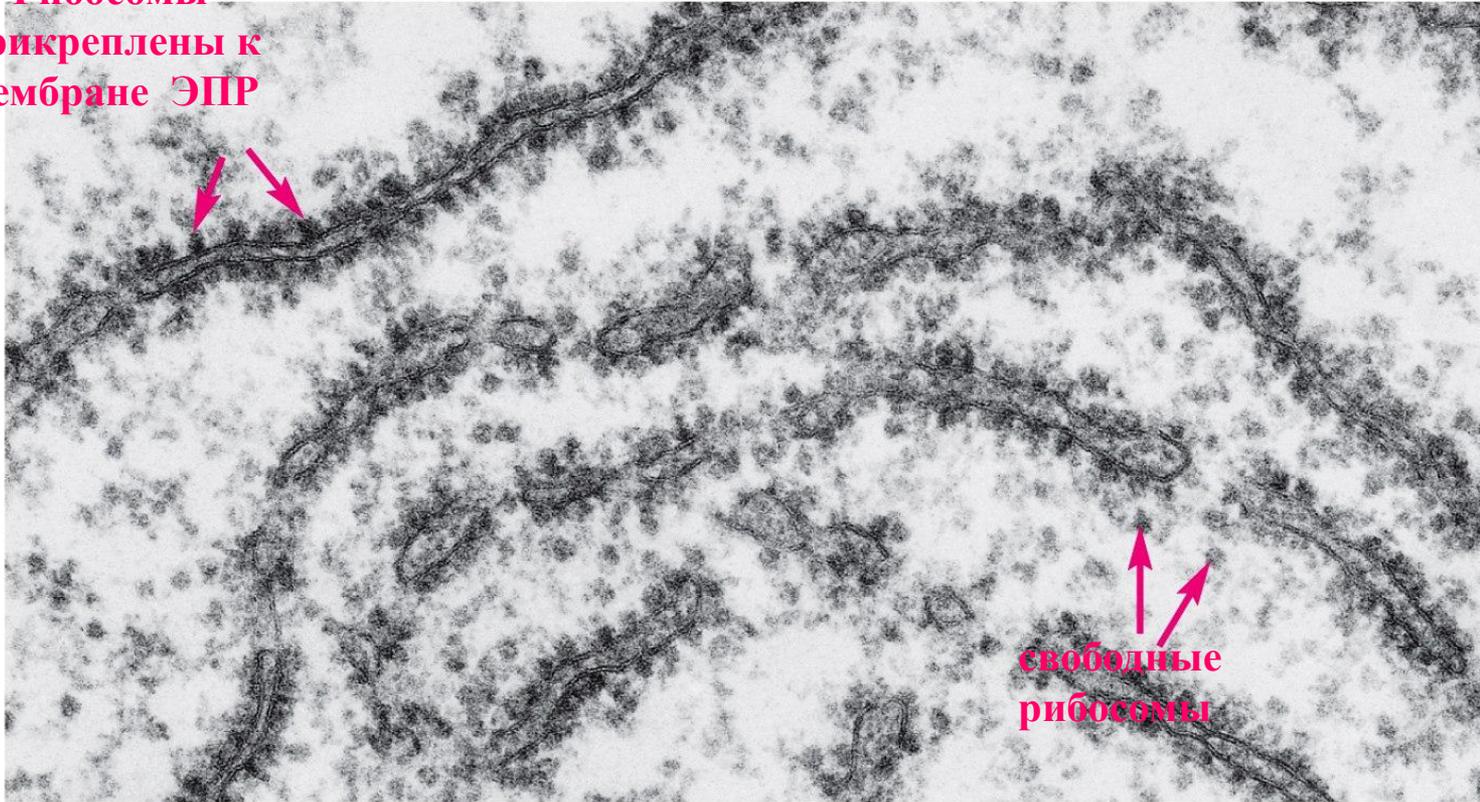


**Лекция 13**  
**Биосинтез белков (трансляция)**

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

Рибосомы  
прикреплены к  
мембране ЭПР

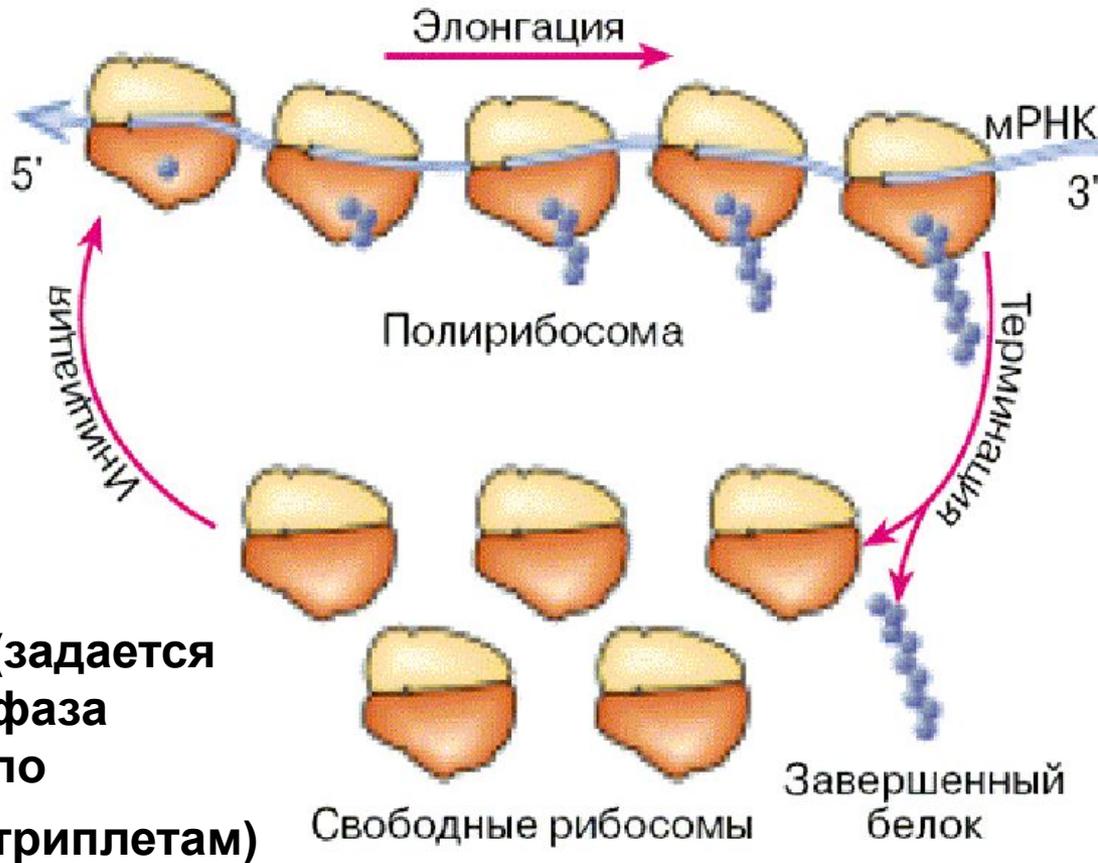


свободные  
рибосомы

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.

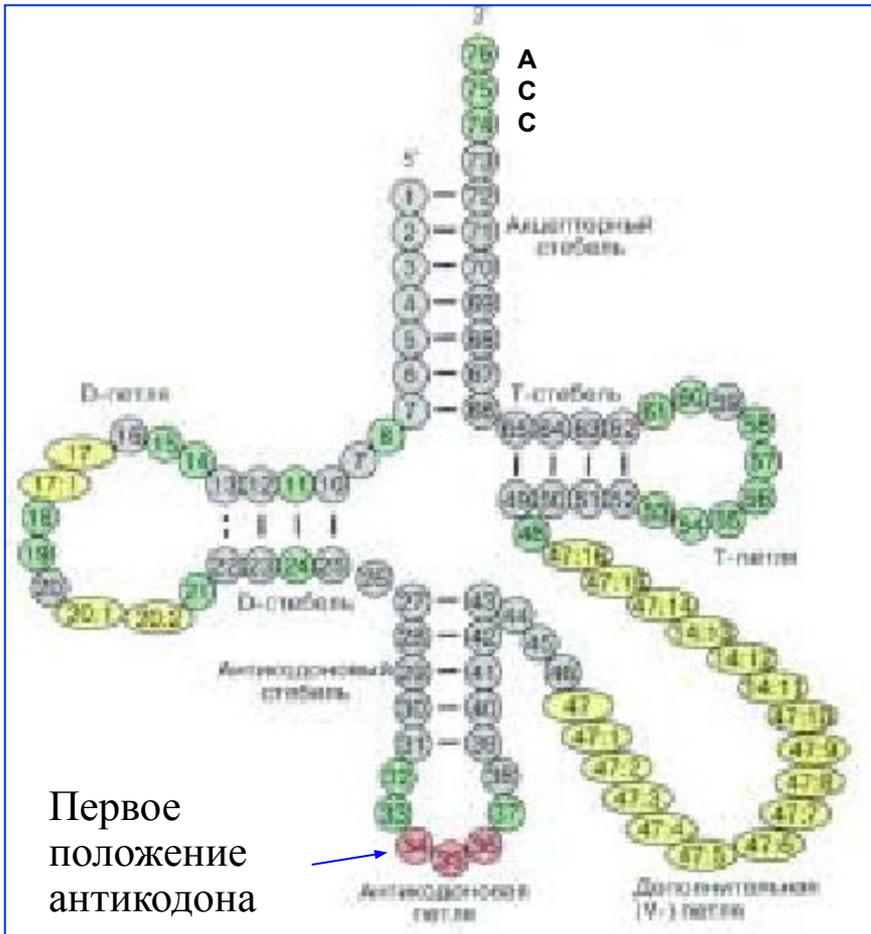
## Цикл (эпицикл) трансляции



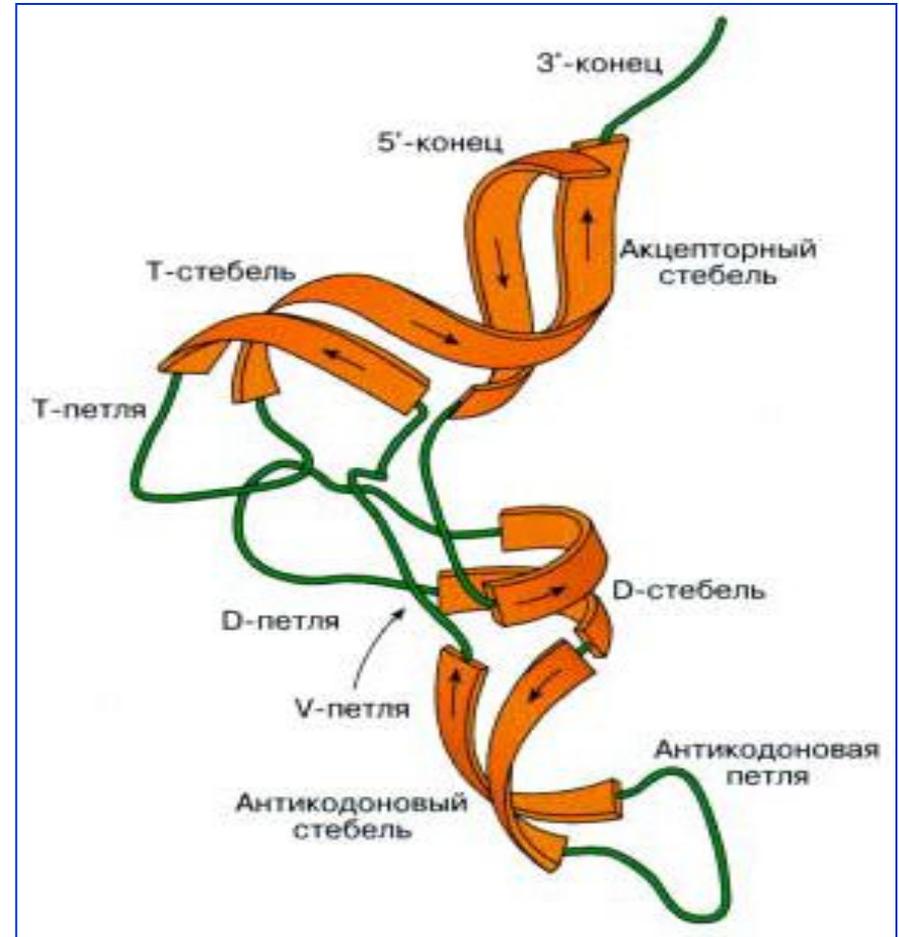
- Стадии инициации и терминации – это модификации стадии элонгации.
- В полирибосоме одна мРНК ассоциирована со многими рибосомами, ее одновременно транслирующими (1:200).
- При интенсивном белковом синтезе рибосомы в полирибосоме могут

