Аппарат экспрессии генов и его логика

**1. Основные положения процесса экспрессии генов**

Экспрессия генов – это процесс реализации информации, закодированной в структуре ДНК, на уровне РНК и белков. Прежде чем переходить к детальному описанию и анализу этих процессов, мы вкратце рассмотрим суть экспрессии генов – ее механизм и регуляцию.

а. Транскрипция ДНК в РНК

Экспрессия всех генов начинается с транскрипции их нуклеотидной последовательности, т.е. перевода ее на язык РНК. При этом определенный участок одной из двух цепей ДНК используется как матрица для синтеза РНК путем комплементарного спаривания оснований. В результате транскрипции генов, в которых закодирована структурная информация о белках, образуются молекулы мРНК; другие гены кодируют молекулы РНК, являющиеся частью аппарата, необходимого для трансляции мРНК с образованием белков. У прокариот, например Е. coli, ДНК транскрибируется с помощью одного фермента – ДНК-зависимой РНК-полимеразы, который участвует в синтезе всех типов РНК. В отличие от прокариот эукариоты имеют три разные ДНК-зависимые РНК-полимеразы, каждая из которых ответственна за транскрипцию генов, кодирующих разные типы клеточных РНК. Несмотря на то, что механизмы синтеза РНК и матричного копирования для всех РНК-полимераз идентичны, каждый фермент узнает в матрице ДНК свои характерные особенности, определяющие сайты инициации, терминации и регуляции транскрипции.

б. Соответствие между нуклеотидными триплетами и аминокислотами

Генетический код устанавливает соответствие между нуклеотидной последовательностью данной мРНК и аминокислотной последовательностью синтезируемой на ней полипептидной цепи. Размер единиц кодирования и сами эти единицы, однозначно задающие ту или иную аминокислоту, практически одинаковы у всех живых организмов. Более того, основные принципы и механизмы перевода генетических посланий также универсальны.

Генетический словарь содержит 64 кодона, каждый из которых образован тремя последовательными нуклеотидами. 61 из 64 кодонов детерминируют 20 аминокислот, обнаруженных в белках, один определяет начало большинства последовательностей, кодирующих белки, и три обозначают окончания этих последовательностей.

Отличительной особенностью генетического кода является то, что каждый кодон кодирует только одну аминокислоту, т.е. код однозначен. Следовательно, зная словарь и правила пользования им, можно перевести нуклеотидную последовательность мРНК в определенную аминокислотную последовательность. Но генетический код является вырожденным. Это означает, что одной аминокислоте могут соответствовать несколько кодонов. Вырожденность генетического кода приводит к тому, что нельзя однозначно перевести аминокислотную последовательность данного белка в нуклеотидную последовательность соответствующей мРНК.

в. Расшифровка кода с помощью тРНК

Аминокислоты не взаимодействуют с соответствующими им кодонами непосредственно. Каждая аминокислота вначале связывается с адаптером – родственной тРНК, и образующаяся при этом аминоацил-тРНК узнает «родственный» кодон путем комплементарного спаривания оснований. Таким образом, декодирование осуществляется с помощью спаривания оснований триплетных кодонов мРНК с триплетными антикодонами в аминоацил-тРНК.

Присоединение аминокислот через карбоксильные группы к родственным тРНК катализируют ферменты, называемые аминоацил-тРНК-синтетазами. При связывании тРНК с аминокислотой карбоксильная группа последней активируется, и в результате образование пептидных связей становится энергетически выгодным. Энергия же, необходимая для активации аминокислоты при присоединении ее к тРНК, поступает от гидролиза АТР.

Присоединение аминокислот к родственным тРНК осуществляется с помощью специфических ферментов. Так, тирозил-тРНК-синтетаза присоединяет L-тирозин только к тем тРНК, которые могут спариться с тирозиновым кодоном. Аналогично лейцил-тРНК-синтетаза катализирует присоединение лейцина к молекулам тРНК, которые узнают кодоны лейцина. Таким образом, специфичность декодирования обеспечивается двумя реакциями: точным присоединением каждой аминокислоты к родственной ей тРНК и комплементарным спариванием антикодонов аминоацил-тРНК с соответствующими им кодонами в мРНК.

г. Правильная инициация трансляции

Имеются три «рамки считывания», при которых может осуществляться перевод последовательных нуклеотидных триплетов мРНК в аминокислоты. Правильная инициация трансляции чрезвычайно важна для точной расшифровки генетического кода. Выбор рамки считывания зависит от того, какое сочетание из трех последовательных нуклеотидов выбрано в качестве первого кодона. Ниже приведены три возможные рамки считывания для последовательности GUACGUAAGUAAGUAUGGACGUA:

Рамка считывания 1 GUA CGU AAG UAA GUA UGG ACG

Рамка считывания 2 G UAC GUA AGU AAG UAU GGA CGU

Рамка считывания 3 GU ACG UAA GUA AGU AUG GAC GUA

Обычно аминокислотной последовательности кодируемой полипептидной цепи соответствует только одна из рамок. Следовательно, должен существовать какой-то способ инициации трансляции с правильной рамкой считывания. У всех организмов, изученных к настоящему времени, – бактерий, вирусов и эукариот – правильная рамка считывания определяется с помощью механизма, распознающего специфический кодон, который детерминирует концевую аминокислоту синтезируемого белка. Почти всегда таким кодоном является триплет AUG, отвечающий метионину. Поэтому образующийся полипептид неизменно содержит на N-конце метионин, но при последующем удалении аминоконцевой последовательности на N-конце конечного белкового продукта оказывается аминокислота, находящаяся изначально внутри синтезированной полипептидной последовательности. В рассмотренном выше примере кодон AUG, с которого может начаться транскрипция, содержит рамка считывания 3.

д. Трансляция кодонов и соединение аминокислот

Последовательное спаривание разных аминоацил-тРНК с кодонами мРНК и рост полипептидной цепи осуществляются с помощью целой серии взаимно согласованных реакций. Одним из главных участников этого в высшей степени скоординированного процесса является рибосома – особый мультиферментный комплекс, состоящий из нескольких видов РНК и множества белков. Кроме того, целая армия ферментов и различных факторов катализирует мириады химических событий, необходимых для успешного синтеза белка.

Рибосомы, несущие особую инициаторную метионил-тРНК, находят инициаторный кодон в мРНК, AUG, и связываются с ним. Затем с рибосомой связывается аминоацил-тРНК, соответствующая второму кодону, и при участии рибосомной ферментативной активности остаток метионина соединяется со второй аминокислотой, все еще связанной со «своей» тРНК. В результате образуется дипептидил-тРНК. По мере продвижения рибосомы по цепи мРНК и считывания каждого последующего кодона полипептидная цепь удлиняется на одну аминокислоту за один шаг. Элонгация прекращается в тот момент, когда рибосома достигает одного из трех терминирующих кодонов. Завершенная полипептидная цепь тотчас же высвобождает последнюю тРНК, и происходит разделение рибосомы и мРНК.

