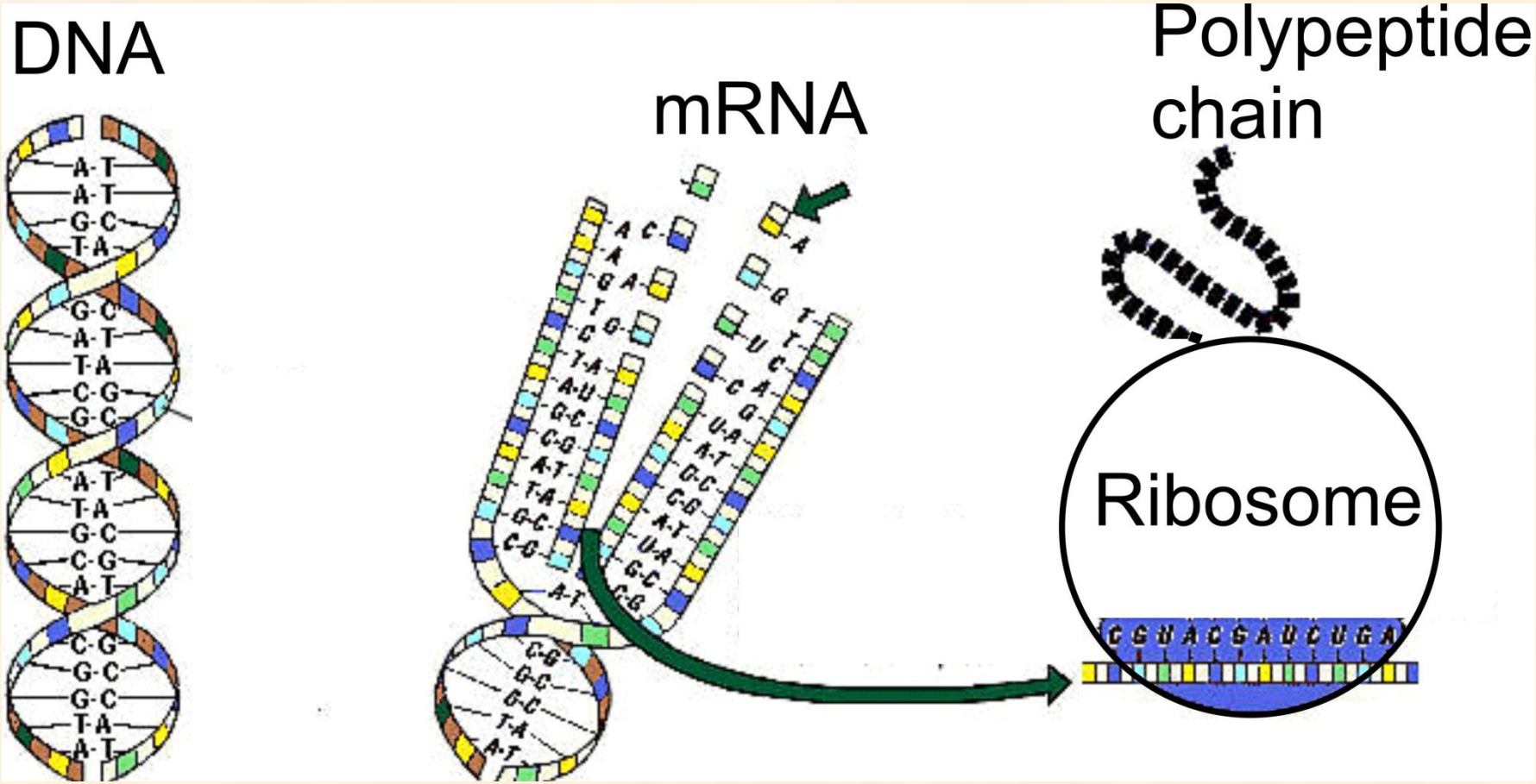
Грайфер Дмитрий Маратович
д.х.н., в.н.с. Лаборатории
структуры и функции рибосом

БИОСИНТЕЗ БЕЛКА

Реализация генетической информации



Генетический код

Генетическая информация – сумма признаков.

В основе - информация о строении (аа-последовательности) белков.

Язык, которым записана эта информация - генетический код. Записана она в ДНК 4-х-буквенным кодом.

Генетический код – это запись только о последовательности аминокислот в белках.

Кроме этого, в ДНК записана информация о последовательностях тРНК, рРНК и др., а также сигналы начала транскрипции, репликации и модификаций – это другой язык, не ген. код.

История

Уотсон-Крик 1953 – двойная спираль ДНК

1954 – Георгий Гамов. Предложил в качестве механизма кодирования установление соответствия между боковыми цепями аминокислот и ромбовидными «дырами», образованными четырьмя нуклеотидами ДНК. Исходя из своей модели, Гамов предположил, что код может быть триплетным. Гамов был первым, кто представил проблему кодирования не как биохимическую, а просто как задачу перевода из четырёхзначной системы в двадцатизначную.

к 1965 году был установлен смысл всех 64 триплетов.

Свойства генетического кода:

1)**Триплетность** (почему именно – объяснить).

2) **Однозначность** (исключения – fMet/Met – AUG, Sec – UGA/stop, Pyr – UAG/stop). Для исключений - сигналы в РНК – как читать «спорный» кодон.

3) **вырожденность** (избыточность – 1 АК кодируется несколькими триплетами). Следствие - помехоустойчивость.

4) **Помехоустойчивость**. Консервативные и радикальные замены аминокислот.

Всего возможно замен 61 x 9 = 549.

Из них из-за вырожденности 134 не меняют АК, 230 – не меняют класс АК, 162 – радикальные.

5) Компактность – отсутствие знаков препинания внутри генов, знаки препинания только между генами – 3 стоп-кодона (UAA, UAG, UGA) и один старт (AUG) – только между генами.

6) **универсальность** (у всех живых организмов одинаковые АК кодируются одинаковыми кодонами) **не митохондрии**

7) специфичность (1 кодон кодирует только 1 АК)

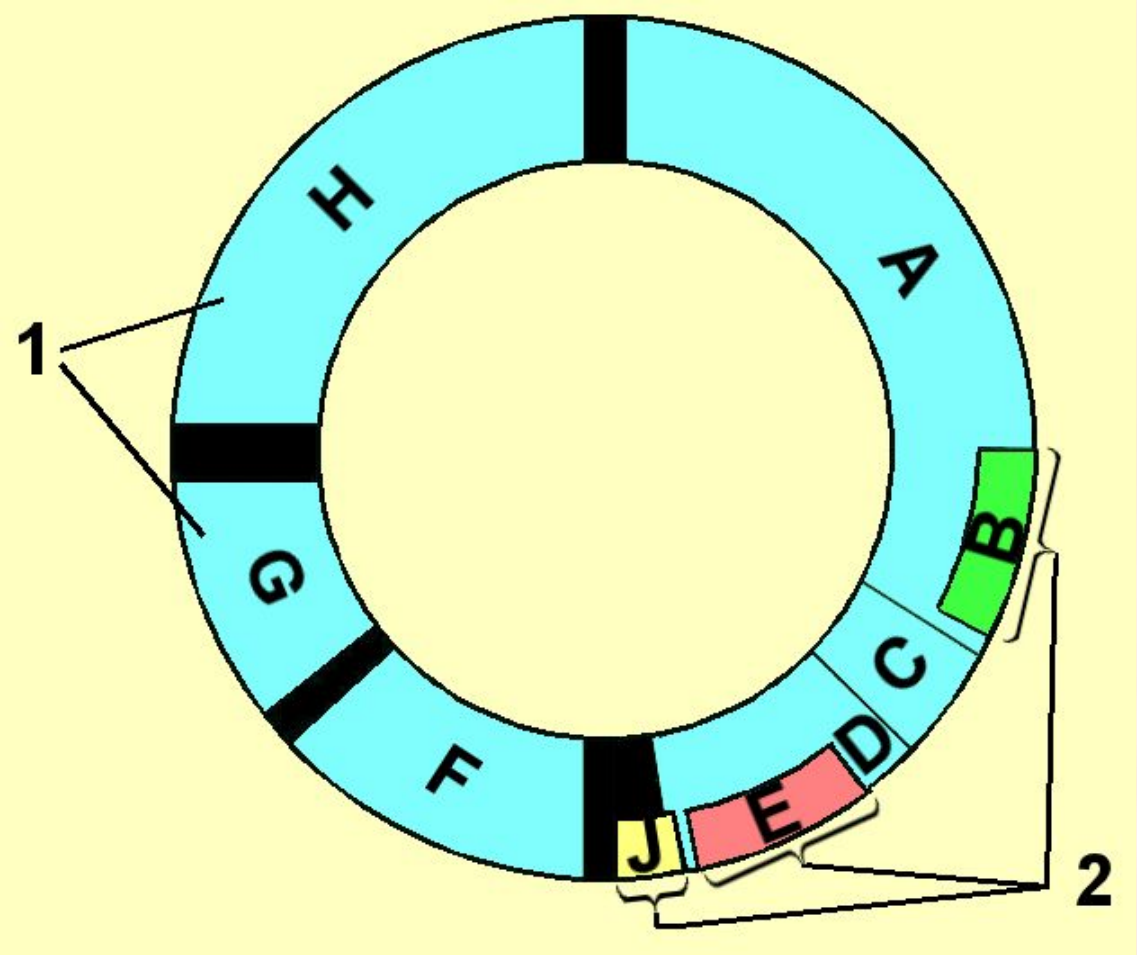
8) **однонаправленность** (от 5’ к 3’ концу)

9) **неперекрываемость** (один нуклеотид входит в состав только одного кодона).

Рамки считывания

Одна и та же нуклеотидная последовательность может кодировать совершенно различные последовательности аминокислот. Мутации со сдвигом рамки и без.

Пример – в 1974 г. была секвенирована ДНК фага φX174.



Перекрывание генов в геноме фага φX174:

1 – неперекрывающиеся гены;

2 – перекрывание генов

Первая буква в кодоне	Вторая буква в кодоне				Третья буква в кодоне
	У	Ц	А	Г	
У	Фен	Сер	Тир	Цис	У
	Фен	Сер	Тир	Цис	Ц
	Лей	Сер	Стоп	Стоп	А
	Лей	Сер	Стоп	Трп	Г
Ц	Лей	Про	Гис	Арг	У
	Лей	Про	Гис	Арг	Ц
	Лей	Про	Глн	Арг	А
	Лей	Про	Глн	Арг	Г
А	Иле	Тре	Асн	Сер	У
	Иле	Тре	Асн	Сер	Ц
	Иле	Тре	Лиз	Арг	А
	Мет (старт)	Тре	Лиз	Арг	Г
Г	Вал	Ала	Асп	Гли	У
	Вал	Ала	Асп	Гли	Ц
	Вал	Ала	Глу	Гли	А
	Вал	Ала	Глу	Гли	Г

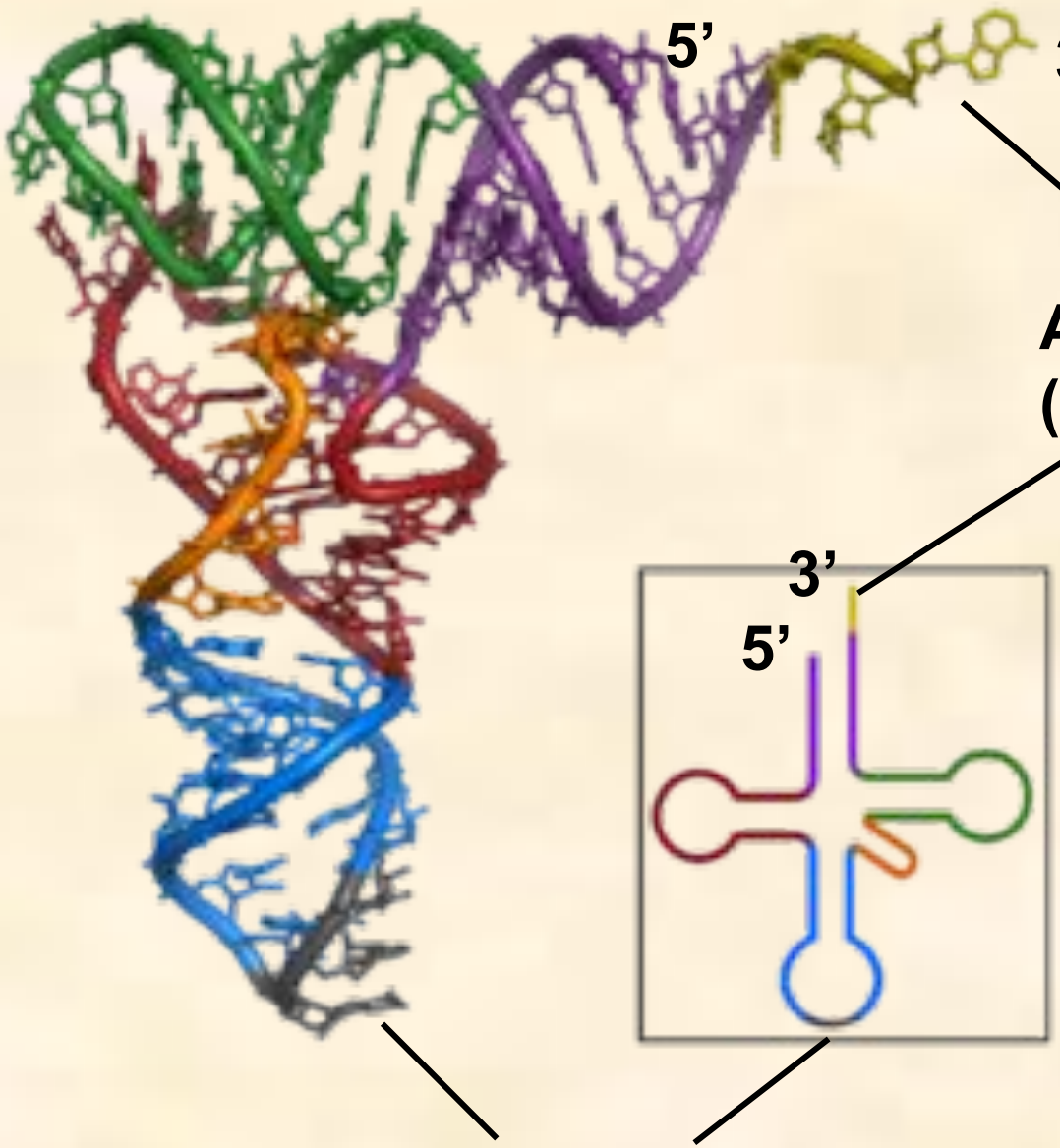
Что содержится в ДНК

Длина ДНК человека ок. 3.2 х 109 пар нуклеотидов.

В ней ок. 25 000 генов, они содержат ок. 10 млн. кодонов.

На долю последовательностей нуклеотидов, кодирующих белки, у человека приходится не более 1,5 % ДНК.

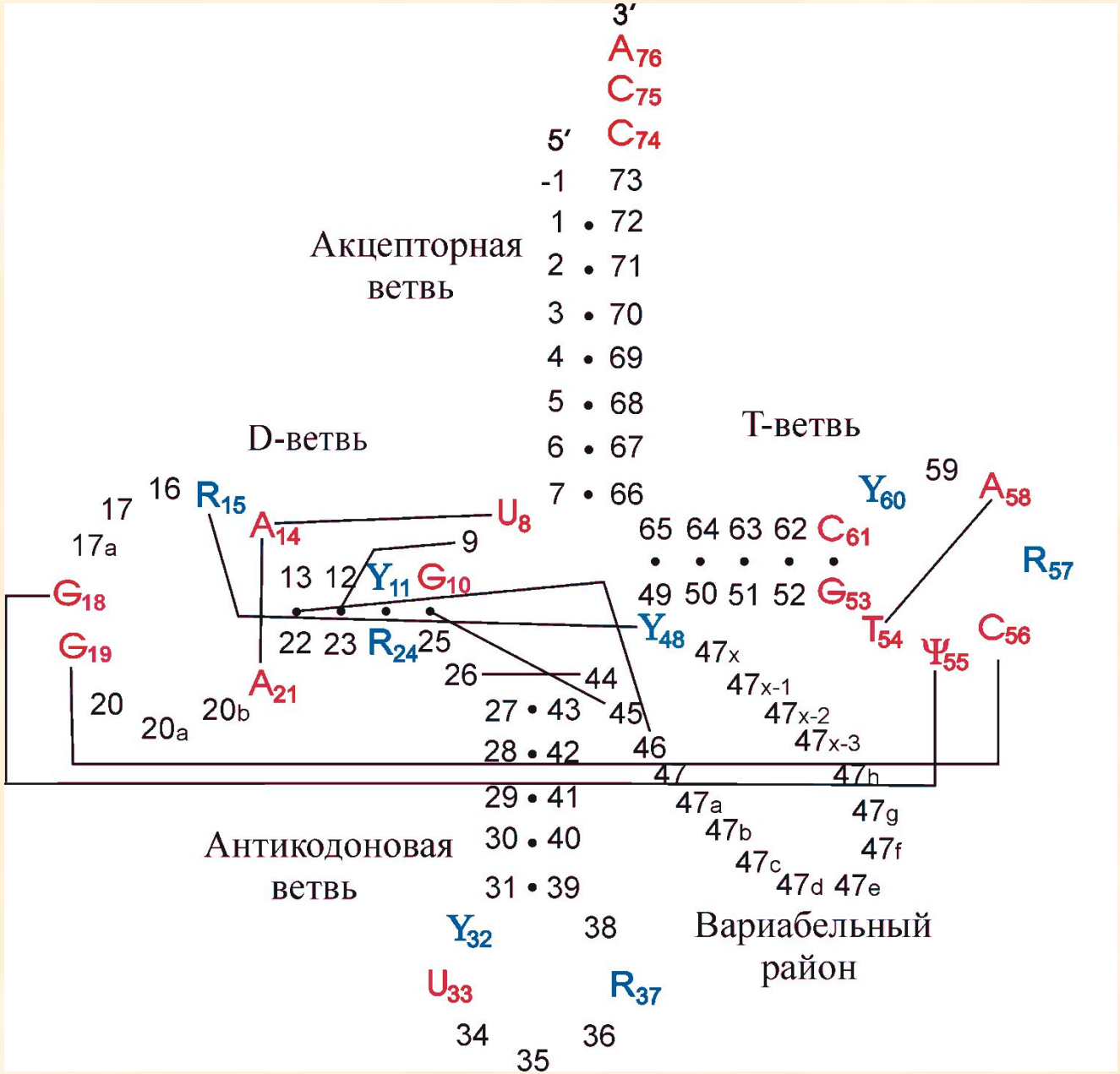
Строение тРНК



Акцепторый (ССА)-конец

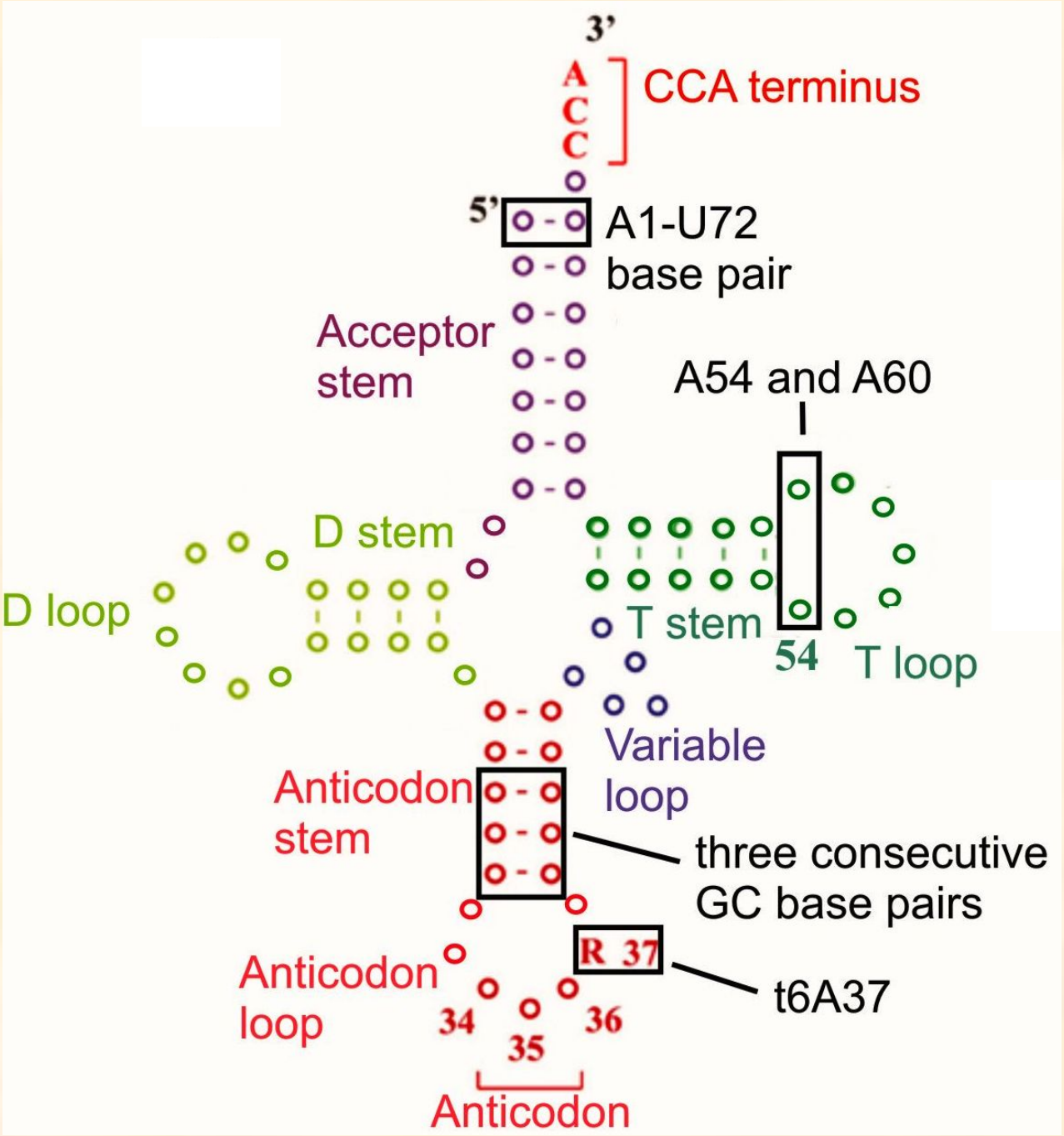
антикодон

Пространственная структура тРНК впервые установлена с помощью РСА для дрожжевой тРНКPhe в 1974–1976 гг. независимо тремя лабораториями.



Вторичная структура тРНК. Консервативные (красного цвета) и полуконсервативные нуклеотиды (синего цвета; R – пурин, Y – пиримидин). Точки и линии соединяют основания, образующие пары во вторичной и третичной структуре соответственно.

Длина тРНК - от 72 до 95 нуклеотидов из-за различий в размерах D-петли и V-ветви



Структурные элементы, отличающие инициаторную тРНК от элонгаторных.

Особенностью тРНК является присутствие минорных нуклеозидов.

