

А.С. Спирин

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

Структура рибосомы и биосинтез белка

Допущено
Министерством высшего и среднего
специального образования СССР
в качестве учебника для студентов
биологических специальностей
высших учебных заведений



Москва

«Высшая школа» 1986

Функционирование рибосомы

Глава I

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ АКТИВНОСТИ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ УЧАСТКИ РИБОСОМЫ

1. РАБОЧИЙ ЦИКЛ РИБОСОМЫ

Если рассмотреть рибосому в любой момент синтеза пептида в течение элонгации, то можно видеть, что она прикреплена к мРНК (к ее кодирующей части) и обязательно удерживает молекулу пептидил-тРНК (рис. 80). Эта пептидил-тРНК представляет собой растущий пептид, соединенный своим С-концом с тРНК, принесшей последний (к данному моменту) аминокислотный остаток в рибосому. Такая рибосома способна быть или стать компетентной в том, чтобы связывать молекулу аминоацил-тРНК, соответствующую очередному кодону мРНК (рис. 80.I). Связывание аминоацил-тРНК приводит к ситуации, когда удерживаемая пептидил-тРНК и новосвязанная аминоацил-тРНК оказываются одновременно на рибосоме. Их расположение бок о бок и каталитическая активность рибосомы приводят к тому, что между ними происходит реакция транспептидации: С-конец пептидильного остатка от своей тРНК переносится на аминогруппу аминоацил-тРНК (рис. 80.II). В результате на рибосоме образуется новая пептидил-тРНК, где пептид удлинен на один аминокислотный остаток со стороны С-конца, а также деацелированная тРНК. Чтобы рибосома снова могла быть способной связывать следующую аминоацил-тРНК, необходимо произвести некоторые перемещения в рибосоме, в результате которых освободится место для аминоацил-тРНК и установится следующий нуклеотидный триплет (кодон) мРНК (рис. 80.III); этот шаг называется транслокацией.

Итак, рабочий цикл рибосомы в процессе элонгации состоит из трех шагов — кодонзависимого связывания аминоацил-тРНК (шаг I), транспептидации (шаг II) и транслокации (шаг III). Связывание аминоацил-тРНК происходит с участием белка $EF-T_u$, взаимодействующего с рибосомой, и сопровождается гидролизом молекулы ГТФ. Транспептидация катализируется самой рибосомой. Транслокация происходит с участием другого белка, $EF-G$, и тоже сопровождается гидролизом ГТФ.

Согласно классической схеме имеются два участка связывания тРНК на рибосоме — так называемые А-участок и Р-участок. На стадии I аминоацил-тРНК в комплексе с $EF-T_u$ и ГТФ связывается с А-участком и расположенным там вакантным триплетом (кодоном) матрицы. Пептидил-тРНК расположена в этот момент в Р-участке. Связывание аминоацил-тРНК завершается гидролизом ГТФ на рибосоме и освобождением комплекса $EF-T_u \cdot GDP$ и ортофосфата в раствор. На стадии II

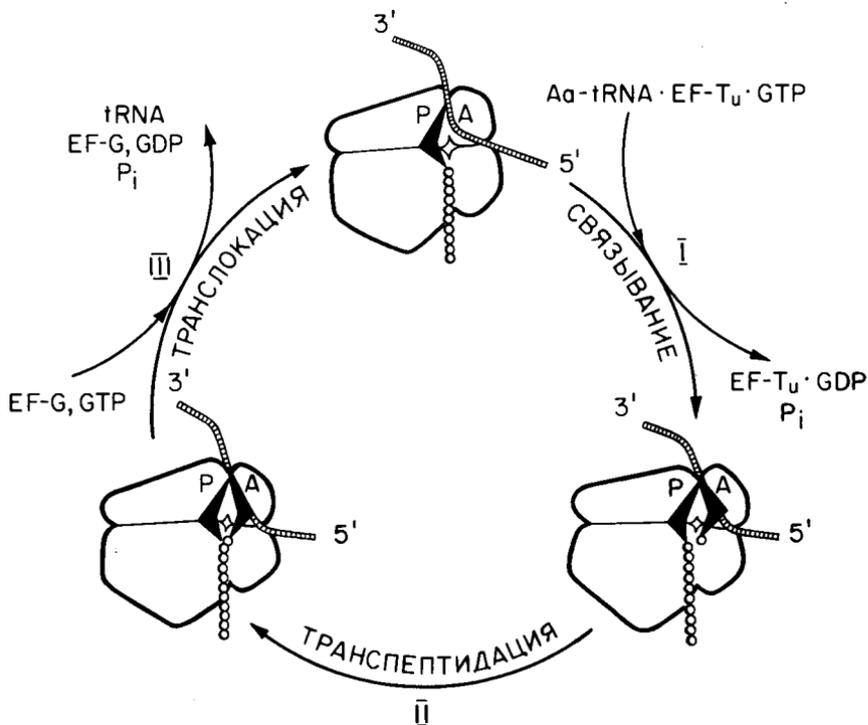


Рис. 80. Схема элонгационного цикла рибосомы

аминоацил-тРНК в А-участке реагирует с пептидил-тРНК в Р-участке, так что осуществляется перенос С-конца пептида на аминоацил-тРНК. Теперь удлиненная пептидил-тРНК (точнее ее остаток тРНК) занимает А-участок, а образовавшаяся деацилированная тРНК — Р-участок. На стадии III рибосома взаимодействует с EF-G и ГТФ, которые катализируют перемещение пептидил-тРНК (ее остатка тРНК) вместе с кодоном матрицы из А-участка в Р-участок и освобождение деацилированной тРНК из Р-участка в раствор. По завершении этого ГТФ гидролизуется, и EF-G, ГДФ и ортофосфат освобождаются из рибосомы. В результате снова достигается состояние, когда пептидил-тРНК находится в Р-участке, а в А-участке установлен следующий кодон матрицы, и он готов воспринять следующую аминоацил-тРНК. Трансляция всей кодирующей последовательности матричного полинуклеотида и элонгация полипептида на рибосоме осуществляются повторением именно таких циклов. (Кстати, стадия инициации и стадия терминации трансляции представляют собой не более, чем модификации представленного здесь рабочего элонгационного цикла — см. гл. V.VI и VIII.)

Таким образом, из рассмотрения рабочего цикла видно, что рибосома в процессе трансляции выполняет следующие функции: 1) связывание и удержание мРНК; 2) удержание пептидил-тРНК; 3) связывание амино-

ацил-тРНК; 4) связывание белковых факторов трансляции; 5) участие в катализе гидролиза ГТФ; 6) катализ транспептидации; 7) комплекс внутририбосомных перемещений, именуемый транслокацией.

2. ФУНКЦИИ СВЯЗЫВАНИЯ

Связывание и удержание матричного полинуклеотида (мРНК-связывающий участок)

Рибосома имеет собственное сродство к матричным полинуклеотидам. Уже давно известно, что среди синтетических полирибонуклеотидов вакантная рибосома лучше всего связывает полиуридиловую кислоту, на чем и было основано широкое применение поли(U) в качестве матрицы в бесклеточных системах трансляции. Возможно, что отсутствие стабильной вторичной и третичной структуры в поли(U) является существенным фактором ее хорошего связывания с рибосомой. В случае природных мРНК имеются совершенно определенные предпочтительные места на полинуклеотиде, с которыми могут связываться вакантные рибосомы (см. гл. V.VI). В любом случае прочная сплошная двойная спираль вряд ли может служить местом присоединения вакантных рибосом.

В то же время, рибосома в ходе трансляции (элонгации) проходит вдоль всей кодирующей части мРНК и, очевидно, может удерживать ее в любом участке полинуклеотидной последовательности. Здесь следует указать, что рибосома в ходе трансляции расплетает матричный полинуклеотид, так что удерживаемый на рибосоме участок скорее всего лишен собственной вторичной и третичной структуры. В транслирующей рибосоме удержанию мРНК несомненно способствуют кодон-антикодовые взаимодействия с тРНК.

Связываясь с матричным полинуклеотидом и удерживая его в ходе трансляции, рибосома защищает от действия внешних нуклеаз довольно протяженный участок цепи. Еще в ранних опытах с поли(U) было показано, что рибосома покрывает участок длиной около 25 нуклеотидных остатков, делая его недоступным для панкреатической рибонуклеазы. На природной мРНК (РНК фага R17 или f2) рибосомы *E. coli* защищали от нуклеаз участки длиной от 30 до 60 остатков. В последних опытах было показано, что функциональная 70S рибосома, несущая тРНК, защищает от нуклеаз участок матричного полинуклеотида длиной около 45—50 нуклеотидных остатков, причем в пределах защищаемого участка имеется относительно доступная точка, разрыв при которой дает фрагменты длиной 27—30 остатков и около 15—20 остатков. (Из некоторых наблюдений следует, что эта чувствительная точка матрицы находится непосредственно перед кодоном, связанным с тРНК в А-участке рибосомы; защищаемый 15-нуклеотидный фрагмент представляет собой 3'-проксимальную часть, а 30-нуклеотидный фрагмент — 5'-проксимальную часть связанного рибосомой участка матрицы.) Это позволяет думать о большой протяженности мРНК-связывающего участка рибосомы; похоже, что он должен иметь протяженность по крайней мере порядка 10 нм, т. е. масштаба полрибосомы.

Первым вопросом, который встает при попытках локализации любого функционального участка рибосомы, является вопрос о том, локализован ли он на какой-либо одной из двух субчастиц, и если да, то на какой именно, или он организован связывающими центрами обеих субчастиц вместе. Экспериментально, в самом простом случае, этот вопрос решается таким образом: рибосому диссоциируют на большую и малую субчастицы, их разделяют и к каждой из них в отдельности добавляют испытуемый лиганд (в присутствии достаточной концентрации Mg^{2+} , требуемой для любого связывания на рибосоме). Оказалось, что изолированная 30S субчастица связывает матричный полинуклеотид, а 50S субчастица нет. На основании этого в настоящее время принимается, что мРНК-связывающий участок рибосомы локализован только на меньшей (30S или 40S) субчастице.

Для идентификации рибосомных белков, принимающих участие в организации мРНК-связывающего участка 30S субчастицы, использовались различные подходы. В опытах по частичной разборке частиц выяснилось, что мРНК-связывающая способность утрачивается при отделении группы белков S1, S2, S3, S5, S9, S10 и S14; однако реконструкция без любого одного из этих белков давала активные в связывании поли(U) 30S частицы. Вероятно, что большая протяженность мРНК-связывающего участка предполагает многоцентровое связывание мРНК на частице, т. е. участие нескольких точек связывания; тогда исключение любой одной из них может быть не критично для функции. С другой стороны, утрата поли(U)-связывающей способности при отделении всей вышеуказанной группы белков может быть обусловлена нарушением общей структуры соответствующего района рибосомы, а не обязательно удалением главных компонентов активного участка.

Другой подход для выявления белков функциональных участков рибосомы состоит в их так называемом аффинном мечении. Это значит, что соответствующий лиганд, специфически связывающийся с рибосомой — мРНК, тРНК, белковый фактор трансляции, нуклеотид или антибиотик, — содержит химически активную (рис. 81) или фотоактивируемую (рис. 82) группировку, которая атакует рибосомные компоненты, находящиеся в ближайшем окружении, и сшивается с ними; белки, оказавшиеся сшитыми с лигандом, идентифицируются. Для изучения мРНК-связывающего участка рибосомы использовались олигонуклеотидные аналоги мРНК, содержащие или бромацетильные, или 4-[(N-2-хлорэтил-N-метил)амино]-бензилдиеновые, или фотоактивируемые арилизидные группы (рис. 82,2) на 3'- или 5'-конце, а также фотоактивируемое тиопроизводное поли(U) — поли(s^4U). Кроме того, оказалось возможным фотоактивировать немодифицированные синтетические и природные матричные олиго- и полинуклеотиды [поли(U), MS2 РНК] для их сшивки с рибосомным окружением. Ясно, что с помощью этого подхода, однако, нельзя отличить компоненты, непосредственно формирующие мРНК-связывающий участок, и таковые, находящиеся вблизи него. Среди белков мРНК-связывающего участка 30S субчастицы и/или вблизи него таким путем надежнее всего обнаруживаются белки S1, S3 и S5 (хотя в отдельных работах отмечается еще не менее десятка других белков 30S субчастицы, включая S4, S9, S18). Исходя из междоменного или междо-

левого расположения белков S3 и S5 (см. гл. Б. IV, а также Б. V. 3), можно думать, что мРНК-связывающий участок локализуется в районе борозд, разделяющих головку, тело и боковую лопасть 30S субчастицы.

Относительно белка S1 известно, что он не строго обязателен для связывания и трансляции поли(U), хотя стимулирует их; он оказался необходимым для связывания и трансляции природных мРНК. Кроме того, обнаружена его собственная способность сильно связываться с полинуклеотидами. Связывание белка S1 с РНК приводит к ослаблению или расплетанию их вторичной структуры. Принимая во внимание также соседство белка S1 с мРНК на рибосоме, можно предполагать его прямую причастность к мРНК-связывающему участку.

Химически активные аналоги мРНК сшиваются не только с белками 30S субчастицы, но и с ее 16S РНК, а некоторые из них преимущественно с 16S РНК. Опять-таки не ясно, означает ли это участие рибосомной РНК в связывании мРНК или отражает простое соседство определенных районов 16S РНК с мРНК-связывающими центрами. Можно указать, что очень близко от кодона мРНК в Р-участке или в непосредственном контакте с ним находится неспаренный район 16S РНК между доменом III и длинной составной шпилькой (спирали 57—58) 3'-концевой последовательности (см. рис. 42). Кроме того, при инициаторном связывании вакантной рибосомной частицы с природной мРНК полипуриновый блок последней, по-видимому, комплементарно спаривается с полипиримидиновой последовательностью у самого 3'-конца 16S РНК (см. В. VI. 4). Разумеется, с началом элонгации эта связь исчезает.

Для того чтобы прямо локализовать мРНК-связывающий участок на морфологически видимой поверхности рибосомы, было предпринято иммуноэлектронно-микроскопическое исследование 30S рибосомных субчастиц и 70S рибосом, связанных с короткими поли(U), несущими гаптен, пришитый к 3'- или 5'-концу. Использование этого подхода позволило локализовать концы матричного полинуклеотида в районе желобка, отделяющего головку от тела 30S субчастицы, на ее внешней (обращенной от 50S субчастицы) стороне и вблизи бокового выступа.

Из совокупности данных создается впечатление, что цепь мРНК связывается и проходит по 30S субчастице где-то между ее долями или между доменами ее РНК. Очень вероятно, что это район желобка, отделяющего головку от боковой лопасти и головку от тела. В этом протяженном районе находятся как 3'-конец 16S РНК, так и белки S3 и S5 (см. Б. IV. 2 и 3; Б. V. 3), а также, вероятно, черешок домена III 16S РНК и белок S1. Сшивки химически активных аналогов мРНК с компонентами 50S субчастицы указывают на близость к мРНК таких белков, как L1 и L7/L12, находящихся с двух разных сторон прямо напротив борозды, отделяющей головку от боковой лопасти и головку от тела 30S субчастицы, соответственно (см. раздел Б. IV. 2 и рис. 67).

Как бы то ни было, общие соображения заставляют предполагать, что ассоциация матричного полинуклеотида с рибосомой допускает сравнительно легкое скольжение цепи полинуклеотида вдоль мРНК-связывающего участка. Во всяком случае, это, по-видимому, требуется для последовательного прочитывания цепи мРНК при трансляции. Положение остатков тРНК в рибосоме и возможная траектория их

перемещений при транслокации (см. раздел В.IV.8) могут служить указанием на то, что мРНК скользит от стороны с боковой лопастью, примыкающей к белку L1, к противоположной стороне 30S субчастицы, примыкающей к белку L7/L12, как изображено на рис. 83.

Удержание пептидил-тРНК или деацилированной тРНК (тРНК-связывающий Р-участок)

Рибосома имеет собственное средство к тРНК. Вакантная рибосома может связывать любую тРНК или ее производное (аминоацил-тРНК, пептидил-тРНК) в отсутствие матричного полинуклеотида. Присутствие матричного полинуклеотида делает это связывание специфическим, т. е. в этом случае будет связываться лишь тРНК, соответствующая кодону матрицы. Во всех случаях при связывании тРНК с вакантной рибосомой в первую очередь заполняется тот тРНК-связывающий участок, который в транслирующей рибосоме занят пептидил-тРНК до транспептидации или деацилированной тРНК после транспептидации (см. рис. 80), обозначаемый как Р-участок. Сродство Р-участка вакантной 70S рибосомы *E. coli* с матричным полинуклеотидом к тРНК оценивается константой связывания порядка $10^7 - 10^9 \text{ M}^{-1}$, в зависимости от концентрации Mg^{2+} , ионной силы и температуры (средство повышается с увеличением концентрации Mg^{2+} , уменьшением ионной силы и уменьшением температуры).

Удержание тРНК в Р-участке **транслирующей рибосомы** имеет важную особенность. Дело в том, что пептидил-тРНК не должна обмениваться со средой, пока идет трансляция. Соответственно, когда в Р-участке транслирующей рибосомы сидит пептидил-тРНК, она, по-видимому, не находится в равновесии со средой (скорость диссоциации очень мала), а скорее каким-то образом окклюдирована. Наоборот, когда в результате транспептидации в Р-участке оказывается деацилированная тРНК, участок становится обмениваемым, и тРНК может освобождаться. Обусловлено ли неравновесное удержание пептидил-тРНК в Р-участке транслирующей рибосомы вкладом пептидильного остатка (который, может быть, окклюдирован рибосомной частицей, пока не произошла терминация) или же это свойство самого Р-участка **посттранслокационной рибосомы**, неизвестно.

Разделение рибосомных субчастиц и проверка возможности локализации тРНК-связывающего участка на одной или на другой показали, что **обе** рибосомные субчастицы обладают некоторым сродством к тРНК. Правда, способностью к кодонспецифическому связыванию тРНК обладает лишь изолированная малая (30S или 40S) субчастица рибосомы, и это понятно, так как только она может связывать и удерживать матричный полинуклеотид. Зато в результате диссоциации транслирующих рибосом пептидил-тРНК часто остается присоединенной к большой (50S или 60S) субчастице. В настоящее время имеются все основания считать, что тРНК-связывающий Р-участок образован при участии обеих рибосомных субчастиц.

Уже в первых опытах по частичной разборке 30S субчастицы было показано, что удаление группы белков S1, S2, S3, S5, S9, S10

и S14 лишает ее не только мРНК-связывающей, но и тРНК-связывающей активности. При реконструкции для восстановления тРНК-связывающей активности необходимыми из них оказались прежде всего белки S10 и S14, а также S3. В дальнейших опытах по полной реконструкции 30S субчастиц наиболее критичными для восстановления функции связывания тРНК оказались те же белки S10 и S14 и в меньшей степени — белки S3, S9, S11 и S19. (Кстати, отсутствие белка S1 никак не сказалось на тРНК-связывающей способности рибосом, а отсутствие белка S2 сказывалось мало). В соответствии с этим, добавление белков S3 и S14 к преператам рибосом особенно стимулировало их тРНК-связывающую способность — вероятно, за счет восстановления тРНК-связывающих участков, частично поврежденных в ходе выделения частиц (ведь эти белки сравнительно легко отмываются). Было не ясно, однако, насколько перечисленные белки причастны к формированию именно Р-участка, а не А-участка рибосомы.

Метод аффинного мечения мог бы дать более избирательную информацию, так как те или иные химически активные или фотоактивируемые аналоги тРНК (рис. 81 и 82,1) можно поместить именно в Р-участок, проконтролировать это связывание и затем, после сшивки, идентифицировать белки, примыкающие к тРНК. Еще лучше было бы использовать прямую сшивку тРНК, сидящую в Р-участке, с ее непосредственно соседними компонентами с помощью ультрафиолетового излучения. Первые результаты, хотя и несколько противоречивые, указали на непосредственное соседство таких белков 30S субчастицы, как S5, S9, S10 и S11, с неспаренными основаниями внутренней части полинуклеотидной цепи тРНК в Р-участке. Кроме того, белки 50S субчастицы, такие как L7/L12, L11, L27, также обнаруживали контакт с полинуклеотидной цепью тРНК. Сшивки отмечались и с рибосомными РНК, и, в частности, антикодоновая петля тРНК в Р-участке может быть сшита ультрафиолетом с 16S РНК в районе 1400-го нуклеотида, пограничным между доменом III и 3'-концевой частью.

К сожалению, окончательные суждения о белках тРНК-связывающего Р-участка и о его локализации на рибосоме из имеющихся данных сделать никак нельзя. Тем не менее, сопоставляя их с данными по белкам и по локализации мРНК-связывающего участка, можно предполагать, что антикодоновая ветвь L-образной молекулы тРНК связывается с 30S субчастицей в районе борозды, отделяющей голов-

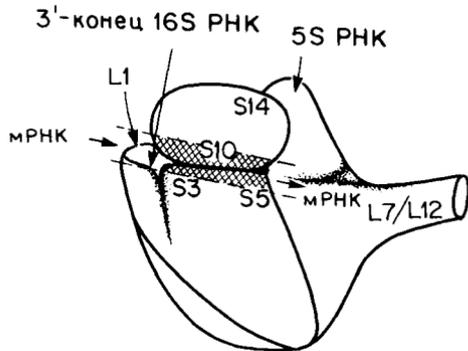


Рис. 83. Схема приблизительного расположения мРНК-связывающего участка (заштрихованная область) на рибосоме. (Белки S3, S5 и S10, по-видимому, участвуют в его формировании или непосредственно примыкают к нему.)

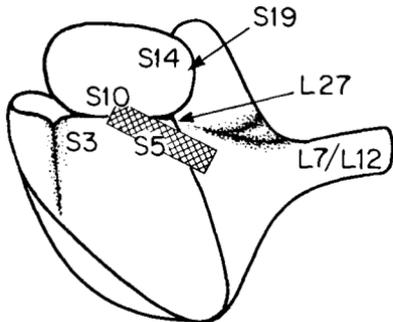


Рис. 84. Схема возможного расположения тРНК (заштрихованная область) в Р-участке рибосомы

ку от тела, где-то между белками S5 и S10; тогда, естественно, близко от нее располагается и белок S3. Акцепторная ветвь тРНК в Р-участке определенно должна контактировать с 50S субчастицей, на которой расположен пептидилтрансферазный центр (см. ниже); возможно, что такие белки 50S субчастицы, как L7/L12 и находящийся у основания L7/L12-стержня белок L11, оказываются в соседстве с центральной частью (углом) L-образной тРНК; в то время как конец акцепторной ветви близок к белку L27, расположенному в районе пептидилтрансферазного центра, по-видимому, где-то у головки

50S субчастицы (см. ниже). Схематически возможное положение тРНК в Р-участке 70S рибосомы дано на рис. 84 (еще раз надо подчеркнуть, что фактические основания для такой локализации Р-участка пока зыбкие и схему надо рассматривать как гипотетическую).

Связывание аминокил-тРНК (тРНК-связывающий А-участок)

Когда Р-участок заполнен (все равно — либо деацилированной тРНК, либо пептидил-тРНК, либо аминокил-тРНК), рибосома может связывать вторую молекулу тРНК. Это связывание происходит по другому тРНК-связывающему участку, который обозначается как А-участок. Связывание по А-участку сильно стимулируется матричным полинуклеотидом, и тогда оно является кодонспецифическим, т. е. связывается лишь тРНК, соответствующая установленному там кодону. Сродство тРНК к А-участку приблизительно на порядок величины ниже, чем к Р-участку. Аминокил-тРНК имеет несколько большее сродство к А-участку, чем деацилированная тРНК. Однако в процессе естественной трансляции связывание аминокил-тРНК значительно усиливается участием белка (фактора элонгации) EF-T₂, который комплексируется с ней только при наличии свободной аминокислотной группы и сопровождается ее на первых стадиях.

Как и в случае Р-участка, А-участок, очевидно, также формируется обеими рибосомными субчастицами. Так или иначе, антикодон тРНК должен лежать там, где располагается кодон мРНК, т. е. на малой (30S или 40S) субчастице, а акцепторный конец должен взаимодействовать с пептидилтрансферазным центром, т. е. с большой (50S или 60S) субчастицей.

Данные об участии конкретных рибосомных компонентов в организации тРНК-связывающего А-участка еще более скудны, чем в отношении Р-участка, так как эксперименты с ним труднее.

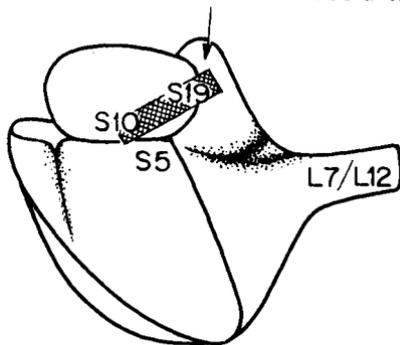


Рис. 85. Схема возможного расположения тРНК (заштрихованная область) в А-участке рибосомы

Дело в том, что на вакантной рибосоме А-участок оказывается невозможным тестировать: он не заполняется, пока не заполнен Р-участок. Поэтому для тестирования А-участка рибосоме надо специально подготовить путем заполнения Р-участка. С другой стороны, связывание аминоксил-тРНК с А-участком, когда Р-участок заполнен пептидил-тРНК или N-блокированной аминоксил-тРНК, приводит к немедленной транспептидации, так что зафиксировать нужное состояние оказывается непросто. Имеются и другие трудности при экспериментировании с А-участком. Одним из первых наиболее четких указаний на причастность или соседство конкретного белкового компонента рибосомы к А-участку было получено в опытах, когда Р-участок поли(U)-программированной рибосомы был предварительно занят ацетилфенилаланил-тРНК, а в А-участке была связана фенилаланил-тРНК с *para*-азидофенацильной группой, присоединенной к s^4U8 центрального района (угла) тРНК. Фотоактивация такого комплекса дает в результате уникальную сшивку центрального района (угла) тРНК с белком S19. Из стереохимии аффинной метки и ее положения на тРНК следует, что контакт угла L-образной тРНК с белком S19 должен осуществляться с правой стороны молекулы, если смотреть с внешней стороны угла на тРНК антикодоном вверх. Принимая приблизительное положение белка S19 на головке 30S субчастицы между белками S13 и S14 (см. рис. 68) и помещая антикодоновую ветвь тРНК на 30S субчастицу, а акцепторную ветвь на 50S субчастицу, можно расположить L-образную молекулу тРНК в А-участке так, как показано на рис. 85. В этом положении угол тРНК должен иметь контакт как с головкой 30S субчастицы, так и с головкой 50S субчастицы. Действительно, имеется ряд косвенных данных о возможном участии 5S РНК-белкового комплекса, входящего в состав головки 50S субчастицы, в связывании тРНК с А-участком.

В целом, при рассмотрении электронно-микроскопического изображения 70S рибосомы или ее соответствующей модели можно видеть, что у основания L7 / L12-стержня сформирован карман (или полость), ограниченный незакрытой вогнутой поверхностью 50S субчастицы и боковой вогнутой поверхностью 30S субчастицы (см. рис. 39 и 40). Как борозда, отделяющая головку от тела 30S субчастицы, так и борозда между головкой и телом 50S субчастицы открываются в этот карман. Соблазнительно думать, что именно этот карман является местом обоих тРНК-связывающих участков, как это и представ-

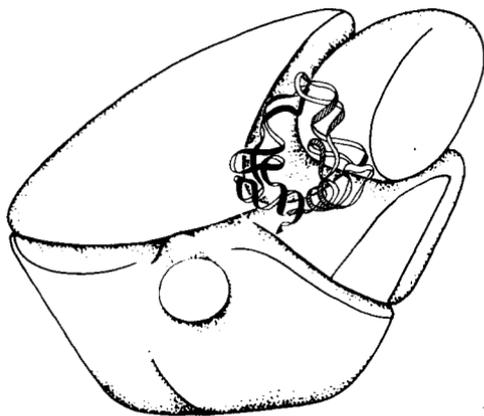


Рис. 86. Контурный рисунок модели 70S рибосомы с двумя тРНК, занимающими А- и Р-участки (по А. S. Spirin, FEBS Lett., 1983, v. 156, p. 217–221)

лено в вышеприведенном изложении. Масштабный рисунок модели расположения двух L-образных тРНК в этом кармане дан на рис. 86. Согласно модели, антикодоны двух тРНК находятся в желобке между головкой и телом 30S субчастицы на ее открытой стороне, а акцепторные концы попадают в район желобка, разделяющего головку и тело 50S субчастицы на контактирующей ее поверхности (в этом районе предполагается локализация пептидилтрансферазного центра — см. В.1.3); центральные части двух тРНК заполняют рассмотренный карман 70S рибосомы.

Следует сказать, что имеется и альтернативная модель, где тРНК-связывающий А-участок, как и Р-участок, расположен на рибосоме со стороны боковой лопасти малой рибосомной субчастицы.

Связывание белковых факторов трансляции и ГТФ (факторсвязывающий участок)

В процессе элонгации транслирующая рибосома периодически связывает и освобождает (один раз в каждом цикле) белок EF-T_u и белок EF-G (у эукариот EF-1 и EF-2, соответственно). Связывание происходит всегда в комплексе с ГТФ, а освобождение в результате гидролиза ГТФ до ГДФ и ортофосфата. Связывание и освобождение EF-T_u осуществляется на стадии связывания аминоксил-тРНК, а связывание и освобождение EF-G — на стадии транслокации. Кроме того, в процессе инициации трансляции происходит связывание с рибосомой белка IF-2 с ГТФ (eIF-2 в случае эукариот) и его освобождение в результате гидролиза ГТФ. Наконец, в процессе терминации трансляции рибосома связывает и освобождает, также при участии ГТФ, белок RF. Все эти белки, взаимодействующие с рибосомой только в виде комплексов с ГТФ, присоединяются, по видимому, к одному и тому же району рибосомной частицы. Скорее всего, их участки связывания либо идентичны, либо перекрывающиеся. Во всяком случае, все перечисленные белки конкурируют друг с другом за место посадки на рибосому и никак не могут присутствовать на ней одновременно.

Так как все перечисленные белки после присоединения к рибосоме быстро освобождаются в результате гидролиза ГТФ, то изучение их связывания в опытах *in vitro* удобнее всего проводить, заменив ГТФ его нерасщепляемым аналогом, таким как гуанилилметиленидифосфонат (GMP-PCP) или гуанилилимидодифосфат (GMP-

PNP) (рис. 87). Комплекс белка с таким аналогом взаимодействует с рибосомой и задерживается на ней.

Связывание белка EF-G с 70S рибосомой изучено, пожалуй, лучше всего. EF-G с GMP-PCP может образовывать комплекс как с транслирующей, так и с вакантной рибосомой. EF-G с ГТФ также взаимодействует как с транслирующей, так и с вакантной рибосомой, но не задерживается на них, так как ГТФ расщепляется, и EF-G с ГДФ освобождается. Однако в присутствии антибиотика фузидовой кислоты (см. рис. 109) EF-G сохраняет сродство к рибосоме также и после расщепления ГТФ и, соответственно, задерживается на рибосоме. Точно так же, как и полная рибосома, ведет себя изолированная 50S субчастица: EF-G с GMP-PCP или EF-G с ГТФ (точнее, с продуктом его расщепления ГДФ) в присутствии фузидовой кислоты образует с ней довольно стабильный комплекс; EF-G с ГТФ взаимодействует с 50S субчастицей, давая в результате расщепление ГТФ и освобождение EF-G с ГДФ. Взаимодействие EF-G с изолированной 30S субчастицей не обнаруживается. Следовательно, участок связывания EF-G формируется в основном 50S субчастицей рибосомы.

Для идентификации белковых компонентов 50S субчастицы, формирующих факторсвязывающий участок, были использованы, в частности, антитела против различных рибосомных белков. Оказалось, что только антитела против белка L7/L12 ингибировали связывание EF-G, в то время как антитела против большого разнообразия других белков не влияли на эту функцию. Первоначально из этих опытов был сделан вывод, что местом присоединения EF-G является белок L7/L12. Действительно, избирательное удаление белка L7/L12 из 50S субчастицы (с помощью диссоциации 0,5 М NH₄Cl с этанолом) приводило к значительному падению связывания EF-G с рибосомой. Однако сродство не исчезало совсем, а лишь уменьшалось. Было показано, что даже при полном отсутствии белков L7/L12 на рибосоме EF-G способен, хотя и гораздо менее эффективно, не только связываться, но и осуществлять свои функции в гидролизе ГТФ и в транслокации. Следовательно, белок L7/L12 лишь помогает связыванию EF-G, а основным связывающим компонентом, ввиду отсутствия других причастных белков, должна быть рибосомная РНК. В прямых экспериментах это было подтверждено: было найдено специфическое сродство определенного района 23S РНК к EF-G.

Известно, что антибиотик тиострептон, препятствующий связыванию EF-G (так же как и EF-T_v) с 50S субчастицей, присоединяется в районе локализации белка L11 и защищаемой им последовательности 23S РНК 1052–1112, представляющей собой составную шпильку, с большой боковой петлей, в домене II (см. рис. 45). Кажется вероятным, что этот район 23S РНК находится вблизи места связывания EF-G с 50S субчастицей.

Следует отметить, что хотя узнавание и связывание EF-G в основном, по-видимому, обеспечивается 50S субчастицей рибосомы, фактор контактирует также и с 30S субчастицей. В частности, белок S12 легко может быть шит дисульфидной связью с EF-G при окисле-

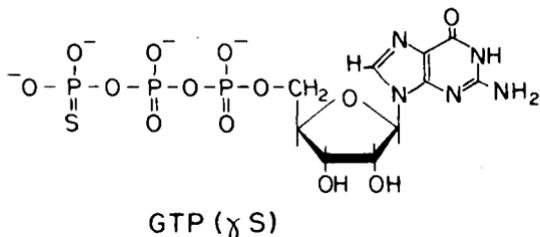
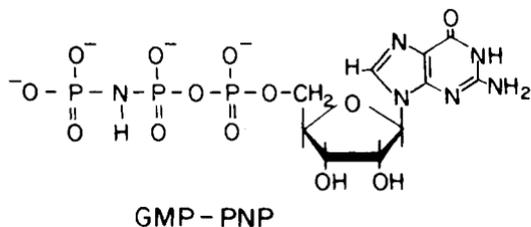
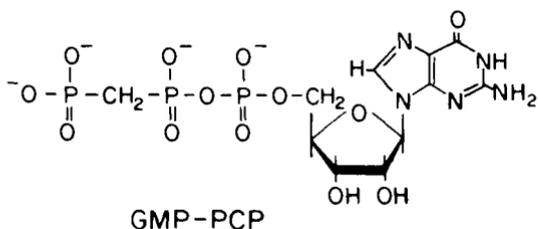
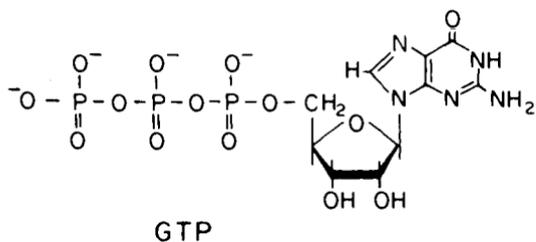


Рис. 87. ГТФ и его нерасщепляемые и медленно расщепляемые аналоги, используемые для изучения функций факторов трансляции и рибосомы:

GTP — гуанозин-5'-трифосфат; GMP-PCP — нерасщепляемый аналог 5'-гуанилиметиленидифосфат; GMP-PNP — очень медленно расщепляемый аналог 5'-гуанилилимидодифосфат; GTP (γ S) — медленно расщепляемый аналог гуанозин-5'-(γ -тио) трифосфат

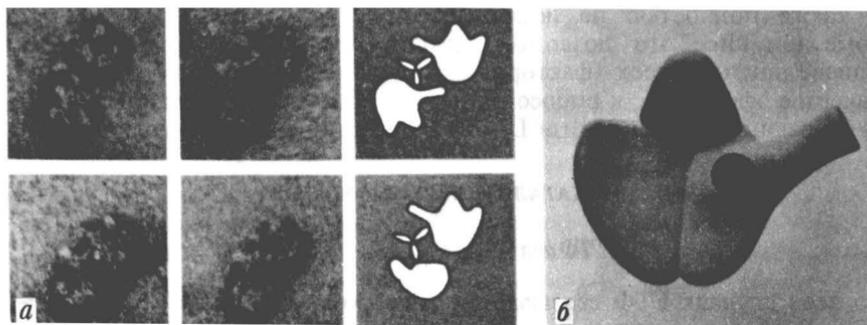


Рис. 88. Электронные микрофотографии рибосомных 50S субчастиц с присоединенным EF-G, прореагировавших с антителами против EF-G (а), и фотография модели 50S субчастицы с обозначением (черный кружок) приблизительного местоположения EF-G на субчастице (б) (предоставлены В. Д. Васильевым, Институт белка АН СССР, Пушино)

нии комплекса EF-G с 70S рибосомой. Это говорит о локализации EF-G где-то у границы раздела между рибосомными субчастицами.

Прямая локализация места присоединения EF-G на 50S субчастице была сделана с помощью метода иммунной электронной микроскопии. Для этого было получено фотоактивируемое (арилазидное) производное EF-G (см. рис. 82,4) и сначала специфически присоединено к частице в присутствии ГТФ и фусидовой кислоты; затем путем облучения была образована ковалентная сшивка между EF-G и местом его прикрепления. 50S субчастицы с таким ковалентно закрепленным белком EF-G были обработаны антителами против EF-G и комплексы изучены с помощью электронной микроскопии. На рис. 88 видно, что место присоединения антитела указывает на район у основания L7 / L12-стержня на контактирующей поверхности 50S субчастицы. Следовательно, EF-G-связывающий участок расположен в этом районе.

Другой белок — EF-T_u — поступает на рибосому в виде комплекса Aa-tRNA · EF-T_u · GTP. В составе такого комплекса он взаимодействует с рибосомой, и можно показать, что место его взаимодействия — 50S субчастица. Присутствие EF-G на 50S субчастице препятствует взаимодействию EF-T_u с рибосомой, откуда можно заключить, что EF-T_u-связывающий участок совпадает или перекрывается с EF-G-связывающим участком. Как и в случае EF-G, антитела против белка L7 / L12, и только они, ингибируют взаимодействие EF-T_u с рибосомой. Удаление белка L7 / L12 сильно уменьшает взаимодействие EF-T_u с рибосомой, но не исключает его полностью, и EF-T_u может выполнять свои функции на рибосомах без белка L7 / L12, хотя не так эффективно; следовательно, EF-T_u, по-видимому, тоже связывается с 23S РНК.

Фактор инициации IF-2 и фактор терминации RF тоже конкурируют как с EF-T_u, так и с EF-G за место посадки. Их взаимодействие с рибосомой также зависит от присутствия белка L7 / L12

и также полностью не исключается, когда белка L7 / L12 на рибосоме нет. Все это позволяет думать, что существует общность в присоединении всех факторов трансляции, использующих ГТФ в качестве эффектора, к рибосоме, и что рибосома имеет единый фактор-связывающий район вблизи L7 / L12-стержня на 50S субчастице.

3. КАТАЛИТИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ

ГТФаза

Во всех случаях ГТФ связывается фактором трансляции (EF-T_u, EF-G, IF-2, RF-2 или их эукариотическими аналогами) до его присоединения к рибосоме. Поэтому очевидно, что ГТФ-связывающий центр должен находиться на самом факторе. Однако гидролиз связанного ГТФ до ГДФ и ортофосфата происходит **после** присоединения фактора к рибосоме. Другими словами, для ГТФазной активности нужны как факторный белок, так и рибосома, в их комплексе. Присоединение фактора с ГТФ к рибосоме вызывает гидролиз ГТФ. Отсюда было бы логично предполагать, что ГТФазный центр формируется совместно факторным белком и рибосомой.

До сих пор, однако, окончательно не ясно, так это или нет. Сомнения в том, что это так, порождаются двумя группами фактов. Во-первых, в ряде опытов с фотоактивируемыми аналогами ГТФ (см. рис. 82,3) было показано, что если после образования комплекса рибосома · EF-G · GTP индуцировать химическую сшивку ГТФ с окружающими группами, то атакуется преимущественно EF-G, но не компоненты рибосомы, независимо от того, к какой части ГТФ прикреплена фотоактивируемая группа. Во-вторых, был найден агент — антибиотик кирромицин (см. рис. 96), — который индуцировал собственную ГТФазную активность EF-T_u, без рибосомы. Поэтому сейчас более принята точка зрения, что присоединение фактора к рибосоме активирует собственный ГТФазный центр фактора, а сама рибосома не имеет ни готового ГТФазного центра, ни какого-либо компонента ГТФазного центра фактора.

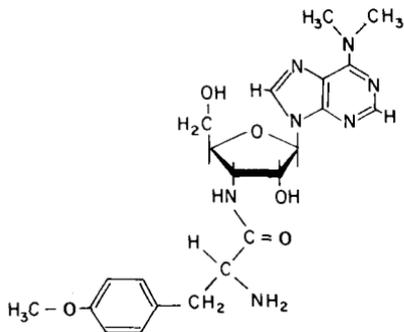
Несмотря на указанные факты, все-таки пока нельзя исключить той возможности, что ГТФазный центр фактора не вполне завершен и какие-то компоненты рибосомы (возможно даже рибосомная РНК) принимают прямое участие в его завершении.

Пептидилтрансфераза

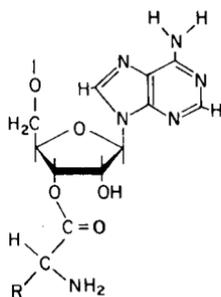
Главная каталитическая активность рибосомы, ответственная за весь синтез полипептидной цепи, есть ее пептидилтрансферазная активность. В транслирующей рибосоме реакция транспептидации протекает между пептидил-тРНК и аминокцилл-тРНК:



В этой реакции пептидил-тРНК является донорным субстратом, а аминокцилл-тРНК — акцепторным субстратом.



ПУРОМИЦИН



АМИНОАЦИЛИРОВАННЫЙ
3'-КОНЕЦ tРНК

Рис. 89. Антибиотик пуромицин (слева) как аналог аминокцилированного 3'-концевого аденозина аминокцил-tРНК (справа).

Однако рибосома может катализировать транспептидацию не обязательно только между этими природными субстратами. Антибиотик пуромицин оказался прекрасным низкомолекулярным акцепторным субстратом реакции. Действительно, по своей химической природе он является аналогом аминокцилированного 3'-концевого аденозина молекулы аминокцил-tРНК (рис. 89); его особенностями являются диметилированная NH_2 -группа при 6-м атоме аденинового остатка, метилированная оксигруппа тирозина как аминокцильного остатка и амидная связь вместо сложноэфирной между рибозой и аминокцильным остатком. Добавление пуромицина к транслирующим рибосомам приводит к тому, что антибиотик как акцепторный субстрат реагирует с донорным субстратом в пептидилтрансферазном центре рибосомы:



Таким образом, пептидил оказывается переброшенным не на аминокцил-tРНК, а на низкомолекулярное соединение, не удерживаемое прочно в рибосоме; в итоге пептидилпуромицин освобождается из рибосомы, т.е. пуромицин приводит к аборту растущего пептида.

Использование пуромицина сыграло большую роль в изучении пептидилтрансферазного центра рибосомы. Прежде всего, с его помощью удалось установить, на какой из двух рибосомных субчастиц локализован пептидилтрансферазный центр. Известно, что изолированная 50S субчастица может удерживать на себе пептидил-tРНК, а также лабильно взаимодействовать с 3'-концевыми фрагментами N-блокированных аминокцил-tРНК как донорными субстратами. Если к таким 50S частицам с пептидил-tРНК или ее аналогом добавить пуромицин, то между ними идет пептидилтрансферазная реакция. Следовательно, пептидилтрансферазный центр целиком локализован на 50S субчастице (или на 60S субчастице у эукариот).

Малая (30S или 40S) субчастица никакого вклада в катализ реакции не вносит.

Субстратами собственно пептидилтрансферазного центра рибосомы являются, как было показано, не целиком пептидил-тРНК и аминок-ацил-тРНК, а лишь 3'-концевые части тРНК с примыкающими аминок-ацильными остатками. В отношении акцепторного субстрата это ясно уже из рассмотрения структуры пурамицина. Кроме пурамицина, хорошим акцепторным субстратом может быть ряд аминок-ациладенозинов (A-Phe, A-Tyr, A-Lys, A-Met, A-Ala, и др.), хотя рА-Аа и особенно СрА-Аа обычно еще более активны. Донорными субстратами могут быть рА-(Ас-Аа) или рА-(F-Аа), а еще лучше СрСрА-(Ас-Аа) или СрСрА-(F-Аа). Поэтому, если к изолированным вакантным 50S субчастицам добавить такие аминок-ацилолигонуклеотиды, как СрСрА-(F-Met) и пурамицин или A-Phe, то 50S субчастица будет работать как обычный фермент, катализируя реакцию транспептидации между низкомолекулярными субстратами:



Оба продукта на 50S субчастице не удерживаются и сразу появляются в растворе.

Естественно, что неоднократно предпринимались настойчивые попытки выделить «фермент» из 50S субчастицы, т. е. найти рибосомный белок, ответственный за катализ транспептидации. Однако ни в одном случае изолированные белки такой активностью не обладали. Было решено, что ферментная белковая структура, состоящая, возможно, из нескольких белков, интегрирована в 50S субчастице так, что при выделении белков она разрушается.

Различные аналоги пептидил-тРНК и аминок-ацил-тРНК, несущие химически активную или фотоактивируемую группу на аминок-ацильном остатке при 3'-конце тРНК (см. рис. 81 и 82,1), такие как различные N^α-бромацетиламиноацил-тРНК, N^ε-бромацетиллизил-тРНК, N-(*пара*-нитрофеноксикарбонил)-фенилаланил-тРНК, N-(2-нитро-4-азидофенил)-глицилфенилаланил-тРНК и другие, были использованы как аффинные метки для идентификации белков в районе пептидилтрансферазного центра. В большинстве опытов наиболее интенсивные сшивки образовывались с белками L2 и L27; белки L6, L11, L16, L18 и L33 также часто отмечались как сшиваемые соседи субстратов пептидилтрансферазного центра.

В опытах по частичной разборке и реконструкции 50S субчастиц критичными для пептидилтрансферазной активности были белки L6, L11 и L16; их добавление к производным 50S субчастицы, лишенным более трети исходных белков, восстанавливало активность. Однако позже выяснилось, что добавление только одного белка L16, но в большом избытке, тоже восстанавливает пептидилтрансферазную активность; оказалось, что белки L6 и L11 лишь помогают белку L16 прочно встроиться в частицу. Далее были получены данные, еще более подтверждавшие ключевую роль белка L16 в организации пептидилтрансферазного центра: химическая модификация его гистидинового остатка инактивировала пептидилтрансферазу. Тем не менее,

в конце концов оказалось, что и встроенный белок L16 не является пептидилтрансферазой или ее активным участком: в модифицированных ионных условиях при наличии других белков 50S субчастицы без белка L16 проявляют хорошую пептидилтрансферазную активность.

В то же время, опыты с аффинным мечением пептидилтрансферазного центра активными аналогами аминокил-тРНК или пептидил-тРНК неоднократно указывали, что хотя белки действительно часто обнаруживаются как сшиваемые соседи, но рибосомная 23S РНК является наиболее предпочтительной мишенью. Сшивки преимущественно с 23S РНК были получены во многих опытах, включая пионерскую работу Д. Г. Кнорре и А. С. Гиршовича с сотрудниками, впервые применившими принцип аффинного мечения для изучения функциональных центров рибосомы. Идентификация места сшивки акцепторного конца тРНК, несущего фотоактивируемую метку, с 23S РНК, а также нуклеотидные замены в 23S РНК при мутациях, затрагивающих пептидилтрансферазный центр, указывают на его положение в районе эволюционно консервативной последовательности 2450—2600 предпоследнего домена (домен V) (см. рис. 45). Нельзя исключить, что пептидилтрансферазный центр организован преимущественно 23S РНК, а не белками. Однако на сегодняшний день более осторожной точкой зрения является предположение о совместном участии 23S РНК (домена V) и некоторых белков 50S субчастицы в организации пептидилтрансферазного центра.

Локализация пептидилтрансферазного центра на морфологически видимой поверхности 50S субчастицы может быть сделана на основании знания того, с какими белками комплексирована последовательность 2450—2600 домена V 23S РНК, при условии, если положения этих белков известны из иммуноэлектронной микроскопии. Известно, что с этой последовательностью связан белок L6, который локализован с помощью иммуноэлектронной микроскопии у основания L7 / L12-стержня. Действительно, согласно данным по химическим сшивкам бифункциональными реагентами, белок L6 является соседом белков L7 / L12, L10 и L11, расположенных в стервне и его основании. С другой стороны, пептидилтрансферазный центр должен соседствовать с головкой (центральным протуберанцем) 50S субчастицы, так как район 23S РНК, который связывает 5S РНК-белковый комплекс и, следовательно, входит в состав головки (последовательность 2250—2350), и район, который участвует в формировании пептидилтрансферазного центра (последовательность 2450—2600), — близкие части одного и того же домена V (третья, 5'-проксимальная часть этого же домена 23S РНК связывает белок L1, расположенный на боковой лопасти 50S субчастицы). Это подтверждается тем фактом, что такой белок 5S РНК-белкового комплекса и, следовательно, головки, как L18, обнаруживается среди компонентов, реагирующих с активными аналогами субстратов пептидилтрансферазного центра. Другие белки, реагирующие с активными аналогами субстратов, такие как L2, L11 и L16, являются соседями 5S РНК-белкового комплекса, как следует из их сшивок бифункциональными реагентами либо с белком L5, либо с белком L25.

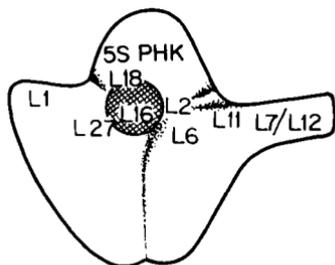


Рис. 90. Схема приблизительного расположения пептидилтрансферазного центра (заштрихованная область) на контактирующей поверхности рибосомной 50S субчастицы

контактирующей (вогнутой) поверхности, где-то совсем рядом с головкой (центральным протуберанцем), скорее всего в районе желобка, отделяющего головку от остального тела.

Схематически вероятное положение пептидилтрансферазного центра на 50S субчастице показано на рис. 90.

4. ФУНКЦИИ ПЕРЕМЕЩЕНИЙ ЛИГАНДОВ (ТРАНСЛОКАЦИЯ)

В рабочем цикле рибосомы после реакции транспептидации имеют место одновременные перемещения ее трех крупных лигандов — мРНК, пептидил-тРНК и деацилированной тРНК. Это может быть названо механической функцией рибосомы. Ни одна из изолированных рибосомных субчастиц не обладает, по-видимому, такой функцией, даже частично. Вероятно, механическая функция является следствием именно двухсубчастичного строения рибосомы.

Естественно, что в поисках молекулярных механизмов, ответственных за направленные перемещения крупных лигандов, необходимо обратить внимание прежде всего на возможности крупномасштабных перемещений частей самой рибосомы. Построение рибосомы из двух субчастиц, относительно лабильно ассоциированных в отсутствие лигандов, в принципе представляет такую возможность: субчастицы могли бы быть способны смещаться друг относительно друга при функционировании либо путем небольшого размыкания и смыкания, либо относительного скольжения. Имеется экспериментальное указание о небольшом изменении (уменьшении) компактности рибосомы в процессе транслокации, что может свидетельствовать в пользу первого способа взаимного смещения субчастиц, предполагающего размыкание при транслокации.

Другой возможный подвижный элемент рибосомы — это L7/L12-стержень 50S субчастицы. Ряд данных говорит о его прямом участии в функционировании белковых факторов трансляции и, в част-

Иммуноэлектронно-микроскопические наблюдения, где использовались антитела против пуромидина, ковалентно фиксированного в пептидилтрансферазном центре, также указывали на его положение у головки (центрального протуберанца) 50S субчастицы, но скорее с другой стороны, а именно со стороны L1 ребра (хотя нельзя исключать, что последнее могло бы быть артефактом вследствие искажения положения антитела при специфической ориентации 50S субчастицы — контактирующей стороной к подложке). В целом можно утверждать, что пептидилтрансферазный центр на 50S субчастице должен быть расположен на ее кон-

ности, EF-G, катализирующего транслокацию. Было бы не очень удивительным, если бы оказалось, что подвижность L7 / L12-стержня играет роль в перемещениях лигандов при транслокации (а также, возможно, и при поступлении аминоктил-tРНК в рибосому).

Нельзя исключать также возможности междоменной подвижности в рибосомных субчастицах, и особенно в малой субчастице, которая в целом представляется более лабильной и изменчивой, чем большая субчастица.

Рекомендуемая литература

- Итоги науки и техники. Сер. молекул биол. — М.: ВИНТИ. 1977. Т. 9. С. 6—115.
- Итоги науки и техники. Сер. биол. химия — М.: ВИНТИ. 1981. Т. 15. С. 116—174.
- Спирин А. С., Гаврилова Л. П. Рибосома. М.: Наука, 1971.
- Спирин А. С. О механизме работы рибосомы. Гипотеза смыкания-размыкания субчастиц. — Докл. АН СССР, 1968. Т. 179. С. 1467—1470.
- Спирин А. С., Баранов В. И., Сердюк И. Н., Май П. П. Изменение компактности рибосомы при транслокации. — Докл. АН СССР, 1984. Т. 274. С. 1260—1266.
- The Mechanism of Protein Synthesis. — Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1969, v. 34, p. 49—67; 197—207; 621—630.
- Chambliss G. et al., eds. Ribosomes: Structure, Function, and Genetics. Baltimore: Univ. Park Press, 1980, p. 89—110; 267—294; 497—581.
- Cohn W. E., ed. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. N. Y.: Acad. Press, 1979, v. 23, p. 1—51.
- Nomura M., Tissières A., Lengyel P., eds. Ribosomes. N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1974, p. 309—331; 573—585; 711—731.
- Weissbach H., Pestka S., eds. Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis. N. Y.: Acad. Press, 1977, p. 203—244.
- Bretscher M. S. Translocation in protein synthesis: A hybrid structure model. — Nature, 1968, v. 218, p. 675—677.
- Chinali G., Wolf H., Parmeggiani A. Effect of kirromycin on elongation factor T_u . Location of the catalytic center for ribosome · elongation-factor- T_u GTPase activity on the elongation factor. — Eur. J. Biochem., 1977, v. 75, p. 55—65.
- Girshovich A. S., Kurtshalia T. V., Ovchinnikov Yu. A., Vasiliev V. D. Localization of the elongation factor G on *Escherichia coli* ribosomes. — FEBS Lett., 1981, v. 130, p. 54—59.
- Gudkov A. T., Gongadze G. M., Bushuev V. N., Okon M. S. Proton magnetic resonance study of the ribosomal protein L7 / L12 *in situ*. — FEBS Lett., 1982, v. 138, p. 229—232.
- Hamel E., Koka M., Nakamoto T. Requirement of an *E. coli* 50S ribosomal protein component for effective interaction of the ribosome with T and G factors and with guanosine triphosphate. — J. Biol. Chem., 1972, v. 247, p. 805—814.
- Koteliansky V. E., Domogatsky S. P., Gudkov A. T., Spirin A. S. Elongation factor-dependent reactions on ribosomes deprived of proteins L7 and L12. — FEBS Lett., 1977, v. 73, p. 6—11.
- Lipmann F. Polypeptide chain elongation in protein biosynthesis. — Science, 1969, v. 164, p. 1024—1031.
- Monro R. E. Catalysis of peptide bond formation by 50S ribosomal subunits from *Escherichia coli*. — J. Mol. Biol., 1967, v. 26, p. 147—151.
- Noller H. F., Kap J. A., Wheaton V. et al. Secondary structure model for 23S ribosomal RNA. — Nucleic Acids Res., 1981, v. 9, p. 6167—6189.
- Traut R. R., Monro R. E. The puromycin reaction and its relation to protein synthesis. — J. Mol. Biol., 1964, v. 10, p. 63—72.
- Watson J. D. The synthesis of proteins upon ribosomes. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1964, v. 46, p. 1399—1425.

ЭЛОНГАЦИЯ: ПОСТУПЛЕНИЕ АМИНОАЦИЛ-ТРНК В РИБОСОМУ

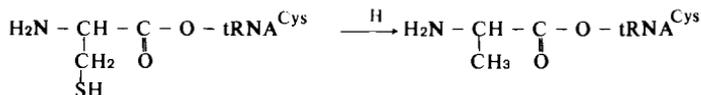
1. КОДОН-АНТИКОДОНОВОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ

Рассмотрение элонгационного цикла удобно начать с состояния транслирующей рибосомы, когда пептидил-тРНК занимает Р-участок, а А-участок с установленным там кодоном матричного полинуклеотида вакантен (см. рис. 80, верх). Такая рибосома способна к связыванию очередной аминоацил-тРНК.

Хотя связывание аминоацил-тРНК с А-участком рибосомы осуществляется, по-видимому, несколькими связывающими центрами участка и, соответственно, по нескольким точкам молекулы, специфичность связанной аминоацил-тРНК определяется лишь кодоном матричного полинуклеотида. Другими словами, именно кодон ответствен за выбор соответствующей ему аминоацил-тРНК («своей» аминоацил-тРНК), т.е. тРНК с аминокислотным остатком, кодируемым данным кодоном.

Адапторная гипотеза и ее доказательство

Согласно адапторной гипотезе Ф. Крика, структура аминокислотного остатка не имеет отношения к выбору аминоацил-тРНК кодоном. Кодон комплементарно взаимодействует лишь с самой тРНК как адаптором, и, следовательно, тот аминокислотный остаток, который был присоединен к адапторной тРНК заранее, оказывается автоматически навязанным рибосоме, никак не участвуя в узнавании кодона. Решающее доказательство этого положения адапторной гипотезы было дано в блестящих экспериментах групп Ф. Липманна и С. Бензера. Цистеинил-тРНК^{Cys} была каталитически восстановлена на никеле Ренея, так что цистеиновый остаток превратился в аланиновый, оставаясь присоединенным к тРНК^{Cys}:



Когда Ala-tRNA^{Cys} была добавлена в бесклеточную систему с рибосомами, программированными статистическим сополимером поли(U,G), кодирующим Phe, Leu, Val, Gly, Trp и Cys, но не кодирующим Ala, наблюдался синтез полипептида, содержащего Ala. В другом опыте Ala-tRNA^{Cys} добавлялась в ретикулоцитную бесклеточную систему синтеза глобина на естественной мРНК, и в синтезируемой полипептидной цепи в положениях, где в норме должны быть остатки Cys, наблюдались остатки Ala.

Таким образом, узнавание кодона осуществляется тРНК. Было постулировано, что узнавание кодона происходит посредством спаривания с комплементарным нуклеотидным триплетом адаптора. Следовательно, выбор аминокил-тРНК должен определяться комплементарностью кодона с этим триплетом, получившим название антикодона. Ярким экспериментальным доказательством решающей роли кодон-антикодоновой комплементарности в связывании аминокил-тРНК является получение мутационно измененных тРНК с точечной заменой нуклеотида в положениях 34–36 (см. рис. 22), соответствующих антикодону. Так, когда в тРНК^{Tyr} *E. coli* ее антикодон GUA изменен в CUA, Тург-tRNA^{Tyr}_{CUA} перестает узнавать тирозиновый кодон UAC, а вместо этого узнает терминаторный кодон UAG.

