МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ

«ВЯТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Биологический факультет

Кафедра микробиологии

Е. А. БЕССОЛИЦЫНА

СПЕЦГЛАВЫ БИОХИМИИ

Конспект лекций

Модуль 1

Реализация генетической информации

Учебно-методическое пособие

Киров

2011

УДК

К

Допущено к изданию методическим советом биологического факультета ФГБОУ ВПО «ВятГУ» в качестве учебно-методического пособия для студентов направления 020400.62 «Биология» всех профилей подготовки, всех форм обучения

Рецензент

доцент кафедры биотехнологии ФГБОУ ВПО «ВятГУ»,

кандидат биологических наук

О. Н. Шуплецова

Бессолицына Е. А.

К Спецглавы биохимии конспект лекций модуль 1 «Реализация генетической информации»: учебно-методическое пособие / Е. А. Бессолицына – Киров: ФГБОУ ВПО «ВятГУ», 2011. – 106 с.

УДК

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов направления 020400.62 «Биология» всех профилей подготовки, всех форм обучения для изучения дисциплины «Спецглавы биохимии».

Тех. редактор Е. В. Кайгородцева

© ФГБОУ ВПО «ВятГУ», 2011

Матричный синтез

В разделе «метаболизм» вы уже рассматривали ферментативные процессы в клетке, однако, все эти реакции упрощенно представляли собой превращение одного вещества в другое, и все зависело от специфичности фермента катализирующего реакцию. Однако существует еще один тип ферментативных реакций – матричный синтез, который представляет собой образование копии молекулы, причем сама молекула является образцом для фермента. Собственно именно такой тип синтеза лежит в основе передачи и реализации генетической информации, так как потомки в какой-то мере являются копией родителей, особенно четко этот принцип проявляется при бесполом размножении. Вспомните деление бактериальной клетки - из одной образуются две сходные друг с другом и предшественницей, или гидра - на взрослой особи по ее образу (считай образцу) и подобию образуется маленькая копия. И естественно ученых давно интересовал вопрос: какая молекула обладает необходимыми качествами, чтобы хранить передавать и обеспечивать реализацию генетической информации? Это сейчас вы знаете, что эта молекула нуклеиновая кислота, но еще в начале XX-го века хранилищем генетической информации считали белок. А некоторые «деятели науки» вообще говорили о крахмале. Важную роль в открытии генетической функции ДНК сыграли бактерии пневмококки.

Пневмококки обычно окружены слизистой блестящей полисахаридной капсулой. Этот наружный слой имеет существенное значение для проявления патогенности бактерий. Они вызывают пневмонию у человека и других чувствительных млекопитающих. Мутанты, лишенные полисахаридной оболочки, не патогенны. Бактерии дикого типа обозначают буквой S (от англ. smooth - гладкий), так как они образуют гладкие колонии, а мутантные бактерии, не имеющие капсулы,- буквой R (от англ. rough - шероховатый), так как они образуют шероховатые колонии. У одной группы R-мутантов

отсутствует фермент дегидрогеназа, превращающий UDP-глюкозу в UDP-глюкуронат. Фермент необходим для синтеза капсульного полисахарида, который у этих пневмококков состоит из чередующейся последовательности остатков глюкозы и глюкуроната. В 1928 г. Фред Гриффит (Fred Griffith) обнаружил, что непатогенный R-мутант можно трансформировать в патогенную S-форму следующим путем. Он инъецировал мышам смесь живых бактерий R-формы и убитых нагреванием пневмококков S. Поразительное открытие Гриффита состояло в том, что эта смесь вызывала гибель мышей, хотя ни живые R-пневмококки, ни убитые нагреванием S- пневмококки мышей не убивали. Кровь погибших мышей содержала живые S-пневмококки. Следовательно, убитые нагреванием S-пневмококки каким-то образом трансформировали живые R-пневмококки в живые S-пневмококки. Это изменение было стабильным: трансформированные пневмококки давали патогенное потомство S-формы. Затем было установлено, что такая трансформация R—>S может происходить in vitro. Некоторые клетки в растущей культуре R-формы трансформировались в S-форму при добавлении бесклеточного экстракта убитых нагреванием пневмококков S. Это открытие заложило основу для изучения химической природы трансформирующего начала. Исследователи стали фракционировать бесклеточный экстракт убитых нагреванием пневмококков S и определять трансформирующую активность его компонентов. В 1944 г. Освальд Эйвери, Колин Мак-Леод и Маклин Мак-Карти опубликовали результаты своей работы. Оказалось, что «нуклеиновая кислота дезоксирибозного типа - основное действующее начало трансформирующего экстракта пневмококка типа III». Экспериментальные доказательства этого заключения состояли в следующем:

1. при элементном химическом анализе очищенного, высокоактивного трансформирующего начала результат был близок к расчетному для ДНК;

2. оптические, электрофоретические свойства, поведение при ультрацентрифугировании и диффузия очищенного материала соответствовали свойствам ДНК;

3. при экстрагировании белков или липидов не происходило потери трансформирующей активности;

4. трипсин и химотрипсин (ферменты, расщепляющие белки) не влияли на трансформирующую активность;

5. гликозидазы (ферменты, расщепляющие полисахариды) не влияли на трансформирующую активность;

6. рибонуклеаза не влияла на трансформирующее начало;

7. при добавлении дезоксирибонуклеазы трансформирующая активность, наоборот, терялась.

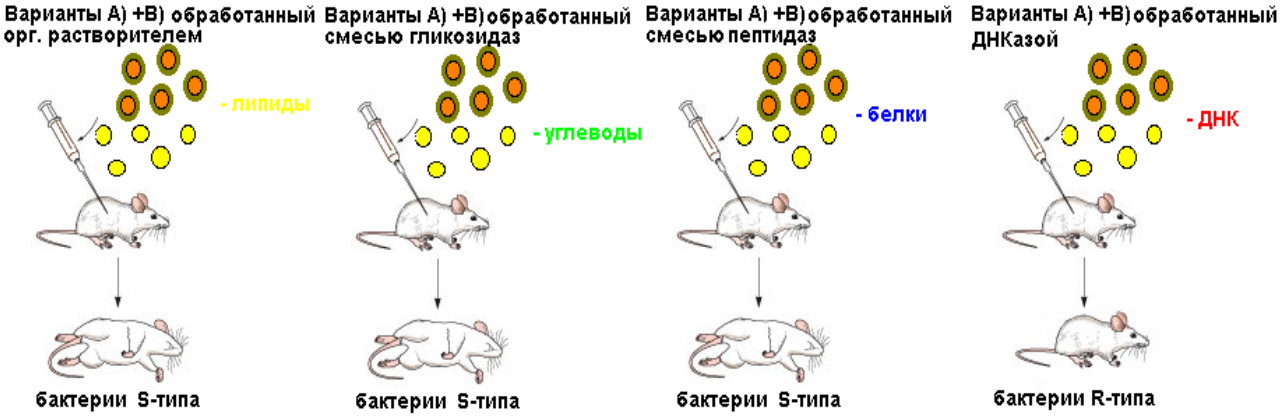


Рисунок 1: Схема экспериментов О. Авери, К. Мак-Леода, М. Мак-Карти

Эта работа - памятная веха в истории биохимии, так как до 1944 г. считалось, что генетическую информацию несут хромосомные белки, а ДНК играет вторичную роль. Такая преобладающая точка зрения была решительно опровергнута открытием строго доказанного факта, что очищенная ДНК обладает генетической специфичностью.

Но как достаточно монотонная длинная молекула всего из 4-х типов мономеров могла стать хранилищем информации о развитии не только одной клетки, но и всего организма объяснили в 1953 г. Джеймс Уотсон и Френсис Крик, установив трехмерную структуру ДНК, они же предложили возможный механизм ее репликации. Это блестящее достижение стоит в ряду важнейших событий в истории биологии, так как оно открыло путь к пониманию функции гена на молекулярном уровне. Уотсон и Крик проанализировали картины дифракции рентгеновских лучей на нити ДНК, полученные Розалиндой

Франклин и Морисом Уилкинсом (как гласит легенда, эти два гения «украли» рентгеновский снимок из лаборатории), и предложили структурную модель, которая в основных своих чертах оказалась верной. В связи с этим вспомним вторичную структуру ДНК: Характерные особенности этой модели сводятся к следующему.

1. Две спиральные полинуклеотидные цепи закручены вокруг общей оси. Цепи направлены в противоположные стороны, то есть антипараллельны.

2. Пуриновые и пиримидиновые основания расположены внутри спирали, а остатки фосфата и дезоксирибозы – снаружи. Плоскости оснований перпендикулярны оси спирали. Плоскости остатков сахара расположены почти под прямым углом к основаниям.

3. Диаметр спирали 20 А. Расстояние между соседними основаниями вдоль оси спирали 3,4 А, они повернуты относительно друг друга на 36°. Таким образом, на один виток спирали каждой из цепей приходится 10 нуклеотидов, что соответствует 34 А.

4. Две цепи удерживаются вместе водородными связями между парами оснований. Аденин всегда спаривается с тимином, гуанин - с цитозином.

5. На последовательность оснований в полинуклеотидной цепи не накладывается никаких ограничений.

Более подробно вопрос рассмотрен в дисциплине «Биохимия», модуле «Структурная биохимия».

Определенная последовательность оснований несет конкретную генетическую информацию. Вот именно наличие взаимодействия между основаниями и тот факт, что взаимодействие возможно только между комплиментарными азотистыми основаниями (канонические пары A- T G-C) и обусловило способность ДНК хранить информацию и быть матрицей для синтеза своих копий. В настоящее время выявлено три основных процесса матричного синтеза: репликация транскрипция и трансляция.

Репликация

Репликация – это процесс удвоения молекулы ДНК, который лежит в основе процессов клеточного деления и как следствие процессов размножения всех живых организмов. Матрицей служит молекула ДНК.

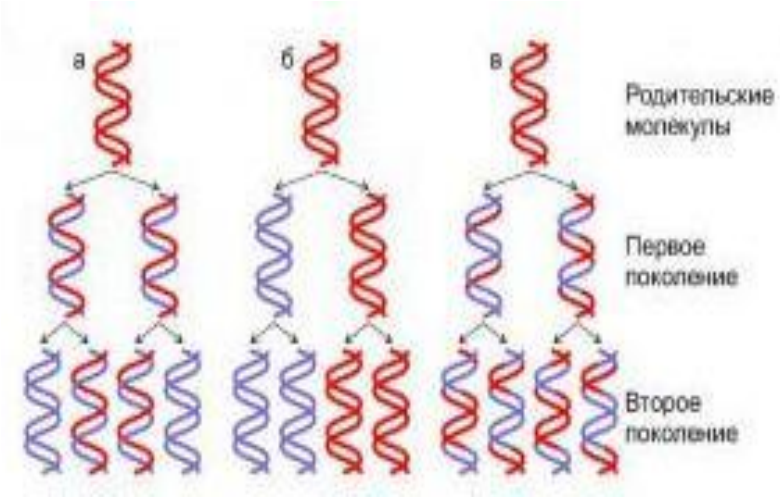


Рисунок 2: Схема моделей репликации а - полуконсервативная, б - косервативная, в - мозаичная

Было предложено три схемы репликации ДНК консервативная (результате образуются две цепи, но одна полностью новосинтезированная, а вторая полностью матричная), полуконсервативная (в результате образуются две цепи ДНК, в каждой из которых одна цепь матричная, вторая новосинтезированная) и мозаичная (где

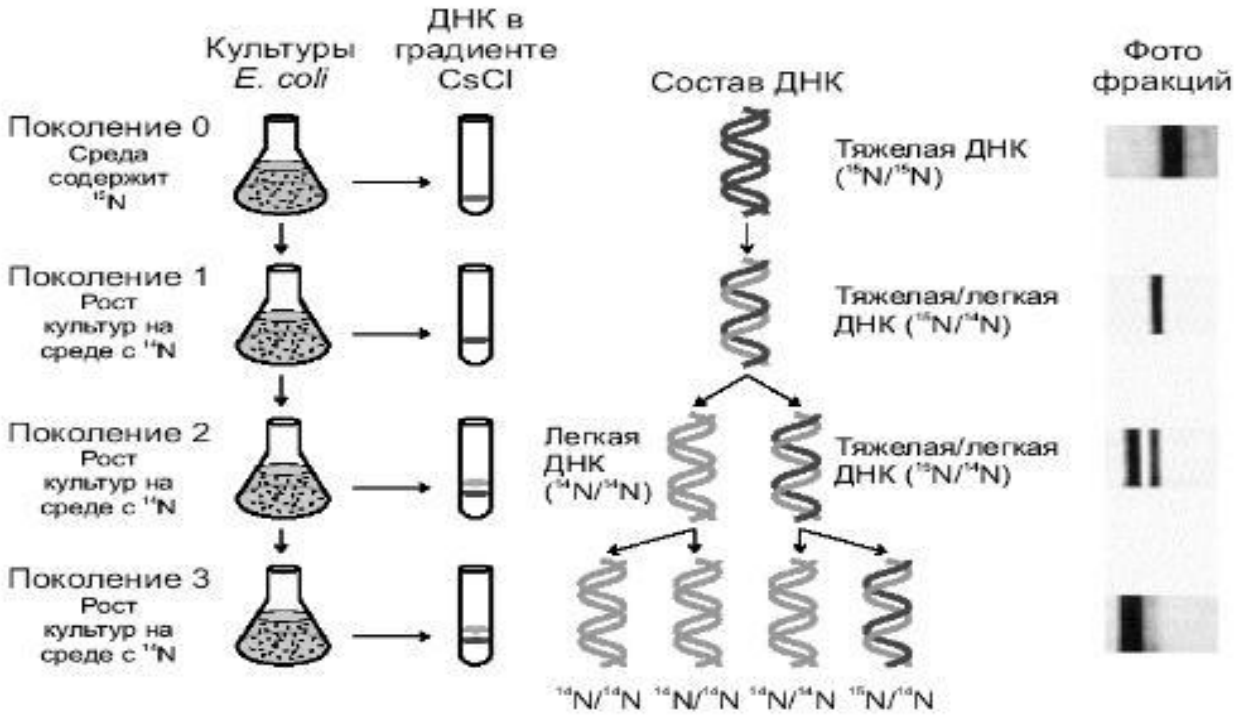


Рисунок 3: Схема экспериментов Мезельсона и Сталя (1958 год)

обе образовавшиеся цепи представляют собой смеси матричных и

новосинтезированных фрагментов), но экспериментальное подтверждение получила только полуконсервативная модель. Эксперимент Мезелсона и Сталя (1958) это доказывающий синтез цепей с меченым нуклеотидом, в результате только тяжелые цепи (введение изотопа N^{15} увеличивает молекулярный вес цепи за счет изменения веса ядра атома см. Химию). Затем начали вводить немеченый изотоп N^{14} и получали в первом поколении один тип N^{15}/N^{14}, в следующих два типа цепей N^{15}/N^{14} и N^{14}/N^{14}.

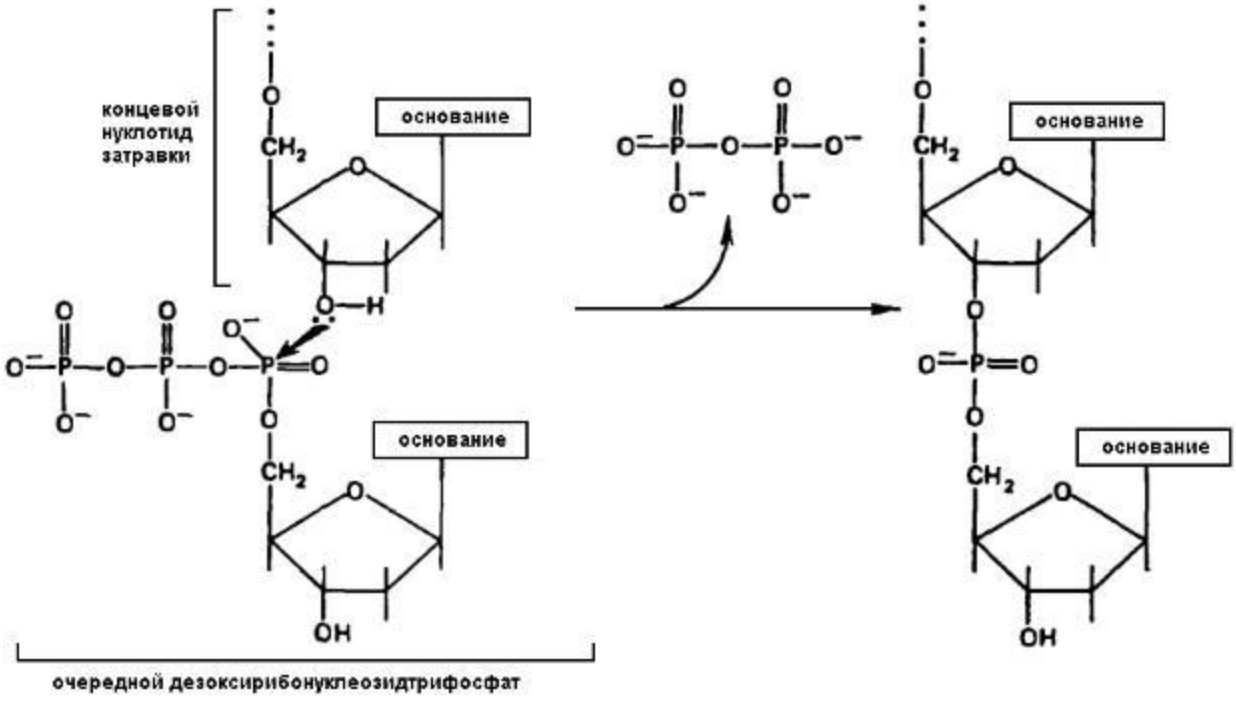


Рисунок 4: Механизм присоединения нуклеотида в ходе реакции полимеризации нуклеиновых кислот

Репликация, как и любой процесс метаболизма – ферментативная реакция. Прежде всего, основным ферментом репликации является ДНК-полимераза, этот фермент впервые был выделен в 1956 г. из *Escherichia coli*. Этот фермент осуществляет полимеризацию нуклеотидов в цепь, комплементарную матричной. Субстратом являются тринуклеотиды. Коферментом двухвалентные ионы Zn, обеспечивающие правильную ориентацию 3’гидроксила альфа-фосфата и нуклеотида матрицы (следует отметить, что ионы Zn также могут катализировать реакцию полимеризации, но со значительно меньшими скоростью и точностью); также для полимеризации необходимы ионы Mg, которые образуют комплекс с нуклеотидтрифосфатами и уже этот комплекс

поступает в активный центр фермента. Энергия необходимая для катализа выделяется при расщеплении макроэргической связи между альфа и бета фосфатными группами. Один акт полимеризации можно разделить на несколько этапов:

1. Комплекс (Mg/дезоксирибонуклеотидтрифосфат) поступает в активный центр фермента и образует водородные связи с нуклеотидом матрицы (на данном этапе осуществляется первый раунд коррекции полимеризации). Если нуклеотиды комплементарны, то образуется комплекс, в котором нуклеотид матрицы, 3' концевой нуклеотид нарастающей цепи и новый нуклеотидтрифосфат образуют комплекс с правильной ориентацией всех молекул, а в связи с этим стабильный, если нуклеотидтрифосфат не комплементарен, то стабильный комплекс не образуется и, следовательно, этот нуклеотид отсоединяется и уходит из активного центра.

2. После образования комплекса (пункт 1) происходит нуклеофильная атака кислородом 3' концевого гидроксила, 5'-концевого альфа-фосфата, следующего нуклеотида; в результате образуется фосфоэфирная связь и выщепляется пирофосфат (рисунок).

3. После присоединения нового нуклеотида происходит второй этап коррекции полимеризации; если новоприсоединенный нуклеотид не комплементарен, то следующий не поступает в активный центр фермента и ДНК полимераза своей 3'-5' нуклеазной активностью отщепляет неправильный нуклеотид. Далее цикл повторяется.

Таким образом, взаимодействие комплекса фермент, матрица, субстрат обеспечивает синтез точной копии, а, следовательно, передачу закодированной информации от родителей потомкам.

Правила репликации:

1. Репликация всегда осуществляется с ORI; исключение – искусственные системы (ПЦР).

2. Репликация полуконсервативна.

3. Синтез ДНК у всех организмов и в искусственных системах требует

затравки в отличие от синтеза РНК. Затравка может быть белковая (вирусы), РНК и ДНК.

4. Синтез ДНК всегда осуществляется в направлении 5’ – 3’ . Это связано с тем фактом, что присоединение к 3’ – ОН ‘ энергетически более выгодно (см. структуру тринуклеотида), а также с активностью коррекции присоединения нуклеотидов.

Синтез нуклеиновых кислот осуществляет группа ферментов — полимераз.

Их различают по субстратам (используемым нуклеотидам) и по матрице.

ДНК зависимая ДНК полимераза — фермент репликации осуществляет синтез молекулы ДНК на ДНК матрице.

РНК зависимая ДНК полимераза — обратная транскриптаза осуществляет синтез молекулы ДНК на РНК матрице.

ДНК зависимая РНК полимераза — фермент транскрипции осуществляет синтез молекулы РНК на ДНК матрице.

РНК зависимая РНК полимераза — фермент репликации, РНК-овых вирусов осуществляет синтез молекулы РНК на РНК матрице.

Ферменты состоят из нескольких субъединиц и имеют несколько активностей, основную полимеразную и одну или несколько других дополнительных, которые зависят от типа полимеразы.

В репликации участвуют ДНКзависимые ДНК-полимеразы.

ДНК -полимеразы прокариот

Их всего три и их характеристики представлены в таблице.

Таблица 1

Структура и функции ДНК полимераз прокариот

	ДНК полимераза I	ДНК полимераза II	ДНК полимераза III
Количество субъединиц	1	1	7
активности	Полимеразная, 5' и 3'-экзонуклеазные	Полимеразная, 3'-экзонуклеазная	Полимеразная, 3'-экзонуклеазная, АТФ-азная
Функция	Удаление затравок, репарация	репарация	Основной фермент репликации
Молекулярная масса	102 kDa	120 kDa	Таблица ниже

Так как ДНК полимераза III является основным ферментом репликации, рассмотрим ее строение подробнее. Размер и функции субъединиц представлены в таблице.

Таблица 2

Субъединичный состав ДНК-полимеразы III *E.coli.*

Субъединицы	Молекулярная масса	Функция	активности
α	140	Синтез новой цепи	полимеразная
β	37	Закрепляет комплекс на матрице, обеспечивает процессивность	АТФ-азная
γ	52	Обеспечивает начальную посадку β-субъединицы	
ε	25	Коррекция ошибок	3'экзонуклеазная
τ	83	Димеризация комплекса	
θ	10	?	
δ	32	?	

У эукариот выделено 4 ДНК-полимеразы

Таблица 3

Структура и функции ДНК полимераз эукариот

	ДНК полимераза α	ДНК полимераза β	ДНК полимераза γ	ДНК полимераза δ
Количество субъединиц	несколько	1	1	2
активности	Полимеразная, 3'-экзонуклеазная АТФ-азная	Полимеразная, 3'-экзонуклеазная	Полимеразная, 3'-экзонуклеазная,	Полимеразная, 3'-экзонуклеазная
Функция	Основной фермент репликации	репарация	Митохондриальная репликация	Не известна
Молекулярная масса	500 kDa (весь комплекс)	40 kDa	50 kDa	150 kDa

ДНК полимераза α по функциям и строению сходна с ДНК-полимеразой III бактерий, но существуют некоторые различия:

Присутствует праймазная активность (ДНК полимераза III не может сама синтезировать затравки) β –субъединица ДНК-полимеразы α состоит из трех частей, а у ДНК-полимеразы III из двух.

Как было сказано ранее, синтез ДНК осуществляется только в направлении 5'-3', а репликация обеих цепей происходит параллельно. Следовательно, только у одной цепи направление синтеза и движение ферментативного комплекса совпадают, и на этой цепи синтез непрерывен. Такая цепь называется лидирующей, тогда как на второй цепи происходит периодическая инициация репликации и образование затравок (новосинтезированные фрагменты ДНК с затравками называются фрагментами Оказаки), эта цепь называется отстающей. Отстающая цепь изгибается, и эта модель получила название “тромбон”.

Репликативный комплекс

Как любой процесс матричного синтеза, репликация состоит из трех этапов: инициации, элонгации, и терминации.

ДНК полимераза, в ходе репликации димеризуется, для параллельно1 репликации обеих цепей, кроме того для репликации необходимы дополнительные ферментативные активности, которых ДНК-полимераза не имеет, поэтому используются дополнительные ферменты, которые вместе с димером ДНК-полимеразы образуют репликативный комплекс.

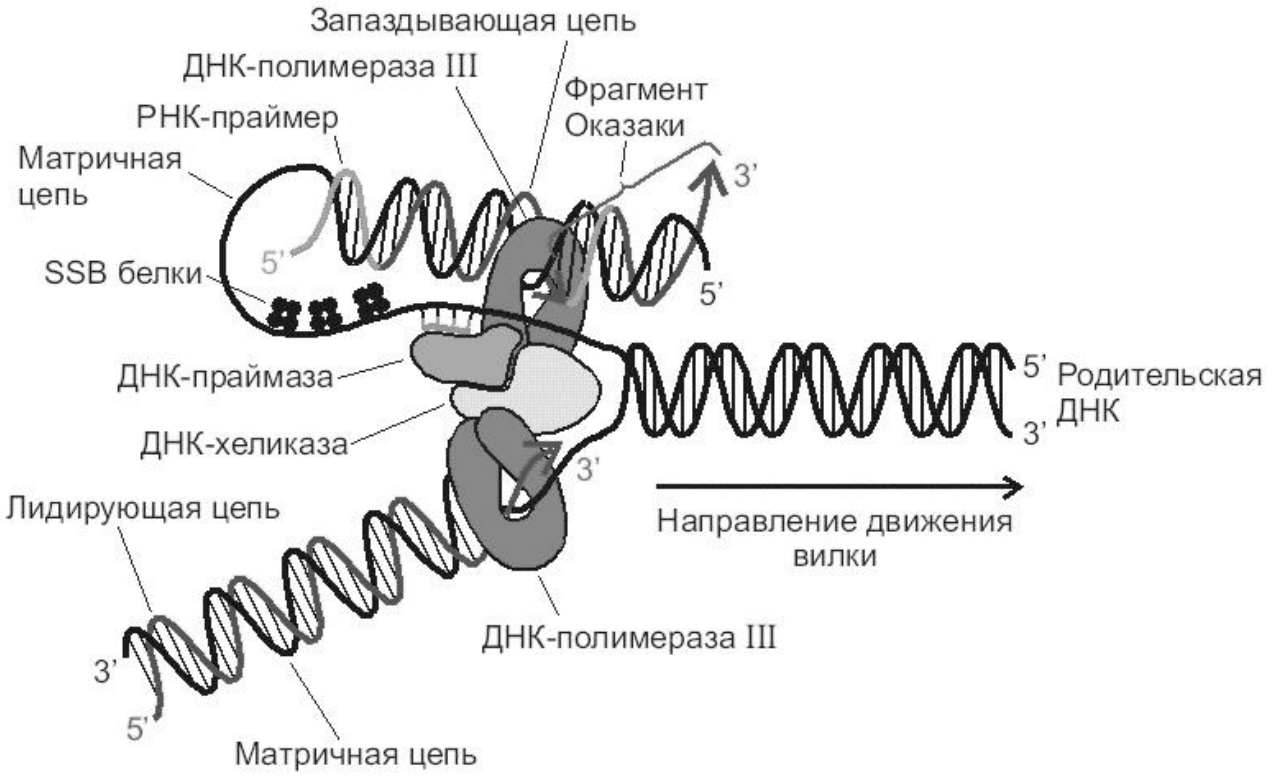


Рисунок 5: Схема организации репликативного комплекса на этапе элонгации

Сборка комплекса происходит в строго определенной части хромосомы называемой ориджином репиликации (ori-репликации), на этапе инициации. Сборка начинается с присоединения белка DnaA, распознающего последовательность ориджина репиликации, затем происходит присоединение хеликазы расплетающей двухцепочечную ДНК, затем праймазы у эукариот или синтезирующей затравки РНК -полимеразы у прокариот, после этого присоединяется димер ДНК-полимеразы. Кроме перечисленных выше ферментов в репликативный комплекс входят ДНК-полимезаза I (удаляющая затравки и синтезирующая цепи ДНК на образовавшихся брешах), SSB белок, связывающий одноцепочечную ДНК, сохраняя ее стабильном виде, ДНК лигаза, сшивающая фрагменты Оказаки, и топоизомеразы, удаляющие супервитки ДНК, вводя и удаляя одноцепочечные разрывы. Когда репликативный комплекс полностью собран начинается следующий этап — элонгация, описанный выше. Когда матрица заканчивается происходит терминация репликации, в ходе которой происходит разборка комплекса и разделение двух катенированных кольцевых ДНК у прокариот, разделение осуществляет топоизомераза II.

