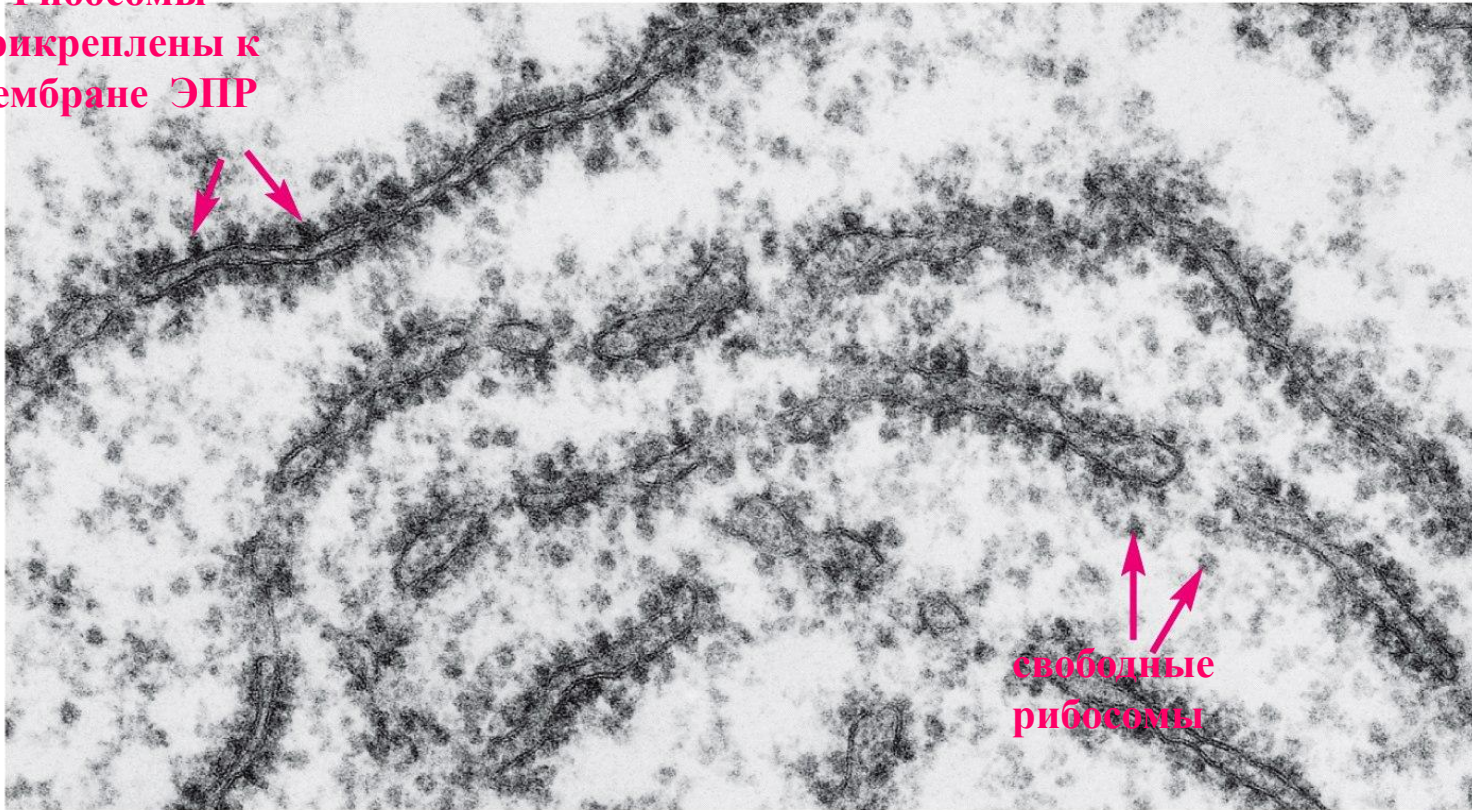


Лекция 13
Биосинтез белков (трансляция)

Биосинтез белков осуществляется в цитоплазме эукариотической клетки, где присутствуют миллионы рибосом

Рибосомы
прикреплены к
мембране ЭПР

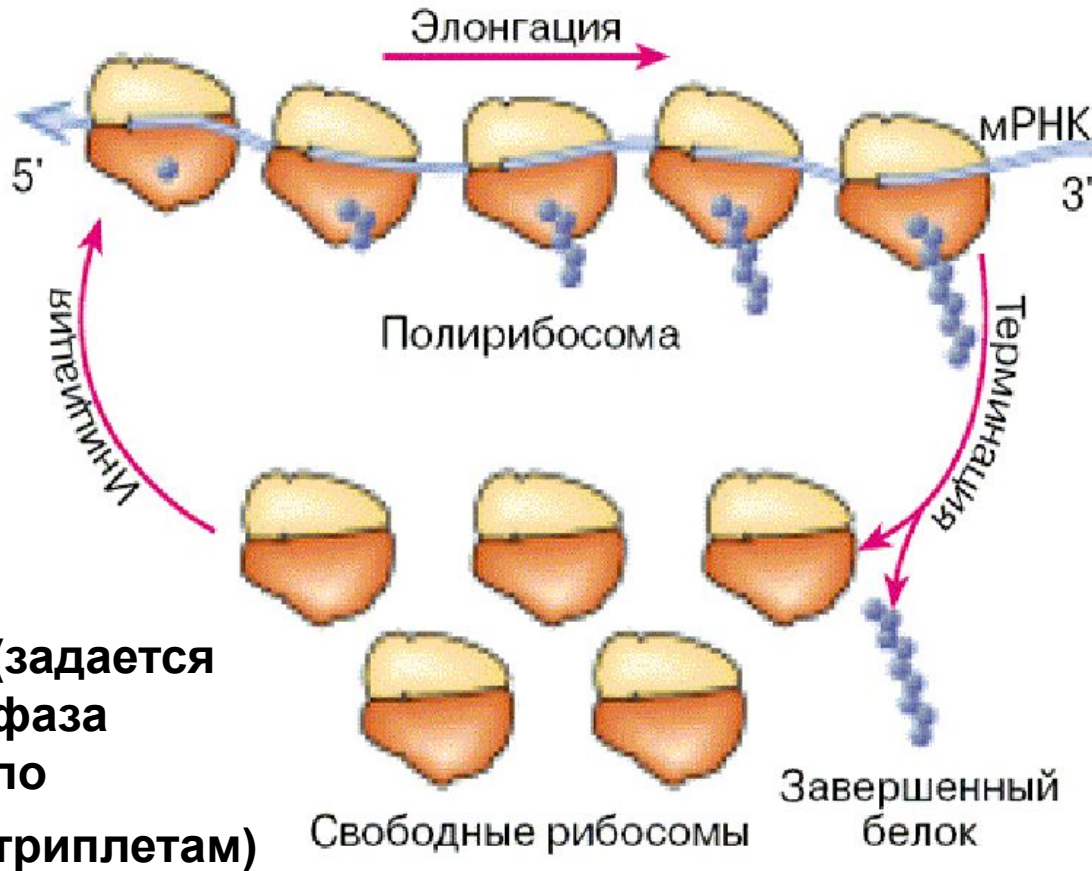


свободные
рибосомы

400 nm

Рибосомные субчастицы собираются из предшественников в ядрышке эукариотической клетки. Там вновь синтезированные рРНК связываются с рибосомными белками, синтезированными в цитоплазме, и экспортируются в цитоплазму.

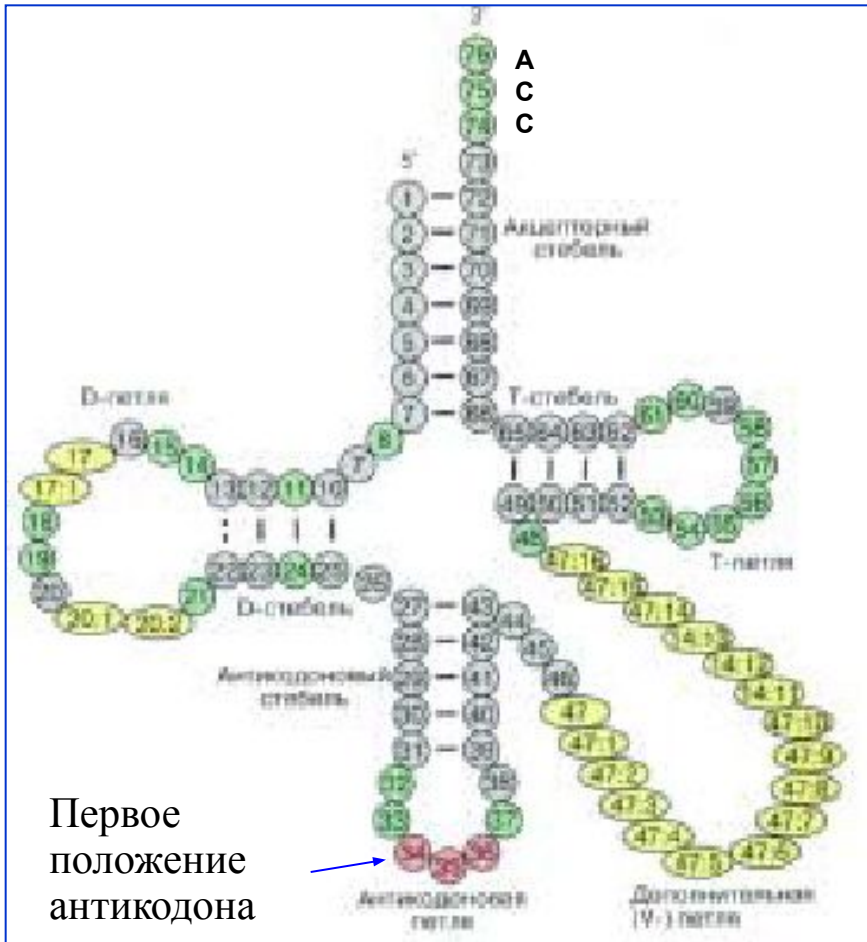
Цикл (эпицикл) трансляции



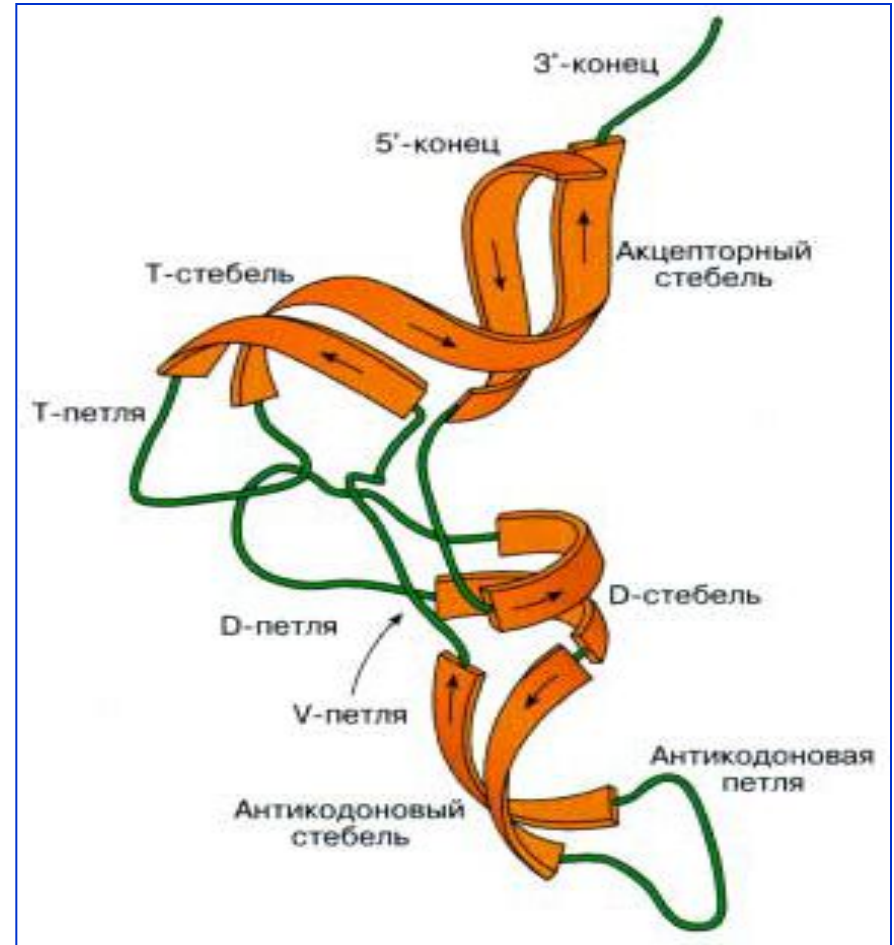
- Стадии инициации и терминации – это модификации стадии элонгации.
- В полирибосоме одна мРНК ассоциирована со многими рибосомами, ее одновременно транслирующими (1:200).
- При интенсивном белковом синтезе рибосомы в полирибосоме могут

находиться вплотную друг к другу, и каждую секунду происходит соскакивание одной рибосомы у 3'-конца кодирующей части мРНК и посадка другой у 5'-конца.

