



Молекулярная биология

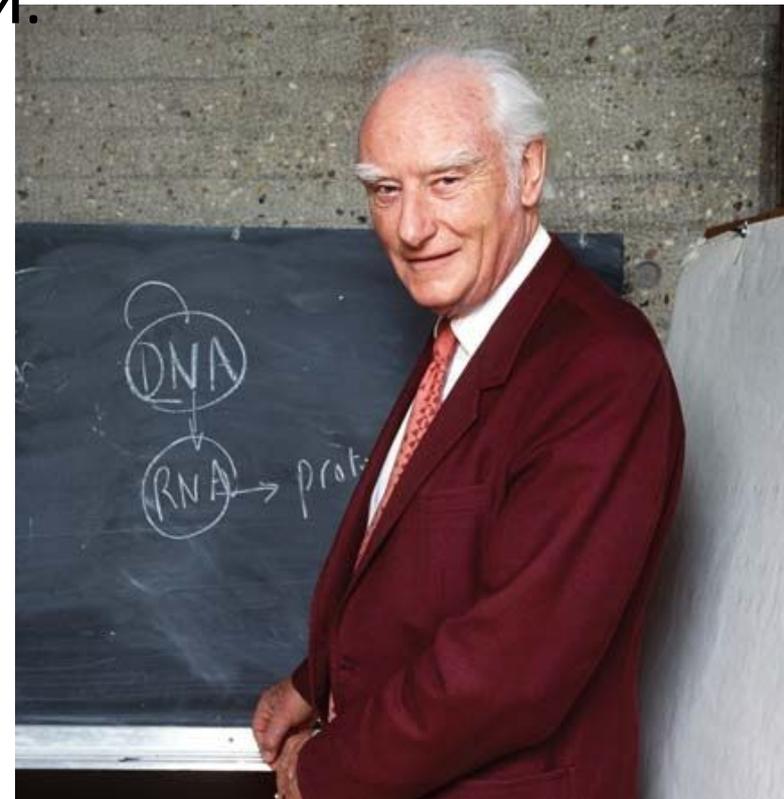
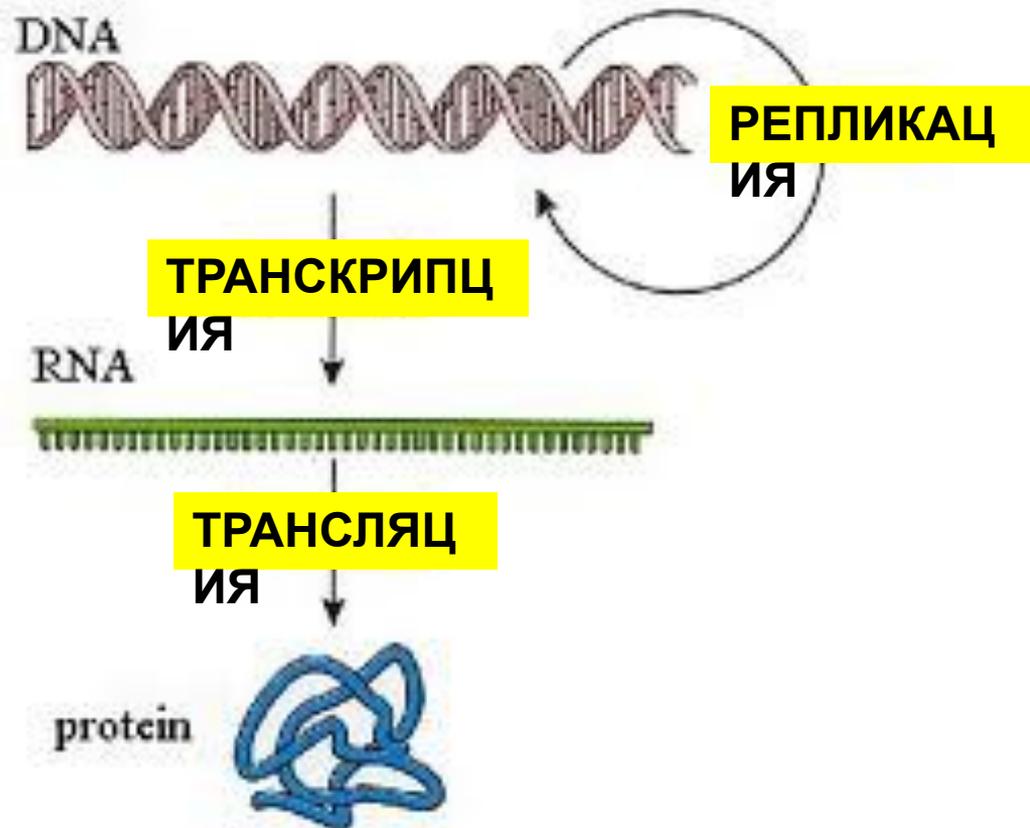
Лекция 9. *Трансляция.*

Скоблов Михаил

Ю

Часть 1. Трансляция у прокариот

1957 г. Центральная догма молекулярной биологии.

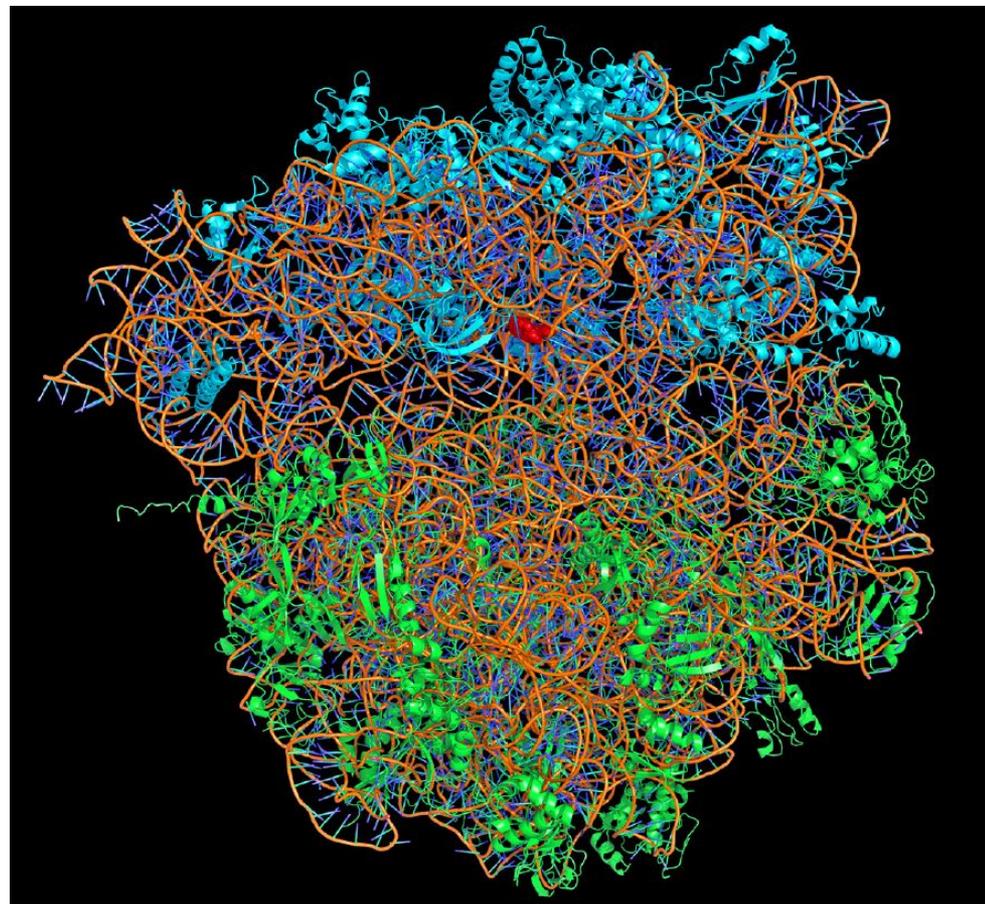


Francis Crick

Трансляци

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

- Главный участник трансляции - ***рибосома***



Основные этапы

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

Трансляци

Я

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

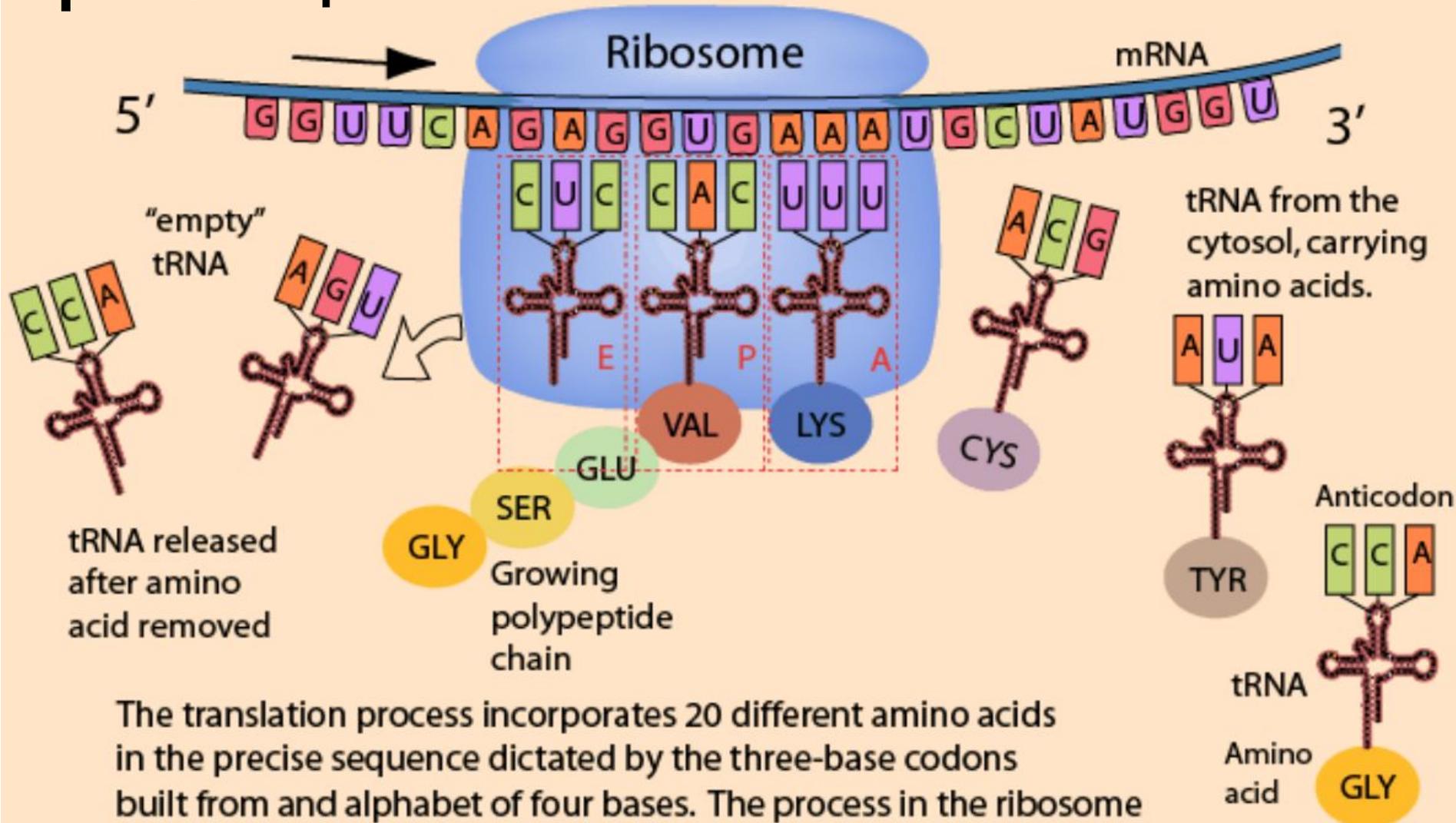
Ada E. Yonath

🕒 1/3 of the prize

Israel

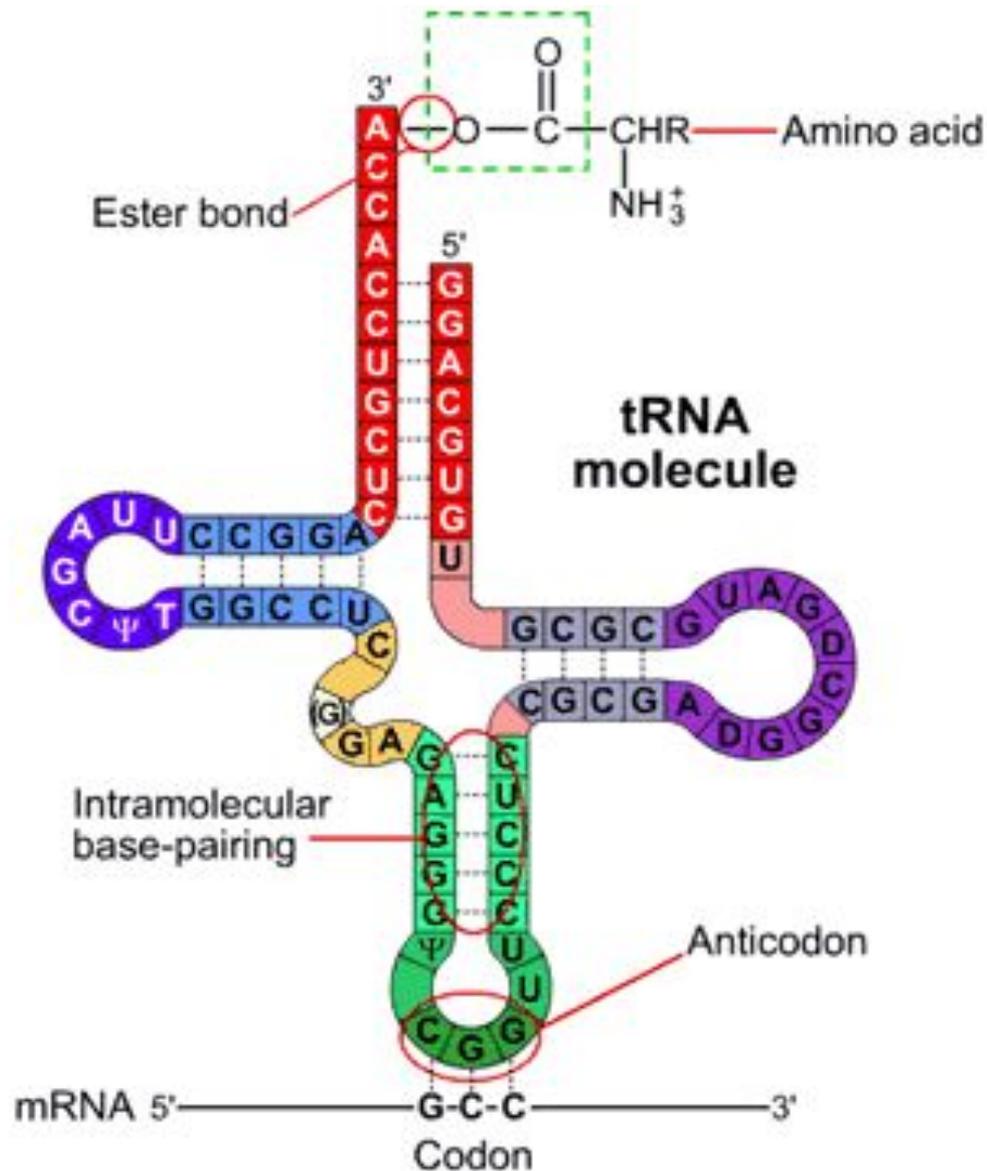
Weizmann Institute of Science
Rehovot, Israel

