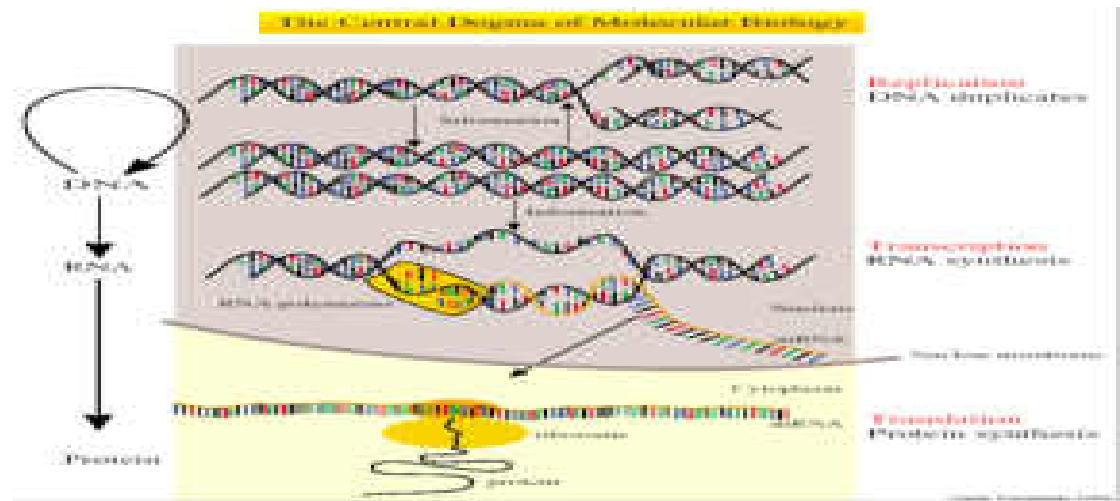


**Репликация ДНК, ферменты, участвующие в процессе у эукариот. Биосинтез белка и его регуляция. Генетический код. Этапы синтеза белка. Транскрипция, процессинг и сплайсинг синтеза белка. Трансляция. Посттрансляционная модификация белка.**



Зыкова Екатерина Владимировна

Кафедра теоретической биохимии с курсом клинической биохимии

# ПЛАН ЛЕКЦИИ

- Матричные процессы в клетке
- Нуклеиновые кислоты
- Репликация
- Репарация
- Транскрипция
- Трансляция

# Матричный биосинтез –

процесс синтеза (сборки) молекул биополимеров (нуклеиновых кислот и белков) в живых организмах, строение которых определяется матрицей.

## Процессы в организме, использующие принцип матричного синтеза

Процесс	Матрица	Продукт	Функции в организме	Основной фермент
<b>Репликация</b>	ДНК (обе цепи)	ДНК (новая цепь)	Дублирование генетической информации при делении клеток	<i>ДНК-зависимая ДНК-полимераза</i>
<b>Транскрипция</b>	ДНК (одна из цепей)	РНК	Начальная стадия реализации генетической информации	<i>ДНК-зависимая РНК-полимераза</i>
<b>Трансляция</b>	мРНК	Полипептид	Формирование первичной структуры белков организма	<i>Пептидилтрансфераза</i>
<b>Репарация</b>	ДНК (одна из цепей)	ДНК (вставка в поврежденной цепи)	Восстановление поврежденной генетической информации	<i>ДНК-зависимая ДНК-полимераза</i>

# Три обязательные стадии матричных биосинтезов

**Инициация** – процесс, в котором образуется первая связь между мономерными звеньями синтезирующейся полимерной цепи.

**Элонгация** - процесс поэтапного удлинения цепи растущего полимера.

**Терминация** - процесс остановки роста синтезируемой полимерной цепи и отсоединение ее от матрицы.

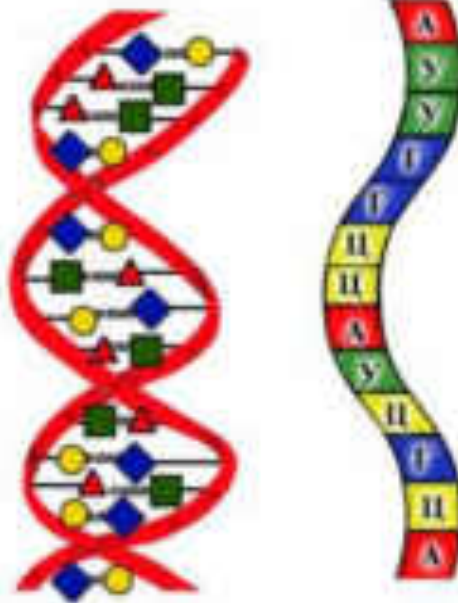
# Нуклеиновые кислоты

Биологические полимеры, мономерами которых являются нуклеотиды

В природе существует  
2 вида нуклеиновых кислот



**ДНК**  
Дезоксирибо-  
нуклеиновые  
кислоты



**РНК**  
Рибонуклеиновые  
кислоты

# Нуклеиновые кислоты

Обеспечивают формирование 2-х информационных потоков:

- Первый поток реализуется в период деления клетки (воспроизводится информация, заключенной в молекуле ДНК - инструкция о строении всех видов РНК и всех белков организма)
- Второй поток информации реализуется в процесс жизнедеятельности клетки (экспрессия генов приводит к синтезу спектра белков, необходимых в данном месте в данное время)



## Из истории открытия нуклеиновых кислот



В 1868г швейцарский врач **И.Ф.Мишер** в ядрах лейкоцитов обнаружил вещества, обладающие кислотными свойствами, которые он назвал **нуклеином** (nucleus-ядро)

В 1889г **Р.Альтман** эти вещества назвал **ядерными** (нуклеиновыми) кислотами

В 1889 г **Коссель** - термин «**нуклеиновые кислоты**»

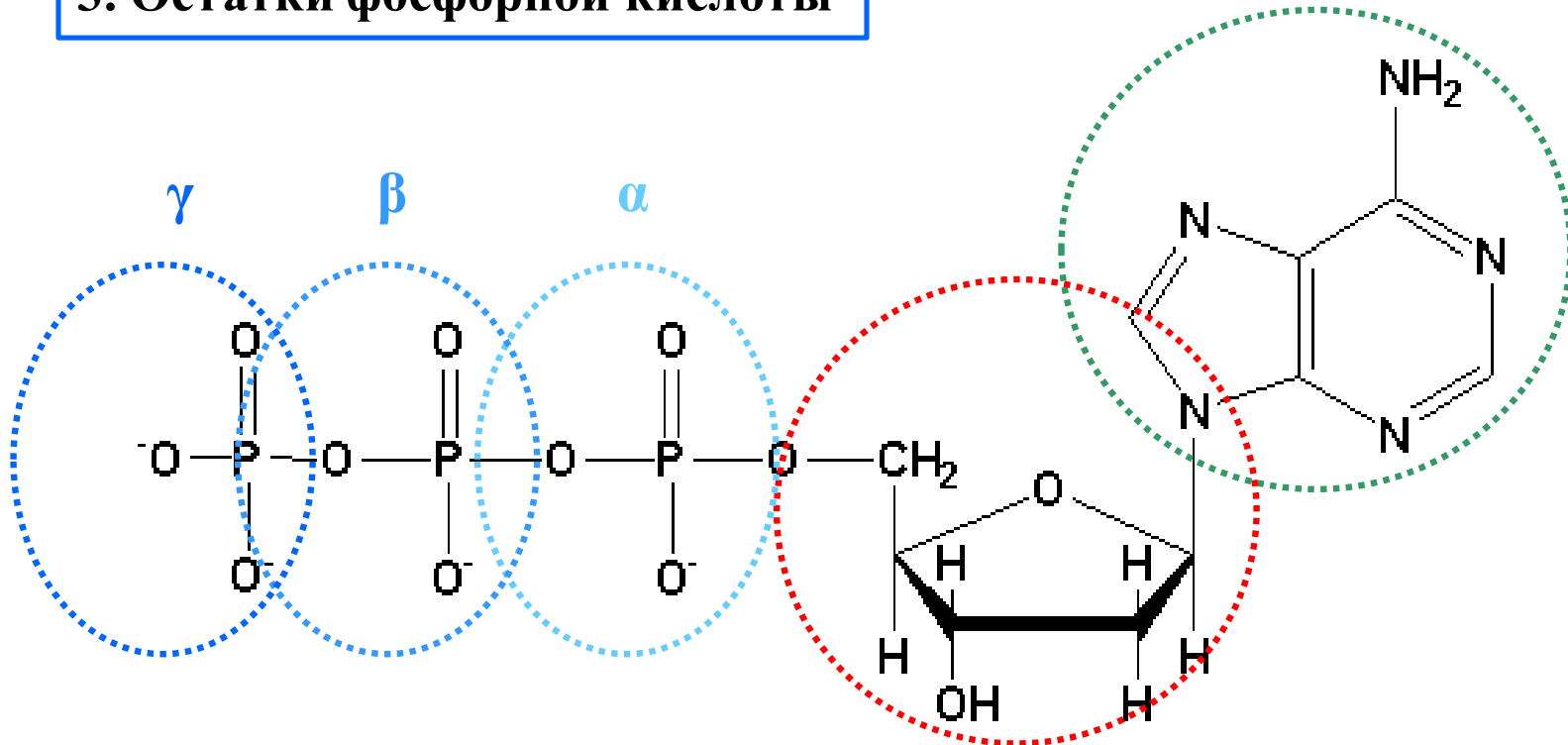


# Строение нуклеотидов

1. Пуриновое или пиримидиновое азотистое основание

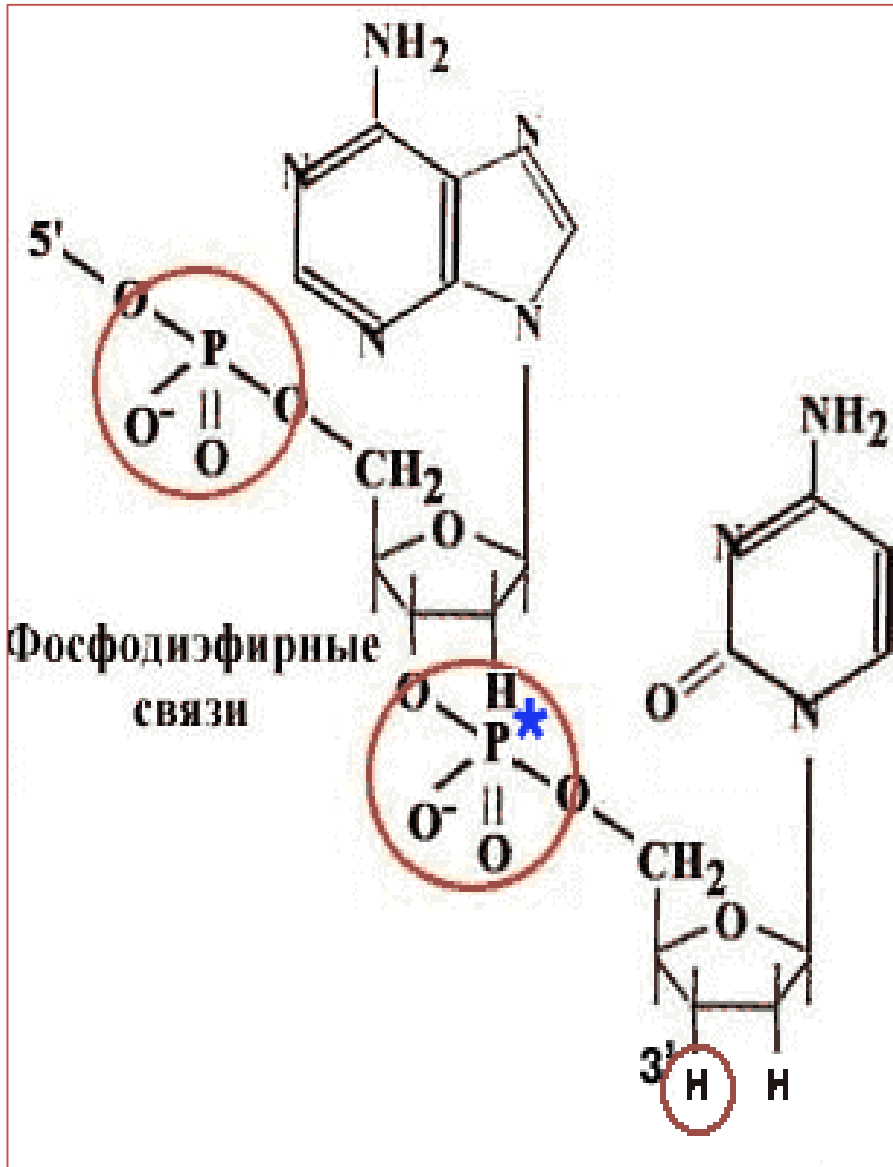
2. Пентоза – D(или  $\beta$ )-рибоза или D (или  $\beta$ )-2-дезоксирибоза

3. Остатки фосфорной кислоты



Дезоксиаденозинтрифосфат (дАТФ) – фосфорный эфир нуклеозида

# Первичная структура ДНК и РНК -это



полинуклеотидная цепь,  
удерживаемая  
фосфодиэфирными и  
гликозидными связями

В молекулах нуклеиновых  
кислот остатки нуклеотидов  
соединены между собой

**3',5'-фосфодиэфирными  
связями.**

# Джеймс Уотсон и Френсис Крик



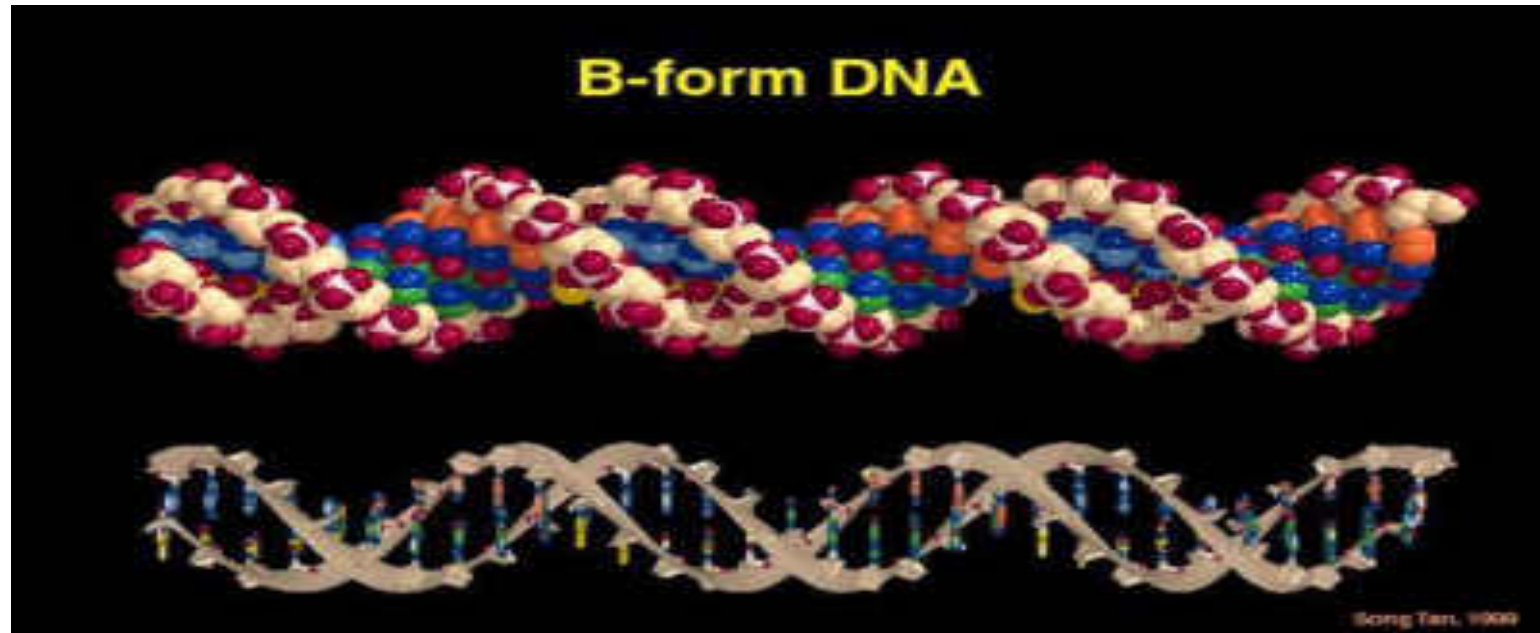
25 апреля 1953 года в американском журнале *Nature* была опубликована статья Джеймса Уотсона и Френсиса Крика «Структура дезоксирибонуклеиновой кислоты». Публикация занимала чуть больше одной странички, в ней был всего один очень простой рисунок.

Так, более 60 лет назад, впервые была предложена модель пространственной структуры ДНК, за которую ее авторы получили Нобелевскую премию.

(Watson J.D., Crick F.H.C. Molecular structure of nucleic acids // *Nature*. 1953. V. 171. P. 738-740)

## Вторичная структура ДНК

Две комплементарные, антипараллельно расположенные нуклеотидные цепи образуют правозакрученную спираль с общей осью



# Правила построения молекул ДНК

## 1. Комплементарность

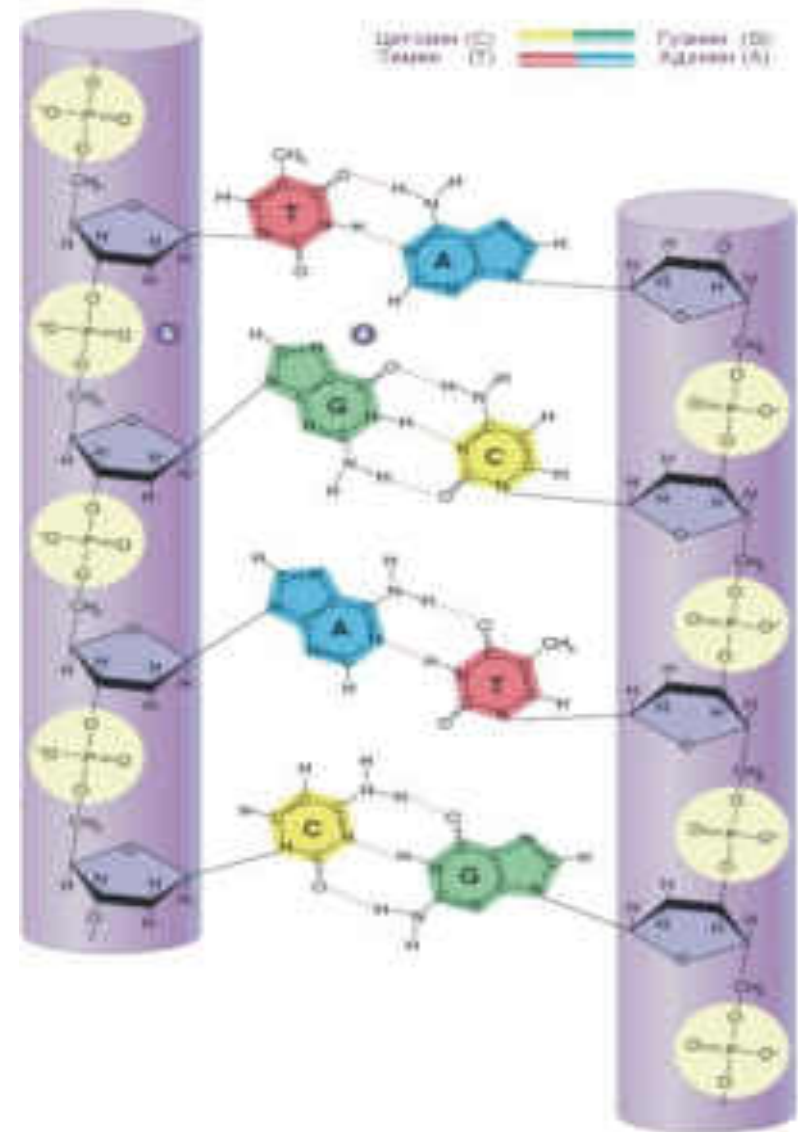
(дополнительность)

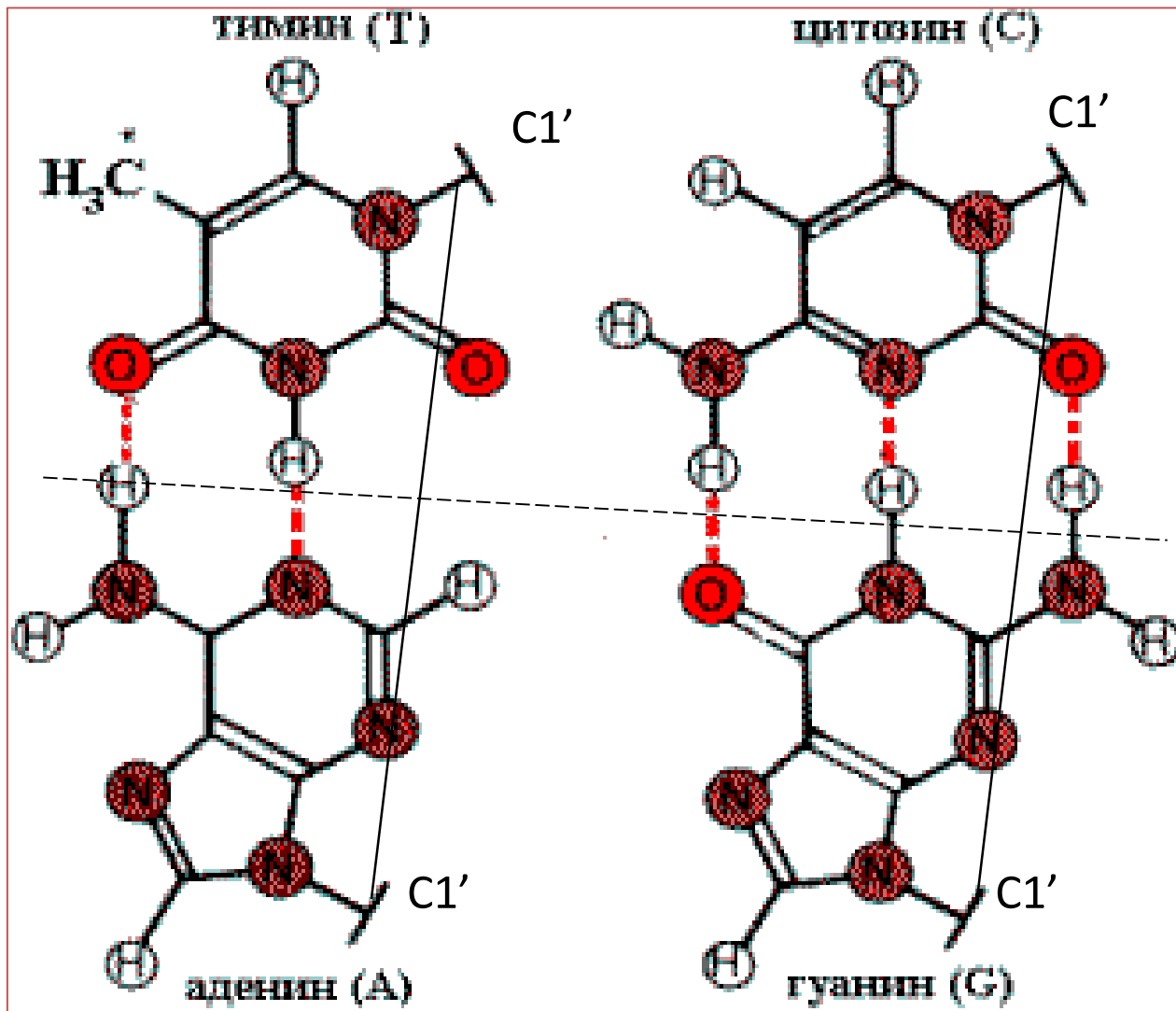
Каждому азотистому основанию одной цепи соответствует строго определенное азотистое основание другой цепи

**(А-Т; Г-Ц)**

## 2. Антипараллельность

ДНК состоит из двух полинуклеотидных цепей, ориентированных антипараллельно (5'-конец одной из них расположен напротив 3'-конца другой)





**Азотистые основания соединяются водородными СВЯЗЯМИ**

- G-C пары прочнее, чем А-Т

# Третичная структура ДНК

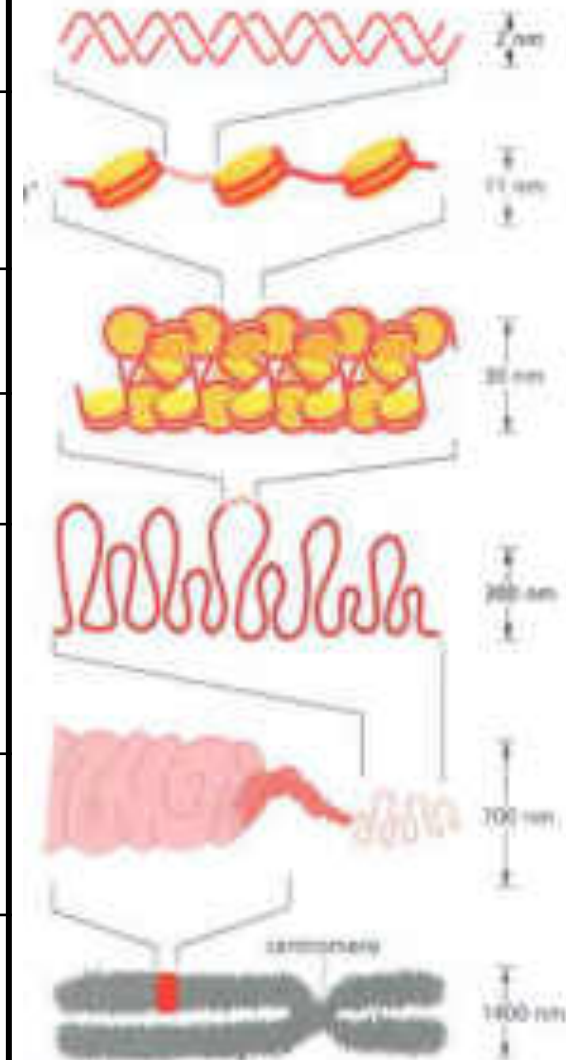


Укладка молекулы ДНК  
в компактную структуру  
**ХРОМОСОМУ** (нуклео-  
протеидный комплекс) с  
помощью белков  
ГИСТОНОВ

# ТРЕТИЧНАЯ СТРУКТУРА ДНК

## Уровни структурной организации хроматина

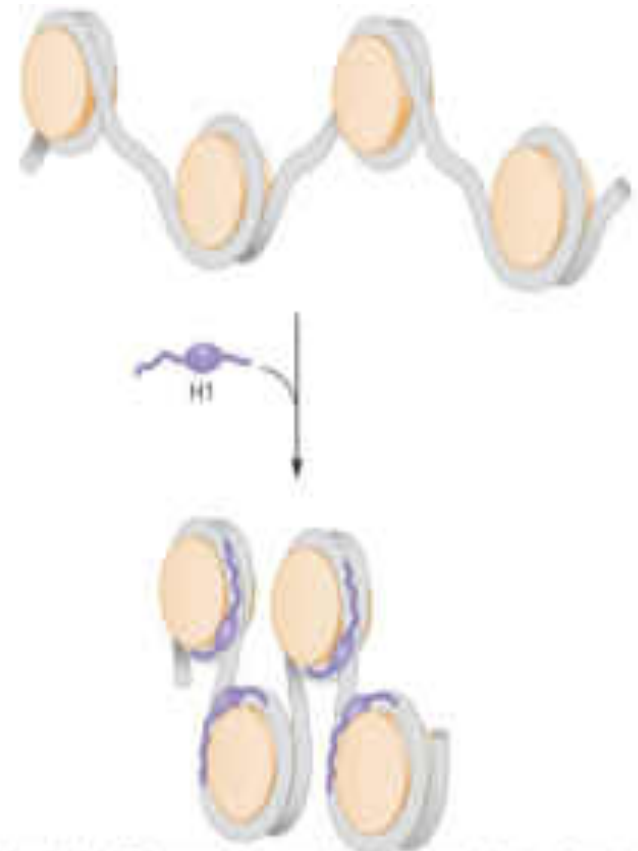
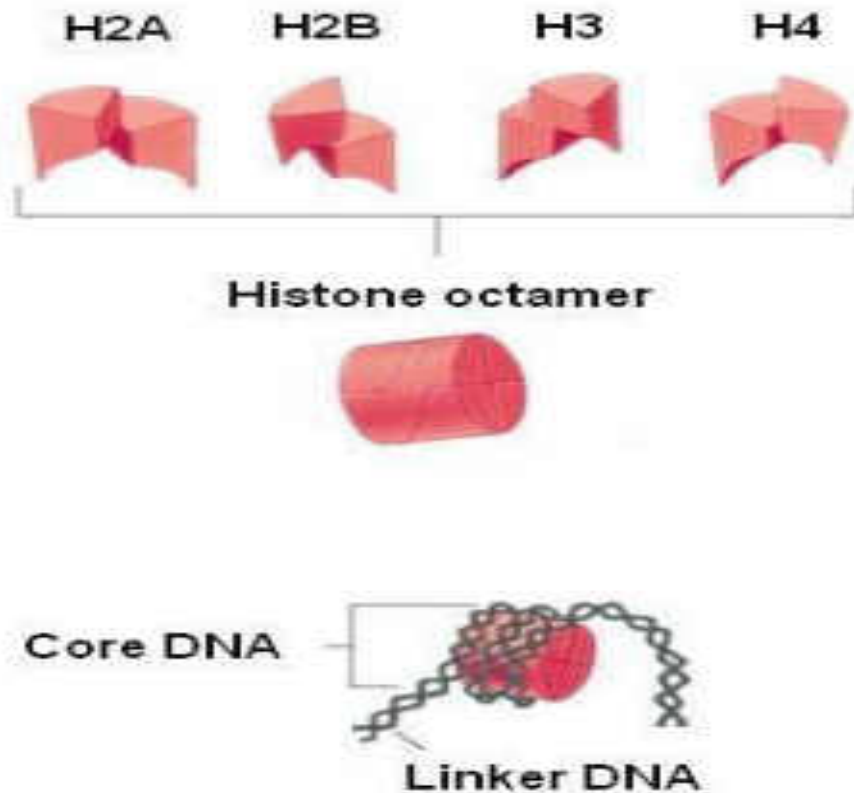
	Обозначение	Структура
1	<b>Двойная спираль</b>	Собственно вторичная структура ДНК
2	<b>Нить нуклеосом</b>	Цепь ДНК, через определенное расстояние намотанная на гистоновый октамер
3	<b>Нуклеосомное волокно</b>	Плотная однорядная упаковка нуклеосом при участии гистона H1
4	<b>Соленоид</b>	Плотная трехрядная упаковка нуклеосом
5	<b>Петли</b>	Спирализация соленоида, организуемая при участии негистоновых белков хроматина и белков ядерного скелета
6	<b>Мини-диски</b>	Структурное объединение примерно 20 петель
7	<b>Хромосома</b>	Плотная стопчатая упаковка мини-дисков



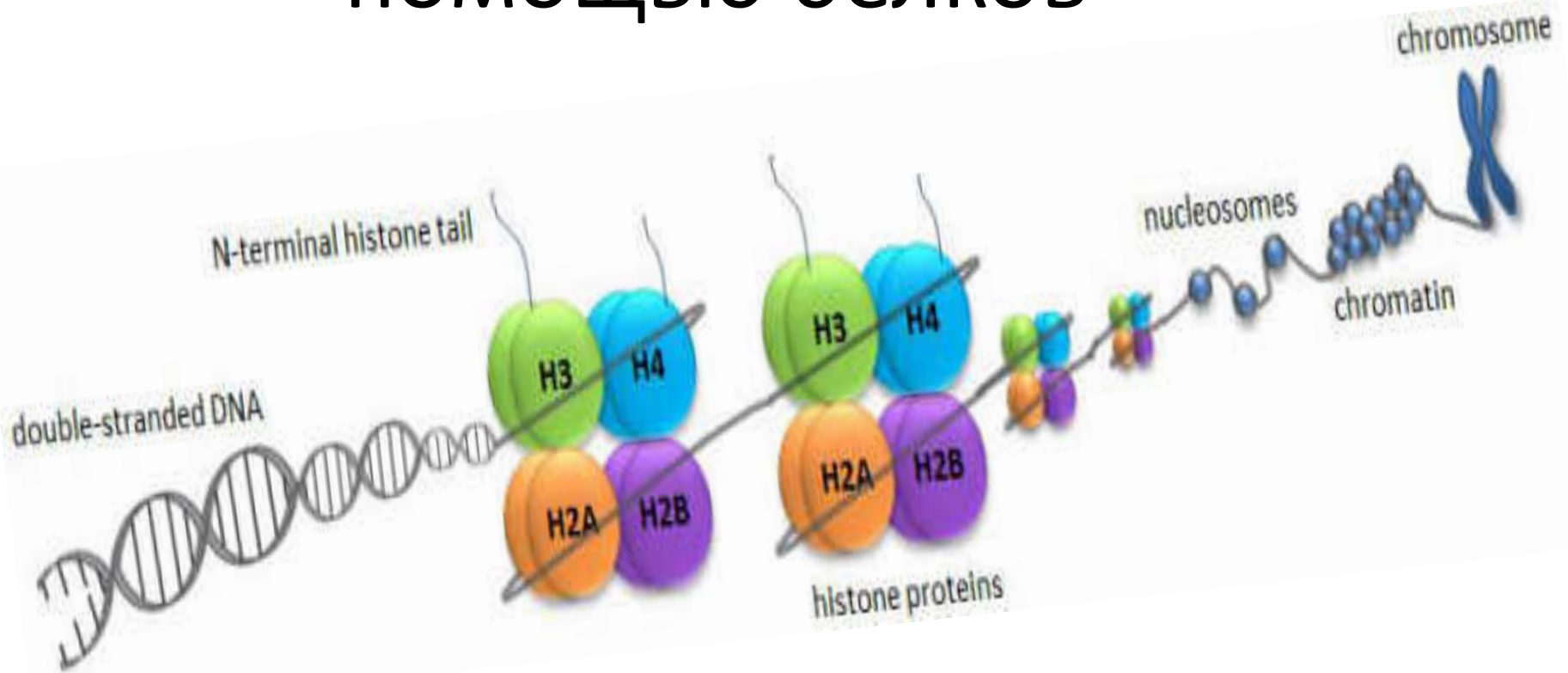


# Гистоны

Ядерные белки богатые лизином и аргинином, содержат структурный мотив  $\alpha$ -спираль-поворот- $\alpha$ -спираль.