Итак, выбор аминокил-тРНК для связывания в А-участке рибосомы осуществляется посредством комплементарного кодон-антикодонового взаимодействия. Это значит, что между кодоном и антикодоном должен образоваться комплекс с параметрами двойной спирали Уотсона — Крика (типа А-формы), существенными моментами которой являются антипараллельность цепей, образование стандартных пар оснований А · U, U · A, G · C и C · G, скрепленных водородными связями, и межплоскостные взаимодействия (стэкинг) оснований. Если рассмотреть вышеприведенный пример с тирозиновой тРНК, то ее исходный антикодон и мутационно измененный антикодон должны спариваться соответственно с тирозиновым кодоном и терминаторным кодоном следующим образом:



Гипотеза нестрогого соответствия при кодон-антикодоновом спаривании

Однако оказалось, что такое строгое каноническое спаривание оснований не является общим правилом для взаимодействия первого остатка антикодона с третьим остатком кодона. Прежде всего было замечено, что если аминокислота кодируется двумя, тремя или четырьмя кодонами, то первые два нуклеотидных остатка кодонов всегда идентичны, а третий различается (см. рис. 3). Следовательно, аминокислота строго кодируется двумя первыми буквами кодона и менее строго — третьей. С другой стороны, было обнаружено, что рибосомы, запрограммированные разными кодонами для одной и той же аминокислоты, могут связывать одну и ту же тРНК, т.е. тРНК может узнавать более чем один кодон. Например, одна и та же фенилаланиновая тРНК узнает как UUU, так и UUC. Анализируя эти и некоторые другие факты, Ф. Крик выдвинул гипотезу о неоднозначном спаривании первого нуклеотида антикодона с третьим остатком кодона; он предположил возможность нестрогого соответствия

АНТИКОДОН

1-е ПОЛОЖЕНИЕ

КОДОН

3-е ПОЛОЖЕНИЕ

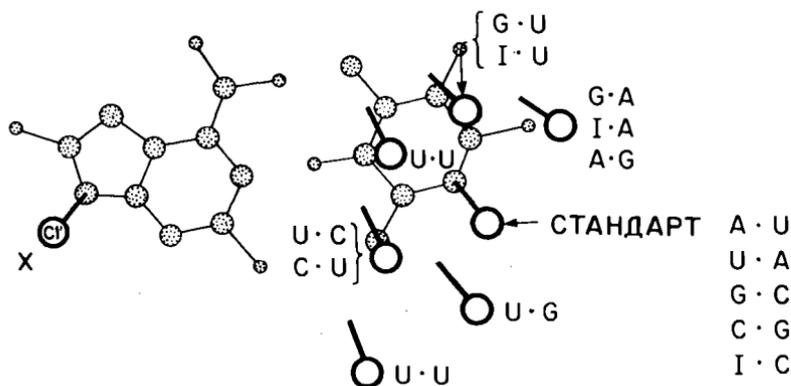


Рис. 91. Относительные положения и направления N-гликозидных связей нуклеозидных остатков при спаривании первого основания антикодона (слева) с третьим основанием кодона (справа) (по F. H. Crick, J. Mol., 1966, v. 19, p. 548–555):

жирные кружки — положения C1' атомов; толстые отрезки — N-гликозидные связи; стандартная пара A·U, обозначенная тонкими кружками и линиями, приведена для сравнения. Если атом C1' нуклеотидного остатка антикодона фиксируется в положении X, атом C1' нуклеотидного остатка кодона находится либо в стандартном положении (в случае стандартных пар), либо в положении, несколько отклоняющемся от стандартного (в случае «нестрогих» пар)

(wobble) в этом положении. Это значит, что здесь, в дополнение к стандартному спариванию A·U, U·A, G·C и C·G, а также I·C (I, являясь дезаминированным производным А, спаривается так же, как G), могут иметь место нестандартные (неканонические) пары, **не сильно отличающиеся** по геометрическим параметрам от стандартных. Такими парами могли бы быть A·G, G·A и I·A; G·U и I·U; U·G; U·U, U·C и C·U (рис. 91). Однако необходимо было принять во внимание следующие черты кодового словаря (см. рис. 3): 1) U и C в третьем положении кодона всегда эквивалентны с точки зрения кодовой специфичности; 2) A и G в третьем положении кодона, как правило (но не всегда), эквивалентны; 3) пиримидиновые нуклеотиды (U, C) и пуриновые нуклеотиды (A, G), по крайней мере иногда, не эквивалентны в третьем положении кодона.

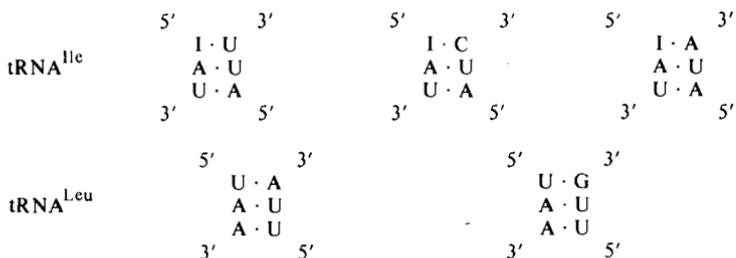
По физическим соображениям Крик исключил пары A·G и G·A, так как такого рода взаимодействие привело бы к дегидратации NH₂-группы гуанина, что крайне невыгодно энергетически. Далее, принимая во внимание вышеуказанные черты кодового словаря, он исключил возможность спаривания U·U, U·C и C·U (иначе пиримидиновые и пуриновые нуклеотиды в третьем положении были бы всегда эквивалентны с точки зрения кодовой специфичности, что противоречило экспериментальным данным). В итоге получились сле-

дующие правила спаривания первого нуклеотида антикодона с нуклеотидом в третьем положении кодона:

A спаривается с U;
 G спаривается с C
 и U;
 I спаривается с C
 U
 и A;
 U спаривается с A
 и G;
 C спаривается с G.

При этом уже было известно, что I действительно часто встречается в антикодонах тРНК и что A в первом положении антикодона вряд ли встречается, а скорее всего, всегда превращен в I посредством энзиматического дезаминирования. Все типы нестрогого спаривания оснований, предложенные Криком, в сравнении со строгим стандартным спариванием даны на рис. 92 (см. цветную вклейку).

Если следовать гипотезе Крика, то не может быть отдельного смыслового кодона, кончающегося на A, для кодирования какой-то аминокислоты. Действительно, AUA вместе с AUU и AUC кодируют изолейцин, или, например, UUA вместе с UUG кодируют лейцин, но один UGA не кодирует никакой аминокислоты. Гипотеза предсказывает, что все три кодона изолейцина должны узнаваться одной тРНК с антикодоном IAU, а два указанных кодона лейцина — одной тРНК с антикодоном UAA:



Далее, согласно гипотезе, когда аминокислота кодируется только двумя кодонами, I не может быть в антикодоне тРНК. Следовательно, гипотеза предсказывает, что в фенилаланиновых, тирозиновых, цистеиновых, гистидиновых, глютаминовых и глютаминиловых, аспарагиновых и аспарагиниловых тРНК никогда не может быть I в первом положении антикодона.

Наконец, когда аминокислота кодируется четырьмя кодонами, для нее должно существовать не менее двух тРНК с разными антикодонами: либо одна для узнавания U и C, а другая — A и G в третьем положении кодона (соответственно с G и U в первом положении антикодона), либо одна для узнавания U, C и A, а другая — только G в третьем положении кодона (соответственно с I и C в первом положении антикодона).

Само существование нестрогого соответствия при первом положении антикодона — третьем положении кодона, а также большинство правил и предсказаний гипотезы было подтверждено всем последующим экспериментальным материалом.

Поправки к правилам нестрогого соответствия

Однако были обнаружены также и несоответствия, потребовавшие некоторых коррекций правил. Например, в дрожжах изоакцепторные тРНК^{Ser}, читающие кодоны UCU, UCC, UCA и UCG, имеют антикодоны IGA, U*GA (где U* — модифицированный U) и CGA; все они, включая тРНК^{Ser}_{U*GA}, оказались строго необходимыми для трансляции *in vivo*, что указывает, по-видимому, на неспособность тРНК^{Ser}_{IGA} хорошо узнавать кодон UCA в естественных условиях. Действительно, до сих пор нельзя считать доказанным, что I одинаково хорошо спаривается с C, U и A в третьем положении кодона; и не исключено, что для кодонов, оканчивающихся на A, могут существовать свои изоакцепторные тРНК.

С другой стороны, имеются и противоположные указания, полученные в основном *in vitro*, что I в некоторых случаях (а также G и модифицированный U) может спариваться со всеми четырьмя основаниями в третьем положении кодона; во всяком случае, дрожжевая тРНК^{Val} с антикодоном IAC считывает все четыре валиновых кодона в бактериальной бесклеточной системе (хотя последнее может быть следствием не совсем нормальных условий *in vitro* и происходить по тому же механизму, что и ложное кодирование — см. В. II.5). На основании таких опытов *in vitro* У. Лагерквист предложил гипотезу «два из трех», согласно которой для восьми несмешанных кодоновых семей (Leu, Val, Ser, Pro, Thr, Ala, Arg и Gly) узнавание кодонов антикодонами их тРНК происходит только по первым двум нуклеотидам, тогда как третий нуклеотид кодона участия в узнавании не принимает и может быть любым. Физическим основанием такого способа кодон-антикодонного узнавания могло бы быть то обстоятельство, что спаривание первых двух положений кодона с антикодоном особенно сильно в перечисленных случаях кодоновых семей, например, за счет участия G·C и C·G пар и за счет предполагаемого стабилизирующего вклада пуринового основания во втором положении антикодона.

Другая группа несоответствий была обнаружена при изучении митохондриального кода и митохондриальных тРНК. Было найдено, что митохондриальные тРНК, содержащие немодифицированный U в первом положении антикодона, узнают все четыре кодона, имеющие общие два первых нуклеотида. Так, тРНК^{Val} с антикодоном UAC узнает кодоны GUU, GUC, GUA и GUG; тРНК^{Ala} с антикодоном UGC узнает кодоны GCU, GCC, GCA и GCG. В тех случаях, когда нуклеотид в первом положении антикодона узнает только пуриновые нуклеотиды кодонов, U в митохондриальных тРНК оказался модифицированным. В тРНК бактерий и цитоплазматических тРНК эукариотических клеток U в первом положении антикодона,

как правило, модифицирован. Возможно, немодифицированный U в первом положении антикодона действительно хорошо спаривается со всеми четырьмя основаниями, и лишь модификации ограничивают его взаимодействия спариванием с пуриновыми нуклеотидами, т. е. правилами Крика. Не исключено, что некоторые модификации U могут ограничивать его узнавание одним А, как в примере с дрожжевой тРНК^{Ser}, имеющей антикодон U*GA.

Интересно отметить также, что в *E. coli* имеется минорный вид тРНК^{Ile}, которая узнает только изолейциновый кодон AUA; в первом положении ее антикодона находится неидентифицированное производное С (а не U). Это еще раз говорит в пользу существования специальных антикодонов, узнающих только кодоны, оканчивающиеся на А.

Стереохимия кодон-антикодонного спаривания

Структура антикодонной петли, описанная в А. III. 2, характеризуется спиральным ходом отрезка цепи, включающего три остатка антикодона и следующие за ним (по направлению к 3'-концу) остатки; параметры спирали близки к таковым одной цепи стандартной двойной спирали РНК, ее основания находятся в стэкинге, а три основания антикодона оказываются обращенными своими группами, ответственными за спаривание посредством водородных связей, наружу (см. рис. 20). Таким образом, антикодон готов образовать двуспиральный комплекс с комплементарной последовательностью без существенной перестройки своей пространственной структуры.

Если смотреть на L-образную молекулу тРНК вверх антикодоном с внешней стороны угла, то группы трех оснований антикодона, способные к спариванию посредством водородных связей, обращены более или менее по правую сторону от плоскости, содержащей обе ветви молекулы (см. рис. 22). Первое основание антикодона (положение нестрогого спаривания при кодон-антикодонном взаимодействии) находится на самой верхушке антикодонной ветви молекулы, а два других основания антикодона и два последующих основания петли спускаются от него по спирали, как винтовая лестница, слева вниз направо.

Когда антикодон тРНК образует комплекс с мРНК, образующийся элемент двойной спирали будет иметь стандартное Уотсон—Криковское спаривание вниз от верхушки антикодонной ветви и менее строгое спаривание на краю у верхушки. Это, естественно, соответствует большей стерической свободе крайней пары спирали по сравнению с внутренними парами (третья пара в антикодон-кодонном спаривании тоже может рассматриваться как внутренняя, так как она ограничивается в конформационных возможностях подпирающим ее и стэкингованным с ней пуриновым основанием антикодонной петли, а также, возможно, примыкающим антикодоном пептидил-тРНК). Кодон мРНК, взаимодействующий с антикодоном тРНК в А-участке, тоже должен принимать спиральную конформацию; возможно, такая конформация, готовая для взаимодействия с антикодоном, формируется

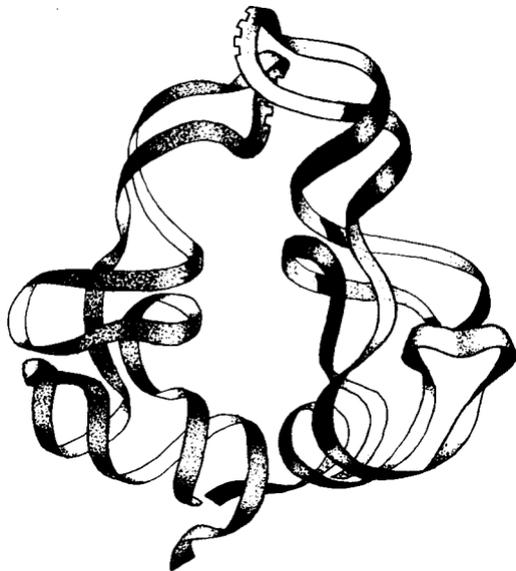


Рис. 93. Взаимная ориентация двух молекул тРНК в рибосоме, представленных в виде ленточных моделей:

антикодоны непосредственно соседствуют вдоль цепи мРНК, акцепторные концы тоже сближены, а углы в той или иной степени разведены

ми) (рис. 93). Отсюда следуют довольно жесткие требования относительно того, как могут быть расположены два кодон-антикодоновые двуспиральные элемента друг относительно друга.

По стереическим соображениям приходится допустить, что между кодон-антикодоновыми дуплексами, образуемыми между двумя тРНК и смежными кодонами мРНК, существует гибкое сочленение, позволяющее ориентировать две тРНК так, чтобы сближить их акцепторные концы. Очевидно, что такое гибкое сочленение возможно реализовать за счет вращения вокруг связей $C(3)-O-P-O-C(5)-C(4)$ межнуклеотидного мостика, соединяющего два кодона мРНК. Тогда в этом месте образуется некоторый излом, т. е. два кодон-антикодоновых дуплекса не будут коаксиальны и, соответственно, между ними не будет межплоскостного взаимодействия оснований (стэкинга) (рис. 94). Две L-образные молекулы тРНК будут располагаться так, что их плоскости, содержащие обе ветви молекулы, окажутся образующими друг с другом некоторый угол, а верхушки обеих ветвей (антикодоны и акцепторные концы) сближены (рис. 93).

2 УЧАСТИЕ ФАКТОРА ЭЛОНГАЦИИ (EF-T_u ИЛИ EF-1) В СВЯЗЫВАНИИ АМИНОАЦИЛ-тРНК

Кодонзависимое связывание аминоксил-тРНК с А-участком рибосомы катализируется белком, называемым фактором элонгации T_u (EF-T_u)

до связывания аминоксил-тРНК под влиянием соответствующего мРНК-удерживающего центра рибосомы.

Связывание аминоксил-тРНК в А-участке рибосомы в процессе элонгации предполагает, что Р-участок занят пептидил-тРНК. Показано, что в Р-участке сохраняется кодон-антикодонное взаимодействие между мРНК и тРНК. Это значит, что триплет нуклеотидов, непосредственно смежный с кодоном в А-участке по направлению к 5'-концу мРНК, тоже спарен и находится в спиральной конформации. Ориентация двух молекул тРНК на рибосоме должна быть только такой, при которой их аминокислотные концы сближены (для последующей реакции транспептидации между ними)

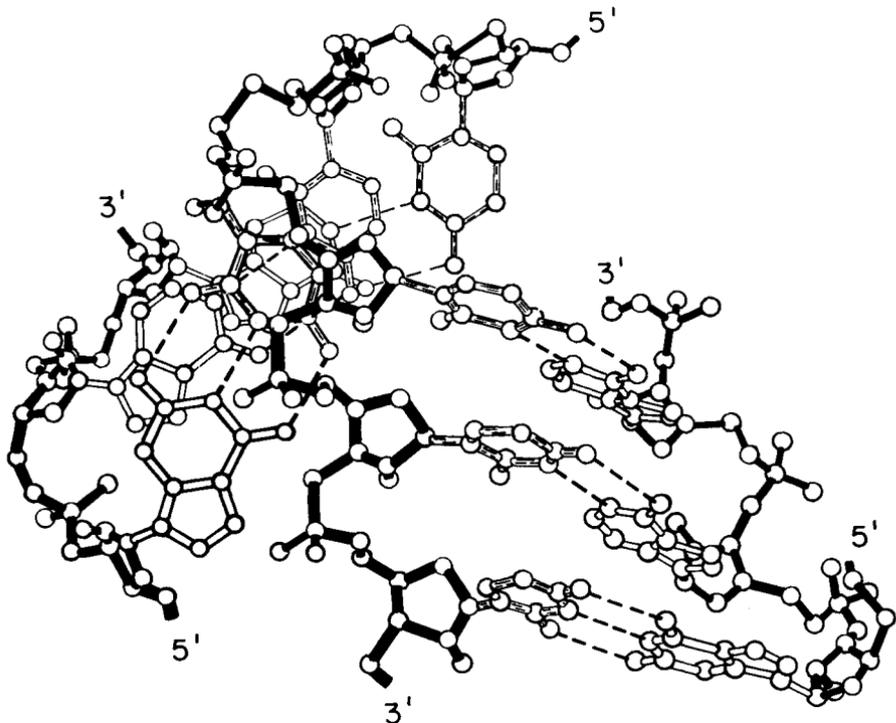


Рис. 94. Двуспиральные структуры, образованные двумя кодон-антикодоновыми комплексами в рибосоме: шаростержневое изображение без водородов (предоставлено В. И. Лимом, Институт белка АН СССР, Пушкино);

Цепь мРНК (шесть нуклеотидных остатков) видна в середине, антикодон акцепторной тРНК находится справа, а антикодон донорной тРНК слева; между двумя кодонами мРНК имеется излом, так что, если полинуклеотидный остов 3'-кодона мРНК лежит примерно в плоскости рисунка, направление цепи 5'-кодона почти перпендикулярно этой плоскости; пунктирные линии означают водородные связи между основаниями кодонов и антикодонов.

у прокариот или фактором элонгации 1 (EF-1) у эукариот. Аминоацил-тРНК поступает в рибосому в виде комплекса с этим белком и с ГТФ.

EF-T_u и его взаимодействия

EF-T_u представляет собой лабильный трехдоменный белок с молекулярной массой около 45 000 дальтон. Его полипептидная цепь состоит из 393 аминокислотных остатков (в случае *E. coli*). Общие размеры молекулы EF-T_u составляют 7,5×5,0×4,5 нм и, таким образом, сравнимы с размерами молекулы тРНК. Трехмерная структура белка находится в стадии интенсивного исследования. Плотный домен I молекулы охватывает последовательность 60–240, рыхлый домен II образован C-концевой последовательностью 300–393, а соединяющий их домен III построен из N-концевого участка цепи 1–60 и внутреннего участка 260–300. ГТФ-связывающий центр белка локализован на компактном

домене и содержит важную для функции SH-группу (Cys-137). Связывание аминоацил-тРНК с EF-T_u является, скорее всего, многоцентровым и охватывает, по крайней мере, два домена. Другая SH-группа того же домена (Cys-81) важна для связывания аминоацильной части молекулы тРНК. При связывании аминоацил-тРНК EF-T_u покрывает значительную часть, и в основном левую сторону, если смотреть на молекулу антикодоном вверх с внешней стороны угла, акцепторной ветви и центральной части L-образной молекулы тРНК.

Свободный EF-T_u может связывать как ГТФ, так и ГДФ, причем константа сродства к последнему на порядок выше. Свободный EF-T_u может взаимодействовать также с другим белком с молекулярной массой около 30 000 дальтон, обозначаемым как фактор элонгации T_s (EF-T_s); между EF-T_u и EF-T_s образуется комплекс EF-T_u · T_s (EF-T). Если EF-T_u связан с ГДФ, то EF-T_s, комплексируясь с EF-T_u, освобождает ГДФ:



Комплекс EF-T_u · T_s может взаимодействовать с ГТФ, давая EF-T_u · GTP и свободный EF-T_s при избытке ГТФ:



Таким образом, EF-T_s является фактором, вытесняющим ГДФ из медленно диссоциирующего комплекса EF-T_u · GDP и тем самым катализирующим обмен ГДФ на ГТФ, согласно суммарной реакции:



Свободный EF-T_u, комплекс EF-T_u · GDP и комплекс EF-T_u · T_s, если и обладают, то лишь небольшим сродством к аминоацил-тРНК. Только присоединение ГТФ индуцирует сильное сродство EF-T_u к аминоацил-тРНК, так что образуется тройственный комплекс:



Ни деацилированные, ни N-блокированные аминоацил-тРНК не связываются с EF-T_u · GTP; аминоацильный остаток и его свободная аминогруппа являются абсолютно необходимыми для образования тройственного комплекса. Природа боковой группы аминоацильного остатка не имеет принципиального значения (хотя определенные вариации сродства аминоацил-тРНК к комплексу EF-T_u · GTP в зависимости от боковой группы в литературе отмечались). Считается, что присоединение ГТФ наводит конформационное изменение в белке EF-T_u, так что он приобретает сродство к аминоацил-тРНК. Наоборот, ГДФ фиксирует EF-T_u в конформации, лишенной сродства к аминоацил-тРНК.

Подобным образом ведет себя и эукариотический EF-1. Различают две формы фактора — EF-1_L (легкая) и EF-1_H (тяжелая). Аналогом EF-T_u является EF-1_L; он представляет собой мономерный белок с молекулярной массой около 50 000 дальтон, способный связываться с ГТФ или ГДФ и образовывать тройственный комплекс Aa-tRNA · EF-1_L · GTP. EF-1_H является, по-видимому, агрегированным аналогом комплекса

EF-T_u · T_s; он состоит из EF-1_L (α-субъединица) и двух других белков (β- и γ-субъединицы) с молекулярными массами 30000 дальтон и 55000 дальтон, которые образуют между собой прочный комплекс. Похоже, что β-субъединица EF-1_u является аналогом EF-T_s, в то время как роль более крупной γ-субъединицы неизвестна; во всяком случае, в экспериментах *in vitro* β-субъединица и комплекс β · γ как будто бы функционально полностью взаимозаменяемы.

Связывание тройственного комплекса с рибосомой

Содержание EF-T_u (или EF-1) в клетках достаточно велико, так что практически вся аминоацил-тРНК находится в виде тройственных комплексов с белком и ГТФ. Как тРНК, так и белковая часть комплекса имеет сродство к рибосоме. В результате кодон-антикодонного узнавания комплекс с тРНК, соответствующей кодону матрицы, оказывается связанным в рибосоме.

Кодонзависимая ассоциация тройственного комплекса с рибосомой индуцирует гидролиз связанного ГТФ до ГДФ и ортофосфата. Ортофосфат освобождается, а EF-T_u оказывается теперь в комплексе с ГДФ и, соответственно, утрачивает сродство как к рибосоме, так и к аминоацил-тРНК; происходит освобождение EF-T_u · GDP из рибосомы. Аминоацил-тРНК остается в А-участке и только теперь становится способной вступить в реакцию с пептидил-тРНК. Таким образом, после образования тройственного комплекса имеет место следующая последовательность реакций:

- (1) Aa-tRNA · EF-T_u · GTP + RS · mRNA → RS · mRNA · Aa-tRNA · EF-T_u · GTP;
- (2) RS · mRNA · Aa-tRNA · EF-T_u · GTP + H₂O → RS · mRNA · Aa-tRNA · EF-T_u · GDP + P_i;
- (3) RS · mRNA · Aa-tRNA · EF-T_u · GDP → RS · mRNA · Aa-tRNA + EF-T_u · GDP

Роль гидролиза ГТФ

Что будет, если вместо ГТФ использовать его нерасщепляемый аналог — гуанилилметилendifосфонат (GMP-PCP) или гуанилилимидодифосфат (GMP-PNP)? EF-T_u (так же как и эукариотический EF-1) способен взаимодействовать с аналогом, так что белок приобретает сродство к аминоацил-тРНК. Белок, аналог ГТФ и аминоацил-тРНК образуют тройственный комплекс. Тройственный комплекс связывается с рибосомой. Однако следующая реакция (2) не происходит, EF-T_u продолжает сохранять сродство к аминоацил-тРНК и рибосоме, и аминоацил-тРНК остается сидеть в рибосоме вместе с белком и нерасщепляемым аналогом ГТФ. В этом случае аминоацил-тРНК неспособна служить акцепторным субстратом в реакции транспептидации с пептидил-тРНК и следующая стадия элонгационного цикла оказывается блокированной.

Можно предложить два объяснения неспособности аминоацил-тРНК в комплексе с EF-T_u участвовать в транспептидации. Согласно одному, тройственный комплекс Aa-tRNA · EF-T_u · GTP или Aa-tRNA · EF-T_u · GMP-PCP поступает в рибосому и связывается с кодоном матрицы, но тРНК не занимает А-участка, пока не произойдет расщепления ГТФ и освобождения EF-T_u. Соответственно, постулируется существование

специального участка такого предварительного кодонзависимого связывания аминоксил-тРНК, обозначаемого как «R-участок» («recognition site»). (В предполагаемом «R-участке» тРНК взаимодействует с кодоном матрицы, установленным в А-участке, так что «R-участок» не является независимым и отдельным, а перекрывается с А-участком.) Гидролиз ГТФ мог бы рассматриваться как источник энергии для перемещения аминоксил-тРНК из «R-участка» в А-участок. При использовании нерасщепляемого аналога ГТФ аминоксил-тРНК должна застрять в «R-участке» и потому не реагировать с пептидил-тРНК.

Вместе с тем имеются две группы экспериментальных данных, которые показывают, что дело обстоит не совсем так. С одной стороны, аминоксил-тРНК, связанную с рибосомой при участии EF-T_u и нерасщепляемого аналога ГТФ (например, GMP-PCP), оказалось возможным сделать активной в транспептидации без гидролиза ГТФ, а путем простой отмывки EF-T_u с аналогом из рибосомы. С другой стороны, аминоксил-тРНК, связанная с рибосомой при участии EF-T_u и ГТФ, не становится, как показано, способной к реакции с пептидил-тРНК в результате гидролиза ГТФ, если EF-T_u не уходит с рибосомы. Действительно, имеется ингибитор элонгации — антибиотик кирромицин, — механизм действия которого состоит в следующем: он связывается с EF-T_u, увеличивая его сродство к рибосоме, так что все стадии связывания EF-T_u с ГТФ, затем с аминоксил-тРНК и, наконец, с рибосомой идут как будто бы нормально, но после гидролиза ГТФ комплекс EF-T_u · GDP не освобождается; в результате, следующий шаг элонгационного цикла — транспептидация — оказывается блокированным.

Второе объяснение неспособности аминоксил-тРНК в комплексе с EF-T_u участвовать в транспептидации состоит в том, что EF-T_u как крупный белок, связанный с аминоксил-тРНК молекулой аминоксил-тРНК в А-участке, просто закрывает (экранирует) аминоксил-тРНК от взаимодействия с пептидилтрансферазным центром и/или со сложной группой пептидил-тРНК. Имеющиеся экспериментальные данные не противоречат этому самому простому объяснению. Если это так, то роль гидролиза ГТФ сводится только к тому, чтобы эффектор (ГТФ), придавший сродство EF-T_u к рибосоме и аминоксил-тРНК, разрушился, сродство исчезло, и белок бы покинул их.

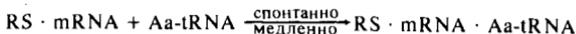
Тем не менее, даже принимая последнее объяснение, нельзя исключить, что до ухода EF-T_u молекула аминоксил-тРНК не вполне «аккомодирована» в А-участке, в том смысле, что ее акцепторный конец может удерживаться белком от вхождения в пептидилтрансферазный центр. (В этом смысле можно было бы пользоваться понятием «R-участка» для обозначения положения аминоксил-тРНК, сильно перекрываемого с ее окончательным положением в А-участке. В дальнейшем изложении, однако, А-участок будет пониматься только в структурном смысле, как место на рибосоме, где аминоксил-тРНК взаимодействует с кодоном мРНК, смежным с тем, что удерживает пептидил-тРНК в Р-участке. Если имеется ряд промежуточных **перекрываемых** положений аминоксил-тРНК, то они будут рассматриваться как положения в пределах одного структурного участка.)

Итак, кодонзависимое связывание аминоксил-тРНК с А-участком

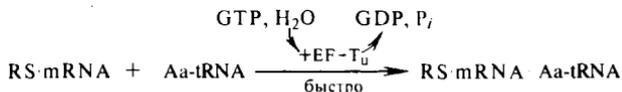
рибосомы катализируется белком EF-T_u с ГТФ. Катализ, по-видимому, происходит вследствие присоединения EF-T_u вместе с аминоацил-тРНК к рибосоме, а не вследствие гидролиза ГТФ. Гидролиз ГТФ необходим для разрушения сродства белка к рибосоме и его удаления, чтобы разрешить следующую стадию элонгационного цикла (транспептидацию).

3. «НЕЭНЗИМАТИЧЕСКОЕ» (БЕСФАКТОРНОЕ) СВЯЗЫВАНИЕ АМИНОАЦИЛ-тРНК

Кодонзависимое связывание аминоацил-тРНК с А-участком рибосомы может быть достигнуто также и без EF-T_u (см. эпиграф к гл. В.VI.6). Такое бесфакторное связывание требует несколько более высокой концентрации Mg²⁺ в среде (10–15 мМ при 100 мМ NH₄Cl или KCl) по сравнению с концентрацией Mg²⁺, оптимальной для EF-T_u-промотируемого связывания (5–10 мМ). Это связывание является вполне функциональным: связанная аминоацил-тРНК может реагировать с пептидил-тРНК в Р-участке в реакции транспептидации. Отличием бесфакторного («неэнзиматического») связывания аминоацил-тРНК от EF-T_u-промотируемого («энзиматического») является его существенно меньшая скорость. Итак,



Тем не менее конечный результат этой реакции такой же, как и в случае быстрого связывания тройственного комплекса Aa-tRNA · EF-T_u · GTP, с последующим расщеплением ГТФ и уходом EF-T_u:



4. ИНГИБИТОРЫ

Известен целый ряд специфических ингибиторов, главным образом антибиотиков, блокирующих ту или иную стадию элонгационного цикла рибосомы. Большая часть из них действует избирательно либо на прокариотические (бактериальные), либо на эукариотические рибосомы. Классическими специфическими ингибиторами как EF-T_u-промотируемого, так и неэнзиматического связывания аминоацил-тРНК с А-участком бактериальной 70S рибосомы являются тетрациклины (рис. 95). Тетрациклины подавляют также кодонзависимое связывание аминоацил-тРНК с изолированной 30S субчастицей (последнее является свидетельством того, что часть именно А-участка проявляет свою тРНК-связывающую способность на изолированной 30S субчастице). В соответствии с этим место специфического связывания тетрациклина с рибосомой обнаружено на 30S субчастице, хотя при более высоких концентрациях он может связываться также и с 50S субчастицей, обнаруживая побочные действия. Интересно, что когда тройственный комплекс Aa-tRNA · EF-T_u · GTP взаимодействует с 70S рибосомой в присутствии тетрациклина, то ГТФ гидролизуется и EF-T_u · GDP освобождается, но аминоацил-тРНК не остается связанной. По-видимому, тетрациклин, будучи связан

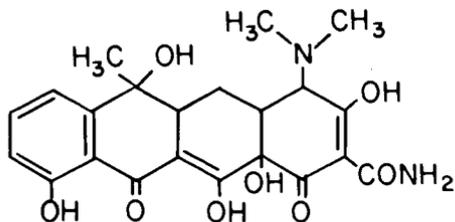


Рис. 95. Тетрациклин — ингибитор связывания аминоацил-тРНК с рибосомой

где-то в районе тРНК-связывающего А-участка на 30S субчастице рибосомы, ослабляет сродство участка к тРНК, что приводит к плохому удержанию тРНК на рибосоме после ухода EF-T_u.

Хотя тетрациклины не действуют на эукариотические клетки из-за непроницаемости их мембран для антибиотика, в эукариотических бесклеточных системах они тоже оказываются сильными ингибиторами, подавляя связывание аминоацил-тРНК с 80S рибосомами.

Существует целый ряд ингибиторов, которые подавляют главным образом EF-T_u (или EF-1)-прототируемое связывание аминоацил-тРНК с рибосомой путем блокирования факторсвязывающего участка 50S (или 60S) субчастицы. Типичными ингибиторами такого действия являются антибиотики тиострептон и близкий к нему сиомицин. Крупная молекула такого антибиотика прочно связывается с 50S субчастицей в районе белка L11 и препятствует взаимодействию EF-T_u, так же как и EF-G, с факторсвязывающим центром. Рибосомы без белка L11 оказываются функционально активными и нечувствительными к антибиотику. Интересно, что в некоторых мутантах, устойчивых к антибиотику, обнаруживается не измененный белок L11, а его полное отсутствие.

Антибиотик фусидовую кислоту (см. рис. 109) обычно рассматривают среди ингибиторов транслокации, но по существу он является специфическим ингибитором связывания аминоацил-тРНК. Этот антибиотик не действует на рибосому, а связывается с EF-G, так что белок приобретает повышенное сродство к факторсвязывающему центру 50S субчастицы и остается там после транслокации и гидролиза ГТФ. Присоединенный EF-G · GDP с фусидовой кислотой блокируют, таким образом, взаимодействие EF-T_u и аминоацильного конца тРНК с 50S субчастицей рибосомы.

Наконец, здесь необходимо рассмотреть антибиотик, который действует на сам EF-T_u, но не вызывает ингибирования связывания аминоацил-тРНК, а блокирует последующую стадию цикла. Это — кирромицин (рис. 96). Антибиотик действует на EF-T_u аналогично тому, как фусидовая кислота действует на EF-G: он придает EF-T_u такое сродство к рибосоме и аминоацил-тРНК, что белок не уходит после гидролиза ГТФ и блокирует участие аминоацильного конца в транспептидации. Важно отметить, что взаимодействие кирромицина с EF-T_u индуцирует собственную ГТФазную активность белка в отсутствие рибосомы; эти наблюдения послужили основанием для того, чтобы считать ГТФазный центр принадлежностью фактора, а не рибосомы, а рибосому рассматривать лишь как активатор латентной ГТФазной активности белка.

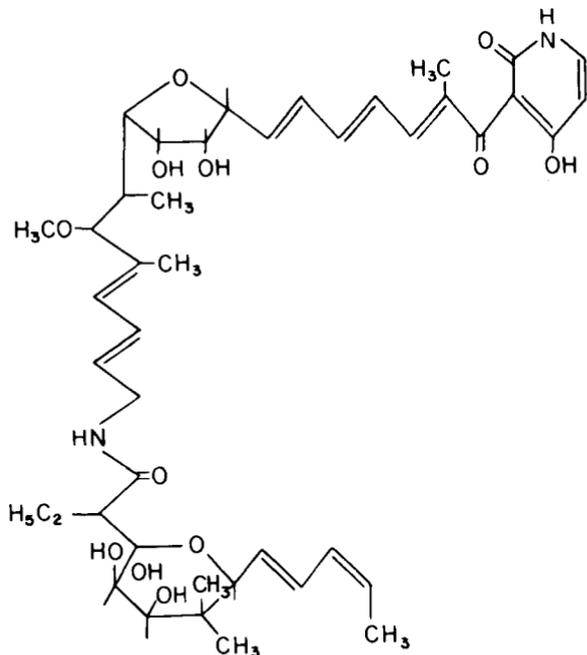


Рис. 96. Кирромицин – ингибитор, воздействующий на EF-T_u

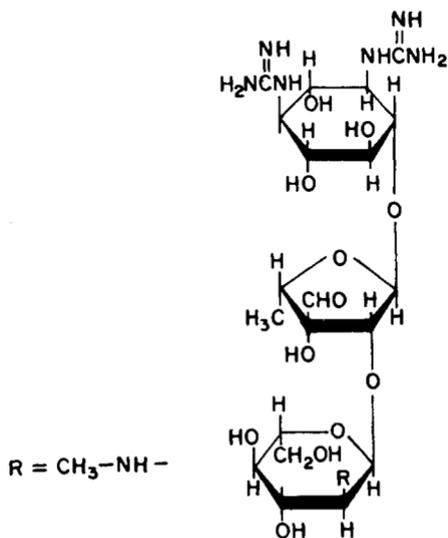


Рис. 97. Стрептомицин – ингибитор, стимулирующий ложное связывание аминоацил-тРНК

Имеется другая группа антибиотиков, которые воздействуют на связывание аминоацил-тРНК с А-участком рибосомы, но оказывают эффект совсем иного рода. Это так называемые аминогликозидные антибиотики, к которым относятся стрептомицин (рис. 97), а также неомицин, канамицин и некоторые другие. Антибиотики этой группы способствуют удержанию на рибосоме аминоацил-тРНК, не соответствующих кодону, установленному в А-участке рибосомы. В результате такого *ложного кодирования* синтезируются неправильные полипептиды, с большим количеством ошибок, что и приводит к цитотоксическому (бактерицидному) эффекту на клетки. Стрептомицин действует специфически на бактериальные 70S рибосомы, в то время как канамицин и неомицин могут индуцировать ложное кодирование также и на эукариотических 80S рибосомах. Главным местом связывания антибиотиков с рибосомой является, по-видимому, малая (30S или 40S) субчастица, хотя эффект зависит от взаимодействия обеих субчастиц и проявляется только на полной (70S или 80S) рибосоме.

5. ЛОЖНОЕ КОДИРОВАНИЕ

Ложное кодирование при связывании аминоацил-тРНК с рибосомой в присутствии стрептомицина и других аминогликозидных антибиотиков не является новым феноменом в функционировании трансляционного аппарата, обусловленным действием антибиотика. Оказалось, что определенный уровень ошибочного связывания аминоацил-тРНК в рибосоме всегда сопровождает процесс трансляции, и указанные антибиотики лишь увеличивают его. При этом определенный кодон матрицы в А-участке рибосомы, кроме своей аминоацил-тРНК, может связывать по ошибке лишь ограниченный набор других аминоацил-тРНК, более или менее близких ему по кодовой специфичности; аминогликозидные антибиотики, как правило, усиливают связывание того же самого набора аминоацил-тРНК, не внося новых двусмысленностей.

Ложное считывание поли(U)

В простейшей бесклеточной системе синтеза полифенилаланина поли(U)-программированными рибосомами *E. coli* можно наблюдать заметное ложное включение лейцина и изолейцина, а также, в уменьшающихся количествах, серина, тирозина и валина. Включение этих же пяти аминокислот, и особенно лейцина и изолейцина, резко стимулируется стрептомицином. На рис. 98 показано правильное кодон-антикодонное спаривание матрицы с тРНК^{Phе} и известные неправильные спаривания кодона UUU с антикодонами тРНК^{Ile}, тРНК^{Leu}, тРНК^{Ser}, тРНК^{Tyr} и тРНК^{Val} *E. coli*. Следует заметить, что тРНК^{Leu} с антикодоном CAG и тРНК^{Cys}, имеющая антикодон GCA, по-видимому, не могут связываться с поли(U) на рибосоме.

Можно думать, что при ложном связывании два из трех положений должны быть спарены (включая неканоническое спаривание при первом положении антикодона); без этого тРНК не может иметь, по-видимому, заметного кодонзависимого связывания в А-участке рибосомы (до-

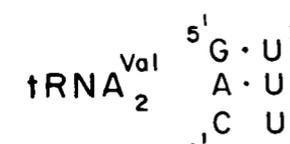
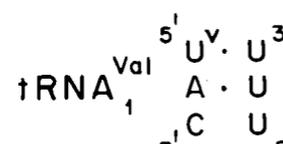
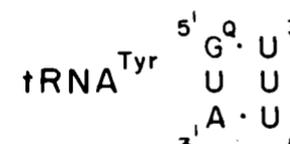
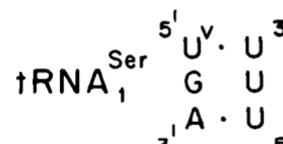
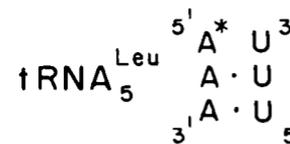
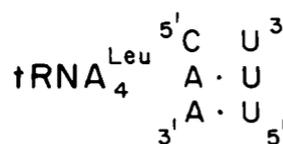
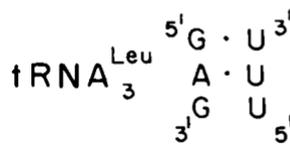
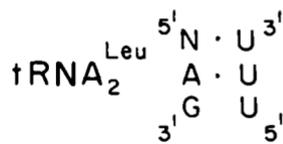
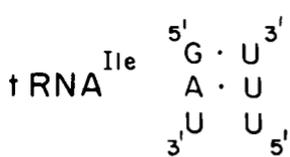
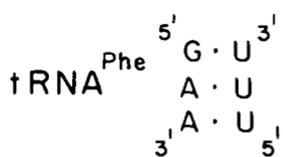


Рис. 98. Кодон-антикодонное спаривание поли (U) с правильной («своей») и неправильными («несвоими») тРНК:
 U^{V} – уридин-5-оксиуксусная кислота (сто⁵U или V); G^{Q} – кьюозин (Q) (см. рис. 15);
 A^* – неидентифицированное производное A; N – неидентифицированный нуклеозид.

пускается, что при связывании тРНК₂^{Leu}, тРНК₁^{Ser} и тРНК₁^{Val} с кодоном UUU основания N или V соответственно образуют неканоническую пару с U при первом положении антикодона).

Основные типы ложного спаривания

Анализ ложного кодирования в случаях с поли(U) и другими матричными полинуклеотидами, как *in vitro*, так и *in vivo*, в том числе под действием различных аминогликозидных антибиотиков, показывает, что наиболее частыми являются ошибки вследствие спаривания (или «противостояния» без спаривания) G · U или U · G, а также U · U в любом месте антикодон-кодонового дуплекса. Более редки ошибочные спаривания или противостояния U · C или C · U; бывают ошибки за счет противостояния C антикодона против A кодона. Лишь в исключительных случаях возможны ошибки с образованием пар (или противостояний) A · G или G · A, а также противостояний C · C, A · A и G · G.

В положении нестрогого спаривания возможны, по-видимому, все типы противостояний, включая I · G, G · A, G · G, U · U, U · C, C · A, C · U и C · C. Этим объясняются те случаи, когда любая из изоакцепторных тРНК могла узнавать в бесклеточной системе любой из четырех кодонов данной кодоновой семьи (т. е. кодонов, имеющих общими два первых нуклеотида).

Факторы, способствующие ложному кодированию

Кроме аминогликозидных антибиотиков целый ряд менее специфических агентов, включая ионные условия среды, может увеличивать уровень ошибок при кодонзависимом связывании аминоацил-тРНК транслирующей рибосомой. В общем все те факторы, которые увеличивают сродство тРНК к рибосоме, как правило, приводят к увеличению ложного кодирования. Так, увеличение концентрации Mg²⁺ в среде, а также диаминов (путресцин) или полиаминов (спермидин) повышает количество ошибок при трансляции в бесклеточной системе. Этанол и другие гидрофобные агенты, будучи добавлены к среде даже в небольшой концентрации, тоже увеличивают ложное кодирование. Наоборот, мочевины понижает количество ошибок трансляции. Из наиболее общих факторов среды ошибкам способствуют такие, как понижение температуры, понижение pH и понижение ионной силы.

С другой стороны, можно отметить некоторые структурные особенности самой тРНК, которые влияют на точность ее кодонзависимого связывания в А-участке. В частности, важной может быть структура D-шпильки тРНК. Так, мутационная замена G на A в D-шпильке тРНК^{Trp} приводит к тому, что эта тРНК с антикодоном CCA лучше спаривается в рибосоме с не своими кодонами UGA или UGU, чем исходная. Так как в отсутствие рибосом сродство антикодона CCA как к комплементарному триплету, так и к не своему триплету UGA в результате такой модификации не изменяется, то имеются все основания полагать, что

изменение D-шипilки влияет на родство тРНК к А-участку (увеличивает его). Это находится в соответствии с моделью, согласно которой L-образная молекула тРНК в А-участке взаимодействует с рибосомой преимущественно своей правой стороной, если смотреть на тРНК антикодоном вверх с внешней стороны угла (в то время как левая сторона взаимодействует с EF-T₀ — см. гл. В. I. 2 и II.2).

Далее, большую роль в точности выбора аминоксил-тРНК играет структура рибосомы. Впервые в работах Л. Горини с сотрудниками было показано, что некоторые мутации, приводящие к изменению рибосомных компонентов, могут либо понижать, либо повышать уровень ошибок трансляции. Оказалось, что определенные мутационные изменения белка S12, приводящие к устойчивости против стрептомицина (мутации *strA*), в то же время делают рибосому более точной в кодон-зависимом выборе аминоксил-тРНК. Наоборот, так называемые *ram*-мутации (*ribosome ambiguity mutations*), заключающиеся в изменении белка S4, делают рибосому менее селективной, повышая уровень ложного кодирования. Некоторые мутационные изменения белка S5 также уменьшают селективность рибосомы. Характерно, что все до сих пор обнаруженные типы мутационных изменений, влияющих на точность кодон-антикодонного узнавания в А-участке рибосомы, сосредоточены в 30S субчастице. Несомненно, та часть А-участка, которая локализована на 30S субчастице, особенно важна для точности кодон-антикодонного узнавания; вероятно, что компоненты 30S субчастицы, образующие А-участок и располагающиеся вблизи него, и в частности группа тесно расположенных белков S4, S5 и S12, могут определять не только (и может быть не столько) прочность удержания тРНК, но и возможную степень жесткости (фиксации) или гибкости (*wobble*) антикодона тРНК или кодона мРНК на рибосоме.

Вышеперечисленные факторы среды или внутренние структурные факторы влияющие на степень избирательности мРНК-программированной рибосомы по отношению к тРНК. В то же время уровень ложного кодирования в системе будет определяться не только избирательностью как свойством компонентов системы в данных условиях, но и соотношением компонентов. Естественно, при повышении отношения концентрации не своих тРНК к концентрации своих тРНК вероятность ложного связывания будет возрастать. Поэтому, например, при трансляции поли(U) в бесклеточной системе, когда происходит истощение своей фенилаланил-тРНК, уровень включения лейцина, изолейцина и других аминоксил в полипептид возрастает. Как крайний вариант в систему с поли(U)-программированными рибосомами можно дать лишь лейцил-тРНК, и тогда будет синтезироваться чистый полилейцин на поли(U) как матрице (хотя, конечно, с существенно меньшей скоростью, чем синтезировался бы полифенилаланин). В природных системах уровень ложного включения тех или иных аминоксил в синтезируемый полипептид может сильно зависеть от соотношения концентраций различных аминоксил-тРНК. В частности, голодание клетки по какой-либо аминоксилоте вызывает множественные замены этой аминоксилоты на близкие ей по кодовой специфичности в полипептидных цепях активно синтезируемых белков.

Так как ложное кодирование очень сильно зависит от целого ряда как внешних, так и структурных факторов, то очевидно, что в бесклеточных системах его уровень может варьировать в чрезвычайно широких пределах. Поэтому важно оценить, каков естественный уровень ложного кодирования в нормальных живых клетках, не подвергаемых тем или иным экстремальным воздействиям и не содержащих мутационных нарушений белоксинтезирующего аппарата. Однако оценить это нелегко по ряду причин. Во-первых, на стадиях, предшествующих связыванию аминоксил-тРНК, тоже возможны ошибки, например, ложное ацилирование тРНК; оно будет завышать оцениваемый уровень ложного кодирования. Во-вторых, на стадиях после связывания аминоксил-тРНК и включения ложной аминокислоты в пептидную цепь возможна элиминация ложного продукта — либо путем аборта растущего пептида, либо путем переваривания окончательного неправильного белкового продукта. В-третьих, если готовый неправильный продукт обладает другими свойствами, чем правильный, то он может не встраиваться в те структуры, в которых мы его ищем, или не выделяться теми процедурами, которые мы используем для данного белка. Два последних обстоятельства будут занижать оцениваемый уровень ложного кодирования, и могут занижать его сильно.

Кроме того, по ложному включению одной аминокислоты нельзя судить о возможностях ложного включения других. В частности, можно думать, что ложное кодирование в пределах одной кодоновой группы (т. е. кодонов, различающихся только по третьему нуклеотиду) должно быть более вероятным, чем другие замены. Как следует из кодового словаря (см. рис. 3), к таким наиболее вероятным аминокислотным заменам в результате ложного кодирования должны относиться Phe↔Leu, Cys↔Trp, His↔Gln, Ile↔Met, Asn↔Lys, Ser↔Arg и Asp↔Glu, причем замены слева направо (ложное спаривание с U или C в третьем положении кодона) должны быть более вероятны, чем замены справа налево (ложное спаривание с A или G в третьем положении кодона). Действительно, замены аспарагина на лизин являются гораздо более частыми, чем замены лизина; точно так же гистидин часто заменяется на глютамин, в то время как замены глютамина редки.

Было сделано несколько попыток оценить уровень ложного кодирования *in vivo*. В классических оценках Лофтфилда была определена частота ложного включения валина вместо треонина в α-цепи глобина кролика; было получено значение в районе $2-6 \cdot 10^{-4}$. Частота ошибочного включения цистеина, вероятно, вместо аргинина в заверченный флагеллин (белок, не содержащий цистеина) у *E. coli* того же порядка — 10^{-4} на кодон. Однако, строго говоря, не было ясно, насколько это значение действительно отражает уровень ложной трансляции на рибосомах (см. первый абзац этой главы). В последнее время были сделаны более прямые определения частоты ложного кодирования *in vivo*. Средняя частота трансляционных ошибок около $4 \cdot 10^{-4}$ на кодон у *E. coli* была рассчитана из опытов, где регистрировались аминокислотные замены, приводящие к изменению заряда белка (т. е. по появлению

добавочного или исчезновению заряженного аминокислотного остатка); опыты ставились в присутствии стрептомицина, стимулирующего только трансляционные ошибки, и полученные величины приводились к величинам для нормального роста, исходя из независимо определенной величины стимуляции стрептомицином (приблизительно в 10 раз).

Однако на некоторых кодонах трансляционные ошибки могут быть существенно более частыми. Так, в опытах *in vivo* частота ложного считывания аспарагинового кодона AAU, приводящая к замене незаряженного аспарагина на положительно заряженный лизин, при трансляции мРНК белка оболочки фага MS2 составляла около $5 \cdot 10^{-3}$ (хотя частота ложного считывания аспарагинового кодона AAC в этих опытах была почти на порядок меньше и составляла около $2 \cdot 10^{-4}$). Это приводит к тому, что даже в нормальных условиях роста до 1–3% молекул белка оболочки фага MS2, синтезируемого в *E. coli*, имеют замены аспарагина на лизин как результат трансляционных ошибок.

Недавно, однако, было показано, что высокие уровни трансляционных ошибок *in vivo* могут наблюдаться не только в случаях аминокислотных замен в пределах одной кодоновой группы за счет ложного спаривания пиримидинового нуклеотида в третьем положении кодона. Триптофановый кодон UGG в мРНК рибосомного белка S6 (*E. coli*) позволяет включаться цистеину вместо триптофана с частотой $(3-4) \cdot 10^{-3}$; очевидно, по каким-то причинам здесь имеет место высокий уровень ложного спаривания с пуриновым нуклеотидом в третьем положении кодона. Цистеин включается вместо аргинина в рибосомный белок L7/L12 тоже с высокой частотой — 10^{-3} , хотя в данном случае кодоны этих двух аминокислот принадлежат к разным кодоновым группам.

Следует отметить, что самые последние оценки уровня ложного кодирования при трансляции *in vivo* дают еще более высокие значения — от 10^{-3} до 10^{-1} ошибок на прочитанный кодон, заставляя пересмотреть прежние оценки. Однако если бы это было так для большинства кодонов, то при трансляции не должно было бы вовсе образовываться правильных белков. В настоящее время наиболее разумной оценкой, согласующейся с большей частью имеющихся экспериментальных данных, является среднее значение ложного кодирования *in vivo* от 10^{-4} до 10^{-3} ошибок на кодон, может быть с исключительными отклонениями для некоторых кодонов до 10^{-2} – 10^{-1} .

В бесклеточных системах обычно уровень ложного кодирования много выше; частота замен может достигать 10^{-2} , а в пределах одной кодоновой группы (Phe → Leu) даже 10^{-1} на кодон. Однако в специальных ионных условиях (низкий Mg^{2+} , оптимизированные соотношения других компонентов) можно воспроизвести уровень ложного кодирования, приближающийся к оценке 10^{-4} – 10^{-3} ошибок на кодон.

Надо сказать, что и, наоборот, при определенных условиях можно резко поднять уровень ложного кодирования *in vivo* как в бактериальных, так и в животных клетках, например путем голодания по некоторым аминокислотам, а также добавлением этанола и некоторых других агентов к среде (не говоря уже об увеличении ложного кодирования в клетках в ответ на аминогликозидные антибиотики).

По-видимому, определенный уровень ложного кодирования имеет большое биологическое значение и поддерживается в эволюции живых организмов. В искусственных условиях можно получить бактериальные мутанты, обладающие пониженным уровнем ложной трансляции (стрептомицинустойчивые мутанты), но в природных диких штаммах, более приспособленных к выживанию, он всегда выше. Несомненно, что в ряде случаев ложное кодирование помогает выживать при мутациях, которые иначе были бы летальны. Так, ложная посадка аминоксил-тРНК на терминирующий кодон, возникший в результате мутации смыслового кодона, может дать законченный белок с необходимой для клетки активностью. Получается «ложь во спасение», и «бессмысленный» мутант выживает. Таким же путем могут выживать и некоторые мутанты с точечными летальными заменами аминокислот в важных белках. Кроме того, редкое ложное связывание аминоксил-тРНК с нормальным терминирующим кодоном может постоянно использоваться клеткой как регуляторный прием; оно приводит к прочтению мРНК за пределы ее обычной кодирующей части («проскок» — см. раздел V.VIII.1) и, таким образом, к синтезу небольшого количества удлинённых полипептидов, дающих функционально отличные белки, необходимые для каких-то процессов в клетке. Не исключено, что аналогичный прием с заменой аминокислоты также может постоянно использоваться клеткой для образования небольшого количества какого-то нужного варианта белка.

Во всяком случае, чересчур большая строгость кодирования в процессе трансляции, по-видимому, сильно ограничила бы жизненную гибкость и потенции клетки.

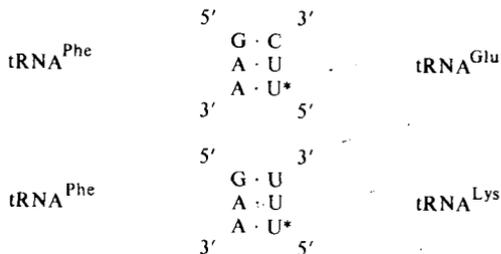
Кинетические механизмы ложного кодирования и его коррекции

Из предыдущего изложения следует, что ложное кодирование определяется прежде всего сродством антикодона к кодону. При полностью комплементарном антикодоне сродство наибольшее, и поэтому с кодоном преимущественно связывается своя тРНК. При частичной комплементарности сродство меньше, но имеется, и поэтому с кодоном могут связываться также и некоторые не свои тРНК, близкие по антикодону к своим. Это и есть ложное кодирование.

Эксперименты с различными межполинуклеотидными комплексами показали, что разница в константах сродства при комплементарных или частично комплементарных спариваниях определяется главным образом разницей во временах жизни, т. е. скоростях диссоциации таких комплексов, тогда как скорости их образования, если и отличаются, то не сильно. Все говорит о том, что и правильный, и неправильный антикодон-кодоновые комплексы могут образоваться с приблизительно одинаковой вероятностью, но неправильный комплекс быстрее распадается, а правильный остается жить дольше.

Для измерения времен полужизни комплексов антикодонов с комплементарными и частично комплементарными последовательностями была предложена интересная модель, а именно взаимодействие двух тРНК, обладающих той или иной степенью комплементарности между их

антикодонами. Например, тРНК^{Phe}, имеющая антикодон GAA, с одной стороны, и тРНК^{Lys}, имеющая антикодон s²UUU, или тРНК^{Glu}, имеющая антикодон s²UUC, — с другой, спариваются своими антикодонами по всем правилам кодон-антикодонного взаимодействия:



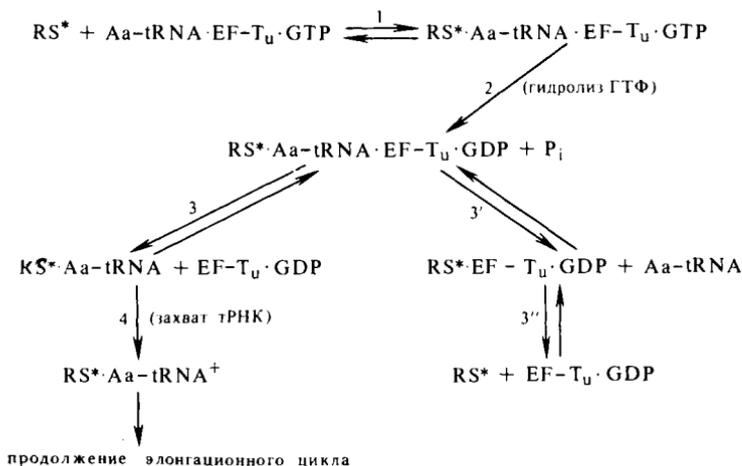
Таким образом, антикодон тРНК^{Glu} или тРНК^{Lys} можно было рассматривать как модель фиксированного на рибосоме кодона UUC или UUU, соответственно, для связывания тРНК^{Phe}. Оказалось, что полностью комплементарный антикодон-антикодонный комплекс тРНК^{Phe} · тРНК^{Glu} имеет время полужизни, по крайней мере, на два порядка больше, чем большинство комплексов, моделирующих ложное связывание — тРНК^{Leu}₂ · тРНК^{Lys}, тРНК^{Leu}₃ · тРНК^{Lys}, тРНК^{Leu}₄ · тРНК^{Lys} (см. рис. 98) (но не комплекса тРНК^{Leu}₅ · тРНК^{Lys}, время полужизни которого было лишь на порядок меньше, чем у полностью комплементарного комплекса).

Хотя наличие антикодон-кодонного средства необходимо для ложного связывания аминоксил-тРНК на рибосоме, это не значит, что частота ложного связывания будет пропорциональна константе средства. Именно то обстоятельство, что разное средство тРНК к кодону определяется главным образом разницей скоростей диссоциации комплекса, а не скоростей ассоциации, делает кинетические параметры работы рибосомы решающими в установлении уровня ложного кодирования.

С одной стороны, если в элонгационном цикле вслед за обратимым кодонзависимым связыванием тРНК быстро следует необратимая или медленно обратимая фаза (например, запираение аминоксил-тРНК в А-участке или транспептидация), то ее скорость будет влиять на уровень ложного кодирования: чем выше скорость последующей необратимой (медленно обратимой) фазы, тем выше ложное кодирование. Действительно, время образования комплекса кодона с правильной и неправильной тРНК приблизительно одинаково, так что дискриминация между ними происходит только путем более быстрого распада неправильного комплекса. Но если скорость следующей фазы цикла чересчур быстра и сравнима со скоростью распада неправильного комплекса, то с большей вероятностью неправильная тРНК окажется вовлеченной в дальнейший цикл. Очевидно, что чем быстрее будет скорость последующей фазы, тем более условия связывания тРНК будут отличаться от равновесных и тем вероятнее окажется захват неправильных тРНК. Наоборот, чем медленнее скорость последующей фазы, тем больше условия будут приближаться к равновесным и тем в большей степени дискриминация правильной и неправильной тРНК будет определяться разницей в их

константе сродства к кодону. Для уменьшения частоты ложного кодирования в рибосоме может существовать специальный механизм *кинетической задержки* на стадии обратимого кодонзависимого связывания аминоксил-тРНК. Например, такую роль мог бы играть EF-T_u: белок, пока не распалась ГТФ, блокирует следующую стадию цикла, а тем временем тройственный комплекс обратимо связан с рибосомой.

С другой стороны, дискриминация правильной и неправильной тРНК на рибосоме может быть усилена еще более, чем это позволяет их разница в константах сродства. Если в связывании аминоксил-тРНК имеются две фазы обратимого связывания, разделенные каким-либо практически необратимым шагом, то ей будет предоставлено, соответственно, два независимых шанса диссоциировать; суммарная вероятность диссоциации будет определяться произведением вероятностей диссоциации на каждой стадии, т. е. дискриминация между правильной и неправильной тРНК может быть существенно усилена по сравнению с разницей в константе сродства. Это есть механизм *кинетической коррекции*, или *редактирования* (proof-reading). Опять-таки EF-T_u мог бы осуществлять такую корректорскую роль: первой фазой обратимого связывания было бы связывание тройственного комплекса Aa-tRNA · EF-T_u · GTP до распада ГТФ, гидролиз ГТФ представлял бы собой практически необратимый разделительный шаг, а на стадии диссоциации EF-T_u · GDP от рибосомы для аминоксил-тРНК предоставлялся бы еще один независимый шанс диссоциировать из комплекса с кодоном:



(RS* обозначает транслирующую рибосому с мРНК и пептидил-тРНК; Aa-tRNA⁺ — необратимо захваченная аминоксил-тРНК либо в результате транспептидации, либо в результате ее окклюирования в претранспептидационной рибосоме — см. ниже). В случае правильной аминоксил-тРНК скорость побочной реакции 3' (распад кодон-антикодонного комплекса до ухода EF-T_u · GDP) будет мала в сравнении с основной реакцией 3 (освобождение EF-T_u · GDP), т. е. $k_3 \gg k_{3'}$. В случае менее стабильного комплекса с неправильной тРНК побочная реакция 3' будет много

быстрее и станет конкурировать с основной реакцией 3, т. е. $k_3 > k_3$. Таким образом, дискриминация между правильной и неправильной тРНК осуществляется дважды — по разнице в скоростях распада кодон-антикодонного комплекса в реакции 1 (разница в k_{-1}) и по разнице в скоростях распада кодон-антикодонного комплекса в реакции 3' (разница в k_3). Практически необратимый гидролиз ГТФ служит для разделения этих двух фаз, и в этом смысле освобождаемая свободная энергия, диссипируя в теплоту, повышает точность трансляции.

