Матричные синтезы

- **Биосинтез нуклеиновых кислот.**
- **Факторы транскрипции.**
- **Биосинтез белка.**
- **Факторы трансляции.**
- **Посттрансляционные модификации белковых молекул.**

БИОСИНТЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И БЕЛКОВ (МАТРИЧНЫЕ БИОСИНТЕЗЫ)

Нуклеиновые кислоты - высокомолекулярные соединения со строго определённой ***линейной*** последовательностью мономеров. Они формируют в организме два ***информационных потока***.

Репликация – это ***удвоение*** молекул **ДНК**. Последующие деления передают воспроизведенную информацию дочерним клеткам, которые наследуют ***геном*** родительской клетки с полным набором ***генов*** - "инструкций" о ***строении РНК и всех белков организма***.

Геном – это вся наследственная информация, хранящаяся в данном организме.

Ген (от греч. génos — род, происхождение) - это структурно-функциональная единица генетического материала, элементарная единица наследственности, участок молекулы ***ДНК***, на котором синтезируется активная молекула РНК (т-РНК, м-РНК, р-РНК).

Транскрипция – это синтез **мРНК** ("***считывание***" генетической информации) как матрицы для синтеза соответствующих белков.

Трансляция – это синтез **белка** ("***перевод***" информации, заключённой в мРНК, на "язык" аминокислотных остатков в белке).

"Центральная догма биологии" - это поток информации от ***ДНК*** через ***РНК*** на ***белок.***

Он характерен для всех живых организмов, за исключением некоторых ***РНК-содержащих вирусов***.

Матричная природа синтеза нуклеиновых кислот и белков обеспечивает ***высокую точность воспроизведения информации***.

Репарация - это ***матричный*** синтез, исправляющий ошибки в структуре ДНК**,** вариант ***ограниченной репликации.*** Восстанавливает ***первоначальную*** структуру ДНК. Матрица – это участок ***неповреждённой*** нити ДНК.

Обратная транскрипция - это синтез ***комплементарной*** ДНК, которая может включаться в геном высших организмов. Матрица - ***РНК*** размножающегося вируса.

40 000 генов способны к экспрессии. Это составляет 5% от всего количества генов в геноме. Остальные 95% - паразиты (вирусные).

В геноме человека обнаружено 400 разновидностей вирусов.

Поток информации от ДНК к структуре белка

Генетическая информация ***генотипа*** определяет ***фенотипические*** признаки клетки - ***генотип трансформируется в фенотип***.

Это направление потока информации включает три типа ***матричных*** синтезов:

1. синтез DNA — **репликация**
2. синтез RNA — **транскрипция**
3. синтез белка — **трансляция**

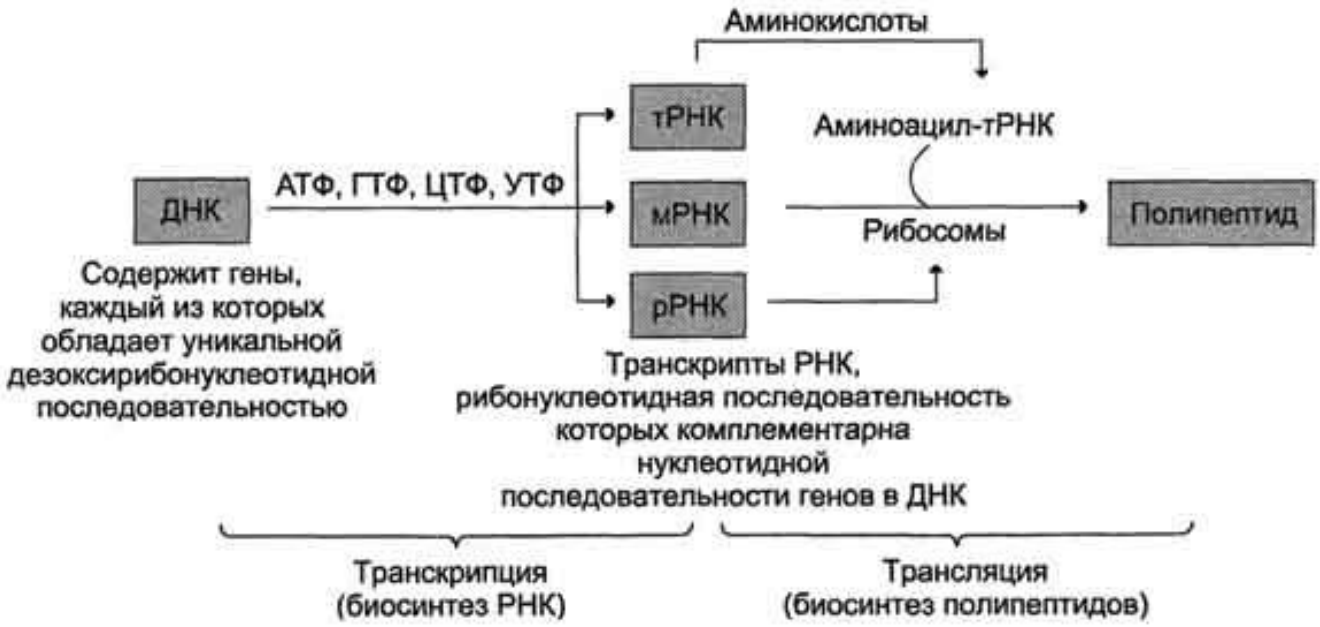
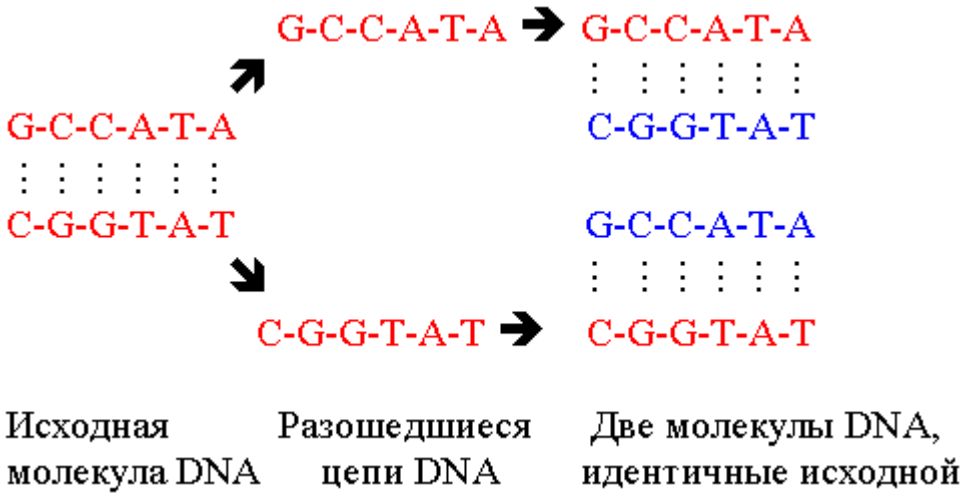


Схема реализации генетической информации в фенотипические признаки.

Репликация ДНК

Репликация ДНК (воспроизведение генома) происходит по ***полуконсервативному механизму***. Каждая нить двойной спирали выступает в роли ***матрицы*** для синтеза новой цепи.

Дезоксинуклеозидтрифосфаты - это ***строительный*** материал и источники ***энергии.***

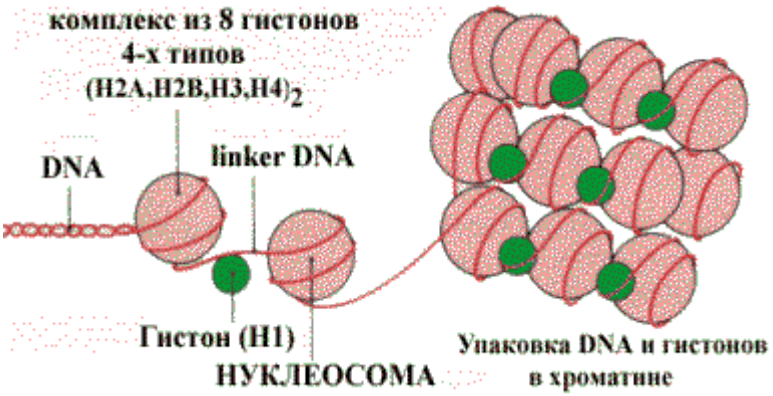


Полуконсервативный механизм репликации ДНК

Этапы репликации

1. Узнавание точки начала процесса
2. Расплетение родительских цепей ДНК
3. Инициация, элонгация, терминация биосинтеза дочерних цепей ДНК

Нуклеосома - это молекула ***ДНК,*** упакованная в отдельную ***хромосому.*** ДНК располагается вокруг белков (***гистоны*** и ***протамины***).



Упаковка ДНК и гистонов с образованием *хроматина*

А. Инициация репликации

Синтез **ДНК** у эукариотов происходит в **S-фазу** клеточного цикла.

Факторы роста – это специфические ***сигнальные*** белковые молекулы. Они регулируют инициацию репликации через рецепторы мембран клеток.

Точка начала репликации – это место, где происходит локальная ***денатурация*** ДНК. Цепи расходятся и образуются две ***репликативные вилки,*** движущиеся в **противоположных** направлениях.

Реплисома – ***ДНК-репликазная система*** состоит из **40 ферментов** и **белковых факторов**. ***Мультиферментный комплекс*** должен работать быстро и точно. Наиболее важные:

Праймаза – РНК-полимераза осуществляет синтез ***праймера*** (10-60 нуклеотидов) на стадии инициации:

Праймер→ (1) Праймасома (20 полипептидов) →(2) Отстающая цепь ДНК

n'- белок перемещает (1) к (2). Проявляет ***АТФ-азную*** активность.

Белки dna B и ***dna C*** формируют ***специфическую*** вторичную структуру ДНК для узнавания ее ***праймазой***.

ДНК-полимераза III – осуществляет сопряженный синтез ***ведущей*** (лидирующей) и ***отстающей ДНК.*** Использует двухцепочечные участки ДНК.

ДНК-полимераза I – отщепляет ***праймер***, достраивает пробелы дезоксинуклеотидами.

ДНК-полимераза II – осуществляет ***«ремонтные»*** функции, устраняет повреждения цепей ДНК.

ДНК-лигаза – образует фосфодиэфирные связи, сшивает фрагменты ДНК.

Хеликаза **(rep-белок)** – раскручивает двойную спираль ДНК, разрывая водородные связи.

Топоизомеразы **(ДНК-гиразы)** – создают и ликвидируют **сверхспирализацию** ДНК. Обладают ***нуклеазной*** активностью.

SSB-белки (от англ, *single strand binding proteins*) поддерживают участки ДНК в ***раскрученном*** состоянии.

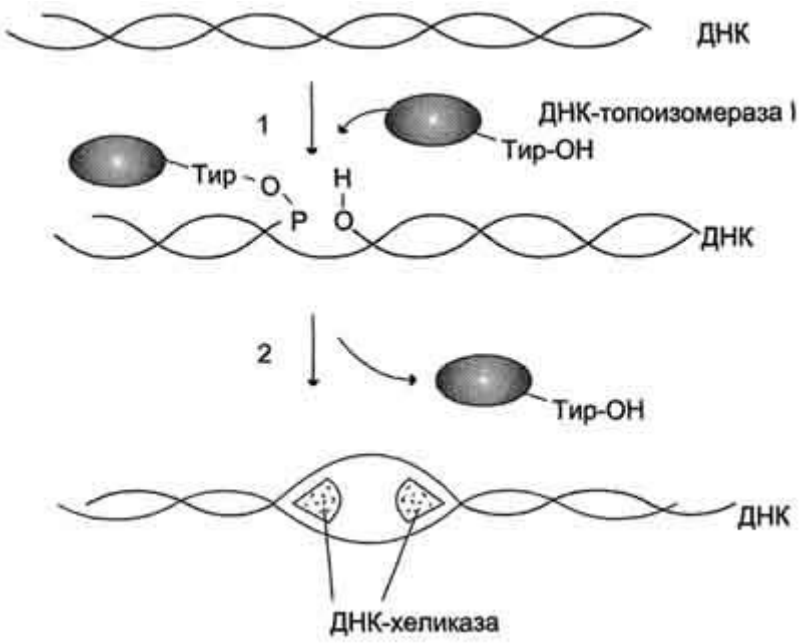
ДНК-«редактирующий» фермент – устраняет ошибки в структуре ДНК.

Антипараллельное направление комплементарных цепей – это общий принцип ***репликации*** и ***транскрипции.***

Особенности репликации ДНК у эукариот:

1) **Автономно** реплицирующиеся последовательности. Не одна, а сразу много (до **400** в дрожжевой клетке).
2) **Множественность** точек «начала» репликации.
3) Скорость движения репликационной вилки в **10** раз ниже, чем у E.coli.

Праймеры – небольшие **олиго-ДНК** (4-6 нуклеотидов) служат ***«затравками»*** для начала репликации. Позже они удаляются, и на их место достраивается соответствующий участок ДНК.



Участие ДНК-топоизомеразы I в образовании репликативной вилки.

1 - фермент расщепляет одну цепь ДНК. Между остатком **тирозина** молекулы фермента и фосфорным остатком цепи образуется ***ковалентная*** связь

2 - происходит локальное раскручивание двойной спирали при участии ***ДНК-хеликазы***.

ДНК-топоизомераза I восстанавливает **фосфоэфирную** связь.

Б. Элонгация

ДНК-полимеразы α (альфа), **β** (бета), **δ** (дельта), **ε** (эпсилон) участвуют в синтезе ДНК в **ядре** клеток.

ДНК-полимераза γ (гамма) **-** в репликации ***митохондриальной*** ДНК.

Энергия макроэргических связей расходуется на образование ***3',5'-фосфодиэфирной*** связи между последним нуклеотидом растущей цепи ДНК и присоединяемым нуклеотидом.

В каждой репликативной вилке идёт ***одновременно*** синтез ***двух*** новых (**дочерних**) цепей.

Лидирующая цепь синтезируется в направлении движения репликативной вилки**.** На второй матричной цепи синтез **дочерней ДНК** осуществляется двумя ферментами:

"Фрагменты Оказаки" синтезируются ***ДНК-полимеразой α*** и ***ДНК-полимеразой ε*** в направлении **5'→3'**, но **против** движения репликативной вилки. Они формируют **отстающую цепь.**

ДНК-полимераза β заполняет брешь, возникающую при удалении праймера.

ДНК-лигаза образует ***непрерывную*** цепь ДНК из множества ***фрагментов Оказаки***.