Основные участники трансляции



тРНК - 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

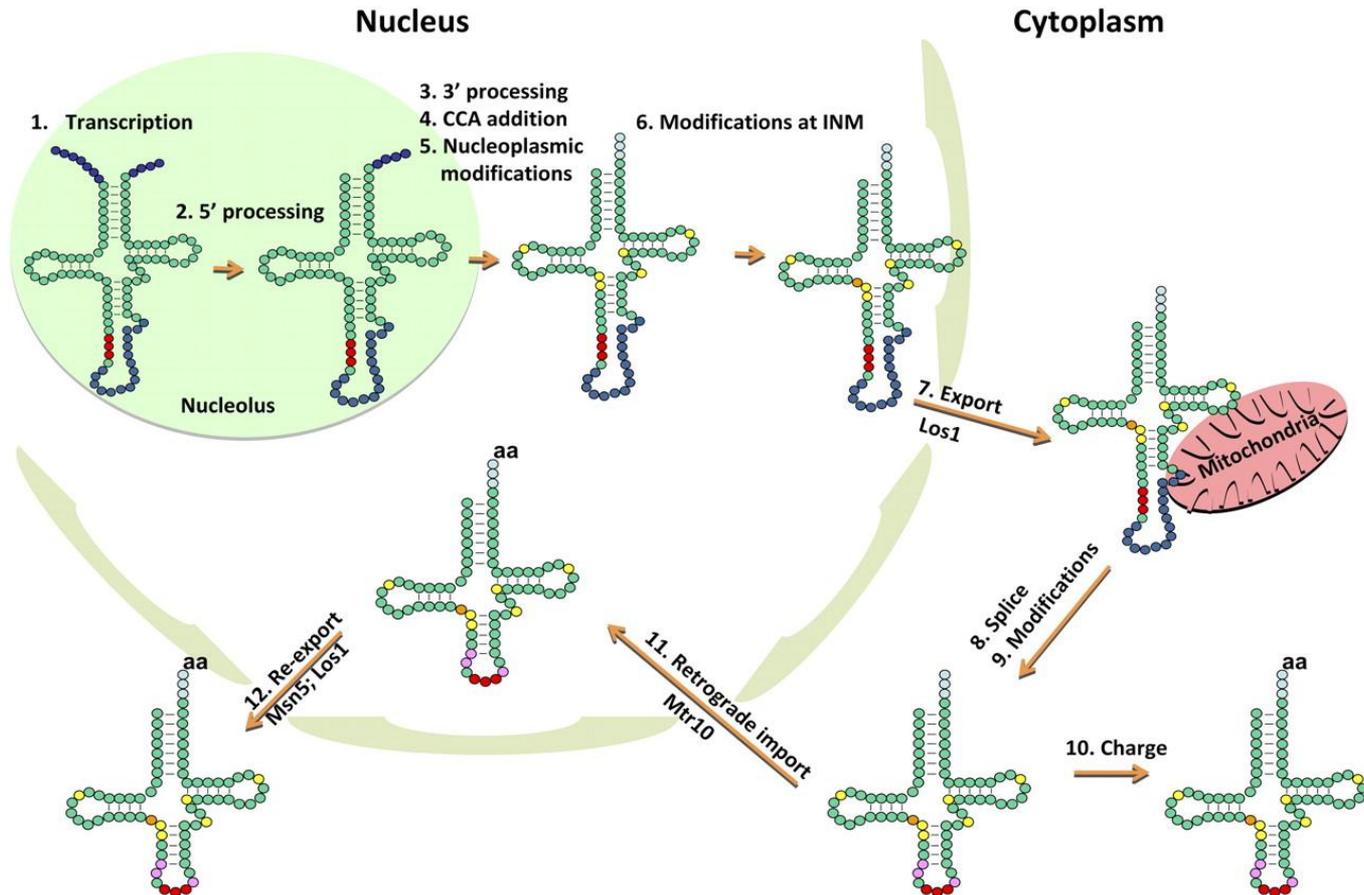


тРНК - транспортная

РНК

транскрипты генов тРНК подвергаются многостадийному процессингу:

- удаление 5'-лидерной нуклеотидной последовательности;
- удаление 3'-концевой последовательности;
- добавление последовательности ССА на 3'-конец;
- вырезание интронов (у эукариот и архей);
- модификации отдельных нуклеотидов

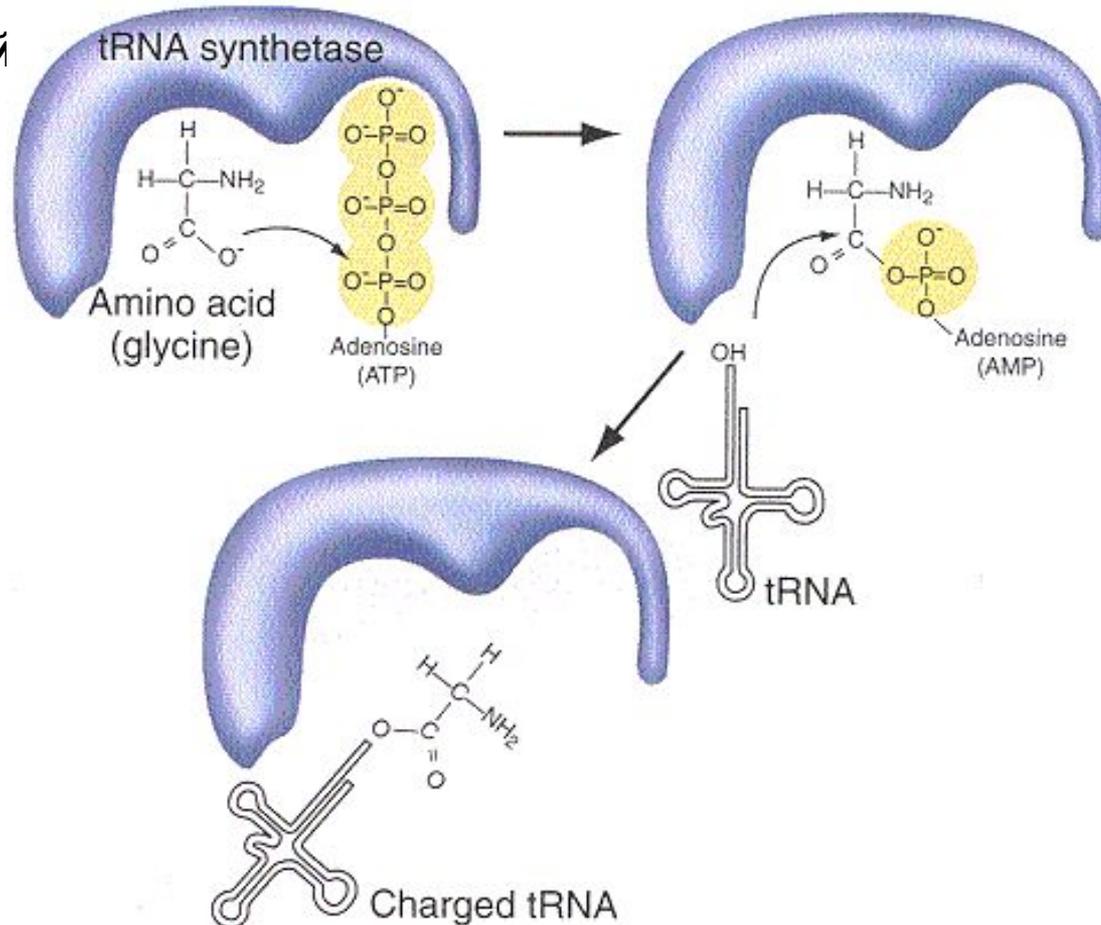


Аминоацил-тРНК-синтетаза

Синтетаза

Для каждой аминокислоты существует своя тРНК – 20 аминокислот в организме человека кодирует 61 кодон, соответственно существует 61 тип тРНК.

- Аминокислота ковалентно присоединяется к 3'-концу молекулы с помощью специфического для каждого типа тРНК фермента **аминоацил-тРНК-синтетазы**
- Для каждой



-синтетаза.

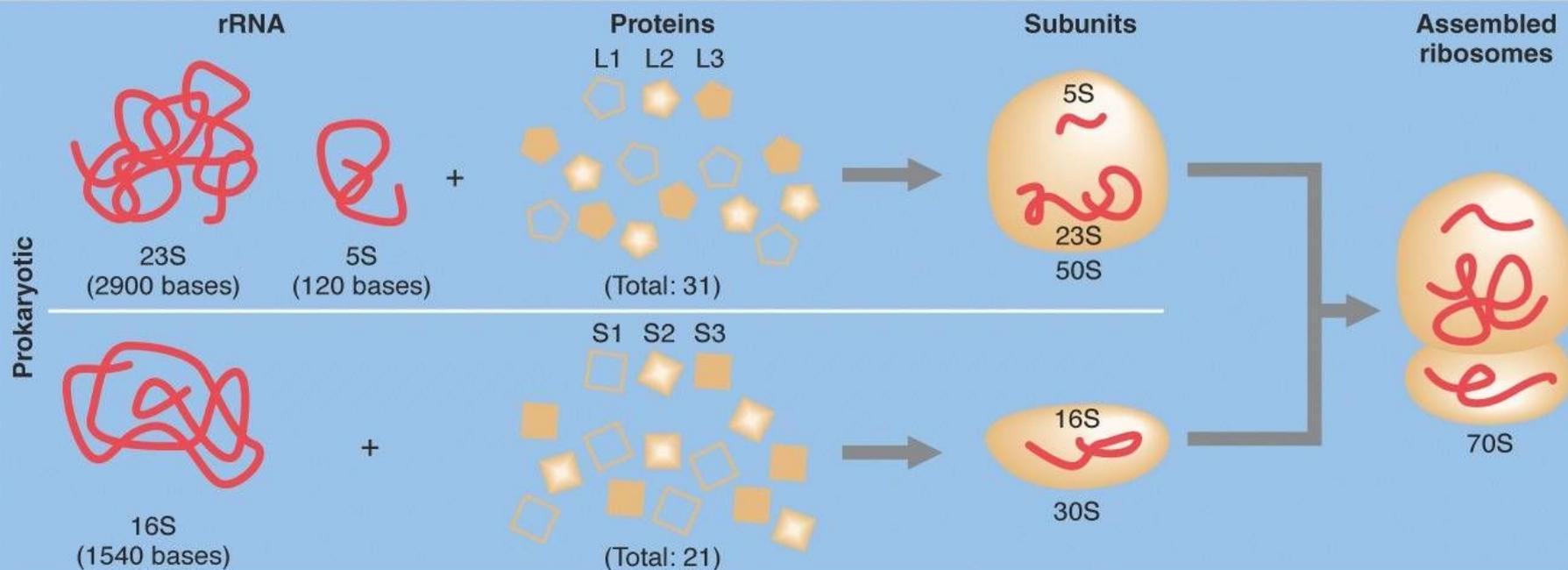
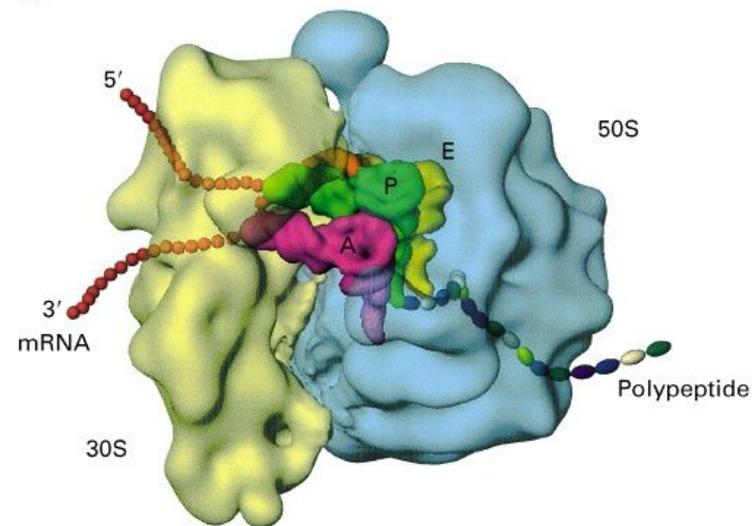
Рибосома

ма

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).