Разумеется, предлагаемая схема является гипотетической и направлена лишь на то, чтобы показать возможность такого рода кинетической коррекции. В то же время имеются факты, действительно указывающие, что $EF-T_u$ может снижать уровень ошибок в трансляции. Кроме того, имеются независимые данные в пользу существования двух различных фаз в связывании аминоксил-тРНК, на которых может осуществляться распад кодон-антикодонных комплексов.

6. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ СОБЫТИЙ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ

Перебор тРНК

В среде, окружающей транслирующую рибосому, находятся различные аминоксил-тРНК. Из этой смеси рибосома должна выбрать аминоксил-тРНК, соответствующую кодону матрицы в А-участке. Очевидно, чтобы достичь этого, прежде всего должен быть осуществлен быстрый перебор окружающих аминоксил-тРНК (комплексов $Aa-tRNA \cdot EF-T_u \cdot GTP$), и только та, которая узнается как соответствующая кодону, должна остаться связанной на рибосоме. Такое сканирование предполагает множественные соударения кодона, закрепленного на рибосоме, с антикодонами различных тРНК. Встает вопрос, осуществляется ли это путем случайных диффузионных соударений несвязанных, беспорядочно ориентированных тРНК с рибосомой, или же имеет место быстрое образование и распад короткоживущих комплексов между различными тРНК и рибосомой, где соударения антикодонов с кодоном осуществлялись бы в их нужной ориентации.

Изучение быстрой кинетики процесса связывания тРНК с рибосомой (путем регистрации изменений интенсивности и поляризации флюоресценции профлавиновой метки, присоединенной к антикодонной петле или к D-петле тРНК) свидетельствует скорее в пользу второй альтернативы. Действительно, кинетика связывания тРНК оказалась многофазной. Первая быстрая фаза была интерпретирована как образование промежуточного короткоживущего комплекса, не зависящего от кодона матрицы (рис. 99, реакция 1). Промежуточный короткоживущий комплекс, регистрируемый в экспериментах, формируется в результате столкновения тРНК с рибосомой и, по-видимому, последующей определенной ориентации тРНК. Его образование не зависит ни от присутствия кодона в А-участке, ни от природы присутствующего кодона, т. е., очевидно, происходит без использования кодон-антикодонного взаимодействия. Промежуточный комплекс образуется одинаково как в присут-

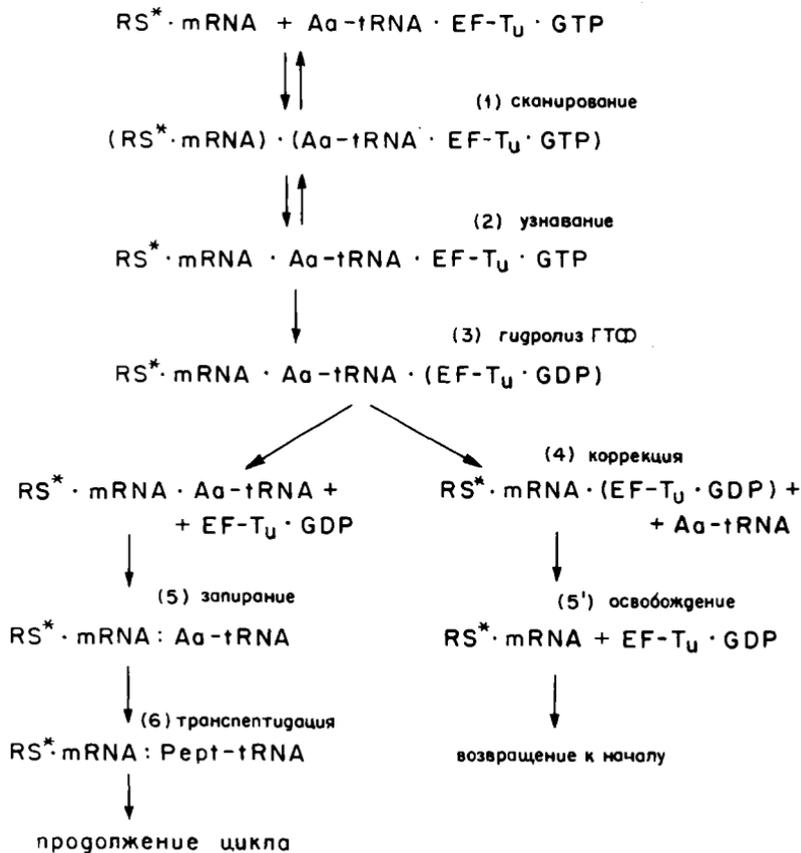


Рис. 99. Реакционный путь поступления аминоксил-тРНК в элонгирующую рибосому:

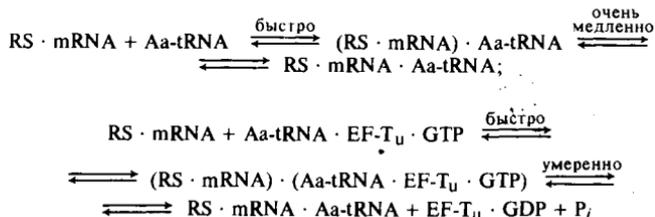
RS^* — элонгирующая рибосома, несущая пептидил-тРНК в Р-участке; точка между компонентами комплекса — обратимая нековалентная связь; двоеточие — запирање (окклюзия) лиганда в комплексе; а скобки взята часть комплекса, находящаяся в быстро обратимой, короткоживущей ассоциации с остальной частью комплекса

ствии, так и в отсутствие $EF-T_u$, что указывает также на неучастие фактора в катализе этой первой быстрой фазы связывания.

Можно предполагать, что путем быстрого образования и распада таких комплексов с тРНК происходит перебор антикодонов. Когда антикодон окажется подходящим для кодона, произойдет узнавание, индуцирующее перестройку комплекса, что означает следующую фазу связывания.

Вероятно, в промежуточном короткоживущем комплексе тРНК транзитно связана с участком рибосомы, перекрываемым с А-участком. Скорее всего, здесь принимает участие тРНК-связывающий центр лишь малой субчастицы рибосомы.

Как показало изучение многофазной кинетики связывания тРНК, при занятом Р-участке и **только** при наличии своего кодона в А-участке за вышеописанной быстрой фазой следовала медленная фаза, в которой промежуточный короткоживущий комплекс перестраивался в стабильный комплекс. В результате тРНК оказывалась специфически связанной в А-участке рибосомы. Без EF-T_u, т. е. в случае неэнзиматического связывания тРНК, этот процесс был очень медленным; EF-T_u с ГТФ сильно ускоряли именно этот процесс:



Процесс, ускоряемый EF-T_u с ГТФ, в свою очередь, является многоступенчатым. Он должен начинаться с кодон-антикодонного узнавания. По-видимому, только когда антикодон оказывается стерически подогнанным к кодону, может начаться вхождение тРНК в А-участок. В случае узнавания тРНК в составе тройственного комплекса вхождение сопровождается взаимодействием EF-T_u с факторсвязывающим центром 50S субчастицы; скорее всего, это дополнительное взаимодействие способствует вхождению тРНК. Опыты с нерасщепляемыми или медленно расщепляемыми аналогами ГТФ показали, что на этой стадии кодонзависимого связывания аминоксил-тРНК или, точнее, тройственный комплекс Aa-tRNA · EF-T_u · GTP обратимо ассоциирован с рибосомой, так что если распад ГТФ не очень быстр, то может установиться равновесие. Таким образом, на этой стадии происходит первый этап селекции аминоксил-тРНК согласно ее кодовой специфичности (рис. 99, реакция 2).

Если взаимодействие, имевшее место при образовании промежуточного короткоживущего комплекса, сохраняется после кодон-антикодонного узнавания, то теперь аминоксил-тРНК оказывается связанной с 70S рибосомой по крайней мере тремя точками — антикодоном через кодон мРНК с 30S субчастицей, аминоксилной ветвью через EF-T_u с 50S субчастицей и неизвестной точкой первоначального взаимодействия (может быть, D-шпилькой, взаимодействующей с головкой 30S субчастицы).

Гидролиз ГТФ

В этом состоянии индуцируется гидролиз EF-T_u-связанного ГТФ (рис. 99, реакция 3). По-видимому, непосредственным индуктором гидролиза является взаимодействие EF-T_u с факторсвязывающим центром 50S субчастицы. Гидролиз ГТФ как практически необратимая фаза (вследствие большой разницы термодинамического потенциала ГТФ

и продуктов его гидролиза) разрывает процесс связывания аминокцил-тРНК на два независимых (не связанных равновесием) этапа. Чем быстрее реакция гидролиза ГТФ следует за узнаванием тРНК, тем ниже будет селективность фазы узнавания. При искусственной задержке гидролиза — например, путем использования медленно гидролизующегося аналога ГТФ, такого как гуанозин-5'-(γ -тио)-трифосфат (см. рис. 87), дискриминация между правильной тРНК и тРНК, близкой по кодовой специфичности (тРНК^{Phc} и тРНК₂^{Leu}), поднимается до отношения 10^4 к 1 в пользу правильной.

При гидролизе ГТФ на EF-T₀ никаких промежуточных фосфорилированных продуктов не обнаруживается. Перенос фосфата осуществляется, вероятно, непосредственно на воду. Таким образом, не видно никакого материального (биохимического) сопряжения гидролиза ГТФ как энергодающей реакции с каким-либо энергопотребляющим процессом. По-видимому, вся свободная энергия гидролиза ГТФ немедленно диссипирует в теплоту (в то же время следует оговориться, что значение свободной энергии гидролиза ГТФ, прикрепленного к фактору, не должна быть равна таковой свободного ГТФ в растворе).

Результатом гидролиза ГТФ является исчезновение или резкое уменьшение средства EF-T₀ к аминокцил-тРНК и к рибосоме. Считается, что это обусловлено какой-то конформационной перестройкой EF-T₀, когда он оказывается связан с ГДФ вместо ГТФ.

Коррекция выбора аминокцил-тРНК

После гидролиза ГТФ имеется промежуточный рибосомный комплекс, в котором EF-T₀ · GDP не имеет больше средства к аминокцил-тРНК, очень лабильно связан с рибосомой и готов быстро диссоциировать. Однако аминокцил-тРНК также лишилась своей точки прикрепления через EF-T₀. Здесь ей также предоставляется возможность диссоциировать, и если скорость ее диссоциации, как в случае неправильной тРНК, особенно высока, она может успеть освободиться до ухода EF-T₀ · GDP (рис. 99, реакция 4, правый путь). Если скорость ее диссоциации в силу правильного кодон-антикодонного взаимодействия не столь высока, то раньше освободится EF-T₀ · GDP (рис. 99, реакция 4, левый путь), что повлечет за собой практически необратимый захват аминокцильного конца 50S субчастицей. Таким образом, после гидролиза ГТФ в рибосоме создается, по-видимому, ситуация для дополнительной коррекции того выбора аминокцил-тРНК, который был сделан до гидролиза ГТФ.

Имеются указания на то, что стрептомицин ингибирует именно стадию коррекции в общем процессе кодонзависимого выбора аминокцил-тРНК рибосомой; вероятным объяснением действия антибиотика является задержка возможного освобождения аминокцил-тРНК из рибосомы после гидролиза ГТФ. Хотя для других аминокглицозидных антибиотиков, таких как канамицин и неомицин, предполагаются более сложные механизмы их действия, стадия коррекции и здесь, по-видимому, одна из главных мишеней их действия. Мутационные изменения рибосом, наблюдаемые в стрептомицинустойчивых и в *gam*-мутантах,

могут воздействовать либо как на начальную дискриминацию аминоксил-тРНК, так и на стадию коррекции, либо в некоторых случаях избирательно изменять именно корректирующую функцию рибосомы.

Запирание аминоксил-тРНК в А-участке

В целом ряде независимых экспериментов были получены данные о том, что после гидролиза ГТФ и освобождения $EF-T_u \cdot GDP$ из рибосомы аминоксил-тРНК еще до стадии транспептидации оказывается запертой в А-участке. Это и есть окончательная фаза связывания с А-участком — полное связывание с А-участком (рис. 99, реакция 5).

Можно строить различные гипотезы о механизме такого запирания, но его трудно представить без конформационной перестройки тРНК или рибосомы. Одна из возможных гипотез состоит в том, что в 70S рибосоме А-участок не строго фиксирован, а доформируется в процессе кодонзависимого связывания аминоксил-тРНК путем подстройки 30S и 50S субчастиц. Например, уход крупного белка $EF-T_u$ мог бы позволить осуществиться более тесному смыканию («притягиванию») 50S субчастицы к аминоксилному концу аминоксил-тРНК и к 30S субчастице, что вызвало бы как раз запирание аминоксил-тРНК.

Общая схема

Итак, аминоксил-тРНК в ходе энзиматического связывания с мРНК-программированной рибосомой проходит целый ряд последовательных фаз (рис. 99). Вопрос о том, что называть А-участком — лишь положение окончательного (запертого) связывания аминоксил-тРНК, рассматривая предыдущие положения связываемой тРНК как серию последовательных перекрывающихся участков предварительного связывания, или же область рибосомы, в пределах которой возможны разные промежуточные состояния связывания аминоксил-тРНК, — носит скорее терминологический характер. Ясно, что во всяком случае при переходе от фазы к фазе некоторые контакты аминоксил-тРНК с рибосомой могут несколько меняться, но перераспределения на неперекрывающиеся участки нет. Здесь вся совокупность различных возможных перекрывающихся положений аминоксил-тРНК в процессе связывания с рибосомой рассматривается в терминах единого А-участка, с разными состояниями связывания в нем.

Общая схема последовательности событий, описанная выше, дана на рис. 100.

Рекомендуемая литература

Биологическое воспроизведение макромолекул: Пер. с англ./Под ред. В. Л. Рыжкова. М.: ИЛ, 1960. С. 209—246.

Итоги науки и техники. М.: ВИНТИ. Сер. биол. химия, 1983. С. 5—193.

Кемхадзе К. Ш., Одинцов В. Б., Махно В. И. и др. Механизм кодон-антикодонного взаимодействия в рибосомах. Взаимодействие аминоксил-тРНК с 70S рибосомами *Escherichia coli* в отсутствие фактора элонгации $EF-T_u$ и GTP. — Молекул. биол., 1981. Т. 15. С. 779—789.

Руткевич Н. М., Гаврилова Л. П. Рибосомный синтез полилейцина на полиуридилон-

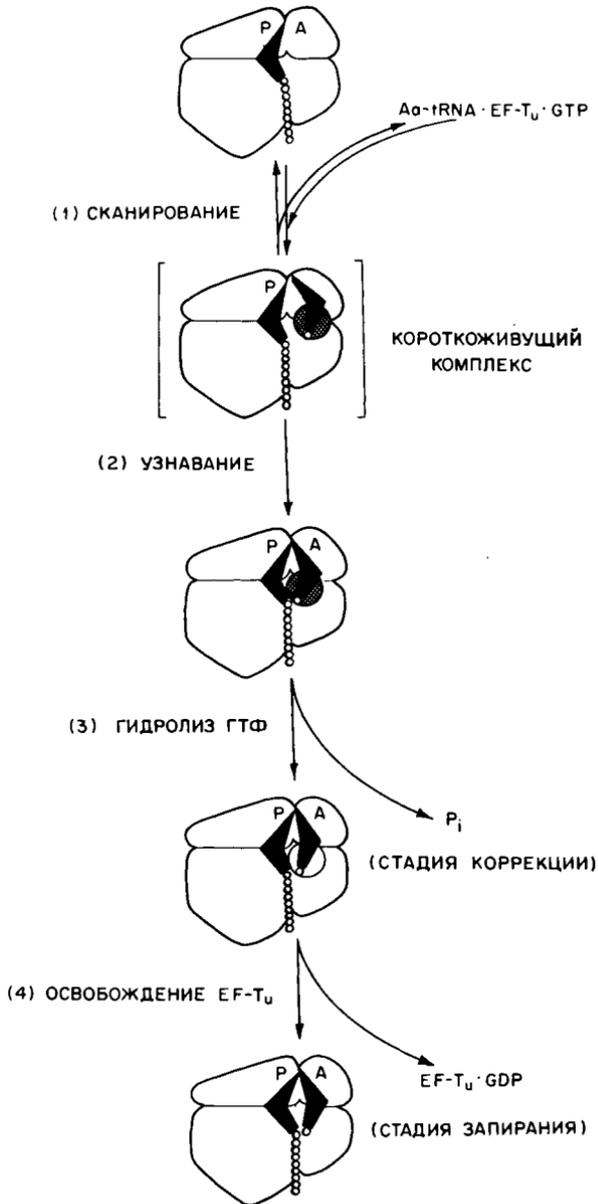


Рис. 100. Схема последовательности событий в процесс связывания аминоксил-тРНК с рибосомой

вой кислоте как матрице в бесклеточной системе трансляции. — Докл. АН СССР, 1980. Т. 254, № 3. С. 766—768.

Шварц В. С., Лысуков В. Н. Физические механизмы «рибосомального сита». — Докл. АН СССР, 1974. Т. 217, № 6. С. 1446—1448.

The Mechanism of Protein Synthesis. — Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1969, v. 34, p. 321—344; 377—384; 419—462.

Chambliss G. et al., eds. *Ribosomes: Structure, Function, and Genetics.* Baltimore: Univ. Park Press, 1980, p. 377—444; 555—581; 585—638.

Cohn W. E., ed. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology.* N. Y.: Acad. Press, 1978, v. 21, p. 63—100.

Nomura M., Tissières A., Lengyel P., eds. *Ribosomes.* N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1974, p. 871—884.

Sundaralingam M., Rao S. T., eds. *Structure and Conformation of Nucleic Acids and Protein-Nucleic Acid Interactions.* Baltimore: Univ. Park Press, 1975, p. 101—115.

Weissbach H., Pestka S., eds. *Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis.* N. Y.: Acad. Press, 1977, p. 7—79; 323—373; 467—555.

Chaperville F., Lipmann F., von Ehrenstein G. et al. On the role of soluble ribonucleic acid in coding for amino acids. — Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1962, v. 48, p. 1086—1092.

Crick F. H. C. Codon-anticodon pairing: The wobble hypothesis. — J. Mol. Biol., 1966, v. 19, p. 548—555.

Davies J. E., Gilbert W., Gorini L. Streptomycin, suppression, and the code. — Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1964, v. 51, p. 883—890.

Edelman P., Gallant J. Mistranslation in *E. coli*. — Cell, 1977, v. 10, p. 131—137.

Eisinger J., Gross N. The anticodon-anticodon complex. — J. Mol. Biol., 1974, v. 88, p. 165—174.

Gavrilova L. P., Perminova I. N., Spirin A. S. Elongation factor T_u can reduce translation errors in poly(U)-directed cell-free systems. — J. Mol. Biol., 1981, v. 149, p. 69—78.

Goodman H. M., Abelson J., Landy A. et al. Amber suppression: A nucleotide change in the anticodon of a tyrosine transfer RNA. — Nature, 1968, v. 217, p. 1019—1024.

Gorini L. Ribosomal discrimination of tRNAs. — Nature New Biol., 1971, v. 234, p. 261—264.

Hopfield J. J. Kinetic proofreading: a new mechanism for reducing errors in biosynthetic processes requiring high specificity. — Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1974, v. 71, p. 4135—4139.

Lagerkvist U. «Two out of three»: An alternative method for codon reading. — Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1978, v. 75, p. 1759—1762.

Lake J. A. Aminoacyl-tRNA binding at the recognition site is the first step of the elongation cycle of protein synthesis. — Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1977, v. 74, p. 1903—1907.

Lucas-Lenard J., Lipmann F. Separation of three microbial amino acid polymerization factors. — Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1966, v. 55, p. 1562—1566.

Ninio J. A semi-quantitative treatment of missense and nonsense suppression in the *strA* and *ram* ribosomal mutants of *Escherichia coli*. Evaluation of some molecular parameters of translation *in vivo*. — J. Mol. Biol., 1974, v. 84, p. 297—313.

Wintermeyer W., Robertson J. M. Transient kinetics of transfer ribonucleic acid binding to the ribosomal A and P sites: Observation of a common intermediate complex. — Biochemistry, 1982, v. 21, p. 2246—2252.

Глава III

ЭЛОНГАЦИЯ: ТРАНСПЕПТИДАЦИЯ (ОБРАЗОВАНИЕ ПЕПТИДНОЙ СВЯЗИ)

1. ХИМИЯ РЕАКЦИИ

Когда пептидил-тРНК занимает Р-участок, а аминоацил-тРНК окончательно связалась в А-участке, их 3'-концы оказываются сближенными в районе пептидилтрансферазного центра на 50S субчастице. Происходит нуклеофильная атака на карбонил сложноэфирной груп-

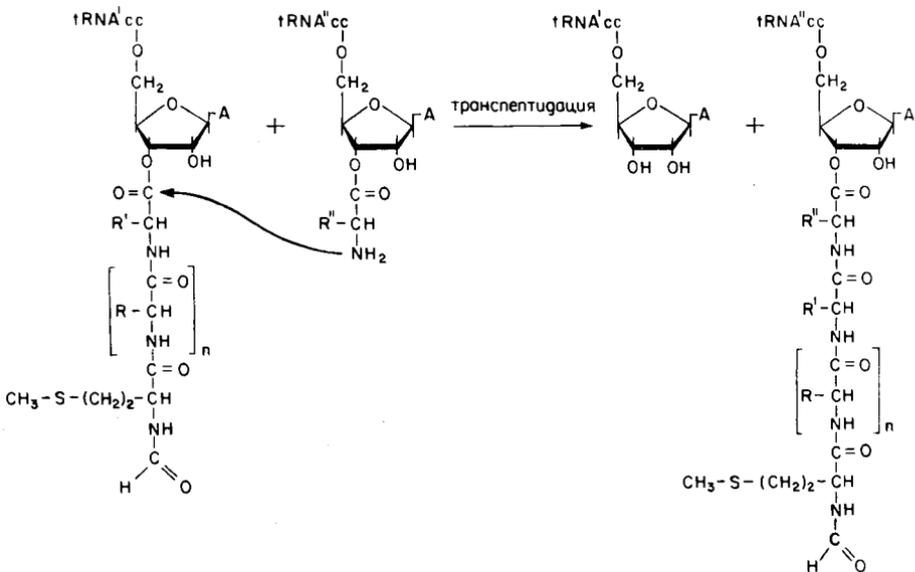


Рис. 101. Реакция транспептидации, катализируемая рибосомой

пы между пептидным остатком и тРНК молекулы пептидил-тРНК **аминогруппой** аминокислотного остатка аминоацил-тРНК. В результате вместо сложноэфирной связи образуется амидная (пептидная) связь между пептидным остатком и аминоацильным остатком молекулы аминоацил-тРНК (рис. 101). Таким образом, субстратами реакции являются пептидил-тРНК и аминоацил-тРНК. Пептидил-тРНК называется *донорным* субстратом, а аминоацил-тРНК — *акцепторным* субстратом. Продуктами реакции являются деацилированная тРНК и пептидил-тРНК, в которой пептидный остаток оказывается удлиненным на один аминокислотный остаток и присоединенным к тРНК в А-участке. Схематически это показано на рис. 102.

Уже отмечалось, что вместо аминоацил-тРНК в качестве акцепторного (нуклеофильного) субстрата в реакции с пептидил-тРНК могут участвовать 3'-концевые фрагменты аминоацил-тРНК, аминоацильные эфиры аденозина или пуриноцина.

Во всех случаях реакция идет, только если NH₂-группа находится в α-положении аминоацильного остатка. Аминоацильный остаток должен иметь L-конфигурацию. В пептидилтрансферазном центре аминоацильный остаток должен быть присоединен в 3'-положении (но не в 2'-положении) концевого аденозина тРНК или другого акцепторного субстрата. Последнее обстоятельство заслуживает некоторых комментариев. Так, в растворе аминоацильный остаток может мигрировать между 2'- и 3'-гидроксилами рибозы концевого аденозина тРНК (см. рис. 27). Связывание аминоацил-тРНК с EF-T_u разрешено при обоих положениях амино-

ацильного остатка, и как тройственный комплекс $Aa(2')tRNA \cdot EF-T_u \cdot GTP$, так и $Aa(3')tRNA \cdot EF-T_u \cdot GTP$ могут связываться с рибосомой. По-видимому, после гидролиза ГТФ и потери сродства к $EF-T_u$ (стадия коррекции) также разрешена миграция аминокислотного остатка между 2'- и 3'-положениями. Однако аминокислотный остаток именно в 3'-положении фиксируется пептидилтрансферазным центром (стадия записывания).

Свободный 2'-гидроксил рибозы акцепторного субстрата не существует для реакции транспептидации; когда он замещен (например, метилирован) или вообще отсутствует (2'-дезоксипроизводное), акцепторная активность субстрата сохраняется. Однако для активности **донорного субстрата** рибозный 2'-гидроксил оказывается необходимым.

Транспептидация в рибосоме — самый быстрый шаг элонгационного цикла по сравнению со связыванием аминокислот-тРНК и с транслокацией. Во всяком случае, ни при каких условиях она, по-видимому, не является лимитирующей стадией цикла.

Механизм катализа реакции транспептидации рибосомой служил предметом многих исследований и дискуссий. Имеется целый ряд указаний на участие имидазольного остатка гистидина какого-то рибосомного белка в катализе. Однако все попытки выделить промежуточное ацилферментное (ацилрибосомное) производное, типа того, что образуется при катализе реакций гидролиза и транспептидации протеиназами, были безуспешны. (Возможно, его и не должно быть в искомом виде, поскольку пептидил-тРНК уже является активированным макромолекулярным ацилпроизводным, которое может рассматриваться как функциональный аналог ацилферментной группы.) Многие считают, что транспептидация в рибосоме катализируется просто вследствие надлежащей пространственной ориентации и сближения реагирующих групп аминокислот-тРНК и пептидил-тРНК, без химического каталитического участия каких-либо специальных нуклеофильных групп пептидилтрансферазного центра. В пользу последнего предположения приводятся данные о малой специфичности пептидилтрансферазного центра по отношению к типу связи, образование которой может быть им катализировано. Действительно, если к тРНК или аналогу ее 3'-конца присоединен не аминокислотный остаток, а оксикислотный ($HO-CHR-CO-$ вместо $H_2N-CHR-CO-$), то такое производное тоже является хорошим акцепторным субстратом, и в результате реакции образуется сложноэфирная связь. Подобным же образом, если акцепторным субстратом служит тиоацильное производное, рибосомный пептидилтрансферазный центр катализирует образование тиоэфирной связи. Более того, донорный субстрат также может

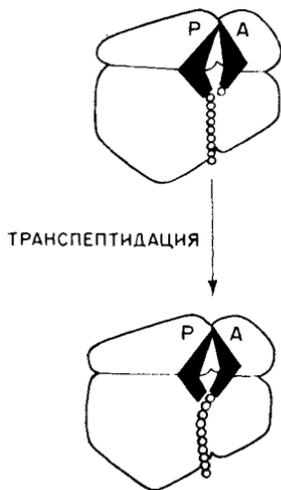
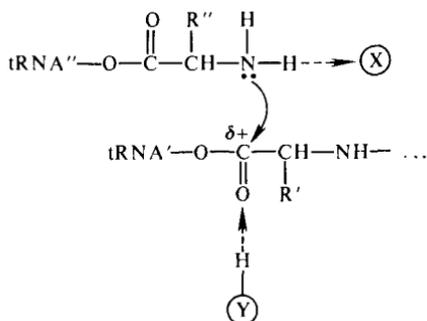


Рис. 102. Схема транспептидации на рибосоме

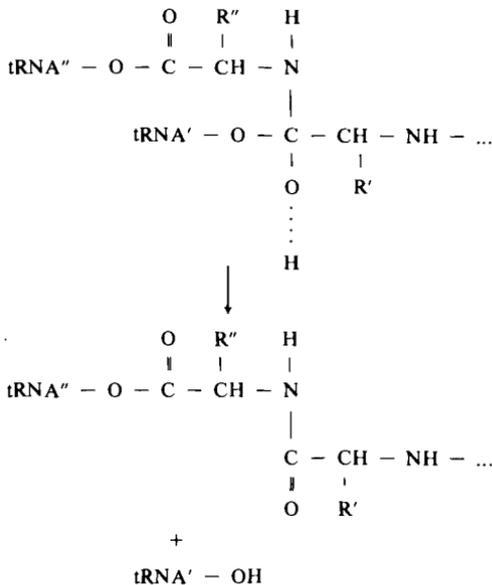
представлять собой какое-либо производное, и, например, рибосома может катализировать атаку аминокруппы акцепторного субстрата на тиоэфирную группу донорного субстрата с образованием тиоамидной связи. Наконец, было показано, что фосфиноэфирный аналог донорного субстрата может реагировать с аминокцил-тРНК в пептидилтрансферазном центре рибосомы, в результате чего образуется неприродная фосфиноамидная связь. Последний факт особенно важен, так как геометрия атакующей группы и переходного состояния этой реакции (треугольная бипирамида) сильно отлична от таковой в случае нормального донорного субстрата (см. В.П.4); нуклеофильный катализ вряд ли совместим с реализацией реакций обоих типов одним и тем же пептидилтрансферазным центром.

В то же время, однако, рибосомная пептидилтрансфераза в определенных условиях способна использовать воду и низкомолекулярные простые спирты типа метанола и этанола как акцепторные субстраты, производя гидролиз или алкоголиз пептидил-тРНК (см. гл. В.VIII). Последнее трудно объяснить в рамках механизма чисто ориентационного действия рибосомной пептидилтрансферазы.

Наиболее разумной кажется гипотеза о том, что ориентационный эффект пептидилтрансферазного центра действительно принципиально важен в осуществлении реакции транспептидации на рибосоме, но что он может дополняться вкладом специфического микроокружения, способствующего реакции. Не исключено, что вблизи субстратов, ориентированных надлежащим образом в рибосоме, локализуются группы, оттягивающие на себя протон от NH_2 -группы акцептора, тем самым увеличивая его нуклеофильность, и могущие способствовать протонированию карбонильного кислорода, увеличивая электрофильность атакующего углерода сложноэфирной группы донора:

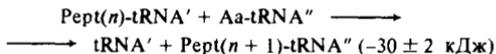


Так или иначе, кажется несомненным, что реакция должна идти по механизму $\text{S}_{\text{N}}2$ нуклеофильного замещения через промежуточное «тетраэдрическое» соединение:



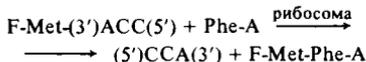
2. ЭНЕРГЕТИКА РЕАКЦИИ

Стандартная свободная энергия гидролиза сложноэфирной связи между тРНК и карбонилем аминокислотного или пептидильного остатка $\Delta G^{0'}$ составляет около -30 кДж/моль (-7 – -8 ккал/моль). Стандартная свободная энергия гидролиза пептидной связи в полипептиде бесконечной длины оценивается около -2 кДж/моль ($-0,5$ ккал/моль). Таким образом, если бы субстраты реакции черпались бы непосредственно из раствора, а продукты реакции освобождались бы в раствор, то свободная энергия, освобождающаяся в результате транспептидации в стандартных условиях, составила бы около -30 кДж/моль ($-6,5$ – $-7,5$ ккал/моль):



Такой формальный расчет обычно приводится в подтверждение энергетической обеспеченности и термодинамической спонтанности процесса транспептидации в рибосоме.

Однако на самом деле таким путем можно оценивать лишь модельные реакции, катализируемые рибосомой или 50S субчастицей между низкомолекулярными субстратами типа



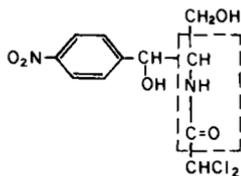
Здесь субстраты достигают пептидилтрансферазного центра прямо из раствора, а продукты немедленно и спонтанно освобождаются в раствор.

В элонгационном цикле один субстрат всегда связан с рибосомой, а другой попадает в пептидилтрансферазный центр из заранее связанного состояния; один из продуктов реакции не освобождается в раствор (до конца трансляции), а другой продукт освобождается не в результате транспептидации, а в результате последующего, более или менее независимого, шага элонгационного цикла (транслокации). Все это делает невозможным даже приблизительную оценку изменения свободной энергии в самой реакции транспептидации в процессе нормального элонгационного цикла на рибосоме. Конечно, из того факта, что реакция протекает, и быстро, следует вывод об уменьшении свободной энергии рибосомного комплекса при транспептидации. Однако это уменьшение не может быть столь значительным, как -30 кДж/моль (-7 ккал/моль) в стандартных условиях, а должно быть меньше по следующим соображениям. Во-первых, свободная энергия гидролиза связанного субстрата, при условии освобождения продуктов гидролиза, должна быть меньше таковой свободного субстрата, так как часть энергии должна была освободиться при связывании, если оно было спонтанным. Во-вторых, свободная энергия гидролиза субстрата, когда продукт задерживается в связанном виде, тоже должна быть меньше таковой в случае, когда продукт освобождается, так как в связанном состоянии продукта аккумулярована часть свободной энергии, если освобождение продукта является в принципе термодинамически спонтанным. Можно считать, что свободная энергия около -30 кДж/моль (-7 ккал/моль), которая освободилась бы в реакции транспептидации в случае, когда субстраты и продукты свободны, здесь распределяется на предыдущую стадию связывания аминоксил-тРНК и последующую стадию транслокации, таким образом питая весь элонгационный цикл.

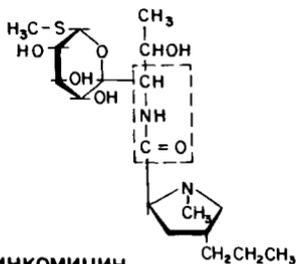
3. ИНГИБИТОРЫ

Существует много специфических ингибиторов пептидилтрансферазной реакции, катализируемой как прокариотическими, так и эукариотическими рибосомами. Все они, как и можно было ожидать, действуют на большую (50S или 60S соответственно) субчастицу рибосомы и имеют к ней большее или меньшее сродство. Многие классические антибиотики, используемые для лечения бактериальных инфекций, — ингибиторы пептидилтрансферазы прокариотической 70S рибосомы.

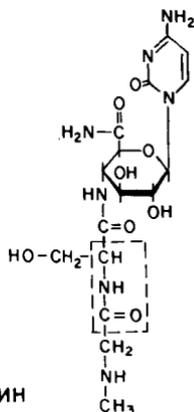
Хлорамфеникол. Самый известный ингибитор пептидилтрансферазы 70S рибосомы это, пожалуй, хлорамфеникол (хлоромидетин) (рис. 103). Он является бактериостатическим антибиотиком широкого спектра действия. На эукариотические 80S рибосомы он не действует. В химическом отношении он представляет собой N-блокированный аминокислотный спирт с ароматическим радикалом. Дихлорметильная группа не обязательна для активности: она может быть заменена на многие умеренно массивные радикалы. Ароматическая



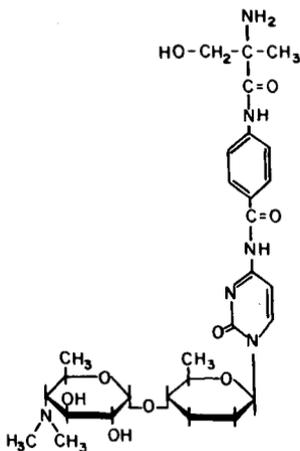
ХЛОРАМФЕНИКОЛ



ЛИНКОМИЦИН



ГУГГЕРОТИН



АМИЦЕТИН

Рис. 103. Антибиотики — ингибиторы пептидилтрансферазного центра рибосомы

нитрогруппа также может быть заменена на ряд других электроотрицательных групп без потери активности антибиотика. В связи с механизмом действия антибиотика заслуживает внимания амидная связь и стереохимия $-\text{CO}-\text{NH}-$ группы с прилегающими атомами, по-видимому, имитирующая стереохимию пептидной группы с прилегающим C^{α} -атомом и боковым радикалом.

Хлорамфеникол связывается с 70S рибосомой или с ее изолированной 50S субчастицей довольно нестабильно и легко может быть отмыт. Соответственно, действие антибиотика обратимо. По-видимому, он связывается с участком пептидилтрансферазного центра, ответственным за взаимодействие с акцепторным субстратом; во всяком случае, пурамицин и 3'-концевые фрагменты

аминоацил-тРНК конкурируют с хлорамфениколом за связывание с пептидилтрансферазным центром. Различные химически активные и фотоактивируемые производные хлорамфеникола могут быть ковалентно сшиты с его ближайшим окружением в рибосоме, в частности с антибиотиком, когда он связан с пептидилтрансферазным центром, сшиваются белки L2, L16, L24 и L27.

Хлорамфеникол ингибирует как естественную транспептидацию между пептидил-тРНК и аминоацил-тРНК в ходе элонгационного цикла, так и реакцию пептидил-тРНК или ее аналогов с пурамицином. Простейшее объяснение состоит в том, что хлорамфеникол является неактивным аналогом акцепторного субстрата и, связываясь с пептидилтрансферазным центром, конкурентно мешает взаимодействию настоящих акцепторов. Однако имеются указания также и на неконкурентный способ ингибирующего действия хлорамфеникола; и не исключено, что, связываясь, антибиотик подавляет какую-то каталитическую функцию пептидилтрансферазного центра.

Линкомицин. Этот антибиотик (рис. 103) также действует только на бактериальные 70S рибосомы, но не на эукариотические 80S рибосомы. Место связывания антибиотика — пептидилтрансферазный центр на 50S субчастице. Линкомицин конкурирует с хлорамфениколом за связывание с рибосомой. По-видимому, он ингибирует взаимодействие акцепторного субстрата с пептидилтрансферазным центром по конкурентному механизму. Химическая структура линкомицина, как и хлорамфеникола, характеризуется наличием амидной связи и группы, имитирующей пептидную группу, смежную с C^α-атомом аминокислотного остатка (только вместо кислоты здесь опять спирт).

4-аминогексозо-пиримидин-нуклеозидные антибиотики. Сюда относятся такие ингибиторы рибосомной транспептидации, как гугеротин, амицетин, бластицидин S, бамицетин и некоторые другие. Химические формулы гугеротина и амицетина даны на рис. 103. Все антибиотики этой группы имеют нуклеозидную структуру и могут рассматриваться как аналоги 3'-концевого аденозина тРНК. Кроме того, в гугеротине (и бластицидине S) можно видеть тот же структурный мотив, что в хлорамфениколе и линкомицине — пептидные группы с примыкающими C^α-атомами. Антибиотики этой группы действуют на бактериальные рибосомы, но некоторые из них (гугеротин, бластицидин S) могут быть ингибиторами также и эукариотических рибосом. Все они связываются с 50S субчастицей рибосомы и ингибируют взаимодействие акцепторных субстратов с пептидилтрансферазным центром рибосомы. Интересно, что их связывание стимулирует взаимодействие низкомолекулярных аналогов донорного субстрата с пептидилтрансферазным центром.

Анизомицин. Этот антибиотик ингибирует транспептидацию только на эукариотических рибосомах. Он связывается с 60S субчастицей и является конкурентным ингибитором пурамицина. Очевидно, он, как и вышеперечисленные антибиотики, мешает взаимодействию акцепторного субстрата с пептидилтрансферазным центром эукариотической рибосомы. Анизомицин — сильный инги-

битор и может полностью блокировать процесс элонгации, остановив рибосомы на мРНК и, таким образом, «заморозив» полирибосомы.

4. СТЕРЕОХИМИЯ

Знание конформации реагирующих субстратов в пептидилтрансферном центре рибосомы имеет ключевое значение для понимания молекулярного механизма реакции транспептидации, катализируемой рибосомой. Однако какие-либо прямые сведения о тех конформациях, в которых 3'-концы тРНК и примыкающие аминокислотные остатки реагируют друг с другом, отсутствуют.

В отношении акцепторного субстрата реакции некоторые сведения могло бы дать изучение пурамицина и его аналогов. Так, известна конформация пурамицина в кристалле, определенная рентгеноструктурным анализом (рис. 104). Она подтверждается исследованиями пурамицина в растворе. Так как пурамицин — хороший акцепторный субстрат в реакции транспептидации, знание его структуры может привести к некоторым суждениям о стереохимии аминокислотного и аденозинового остатков в пептидилтрансферном центре. Далее, известно, что аналог с более фиксированной конформацией, типа изображенного на рис. 105, тоже может служить в качестве акцепторного субстрата в реакции транспептидации, и даже более активен, чем пурамицин. Здесь фиксирована ориентация пуринового кольца относительно рибозы (так называемая «анти»-ориентация), и это позволяет думать, что именно она

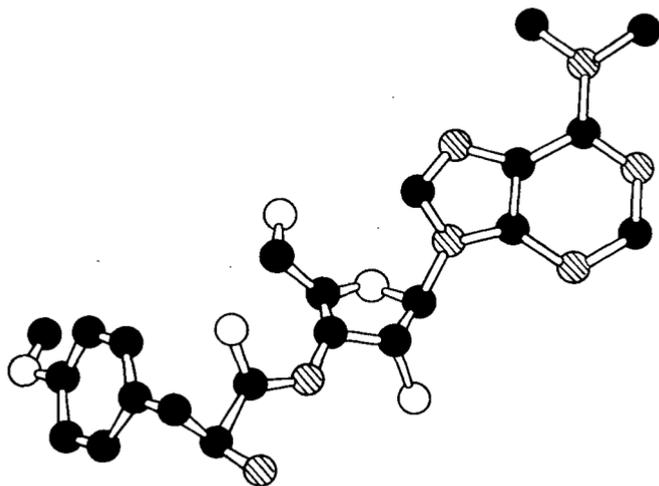


Рис. 104. Шаро-стержневая скелетная модель пурамицина (без водородов), основанная на данных рентгеноструктурного анализа (по М. Sundaralingam et al. *J. Mol. Biol.*, 1972, v. 71, p. 49–70):

черные кружки — углерод; заштрихованные кружки — азот; белые кружки — кислород

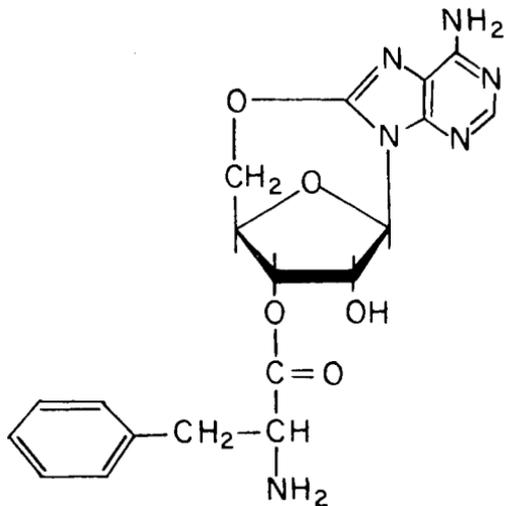


Рис. 105. Активный аналог пурамицина с фиксированной «анти»-ориентацией пуринового кольца (по А. А. Крауевскому, М. К. Кукуханова. In: Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, N. Y.: Academic Press, 1979, v. 23, p. 1–51):

(В противоположной «син»-ориентации кольцо повернуто на 180° вокруг N-гликозидной связи, так что C8 кольца обращен от C5' рибозы.)

субстратов на основании чисто стереохимического анализа.

Прежде всего следует учесть, что рибосома катализирует нормальную реакцию транспептидации также и в том случае, когда субстратом является пролиновый остаток. Пролин, в отличие от остальных аминокислот, имеет стерически ограниченный угол поворота вокруг связи $C^\alpha-N$ (так как эта связь входит в состав кольцевой структуры). В случае пролинового остатка в **донорном субстрате** это ограничение будет задавать определенный фиксированный угол между плоскостью ($N_i-C_i^\alpha-C_i'$) и плоскостью примыкающей пептидной группы ($N_i-C_{i-1}'-O_{i-1}$), равный приблизительно 60° (рис. 106). В пептидной химии угол, определяемый поворотом вокруг связи $C^\alpha-N$, обозначается как угол φ ; в данном случае его значение считается -60° , так как плоскость пептидной группы повернута на 60° против часовой стрелки, если смотреть от C^α -атома. Поскольку любой аминокислотный остаток должен быть установлен в пептидилтрансферазном центре эквивалентным образом, то, очевидно, угол φ должен быть подогнан к тому же значению путем вращения вокруг связи $C^\alpha-N$ для всех других 19 типов остатков донорного субстрата (имеется в виду С-концевой остаток растущего пептида, связанный с тРНК и участвующий в транспептидации).

Далее, из рассмотрения химии реакции следует, что при реакции транспептидации имеет место нуклеофильная атака на атом углерода

реализуется в 3'-концевом аденозине акцепторного субстрата в пептидилтрансферазном центре. К сожалению, никаких уверенных заключений о той конформации, которую принимает aminoacyльный остаток в пептидилтрансферазном центре, отсюда сделать не удается.

Вместе с тем следует полагать, что все aminoacyльные остатки акцепторного субстрата, с одной стороны, и С-концевые aminoacyльные остатки донорного субстрата — с другой, устанавливаются и предъявляются друг другу пептидилтрансферазным центром рибосомы одним и тем же эквивалентным образом, независимо от их типа. Руководствуясь этим важнейшим правилом, можно попытаться вывести некоторые заключения о конформациях реагирующих

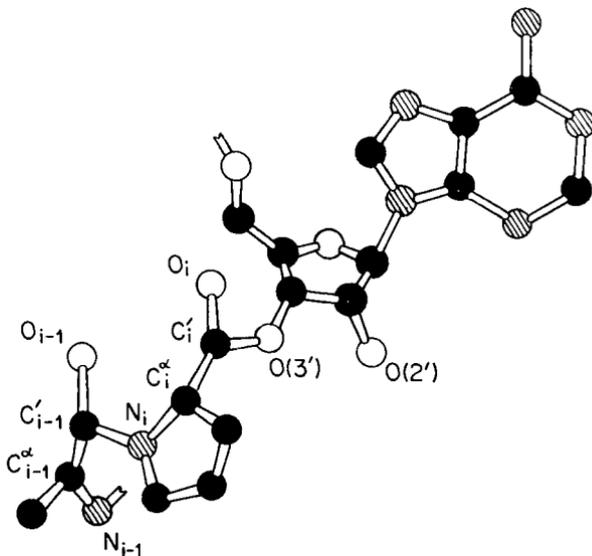


Рис. 106. Шаро-стержневая скелетная модель (без водородов) остатка аланилпролиладенозина как донорного субстрата в пептидилтрансферазном центре рибосомы (предоставлено В. И. Лимом, Институт белка АН СССР, Пушкино):

обозначения атомов те же, что на рис. 104; атомы С-концевого остатка пролина помечены индексом i ; атомы предшествующего остатка аланина — $i - 1$.

карбонильной группы по механизму SN_2 замещения*. Известно, что такая атака осуществляется приблизительно **перпендикулярно** плоскости, в которой лежит сложноэфирная группа, в данном случае

$O_3' - C' \begin{matrix} \diagup O \\ \diagdown C^\alpha \end{matrix}$ (рис. 107, а). Затем в результате атаки должно образо-

ваться промежуточное соединение, где валентные связи атакуемого карбонильного углерода C_i' донорного субстрата направлены к вершинам тетраэдра («**тетраэдрический интермедиат**») (рис. 107, б).

С другой стороны, следует напомнить, что атакующая NH_2 -группа должна быть непротонированной, т. е. атом азота должен иметь свободную неподеленную пару электронов; следовательно, пептидилтрансферазный центр должен обеспечить депротонирование аминоацильного остатка акцепторного субстрата. До образования пептидной связи атом азота имеет три валентные связи, направленные к вершинам тетраэдра, в то время как к четвертой вершине направлена орбиталь неподеленной пары электронов. Из стереохимического анализа следует, что при нуклеофильной атаке направление

* См., напр., P. Sykes. A Guide-Book to Mechanisms in Organic Chemistry, 4th Edition, Longman Publishers, L-N-Y, 1981, pp. 200-239; З. А. Шабарова и А. А. Богданов. Химия нуклеиновых кислот и их компонентов. — М.: Химия, 1978.

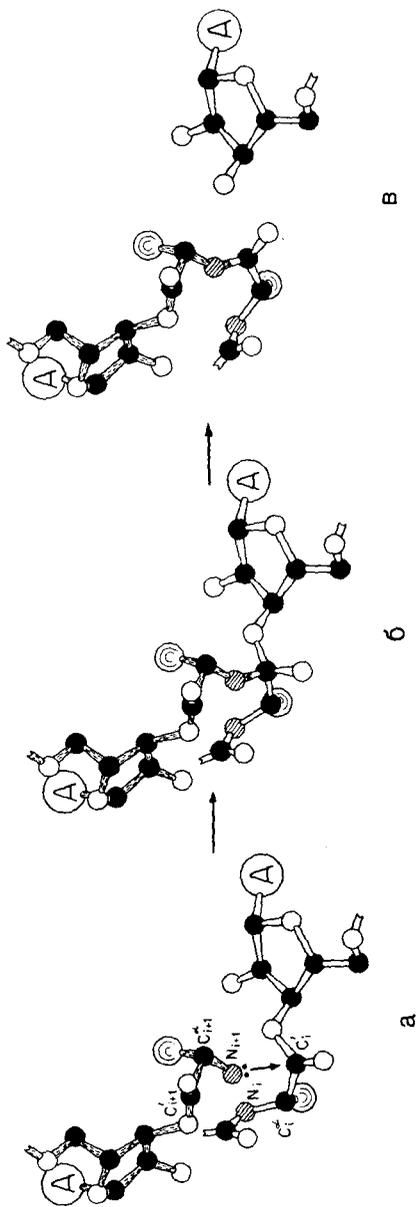


Рис. 107. Стереохимия реакции транспептидации, представленная в виде шаро-стержневых моделей (без водородов) (предоставлено В. И. Лимом, Институт белка АН СССР, Пушкино):
 обозначения атомов те же, что на рис. 104; атомы акцепторного аминокислотного остатка помечены индексом $i+1$; А — остаток аленина в донорном и акцепторном субстрате; a — взаимное расположение донорного (внизу) и акцепторного (вверху) субстратов в пептид-трансаферазном центре; азот акцепторного субстрата (N_{i+1}) атакует донорный карбонильный углерод (C_i^{β}); b — тетраэдрический промежуточный комплекс, образующийся в результате атаки; c — продукты реакции: удлиненный остаток пептидильаденозина (слева) и деацилированный остаток аденозина (справа)

свободной валентности атакующего атома азота должно быть строго определенным: плоскость, образованная этим направлением и связью $N_{i+1} - C_{i+1}^{\alpha}$, должна быть под углом около 120° к плоскости $(N_{i+1} - C_{i+1}^{\alpha} - C'_{i+1})$ акцепторного аминокислотного остатка (рис. 107, а); при любых других ориентациях нуклеофильная атака карбонильной группы невозможна из-за стерических препятствий. После образования пептидной связи это определит угол $\varphi = -60^{\circ}$ во вновь добавленном аминокислотном остатке продукта (рис. 107, в).

Стереохимический анализ, учитывающий все вышеизложенные обстоятельства, показывает, что эффективная нуклеофильная атака в пептидилтрансферазном центре рибосомы возможна только в том случае, если угол между плоскостью сложной азотной группы

$C'_{i+1} = O$ и плоскостью $(C'_i - C_i^{\alpha} - N_i)$, задаваемый вращением вокруг

связи $C_i^{\alpha} - C'_i$ в атакуемом аминокислотном остатке донорного субстрата (пептидил-тРНК), будет около 60° (рис. 107, а). После реакции транспептидации он станет углом ψ со значением около -60° (поворот вокруг связи $C^{\alpha} - C'$ на 60° против часовой стрелки, если смотреть от C^{α} -атома) (рис. 107, в).

Таким образом, конформация донорного аминокислотного остатка в пептидилтрансферазном центре рибосомы должна быть такой же, как конформация аминокислотного остатка в α -спирали ($\varphi = -50^{\circ}$, $\psi = -60^{\circ}$). Более того, акцепторный аминокислотный остаток атакует донорный остаток в такой ориентации, что реакция транспептидации дает в результате удлиненный остов $N_i - C_i^{\alpha} - C'_i - N_{i+1} - C_{i+1}^{\alpha}$ с параметрами α -спиральной конформации.

Независимо от этого результата стереохимического анализа правило эквивалентной (универсальной) установки любого аминокислотного остатка в пептидилтрансферазном центре рибосомы приводит к выводу, что вновь включаемый в полипептидную цепь остаток оказывается всегда в заданной стандартной конформации его остова, с одними и теми же значениями углов поворота вокруг связей $C^{\alpha} - C'$ и $C^{\alpha} - N$. Это с неизбежностью значит, что пептидилтрансферазный центр будет строить спиральную конформацию пептида. Неудивительно, если пептид строится в одной из стерически и энергетически наиболее выгодных спиральных конформаций, каковой является α -спираль. Эта стартовая конформация затем перестраивается в конформацию с уникальной трехмерной структурой. То обстоятельство, что складывание полипептидной цепи *in vivo*, может быть, начинается вовсе не с беспорядочного или вытянутого состояния полипептидной цепи, а путем перестройки спиральной структуры, может создавать уникальные возможности для быстрого и правильного пути поиска конечных конформаций в белковой молекуле.

Рекомендуемая литература

Итоги науки и техники. Сер. молекул. биол. — М.: ВИНТИ, 1977. Т. 9. С. 6—115.

Cohn W. E., ed. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. — N. Y.: Acad. Press, 1979, v. 23, p. 1—51.

Weissbach H., Pestka S., eds. Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis. — N. Y.: Acad. Press, 1977, p. 413–442; 468–553.

Caskey C. T., Beaudet A. L., Scolnick E., Rosman M. Hydrolysis of fMet-tRNA by peptidyl transferase. — Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1971, v. 68, p. 3163–3167.

Krayevsky A. A., Kukhanova M. K., Gottikh B. P. Peptidyl transferase centre of bacterial ribosomes: substrate specificity and binding sites. — Nucleic Acids Res., 1975, v. 2, p. 2223–2236.

Monro R. E. Catalysis of peptide bond formation by 50S ribosomal subunits from *Escherichia coli*. — J. Mol. Biol., 1967, v. 26, p. 147–151.

Scolnick E., Milman G., Rosman M., Caskey T. Transesterification by peptidyl transferase. — Nature, 1970, v. 225, p. 152–154.

Traut R. R., Monro R. E. The puromycin reaction and its relation to protein synthesis. — J. Mol. Biol., 1964, v. 10, p. 63–72.

Глава IV

ЭЛОНГАЦИЯ: ТРАНСЛОКАЦИЯ

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ТЕСТЫ

Итак, в результате реакции транспептидации новоудлиненная пептидил-тРНК занимает А-участок рибосомы, а деацилированная тРНК находится в Р-участке (рис. 108, слева). Другими словами, продукты реакции из рибосомы не освобождены и занимают положения, предназначенные для субстратов. Естественно, что в этом состоянии рибосома не способна осуществлять дальнейшую элонгацию.

Транслокацией называется внутририбосомный переход пептидил-тРНК из положения продукта реакции (из А-участка), где она не способна участвовать в транспептидации в качестве донора пептидила, в положение субстрата реакции (в Р-участок), где она опять сможет реагировать с другим, акцепторным, субстратом. Этот переход непосредственно сопряжен с освобождением второго продукта реакции, деацилированной тРНК, из рибосомы (из Р-участка). Транслокация сопровождается передвижением матричного полинуклеотида относительно рибосомы на один кодон и появлением компетентности к связыванию второго субстрата, аминоацил-тРНК (с вакантным А-участком).

Изменение функционального состояния рибосомы как результат транслокации схематически показано на рис. 108. Итак, пептидил-тРНК перемещается в Р-участок, деацилированная тРНК вытесняется из Р-участка, матрица передвигается на длину одного кодона и А-участок с новым кодоном оказывается вакантным.

В соответствии с вышесказанным, имеются четыре способа измерения транслокации, основанных на одном из следующих критериев: 1) реакция транспептидации с низкомолекулярным акцепторным субстратом — пурамицином; 2) связывание аминоацил-тРНК; 3) освобождение деацилированной тРНК; 4) передвижение матричного полинуклеотида.

1. Пурамициновая реакция — наиболее простой и распространенный тест. Как уже говорилось, пурамицин представляет собой низкомолекулярный аналог аминоацил-тРНК (см. рис. 89), служащий акцеп-

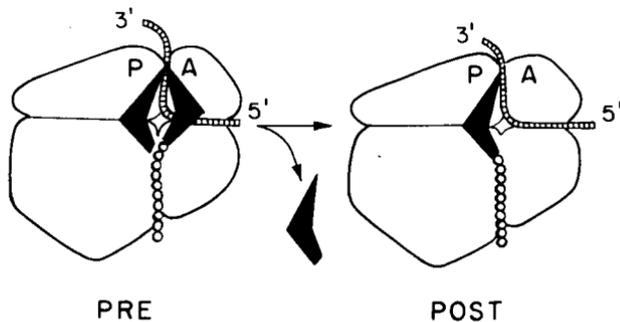


Рис. 108. Схемы претранслокационного (слева) и посттранслокационного (справа) состояний рибосомы

торным субстратом для пептидилтрансферазного центра рибосомы: аминогруппа его аминоацильного остатка атакует сложноэфирную группировку пептидил-тРНК (или ее аналога) как донорного субстрата, в результате чего между ними происходит реакция транспептидации, и пептидилпурамицин выпадает из рибосомы. Пептидил-тРНК в посттранслокационной рибосоме реагирует с пурамицином, а в претранслокационной рибосоме — нет. Отсюда, если пептидильный остаток мечен, то освобождение метки из рибосомы в ответ на добавление пурамицина свидетельствует о компетентности рибосомы к пурамициновой реакции, т. е. о нахождении пептидил-тРНК в Р-участке, и является количественной мерой посттранслокационного состояния в изучаемом препарате рибосом. Наоборот, некомпетентность к пурамицину говорит о претранслокационном состоянии частиц.

2. Связывание аминоацил-тРНК также может служить количественной мерой транслокации (для тестирования удобно пользоваться меченой аминоацил-тРНК). Кодонзависимое связывание аминоацил-тРНК с **транслирующей** рибосомой непосредственно после реакции транспептидации оказывается невозможным; метка будет связываться только после транслокации. Следовательно, неспособность к связыванию аминоацил-тРНК означает претранслокационное состояние рибосомы, а компетентность к связыванию аминоацил-тРНК характеризует посттранслокационное состояние.

3. Освобождение деацелированной тРНК из транслирующей рибосомы сопряжено с транслокацией. Поэтому, если остаток тРНК молекулы пептидил-тРНК, удерживаемой в рибосоме, мечен, то после реакции транспептидации метка будет еще обнаруживаться в рибосоме (деацелированная тРНК остается в Р-участке), и только транслокация будет освобождать метку в раствор. Поэтому для транслирующей рибосомы удержание деацелированной тРНК отражает претранслокационное состояние, а отсутствие деацелированной тРНК свидетельствует о посттранслокационном состоянии. Освобождение деацелированной тРНК из рибосомы в раствор является очень удобным количественным тестом для прослеживания хода транслокации в популяции рибосом.

4. Перемещение матричного полинуклеотида как тест транслокации наиболее сложен в техническом отношении. Он может быть или непрямым, когда основан на появлении компетентности к связыванию аминоацил-тРНК, специфической к кодону, следующему за ранее фиксированным в рибосоме, или прямым, если анализируется непосредственно изменение закрытого (защищаемого) рибосомой отрезка матрицы. В прямом тесте было показано, что сдвиг полинуклеотидной матрицы относительно рибосомы на один триплет нуклеотидов сопровождается появлением компетентности к пурамицину и к связыванию аминоацил-тРНК.

2. УЧАСТИЕ ФАКТОРА ЭЛОНГАЦИИ (EF-G ИЛИ EF-2)

Транслокация катализируется довольно крупным белком, называемым фактором элонгации G (EF-G) у прокариот или фактором элонгации 2 (EF-2) у эукариот. Молекулярная масса EF-G — около 80000; он представляет собой одну полипептидную цепь длиной 701 аминокислотный остаток (в случае *E. coli*), образующую несколько глобулярных доменов. Эукариотический EF-2 несколько крупнее EF-G; его молекулярная масса у млекопитающих и ряда других животных — около 95000. EF-G (или, соответственно, EF-2) взаимодействует с ГТФ и с рибосомой. При этом взаимодействии наводится ГТФазная активность, и ГТФ расщепляется до ГДФ и ортофосфата. При взаимодействии (комплексобразовании) EF-G и ГТФ с претранслокационной рибосомой происходит быстрая транслокация, а EF-G, ГДФ и ортофосфат освобождаются из комплекса с рибосомой.