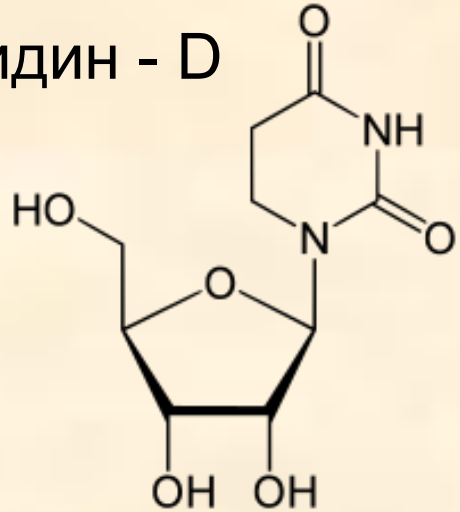
Структура митохондриальных тРНК млекопитающих сильно отличается от канонической из-за необычных размеров D- и T-ветвей

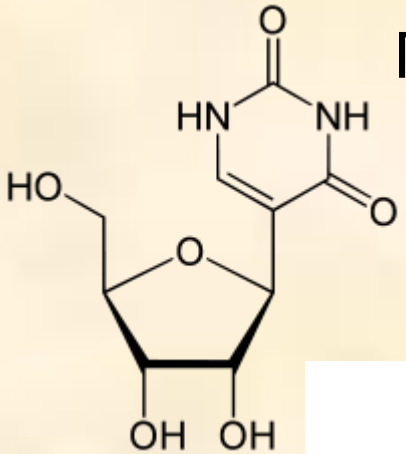
Трехмерная структура стабилизирована девятью парами оснований которые, за исключением пары G19-C56, не относятся к каноническим (уотсон-криковским).

Типы минорных нуклеозидов.

1. Стандартные – встречаются почти во всех тРНК

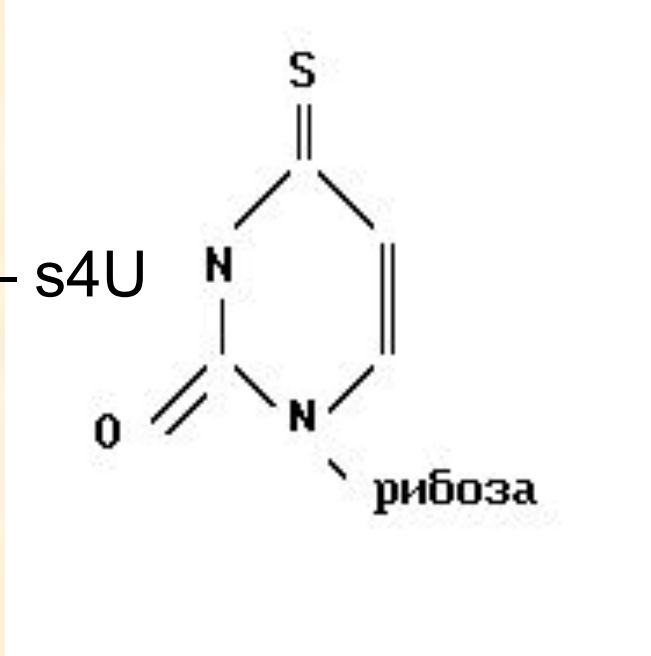
Дигидроуридин - D





Псевдоуридин - ψ

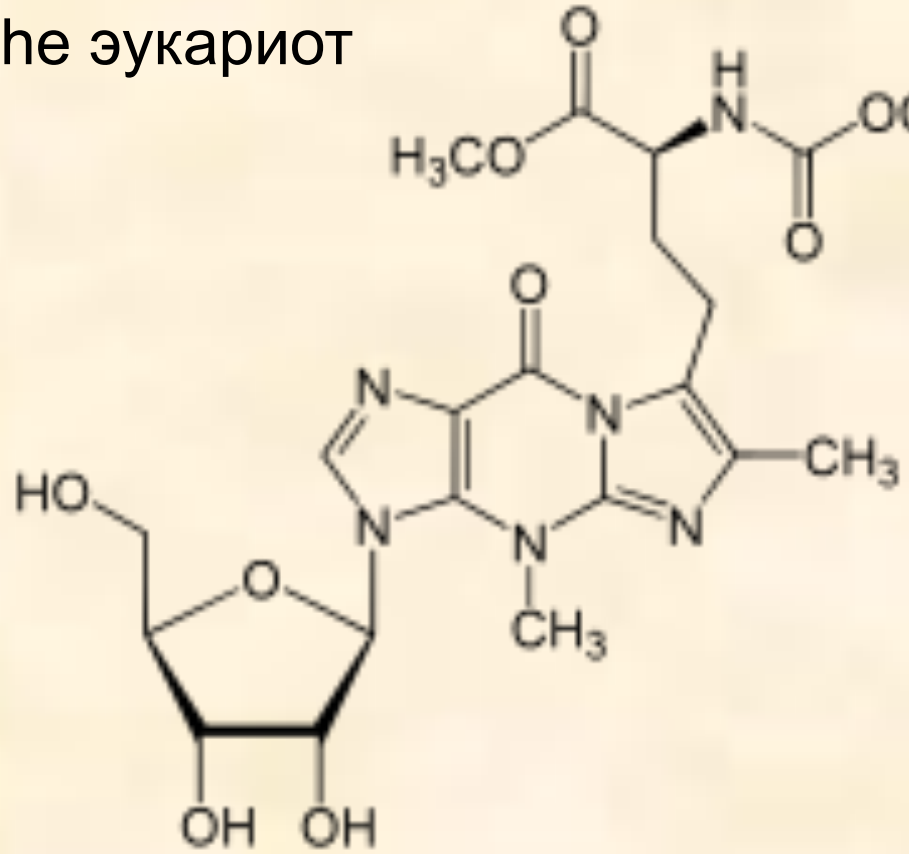
Тиоуридин – s4U



Риботимидин - T

2. Метилированные основания – встречаются почти во всех тРНК.

3. Гипермодифицированные основания (обычно с 3’-стороны от антикодона). Пример – вайбутозин у тРНК-Phe эукариот



Роль минорных нуклеотидов в поддержании третичной структуры тРНК.

Рекогниция

Присоединение аминокислотного остатка к тРНК

Аминоацил-тРНК-синтетазы

Изоакцепторные тРНК

Общая схема аминоацилирования

На первой стадии аминокислота (аа) активируется ATP с образованием связанного ферментом смешанного ангидрида – аминоациладенилата (аа-AMP) – и освобождением пирофосфата (PPi); на второй стадии ами-ноацильный остаток переносится на 3'-концевую рибозу соответствующей тРНК

(1) aaRS + aa + ATP → aaRS•aa-AMP + PP_i.

(2) aaRS•aa-AMP + тРНК → aa-тРНК + AMP + aaRS

В клетке существует 20 ферментов, специфичных к стандартным аминокислотам

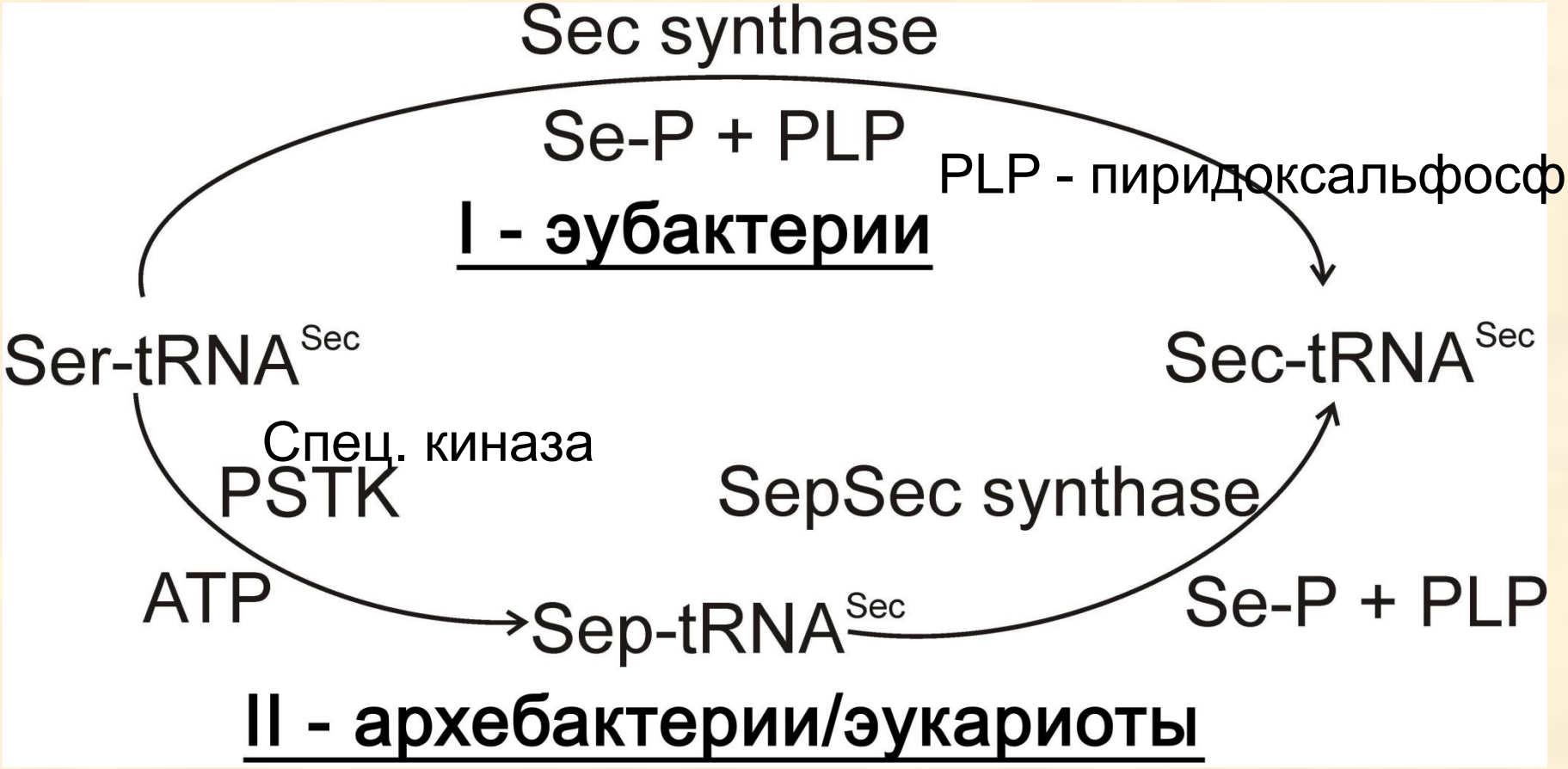
Нестандартные ситуации

1. Во многих бактериях и органеллах эукариот отсутствуют GlnRS и AsnRS, а в ряде архебактерий – CysRS. В этих случаях Gln-тРНКGln и Asn-тРНКAsn синтезируются с участием так называемых «недискриминирующих» RS и амидотрансфераз (Glu-AdT и Asp-AdT)

(1) ND_GluRS + Glu + ATP + тРНК^{Gln} → Glu-тРНК^{Gln}.

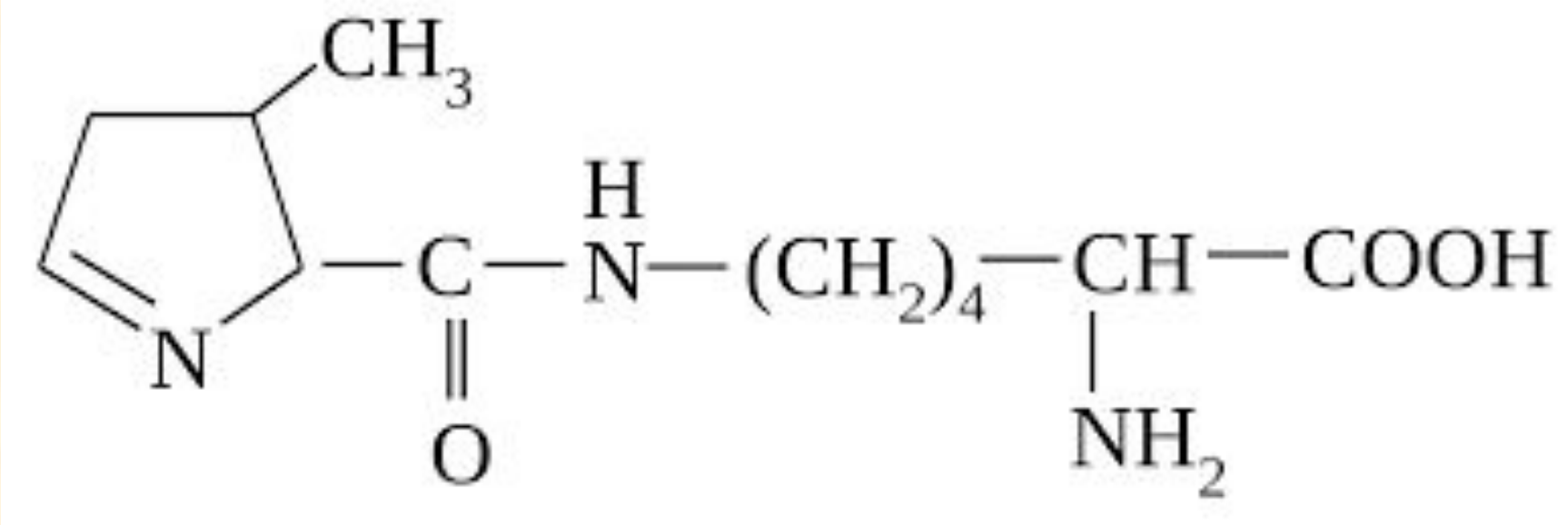
(2) Glu-тРНК^{Gln} + Glu-AdT + Gln + ATP → Gln-тРНК^{Gln} + Glu

2. Синтез 21-й аминокислоты селеноцистеина (Sec).



В обоих случаях донором селена является селенофосфат (Se-P), синтезируемый в клетке специальным ферментом из селенида водорода

3. Другая нестандартная аминокислота, кодируемая генами некоторых метаногенных архебактерий, – производное лизина пирролизин (Pyl) – включается специфически в «свою» тРНКPyl соответствующим ферментом пирролизил-тРНК-синтетазой (PylRS) по обычному двухступенчатому механизму.



АРСазы

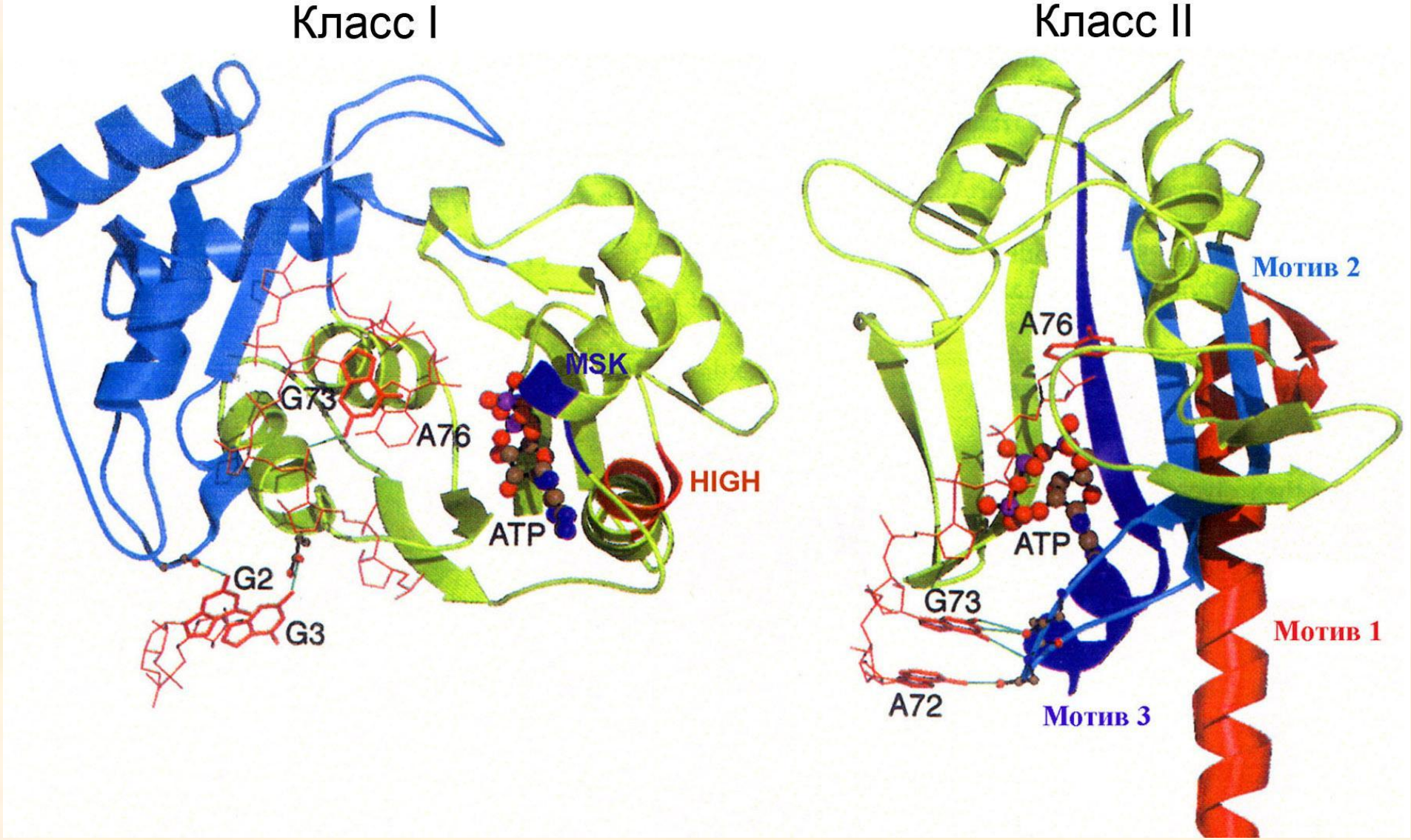
Класс I	Класс II
Подкласс Ia ArgRS (α), CysRS (α), IleRS (α), LeuRS (α, αβ), ValRS (α), MetRS (α, α_2),	*Подкласс IIa* GlyRS (α_2), HisRS (α_2), ProRS (α_2), ThrRS (α_2), SerRS (α_2)
Подкласс Ib GlnRS (α), GluRS (α), LysRS1 (α)	*Подкласс IIb* AsnRS (α_2), AspRS (α_2), LysRS2 (α_2)
Подкласс Ic TrpRS (α_2), TyrRS (α_2)	*Подкласс IIc* AlaRS (α_4), GlyRS [$(\alpha\beta)_2$], PheRS [$(\alpha\beta)_2$], PylRS (α_2), SepRS (α_4)

Мол. массы - в диапазоне 37–250 кДа, четвертичная структура - от мономеров до гомо- и гетеротетрамеров

Ферменты разных классов отличаются устройством активного центра и способами связывания акцепторной ветви тРНК.

Все ферменты класса I используют 3'-концевую 2'-OH-группу тРНК в качестве акцептора аминокислоты, а ферменты класса II (за исключением PheRS) − 3'-OH-группу

Структура активных центров аминоацил-тРНК-синтетаз, принадлежащих классу I (GlnRS) и классу II (AspRS). Характерные структурные мотивы выделены разным цветом



Для большинства синтетаз (за исключением 4-х ферментов класса I – ArgRS, GlnRS, GluRS и LysRS1) взаимодействие с аминокислотой и ATP и синтез аминоациладенилата не требуют присутствия тРНК

Что является причиной деления синтетаз на два структурно не связанных класса? Согласно одной гипотезе, два класса могут быть кодированы комплементарными цепями ДНК. Согласно другой гипотезе, два класса возникли независимо. На глубокую эволюционную связь между аминоацилированием тРНК и биосинтезом аминокислот указывает структурное сходство между каталитическими доменами аминоацил-тРНК-синтетаз и ферментов, вовлеченных в биосинтез аминокислот.

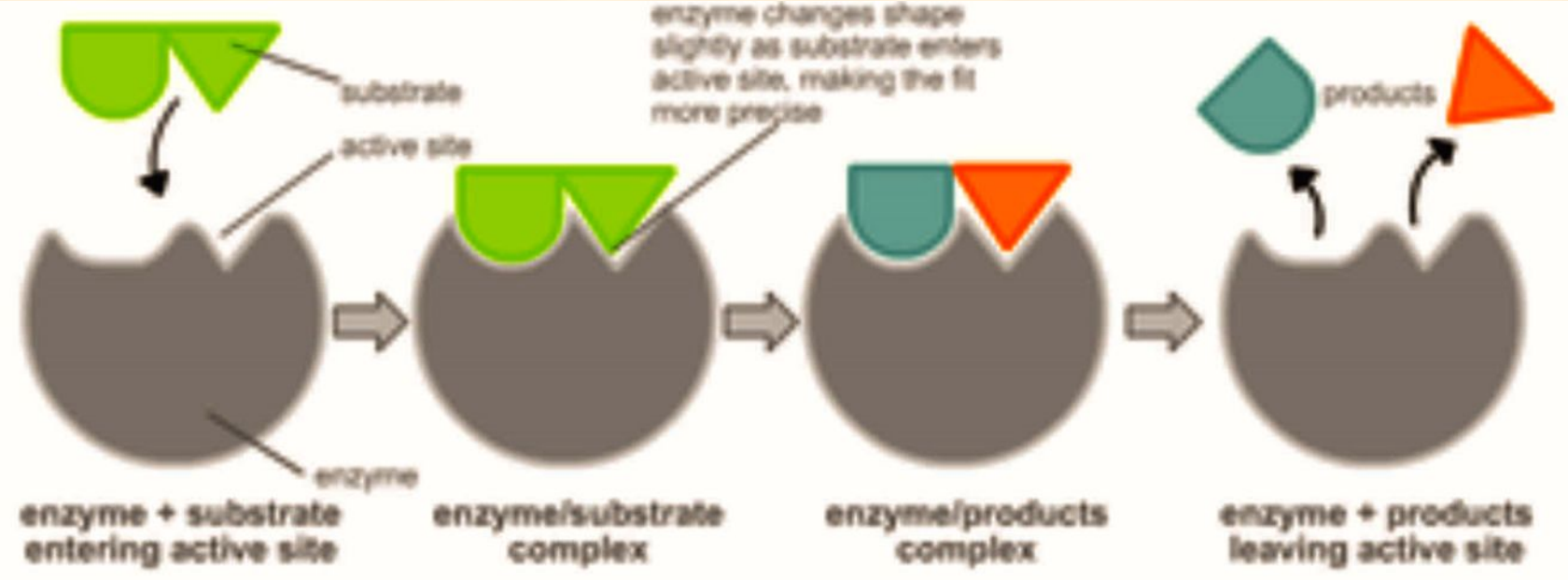
Узнавание тРНК АРСазами

Методы исследования - генетические in vivo и кинетических экспериментов in vitro с мутантными тРНК.

