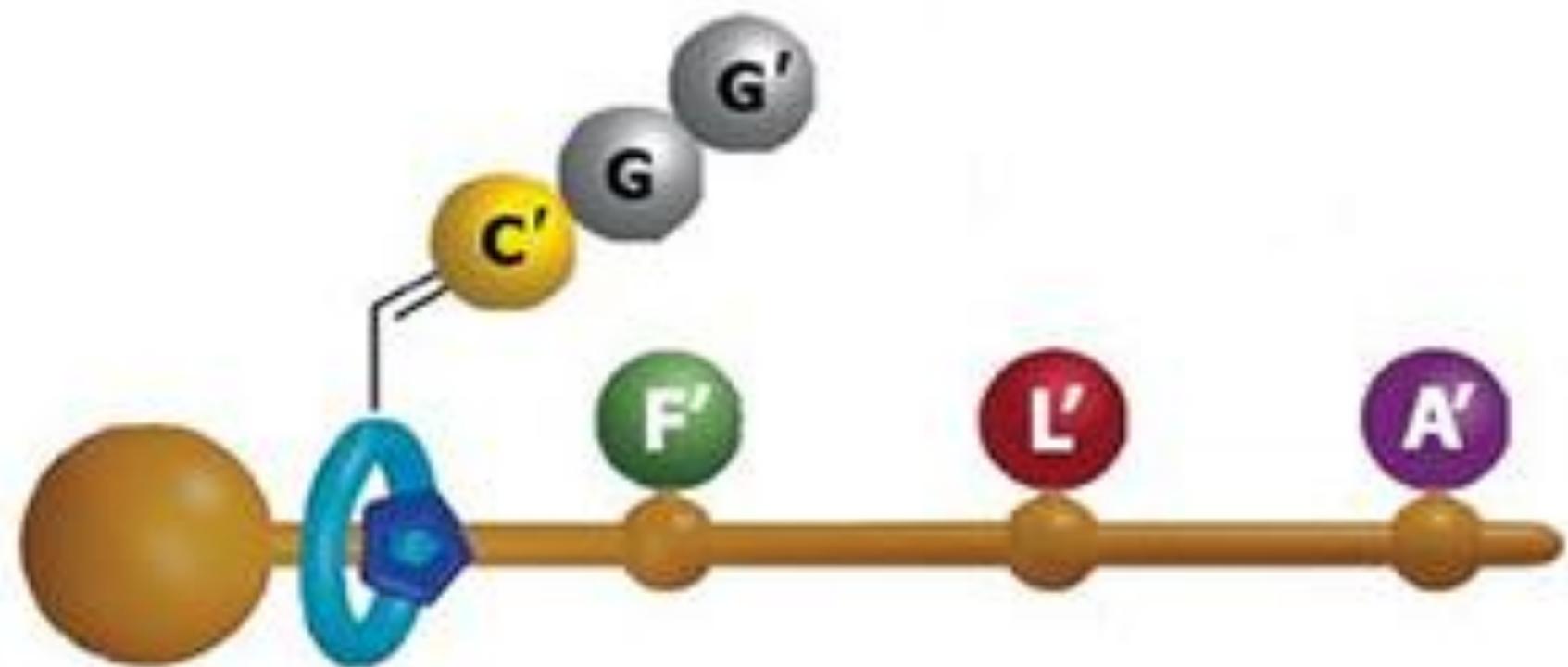


БИОСИНТЕЗ БЕЛКА



Создана молекулярная машина для сборки пептидов

- Исследователи из Манчестера и Эдинбурга создали примитивный искусственный аналог рибосомы — ротаксановую наномашину, способную синтезировать пептиды заданного состава.**



Интересно, что

- Синтез одной молекулы белка длится 3-4 минуты.
- За одну минуту образуется от 50 до 60 тыс. пептидных связей.
- Половина белков нашего тела обновляется за 80 дней.
- За свою жизнь человек обновляет все свои белки около 200 раз.

- Белки – конечный продукт большинства информационных метаболических путей.
- На синтез белка может расходоваться до 90% всей энергии клетки.
- Полипептид из 100 амк остатков синтезируется в клетке *E. coli* при 37° С ~5 секунд.

- Синтез тысяч различных белков в клетке регулируется таким образом, что их количество точно соответствует текущему метаболическому состоянию.

Генетический код

- Синтез белка отличается от других матричных биосинтезов тем, что между матрицей и продуктом нет комплементарного соответствия. Поскольку матрица построена из 4 нуклеотидов, а полипептидная цепь — из 20 аминокислот, существует определенный закон шифрования аминокислот в нуклеотидной последовательности матрицы, т.е. **генетический код**.

Генетический код

- **Генетический код** — это способ записи информации об аминокислотной последовательности белков с помощью последовательности нуклеотидов в ДНК или РНК.

ГЕОРГИЙ АНТОНОВИЧ ГАМОВ

В 1954 году опубликовал статью, где первым поднял вопрос генетического кода, доказывая, что "при сочетании 4 нуклеотидов тройками получаются 64 различные комбинации, чего вполне достаточно для "записи наследственной информации"



НОБЕЛЕВСКАЯ ПРЕМИЯ



**Роберт Уильям
Холли (США)**



**Хар Гобинд
Корана (США)**



**Маршалл Уоррен
Ниренберг (США)**

За расшифровку генетического кода и его функции в синтезе белков.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОД

ГЕН

5. НЕПРЕРЫВЕН

1 2 3

А У Г А Ц ~~Г~~ А Г Ц У Г У У А У У Г У А А

ТРИПЛЕТ
(КОДОН)



АК

1. ТРИПЛЕТЕН

2. НЕ ПЕРЕК-
РЫВАЕТСЯ

3. ОДНОЗНАЧЕН

4. ИЗБЫТОЧЕН
(ВЫРОЖДЕН)

ЛЕЙ

6. УНИВЕРСАЛЕН



1. ОДНА АК КОДИРУЕТСЯ ТРЕМЯ НУКЛЕОТИДАМИ (ТРИПЛЕТОМ)
2. НУКЛЕОТИД НЕ МОЖЕТ ВХОДИТЬ В СОСТАВ ДВУХ ТРИПЛЕТОВ
3. ТРИПЛЕТ КОДИРУЕТ ТОЛЬКО ОДНУ АК
4. КАЖДАЯ АК ШИФРУЕТСЯ БОЛЕЕ ЧЕМ ОДНИМ КОДОНОМ
5. ВНУТРИ ГЕНА НЕТ ЗНАКОВ ПРЕПИНАНИЯ (СТОП-КОДОНОВ)
6. УНИВЕРСАЛЕН Б=Г=Р=Ж

- Трансляция- процесс синтеза белка из аминокислот на матрице РНК, осуществляемый рибосомальным комплексом, где ведущую роль играют огромные молекулы РНК.

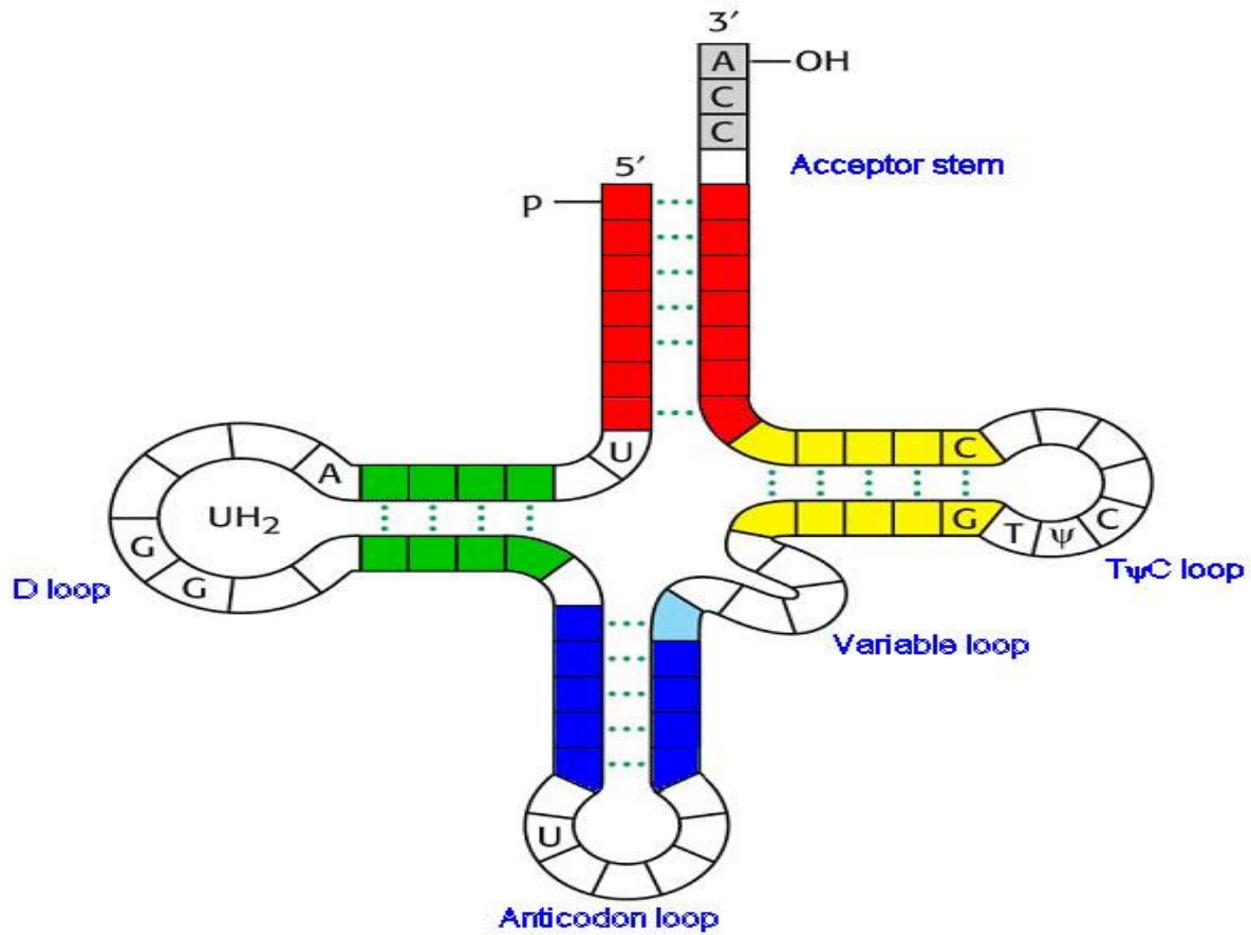
- Клетка *E. coli* имеет 15 000 и более рибосом, состоящие из 65% рРНК и 35% белка.
- Рибосомы состоят из двух неравных субъединиц: 30S и 50S, содержат очень большие молекулы РНК.
- 50S состоит из 5S- и 23S-рРНК + 36 белков.
- 30S состоит из 16S-рРНК + 21 белок.
- белки вторичны, покрывают поверхность РНК.

