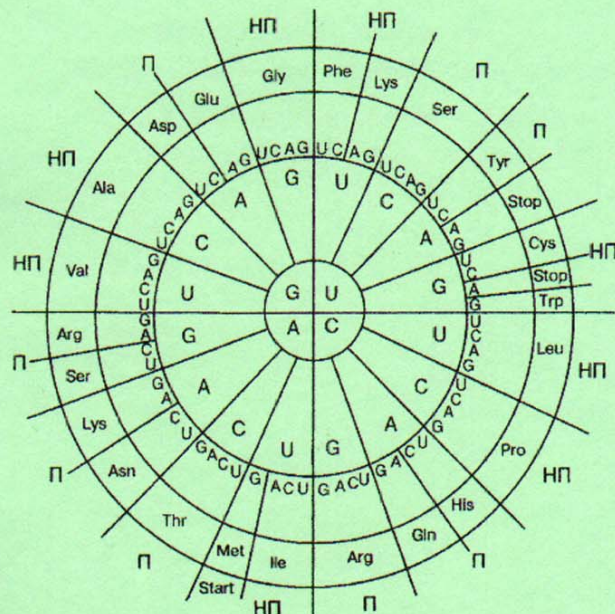


МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ УКРАИНЫ  
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
"Харьковский политехнический институт"

А.Н. Огурцов

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ  
*ОСНОВНЫЕ*  
*МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ*  
*МЕХАНИЗМЫ*



Харьков 2007

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ УКРАИНЫ  
Национальный технический университет  
"Харьковский политехнический институт"

А.Н. Огурцов

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ.  
ОСНОВНЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ  
ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ

Конспект лекций по курсу  
"Клеточная и молекулярная биология"

для студентов специальности 092901  
"Промышленная биотехнология"

Утверждено  
редакционно-издательским  
советом университета,  
протокол № 1 от 30.03.2007 г.

Харьков НТУ "ХПИ" 2007

ББК 28.070  
О 39  
УДК 576.32

Рецензенты:

*Е.М. Климова*, д-р биол. наук, профессор, Институт общей и неотложной хирургии АМН Украины,

*Р.Д. Сытник*, д-р техн. наук, профессор, НТУ "ХПИ".

Конспект лекцій містить основні поняття та уявлення теорії молекулярних механізмів генетичних процесів клітини, викладені основні етапи транскрипції, реплікації, репарації ДНК та біосинтезу білків у ході трансляції, розглянуті питання контролю експресії генів, особливості генетичного коду, специфіка молекулярної будови та функціонування вірусів.

Призначений для студентів спеціальностей біотехнологічного профілю, а також усім, хто вивчає молекулярну біологію або цікавиться її проблемами.

**Огурцов А.Н.**

О 39 Молекулярная биология клетки. Основные молекулярные генетические механизмы: Конспект лекций / А.Н. Огурцов. – Харьков: НТУ "ХПИ", 2007. – 120 с.

Конспект лекцій включає основні поняття і представлення теорії молекулярних механізмів генетичних процесів клітки, изложены основные этапы транскрипции, репликации, репарации ДНК и биосинтеза белков в ходе трансляции, рассмотрены вопросы контроля генной экспрессии, особенности генетического кода, специфика молекулярного строения и функционирования вирусов.

Предназначен для студентов специальности биотехнологического профиля, а также всем, кто изучает молекулярную биологию или интересуется ее проблемами.

Ил. 62. Табл. 3. Библиогр.: 10 назв.

ББК 28.070

© А.Н. Огурцов, 2007 г.

## ВСТУПЛЕНИЕ

Предметом учебной дисциплины "Клеточная и молекулярная биология" являются биофизические и биохимические механизмы процессов в живой клетке. Курс "Клеточная и молекулярная биология" состоит из *трех разделов*: основы клеточной организации, основные молекулярные генетические механизмы, и молекулярные основы генных технологий.

Методическими основами курса являются лекции, в которых излагаются основные положения каждого раздела, практические занятия и самостоятельная работа студентов, которая является основным способом усвоения материала в свободное от аудиторных занятий время.

Для самостоятельной работы выделяется больше половины общего объема времени, предназначенного для изучения данной дисциплины. Самостоятельная работа проводится по всем темам, которые входят в дисциплину. В процессе самостоятельной работы студент учится самостоятельно приобретать знания, которые затем используются в ходе практических занятий, при подготовке к выполнению контрольных работ и к экзамену.

На дисциплину выделяется 216 учебных часов. Из них аудиторные занятия занимают 75 часов, в том числе лекции – 45 часов, практические занятия – 30 часов. На самостоятельную работу студентов выделяется 141 час. На раздел "*Основные молекулярно-генетические механизмы*" выделяется 14 часов лекций и 10 часов практических занятий.

Настоящее пособие является продолжением конспекта лекций [1], в нем продолжается начатая в [1] нумерация лекций. Пособие подготовлено на основе работ [1–10], послуживших также источником иллюстраций, таким образом, чтобы максимально облегчить студентам специальности 092901 "Промышленная биотехнология" усвоение раздела "Основные молекулярно-генетические механизмы" курса "Клеточная и молекулярная биология". В каждой лекции выделяются основные вопросы, излагаются основные положения, приведены вопросы для самоконтроля.

## Лекция 10. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

### ПЛАН ЛЕКЦИИ:

1. Четыре основных генетических процесса.
2. Специфика ДНК.
3. Сверхспирализация ДНК.
4. Конформации РНК.

#### ЧЕТЫРЕ ОСНОВНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССА

Огромное разнообразие белков как молекулярных машин и регуляторов метаболических процессов в любом организме запрограммировано той генетической информацией, которая хранится, передается из поколения в поколение, считывается и реализуется в конкретные клеточные структуры с помощью *нуклеиновых кислот*.

*Макромолекулы нуклеиновых кислот* (1) содержат информацию, определяющую последовательность аминокислот и, следовательно, структуру и функции всех белков в клетке, (2) являются частью клеточной "фабрики" в которой отбираются и выстраиваются в необходимой, "правильной", последовательности аминокислоты в процессе синтеза полипептидных цепей, (3) катализируют необходимые в процессе биосинтеза белков химические реакции, включая образование пептидных связей между аминокислотами.

ДНК содержит всю информацию, необходимую для синтеза клеток и тканей организма.

**Точность копирования** этой информации – гарантия генетического наследования и правильного развития любого организма.

Информация, записанная в ДНК хранится в виде смысловых единиц, которые называются *генами*.

В процессе *транскрипции* информация с гена копируется в РНК.

РНК выполняют *три различные функции* в процессе синтеза белков.

РНК первого типа – *информационная* или *матричная РНК*, мРНК (*mRNA – messenger RNA*) переносит от ДНК "технологические инструкции", которые задают однозначный порядок аминокислот в ходе белкового синтеза.

Процесс собирания аминокислотной цепочки на основе этих инструкций называется *трансляцией* мРНК.

В процессе трансляции информация мРНК считывается и обрабатывается рибонуклеиновыми кислотами *второго* типа, которые называются *транспортными РНК*, тРНК (*tRNA – transfer RNA*) с помощью рибонуклеиновых кислот *третьего* типа, *рибосомных РНК*, рРНК (*rRNA – ribosomal RNA*) и связанных с ними рибосомными белками. Как только "правильная" аминокислота оказывается доставленной к месту синтеза соответствующей тРНК, *рибосома катализирует* присоединение этой аминокислоты к белковой цепи, то есть катализирует образование пептидной связи.

Открытие в 1953 году структуры ДНК и дальнейшее исследование молекулярных генетических механизмов того, каким образом ДНК управляет синтезом РНК, а та, в свою очередь, направляет синтез белка, позволило сформулировать так называемую *основную догму молекулярной биологии*:

Перенос генетической информации идет в направлении

**ДНК → РНК → белок.**

Однако сразу же заметим, что при всей значимости, основная догма молекулярной биологии *не отражает* действительную роль белков в

процессе биосинтеза нуклеиновых кислот, и их роли в управлении генной экспрессией. Кроме того, в 1970 году было открыто явление обратной транскрипции у ретровирусов (см. рисунок 16.11) и обнаружен фермент **обратная транскриптаза**, который катализирует процесс синтеза ДНК по молекуле РНК, иными словами, перенос генетической информации идет в направлении РНК → ДНК. Подробнее это **отклонение** от основной догмы молекулярной биологии и использование явления обратной транскрипции в генной инженерии будет рассмотрено в заключительных частях курса.

На рисунке 10.1 показаны **четыре основных генетических процесса**: (1) транскрипция, (2) процессинг РНК, (3) трансляция РНК и (4) репликация ДНК, рассмотрению которых будет посвящен данный раздел курса. Кроме того, будут также рассмотрены процессы с участием вирусов, поскольку вирусы паразитируют на генетических механизмах клетки.

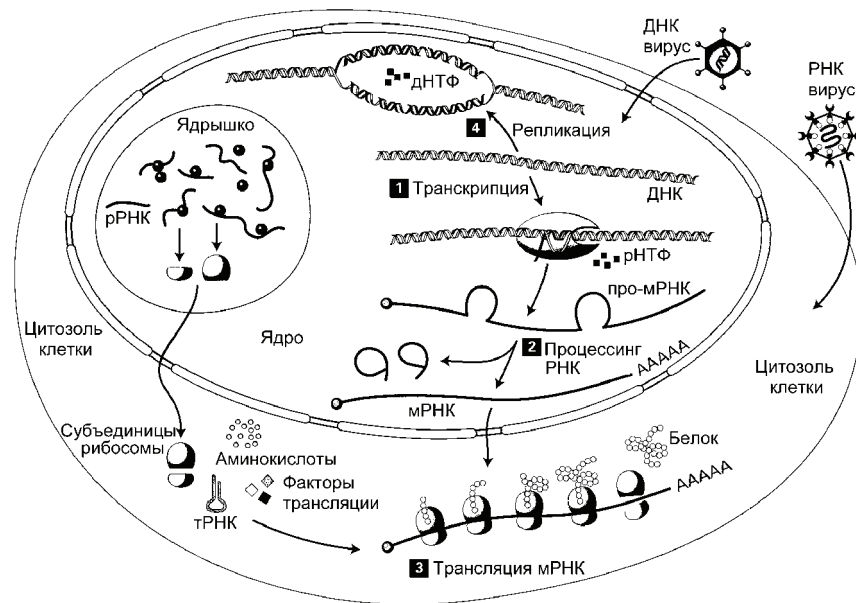


Рисунок 10.1 – Обобщенная схема четырех основных молекулярных генетических процессов

Последовательность процессов (1 → 2 → 3) как раз и иллюстрирует основную догму молекулярной биологии.

В ходе **транскрипции** гена (процесс 1), которую осуществляет **РНК-полимераза** в ядре клетки, генетический код **переносится** (копируется, транскрибируется) на про-РНК (первичный транскрипт, прообраз матричной РНК или предшественница функциональной мРНК) (*precursor messenger RNA*, pre-mRNA) посредством полимеризации мономеров рибонуклеозид трифосфатов, рНТФ (*ribonucleoside triphosphate monomers*, rNTP).

Удаление "лишних" последовательностей и некоторые другие модификации про-мРНК, которые в совокупности называются **процессингом мРНК** (процесс 2 на рисунке 10.1), образуют функциональную мРНК, которая транспортируется в цитоплазму клетки.

В процессе **трансляции** (процесс 3 на рисунке 10.1) на рибосоме код мРНК, записанный с помощью четырех нуклеиновых оснований (см. рисунок 6.7) декодируется в аминокислотную последовательность белков – происходит **перевод** информации с четырехбуквенного языка нуклеиновых кислот на двадцатибуквенный язык белков, поэтому такой процесс перевода с одного языка на другой и носит название **трансляция**.

**Рибосомы** собираются из двух субъединиц, которые, в свою очередь, синтезируются из рРНК и рибосомных белков в ядрышке. После выхода в цитоплазму рибосомные субъединицы присоединяются к мРНК и осуществляют синтез белка при помощи тРНК и различных **факторов трансляции**.

В ходе репликации ДНК (процесс 4 на рисунке 10.1), которая происходит только в готовой к делению клетке, происходит полимеризация дезоксирибонуклеозид трифосфатных мономеров, дНТФ (*deoxynucleotide triphosphate monomers*, dNTP), в результате чего в ядре образуется две идентичные копии каждой хромосомной молекулы ДНК. Каждая из дочерних клеток получает одну из этих идентичных копий.

### СПЕЦИФИКА ДНК

Нуклеиновые кислоты представляют собой полимеры из нуклеотидов, формирующих сахарофосфатный остов с чередующимися



четырьмя нуклеиновыми основаниями: А,Т,С,Г в ДНК и А,У,С,Г в РНК (рисунок 10.2).

ДНК представляет собой двойную спираль, состоящую из двух правых спиралей, соединенных водородными связями между комплементарными парами оснований А=Т, С≡Г.

Основной формой ДНК является В-форма, однако встречаются и А-форма, особенно в случае образования РНК-ДНК и РНК-РНК двойных спиралей, а также Z-форма, которую имеют некоторые короткие молекулы ДНК. Функция Z-формы в клетке пока не выяснена. И, наконец, синтетические полимеры поли-А и поли-У могут образовывать тройные спирали.

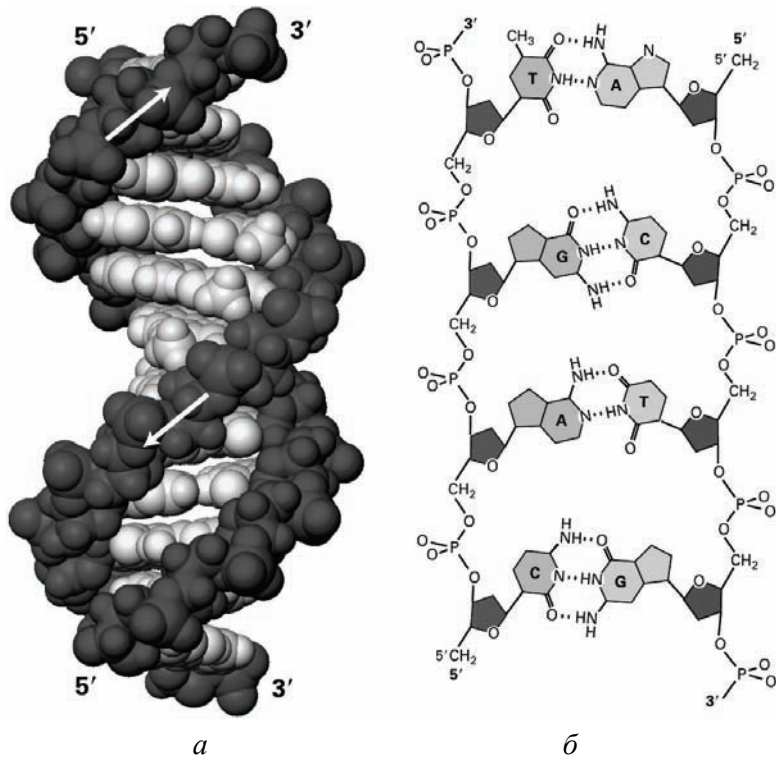


Рисунок 10.2 – Схема строения ДНК: а – ван-дер-ваальсовая модель, б – схема химических связей в ДНК

Основная В-форма ДНК, несмотря на достаточно высокую стабильность структуры, обеспечиваемую множественными водородными и гидрофобными взаимодействиями, обладает **значительной гибкостью**.

Это свойство обеспечивает необходимую модификацию структуры ДНК при связывании белков со специфическими участками ДНК. В ДНК, в отличие от белковых α-спиралей, **нет водородных связей, параллельных основной оси**. Это свойство позволяет молекуле ДНК **изгибаться** при объединении с белками, управляющими эволюцией ДНК (рисунок 10.3).

Высокая гибкость ДНК обеспечивает **плотную упаковку** ДНК в нуклеосомы **хроматина** – ДНК-белкового комплекса, из которого формируются хромосомы эукариот. В ходе процессов **репликации** и **транскрипции** ДНК две спирали двойной спирали должны **разъединяться** с тем, чтобы позволить "внутренним" краям оснований **спариваться** с соответствующими комплементарными основаниями, формируя новую полинуклеотидную цепь.

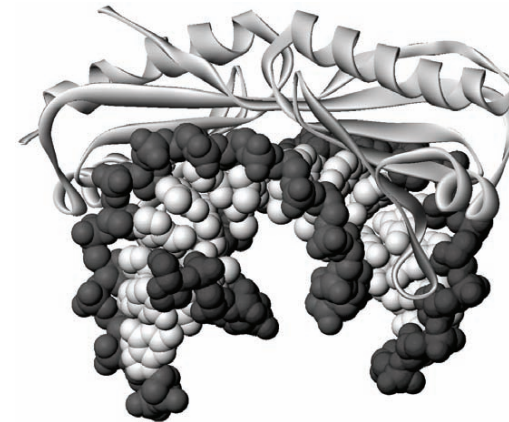


Рисунок 10.3 – Изгиб ДНК при связывании с С-доменом ТАТА-связывающего белка (TATA box-binding protein (TBP))

Процесс раскручивания двойной спирали и разъединения двух спиралей называется **денатурацией** (или плавлением) ДНК.

Денатурация может быть *индуцирована искусственно in vitro нагреванием* раствора, содержащего ДНК. При *повышении температуры* усиливается тепловое движение в молекулах и разрушаются слабые нековалентные связи, которые формируют двойную спираль. Спирали разъединяются и расходятся вследствие *электростатического отталкивания* между отрицательно заряженными сахарофосфатными остовами. Вблизи температуры денатурации небольшое увеличение температуры раствора вызывает резкое, практически одновременное, разрушение множественных слабых нековалентных взаимодействий (которые удерживают двойную спираль) вдоль всей длины ДНК, что проявляется в резком изменении ультрафиолетового поглощения раствором (рисунок 10.4(а)).

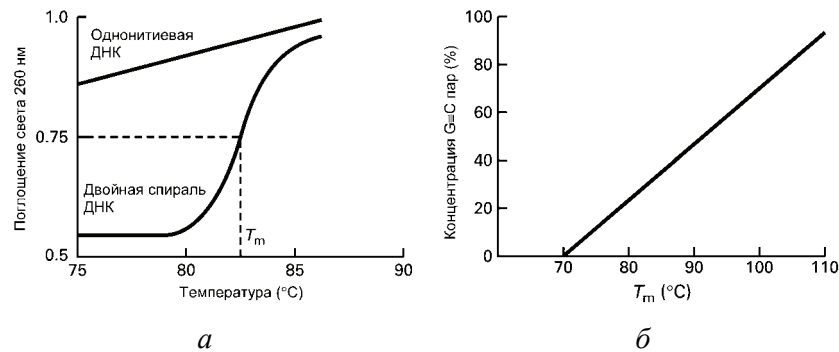


Рисунок 10.4 – Температура денатурации ДНК: а – поглощение ультрафиолета, б – зависимость концентрации G≡C пар от  $T_m$

Температура плавления,  $T_m$ , при которой разъединяются две спирали ДНК, определяется несколькими факторами.

Молекулы, которые содержат *большее количество C≡G пар* плавятся при более высокой температуре, поскольку пары C≡G, имеющие *три* водородные связи, более стабильны, чем пары A=T, в которых только *две* водородные связи. Таким образом, по температуре плавления можно оценить концентрацию C≡G пар (рисунок 10.4(б)).

*Концентрация ионов* в растворе также влияет на  $T_m$ , поскольку отрицательно заряженные фосфатные группы обеих спиралей экранированы положительными ионами. Если *снизить концентрацию положительных ионов* в растворе, то уменьшается и степень экранирования. Это увеличивает силы отталкивания между сахарофосфатными остовами и снижает  $T_m$ .

Наконец, резкое *изменение рН* денатурирует ДНК даже при низких температурах. При *низких* значениях рН (кислая среда) нуклеиновые основания протонируются и, следовательно, приобретают положительный заряд, отталкивая друг друга. При *высоких* значениях рН (щелочная среда) основания теряют протоны, становятся отрицательно заряженными и опять-таки отталкиваются друг от друга.

*Одноцепочечные молекулы ДНК*, которые получаются в результате денатурации, образуют случайным образом сформированные *клубки* без определенной структуры.

Понижение температуры, увеличение ионной концентрации или нейтрализация рН вызывают самопроизвольную *ренатурацию* (или "отжиг") двух цепей ДНК в двойную спираль.

При этом, однако, *важно*, что две *некомплементарные* цепи ДНК *не ренатурируют*, а остаются в виде хаотичных клубков. Еще более важно, что они не мешают двум комплементарным цепям ДНК найти друг друга в растворе и ренатурировать.

Процессы денатурации и ренатурации (плавления и отжига) ДНК являются основами *гибридизации ДНК* – методики, которая используется для определения взаимного соответствия двух ДНК-образцов и для детектирования и изолирования специфических молекул ДНК в растворе, содержащем различные ДНК последовательности.

#### СВЕРХСПИРАЛИЗАЦИЯ ДНК

Многие ДНК прокариот являются кольцевыми (циклическими). Кольцевые ДНК также наблюдаются в митохондриях и хлоропластах эукариот.

Каждая из двух цепей кольцевой молекулы ДНК образует замкнутую цепь без свободных концов.

Локальное расплетание двойной спирали ДНК, которое происходит в ходе репликации ДНК, индуцирует *торсионное напряжение* в оставшейся части молекулы, поскольку в ней отсутствуют свободные концы, которые могли бы, свободно вращаясь, снять напряжение.

В результате кольцевая молекула скручивается, принимая *сверхспиральную* форму (рисунок 10.5(а)).

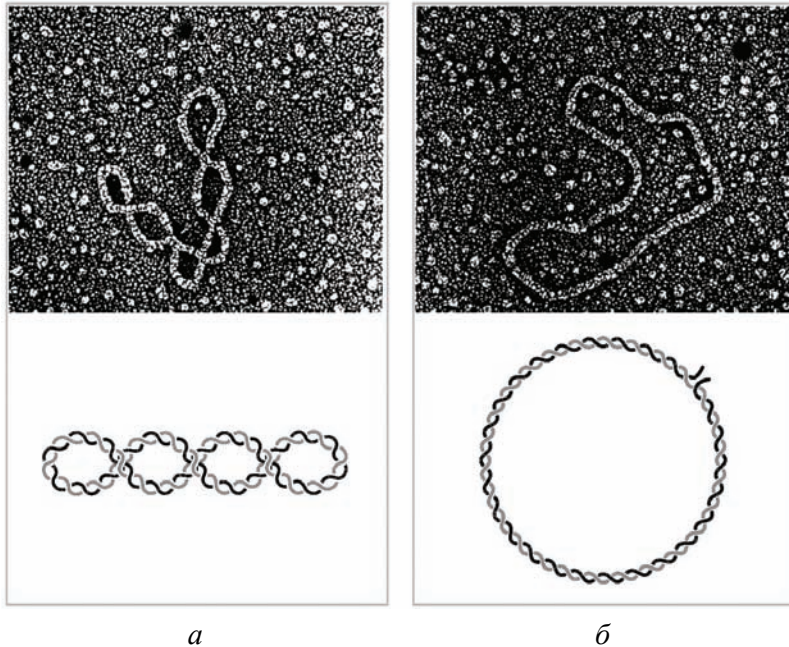


Рисунок 10.5 – Кольцевые ДНК: *а* – сверхспирализованная кольцевая ковалентно замкнутая ДНК, *б* – релаксация кольцевой ДНК при разрезании одной из нитей топоизомеразой, которая затем восстанавливает замкнутость нити

Другими словами, когда часть ДНК расплетена, другая часть оказывается сверхспирализована. Фермент *топоизомераза I*, который содержится в клетках, снимает подобные напряжения, которые возникают в кольцевых ДНК при репликации или других процессах. Топоизомераза I связывается с ДНК, разрезает одну из фосфодиэфирных связей (что

позволяет сверхспирализованной "скрученной" молекуле "раскрутиться"), восстанавливая релаксированную кольцевую форму (рисунок 10.5(б)), а затем "сшивает" разорванную цепь.

Другой фермент *топоизомераза II* (другое название, *ДНК-гираза*), разрезает сразу две цепи кольцевой ДНК, а затем восстанавливает их. В результате топоизомераза II может как удалять сверхспирализацию, так и объединять две пересекающиеся кольцевые ДНК в одну в точке их пересечения.

С функциональной точки зрения важно, что сверхспирализованная ДНК обладает значительным *запасом энергии* по сравнению с ее релаксированной формой. Этот запас энергии является "сигналом" для связывания с ней некоторых белков (например, топоизомераз).

Хотя ДНК *эукариот* не имеет кольцевой формы, но при конденсации ДНК в хромосому происходит образование петель и спирализация хроматина. Поэтому в процессе деконденсации хроматина, репликации и транскрипции ДНК также происходит образование торсионных напряжений и образования сверхспиралей. Наличие *топоизомеразы I* в ядре эукариот позволяет устранять такие торсионные напряжения.

### КОНФОРМАЦИИ РНК

Первичная структура РНК подобна ДНК. Два важных отличия: (1) наличие *гидроксильной группы* в рибозе в позиции 2' (рисунок 10.6) и (2) нуклеиновое основание *урацил* вместо тимина в ДНК.

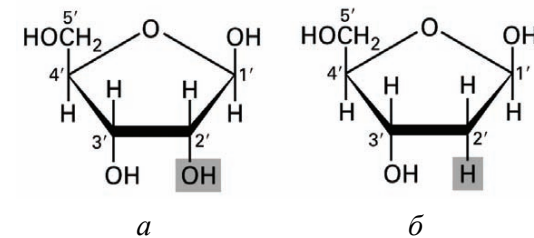


Рисунок 10.6 – Пентозы рибонуклеиновых кислот: *а* – D-рибоза, *б* – 2-дезоксид-рибоза

Гидроксильная группа в рибозе делает РНК более химически лабильной (реакционноспособной) по сравнению с ДНК, и обеспечивает ОН-группу, необходимую в реакциях, катализируемых РНК. В результате этой лабильности РНК, в отличие от ДНК, распадается на мононуклеотиды в щелочном растворе. Так же как и ДНК, РНК представляет собой полинуклеотид, который может образовывать одиночную спираль, двойную спираль, иметь *линейную* или *кольцевую* форму.

Возможны также *гибридные* РНК-ДНК двойные спирали.

В отличие от ДНК большинство клеточных РНК имеет одноцепочечную форму, разнообразные элементы *вторичной структуры* которой (рисунок 10.7) обеспечивают выполнение специфических функций.

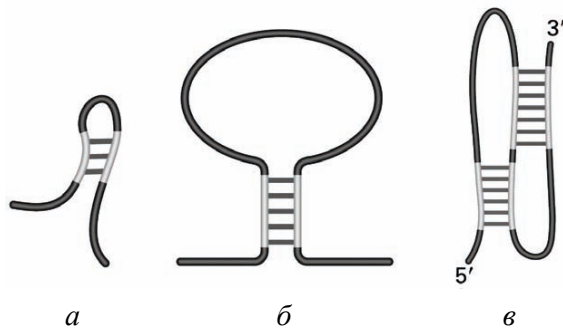


Рисунок 10.7 – Элементы вторичной структуры РНК: *а* – шпилька, *б* – петля, *в* – псевдоузел

*Простейшие* вторичные структуры образуются, так же как и в случае ДНК, спариванием комплементарных оснований. *Шпильки* (*hairpins*) образуются спариванием участков РНК отстоящих друг от друга на 5–10 нуклеотидов. Если расстояние между спаривающимися участками *более 10* нуклеотидов (до 100), то такие структуры называют *петлями* (*stem-loops*). Эти простые образования могут кооперироваться, образуя более сложные третичные структуры, одна из которых называется *псевдоузел* (*pseudoknot*).

Таким образом, *именно спаривание оснований* является фундаментальным процессом, обеспечивающим функциональные особенности как ДНК, так и РНК.

Ниже мы подробно рассмотрим особенности вторичной и третичной структуры тРНК, рРНК и мРНК, которые обеспечивает их функциональное различие и взаимодействие в процессе биосинтеза белка.

Необходимо отметить, что молекулы РНК, подобно белковым молекулам, имеют *доменную структуру*. Более структурированные и жесткие домены связаны между собой менее структурированными (и более гибкими) участками.

Доменная структура РНК – это не просто аналог  $\alpha$ - и  $\beta$ -структур в белковых молекулах. В некоторых случаях доменная структура обеспечивает *каталитическую активность* РНК. Такие каталитические РНК называются *рибозимами*. Хотя рибозимы обычно образуют ассоциаты с белками, которые стабилизируют их структуру, именно РНК являются катализаторами.

Некоторые рибозимы катализируют *сплайсинг* РНК, при котором определенные внутренние участки РНК вырезаются и удаляются, а оставшиеся части РНК сшиваются в единую нить. Этот процесс происходит в ходе формирования большинства функциональных мРНК в эукариотических клетках. Сплайсинг также обнаружен и в клетках прокариот. Примечательно, что некоторые РНК способны к *самосплайсингу* (*self-splicing*).

*Рибосомные* рРНК выполняют *каталитическую* функцию при образовании *пептидной* связи в ходе синтеза белков.

#### ВЫВОДЫ

✓ ДНК является *носителем* информации, которая определяет аминокислотную последовательность белков. Эта информация переписывается в *несколько* типов РНК, включающих матричную мРНК, транспортную тРНК и рибосомную рРНК, которые и осуществляют синтез белков.



✓ ДНК и РНК представляют собой длинные **неразветвленные полимеры** нуклеотидов, которые состоят из фосфорилированной пентозы, связанной с органическим основанием либо пурином, либо пиримидином.

✓ **Пурины** аденин и гуанин, и **пиримидин** цитозин входят в состав и ДНК, и РНК. Пиримидин **тимин**, входящий в состав ДНК, заменяется в РНК на пиримидин **урацил**.