тРНК - адапторная молекула белкового синтеза

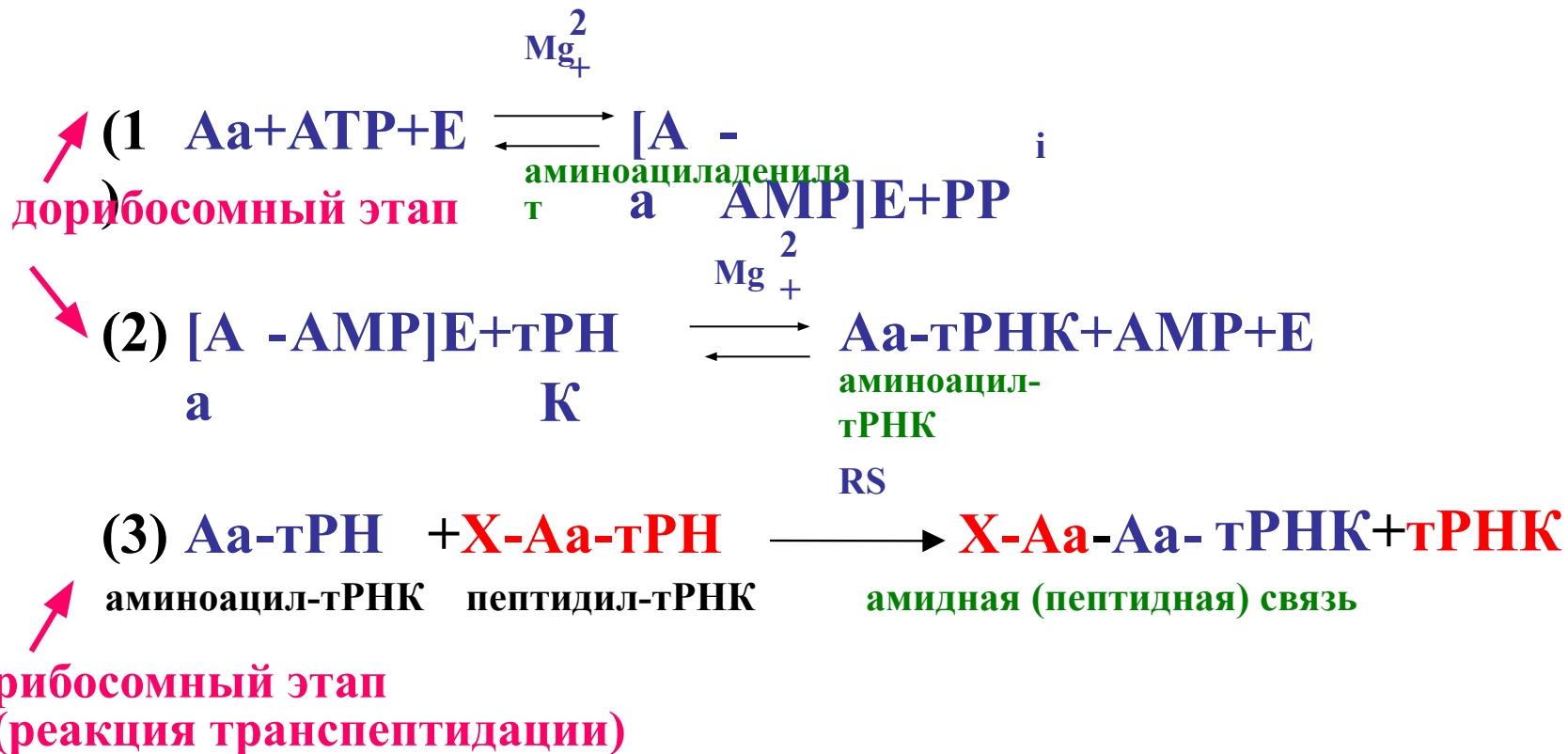


Вторичная структура тРНК



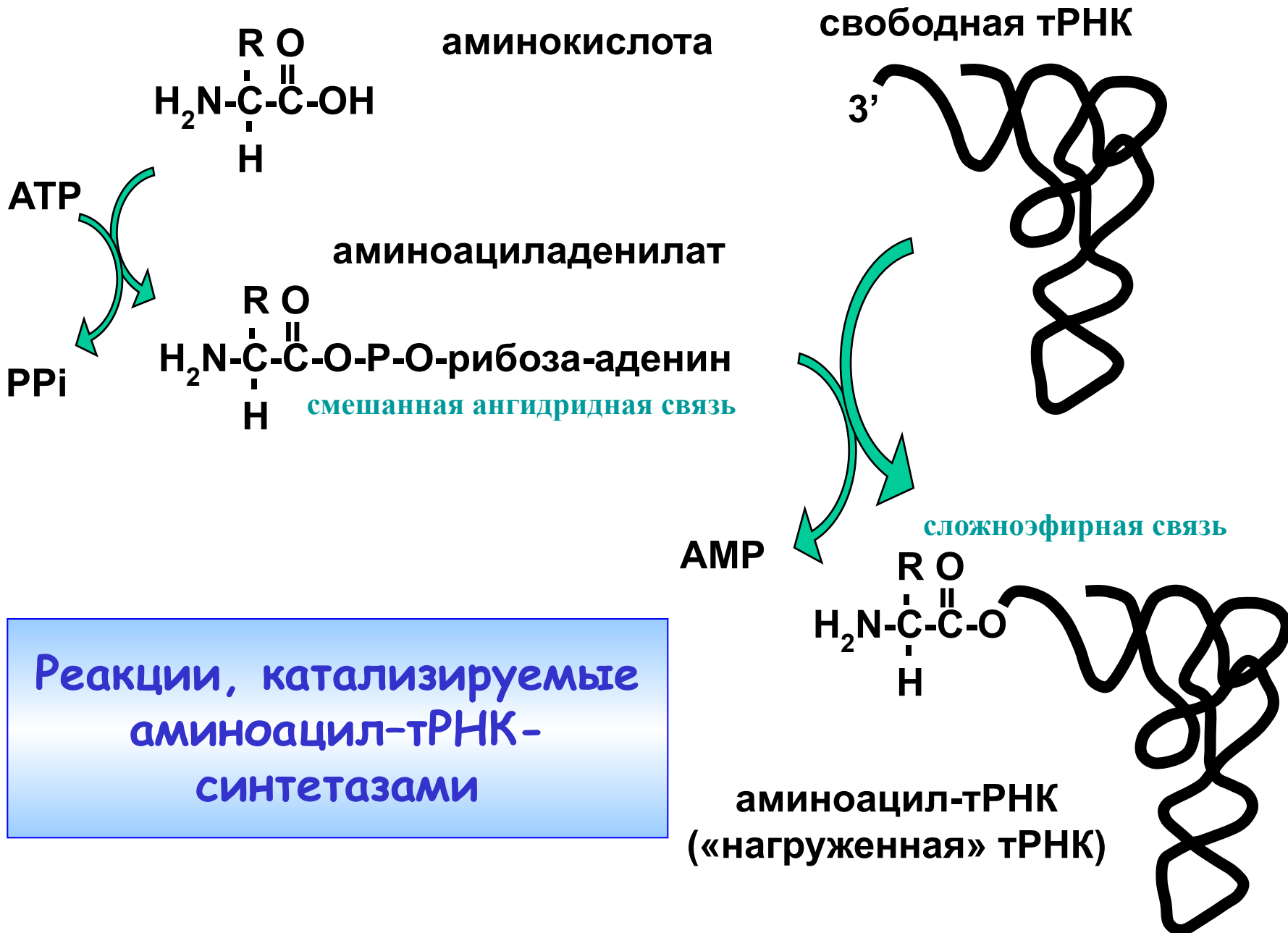
Третичная структура тРНК

Химические реакции включения аминокислоты в полипептидную цепь



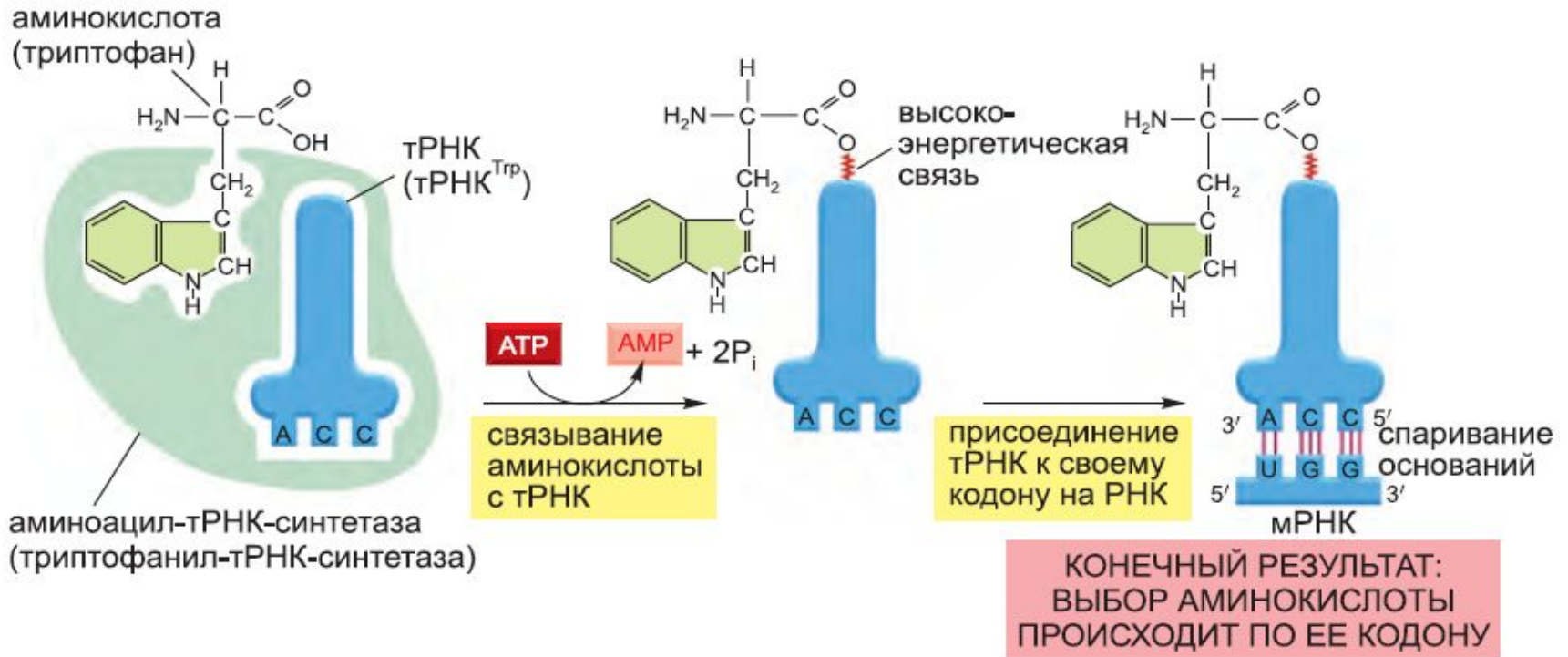
E – аминоксил-тРНК-синтетаза (АРСаза, АРСаза)

RS – рибосома



Реакции, катализируемые
аминоацил-тРНК-
синтетазами

Генетический код транслируется при участии двух адапторов: аминоксил-тРНК-синтетаза и тРНК, которые действуют друг за другом



Аминокислота триптофан отбирается кодоном UGG в мРНК при участии триптофанил-тРНК-синтетазы

Ошибка на любой стадии будет приводить к включению «неправильной» аминокислоты в белок, что может привести к синтезу мутантного белка.

Дорибосомный этап белкового синтеза

Аминоацил-тРНК-синтетазы катализируют активацию аминокислот и аминоацилирование тРНК:

- в большинстве клеток для каждой из 20 аминокислот имеется по одной АРСазе (есть исключения – две изоформы LysRSазы у *E.coli*; некоторые прокариоты имеют меньше 20 АРСаз, модификация аминокислот происходит после их присоединения к тРНК););
- одна и та же АРСаза аминоацилирует все изоакцепторные тРНК для данной аминокислоты;
- активация аминокислот и аминоацилирование тРНК протекают сопряженно: АРСазы образуют промежуточные аминоациладенилат-ферментные комплексы;
- АРСазы - обычно функциональные димеры (даже если структурные мономеры).

Два класса аминокцил-тРНК-синтетаз

Позиционная
специфичность
аминоацилирования

Активируемые
аминокислоты

Класс I
2'-ОН
концевой
тРНК

Arg Leu
Cys Met
G1 Trp
G1 Tyr
H Val

в основном с ^eобъемным
гидрофобным радикалом

Характерные
аминокислотные
мотивы APCаз

His-Ile-Gly-His
Lys-Met-Ser-Lys-Ser

CE структура в основном мономеры

Класс II
3'-ОН
концевой
тРНК

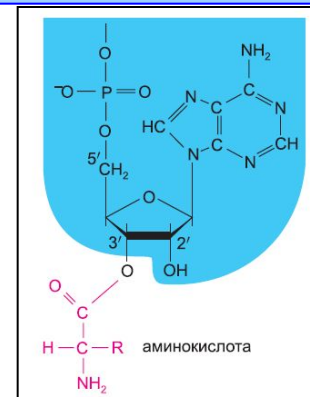
Ala Lys
Asn **Phe**
Asp Pro
G1 Ser
His Thr

исключение

в основном с небольшими
нейтральными остатками

Три мотива с характерным
чередованием гидрофильных
и гидрофобных АК

обязательно олигомеры

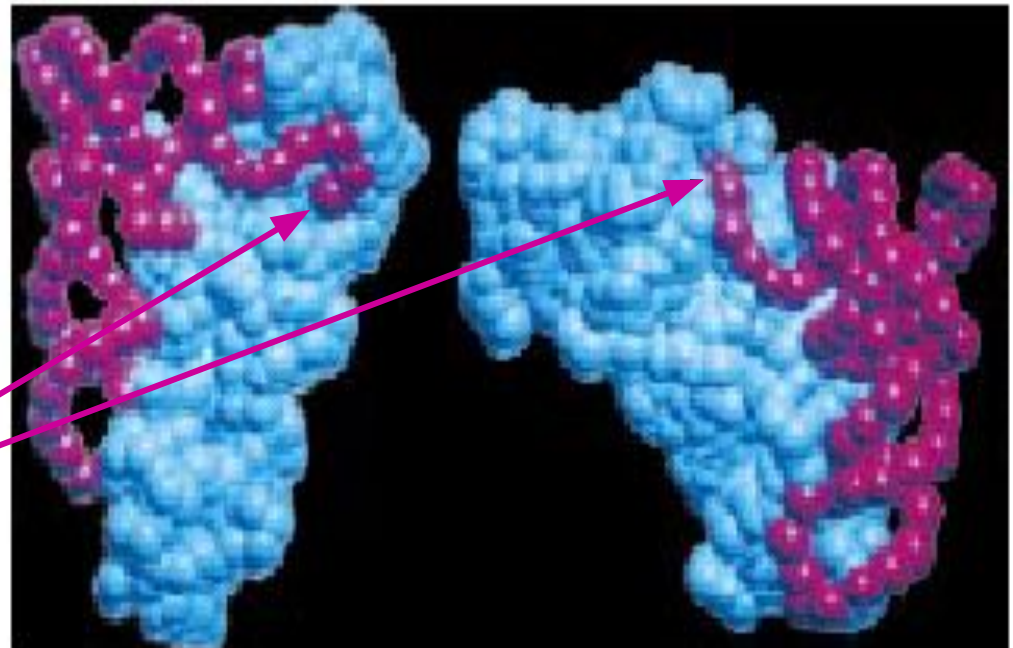


Класс I

Класс II

Пространственные модели комплексов аминокил-тРНК-синтетаз с тРНК

тРНК связаны с ферментами классов I и II «разными боками»



Активный центр

**неглубокая выемка
на поверхности белка**

глубокий узкий карман

**Особенности структуры
активного центра**

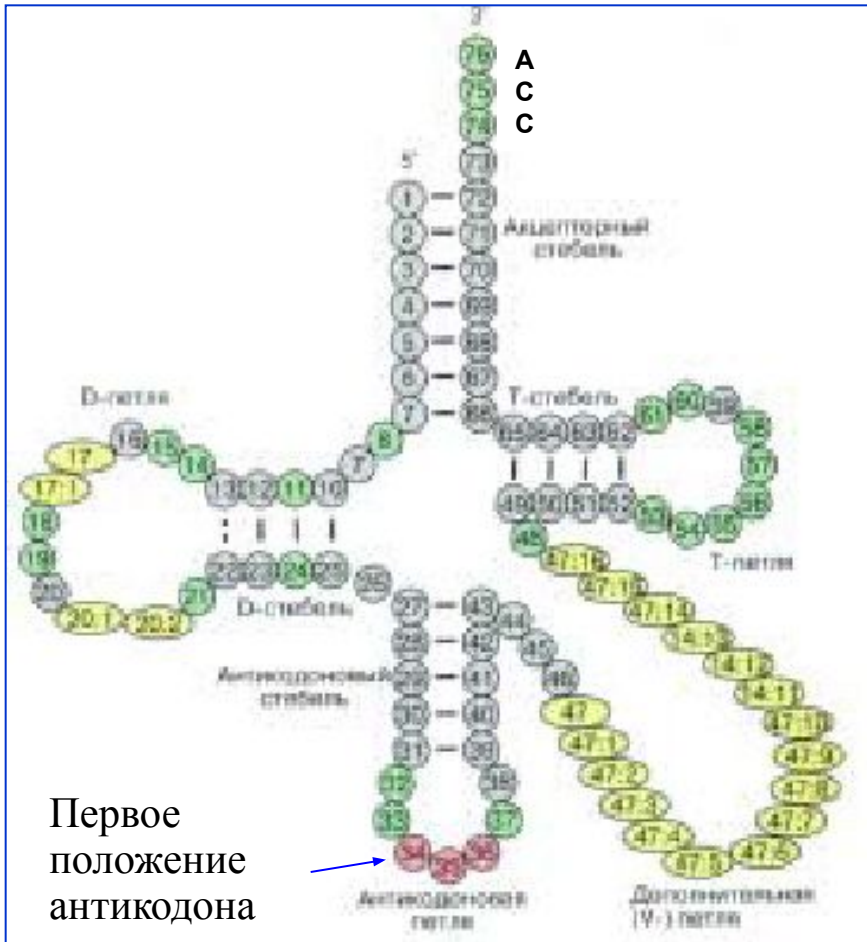
укладка Россмана

**7 антипараллельных
бета-тяжей**

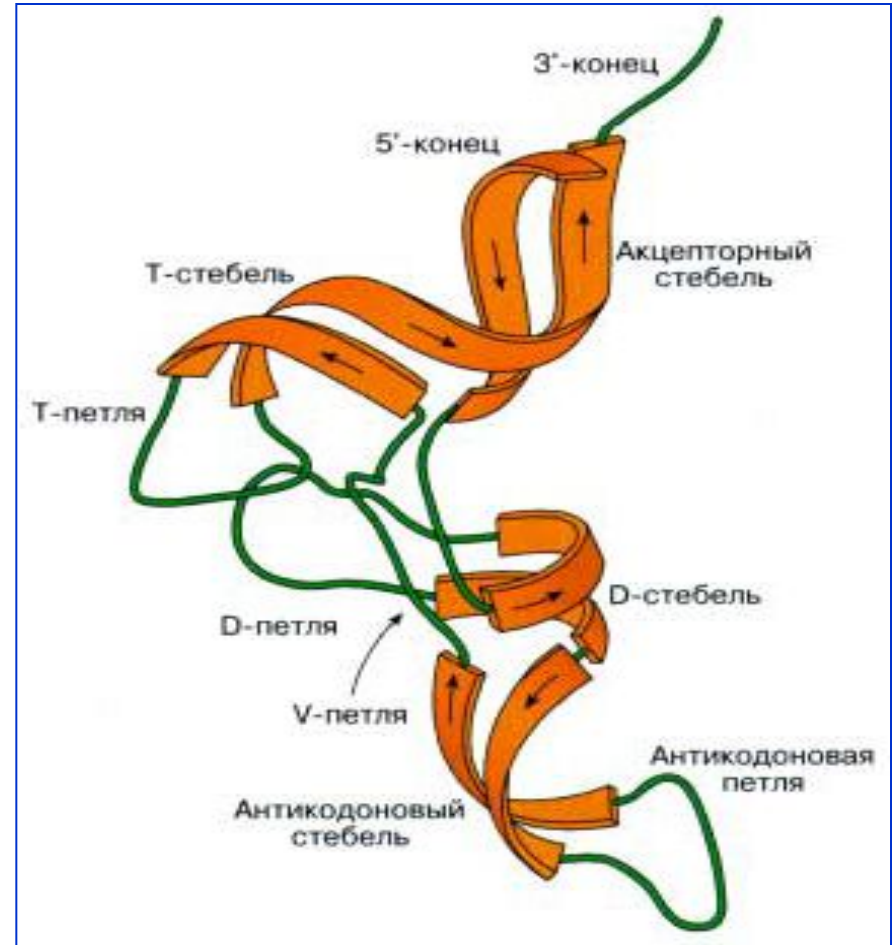
• Крупным радикалам легче связаться с неглубокой впадиной, а карман удобен для селекции мелких аминокислотных остатков. Различные группы активируемой аминокислоты взаимодействуют с аминокислотами, формирующими активный центр фермента, что облегчает контроль и коррекцию связывания.