Транскрипция

Транскрипция является первой стадией реализации (считывания) генетической информации, на которой нуклеотидная последовательность ДНК копируется в виде нуклеотидной последовательности РНК. В основе механизма копирования при транскрипции лежит тот же структурный принцип комплементарного спаривания оснований, что и при репликации. Транскрипция осуществляется ферментами РНК-полимеразами, синтезирующими РНК на ДНК-матрице из рибонуклеозидтрифосфатов.

Синтез молекул РНК начинается в определенных местах ДНК, называемых промоторами, и завершается в терминаторах. Участок ДНК, ограниченный промотором и терминатором, представляет собой единицу транскрипции — транскриптон. В пределах каждого транскриптона копируется только одна из двух нитей ДНК, которая называется значащей или матричной. Во всех транскриптонах, считываемых в одном направлении, значащей является одна нить ДНК.

У эукариот в состав транскриптона, как правило, входит только одна открытая рамка считывания (ORF). Открытая рамка считывания это фрагмент ДНК, кодирующий белок (последовательность триплетов) или функциональную

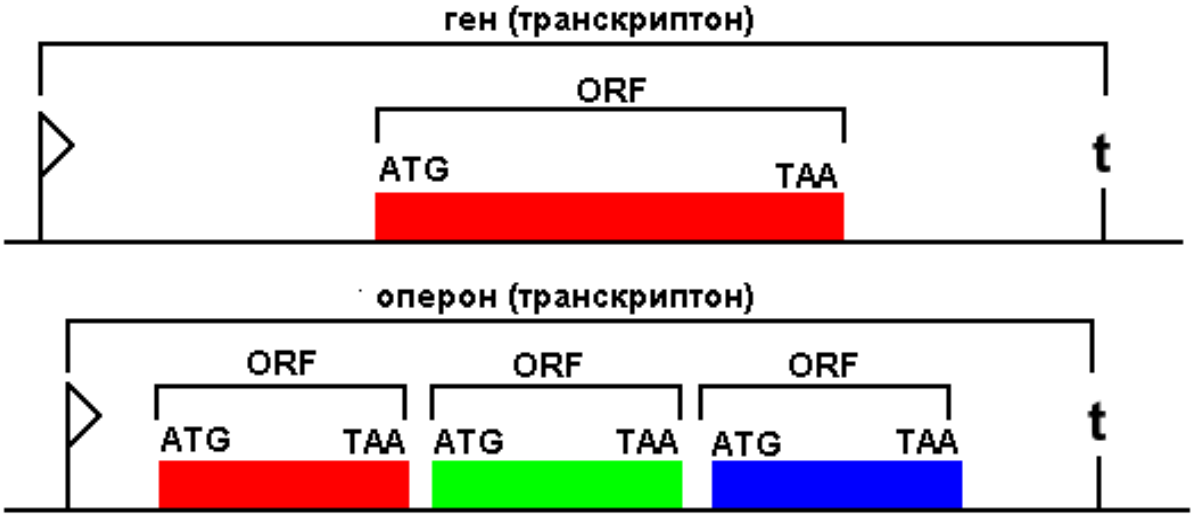


Рисунок 6: Схема строения транскриптона у прокариот и эукариот

РНК(в случае тРНК и рРНК).

Транскриптоны прокариот чаще называют оперонами, многие из них

содержат по нескольку открытых рамок считывания, обычно функционально связанных, например, кодирующих ферменты синтеза той или иной аминокислоты. Существуют опероны, содержащие гены, не кодирующие белков (гены рибосомных РНК, тРНК и др.). Описаны смешанные опероны, включающие гены тРНК и белков.

Ферменты транскрипции

У бактерий молекула РНК-полимеразы состоит из двух компонентов: минимальной РНК- полимеразы, или «кор»-фермента (от англ. core — сердцевина), содержащего все каталитические центры, участвующие в синтезе РНК, и σ-субъединицы, необходимой для правильного присоединения фермента к промотору и отделяющейся от РНК-полимеразы после начала синтеза РНК. Минимальная РНК-полимераза состоит из пяти субъединиц: двух идентичных α-субъединиц и неидентичных β- и β '-субъединиц. В β - и β '-субъединицах имеется по одному атому Zn. У E. coli α -субъединица состоит из 329 аминокислотных остатков (Мг=36,51 кДа), β — из 1342 (150,62 кДа), а β ' — из 1407 (155,16 кДа). Размеры этих субъединиц у других бактерий примерно такие же. Субъединицы β β' контактируют с ДНК в комплексе РНК-полимеразы с промотором и несут в себе каталитические центры. β- субъединица формирует центр связывания антибиотиков рифампицина и стрептолидигина, являющихся специфическими ингибиторами бактериальных РНК-полимераз. Функция α-субъединицы не известна. Присутствует также ω-субъединица являющаяся регулятором процессивности белка.

Транскрипцию генов рибосомных РНК, тРНК и большинства генов, кодирующих белки, обеспечивают молекулы РНК-полимеразы, содержащие «главную» σ -субъединицу (молекулярная масса у E. coli 70 кДа, у Bac. sub tills— 43 кДа). На несколько тысяч молекул РНК-полимеразы, имеющихся в бактериальной клетке, приходится примерно тысяча молекул главной σ -субъединицы. В меньших количествах имеются «минорные» σ -субъединицы, используемые для транскрипции ограниченного числа генов. σ –субъединица (32) – участвует в транскрипции генов теплового шока, σ –субъединицы(54) –

белков участвующих в спорообразовании. Набор минорных σ -субъединиц у разных бактерий неодинаков. По размеру они меньше главной σ -субъединицы.

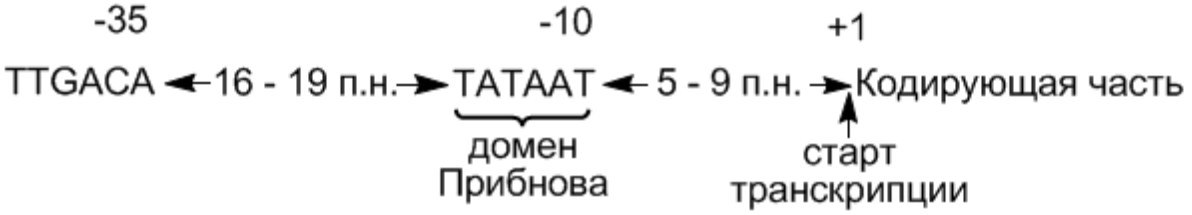
В ядрах эукариот обнаружены три специализированные формы РНК-полимеразы. РНК- полимераза I (или А по другой, номенклатуре) осуществляет в ядрышке синтез 18 S и 23 S рРНК- РНК-полимераза II (или В) — синтез информационных РНК- РНК-полимераза III (или С) — синтез тРНК и некоторых других низкомолекулярных РНК- РНК-полимеразы эукариот нечувствительны к ингибиторам бактериальных РНК-полимераз — рифампицину и стрептолидигину. Специфическим ингибитором РНК-полимеразы II является токсин бледной поганки α-аманитин. Каждая форма РНК-полимеразы состоит из двух больших субъединиц с Mr= 120-220 кДа и от 5 до 13 малых с Mr= 10-100 кД. Несколько малых субъединиц являются общими для разных форм РНК-полимераз. Большие субъединицы, по-видимому, выполняют те же функции, что β- и β'-субъединицы бактериальных РНК-полимераз. О функциях малых субъединиц пока ничего не известно. В самых больших субъединицах эукариотических РНК-полимераз обнаружено несколько участков, которые по аминокислотной последовательности у всех трех форм сходны между собой и с β '-субъединицей РНК-полимеразы E. coli. В следующих за ними по размеру субъединицах эукариотических РНК-полимераз обнаружено сходство в аминокислотной последовательности с β -субъединицей РНК-полимеразы E. coli. Эти данные свидетельствуют о том, что на заре эволюции эукариот у них имелась одна форма РНК-полимеразы, а разные формы возникли за счет умножения предковых генов (общих для про- и эукариот) и последующего расхождения их нуклеотидных последовательностей в результате множества мутаций.

Цикл транскрипции

Цикл транскрипции можно разделить на четыре основные стадии, каждая из которых в свою очередь состоит из многих элементарных этапов: 1) связывание с ДНК; 2) инициация цепи РНК; 3) рост (элонгация) цепи РНК; 4) терминация цепи РНК.

Инициация транскрипции

Цикл транскрипции начинается с присоединения РНК- полимеразы к промотору — строго определенному участку ДНК, с которого начинается синтез РНК. Механизм поиска промоторов изучен недостаточно; предполагается, что молекулы РНК-полимеразы присоединяются к случайным местам двойной спирали ДНК, некоторое время перемещаются по ней,



Наиболее типичный промотор прокариот, имеющий три компонента: консенсусы последовательностей в точках -10 и -35 и стартовая точка транскрипции.

Частота встечаемости нуклеотидов последовательности в положении -10 (указана в % под названием нуклеотида):
T_{80} A_{95} t_{45} A_{60} a_{50} T_{96};
частоты встречаемости последовательности в положении -35:
T_{82} T_{84} G_{78} A_{65} C_{54} a_{45}

Рисунок 7: Структура промотора у прокариот

отсоединяются и снова присоединяются к ДНК до тех пор, пока не окажутся на промоторах. Оказавшись на промоторе, РНК-полимераза образует с ним так называемый закрытый промоторный комплекс, в котором ДНК сохраняет двуспиральную структуру. Основной элемент промотора — место связывания РНК-полимеразы, которое она занимает перед началом синтеза РНК. В состав промоторов могут входить также участки связывания белков-регуляторов. Размер участка связывания РНК-полимеразы соответствует ее длине и составляет примерно 70 п. н. Располагается этот участок относительно стартовой точки несимметрично: по ходу транскрипции его граница отстоит от стартовой точки на 20 п. и., а против хода — примерно на 50 п. н.. При сравнении нуклеотидной последовательности большого числа промоторов E. coli, узнаваемых РНК-полимеразой, содержащей главную σ-субъединицу, оказалось, что одинаковых среди них нет. Сходство между ними обнаружилось в основном в двух участках длиной по 6 п. н., центры которых располагаются в

районах «—10» и «—35» п. н. (нумерация нуклеотидов промотора ведется от стартовой точки, которой приписывается номер +1). Некоторое сходство наблюдается также в районе стартовой точки. На основании сравнения последовательностей разных промоторов выведена «каноническая» последовательность промотора, в которой представлены наиболее часто встречающиеся в каждом положении нуклеотиды. Каноническая последовательность участка «—10» — TATAAT (эта последовательность называется также блоком Прибнова), участки «—35» — TTGACA (при рассмотрении промоторов обычно приводят последовательность только той нити ДНК, которая в транскрибируемой части совпадает с последовательностью РНК, т. е. является незначащей). Каноническая последовательность промотора несимметрична, что отражает его функциональную несимметричность. Действительно, промотор определяет не только место начала транскрипции, но и ее направление. У разных промоторов расстояния между участками «—10» и «—35» могут быть не одинаковыми, у большинства промоторов оно составляет 16—18 п. н.; у небольшого числа промоторов вариации составляют 15—20 п. н. Оптимальное расстояние 17 п. н.: мутации, изменяющие это расстояние, как в сторону увеличения, так и уменьшения, ослабляют промотор. Стартовая точка транскрипции отстоит у разных промоторов на 6—9 п. н. от последовательности Прибнова. Начальным нуклеотидом РНК чаще всего является диктуемый матрицей A или G. Предпочтение пуринов, однако, неабсолютно, и есть несколько промоторов, на которых транскрипты начинаются с C или U, несмотря на наличие на расстоянии одного - двух нуклеотидов потенциального пуринового начала. У некоторых промоторов стартовая точка не строго фиксирована: инициация происходит с двух- соседних нуклеотидов матрицы.

В закрытом комплексе РНК-полимераза еще не способна к синтезу РНК. Этот комплекс нестабилен и легко диссоциирует при повышении ионной силы. Закрытый комплекс может обратимо превращаться в открытый комплекс, в котором РНК- полимераза расплетает примерно один виток двойной спирали

ДНК в районе стартовой точки — нуклеотида, с которого начинается комплементарное копирование матрицы. В открытом комплексе связь РНК-полимеразы с промотором становится значительно более прочной, чем в закрытом. При низких температурах равновесие сильно сдвинуто в сторону закрытого комплекса, при температурах, близких к физиологическим,— в сторону открытого. Переход между этими крайними случаями происходит в узком температурном интервале, что, по-видимому, отражает кооперативный характер плавления ДНК промотора.

Основным функциональным параметром для промотора является его сила. Сила промотора — это количество молекул РНК, транскрибируемых с промотора за единицу времени. Сила промотора определяется способностью связывать РНК поилмеразу, это определяется структурой промотора (чем ближе структура к какононической тем больше сила промотора) и способностью переходить в открытый комплекс, это в основном определяется строением РНК-полимеразы и температурой.

Среди природных промоторов пока не обнаружено ни одного с канонической последовательностью, но искусственно сконструированный промотор с канонической последовательностью отличается очень высокой эффективностью (этот результат не был заранее очевиден: усредненная последовательность вполне могла бы обладать «средними» свойствами). О том, что каноническая последовательность является наиболее эффективной, свидетельствуют и результаты многочисленных исследований по изменению последовательности промоторов: мутации, приближающие последовательность промотора к канонической, как правило, увеличивают его силу, тогда как изменения, уменьшающие его сходство с канонической,— уменьшают его силу. Изменения нуклеотидной последовательности вне участков «—10» и «—35» обычно слабо сказываются на силе промотора. Знание этих закономерностей, однако, еще не позволяет надежно предсказывать силу промоторов и находить промоторы, рассматривая последовательность ДНК, хотя РНК- полимераза делает это очень быстро.

Наиболее близки к канонической структуре промоторы генов, кодирующих рРНК, что связано с постоянной потребностью в рибосомах, и вирусные промоторы, так как необходимо размножать вирус с высокой эффективностью и с использованием клеточного аппарата реализации генетической информации.

Следующая стадия инициации требует наличия субстратов РНК-полимеразы, нуклеозидтрифосфатов и заключается в образовании первых нескольких звеньев цепи РНК- Первый нуклеотид входит в состав цепи, сохраняя свою трифосфатную группу, а последующие присоединяются к 3'-ОН-группе предыдущего с освобождением пирофосфата. На стадии инициации РНК-продукт связан с матрицей и РНК-полимеразой непрочно и с высокой вероятностью может освобождаться из комплекса. В этом случае РНК-полимераза, не покидая промотора, снова инициирует РНК. Такой синтез ди-, три- и более длинных олигонуклеотидов называют абортивной инициацией в противоположность продуктивной (т. е. завершающейся образованием полноценного РНК-продукта) инициации. Когда РНК-продукт достигает критической длины (от 3 до 9 нуклеотидов на разных промоторах), абортивная инициация полностью прекращается, транскрибирующий комплекс стабилизируется и уже не распадается до тех пор, пока синтез молекулы РНК не будет доведен до конца. Примерно в этот же момент, который считается концом инициации и началом элонгации, от РНК-полимеразы отделяется σ-субъединица.

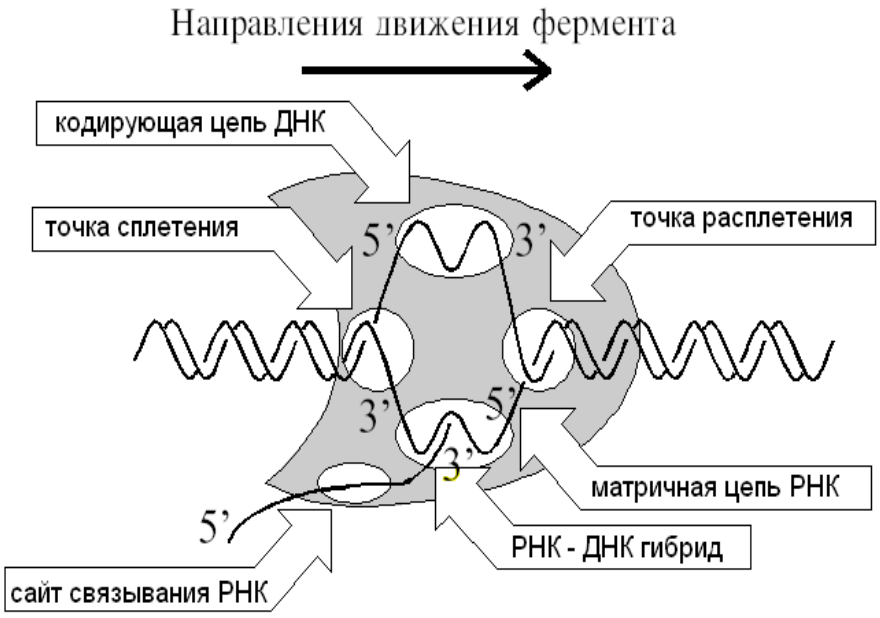


Рисунок 8: Схема элонгации транскрипции

Элонгация транскрипции

На стадии элонгации в ДНК расплетено примерно 18 н. п. Примерно 12 нуклеотидов матричной

нити ДНК образует гибридную спираль с растущим концом цепи РНК. По мере движения РНК- полимеразы по матрице впереди нее происходит расплетание, а позади — восстановление двойной спирали ДНК- Одновременно освобождается очередное звено растущей цепи РНК из комплекса с матрицей и РНК-полимеразой. Эти перемещения должны сопровождаться относительным вращением РНК-полимеразы и ДНК. Трудно себе представить, как это может происходить в клетке, особенно при транскрипции хроматина. Поэтому не исключено, что для предотвращения такого вращения двигающуюся по ДНК РНК-полимеразу сопровождают топоизомеразы. В процессе удлинения РНК РНК-полимераза движется по ДНК с непостоянной скоростью. Особенно четко это видно при низких концентрациях субстратов. В некоторых участках матрицы длительные задержки в продвижении РНК-полимеразы, так называемые паузы, наблюдаются даже при оптимальных концентрациях субстратов. Завершается синтез РНК в строго определенных участках матрицы — терминаторах, где происходит отделение от ДНК и готовой РНК, и минимальной РНК-полимеразы, которая, объединившись со свободной σ- субъединицей, может вступить в следующий цикл транскрипции.

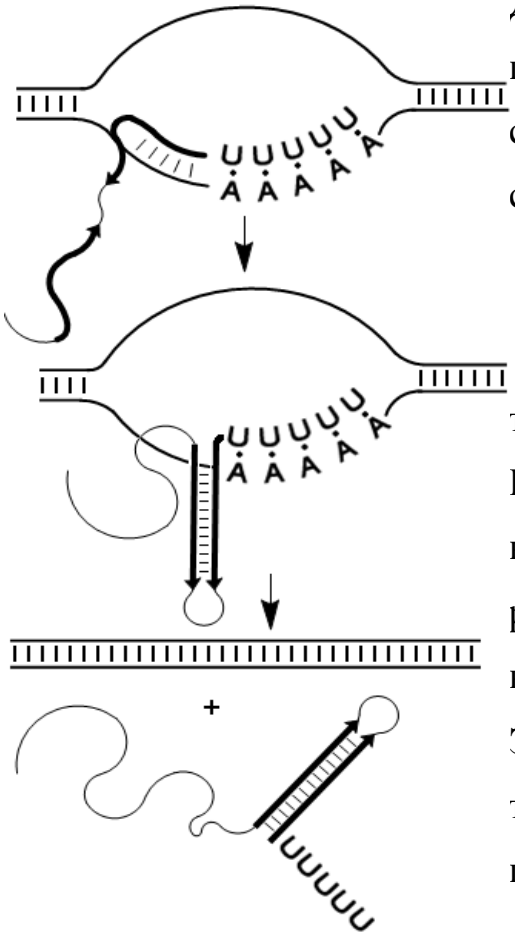


Рисунок 9: Схема терминации транскрипции без участия белковых факторов

Терминация транскрипции

Очевидная роль терминаторов транскрипции состоит в прекращении синтеза РНК в концах оперонов, что обеспечивает независимую регуляцию экспрессии различных участков ДНК. Но терминаторы встречаются и внутри оперонов. Эффективность этих «внутренних» терминаторов может регулироваться, что позволяет клетке изменять скорость синтеза

РНК на участках ДНК, расположенных за терминаторами, не меняя скорости синтеза РНК на участках, расположенных перед терминаторами.

Прежде чем переходить к обсуждению функционального смысла и механизмов такой регуляции, в которой участвуют специальные белковые факторы и рибосомы, рассмотрим процесс терминации в отсутствие факторов. В их отсутствие РНК-полимераза способна терминировать синтез РНК лишь на некоторых терминаторах, нуклеотидная последовательность в районе которых отличается двумя характерными особенностями. В них по ходу транскрипции сначала идет GC-богатый участок, обладающий центральной симметрией, а затем участок из 4—8 расположенных подряд А в значащей нити. Транскрипция заканчивается на конце олигоА последовательности или сразу за ней. Предполагается, что после прохождения РНК-полимеразой GC-богатого участка с центральной симметрией в РНК-продукте возникает шпилька, приводящая к остановке РНК- полимеразы и разрушению части РНК-ДНК гибрида транскрибирующего комплекса. Оставшаяся часть РНК-ДНК гибрида, содержащая концевую олигоU последовательность РНК» легко плавится ввиду относительной нестабильности rU-dA-nap, что приводит к освобождению РНК-продукта. Первым из комплекса освобождается РНК-продукт, а затем РНК-полимераза. В какой момент происходит схлопывание нитей ДНК пока не известно. Эффективность терминацни зависит от прочности терминаторной шпильки в РНК. Это видно из того, что мутации, приводящие к нарушению комплементарного спаривания какого-либо основания в шпильке, ослабляют терминацию, а мутации, восстанавливающие комплементарность, усиливают терминацию. Усиление прочности РНК-ДНК гибрида в районе олигоU ослабляет терминацию. Такое усиление происходит при уменьшении длины олигоА в матрице (минимальный размер этой последовательности, при котором терминация еще возможна 4 нуклеотида). Таким образом, эффективность терминации зависит, по-видимому, от баланса стабильности различных РНК:РНК и РНК:ДНК двойных спиралей. В энергетику этого баланса вносит вклад и РНК-полимераза, так как определенные мутации, затрагивающие РНК-

полимеразу, влияют на эффективность терминации. Эти же мутации влияют и на продолжительность ауз транскрипции, что подтверждает представление о том, что подготовительной стадией терминации является пауза. Терминация в отсутствие факторов, по-видимому, не полностью моделирует этот процесс в том виде, как он протекает в живой клетке. Действительно, на ряде терминаторов очищенная РНК- полимераза завершает синтез молекул РНК, отступя на несколько нуклеотидов от того места, где она завершает его в живой клетке, и с меньшей эффективностью. Недавно обнаружен белковый фактор, названный тау(τ), который улучшает эффективность и точность скорость синтеза РНК на участках ДНК, расположенных за терминаторами, не меняя скорости синтеза РНК на участках, расположенных перед терминаторами. Механизм его действия еще не изучен. Прежде чем переходить к обсуждению функционального смысла и механизмов такой регуляции, в которой участвуют специальные белковые факторы и рибосомы, рассмотрим процесс терминации в отсутствие факторов.

Многие терминаторы узнаются РНК-полимеразой только с помощью фактора терминации, названного ρ. Этот белок с молекулярной массой 46 кД обладает РНК-зависимой нуклеозидтрифосфатазной активностью, обязательной для терминирующего действия. АТФазная активность фактора ρ проявляется только в комплексе с однонитевой РНК. Наибольшей АТФазной активностью ρ -фактор обладает в присутствии полицитидиловой кислоты. Фактор ρ агрегирует с образованием гексамера, способного связываться с РНК. В комплексе с РНК гексамер защищает в ней от действия РНКазы 80—90 нуклеотидов, так что каждый мономер связывает по 12—14 нуклеотидов РНК. Фактор ρ присоединяется к РНК-продукту до того, как РНК-полимераза достигает терминатора. Присоединение происходит к определенным участкам РНК, в нуклеотидной последовательности которых пока не обнаружено каких-либо характерных особенностей. Ясно лишь, что эти участки не склонны к образованию протяженных двуспиральных структур. В местах ρ -зависимой терминации РНК-полимераза делает паузы в отсутствие ρ -фактора, поэтому

считается, что роль ρ -фактора заключается в вытеснении РНК из транскрипционного комплекса в местах пауз. Рассматриваются две модели. Согласно одной из них, фактор движется по синтезируемой РНК, а в местах пауз догоняет РНК-полимеразу и вытесняет РНК- продукт. Другая модель основана на том, что пирофосфат подавляет АТФазную активность ρ - фактора. Согласно этой модели, ρ-фактор движется за РНК-полимеразой без отставания, но при нормальной скорости элонгации ингибируется пирофосфатом, высвобождающимся при синтезе РНК. Активация ρ -фактора происходит лишь в местах пауз, где синтез цепи РНК временно останавливается, что приводит к прекращению освобождения пирофосфата. Конкретный механизм вытеснения РНК из транскрипционного» комплекса под действием ρ - фактора еще не выяснен. Это вытеснение сопряжено с гидролизом АТФ, при котором, по-видимому, происходит конформационное изменение ρ-фактора. В результате этого изменения РНК вытесняется из комплекса либо непосредственно ρ -фактором, либо за счет воздействия на РНК-полимеразу. Однако ρ -фактор вызывает терминацию не во всех местах пауз. Анализ нуклеотидной последовательности показывает, что начальная часть РНК способна образовывать большое число двунитчатых структур. По-видимому, в данном случае сильно развитая вторичная структура транскрипта мешает связыванию с ним ρ -фактора, без которого терминации в местах пауз не происходит. Связыванию ρ -фактора с РНК мешают также рибосомы, транслирующие РНК, поэтому на ρ - зависимых терминаторах, встречающихся внутри структурных генов, ρ -фактор не обеспечивает терминации, если мРНК эффективно транслируется. Наличие таких терминаторов внутри генов, по-видимому, не случайно. Когда синтез белка по каким-либо причинам подавлен, они сигнализируют РНК-полимеразе о том, что мРНК не транслируется и синтез бессмысленен.

Регуляция транскрипции у прокариот

Прокариоты часто регулируют свой метаболизм, влияя на концентрацию ферментов. То есть бактерии синтезируют ферменты когда они нужны и

прекращают синтез, если нет необходимости.

Таким образом, нуклеиновая кислота является не только матрицей для синтеза самой себя, но и, связываясь с белками, может участвовать в регуляции процессов происходящих при передаче и реализации генетической информации. Эта способность ДНК, прежде всего, проявляется при реализации закодированной в ней информации (транскрипции) и определяется способностью белков специфично связывать определенную последовательность нуклеотидов.

Существует два типа белков связывающих ДНК специфичные и неспецифичные. Неспецифичные связывают любую последовательность ДНК, к таким белкам относятся SSB белок белки нуклеосом. Аминокислотные остатки таких белков образуют водородные связи с сахарофосфатным остовом и/или с химическими группами азотистых оснований не участвующими в комплементарном спаривании и экспонированными в малый желобок. Так как в малый желобок выходит мало групп, различия между различными основаниями невелика, и сложно белку распознавать определенную последовательность нуклеотидов. Специфичные белки связывают строго определенную последовательность нуклеотидов, к таким белкам относятся ферменты репликации и транскрипции различные регуляторные белки. Эти белки связываются с химическими группами азотистых оснований не участвующими в комплементарном спаривании и экспонированными в большой желобок, в котором располагается достаточное число групп для связывания со строго определенными нуклеотидами. В случае специфических белков с ДНК связывается определенный домен белка, наиболее распространены два типа доменов: спираль-поворот-спираль и цинковый палец. В домене спираль-поворот-спираль одна из спиралей лежит в большом желобке и радикалы аминокислот на поверхности α-спирали образуют водородные и гидрофобные связи с группами азотистых оснований. Аналогичная ситуация и в случае Zn-пальцев. Чаще всего эти белки димеры и распознают последовательности с зеркальной симметрией – палиндромы.