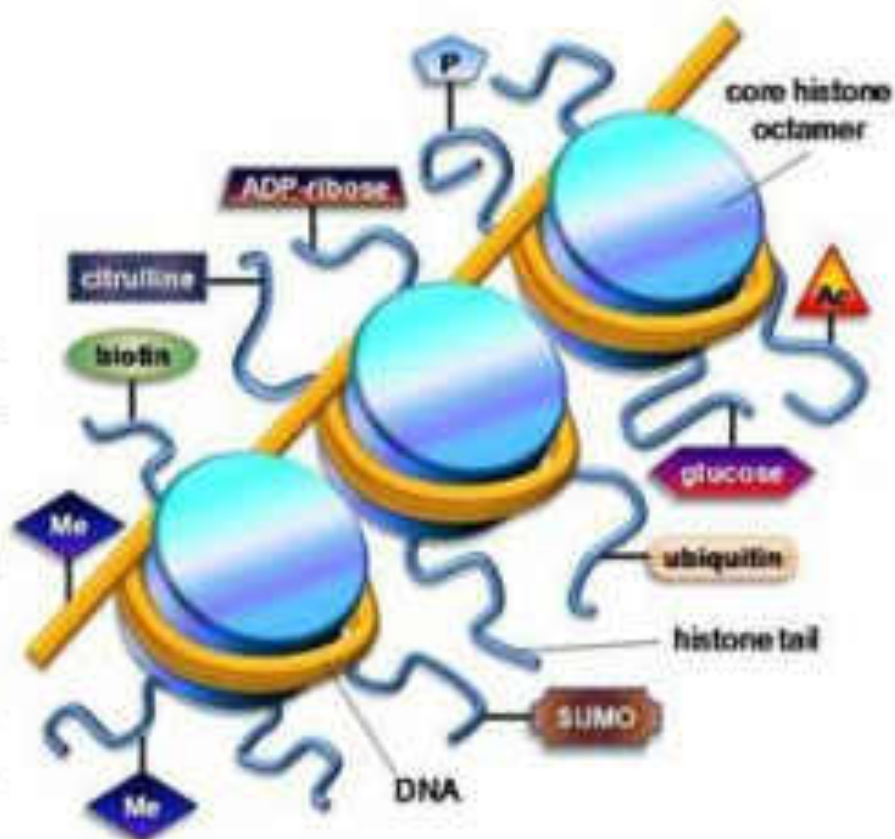


# Упаковка ДНК в хромосому с помощью белков



# Модификации гистонов

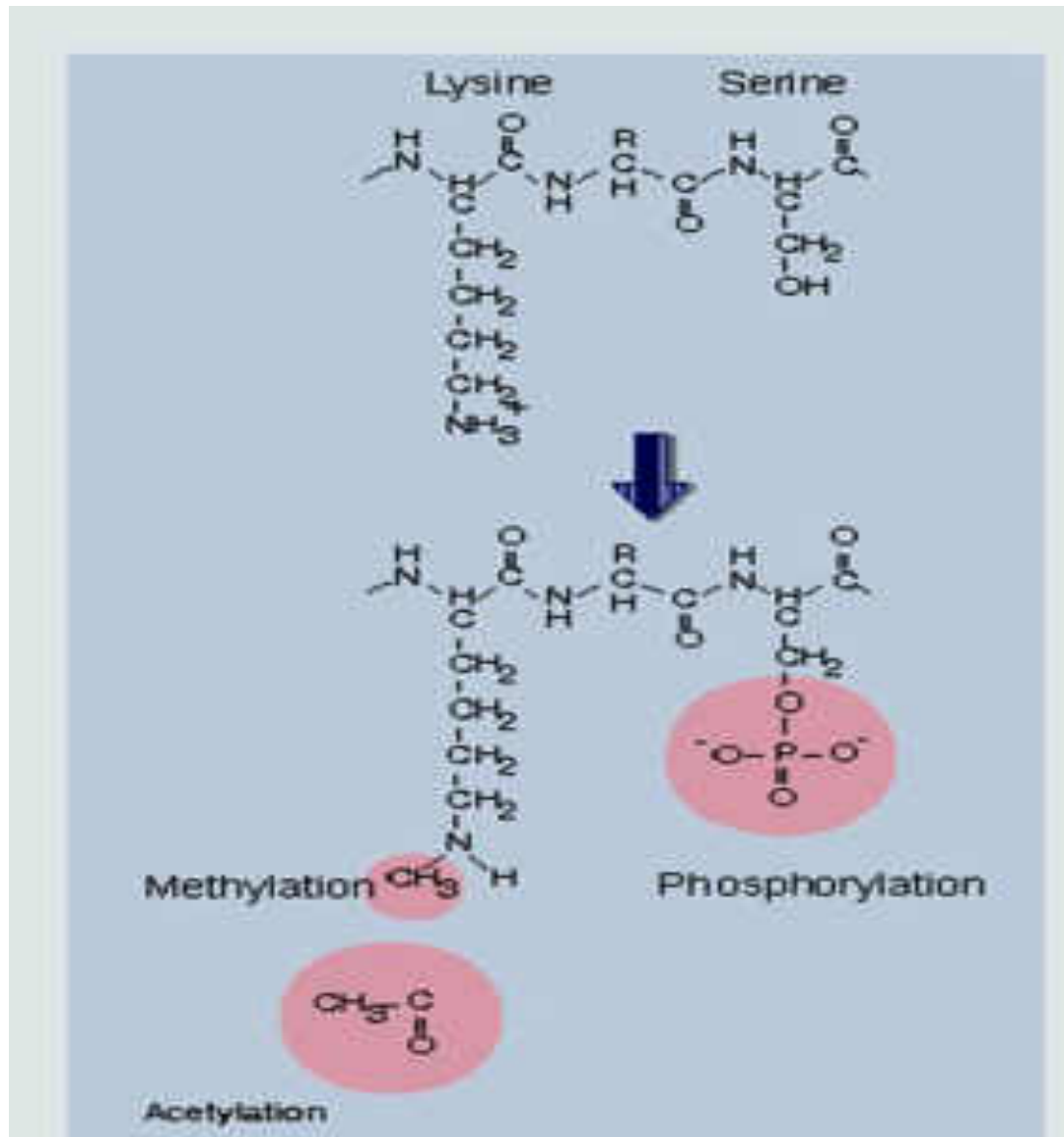
Аминокислота	Модификация
Лизин (K)	Метилирование (Me) Ацетилирование (Ac) Убиквитинирование (Ub) Сумоилирование (Su) Рибозилирование (Rib)
Аргинин (R)	Метилирование (Me)
Серин (S) Треонин (T) Цистеин (C)	Фосфорилирование (P)



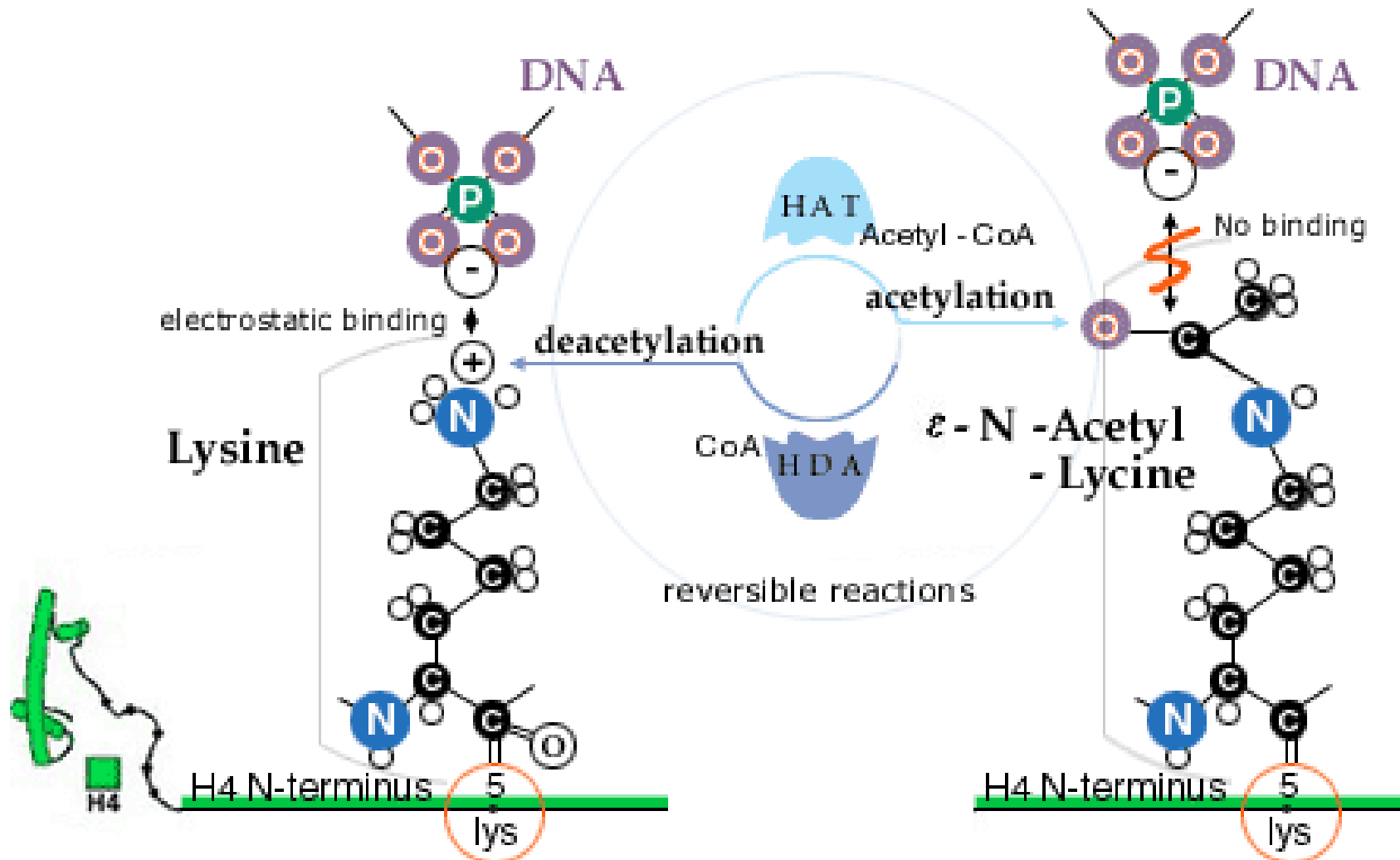
Модификация	Суть модификации	Аминокислотные остатки-мишени	Биологическая роль
<b>Фосфорилирование</b>	Присоединение остатков ортофосфорной кислоты	Сер	Стимулирует конденсацию хроматина
<b>Ацетилирование</b>	Присоединение остатка уксусной кислоты	Лиз	Стимулирует разворачивание хроматина
<b>Метилирование</b>	Присоединение $\text{CH}_3$ -группы	Лиз	Данные противоречивы
<b>Убиквитирование (только для H2a)</b>	Ковалентное связывание с низкомолекулярным белком убихвитином	Лиз	Стимулирует разворачивание хроматина
<b>АДФ-рибозилирование</b>	Присоединение АДФ-рибозы	?	Необходимо в процессе репарации ДНК

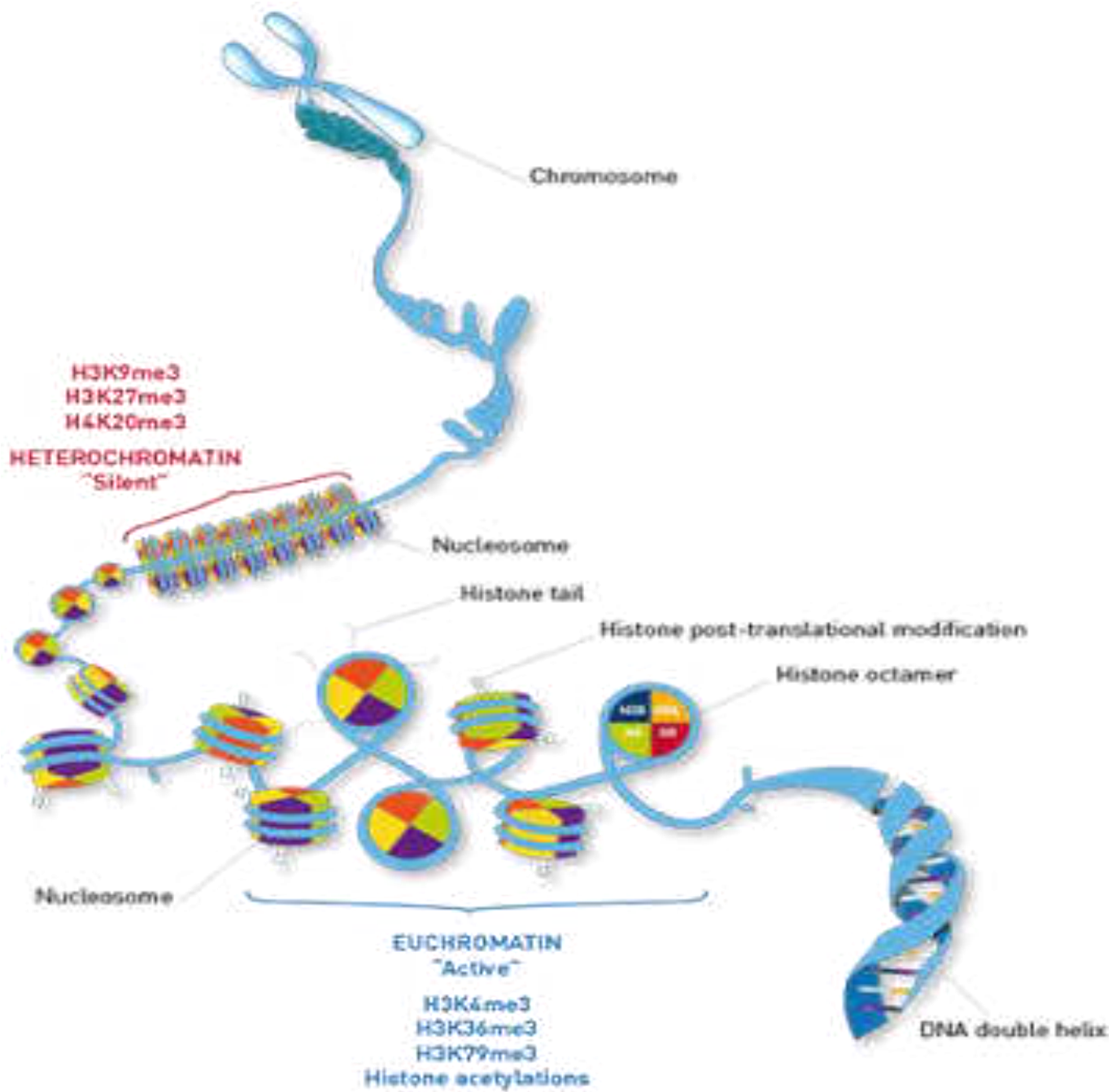
Активность ферментов, ответственных за модификацию, регулируется и зависит от стадии клеточного цикла

# Химическая модификация гистонов



# Ацетилирование гистонов





# РЕПЛИКАЦИЯ ДНК

Репликация ДНК (replico - повторяю) процесс образования идентичных копий ДНК, осуществляемый комплексом ферментов и белков

Репликация ДНК происходит при делении клеток и лежит в основе передачи наследственных признаков





# Принципы процесса репликации

- **комплементарность** — новая цепь строится по принципу дополнения материнской цепи
- **полуконсервативность** — одна цепь молекулы ДНК, образовавшейся в результате репликации, является вновь синтезированной, а вторая — материнской;
- **униполярность** - идёт в направлении от 5'-конца новой молекулы к 3'-концу;
- **прерывистость** — одна из цепей ДНК синтезируется непрерывно, а вторая — в виде набора отдельных коротких фрагментов (фрагментов Оказаки);
- **начинается с определённых участков ДНК**, которые называются *сайтами инициации*

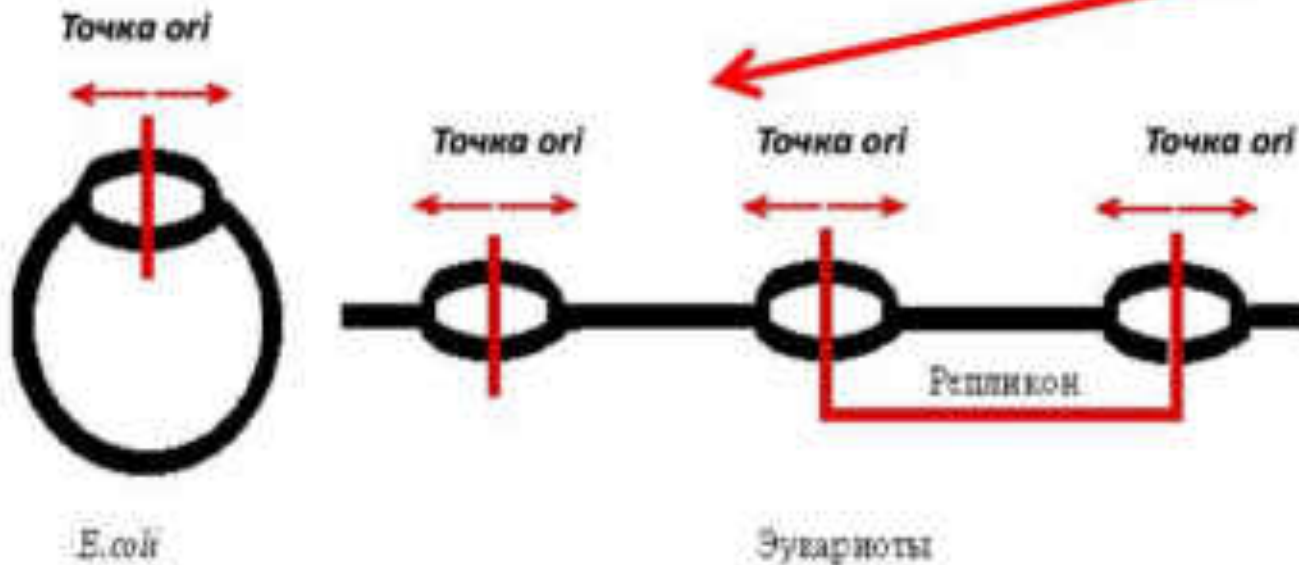
# Основные этапы репликации

- Инициация
- Элонгация
- Терминация

# Репликация ДНК

- Репликация начинается в точке «*ori*» (начало репликации)

У бактерий в кольцевом геноме имеется только одна точка «*ori*», тогда как у эукариотических хромосом их множество

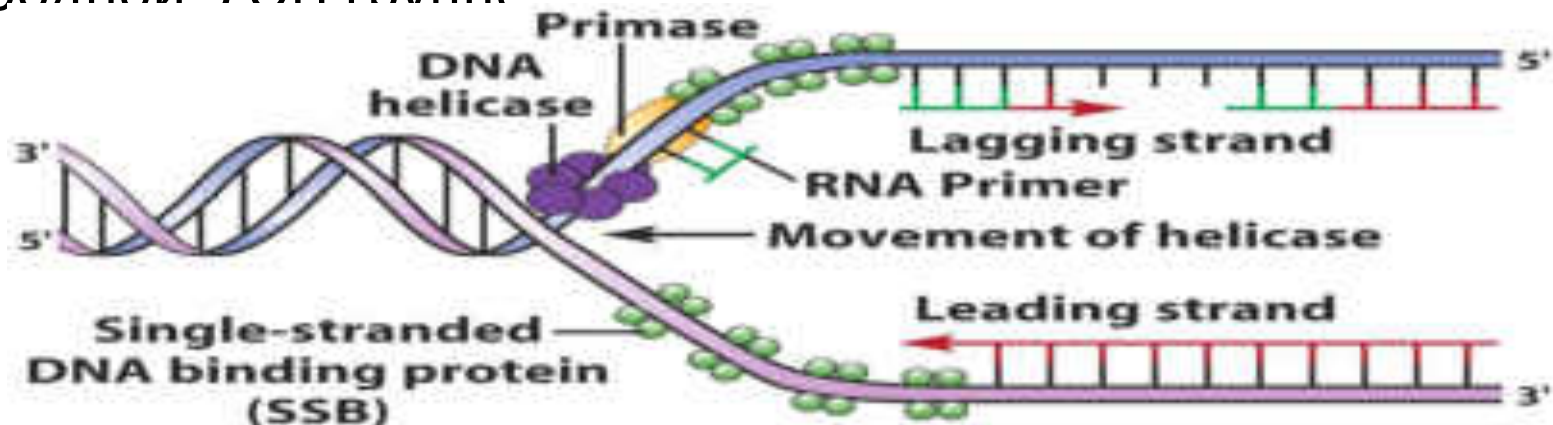


Ориджины репликации имеют определенную нуклеотидную последовательность.

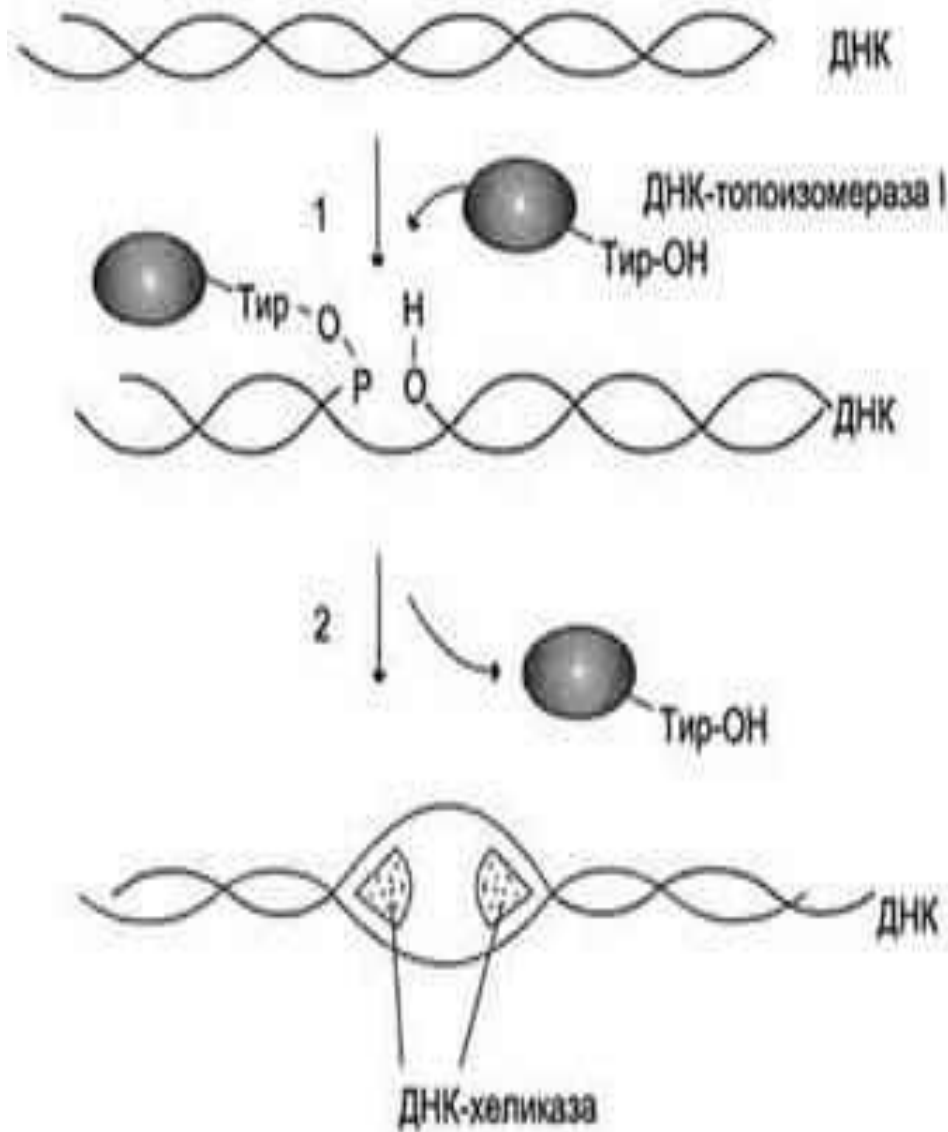
- **Репликон** - участок ДНК между двумя «ориджинами» репликации.

# ИНИЦИАЦИЯ РЕПЛИКАЦИИ

1. Перед процессом репликации молекула ДНК должна быть раскручена (Фермент: **ДНК-топоизомеразы**).
2. Две нити должны быть разделены (как две стороны молнии), путем разрыва слабых водородных связей между нуклеотидами (Фермент : **хеликаза**).
3. После того, как нити ДНК были разделены, они должны быть стабилизированы (**SSB- белки**).
4. Образование праймера (Фермент: **праймаза**). Синтез новой цепи ДНК требует затравки в виде небольшого фрагмента РНК, т.к. ведущий его фермент ДНК-полимераза для работы нуждается в свободной 3'ОН группе



# ДНК-топоизомеразы

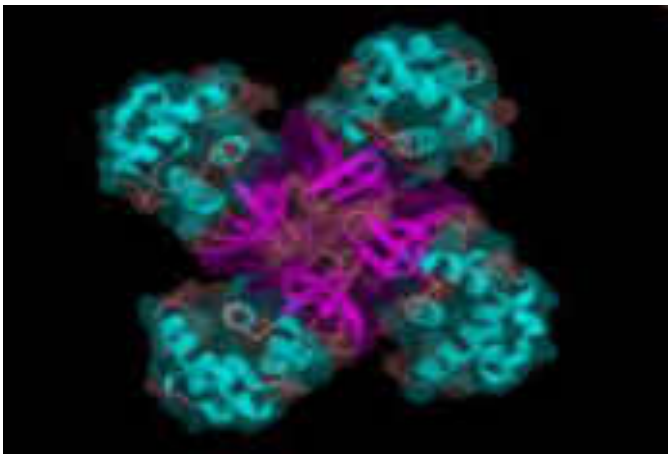
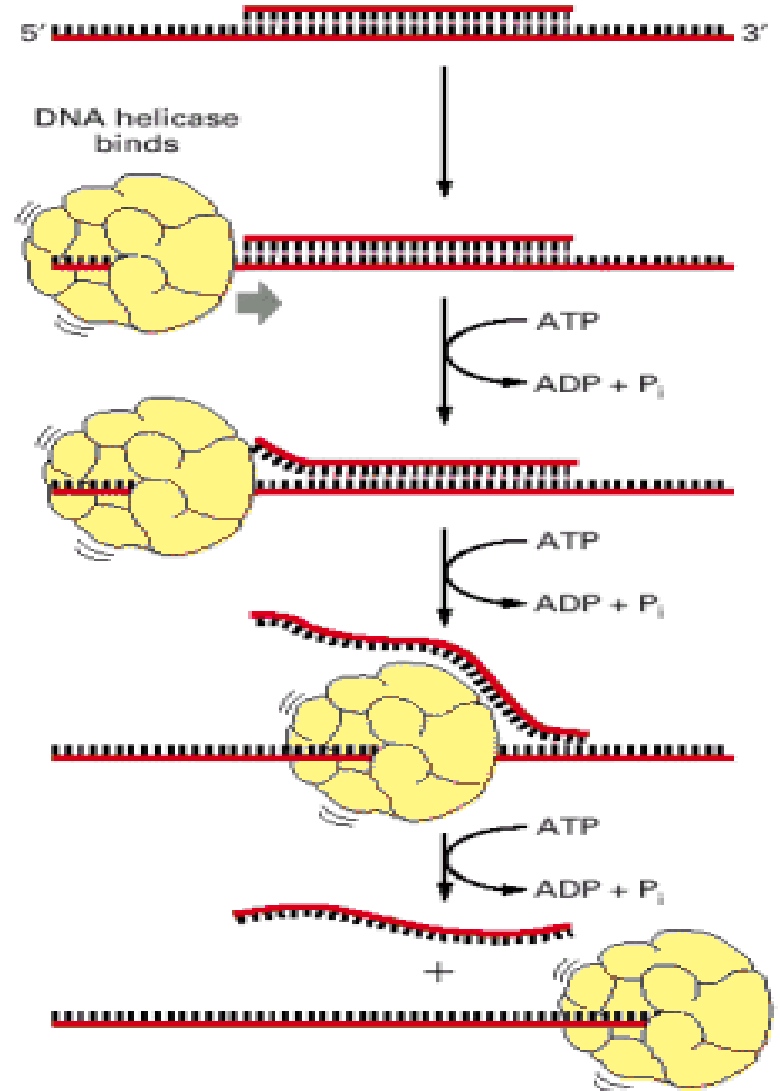


Участвуют в инициации репликации и регуляции суперспирализации ДНК

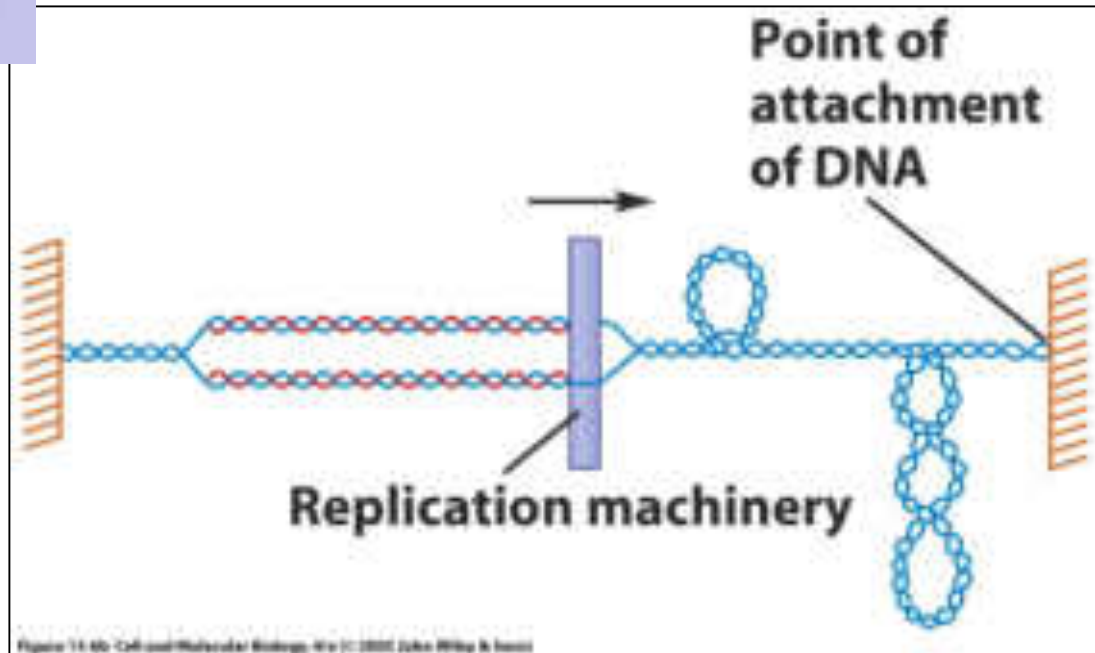
**ДНК-топоизомераза I** разрывает фосфоэфирную связь в одной из цепей двойной спирали и ковалентно присоединяется к 5'-концу в точке разрыва. После формирования репликативной вилки фермент ликвидирует разрыв в цепи и отделяется от ДНК.

# ХЕЛИКАЗА

ДНК-хеликаза осуществляет разрыв водородных связей в двухцепочечной молекуле ДНК, использует энергию АТФ.

