

Курс молекулярной биологии

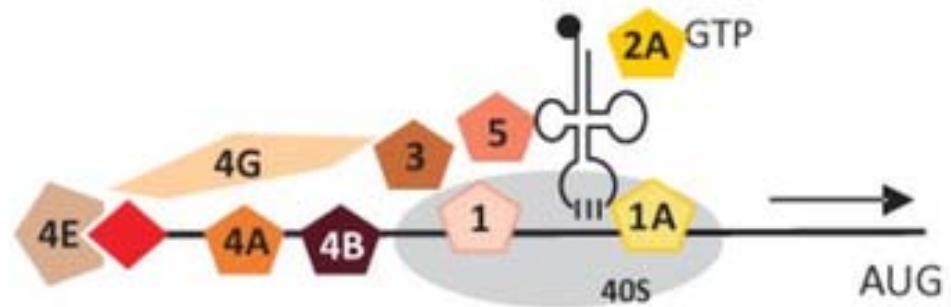
**Особенности трансляции у эукариот
Регуляция экспрессии генов на уровне
трансляции**

**Захарова Ирина Борисовна,
к.б.н., доцент**

Особенности инициации трансляции у эукариот

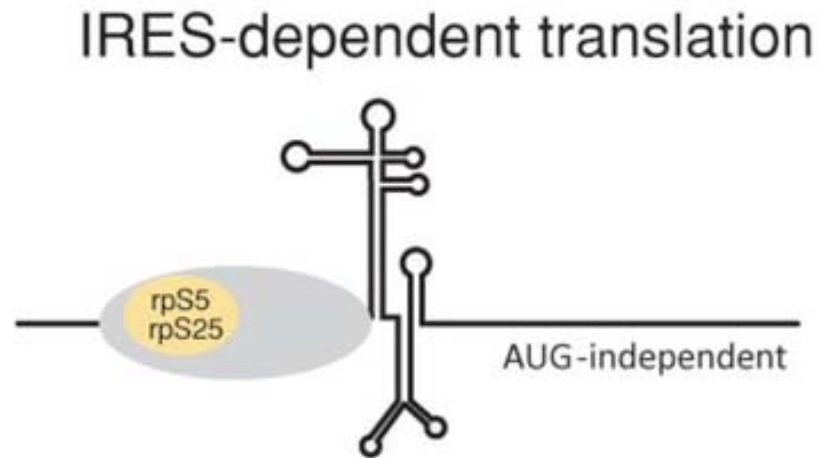
У эукариот существуют два основных механизма нахождения рибосомой стартового AUG:

**Кэп-зависимый
(сканирующий)**



При сканирующем механизме малая субъединица рибосомы садится на 5'-конец мРНК в области кэпа и двигается вдоль молекулы мРНК, «сканирует» кодоны в поисках инициаторного AUG.

Кэп-независимый (внутренняя инициация)