Взаимодействие EF-G (или EF-2) с ГТФ значительно слабее, чем аналогичное взаимодействие EF-T_u (или EF-1) с ГТФ. Образующий комплекс EF-G · GTP не стабилен и быстро обратим (комплекс EF-2 · GTP несколько стабильнее). Тем не менее, его образование является необходимой предпосылкой для взаимодействия EF-G с рибосомой. Считается, что ГТФ индуцирует какое-то конформационное изменение белка (EF-G или EF-2), которое дает в результате сродство к рибосоме. В этом отношении ГТФ очень специфичен и не может быть заменен ни другими нуклеозидтрифосфатами, ни какими бы то ни было нуклеозидмоно- и дифосфатами. Однако он может быть заменен нерасщепляемыми аналогами ГТФ — гуанилилметилendifосфонатом (GMPPCP) или гуанилилимидодифосфонатом (GMPPNP) (см. рис. 87).

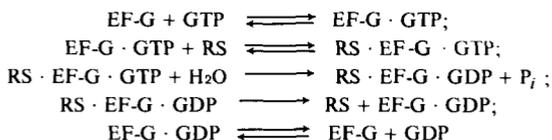
Комплекс EF-G · GTP (EF-2 · GTP) может связываться как с функционирующей (транслирующей), так и с вакантной рибосомой, и даже с изолированной 50S субъединицей. Место связывания EF-G на 50S субъединице находится у основания L7/L12-стержня (см. рис. 88); в 70S рибосоме он оказывается у границы раздела между рибосомными субчастицами, в районе тРНК-связывающих участков. Связыванию EF-G · GTP с рибосомой препятствует аминоацил-тРНК в А-участке рибосомы, а также присутствие другого белкового фактора — EF-T_u (см. В.1.2).

Во всех случаях связывание комплекса EF-G · GTP (или EF-2 · GTP)

с рибосомой или ее субчастицей приводит к расщеплению (гидролизу) ГТФ. Считается, что рибосома наводит ГТФазную активность на EF-G, т.е. что ГТФазный центр находится на EF-G, но без рибосомы почему-то не активен (см. В.1.3). Если рибосома вакантна или вместо рибосомы используется ее большая субчастица, то имеет место просто гидролиз ГТФ, не сопряженный с какими-либо событиями элонгации.

EF-G-катализируемый гидролиз ГТФ на рибосоме приводит к тому, что EF-G теперь оказывается в комплексе с ГДФ. Но ГДФ не эффективен в придании белку EF-G сродства к рибосоме, и поэтому комплекс EF-G · GDP освобождается из рибосомы и затем диссоциирует.

Таким образом, полная последовательность реакций с участием EF-G выглядит следующим образом:



Если в реакциях участвует вакантная рибосома или ее изолированная 50S субчастица, то весь процесс представляет собой не более чем гидролиз ГТФ, согласно суммарному уравнению:



Другими словами, в этом случае EF-G в комбинации с рибосомой выступает только как ГТФаза. Однако, если в те же реакции вовлечена претранслокационная рибосома, то в дополнение к гидролизу ГТФ результатом участия EF-G будет также и транслокация.

Возникает вопрос, с какой из перечисленных последовательных реакций при участии EF-G непосредственно сопряжена транслокация? Долгое время казалось естественным, что транслокация — энергопотребляющий процесс и что она непосредственно сопряжена с гидролизом ГТФ на рибосоме. Оба эти предположения оказались неверными. Рассмотрение ошибочности первого предположения о необходимости энергии для осуществления транслокации будет дано ниже. Что касается предположения о сопряжении транслокации с гидролизом ГТФ, то оно было опровергнуто прямыми экспериментами, где вместо ГТФ был использован его нерасщепляемый аналог. Оказалось, что в том случае, когда претранслокационные рибосомы взаимодействовали с EF-G и GMPPCP или GMPPNP, имела место быстрая транслокация, как и в случае EF-G и ГТФ. Отсюда следовал вывод, что для промотирования (катализа) транслокации достаточно присоединения EF-G · GTP к рибосоме. Здесь имеются две возможности: либо само присоединение (сродство) белка к рибосоме производит некое воздействие, сдвигающее молекулы тРНК в рибосоме, либо в претранслокационной рибосоме с присоединенным EF-G

барьер для спонтанных транслокационных перемещений оказывается пониженным.

Итак, транслокация катализируется EF-G с ГТФ; катализ транслокации происходит вследствие присоединения EF-G с ГТФ к рибосоме, но не вследствие расщепления ГТФ.

3. РОЛЬ EF-G-ОПОСРЕДОВАННОГО ГИДРОЛИЗА ГТФ

Использование нерасщепляемого аналога ГТФ в EF-G-катализируемой транслокации показало, что в этом случае после транслокации EF-G остается ассоциированным с посттранслокационной рибосомой. Это понятно: разрушения эффектора, навещающего сродство EF-G к рибосоме, здесь нет, и, следовательно, EF-G продолжает сохранять это сродство и удерживаться в комплексе. Однако присутствие EF-G на рибосоме препятствует присутствию EF-T_u и аминоацил-тРНК в А-участке. Поэтому в результате транслокации, произведенной EF-G с нерасщепляемым аналогом ГТФ, хотя пептидил-тРНК приобретает способность реагировать с акцепторным субстратом (компетенцию к пурамицину), а деацилированная тРНК освобождается из рибосомы, такая посттранслокационная рибосома не может связать очередную аминоацил-тРНК, а, следовательно, не может продолжить элонгацию. В экспериментальных условиях EF-G с нерасщепляемым аналогом ГТФ может быть отмыт от таких посттранслокационных рибосом, и тогда способность связывать аминоацил-тРНК и продолжать элонгацию приобретает. Значит, в нормальном процессе EF-G должен присоединиться к рибосоме, чтобы вызвать транслокацию, а затем покинуть ее, чтобы разрешить следующий шаг. Роль ГТФ состоит в том, что он как эффектор обеспечивает присоединение EF-G к рибосоме; роль гидролиза ГТФ состоит в том, что эффектор разрушается, приводя к требуемому освобождению EF-G из рибосомы.

В этом плане интересно действие антибиотика фусидовой кислоты (рис. 109), специфически воздействующего на EF-G. EF-G с фусидовой кислотой может нормально взаимодействовать с ГТФ и далее с рибосомой; в рибосоме происходит транслокация; далее происходит расщепление ГТФ до ГДФ и ортофосфата; однако фусидовая кислота повышает сродство EF-G к рибосоме, так что после распада ГТФ EF-G · GDP не освобождается. Соответственно, хотя транслокация произошла, очередная аминоацил-тРНК не может связаться с А-участком рибосомы, и элонгация останавливается.

4. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ СОБЫТИЙ В EF-G-КАТАЛИЗИРУЕМОЙ ТРАНСЛОКАЦИИ. ИНГИБИТОРЫ

Схема последовательности событий при транслокации, промотируемой EF-G, дана на рис. 110.

Первое событие — взаимодействие претранслокационной рибосо-

мы с EF-G · GTP. Это событие ингибируется тиострептоном — специфическим антибиотиком, связывающимся с 50S субчастицей рибосомы в районе основания L7/L12-стержня, т. е. приблизительно в том же районе, где показано связывание EF-G (см. рис. 88). Белок L11 и его участок 23S РНК оказались непосредственно ответственными за связывание тиострептона. Интересно, что тиострептоустойчивые мутанты или штаммы лишены белка L11 как компонента 50S субчастицы рибосомы. Похоже, что молекула связанного тиострептона блокирует место взаимодействия EF-G с рибосомой.

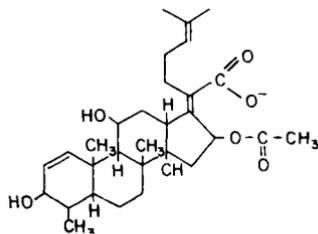


Рис. 109. Фусидовая кислота — ингибитор, действующий на EF-G

До сих пор ни при каких условиях не удалось экспериментально наблюдать стабильного комплекса претранслокационной рибосомы с EF-G · GTP или EF-G · GMPPCP. По-видимому, такой комплекс нестабилен и короткоживущ. Взаимодействие претранслокационной рибосомы с EF-G · GTP или EF-G · GMPPCP дает в результате немедленную быструю транслокацию. Это второе событие в рассматриваемой схеме (рис. 110). Транслокацию можно ингибировать либо понижением температуры, либо повышением концентрации Mg^{2+} ; например, при 4°C или в 30 мМ Mg^{2+} при физиологической температуре (30–37°C) транслокация оказывается практически блокированной. Однако и в этих условиях стабильного комплекса претранслокационной рибосомы с EF-G · GTP или EF-G · GMPPCP не наблюдается, т. е. взаимодействие, видимо, быстро обратимо. Имеются также специфические агенты, например антибиотик виомицин, которые ингибируют рассматриваемое событие, т. е. собственно транслокацию.

Третье событие в рассматриваемой схеме — гидролиз ГТФ и освобождение ортофосфата. Посттранслокационная рибосома довольно прочно удерживает EF-G, пока не произойдет гидролиз ГТФ. Естественно, что при замене ГТФ на его нерасщепляемый аналог (например, GMPPCP) это событие не произойдет, и посттранслокационная рибосома останется в комплексе с EF-G · GMPPCP.

Если произошел гидролиз ГТФ, то в комплексе с посттранслокационной рибосомой окажется теперь EF-G · GDP. Такой комплекс весьма нестабилен и диссоциирует, т. е. EF-G и ГДФ освобождаются из рибосомы. Это четвертое событие на схеме. Фусидовая кислота, упоминавшаяся выше, специфически ингибирует как раз эту стадию, фиксируя комплекс и не давая EF-G · GDP освободиться из рибосомы.

В целом, последовательность событий, описываемая схемой (рис. 110), оказывается поразительно **аналогичной** последовательности событий в EF- T_u -промотируемом связывании аминокил-тРНК (см. рис. 100): сначала нестабильное обратимое взаимодействие, следующая за ним быстрая (катализируемая) стадия основного события, затем гидролиз ГТФ и, наконец, освобождение белкового фактора с

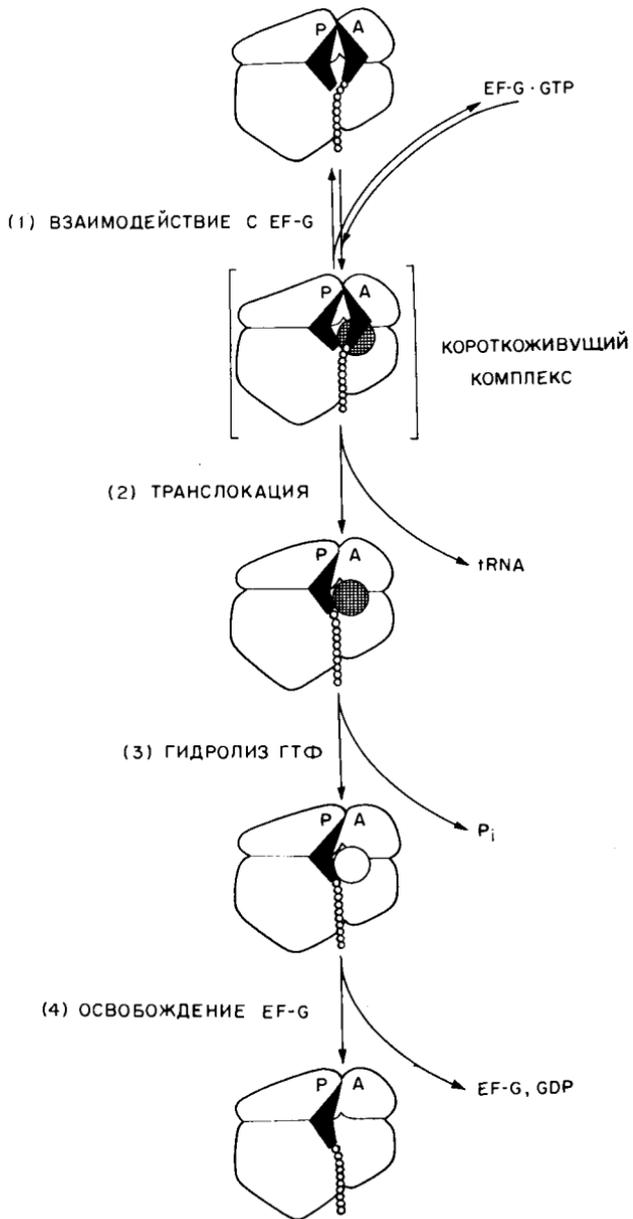


Рис. 110. Схема последовательности событий в процессе транслокации

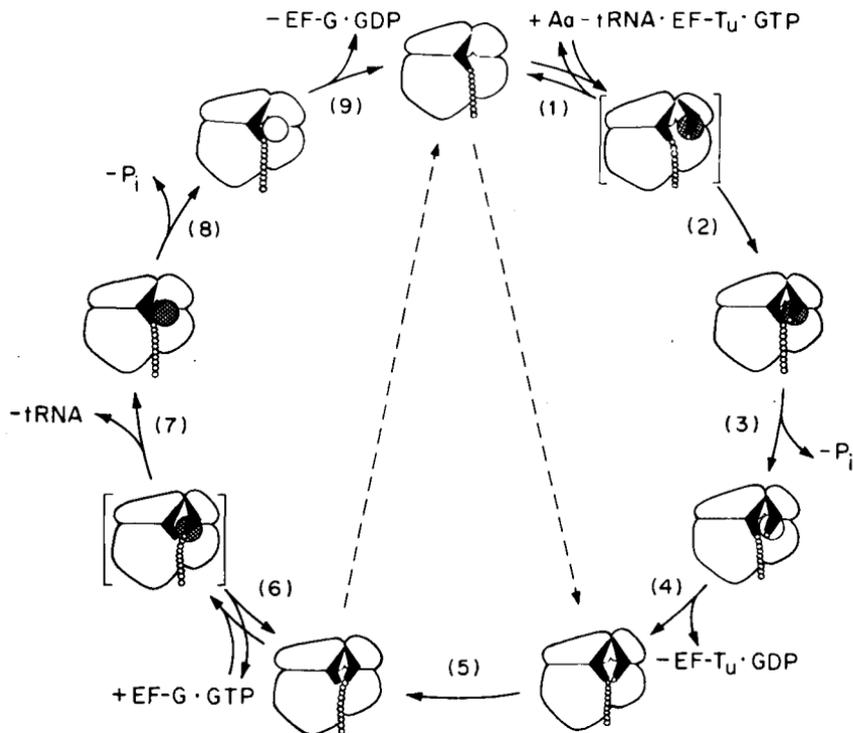


Рис. 111. Схема полной последовательности событий в фактор-катализируемом элонгационном цикле:

пунктиром даны бесфакторные шунты: неэнзиматическое связывание аминоксил-тРНК и неэнзиматическая транслокация

ГДФ. Такая симметрия элонгационного цикла видна на рис. 111, где оба фактор-катализируемых процесса даны в виде отдельных последовательных событий.

5. «НЕЭНЗИМАТИЧЕСКАЯ» (БЕСФАКТОРНАЯ) ТРАНСЛОКАЦИЯ

Было установлено, что при определенных условиях в бесклеточных системах транслокация может происходить также и в отсутствие факторов элонгации и ГТФ. Эта «неэнзиматическая» транслокация идет гораздо медленнее, чем EF-G · GTP-катализируемая, но, тем не менее, дает в результате нормальное посттранслокационное состояние рибосомы, которое способно продолжать элонгацию. Следовательно, процесс транслокации является термодинамически спонтанным. Транслокационный механизм оказывается принципиально присущ самой рибосоме, а не привносится фактором элонгации.

Опять-таки здесь ситуация оказывается полностью симметричной таковой в случае связывания аминоксил-тРНК: в обоих случаях

процесс может идти медленно в бесфакторном режиме, оба процесса идут спонтанно («с горы») и их механизм обеспечивается рибосомой; таким образом, факторы элонгации лишь катализируют термодинамически разрешенные и механистически обеспеченные процессы.

Бесфакторное (неэнзиматическое) связывание аминоацил-тРНК, катализируемая рибосомой транспептидация и бесфакторная (неэнзиматическая) транслокация создают *бесфакторный элонгационный цикл*. Он показан пунктирными шунтирующими стрелками на рис. 111. Повторение циклов дает в результате медленную бесфакторную элонгацию. В бесклеточных системах была проведена бесфакторная трансляция полиуридиловой кислоты и ряда синтетических гетерополинуклеотидов и показано полное соответствие полипептидного продукта матричному полинуклеотиду, согласно генетическому коду.

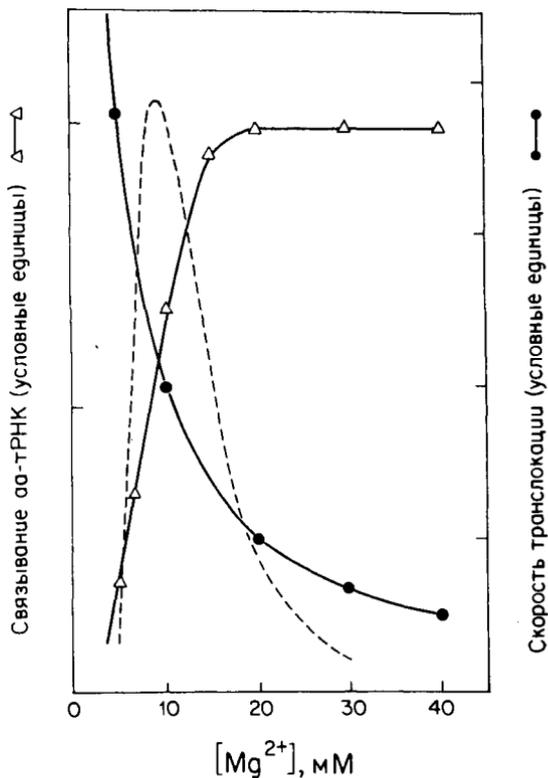
В то время как повышение концентрации Mg^{2+} стимулирует связывание аминоацил-тРНК, понижение Mg^{2+} стимулирует транслокацию (рис. 112). При концентрациях Mg^{2+} около 3 мМ скорость транслокации может приближаться к таковой в присутствии EF-G с ГТФ (зато связывание аминоацил-тРНК практически не идет). При концентрации Mg^{2+} около 30 мМ скорость транслокации близка к нулю (связывание аминоацил-тРНК идет хорошо). Поперемненно меняя концентрацию Mg^{2+} в бесклеточной системе, можно было бы в известной мере имитировать действие факторов элонгации и тем самым значительно ускорить бесфакторный элонгационный цикл. Не исключено, что этот подход в будущем найдет свое применение.

Сравнивая медленную бесфакторную транслокацию с быстрой EF-G · GTP-катализируемой транслокацией, важно отметить, что фактор, по-видимому, не снижает заметным образом тепловую энергию активации процесса; это наводит на мысль, что здесь катализ имеет преимущественно энтропийную природу. Ингибиторный анализ также показывает, что фактор не создает нового реакционного пути, идущего через промежуточные стадии в обход высокого активационного барьера, как это делает обычный «энзальпийный катализатор»: самые различные специфические ингибиторы транслокации (виомицин, спектиномицин, эритромицин, неомицин, канамицин, гентамицин, гигромицин В) действуют как на энзиматический, так и неэнзиматический процесс, указывая на существование **одинакового транслокационного механизма**, с одними и теми же мишенями в обоих случаях. Следовательно, фактор элонгации катализирует процесс, скорее всего, путем создания лучших пространственных условий в рибосоме для **того же самого**, присущего рибосоме как таковой, транслокационного пути. Одним из способов сделать это могла бы быть простая фиксация одного из термически флуктуирующих подсостояний рибосомы, которое было бы благоприятно для транслокации. Такой фиксирующий или ориентирующий эффект присоединения EF-G как крупного дополнительного лиганда рибосомы кажется вероятным.

Таким образом, возможность бесфакторной (неэнзиматической) транслокации отражает, по-видимому, существование присущего рибосоме транслокационного механизма и энергетическую обеспечен-

Рис. 112. Зависимость бесфакторного (неэнзиматического) связывания аминоацил-тРНК с рибосомой и бесфакторной (неэнзиматической) транслокации от концентрации Mg^{2+} (по Н. В. Белициной и др. Докл. АН СССР, 1975, т. 224, с. 1205—1208):

чем ниже концентрация Mg^{2+} , тем хуже связывание аминоацил-тРНК, но тем скорее транслокация; пунктирная линия — зависимость скорости бесфакторной трансляции от концентрации Mg^{2+}



ность процесса без привлечения ГТФ, а ее свойства в сравнении с таковыми факторзависимой (энзиматической) транслокации свидетельствуют о преимущественно энтропийном вкладе EF-G как катализатора.

6. ПЕРЕДВИЖЕНИЕ МАТРИЦЫ ПРИ ТРАНСЛОКАЦИИ

Уже отмечалось, что транслокация сопровождается перемещением матричного полинуклеотида на один кодон. В процессе этого сдвига и после него связь между антикодоном пептидил-тРНК и кодоном матрицы сохраняется; кодон-антикодовый комплекс движется, по-видимому, как целое из А-участка в Р-участок рибосомы.

Естественно поставить вопрос, что служит ведущим актом — перемещение матрицы или перемещение пептидил-тРНК? Ряд фактов указывает на то, что ведущим является транслокационное перемещение тРНК, которая своим антикодоном тянет за собой кодон матрицы. В качестве одной из ярких демонстраций независимости транслокации от матричного полинуклеотида можно рассматривать открытие рибосомного синтеза полипептида из аминоацил-тРНК в отсутствие матричного полинуклеотида; в этом случае было показано существование нормального элонгационного цикла с EF-G · GTP-катализируемой транслокацией. Наиболее прямым указанием на ведущую роль

тРНК и ведомую роль мРНК в процессе транслокации был опыт Д. Л. Риддла и Дж. Карбона (1973), в котором мутантная тРНК, имевшая в качестве антикодона нуклеотидный квадруплет вместо триплета, супрессировала мутацию со сдвигом рамки (+1), т. е. передвигала мРНК в рибосоме, соответственно, на четыре (а не на три) нуклеотидных остатка.

Таким образом, главное событие транслокации это, по-видимому, перемещение пептидил-тРНК из А-участка в Р-участок рибосомы. Антикодон тянет за собой связанный с ним кодон матрицы, приводя к соответствующему перемещению матрицы относительно рибосомы на один триплет (в норме). В результате в А-участке устанавливается следующий (по направлению к 3'-концу) нуклеотидный триплет матрицы, а предыдущий (примыкающий с 5'-конца) триплет вместе с антикодоном деацилированной тРНК оказывается выведенным из Р-участка.

7. ЭНЕРГЕТИКА ТРАНСЛОКАЦИИ

Вопрос об энергетике транслокации долгое время был сильно запутан ввиду ряда исторических причин и из-за традиционности мышления биохимиков. Дело в том, что участие ГТФ в процессе транслокации стало известно раньше всех прочих фактов, касающихся этой стадии элонгационного цикла. Рассмотрение транслокации как процесса **механического перемещения** крупных молекулярных масс и факт сопряженного расщепления ГТФ на ГДФ и ортофосфат наводили на мысль об аналогии с мышечным сокращением, происходящим за счет энергии гидролиза АТФ до АДФ и ортофосфата. Это создало мощный психологический стимул для выдумывания особых энергетических проблем в процессе транслокации, которые должны бы были решаться за счет энергии расщепления ГТФ. Практически все предложенные с тех пор модели транслокации предполагают, что энергия **именно** EF-G-опосредованного гидролиза ГТФ так или иначе используется для механической работы по активному перемещению или хотя бы активному выталкиванию рибосомных лигандов (тРНК) из их связывающих участков, а фактору EF-G и/или белку L7 / L12 часто приписывают функцию сократительных белков. Согласно одним моделям, энергия ГТФ через EF-G прилагается к пептидил-тРНК, занимающей А-участок, так что развиваемое усилие сдвигает ее вместе со своим кодоном по направлению к Р-участку, вытесняя деацилированную тРНК из Р-участка. В других моделях энергия ГТФ реализуется фактором EF-G первично для удаления (выталкивания) деацилированной тРНК из Р-участка, и тогда пептидил-тРНК спонтанно переходит из А-участка в вакантный Р-участок, к которому она имеет большое сродство, увлекая с собой свой кодон матричного полинуклеотида.

Однако распад ГТФ, как уже указывалось, происходит **после** транслокации, т. е. никакого сопряжения реакции гидролиза ГТФ непосредственно с транслокацией нет. Кроме того, было показано, что в реакции гидролиза идет прямой перенос фосфатного остатка

от ГТФ на воду, без образования какого бы то ни было промежуточного фосфорилированного соединения, могущего обеспечить сопряжение. Следовательно, остается предполагать другой механизм: транслокация сопряжена с адсорбцией EF-G на рибосому, в то время как гидролиз ГТФ требуется для десорбции EF-G. Если бы действительно надо было совершать работу для перевода рибосомы из претранслокационного состояния в посттранслокационное, то можно было бы считать, что работа совершается за счет энергии образования комплекса $GTP \cdot EF-G \cdot$ рибосома, которая затем компенсируется энергией гидролиза ГТФ. Таким образом, этот механизм все равно обеспечивал бы работу в конечном счете энергией гидролиза ГТФ, но не путем ее прямого сопряжения, а путем «дачи взаймы» с последующим возвратом.

На самом деле, как было показано, транслокация может идти спонтанно, без EF-G и ГТФ (неэнзиматическая транслокация). Это значит, что процесс термодинамически разрешен (процесс «с горы») или, другими словами, термодинамический потенциал (свободная энергия) претранслокационного состояния рибосомы выше, чем посттранслокационного состояния. Естественно, в такой ситуации затрата энергии для совершения работы (поднятия потенциала) не требуется. Таким образом, какой бы то ни было термодинамический вклад EF-G с ГТФ в процесс транслокации надо исключить.

Тем не менее, в EF-G-катализируемой транслокации EF-G с ГТФ к рибосоме присоединяются, и затем ГТФ гидролизует, т. е. дополнительная свободная энергия тратится. На что? Очевидно, что любая энергия может затрачиваться либо для совершения полезной работы против термодинамического потенциала (проведение процесса «в гору»), либо на преодоление барьеров в спонтанном («с горы») процессе, без накопления полезной работы. Исключая первую альтернативу, остается признать, что вклад ГТФ является **чисто кинетическим**: сначала взаимодействие ГТФ с EF-G обеспечивает присоединение EF-G · GTP к рибосоме и тем самым уменьшение барьеров в ходе транслокации, а затем гидролиз ГТФ снимает барьер, создаваемый самим EF-G для следующей стадии элонгационного цикла. Следовательно, энергия ГТФ тратится только на преодоление барьеров и в конечном счете целиком диссипирует в теплоту. Это и есть катализ транслокации. В данном случае особенностью катализа является то, что он энергозависим, как и катализ связывания аминоксил-тРНК с участием EF-T_u.

8. МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ ТРАНСЛОКАЦИИ

Точный молекулярный механизм транслокации не известен. Вместе с тем, имеющиеся знания о структуре тРНК и рибосомы, а также о свойствах претранслокационного и посттранслокационного комплексов дают возможность предполагать вероятную стереохимическую модель взаимодействий между рибосомой, двумя тРНК и мРНК и изменение этих взаимодействий при транслокации. Такая гипотетическая модель излагается ниже.

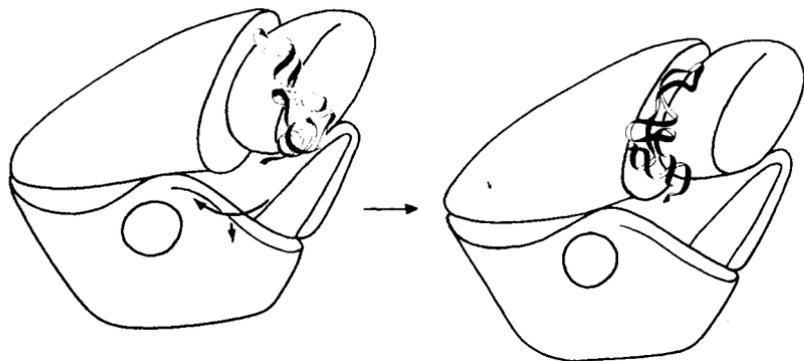


Рис. 113. Схематическое изображение перехода (винтового перемещения) молекулы тРНК из А-участка в Р-участок рибосомы при транслокации. Для простоты изображения в претранслокационном состоянии рибосомы показан лишь один остаток тРНК (остаток пептидил-тРНК)

При рассмотрении стереохимии кодон-антикодонного взаимодействия в гл. V. II.1 указывалось, что антикодоны двух тРНК образуют двуспиральные структуры типа А-формы с двумя смежными кодонами мРНК (см. рис. 94). 3'-Концы двух тРНК также сближены, а углы разведены, так что плоскости двух тРНК находятся под определенным углом друг к другу (см. рис. 93). Эта ситуация сохраняется после транспептидации и, таким образом, **претранслокационная рибосома** содержит комплекс деацилированной тРНК (в Р-участке) и пептидил-тРНК (в А-участке), скрепленный комплементарным гексаплетом мРНК. По-видимому, угол пептидил-тРНК примыкает к головкам 30S и 50S субчастиц рибосомы, а угол деацилированной тРНК находится в районе основания L7/L12-стержня 50S субчастицы (см. рис. 86).

Транслокация мыслится как операция **винтового перемещения** тРНК, включающая поворот относительно оси, проходящей через антикодон и акцепторный конец, по часовой стрелке (если смотреть от антикодона) и трансляцию вдоль той же оси в направлении акцепторного конца. В результате деацилированная тРНК оказывается выведенной из Р-участка и диссоциирует из комплекса со своим кодоном; пептидил-тРНК оказывается в Р-участке, а угол ее тРНК располагается у основания L7/L12-стержня; А-участок теперь вакантен. Это и есть посттранслокационное состояние (рис. 113).

Какая сила заставляет двигаться пептидил-тРНК из А-участка в Р-участок при транслокации? Если путь перемещения комплекса двух тРНК и мРНК задается конструкцией самой рибосомы, то само перемещение может быть результатом теплового движения. Поскольку перемещение сопровождается диссоциацией деацилированной тРНК, результат оказывается энтропийно выгодным. Во всяком случае, в бесфакторной (неэнзиматической) транслокации нет, по-видимому, другого источника движения, кроме теплового движения. Вероятно, что точно так же тепловое движение индуцирует перемещение в

процессе EF-G · GTP-катализируемой транслокации, но посадка EF-G с ГТФ на рибосому создает какую-то структурную обстановку, при которой стерические и энергетические барьеры на пути перехода оказываются сниженными (в том числе, под влиянием EF-G может снижаться сродство пептидил-тРНК к А-участку). Стержень L7 / L12 рибосомы, по-видимому, каким-то образом участвует в механизме катализа транслокации (в создании благоприятной структурной обстановки) под влиянием фактора EF-G с ГТФ.

9. ПОДВЕДЕНИЕ ИТОГОВ: ОБЩИЙ МАТЕРИАЛЬНЫЙ И ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ БАЛАНС ЭЛОНГАЦИОННОГО ЦИКЛА

Итак, следующие друг за другом стадии кодоннаправляемого связывания аминоацил-тРНК с элонгирующей рибосомой, транспептидации и транслокации создают цикл, в результате которого а) детерминируется положение одного аминокислотного остатка в полипептидной цепи, подлежащей синтезу; б) образуется одна пептидная связь; в) деацилируется одна молекула аминоацил-тРНК; г) гидролизуются две молекулы ГТФ до ГДФ и ортофосфата и д) оказывается продвинутым относительно рибосомы (прочитанным) один нуклеотидный триплет матричного полинуклеотида. Повторение таких циклов и создает процесс элонгации; количество циклов на всю элонгацию определяется количеством кодирующих триплетов матрицы (за вычетом иницирующего кодона).

В чисто материальном выражении на один цикл потреблены **из раствора** одна молекула аминоацил-тРНК и две молекулы ГТФ (плюс две молекулы воды). Отданы **в раствор** одна молекула деацилированной тРНК, две молекулы ГДФ и две молекулы ортофосфорной кислоты (см. рис. 80). Одновременно **в рибосоме** произошло удлинение пептида.

Отсюда следует также и энергетический баланс цикла. Энергетические потребности цикла представляются весьма скромными: это детерминация положения аминокислотного остатка в полипептидной цепи, $\Delta G^{\circ} \leq +10$ кДж/моль (2,5 ккал/моль) и образование пептидной связи, $\Delta G^{\circ} \approx +2$ кДж/моль (+0,5 ккал/моль). Ясно, что эти энергетические потребности **всего** цикла с избытком покрываются той свободной энергией, которая освобождается при деацилировании аминоацил-тРНК, $\Delta G^{\circ} \approx -30$ кДж/моль (-7 ккал/моль). Тем не менее, сопряженно с циклом происходит гидролиз двух молекул ГТФ (см. рис. 80), дающий освобождение еще дополнительного большого количества свободной энергии, $\Delta G^{\circ} \approx -60$ кДж/моль (-15 ккал/моль). Таким образом, элонгация выглядит процессом расточительным, мало экономичным, с низким коэффициентом полезного действия. Преобладающая часть свободной энергии, освобождаемой в ходе цикла, диссипирует в теплоту.

В то же время, при исключении ГТФ даже из одной стадии цикла (либо из стадии связывания аминоацил-тРНК, либо из стадии транслокации) процесс резко замедляется, а кроме того, становится

мало устойчив к неблагоприятным условиям, ядам и другим помехам. Следовательно, большой избыток свободной энергии необходим системе, чтобы обеспечить высокие скорости и высокую устойчивость элонгации. Очевидно, экономичность не является главным преимуществом, обеспечивающим жизнеспособность системы в живой природе.

Рекомендуемая литература

- Итоги науки и техники. Сер. биол. химия. — М.: ВИНТИ, 1983. Т. 18. С. 135—193.
- Гаврилова Л. П., Спири А. С.* Изучение механизма транслокации в рибосомах. II. Активация спонтанной («неэнзиматической») транслокации в рибосомах *Escherichia coli* парахлормеркурибензоатом. — Молекул. биол., 1972. Т. 6. С. 311—319.
- Обвинников Ю. А., Алахов Ю. Б., Бундулис Ю. П.* и др. Первичная структура фактора элонгации G из *Escherichia coli*. IX. Исследование структуры пептидов бромиданового расщепления G-фактора, выделенных на тиол-активированной сефарозе, и продуктов расщепления G-фактора по связям Asp-Pro. Полная первичная структура.—Биоорган. химия, 1983. Т. 9. С. 343—357.
- Спири А. С.* О механизме работы рибосомы. Гипотеза смыкания-размыкания субчастиц. — Докл. АН СССР, 1968. Т. 179. С. 1467—1470.
- Тналина Г. Ж., Белицина Н. В., Спири А. С.* Безматричный синтез полипептидов из аминоксил-тРНК на рибосомах *Escherichia coli*. — Докл. АН СССР, 1982. Т. 266, С. 741—745.
- Четверин А. Б., Спири А. С.* Биоэнергетика и синтез белка. — Усп. биол. химии, 1983. Т. 24. С. 3—39.
- The Mechanism of Protein Synthesis.* — Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1969, v. 34, p. 167—177; 197—207; 331—356; 377—431; 437—468.
- Chambliss G. et al., eds.* Ribosomes: Structure, Function, and Genetics. Baltimore: Univ. Park Press, 1980, p. 377—411; 555—581.
- Cohn W. E., ed.* Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. N. Y.: Acad. Press, 1978, v. 21, p. 39—62.
- Nomura M., Tissières A., Lengyel P., eds.* Ribosomes. N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1974, p. 871—884.
- Weissbach H., Pestka S., eds.* Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis. — N. Y.: Acad. Press, 1977, p. 375—411.
- Belitsina N. V., Spirin A. S.* Ribosomal translocation assayed by the matrix-bound poly(uridylic acid) column technique. Effects of different magnesium concentrations. — Eur. J. Biochem., 1979, v. 94, p. 315—320.
- Belitsina N. V., Glukhova M. A., Spirin A. S.* Translocation in ribosomes by attachment-detachment of elongation factor G without GTP cleavage: Evidence from a column-bound ribosome system. — FEBS Lett., 1975, v. 54, p. 35—38.
- Bodley J. W., Zieve F. J., Lin L.* Studies on translocation: IV. The hydrolysis of a single round of GTP in the presence of fusidic acid. — J. Biol. Chem., 1970, v. 245, p. 5662—5667.
- Gupta S. L., Waterson J., Sopori M. L. et al.* Movement of the ribosome along the messenger ribonucleic acid during protein synthesis. — Biochemistry, 1971, v. 10, p. 4410—4421.
- Haenni A.-L., Lucas-Lenard J.* Stepwise synthesis of a tripeptide. — Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1968, v. 61, p. 1363—1369.
- Inoue-Yokosawa N., Ishikawa C., Kaziro Y.* The role of guanosine triphosphate in translocation reaction catalyzed by elongation factor G. — J. Biol. Chem., 1974, v. 249, p. 4321—4323.
- Kaziro Y.* The role of guanosine 5'-triphosphate in polypeptide chain elongation. — Biochim. Biophys. Acta, 1978, v. 505, p. 95—127.
- Leder P.* The elongation reactions in protein synthesis. — Adv. Protein Chem., 1973, v. 27, p. 213—242.
- Matzke A. J. M., Barta A., Kuechler E.* Mechanism of translocation: Relative arrangement of tRNA and mRNA on the ribosome. — Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1980, v. 77, p. 5110—5114.
- Nishizuka Y., Lipmann F.* The interrelationship between GTPase and amino acid polymerization. — Arch. Biochem. Biophys., 1966, v. 116, p. 344—351.

Pestka S. Studies on the formation of transfer ribonucleic acid-ribosome complex. VI. Oligopeptide synthesis and translocation on ribosomes in the presence and absence of soluble transfer factors. – *J. Biol. Chem.*, 1969, v. 244, p. 1533–1539.

Riddle D. L., Carbon J. Frameshift suppression: a nucleotide addition in the anticodon of a glycine transfer RNA. – *Nature New Biol.*, 1973, v. 242, p. 230–234.

Thach S. S., Thach R. E. Translocation of messenger RNA and «accommodation» of Met-tRNA. – *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 1971, v. 68, p. 1791–1795.

Глава V

ЭЛОНГАЦИЯ: РЕГУЛЯЦИЯ

1. НЕРАВНОМЕРНОСТЬ ЭЛОНГАЦИИ

Из скорости считывания мРНК рибосомами (см. А.IV.4) следует, что продолжительность каждого элонгационного цикла, включая связывание аминоксил-тРНК, транспептидацию и транслокацию, составляет около 0,06–0,1 с (при 37°C). Однако эта частота около 10–15 циклов в секунду может считаться лишь средним значением для всей элонгации. Имеются данные, что скорость элонгации может меняться во время трансляции цепи мРНК.

Прежде всего, было отмечено, что во время синтеза глобиновых цепей в ретикулоцитах кролика распределение образующихся пептидов по размеру не является непрерывным, а скорее обнаруживает дискретные классы, указывая на возможность каких-то перерывов или остановок в процессе трансляции (элонгации). Аналогичные результаты были получены при синтезе белка оболочки бактериофага MS2 в клетках *E. coli*, инфицированных фагом MS2. Такая прерывистая или неравномерная трансляция наблюдалась также в интактных клетках и бесклеточных системах для некоторых других белков, например для фиброина шелка, вителлогенина и сывороточного альбумина, белков вируса табачной мозаики, белков вируса энцефаломиокардита, бактериальных колицинов и т. д. Все эти наблюдения привели к заключению, что во время элонгации рибосомы двигаются вдоль цепи мРНК с неравномерной скоростью; иногда, на некоторых специфических участках мРНК, они могут замедлять свое движение или на время останавливаться. Иными словами, во время элонгации, по крайней мере в некоторых случаях, могут случаться более или менее длительные паузы.

Для объяснения этой трансляционной неравномерности (пауз) можно предложить три механизма, не обязательно исключаящие друг друга.

1. Первое объяснения состоит в том, что рибосома может задерживаться на кодонах, соответствующих минорным (присутствующим в малых количествах) изоакцепторным тРНК (или, что менее вероятно, тРНК, обладающим низкой эффективностью узнавания кодонов и связывания с рибосомой). Анализы использования различных кодонов в мРНК показывают, что мРНК, кодирующие главные (в количественном отношении) клеточные белки, избирательно используют те

синонимные кодоны, которые соответствуют изоакцепторным тРНК, присутствующим в клетке в относительно больших количествах. Синонимные кодоны, соответствующие минорным тРНК, используются редко (если вообще используются) в этих мРНК (например, в случае *E. coli*, аргининовые кодоны CGA и CGG, а также AGA и AGG; изолейциновый кодон AUA; лейциновый кодон CUA; сериновые кодоны UCA и UCG; пролиновый кодон CCC; глициновые кодоны GGA и GGG). Возможно, что, когда транслирующая рибосома сталкивается с таким редко используемым кодоном в мРНК, ей необходимо какое-то время для ожидания прихода минорной тРНК из окружающей среды. Иными словами, низкие концентрации некоторых тРНК могут быть фактором, регулирующим скорость, приводя к трансляционным паузам на соответствующих кодонах.

Кодоны, соответствующие минорным тРНК, можно назвать *модулирующими* кодонами, так как предполагается, что они могут модулировать скорость трансляции. Встречаясь в разных количествах в различных мРНК, они могут определять разную степень экспрессии мРНК: чем больше модулирующих кодонов содержится в мРНК, тем менее эта мРНК будет экспрессироваться, по сравнению с другими мРНК. В то же время, клетка может избирательно менять степень экспрессии (транслируемости) слабо экспрессируемой мРНК путем *адаптации* концентраций изоакцепторных тРНК к набору кодонов в данной мРНК. Например, известно, что во время интенсивного синтеза фиброина в шелкоотделительных железах внутриклеточный запас изоакцепторных тРНК претерпевает сильные изменения, в результате которых обеспечивается снабжение именно теми тРНК, которые необходимы для трансляции мРНК фиброина; в частности, определенные глициновая, аланиновая и сериновая изоакцепторные тРНК становятся преобладающими в соответствии с преобладанием соответствующих глициновых, аланиновых и сериновых кодонов в мРНК фиброина.

2. Скорость продвижения рибосомы по цепи мРНК может быть не одинаковой из-за различной стабильности вторичной и третичной структур различных участков мРНК. В частности, для того чтобы иметь стабильный двухтяжевый участок мРНК в расплетенном и доступном для трансляции виде, рибосоме необходимо большее время «ожидания», чем при трансляции других, менее структурированных, участков мРНК. В таких случаях будет возникать неравномерность элонгации, и места трансляционных пауз будут соответствовать прохождению рибосом через участки, содержащие относительно стабильные двойные спирали или иные структуры в цепи мРНК. Эта гипотеза согласуется с предсказаниями вторичных структур мРНК, кодирующих некоторые неравномерно синтезируемые белки.

В связи с рассматриваемой гипотезой особый интерес представляет наблюдение, сделанное недавно Ю. В. Свиткиным и В. И. Аголом (1983). Они показали, что во время трансляции РНК вируса энцефаломиокардита в определенном участке этой РНК существует трансляционный барьер, вызывающий значительную задержку во времени экспрессии последующей кодирующей последовательности. Примеча-

тельно, что этот барьер преодолевается добавлением фактора элонгации 2 (EF-2) в количествах, превышающих каталитические количества EF-2, необходимые для максимальных скоростей элонгации на других участках РНК. Следовательно, эукариотический EF-2 обладает какими-то регуляторными функциями в элонгации, в дополнение к его функции катализа транслокации. Возможно, эта функция имеет отношение к РНК-связывающей способности EF-2 (отсутствующей у его прокариотического аналога EF-G); например, можно предположить, что РНК-связывающая способность EF-2 служит для разворачивания или дестабилизации структурных барьеров в мРНК, таких как стабильные двухтяжевые спирали или особые третичные взаимодействия.

3. Возможно существование каких-то регуляторных белков или малых рибонуклеопротеидов, которые взаимодействуют с транслирующей рибосомой и избирательно останавливают или затрудняют элонгацию в определенных местах. Известен пример таких специфичных репрессоров элонгации в эукариотах: это рибонуклеопротеидная частица, содержащая 7S РНК; частица узнает особую N-концевую гидрофобную последовательность образующегося полипептида на транслирующей рибосоме, присоединяется к рибосомам и останавливает элонгацию до тех пор, пока рибосома не вступит во взаимодействие с мембраной эндоплазматического ретикулаума (см. В. IX. 2). Не исключено, что подобные механизмы используются для регуляции скорости элонгации на других стадиях синтеза белка, например, на определенных стадиях сворачивания белка или сборки белка на транслирующей рибосоме.

2. ИЗБИРАТЕЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ СКОРОСТИ ЭЛОНГАЦИИ НА РАЗЛИЧНЫХ мРНК

Во время развития клеток и организмов, а также в ответ на обработку гормонами или под действием факторов окружающей среды, возможны, по-видимому, дифференциальные изменения в скоростях элонгации на различных мРНК. Одним из примеров является различная скорость элонгации на двух популяциях мРНК после теплового шока в клетках *Drosophila*: элонгация на основных дошоковых мРНК сильно замедляется, и в то же время оказывается быстрой на мРНК, синтезированных в результате теплового шока.

Другой пример регулируемых дифференциальных изменений в скорости элонгации был дан Дж. Иланом и сотр.: эстроген, введенный цыплятам, ведет к индуцированию синтеза вителлогенина в печени с начальной скоростью элонгации, равной примерно 9 остаткам в секунду; в то же время скорость элонгации суммарных белков печени снижается с 7 до 4,5 остатков в секунду; через 2 дня после инъекции и в последующее время скорость элонгации всех белков печени составляет от 2 до 3 остатков в секунду.

Механизмы избирательной регуляции скорости элонгации на различных эукариотических мРНК не известны. Во всяком случае, не исключено, что здесь могут действовать некоторые из тех механизмов,

которые были описаны в предыдущем разделе. В частности, возможные изменения в популяциях изоакцепторных тРНК, а также изменения в концентрациях факторов элонгации и аминоацил-тРНК-синтетаз могут влиять на избирательную регуляцию элонгации. Разумеется, нельзя исключать и прямого участия гипотетических репрессоров элонгации, например белков, способных связываться с определенными кодирующими участками мРНК.

3. ТОТАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ СКОРОСТИ ЭЛОНГАЦИИ

Замедление элонгации при вирусных инфекциях

Вирусная инфекция эукариотической клетки часто приводит к снижению скорости элонгации всех полипептидов, синтезируемых хозяйскими рибосомами. Это явление общего замедления элонгации особенно характерно для пикорнавирусных инфекций; его наблюдали в клетках HeLa, инфицированных полиовирусом, в мышинных клетках асцитного рака Эрлиха, зараженных менговирусом, в L-клетках, инфицированных вирусом энцефаломиокардита. Считается, что пикорнавирусная инфекция ведет к снижению эффективности рибосом в элонгации. Имеются данные о том, что снижение элонгационной активности вызывается какими-то изменениями в рН 5 фракции, которая содержит аминоацил-тРНК-синтетазы, тРНК и факторы элонгации.

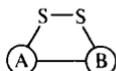
Об ингибировании элонгации сообщалось также в случае клеток, инфицированных вирусом осповакцины, и этот эффект оказалось возможным воспроизвести в бесклеточных системах *in vitro* добавлением вирусного нуклеопротеида. Это наводит на мысль о прямом действии вирусного компонента на какое-то звено элонгационного цикла.

Блокирование элонгации токсинами бактериального и растительного происхождения

Имеется целый ряд белковых токсинов бактериального и растительного происхождения, которые являются мощными ингибиторами эукариотической (животной) белоксинтезирующей системы. Эти токсины блокируют элонгационную фазу трансляции. Все они обладают каталитическим (энзиматическим) механизмом действия. Мишенью их действия оказалась стадия транслокации элонгационного цикла эукариотической рибосомы. Наиболее изученным примером является дифтерийный токсин.

Дифтерийный токсин. Это белок с молекулярной массой около 60000 дальтон. Он секретируется клетками *Corynebacterium diphtheriae*, содержащими геном лизогенного бактериофага β ; белок есть продукт фагового, а не собственно бактериального, генома. Молекула белка представляет собой одну ковалентно-непрерывную полипептидную цепь, организованную по крайней мере в два, довольно

независимых друг от друга, глобулярных домена (А и В); между доменами имеется скрепляющий их дисульфидный мостик:



С-терминальный домен В, имеющий молекулярную массу около 39000 дальтон, обладает лектиноподобным действием: он способен специфически связываться с поверхностным неидентифицированным рецептором животной клетки. Связывание белка с поверхностью клетки приводит к тому, что он, по непонятному пока механизму, внедряется в цитоплазматическую мембрану, и там происходит протеолитическое расщепление междоменной пептидной связи и одновременное восстановление дисульфидной связи; в результате белок распадается на фрагмент А и фрагмент В. N-терминальный фрагмент А, имеющий молекулярную массу 21150 дальтон, проваливается в цитоплазму. Именно этот фрагмент и является ингибитором белкового синтеза в клетке. Он оказался высокоспецифическим ферментом, осуществляющим АДФ-рибозилирование одного аминокислотного остатка в EF-2. После такого АДФ-рибозилирования нормальные функции EF-2 нарушаются. Ввиду каталитического характера действия фрагмента А достаточно одной молекулы токсина, чтобы модифицировать все молекулы EF-2 и убить клетку.

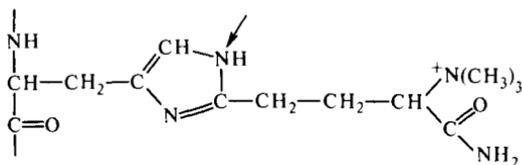
Необходимо отметить, что исходные молекулы дифтерийного токсина не обладают таким ингибиторным действием на белковый синтез; они скорее являются зимогеном, превращаемым в каталитически активный белок (А-фрагмент) лишь после расщепления. С другой стороны, сам фрагмент А не обладает цитотоксическим действием, так как не может проникнуть в интактную клетку.

Субстратом, от которого остаток АДФ-рибозы энзиматически переносится на EF-2, является никотинамидадениндинуклеотид (NAD):



Реакция обратима, и в присутствии избытка никотинамида (в условиях *in vitro*) можно де-АДФ-рибозилировать белок и, таким образом, восстановить интактный EF-2.

Аминокислотный остаток, на который переносится АДФ-рибоза в EF-2, представляет собой уникальное производное гистидина — так называемый дифтаמיד:



АДФ-рибозильный остаток переносится на азот имидазольного кольца, отмеченный стрелкой.

Несмотря на знание многих деталей процесса превращения дифтерийного токсина в энзиматически активный фрагмент А и энзиматического действия фрагмента А на EF-2, механизм происходящей в результате инактивации белкового синтеза остается загадкой. Дело в том, что АДФ-рибозилирование не приводит, как ожидалось, к инактивации известных парциальных функций фактора. АДФ-рибозилированный EF-2 сохраняет способность взаимодействовать с ГТФ как эффектором, и комплекс ADPR-EF-2 · GTP связывается с рибосомой так же, как и исходный EF-2 · GTP. Связывание происходит по тому же рибосомному участку. Более того, это связывание может давать в результате транслокацию пептидил-тРНК из А-участка в Р-участок и освобождение деацилированной тРНК. ГТФазная активность тоже обнаруживается как результат взаимодействия модифицированного фактора (плюс ГТФ) с рибосомой. Правда, в ряде работ отмечалось, что в случае АДФ-рибозилированного EF-2 ГТФазная активность может быть в той или иной степени снижена и что для промотирования транслокации требуются не каталитические, а стехиометрические количества фактора по отношению к рибосомам. Были высказаны предположения, что ингибирование белкового синтеза в результате АДФ-рибозилирования EF-2 может достигаться либо за счет понижения сродства модифицированного EF-2 к факторсвязывающему участку рибосомы, либо за счет уменьшения скорости его реутилизации (recycling), например, вследствие малой скорости диссоциации комплекса рибосома · ADPR-EF-2 · GDP. Не понятным, однако, остается тот факт, что АДФ-рибозилирование EF-2 приводит к полной остановке белкового синтеза, в то время как парциальные функции EF-2 если и нарушаются, то лишь до некоторой степени.

Имеется, однако, одно свойство EF-2 (не имеющее прямого отношения к промотированию транслокации), которое полностью утрачивается после АДФ-рибозилирования. Это — неспецифическая РНК-связывающая способность; которая свойственна эукариотическим факторам элонгации (так же как и аминоксил-тРНК-синтетезам — см. А. III.3), в отличие от их прокариотических аналогов. Благодаря этой способности значительная часть EF-2 (так же как и EF-1) эукариотической клетки оказывается компартиментализованной вокруг полирибосом за счет лабильной и обратимой ассоциации с их РНК (возможно, как мРНК, так и рРНК). АДФ-рибозилирование EF-2 приводит к исчезновению неспецифической РНК-связывающей способности фактора и к его полной декомпартментализации из полирибосомных структур. Может быть, что этот эффект, приводящий к резкому уменьшению локальной концентрации фактора вблизи полирибосом, ответствен, по крайней мере частично, за ингибирование белкового синтеза под действием А-фрагмента дифтерийного токсина.

Некоторые другие бактериальные токсины. Экзотоксин А *Pseudomonas aeruginosa* обладает подобным же механизмом действия, что и дифтерийный токсин. Этот белок с молекулярной массой 71500 дальтон тоже взаимодействует с поверхностью эукариотической клетки своим лектиновым доменом, погружается в мембрану, там расщепляется на фрагменты А и В с молекулярными массами 27000

и 45000 дальтон, соответственно, и фрагмент А проникает в цитоплазму. Фрагмент А является ферментом, переносящим АДФ-рибозный остаток от NAD на тот же самый остаток дифтамида EF-2, в результате чего происходит ингибирование белкового синтеза. Однако никакой иммунологической перекрестной реактивности между токсином *Pseudomonas aeruginosa* и дифтерийным токсином не наблюдается. Кроме того, рецепторы этих двух токсинов на клеточной мембране различны.

Токсин *Shigella dysenteriae* также мощный ингибитор белкового синтеза в клетках ряда позвоночных животных. Этот белковый токсин состоит из одной полипептидной А-цепи с молекулярной массой 30500 дальтон и шести (или семи) относительно коротких В-цепей с молекулярной массой около 5000 дальтон каждая (A₁B₆). В-часть белка, по-видимому, ответственна за взаимодействие токсина с рецептором цитоплазматической мембраны животной клетки и погружение токсина в мембрану. Протеолитическое расщепление А-цепи токсина в мембране на два фрагмента — А₁(M_r = 27500) и А₂(M_r = 3000) — приводит к проникновению фрагмента А₁ в цитоплазму и ингибированию белкового синтеза. Ингибирование является результатом энзиматического действия фрагмента А₁. (До расщепления энзиматическая активность не проявляется.) Мишенью энзиматического действия в данном случае является 60S субчастица эукариотической 80S рибосомы. Природа ее энзиматической модификации не установлена, но известно, что NAD или другие кофакторы как будто бы не требуются. Рибосомы с модифицированными 60S субчастицами способны осуществлять реакцию транспептидации, т. е. пептидилтрансферазный центр не нарушается. Предполагается, что ингибирование белкового синтеза А₁-фрагментом токсина происходит вследствие какого-то нарушения функций связывания аминоксил-тРНК и/или транслокации; нельзя исключать, что нарушается факторсвязывающий участок на 60S субчастице рибосомы.

Растительные токсины. Среди растительных лектинов, специфически связывающихся с D-галактозными остатками белков (гликопротеидов) клеточной мембраны животных клеток, имеется ряд сильных токсинов, ингибирующих белковый синтез в клетках-мишенях. Сюда относятся рицин из клещевины (*Ricinus communis*), абрин из *Abrus precatorius*, модекцин из *Modecca digitata*, вискумин из омелы белой (*Viscum album*). Эти белки обнаруживают поразительное сходство с бактериальными токсинами, и в частности, с дифтерийным токсином, в отношении их молекулярно-функциональной организации.

Рицин представляет собой двухсубъединичный белок (гликопротеид) с молекулярной массой 62000 дальтон. В-субъединица (31400 дальтон) является собственно лектином и способна специфически связываться с галактозными остатками на внешней стороне мембраны животной клетки. А-субъединица (30000 дальтон) обладает неидентифицированной ферментативной активностью и ответственна за ингибирование белкового синтеза в цитоплазме. Две субъединицы скреплены вместе дисульфидным мостиком. Прикрепление токсина к мембране ведет к его погружению в нее, восстановлению дисуль-

фидной связи и проваливанию освобожденной А-субъединицы в цитоплазму. Для ферментативного действия А-субъединицы не нужно, по-видимому, ни NAD, ни других кофакторов; полагают, что ее действие может быть гидролитическим. Мишенью действия А-субъединицы являются 60S рибосомные субчастицы. Пока не известно, какого рода модификацию претерпевают рибосомные субчастицы; имеются косвенные данные, что именно белковый компонент 60S частиц как-то нарушается под действием энзиматической субъединицы токсина. Может быть, нарушение 60S субчастицы затрагивает ее функцию взаимодействия с факторами элонгации. Во всяком случае, сообщалось, что главным результатом действия токсина является ингибирование EF-2-катализируемой транслкации.

Другие растительные токсины организованы и действуют подобным же образом, хотя химически представляют собой другие белки.

Заслуживает упоминания также так называемый «антивирусный белок лаконоса» («pokeweed antiviral protein», или PAP) из *Phytolacca americana*. Он имеет молекулярную массу 27 000 дальтон и представляет собой аналог А-субъединицы рибосомы. Соответственно, он не обладает лектиновой активностью и не может взаимодействовать с клеточной мембраной. Поэтому он не действует на интактные клетки, но сильно ингибирует белковый синтез *in vitro* (в эукариотических бесклеточных системах). PAP — фермент, модифицирующий 60S субчастицу рибосом (по-видимому, один из рибосомных белков). Главным результатом является, по-видимому, ингибирование EF-2-катализируемой транслкации, хотя нельзя исключать, что может нарушаться функциональное взаимодействие модифицированной рибосомы с обоими факторами элонгации, как EF-2, так и EF-1.

Искусственные химерные токсины. Таким образом, разнообразные белковые токсины бактериального и растительного происхождения используют один и тот же принцип цитотоксического действия, основанный на двухсубъединичном (или двухдоменном) строении белка: одна субъединица (или фрагмент) взаимодействует с мембраной и ответственна за **трансмембранный транспорт**, а другая **освобождается внутрь клетки** и проявляет так **энзиматическую активность**, приводящую к ингибирующей модификации компонента белоксинтезирующей системы. Можно воспользоваться этим принципом живой природы для того, чтобы доставлять внутрь клетки любой энзиматический белок, искусственно сшив (конъюгировав) его с другим подходящим белком, способным взаимодействовать с мембраной.

Уже первые опыты дали обнадеживающие результаты. Используя простую процедуру дисульфидного обмена, оказалось возможным сшивать энзиматический А-фрагмент дифтерийного токсина или А-субъединицу рибосомы с нетоксическим растительным лектином (например, с конканавалином А или с лектином *Wistaria floribunda*) и получать цитотоксический эффект; очевидно, лектиновая часть химерного белка была ответственна за доставку ингибиторного компонента в клетку. Однако, как и в случае исходных токсинов, эффект был мало тканеспецифичен. Высокую тканеспецифичность химерного токсина удается получать, сшивая А-фрагмент дифтерийного токсина

или А-субъединицу рибина с тем или иным пептидным гормоном, взаимодействующим со специфическим рецептором мембраны клеток определенного типа (например, с хорионным гонадотропином, или с эпидермальным ростовым фактором, или с инсулином). В этих случаях энзиматический компонент также доставляется внутрь клетки и, ингибируя белковый синтез, убивает ее. Более того, мембрановзаимодействующим компонентом может быть антитело (или его Fab-фрагмент) против какого-либо поверхностного антигена, специфичного для мембраны только данного типа клеток; тогда, сшивая А-фрагмент дифтерийного токсина или А-субъединицу рибина с таким антителом, можно иметь в руках крайне тканеспецифичный химерный токсин, избирательно убивающий лишь эти клетки. Когда мембраносвязывающей половиной химерного токсина является антитело против поверхностного антигена опухолевой клетки, токсин должен высокоизбирательно убивать опухоль, не трогая других клеток.