✓ Соседние нуклеотиды в нуклеиновых кислотах связаны **фосфодиэфирными связями**. Полинуклеотидная цепь имеет химическую **направленность**: 5'-конец со свободной фосфатной группой на 5'-углероде пентозы, и 3'-конец со свободной гидроксильной группой на 3'-углероде пентозы.

✓ Природная ДНК (В-форма) состоит из **двух** комплементарных антипараллельных полинуклеотидных цепей, свернутых в **двойную спираль**, нуклеиновыми основаниями внутрь и двумя сахарофосфатными остовами наружу. Водородные связи между комплементарными парами оснований между полинуклеотидными цепями и гидрофобные взаимодействия между соседними нуклеиновыми основаниями внутри одной цепи **стабилизируют** эту структуру.

✓ Основания в нуклеиновых кислотах взаимодействуют, образуя водородные связи. Стандартные **уотсон-криковские пары**: G≡C, A=T (в ДНК) и A=U (в РНК). Спаривание оснований стабилизирует трехмерную структуру ДНК и РНК.

✓ **Связывание** с ДНК **белков** может деформировать структуру двойной спирали, вызывая локальные изгибы и расплетание молекулы ДНК.

✓ Нагревание расплетает двойную спираль ДНК на две одиночные нити (**денатурация**). Температура плавления ДНК,  $T_m$ , возрастает с ростом концентрации G≡C пар. При благоприятных условиях отдельные комплементарные полинуклеотидные цепи **ренатурируют**.

✓ **Кольцевые** молекулы ДНК могут быть скручены, образуя **сверхспиральную** форму. Ферменты **топоизомеразы** ликвидируют торсионные напряжения и устраняют сверхспирализацию ДНК.

✓ **РНК** клетки представляют собой **одноцепочечные** полинуклеотиды, некоторые из которых имеют четко определенную вторичную и

третичную структуру. Некоторые РНК, называемые **рибозимами**, обладают каталитической активностью.

#### ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Перечислите и охарактеризуйте четыре основных генетических процесса.
2. Как влияет на денатурацию ДНК кислотность среды?
3. Что такое сверхспирализация ДНК и какие ферменты устраняют сверхспирализацию ДНК?
4. Перечислите простейшие элементы вторичной структуры РНК.

### Лекция 11. ТРАНСКРИПЦИЯ ДНК

#### ПЛАН ЛЕКЦИИ:

1. Полимеризация рибонуклеотидов РНК-полимеразами.
2. Стадии транскрипции.
3. Организация генов прокариот и эукариот.
4. Процессинг РНК эукариот.
5. Альтернативный сплайсинг.

#### ПОЛИМЕРИЗАЦИЯ РИБОНУКЛЕОТИДОВ РНК-ПОЛИМЕРАЗОЙ

**Ген** – это участок ДНК, который содержит информацию, определяющую синтез одной полипептидной цепи или функциональной РНК (такой, как тРНК).

Абсолютное большинство генов несут информацию о строении белковых молекул и РНК-копии таких белок-кодирующих генов и представляют собой матричные РНК (мРНК). ДНК-молекулы вирусов содержат всего несколько генов, в то время как ДНК-молекула хромосомы эукариот может содержать несколько десятков тысяч генов.

В ходе синтеза РНК четырехбуквенный (A,G,C,T)-"язык" ДНК, просто копируется или осуществляется **транскрипция** (*transcription* – переписывание) в четырехбуквенный (A,G,C,U)-"язык" РНК, в котором тимин заменен урацилом (рисунок 11.1).

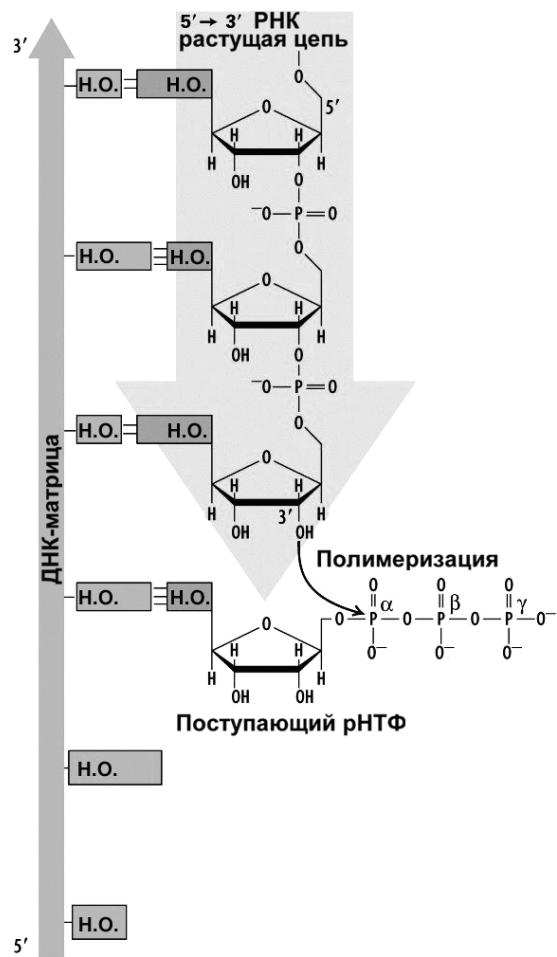


Рисунок 11.1 – Полимеризация рибонуклеотидов РНК-полимеразой в ходе транскрипции. Н.О. – нуклеиновые основания, рНТФ – рибонуклеозидтрифосфат

В отличие от **транскрипции**, при биосинтезе белка (**трансляция**) четырехбуквенный "язык" ДНК и РНК переводится (транслируется) в 20-символьный аминокислотный язык белков.

В ходе транскрипции одна из цепей ДНК выполняет функцию матрицы, определяющей порядок, в котором мономеры рНТФ,

**рибонуклеозидтрифосфаты**, полимеризуются, образуя комплементарную ДНК-матрице нить РНК. Основания ДНК-матрицы спариваются с комплементарными рНТФ, которые затем присоединяются к РНК-полинуклеотидной цепи в результате реакции полимеризации, катализируемой ферментом **РНК-полимераза**.

**Полимеризация** включает в себя нуклеофильную атаку 3'-кислорода растущей цепи РНК на  $\alpha$ -фосфат следующего нуклеотида, который должен быть присоединен к цепи, и который уже спарен со следующим основанием ДНК-матрицы (рисунок 11.1). В результате образуется фосфодиэфирная связь и высвобождается **пирофосфат** ( $PP_i$ ). Следствием этой реакции является то, что молекула РНК **всегда синтезируется в направлении 5'→3'**.

Добавление очередного рибонуклеотида к растущей молекуле РНК энергетически выгодно, поскольку высокоэнергетичная связь между  $\alpha$  и  $\beta$  фосфатами рНТФ-мономера заменяется низкоэнергетичной фосфодиэфирной связью между рибонуклеотидами.

Химическое равновесие в реакции полимеризации сдвигается в сторону дальнейшего наращивания цепи наличием в клетке **пирофосфатазы**, фермента, который катализирует расщепление пирофосфата на две молекулы неорганического фосфата.

Подобно двойной спирали ДНК, матричная нить ДНК и комплементарная ей растущая нить РНК имеют **противоположные 5'→3'** направления.

**Принято нумеровать** положения нуклеиновых оснований матричной нити ДНК, по которым идет синтез молекулы РНК, следующим образом. То нуклеиновое основание, **с которого начинается** полимеризация РНК (**стартовая точка** транскрипции), обозначают (+1).

Положительным считается направление, в котором идет наращивание цепи РНК, а отрицательным – обратное направление. Соответственно, нумерация нуклеотидов от стартовой позиции (+1) в положительном направлении (еще говорят "вниз") идет со знаком (+), а в противоположном направлении ("вверх") со знаком (-).

## СТАДИИ ТРАНСКРИПЦИИ

Процесс транскрипции может быть представлен в виде последовательности стадий, на которых РНК-полимераза выполняет различные операции (рисунок 11.2).

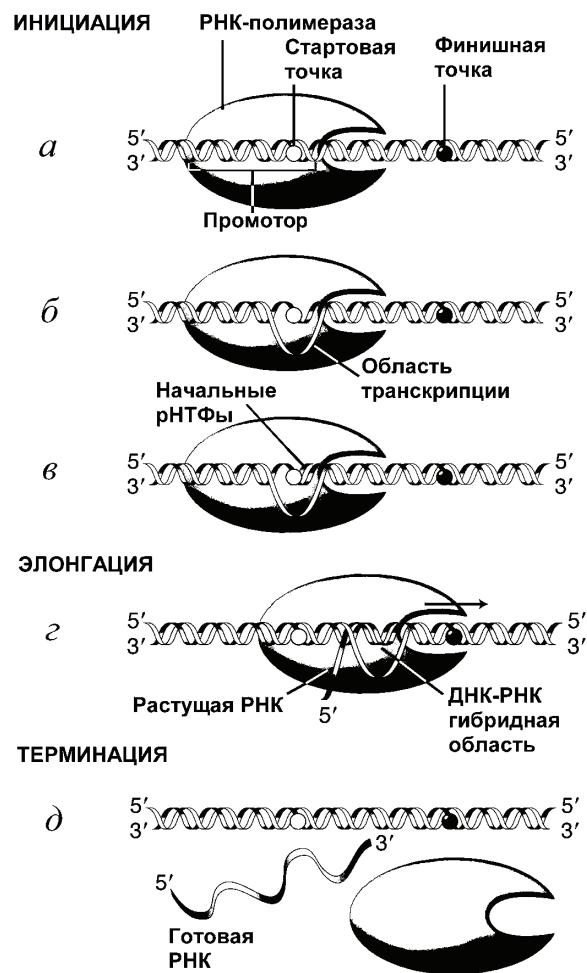


Рисунок 11.2 – Стадии транскрипции: а, б, в – инициация, г – элонгация, д – терминация

В ходе **инициации** транскрипции РНК-полимераза распознает **промотор** – специфическую последовательность пар нуклеотидов в двойной спирали ДНК – и связывается с ним (рисунок 11.2(а)).

Для нахождения промотора и инициации трансляции ядерной РНК-полимеразой необходимо присутствие специфических белков, которые называются **факторы транскрипции**. После связывания с промотором РНК-полимераза расплетает ("плавит") ДНК для того, чтобы освободить нуклеиновые основания матричной цепи ДНК для спаривания с рНТФ (рисунок 11.2(б)). Всего РНК-полимераза "плавит" приблизительно **14 пар** оснований ДНК вокруг **стартовой точки** транскрипции.

Первый рибонуклеотид входит в состав цепи, сохраняя свою трифосфатную группу, а последующие присоединяются к 3'-ОН-группе предыдущего с освобождением пиродифосфата (рисунок 11.2(в)).

На стадии инициации РНК-продукт связан с матрицей и РНК-полимеразой **непрочно** и с высокой вероятностью может освобождаться из комплекса. В этом случае РНК-полимераза, не покидая промотора, снова иницирует синтез РНК.

Такой синтез ди-, три- и более длинных олигонуклеотидов называют **абортивной инициацией**, в противоположность **продуктивной инициации**, при которой происходит образование полноценного РНК-продукта.

Когда РНК-продукт достигает **критической** длины (от 3 до 9 нуклеотидов на разных промоторах), abortивная инициация полностью прекращается, транскрибирующий комплекс стабилизируется и уже не распадается до тех пор, пока синтез РНК не будет доведен до конца, а РНК-полимераза **диссоциирует с промотора** и начинает движение вдоль матричной ДНК. Этот момент считается концом инициации и началом **элонгации**.

**На стадии элонгации** РНК-полимераза перемещается по ДНК пошагово, на один нуклеотид за один шаг, расплетая спираль ДНК впереди по направлению движения, и восстанавливая двойную спираль ДНК сзади (рисунок 11.2(г)). За один шаг один рибонуклеотид присоединяется к 3'-концу растущей (*nascent*) нити РНК. РНК-полимераза поддерживает в расплетенном состоянии **область транскрипции** (*transcription bubble*) – часть ДНК длиной приблизительно 14 пар

оснований. **Примерно 8 нуклеотидов** на 3'-конце растущей РНК остаются спаренными с нуклеотидами матричной цепи ДНК в области транскрипции, образуя *ДНК-РНК гибридную область*.

Элонгационный комплекс, состоящий из РНК-полимеразы, матричной ДНК и растущей цепи РНК обладает **чрезвычайной стабильностью**. Для примера, РНК-полимераза транскрибирует за одну транскрипцию (без диссоциации с ДНК и освобождения растущей РНК) один из самых длинных из известных генов млекопитающих, состоящий из  $2 \times 10^6$  пар оснований. Поскольку синтез РНК происходит со средней скоростью 1000 нуклеотидов в минуту при  $37^\circ\text{C}$ , элонгационный комплекс должен оставаться функциональным более чем 24 часа, чтобы завершить транскрипцию.

Последний этап транскрипции – **терминация**, – при котором синтезированная РНК, или **первичный транскрипт** (*primary transcript*), освобождается от РНК-полимеразы, а сама полимеразы диссоциирует с матричной ДНК (рисунок 11.2(д)).

Определенная последовательность пар нуклеотидов ДНК – **терминатор** – сигнализирует полимеразе об окончании транскрипции. Освобожденная полимеразы может сразу же приступить к транскрипции этого же или другого гена.

РНК-полимеразы прокариот и эукариот организованы **подобным** образом. Они состоят из **двух** относительно больших субъединиц ( $\beta'$  и  $\beta$ ), **двух** одинаковых малых субъединиц  $\alpha$  и **одной** субъединицы  $\omega$ , которая не участвует в транскрипции, но стабилизирует структуру фермента (рисунок 11.3).

РНК-полимеразы эукариот имеют несколько дополнительных малых субъединиц присоединенных к этому базовому комплексу, который называется "**кор**" (*core* – сердцевина).

На схематических диаграммах (рисунок 11.2) РНК-полимеразу изображают присоединенной к прямой молекуле ДНК. Однако, по современным представлениям о взаимодействии бактериальной РНК-полимеразы и промотора ДНК считается, что ДНК резко изогнута внутри РНК-полимеразы (рисунок 11.3).

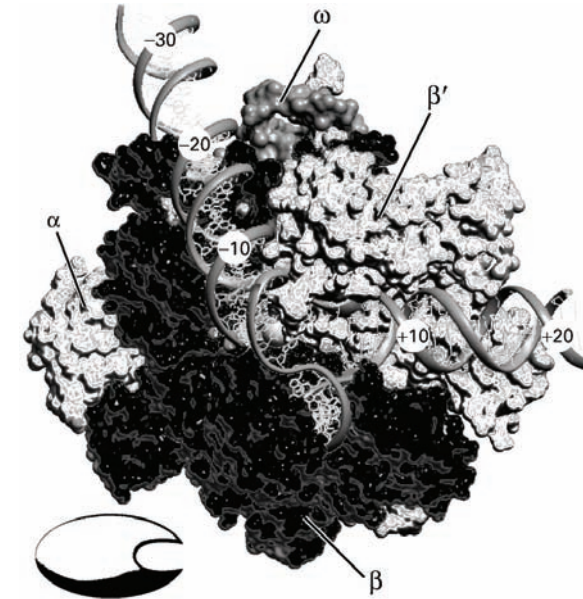


Рисунок 11.3 – Модель ядра бактериальной РНК-полимеразы, связанной с промотором. Номера указывают положения нуклеотидов ДНК по отношению к стартовой точке транскрипции

### ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНОВ ПРОКАРИОТ И ЭУКАРИОТ

Генная информация различным образом организована в генах прокариот и эукариот.

**У прокариот** гены, кодирующие белки, которые участвуют в данной метаболической последовательности биохимических реакций, (например, в синтезе аминокислоты триптофана (*trp* или *W*)) расположены в ДНК в виде **непрерывной** последовательности, **массива**, генов.

Такая группа упорядоченных генов называется **оперон**. Оперон имеет **один** общий **промотор** и **один** общий **терминатор** и является **единицей транскрипции** у прокариот.

Например, на рисунке 11.4 показана схема транскрипции *trp*-оперона. Транскрипция оперона синтезирует одну непрерывную мРНК, в которой записана информация для синтеза серии родственных белков



(рисунок 11.4(a)), управляющих биосинтезом триптофана (*trp*) (рисунок 11.5).

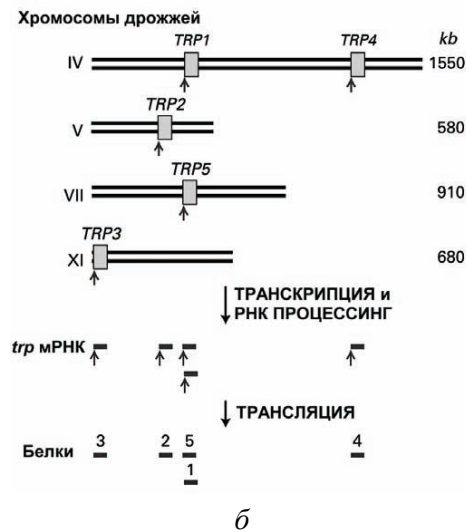
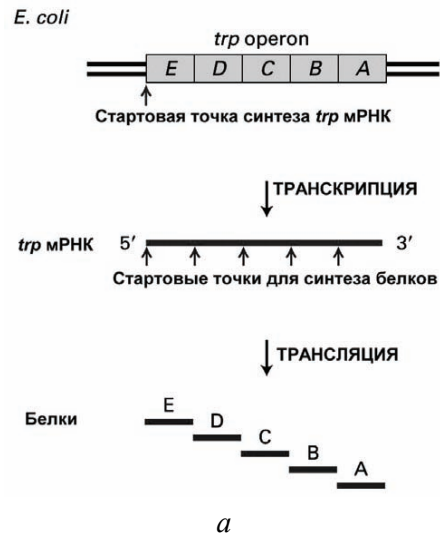


Рисунок 11.4 – Организация генной информации, транскрипция и трансляция ферментов для синтеза триптофана (*trp*): *a* – у прокариот, *б* – у эукариот

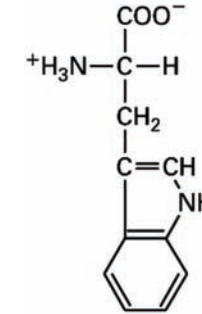


Рисунок 11.5 – Триптофан

Каждая часть мРНК представляет один ген, который кодирует один из ферментов серии, необходимой для биосинтеза триптофана. В *эукариотах*, даже у простейших типа дрожжей, которые функционально подобны прокариотам, *нет* такой "экономной" организации родственных генов в единый оперон. **Более того**, гены эукариот, кодирующие единый метаболизм, зачастую не только **физически разделены** в ДНК, но и находятся в **различных хромосомах**.

Каждый ген **имеет свой собственный промотор** и транскрибируется независимо в отдельную мРНК, которая затем транслируется в соответствующий полипептид (рисунок 11.4(б)). Пять генов TRP1–TRP5 расположены на четырех разных хромосомах (IV, V, VII, XI). Длина хромосом записана в тысячах оснований (*kilobase*, kb).

Кроме того, у эукариот в пределах гена есть кодирующие участки – **экзоны**, и участки, в которых не записана информация о кодировании аминокислотной последовательности белка – некодирующие участки – **интроны**. Поэтому, из РНК-копии с ДНК-гена должны быть вырезаны копии интронов, а оставшиеся копии экзонов должны быть соединены так, чтобы получилась функционально зрелая РНК. В литературе РНК-копию с ДНК-гена, которая содержит копии и экзонов и интронов, называют **первичным транскриптом** или **про-РНК**, или же **ядерной РНК**, яРНК (*nuclear RNA*, nRNA).

Название **экзоны** отражает тот факт, что это те участки гена, копия с которых в виде мРНК выходят (*exit*) из ядра, а **интроны** – это промежуточные, переходные (*intervening*) участки между экзонами.

Процесс вырезания копий интронов из про-РНК и сшивание копий экзонов с образованием собственно мРНК называется **сплайсингом** РНК.

Интроны есть не только в ДНК эукариот, но и в ДНК вирусов.

### ПРОЦЕССИНГ РНК ЭУКАРИОТ

В *прокариотических* клетках, не имеющих ядра, трансляция мРНК может начинаться со свободного 5'-конца мРНК в то время, когда 3'-конец все еще наращивается РНК-полимеразой. Т.е. транскрипция и трансляция в прокариотах **могут происходить одновременно**.

В *эукариотических* клетках не только **пространственно разделены** транскрипция в ядре и трансляция в цитоплазме клетки, но и первичный транскрипт (про-мРНК) должен быть подвергнут ряду модификаций, который называется **процессингом РНК**, с тем, чтобы получить функционально зрелую мРНК (рисунок 10.1, процесс 2). Только после этого мРНК транспортируется в цитоплазму из ядра. Таким образом, транскрипция и трансляция не могут происходить одновременно в клетках эукариот.

Процессинг мРНК включает в себя несколько операций. В дополнение к уже упомянутому сплайсингу, которому подвергается 95% мРНК, обязательными являются **кэпирование** мРНК (100%) (рисунок 11.6) и **полиаденилирование** (95%) мРНК.

Во всех эукариотических про-мРНК немедленно после синтеза оба конца полинуклеотидной цепочки модифицируются.

Процессинг 5'-конца – кэпирование – заключается в том, что как только 5'-конец растущей РНК выходит из РНК-полимеразы, он немедленно **кэпируется** особыми ферментами.

**Кэп** ("шапочка", "*cap*") – это (1) **метиллированный гуанозин-трифосфат** (ГТФ) (7-Метилгуанилат), присоединенный **в необычной** 5'–5' позиции к 5'-концу мРНК, и (2) **две метиллированные рибозы** в первых двух нуклеотидах мРНК (рисунок 11.6). (При этом, однако, у

*дрожжей* не метиллируется рибоза первого нуклеотида, а **рибоза второго** нуклеотида метиллируется **только у позвоночных**).

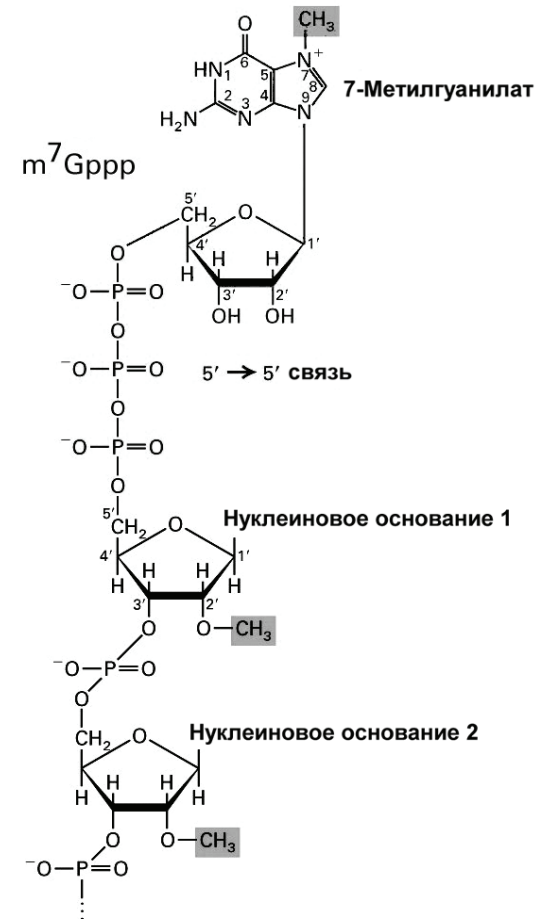


Рисунок 11.6 – Схема кэпа эукариотической мРНК

Кэп (1) **защищает** мРНК от ферментативной деградации **экзонуклеазами** и (2) **способствует** экспорту мРНК в цитоплазму. (3) К кэпу присоединяется **фактор трансляции** – белок, необходимый для правильной установки мРНК на рибосоме.

Процессинг 3'-конца про-мРНК – **полиаденилирование** – заключается в (1) **разрезании** ее специфической **эндонуклеазой** вблизи поли(А)-точки – ААУАА-последовательности и (2) **присоединении** к освободившемуся 3'-ОН концу поли(А)-цепочки из 100–250 аденин-нуклеотидов с помощью фермента **поли(А)-полимеразы**. Длина этой цепочки у дрожжей и беспозвоночных **меньше**, чем у позвоночных и, в значительной степени, время жизни мРНК коррелирует с длиной поли(А)-хвоста.

Поли(А)-полимераза это составная часть комплекса белков, которые (1) **обнаруживают** специфическую последовательность в транскрипте, (2) **разрезают** транскрипт и (3) **присоединяют** к транскрипту правильное число аденозинфосфатов, осуществляя **безматричный синтез**.

**Финальный этап** процессинга про-мРНК – это упоминавшийся выше **сплайсинг**.

На рисунке 11.7 представлены основные этапы процессинга эукариотической мРНК, кодирующей трансляцию гена β-глобина, состоящего из 147 аминокислот. Два интрона прерывают белок-кодирующую последовательность между кодонами для аминокислот 31 и 32, и 105 и 106.

Транскрипция эукариотического гена начинается **до** последовательности, которая кодирует первую аминокислоту и продолжается **за пределы** последнего кодона, в результате чего на концах про-мРНК находятся **некодирующие участки**, с которых не осуществляется трансляция. Такие **нетранслируемые участки** (*untranslated regions, UTR*) не удаляются в ходе процессинга.

5'-Кэп (7-метилгуанозинтрифосфат,  $m^7Gppp$ ) присоединяется в ходе синтеза первичного РНК-транскрипта, который продолжается за пределы поли(А) точки – точки, в которой эндонуклеаза затем разрезает транскрипт, формируя 3'-конец. После присоединения поли(А)-хвоста,  $(A)_n$ , сплайсинг удаляет интроны и соединяет экзоны.

Нетранслируемые участки UTR эукариот достаточно длинные: в клетках млекопитающих длина 5'UTR более сотни нуклеотидов, а 3'UTR –

несколько kb (*kilobases*). мРНК прокариот тоже имеют 5' и 3' UTR-ы, но они обычно содержат менее 10 нуклеотидов.

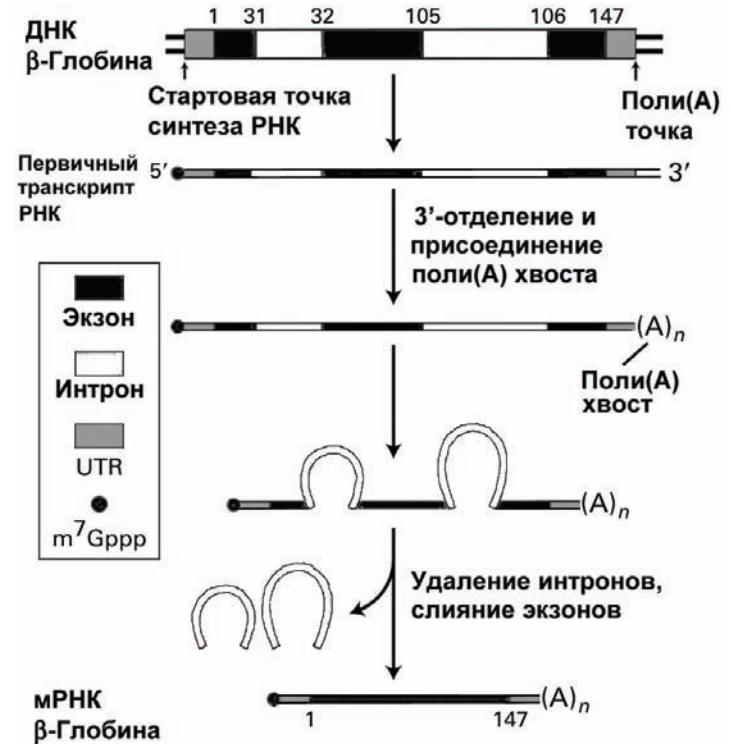


Рисунок 11.7 – Схема процессинга мРНК на примере гена β-глобина, содержащего три экзона и два интрона. Кэп  $m^7Gppp$  обозначен (•)

Наличие интронов в генах многоклеточных эукариот позволяет объяснить синтез **многодоменных** белков. Если отдельный домен мультидоменного белка кодируется одним экзоном, расположенными между двумя интронами, то мультидоменная структура белка обеспечивается **многократным повторением этого экзона** в структуре ДНК, в результате чего цепочка повторяющихся экзонов будет лежать

между двумя данными интронами, обеспечивая мультидоменное повторение.

### АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ СПЛАЙСИНГ

Наличие в генах эукариот интронов позволяет синтезировать различные (но родственные) белки с одного гена посредством **альтернативного сплайсинга**. У высших эукариот альтернативный сплайсинг это важный механизм для синтеза различных форм белков, называемых **изоформами**, различными типами клеток.

Рассмотрим альтернативный сплайсинг на примере **фибронектина**, мультидоменного внеклеточного клейкого белка млекопитающих (рисунок 11.8).



Рисунок 11.8 – Альтернативный сплайсинг фибронектина в фибробластах и гепатоцитах. Интроны в гене фибронектина (без масштаба) изображены двойными черными линиями

В фибробластах транскрибируется мРНК, которая включает экзоны ЕIIIA и ЕIIIB, эти экзоны кодируют аминокислотные последовательности **доменов**, которые **связываются со специфическими белками плазматической мембраны фибробластов**. Вследствие этого изоформа фибронектина "приклеивает" фибробласт к внеклеточному матриксу.

В результате альтернативного сплайсинга первичного транскрипта фибронектина в гепатоцитах (основных клетках печени) получается мРНК, в которой нет экзонов ЕIIIA и ЕIIIB. Поэтому секретируемый в кровь гепатоцитами фибронектин не связывается с клетками, позволяя им свободно циркулировать.

Были идентифицированы более 20 изоформ фибронектина, синтез которых кодировался различными мРНК, полученными **альтернативным сплайсингом от одного первичного транскрипта** с гена фибронектина.