При регуляции транскрипции прокариоты в основном осуществляют регуляцию активности промоторов, усиливая их или ослабляя. Активность многих промоторов регулируется с помощью особых белков-регуляторов, которые присоединяются к определенным участкам ДНК и либо мешают, либо помогают РНК- полимеразе инициировать синтез РНК- В первом случае говорят о негативной*. во втором — о позитивной регуляции активности промотора. Белки, осуществляющие негативную регуляцию, называются репрессорами. Места их связывания на ДНК называются операторами. Способность многих репрессоров связываться со своими" операторами зависит от низкомолекулярных лигандов — эффекторов. Эффекторы, снижающие сродство репрессора к оператору, называются индукторами. В отсутствие индуктора репрессор связывается с оператором и мешает РНК-полимеразе начинать синтез РНК с промотора (промотор репрессирован). В комплексе с индуктором репрессор теряет способность связываться с оператором, в результате чего промотор активируется (индуцируется). Другие репрессоры, наоборот, могут связываться с оператором только в комплексе с эффектором (который в этом случае называется корепрессором). В присутствии корепрессора промотор неактивен (репрес- сирован), в отсутствие корепрессора активируется (дерепрессируется). Белки, осуществляющие позитивную регуляцию, называются активаторами. Ряд белков-регуляторов могут выступать как в роли репрессора, так и в роли активатора.

Простейший механизм репрессии заключается в стерическом блокировании репрессором присоединения РНК-полимеразы к промотору. Такой механизм имеет место в тех промоторах, в которых участок связывания репрессора перекрывается с участком связывания РНК- полимеразы. Простейший механизм активации заключается в том, что белок-активатор присоединяется к промотору рядом с РНК-полимеразой и за счет непосредственного контакта с ней облегчает образование открытого промоторного комплекса. Дискуссионными являются механизмы действия тех белков-регуляторов, которые присоединяются к ДНК на значительном

расстоянии от РНК-полимеразы. Ниже рассмотрено несколько наиболее хорошо изученных, примеров, иллюстрирующих различные принципы регуляции промоторов.

Регуляция транскрипции осуществляется либо за счет активации промотора, либо за счет его подавления. Но лучше рассмотреть на примерах.

Оперон катаболитных оперонов является наиболее простым и удачным примером регуляции, за счет активации промотора.

Регуляция активности катаболитного оперона

Катаболитные опероны кодируют ферменты, участвующие в расщеплении любых субстратов кроме углеводов. Это связано с тем, что углеводы расщепляются по стандартным путям (гликолиз и петозофосфатный путь). А ферменты катаболитных оперонов должны включаться, когда бактерии исчерпали углеводы как ресурс.

И так рассмотрим процесс. Пока клетка имеет достаточное количество

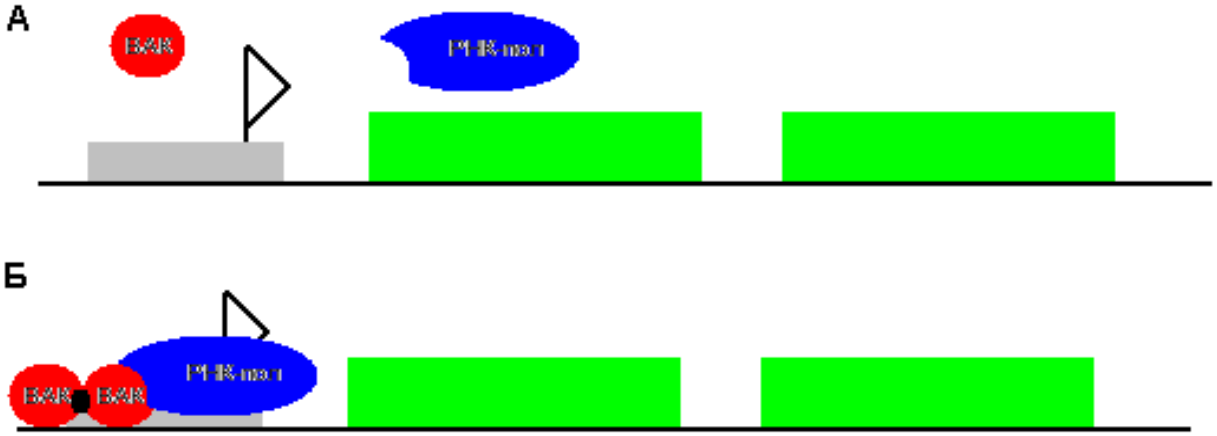


Рисунок 10: Схема регуляции катаболитных оперонов. А - моносахариды доступны, оперон не активен; Б - моносахариды не доступны, оперон активен

углеводов, то ферменты альтернативных путей окисления не нужны, следовательно, к слабому промотору катаболитных оперонов РНК-полимераза присоединяется слабо, и транскрипция не идет. Если источник углеводов истощается, клетка «включает» сигнал голода, то есть начинает синтез цАМФ, при этом в клетке находится БАК(белок активатор катаболитных оперонов). цАМФ связывается с БАК, в результате белок БАК приобретает способность к

димеризаци, и комплекс цАМФ/БАК димеризуется и приобретает способность связываться с промотором катаболитных оперонов. С образовавшимся комплексом цАМФ/БАК/промотор РНК-полимераза связывается легче, и комплекс более прочный, чем других условиях, и эффективность транскрипции увеличивается. Следовательно комплекс цАМФ/БАК усиливает промотор, то есть увеличивает его силу.

Другой вариант это репрессия промотора. Это можно рассмотреть на примере наиболее давно и и хорошо изученного лактозного оперона.

Регуляция активности лактозного оперона

В случает лактозного оперона проблема сходная, но несколько иная. Лактозный оперон кодирует белки, окисляющие лактозу, следовательно

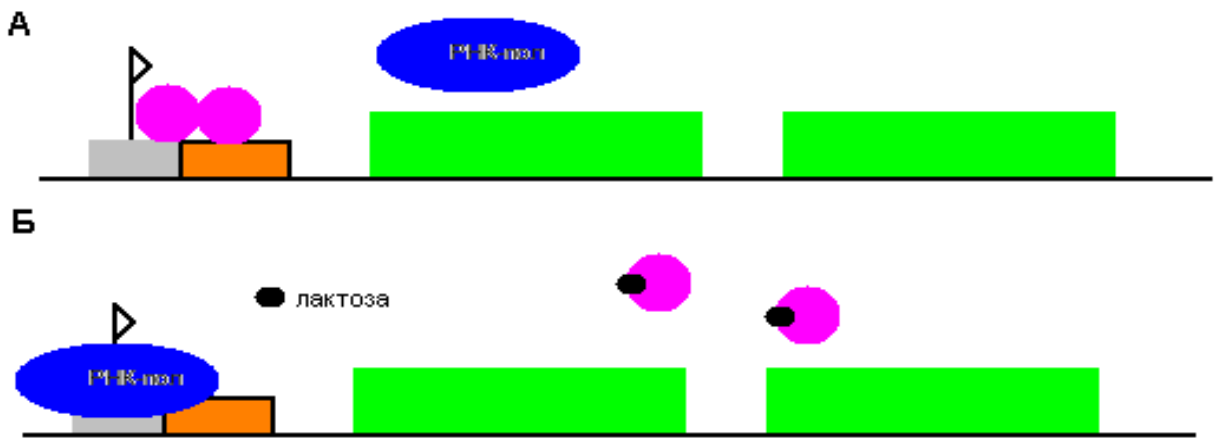


Рисунок 11: Схема регуляции лактозного оперона. А -лактоза отсутствуе, оперон не активен; Б - лактоза ессть, оперон активен

включать его нужно только при появлении лактозы в среде. В опероне присутствует фрагмент, называемый оператром. В отсутствии лактозы репрессор связывается с оператором и за счет изгиба ДНК образует комплекс с РНК-полимеразой, в результате чего ее связь с промотором ослабевает, происходит отделение фермента от промотора, и следовательно транскрипция не идет. Когда в клетке появляется лактоза, она связывается с репрессором, в результате димер репрессорного белка распадается и теряет связь с оператором. Без связи с оператором белок-репрессор не сможет связаться с РНК-полимеразой и ослабить ее связь с промотором. Комплекс РНК-

полимераза/промотор не распадается, и транскрипция идет.

Еще один способ регуляции транскрипции с помощью терминации (регулируемые терминаторы)

Аттенюаторы

Регулируемые терминаторы бактерий называют аттенюаторами (ослабителями). Впервые обнаружен и лучше других изучен аттенюатор триптофанового оперона E. coli. Этот оперон состоит из пяти генов, кодирующих ферменты биосинтеза триптофана. Регуляцию осуществляют две системы, чувствующие потребность клетки в триптофане. Первая система влияет на эффективность инициации на промоторе оперона. Репрессор триптофанового оперона в комплексе с триптофаном присоединяется к оператору, расположенному перед стартовой точкой транскрипции в районе «—10»» и стерически препятствует РНК-полимеразе присоединяться к промотору. Таким образом, при избытке триптофана оперон репрессирован. В отсутствие триптофана репрессор теряет способность связываться с оператором, в результате чего оперон индуцируется. Эту систему дополняет регуляция в аттенюаторе, расположенном на расстоянии 180 п. н. от стартовой точки транскрипции внутри «лидерной» последовательности, предшествующей инициирующему

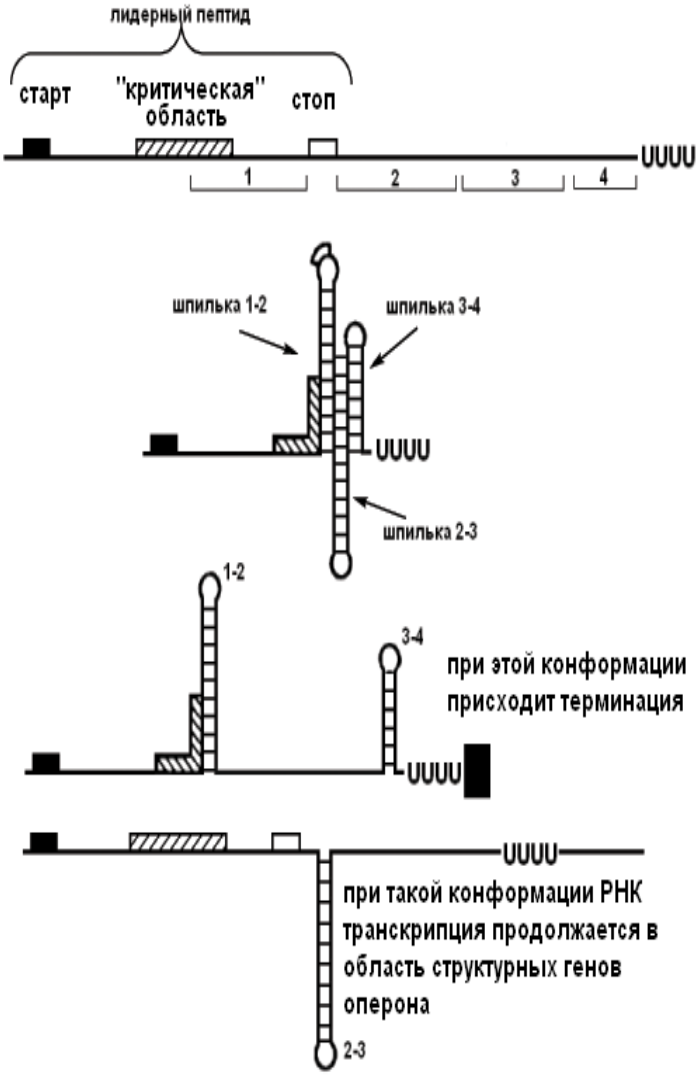


Рисунок 12: Строение и функции аттенюаторов

кодону первого структурного гена. В условиях избытка триптофана лишь одна из десяти молекул РНК-полимеразы, начавших синтез РНК на триптофановом промоторе, преодолевает этот терминатор и переходит в область структурных генов. При уменьшении количества триптофана доля молекул РНК-полимеразы, преодолевающих аттенюатор, возрастает. Перед аттенюатором располагается несколько областей с центральной симметрией. Образующаяся на них лидерная РНК содержит четыре участка, способных образовывать шпильки в различных сочетаниях. Могут образоваться шпильки 1:2 и 3:4; шпилька 2:3 при этом образоваться не может. Если образуется шпилька 2:3, то не могут образовываться шпильки 1:2 и 3:4. Шпилька 3:4 представляет собой терминаторную шпильку, характерную для обычных ρ-независимых терминаторов, так как после нее в РНК следует несколько U подряд. Поэтому при образовании этой шпильки в аттенюаторе происходит терминация. Эффективность ее составляет около 80— 90%. Если же шпильки 3:4 не образуется (за счет образования шпильки 2:3), то терминацин не происходит. Образование альтернативных шпилек в лидерной области, от которых зависит терминация в аттенюаторе, определяется тем, как транслируется лидерная РНК. Эта РНК кодирует так называемый лидерный пептид, содержащий два триптофановых остатка подряд. Если этот пептид не транслируется, то вторичная структура РНК формируется по мере ее роста и выхождения из транскрипционного комплекса: сначала формируется шпилька 1:2, что делает невозможным образование шпильки 2:3, а затем шпилька 3:4, что приводит к терминации синтеза РНК. Если в клетке имеется недостаток триптофана, то рибосома, транслирующая лидерный пептид, задерживается на его триптофановых кодонах. Эти кодоны расположены так, что, находясь на них, рибосома прикрывает последовательность 1 и мешает образованию шпильки 1:2. В результате становится возможным образование «антитерминаторной» шпильки 2:3. Терминации не происходит, и РНК-полимераза переходит в область структурных генов. Сходная система регуляции в аттенюаторе используется в оперонах, отвечающих за синтез других аминокислот у E. coli. В

лидерных РНК этих оперонов закодированы специфические пептиды, включающие по нескольку остатков той аминокислоты, биосинтез которой определяется опероном. Если в лидерном пептиде триптофанового оперона содержится два тандемно расположенных остатка триптофана, то в лидерном пептиде фенилаланинового оперона — последовательно семь остатков фенилаланина, в которые вклинивается один остаток аланина и один остаток треонина. В лидерном пептиде гистидинового оперона — подряд семь остатков гистидина, в лидерном пептиде лейцинового оперона — четыре остатка лейцина подряд. При отсутствии соответствующей аминокислоты рибосома задерживается на ее кодонах и обеспечивает образование «антитерминаторной» шпильки.

Трансляция

Следующий тип матричного синтеза – трансляция. В данном случая происходит «перевод» нуклеотидного языка в аминокислотный, но в основе этого процесса все же лежит способность нуклеиновых кислот образовывать двойную спираль комплементарных оснований. Во всех процессах трансляции участвуют молекулы РНК, они выполняют различные функции и имеют различную структуру.

Типы РНК

Транскрибируются все РНК. Как уже говорилось ранее, у прокариот выделяют 3 класса РНК: транспортные, рибосомные и матричные.

Транспортные РНК

Все молекулы транспортных РНК обладают следующими общими свойствами.

1. Все они представляют собой одну цепь длиной от 73 до 93 рибонуклеотидов (масса около 25 кДа).

2. Они содержат много необычных оснований, как правило, от 7 до 15 на молекулу. Многие из этих необычных оснований представляют собой метилированные или диметилированные производные A, U, C и G, которые

образуются путем ферментативной модификации тРНК-предшественника. Роль этих необычных оснований неизвестна. Вполне возможно, что метилирование препятствует спариванию некоторых оснований и делает их доступными для других взаимодействий. Кроме того, метилирование изменяет гидрофобность некоторых участков тРНК, что может иметь большое значение для их взаимодействия с синтетазами и рибосомными белками.

3. 5'-конец тРНК фосфорилирован. На 5'-конце обычно расположен остаток pG.

4. На 3'-конце всех тРНК находится последовательность ССА. Активированная аминогруппа аминокислоты прикрепляется к 3'-гидроксильной группе концевого аденозина.

5. Примерно половина нуклеотидов тРНК спарена и образует участки двойной спирали. Не спарены пять групп оснований: 3'-концевая область ССА (акцепторная ветвь); ТΨС-петля, которая получила свое название по последовательности риботимидин - псевдоурацил - цитозин; добавочная петля, число остатков которой различно в разных тРНК; дигидроуридиловая петля, которая содержит несколько остатков дигидроуридина; антикодоновая петля.

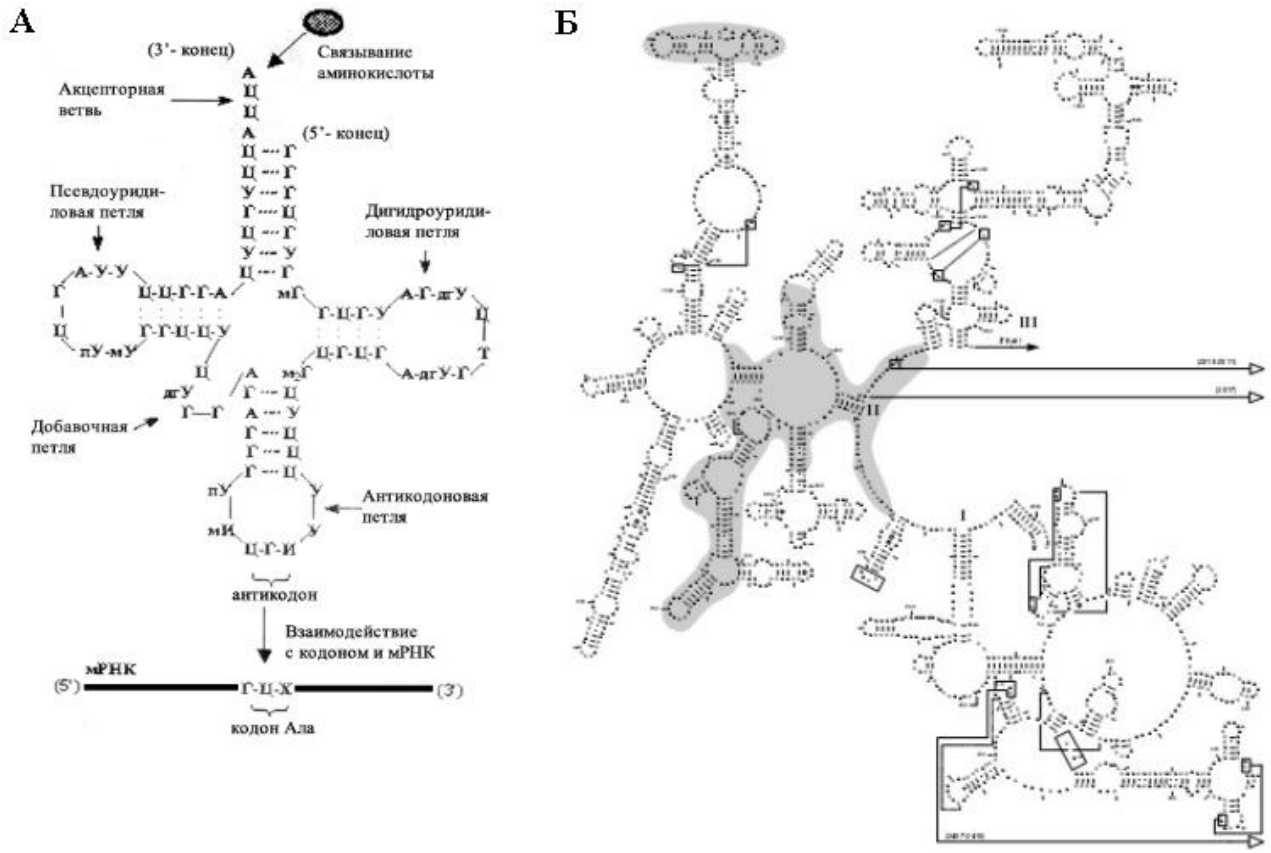


Рисунок 13: А - схема строения тРНК; Б — схема строения рРНК

6. Антикодоновая петля состоит из семи оснований, расположенных в следующей последовательности.

Вторичная структура тРНК

Анализ даже первичной структуры первой тРНК (то есть tRNAAla дрожжей) показал множество интересных особенностей относительно возможностей цепи, сворачиваться во вторичную структуру. Прежде всего, 5 '-концевая часть положения 1 - 7 имеет комплементарность с 3 '-концевыми участками 66 - 72, если блоки устроены антипараллельным способом.

Кроме того, три внутренних стебля из тРНК цепи показывают комплементарность, из-за этого они способны к формированию шпилькоподобных структур. Соединение этих дополнительных последовательностей образует структуру, обычно называемую трилистниковидной структурой (клеверный лист). Замечательно то, что все без исключения последовательности нуклеотидов известных тРНК показывает подобную комплементарность и соответственно могут быть свернуты в подобный клеверный лист.

Части трилистниковидной структуры определялись следующим образом: акцепторный стебель, с универсальными последовательностями 3’-конца ССА, к которому присоединяется остаток аминокислоты; дигидроуридиловая шпилька (D шпилька), варьирующая по длине но, как правило, содержит один и пять дигидроуридиловых остатков, антикодоновая шпилька (АК шпилька), с петлей антикодона, имеет постоянную длину равную семи нуклеотидам; и тимидил-псевдоуридиновая шпилька (TΨ шпилька), содержащая петлю с универсальной GTΨCGA или GTΨCAA последовательностью. Кроме того, тРНК содержит вариабельную петлю (V петля) между антикодоном и TΨ рукой; в тРНК-Ala эта петля - только пять нуклеотидов, тогда как в других тРНК она может достигать 15 - 20 нуклеотидных остатков. В дополнение к каноническим Уотсон-Криковским взаимодействиям, присутствуют пары Г:У.

Третичная Структура тРНК

Трехмерная структура тРНК была сначала определена для дрожжевой тРНКPhe. Эта структура была определена независимо группами Александра Рича и Эрона Клага в 1974 с рентгеноструктурного анализа кристаллов тРНКPhe. Схематично, это сворачивание может быть представлено следующим образом. Акцепторный стебель и Т-шпилька устроены по общей оси, формируя непрерывную двойную спираль 12 пар нуклеотидов в длине; антикодоновая шпилька и D-шпилька также устроены по общей оси и приводят к другой двойной спирали, длиной 9 пар нуклеотидов. Эти две спирали ориентируются друг к другу приблизительно под прямым углом так, чтобы D-шпилька была близка с Т-петлей, и они могли взаимодействовать. В результате, структура напоминает букву L с вершинами его двух членов, соответствующих антикодону и 3 '-концу акцепторного стебля.

Рибосомная РНК будет рассмотрена позднее в составе рибосомы.

Матричная РНК

Не имеет строго определенной длины. Имеет 5'UTR и 3'UTR и кодирующую часть. У эукариот на 5’-конце располагается кэп, на 3’-конце полиА-хвост. Кодирующая часть или открытая рамка считывания содержит

информацию об аминокислотной последовательности белка. Иногда открытая рамка считывания называется термином цистрон, соответственно в зависимости от количества цистронов РНК разделяют на поли или моноцистронные. Одна аминокислота кодируется триплетом нуклеотидов. Генетический код связывает последовательность оснований в ДНК (или в соответствующих транскриптах) и последовательность аминокислот в белках. К 1961 г. благодаря экспериментам Фрэнсиса Крика, Сиднея Бреннера и других исследователей были установлены следующие свойства генетического кода.

Генетический код триплетен. Поскольку в ДНК имеется четыре вида оснований, то при кодировании одной аминокислоты одним основанием могло бы кодироваться всего лишь четыре аминокислоты. При кодировании одной аминокислоты двумя основаниями кодировалось бы 16 аминокислот (4*4=16), а при кодировании тремя основаниями - 64 аминокислоты (4*4*4 = 64). Белки состоят из двадцати аминокислот основного набора. Из этого несложного подсчета было очевидно, что для кодирования одной аминокислоты, видимо, необходимы три или более оснований. Генетические эксперименты показали, что на самом деле одну аминокислоту кодирует группа из трех оснований. Эта группа оснований называется кодоном.

Генетический код не перекрывается. В случае непрерывающегося триплетного кода каждая группа из трех оснований кодирует только одну аминокислоту, тогда как в случае полностью перекрывающегося триплетного кода АБВ кодирует первую аминокислоту, БВГ-вторую, ВГД- третью и т.д. Эту дилемму удалось решить путем определения последовательности аминокислот в мутантах. Предположим, что основание В мутировало в В'. Если код не перекрывается, изменится только одна аминокислота. При полностью перекрывающемся коде мутация В в В' приведет к изменению аминокислот 1, 2 и 3. Изучение последовательности аминокислот белка оболочки мутантов вируса табачной мозаики показало, что у этих мутантов измененной обычно оказывалась только одна аминокислота. Отсюда был сделан вывод, что генетический код не перекрывается:

Генетический код считывается без знаков препинания. Apriori одна из возможностей состоит в том, что одно из четырех оснований (оно обозначено Q) служит «запятой» между группами по три основания:

. . . QАБВQГДЕQЖЗИQКЛМQ. . .

Оказалось, что это не так. Последовательность оснований читается последовательно, начиная со строго определенной точки:

Генетический код вырожден. Как уже было сказано выше, существует 64 возможных триплета оснований и 20 аминокислот. Соответствует ли каждой из 20 аминокислот только один триплет, или некоторые аминокислоты кодируются более чем одним триплетом? Генетические исследования показали, что большинство из 64 триплетов кодируют аминокислоты. В последующих биохимических исследованиях было установлено, что 61 триплет из 64 кодирует определенные аминокислоты. Таким образом, для большинства аминокислот имеется более одного кодового слова. Другими словами, генетический код вырожден.

Генетический код универсален. То есть для всех исследованных организмов он совпадает. Однако к концу 1970-ых и в течение 1980-ых это было обнаружено, что универсальность генетического кода не абсолютна, и возможны некоторые исключения. Два рода eubacteria, Микоплазмы и Spiroplasma, как известно, имеют два кодона для триптофана, универсальный UGG и "соседней" UGA, который является стоп-кодоном в других организмах. В одном роде Ciliates (Protozoa), Euplotes, UGA кодирует для цистеина. Два других универсальных стоп- кодона, UAA и UAG, кодируют глутамин в других родах Ciliates (Tetrahymena, Paramecium, Stylonicia, Oxytricha) и, по крайней мере, в одном роде одноклеточных зеленых морских водорослей (Acetabularia). Также, в некоторых дрожжах (Кандида) универсальный лейциновый кодон CUG кодирует серин. Органеллы эукариотических клеток, включая митохондрии, обладают их собственной системой биосинтеза белка. Белок синтезирующие системы митохондрий животных и грибов (но не растений) имеют множество существенных отклонений от универсального кодекса. Триптофан в

митохондриях закодируется и УГГ и УГА кодонами, следовательно УГА не является стоп-кодоном. В митохондриях всех позвоночных животных, большинства (но не всех) беспозвоночных и некоторых грибов универсальный изолейциновый кодон АУА кодирует метионин, следовательно, метионин определяется двумя триплетами: универсальным АУГ и дополнительным АУА. В митохондриях дрожжей (Saccharomyces, Torulopsis) целое семейство кодонов ЦУУ, ЦУЦ, ЦУА, и ЦУГ кодируют треонин, но не лейцин, хотя в других грибах, типа Neurospora и Aspergillus, эти кодоны соответствуют к лейцину как в универсальном коде.

Процесс трансляции обеспечивает органелла — рибосома. Ривосома является по сути наномашиной, чья структура очень важна для процесса биосинтеза белка.

Рибосома и ее структура

К 1940 Альберт Клод преуспел в изоляции из цитоплазмы клеток животных содержащие РНК гранулы, которые были меньше чем митохондрии. Размер этих гранул варьировал от 50 до 200 μм по диаметру, и позже Клод начал называть их микросомами. Химические исследования показали, что микросомы Клода были “комплексы фосфолипидов-РНП”. Электронная микроскопия и анализ отложения осадка после ультрацентрифугирования показали, что эти частицы были компактны; имели более или менее сферическую форму; были гомогенны по размеру, с диаметром 100 - 200 Å; и коэффициентам седиментации с 30-S к 100S. Первое однозначное свидетельство это такие частицы от бактерий - РНП, было вероятно получено Schachman, Pardee, и Stanier в 1952. Улучшение методов электронной микроскопии ультратонких срезов клеток животных привело к обнаружению однородных плотных гранул, с диаметром приблизительно 150 Å, непосредственно в клетке. Электронные микроскопические исследования (1955) демонстрировали, что маленькие плотные гранулы изобилуют в цитоплазме клеток животных. Эти гранулы были обнаружены на мембране ЭПР или свободно рассеянными в цитоплазме. Микросомы Клода были идентифицированы как фрагменты ЭПР с этими

гранулами. Стало ясно, что гранулы были РНП частицами, и что они составляли, большую часть цитоплазматической РНК и вовлечены в синтез белка. РНП частицы были изолированы в нескольких лабораториях между 1956 и 1958; из дрожжей Chao и Schachman (1956); из растений, Ts'o, Bonner, и Vinograd (1956); и от животных, Petermann и Гамильтон (1957); и частицы 70-S были изолированы из бактерий (E. coli), Tissieres и Уотсон (1958). В 1958 состоялся первый симпозиум, посвященный этим частицам и их участию в биосинтезе белка (Первый Симпозиум Биофизического Общества в Институте Штата Массачусетс Технология, Кембридж, 5 февраля, 6, и 8, 1958); в течение этого симпозиума это было предложено эти РНП частицы, назвать рибосомами.