Регуляция скорости элонгации путем эндогенной модификации факторов элонгации

Исследование белковых токсинов, проявляющих энзиматическую активность, показывает, что они имеют весьма специфические мишени. Наиболее изученный из них — дифтерийный токсин. Мишенью дифтерийного токсина является, как уже известно, уникальный аминокислотный остаток, дифтаמיד, фактора элонгации 2. Этот остаток в EF-2 удивительно консервативен в эволюции, будучи универсальным среди эукариотических организмов, включая животных, растения и грибы, и встречается даже у архебактерий. В то же время, дифтаמיד не имеет принципиального значения для функционирования EF-2 в транслокации: были получены жизнеспособные токсинустойчивые мутанты культивируемых животных клеток, которые утратили эту модификацию гистидина в EF-2 без снижения белоксинтезирующей активности. Маловероятно, что дифтаמיד в EF-2 произошел и сохранился в процессе эволюции в эукариотических организмах лишь для того, чтобы быть мишенью действия токсинов. Скорее можно полагать, что дифтаמיד служит специальной мишенью для действия некоторых эндогенных (внутриклеточных) регуляторных воздействий на уровне EF-2, а некоторые бактерии лишь используют эту же мишень для интоксикации эукариотических клеток.

Действительно, недавно в нормальных клетках млекопитающих была открыта эндогенная АДФ-рибозилтрансфераза, которая специфически модифицирует дифтаמידный остаток в EF-2. Фермент ассоциирован с полирибосомами, т. е. присутствует в том же клеточном компартменте, который содержит факторы элонгации (в случае эукариотической клетки). Функция эндогенного АДФ-рибозилирования EF-2, возможно, состоит в воздействии на активность EF-2, отличную от катализа транслокации. Известно, что АДФ-рибозилирование EF-2 дифтерийным токсином приводит к утрате неспецифической РНК-связывающей способности EF-2 и, следовательно, к

удалению избыточного EF-2 из полирибосом (декомпарментализации). Следовательно, эндогенное АДФ-рибозилирование могло бы регулировать степень компарментализации EF-2 на полирибосомах эукариотической клетки. Ассоциация EF-2 с полирибосомами, вероятно, имеет несколько целей: во-первых, она поддерживает увеличенную локальную концентрацию EF-2 непосредственно вблизи мест его функционирования, что может быть важным в большом объеме эукариотической клетки; во вторых, избыточный EF-2, обратимо связанный с мРНК, возможно, имеет особую функцию в преодолении трансляционных барьеров, например, стабильной вторичной структуры. Таким образом, скорость элонгации можно регулировать, регулируя компарментализацию EF-2 на полирибосомах с помощью механизма эндогенного АДФ-рибозилирования.

Возможно, аналогичная регуляция степени компарментализации на полирибосомах существует также в случае другого фактора элонгации, EF-1. Л.П. Овчинниковым с сотр. было обнаружено, что полирибосомная фракция эукариотической клетки содержит латентную фосфокиназу, которая в определенных условиях может активироваться и специфически фосфорилирует α -субъединицу EF-1; в результате EF-1 утрачивает свое неспецифическое сродство к высокомолекулярным РНК и покидает полирибосомы. Нельзя исключить того, что фосфорилирование EF-1 α может оказывать влияние на скорость элонгации и служить для регуляции трансляционного процесса в клетке.

Рекомендуемая литература

Безлепкина Т. А., Давыдова Е. К., Ситиков А. С. и др. Эукариотический фактор элонгации EF-2 утрачивает неспецифическое сродство к РНК в результате АДФ-рибозилирования. — Докл. АН СССР, 1984. Т. 278. С. 751—754.

Cohen P., van Heyningen S., eds. Molecular Actions of Toxins and Viruses. — Amsterdam: Elsevier, North-Holland, 1982, p. 51—105.

Freedman R. B., Hawkins H. C., eds. The Enzymology of Post-translational Modification of Proteins. — L.-N.Y.: Acad. Press, 1980, v. 1, p. 387—422.

Ovchinnikov Yu. A., ed. Progress in Bioorganic Chemistry and Molecular Biology. — Amsterdam and London: Elsevier Sci. Publ., 1984, p. 71—82.

Ballinger D. G., Pardue M. L. The control of protein synthesis during heat shock in *Drosophila* cells involves altered polypeptide elongation rates. — Cell, 1983, v. 33, p. 103—114.

Chaney W. G., Morris A. J. Nonuniform size distribution of nascent peptides. The effect of messenger RNA structure upon the rate of translation. — Arch. Biochem. Biophys., 1979, v. 194, p. 283—291.

Chavaney G., Chevallier A., Fournier M., Garel J. P. Adaptation of iso-tRNA concentrations to mRNA codon frequency in the eukaryotic cell. — Biochimie, 1979, v. 61, p. 71—78.

Collier R. J. Diphtheria toxin: mode of action and structure. — Bact. Rev., 1975, v. 39, p. 54—85.

Davydova E. K., Sitikov A. S., Ovchinnikov L. P. Phosphorylation of elongation factor 1 in polyribosome fraction of rabbit reticulocytes. — FEBS Lett., 1984, v. 176, p. 401—405.

Domogatsky S. P., Vlasik T. N., Seryakova T. A., et al. Difference in RNA-binding ability between eukaryotic and prokaryotic elongation factors of translation. — FEBS Lett., 1978, v. 96, p. 207—210.

Garel J.-P. Quantitative adaptation of isoacceptor tRNAs to mRNA codons of alanine, glycine, and serine. — Nature, 1976, v. 260, p. 805—806.

Gehrke L., Bast R. E., Ilan J. An analysis of rates of polypeptide chain elongation in avian liver explants following *in vivo* estrogen treatment. II. Determination of the specific

rates of elongation of serum albumin and vetellogenin nascent chains. - J. Biol. Chem., 1981, v. 256, p. 2522-2530.

Grosjean H., Fiers W. Preferential codon usage in prokaryotic genes: the optimal codon-anticodon interaction energy and the selective codon usage in efficiently expressed genes. - Gene, 1982, v. 18, p. 199-209.

Ikemura T. Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes. - J. Mol. Biol., 1981, v. 146, p. 1-21.

Lee H., Iglewski W. J. Cellular ADP-ribosyl-transferase with the same mechanism of action as diphtheria toxin and *Pseudomonas* toxin A. - Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1984, v. 81, p. 2703-2707.

Lizardi P. M., Mahdavi V., Shields D., Candelas G. Discontinuous translation of silk fibroin in a reticulocyte cell-free system and in intact silk gland cells. - Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1979, v. 76, p. 6211-6215.

Olsnes S. Directing toxins to cancer cells. - Nature, 1981, v. 290, p. 84.

Pappenheimer A. M. Diphtheria toxin. - Ann. Rev. Biochem., 1977, v. 46, p. 69-94.

Protzel A., Morris A. J. Gel chromatographic analysis of nascent globin chains. Evidence of nonuniform size distribution. - J. Biol. Chem., 1974, v. 249, p. 4594-4600.

Ramabhadran T. V., Thach R. E. Translational elongation rate changes in encephalomyocarditis virus-infected and interferon-treated cells. - J. Virol., 1981, v. 39, p. 573-583.

Sitikov A. S., Davydova E. K., Bezlepkina T. A. et al. Eukaryotic elongation factor EF-2 loses its nonspecific affinity for RNA and leaves polyribosomes as a result of ADP-ribosylation. - FEBS Lett., 1984, v. 176, p. 406-410.

Sitikov A. S., Davydova E. K., Ovchinnikov L. P. Endogenous ADP-ribosylation of elongation factor 2 in polyribosome fraction of rabbit reticulocytes. - FEBS Lett., 1984, v. 176, p. 261-263.

Svitkin Yu. V., Agol V. I. Translational barrier in central region of encephalomyocarditis virus genome. Modulation by elongation factor 2 (eEF-2). - Eur. J. Biochem., 1983, v. 133, p. 145-154.

Varenne S., Knibiehler M., Cavard D. et al. Variable rate of polypeptide chain elongation for colicins A, E2 and E3. - J. Mol. Biol., 1982, v. 159, p. 57-70.

Глава VI

ИНИЦИАЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ И ЕЕ РЕГУЛЯЦИЯ У ПРОКАРИОТ

1. ЗНАЧЕНИЕ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ

Инициация в процессе биосинтеза белка означает не просто начало элонгации. Прежде всего, так как начало кодирующей последовательности мРНК не совпадает с началом полинуклеотидной цепи, а всегда находится, отступая от ее 5'-конца (иногда на значительное расстояние), необходимо точное узнавание первого кодона на внутренней части цепи. Это узнавание определяет не только начало полипептидной цепи, которая синтезируется, но и задает фазу всего дальнейшего считывания мРНК по триплетам, т. е. абсолютно критично для всей аминокислотной последовательности полипептида. Другими словами, именно инициация определяет фиксированную точку на матричном полинуклеотиде, с которой начинается отсчет триплетов без запятых (см. гл. А.II).

С другой стороны, инициация является главной точкой прило-

жения механизмов регуляции синтеза белка на уровне трансляции. Регуляция на уровне трансляции у прокариот практически целиком сводится к разрешению или предотвращению **инициации** трансляции данных кодирующих последовательностей мРНК рибосомами; именно этим путем достигается избирательная или преимущественная трансляция одних мРНК или отдельных ее цистронов и выключение трансляции других. Кроме того, разная скорость инициации на разных мРНК или их цистронах определяет соотношение продукции соответствующих белков.

В связи со сказанным, существует специальный, довольно сложный механизм инициации трансляции, обеспечивающий как точное узнавание начала кодирующей последовательности и ее дальнейшую фазировку, так и возможность положительных и отрицательных регуляторных влияний.

2. ИНИЦИИРУЮЩИЕ КОДОНЫ, ИНИЦИАТОРНАЯ тРНК И БЕЛКОВЫЕ ФАКТОРЫ ИНИЦИИИ

Иницирующие кодоны. Трансляция природных мРНК или ее отдельных цистронов (в случаях полицистронных мРНК) начинается, как правило, с триплета AUG или, гораздо реже, GUG или UUG. Эти триплеты, таким образом, могут служить как иницирующие кодоны матрицы. В некоторых, еще более редких, случаях триплеты AUU и AUA также, по-видимому, могут быть иницирующими кодонами. Таким образом, иницирующий кодон — как правило, AUG — начальная точка отсчета триплетов вдоль матрицы по направлению к ее 3'-концу.

Инициаторная тРНК. Иницирующие кодоны узнаются специальной инициаторной тРНК. Антикодомом этой тРНК служит CAU, который способен спариваться с иницирующим коконом, как правило, с AUG, но также и с GUG, UUG, AUU или AUA, когда они являются иницирующими. Очевидно, здесь может иметь место необычное неканоническое спаривание по 1-му положению кодона ($U \cdot G$ и $U \cdot U$), а также, в более редких случаях, нестрогое спаривание по 3-му положению кодона ($C \cdot A$, $C \cdot U$), отличающиеся от Криковского нестрогого соответствия при 3-м положении кодона в процессе элонгации. Это можно объяснить тем, что при инициации первичное кодон-антикодонное узнавание происходит в Р-участке рибосомы, а не в А-участке, как в случае элонгации.

Структура инициаторной тРНК организована принципиально так же, как и структура обычных тРНК, хотя некоторые отличия могут быть отмечены. Например, в инициаторной тРНК 5'-концевой нуклеотидный остаток не спарен с противолежащим нуклеотидным остатком 3'-концевого участка (рис. 114); это, по-видимому, дает бóльшую гибкость акцепторному концу инициаторной тРНК, который, как показано рентгеноструктурным анализом, может загигаться по направлению к 5'-концу, а не продолжает спиральную организацию акцепторного черешка, как в обычных тРНК. Кроме

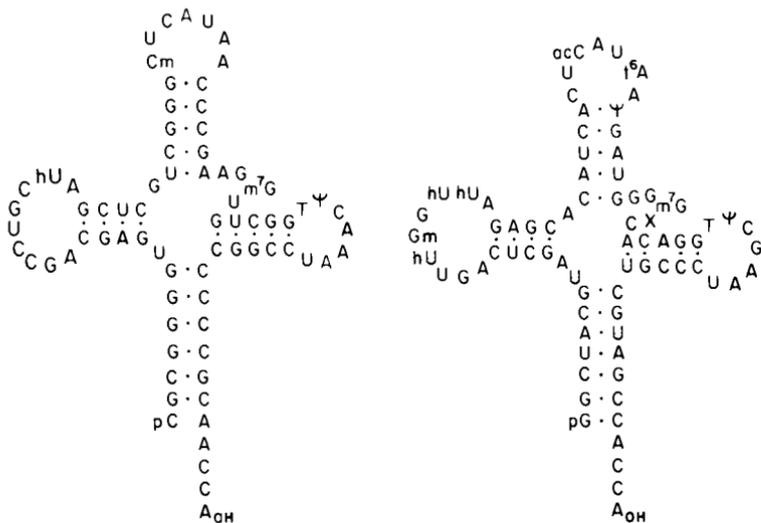
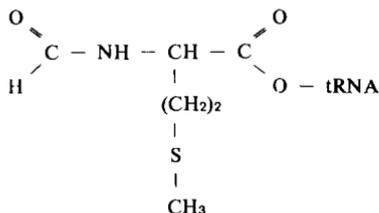


Рис. 114. Нуклеотидная последовательность и схема вторичной структуры прокариотической инициаторной тРНК (тРНК_F^{Met}, слева) в сравнении с прокариотической метиониновой тРНК, участвующей в элонгации (тРНК_M^{Met}, справа) (по S. K. Dube et al. *Nature*, 1968, v. 218, p. 232–233; S. Cory et al. *Nature*, 1968, v. 220, p. 1039–1040)

того, в инициаторной тРНК нуклеотидные остатки дигидроуридиловой петли (положения 16–17) более компактно упакованы друг с другом и с ядром тРНК, чем в обычных тРНК, где они рыло торчат в районе угла L-образной молекулы. Интересное отличие найдено также в антикодонной петле: хотя стэкинговая структура антикодона и двух примыкающих к нему с 3'-стороны пуриновых остатков очень похожа у инициаторной и у обычных тРНК, но инвариантный урацил в положении 33, примыкающий к антикодону с 5'-стороны, оказывается вывернутым наружу (а не обращенным внутрь петли и связанным с фосфатом 3-го остатка антикодона) в случае инициаторной тРНК; в связи с этим и структура самого антикодона оказывается несколько искаженной по сравнению с антикодонами других тРНК.

Инициаторная тРНК имеет сходство к обычной метионил-тРНК-синтетазе и, соответственно, акцептирует метионин в качестве аминокислоты. Таким образом, в клетке два класса тРНК оказываются ацилированными метионином: обычная тРНК^{Met}, узнающая только метиониновый кодон AUG при элонгации, и инициаторная тРНК, узнающая кодон AUG, а также GUG, UUG и другие в процессе инициации. В отличие от Met-tRNA^{Met}, инициаторная Met-tRNA является субстратом специальной формилтрансферазы, которая переносит формильную группу от формилтетрагидрофолата

на аминокгруппу остатка метионина, давая в результате формил-метионил-тРНК:



Поэтому инициаторную тРНК, в отличие от тРНК^{Met}, обычно обозначают индексом F: тРНК_F^{Met}. Именно в аминоацелированной и формилированной форме (F-Met-tRNA_F^{Met}) она является инициатором трансляции. Соответственно, первым аминокислотным остатком любой синтезируемой полипептидной цепи в прокариотической рибосоме всегда является формилметионин. В последующем, в ходе элонгации формильный остаток, как правило, отщепляется формилазой; метиониновый остаток тоже часто (но не всегда) отщепляется от растущей полипептидной цепи специальной аминопептидазой.

У архебактерий, однако, инициаторная метионил-тРНК не формилирована.

Белковые факторы инициации. Существуют три специальных белка, необходимых для процесса инициации у прокариот; они получили название факторов инициации IF-1, IF-2 и IF-3.

IF-1 представляет собой небольшой белок основного характера с молекулярной массой около 9000 дальтон. IF-1 обнаруживается не у всех видов бактерий.

IF-2, наоборот, крупный белок кислой природы с важной для функции SH-группой. Это — главный фактор инициации. Он выделен в двух формах, несколько различающихся по молекулярной массе: одна (IF-2a) — около 100000, а другая (IF-2b) — около 90000 дальтон; обе формы, по-видимому, функционально эквивалентны в процессе инициации. IF-2 имеет сродство к ГТФ и образует с ним нестабильный комплекс. IF-2 с ГТФ взаимодействует с F-Met-tRNA и с рибосомой (с 30S субчастицей). ГТФ может быть заменен его нерасщепляемым аналогом.

IF-3 — белок слегка основного характера с молекулярной массой 21000—23000 дальтон; для него тоже описаны две функционально эквивалентные формы: одна — с длиной полипептидной цепи 181 аминокислотный остаток, и другая — укороченная на 6 остатков с N-конца.

3. СОСТОЯНИЕ РИБОСОМЫ ПЕРЕД ИНИЦИАЦИЕЙ

Свободные нетранслирующие 70S рибосомы в ионных и температурных условиях, благоприятных для трансляции, находятся в динамическом равновесии со своими 30S и 50S субчастицами (см. Б. V.1):



Оказалось, что в первичной ассоциации с мРНК и следующей затем инициации трансляции участвует, скорее, 30S субчастица, а не 70S рибосома. Именно 30S субчастица уводится из этой равновесной смеси на мРНК и затем вовлекается в первые стадии инициации. 50S субчастица присоединяется на более поздних стадиях инициации к 30S-мРНК-инициаторному комплексу. Факторы инициации — прежде всего IF-3 (а также, возможно, IF-1) — способствуют сдвигу равновесия в сторону диссоциации свободных нетранслирующих рибосом на субчастицы.

В случае полицистроновой матрицы рибосома после терминации на предыдущем цистроне может перейти в нетранслирующее состояние, но остаться (на некоторое время) в ассоциации с мРНК. Из такого состояния она может либо диссоциировать в раствор, либо непосредственно перейти к инициации трансляции на следующем цистроне, без диссоциации от мРНК. Вероятность перехода той же рибосомы к инициации трансляции следующего цистрона определяется, по-видимому, длиной и структурой межцистронового участка: чем он короче и менее структурирован, тем больше шансов на инициацию без диссоциации. Однако и в данном случае похоже на то, что на матрице удерживаются лишь 30S субчастицы, а 50S субчастицы, как результат терминации трансляции, находятся с ними в обратимом равновесии и, таким образом, обмениваются.

4. АССОЦИАЦИЯ РИБОСОМЫ С МАТРИЧНЫМ ПОЛИНУКЛЕОТИДОМ

Для того чтобы свободная нетранслирующая рибосомная частица (30S субчастица) соединилась с мРНК в районе иницирующего кодона, должен быть выполнен целый ряд структурных требований. Прежде всего, этот район должен быть достаточно открытым для взаимодействия; во всяком случае, иницирующий кодон и прилегающие к нему участки не должны быть спрятаны в стабильной вторичной или третичной структуре матричного полинуклеотида. Возможно, существует какая-то специальная конформация рибосомосвязывающего района матрицы, предпочтительная для узнавания соответствующего участка рибосомой (30S субчастицей).

Наиболее очевидной универсальной структурной чертой рибосомосвязывающих районов прокариотических мРНК является существование полипуриновой нуклеотидной последовательности (последовательность Шайна — Дальгарно), отстоящей от иницирующего кодона на несколько (3—10) нуклеотидов к 5'-концу, т. е. предшествующей иницирующему кодону. Эта последовательность в большей или меньшей степени комплементарна 3'-концевому участку рибосомной 16S РНК, богатому пиримидиновыми нуклеотидными остатками (...GAUACCUCCUUA_{OH} в *E. coli*). Комплементарными могут быть от 3 до 9 остатков (обычно около 4—5). Последовательность CCUCCU 3'-концевого участка 16S РНК (*E. coli*) оказывается наиболее часто комплементарной (хотя, как правило,

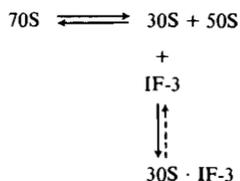
частично) полипуриновой прединицирующей последовательности мРНК. Некоторые примеры даны на рис. 115. Считается, что комплементарное спаривание 3'-концевого участка 16S РНК с прединицирующим полипуриновым блоком мРНК прямо участвует в ассоциации свободной рибосомной 30S субчастицы с матричным полинуклеотидом.

Необходимо отметить, однако, что инициация трансляции свободными рибосомами в какой-то мере возможна, по-видимому, также и на матрицах без последовательности Шайна — Дальгарно. Так, мРНК репрессора *cI* фага λ , транскрибируемая с промотора λ_{pRM} (в лизогенной клетке), вообще не имеет прединицирующей последовательности, но инициация на ней происходит, хотя и не очень эффективно. Бактериальные рибосомы могут осуществлять также инициацию на некоторых чужеродных (эукариотических) РНК, лишенных последовательности Шайна — Дальгарно, например, на РНК 4 вируса мозаики костра; инициация требует всех трех бактериальных факторов инициации и происходит на нормальном иницирующем кодоне. Отсюда последовательность Шайна — Дальгарно, безусловно, вносит важный вклад в эффективную ассоциацию рибосомных частиц с матрицей, но не является абсолютным требованием.

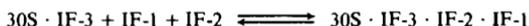
Если рибосома читает полицистронную мРНК и после терминации предыдущего цистрона не соскакивает с матрицы, то для новой инициации на следующем цистроне она, по-видимому, не требует последовательности Шайна — Дальгарно.

5. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ СОБЫТИЙ В ПРОЦЕССЕ ИНИЦИАЦИИ

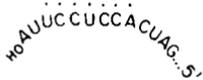
Итак, во всех случаях инициации трансляции предшествует диссоциация нетранслирующих 70S рибосом на 30S и 50S субчастицы. Как уже говорилось, в физиологических условиях нетранслирующие рибосомы находятся в обратимом равновесии со своими субчастицами. IF-3 имеет довольно сильное сродство именно к диссоциированной 30S субчастице и, связываясь с ней, препятствует ее реассоциации с 50S субчастицей; таким образом, 30S субчастица уводится из равновесия и подготавливается для инициации:



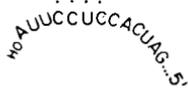
Два других фактора инициации, IF-1 и IF-2, также имеют большее или меньшее сродство к 30S субчастице и могут связываться с ней:



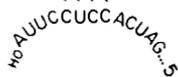
MS2 A белок: 5'... UCCUAGGAGGUUUUGACCUGCGAGCUUUU... 3'



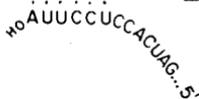
MS2 белок оболочки: 5'... UCAACCGGAGUUUGAAGCAUGGCUUCCAAC... 3'



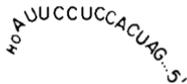
MS2 синтетаза: 5'... CAAACAUGAGGAAUACCCAUGUCGAAGACA... 3'



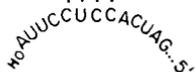
T4 r_{II}B: 5'... CCUAAUAAGGAAAUAUGUACA AU ... 3'



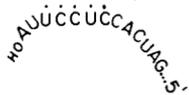
β - галактозидаза (lac Z): 5'... UUCACACAGGAAACAGCUUAGCAUGAUU... 3'



PHK полимеразы β - субъединица: 5'... AGCGAGCUGAGGAACCCUAUGGUUUACUCC... 3'



Рибосомный белок S12: 5'... AAAACCAGGAGCUAUUUAAUAGGCAACAGUU... 3'



Рибосомный белок L10: 5'... CAUCCAGGAGCAAAGCUAUAGGCUUUAAA... 3'

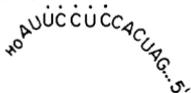
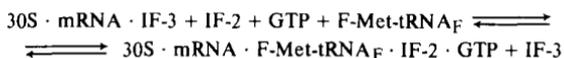


Рис. 115. Нуклеотидные последовательности, предшествующие инициаторному кодону (AUG или GUG), для ряда мРНК, кодирующих фаговые и бактериальные белки, и схема спаривания их полипиримидиновых блоков (последовательности Шайна — Дальгарно) с 3'-концевым полипиримидиновым блоком рибосомной 16S РНК

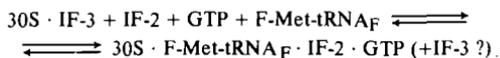
Далее, 30S субчастица с IF-3 или со всеми факторами инициации может ассоциироваться с инициаторным районом мРНК. Этот район может находиться близко у 5'-конца или далеко от него, а в случае полицистронных мРНК таких районов может быть несколько вдоль всей цепи мРНК; важно лишь то, чтобы он был открыт для взаимодействия, имел подходящую конформацию и содержал прединицирующую полипуриновую последовательность Шайна—Дальгарно и иницирующий триплет AUG (или GUG, или UUG, и т. д.). Сама 30S субчастица, без факторов инициации, также способна узнавать иницирующий район мРНК и связываться с ним. Вместе с тем, IF-3, по-видимому, способствует ассоциации 30S субчастицы с мРНК, возможно, путем усиления комплементарного взаимодействия 3'-конца рибосомной РНК с последовательностью Шайна—Дальгарно или путем привнесения дополнительного взаимодействия между рибосомной частицей и матрицей.

На следующей стадии вступает в действие IF-2, либо уже ассоциированный с 30S субчастицей, либо находящийся в растворе. Он взаимодействует с ГТФ и с инициаторной F-Met-tRNA_F, в результате чего имеет место кооперативное образование инициаторного 30S-комплекса с освобождением IF-3:



Здесь, как и в случае факторов элонгации, ГТФ выступает в роли эффектора, придающего фактору IF-2 повышенное сродство к рибосоме (в данном случае к 30S субчастице) и к соответствующей тРНК (F-Met-tRNA_F). По-видимому, сначала ГТФ взаимодействует с IF-2, а затем комплекс IF-2 · GTP связывает F-Met-tRNA; F-Met-tRNA узнает иницирующий кодон на 30S субчастице, а IF-2 · GTP обеспечивает дополнительное взаимодействие, комплексируясь одновременно с F-Met-tRNA и с рибосомной частицей. В процессе образования этого инициаторного 30S-комплекса ГТФ не расщепляется и, как уже отмечалось, может быть с полным успехом заменен на его нерасщепляемый аналог—гуанилилметиленидифосфонат (GMPPCP) или гуанилилимидодифосфат (GMPPNP).

Однако не исключен и альтернативный путь образования инициаторного 30S-комплекса. Дело в том, что рибосомная 30S субчастица без мРНК тоже имеет собственное сродство к инициаторной F-Met-tRNA, а также к IF-2. Это создает хорошую возможность взаимодействия F-Met-tRNA · IF-2 · GTP с 30S субчастицей в отсутствие матрицы:



Лишь после этого 30S субчастицы вместе с F-Met-tRNA специфически связываются с иницирующим районом и иницирующим кодоном мРНК; антикодон F-Met-tRNA способствует специфичности и точности узнавания района с иницирующим триплетом

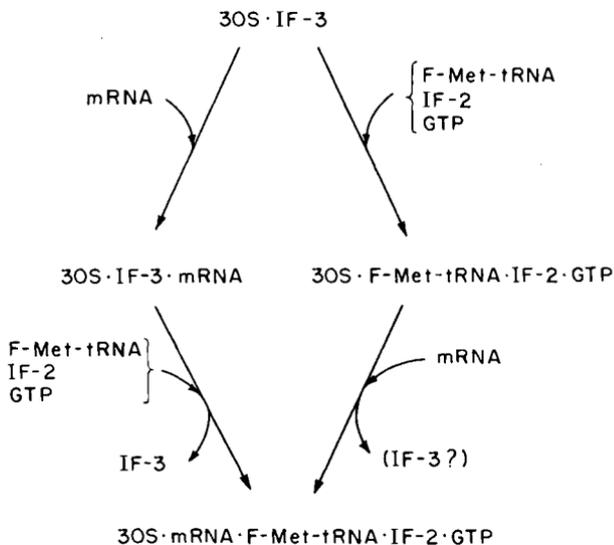


Рис. 116. Два возможных альтернативных реакционных пути образования инициаторного 30S комплекса: слева — ассоциация рибосомной 30S субчастицы с мРНК и затем связывание инициаторной тРНК; справа — связывание инициаторной тРНК с 30S субчастицей и затем ассоциация с мРНК; оба пути дают в результате одинаковый комплекс

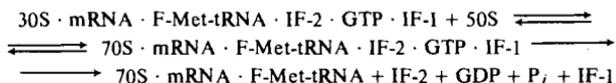
на мРНК. Хотя в настоящее время большинство исследователей, работающих с бесклеточными системами, отдают предпочтение первому пути, не исключено, что в клетке сосуществуют оба пути, или даже второй может использоваться предпочтительнее.

Два альтернативных пути образования инициаторного 30S-комплекса схематически представлены на рис. 116.

Роль третьего, самого маленького, белка IF-1 не очень ясна в процессе образования инициаторного 30S-комплекса. С одной стороны, есть указания на его вклад в увеличение скорости диссоциации нетранслирующих 70S рибосом на субчастицы. С другой стороны, он стабилизирует связывание двух других факторов инициации, IF-3 и IF-2, с 30S субчастицей, связываясь и сам в их присутствии (кооперативное связывание трех факторов инициации). IF-1 присутствует в конечном инициаторном 30S-комплексе с мРНК и F-Met-tRNA (в то время как IF-3, по-видимому, освобождается при связывании F-Met-tRNA) и, как полагают, стабилизирует его.

Инициаторный 30S-комплекс теперь имеет сильное средство к свободной 50S субчастице, так что они ассоциируют, давая в результате 70S-комплекс. При этом F-Met-tRNA оказывается в Р-участке рибосомы. IF-2, ассоциированный с F-Met-tRNA и с 30S субчастицей, взаимодействует также с 50S субчастицей в комплексе, непосредственно контактируя с районом у основания L7/L12-

стержня. В результате взаимодействия наводится ГТФазная активность, и ГТФ гидролизуется на ГДФ и ортофосфат. Это, в свою очередь, приводит к резкому уменьшению сродства IF-2 к F-Met-tRNA и к рибосоме, так что IF-2 с ГДФ освобождаются в раствор. Имеются указания, что IF-1 сильно способствует освобождению IF-2 после распада ГТФ. 70S рибосома остается с мРНК и с инициаторной F-Met-tRNA в Р-участке, где иницирующий кодон связан с антикодоном инициаторной тРНК. Таким образом,



(существует альтернативное предположение, что IF-1 выходит из инициаторного комплекса после ассоциации с 50S субчастицей и до гидролиза ГТФ).

Образовавшийся конечный инициаторный 70S-комплекс способен воспринять аминоксил-тРНК (с EF-T_u и ГТФ) на свой вакантный А-участок и начать элонгацию.

Схема последовательности событий при образовании инициаторного комплекса дана на рис. 117.

Если вместо ГТФ присутствовал его нерасщепляемый аналог, то ассоциация с 50S субчастицей и образование инициаторного промежуточного 70S-комплекса происходит нормально, включая правильную установку F-Met-tRNA в Р-участок, но последующего освобождения IF-2 не происходит, что, очевидно, препятствует связыванию очередной аминоксил-тРНК на А-участок и, стало быть, началу элонгации. В то же время, в эксперименте IF-2 с нерасщепляемым аналогом ГТФ могут быть физически отмыты от 70S-комплекса, и тогда комплекс ничем не отличается от образующегося в результате расщепления ГТФ: он имеет F-Met-tRNA и иницирующий кодон в Р-участке, вакантный А-участок и, таким образом, способен начать элонгацию. Следовательно, как и в случаях функционирования факторов элонгации, гидролиз ГТФ при инициации трансляции не сопряжен ни с одним из «активных» событий процесса — ни с посадкой инициаторной тРНК и соответствующего иницирующего кодона матрицы в Р-участок, ни с ассоциацией и подгонкой двух рибосомных субчастиц; гидролиз ГТФ оказывается нужным только для удаления белкового фактора (IF-2), сделавшего свое дело и теперь мешающего следующей стадии (связыванию очередной аминоксил-тРНК). Особенно большую аналогию IF-2 обнаруживает именно с EF-G: оба белка близки по молекулярной массе, оба не образуют стабильных комплексов с ГТФ и тРНК, оба имеют дело с N-блокированными производными аминоксил-тРНК и, наконец, оба участвуют в установке таких тРНК в Р-участок рибосомы. Не исключено, что оба белка гомологичны и что IF-2 мог возникнуть из EF-G в процессе эволюционной специализации стадии инициации трансляции.

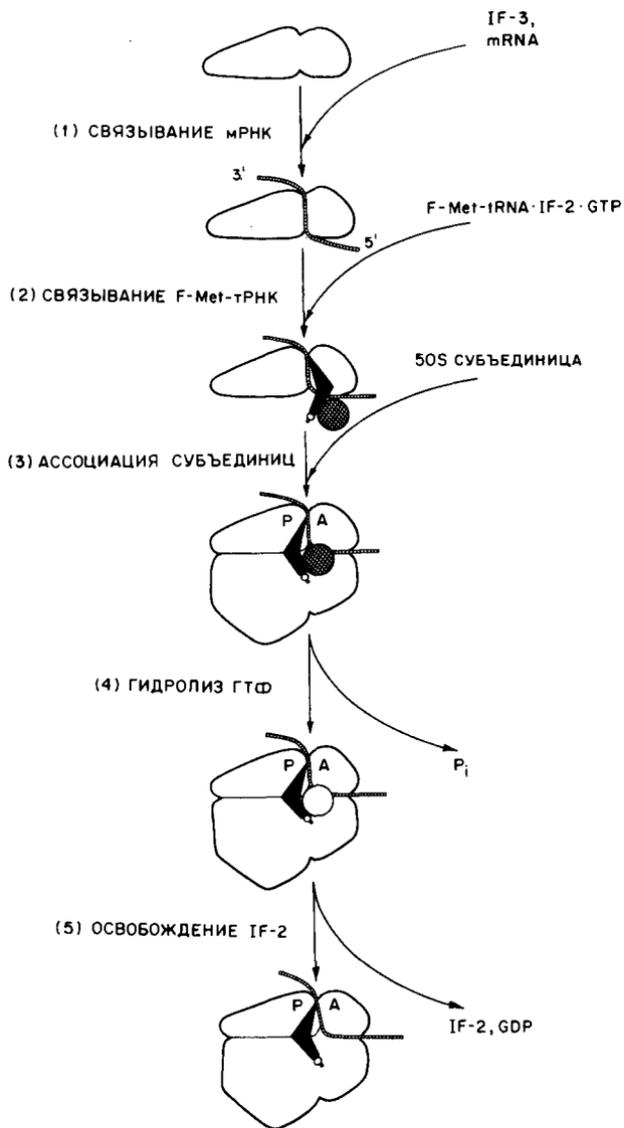


Рис. 117. Схема последовательности событий в процессе инициации трансляции у прокариотических организмов

«Гиена — хищный зверь, охотится ночью только при луне, а если луны нет, то без».

Уже говорилось, что для ассоциации рибосомы (30S субчастицы) с мРНК требуется полипуриновая последовательность Шайна — Дальгарно перед иницирующим кодоном матрицы. Однако, если она отсутствует, то ассоциация с последующей инициацией тоже может происходить (хотя и менее эффективно).

IF-1 тоже требуется для инициации, во всяком случае в системах *E. coli* с природными мРНК. Однако это требование не абсолютное, и инициация возможна также и без IF-1 (не говоря уже о том, что в некоторых бактериях, таких как *Bacillus stearothermophilus*, *Caulobacter crescentus*, вообще не найдено IF-1 или его аналога).

Известно, что при использовании некоторых синтетических матричных полинуклеотидов, например поли(U, G), инициация с участием инициаторной F-Met-tRNA, иницирующего кодона GUG и IF-2 с ГТФ может происходить также и без IF-3.

Требование, чтобы в инициации участвовал IF-2 с ГТФ, является наиболее жестким. Однако, как известно, 30S субчастица имеет собственное преимущественное сродство к тРНК_F, по сравнению с другими тРНК, так что при повышенных концентрациях Mg²⁺ в присутствии кодона AUG (или GUG) инициаторная тРНК может довольно избирательно связываться с рибосомной частицей без IF-2 и ГТФ; в результате такого бесфакторного связывания F-Met-tRNA оказывается в Р-участке рибосомы и образует нормальный инициаторный комплекс, готовый к элонгации.

Хотя обычным иницирующим кодоном в прокариотических системах является AUG, триплеты GUG и UUG также используются, хотя и гораздо реже, в качестве инициаторных. Более того, в некоторых случаях инициация *in vivo* с участием той же F-Met-tRNA_F может осуществляться и на некоторых других триплетах, таких как AUU и AUA. Известны случаи, когда элонгация прерывается вследствие мутации, приводящей к появлению терминирующего кодона, но рибосома не соскакивает с матрицы, а реиницирует трансляцию, используя близлежащий триплет GUG, UUG или CUG. Известны также мутантные мРНК, в которых иницирующий триплет AUG (которому предшествует последовательность Шайна — Дальгарно) изменен в AUA или в ACG; хотя эффективность инициации таких мРНК резко падает, но тем не менее какой-то уровень инициации с участием нормальной инициаторной F-Met-tRNA_F (антикодон CAU!) и всех факторов инициации сохраняется. В определенных искусственных условиях в бесклеточных системах показана даже возможность использования поли(U) в качестве матрицы для инициации трансляции с помощью F-Met-tRNA_F и факторов инициации.

Наконец, инициация трансляции в искусственных условиях возможна без нормальной инициаторной F-Met-tRNA_F. С одной стороны, в системах *in vitro* довольно удовлетворительную инициацию с участием факторов инициации можно получить, используя некоторые N-блокированные аминоксил-тРНК, например, N-ацетилфенилаланил-тРНК (N-Ас-Phe-tRNA^{Phe}) в системе с поли(U). Блокирование NH₂-группы аминоксильного остатка аминоксил-тРНК необходимо, по-видимому, для взаимодействия с IF-2 и для большей вероятности правильного попадания и ориентации в Р-участке рибосомы, а также для последующей хорошей реактивности с очередной аминоксил-тРНК в А-участке. Однако и это требование не является совсем абсолютным: любая аминоксил-тРНК без факторов инициации может сесть в Р-участок вакантной рибосомы в соответствии с кодоном матричного полинуклеотида, после чего другая аминоксил-тРНК может занять А-участок, и между ними произойдет реакция с образованием первой пептидной связи. Конечно, это гораздо более медленный и менее точный процесс, чем нормальная инициация, но в отсутствие компонентов инициаторного аппарата он происходит, требуя лишь повышенных концентраций Mg²⁺ для обеспечения достаточного сродства рибосомы к лигандам (тРНК, мРНК). Именно так начинается трансляция поли(U) с участием Phe-tRNA в простейших бесклеточных системах.

7. РЕГУЛЯЦИЯ ИНИЦИАЦИИ (РЕГУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА БЕЛКА НА УРОВНЕ ТРАНСЛЯЦИИ)

Обычно считается, что главным способом регуляции синтеза белка у прокариот является регуляция на уровне транскрипции. Действительно, метаболическая нестабильность (быстрый синтез и быстрый распад) мРНК в клетках прокариот обеспечивает практически немедленную смену матриц в зависимости от меняющихся условий среды и потребностей клетки. В то же время, однако, существование полицистронных матриц у прокариот часто требует дифференциального управления активностью отдельных цистронов для осуществления количественно разной и/или разновременной продукции белков, кодируемых одним полинуклеотидом. Кроме того, в ряде случаев накопление неиспользуемых количеств продукта трансляции выгодно использовать для немедленного выключения именно трансляции соответствующей мРНК и тем самым осуществлять очень тонкую подгонку размера продукции и ее потребления в клетке. Во всех известных случаях точкой приложения регуляции на уровне трансляции у прокариот является стадия инициации.

Регуляция инициации может осуществляться несколькими путями. Во-первых, количественно разный уровень продукции на разных мРНК или разных цистронах одной полицистронной мРНК может осуществляться за счет разной «силы» инициаторных районов матриц: одни весьма эффективно (с большим сродством) ассоциируют с рибосомными частицами и дают начало инициаторному комплексу, в то время как другие делают это медленнее. В частности,

степень комплементарности и длина последовательности Шайна — Дальгарно может определять «силу» инициаторного района мРНК. Здесь разница в первичной структуре иницирующего района может задавать постоянную разницу продуктивности разных мРНК или разных цистронов в трансляции. Во-вторых, известен способ негативной регуляции инициации за счет пространственной структуры иницирующего района мРНК: сворачивание в стабильную вторичную и третичную структуру может блокировать инициацию. В таком случае лишь расплетание, либо как результат расплетающего действия рибосом, читающих предшествующий цистрон, в случае полицистронной мРНК (см. ниже), либо под действием специального агента, дестабилизирующего пространственную структуру соответствующего района мРНК, открывает путь для инициации. В-третьих, весьма избирательная негативная регуляция инициации может осуществляться белками, специфически связывающимися с тем или иным инициаторным районом мРНК и тем самым блокирующими («репрессирующими») ассоциацию с рибосомой. Это настоящая репрессия трансляции. Функцию таких репрессоров трансляции часто выполняют белки, имеющие какую-то совсем другую главную функцию в клетке.

Ниже будут рассмотрены, в качестве примера, две системы, в которых имеет место регуляция на уровне трансляции через ее инициацию.

Регуляция трансляции РНК фага MS2

РНК бактериофага MS2 содержит три цистрона, разделенных нетранслируемыми последовательностями, и один цистрон, перекрывающийся с двумя другими (см. раздел А. П. 4 и рис. 6). Ближе всего к 5'-концу этой полицистронной мРНК расположен А-цистрон (1182 нуклеотидных остатка, включая терминирующий кодон), кодирующий А-белок, или «белок созревания» (393 аминокислотных остатка). Далее по направлению к 3'-концу следует С-цистрон (393 нуклеотидных остатка, включая терминирующий кодон UAA), кодирующий белок оболочки фага (129 аминокислотных остатков). Ближе всего к 3'-концу располагается S-цистрон (1638 нуклеотидных остатков, включая терминирующий кодон UAG), кодирующий субъединицу РНК-репликазы (544 аминокислотных остатка). L-цистрон (228 нуклеотидных остатков вместе с терминирующим кодоном UAA), кодирующий маленький белок лизиса (75 аминокислотных остатков), перекрывает не в фазе конец С-цистрона, нетранслируемую последовательность и начало S-цистрона. (Следует заметить, что при синтезе белка оболочки и субъединицы РНК-репликазы N-концевой метионин отщепляется, и поэтому количество аминокислотных остатков в готовом белке на один меньше, чем количество значащих кодонов матрицы.)

Три неперекрывающихся цистрона имеют предшествующие им полипуриновые последовательности Шайна — Дальгарно; они приведены на рис. 115. В соответствии со степенью комплементарности

к 3'-концевой последовательности 16S РНК, можно думать, что «сила узнавания» рибосомой иницирующего района и, следовательно, интенсивность инициации трансляции на А-цистроне будет выше, чем на С- и S-цистромах. Действительно, на изолированных рибосомосвязывающих фрагментах РНК родственного фага R17 было показано, что 30-ти нуклеотидный фрагмент, содержащий иницирующий кодон А-цистрона, значительно лучше связывается с 30S субчастицей, чем аналогичные фрагменты, содержащие иницирующие кодоны S-цистрона или С-цистрона. Однако на целой MS2 РНК этого не наблюдается: А-цистрон, так же как и S-цистрон, практически не может связывать рибосомы вследствие участия их иницирующих районов во вторичной и третичной структуре MS2 РНК. С-цистрон является единственным, на котором может происходить независимая инициация трансляции свободными рибосомами, т. е. открыт для взаимодействия.

В соответствии с вышесказанным трансляция интактной MS2 РНК в бесклеточных системах, а также, по-видимому, и *in vivo* начинается с инициации синтеза белка оболочки. Трансляция С-цистрона приводит к тому, что рибосомы движутся вдоль него по направлению к S-цистрону и расплетают структуру РНК по мере своего продвижения. Это приводит к открыванию иницирующего района цистрона S. Таким образом, еще до окончания трансляции С-цистрона первой рибосомой и синтеза первой молекулы белка оболочки иницирующий район S-цистрона делается доступным, и происходит инициация синтеза субъединицы РНК-репликазы.

Завершение трансляции С-цистрона первыми рибосомами приводит к тому, что в системе появляются свободные молекулы белка оболочки. По мере трансляции этот белок накапливается и в будущем будет вовлечен в самосборку готовых вирусных частиц. Однако он оказался обладающим также и другой функцией: он имеет сильное специфическое сродство к определенному участку MS2 РНК между С- и S-цистромами, включающему иницирующий кодон S-цистрона. Соответственно, он присоединяется к этому участку и репрессирует инициацию трансляции S-цистрона. Вероятно, репрессия происходит вследствие стабилизации лабильной вторичной структуры, показанной на рис. 11, белком оболочки фага и получающейся отсюда недоступности иницирующего кодона S-цистрона. Следовательно, через сравнительно короткое время после того, как трансляция S-цистрона была разрешена трансляцией предшествующего цистрона, происходит репрессия инициации трансляции S-цистрона вследствие накопления белкового продукта трансляции предшествующего цистрона. В этих условиях рибосомы, уже начавшие трансляцию, продолжают ее и в конце концов заканчивают синтез соответствующего количества молекул субъединиц синтетазы. Ограниченного количества этого белка достаточно, чтобы образовать активные молекулы РНК-репликазы, которые начнут репликацию MS2 РНК. В то же время репрессия дальнейшего синтеза этого белка позволяет избежать ненужной суперпродукции фермента. Белок оболочки фага, являющийся репрессором S-цистрона,

выполняет, таким образом, регуляторную функцию в трансляции.

Чтобы образовать молекулу активной РНК-репликазы, продукт S-цистрона фага комплексируется с тремя хозяйскими белками, выполняющими в нормальной клетке другие функции. Этими белками оказываются два фактора элонгации — EF-T_u и EF-T_s — и рибосомный белок S1. Таким образом, полный активный фермент является белком с четвертичной структурой, обладающим четырьмя различными субъединицами, лишь одна из которых кодируется фаговой РНК. РНК-репликаза является РНК-зависимой РНК-полимеразой, использующей исходную (+) цепь MS2 РНК сначала для образования комплементарной (-) цепи, а затем для синтеза на ней многочисленных копий исходной (+) цепи. А-цистрон не может транслироваться до тех пор, пока не начнется репликация MS2 РНК. Его иницирующий район, по-видимому, «спрятан» за счет вторичной и третичной структуры интактной РНК, и лишь некоторыми искусственными воздействиями, такими, как частичная нуклеазная или тепловая деградация исходной полинуклеотидной цепи, обработка формальдегидом, разрушающим спаривание оснований, и т. п., можно получить инициацию трансляции А-цистрона *in vitro*. Однако в начале репликации (+) цепи MS2 РНК, когда цепь растет в направлении от 5'-конца к 3'-концу, пространственная структура 5'-концевого отрезка, содержащего иницирующий кодон А-цистрона, в течение какого-то времени еще не сформирована, и, по-видимому, именно этот момент используется для инициации трансляции в нормальных условиях. Так как в готовой вирусной частице содержится всего одна молекула А-белка на 180 молекул белка оболочки, то сравнительно короткого промежутка времени, в течение которого возможна инициация трансляции А-цистрона, оказывается достаточно для надлежащей продукции А-белка. Затем наращиваемая далее последовательность цепи MS2 РНК вовлекает иницирующий район А-цистрона в образование структуры, которая выключает его доступность для свободных иницирующих рибосом.

В случае MS2 РНК после терминации трансляции каждого из перечисленных цистронов происходит, по-видимому, диссоциация рибосом от матрицы. Каждый цистрон в соответствующий момент начинает транслироваться в результате независимой инициации свободными рибосомами из среды. Однако ситуация с L-цистроном, очевидно, другая. По каким-то структурным причинам не удается получить эффективной ассоциации рибосом с инициаторным районом L-цистрона на MS2 РНК. Полагают, что инициация трансляции L-цистрона может иметь место вследствие время от времени происходящего спонтанного сдвига рамки (+1) при трансляции конца С-цистрона рибосомами: в этом случае рибосомы терминируют на триплете UAA, отстоящем на три нуклеотида к 5'-концу от иницирующего кодона L-цистрона, и, не успев соскочить с матрицы, реиницируют на первом близлежащем триплете AUG (см. рис. 7). Естественно, что продукция L-цистрона должна быть маленькой, как это и есть на самом деле.

Известно, что бактериальная клетка не допускает избыточной продукции рибосомных белков. Практически их синтезируется столько, сколько требуется для сборки рибосом, в соответствии с количеством образующейся рибосомной РНК, и сколько-нибудь серьезного избытка свободных рибосомных белков в нормальной клетке не бывает. Поразительно одинаковый и координированный уровень продукции всех 52 рибосомных белков достигается несмотря на то, что их гены вовсе не организованы в единый регулируемый блок, а представлены независимыми приблизительно 16 оперонами, распределенными по геному клетки. Оказалось, что координированно одинаковая продукция практически всех рибосомных белков и отсутствие их избыточной продукции поддерживаются регуляторным механизмом, обеспечивающим репрессию трансляции избытком белка (трансляционная регуляция по принципу обратной связи).

Значительная часть генов рибосомных белков (31 из 52) содержится в двух главных кластерах на хромосоме *E. coli*: в районе *str-spc* на 72 мин и в районе *rif* на 89 мин. Район *str-spc* содержит 4 оперона, кодирующих 27 рибосомных белков, а также EF-T_u, EF-G и α -субъединицу РНК-полимеразы. Район *rif* имеет 2 оперона, кодирующих 4 рибосомных белка, а также β - и β' -субъединицы РНК-полимеразы. Каждый оперон продуцирует соответствующую полицистронную мРНК. Цистроны и их последовательность в этих полицистронных мРНК схематически показаны на рис. 118.

Исследования группы М. Номуры в США показали, что в случае каждой из перечисленных полицистронных мРНК среди синтезируемых рибосомных белков имеется один, который одновременно является репрессором трансляции данной мРНК; этот белок обведен кружком на рис. 118. Это оказалось возможным показать как в опытах *in vivo*, так и в бесклеточных системах. В опытах *in vivo* наблюдали ингибирование синтеза рибосомных белков, кодируемых соответствующей мРНК, путем суперпродукции одного из обведенных кружком белков. Суперпродукция вызывалась путем использования плазмиды, содержащей *lac*-оператор и *lac*-промотор с геном одного из рибосомных белков, так что синтез белка можно было индуцировать индуктором *lac*-оперона (изопропилтиогаалактозидом). Индукция белков S7, L4, S8, S4, L1 или L10 приводила к подавлению синтеза тех и только тех рибосомных белков, которые кодируются полицистронной мРНК с цистроном данного белка. Опыты *in vitro* дали еще более прямые результаты: добавление одного из перечисленных белков (S7, L4, S8, S4, L1 или L10) в бесклеточную систему трансляции приводило к избирательному ингибированию синтеза именно того ряда белков, который кодируется той же мРНК, что и добавленный белок. Добавление других рибосомных белков не приводило ни к какому ингибированию трансляции.

Однако синтез некоторых белков, кодируемых перечисленными

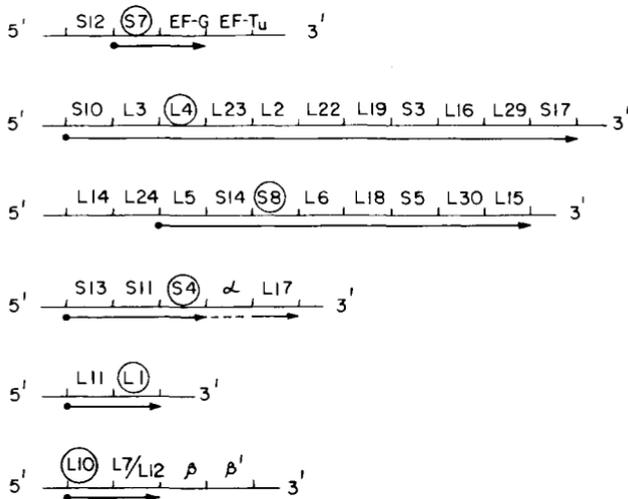


Рис. 118. Схема расположения кодирующих последовательностей (цистронов) рибосомных белков вдоль цепей полицистронных мРНК (по M. Nomura et al., in: *Interaction of Translational and Transcriptional Controls in the Regulation of Gene Expression*, N.-Y.: Elsevier Science Publishing Company Inc., 1982, p. 91-104; D. Dean, M. Nomura, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 1980, v. 77, p. 3590-3594):

α , β и β' — цистроны соответствующих субъединиц РНК-полимеразы; начало стрелки под последовательностью — точка действия регуляторного белка; стрелка простирается до цистрона, охватываемого этой регуляцией (включительно); кружок вокруг обозначения рибосомного белка указывает, что именно этот белок является регуляторным (репрессорным), присоединяясь к участку полицистроновой мРНК, соответствующему началу стрелки

полицистронными мРНК, не реагировал на добавление рибосомных белков-репрессоров. Так, белок S12 продолжал синтезироваться после добавления в бесклеточную систему белка S7 или *in vivo* в результате избирательной индукции белка S7. Точно так же белки L14 и L24 не прекращали синтезироваться в ответ на добавление или суперпродукцию белка S8. Примечательно, что цистроны белков, не регулируемых белком S7 или S8, оказались проксимальными по отношению к 5'-концу полицистроновой мРНК.

Перечисленные факты лучше всего могли бы быть объяснены, если исходить из допущения, что белок-репрессор, специфически связываясь с иницирующим районом какого-то одного цистрона, блокирует трансляцию всех цистронов в направлении к 3'-концу. Например, белок S8 связывается с началом цистрона белка L5, в результате чего репрессируется трансляция всех последующих (но не предыдущих!) цистронов. Это значит, что в случаях полицистронных мРНК для рибосомных белков независимая инициация трансляции каждого цистрона свободными рибосомами оказывается невозможной. Вместо этого реализуется так называемая «последовательная трансляция», когда рибосомы, терминировавшие на предыдущем цистроне, не соскакивают с матрицы, а

непосредственно переходят к реинициации на следующем цистроне. Такая «последовательная трансляция» цистронов обеспечивает эквимолярность продукции рибосомных белков в пределах данной полицистроновой мРНК. Отсутствие диссоциации рибосом (или, по крайней мере, их 30S субчастиц) от мРНК после терминации трансляции и отсутствие независимой инициации внутренних цистронов свободными рибосомами как характерная черта трансляции полицистроновых мРНК, кодирующих рибосомные белки, является наиболее приемлемым объяснением полученных фактов.

В полицистроновых мРНК имеются, однако, и исключения. Так, показано, что трансляция цистронов EF-T_u и субъединиц РНК-полимеразы не подчиняется репрессорному действию белков S7, L10 и S4 (рис. 118); по-видимому, инициаторные районы этих цистронов могут связывать свободные рибосомы, обеспечивая независимую инициацию трансляции. С другой стороны, известно, что в случае синтеза белков L10 и L7/L12 продукция последнего (L7/L12) в четыре раза выше, чем продукция белка L10 (в соответствии с их стехиометрией в рибосоме!); следовательно, и здесь имеется скорее всего независимая инициация трансляции на цистроне белка L7/L12, причем «сила инициации» у этого цистрона оказывается существенно больше, чем у цистрона белка L10. В то же время, как уже говорилось, белок L10 репрессует трансляцию обоих белков, как L10, так и L7/L12. Отсюда приходится допустить, что, как и в случае с S-цистроном MS2 РНК, инициация трансляции белка L7/L12 невозможна, если нет трансляции предшествующего цистрона; трансляция цистрона белка L10 открывает (делает доступным) инициаторный район цистрона белка L7/L12 для ассоциации со свободными рибосомами и, таким образом, для независимой инициации.

Особый интерес, конечно, представляет установление места посадки и действия соответствующих рибосомных белков-репрессоров на полицистроновых мРНК. С помощью использования делеционных мутантов, продуцирующих мРНК без того или иного участка, удалось показать, что, например, белок S4 не репрессует трансляцию соответствующей полицистроновой мРНК (4-ая сверху на рис. 118), если отсутствуют начало структурного гена белка S13 и предшествующая ему нуклеотидная последовательность. Наоборот, белок S7 репрессует свою собственную трансляцию, если отсутствует начало его полицистроновой мРНК (1-я сверху на рис. 118), включающее цистрон белка S12. Для белка L1 показано, что он оказывает репрессорное действие на свою бицистроновую мРНК (5-я сверху на рис. 118) только при наличии 5'-концевой последовательности, предшествующей цистрону белка L11. Отсюда следует, что, действительно, место посадки репрессорных белков следует искать в начале именно того цистрона, с которого начинается репрессия «последовательной трансляции» полицистроновой мРНК. Соответственно, для белка S7 это место должно быть где-то между цистронами белков S12 и S7 и/или в начале цистрона белка S7, для белка S4 — перед или в начале цистрона белка S13, а для белка L1 — перед цистроном белка L11. Продолжая эту логику, можно считать, что место репрессорного действия для белка L4 должно быть перед или в начале цистрона белка S10,

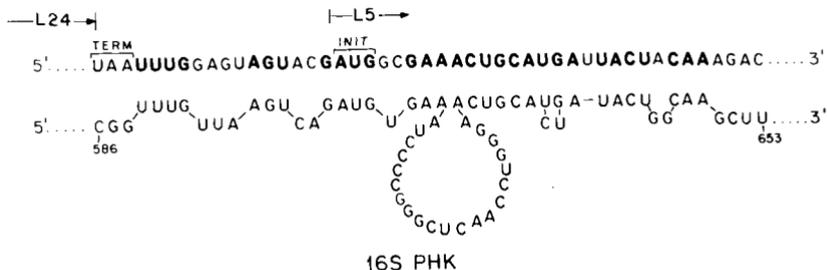


Рис. 119. Сравнение нуклеотидных последовательностей участка полицистронной мРНК, являющегося местом репрессорного действия белка S8 (вверху), и участка рибосомной 16S РНК, который узнается белком S8 при сборке рибосомы (внизу) (по данным Р. О. Olins, М. Nomura. *Nucleic Acids Res.*, 1981, v. 9, p. 1757–1764); идентичные последовательности на верхней цепи выделены жирным

для белка L10 — перед или в начале его собственного цистрона, в то время как для белка S8 — между цистронами белков L24 и L5 и/или в начале цистрона белка L5.

Про белки S4, S7, S8, L1 и L4 известно, что в структуре рибосом и их самосборке они играют важную роль, являясь «сердцевинными» (core) белками, довольно прочно связывающимися со специфическими местами своих рибосомных РНК. Место посадки этих белков на рибосомные РНК более или менее определено (см. гл. Б.IV). М. Номура с сотрудниками предположили, что эти рибосомные белки, выступая в роли репрессоров, связываются с мРНК тем же своим РНК-связывающим центром, который участвует в связывании с рибосомной РНК. В таком случае структуры участков, связывающих данный рибосомный белок, должны быть похожи в рибосомной РНК и в мРНК. Зная приблизительно место посадки репрессора на полицистронной мРНК, эти исследователи сравнили его первичную и предсказанную вторичную структуру с первичной и вторичной структурой белоксвязывающего участка рибосомной РНК. Результат оказался хотя и ожидаемым, но поразительным: структуры оказались похожи.

На рис. 119 приведено сопоставление первичных структур межцистронового участка L24–L5 и начала цистрона белка L5 как места действия репрессорного белка S8, с одной стороны (вверху), и участка рибосомной 16S РНК, связывающего белок S8 (внизу). Видна большая гомология, включая совпадение последовательностей 7 участков, от 3 до 7–9 остатков каждый. Еще большая гомология видна из сравнения предсказанных вторичных структур этих двух участков, узнаваемых белком S8 (рис. 120).

Гомология первичных и предсказанных вторичных структур хорошо видна также между последовательностью мРНК, включающей самый конец цистрона белка S12, 100-нуклеотидный межцистронный промежуток и начало цистрона белка S7, и близкой к 3'-концу последовательностью рибосомной 16S РНК специфически связывающей белок S7.

Такая же структурная гомология прослеживается между самым началом цистрона белка S13 и предшествующей ему 5'-проксимальной 50-нуклеотидной последовательностью в мРНК, с одной стороны, и S4-связывающим участком, с 490-го по 550-й нуклеотид, рибосомной 16S РНК — с другой. В самом цистроне белка S10 и примыкающем к нему 5'-проксимальном участке соответствующей полицистронной мРНК найдена нонануклеотидная и ряд менее длинных последовательностей, идентичных последовательностям L4-связывающего участка рибосомной 23S РНК и расположенных в том же порядке вдоль цепи.