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

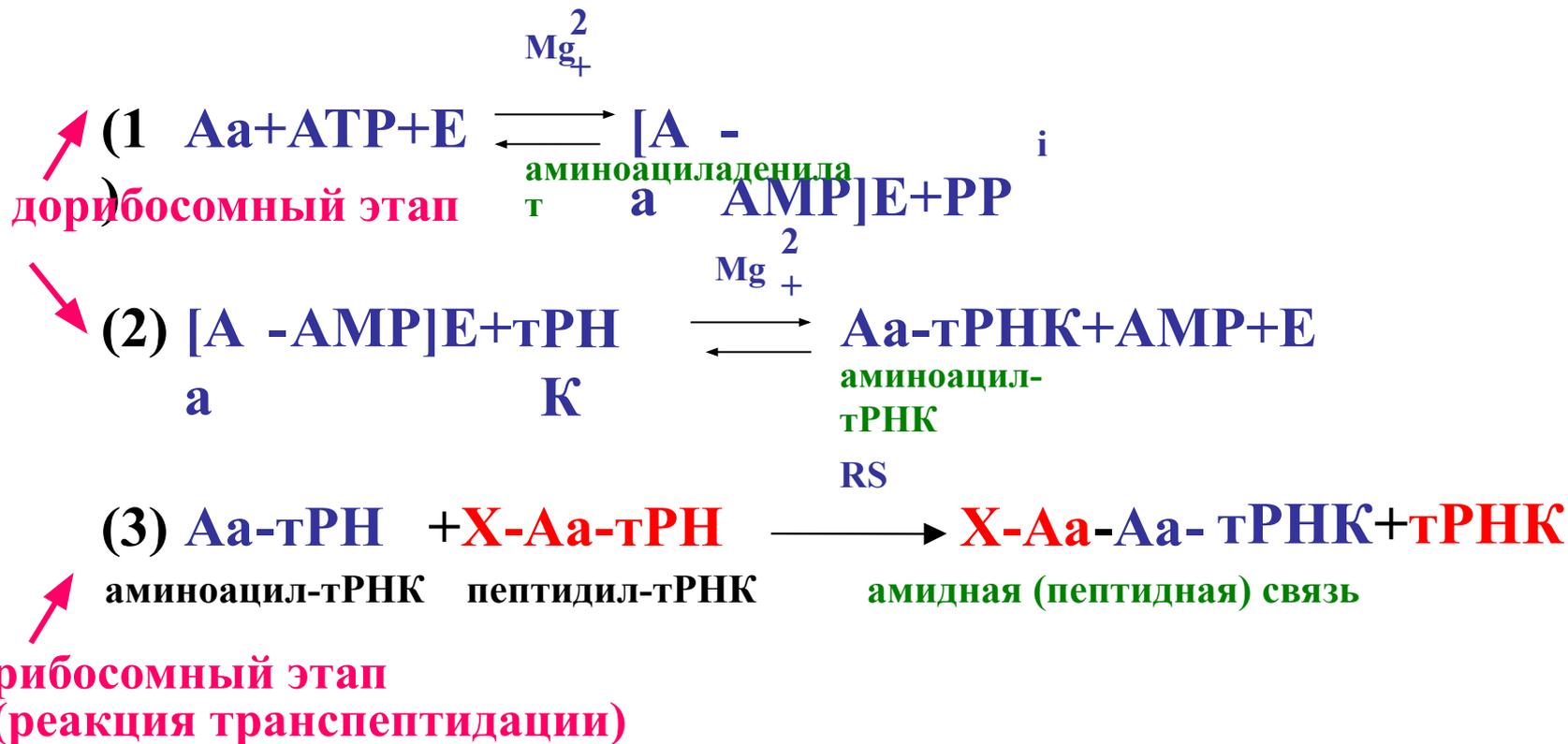


Вторичная структура тРНК



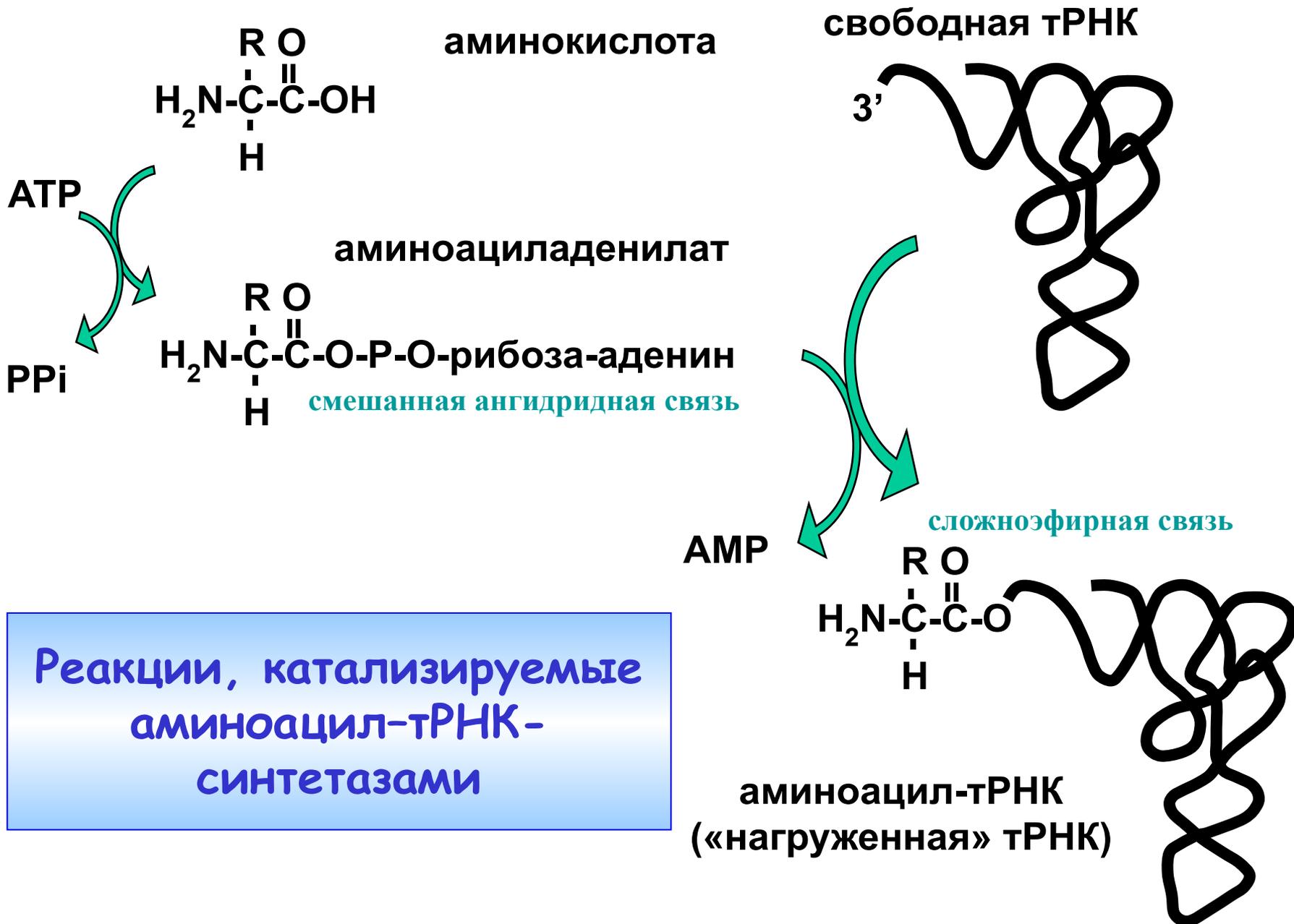
Третичная структура тРНК

# Химические реакции включения аминокислоты в полипептидную цепь



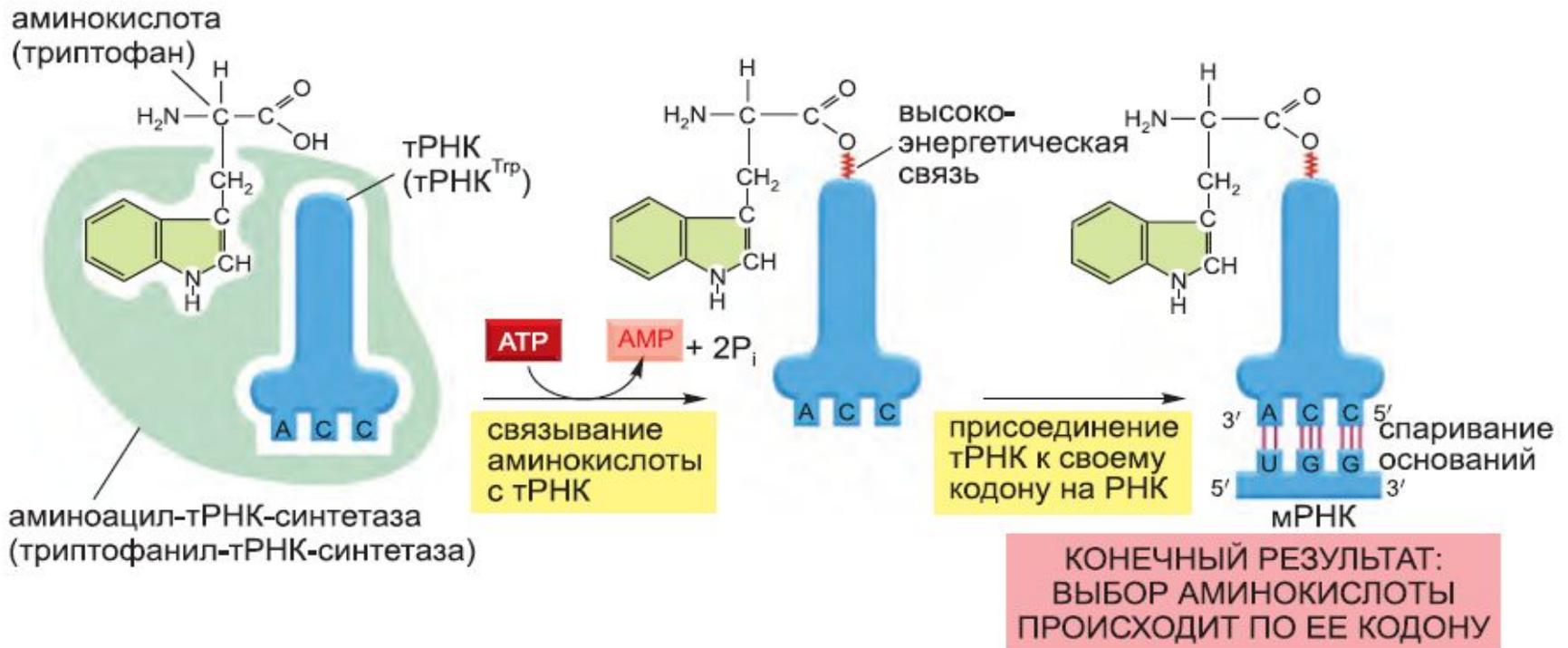
**E** – аминоксил-тРНК-синтетаза (АРСаза, АРСаза)

**RS** – рибосома



Реакции, катализируемые  
аминоацил-тРНК-  
синтетазами

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



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

Ошибка на любой стадии будет приводить к включению «неправильной» аминоксилоты 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 аминоацил-тРНК-синтетаз

Позиционная  
специфичность  
аминоацилирования

Активируемые  
аминокислоты

Класс I  
2'-ОН  
концевые  
тРНК

Arg Leu  
Cys Met  
G1 Trp  
G1 Tyr  
H Val

в основном с <sup>e</sup>объемным  
гидрофобным радикалом

Характерные  
аминокислотные  
мотивы APCаз

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

CE структура в основном мономеры

Класс II  
3'-ОН  
концевые  
тРНК

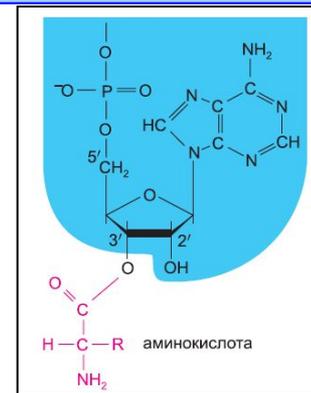
Ala Lys  
Asn **Phe**  
Asp Pro  
G1 Ser  
His Thr

исключение

в основном с небольшими  
нейтральными остатками

Три мотива с характерным  
чередованием гидрофильных  
и гидрофобных АК

обязательно олигомеры

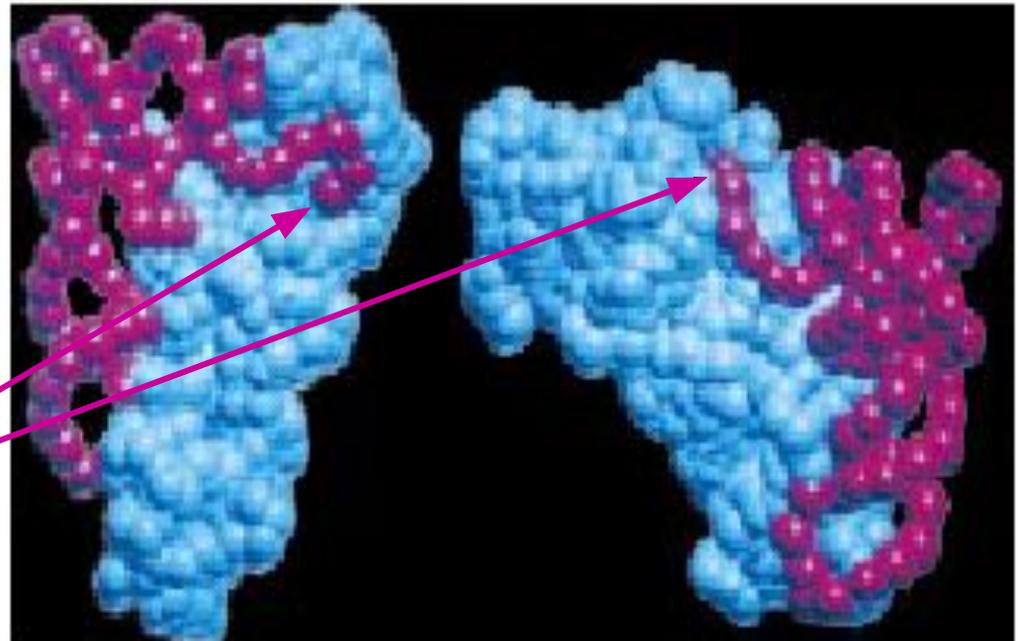


## Класс I

## Класс II

### Пространственные модели комплексов аминоксил-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**

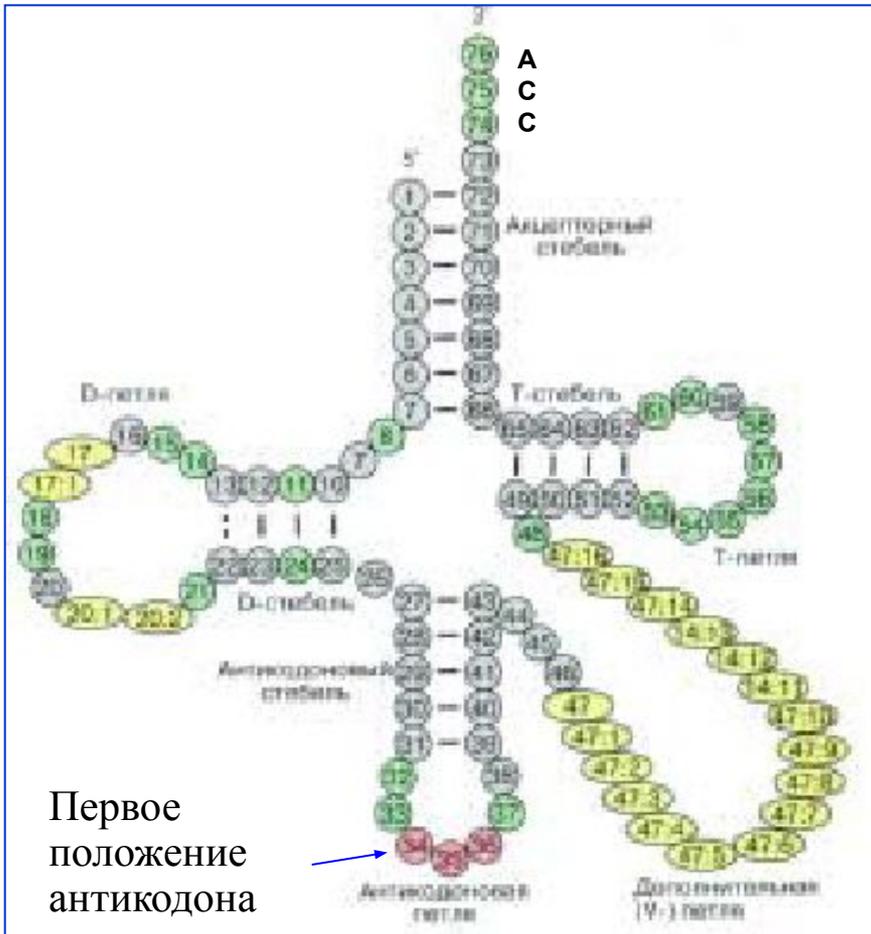
**7 антипараллельных бета-тяжей**

• 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.