е. Регуляция экспрессии генов на разных этапах образования РНК и белка

Клетки про- и эукариот обладают способностью к дифференциальной регуляции экспрессии генов. Так, при определенных условиях многие гены вообще не экспрессируются, а степень экспрессии других различается на несколько порядков. Изменение условий может привести к активации «молчавших» ранее генов и репрессии активно работавших. Подобная способность позволяет клеткам приспособить свои фенотипы к самым разнообразным условиям окружающей среды и физиологическим воздействиям. Дифференцированная экспрессия одного генома у многоклеточных организмов обусловливает развитие огромного множества типов клеток, имеющих специфические функции, из одной или нескольких зародышевых клеток.

Экспрессия генов, как правило, регулируется на уровне образования РНК. Обычно регулируемым этапом является инициация транскрипции, при этом регуляция осуществляется либо с помощью репрессорных белков, предотвращающих транскрипцию, либо с помощью активаторных, необходимых для ее начала. В первом случае транскрипция начинается только после того, как инактивируется репрессорный белок. Во втором ген транскрибируется лишь тогда, когда белок-активатор находится в соответствующем функциональном состоянии. В регуляции транскрипции генов участвуют не только репрессорные и активаторные белки. В некоторых случаях сами белки – продукты генной экспрессии – оказываются регуляторами транскрипции собственных генов. Эффективность транскрипции зависит также от конформационного состояния ДНК или РНК. Кроме того, регуляция синтеза РНК может осуществляться путем контроля скорости ее элонгации или с помощью «стоп-сигнала» в транскрибируемой последовательности, который может остановить транскрипцию гена. Модификация и / или процессинг, которые могут предшествовать образованию зрелой функциональной РНК, также регулируются.

Экспрессия генов может регулироваться и на уровне трансляции мРНК с образованием белков. И в этом случае специфическая регуляция, как правило, осуществляется на начальном этапе декодирования. Однако контроль может осуществляться и на разных этапах сборки полипептидной цепи. Более того, синтез тех белков, которые претерпевают посттрансляционные модификации или транспортируются к местам своего назначения внутри клетки, может регулироваться на каждом из этих этапов.

Позднее, когда мы проанализируем эти процессы подробнее, мы увидим, что механизмы регуляции экспрессии генов весьма разнообразны, многочисленны и очень сложны. И хотя многим из них присущи общие черты, тонкие механизмы регуляции всегда уникальны для данного гена, определенного физиологического состояния организма и условий окружающей среды. Анализ регуляторных механизмов бактериальных систем позволил выявить широкий спектр способов регуляции и координации экспрессии генов. Однако исследование механизма контроля экспрессии генов в клетках эукариот только начинается, а процессы, ответственные за дифференцировку многоклеточных организмов, пока остаются невыясненными.

**2. Транскрипция: передача информации о нуклеотидной последовательности ДНК на уровень РНК**

В этом и следующем разделах мы рассмотрим некоторые аспекты переноса информации о нуклеотидной последовательности ДНК на уровень РНК – процесса, ответственного за синтез всех типов клеточных РНК как у про-, так и у эукариот. Подавляющее число пионерских работ, в которых изучалась транскрипция, – природа соответствующих реакций и их субстраты, ферментативный аппарат, сигнальные нуклеотидные последовательности, определяющие, какие области ДНК должны транскрибироваться, некоторые способы процессинга, превращающего первичные транскрипты в зрелые молекулы РНК, – было выполнено на прокариотических системах. Параллельное проведение генетических и биохимических экспериментов позволило исследовать ферменты, участвующие в транскрипции, и механизм самого этого процесса. Предпринимаемые в то же время усилия по изучению транскрипционного и регуляторного аппаратов у эукариот были сильно затруднены и гораздо менее успешны главным образом из-за того, что компоненты их транскрипционного аппарата – ДНК в форме хроматина и РНК-полимеразы – были слабо охарактеризованы. Кроме того, была неизвестна природа транскрипционных единиц, а применение генетических подходов для их определения было невозможно.

Ситуация резко изменилась с появлением методов молекулярного клонирования. Сейчас многие гены, составляющие различные типы транскрипционных единиц, выделены, секвенированы и даже соответствующим образом модифицированы с целью исследования их функций. Более того, использование некоторых современных подходов позволило по-новому посмотреть на транскрипционный аппарат самых разных организмов – от дрожжей до человека. Имеются в виду методы введения ДНК в культуры клеток млекопитающих и даже в клетки целого организма животных, применяемые наряду с традиционными методами исследования очищенных транскрипционных систем in vitro. Одновременно был достигнут прогресс в установлении структуры хроматина и свойств эукариотических РНК-полимераз. Подробные данные о структуре генов, механизме транскрипции и непосредственно связанных с ней посттранскрипционных событиях, происходящих при синтезе РНК у эукариот.

а. Синтез РНК на ДНК-матрице

Двухцепочечная молекула ДНК – это физиологическая матрица для синтеза всех клеточных РНК. Даже если геном, как у некоторых вирусов, представлен одноцепочечной ДНК, последняя перед транскрипцией обязательно переходит в двухцепо-чечную репликативную форму. Транскрибирована может быть любая из двух цепей геномной ДНК, однако матрицей при транскрипции отдельного гена обычно служит только какая-то одна из них. Впрочем, в некоторых случаях все мРНК транскрибируются с одной и той же цепи. Очень редко транскрипция идет на обеих цепях в одном и том же месте, так что образующиеся цепи РНК оказываются комплементарны друг другу; возможно, подобный способ транскрипции имеет особое регуляторное значение.

Нуклеотидными предшественниками для синтеза РНК являются четыре рибонуклеозид-5'-трифосфата: ATP, GTP, UTP и СТР. Многие РНК содержат модифицированные нуклеотиды, но изменения в основаниях и рибозных остатках происходят после полимеризации, т.е. посттранскрипционно. Тем не менее, РНК-полимеразы могут использовать рибонуклеозид-5'-трифосфаты, отличные от указанных четырех, при условии, что модифицированные основания обладают способностью к спариванию, сравнимой с таковой для аденина, гуанина, цитозина и урацила.

РНК-полимеразы катализируют реакцию присоединения 3'-ОН-группы нуклеотида, находящегося на растущем конце цепи, к а-фосфату следующего рибонуклеозид-5'-трифосфата. Многократное повторение этой реакции приводит к постепенному удлинению цепи РНК. Образование каждой новой фосфодиэфирной связи сопровождается высвобождением неорганического пирофосфата; быстрый гидролиз пирофосфата до неорганического фосфата in vivo делает реакцию образования фосфодиэфирной связи энергетически выгодной.

