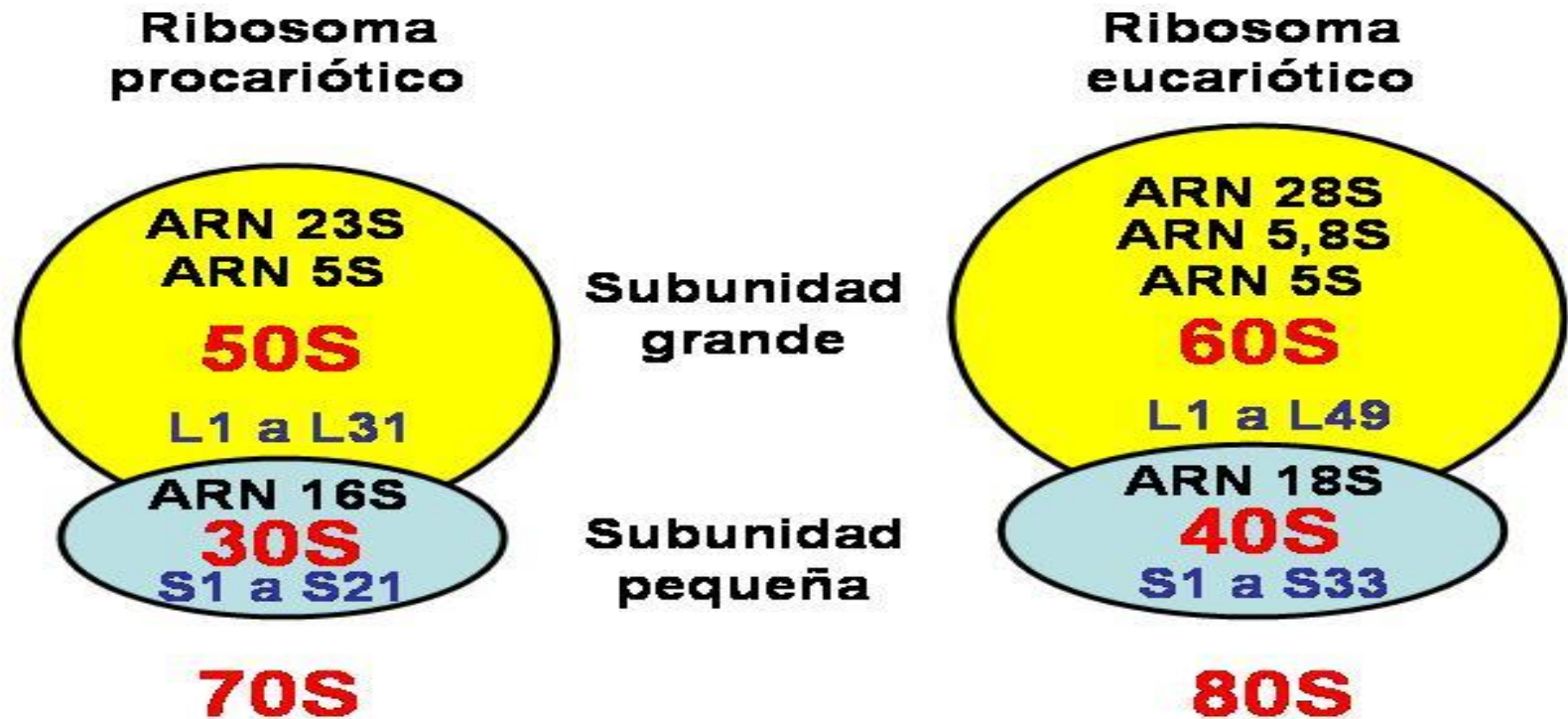


Лекция 5. Функциональная морфология синтетического аппарата.



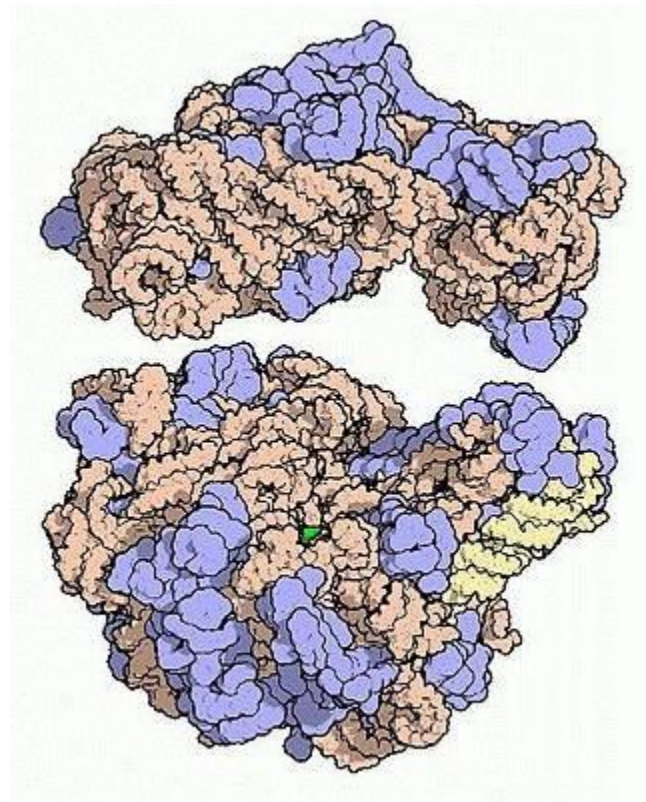
Рибосомы

- немембранная органелла клетки (10-30 нм), обеспечивающая трансляцию.



80S рибосома

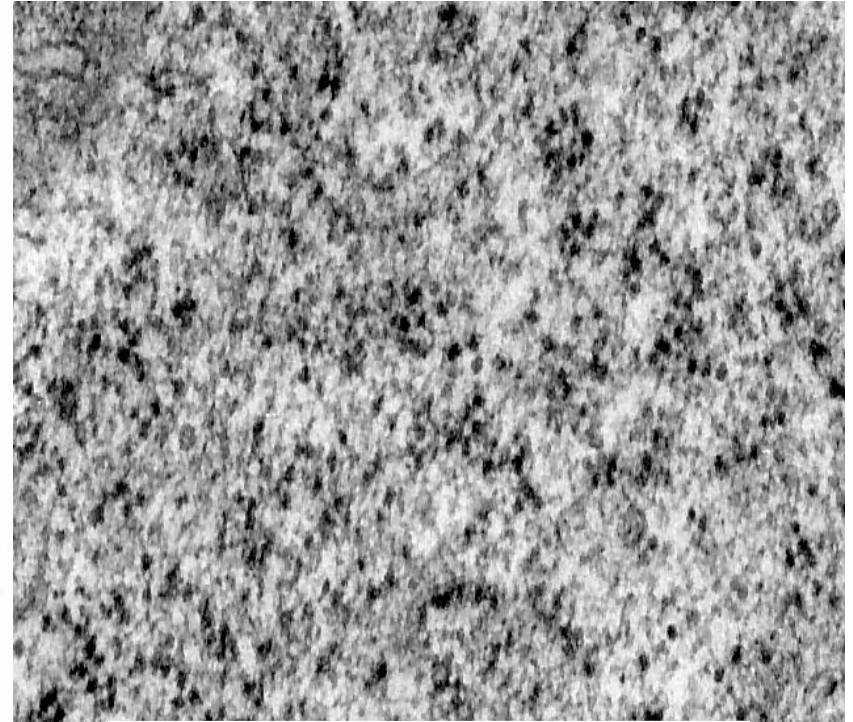
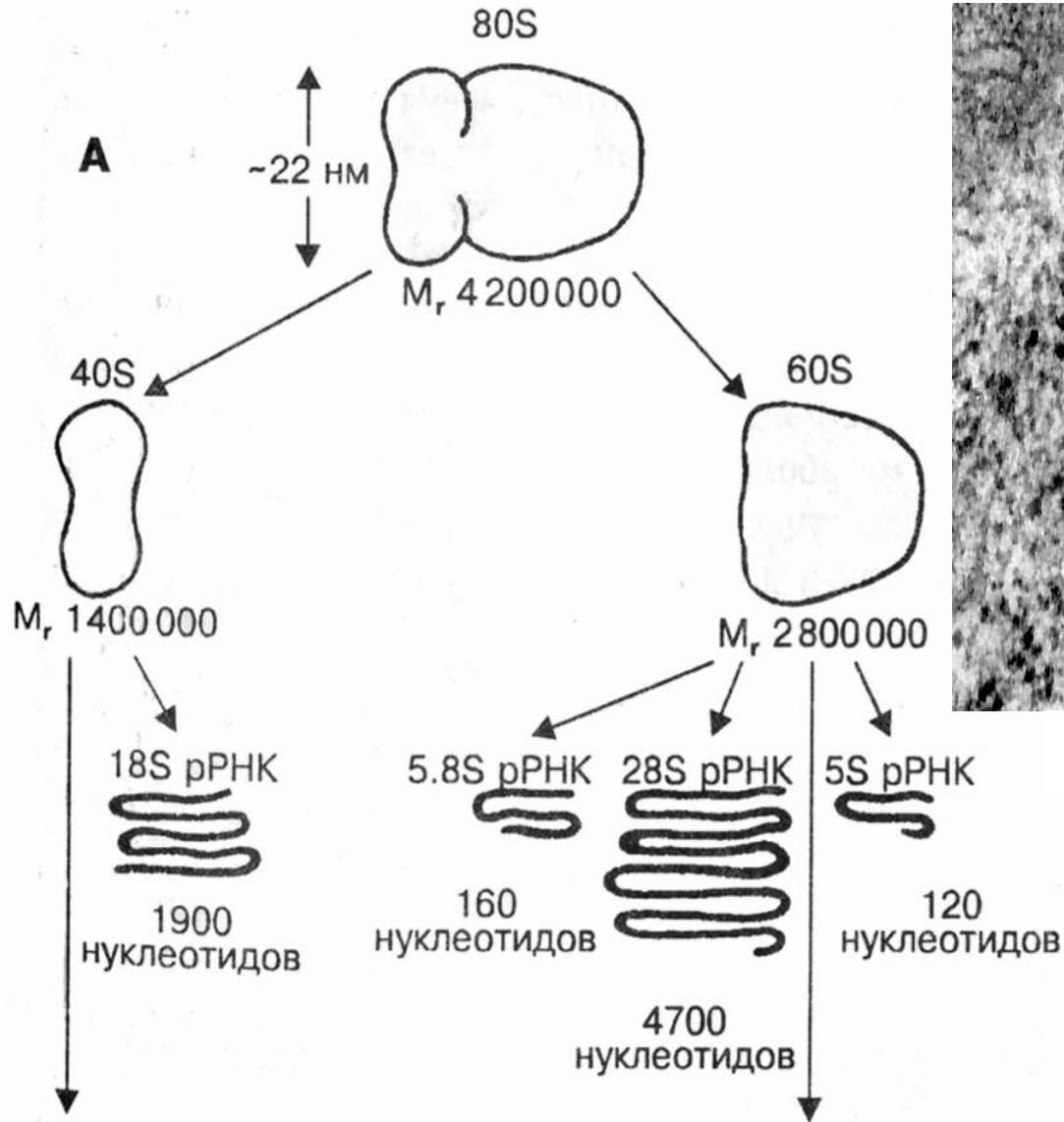
- Неактивные рибосомы диссоциируют и располагаются в цитозоле в виде отдельных субъединиц.
- Рибосомальные белки
- рРНК (5S, 18S, 5,8S, 28S)



