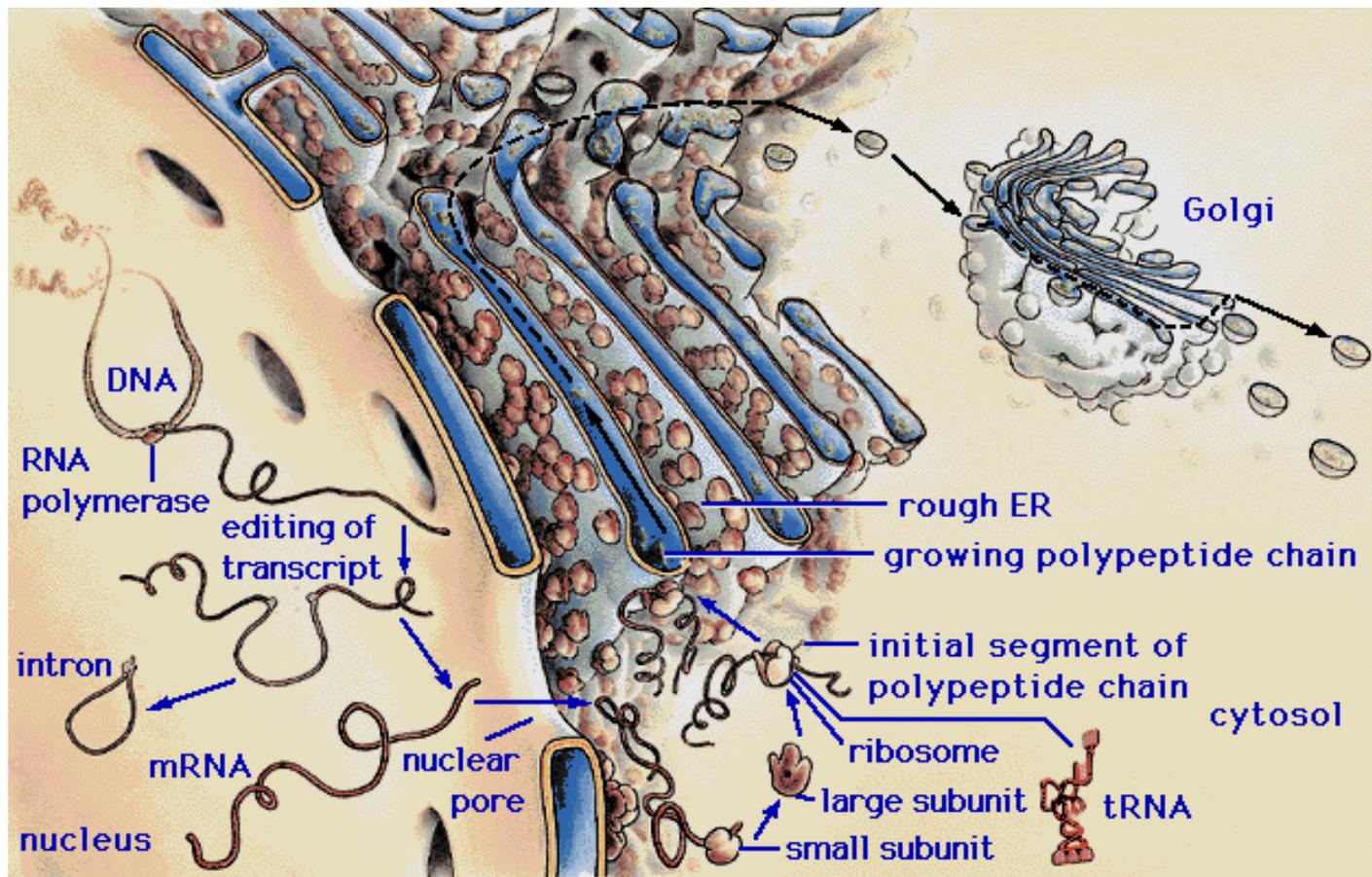
прокариоты

эукариоты

➤ Факторы элонгации	EF1 (Tu), EF2 (Ts), EF3 (G)	eEF1, eEF2
➤ Факторы терминации	RF1, RF2, RF3, RRF	eRF1, eRF3
➤ Локализация процесса в клетке	Цитозоль	Цитозоль, мембраны ЭПР, митохондрии
➤ Сопряженность с транскрипцией	Идут одновременно	После транскрипции и процессинга РНК

Разобщенность транскрипции и трансляции у эукариот





Готовая белковая молекула затем отщепляется от рибосомы и транспортируется в нужное место клетки. Для достижения своего активного состояния некоторые белки требуют дополнительной посттрансляционной модификации.