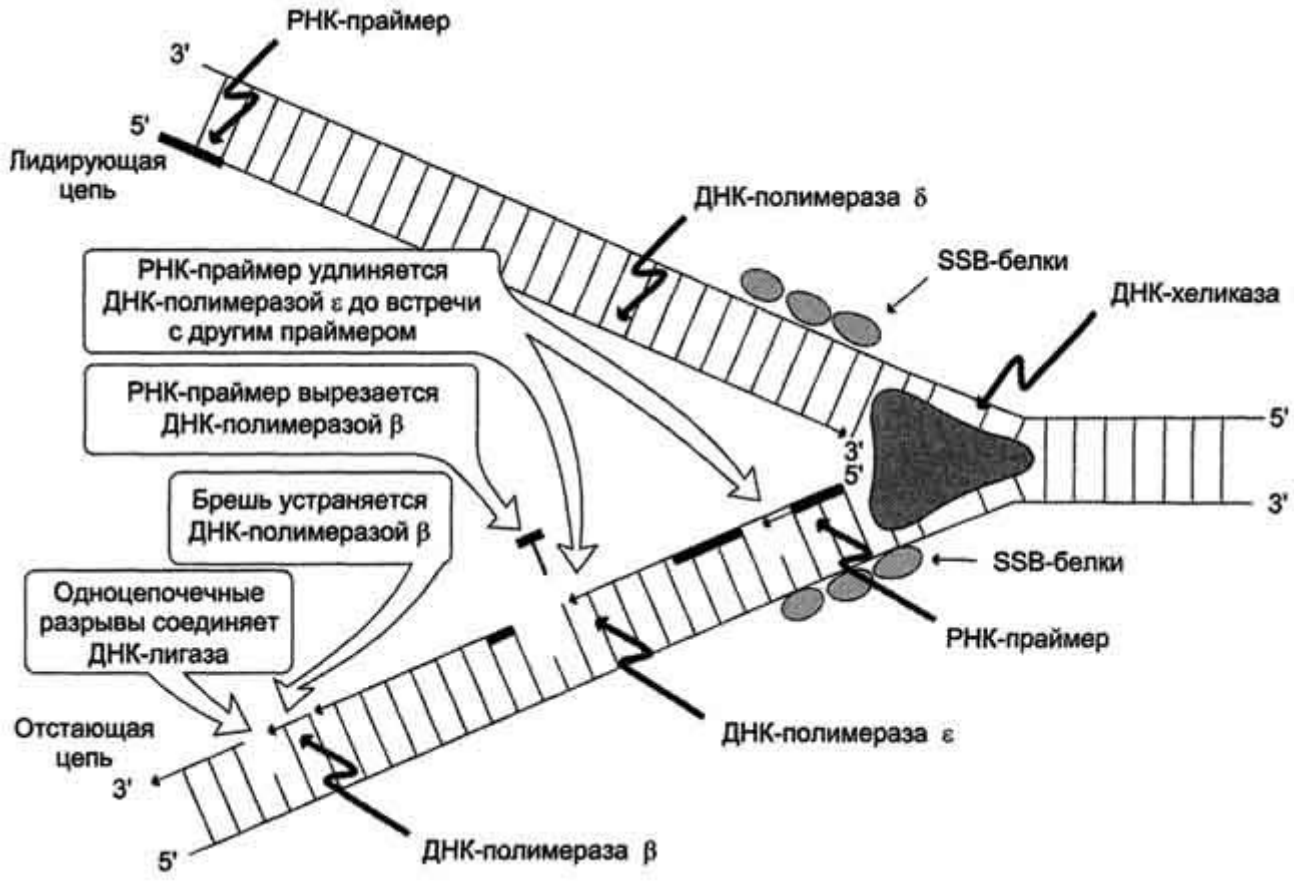
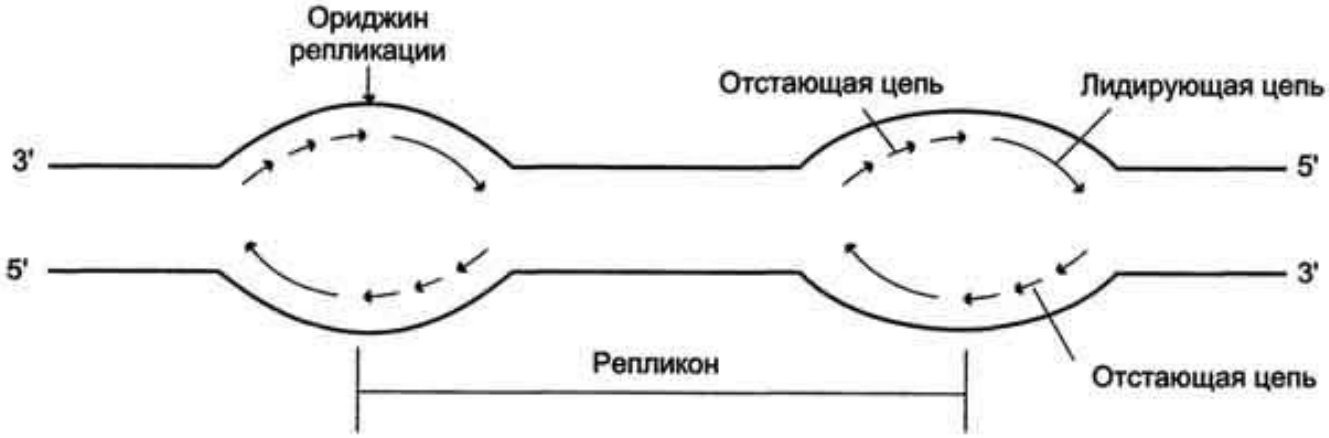


Схема репликации ДНК.

Ориджины (от англ. *origin* - происхождение) **репликации** – это сайты инициации репликации. ***"Сайт"*** *– это любой участок генома.*



Образование двух репликативных вилок, перемещающихся в противоположных направлениях от ориджина.

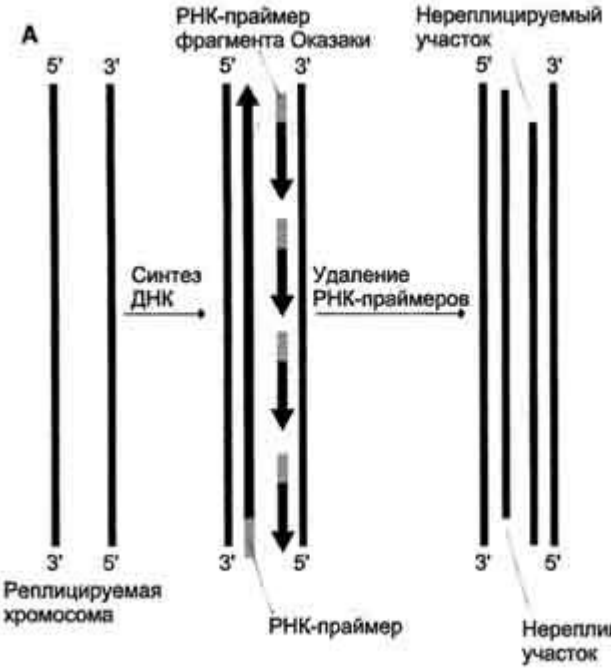
Репликоном называют последовательность ДНК, ограниченную двумя ***ориджинами репликации***.

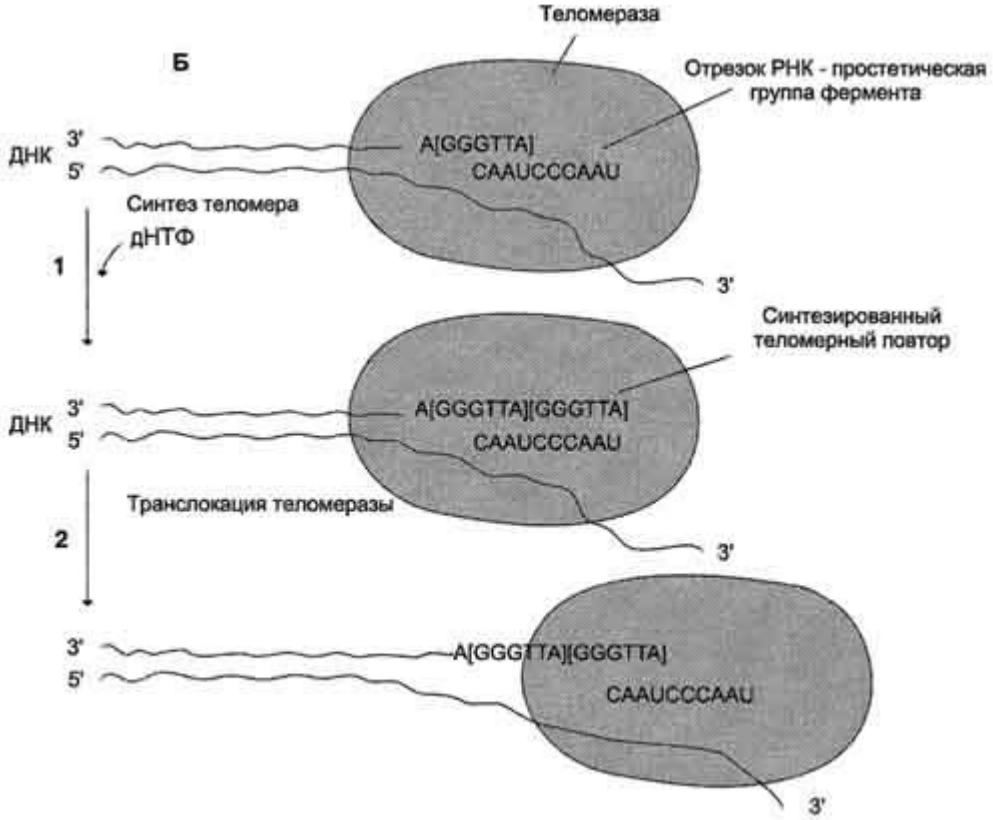
ДНК хромосомы человека содержит примерно ***150 млн пар*** нуклеотидов. Репликация такой большой молекулы со скоростью ***50 нуклеотидов в минуту*** шла бы примерно ***800 ч***. Поэтому инициация синтеза ДНК происходит в ***нескольких*** сайтах хромосомы (***ориджинах***).

В. Терминация репликации

Репликация прекращается, когда встречаются две ***репликативные вилки***.

А - на рисунке показано укорочение вновь синтезированных цепей ДНК, после удаления праймеров.





Синтез теломерной ДНК.

Б - в состав **теломеразы** входит короткая молекула **РНК**, содержащая в ***активном центре*** последовательность нуклеотидов, комплементарную теломерному повтору. Теломерный повтор на рисунке взят в квадратные скобки - ***[GGGTTA]-***.

Теломе́ры (от греческого τέλος — конец и μέρος — часть) — концевые участки хромосом. Теломерные участки хромосом характеризуются отсутствием способности к соединению с другими хромосомами или их фрагментами и выполняют **защитную** функцию.

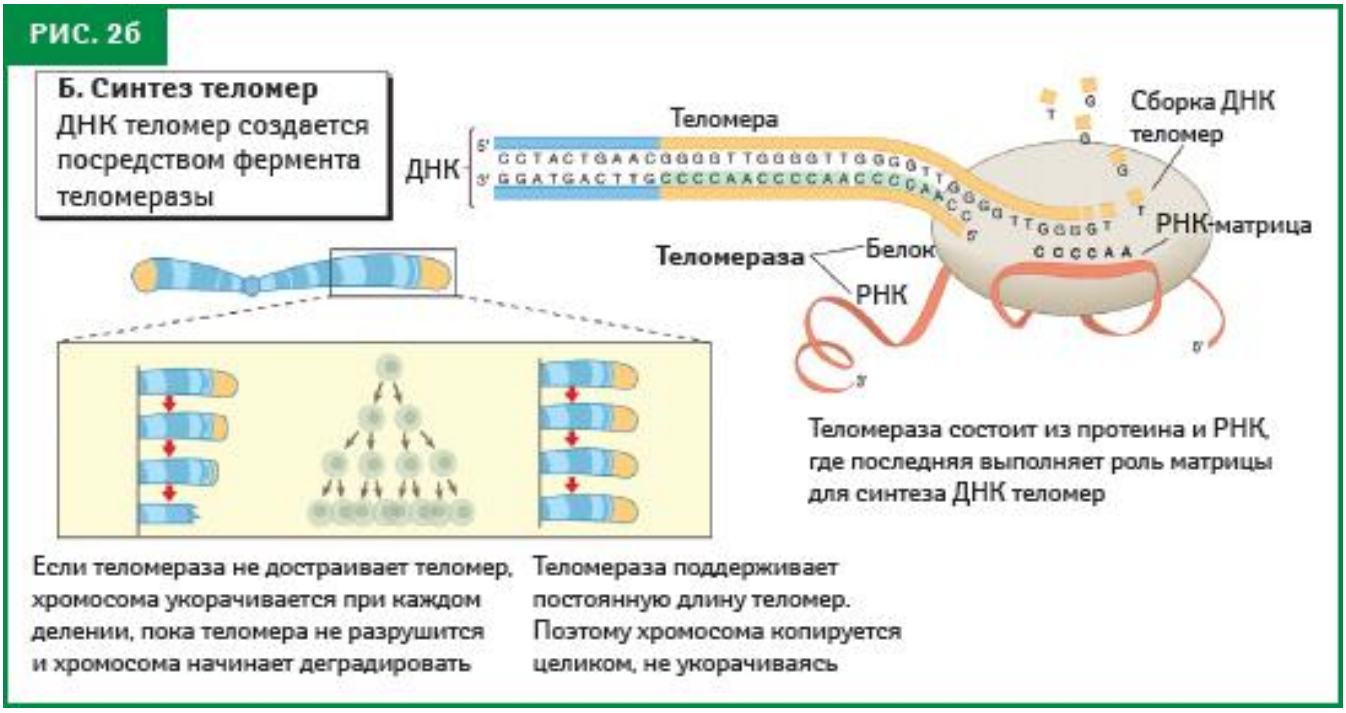
Теломерные повторы — это **TTAGGG** (у всех позвоночных состоят из шести нуклеотидов).

Теломерный гетерохроматин - это конститутивный (структурный) нуклеопротеидный комплекс из специализированной хромосомной ДНК (теломерные повторы) и специфических белков.

Укорочение ***теломер*** в большинстве клеток по мере их старения - важный фактор, определяющий ***продолжительность жизни*** организма.

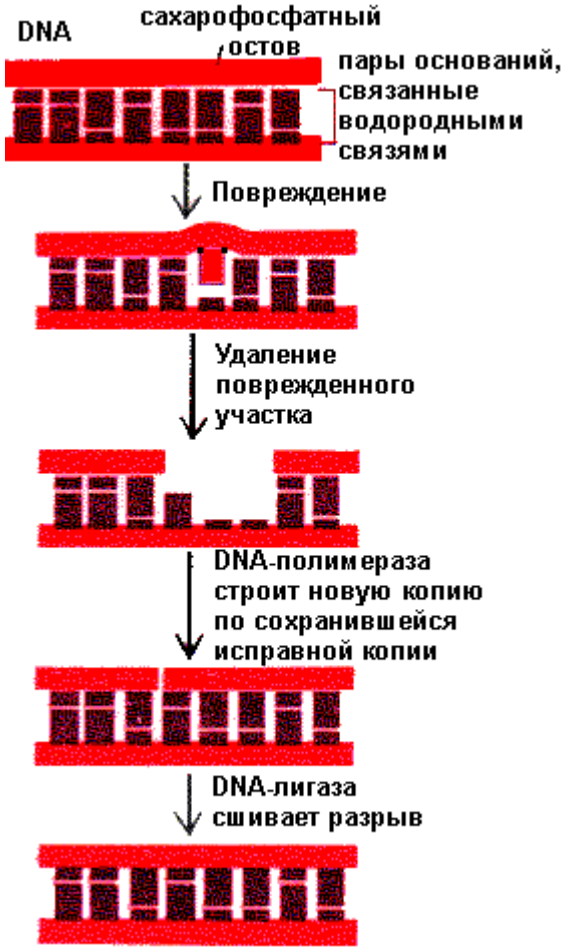
Теломераза обеспечивает восстановление недореплицированных 5'-концов. В большинстве дифференцированных клеток теломераза заблокирована, однако активна в стволовых и половых клетках.