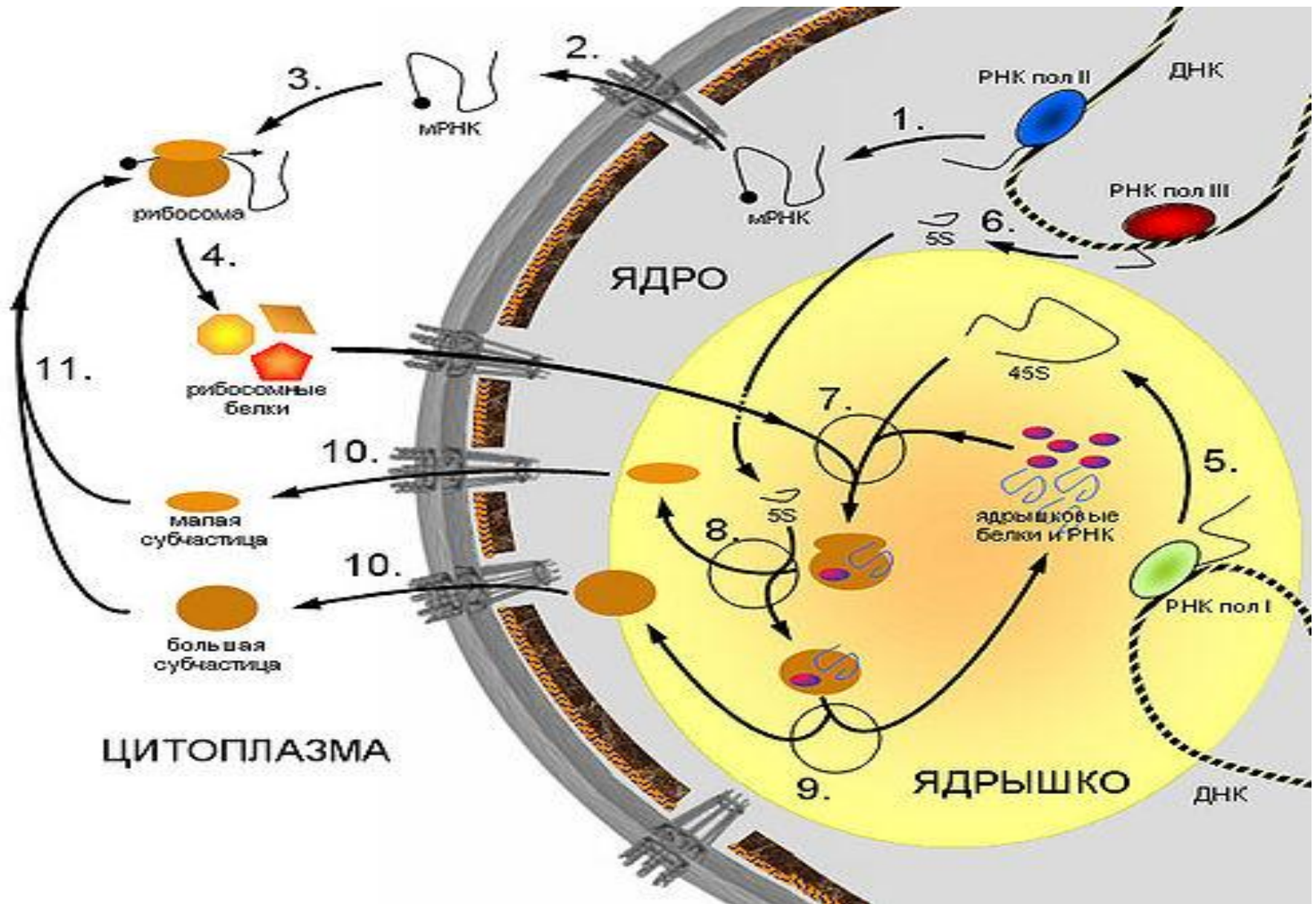
Малая субъединица содержит 18S рРНК и 30-40 белков.

Большая субъединица содержит 5,8S, 5S, 28S рРНК и 50 белков.

Строение 80S рибосомы



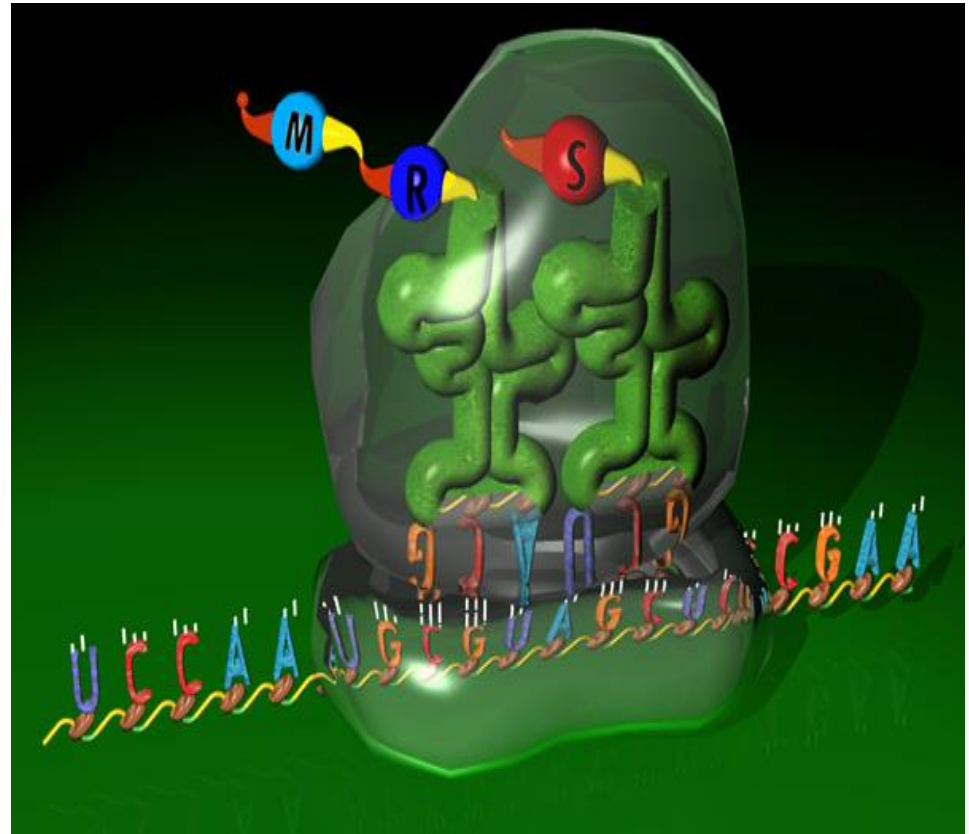
Синтез рибосом



Сборка рибосом в цитоплазме

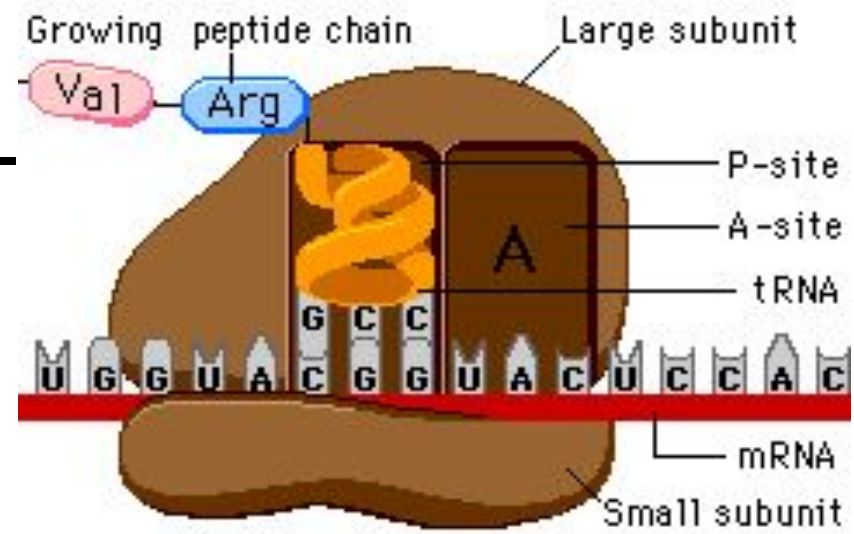
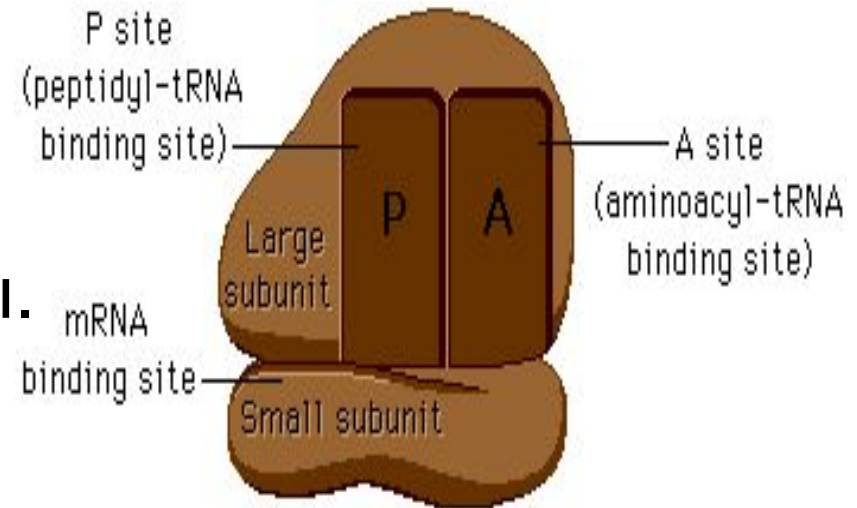
В присутствии мРНК малая субъединица связывается с её 5'-концом, после чего происходит взаимодействие с первой тРНК, затем присоединение