Недавнее **секвенирование** (определение последовательности) большого числа мРНК, полученных из разных тканей человека, и сравнение их с геномной ДНК показали, что около 60% генов человека экспрессируются посредством альтернативного сплайсинга мРНК. Альтернативный сплайсинг во много раз увеличивает количество белков, которые закодированы в геноме высших многоклеточных организмов.

### ВЫВОДЫ

✓ **Транскрипция** ДНК осуществляется РНК-полимеразой, которая за один шаг присоединяет один рибонуклеотид к растущему 3'-концу цепи РНК. Последовательность нуклеиновых оснований в матричной цепи ДНК **определяет** порядок, в котором рибонуклеотиды полимеризуются, формируя нить РНК.

✓ В ходе **инициации** транскрипции РНК-полимераза присоединяется к специфическому участку ДНК, который называется **промотор**, локально плавит (расплетает) двойную нить ДНК, открывая неспаренную матричную нить, и полимеризует несколько первых нуклеотидов.

✓ В ходе **элонгации** РНК-полимераза движется вдоль ДНК, расплетая последовательно спираль ДНК и добавляя рибонуклеотиды к растущей цепи РНК.

✓ Когда РНК-полимераза достигает **терминатора**, она прекращает транскрипцию, что приводит к освобождению завершенной РНК и диссоциации РНК-полимеразы с матричной ДНК.

✓ В ДНК прокариот несколько генов, кодирующих белки, объединены в функциональный участок ДНК, называемый **опероном**, который транскрибируется с одного общего промотора в одну РНК, кодирующую синтез нескольких белков с родственными функциями. Трансляция бактериальной РНК может начаться еще до завершения транскрипции РНК.

✓ В ДНК эукариот каждый белок-кодирующий ген транскрибируется со **своего собственного** промотора. Первичный транскрипт зачастую



содержит некодирующие участки (**интроны**), расположенные между кодирующими участками (**экзонами**).

✓ Чтобы сформировалась функционально зрелая РНК, первичные транскрипты эукариот должны пройти процедуру **процессинга**. В ходе процессинга концы первичного транскрипта **5'-экспонируются** и **3'-полиаденилируются**. Транскрипты с генов, содержащих интроны, подвергаются **сплайсингу**, удаляющему интроны и соединяющему экзоны.

✓ Индивидуальные домены мультдоменных белков высших эукариот зачастую кодируются индивидуальными экзонами или небольшим числом экзонов. Различные изоформы таких белков часто различным образом экспрессируются в различных типах клеток в результате **альтернативного сплайсинга**.

#### ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Перечислите и охарактеризуйте стадии транскрипции ДНК.
2. Чем отличается организация генов прокариот и эукариот?
3. Каковы основные операции процессинга мРНК?
4. В чем преимущества альтернативного сплайсинга?

## Лекция 12. КОНТРОЛЬ ГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ У ПРОКАРИОТ

#### ПЛАН ЛЕКЦИИ:

1. Контроль инициации транскрипции.
2. Индукторы.
3. Транскрипция  $\sigma^{54}$ -РНК-полимеразой.
4. Двухкомпонентные системы регуляции.

#### КОНТРОЛЬ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ

Из того факта, что **структура и функции** клеток определяются содержащимися в ней **белками** следует, что контроль генной экспрессии является **краеугольным камнем**, основой молекулярной биологии.

Само "решение" об инициации транскрипции того или иного гена **является основой** всего дальнейшего механизма белкового синтеза.

С помощью механизма контроля инициации транскрипции клетка может регулировать свой белковый состав.

**Репрессия транскрипции** гена приводит к **слабой** транскрипции гена, при которой соответствующая мРНК синтезируется с низкой скоростью.

**Активация транскрипции** гена приводит к **интенсивной** транскрипции мРНК и, соответственно, к интенсивному синтезу соответствующего белка.

В большинстве бактерий и в других **одноклеточных** организмах интенсивность генной экспрессии эффективно регулируется, обеспечивая тонкую регуляцию ферментативной системы и структурных компонентов, тем самым адекватно реагируя на изменения во внешней среде. В каждый данный момент бактериальная клетка синтезирует **именно те** белки, которые обеспечивают ей выживание в данных конкретных условиях.

В **многоклеточных** организмах контроль генной экспрессии главным образом рассчитан на обеспечение того, чтобы запустить **экспрессию нужного гена в нужной клетке и в нужное время** во время развития эмбриона и в ходе дифференцировки тканей.

Механизм контроля транскрипции в бактериях мы рассмотрим на примере **lac оперона** *E. coli*.

В *E. coli* **около половины всех генов** собраны в **опероны**, которые кодируют ферменты, участвующие в определенных метаболических путях или объединяющиеся после синтеза в один мультисубъединичный белок.

Например, **trp оперон**, рассмотренный на предыдущей лекции, кодирует пять ферментов, необходимых для синтеза триптофана.

Аналогично, **lac оперон** кодирует **три фермента**, участвующие в метаболизме **лактозы** (сахара, присутствующего в молоке, рисунок 12.1). Поскольку бактериальный оперон транскрибируется **весь** сразу, начиная с одной стартовой точки, в одну молекулу мРНК, то **экспрессия всех генов** оперона **регулируется синхронно**, они все или репрессируются, или активируются.

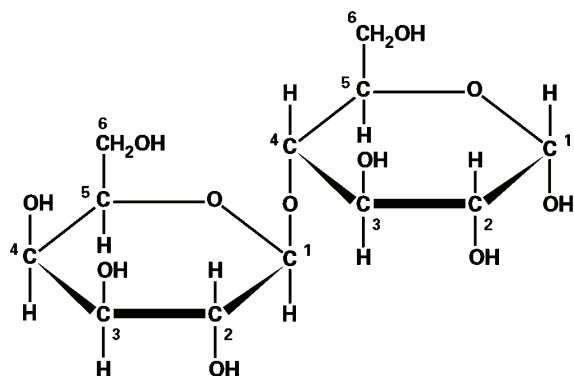


Рисунок 12.1 – Схема дисахарида лактоза состоящего из галактозы (слева) и глюкозы (справа)

Транскрипция оперонов (или изолированных генов, не входящих в опероны) контролируется взаимодействием между РНК-полимеразой и специфическими *белками-репрессорами* или *белками-активаторами*.

Кроме того, для *инициации* транскрипции РНК-полимераза *E. coli* должна *присоединить* к себе один из небольших белков, которые называются  *$\sigma$ -факторами*, чаще всего с фактором  $\sigma^{70}$ .

Пока *E. coli* находится в среде с недостатком лактозы, синтез *lac* мРНК репрессирован, и ресурсы клетки не тратятся зря на синтез ферментов, которые не нужны в данный момент.

В среде, которая содержит и лактозу, и глюкозу, клетка *E. coli* метаболизирует в основном глюкозу. Метаболизм лактозы включается на полную силу, *только если лактоза доминирует в среде, а глюкоза практически исчерпана*. Такая регулировка метаболизма достигается репрессией экспрессии *lac* оперона до тех пор, пока в среде не появится лактоза, и поддержанием синтеза *lac* мРНК на низком уровне, пока в среде не снизится концентрация глюкозы (рисунок 12.2).

Транскрипция *lac* оперона управляется *lac-репрессором* и *катаболическим белком-активатором* CAP (*catabolite activator protein*), каждый из которых связывается со специфической последовательностью нуклеотидов ДНК в области, которая управляет транскрипцией *lac* оперона (рисунок 12.2(a)).

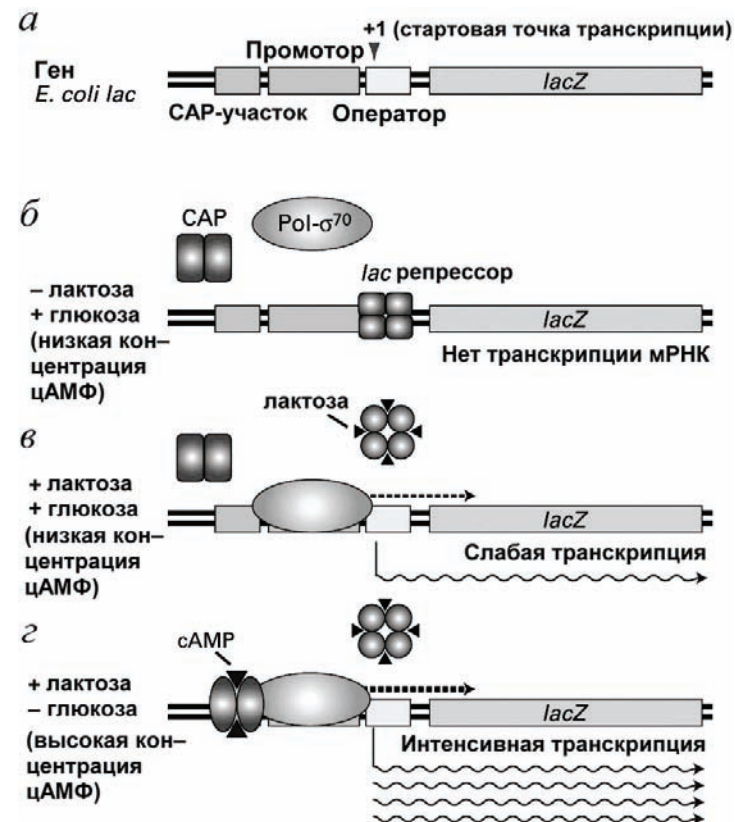


Рисунок 12.2 – Регуляция экспрессии *lac* оперона *E. coli*: а – участок управления транскрипцией, б – в отсутствие лактозы *lac*-репрессор связан с оператором, в – при наличии лактозы комплекс РНК-полимеразы с  $\sigma^{70}$ -фактором ( $\text{Pol-}\sigma^{70}$ ) начинает транскрипцию мРНК, z – максимальная интенсивность транскрипции достигается в отсутствие глюкозы, когда комплекс CAP-сАМФ связывается с CAP-участком ДНК

Для того, чтобы началась транскрипция *lac* оперона субъединица  $\sigma^{70}$  РНК-полимеразы должна связаться с *lac* промотором, который находится сразу перед стартовой точкой.

*Когда в среде нет лактозы*, *lac*-репрессор связывается со специфической ДНК-последовательностью, которая называется *lac оператор*, и

которая расположена сразу за промотором, даже слегка *перекрывает* с ним.

Связывание *lac*-репрессора с *lac* оператором *блокирует промотор* так, что *даже* посадка РНК-полимеразы на промотор становится невозможной (рисунок 12.2(б)). Когда же в среде есть лактоза, она связывается со специфическими центрами связывания на каждом из четырех субъединиц *lac*-репрессора, индуцируя такое его конформационное изменение, вследствие которого *lac*-репрессор диссоциирует с *lac* оператора. В результате РНК-полимераза может инициировать транскрипцию *lac* оперона (рисунок 12.2(в)).

В то же время, *пока в среде присутствует глюкоза*, скорость инициации транскрипции (т.е. число актов инициации транскрипции в единицу времени) *крайне мала* и, следовательно, синтезируется малое число мРНК и белков, закодированных в *lac* опероне.

Стоит только *убрать* глюкозу из среды, что сопровождается снижением концентрации глюкозы внутри клетки, *E. coli* синтезирует *циклический аденозинмонофосфат*, цАМФ (*cyclic adenosine monophosphate*, сАМФ) (рисунок 12.3).

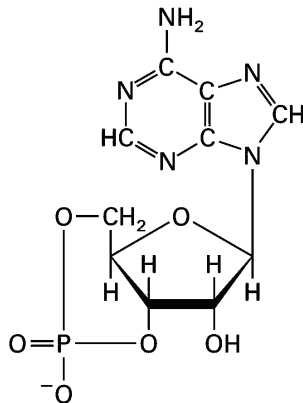


Рисунок 12.3 – Циклический аденозинмонофосфат, цАМФ

С ростом концентрации цАМФ он связывается с каждой из субъединиц димерного CAP-белка, индуцируя такую его конформацию,

которая позволяет этому белку связаться с CAP-участком ДНК в области, которая управляет транскрипцией *lac* оперона (рисунок 12.2(г)).

*Комплекс "CAP-сАМФ"* взаимодействует с РНК-полимеразой, связанной с промотором, существенно стимулируя скорость инициации транскрипции (минимизируя abortивную инициацию). Такая активация ведет к интенсивной транскрипции мРНК и, следовательно, к интенсивному синтезу ферментов закодированных в *lac* опероне.

*Как только ферменты переработают всю лактозу*, свободный от лактозы репрессор выключит *lac* оперон.

Хотя структура промоторов различных генов *E. coli* подобна (они являются *гомологичными*), но точная последовательность нуклеотидов в них различна. Именно последовательность нуклеотидов в промоторе определяет *скорость* инициации транскрипции *в отсутствие* репрессоров и активаторов.

Промоторы, которые поддерживают *высокую скорость* инициации транскрипции, называются *сильными промоторами* (*strong promoters*).

Промоторы, которые поддерживают *низкую скорость* инициации транскрипции, называются *слабыми промоторами* (*weak promoters*). Так *lac* оперон это пример слабого промотора, присущая ему низкая скорость инициации транскрипции еще более снижается *lac*-репрессором или же существенно увеличивается CAP-сАМФ-активатором.

### ИНДУКТОРЫ

Транскрипция большинства генов *E. coli* регулируется процессами подобными тем, которые описаны для *lac* оперона. Основной регуляции является наличие специфических малых молекул, которые называют *индукторами* (*inducers*). Эти молекулы связываются с белками-репрессорами и изменяют их сродство к операторам ДНК, тем самым регулируя скорость транскрипции в соответствии с нуждами клетки.

Например, когда концентрация *триптофана* в среде и цитозоле достаточно *высока*, клетка *не синтезирует* ферменты, которые закодированы в *trp опероне*. Связывание *триптофана с trp-репрессором* вызывает конформационное изменение, которое позволяет *репрессору* связываться с *trp оператором*, *блокируя* транскрипцию *trp* оперона и

репрессируя тем самым, экспрессию ферментов, которые синтезируют триптофан в клетке. И наоборот, когда концентрация триптофана в среде и в цитозоле низкая, триптофан диссоциирует с *trp*-репрессора, белок совершает конформационный переход в состояние, которое обладает низким сродством к *trp* оператору, и диссоциирует с *trp* оператора, позволяя начаться транскрипции *trp* оперона.

В случае *lac оперона* роль индуктора играет **лактоза**. Её связывание с *lac*-репрессором ослабляет связывание репрессора с оператором, следовательно, стимулирует транскрипцию.

Специфические **белки-активаторы**, такие как CAP в случае *lac* оперона, также контролируют транскрипцию **некоторых (но не всех)** бактериальных генов. Эти активаторы связываются с ДНК вместе с РНК-полимеразой, стимулируя транскрипцию начиная с определенного промотора. Сродство активаторов к ДНК регулируется их связыванием со специфическими малыми молекулами (например, цАМФ, в случае *lac* оперона), которые изменяют конформацию активатора.

#### ТРАНСКРИПЦИЯ $\sigma^{54}$ -РНК-ПОЛИМЕРАЗОЙ

Большинство промоторов *E. coli* взаимодействуют с  $\sigma^{70}$ -РНК-полимеразой, которая является основной формой бактериальной полимеразы. Транскрипция же некоторых генов *E. coli* осуществляется РНК-полимеразой, содержащими один или несколько альтернативных  $\sigma$ -факторов, которые распознают **другие промоторы**, не те промоторы, которые распознаются с помощью субъединицы  $\sigma^{70}$ .

Но все эти  $\sigma$ -факторы (за одним исключением,  $\sigma^{54}$ ) реализуют описанный выше механизм регуляции транскрипции. Инициация транскрипции РНК-полимеразой, содержащими сигма-факторы, подобными  $\sigma^{70}$ , регулируется репрессорами и активаторами, которые связываются с ДНК вблизи промотора.

Механизм действия сигма-фактора  $\sigma^{54}$  **резко отличается** от  $\sigma^{70}$ -подобных факторов. Транскрипция генов РНК-полимеразой, содержащими  $\sigma^{54}$ , регулируется активаторами, которые связываются с участками ДНК, называемыми **энхансерами** (*enhancers*), причем эти

энхансеры расположены **за 80–160** нуклеотидов **до** стартовой точки транскрипции. И даже если **энхансер** отнесен более чем на 1 kb (*kilobase*) от стартовой точки, связывающиеся с ними  **$\sigma^{54}$ -активаторы** могут активировать транскрипцию  $\sigma^{54}$ -РНК-полимеразы.

Один из наиболее хорошо изученных  $\sigma^{54}$ -активаторов – **белок NtrC** – стимулирует транскрипцию с промотора **гена *glnA***. Этот ген кодирует фермент **глутамин-синтетазу**, который синтезирует аминокислоту глутамин из глутаминовой кислоты и аммиака (рисунок 12.4).

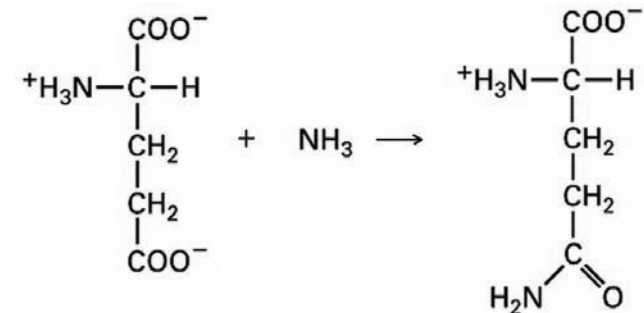


Рисунок 12.4 – Синтез глутамин-синтетазой глутамина из глутаминовой кислоты и аммиака

$\sigma^{54}$ -РНК-полимераза связывается с *glnA* промотором, но **не начинает** расплетание ДНК, пока с энхансером не свяжется димерный белок NtrC. В свою очередь NtrC регулируется (активируется) **протеин-киназой NtrB**.

(Напомним, протеин-киназа это фермент, который фосфорилирует субстрат, превращая АТФ в АДФ и перенося фосфорильную группу АТФ на субстрат (рисунок 9.5).)

**В ответ на снижение концентрации глутамин** белок NtrB фосфорилирует NtrC, который затем связывается с энхансером, расположенным **на значительном расстоянии** от *glnA* промотора. Связанный с энхансером NtrC стимулирует связанную с промотором  $\sigma^{54}$ -РНК-полимеразу, которая начинает транскрипцию.



Электронная микроскопия показала, что NtrC, связанный с энхансером, и  $\sigma^{54}$ -РНК-полимераза, связанная с промотором (рисунок 12.5(а)), **непосредственно взаимодействуют**, в результате образования **петли** ДНК между энхансером и промотором (рисунок 12.5(б)). Такой механизм активации транскрипции характерен для эукариот.

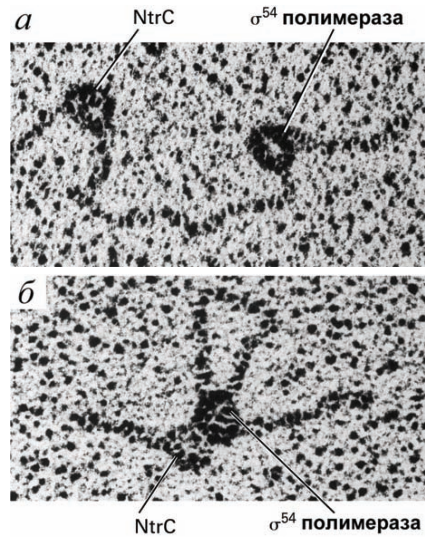


Рисунок 12.5 – Образование петли ДНК обеспечивает взаимодействие NtrC и  $\sigma^{54}$ -РНК-полимеразы

Белок NtrC обладает АТФазной активностью, поскольку для активации транскрипции  $\sigma^{54}$ -РНК-полимеразой **необходимо его активировать** фосфорилированием. Если дефектные NtrC не обеспечивают гидролиз АТФ, то  $\sigma^{54}$ -РНК-полимераза **не способна** обеспечить расплетание ДНК в точке начала транскрипции. Таким образом, утверждается, что **гидролиз АТФ** является источником энергии, необходимым для "плавления" ДНК  $\sigma^{54}$ -РНК-полимеразой.

В отличие от неё  $\sigma^{70}$ -РНК-полимераза **не нуждается** в гидролизе АТФ, чтобы разъединить нити ДНК в стартовой точке.

## ДВУХКОМПОНЕНТНЫЕ СИСТЕМЫ РЕГУЛЯЦИИ

В рассмотренном выше примере контроль репрессии гена *glnA* *E. coli* зависит от двух белков NtrB и NtrC. Такие двухкомпонентные регуляторные системы контролируют большое число процессов реакции бактерий на изменение внешней среды.

Например, регуляцию транскрипции *E. coli* **в ответ на изменение концентрации свободных фосфатов** обеспечивают два белка PhoR и PhoB (рисунок 12.6).

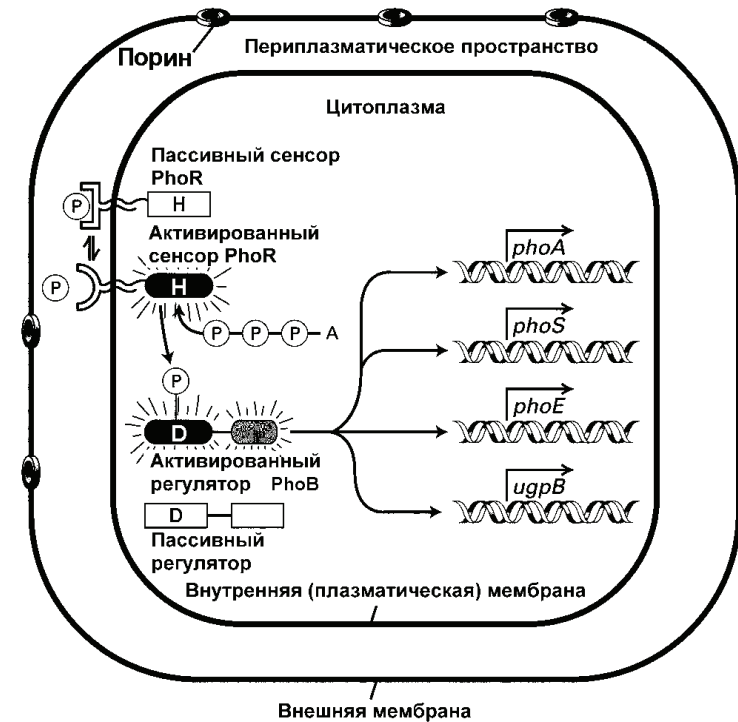


Рисунок 12.6 – Двухкомпонентная система регуляции

PhoR – это **трансмембранный белок**, расположенный на плазматической (внутренней) мембране бактерии. **Периплазматический домен** белка PhoR связывает фосфат, а **цитозольный домен** обладает

активностью протеин-киназы. Белок PhoV является цитозольным. Большие поры, образуемые во внешней мембране *E. coli* белками поринами, позволяют ионам свободно диффундировать между внешней средой и периплазматическим пространством. Если концентрация фосфора снижается вне бактерии (а, следовательно, и в периплазматическом пространстве), то фосфат диссоциирует с PhoR периплазматического домена (рисунок 12.6).

**Диссоциация** фосфата вызывает конформационное изменение PhoR-цитоплазматического домена, которое стимулирует его протеин-киназную активность. Активированный PhoR сначала переносит  $\gamma$ -фосфат с АТФ на **гистидин** в самом PhoR-киназном домене.

Этот же фосфат затем переносится на определенный аминокислотный остаток Asp (**аспаргиновая кислота**) в PhoV, тем самым "**активируя**" активатор транскрипции. Фосфорилированный, активный PhoV затем способен индуцировать транскрипцию нескольких генов, что позволяет клетке "бороться" с низкой концентрацией фосфора.

Многие другие бактериальные реакции регулируются двумя белками подобно PhoR и PhoV.

В каждой из таких регуляторных систем один белок, называемый **сенсором**, имеет **трансмиссивный** (передающий) домен, подобный PhoR протеин-киназному домену. Трансмиссивный домен сенсорного белка регулируется **другим**, уникальным в каждом случае, **доменом** (например, периплазматическим доменом PhoR), который "чувствует" изменения в окружающей среде.

Другой белок, называемый **регулятором отклика**, содержит **домен-ресивер** (приемник), подобно области D в PhoV (рисунок 12.6), которая фосфорилируется при активации PhoR. Домен-ресивер регулятора отклика **связан** с другим доменом (**функциональным**), который определяет функцию белка. Активность этого второго функционального домена регулируется фосфорилированием домена-ресивера. Хотя все трансмиссивные домены подобны между собой (та же, как подобны между собой и домены-ресиверы), трансмиссивные домены **специфических** сенсорных белков будут фосфорилировать только **определенные** домены-

ресиверы **определенных** регуляторов отклика, обеспечивая специфический отклик на различные изменения окружения.

Заметим, что NtrB и NtrC, обсужденные ранее, работают как сенсор и регулятор отклика, соответственно, в двухкомпонентной регуляторной системе, которая регулирует транскрипцию *glnA*.

Подобная двухкомпонентная фосфорочувствительная система, подобная His-Asp, обнаружена и в растениях.

### ВЫВОДЫ

✓ Генная экспрессия и прокариот, и эукариот **регулируется** главным образом механизмами, которые контролируют **инициацию** транскрипции.

✓ **Связывание** комплекса  $\sigma$ -РНК-полимераза с промотором является **первым** этапом в инициации транскрипции *E. coli*.

✓ Последовательность нуклеотидов в промоторе определяет его **силу** – насколько часто (в единицу времени) разные молекулы РНК-полимеразы могут связываться с промотором и инициировать транскрипцию.

✓ **Репрессоры** – это белки, которые связываются с оператором. **Оператор** – это участок ДНК, который расположен рядом с промотором или даже перекрывает промотор. Связывание репрессора с оператором ингибирует инициацию транскрипции.

✓ Активность связывания репрессоров с ДНК регулируется **индукторами** – малыми молекулами-эффекторами. Это позволяет бактериальной клетке регулировать транскрипцию специфических генов в ответ на изменения концентрации различных компонентов в окружающей среде.

✓ *lac*-Оперон и некоторые другие бактериальные гены также регулируются белками-активаторами, которые связываются вблизи промотора и увеличивают скорость инициации транскрипции РНК-полимеразы.

✓ Основной **сигма-фактор** у *E. coli* это  $\sigma^{70}$ , но существуют и некоторые другие менее распространенные сигма-факторы, для каждого из которых существует своя промоторная последовательность нуклеотидов.

✓ Инициация транскрипции всеми РНК-полимеразами *E. coli*, кроме тех, которые содержат  $\sigma^{54}$ , могут регулироваться репрессорами и активаторами, которые связываются с ДНК вблизи стартовой точки транскрипции.

✓ Гены, транскрибируемые  $\sigma^{54}$ -РНК-полимеразой, регулируются активаторами, которые связываются с *энхансером*, расположенным более чем за 100 нуклеотидов до стартовой точки. ДНК образует *петлю*, для того чтобы сблизилась активатор и  $\sigma^{54}$ -РНК-полимераза.

✓ В *двухкомпонентных* регуляторных системах один из белков выполняет функцию сенсора, отслеживающего концентрацию питательных веществ или других компонентов в окружающей среде. При соответствующих условиях  $\gamma$ -фосфат АТФ переносится сначала на гистидин белка-сенсора, а затем на аспаргиновую кислоту во втором белке, который называется регулятором отклика. Фосфорилированный регулятор отклика затем связывается с регуляторной последовательностью нуклеотидов ДНК, стимулируя или репрессируя транскрипцию специфических генов.

#### ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Как осуществляется регуляция экспрессии *lac*-опреона?
2. Какие промоторы называются сильными? Какие слабыми?
3. Какова роль индукторов в регуляции экспрессии генов?
4. В чем специфика процесса транскрипции  $\sigma^{54}$ -РНК-полимеразой?
5. Какова роль каждого компонента в двухкомпонентных регуляторных системах?

### Лекция 13. РОЛЬ РНК В ТРАНСЛЯЦИИ

#### ПЛАН ЛЕКЦИИ:

1. Три функции РНК в трансляции.
2. Генетический код.
3. Структура тРНК.
4. Нестандартное спаривание нуклеотидов кодона и антикодона.

5. Активация аминокислот аминоацил-тРНК-синтетазой.
6. Рибосомные РНК.

#### ТРИ ФУНКЦИИ РНК В ТРАНСЛЯЦИИ

Хотя ДНК хранит в себе информацию о синтезе белков, а мРНК переносит инструкции для биосинтеза, большинство биологических действий совершают белки. Линейная последовательность аминокислот в каждой белковой молекуле определяет её трёхмерную структуру и активность. Поэтому *аккуратная* укладка аминокислот в том *правильном* порядке, который закодирован в ДНК, является критически важным процессом для синтеза *функционального* белка, а значит и *правильного* функционирования клеток и организмов.

*Трансляция* – это совокупный процесс, посредством которого последовательность нуклеотидов мРНК используется с целью соединения аминокислот в полипептидную белковую молекулу.

В клетках эукариот синтез белков происходит в цитоплазме, где три типа РНК молекул вместе выполняют *различные, но взаимодополняющие*, кооперативные, функции (рисунок 13.1).

1. *Матричная РНК* (мРНК) *переносит генетическую информацию*, транскрибированную с ДНК, в виде набора *кодонов* – трехнуклеотидных последовательностей, каждая из которых обозначает конкретную аминокислоту.

2. *Транспортная РНК* (тРНК) *выполняет функцию ключа* в расшифровке кодонов мРНК. Каждый тип аминокислот имеет свой собственный набор тРНК, с которыми эти аминокислоты связываются, и которые доставляют эти аминокислоты к растущему концу полипептидной цепи, если следующий кодон в мРНК "заказывает" их "прибытие".