• Последовательности, на которых основана классификация АРСаз,

тРНК - адапторная молекула белкового синтеза

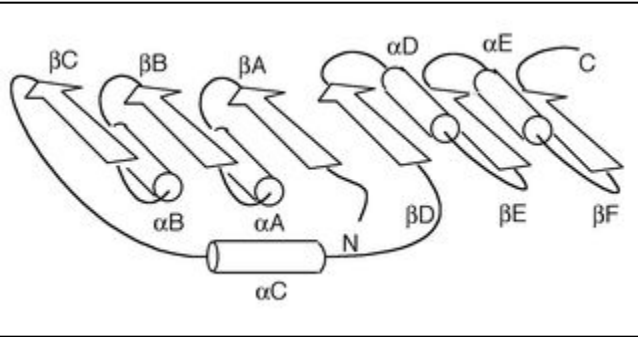


Вторичная структура тРНК

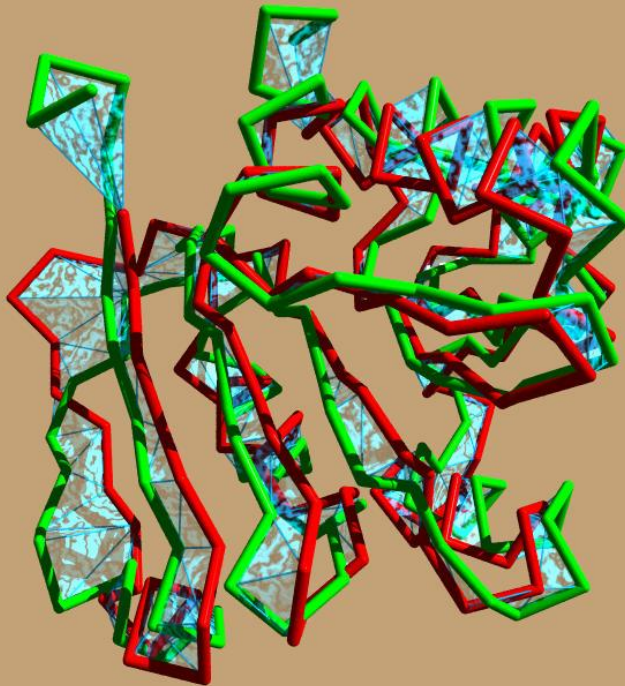


Третичная структура тРНК

Укладка Россмана (Rossmann fold)



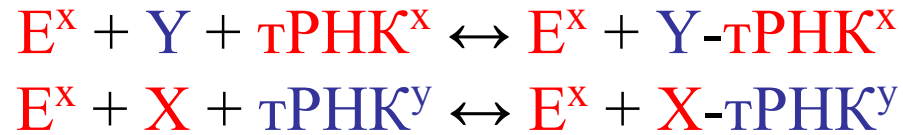
"Укладка Россмана" представляет собой шесть параллельных бета-тяжей, чередующихся с альфа-спиральными участками



- Пептидные мотивы, характерные для АРСаз 1-го класса, располагаются именно в структуре Россмана и образуют часть АТФ-связывающего центра.
- Положительно заряженные остатки гистидина консервативного тетрапептида **His-Ile-Gly-His** взаимодействуют с фосфатными группами АТФ.

«Сверхспецифичность» аминокцил-тРНК-синтетаз

1. Два типа возможных ошибок аминокцил-тРНК-синтетазы (отбор «неправильной» аминокислоты и «неправильной» тРНК) приводят к одинаковому ошибочному результату:



2. При отборе аминокислот в реакции аминокцилирования тРНК происходит каскадное усиление специфичности аминокцил-тРНК-синтетаз:

- ❖ Отбор за счет различий в энергии взаимодействия боковых радикалов аминокислот с аминокислотами активного центра АРСаз, т.е. правильная аминокислота имеет наиболее высокое сродство к «карману» активного участка своей АРСазы;
- ❖ Два последовательных дополнительных механизма коррекции: гидролиз «ошибочных» аминокциладенилатов и «ошибочных» аминокцил-тРНК.

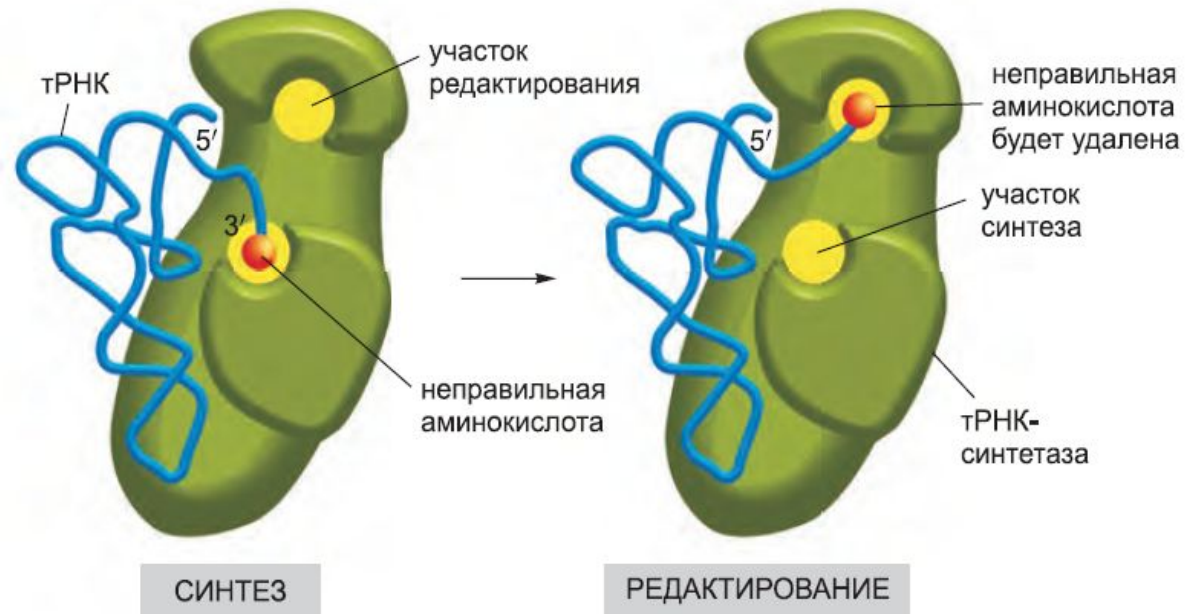
3. Существуют также специальные механизмы контроля образующихся продуктов, например:

- ❖ Фермент D-тирозилгидролаза (специфический гидролиз D-тирозил-тРНК^{Tyr});
- ❖ Селективные системы деградации аномальных белков.

«Сверхспецифичность» аминоктил-тРНК-синтетаз: гидролитическое редактирование «неправильной» аминоктил-тРНК

• тРНК при связывании с АРСазой, пытается вытолкнуть аминокислоту во второй карман, точные размеры которого исключают правильную аминокислоту, но допускают введение близкородственных

аминокислот. При введении аминокислоты в этот «участок редактирования», ее связь с АМР гидролизуется (или связь с самой тРНК, если связь аминоктил-тРНК уже образовалась к тому времени) и она высвобождается из фермента.



Частота ошибок при аминоктировании тРНК 1:40 000

Отбор «правильных» тРНК

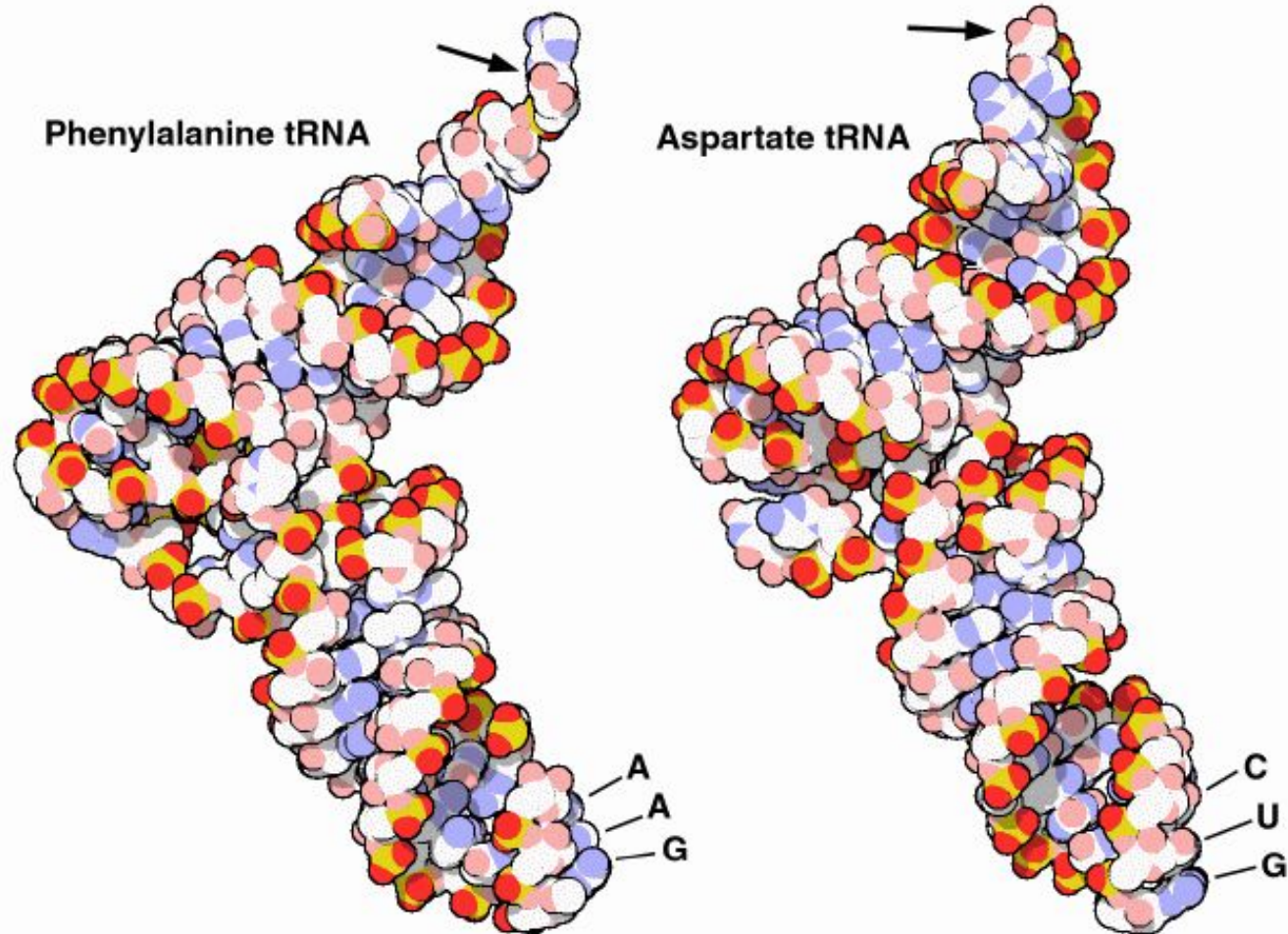
Двойственные требования к структуре тРНК:

- для универсальной адапторной функции необходимы сходные элементы структуры (L-форма);
- для узнавания 20-ю специфическими аминокцил-тРНК-синтетазами и специфического аминокцилирования (акцепторные функции) необходимы уникальные элементы распознавания.

Элементы, определяющие «индивидуальность» (identity) тРНК, или элементы распознавания:

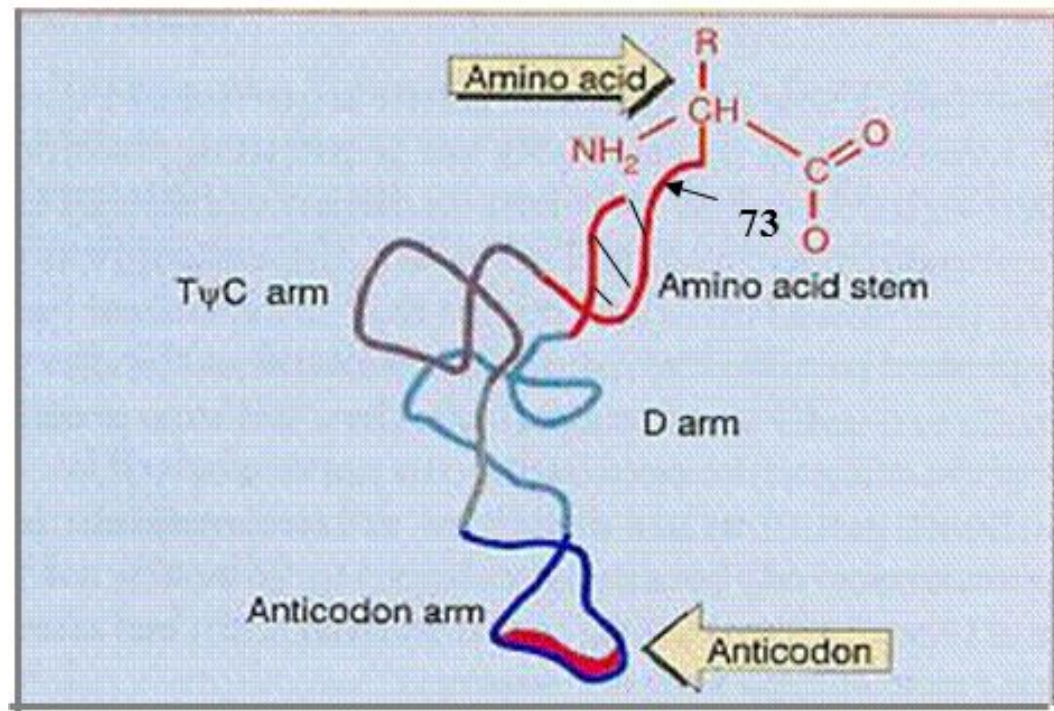
черты, воспринимаемые своей АРСазой, как «притягательные», а остальными 19-ю АРСазами, как «отталкивающие».

Структура тРНК^{Phe} и тРНК^{Asp}



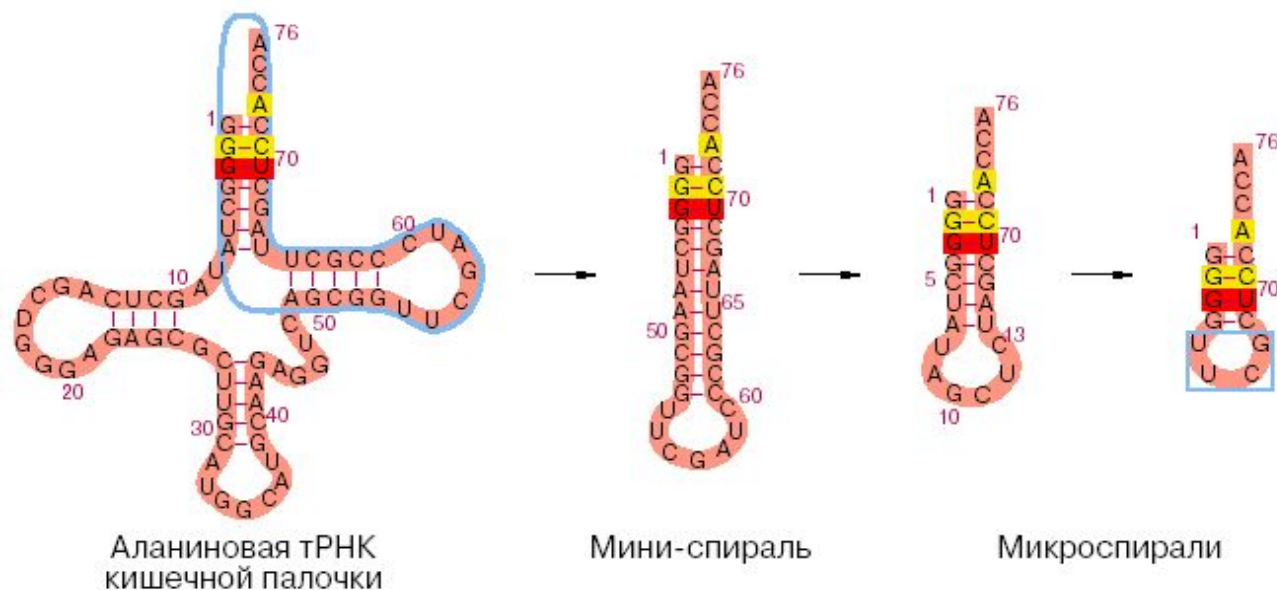
Отдельные элементы распознавания в тРНК

- **антикодон** (например, в тРНК^{Met}, тРНК^{Trp}); но не в случае, если аминокислота имеет 6 кодонов;
- **нуклеотид-«дискриминатор»** в положении **73** (А – для гидрофобных АК, G – для полярных АК) – есть у всех тРНК;
- **первые три пары нуклеотидов акцепторного стебля** (от одной до трех): 1-72, 2-71, 3-70;
- в некоторых случаях **неконсервативные нуклеотиды D- и T-петель**.