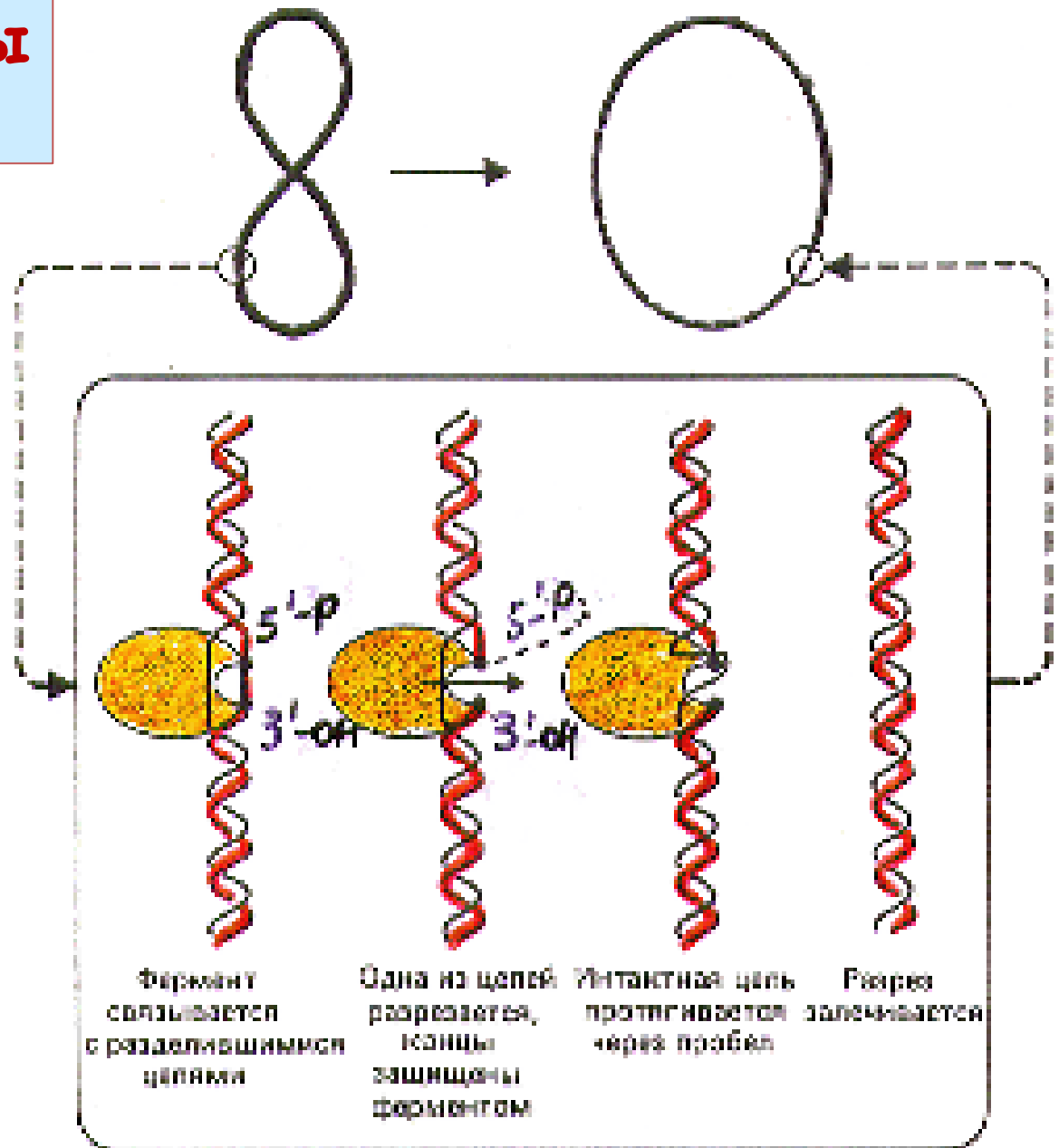


# СУПЕРСПИРАЛИЗАЦИЯ ДНК



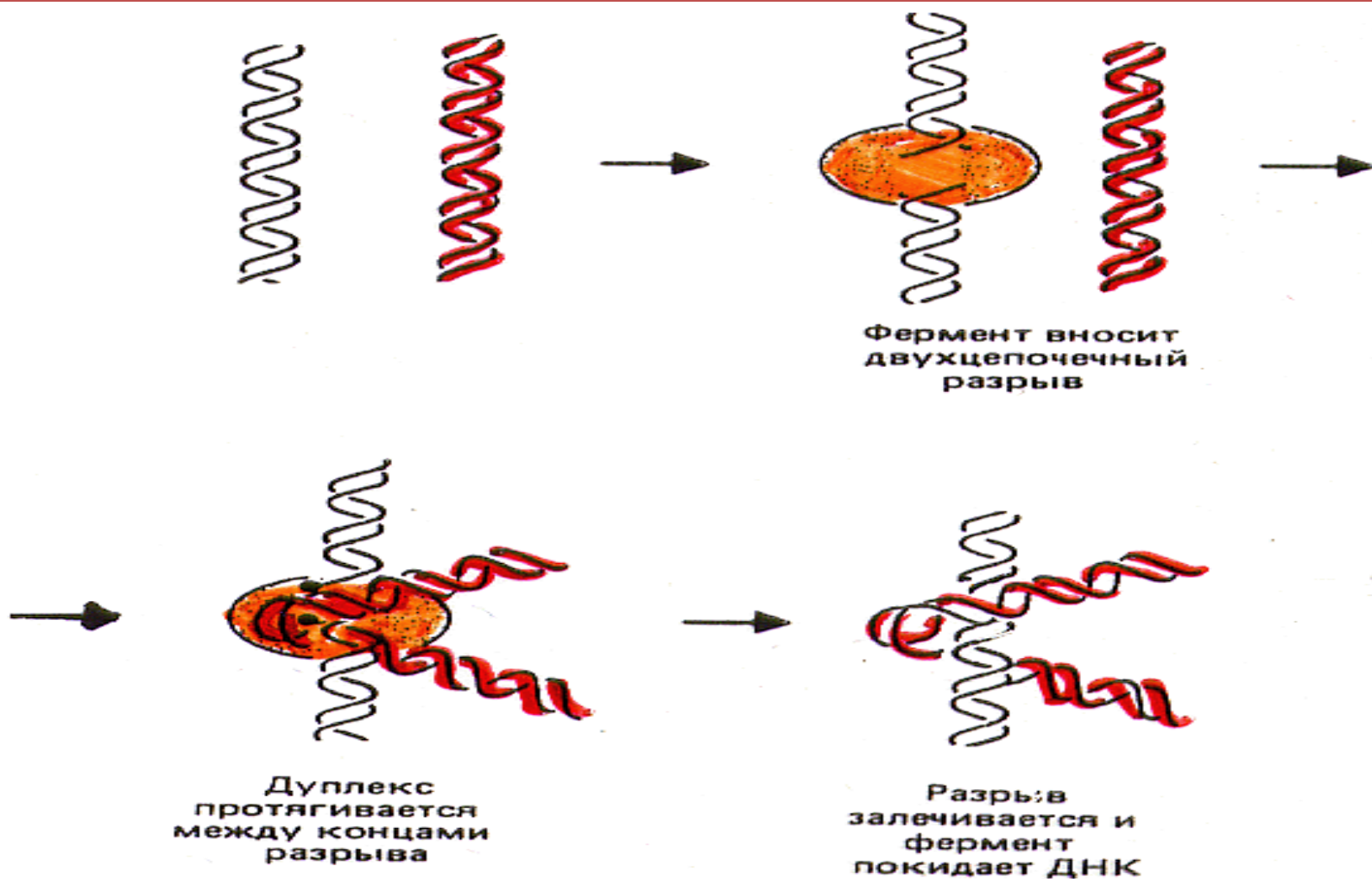
# Топоизомеразы типа I

- временно разрезают одну цепь ДНК из двух
- 5'-фосфат разрезанной цепи ковалентно прикрепляется к Tyr фермента
- Разорванная нить раскручивается, и цепь зашивается
- Энергии извне не требуется



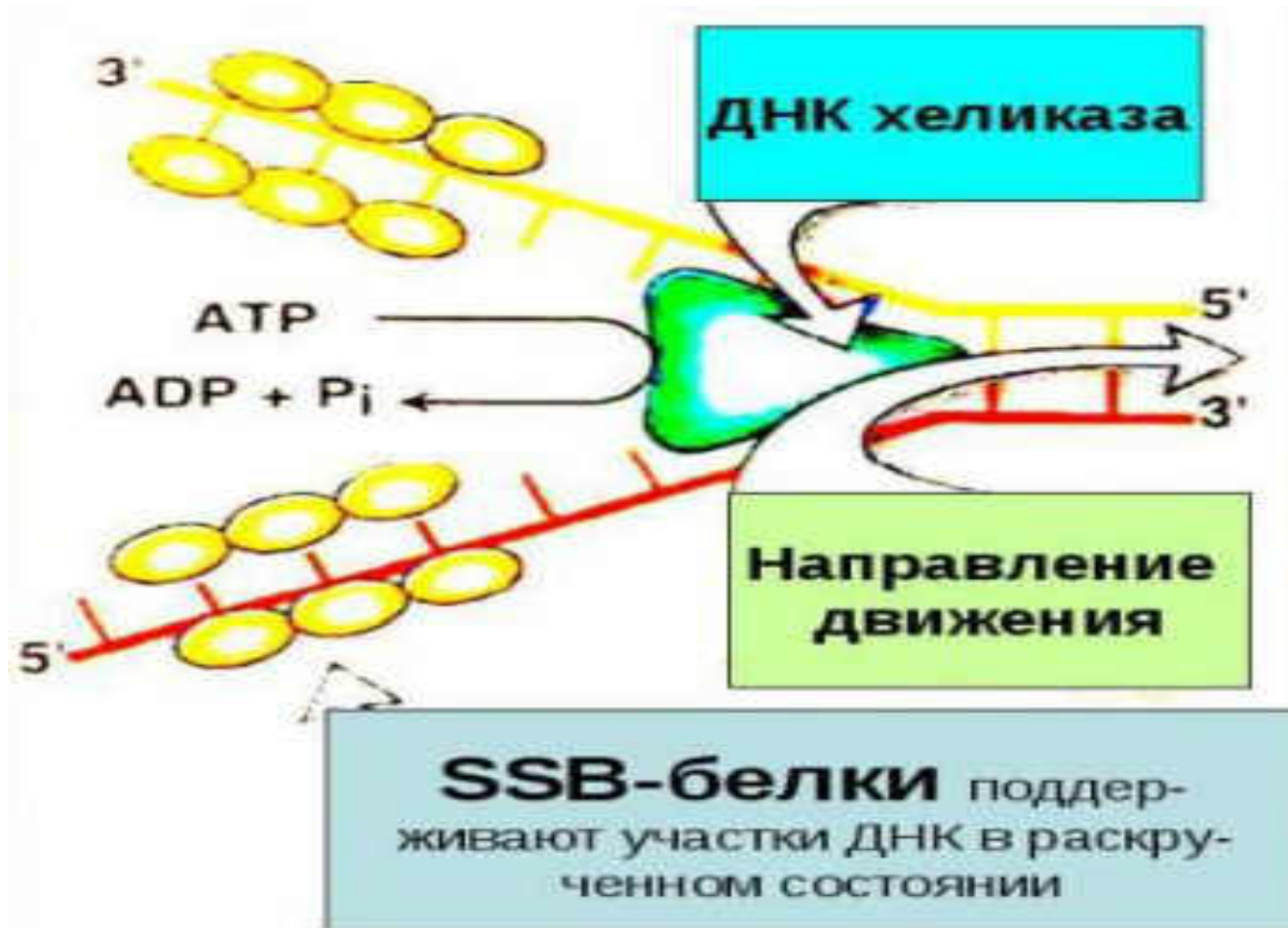


# Топоизомераза типа II: ДНК



# SSB – белки *single strand binding proteins*

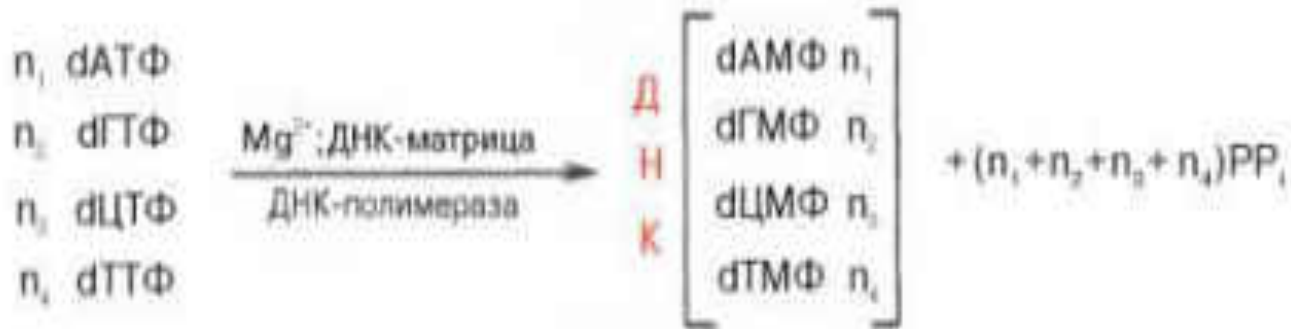
Стабилизируют разделенные одноцепочечные фрагменты



# Элонгация репликации

# ОСНОВНОЙ ФЕРМЕНТ Репликации - ДНК-ПОЛИМЕРАЗА

Катализирует реакцию:



**Матрица**- цепи ДНК

**Субстраты** - нуклеотидтрифосфаты (**dATФ, dГТФ, dТТФ, dЦТФ**), они же - источники энергии.

**Продукт** – дочерние цепи ДНК

Фермент ДНК-полимераза перемещается вдоль открытой нити ДНК, присоединяя вновь прибывшие нуклеотиды к новой нити ДНК, комплементарной к шаблону.

# Ферментативная реакция, катализируемая ДНК-полимеразой - присоединение нуклеотидмонофосфата к свободному 3-концу

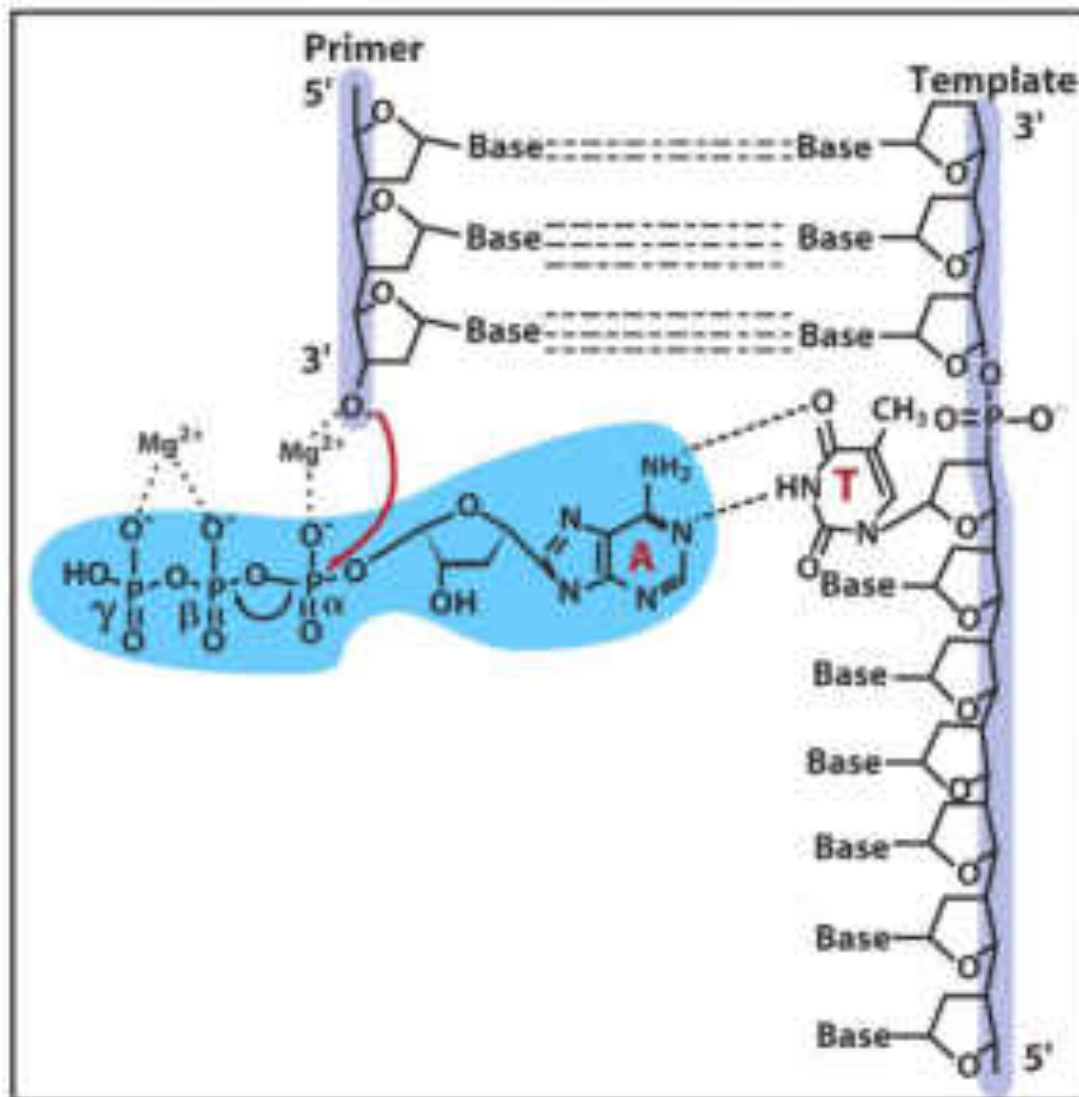


Figure 13-8b Cell and Molecular Biology, 4/e (© 2005 John Wiley & Sons)

## Особенность ДНК- полимераз

Не могут начинать синтез ДНК, а способны только добавлять новые дезоксирибонуклеотиды к **3'-концу** уже имеющейся полинуклеотидной цепи



Эти ферменты нуждаются в затравке (праймере –фрагменте РНК), которая предоставляет свободный **3'-гидроксильный конец** для присоединения к нему дезоксирибонуклеотидов



## Асимметричный синтез ДНК в направлении 5'→3'

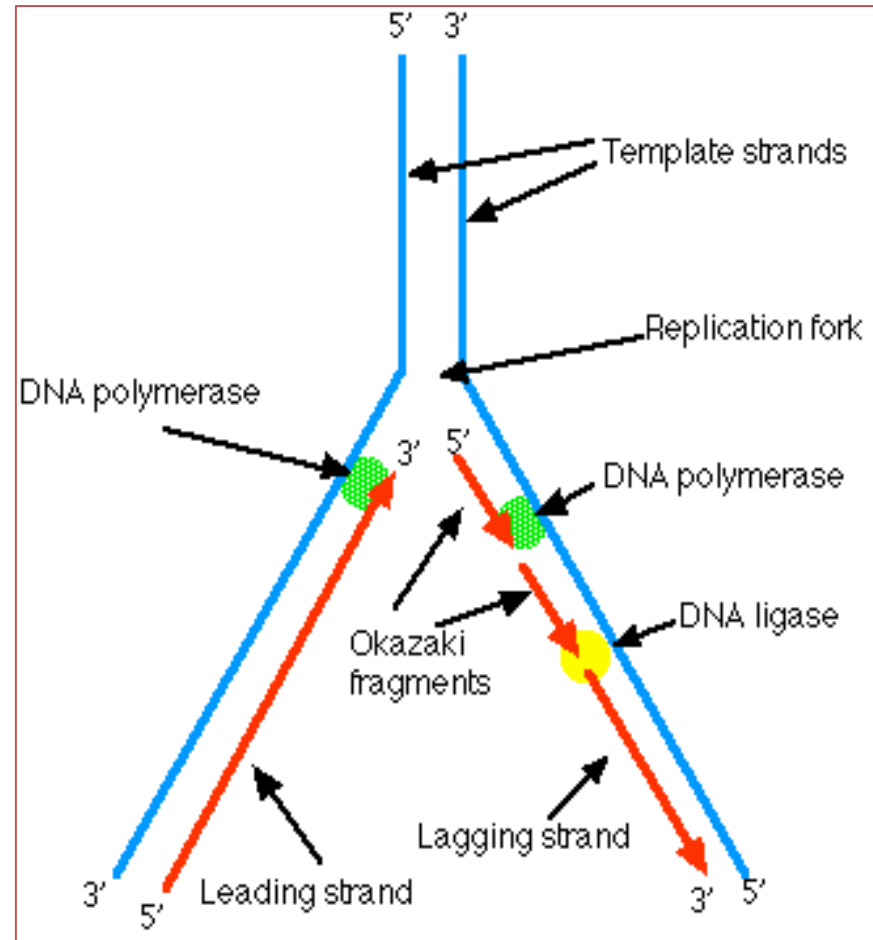
Ферментный комплекс функционирует так, что одна из двух цепей растет с опережением относительно другой цепи.

Первая цепь называется **лидирующей**, а вторая – **запаздывающей**.

**Лидирующая цепь** образуется в виде непрерывного очень длинного фрагмента.

**Запаздывающая цепь** образуется в виде серии относительно коротких фрагментов – **фрагменты Оказаки**.

Размеры фрагментов Оказаки:  
фаги – 1000-2000 н,  
*E.coli* – 1000 н  
эукариоты – 200-400 н.



ТЕРМИНАЦИЯ



# ЭТАПЫ ТЕРМИНАЦИИ

1. Вырезание праймеров (фермент полимеразы)

2. Заполнение брешей, образовавшихся после вырезания праймеров дезоксирибонуклеотидами :на лидирующей цепи -1 праймер, на отстающей – праймер на каждом фрагменте Оказаки (фермент полимеразы)

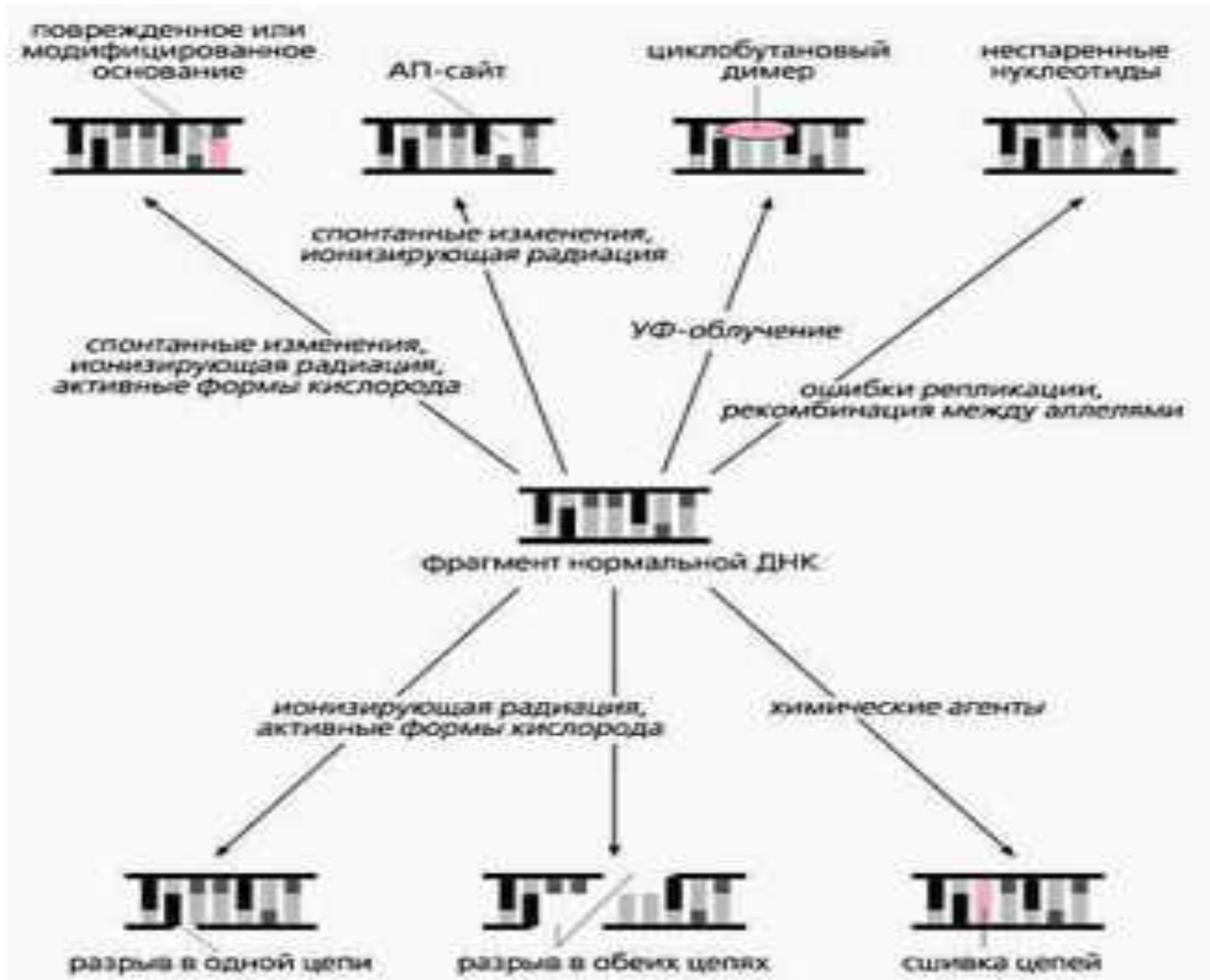
3. Сшивание фрагментов ДНК (фермент лигаза)

# Репарация

**Репарация** генетических повреждений – **свойство** живых организмов **восстанавливать** **повреждения**, возникающие в **ДНК** спонтанно или в результате воздействия разнообразных повреждающих факторов.



# Повреждения ДНК и их причины



- Ионизирующая радиация
- УФ-излучение
- Активные формы кислорода
- Химические агенты
- Спонтанные изменения

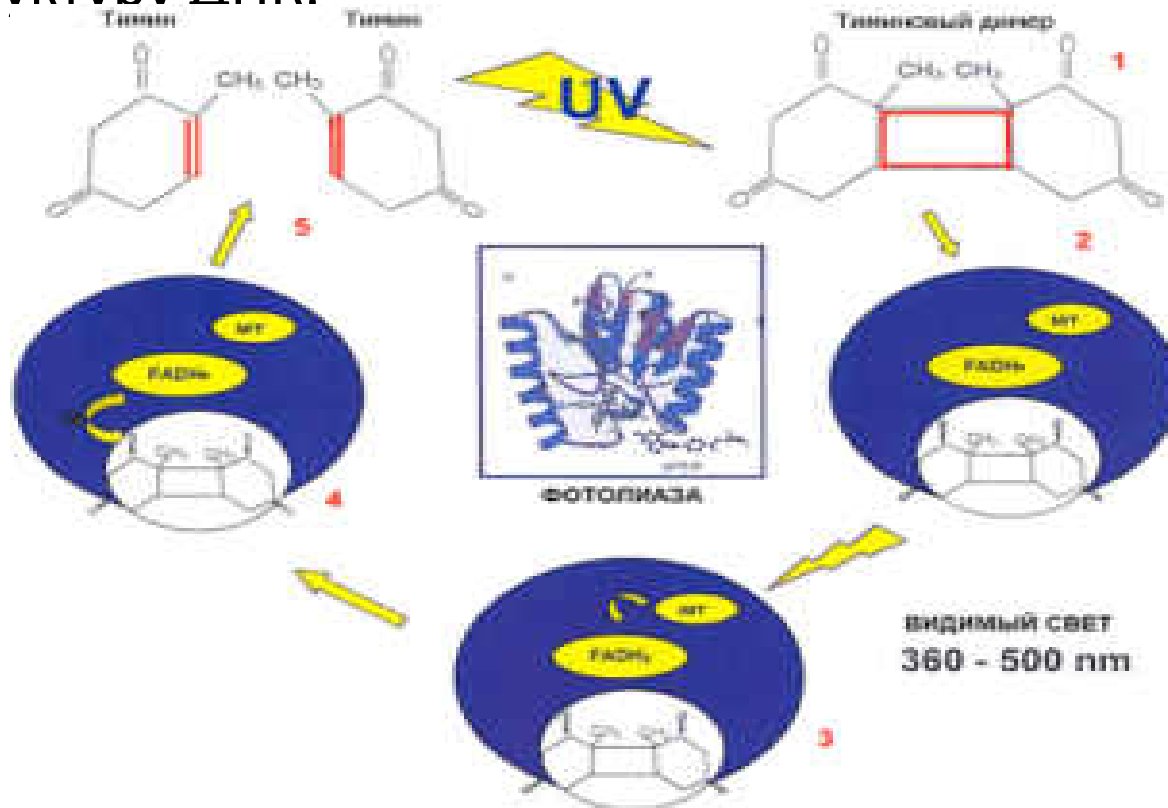
# Виды репарации

- **Прямая** - обеспечивает прямое восстановление исходной структуры ДНК или удаление повреждения.
- **Эксцизионная** – происходит в несколько этапов сопровождается вырезанием большого фрагмента цепи ДНК

# Репарация

## Пример: прямая репарация циклобутановых димеров

**Фотореактивация.** Фермент **фотолиаза** активируется светом и расщепляет образовавшиеся связи между соседними пиримидиновыми основаниями (тиминами) и восстанавливает нативную структуру ДНК.



# Экцизионная репарация

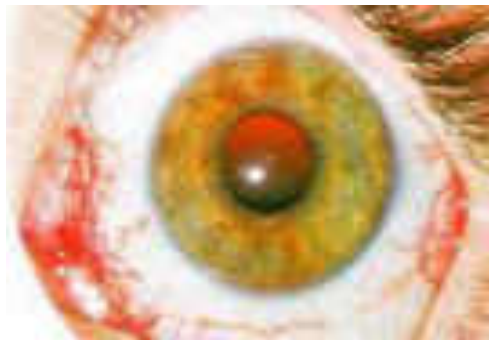
## Основные этапы

1. Узнавание повреждения (ДНК эндонуклеаза)
2. Разрез цепи ДНК ферментом по обе стороны от повреждения
3. Эксцизия (вырезание и удаление участка ДНК)
4. Восстановление структуры ДНК (ДНК – полимераза)
5. Сшивание концов ДНК (лигаза)



# Дефекты репарационных систем и наследственные болезни

Изменения сосудов конъюнктивы при синдроме Луи-Бара.