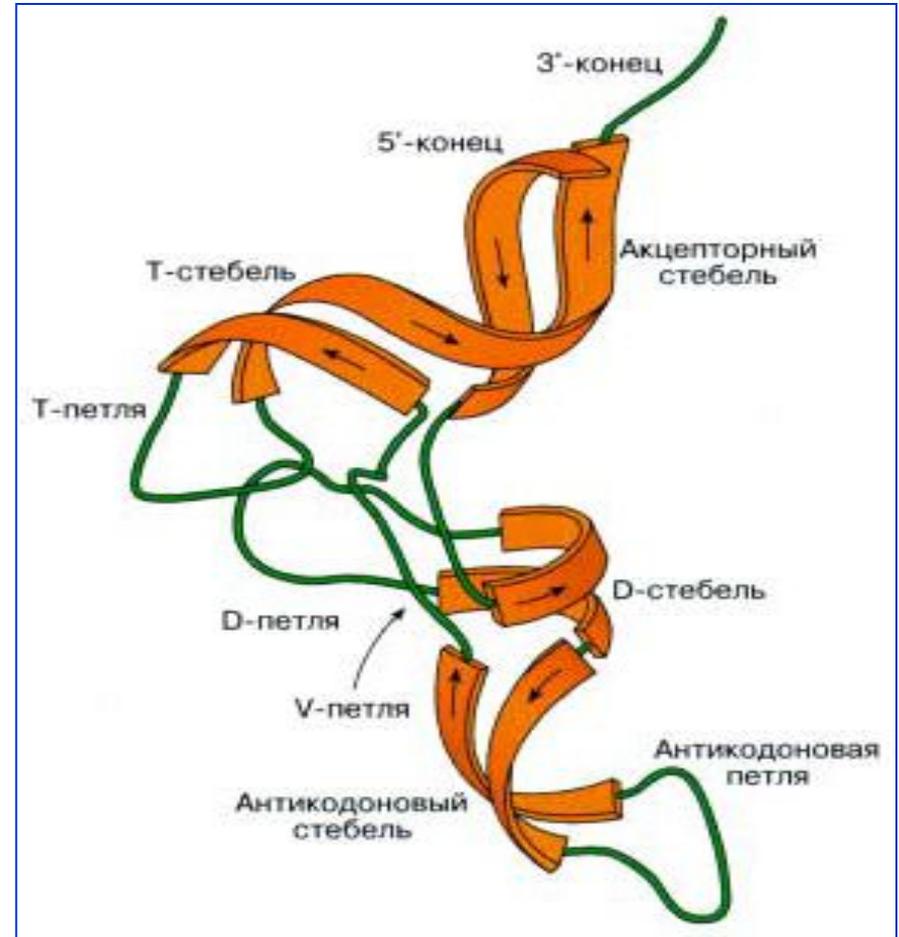
• Последовательности, на которых основана классификация АРСаз,

АТФ

# тРНК - адапторная молекула белкового синтеза

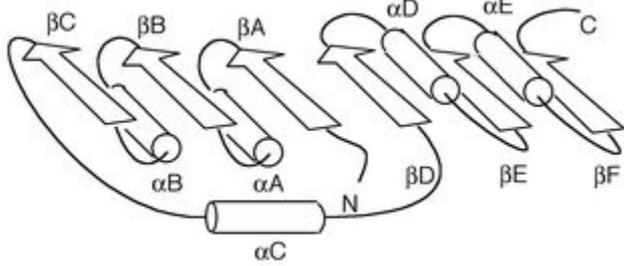


Вторичная структура тРНК

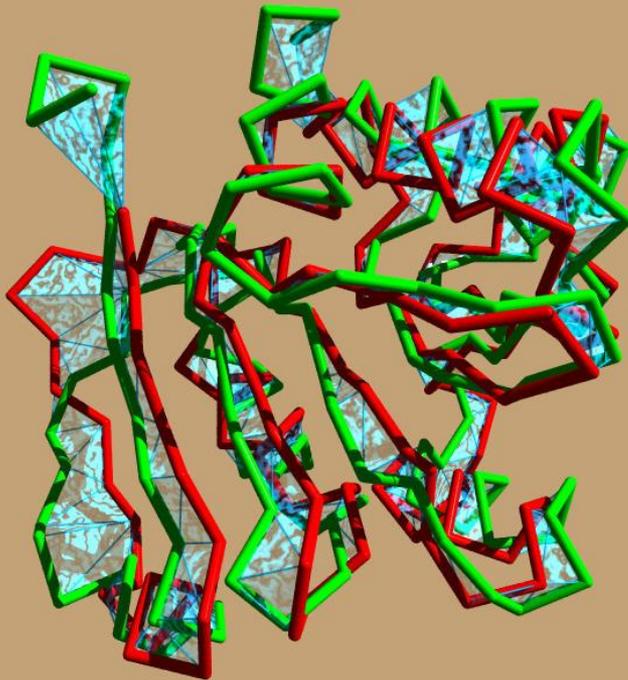


Третичная структура тРНК

# Укладка Россмана (Rossmann fold)



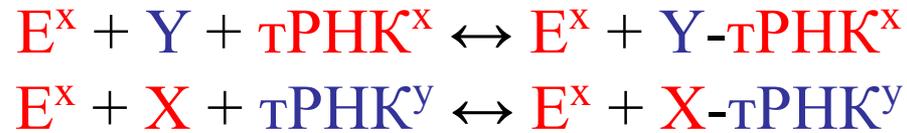
"Укладка Россмана" представляет собой шесть параллельных бета-тяжей, чередующихся с альфа-спиральными участками



- 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:

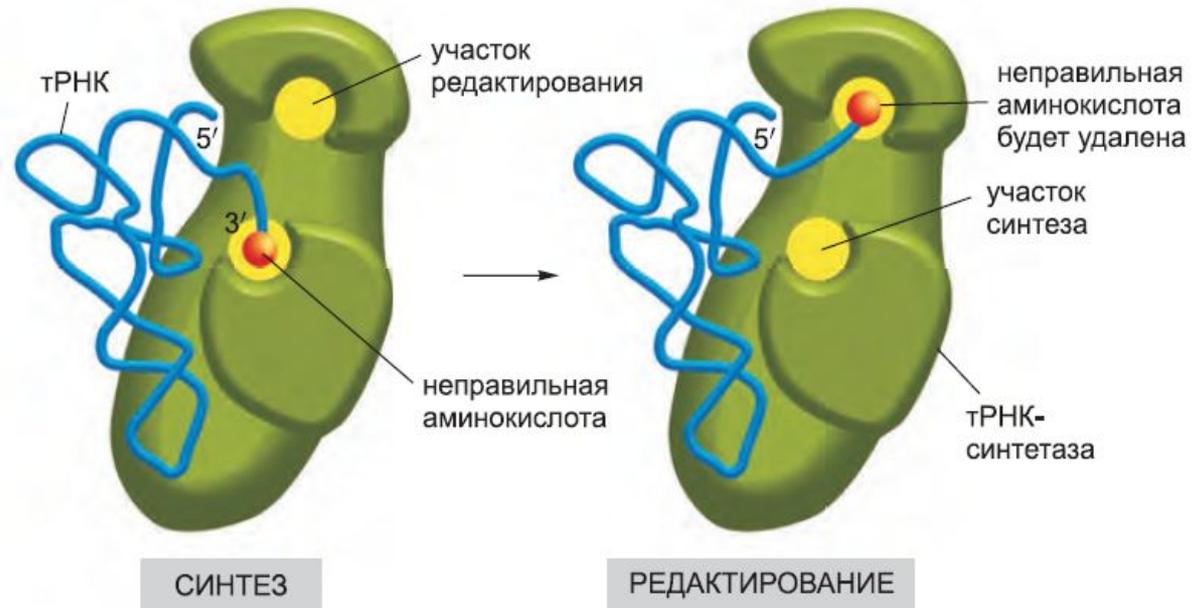
❖ Фермент D-тирозилгидролаза (специфический гидролиз D-тирозил-тРНК<sup>Tyr</sup>);

❖ 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

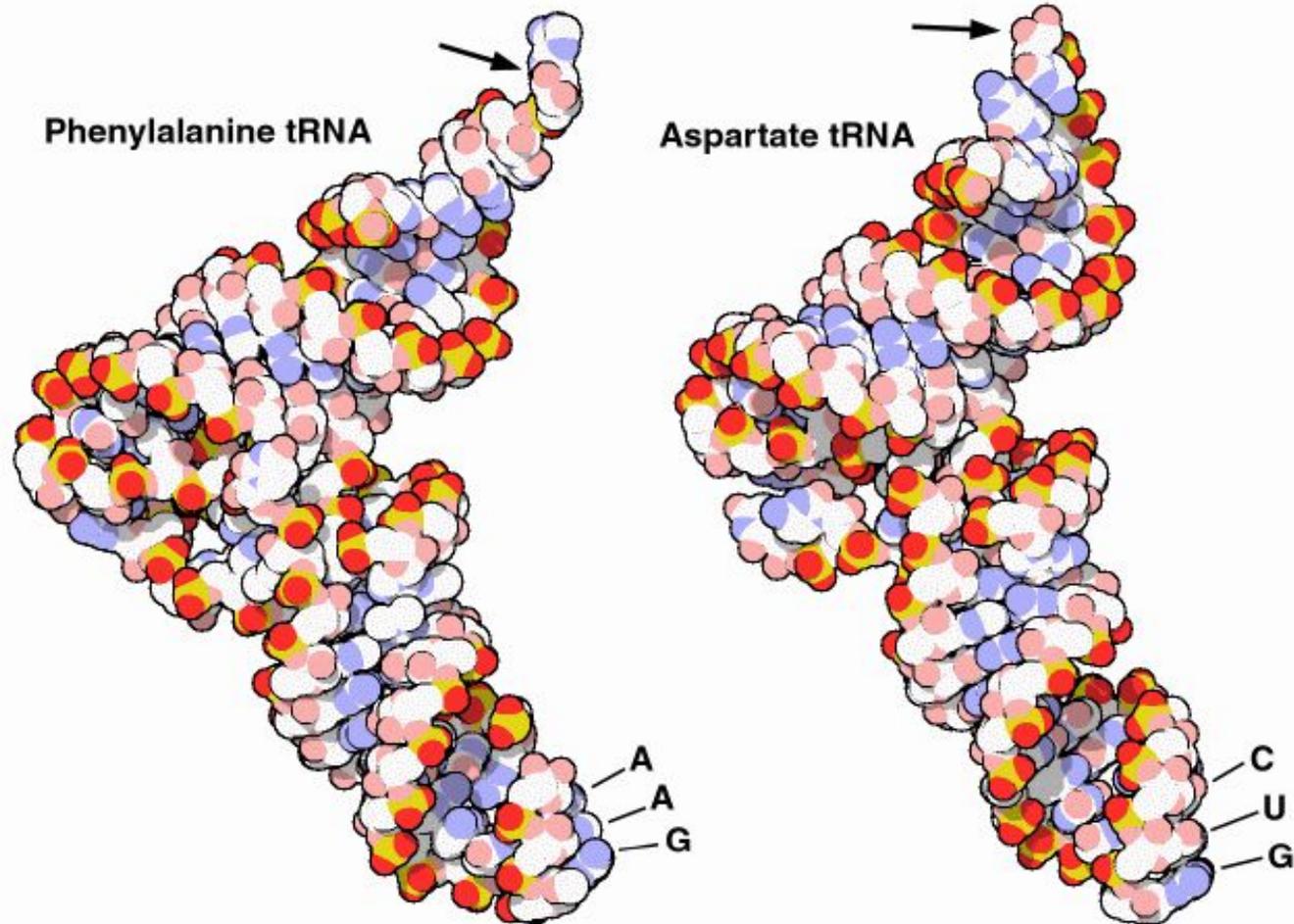
## **Двойственные требования к структуре тРНК:**

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

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

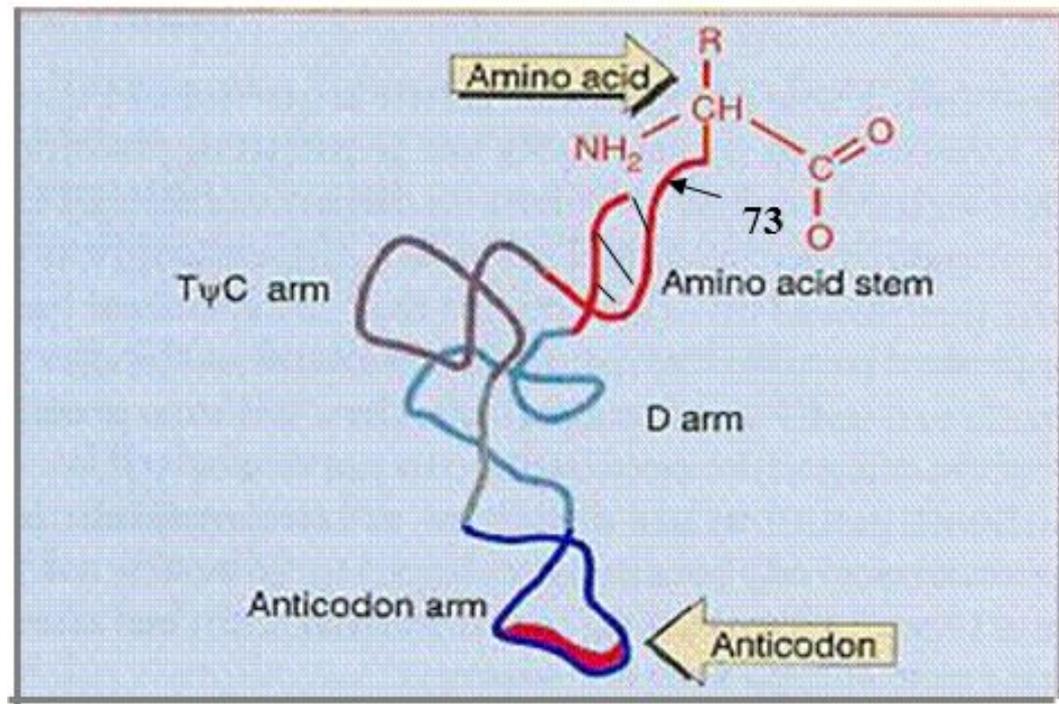
**черты, воспринимаемые своей АРСазой, как «притягательные», а остальными 19-ю АРСазами, как «отталкивающие».**

# Структура тРНК<sup>Phe</sup> и тРНК<sup>Asp</sup>



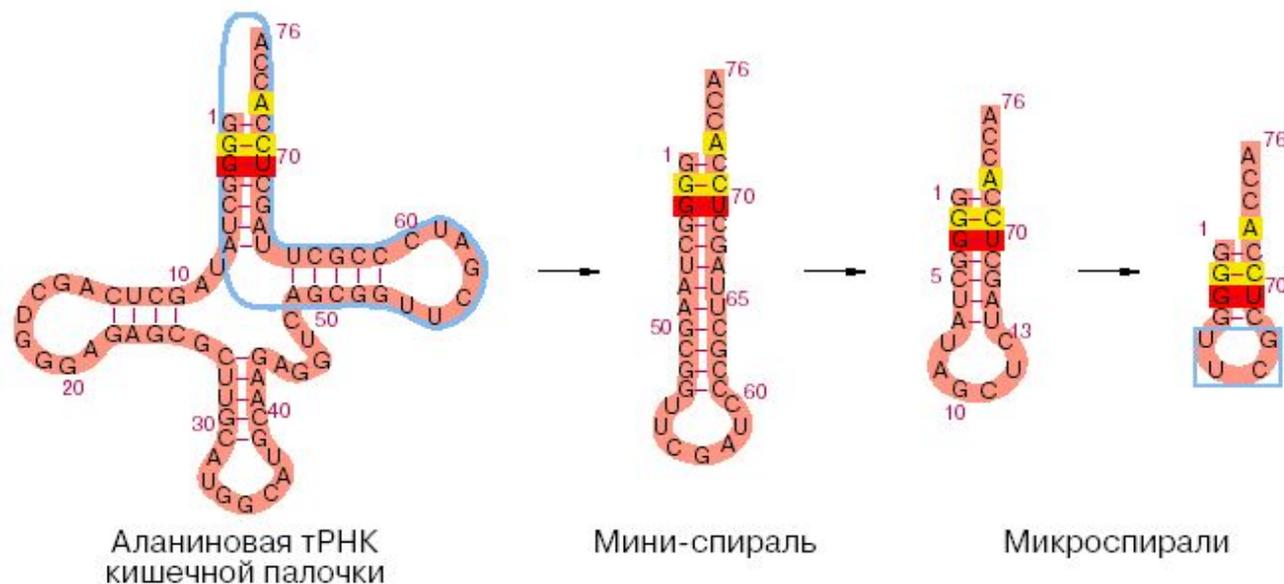
# Отдельные элементы распознавания в тРНК

- **антикодон** (например, в тРНК<sup>Met</sup>, тРНК<sup>Trp</sup>); 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.