Транскрипция аналогична репликации в том смысле, что для ее осуществления также нужна ДНК-матрица. Порядок присоединения нуклеотидов определяется комплементарным спариванием оснований. Чтобы могло происходить комплементарное спаривание каждого следующего нуклеозидтрифосфата с матричным транскрибируемым основанием, спираль ДНК во время транскрипции должна раскручиваться с помощью ДНК-полимеразы. Растущая цепь РНК остается связанной с ферментом и спаренной своим растущим концом с участком матричной цепи длиной 20–30 нуклеотидов; остальная часть образовавшейся цепи не связана ни с ферментом, ни с ДНК. По мере продолжения транскрипции временно разошедшиеся цепи ДНК воссоединяются и восстанавливается исходная дуплексная структура. Таким образом, транскрипция – процесс консервативный, в котором сохраняется двойная спираль ДНК, а синтезированная цепь РНК отделяется. В противоположность этому репликация ДНК полуконсервативна, поскольку обе цепи исходного дуплекса распределяются по двум дочерним спиралям. Другое существенное различие между репликацией и транскрипцией ДНК состоит в том, что репликация не может начаться без затравки – праймера, а инициация синтеза РНК с помощью РНК-полимеразы происходит de novo, начинаясь с рибонуклеозидтрифосфата, соответствующего первому нуклеотиду в цепи РНК.

Наращивание РНК идет в направлении от 5' - к 3'-концу вдоль матричной цепи, ориентированной в направлении 3'–>5', т.е. антипараллельно. Несмотря на процессивный характер элонгации, ее скорость вдоль матрицы не постоянна. В некоторых местах фермент делает остановки; возможно, это происходит там, где в одноцепочечной ДНК или в самой РНК образуются внутрицепочечные дуплексы, мешающие продвижению полимеразы. Такие паузы могут при определенных обстоятельствах приводить к преждевременной терминации транскрипции. Как мы вскоре увидим, сигналами для нормальной терминации и отделения синтезированной РНК и полимеразы от матрицы являются особые структуры РНК – шпильки.

Каков механизм однонаправленного движения РНК-полимеразы вдоль матричной ДНК, остается неясным. Не знаем мы пока и того, как расплетается и заплетается вновь во время транскрипции дуплекс ДНК и почему восстановление этого дуплекса более выгодно, чем образование дуплекса ДНК-РНК. Можно лишь отметить, что, поскольку РНК-полимераза одна осуществляет все эти функции in vitro даже в случае ковалентно замкнутых кольцевых

Исследования с применением препаратов, ингибирующих РНК-полимеразу, и с ферментами, субъединицы которых были изменены в результате мутации, несколько прояснили роль корсубъединиц. в-Субъединица скорее всего участвует в связывании рибонуклеозидтрифосфатов в реакциях инициации и элонгации. Комплекс а- и в'-субъединиц участвует в неспецифическом прочном связывании с ДНК и в специфическом взаимодействии холофермента с промоторами – сайтами, детерминирующими инициацию транскрипции. Наиболее полно по сравнению со всеми другими субматричных ДНК, все секреты, по-видимому, кроются в самом этом ферменте. Для сравнения вспомним, что ДНК-полимеразы не способны к инициации синтеза новых цепей de novo и что в процессах расплетания и восстановления дуплексов при репликации двухцепочечной ДНК участвуют геликазы и топоизомеразы.

б. ДНК-зависимые РНК-полимеразы

У прокариот синтез всех видов РНК–мРНК, рРНК и тРНК, а также более специализрованных РНК, участвующих в процессинге РНК, – катализируется единственной ДНК-зависимой РНК-полимеразой. Бактериальные РНК-полимеразы – это сложные белки, состоящие из нескольких разных субъединиц. Наиболее изученный фермент – холофермент РНК-полимераза Е. coli – содержит пять разных полипептидных субъединиц: две а-цепи, одну в- и одну в'-цепи, а- и ю-цепи. Альтернативная, сосуществующая с первой форма фермента, называемая кором, лишена а-субъединицы.

Единицами холофермента изучена роль а-субъединицы. Корфермент, лишенный а-субъединицы, катализирует большинство реакций, необходимых для транскрипции ДНК с образованием РНК, а именно комплементарное копирование матричной цепи, образование фосфодиэфирных связей и терминацию цепи РНК. Однако он не может инициировать синтез РНК в нужном месте, поскольку не способен узнавать промоторные сайты. Точное связывание и инициация в промоторах происходят только после добавления к корферменту а-субъединицы и образования холофермента. Такое поведение можно объяснить, например, тем, что корфермент очень прочно, но неспецифично связывается с ДНК, а поэтому редко оказывается в том месте, где находится промотор. И напротив, холофермент связывается с неспецифическими участками ДНК непрочно и, последовательно связываясь с разными областями ДНК, находит промотор и прочно связывается с ним. После образования нескольких первых фосфодиэфирных связей а-субъединица отделяется от инициирующего комплекса, и дальнейшая транскрипция осуществляется с помощью корфермента. Транскрипция непрерывно продолжается до тех пор, пока фермент не достигнет сайта терминации транскрипции. Итак, а-субъединица обеспечивает эффективное связывание холофермента с промотором, а при ее отсоединении полимераза переключается на элонгацию. А-Субъединица может снова стимулировать инициацию, специфически связавшись с другой молекулой РНК-полимеразы.

Имеются данные о том, что способность РНК-полимеразы узнавать промотор может изменяться при связывании с разными а-субъединицами. Так, после заражения Bacillus subtilis определенными бактериофагами или на ранних стадиях спо-руляции экспрессируются разные а-субъединицы и в результате изменяется порядок транскрипции клеточных и вирусных генов. Использует ли РНК-полимераза других прокариот различные а-субъединицы для регуляции промоторной специфичности, пока неизвестно.

Не все РНК-полимеразы прокариот представляют собой мультисубъединичные ферменты. РНК-полимеразы, кодируемые бактериофагами Т3 и Т7 Е. coli, – это одиночные полипептидные цепи средней длины. Эти ферменты высокоспецифичны в отношении промоторных сайтов, используемых для транскрипции определенного набора вирусных генов. Такие «упрощенные» ферменты обладают всеми активностями мультисубъединичных РНК-полимераз. Они катализируют синтез РНК на ДНК-матрицах и осуществляют правильную терминацию цепей РНК.

в. Транскрипция инициируется в особых нуклеотидных последовательностях

Транскрипция инициируется при образовании стабильного комплекса между холоферментом и специфической последовательностью, называемой промотором и располагающейся в начале всех транскрипционных единиц. Изучение нуклеотидной последовательности более чем 50 разных промоторных сайтов прокариот и мутационный анализ выявили только два консервативных участка, по-видимому играющих ключевую роль в узнавании и функционировании промотора. Одна из этих последовательностей состоит из шести или семи пар оснований и расположена на расстоянии примерно 10 оснований до того нуклеотида, с которого начинается транскрипция; этот сигнал обычно обозначают как –10-последовательность. Сравнительный анализ 10-последовательностей примерно 50 промоторов прокариот показал, что все они немного отличаются от консенсус-последовательности ТАТААТ. Подчеркнутый Т присутствует почти во всех промоторах, тогда как по другим позициям в каждом промоторе может наблюдаться от одного до нескольких вариантов.