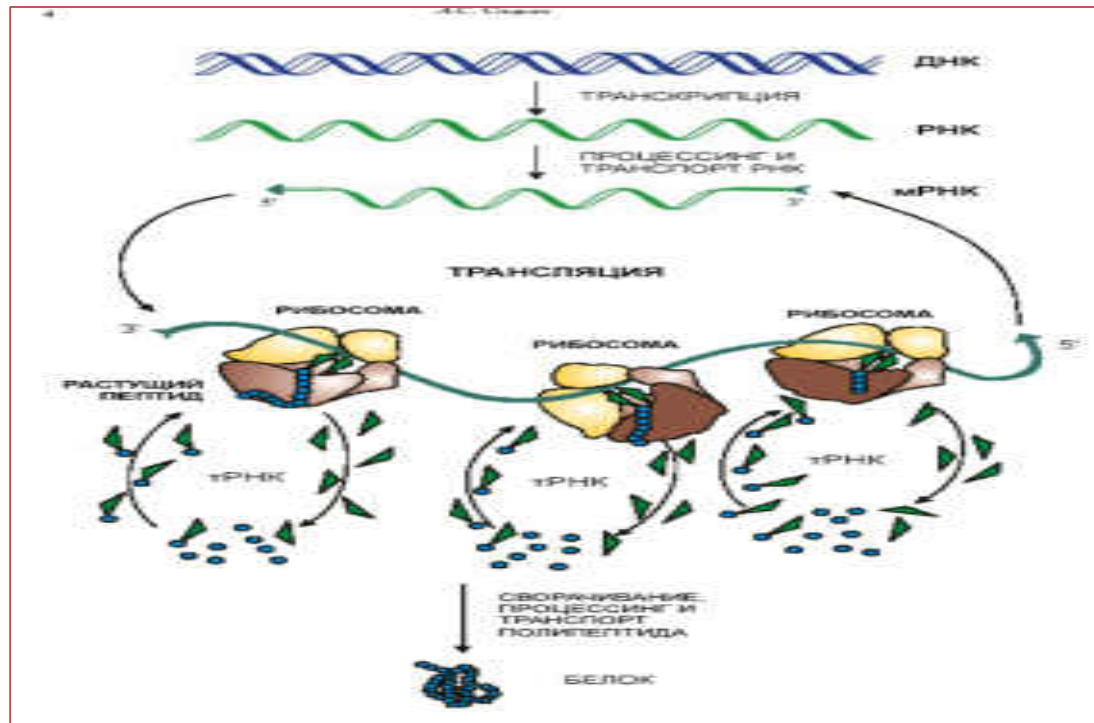
Пигментная ксеродермия (пятна, короста, рак кожи) – нарушение репарации УФ – повреждений



Синдром блума (глубокие поражения капилляров на лице) – мутация ДНК-лигазы



# Матричные биосинтезы



## Транскрипция

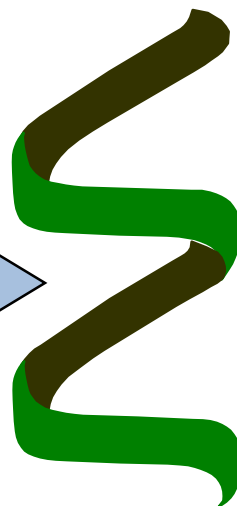




РНК-полимераза

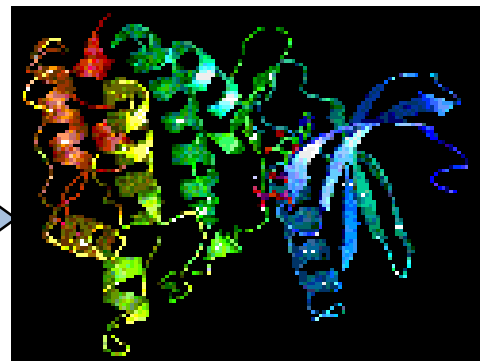
Транскрипция

Ген (ДНК)



мРНК

Трансляция



Белок

В каждом типе клеток экспрессируется свой набор генов и в определенный промежуток времени определенные гены

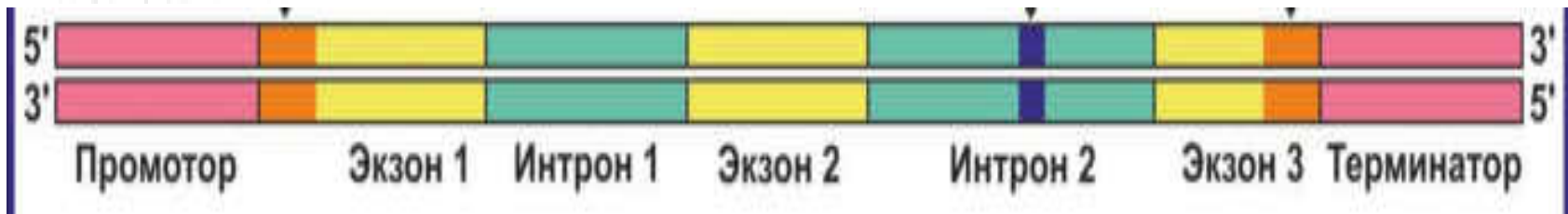
**ГЕН** – единица транскрипции эукариот

## Структура гена

**ПРОМОТОР** - особая последовательность нуклеотидов ДНК, узнаваемая РНК-полимеразой (**место старта синтеза РНК**)

**ТЕРМИНАТОР** - особая последовательность нуклеотидов ДНК, узнаваемая РНК-полимеразой (**финиш транскрипции**)

**ЭКЗОН** – транскрибируемый и транслируемый участок гена эукариот



**Транскрипция** - это синтез всех  
видов РНК (мРНК, рРНК, тРНК) на  
матрице ДНК ферментом **ДНК-**  
**зависимой РНК-полимеразой.**

**prokaryotic**

$\alpha$

$\alpha$

$\beta'$

$\beta$

$\sigma$

**РНК-полимераза - это белок с четвертичной структурой, состоящий из различных субъединиц**

**eukaryotic**

**RPB3**

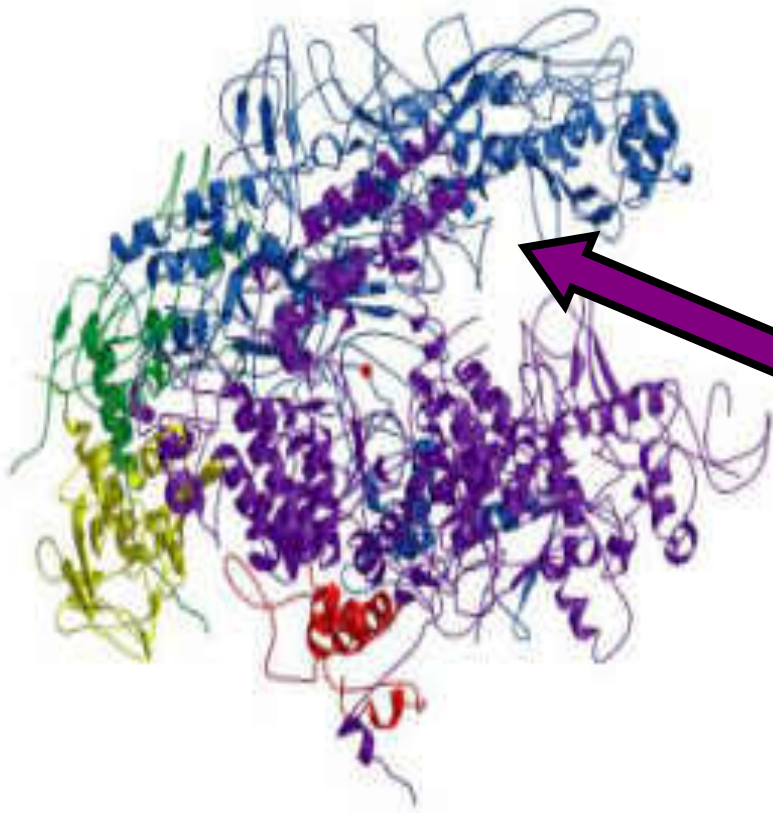
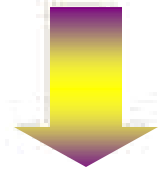
**RPB11**

**RPB2**

**RPB1**

**RPB6**

“Crab claw” shape of RNAP  
(The shape of DNA pol is\_\_)



Активный центр

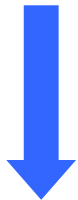
# Стадии транскрипции

## ИНИЦИАЦИЯ



- Связывание РНК полимеразы с промотором ДНК
- Расплетание ДНК на участке 10-20 нуклеотидов
- Образование фосфодиэфирной связи между первыми рибонуклеотидами

## ЭЛОНГАЦИЯ



- Удлинение цепи РНК

## ТЕРМИНАЦИЯ

- Остановка синтеза РНК
- Распад тройного комплекса: ДНК, РНК, полимеразы

*У эукариот специализированные ядерные РНК-полимеразы трех типов*

- **РНК-полимераза I** - синтезирует **rРНК** (кроме 5S rРНК).
- **РНК-полимераза II** - синтезирует **mРНК** и мяРНК.
- **РНК-полимераза III** - синтезирует **tРНК**, и **5SrРНК**.

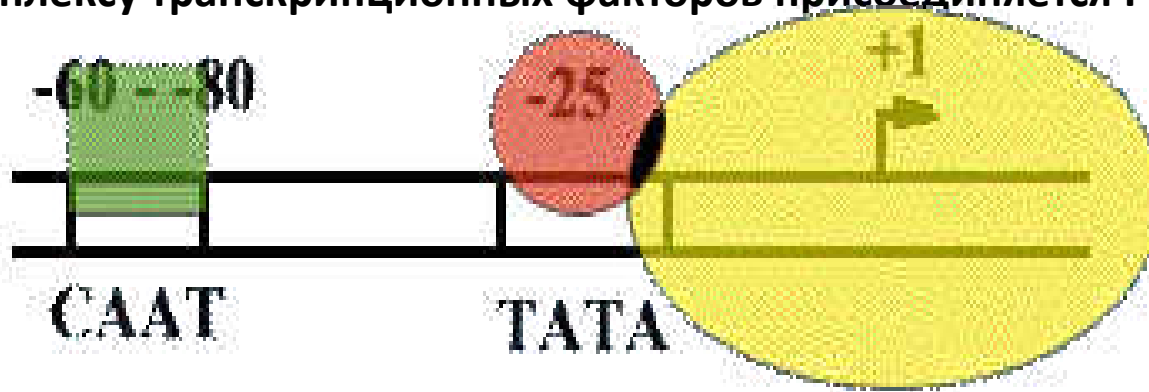
*Базальные факторы транскрипции - белки, необходимые для инициации транскрипции.*

Базальные факторы транскрипции необходимы для инициации транскрипции всеми типами ядерных РНК-полимераз.

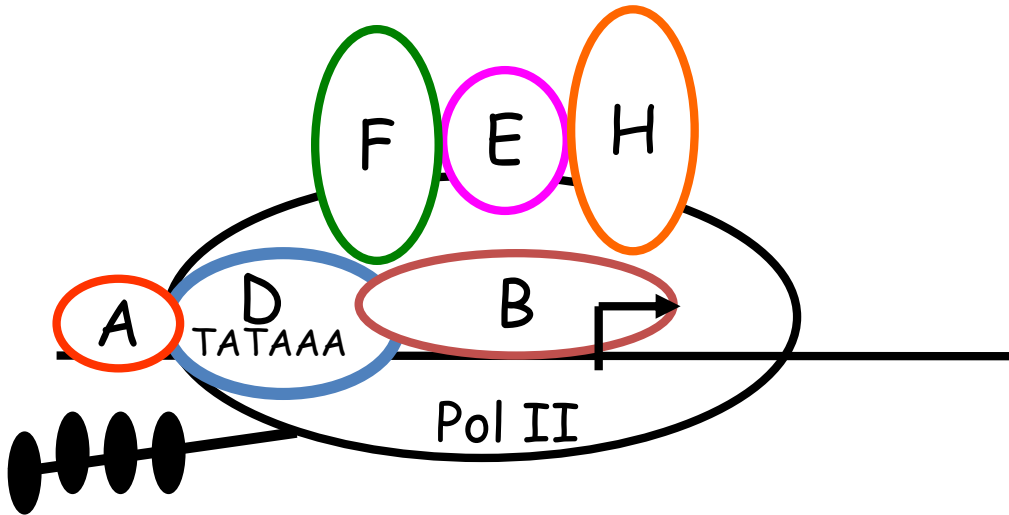


## Инициация транскрипции

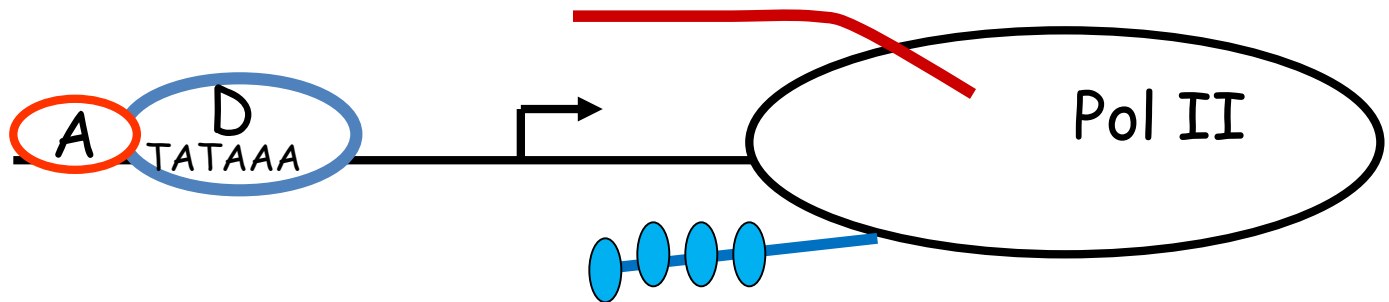
- В промоторе располагается находится **ТАТА-бокс**, максимально приближен к точке инициации транскрипции.
- А на расстоянии -60-80 п.н. находится **другой-бокс** ( с переменным составом нуклеотидов) .
- Расстояние между ТАТА –боксом и боксом с переменным составом нуклеотидов больше размера сигма-фактора РНК-полимеразы.
- Каждый бокс опознается своим базальным фактором транскрипции
- К этим белкам присоединяются другие базальные факторы транскрипции
- К комплексу транскрипционных факторов присоединяется РНК-полимераза



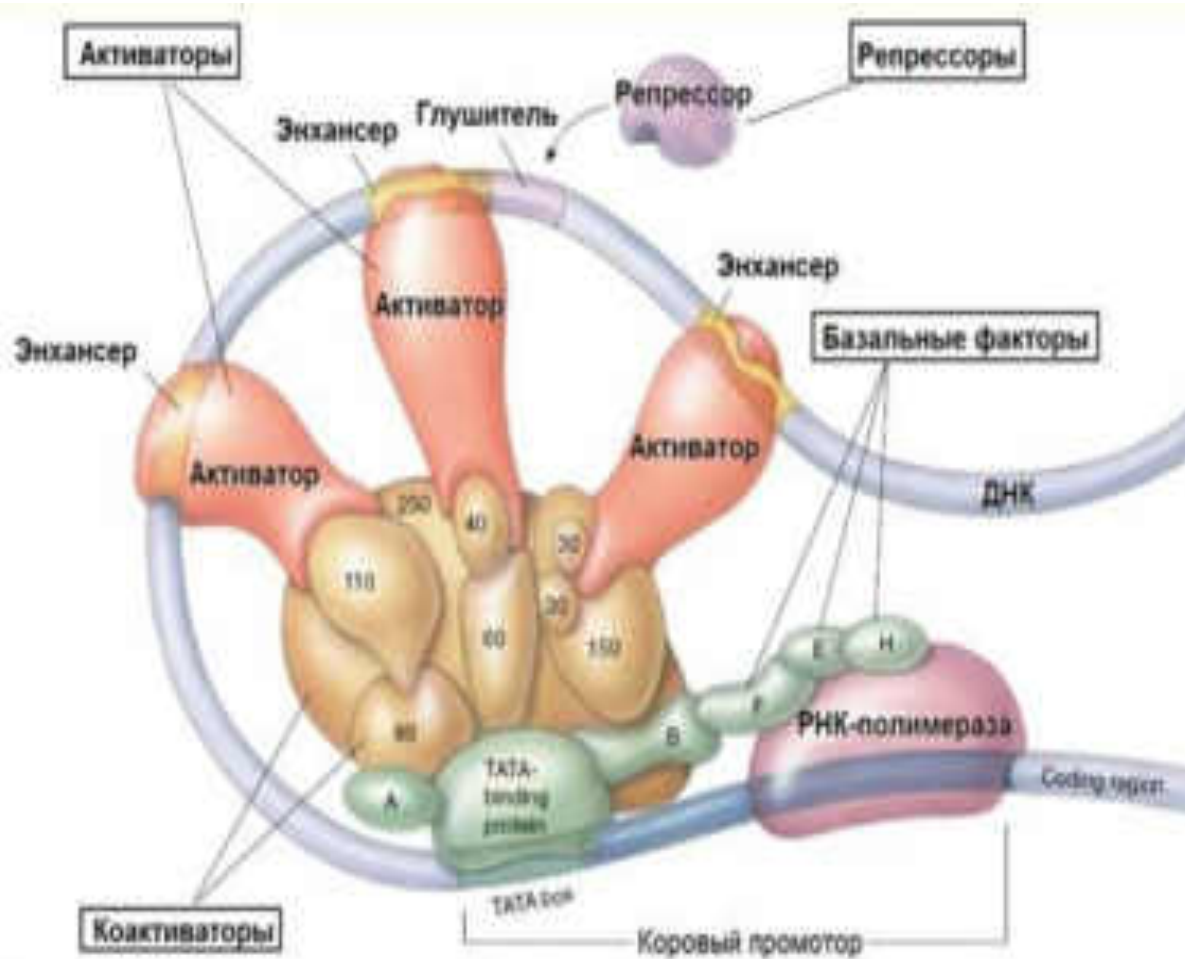
# Инициация



Один из факторов фосфорилирует РНК-полимеразу, она меняет конформацию, факторы остаются в зоне промотора, начинается транскрипция **РНК**



# СТРУКТУРА ТРАНСКРИПЦИОННОГО КОМПЛЕКСА ЭУКАРИОТ



Транскрипционный комплекс очень сложенный, состоит из нескольких типов белков:

**Базальные факторы** - определяющих стартовую точку

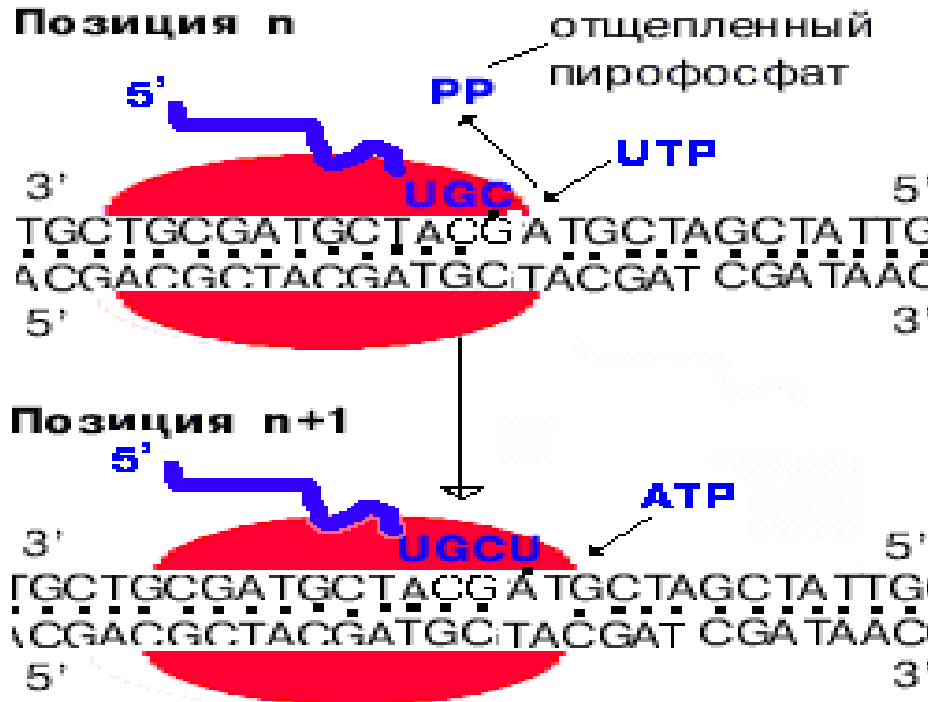
**Коактиваторы** - связывающие базальные факторы с активаторами

**Активаторы** - связывающиеся с регуляторными участками энхансерами

**Репрессоры** - мешающие связыванию активаторов

# Элонгация

Элонгация - удлинение цепи РНК с определенной скоростью (примерно 40-50 нукл./сек. )

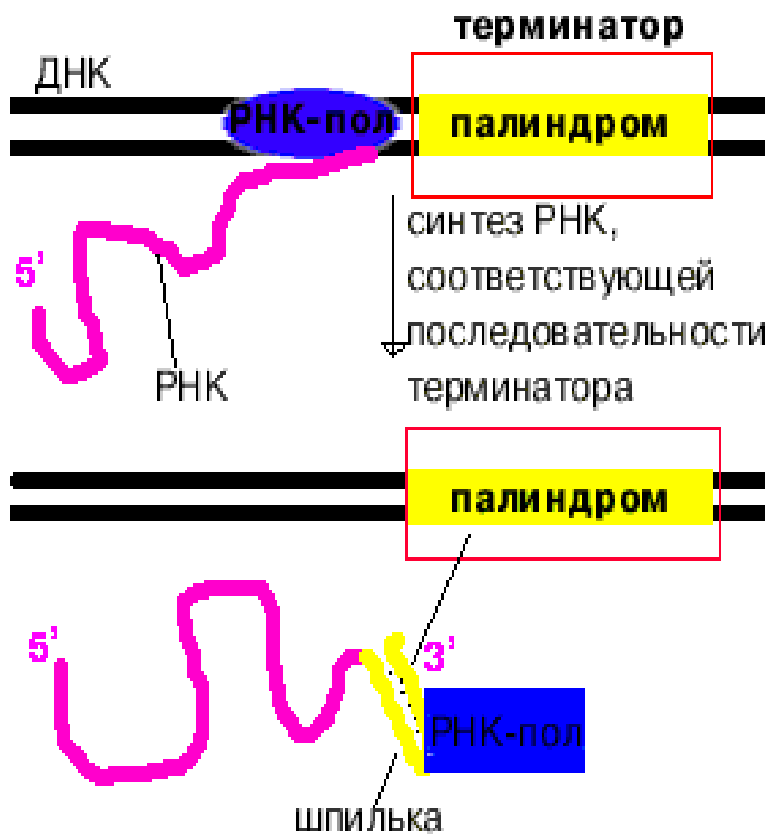


**Субстраты** – НТФ (АТФ, ГТФ, ЦТФ, УТФ), они же источники энергии

# Терминация

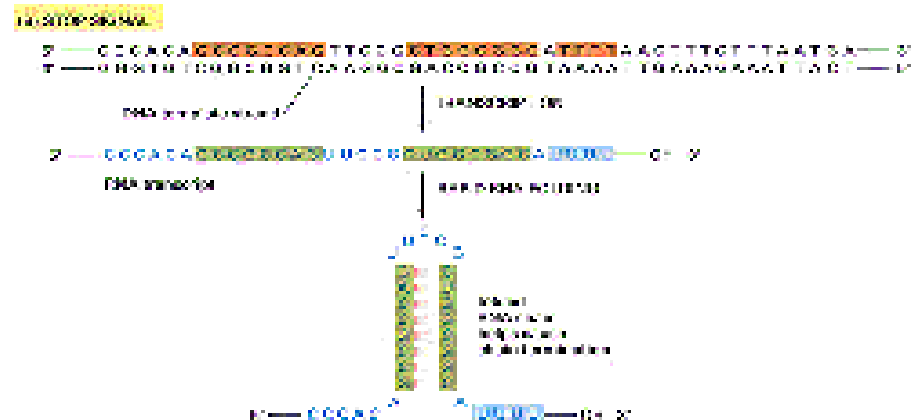
**Видов терминации** несколько, механизм терминации зависит от строения участка в конце гена -терминатора .

Пример:



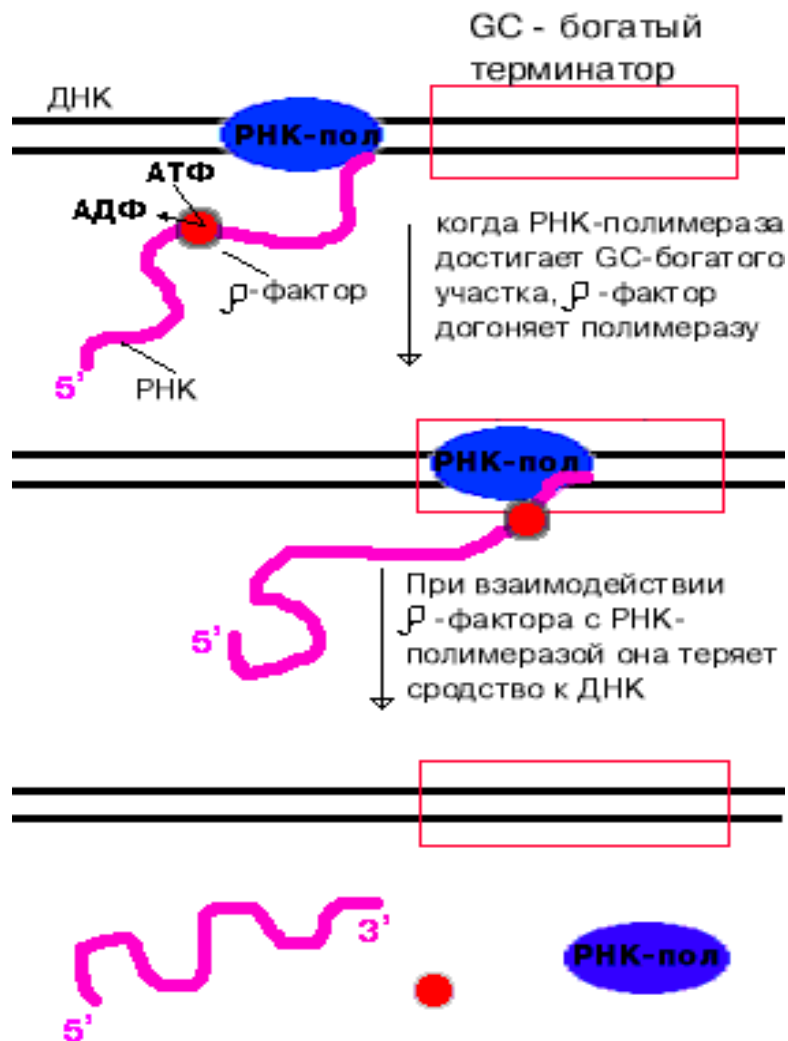
Терминатор - ПАЛИНДРОМ (участок с комплементарными основаниями)

В синтезируемой РНК формируется шпилька. Шпилька меняет конформацию РНК-полимеразы и фермент теряет сродство к ДНК – синтез заканчивается .



## Терминация

### ***ρ-зависимая терминация***



- ρ- фактор - это имеющий четвертичную структуру белок, обладающий АТФ-азной активностью.
- ρ- фактор способен узнавать 5`-конец синтезируемой РНК длиной приблизительно 50 нуклеотидов, садиться на него и двигаться по РНК с такой же скоростью, с которой РНК-полимераза движется по ДНК.
- В терминаторе много Г-Ц пар (с тремя водородными связями), РНК-полимераза замедляет ход, ρ- фактор ее догоняет, изменяет конформацию фермента - и синтез РНК прекращается.

# Процессинг первичных транскриптов

Процессинг РНК – структурное и химическое изменение вновь синтезированных молекул РНК.

Этап между транскрипцией и трансляцией

транскрипция

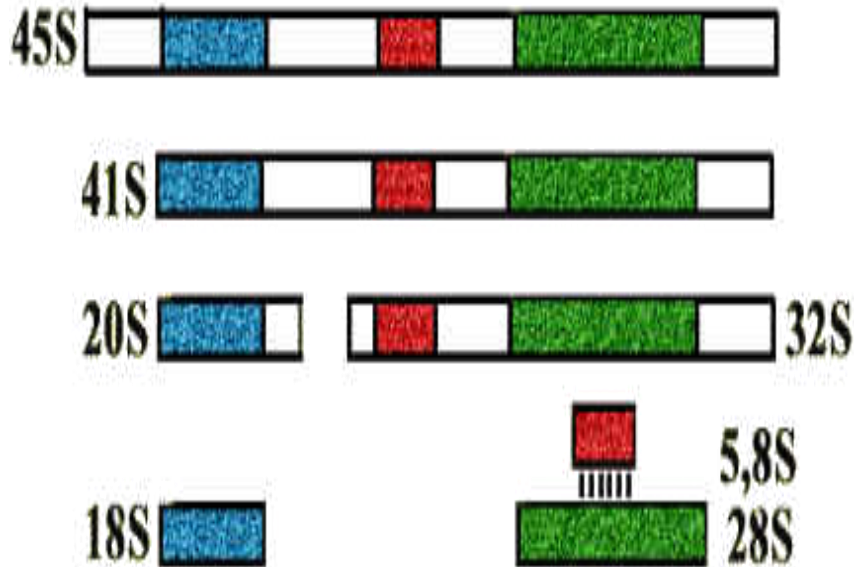
процессинг

трансляция



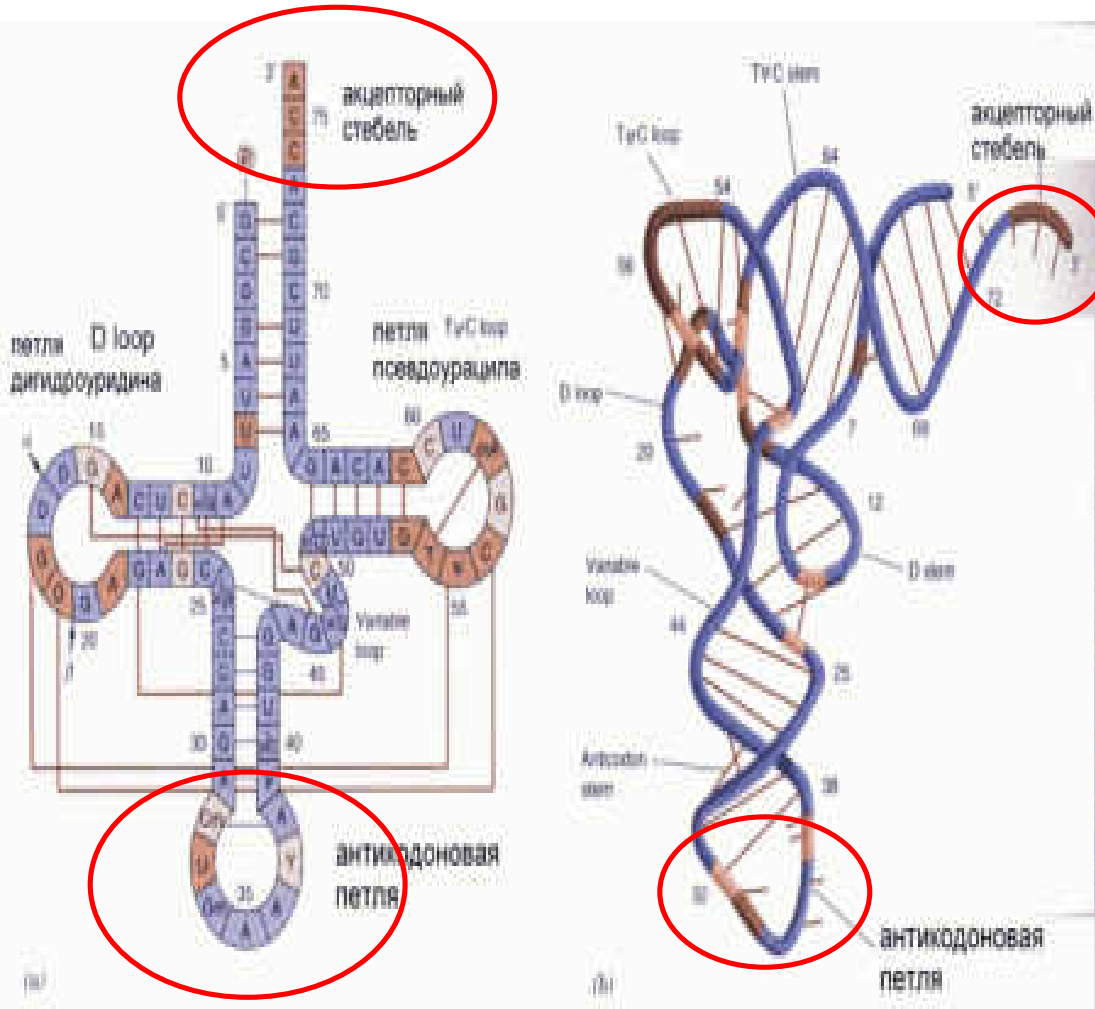


# Созревание рибосомальных РНК



- Предшественником зрелых рРНК является одна молекула (пре-рРНК)
- Данная молекула разрезается ферментами эндонуклеазами на индивидуальные цепи РНК
- Индивидуальные цепи РНК в ядре связываются с белками, образуя большие и малые субъединицы рибосом, которые затем выходят в цитоплазму.