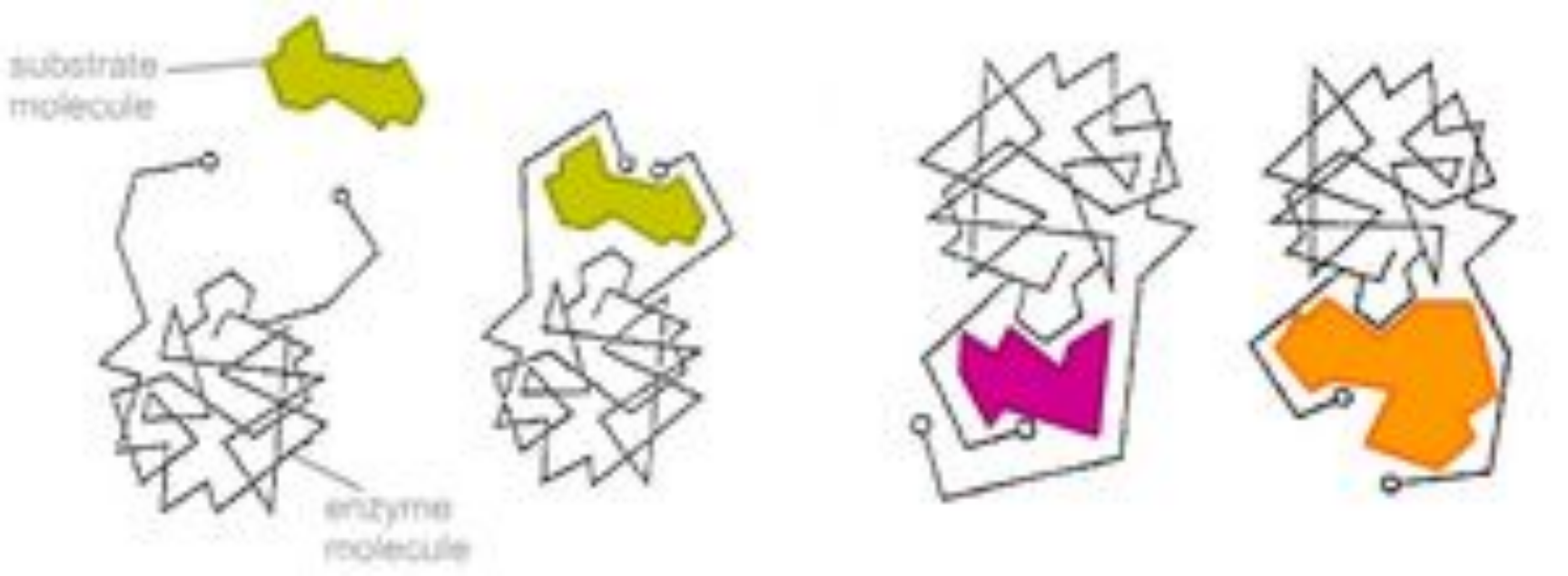
Ищут детерминанты идентичности (специфичности) - нуклеотиды тРНК, замена которых приводит к потере специфичности или эффективности аминоацилирования.

in vivo используют мутантные гены супрессорной тРНК, полученной введением стоп-антикодона (CUA или UCA) в тестируемую тРНК. Мутантные гены клонируются в экспрессирующие векторы, и исследуется способность супрессорных тРНК подавлять стоп-кодон в гене репортерного белка, экспрессируемого в E. coli. Специфичность мутантных форм тРНК определяется путем анализа аминокислот, встроенных в транслируемый белок.

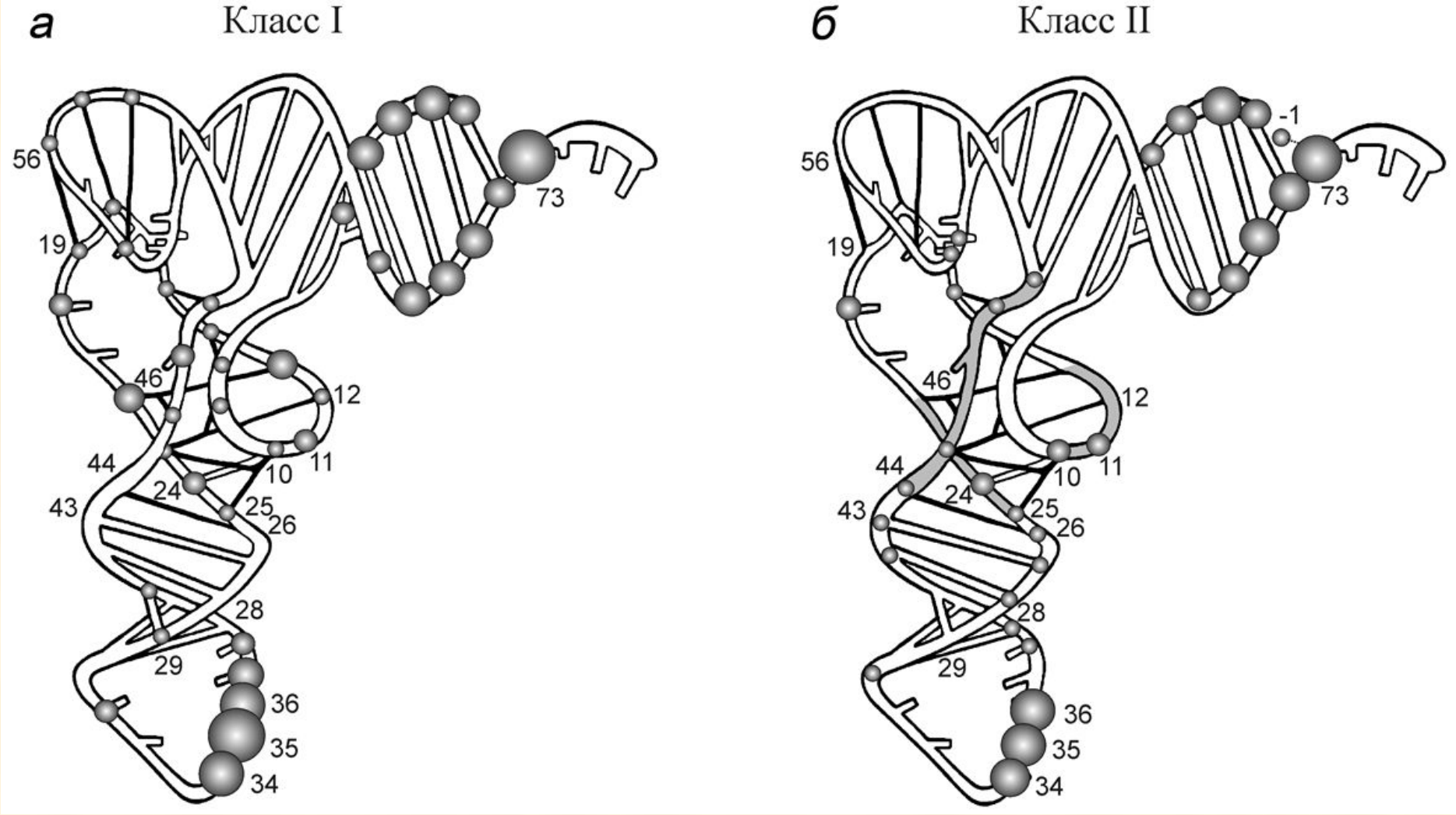
Узнавание боковых групп аминокислот обеспечивается изначальной комплементарностью многих ферментов субстрату по известной модели «замка и ключа».



Селективность отбора аминокислот некоторыми ферментами (CysRS, MetRS, HisRS и ProRS), обеспечивается индуцированным соответствием («рука-перчатка»): связывание специфичной аминокислоты вызывает конформационные изменения, в результате которых полностью формируется участок связывания боковой группы субстрата



Установлены элементы узнавания тРНК для всех 20-ти синтетаз из E. coli, а также некоторых АРС ряда других бактерий, дрожжей, человека и пр. Оказалось, что небольшое число нуклеотидов в тРНК является критическим для специфичности аминоацилирования, и этот набор строго индивидуален для каждой пары aaRS-тРНК.



Распределение элементов узнавания тРНК E. coli аминоацил-тРНК-синтетазами класса I (а) и класса II (б) Выделенная серым цветом вариабельная ветвь узнается как структурная особенность тРНКTyr и тРНКSer

Антикодон не важен для узнавания тРНК E. coli, специфичных к Leu, Ser и Ala.

Это неудивительно в случае тРНКSer, существующей в форме шести изоакцепторов, в которых все три нуклеотида антикодона варьируют.

Минорные компоненты природных тРНК редко выступают в роли элементов идентичности.

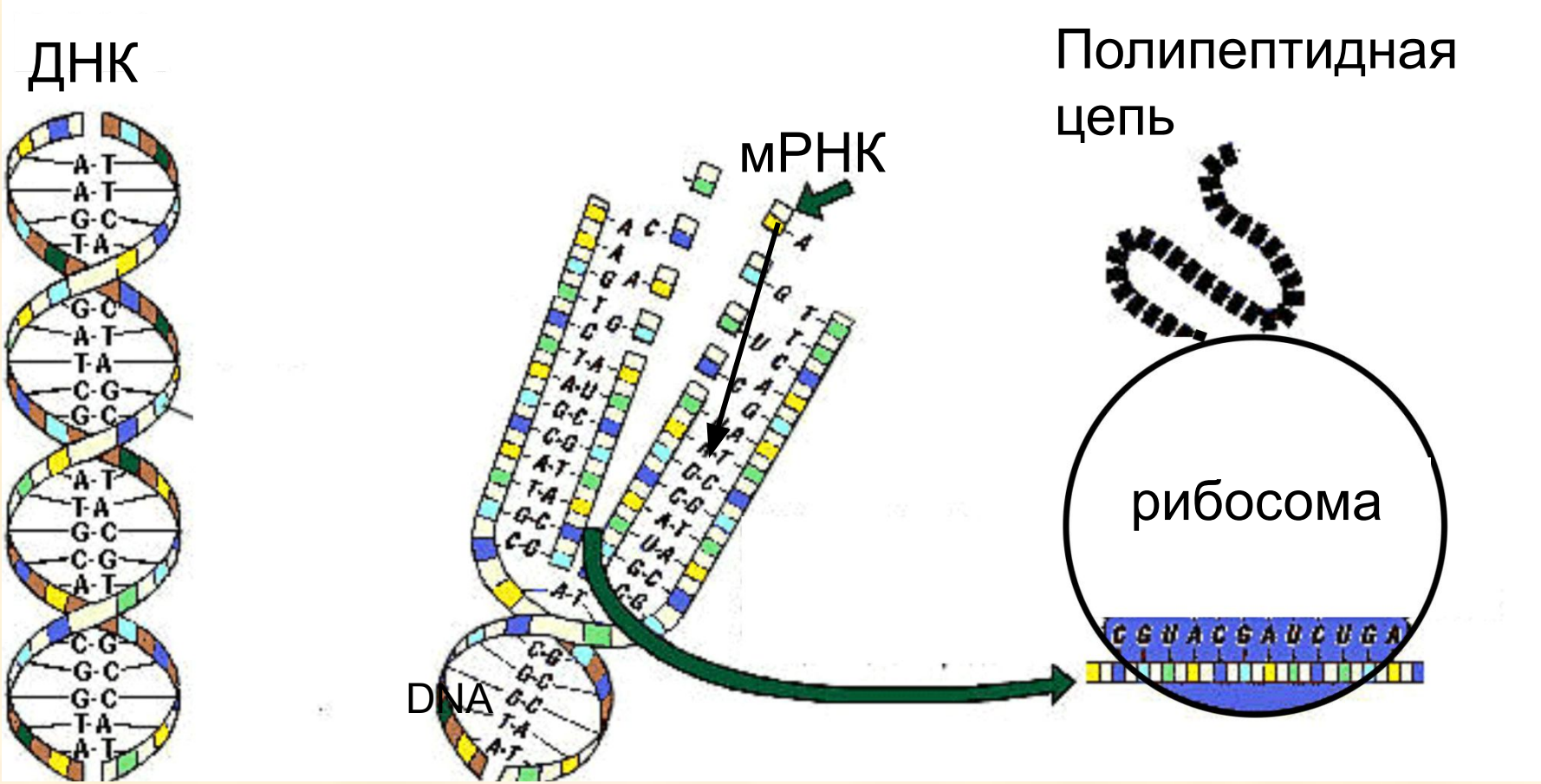
В некоторых тРНК модификации оснований предотвращают взаимодействие с неспецифичными aaRSs – «антидетерминанты»

Примеры антидетерминант узнавания в парах тРНК-aaRS

Антидетерминанта	тРНК (организм)/класс	AaRS (организм)/класс
G3-U70	тРНК^{Ala} (дрожжи)/II	ThrRS (дрожжи)/II
U34	тРНК^{Ile} (дрожжи)/I	MetRS (дрожжи)/I
L34	тРНК^{Ile} (*E. coli*)/I	MetRS (*E. coli*)//I
U30-G40	тРНК^{Ile} (дрожжи)/I	GlnRS (дрожжи)/I; LysRS (дрожжи)/II
A36	тРНК^{Arg} (*E. coli*)/I	TrpRS (*E. coli*)/I
C6-G67	тРНК$_2^{Arg}$ (дрожжи)/I	AspRS (дрожжи)/II
m^1G37	тРНК^{Asp} (дрожжи)/II	ArgRS (дрожжи)/I
G37	тРНК^{Ser} (дрожжи)/II	LeuRS (дрожжи)/I
A73	тРНК^{Leu} (человек)/I	SerRS (дрожжи)/II
U28-A42 и A37	тРНК^{Trp} (дрожжи) ^{г}/I	TrpRS (млекопитающие)/I

Рибосома - **сложнейшая молекулярная машина клетки, ее функция состоит в том, чтобы переводить (транслировать) генетическую информацию, скопированную с ДНК в качестве матричной РНК, в полипептидные цепи белков.**

Эта функция одинакова во всех организмах от бактерий до человека.



мРНК

Общие черты строения: односпиральность, направление чтения и написания 5’-3’, НТП, старт-кодон, кодирующая последовательность, стоп-кодон, 3’-НТП

мРНК прокариот - полицистронные, схема цистрона:

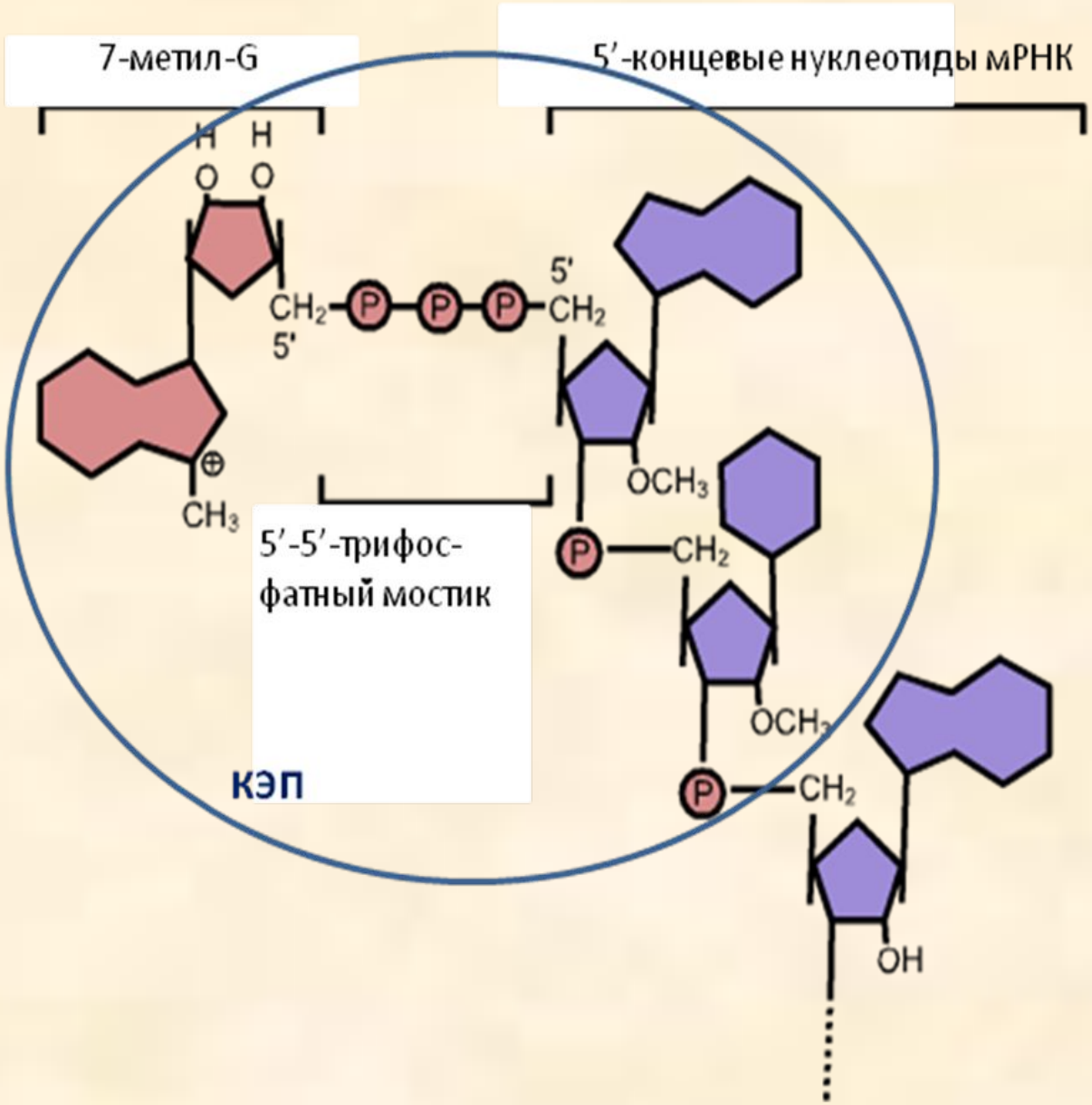
ШД-послед-ти расположены за 3-10 нт перед стар-кодоном. Они богаты пуринами и частично комплементарны пиримидин-богатым 3'-концевым послед-тям рРНК малых субчастиц

Полицистронными являются также геномные РНК некоторых вирусов (например, вируса гепатита С.

Особенности мРНК эукариот :

1. Одноцистронные
2. Нет ШД-послед-тей.
3. Кэп на 5’-конце.
4. Поли(А) – послед-ть на 3’-конце.

Структура кэпа



тРНК – сходство у всех организмов

Инициаторные тРНК аминоацилируются только остатками Met и «работают» только на стадии инициации: остатки Met для встраивания в синтезируемую полипептидную цепь (кроме самого первого) переносит «обычная» метиониновая тРНК. Их структура имеет **характерные черты** – 3 GC пары в АКД-стебле и лишняя пара в АКЦ стебле.

Отличительная особенность *прокариотической* инициаторной тРНК состоит в том, что она формилируется по N-концевой аминогруппе остатка Met специальными ферментами.

Факторы трансляции - одно- или многосубъединичные белки, подразделяющиеся на

факторы инициации (IF),

факторы элонгации (EF)

и факторы терминации (RF от англ. releasing factor – «фактор освобождения синтезированного полипептида из рибосомы»).

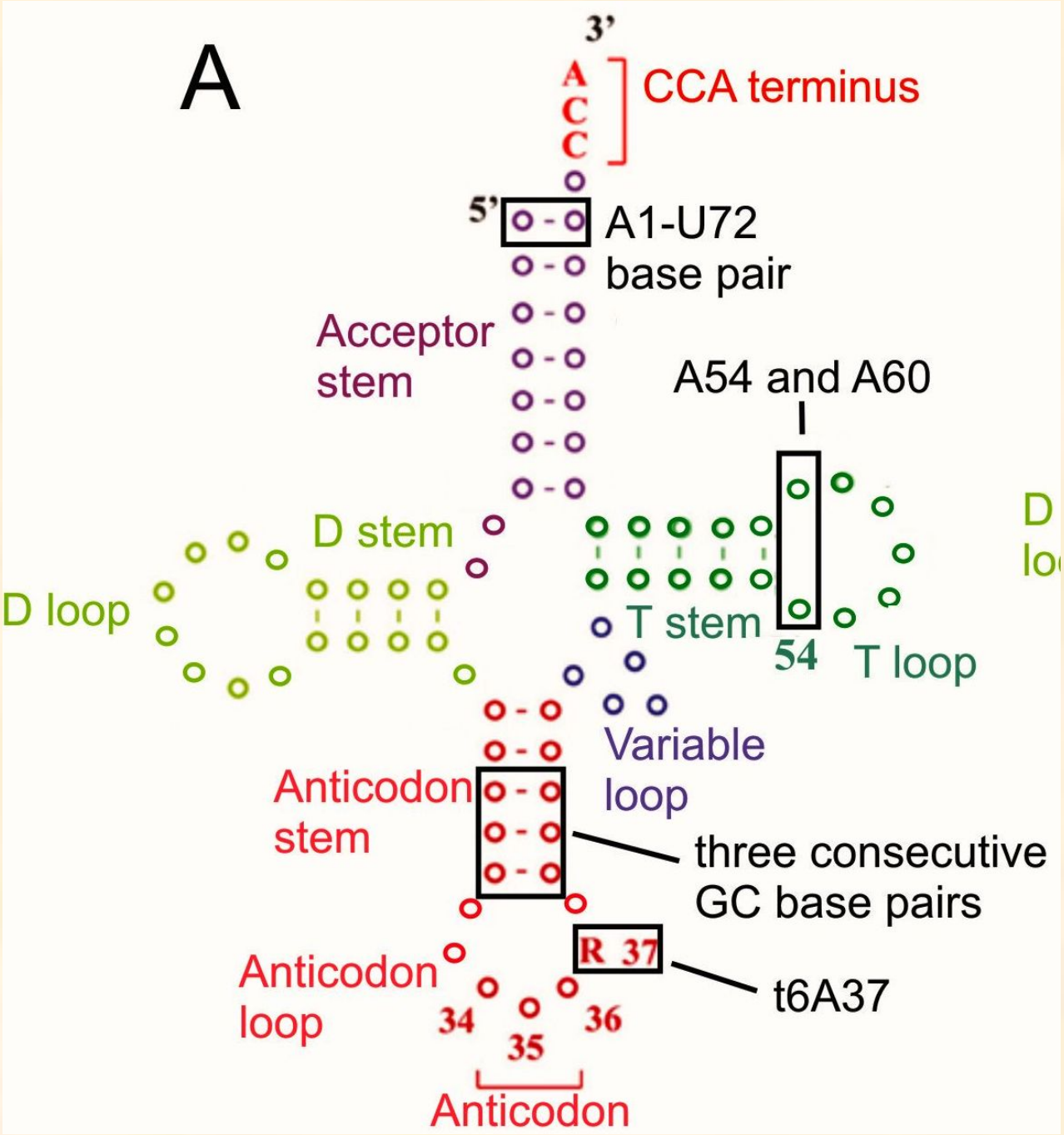
Внутри групп каждый фактор дополнительно обозначается цифрами или буквами, следующими после сокращения IF, EF или RF.

Перед названиями соответствующих факторов эукариот ставят букву «e» (eukaryotic), например, eIF2.

Инициация – процесс, приводящий к образованию комплекса, в котором старт-кодон AUG находится в пептидильном (P) – участке рибосомы.