- Между ними образуется щель, через которую при трансляции проходит молекула РНК.
- Образование пептидной связи катализирует рибозим.

- Бактериальные тРНК содержат от 73 до 93 ак.
- Каждой амк своя тРНК.
- Для распознавания кодонов всех ак требуется не менее 32 типов тРНК.

- для выполнения адаптерной функции тРНК имеет:
- аминокислотное плечо на 3'конце тРНК.
- Антикодонное плечо содержит антикодон.
- Кодон-триплет нуклеотидов, кодирующих определенную ак.

- Плечо D, содержит дигидроуридин, взаимодействие при укладке молекул тРНК.
- плечо ТΨС, содержащего риботимидин и псевдоуридин, обеспечивает взаимодействие с большой субъединицей рРНК.



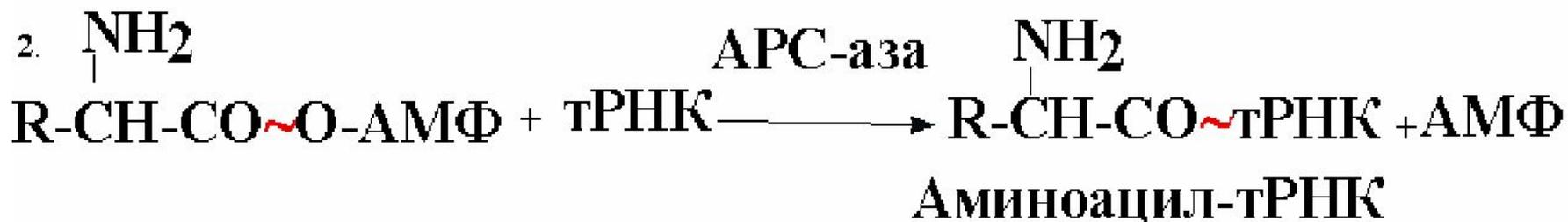
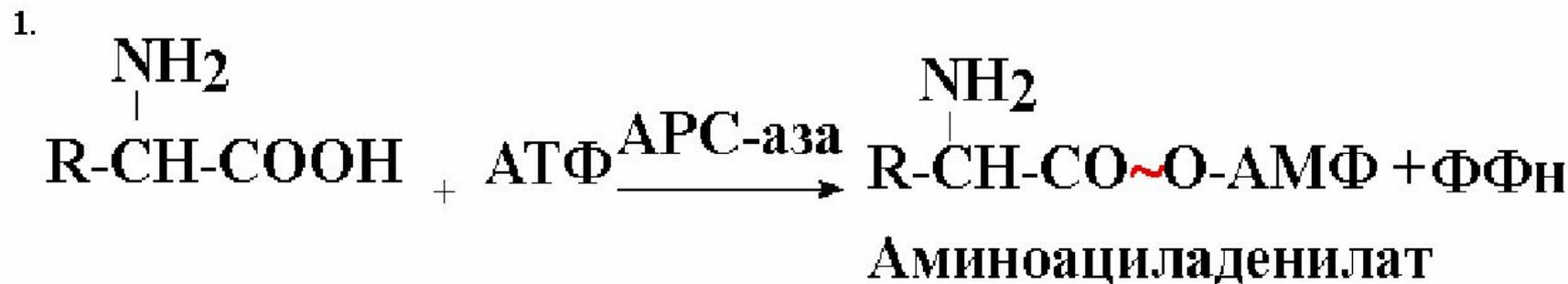
Этапы трансляции

- **Активация аминокислот**
- **Инициация**
- **Элонгация**
- **Терминация и высвобождение**
- **Укладка и посттрансляционный процессинг**

Активация аминокислот

- Mg^{+2} зависимые аминокцил-тРНК-синтетазы (АРС-аза или кодаза)
- α -Карбоксил атакует α -фосфат АТФ, образуя 5' -аминоациладенилат.
- Аминоацильная группа переносится на тРНК.

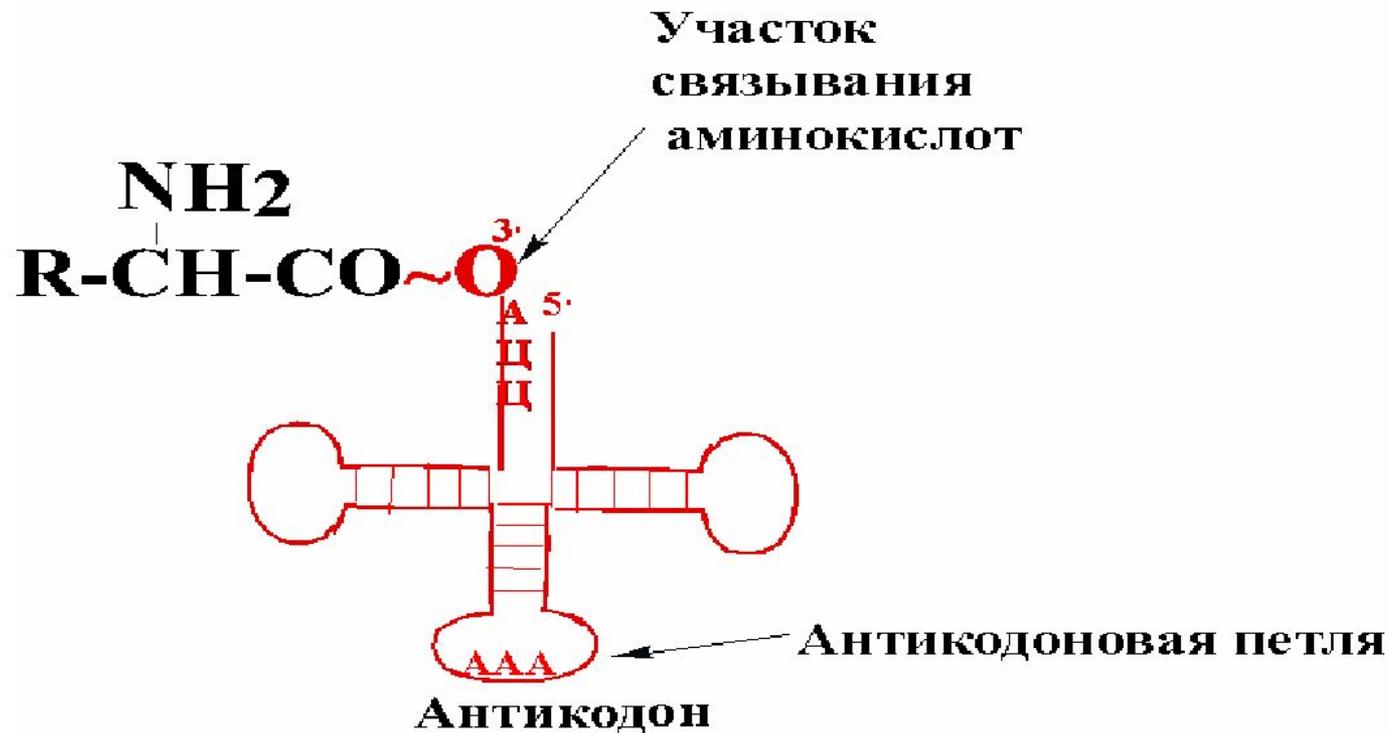
Инициация трансляции. Активация аминокислот.