Модифицированные нуклеотиды - антидетерминанты аминоацилирования, препятствующие взаимодействию тРНК с чужой аминоацил-тРНК-синтетазой.

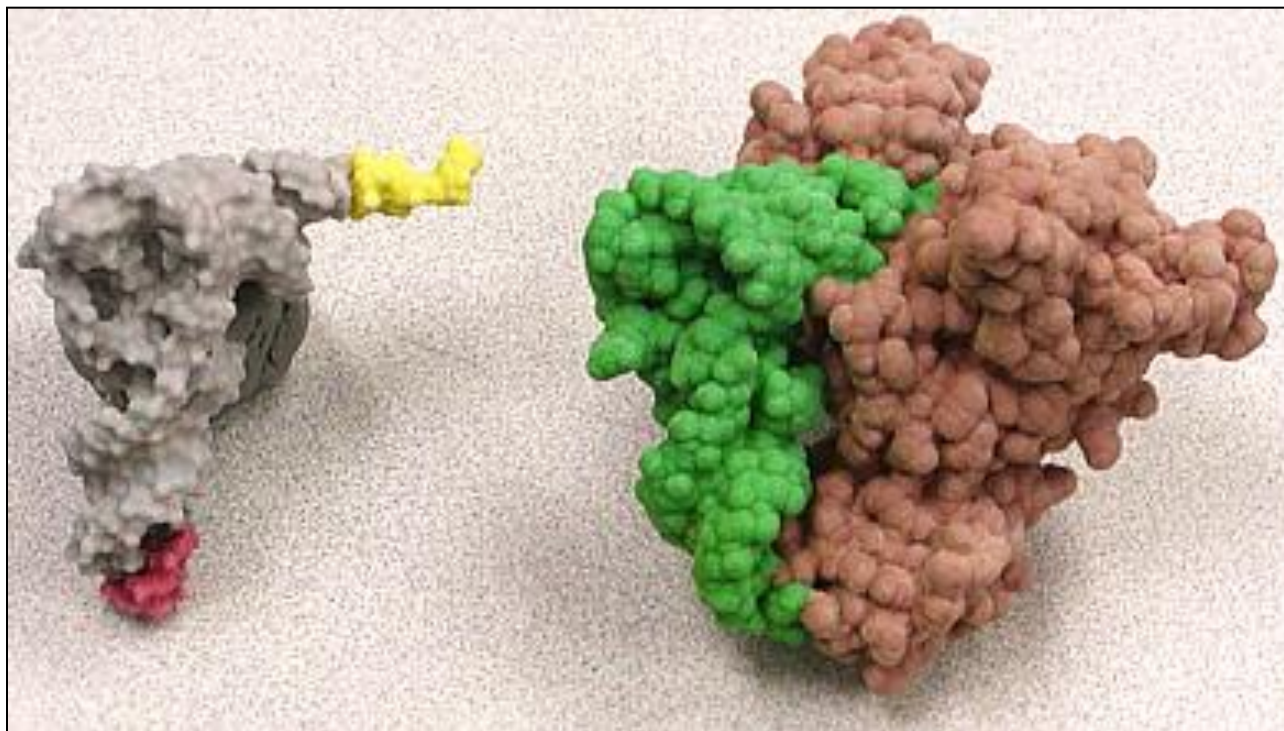
Наборы элементов распознавания в тРНК



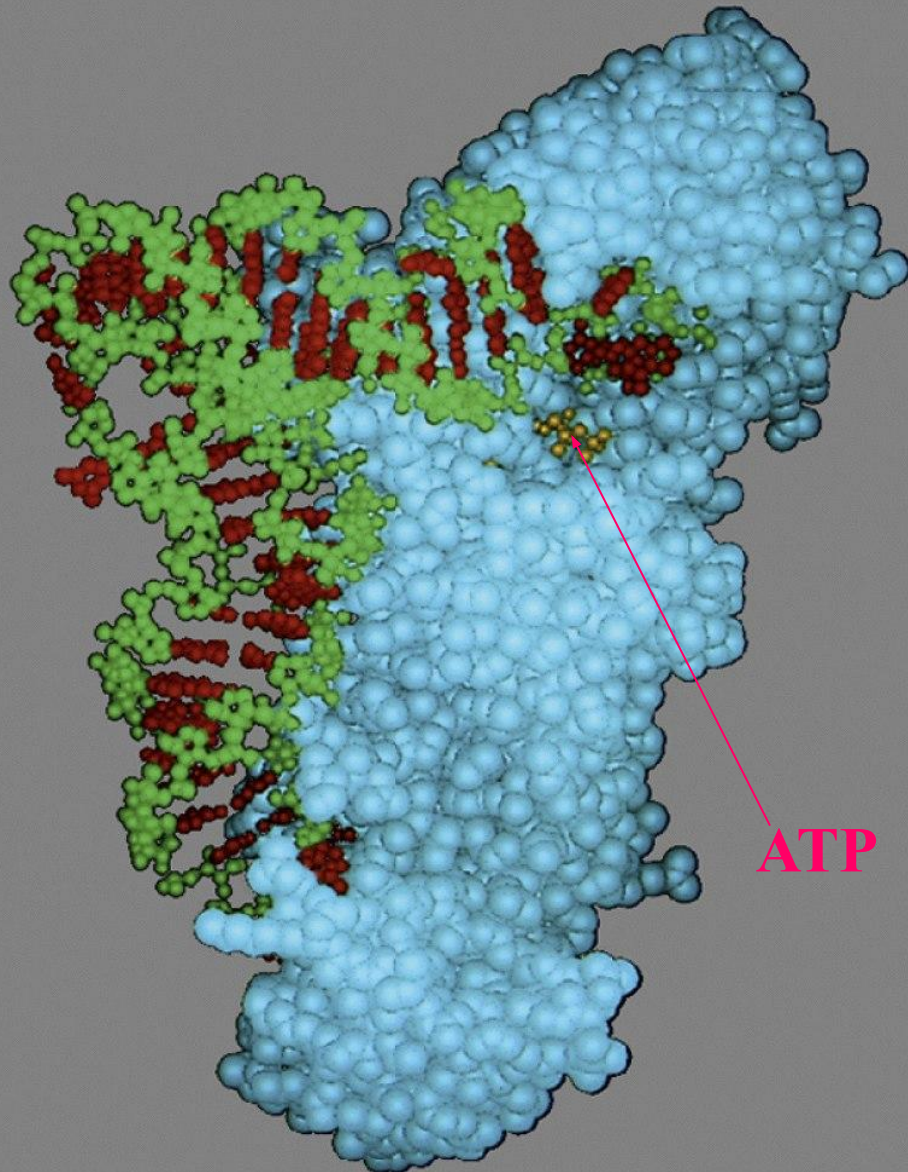
Искусственные субстраты, узнаваемые аланил-тРНК-синтетазой *E. coli*. Основным элементом распознавания – неканоническая пара **G-U** в акцепторном стебле

Индивидуальность тРНК определяется небольшим числом элементов, минимум одним. Специфическое взаимодействие между белком-ферментом и тРНК не укладывается в понятие какого-либо кода, а представляет собой сложный набор взаимодействий, обеспечивающий **структурную комплементарность** двух макромолекул.

Вовлечение акцепторного конца и антикодона
тРНК^{Gln} в комплекс с аминокил-тРНК-
синтетазой

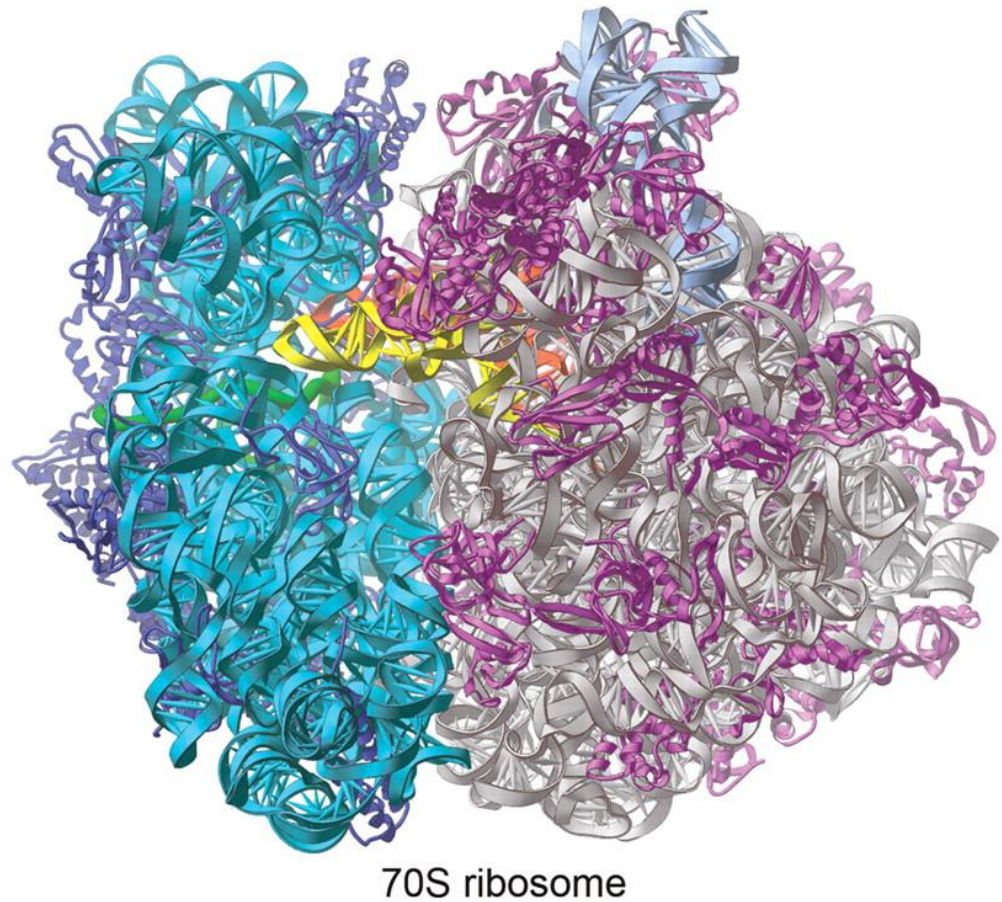
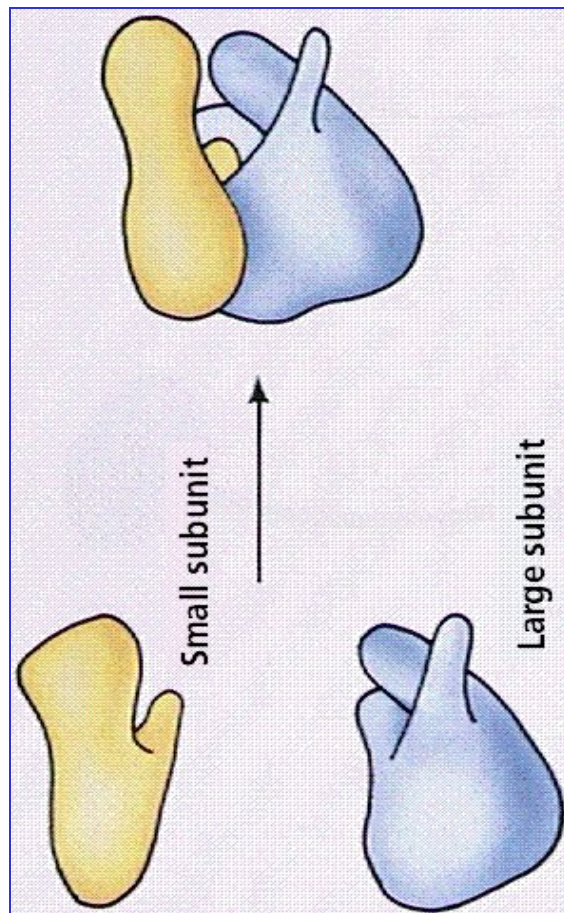


**Комплекс тРНК^{Gln} с
глутаминил-тРНК-
синтетазой (Т. Стейц)**



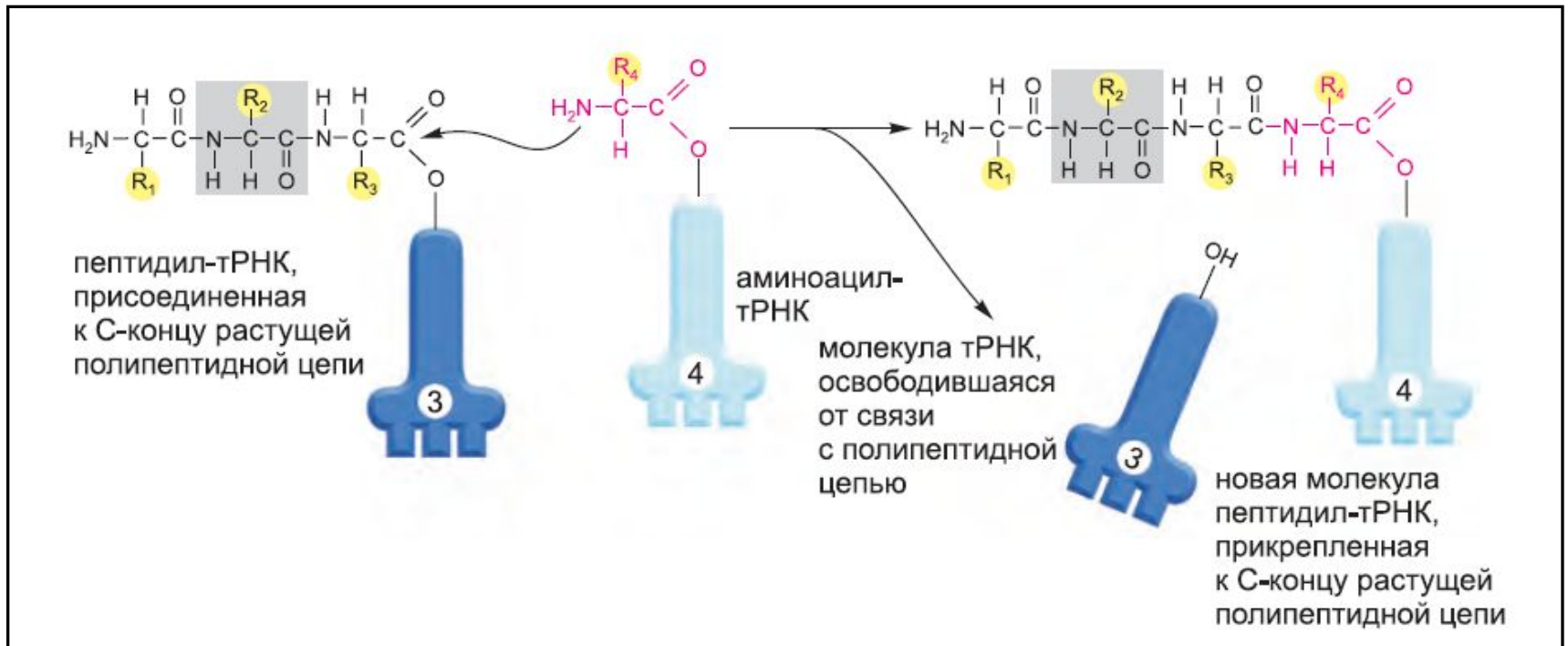
**В приведенной здесь
тРНК^{Gln} специфические
нуклеотиды в антикодоне
(внизу), и в акцептирующем
аминокислоту плече
позволяют ферменту АРСазе
(голубая) опознать ее как
правильную тРНК.**