Фрагмент РНК (простетическая группа) в активном центре теломеразы служит ***матрицей*** при синтезе теломерных повторов хромосом.



Репарация ДНК

Поврежденные участки DNA или ***ошибочно*** встроенные нуклеотиды удаляются в результате действия специальных **эндо** — и **экзонуклеаз**.

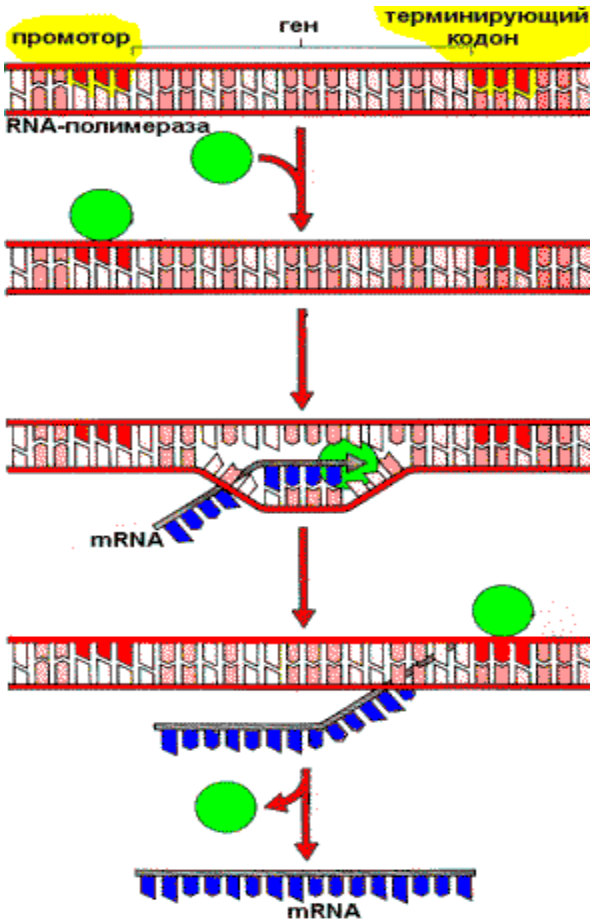


Репарация ДНК

Синтез РНК — *транскрипция*

РНК - полимераза катализирует синтез всех типов РНК.
Промотор - это участок, с которым связывается ***РНК-полимераза.***
Терминирующий кодон останавливает ***РНК-полимеразу***.
Экзоны - это участки ДНК, ***кодирующие*** информацию.
Интроны - это ***некодирующие*** участки ДНК.

Первичный транскрипт образуется при транскрипции гена.



Транскрипция ДНК с образованием мРНК

Стадии транскрипции

В процессе транскрипции различают 3 стадии: ***инициацию, элонгацию и терминацию.***

А. Инициация

ТАТА-фактор – белок: активирует ***промотор,*** взаимодействует со специфической последовательностью нуклеотидов промотора -*ТАТААА- (ТАТА-бокс).*

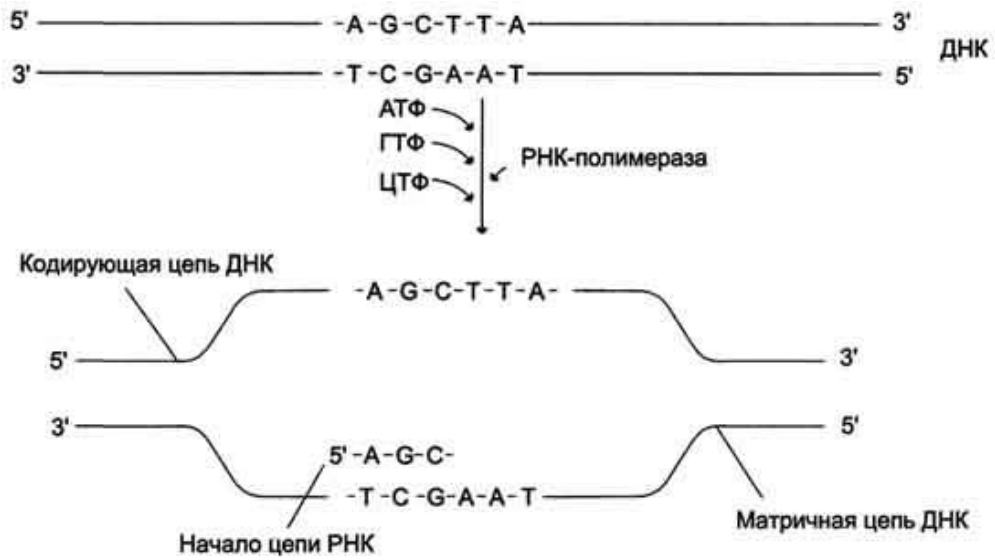
Транскрипционная вилка образуется при действии факторов инициации.

Транскриптон - участок **ДНК**, ограниченный ***промотором*** и ***сайтом терминации.***



Строение *транскриптона*.

Транскрипционые факторы - белки, взаимодействующие с определёнными ***регуляторными*** сайтами и ускоряющие или замедляющие процесс транскрипции.



Транскрипция РНК на матричной цепи ДНК.

Матричная цепь ДНК транскрибируется в ***транскриптоне***.
Кодирующая – это комплементарная ***матричной*** цепь ДНК.

Б. Элонгация

Факторы элонгации повышают активность ***РНК-полимеразы*** и облегчают расхождение цепей ДНК. Синтез молекулы РНК идёт от ***5'***- к ***3'***-концу ***комплементарно*** матричной цепи ДНК.

По мере продвижения ***РНК-полимеразы*** по матрице в направлении от ***3'-*** *к* ***5'-концу*** впереди неё происходит ***расхождение***, *а позади* - ***восстановление*** двойной спирали ДНК.

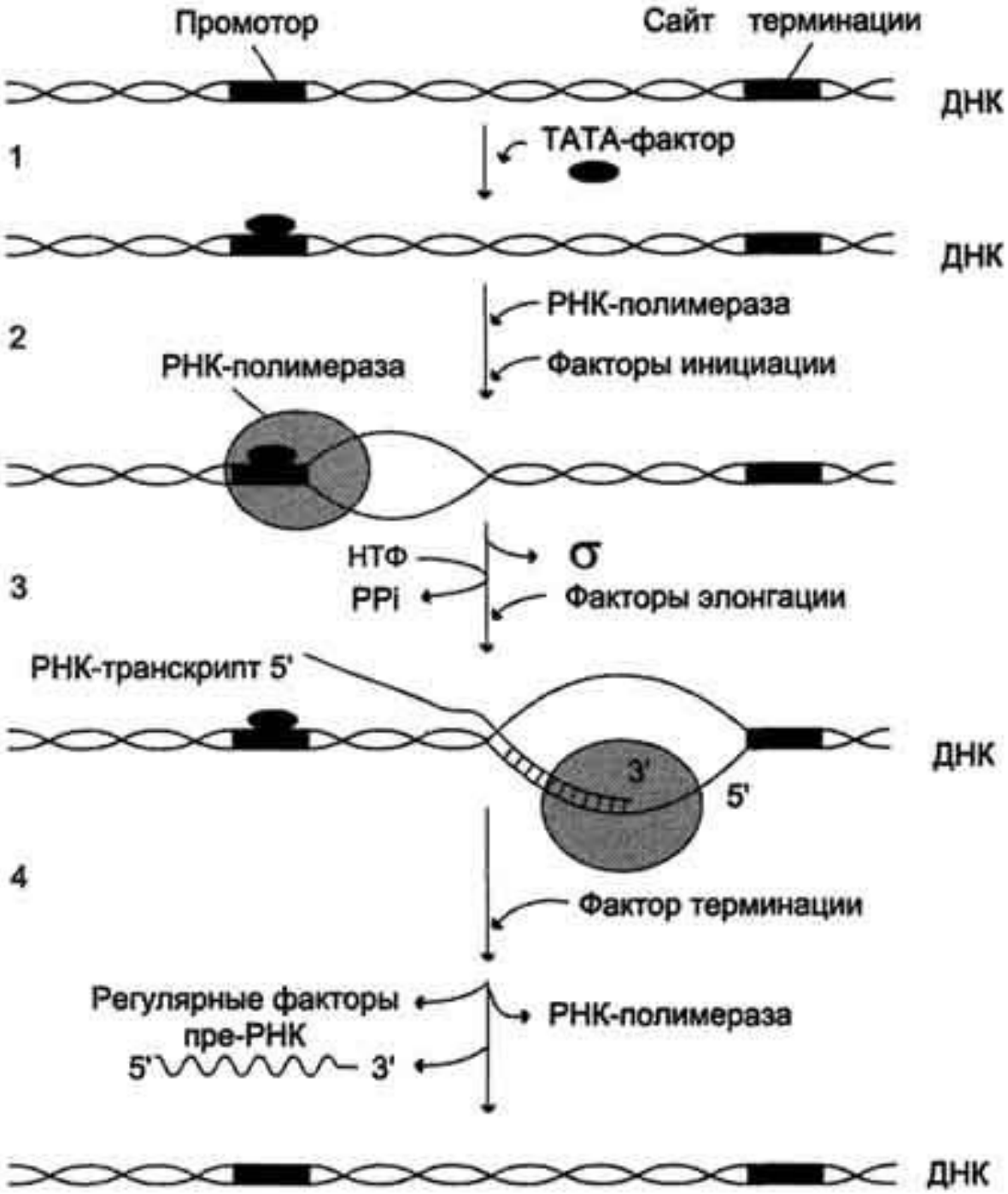
В. Терминация

Раскручивание двойной спирали ДНК в области сайта ***терминации*** делает его доступным для ***фактора терминации***.

Сайты терминации - это строго определенные ***участки матрицы***, в которых ***завершается*** синтез РНК.

1 - присоединение ***ТАТА-фактора*** к **промотору**. Чтобы промотор был узнан ***РНК-полимеразой***, необходимо образование транскрипционного комплекса **ТАТА-фактор/ТАТА-бокс (промотор).** ТАТА-фактор остаётся связанным с ТАТА-боксом во время транскрипции, это облегчает использование промотора многими молекулами РНК-полимеразы;

2 - образование ***транскрипционной вилки***;

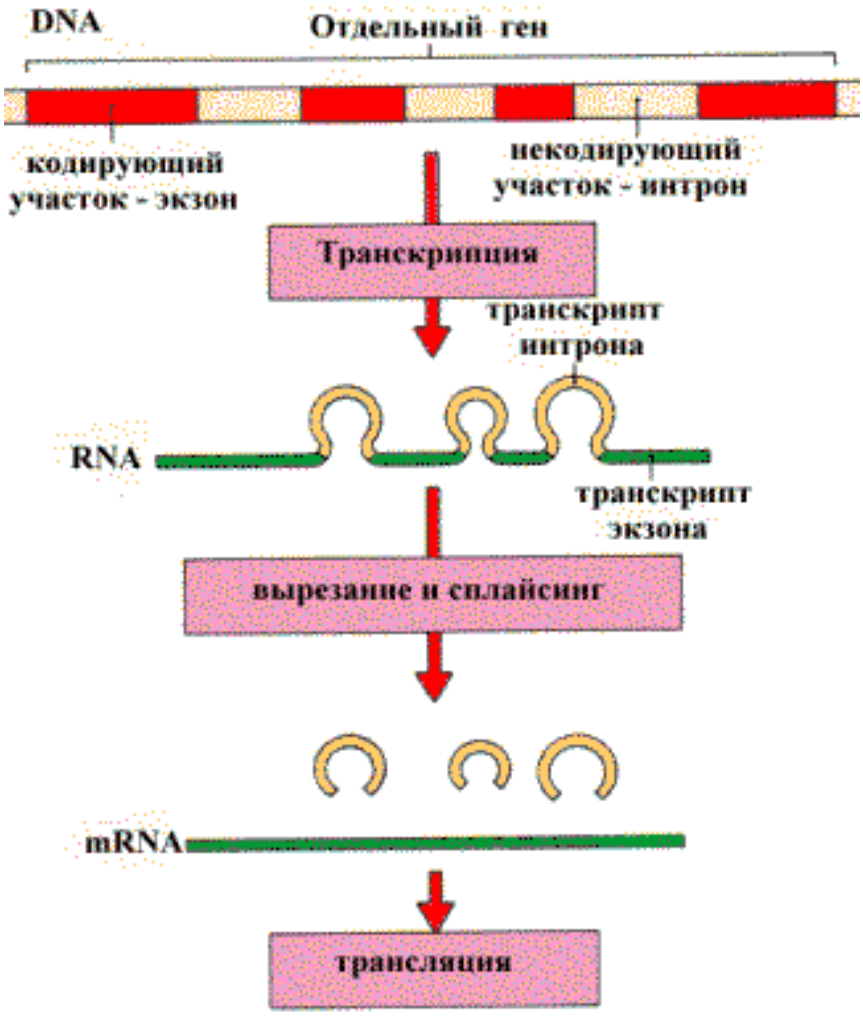


Стадии транскрипции.

3 - элонгация; 4.- терминация.

Сплайсинг первичных транскриптов мРНК

Сплайсинг (от англ, *to splice* -сращивать) - вырезание ***интронов*** из **мРНК** и присоединение характерных для **мРНК** концевых последовательностей.



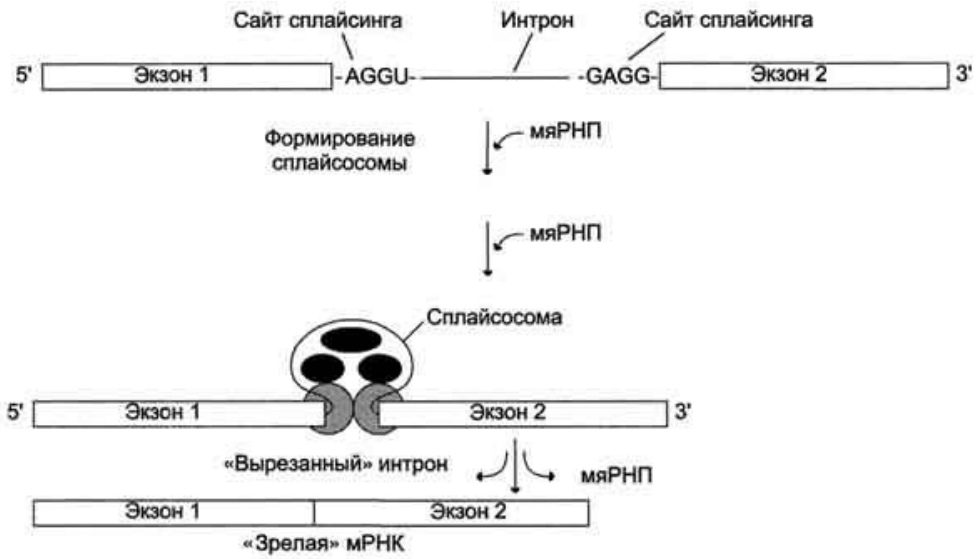
Удаление интронов из мРНК

Малые ядерные рибонуклеопротеины (мяРНП) участвуют в процессе "***вырезания***" интронов.