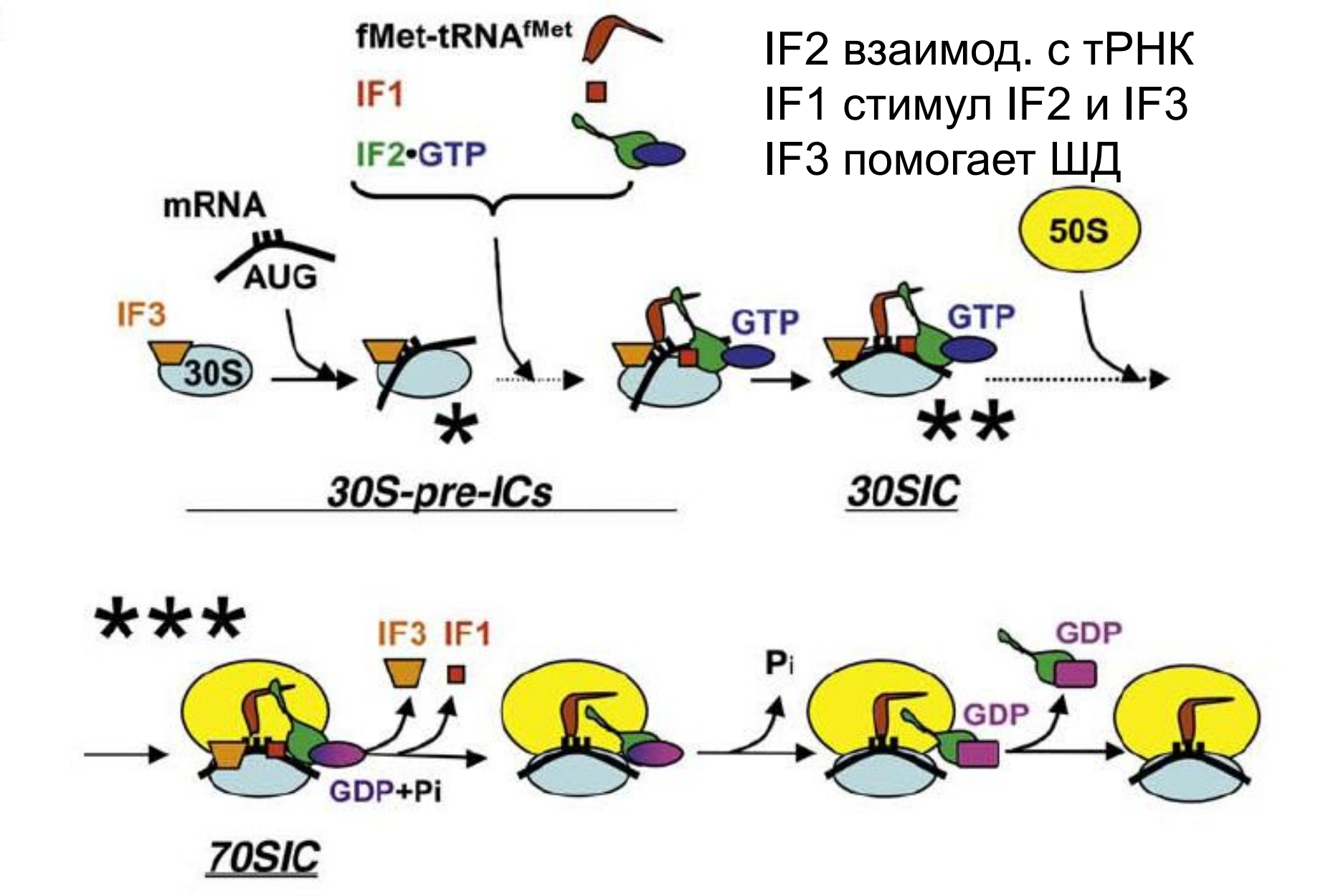
Принципиальные отличия инициации на рибосомах эукариот.

1. Инициаторная метиониновая тРНК НЕ формилирована.
2. Отличия в устройстве мРНК – кэп на 5’-конце, наличие поли(А)-хвоста на 3’-хвосте, отсутствие последовательностей Шайна – Далгарно.
3. Значительно усложненный механизм инициации с участием намного большего числа факторов.
4. Зачем нужен настолько усложненный путь инициации у эукариот?



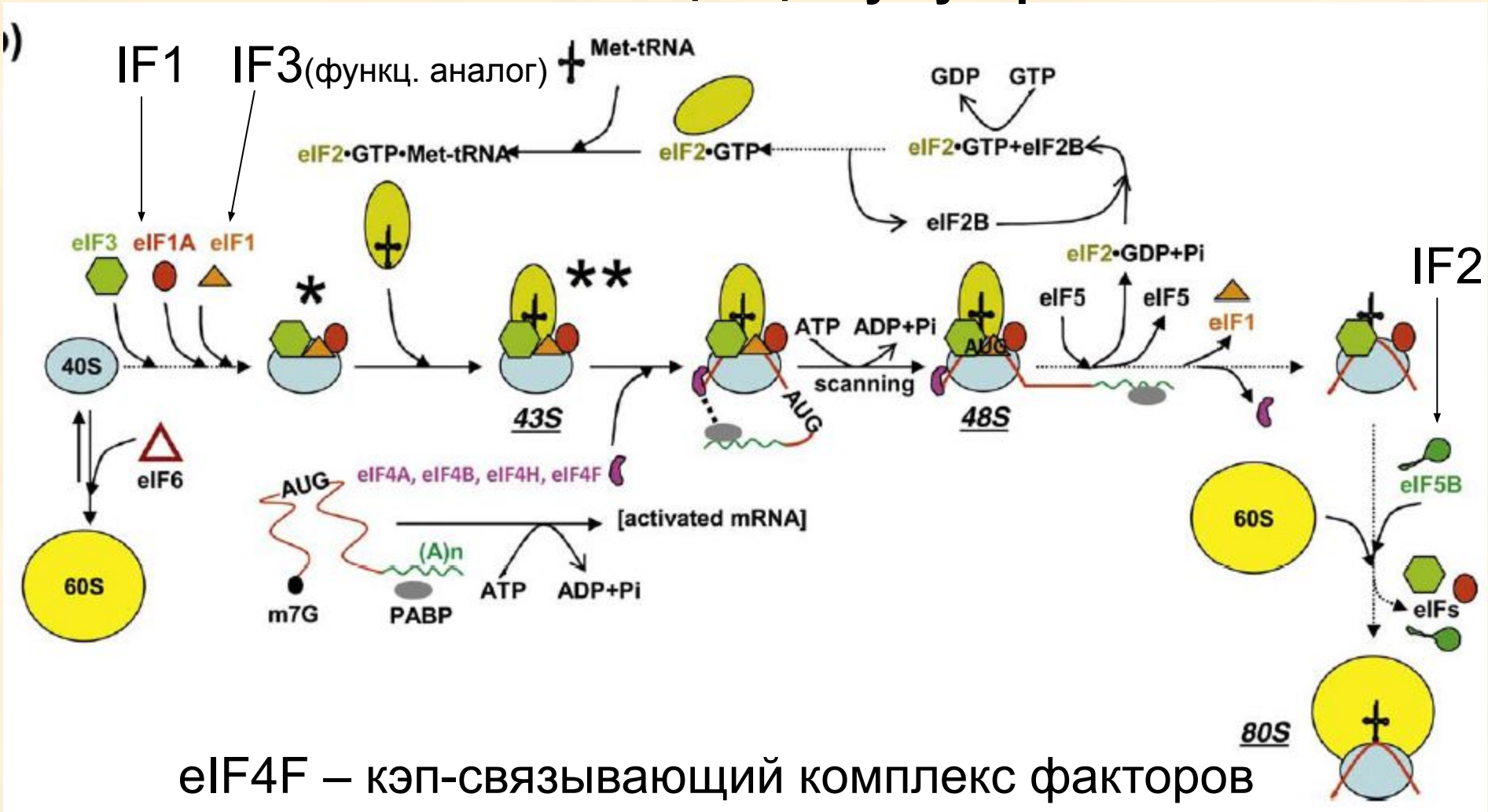
Структурные элементы, отличающие инициаторную тРНК от элонгаторных.

Схема инициации у прокариот



IF2 взаимод. с тРНК
IF1 стимул IF2 и IF3
IF3 помогает ШД

Схема инициации у эукариот

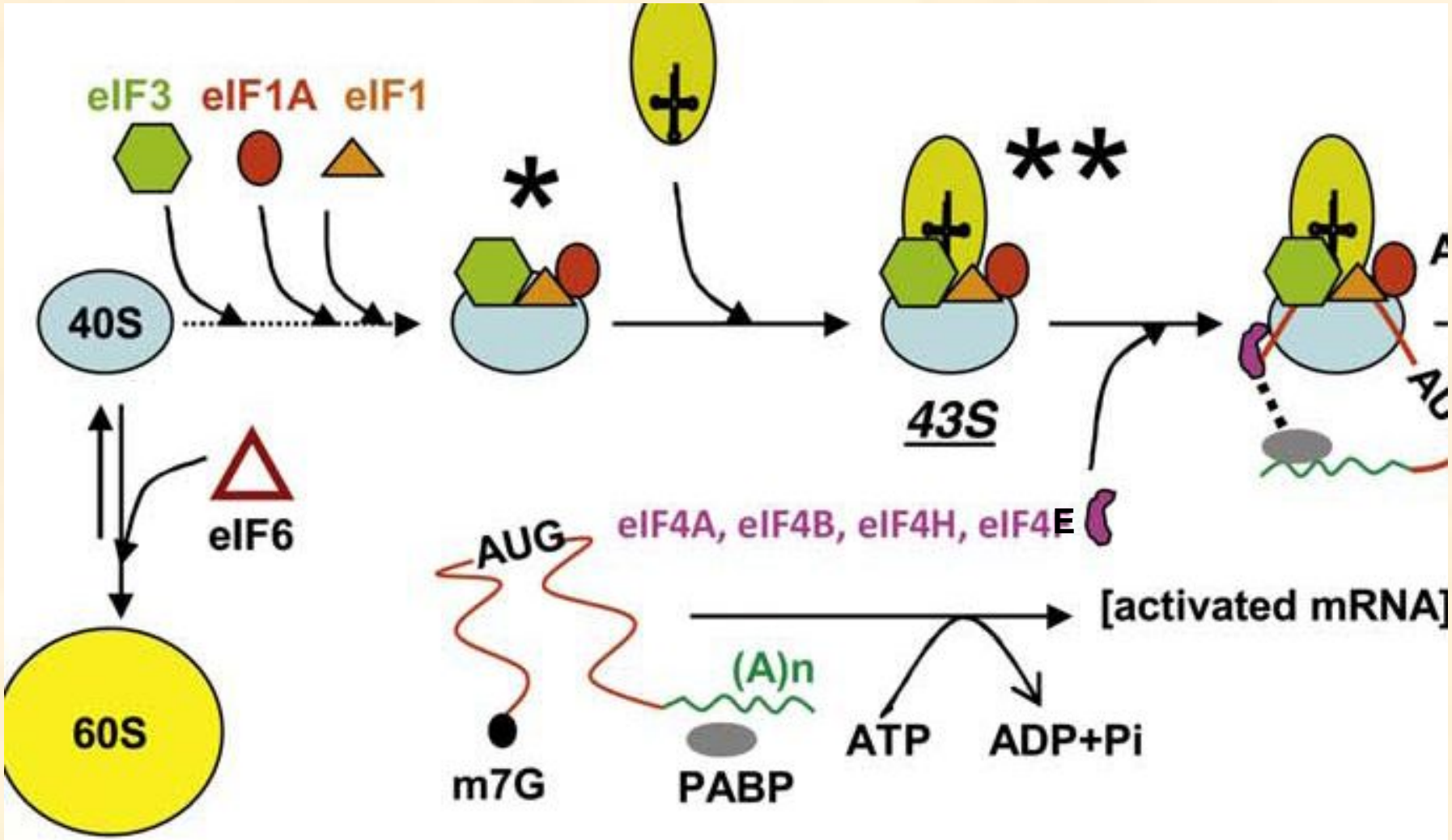


eIF4F – кэп-связывающий комплекс факторов

eIF4E – кэп-узнающий белок

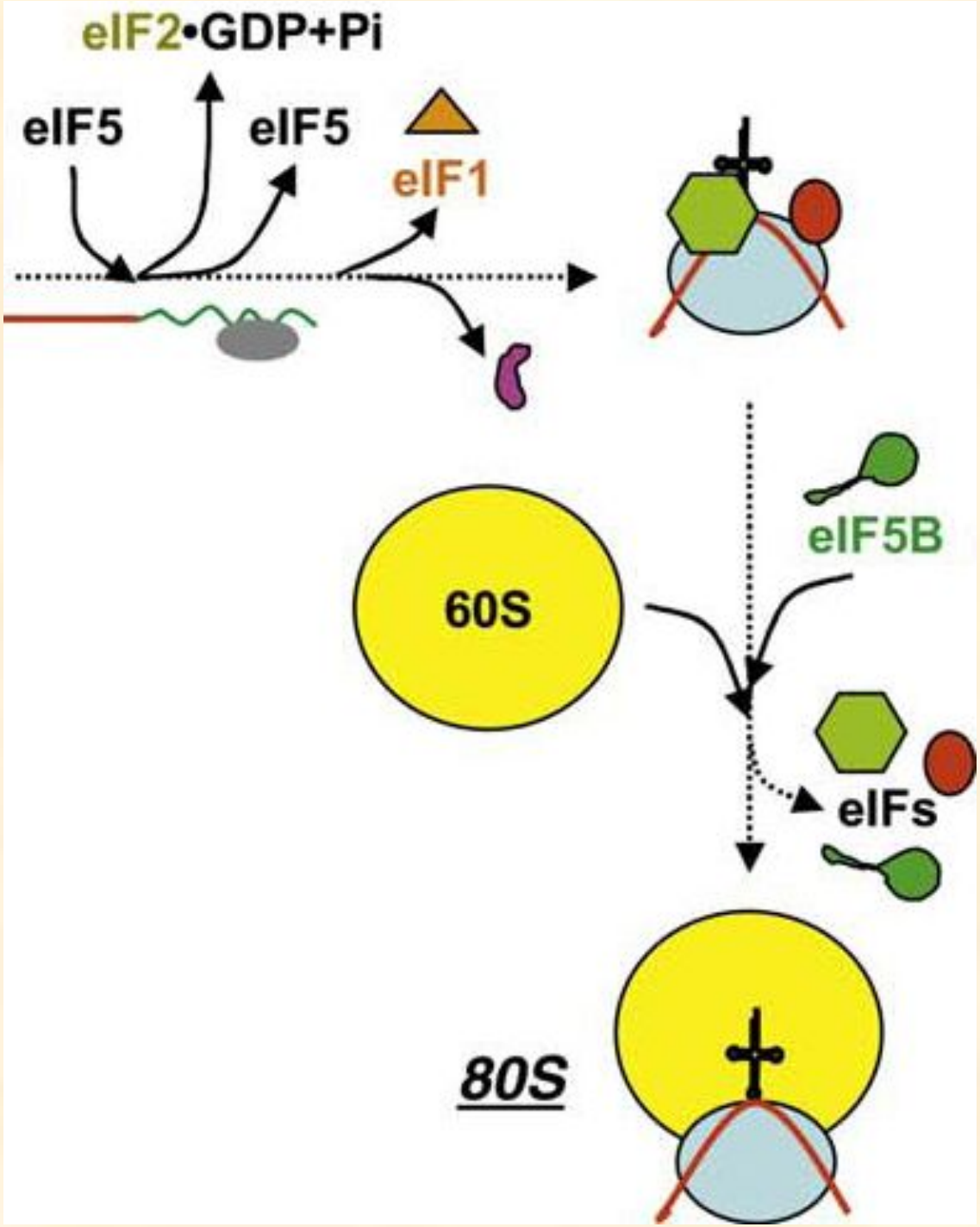
eIF4A – ATP-зависимая хеликаза

eIF4G замыкает PABP и eIF4E

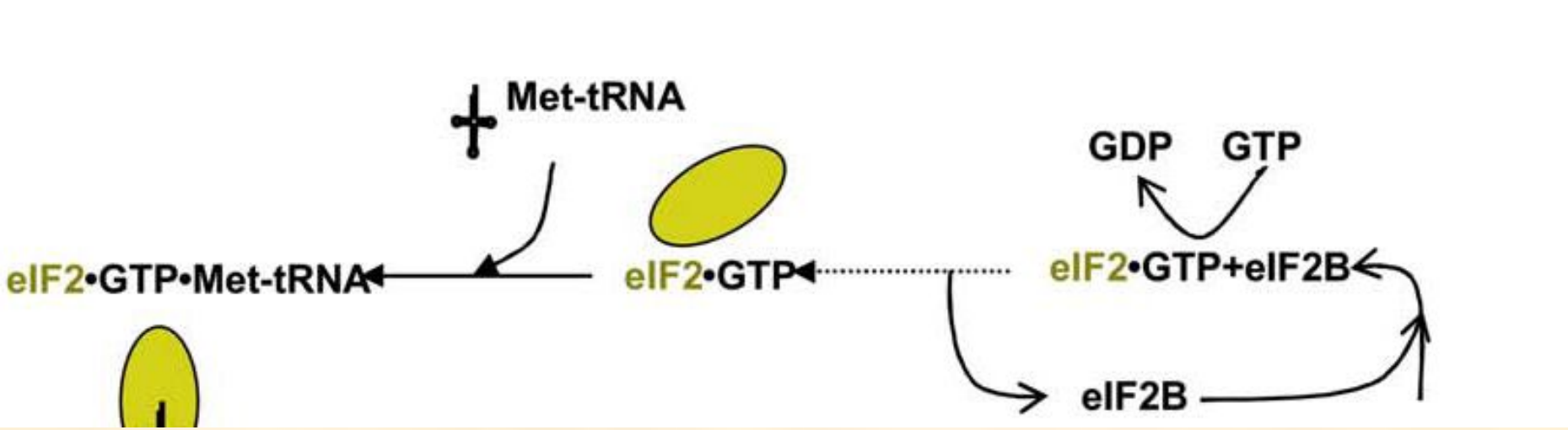


eIF4E-Кэп-связывающий белок

eIF4A – ATP-завис. геликаза
eIF4B, H – ассистируют ей


eIF2•GDP+Pi
eIF5
eIF5
eIF1
eIF5B
60S
eIFs
80S

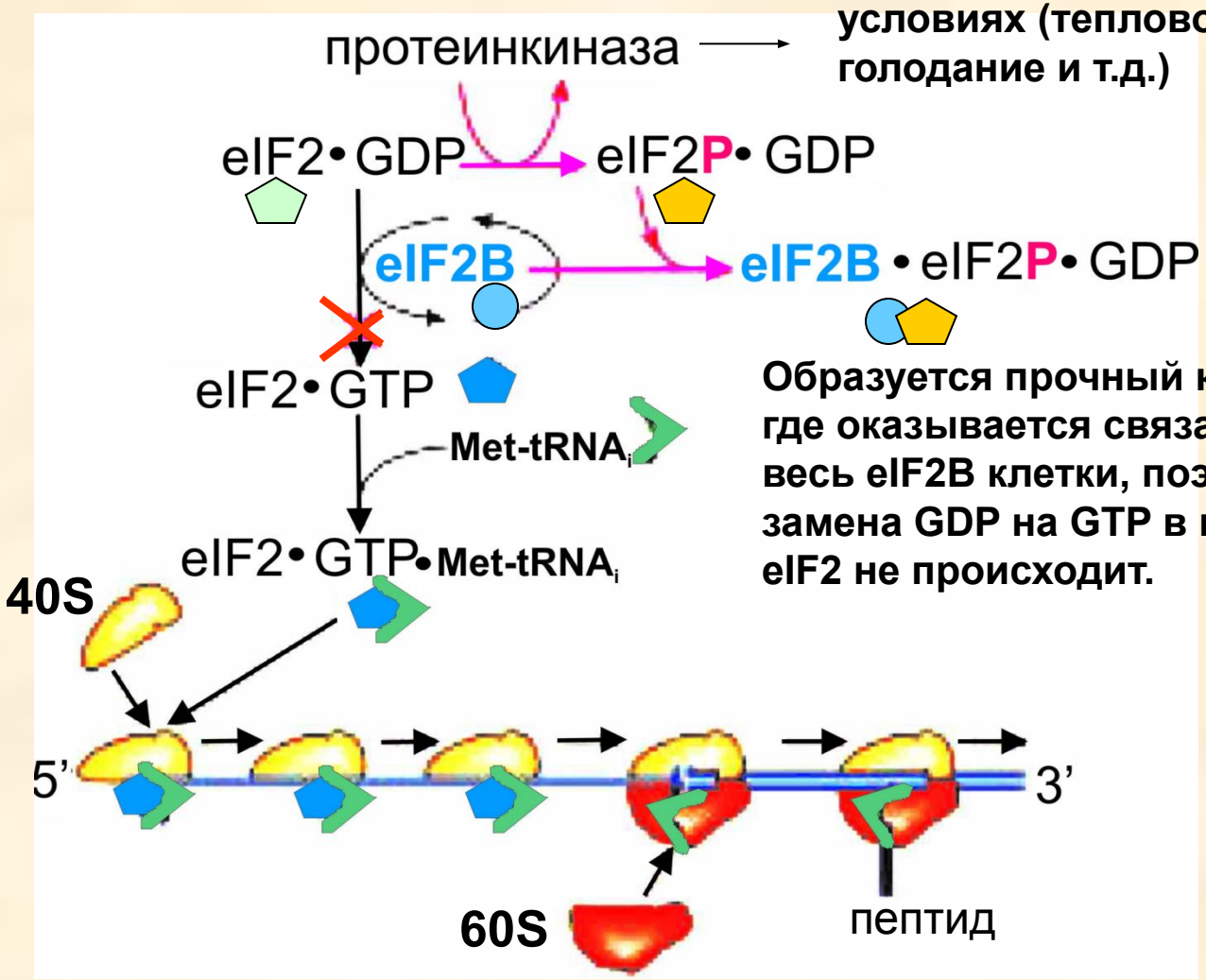
Образование тройного комплекса и замена GDP на GTP в eIF2



eIF2•GDP

Пример регуляции трансляции на стадии инициации. Тотальная репрессия трансляции в результате фосфорилирования факторов инициации (в частности, eIF2) у эукариот.

Активируется в стрессовых условиях (тепловой шок, голодание и т.д.)



Образуется прочный комплекс, где оказывается связанным весь eIF2B клетки, поэтому замена GDP на GTP в комплексе с eIF2 не происходит.

Факторы инициации эукариот

Фактор	Гомологи Бакт	Гомологи Археи	Субъединицы	Функции
eIF1	нет	aIF1	1 (13 kDa)	Предотвращает инициацию на неправильном кодоне или в плохом контексте (функц. аналог IF3)
eIF1A	IF1	aIF1A	1 (16 kDa)	Помогает eIF1 в селекции старт-кодона и вовлекает eIF5B
eIF2	нет	aIF2	αβγ (30-50 kDa)	ГТФаза образует 3-ной комплекс с GTP и Met-тРНК, играет ключ. роль в селекции старт-кодона
eIF2B	нет	aIF2B	αβγ (30-50 kDa)	Обменивает GDP на GTP в eIF2 и тем самым реактивирует его
eIF3	нет	нет	8-11 (Σ 800 kDa)	Стимулирует связ- 3-ного комплекса, участвует в сканировании, пре-пятствует раннему связыванию 60S
eIF4A	нет	aIF4A	1 (46 kDa)	АТФаза, расплетающая мРНК с 5'-конца
eIF4B	нет	нет	1 (69 kDa)	Ассистирует eIF4A

Фактор	Гомологи Бакт	Гомологи Археи	Субъединицы	Функции
eIF4E	нет	нет	1 (25 kDa)	Связывается с кэпом
eIF4F	нет	нет	Комплекс eIF4E, A и G	Расплетает 5’-концевую часть мРНК и обеспечивает посадку туда 43S
eIF4G	нет	нет	1 (175 kDa)	Связывается с eIF4E, eIF4A, eIF3, PABP и mRNA and усиливает геликазную активность of eIF4A
eIF5	нет	aIF5	1 (50 kDa)	Активирует ГТФазную активность eIF2 предотвращает диссоциацию GDP с eIF2
eIF5B	IF2	aIF5B	1 (140 kDa)	ГТФаза, осуществляющая ассоциацию с 60S
DHX29	*нет*	*нет*	*1*	*Доп. Фактор - расплетает 5’-конц. часть мРНК у высших эукариот*
eIF6	*нет*	*aIF6*	*1*	*Связывается с 60S и не дает ей преждеврем. ассоциировать с 40S*

Цикл элонгации.

eEF1 – EF-Tu

eEF2 – EF-G

Аналогичны по функции, но
не работают в гетерологичных системах

2. Цикл **элонгации** полипептидной цепи.