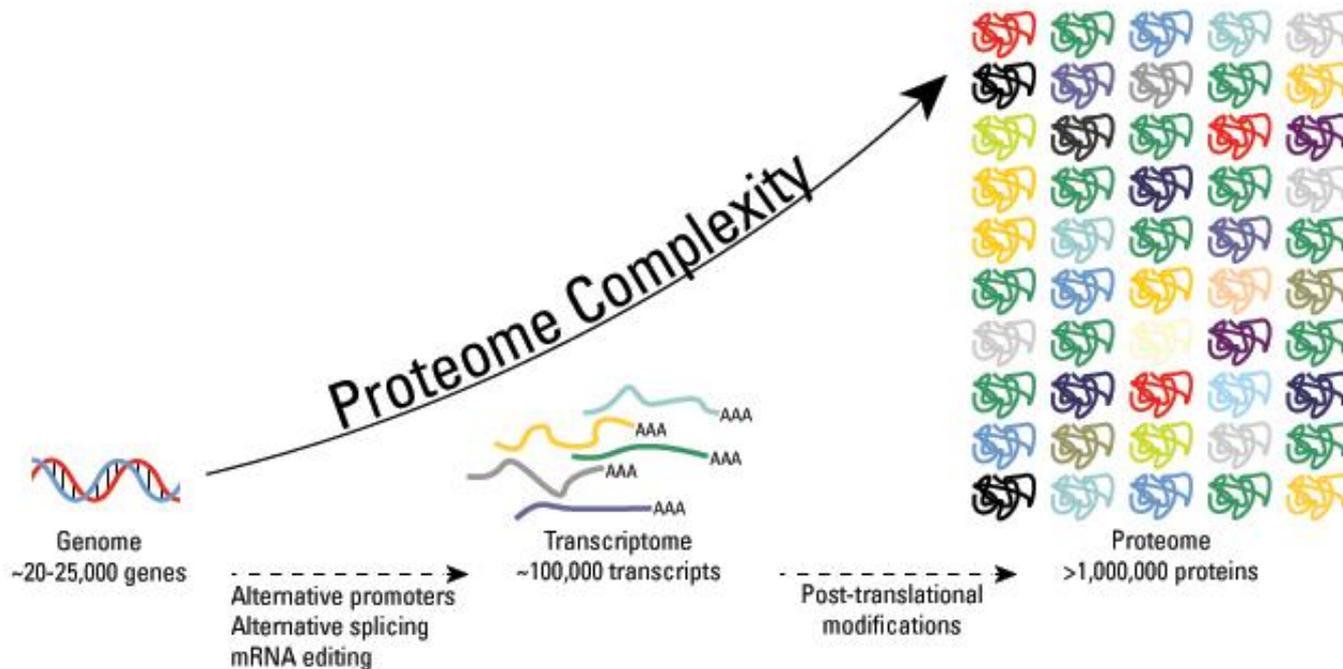
Посттрансляционная модификация

химическая модификация белка - последний этап синтеза

Известно более 200 вариантов посттрансляционной модификации белков

Эффекты ПМ - продолжительность жизни белков, ферментативную активность, взаимодействие с другими белками

Частичный гидролиз, гликозилирование (половина всех белков человека), фосфорилирование, алкилирование, убиквитирование, тирозинирование и т.д.



Процессинг белка

Процессинг белка – комплекс посттрансляционных модификаций (созревание) белковой молекулы.

Этапы процессинга белка

- Частичный протеолиз (удаление фрагментов полипептидной цепи)
- Присоединение простетических групп (углеводов, липидов и др.)
- Химическая модификация аминокислотных остатков (фосфорилирование, метилирование, ацетилирование, гидроксилирование и др.)
- Фолдинг (формирование третичной структуры)
- Ассоциация субъединиц белков, обладающих четвертичной структурой

Фолдинг белка

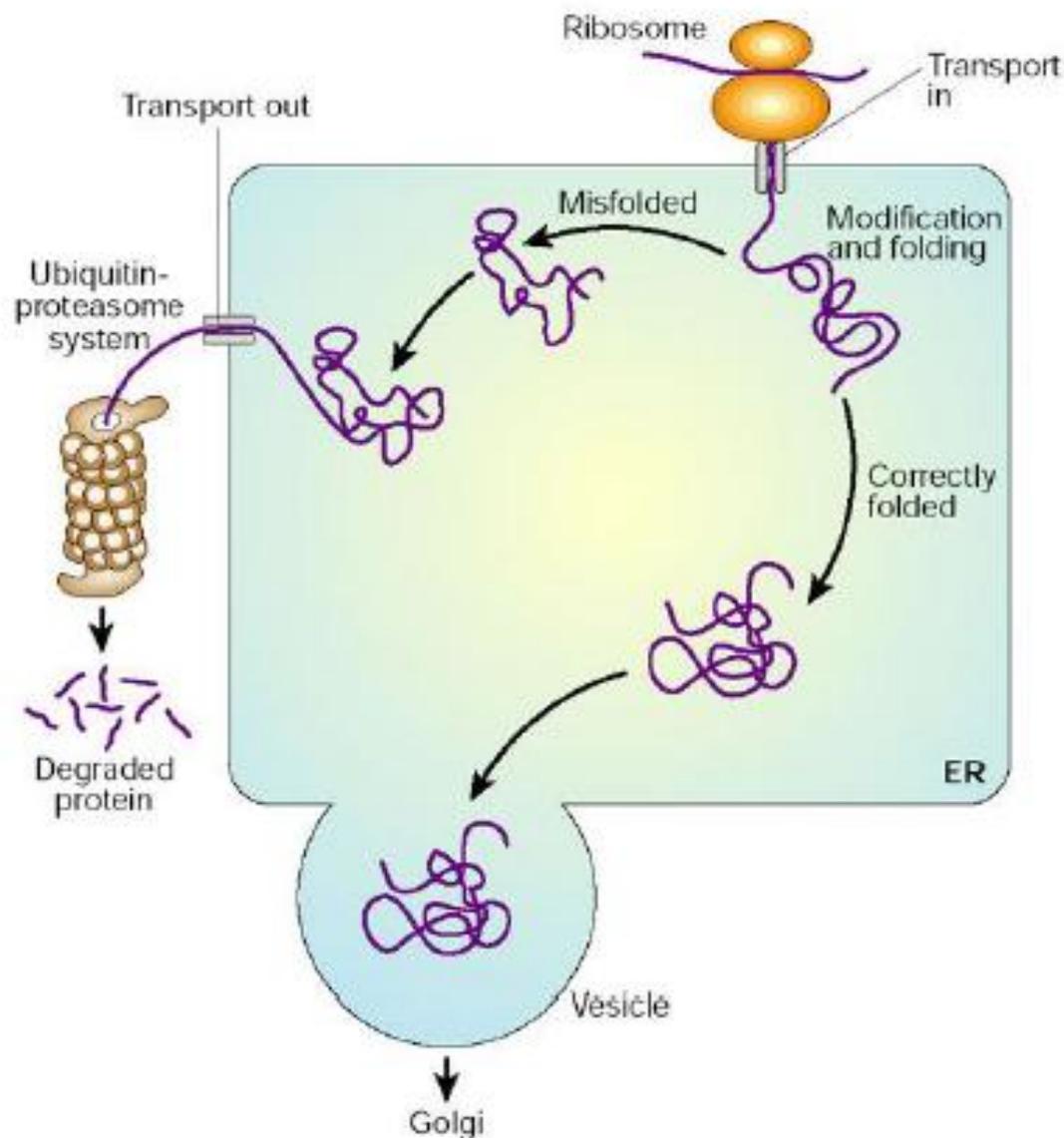
Это процесс сворачивания полипептидной цепи в специфическую пространственную (третичную) структуру.