Структура рибосом

Когда исследовано электронной микроскопией изолированные бактериальные рибосомы в первом приближении напоминают компактные округленные частицы с линейными размерами приблизительно 200 - 250 Å, и несколько больший, от 200 до 300 Å, в случае эукариотических рибосом.

Рибосомы от различных организмов и клеток, или прокариотических или эукариотических, имеют поразительно сходную структуру. Характерная особенность одного из видимых рибосомных проекций - углубление, делящее рибосому в две неравных части. Это подразделение отражает факт, что рибосома состоит из двух отдельных субъчастиц, или рибосомных субъединиц. При некоторых условиях, например, если концентрация ионов магния в среде достаточно низка, рибосома отделяет в две субъединицы с массовым отношением приблизительно 2:1. Прокариотическая рибосома 70-S подразделяется на 50-S и 30-S субъединицы, эукариотическая рибосома 80-S – на 60-S и 40-S субъединицы. Разделение 80S может быть также вызвано ионами Na^+, Li^+, и мочевиной, так же как высокими концентрациями (более чем 0.5 M) таких "физиологических" одновалентных катионов как K^+ и NH^{4+}. Разобщение *Escherichia coli* рибосом 70-S происходит в результате уменьшения концентрации Mg^{2+}.

Типы Рибосомных RNAs и их Первичная Структура

Малая рибосомная субъединица (30-S или 40-S) содержит одну молекулу РНК – 16S рРНК в случае рибосом E. coli и других бактерий, или подобной 16S рРНК в других случаях. Самые короткие подобные 16S рРНК, всего лишь 610 нуклеотидов длиной, были найдены в митохондриальных рибосомах Leishmania tarentolae. Относительно короткие подобные 16S рРНК (12S рРНК, 960-970 нуклеотидов) были также обнаружены в митохондриальных рибосомах позвоночных; интересно, цитоплазматические рибосомы те же самые организмы содержат самую длинную 16S рРНК подобную РНК (18S рРНК, приблизительно 1880 нуклеотидов длиной). 16S рРНК E. coli содержат 1542 нуклеотидов. Огромное большинство 16S рРНК и подобного 16S рРНК – непрерывный полинуклеотид. Однако, несколько примеров фрагментированных подобных 16S рРНК были найдены в митохондриях некоторых организмов. Например - митохондриальная 16S рРНК подобная РНК Chlamydomonas reinhardtii состоит из четырех отдельных фрагментов.

Большая рибосомная субъединица (50-S или 60-S) содержит две молекулы РНК: 23S рРНК в случае бактерий или подобную 23S рРНК в других случаях, и короткую 5S рРНК. Бактериальные 23S рРНК – нефрагментированные полинуклеотиды так же, как и 16S рРНК. В то же самое время 23S рРНК подобные молекулы в больших рибосомных субъединицах цитоплазматических рибосом эукариот фрагментированы. Они состоят из двух тесно связанных цепей РНК: 28S рРНК длиной 4700-4800 нуклеотидов, и 5,8S рРНК фрагмент, который равняется приблизительно 160 нуклеотидами. 5.8S рРНК является структурным эквивалентом 5 '-концевых 160 нуклеотидов прокариотической 23S рРНК. Другими словами, 5' конец 23S рРНК был отрезан в течение эволюционного развития, и в результате произошло формирование эукариотической 5.8S рРНК. Другой пример неоднородности среди большой субъединицы 23S рРНК - 23S рРНК подобные молекулы в рибосомах хлоропластов растений,которые содержат 4,5S РНК фрагмент (приблизительно 110 нуклеотидов длиной), который является структурной копией 3'-конца 23S рРНК E. coli; фрагмент также сильно связан с высокомолекулярной РНК.

Митохондриальные 23S рРНК-подобные РНК Chlamydomonas reinhardtii состоят из восьми отдельных фрагментов. Самый поразительный пример фрагментированных РНК – рибосомы Euglena gracilis, чьи цитоплазматические 23S рРНК подобные РНК состоят из 14 фрагментов. Так же, как в случае рРНК от малых рибосомных субъединиц, рРНК большой субъединицы значительно варьируют по длине. Например, 23S рРНК 50-S субъединицы E. coli имеют длину 2904 нуклеотидов, тогда как человеческие цитоплазматические 28S рРНК – 5025 нуклеотидов. Это интересно это обе цитоплазматические и митохондриальные 23S рРНК подобный РНК дрожжей имеют сходный размер (3392 и 3273 нуклеотида, соответственно, в случае Saccharomyces cerevisiae). Большие рибосомные субъединицы митохондриальных рибосом высших эукариот содержат относительно короткие 23S подобные рРНК(1560-1590 нуклеотидов). Помимо "нормальных" Г, А, У и Ц остатков рРНК содержит измененные нуклеотиды. Они главным образом представлены с псевдоуридином и метилированныи (и в основании и в 2 '- OH рибозы) остатками нуклеозидов. Хотя некоторые сайты модификации в рРНК – чрезвычайно консервативны в эволюции (типа мА1518/мА1519 и мГ527 в 16S подобной рРНК) число измененных остатков в рРНК значительно отличается у различных организмов и увеличивается от эубактерий до многоклеточных эукариот. Например, E. coli рРНК имеет 9 D остатков в рибосому 70-S (1 в 16S рРНК и 8 в 23S рРНК), тогда как рРНК позвоночных животных содержит приблизительно 95 D остатков.

Рибосомные белки

Каждая из двух рибосомных субъединиц содержит много различных белков, большинство которых представлено только одной копией в рибосому. Это - фундаментальное различие между структурно асимметричным рибосомным РНП и симметричными вирусными НП, которые сформированы заказанной упаковкой многих идентичные субъединицы белка. Средирибосомных белков у большинства организмов преобладают умеренно основные полипептиды, хотя присутствует также несколько нейтральных и

кислых белков. Молекулярные массы рибосомных белков находятся обычно в диапазоне 10 000 - 30 000 Da. Только немногие белки имеют больший размер, приблизительно до 50 000 или 60 000 Da (два белка большой субъединицы рибосом млекопитающих и одного белка малой субъединицы рибосомы E. coli, соответственно). С другой стороны большая субъединица и прокариотических и эукариотических рибосом содержит несколько (3 - 6) низкомолекулярных белков, или полипептидов, только приблизительно 50 - 60 остатков аминокислот длиной, или даже меньше. Малая (30-S) субъединица прокариотических рибосом содержит приблизительно 20 белков, большая субъединица (50S) – около 30. Эукариотические рибосомы содержат более широкий спектр белков: малая (40S) субъединица содержит приблизительно 30 белков, и большая (60S) приблизительно 50. Почти все эти белки присутствуют в единственной копии на рибосому.

Функциональные сайты рибосом

Р - участок

В случаях, где тРНК или его производная приняты свободной рибосомой, один из двух тРНКсвязывающих участков заполнен изначально. Это, тот же самый участок, который занят пептидил-тРНК до транспептидации (см. ниже) в рибосомах, то есть, Р участок. Задержание тРНК в Р участке рибосомы, однако, имеет важную особенность. Необходимо, чтобы пептидил- тРНК не сообщалась со средой в течение трансляции. Соответственно, пептидил-тРНК, связанная в Р участке рибосомы не должна быть в равновесии с экзогенной тРНК, а скорее закрыта. Тогда как деацилированная тРНК или аминоацилированная тРНК занимает Р участок, он становится открытым и тРНК может быть выпущена. Вероятно, что очевидное неравновесное задержание пептидил-тРНК в Р участке рибосомы происходит из-за вклада петидильного, который заякоривается рибосомной частицей в течение трансляции. Эксперименты с отделенными рибосомными субъединицами показали, что и малая и большая субъединицы обладают некоторым сродством к тРНК. Способность для определенного кодоном закрепления тРНК, однако, выявлена только для малой (30S или 40S)

рибосомной субъединицы, это доказывает что, только эта субъединица , но не большая, может связывать и удерживать матрицу. В то же самое время, после разобщения рибосом пептидил-тРНК часто остается с большой (50S или 60S) субъединицей. В настоящее время есть серьезное основание, чтобы полагать, что обе рибосомных субъединицы вовлечены в формирование тРНК соединения в Р участке.

А -участок

Когда Р участок заполнен пептидил-тРНК, рибосома становится способной к закреплению молекулы аминоацил-тРНК. Это закрепление имеет место в другом тРНК связывающем участке – А участке. Закрепление в А участке очень стимулируется мРНК; то есть закрепление аминоацил тРНК в А-участке определяется кодон/антикодоновыми взаимодествиями тРНК и мРНК. А - участок, подобно Р-участку, сформирован обеими рибосомными субъединицами. В любом случае, антикодон тРНК должен быть помещен в непосредственной близости от кодона мРНК , то есть на малой (30S или 40S) рибосомной субъединице, тогда как акцепторный конец тРНК – с участком ПТЦ, то есть с большой (50S или 60S) субъединицей. Процесс трансляции как собственно и репликацию и транскрипцию можно подразделить на три этапа: инициация, элонгация и терминация.ы происходит активация

В ходе синтеза белка с рибосомой связываются не аминокислоты а аминоацил-тРНК, с одной сторон

Активация аминокислот

Образование пептидной связи между аминогруппой одной аминокислоты и COOH- группой другой аминокислоты термодинамически невыгодно. Этот термодинамический барьер преодолевается путем активации COOH-группы аминокислот-предшественников. Активированными промежуточными продуктами синтеза белка служат эфиры аминокислот, в которых карбоксильная группа аминокислоты связана с 2'- или 3'-гидроксильной группой рибозного остатка на 3'-конце тРНК. Аминоацильная группа может быстро перемещаться из 2'-положения в 3'-положение и обратно. Этот активированный промежуточный продукт называется аминоацил-тРНК. Присоединение аминокислоты к тРНК имеет значение не только потому, что при этом активируется ее карбоксильная группа, и она может образовать пептидную связь, но и потому, что аминокислоты сами по себе не способны узнавать кодоны в мРНК. Аминокислоты переносятся к рибосомам специфическими тРНК, которые и узнают кодоны в мРНК. Таким образом, эти тРНК выполняют роль адаптерных молекул. В 1957 г. Пол Замечник и Малон Хогланд установили, что активация аминокислот и их последующее присоединение к тРНК катализируются специфическими аминоацил-тРНК—синтетазами, которые также называют активирующими ферментами. В реакциях, катализируемых некоторыми

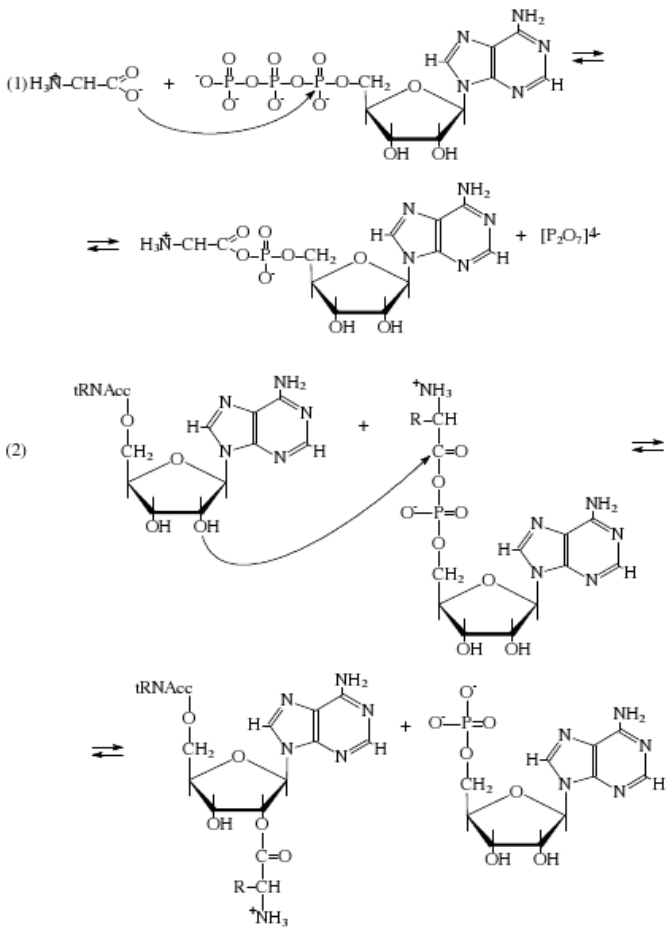


Рисунок 14: Схема реакций активации аминокислот

синтетазами, первая стадия состоит в образовании аминоациладенилата из аминокислоты и АТР. Это активированное соединение представляет собой смешанный ангидрид, в котором карбоксильная группа аминокислоты присоединена к фосфатной группе АМР. Другие синтетазы катализируют реакцию АТР, аминокислоты и тРНК без промежуточного образования доступного для обнаружения аминоациладенилата. Следующий этап - перенос аминоацильной группы аминоацил-АМР на молекулу тРНК с образованием аминоацил-тРНК-активированного промежуточного продукта в синтезе белка. Переносится ли аминоацильная группа на 2'- или 3'-гидроксильную группу рибозного остатка на 3'-конце тРНК, зависит от того, о какой аминокислоте и какой аминоацил-тРНК—синтетазе идет речь. Активированная аминокислота может очень быстро перемещаться из 2'- в 3'-положение и обратно. Суммарная реакция этапов активации и переноса описывается следующим уравнением: $\Delta G0$ для этой реакции близко к нулю, так как свободная энергия гидролиза эфирной связи аминоацил-тРНК соответствует свободной энергии гидролиза концевой фосфорильной группы АТР. Что же в таком случае запускает синтез аминоацил-тРНК? Как и можно было ожидать, реакция запускается гидролизом пирофосфата. Суммарная реакция этих превращений высокоэкзергонична. Таким образом, на синтез аминоацил-тРНК затрачиваются две богатые энергией фосфатные связи. Одна из них расходуется на образование эфирной связи аминоацил-тРНК, другая сдвигает равновесие реакции в сторону образования продукта. Стадии активации и переноса определенной аминокислоты катализируются одной и той же аминоацил-тРНК—синтетазой. В действительности аминоацил-АМР не диссоциирует из комплекса с синтетазой. Он прочно связывается с активным центром фермента нековалентными взаимодействиями. В норме аминоацил-АМР, образующийся в качестве промежуточного продукта синтеза аминоацил-тРНК, существует в течение непродолжительного времени, но он вполне стабилен и может быть легко выделен, если в реакционной смеси нет тРНК. Для каждой аминокислоты имеется, по крайней мере, одна аминоацил-тРНК—синтетаза. Эти ферменты

различаются по размеру, субъединичной структуре и аминокислотному составу. Правильная трансляция генетических матриц обеспечивается высокой специфичностью аминоацил-тРНК—синтетаз. Эти ферменты весьма избирательны в отношении активируемых аминокислот и соответствующей тРНК-акцептора. Молекулы тРНК, акцептирующие различные аминокислоты, имеют различные последовательности оснований, благодаря чему синтетазы легко узнают их. Гораздо более сложная задача для этих ферментов - различать сходные аминокислоты. Например, единственное различие между изолейцином и валином состоит в том, что изолейцин содержит лишнюю метиленовую группу. Дополнительная энергия связывания, которую вносит эта лишняя группа —CH—, благоприятствует тому, что активация изолейцина происходит примерно в 200 раз чаще, чем активация валина. Это указывает, что должна существовать еще какая-то стадия коррекции ошибок для увеличения надежности. Действительно, синтетаза исправляет собственные ошибки. Валин, активированный по ошибке, не переносится на тРНК, специфичную к изолейцину. Вместо этого тРНК способствует гидролизу валин-AMP и таким образом предупреждает его неправильное включение в белки. Кроме того, эта гидролитическая реакция освобождает синтетазу для активации и переноса изолейцина правильной аминокислоты. Каким образом синтетаза избегает гидролиза изолейцин-AMP - правильного промежуточного продукта? Скорее всего, гидролитический участок достаточно велик, чтобы там поместился валин-AMP, но слишком мал для связывания изолейцин-AMP. Многие другие аминоацил-тРНК—синтетазы также содержат, помимо участков синтеза, гидролитические участки. Возможно, эти участки действуют как двойные фильтры, обеспечивающие высокую надежность. Участок синтеза отбрасывает аминокислоты, превышающие по размеру нужную аминокислоту, а гидролитический участок разрушает те активированные промежуточные продукты, которые меньше по размеру, чем требуется. Очевидно, высокая надежность синтеза белка в первую очередь зависит от механизма коррекции с помощью гидролитической активности, которой обладают многие аминоацил-

тРНК—синтетазы.

Процесс трансляции состоит из трех этапов: инициация, элонгация и терминация.

Инициация трансляции

В качестве примера лучше изучить инициацию трансляции у прокариот. мРНК соединяется с малой субъединицей. Малая субъединица рибосомы распознает в 5'-UTR в мРНК последовательность Шайн-Дельгарно, которая образует комплиментарное взаимодействие с последовательностью антиШайн-Дельгарно в 16S рРНК, в результате малая субъединица рибосомы качесвенно связывается с мРНК. К полученному комплексу присоединяется комплекс формилметионит-тРНК/фактор инициации второй/ГТФ. К образовавшемуся комплексу присоединяется большая (50S) субъединица рибосомы, затем происходит гидролиз ГТФ и пронос мРНК. В результате формилметионит-тРНК оказывается в Р-сайте рибосомы, а А-сайт становится свободным и содержащим следующий кодон, то есть система готова к процессу элонгации.

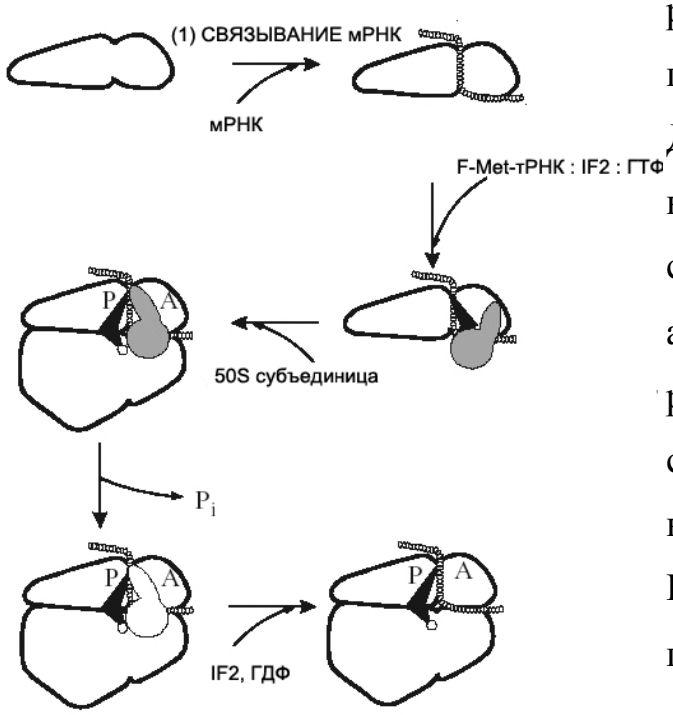


Рисунок 15: Схема инициации транскрипции у прокариот

У эукариот система инициации сходная, но есть различия. В-первых, количество факторов инициации больше. Во-вторых, обязательны кэр и 5'-UTR, участвующие не только в инициации трансляции, но и в ее регуляции. В-третьих, стартовой аминокислотой у эукариот является менионин-тРНК. Итак все готово к процессу элонгации трансляции, который является циклическим.

Цикл элонгации трансляции

Цикл элонгации белкового синтеза включает три этапа: 1) связывание аминоацил-тРНК (узнавание кодона); 2) образование пептидной связи; 3) транслокация.

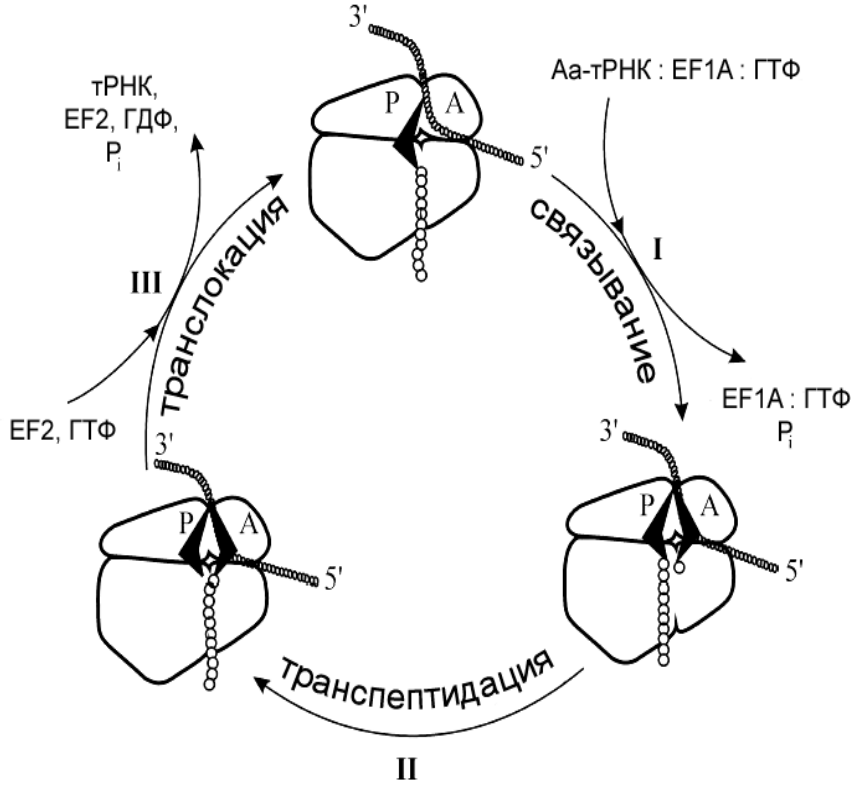


Рисунок 16: Схема цикла элонгации трансляции

Цикл начинается с введения аминоацил-тРНК в пустой А-участок рибосомы. Выбор определенной разновидности тРНК зависит от того, какой кодон мРНК находится в А-участке. Комплементарная аминоацил-тРНК доставляется в А-участок белком, который называется фактором элонгации EF-Tu. Когда аминоацил-тРНК занимает правильное положение на рибосоме, происходит гидролиз ГТФ, связанного с EF-Tu. ГДФ остается прочно связанным с EF-Tu до тех пор, пока он не вытесняется другим фактором элонгации, а именно EF-Ts. Образовавшийся комплекс Tu с Ts распадается при связывании ГТФ с Tu; новый комплекс Tu-ГТФ готов для следующего раунда элонгации. Эта ассоциация и диссоциация белков ускоряется и приобретает характер повторяющегося цикла за счет энергии гидролиза ГТФ. Важно отметить, что EF-Tu не взаимодействует с фмет-тРНК. Поэтому инициаторная тРНК не попадает в А-участок. В то же время Met-тРНК связывается с EF-Tu, подобно всем другим аминоацил-тРНК. Этим и объясняется тот факт, что внутренние кодоны AUG не считываются инициаторной тРНК, а фмет-тРНК занимает Р-участок. Все готово к образованию пептидной связи.

Эту реакцию катализирует пептидилтрансфераза-фермент, представляющий собой составную часть 50S-субчастицы. Активированный формилметиониновый остаток фмет- ТРНК (расположенной в Р-участке) переносится на аминогруппу аминоацил-тРНК (в А-участок), образуя дипетидил-тРНК. Образование пептидной связи называется транспептидацией. Каталитический центр располагается в большой субъединице рибосомы, транспептидазный центр. Каталитической активностью в данной реакции обладает РНК. Из этого можно заключить, что рибосома является рибозимом (РНК-ферментом). После образования пептидной связи ненагруженная тРНК занимает Р-участок, а дипептидил-тРНК занимает А- участок.

Следующий этап цикла элонгации - транслокация. Происходят три перемещения: ненагруженная тРНК покидает Р-участок, пептидил-тРНК переходит из А-участка в Р-участок и мРНК продвигается на тринуклеотида. В результате следующий кодон занимает нужное положение для считывания очередной мРНК. Для транслокации необходим третий фактор элонгации - EF-G (называемый также транслоказой). Во время транслокации происходит гидролиз ГТФ, связанного с EF-G. Гидролиз ГТФ обусловливает отделение EF-G от рибосомы. Следовательно, GTP может действовать каталитически. Транслокация - еще один пример направленного движения, энергию для которого обеспечивает гидролиз нуклеозидтрифосфата. После транслокации А-участок освобождается и подготавливается к связыванию аминоацил- тРНК, чтобы начать новый цикл элонгации.

Таким образом на присоединение одной аминокислоты затрачивается 4 макроэргические связи: 2 связи из АТФ (при активации аминокислоты АТФ гидроглизуется до АМФ и пирофосфата, и пирофосфат гидролизуется до 2-фосфатов) и 2 связи из ГТФ (2 молекулы ГТФ гидролизуются в цикле элонгации до ГДФ и фосфата на этапах связывания аминоацил-тРНК и транслокации). При этом затрачиваются на один цикл трансляции 1 молекула АТФ и 2 ГТФ.

Процесс трансляции происходит от N-конца к С-концу, а мРНК проходит от 5'-конца к 3'-концу.

Терминация трансляции

Если А-участок рибосомы занят кодонами УАА, УГА или УАГ, то связывания аминоацил-тРНК обычно не происходит. Нормальные клетки не содержат тРНК с антикодонами, комплементарными сигналам термииации. Их узнают белковые факторы освобождения. Один из этих факторов освобождения - RF-1 - узнает кодоны УАА или УАГ. Второй фактор освобождения —RF-2 - узнает УАА или УГА. Таким образом, белки способны узнавать тринуклеотидные последовательности с высокой специфичностью. Связывание одного из факторов освобождения с терминирующим кодоном в А-участке каким-то образом активирует пептидилтрансферазу, и она гидролизует связь между полипептидом и тРНК в Р-участке. Фактор освобождения изменяет специфичность пептидилтрансферазы таким образом, что акцептором активированного пептидильного остатка становится H_2O, а не аминогруппа. Затем полипептидная цепь покидает рибосому. 70S-рибосома диссоциирует на 30S- и 50S-субчастицы и приготавливается к синтезу новой белковой молекулы

В 1986 г. появилась информация еще об одном типе матричных процессов это редактирование РНК.

Редактирование РНК

Редактирование - это процесс изменения нуклеотидной последовательности РНК по сравнению с первичной структурой ДНК. Этот процесс был изначально открыт в митохондриях трипаносоматид. Однако, при более детальном сравнении последовательностей РНК и ДНК различных организмов, было показано, что подобные несоответствия существуют в митохондриальных геномах животных, растений, грибов и простейших. Причем, редактированию могут подвергаться не только мРНК, но и тРНК (рРНК).

→ животные.

В митохондриях животных исправлению подвергаются матричные и транспортные РНК. В данном случае редактирование осуществляется путем полиаденилирования. Поэтому данный механизм можно рассматривать как

частный случай модификации 3'-конца пре-мРНК.

→ слизевики

Второй механизм, относящийся к типу вставок/делеций, был обнаружен в митохондриях *Physarum polycephalum*. Редактированию по этому механизму подвергаются новосинтезируемые мРНК, а также тРНК. Было показано, что в молекулу РНК происходит вставка мононуклеотидов (преимущественно цитидиловых и реже уридиновых остатков) и динуклеотидов (UA, CU, GU), вставка осуществляется каждые 25 нт в мРНК и каждые 40 в рРНК и тРНК. Этот процесс полярен, и осуществляется в направлении от 5'- к 3'-концу. Исследователи предполагают, что редактирование новосинтезированных мРНК в митохондриях Physarum polycephalum осуществляется котранскрипционно, и РНК-полимераза нематрично добавляет нуклеотиды в ходе транскрипции. Однако точных данных о сигнале редактирования до сих пор не получено, хотя имеются данные, что за вставку цитидинов отвечает структура, состоящая из последовательности ДНК длиной 25 п.н., расположенной downstream от сайта редактирования, и участка нарастающей цепи РНК размером 15 нт. Эта химерная структура как бы окружает сайт редактирования. Однако эта гипотеза не может считаться полностью подтвержденной, прежде всего из-за индивидуальности расположения сайтов встройки/ делеции для каждой мРНК.

→ трипаносоматиды.