# Созревание транспортных РНК



Укладка в пространстве в форме клеверного листа

Формирование участка для связывания аминокислот (присоединение к 3' концу тРНК трех нуклеотидов – С, С и А)


Антикодон (участок из 3-х нуклеотидов) занимает положение (по центру центральной петли тРНК)

# Созревание мРНК проходит в три этапа

exon 1

intron 1

exon 2

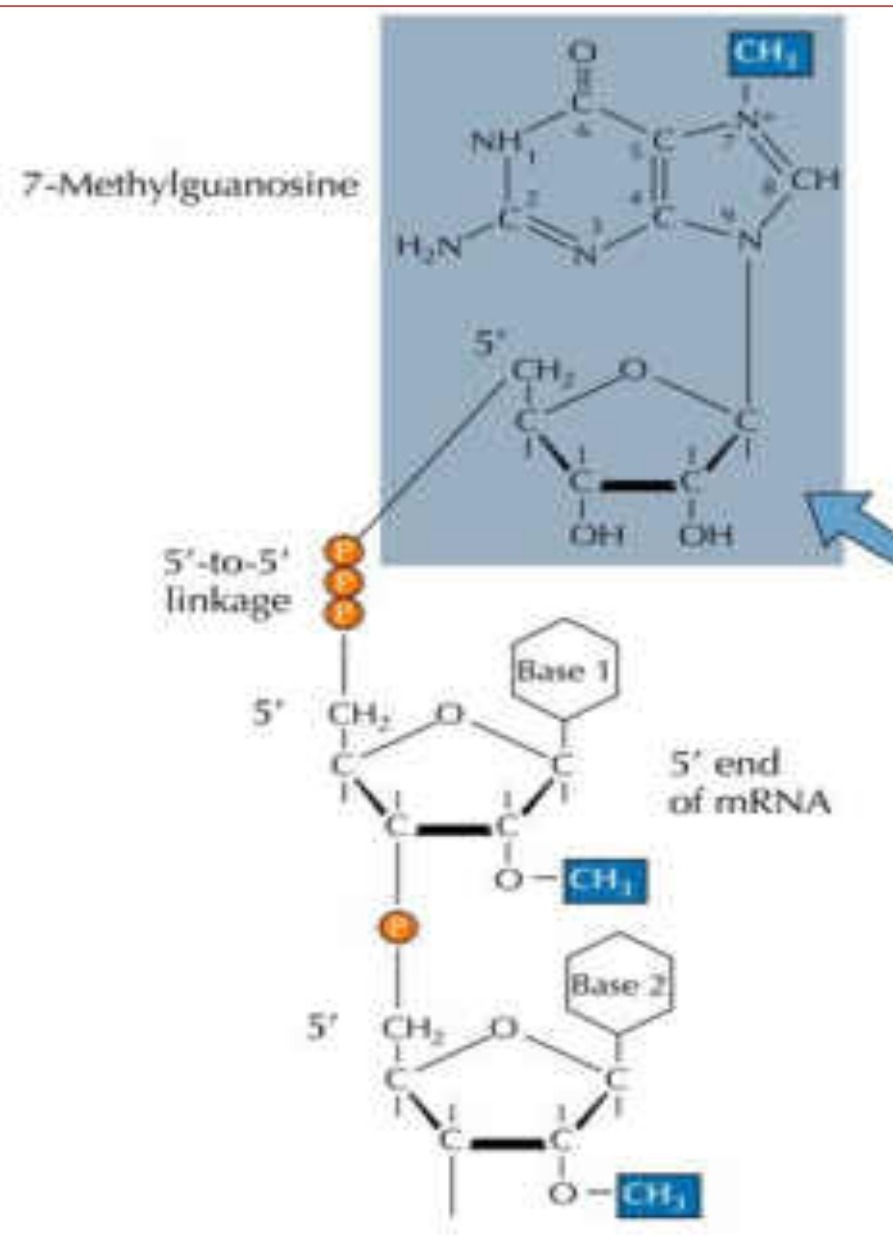
- 
- 1. Кэпирование 5'-конца** – его модификация с образованием метилированного гуанина. Это защищает транскрипт от деградации 5'-экзонуклеазами (благодаря 5'-5' связи), необходимо для транспорта в цитоплазму и обеспечивает связывание мРНК с рибосомой в цитоплазме.
  - 2. Полиаденилирование 3'-области** : присоединение к растущей цепи РНК 100-200 остатков адениловой кислоты. При этом формируется полиА-последовательность, которая замедляет гидролиз транскрипта в цитоплазме (определяет время жизни мРНК).
  - 3. Сплайсинг (вырезание интронов и сшивание экзонов)**

exon 1

exon 2



# Созревание эукариотических матричных РНК

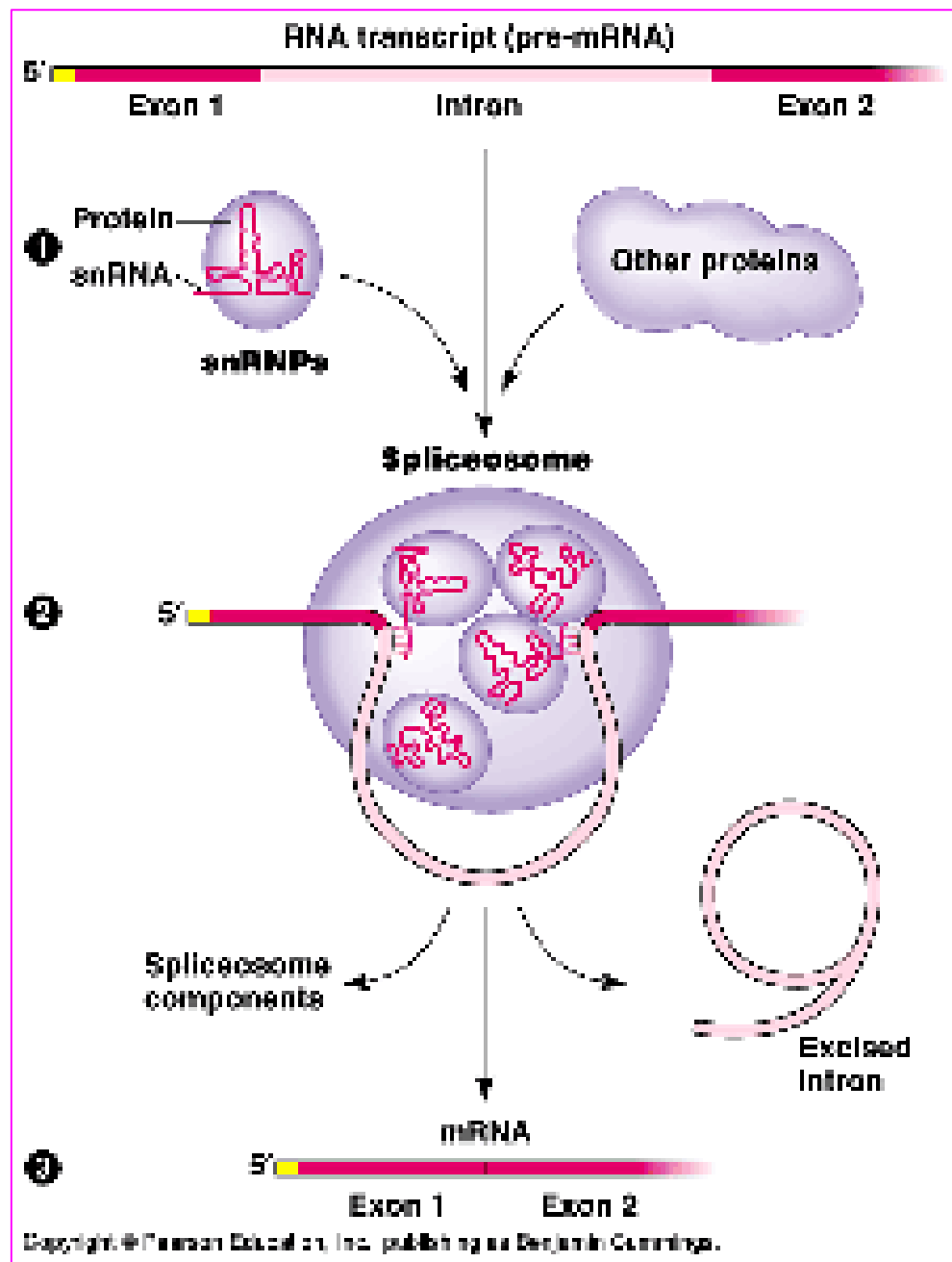
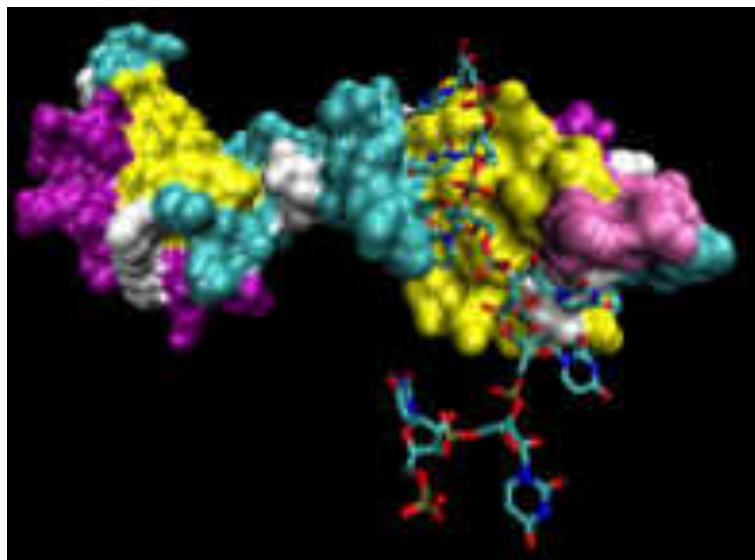


## Кэпирование 5' конца –

образование участка из нескольких модифицированных нуклеотидов.

- Первый нуклеотид всегда 7-метилгуанилат, соединенный с очередным нуклеотидом пирофосфатной связью.
- Несколько следующих нуклеотидов метилируются по 2 положению рибозы

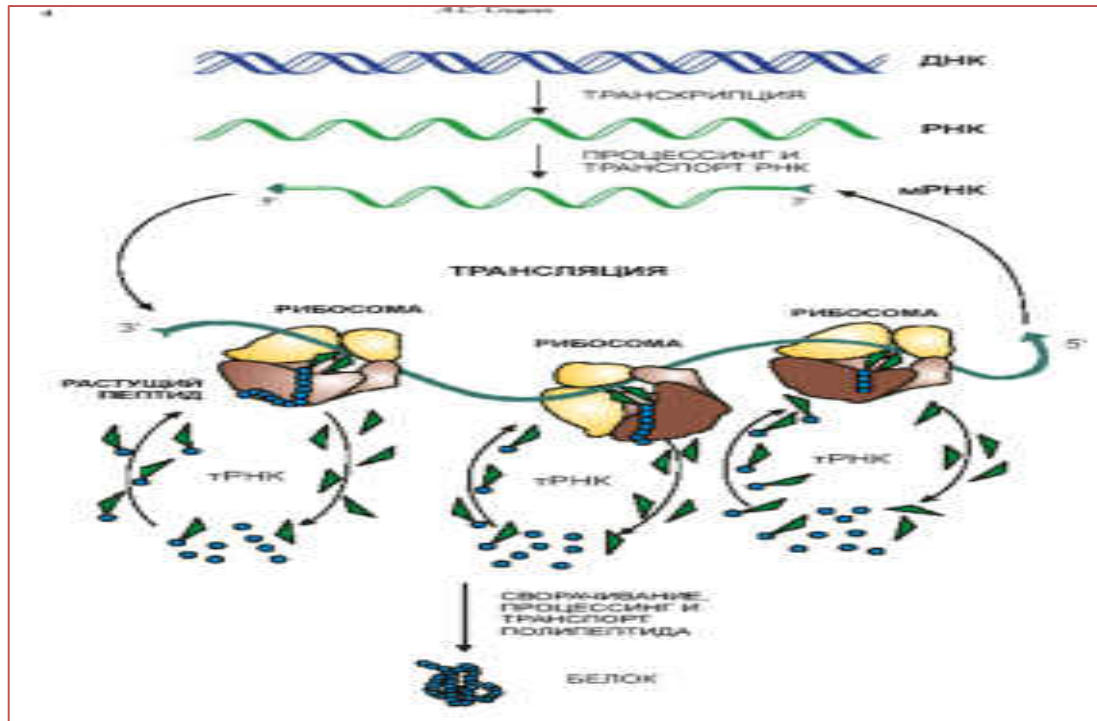
**Сплайсинг** проходит в специальной внутриядерной структуре – **сплайсосоме**, которая состоит из 6 типов малых ядерных РНК (snRNPs) и множества белков.



## **Нарушение процесса сплайсинга:**

- фенилкетонурия: нарушенный сплайсинг 12-го и 13-го экзонов гена Phe-гидроксилазы**
- талассемия: мутации, нарушающие сплайсинг бета-глобиновых генов (и другие мутации этих генов).**

# Матричные биосинтезы



## Трансляция

# Синтез полипептидной цепи

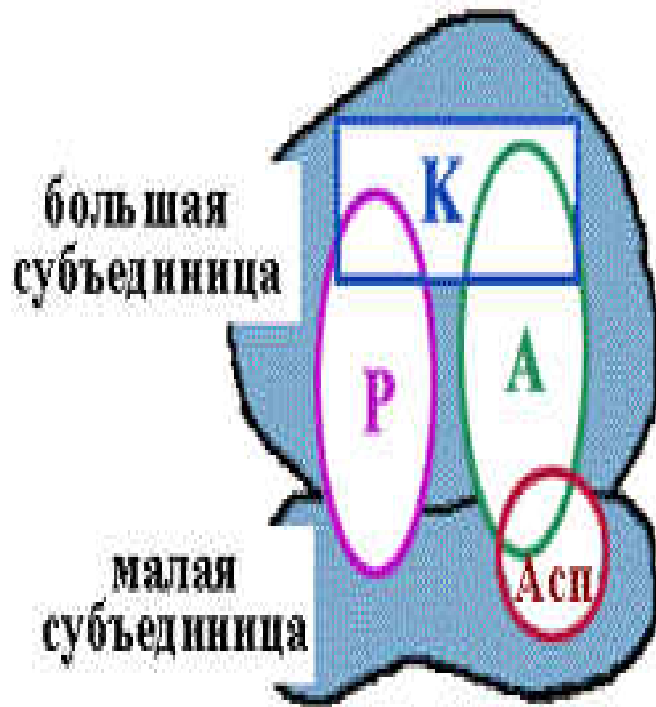
**Трансляция** – циклический процесс в котором свободные аминокислоты объединяются в генетически запрограммированную последовательность, образуя полипептид.



# Компоненты белок синтезирующей системы

- Аминокислоты
- мРНК
- тРНК
- Рибосомы (малая и большая субъединицы субъединиц на этапе трансляции собираются в единую молекулу -рибосому )
- Белковые факторы

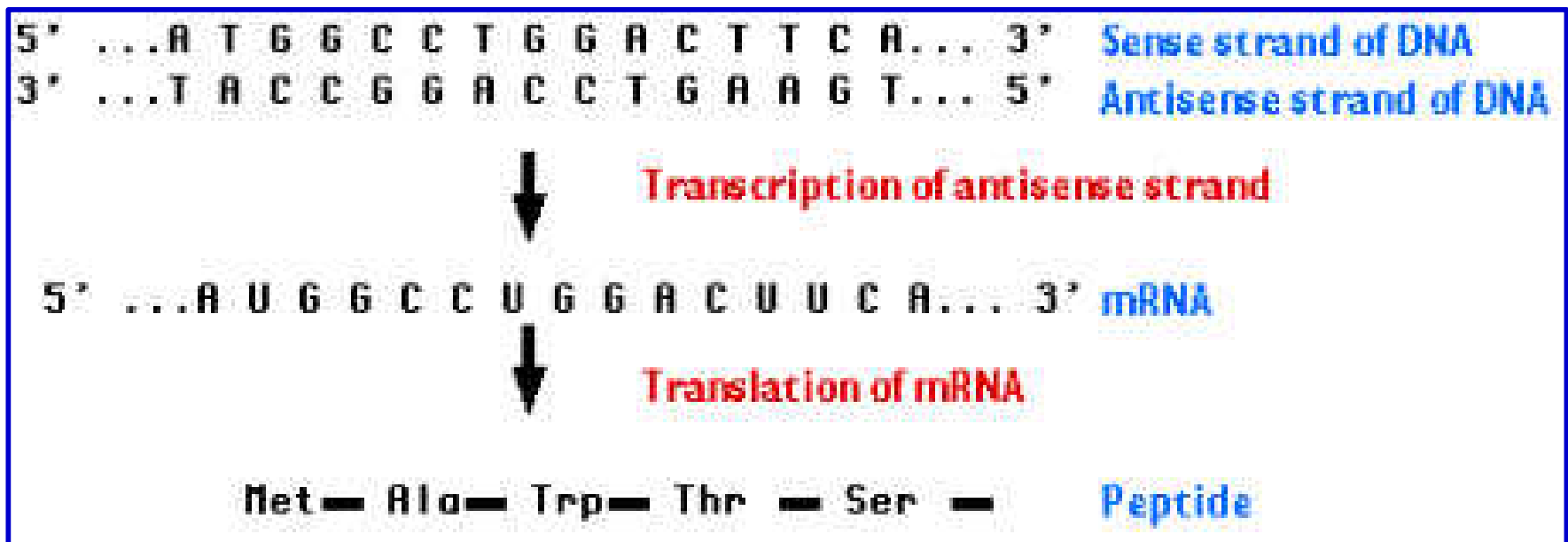
# Центры рибосом



- **Р-центр - пептидильный**  
При инициации в нем находится транспортная РНК с метионином, при элонгации транспортная РНК с растущей цепью пептида
- **А-центр - аминоацильный**  
На этапе элонгации в нем находится транспортная РНК с новой аминокислотой или растущей цепью пептида
- **К-центр - каталитический (пептидилтрансферазный)**  
Обеспечивает формирование пептидной связи в растущей цепи пептида

Для всех живых организмов характерна единая система записи генетической информации в молекулах нуклеиновых кислот в виде последовательности нуклеотидов – она называется **генетический код**.

**Последовательность нуклеотидов в ДНК кодирует последовательность аминокислот в белках**



# Свойства генетического кода

**Триплетность** - одну аминокислоту кодируют три нуклеотида (кодон). Исключения: **УАА, УАГ, УГА** не кодируют ни одну из аминокислот (терминирующие или стоп- кодоны).

**Вырожденность** – большинство число аминокислот кодируется несколькими кодонами

ГУУ	ГЦУ	ГАУ	ГГУ
ГУЦ	ГЦЦ	ГАЦ	ГГЦ
ГУА	ГЦА	ГАА	ГГА
ГУГ	ГЦГ	ГАГ	ГГГ
} Валин	} Аланин	} Аспарагиновая кислота	} Глицин
		} Глутаминовая кислота	



**Универсальность** – одинаковое кодирование аминокислот вне зависимости от уровня организации объекта

**Непрерывность** - отсутствие сигналов, указывающих на конец одного кодона и начало другого нуклеотида



# Нобелевская премия 1968



Роберт Вильям Холли (США)



Хар Гобин Корана (США)



Маршал Уорен Ниренберг (США)

за расшифровку генетического кода и его роли в синтезе белков

В 1970 ученым удалось синтезировать ДНК, а спустя несколько лет ген кишечной палочки

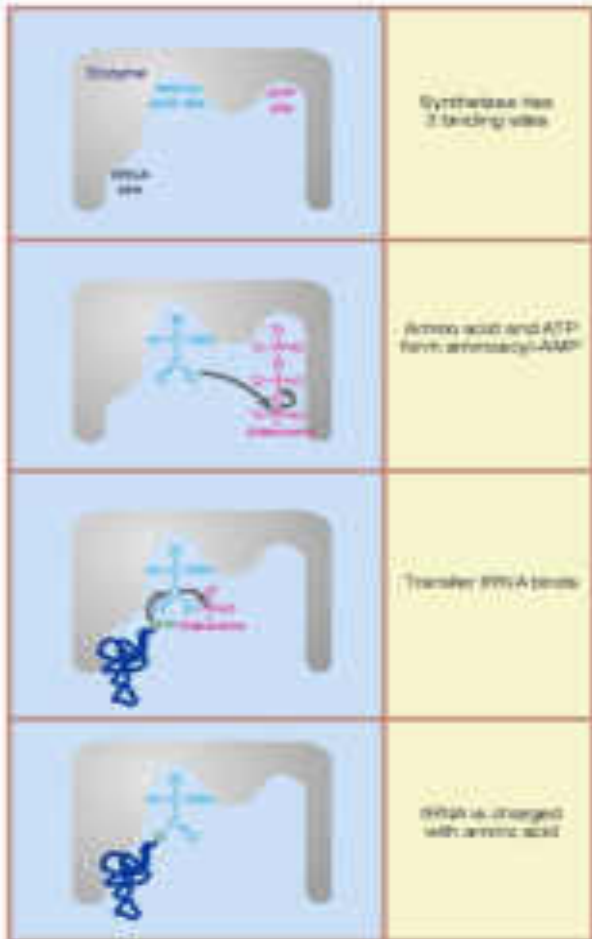
# СТАДИИ ТРАНСЛЯЦИИ

# Инициация

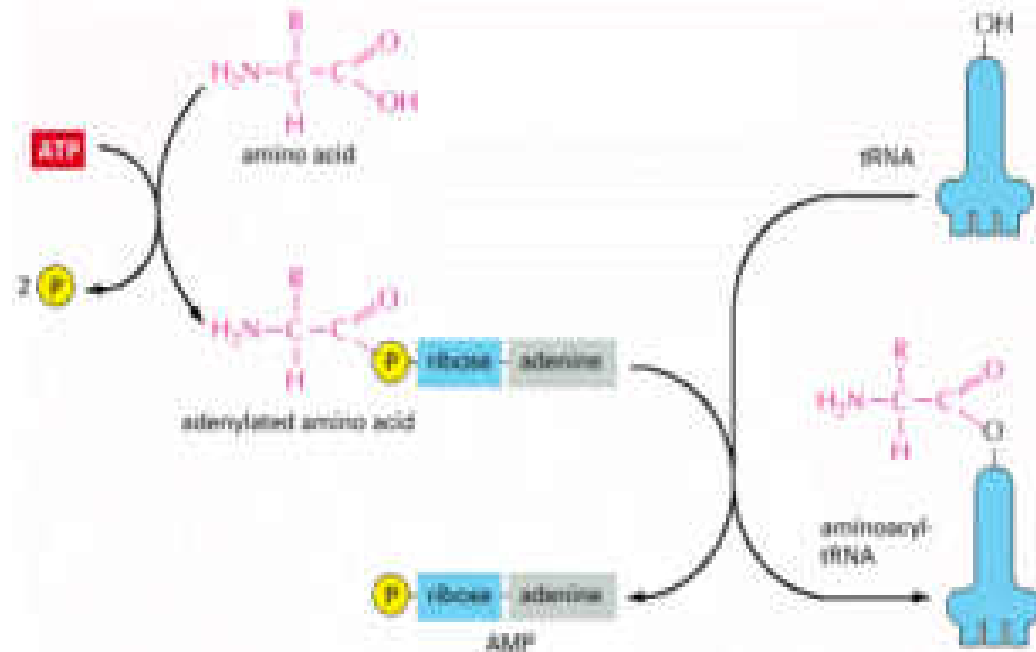
## Образование инициаторного комплекса

1. мРНК связывается с малой субъединицей рибосомы, иницирующий кодон (AUG, кодирующий метионин) устанавливается в Р-центре
2. Иницирующая тРНК (несущая метионин) связывается с иницирующим кодоном
3. Большая субъединица соединяется с малой субъединицей

# Активация аминокислот



Активация свободных аминокислот осуществляется при помощи специфических ферментов аминоацил-тРНК-синтетаз в присутствии АТФ. Процесс протекает в две стадии:



Каждая aa-тРНК-синтетаза катализирует реакцию специфического связывания одной из 20 аминокислот с соответствующей тРНК

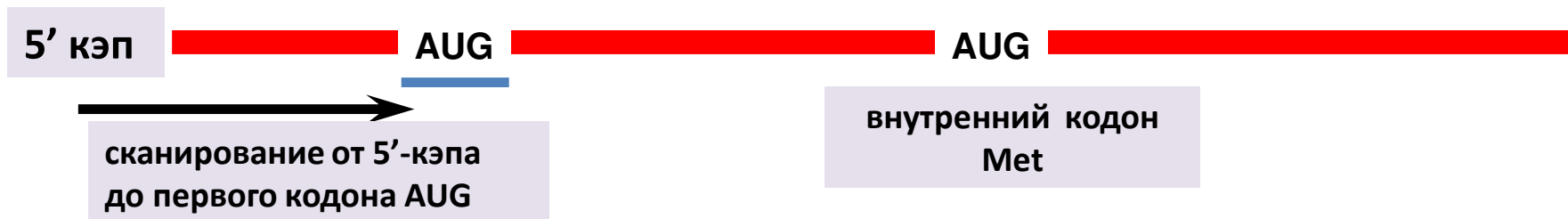


## Два пути поиска стартовой точки трансляции

В мРНК прокариот – внутренняя инициация:  
триплет AUG (GUG, UUG) через 3-8 остатков после GGAG-содержащей последовательности Шайна-Дальгарно длиной 4 -7 н.

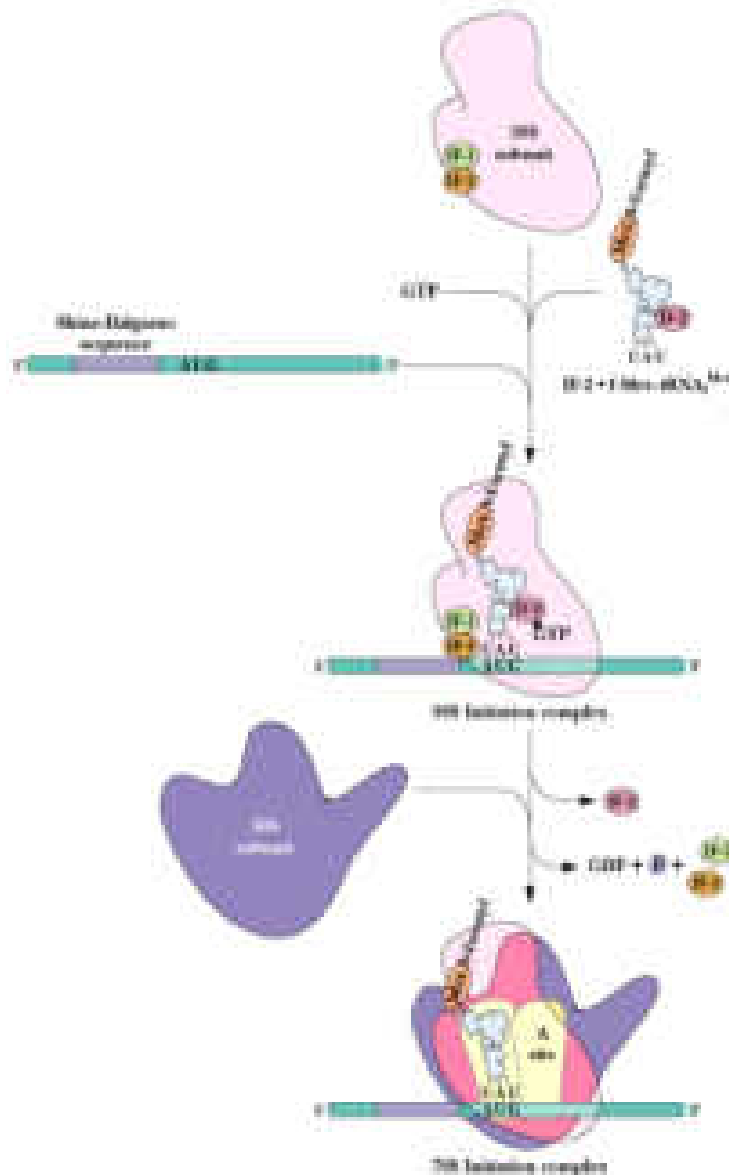


В мРНК эукариот – терминальная инициация по сканирующему механизму:  
определяется первый от 5'-кэпа триплет AUG в контексте **A/GCCAUGGA/CU**



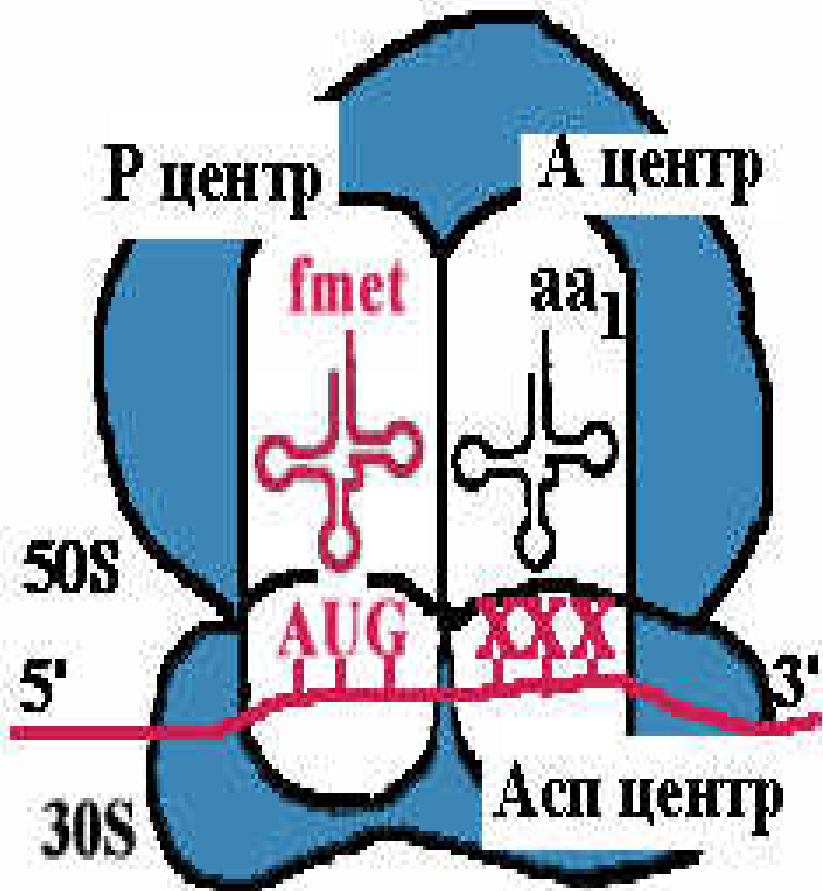
# Инициация

## Образование инициаторного комплекса у прокариот



1. мРНК связывается с малой субъединицей рибосомы, иницирующий кодон устанавливается в Р-центре
  2. Иницирующая тРНК (несущая формилметионин) связывается с иницирующим кодоном
  3. Большая субъединица соединяется с малой субъединицей – образуется инициаторный комплекс
- IF-3 – препятствует преждевременному связыванию субъединиц рибосом
- IF-2 + ГТФ – участвуют в связывании иницирующей тРНК
- IF-1 – способствует новой «зарядке» eIF-2 (присоединяя к нему очередную молекулу ГТФ и иницирующую тРНК)

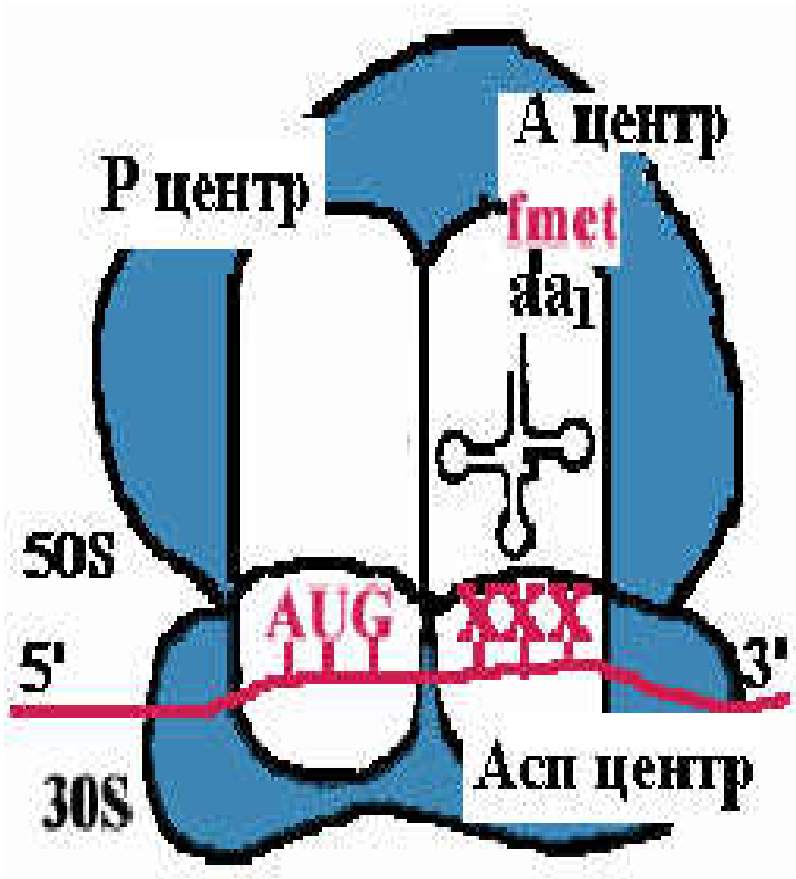
# Элонгация



В **Р - центре** находится транспортная РНК с метионином

В **А - центре** присоединяется транспортная РНК с аминокислотой антикодон которой совпадает со вторым кодоном на мРНК