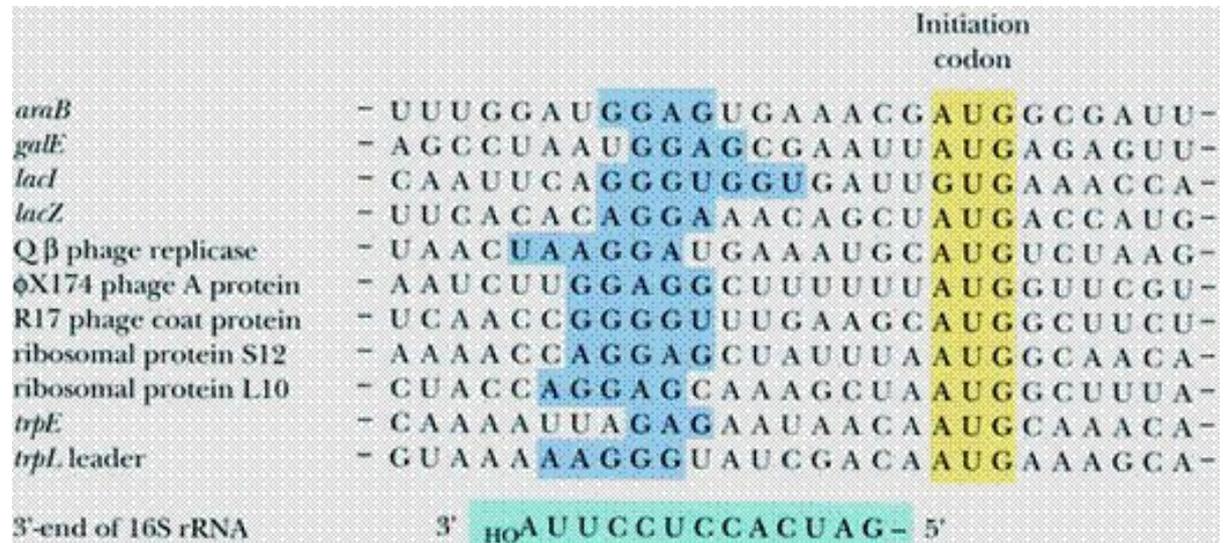
(a)



Инициация трансляции у

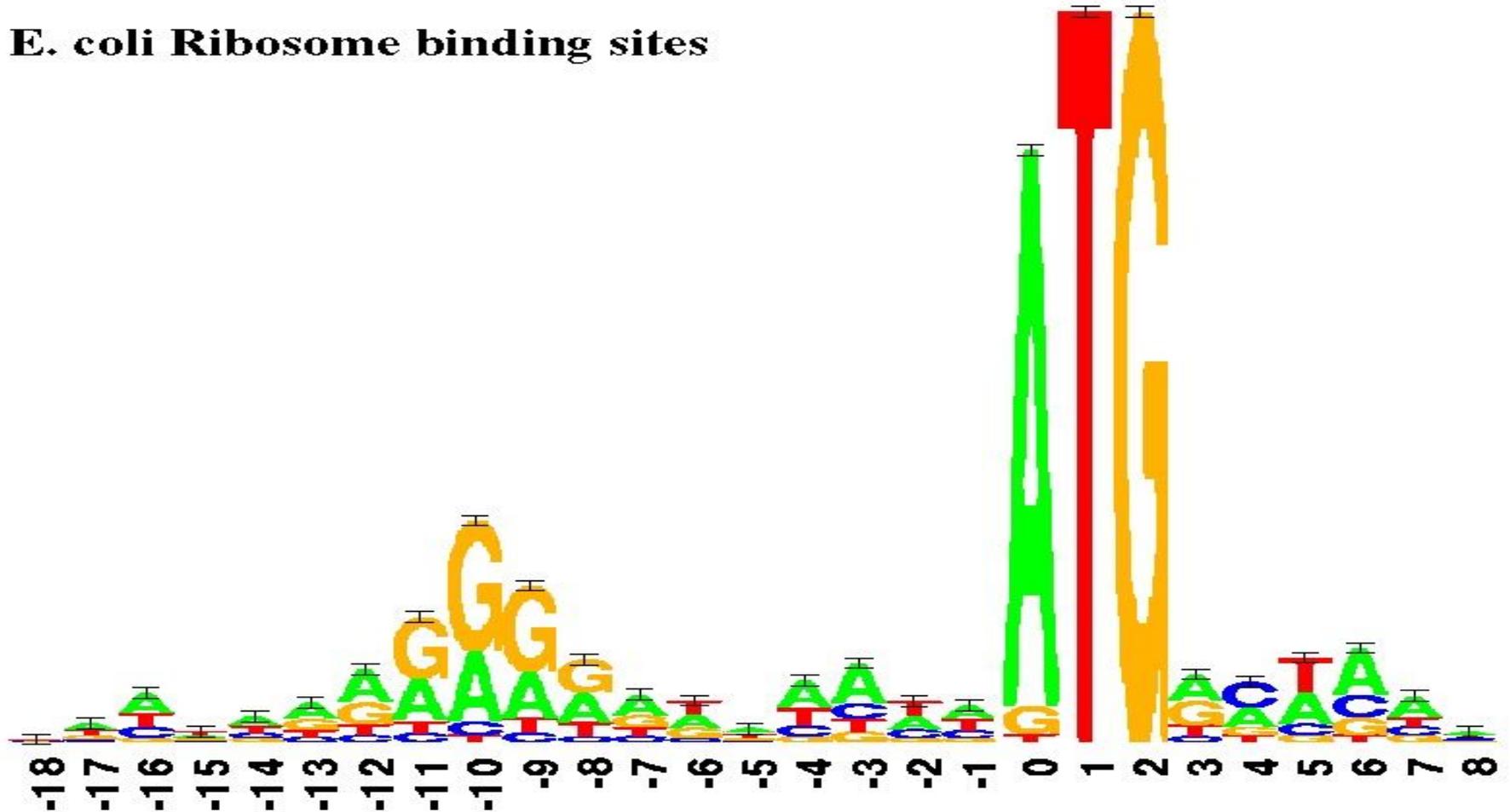
прокариот

- 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

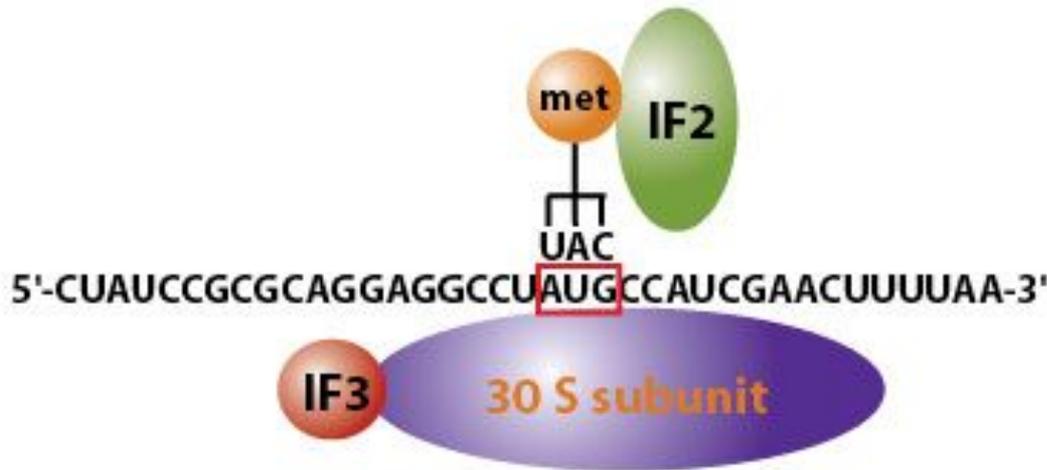
E. coli Ribosome binding sites



Инициация трансляции у

прокариот

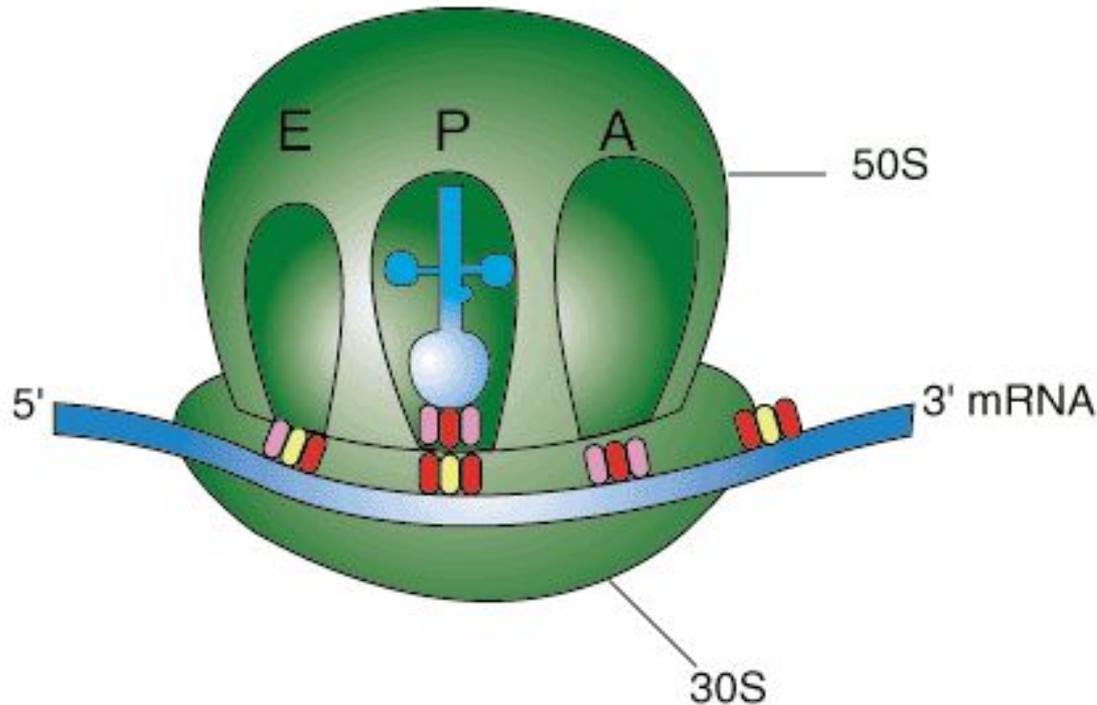
- В момент образования комплекса последовательности Шайна — Дальгарно и анти-Шайна — Дальгарно, с 30S-рибосомной субъединицей связываются и **факторы инициации трансляции IF2-GTP, IF1, IF3**, а также инициаторная формилметионил-тРНК (fMet-tRNA).
- К образовавшемуся преинициаторному комплексу затем присоединяется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

Элонгация трансляции у прокариот

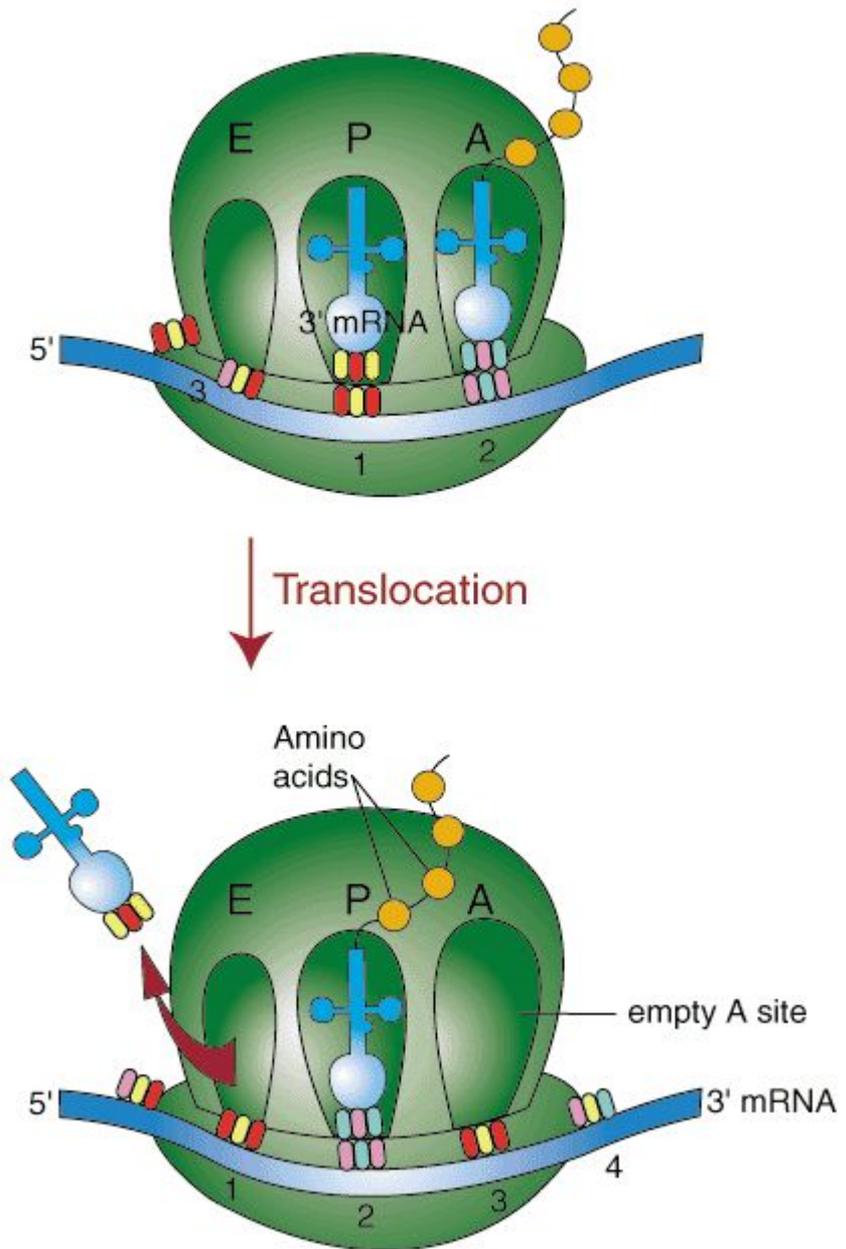


A – аминоацил тРНК связывающий сайт
(акцепторный участок)

P – пептидил тРНК связывающий сайт (донорный
участок)