РИБОСОМА - крупный внутриклеточный макромолекулярный ансамбль, ответственный за синтез полипептидной цепи из аминокислот; это рибонуклеопротеид, построенный из двух субчастиц



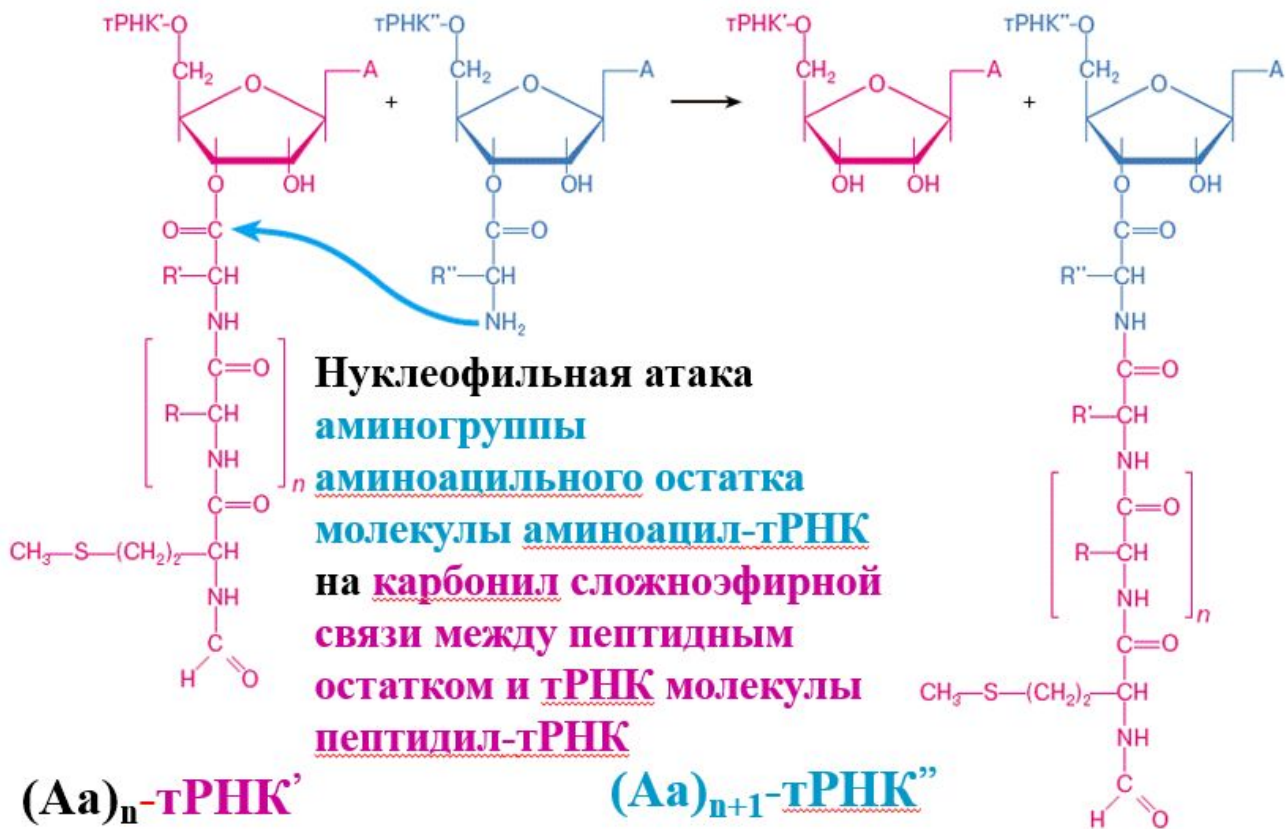
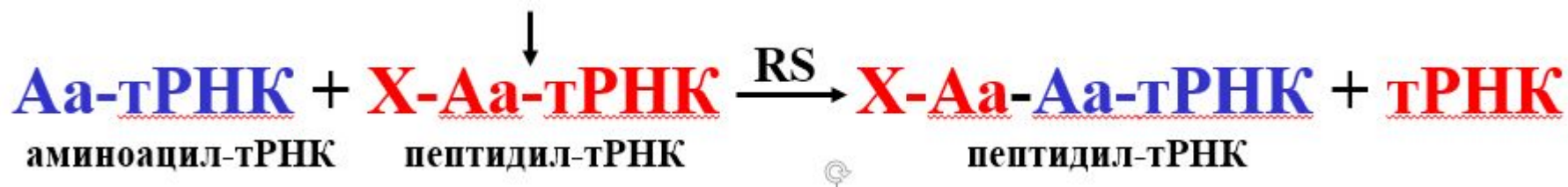
Рибосома

- **химически** – рибонуклеопротеид;
- **физически** - компактная частица, грубо аппроксимируемая сферой с диаметром около 30 нм.
- **функционально** - молекулярная машина, протягивающая вдоль себя цепь мРНК, считывающая закодированную в мРНК генетическую информацию и синтезирующая полипептидную цепь белка (рибозим).



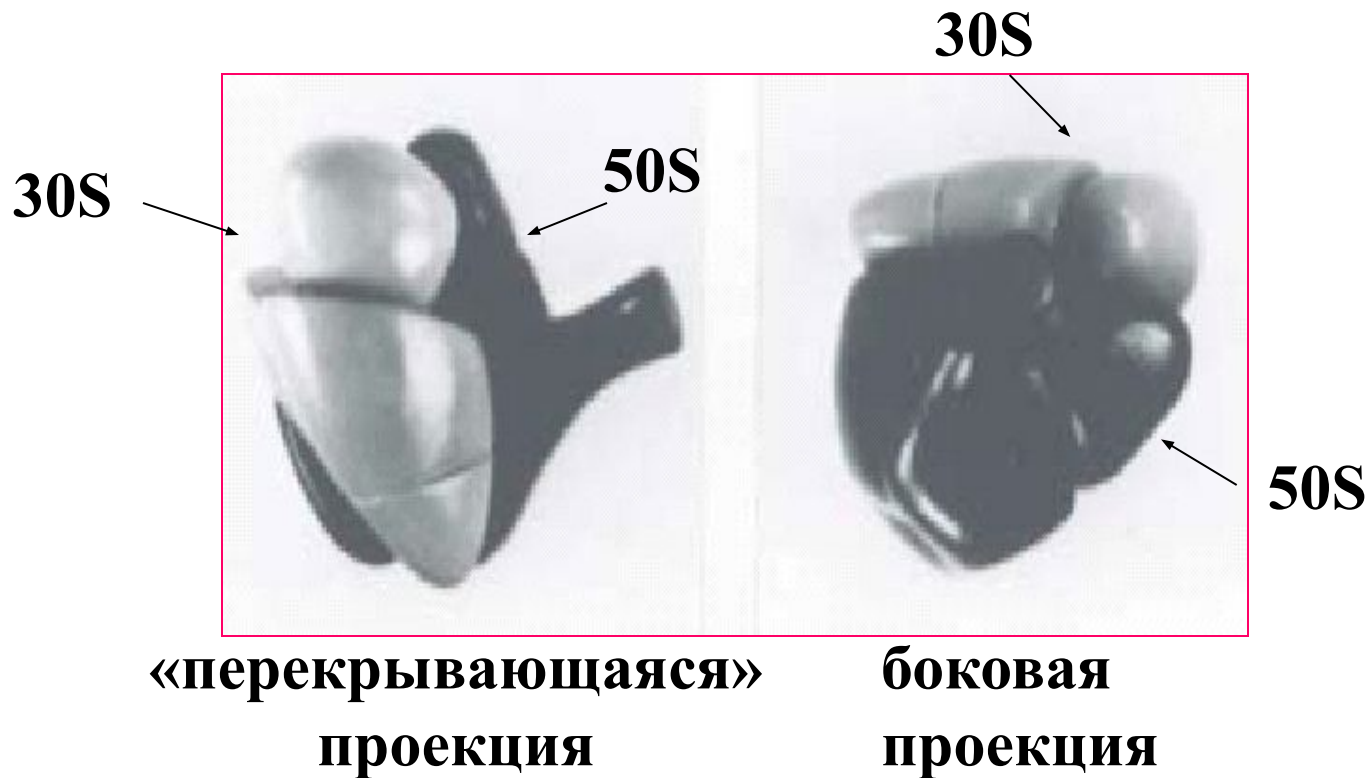
Удлинение полипептидной цепи, катализируемое рибосомой

Реакция транспептидации



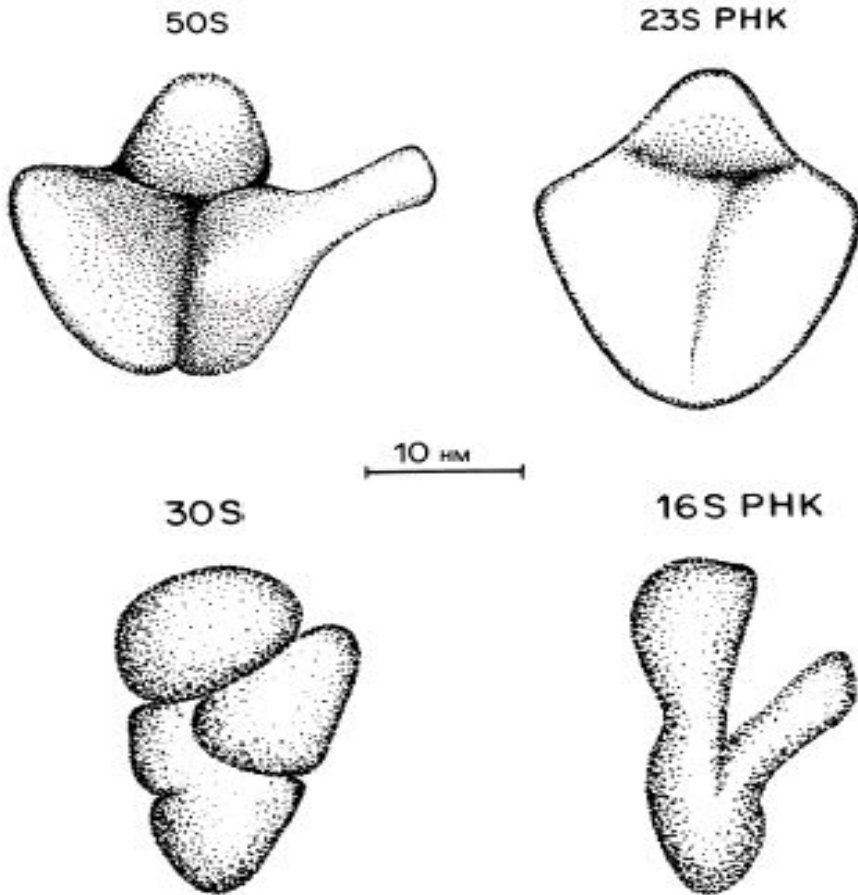
- Реакция транспептидации осуществляется в рибосоме и катализируется самой рибосомой, без участия какого-либо другого фермента.
- Рибозимом является большая субчастица рибосомы.

Модель рибосомы *E.coli*



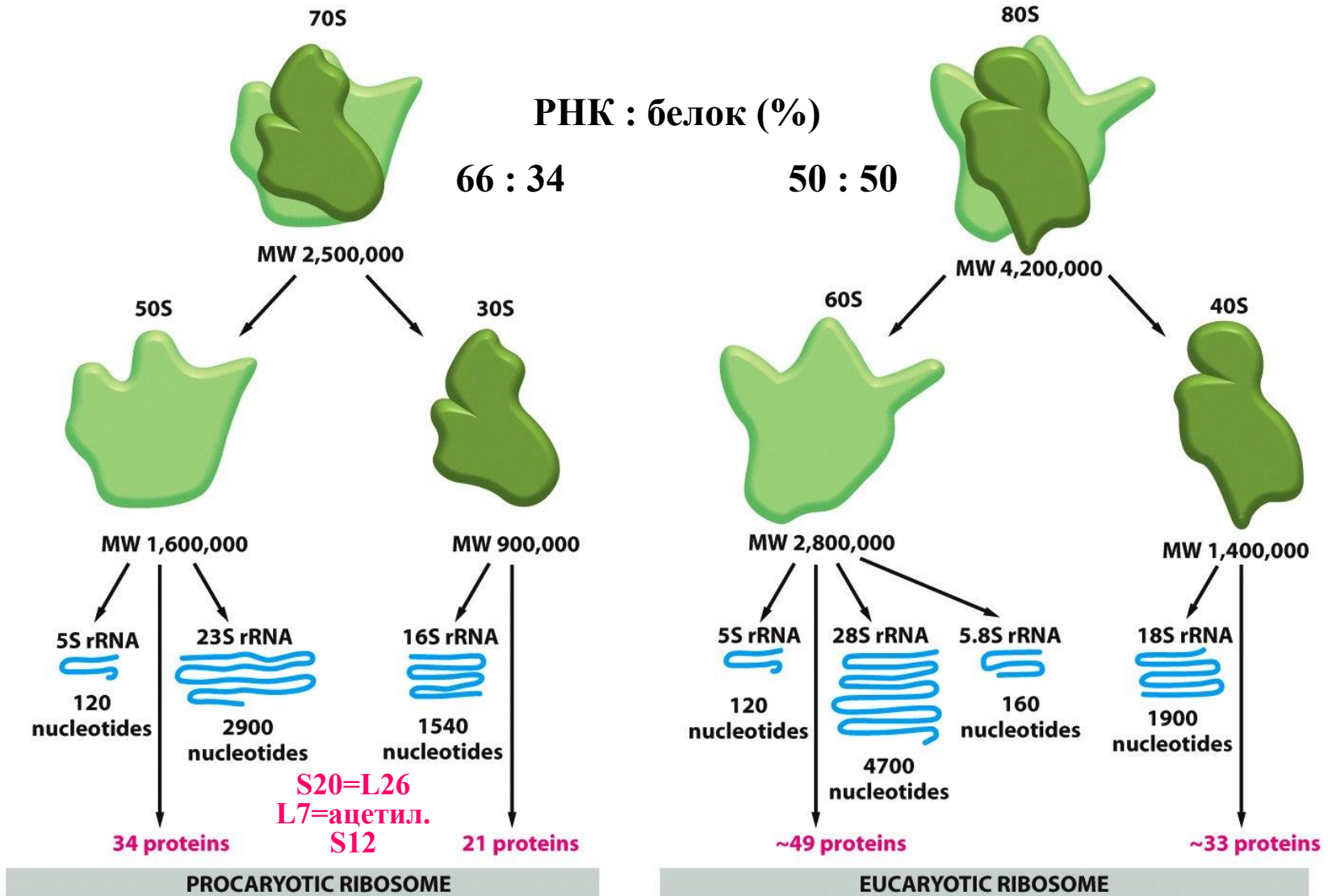
**Рибосома состоит из двух неравных
лабильно ассоциированных субчастиц**

Рибосомные субчастицы и рибосомные РНК *E. coli*



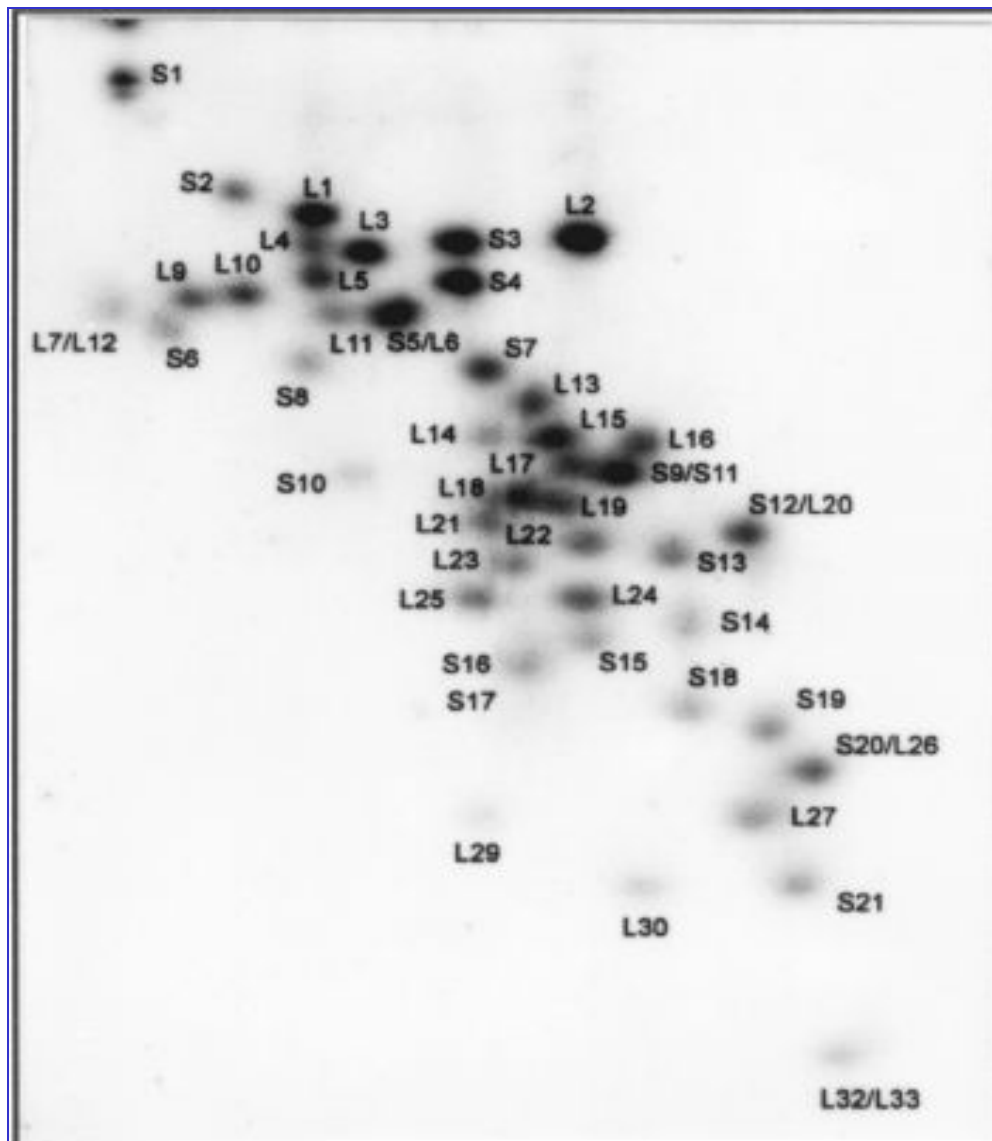
Каждая рибосомная субчастица содержит одну молекулу компактно свернутой высокополимерной рибосомной РНК, которая служит структурным ядром субчастицы.