большой субъединицы и формирование активной рибосомы.



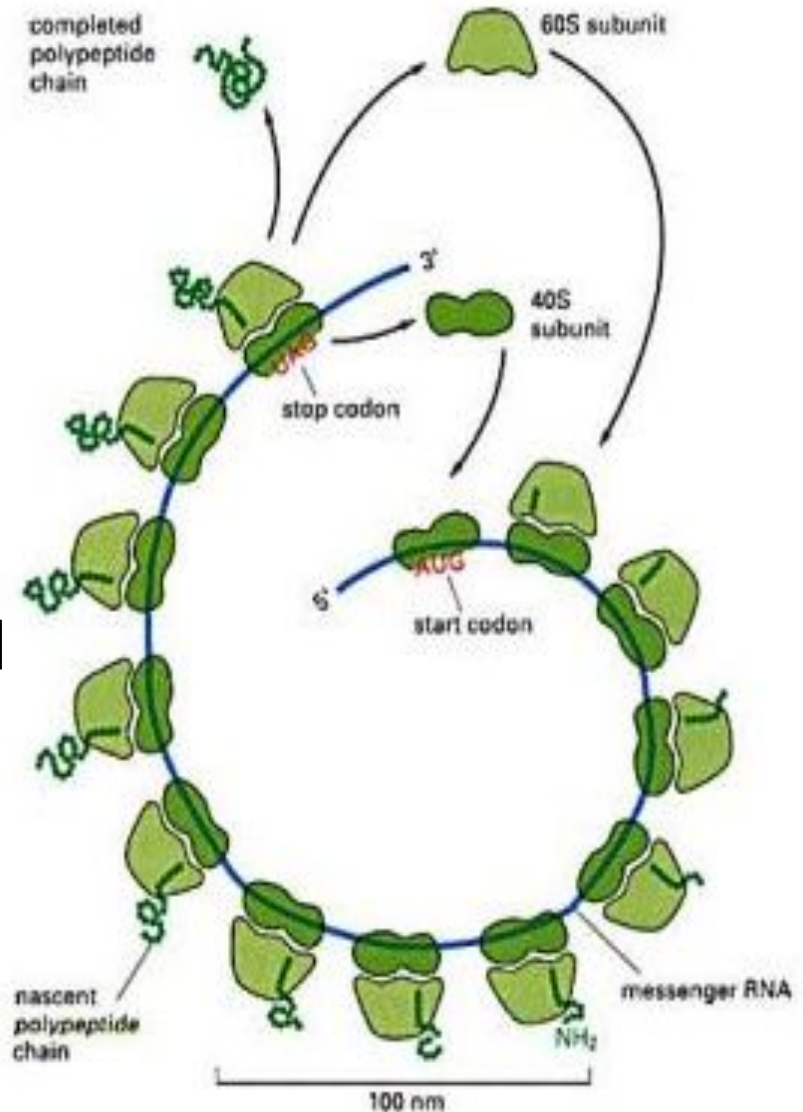
Центры рибосомы

- Аминоацильный – А.
 - Пептидильный – Р.
- Формируют обе субъединицы.
- Оба центра включают участок мРНК равный двум кодона.
 - А – центр связывает аа-тРНК.
 - Р – центр занимает пептидил-тРНК.



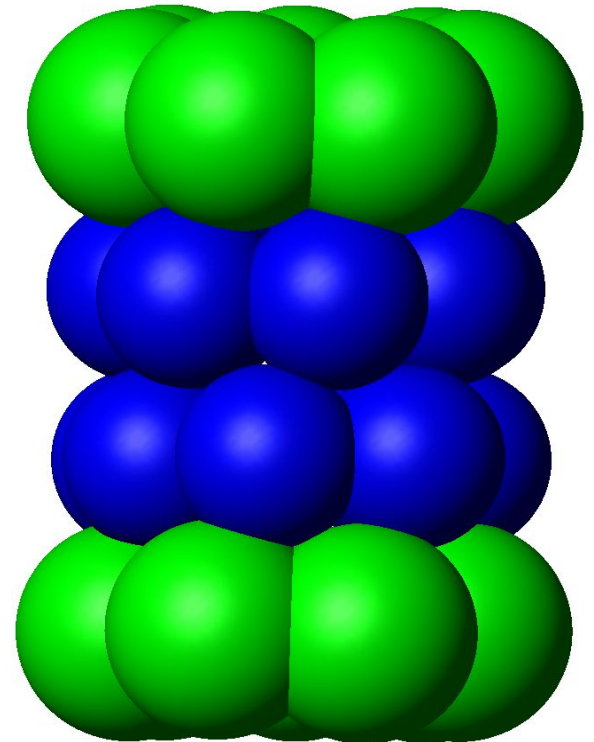
Полисома (полирибосома)

-несколько рибосом,
объединенных общей
мРНК. Рибосомы в
составе полисома –
транслирующие.
Неактивные рибосомы
располагаются
поодиночке и
диссоциированы.



Протеасома

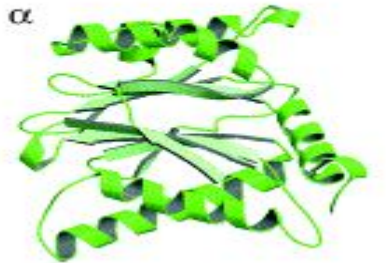
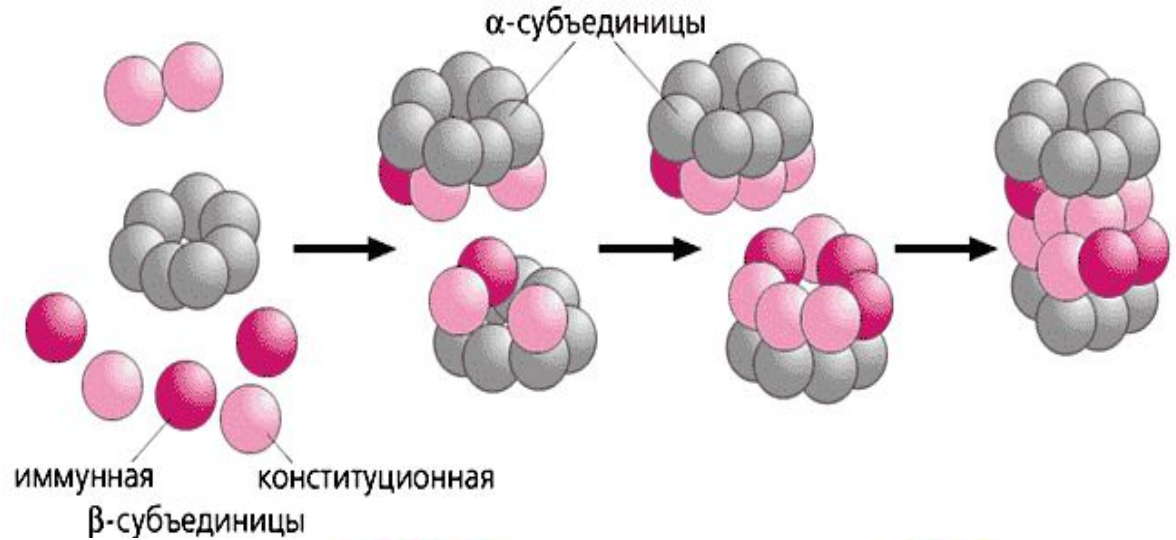
- белковый комплекс, осуществляющий разрушение цитоплазматических белков.
- В эукариотических клетках протеасомы содержатся и в ядре и в цитоплазме клеток. Протеасомы имеются у археобактерий и эубактерий.



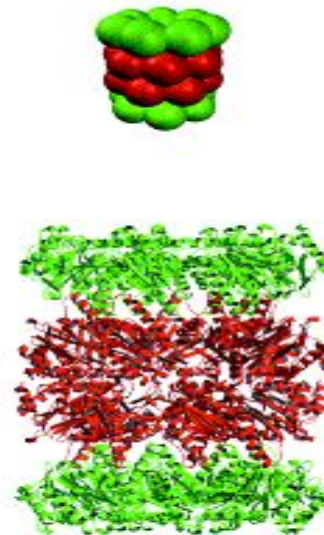
Синтез 20S протеасом

Коровая частица,
700kDa.