## Элонгация (1-ый цикл)

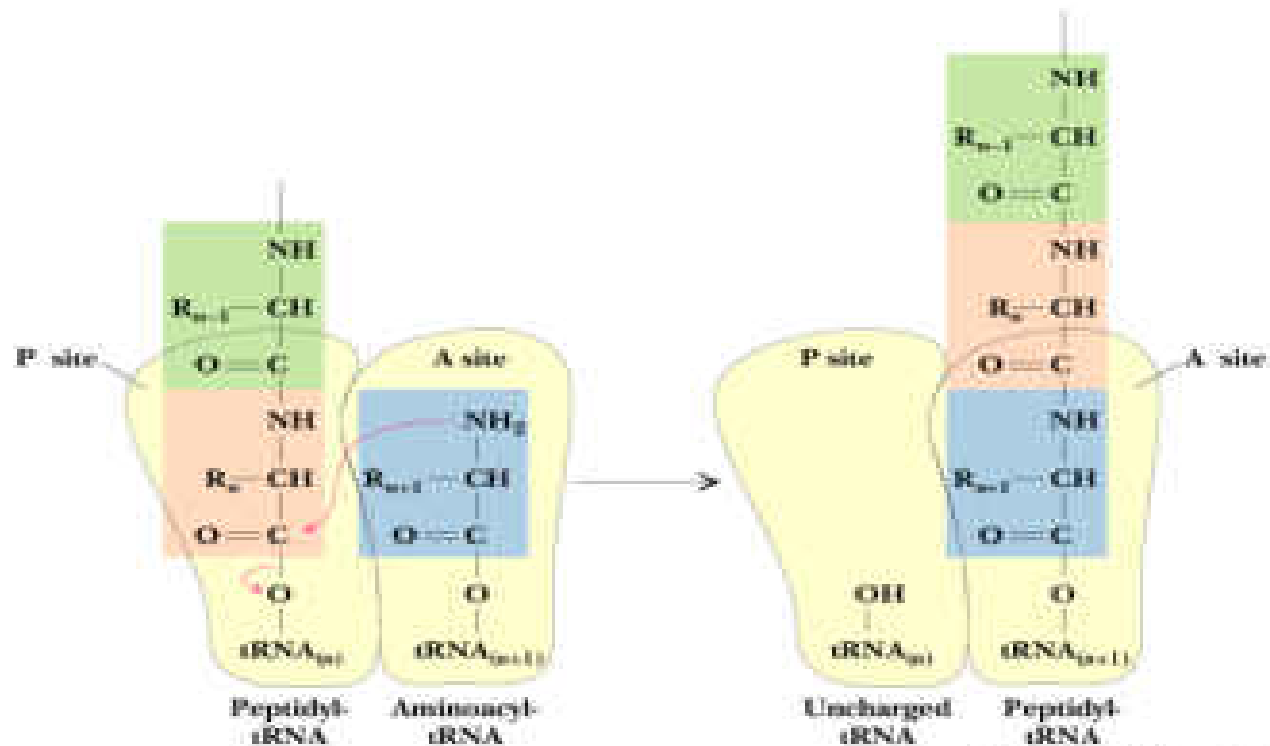


Пептидилтрансфераза переносит метионин из Р-центра в А-центр

Образуется пептидная связь между метионином (C=O группа) и аминокислотой (NH группа), находящейся в А-центре

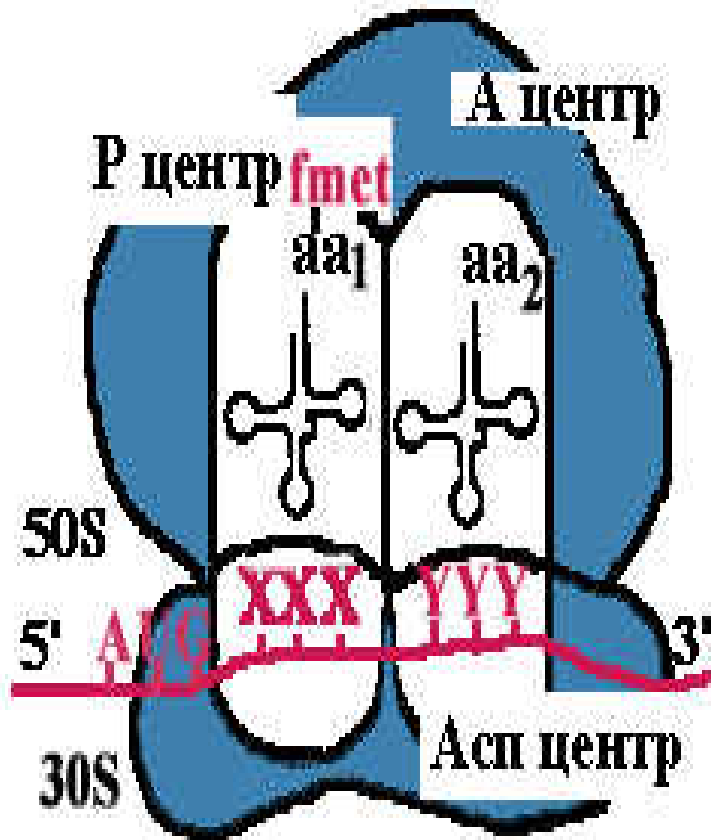
# Транспептидация (образование пептидной связи)

Garrett & Grisham: Biochemistry, 2/e  
Figure 33.13



Saunders College Publishing

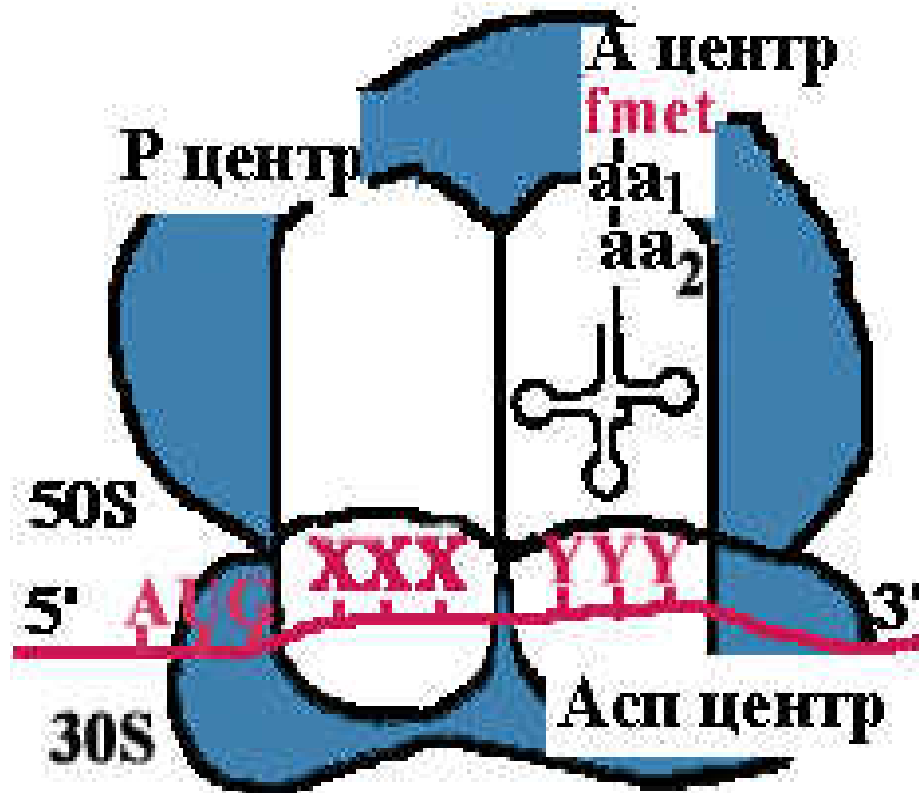
# Элонгация



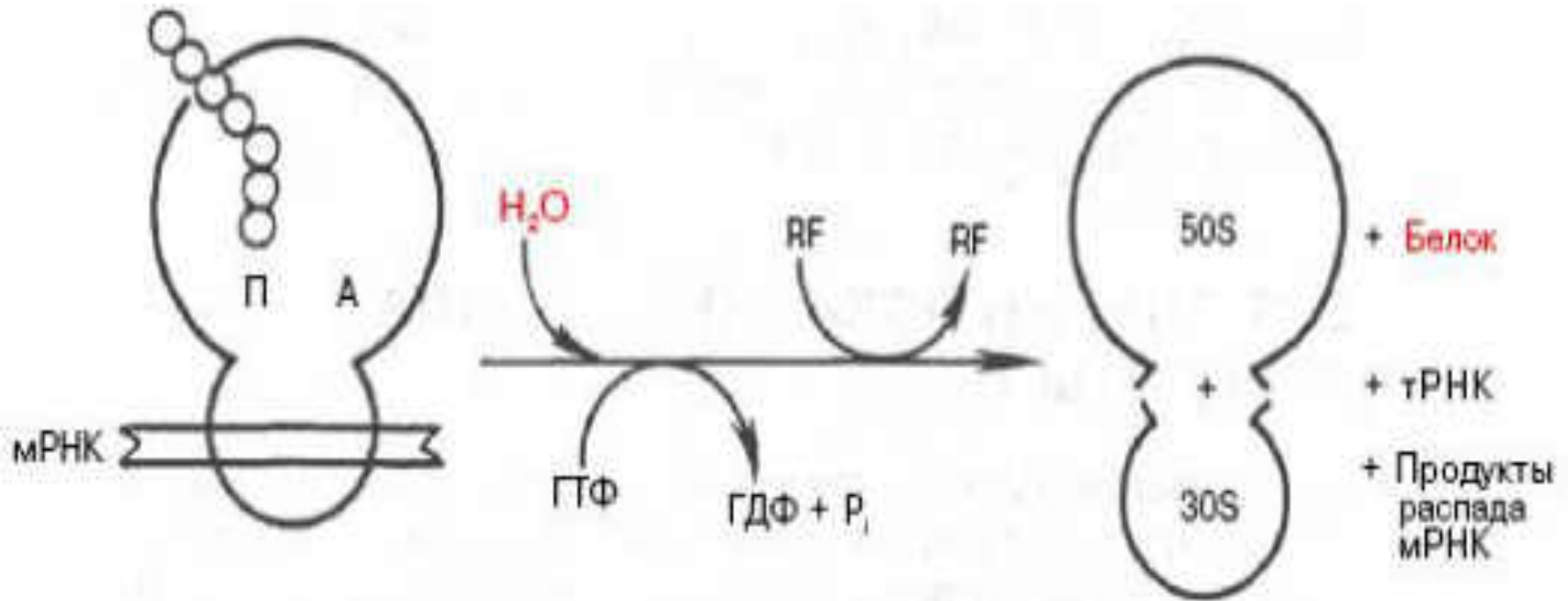
- Рибосома сдвигается на один кодон (**транслокация** – энергозависимый процесс)
- Транспортная РНК к которой был присоединен метионин покидает рибосому.
- Второй кодон с прикрепленной к нему транспортной РНК с дипептидом оказывается в Р-центра.
- В А-центр попадает третий кодон и к нему присоединяется очередная транспортная РНК с соответствующим антикодоном и новой аминокислотой
- Повторяется 1-ый цикл

# Элонгация

Элонгация продолжается до тех пор, пока в А-центр не попадает один из терминирующих (стоп) кодонов



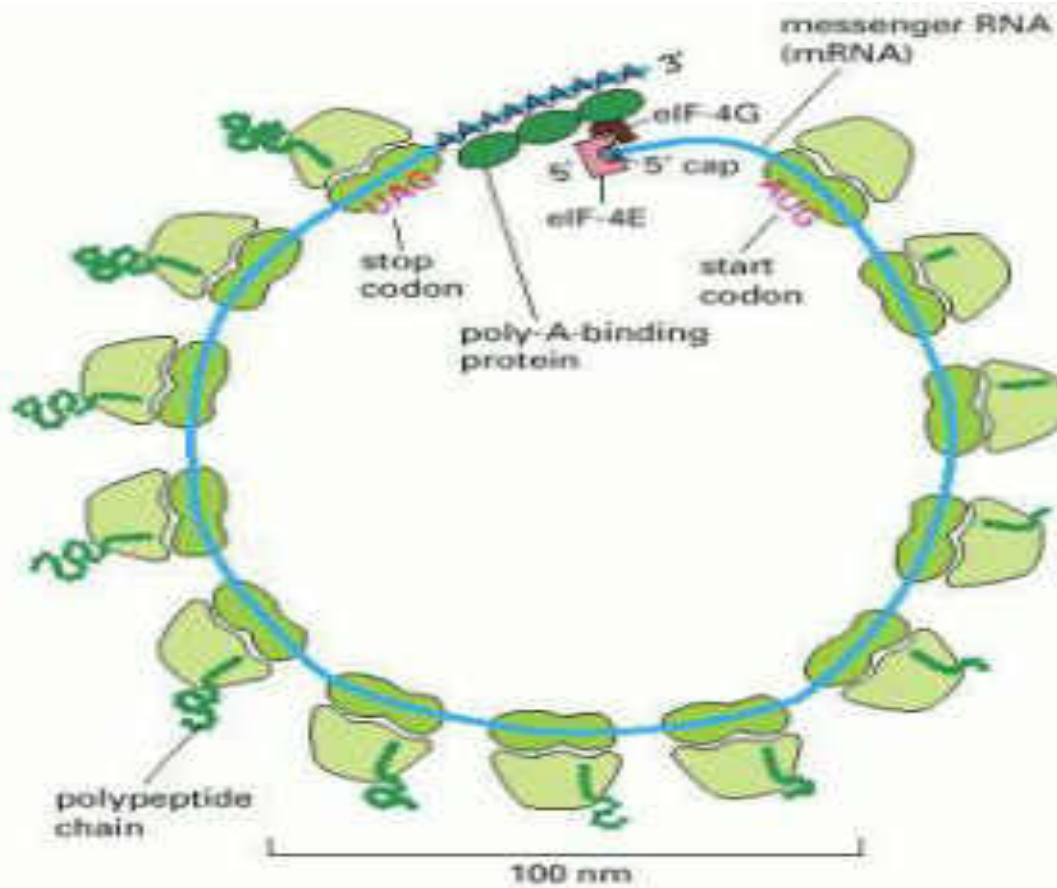
# Терминация



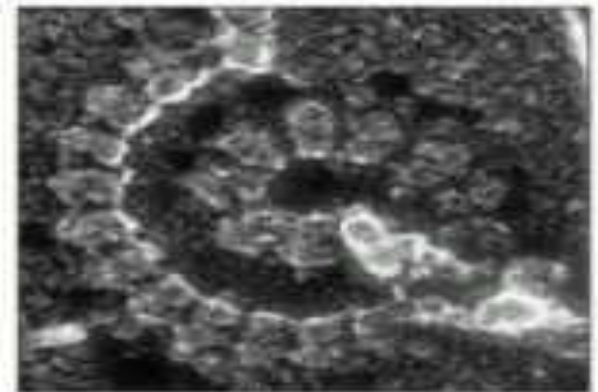
Пептидилтрансфераза катализирует перенос молекулы пептида не на очередную аминокислоту, а на молекулу воды, вызывая гидролиз и распад трансляционного комплекса (пептид, тРНК, мРНК, субъединицы рибосом)



# мРНК в процессе трансляции в составе полисомы

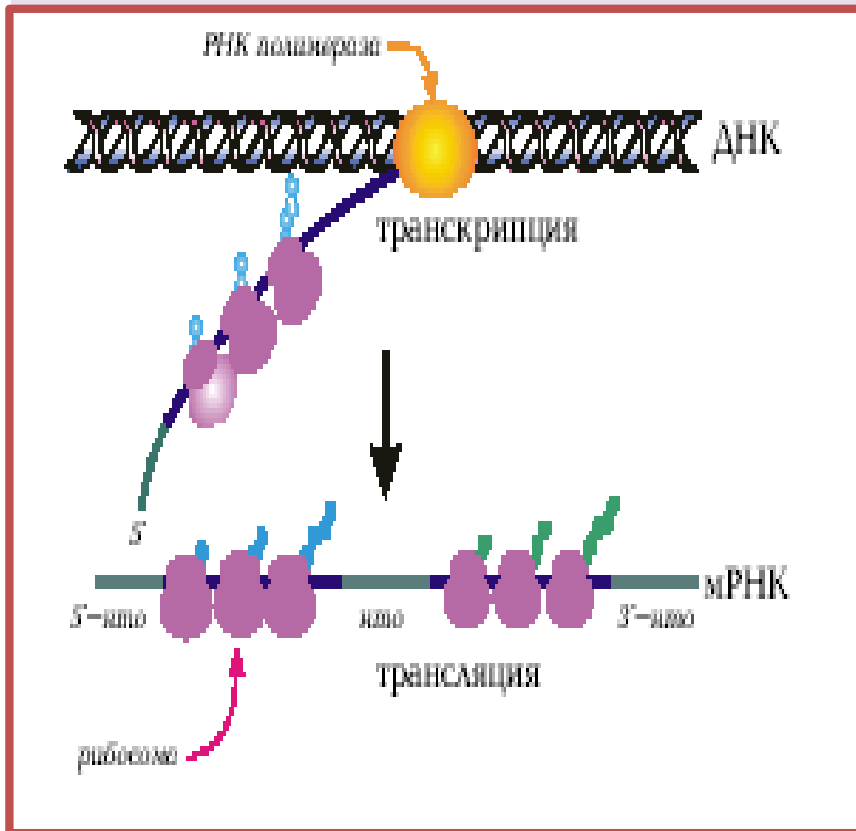


(A)



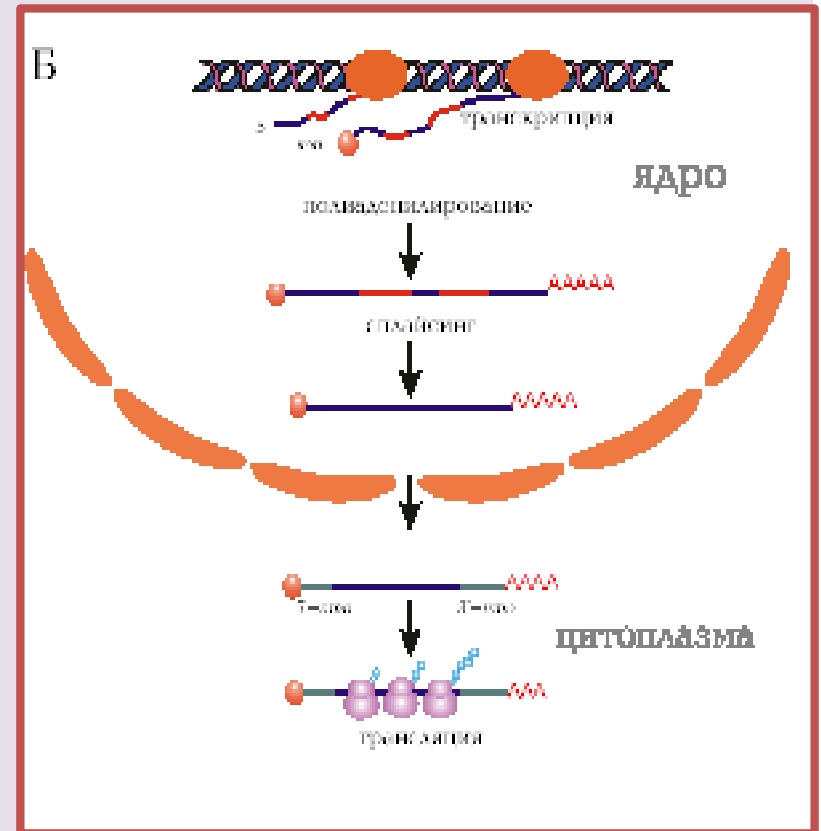
(B)

## Трансляция мРНК прокариот



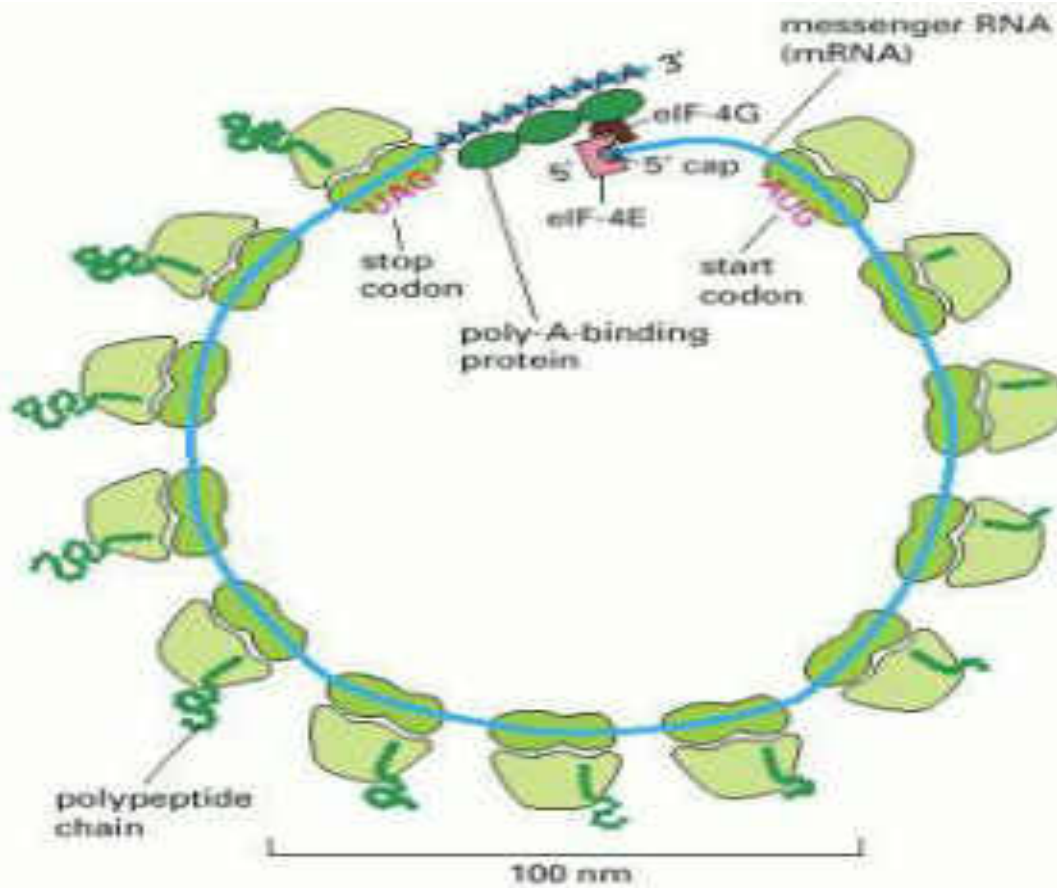
Трансляция может начинаться еще до полного завершения транскрипции

## Трансляция мРНК эукариот

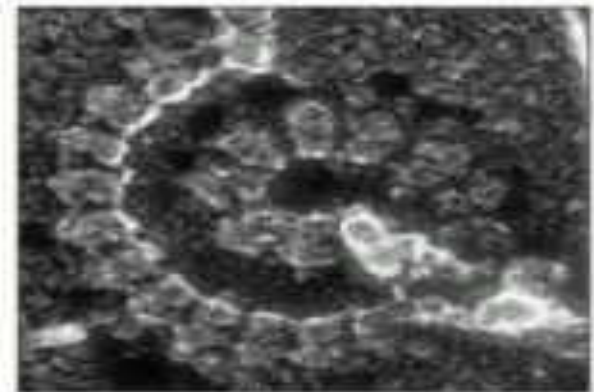


Транскрипция и трансляция разобщены в пространстве (ядро и цитоплазма) и времени (не менее 10 мин).

# мРНК в процессе трансляции в составе полисомы



(A)



(B)

# Пространственная сборка белка (фолдинг)

# Фолдинг – сворачивание пептидной цепи в правильную трехмерную структуру

## Возможная последовательность фолдинга белка

<b>СЛУЧАЙНЫЙ КЛУБОК</b>	нет ни вторичной, ни третичной структуры, пептидная цепь развернута
<b>СОСТОЯНИЕ-ПРЕДШЕСТВЕННИК РАСПЛАВЛЕННОЙ ГЛОБУЛЫ</b>	вторичная структура сформирована не до конца, третичная структура отсутствует, цепь частично развернута
<b>РАСПЛАВЛЕННАЯ ГЛОБУЛА</b>	вторичная структура сформирована, цепь полностью свернута в компактную глобулу, но жесткая третичная структура отсутствует
<b>НАТИВНЫЙ БЕЛОК</b>	цепь свернута в компактную глобулу, которая имеет определенную третичную структуру

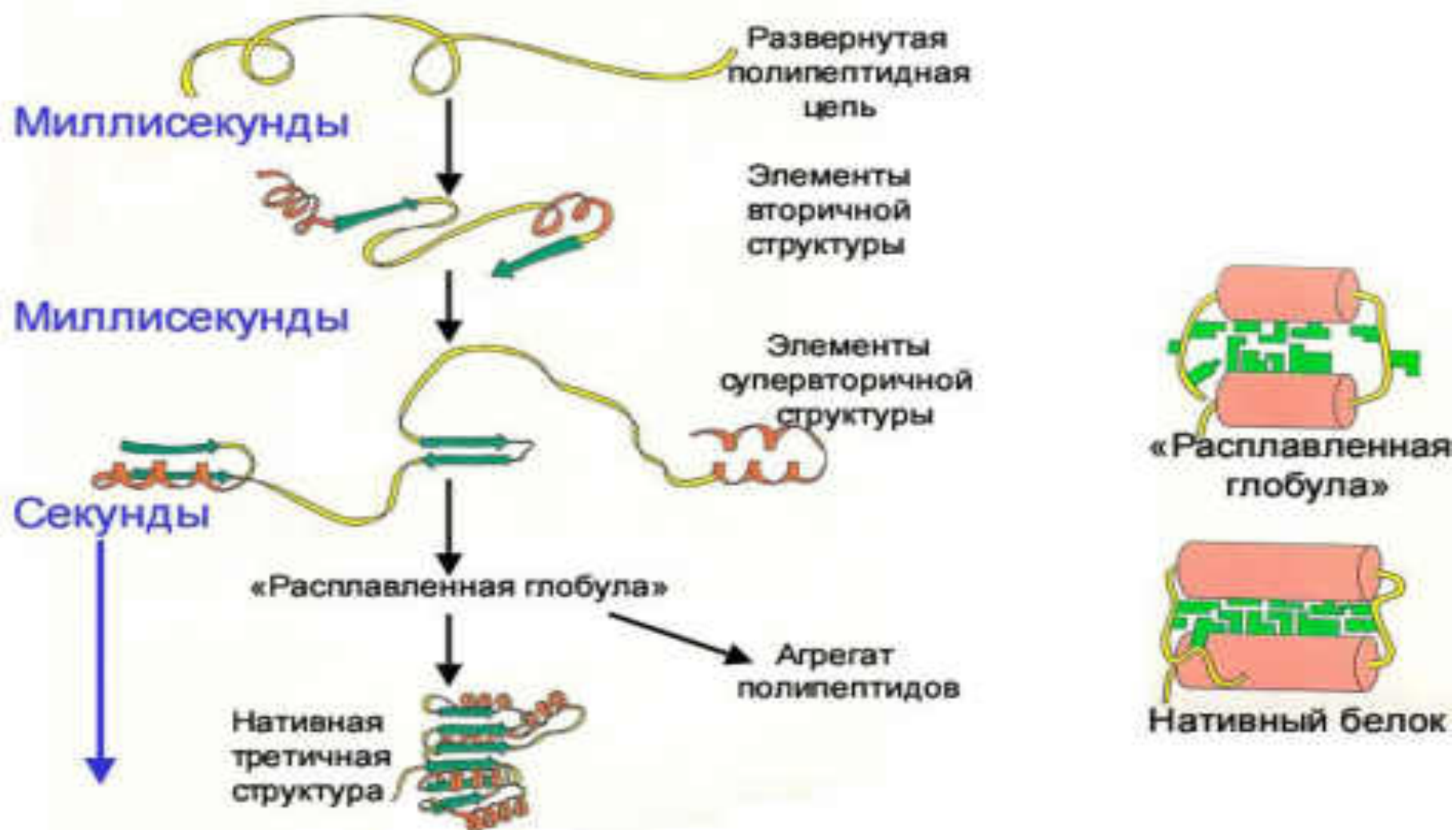
# Стадии самопроизвольного сворачивания полипептидной цепи в нативную конформацию *in vitro*



Полипептидная цепь

Нативная  
структура белка

# Синтез, созревание и транспорт белков



# Факторы фолдинга

**Ферменты, ускоряющие процесс сворачивания белков  
(ферменты фолдинга, или фолдазы )**

1. Протеинсульфоизомераза

2. Пептидилпролизомераза

**Молекулярные шапероны, участвующие в пространственной укладке  
белков**

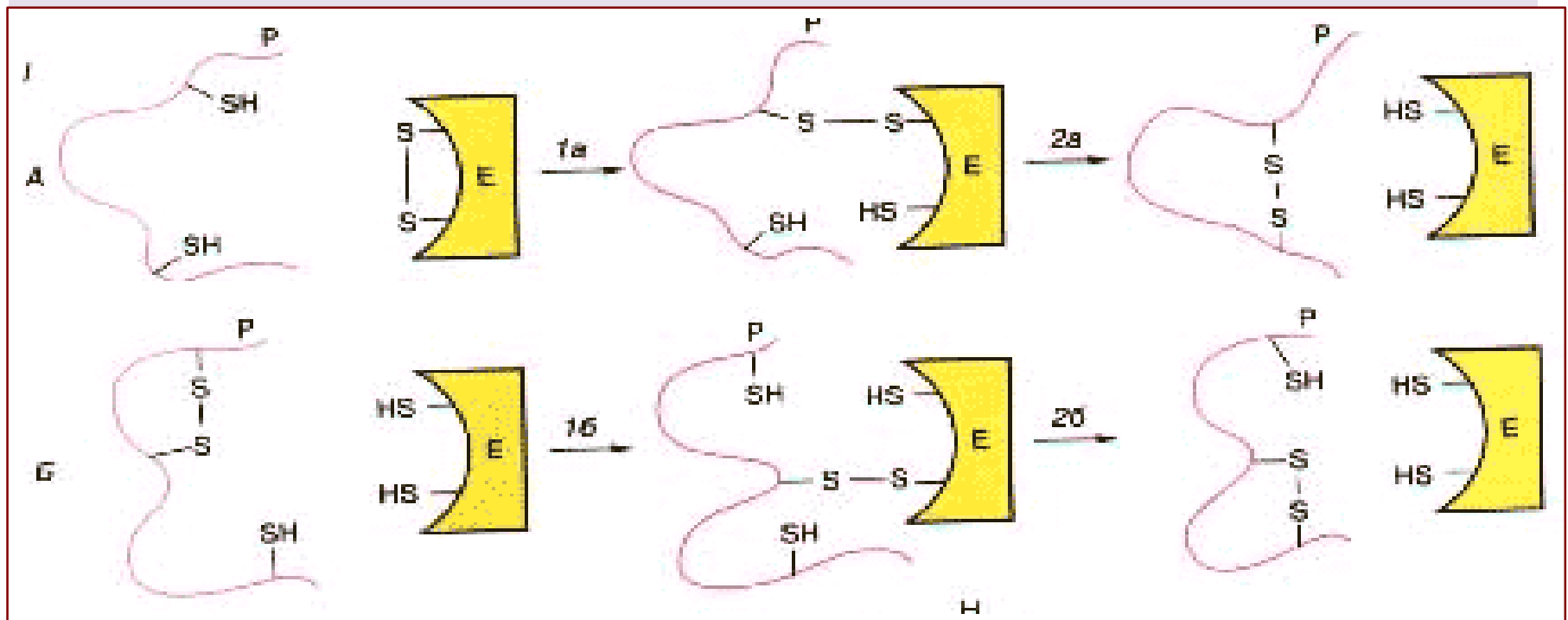
Большая группа неродственных белковых семейств



# Протеиндисульфидизомераза (PDI)

(способствует сворачиванию секретируемых клетками белков, содержащих дисульфидные мостики (инсулин, рибонуклеаза, иммуноглобулины)

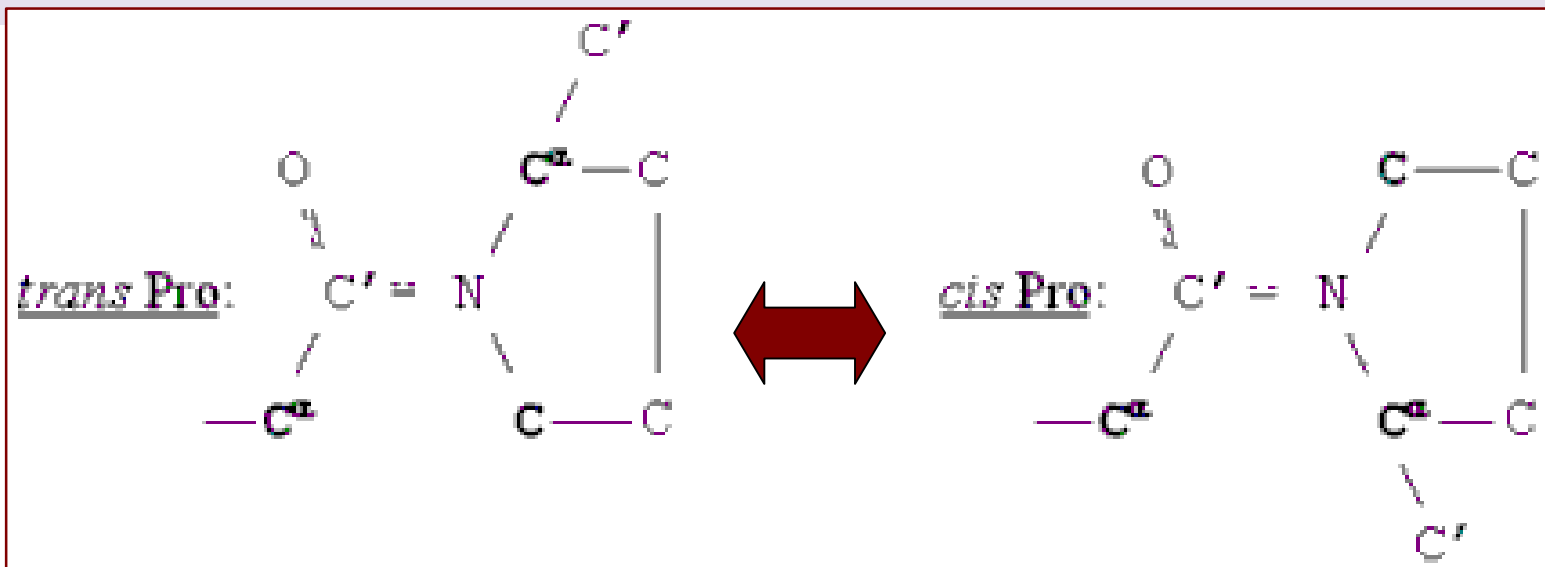
Катализирует изомеризацию дисульфидных связей в формирующемся белке, дает ему возможность найти (путем случайного перебора) такую комбинацию этих связей, которая соответствует энергетически наиболее оптимальной пространственной структуре.