Факторы:

- Фолдазы (протеиндисульфидизомераза и др.)
- Шапероны (белки теплового шока и шаперонины)

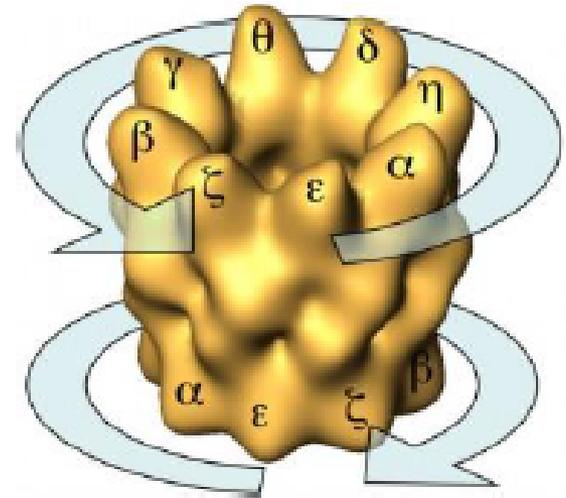
Фолдинг белка

Фолдингом белка (укладкой белка, от англ. folding) называют процесс спонтанного сворачивания полипептидной цепи в уникальную нативную пространственную структуру (так называемая третичная структура).



Фолдинг белка

- В фолдинге участвуют **белки-шапероны**.
- Большинство только что синтезированных белков может сворачиваться при отсутствии шаперонов
- **Шапероны** — класс белков, главная функция которых состоит в восстановлении правильной третичной структуры повреждённых белков, а также образование и диссоциация белковых комплексов.
- Многие шапероны являются белками теплового шока, то есть белками, экспрессия которых начинается в ответ на рост температуры или другие клеточные стрессы
- Белки теплового шока – Hsp (heat shock protein).
- Тепло сильно влияет на фолдинг белка, а некоторые шапероны участвуют в исправлении потенциального вреда, который возникает из-за неправильного сворачивания белков
- Другие шапероны участвуют в фолдинге только что созданных белков в тот момент, когда они «вытягиваются» из рибосомы.



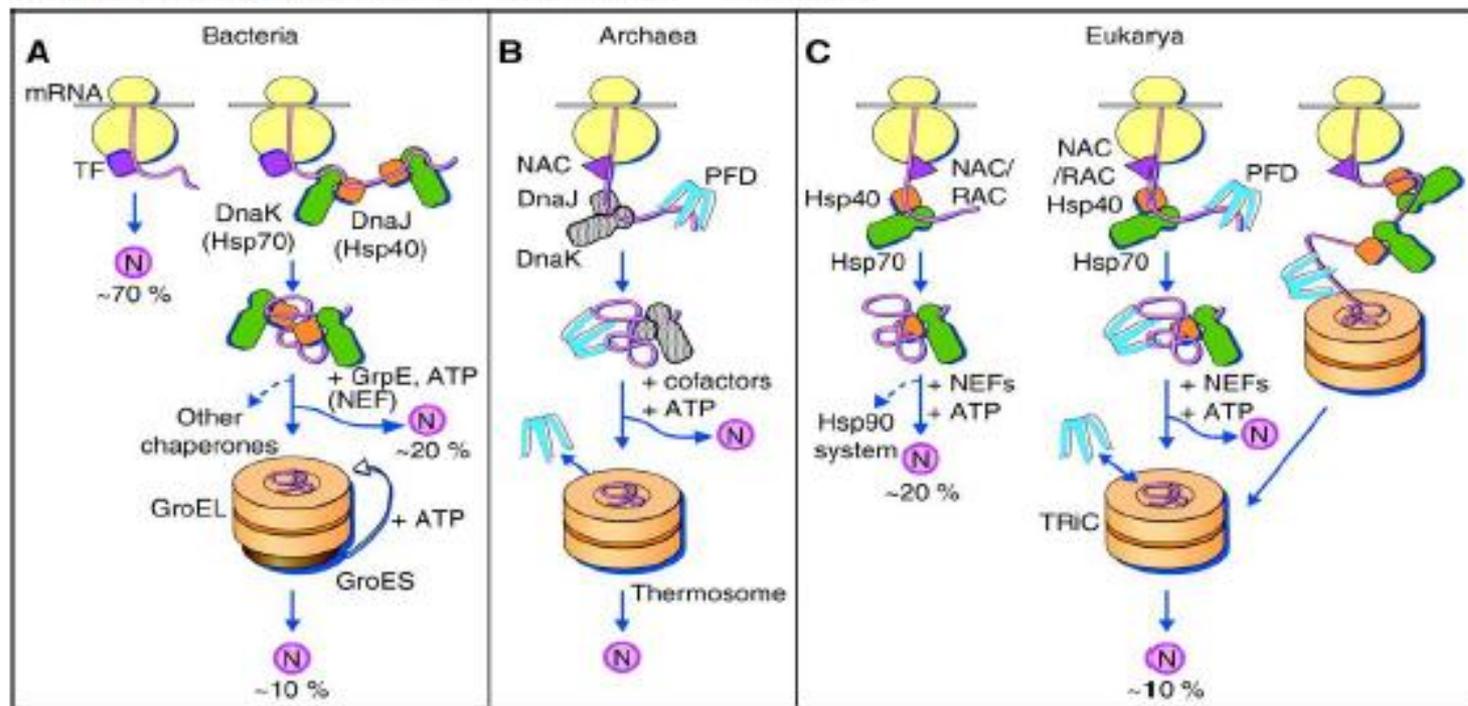
Фолдинг белка

- Фолдинг белков происходит в эндоплазматическом ретикулуме
- В нём содержатся необходимые для фолдинга шапероны и ферменты
- Также он обладает уникальным окислительным потенциалом, облегчающим образование дисульфидных связей в процессе укладки белка.
- Из эндоплазматического ретикулума белки с корректной укладкой отправляются к месту назначения.
- Белки с нарушенной укладкой подвергаются ассоциированной с эндоплазматической сетью деградации