Вторая последовательность, длина которой обычно равна девяти нуклеотидам, расположена на расстоянии ~ 35 оснований до сайта инициации и также встречается в большинстве промоторов прокариот. Нуклеотидная последовательность сегмента между –35- и –10-участками не является критической, важно лишь расстояние между этими участками. –35-последовательность участвует в связывании РНК-полимеразы, которое предшествует перемещению фермента в Прибновбокс. Возможно, РНК-полимераза вызывает локальное раскручивание спирали, начиная этот процесс с Прибновбокса, и создает условия для инициации синтеза РНК.

Однако остается открытым вопрос, достаточно ли простого связывания РНК-полимеразы с промотором для локального расхождения цепей вблизи сайта инициации синтеза РНК или РНК-полимераза расплетает спираль в стартовом сайте. Независимо от механизма образование «открытого» промоторного комплекса позволяет РНК-полимеразе осуществить спаривание первого и второго рибонуклеозид-трифосфатов с матричной цепью и катализировать образование первой фосфодиэфирной связи.

Различия в эффективности транскрипции индивидуальных генов отчасти зависят от структуры их промоторов. Как прочность взаимодействия РНК-полимеразы с промоторной последовательностью, так и эффективность образования «открытого» промоторного комплекса определяются конкретными нуклеотидными последовательностями –35- и –10-участков соответственно. Мутации в этих участках приводят к значительным изменениям способности многих промоторов обеспечивать инициацию транскрипции. В некоторых случаях инициацию транскрипции в малоэффективных промоторах облегчают вспомогательные белки, связывающиеся с ДНК вблизи –35-последовательностей. Суть подобного феномена до конца не выяснена, но известно, что иногда белки, связывающиеся с –35-последовательностью, увеличивают вероятность того, что она будет обнаружена РНК-полимеразой и свяжется с ней. Связывание белков-активаторов может привести также к изменению структуры ДНК и тем самым способствовать инициации транскрипции. Изменение топологической структуры ДНК – особенно увеличение числа отрицательных сверхвитков – также может приводить к повышению или снижению эффективности некоторых промоторов.

г. Терминация транскрипции и отделение цепей РНК

Последовательности ДНК, являющиеся сигналами остановки транскрипции, называются транскрипционными терминаторами. Обнаружены два типа сигналов терминации – р-зависимый и р-независимый терминаторы. Оба они имеют некоторые общие признаки. И тот и другой содержат инвертированные повторы, благодаря чему 3'-концы РНК-транскриптов складываются с образованием шпилек разной длины. Стебли шпилек р-независимых терминаторов обычно содержат GC-богатые участки; один из них находится вблизи основания стебля, и к нему примыкает участок, состоящий из четырех-шести уридиловых и одного-двух адениловых остатков. В стебле р-зависимых терминаторов, напротив, содержится лишь несколько GC-пар, а уридиновые 3'-хвосты могут отсутствовать.

Точный механизм р-независимой и р-зависимой терминации транскрипции является пока предметом дискуссий. Наиболее вероятным представляется следующее объяснение р-независимой терминации: РНК-полимераза останавливается после транскрипции инвертированного повтора, потому что шпилечная структура оказывается помехой. В результате сразу после остановки процесса РНК отделяется от матричной цепи вблизи U-богатого участка, который относительно слабо спарен с А-богатым участком матрицы. Этим, по-видимому, объясняется то обстоятельство, что наиболее часто на конце цепи РНК находятся уридиловые или адениловые остатки.

Р – это олигомерный белок, прочно связывающийся с РНК и в этом состоянии гидролизующий АТР до ADP и неорганического фосфата. В одной из моделей действие р-белка объясняется тем, что он связывается с синтезируемой цепью РНК и перемещается вдоль нее в направлении 5' – >3' к месту синтеза РНК; необходимая для его перемещения энергия выделяется при гидролизе АТР. Если р-белок наталкивается на образующуюся в РНК шпильку, он останавливает полимеразу, которая могла бы продолжать транскрипцию. Возможно, для отсоединения РНК от матрицы достаточно этой р-индуцированной остановки, но не исключено, что диссоциации и отделению способствует сам р-белок.

Терминация транскрипции редко является абсолютно зависимой или абсолютно независимой от р-белка. Некоторые р-независимые терминаторы работают в присутствии р более эффективно. А в некоторых условиях так называемые р-зависимые терминаторы вызывают терминацию и в отсутствие р, хотя и не столь успешно.

Терминация, как и инициация синтеза РНК, является регулируемым процессом. Существуют белки, функционирующие как антитерминаторы и предотвращающие терминацию в р-независимых терминаторах; известны также другие белки, ингибирующие р и тем самым обеспечивающие удлинение цепи после сигналов терминации. При определенных обстоятельствах молекулы РНК могут образовывать альтернативные шпилечные структуры на особых последовательностях определенных участков ДНК. Одни из таких структур могут приводить к абортивной терминации, а другие – к продолжению транскрипции.

**3. Процессинг РНК у прокариот**

Первичные транскрипты, образующиеся при транскрипции прокариотических генов, кодирующих белки, функционируют в качестве мРНК без последующей модификации или процессинга. Действительно, трансляция мРНК часто начинается даже до завершения синтеза 3'-конца транскрипта. Совсем иная ситуация наблюдается для молекул рРНК и тРНК. В этом случае кластеры рРНК-или тРНК-генов или даже перемежающиеся участки этих генов часто транскрибируются с образованием единой цепи РНК. И хотя транскрипция этих генов всегда начинается на определенных промоторах и заканчивается на определенных терминаторах, для образования зрелых функциональных форм должны произойти специфическое надрезание первичных РНК-транскриптов и модификация. Подобные молекулярные события называют общим терминомпосттранскрипционные модификации или просто процессинг РНК. Механизмы процессинга рРНК и тРНК и ферменты, с помощью которых он осуществляется, наиболее полно изучены у Е. coli, и для иллюстрации особенностей посттранскрипционного процессинга РНК мы используем эту систему. Аналогичные модификации эукариотических РНК; в этом случае помимо процессинга рРНК и тРНК используются более сложные системы созревания транскриптов с образованием мРНК.