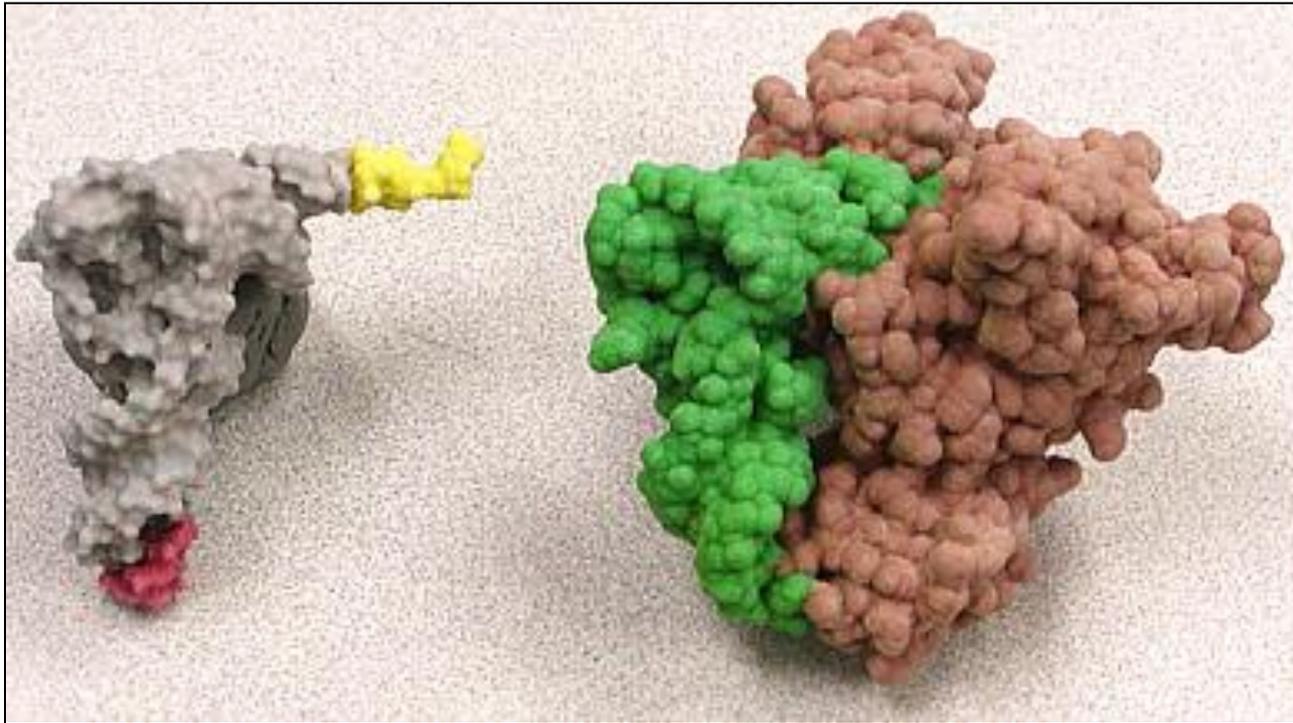
# Наборы элементов распознавания в тРНК



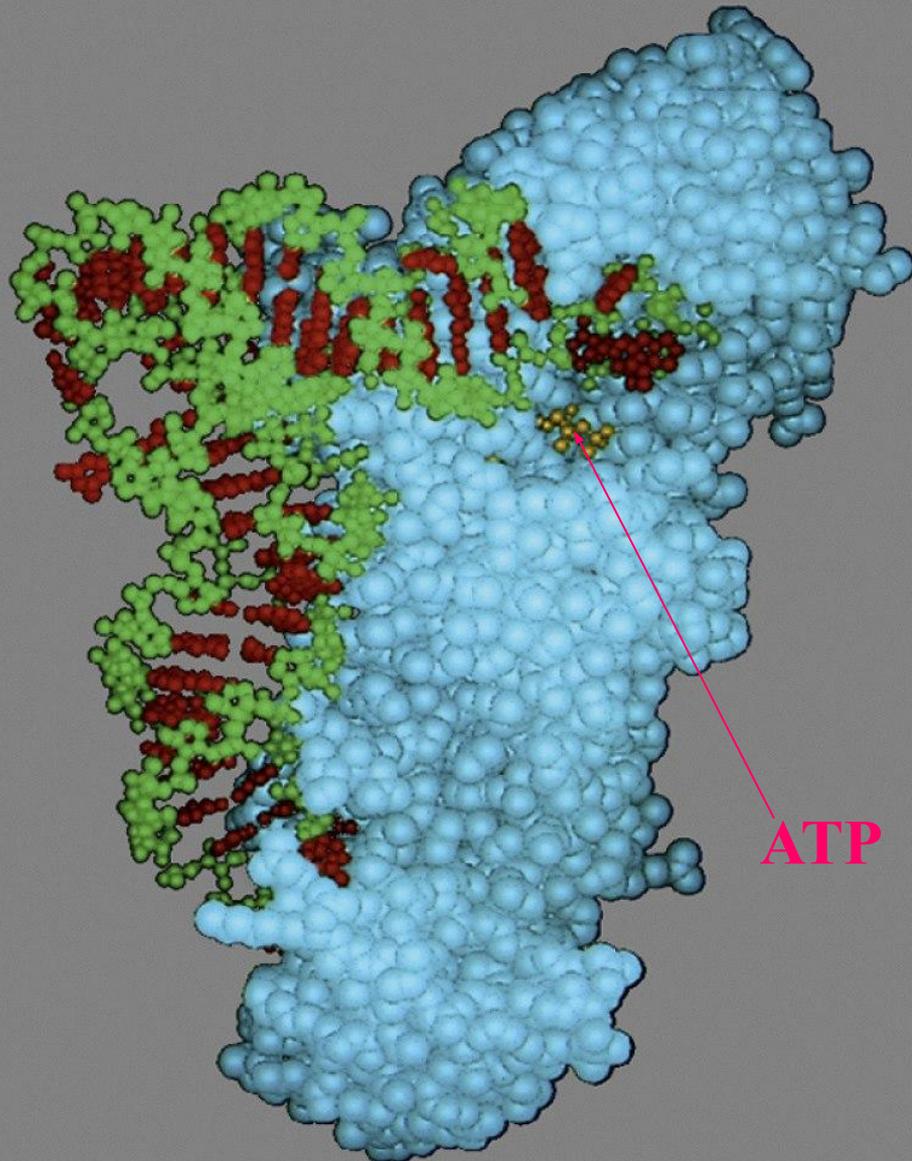
Искусственные субстраты, узнаваемые аланил-тРНК-синтетазой *E. coli*.  
Основной элемент распознавания – неканоническая пара **G-U** в акцепторном стебле

**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<sup>Gln</sup> в комплекс с аминокил-тРНК-  
синтетазой

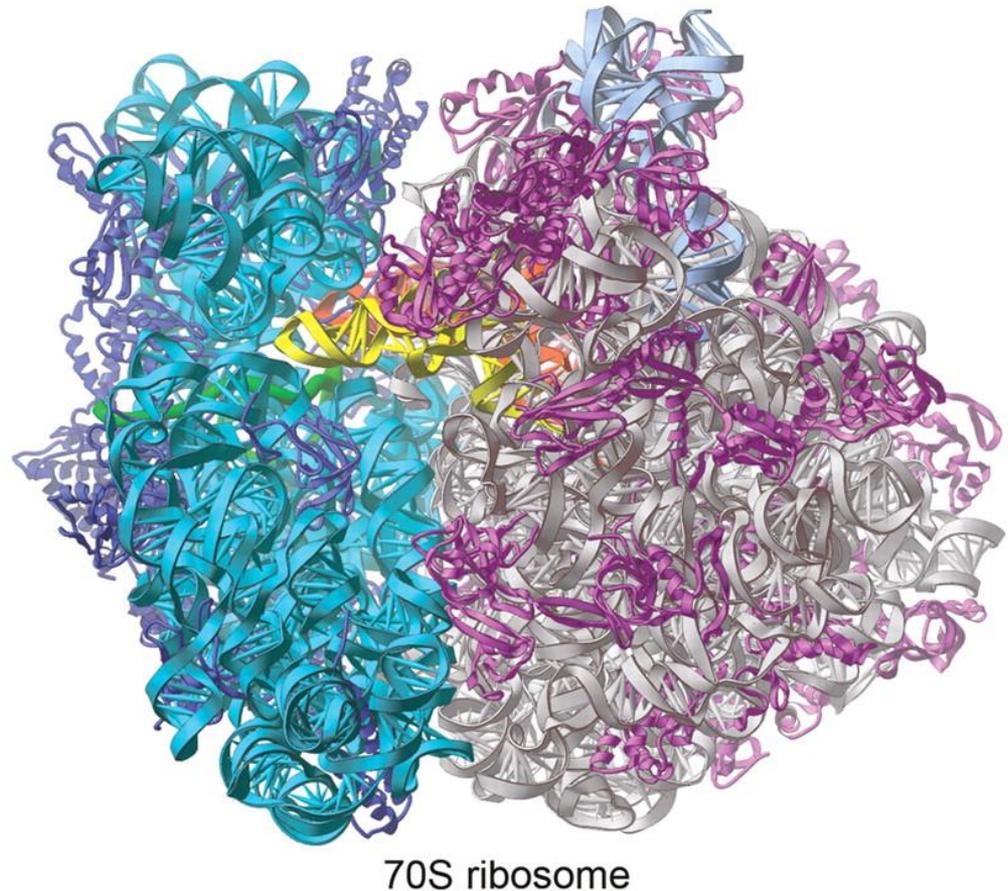
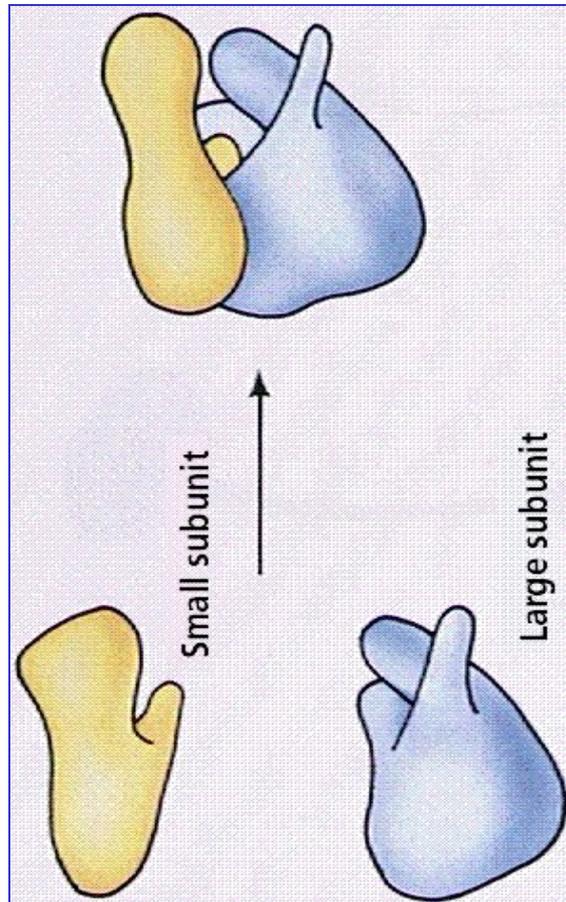


**Комплекс тРНК<sup>Gln</sup> с  
глутаминил-тРНК-  
синтетазой (Т. Стейц)**



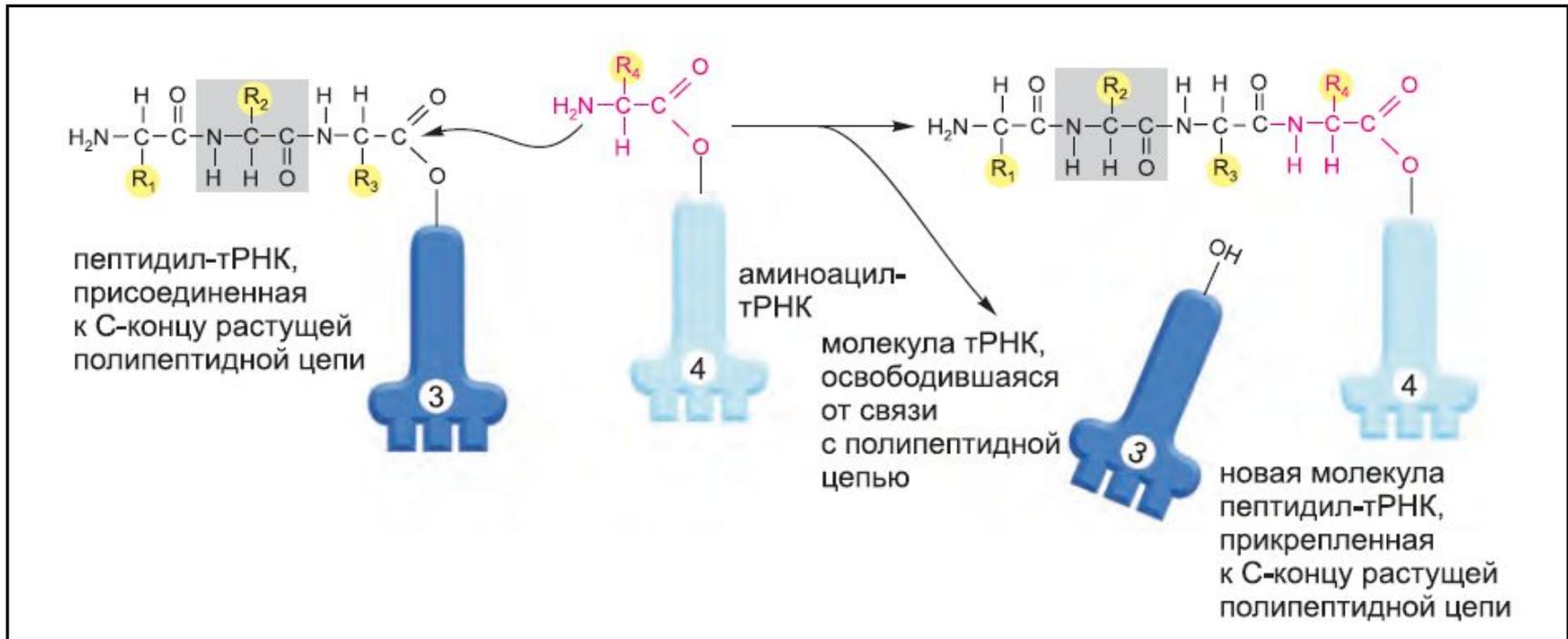
**В приведенной здесь  
тРНК<sup>Gln</sup> специфические  
нуклеотиды в антикодоне  
(внизу), и в акцептирующем  
аминокислоту плече  
позволяют ферменту АРСазе  
(голубая) опознать ее как  
правильную тРНК.**