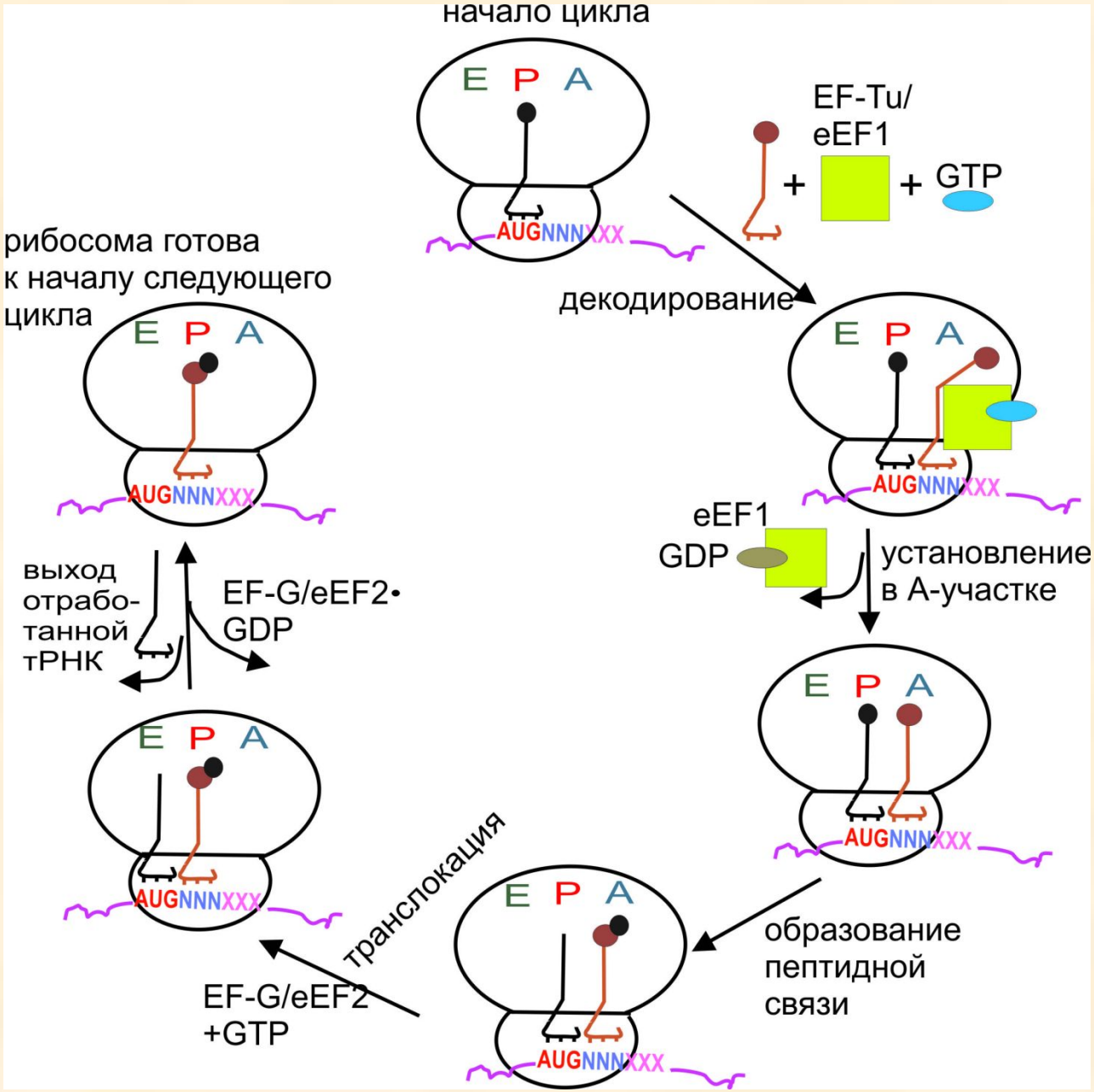
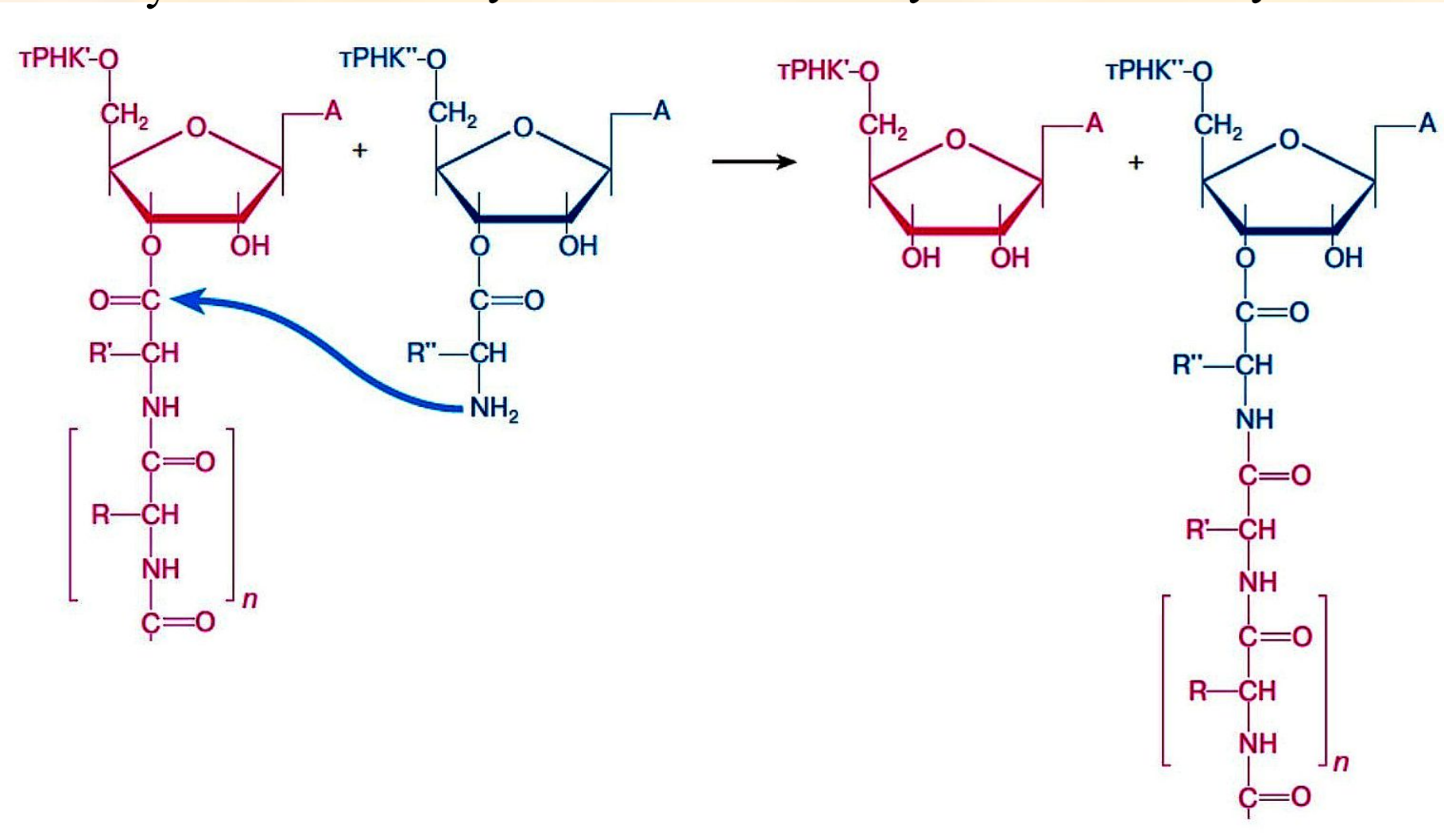


Схема образования пептидной связи

Р-участок А-участок Р-участок А-участок



3. **Терминация** трансляции наступает, когда в аминоацильном (А)-участке оказывается один из 3-х стоп кодонов – UGA, UAG или UAA.

RF от англ. Releasing factor

RF 1-го класса:
У эукариот - eRF1
архей aRF1

У бактерий :
RF1 узнает кодоны UAA и UAG,
а RF2 – кодоны UAA и UGA.

Функции RF 1-го класса - запуск гидролиза сложноэфирной связи между пептидильным остатком и молекулой тРНК в Р-участке рибосомы (освобождение синтезированного полипептида).

Молекулярная мимикрия – сходство структуры RF и тРНК. Связываясь с рибосомой, RF одним своим фрагментом, напоминающим антикодоновую шпильку тРНК, узнает стоп-кодон, а другой его фрагмент, похожий на акцепторный конец, оказывается в пептидилтрансферазном центре.

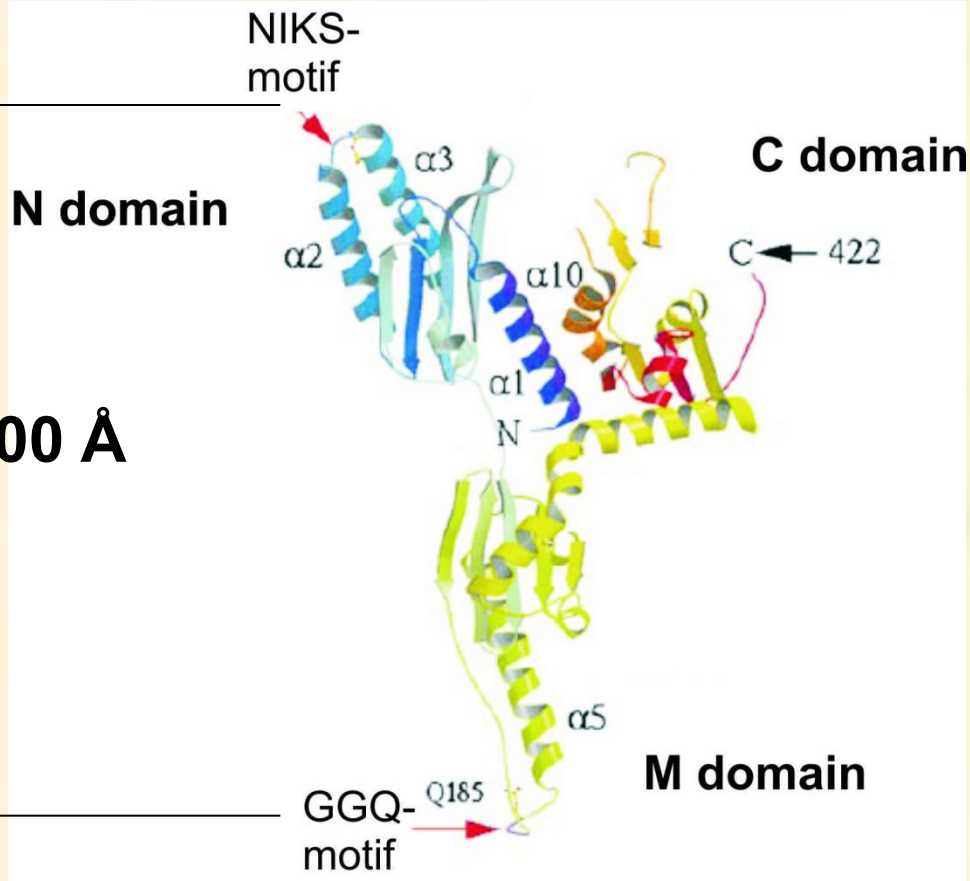
Отсутствие гомологии между бактериальными и эукариотическими факторами

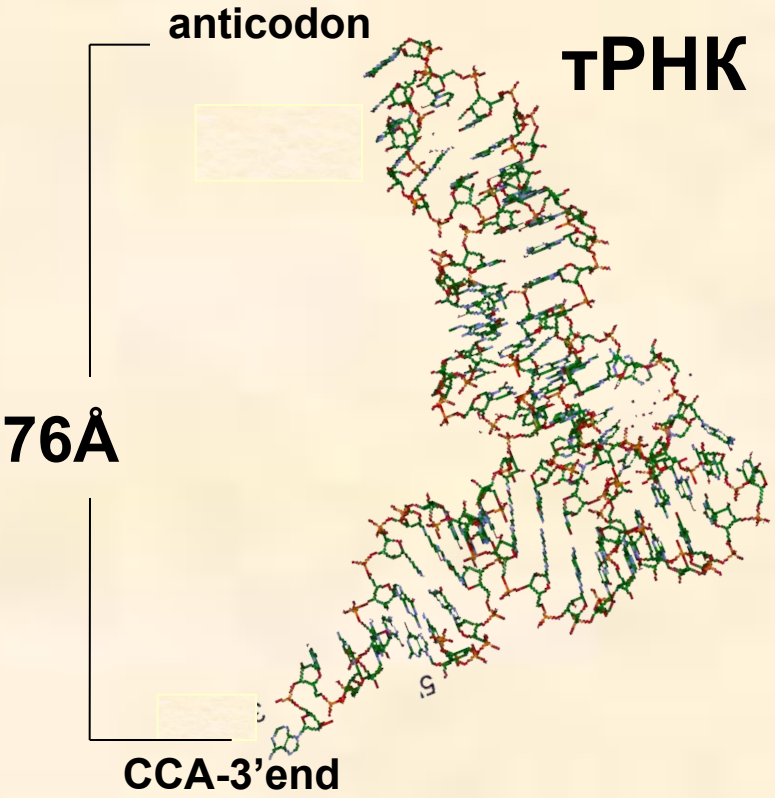
Факторы терминации 2-го класса – активируемые рибосомой GTPазы.

RF3

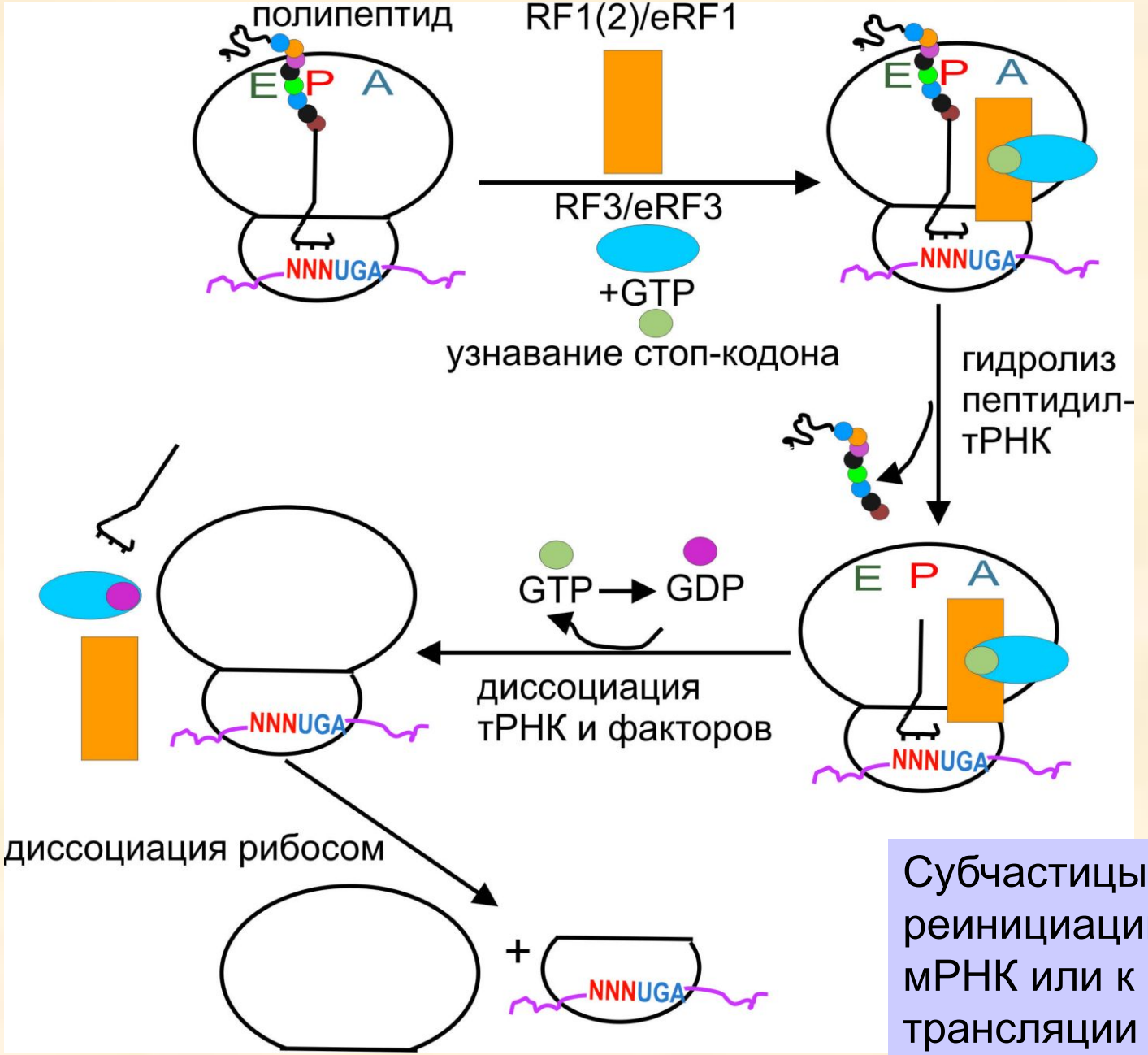
eRF3

eRF1


NIKS-
motif
N domain
α3
α2
α10
C domain
C
422
α1
N
>100 Å
α5
M domain
Q185
GGQ-
motif


anticodon
тРНК
76Å
CCA-3'end

Общая схема



Субчастицы готовы к реинициации на этой же мРНК или к инициации трансляции новой мРНК.

Характерные особенности терминации *у прокариот*:

1) освобождение синтезированного полипептида происходит до гидролиза GTP и без участия RF3;

2) гидролиз GTP необходим для диссоциации RF3 с рибосомы;

3) посттерминационный комплекс рибосом, содержащий RF1/RF2, выступает в роли фактора, обменивающего GDP на GTP в комплексе с RF3.

4) RF3 не требуется для гидролиза пептидил-тРНК; вообще клетка может существовать и без этого фактора.

У эукариот

оба фактора терминации действуют кооперативно и скоодинированно:

1) eRF1 имеет высокое сродство к eRF3, и оба фактора образуют комплекс перед тем, как попасть на рибосому;

2) гидролиз GTP фактором eRF3 необходим для быстрого и эффективного гидролиза пептидил-тРНК фактором eRF1.

Гидролиз GTP приводит к изменению конформации терминационного комплекса таким образом, что универсальная для всех организмов последовательность GGQ фактора eRF1, отвечающая за индукцию гидролиза пептидил-тРНК, оказывается в пептидилтрансферазном центре рибосомы.

Рециклинг - диссоциация мРНК и деацилированной тРНК и последующая диссоциация рибосом на субчастицы, которые затем снова участвуют в процессе трансляции.

У прокариот есть специальный RRF, который, действуя совместно с EF-G, диссоциирует рибосому на субчастицы. мРНК, которая может оставаться связанной с 30S субчастицей, удаляется из нее фактором инициации IF3.

У эукариот и архей специализированного фактора рециклинга нет.

Диссоциация 80S рибосом эукариот на субчастицы после завершения терминации трансляции просходит при участии факторов инициации eIF3 и eIF6 и белка ABCE1;

диссоциацию мРНК с 40S субчастицы вызывает фактор eIF3j, а диссоциацию тРНК – фактор eIF1.

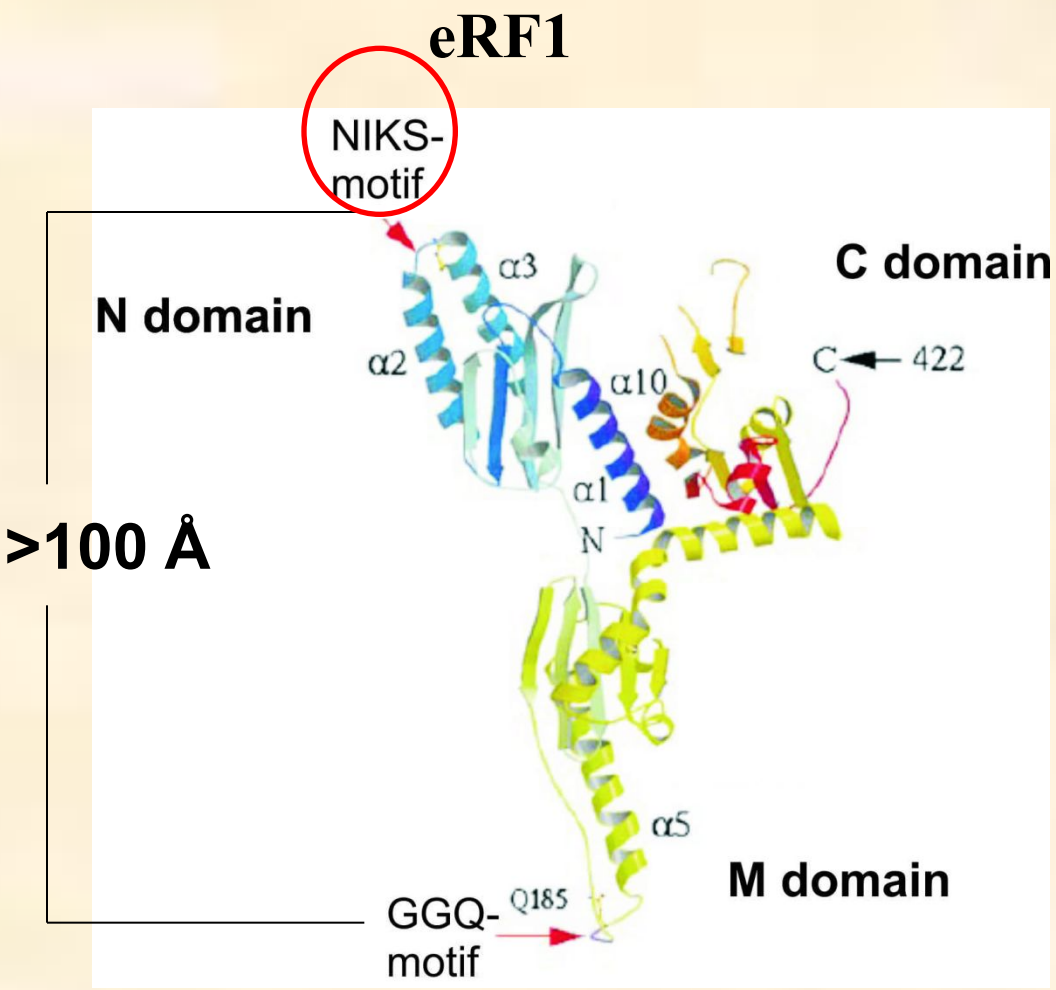
Отклонения от канонических правил

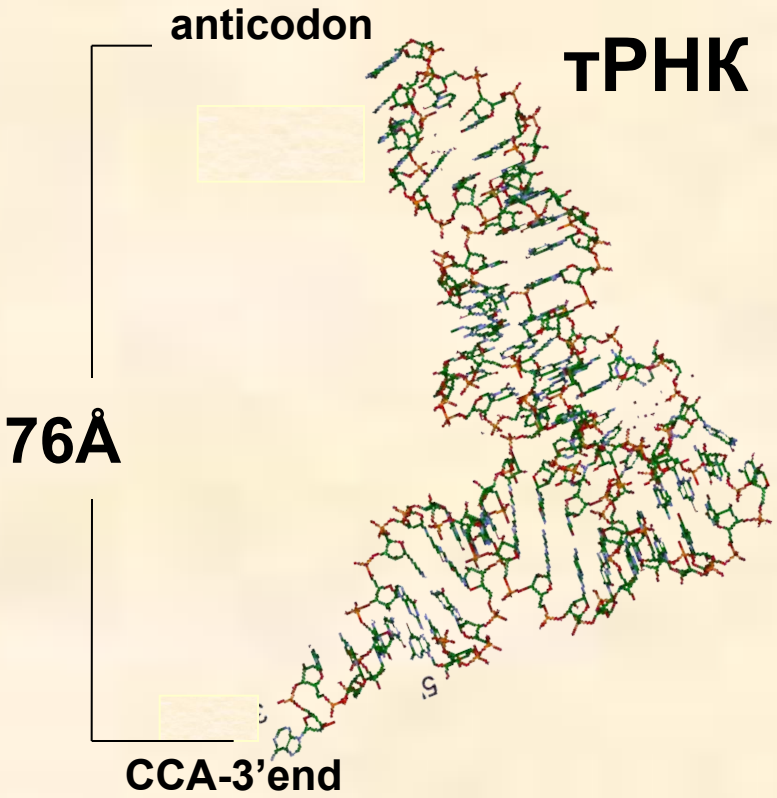
1. **Неканоническая инициация – трансляционные энхансеры в мРНК и IRES – элементы некоторых вирусных и клеточных мРНК.**

2. **Прочтение стоп-кодонов как смысловых: селенопротеиновые мРНК и вариантный генетический код в силиатах (инфузориях). Причины этого.**

Примеры – у Stilonichia Paramecium стоп кодон только UGA, а кодоны UAA и UAG кодируют глутамин.