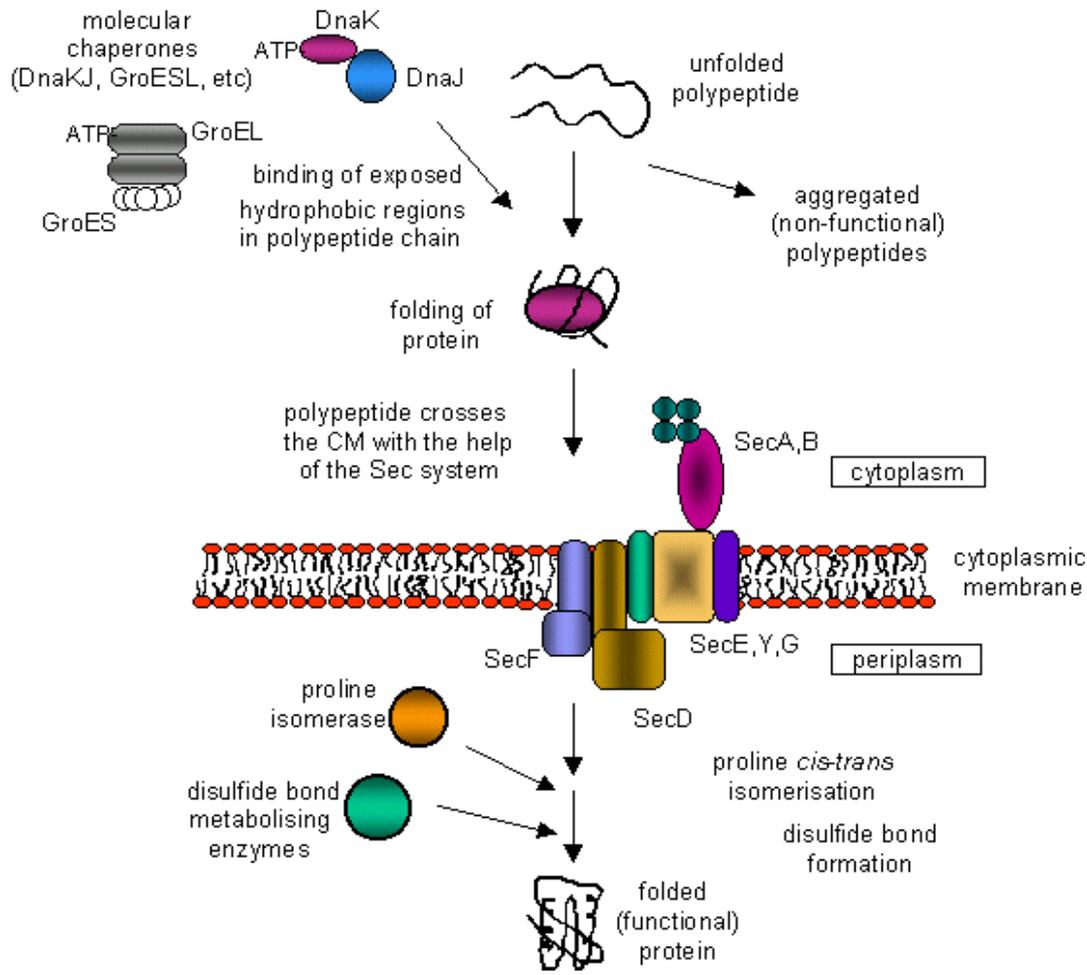


Фолдинг белка

- Hsp70 играют доминирующую роль в фолдинге и рефолдинге клеточных белков среди всех шаперонов у эукариот
- Для их работы необходимо присутствие еще одного класса белков - Hsp40.
- Шаперонины — белки, работающие «в паре» с шаперонами, — обеспечивают правильное сворачивание полипептидной цепи, временно «изолируя» только что сошедший с рибосомы белок в своей внутренней полости
- При этом бактериальные шаперонины «закрываются» с помощью отдельной «крышки», а шаперонины эукариот имеют «встроенную» «задвижку»