Сравнение прокариотической и эукариотической рибосом



Дополнительные нуклеотиды эу-рРНК образуют множественные вставки, формирующие доп. домены, и не затрагивают основной структуры обеих рРНК

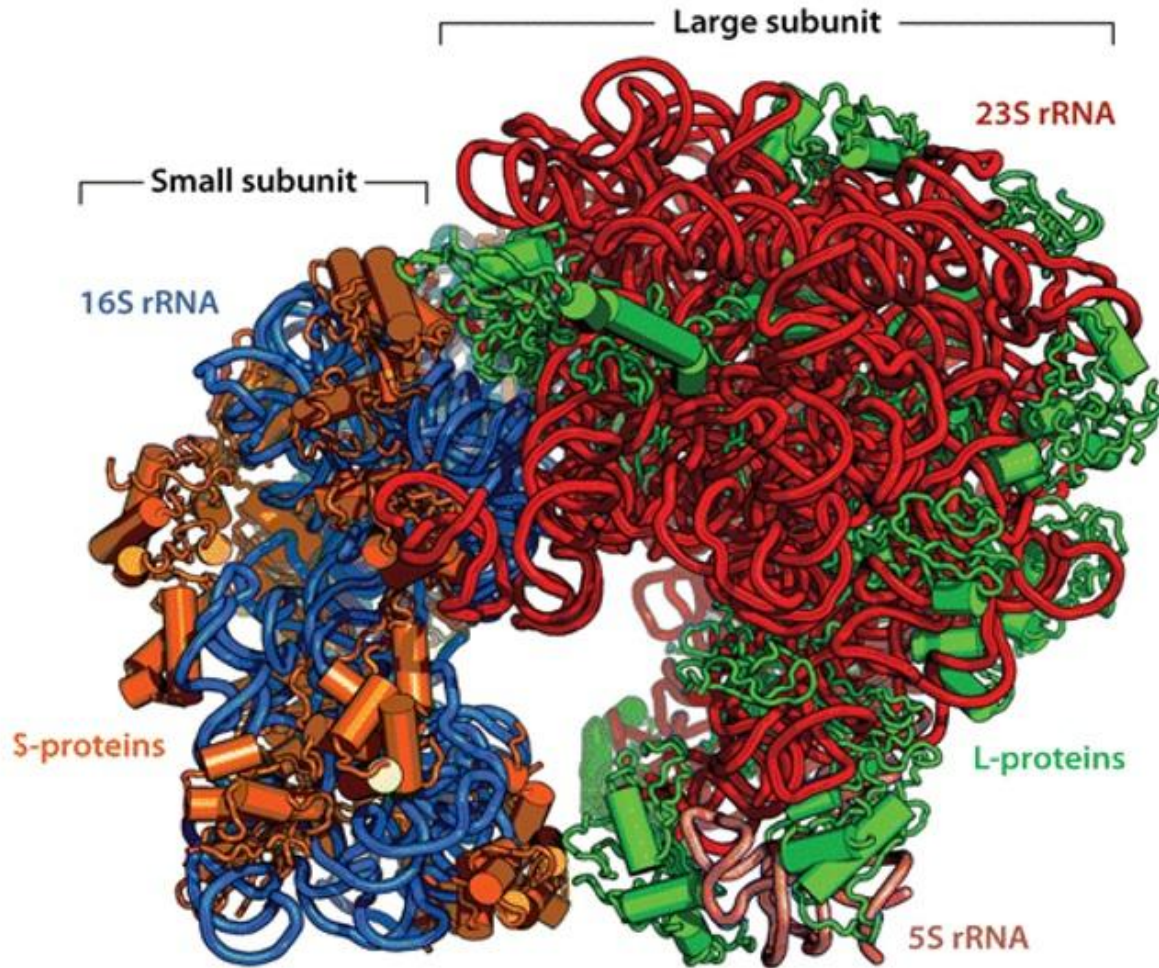
Рибосомные белки



Разделение индивидуальных белков бактериальной (*E. coli*) 70S-рибосомы путём двумерного электрофореза в полиакриламидном геле.

Каждый рибосомный белок имеет свою «персональную» посадочную площадку на рибосомной РНК.

Трехмерная модель 70S-рибосомы *E.coli*, содержащей молекулы рРНК и рибосомные белки



Нобелевская премия по химии за 2009 год за трехмерную модель с высоким разрешением малой субчастицы рибосомы *E.coli*, содержащей молекулу 16S-рРНК и рибосомные белки (Венкатраман Рамакришнан, Томас Стейц и Ада Йонат).

Типы рибосом

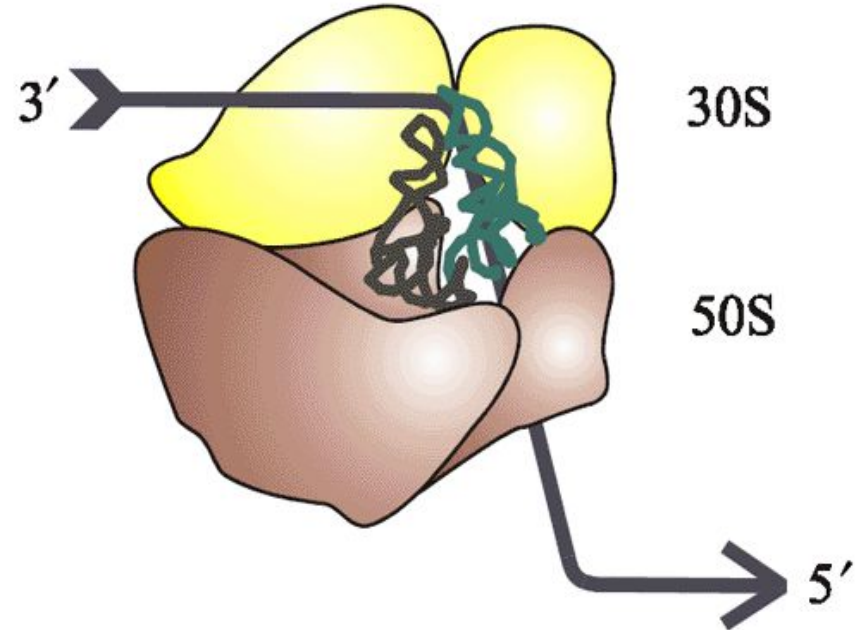
Прокариотический тип:
эубактерии,
сине-зеленые водоросли,
хлоропласты,
архебактерии,
митохондрии грибов (75S),
митохондрии млекопитающих
(55S, «минирибосомы»).

Эукариотический тип:
цитоплазма животных,
цитоплазма грибов,
цитоплазма высших растений.

Определяющая роль рРНК в рибосоме

рРНК определяют:

- форму и морфологические особенности субчастиц;
- ассоциацию субчастиц;
- связывание рибосомных белков;
- организацию функциональных центров рибосом;
- собственно катализ.



Полость между субчастицами – главный функциональный карман рибосомы.

Участки связывания тРНК в рибосоме

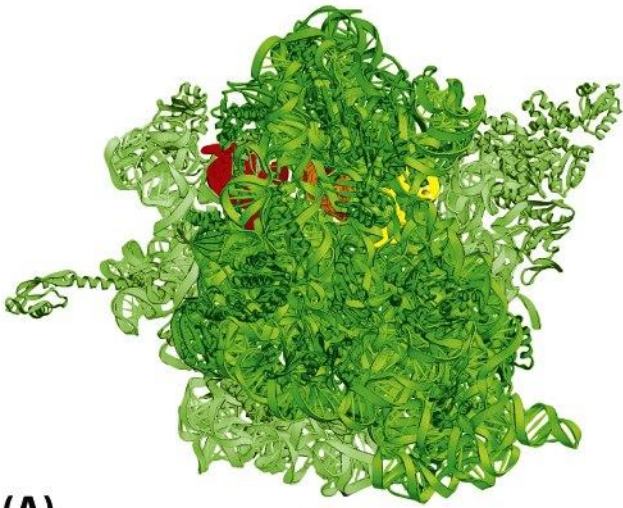
Рибосома содержит четыре участка связывания молекул РНК: один предназначен для мРНК, а три (названные А-сайтом, Р-сайтом и Е-сайтом) — для молекул тРНК .

Малая субчастица в составе полной транслирующей рибосомы имеет два **кодон-зависимых** тРНК-связывающих участка:

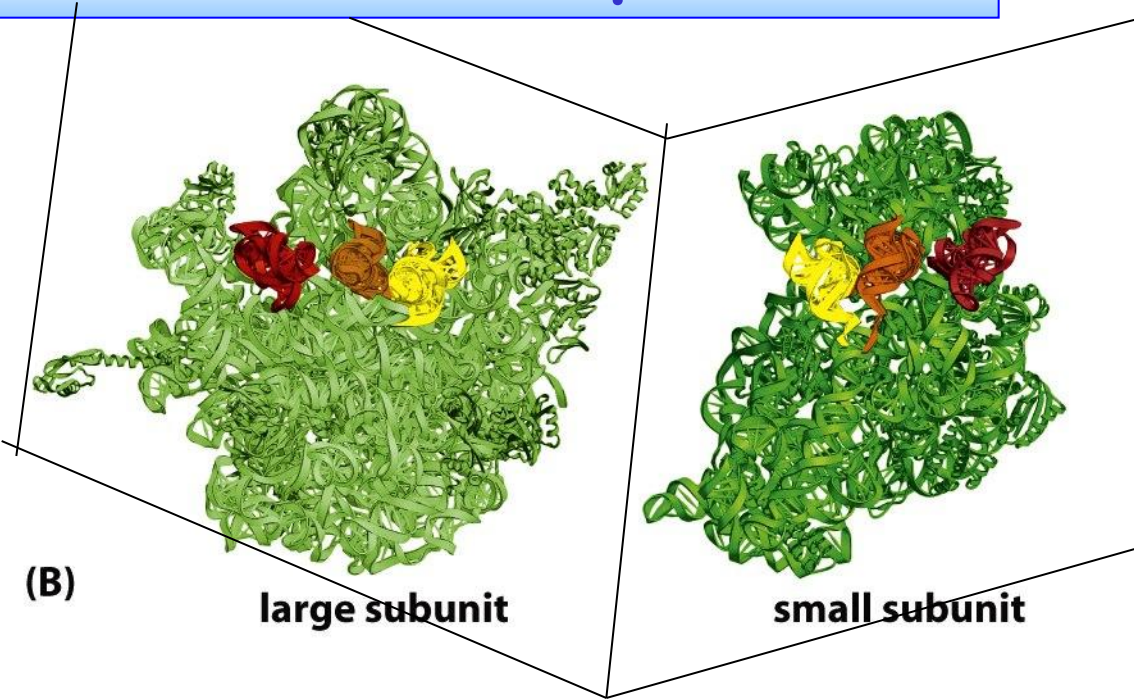
аминоацил-тРНК-связывающий участок (**А**-сайт) и **пептидил**-тРНК-связывающий участок (**Р**-сайт).

Большая субчастица в составе полной транслирующей рибосомы имеет **кодон-независимый** тРНК-связывающий участок, специфичный для **деацилированной тРНК** (**Е**-сайт, от exit).

Три участка связывания тРНК в рибосоме



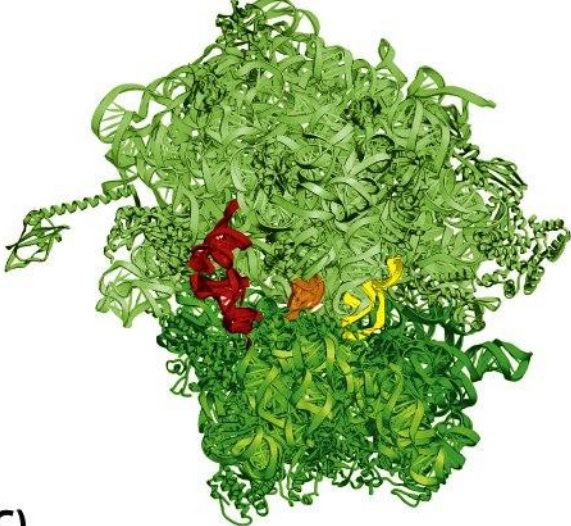
(A)



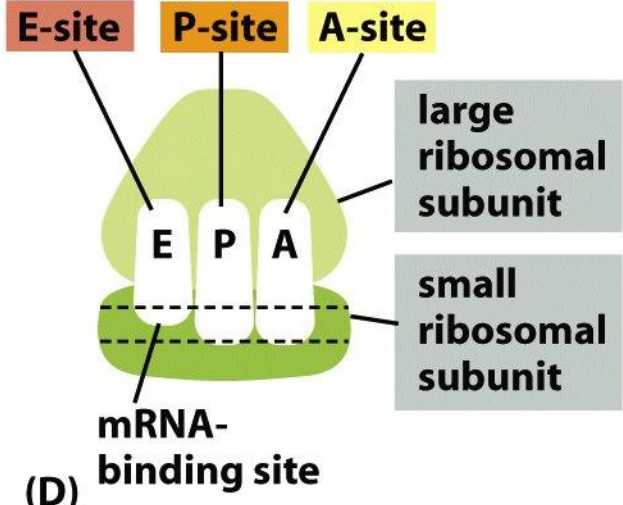
(B)

large subunit

small subunit

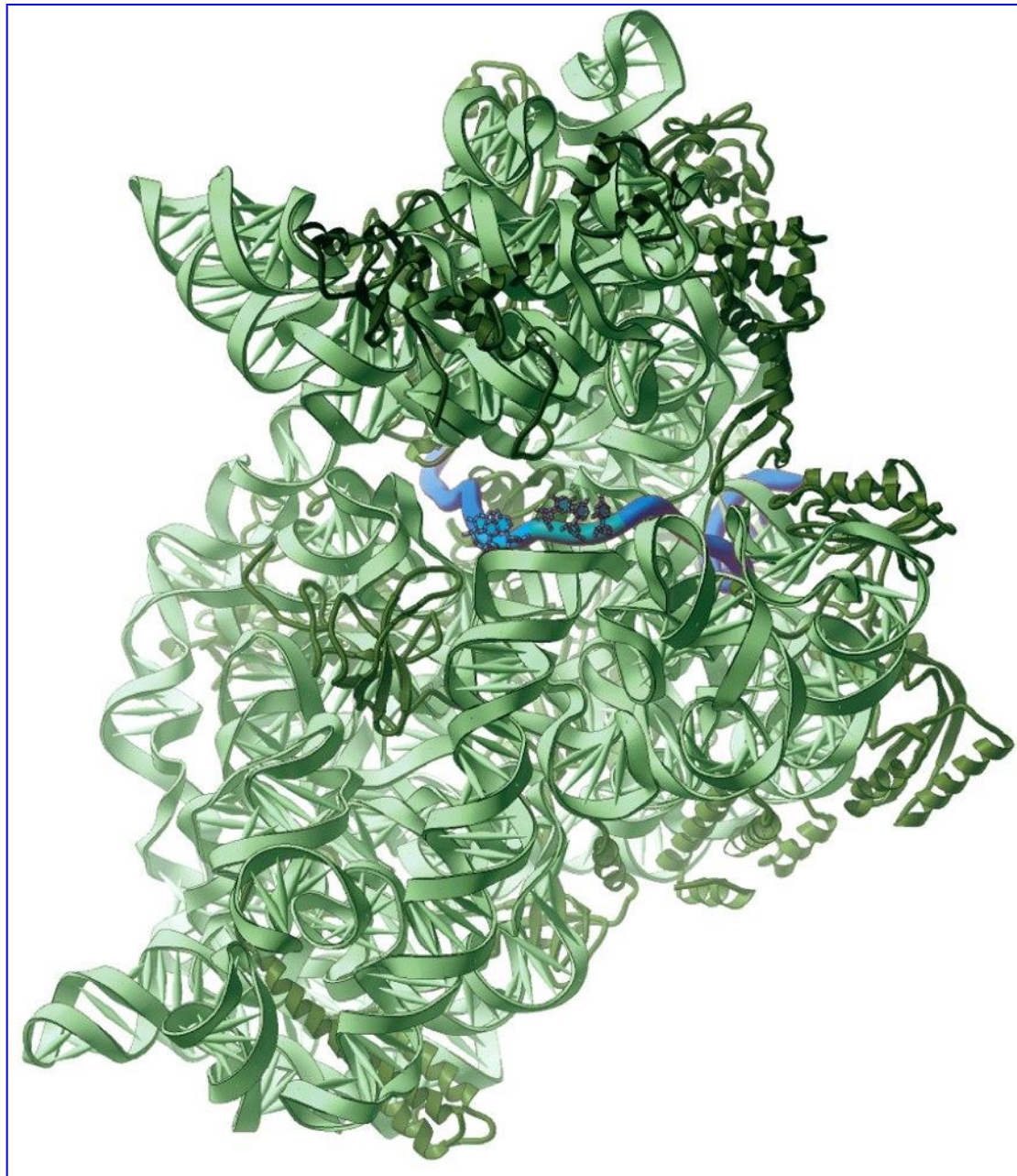


(C)



(D)

В процессе
белкового синтеза
одновременно
заняты только 2
участка
(Р и А или Р и Е).