Сплайсосома катализирует реакцию расщепления **3',5'-фосфодиэфирной** связи на границе ***экзона*** с ***интроном***.

При формировании структуры ***сплайсосомы*** **3'-конец** одного ***экзона*** сближается с **5'-концом** следующего ***экзона***. Последовательность ***интрона*** удаляется, а два ***экзона*** соединяются.

Малые ядерные РНК, входящие в структуру ***сплайсосомы***, образуют **3',5'-фосфодиэфирные** связи между двумя ***экзонами.***



Сплайсинг РНК.

Рибозимы - это РНК с каталитическими функциями в ***сплайсосомах.***

Ковалентная модификация (процессинг) матричной РНК

Процессинг – доработка ***первичного транскрипта.***

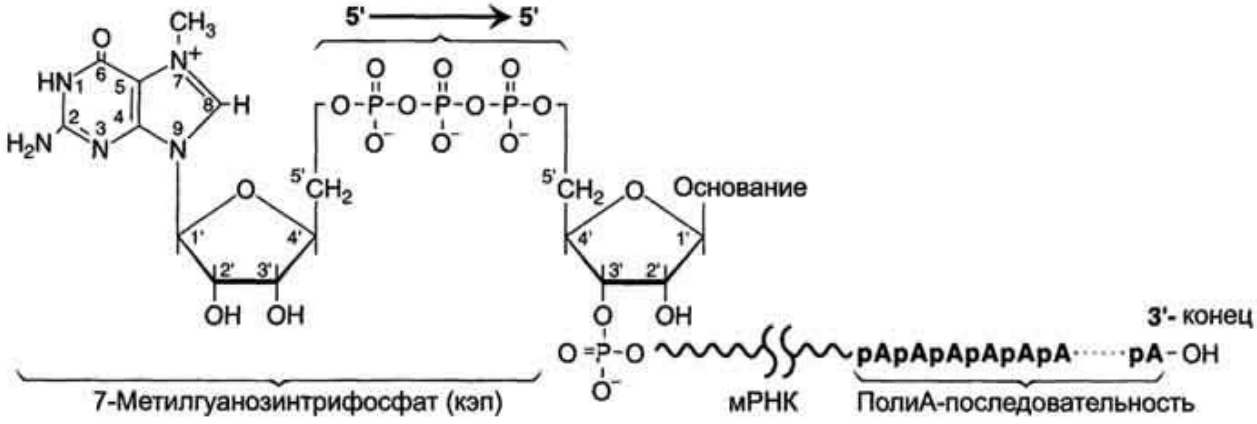
Модификации необходимы для функционирования мРНК в качестве ***матрицы***.

Модификация 5'-конца

Кэпирование 5'-конца мРНК осуществляет ***гуанилилтрансфераза***. Последующее ***метилирование*** остатка гуанина в составе ГТФ завершает формирование ***кэпа.***

Модифицированный 5'-конец обеспечивает ***инициацию трансляции, удлиняет время жизни*** мРНК, защищая её от действия ***5'-экзонуклеаз*** в цитоплазме.

Инициирующие триплеты АУГ, ГУГ распознаются рибосомой, только если присутствует ***кэп***. Наличие ***кэпа*** также необходимо для работы сложной ферментной системы, обеспечивающей ***удаление интронов***.



Ковалентная модификация концевых нуклеотидных остатков первичного транскрипта мРНК.

Модификация 3'-конца

ПолиА-полимераза формирует полиА-последовательность (полиА-"хвост"), состоящая из **100-200** остатков **адениловой кислоты**.

Сигналом к началу ***полиаденилирования*** является последовательность - **AAUAAA**- на растущей цепи РНК. Наличие полиА-последовательности на 3'-конце облегчает **выход мРНК** из ядра и замедляет её **гидролиз** в цитоплазме.

Ферменты, осуществляющие **кэпирование** и **полиаденилирование**, ***избирательно*** связываются с **РНК-полимеразой II.** В отсутствие полимеразы неактивны.

Биосинтез белков — *трансляция* генетической информации

Трансляция - это ***перевод*** с четырехбуквенного языка (нуклеотидная последовательность) на двадцатибуквенный язык (аминокислотная последовательность). Это - третий ***матричный*** синтез.

Перевод происходит с помощью ***биологического (генетического) кода.***

Генетический код и его свойства

Необходимость кодирования структуры **белков** в ***линейной*** последовательности нуклеотидов **мРНК** и **ДНК** продиктована тем, что в ходе ***трансляции*** **нет**:

- ***соответствия*** между ***числом*** мономеров в ***матрице*** мРНК и ***продукте*** - синтезируемом белке;
- ***структурного сходства*** между мономерами ***РНК*** и ***белка***.

Комплементарное взаимодействие между ***матрицей*** и ***продуктом*** - принцип, по которому происходит построение новых молекул ДНК и РНК в ходе ***репликации*** и ***транскрипции,*** при ***трансляции*** **невозможно.**

Генетический код – это способ ***кодирования*** информации о строении белков в виде нуклеотидной последовательности.

Он функционирует как ***"словарь"*** при переводе с ***четырехзначного*** языка нуклеотидов (**А, Г, У, Ц**) в ДНК и мРНК на ***двадцатизначный*** язык **аминокислот** в кодируемых белках.

Свойства генетического кода

Триплетность. Три нуклеотида формируют ***кодон***, кодирующий аминокислоту.

Число ***кодирующих*** последовательностей из ***четырёх*** нуклеотидов по ***три*** равно $4^3 = 64$. Это в **3** раза превышает ***минимальное*** количество, которое необходимо для кодирования **20** аминокислот.

"Кодоны" – это ***триплеты*** (тройки нуклеотидов), кодирующие аминокислотную последовательность в белках.

Смысл кодонов. 61 триплет из **64** кодонов ***шифрует*** включение аминокислот в полипептидную цепь. Остальные **3** - UAA, UAG, UGA сигнализируют о ***завершении трансляции***. Это - ***терминирующие***, или ***стоп-кодоны***.

"**Эффект качания**". Для каждой аминокислоты имеется по два ***обязательных*** нуклеотида и третий ***вариабельный***, менее специфичный.

Специфичность (однозначность). Каждому ***кодону*** соответствует только ***одна*** определённая аминокислота. В этом смысле генетический код ***строго однозначен***.

Вырожденность – ***одной*** аминокислоте может соответствовать ***несколько*** кодонов. Например, аминокислота **серин** кодируется триплетами UCU, UCC, UCA, UCG, AGC.

Линейность записи информации. ***Инициирующий*** кодон АУГ прочитывается как ***Мет*** и служит фиксированной ***стартовой*** точкой. Следующие за ним триплеты читаются ***последовательно, непрерывно, не перекрываются*** вплоть до ***стоп-кодона,*** на котором синтез полипептидной цепи завершается.

Неперекрываемость – триплеты не накладываются друг на друга, располагаясь рядом.

Отсутствие знаков препинания – между триплетами ***нет*** дополнительных нуклеотидов, пропусков или каких-либо иных сигналов.

Однонаправленность – при синтезе белка считывание кодонов идет последовательно, без пропусков или возвратов назад.

Универсальность. Биологический код ***одинаков*** для ***всех*** видов организмов на Земле (однако в ***митохондриях*** млекопитающих есть исключения).

Колинеарность – ***последовательность*** кодонов соответствует *последовательности* аминокислот в кодируемом белке.

Биологический код **не** может проявить себя без дополнительных молекул, которые выполняют переходную функцию или функцию **адаптора.**

Основные компоненты белоксинтезирующей системы

Условия синтеза белка в бесклеточной системе.

1) **20 видов протеиногенных АМК**
2) **20 видов т-РНК**
3) **20 видов аминоацил-тРНК-синтетаз с двойной специфичностью: к АМК и т-РНК**
4) **Рибосомы**
5) **Источники энергии: АТФ и ГТФ**
6) **Mg^{+2}**
7) **м-РНК – матрица**
8) **Белковые факторы**

Любые белки можно синтезировать при наличии этих компонентов.

Функции основных компонентов белоксинтезирующей системы

Необходимые компоненты	Функции
1 . Аминокислоты	Субстраты для синтеза белков
2. тРНК	тРНК выполняют функцию **адаптеров.** Они акцепторным концом взаимодействуют с ***аминокислотами***, а антикодоном - с кодоном ***мРНК***.
3. Аминоацил-тРНК синтетазы	Каждая **аа-тРНК-синтетаза** катализирует реакцию ***специфического*** связывания одной из 20 ***аминокислот*** с соответствующей **тРНК**
4. мРНК	Матрица содержит ***линейную*** последовательность кодонов, определяющих первичную структуру белков
5. Рибосомы	***Рибонуклеопротеиновые*** субклеточные структуры, являющиеся местом синтеза белков
6. АТФ, ГТФ	Источники энергии
7. Белковые факторы инициации, элонгации, терминации	***Специфические*** внерибосомные белки, необходимые для процесса трансляции (12 факторов инициации: **elF**; 2 фактора элонгации: **eEFl, eEF2**, и факторы терминации: **eRF**)
8. Ионы магния	Кофактор, стабилизирующий структуру рибосом

Примечания: elF (*eukaryotic initiation factors*) - факторы ***инициации***; ***eEF* (eukaryotic elongation factors*)** - факторы ***элонгации***; **eRF (*eukaryotic releasing factors*)** - факторы *терминации*.

Стадии трансляции

Синтез белка осуществляется в **5-ть** стадий (на примере бактериальной клетки): ***активация АМК, инициация, элонгация, терминация, посттрансляционная модификация***.

Активация АМК

Адапторная роль транспортных РНК

Транспортные РНК - это единственный ***посредник*** между **4**-х буквенной последовательностью ***нуклеиновых кислот*** и **20**-ти буквенной последовательностью ***белков***.

Антикодон - это ***триплетная последовательность*** в антикодоновой петле у каждой ***транспортной РНК.***

Присоединить можно только такую аминокислоту, которая соответствует этому ***антикодону***.

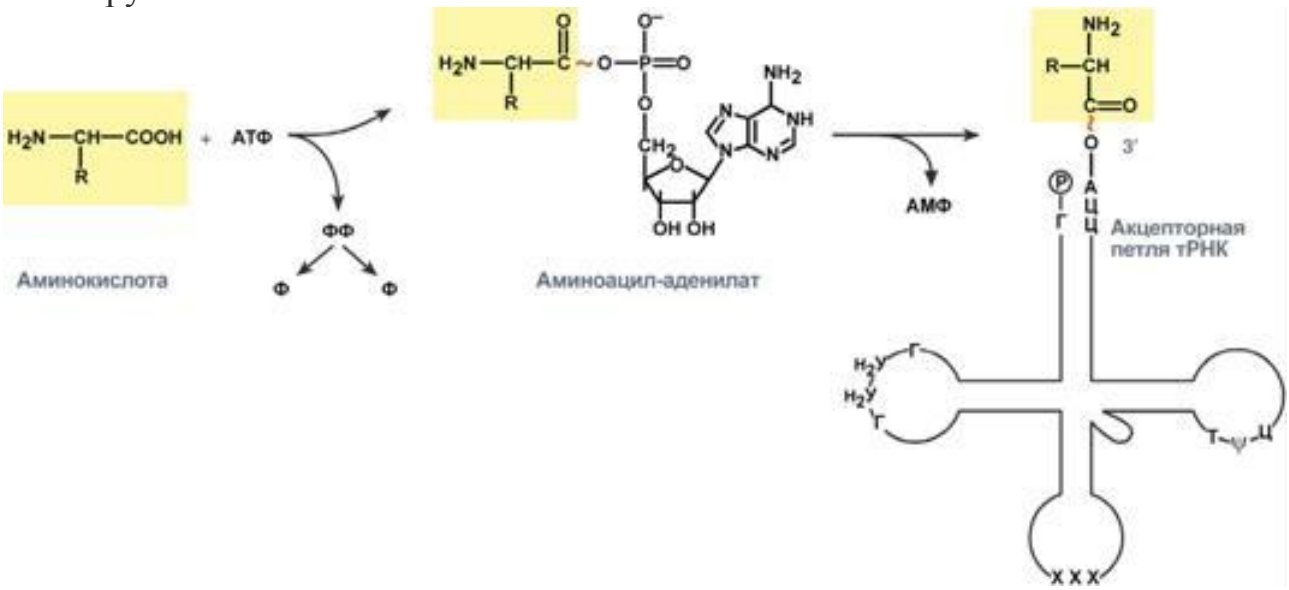
Именно от наличия того или иного антикодона в **тРНК** зависит, какая аминокислота включится в белковую молекулу, т.к. ни рибосома, ни мРНК не узнают аминокислоту. Таким образом, **адапторная** роль тРНК заключается:

1. в ***специфичном*** связывании с **аминокислотами,**
2. в ***специфичном***, согласно кодон-антикодоновому взаимодействию, связывании с **мРНК,**
3. во включении аминокислот в белковую цепь в ***соответствии*** с информацией **мРНК**.

Аминоацил-тРНК-синтетаза специфично присоединяет аминокислоту к соответствующей тРНК.

Для реакции требуется две макроэргические связи АТФ. Аминокислота присоединяется к ***3'-концу акцепторной петли*** **тРНК** через свою α-***карбоксильную*** группу.

Связь между аминокислотой и тРНК становится **макроэргической**. α-Аминогруппа остается ***свободной***.



Реакция синтеза аминоацил-тРНК

Так как существует около **60** различных **тРНК**, то некоторым аминокислотам соответствует по ***две*** или ***более*** тРНК.

Изоакцепторными называют ***различные*** тРНК, присоединяющие **одну** аминокислоту.