# Пептидил-пролил-цис/транс-изомераза (PPI)

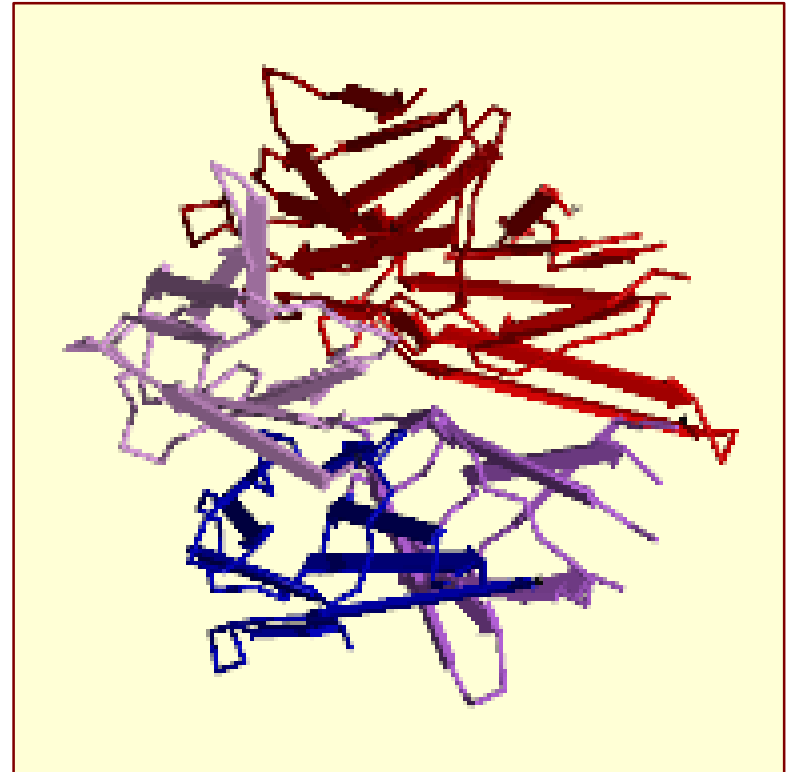
Катализирует переход радикалов в области пептидной связи Pro из транс-конфигурации в цис-конфигурацию и обратно.

Обеспечивает возможность пептидной связи делать в области нахождения аминокислоты пролина, такие изгибы, которые приводят к наиболее оптимальной пространственной структуре



# Пространственная сборка белков *in vivo* осуществляется с помощью шаперонов

- **Молекулярные шапероны** – большая группа неродственных белковых семейств, которые
  - участвуют в стабилизации развернутых или частично свернутых белков;
  - способствуют корректному фолдингу белков и сборке белковых комплексов
- **Нуклеоплазмин** – первый «молекулярный шаперон» участвует в сборке нуклеосом



Структура нуклеоплазмина

# Свойства молекулярных шаперонов

- Участвуют в сборке белков и белковых комплексов (вновь синтезированных), но не входят в конечный продукт;
- Есть во всех компартментах клетки, где происходит сборка белков;
- Большинство шаперонов - АТФ-зависимые;
- Защищают белки от нежелательных процессов, в том числе от агрегации;
- Участвуют в некоторых видах внутриклеточного транспорта, предупреждая преждевременный фолдинг (митохондрии);
- Могут осуществлять рефолдинг (многие шапероны являются белками теплового шока (heat shock proteins, Hsp));
- Поддерживают ряд белков в определенной конформации, в состоянии незавершенного фолдинга (рецептор к глюкокортикоидным гормонам)

# Как работают шапероны при фолдинге белков?

- Связывают и стабилизируют полипептиды, имеющие ненативную конформацию, взаимодействуя с гидрофобными областями молекул;
- Предоставляют возможность полипептидам, имеющим ненативную конформацию, правильно свернуться в изолированном гидрофобном окружении.

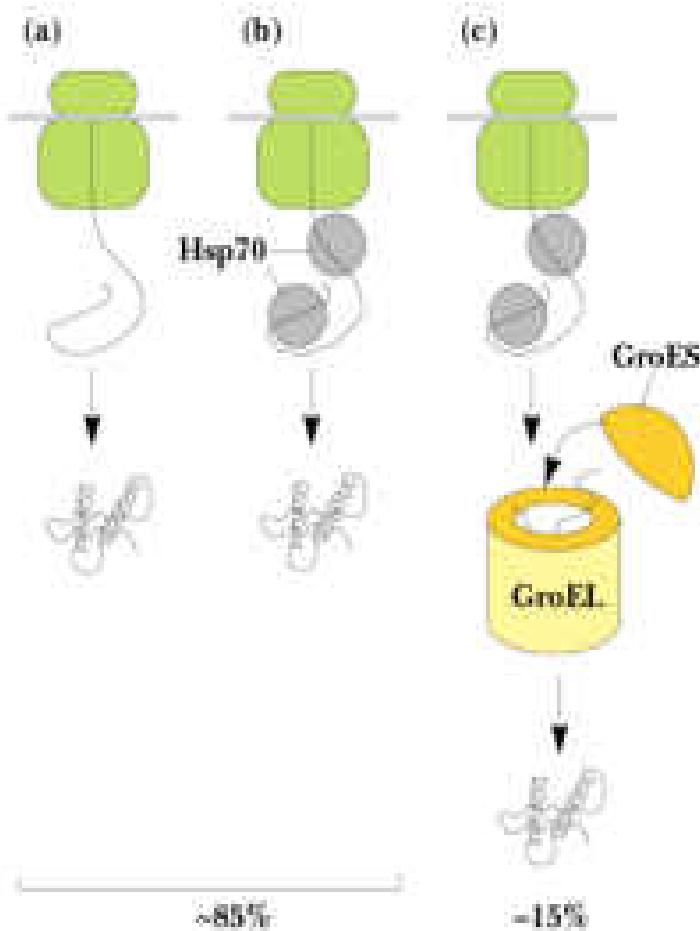
## Классификация шаперонов (HSP)

Сем-во	Шапероны	Роль
Hsp10	GroES, Grp31, Hsp10, Cpn10	Фолдинг белков, кошапероны для Hsp60
Hsp60	GroEL, TF55, Hsp60, TriC	Фолдинг белков
Hsp70	DnaK, Hsc/Hsp70, BiP, Hsp68, 70, 71, 73	Стабилизация развернутых белков, фолдинг белков, трнслокация через мембраны, защита от стресса
Hsp90	Hsp90, Grp94, ERp90, HtpG	Предотвращение агрегации белков, регуляция активности рецепторов стероидных гормонов и киназ.
Hsp100	Hsp104, C1pA, B, X, Y	Предотвращение агрегации белков, содействие в протеолизе белков
Hsp40	DnaJ, Hsp40, GrpE, HscB	Стабилизация и фолдинг белков, кошапероны для Hsp70

# Шапероны, относящиеся к различным семействам образуют шаперониновые системы

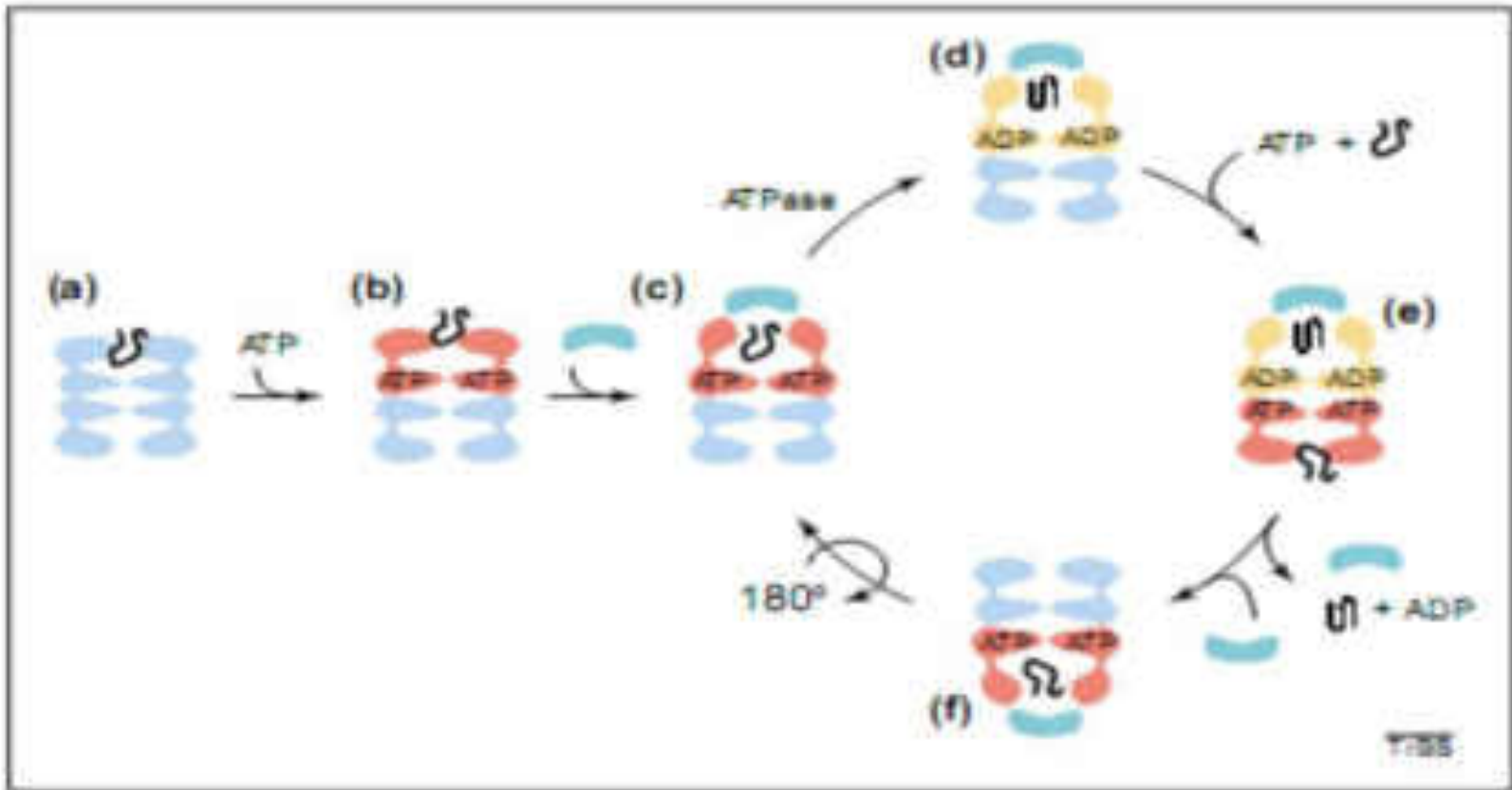
Локализация	Шапероны	Роль
Цитозоль прокариот	GroEL/ GroES семейство: (Hsp60/Hsp10)	Фолдинг белков; необходим для сборки фагов
Митохондрии эукариот	Hsp60/Hsp10 семейство: (Hsp60/Hsp10)	Фолдинг белков

# Схема фолдинга вновь синтезированных белков в бактериальной клетке



- Фолдинг белков начинается до окончания трансляции при участии шаперонов . Возможно несколько циклов укладки белка в нативную структуру
- Если после этого белок продолжает находиться в состоянии незавершенного фолдинга (в виде расплавленной глобулы)
- Завершение фолдинга таких белков происходит при участии шаперониновой системы





- a. GroEL обладает высоким сродством к неправильно свернутому субстрату.
- b) ATP связывается с положительной кооперативностью в цис-кольце и отрицательной кооперативностью в транскольце.
- c) Быстрое связывание GroES и связывание гидрофобных участков субстрата внутри камеры.
- d) Гидролиз ATP и сворачивание субстрата.
- e) Связывание ATP в противоположном кольце инициирует диссоциацию GroES и освобождение субстрата. f) Связывание новой молекулы субстрата и повторение цикла

# Структура комплекса GroEL/GroES (E=E.coli)

## GroEL (L=Large)

Состоит из двух  
семичленных колец,  
лежащих одно под  
другим,  
14 идентичных  
субъединиц (57kD):

## GroES (S=Small)

Состоит из одного  
семичленного кольца,  
7 идентичных  
субъединиц (10kD)

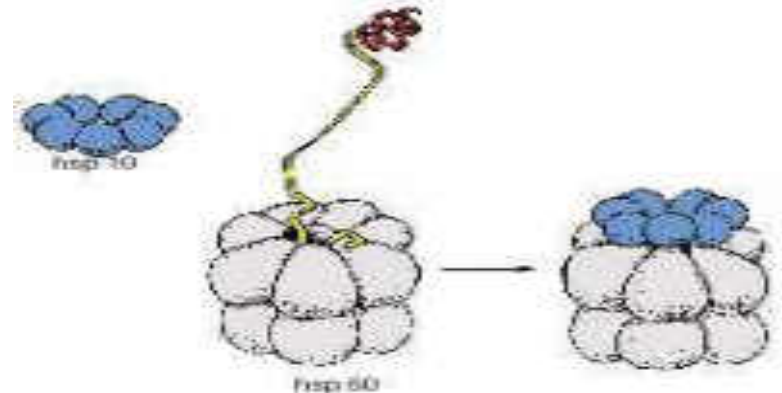
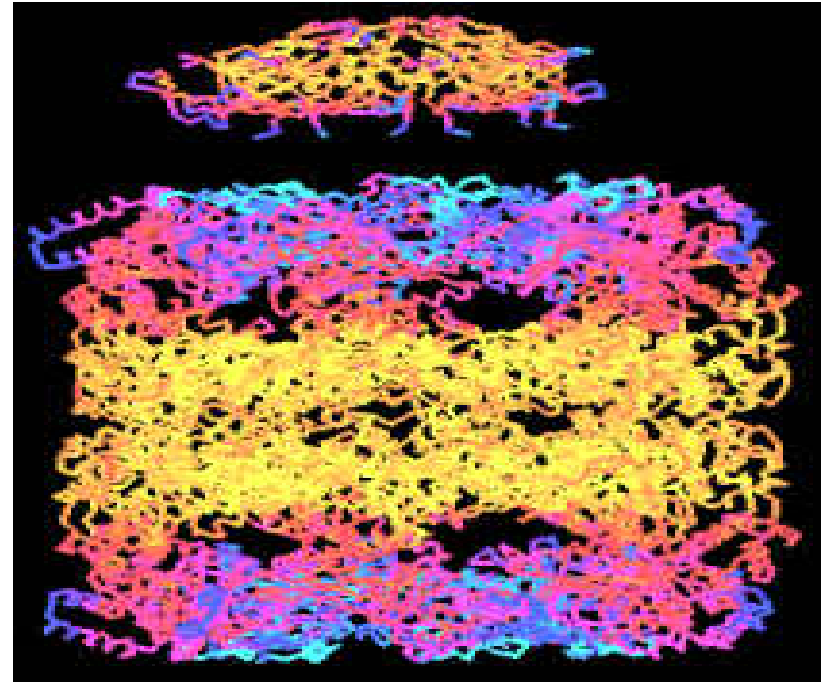
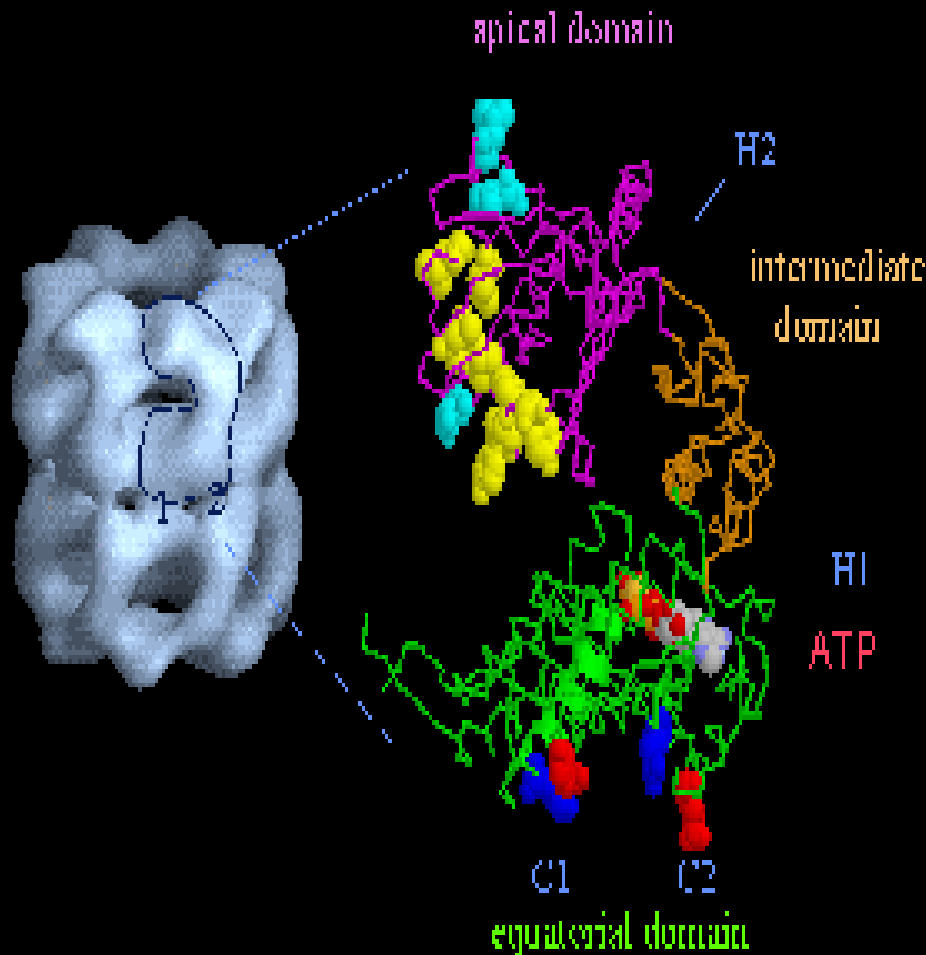


Рис. 6. Структура шперозина hsp60 и его кофактора — hsp10. На схеме показано проникновение полипептидной цепи в центральный канал молекулы hsp60, сопровождающееся присоединением hsp10 к поверхности дна и конуса.

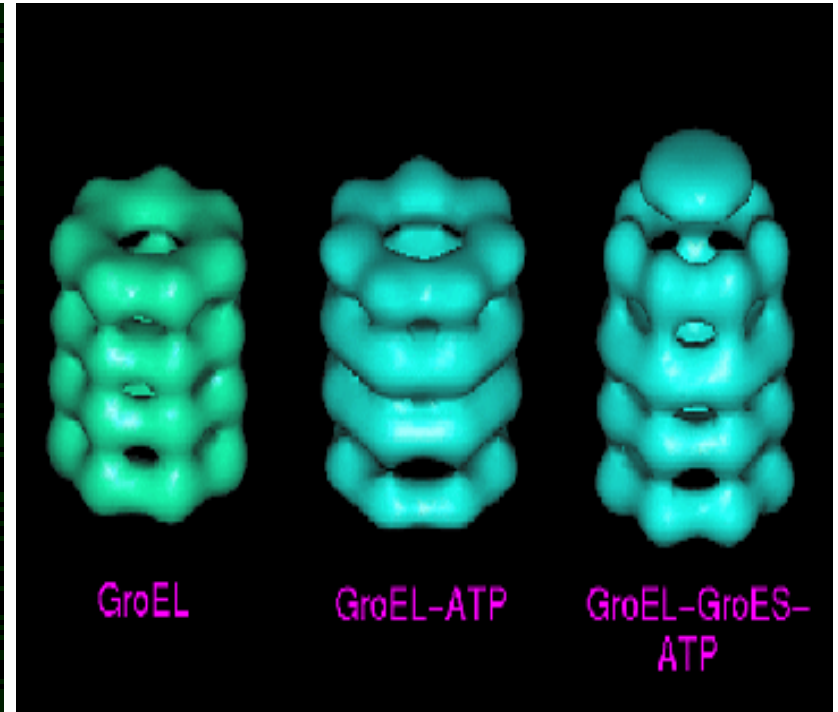
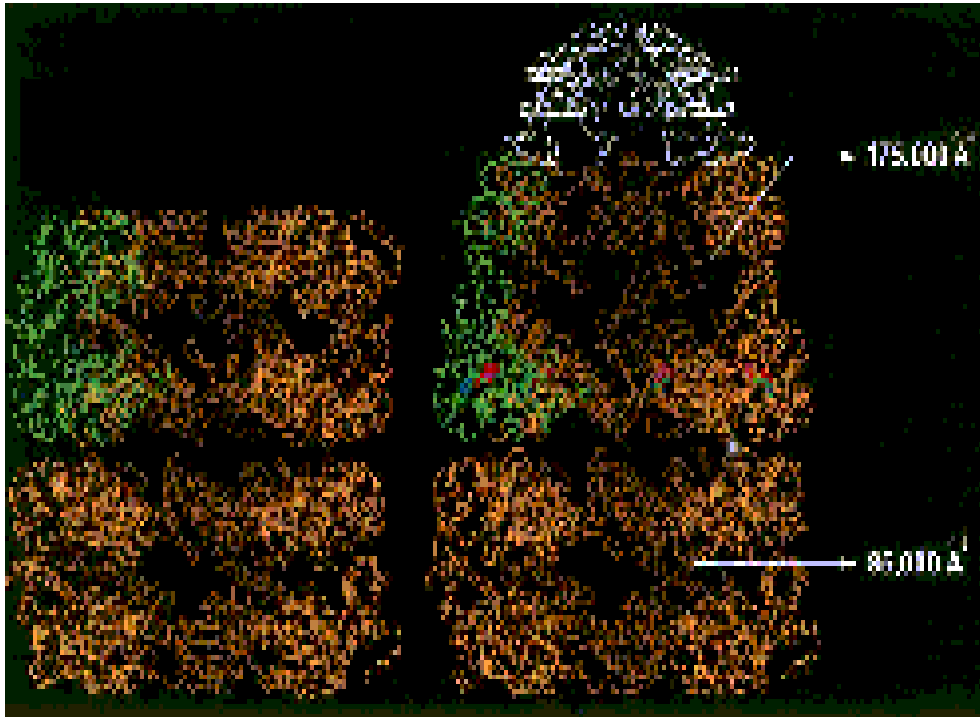
# Структура субъединицы GroEL



Субъединица GroEL состоит из трех доменов:

- Экваториальный домен
  - образует контакты с аналогичным доменом на втором кольце;
  - связывает АТФ;
- Промежуточный домен
  - является гибким шарниром, обеспечивает связывание АТФ и GroES
- Апикальный домен
  - связывает полипептид; сайт связывания содержит в основном крупные гидрофобные ак,
  - связывает GroES.

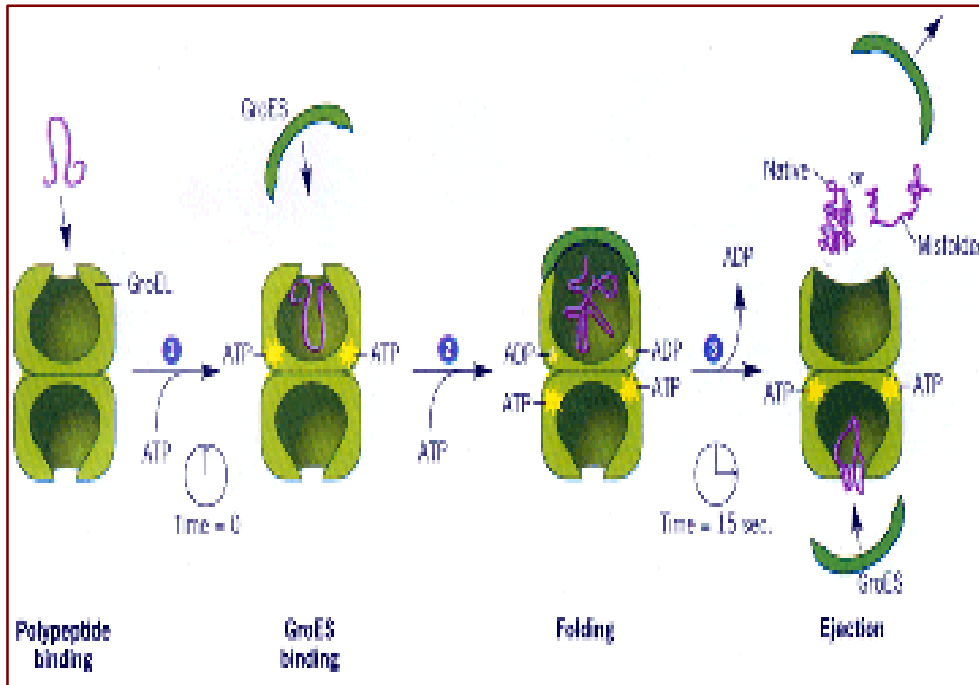
# Конформационные изменения в шаперонине GroEL



При связывании АТФ и GroES:

- увеличивает объем внутренней полости примерно в 2 раза;
- меняет расположение гидрофобных остатков апикального домена, и внутренняя поверхность полости становится гидрофильной

# Схема фолдинга белковой молекулы при помощи шаперониновой системы **GroEL/ GroES** с

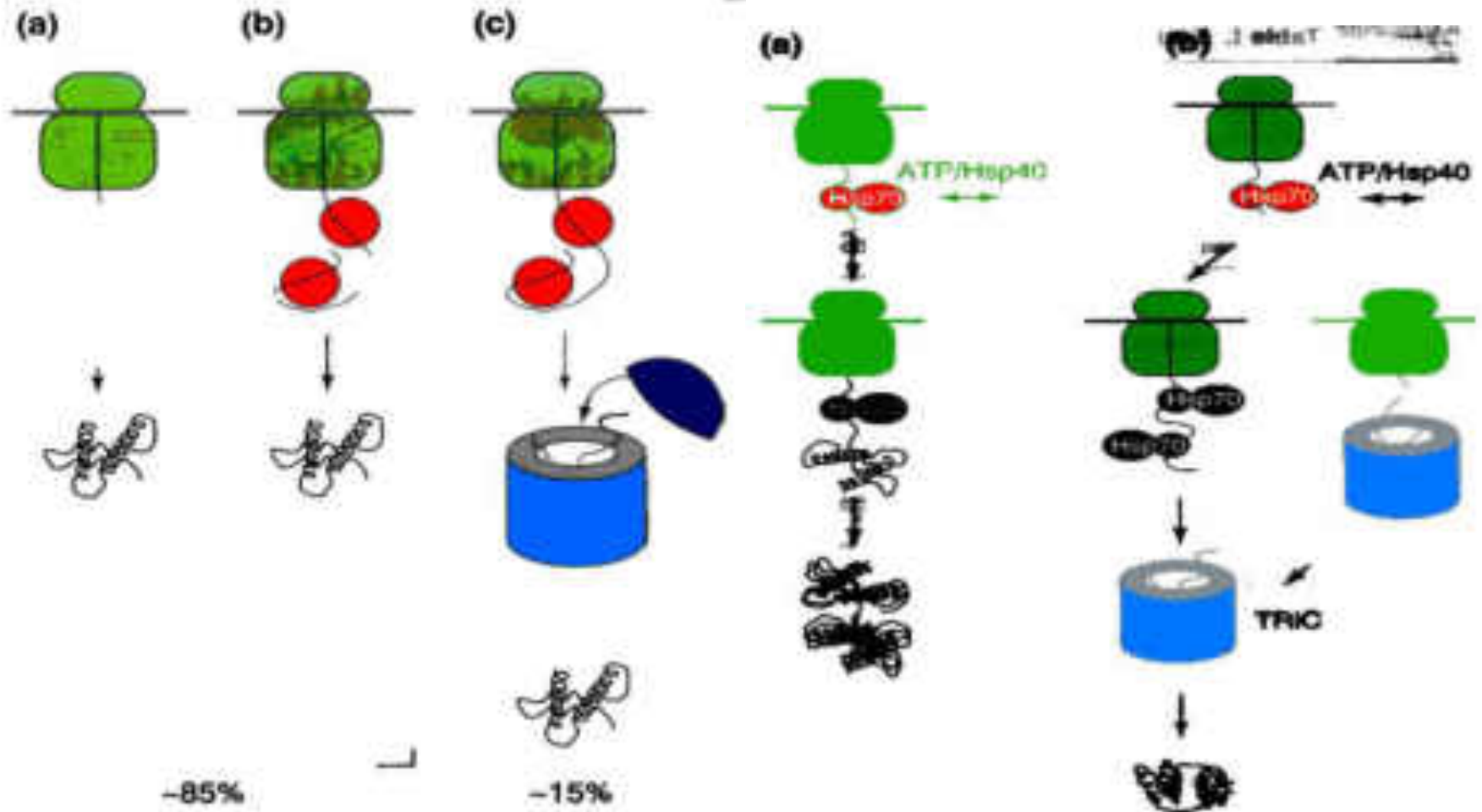


- В открытый «котел» **GroEL** проникает белок в состоянии незавершенного фолдинга
- Происходит связывание белка, имеющего на своей поверхности гидрофобные радикалы с и внутренней стенкой «котла» за счет избытка на ней гидрофобных радикалов
- Происходит связывание крышечки **GroES** с «котлом». Поверхность «котла» становится гидрофильной. Идет фолдинг.
- Через 15 секунд происходит гидролиз АТФ.  
Крышечка диссоциирует, «котел» становится гидрофобным

## Последствия:

1. Фолдинг завершен-молекула покидает систему
2. Фолдинг не завершен, белковая молекула вновь связывается со стенками «котла» цикл повторяется пока не будет достигнут необходимый результат

Участие разных белков теплового шока в правильном сворачивании полипептидных цепей у *E.coli* (слева) и у эукариот (справа)



# Прионы как антишапероны

- Не всегда результат фолдинга – это «правильная» полипептидная цепь.
- Прионовый белок – белок мозга, находится в нормальной конформации (функция пока не выяснена).
- при ряде заболеваний этот белок переходит в другие конформации (много участков с  $\beta$ -структурой, способной к агрегации).
- Такой неправильный белок называют «прион»

# Прионы



**Прионы**— особый класс инфекционных агентов, представленных белками с аномальной третичной структурой и не содержащих нуклеиновых кислот. Это положение лежит в основе прионной гипотезы

**Прионные болезни** — группа нейродегенеративных заболеваний, характеризующихся прогрессирующим поражением головного мозга и летальным исходом



# Прионные белки.

Основной компонент прионов - аномальная изоформа прионного белка (одного из белков ЦНС).

Проникновение прионов в клетку приводит к нарушению конформации синтезируемого клеткой прионного белка, нарушению функции клетки и дальнейшему накоплению прионов.

Причины появления прионов:

1. Ошибки фолдинга (редко)
2. Мутации гена, кодирующего прионный белок
3. Употребление в пищу тканей животных, в которых содержатся прионы

# Прионы

Все известные прионы вызывают формирование амилоидов — белковых агрегатов, включающих плотно упакованные  $\beta$ -слои. Амилоиды представляют собой фибриллы, растущие на концах, а разлом фибриллы приводит к появлению четырёх растущих концов. Инкубационный период прионного заболевания определяется скоростью экспоненциального роста количества прионов, а она, в свою очередь, зависит от скорости линейного роста и фрагментации агрегатов (фибрилл). Для размножения приона необходимо исходное наличие нормально уложенного клеточного прионного белка; организмы, у которых отсутствует нормальная форма прионного белка, не страдают прионными заболеваниями.

# Устойчивость

Прионная форма белка чрезвычайно стабильна и накапливается в поражённой ткани, вызывая её повреждение и, в конечном счёте, отмирание. Стабильность прионной формы означает, что прионы устойчивы к денатурации под действием химических и физических агентов, поэтому уничтожить эти частицы или сдержать их рост тяжело.

Прионы существуют в нескольких формах — штаммах, каждый со слегка отличной структурой.