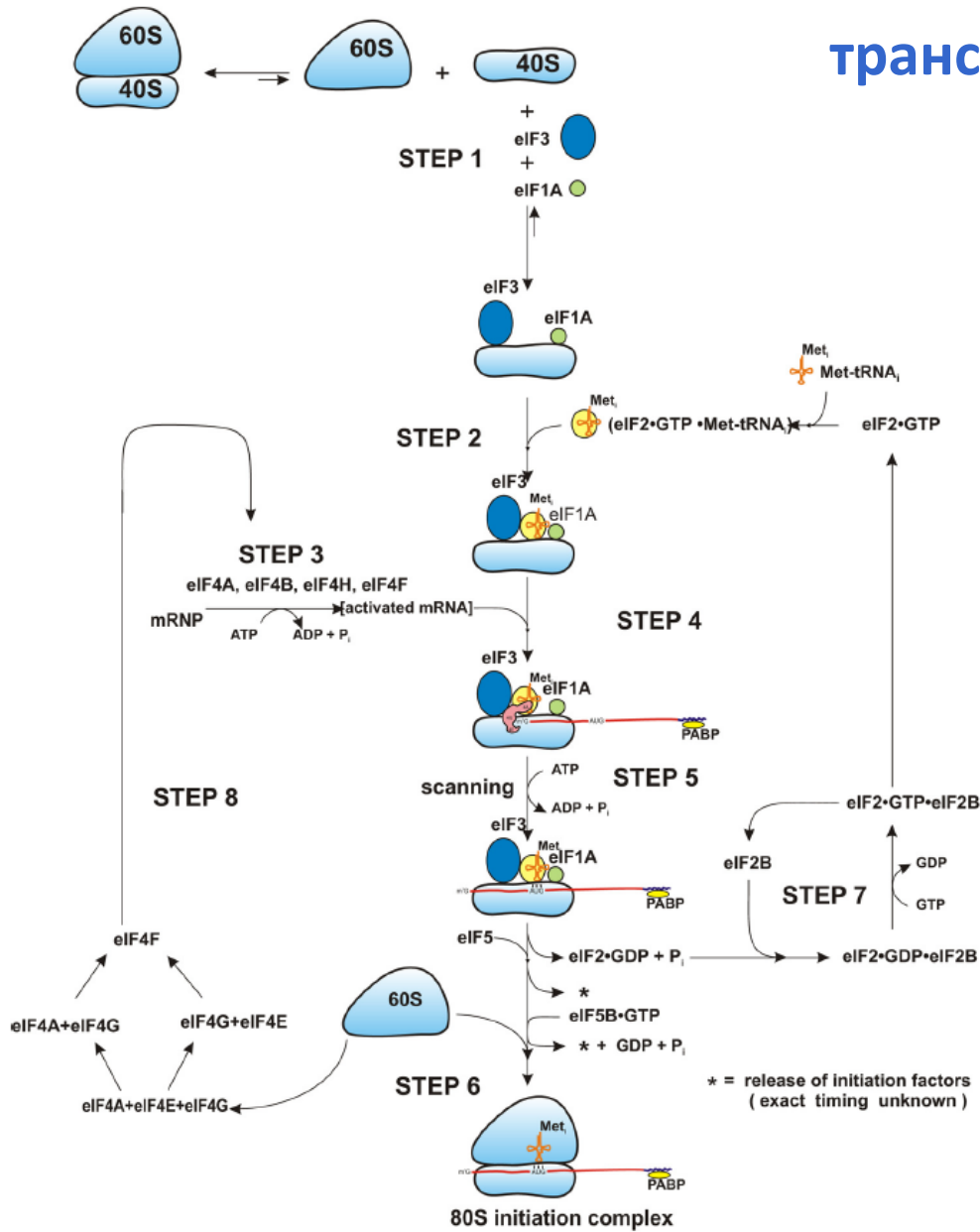


Механизм внутренней инициации осуществляется за счет элементов **IRES** (англ. Internal Ribosomal Entry Site) — участок мРНК, обладающий выраженной вторичной структурой, позволяющей ему направлять рибосомы на стартовый AUG. 10–15% всех мРНК способны к КЭП-независимой трансляции

Факторы трансляции эукариот

Факторы инициации		Факторы элонгации	Релизинг фактор
<u><i>eIF1</i></u>	<u>eIF1AX</u> <u>AY</u> <u>1B</u>	<u>eEF-1</u> <u>eEF1A1</u> <u>eEF1A2</u> <u>eEF1A3</u>	eRF1
<u><i>eIF2</i></u>	<u>eIF2S1</u> <u>eIF2S2</u> <u>eIF2S3</u> <u>eIF2B1</u> <u>eIF2B2</u> <u>eIF2B3</u> <u>eIF2B4</u> <u>eIF2B5</u> <u>eIF-2 kinase</u>		
<i>eIF3</i>	<u>eIF3A</u> <u>B</u> <u>C</u> <u>D</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>H</u> <u>I</u> <u>J</u> <u>K</u> <u>M</u> <u>S6</u>	<u>eEF1B1</u> <u>eEF1B2</u> <u>eEF1B3</u> <u>eEF1B4</u>	
<i>eIF4</i>	<u>eIF4A2</u> <u>A3</u> <u>B</u> <u>E1</u> <u>E2</u> <u>G1</u> <u>G2</u> <u>G3</u> <u>H</u>	<u>eEF1D</u> <u>eEF1E1</u>	
<u><i>eIF5</i></u>	<u>eIF5A</u> <u>A2</u> <u>B</u>	<u>eEF1G</u>	
<u><i>eIF6</i></u>	eIF6	<u>eEF2</u>	

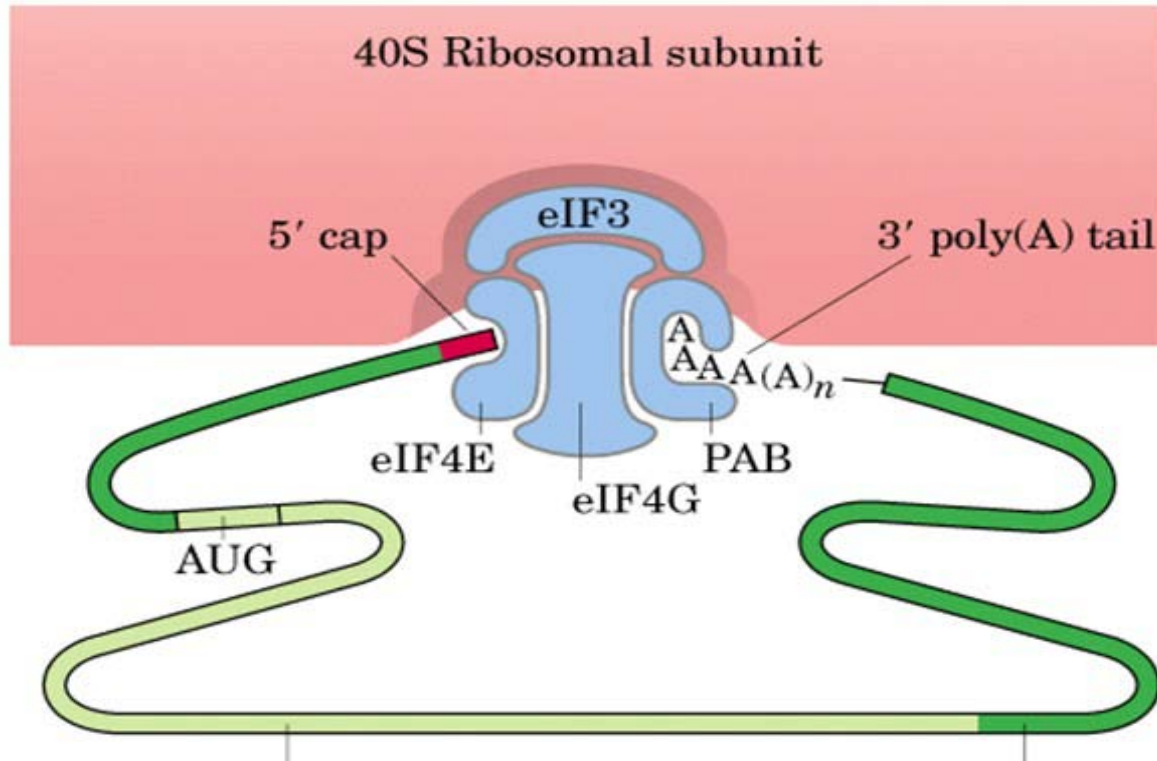
Схема процесса инициации трансляции у эукариот