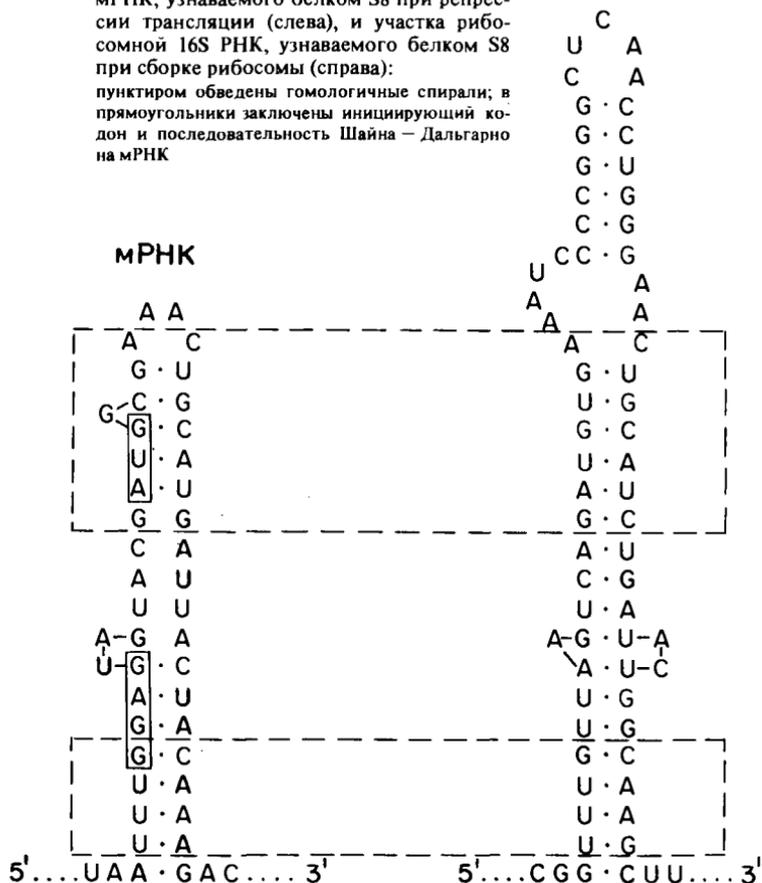
Во всех вышеперечисленных случаях модель репрессорного действия соответствующего рибосомного белка аналогична таковой в случае репрессии S-цистрона белком оболочки фага (см. предыдущую главу): прединицирующий район мРНК и инициирующий кодон вовлечены в достаточно лабильную вторичную и третичную структуру, которая сама по себе не запрещает инициацию; но когда специфический белок-репрессор узнает эту структуру и присоединяется к ней, происходит ее стабилизация, приводящая к недоступности прединицирующей последовательности и инициирующего кодона для взаимодействия с рибосомой и инициаторной тРНК. Действительно, участки мРНК, структурно гомологичные белоксвязывающим участкам рибосомных РНК, включаются в себя, как правило, прединицирующую последовательность и инициирующий кодон (рис. 120).

Однако механизм регуляции полицистронной мРНК, кодирующей белки L10 и L7/L12 (6-ая сверху на рис. 118), отличается, по-видимому, от предыдущих. Для этой мРНК прямыми экспериментами было показано, что белок L10, а еще лучше его комплекс с белком L7/L12 (пентамерный комплекс $[L7/L12]_4 \cdot L10$, см. раздел Б. III.4), специфически связывается с участком 5'-концевой лидирующей последовательности, отстоящим по крайней мере на несколько десятков нуклеотидных остатков от инициирующего кодона первого цистрона, и это связывание репрессирует трансляцию. В пределах этого же участка лидирующей (некодирующей) последовательности мРНК найдена большая гомология с участком рибосомной 23S РНК, где предполагается место специфического связывания комплекса $L10 \cdot (L7/L12)_4$. Таким образом, белок L10 или его комплекс с белком L7/L12 узнают структуру мРНК, удаленную от инициирующего кодона, но их взаимодействие, тем не менее блокирует инициацию трансляции. Оказалось, что инициация блокирует также многие мутационные изменения нуклеотидов, а также делеции в этом удаленном участке лидирующей последовательности. Создается впечатление, что надлежащая вторичная и третичная структура данного участка лидирующей последовательности имеет позитивное значение для инициации трансляции этой мРНК и ее пертурбации, в том числе в результате присоединения белка L10 или его комплекса с белком L7/L12, приводят к невозможности инициации трансляции.

Предположение, что рибосомный белок-репрессор использует один и тот же активный центр для связывания с рибосомной РНК при самосборке рибосомы и для связывания с мРНК при репрессии трансляции, нашло также подтверждение и в другой группе фактов. Оказалось, что рибосомная РНК, добавленная в систему трансляции, снимает репрес-

Рис. 120. Сравнение предсказанных вторичных структур участка полицистронной мРНК, узнаваемого белком S8 при репрессии трансляции (слева), и участка рибосомной 16S РНК, узнаваемого белком S8 при сборке рибосомы (справа): пунктиром обведены гомологичные спирали; в прямоугольники заключены инициирующий кодон и последовательность Шайна — Дальгарно на мРНК

16S РНК



сорный эффект соответствующего рибосомного белка. В опытах *in vitro* прямо показано, что репрессорное действие белка L1 на синтез белков L1 или L11 и ингибирование синтеза белков L10 и L7/L12 комплексом L10 · (L7 / L12)₄ специфически предотвращается добавлением рибосомной 23S РНК, но не 16S РНК.

На основании вышеперечисленных фактов и наблюдений М. Номура с сотрудниками предложили очень изящную модель координированной регуляции синтеза всех рибосомных белков. Модель основана на идее о конкуренции между рибосомной РНК и мРНК за связывание с «сердцевинными» рибосомными белками. Такие белки, как S4, S7, S8, L1, L4, а также белковый комплекс L10 · (L7 / L12)₄, имеют сильное сродство к специфическим местам прикрепления на рибосомных РНК, и поэтому по мере их синтеза они немедленно вовлекаются в процесс сборки рибосомных частиц, связываясь с 16S и 23S РНК соответственно. Собственное высокое сродство к рибосомной РНК и кооперативность сборки

рибосомных частиц с участием других рибосомных белков приводят к уводу всех появляющихся свободных рибосомных белков в процессе сборки на рибосомные мРНК. В этих условиях мРНК оказываются не конкурентоспособными, не связывают рибосомные белки и могут нормально транслироваться. Однако когда рибосомных белков становится больше, чем доступной рибосомной РНК, появляется их избыток в свободном состоянии. Это приводит к связыванию соответствующих ключевых белков со своими мРНК, давая в результате ингибирование инициации и репрессию трансляции. Строго последовательная трансляция полицистронных мРНК, кодирующих ряд рибосомных белков, делает возможным существование только одного репрессорного белка и одного места его действия на каждую мРНК для координированной репрессии трансляции всего ряда кодируемых белков. Этот простой механизм обеспечивает прямую регуляторную связь между сборкой рибосом и синтезом рибосомных белков.

Рекомендуемая литература

- Итоги науки и техники. Сер. молекул. биол. — М.: ВИНТИ, 1982. Т. 17. С. 5–65.
- Шанвиль Ф., Энни А.-Л. Биосинтез белка: Пер. с франц./Под ред. Л. Л. Киселева. — М.: Мир, 1977.
- The Genetic Code.* — Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1966, v. 31, p. 39–49; 103–111; 289–295.
- The Mechanism of Protein Synthesis.* — Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1969, v. 34, p. 261–312; 655–673.
- Bosch L., ed. *The Mechanism of Protein Synthesis and Its Regulation.* Amsterdam, London: North-Holland, 1972, p. 55–131.
- Chambliss G. et al., eds. *Ribosomes: Structure, Function, and Genetics.* Baltimore: Univ. Park Press, 1980, p. 377–411; 445–495; 693–718.
- Cohn W. E., ed. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology.* N. Y.: Acad. Press, 1977, v. 20, p. 209–284.
- Weissbach H., Pestka S., eds. *Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis.* N. Y.: Acad. Press, 1977, p. 245–321.
- Clark B. F. C., Marcher K. A. The role of N-formylmethionyl-sRNA in protein biosynthesis. — *J. Mol. Biol.*, 1966, v. 17, p. 394–406.
- Gralla J., Steitz J. A., Crothers D. M. Direct physical evidence for secondary structure in an isolated fragment of R17 bacteriophage mRNA. — *Nature*, 1974, v. 248, p. 204–208.
- Kastelein R. A., Remaut E., Fiers W., van Duin J. Lysis gene expression of RNA phage MS2 depends on a frameshift during translation of the overlapping coat protein gene. — *Nature*, 1982, v. 295, p. 35–41.
- Marcker K., Sanger F. N-formyl-methionyl-sRNA. — *J. Mol. Biol.*, 1964, v. 8, p. 835–840.
- Nomura M., Yates J. L., Dean D., Post L. E. Feedback regulation of ribosomal protein gene expression in *Escherichia coli*: Structural homology of ribosomal RNA and ribosomal protein mRNA. — *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 1980, v. 77, p. 7084–7088.
- Scherer G. F. E., Walkinshaw M. D., Arnott S., Morré D. J. The ribosome binding sites recognized by *E. coli* ribosomes have regions with signal character in both the leader and protein coding segments. — *Nucleic Acids Res.*, 1980, v. 8, p. 3895–3907.
- Shine J., Dalgarno L. The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: Complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. — *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 1974, v. 71, p. 1342–1346.
- Steitz J. A. Discriminatory ribosome rebinding of isolated regions of protein synthesis initiation from the ribonucleic acid of bacteriophage R17. — *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 1973, v. 70, p. 2605–2609.
- Weissman C., Billeter M. A., Goodman H. M. et al. Structure and function of phage RNA. — *Ann. Rev. Biochem.*, 1973, v. 42, p. 303–328.
- Woo N. H., Roe B. A., Rich A. Three-dimensional structure of *Escherichia coli* initiator tRNA^{Met}. — *Nature*, 1980, v. 286, p. 346–351.

ИНИЦИАЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ
И ЕЕ РЕГУЛЯЦИЯ У ЭУКАРИОТ

1. ОСОБЕННОСТИ ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ мРНК

В отличие от прокариотической мРНК эукариотическая мРНК комплексирована с белками, образуя «мессенджер-рибонуклеопроteidы» (мРНП), или информсомы, метаболически стабильна (т. е. отсутствует постоянная интенсивная деградация и интенсивный ресинтез мРНК), моноцистронна и, как правило, имеет специфические модифицированный (кэппированный) 5'-конец. Все это обуславливает целый ряд особенностей инициации трансляции и ее регуляции у эукариот.

Прежде всего в эукариотических клетках более или менее значительная часть мРНК оказывается не вовлеченной в данный момент в трансляцию, будучи представлена так называемыми свободными цитоплазматическими мРНП (свободными информосомами). Эти свободные **нетранслируемые** частицы, как правило, имеют соотношение масс белок: РНК около 3 : 1 и, соответственно, относительно низкую плавучую плотность в CsCl — около 1,4 г/см³ (в то время как рибосома — около 1,55—1,59 г/см³). Они характеризуются специфическим набором белков, функция и роль которых пока совершенно не ясна. Предполагают, что по крайней мере некоторые из этих белков могут играть роль репрессоров трансляции, препятствующих присоединению рибосом и инициации трансляции. Однако ни в одном случае до настоящего времени существование таких репрессорных белков прямо показано не было. Репрессорную функцию приписывают также некоторым цитоплазматическим низкомолекулярным РНК, находимым в комплексе со свободными мРНП.

Как бы то ни было, мРНК у эукариот может довольно длительное время быть в нетранслируемой, запасной или маскированной форме. Ярким примером является запасная мРНК неоплодотворенных яйцеклеток животных или семян растений. Оплодотворение ооцитов, а также прорастание семян вызывает как общую, так и специфическую активацию трансляции предсуществующих мРНК. В процессах развития эукариотических организмов и клеточной дифференцировки синтез мРНК и ее накопление в цитоплазме (возможно, в форме мРНП) может происходить заранее, задолго до момента начала ее трансляции. Так, делящиеся миобласты характеризуются синтезом и накоплением нетранслируемой миозиновой мРНК в форме мРНП, и лишь последующее слияние клеток и переход к дифференцированному состоянию миотрубок индуцирует трансляцию накопленной миозиновой мРНК. Трансляция предсинтезированных мРНК индуцируется какими-то механизмами, природа которых не известна. Во всяком случае, переход мРНК в транслируемую форму сопровождается сменой многих белков, комплексированных с ней. (Дело в том, что из эукариотических полирибосом мРНК также выделяет-

ся в форме мРНК, но их белковый состав сильно отличается от такового свободных мРНК.)

Естественно, что метаболическая стабильность (долгоживучесть) эукариотической мРНК делает регуляцию на уровне трансляции особенно важной в общей картине регуляции биосинтеза белка. В частности, кроме сигналов для активации матриц, т. е. для инициации их трансляции, становятся важными и необходимыми также сигналы для инактивации матриц, т. е. для прекращения их трансляции. Здесь можно указать на гормональную регуляцию трансляции как на яркий пример включения и выключения трансляции определенных мРНК. Например, показано, что инъекция женского полового гормона (эстрогена) цыплятам индуцирует цитодифференцировку яйцеводов, синтез мРНК яичного альбумина и синтез этого белка. После прекращения инъекций синтез мРНК и синтез альбумина прекращаются, но можно показать, что предсинтезированная альбуминовая мРНК частично сохраняется в цитоплазме в нетранслируемой или слабо транслируемой форме. Повторная инъекция гормона (эстрогена или прогестерона) немедленно реактивирует ее трансляцию, стимулируя инициацию.

При дифференцировке хрусталика глаза куриного эмбриона синтез δ -кристаллина падает к определенному периоду; однако было показано, что количество δ -кристаллиновой мРНК в клетках сохраняется приблизительно на прежнем уровне.

При тепловом шоке начинается выработка нескольких специальных белков и прекращается трансляция большей части старой клеточной мРНК без ее разрушения; восстановление клеток сопровождается реактивацией трансляции тотальной мРНК. В случае ооцитов лягушки (*Xenopus laevis*) было показано, что реакция на тепловой шок и восстановление от него контролируются целиком на уровне трансляции; мРНК белков теплового шока синтезируется заранее, в процессе оогенеза, и запасается в ооцитах в нетранслируемой форме; она может обратимо активироваться и вовлекаться в трансляцию при повышенной температуре. Опять-таки во всех этих случаях молекулярные механизмы маскирования и демаскирования не известны.

Существует мнение, что необходимость более развитой регуляции на уровне трансляции у эукариот, по сравнению с прокариотами, привела к эволюционной выработке более сложного механизма инициации, с участием гораздо большего количества белков. Вместо комплементарного РНК-РНК узнавания, в которое вовлечена прединицирующая последовательность Шайна — Дальгарно прокариотических мРНК (а 5'-конец матрицы не нужен), эукариотические мРНК узнаются эукариотическими рибосомами по кэппированному 5'-концу с обязательным участием специального кэпсвязывающего белка. Не исключено, что это дает больше возможностей для регуляции инициации. Можно думать, что эукариотические мРНК должны быть моноцистронными в связи с тем фактом, что 5'-конец матричного полинуклеотида у эукариот оказывается необходимым для связывания определенных белков и инициации трансляции. Узнавание внутренних цистронов полицистронных мРНК («внутренняя инициация») эукариотическими рибосомами, как правило, невозможно.

Иницирующий кодон. AUG — единственный иницирующий кодон природных эукариотических мРНК. В подавляющем большинстве случаев им служит первый триплет AUG от 5'-конца матричного полинуклеотида, хотя это не абсолютное правило для всех мРНК.

Инициаторная тРНК. В качестве инициаторной тРНК, узнающей кодон AUG, в эукариотах, как и в прокариотах, служит специальная тРНК_F, ацилируемая метионил-тРНК-синтетазой. Однако образующаяся метионил-тРНК_F в эукариотических клетках, в отличие от прокариотической инициаторной тРНК, не формилируется. Следовательно, единственным отличием инициаторной метионил-тРНК_F и обычной метионил-тРНК^{Met} являются некоторые особенности структуры самого тРНК_F-остатка, которые делают ее способной взаимодействовать с факторами инициации и вакантной рибосомной субчастицей и не способной участвовать в элонгации. Первичные и вторичные структуры (в форме клеверного листа) этих двух эукариотических тРНК даны на рис. 121. Видно, что различия невелики. Наиболее постоянной чертой инициаторных тРНК эукариот является последовательность GAUC (или GAΨC у высших растений и иглокожих) вместо универсальной последовательности GTΨC в элонгаторных тРНК в положениях 51—54. В инициаторных тРНК большинства эукариотических объектов дигидро-

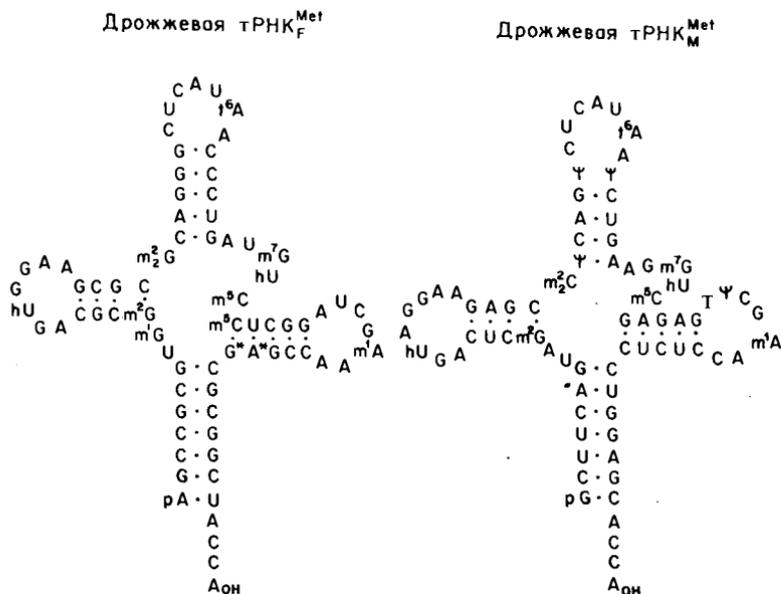


Рис. 121. Нуклеотидная последовательность и схема вторичной структуры эукариотической инициаторной тРНК (тРНК_F^{Met}, слева) в сравнении с эукариотической метиониновой тРНК, участвующей в элонгации (тРНК_M^{Met}, справа) (по М. Simsek, U. Z. Raj Bhandary Biochem. Biophys. Res Commun., 1972, v. 49, p. 508—515; Н. Gruhl, Н. Feldman FEBS Lett., 1975, v. 57, p. 145—148)

уридилловая петля не содержит дигидроуридина. В отличие от инициаторных тРНК прокариот (и митохондрией) 5'-концевой нуклеозид эукариотических инициаторных тРНК спарен с нуклеозидом 3'-концевого участка, как и в элонгаторных тРНК. Неизвестно; какие структурные особенности определяют функциональную специфику эукариотической инициаторной тРНК.

Факторы инициации. Насчитывается около десятка белковых факторов, необходимых для инициации трансляции эукариотических мРНК эукариотическими рибосомами и обозначаемых как eIF-1, eIF-2, eIF-3, eIF-4A, eIF-4B, eIF-4C, eIF-4D, eIF-4E, eIF-4F, eIF-5 и т. д. (буква «е» означает «эукариотический»; IF — фактор инициации). Список факторов инициации и их некоторые физические и функциональные свойства даны в табл. 2. Строго говоря, почти все вышеперечисленные факторы инициации выделены в более или менее индивидуальном состоянии и охарактеризованы для случая трансляции глобиновой

Таблица 2. Эукариотические факторы инициации и их некоторые физические и функциональные свойства

Обозначения	Синонимы	Мол. масса, $M_r \times 10^{-3}$	Субъединицы и их мол. масса, $M_r \times 10^{-3}$	Сродство к 40S субчастицам	Сродство к мРНК	Стимуляция связывания Met-tRNA 40S субчастицами	Стимуляция связывания мРНК 40S субчастицами
eIF-1		12		±	+	+	+
eIF-2		120	32 (α), 35 (β), 55 (γ)	+?	+	++	+
eIF-2A		65	—	+?	?	+	—
eIF-2B	анти-HCl, eRF, ESP, GEF, RF, SRF	≈ 300	30, 40, 55, 65, 80	—	?	+	—
eIF-3		≈ 600	около 10 субъединиц от 30 до 150	++	+	+	+
eIF-4A		50	—	—	—	—	+
eIF-4B		80	—	—	+	—	+
eIF-4C		17	—	+	+	+	+
eIF-4D		16	—	—	—	—	—
eIF-4E	CBP-I	24	—	—	+	—	+
eIF-4F							
(включает eIF-4A, eIF-4E и белок с $M_r = 220000$)	CBP-II	300	24, 50, 220	—	+	—	+
eIF-5		160	—	—	+	—	—
eIF-6		25	—	—	?	—	—

мРНК в ретикулоцитной белоксинтезирующей системе, в то время как для других эукариотических систем существуют более фрагментарные сведения, касающиеся в основном таких главных факторов инициации, как eIF-2, eIF-3 и eIF-5.

eIF-2, eIF-3 и eIF-5 строго необходимы для инициации, в то время как eIF-1, eIF-2B, eIF-4A, eIF-4B, eIF-4C, eIF-4E и eIF-4F оказывают большее или меньшее стимулирующее действие. Роль и вклад eIF-2A и eIF-4D в инициацию вообще не ясна, и имеются сомнения, являются ли они действительно необходимыми факторами инициации. В экспериментах *in vitro* белок eIF-2A стимулирует связывание инициаторной тРНК с 40S субчастицей в отсутствие ГТФ; белок eIF-4D стимулирует реакцию инициаторной метионил-тРНК с пуромицином в составе конечного инициаторного 80S-комплекса.

Все факторы инициации, кроме eIF-4A и eIF-4D, по-видимому, РНК-связывающие белки в том смысле, что имеют неспецифическое сродство к любой высокомолекулярной РНК и способны образовывать с ней более или менее стабильные комплексы.

eIF-2 представляет собой субъединичный белок, взаимодействующий с ГТФ и Met-tRNA_F; функционально он аналогичен прокариотическому IF-2. eIF-2, однако состоит из трех различных субъединиц, с молекулярными массами около 32000 (α), 35000 (β) и 55000 (γ) дальтон. (Следует помнить, что при оценке молекулярной массы β -субъединицы методом гелеэлектрофореза в присутствии додецилсульфата натрия получается значение около 50000 дальтон, что является следствием ее аномального поведения, по-видимому, из-за высокого содержания основных аминокислот.)

eIF-3 — еще более крупный и сложный субъединичный белок. Он имеет молекулярную массу не менее $0,5 \cdot 10^6$ дальтон, коэффициент седиментации около 15S и состоит приблизительно из десятка субъединиц с молекулярными массами от 30000 до 150000 дальтон. eIF-3 имеет высокое сродство к рибосомной 40S субчастице и часто рассматривается как функциональный аналог прокариотического IF-3; однако ряд данных показывает, что функции этого белкового комплекса гораздо сложнее, и, в частности, есть указания на его возможную тканеспецифичность и роль в избирательном узнавании (дискриминации) мРНК.

eIF-5 — тоже относительно крупный белок, но состоящий из одной полипептидной цепи с молекулярной массой около 160000 дальтон. Прокариотические системы не имеют, по-видимому, аналога eIF-5. Этот фактор абсолютно необходим для присоединения рибосомной 60S субчастицы к инициаторному 40S комплексу с сопутствующим расщеплением ГТФ на ГДФ и ортофосфат. Другими словами, он промотирует образование 80S частиц на завершающей стадии инициации.

Почти все остальные факторы инициации — eIF-1, eIF-4A, eIF-4B, eIF-4C, eIF-4D и eIF-4E — состоят каждый из одной полипептидной цепи. eIF-1, eIF-4C и eIF-4D — маленькие белки с молекулярными массами между 15000 и 20000 дальтон; первые два оказывают стимулирующее действие на стадии связывания мРНК. eIF-4A и eIF-4B — более крупные белки с молекулярными массами около 50000 дальтон и около 80000 даль-

тон соответственно; их участие в связывании мРНК с рибосомной 40S субчастицей более необходимо.

Важным белком является eIF-4E, чаще называемый кэпсвязывающим белком (СВР-I), с молекулярной массой 24000 дальтон. Специфически связываясь с модифицированным (кэппированным) 5'-концом мРНК, он стимулирует ассоциацию рибосомных частиц с матрицей и инициацию трансляции. Имеются указания, однако, что этот белок существует и функционирует в норме в составе большого кэпсвязывающего мультибелкового 8—10S комплекса, обозначаемого как СВР-II или eIF-4F; комплекс включает в себя также eIF-4A и субъединицу (один полипептид) с молекулярной массой 220000 дальтон. Комплекс СВР-II (eIF-4F) функционирует совместно со свободными eIF-4A и eIF-4B.

В отличие от прокариотических систем стадия связывания мРНК в процессе инициации у эукариот включает распад АТФ до АДФ и ортофосфата. Гидролиз АТФ сопряжен с участием СВР-II (eIF-4F), eIF-4A и eIF-4B в связывании мРНК. Возможно, что кэпсвязывающие белки осуществляют АТФ-зависимое расплетание или дестабилизацию вторичной структуры 5'-концевого участка эукариотической мРНК, тем самым способствуя ассоциации этого участка с рибосомными частицами.

Крупный белок eIF-2B, построенный из 5 различных субъединиц, имеет вспомогательное значение. Он образует комплекс с eIF-2, в котором сродство eIF-2 к ГДФ уменьшено, а к ГТФ увеличено, в результате чего обеспечивается эффективный обмен связанного ГДФ на свободный ГТФ. (Иначе, при физиологических концентрациях ГДФ и ГТФ более 90% молекул eIF-2 было бы связано с ГДФ, существуя, таким образом, в неактивном состоянии.) Образующийся комплекс eIF-2B · eIF-2 · GTP непосредственно связывает инициаторную метионил-тРНК, и затем комплекс Met-tRNA_F · eIF-2 · GTP переносится от eIF-2B на иницирующую 40S рибосомную частицу. Таким образом, eIF-2B катализирует повторное использование eIF-2 после его освобождения (в форме eIF-2 · GDP) из рибосом, заканчивающих инициацию (см. рис. 124).

В целом картина с белковыми факторами, участвующими в инициации трансляции у эукариот, получается сложной.

3. СОСТОЯНИЕ РИБОСОМЫ ПЕРЕД ИНИЦИАЦИЕЙ

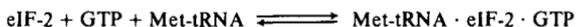
Как и в случае прокариот, терминировавшие (нетранслирующие) рибосомы перед инициацией трансляции должны перейти в диссоциированное состояние. Однако эукариотические 80S рибосомы довольно стабильны, и надо полагать, что их окончательная диссоциация на субчастицы после терминации трансляции достигается только в результате действия белковых факторов. Во всяком случае, в цитоплазматических экстрактах эукариотических клеток существуют так называемые «нативные» 40S и 60S субчастицы, отличающиеся от «производных» 40S и 60S субчастиц, получаемых из 80S рибосом путем диссоциации понижением концентрации Mg²⁺. «Нативные» субчастицы не способны ассоциировать в 80S рибосомы при умеренных концентрациях Mg²⁺; в противоположность «производным» субчастицам. «Нативные» субчастицы, и

особенно 40S субчастицы, имеют существенно большее содержание белка, чем «производные» субчастицы; соответственно, если плавучая плотность в CsCl у «производной» 40S субчастицы равна около 1,52–1,55 г/см³, то у «нативной» 40S субчастицы она составляет около 1,49 г/см³ и может приближаться даже к 1,40 г/см³. В составе «нативных» 40S субчастиц находят ряд факторов инициации в связанном виде в варьирующих количествах (именно «нативные» субчастицы и являются источником для получения факторов инициации при их препаративном получении). Все «нативные» 40S частицы обязательно содержат eIF-3 в эквимольном количестве. «Нативные» 60S субчастицы могут иметь, по-видимому, связанные факторы элонгации.

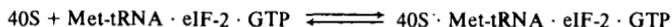
Итак, в цитоплазме эукариотических клеток и в их экстрактах всегда имеется больший или меньший фонд свободных неассоциируемых («нативных») 40S и 60S субчастиц, связанных с факторами инициации и, возможно, также с рядом других белков. Именно «нативные» 40S субчастицы, несущие на себе eIF-3 и некоторые другие факторы инициации, начинают процесс инициации трансляции.

4. ОБРАЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСА РИБОСОМНОЙ 40S СУБЧАСТИЦЫ С ИНИЦИАТОРНОЙ тРНК

В присутствии ГТФ eIF-2 специфически узнает инициаторную метионил-тРНК и образует с ней тройственный комплекс:



Тройственный комплекс имеет сильное сродство к «нативной» 40S субчастице. В результате образуется инициаторный 43S комплекс:



Уже указывалось, что eIF-2B, взаимодействуя с eIF-2, стимулирует образование тройственного комплекса Met-tRNA_F · eIF-2 · GTP и его вступление в инициаторный 43S комплекс (см. рис. 124).

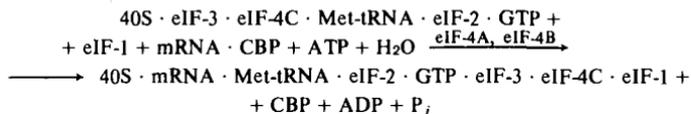
Присутствие других факторов инициации на 40S субчастице, и особенно eIF-3, а также eIF-4C и, возможно, eIF-1, стабилизирует инициаторный 43S комплекс. Для образования комплекса ГТФ может быть заменен на его нерасщепляемый аналог.

Таким образом, в эукариотических системах связывание малой рибосомной субчастицы с инициаторной тРНК, по-видимому, предшествует ассоциации с мРНК, являясь первым этапом инициации трансляции.

5. АССОЦИАЦИЯ РИБОСОМНОЙ 40S СУБЧАСТИЦЫ С мРНК

Комплекс нативной 40S субчастицы с инициаторной метионил-тРНК (включающий некоторые факторы инициации и ГТФ) вступает в ассоциацию с мРНК. На этом этапе абсолютно необходимым оказывается eIF-3. Механизм его действия не ясен. Предполагается, что он, будучи связанным с «нативной» 40S субчастицей, участвует в формировании центра; узнающего мРНК. Ему приписывают также функции белка, способствующего расплетанию вторичной структуры матричного полинуклеотида в

процессе инициации. Имеются указания на роль eIF-3 в дискриминации различных мРНК. Наличие eIF-2 на 40S субчастице также сильно способствует связыванию и, возможно, дискриминации мРНК, тем более что этот белок обладает сильной РНК-связывающей способностью. В ассоциации 40S субчастицы с мРНК принимают участие также eIF-1, eIF-4A, eIF-4B, eIF-4C и кэпсвязывающие белки (eIF-4E, eIF-4F), и происходит гидролиз АТФ до АДФ и ортофосфата. В результате образуется так называемый инициаторный 48S комплекс:



В большинстве случаев важным условием для начальной ассоциации с мРНК является наличие кэп-структуры на 5'-конце (см. рис. 5) и комплексированного с ним кэпсвязывающего белка или белков (CBP). Действительно, все клеточные эукариотические мРНК имеют кэп, и удаление его резко понижает эффективность трансляции мРНК. Показано, что кэп-структура вместе с кэпсвязывающими белками увеличивают сродство мРНК к рибосомным частицам. Добавление химических аналогов кэп-структуры, таких, как m⁷GMP, m⁷GDP или m⁷GpppN^m (где N — любой нуклеотид), ингибирует связывание рибосом с кэппированными мРНК и, соответственно, их трансляцию в бесклеточных системах. Антитела против кэпсвязывающего белка точно так же ингибируют связывание рибосом и инициацию трансляции кэппированных мРНК. Интересно, что прокариотические (некэппированные) мРНК могут в ряде случаев транслироваться эукариотическими рибосомами, но со сравнительно низкой эффективностью; присоединение кэп-структуры к их 5'-концу делает их высокоэффективными матрицами в эукариотических бесклеточных системах:

Следует указать, однако, что РНК некоторых животных и растительных вирусов не имеют кэп-структуры на 5'-конце, но тем не менее являются эффективными матрицами в эукариотических системах. Это относится, например, к РНК пикорнавирусов, такого, как вирус энцефаломиокардита, к РНК сателлитного вируса некроза табака и т. п. Кэпсвязывающие белки не участвуют в их ассоциации с рибосомами. Предполагается, что в этих исключительных случаях 5'-конец мРНК имеет особую (может быть, развернутую) структуру, обеспечивающую ему высокое сродство к 40S субчастице с факторами инициации в отсутствие кэп-структуры и кэпсвязывающих белков.

Как уже отмечалось, одной из функций, приписываемых кэп-структуре, является связывание кэпсвязывающих белков, обеспечивающих необходимую дестабилизацию или перестройку собственной 5'-концевой вторичной и/или третичной структуры мРНК. Предполагается, что расплетающий эффект кэпсвязывающего белкового комплекса зависит от АТФ, и что гидролиз АТФ требуется для такого расплетания. Возможно, что лишь специально подготовленная (например, «расплавленная») пространственная структура 5'-концевого участка мРНК может достаточно эффективно участвовать в ассоциации с эукариотической рибо-

сомной частицей. Действительно, ряд наблюдений указывает на то, что чем менее структурирован 5'-концевой участок мРНК, тем меньше его ассоциация с рибосомами зависит от наличия кэпа.

На моноцистронный характер большинства эукариотических мРНК и неспособность эукариотических рибосом осуществлять «внутреннюю инициацию» было указано еще М. Джекобсоном и Д. Балтимором в 1968 г. Позднее необходимость 5'-конца мРНК для инициации трансляции в эукариотических системах была продемонстрирована в очень изящных опытах М. Козак (США): если матричный полинуклеотид, способный транслироваться как эукариотическими, так и прокариотическими рибосомами, был замкнут в кольцо (путем соединения 5'-конца с 3'-концом РНК-лигазой), то тогда только прокариотические рибосомы могли транслировать его, в то время как эукариотические рибосомы полностью теряли способность инициировать трансляцию на такой циркулярной матрице. Разрыв кольца перед инициирующим кодоном AUG восстанавливал способность эукариотических рибосом транслировать этот полинуклеотид. Точно так же в экспериментах М. Розенберга и Б. Патерсона (США) было показано, что если прокариотическая полицистронная мРНК снабжена 5'-концевой кэп-структурой, чтобы разрешить ее эффективную трансляцию эукариотическими рибосомами, то трансляция ограничена лишь 5'-проксимальным цистроном. Эукариотические рибосомы действительно оказываются, как правило, не способными инициировать на внутренних участках матричного полинуклеотида (в противоположность прокариотическим рибосомам).

Анализ первичных структур рибосомных РНК и мРНК эукариот показал, что здесь отсутствует столь хорошо просматриваемая у прокариот комплементарность 3'-конца РНК малой рибосомной субчастицы с прединицирующей полипуриновой последовательностью прокариотических мРНК и их отдельных цистронов. Поразительно, что 3'-концевые 50-нуклеотидные последовательности рибосомных РНК малых субчастиц (16S РНК прокариот и 18S РНК эукариот) консервативны в эволюции и очень гомологичны, давая похожую шпильку вторичной структуры, но именно полипиримидиновый блок CCUCC прокариотической 16S РНК отсутствует в эукариотической 18S РНК (рис. 122). Этот факт наводит на мысль, что по каким-то важным причинам эукариоты вынуждены были отказаться от использования первичного комплементарного узнавания между рибосомной РНК и мРНК в ассоциации рибосом с матрицей и выработать другой путь для узнавания инициирующей последовательности. Этот путь состоит, по-видимому, в первичном узнавании 5'-конца. (Конечно, можно думать и наоборот: узнавание 5'-конца является более ранним, и эволюция прокариотических организмов, особенно развитие оперонов и полицистронных матриц, привели к специальному механизму узнавания внутренних инициирующих районов; таким механизмом служит спаривание полипуриновой последовательности Шайна — Дальгарно с эволюционно приобретенной вставкой CCUCC у самого 3'-конца рибосомной РНК.) В то же время в процессе инициации какое-то комплементарное взаимодействие между последовательностями у 5'-конца кэпированной мРНК и 3'-конца 18S РНК, видимо, имеет место; однако это спаривание строго зависит от присутствия факторов инициации.



Рис. 122. Сравнение нуклеотидных последовательностей и вторичной структуры 3'-концевого участка прокариотической 16S и эукариотической 18S рибосомных РНК:

полипиримидиновая пентануклеотидная вставка прокариотической РНК обведена пунктиром

6. УЗНАВАНИЕ ИНИЦИИРУЮЩЕГО КОДОНА

Ассоциация рибосомной частицы с мРНК и узнавание иницирующего кодона у эукариот четко разграничены в пространстве и времени. Ассоциация 40S субчастицы с мРНК происходит на 5'-конце матричного полинуклеотида. В то же время в большинстве случаев иницирующий кодон удален от 5'-конца на несколько десятков нуклеотидов, а в некоторых редких случаях — даже на сотни нуклеотидов.

С другой стороны, характерной чертой подавляющего большинства эукариотических мРНК является то, что иницирующим кодоном служит первый AUG триплет от 5'-конца. На основании этих и ряда других фактов М. Козак выдвинула интересную гипотезу о механизме поиска рибосомной 40S субчастицей иницирующего района мРНК. Согласно гипотезе, «нативная» 40S субчастица с факторами инициации и инициаторной метионил-тРНК, взаимодействуя с экзпированным 5'-концом мРНК (очевидно, при участии экзпсвязывающего белка), ассоциирует с ним (при этом экзпсвязывающий белок диссоциирует). Далее эта 40S субчастица движется вдоль мРНК, сканируя ее последовательность (и при этом потребляя АТФ), пока не наткнется на триплет AUG, узнаваемый антикодоном связанной инициаторной тРНК. Здесь она останавливается, вслед за чем происходит следующий этап инициации — присоединение 60S субчастицы.

Следует отметить, однако, что не всегда первый триплет AUG от 5'-конца является истинным иницирующим кодоном. По-видимому, сканирующая 40S субчастица с инициаторной тРНК может пропускать некоторые AUG триплеты, если они оказываются не в соответствующем структурном окружении. Так, почти все функциональные иницирующие AUG кодоны эукариотических мРНК имеют непосредственно перед собой триплет, начинающийся с пуринового (чаще всего с А) нуклеотидного остатка. Предполагается, что при сканировании матрицы,

начиная с 5'-конца, 40S частицы с инициаторной тРНК предпочтительно узнают именно такую структуру $\overset{\wedge}{\text{NNAUG}}$ (где N — любой нуклеотид) как «правильное» место инициации; AUG триплеты с предшествующим $\overset{\text{C}}{\text{U}}$ NN триплетом являются, видимо, очень «слабыми» инициаторами и, как правило, проскакиваются рибосомной частицей без инициации. Кроме того, в окружении функциональных иницирующих кодонов наиболее предпочтительным непосредственным соседом с 3'-стороны является G, а примыкающая пентануклеотидная последовательность с 5'-стороны обычно богата C (CCACCAUGG).

В некоторых редких случаях инициация трансляции может происходить на AUG триплете, отстоящем довольно далеко от 5'-конца. Например, в мРНК эпидермального фактора роста мышей иницирующий кодон отнесен от 5'-конца на 350 нуклеотидных остатков, но и в этом случае он — первый AUG триплет от конца. Имеются также другие редкие примеры, где в нетранслируемых 5'-концевых последовательностях встречаются AUG триплеты, проскакиваемые рибосомами без инициации; очевидно, они не могут служить инициаторами из-за отсутствия подходящего структурного окружения. Иногда на сравнительно небольшом расстоянии вслед за AUG триплетом следует терминирующий кодон, который, по-видимому, предотвращает его использование в качестве инициатора синтеза длинного полипептида. Однако в случаях некоторых вирусиндуцированных мРНК может наблюдаться такое явление, когда первый AUG триплет узнается как иницирующий лишь частью рибосом («слабый инициатор»), в то время как остальная часть сканирующих рибосом его проскакивает без инициации и иницирует на следующем AUG; тогда мРНК оказывается **функционально двуцистронной**, так как на ней начинается и происходит синтез двух разных полипептидов, кодируемых перекрываемой нуклеотидной последовательностью.

Известно, что многие РНК животных и растительных вирусов представляют собой исключение из правила моноцистронности эукариотических мРНК. В случаях полицистронных РНК растительных и ряда животных вирусов эукариотические рибосомы могут иницировать трансляцию лишь первого цистрона, а последующие цистроны читаются после специфической фрагментации РНК, открывающей новые 5'-концы. В других случаях, например РНК вируса полиомиелита, цистроны транслируются непрерывно в виде единой полипептидной цепи-предшественника («полибелка»), которая затем нарезается на функционально активные цепи вирусных белков.

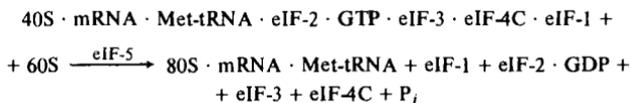
Следует специально указать на случаи, когда инициация происходит особенно далеко от 5'-конца цепи мРНК. Так, иницирующий кодон AUG полиовирусной РНК расположен на расстоянии 743 нуклеотида от 5'-конца, и ему предшествуют восемь AUG триплетов во всех трех фазах считывания! Эти предшествующие AUG триплеты, однако, находятся не в подходящем структурном окружении (см. выше), а кроме того, вслед за большинством из них на небольших расстояниях имеются терминирующие триплеты, прерывающие трансляцию, если бы она была на них иницирована. Таким образом, даже в рассматриваемом случае

принципиально возможно сканирование всей цепи РНК с 5'-конца, чтобы найти «внутренний» иницирующий AUG кодон.

Однако пока нет достаточных оснований исключить возможность того, что эукариотические рибосомы в каких-то особых случаях могут осуществлять и непосредственную «внутреннюю» инициацию, т. е. узнавать надлежащий иницирующий AUG кодон без сканирования всей длинной предшествующей последовательности.

7. ОБРАЗОВАНИЕ ИНИЦИИРУЮЩЕГО РИБОСОМНОГО 80S КОМПЛЕКСА

После нахождения 40S субчастицей с инициаторной тРНК иницирующего кодона она присоединяет свободную «нативную» 60S субчастицу, давая в результате образование 80S рибосомы, где инициаторная метионил-тРНК находится в Р-участке, а А-участок вакантен. Эта заключительная стадия инициации, в противоположность прокариотическим рибосомам, обязательно требует участия специального крупного белка — eIF-5. Присоединение 60S субчастицы, промотируемое eIF-5, сопровождается гидролизом ГТФ, связанного с eIF-2, освобождением eIF-2 с ГДФ, а также уходом eIF-3 и других факторов инициации:



Если в инициаторном 48S комплексе присутствовал нерасщепляемый аналог ГТФ, то eIF-5-промотируемое присоединение 60S субчастицы ингибируется. Возможно, что eIF-5 индуцирует гидролиз ГТФ непосредственно на 40S субчастице, а также общую дестабилизацию 48S инициаторного комплекса, в результате чего eIF-2 с ГДФ, eIF-3 и другие факторы инициации уходят, а 40S субчастица остается только с мРНК и метионил-тРНК, будучи в таком виде способна ассоциировать с 60S субчастицей. Во всяком случае показано, что если 48S инициаторный комплекс освобожден от eIF-2 и eIF-3, то он спонтанно, без eIF-5, присоединяет 60S субчастицу. Имеются некоторые указания на участие eIF-4C и eIF-4D в правильной ассоциации субчастиц и образовании окончательного 80S инициаторного комплекса с метионил-тРНК в Р-участке.

Общая схема последовательности событий в инициации трансляции у эукариот изображена на рис. 123.

8. РЕГУЛЯЦИЯ ИНИЦИАЦИИ

Несмотря на предполагаемую особую значимость регуляции на уровне трансляции и, казалось бы, развитость системы такой регуляции у эукариот, прямых фактических данных и конкретных разработанных примеров механизмов трансляционной регуляции до сих пор удивительно мало. Механизмы маскирования и демаскирования мРНК при ее запасаении в покоящихся клетках и активации при пробуждении соответственно, а также включения и выключения трансляции определенных

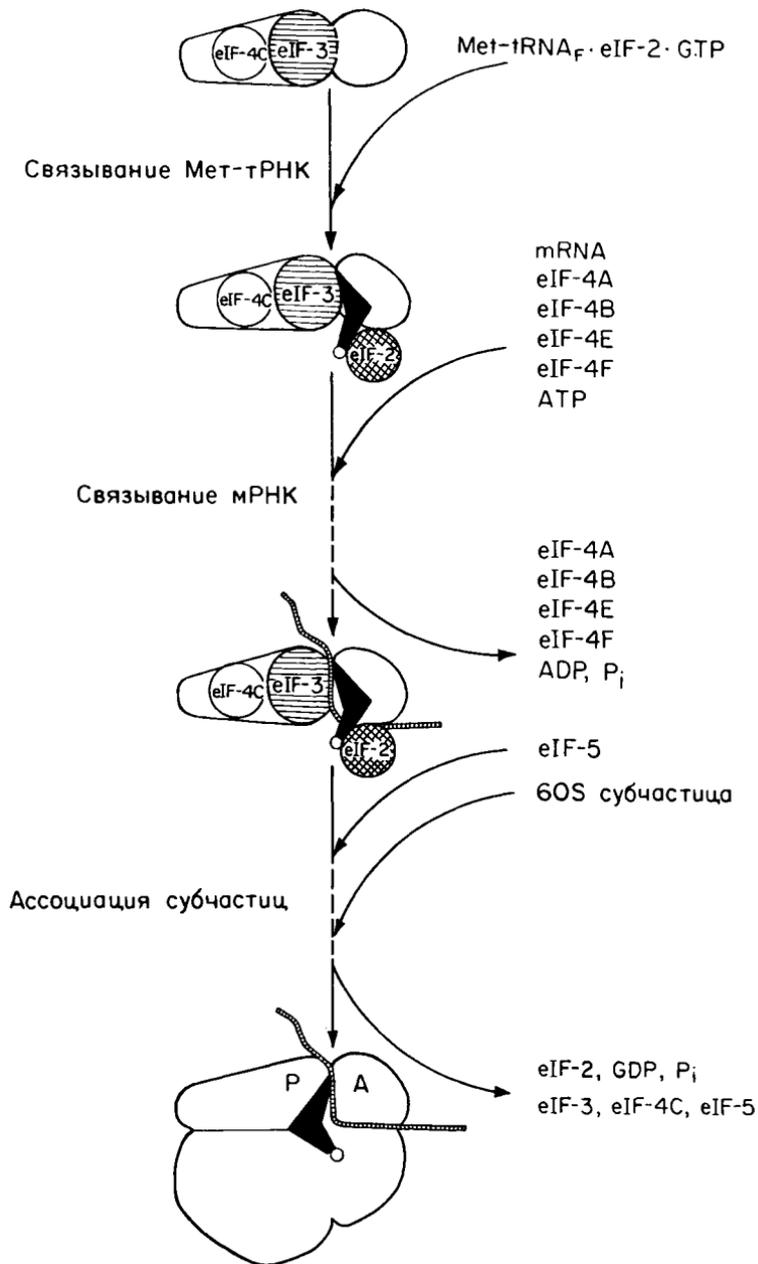


Рис. 123. Схема последовательности событий в процессе инициации трансляции у эукариотических организмов.

предсинтезированных мРНК в процессах клеточной дифференцировки совершенно не известны. Уже говорилось, что совершенно не ясна роль многочисленных белков, связанных с нетранслируемыми и транслируемыми мРНК в мРНК всех видов. Те сведения, которые имеются, не могут рассматриваться иначе, как фрагментарные и касающиеся лишь частных особенностей общей регуляторной системы трансляционного аппарата эукариотической клетки.

Имеющиеся сведения сводятся в основном к двум группам фактов. Во-первых, известно много случаев, когда имеет место **избирательная дискриминация** мРНК как результат разной эффективности («силы») инициации благодаря каким-то (неизвестным) чертам структуры 5'-концевого и иницирующего района матриц. Сюда относятся, по-видимому, также случаи подавления трансляции хозяйских мРНК при одновременной высокоэффективной трансляции вирусных РНК в вирусинфицированных эукариотических клетках. Во-вторых, четко продемонстрирована возможность **тотальной регуляции** (подавления) синтеза белка в клетке за счет модификации ключевого фактора инициации — eIF-2.

Избирательная дискриминация мРНК

Идеальным объектом для изучения регуляции на уровне трансляции являются ретикулоциты млекопитающих или бесклеточные системы, приготовленные из них. Здесь отсутствует клеточное ядро и не примешиваются никакие влияния транскрипции. Кроме того, в таких системах синтезируется главным образом один белок — гемоглобин. Для его образования требуются эквимоллярные количества α - и β -цепей глобина. Две соответствующие мРНК присутствуют в цитоплазме или в экстракте и эффективно транслируются рибосомами. Скорость элонгации в полирибосомах на обеих мРНК, как показано, одинакова и составляет около 5—10 аминокислотных остатков в секунду при 37°C (или в 10 раз меньше при 20°C). Однако полирибосомы, синтезирующие β -цепи, содержат больше рибосом, чем те, что делают α -цепи, при приблизительно одинаковой длине обеих мРНК. Отсюда следует, что инициация на мРНК, кодирующей β -цепь, идет более эффективно, чем на мРНК для α -цепи, т. е. мРНК β -цепи «сильнее» в инициации трансляции. Чтобы скомпенсировать это и продуцировать эквимоллярные количества α - и β -цепей, клетка содержит соответственно большее количество мРНК для α -цепи, чем мРНК для β -цепи. Основанием для большей эффективности инициации на одной мРНК, по сравнению с инициацией на другой, могут быть какие-то структурные особенности 5'-концевой последовательности, определяющие ее большее сродство к факторам инициации (а также, может быть, к самим рибосомным 40S частицам).

Другой пример дискриминации между двумя мРНК — это разные скорости инициации трансляции овальбуминовой и кональбуминовой мРНК (мРНК для белков куриного яйца) в бесклеточных системах.

При некоторых вирусных инфекциях подавление трансляции хозяйских мРНК и преимущественный синтез вирусных белков происходит как результат подобной же конкуренции: вирусные мРНК оказываются более эффективными в инициации трансляции, чем хозяйские мРНК.

Например, это имеет место при заражении клеток вирусом энцефаломиокардита. Здесь опять-таки 5'-концевая последовательность вирусной РНК имеет структуру, сходство которой к хозяйским факторам инициации много выше, чем у клеточных мРНК. Имеются указания, что РНК вируса энцефаломиокардита обладает на порядок более высоким сходством к eIF-4B, чем клеточные мРНК; увод этого фактора инициации на вирусную мРНК мог бы быть причиной угнетения инициации хозяйских белков, хотя прямо этот механизм не показан. Сами факторы инициации, включая кэпсвязывающие белки хозяйской клетки, в случае инфекции данным вирусом никак не модифицируются и их количество не изменяется.

Другой механизм избирательной дискриминации мРНК реализуется при инфекции вирусом полиомиелита. В этом случае инфекция каким-то образом вызывает инактивацию комплекса кэпсвязывающих белков, так что резко снижается эффективность инициации на всех кэппированных мРНК и сохраняется достаточно высокая эффективность инициации на вирусной мРНК, не имеющей кэп-структуры. Есть указание, что инактивация вызывается вирусиндуцированным протеолизом белка с молекулярной массой 220000 дальтон, входящего в состав кэпсвязывающего белкового комплекса (eIF-4F).

Наконец, известны случаи, когда для избирательной дискриминации мРНК используется, по-видимому, изменение ионного состава внутриклеточной среды. Так, заражение фибробластов цыплят вирусом Синдбис вызывает уменьшение концентрации K^+ и увеличение концентрации Na^+ в клетке. В измененных ионных условиях сходство хозяйских мРНК к компонентам инициаторного комплекса падает, в то время как вирусные мРНК сохраняют высокую эффективность инициации (по-видимому, опять-таки за счет каких-то особенностей структуры 5'-концевой последовательности, обеспечивающей более устойчивое сходство к соответствующим белкам). Действительно, оптимальные концентрации одновалентных катионов для трансляции *in vitro* РНК ряда вирусов выше, чем для трансляции большинства клеточных мРНК, включая глобиновые мРНК. Между прочим, эффективность инициации различных клеточных мРНК тоже по-разному меняется при изменении ионного состава; так, соотношение синтезируемых α - и β -цепей глобина отклоняется от нормального в сторону преобладания β -цепей при повышении концентрации KCl в бесклеточной ретикулоцитной системе. Можно предположить, что дифференциальный эффект концентрации солей на инициацию с различными мРНК связан со вторичной структурой 5'-концевого района: чем более развита вторичная структура, тем она больше будет стабилизироваться повышенной ионной силой и, следовательно, тем хуже расплетаться кэпсвязывающими белками.

Относительно тех факторов инициации, сходство которых к структуре 5'-концевой последовательности мРНК является решающим для избирательной дискриминации, сведения очень противоречивы. Часто обсуждается возможная роль eIF-4A, eIF-4B и eIF-4E, особенно в связи с их вероятным участием в образовании кэпсвязывающего 8-10S комплекса СВР-II. В некоторых случаях как будто бы удавалось выявить различное сходство eIF-2 к разным мРНК, например к α - и β -глобиновым мРНК.

Особый интерес представляют данные о тканеспецифичности eIF-3 и ее возможной роли в тканеспецифической дискриминации мРНК. Уже давно С. М. Хейвуд с сотрудниками пытались показать, что препараты eIF-3 из разных тканей различаются функционально. Если в бесклеточную систему, содержащую как глобиновую, так и миозиновую мРНК, был добавлен препарат eIF-3 из мышц, то это приводило к избирательной стимуляции трансляции миозиновой мРНК. Очищенный eIF-3 из мышц удалось разделить на «сердцевинные» и «дискриминаторные» субъединицы. «Сердцевинный» eIF-3 способствует трансляции как миозиновой, так и глобиновой мРНК, причем миозиновая мРНК транслируется менее эффективно; добавление дискриминаторных субъединиц фактора приводило к преимущественной трансляции миозиновой мРНК. Это указание на позитивную регуляцию инициации со стороны самого сложного фактора инициации, eIF-3, заслуживает внимания как один из возможных путей регуляции на уровне трансляции в процессах клеточной дифференцировки.

Как уже обсуждалось выше (см. гл. V.V), в эукариотических клетках скорость элонгации, а не только инициации трансляции, может подвергаться регуляторным воздействиям, причем эти воздействия тоже могут быть как избирательными, так и тотальными.

Изменения скорости элонгации оказываются важными для регуляции инициации, в том числе для избирательной дискриминации мРНК: замедление элонгации должно приводить к тому, что скорость инициации перестает быть лимитирующим фактором всего процесса трансляции и, следовательно, разница в скоростях инициации разных мРНК будет нивелироваться; другими словами, замедление элонгации будет давать в результате **уменьшение дискриминации** между мРНК с разной «силой» инициации. (Действительно, для случая дискриминации между мРНК α - и β -цепей глобина было прямо показано, что замедление элонгации с помощью частичного ингибирования некоторыми антибиотиками приводит к утрате преимущественной инициации мРНК β -цепи.)

Тотальная репрессия инициации

Геминконтролируемая инициация трансляции в ретикулоцитах. Давно было известно, что синтез белка (главным образом, гемоглобина) в ретикулоцитах кролика и других млекопитающих, а также в лизатах ретикулоцитов и ретикулоцитных бесклеточных системах требует присутствия гемина. В отсутствие гемина синтез белка быстро затухает.

При этом уменьшается количество полирибосом и накапливаются нетранслирующие 80S монорибосомы, что указывает на ингибирование инициации трансляции. Прямые анализы показали, что в отсутствие гемина уменьшается количество инициаторных 43S комплексов, содержащих инициаторную метионил-тРНК_f.

Оказалось, что инкубация ретикулоцитных экстрактов без гемина при физиологических температурах приводит к накоплению специального ингибитора белковой природы. Он был назван *гем-контролируемым ингибитором* (HCI) или *гем-контролируемым репрессором* (HCR). Ингибитор образуется из проингибитора, предсуществующего в клетке

и, соответственно, в экстракте. Добавление ингибитора или экстракта, его содержащего, к бесклеточной системе синтеза приводит к ингибированию синтеза даже в присутствии гемина.

Активация проингибитора и его превращение в ингибитор в отсутствие гемина проходит две фазы. Сначала, в течение минут, проингибитор без гемина превращается в так называемый обратимый ингибитор; добавление к нему гемина снова переводит его в состояние проингибитора. Природа этого превращения, обязательно требующего физиологической температуры, не ясна; так как общие физические параметры этого белка в состоянии проингибитора и обратимого ингибитора одинаковы, предполагают какую-то внутримолекулярную перестройку, приводящую к появлению ингибиторной активности. При дальнейшей инкубации, в течение часов, обратимый ингибитор превращается в необратимый ингибитор. Это превращение происходит, по-видимому, вследствие окисления SH-групп белка и может быть сильно ускорено SH-реагентами, блокирующими SH-группы (например, N-этилмалеимидом или *o*-иодобензоатом). Наоборот, SH-соединения типа восстановленного глутатиона, β -меркаптоэтанола и дитиотреита препятствуют превращению обратимого ингибитора в необратимый ингибитор. При превращении происходит также автофосфорилирование ингибитора за счет АТФ.

Ингибитор — крупный белок. Он характеризуется молекулярной массой от 150000 до 350000 дальтон (по разным оценкам) и коэффициентом седиментации около 6S. Он состоит из одинаковых или разных субъединиц с молекулярной массой около 80000—100000 дальтон каждая.

Ингибитор в активированном состоянии оказался обладающим цАМФ-независимой протеинкиназной активностью, специфически фосфорилирующей α -субъединицу eIF-2 за счет АТФ. Именно эта активность и является ответственной за ингибирование (репрессию) инициации трансляции в клетках, лизатах, экстрактах и бесклеточных системах ретикулоцитов в отсутствие гемина. Киназная активность обратимого ингибитора подавляется геминном. Ингибитор, как уже отмечалось, способен также к автофосфорилированию, которое, возможно, играет какую-то роль в регуляции его активности.

Эффект фосфорилирования eIF-2 ингибитором оказался, однако, не простым. eIF-2 вовсе не инактивируется в результате фосфорилирования его α -субъединицы. Так, препараты исходного eIF-2 и фосфорилированного eIF-2 одинаково активны в образовании тройственного комплекса Met-tRNA_F·eIF-2·GTP, в связывании этого тройственного комплекса с 40S субчастицей и в конечном образовании инициаторного 80S комплекса, когда eIF-2 покидает рибосому.

В настоящее время показано, что фосфорилирование eIF-2 оказывает эффект на способность фактора взаимодействовать со специальным крупным белком (молекулярная масса около 300000 дальтон), относимым теперь к факторам инициации и обозначаемым как eIF-2B (он же — анти-HCl). Согласно последней принятой схеме (рис. 124), eIF-2·GDP, освобождаемый из рибосомного инициаторного комплекса на стадии присоединения 60S субчастицы, взаимодействует с eIF-2B (на схеме внизу). В таком eIF-2B·eIF-2 комплексе ГДФ, связанный с eIF-2,

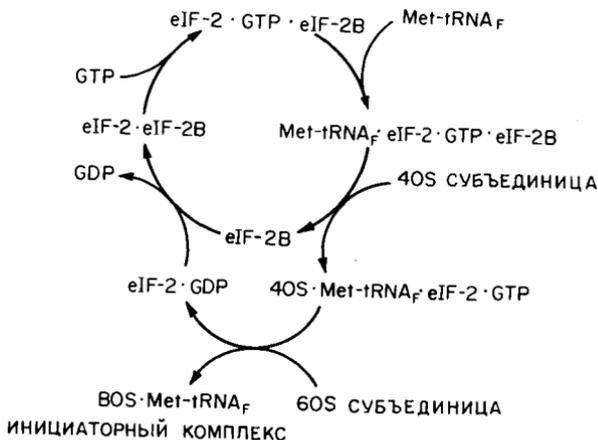


Рис. 124. Схема циклического использования эукариотических факторов инициации eIF-2 и eIF-2B (по M. Salimans et al. Eur. J. Biochem., 1984, v. 145, p. 91–98)

быстро обменивается на ГТФ (на схеме слева). Инициаторная метионил-тРНК непосредственно ассоциирует с комплексом $eIF-2B \cdot eIF-2 \cdot GTP$, давая в результате образование четверного комплекса $eIF-2B \cdot (Met-tRNA_F \cdot eIF-2 \cdot GTP)$ (на схеме справа). При взаимодействии с 40S субчастицей eIF-2B диссоциирует от eIF-2, оставляя $Met-tRNA_F \cdot eIF-2 \cdot GTP$ на рибосомной частице. Следовательно, в норме eIF-2B катализирует реутилизацию eIF-2 после его освобождения в форме $eIF-2 \cdot GDP$ и, по-видимому, связывание $Met-tRNA_F \cdot eIF-2 \cdot GTP$ комплекса с 40S рибосомной субчастицей. Если eIF-2 фосфорилирован ингибитором (НСИ), то eIF-2B по-прежнему комплексируется с ним, но образующийся комплекс $eIF-2(P) \cdot eIF-2B$ очень стабилен, так что eIF-2B оказывается захваченным в комплексе. Так как количество eIF-2B в клетке (или бесклеточной системе) ограничено по сравнению с количеством eIF-2, то происходит обеднение свободным eIF-2B. Именно поэтому даже частичное (скажем, на 30%) фосфорилирование свободного фонда eIF-2 достаточно, чтобы связать весь eIF-2B в стабильный неактивный комплекс. В результате eIF-2 накапливается в форме $eIF-2 \cdot GDP$, вместо того чтобы быть быстро вовлеченным в образование инициаторного 43S комплекса. Другими словами, без eIF-2B или в результате его захвата фосфорилированным eIF-2 подавляется каталитическое (циклическое) использование eIF-2. Поэтому при сравнении действия чистого eIF-2 в исходном и фосфорилированном виде они не обнаруживают различия в своей собственной активности в парциальных реакциях инициации трансляции. Однако когда в смеси присутствует дополнительный белок (eIF-2B), стимулирующее (каталитическое) действие последнего проявляется только с нефосфорилированным eIF-2.