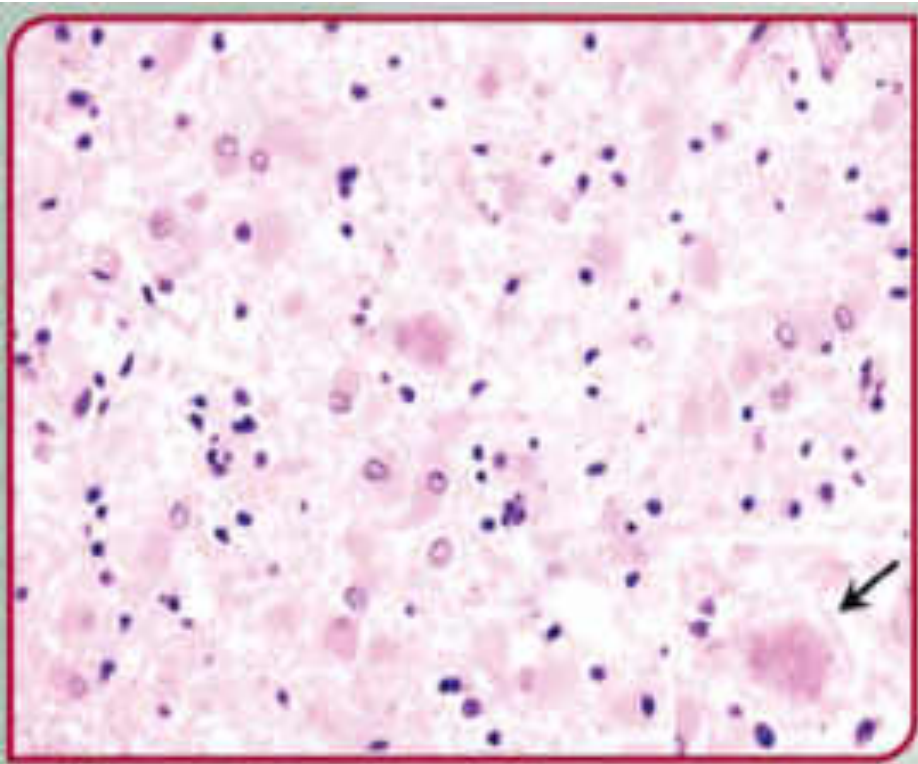


Рис. 5. Гистопатологические изменения во фронтальной коре у пациента, умершего от нБКЯ в США. Показана астроглиальная реакция, вакуолизация ткани мозга на месте погибших нейронов показана стрелкой – окраска гематоксилин/эозин, увеличение  $\times 40$  по данным CDC, 2005

Прионы – уникальный природный инфекционный агент (лишен нуклеиновой кислоты)

Прионы вызывают некоторые дегенеративные заболевания ЦНС - болезнь Крейтцфельдта-Якоба , куру (туземцы Новой гвинеи)

Предполагают также участие прионов в передаче человеку губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота (коровьего бешенства)

# КЛАССИФИКАЦИЯ ПРИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

- Куру;
- Болезнь Крейтцфельда-Якоба (спорадическая, ятрогенная, наследственная, новый вариант);
- Синдром Герстмана-Штреусслера-Шайнкера;
- Фатальная семейная бессоница

# Посттрансляционная модификация белков

# Особенности реакций посттрансляционной модификации

- Катализируются специфическими ферментами (хотя есть и внутримолекулярные превращения)
- Модификации затрагивают определенные АК остатки
- Могут происходить как во время синтеза полипептидной цепи (котрансляционная модификация), так и после окончания синтеза
- Нематричные процессы, отсюда – образование множественных форм белка
- Некоторые реакции характерны для очень многих белков, а некоторые для ограниченной группы или отдельных белков
- Функциональная направленность реакций посттрансляционной модификации (в отличие от повреждающих реакций)

# Функциональное значение посттрансляционной модификации

1. Увеличивают разнообразие белковых молекул (структурное и функциональное);

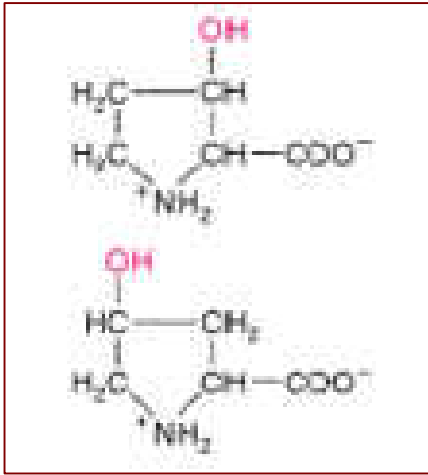
*(Протеом человека состоит из ~ 300000 различных белков, что почти в 10 раз превышает число генов)*

*Обеспечивают:*

1. Правильную сборку белков;
2. Регуляцию активности белков;
3. Передачу сигнала и др.

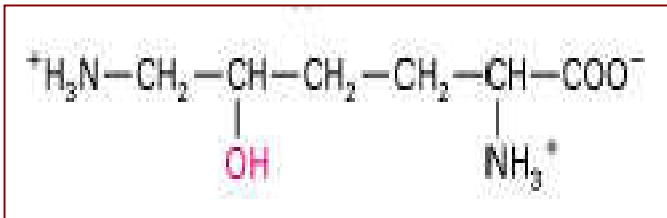


# Модификация внутренних аминокислотных остатков белков (I)



Образование оксипролина (котрансляционно)

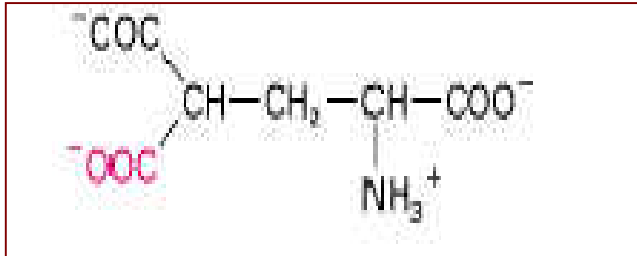
- Часто встречается в коллагене, эластине;



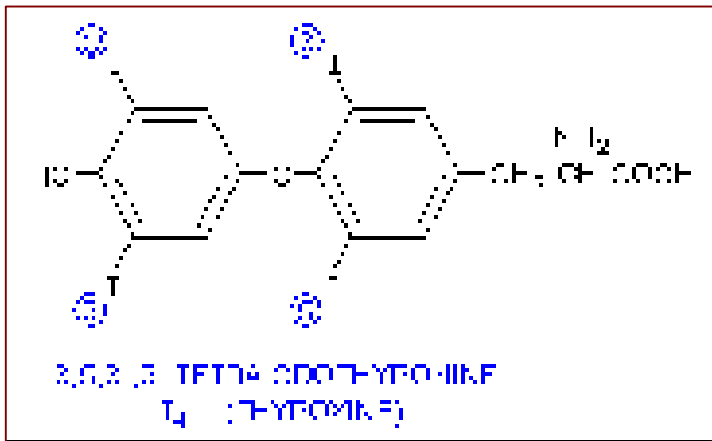
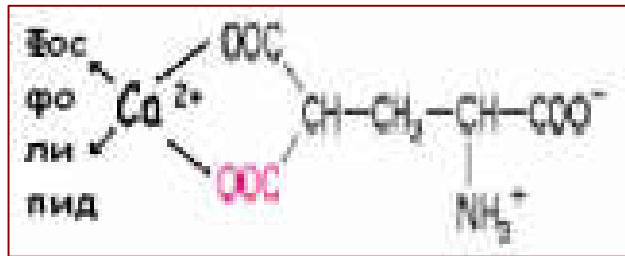
Образование оксилизина (котрансляционно)

- Часто встречается в коллагене;

# Модификация внутренних аминокислотных остатков белков (II)

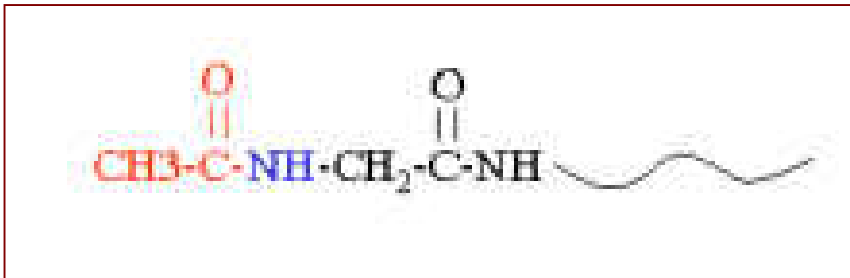


Образование  $\gamma$ -карбоксихлутаминовой кислоты в белках, образующих комплексы с ионами  $\text{Ca}^{2+}$  : протромбин, остеокальцин.



Иодирование остатков Tyr в тиреоглобулине, идущем на синтез тиреоидных гормонов

# Модификации N-конца белков



Ацетилированный N-конец белка

- Удаление N-формильной группы Met (прокариоты);
- Отщепление иницирующего Met (эукариоты)

*Примерно у 50% цитозольных белков сохраняется Met.*

- Ацетилирование N-конца (около 50 % цитозольных белков ацетилировано);
- Метилирование N-конца (редкая модификация, например рибосомные белки).

# Гликозилирование белков

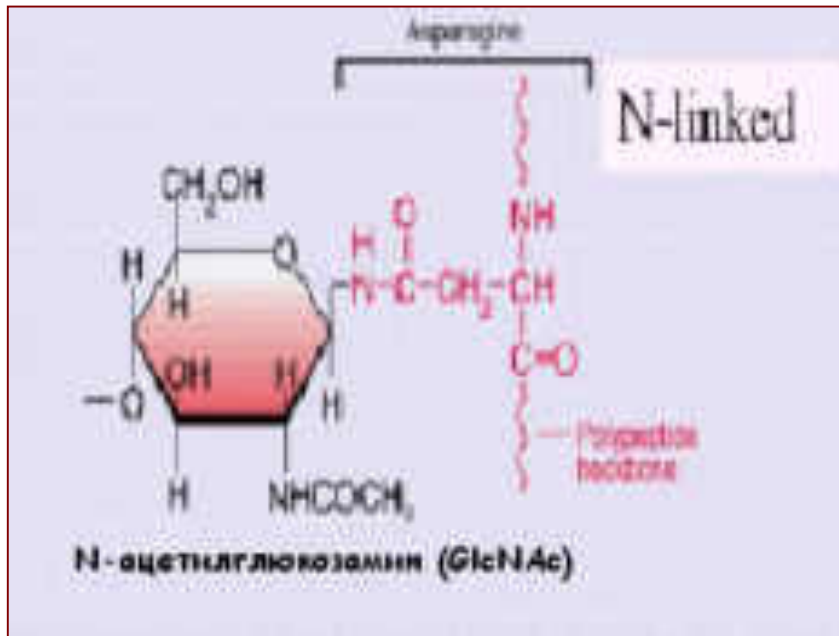
Гликопротеинами называют белки, содержащие ковалентно связанный углеводный компонент.

Гликозилирование:

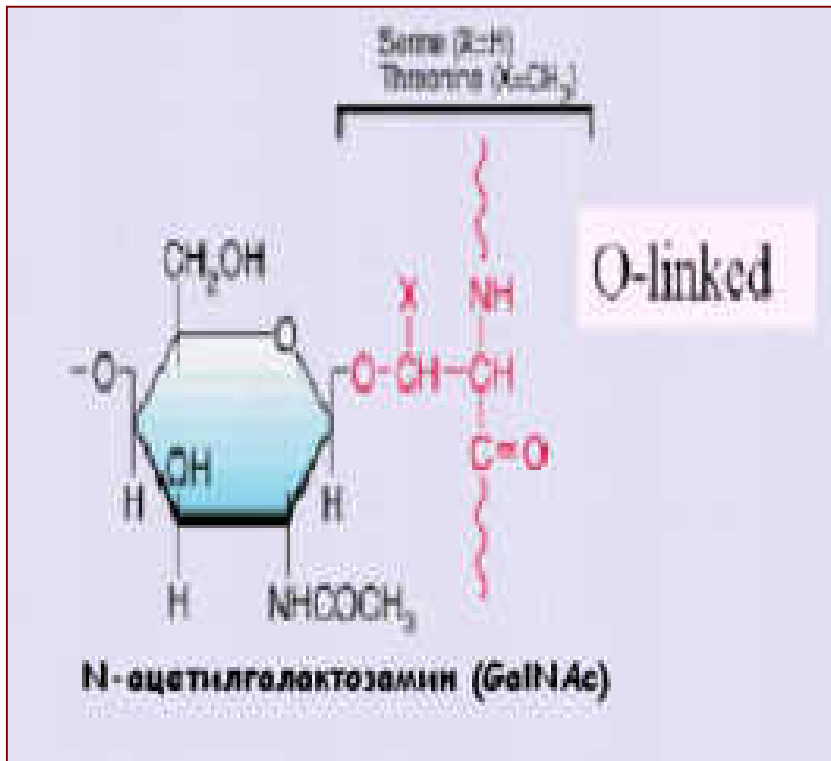
- Одна из основных форм модификации белков (более 80% белков гликозилировано);
- Происходит в основном в ЭПР и аппарате Гольджи (большинство секреторных и мембранных белков гликозилированно);
- Реже происходит в цитоплазме и ядре;

# N-гликопротеины

- Углеводный компонент присоединяется N-гликозидной связью к амидному азоту Asp
- Происходит в ЭТР
- Фолдинг белков препятствует N-гликозилированию



# O-гликопротеины



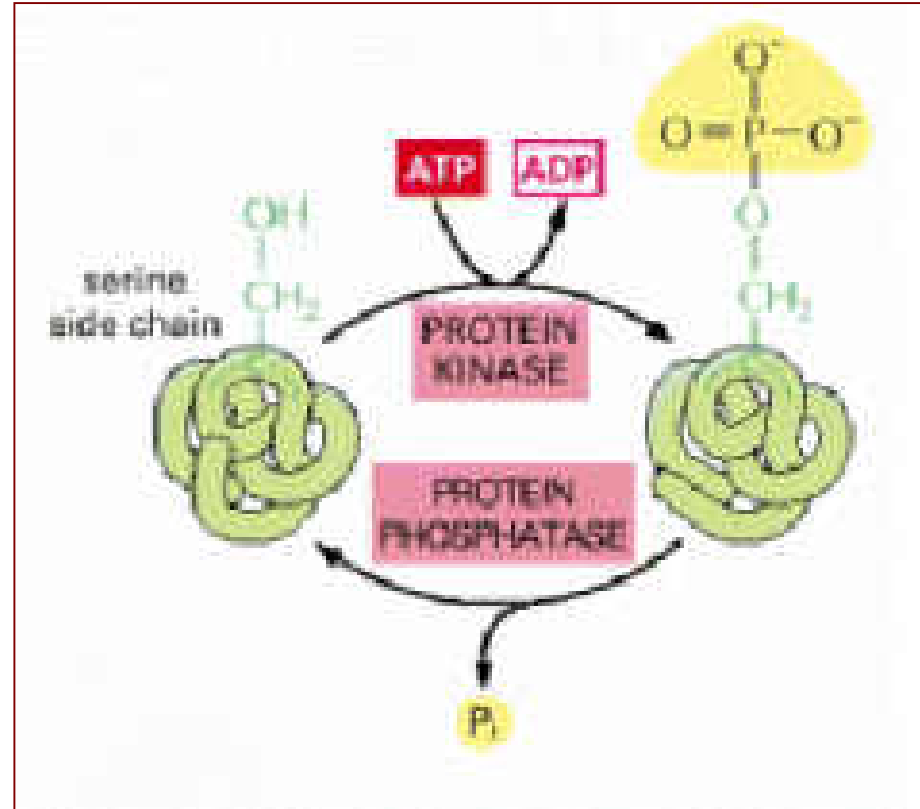
- Углеводный компонент присоединяется O-гликозидной связью к оксигруппе Ser или Thr
- Происходит в аппарате Гольджи;
- O-гликозилирование может происходить после формирования глобулы;
- O-гликозилирование встречается реже в глобулярных белках, чем N-гликозилирование.

# Функциональное значение гликозилирования

- Стабилизация структуры белков, защита от протеаз (особенно для секреторных белков)
- Передача сигнала
  - клеточные рецепторы в основном – гликопротеины и протеогликаны

# Фосфорилирование белков

- Одна из наиболее общих модификаций белков эукариот;
- В большинстве случаев фосфорилирование существует как механизм регуляции биологической активности белков (обратимо);
- Перенос концевых фосфата АТФ (серин/треониновые киназы и тирозинкиназы) на гидроксильные группы Ser, Thr, Tyr;
- Уровень фосфорилирования Ser, Thr, Tyr - 1000/100/1



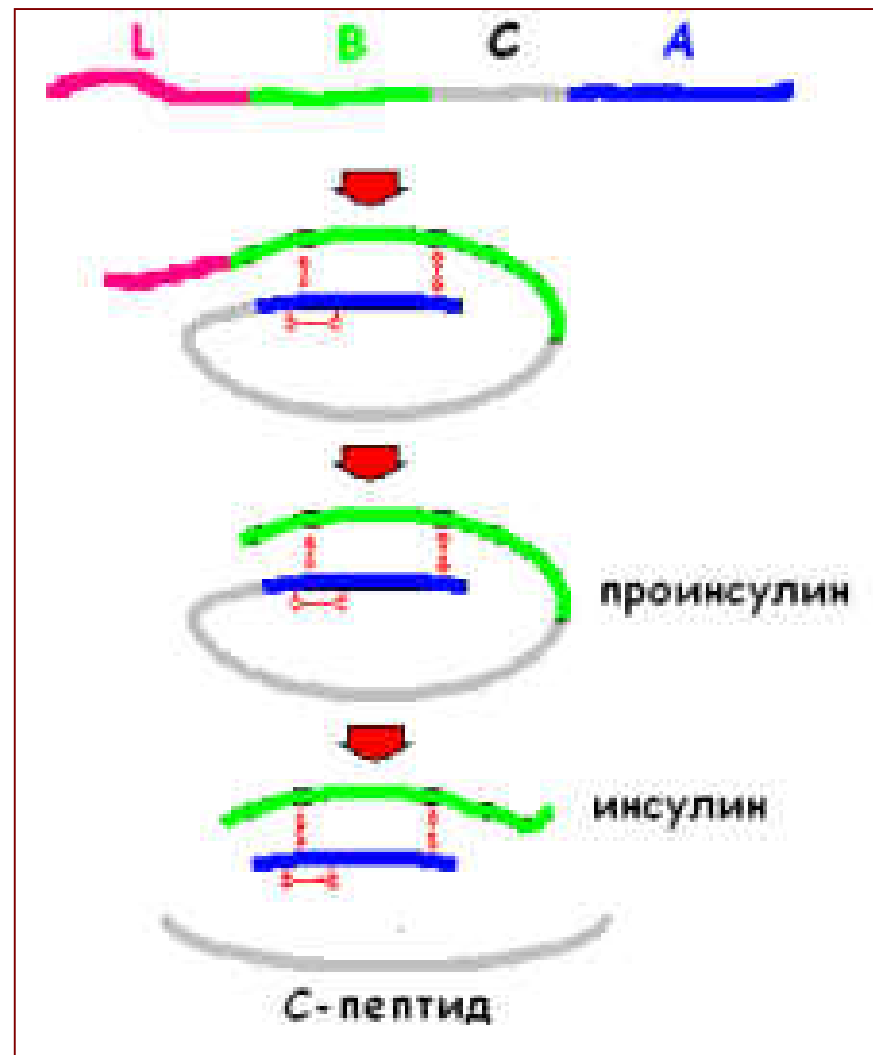
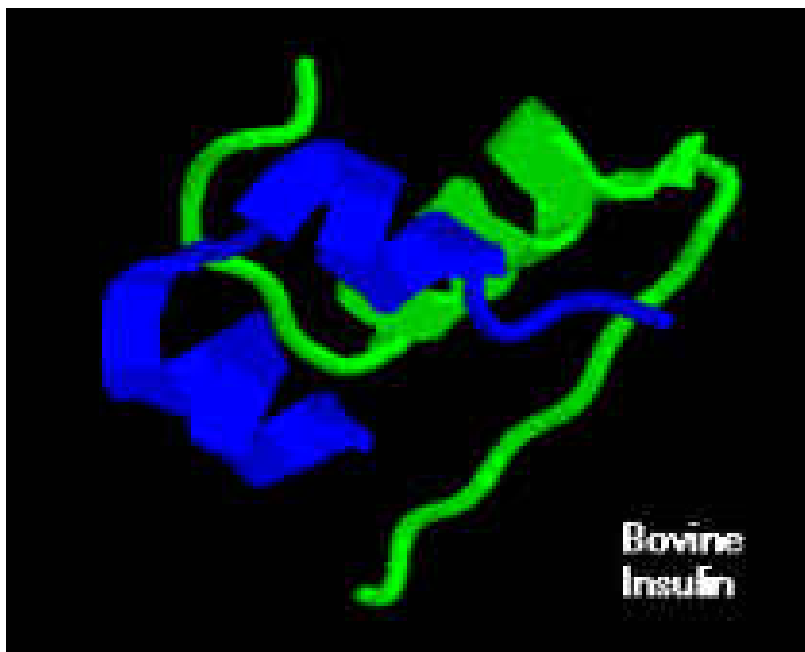


# Ограниченный протеолиз

Ограниченный протеолиз - процесс протеолитического расщепления белков, приводящий к их активации.

# Формирование структуры инсулина

- Препроинсулин (105 ак)→
- Проинсулин (86 ак) - вырезание С-пептида:
- Инсулин - 21ак (А цепь) и 30ак (В цепь)



# Активация предшественников ферментов

- Трипсиноген

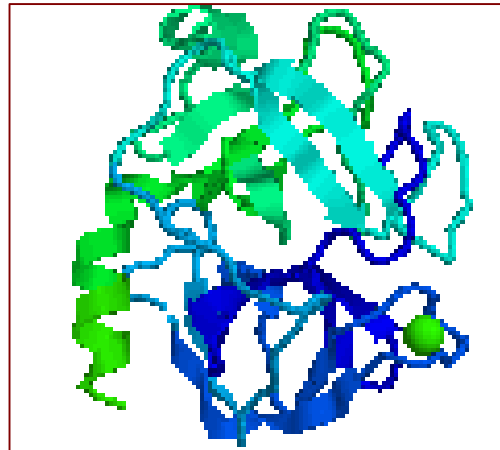
Активационный пептид      Трипсин

Val-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys -|-Ile-Val-Gly-

Расщепление трипсином или энтеропептидазой  
(в 1000 раз эффективнее)

Трипсиноген

Трипсин

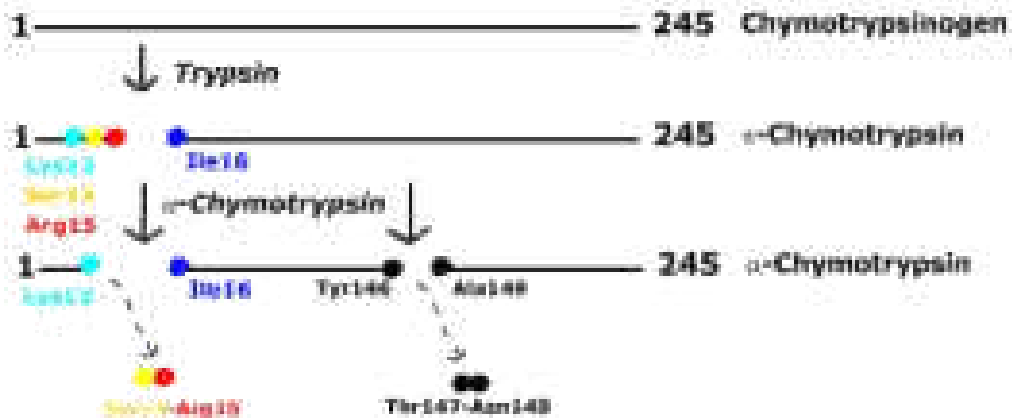


- Многие ферменты синтезируются в виде неактивных предшественников – проферментов.
- Во многих случаях активация – протеолитическое отщепление активационного пептида (панкреатические сериновые протеиназы – трипсин и хемотрипсин);

# Активация химотрипсина



- Разрыв связи Arg15-Ile16;
- Пептид остается связанным с ферментом дисульфидной связью;
- Взаимодействие Ile16 с Asp184;
- Удаление дипептида Ser14Arg15;
- Разрыв связи Asn148-Ala149;
- Удаление дипептида Thr147Asn148.

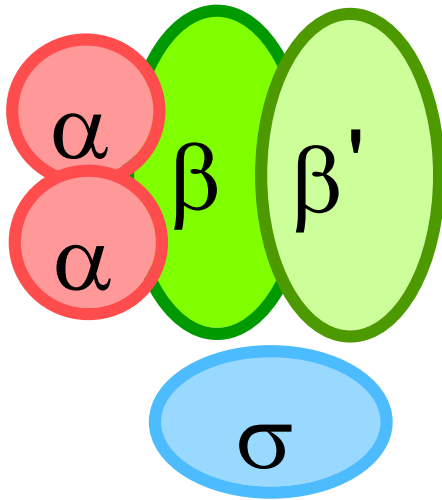




**СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ**

# Строение РНК -полимеразы

Белок с четвертичной структурой



Две  $\alpha$  субъединицы - каркас РНК-полимеразы.

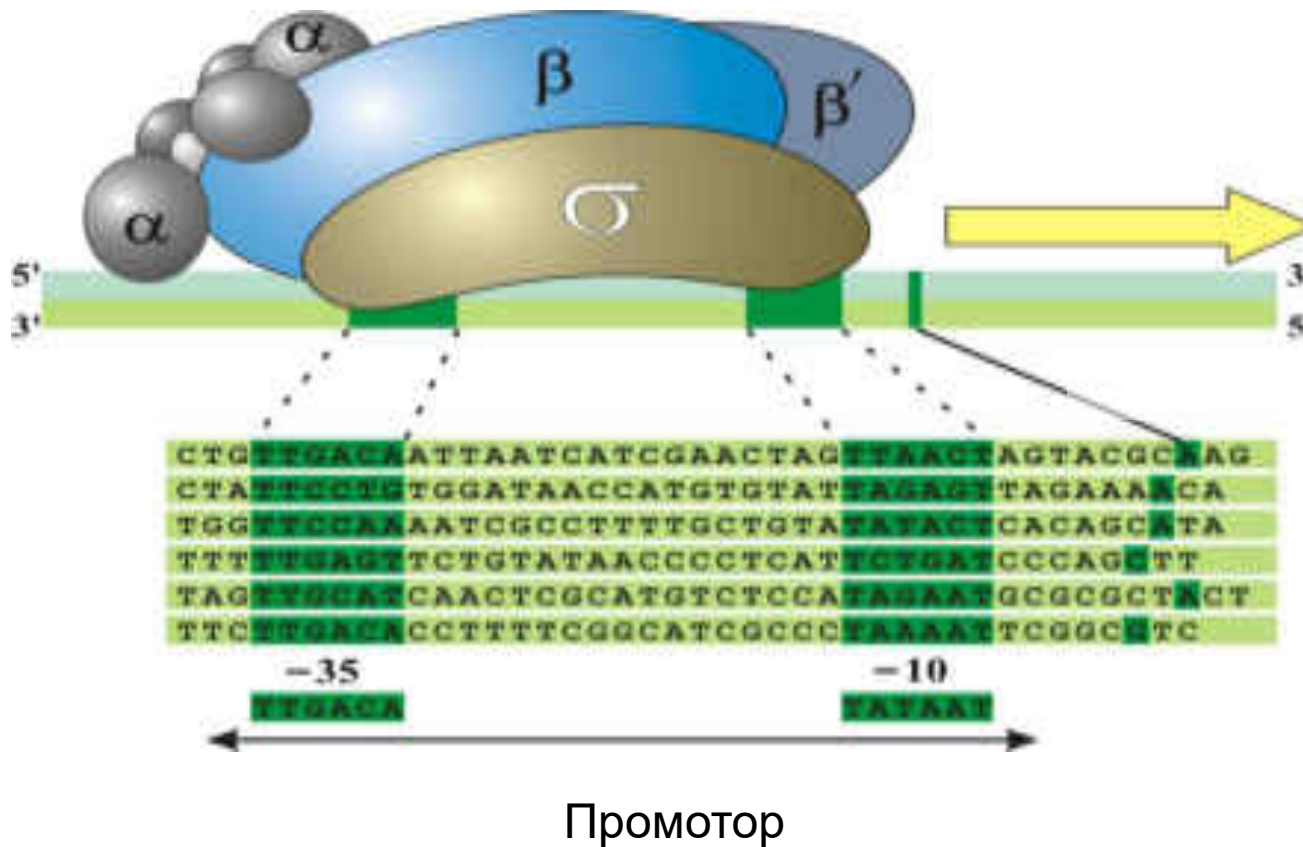
$\beta'$  - субъединица отвечает за прочное связывание с ДНК за счет содержания большого количества положительно заряженных аминокислот.

В  $\beta$  - субъединице находится каталитический центр, отвечающий за связывание между собой рибонуклеотидов

$\sigma$  (сигма) – фактор, который через базальные факторы транскрипции связывает РНК –полимеразу с промотором

# Инициация транскрипции

Если структура промотора соответствует структуре *сигма* – фактора РНК – полимеразы – происходит инициация транскрипции

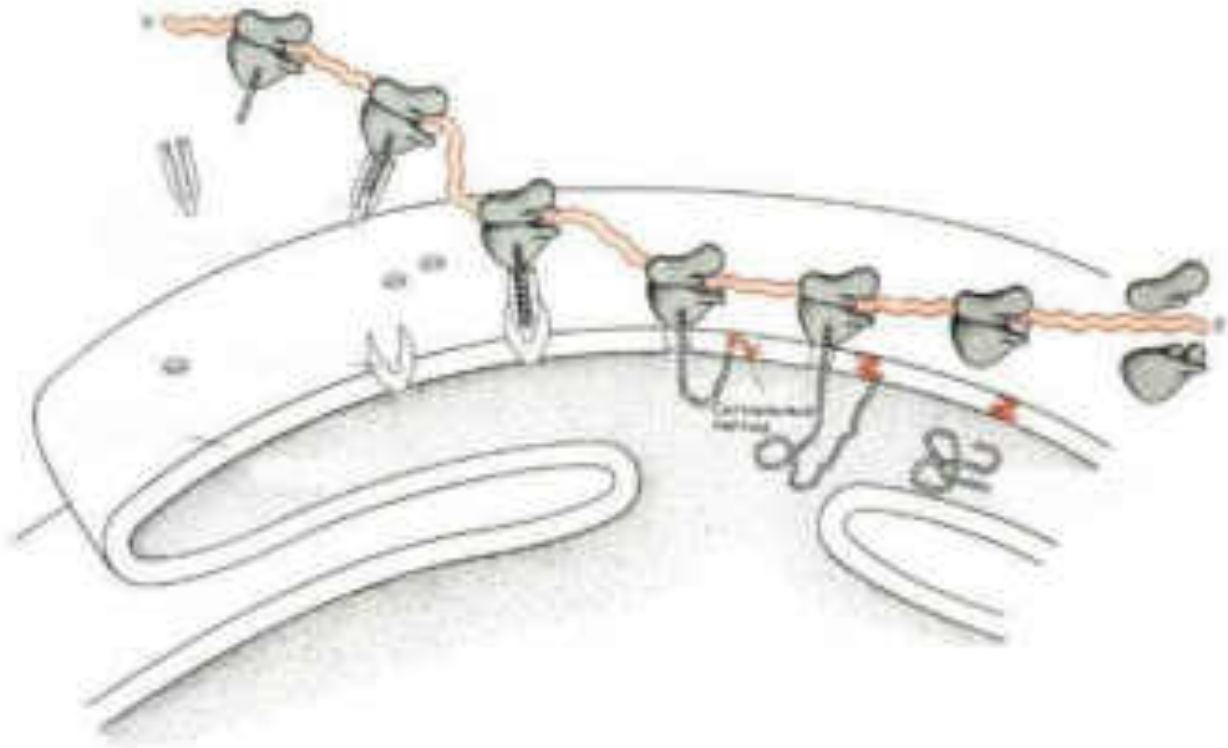


Направление транскрипции

**Строение промотора**  
Промотор имеет консервативную последовательность нуклеотидов - **ТАТААТ (ТАТА-бокс)** и переменную последовательность нуклеотидов



## Синтез белков на экспорт



Рибосомы находящиеся на эндоплазматической сети, синтезируют белковую молекулу, которая постепенно проникает во внутрь ЭПС и транспортируется к аппарату Гольджи.

## Николай Константинович Кольцов (1872-1940)



Отечественный зоолог,  
цитолог, генетик.

Выдвинул идею о том, что  
синтез белка идет  
**по матричному принципу.**

Почему лак-оперон не транскрибируется (молчит) если в среде есть одновременно глюкоза и лактоза

Почему в эти условия не работает индуктор – лактоза

Почему транскрипция начинается только того, как израсходуется вся глюкоза