Последовательность стадий инициации у эукариот:

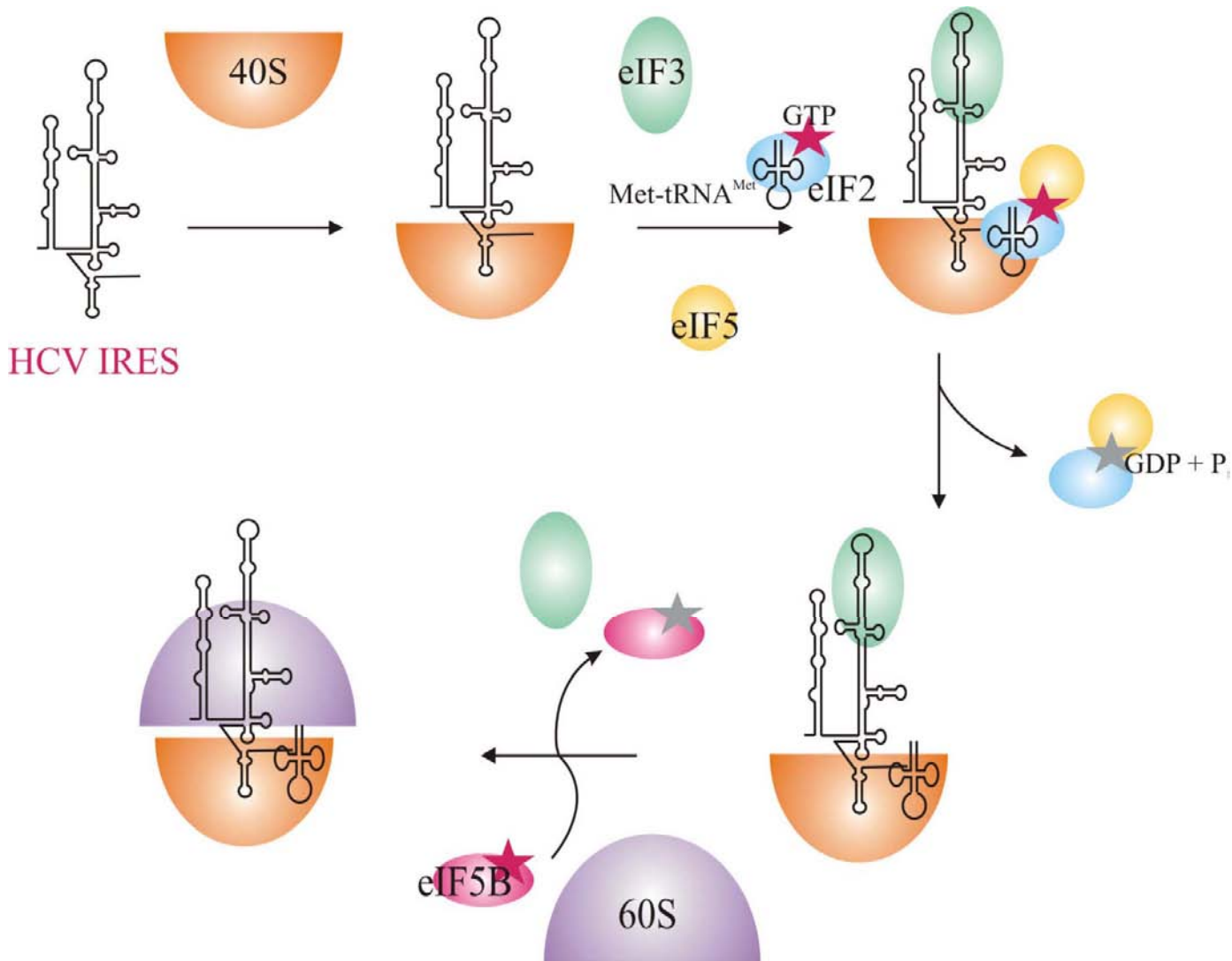
- Образование тройного комплекса, содержащего инициаторную метионин-тРНК, факторы инициации трансляции и ГТФ.
- Присоединение тройного комплекса к 40S-субъединице рибосомы. Процесс стимулируется факторами eIF3 и eIF4C, которые стабилизируют комплекс.
- Присоединение мРНК к 40S-субъединице. Для этого требуется фактор eIF3 и другие дополнительные факторы (eIF1, eIF4A, eIF4B). 40S-субъединица присоединяется к 5'-концу (кэпу) и мигрирует к иницирующему кодону АУГ. В присоединении используется энергия АТФ.
- Присоединение 60S-субъединицы происходит в присутствии фактора eIF5 и сопряжено с гидролизом ГТФ. После образования полной рибосомы все факторы инициации высвобождаются.