Уридиловое редактирование пре-мРНК. Процесс редактирования в митохондриях трипаносоматид был открыт в 1986 г. Бенне. При определении первичной структуры гена цитохромоксидазы II у Crithidia fasciculata были обнаружены нарушения рамки считывания, которые могли бы быть исправлены путем вставок и/или делеций остатков уридила. Это явление посттранскрипционных вставок/делеций уридилов и было названо уридиловым редактированием. В дальнейшем было показано, что этот процесс характерен и для других митохондриальных генов трипаносоматид. Для него показан ряд особенностей, не обнаруженных при изучении редактирования у других организмов. Прежде всего, матричный характер этого процесса, то есть имеется

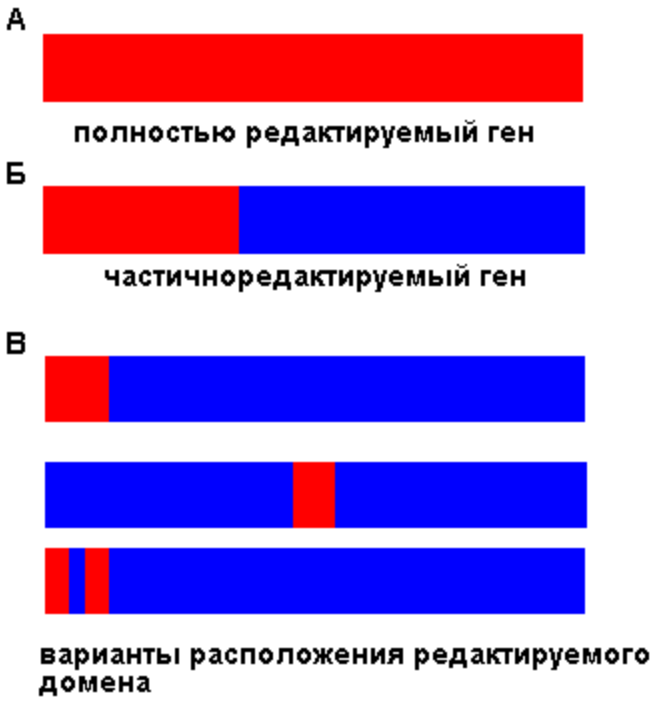


Рисунок 17: Схема строения редактируемых генов

матрица, по которой осуществляются исправления нарушенной рамки считывания. Во-вторых, тот факт, что редактирование у трипаносоматид полярно и происходит в направлении от 3'- к 5'-концу молекулы пре-мРНК. В-третьих, изменение первичной структуры РНК осуществляется специальным РНП-комплексом (эдитосомой). В той или иной степени редактированию подвергаются 12 генов из 20-ти, закодированных в максикольцевой ДНК трипаносоматид. Часть из них полностью редактируется (пан- редактирование), тогда как у остальных генов изменению может подвергаться небольшой участок, чаще всего располагающийся в 5'-концевой области гена (частичное редактирование). Причем размер домена, в котором производятся вставки и/или делеций уридилов, одного и того же гена у разных видов трипаносоматид может варьировать. Матрицей, по которой осуществляется редактирование, являются гидовые РНК (гРНК). Подавляющее большинство генов гРНК закодировано в миникольцевых ДНК, часть - в максикольцевой ДНК. гРНК - это небольшие молекулы, размер которых варьирует в пределах 55-70 нуклеотидов. В структуре гРНК выделяют три области. На 5'-конце располагается так называемый якорь, длиной 5-12 нуклеотидов, полностью комплементарный фрагменту пре-мРНК, за якорем находится собственно гидовая последовательность -участок РНК, по которому

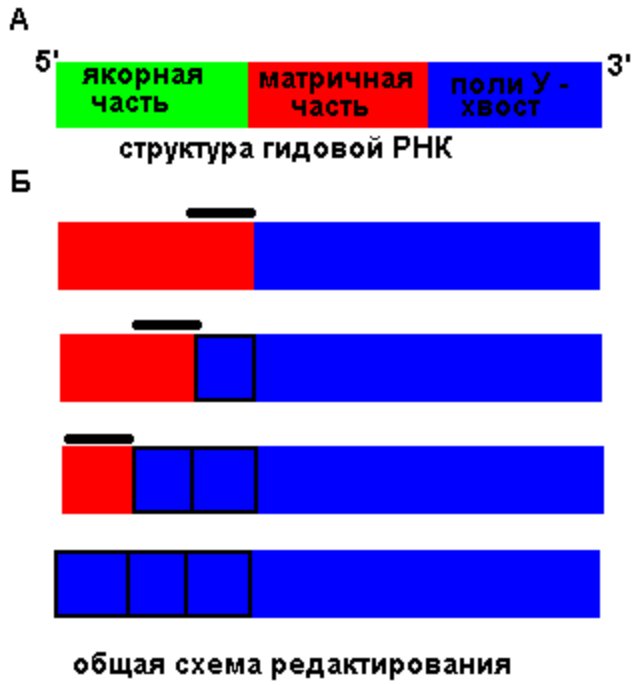


Рисунок 18: Схема механизмов редактирования (Б), строение гРНК - А

осуществляется редактирование данного фрагмента пре-мРНК, длина этого района составляет 25-35 нуклеотидов, и 3'-конец гРНК образован ПОЛИ-U-хвостом, размер которого варьирует от 5 до 24 остатков уридила.

Существует две модели уридилового редактирования: трансэтерификационная и «ферментативного каскада».

Механизм редактирования на основе модели трансэтерификации предполагает, что либо 3'- концевая гидроксильная группа уридила гРНК, либо свободный UTP осуществляет нуклеофильную атаку фосфодиэфирной связи между последним нуклеотидом якорного дуплекса гРНК-пре-мРНК и первым нуклеотидом неотредактированной последовательности. В результате нуклеофильный агент присоединяется к пре-мРНК, и образуется свободный внутренний 5'-конец пре-мРНК. Новообразованный 3'-конец пре-мРНК является нуклеофильным агентом во втором акте трансэтерификации. В результате образуется частично отредактированная пре-мРНК. В соответствии с этой моделью механизм редактирования аналогичен сплайсингу и предполагается, что вставки и делеции уридилов in vitro должны осуществляться без участия каких-либо дополнительных факторов. Однако все попытки провести эту реакцию оказались неудачными.

В отличие от трансэтерификационной, модель ферментативного каскада подтверждается экспериментально. Согласно этой модели в процессе модификации транскрипта помимо гРНК и пре-мРНК участвует большое количество ферментов, которые, последовательно взаимодействуя с пре-мРНК и

гРНК, осуществляют в модели ферментативного каскада выделяют несколько этапов.

На первом этапе происходит образование дуплекса между якорной последовательностью гРНК и пре-мРНК. Дополнительная стабилизация этого дуплекса осуществляется за счет поли- У-хвоста гРНК, который взаимодействует с пуринбогатым участком пре-мРНК выше редактируемого района. Показано несколько белковых факторов, связывающихся с гРНК, однако их роль в процессе редактирования не известна. Для одного из этих факторов (gBP21) был сделан нокаут, но полученные мутанты не имели видимых фенотипических изменений, и процесс редактирования у этих организмов не был нарушен.

На втором этапе производится разрыв пре-мРНК, в участке, где нарушается комплементарность между гРНК и пре-мРНК. Разрыв вносится специфической эндорибонуклеазой, которая, по некоторым предположениям, узнает шпилькоподобные структуры пре-мРНК, расположенные ближе к 3'-концу, сразу за окончанием дуплекса гРНК/пре-мРНК. Эта активность описана в митохондриальных лизатах Trypanosoma brucei и Leishmania tarentolae, но только одна митохондриальная рибонуклеаза очищена и охарактеризована. Фермент был выделен из Leishmania tarentolae, и был назван MAR1 (mitochondrial associated ribonuclease). При изучении свойств этого белка было показано, что MAR1 может использовать в качестве субстрата как пре-мРНК, так и отредактированную мРНК. Однако не было показано ни участие этого фермента в редактировании, ни сайта, по которому осуществляется разрезание. Но исследователи полагают, что существует вероятность наличия в митохондриальном матриксе факторов, обеспечивающих гРНК-зависимую и сайтспецифическую реакцию этого фермента В последнее время была сделана попытка охарактеризовать все белки редактирующего комплекса. В результате были обнаружены несколько белков, возможно, участвующих в разрезании пре-мРНК в комплексе с гРНК;

На третьем этапе к образовавшемуся 3'-концу пре-мРНК, присоединяются остатки уридила. В этом процессе участвует терминальная уридилтрансфераза, которая синтезирует ПОЛИ-U- хвост на 3'-конце пре-мРНК. В настоящее время из редактирующего комплекса выделено

Рисунок 19: Схема механизма редактирования

два белка проявляющих уридилтрансферазную активность. Эти ферменты (RET 1 и RET2) имеют структуру сходную с поли-А-полимеразой. Анализ каталитического центра показал наличие замен некоторых аминокислот, что, по мнению некоторых авторов, привело к изменению субстратной специфичности фермента.

Далее под действием 3'-5' экзонуклеазы происходит удаление этих остатков до восстановления комплементарности между гРНК и пре-мРНК. Это предположение подтверждается наличием в митохондриальном матриксе фракции РНК, у которых число уридиловых остатков больше, чем закодировано в гРНК. В настоящее время выделено два белка, которые, по предположениям исследователей, представляют собой 3'-5' экзонуклеазу, но пока эти предположения не доказаны.

На последнем этапе происходит лигирование концов разрезанного участка пре-мРНК РНК- лигазой. Из эдитосомы были выделены два типа этих ферментов (REL1 и REL2), и было показано сходство некоторых доменов этих белков с аналогичным ферментом из фага Т4. Так как, согласно второй модели, в редактировании участвует большое число ферментов, было сделано предположение, что, этот процесс осуществляется крупным РНП-комплексом

(эдитосомой). Были предприняты попытки выделить и очистить его из митохондрий. При анализе митохондриального лизата Trypanosoma brucei в изокинетическом градиенте глицерина, в лаборатории Полларда, были выделены два типа комплексов с коэффициентами седиментации 19S и 35-40S. При изучении состава 19S комплекса было показано, что в него входят гРНК и часть мРНК, а также РНК-лигаза. Тогда как с комплексом 35-40S ассоциированы основной процент пре-мРНК и активность терминальной уридилтрансферазы (TUT-азы). Позже было показано, что активности РНК-лигазы, РНК -хеликазы и TUT-азы присутствуют в обоих комплексах, но с разной удельной активностью. Редактирование пре-мРНК путем конверсии нуклеотидов

Второй тип редактирования был обнаружен в митохондриях высших растений, слизевиков Physarum polycephalum, Dictyostelium discoideum и простейших, и представляет собой конверсию уже имеющихся в составе РНК нуклеотидов.

→ C-U и U-C конверсии.

В митохондриях и хлоропластах высших растений редактированию подвергаются мРНК и тРНК. Этот процесс заключается в конверсии C→U, а также U→C. Причем, частота встречаемости замен U-C значительно меньше. Модификации чаще всего подвергаются нуклеотиды в составе кодирующих районов пре-мРНК. Однако для пре-мРНК хлоропластных генов растений было также показано наличие конверсии в спейсерных участках пре-мРНК, а так же в 3'- и 5'-нетранслируемых участках митохондриальных мРНК, что, возможно, связано со стабилизацией зрелой РНК и увеличением эффективности трансляции. Обе реакции конверсии осуществляются одним и тем же ферментом -С-дезаминазой, сходной с ферментом APOBEC-1 (APOBEC-1 является ядерной дезаминазой животных, которая редактирует мРНК аполипопротеина B). Частично отредактированные митохондриальные пре-мРНК растений транслируются. Однако в комплекс дыхательной цепи включаются только белковые продукты, синтезированные с полностью

отредактированных матриц. Модификации оснований также подвергаются транспортные РНК в митохондриях растений. В данном случае наблюдается два типа модификации оснований: первое - просто амнирование/дезаминирование, второе - где помимо дезаминирования осуществляется изомеризация азотистого основания с образованием псевдоуридина. Аналогичный механизм редактирования обнаружен у слизевиков (Physarum polycephalum и Dictyostelium discoideum). Однако спектры редактируемых РНК у этих миксомицетов различны. У Physarum polycephalum C/ U замены происходят только в мРНК, тогда как у Dictyostelium discoideum модификации подвергаются не только матричные, но и рибосомные РНК малой субъединицы рибосомы. В рРНК этого слизевика показана единственная конверсия C →U в положении 530, которая приводит к изменению вторичной структуры рРНК таким образом, что восстанавливается способность рибосомы к трансляции.

→ A-G и G-C конверсии

В митохондриальных тРНК Acanthamoeba castellanii наблюдается G—»A конверсия. При исследовании первичной структуры мтДНК этого организма было обнаружено, что 13 из 16 закодированных в ней тРНК содержат неспаренные основания в аминоацилсвязывающем домене. В результате нарушается правильная укладка вторичной структуры тРНК и блокируется процесс аминоацилирования. Все неспаренные нуклеотиды располагаются между 1-3 и 70-72 нуклеотидами, соответственно. Однако, при анализе первичной структуры ДНК- копий самих тРНК, нарушений в спаривании в этом районе не было обнаружено. Показано, что в ходе редактирования происходит замена G-U пар на A-U в первых трех положениях, тогда как G-U пара в четвертом положении остается неизменной. В митохондриях динофлагеллят обнаружены как A-G так и G-C тип конверсии, но в отличие от амебоидных простейших у жгутиковых редактированию подвергаются мРНК.

Топогенез белков

Топогенез белков – это огромный путь (если не сказать артерия)

метаболизма. К топогенезу белков относятся такие процессы как сворачивание (фолдинг), ко- и посттрансляционные модификации аминокислот, также транспорт белков внутри клетки и во внешнюю среду.

Прежде чем начать обсуждать столь сложную проблему необходимо изучить процессы связанные с посттрансляционными модификациями аминокислот.

Полипептидная цепь — первичный продукт биосинтеза белка — часто подвергается химическим превращениям, изменяющим ее ковалентную структуру. Такие превращения могут происходить как в процессе трансляции **(котрансляционная модификация),** так и после ее окончания, нередко уже после сформирования пространственной структуры белка. Многообразие этих реакций, завершающих созревание белка или видоизменяющих его функциональные свойства, очень велико — их число достигает 300—400. Иногда реакции посттрансляционной модификации называют **процессингом** (от англ. processing — обработка), подчеркивая этим, что они как бы завершают биосинтез белка. Этот термин не вполне точен, поскольку некоторые реакции, например фосфорилирование, могут происходить с одной и той же молекулой неоднократно, регулируя ее активность, другие, вероятно, служат сигналом к расщеплению белка.

Обычно реакции посттрансляционной модификации катализируются специфическими ферментами, хотя известны и внутримолекулярные превращения белков, происходящие без участия "внешних" ферментов. Реакции посттрансляционной модификации, как правило, имеющие функциональный смысл, направленность, принято отличать от более или менее случайных повреждающих реакций, также весьма многочисленных, которые происходят с белками *in vivo*$_t$ отражаясь на их структурной целостности и функциональных свойствах. К ним относят, например, реакции окисления, случайный протеолиз и некаталитическое дезамидирование белка, присоединение глюкозы к аминогруппам некоторых белков, в частности гемоглобина, при ее повышенном содержании в крови при диабете и т.п.

Реакции посттрансляционной модификации являются **нематричными процессами,** они не кодируются непосредственно, поэтому нередко протекают неполно, что приводит к образованию множественных форм того или иного белка — продуктов частичного превращения.

Каков функциональный смысл реакций посттрансляционной модификации? На этот вопрос в обобщенной форме можно дать следующий ответ.

Во-первых, несмотря на удивительное богатство структур, образуемых аминокислотными остатками и их ансамблями в пространственной структуре белка, это многообразие далеко не безгранично. Разумеется, образование комплексов с кофакторами (металлами, коферментами и т.п.) резко расширяет функциональные возможности белка. Однако и этот путь не всегда оказывается достаточным. В таких случаях структурная палитра белка может быть обогащена путем направленного преобразования боковых цепей тех или иных аминокислотных остатков, а иногда и молекулы в целом.

Во-вторых, что не менее важно, некоторые реакции посттрансляционной модификации, в особенности обратимые, позволяют управлять активностью белка или целых групп белков в ответ на изменяющиеся потребности клетки.

Заметим, что реакции посттрансляционной модификаций в отличие от предшествующих им стадий трансляции очень индивидуальны, иногда свойственны только одному белку — к таким относятся, например, гидроксилирование остатков пролина в коллагене, иодирование тиреоглобулина и некоторые другие. Специфичность посттрансляционной модификации открывает перспективу избирательного воздействия на процессинг и, следовательно, функцию тех или иных белков.

Далее будут рассмотрены некоторые важнейшие реакции посттрансляционной модификации.

Иодирование остатков тирозина

Эта реакция характерна для тиреоглобулина — высокомолекулярного белка, содержащегося в щитовидной железе и являющегося источником

тироксина — гормона, влияющего на обменные процессы в тканях. Процесс начинается с избирательного иодирования немногих остатков тирозина в этом белке под действием иода, который образуется в свою очередь при окислении иодид-иона, катализируемом пероксидазой; Иод далее атакует ОН-группу тирозина по радикальному механизму и, отщепляя водород с образованием HI, оставляет неспаренный электрон на кислороде тирозина. Этот электрон способен перемещаться по ароматической системе сопряженных связей и может быть локализован в пара-положении, что приводит к разрыву связи С- CH_2 по так называемому гемолитическому пути. Затем весь ароматический фрагмент, имеющий неспаренный электрон в параположении, внутримолекулярно переносится на кислород пространственно сближенного остатка дииодтирозина: На модельных пептидах показано, что выход этой реакции, протекающей неферментативно, зависит от относительного расположения остатков тирозина, которое в тиреоглобулине, видимо, особенно благоприятствует процессу (для чего оба ароматических ядра должны быть копланарны). Иодированию и превращению в тироксин преимущественно подвергаются в этом белке остатки Туг-5, 1291, 2555, 2748. Высвобождение тироксина из тиреоглобулина происходит под действием специфической аспартильной протеиназы, содержащейся в щитовидной железе.

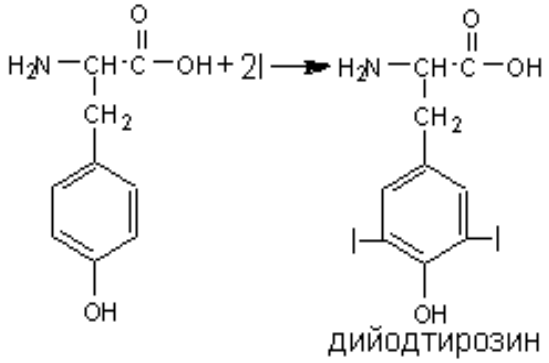


Рисунок 20: Схема реакции иодирования тирозина

Образование остатков γ-карбоксиглутаминовой кислоты

Такая реакция происходит в некоторых животных белках, функционирование которых требует образования *комплекса с ионами кальция.* Она состоит в прямом включении CO_2 в γ метиленовую группу остатка глутаминовой кислоты. Эта реакция, протекающая только в присутствии витамина К, свойственна протромбину и многим другим белкам системы

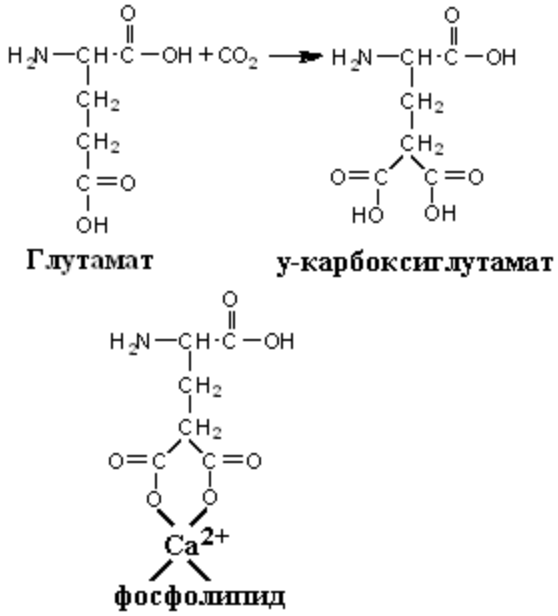


Рисунок 21: Схема образования карбоксиаминокислот и форимирования комплексов карбоксиаминокислот и ионами металлов

свертывания крови, в которых карбоксилированию подвергаются несколько (обычно около 10) остатков глутаминовой кислоты в аминоконцевом участке полипептидной цепи. Остатки γ -карбоксиглутаминовой кислоты за счет двух сближенных карбоксильных групп могут образовывать комплексы с ионами кальция, связанными в то же время с фосфолипидами клеточных мембран. Таким образом, ионы кальция выступают как своеобразные мостики, способствующие концентрированию белков системы свертывания крови на поверхности клеток, что облегчает их взаимодействие друг с другом. Сходную роль играют остатки γ -карбоксиглутаминовой кислоты и в белке костной ткани - остеокалъцине, который взаимодействует с ионами кальция на поверхности частиц гидроксилапатита - минерального компонента кости. Аналогично модифицированы остатки глутаминовой кислоты в овокальцине и атерокальцине, некоторых белках хрящей, почечных канальцев, а также в некоторых белках рибосом, которые содержат и β-карбоксиаспарагиновую кислоту.

Дефицит витамина К или присутствие его специфических ингибиторов, например дикумарина, блокирует γ -карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты и приводит к глубоким нарушениям функции соответствующих белков, в частности к торможению свертывания крови.

Гликозилирование белков

Гликопротеинами называют белки, содержащие ковалентно связанный углеводный компонент. Основываясь на структурной роли углеводного компонента, гликопротеины можно разделить на два класса. К одному из них

принадлежат так называемые протеогликаны, их пептидная цепь настолько плотно унизана олигосахаридными цепочками, что молекула в целом выступает подобно разветвленному полисахариду, ее полипептидный скелет постоянно скрыт. Протеогликаны играют немалую роль в формировании межклеточного матрикса в тканях животных. Ко второму классу относятся такие гликопротеины, в которых полипептидная цепь формирует пространственную структуру по обычным правилам, свойственным белкам, а углеводные компоненты присоединены к белковой глобуле. Далее речь будет идти именно о таких ликопротеинах.

Известны два основных способа ковалентного присоединения олигосахаридных цепочек к белкам.

N-Гликопротеины

В этих гликопротеинах углеводный компонент присоединяется N-гликозидной связью (отсюда и название) к амидному азоту остатка аспарагина, включенного в пептидную цепь. Первым моносахаридным звеном, образующим N-гликозидную связь с аспарагином в гликопротеинах этой группы, всегда оказывается N -ацетилглюкозамин так что "узел" присоединения имеет следующую структуру. N-Гликозидная связь легко расщепляется в кислой среде, поэтому N-гликопротеины кислотолабилъны. В гликопротеинах этого типа к остатку аспарагина присоединен олигосахарид, в котором к "узловому" остатку N-ацетилглюкозамина присоединен 1-4-связью еще один остаток N-ацетилглюкозамина, далее следуют несколько остатков маннозы, могут встречаться остатки N-ацетилглюкозамина, галактозы, нейраминовой кислоты, фукозы и некоторые другие моносахаридные звенья.

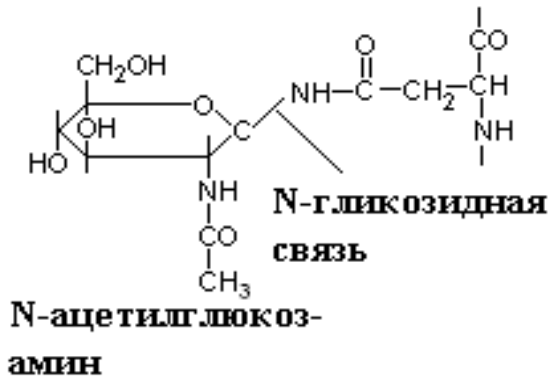


Рисунок 22: Схема связей при N-гликозилировании

Биосинтез N-гликопротеинов происходит в шероховатом ретикулуме, причем на амидную группу аспарагина

переносится под действием специализированного фермента в один шаг олигосахарид весьма сложной структуры $Glc_6Man_9GlcNAc_2$. Далее он подвергается более или менее сложному процессингу - отщеплению концевых моносахаридных звеньев, в частности полному отщеплению остатков глюкозы при помощи специфических глюкозидаз, частичному - маннозы маннозидазами. В результате этого остается так называемое "ядро", к которому присоединяются другие моносахариды NeuNAc -ацетилнейраминовая кислота, Gal - галактоза, иногда и другие моносахариды, например фукоза - Fuc. Эти реакции специфичны, поэтому образующаяся в результате завершенная структура олигосахарида различна у разных белков. Гликозилирование подвергаются лишь немногие из остатков аспарагина, имеющихся в белках. Например, в панкреатической рибонуклеазе из 34 остатков аспарагина гликозилируется только один, находящийся в последовательности Asn-Leu-Thr, что приводит к образованию так называемой рибонуклеазы В. Реакция протекает, как это нередко случается при посттрансляционной модификации, неполно, и значительная часть молекул фермента остается негликозилированной (рибонуклеаза А). Исследование множества N-гликопротеинов показало, что присутствие оксиаминокислоты - треонина или серина через один остаток от аспаратна - служит сигналом для специфического фермента - олигосахаридтрансферазы, гликозилирующей аспарагин в последовательности **Asn-Xaa-Ser(Thr)**, где Хаа - любая аминокислота. Это позволяет предсказать возможные точки N-гликозилированйя по первичной структуре белка. Фермент, катализирующий N-гликозилирование, -олигосахаридтрансфераза - "узнает" амидную группу аспарагина, отделенного одним аминокислотным остатком от серина или треонина, если полипептидная цепь развернута. По-видимому, свертывание соответствующего участка в пространственную структуру препятствует гликозилированию. Этим объясняется отсутствие гликозилирования одного из двух остатков аспарагина в овальбумине *in vivo,* хотя *in vitro* удается присоединить олигосахариды к обоим остаткам, входящим в указанную выше характерную для N-гликозилирования последовательность.

Антибиотик туникамицин блокирует N-гликозирование белков. Фермент - гликопептидаза F - избирательно отщепляет олигосахариды от N-гликопротеинов. N-Гликозилирование характерно для секреторных белков, попадающих в эндоплазматический ретикулум, хотя оно не является непременной предпосылкой секреции.

О-Гликопротеины

В гликопротеинах этого типа углеводный компонент присоединяется О-гликозидной связью к оксигруппе остатка серина или треонина, причем "узловое" положение всегда занимает остаток N-ацетилгалактозамина. В отличие от N-гликозилирования биосинтез О-гликопротеинов происходит ступенчато. Вслед за присоединением "узлового" N-аце-тилгалактозамина последовательно действующие гликозилтрансферазы присоединяют другие моносахаридные звенья. Однозначного "сигнала" в первичной структуре О-гликопротеинов, который определял бы подлежащий модификации остаток серина или треонина, не обнаружено. Имеются, однако, указания на то, что гликозилируется гидроксильная группа остатка серина или треонина, который следует за остатком пролина и входит в β-изгиб. Это указывает на то, что гликозилирование происходит уже после формирования пространственной структуры белка. О-гликозидная связь расщепляется в щелочной среде, причем углеводный компонент отделяется от белкового вместе с водородом, принадлежащим а-углеродному атому серина, оставляя в полипептидной цепи дегидроаланин. О-Гликозилирование встречается, не столь часто в глобулярных белках, оно более свойственно муцинам (веществам, определяющим группу крови) — гликопротеинам, относящимся к классу протеогликанов. Однако в иммуноглобулинах, например, одновременно встречаются оба типа

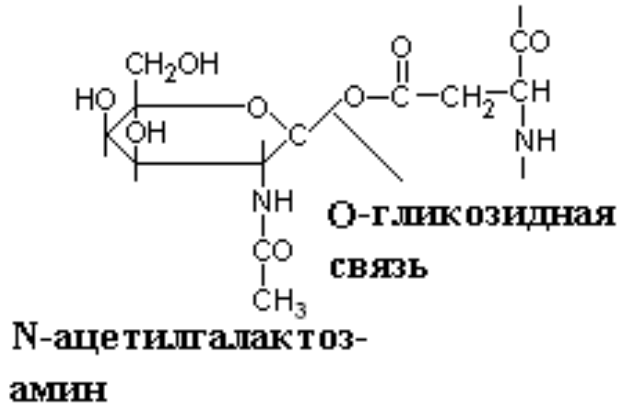


Рисунок 23: Схема связей при О-гликозилировании

гликозилирования.