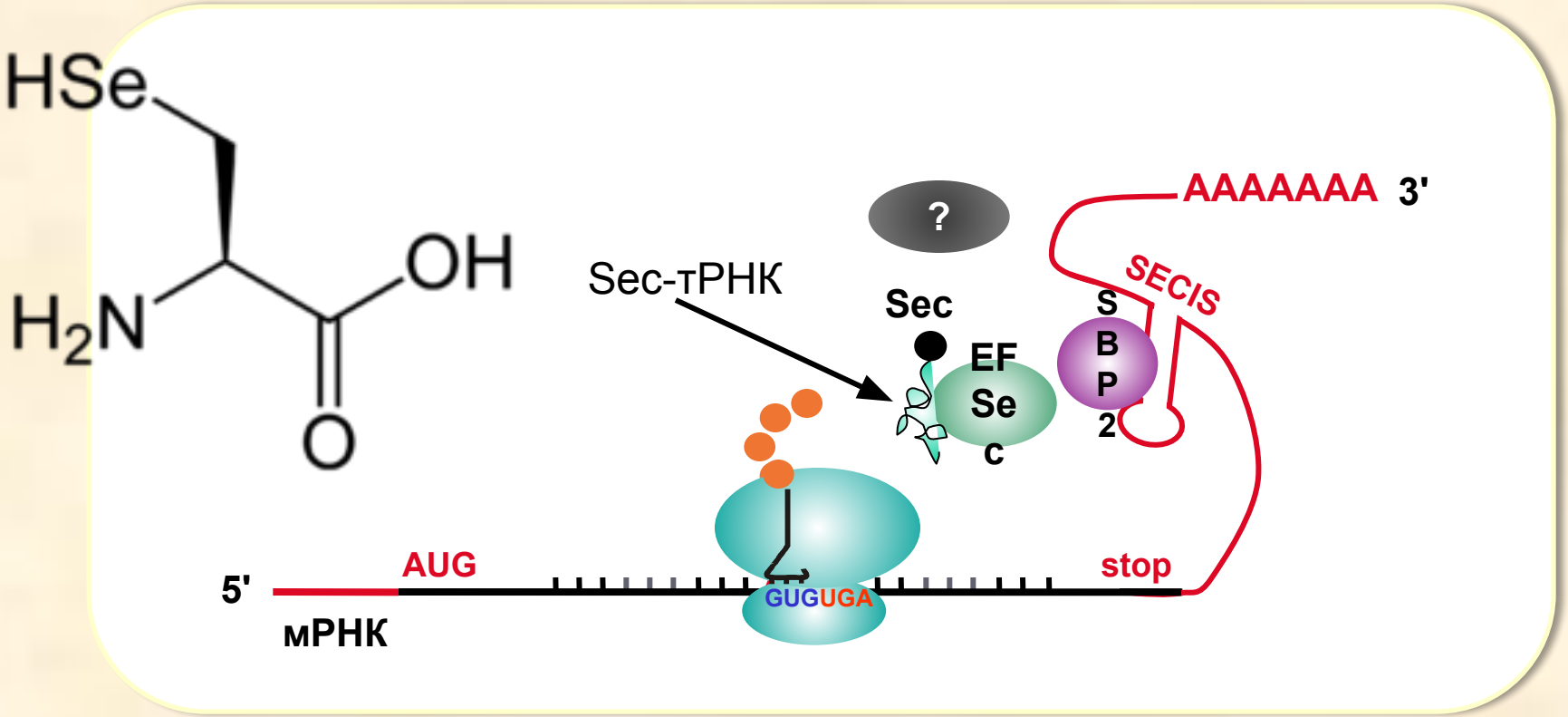
Причина – мутации в консервативном мотиве eRF1, отвечающем за распознавание пуринов.


eRF1
NIKS-motif
N domain
C domain
α3
α2
α10
C
422
α1
N
>100 Å
α5
M domain
GGQ-motif
Q185


anticodon
тРНК
76Å
CCA-3'end

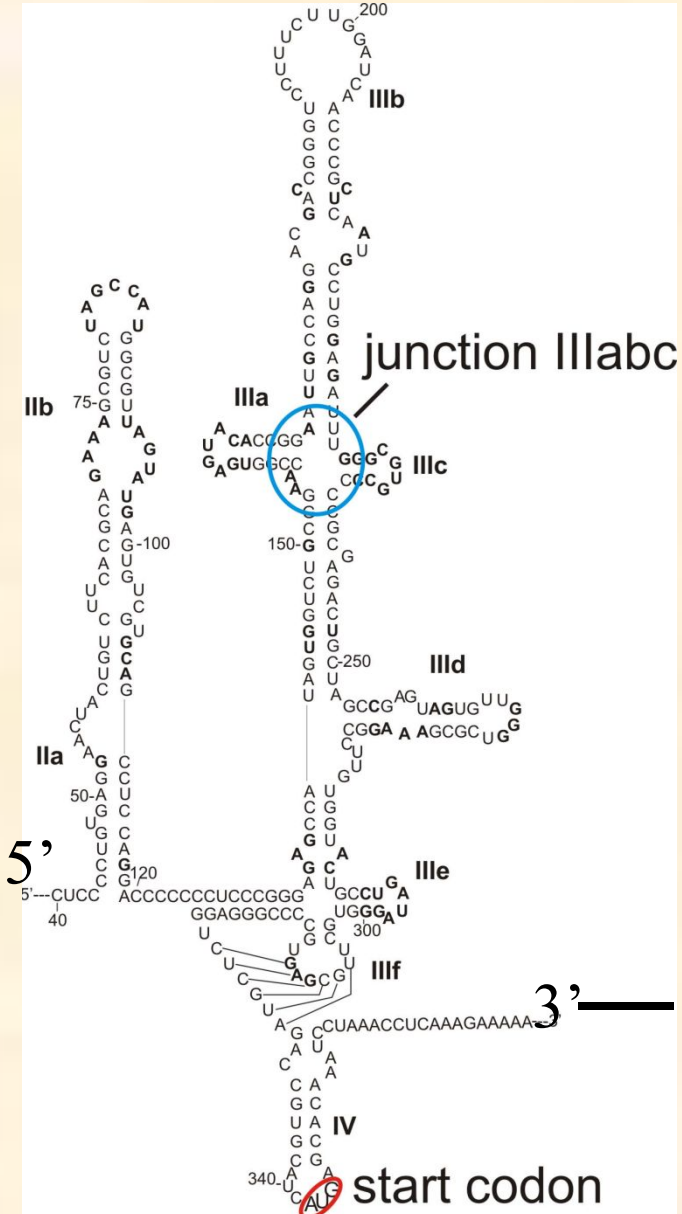
Аминокислота селеноцистеин - биологическая форма селена. Ее кодирует триплет UGA, являющийся обычно стоп-кодоном.

Специальный механизм, благодаря которому происходит включение селеноцистеина в растущий полипептид, использует специфический структурный район в 3‘-НТО мРНК - SECIS (от англ. Selenocysteine Insertion Sequence) и белковые факторы (SBP2, EFSec и др.). SECIS может быть расположен на расстоянии нескольких сотен нуклеотидов от UGA-кодона.



К человеческим селенопротеинам относят:
Иодтирониндеиодиназы 1—3: DIO1Иодтирониндеиодиназы
1—3: DIO1, DIO2Иодтирониндеиодиназы 1—3: DIO1, DIO2, DIO3
Глутанионпероксидазы: GPX1Глутанионпероксидазы: GPX1, GPX2Глутанионпероксидазы: GPX1, GPX2, GPX3Глутанионпероксидазы: GPX1, GPX2, GPX3, GPX4Глутанионпероксидазы: GPX1, GPX2, GPX3 GPX4, GPX6[4]

Внутренняя инициация трансляции – для некэпированных геномных РНК некоторых вирусов AUG попадает в Р-сайт прямо, без сканирования

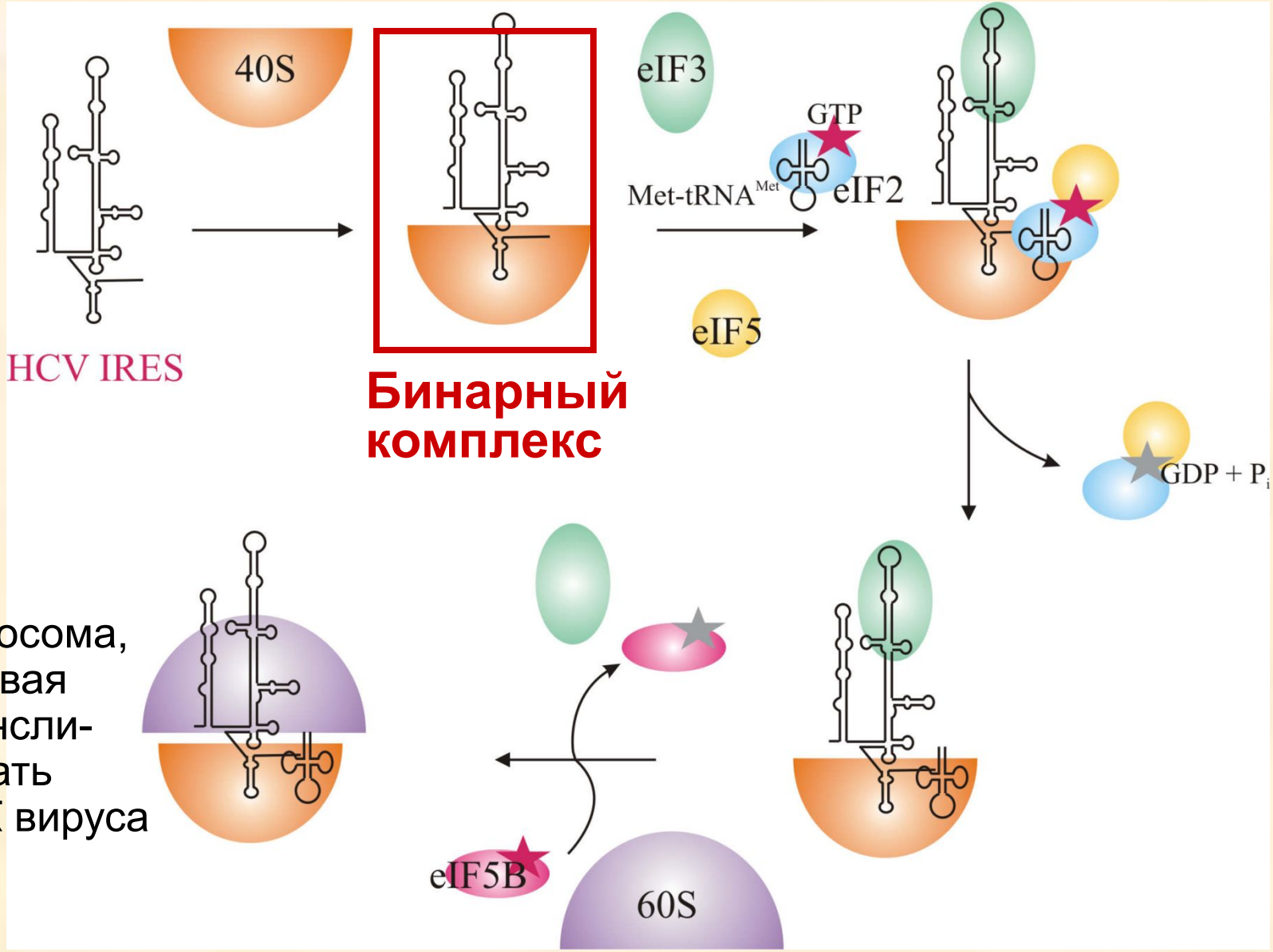


IRES-элемент РНК вируса гепатита С-

IRES (Internal Ribosome Entry Site) – очень своеобразный высокоструктурированный элемент вирусной РНК перед старт-кодоном.

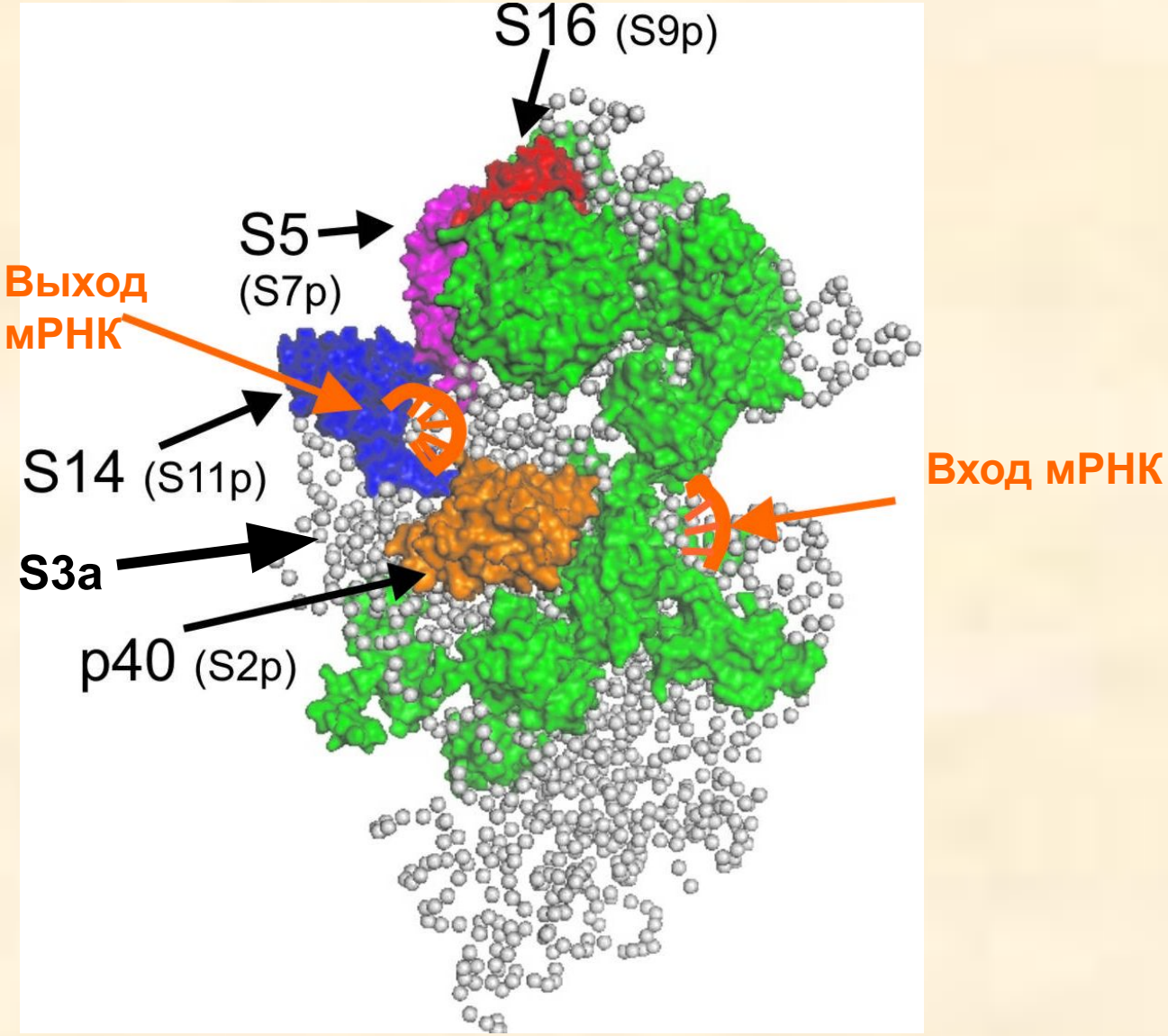
Он отвечает за инициацию трансляции вирусной РНК «в обход» клеточных регуляторных механизмов

Последовательность событий при инициации трансляции РНК вируса гепатита С.



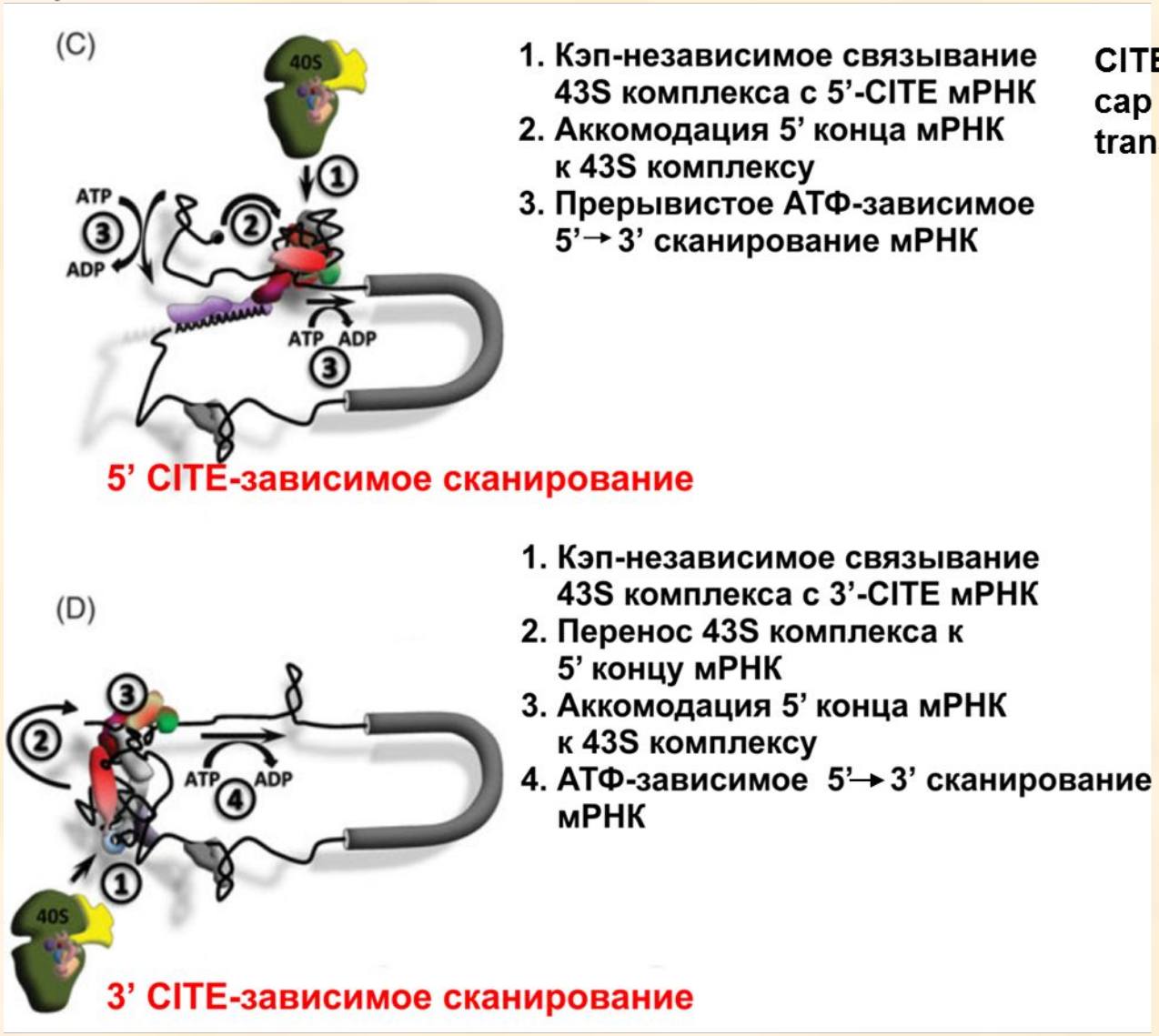
Рибосома, готовая трансли-ровать РНК вируса

Участки связывания IRES и мРНК на рибосоме



Трансляционные энхансеры

Некоторые виды мРНК рекрутируют рибосомы через свои 5’-концы без участия 5’-кэпа или комплекса eIF-4F, вместо них вовлекается фактор eIF-4G



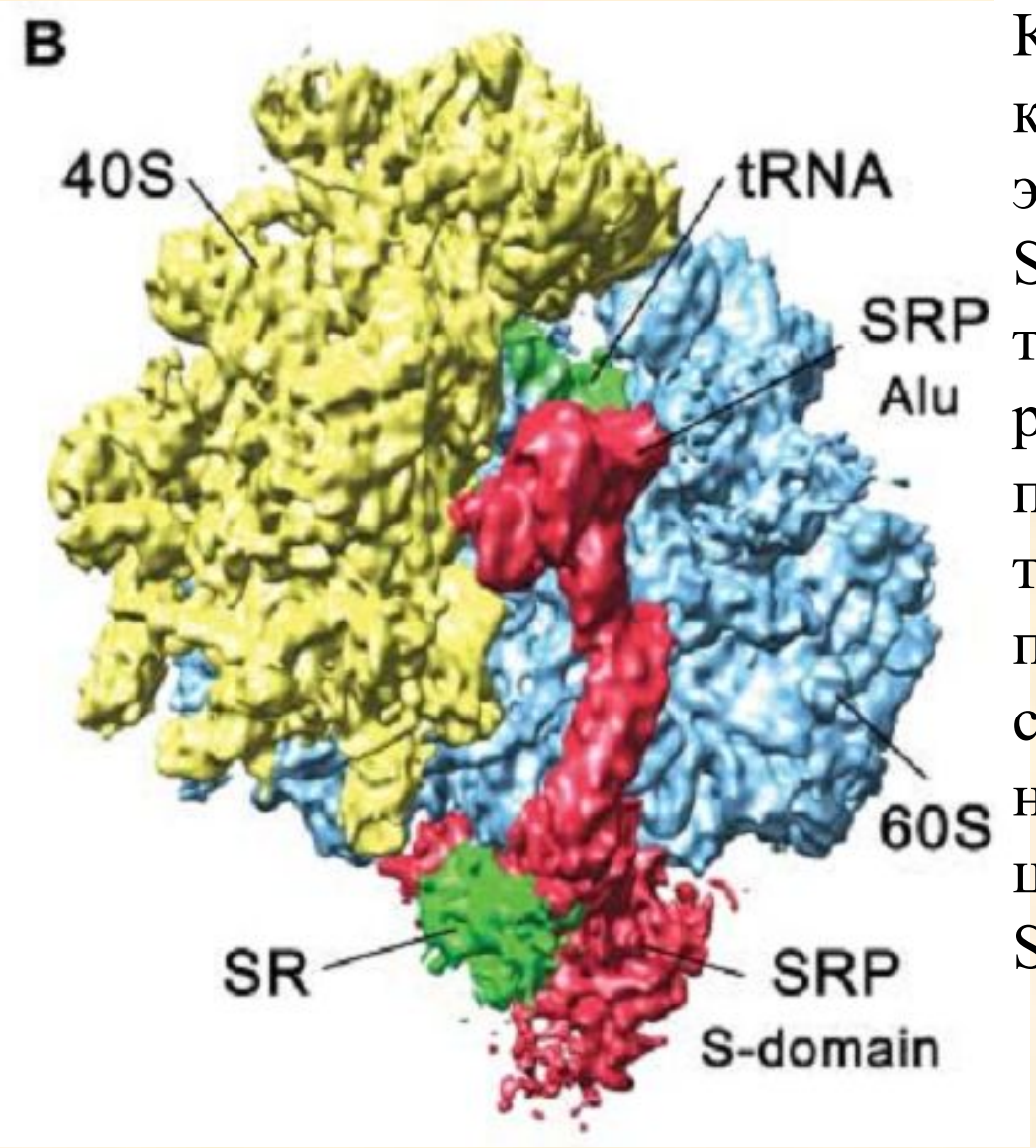
CITE – от англ. cap independent translation enhancer

По такому механизму рекрутируются мРНК, содержащие так называемые трансляционные энхансеры в 5’- или 3’-НТО. В основе этого механизма лежит высокое сродство энхансера к eIF-4G, рекрутирующему мРНК. Но энхансер, в отличие от IRES не способен помещать кодирующую часть мРНК в мРНК-связывающий канал.