Фермент - Аминоацил-тРНК-синтетаза, АРС-аза, кодаза

Активация аминокислот

Аминоацил-т-РНК



- Аминоацилирование тРНК приводит к двум результатам:
- Активация ак для формирования пептидной связи.
- Ак присоединяется к адаптерной тРНК, что обеспечивает правильное положение ак в растущем полипептиде.

- Взаимодействие между аминокцил-тРНК – синтетазами и тРНК называют «вторым генетическим кодом».

- Синтез белка начинается с N-конца и происходит путем последовательного присоединения аминокислот к C-концу растущего полипептида.
- Инициаторный кодон AUG соответствует N-концевому остатку **метионина**.

- Для метионина существует один кодон - 5'AUG, все организмы имеют для метионина две тРНК:
- Одна тРНК только для инициаторного кодона, другая – для встраивания остатка метионина во внутреннее положение полипептидной цепи.

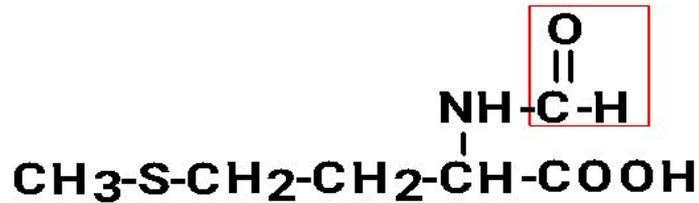
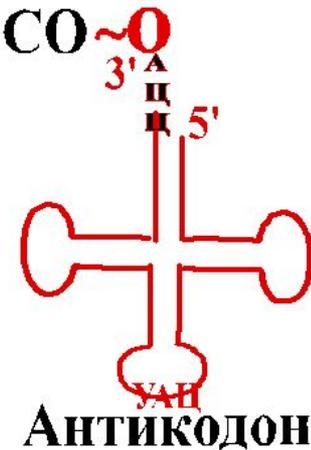
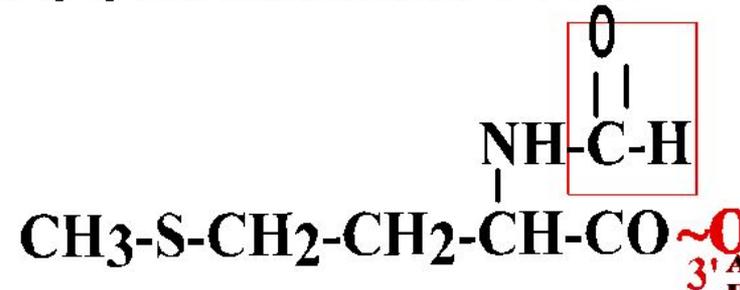
- Поэтому у бактерий есть два типа тРНК, специфичных для Met:

• **тРНК^{Met} и тРНК^{fMet}**

- Инициаторная ак у бактерий – **формилметионин.**
- Инициаторная ак у эукариот – **метионин.**

Активация аминокислот

Инициаторная формилметионин-т-РНК



Формил-метионин

- Для инициации синтеза полипептида у бактерий требуется 30S и 50S –рибосомальные субъединицы
- мРНК
- Инициаторная **fMet** - тРНК^{fMet}
- ГТФ, ионы Mg⁺²
- Три белковых фактора инициации:
IF-1, IF-2, IF-3

Инициация

- Иницирующие комплексы:
- 30S рибосома соединяется с IF-1, IF-3.
- IF-3 предупреждает преждевременное соединение субъединиц 30S и 50S.
- С 30S -субъединицей связывается мРНК.

- Инициаторный кодон 5'AUG попадает в правильную позицию благодаря последовательности Шайна-Дальгарно в мРНК.
- Эта консенсусная последовательность из 4-9 пуриновых оснований расположена на расстоянии 8-13 п.н. в сторону 5'-конца от инициаторного кодона.

- Эта последовательность комплементарно связывается с пиримидин-обогащенной последовательностью, находящейся вблизи 3'конца 16S рРНК 30S –субъединицы рибосомы.

- Бактериальные рибосомы имеют три сайта связывания аминоксил-тРНК:
- Аминоксилный (А)
- Пептидилный (Р)
- Сайт выхода (Е)

- Сайты А и Р образованы обеими субъединицами рибосомы 30S и 50S, сайт Е локализован в 50S субъединице.
- Инициаторный 5'-кодон располагается в пептидильном сайте – здесь связывается **fMet - тРНК^{fMet}**

- К комплексу: 30S субъединица рибосомы, IF-3, IF-1 присоединяется ГТФ и инициаторная **fMet - тРНК^{fMet}**
- Антикодон этой тРНК связывается с инициаторным кодоном мРНК.

- Далее этот крупный комплекс объединяется с 50S субъединицей рибосомы.
- В это же время ГТФ, связанный с IF-2, гидролизуеться до ГДФ и Фн, которые высвобождаются из комплекса.
- В этот момент все три фактора инициации отделяются от рибосомального комплекса.

Инициация

- В результате образуется функционально-активная 70S- рибосома, называемая **инициаторным комплексом.**

Инициация

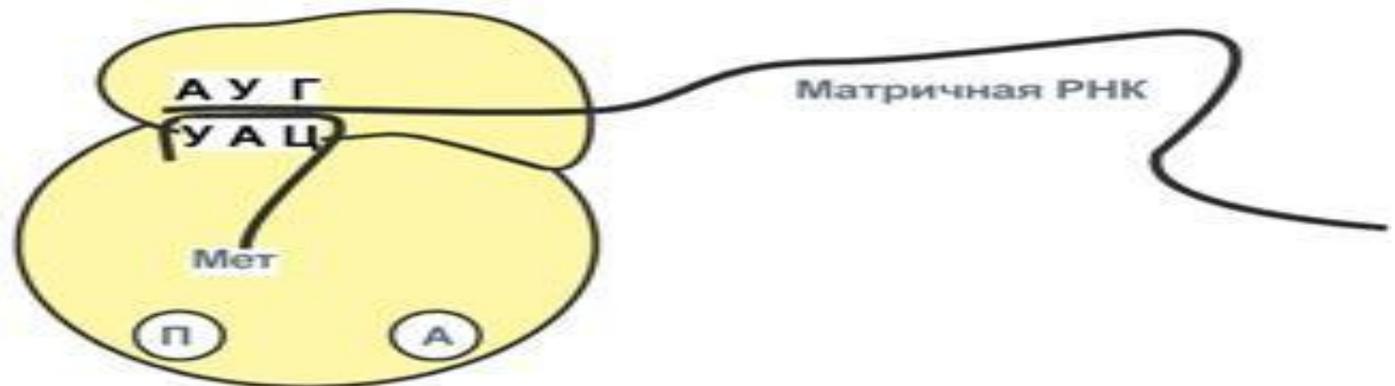
Матричная РНК
Фактор инициации ИФ-3
Малая субъединица рибосомы