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



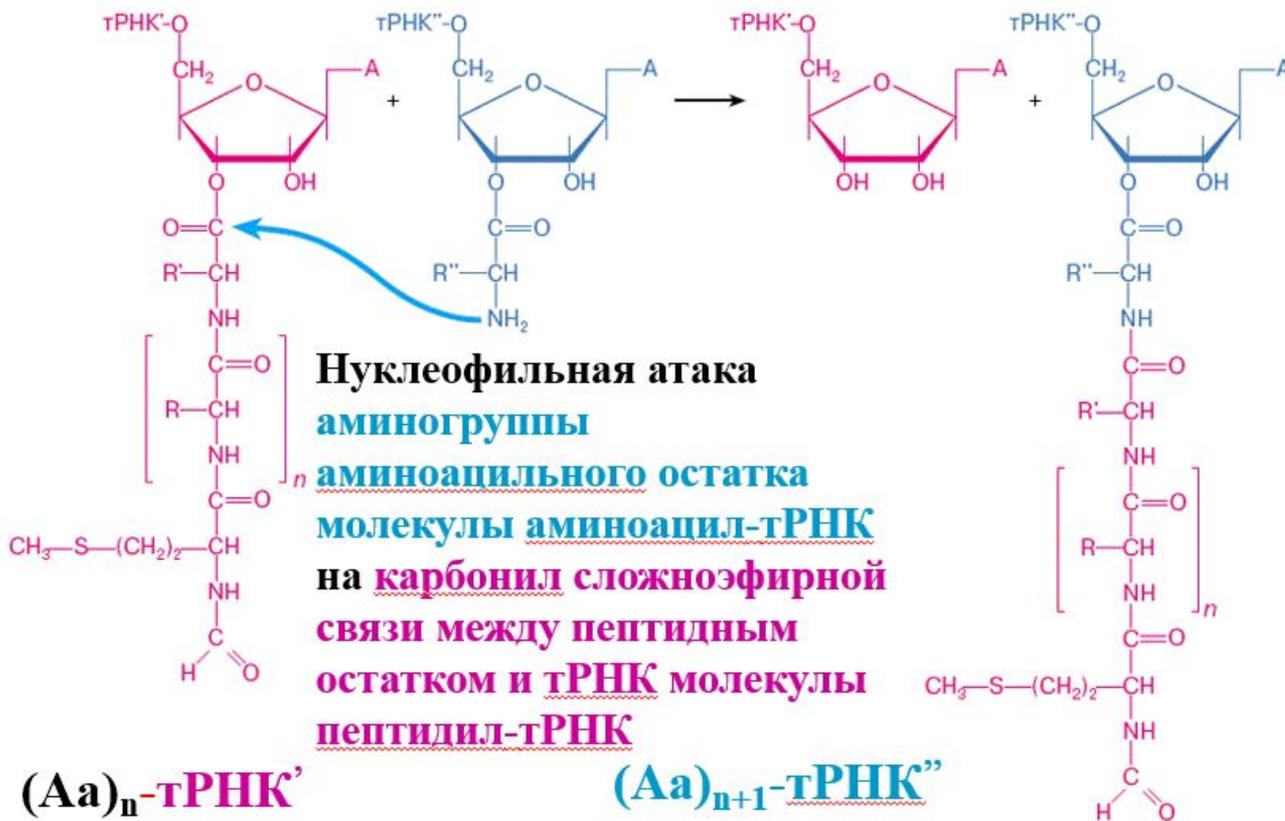
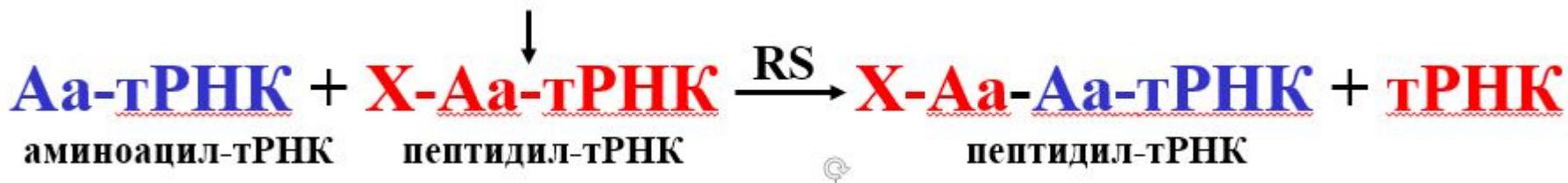
# Рибосома

- **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).



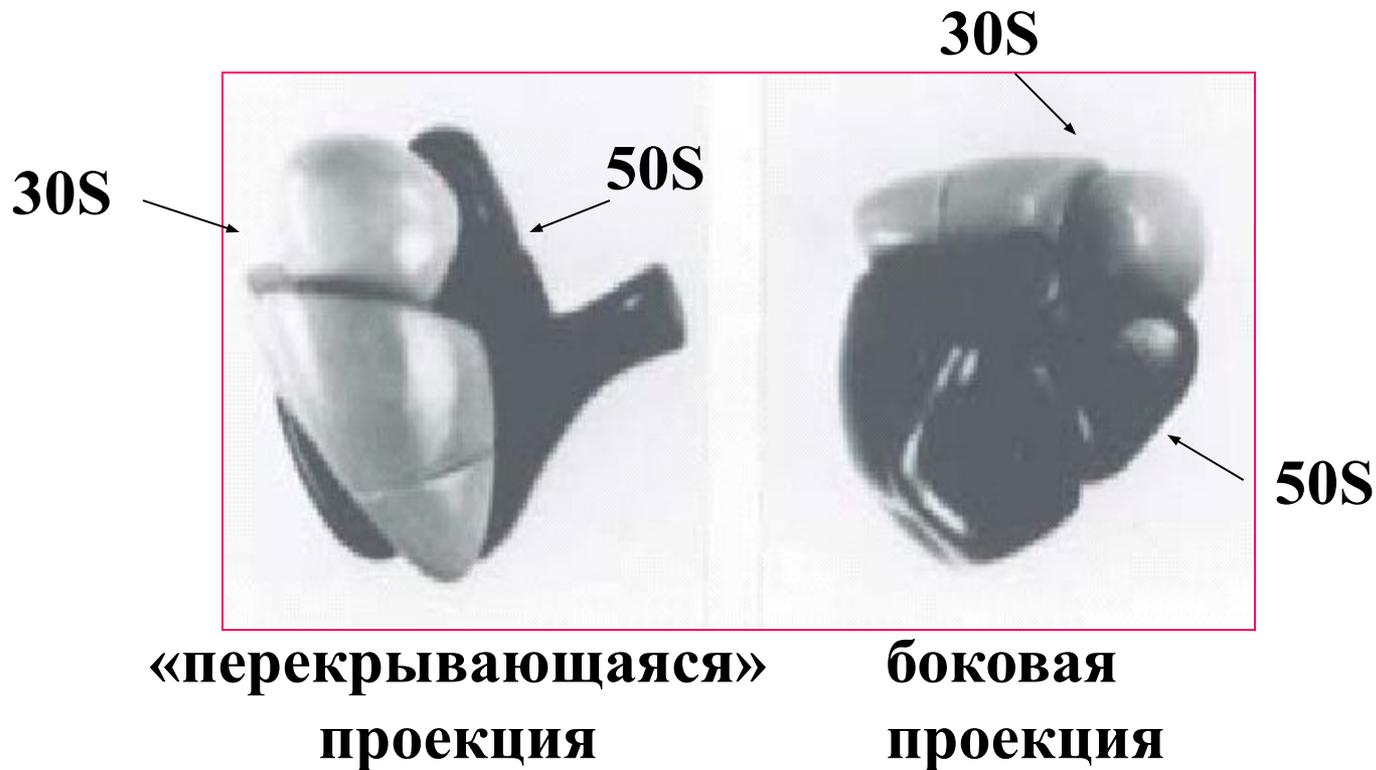
Удлинение полипептидной цепи, катализируемое рибосомой

# Реакция транспептидации



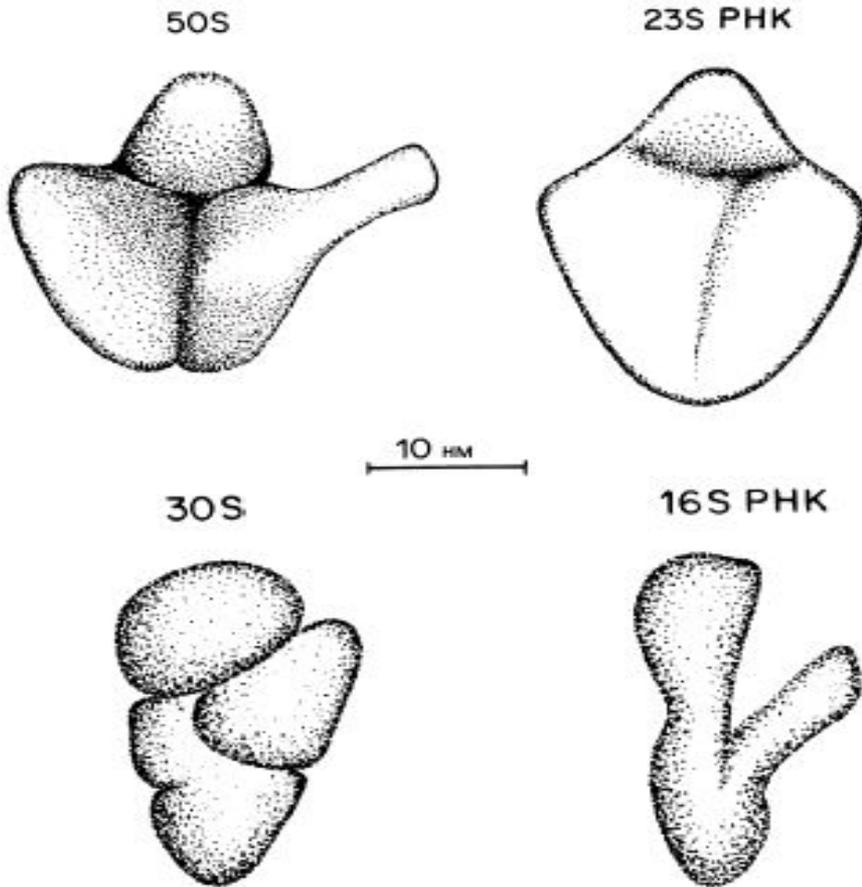
- Реакция транспептидации осуществляется в рибосоме и катализируется самой рибосомой, без участия какого-либо другого фермента.
- Рибозимом является большая субчастица рибосомы.

# Модель рибосомы *E.coli*



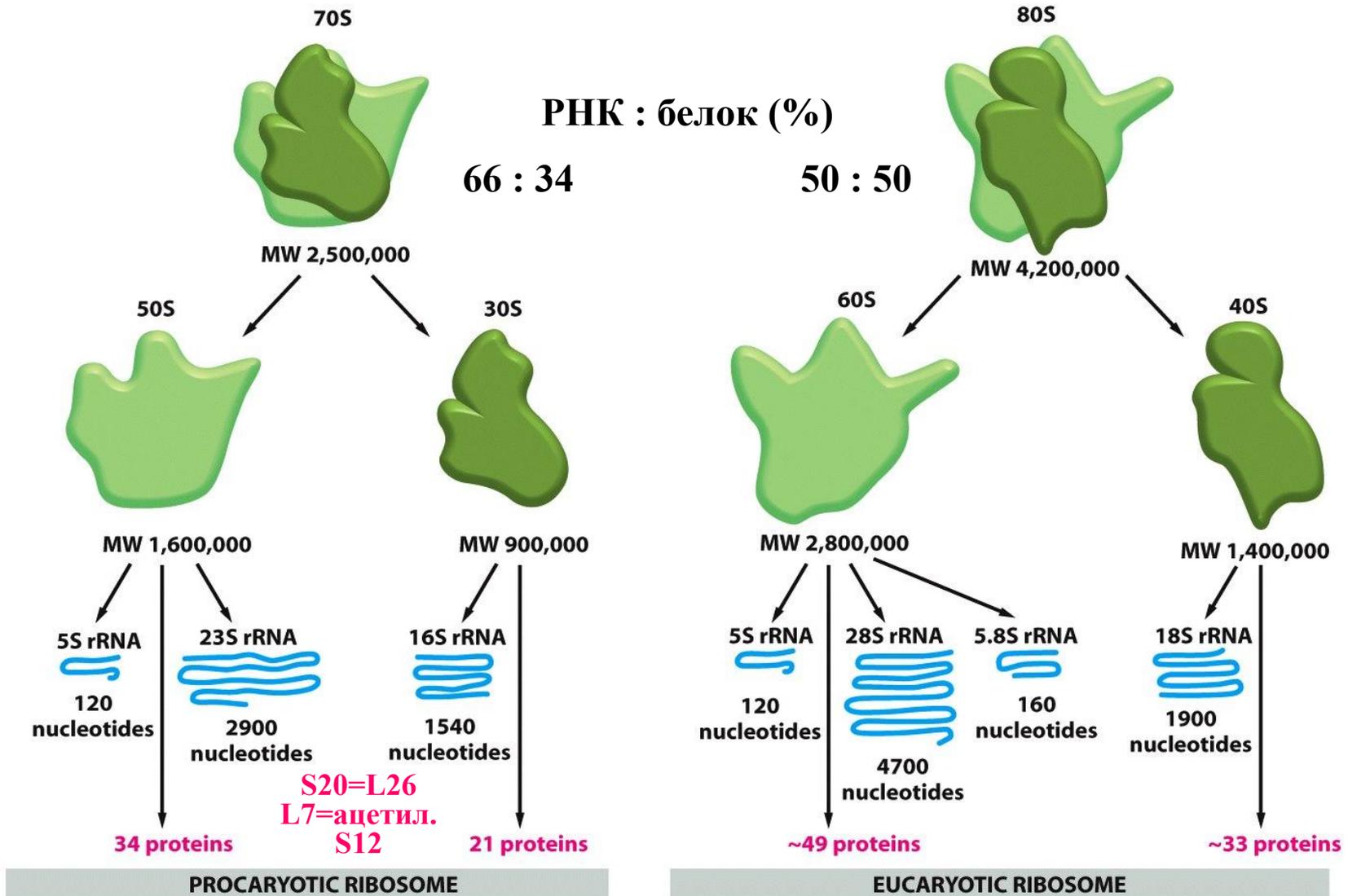
**Рибосома состоит из двух неравных  
лабильно ассоциированных субчастиц**