Выход синтезированного полипептида из рибосомы

Сигнал-узнающая частица SRP распознает специальную сигнальную последовательность в синтезируемом полипептиде, как только эта последовательность появляется на выходе из рибосомы. SRP - консервативный рибонуклеопротеид, состоящий из 7S РНК (в прокариотах 4.5S рРНК) и нескольких белков.

Связываясь с этой последовательностью, SRP вызывает **паузу в элонгации**, во время которой рибосома закрепляется своей большой субчастицей на специальном рецепторе для SRP на мембране, после чего SRP способствует ***транслокации (перемещению) полипептида*** через мембрану.



Крио-электронное изображение комплекса транслирующей эукариотической рибосомы с SRP . Обозначены субчастицы, тРНК (tRNA), SRP и белок-рецептор SR, способствующий переносу рибосомы на транслокон. Сигнальная последовательность синтезированного полипептида на этом изображении закрыта центральной частью S-домена SRP

Трансмембранный канал для транслокации полипептида в ЭР

Образован кольцеобразной олигомерной белковой структурой, состоящей из трех или четырех частиц так называемого «Sec61p-комплекса», содержащего a-субъединицу с десятью трансмембранными (TM)-доменами и две меньшие b- и g-субъединицы, в каждую из которых входит по одному трансмембранному домену. Эта кольцеобразная структура, которую иногда называют «транслоконом», эволюционно консервативна (в прокариотах соответствующий комплекс называется SecYEG или SecY).

Сравнительная характеристика рибосом про- и эукариот

Рибосома: эукариоты – 80S мол. масса 4 – 4.5 мДа, примерно в 1.5 раза больше, чем 70S рибосома прокариот

Субчастицы: малая – 40S (1.4 мДа)

большая - 60S (ок. 3 мДа)

Компоненты субчастиц: белки, рРНК, полиамины (спермин, спермидин, путресцин) и ионы К+ и Mg2+.

Все рибосомы эукариот содержат одинаковый набор рРНК и белков.

Содержание и количественный состав полиаминов зависит от природы организма и типа ткани.

Обратимая диссоциация рибосом на субчастицы.

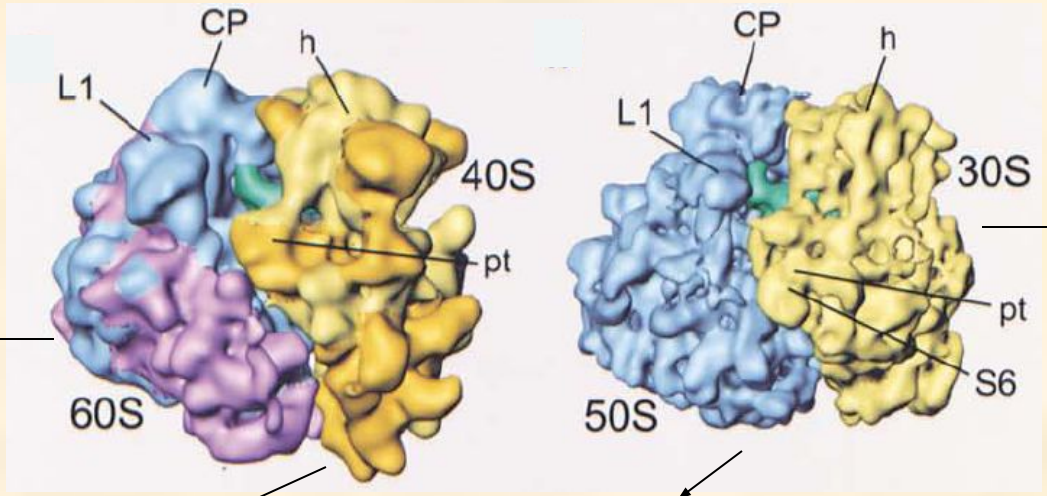
Сравнительная характеристика рибосом про- и эукариот

Рибосома высших организмов

24 нм

Рибосома бактерий

20 нм



28S рРНК
3500-5000 нт,
5.8S рРНК,
5S рРНК,
47 белков

16S рРНК
1500 нт,
23 белка

18S рРНК
1800 нт,
33 белка

23S рРНК
3000 нт,
5S рРНК,
34 белка

Гомология между структурными элементами 70S и 80S рибосом

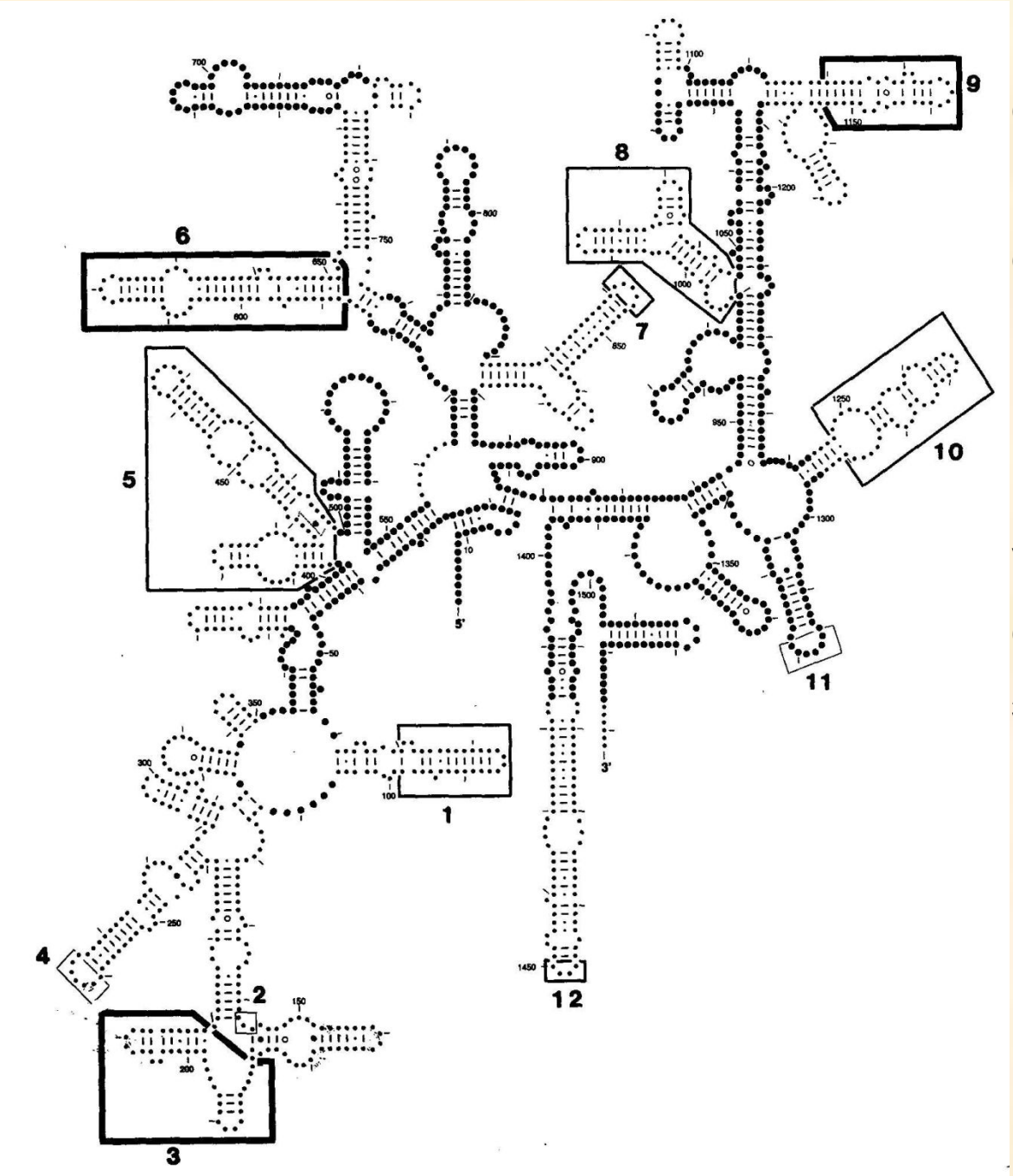
Гомология между рРНК прокариот и эукариот

Степень гомологии первичных и вторичных структур

5.8S рРНК – гомолог 5’-концевого района 23S рРНК

Консервативный «кор» вторичной структуры рРНК

Роль рРНК в оганизации декодирующего центра иПТЦ.



Консервативные положения и сегменты экспансии во вторичной стуктуре рРНК, изображенные на структуре 16S *E.coli.*

Большие кружки – положения, всегда присутствующие в универсальном коре вторичной структуры. Сегменты экспансии нумерованы и обведены прямоугольниками.

Гомологичные рибосомные белки:

Невысокая степень гомологии аминокислотных последовательностей и

большое сходство пространственных структур

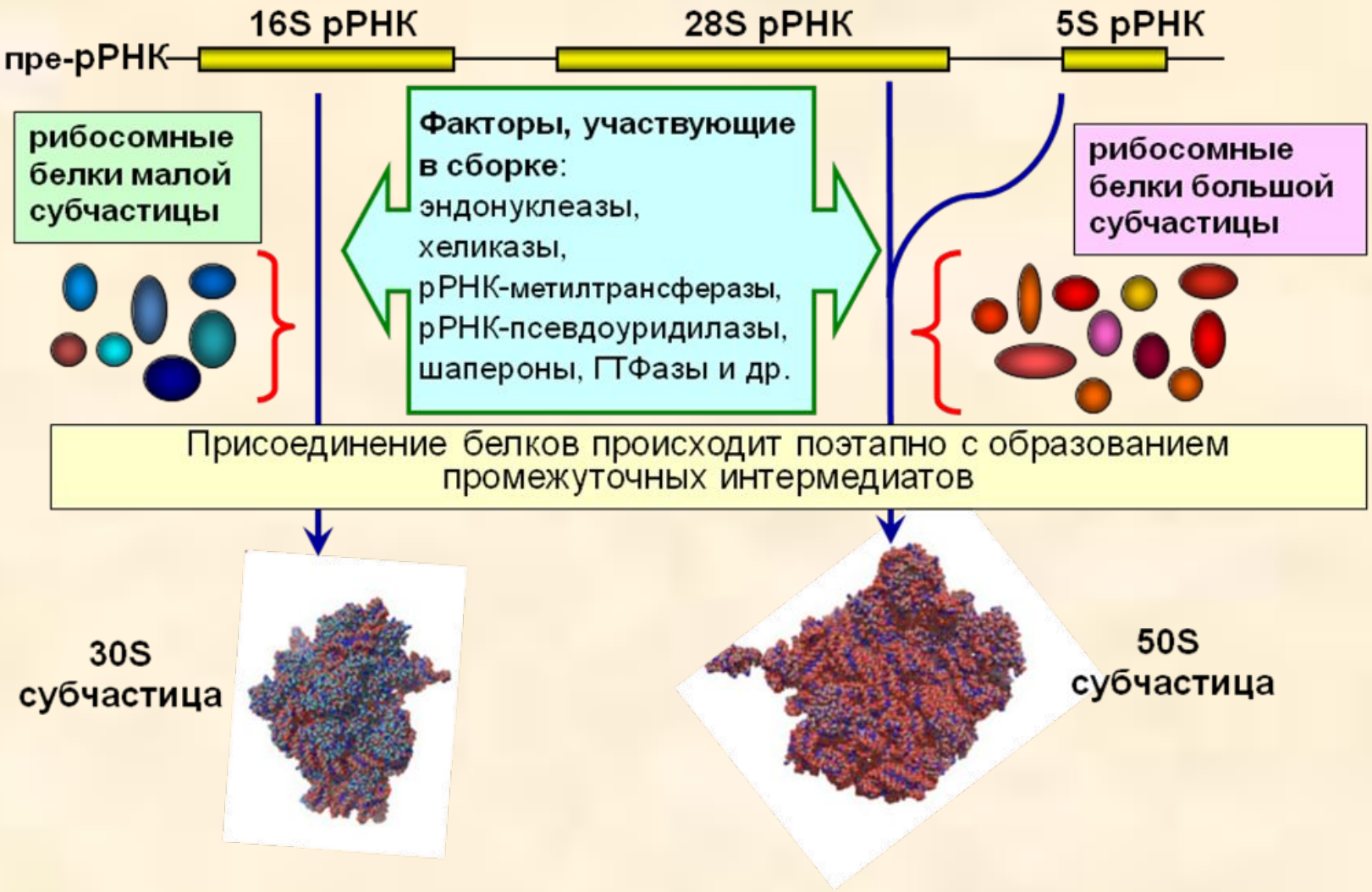
гомологичных белков в рибосомах **про- эукариот**.

Высокая степень сходства последовательностей между гомологичными рибосомными белками эукариот.

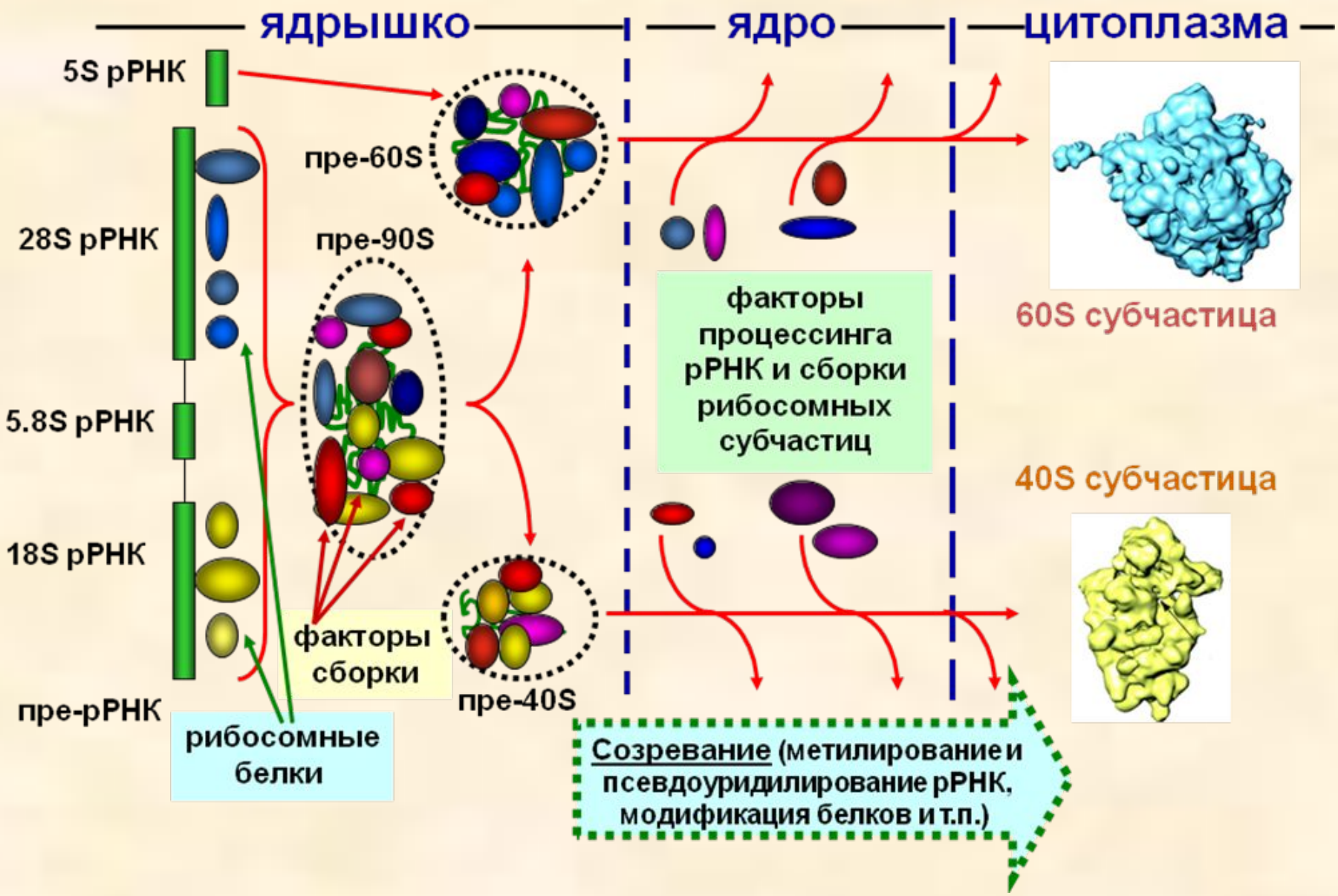
Качественные различия между рибосомами про- и эукариот

Рибосомы эукариот невозможно собрать in vitro из набора рибосомных белков и рРНК.

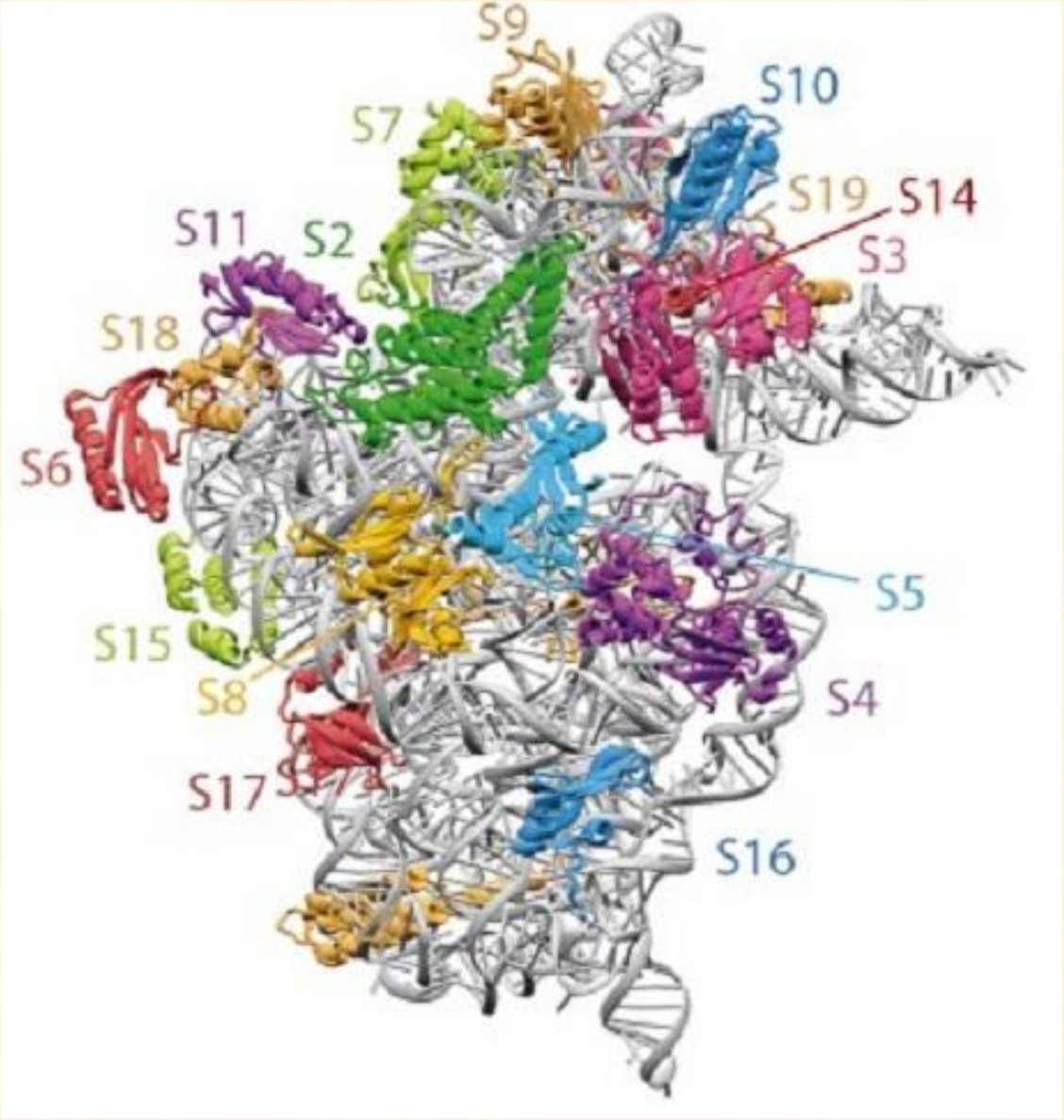
Сборка субчастиц прокариот



Сборка субчастиц рибосом эукариот *in vivo*



Методы изучения строения рибосомы и ее функциональных центров

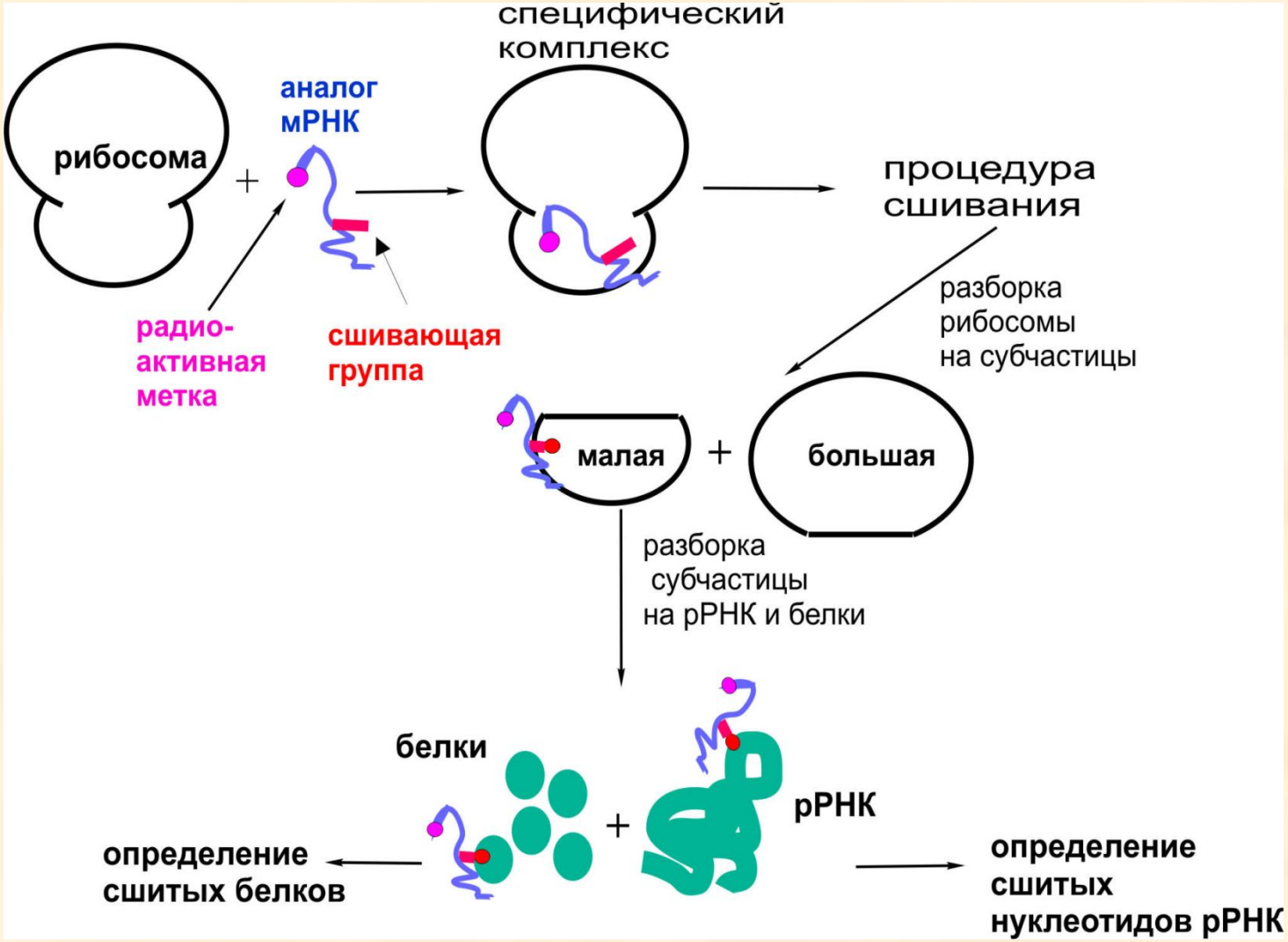


Строение малой субчастицы рибосом *Thermus thermophilus* по данным РСА. Полипептидные цепи белков и полинуклеотидные цепи рРНК изображены ленточками. Рибосомные белки (в которых видны участки α-спиралей) выделены разными цветами и подписаны, рРНК отмечена серым цветом .