ГТФ
Метионил-тРНК
Фактор инициации ИФ-2

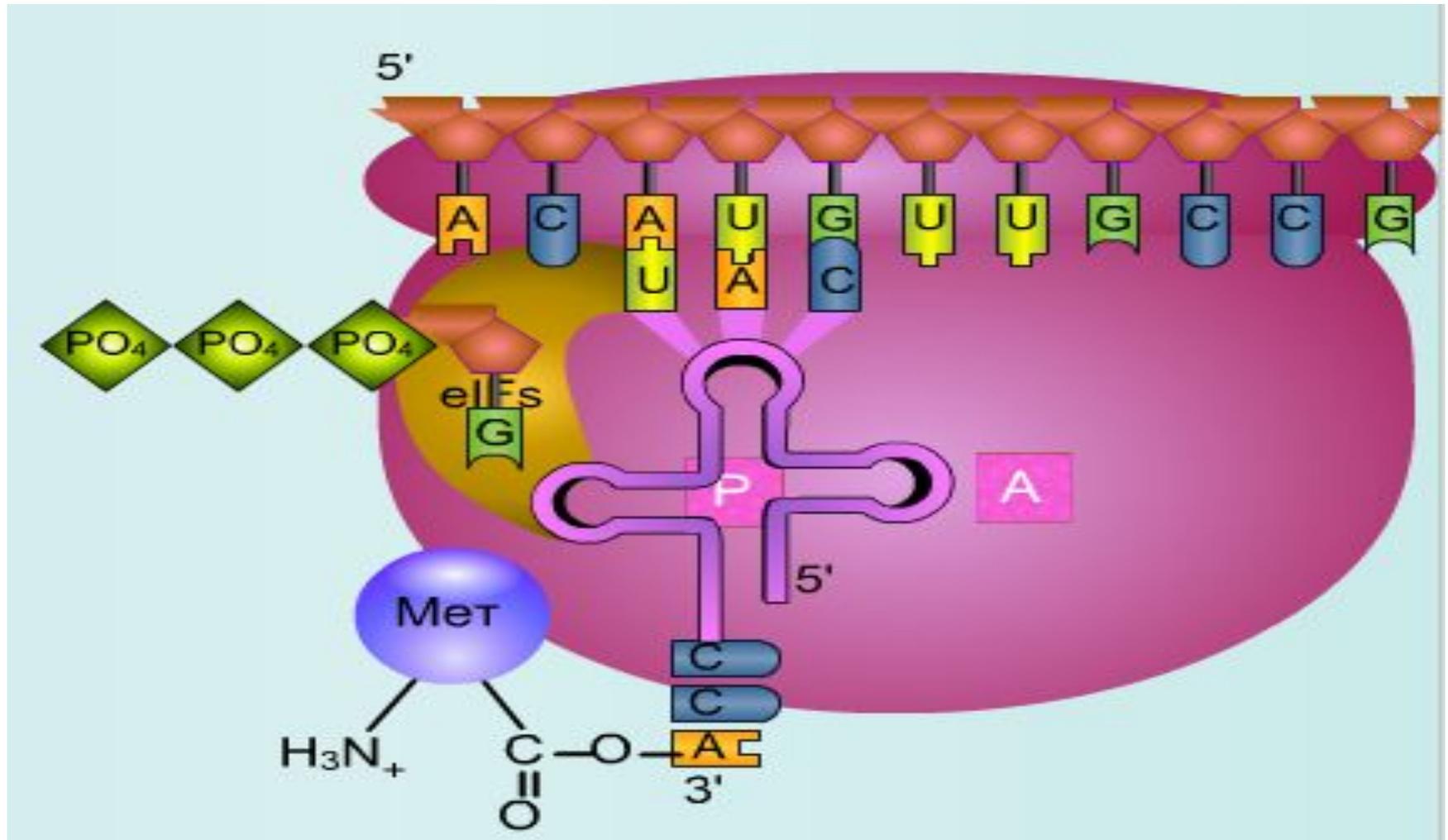
+ Фактор инициации ИФ-1

Образование и объединение тройных комплексов

Большая субъединица рибосомы
ГДФ + Ф
ИФ-1, ИФ-2, ИФ-3



Инициация



ЭЛОНГАЦИЯ

- Необходимо:
- Инициаторный комплекс
- Аминоацил-тРНК
- Три растворимых цитоплазматических фактора – факторы элонгации (**EF-Tu, EF-Ts, EF-G**)
- ГТФ

- В клетке присоединение каждой аминокислоты происходит в три стадии и эти стадии повторяются столько раз, сколько аминокислотных остатков нужно присоединить.
- Элонгация начинается с присоединения второй аминоацил-тРНК.

- На первой стадии элонгации соответствующая аминоксил-тРНК взаимодействует с фактором EF-Tu, связанным с ГТФ.
- Комплекс аминоксил-тРНК - EF-Tu – ГТФ связывается на сайте A 70S инициаторного комплекса.

- ГТФ гидролизуеться, комплекс EF-Tu – ГДФ высвобождается из 70S рибосомы.
- Далее при участии фактора EF-Ts и ГТФ комплекс EF-Tu – ГТФ регенерирует.

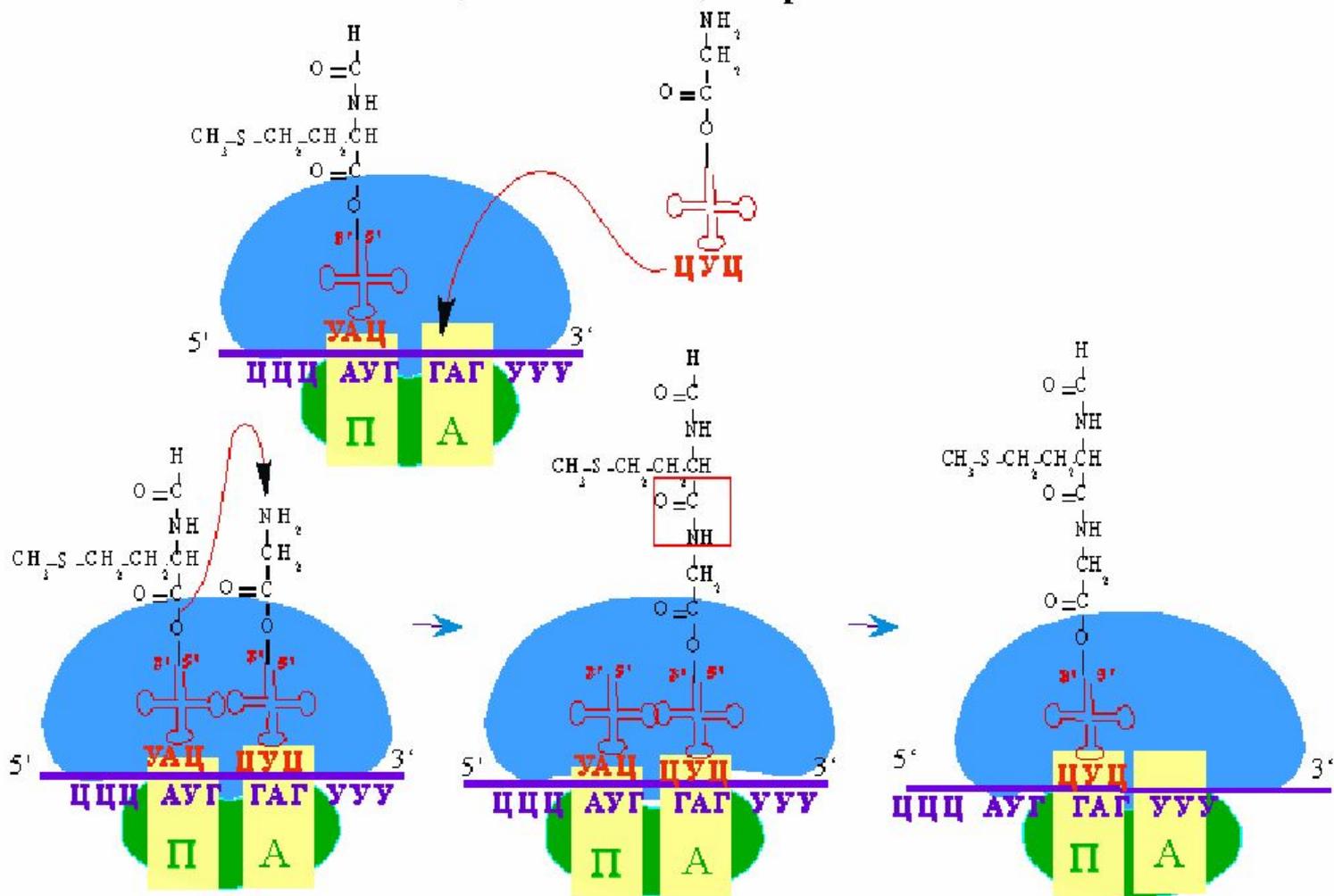
- Формирование пептидных связей:
- Пептидная связь формируется между двумя аА, связанными через соответствующие тРНК с А- и Р-сайтами рибосомы.
- Инициаторная N-формилметионильная группа переносится от своей тРНК на аминогруппу второй аминокислоты, находящейся в сайте А.

- α -аминогруппа ак в сайте А выступает в роли нуклеофила, вытесняя тРНК, находящуюся в сайте Р, образуя пептидную СВЯЗЬ.
- Катализирует реакцию **23S рРНК – пептидилтрансфераза.**
- В сайте А образуется дипептидил –тРНК, а разгруженная тРНК^{fMet} остается связанной с Р сайтом.

- **Транслокация** – рибосома передвигается на один кодон по направлению к 3' - концу мРНК, при этом антикодон дипептидил-тРНК, который все еще присоединен ко второму кодону мРНК, сдвигается из А сайта в Р сайт.

- Деацилированная тРНК смещается из Р сайта в Е сайт и высвобождается в цитозоль.
- Для транслокации рибосомы вдоль мРНК необходим фактор **EF-G** и энергия гидролиза ГТФ.
- Теперь в А сайте расположен третий кодон мРНК, в Р сайте – второй кодон.

Элонгация. Рабочий цикл рибосомы



1. Связывание аминоксил-тРНК в А-участке (ГТФ, фактор элонгации)

2. Образование пептидной связи (пептидил-трансфераза) (ГТФ, фактор элонгации)

3. Транслокация

- После транслокации дипептидил-тРНК готова к следующему циклу элонгации и связыванию третьего аминокислотного остатка.
- Таким образом, присоединение одного ак остатка сопровождается гидролизом двух молекул ГТФ до ГДФ и Фн.