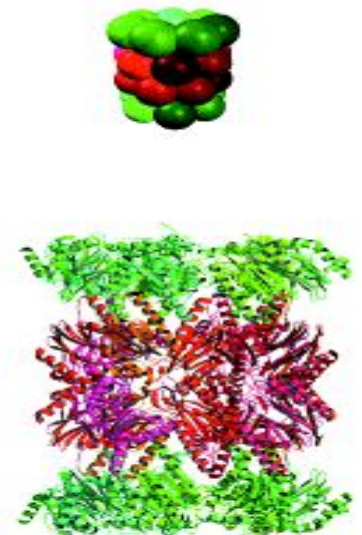
Обеспечивает
АТФ и убиквитин-
независимый
протеолиз.



E. coli



T. acidophilum



Yeast

26S протеасомы

$$20S + 2 \cdot (19S) = 26S$$

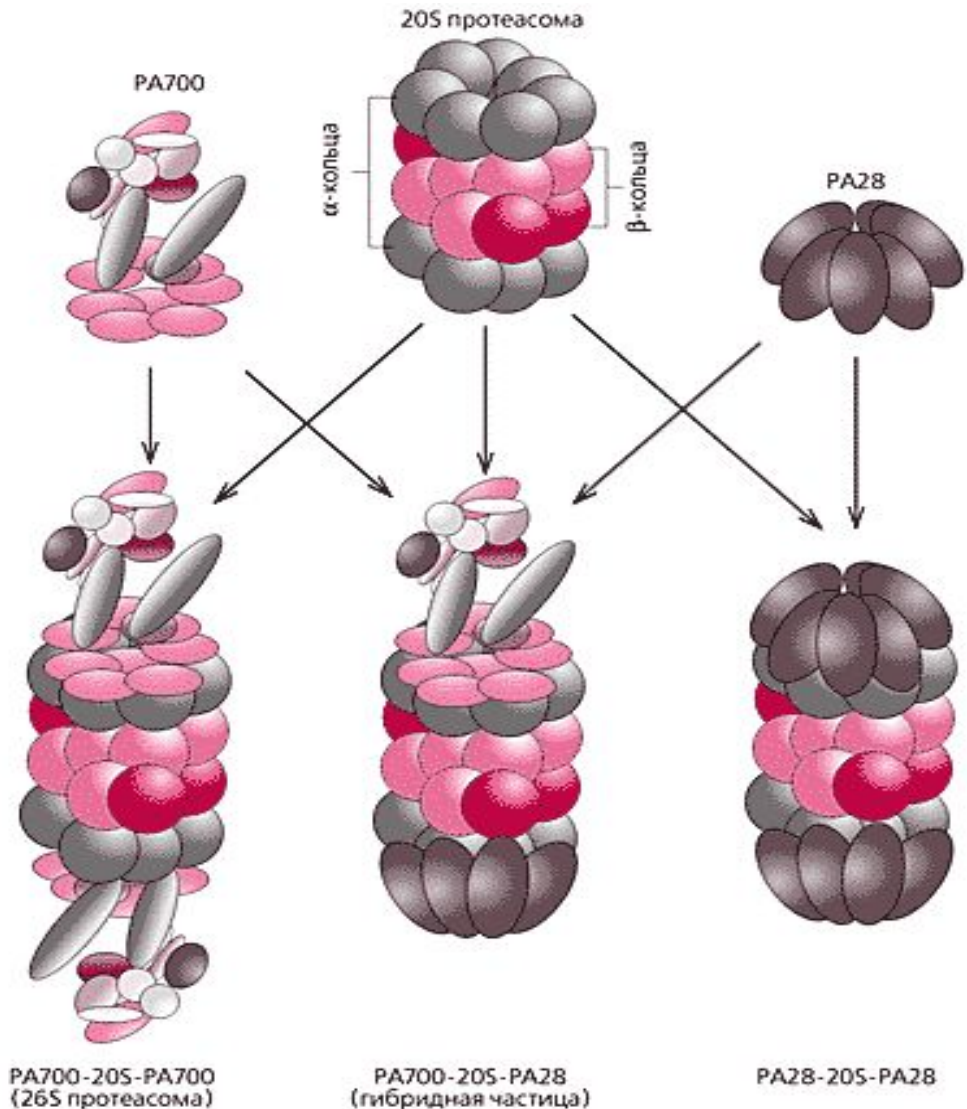
19S частица служит для распознавания субстрата и денатурации белка.

26S протеасома обеспечивает АТФ- и убиквитин-зависимый протеолиз.

11S частица не обладает АТФ-азной активностью и не способны денатурировать крупные белки.

Протеасомы, содержащие 11S частицы осуществляют частичный протеолиз пептидов.

Экспрессия 11S частиц инициируется γ INF.



Эндоплазматический ретикулум

Описан К. Портером в 1945 г.

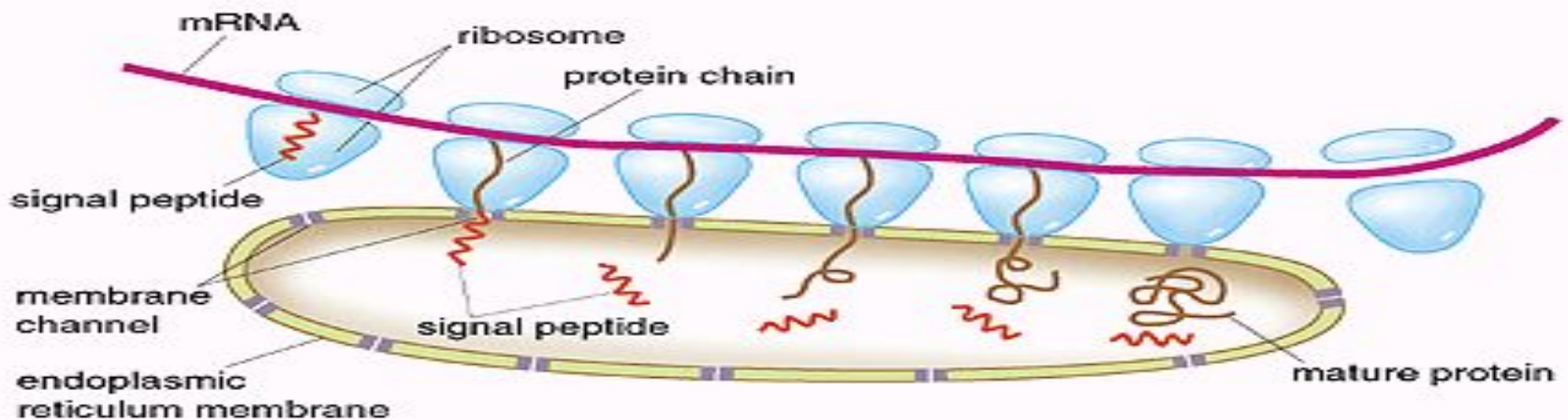
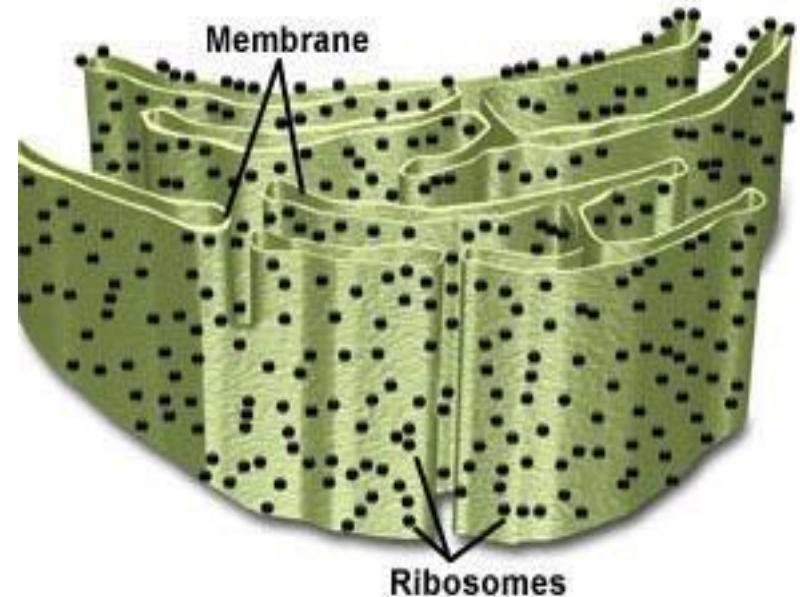
- постоянная органелла эукариотической клетки, представляющая собой разветвлённую систему, окружённых мембраной уплощённых полостей, пузырьков и канальцев.

- Граулярный ЭПР.
- Агранулярный ЭПР.