E – участок отсоединения тРНК от рибосомы

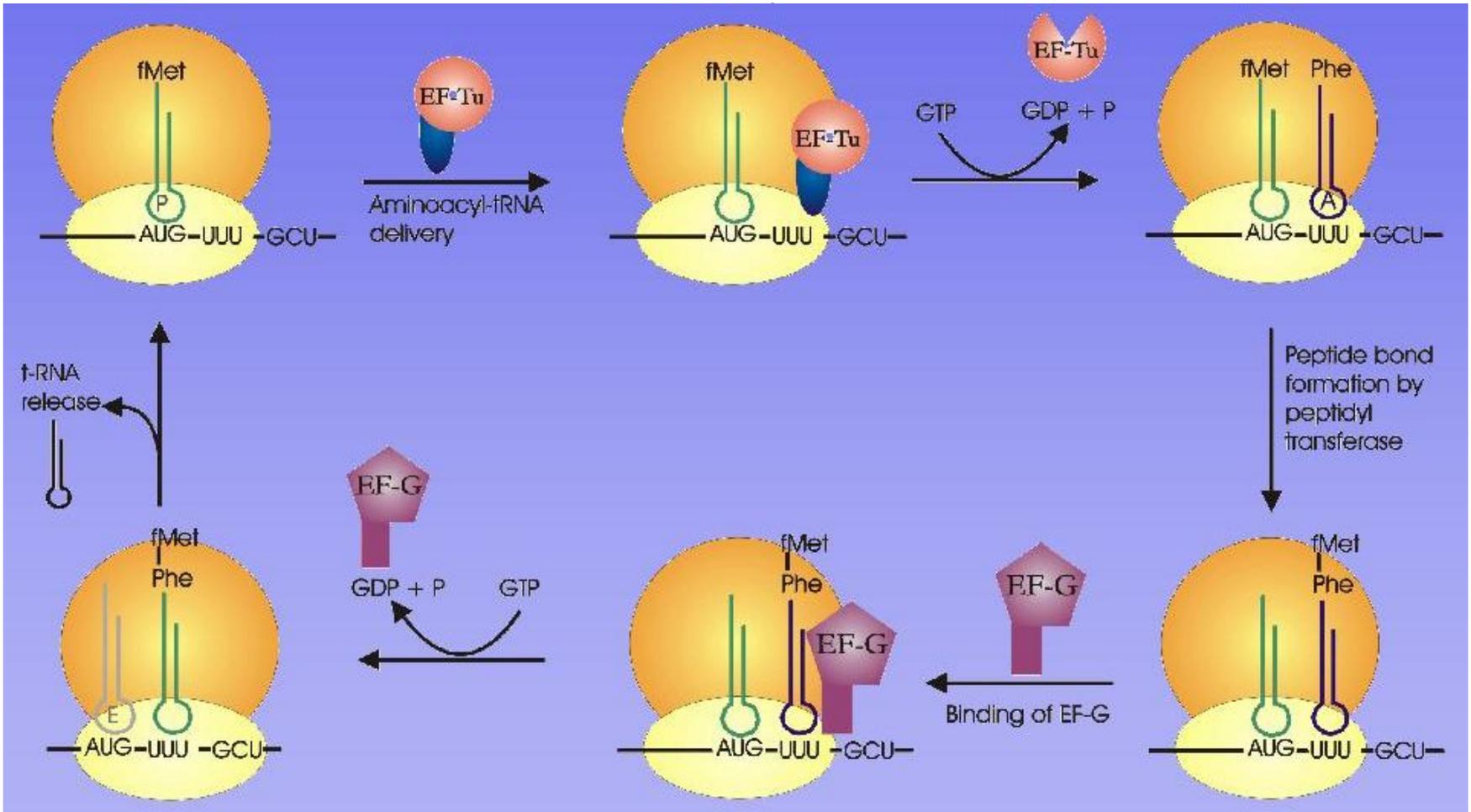
Элонгация трансляции у прокариот



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-tРНК в свободный сайт рибосомы
- EF-Ts выступает в качестве фактора нуклеотидного обмена на EF-Tu, катализируя освобождение GDP от EF-Tu



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

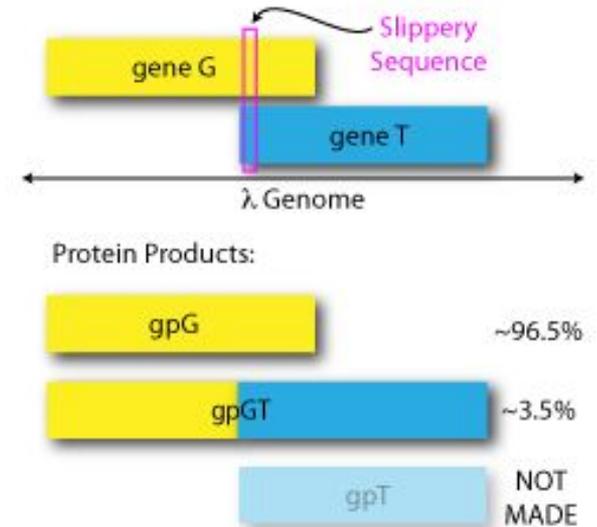
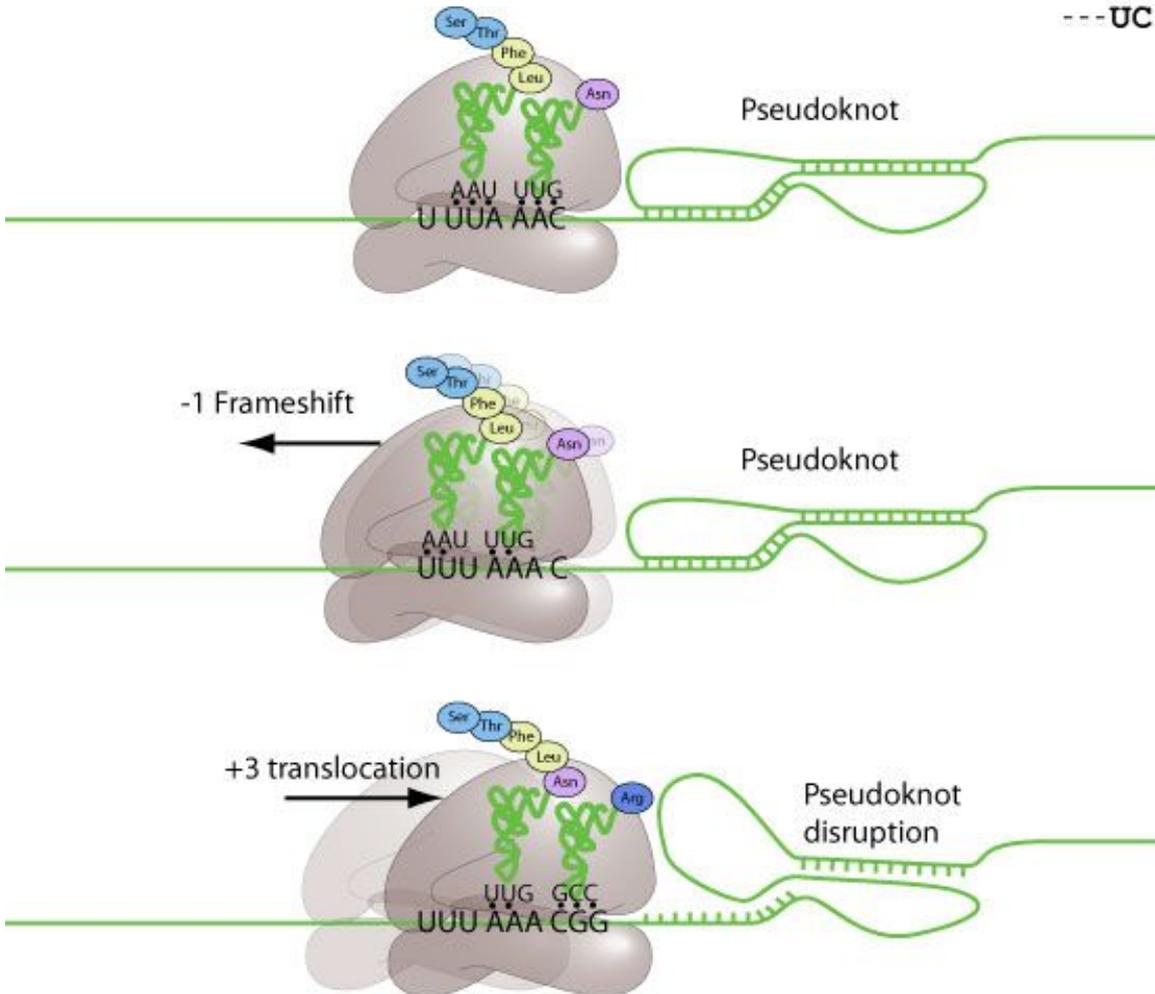
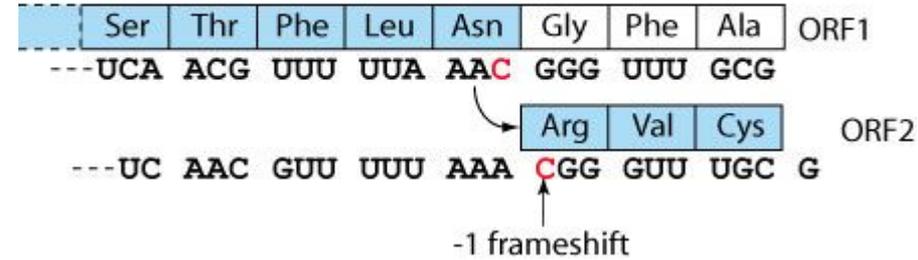
трансляции:

- 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.



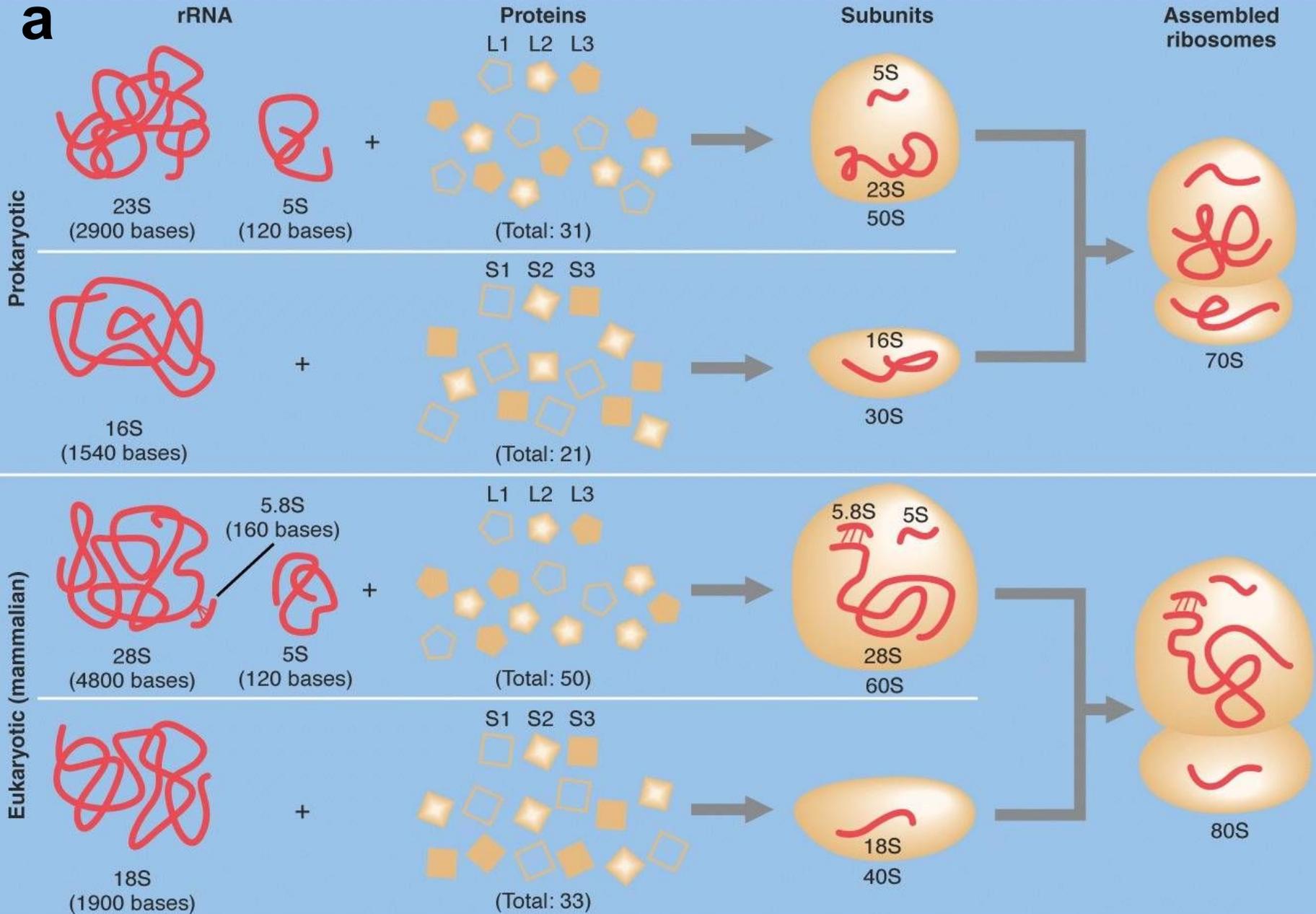
Часть 2. Трансляция у эукариот

Рибосом

- а** 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 магниевои соли, что необходимо для поддержания структуры;
 - При удалении ионов магния рибосома подвергается диссоциации на субъединицы
 - Синтез рибосомной структуры –