Терминация и высвобождение

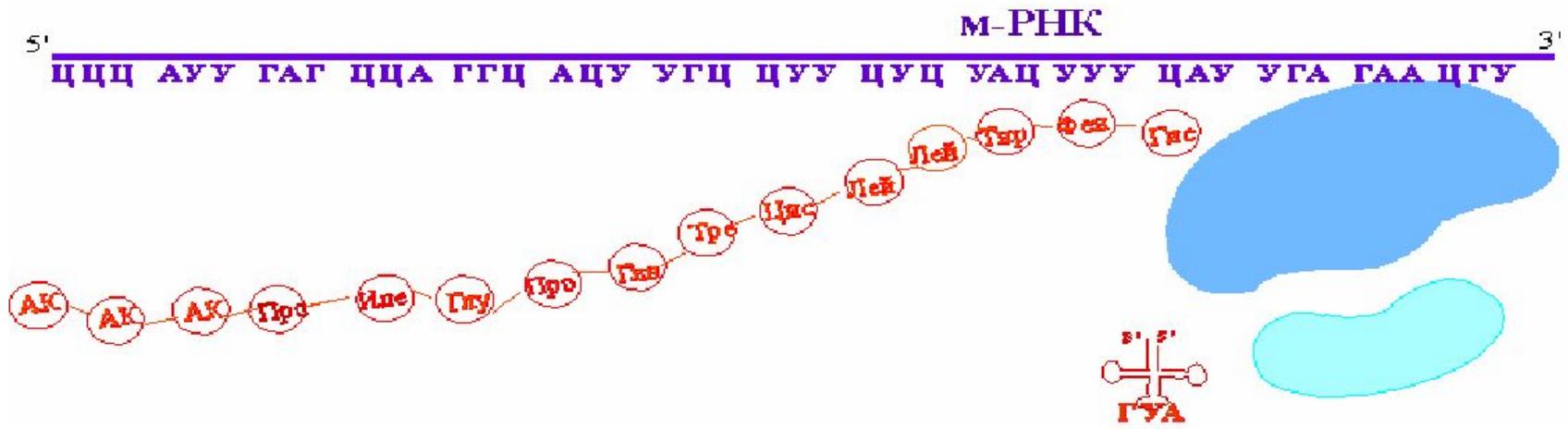
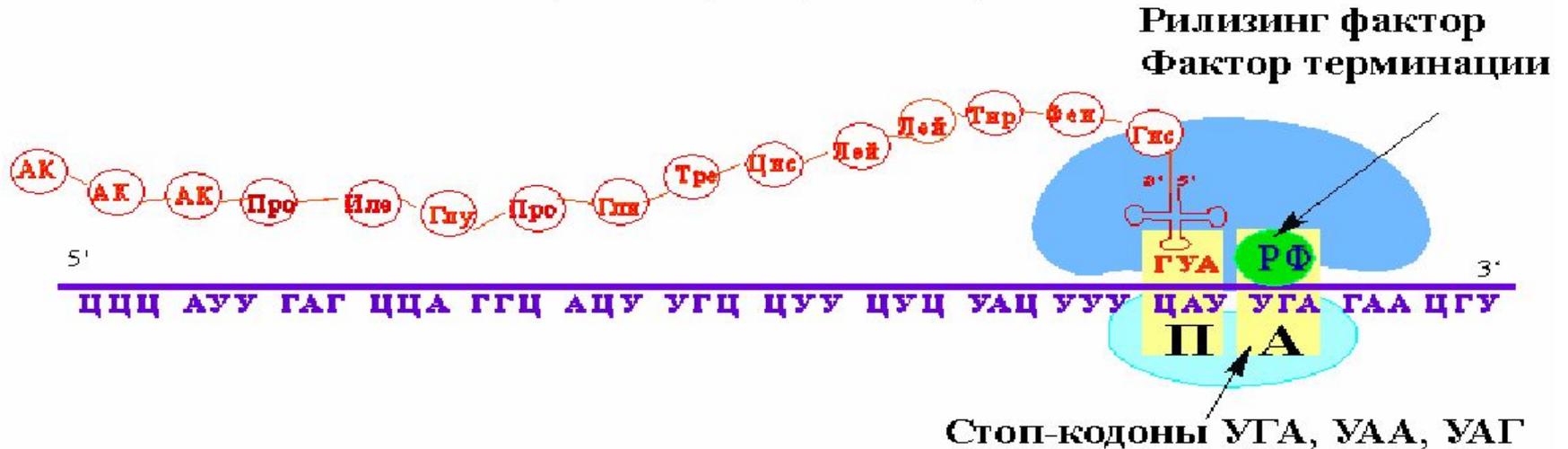
- О терминации сигнализирует один из трех стоп-кодонов (UAA, UAG, UGA).
- Мутации в антикодоне тРНК, которые позволяют встраивать аминокислоту в ответ на стоп-кодон, губительны для клетки.

- Стоп-кодон в А сайте рибосомы, подключаются три фактора терминации (высвобождения) – RF-1, RF-2, RF-3.
- RF-1 распознает стоп-кодона UAA, UAG.
- RF-2 распознает стоп-кодона UGA, UAA.
- Под действием пептидилтрансферазы растущий полипептид связывается с H₂O.

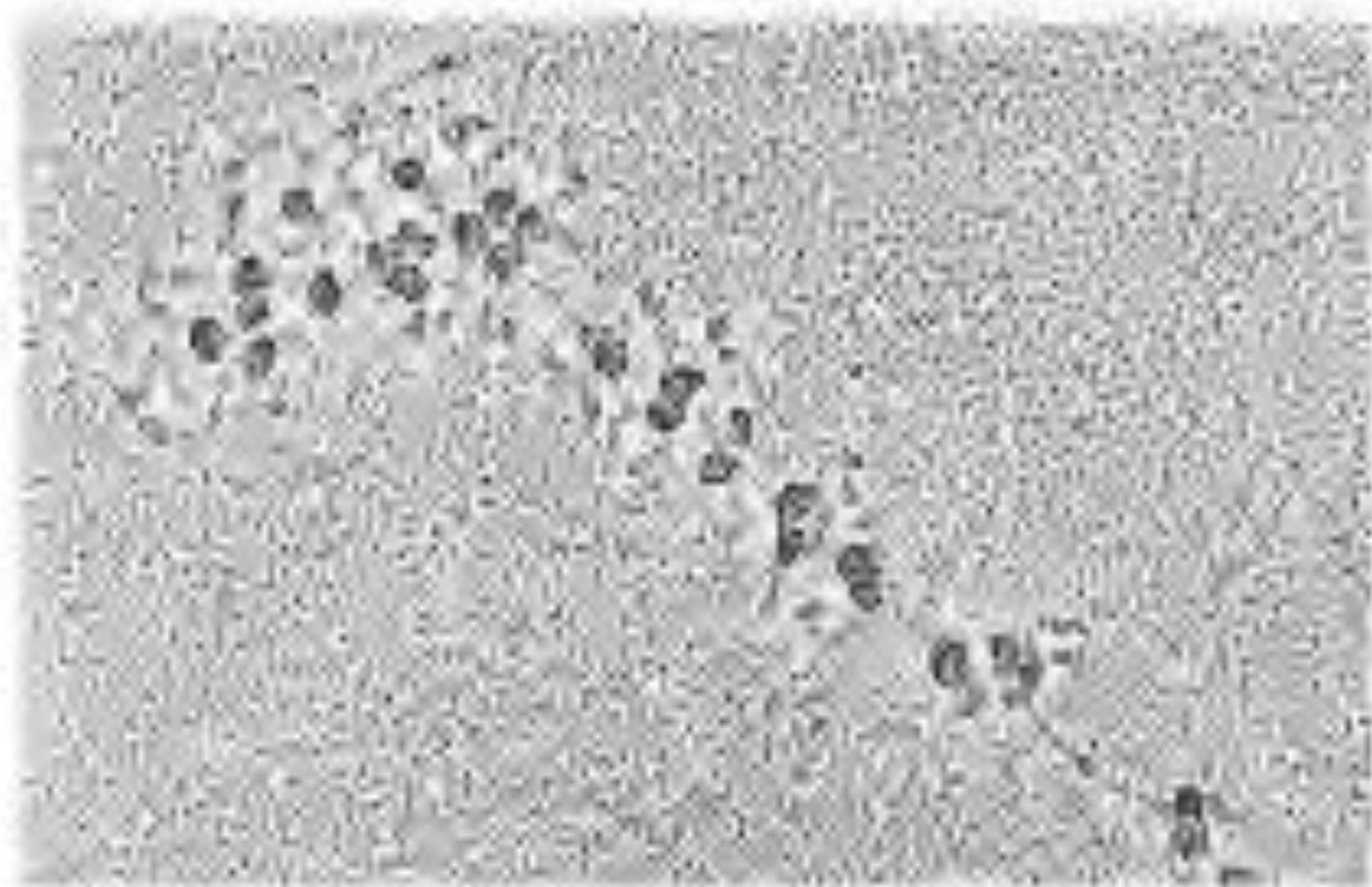
- RF-3 участвует в высвобождении субъединицы рибосомы.
- Высвобождение и распад рибосом на субъединицы приводит к диссоциации компонентов трансляционного комплекса.
- Факторы терминации заменяются на фактор EG-G и фактор рециклизации рибосом (RRF).

- Гидролиз ГТФ под действием EFG-G приводит к уходу 50S-субъединицы из комплекса 30S-тРНК-мРНК.
- Факторы EFG-G, RRF заменяются на IF-3, который способствует высвобождению тРНК, затем отделяется мРНК.
- Затем комплекс 30S субъединица- IF-3 готов инициировать новый раунд синтеза белка.

Терминация трансляции



- Из бактериальных и эукариотических клеток можно выделить крупные кластеры из 10-100 рибосом – **полисомы**, в которых соседние рибосомы соединены между собой тонкими волокнами – молекулами мРНК, с которых происходит трансляция белка одновременно многими рибосомами.
- Высокая эффективность процесса.