На каждом шаге биосинтеза белка новый кодон мРНК выбирает соответствующую тРНК с присоединенной к ней аминокислотой благодаря тому, что каждая тРНК имеет *антикодон* – последовательность из трех нуклеотидов, которые могут спариться с комплементарными им нуклеотидами кодона в мРНК.

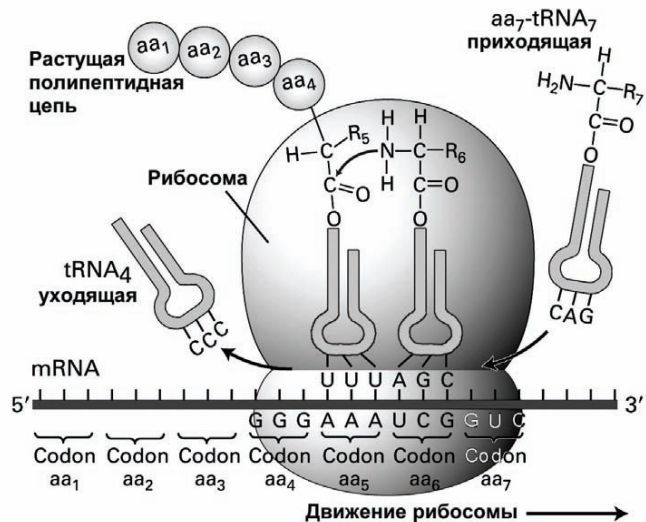


Рисунок 13.1 – Три функции РНК в трансляции. *aa* – обозначение аминокислот (*amino acids*), *R* – обозначение аминокислотных остатков

3. **Рибосомные РНК** (рРНК) связываются с наборами специфических белков и формируют рибосомы – сложные органеллы, которые (1) **физически перемещаются** вдоль молекулы мРНК, (2) **катализируют** процесс сборки аминокислот в полипептидную цепь. Они также (3) **присоединяют** к себе (в нужной последовательности и в необходимое время) молекулы тРНК и различных вспомогательных белков, необходимых для синтеза белков.

**Рибосомы состоят** из большой и малой субъединиц, каждая из которых содержит свои собственные рРНК.

Эти три типа РНК участвуют в трансляции во всех клетках.

### ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОД

**Генетический код** – это система записи информации о последовательности расположения аминокислот в белках с помощью последовательности расположения нуклеотидов (А,Т,Г,С) в ДНК.

Поскольку ДНК непосредственного участия в синтезе белка не принимает, то код записывается на языке (А,У,Г,С) РНК.

В РНК вместо **тимина** входит **урацил**.

### СВОЙСТВА ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОДА.

1. **Триплетность.** Каждая аминокислота кодируется последовательностью из трех нуклеотидов (таблица 13.1).

Код не может быть моноплетным, поскольку 4 (число разных нуклеотидов в ДНК) меньше 20 (число аминокислот).

Таблица 13.1 – Генетический код

Первый нуклеотид	Второй нуклеотид				Третий нуклеотид
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	<b>STOP</b>	<b>STOP</b>	A
	Leu	Ser	<b>STOP</b>	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu (Met)*	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met ( <b>START</b> )	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val (Met)*	Ala	Glu	Gly	G

\* AUG – наиболее общий код инициации; GUG обычно кодирует валин, а CUG – лейцин, но изредка эти кодоны кодируют метионин для инициации белковой цепи

Ala – аланин, Asn – аспаргин, Asp – аспаргиновая кислота, Gly – глицин, Gln – глутамин, Glu – глутаминовая кислота, Pro – пролин, Ser – серин, Tyr – тирозин, Cys – цистеин, Arg – аргинин, Val – валин, His – гистидин, Ile – изолейцин, Leu – лейцин, Lys – лизин, Met – метионин, Thr – треонин, Trp – триптофан, Phe – фенилаланин



Код не может быть дуплетным, поскольку 16 (число сочетаний и перестановок из четырех нуклеотидов по два) меньше 20.

Код может быть триплетным, поскольку 64 (число сочетаний и перестановок из четырех по три) больше 20.

**2. Вырожденность.** Из 64 возможных кодонов 61 определяет аминокислоты, а 3 являются стоп-кодонами. Большинство аминокислот кодируется более, чем одним кодоном. Только *две* – метионин (Met) и триптофан (Trp) – имеют единственный кодон. С другой стороны, лейцин (Leu), серин (Ser) и аргинин (Arg) кодируются *шестью* кодонами каждый.

Различные кодоны для одной и той же аминокислоты называют **синонимами**.

Сам код называют **вырожденным**, что означает, что более чем один кодон определяет одну аминокислоту.

За исключением метионина и триптофана **все аминокислоты** кодируются **более, чем одним** триплетом:, а именно:

- *Две* аминокислоты кодируются одним триплетом:  $2 \times 1 = 2$ .
- *Девять* аминокислот кодируются двумя триплетами:  $9 \times 2 = 18$ .
- *Одна* аминокислота кодируется тремя триплетами:  $1 \times 3 = 3$ .
- *Пять* аминокислот кодируется четырьмя триплетами  $5 \times 4 = 20$ .
- *Три* аминокислоты кодируются шестью триплетами  $6 \times 6 = 18$ .

Всего  $2+18+3+20+18=61$  триплет кодирует 20 аминокислот.

**3. Наличие межгенных знаков препинания.** Ген – это участок ДНК, кодирующий одну полипептидную цепь или одну молекулу РНК.

На **конце** каждого гена, кодирующего полипептид, находится, по меньшей мере, один из трех **терминирующих кодонов**, или **стоп-кодонов**: UAA, UAG, UGA. Они не кодируют аминокислоты, а терминируют трансляцию. Иногда их называют **бессмысленными кодонами** или **нонсенсами**. В конце гена обязательно стоит UAA, или UAG, или UGA (а то и два нонсенса подряд).

Условно к знакам препинания относятся и кодон AUG – первый после стартовой точки. Он выполняет функцию **заглавной буквы**. В этой позиции он кодирует **формилметионин** (у прокариот). Любой последующий AUG в гене просто кодирует метионин.

В некоторых бактериальных мРНК GUG тоже используется как иницирующий кодон, и иногда CUG случайно используется как иницирующий кодон у эукариот.

**4. Однозначность.** Каждый триплет кодирует лишь одну аминокислоту или является терминатором трансляции. Исключение составляет кодон AUG. У прокариот в первой позиции (заглавная буква) он кодирует *формил*метионин, а в любой другой – метионин.

**5. Универсальность.** Генетический код един для всех живущих на Земле существ. Это является сильнейшим свидетельством в пользу единства происхождения и эволюции.

**6. Компактность,** или отсутствие внутригенных знаков препинания. Внутри гена каждый нуклеотид входит в состав значащего кодона.

**7. Помехоустойчивость.**

**Консервативными** мутациями называют замены нуклеотидов, **не приводящие** к смене класса кодируемой аминокислоты.

**Радикальными** мутациями называют замены нуклеотидов, приводящие к смене класса кодируемой аминокислоты.

На рисунке 13.2 генетический код представлен в **круговой форме**.

Примечательно, что для кодирования большинства аминокислот существенны два первых основания, а **третье** может быть **любым**. Следовательно, мутации-замены оснований в третьем положении многих кодонов вообще не будут проявляться.

Кроме того, мутации, приводящие к замене полярного остатка на неполярный, часто не носят ярко выраженный характер, **если** остатки **близки** по своим физико-химическим свойствам. Если такие мутации и проявляются, то мутантный белок не полностью утрачивает свою активность, а лишь частично. Такие мутации привели, по-видимому, к возникновению так называемых **белков-синонимов**, имеющих одинаковую укладку и ферментативную активность, но разную первичную структуру.

**В каждом триплете** можно провести 9 однократных замен.

**Общее количество** возможных замен нуклеотидов:  $61 \text{ по } 9 = 549$ .



нуклеотид, начиная с третьего в гене, входит в состав трех кодонов. Когда генетический код был расшифрован, оказалось, что он **неперекрываем**, т.е. каждый нуклеотид входит в состав лишь одного кодона.

Таковы восемь свойств генетического кода.

### Информационная емкость ДНК.

На Земле живет 6 миллиардов человек. Наследственная информация о них заключена в  $6 \times 10^9$  сперматозоидах. По разным оценкам у человека от 30 до 50 тысяч генов. У всех людей  $\sim (50 \times 10^3) \times (6 \times 10^9) = 30 \times 10^{13}$  генов или  $(30 \times 10^{16}) = (3 \times 10^{17})$  пар нуклеотидов, которые составляют  $10^{17}$  кодонов.

Средняя книжная страница содержит 2500 знаков. ДНК  $6 \times 10^9$  сперматозоидов содержит информацию, равную по объему примерно  $4 \times 10^{13}$  книжных страниц. Эти страницы заняли бы объем пяти зданий Госпрома.  $6 \times 10^9$  сперматозоидов занимают половину наперстка. Их ДНК занимает менее четверти наперстка.

### Рамка считывания.

Последовательность кодонов между стартовым и финишным кодонами называется **рамкой считывания** (*reading frame*).

Эта точная последовательность рибонуклеотидов группами по три в мРНК определяет как линейную последовательность аминокислот в полипептидной цепи, так и сигналы о том, где следует начинать и заканчивать синтез.

Поскольку в генетический код не имеет "запятых" и записывается **неперекрываемыми** триплетными кодонами, то конкретная мРНК теоретически могла быть транслирована в три различные рамки чтения.

В самом деле, было показано, что некоторые мРНК содержат перекрывающуюся информацию, которая может быть транслирована в различные рамки считывания, дающие различные полипептиды (рисунок 13.3).

подавляющее большинство мРНК, однако, считываются **только в одну рамку**, иначе еще до того, как сформируется функциональный белок,

трансляция прерывается стоп-кодоном, неизбежно возникающем при использовании одной из двух других "неправильных" рамок считывания.

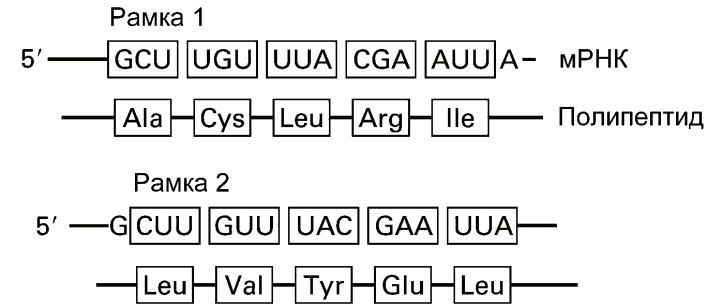


Рисунок 13.3 – Пример того, как генетический код может быть транслирован в различные рамки чтения

Другая возможность ошибочной трансляции возникает при случайном **сдвиге рамки** считывания.

Это происходит, когда, например, четыре нуклеотида будут ошибочно прочтены как один кодон и транслированы в одну аминокислоту, или, наоборот, будет пропущен один нуклеотид и дальнейшее чтение триплетов будет происходить в уже новой рамке считывания. Такие случаи сдвига рамки **достаточно редки**, но несколько десятков таких примеров зарегистрированы.

### Вариации генетического кода.

Генетический код одинаков для всех организмов – аргумент в пользу утверждения о **едином происхождении** всей земной биосферы.

Однако генетический код **отличается** для **некоторых кодонов** во многих митохондриях, и некоторых простейших (таблица 13.3), причем большинство этих отклонений заключаются в чтении стоп-кодона как аминокислоты, а не в замене одной аминокислоты на другую.

Таблица 13.3 – Отклонения от универсального генетического кода

Кодон	Универсальный код	Необычный код	Проявление
UGA	STOP	Trp	<i>Mycoplasma, Spiroplasma</i> , митохондрии многих видов
CUG	Leu	Thr	Митохондрии дрожжей
UAA, UAG	STOP	Gln	<i>Acetabularia, Tetrahymena, Paramecium</i> ,
UGA	STOP	Cys	<i>Euplotes</i>

### СТРУКТУРА тРНК

Для трансляции четырехбуквенного языка ДНК и мРНК в 20-аминокислотный язык белков **необходимы** тРНК и ферменты, которые называются **аминоацил-тРНК-синтетазы**.

Чтобы принять участие в белковом синтезе молекула тРНК **должна**

(1) **химически связаться** с соответствующей аминокислотой посредством высокоэнергетической связи, т.е. должна быть образована **аминоацил-тРНК**,

(2) затем антикодон этой аминоацил-тРНК связывается с кодоном в мРНК так, чтобы активированная аминокислота могла быть присоединена к растущей полипептидной цепи (рисунок 13.4).

В бактериальных клетках обнаружено около 40 различных тРНК и приблизительно 50–100 тРНК в клетках растений и животных.

Таким образом, **число тРНК** в большинстве клеток с одной стороны **превышает число аминокислот** (20), используемых в белковом синтезе, а с другой стороны, отличается от числа кодонов для аминокислот (61) в генетическом коде.

Следовательно, многие аминокислоты могут присоединяться **более, чем к одной** тРНК (это объясняет, почему число тРНК больше, чем число аминокислот).

Кроме того, многие тРНК могут **спариваться более чем с одним** кодоном (это объясняет, почему число тРНК может быть меньше, чем число кодонов).

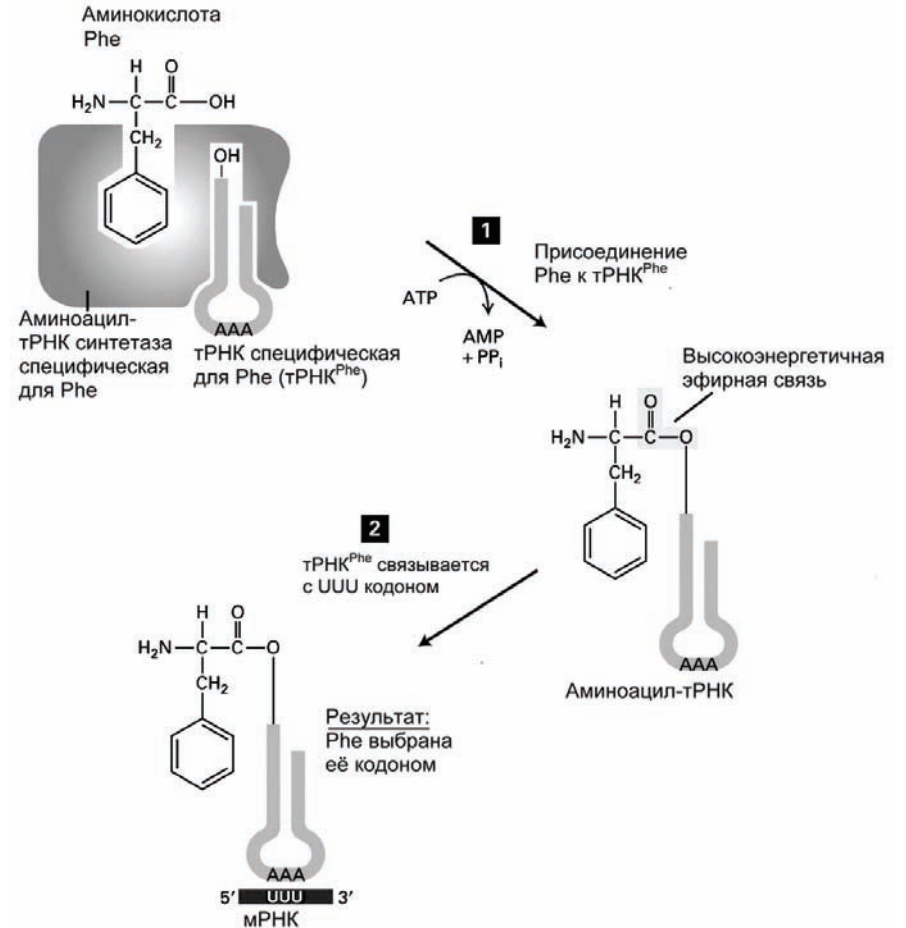


Рисунок 13.4 – Два этапа трансляции последовательности нуклеотидов мРНК в аминокислотную последовательность белковой молекулы

### Трехмерная структура тРНК.

Функционирование молекулы тРНК, имеющей длину 70–80 нуклеотидов, зависит от правильности организации трехмерной структуры тРНК (рисунок 13.5).

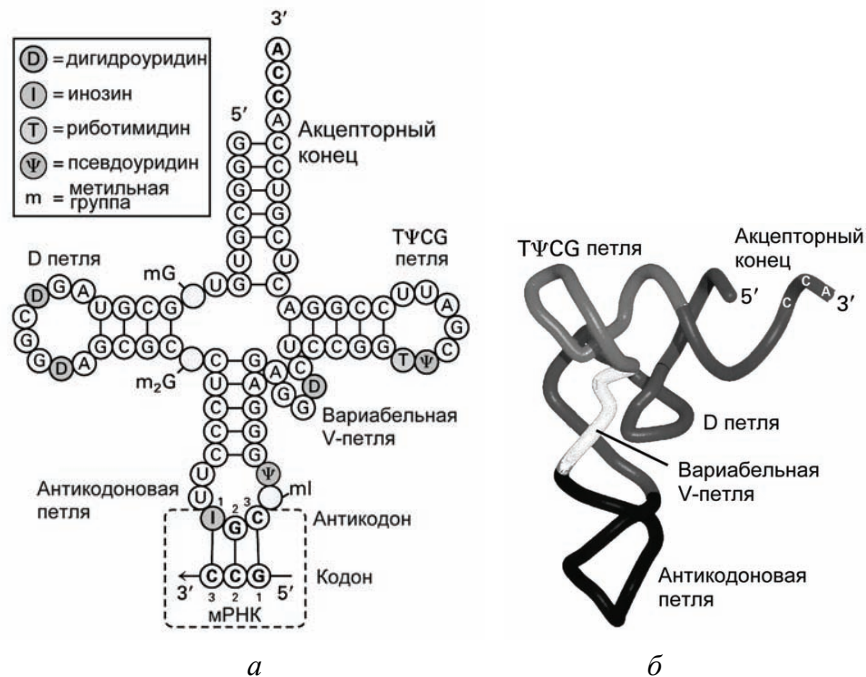


Рисунок 13.5 – Структура тРНК: *а* – плоская схема, *б* – объемная схема

В цитозоле все тРНК имеют подобные структуры с чередованием "черешков" и петель (*stem-loop arrangement*). Эти структуры при двумерном их изображении имеют форму кленового листа или трилистника (*cloverleaf*) (рисунок 13.5(а)).

Четыре лепестка тРНК представляют собой короткие участки двойной спирали, стабилизированные уотсон-криковским спариванием рибонуклеотидов. Три из четырех лепестков завершаются петлями, содержащими семь или восемь нуклеотидов, а четвертый "черешок" (*акцепторный* конец или акцепторный черешок (*acceptor stem*)) содержит 3' и 5' концы тРНК.

Три нуклеотида, составляющие антикодон, расположены на середине средней петли, что обеспечивает возможность сближения с

кодоном мРНК и кодон-антикодонового спаривания. Эта петля называется *антикодоновой*.

Во всех тРНК *на 3'-конце* акцепторного черешка находится нуклеотидная последовательность **ССА**, которая добавляется к тРНК уже после её синтеза и процессинга. Некоторые рибонуклеотиды в большинстве тРНК также подвергаются модификации после синтеза.

Трехмерная структура тРНК напоминает латинскую букву "L" (иногда пишут, что в проекции на плоскость она имеет форму бумеранга) с антикодоновой петлей и акцепторным "черешком" на концах (рисунок 13.5(б)).

### НЕСТАНДАРТНОЕ СПАРИВАНИЕ НУКЛЕОТИДОВ КОДОНА И АНТИКОДОНА

В идеальном случае стандартного (строгого) уотсон-криковского спаривания между кодонами и антикодонами клетки должны были бы иметь точно 61 различную тРНК, для каждого кодона, которые задают аминокислоты.

Однако многие клетки содержат меньше, чем 61 тРНК. Это объясняется способностью антикодонов тРНК (но не обязательно каждого из них) распознавать более одного кодона, задающего аминокислоту.

Первое и второе нуклеиновые основания кодона почти всегда образуют стандартные уотсон-криковские пары с, соответственно, третьим и вторым нуклеотидами соответствующего антикодона (рисунок 13.6).

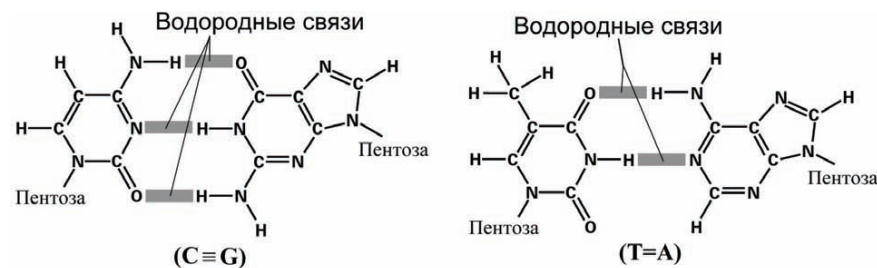


Рисунок 13.6 – Стандартные уотсон-криковские пары



Однако, для *третьего* нуклеотида *в кодоне* мРНК или, соответственно, *первого в антикодоне* тРНК, существует возможность *нестроого соответствия*. Позиция, в которой возможно отклонение от строгого правила А-У, С-Г, получила название *нестрогой* (нерешительной, качающейся, *wobble*) позиции.

В частности, важным является G-U нестрогое спаривание, при котором компоненты пары почти также хорошо структурно "подогнаны", как и при строгом G-C спаривании (рисунок 13.7).

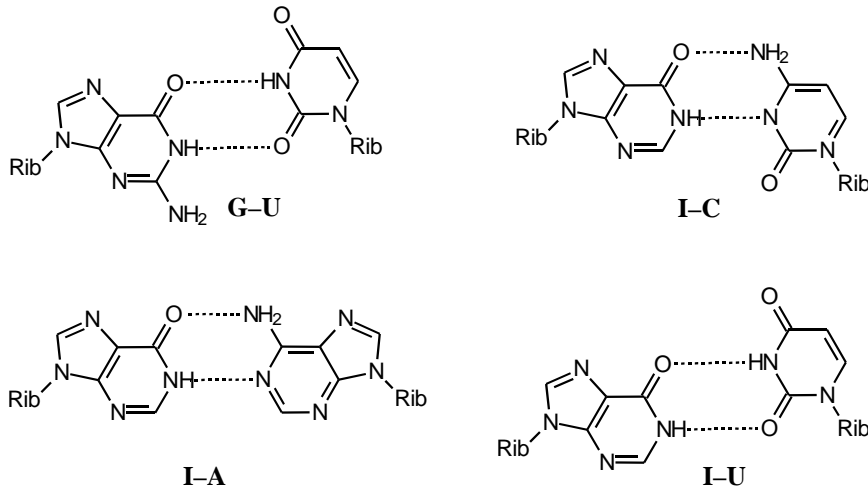


Рисунок 13.7 – Строение нестандартных уотсон-криковских пар

Поэтому данный антикодон с G в первой (*wobble*) позиции может спариться с двумя соответствующими кодонами, имеющими любой из пиримидинов (С или U) в третьей позиции (рисунок 13.8). Например, оба кодона фенилаланина UUU и UUC (5'→3') распознаются тРНК, имеющей антикодон GAA (5'→3').

На самом деле, *любые два кодона* типа NNPyg (где N – любое основание, а Pyg – пиримидин) задают *одну и ту же* аминокислоту и декодируются одной тРНК с G в первой, качающейся, позиции антикодона.

Хотя аденин редко встречается в антикодонной нестрогой позиции, многие тРНК растений и животных содержат в этой позиции *инозин, I* (результат дезаминирования аденина). Инозин может образовывать нестандартные пары с А, С и U (рисунок 13.7).

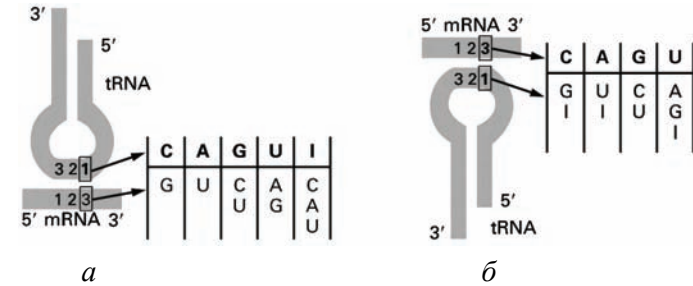


Рисунок 13.8 – Нестандартное кодон-антикодон спаривание – нуклеиновое основание в нестрогой (*wobble*) позиции и возможные для него парные основания: *а* – первая *wobble*-позиция антикодона, *б* – третья *wobble*-позиции кодона

Поэтому тРНК с инозином в первой *wobble*-позиции может распознать соответствующий кодон мРНК А, С или U в третьей *wobble*-позиции. Именно поэтому инозин-содержащие тРНК интенсивно используются в трансляции *кодонов-синонимов*, задающих одну и ту же аминокислоту.

Например, из шести кодонов *лейцина* четыре кодона (CUA, CUC, CUU и UUA) распознаются одной тРНК с антикодоном 3'-GAI-5', инозин в "качающейся" позиции образует нестандартные пары с третьим нуклеотидом во всех четырех кодонах. В случае кодона UUA нестандартное спаривание G=U происходит между позицией 3 антикодона и позицией 1 кодона.

#### АКТИВАЦИЯ АМИНОКИСЛОТ АМИНОАЦИЛ-тРНК-СИНТЕАЗОЙ

В действительности, распознавание кодона (или кодонов) задающего данную аминокислоту конкретной тРНК – это второй этап в декодировании генетической информации. Первый шаг – присоединение соответствующей аминокислоты к тРНК – катализируется специальным ферментом *аминоацил-тРНК-синтетазой*. Каждая из 20 различных

синтетаза распознает **одну** аминокислоту и **все** совместимые с ней (родственные) тРНК.

Родственные тРНК, имеющие разную первичную, но одинаковую третичную структуру и акцептирующие одну и ту же аминокислоту называются **изоакцепторными** тРНК.

Аминоацил-тРНК-синтетаза присоединяет аминокислоту к свободному 2' или 3' гидроксилу пентозы аденозина на 3'-конце молекулы тРНК в ходе **АТФ-зависимой реакции**.

В этой реакции (рисунок 13.4) аминокислота присоединяется к тРНК высокоэнергетичной связью и поэтому говорят, что она **активируется**. Энергия этой связи впоследствии расходуется на образование пептидной связи, соединяющей соседние аминокислоты в растущей полипептидной цепи.

Равновесие в реакции аминоациллирования сдвигается в сторону активации аминокислот вследствие **гидролиза** высокоэнергетичной фосфор-ангидридной связи в высвобождаемом пирофосфате и образования ортофосфата. Эту реакцию катализирует фермент **пирофосфатаза**, который, таким образом, играет важную роль в энергетическом обеспечении направленности аминоациллирования.

Поскольку аминокислоты подобны, то аминоацил-тРНК-синтетаза иногда ошибается. Эти ошибки, однако, устраняются самой синтетазой, поскольку она имеет специальный **механизм коррекции ошибок**, который в литературе часто называют термином **пруфридинг** (*proofreading*).

"Правильно" аминоациллированная тРНК покидает синтетазу, а "неправильно" – остается связанной в активном центре фермента, который катализирует реакцию удаления "неправильной" аминокислоты от тРНК.

Такой механизм **гарантирует** доставку к месту синтеза белка необходимых аминокислот. В результате в ходе трансляции *E. coli* случается только **одна** ошибка на 50 000 кодонов, что подтверждает высокую эффективность механизма коррекции ошибок аминоацил-тРНК-синтетазой.

## РИБОСОМНЫЕ РНК

Если бы взаимодействие всех компонентов, которые участвуют в трансляции мРНК, происходило бы в свободном растворе, то вероятность одновременной их встречи была бы ничтожна и скорость полимеризации была бы крайне низкой. Эффективность трансляции обеспечивается связыванием мРНК и аминоациллированных тРНК с **рибосомами** – наиболее многочисленными из присутствующих в клетке РНК-белковых комплексов, которые реализуют элонгацию полипептидов **со скоростью 3–5 аминокислот в секунду**.

Поэтому **небольшие** белки, состоящие из 100–200 аминокислот, синтезируются **за минуту или менее того**. С другой стороны, требуется **2–3 часа**, чтобы синтезировать **самый большой** из известных белков, **титин**, который обнаружен в мышцах, и который состоит более, чем из 30 000 аминокислотных остатков. Тот клеточный "агрегат", который выполняет эту работу, обязан быть точным и надежным.

С помощью электронного микроскопа рибосомы сначала были обнаружены как небольшие, дискретные, богатые РНК частицы в клетках, секретирующих большие объемы белков. Однако их роль в биосинтезе белков не была ясна, до тех пор, пока не была выделена чистая рибосомная фракция. **Эксперименты in vitro** с радиоактивно мечеными аминокислотами в такой фракции показали, что аминокислоты **сначала** присоединяются к аминокислотным цепям, которые растут на рибосоме, а только **потом** появляются в завершенных белках.

Рибосома состоит из **трех** (в бактериях) или **четырех** (в эукариотах) различных молекул **рРНК** и **нескольких десятков** (до 83-х) **белков**, которые организованы в **две субъединицы** – большую и малую (рисунок 13.9).

Субъединицы рибосомы и молекулы рРНК обычно обозначаются в **единицах Сведеборга (S)** – единицах измерения скорости седиментации взвешенных частиц центрифугируемых в стандартных условиях. Малая субъединица рибосомы содержит одну молекулу рРНК, которую называют **малой рРНК**. Большая субъединица включает молекулу

большой рРНК и молекулу 5S-рРНК, а у *позвоночных* еще одну молекулу 5,8S-рРНК дополнительно.