Рибосом

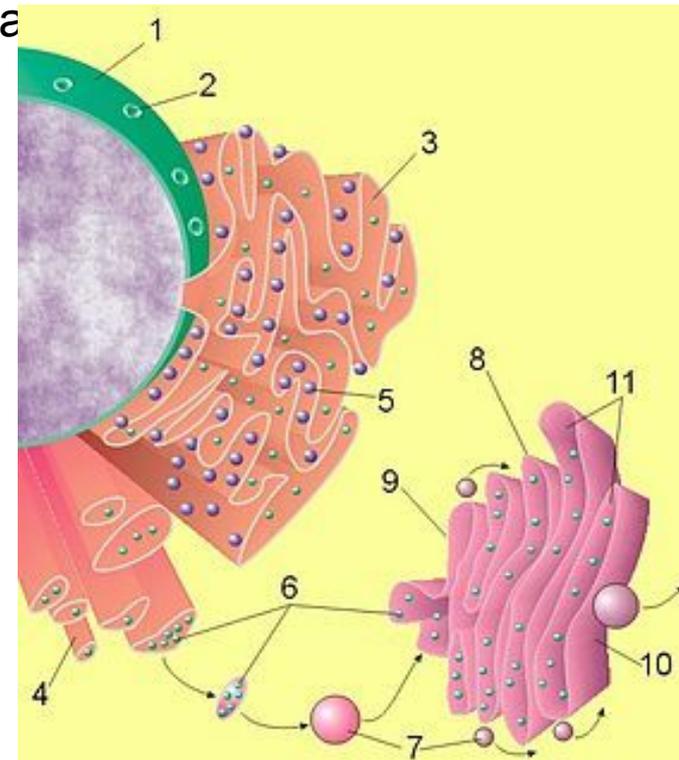


Рибосом

а 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

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

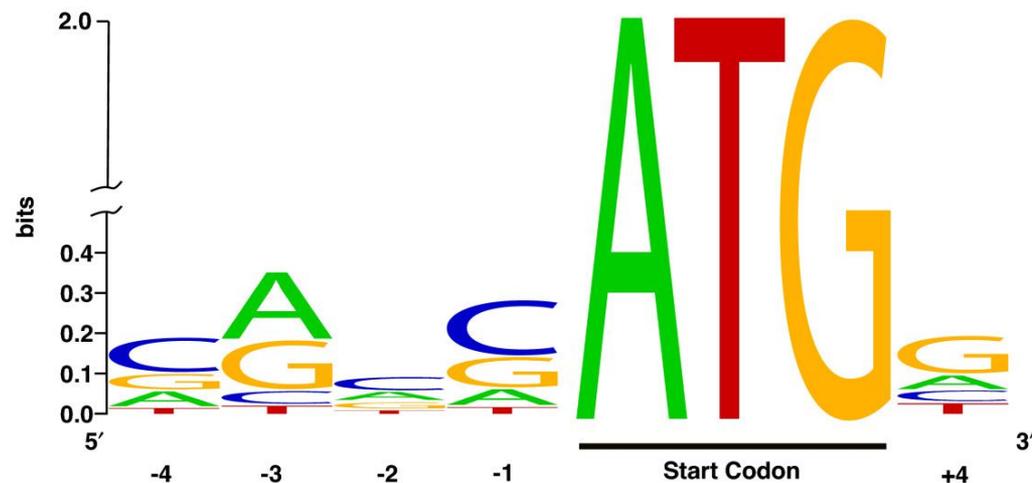


Инициация трансляции у

эукариот

У эукариот сайт 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) — отличие от прокармальной 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 двигается 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 рибосому на стартовый AUG.
- 10–15% всех мРНК способны к КЭП-независимой трансляции

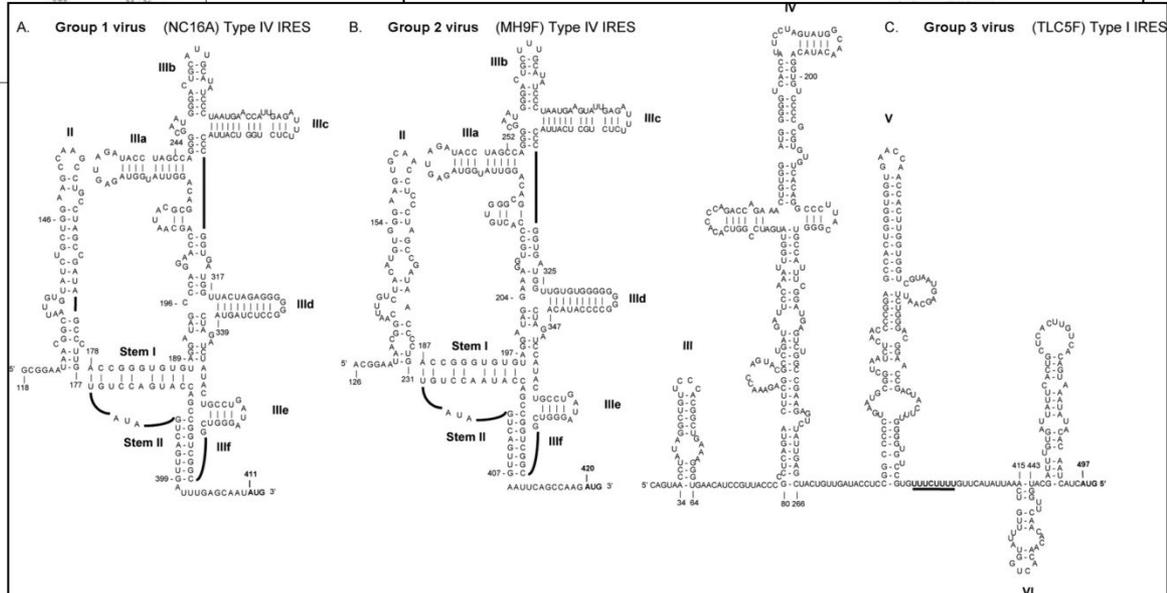
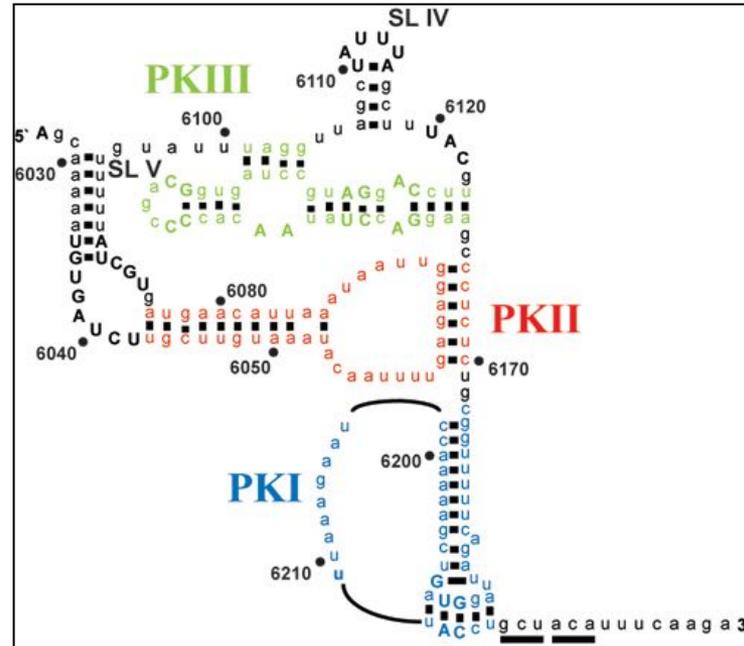
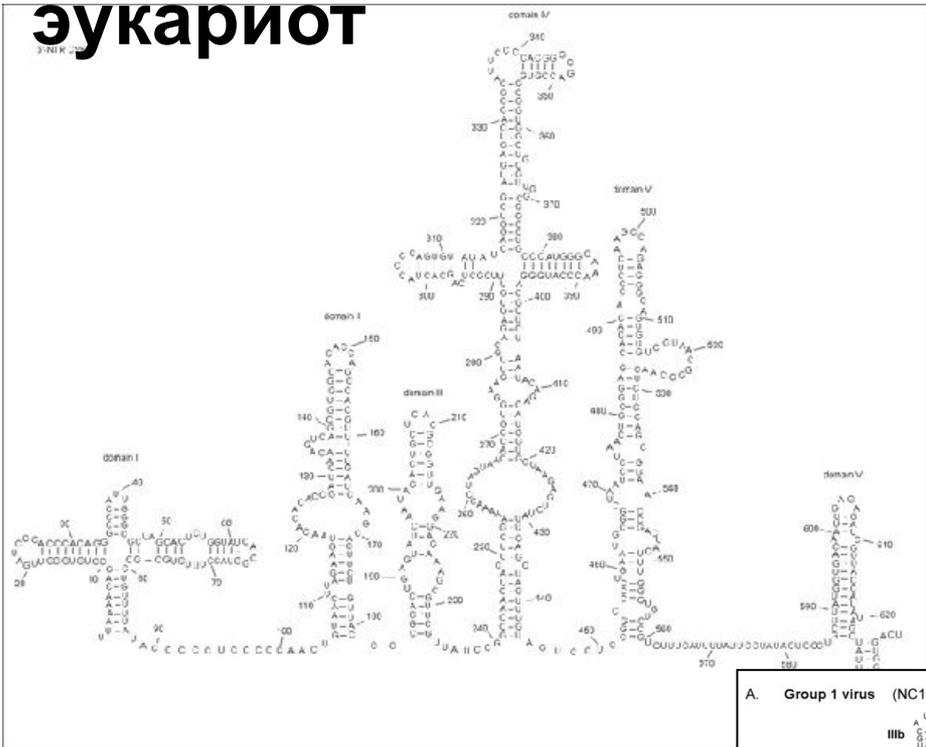
	IRESite: The database of experimentally verified IRES structures								
Home	Browse	Search	Documentation	Literature	Annotated plasmid flatfiles	Data submission	About	Login	User: guest

The IRESite database presents information about the experimentally studied IRES (Internal Ribosomal Entry Site) segments. IRES regions are known to attract eukaryotic ribosomal translation initiation complex and thus promote translation initiation independently of the presence of the commonly utilized 5'-terminal 7mG cap structure. It is not yet clear whether the activity could be attributed to a common sequence or to a common secondary structure present in them. Such IRES regions were found in a broad range of +RNAs viruses and in some

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

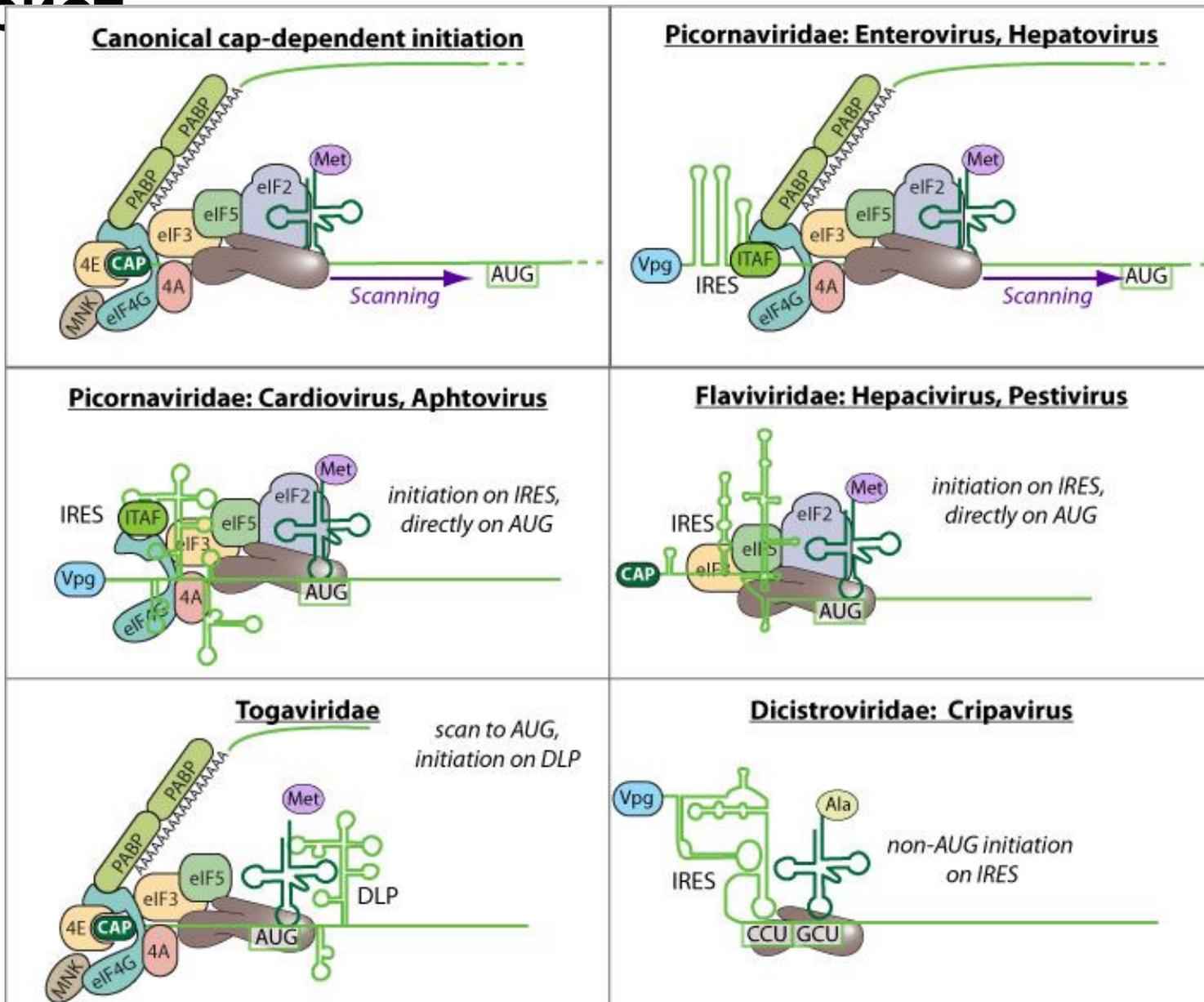
Кэп-независимая инициация трансляции у эукариот