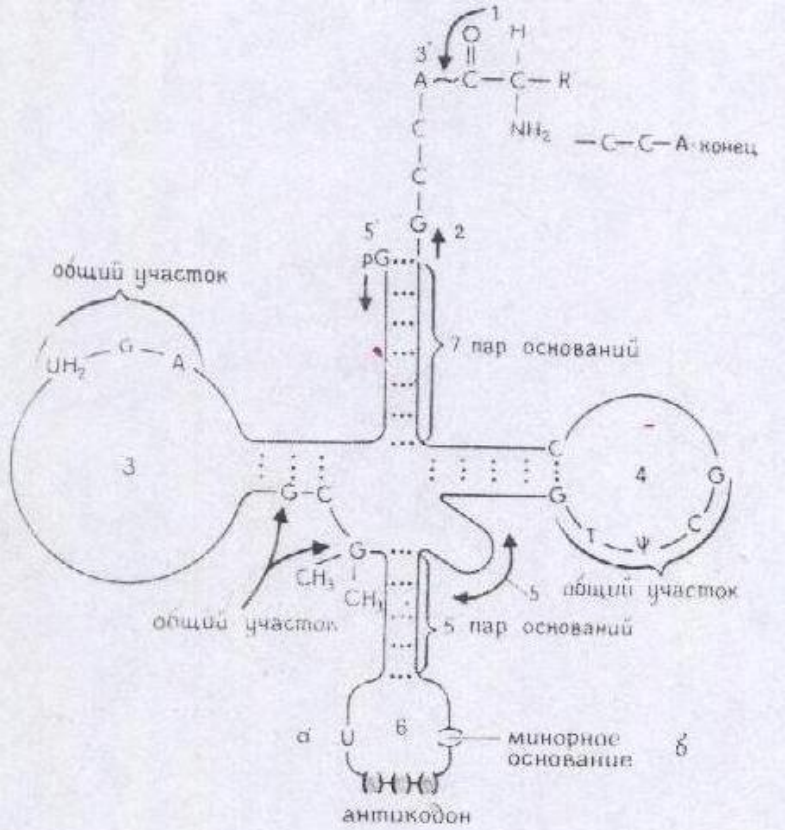


Схема строения т-РНК

Объемная модель т-РНК

СТРОЕНИЕ ТРАНСПОРТНОЙ РНК

Функциональные участки тРНК

1. ***3'-гидроксильный*** конец (ЦЦА) – присоединяет АМК.

2. Участки двойной спирали – «***ножка***».

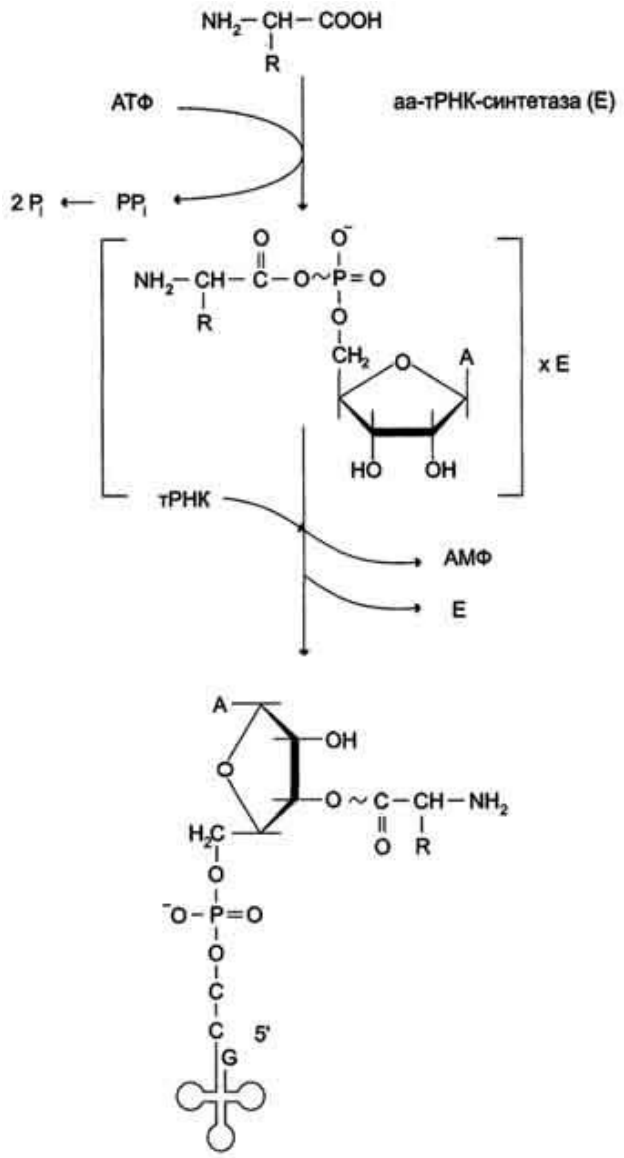
3. ***Дигидроуридиновая*** петля (UH2-G-A) – связывается с аминоацил-тРНК-синтетазой.

4. ***Тимидин-псевдоуридин-цитидиловая*** петля (TψC) – для связывания аминоацил-тРНК с рибосомами.

5. Петля переменного размера (***добавочная***).

6. ***Антикодоновая петля*** – несет триплет-антикодон для специфического связывания с кодоном м-РНК

Энергия, заключённая в ***макроэргической*** **сложноэфирной** связи аминоацил-тРНК, впоследствии используется на образование ***пептидной*** связи в ходе синтеза белка.



Образование аминоацил-тРНК.

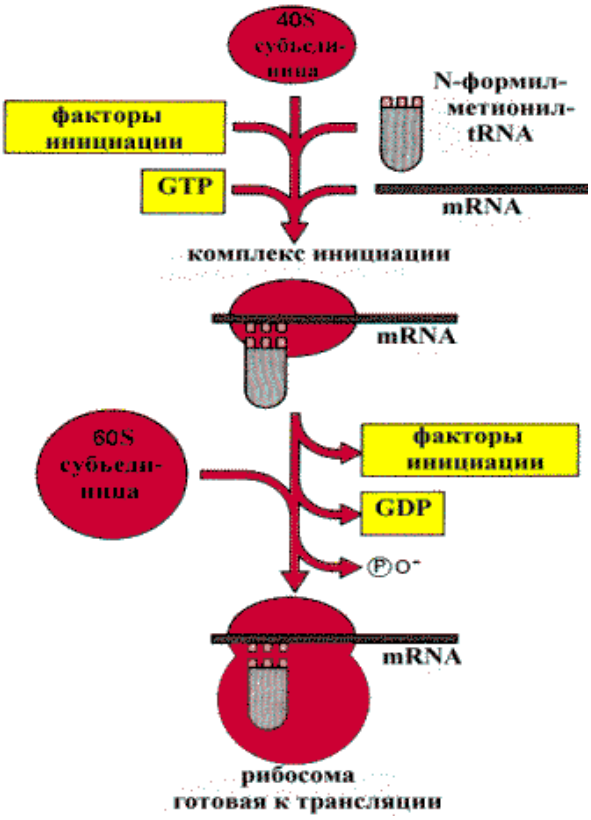
Пирофосфат, выделяющийся в ходе этой реакции, гидролитически расщепляется с образованием двух молекул ортофосфата и выделением энергии, что делает реакцию активации аминокислот ***необратимой***.

Синтез полипептидной цепи на рибосоме

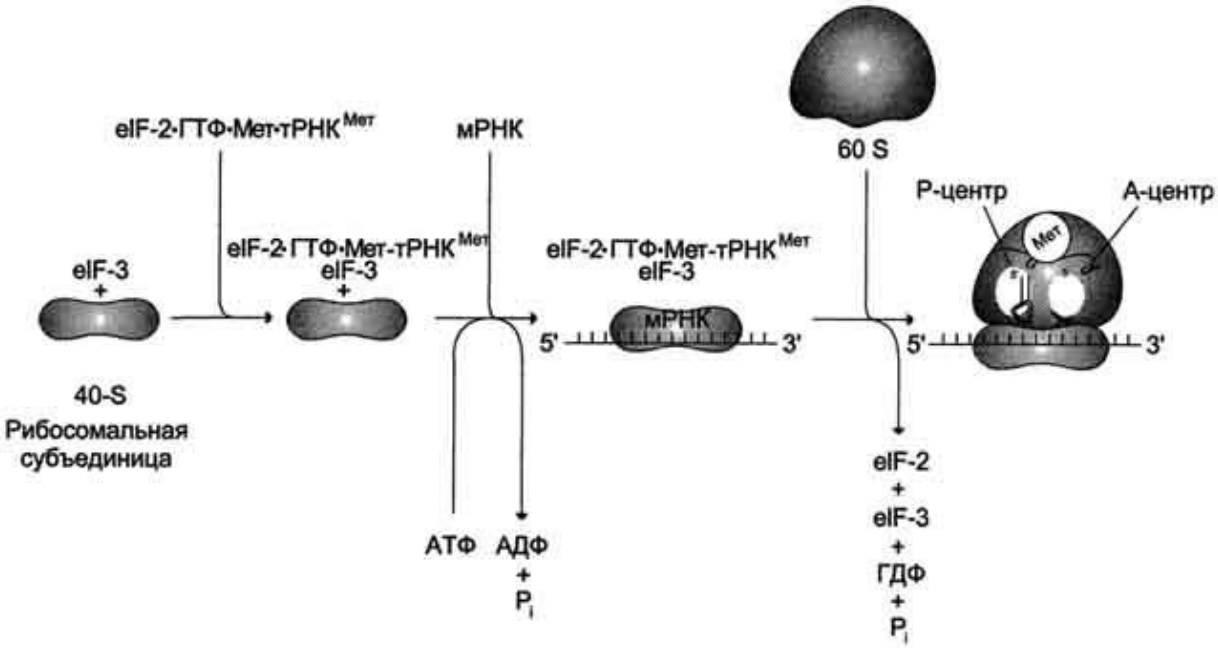
События на рибосоме включают этапы: ***инициации***, ***элонгации*** и ***терминации***.

А. Инициация

Инициация – это процесс формирования инициирующего комплекса из малой и большой субъединиц рибосом, белковых факторов инициации и аминоацил — tRNA. Инициация запускается ***специфической*** последовательностью ***mRNA***, содержащей кодон **метионина.**



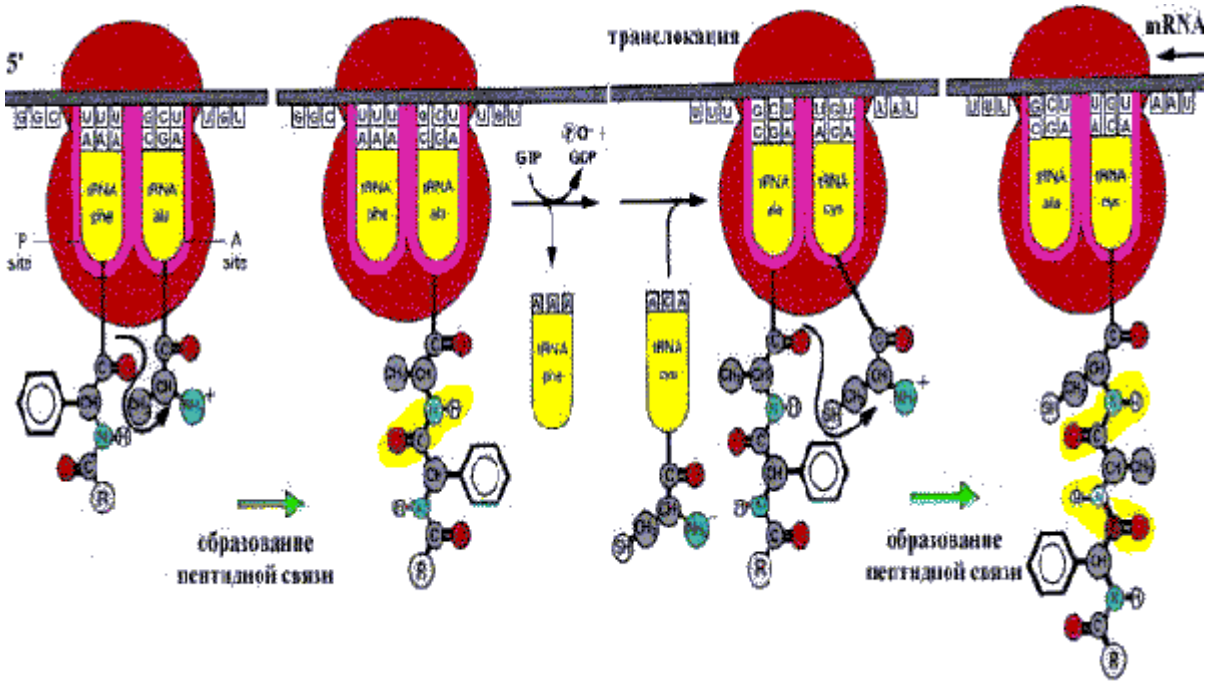
Инициация трансляции у эукариот



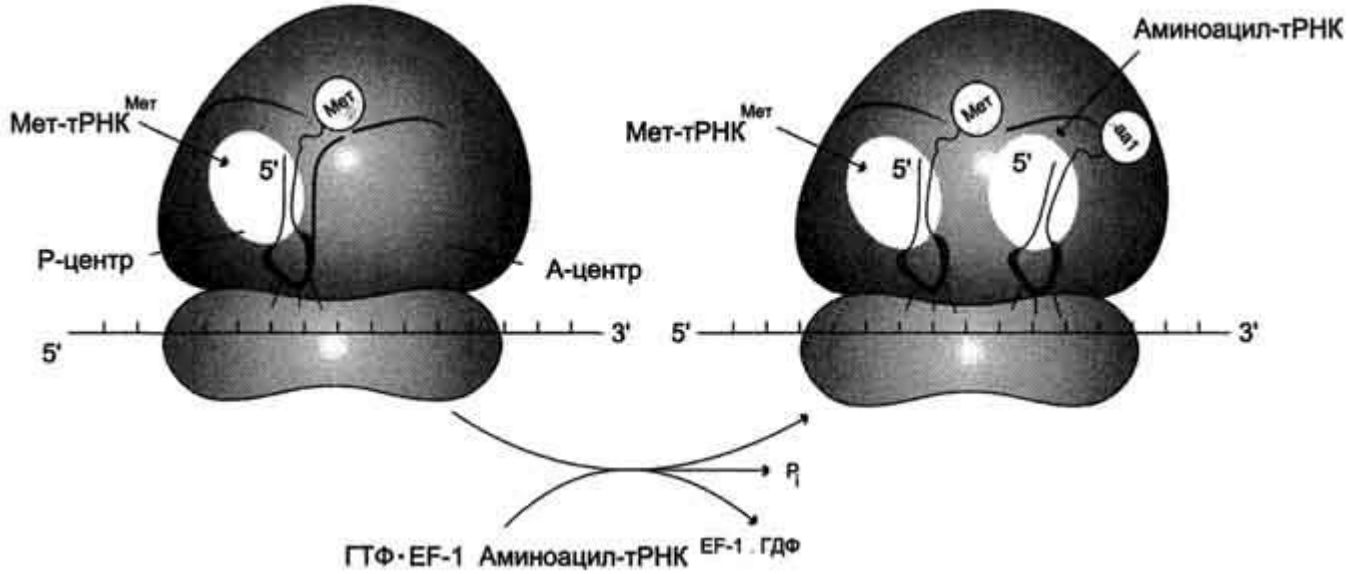
Образование инициирующего комплекса в ходе синтеза белка у эукариотов

Мет-тРНК^{Мет} объединяется с малой субъединицей рибосомы в форме тройного комплекса: ***Мет-мРНК^{Мет}, elF-2 и ГТФ***. Он присоединяется к **5'-концу** мРНК с помощью нескольких дополнительных факторов. ***Антикодон*** Мет-тРНК^{Мет} связывается с ***инициирующим*** кодоном AUG. Ускоряется присоединение ***60S*** субъединицы рибосомы. Мет-тРНКi^{Мет} занимает на рибосоме **Р-центр.**