а. Группы генов, кодирующих рРНК и тРНК

В геноме Е. coli идентифицированы и картированы семь дискретных транскрипционных единиц, кодирующих рРНК. Каждая транскрипционная единица – это молекула РНК, которая состоит из ~5000 нуклеотидов и содержит по одной копии кодирующих последовательностей для 5S-, 16S- и 23S-pPHK. Транскрипция в этой области осуществляется в направлении 16S –> 23S –> 5S. Помимо этих трех последовательностей, кодирующих рРНК, транскрипты содержат вставки разной длины и одну или более копий тРНК-генов. Спейсеры могут находиться перед последовательностями для рРНК, между ними и после них, а тРНК-гены обычно лежат в пределах вкрапленных или 3'-концевых спейсерных сегментов. Для образования функционально зрелых молекул РНК должен произойти процессинг таких транскриптов. До процессинга или во время него происходит модификация специфических оснований в спейсерах, а также в рРНК- и тРНК-генах.

б. Разрезание рРНК-тРНК-котранскриптов

Начальное расщепление первичных транскриптов на фрагменты, содержащие либо тРНК, либо 16S-, 23S- или 58-рРНК-последовательности, осуществляет эндонуклеаза РНКаза III. Ее мишенями служат короткие дуплексы РНК, образующиеся при внутримолекулярном спаривании оснований в последовательностях, фланкирующих каждый из рРНК-сегментов. Например, комплементарные участки в спейсерных областях, фланкирующих последовательность 16S-pPHK, образуют стебель шпильки, в петле которой находится последовательность 16S-pPHK. Аналогичные шпильки образуют и последовательности 23S- и 5S-pPHK. РНКаза III вносит разрывы в двухцепочечный стебель, в результате образуется цепь РНК, содержащая последовательность той или иной рРНК, фланкированную короткими спейсерными участками с 5'-фосфатным и 3'-гидроксильным концами. Затем лишние нуклеотиды спейсерных последовательностей удаляются, возможно с помощью той же самой РНК-экзонуклеазы, которая катализирует и последние этапы процессинга тРНК. В принципе для того, чтобы произошло ферментативное расщепление, должны быть транскрибированы только те нуклеотидные последовательности, которые образуют шпильки. Однако процессинг происходит лишь после завершения синтеза всего первичного транскрипта, поскольку, по-видимому, для правильной укладки целого РНК-транскрипта, который и распознается эндонуклеазой III, необходимы рибосомные или какие-либо другие белки. Процессинг тРНК-сегментов, выщепляющихся из мультигенных транскриптов, осуществляется так же, как и процессинг тРНК из транскрипционных единиц одиночных генов.

в. Образование зрелых тРНК из более крупных транскриптов

Несмотря на то, что некоторые кодирующие тРНК гены находятся внутри транскрипционных единиц рРНК и экспрессируются совместно с генами рРНК, основная часть тРНК-генов представлена одиночными генами или объединена в кластеры. Одни кластеры содержат множественные повторы одних и тех же генов, другие – различные и неродственные тРНК-гены. В некоторых случаях каждый кластер транскрибируется как одна большая молекула РНК, которая подвергается процессингу с последовательным выщеплением зрелых тРНК-фрагментов. Для образования зрелой функциональной тРНК, по-видимому, должны произойти специфическая модификация оснований и присоединение одного, двух или всех трех нуклеотидов 3'-ССА-конца.

Независимо от того, содержит ли первичный транскрипт одну или более тРНК-последовательностей или эти последовательности внедрены в спейсерные участки рРНК, 5'-концы всех тРНК образуются при участии одной эндонуклеазы, называемой РНКазой Р. По-видимому, РНКаза Р узнает характерную свернутую структуру тРНК в полинуклеотиде-предшественнике и отщепляет лидерную или спейсерную последовательности, расположенные перед 5'-концом зрелой последовательности тРНК. 3'-концы тРНК образуются с помощью нескольких активностей. До сих пор неидентифицированная эндонуклеаза расщепляет предшественник в том месте шпильки, где находится 3'-конец зрелой тРНК, а затем другая эндонуклеаза, РНКаза D, завершает образование правильного 3'-конца. В некоторых случаях экзонуклеазное расщепление прекращается точно у 3'-ССА-конца зрелой тРНК, а в других случаях под действием экзонуклеазы образуется конец, служащий затравкой, к которому тРНК-нуклеотидилтрансфераза добавляет один или более инвариантных концевых нуклеотидов.

Отличительной особенностью РНКазы Р является то, что сайт расщепления для нее формируется в результате правильной укладки молекулы тРНК. Изменения в нуклеотидной последовательности, не приводящие к нарушению этой укладки, не сказываются и на процессинге 5'-конца. Другим необычным свойством РНКазы Р является то, что она состоит из белка и РНК. Эта РНК имеет специфическую последовательность из 377 нуклеотидов и сама транскрибируется РНК-полимеразой с гена чуть большего размера и затем подвергается процессингу до размера зрелой молекулы. Удивительной особенностью этой РНК оказалось то, что она одна может катализировать такую же эндонуклеазную реакцию, что и целый рибонуклеопротеин; белок же не обладает самостоятельной эндонуклеазной активностью. Таким образом, эндонуклеазная активность может быть присуща самой РНК, а белок, по-видимому, необходим для сохранения структуры РНК в максимально активной конфигурации.

Зрелые тРНК не только имеют характерную конформацию, но и содержат модифицированные нуклеотиды. Многие из таких модификаций оказываются существенными для выполнения некоторых физиологических функций тРНК. Сегодня охарактеризованы лишь немногие из целой армии ферментов, катализирующих огромное количество реакций модификации. Однако ясно, что модификации происходят в основном на стадии РНК-предшественника и в полностью процессированной тРНК. Такие модифицирующие ферменты представляют особый интерес благодаря своей необычной специфичности в отношении определенных последовательностей: например, только отдельные урациловые остатки превращаются в тиоурацил, метилируются до тимина или восстанавливаются до дигидроурацила. Еще более загадочным представляется образование псевдоуридилата при модификации обычной связи между урацилом и рибозой.

**4. Генетический код**

Последовательность аминокислот в белках определяется порядком расположения дезоксинуклеотидов в генах, кодирующих белки, точнее – последовательностью рибонуклеотидов в мРНК-транскриптах. Информационная связь между нуклеотидными и аминокислотными последовательностями осуществляется с помощью генетического кода. Для составления генетического словаря было проведено множество специальных генетических и биохимических экспериментов. Он включает также и знаки препинания – начало и конец участков, кодирующих белки. За исключением незначительных вариаций в использовании нескольких нуклеотидов для кодирования особых аминокислот у митохондрий и некоторых инфузорий, генетический словарь универсален, т.е. конкретная последовательность нуклеотидов задает одинаковую для всех живых организмов аминокислотную последовательность.

Наличие подобной системы кодирования подразумевает существование некоего механизма для перевода информации с языка нуклеотидов на язык аминокислот. Как и следовало ожидать, этот механизм и реакции, осуществляющие перевод, очень сложны. Несмотря на различия между про- и эукариотами как в том, что касается структуры мРНК, так и в физическом взаимоотношении генов и аппарата трансляции, оба типа организмов используют весьма сходные механизмы для расшифровки генетических посланий.