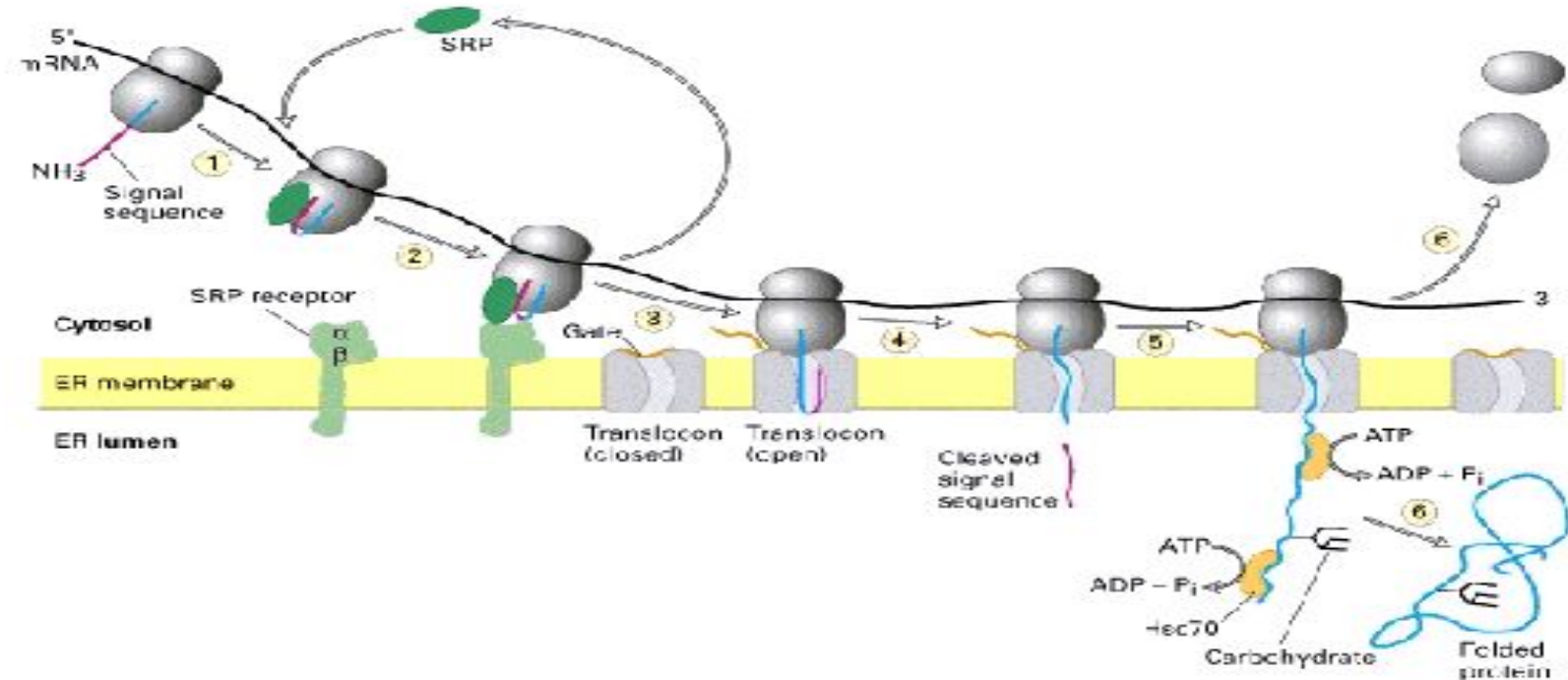
Шероховатый ЭПР

- ЭПР на цитоплазматической поверхности, которой расположены рибосомы.



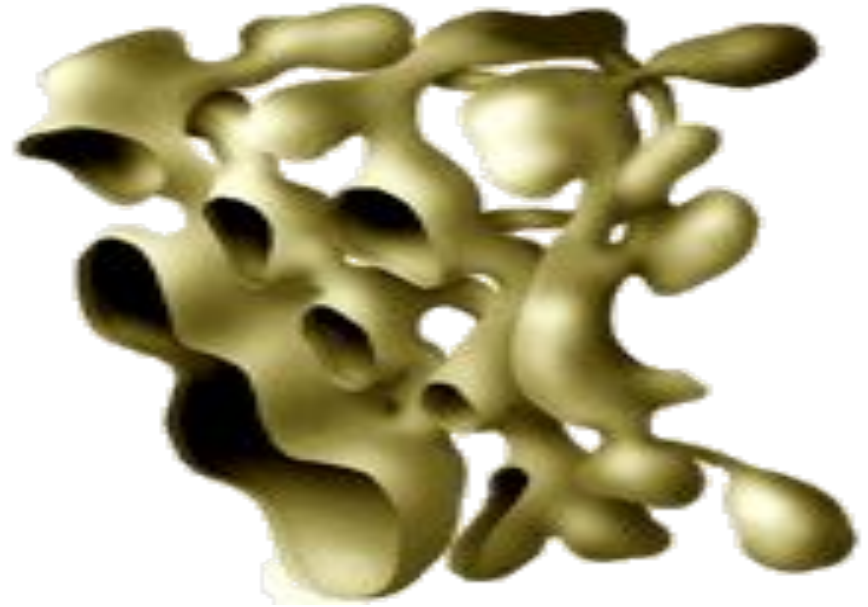
Функции грЭПР

- Биосинтез всех мембранных и экспортных белков.
- Посттрансляционные изменения белков (обеспечение фолдинга, химическая модификация).



Гладкий ЭПР, микросомы

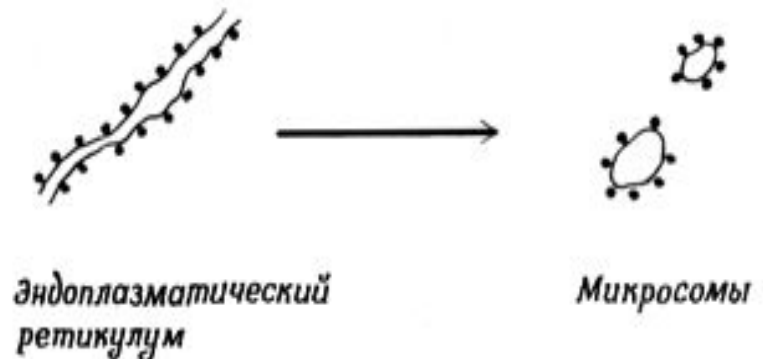
- представляет собой ЭПР на поверхности которого отсутствуют рибосомы.



- фрагменты ЭПР (везикулы D 100 нм), образующиеся при разрушении клеток в процессе гомогенизации тканей животных и растений.

с гладкой поверхностью

с шероховатой поверхностью.



Функции аЭПР

- Синтез липидов.
- Метаболизм углеводов.
- Восстановление кариолеммы в телофазе.
- Накопление ионов Ca^{++} (кальретикулин, кальсеквестрин). Концентрация ионов кальция в ЭПС достигает 10^{-3} моль, в цитозоле составляет порядка 10^{-7} моль.
- Формирование пероксисом.
- Детоксикация (микросомальные оксидазы, немитохондриальные ЭТЦ: NADPH-цитохром P_{450} редуктаза-цитохром P_{450} ; NADPH-цитохром b_5 редуктаза, цитохром b_5 , стеароил-КоА-десатураза).

Метаболизм липидов и углеводов

Метаболизм липидов:

- Синтез холестерина (ГМГ-КоА-редуктаза).
- Синтез фосфолипидов.
- Ферменты синтеза глико- и сфинголипидов на люменальной стороне мембраны ЭПР.

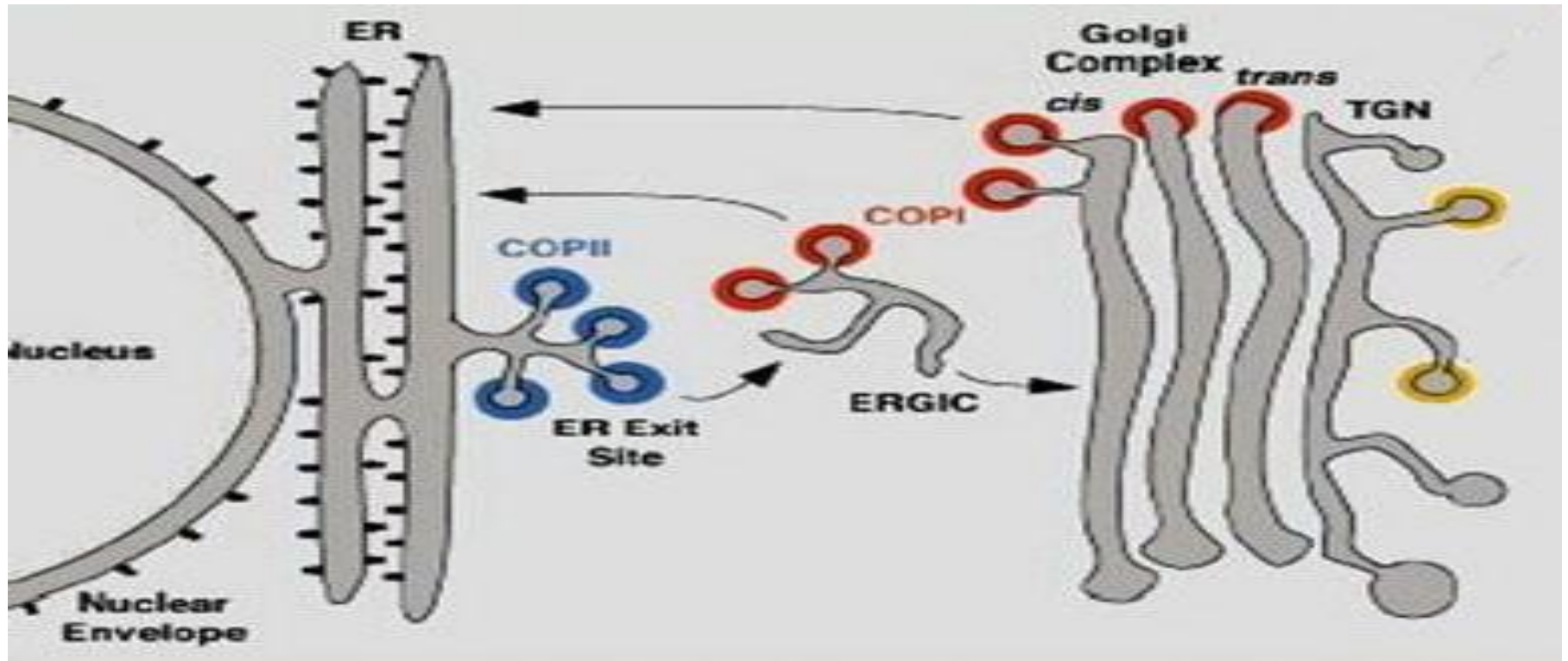
Метаболизм гликогена:

глюкоза-6-фосфатаза расположена на цитозольной стороне мембраны аЭПР.

ERGIC

Endoplasmic Reticulum - Golgi Intermediate Complex

- совокупность везикул, обеспечивающих взаимодействие между ЭПР и цис-поверхностью комплекса Гольджи.