эукариот



Кэп-независимая инициация трансляции у эукариот

эукариот



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

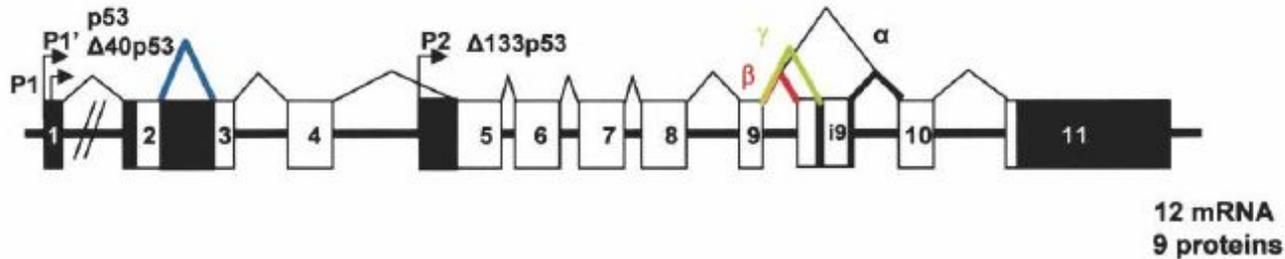
эукариот

IRES : механизм трансляции при клеточном стрессе

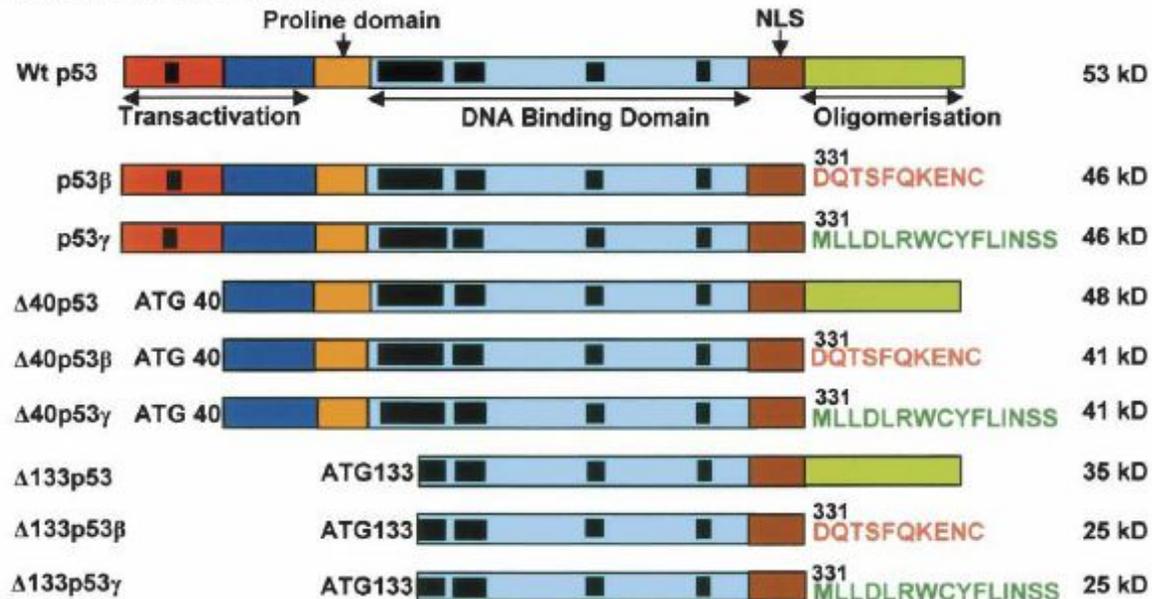
- Клеточный стресс вызывает изменения в белковом составе клетки и делает невозможным cap-dependent инициацию
- Эти изменения активируют механизм внутренней инициации

Структура гена p53 и кодирующие изоформы

A Human p53 gene structure



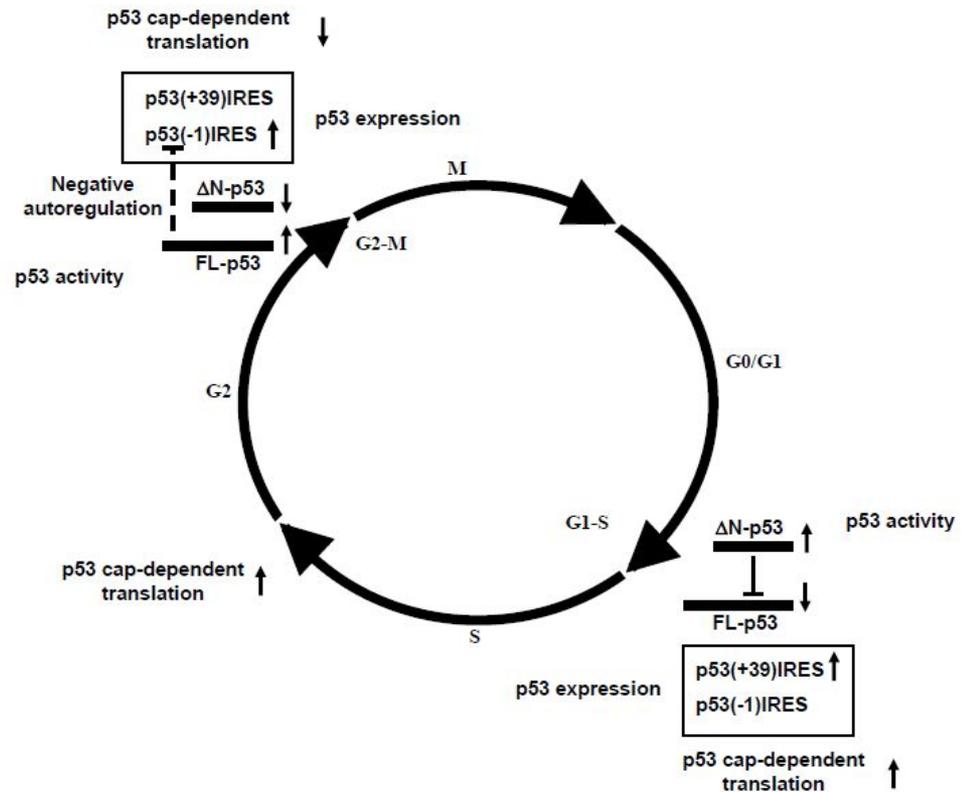
B Putative p53 protein isoforms



Кэп-независимая инициация трансляции у

эукариот мРНК гена TP53 имеет 2 IRES элемента

1. (IRES-1) ответственен за трансляцию всей длины p53 находится в 5' UTR мРНК и активен во время G2-M
2. (IRES+39) - за трансляцию p53/47 (на 40 а.о короче) и активен во время G1-S

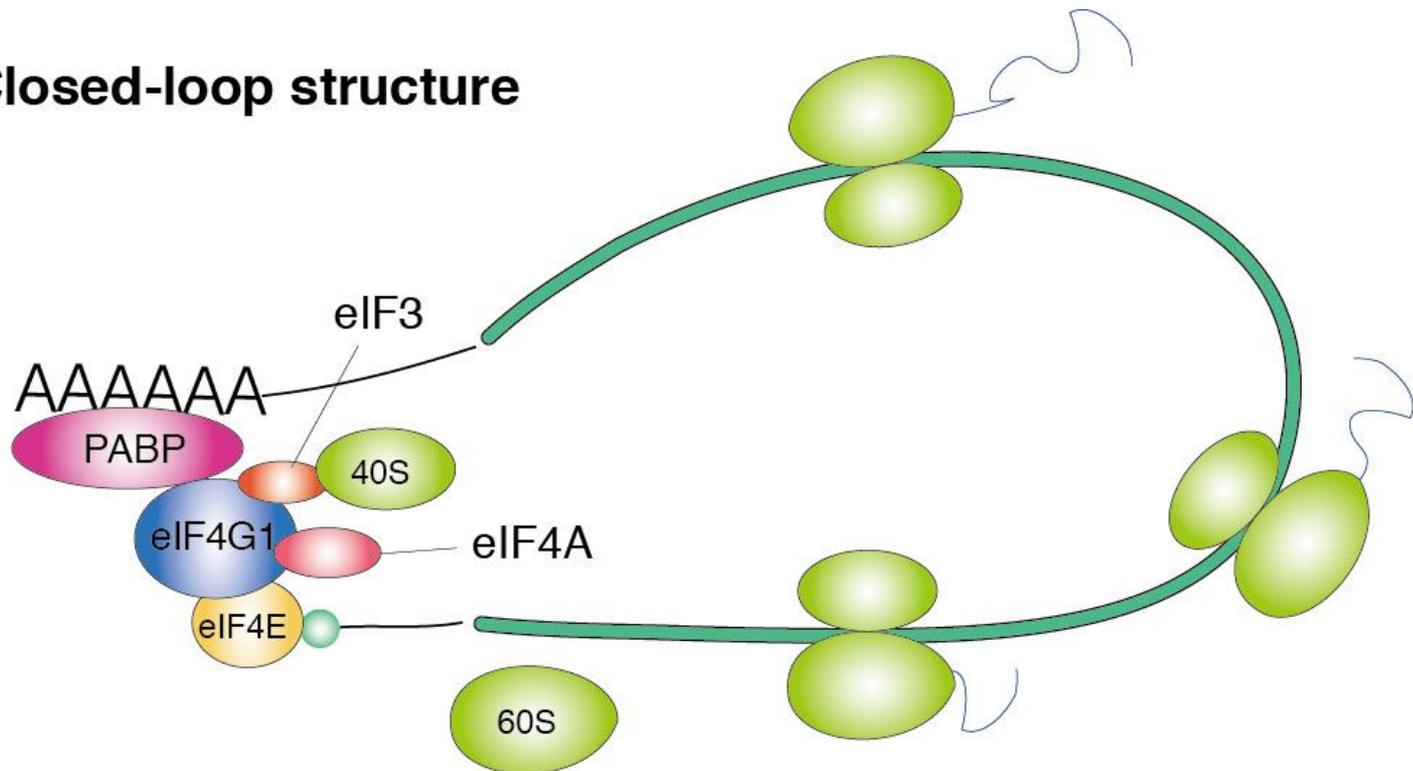


Реинициация трансляции у

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



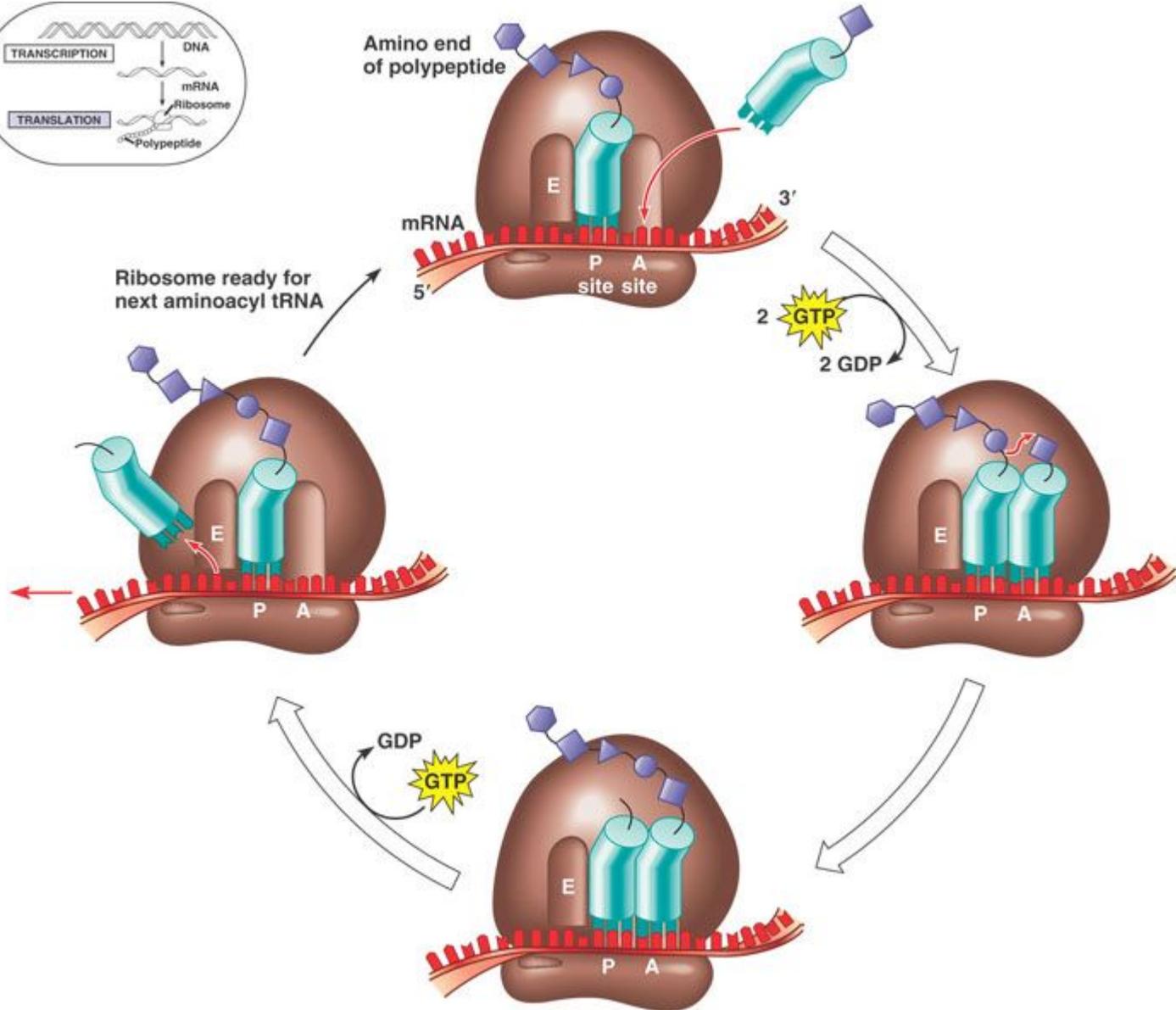
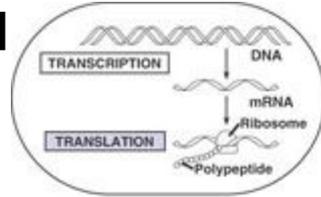
Инициация трансляции у

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-tRNA^{iMet});
 - связывание 5'-кэпа, связывание поли(А), сканирование;
 - выбор правильного старт-кодона;
 - объединение рибосомных субъединиц на старт-кодоне