а. Аминокислотная последовательность белков соответствует нуклеотидной последовательности кодирующих их генов

Предположение о коллинеарности нуклеотидных и аминокислотных последовательностей было высказано в числе первых в дискуссии о природе генетического кода. Догадки такого рода возникли после того, как было показано, что многие мутации проявляются в замене одной-единственной аминокислоты в белках бактерий, растений или животных. Но гипотеза коллинеарности оставалась неподтвержденной до тех пор, пока не были проведены тщательные генетические и биохимические исследования хорошо охарактеризованных генно-белковых систем. Например, было показано, что относительное положение аминокислотных замен в а-субъединице триптофансинтетазы Е. coli согласуется с относительной локализацией на карте соответствующих мутаций в trpA-гене этого микроорганизма. Однако выделить и охарактеризовать мутантную ДНК в то время не удалось, поэтому нельзя было установить соответствие между нуклеотидными последовательностями и аминокислотными.

Теоретический анализ привел к предположению, что наиболее подходящей по размеру для генетической кодирующей единицы, или кодона, является последовательность из трех нуклеотидов. В основе этого вывода лежали три соображения. Во-первых, четыре нуклеотида, взятые по одному, могут кодировать только четыре разные аминокислоты. Сочетания из двух нуклеотидов могут кодировать только 42, или 16 аминокислот, а это меньше, чем те 20 аминокислот, которые, как было известно, присутствуют в белках. И только совокупности трех нуклеотидов дают 64 возможных кодона, т.е. число, более чем достаточное для кодирования 20 разных аминокислот. Генетические эксперименты, выполненные на мутантах с делециями или вставками длиной один, два или три нуклеотида в генах, кодирующих белки, позволили доказать, что наиболее подходящий размер для кодона – три нуклеотида. Более того, из этих исследований был сделан вывод, что нуклеотидная последовательность считывается расположенными один за другим триплетами с фиксированной точки. Все эти выводы наряду с данными о том, что полипептидные цепи синтезируются последовательно путем соединения аминогруппы одной аминокислоты с карбоксильной группой другой, послужили краеугольным камнем в расшифровке генетического кода.

б. Соответствие между аминокислотами и их кодонами

Одним из загадочных моментов кодирования было отсутствие структурной комплементарности между нуклеиновыми кислотами, с одной стороны, и аминокислотными цепочками – с другой. Выход из этого концептуального тупика–ответ на вопрос, как аминокислоты спариваются с соответствующими кодонами, – был найден, когда появилась идея о существовании адаптора. Согласно этой идее, аминокислоты сначала связываются с молекулами РНК, а затем такие гибриды выстраиваются вдоль мРНК, соединяясь с ней путем комплементарного спаривания нескольких оснований в адапторной молекуле РНК с соответствующим кодоном в мРНК. Адапторная гипотеза получила строгое экспериментальное подтверждение после того, как были обнаружены тРНК и ферменты, ответственные за связывание аминокислот и тРНК, и показано, что присоединенные к тРНК аминокислоты являются прямыми предшественниками при сборке полипептида.

Если тРНК – это адапторы, то каждая аминокислота должна присоединяться только к специфической тРНК, а каждая тРНК – спариваться только с одним, соответствующим ей кодоном. Правильность первого из этих положений была доказана с открытием особых ферментов – аминоацил-тРНК-синтетаз, каждый из которых связывает одну-единственную аминокислоту с одной или несколькими родственными тРНК. Эти ферменты и катализируемые ими реакции более детально будут рассмотрены в разд. 3.5.а. Здесь достаточно сказать, что связывание аминокислот с молекулами тРНК – это первый шаг в процессе расшифровки. Правильность второго положения адапторной гипотезы – о том, что тРНК сама определяет место своей аминокислоты в полипептидной цепи – была подтверждена с помощью простого эксперимента. Одна из аминокислот, будучи связанной с соответствующей тРНК, была химически превращена в другую. После включения этой модифицированной аминокислоты в белок in vitro была установлена ее локализация в белковой цепи. Оказалось, что после превращения цистеинил-тРНК в аланил-тPHK остаток аланина, связанный с тРНК, обнаруживается в тех сайтах белковой цепи, которые обычно занимает цистеин, а не в сайтах, где обычно находится аланин. Стало ясно, что именно тРНК с присоединенной к ней аминокислотой, а не сама аминокислота определяет, с каким кодоном должно произойти спаривание.

в. Расшифровка генетического кода

Предпосылками для расшифровки кода послужили два открытия. Во-первых, было установлено, что мРНК – это информационный посредник между генами и белками. Во-вторых, обнаружилось, что мРНК, введенная в бактериальные экстракты, транслируется с образованием соответствующих белков. Прорыв в этой области произошел, когда с помощью экстрактов из клеток Е. coli была осуществлена трансляция синтетических РНК-полиуридилата, полиаденилата и полицитидилата – с образованием полифенилаланина, полилизина и полипролина соответственно. Это привело к заключению, что триплеты, состоящие только из U, А и С, кодируют соответственно фенилаланин, лизин и пролин. Затем были проделаны эксперименты с применением смешанных полимеров с варьирующим соотношением двух и трех нуклеотидов; в результате был определен состав кодонов. Однако эти данные позволили установить лишь нуклеотидный состав кодонов, но не порядок следования нуклеотидов в них. Все кодоны были в конце концов идентифицированы при помощи следующих двух экспериментов. В экспериментах первого типа сравнивали аминокислотную последовательность полипептидов, полученных in vitro с использованием синтетических мРНК, содержащих определенные повторы из двух или трех нуклеотидов. В экспериментах другого типа определяли, какая именно из аминоацил-тРНК связывается с рибосомами в присутствии каждого из возможных тринуклеотидов. Эти эксперименты позволили составить непротиворечивый словарь, в котором 61 трехнуклеотидный кодон соответствует 20 аминокислотам, а три кодона – окончанию кодирующей последовательности. В коде заложена некая неоднозначность, которая связана с точкой начала трансляции, а не с соответствием кодон-аминокислота. Эта неоднозначность обусловлена наличием альтернативных наборов триплетов, или рамок считывания, для любой полинуклеотидной последовательности. Большинство прокариотических генов транслируется при одной непрерывной рамке считывания; при альтернативных рамках на каждые 20 нуклеотидов приходится в среднем по одному терминирующему кодону.

В экспериментах по расшифровке кода, описанных выше, синтетические полинуклеотиды транслировались в условиях, не требующих точной инициации. Однако in vivo и в соответствующих условиях in vitro инициация происходит только с правильной рамкой считывания. Однозначность прочтения белок-кодирующей последовательности обеспечивается тем, что трансляция мРНК начинается только со специфического триплета – AUG, и далее расшифровывается каждый последующий триплет в направлении от 5'-конца молекулы мРНК к 3'-концу. Позднее был разработан метод быстрого секвенирования нуклеиновых кислот и белков, который позволил проверить систему кодирования непосредственно, путем сравнения последовательностей ДНК, РНК и кодируемых ими белков. Сравнительные исследования подтвердили также и то, что кодирующие последовательности действительно читаются от 5'- к 3'-концу мРНК.