Присоединение мРНК к 40S-субъединице (Кэп-зависимый механизм)



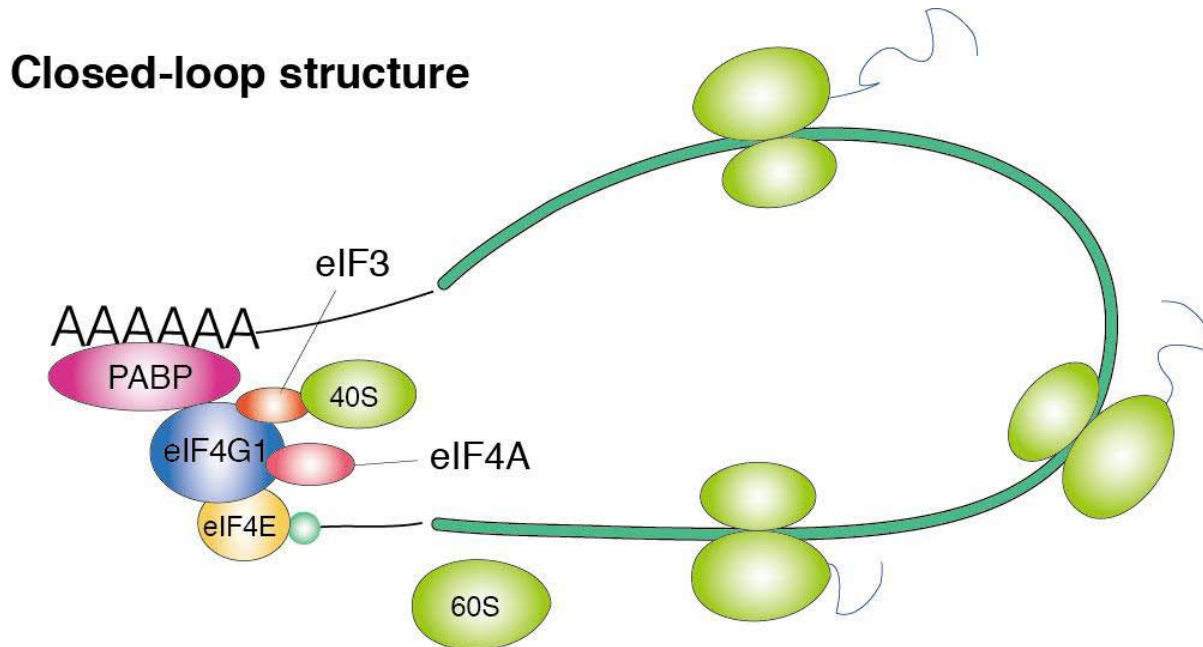
Кэп-связывающий белковый комплекс eIF-4F, включающий факторы инициации eIF-4E, eIF-4G и eIF-4A, играет центральную роль в рекрутировании кэпированных мРНК к рибосоме.

Последовательность событий при инициации трансляции РНК вируса гепатита С (внутренняя инициация).



Реинициация трансляции у эукариот

- У эукариот возможна реинициация трансляции, когда после окончания трансляции рибосома с белковыми факторами не диссоциирует от мРНК, а перескакивает с 3' на 5' конец мРНК и начинает инициацию ещё раз.
- Это возможно благодаря т.н. циклизации мРНК в цитоплазме, то есть физическому сближению старт- и стоп-кодонов с помощью специальных белков.



Элонгация и терминация

Эукариотические факторы элонгации EF1 α и EF1 $\beta\gamma$ являются аналогами прокариотических EF-Tu и EF-Ts.

- GTP форма EF1 α обеспечивает позиционирование аминокил - тРНК в А - сайте рибосомы
- EF1 $\beta\gamma$ катализирует обмен GTP для связанного GDP.

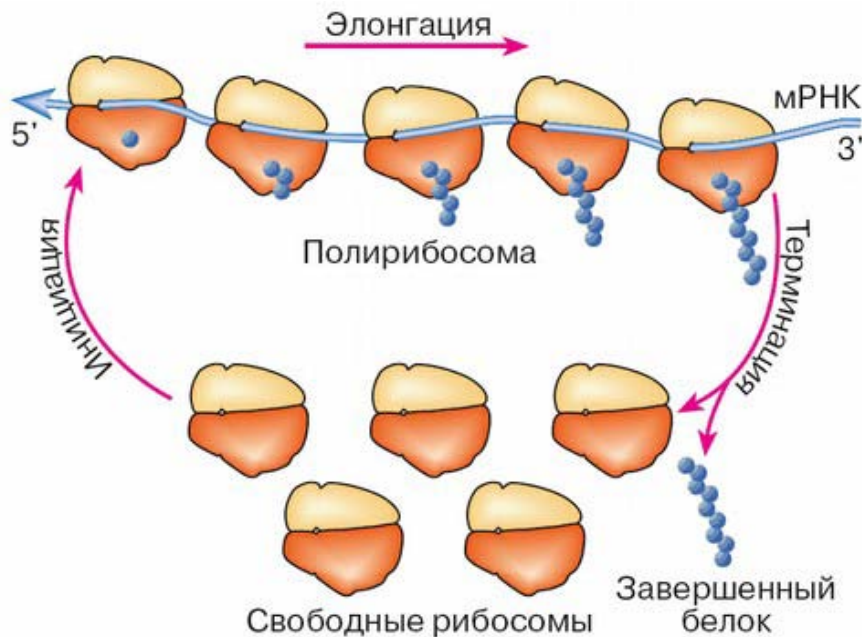
Эукариотический EF2 опосредует GTP-управляемую транслокацию подобно прокариотическому EF-G.