Б.Элонгация

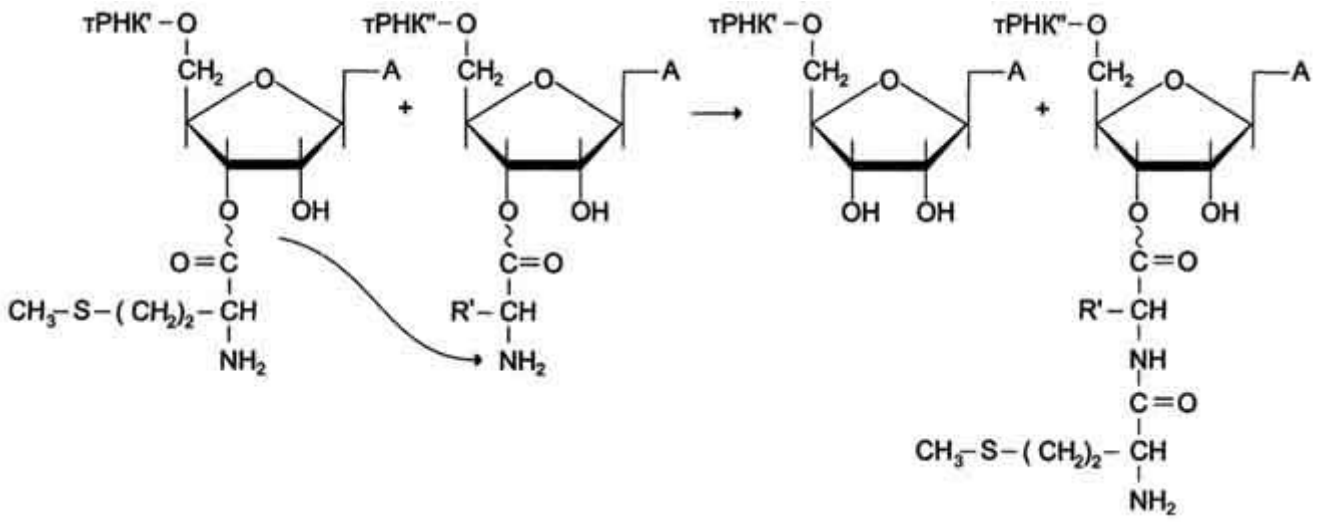


Элонгация пептидной цепочки



Включение $аа_1$-тРНК$^{аа}{}_1$ в рибосому

$аа_1$-мРНК$^{аа}{}_1$ взаимодействует с рибосомой в виде тройного комплекса, состоящего из ***фактора элонгации EF-1I, $аа_1$-мРНК$^{аа}{}_1$ и ГТФ***.



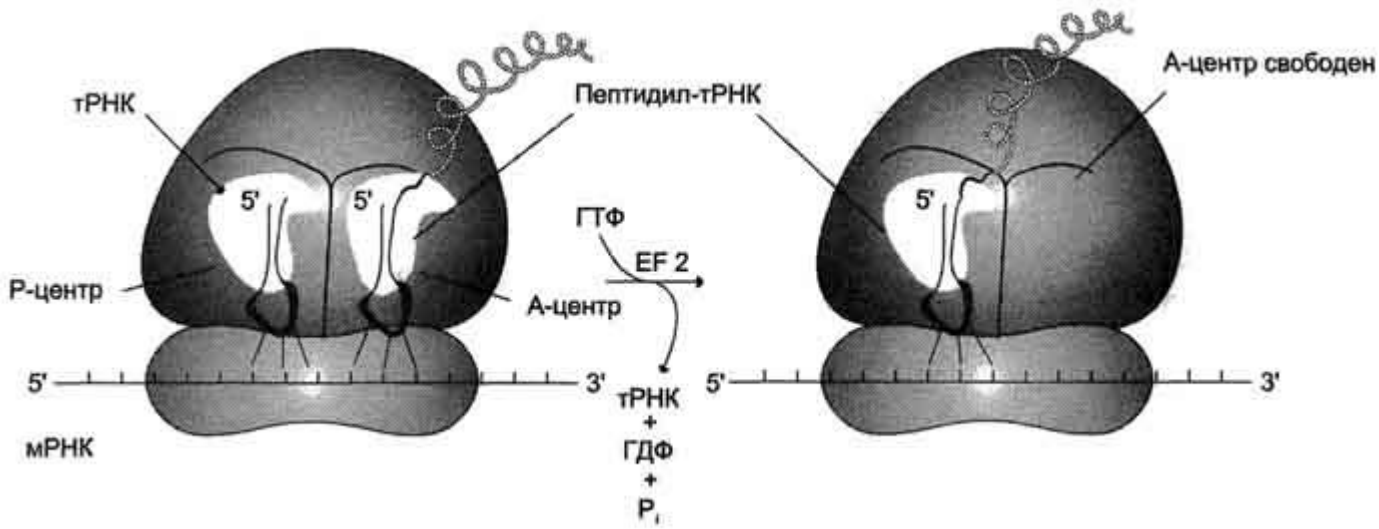
Реакция транспептидации

Метионин от Мет-тРНК$_i^{Мет}$, находящегося в Р-центре, присоединяется к ***α-NH$_2$ -группе*** аминоацильного остатка аа$_1$-тРНК$^{аа}_1$ А-центра с образованием новой ***пептидной*** связи.

Транслокация - третья стадия элонгации. К рибосоме присоединяется ***фактор элонгации EF-2*** и за счёт энергии ГТФ продвигает рибосому по мРНК на один кодон к ***3'-концу.***

По завершении третьей стадии элонгации рибосома в **Р-центре** имеет ***дипептидил-тРНК***, а в **А-центр** попадает ***триплет***, кодирующий включение в полипептидную цепь второй аминокислоты.

Начинается следующий цикл стадии элонгации.



Стадия транслокации.

Пептидил-тРНК из ***А-центра*** перемещается в ***Р-центр.***

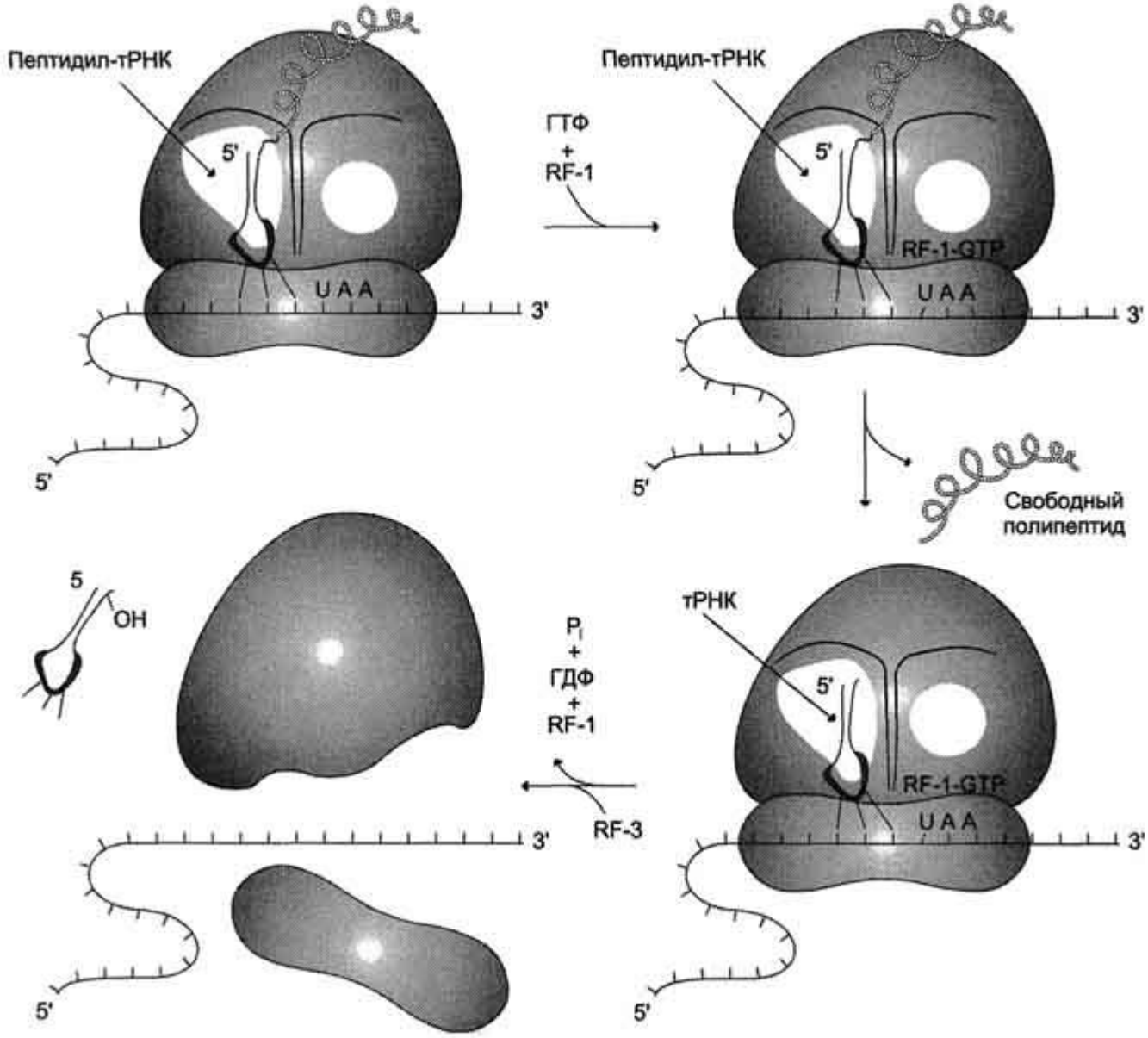
Повторение таких циклов по числу смысловых кодонов мРНК завершает весь этап элонгации.

B. Терминация

Терминация. Элонгация цепи продолжается до тех пор, пока рибосома не достигнет ***терминального*** кодона: **UAG, UAA, UGA** (стоп-кодоны).

К рибосоме присоединяются 2 белковых ***высвобождающих*** фактора RF (от англ, *releasing factor*) или **фактора терминации.**

Малая и большая субъединицы рибосомы в процессе трансляции выполняют разные функции: малая субъединица ***присоединяет мРНК*** и ***декодирует*** информацию с помощью тРНК и механизма транслокации, а большая субъединица ответственна за ***образование пептидных связей***.

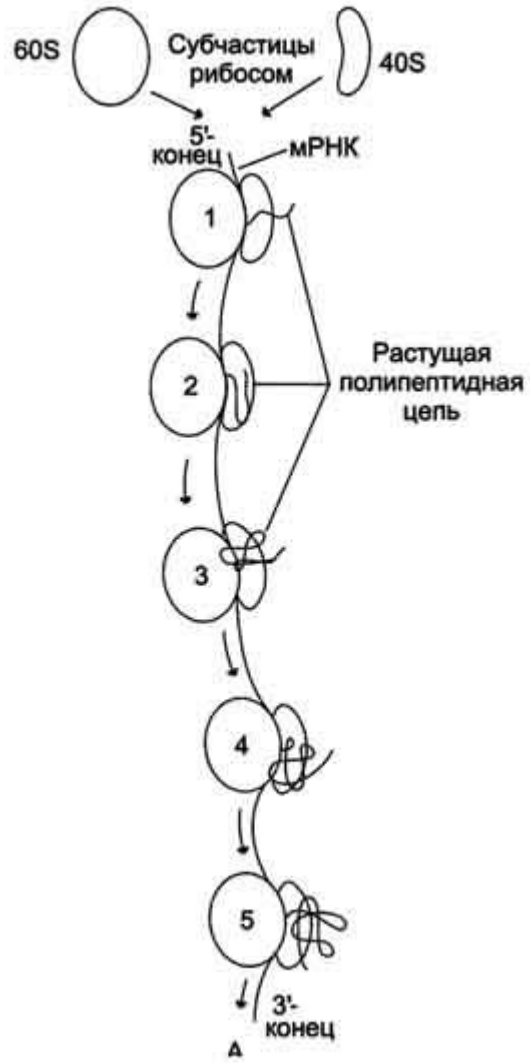


Терминация синтеза белка.

Полирибосомы или ***полисома*** – это комплекс из рибосом, которые одновременно участвует в синтезе белка на **одной** и той же **мРНК.**

Полирибосомы, ассоциированные с ЭР, под электронным микроскопом имеют вид "шероховатой" поверхности. Белки, синтезируемые "шероховатым"

ЭР, должны транспортироваться через мембрану для того, чтобы они достигли места окончательной локализации.



Синтез белков на полирибосомном комплексе.

Пять рибосом считывают информацию, содержащуюся в мРНК. Некоторые из этих белков для дальнейшего транспорта упаковываются аппаратом Гольджи в ***секреторные гранулы***.

Посттрансляционные модификации полипептидной цепи

Цель у ***фолдинга*** и ***процессинга*** («созревания») одна – образование ***нативной*** (функционально значимой) структуры.

Пути ***разные***:

- Фолдинг – ***без*** количественных изменений состава белковой молекулы.
- Процессинг – ***обязательно*** количественные изменения путем химической модификации

Значение:

- В неактивном состоянии: хранение и транспорт
- Активирование – по необходимости: в нужном месте и в нужное время

Посттрансляционная модификация – это процесс активации путем количественных изменений в конформации и структуре полипептидной цепи для приобретения белком-предшественником нативной, функционально значимой конформации.

Полипептидные цепи могут подвергаться структурным модификациям, либо будучи ещё связанными с рибосомами, либо после завершения синтеза.

Многие модификации осуществляются в ***эндоплазматическом ретикулуме***.

Здесь происходят **фолдинг** полипептидных цепей и формирование уникальной третичной или четвертичной структуры белков. Для поддержания нативной конформации молекул огромное значение имеет правильное **формирование дисульфидных связей.**

Частичный протеолиз – это процесс активации белков-предшественников путем удаления части полипептидной цепи специфическими эндопротеазами.



- **Проинсулин** ⟶ **инсулин (**гормон, регуляторная функция**)**
- **Пепсиноген** ⟶ **пепсин**
- **Трипсиноген** ⟶ **трипсин**
- **Химотрипсиноген** ⟶ **химотрипсин**
- **Проэластаза** ⟶ **эластаза**

} Протеолитические ферменты (катализ – пищеварение)

- **Фибриноген** ⟶ **фибрин (**защита – закупорка повреждения сосуда сгустком)

Ковалентные модификации

Структурные белки и ферменты могут активироваться или инактивироваться в результате присоединения различных химических групп

Гликозилирование – это присоединение ***углеводной цепи*** по гидроксильным группам серина или треонина (**О-гликозилирование**) либо аспарагина (**N-гликозилирование**).