г. Избыточность генетического кода

Удивительной особенностью кода оказалось то, что все аминокислоты, кроме двух, кодируются более чем одним кодоном. Эти две составляющие исключение аминокислоты, метионин и триптофан, встречаются в белках достаточно редко. Наибольшее число кодонов имеют серин и лейцин, которыми белки изобилуют. Такие достаточно часто встречающиеся аминокислоты, как цистеин, аланин, глицин, валин, а также дикарбоновые кислоты и их амиды, кодируются двумя-четырьмя кодонами каждая. Из-за такой избыточности разные нуклеотидные последовательности могут при трансляции давать одну и ту же аминокислотную последовательность. Итак, если мы знаем нуклеотидную последовательность, то можем однозначно определить последовательность белка, обратное же проделать невозможно.

Сигналом для остановки синтеза белка служит любой из трех кодонов: UAA, UAG или UGA. Кодон AUG выполняет двойную функцию: он детерминирует аминокислоту метионин и в определенных последовательностях обозначает начало сегмента, кодирующего белок.

Избыточность кода имеет одну интересную особенность: наибольшее число вариаций в кодонах, детерминирующих данную аминокислоту, приходится на третью позицию. Например, аминокислоты глицин, валин, пролин, аланин и треонин кодируются четырьмя кодонами каждая, и в каждом случае эти четыре кодона различаются только нуклеотидами в третьей позиции. Если какая-то аминокислота кодируется двумя кодонами, то последние различаются только пуринами или пиримидинами, находящимися в третьей позиции. И только кодоны для лейцина, серина и аргинина различаются нуклеотидами, находящимися в первой, второй или обеих позициях. Поэтому мутации, приводящие к заменам нуклеотидов в третьей позиции, часто не сопровождаются изменением аминокислотной последовательности. Кроме того, код устроен так, что при замене нуклеотидов даже в первой или второй позиции некоторых кодонов в полипептид включается структурно родственная аминокислота, сводя тем самым к минимуму нарушения во вторичной структуре белка. Кодоны для гидрофобных аминокислот, например фенилаланина, лейцина, изолейцина и валина, различаются только одним нуклеотидом. Аналогичная ситуация наблюдается и для кодонов серина и треонина или аланина и глицина.

д. Универсальность генетического кода

По-видимому, все прокариоты, а также большинство эукариот пользуются одним и тем же словарем кодонов независимо от того, представлен ли их геном ДНК или РНК. В этом смысле нередко говорят, что код универсален. Тем не менее частота использования кодонов-синонимов варьирует как на уровне организмов, так и на уровне мРНК. Если действительно какие-то кодоны используются в большинстве кодирующих белки последовательностей чаще, чем другие, то это должно найти отражение в относительном содержании в клетке различных тРНК, расшифровывающих кодоны-синонимы. Так, если кодон AGA встречается в мРНК какого-либо организма сравнительно редко, то и содержание тРНК, расшифровывающей AGA, должно быть невелико. В некоторых случаях выбор кодонов для конкретной кодирующей последовательности определяется задачами, не связанными с их трансляцией. Например, определенное взаимное расположение кодонов может благоприятствовать образованию специфической вторичной структуры мРНК; таким образом, присутствие конкретных кодонов может влиять на готовность мРНК к трансляции и тем самым играть регуляторную роль. В некоторых случаях экспериментальная замена существующих кодонов их синонимами приводит к изменению стабильности мРНК при полном сохранении ее способности к правильной трансляции.

Редкие исключения в стандартном словаре кодо-нов обнаружены у инфузорий и в митохондриальных генах. Например, в митохондриях млекопитающих кодон UGA читается как триптофан и митохондриальная ДНК кодирует тРНК, чей антикодон UCA спаривается с UGA почти так же прочно, как с нормальным триптофановым кодоном UGG. В митохондриях млекопитающих кодоны AGA и AGG прочитываются как сигналы терминации. AUU, AUC, AUA и AUG служат инициирующими кодонами, a AUA кодирует метионин вместо изолейцина. В митохондриях дрожжей триплеты CUU, CUC, CUA и CUG кодируют треонин, а не лейцин.

**5. Аппарат трансляции**

Основными участниками процесса считывания информации, закодированной в последовательности мРНК, являются аминоацил-тРНК-синтетазы, тРНК, рибосомы, белки, связанные с рибосомами, и некоторые другие белки. Они ответственны за инициацию, элонгацию и терминацию сборки полипептида. В этом разделе мы опишем свойства каждого из перечисленных компонентов, а в следующем обсудим, как они функционируют на разных этапах процесса трансляции.

а. Присоединение аминокислот к «родственным» тРНК

Функционирование тРНК при трансляции сводится к двум уникальным процессам. Первый из них состоит в присоединении аминокислоты к 3'-концу родственной тРНК с помощью специфической аминоацил-тРНК-синтетазы, второй – в специфическом связывании аминоацил-тРНК с соответствующим кодоном мРНК, находящейся в комплексе с рибосомой. Ключевой особенностью обеих реакций является их специфичность, поскольку сбои в образовании аминоацил-тРНК или связывании аминоацил-тРНК с соответствующим кодоном приведут к ошибкам в экспрессии генов. Поэтому очень важно понять природу такой специфичности, механизм ее обеспечения и последствия нарушений точности на этих двух этапах трансляции.

Основные особенности структуры тРНК. В любой клетке присутствует очень много разных тРНК. Молекула тРНК состоит обычно из 75–85 нуклеотидов и содержит уникальный тринуклеотид, который определяет, какую аминокислоту эта тРНК присоединяет и с каким кодоном она может спариться. На основании данных о нуклеотидной последовательности более чем 150 отдельных видов тРНК, выделенных из клеток про- и эукариот, были построены компьютерные модели внутримолекулярного комплементарного спаривания оснований в молекуле тРНК. Был сделан вывод, что практически все тРНК, независимо от их нуклеотидной последовательности, обладают характерной вторичной структурой, которую называют структурой «клеверного листа» из-за наличия в ней трех шпилек. Реальность предсказанной структуры была подтверждена данными о разной химической чувствительности оснований, одни из которых спарены, а другие нет.