Весьма сложен вопрос о функциональной роли углеводных компонентов в гликопротеинах. В некоторых, правда немногих, случаях удалось определить пространственную структуру гликопротеинов. Оказалось, что олигосахаридные цепочки не образуют сколько-нибудь протяженных контактов с белковой глобулой, за исключением немногих водородных связей вблизи точки присоединения к белку, а направлены в сторону от глобулы и погружены в окружаюую гликопротеин воду. Лишь для одного из иммуноглобулинов *G* .оказалось, что углеводный компонент, содержащий шесть моносахаридных звеньев, как бы лежит на поверхности раздела двух доменов Сн 2 и играет, по-видимому, роль своеобразной гидрофильной прокладки площадью около 500 A^0, не позволяя слипнуться гидрофобным поверхностям этих доменов. В других изученных случаях трудно говорить о структурообразующей роли углеводных компонентов. Углеводный компонент практически никогда не участвует в, главной функции белка, т.е. не входит в состав каталитического центра или зоны связывания ферментов, активные участки регуляторных белков и т.п. Активность, измеренная для пар гликозилированных и негликозилированных ферментов, неизменно оказывается одинаковой. Сказанное не относится, впрочем, к случаям, когда функция белка состоит в передаче сигнала — в таких белках, например в некоторых гормонах, углеводный компонент нередко критически важен для активности. Как уже говорилось, гликозилирование сопровождает секрецию белков у животных, однако секреция может происходить и без гликозилирования; следовательно, включение углеводных компонентов есть результат, а не предпосылка секреции. Это хорошо иллюстрируют данные о доле гликопротеинов среди белков, содержащихся в секрете поджелудочной железы — 4,7%, коровьем молоке — 58%, синтезируемых в печени белках сыворотки крови — 59,7%. Однако в курином яйце гликозилировано около 97% суммы белков.

По-видимому, гликозилированйе важно не для структуры или функции белка как такового, а для его взаимоотношений с другими компонентами клетки

или организма, для его "поведения" в этих чрезвычайно сложных системах. Действительно, известно, что фосфорилирование одного из остатков маннозы в олигосахаридных структурах цитоплазматических ферментов, например внутриклеточной аспартильной протеиназы — катепсина D, "адресует" их в лизосомы. Присутствие другого моносахарида — сиаловой кислоты в гликопротеинах крови — способствует их удержанию в кровотоке; белки, подвергшиеся отщеплению концевых остатков сиаловой кислоты, быстро удаляются печенью. Например, церулоплазмин, циркулирующий в крови в среднем около 50 ч, после отщепления концевой сиаловой кислоты удаляется за несколько минут.

Несомненна физиологическая роль углеводных компонентов в гликопротеинах мембран — они неизменно располагаются в той части молекулы, которая направлена в окружающую среду, но почти всегда отсутствуют в цитоплазматических доменах этих белков. Углеводные компоненты участвуют в процессах межклеточного "узнавания", дифференциации, трансформации клеток, фагоцитозе, процессах оплодотворения, во взаимодействии клеток с вирусами, связывании гормонов с рецепторными белками.

Интересны гликопротеины антарктических рыб, понижающие точку замерзания жидкостей, — их функциональная роль вполне очевидна. В полипептидной цепи одного из них содержатся многочисленные повторы Ala—Ala—Thr, причем к гидроксильным группам треонина присоединены дисахаридные звенья галактозил-N-ацетилгалактозамина.

Фосфорилирование белков

Белки фосфорилируют специфические ферменты — **протеинкиназы,** которые катализируют перенос концевого фосфата ATP на гидроксильные группы остатков серина или треонина. Значительно реже наблюдается фосфорилирование гидроксила тирозина, так что содержание фосфотирозина составляет около 0,1% суммы фосфосерина и фосфотреонина, однако физиологическая роль этой модификации весьма велика.

Фосфоэфирные -связи фосфопротеинов могут гидролизоваться специализированными ферментами — фосфопротеинфосфатазами. Таким образом, фосфорилирование — обратимый процесс. Белок за время своего существования может многократно переходить то в фосфорилированную, то в дефосфорилированную форму. Эта чрезвычайно важная особенность фосфорилирования — возможность обращения модификации — обусловила роль этой реакции как механизма, позволяющего регулировать активность белка и даже целых групп белков в ответ на изменяющиеся внутри- и внеклеточные стимулы. Таким образом, столь значительные функциональные последствия фосфорилирования (и дефосфорилирования) обусловлены тем, что эти реакции происходят в относительно лабильной зоне белковой структуры— в области контакта субъединиц (как в рассмотренном случае) или доменов. Интересно, что регуляторное действие AMP на фосфорилазу основано на. похожем принципе — аденозинмонофосфат образует прочный нековалентный комплекс *с* фосфорилазой *b,* связываясь на поверхности контакта субъединиц. Его фосфатная группа взаимодействует с двумя гуанидогруппами остатков аргинина и вызывает, как и в случае фосфорилирования Ser-14, цепь перестроек в структурно лабильной зоне фермента, опять-таки открывая каталитический центр Результатом является активация фосфорилазы *b* — фермента, практически не активного в отсутствие AMP. Разница в том, что фосфорилирование активирует фермент, переводя его в фосфорилазу а, не зависимо от концентрации эффектора (в данном случае AMP) внутри клетки и, следовательно, в определенной мере не зависимо от биохимического статуса клетки.

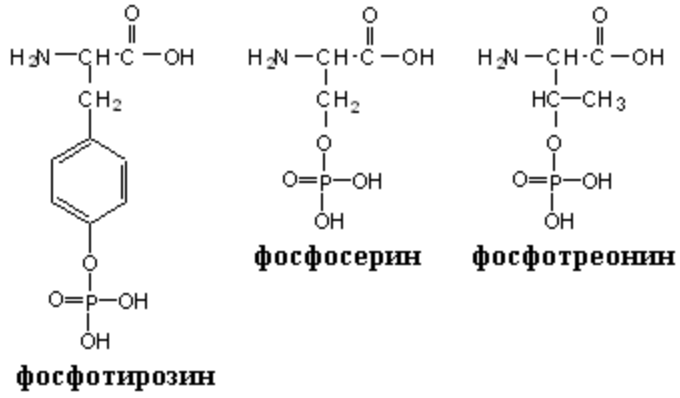


Рисунок 24: Структура фосфорилированных аминокислот

Как уже отмечалось, перенос фосфата ATP на фермент катализируется

протеинкиназой. Активность этого фермента, в свою очередь, контролируется и зависит от содержания в клетке так называемого "вторичного мессенджера" — cAMP. cAMP-зависимая протеинкиназа состоит из неодинаковых субъединиц: регуляторной R-субъединицы, способной связывать эффектор, т.е. с AMP, и каталитической С-субъединицы. Регуляторная субъединица выступает как ингибитор протеинкиназы, в комплексе с ней каталитическая субъединица лишена активности. При связывании регуляторной субъединицей cAMP, которое происходит за счет нековалентных взаимодействий, она утрачивает способность образовывать четвертичную структуру. В результате каталитическая субъединица высвобождается и оказывается способной фосфорилировать белки. Снижение концентрации свободного cAMP в клетке приводит к тому, что синтезируемая в избытке регуляторная субъединица вновь связывается с каталитической субъединицей, вызывая ингибирование фермента. Так реализуется динамическое равновесие. Выбор остатка серина, подвергаемого фосфорилированию, может зависеть от последовательности аминокислот, которые его окружают. Так, cAMP-зависимая протеинкиназа быка фосфорилирует гидроксильную группу серина в последовательности **Arg—Arg—Ala—*Ser*—Val(Leu),** причем соседствующие остатки аргинина, видимо, направляют фермент. Фосфорилирование по остаткам тирозина, которое катализируется специфическими протеинкиназами (тирозинкиназами), встречается значительно реже, чем фосфорилирование остатков серина и треонина, — на долю фосфотирозина приходится около 0,1% всего связанного с белком фосфата. Однако биологическая роль этой реакции очень велика, так как она активно используется для передачи сигналов в биологических системах.

Так, инсулин, связываясь с рецептором — трансмембранным белком, вызывает активацию его домена, направленного в цитоплазму и являющегося тирозинкиназой. Тирозинкинавную активность индуцирует ряд факторов роста — белков, запускающих деление клеток по механизму, аналогичному описанному для инсулина. Рецепторы этих факторов — крупные трансмембранные белки — связывают их на наружной поверхности мембраны.

Образование комплекса фактор — рецептор передает сигнал через трансмембранную часть рецептора на его цитоплазматический домен, являющийся тирозинкиназой. Активированная таким образом тирозинкиназа модифицирует внутриклеточные белки, передавая сигнал далее.

Тирозинкиназы фосфорилируют остатки тирозина в некоторых-внутриклеточных белках, вовлеченных в сложную систему регуляции клеточного деления, в которой также участвует и фосфорилирование белков по остаткам серина и треонина. ной регуляторной сети может привести к неконтролируемому делению клеток, опухолевому росту. Характерно, что онкобелки, структурно близкие нормальным белкам животной клетки, но вызывающие ее трансформацию, превращение в опухолевую, нередко оказываются тирозинкиназами.

АДФ-рибозилирование

Реакция переноса ADP-рибозного остатка NAD на белки, катализируемая специфическими ферментами, используется для регуляции активности ряда ферментов, в том числе глутаминсинтетазы, где модифицируется остаток тирозина. Аналогичную реакцию переноса ADP-рибозного фрагмента катализируют некоторые бактериальные токсины. Каталитический домен дифтерийного токсина, образующийся в результате ограниченного протеолиза, катализирует присоединение этого фрагмента к фактору элонгации EF-2 в клетках эукариот и архебактерий. Модификации подвергается производное гистидина (содержащееся в консервативном районе последовательности этого фактора) — дифтамид, в свою очередь образуемый многоступенчатой модификацией остатка гистидина. ADP-рибозилирование дифтамида, катализируемое дифтерийным токсином, инактивирует фактор элонгации EF, прерывая тем самым трансляцию, что приводит к гибели клетки.

Пренилированные белки

Реакции S-пренилирования, заключающейся в присоединении изопреноидов к атому серы остатка цистеина, который локализован в С-

концевом участке полипептидной цепи, подвергается около 100 белков, в частности белок Ras. Первоисточником пренильных группировок является изопентенилпирофосфат, изомеризующийся с перемещением двойной связи в диметилаллилпирофосфат. Фарнезильная или геранил-геранильная группы с отщеплением пирофосфата переносятся на атом серы остатка цистеина, который расположен вблизи С-конца полипептидной цепи в последовательности С—А—А—Х (так называемом СААХ-боксе), где С — остаток цистеина, А — остатки алифатических аминокислот, Х — С-концевая аминокислота, определяющая, какой из двух типов реакции пренилирования осуществится. Если Х — серии, метионин или глутамин, то к цистеину присоединяется фарнезил (С15), если Х — лейцин, то происходит присоединение геранил-геранила (С20).Пренилирование белков включает в себя следующую цепь превращений. Пренилтрансфераза переносит пренильный остаток соответствующего пренилпирофосфата на SH-группу остатка цистеина в белке, имеющем на С-конце СААХ-бокс. Затем специфическая пептидаза отщепляет выполнившую роль сигнала последовательность А—А—Х, после чего с участием метилтрансферазы метильная группа S-аденозилметионина переносится на карбоксил пренилированного цистеина, превращая его в метиловый эфир. Очевидно, что присоединение к белку крупной гидрофобной пренильной группировки благоприятствует его включению, в цитоплазматическую мембрану. При этом существенно, что от типа пренильной группы зависит ориентация белка в мембране — фарнезилированые белки встраиваются во внешнюю мембрану, белки же, содержащие геранил-геранильный остаток, — во внутреннюю мембрану, обращенную к цитоплазме. Впрочем, у этого правила могут быть исключения, кроме того, в адресовании пренилированных белков участвуют, вероятно, и другие элементы их структуры. Таким образом, реакция пренилирования — один из процессов, определяющих локализацию белков в биологических структурах, их *топогенез.*

Ограниченный протеолиз

Ограниченный протеолиз — важнейшая реакция посттрансляционной

модификации белка. Обычный "неограниченный", глубокий протеолиз — расщепление белка протеиназами —протекает по принципу "все или ничего". Компактный белок, как правило, относительно устойчив к действию протеиназ, поскольку в нем практически нет необходимых для связывания протеолитических ферментов протяженных "открытых" участков полипептидной цепи. Поэтому атака на первых порах ограничивается расщеплением отдельных петель, концевых участков белка. Если же протеолизу подвергается "внутренний" участок полипептидной цепи, ставший доступным, например, за счет частичной (и обратимой) денатурации белковой глобулы, то пространственная структура дестабилизируется, белок-субстрат необратимо денатурирует и вся полипептидная .цепь оказывается доступной протеолитической атаке. Результатом является глубокий гидролиз с образованием коротких фрагментов. При таком ходе протеолиэа в гидролизате присутствуют исходный белок, количество которого постоянно уменьшается, и низкомолекулярные пептидные продукты гидролиза, содержание которых постоянно нарастает, промежуточные же продукты наблюдать не удается. '

Ограниченный протеолиз, при котором процесс задерживается или полностью останавливается на промежуточных продуктах, возможен лишь тогда, когда продукты протеолиза сохраняют компактность, например при отщеплении фрагмента какого-либо из концов пептидной цепи, разрыве петли на поверхности глобулы или при расщеплении пептидной цепи между достаточно стабильными доменами белка. Ход ограниченного протеолиза, его результат решающим образом зависят от особенностей структуры белка-субстрата. Ввиду этого нередко одинаковые или очень близкие результаты дает применение различных протеиназ, место действия которых определяется особенностями пространственного строения субстрата. Если в разрешенном для атаки участке (шарнирный участок) последовательность аминокислотных остатков согласуется со специфичностью атакующей протеиназы, то эффективность процесса возрастает. Именно так обстоит дело при посттрансляционной модификации белков протеиназами.

Формирование белка неканонической структуры

Примером такого процесса могут служить такие процессы как: биосинтез инсулина, разъединение белковых глобул в полибелках, разделение доменов, разделение доменов, активация предшественников ферментов. Каждый из этих процессов уникален, и необходимо рассмотреть их отдельно.

Биосинтез инсулина

Инсулин, построенный из двух полипептидных цепей А и В, содержащих соответственно 21 и 30 аминокислотных остатков и соединенных между собой дисульфидными связями, слишком мал, чтобы сформировать стабильную глобулярную структуру с достаточной эффективностью. Действительно,, удается поручить инсулин рекомбинацией раздельно синтезированных А- и В-цепей, причем остатки цистеина, окисляясь, образуют свойственную нативному белку систему дисуль-фидных связей. Однако такой процесс происходит медленно и дает, как правило, невысокий выход инсулину. Гораздо легче образует третичную структуру предшественник инсулина — проинсулин, в полипептидной цепи которого "будущие" А- и В-цепи инсуцина соединены пептидом С в последовательности *В—С*—А, Такой белок, содержащий в одной полипептидной цепи около 90 аминокислотный остатков, сворачивается в компактную структуру, далее следует замыкание дисульфидных мостиков, стабилизирующее молекулу в целом, после чего специальная протеиназа "вырезает" пептид С. Точки воздействия этой протёиназы предопределены двумя факторами — пространственной структурой проинсулина и присутствием в его полипептидной цепи двух ..сигналов — двух пар катионных аминокислот, расположенных в последовательности таким образом:

В-цепь—Arg—Arg—С-пептид—Lys—Arg—А-цепь

Процессирующая такой предшественник протеиназа узнает пары аминокислот с катионными боковыми группами типа Arg—Arg, Lys—Arg и т.п. и расщепляет пептидную связь на С-конце таких пар. В результате будет вырезан пептид С «месте с последовательностью Lys—Arg на С-конце и освободятся цепи А и. В, причем на С-конце цепи В окажутся два остатка

аргинина, которые необходимо отщепить. Это выполняет специализированная металлокарбоксипептидаза с оптимумом действия в слабокислой среде. Заметим, что сочетание действия протёиназы, гидролизующей пептидные связи после пары катионных аминокислот (такие ферменты обнаружены у животных и дрожжей), и карбоксипептидазы, отщепляющей затем эти аминокислоты (по-специфичности фермент близок карбоксипептидазе В), используется в биосинтезе коротких пептидов, например энкефалина.

Разъединение белковых глобул в полибелках

В ряде случаев несколько структурно и функционально различных белков синтезируется первоначально как одна полипептидная цепь очень большой длины, отдельные участки которой независимо друг от друга свертываются в белковые глобулы, образуя так называемый полибелок. Так, например, синтезируются ферменты биосинтеза жирных кислот. Особенно характерен синтез полибелков для ретровирусов. В дальнейшем происходит разрезание специфическими протеина-зами пептидных перетяжек между отдельными глобулами, после чего последние функционируют независимо. Так, в частности, разделяются компоненты полибелка вируса иммунодефицита человека. Видимо, точность расщепления полипептидных перетяжек в полибелкр в этом случае столь существенна, что этот процесс не всегда может быть доверен протеиназам клетки-хозяина. Полибелок содержит весьма специфичную протеиназу вируса иммунодефицита человека, отдаленно родственную пепсину, которая узнает характерные последовательности аминокислот в перетяжках и точно разрезает их. Предполагают, что избирательное ингибирование таких протеиназ может быть использовано как один из способов борьбы с вирусной инфекцией.

Разделение доменов

Эта реакция используется, в частности, как необходимый этап в механизме действия ряда белковых токсинов, вырабатываемых микроорганизмами. Так, дифтерийный токсин синтезируется как протоксин, построенный из одной полипептидной Цепи, которая образует по крайней мере два структурно и функционально автономных домена. Один из них ответствен

за связывание токсина с рецептором мембраны атакуемой клетки, второй — представляет собой фермент, катализирующий перенос аденозиндифосфатрибозного фрагмента NAD на фактор элонгации EF, который при этом инактивируется. Комплекс токсин — рецептор, обязанный своим образованием связыванию первого домена с рецептором, после интернализации (втягивания внутрь клетки) оказывается в окруженном мембраной пузырьке — везикуле.

Для того чтобы получить возможность действия на фактор элонгации EF, каталитический домен должен покинуть везикулу, оказаться в цитоплазме. Токсин содержит структуру, позволяющую каталитическому домену проникнуть через мембрану, однако и после этого он еще сохранит связь с "узнающим" доменом. Следовательно, он не сможет покинуть везикулу, пока протеиназа подходящей специфичности не расщепит междоменный участок пептидной цепи. Это высвобождает каталитический домен и позволяет ему сблизиться с фактором EF.

Для того чтобы получить возможность действия на фактор элонгации EF, каталитический домен должен покинуть везикулу, оказаться в цитоплазме. Токсин содержит структуру, позволяющую каталитическому домену проникнуть через мембрану, однако и после этого он еще сохранит связь с "узнающим" доменом. Следовательно, он не сможет покинуть везикулу, пока протеиназа подходящей специфичности не расщепит междоменный участок пептидной цепи. Это высвобождает каталитический домен и позволяет ему сблизиться с фактором EF.

Расщепление пептидной связи между α- и β-субъединицами рецептора инсулина необходимо для активации этого белка. Соединяющий (шарнирный) участок пептидной цепи содержит очень характерную сигнальную последовательность Arg—Lys—Arg—Arg—Xaa, в который связь Arg—Xaa расщепляется специфическим протеолитическим ферментом. Найдены носители аномального гена рецептора инсулина, в котором отмеченная последовательность заменена на Arg—Lys—Arg— —Spr—Xaa. Замена Arg на

Ser делает белок устойчивым к процессирующей протеиназе, домены не разделяются, что приводит к образованию неактивного рецептора. Гомозиготные носители такого мутантного гена страдают диабетом, который не компенсируется инсулином.

Интересно, что аналогично построенная сигнальная последовательность четырех катионных аминокислот определяет протеолитическую активацию гемагглютинина вируса гриппа, а также созревание гликопротеина поверхности вируса иммунодефицита человека.

Активация предшественников ферментов

Многие ферменты, в особенности гидролазы, синтезируются в виде неактивных предшественников — проферментов, или зимогенов. Наиболее изучена активация предшественников панкреатических серино-вых протеиназ —-трипсиногена и химотрипсиногена. В обоих случаях пептидная цепь фермента удлинена с аминного конца на несколько аминокислотных остатков — активациопный пептид, протеолитическое отщепление которого превращает практически неактивный зимоген в активную протеиназу. Так, в трипсиногене

Val—Asp—Asp—Asp—Asp—Lys—Ile—Val—Gly~. - •

Связь, расщепляемая при активации трипсином или лучше энтеропептидазой ..

быка аминоконцевая последовательность имеет такую структуру:

Гидролиз трипсином именно пептидной связи Lys—Ile определяется прежде всего ее доступностью — в молекуле трипсиногена содержится целый ряд пептидных связей, образованных остатками аргинина или лизина и атакуемых трипсином в денатурированном зимогене, однако в нативном белке расщепляется первой именно эта связь. При активации трипсиногена образуется трипсин, способный активировать другие молекулы профермента, так что реакция в целом оказывается аутокаталитцческой и протекает с резким ускорением.

Характерно, что скорость активации, обеспечиваемая трипсином, *in vivo*

все же оказывается недостаточной и активация инициируется специальным протеолитическим ферментом — **энтеропептидазой** (энте-рокиназой), который содержится в секрете двенадцатиперстной кишки и активирует трипсиноген примерно в 1000 раз быстрее трипсина. Столь высокая специфичность энтеропептидазы обусловлена тем, что фермент узнает в трипсиногене предшествующую остатку лизина гроздь из четырех остатков аспарагиновой кислоты. Отщепление активационного пептида от молекулы трипсиногена влечет за собой цепь изменений в пространственной структуре продукта активации. Активация трипсиногена сопровождается как бы фиксацией, более точной организацией около 15% пространственной структуры — соответствующие атомы испытывают значительные колебания в молекуле профермента, но закрепляются в трипсине. Таким образом, расщепление пептидной связи Lys—Ile запускает весьма сложный механизм локальных перестроек, активирующий молекулу. Сходно протекает активация химотрипсиногена, инициируемая также трипсином. Последующее расщепление некоторых связей в активном химотрйпсине другими его молекулами дает целый набор молекулярных форм фермента. Такой же механизм положен в основу активации протеиназ системы свертывания крови, в которых при протеолизе единой полипептидной цепи обнажается а-аминогруппа N-концевого остатка в каталитическом домене активного фермента, что запускает, по-видимому, такую же цепь изменений структуры, активирующую фермент. Разница .состоит в том, что аминоконцевой район профермента, подчас очень крупная структура, сохраняет связь с собственно каталитическим ядром за счет дисульфидных и, вероятно, нековалентных взаимодействий. Это позволяет сообщить протеиназе новые функциональные особенности, например способность к связыванию с липидами мембран через ионы кальция за счет остатков 7-карбоксиглутаминовой кислоты. В предшественниках других протеиваз — пепсиногене и прокар-боксипептидазе — отщепляемый при активации (соответственно, пепсином или трипсином) пептид содержит около 40 аминокислотных остатков и, видимо, играет роль

своеобразного экрана, прикрывающего активный центр фермента. Отщепление этого экрана, которое не требует строго однозначного протеолиза, как в случае рассмотренных выше сериновых протеиназ, и может быть результатом разрыва любой пептидной связи в последовательности, соединяющей активационный пептид с будущим ферментом. Отсюда неоднозначность активации, которая может приводить к смеси активных ферментов, различающихся длиной и аминоконцевыми остатками (так называемые **растрепанные концы**).

Биологический смысл активации проферментов очевиден: она позволяет накопить значительные количества предшественника, чрезвычайно быстро превращаемого в активный фермент в результате всего лишь одной реакции — расщепления единственной пептидной связи. Синтез значительных количеств фермента *de novo* потребовал бы гораздо большего времени, что невыгодно, особенно в процессах пищеварения, В то же время накопление активных протеиназ внутри клетки может оказаться для нее далеко не безобидным. Биосинтез профермента позволяет снять и эту проблему.

Не следует думать, что активация зимогенов характерна лишь для ферментов животных. Обнаружено, что в виде предшественников синтезируются практически все протеиназы бактерий.

Модификация N-конца белка

Трансляция инициируется метионином. После того как длина пептидной цепочки, еще связанной с рибосомой, достигнет примерно 20 аминокислотных остатков, инициирующий метионин может отщепляться специальной амиинопептидазой. (Однако это не обязательно, и примерно у половины цитоплазматических белков животных аминоконцевой метионин сохраняется.) Среди других N-концевых остатков доминируют относительно небольшие — аланин, серии и треонин. По-видимому, это обусловлено особенностями аминопептидазы, предпочтительно отщепляющей N-концевой метионин, если за ним следует аминокислота с небольшой боковой цепью. В тех случаях, когда аминокислота, следующая за концевым метионином, имеет объемистый радикал, метионин не отщепляется, сохраняясь на аминном конце белка. Есть

основания полагать, что природа N-концевой аминокислоты как-то связана с устойчивостью белка к внутриклеточному протеолизу. По-видимому, этим обусловлена и распространенность блокирования аминоконцевого остатка ацетилированием — в общей сложности ацетилирован аминный конец у примерно 50% растворимых белков клеток млекопитающих. В этой реакции, катализируемой ацетилтрансфе-разой, донором ацетильной группы служит ацетил-коэнзим А. Чаще -всего встречаются на N-конце белков эукариот ацетилсерин, ацетил-аланин, ацетил метионин. В то же время известен и фермент, способный отщеплять от N_a-ацетилированных белков ацетиламинокислоту, например ацетил аланин. Существенно, что отмеченные модификации обеспечивают многообразие аминных концов полипептидных цепей, которые в отсутствие таких реакций были бы неизменно представлены метионином. Не исключено, что отщепление N-концевого метионина важно и потому, что делает возможным многократное использование этой инициирующей аминокислоты биосинтез которой весьма не прост.

Белковый сплайсинг

Не так давно в середине 80-х годов уже прошлого века было обнаружено явление белкового сплайсинга, то есть из белковой молекулы автокаталитически вырезались определенные участки белка, этот процесс происходил аналогично сплайсингу РНК, назван был соответственно. По аналогии вырезаемые фрагменты названы интеинами.

Механизм белкового сплайсинга изучен достаточно хорошо. Событием, запускающим белковый сплайсинг, является автокаталитический N–O или N–S-сдвиг (первый аминокислотный остаток на N-конце интеина Ser или Cys, соответственно) на N-концевом сайте сплайсинга (шаг 1). В результате

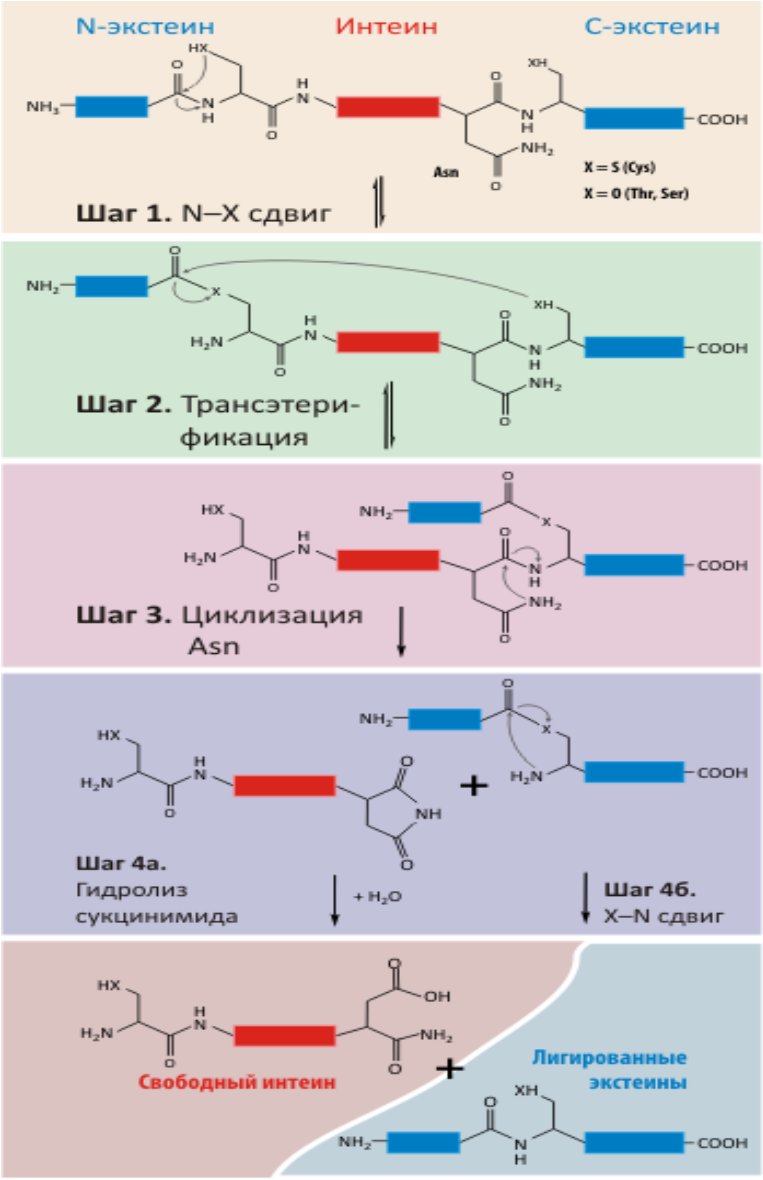


Рисунок 25: Схема реакций белкового сплайсинга

образуется высокореакционная эфирная или тиоэфирная связь. На втором этапе белкового сплайсинга происходит нуклеофильная атака образовавшейся эфирной связи OH- или SH-группой первого остатка С-экстеина. В результате происходит реакция трансэтерификации, т. е. перенос N-концевого экстеина на боковую группу первого остатка С-экстеина (шаг 2). В результате образуется разветвленное промежуточное соединение (те самые белки с двумя N-концами, с помощью изучения которых был и предложен данный механизм сплайсинга). Такая перестановка приводит к смещению зарядов, что в свою очередь, индуцирует циклизацию боковой цепи Asn на С-конце интеина (шаг 3). Последний шаг сплайсинга белка происходит спонтанно

В настоящее время этот процесс открыт у нескольких белков: RecA, Vent-pol. Вырезание происходит в результате трансаминирования. И в настоящее время используется в белковой инженерии, для создания химерных белков. Однако внятных объяснений зачем белковый сплайсинг нужен пока нет.