# Рибосомные субчастицы и рибосомные РНК *E. coli*



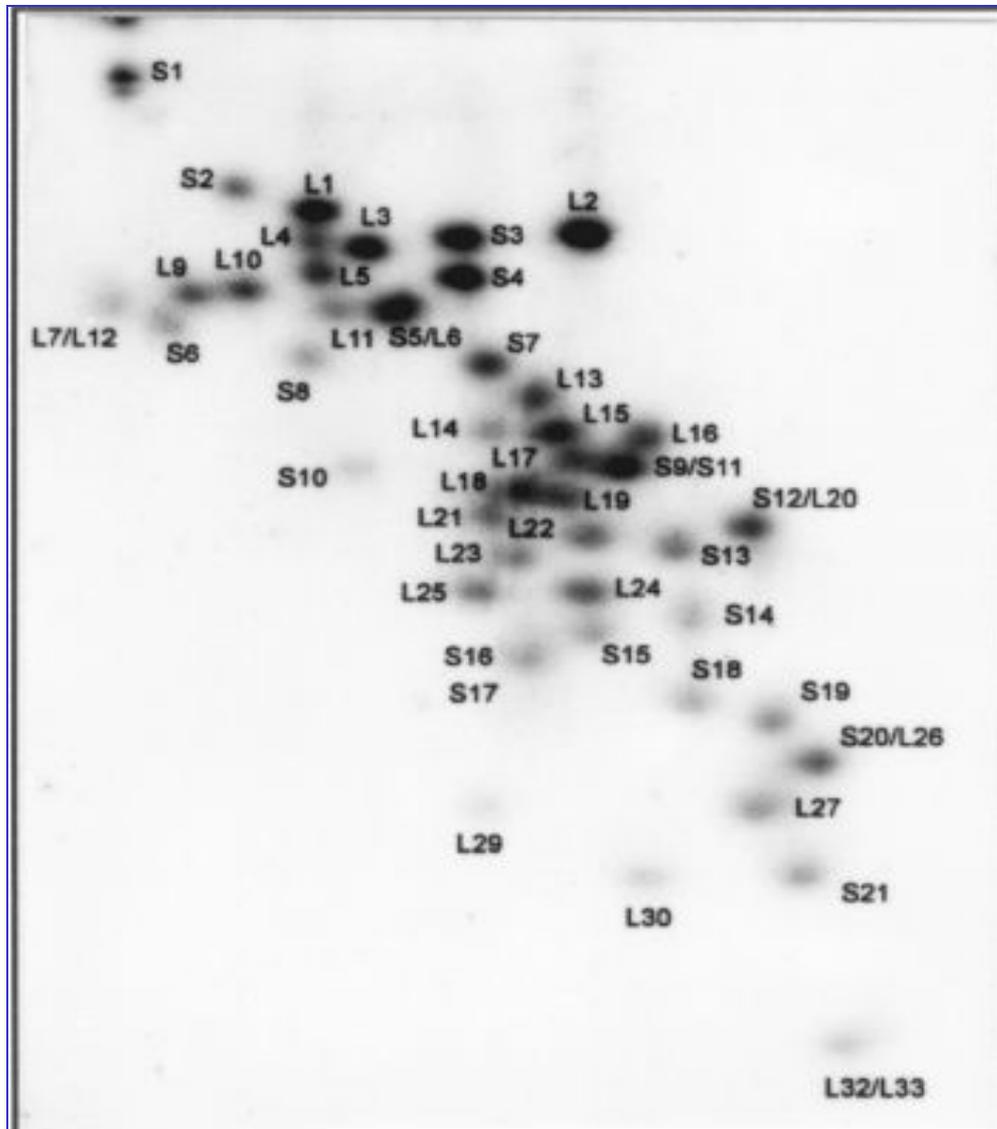
Каждая рибосомная субчастица содержит одну молекулу компактно свернутой высокополимерной рибосомной РНК, которая служит структурным ядром субчастицы.

# Сравнение прокариотической и эукариотической рибосом



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

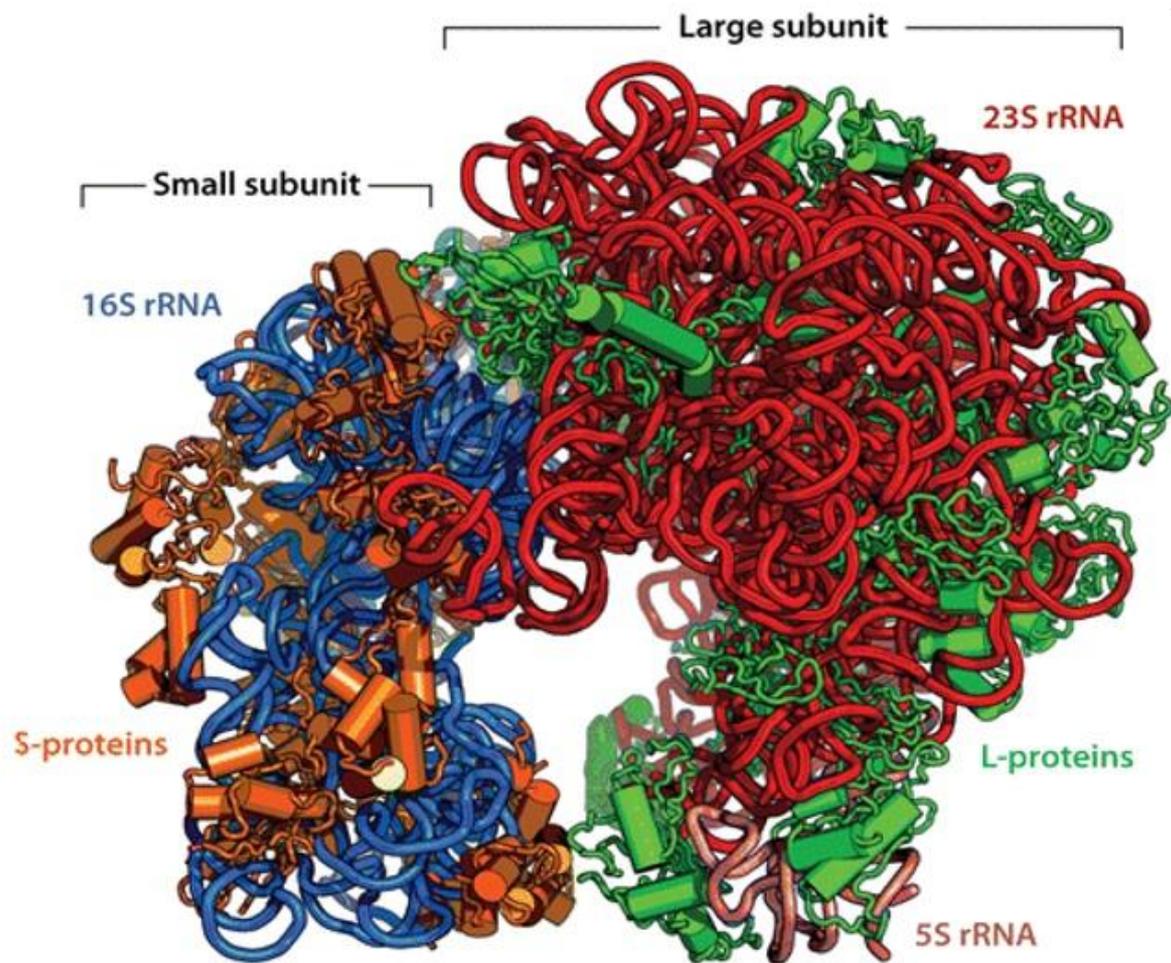
# Рибосомные белки



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.

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



Нобелевская премия по химии за 2009 год за трёхмерную 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

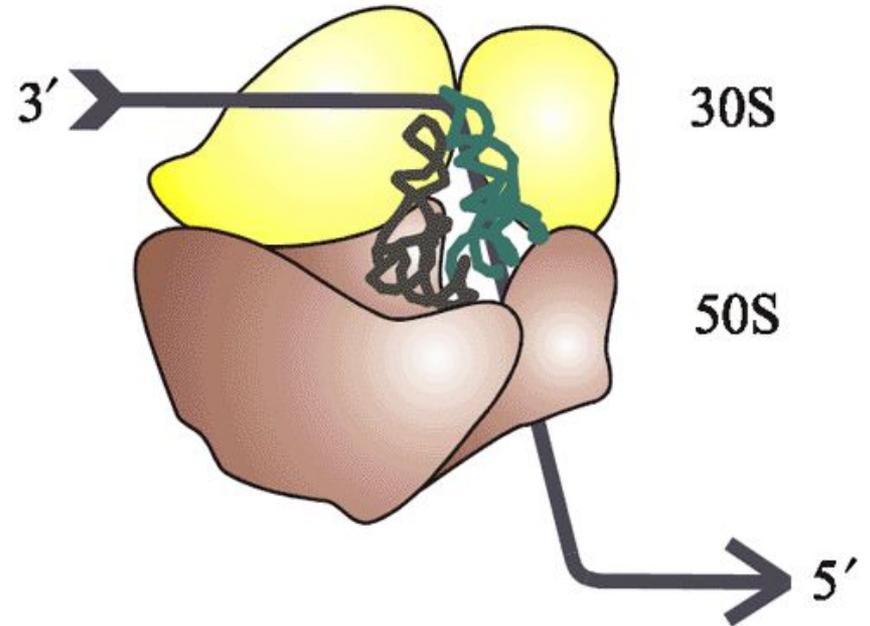
**Прокариотический тип:**  
эубактерии,  
сине-зеленые водоросли,  
хлоропласты,  
архебактерии,  
митохондрии грибов (75S),  
митохондрии млекопитающих  
(55S, «минирибосомы»).

**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

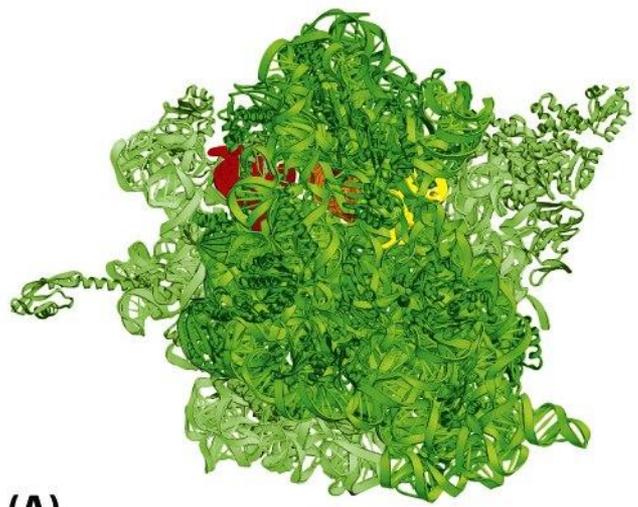
Рибосома содержит четыре участка связывания молекул РНК: один предназначен для мРНК, а три (названные А-сайтом, Р-сайтом и Е-сайтом) — для молекул тРНК .

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

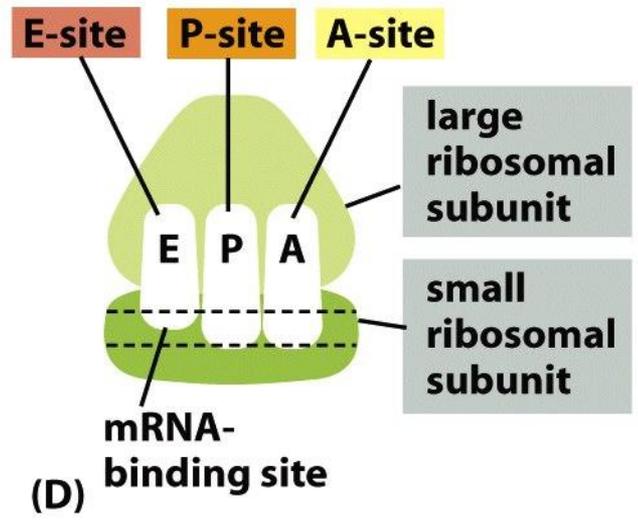
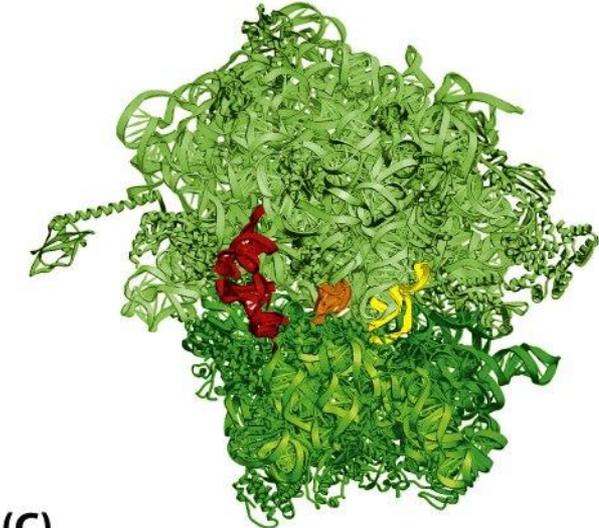
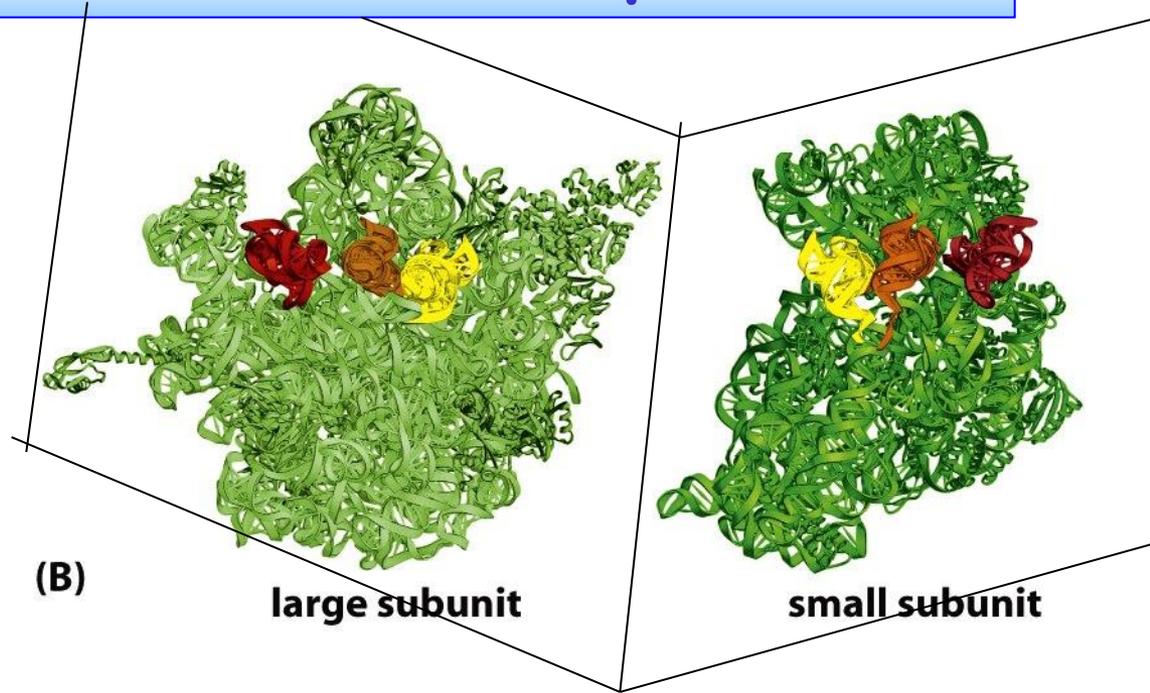
**аминоацил-тРНК**-связывающий участок (**А**-сайт) и **пептидил**-тРНК-связывающий участок (**Р**-сайт).