- У бактерий процессы транскрипции и трансляции тесно связаны между собой.
- Рибосомы начинают трансляцию ($5' \rightarrow 3'$) еще до завершения транскрипции.

Укладка и посттрансляционный процессинг

- Образованная полипептидная цепь сворачивается в биологически активную форму.
- То есть линейная белковая молекула превращается в трехмерную структуру.
- Но до этого подвергается посттрансляционным модификациям.
- У эукариот в ЭР, аппарат Гольджи.

- Модификации N-конца и C-конца.
- В процессе образования функционального белка формильная группа (у бактерий), метионин (у эукариот) могут удаляться ферментативным путем.
- У эукариот аминокислотная группа N-конца подвергается ацилированию.

- N-концевая последовательность – для доставки белка к месту его назначения в клетке (маркировка)
- Удаление сигнальной последовательности специфическими пептидазами.

- Модификации некоторых аминокислот:
- Гидроксильные группы сер, тре, тир – фосфорилируются под действием АТФ, фосфатные группы сообщают полипептидам «-» заряд.
- Используется при регуляции активности ферментов, регуляторных белков или для связывания ионов Ca^{2+}

- Образование дисульфидных мостиков между остатками цистеина.
- Дисульфидные мостики защищают нативную конформацию белка от денатурации во внеклеточной среде.
- Метилирование аргинина и лизина в составе гистонов используется для регуляции активности генома
-

- К остаткам глутамата присоединяются карбоксигруппы.
- При участии витамина К происходит γ -карбоксилирование глутамата в составе протромбина, проконвертина, фактора Стюарта, Кристмаса.
- Позволяет связывать ионы кальция при инициации свертывания крови.

- Частичный протеолиз – удаление части пептидной цепи протеолитическими ферментами
- Инсулином из проинсулина
- Трипсин из трипсиногена

- Присоединение простетических групп:
- Гем – при синтезе гемоглобина, миоглобина, цитохромов, каталазы
- Витаминных коферментов – биотина, ФАД, пиридоксальфосфата и т.п.

- Присоединение углеводных остатков к остаткам асп или сер, тре – гликирование требуется при синтезе гликопротеинов.
- Присоединение изопренильных групп к остатку цис. Помогает заякоривать белок на мембране.
- Ras-белки – продукты онкогенов и протонкогенов ras.

- Трансформирующая активность онкогена *ras* исчезает при дефекте изопренилирования белка Ras.
- Применяется в противоопухолевой терапии.

Лекарственная регуляция синтеза белка

- *Инактивация факторов инициации:*
- **интерферон** активирует внутриклеточные протеинкиназы, которые, в свою очередь, фосфорилируют белковый фактор инициации ИФ-2 и подавляют его активность.
- *Нарушение кодон-антикодонного взаимодействия:*
- **стрептомицин** присоединяется к малой субъединице и вызывает ошибку считывания первого основания кодона.

Лекарственная регуляция

- *Нарушение элонгации:*
- **тетрациклины** блокируют А-сайт рибосомы и лишают ее способности связываться с аминоацил-тРНК.
- **Хлорамфеникол** ингибирует пептидил трансферазу у бактерий; на уэкариот не влияет.
- **Циклогексимид** ингибирует пептидил трансферазу эукариотических рибосом.

Фолдинг белков

- **Фолдинг** – это процесс сворачивания полипептидной цепи в правильную пространственную структуру. Для обеспечения фолдинга используется группа вспомогательных белков под названием **шапероны** (chaperon, франц. – спутник). Они предотвращают взаимодействие новосинтезированных белков друг с другом, изолируют гидрофобные участки белков от цитоплазмы, способствуют переходу вторичной структуры в третичную.

Фолдинг белков

- При нарушении функции шаперонов и отсутствии фолдинга в клетке формируются белковые отложения – развивается **амилоидоз**. Насчитывают около 15 вариантов амилоидоза.

Регуляция синтеза белка

- Синтез белка регулируется внешними и внутренними факторами, которые диктуют клетке синтез такого количества белка и такого набора белков, которые необходимы для выполнения физиологических функций.

- **Концентрация белка в клетке определяется сложным равновесием семи процессов:**
- Транскрипция
- Посттранскрипционная модификация мРНК
- Расщепление мРНК
- Трансляция
- Посттрансляционная модификация белка
- Компарментализация и транспорт белка
- Расщепление белка

- Транскрипция – первая стадия в сложном и энергозатратном процессе синтеза белка, поэтому регуляция концентрации белков как у бактерий, так и эукариот часто осуществляется на уровне транскрипции.

- Гены тех продуктов, которые необходимы клетке постоянно (ферменты основных метаболических путей) экспрессируются на постоянном уровне в каждой клетке организма (гены домашнего хозяйства).
- **Регулируемая экспрессия гена** – концентрация продуктов этих генов изменяется в ответ на молекулярные сигналы.
-

- Инициацию транскрипции РНК-полимеразой регулируют три типа белков:
- **Факторы специфичности** изменяют специфичность РНК-полимеразы по отношению к данному промотору или набору промоторов (σ – субъединица холофермента РНК-полимеразы *E.coli*).

- **Репрессоры** блокируют присоединение РНК-полимеразы к промотору.
- **Активаторы** усиливают взаимодействие РНК – полимеразы с промотором.

- Белки-репрессоры связываются с определенными участками ДНК – операторами.
- Оператор часто находится вблизи промотора.
- Репрессор блокирует связывание РНК-полимеразы или ее продвижение вдоль РНК.

- Регуляция с участием репрессора, подавляющего транскрипцию, называется **отрицательной регуляцией**.
- Связывание репрессора с ДНК регулируется сигнальной молекулой, **эффектором**.

- **Эффектор** – это небольшая молекула или белок, который присоединяется к репрессору и изменяет его конформацию.
- Взаимодействие репрессора с **эффектором** либо **усиливает**, либо **ослабляет** транскрипцию.

- **Положительная регуляция** - активаторы связываются с ДНК и увеличивают активность РНК-полимеразы на промоторе.
- Участки связывания активатора часто примыкают к тем промоторам, с которыми сама (без активаторов) РНК-полимераза не связывается совсем, либо очень слабо.

- Многие бактериальные мРНК **полицистронные** – содержат в одном транскрипте **несколько генов**, **единственный промотор**, инициирующий транскрипцию всего кластера.

- **Кластер генов и промотор, регуляторные последовательности называются опероном.**
- **Оперон может содержать от 2 до 6 генов, транскрибируемых как единое целое.**

Регуляция синтеза белка

- Принципы экспрессии бактериальных генов впервые были выявлены при изучении метаболизма лактозы в клетках *E.coli*, которая использует этот сахар как единственный источник углерода.
- В 1960 г. французские ученые Ф. Жакоб и Ж. Моно лауреаты Нобелевской премии опубликовали статью, где описали регуляцию экспрессии генов, участвующих в метаболизме лактозы у *E.coli*.

Регуляция синтеза белка

- **Лактозный оперон (lac)** содержит **структурные гены**, определяющие первичную структуру синтезируемых белков:
- Ген β -галактозидазы (**Z**)- расщепляет лактозу на галактозу и глюкозу.

- Ген галактозидпермеазы (Y)–переносит лактозу внутрь клетки.
- Ген тиогалактозидтрансацетилазы (A) – модифицирует токсичные галактозиды для облегчения их удаления из клетки.
- Каждому из этих трех генов предшествует участок связывания рибосомы, который направляет трансляцию этого гена независимо от остальных.