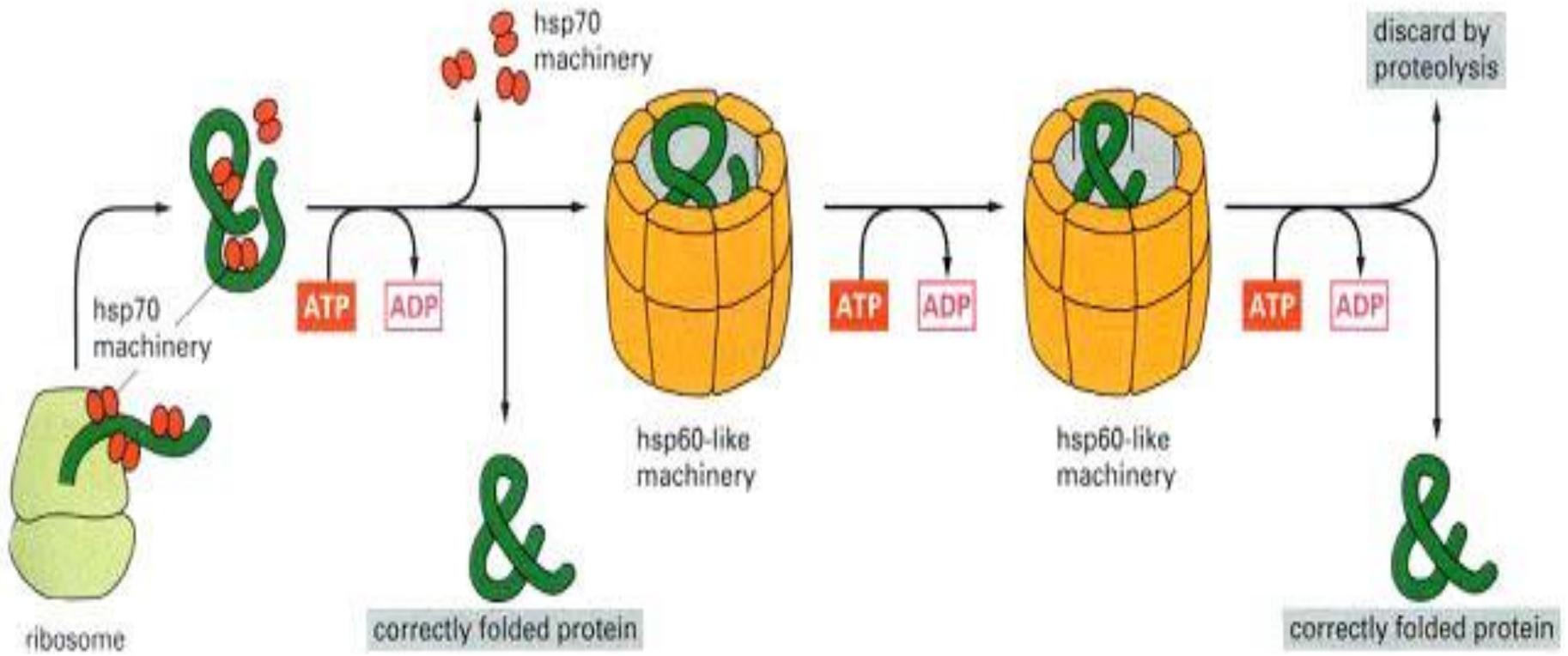
Бактериальный фолдинг



Ко-трансляционный фолдинг осуществляется системой DnaK/DnaJ

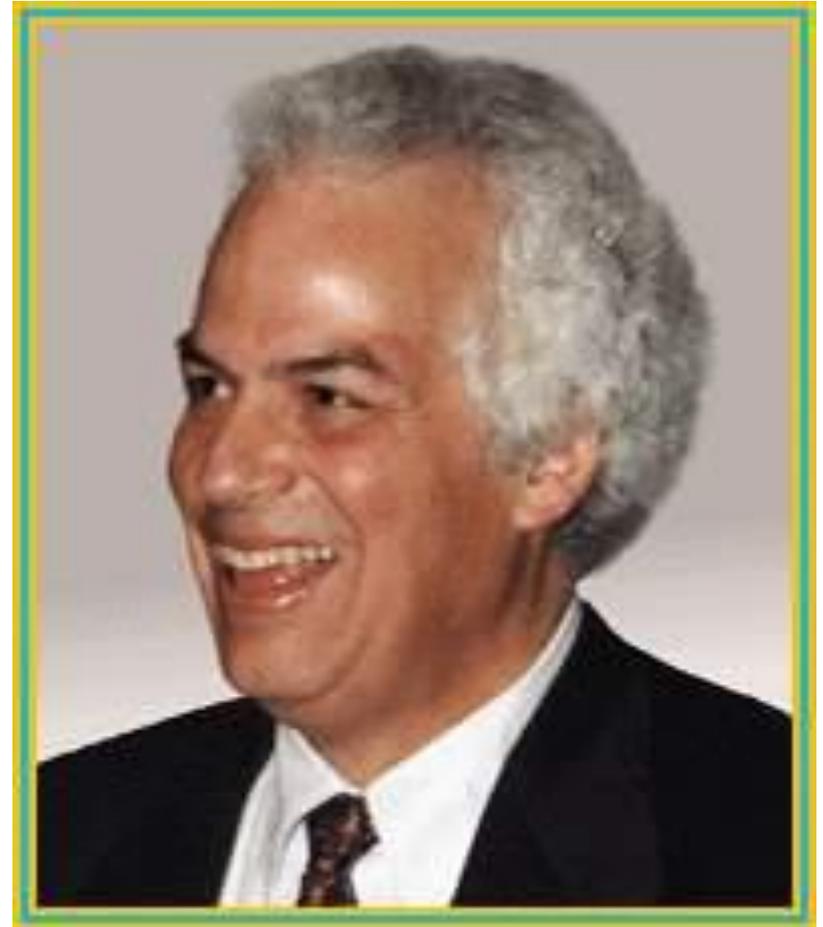
Посттрансляционный фолдинг — системой GroEL/ES, а также фолдазами