В заключение следует указать, что фосфорилированию eIF-2 гем-контролируемым ингибитором противостоит его дефосфорилирова-

ние с помощью специфической фосфатазы, присутствующей в клетке и в экстракте. На самом деле в нормальной ситуации, в присутствии гемина, определенный уровень протеинкиназной активности, фосфорилирующей eIF-2, всегда имеется, так что существует равновесие между фосфорилированием и дефосфорилированием eIF-2:



Дефицит гемина приводит к активации больших количеств НСI и, следовательно, к сдвигу равновесия в сторону фосфорилированного eIF-2.

Репрессия трансляции под действием двуспиральной РНК. В лизате ретикулоцитов двуцепочечные РНК, включая как двуспиральные фрагменты вирусного происхождения (полиовируса или реовирусов), так и синтетические комплексы поли(А)·поли(У) или поли(І)·поли(С), вызывают ингибирование синтеза белка в присутствии гемина, похожее по всем признакам на репрессию, вызываемую отсутствием гемина. Двуцепочечная РНК, которая оказывает такое воздействие на трансляцию, должна состоять не менее, чем из 50 пар нуклеотидных остатков. Оказалось, что, так же как и в результате отсутствия гемина, в присутствии такой двуцепочечной РНК происходит активация ингибитора инициации, обозначаемого как dsI, и этот ингибитор тоже является протеинкиназой, фосфорилирующей α -субъединицу eIF-2. В отличие от НСI, однако, dsI связан с рибосомными частицами и представляет собой белок с молекулярной массой около 67000 дальтон. Активация ингибитора требует АТФ и происходит как результат автофосфорилирования белка с двуцепочечной РНК. По-видимому, механизм репрессии инициации под действием активированного dsI во всем аналогичен таковому в случае НСI и заключается в изменении взаимодействия eIF-2 в результате его фосфорилирования с дополнительным белком eIF-2В (см. выше).

DsI представляет, по-видимому, особый интерес в связи с противовирусным действием интерферона на животные клетки. Дело в том, что взаимодействие клеток с интерфероном приводит к индукции образования ряда белков, в том числе к увеличению уровня цАМФ-независимой протеинкиназы, фосфорилирующей α -субъединицу eIF-2. Так же как и dsI, эта протеинкиназа находится в неактивном (латентном) состоянии до тех пор, пока она не вступит во взаимодействие с двуспиральной РНК. Не исключено, что это либо тот же белок, что и dsI, либо dsI входит в состав фермента интерферонобработанных клеток в качестве одной из субъединиц.

Интересно, что двуцепочечная РНК вызывает сильное ингибирование синтеза белка в лизате ретикулоцитов без всякой их предобработки интерфероном, но оказывает сравнительно слабое воздействие на трансляцию в экстрактах таких клеток, как

HeLa, L, асцитной опухоли Эрлиха и др. Обработка этих клеток интерфероном значительно повышает чувствительность их экстрактов к ингибирующему действию двуцепочечной РНК, и это непосредственно коррелирует с фосфорилированием eIF-2 в присутствии двуцепочечной РНК. В настоящее время считается, что интерферон индуцирует синтез протеинкиназы *de novo*, чем подготавливает клетку к «противовирусному состоянию». Внедрение вируса и появление в клетке длинных двуцепочечных районов РНК немедленно активирует фермент, давая в результате фосфорилирование eIF-2 и, тем самым, подавление скорости инициации. Среди ряда других событий, индуцируемых интерфероном, это может иметь значение в подавлении синтеза вирусных компонентов.

Следует отметить, что интерферон индуцирует также образование олигоадезилсинтетазы E, требующей для своей активности двуцепочечной РНК и синтезирующей кофактор предсуществующей РНКазы F-(2'-5')олигоаденилат; в результате РНКазы F начинает разрушать мРНК.

Рекомендуемая литература

- Шавиль Ф., Энни А.-Л.* Биосинтез белка/Пер. с франц. яз.; Под ред. Л. Л. Киселева. М.: Мир, 1977.
- Bosch L., ed.* The Mechanism of Protein Synthesis and Its Regulation. Amsterdam, London: North-Holland, 1972, p. 87-131; 395-440; 487-537.
- Chambless G. et al., eds.* Ribosomes: Structure, Function, and Genetics. Baltimore: Univ. Park Press, 1980, p. 479-495; 825-845.
- Cohn W. E., ed.* Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. N. Y.: Acad. Press, 1977, v. 20, p. 209-284; 1978, v. 21, p. 1-38; 1981, v. 25, p. 127-185.
- Cohn W. E., Volkin E., eds.* mRNA: The Relation of Structure to Function. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. N. Y.: Acad. Press, 1976, v. 19.
- Horecker B. L., Stadtman E. R., eds.* Current Topics in Cellular Regulation. N. Y.: Acad. Press, 1982, v. 21, p. 65-88.
- Moscona A. A., Monroy A., eds.* Current Topics in Developmental Biology. N. Y.: Acad. Press, 1966, v. 1, p. 1-38; 1967, v. 2, p. 1-47.
- Weissbach H., Pestka S.* Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis. N. Y.: Acad. Press, 1977, p. 245-321; 555-601.
- Anderson W. F., Bosch L., Cohn W. E. et al.* International Symposium on Protein Synthesis: Summary of Fogarty Center-NIH Workshop held in Bethesda, Maryland, 18-20 October, 1976. - FEBS Lett., 1977, v. 76, p. 1-10.
- Austin S. A., Clemens M. J.* Control of the initiation of protein synthesis in mammalian cells. - FEBS Lett., 1980, v. 110, p. 1-7.
- Beele D. C., Piatigorsky J.* Translational regulation of δ -crystallin synthesis during lens development in the chicken embryo. - Dev. Biol., 1981, v. 84, p. 96-101.
- Benne R., Brown-Luedi M., Hershey J. W. B.* Purification and characterization of protein synthesis initiation factors eIF-1, eIF-4C, eIF-4D, and eIF-5 from rabbit reticulocytes. - J. Biol. Chem., 1978, v. 253, p. 3070-3077.
- Bester A. J., Kennedy D. S., Heywood S. M.* Two classes of translational control RNA: their role in the regulation of protein synthesis. - Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1975, v. 72, p. 1523-1527.
- Bienz M., Gurdon J. B.* The heat-shock response in *Xenopus* oocytes is controlled at the translational level. - Cell, 1982, v. 29, p. 811-819.
- Brown J. C., Smith A. E.* Initiation codons in eukaryotes. - Nature, 1970, v. 226, p. 610-612.
- Buckingham M. E., Cohen A., Gros F.* Cytoplasmic distribution of pulse-labelled poly(A)-containing RNA, particularly 26S RNA, during myoblast growth and differentiation. - J. Mol. Biol., 1976, v. 103, p. 611-626.

Civelli O., Vincent A., Maundrell K. et al. The translational repression of globin mRNA in free cytoplasmic ribonucleoprotein complexes. - Eur. J. Biochem., 1980, v. 107, p. 577-585.

Carrasco L., Smith A. E. Sodium ions and the shut-off of host cell protein synthesis by picornaviruses. - Nature, 1976, v. 264, p. 807-809.

Davis B. D. Role of subunits in the ribosome cycle. - Nature, 1971, v. 231, p. 153-157.

Di Segni G., Rosen H., Kaempfer R. Competition between α - and β -globin messenger ribonucleic acids for eucaryotic initiation factor 2. - Biochemistry, 1979, v. 18, p. 2847-2854.

Erni B., Staehelin T. Base-pair formation between 18S ribosomal RNA and globin mRNA during initiation of protein synthesis in vitro. - FEBS Lett., 1982, v. 148, p. 79-82.

Eichison D., Milburn S. C., Edery I. et al. Inhibition of HeLa cell protein synthesis following poliovirus infection correlates with the proteolysis of a 220,000 dalton polypeptide associated with eucaryotic initiation factor 3 and a cap binding protein complex. - J. Biol. Chem., 1982, v. 257, p. 14806-14810.

Freinstein C., Blöbel G. Nonribosomal proteins associated with eucaryotic native small ribosomal subunits. - Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1975, v. 72, p. 3392-3396.

Gette W. R., Heywood S. M. Translation of myosin heavy chain messenger ribonucleic acid in an eucaryotic initiation factor 3-and messenger-dependent muscle cell-free system. - J. Biol. Chem., 1979, v. 254, p. 9879-9885.

Jacobson M. F., Baltimore D. Polypeptide cleavage in the formation of poliovirus proteins. - Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1968, v. 61, p. 77-84.

Kennedy D. S., Heywood S. M. The role of muscle and reticulocyte initiation factor 3 on the translation of myosin and globin messenger RNA in a wheat germ cell-free system. - FEBS Lett., 1976, v. 72, p. 314-318.

Konieczny A., Safer B. Purification of the eucaryotic initiation factor 2 - eucaryotic initiation factor 2B complex and characterization of its guanine nucleotide exchange activity during protein synthesis initiation. - J. Biol. Chem., 1983, v. 258, p. 3402-3408.

Kozak M. How do eucaryotic ribosomes select initiation regions of messenger RNA? - Cell, 1978, v. 15, p. 1109-1123.

Kozak M. Inability of circular mRNA to attach to eucaryotic ribosomes. - Nature, 1979, v. 280, p. 82-85.

Kozak M. Evaluation of the «scanning model» for initiation of protein synthesis in eucaryotes. - Cell, 1980, v. 22, p. 7-8.

Kozak M. Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eucaryotic ribosomes. - Nucleic Acids Res., 1981, v. 9, p. 5233-5252.

Kozak M. Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes, and organelles. - Microbiol. Rev., 1983, v. 47, p. 1-45.

Lodish H. F. Alpha and Beta globin messenger ribonucleic acid. Different amounts and rates of initiation of translation. - J. Biol. Chem., 1971, v. 246, p. 7131-7138.

Lodish H. F. Translational control of protein synthesis. - Ann. Rev. Biochem., 1976, v. 45, p. 39-72.

Ochoa S. Regulation of protein synthesis initiation in eucaryotes. - Arch. Biochem. Biophys., 1983, v. 223, p. 325-349.

Ovchinnikov L. P., Spirin A. S., Erni B., Staehelin T. RNA-binding proteins of rabbit reticulocytes contain the two elongation factors and some of the initiation factors of translation. - FEBS Lett., 1978, v. 88, p. 21-26.

Palmiter R. D. Differential rates of initiation on conalbumin and ovalbumin messenger ribonucleic acid in reticulocyte lysates. - J. Biol. Chem., 1974, v. 249, p. 6779-6787.

Paterson B. M., Rosenberg M. Efficient translation of prokaryotic mRNAs in a eucaryotic cell-free system requires addition of a cap structure. - Nature, 1979, v. 279, p. 692-696.

Pennequin P., Robins D. M., Schimke R. T. Regulation of translation of ovalbumin messenger RNA by estrogens and progesterone in oviduct of withdrawn chicks. - Eur. J. Biochem., 1978, v. 90, p. 51-58.

Revel M., Groner Y. Post-transcriptional and translational controls of gene expression in eucaryotes. - Ann. Rev. Biochem., 1978, v. 47, p. 1079-1126.

Rosenberg M., Paterson B. M. Efficient cap-dependent translation of polycistronic prokaryotic mRNAs is restricted to the first gene in the operon. - Nature, 1979, v. 279, p. 696-701.

Safer B., Grunberg-Manago M., Badman D. et al. International symposium on translational / transcriptional regulation of gene expression. Highlights of the Fogarty International Center Meeting held in Bethesda, Maryland, on 7-9 April, 1982. - FEBS Lett., 1982, v. 147, p. 1-10.

Schreier M. H., Erni B., Staehelin T. Initiation of mammalian protein synthesis. I. Purification and characterization of seven initiation factors. — J. Mol. Biol., 1977, v. 116, p. 727–753.

Smith A. E., Marcker K. A. Cytoplasmic methionine transfer RNAs from eukaryotes. — Nature, 1970, v. 226, p. 607–610.

Sonenberg N. ATP / Mg²⁺-dependent cross-linking of cap binding proteins to the 5'-end of eukaryotic mRNA. — Nucleic Acids Res., 1981, v. 9, p. 1643–1656.

Spirin A. S. Informosomes. — Eur. J. Biochem., 1969, v. 10, p. 20–35.

Thomas A. A. M., Benne R., Voorma H. O. Initiation of eukaryotic protein synthesis. — FEBS Lett., 1981, v. 128, p. 177–185.

Van Venrooij W. J., Janssen A. P. M., Haeymakers J. H., DeMan B. M. On the heterogeneity of native ribosomal subunits in Ehrlich-sarcoma-tumor cells cultured in vitro. — Eur. J. Biochem., 1976, v. 64, p. 429–435.

Глава VIII

ТЕРМИНАЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ

1. КОДОНЫ ТЕРМИНАЦИИ

Начав трансляцию на инициирующем триplete AUG (или GUG), рибосома далее читает мРНК по три нуклеотидных остатка и, соответственно, синтезирует (элонгирует) полипептидную цепь, пока не дойдет до триплетов UAA, UAG или UGA. Эти триплеты не имеют своей аминоксил-тРНК, и на них трансляция прекращается. Они являются кодонами терминации.

Кодон терминации обязательно присутствует в конце кодирующей части каждой природной мРНК. Иногда можно видеть даже тандем терминирующих кодонов, например в конце цистрона белка оболочки бактериофага MS2, где за терминирующим кодоном UAA следует триплет UAG (см. рис. 6).

Надо сказать, что вне фазы (рамки) считывания триплеты UAA, UAG и UGA в пределах кодирующей последовательности мРНК встречаются существенно чаще, чем в фазе считывания, где имеется, как правило, всего один терминирующий кодон на всю кодирующую последовательность. Поэтому обычно случайный сдвиг рамки в процессе элонгации не может привести к синтезу очень длинного неправильного полипептида и чаще всего приводит к скорой терминации этой неправильной трансляции. В не-кодирующих участках мРНК, включая межцистронные участки полицистронных РНК, частота терминирующих триплетов обычно также высока.

Терминирующий триплет в рамке считывания может появиться в кодирующей части мРНК в результате мутации. Например, замена G на A в триптофановом кодоне (UGG) приводит к появлению либо UAG, либо UGA; замена C на U в глутаминовых кодонах (CAA и CAG) приводит к появлению либо UAA, либо UAG. Такие мутации называются «бессмысленными» (nonsense); появление UAG обозначается как «янтарная» мутация, UAA — «охровая», а UGA — «опал». Эти мутации приводят не к замене

аминокислотного остатка в синтезируемом полипептиде, а к преждевременной терминации, как раз в точке появления «бессмысленного» кодона. Другая мутация, изменяющая антикодон какой-либо тРНК так, что он становится комплементарным бессмысленному кодону, может привести к супрессии бессмысленной мутации; например, тирозиновая тРНК, в которой антикодон GUA изменен на CUA, узнает терминаторный кодон UAG и, таким образом, супрессирует «янтарные» мутации.

В процессе трансляции возможны ошибки, в том числе такие, когда нормальный терминирующий кодон, завершающий кодирующую последовательность мРНК, узнается тРНК, имеющей антикодон, близкий комплементарному, например нормальной триптофановой тРНК. Тогда происходит «проскок» («reading-through»), и получается более длинный полипептид, чем должно быть. Образование таких удлинённых продуктов, в дополнение к основной массе нормального продукта, нередко отмечается при изучении белкового синтеза как *in vivo*, так и *in vitro*. По этой же причине возможно образование небольшого количества нормального продукта в «бессмысленных» мутантах («leakage»).

Из трех терминирующих кодонов самым «слабым» является UGA. Он чаще всего может «проскакиваться» транслирующей рибосомой, по-видимому, за счет его узнавания триптофановой тРНК. В некоторых случаях этот терминирующий кодон специально используется в природе для того, чтобы в дополнение к основному белковому продукту, синтез которого завершается на этом кодоне, происходило образование небольших количеств другого физиологически важного белка из удлинённого полипептида. Такая ситуация наблюдается при трансляции РНК фага Q β : цистрон белка оболочки фага заканчивается терминаторным кодоном UGA, который время от времени «проскакивается» рибосомами, что приводит к синтезу небольших количеств значительно более длинного, чем белок оболочки, полипептида; последний является необходимым продуктом трансляции фаговой РНК, так как требуется для сборки полноценной (инфекционной) фаговой частицы.

Следует сделать оговорку в отношении митохондриального генетического кода: в митохондриях млекопитающих и грибов кодон UGA не терминирующий, а связывает триптофановую тРНК, т.е. кодирует, как и UGG, триптофан; с другой стороны, сообщалось, что в митохондриях млекопитающих кодоны AGA и AGG являются терминирующими, а не кодируют аргинин.

2. БЕЛКОВЫЕ ФАКТОРЫ ТЕРМИНАЦИИ

Когда терминирующий кодон оказывается в А-участке рибосомы, он узнается специальным растворимым белком, который садится на рибосому и индуцирует гидролиз сложноэфирной связи между тРНК и полипептидом молекулы пептидил-тРНК в Р-участке. В результате полипептид освобождается из рибосомы. Белки, узнающие терминирующие кодоны и индуцирующие освобождение

полипептида, получили название *факторов терминации* или факторов освобождения (release factors, RF).

В прокариотах имеются три белка, участвующих в терминации и обозначаемых как RF-1, RF-2 и RF-3. Молекулярные массы этих белков лежат между 45000 и 50000 дальтон. RF-1 узнает кодоны UAA и UAG, RF-2 специфичен к кодонам UAA и UGA, в то время как RF-3 в узнавании кодонов непосредственного участия не принимает, а требуется для вовлечения ГТФ/ГДФ в процесс терминации.

В эукариотах имеется единственный фактор терминации, называемый RF. Его мономерная форма имеет молекулярную массу около 50000—60000 дальтон, но, по-видимому, он обычно присутствует в виде димера с молекулярной массой около 120000 дальтон. RF способен узнавать все три терминирующих кодона (UAA, UAG и UGA), взаимодействует с ГТФ и вместе с рибосомой проявляет ГТФазную активность.

Взаимодействуя с терминирующим кодоном и рибосомой, факторы терминации (RF-1 и RF-2 прокариот или RF эукариот) как бы имитируют посадку аминоксил-тРНК в А-участок транслирующей рибосомы. Однако вместо последующей атаки сложноэфирной связи пептидил-тРНК аминокислотной группой аминоксил-тРНК имеет место атака той же связи молекулой воды. В обоих случаях реакцию переноса пептидильного остатка либо на аминокислотную группу, либо на воду катализирует пептидилтрансферазный центр рибосомы (см. ниже).

Проблема специфического фактор-кодонового взаимодействия, вместо кодон-антикодонового взаимодействия, очень интересна. Поразительно, что белок тоже узнает именно триплет нуклеотидов, и узнавание имеет такую же высокую степень специфичности. Более того, при наличии супрессорной тРНК, комплементарной терминирующему кодону, аминоксил-тРНК и фактор терминации равноправно конкурируют за посадку в А-участок рибосомы. Использование различных модифицированных нуклеотидных остатков в терминирующих кодонах указывает на то, что специфичность RF в узнавании кодона очень напоминает специфичность Уотсон—Криковского спаривания оснований, включая Криковское неоднозначное спаривание («wobble»). Безусловно, структура белкового «антикодона» представляет собой очень интригующую и важную задачу, в том числе для решения общих проблем белок-нуклеинового узнавания.

Функционирование факторов терминации, так же как факторов элонгации и одного из факторов инициации, зависит от ГТФ. Для эукариотических систем это показано достаточно четко: ГТФ, так же как и его нерасщепляемый аналог, стимулирует кодонзависимое связывание RF с рибосомой, с другой стороны, RF на рибосоме обладает ГТФазной активностью, которая, видимо, нужна для расщепления ГТФ с целью освобождения RF с терминировавшей рибосомы. Для прокариотов имеются следующие факты: 1) RF-3 имеет родство к ГТФ и к ГДФ; 2) RF-3 в присутствии рибосомы обладает

ГТФазной активностью; 3) RF-3 стимулирует кодонзависимое связывание RF-1 и RF-2 с рибосомой; 4) RF-3 с ГДФ стимулирует освобождение RF-1 и RF-2 из рибосомы. Хотя прямо необходимость комплекса RF-3 с ГТФ для кодонзависимого связывания RF-1 и RF-2 показана не была, но не исключено, что это именно так, особенно в условиях *in vivo*.

3. РИБОСОМНЫЙ УЧАСТОК СВЯЗЫВАНИЯ ФАКТОРОВ ТЕРМИНАЦИИ

Уже говорилось, что факторы терминации узнают терминирующий кодон, установленный именно в А-участке рибосомы. Прежде всего, кодонзависимое связывание RF возможно только после транслокации пептидил-тРНК из А-участка в Р-участок. В экспериментах *in vitro* можно прямо связать триплет AUG и инициаторную F-Met-tRNA с Р-участком вакантной рибосомы, а затем добавить RF и триплет UAA (или UAG, или UGA); последние связываются и индуцируют гидролиз F-Met-tRNA в Р-участке с освобождением свободного формилметионина. Довольно очевидно, что в указанном случае терминирующий триплет и RF попадают в вакантный А-участок. Тот факт, что супрессорная аминоксил-тРНК с EF-T_u и ГТФ, несущая антикодон, комплементарный терминирующему кодону, конкурирует с RF в процессе трансляции, тоже говорит об А-участке как месте связывания RF. Такие ингибиторы А-участка рибосомы, как тетрациклин и стрептомицин, ингибируют кодонзависимое связывание факторов терминации с рибосомой. EF-G, стабильно связанный с рибосомой (например, в присутствии фусидовой кислоты), мешает как связыванию комплекса Aa-tRNA · EF-T_u · GTP, так и RF с рибосомой. Белок прокариотической рибосомы L7 / L12, образующий боковой стержень на 50S субчастице, способствует как связыванию факторов элонгации, так и RF. Данные по ингибированию кодонзависимого связывания RF антителами к индивидуальным рибосомным белкам подтверждают, что место связывания RF сильно перекрывается одновременно с А-участком и участком связывания факторов элонгации.

4. ГИДРОЛИЗ ПЕПТИДИЛ-ТРНК

Кодонзависимое связывание фактора терминации необходимо, чтобы произошли гидролиз пептидил-тРНК в Р-участке и освобождение полипептида из рибосомы. Показано, что гидролиз пептидил-тРНК в рибосоме подавляется всеми теми же ингибиторами, которые подавляют пептидилтрансферазную реакцию. Так, хлорамфеникол, амицетин, линкомицин, гугеротин, спарсомицин и др., будучи типичными ингибиторами рибосомной пептидилтрансферазы, подавляют RF-индуцируемое освобождение пептида из бактериальных рибосом. Эти же антибиотики совсем не подавляют кодонзависимого связывания RF с бактериальной рибосомой. Следовательно,

терминирующий гидролиз пептидил-тРНК осуществляется, скорее всего, именно пептидилтрансферазным центром рибосомы.

Имеются независимые данные о том, что пептидилтрансферазный центр рибосомы может образовывать сложноэфирные связи между С-концом пептида и оксианалогами аминоацил-тРНК или пурамицина. Кроме того, в присутствии метанола или этанола и деацилированной тРНК может происходить метанолиз или, соответственно, этанолиз пептидил-тРНК в Р-участке рибосомы, т.е. перенос пептидного остатка на оксигруппу спирта. В присутствии других органических растворителей, например ацетона, перенос пептидного остатка происходит на воду, т.е. имеет место катализируемый рибосомой гидролиз сложноэфирной связи пептидил-тРНК; гидролиз зависит от присутствия деацилированной тРНК или ее 3'-концевой последовательности ССА. В этом случае гидролиз пептидил-тРНК тоже подавляется ингибиторами рибосомной пептидилтрансферазы.

Возможно, что кодонзависимое связывание фактора терминации каким-то образом делает пептидилтрансферазный центр рибосомы просто доступным для воды, которая является для него хорошим субстратом; в результате перенос пептида происходит на воду, тем более что конкурирующая аминокетильная группа аминоацил-тРНК в данной ситуации отсутствует. Например, это могло бы быть достигнуто в результате некоторого раздвигания рибосомных субчастиц или легкого раскрытия (разрыхления) большой субчастицы, несущей пептидилтрансферазный центр. Однако пока нельзя исключить и другую альтернативу, предполагающую непосредственное участие либо какой-то нуклеофильной группы белка RF в атаке сложноэфирной связи и промежуточном кратковременном акцептировании пептида, либо RF-фиксированной молекулы воды как специфического акцептора.

5. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ СОБЫТИЙ В ПРОЦЕССЕ ТЕРМИНАЦИИ

Итак, терминация трансляции включает несколько последовательных шагов.

Первый шаг — *узнавание* терминирующего кодона, когда он оказывается в А-участке транслирующей рибосомы, белковым фактором терминации. Это узнавание завершается *связыванием* фактора терминации, в котором принимают участие как кодон на 30S субчастице, так и факторсвязывающий участок рибосомы на 50S субчастице рибосомы. Есть все основания думать, что для связывания с факторсвязывающим участком (по-видимому, у основания стержня L7/L12) требуется ГТФ. В прокариотах это осуществляется двумя взаимодействующими белками — RF-1 (или RF-2), узнающим кодон, и RF-3, связывающим ГТФ и, возможно, ответственным за связывание с факторсвязывающим участком у основания L7/L12-стержня (по аналогии с аминоацил-тРНК и EF-T_u, соответственно). В эукариотах как в узнавании кодона,

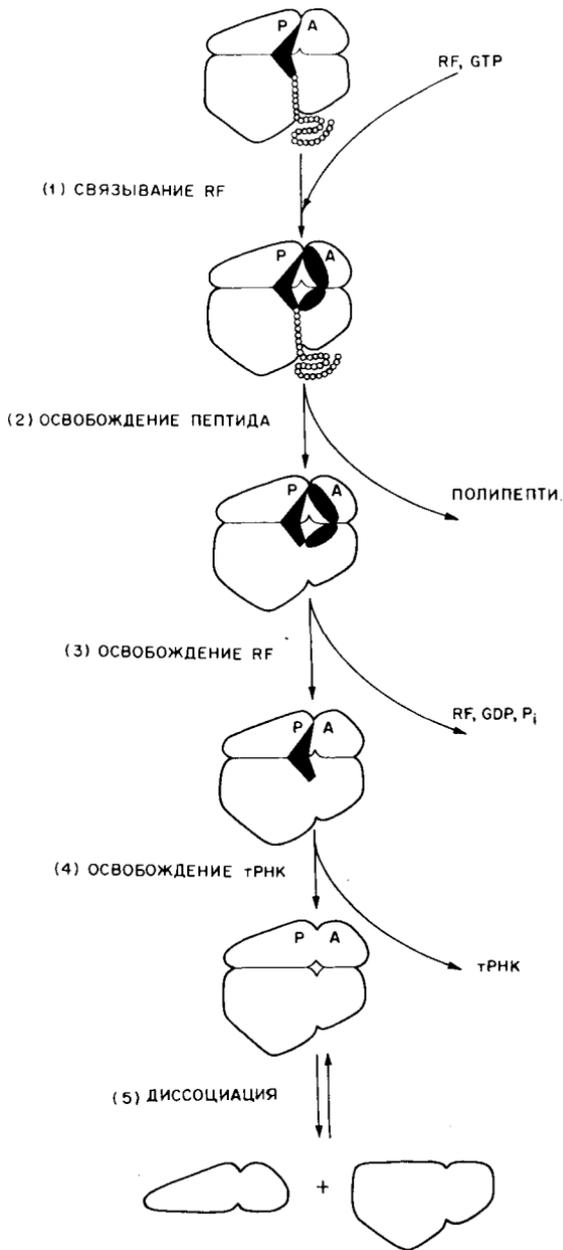
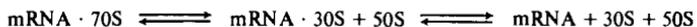


Рис. 125. Схема последовательности событий в процессе терминации трансляции

так и во взаимодействии с ГТФ действует единый фактор RF. Второй шаг — гидролиз сложноэфирной связи пептидил-тРНК в Р-участке. Гидролиз катализируется пептидилтрансферазным центром рибосомы на 50S субчастице. Именно связывание факторов терминации как с терминирующим кодоном, так и с фактор-связывающим центром рибосомы наводит гидролазную активность пептидилтрансферазного центра или как-то обеспечивает наличие молекулы воды в качестве акцепторного субстрата в нем. В результате пептид освобождается из рибосомы. Рибосома пока остается на мРНК с деацелированной тРНК в Р-участке и факторами (факторами) терминации, связанным с ГТФ, в А-участке.

Третий шаг — эвакуация лигандов из рибосомы. Прежде всего уходят, по-видимому, факторы терминации. Можно предполагать, по аналогии с EF-T_u, EF-G и IF-2, что индуцируется гидролиз ГТФ, и в результате уменьшается сродство фактора терминации к рибосоме. Есть указание, что эвакуация деацелированной тРНК из Р-участка рибосомы прототируется специальным белком, фактором освобождения (heat labile releasing factor, HLR).

Вакантная рибосома обладает значительно меньшей прочностью ассоциации ее субчастиц, чем рибосома с лигандами, так что теперь имеет место обратимая диссоциация-ассоциация; после диссоциации 50S субчастицы мРНК-связанная 30S субчастица не прочно удерживается на матрице и тоже может легко диссоциировать:



Однако, как уже отмечалось в гл. В. VI. 30S субчастица не обязательно покидает матрицу после завершения терминации, а может некоторое время скользить вдоль нее без трансляции и реиницировать трансляцию на следующем цистроне в той же полицистронной мРНК.

Схематически последовательность событий в ходе терминации трансляции дана на рис. 125.

Рекомендуемая литература

Шанвиль Ф., Энни А.-Л. Биосинтез белка: Пер. с франц./Под ред. Л. Л. Киселева. М.: Мир, 1977.

The Mechanism of Protein Synthesis. — Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1969, v. 34, p. 167–177; 469–488.

Weissbach H., Pestka S., eds. *Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis.* — N. Y.: Acad. Press, 1977, p. 443–465.

Brenner S., Stretton A. O. W., Kaplan S. Genetic code: the «nonsense» triplets for chain termination and their suppression. — *Nature*, 1965, v. 206, p. 994–998.

Brenner S., Barnett L., Katz E. R., Crick F. H. C. UGA: a third nonsense triplet in the genetic code. — *Nature*, 1967, v. 213, p. 449–450.

Garen A. Sense and nonsense in the genetic code. — *Science*, 1968, v. 160, p. 149–159.

Geller A. I., Rich A. A UGA termination suppression tRNA^{Trp} active in rabbit reticulocytes. — *Nature*, 1980, v. 283, p. 41–46.

Hofstetter H., Monstein H.-J., Weissman C. The readthrough protein A₁ is essential for the formation of viable Q β particles. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1974, v. 374, p. 238–251.

Weiner A. M., Weber K. A single UGA codon functions as a natural termination signal in the coliphage Q β coat protein cistron. — *J. Mol. Biol.*, 1973, v. 80, p. 837–855.

**КО-ТРАНСЛЯЦИОННОЕ СВРАЧИВАНИЕ,
КОМПАРТМЕНТАЛИЗАЦИЯ
И МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКА****1. ВКЛАД РИБОСОМЫ В СВРАЧИВАНИЕ БЕЛКА**

Фундаментальный факт в наших знаниях по рибосомному синтезу белка состоит в том, что полипептидная цепь строится путем **последовательного роста** от N-конца к С-концу. В течение элонгации растущий С-конец остается всегда ковалентно фиксированным в пептидилтрансферазном центре на рибосоме, а N-конец свободен. Естественно допустить, что **по мере синтеза** белка на рибосоме должно происходить также его сворачивание, и что сворачивание должно начинаться с его N-концевой части.

Однако факторы, определяющие сворачивание N-концевой части растущего пептида, будут, очевидно, различны в зависимости от того, насколько удален рассматриваемый участок от фиксированного С-конца. В самом деле, можно рассматривать три различные ситуации, в которых оказываются аминокислотные остатки растущего пептида.

1. В самом пептидилтрансферазном центре рибосомы, как уже указывалось в разделе В.Ш.4, два аминокислотных остатка (донорный и акцепторный) должны располагаться в определенной ориентации по отношению друг к другу, всегда однотипной (эквивалентной), независимо от их природы; вероятной является их взаимная ориентация, соответствующая универсальной α -спиральной конформации полипептидного остова.

2. Транслокация выводит аминоацильный остаток, предшествующий С-концевому, из пептидилтрансферазного центра рибосомы, а дальнейшее добавление очередных остатков к С-концу все более отодвигает его и примыкающие к нему остатки от пептидилтрансферазы. Однако участок пептида длиной приблизительно 30—40 остатков, начиная от пептидилтрансферазного центра (т. е. от растущего С-конца), оказывается все еще закрытым рибосомой и не экспонированным в виде свободной цепи в окружающий раствор. В какой конформации пребывает этот примыкающий к С-концу участок растущего пептида и какое влияние оказывает на него рибосомное окружение — вопрос открытый. Кажется маловероятным, что пептид в рибосоме переходит в состояние вытянутой цепи или беспорядочного клубка. При каждом акте транспептидации и последующей транслокации пептид должен проталкиваться сквозь рибосому на один остаток, и необходимая для этого жесткость и векторность могли бы обеспечиваться его α -спиральной конформацией (т. е. сохранением **исходной** конформации, задаваемой пептидилтрансферазным центром). Имеется еще одно веское соображение: спиральная конформация любого полипептида оказывается предпочтительной в канале или другом

достаточно узком объеме, ограничивающем крупномасштабную подвижность частей макромолекулы.

3. За пределами 30—40 остатков, примыкающих к С-концу, N-концевая часть растущего пептида оказывается свешенной с рибосомы в окружающую среду. Здесь уже действуют все те факторы, которые определяют спонтанное сворачивание пептида в конформацию, диктуемую условиям среды. Однако необходимо учитывать три обстоятельства, делающих ситуацию отличной от таковой, наблюдаемой при спонтанной ренатурации развернутого белка в опытах *in vitro*. Во-первых, если рибосома обеспечивала и поддерживала какую-то определенную универсальную конформацию растущего пептида внутри себя, например α -спираль, то сворачивание белка может начинаться не из вытянутого или беспорядочного состояния цепи, а из данной стартовой конформации. Во-вторых, поиск путей сворачивания начинается не с любых и не с разных участков полипептидной цепи, а идет последовательно с N-концевой части цепи. В-третьих, в процессе сворачивания С-конец фиксирован на частице большой молекулярной массы (т. е. подвижность его резко ограничена), что должно приводить к большей стабильности промежуточных структур по сравнению с аналогичными структурами свободной полипептидной цепи.

То, что сворачивание полипептида в белок происходит в процессе синтеза на рибосоме, т. е. *ко-трансляционно*, следует из целого ряда косвенных свидетельств. Одно из них — приобретение растущим пептидом на рибосоме активностей, присущих готовому белку со сформированной третичной структурой. Давно известный пример — синтез β -галактозидазы: ферментативная активность этого белка требует не только сворачивания полипептидной цепи в третичную структуру, но и объединения четырех субъединиц в четвертичную структуру; оказалось, что растущая цепь до своего завершения, будучи присоединенной к рибосоме, уже способна ассоциировать со свободными субъединицами белка, и комплекс на рибосоме проявляет β -галактозидазную активность.

Еще более убедительны опыты, демонстрирующие приобретение растущим пептидом на рибосоме иммунологической специфичности, присущей нативной конформации готового белка. Так, рибосомы, несущие растущие цепи β -галактозидазы, реагируют с антителами против готового фермента еще задолго до завершения трансляции мРНК и освобождения белка. Используемые антитела были специфичны к третичной структуре: денатурация рибосомосвязанного материала путем нагревания полностью разрушала его способность реагировать с антителами.

Не исключено, что, в отличие от ренатурации свободной развернутой полипептидной цепи *in vitro*, достижение правильной конечной конформации белка на рибосоме идет более направленно и потому в ряде случаев быстрее и надежнее. Другими словами, рибосома могла бы способствовать определенному пути сворачивания. Этот вклад рибосомы включал бы, по крайней мере,

детерминацию последовательности процесса сворачивания от N-конца к C-концу цепи, задание определенной стартовой конформации (в частности, углов φ и ψ) каждого аминокислотного остатка цепи и поддержание (стабилизацию) промежуточных локальных конформаций за счет фиксации C-конца.

К сожалению, экспериментальное решение проблемы сворачивания белка с учетом возможного вклада рибосомы в этот процесс еще не начиналось.

**2. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РИБОСОМЫ И РАСТУЩЕГО ПЕПТИДА С МЕМБРАНОЙ.
КО-ТРАНСЛЯЦИОННЫЙ
ТРАНСМЕМБРАННЫЙ ТРАНСПОРТ**

*Синтез белков свободными и мембрано-
связанными полирибосомами*

Итак, когда рибосома синтезирует пептид длиной более 30—40 аминокислотных остатков, N-концевая часть пептида уже высовывается за пределы рибосомы. Эта внерибосомная часть начинает сворачиваться в определенную структуру, в соответствии со своей аминокислотной последовательностью и окружением.

В то же время известно, что как в прокариотических, так и в эукариотических клетках часть рибосом, организованных в полирибосомы, является «свободными» (хотя в эукариотах они, по видимому, связаны с каким-то «цитоскелетом»), а другая часть прикреплена к мембранам. В прокариотах полирибосомы могут сидеть на внутренней стороне цитоплазматической мембраны клетки, в то время как в эукариотах местом размещения мембраносвязанных рибосом является так называемый шероховатый эндоплазматический ретикулум цитоплазмы; прикрепленные рибосомы могут продуцировать пептид непосредственно в мембрану. Соответственно, в зависимости от локализации рибосом, ко-трансляционное внерибосомное сворачивание растущего полипептида может происходить либо в водной среде цитоплазмы, либо в гидрофобном окружении липидного бислоя мембраны.

Уже давно было отмечено, что свободные полирибосомы продуцируют в основном водорастворимые белки для внутренних потребностей самой цитоплазмы, в то время как мембраносвязанные частицы синтезируют либо белки для мембран, либо секреторные белки, выводимые через мембраны из клетки. Очевидно, что растворимые цитоплазматические белки, синтезируемые на свободных полирибосомах, сворачиваются по мере выхода из рибосомы в водном окружении, в результате формируя типичную глобулярную структуру с гидрофобным ядром внутри и более или менее полярной поверхностью. В то же время, синтез белков на мембраносвязанных рибосомах приводит к тому, что растущий пептид вводится в контакт с гидрофобным окружением липидного бислоя мембраны, и значит, должен сворачиваться, по крайней

мере поначалу, в гидрофобном окружении. В случае белков, постоянно удерживаемых в данной мембране (мембране эндоплазматического ретикулума эукариот или цитоплазматической мембране бактерий), это должно задавать, скорее всего, окончательный тип сворачивания, когда многие гидрофобные остатки экспонированы наружу молекулы; часто конформацией трансмембранных гидрофобных последовательностей таких белков является α -спираль (см., например, бактериородопсин).

Однако в случае белков, проходящих сквозь мембрану снова в водную фазу (межмембранный просвет эндоплазматического ретикулума эукариот, периплазматическое пространство грамотрицательных бактерий, или вообще наружу), ситуация оказывается более сложной. Здесь, по-видимому, осуществляется многоэтапное сворачивание белка, с вовлечением ко-трансляционного и пост-трансляционного процессинга полипептидной цепи и ее энзиматических ковалентных модификаций. Как бы то ни было, в случае водорастворимых секреторных белков, полипептидная цепь сначала оказывается в гидрофобном окружении липидного бислоя мембраны и сворачивается, по-видимому, без формирования компактного гидрофобного ядра, а затем, по выходе из мембраны, она вынуждена перестраиваться из этой промежуточной конформации в водорастворимую глобулу с гидрофобным ядром и полярной поверхностью.

Способы соединения рибосомы с мембраной

Идея о том, что синтез белков на мембраносвязанных рибосомах сопряжен с трансмембранным транспортом белков, возникла из наблюдений по тесной ассоциации растущих полипептидных цепей с мембраной шероховатого эндоплазматического ретикулума в эукариотических клетках или с внутренней цитоплазматической мембраной бактерий. Транслирующие рибосомы оказались прочно заякоренными на мембране растущим пептидом, и лишь обработка пуромицином, приводящая к аборту пептида из рибосомы, позволяла диссоциировать комплекс на интактные рибосомы и мембраны, оставляя пептид в мембране. Таким образом, стало ясно, что существенный вклад в ассоциацию транслирующей рибосомы с мембраной вносит сам растущий пептид. В бактериях разрыв этого якоря пуромицином приводит к немедленному освобождению рибосом от мембраны, откуда делается вывод, что растущие пептиды являются единственным прочным соединением полирибосом с цитоплазматической мембраной.

Однако в эукариотах рибосомы после разрыва пептидного якоря еще обнаруживают существенное сродство к мембране эндоплазматического ретикулума. В опытах *in vitro* полная диссоциация рибосом от мембран эндоплазматического ретикулума достигается лишь путем совместной обработки микросом пуромицином и высокой ионной силой. Можно показать также определенное сродство нетранслирующих рибосом или рибосом, только начав-



Рис. 126. Схема, демонстрирующая ориентацию субъединиц 80S рибосомы относительно поверхности мембраны эндоплазматического ретикулума (по P. N. Unwin, J. Mol. Biol., 1979, v. 132, p. 69–84)

сопровождает связанные рибосомы и локализуется в непосредственном соседстве с ними (они могут быть химически сшиты с рибосомами бифункциональными реагентами). Рибофорины имеют молекулярные массы 65 000 и 63 000 дальтон соответственно. Они являются трансмембранными белками. В опытах по реконструкции мембран из солюбилизированных детергентом смесей микросомных белков и фосфолипидов включение рибофоринов в мембрану коррелирует с восстановлением сродства к рибосомам.

Уже давно было показано что во всяком случае эукариотические рибосомы прикрепляются к мембране своей большой (60S) субчастицей. По-видимому, существует специальный участок на 60S субчастице, который имеет сродство к мембране эндоплазматического ретикулума, и, таким образом, все рибосомы прикрепляются к мембране строго определенной точкой, в одной и той же ориентации. Эта ориентация такова, что ось, соединяющая большую субчастицу и малую субчастицу, приблизительно параллельна поверхности мембраны (рис. 126). Данные электронной микроскопии негативно контрастированных эукариотических рибосом указывают, что длинная ось малой субчастицы должна быть приблизительно параллельна поверхности мембраны, и заставляют предполагать, что прикрепление рибосомы к мембране должно, скорее всего, иметь место со стороны боковых выступов субъединиц (эквивалентных L1-гребню 50S субчастицы и платформе 30S субчастицы *E. coli*, см. Б.1.2); таким образом, район предполагаемого «кармана» для тРНК (см. рис. 86) и стержень большой субчастицы (см. Б.1.3), по-видимому, должны находиться на стороне, обращенной от мембраны.

Очевидно, что растущий пептид должен выходить из рибосомы где-то на стороне, контактирующей с мембраной. Прямые иммуноэлектронно-микроскопические попытки выявить место выхода синтезируемого белка (β -галактозидазы на 70S рибосомах *E. coli*

ших трансляцию и содержащих короткий (не высывывающийся из рибосом) пептид, к мембранам эндоплазматического ретикулума. Отсюда предполагается, что в мембранах шероховатого эндоплазматического ретикулума существуют специальные «рецепторы» рибосом, обеспечивающие их обратимую посадку на мембрану и, возможно, облегчающие последующее восприятие растущего пептида мембраной (гипотетические «поры» для полипептидной цепи).

В мембранах шероховатого эндоплазматического ретикулума эукариотических клеток действительно были обнаружены два гликопротеида, названные *рибофоринами* I и II, которые всегда

или рибулезо-1,5-дифосфат карбоксилазы на 80S рибосомах растения *Lemna gibba*) указали на район большой субчастицы, удаленный от головки (центрального протуберанца), вблизи щели, раздваивающей тело субчастицы (рис. 127).

N-концевая сигнальная последовательность растущего полипептида

Несмотря на тщательные поиски, не удалось найти сколько-нибудь достоверных различий ни в составе и структуре свободных и мембраносвязанных рибосом, ни в функциональных свойствах выделенных частиц. Во всех экспериментальных тестах рибосомы, выделенные из свободной полирибосомной и из микросомной фракций клеточного гомогената, оказались полностью эквивалентны и взаимозаменяемы.

Более того, хотя синтез мембранных и секреторных белков происходит на мембраносвязанных рибосомах, инициация их трансляции совершается на свободных частицах: «нативные» 40S частицы, начинающие инициацию, всегда свободны, и образующиеся в результате инициации 80S частицы также еще не прикреплены к мембранам. Присоединение к мембранам имеет место лишь через некоторое время после начала элонгации. Это понятно, так как решающую роль в закоривании рибосом на мембране играет растущий пептид.

Основываясь на ряде известных фактов и собственных наблюдений, Г. Блобель и Д. Сабатини в 1971 г. предположили, что мРНК, которым надлежит транслироваться мембраносвязанными рибосомами, имеют специальную последовательность сразу вслед за иницирующим кодоном, которая кодирует особую *N*-концевую последовательность растущего пептида, служащую сигналом для узнавания мембраной или фактором, посредничающим между рибосомой и мембраной. Таким образом, если рибосома транслирует данную мРНК, кодирующую секреторный или мембранный белок, то через определенное время после инициации трансляции из рибосомы высунется *N*-концевая часть растущего пептида, несущая сигнал для присоединения к мембране; рибосома станет

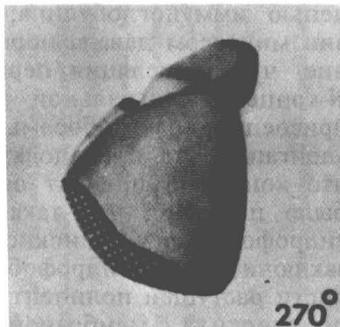
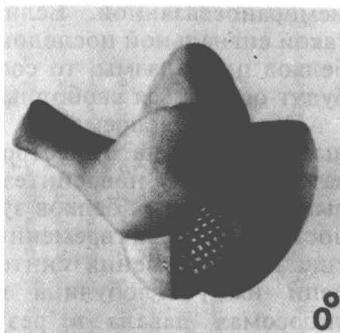


Рис. 127. Предполагаемый район места выхода растущего пептида, показанный в виде заштрихованной поверхности на модели 60S субчастицы (в двух проекциях) (по С. Bernabeu, J. A. Lake Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1982, v. 79, p. 3111–3115; С. Bernabeu et al. J. Cell. Biol., 1983, v. 96, p. 1471–1474)

мембраносвязанной. Если N-конец растущего пептида не несет такой сигнальной последовательности, как в случае водорастворимых белков цитоплазмы, то соответствующие рибосомы (полирибосомы) будут оставаться свободными в течение элонгации.

Почти одновременно появились независимые экспериментальные указания на существование специальных N-концевых последовательностей у новосинтезированных полипептидных цепей некоторых секреторных белков эукариотических клеток; эти последовательности оказались временными, т. е. они отщеплялись в мембране еще до завершения синтеза белка. Так, трансляция мРНК легкой цепи иммуноглобулина в бесклеточной системе на свободных рибосомах давала в результате полипептид, имеющий лишнюю последовательность на N-конце, по сравнению с аутентичной легкой цепью иммуноглобулина; трансляция той же мРНК в присутствии микросом давала нормальный продукт. Было сделано заключение, что трансляция первых кодонов мРНК приводит к синтезу N-концевой сигнальной последовательности, которая определяет присоединение рибосомы к мембране; в течение дальнейшей элонгации эта последовательность отщепляется на мембране, так что конечный продукт оказывается лишенным ее. Вслед за этим было показано, что такая N-концевая последовательность богата гидрофобными аминокислотными остатками; было естественно заключить, что гидрофобный характер сигнальной последовательности растущей полипептидной цепи способствует взаимодействию полипептида с мембраной.

С тех пор в отношении многих секреторных белков эукариот (например, легкая и тяжелая цепи иммуноглобулина, сывороточный альбумин, проколлаген, утероглобин, казеины, α -лактальбумин и β -лактальбумин молока, овомукоид, лизоцим и кональбумин яичного белка, трипсиноген, проинсулин и другие пептидные гормоны, и т. д.) были получены данные о том, что они начинают синтезироваться с добавочной N-концевой последовательностью, длиной от 15 до 30 аминокислотных остатков (табл. 3), которая затем отщепляется в ходе синтеза на мембране. Если трансляция соответствующих мРНК проходит в бесклеточной системе в отсутствие мембран, то синтезируются удлиненные продукты, получившие название пребелков. Отщепление N-концевой сигнальной последовательности, как правило, не происходит, если мембраны (микросомная фракция) добавлены в систему после завершения синтеза пребелка или даже на поздних стадиях элонгации. Только когда мембраны присутствуют в системе с самого начала синтеза или когда они добавлены **вскоре** после выхода N-концевой части полипептида из рибосомы, может происходить присоединение рибосомы к мембране, погружение в нее растущего пептида и отщепление сигнальной последовательности. По-видимому, рост пептида в водной среде свыше какого-то размера приводит к его сворачиванию, экранирующему гидрофобную N-концевую часть от взаимодействия с мембраной и от расщепления.

Таблица 3. N-концевые сигнальные последовательности некоторых белков

Белок	N-концевая последовательность					Точка расщепления ↓ +1
	-25	-20	-15	-10	-5	
Пре-K-иммуноглобулин, легкая A-цепь (мышь)		MetGluThrAspThrLeuLeuLeuTrpValLeuLeuLeuTrpValProGlySerThrGlyAspIleVal				
Пре-альбумин (крыса)		MetLysTrpValThrPheLeuLeuLeuLeuPheIleSerGlySerAlaPheSerArgGlyVal				
Пре- α -SI-казеин (овца)		MetLysLeuLeuIleLeuThrCysLeuValAlaValAlaLeuAlaArgProLys				
Пре-кональбумин (цыпленок)		MetLysLeuIleLeuCysThrValLeuSerLeuGlyIleAlaAlaValCysPheAlaAlaProPro				
Пре-лизозим (цыпленок)		MetArgSerLeuLeuIleLeuValLeuCysPheLeuProLeuAlaAlaLeuGlyLysValPhe				
Пре-овомукоид (цыпленок)	MetAlaMetAlaGlyValPheValLeuPheSerPheValLeuCysGlyPheLeuProAspAlaAlaPheGlyAlaGluVal					
Пре-интерферон (человек)	MetAlaLeuThrPheAlaLeuLeuValAlaLeuLeuValLeuSerCysLysSerSerCysSerValGlyCysAspLeu					
Пре-мелиттин (пчела)	MetLysPheLeuValAsnValAlaLeuValPheMetValValTyrIleSerTyrIleTyrAlaAlaProGlu					
Пре-проинсулин I (крыса)	MetAlaLeuTrpMetArgPheLeuProLeuLeuAlaLeuLeuValLeuTrpGluProLysProAlaGlnAlaPheValLys					
Пре-ростовой гормон (крыса)	MetAlaAlaAspSerGlnThrProTrpLeuLeuThrPheSerLeuLeuCysLeuLeuTrpProGlnGluAlaGlyAlaLeuProAla					
Пре-пропаратироидный гормон (бык)	MetMetSerAlaLysAspMetValLysValMetIleValMetLeuAlaIleCysPheLeuAlaArgSerAspGlyLysSerVal					
Пре-просоматостатин (крыса)	MetLeuSerCysArgLeuGlnCysAlaLeuAlaAlaLeuCysIleValLeuAlaLeuGlyGlyValThrGlyAlaProSer					
Пре-гликопротеид (VS вирус)	MetLysCysLeuLeuTyrLeuAlaPheLeuPheIleHisValAsnCysLysPheThr					
Пре-гемагглютинин (вирус гриппа Jap)	MetAlaIleIleTyrLeuIleLeuLeuPheThrAlaValArgGlyAspGlnIle					
Пре-фосфатаза, щелочная (E.coli)	MetLysGlnSerThrIleAlaLeuAlaLeuLeuProLeuLeuPheThrProValThrLysAlaArgThr					
Пре-пенициллиназа (E.coli)	MetSerIleGlnHisPheArgValAlaLeuIleProPhePheAlaAlaPheCysLeuProValPheAlaHisProGlu					
Пре-липопроteid (E.coli)	MetLysAlaThrLysLeuValLeuGlyAlaValIleLeuGlySerThrLeuLeuAlaGlyCysSerSer					
<u>Неотщепляемые</u>						
Овальбумин (цыпленок)	MetGlySerIleGlyAlaAlaSerMetGluPheCysPheAspValPheLysGluLeuLysValHisHisAlaAsnGluAsnIlePheTyrCys					

Похожая добавочная N-концевая последовательность оказалась свойственной и растущим цепям ряда бактериальных белков, выводимых (экспортируемых) из цитоплазмы (см. табл. 3). В случае грамотрицательных бактерий этот экспорт белков происходит либо в периплазматическое пространство (например, щелочная фосфатаза, мальтозосвязывающий белок, арабинозосвязывающий белок, пенициллиназа), либо далее во внешнюю мембрану (липопротеид внешней мембраны, λ -рецептор). Начало синтеза секретируемых белков приводит, по-видимому, к взаимодействию их гидрофобной N-концевой последовательности с внутренней цитоплазматической мембраной бактериальной клетки, так что они далее синтезируются на мембраносвязанных рибосомах. В течение элонгации (или в некоторых случаях после нее) может происходить отщепление N-концевой последовательности. По завершении синтеза, после терминации трансляции, готовый белок проваливается в периплазматическое пространство и далее, в зависимости от гидрофобности (гидрофильности) своей поверхности, либо остается в периплазматическом пространстве как водорастворимый белок, либо интегрируется во внешнюю мембрану. Здесь, как видно, имеется большая аналогия с ситуацией для секретируемых белков в эукариотических клетках.

Более того, имеются основания утверждать, что, по крайней мере, самые фундаментальные механизмы сигнального пептид-мембранного узнавания и последующего внутримембранного пептидного отщепления являются общими для эукариот и прокариот. В самом деле, бактерии, несущие рекомбинантные плазмиды с генами эукариотических секретируемых белков, могут синтезировать эти белки и эффективно секретировать их сквозь цитоплазматическую мембрану из клетки, специфически отщепляя аминокислотный терминальный сигнальный сегмент. Например, крысиный препроинсулин, синтезируемый в *E. coli*, правильно процессируется в проинсулин, и последний секретруется из бактериальной цитоплазмы в периплазматическое пространство.

Кроме секретируемых белков, растущие полипептидные цепи ряда встроенных в мембрану белков также характеризуются временной сигнальной N-концевой последовательностью. Одним из первых изученных примеров такого рода был гликопротеид вируса везикулярного стоматита, который вместе с хозяйской мембраной участвует в построении вирусной оболочки. Этот белок, как оказалось, синтезируется с N-концевой сигнальной последовательностью, очень похожей на такую секретиремых пребелков; сигнальная последовательность необходима для присоединения транслирующей рибосомы к мембране эндоплазматического ретикула; дальнейший синтез белка идет, таким образом, на мембраносвязанных рибосомах; в ходе элонгации N-концевая последовательность из 16 аминокислотных остатков отщепляется в мембране. Другими словами, все это не отличимо от ситуации в случае водорастворимых секретируемых белков. Однако, в отличие от секретируемых белков, здесь окончательный продукт после термина-

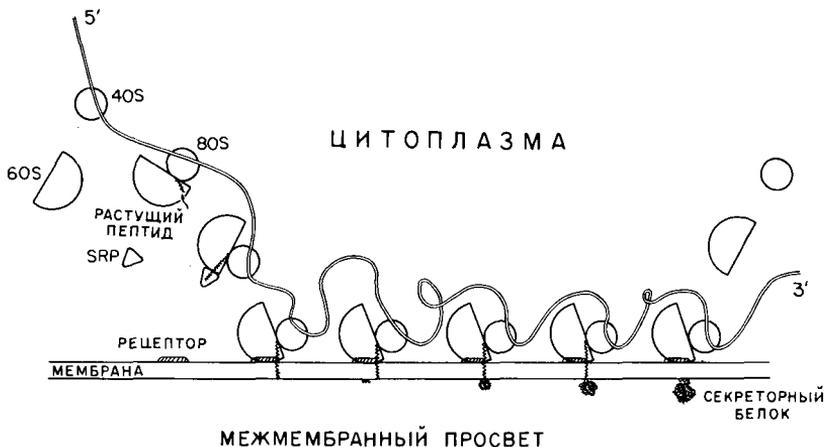


Рис. 128. Схема мембраносвязанной полирибосомы.

ции трансляции не проходит далее сквозь мембрану, а остается вставленным в мембрану как трансмембранный белок. Можно привести еще ряд аналогичных примеров интегральных мембранных белков, синтезируемых с отщепляемой N-концевой сигнальной последовательностью (гемагглютинин вируса гриппа, тяжелая цепь антигенов гистосовместимости А и В, гликофорин А красных кровяных клеток, цитохром Р-448 и т. д.). Получается, что в синтезе как секреторных, так и интегральных мембранных белков используется один и тот же механизм сигнального пептид-мембранного узнавания, вхождения растущего пептида в мембрану и затем отщепления N-концевого сигнального фрагмента, но терминация трансляции может приводить либо к прохождению конечного продукта сквозь мембрану в случае водорастворимых секреторных белков, либо к его «солюбилизации» в мембране в случае более гидрофобных белков, предназначенных для внутримембранной локализации. Белки, оставшиеся в мембране эндоплазматического ретикулума, далее могут подвергаться посттрансляционному транспорту через секреторные пузырьки в мембранные структуры других типов, включая клеточную плазматическую мембрану.

Схема мембраносвязанной полирибосомы, демонстрирующая инициацию на свободных частицах, прикрепление частиц к мембране через посредство сигнальной N-концевой последовательности, отщепление сигнального пептида и терминацию, дана на рис. 128.

Примеры отщепляемых N-концевых последовательностей секреторных и мембранных пребелков даны в табл. 3. Как уже указывалось, все они носят сильно гидрофобный характер. Наиболее гидрофобная область (чаще всего сплошь гидрофобная) лежит приблизительно в середине отщепляемой последовательности; это гидрофобное «ядро» обычно включает около десятка аминокислотных остатков. Последний аминокислотный остаток отщепля-

емой последовательности, т. е. место расщепления, характеризуется, как правило, малыми размерами: это могут быть либо Gly, либо Ala (гораздо реже — Ser или Cys), за ним часто (но далеко не всегда) следует заряженная аминокислота. Однако никакого очевидного сходства или гомологии аминокислотных последовательностей отщепляемых сигнальных пептидов, кроме их вообще сильно гидрофобного характера, заметить не удастся. В связи с этим можно думать, что главным в сигнальном пептидомембранном узнавании и вхождении пептида в мембрану является какая-то общая конформация гидрофобного N-концевого пептида, высывающегося из рибосомы. Наиболее благоприятной конформацией гидрофобной последовательности для взаимодействия с гидрофобным окружением могла бы быть α -спираль.

Несмотря на большое количество примеров, когда секреторные и внутримембранные белки синтезируются с **отщепляемой** сигнальной N-концевой последовательностью, это, по-видимому, не есть общее правило. Некоторые белки, как оказалось, тоже синтезируются на мембраносвязанных рибосомах, но **без отщепления** N-концевой или какой-либо иной сигнальной последовательности. К ним относится такой типичный секреторный белок, как овальбумин, а также мембранные белки цитохром Р-450, эпоксидгидратаза, ретинальный опсин, гликопротеид PE₂ вируса Синдбис. В этих случаях растущая полипептидная цепь тоже, по-видимому, имеет сигнальную последовательность, индуцирующую присоединение транслирующей рибосомы к мембране эндоплазматического ретикулума и ко-трансляционный транспорт белка в мембрану, но без сопутствующего процессинга. Для цитохрома Р-450 показано, что его N-концевая последовательность гидрофобна и напоминает сигнальную, но она сохраняется у зрелого белка. Однако N-концевые последовательности овальбумина и опсина не похожи на обычную сигнальную последовательность. Возможно, что либо сигнальную роль здесь выполняют специальные внутренние гидрофобные участки растущего полипептида, либо не столь гидрофобная N-концевая последовательность тоже в каких-то случаях может служить сигналом для присоединения к мембране. Как и в других случаях, взаимодействие с мембраной возможно лишь в течение трансляции, но не после нее; очевидно, сворачивание завершенной цепи как-то блокирует (экранирует) сигнальную функцию соответствующего участка.