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

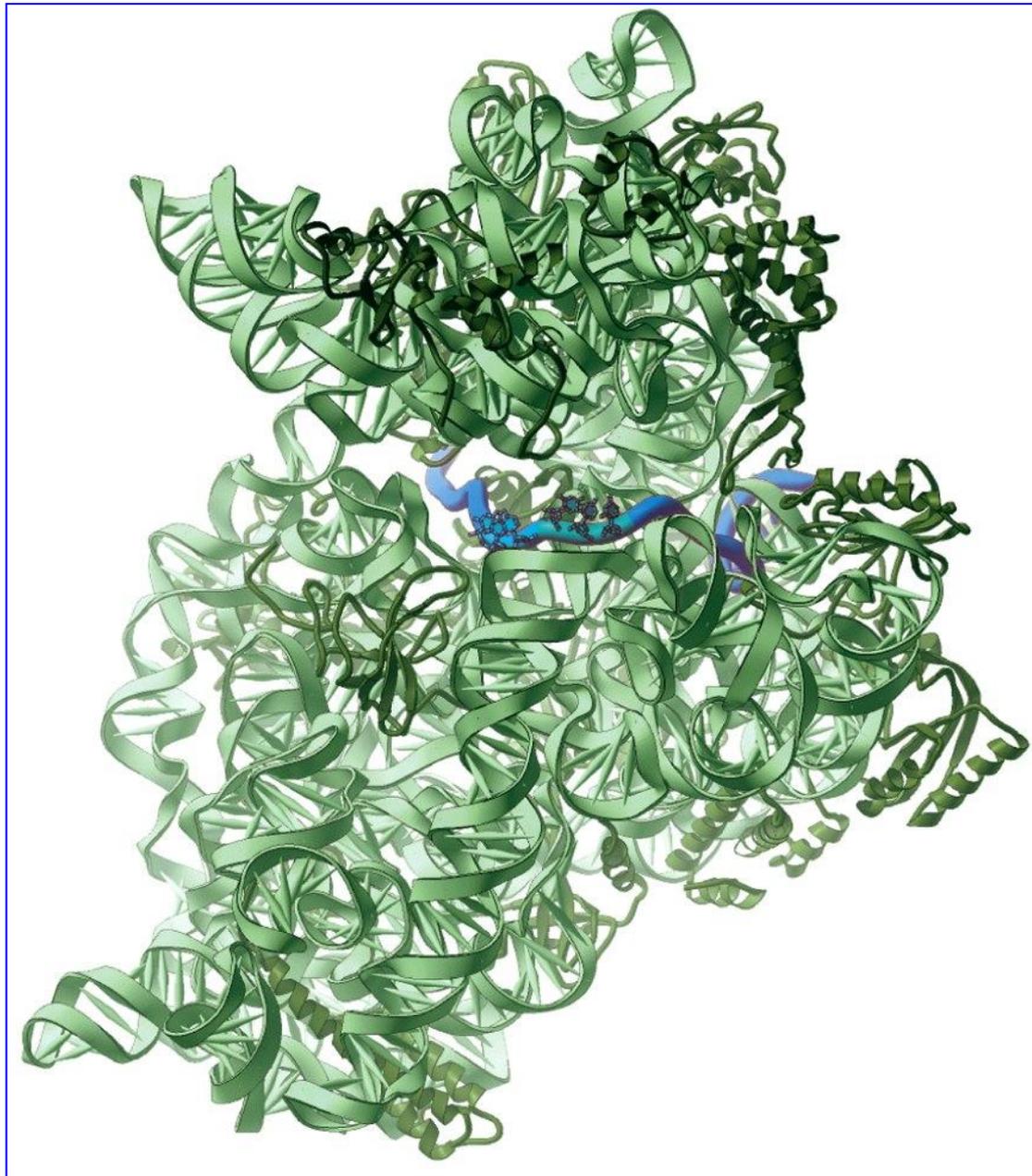
# Три участка связывания тРНК в рибосоме



90°



В процессе  
белкового синтеза  
одновременно  
заняты только 2  
участка  
(P и A или P и E).



## Положение мРНК в малой рибосомной субчастице

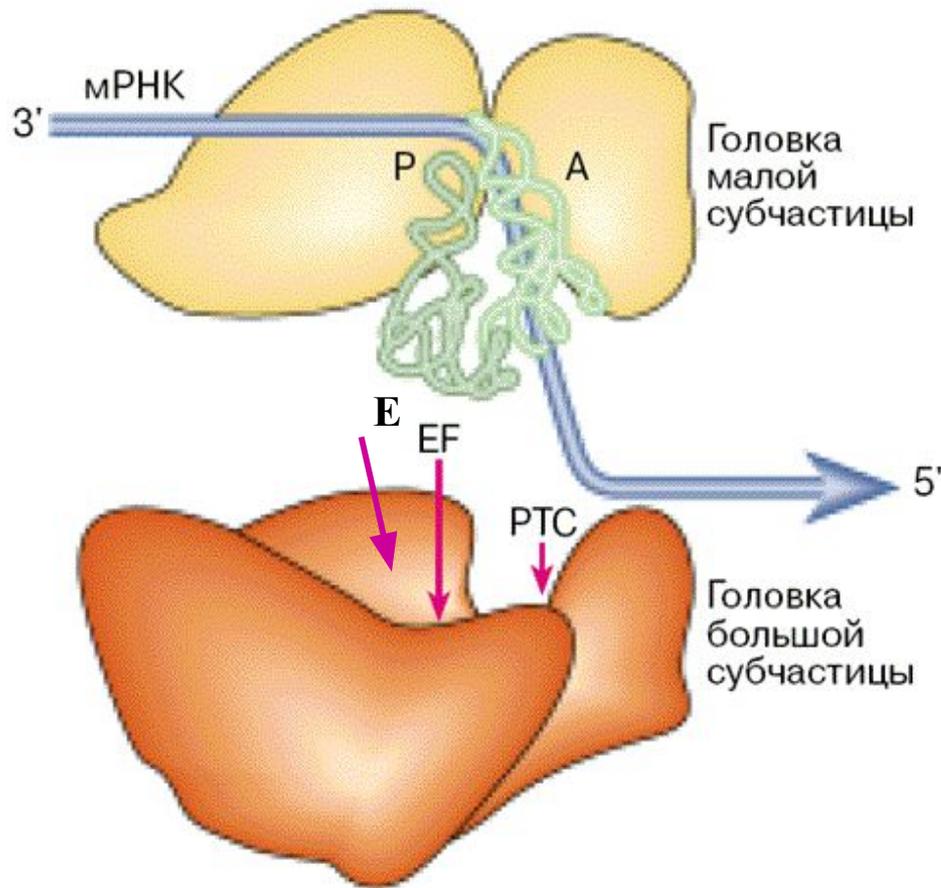
Ориентация малой субчастицы та же, что и на предыдущем слайде (В).

# 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



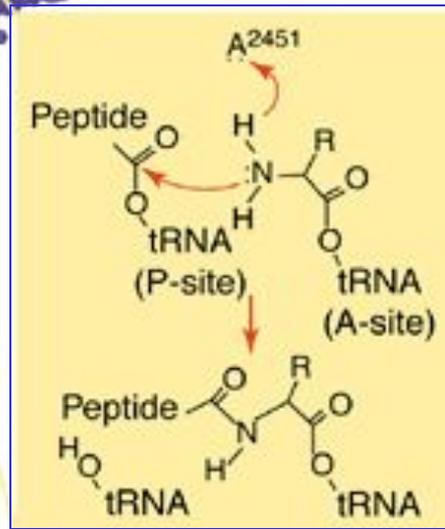
- **Две молекулы тРНК** занимают **A-** и **P-**сайты на **малой субчастице**.
- **Пептидилтрансферазный центр (PTC)** расположен в борозде под центральным выступом **большой субчастицы**.
- **Факторы элонгации (EF)** связываются в районе палочкообразного бокового выступа **большой субчастицы**.
- **E-сайт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

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

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

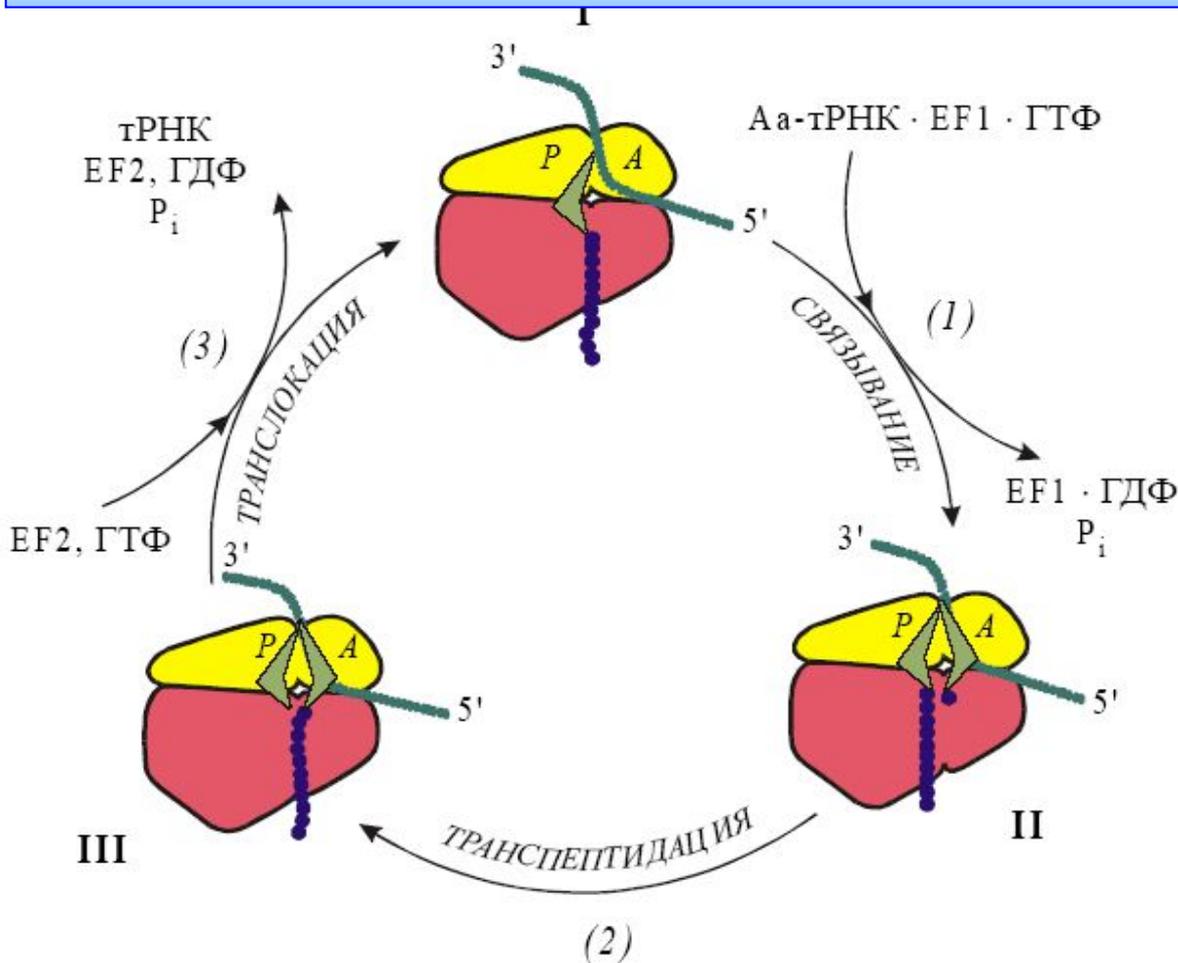
Белки (фиолет.) -  
на периферии

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).

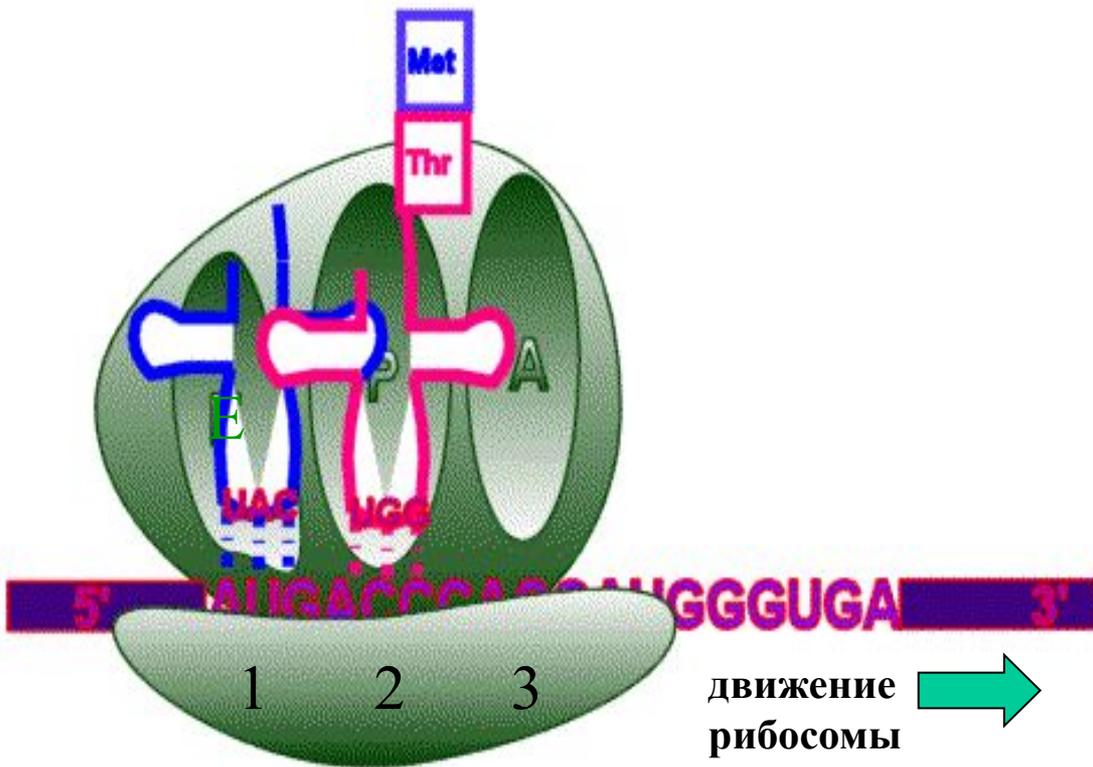
Этап 2 – транспептидация.

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.