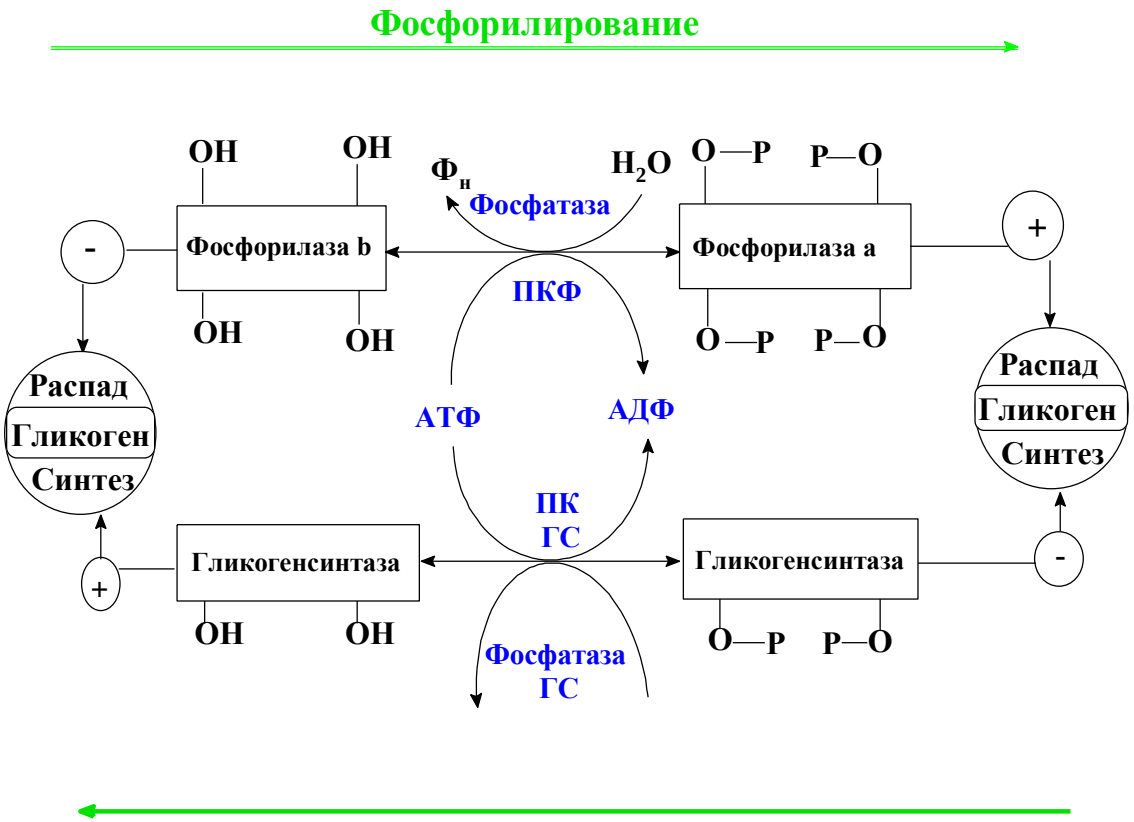
Белки, входящие в состав плазматических мембран или секретирующиеся из клеток, подвергаются ***гликозилированию***. Последовательное наращивание углеводного фрагмента происходит в ***эндоплазматическом ретикулуме*** и ***аппарате Гольджи***.

Гликозилирование защищает белки от расщепления протеиназами, удлиняет срок существования (прочная основа – механические, структурные функции).

Утрата углеводной части гликопротеинами служит сигналом для печени и других структур к поглощению и утилизации (повторное использование) белкового компонента (белки крови, эритроцитарных мембран).

Фосфорилирование белков осуществляется по гидроксильным группам серина, треонина и, реже, тирозина ферментами из группы **протеинкиназ**, тогда как ***дефосфорилирование*** катализируют гидролитические ферменты

фосфопротеинфосфатазы.



Регуляция синтеза и распада гликогена гормонами

Глюкагон активирует ***протеинкиназы*** и стимулирует процесс фосфорилирования ***фосфорилазы*** и ***гликогенсинтазы***. В итоге ускоряется **распад** гликогена.

Инсулин путем активации процесса ***дефосфорилирования*** этих же ферментов вызывает ускорение **синтеза** гликогена.

Гидроксилирование заключается в присоединении гидроксильной группы к остаткам аминокислот. Обязательными кофакторами ***монооксигеназ*** (гидроксилаз) служат **аскорбиновая кислота** и **тетрагидробиоптерин.**

В результате ***гидроксилирования*** остатков **лизина** и **пролина** с последующим ***гликозилированием*** образовавшихся оксилизина и оксипролина из **проколлагена** образуется **коллаген.** Он придает прочность и эластичность стенкам кровеносных сосудов и формирует прочную опору для зубов. Спасает от цынги.

Ацелирование осуществляют ***ацилтансферазы.*** Они присоединяют остатки карбоновых кислот к гидроксильным группам серина, треонина и тирозина. Белок за счет добавленного гидрофобного фрагмента («якорь») приобретает способность интегрироваться с цитоплазматические мембраны. Так устроены и функционируют ***цитохромы*** в цепи дыхательных переносчиков, мембранные ***рецепторы***.

Карбоксилирование – присоединение карбоксильной группы к факторам свертывания крови: протромбину, проконвертину, фактору Кристмаса,

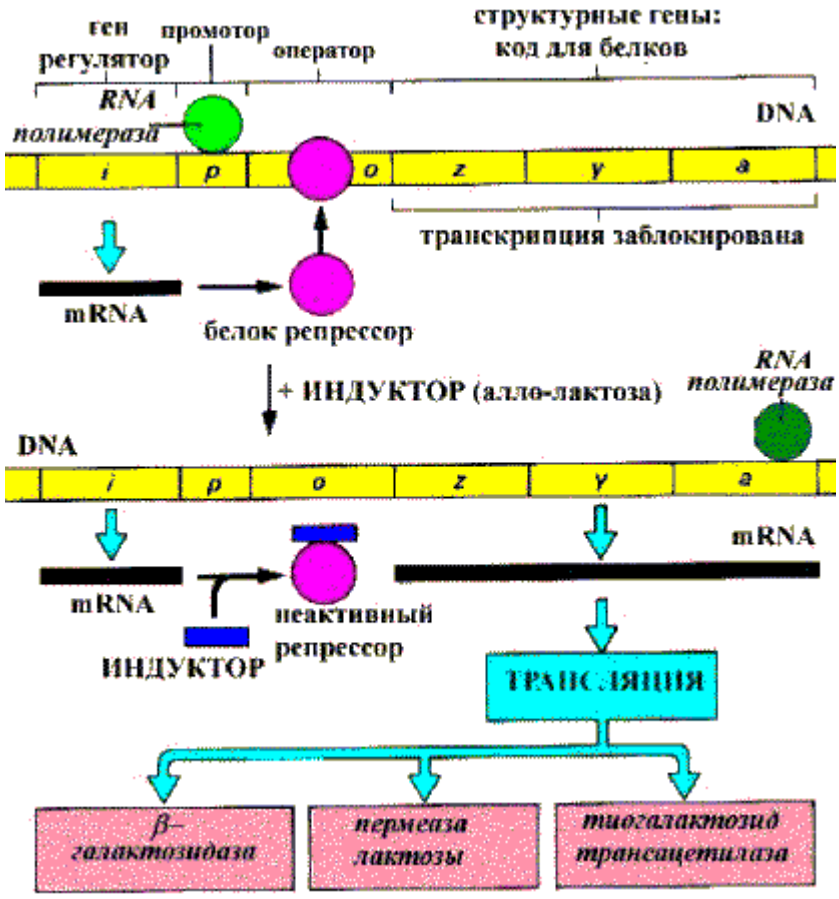
фактору Стюарта, - с образованием гамма-карбоксиглуминовой кислоты, необходимой для связывания кальция, активирует эти белки. Витамин К участвует в реакциях карбоксилирования в качестве кофермента.

Регуляция синтеза белка

Концентрация многих белков в клетке непостоянна и изменяется в зависимости от состояния клетки и внешних условий. Это происходит в результате регуляции скоростей синтеза и распада белков. Регуляция экспрессии генов может осуществляться на любой стадии на пути от гена до образования функционально активного белка.

Регуляция транскрипции

Транскрипция генов может подавляться или активироваться, следовательно, синтез белков может ***репрессироваться*** или ***индуцироваться***. ***Оперон*** — это участок DNA, кодирующий строение, как правило, функционально связанных белков и содержащий регуляторную зону, контролирующую синтез этих белков. На рисунке приведена схема лактозного оперона:



Регуляция экспрессии Lac—оперона E.Coli

Структурные гены, индуцируемые совместно располагаются на молекуле ДНК рядом с последовательностями нуклеотидов, называемых ***промотором*** и ***оператором***. Для регуляции транскрипции необходим еще один участок ДНК — ***регуляторный ген***, не всегда располагающийся вблизи вышеописанной группы. Во время транскрипции РНК—полимераза связывается с

промотором и продвигается вдоль ДНК, образуя транскрипт генов оперона. ***Белки—репрессоры*** — продукты трансляции регуляторных генов, связывающиеся с соответствующими операторными участками и блокирующие продвижение РНК—полимеразы, и, следовательно, препятствующие транскрипции.

Индукторы. Небольшие молекулы, которые могут связываться с белками—репрессорами и ингибировать их способность связываться с операторными участками ДНК. Таким образом, транскрипция может происходить только в присутствии индуктора. Индукторами транскрипции служат субстраты метаболических путей. Они стимулируют синтез белков, обеспечивающих их превращения.

Корепрессоры — лиганды белков—репрессоров. Корепрессорами, как правило, являются ***конечные продукты метаболических путей***. Роль индукторов и репрессоров могут играть ***гормоны.***

Регуляция действия генов и клеточная дифференцировка

В клетках животных кратковременная адаптивная индукция и репрессиясинтеза белков возникает при изменении концентрации определенных веществ: субстратов, продуктов метаболических путей, гормонов. Однако существуют также длительные, часто сохраняющиеся на протяжении всей жизни индукция и репрессия, возникающие в ходе клеточной дифференцировки. Разные дифференцированные клетки одного организма имеют одинаковый набор генов, но, как правило, отличаются по белковому составу. Различия клеток при дифференцировке возникают в результате ***репрессии*** одних генов и ***дерепрессии*** других. Молекулярные механизмы регуляции такого типа недостаточно изучены, но общий принцип действия специфических регуляторов сводится к созданию зон ДНК, недоступных для транскрипции за счет конденсации хроматина.

Ингибиторы матричных биосинтезов

Использование некоторых **лекарственных** средств из группы антибиотиков основано на ингибировании матричных биосинтезов, протекающих в микроорганизмах, вызывающих инфекцию. Например, **тетрациклин** ингибирует элонгацию, блокируя центр связывания аа—тРНК на рибосоме, **эритромицин** ингибирует транслокацию.

Противобактериальные средства отличаются достаточно высокой избирательностью и мало токсичны для человека. Это объясняется тем, что у бактерий рибосомы в целом, а также некоторые ферменты и белки рибосом отличаются по строению от соответствующих белков эукариот.

Противоопухолевые антибиотики (**актиномицин D, рубомицин** и т.д.) нарушают структуру ДНК и ингибируют репликацию ДНК и (или) транскрипцию. Лекарственные средства этой группы не обладают абсолютной избирательностью по отношению к ДНК опухолевых клеток, поэтому они достаточно токсичны. Однако избирательность в их действии всё же имеется, но объясняется не ДНК, а другими факторами, например отличиями проницаемости мембран опухолевых клеток, особенностями метаболизма и т.д.

Генные мутации

Различные факторы могут нарушать последовательность нуклеотидов в ДНК и, следовательно, изменять генетическую информацию. Такие изменения первичной структуры DNA не исправленные ***репарирующей*** системой, называются ***мутациями***. Причинами мутаций могут быть: повреждение ДНК ультрафиолетом, ионизирующей радиацией, химическими соединениями окружающей среды и, кроме того, ошибки репликации. Генетические мутации ведут к синтезу измененного, дефектного белка. Мутации, затрагивающие регуляторную зону оперона, приводят к нарушению регуляции или прекращению синтеза белка. Выделяют следующие разновидности мутаций:

1. ***Замена*** нуклеотида в кодоне. Такое изменение может привести к изменению ***смысла*** кодона — ***миссенс*** мутации, и появлению в белке новой аминокислоты. Если в результате замены нуклеотида кодон превращается в терминирующий — ***нонсенс*** мутации, то синтезируется незавершенный белок, так как его синтез прерывается на этом кодоне. В то же время замена не всегда приводит к изменению смысла кодона. Так как код вырожденный и одна аминокислота кодируется несколькими кодонами, то в результате мутации может получиться новый кодон, но кодирующий ту же аминокислоту.
2. ***Делеция*** — утрата мономера из цепи. Может быть утрата фрагмента ДНК, состоящего из трех нуклеотидов или количества нуклеотидов кратного трем. В этом случае выпадает один кодон или несколько, а в белке утрачивается одна или несколько аминокислот. Если в ДНК утрачивается один мономер (или количество нуклеотидов, не кратное трем), то изменяется смысл всех последующих кодонов. Неполный кодон при считывании дополняется недостающим нуклеотидом из соседнего кодона и Lрамка¦ считывания при транскрипции смещается. В результате такой мутации синтезируется белок со случайной последовательностью аминокислот после места мутации.
3. ***Вставка*** дополнительных мономеров. В случае вставки фрагмента из трех нуклеотидов (или количества кратного трем) синтезируется белок удлиненный на одну или несколько аминокислот. Если же в цепь включается один мономер или количество мономеров не кратное трем, то происходит мутация со сдвигом рамки считывания, как описано выше, и синтезируется белок с измененной последовательностью аминокислот после места мутации, не способный выполнять свои функции. Мутации могут быть нейтральными, полезными и вредными. Мутации в половых клетках передаются по наследству и могут проявляться как ***наследственная болезнь***, связанная со структурными и функциональными изменениями белков. Мутации в соматических клетках могут вызывать различные функциональные нарушения, а иногда трансформацию клеток и развитие опухолей. Если в результате мутации свойства белка изменились в лучшую сторону и повышают жизнеспособность организма, то такие мутации биологически полезны и являются средством естественного отбора.

Полиморфизм белков

При филогенезе происходит усложнение генома по двум причинам: удвоение генов и независимые мутации в них. Получаются варианты генов, которые, образовавшись у отдельных особей, распространяются в популяции в результате наследования. Так формируется генетическая неоднородность, ведущая к неоднородности (***гетерогенности***) фенотипической.

Полиморфизм белков обусловливает существование разных форм белка, выполняющего одинаковые или очень сходные функции.

Первый тип полиморфных белков связан с увеличением числа ***локусов*** кодирующих определенный белок в хромосоме в результате удвоения и мутаций, то есть имеет место группа сходных локусов в геноме индивида. Гены этих белков ***не аллельны***, они занимают разные локусы (HbA, HbA_2, HbF).

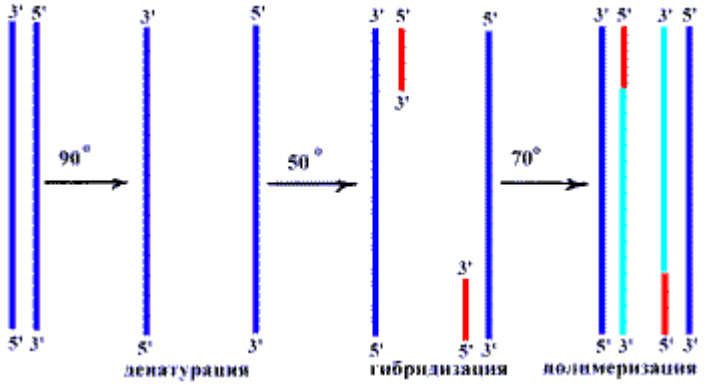
Второй тип полиморфных белков — продукты ***аллельных генов*** (HbA, HbS) — то есть имеет место множество аллелей в генофонде популяции. Полиморфизм белков настолько велик, что можно говорить о биохимической индивидуальности организма.