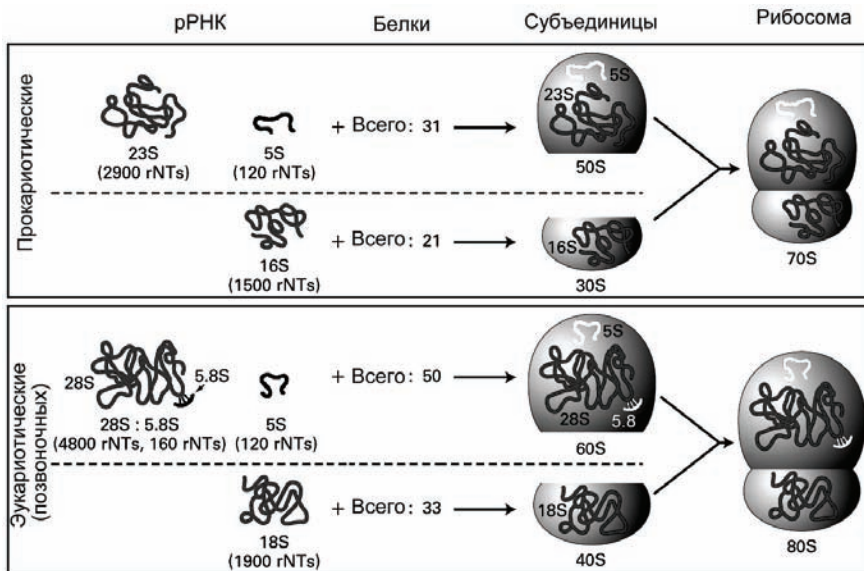


Рисунок 13.9 – Составные части рибосом в прокариотах и эукариотах

Длина молекул рРНК, количество белков в каждой субъединице и, следовательно, размер субъединиц различен в бактериальных и эукариотических клетках. Собранный рибосома представляет собой 70S в бактериях и 80S у позвоночных.

Но намного интереснее этих различий то **структурное и функциональное подобие**, которое наблюдается между рибосомами всех организмов. Это подобие является **еще одним** отражением общего эволюционного происхождения основных компонентов биологических клеток.

На сегодняшний день установлены нуклеотидные последовательности больших и малых рРНК нескольких тысяч организмов. Хотя первичная нуклеотидная последовательность этих рРНК существенно варьируется, но **подобные** части каждого типа РНК теоретически могут

сформировать все те спирали и петли, которые образуют **подобную** трехмерную структуру каждой рРНК во всех организмах.

Реальная пространственная структура бактериальной рРНК из *Thermus thermophilus* недавно была определена методом рентгеноструктурной кристаллографии 70S рибосомы.

Множественные, относительно небольшие рибосомные белки ассоциированы, главным образом, с поверхностью рРНК. Хотя количество белковых молекул в рибосоме намного превышает число молекул рРНК, последние составляют около 60% массы рибосомы.

В ходе трансляции рибосома движется вдоль мРНК, взаимодействуя со многими белковыми факторами и тРНК, и претерпевает большие конформационные изменения.

Несмотря на сложность рибосомы, достигнут значительный прогресс в определении общей структуры бактериальных рибосом и идентификации их различных реакционных центров. В результате рентгеновских кристаллографических исследований 70S рибосомы *Thermus thermophilus*, например, не только был выявлен размер и общая форма рибосомных субъединиц, но также были локализованы позиции, в которых с рибосомой связывается тРНК в процессе элонгации растущей белковой цепи.

Кроме того, эффективные химические методики, такие, как "footprint" (специфическая ассоциация с нуклеотид-связывающимися белками), были использованы для идентификации специфических нуклеотидных последовательностей в рРНК, которые связываются с белками или другими РНК. Через 40 лет после открытия рибосом их структура и функции в ходе белкового синтеза наконец стали ясны.

#### ВЫВОДЫ

✓ Генетическая информация транскрибируется с ДНК в мРНК в форме непрерывающегося, вырожденного триплетного **кода**, в котором нет знаков препинания.

✓ Каждая аминокислота кодируется одной или несколькими трехнуклеотидными последовательностями (**кодонами**) в мРНК. Каждый

кодон задает одну аминокислоту, но большинство аминокислот кодируется несколькими кодонами.

✓ Метиониновый кодон AUG в большинстве случаев является **стартовым**, определяя аминокислоту на NH<sub>2</sub>-конце белковой цепочки. Три кодона (UAA, UAG, UGA) выполняют функцию **стоп**-кодонов и не задают аминокислот.

✓ **Рамка считывания**, непрерывная последовательность кодонов в мРНК от специфического старт-кодона до стоп-кодона, транслируется в линейную последовательность аминокислот в полипептидной цепи.

✓ Декодирование нуклеотидной последовательности мРНК в аминокислотную последовательность белка зависит от тРНК и аминоацил-тРНК-синтетаз.

✓ Все тРНК имеют **подобную** трехмерную структуру, которая включает акцепторный конец для присоединения специфической аминокислоты и антикодоновую петлю с трехосновой антикодоновой последовательностью на ее конце. Антикодон может спариваться с соответствующим кодоном в мРНК.

✓ Вследствие образования нестандартных пар тРНК может спариваться **более чем с одним** кодоном мРНК и, наоборот, данный кодон может спариться с **несколькими** тРНК. В любом случае, однако, только правильные аминокислоты вставляются в растущую полипептидную цепь.

✓ **Каждая** из 20 аминоацил-тРНК-синтетаз распознает **единственную** аминокислоту и ковалентно связывает её с родственными тРНК, формируя аминоацил-тРНК. Эта реакция активирует аминокислоту и она может участвовать в образовании пептидной связи.

✓ И прокариотические, и эукариотические **рибосомы** – большие рибонуклеопротеиновые комплексы, на которых происходит трансляция – состоят из малой и большой субъединиц. Каждая субъединица содержит значительное число различных белков и одну главную молекулу рРНК (малую или большую). Большая субъединица также включает одну дополнительную 5S рРНК в бактериях и две дополнительных рРНК в клетках эукариот (5S и 5,8S у позвоночных).

✓ Аналогичные рРНК многих различных организмов сворачиваются в чрезвычайно подобные трехмерные структуры, содержащие многочисленные петли и места связывания белков, мРНК и тРНК. Значительно меньшие по размеру рибосомные белки ассоциируются с периферическими областями рРНК.

#### ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Перечислите и охарактеризуйте функции РНК в трансляции.
2. Перечислите свойства генетического кода.
3. Какие кодоны называются нонсенсами?
4. Какие мутации называются миссенс-мутациями?
5. В чем отличие радикальных мутаций от консервативных?
6. Что называется рамкой считывания?
7. Приведите примеры нестандартного спаривания кодона и антикодона.
8. Какова функция аминоацил-тРНК-синтетазы?

### Лекция 14. СИНТЕЗ БЕЛКОВ НА РИБОСОМАХ

#### ПЛАН ЛЕКЦИИ:

1. Инициация трансляции.
2. Элонгация трансляции.
3. Терминация трансляции.
4. Полисомы.

#### ИНИЦИАЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ

Подобно транскрипции, сложный процесс трансляции может быть разделен на три стадии – инициация, элонгация и терминация. Рассмотрим трансляцию в клетках эукариот, имея в виду, что механизм трансляции в общих чертах одинаков во всех организмах.

В большинстве мРНК **стартовым** является AUG – **кодон метионина**. Поэтому распознавание этого кодона является критически важным для установления правильной рамки считывания (*reading frame*) для всей мРНК.

И в прокариотах, и в эукариотах существует *две различных метиониновых тРНК*:

- 1)  $tRNA_i^{Met}$  – может инициировать синтез белка,
- 2)  $tRNA^{Met}$  – способна только добавлять метионин в уже растущую полипептидную цепь.

Одна и та же аминоксил-тРНК-синтетаза (MetSR) аминоксилуирует *обе* тРНК метионином. Но только  $Met-tRNA_i^{Met}$  (т.е.  $tRNA_i^{Met}$  с присоединенным активированным метионином) может связаться с особым активным центром, **Р-центром**, малой рибосомной субъединицы, чтобы начать синтез полипептидной цепи. Обычная  $Met-tRNA^{Met}$ , равно как и остальные аминоксилуированные тРНК, связывается только с другим активным центром рибосомы, **А-центром**.

После терминации предыдущей трансляции диссоциировавшие 40S и 60S субъединицы рибосомы связываются с факторами инициации eIF3 и eIF6, соответственно, что делает их готовыми к следующему циклу трансляции (рисунок 14.1).

В обозначении "eIF" символ "е" означает эукариотический фактор, "I" означает процесс инициации, а "F" – сокращение слова "фактор".

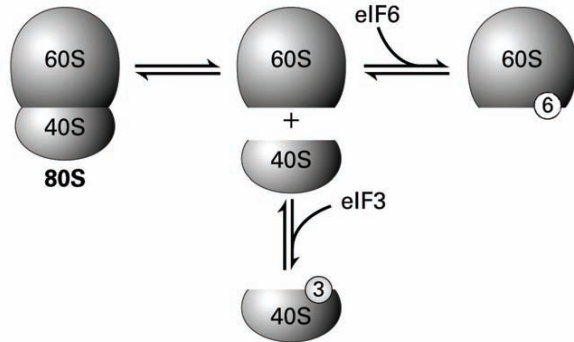


Рисунок 14.1 – Связывание субъединиц рибосомы с факторами инициации

**В ходе первого этапа** трансляции происходит сборка комплекса из рибосомной субъединицы, мРНК и активированной иницирующей тРНК, которая правильно позиционируется на стартовом кодоне.

**Пред-инициаторный комплекс** трансляции формируется, когда комплекс (40S-субъединица-eIF3) связывается с eIF1A и тройным комплексом ( $Met-tRNA_i^{Met}$ -eIF2-GTP) (рисунок 14.2, этап 1) (GTP – гуанозин трифосфат).

Клетка может **регулировать** белковый синтез с помощью **фосфорилирования серина** в факторе инициации eIF2, связанном с GTP, в результате чего фосфорилированный eIF2 не способен заменить уже использованный GDP на GTP и, следовательно, не может связаться с  $Met-tRNA_i^{Met}$ . Это ингибирует синтез белка.

В ходе инициации трансляции 5'-кэп мРНК связывается eIF4E субъединицей кэп-комплекса eIF4.

Комплекс (мРНК-eIF4) затем объединяется с пред-инициаторным комплексом, благодаря взаимодействию eIF4G-субъединицы и eIF3, образуя **инициаторный комплекс** (рисунок 14.2, этап 2).

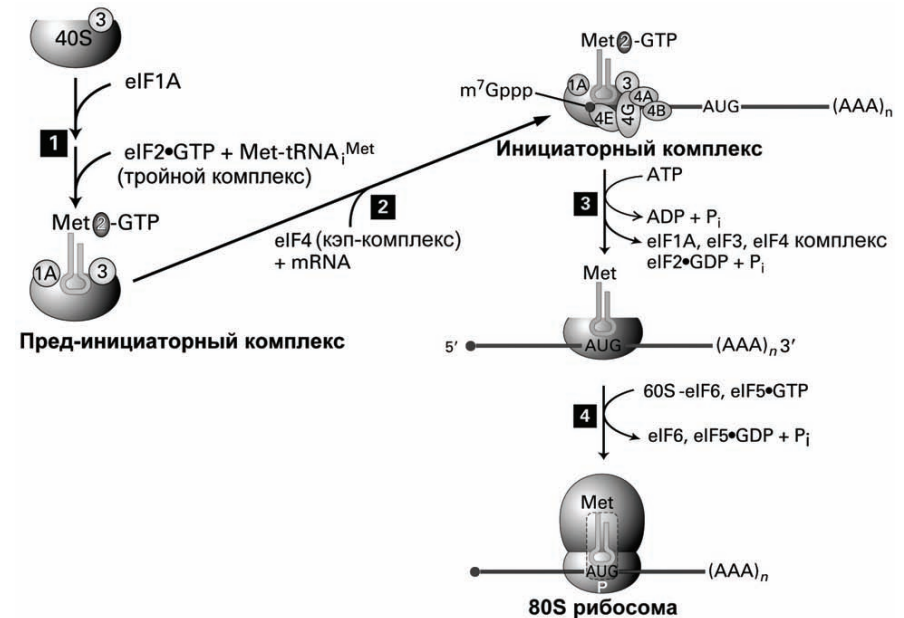


Рисунок 14.2 – Этапы инициации трансляции



Затем инициаторный комплекс сдвигается вдоль – *сканирует* – мРНК, при этом субъединица eIF4A, обладающая *геликазной* активностью, расплетает вторичную структуру мРНК, используя энергию гидролиза АТФ.

Сканирование *прекращается*, когда антикодон Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> *распознает стартовый кодон*, которым является первый AUG вниз от 5'-конца в большинстве эукариотических мРНК (рисунок 14.2, этап 3).

Распознавание стартового кодона приводит к гидролизу GTP, связанному с eIF2. Это необратимое событие исключает дальнейшее сканирование мРНК.

Выбор иницирующего кодона AUG облегчается его специфическим нуклеотидным окружением, которое называется *последовательностью Козак* ("Kozak sequence", в честь Марилин Козак, которая открыла ее):

(5')-ACCAUGG-(3').

Первый А и последний G в этой последовательности оказывают самое сильное влияние на эффективность инициации трансляции.

Сразу после того, как малая рибосомная субъединица с присоединенным Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> правильно расположится на стартовом кодоне, присоединение к ней большой (60S) субъединицы завершает формирование 80S-рибосомы.

Это требует участие *еще одного* фактора eIF5 и гидролиза связанного с ним GTP (рисунок 14.2, этап 4).

То, что реакция объединения большой и малой субъединиц связана с гидролизом GTP, делает её необратимым шагом, и поэтому рибосомные субъединицы не диссоциируют до тех пор, пока вся мРНК не транслируется и не произойдет терминация синтеза белка.

Во время элонгации растущий полипептид *остаётся присоединенным* к Р-центру рибосомы.

В большинстве эукариот описанный выше синтез протеинов начинается на участке порядка 100 нуклеотидов от экзипированного 5'-конца мРНК. Однако в некоторых клеточных мРНК существует так называемый *внутренний участок связывания рибосомы*, IRES (*internal*

*ribosome entry site*), расположенный далеко от 5'-конца. Кроме того, трансляция некоторых вирусных мРНК, в которых отсутствует 5'-кэп, иницируется на IRES не изученными пока механизмами взаимодействия инфицированной клетки с вирусом.

По-видимому, те же факторы инициации трансляции, которые способствуют сканированию рибосомы от 5'-конца в поисках AUG, необходимы и для определения AUG во внутреннем участке связывания рибосомы, но деталей идентификации IRES пока не известно.

Предварительно есть основания предполагать, что IRES свернут в особую *структуру*, которая присоединяется к *третьему* активному центру рибосомы, *Е-центру*, тем самым рибосома правильно устанавливается центром Р напротив внутреннего AUG стартового кодона.

### ЭЛОНГАЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ

Итак, установленный на старт-кодоне эукариотический комплекс (80S-рибосома–Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>) готов к пошаговому наращиванию белковой цепи. Подобно стадии инициации трансляции, необходим набор специализированных белков – *факторов элонгации*, EF (*elongation factors*).

Основными этапами элонгации являются:

- 1) присоединение следующей аминоксил-тРНК,
- 2) конформационное изменение рибосомы,
- 3) формирование пептидной связи,
- 4) сдвиг, или *транслокация*, рибосомы на один кодон вдоль мРНК.

В момент завершения инициации трансляции Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> связана с Р-центром 80S-рибосомы (рисунок 14.3). Этот центр называется "Р", поскольку именно здесь располагается тРНК, химически связанная с растущей полипептидной (*polyPeptide*) цепью.

Вторая аминоксил-тРНК доставляется к рибосоме в виде *тройного комплекса* в комбинации с EF1α и GTP и присоединяется к А-центру, названному так, поскольку к нему присоединяется *Аминоациллированная* тРНК (рисунок 14.3, этап 1). Если антикодон второй аминоксил-тРНК

правильно спаривается со вторым кодоном мРНК, то происходит *гидролиз* GTP, связанного с EF1 $\alpha$ .

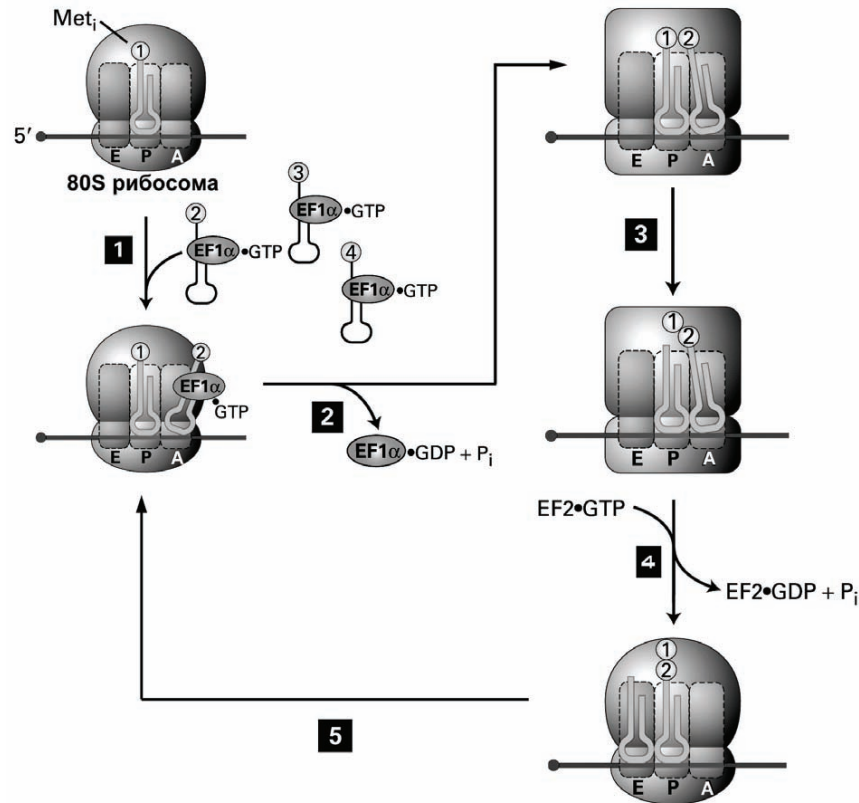


Рисунок 14.3 – Этапы элонгации трансляции

*Гидролиз GTP* стимулирует *конформационное изменение* рибосомы (на рисунке 14.3 первоначально "овальная" рибосома стала "квадратной"). Это конформационное изменение рибосомы

- *прочно* связывает аминоксил-тРНК в А-центре,
- индуцирует *десорбцию* дефосфорилированного комплекса (EF1 $\alpha$ -GDP),

- *сближает* 3'-конец тРНК на А-центре с 3'-концом Met-tRNA<sub>1</sub><sup>Met</sup> в Р-центре (рисунок 14.3, этап 2).

Гидролиз GTP и, следовательно, прочное связывание с рибосомой *не происходит*, если антикодон аминоксил-тРНК *не спаривается* с кодоном в А-центре. В этом случае, тройной комплекс диффундирует прочь, оставляя свободным А-центр, с которым будут пытаться связаться очередные комплексы (аминоксил-тРНК-EF1 $\alpha$ -GTP) до тех пор, пока не образуется правильная комбинация кодон-антикодон и произойдет их спаривание. Это явление обеспечивает "точность сборки" полипептидной цепи.

Трехмерная модель рибосомы изображена на рисунке 14.4.

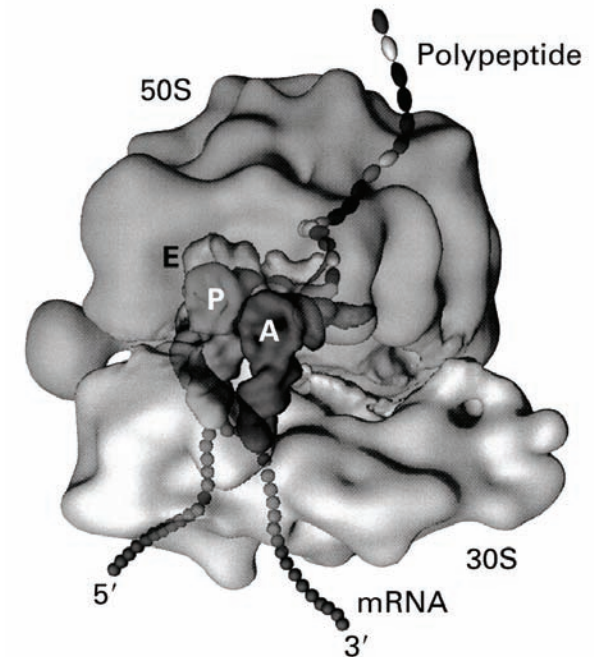


Рисунок 14.4 – Модель 70S рибосомы *E. coli* с тремя тРНК в Е, Р и А центрах

Когда Met-tRNA<sub>1</sub><sup>Met</sup> находится в Р-центре и вторая аминоксил-тРНК прочно связана в А-центре  $\alpha$ -аминогруппа второй аминоксилы реаги-

рует с инициаторной тРНК ( $\text{Met-tRNA}_i^{\text{Met}}$ ), которая активирована метионином, при этом образуется пептидная связь (рисунок 14.3, этап 3, рисунки 13.1 и 13.4). Эта **пептидилтрансферная реакция** катализируется большой рРНК, которая идеально точно **ориентирует** в пространстве взаимодействующие атомы, обеспечивая протекание реакции.

Каталитическая активность именно большой рРНК была **доказана**, тем, что она катализировала пептидилтрансферную реакцию даже в условиях, когда из большой субъединицы рибосомы были **удалены все малые белки**. Другой аргумент в пользу каталитической активности большой рРНК, был получен из кристаллографических исследований пространственной структуры рибосомы, которые показали, что вблизи места, где происходит синтез пептидной связи, **нет рибосомных белков**.

**После** синтеза пептидной связи рибосома сдвигается (происходит так называемая **транслокация**) вдоль мРНК на один кодон. Этот шаг транслокации обеспечивается гидролизом GTP эукариотического комплекса (EF2-GTP).

В результате транслокации  $\text{tRNA}_i^{\text{Met}}$ , уже без активированного метионина, смещается в Е-центр – центр "выхода" (*exit*) тРНК из рибосомы. А вторая тРНК, ковалентно связанная теперь с **дипептидом**, перемещается в Р-центр (рисунок 14.3, этап 4).

Таким образом, транслокация возвращает рибосому в "исходную" конформацию, в состоянии, в котором А-центр свободен и способен принять очередную аминокислотированную тРНК, в комплексе с EF1 $\alpha$  и GTP, начиная второй (а затем и все последующие) цикл элонгации (рисунок 14.3, этап 5).

Такие, циклы элонгации, которые изображены на рисунке 14.3, добавляющие к С-концу растущей полипептидной цепи за цикл по одной аминокислоте в соответствии с последовательностью кодонов мРНК, повторяются до тех пор, пока не будет достигнут стоп-кодон.

При этом **каждый раз** на этапе 2 конформационное изменение, которое претерпевает рибосома, стимулирует **сброс** уже дезацилированной тРНК с Е-центра. По мере того, как растущая полипептидная цепь становится длиннее, она проходит сквозь особый

канал в теле большой рибосомной субъединицы и выходит из неё наружу напротив той стороны, вдоль которой большая субъединица взаимодействует с малой (рисунок 14.4).

Положение тРНК в центрах А, Р и Е было также визуализировано при определении кристаллической структуры бактериальной рибосомы. Насколько это возможно в черно-белом исполнении, это показано на рисунке 14.5.

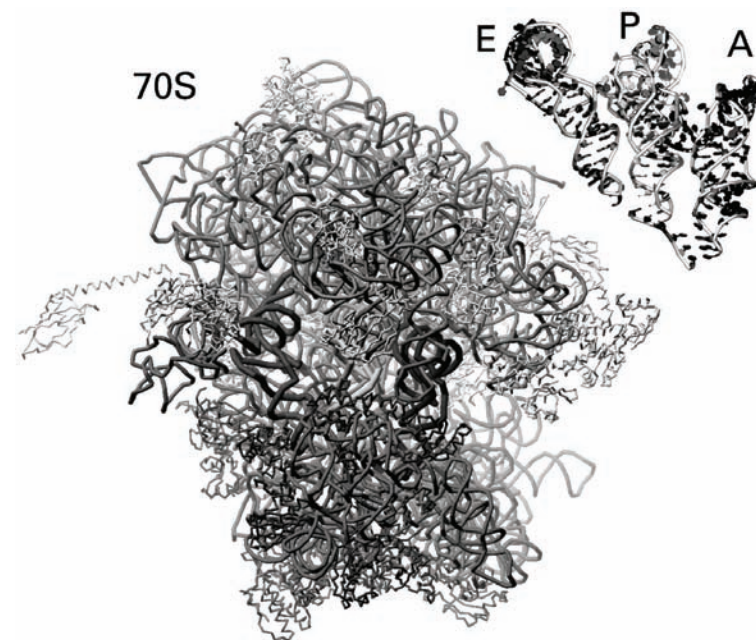


Рисунок 14.5 – Модель 70S рибосомы *N. thermophilus*

Оказалось, что между тРНК, расположенными в А и Р центрах, происходит спаривание нуклеиновых оснований (рисунок 14.5, справа вверх).

Такой гибрид РНК-РНК, связанный **только тремя парами нуклеотидов** нестабилен при физиологических условиях. Однако множественные взаимодействия между молекулами рРНК с одной стороны и базовыми доменами тРНК (например D- и ТΨСG-петлями

(рисунок 13.5)), с другой стороны, стабилизируют тРНК в А и Р центрах, в то время, пока остальные РНК-РНК взаимодействия "чутко" контролируют правильность кодон-антикодонного спаривания, обеспечивая правильность чтения генетического кода.

### ТЕРМИНАЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ

Финальная стадия трансляции, так же как инициация и элонгация, требует специфических молекулярных сигналов, которые превращают стоп-сигнал стоп-кодона в диссоциацию комплекса *мРНК-рибосома-тРНК-полипептид* (рисунок 14.6).

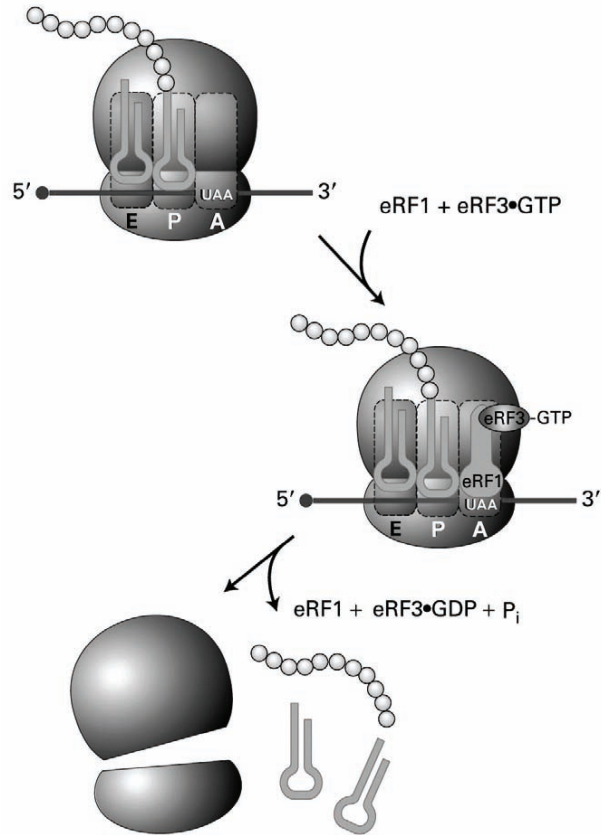


Рисунок 14.6 – Терминация трансляции у эукариот  
74

Были обнаружены *два* особых белковых *фактора терминации*, которые называются *факторами высвобождения* (или отделения) полипептидной цепи от рибосомы (*release factors, RF*). Эукариотический eRF1, чья форма подобна форме тРНК, действует, по-видимому, просто связываясь с А-центром и непосредственно распознавая стоп-кодон.

Подобно некоторым из факторов инициации и элонгации, фактор высвобождения eRF3 связан с GTP. Связывание комплекса (eRF3–GTP) с eRF1 обеспечивает отделение полипептида от тРНК и завершение синтеза белка (рисунок 14.6).

Бактерии, в отличие от эукариот, имеют *два* фактора высвобождения RF1 и RF2 (которые функционально аналогичны эукариотическому фактору eRF1) и GTP-связанный фактор RF3, аналогичный eRF3.

После высвобождения из рибосомы вновь синтезированный белок с помощью специальных белков шаперонов (смотри рисунок 8.7 в [1]) сворачивается в свою нативную трехмерную конформацию.

Дополнительные белковые факторы терминации обеспечивают

- 1) диссоциацию рибосомы,
- 2) разъединение субъединиц, мРНК и последней тРНК, которые теперь вновь готовы участвовать в новом цикле синтеза нового белка.

Каждая стадия трансляции происходила при участии GTP-связывающих белков. Эти белки принадлежат к *суперсемейству ГТФаз* – белков-переключателей, которые циклируют между ГТФ-активной и ГДФ-неактивной формами (рисунок 14.7).

Гидролиз связанного с ГТФазой GTP вызывает конформационное изменение *или* самой ГТФазы, *или* связанных с ней белков, что и срабатывает как переключатель во многих молекулярных процессах.

Например, в ходе инициации трансляции гидролиз (eIF2–GTP) в (eIF2–GDP) при достижении стартового кодона останавливает сканирование мРНК и разрешает связывание большой субъединицы с малой (рисунок 14.2, этап 3).

Аналогично, гидролиз (EF2–GTP) в (EF2–GDP) в ходе элонгации приводит к транслокации рибосомы вдоль мРНК (рисунок 14.3, этап 4).