Элонгация трансляции у

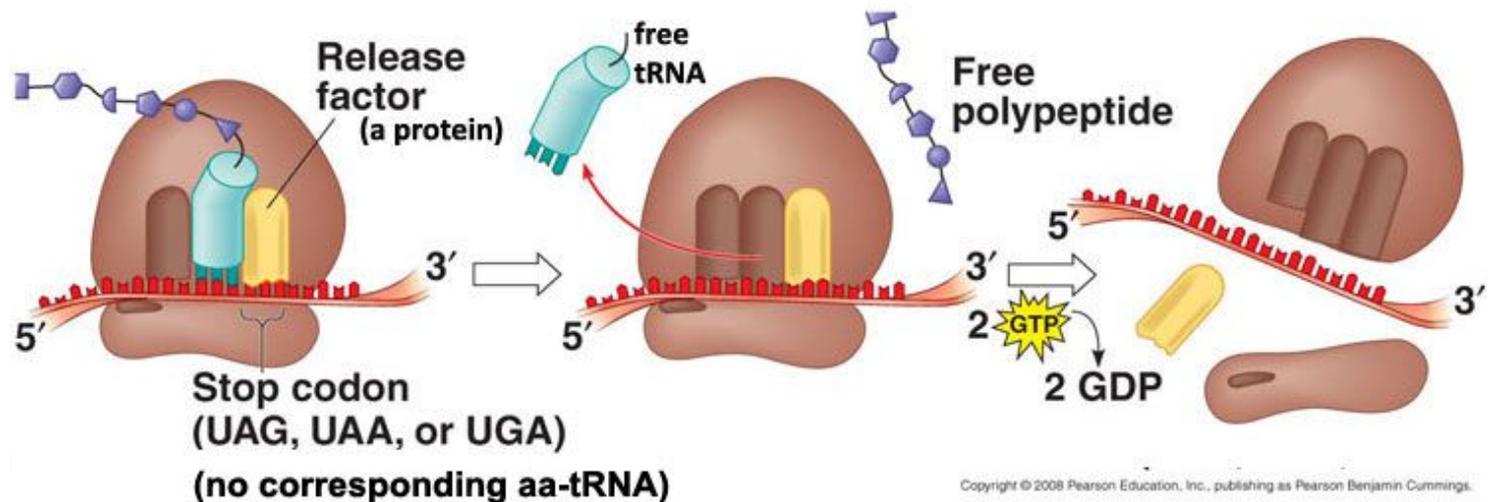
эукари



Терминация трансляции у

эукариот

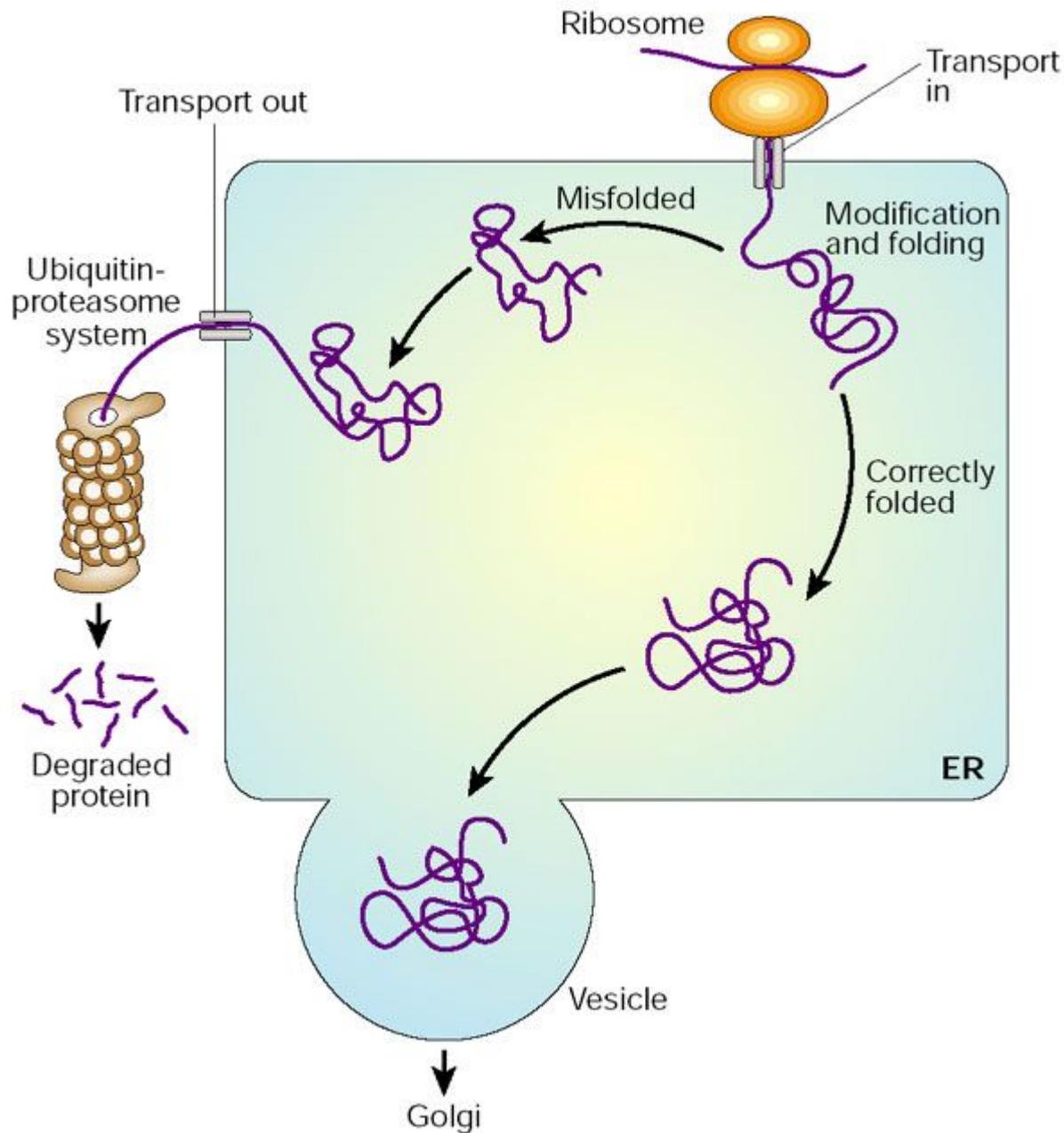
- у эукариот найден только один фактор терминации трансляции – eRF, способный «читать» все три терминирующих кодона
- На эффективность терминации трансляции у эукариот влияет последовательности нуклеотидов в окрестностях терминирующих кодонов и структура С-концевой части строящейся полипептидной цепи.
- 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%.



Фолдинг

белка

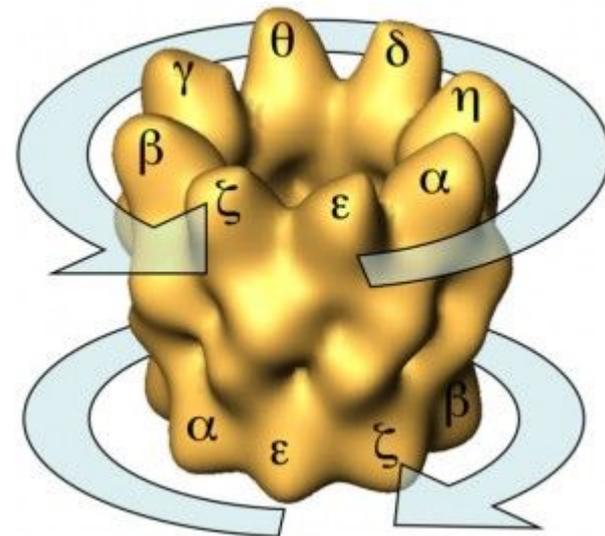
Фолдингом белка (укладкой белка, от англ. folding) называют процесс спонтанного сворачивания полипептидной цепи в уникальную нативную пространственную структуру (так называемая третичная структура).



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
- Белки теплового шока – Hsp (heat shock protein), экспрессия которых начинается в ответ на рост температуры или другие клеточные стрессы
- 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

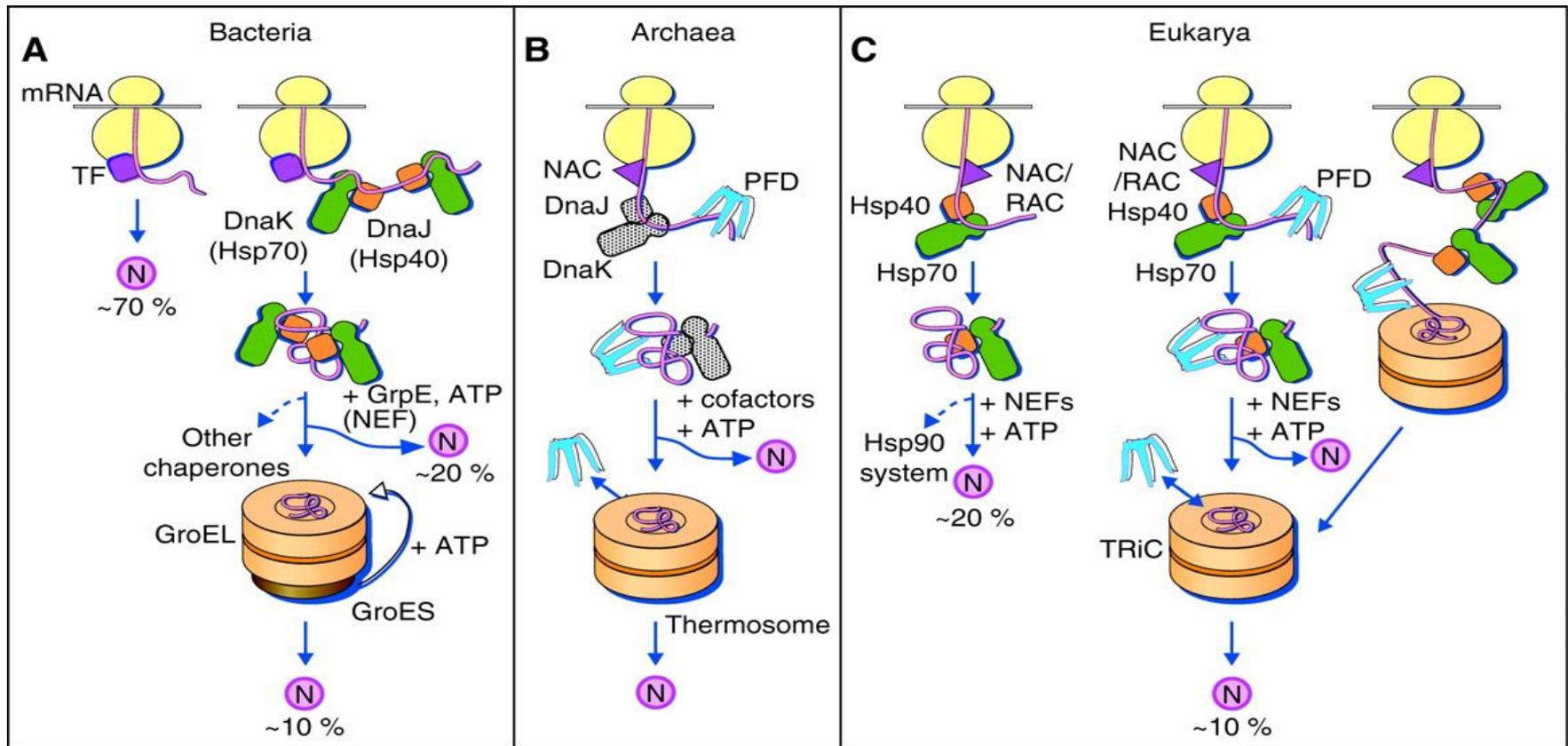
- Фолдинг белков происходит в эндоплазматическом ретикулуме
- В нём содержатся необходимые для фолдинга шапероны и ферменты
- Также он обладает уникальным окислительным потенциалом, облегчающим образование дисульфидных связей в процессе укладки белка.
- Из эндоплазматического ретикулума белки с корректной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



Фолдинг

белка

- ~70 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»