Посттрансляционные модификации являются частью огромной сети реакций, называемых топогенезом белков. К этому процессу относят укладку белков, их модификацию, а так же распределение и транспорт белков внутри

клетки.

Модификации аминокислот осуществляются параллельно со всеми остальными процессами, относящимися к топогенезу, кроме этого топогенез белка включает процессы сворачивания, транспорта и утилизации белков. В зависимости от типа белков путь топогенеза может различаться, существует несколько путей топогенеза белков, которые необходимо рассмотреть более подробно.

Топогенез белков

Несмотря на все многообразие процессов, входящих в топогенез белков, начало этих метаболических путей практически одинаково. Почти все белки синтезируются на рибосомах, расположенных в цитозоле. Белки, принадлежащие первой транспортной ветви, после завершения их синтеза выделяются в цитозоль. Некоторые из них содержат сигналы сортировки, направляющие их из цитозоля в митохондрии или ядро, другие же - их большинство - не имеют специфических сигналов сортировки и остаются в цитозоле в качестве постоянных компонентов.

Второй путь транспорта используется для направления белков в ЭР для выведения белков из клетки, а также белков, направляемых в аппарат Гольджи , к плазматической мембране или в лизосомы . Все эти белки по мере их образования переносятся в ЭР при помощи сигналов сортировки , расположенных обычно на N-конце. Рибосомы, на которых собираются такие белки, остаются связанные с мембраной ЭР в течение недолгого времени после начала синтеза полипептидной цепи. Как только очередной участок полипептидной цепи синтезируется, он проникает через липидный бислой этой мембраны, затем одни белки попадают в просвет ЭР, другие остаются частично заключенными в мембрану в качестве трансмембранных белков.

Обычно проходит не больше одной или двух минут с момента высвобождения белка в цитозоль до поступления его в соответствующую органеллу. Белки, предназначенные для ядра, или митохондрий, достигнув этих органелл, на этом заканчивают свой путь, между тем белки, попадающие в ЭР,

вовлекаются в дальнейший транспорт, который, как полагают, происходит с помощью транспортных пузырьков, отделяющихся от одной мембраны и сливающихся с другой. По-видимому, для достижения конечного пункта должно произойти несколько таких циклов, и путь от мембраны ЭР до места назначения может занять один час.

Топогенез цитозольных белков

Транслокация перемещает аминокислотный остаток предыдущий остаток С-конца из пептидилтрансферазного центра рибосомы. Последующие дополнения новых аминокислотных остатков в С-концу перемещают часть N-конца растущей полипептидной цепи дальше и дальше от пептидилтрансферазного центра. Согласно популярной “рибосомной туннельной модели ”, полипептидная цепная секция, которая имеет длину приблизительно 30 - 40 остатков, начинающихся с пептидилтрансферазного центра (то есть с растущего конца карбоксильной группы), все еще прикрывается рибосомой в предполагаемом внутри рибосомном туннеле и не выставлена во внешней среде. Если дело обстоит так, самой предпочтительной конформацией рождающегося полипептида в рибосоме, кажется α- спираль так как:

1. это - конформация, настроенная в РТЦ, который будет стабилизирован по некоторому интервалу связыванием С-конца;
2. это будет далее стабилизировано в пределах ограниченного места, имеющего размер, сопоставимый размеру статистического сегмента полипептидной цепи;
3. твердая конформация, которая требуется чтобы вытолкнуть растущий пептид через рибосому;
4. α - спираль наиболее насыщена влагой с водородными связями и следовательно наименее "липкая" структура полипептида, которая является также важным для прохода через предполагаемый туннель или канал;
5. α - спиральная конформация может быть универсально принята любой последовательностью аминокислот.

Наличие внутририбосомного туннеля подтверждается тем фактом что 30-40 С-концевых остатков аминокислот в растущей цепи защищены от действия протеаз. Но показать наличие туннеля пока не удается, хотя предположительная длинна туннеля составляет 50 ангстрем. Однако, следует упомянуть, что два других фермента бактериальная деформилаза и аминопептидаза млекопитающих – способны воздействовать на рождающуюся полипептидную цепь в точке, удаленной только 15 - 20 остатками аминокислоты от пептидилтрансферазного центра. Эти наблюдения указывают, что предполагаемый внутририбосомный туннель для растущего пептида, если это существует, должен быть намного короче, чем принято из других данных. Другая интерпретация экспериментальных данных относительно защиты рождающегося пептида рибосомами: рождающийся полипептид идет с пептидилтрансферазного центра в канал или канавку на поверхности рибосомы, а не в внутририбосомный туннель. В таком случае, различные точки полипептидной цепи на поверхности рибосомы могут быть доступны для ферментов. Открытие цитозольного “связанного с растущим пептидом комплекса”, или NAC-белка способного к присоединению к С-концевому участку связанного рибосомой растущего пептида, позволил предложить альтернативную интерпретацию процитированных выше результатов: никакой внутририбосомный туннель для растущего пептида не существует, и это - NAC, закрывая растущую цепь, позволяет думать о существовании предполагаемого рибосомного туннеля. Согласно недавно разработанной модели, растущая полипептидная цепь выходит из рибосомы сразу из пептидилтрансферазного центра, но тут же захватывается и экранируется специальными растворимыми белками, в частности NAC. В эукариотической клетке комплекс белков NAC состоит из двух полипептидов α (33 kDa), и β (21 kDa). NAC связывается с несущей пептид рибосомой и экранирует фрагмент растущего полипептида длиной до 30 - 40 остатков аминокислот, защищая от взаимодействий с окружающими макромолекулами. Структура связанной с NAC полипептидной цепи не известна, не исключено, что это α – спираль.

Недавние исследования котрансляционного сворачивания белка показали, что сворачивание в третичную структуру может вовлечь и С-концевую часть возникающего пептида, включая остатки аминокислот, смежные с пептидилтрансферазным центром. Эти результаты также противоречат концепции внутририбосомного туннеля для возникающего пептида.

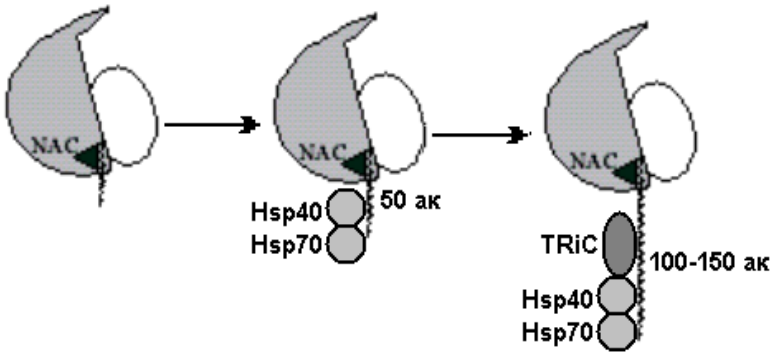


Рисунок 26: Схема сворачивания цитозольных белков

Соответственно начальные этапы сворачивания белка связаны с несколькими факторами. Сначала, если рибосома создает и поддерживает некоторую универсальную структуру нарастающего пептида, например α - спираль, следовательно, сворачивание белка может начаться не со случайного состояния цепи, а от конкретной стартовой структуры. Далее, поиск пути правильного сворачивания начинается не беспорядочно от какого-либо участка цепи, а последовательно с N-концевого участка нарастающей цепи. Кроме того, в ходе сворачивания, С-конец полипептида закреплен в рибосоме, и его подвижность ограничена, соответственно образуются стабильные промежуточные продукты, отличающиеся от конечной формы свободной цепи. Кроме того, на сворачивание влияют условия среды, типа ионного состава, полярности, ионной силы, а также связывание специальных факторов, включая шапероны.

Шапероны котрансляционного сворачивания

Важную роль в котранляционном сворачивании полипептида могут играть цитозольные шапероны. Есть свидетельство, что в эукариотических клектах растущие цепи, связанные с рибосомой, могут связываться с двумя белками, Hsp70 и Hsp40. Эти белки называют шаперонами, и они служат для предотвращения «слипания» полипептидов и обеспечения их правильной

конформации, Второй участник, гарантирующий сворачивание нарастающих цепей полипептида, - это большой гетеромерный комплекс (TRiC). В клетках *Escherichia coli* выявлены соответствующие аналоги - DnaK/DnaJ пара и олигомер GroEL, соответственно. Показано, что растущая цепь полипептида связывается первоначально с Hsp70 в сотрудничестве с Hsp40. Закрепление происходит на участке нарастающей цепи длинной приблизительно 50 остатков аминокислот не связанном с белковым комплексом NAC. После дополнительных 100-150 шагов удлинения цепь полипептида может быть далее захвачена TRiC олигомером. Комплекс Hsp70/Hsp40/TRiC обеспечивает укладку всей нарастающей полипептидной цепи до окончания синтеза. Эта модель позволяет предположить, что новосинтезированные цепи могут подвергнуться сворачиванию заново. Минимальная область полипептида котрансляционно закрытая включает приблизительно 100 остатков аминокислот или несколько меньше. Взаимодействие возникающей полипептидной цепи с Hsp70/Hsp40 (DnaK/DnaJ) и TRiC (GroEL) – это АТР-зависимый процесс.

Однако, эта модель используется только для белков, синтезируемых в цитозоле на так называемых свободных полирибосомах, то есть не связаных ни с какой внутриклеточной мембраной.

Однако многие белки не остаются в цитозоле, а поступают в другие органеллы клетки, для того чтобы белки проникали в те компартменты клетки, где им положено располагаться существуют специальные сигналы.

Полагают, что на белках существуют два вида сигналов сортировки, направляющие их, шаг за шагом, вдоль разветвляющихся путей. Для некоторых стадий сигналы сортировки представляют собой протяженный участок аминокислотной последовательности длиной 15-60 остатков. Когда эта стадия пройдена, такой сигнальный пептид отрезается. Сигналом сортировки для других стадий, вероятно, служит определенная трехмерная структура, образуемая атомами поверхности белка при свертывании его молекулы. Аминокислотные остатки, формирующие такие сигнальные участки, могут быть расположены очень далеко друг от друга в линейной последовательности

белка.

Сигнальные пептиды направляют белки из цитозоля в эндоплазматический ретикулум, митохондрии, хлоропласты и ядро; они также отвечают за то, чтобы некоторые белки остались в эндоплазматическом ретикулуме. Сигнальные участки, видимо, играют важную роль при распознавании определенных лизосомных белков специальным ферментом в аппарате Гольджи. Чтобы выяснить пункт назначения того или иного белка внутри клетки, необходимо определить тип его сигнального пептида. Белки, которые должны попасть в эндоплазматический ретикулум, обычно несут N-концевой сигнальный пептид. Его центральная часть образована 5-10 гидрофобными аминокислотными остатками. Большинство этих белков направляется из ЭР в аппарат Гольджи; те же, которые имеют на С-конце специфическую последовательность из четырех аминокислот, остаются в качестве постоянных компонентов. Многие белки, предназначенные для митохондрий, имеют сигнальные пептиды, в которых положительно заряженные аминокислотные остатки чередуются с гидрофобными. Среди белков, направляющихся в ядро, большинство имеет сигнальные пептиды, в которых положительно заряженные аминокислотные остатки чередуются с гидрофобными. Среди белков, направляющихся в ядро, большинство имеет сигнальные пептиды, образованные кластером положительно заряженных аминокислотных остатков. Наконец, некоторым белкам цитозоля присущи сигнальные пептиды, с которыми ковалентно связывается жирная кислота, направляющая эти белки к мембранам без проникновения в эндоплазматический ретикулум.

Существует два различных пути, по которым белки перемещаются из одного компартмента в другой.

Во-первых, они могут непосредственно проникать через мембрану, попадая из пространства, топологически эквивалентного цитозолю, в пространство, топологически эквивалентное внеклеточному, или наоборот.

Второй путь передвижения белковых молекул опосредован

транспортными пузырьками. Эти пузырьки захватывают определенные молекулы в полости одного компартмента и переносят их в другой компартмент, сливаясь с ним. Именно так происходит перенос растворимых белков из эндоплазматического ретикулума к аппарату Гольджи. При таком везикулярном транспорте белки не пересекают никаких мембран, поэтому они переносятся только между компартментами, топологически эквивалентными друг другу.

Оба типа транспортных процессов избирательно контролируются с помощью специальных белков, выполняющих роль сигналов сортировки. Некоторые сигналы сортировки в составе белков известны, тогда как большинство комплементарных им мембранных рецепторов - нет. Кроме того, мы мало знаем о транспортных пузырьках. Можно предположить только, что их существует множество видов, в соответствии с различными переносами, которые они должны осуществлять. Чтобы выполнять свои функции, каждый пузырек должен захватывать только определенные белки и сливаться только с определенной мембраной-мишенью.

Как классический пример первого варианта транспорта можно рассмотреть импорт белков в митохондрии.

Импорт белков в митохондрии

Как полагают, митохондрии содержат приблизительно 1000-2000 белков, в зависимости от ткани. Все они кроме малого числа митохондриальных белков (13 у человека) кодируются в ядре, синтезируются на цитозольных рибосомах и поэтому должен быть импортирован в эту органеллу. Этот процесс представляет диапазон отличных проблем. Во-первых, митохондрия растет за счет белков, синтезируемых как внутри так и снаружи органеллы. Это предполагает, наличие процесса, который координирует регулирование митохондриального и ядерного зашифровывания генов митохондриальные белки и/или комплексы, через которые белки импортируются. Кроме того, должен быть механизм, который регулирует абсолютное количество митохондриальных белков в пределах каждой ткани. Во-вторых, существует по крайней мере четыре подкомпартмента: внешняя мембрана, внутренняя

мембрана, межмембранное пространство и матрикс. Кроме того, есть теперь признаки, что мембрана крист и пространство между ними образуют дополнительные подкомпартнеты. Это требует существования механизма, который позволяет белкам не только достигнуть митохондрии, но и попасть в определенный компартмент. В-третьих, основная функция митохондрий поставлять большую часть АТР клетке. Так как механизм синтеза АТР зависит от протонного градиента поперек внутренней мембраны, проходимость этой мембраны должна быть сильно ограничена. Таким образом, митохондрия имеет в месте большое количество внутренних мембранных белков для транспорта всех метаболитов. Это большое количество транспортеров, наряду с компонентами комплекса окислительного фосфорилирования, означает, что внутренняя мембрана - одна из наиболее плотно упакованных мембран клетки. Точно так же и матрикс имеет чрезвычайно высокую концентрацию белка, приближаясь к 500 мг/мл. Можно предполагать, что этот компартмент имеет высоко организованную молекулярную архитектуру.

Митохондриальные сигналы импорта

Митохондриальные белки синтезируются в цитозоле как предбелки с сигнальными последовательностями, которые позволяют их начальное опознание митохондриальными поверхностными рецепторами и их последующий вход через транслоказу внешней мембраны (ТОМ) и одну из двух транслоказ внутренней мембраны (ТИМ). Сигналы импорта для всех белков, локализованных во внутренней мембране, содержат отдельные трансмембранные сиганалы, тогда как белки матрикса и некоторые IMS белки содержат типичные N-концевые сигналы, длина которых приблизительно из 15-40 аминокислот, богатые основными и гидроксилированными аминокислотами, которые имеют способность формировать амфифильную α-спираль. Однако, приблизительно 30 % митохондриальных белков не содержат таких сигналов, и вместо этого информация о импорте располагаетя в пределах их зрелых полипептидов. Такие белки включают транспортеры метаболитов внутренних мембран, множество локализованных в межмембранном пространстве

предбелков, а также как все митохондриальные белки внешней мембраны. Направляющие сигналы для этих белков, похоже, отличаются от белка к белку, хотя некоторые тенденций все же соблюдаются. Например, многие отдельные трансмембранные белки внешней мембраны содержат сигналы импорта в участке смежном с трансмембранной областью, и иногда входящем в нее. Обычно эти области, прилегающие к трансмембранному домену содержат одну или более основных аминокислот, и это является критическим для правильного фолдинга и направления белка. Однако, по некоторыми данным, мембранные белки и внутренней и внешней мембраны, похоже, содержат более сложные сигналы импорта, в частности они содержат многократно повторенные сигналы.

Поставка предбелков к митохондриальной поверхности

Митохондриальная внешняя мембрана содержит многосубъединичный комплекс белков (TOM), содержащий рецептор для опознания предбелков, синтезируемых в цитозоле, и компоненты канала для перемещения предбелка. Амфифильный N-концевой сигнал распознается рецептором Tom20, который осуществляет физический контакт с гидрофобным участком последовательности сигнала. Основной участок сигнального пептида растворим и возможно вступает в контакт с компонент «крышки» комплекса TOM. Еще один потенциальный кандидат на эту функцию белок Tom22. Это рецептор, который имеет цитозольную область, богатую кислыми остатками. Учитывая, что взаимодействие между Tom20 и предбелками - в значительной степени гидрофобное, вероятно что распознавание предбелков с внутренними сигналами импорта происходит через Tom20. Однако, существует свидетельство, что множество пребелков содержащих внутренние сигналы попадают в митохондрию через предварительное взаимодействие с рецептором Tom70, в частности так транспортируются переносчики метаболитов внутренней митохондриальной мембраны. Эти гидрофобные предбелки могут устойчиво свяываться с множественными димерами Tom70 в отсутствии АТФ перед перемещением к другим компонентам комплекса TOM. Tom70 может действовать также как молекулярный шаперон, предотвращающий скопление

предбелков и неправильную вставку во внешнюю мембрану гидрофобных предбелков, предназначенных для внутренней мембраны. Tom70 не содержит мотивы для связывания нуклеотидов, что предполагает, что цитозольные шапероны могут также взаимодействовать и с предбелком и рецептором. Предполагается, что цитозольные шапероны или помогают в предбелку направляться в митохондрию, или поддерживают предбелки компетентном к импорту состоянии. В частности Hsp70 (Hsc70) вовлекается в процесс импорте пребелка через комплекс TOM. Дополнительно для повышения компетентности импорта процесс вовлекаются кошапероны такие как: dj2, dj3 и две изоформы DnaJ.По мимо шаперонов в направление предбелков к митохондрии вовлечены дополнительные белки - например: "фактор направления" (белок весом 28 kDa, связывающий N-концевой сигнальный пептид), "предпоследовательность связывающий фактор", и "митохондриальный импорт стимулирующий фактор" или MSF (гетеродимер весом 66 kDa, выделенный из печени крысы) MSF, кажется, не имеет никакого функционального гомолога у низших эукариот.

Перемещение пребелка через внешнюю митохондриальную мембрану

Комплекс TOM, в дополнение к интегральным мембранным рецепторам Tom20 и Tom70, содержит несколько других субъединиц, которые устроены в сильно связанный комплекс, названый «пора общего импорта» (GIP) В грибах, компоненты GIP - Tom40, Tom22 и три маленьких белка; Tom5, Tom6 и Tom7. В последние годы, большинство основных компонентов системы были также идентифицированы у млекопитающих: Tom20, Tom22, Tom70, Tom40 и Tom7и т. д.. Дрожжевые GIP комплексы в нативном ПААГ имеют вес ~400 kDa, тогда как у млекопитающих этот комплекс ~380 kDa и содержит по крайней мере Tom40, Tom22 и Tom7. Кроме того иднтифицированы другие ассоциированные с комплексом белки, но функции этих белков вспомогательные и недоказанные.

Предполагается что перенос белка через комплекс TOM происходит следующим образом. После начального распознания периферийными рецепторами (Tom20 или Tom70), предбелки передают к Tom22, а затем на центральный компонент поры – Tom40. Tom22 отличается от других рецепторов, тем, что это интегральный белок имеющий фрагменты обращенные как в цитозоль так и в межмембранное пространство, при чем обе области богаты остатками «кислых» аминокислот. Это привело к модели, где основная последовательность сигнала предбелков, взаимодействующих с Tom20 передается к кислой области рецептора Tom22 и затем, после перемещения через Tom40 поры, к кислой межмембранной области. Эта "гипотеза кислотной цепи" была позже изменена, в соответствии с наблюдением, что область Tom22 не существенна для импорта белка, кроме того Tom22 млекопитающих имеет слабо кислую межмембранную область. В настоящее время предполагают, что предбелки могут следовать по пути увеличивающейся аффинности к структурным особенностям пребелка, а не его «кислым» регионам. Кроме рецепторной функции, Tom22 также играет

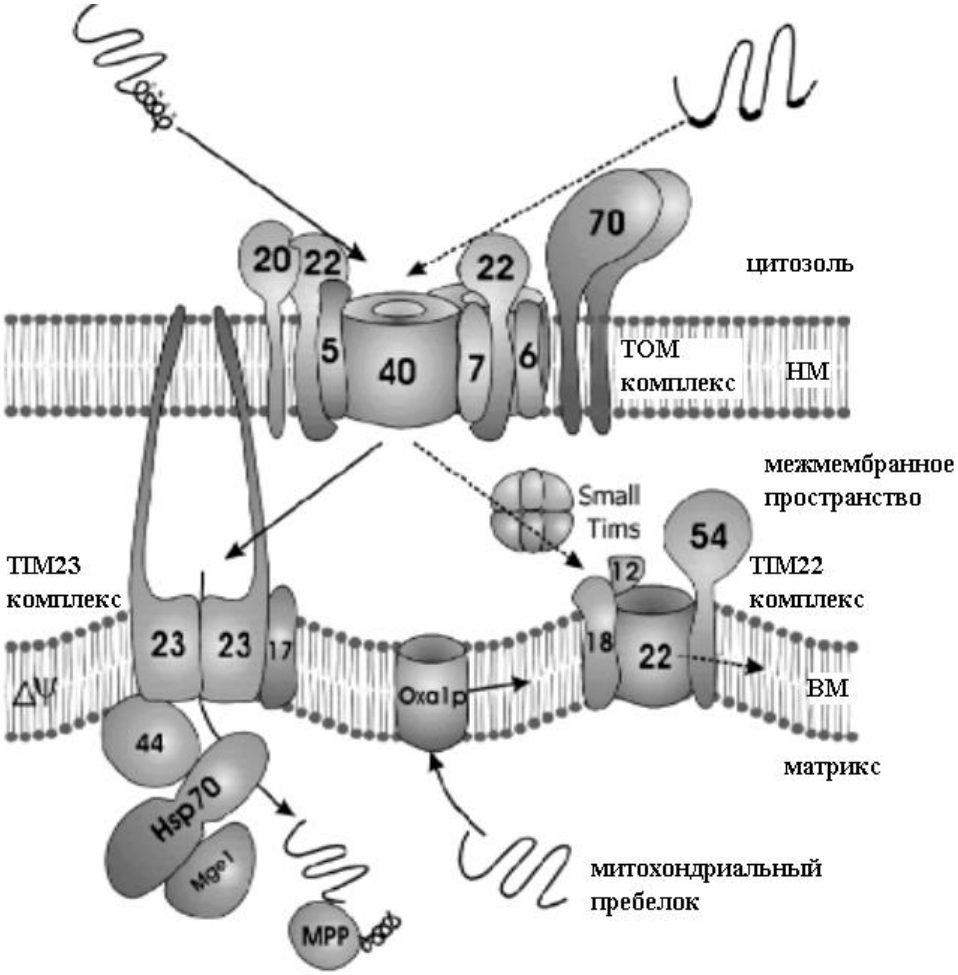


Рисунок 27: Схема организации комплексов импорта белков в митохондрии

критическую роль как "организатор" комплекса. Таким образом, в дрожжах Tom22 регулирует открытие канала по достижению предбелка. Недавно, Джонстон *и другие.* (2002) продемонстрировали аналогичный процесс в клетках млекопитающих. Tom40 - канал-формирующая единица комплекса, позволяющая перемещение пребелка через мембрану. Как предполагают, димер Tom40 формирует мембранный канал за счет формировании β-слоя, подобно другим мембранным порам, таким как порин. Однако, в отличие от порина, Tom40 формирует катион- проводящий канал с размером поры ~22 Å. Эта пора не является достаточно большой, чтобы облегчить проход больших, свернутых областей предбелков и подтверждает более ранние наблюдения, что предбелки требуют в значительной степени развернутого состояния для прохода через пору. Полагают, что расположенный в матриксе Hsp70 обеспечивает энергию для разворачивания предбелков в ходе импорта белка. Это в свою очередь, требует того, чтобы импорт происходил на участках контакта, где внутренняя и внешняя мембрана входят в близкую ассоциацию, чтобы позволить полипептиду охватить обе мембраны. Белки TOM с малой молекулярной массой возможно необходимы для взаимодействия рецепторных и канальных белков в комплексе TOM .

Альтернативные, пути сортировки после перемещения через внешнюю мембрану

После перемещения предбелков, предназначенных для внутренней мембраны и матрикса, через комплекс TOM, белки поступают к одному из двух отдельных аппаратов ТИМ. Предбелки с N-концевым сигналом поступают в матрикс через TIM23 комплекс, в то время как для предбелки с внутренними сигналами импорта поступают через TIM22 комплекс. Оба пути сортировки требуют наличия мембранного потенциала. Мембранный потенциал обеспечивает отрицательная заряд на внутренней мембране со стороны матрикса и положительный заряд на межмембранной поверхности. Это обеспечивает электрофоретический градиент чтобы провести положительно заряженный пептид сигнала через канал Tim23. Однако, учитывая, что те

предбелки, которые используют TIM22 комплекс, кажется, не перемещаются через внутреннюю мембрану (и не содержат положительно заряженных сигналов направления) все же требуют мембранного потенциала, это позволяет, предположить, что мембранный потенциал может быть важен для других функций каналов ТИМ.

TIM23 комплекс: транслоказа общего пути импорта

TIM23 транслоказа состоит из комплекса, содержащего несколько белков, включая Tim23, Tim17 и Tim44. Tim23 основной белок комплекса транслоказы, С-концевая область Tim23 формирует гидрофильный, ~13-24 Å катион-селективный канал, который активизируется мембранным потенциалом и сигнальными последовательностями. Тогда как N-конец Tim23 пронизывает внешнюю мембрану митоходрии, объединяя обе мембраны. После переноса через канал TIM23 сигнальная последовательность попадает в матрикс где связывается с Tim44, белком, который присоединяет две АТФ-азы матрикса Hsp70 и Mge1(соответственный к бактериальному GrpE), весь комплекс обеспечивает ATP- зависимый перенос белка.

TIM22 комплекс: транслоказа для вставки полиморфных внутренние мембранные белки

Tim22 комплекс обеспечивает перенос интегральных белков внутренней мембраны митохондрии, в частности белков переносчиков метаболитов. Основным белком комплекса является белок Tim22, интегральный белок подобный Тим23, молекулярный вес которого составляет 22 kDa. Сам комплекс имеет вес ~300 kDa и включает по мимо Tim22 белки Tim54, Tim18 и Tim12. Кроме собственно белков комплекса транслоказы к TIM22 также относят группу растворимых маленьких белков межмембранного пространства. Семейство состоит из пяти членов, Tim 8, Tim9, Tim10, Tim12 и Tim13, эти белки обеспечивают растворимость и следовательно перенос пре-белка к транслоказе. Эти белки подобно шаперонам маскируют гидрофобные области транспортируемых белков, предотвращая их агрегацию в водной фазе

межмембранного пространства. Рецептором агрегата пребелок/растворимые Tim белки является Tim12. Точный механизм переноса пока не известен.

Вход пре-белка в матрикс: модификации и фолдинг

После перемещения предбелков в матрикс, N-концевые, направляющие сигналы – протеолитически, удаляются пептидазой матрикса. После того как предбелки импортированы в митохондрию в развернутом состоянии, они должны быть впоследствии свернуты. Набор шаперонов, включая матриксный Hsp70 и его кофакторы и Hsp60/Hsp10 шаперонины исполняют такую функцию.