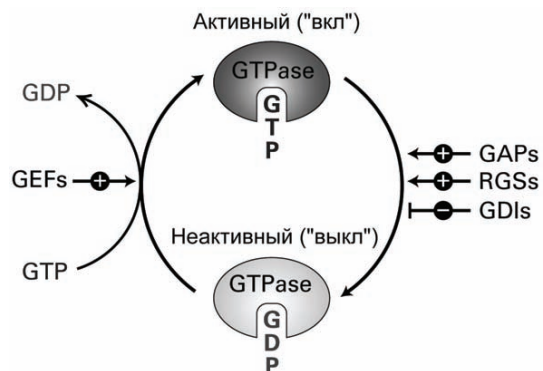


Рисунок 14.7 – Циклирование ГТФазных белков-переключателей между активной и неактивной формами. "Срабатывание" ГТФазы ускоряется белками GAPs (*GTPase-acceleration proteins*) и RGSs (*regulators of G-protein-signaling*) и ингибируется белками GDIs (*guanine nucleotide dissociation inhibitors*). Реактивация ГТФазы обеспечивается белками GEFs (*guanine nucleotide-exchange factors*)

### ПОЛИСОМЫ

В среднем трансляция эукариотической мРНК длится 30–60 секунд. Существуют **два явления**, которые значительно ускоряют этот процесс:

- 1) одновременное транслирование одной молекулы мРНК **несколькими** рибосомами,
- 2) быстрое **рециклирование** рибосомных субъединиц – диссоциировавшие с 3'-конца мРНК субъединицы снова быстро формируют рибосому на 5'-конце.

Одновременная трансляция мРНК несколькими рибосомами действительно наблюдается в электронном микроскопе и при седиментационном анализе, демонстрируя несколько присоединенных к одной мРНК рибосом, синтезирующих белки.

Такие структуры, называемые **полирибосомами** или **полисомами**, видны в виде циркулярных (круговых) образований в электронном микроскопе (рисунок 14.8). Дальнейшие исследования клеток дрожжей объяснили круговую форму полисом и механизм эффективного рециклирования рибосом.

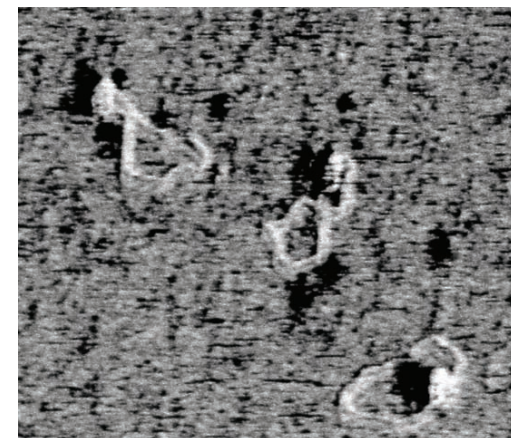


Рисунок 14.8 – Изображение в электронном микроскопе трех полисом

Оказалось, что цитозольные белки PABPI, которые найдены во всех эукариотических клетках – **поли(А)-связывающие белки** (poly(A)-binding protein), одновременно взаимодействуют с поли(А) хвостом мРНК и 4G субъединицей eIF4 фактора. А субъединица 4E этого же фактора eIF4 связывается с кэпом на 5'-конце мРНК. В результате концы мРНК соединяются промежуточными белками и молекула мРНК "закольцовывается" (рисунок 14.9).

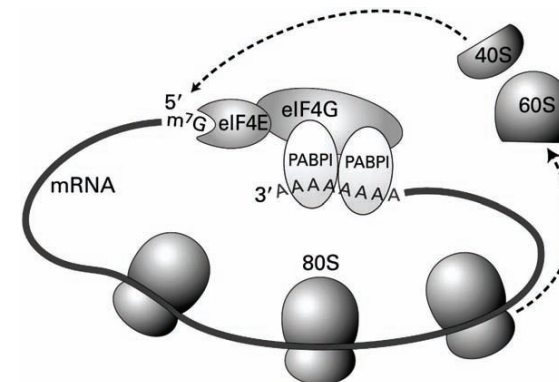


Рисунок 14.9 – Схема синтеза белков на круговой полисоме и рециклирования рибосомных субъединиц



Поскольку два конца мРНК располагаются близко друг к другу, рибосомные субъединицы, освободившиеся на 3'-конце мРНК могут сразу же быть использованы на 5'-конце. Такой циркулярный способ синтеза белков обнаружен во многих эукариотических клетках.

### ВЫВОДЫ

✓ Только **одна** из двух метиониновых тРНК, а именно  $tRNA_i^{Met}$ , может инициировать трансляцию.

✓ Каждая из стадий трансляции – инициация, элонгация и терминация – требуют **участия** специфических белковых факторов, включая ГТФазы – белки-переключатели, которые гидролизуют ГТФ в ГДФ при успешном завершении определенного этапа трансляции.

✓ В ходе **инициации** рибосомные субъединицы объединяются вокруг стартовой точки трансляции с иницирующей метиониновой тРНК ( $Met-tRNA_i^{Met}$ ) спаренной со стартовым кодоном.

✓ Элонгация белковой цепи представляет собой повторяющийся **четырёхэтапный цикл**: (1) отъединение тРНК от А-центра, (2) связывание следующей аминоацил-тРНК с А-центром рибосомы, сопровождающееся высвобождением уже использованной тРНК с центра Е, (3) катализ большой рРНК переноса полипептидной цепи на новую тРНК и образования пептидной связи, и (4) транслокация рибосомы к следующему кодону, при этом происходит перемещение пептидил-тРНК с А на Р центр, а деацилированной тРНК с Р на Е центр.

✓ В каждом цикле элонгации рибосома претерпевает **два** конформационных превращения, стимулируемых ГТФ-связанными белками. **Первое** позволяет прочное связывание новой аминоацил-тРНК в А-центре и выброс тРНК из Е-центра, **второе** приводит к транслокации.

✓ Терминация обеспечивается **двумя** типами факторов: теми, которые распознают стоп-кодоны, и теми, которые стимулируют гидролиз пептидил-тРНК.

✓ Эффективность синтеза белков увеличивается одновременной трансляцией одной мРНК **несколькими** рибосомами. В эукариотах

происходит сближение концов мРНК, обеспечиваемое белковыми факторами, что позволяет быстро рециклировать рибосомные субъединицы, еще более увеличивая эффективность синтеза белков.

### ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Охарактеризуйте этапы инициации трансляции.
2. Охарактеризуйте этапы элонгации трансляции.
3. Охарактеризуйте этапы элонгации трансляции.
4. Охарактеризуйте роль ГТФазных переключателей в трансляции.

## Лекция 15. РЕПЛИКАЦИЯ И РЕПАРАЦИЯ ДНК

### ПЛАН ЛЕКЦИИ:

1. Механизмы репликации.
2. Репликационная вилка.
3. Двухнаправленная репликация.
4. Репарация ДНК

### МОДЕЛИ РЕПЛИКАЦИИ

После расшифровки структуры двойной спирали ДНК Уотсоном и Криком было предположено, что **синтез новых спиралей происходит с использованием уже существующих** (родительских) спиралей в качестве матрицы и формировании **дочерних** спиралей, **комплементарных** родительским.

Такая модель матричного синтеза пар нуклеотидов теоретически может быть реализована либо по **консервативному**, либо по **полуконсервативному** механизму.

Согласно **консервативному механизму**, две дочерние нити могут образовать новую двойную спираль ДНК, или дуплекс (*duplex*), при этом родительский дуплекс будет сохранен.

Согласно **полуконсервативному механизму**, цепи спирали родительской ДНК полностью разъединяются, каждая из них образует новый дуплекс с дочерними цепями, которые образуются на родительских цепях путем спаривания комплементарных нуклеотидов.

Доказательство того, что ДНК реплицируется по полуконсервативному механизму, было получено в классическом эксперименте представленном на рисунке 15.1, который провели Мэтт Мезельсон и Фрэнк Сталь в 1958 году,

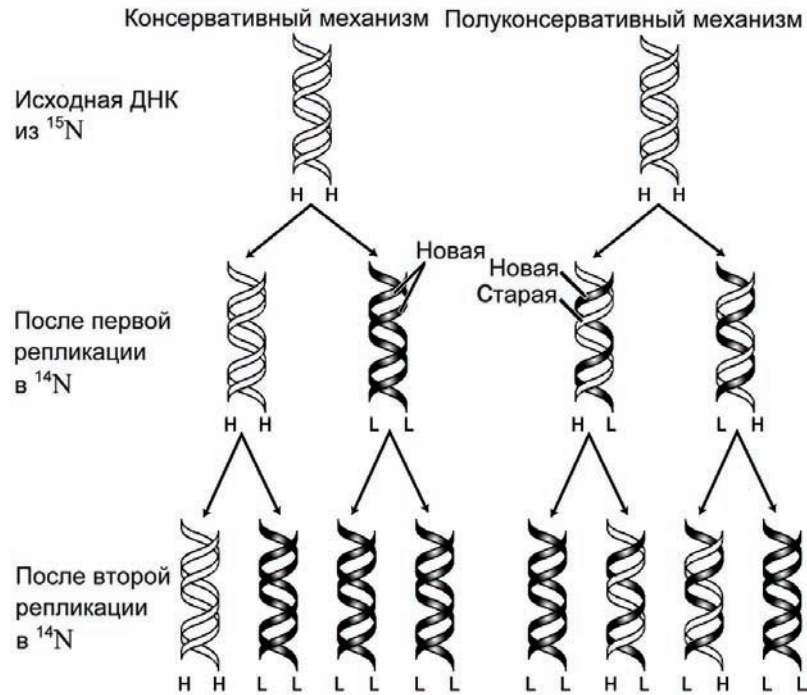


Рисунок 15.1 – Схемы консервативного и полуконсервативного механизмов репликации ДНК

Исходные клетки *E. coli* были выращены в среде содержащей только "тяжелый" изотоп азота <sup>15</sup>N, поэтому все исходные ДНК были "мечены" этим изотопом. Затем, клетки были перенесены в среду, содержащую только "легкий" изотоп азота <sup>14</sup>N. Периодически отбирались образцы, и ДНК каждого образца анализировалась методом центрифугирования в равновесном градиенте плотности. Это давало возможность

зарегистрировать тяжелые (*heavy-heavy*, H-H), смешанные (*heavy-light*, H-L) и легкие (*light-light*, L-L) дуплексы (рисунок 15.2).

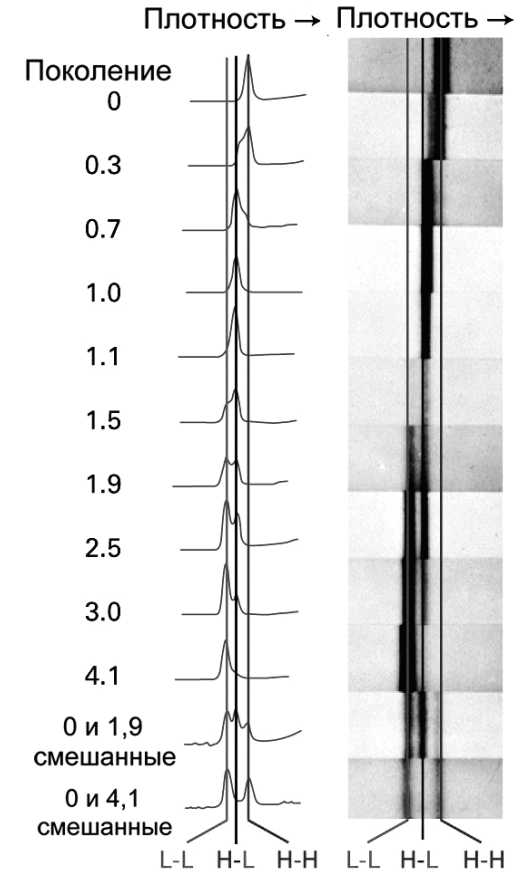


Рисунок 15.2 – Анализ репликации ДНК методом центрифугирования

Если бы репликация проходила по консервативному механизму, то невозможно было бы образование H-L дуплексов, в то время как полуконсервативный механизм в большинстве генерирует как раз H-L дуплексы (рисунок 15.1). Эксперимент показал, что первое дочернее поколение состоит из H-L дуплексов, а во втором (точнее, в 1,9-м)

примерно поровну H-L и L-L дуплексов (рисунок 15.2). В дальнейших поколениях появлялась все большая доля L-L дуплексов, как и предсказывал полуконсервативный механизм репликации.

Таким образом, **копирование** матричной цепи в комплементарную цепь является **универсальной** особенностью **и репликации ДНК, и транскрипции ДНК в РНК**. В обоих случаях информация в матричной цепи сохраняется.

**В некоторых вирусах** одноцепочечные молекулы РНК выполняют функцию матрицы для синтеза комплементарных ДНК или РНК цепей. Однако подавляющее большинство молекул РНК и ДНК в клетках синтезируются **из** имеющихся **дуплексов**.

**Подобно РНК**, молекулы ДНК синтезируются из дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатов (дНТФ). Аналогично синтезу РНК, синтез ДНК идет в направлении 5'→3', поскольку, как и при синтезе РНК, рост цепи идет за счет формирования фосфодиэфирной связи между 3' кислородом растущей цепи и α-фосфатом дНТФ (рисунок 11.1).

Синтез нити ДНК катализируется ферментом **ДНК-полимераза**. Субстратами ДНК-полимеразы являются четыре дезоксирибонуклеозид трифосфата: дАТФ, дЦТФ, дГТФ, и дТТФ.

Как было сказано ранее, **РНК-полимераза** сама находит соответствующую стартовую точку на дуплексе ДНК и инициирует синтез нити РНК, комплементарной матричной ДНК-нити.

**В отличие** от РНК-полимеразы, **ДНК-полимераза не может самостоятельно** инициировать новый (*de novo*) синтез цепи. Для этого ей нужно, чтобы уже существовала цепь или ДНК, или РНК, которая называется **праймер** (рисунок 15.3).

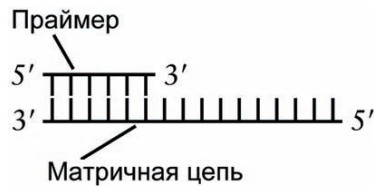


Рисунок 15.3 – Схема праймера репликации

Когда уже есть праймер, спаренный с матричной нитью ДНК, тогда ДНК-полимераза катализирует реакцию присоединения того дНТФ к гидроксильной группе на 3'-конце праймера, который закодирован в матричной цепи.

Если праймером служит РНК, то дочерняя цепь является РНК на 5'-конце и ДНК на 3'-конце.

### РЕПЛИКАЦИОННАЯ ВИЛКА

Для того чтобы дуплекс ДНК мог работать как матрица в процессе репликации, две его нити должны быть расплетены (или ещё говорят, расплавлены, *melted*), чтобы обеспечить доступ к нуклеиновым основаниям тех дНТФ, из которых ДНК-полимераза формирует дочернюю нить.

Это **расплетание**, используя энергию гидролиза АТФ, проводят ферменты **геликазы**.

Расплетание начинается со специфических последовательностей в ДНК, которые называются **началом репликации** (*replication origin*) или просто **ориджином**. Последовательности нуклеотидов в ориджинах разных организмов сильно варьируются, хотя они имеют и общее свойство – в ориджинах **повышенная концентрация А-Т пар**. В таких областях меньше водородных связей между нитями ДНК, и поэтому "легче" осуществлять "плавление" (расплетание) ДНК.

Как только геликаза расплетет дуплекс, особый фермент **праймаза** (специализированная РНК-полимераза) синтезирует **короткий РНК-праймер**, комплементарный расплетенному участку матричной цепи. Спаренный с ДНК праймер **затем** удлиняется **ДНК-полимеразой**, формируя дочернюю цепь.

Область ДНК, в которой собраны все эти ферменты для синтеза дочерних цепей, называется **репликационная вилка** или вилка роста.

В ходе репликации репликационная вилка и ассоциированные с ней белки удаляются от ориджина, что сопровождается ростом торсионных напряжений в ДНК. Эти напряжения снимаются ферментом **топоизомераза I**. Для того чтобы процесс репликации протекал непрерывно и ДНК-полимераза перемещалась и копировала дуплекс ДНК,

*геликаза* должна непрерывно расплетать дуплекс, а *топоизомераза* должна удалять образующиеся суперспирали.

**Главная проблема** при "обработке" ДНК репликационной вилкой вытекает из двух факторов:

- 1) две нити родительской ДНК **антипараллельны**,
- 2) ДНК-полимераза (так же, как и РНК-полимераза) катализирует рост дочерней цепи **только в направлении 5'→3'**.

Синтез дочерней цепи, которая называется **лидирующая цепь**, может происходить непрерывно, начиная с единственного праймера в 5'→3' направлении, т.е. в том направлении, в котором перемещается репликационная вилка (рисунок 15.4).

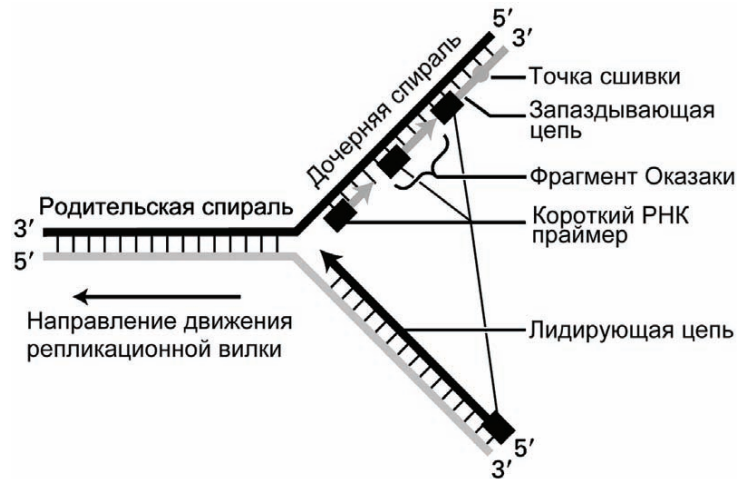


Рисунок 15.4 – Схема формирования лидирующей и запаздывающей цепей

Проблемы возникают при синтезе другой дочерней цепи, которая называется **запаздывающей**.

Поскольку рост запаздывающей цепи должен происходить в 5'→3' направлении, копирование матрицы должно осуществляться в направлении **противоположном** движению репликационной вилки.

Клетка решает эту проблему, **синтезируя новые праймеры** через каждые **несколько сотен** оснований на матричной цепи, по мере того, как

дуплекс расплетается, и все более оснований освобождаются при расплетании.

Каждый из этих праймеров, спаренный с матричной цепью, удлиняется в 5'→3' направлении, образуя непрерывные сегменты, которые называются **фрагменты Оказаки** (в честь Рейджи Оказаки, который их открыл).

РНК-праймер каждого фрагмента Оказаки **удаляется и замещается ДНК-цепью** соседнего растущего фрагмента Оказаки. Фермент **ДНК-лигаза** сшивает соседние фрагменты.

Детальная информация о том, как белки участвуют в репликации ДНК эукариот, была получена главным образом при исследовании малых вирусных ДНК, в частности кольцевой ДНК вируса SV40, инфицирующего обезьян.

На рисунке 15.5 представлены те белки, которые координируют копирование SV40 ДНК в репликационной вилке. Этот многокомпонентный комплекс позволяет клетке реализовывать упорядоченную последовательность событий, которые обеспечивают важные функции клетки.

В молекулярной "машине", которая реплицирует SV40 ДНК, **гексамер вирусного белка**, который называется **большой Т-антиген**, расплетает родительскую спираль в репликационной вилке.

Все остальные белки, которые участвуют в репликации, это собственные белки инфицированной клетки.

**Праймеры** для лидирующей и запаздывающей дочерних цепей ДНК синтезируются комплексом (праймаза–Pol α). В этом комплексе совместно работают **праймаза**, которая синтезирует короткий РНК-праймер, и **ДНК-полимераза α** (Pol α), которая наращивает РНК-праймер дезокси-нуклеотидами, образуя **смешанный РНК-ДНК праймер**.

Далее праймер наращивается в дочернюю нить ДНК ферментом **ДНК-полимераза δ** (Pol δ), которая точнее, с меньшим количеством ошибок, чем Pol α, копирует матричную цепь. В литературе ДНК-полимеразу δ еще называют **ДНК-полимераза III**.

Pol δ формирует **комплекс** (PCNA–Rfc–Pol δ) с **фактором репликации C**, Rfc (*replication factor C*), и **ядерным антигеном**

размножения клеток, PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), который **заменяет** комплекс (праймаза–Pol  $\alpha$ ) после синтеза праймазы.

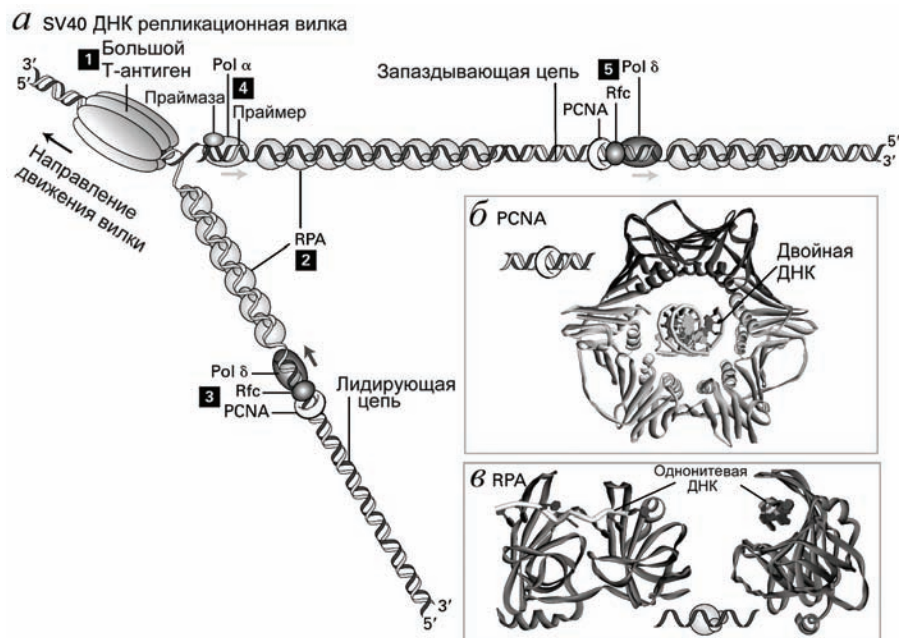


Рисунок 15.5 – Схема репликационной вилки SV40 ДНК и ассоциированных белков: а – репликационная вилка, б – схема PCNA, охватывающего дуплекс ДНК, в – схема расположения RPA относительно матричной цепи ДНК

**Гомотримерный белок PCNA** имеет **центральный канал**, через который проходит дочерний дуплекс ДНК (рисунок 15.5(б)). Тем самым PCNA предотвращает диссоциацию комплекса (PCNA–Rfc–Pol  $\delta$ ) с матричной цепи.

После того, как родительская ДНК разделилась на репликационной вилке на две матричные нити, с этими нитями связываются **гетеротримерные белки RPA** (*replication protein A*) (рисунок 15.5(в)). Белки RPA относятся к классу **однонитиевых связывающих белков** (*single-strand binding proteins*), которые еще называют белками, которые дестабилизируют двойную спираль, (*helix-destabilizing proteins*).

Связывание с RPA поддерживает **оптимальную** конформацию матричной цепи для репликации ДНК-полимеразой. Эти RPA-белки отсоединяются от матричной цепи полимеразой Pol  $\alpha$  и Pol  $\delta$  по мере того, как они синтезируют комплементарные нити, спаренные с родительскими нитями.

Некоторые эукариотические белки, которые участвуют в репликации ДНК, **не показаны** на рисунке 15.5.

Фермент **топоизомераза I** связывается с родительской ДНК **перед** геликазой, чтобы устранять торсионные напряжения, которые возникают при расплетании спирали.

Специальные ферменты **рибонуклеаза H** и белок **FEN I** удаляют рибонуклеотиды на 5'-конце фрагментов Оказаки. Эти рибонуклеотиды заменяются на дезоксирибонуклеотиды ДНК-полимеразой Pol  $\delta$ , когда она достигает соседнего фрагмента Оказаки.

Завершенные фрагменты Оказаки сшиваются ферментом **ДНК-лигаза**, катализирующим образование стандартной 5'–3' фосфодиэфирной связи.

В ходе синтеза ДНК-полимераза приблизительно один раз на 10000 шагов **ошибается** и присоединяет **неправильное** основание к растущей ДНК-цепи. Геном человека содержит  $3 \times 10^9$  пар оснований, и если бы не осуществлялся контроль и исправление ошибок синтеза, интенсивность возникновения мутаций была бы катастрофической. К счастью, ДНК-полимераза имеет встроенный механизм **пруфридинга** (*proofreading*, нахождение и исправление ошибок).

В ДНК полимеразе есть **два** активных центра. **Первый** контролирует пространственное расположение и соответствие матричной цепи каждого следующего нуклеотида и **катализирует синтез** сахарофосфатной связи между новым нуклеотидом и уже синтезированным участком цепи ДНК.

После окончания "работы" первого активного центра **второй** активный центр **оттягивает** это последнее нуклеиновое основание, пытаясь оторвать его от синтезированной двойной цепи ДНК. Если связь нового основания недостаточно прочная – второй активный центр отрывает его и удаляет. Такой дополнительный этап устраняет



нестандартное спаривание и в тысячи раз увеличивает точность матричного синтеза.

### ДВУНАПРАВЛЕННАЯ РЕПЛИКАЦИЯ

Как показано на рисунках 15.4 и 15.5, **обе** родительские нити после расплетания и разъединения репликационной вилкой копируются в дочерние нити.

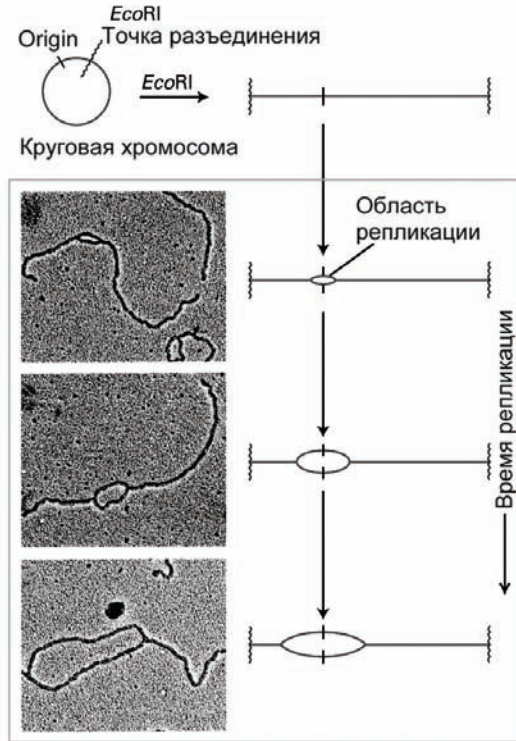


Рисунок 15.6 – Двухнаправленная репликация ДНК

С одного ориджина может начинаться как единственная репликация, при которой репликационная вилка перемещается в одном направлении вдоль родительской спирали, так и **двухнаправленная репликация** (*bidirectional growth*), при которой две репликационные вилки организуются на одном и том же ориджине и двигаются в

противоположных направлениях. Двухнаправленный рост наблюдался во многих экспериментах, включая представленный на рисунке 15.6.

Кольцевая ДНК вируса была разрезана **рестрикционным ферментом EcoRI**, и затем наблюдался рост области репликации симметрично в обе стороны от ориджина, демонстрируя двухнаправленную репликацию.

В настоящее время считается, что **все** прокариотические и эукариотические клетки задействуют процесс двухнаправленной репликации.

Так, в рассмотренном ранее примере, двухнаправленная репликация SV40 ДНК инициируется связыванием **двух больших T-антигеновых геликаз** с одним SV40 ориджином и присоединением остальных необходимых белков так, что формируются две репликационные вилки.

Затем эти две вилки перемещаются в противоположных направлениях, начиная от ориджина. Как показано на рис 15.7, левая репликационная вилка осуществляет синтез ДНК справа налево, а правая – слева направо.

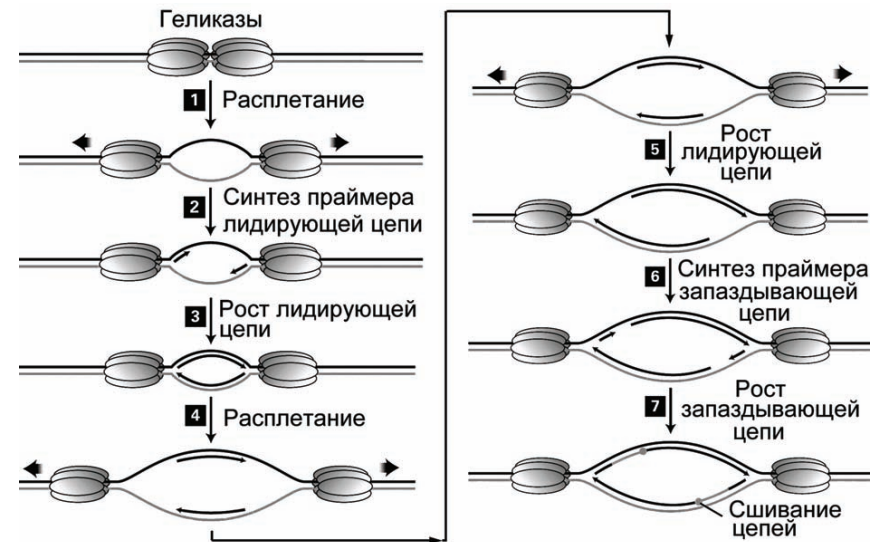


Рисунок 15.7 – Схема двухнаправленной репликации ДНК

Используя энергию гидролиза АТФ, геликазы двигаются в противоположных направлениях, образуя две одностранные цепи, стабилизированные RPA белками (рисунок 15.7, этап 1).