Следует отметить, что не все мембранные белки синтезируются на мембраносвязанных рибосомах и, следовательно, входят в мембрану ко-трансляционно. Например, цитохром b₅ и NADH-цитохром-b₅-редуктаза синтезируются на свободных рибосомах и инкорпорируются в мембраны посттрансляционно. Эти белки, будучи освобождены из рибосом в цитоплазму в виде завершенных цепей, имеют высокое сродство к мембранам (возможно, за счет гидрофобного C-концевого домена) и легко вступают с ними во взаимодействие в их свернутом виде, независимо от рибосом.

Итак, появление гидрофобной последовательности растущего пептида, торчащей из рибосомы, приводит к ее присоединению к мембране. Встает вопрос, узнается ли эта гидрофобная последовательность непосредственно мембраной, или же соединение растущего пептида, высунувшегося из рибосомы, с мембраной осуществляется через посредничество какого-либо вспомогательного узнающего компонента.

Оказалось, что в эукариотических клетках рибосома с экспонированной сигнальной последовательностью растущего пептида действительно сначала взаимодействует со специальной малой частицей, получившей название *сигналузнающей частицы* или SRP. Частица представляет собой 11S рибонуклеопротеид, содержащий 7S РНК длиной около 300 нуклеотидов и шесть белков (полипептидов) с молекулярными массами 72000, 68000, 54000, 19000, 14000 и 9000 дальтон; все эти компоненты находятся в частице в эквимолярных количествах, по одному на частицу. Частицы, по-видимому, универсальны, во всяком случае среди эукариот. Они имеют определенное сродство к мембране эндоплазматического ретикулума, так что могут находиться с ней в лабильной и обратимой ассоциации, хотя значительная их часть представляет собой растворимый цитоплазматический компонент. Кроме того, они имеют некоторое, относительно небольшое, сродство и к рибосомам. Присутствие на рибосоме сигнального пептида повышает сродство рассматриваемых частиц к рибосоме на несколько порядков.

Узнавание сигнального пептида и присоединение 11S частицы к рибосоме имеет ряд последствий. Во-первых, происходит остановка элонгации пептида на рибосоме. Во-вторых, индуцируется присоединение транслирующей рибосомы к мембране.

С другой стороны, на мембране эндоплазматического ретикулума эукариотических клеток имеется специальный рецептор, воспринимающий сигналузнающую частицу в комплексе с рибосомой. Рецептор оказался белком с молекулярной массой 72000 дальтон, частично погруженным в мембрану, в то время как основной его домен обращен в цитоплазму и служит непосредственным «причалом» для сигналузнающей частицы. Он получил название «причального белка». Взаимодействие ассоциированной с рибосомой сигналузнающей частицы с «причальным белком» мембраны снимает запрет с элонгации; синтез пептида возобновляется. Теперь, однако, растущий пептид торчит уже не в водную фазу, а непосредственно в мембрану; дальнейшая элонгация приводит к его погружению и вхождению в мембрану прямо из рибосомы, минуя водное окружение цитоплазмы. Происходит так называемая ко-трансляционная транслокация полипептида через мембрану. Более детальные механизмы вхождения полипептида в мембрану и, в случае секреторных белков, его прохождение через нее не известны.

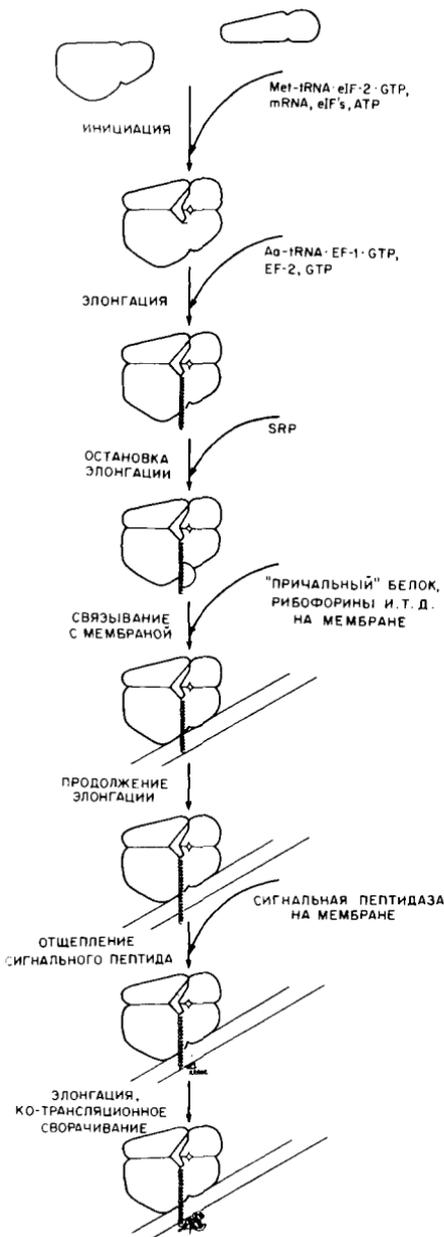


Рис. 129. Схема последовательности событий в процессе присоединения эукариотической рибосомы к мембране

Пептидаза, отщепляющая сигнальный пептид, не обнаруживается на цитоплазматической стороне мембраны; фермент локализован на противоположной стороне мембраны (со стороны мембранного просвета в случае эндоплазматического ретикулама эукариотических клеток). Похоже, что сигнальная пептидаза вступает в действие на поздних стадиях элонгации, когда пептид «прощивает» мембрану и оказывается в контакте с ее противоположной (нецитоплазматической) поверхностью. Кажется вероятным, что отщепление сигнального пептида нужно для высывывания N-концевой части белковой молекулы в водную фазу и соответствующей реорганизации сворачивания в глобулярный наружный внецитоплазматический домен (в случае трансмембранных белков) или в глобулярную структуру в целом (в случае секреторных белков).

Таким образом, последовательность событий может быть представлена следующим образом (рис. 129). Синтез белка, предназначенного для секреции или для трансмембранной установки, начинается на свободных рибосомах. В процессе наращивания первых 30–40 аминокислотных остатков пептид еще не высвывается из рибосом. Далее, в случае секреторируемых или трансмембранных белков, из рибосомы начинает показываться гидрофобная сигнальная последовательность. Когда сигнальная последовательность, торчащая из рибосомы, достигает длины 15–30 аминокислотных остатков, т. е. когда растущий пептид в целом достигает длины около

60—70 остатков, сигнализующая 11S рибонуклеопротеидная частица (SRP) присоединяется к рибосоме и останавливает элонгацию. Эта остановка транслации продолжается до тех пор, пока не осуществится контакт с «причальным белком» (его цитоплазматическим доменом) мембраны эндоплазматического ретикулума. Элонгация теперь восстанавливается, и растущий пептид входит, по мере роста, непосредственно в мембрану (ко-трансляционная транслокация пептида через мембрану).

Следует подчеркнуть, что остановка элонгации по выходе сигнальной последовательности из рибосомы представляется очень важной для нормальной секреции (или вхождения в мембрану) синтезируемого белка. В самом деле, если бы не было остановки, то продолжающаяся элонгация могла бы привести к дополнительному сворачиванию торчащего растущего пептида в водной фазе клетки и, как результат, «упрятьванию» сигнальной последовательности; это сделало бы невозможным его узнавание мембраной и последующую секрецию. Следовательно, остановка элонгации обеспечивает необходимое «ожидание» сигнальной последовательности в нужной экспонированной конформации для «причаливания» к мембране.

Отщепление сигнальной последовательности у люминальной стороны мембраны, обращенной в межмембранный просвет эндоплазматического ретикулума, по-видимому, приводит к тому, что гидрофобность растущего пептида уменьшается, и его пребывание в липидном бислое становится менее выгодным, чем переход в водную фазу межмембранного просвета. Соответственно, в зависимости от аминокислотного состава и последовательности, в водную фазу будут вытолкнуты либо лишь его водорастворимая часть (скажем, N-концевая часть), как в случае многих трансмембранных белков, либо весь белок по завершении его синтеза, как в случае секретрируемых белков. Естественно, переход в водную фазу должен сопровождаться перестройкой пространственной структуры, приобретающей глобулярную конформацию (гидрофобные остатки обращаются внутрь глобулы или глобулярного домена, в то время как гидрофильные экспонируются наружу).

Секреторные белки, накапливающиеся в межмембранном просвете (цистерновом пространстве) эндоплазматического ретикулума, далее транспортируются к аппарату Гольджи, концентрируются в секреторных гранулах и, наконец, выводятся посредством механизма экзоцитоза.

3. КО-ТРАНСЛЯЦИОННЫЕ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКА

Вылезание растущего пептида из рибосомы и его ко-трансляционное сворачивание в водной среде или прохождение через мембрану сопровождается большими или меньшими энзиматическими модификациями цепи.

В прокариотах, а также в митохондриях и хлоропластах эукарио-

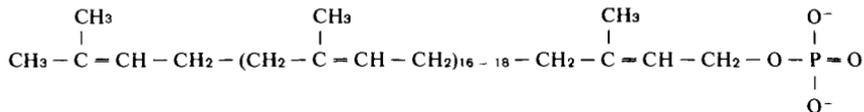
тических клеток синтез любого пептида на рибосоме начинается с формилметионинового остатка (гл. В. VI). Однако в готовых белках формильная группа не обнаруживается, а метионин является N-концевым остатком только у части белков. Оказалось, что в прокариотической клетке (так же как и в митохондриях и хлоропластах) существует специальная *деформилаза*, которая гидролитически отщепляет формильную группу от концевого метионина вскоре после появления N-конца растущего пептида из рибосомы. В прокариотах и в эукариотах существует также метионинспецифическая *аминопептидаза*, способная отщеплять N-концевой метионин, но ее срабатывание зависит, по-видимому, от ко-трансляционного сворачивания растущего пептида. Во всяком случае, в некоторых белках N-концевой метионин сохраняется, и происходит это, как считают, в результате его недоступности из-за каких-то конформационных особенностей N-концевой части растущего пептида.

Выше уже говорилось о ко-трансляционном протеолитическом отщеплении сигнальной гидрофобной последовательности ряда секреторных и трансмембранных белков эукариот. *Сигнальная пептидаза* локализована в мембране на ее стороне, обращенной от цитоплазмы (т. е. на люминальной стороне мембраны эндоплазматического ретикулума эукариотической клетки). По типу действия она оказалась эндопептидазой. Характерным местом расщепления полипептидной цепи сигнальной пептидазой является пептидная связь у малого остатка, такого как C₁у или Ala, реже Ser или Cys, с его С-стороны (часто, но далеко не всегда, за ним следует заряженный остаток, такой как Arg, Lys, His, Asp). Кроме того, район расщепления должен быть как-то отмечен более открытой конформацией пептида в этом месте. Отщепление сигнального пептида — необходимая предпосылка для последующего выхода растущего пептида в водное замембранное пространство и его ко-трансляционного сворачивания там.

Очевидно, что важную роль в ко-трансляционном сворачивании белка может играть образование дисульфидных связей между цистеиновыми остатками. Дисульфидные связи, скрепляющие третичную структуру, особенно распространены у секреторных белков эукариот. Наоборот, внутриклеточные белки чаще характеризуются свободными сульфгидрильными группами цистеиновых остатков. Действительно, условия внеклеточной среды, по сравнению с внутриклеточной, являются более окислительными. Дисульфидные связи, по-видимому, могут завязываться между цистеиновыми остатками растущей полипептидной цепи уже по мере ее прохода через мембрану в межмембранный просвет. Такие связи могут возникать спонтанно при достаточно окислительных условиях среды. Однако, во-первых, скорость спонтанного образования дисульфидных связей в белке, по сравнению со скоростью его синтеза и сворачивания, не велика; во-вторых, в процессе сворачивания всегда существует вероятность образования дисульфидных связей между не теми остатками цистеина, которые должны образовать мостики в законченной свернутой белковой молекуле. Более 20 лет назад

было открыто, что в эндоплазматическом ретикулуме животных клеток содержится фермент, катализирующий образование дисульфидных связей в белках. На самом деле, ускоряя как прямую, так и обратную реакцию, фермент катализировал тиол-дисульфидный обмен, тем самым приводя не только к быстрому образованию дисульфидных связей, но и к быстрой замене неправильных или промежуточных (ненативных) связей на правильные в ходе сворачивания белка. Таким образом, фактически катализировался процесс сворачивания дисульфидсвязитых белков. Фермент может быть обозначен как *дисульфидизомераза белков*. Он очень лабильно ассоциирован с люминальной поверхностью мембраны, обращенной в межмембранный просвет эндоплазматического ретикулума, и не исключено, что он может присутствовать в межмембранном просвете в растворимой форме. Можно думать, что в процессе синтеза белка и выхода растущей полипептидной цепи в межмембранный просвет дисульфидизомераза катализирует ко-трансляционное образование внутримономерных дисульфидных связей и их перебор в ходе формирования правильной третичной структуры высунувшегося домена.

Один из наиболее важных и интересных типов ко-трансляционной модификации — первичное, или так называемое «сердцевинное» *N*-гликозилирование некоторых аспарагиновых остатков растущих цепей ряда трансмембранных и секретируемых белков в мембранах эндоплазматического ретикулума эукариотических клеток. *N*-гликозилирование представляет собой перенос углеводной (олигосахаридной) группы от полипренольного липида мембраны — долихилдифосфата — на амидную группу аспарагинового остатка растущего пептида. Общая схема процесса выглядит так. Долихилфосфат



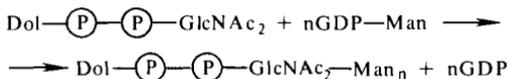
представляет собой мембраносвязанный липидный акцептор, на котором строится олигосахаридная группа. Сначала долихилфосфат, реагируя с уридиндифосфат-*N*-ацетилглюкозамин (UDP-GlcNAc), акцептирует остаток *N*-ацетилглюкозаминфосфата:



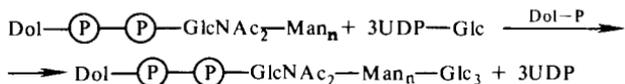
В следующей реакции добавляется еще один остаток *N*-ацетилглюкозамина:



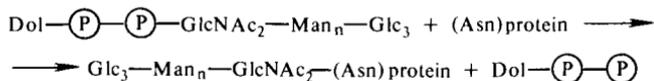
Затем в серии последовательных реакций гликозилированный долихилдифосфат реагирует с гуанозиндифосфатманнозой (GDP-Man), в результате чего на первых углеводных остатках нарастается разветвленный полиманнозид:



Наконец, к нему от уридиндифосфатглюкозы (UDP-Glc) добавляются еще остатки глюкозы:



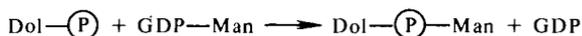
Именно этот олигосахарид и переносится соответствующей гликозилтрансферазой на аспарагиновый остаток растущего пептида:



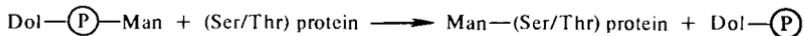
Вслед за этим глюкозные остатки частично удаляются гликозидазами.

Однако в завершенных белках такой олигосахаридной структуры, как правило, не встречается. Оказывается, эта структура представляет лишь промежуточную в общем процессе N-гликозилирования белка. Дело в том, что вслед за описанным ко-трансляционным этапом следует посттрансляционный этап, который осуществляется в основном по поступлению синтезированного белка в аппарат Гольджи. Посттрансляционный этап приводит к удалению глюкозы и последовательному частичному отщеплению остатков маннозы, а затем часто к добавлению остатков N-ацетилглюкозамина, галактозы и сиаловой кислоты, а иногда также фукозы и ксилозы; в конце концов получается разветвленный гетероолигосахаридный остаток, присоединенный к амидной группе аспарагина соответствующего готового белка.

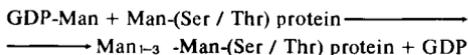
У грибов ко-трансляционное гликозилирование на мембране с участием долихилфосфата может идти не только по аспарагиновым остаткам (N-гликозилирование), но и по остаткам серина и треонина (O-гликозилирование). В этом случае сначала долихилфосфат акцептирует остаток маннозы от гуанозиндифосфатманнозы:



Остаток маннозы соответствующей гликозилтрансферазой переносится на оксигруппу серина или треонина растущей пептидной цепи:



Уже после завершения трансляции, в аппарате Гольджи другая гликозилтрансфераза наращивает углеводный остаток пептидной цепи еще несколькими остатками маннозы, перенося их от гуанозиндифосфатманнозы:



O-гликозилирование белков по остаткам серина и треонина в животных и растительных клетках идет по другому механизму. Оно всегда, по-видимому, является лишь посттрансляционным процессом и происходит в аппарате Гольджи.

Важно подчеркнуть, что ко-трансляционное гликозилирование растущих цепей вовсе не необходимо для их вхождения в мембрану эндоплазматического ретикулума. Более того, это гликозилирование происходит *после* прохождения дистальной части растущего пептида сквозь мембрану, на стороне мембраны, обращенной в межмембранный просвет. Соответственно, каждый акт гликозилирования (если имеется несколько точек гликозилирования вдоль полипептидной цепи) имеет место только после того, как достигнута определенная длина соответствующего отрезка полипептидной цепи, необходимая, чтобы акцепторный Asp достиг межмембранного просвета.

Специфической модификацией полипептидных цепей при синтезе коллагена в клетках соединительных тканей (фибробластах) животных является *гидрокселирование* пролиновых и лизиновых остатков. Этот процесс, по крайней мере частично, также котрансляционный. Проллин-4-гидроксилаза, пролил-3-гидроксилаза и лизил-гидроксилаза, как было показано, — мембраносвязанные ферменты, способные превращать остатки пролина и лизина растущих полипептидных цепей коллагена в остатки *4-транс*-гидроксипролина, *3-транс*-гидроксипролина и 5-гидроксислизина, соответственно. Дальнейшая модификация полипептидных цепей коллагена включает, в частности, O-гликозилирование оксилизиновых остатков.

Рекомендуемая литература

Биосинтез белка и его регуляция: Пер. с англ./Под ред. Я. М. Варшавского. М.: Мир, 1967. С. 194—204.

Freedman R. B., Hawkins H. C., eds. The Enzymology of Post-translational Modifications of Proteins. — L.-N.Y.: Acad. Press, 1980, v. 1, p. 3—212.

Hand A. R., Oliver C., eds. Basic mechanisms of cellular secretion. Methods in Cell Biology. — N.Y.-L.: Acad. Press, 1981, v. 23.

Manson L. A., ed. Biomembranes. — N.Y.-L.: Plenum Press, 1971, v. 2, p. 193—195.

Zimmerman M., Mumford R. A., Steiner D. F., eds. Precursor processing in the biosynthesis of proteins. — Ann. N. Y. Acad. Sci., N. Y., 1980, v. 343.

Blobel G., Dobberstein B. Transfer of protein across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes by murine myeloma. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. — J. Cell Biol., 1975, v. 67, p. 835—862.

Blobel G., Sabatini D. D. Controlled proteolysis of nascent polypeptides in rat liver cell fractions. I. Location of the polypeptides within ribosomes. — J. Cell Biol., 1970, v. 45, p. 130—145.

Ganoza M. C., Williams C. A. *In vitro* synthesis of different categories of specific protein by membrane-bound and free ribosomes. — Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1969, v. 63, p. 1370—1376.

Goldberger R. F., Epstein C. J., Anfinsen C. B. Acceleration of reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by a microsomal system from rat liver. — J. Biol. Chem., 1963, v. 238, p. 628—635.

Hamlin J., Zabin I. β -Galactosidase: Immunological activity of ribosome-bound, growing polypeptide chains. — Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1972, v. 69, p. 412—416.

Henderson R., Unwin P. N. T. Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. — Nature, 1975, v. 257, p. 28—32.

Hubbard S. C., Ivatt R. J. Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides. — Ann. Rev. Biochem., 1981, v. 50, p. 555—583.

Inouye M., Halegoua S. Secretion and membrane localization of proteins in *Escherichia coli*. — CRC Crit. Rev. Biochem., 1980, v. 7, p. 339—371.

Jackson R. C., Blobel G. Post-translational cleavage of presecretory proteins with an extract of rough microsomes from dog pancreas containing signal peptidase activity. - Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1977, v. 74, p. 5598-5602.

Malkin L. I., Rich A. Partial resistance of nascent polypeptide chains to proteolytic digestion due to ribosomal shielding. - J. Mol. Biol., 1967, v. 26, p. 329-346.

Meyer D. I., Krause E., Dobberstein B. Secretory protein translocation across membranes - the role of the 'docking protein'. - Nature, 1982, v. 297, p. 647-650.

Milstein C., Brownlee G. C., Harrison T. H., Mathews M. B. A possible precursor of immunoglobulin light chains. - Nature New Biol., 1972, v. 239, p. 117-120.

Palade G. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. - Science, 1975, v. 189, p. 347-358.

Phillips D. C. The hen egg-white lysozyme molecule. - Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1967, v. 57, p. 484-495.

Rothman J. E., Lenard J. Membrane asymmetry. - Science, 1977, v. 195, p. 743-753.

Sabatini D. D., Blobel G. Controlled proteolysis of nascent polypeptides in rat liver cell fractions. II. Location of the polypeptides in rough microsomes. - J. Cell Biol., 1970, v. 45, p. 146-157.

Sabatini D. D., Kreibich G., Morimoto T., Adesnik M. Mechanisms for the incorporation of proteins in membranes and organelles. - J. Cell Biol., 1982, v. 92, p. 1-22.

Siekevitz P., Palade G. E. A cytochemical study on the pancreas of the guinea pig. V. *In vivo* incorporation of leucine-1-C¹⁴ into the chymotrypsinogen of various cell fractions. - J. Biophys. Biochem. Cytol., 1960, v. 7, p. 619-630.

Smith W. P., Tai P.-C., Davis B. D. Nascent peptide as sole attachment of polysomes to membranes in bacteria. - Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1978, v. 75, p. 814-817.

Smith W. P., Tai P.-C., Davis B. D. Interaction of secreted nascent chains with surrounding membrane in *Bacillus subtilis*. - Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1978, v. 75, p. 5922-5925.

Strauss A. W., Boime I. Compartmentmentation of newly synthesized proteins. - CRC Crit. Rev. Biochem., 1982, v. 9, p. 205-235.

Venetianer P., Straub F. B. The enzyme reactivation of reduced ribonuclease. - Biochim. Biophys. Acta, 1963, v. 67, p. 166-168.

Walter P., Blobel G. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. - J. Cell Biol., 1981, v. 91, p. 557-561.

Walter P., Blobel G. Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translation across the endoplasmic reticulum. - Nature, 1982, v. 209, p. 691-698.

Walter P., Ibrahimi I., Blobel G. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. - J. Cell Biol., 1981, v. 91, p. 545-550.

Wickner W. The assembly of proteins into biological membranes: The membrane trigger hypothesis. - Ann. Rev. Biochem., 1979, v. 48, p. 23-45.

- Абрин — см. Токсины растительные
- Адаптация набора тРНК 212
- Адапторная гипотеза 28—29, 154
- Аденозин 5'-трифосфат (АТФ)
в активации аминокислот 7—8, 41—43, 59—61
в бесклеточных системах трансляции 57—58
в инициации трансляции у эукариот 249, 250—252
в мышечном сокращении 206
в фосфорилировании eIF-2 261—262
см. также Фосфорилирование факторов трансляции
- АДФ-рибозилирование EF-2
дифтерийным токсином 214—216
экзотоксином из *Pseudomonas aeruginosa* 216—217
эндогенное 219—220
- Акридиновые красители, индукция мутаций 13
- Аминоациладенилат 42—43, 46—47
- Аминоацилирование тРНК
коррекция ошибок («редактирование») 46
ошибки (ложное ацилирование) 46—47
последовательность событий 44—45
специфичность по отношению к аминокислоте 45—46
специфичность по отношению к тРНК 46—48
химия реакций 41—44
см. также Аминоацил-тРНК-синтетазы
- Аминоацил-тРНК
аминокислотные остатки, связанные с 2'- и 3'-положениями рибозы концевой аденозина 43, 184—185
в бесклеточных системах трансляции 57—58
взаимодействие с EF-T_u (EF-1) 134—135, 142, 160—162, 163—165, 184—185
в реакции транспептидации 59—60, 134, 135, 148—149, 183—186, 190
как интермедиат в переносе аминокислот в полипептидную цепь 8—9, 28—29
кодонзависимое связывание с рибосомой 134—136, 142, 154—155, 163—168, 174—182, 197—198
конкуренция с фактором терминации 268
неэнзиматическое (бесфакторное) связывание с рибосомой 165, 179, 204
образование — см. Аминоацилирование тРНК
положение на рибосоме — см. Аминоацил-тРНК связывающий участок (А-участок)
положение относительно пептидил-тРНК 160
роль в ложном кодировании 168, 171, 175—176
сканирование рибосомой 177
Аминоацил-тРНК-связывающий участок (А-участок)
вклад EF-T_u 160—161, 162—165, 179—181
влияние Р-участка 142—143, 160
ингибиторы 165—168
кодон-антикодоновое взаимодействие 155, 159—160, 161, 170—171, 174—175, 179
локализация на субчастицах рибосомы 142, 171
необратимое запираание тРНК 175—176, 178, 181
определение 134—135
ориентация тРНК 159—160
предварительное (промежуточное) связывание тРНК 164, 177—178, 181
расположение на рибосоме 143—144
связывание пептидил-тРНК 135, 196
связывание факторов терминации 268, 269
сродство к тРНК 142, 170—171, 208
участие рибосомных белков 143, 171
- Аминоацил-тРНК-синтетазы
катализируемые реакции 41—43
компарментализация на полирибосомах (у эукариот) 41
кооперативность связывания субстрата 44
многоферментные комплексы (у эукариот) 41
молекулярные свойства 39—40
неспецифическая РНК-связывающая способность (у эукариот) 41
открытие 29
специфичность к субстрату 45—48
субстратсвязывающие участки 40
субъединичная структура 39—40

Аминогексозо-пиримидин-нуклеозидные антибиотики 190
Аминогликозидные антибиотики 167, 168, 170, 180—181
Аминокислоты
активация АТФ и акцептирование тРНК 7—8, 41—43
специфичность аминоацилирования тРНК 45—46
структура и соответствие кодонам 12—13
Аминопептидаза, метионинспецифическая 224, 286
Амицитин 189, 190, 268
Анизомицин 190—191
Антивирусный белок лактоноса 218
Антикодон
адапторная роль 28—29, 154
аланиновой тРНК 30
валиновой тРНК 168—169
взаимодействие с комплементарными антикодонами 174—175
глутамил-тРНК 175
изолейциновой тРНК 157, 168—169
инициаторной тРНК_F 222—223
лейциновой тРНК 29, 157, 168—169, 175
лизиновой тРНК 175
митохондриальных тРНК 158
основание в первом положении 156—159
ошибочное спаривание с кодонами 168—170
положение во вторичной структуре тРНК 34, 35—36, 223, 246
положение в первичной структуре тРНК 30
положение в третичной структуре тРНК 37—39
сериновой тРНК 158, 168—169
сшивка с рибосомной РНК 141
тирозиновой тРНК 154, 168—169
трехмерная структура 36—37, 223
триптофановой тРНК 172
участие в узнавании тРНК аминоацил-тРНК-синтетазой 48
фенилаланиновой тРНК 37—38
Ассоциация рибосомных субчастиц 62—63, 66—67, 119—122, 225, 229—230, 255, 271
Аффинное мечение 137—138, 141, 143, 147, 148, 150—151

Бамицитин 190

Белки рибосомные

взаимодействие с рибосомной РНК 99—103
в мРНК-связывающем участке 137, 139—140
в районе пептидилтрансферазного центра 150—151
в районе факторсвязывающего участка 145, 147—148, 166, 201, 268

в транслокации 152—153, 209
в участке связывания тРНК (А-участке) 143, 171
в участке связывания тРНК (Р-участке) 140—142
диссоциация при разборке 127—130
как составная часть рибосомы 7, 90
комплексы и кооперативные группы 98—99
первичные структуры 94—95
периферийная локализация на рибосоме 104—106
разделение гель электрофорезом 90—93
размеры 90—91, 92, 94
регуляция синтеза по принципу обратной связи 237—239, 242—243
репрессорная роль 237—243
синтез на полицистронных мРНК 237—238
соседствующие 106—109
топография на рибосомной поверхности 106—113
трехмерные структуры 95—98, 99
число и номенклатура 91—93
Белковый комплекс (L7/L12)₄ · L10
локализация на рибосоме 65—66, 96, 111—112
связывание с рибосомной РНК 101, 241, 242
структура 96, 98—99
структурная мобильность 152—153
трансляционный контроль по принципу обратной связи 239, 241—242
участие в работе функциональных участков 139, 141—142, 143, 145—148, 151, 201, 206, 208—209
Бесклеточные системы трансляции, описание и компоненты 57—58
Бессмысленные кодоны — см. Кодоны терминации
Бессмысленные мутации 265—266
Бесфакторная транслокация — см. Транслокация неэнзиматическая
Бесфакторная элонгация 204
Бластицидин S 190

Виомицин 201, 204

Вискумин — см. Токсины растительные

Гем-контролируемый ингибитор (НСИ) 259—262

Гентамицин 204

Гигромицин В 204

Гиена 232

Гипермодифицированные нуклеозиды в тРНК 31, 33, 34

Гипотеза нестрогого соответствия при

кодон-антикодоновом спаривании 155—158

Гликозидазы 288

Гликозилирование 287—289

Гликозилтрансферазы 288

ГТФазный центр (на рибосоме) — см. Гуанозин 5'-трифосфатаза (ГТФаза), Факторсвязывающий участок (на рибосоме)

Гуанилилимидодифосфат (GMP-PNP) 144, 146, 163, 198—199, 228

Гуанилилметиленидифосфонат (GMP-PCP) 144—146, 163—164, 198—199, 201, 228

Гуанилаттрансфераза 17

Гуанозин-5'-дифосфат (ГДФ) 61, 134—135, 144—145, 148, 162—166, 176, 179—181, 182, 198—199, 200—203, 206, 209, 230—231, 248—249, 255, 256, 260—261, 267—268, 270, 288 см. также Гуанозин-5'-трифосфатаза (ГТФаза)

Гуанозин-5'-трифосфат (ГТФ) в бесклеточных системах трансляции 57 в образовании кэп-структуры мРНК 17 гидролиз 61, 134—135, 144—145, 148, 163—166, 176—177, 179—180, 198—202, 206—207, 209, 228—231, 248, 255, 256, 267, 271 как источник энергии в элонгации 61, 134, 209 связывание с EF-T_u (EF-1) 134—135, 144—145, 147, 148, 161—166, 176—181, 182, 201, 268 — EF-G (EF-2) 134—135, 144—145, 147, 148, 198—200, 230 — eIF-2 248, 249—251, 255, 256, 260—261 — IF-2 144, 148, 224, 228—231, 232 — RF 144, 148, 267—268, 269—271 структура 146

Гуанозин-5'-трифосфатаза (ГТФаза) 148, 166, 199, 267 см. также Гуанозин-5'-трифосфат (ГТФ), гидролиз

Гугеротин 189, 190, 268

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) как носитель генетической информации 7—9 нуклеотидный состав 10

Деформилаза 224, 286

Диамины в рибосомах 52—53 индукция ложного кодирования 170 стабилизация ассоциации рибосомных субчастиц 122

Диссоциация рибосом на субчастицы вклад факторов инициации 226, 228, 249—250 влияние ди- и полиаминов 122 влияние органических растворителей 122

зависимость от ионной силы 119—120, 121—122 перед инициацией трансляции 225—226, 249—250 после терминции трансляции 271 при снижении концентрации Mg²⁺ 63, 119—122 роль рибосомной РНК 119—120 роль связанной тРНК 121

Дисульфидизомераза белков 286—287

Дифтаמיד 215, 219

Дифтерийный токсин 214—216

Долихилфосфат 287—288

Изоакцепторные тРНК 29, 158—159, 168—169, 175, 212, 214

Иммунная электронная микроскопия концов рибосомной РНК 113—114 пептидилтрансферазного центра 152 рибосомных белков 109—113 участка выхода растущего пептида 276—277 участка связывания EF-G 147 участка связывания мРНК 139

Ингибитор, индуцируемый двуспиральной РНК (dsI) 262—263

Инициаторная тРНК прокаримотическая формилметионил-тРНК_F (F-Met-tRNA_F) 222—224, 228—231, 232, 268 эукаримотическая метионил-тРНК (Met-tRNA_F) 246—247, 249—250, 255, 256, 260—261, 284

Инициаторные кодоны 18—24, 26, 222, 227, 228, 232, 237, 241, 242, 246, 253—255, 268

Инициаторный комплекс 30S (30S · mRNA · F-Met-tRNA_F · IF-2 · GTP), прокаримотический 226, 228—230, 231 70S (70S · mRNA · F-Met-tRNA_F), прокаримотический 229—231 43S (40S · Met-tRNA_F · eIF-2 · GTP), эукаримотический 250, 261 48S (40S · mRNA · Met-tRNA_F · eIF-2 · GTP), эукаримотический 251, 255 80S (80S · mRNA · Met-tRNA_F), эукаримотический 255, 260—261

Инициация трансляции внутренняя 228, 235, 239, 251—252, 254—255 до прикрепления к мембране 277, 281, 284 значение 221—222, 245, на 5'-конце мРНК 228, 250—255 необходимость АТФ (у эукаримот) 249, 251, 253 определение 56 последовательность событий 226—231, 255—258

при отсутствии факторов инициации 228, 232–233
роль структуры мРНК 19–20, 21, 23–24, 26–27, 225–226, 228, 233–234, 251–253, 255, 257–258
сопряженность с ассоциацией рибосомных субчастиц 229–231, 249, 255
у прокариот 21–22, 221–233
участие ГТФ 224, 228–231, 232, 248–250
у эукариот 21, 23, 244–255
см. также Инициаторная тРНК, Инициаторные кодоны, Инициаторный комплекс, Контроль инициации, Реинициация, Факторы инициации

Интерферон 262–263

Информационная РНК (мРНК)

взаимодействие с рибосомой 136–140, 141, 159–160, 178, 225–229, 232, 235, 245, 250–252, 256, 271
взаимодействие с тРНК 159–160, 164, 168–171, 178, 207–208, 228–229
взаимодействие с факторами инициации 228, 247–249, 250–251, 256, 257–259
как носитель генетической информации 7–9
кодирующие последовательности 17–18, 20, 54, 277
«маскированная» (запасная) 244–245, 255
моноцистронная 21, 244, 245, 252, 254
некодирующие последовательности 17, 20, 27, 265
открытие 9–11
первичная структура 17, 18, 19, 22, 240–241
перекрывание цистронов 21, 234–235
полицистронная 20–21, 23, 222, 226, 228, 234–243, 245, 254, 265, 271
синтетическая 57
содержание в клетке 56
считывание рибосомой 54–57, 139–140, 141, 211–214, 265
транслокация 134–135, 152–153, 196–198, 205–206, 208–209
трехмерная структура 23–27, 136, 212–213, 225, 234, 235, 241–242, 251–252, 258
см. также Цистроны

Информационные рибонуклеопротеиды (мРНК) 244, 257

Информосомы – *см.* Информационные рибонуклеопротеиды (мРНК)

Канамицин 168, 180, 204

Кирромицин 148, 166–167

Код генетический

митохондриальный 16, 158, 266
проблема 9

расшифровка и общая характеристика 11–16

универсальность 16

Кодон

определение 15

семьи 16

словарь 12, 15–16

частоты использования 211–212

Кодон-антикодонное взаимодействие

в А-участке 155–160, 179, 208

в Р-участке 140, 160, 208, 222

гипотеза «Два из трех» 158

имитация факторами терминации 267
кинетика 174–175

комплементарность 28, 155, 174–175

нестрогое соответствие 155–159

правила спаривания оснований 157, 158–159

при инициации 222, 228, 232, 253–255

при ложном кодировании 168–171

при транслокации 205–206, 208

стереохимия 159–160

структура комплекса 155

см. также Адапторная гипотеза, Антикодон, Гипотеза нестрогого соответствия

Кодоны терминации – *см.* Терминирующие кодоны

Компартментализация на полирибосомах эукариотических аминоацил-тРНК-синтетаз 41

эукариотических факторов элонгации 219–220

Контроль инициации трансляции

гормональный 245, 257

при клеточной дифференцировке 244–245, 257

при синтезе белков фага MS2 234–236

при синтезе рибосомных белков 237–243

при тепловом шоке 245

репрессорными белками 235, 238–240, 241–243, 244

участие кэп-структуры 251–252, 258

через селективную дискриминацию мРНК 233–235, 257–259

через фосфорилирование фактора инициации 259–263

см. также Р-репрессия трансляции

Кэпсвязывающие белки 249, 251, 252, 258
см. также Факторы инициации, эукариотические eIF-4F и eIF-4F

Кэп-структура 17, 19, 21, 244, 249, 251

Лектины – *см.* Токсины растительные

Лизилгидроксиллаза 289

Линкомицин 189–190, 268

Ложное кодирование 158, 168–177, 266

Матричные полинуклеотиды
природные — см. Информационная РНК (мРНК)
синтетические 14–15, 57, 204, 232
см. также Полиадениловая кислота [поли(А)], Полиуридилловая кислота [поли(У)], Полицитидилловая кислота [поли(С)]

Мембрана — см. Эндоплазматический ретикулум и Плазматическая мембрана (бактерий)

Метилтрансфераза 17

Метионил-тРНК инициаторная — см. Инициаторная тРНК

Микросомы 49, 55, 277

Минирибосомы (митохондриальные) 53, 54, 69

Минорные нуклеозиды
в мРНК — см. Кэп-структура
в рибосомной РНК 77, 79, 82, 113, 252
в тРНК 30–33, 37, 159

Мобильность структуры рибосомы (при функционировании) 152–153

Модецин — см. Токсины растительные

Модификации белков, ко-трансляционные гидроксильные
гидроксилирование 289
гликозилирование 287–289
деформирование 223–224, 286
образование дисульфидных связей 286–287
отщепление N-концевого метионина 223–224, 235, 286
отщепление сигнального пептида 278, 280, 284–285, 286

Модифицированные нуклеозиды — см. Минорные нуклеозиды

мРНК — см. Информационная РНК (мРНК)

мРНК-связывающий участок (на рибосоме) 136–140, 141, 160, 225–226, 252

мРНКП — см. Информационные рибонуклеопротеиды (мРНКП)

Нейтронное рассеяние 94, 104–105, 108–109, 116–117

Неомицин 168, 180, 204

Неравномерность скорости элонгации 24, 26, 211–213

Нестрогость спаривания оснований (при кодон-антикодонном взаимодействии) 155–159, 222, 267

«Неэнзиматическая» (бесфакторная) трансляция 203–205, 207, 208, 209
см. также Бесфакторная элонгация

«Неэнзиматическое» (бесфакторное) связывание аминоксил-тРНК 165, 203–204, 205

Олигоаденилатсинтетазы 263

Освобождение деацилированной тРНК (из рибосомы)

после терминации 271
при транслокации 135, 196–197, 200, 208

Пептидилтрансферазный центр (на рибосоме)
гидролитическая активность 186, 267, 268–269
донорный и акцепторный субстраты 148–150, 184–185, 187–188
ингибиторы 188–191
катализируемые реакции 148, 183–187
каталитический механизм 184–187
конформация субстратов 191–195, 272–273
положение на рибосоме 151–152
специфичность по отношению к субстрату 185–186
участие рибосомной РНК 151
участие рибосомных белков 150–151

Пептидил-тРНК
в реакции транспептидации 134, 135, 148–149, 183–187, 190, 196–197
RF-индуцируемый гидролиз 267, 268–271
компетенция к пурамицину 197, 200
положение на рибосоме 135, 140–142, 196–197, 208–209, 267
присутствие на рибосоме 134
расположение относительно аминоксил-тРНК 160
связывание с рибосомой 140
транслокация из А-участка в Р-участок 134–135, 152, 196–197, 206–209, 268

Пептидил-тРНК-связывающий участок (Р-участок)
кодон-антикодонное взаимодействие 140, 205
локализация на субчастицах 140
нахождение деацилированной тРНК 135, 140, 196, 208
определение 134–135
ориентация тРНК 160
положение на рибосоме 140–142
связывание аминоксил-тРНК 140, 233
связывание инициаторной тРНК 222, 229–230, 231, 232, 255, 268
сродство к тРНК 140
участие рибосомных белков 140–142

Пептидная связь, образование — см. Транспептидация

Периплазма (граммотрицательных бактерий) 275, 280

Пирофосфатаза 43, 60–61

Плазматическая мембрана (бактерий) 274, 275–276, 278–282

Полиаденилатполимераза 17

Полиадениловая кислота [поли(А)]
как синтетическая матрица 14–15, 57, 262

на 3'-конце природных мРНК 17, 21, 23

Полиамины
в рибосомах 52—53
индукция ложного кодирования 170
стабилизация ассоциации рибосомных субчастиц 122
стабилизация структуры РНК 87

Полинуклеотидфосфорилаза 14, 57

Полинуклеотиды — см. Матричные полинуклеотиды

Полирибосомы, определение и описание 54—56

Полиуридиловая кислота [поли (U)] как матрица 14, 57, 136—139, 168—170, 171, 204, 232—233, 262

Полицистронная мРНК, определение и примеры 20—21, 23 см. также Синтез рибосомных белков, Фаговая РНК MS2

Полицитидиловая кислота, [поли (C)] 14, 262

Посттранслокационное состояние рибосомы 197, 200, 201—202, 203, 207, 208

Претранслокационное состояние рибосомы 197, 199, 200—201, 207, 208

Причальный белок (эндоплазматической мембраны) 283—285

Пролилгидроксилазы 289

Проскок терминирующего кодона 174, 266

Протеинкиназы — см. Фосфорилирование факторов трансляции

Профлавин — см. Акридиновые красители

Процессинг
белков 254, 277—282, 283—285, 286—289
РНК 7, 17, 68, 254

Пурамицин 149—150, 152, 184, 189—190, 191—192, 196—197, 198, 200, 269, 275

Разборка рибосомных субчастиц 127—130

Разворачивание рибосомных субчастиц 122—126

Растущий пептид
аборт 149, 275
взаимодействие с мембраной 274—275, 277—285, 289
дискретное распределение по размерам 211
добавление аминокислот к 56
конформация на рибосоме 192—195, 273
место выхода на рибосоме 276
освобождение, индуцируемое пурамицином 149, 196—197
присутствие на рибосоме 54—55, 134
сворачивание 272—275, 286—287
узнавание сигналузнающими частицами 213, 283
см. также Сигнальная последовательность растущего пептида

Регуляция на уровне трансляции — см.

Контроль инициации трансляции, Репрессия трансляционная

Реинициация 225, 226, 232, 237, 239, 271

Реконструкция рибосом 130—132

Рентгеновское рассеяние 104, 116—117

Репрессия трансляции
гем-контролируемая 259—262
индуцируемая вирусами 257—258
индуцируемая двуспиральной РНК 262—263
индуцируемая сигналузнающими частицами 213, 283—285
индуцируемая токсинами 215—219
как результат сворачивания мРНК 24, 234, 235, 236, 239
низкомолекулярными РНК 244
репрессорными белками 234, 235—236, 237—243, 244

см. также Контроль инициации трансляции

Рецептор сигнального пептида — см. Причальный белок

Рибонуклеиновая кислота (РНК) — см. Информационная РНК (мРНК), Рибосомная РНК, Транспортная РНК (тРНК)

Рибонуклеопротеидный комплекс 5S РНК · L15 · L18 · L25
локализация на рибосоме 99, 114, 115
состав 99—100
участие в ассоциации субчастиц 121
участие в формировании функциональных участков 100, 143, 151

Рибонуклеопротеиды, малые цитоплазматические 213, 245, 283

Рибосомная РНК
виды 68
домены 85, 86—87, 88—89
как составная часть рибосомы 7, 68
компактное сворачивание 86, 87, 88, 89, 104—106
коэффициенты седиментации 69—70
локализация 3'- и 5'-концов на рибосоме 113—114
малые (модифицированные) нуклеозиды 77, 79, 82
митохондриальная 69—70, 74, 75
первичная структура 70, 71, 77, 78—79, 81—82, 83—84
16S, прокариотическая 69, 70—77, 85—87
23S, прокариотическая 69—70, 77—79, 88—89
5S 68, 70, 79, 82—84
роль во взаимодействии субчастиц 119—120
роль каркаса в рибосоме 68, 87, 89, 106, 125, 127—128, 130
сердцевинное положение в рибосомных частях 104—106
содержание в клетке 56
спаривание оснований и вторичная структура 71—77, 80—84

топография на рибосоме 113–116
участки связывания белков 114–116
функциональные участки 141–145, 151,
225–226, 227, 252, 253
4,5S хлоропластов 68, 89
5,8S, эукариотическая 68, 88–89
18S, эукариотическая 69, 74–75, 77, 85–86
28S, эукариотическая 70, 88–89

Рибосомы

как белоксинтезирующие частицы 7–9,
50
мембранносвязанные 49, 50, 52, 274
митохондриальные 52, 53, 54, 69–70
открытие 10, 49–50
подразделение на субчастицы 62–63,
66–67, 119–122
прокариотический тип 52–54
размеры и масса 62–63
содержание в клетке 50
химический состав 52–53
хлоропластов 52, 53, 54, 69–70, 74
эукариотический тип 52–54

Рибофорины 276, 284

Рицин — см. Токсины растительные

Сборка рибосомных частиц — см. Реконструкция рибосом

Сворачивание белков, ко-трансляционное 272–274

Сдвиг рамки считывания 14, 21, 206, 236, 265

Седиментация

рибосомной РНК 69
рибосомных субчастиц 49, 52, 119, 120,
123–124, 125, 126, 129
Секрция белков 52, 274, 278, 280–281, 285
«Сердцевинные» белки 100, 101, 128–129,
130–131, 240

Сигналузнающие частицы (SRP) 281,
283–285

Сигнальная пептидаза 284–285, 286

Сигнальная последовательность растущего пептида 213, 277–285

Сигнальный пептид — см. Сигнальная последовательность растущего пептида

Синглет-синглетный перенос энергии, измерения расстояний между белками 108

Сиомидин 166

Скорость элонгации

регуляция 24, 26, 213–214
тотальная репрессия 214–219
у прокариот 54–56, 211
у эукариот 54–56, 214

Спаривание оснований неканоническое в кодон-антикодонном комплексе 155–157, 168–170, 222

в мРНК 23
в рибосомной РНК 75–76, 77, 79, 83
в тРНК 35, 36–37, 38

см. также Нестрогость спаривания оснований (при кодон-антикодонном взаимодействии), Уотсон — Криковское спаривание оснований

Спарсомидин 268

Спектиномицин 204

α-Спираль

как конформация N-концевой сигнальной последовательности 282

как конформация растущего пептида на рибосоме 272

в рибосомных белках 95–98

в трансмембранных белках 275

Стрептомицин 167–168, 171, 173, 180, 268

Субчастицы рибосомные, определение, номенклатура и описание 62–67

см. также Диссоциация рибосом

Субъединицы рибосомные — см. Субчастицы рибосомные

Супрессия

бессмысленных мутаций 266

Супрессорная тРНК 155, 170, 266, 267

Терминация трансляции

гидролиз пептидил-тРНК и освобождение полипептида 266–267, 268–269, 270

ингибиторы 268, 269

кодон-зависимость 15, 265–269

определение 56

перед инициацией 225, 236

последовательность событий 266–267

последующая диссоциация от мРНК

226, 236, 238–239, 271

преждевременное 266

сопутствующая диссоциация рибосом 271

супрессия 155, 266

супрессия 155, 266

участие ГТФ 267–268, 269–271

см. также Терминирующие кодоны, Факторы терминации

Терминирующие кодоны 15, 16, 19–21, 24, 155, 174, 234, 236, 254, 265–268, 269, 271

Тетрациклин 165–166, 268

Тиострептон 145, 166, 201

Токсины

бактериальные 214–217

см. также Дифтерийный токсин

растительные 217–218

Топография белков на рибосоме 106–113, 114–117, 132

Топография поверхности рибосомы — см. Рибосомная РНК

Топография белков на рибосоме

Транскрипция 7

Транслокация

зависимость от Mg²⁺ 201, 204–205

ингибиторы 200—201
матричного полинуклеотида 135, 19—198, 205—206
молекулярные механизмы 204, 206, 207—209
«неэнзиматическая» (бесфакторная) 203—205, 207, 208
определение 134, 196
пептидил-тРНК 135, 196—197, 205—206, 208—209
последовательность событий 200—203
растущего пептида на рибосоме 272—273
роль ГТФ 199—200, 206—207, 209
сопряженный гидролиз ГТФ 135, 198—203, 206—207
сопутствующее освобождение деацилированной тРНК 135, 196—197, 200, 208
участие EF-G (EF-2) 135, 198—203, 204—205, 209, 219—220
экспериментальные тесты 196—198
энергетика 199, 203—205, 206—207

Трансляция
определение 9
цикл 56—57

Трансмембранные белки 277, 280—282, 284, 285, 287

Трансмембранный транспорт белков, ко-трансляционный 52, 274—276, 280—282, 283—285, 289

Транспептидация 59—60, 134—136, 148—150, 163—164, 164—165, 166, 175, 176, 178, 181, 183—195, 196—197, 204, 209, 267
см. также Пептидилтрансферазный центр

Транспортная РНК (тРНК)
акцептирование аминокислот 7—8, 41—43, 46
взаимодействие оснований 33—34, 35, 38—39
вклад в ассоциацию рибосомных субчастиц 121
вторичная структура 33—37
деацилированные в терминации 268—271
деацилированные в элонгационном цикле 134, 140, 184, 185, 196—198, 202, 203, 207—210
изоакцепторные 29
минорные нуклеозиды 30—33, 37
митохондриальные 29, 158
открытие 28—29
первичная структура 29—30, 223, 246
складывание по типу «клеверного листа» 34—35, 223, 246
специфичность по отношению к аминокислотам 29, 45—46
третичная структура 37—39
узнавание аминоксил-тРНК-синтетазой 48
число видов 28
число на рибосому 121
см. также Аминоацил-тРНК, Амино-

ацил-тРНК-синтетазы, Антикодон, Изоакцепторные тРНК
тРНК-связывающие участки (на рибосоме) — *см.* Аминоацил-тРНК-связывающий участок (А-участок), Пептидил-тРНК-связывающий участок (Р-участок)
Тройственный инициаторный комплекс F-Met-tRNA_F · IF-2 · GTP, прокариотический 228, 231
Met-tRNA_F · eIF-2 · GTP, эукариотический 250, 256, 260—261
Тройственный элонгационный комплекс, Аминоацил-тРНК · EF-T_u(EF-1) · GTP 134, 162—164, 165, 176—178, 179, 182, 185, 203, 268

Уотсон — Криковское спаривание оснований
в кодон-антикодонном комплексе 155, 158—159, 168—169, 222
в мРНК 23
в рибосомной РНК 73, 75—76, 81, 84—85
в тРНК 33—36, 38
между антикодонами тРНК 175
между мРНК и рибосомной РНК 225—226, 227

Фаговые РНК

MS2 20—21, 22, 24, 26, 137, 173, 211, 227, 234—236, 241
Q β 266
R17 24, 26, 241

Факторсвязывающий участок (на рибосоме) 144—147, 166, 198, 228, 268, 269

Факторы инициации прокариотические (IF) 58, 224

IF-1 58, 224, 226, 229—230, 232

IF-2 58, 144, 147—148, 224, 226, 228—233, 267, 271

IF-3 58, 224, 226, 228—229, 231, 232

Факторы инициации эукариотические (eIF) 58, 247—250, 255—263, 284

eIF-1 247—248, 251, 255

eIF-2 144, 247—250, 255—256, 258, 260—263, 284

eIF-2A 247—248

eIF-2B 247—249, 256, 260—261

eIF-3 247—248, 250, 255—256

eIF-4A 247—249, 251, 256

eIF-4B 247—249, 251, 256

eIF-4C 247—248, 251, 255—256

eIF-4D 247—248, 255

eIF-4E 247—249, 251, 256

eIF-4F 247—249, 251, 256, 258

eIF-5 247—248, 255, 256

Факторы терминации (RF) 58, 147, 148, 266—271

Факторы элонгации прокариотические (EF)

EF-G 57–58, 134–135, 138, 144–145, 147–148, 152–153, 166, 198–210, 230, 268, 271
EF-T_s 57–58, 162–163
EF-T_u 57–58, 134–135, 138, 142, 144, 145, 147–148, 161–166, 176–182, 184–185, 201–202, 207, 268, 269, 271

Факторы элонгации эукариотические (еEF)
eF-1 58, 144, 160–161, 162–163, 166, 218, 220, 284

eF-2 58, 144, 198, 213, 215–220, 284

Формилирование инициаторной метионил-тРНК (прокариотической) 224

Формилметионил-тРНК — см. Инициаторная тРНК прокариотическая

Фосфорилирование факторов трансляции
eF-1 220

eF-2 260–263

Фуsidовая кислота 145, 166, 200, 201

Хлорамфеникол (хлоромидетин) 188–190, 268

Цистроны

определение 20

РНК фага MS2 20–21, 234–236

рибосомных белков 237–241, 242

Шайна — Дальгарно последовательность 225–226, 227, 228, 232, 234, 242, 252

Шпильки двуспиральные

в мРНК 24–26

в рибосомных РНК 72–77, 80–84, 114–116, 139, 252–253

в тРНК 34–35

Экзотоксин А *Pseudomonas aeruginosa* — см.

Токсины бактериальные

Электронная микроскопия

рибосомной РНК 86–87, 88–89, 127

рибосомных субчастиц 49, 51, 55, 62–67, 106, 127, 143, 276

см. также Иммунная электронная микроскопия

Элонгационный цикл 134–136

Элонгация, определение 56

Эндоплазматический ретикулум

взаимодействие с растущим пептидом 276, 277–285

взаимодействие с рибосомами 49–52, 274–277, 283–285

локализация ферментов модификации белка 278, 280, 283–284, 286–289

Энергетический баланс биосинтеза белка 59–61, 209–210

Эритромицин 204

Оглавление

3	Предисловие
7	<i>Часть А. ВВОДНАЯ</i>
7	<i>Глава I. Общая схема биосинтеза белка</i>
9	Рекомендуемая литература
9	<i>Глава II. Информационная РНК и генетический код</i>
9	1. Открытие мРНК
11	2. Расшифровка кода
15	3. Некоторые особенности кодового словаря
17	4. Структура мРНК
27	Рекомендуемая литература
28	<i>Глава III. Транспортные РНК и аминоацил-тРНК-синтетазы</i>
28	1. Открытие
29	2. Структура тРНК
39	3. Аминоацил-тРНК-синтетазы
41	4. Аминоацилирование тРНК
45	5. Специфичность аминоацилирования тРНК
48	Рекомендуемая литература
49	<i>Глава IV. Рибосомы и трансляция</i>
49	1. Первые наблюдения
50	2. Локализация рибосом в клетке
52	3. Прокариотический и эукариотический типы рибосом
54	4. Последовательное считывание мРНК рибосомами. Полирибосомы
56	5. Стадии трансляции: инициация, элонгация и терминация
57	6. Бесклеточные системы трансляции
58	Рекомендуемая литература
59	<i>Глава V. Химические реакции и общий энергетический баланс биосинтеза белка</i>
61	Рекомендуемая литература
62	<i>Часть Б. СТРУКТУРА РИБОСОМЫ</i>
62	<i>Глава I. Морфология рибосомы</i>
62	1. Размер, внешний вид и подразделение на две субчастицы
63	2. Детальная форма рибосомных субчастиц
66	3. Объединение субчастиц в целую рибосому

Рекомендуемая литература

Глава II. Рибосомные РНК

1. Значение рибосомной РНК
2. Виды рибосомных РНК
3. Первичные и вторичные структуры
4. Структурные домены и компактная самоукладка молекул РНК

Рекомендуемая литература

Глава III. Рибосомные белки

1. Разнообразие. Номенклатура
2. Первичные структуры
3. Пространственные структуры
4. Белковые комплексы
5. Взаимодействие с рибосомными РНК

Рекомендуемая литература

Глава IV. Взаиморасположение рибосомной РНК и белков (четвертичная структура)

1. Периферическое положение белков на ядре РНК
2. Топография белков
3. Топография РНК
4. Четвертичная структура

Рекомендуемая литература

Глава V. Структурные превращения рибосом (*in vitro*)

1. Диссоциация рибосом на субчастицы
2. Разворачивание субчастиц
3. Разборка и обратная сборка субчастиц

Рекомендуемая литература

Часть В. ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ РИБОСОМЫ

Глава I. Функциональные активности и функциональные участки рибосомы

1. Рабочий цикл рибосомы
2. Функции связывания
3. Каталитические функции
4. Функции перемещений лигандов (транслокация)

Рекомендуемая литература

Глава II. Элонгация: поступление аминоацил-тРНК в рибосому

1. Кодон-антикодонное взаимодействие
2. Участие фактора элонгации (EF-T_p или EF-1) в связывании аминоацил-тРНК
3. «Неэниматическое» (бесфакторное) связывание аминоацил-тРНК
4. Ингибиторы
5. Ложное кодирование
6. Последовательность событий и молекулярные механизмы

Рекомендуемая литература

183	<i>Глава III. Элонгация: транспептидация (образование пептидной связи)</i>
183	1. Химия реакции
187	2. Энергетика реакции
188	3. Ингибиторы
191	4. Стереохимия
195	Рекомендуемая литература
196	<i>Глава IV. Элонгация: транслокация</i>
196	1. Определение и экспериментальные гесты
198	2. Участие фактора элонгации (EF-G или EF-2)
200	3. Роль EF-G-опосредованного гидролиза ГТФ
200	4. Последовательность событий в EF-G-катализируемой транслокации. Ингибиторы
203	5. «Неэнзиматическая» (бесфакторная) транслокация
205	6. Передвижение матрицы при транслокации
206	7. Энергетика транслокации
207	8. Молекулярный механизм транслокации
209	9. Подведение итогов: общий материальный и энергетический баланс элонгационного цикла
210	Рекомендуемая литература
211	<i>Глава V. Элонгация: регуляция</i>
211	1. Неравномерность элонгации
213	2. Избирательная регуляция скорости элонгации на различных мРНК
214	3. Тотальная регуляция скорости элонгации
220	Рекомендуемая литература
221	<i>Глава VI. Инициация трансляции и ее регуляция у прокариот</i>
221	1. Значение инициации трансляции
222	2. Иницирующие кодоны, инициаторная тРНК и белковые факторы инициации
224	3. Состояние рибосомы перед инициацией
225	4. Ассоциация рибосомы с матричным полинуклеотидом
226	5. Последовательность событий в процессе инициации
232	6. Инициация без компонентов инициации
233	7. Регуляция инициации (регуляция синтеза белка на уровне трансляции)
243	Рекомендуемая литература
244	<i>Глава VII. Инициация трансляции и ее регуляция у эукариот</i>
244	1. Особенности эукариотической мРНК
246	2. Иницирующий кодон, инициаторная тРНК и белковые факторы инициации
249	3. Состояние рибосом перед инициацией
250	4. Образование комплекса рибосомной 40S субчастицы с инициаторной тРНК
250	5. Ассоциация рибосомной 40S субчастицы с мРНК
253	6. Узнавание иницирующего кодона
255	7. Образование иницирующего рибосомного 80S комплекса
255	8. Регуляция инициации
263	Рекомендуемая литература

265	<i>Глава VIII. Терминация трансляции</i>
265	1. Кодоны терминации
266	2. Белковые факторы терминации
268	3. Рибосомный участок связывания факторов терминации
268	4. Гидролиз пептидил-тРНК
269	5. Последовательность событий в процессе терминации
271	Рекомендуемая литература
272	<i>Глава IX. Ко-трансляционное сворачивание, компартментализация и модификация белка</i>
272	1. Вклад рибосомы в сворачивание белка
274	2. Взаимодействие рибосомы и растущего пептида с мембраной. Ко-трансляционный трансмембранный транспорт
285	3. Ко-трансляционные модификации белка
289	Рекомендуемая литература
291	Предметный указатель

*Учебное
издание*

*Александр
Сергеевич
Спирин*

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ
БИОЛОГИЯ.**

**Структура
рибосомы
и биосинтез
белка**

Заведующий редакцией А. Г. Гаврилов. Редактор М. М. Пенкина. Младшие редакторы И. М. Павлова и Е. И. Попова. Художник В. Н. Хомяков. Художественный редактор Т. А. Коленкова. Технический редактор Э. М. Чижевский. Корректор Т. И. Виталева

ИБ № 5824

Изд. № Е-468. Сдано в набор 14.03.86. Подп. в печать 21.08.86. Т-18708. Формат 60×90/16. Бум. офс. № 1. Гарнитура литературная. Печать офсетная. Объем 19 усл. печ. л. + 0,5 усл. п. л. цв. вкладка. 21 усл. кр.-отт. Уч. изд. л. 21,44 + 0,3 уч. изд. л. цв. вкладка. Тираж 8 000 экз. Зак. № 916. Цена 1 р. 20 к.

Издательство «Высшая школа», 101430, Москва, ГСП-4, Неглинная ул., д. 29/14.
Ярославский полиграфкомбинат Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли. 150014, Ярославль, ул. Свободы, 97.