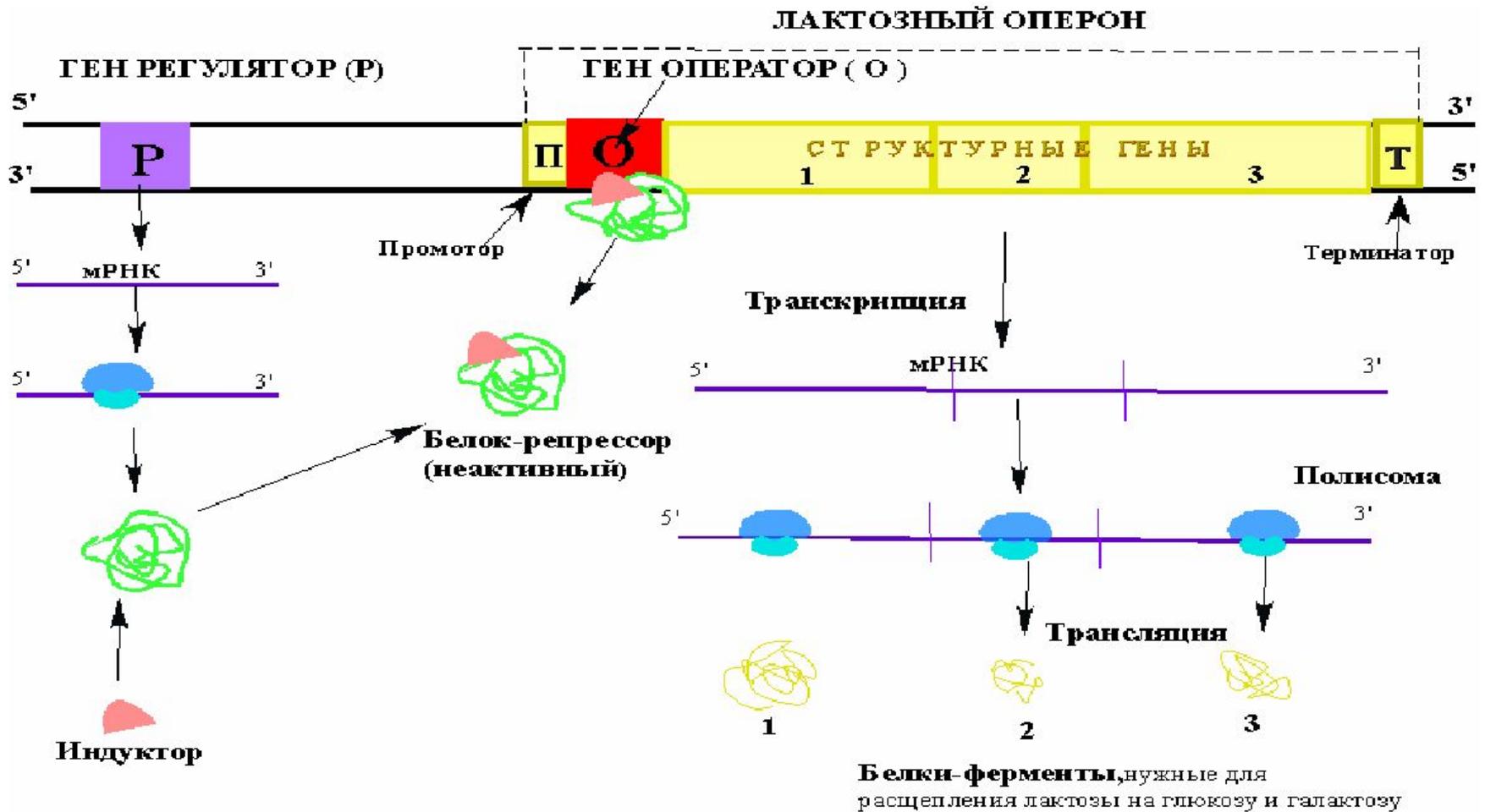
- В отсутствии лактозы транскрипция **lac-оперона** подавлена путем связывания **Lac-репрессора**.
- **Lac-репрессор** – это тетрамерный белок, который прочно связывается с **оператором**.
- **Lac-репрессор** транскрибируется со своего собственного промотора.

- Когда в клетке появляется лактоза происходит индукция **lac-оперона**.
- Молекула индуктора связывается с особым участком **lac-репрессора**, изменяя его **конформацию**.
- Это приводит к отделению репрессора от оператора.
- Транскрипция генов **lac-оперона**.

Регуляция синтеза белка

- Это типичный пример **отрицательной формы регуляции**, когда белок-репрессор связывается с геном-оператором и подавляет транскрипцию.

Регуляция экспрессии генов на уровне транскрипции. Лактозный оперон



- В присутствии глюкозы экспрессия генов, необходимых для катаболизма лактозы, арабинозы ограничивает регуляторный механизм – **катаболитная репрессия**.
- Влияние глюкозы опосредует сАМР, выступающий как коактиватор.
- сАМР-рецепторный белок (**CRP**) содержит участки связывания ДНК и сАМР.

- В отсутствии глюкозы комплекс CRP-сАМР связывается с ДНК вблизи *lac*-промотора и в 50 раз усиливает транскрипцию РНК.
- Комплекс **CRP-сАМР** - **положительный регуляторный элемент**, реагирующий на концентрацию глюкозы.

- **Лас- репрессор – отрицательный регуляторный элемент, реагирующий на лактозу.**
- **Оба элемента действуют согласованно.**

- Когда **Las- репрессор** блокирует транскрипцию, комплекс **CRP-cAMP** оказывает незначительное влияние на **Las-оперон**.
- Комплекс **CRP-cAMP** **значительно облегчает транскрипцию** **Las-оперона** при диссоциации репрессора от **Las-оператора**.

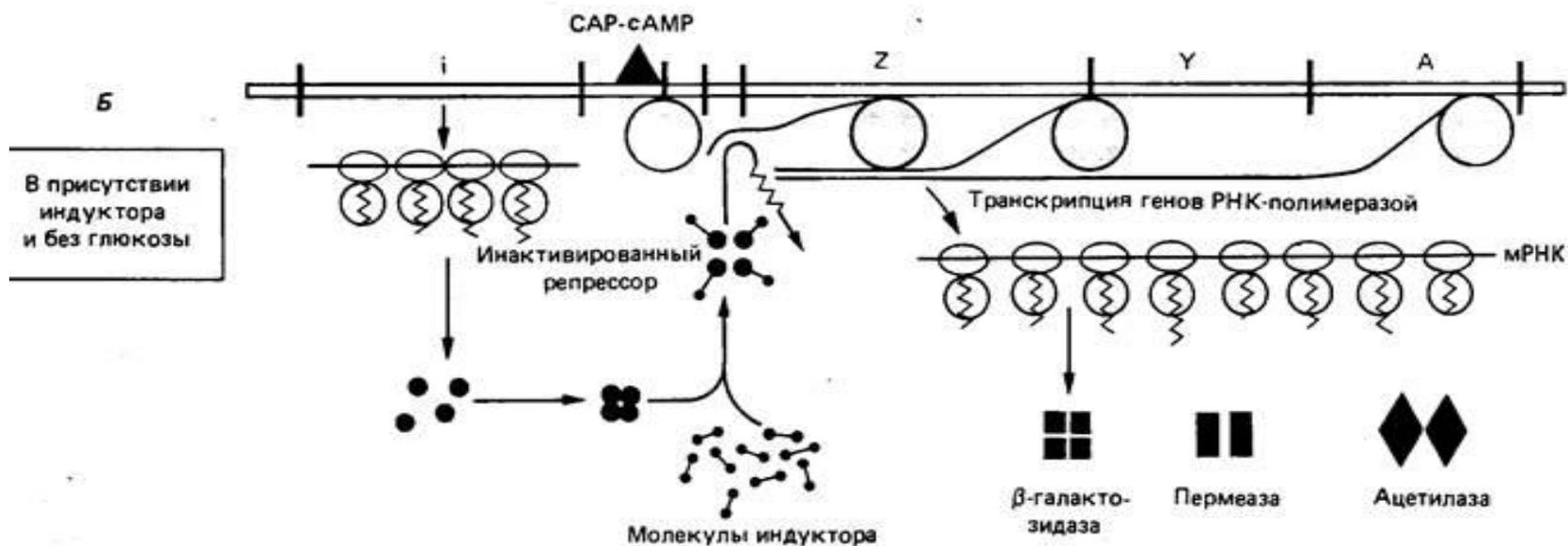
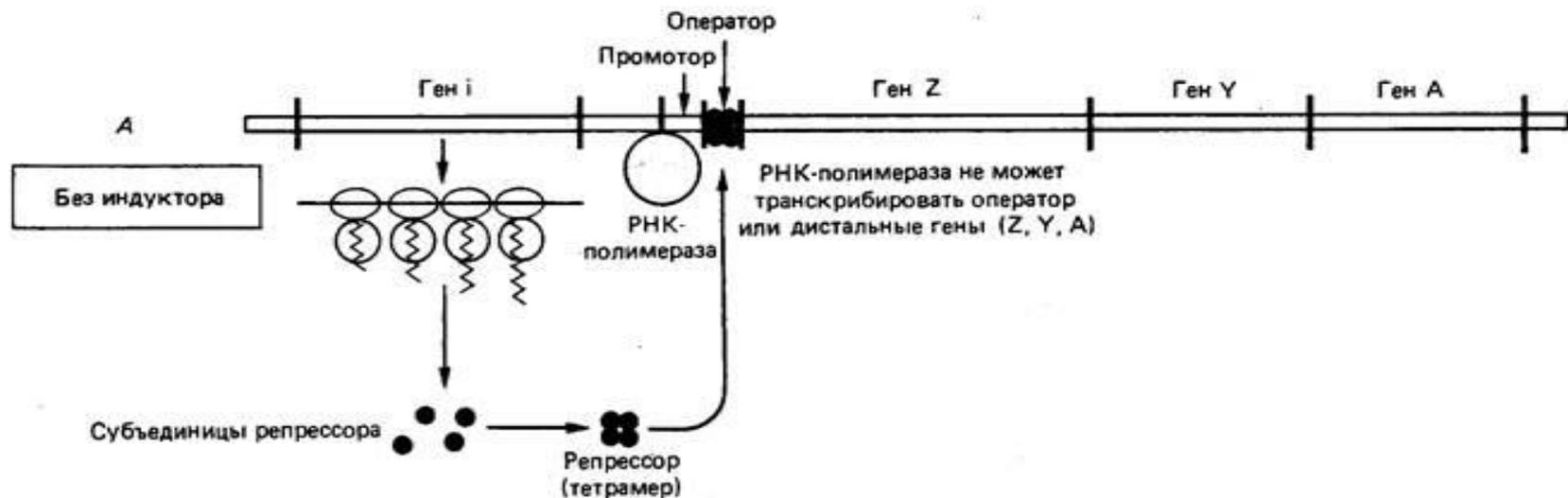
- В отсутствии комплекса **CRP-cAMP** открытый комплекс РНК-полимеразы и промотора образуется с трудом.
- Белок **CRP** взаимодействует непосредственно с α – субъединицей РНК-полимеразы.