Положение мРНК в малой рибосомной субчастице

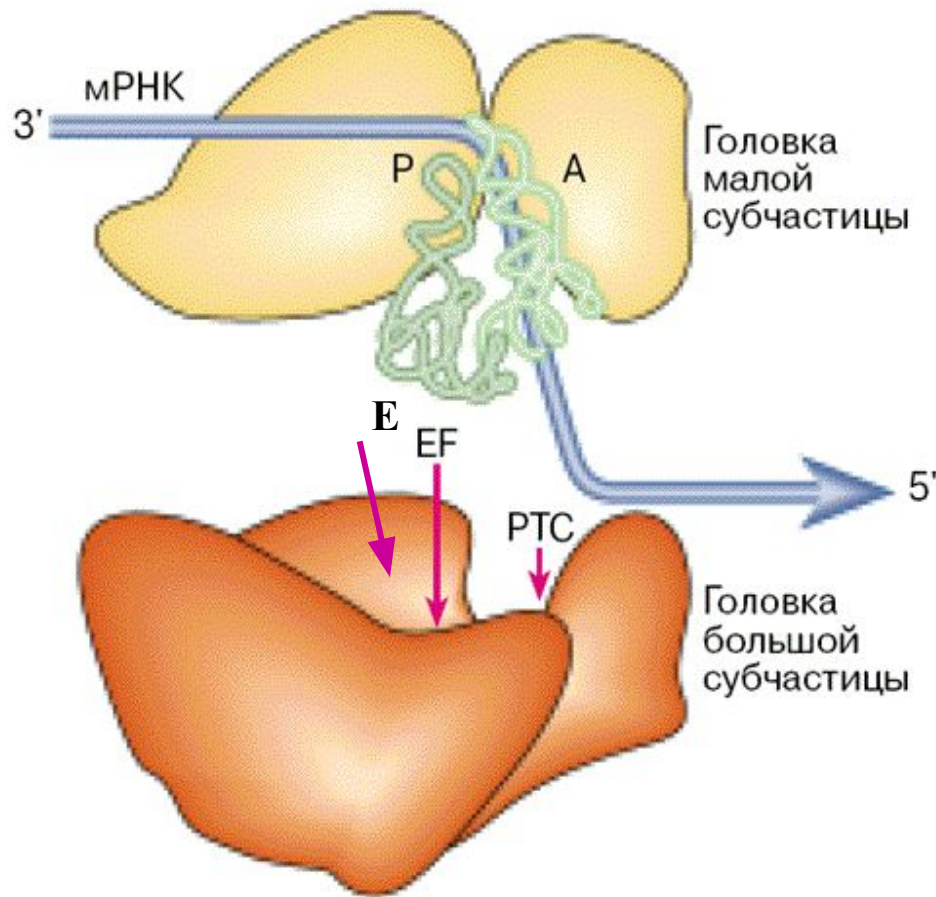
Ориентация малой
субчастицы та же, что
и на предыдущем
слайде (В).

Разделение декодирующей и энзиматической функций между субчастицами

Рибосома выполняет одновременно три функции:

- **Генетическую, или декодирующую** – расшифровывает генетическую информацию ДНК, поступающую в виде мРНК (принадлежит малой субчастице);
- **механическую** – передвигает цепь мРНК (потриплетно) и молекулы тРНК (функцию «молекулярной машины» выполняет малая субчастица);
- **энзиматическую** – катализирует реакцию транспептидации (функция рибозима принадлежит большой субчастице).

Расположение функциональных центров на малой и большой субчастицах рибосомы



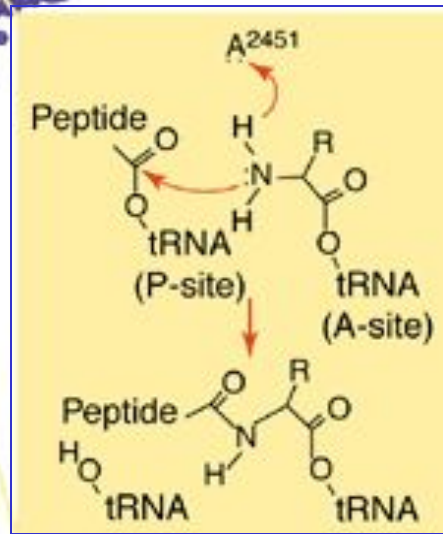
- **Две молекулы тРНК** занимают **А-** и **Р-сайты** на **малой субчастице**.
- **Пептидилтрансферазный центр (PTC)** расположен в борозде под **центральным выступом большой субчастицы**.
- **Факторы элонгации (EF)** связываются в районе **палочкообразного бокового выступа большой субчастицы**.
- **Е-сайт для деацелированной тРНК** находится на **большой субчастице**.

23S РНК
(от белого
до бежевого) –
ядро субчастицы

Атомное строение и рибозимная функция 50S-субчастицы *Haloarcula marismortui*

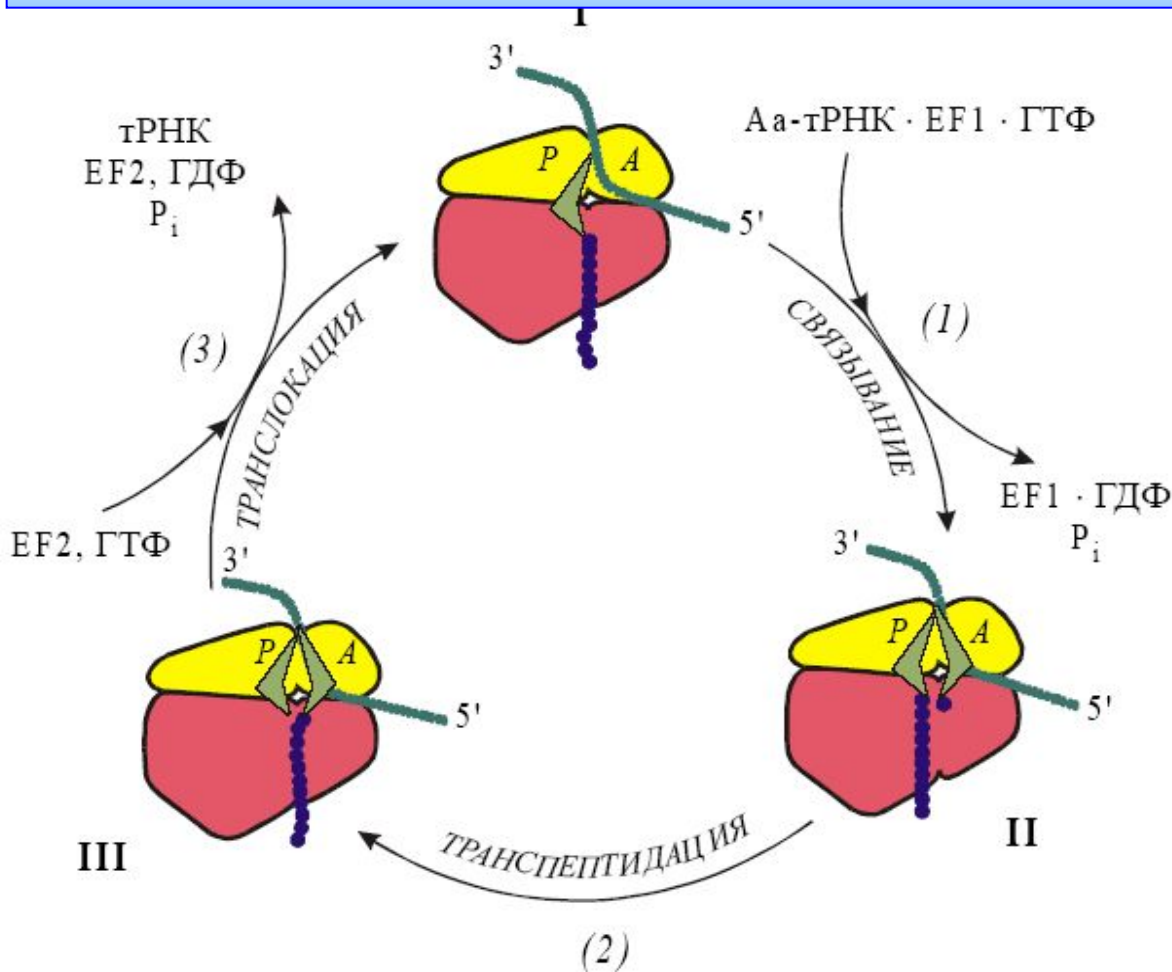
Белки (фиолет.) -
на периферии

Уникально расположенный
A2451 23S рРНК осуществляет
кислотно-основной катализ. В
специфическом
окружении его N3
может отнимать
протон от амино-
группы АК в А-
сайте, повышая ее
нуклеофильность.
Этот протон затем
пойдет в 3'-ОН тРНК



Cech (2000) Science 289:878-879
Ban et al. (2000) Science 289:905-920
Nissen et al. (2000) Science 289:920-930

Элементарный элонгационный цикл рибосомы



Этап 1 – связывание аминоксил-тРНК в комплексе с фактором элонгации **EF1** (эукариоты) или **EF-Tu** (прокариоты).

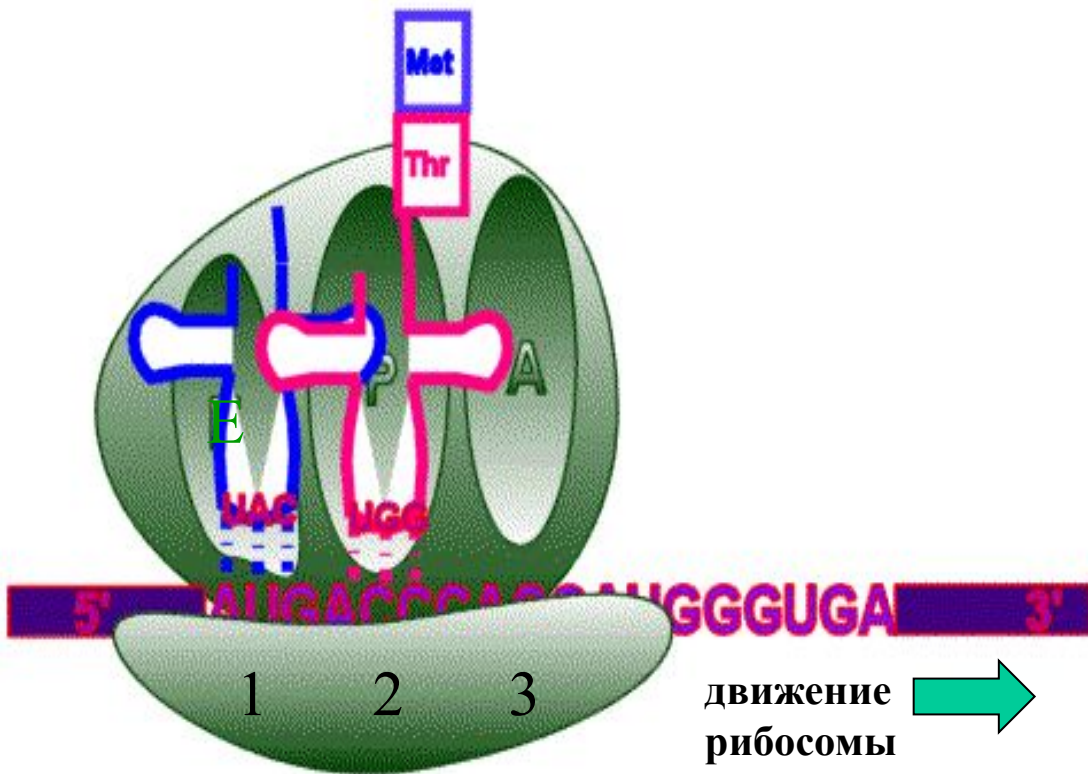
Этап 2 – транспептидация.

Этап 3 – транслокация при участии фактора элонгации **EF2** или **EF-G**.

На этапах 1 и 3 участвует **ГТФ**, гидролизующаяся до **ГДФ** и ортофосфата.

На этапе элонгации *P*-сайт всегда занят остатком тРНК. Деацилированная тРНК из *P*-сайта перемещается в *E*-сайт и затем покидает рибосому.

Рибосома как лентопротяжный механизм



кодоны мРНК

- полярное 5'-3' потриплетное движение вдоль мРНК, обеспечивающее последовательное прочитывание цепи мРНК;
- расплетание вторичной и третичной структуры мРНК;
- скорость у прокариот: 10-15 триплетов/сек;
- скорость у эукариот: 1-10 триплетов/сек – замедление вследствие регуляции трансляции.