Терминация трансляции у эукариот осуществляется одним релизинг фактором – eRF1 (в отличие от двух у прокариот).

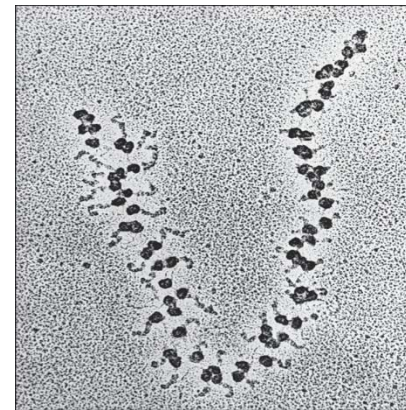
eIF3, как и его прокариотический аналог IF3, предотвращает реассоциацию рибосомных субъединиц в отсутствие инициаторного комплекса.

ПОЛИРИБОСОМЫ

На каждой мРНК могут последовательно располагаться не одна, а несколько рибосом, синтезирующих пептидные цепи. Такие образования называются *полирибосомами*.



На каждой рибосоме в этой структуре синтезируется своя белковая цепочка, что значительно увеличивает скорость синтеза белка в клетке



Регуляция экспрессии генов на уровне трансляции

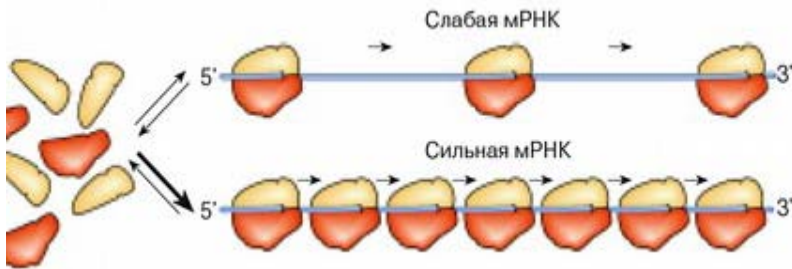
Основные пути регуляции биосинтеза белка на уровне трансляции

- 1. Дискриминация мРНК** за счет различного сродства иницирующих рибосомных частиц к мРНК при инициации трансляции
- 2. Трансляционная репрессия** белками-репрессорами, либо с помощью особых микроРНК
 - маскирование мРНК маскирующими белками
- 1. Тотальная регуляция** (подавление) инициации трансляции путем индуцируемого фосфорилирования фактора инициации eIF2

Тотальная регуляция за счет модификации факторов инициации характерна, по-видимому, только для эукариот

ДИСКРИМИНАЦИЯ мРНК

На основании разницы в эффективности инициации различают мРНК:



«слабые» - редкая посадка рибосом
«сильные» - частая посадка рибосом

Сильная или слабая мРНК – зависит от разного сродства рибосом к рибосомсвязывающим участкам, а у эукариот – из-за разного сродства к этим же участкам белков – факторов инициации трансляции.

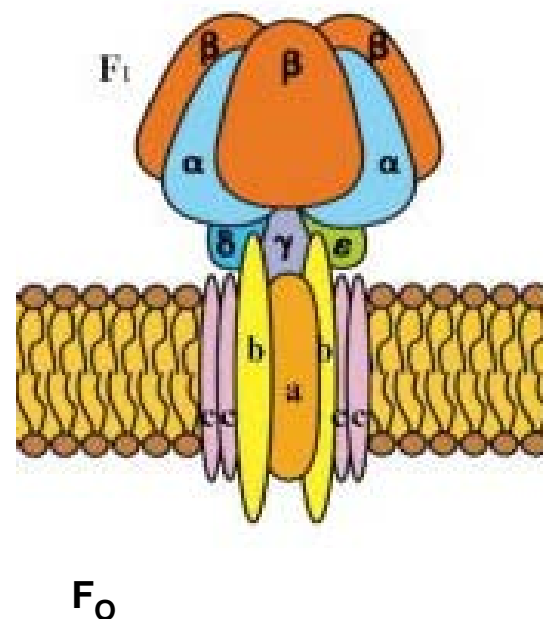
Как правило, если белок имеет четвертичную структуру, построенную из разных субъединиц в различном соотношении, то **сила мРНК** или ее отдельных участков (цистронов), кодирующих эти субъединицы **пропорциональна количеству субъединиц в структуре**.

В состав мембранного комплекса F_0 протонной АТФазы бактерий входят

- 1 субъединица **a**,
- 2 копии субъединицы **b**,
- 9 -12 копий субъединицы **c**.

Соответственно, цистроны имеют мРНК разной силы:

- «с» - сильная
- «b» - средняя
- «a» - слабая



Дискриминация мРНК у прокариот – механизм контроля надлежащего фиксированного соотношения продуктов белкового синтеза.