- Действие глюкозы на CRP опосредовано cAMP.
- Наиболее активно CRP связывается с ДНК при высокой концентрации cAMP, когда концентрация глюкозы низкая.
- При высокой концентрации глюкозы синтез cAMP подавляется и стимулируется выход его из клетки.

- По мере снижения концентрации сАМР (при высокой концентрации глюкозы) ослабевают связывание CRP с ДНК, что снижает экспрессию **Lac – оперона.**



- Для сильной индукции *lac*- оперона необходимо присутствие и лактозы (для инактивации *lac*-репрессора), и глюкозы в низкой концентрации, что повышает концентрацию сАМР и его связывание с CRP –белком.

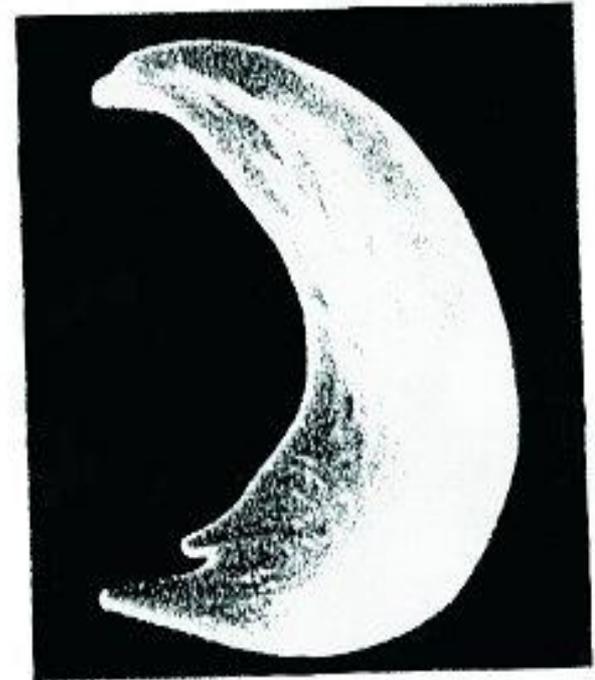
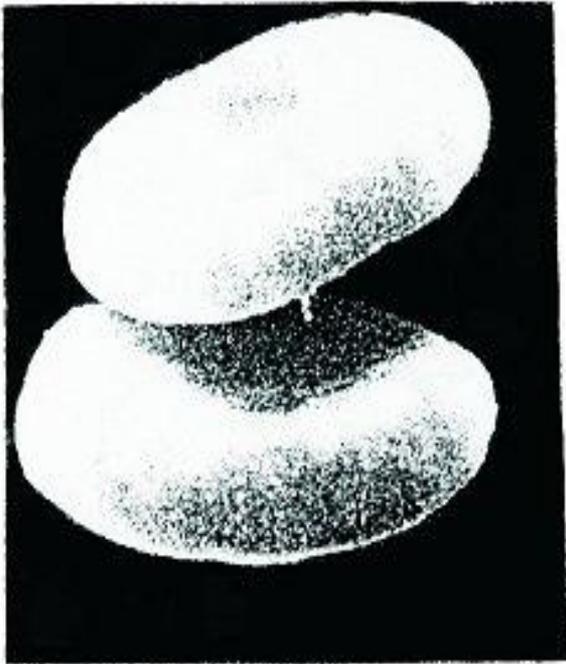
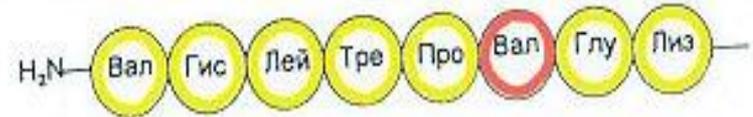
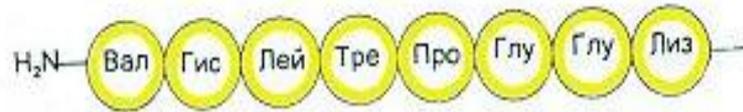


- Так как большинство генов прокариот находятся во «включенном» состоянии, то регуляторные воздействия направлены на их «выключение».
- Для каждого набора генов имеется свой специфический репрессор.

Молекулярные болезни

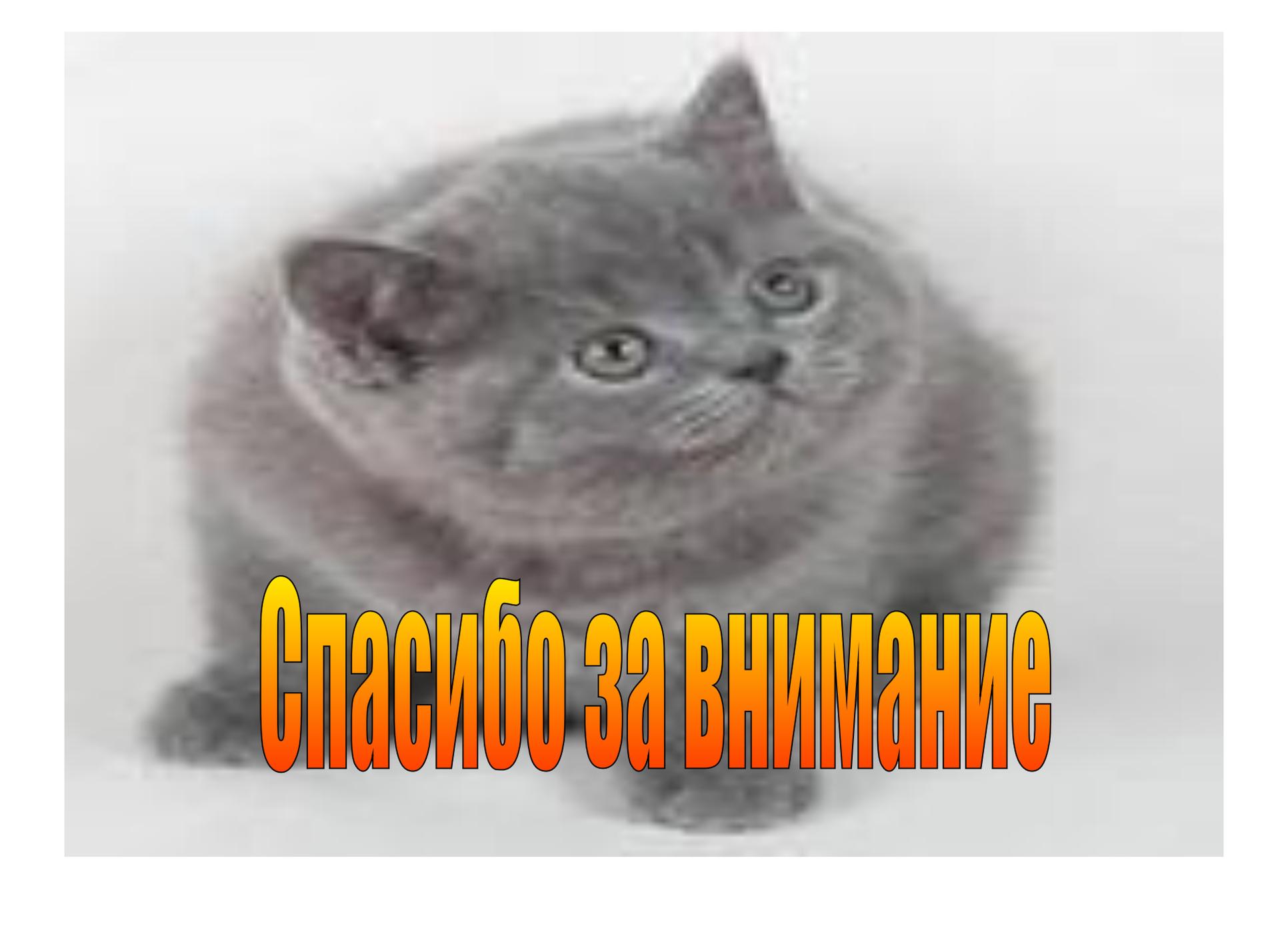
- Серповидно-клеточная анемия
- Замена в 6-ом положении β - цепи **ГЛУ** на **ВАЛ**, что приводит к изменению свойств гемоглобина, форма эритроцита меняется (серп)

Серповидно-клеточная анемия



Молекулярные болезни

- Талассемии – нарушения синтеза цепей Hb.
- Нарушен процессинг РНК.

A close-up photograph of a fluffy grey kitten. The kitten is looking towards the left of the frame with large, light-colored eyes. Its fur is thick and soft-looking. The background is a plain, light grey color.

Спасибо за внимание