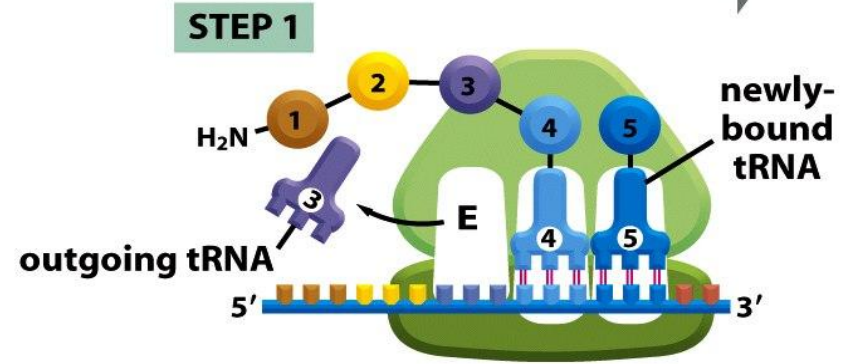
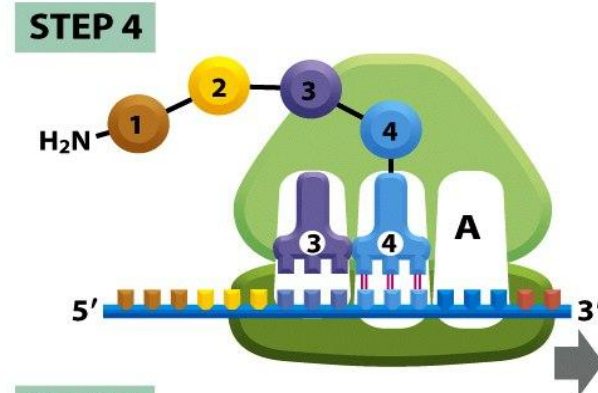
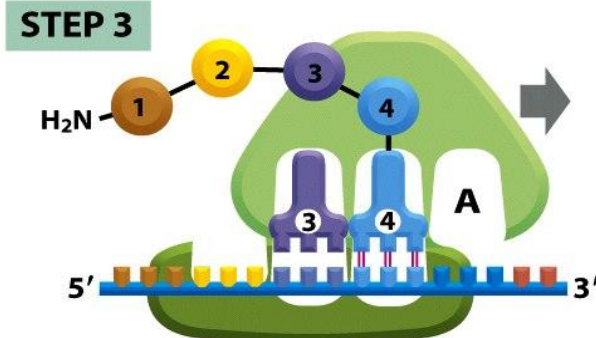
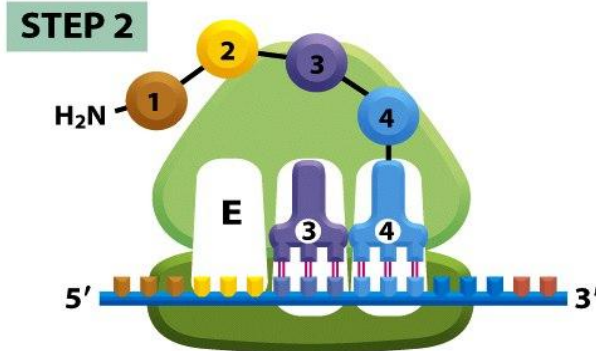
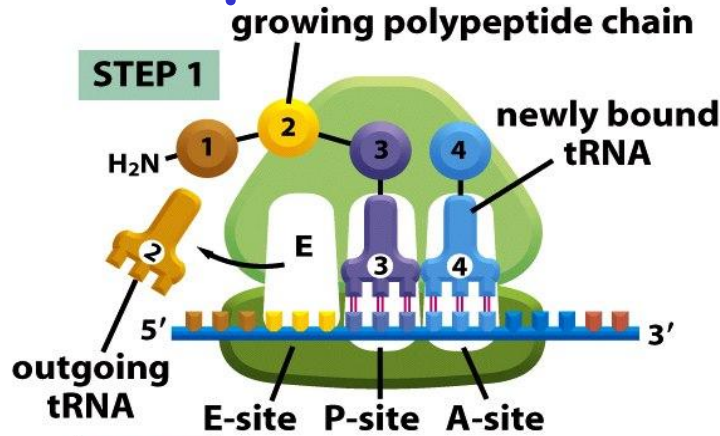
Конформационная подвижность рибосомы

- **Взаимная подвижность двух рибосомных субчастиц;**
- **подвижность “головки” малой рибосомной субчастицы относительно ее “тела”;**
- **подвижность палочкообразного бокового выступа большой субчастицы.**

Механическая подвижность рибосомы может обеспечивать преодоление энергетических барьеров:

- **при работе как “лентопротяжного механизма”;**
- **при перенесении молекулы тРНК, связанной по нескольким точкам, из одного участка в другой в каждом элонгационном цикле.**

Взаимная подвижность рибосомных субчастиц при элонгации (4 этапный цикл)

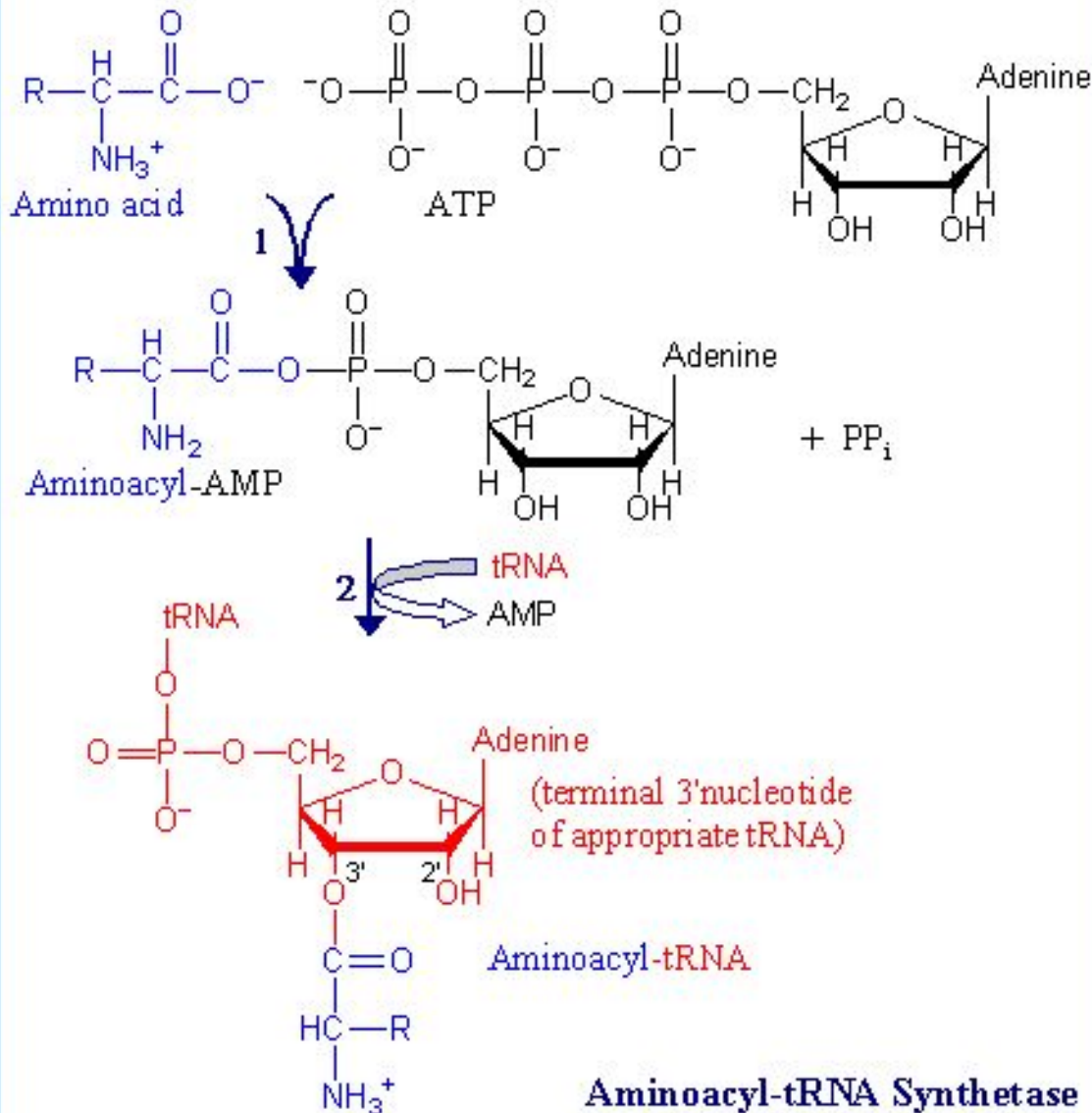


Этап 3: Большая субчастица движется относительно мРНК, сдвигая деацилированную тРНК из Р-участка в Е-участок, а пептидил-тРНК из А в Р-участок на большой СЕ (но не на малой).

Этап 4: Малая СЕ перемещает мРНК на КОДОН

Доп. слайды

Катализируемый аминоктил-тРНК-синтетазой дорибосомный этап белкового синтеза приводит к образованию аминоктил-тРНК



- **Аминоацладенилат** – лабильное соединение со **смешанной ангидридной связью** между АК и АМФ – стабилизируется в комплексе с аминоктил-тРНК-синтетазой.
- **Аминоацильный** остаток переносится с аминокцладенилата в составе промежуточного фермент-субстратного комплекса на тРНК с образованием **аминоацил-тРНК** (сложноэфирная связь между АК и тРНК).

Состав и характеристики компонентов прокариотической рибосомы (*E.coli*)

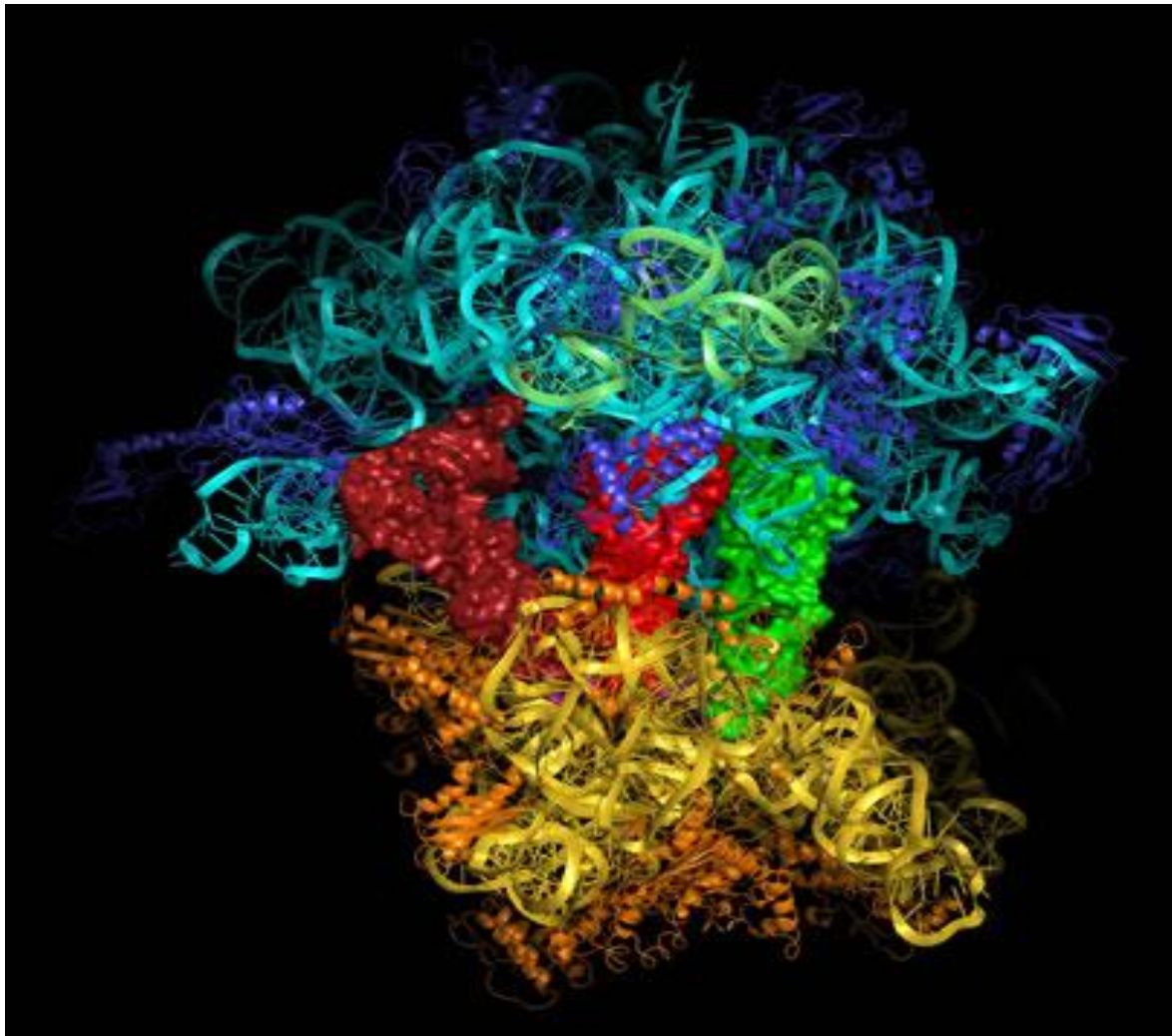
	Рибосома	Малая субчастица	Большая субчастица
Рибосома:			
<i>Коэффициент седиментации</i>	70S	30S	50S
<i>Масса (кДа)</i>	2520	930	1590
РНК:			
<i>Коэффициент седиментации</i>		16S	23S + 5S
<i>Длина (нукл.)</i>		1542	2904 + 120
Белки (число)	55	21 (S20 = L26)	34 (L7 = ацетилпир. S12)
РНК/белок (%)	66/34	60/40	70/30

Состав и характеристики компонентов эукариотической рибосомы (крыса)

	Рибосома	Малая субчастица	Большая субчастица
Рибосома:			
<i>Коэффициент седиментации</i>	80 S	40S	60 S
<i>Масса (кДа)</i>	4220	1400	2820
РН :			
<i>Коэффициент седиментации</i>		18 S	28 + 5.8 (5 -конец) , +5
<i>Длина (нукл.)</i>		1874	4718S + 160 +120
Белки (число)	82	33	49
РНК/белок (%)	50/50	45/55	55/45

)

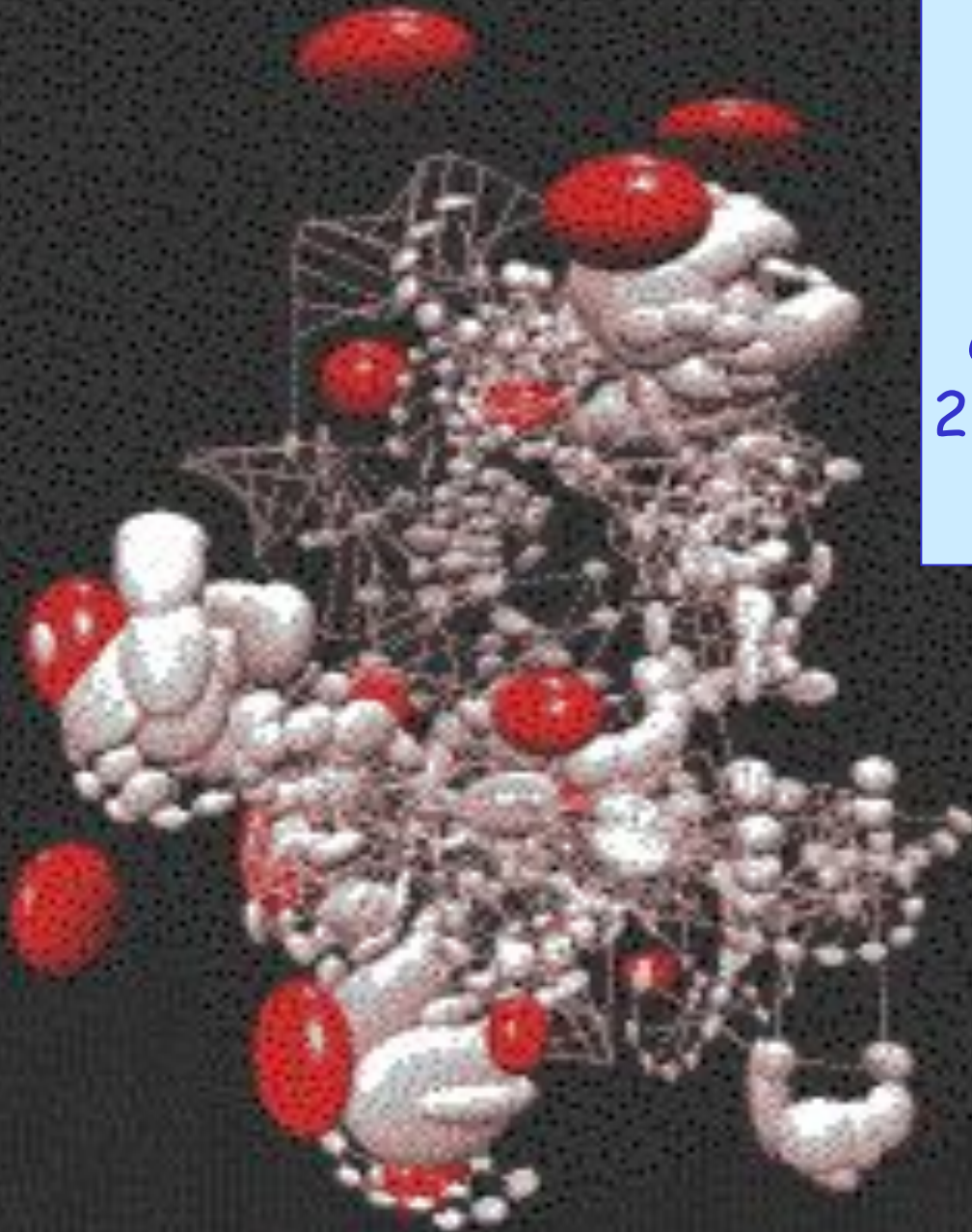
Трехмерная модель с высоким разрешением малой субчастицы рибосомы *E.coli*, содержащей молекулу 16S-рРНК и рибосомные белки (В. Рамакришнан)



**рРНК - бирюзовый,
зеленый и желтый;
Белки – красный и
оранжевый**

**В. Рамакришнан
(Кембридж),
Р. Стейц (Йель),
А. Йонат
(Вайсмановский
институт) -
Нобелевская премия
2009 г**

Трехмерная модель с
низким разрешением
большой субчастицы
рибосомы *E.coli*,
содержащей молекулу
23S-рРНК и рибосомные
белки (Т. Стейц)



Расположение функциональных центров на 70S рибосоме