Трансляционное сопряжение у прокариот

Различают два типа трансляционного сопряжения

- **Сопряжение:** рибосомы, транслирующие предшествующий цистрон, расплетают вторичную и / или третичную структуру мРНК, в которой участвует инициаторный участок последующего цистрона. В результате этот иницирующий участок освобождается и становится доступным для инициации свободными рибосомами
- **Реинициация:** сам по себе внутренний цистрон вообще недоступен для свободных иницирующих рибосомных частиц и его инициация может быть осуществлена только частицами, терминировавшими на предыдущем цистроне

Трансляционная репрессия

Трансляционная репрессия (как у про-, так и у эукариот) ***и маскирование мРНК*** (только у эукариот) – негативная регуляция либо с помощью белков, либо с помощью особых микроРНК, находящихся в составе белковых комплексов.

1. Белок-репрессор связывается с определенным участком на мРНК, тем самым, мешая присоединению к мРНК рибосомы.
2. Вещество-эффектор, появляясь в среде, снимает белок-репрессор с мРНК и разблокирует синтез белка.

Трансляционная репрессия

Трансляционная репрессия используется для тонкой регуляции белкового синтеза как у про-, так и у эукариот.

Репрессором может быть:

1) *сам синтезируемый по данной мРНК белок.*

Например, если в бактериальной клетке возникает избыток фермента треонил-тРНК-синтетазы, этот фермент становится репрессором, блокируя свой собственный синтез – *тип обратной связи*

2) *специальный белок, на данной мРНК не закодированный. Способность такого белка связываться с определенными мРНК зависит от присутствия того или иного низкомолекулярного компонента – эффектора.*

У животных синтез железозапасающего белка ферритина заблокирован белком-репрессором IRP (iron-regulatory protein) и разблокируется лишь после взаимодействия репрессора с эффектором – ионами железа.



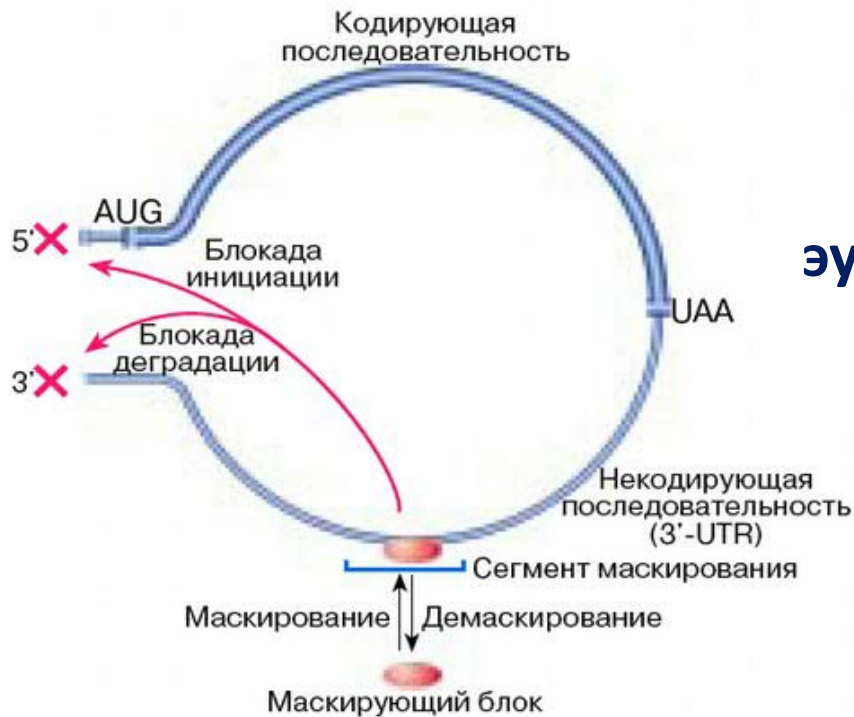
Маскирование мРНК

- Эукариоты активно используют стратегию наработки мРНК впрок.
- Такие метаболически стабильные мРНК не сразу вступают в трансляцию, а их активность избирательно регулируется во времени и во внутриклеточном пространстве путем активации – инактивации.

Маскирование мРНК

Маскирующий белок связывается со специальным участком (сегментом маскирования) в нетранслируемой 3'-концевой области мРНК - 3-UTR (3-Untranslated Region)