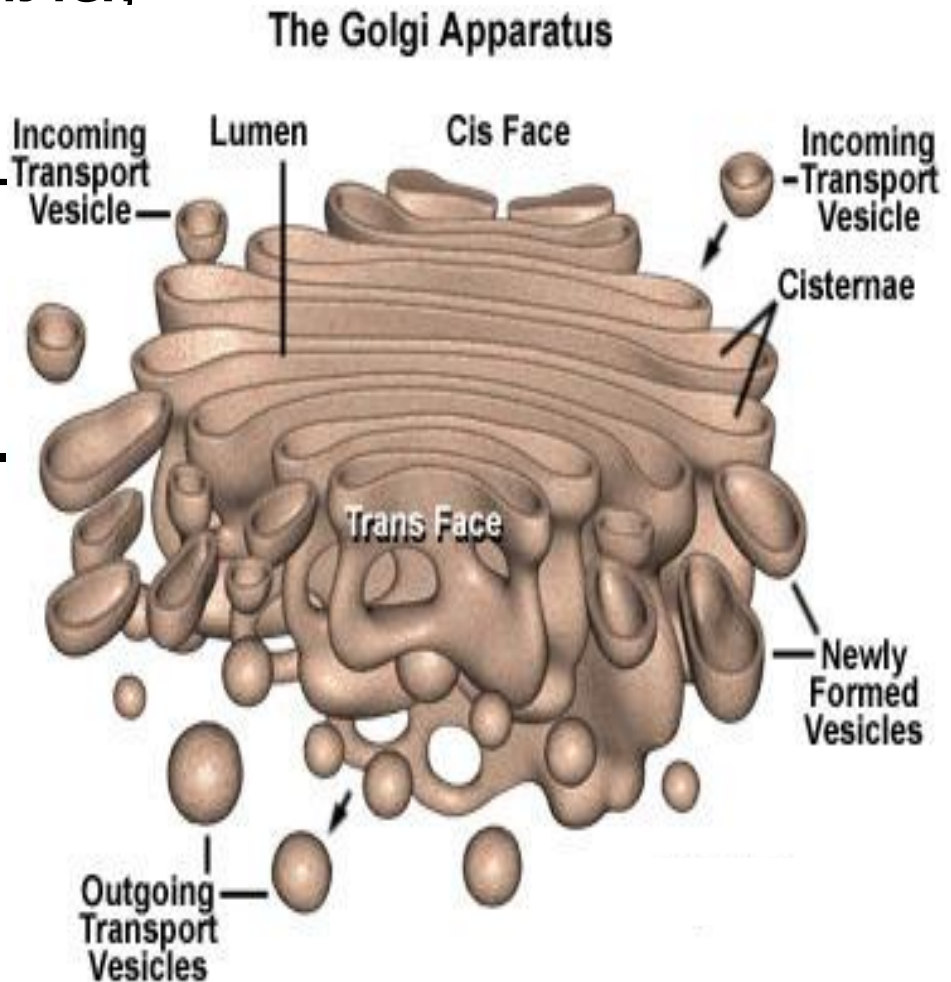


Комплекс Гольджи

Описан К. Гольджи в 1898 г. в нервных клетках.

- мембранная органелла,
состоящая из:

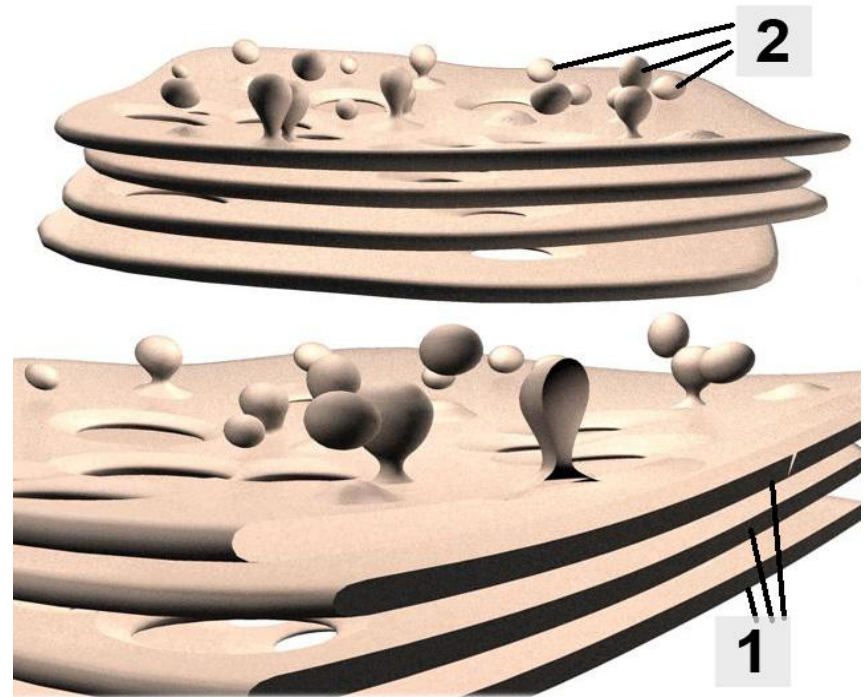
1. Цистерн (цистерн Гольджи).
2. Секреторных пузырьков (вакуолей).
3. Везикул.



Диктиосома (поле Гольджи)

- основная часть комплекса Гольджи, представленная уложенными параллельно друг другу цистернами Гольджи.

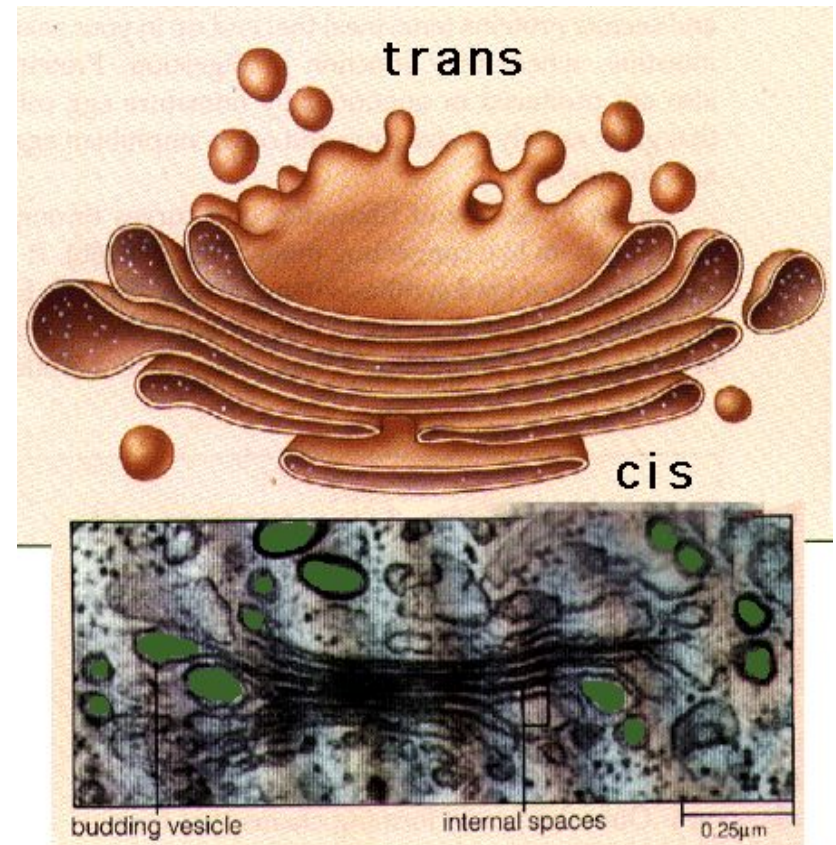
Комплекс Гольджи обычно содержит несколько диктиосом. В экзокриноцитах диктиосомы собраны в апикальной части клетки. В неполярных клетках диктиосомы лежат по всей цитоплазме.



лежат по всей

Полярность диктиосомы

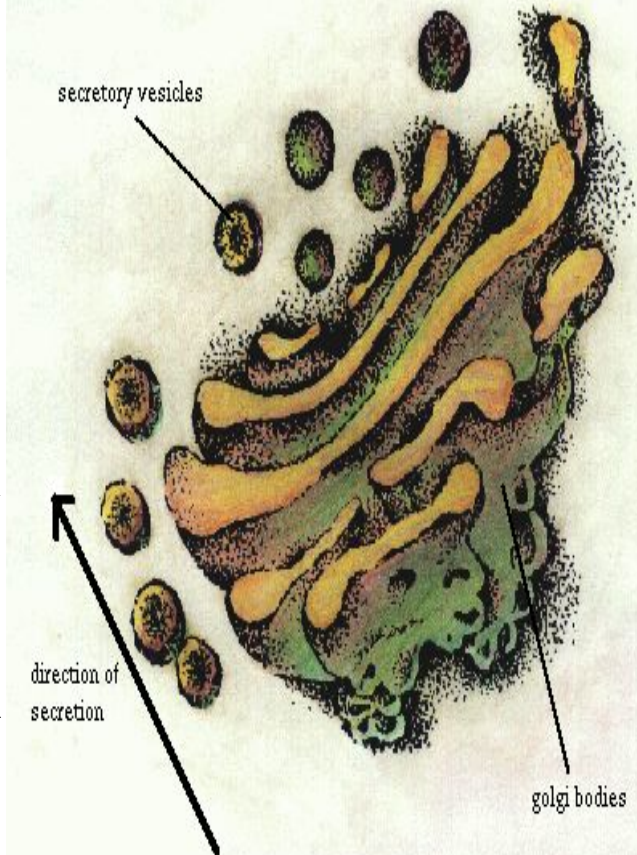
- Цис (незрелая) - выпуклая, обращенная к ЭПР и связанную с последней системой везикул – ERGIC.
- Транс (зрелая) – вогнутая, обращенная к плазмолемме и связанная с последней секреторными пузырьками.



Строение цистерны Гольджи

- изогнутые, уложенные стопкой диски (3-30 шт.) диаметром 0,5-5 мкм разделенные пространством (20-40 нм). Периферические отелы цистерн несколько расширены, от них отщепляются везикулы.