Комплексы (праймаза–Pol  $\alpha$ ) синтезируют короткие праймеры на каждой из родительских матричных цепей (рисунок 15.7, этап 2).

Комплексы (PCNA–Rfc–Pol  $\delta$ ) замещают комплексы (праймаза–Pol  $\alpha$ ) и наращивают короткие праймеры, образуя лидирующую цепь на каждой из репликационных вилок (рисунок 15.7, этап 3).

Геликазы продолжают расплетать дуплекс, и RPA белки связываются с новыми свежерасплетенными одностранными участками (рисунок 15.7, этап 4).

Комплексы (PCNA–Rfc–Pol  $\delta$ ) продолжают наращивать лидирующие цепи (рисунок 15.7, этап 5).

Комплексы (праймаза–Pol  $\alpha$ ) синтезируют праймеры для синтеза запаздывающих цепей на обеих репликационных вилках (рисунок 15.7, этап б).

Комплексы (PCNA–Rfc–Pol  $\delta$ ) замещают комплексы (праймаза–Pol  $\alpha$ ) и наращивают фрагменты Оказаки запаздывающих цепей, которые в конце объединяются с 5'-концами лидирующих цепей. Место сшивки показано кружком (рисунок 15.7, этап 7).

Репликация продолжается дальнейшим повторением этапов 4–7, т.е. расплетанием ДНК и синтезом лидирующих и запаздывающих цепей.

Поскольку при репликации *область ориджина* копируется в дочерние цепи в первую очередь, то возможна *инициация нового* раунда репликации еще *до завершения предыдущего*, и возникает разветвленная структура, показанная на рисунке 15.8.

Такая "*дихотомическая*" репликация позволяет бактериям при благоприятных условиях иметь время генерации генома меньшее, чем время, необходимое на завершение раунда репликации ДНК.

В отличие от SV40 ДНК, *эукариотические хромосомные молекулы* ДНК содержат *множество ориджинов* репликации, разделенных сотнями и тысячами *килобэзов* (kb, kilobase, тысяча пар оснований).

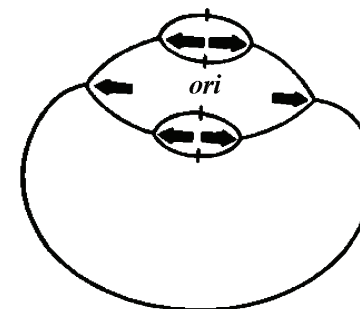


Рисунок 15.8 – Дихотомическая репликация бактериальной хромосомы

Шести-субъединичный белок, который называется *комплекс распознавания ориджина*, ORC (*origin recognition complex*), связывается с каждым ориджином и присоединяет к себе белки, необходимые для того, чтобы связать с ДНК клеточные *гексамерные геликазы*, состоящие из шести гомологичных *MCM-белков*.

Две противоположно направленные *MCM-геликазы* расплетают родительский дуплекс в ориджине. Белки RPA (*replication protein A*), связываясь с разъединенными одиночными нитями, оптимально ориентируют их для синтеза дочерних цепей. Синтез праймеров и последующие шаги в репликации клеточной ДНК происходит, как полагают в настоящее время, *таким же образом*, как и при репликации SV40 ДНК (рисунки 15.3 и 15.4).

Репликация клеточной ДНК и другие события, приводящие к размножению клеток, имеют *тонкие механизмы регуляции*, так, чтобы необходимое количество клеток каждой ткани создавалось в процессе роста и всей жизни организма. Так же, как и при транскрипции большинства генов, *контроль инициации* является *главным механизмом регуляции репликации* ДНК клеток. Активация MCM-геликаз, которые необходимы для инициации репликации ДНК, регулируется специфическими протеин-киназами, которые называются *циклин-зависимые киназы S-фазы* (*S-phase cyclin-dependent kinases*). Другие циклин-зависимые киназы регулируют дополнительные аспекты

клеточного деления, включая сложный процесс митоза, с помощью которого эукариотические клетки делятся на две дочерние клетки.

### РЕПАРАЦИЯ ДНК

ДНК может быть повреждена в результате различных воздействий, включая химические агенты и радиацию.

Наиболее распространенным повреждением ДНК является **депуринизация** – потеря аденина или гуанина, поскольку связи между пуриновыми основаниями и дезоксирибозой может гидролизоваться водой (рисунок 15.9). В каждой клетке человека ежедневно происходит 5 000–10 000 депуринизаций.

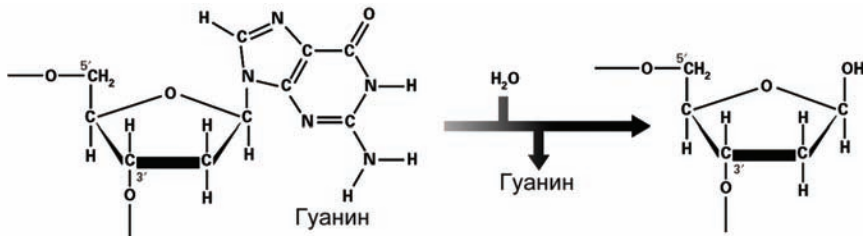


Рисунок 15.9 – Депуринизация нуклеотида

**Дезаминирование** происходит реже, только 100 раз в день в каждой клетке человека. Соударение молекулы воды с аминогруппой цитозина приводит к спонтанному дезаминированию, в результате чего образуется урацил (рисунок 15.10).

Поскольку цитозин стандартно спаривается с гуанином, а урацил – с аденином, то, если не исправить дезаминирование, то при следующей репликации ДНК исходная C≡G пара **мутирует** в U=A пару.

Ультрафиолетовый свет или химические канцерогены, такие как бензопирен (который присутствует, например, в табачном дыме), могут также нарушить структуру ДНК.

Поглощение света может привести к тому, что два соседних тиминовых основания образуют **тиминный димер** (рисунок 15.11).

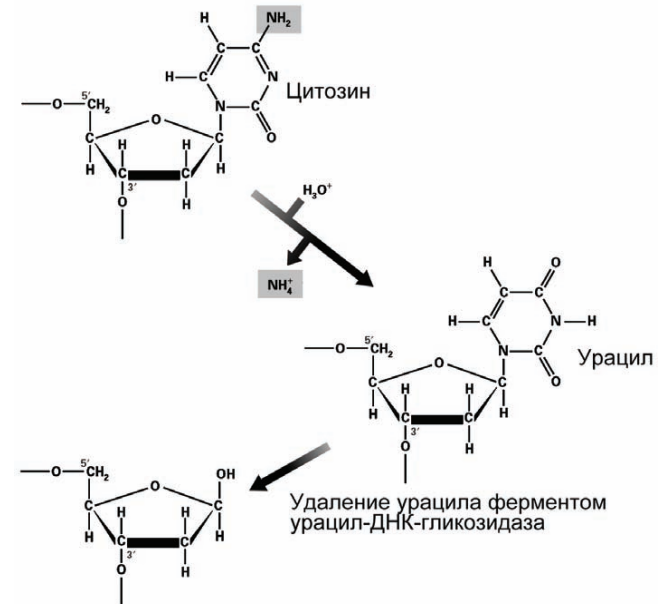


Рисунок 15.10 – Дезаминирование ДНК

Если не устранить такой дефект, то **тиминный димер** создаст нарушение спирали ДНК, которое называется **объемным повреждением** (*bulky lesion*).

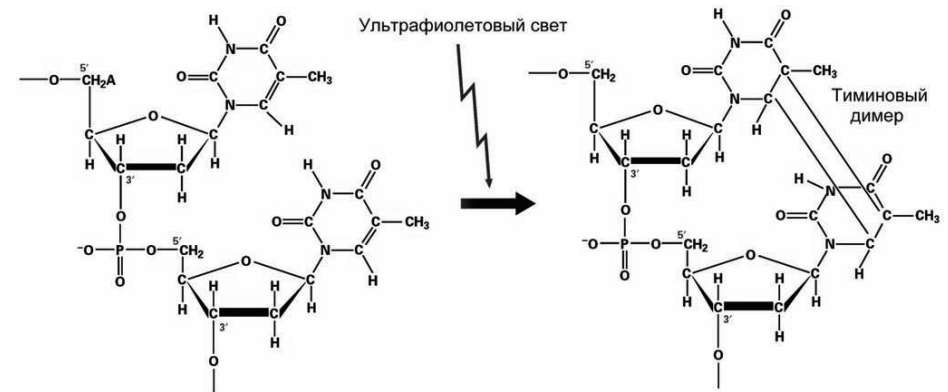


Рисунок 15.11 – Образование тиминного димера в ДНК

Объемное повреждение ингибирует нормальное спаривание оснований двух спиралей и блокирует репликацию ДНК. Именно поэтому ультрафиолетовое излучение обладает сильным **бактерицидным** действием и широко используется для стерилизации оборудования. Одна из главных причин гибели бактерий под действием ультрафиолетового облучения состоит в том, что образование большого количества тиминовых димеров нарушает процесс репликации.

*Репарацию (восстановление) ДНК* осуществляют специализированные ферменты, которые вырезают поврежденные участки и заменяют их неповрежденными. Репарация ДНК возможна именно вследствие двухнитивности строения молекулы ДНК. Репарационные ферменты восстанавливают поврежденную нить по матрице (по информации), сохранившейся в неповрежденной нити.

Возможны два типа "вырезания" и репарации поврежденных фрагментов:

- 1) удаление **только** "неправильных" нуклеиновых оснований и их замена на "правильные",
- 2) удаление и замена целых **нуклеотидов**.

Общими свойствами этих двух типов является:

- 1) специализированный фермент распознает повреждение ДНК,
- 2) удаляется поврежденный участок нити,
- 3) ДНК-полимераза вставляет "правильный" нуклеотид(ы) в соответствии с последовательностью оснований во второй (неповрежденной) нити ДНК,
- 4) ДНК-лигаза соединяет восстановленный участок ДНК с остальными частями ДНК.

Удалять только нуклеиновые основания нужно, например, в случае утери пурина (депуринизация) или в случае дезаминирования цитозина в урацил. Хотя урацил является нормальным компонентом РНК, с урацилом не образуется нормальный участок ДНК. Такой урацил в составе ДНК распознается и удаляется репарационным ферментом **урацил-ДНК-гликозидазой** (рисунок 15.10). Это приводит к тому, что в ДНК образуется "пробел" в том месте, откуда было удален урацил. Не существует фермента, который просто "вставил" бы цитозин на его "место". Вместо

этого специальный фермент АР-эндонуклеаза распознает "пробел" и удаляет ту дезоксирибозу, у которой нет нуклеинового основания, разрезая фосфодиэфирные связи с обеих сторон (рисунок 15.12).

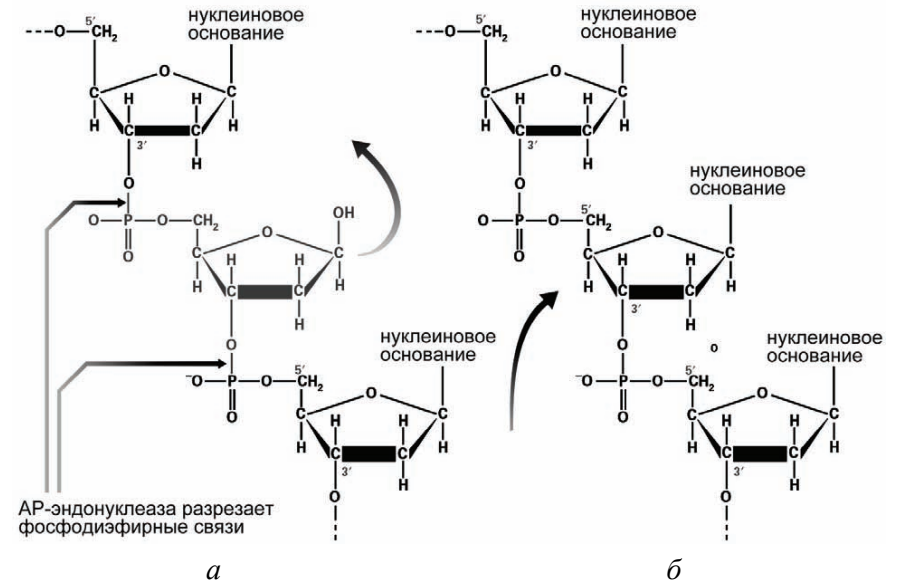


Рисунок 15.12 – Репарация ДНК: *а* – первый этап: удаление дефектного нуклеотида, *б* – второй этап: встраивание нужного нуклеотида ферментом полимераза I

В случае, если ДНК повреждена вследствие депуринизации (рисунок 15.9), АР-эндонуклеаза также удаляет ту дезоксирибозу, которая потеряла пурин. Буквы "АР" в названии фермента означают "**а**пиримидинный" (*apurimidinic*, без пиримидина) или "**а**пуринный" (*apurinic*, без пурина).

Процесс вставления пурина или пиримидина в ДНК происходит одинаково во всех случаях (рисунок 15.12). ДНК-полимераза I вставляет необходимый дезоксирибонуклеотид в "пробел" в нити ДНК. После этого ДНК-лигаза восстанавливает целостность нити ДНК, катализируя образование фосфодиэфирных связей.

Для репарации ДНК в случае образования тиминового димера из поврежденной нити ДНК вырезается сам тиминный димер **вместе с 30 прилежащими нуклеотидами**. В этом процессе образуется "оголенный" участок неповрежденной нити ДНК и для того, чтобы избежать атак нуклеаз в то время, пока ДНК-полимераза и ДНК-лигаза восстанавливают повреждение, необходимо присутствие нескольких специфических белковых факторов, защищающих этот "оголенный" участок.

### ВЫВОДЫ

✓ **Каждая нить** родительского дуплекса ДНК работает как матрица для синтеза дочерних цепей и остается спаренной с новой цепью, формируя дочерний дуплекс (полуконсервативный механизм). Новые цепи формируются в 5'→3' направлении.

✓ Репликация начинается с последовательности нуклеотидов, называемой **ориджином**. Каждая эукариотическая хромосомная ДНК содержит множество ориджинов репликации.

✓ ДНК-полимеразы, в отличие от РНК-полимераз, **не могут расплетать** дуплекс ДНК и **не могут инициировать** синтез новых цепей, комплементарных матричным цепям.

✓ В репликационной вилке одна дочерняя цепь (**лидирующая** цепь) наращивается **непрерывно**. Другая дочерняя цепь (**запаздывающая** цепь) образуется из набора прерывистых **фрагментов Оказаки**, синтезированных из праймеров, образующихся через каждые несколько сотен нуклеотидов.

✓ Рибонуклеотиды на 5'-конце каждого фрагмента Оказаки удаляются и замещаются при элонгации 3'-конца соседнего фрагмента Оказаки. В конце, соседние фрагменты Оказаки **сшиваются** ДНК-лигазой.

✓ Геликазы используют энергию гидролиза АТФ для расплетания родительских (матричных) цепей ДНК. Праймаза синтезирует короткий РНК-**праймер**, который остается связанным с матричной ДНК. Он наращивается с 3'-конца ДНК-полимеразой  $\alpha$  (Pol  $\alpha$ ), образуя короткую (5')РНК-ДНК(3') дочернюю цепь.

✓ Большая часть ДНК в эукариотах синтезируется ДНК-полимеразой (Pol  $\delta$ ), которая удаляет Pol  $\alpha$  и продолжает элонгацию дочерней цепи в направлении 5'→3'. Pol  $\delta$  остается **стабильно связанной** с матричной цепью благодаря присоединению белка Rfc, который, в свою очередь связывается с PCNA, тримерным белком, который окольцовывает дочерний дуплекс ДНК.

✓ Репликация ДНК, как правило, происходит **двунаправленно**, когда на ориджине формируются две репликационные вилки, которые движутся в противоположных направлениях. Обе матричные нити копируются в каждой из репликационных вилок.

✓ Синтез эукариотических ДНК *in vivo* регулируется посредством **контроля активности** МСМ-геликаз, которые иницируют репликацию ДНК на множественных ориджинах, расположенных на хромосомных ДНК.

✓ Наиболее характерными повреждениями ДНК являются депуринизация, дезаминирование и образование тиминных димеров. Репарация ДНК происходит в два этапа: (1) вырезание поврежденного нуклеотида AP-эндонуклеазой и (2) собственно восстановление поврежденного участка ДНК-полимеразой I и ДНК-лигазой.

### ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. В чем отличие консервативного и полуконсервативного механизмов репликации ДНК?
2. В чем отличие инициации транскрипции и инициации репликации?
3. Чем отличается синтез лидирующей и запаздывающей цепей?
4. Какова функция белка PCNA в комплексе PCNA-Rfc-Pol  $\delta$ ?
5. Какая репликация называется дихотомической?
6. В чем заключается депуринизация и дезаминирование ДНК?
7. Как образуются тиминные димеры?
8. Перечислите этапы репарации ДНК.
9. Какие модификации ДНК катализирует AP-эндонуклеаза?
10. Какова роль ДНК-полимеразы и ДНК-лигазы в процессе репарации ДНК?



## Лекция 16. ВИРУСЫ

### ПЛАН ЛЕКЦИИ:

1. Специфичность к инфицируемым клеткам.
2. Строение вирусного капсида.
3. Литический путь роста вирусов.
4. Нелитический жизненный цикл вирусов.

### СПЕЦИФИЧНОСТЬ К ИНФИЦИРУЕМЫМ КЛЕТКАМ

Вирусы не в состоянии воспроизводить себя самостоятельно. Поэтому они нуждаются в *использовании* клеточных механизмов для *синтеза* необходимых для их размножения белков и для *репликации* вирусного генома.

Таким образом, *вирусы являются внутриклеточными паразитами на генетическом уровне.*

Микрофотографии с электронного микроскопа и схемы строения некоторых вирусов показаны на рисунке 16.1.

*РНК-вирусы*, которые обычно реплицируются в цитоплазме инфицированной клетки, имеют РНК-геном.

*ДНК-вирусы*, которые реплицируются в ядре клетки, имеют ДНК-геном.

Геномы вирусов могут быть как *однонитевыми*, так и *двухнитевыми*, в зависимости от специфического типа вирусов.

Внеклеточная покоящаяся вирусная частица называется *вирион*.

*Вирион состоит* из нуклеиновой кислоты и внешней белковой оболочки.

*Простейший вирус* содержит только небольшую молекулу РНК (или ДНК), которая кодирует всего *четыре белка*. Самые сложные вирусы могут кодировать 100-200 белков. Кроме очевидной необходимости изучать вирусы как причины вирусных инфекций, молекулярная биология использует вирусы в качестве "инструментов" для исследования механизмов клеточных процессов.

Поверхность вириона содержит большое количество копий одного (маркерного) белка, который специфически связывается с рецепторными

белками на плазматической мембране инфицируемой клетки. Такое специфическое связывание определяет *диапазон клеток*, которые могут быть инфицированы данным вирусом – *диапазон инфицирования (host range)*. Большинство вирусов имеют достаточно узкий диапазон инфицирования.

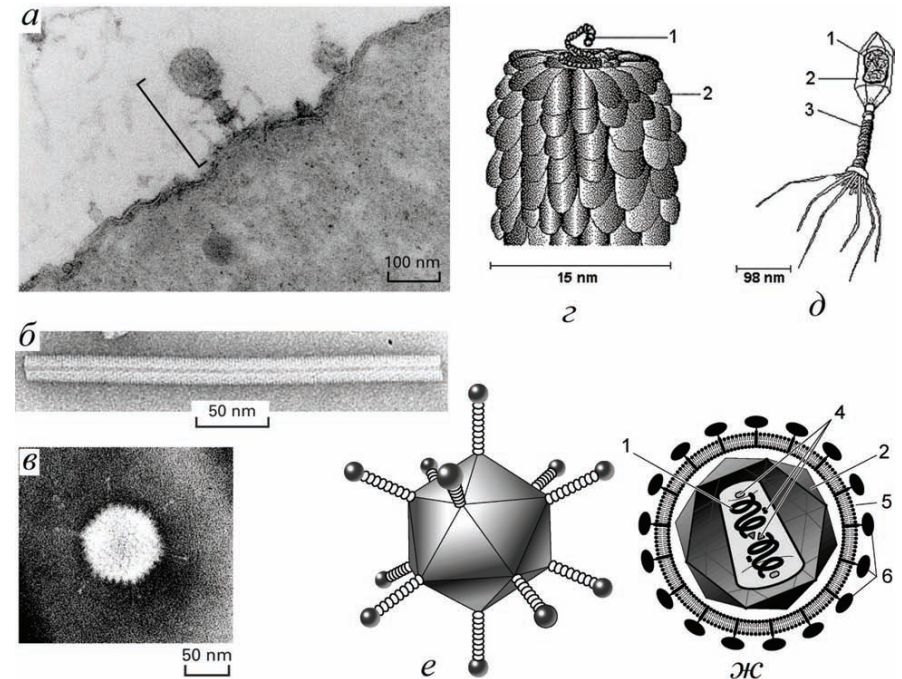


Рисунок 16.1 – Вирусы: *a* – микрофотография бактериофага Т4, *б* – микрофотография вируса табачной мозаики ТМV (*tobacco mosaic virus*), *в* – микрофотография аденовируса, *г* – схема строения ТМV, *д* – схема бактериофага Т4, *е* – схема аденовируса, *ж* – схема вируса иммунодефицита человека, ВИЧ (*human immunodeficiency virus*, HIV). 1 – РНК или ДНК, 2 – капсид, 3 – трубчатый канал, 4 – ферменты, 5 – липопротеидная мембрана, 6 – мембранные белки

Вирусы, которые инфицируют только бактерии, называются *бактериофагами*, или просто *фагами*. Вирусы, которые инфицируют клетки животных или растений, обычно так и называют – *вирусы*

**животных** или **вирусы растений**. Некоторые вирусы могут поражать **как растения, так и насекомых, которые питаются ими**. Подвижные насекомые выполняют функцию векторов, перенося такие вирусы между соответствующими растениями.

Широкий диапазон инфицирования характерен для некоторых вирусов животных, таких как вирус везикулярного стоматита, который размножается как в клетках насекомых, так и в клетках млекопитающих. Однако большинство вирусов животных видоспецифичны, а некоторые (например, вирус полиомиелита) инфицируют только представителей одного отряда, таких как приматы.

Диапазон инфицирования некоторых вирусов животных еще более **сужается**, поскольку они поражают **только ограниченное число типов клеток** данного организма, поскольку на поверхности только этих клеток имеются соответствующие рецепторы, с которыми связывается вирион.

#### СТРОЕНИЕ ВИРУСНОГО КАПСИДА

**Нуклеиновая кислота вириона** заключена в белковую оболочку – **капсид** – которая состоит из **тождественных** белков или же из множественных **повторений** небольшого числа разных белков, которые кодируются **одним виральным геном**.

Именно такая организация позволяет вирусу кодировать информацию для создания относительно большого капсида с помощью очень небольшого числа генов.

Такая эффективность использования генетической информации **критически** важна, поскольку очень **ограниченный** объем капсида может вместить в себя очень **ограниченный** набор генов.

Капсид вместе с заключенной в него нуклеиновой кислотой (РНК или ДНК) называют **нуклеокапсидом**.

Существует **два основных способа организации нуклеокапсида**.

**Первый способ** состоит в том, что идентичные капсидные белки формируют **спиральную** структуру, которая окружает и защищает вирусную РНК (или ДНК), которая расположена вдоль спиральной впадины внутри белковой трубки (рисунок 16.2).

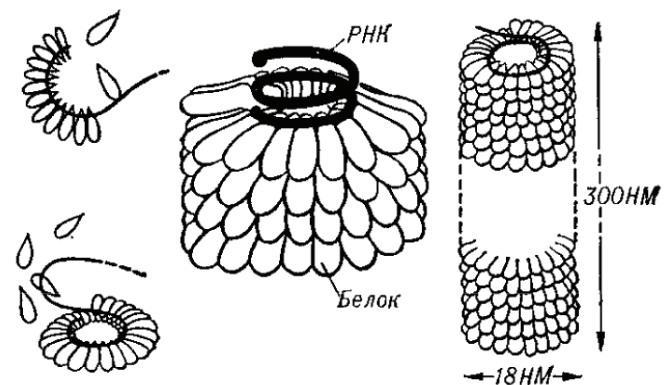


Рисунок 16.2 – Структура и самосборка нуклеокапсида вируса табачной мозаики из белковых субъединиц и молекул РНК

Вирусы, имеющие такую спиралевидную структуру (как, например, вирус табачной мозаики), имеют **стержнеобразную** форму.

**Второй** основной способ формирования капсида – **икосаэдрический**.

Икосаэдр – это сфероподобная поверхность, построенная из 20 идентичных равносторонних треугольников. Число и расположение белков на гранях **икосаэдрических** или **квази-сферических** вирусных капсидов различается в зависимости от **размера** вириона.

В **малых** квази-сферических вирусах каждая из 20 треугольных граней построена тремя идентичными копиями капсидных белков. Весь капсид, таким образом, построен из 60 белков. И каждый капсидный белок находится в **эквивалентном** положении и имеет эквивалентное окружение (рисунок 16.3). Каждая вершина икосаэдра имеет ось симметрии пятого порядка.

В **больших** квази-сферических вирусах каждая грань икосаэдра образована **более чем тремя** белковыми субъединицами.

В результате число соседей у каждой белковой субъединицы зависит от того, расположена она у вершины икосаэдра или нет. Положения белков в капсиде уже не эквивалентны, а **квазиэквивалентны**.

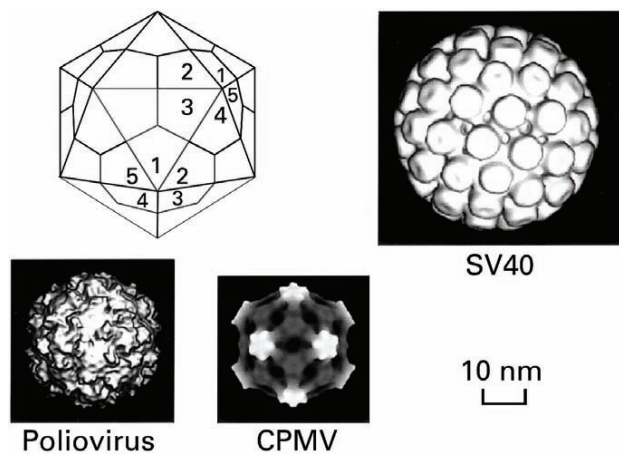


Рисунок 16.3 – Структура малых икосаэдрических вирусов – полиовирус (РНК-вирус человека), мозаичный вирус вигны (*cowpea mosaic virus*, CPMV; РНК-вирус; вигна – род одно- и многолетних растений семейства бобовых), малый вирус 40 (*small virus* 40, SV40, ДНК-вирус обезьян)

Так, например, каждая грань икосаэдра аденовируса образована **четырьмя** субъединицами (рисунок 16.4). Поэтому **вершины** икосаэдра имеют симметрию **пятого** порядка, а места **соединения граней** – симметрию **шестого** порядка.

В **малых** вирусах, таких как полиовирус, **впадина**, которая окружает каждую вершину икосаэдра, взаимодействует с рецепторами на поверхности инфицируемой клетки.

В **больших** вирусах (например, в аденовирусе) с поверхностными рецепторами инфицируемой клетки взаимодействуют длинные фибриллярные белки, **выступающие** над поверхностью нуклеокапсида.

Во многих ДНК-бактериофагах виральная ДНК расположена в икосаэдрической "**головке**", которая соединена с **трубчатым каналом** ("**хвостом**") (рисунок 16.1(д)). В процессе инфицирования вирусные белки на конце хвоста связываются с рецепторами на поверхности инфицируемой клетки, а затем ДНК вируса спускается из головки через трубчатый канал хвоста в цитоплазму инфицируемой клетки.

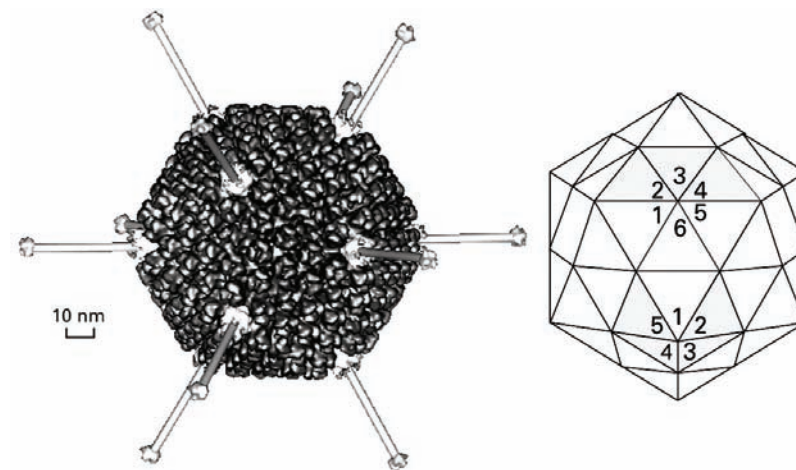


Рисунок 16.4 – Структура большого икосаэдрического аденовируса

У некоторых вирусов симметричный нуклеокапсид окружен **внешней оболочкой** (*envelope*) – липопротеидной мембраной, которая состоит в основном из фосфолипидного бислоя и одного-двух типов вирусных белков (рисунок 16.5). Фосфолипиды **липопротеидной оболочки** вируса **идентичны** тем фосфолипидам, из которых состоит плазматическая мембрана инфицируемой клетки, а сама вирусная оболочка, на самом деле, **формируется** из плазматической мембраны инфицируемой клетки во время цикла размножения вируса, но при этом **еще и** содержит большое число вирусных белков.

На рисунке 16.5 представлена электронная микрофотография вируса гриппа, на которой видны **выступающие** над поверхностью оболочки вируса белки: **нейраминидаза** (тетрамерный белок) или **гемагглютанин** (тримерный белок, схема которого приведена в первой части курса на рисунке 8.3).