Система DnaK/DnaJ у бактерий

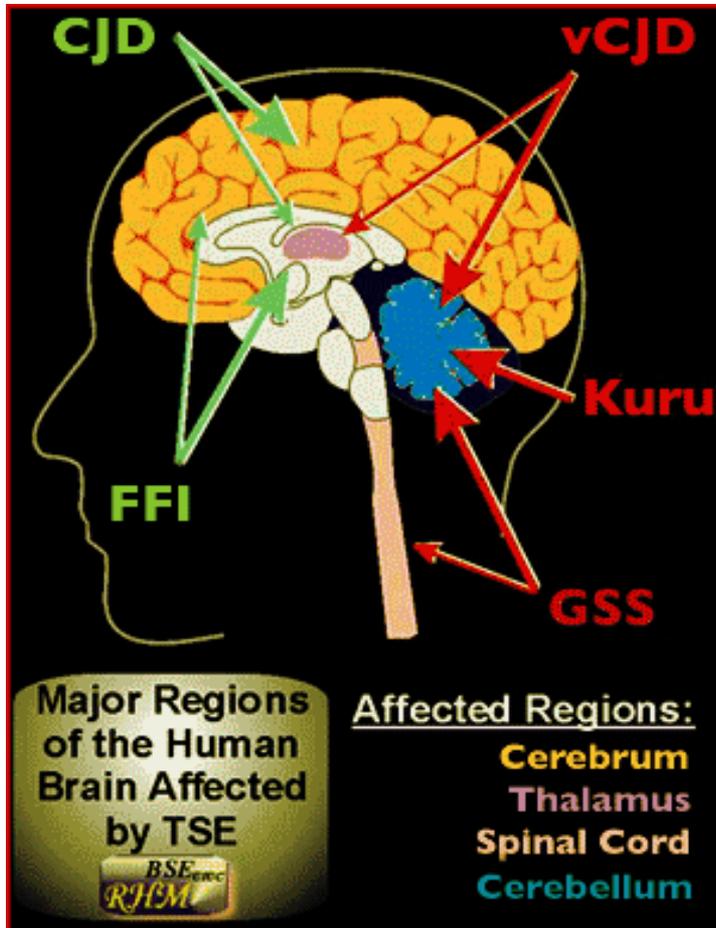


Фолдинг белков и прионы

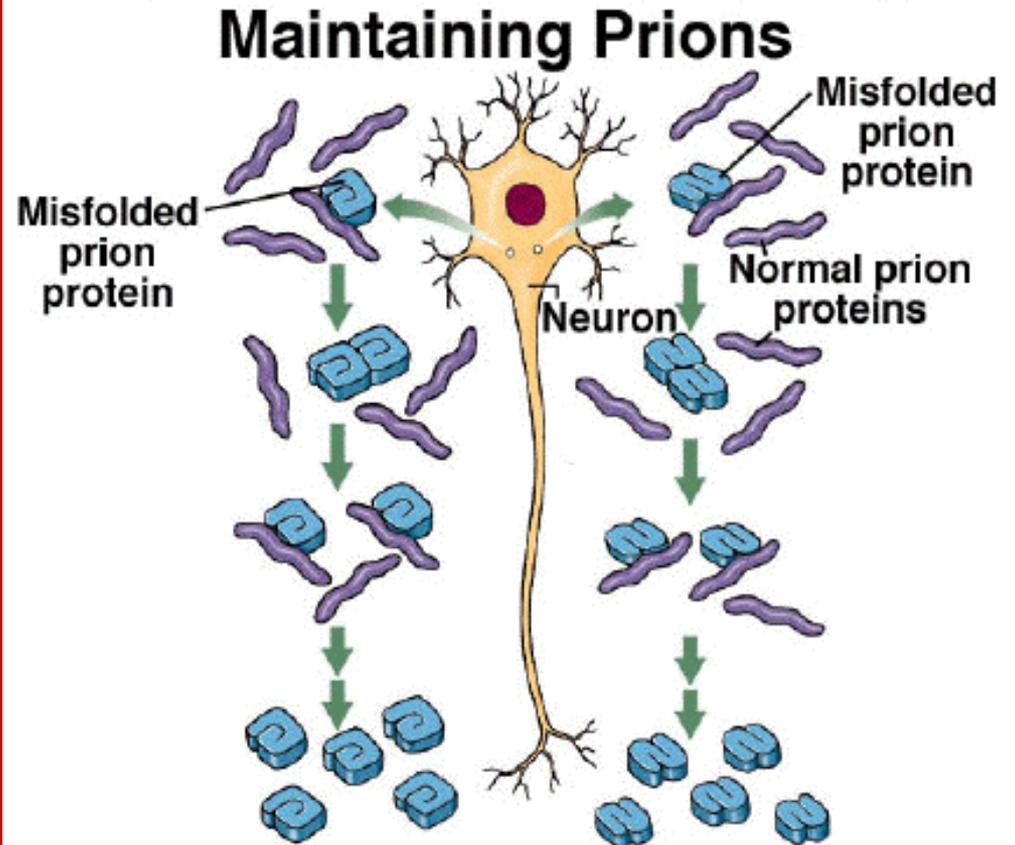
- Причина куру, скрепи, болезни Крейцфельда-Якоба заключается в присутствии **ненормальной формы нормального белка**, называемой **прионом**. Таким образом мы можем рассматривать **прионы как антишапероны**.
- Идея рассмотрения белков в качестве инфекционных агентов принадлежит **Stan Prusiner**.



Прионы — антишапероны



Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



Прионы

(С. Прузинер, 1997)

Прионы - инфекционные агенты белковой природы (от англ. *proteinaceous infectious particles*), вызывающие у человека и животных нейродегенеративные заболевания.

Прионный белок может существовать в двух формах:

- нормальная (клеточная) форма, обозначаемая **PrP^c** (от англ. - *cellular prion-related protein*), содержится в нейронах млекопитающих, включая и человека.
- Патогенная форма (прион), обозначаемая **PrP^{sc}** (от англ. - *scrapie prion-related protein*), обнаруживается в организме людей и животных, страдающих прионными болезнями.

Прион вызывает трансформацию нормального (клеточного) прионного белка в его инфекционную форму за счет конформационных (пространственных) изменений.

Причины появления прионов:

- спонтанная трансформация белка
- поступление с пищей
- заражение через медицинский инструментарий и при трансплантации тканей
- мутации в гене прионного белка

Прионные болезни человека:

- Спорадические (болезнь Крейтцфельдта-Якоба)
- Трансмиссивные (куру)
- Наследственные (летальная семейная бессонница).

Прионные болезни животных:

- губчатая энцефалопатия крупного рогатого скота (коровье бешенство)
- губчатая энцефалопатия кошек
- скрейпи (почесуха) овец и др.