Каждая цистерна (или их группа) характеризуется набором ферментов.



Везикулы и секреторные пузырьки

Везикулы - сферические элементы (D 40-80 нм), образующиеся путем отщепления от цистерн. Служат для переноса веществ между цистернами внутри диктиосомы или комплекса Гольджи.

Вакуоли — крупные сферические образования, формирующиеся на «зрелой» поверхности диктиосомы. Содержат модифицированный продукт, предназначенный для секреции.

Функции комплекса Гольджи

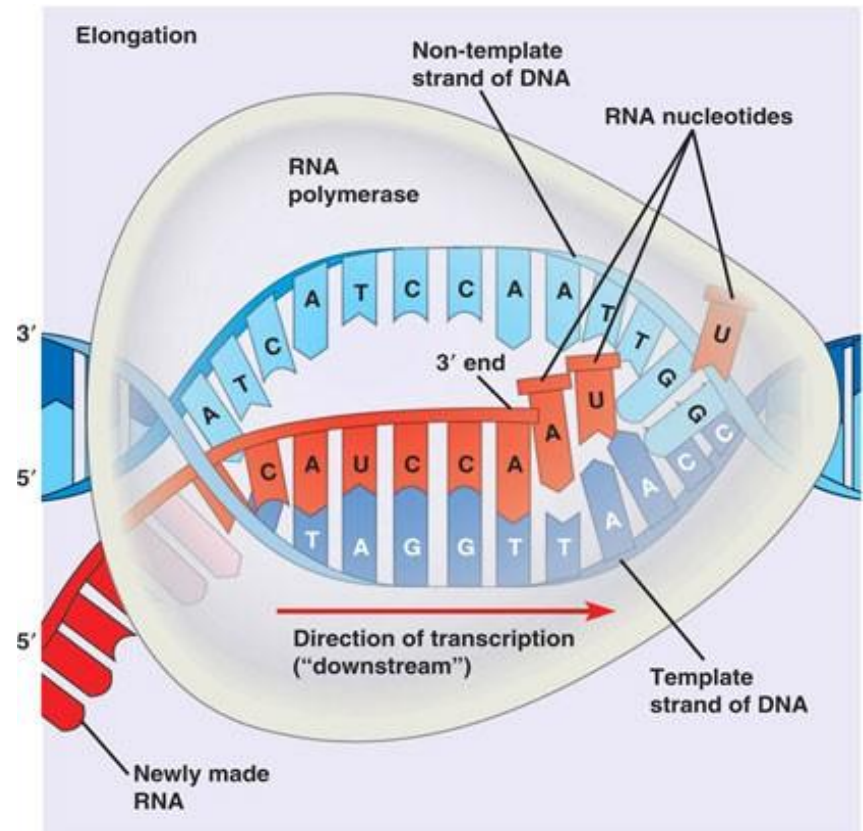
- Формирование секреторных гранул.
- Обновление плазмолеммы.
- Процессинг белков (гликозилирование, фосфорилирование, ацилирование, сульфатирование, частичный протеолиз).
- Синтез полисахаридов.
- Сортировка белков (обеспечивается процессингом и рецепторами мембраны диктиосомы).

Транскрипция. Транскриптон.

Транскрипция - синтез гРНК по матрице ДНК.

Транскриптон – участок ДНК, ограниченный промотором и терминатором, представляющий единицу транскрипции.

Матричная
Кодирующая



Инициация-элонгация-терминация транскрипции

ТАТА-фактор, взаимодействует с ТАТА-боксом, после чего происходит присоединение РНК-полимеразы. Факторы инициации вызывают раскручивание одного витка спирали – транскрипционная вилка. Синтезируется олигонуклеотид (8-10), присоединяются факторы элонгации. Синтез молекулы идет от 5' к 3' концу матричной цепи ДНК. Раскручивание двойной спирали в области сайта терминации, вызывает его связывание с факторами терминации. Факторы терминации обеспечивают отделение первичного транскрипта.

Процессинг первичного транскрипта

- Сплайсинг.
- Кэпирование.
- Полиаденилирование.
- Модификация азотистых оснований.



зрелая
РНК

Сплайсинг

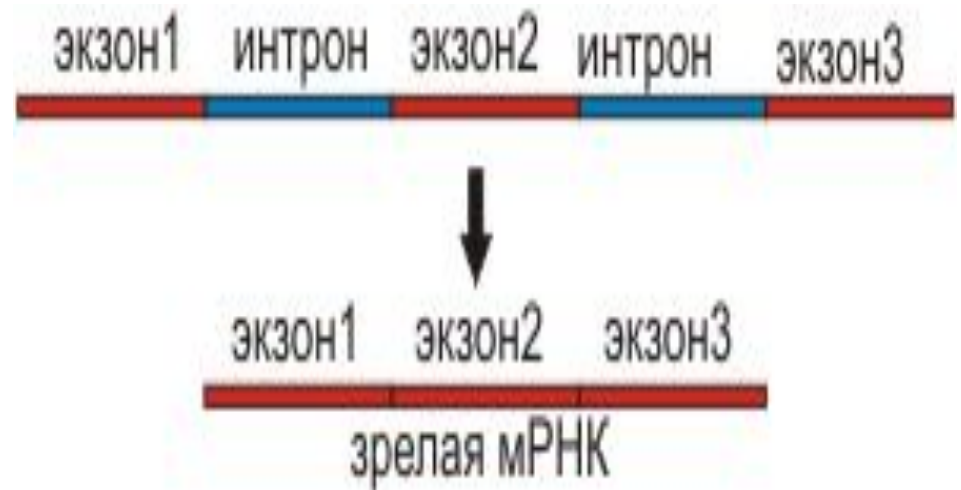
- процесс удаления интронов из гРНК, с последующим соединением экзонов и формированием мРНК.

Сплайсосома — нуклеопротеиновый комплекс, обеспечивающий сплайсинг.

Консенсусные последовательности (сайты сплайсинга):

- 5': GUAAGU, AGGU

- 3': UCAGG, GAGG.



Варианты сплайсинга

- Неферментативный (аутосплайсинг – вид сплайсинга, при котором интроны являются рибозимами).
 - Ферментативный:
 1. С участием матюраз.
 2. С участием сплайсосом:
 - 2.а. Классический сплайсинг
 - 2.б. Альтернативный сплайсинг
 - 2.в. Трансссплайсинг – форма сплайсинга, при которой соединяются РНК разных транскриптов.
- Ретросплайсинг – молекулярный эффект вставки интрона (рибозима) в гомологичную ДНК.

Кэпирование пре-мРНК

- Присоединение гуанилилтрансферазой к 5'-концу синтезирующейся пре-мРНК (≈ 30 нуклеотидов) 7-метилгуанозина – кэпа.

Биологическая роль:

1. защита пре-мРНК от 5'-экзонуклеаз цитоплазмы;
2. необходимы для инициации трансляции;
3. Необходимы для сплайсинга.

Полиаденилирование

- Присоединение полиаденилатполимеразой к 3'-концу пре-мРНК поли(А)-фрагмента (≈ 200 адениловых нуклеотидов). Сигналом к полиаденилированию является – AAUAAA.

Биологическая роль:

1. защита пре-мРНК от 3'-экзонуклеаз цитоплазмы;
2. необходимо для транспорта м-РНК из ядра в цитоплазму.

Описанные ферменты активны только в присутствии РНК-полимеразы II.

Ковалентная модификация азотистых оснований РНК

- Дезаминирование цитозина (урацил). Редактирование пре-мРНК апопротеина В в энтероцитах тонкого кишечника. Эта модификация приводит к возникновению белка апо-В-48, вместо апо-В-100, синтезируемого печенью.
- Метилирование рибозы нуклеотидов РНК.
- Восстановление уридина (дигидроуридин).
- Изомеризация уридина (псевдоуридин).
- Метилирование уридина (метилуридин).
- Дезаминирование аденозина (инозин).
- Метилирование инозина (метилюридин).

Трансляция

- синтез полипептида рибосомами, используя матричную РНК. Прочтение мРНК рибосомой идёт в направлении от 5'- к 3'- концу. Синтез пептида идет от N- к С-концу.



Инициация трансляции

Происходит образование комплекса мРНК, рибосомы и иницирующей тРНК (fMet-, Met-тРНК). Участвуют eIF (более 10). 40S субъединица связывается с Met-tRNA_i, ГТФ и eIF-2. Далее этот комплекс связывается с 5'-концом мРНК. Прикрепившись к мРНК 40S перемещается по ней, достигая иницирующего кодона AUG, с затратой АТФ. Затем 40S субъединица соединяется с 60S субъединицей с образованием 80S рибосомы за счет гидролиза ГТФ. Формируются А- и Р-центры. Существуют 2 тРНК, узнающие кодон AUG: Met-tRNA_i и Met-tRNA.

Элонгация трансляции

В Р-центре – AUG-кодон, соединенный с Met-tRNA_i, в А-центре – триплет, кодирующий включение первой аминокислоты синтезируемого белка.