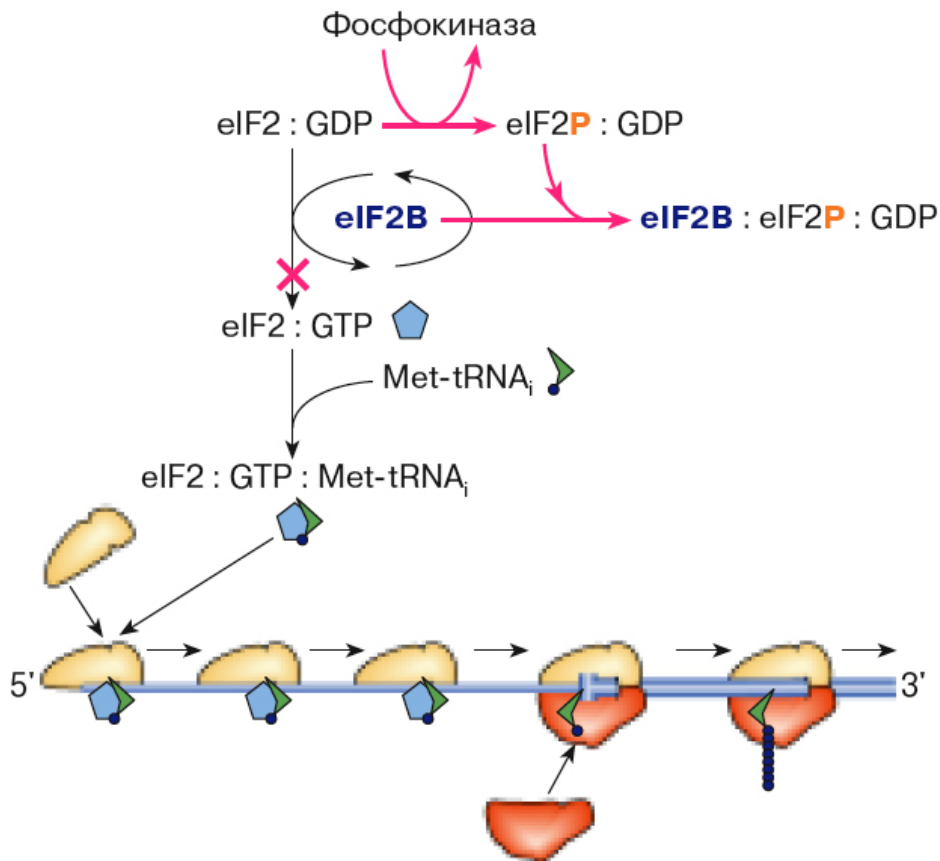
- Защищает мРНК от расщепления 3'-экзонуклеазами
- Делает невозможным появление у мРНК полиА-хвоста
- Блокирует инициацию трансляции на 5'-конце мРНК



Маскирование обеспечивает эукариотам возможность накопить мРНК “впрок”

Тотальная регуляция трансляции у эукариот

Чаще всего тотальная регуляция осуществляется через фосфорилирование фосфокиназой фактора инициации трансляции eIF2, активная форма которого нефосфорилирована.



- Сигналами для активации киназ, фосфорилирующих eIF2, могут быть:
- тепловой шок и другие стрессорные воздействия, причем степень подавления белкового синтеза варьирует в зависимости от уровня стресса.
 - недостаток аминокислот, железа, ростовых факторов;
 - вирусные инфекции и др.

Природные и искусственные ингибиторы синтеза белка

Ингибиторы синтеза белка – мощное и разрушительное оружие, применяемое только против особей другого вида для решения следующих задач:

- 1. Защита** от поедания представителем более высокого трофического уровня
- 2. Атака** на представителей более низкого трофического уровня
- 3. Сдерживание** видов-конкурентов того же самого трофического уровня

Соединения с функцией “защиты от поедания”

Канаванин - небелковая аминокислота – *аналог аргинина*, синтезируется некоторыми растениями сем. Бобовых – вьющимися бобами *Diosclea megacarpa*, канавалией мечевидной *Canavalia ensiformis*.

Распознается **аргининовой тРНК-синтетазой** и в процессе трансляции занимает место аргинина в синтезируемых белках

Замена аргинина на канаванин приводит к образованию нефункциональных белков

Соединения с функцией “защиты от поедания”

Рицин – токсин клещевины *Ricinus communis*

- Субъединица А проникает в клетку
- Присоединяется к 60S- субъединице рибосом и удаляет один остаток аденина из 28S рРНК
- Потеря азотистого основания нарушает взаимодействие рРНК с факторами элонгации.

Нарушает процесс элонгации белковой цепи



Соединения с функцией “защиты от поедания”

Эметин – токсин растения
Serphalis ipesciantha
(ипекакуана, рвотный корень)



Препятствует транслокации рибосомы по мРНК
через воздействие на фактор элонгации EF2

Бактериальные токсины

Веротоксины (Stx-токсины) – ингибиторы трансляции на стадии элонгации – продуцируются *Shigella dysenteriae*, Stx-продуцирующие *E. coli*