Деградация белка



The Nobel Prize in Chemistry 2004
Aaron Ciechanover, Avram Hershko, Irwin Rose

The Nobel Prize in Chemistry 2004

Nobel Prize Award Ceremony

Aaron Ciechanover

Avram Hershko

Irwin Rose

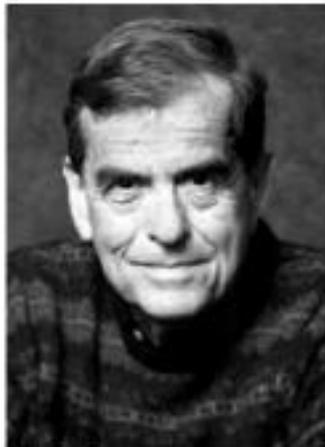


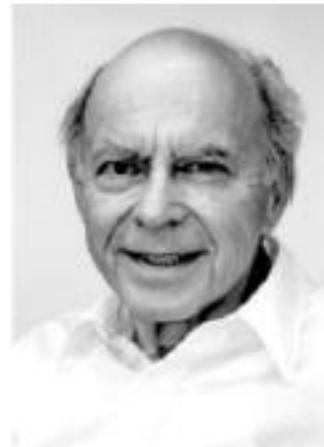
Photo: D. Forgas

Aaron Ciechanover



Photo: D. Forgas

Avram Hershko



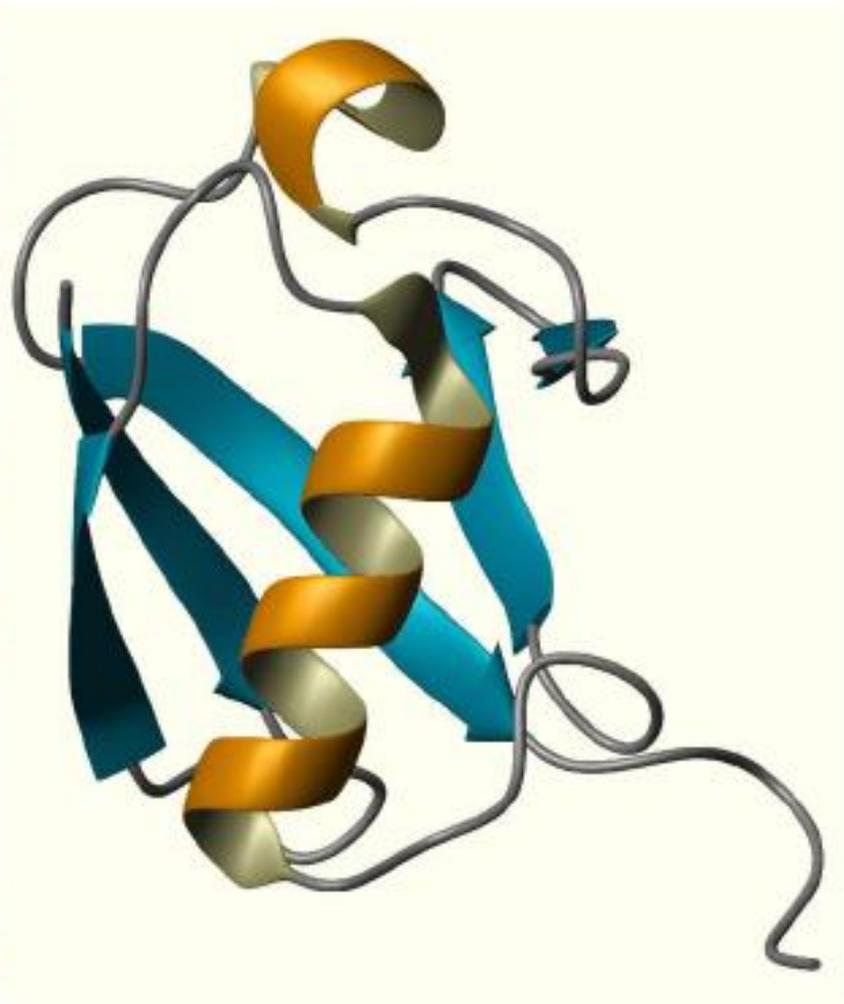
Irwin Rose

The Nobel Prize in Chemistry 2004 was awarded jointly to Aaron Ciechanover, Avram Hershko and Irwin Rose "for the discovery of ubiquitin-mediated protein degradation".

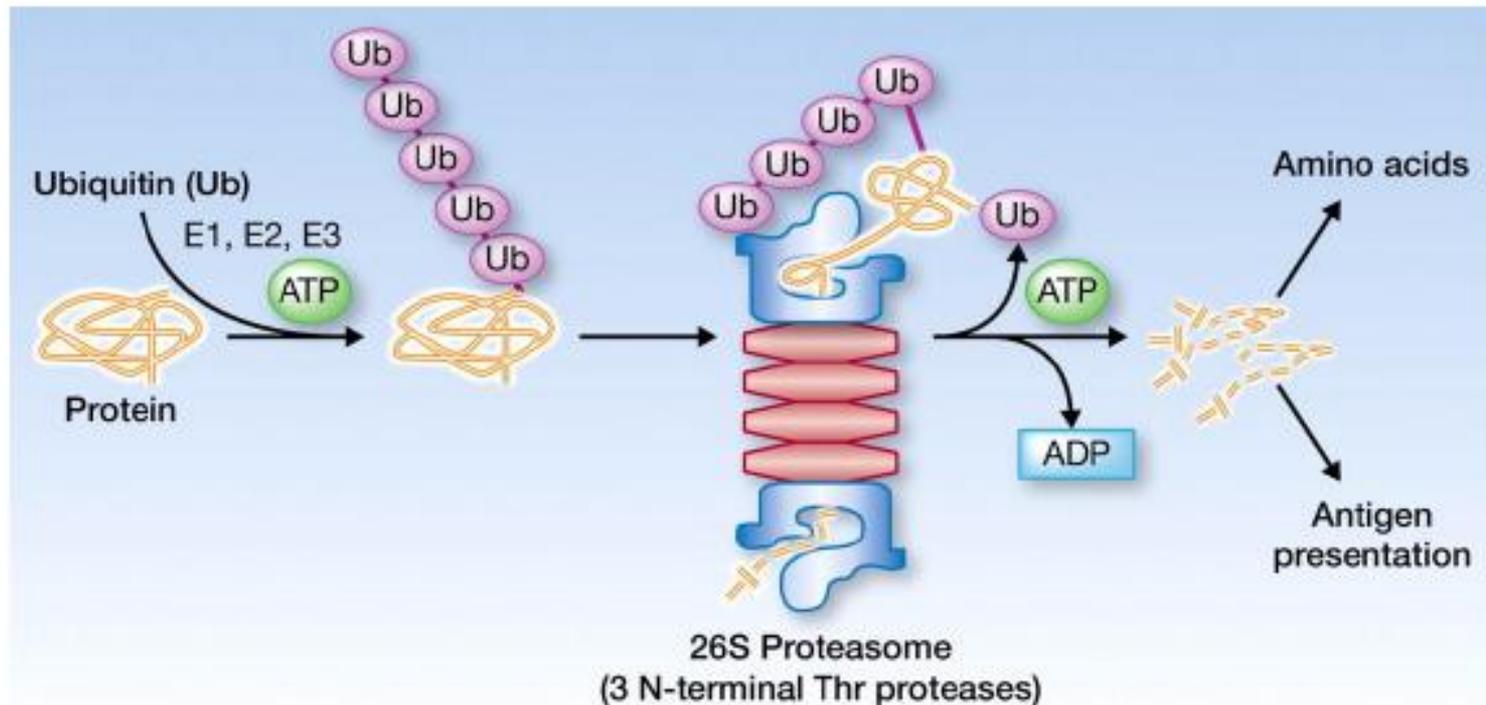
Деградация белков проходит по убиквитин-протеасомному пасвею