Следующий тип переноса белков через мембрану – котрансляционный транспорт белков в эндоплазматический ретикулум. С этого типа переноса начинается путь огромного количества белков.

Транспорт белков в эндоплазматический ретикулум

Как и во всех других случаях транспорта белков в данном случае также необходима сигальная полипептидная последовательность, которая направляет секреторный белок к мембране эндоплазматического ретикулума (ЭР) и затем отрезается специальной протеазой на мембране ЭР еще до того, как полипептидная цепь будет синтезирована полностью.

Транспорт белка к мембране ЭР

В направлении сигнального пептида к мембране ЭР участвуют SRP - частица, распознающая сигнал (a signal-recognition particle) и ее рецептор, известный также как стыкующий белок .

Частица, распознающая сигнал, связывается с сигнальным пептидом, как только он "сходит" с рибосомы. Это приводит к временной остановке синтеза белка. Возникшая пауза в трансляции, вероятно, дает возможность рибосоме связаться с мембраной ЭР до того, как синтез полипептидной цепи будет завершен. Благодаря этому ненужного высвобождения белка в цитозоль не происходит.

Пауза в трансляции длится до тех пор, пока захватившая рибосому частица не свяжется с SRP рецептором на мембране ЭПР. Рецептор состоит из двух субъединиц, одна из которых связывает SRP и имеет участок связывания

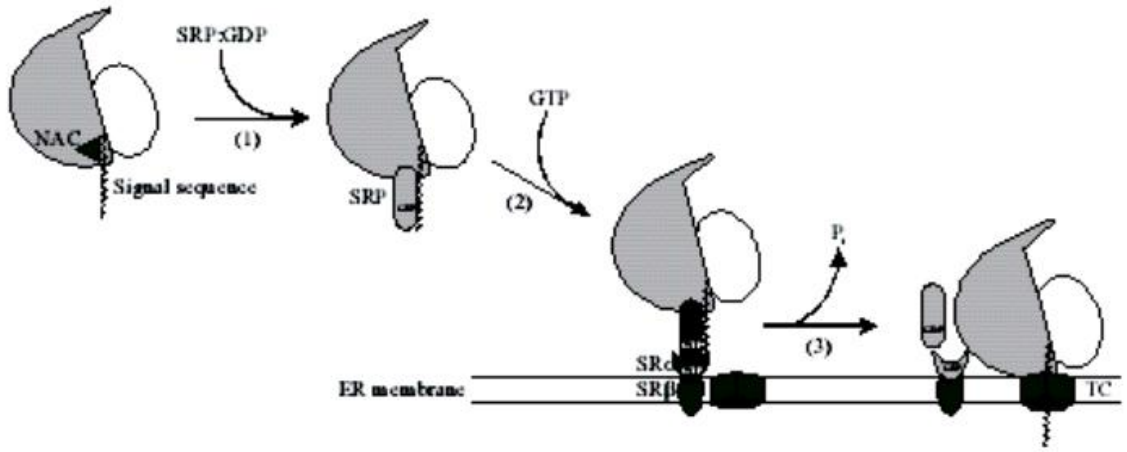


Рисунок 28: Схема импорта белков через мембрану гранулярного эндоплазматического ретикулума

GTP, вторая трансмембранный белок, закрепляющий эту конструкцию на мембране. Регуляция соединения рецептора с SRP осуществляется за счет GTP схема на рисунке. Идея относительно канала транслокации, или туннеля, в мембране эндоплазматической сети, через которую растущая полипептидная цепь котрансляционно переносится через мембрану, была прямым выводом из гипотезы существования пептидного сигнала. У млекопитающих, доминирующий компонент канала транслокации Sec61p составлен из субъединиц α (40 kDa), β (14 kDa) и γ (8 kDa). Фактически, протеолипосомы, которые включают этот комплекс и SR как, единственные белковые компоненты способны исполнять роль SRP-зависимую транслокацию растущих полипептидных цепей. Импортированные цепи становятся устойчивыми к экзогенным протеазам и могут даже быть обработаны, если протеолипосомы содержат пептидазу сигнала в дополнение к Sec61p комплексу и SR. Однако, некоторые белковые предшественники нуждаются в еще одном белковом компоненте, который будет перемещен через двойной слой липида - так называемый белок ассоциированный с транслоцируемой цепью, это вероятно помогает в надлежащем расположении последовательности сигнала в канале.

Млекопитающий Sec61 α является трансмембранным белком; как может быть предсказан от его последовательности аминокислоты с чередованием гидрофобных и гидрофильных отрезков, его полипептидная цепь охватывает мембрану 10 раз. Примечательно, который гидрофобный, возможно трансмембранные отрезки этого белка содержат до 30 % гидрофильных, полярных и наполненных остатков, который делает их потенциально способными к принятию амфифильной конформации при некоторых условиях. Аналогичные комплексы выделены из дрожжей и бактерий. После присоедиенения комплекса к транслокону и входа N-конца пептидной цепи в канал происходит диссоциация SRP и ее рецептора после этого события рибосома взаимодействует с транслоконом 60S субъединицей, дополнительное присоединение обеспечивает нарастающая цепь. В канале растущая полипептидная цепь развернута и не имеет вторичной структуры, у млекопитающих проталкивание происходит за счет роста цепи, у дрожжей есть дополнительные белки Kar2p or Lhs1p, АТФ-азы облегчающие транслокацию. После того как белок высвобождается в полость ЭР, транспорт белков осуществляется внутри мембранных пузырьков (везикул), соответственно такой тип транспорта получил название везикулярного или мембранного.

Везикулярный транспорт

Везикулярный транспорт осуществляется между гранулярным эндоплязматическим ретикуломом и комплексом Гольджи, между комплексом Гольджи и цитоплазматической мембраной, а также между циоплзматической мембраной и лизосомати.

Выделяют конститутивный(постоянный) и регулируемый типы транспорта. По направлению выделяют **ретроградный транспорт** – возвращение рецепторных белков и липидов из аппарата Гольджи (АГ) в ЭР - восполнение мембраны ЭР и **антероградный транспорт** – растворимые грузовые белки двигаются по секреторному пути ЭР→ пузырек цис-Гольджи→пузырек транс-Гольджи → пузырек, органелла или секреция

Существует три типа транспортных везикул клатриновые, COPI, COPII.

Различаются эти везикулы по белкам покрывающим пузырек.

COP-I везикулы

COP-I или коатомер - белковый комплекс из 8-и субъединиц, также в коатомерном комплексе есть небольшой GTP-сиязывающий белок, называемый также (фактором рибозилировамия адепозиидифосфата (ADP ribosylation factor, ARF). Генетическое исследование дрожжевых клеток подтвердило, что мутации, инактивирующие субъединицы коатомеров или изоформы ARF, блокируют также внутриклеточный везикулярный транспорт и секрецию. Таким образом была установлена роль пузырьков COP-I в процессе внутриклеточного транспорта. Дополнительные доказательства были получены, когда в клетки млекопитающих вводили антитела, направленные против одной из субъединиц коатомера, β-COP, что подавляло транспорт от ЭР к комплексу Гольджи. При генетическом исследовании дрожжевых клеток было также показано, что COP-I, скорое всего, участвует в обратном транспорте мембранных компонентов из комплекса Гольджи к ЭР, а не в антероградном транспорте.

Рисунок 29: Схема везикулярного транспорта

COP-II везикулы

Второй белок каймы, состоящий из пяти субъединиц, был биохимически и генетически охарактеризован в дрожжевых клетках. Этот белковый комплекс, называемый COP-II, участвует в антероградном транспорте и опосредует перенос пузырьков от ЭР к комплексу Гольджи. В клетках млекопитающих были обнаружены эквивалентные субъединицы COP-П, которые перекрестно связываются с антителами, полученными против дрожжевых белков. В соответствии с их предполагаемой ролью в антероградном везикулярном транспорте, эти белки концентрируются в промежуточных элементах ЭР

ацинарных клеток поджелудочной железы и β-клеток островков Лангерганса. Промежуточные элементы, впервые описанные Palade (1975), происходят из свободных рибосом ЭР и содержат транспортные белки, направляющиеся в комплекс Гольджи.

Рециркуляция пузырьков

На основании биохимических характеристик, касающихся COP-I, COP-II и их взаимодействий с мембранами, была сформулирована простая модель поведения COP в процессе везикулярного транспорта. Считается, что основные грузовые белки, растворенные или связанные с мембраной, транспортируются в антероградном направлении с помощью пузырьков, окаймленных COP-П. С другой стороны, предполагается, что некоторые белки и липиды возвращаются из цис-Голъджи к ЭР. Среди этих ретроградно-транспортируемых белков есть рецепторные молекулы, ответственные за связывание растворимых белков ЭР.

Молекулярные переключатели

В клетке есть несколько видов молекул, играющих главную роль в активации каскада биохимических реакции. Они называются молекулярными переключателями. Биохимически «переключатель» представляет собой гидролитический фермент, отщепляющий терминальный фосфат от гуанин- или аденозинтрифосфата (GTP или ATP). В основном, переключатели работают с гуаниновыми нуклеотидами. В выключенном состоянии связанный нук-леотид находится в форме дифосфата (GDP). При замене GDP на GTP (с помощью другого белка), конформация белка-переключателя изменяется, он связывается с молекулой-мишенью и активирует ее. Вскоре после того как молекула во включенном состоянии активирует свою мишень, гидролитическая часть белка отщепляет терминальный фосфат от связанного нуклеотидтри-фосфата, и белок возвращается в GDP-связанное состояние, то есть выключается. В дальнейшем мы обсудим некоторые разновидности этого механизма.

ARF — это белок с молекулярной массой приблизительно 20 кДа, миристолированный на N-конце. Присутствие миристинового жирнокислотного остатка усиливает взаимодействие ARF с мембраной. При замене GTP на

гуанозиндифосфат (GDP), комплекс GTP-ARF связывается с мембранами. Это происходит благодаря конформационным изменениям, которые приводят к связыванию N-концевого домена с мембраной-мишенью путем его внедрения в липидный бислой мембраны. Активированная форма ARF, или его дрожжевого эквивалента Sarlp, затем присоединяет COP-I или COP-П к мембране.

В отличие от мембраносвязанного ARF-GTP, комплекс ARF-GDP находится в цптозолс и не может присоединять COP к мембранам. Была выдвинута гипотеза о том, что ARI-CIT облегчает присоединение везикулярной каймы и что при гидролизе GTP, ARF-GDP отделяется от мембраны, приводя к разборке окаймляющего комплекса.

Не совсем понятно, каким образом ARF присоединяет COP-I к мембранам. Раньше считалось, что ARF присутствует в стехиометрических количествах с коатомером. Однако сейчас предполагается, что ARF может активировать присутствующий в комплексе Гольджи фермент, который модифицирует липиды — фосфолипазу D. Следовательно, присоединять коатомерные субъединицы к мембране аппарата Гольджи может продукт фосфолипазы D, фосфатидная кислота, а не ARF. Необходимо дальнейшее исследование роли ARF в процессе присоединения каймы.

Для слияния пузырьков необходимы еще две группы белка SNARE – белки, которые отвечают за слияние донорной и акцепторной мембран, их более 20 видов, каждыйрасполагается на специфич поверхности мембраны, SNARE – это трансмембранные белки. Различают v-SNAR - на поверхности везикулы, t-SNAR – на поверхности донорной мембраны. Взаимодействуя v- и t-SNAR образуют в транс-SNAR-комплекс, обеспечивающий слияние мембран. SNF-белок – цитозольный шаперон разрушает транс-SNAR-комплексы, используя адаптирующие белки для связывания с комплексом-SNAR.

Пузырьки, покрытые клатрином

Интересно, что механизм образования окаймленных пузырьков изначально формировался не для секреции, а для эндоцитоза. Известно, что поглощение лиганд-рецепторных комплексов с поверхности плазматической

мембраны происходит путем образования окаймленных ямок, которые затем превращаются в окаймленные пузырьки. Эти специфические белковые комплексы строятся из белка клатрина. Клатрин формирует корзиноподобную клетку, в которую втягивается мембранный бислой. Инвагинация мембраны также концентрирует вещества, расположенные на поверхностных липидах и белках. В случае плазматической мембраны внеклеточные вещества связываются с поверхностью формирующегося пузырька. Вещества из полости комплекса Гольджи, наоборот, втягиваются в пузырек, формируемый на внутриклеточной мембране.

Пузырьки, покрытые клатрином, участвуют в движении веществ от плазматической мембраны к эндосомам и от комплекса Гольджи к плазматической мембране.

Компоненты клатриновой оболочки

Клатрин представляет собой гексамер, состоящий из трех крупных и трех менее крупных полипептидов. При использовании оттеняющей методики электронной микроскопии было показано, что эта гексамерная структура, названная трискелионом, образует клеткоподобную структуру, которая соединяется с пятью или шестью другими клатриновыми единицами.

Структура может иметь и пентагональную, и гексагональную конфигурацию. Неясно, что инициирует образование клатриновой корзины. Электронномикроскопический анализ плазматической мембраны клеток, в которых идет процесс эндоцитоза, позволил выявить участки мембранного утолщения там, где клатрин образует клеткоподобную структуру. Инвагинация мембраны в клетку формирует мембранную ямку. Продолжающееся группирование молекул клатрина заканчивается отщеплением от плазматической мембраны полностью окаймленного пузырька. Как только пузырек отщепляется, клатриновая корзина незамедлительно разрушается, расходуя при этом энергию АТР. Было показано, что связывание с ионами Са также играет роль в процессе разрушения. При формировании более крупных инвагинаций мембраны, как в случае фагоцитоза, формируются клатриновые

участки, не покрывающие эндоцитируемую структуру. Значение этих участков точно не известно. Покрытые клатрином пузырьки образуются также из транс-сети Гольджи, откуда они транспортируют секретируемые белки к плазматической мембране, а затем во внеклеточное пространство.

Адаптины

Цитоплазматическая часть трансмембранного белка часто несет последовательности, инициирующие биомолекулярные каскады в цитоплазме. При связывании лиганда с рецептором обнажается сигнальный домен интернализации, который маркирует удаление лиганд-рецепторного комплекса с клеточной поверхности. В этом случае белковый комплекс, называемый адаптином и расположенный сразу за мембраной, узнает сигнальный домен и запускает процесс интернализации, активируя формирование клатриновой каймы. Найдено множество адаптинов и считается, что они помогают выявлять специфичность транспорта для ряда рецепторов.

Запрограммированное разрушение белков

Как уже было сказано выше это отдельные пути транспорта белков в клетке. Но завершающий этап топогенеза белков един. Все дефектные белки клетки разрушаются с помощью органеллы именуемой протеосомой. Сигналом для протеосомного разрушения белка является присоединение убиквитинак подлежащему удалению белку. Убиквитин по сути является черной меткой для белка.

Стадии убиквитин-зависимого протеолиза

Деградация белка по убиквитиновому пути включает две основные стадии :

1. Ковалентное присоединение к подлежащему деградации белку полиубиквитиновой цепи.

2. Деградация белка 26S протеосомой.

Убиквитин представляет собой полипептид, содержащий 76 аминокислотных остатков. Присоединение убиквитина к белку происходит в

три шага с участием трёх групп ферментов - E1, E2 и E3:

1. Фермент E1 активирует убиквитин : АТФ зависимо формируется макроэргическая связь между С - концевым глицином убиквитина и цистеином белка E1.

В связи с тем, что процесс активации универсален - одинаков для любого убиквитинового пути, организму достаточно одного варианта E1.

2. Активированный убиквитин переносится на остаток цистеина белка E2 (UBC - ubiquitin conjugating enzyme или UCP - ubiquitin carrier protein). Формируется новая макроэргическая связь.

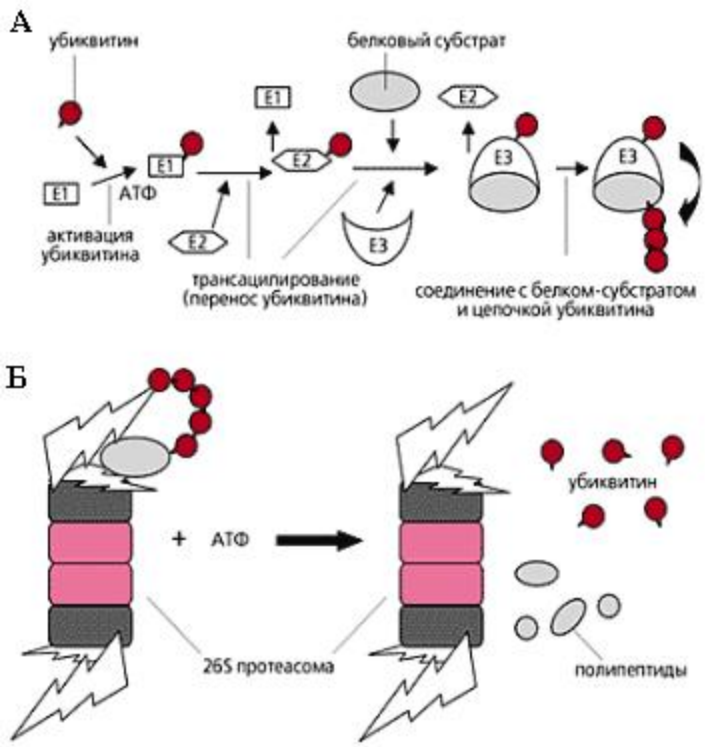


Рисунок 30: Схема запрограммированного разрушения белков А - схема убиквитинилирования, Б - схема работы протеосомы

Клетка содержит несколько вариантов E2 белков. Например, в геноме дрожжей закодировано тринадцать различных E2. Один вид E2 участвует в ограниченном количестве убиквитиновых путей, так как вовлечён в специфическое взаимодейсвие с определёнными белками класса E3 (одним или несколькими).

Существуют E2, способные переносить убиквитин на субстрат самостоятельно, без участия E3.

3. Белки класса E3 представляют собой убиквитин - лигазы, способные специфически связываться с подлежащими деградации белковыми субстратами, напрямую или посредством вспомагательного белка. E3 катализируют перенос убиквитина с E2 на субстрат - образование пептидной связи между С - концом убиквитиновой единицы и аминогруппой лизинового остатка субстрата (в случае если это - первая молекула убиквитина,

присоединяемая к данному белку) или с лизином-48 предыдущей молекулы убиквитина.

Молекула убиквитина содержит семь остатков лизина. In vivo удалось обнаружить в полиубиквитиновых цепях связывание по 11, 29, 48 и 63 лизинам. Из вышеперечисленного протеосома узнает только цепи, связанные по 48 лизину.

Е3 узнают определённый мотив в составе субстрата, называемый дегроном - на уровне Е3 обеспечивается специфичность протеолиза. В связи с тем, что специфическому протеолизу подвергается огромное количество белков, вариантов Е3 в клетке особенно много.

Узнавание субстратов убиквитин - лигазами

Существуют три принципиальных пути узнавания субстратов убиквитин - лигазами :

1. Узнавание определённого мотива, конститутивно входящего в состав белка. Например, узнаётся определённый N - концевой аминокислотный остаток (так называемое N - правило).

Однако присутствие мотива, узнаваемого Е3 (дегрона) в структуре белка не говорит о том, что этот белок обязан деградировать. Обычно дегрон располагается в непосредственной близости от последовательности, ответственной за взаимодействие с субстратом или шапероном, сайта олигомеризации (в случае, если белок активен в виде олигомера), бывает спрятан соответствующей нативной структурой. Таким образом, если белок правильно свёрнут и функционально востребован, дегрон будет пространственно не доступен, Е3 не сможет с ним связаться, деградации не произойдёт.

2. Узнавание белка, подвергшегося определённой модификации.

Пример: Для активации транскрипционного фактора NF kappa B необходимо фосфорилирование соответствующего ингибитора (I kappa B). I kappa B, образуя комплекс с NF kappa B, маскирует сигнал ядерной локализации, принадлежащий фактору - фактор не может попасть в ядро.

Фосфорилированная форма I kappa B узнается соответствующим E3 и немедленно подвергается протеолизу. В результате NF kappa B высвобождается, перемеща-ется в ядро, принимает участие в регуляции транскрипции.

3. Узнавание субстрата в комплексе с соответствующим адапторным белоком.

Пример: Вирус папилломы человека (HPV) кодирует белок E6 и белок, ассоциированный с E6 (E6 - AP). Комплекс E6 и E6 - AP узнаёт одновременно проапоптотический белок p53 и убиквитин - лигазу, ответственную за его деградацию.

Протеосома

26S протеосома состоит из сердцевинного каталитического комплекса 20S, фланкированного с двух сторон регуляторными субъединицами 19S. Молекулярная масса 26S протеосомы - 2МДа.

За рядом исключений 26S протеосома узнаёт и подвергает протеолизу полиубиквитинированные белки.

20S комплекс построен из четырёх колец. Каждое из колец состоит из семи субединиц. Эти субъединицы кодируются 14 генами : семь кодируют разные , семь - разные субъединицы. В - кольцах локализованы три каталитических сайта : сайт, похожий на трипсин (узнаёт остатки тирозина и фенилиаланина), сайт, похожий на химотрипсин (узнаёт остатки лизина и аргинина) и сайт, производящий гидролиз полипептидной цепи после остатка глутамата. Каждый сайт построен из двух, одинаковых - субъединиц, входящих в состав разных колец.

Кроме трёх видов - субъединиц, конститутивно формирующих активные центры (входят в число продуктов семи вышеупомянутых генов), существуют их близкие гомологи, закодированные в локусе MHC II. Эти белки экспрессируются в определённых условиях (например - под действием интерферона) и встраиваются на место конститутивных гомологов в процессе сборки новых протеосом. В результате каталитические свойства протеосомы меняются на уровне соотношения эффективностей активных центров. Общая

эффективность протеолиза не изменяется, изменяется качественное соотношение продуктов.

кольца необходимы для стабилизации - колец, а также для связывания 20S субъединицы с 19S кэпирующими комплексами.

19S кэпирующая субъединица состоит из 2-х частей: основания и крышки. Основание отвечает за связывание с 20S, обладает АТФазной активностью. Крышка отвечает за узнавание полиубиквитинированных белков - субстратов .

Непонятно, как именно протеосома взаимодействует с субстратом: как он туда попадает, как выводятся продукты протеолиза.

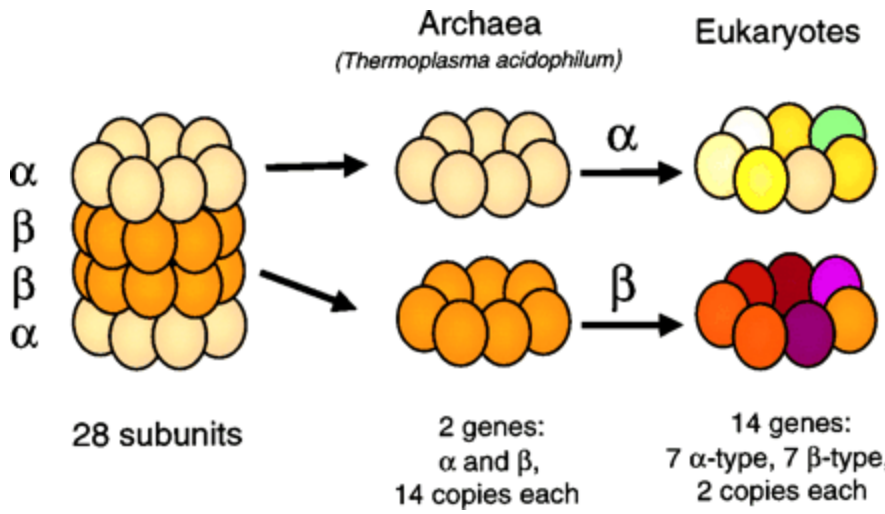


Рисунок 31: Схема структуры протеосомы

У прокариот и архей имеются протеосомы, схожие с 26S протеосомой эукариот по строению и механизму действия : так же имеется каталитический цилиндр и две кэпирующие регуляторные субъединицы. При этом с обеих сторон каталитического цилиндра имеются отверстия. У 20S субъединицы 26S протеосомы таких отверстий нет - N-концы а субъединиц переплетаются и заполняют пространство. Кроме того в зоне контакта и колец обнаруживаются небольшие поры, связанные с активными сайтами - возможна перестройка этих пор с образованием просветов, достаточных для проникновения субстрата. Остается также вероятность АТФ - зависимой перегруппировки N-концов а субъединиц в результате ассоциации с 19S комплексами.

20S каталитический цилиндр может ассоциировать с 11S (PA28) кэпирующими комплексами. PA28 представляет собой кольцо состоящее из

двух видов субъединиц - и . PA28 не обладает АТФазной активностью. Синтез обоих видов субъединиц индуцируется гамма интерфероном.

Протеосома 11S-20S-11S не может расщеплять интактные белки. Она процессирует пептиды - продукты деятельности 26S протеосомы, которые затем презентируются на поверхности клетки в комплексе с MHC I класса. Описана протеосома вида: 19S-20S-11S. Возможно, она осуществляет двойной процессинг.

Деградация белков, ассоциированных с мембраной

Процессирование белков, ассоциированных с мембраной, отличается от деградации цитоплазматических белков. Не вдаваясь в детали этого процесса, обсудим основные отличия :

1. Деградация осуществляется лизосомами.

2. Для таргетинга белка в лизосомы обычно достаточно моноубиквитинирования. В некоторых случаях формируется полиубиквитиновая цепь.

3. В случае формирования полиубиквитиновой цепи связывание происходит по 63 лизину.

Выщепление убиквитина из аддуктов - процесс, обратный убиквитинированию.

В определённых ситуациях клетке необходимо выщеплять убиквитин из образуемых им аддуктов. Например: необходимо отщеплять убиквитин от продуктов протеолиза, от белков, к которым он присоединился по ошибке. Кроме того, убиквитин синтезируется в виде линейного полипредшественника - необходимо нарезать из него функциональные молекулы. При этом на С-конце последнего мономера полипредшественника закодирован дополнительный аминокислотный остаток, который необходимо отщепить, так как он блокирует активный глицин. Есть два рибосомальных белка, на N-конце которых закодирован убиквитин. Таким образом обеспечивается таргетинг этих белков к рибосоме. После того, как вышеупомянутые белки включились в рибосомальный комплекс, убиквитин нужно отщепить.

Белки, осуществляющие выщепление убиквитина относятся к тиоловым протеиназам, узнают С-концевой аминокислотный остаток молекулы убиквитина, делятся на два класса:

1. С-концевые убиквитиновые гидролазы (UCH): белки с молекулярной массой порядка 25 кДа, производят котрансляционный протеолитический процессинг убиквитинового предшественника, а также выщепление убиквитина из аддуктов с небольшими молекулами - аминами и тиолами.

2. Убиквитин - специфичные протеазы (UBP), они же - изопептидазы: катализируют выщепление убиквитина из конъюгатов с клеточными белками. Молекулярный вес - порядка 100 кДа. В отличие от UCH, изопептидаз в клетке много. Среди них есть свободные и ассоциированные с 19S комплексом, АТФ-зависимые и не АТФ-зависимые, специфичные к различным субстратам.

Биологический смысл убиквитинирования

Убиквитин - зависимый протеолиз существует только у эукариот (отсутствует у прокариот и архей). В то же время у прокариот и архей есть АТФ - зависимые протеазы, принципиально схожие с 26S протеосомой: состоят из двух кэпирующих субъединиц, ответственных за узнавание субстрата и обладающих АТФазной активностью и каталитической субъединицы - цилиндра. Их основное отличие от 26S протеосомы состоит в том, что кэпирующая субъединица узнает непосредственно субстрат - определённый мотив в структуре белка, говорящий о том, что он подлежит деградации. Из-за этого число потенциальных субстратов ограничено.

Таким образом, первое преимущество убиквитинирования - увеличение числа потенциальных субстратов засчет большого количества ферментов осуществляющих убиквитинирование и возможности их комбинирования.

Другое важное преимущество убиквитинирования состоит в том, что оно обратимо. Для таргетинга белка в протеосому не достаточно одной молекулы убиквитина, нужна мультиубиквитиновая цепь - деградация происходит не сразу и у клетки есть время подумать (kinetic proofreading). Таким образом обеспечивается гибкость системы протеолиза.

Итак, рассмотрели, не вдаваясь в детали, процесс убиквитин-зависимой деградации белков в клетке. Этот процесс - один из лежащих в основе сложной системы регуляции жизнедеятельности эукариотической клетки, так как позволяет:

1. В строго определённый момент подвергать специфическому протеолизу огромное количество разнообразных белков.

2. Отменять деградацию, если белок всё ещё нужен клетке.