Действуют по механизму, описанному для рицина

Дифтерийный токсин и экзотоксин A *Pseudomonas spp.*

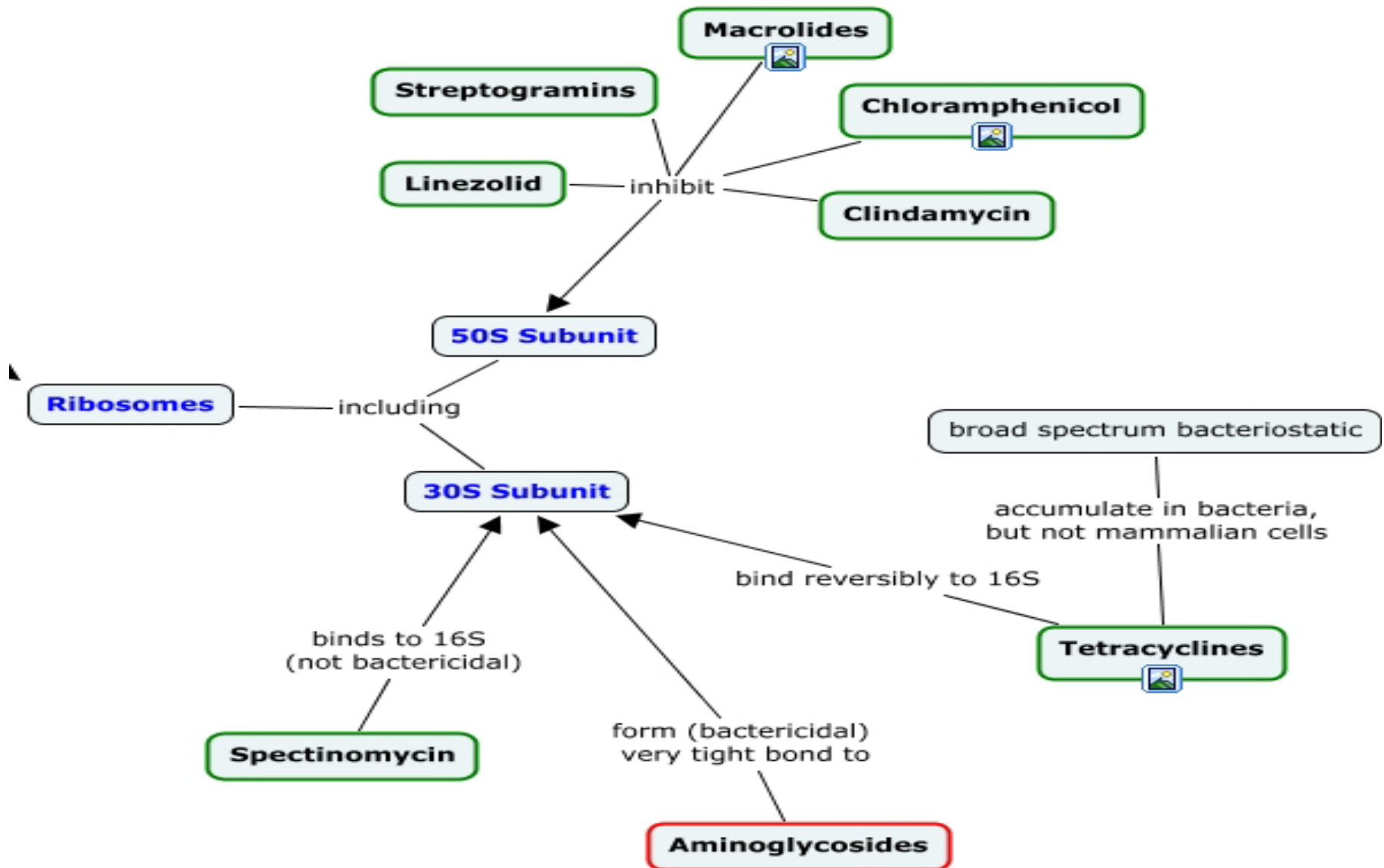
– ингибиторы трансляции на стадии элонгации: воздействие на белковый фактор EF-2, препятствуют транслокации рибосомы по мРНК

Соединения с функцией подавления конкурентов

Антибиотики

Устранение конкурента через подавление его белкового синтеза с помощью выделяемых антибиотиков – очень распространенная стратегия у бактерий и микроскопических грибов.

Антибиотики-ингибиторы трансляции



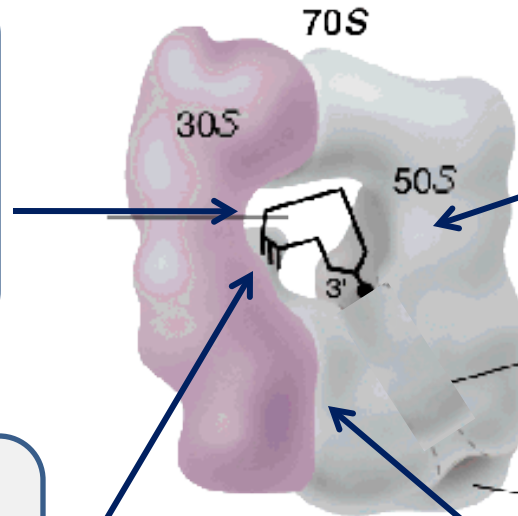
Локализация мишени

Малая субъединица

Большая субъединица

Тетрациклины
Блокируют
присоединение
aa-тРНК к рибосоме

Аминогликозиды
Блокируют А-сайт



Хлорамфеникол
Ингибирует
пептидилтрансферазу

Макролиды
Ингибируют
транслокацию

Ингибитор	Механизм действия
Ингибиторы трансляции прокариот	
Хлорамфеникол	Ингибирует действие пептидилтрансферазы
Стрептомицин	Ингибирует инициацию синтеза белка
Тетрациклин	Ингибирует связывание аминоацил-тРНК с малой субъединицей рибосомы прокариот
Неомицин	Действие аналогично стрептомицину
Эритромицин	Ингибирует транслокацию большой субъединицы
Ингибиторы трансляции эукариот	
Пурамицин	Препятствует транслокации пептида, происходит ранняя терминация трансляции у про- и эукариот
Дифтерийный токсин	Инактивирует действие фактора элонгации эукариот eEF-2
Рицин	Катализирует разрезание рРНК большой субъединицы рибосом эукариот
Циклогексамид	Ингибирует действие пептидилтрансферазы эукариот