#### Исследование вирусов.

Число вирусов в образце может быть определено с использованием **метода бляшек**. Разбавленный раствор, содержащий вирусы помещают на поверхность чашки Петри, содержащей инфицируемые клетки. После инфицирования покрывают слой клеток **агаром** для фиксации и



инкубируют. Затем подсчитывают количество повреждений, называемых **дисками** или **бляшками** (*plaque*) (или **негативными колониями**), которые вырастают через определенное время (рисунок 16.6).

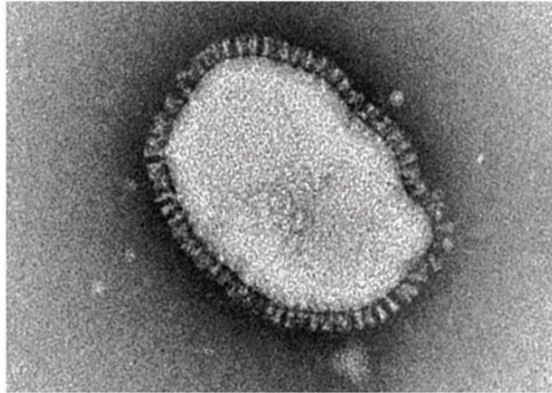


Рисунок 16.5 – Электронная микрофотография вируса гриппа

Бляшка развивается в чашке Петри в месте, где один вирион первоначально инфицировал одну клетку. Вирус размножается в этой клетке, а затем разрушает её, высвобождая много дочерних вирионов, которые инфицируют соседние клетки в чашке. После нескольких циклов инфицирования образуется достаточно разрушенных клеток, которые образуют видимое пятно (бляшку) в слое оставшихся неинфицированных клеток.

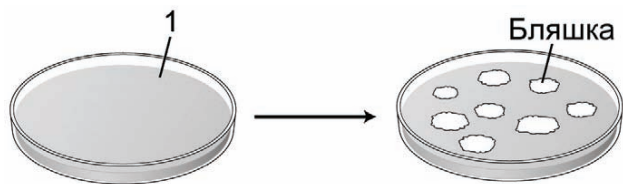


Рисунок 16.6 – Определение числа инфицированных частиц методом бляшек, 1 – посев клеток

Поскольку дочерние вирионы в бляшке развиваются от единственного родительского вируса, они формируют **вирусный клон**.

Такая методика является стандартной при исследовании вирусов бактерий и животных (рисунок 16.7). Вирусы растений исследуют аналогично, считая количество локальных повреждений на листьях растений пораженных вирусом.

Именно анализ вирусных мутантов, которые изолированы в бляшках, внес большой вклад в современный уровень понимания молекулярных клеточных процессов. Кроме того, метод бляшек является важным компонентом изоляции клонов бактериофага λ, который используют для транспортировки сегментов клеточной ДНК в технологии рекомбинантных ДНК.

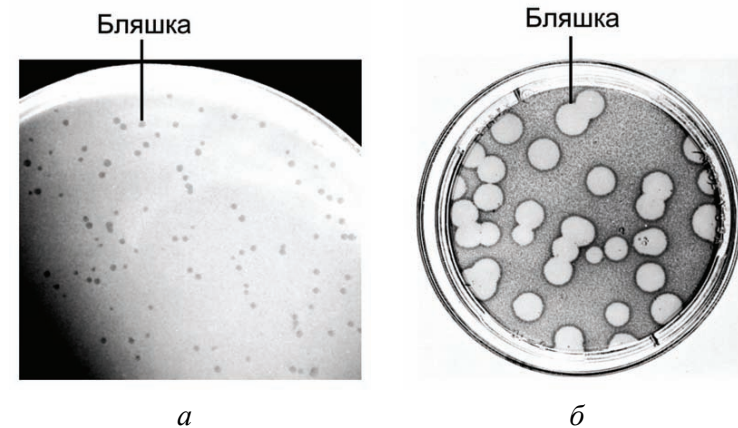


Рисунок 16.7 – Вирусные клоны: а – бляшки образованные бактериофагом λ в клетках *E. coli*, б – бляшки образованные полиовирусом в *HeLa*-клетках

### ЛИТИЧЕСКИЙ ПУТЬ РОСТА ВИРУСОВ

Несмотря на колоссальное разнообразие в деталях развития конкретных вирусов, жизненный цикл тех из них, которые демонстрируют литический путь развития, проходит через следующие этапы.

#### Этапы литического цикла

1. **Адсорбция** – Вирион присоединяется белками своего капсида к специфическим рецепторам на поверхности инфицируемой клетки.

2. **Введение** генома – Виральный геном пересекает плазматическую мембрану. У вирусов растений и животных виральные белки также

вводятся в инфицируемую клетку.

3. **Репликация** – Синтезируются вирусные мРНК, используя генетический аппарат клетки – либо транскрипционные механизмы в случае ДНК-вирусов, либо, в случае РНК-вирусов, ферментативный аппарат с участием ферментов вируса. В обоих случаях вирусные мРНК транслируются трансляционным аппаратом клетки. Размножение вирусного генома управляется либо исключительно вирусными белками, либо с участием белков инфицированной клетки.

4. **Ассемблирование** (сборка) – Вирусные белки и реплицированные геномы вируса ассоциируются, формируя дочерние вирионы.

5. **Высвобождение** – Инфицируемая клетка либо резко разрушается (лизис), высвобождая все синтезированные вирионы сразу, либо разрушается постепенно, так же постепенно высвобождая вирионы.

#### ДНК-вирусы прокариот

На рисунке 16.8 показан **литический цикл бактериофага T4**, безоболочечного (*nonenveloped*) ДНК-вируса, который инфицирует *E. coli*.

После того, как белки на конце "хвоста" T4 связываются со специфическими рецепторами на поверхности клетки, вирусный геном **вводится** внутрь клетки (рисунок 16.8, этап 1).

Ферменты клетки транскрибируют вирусные "первичные" гены, синтезируя мРНК, с которой затем транслируются "**первичные**" вирусные белки (рисунок 16.8, этап 2).

Первичные белки реплицируют вирусную ДНК и индуцируют **экспрессию "вторичных"** вирусных белков, используя ферментативный аппарат клетки (рисунок 16.8, этап 3).

Вторичные вирусные белки – это белки, из которых затем собирается капсид, и ферменты, которые стимулируют "разборку" клеточной ДНК на нуклеотиды, обеспечивая тем самым необходимый запас "строительных материалов" для синтеза вирусных ДНК.

Дочерние вирионы **ассемблируются** в клетке (рисунок 16.8, этап 4) и **высвобождаются**, после того когда вирусные белки разрушат клетку (лизис), (рисунок 16.8, этап 5). Вирусы, освобожденные после лизиса

клетки, инициируют новый цикл инфицирования в других клетках организма.

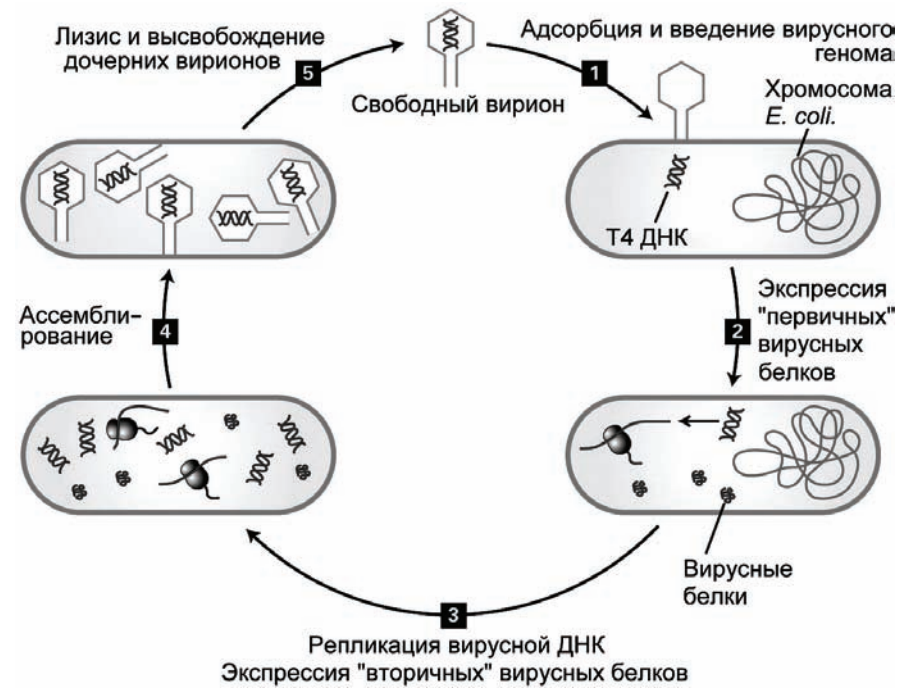


Рисунок 16.8 – Литический жизненный цикл бактериофага T4 *E. coli*

Капсидные белки вируса, как правило, синтезируются в **больших количествах**, поскольку для ассемблирования дочерних вирионов требуется много их копий. В каждой инфицированной клетке синтезируется и ассемблируется около 100-200 дочерних вирионов T4, которые высвобождаются после лизиса клетки.

#### ДНК-вирусы эукариот

Литический цикл **несколько сложнее** у ДНК-вирусов, которые инфицируют **эукариотические** клетки. У большинства таких вирусов вирусный ДНК-геном **транспортируется** (вместе с некоторыми ассоциированными белками) **внутри** ядра клетки.



Там вирусная ДНК транскрибируется в РНК, используя транскрипционный аппарат клетки. Процессинг вирусной про-РНК ферментами клетки образует **вирусную мРНК**, которая транспортируется в цитоплазму и транслируется в вирусные белки рибосомами, тРНК и факторами трансляции инфицированной клетки.

Вирусные белки затем транспортируются назад в ядро клетки, где некоторые из них **либо реплицируют** вирусную ДНК непосредственно, **либо активируют белки** клеточного ядра для репликации вирусной ДНК, как это происходит в случае вируса SV40.

**Ассемблирование** белков капсида с синтезированной вирусной ДНК происходит **в ядре клетки**, при этом формируются **сотни и даже тысячи** дочерних вирионов.

#### РНК-вирусы животных и растений

**С другой стороны**, большинство **РНК-вирусов** животных и растений **не нуждаются** в использовании генетического аппарата ядер клетки для литического размножения.

В некоторых из этих вирусов вирусные ферменты, которые попадают внутрь клетки при внедрении вирусной РНК, **транскрибируют** вирусную РНК в мРНК **в цитоплазме клетки**.

Эта мРНК транслируется в вирусные белки трансляционным аппаратом клетки. Один или несколько таких белков затем синтезируют копии вирусной РНК.

Наконец, дочерние РНК-геномы ассемблируются с синтезированными белками капсида в дочерние вирионы **в цитоплазме**.

После того, как завершён синтез сотен и тысяч новых вирионов, большинство инфицированных бактериальных клеток и некоторые из инфицированных клеток растений и животных разрушаются (лизис), высвобождая все вирионы **одновременно**.

Однако при многих вирусных инфекциях растений и животных **не** происходит такого дискретного литического "события", напротив, погибая инфицированная клетка **постепенно** высвобождает вирионы по мере своей постепенной дезинтеграции.

#### Оболочечные вирусы

Многие вирусы животных имеют **липидную оболочку**, которая происходит из плазматической мембраны инфицированной клетки, и которая содержит большое количество вирусных гликопротеинов.

Процессы **адсорбции** и **высвобождения** оболочечных вирусов (*enveloped viruses*) **существенно отличаются** от аналогичных процессов безоболочечных вирусов (*nonenveloped viruses*).

В качестве примера литической репликации оболочечного вируса рассмотрим **вирус бешенства** (*rabies virus*) (рисунок 16.9).



Рисунок 16.9 – Литический жизненный цикл вируса бешенства

Нуклеокапсид вируса бешенства состоит из однонитиевого РНК-генома, окруженного белковым капсидом. Как и другие литические РНК-вирусы, вирион бешенства реплицируется в цитоплазме и не требует использования ферментативного аппарата ядра инфицированной клетки. Вирус бешенства **адсорбируется** с помощью **эндоцитоза**, а **высвобождение** дочерних вирионов происходит посредством **отпочковывания** от плазматической мембраны инфицированной клетки.

Структурные компоненты вируса перечислены в верхней части рисунка. Заметим, что нуклеокапсид имеет спиральную, а не икосаэдрическую форму.

После адсорбции вириона к множественным копиям специфических мембранных белков инфицируемой клетки (рисунок 16.9, этап 1), происходит **эндоцитозное поглощение** вириона клеткой и формируется эндосома (рисунок 16.9, этап 2).

Клеточные белки (протонные насосы) в мембране эндосомы **закачивают** из цитозоля внутрь эндосомы протоны. Снижение эндосомальной рН приводит к **конформационному изменению вирусных гликопротеинов**, что приводит, в свою очередь, к **слиянию** вирусной липопротеидной оболочки с липидным бислоем мембраны эндосомы и **высвобождением** нуклеокапсида в цитозоль (рисунок 16.9, этапы 3 и 4).

**РНК-полимераза** вируса использует рибонуклеозид трифосфаты (рНТФ) цитозоля для **репликации** РНК-генома вируса (рисунок 16.9, этап 5) и для **синтеза** вирусных мРНК (рисунок 16.9, этап 6).

С одной из вирусных мРНК с помощью рибосом эндоплазматического ретикулума (ЭР) **транслируются трансмембранные гликопротеины**, которые остаются внедренными в мембраны ЭР (рисунок 16.9, этап 7). К ним присоединяются необходимые углеводы в процессе созревания в ЭР и аппарате Гольджи (рисунок 16.9, этап 8).

Везикулы с "созревшими" гликопротеинами сливаются с плазматической мембраной инфицированной клетки, тем самым, помещая рецептор-связывающие домены гликопротеинов **снаружи** клетки (рисунок 16.9, этап 9).

Одновременно другие вирусные мРНК **транслируются** на рибосомах клетки в белки нуклеокапсида, белки матрикса и вирусные РНК-полимеразы (рисунок 16.9, этап 10).

Все эти белки **асSEMBЛИРУЮТСЯ** с реплицированной на этапе 5 вирусной геномной РНК и **образуют** дочерний **нуклеокапсид** (рисунок 16.9, этап 11), который затем присоединяется к цитозольным доменам вирусных трансмембранных гликопротеинов, которые уже внедрены в плазматическую мембрану инфицированной клетки (рисунок 16.9, этап 12).

Плазматическая мембрана оборачивается вокруг нуклеокапсида, формируя **"почку"**, которая **отпочковывается**, высвобождая наружу клетки дочерний вирус.

Отпочковывание вирионов четко видно на электронных микрофотографиях инфицированных клеток, как показано на рисунке 16.10.

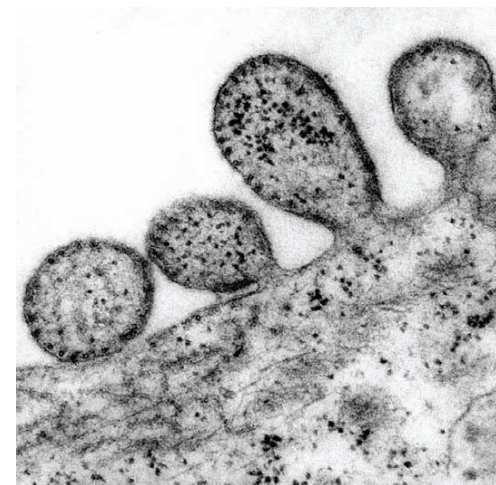


Рисунок 16.10 – Дочерние вирионы вирусов высвобождаются, отпочковываясь от плазматической мембраны инфицированной клетки

Десятки тысяч дочерних вирионов отпочковываются от инфицированной клетки прежде, чем она погибнет.

## НЕЛИТИЧЕСКИЙ ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ ВИРУСОВ

### Лизогения

Некоторые бактериальные вирусы, называемые *нелитическими* (умеренными) *фагами* (*temperate phages*), ассоциируются с инфицируемой клеткой нелитическим образом и поэтому это не приводит к смерти клетки. Например, при инфицировании *E. coli* бактериофагом  $\lambda$  виральная ДНК *может интегрироваться* в хромосому инфицируемой клетки, вместо того, чтобы реплицироваться.

Такая интегрированная в хромосому вирусная ДНК называется *профагом* (или провирусом), а само явление включения ДНК вируса в хромосому инфицированной клетки называется *лизогения*.

Бактериофаги, способные включаться в бактериальные хромосомы, называются *лизогенизирующими бактериофагами*.

*При определенных условиях* (например, иногда, при ультрафиолетовом облучении) ДНК профага лизогенной бактерии *активируется*, вырезается из хромосомы, запускает литический цикл с соответствующим синтезом и высвобождением дочерних вирионов.

### Ретровирусы

Геномы многих вирусов животных также могут интегрироваться в хромосому инфицируемых клеток. Наиболее интересными являются *ретровирусы* – оболочечные вирусы с геномом, содержащим две идентичные нити РНК.

Само название ретровирусы отражает тот факт, что часть их жизненного цикла составляет процесс, *обратный нормальной транскрипции*, т.е. транскрипции ДНК в РНК. Их РНК геном служит матрицей, по которой синтезируется молекула ДНК с помощью специального фермента – *обратная транскриптаза* (*reverse transcriptase*).

Обратная транскриптаза в жизненном цикле ретровируса (рисунок 16.11) *сначала* копирует вирусную РНК в комплементарную однонитевую ДНК, а *затем*, по этой первой нити, синтезирует вторую, комплементарную нить ДНК.

На *первом* этапе жизненного цикла ретровируса после того, как гликопротеины оболочки присоединятся к мембране клетки, оболочка

ретровируса сливается с плазматической мембраной клетки, и нуклеокапсид попадает в цитоплазму (рисунок 16.11, этап 1).

Затем обратная транскриптаза ретровируса вместе с другими белками *копирует* вирусную однонитевую РНК (*single-stranded RNA*, ssRNA) в двойную цепь ДНК (*double-stranded DNA*, dsDNA) (рисунок 16.11, этап 2).

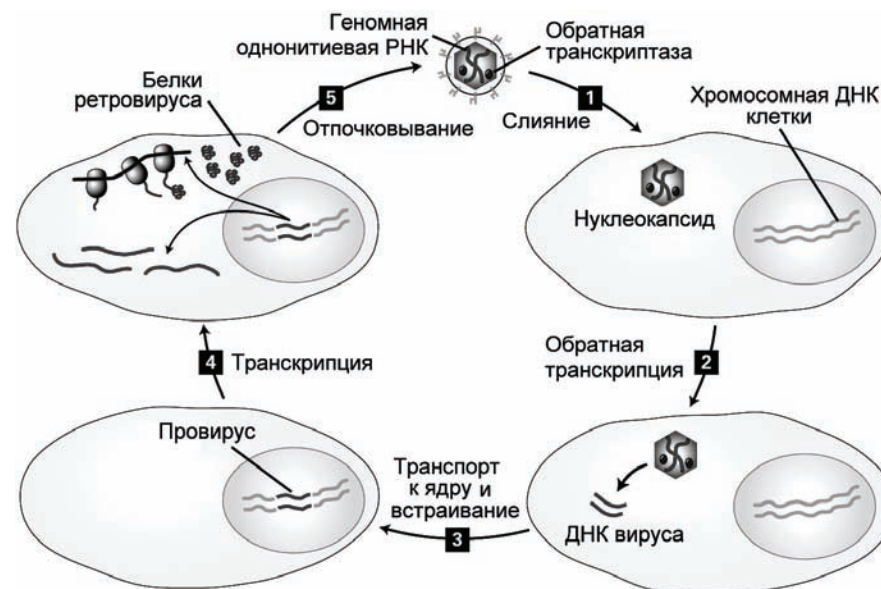


Рисунок 16.11 – Жизненный цикл ретровируса

Вирусная dsDNA *транспортируется* в ядро клетки и *интегрируется* в одно из многих возможных мест в хромосомной ДНК инфицированной клетки – формируется так называемый *провирус* (рисунок 16.11, этап 3). Для простоты на рисунке 16.11 показана только одна хромосома клетки.

Таким образом, вирусное заражение приводит к *стойкому генетическому изменению* в инфицированной клетке.

Далее, интегрированная вирусная ДНК (провирус) *транскрибируется* РНК-полимеразой клетки, образуя геномные РНК и

матричную мРНК, с которой трансляционный аппарат клетки **синтезирует** вирусные гликопротеины и белки нуклеокапсида вируса (рисунок 16.11, этап 4). Затем происходит **ассемблирование** дочерних вирионов и их отпочковывание от инфицированной клетки (рисунок 16.11, этап 5).

Поскольку большинство ретровирусов **не убивают** пораженные клетки, эти клетки могут далее реплицироваться, порождая дочерние клетки с изначально интегрированной ДНК провируса. Эти дочерние клетки продолжают транскрибировать ДНК провируса и отпочковывать следующие поколения вирионов.

Некоторые ретровирусы содержат гены, которые вызывают рак, **онкогены**, и заражение клеток такими вирусами приводит к **трансформации** (перерождению) инфицированных клеток **в опухолевые** клетки. Исследования онкогенных вирусов (преимущественно вирусов птиц и мышей) позволили значительно продвинуться в понимании процессов, которые ведут к перерождению нормальной клетки в опухолевую.

Среди известных ретровирусов человека отметим **лимфотрофный вирус Т-клеток человека** (*human lymphotropic T-cell virus*, HTLV), который вызывает некоторые формы лейкемии, и **вирус иммунодефицита человека**, ВИЧ (*human immunodeficiency virus*, HIV), который вызывает синдром приобретенного иммунодефицита, СПИД (*acquired immuno deficiency syndrome*, AIDS).

Оба эти вируса могут инфицировать **только специфические клетки**, прежде всего некоторые клетки иммунной системы и, в случае ВИЧ, некоторые нейроны центральной нервной системы и глиальные клетки. Только эти клетки имеют поверхностные рецепторы, с которыми взаимодействуют белки вирусной оболочки, что объясняет клеточную специфичность этих вирусов.

В отличие от большинства остальных ретровирусов, ВИЧ, в конце концов, убивает инфицированные клетки. Такая смерть большого числа клеток иммунной системы приводит к искажению иммунной реакции организма, т.е. к СПИДу.

Некоторые ДНК-вирусы **также** могут **интегрироваться** в хромосомы инфицированных клеток. Например, **вирус папилломы человека** (*human papillomavirus*, HPV), который обычно вызывает бородавки и другие кожные новообразования. Геном некоторых **серотипов** HPV, однако, случайно интегрируется в хромосомные ДНК инфицированных эпителиальных клеток шеи, инициируя развитие рака шеи.

(**Serotип** – антигенная характеристика клеток и вирусов, установленная с помощью методов серологии – раздела иммунологии, изучающего взаимодействие между антигенами и антителами сыворотки крови (*blood serum*)).

### ВЫВОДЫ

✓ Вирусы являются **паразитами**, которые могут размножаться только в инфицированных клетках. Вирусные **геномы** могут быть либо ДНК (ДНК-вирусы), либо РНК (РНК-вирусы), и либо одно-, либо двух-цепочечные.

✓ **Кансид**, окружающий вирусный геном, состоит из множества копий одного или небольшого числа разных белков, кодируемых геномом вируса. Некоторые вирусы окружены **липопротеидной оболочкой**, которая подобна плазматической мембране, но содержит вирусные трансмембранные белки.

✓ Большинство **ДНК-вирусов** растений и животных **используют** ферментативный аппарат инфицированных клеток для транскрипции вирусных геномов в мРНК и синтеза дочерних геномов. Напротив, большинство **РНК-вирусов** сами **кодируют** ферменты, которые транскрибируют РНК-геномы в вирусные мРНК, с которых затем синтезируются новые копии РНК-геномов.

✓ Трансляционный аппарат инфицированных клеток – рибосомы, тРНК, факторы трансляции – **используются** для синтеза всех вирусных белков.

✓ **Литическая** вирусная инфекция, состоящая из адсорбции, внедрения, синтеза вирусных белков и дочерних геномов (репликация), ассемблирования дочерних вирионов и высвобождения сотен и тысяч

вирионов, *ведет к смерти* инфицированной клетки. Высвобождение оболочечных вирусов происходит путем отпочковывания от плазматической мембраны клетки.

✓ *Нелитическая* инфекция происходит, когда вирусный геном интегрируется в ДНК инфицированной клетки, и, как правило, *не ведет* к смерти клетки.

✓ *Ретровирусы*, это оболочечные вирусы животных, имеющие одноцепочечный РНК-геном. После проникновения в клетку, вирусный фермент обратная транскриптаза синтезирует по матрице вирусной РНК двухцепочечную ДНК, которая *интегрируется* в хромосому клетки.

✓ В отличие от других ретровирусов, *ВИЧ-инфекция*, в конце концов, *убивает инфицированные клетки*, вызывая искажения в иммунной реакции организма (СПИД).

✓ *Опухолевые вирусы*, содержащие онкогены, могут иметь РНК-геном (например, лимфотрофный вирус Т-клеток человека) или ДНК-геном (например, вирус папилломы человека). В случае таких вирусов *интегрирование* вирусного генома в хромосому клетки вызывает *трансформацию* (перерождение) клетки в опухолевую клетку.

#### ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. В чем отличие РНК-вирусов от ДНК-вирусов?
2. Что такое вирион?
3. Что такое диапазон инфицирования вируса?
4. Какие вирусы называются бактериофагами?
5. Что такое вирусный капсид?
6. Что такое нуклеокапсид вируса?
7. Какие Вы знаете способы организации вирусного капсида?
8. Из каких компонентов состоит липопротеидная оболочка вирусов?
9. Чем отличается механизм взаимодействия с рецепторами клетки малых и больших икосаэдрических вирусов?
10. В чем заключается метод бляшек исследования вирусов?
11. Перечислите и охарактеризуйте основные этапы литического пути развития вируса.

12. В чем отличие процесса сборки ДНК-вирусов прокариот и эукариот?

13. В чем отличие процесса адсорбции оболочечных и безоболочечных вирусов?

14. В чем отличие процессов высвобождения из клетки оболочечных и безоболочечных вирусов?

15. Что такое лизогения?

16. Какие бактериофаги называются лизогенизирующими бактериофагами.

17. Какие вирусы называются ретровирусами?

18. Какова функция фермента обратная транскриптаза?



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Огурцов А.Н. Молекулярная биология клетки. Основы клеточной организации: Конспект лекций по курсу "Клеточная и молекулярная биология" для студентов специальности 7.092901 "Промышленная биотехнология". – Харьков: НТУ "ХПИ", 2006. – 169 с.
2. Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки: В 3-х т., т.2. – М.: Мир, 1994. – 539 с.
3. Алексеев В.И., Каминский В.А. Прикладная молекулярная биология. – М.: КомКнига, 2005. – 200 с.
4. Нолтинг Б. Новейшие методы исследования биосистем. – М.: Техносфера, 2005. – 256 с.
5. Агол В.И., Богданов А.А., Гвоздев В.А., Грагеров А.И., Колчинский А.М., Мирзабеков А.Д., Никифоров В.Г. Молекулярная биология: Структура и биосинтез нуклеиновых кислот: Учебник для биологических специальностей вузов / Под ред. А.С. Спирина. – М.: Высшая школа, 1990. – 552 с.
6. Спирин А.С. Молекулярная биология: Структура рибосомы и биосинтез белка: Учебник для студентов биологических специальностей вузов. – М.: Высшая школа, 1986. – 303 с.
7. Биология. Большой энциклопедический словарь / Гл. ред. М.С.Гиляров. – М.: Большая Российская энциклопедия, 2001. – 864 с.
8. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., Molecular Biology of the Cell, 4<sup>th</sup> Ed. – New York: Garland Publishing, 2002. – 1462 с.
9. Lodish H., Berk A., Zipursky L.S., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. Molecular Cell Biology, 5<sup>th</sup> Ed. – New York: W.H.Freeman & Company, 2003. – 572 p.
10. Bolsover S.R., Hyams J.S., Shephard E.A., White H.A., Wiedemann C.G. Cell Biology: A Short Course, 2<sup>nd</sup> Ed. – John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, New Jersey, USA, 2004. – 531 p.

## СОДЕРЖАНИЕ

Вступление	3
Лекция 10. Молекулярные основы генетических процессов	4
Лекция 11. Транскрипция ДНК	17
Лекция 12. Контроль генной экспрессии у прокариот	32
Лекция 13. Роль РНК в трансляции	44
Лекция 14. Синтез белков на рибосомах	65
Лекция 15. Репликация и репарация ДНК	79
Лекция 16. Вирусы	98
Список литературы	118

Навчальне видання

ОГУРЦОВ Олександр Миколайович

**МОЛЕКУЛЯРНА БІОЛОГІЯ КЛІТИНИ.  
ОСНОВНІ МОЛЕКУЛЯРНІ ГЕНЕТИЧНІ МЕХАНІЗМИ**

Конспект лекцій по курсу  
"Клітинна та молекулярна біологія"  
для студентів спеціальності 092901  
"Промислова біотехнологія"

Російською мовою

Відповідальний за випуск *М.Ф.Клещев*

Роботу до видання рекомендував *М.Г.Зінченко*

В авторській редакції

План 2007 р., поз. 67/40-07.

Підписано до друку 18.04.07 р. Формат 60×84 1/16. Папір офісний.  
Riso-друк. Гарнітура Таймс. Ум. друк. арк. 6,5. Обл.-вид. арк. 7,8.  
Наклад 100 прим. Зам. № 141 Ціна договірна

---

Видавничий центр НТУ "ХП".  
Свідоцтво про державну реєстрацію ДК № 116 від 10.07.2000 р.  
61002, Харків, вул. Фрунзе, 21

---

Друкарня НТУ "ХП". 61002, Харків, вул. Фрунзе, 21