Деградация белка

- **Убиквитин** (от англ. ubiquitous — вездесущий) — небольшой консервативный белок
- **Убиквитинирование** — это посттрансляционное присоединение ферментами убиквитин-лигазами одного или нескольких мономеров убиквитина с помощью ковалентной связи к боковым аминогруппам белка-мишени.
- Присоединение убиквитина влияет на внутриклеточную локализацию и функцию белков.
- Самым первым открытием стала деградация белков, помеченных мультиубиквитиновыми цепями, с помощью 26S-протеасомы.
- Система убиквитинирования вовлечена в такие важные процессы, как пролиферация, развитие и дифференцировка клеток, реакция на стресс и патогены, репарация ДНК.



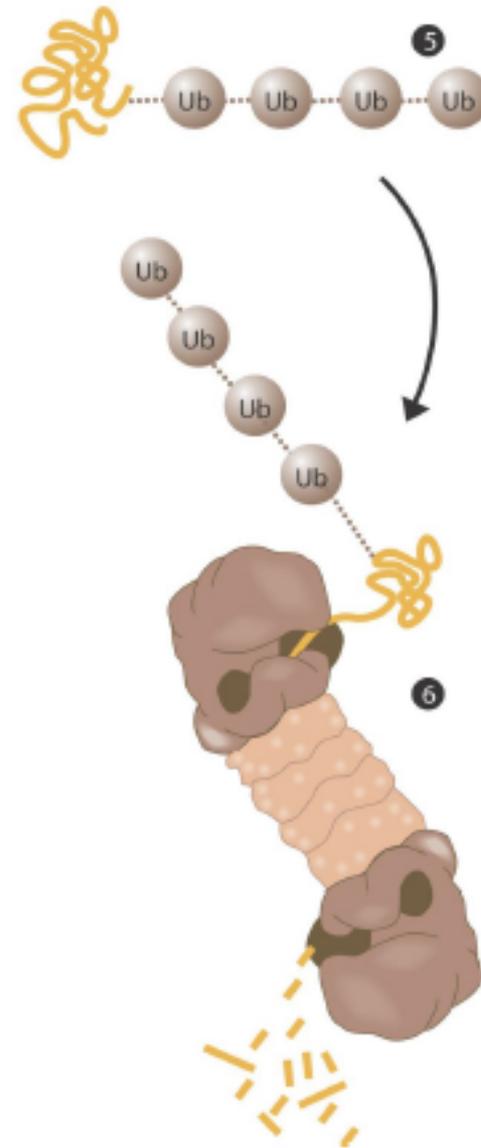
Деградация белка



- При помощи убиквитин-лигаз (E1, E2, E3) цепь из 4 или более молекул убиквитинов присоединяется к одному или более остатку лизина на целевом белке.
- Такой убиквитинилированный белок транспортируется к протеасоме, где цепь убиквитинов удаляется, позволяя целевому белку развернуться (unfold) и загрузиться во внутрь протеасомы, где он деградирует с помощью трёх треониновых протеаз.

Деградация белка

- Протеасома (от англ. protease — протеиназа и лат. soma — тело) — мультисубъединичная протеаза, присутствующая в клетках эукариот, архей и некоторых бактерий.
- У эукариот протеасомы присутствуют в цитозоле и ядрах
- Протеасомы выделяют в виде индивидуальных частиц с коэффициентами седиментации 20S и 26S
- В человеческой клетке насчитывается около 30,000 протеасом
- Они неспецифично расщепляют белки до пептидов длиной 7-9 аминокислот.



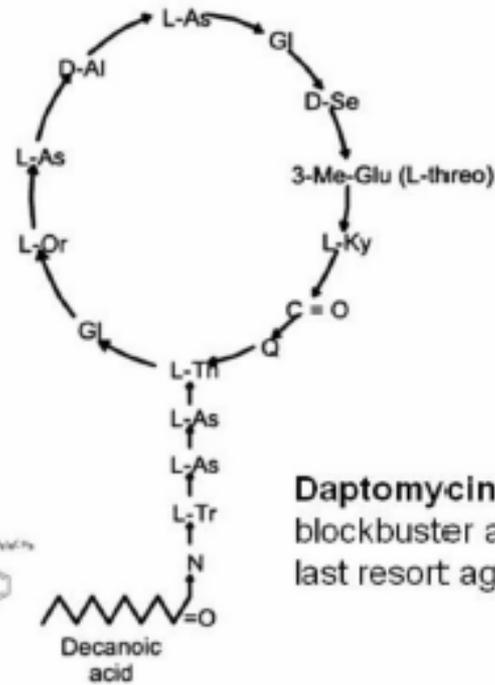
Не-рибосомальный синтез пептидов

Не-рибосомальные пептиды (NRP) являются очень эффективными:

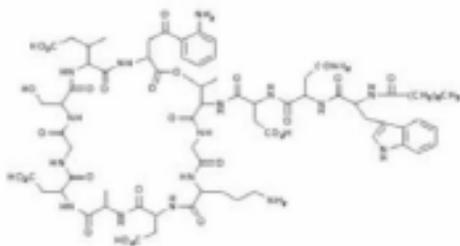
- Антибиотиками
- Иммуносупрессорами
- Антивирусными агентами
- Противораковыми агентами

Cycloproteins

Over 50% of antibacterial and anticancer drugs are derived from natural products (many of them are cyclic and branch-cyclic peptides)



Daptomycin:
blockbuster antibiotic of last resort against MRSA



Интересно, что первым белком, синтезированным искусственно, был инсулин, состоящий из 51 аминокислотного остатка. Потребовалось провести 5000 операций, в работе принимали участие 10 человек в течение трех лет.