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

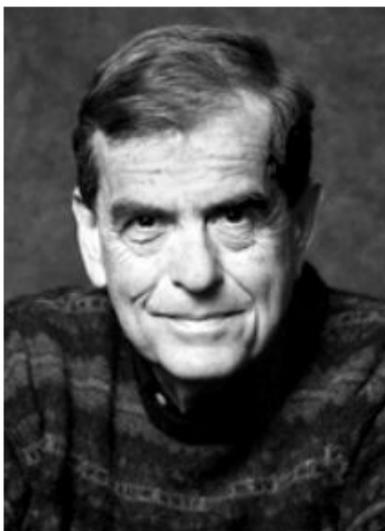


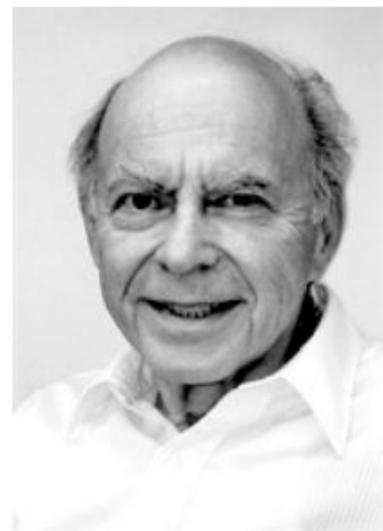
Photo: D. Porges

Aaron Ciechanover



Photo: D. Porges

Avram Hershko



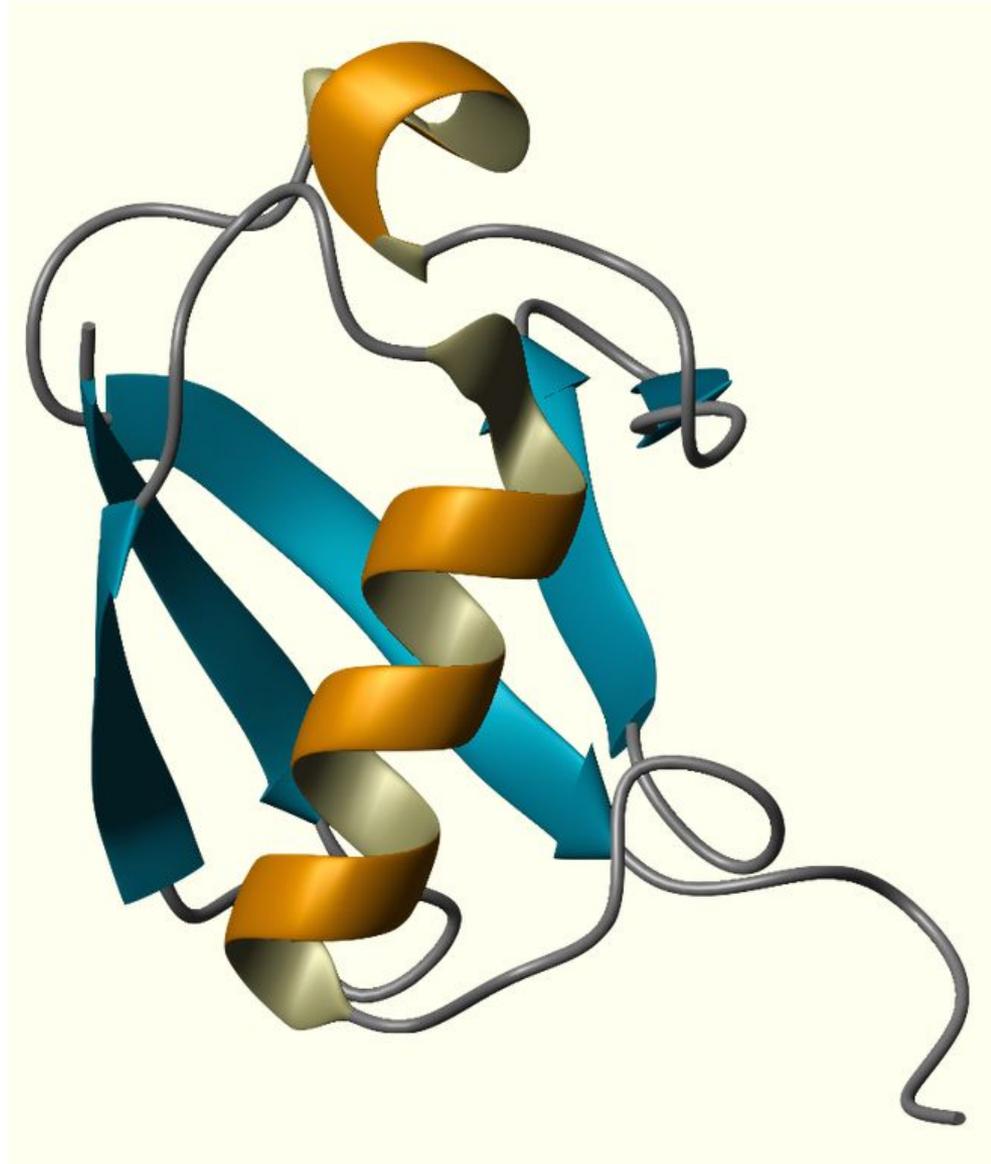
Irwin Rose

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"*.

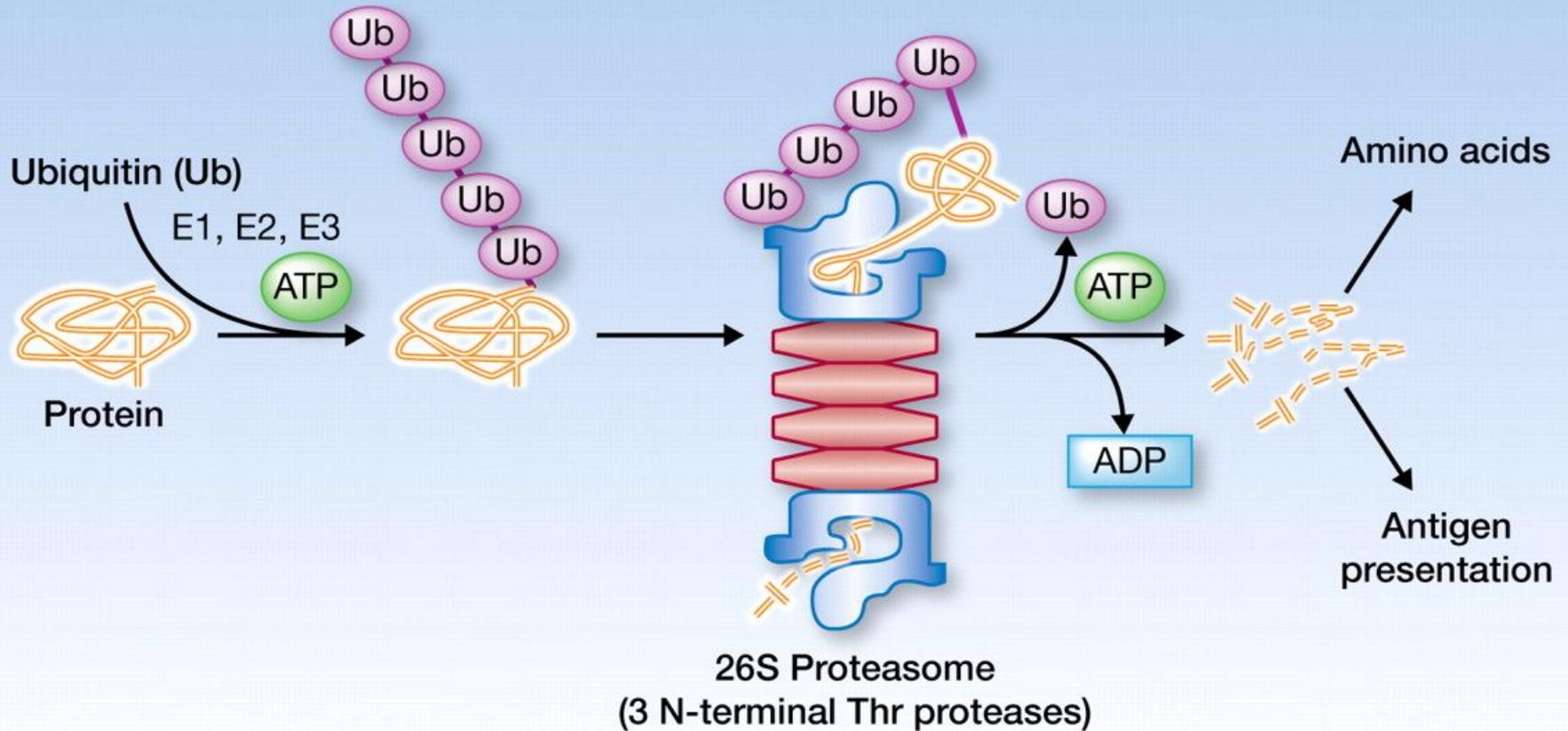
Деградация белков проходит по убиквитин-протеасомному

Деградация

- **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 аминокетам 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 убиквитинилирования вовлечена в такие важные процессы, как пролиферация, развитие и дифференцировка клеток, реакция на стресс и



Деградация



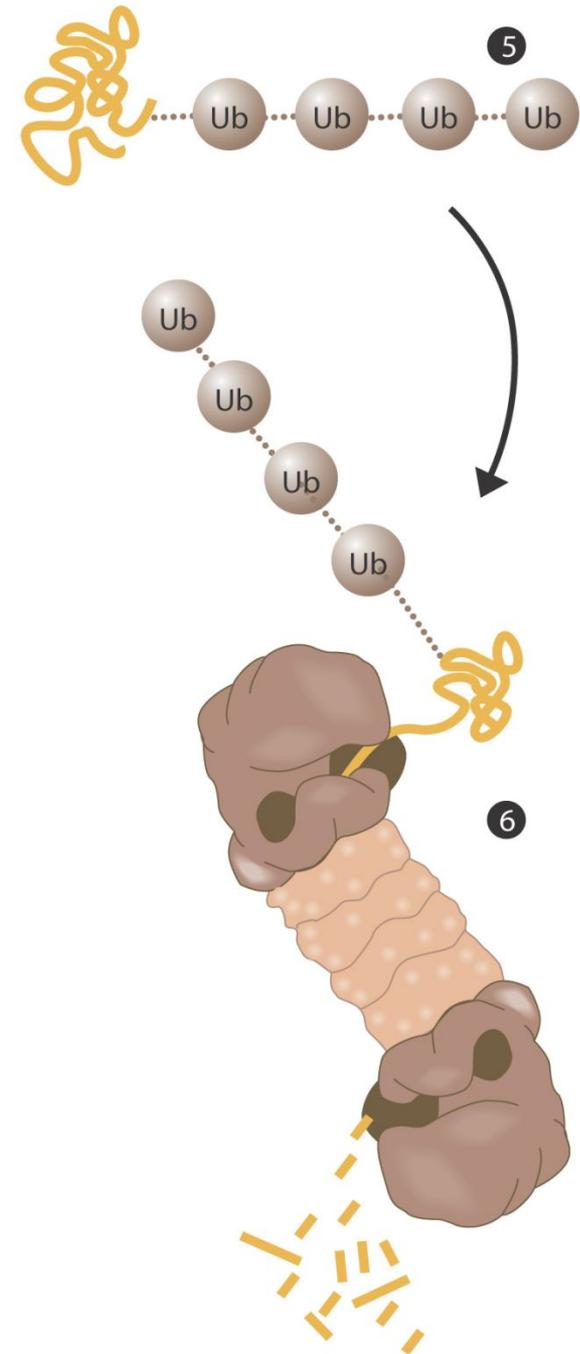
- При помощи убиквитин-лигаз (E1, E2, E3) цепь из 4 или более молекул убиквитинов присоединяется к одному или более остатку лизина на целевом белке.
- Такой убиквитинилированный белок транспортируется к протеасоме, где цепь убиквитинов удаляется, позволяя целевому белку развернуться (unfold) и загрузиться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

Деградация

белка

Протеасома (от англ. protease — протеиназа и лат. soma — тело) — мультисубъединичная протеаза, присутствующая в клетках эукариот, архей и некоторых бактерий.

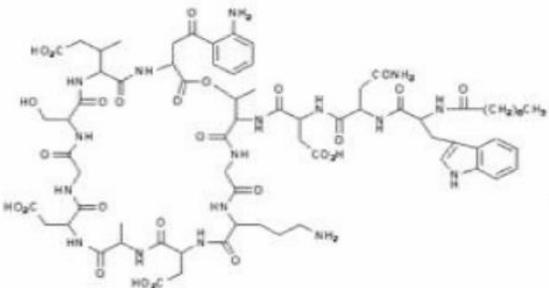
- У эукариот протеасомы присутствуют в цитозоле и ядрах
- Протеасомы выделяют в виде индивидуальных частиц с коэффициентами седиментации 20S и 26S
- В человеческой клетке насчитывается около 30,000 протеасом
- Они неспецифично расщепляют белки до пептидов длиной 7-9 аминокислот.



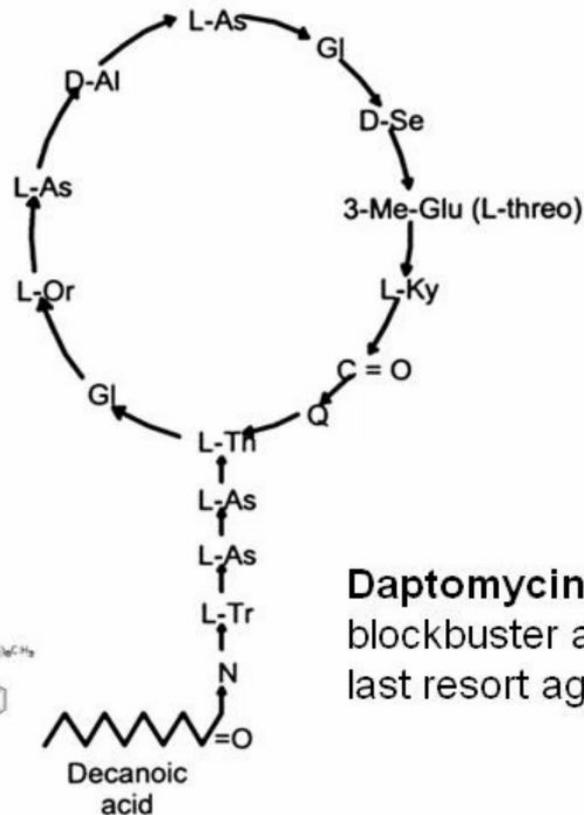
Не-рибосомальный синтез

пептидов

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



Cycloproteins



Daptomycin:
blockbuster antibiotic of last resort against MRSA

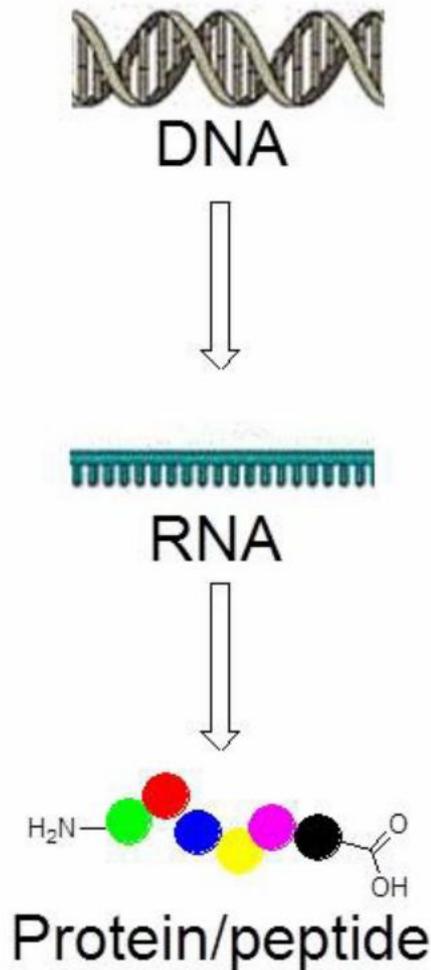
Не-рибосомальные пептиды (NRP) являются очень эффективными:

- Антибиотиками
- Иммуносупрессорами
- Антивирусными агентами
- Противораковыми агентами

Не-рибосомальный синтез

пептидов

Ribosomal peptide synthesis



Non- Ribosomal peptide synthesis