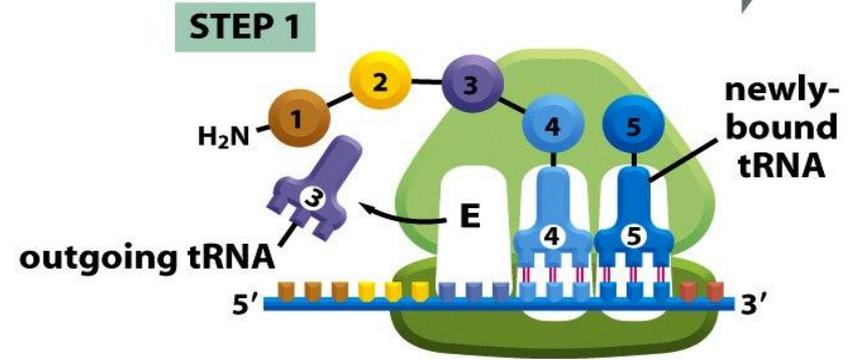
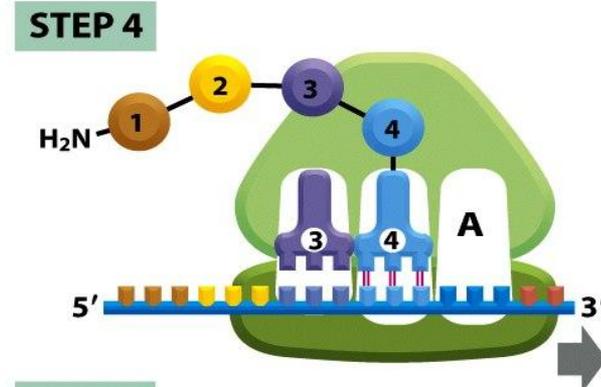
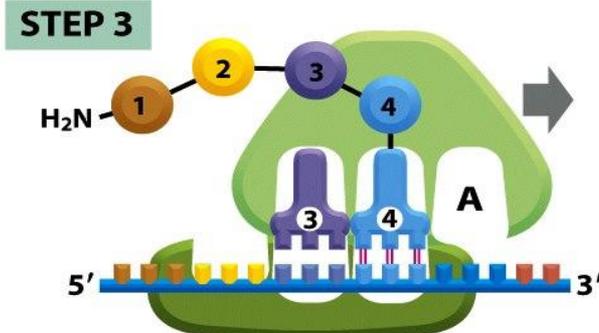
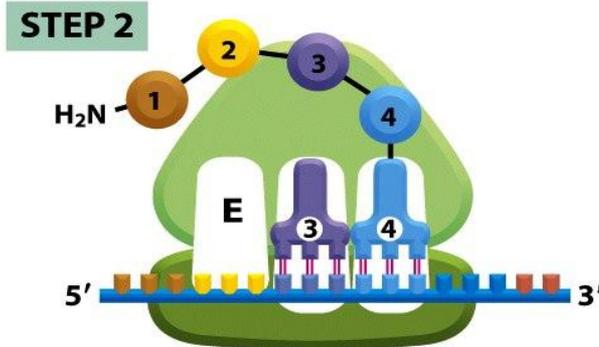
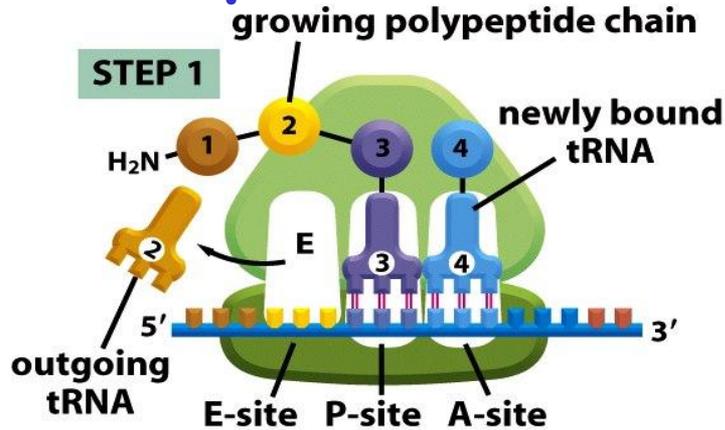
# Конформационная подвижность рибосомы

- **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.**

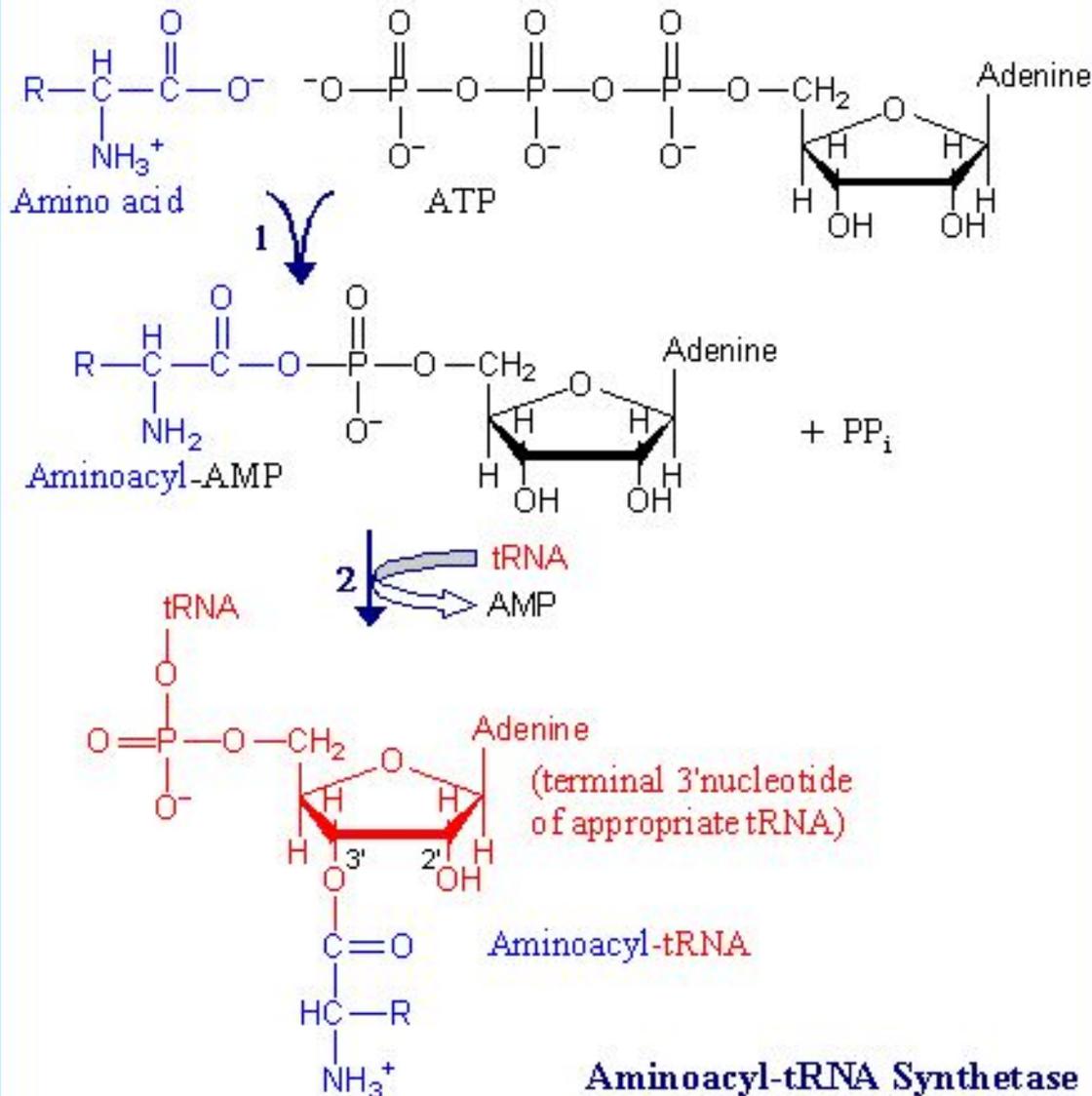
# Взаимная подвижность рибосомных субчастиц при элонгации (4 этапный цикл)



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*)

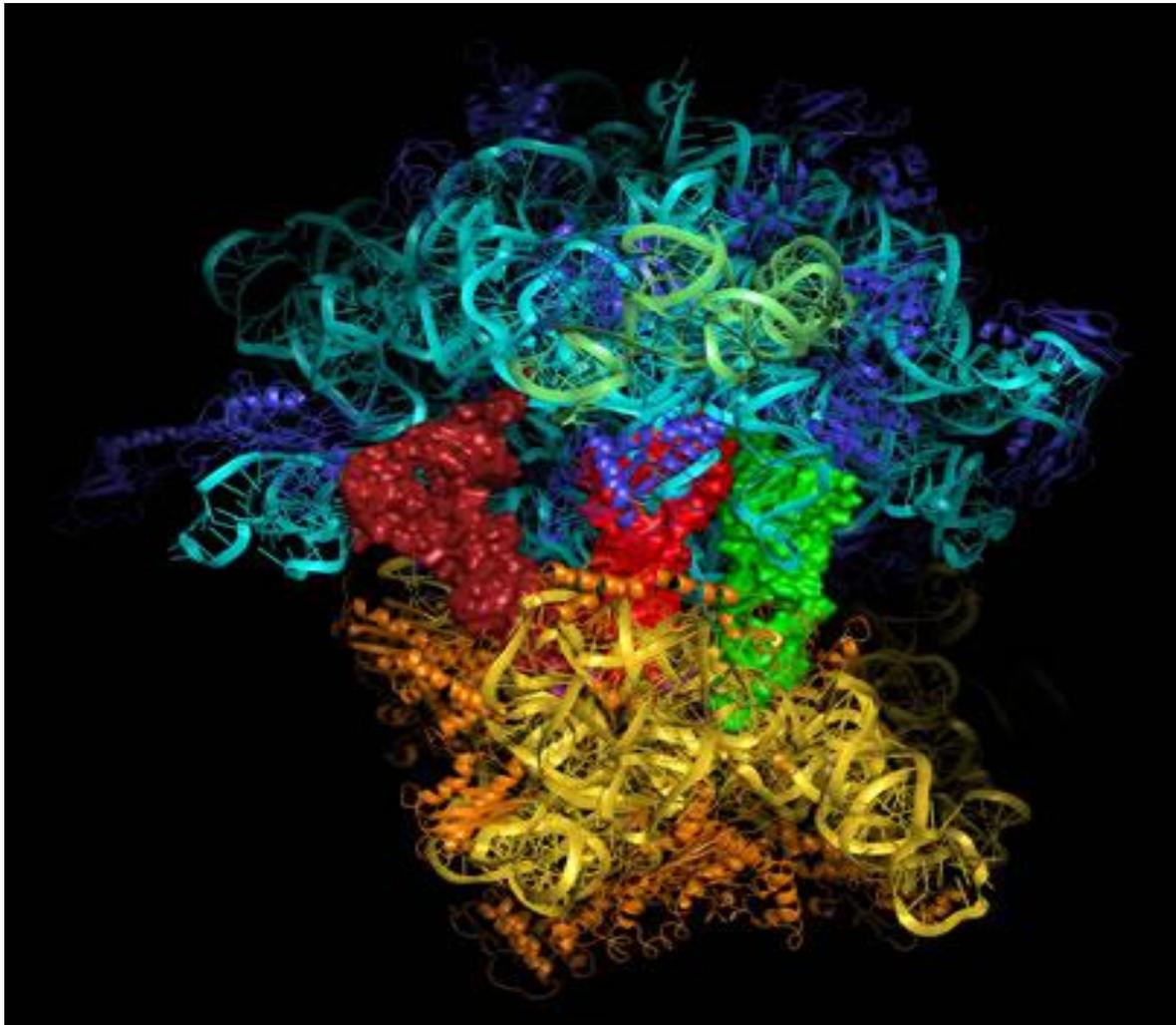
	Рибосома	Малая субчастица	Большая субчастица
<b>Рибосома:</b>			
<i>Коэффициент седиментации</i>	70S	30S	50S
<i>Масса (кДа)</i>	2520	930	1590
<b>РНК:</b>			
<i>Коэффициент седиментации</i>		16S	23S + 5S
<i>Длина (нукл.)</i>		1542	2904 + 120
<b>Белки (число)</b>	55	21 (S20 = L26)	34 (L7 = ацетилир. S12)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

## Состав и характеристики компонентов эукариотической рибосомы (крыса)

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

)

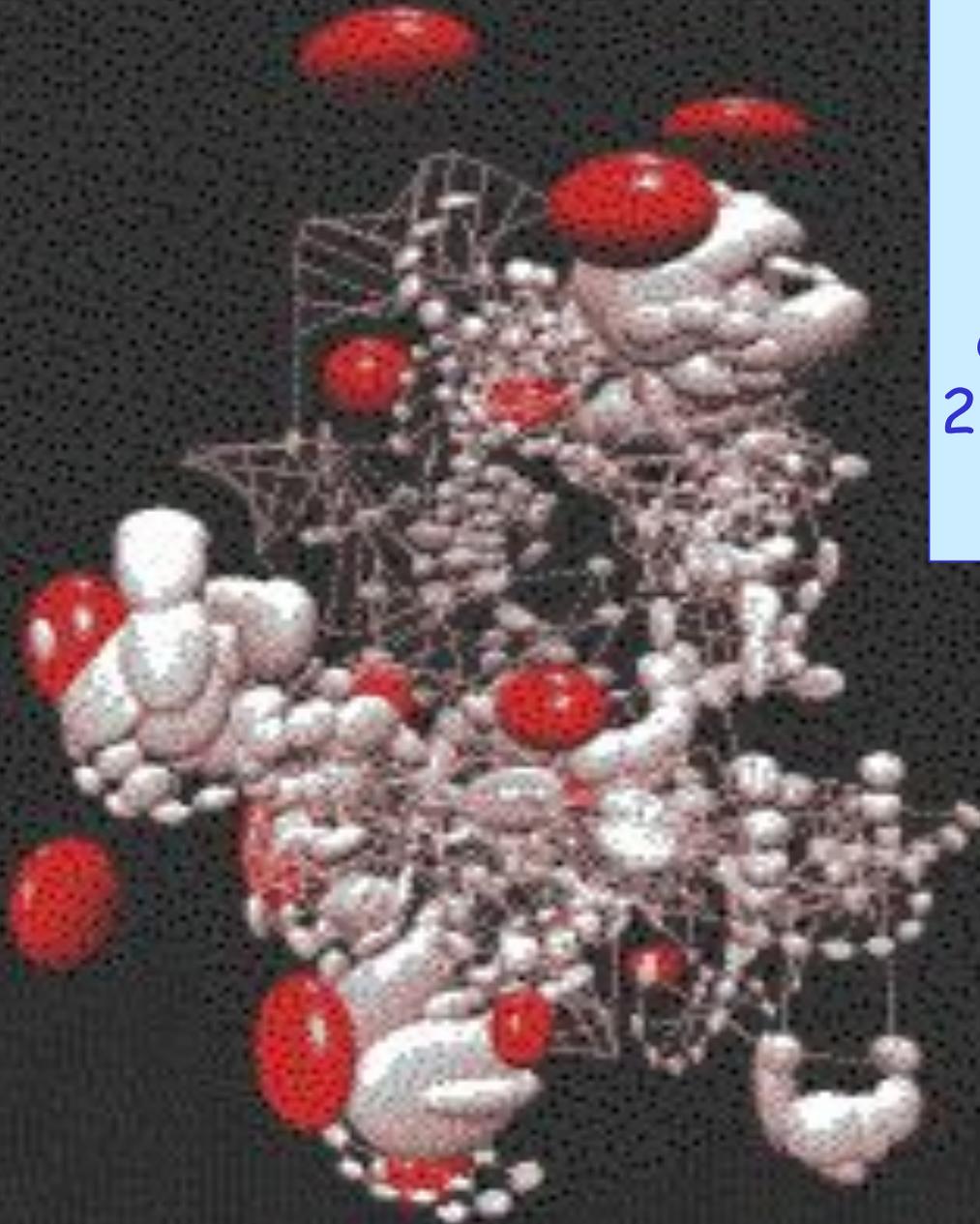
Трехмерная модель с высоким разрешением малой субчастицы рибосомы *E.coli*, содержащей молекулу 16S-рРНК и рибосомные белки (В. Рамакришнан)



**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