Методы работы с генным материалом

Трудности в изучении ДНК заключаются в следующем:

- молекулы ДНК животных и человека имеют огромные размеры. Такие молекулы неудобны для исследования и их предварительно разрезают, фрагментируют с помощью специальных ферментов — ***рестриктаз***, выделяемых из бактерий. Рестриктазы Lузнают¦ определенные последовательности и разрезают ДНК в определенных местах;
- количество DNA в клетке невелико, поэтому необходим способ умножения (***амплификации***) изучаемой ДНК ***in vitro***. Таким методом является ***полимеразная цепная реакция — PCR***, которая позволяет амплифицировать DNA или ее фрагмент в миллионы раз за несколько часов.

PCR осуществляют в пробирке с помощью термостабильной ДНК—полимеразы (***Tag—полимеразы***) при участии дезоксинуклезидтрифосфатов — субстратов и коротких олигонуклеотидных затравок — ***праймеров***. Праймер — это короткие, длиной в 20—30 нуклеотидов одноцепочечные фрагменты DNA, комплементарные 3-—концевым последовательностям копируемой DNA—матрицы. Благодаря праймерам ограничивается фрагмент DNA, который будет скопирован Tag—DNA—полимеразой, присоединяющейся к 3-—концам праймеров и достраивающей их до заданной длины. Реакция происходит в несколько стадий:



Стадии одного цикла PCR

- ***Денатурация***. Инкубационную смесь нагревают до 90^{o}. При этом происходит разрушение слабых связей в ДНК и из одной двухцепочечной молекулы образуются две одноцепочечные.
- ***Гибридизация*** праймеров. Температуру снижают до 50^{o}. При этом происходит гибридизация цепей ДНК с праймерами.
- ***Полимеризация***. Инкубационную смесь нагревают до 70^{o}. При этой температуре Tag—полимераза удлиняет оба праймера с их 3-—концов. Праймеры дорастают до размеров матрицы. В результате количество ДНК удваивается. Tag—полимераза выделяется из термофильных бактерий и отличается устойчивостью к высокой температуре. При температуре 70^{o} гибрид праймер — ДНК не денатурирует, а Tag—полимераза способна работать с большой скоростью.

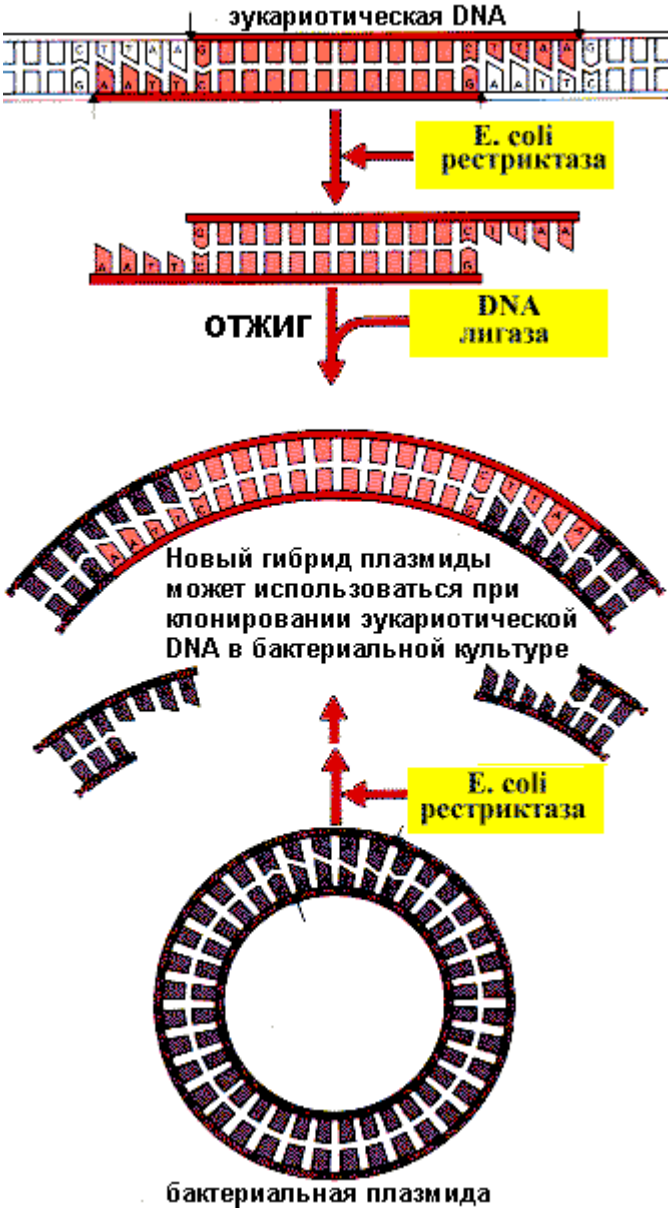
Направления использования PCR

Диагностика болезней (***ДНК—диагностика***). Метод основан на том, что первичная структура ДНК разных видов организмов различна. Значит, можно найти последовательности, характерные для ДНК возбудителей болезни и подобрать такие праймеры, которые будут гибридизоваться с ДНК возбудителя, но не с ДНК человека. В этом случае продуктом амплификации будет ДНК только возбудителя, а не пациента.

Изучение генома человека. Для этого необходимо выделение и амплификация отдельных генов. Используются праймеры, комплементарные началу изучаемого гена. Последовательность нуклеотидов в таком праймере можно определить по аминокислотной последовательности N—конца и С—конца соответствующего белка и таблице кода. Трудность заключается в том, что код вырожденный и приходится синтезировать несколько праймеров, а затем опытным путем находить праймеры, комплементарные концам гена. Выделение и анализ отдельных фрагментов генов используется для определения мутации и диагностики наследственных болезней.

Клонирование генов

Фрагменты ДНК можно вырезать из генома эукариот специально подобранными рестриктазами и встраивать в ДНК ***плазмиды*** или вируса вскрытую (разрезанную) теми же рестриктазами. Образуется гибридная плазмида или ***рекомбинантная ДНК***. Однако таким способом получается очень небольшое количество рекомбинантной ДНК. Клонирование — это способ ее накопления. Для этого рекомбинантные плазмиды встраивают в бактерии и получают рекомбинантные бактерии, которые реплицируют, транскрибируют и транслируют Lчужие¦ гены.



Получение рекомбинантной ДНК

Из бактериальной массы можно выделить достаточное количество рекомбинантной ДНК.

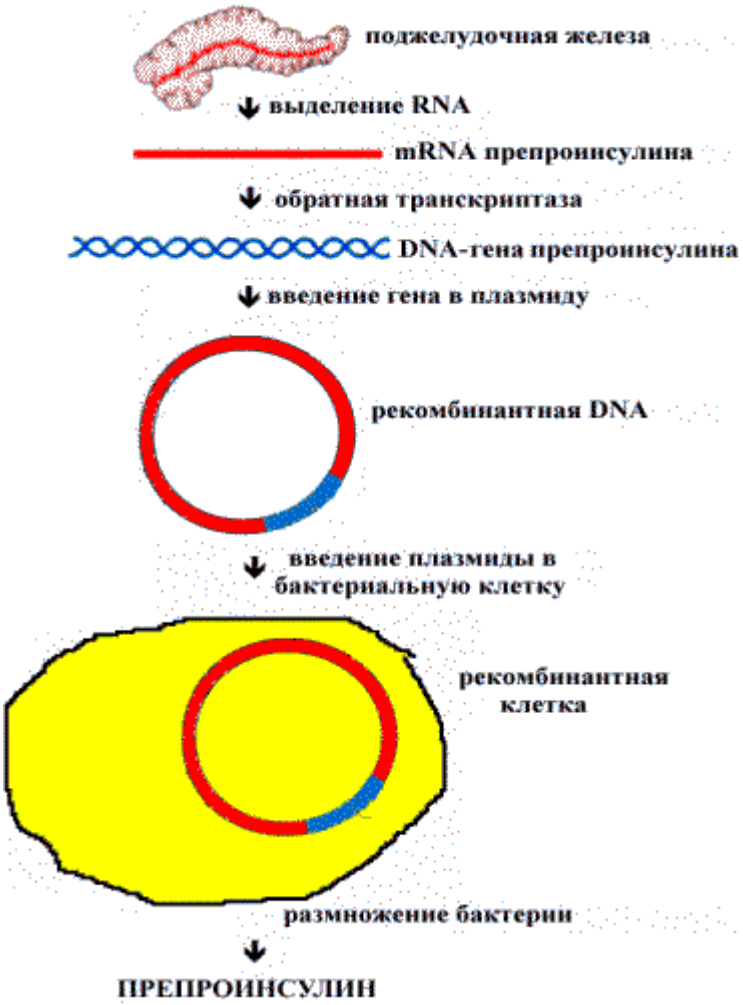


Схема синтеза препроинсулина в трансформированных клетках E.Coli.

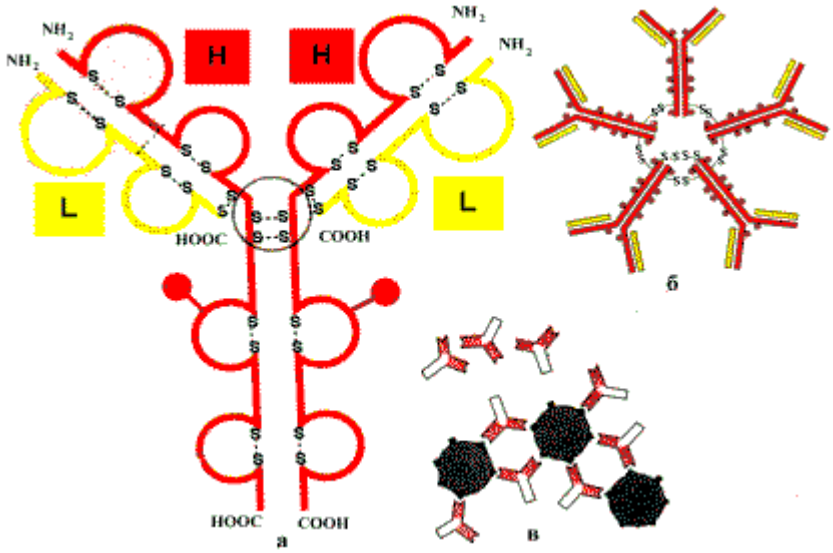
Плазмиды кольцевые, двухцепочечные молекулы DNA, содержащиеся в бактериальных клетках и способные к репликации и транскрипции, независимо от клеточных хромосом.

Обратная транскриптаза (РНК—зависимая ДНК—полимераза) — фермент, катализирующий синтез ДНК, используя в качестве матрицы РНК. Этот фермент необходим для получения последовательности ДНК, комплементарной мРНК (кДНК), применяемой в генной инженерии. С помощью обратной транскриптазы можно получить кДНК— копии мРНК, в которой отсутствуют интроны. Следовательно, при включении в плазмиды эта молекула не подвергается сплайсингу. Рекомбинантные микроорганизмы нашли практическое применение как продуценты необходимых человеку веществ: белковых гормонов, биологически активных пептидов.

Белки иммунной системы

Иммунная система человека — это согласованно функционирующая система молекул и клеток, распознающих и удаляющих чужеродные вещества. За иммунитет отвечают В— и Т—клетки. В—клетки вырабатывают антитела — иммуноглобулины (Ig). Т—клетки могут убивать чужеродные клетки или собственные, инфицированные вирусом, и могут быть регуляторами иммунного

ответа. Каждая молекула антитела представляет собой белок, имеющий форму буквы Y и состоящий из двух идентичных ***тяжелых*** (H) цепей и двух идентичных ***легких*** (L) цепей.



Строение иммуноглобулинов: а — пептидные цепи иммуно—глобулинов (H — тяжелые, L — легкие); пунктиром обозначены вариабельные области; б — молекула IgM, пять мономеров связаны дисульфидными связями; в — комплексы антиген—антитело.

Существует пять классов антител, имеющих различные константные области H—цепи. С любым типом H—цепей могут быть связаны L—цепи любого типа. Каждая L— и H—цепь Ig состоит из ***вариабельной*** области на N—конце и расположенной за ней ***константной*** области. Вариабельность аминокислотной последовательности N—концевых участков, как H — так и L—цепей обеспечивает структурную основу для разнообразия антигенсвязывающих участков. H—цепи образуют Fc—область (Lхвостовую¦) антител. Разные H—цепи придают Lхвостовым¦ областям антител различную конформацию, от которой зависит дальнейшая судьба комплекса антиген—антитело. От того, с какими белками будет связываться Fc—область H—цепей, зависят свойства и функции данного класса Ig. Fc—область Ig может связываться не только с фагоцитирующими клетками, но и с первым компонентом системы комплемента, в результате чего активируется та особая система белков крови, которая способствует разрушению антигена.

Разнообразие антител — результат транспозиции генов. Все B—лимфоциты организма образуют большое число клонов, которые синтезируют антитела только одного вида — имеющие одинаковые вариабельные области. Антиген, присоединяясь к лимфоцитам соответствующего клона, вызывает пролиферацию этого клона и активирует синтез и секрецию антител клетками этого клона. В предшественниках лимфоцитов гены, кодирующие разные области пептидных цепей антител, расположены в разных частях молекулы ДНК. При

дифференцировке лимфоцитов в процессеонтогенеза происходит рекомбинация — перенос генов из одного места в другое в пределах молекулы ДНК (транспозиция). ДНК, определяющая вариабельные области антител, составлена из примерно 400 генов V, около 20 генов D и 4 генов J. В результате транспозиции объединяются 3 гена V, D и J в полный ген вариабельной области, который соединяется с любым из генов константной области, и получается полный ген тяжелой цепи. Сходным путем образуются и гены легких цепей антител. Таким способом возникают миллионы разных генов, ответственных за синтез антител.

Трансляция является хорошей мишенью для *лекарств*

Многие вещества обладают способностью связываться с элементами рибосом или другими факторами трансляции. Некоторые из этих веществ используются в качестве лекарственных средств, которые в состоянии действовать на разных уровнях трансляции, например:

1. Инактивация факторов инициации

- **интерферон** активирует внутриклеточные протеинкиназы, которые, в свою очередь, фосфорилируют белковый фактор инициации ИФ-2 и подавляют его активность.

2. Нарушение кодон-антикодонового взаимодействия

- **стрептомицин** присоединяется к малой субъединице и вызывает ошибку считывания первого основания кодона.

3. Блокада стадии элонгации

- **тетрациклины** блокируют А-центр рибосомы и лишают ее способности связываться с аминоацил-тРНК,
- **левомицетин** связывается с 50S-частицей рибосомы и ингибирует пептидил-трансферазу,
- **эритромицин** связывается с 50S-частицей рибосомы и ингибирует транслоказу,
- **пуромицин** по структуре схож с тирозил-тРНК, входит в А-центр рибосомы и участвует в пептидил-трансферазной реакции, образуя связь с имеющимся пептидом. После этого комплекс пуромицин--пептид отделяется от рибосомы, что останавливает синтез белка.