Электронная микроскопия

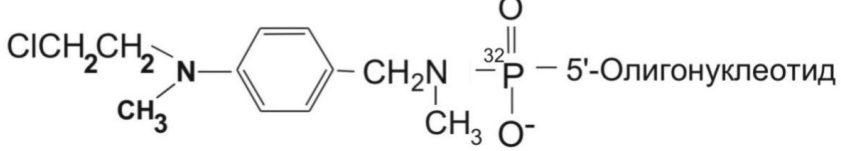
Футпринтинг

Аффинная модификация

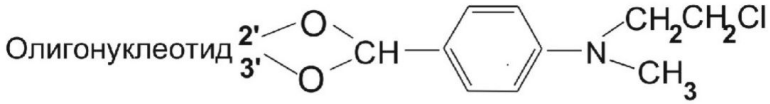


Типы аналогов мРНК

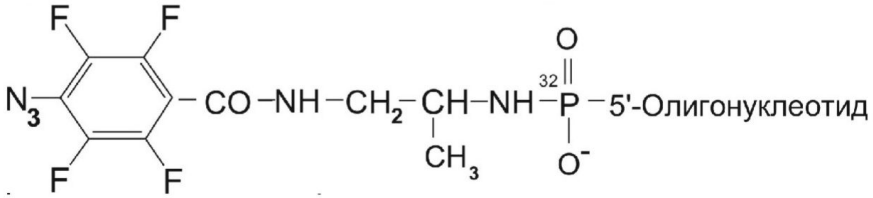
а



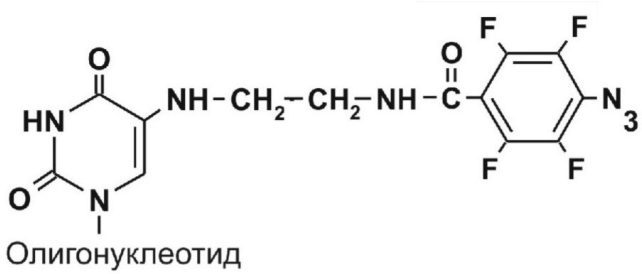
б



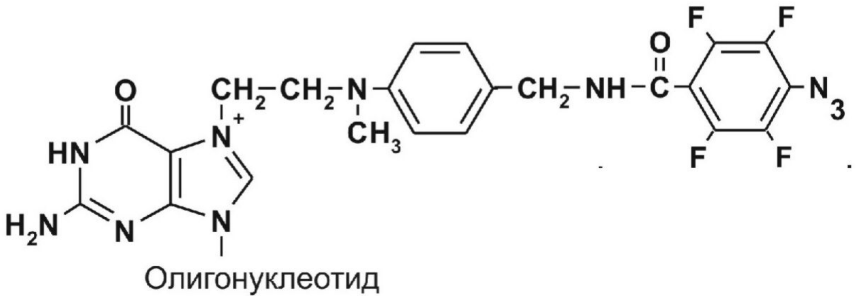
в



г



д



Функциональные центры рибосомы и принципы их организации

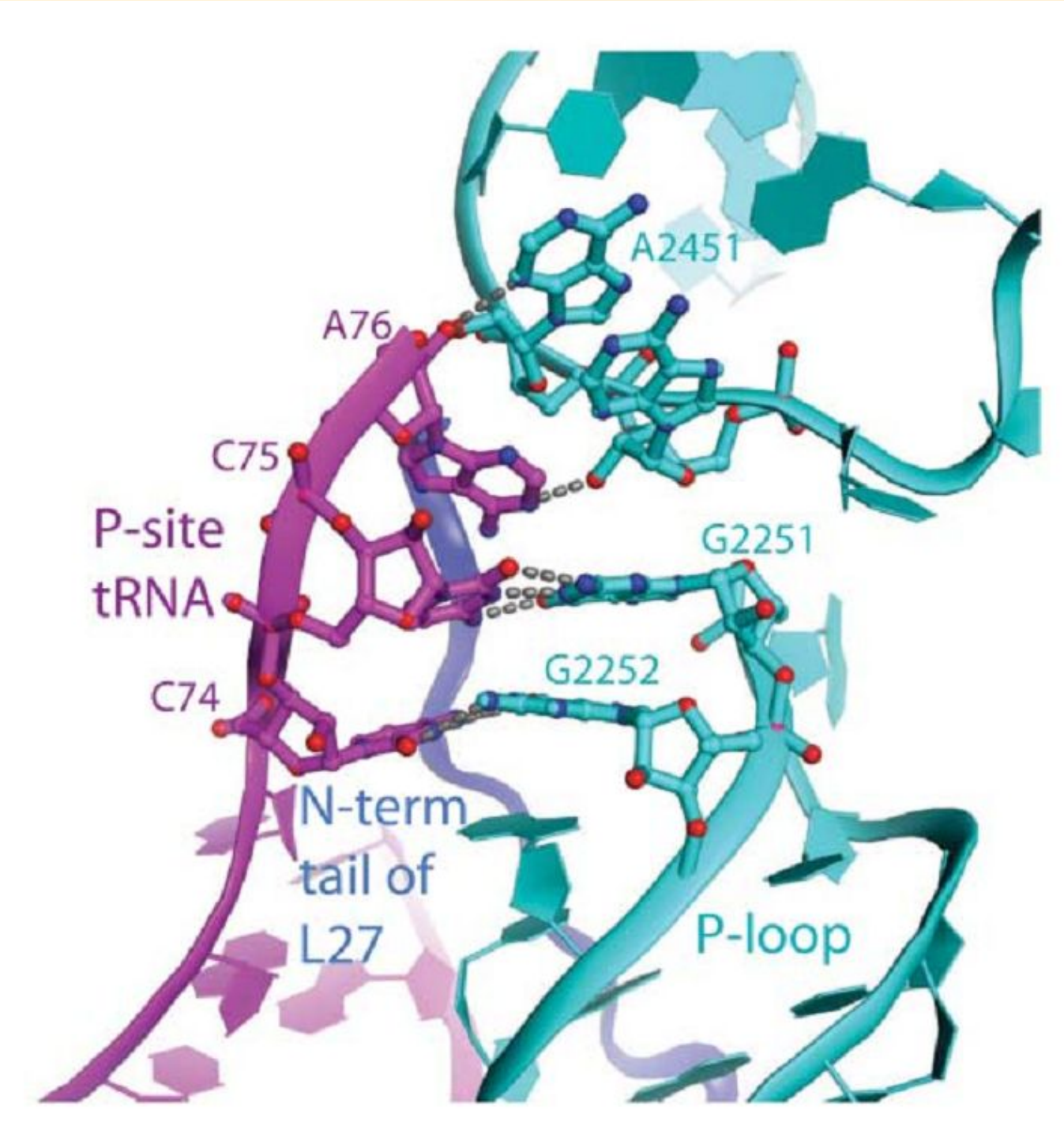
1) участки связывания каждого из участников процесса трансляции (для молекул тРНК – их три – А-, Р- и Е-участки);

2) декодирующий центр, где рибосома распознает «правильный» комплементарный комплекс кодона мРНК с антикодоном аа-тРНК в А-участке;

3) пептидилтрансферазный центр (ПТЦ), где происходит катализ образования пептидной связи при элонгации и гидролиз сложноэфирной связи между синтезированным пептидом и тРНК при терминации;

4) так называемый GTPаза-активирующий центр (ГАЦ), который отвечает за стимуляцию GTPазной активности факторов трансляции;

5) участки связывания факторов трансляции.



Строение ПТЦ
у прокариот

Динамичность структуры рибосомы

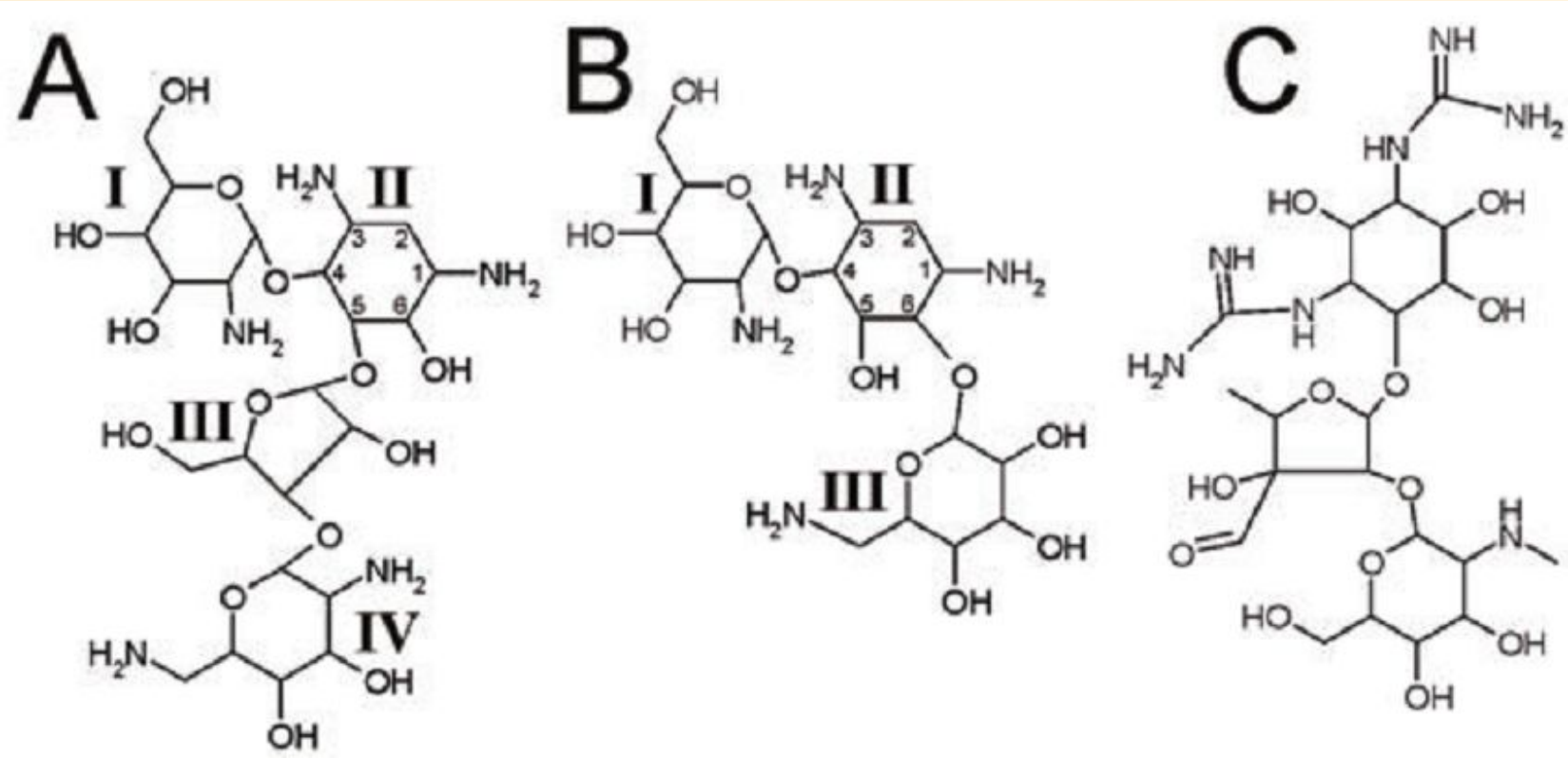
При узнавании правильного кодон-антикодонового дуплекса аа-тРНК с кодоном мРНК в А-участке малая субчастица принимает «закрытую» конформацию, в которой «голова» малой субчастицы наклоняется к телу и к большой субчастице, что и запускает цепь конформационных перестроек, приводящих, в конечном счете, к активации GTPазной активности фактора EF-Tu.

При связывании EF-G голова малой субчастицы поворачивается определенным образом относительно тела, а после транслокации и ухода деацилированной тРНК – возвращается в исходное положение. Движения регулярно повторяются в каждом цикле элонгации, поэтому их и назвали «шестеренкоподобными»,

Алкалоид рицин расщепляет одну-единственную фосфодиэфирную связь в 23S рРНК в так называемой «сарцин-рициновой» петле (район GTPаза-активирующего центра), что лишает рРНК конформационной подвижности и в результате приводит к полной инактивации всей огромной рибосомы.

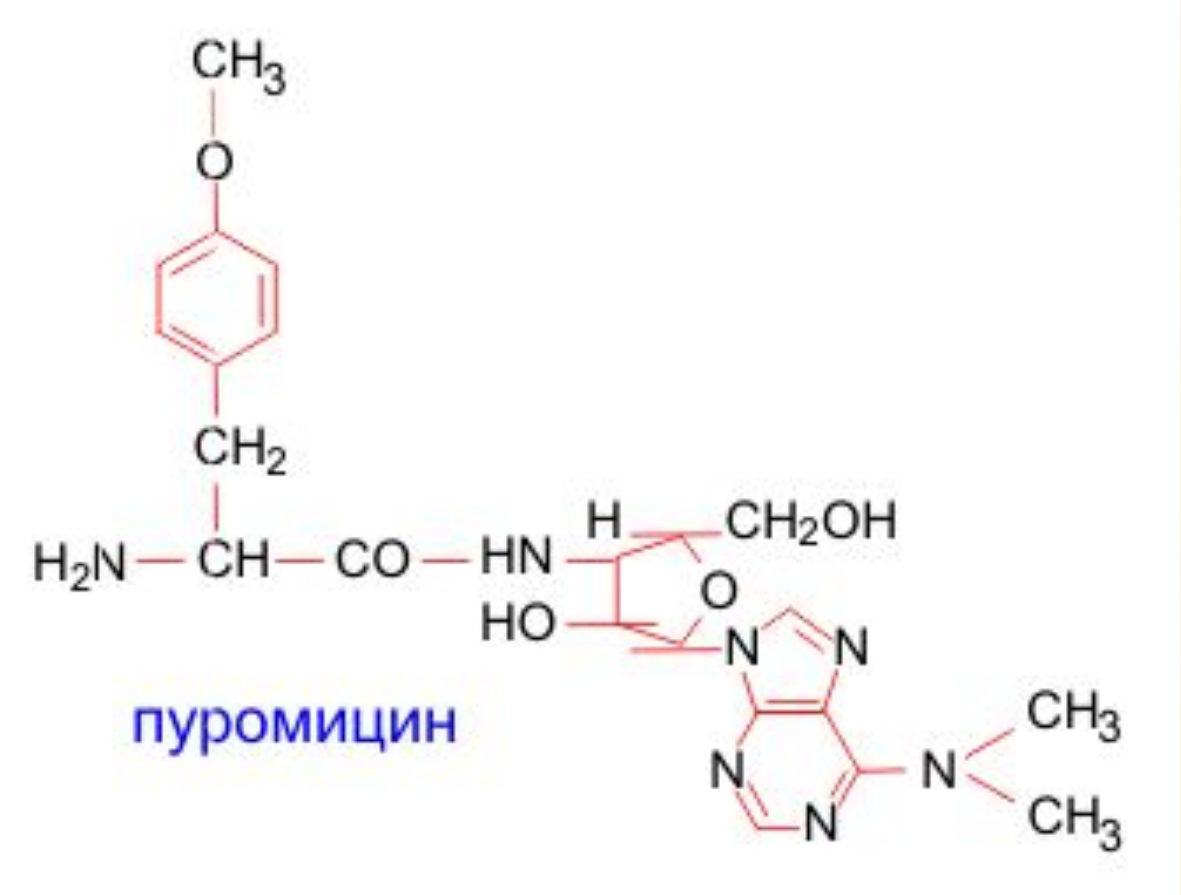
Рибосома и антибиотики

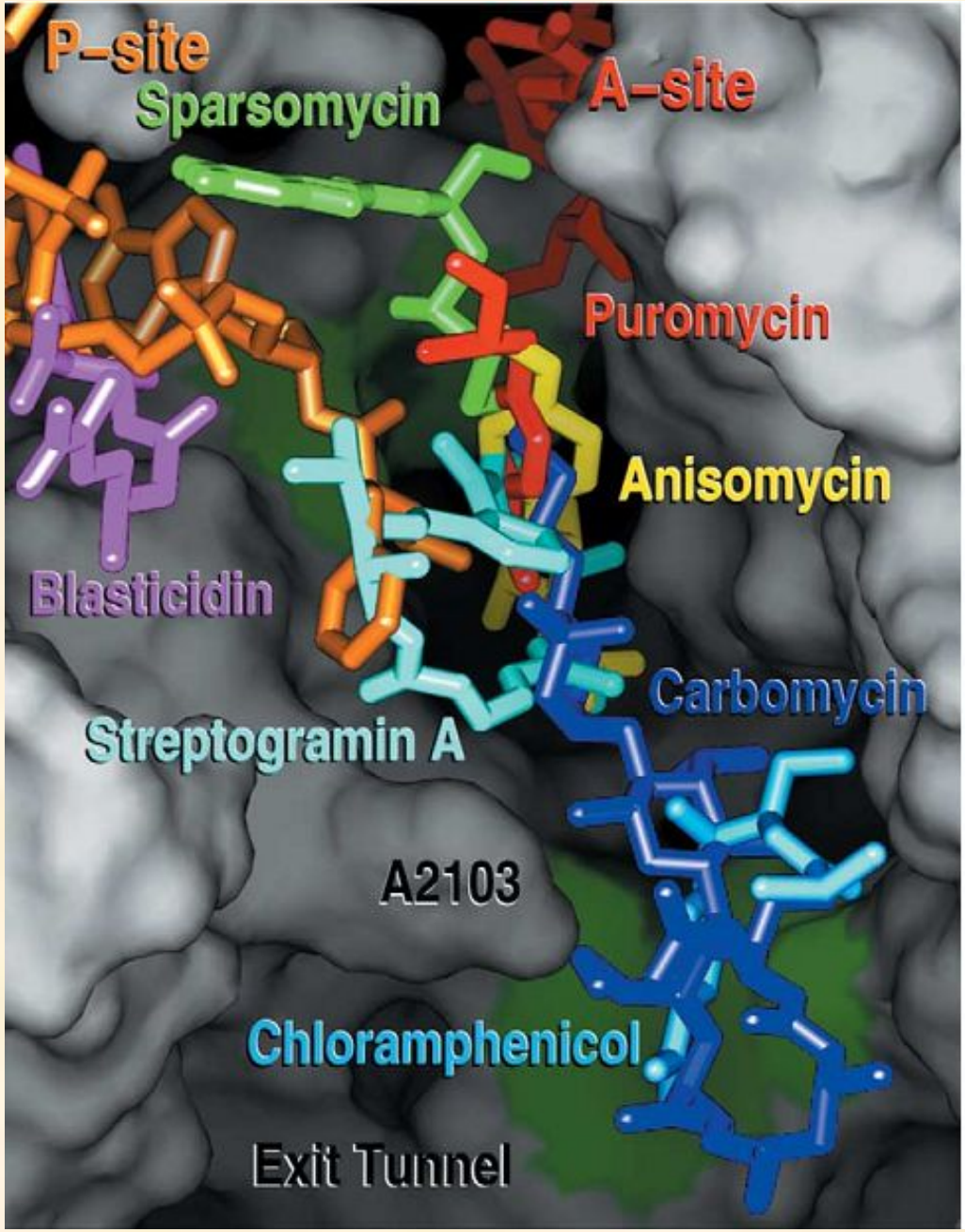
Аминогликозиды узнают с высокой специфичностью структуру декодирующего центра 16S рРНК (по принципу «ключ-замок»), в результате чего рибосома перестает распознавать «правильную» аминоацил-тРНК и резко возрастает частота включения «неправильных» аминокислотных остатков в синтезируемый белок.



Структуры аминогликозидных антибиотиков неомицина (A), канамицина (B) и стрептомицина (C)

Макролиды, содержащие 14-16-членное лактоновое кольцо, остатки сахара и боковые заместители, взаимодействуют с нуклеотидами 23S рРНК, образующими ближайшую к ПТЦ часть «пептидного канала», и тем самым останавливают синтез белка





Структуры некоторых антибиотиков, наложенные на их участки связывания во фрагменте 50S субчастицы в районе ПТЦ. Срез субчастицы, обращенный к малой субчастице, окрашен в серый цвет. Оранжевым цветом показан модельный 3’-концевой фрагмент пептидил-тРНК в Р-участке.