Элонгация включает 3 этапа:

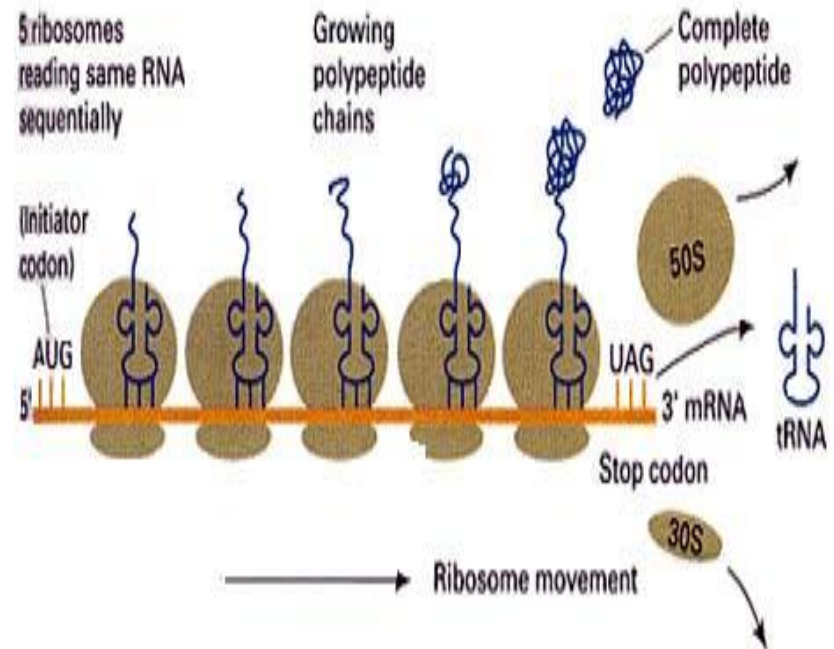
- связывание aa-тРНК с А-центром рибосомы.
- Присоединение пептида пептидил-тРНК Р-центра к NH₂-группе аминоацильного остатка aa-тРНК А-центра (транспептидация).
- Перемещение удлиненной на один аминокислотный остаток пептидил-тРНК из А-центра в Р-центр (транслокация).

Терминация трансляции

В А-центре рибосомы оказывается стоп-кодон: UAG, UAA, UGA.

Для стоп-кодонов нет соответствующей тРНК. К рибосоме присоединяются 2 RF (Releasing Factor).

Один катализирует гидролитическое отщепление пептида от тРНК, другой вызывает ГТФ-зависимую диссоциацию субъединиц рибосом.



Фолдинг

- процесс принятия функционально активной конформации биополимерами внутри клетки при помощи белков – факторов фолдинга.

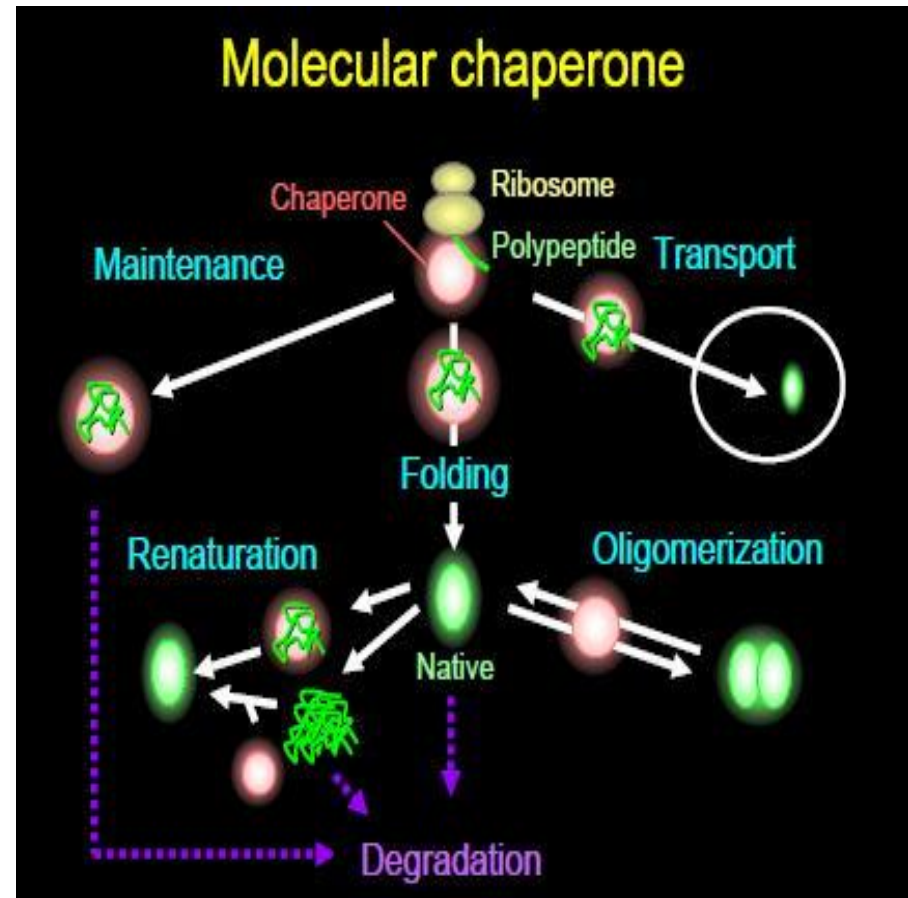
Факторы фолдинга:

1. Ферменты фолдинга:

- Протеиндисульфид-изомераза;

- Пептидилпролил-изомераза;

2. Шапероны.

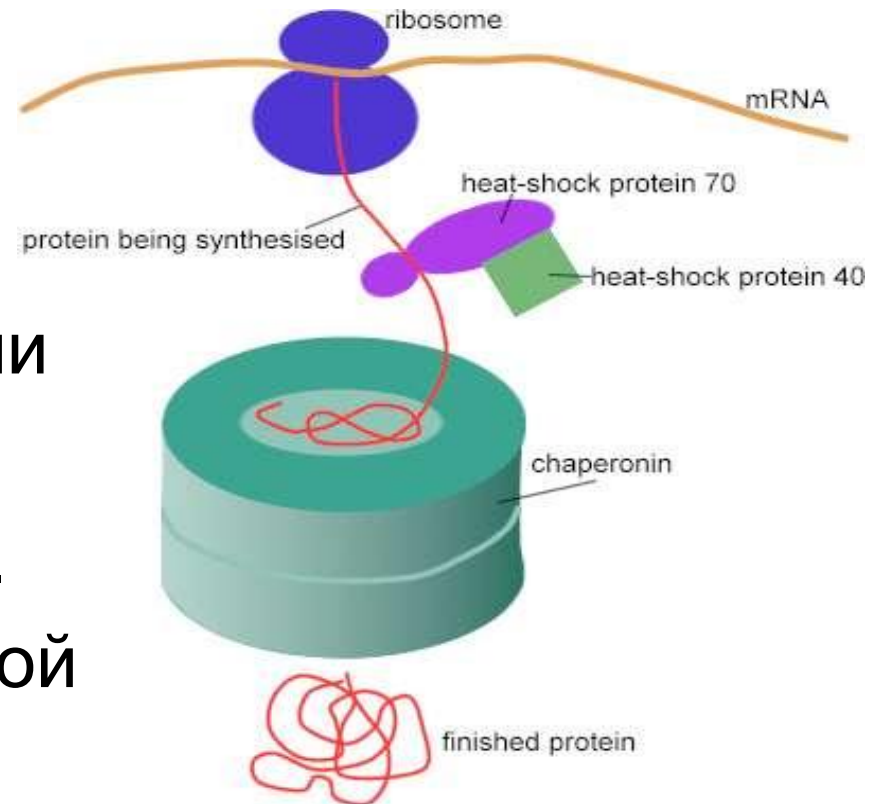


Шапероны

- класс белков, придающих, стабилизирующих и восстанавливающие конформацию других белков.
- Конститутивные
- Индуцибельные (белки теплового шока, HSP)

Функции шаперонов:

- Обеспечение правильного фолдинга белков.
- Предотвращение агрегации белковых молекул.
- Обеспечение рефолдинга.
- Поддержание определенной конформации белка.



Синтез теломер

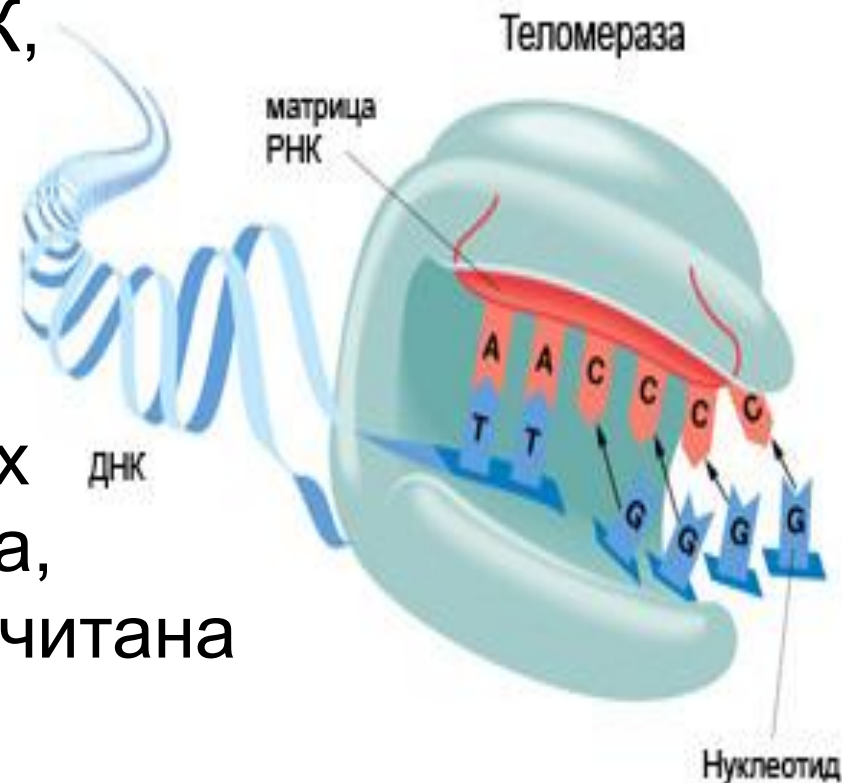
На каждом конце хромосомы имеются многократные повторы GGGTTA – теломерная ДНК. После репликации 5'-концы дочерних цепей ДНК остаются недореплицированными.

Теломераза (нуклеотидилтрансфераза), обеспечивает восстановление 5'-конца.

Простетическая группа - РНК, которая служит матрицей для синтеза теломерной последовательности.

Синтез идет от 3'- к 5'-концу.

В большинстве соматических клеток теломераза неактивна, длина теломерной ДНК рассчитана на несколько делений.



Благодарю за внимание!