Большинство молекул тРНК, имеющих форму клеверного листа, содержат четыре области, каждая из которых обладает инвариантными свойствами независимо от аминокислотной специфичности тРНК. 1. На 3'-конце молекулы всегда находятся четыре неспаренных нуклеотида, причем три из них–это обязательно ССА. 5'- и 3'-концы цепи РНК образуют акцепторный стебель. Цепи удерживаются вместе благодаря комплементарному спариванию семи нуклеотидов 5'-конца с семью нуклеотидами, находящимися вблизи 3'-конца. 2. У всех молекул имеется шпилька РфС, обозначаемая так потому, что она содержит два необычных остатка: риботимидин и псевдоуридин). Шпилька состоит из двухцепочечного стебля из пяти спаренных оснований, включая пару G-C, и петли длиной семь нуклеотидов. Тринуклеотид Т всегда расположен в одном и том же месте петли. В антикодоновой шпильке стебель всегда представлен семью спаренными основаниями. Триплет, комплементарный родственному кодону, – антикодон – находится в петле, состоящей из семи нуклеотидов. С 5'-конца антикодон фланкируют инвариантный остаток урацила и модифицированный цитозин, а к его 3'-концу примыкает модифицированный пурин, как правило аденин. 4. Еще одна шпилька состоит из стебля длиной три-четыре пары нуклеотидов и петли варьирующего размера, часто содержащей урацил в восстановленной форме – дигидроурацил.

Наиболее сильно варьируют нуклеотидные последовательности стеблей, число нуклеотидов между антикодоновым стеблем и стеблем ТфС, а также размер петли и локализация остатков дигидроурацила в DU-петле.

Рентгеноструктурный анализ некоторых молекул тРНК позволил выявить их характерную четвертичную структуру. Эта структура более компактна, чем структура «клеверного листа». Она образуется благодаря внутримолекулярным взаимодействиям, сближающим DU- и Т| С-шпильки. В результате молекула тРНК выглядит так, как будто она состоит из двух взаимно перпендикулярных частей – в одной из них находится акцепторный участок, в другой – антикодон. Из-за такого общего вида молекулы структура получила название L-конфигурации. L-структура представляется более адекватной, чем «клеверный лист», особенно если учесть, что тРНК играет роль адаптора при взаимодействии кодона и антикодона на рибосоме.

Обычно акцепторами для одной и той же аминокислоты служат несколько разных тРНК, имеющих разные антикодоны, что позволяет им спариваться с кодонами-синонимами. Отчасти этим объясняется и вырожденность кода, т.е. способность разных антикодонов детерминировать одну и ту же аминокислоту.

Этерификация молекул тРНК. Для выполнения функции адаптора в процессе трансляции мРНК тРНК должна связаться с аминокислотой, соответствующей своему антикодону. Это происходит в результате АТР-зависимой реакции, катализируемой специфическими ферментами аминоацил-тРНК-синтетазами. В ходе реакции АТР расщепляется на 5'-адениловую кислоту и неорганический фосфат, а высвобождаемая при этом энергия используется для присоединения карбоксильной группы аминокислоты к одной из гидроксильных групп рибозы на 3'-конце тРНК. На самом деле образование аминоацил-тРНК проходит в два этапа. На первом этапе карбоксильная группа аминокислоты присоединяется к а-фосфату АТР, что сопровождается высвобождением неорганического фосфата и образованием аминоацил-аденилата. Аминоацил-аденилат обладает очень высокой реакционной способностью и стабилизируется благодаря прочному связыванию с ферментом. Второй этап состоит в переносе аминоацильной группы от связанного с ферментом аминоацил-аденилата на 2'-или 3'-ОН-группу концевой рибозы тРНК. Потенциала переноса ацильной группы аминоацил-тРНК более чем достаточно для образования пептидной связи без дополнительного поступления энергии.

Ключевой особенностью реакции, приводящей к аминоацетилированию тРНК, является специфичность участвующих в ней ферментов. Присоединение к тРНК каждой из 20 аминокислот, встречающихся в белках, катализируется определенной аминоацил-тРНК-синтетазой. Фермент должен отличить одну аминокислоту от 19 других и перенести ее к одной или нескольким изоакцепторным тРНК из имеющихся примерно 75 других тРНК. Вспомним при этом, что многие аминокислоты очень сходны по структуре: лейцин, валин и изолейцин; валин и треонин; аспарагиновая и глутаминовая кислоты. Аминоацил-тРНК-синтетазы должны отличить «свои» тРНК от всех других, несмотря на удивительное сходство их вторичной и третичной структур. Поэтому необходимо, чтобы ферменты обладали очень высокой специфичностью, позволяющей им сделать правильный выбор из столь родственных структур и избежать ошибок при синтезе белка.

Комментарий по поводу структур аминоацил-тРНК-синтетаз и их способности к узнаванию аминокислот и родственных тРНК. Многие аминоацил-тРНК-синтетазы удалось очистить. Некоторые из них состоят из одной полипептидной цепи, другие – из двух или четырех идентичных цепей, каждая мол. массой от 35 до 115 кДа. Некоторые димерные и тетрамерные ферменты состоят из субъединиц двух типов. Четкой корреляции между размером молекулы фермента или характером его субъединичной структуры и специфичностью не существует.

Исследования взаимодействия между аминоацил-тРНК-синтетазами и родственными им тРНК не позволили выяснить природу их высокой специфичности. Большинство работ показало, что специфичность фермента определяется его прочным связыванием с акцепторным концом тРНК, DU-участком и вариабельной петлей. Некоторые ферменты, по-видимому, не распознают антикодоновый триплет и катализируют реакцию аминоацетилирования даже при измененном антикодоне. Однако отдельные ферменты проявляют пониженную активность по отношению к таким модифицированным тРНК и при замене антикодона присоединяют не ту аминокислоту. Следовательно, в некоторых случаях существенным оказывается и взаимодействие с антикодоновой петлей. В любом случае акцепторный конец тРНК должен быть ориентирован так, чтобы каталитический центр фермента смог перенести связанный аминоациладенилат к концевому нуклеотиду тРНК.

В какой-то степени способность фермента присоединять нужную аминокислоту к родственной тРНК зависит от специфического связывания аминокислоты. Однако, если безошибочное распознавание родственных аминокислот невозможно, синтетазы могут исправлять ошибки, происходящие при присоединении. Например, нельзя полностью исключить возможность связывания валина изолейцил-тРНК-синтетазой из-за сходства размера и структуры изолейцина и валина. Дефект в специфичности обнаруживается в первой же реакции: изолейцил-тРНК-синтетаза образует ферментсвязанный валил-аденилат, хотя и с меньшей эффективностью, чем изолейцил-аденилат, однако такой активированный валин не связывается ни с TPHK, ни с тРНК. Вместо этого ферментсвязанный валил-АМР быстро гидролизуется в присутствии тРНК, и образование валил-тРНК предотвращается. Подобный механизм позволяет валил-тРНК-синтетазе различать валин и треонин, а метионил-тРНК-синтетазе отличать треонин от метионина. Очевидно, что аминоацил-тРНК-синтетазы пользуются механизмом коррекции с целью предотвращения неизбежных ошибок в аминоацетилировании тРНК. И напротив, механизм, с помощью которого удалялась бы уже присоединенная к тРНК неправильная аминокислота, отсутствует. В таких случаях аминокислота занимает неправильную позицию в белке. Частота таких ошибок очень низка. В гемоглобине кролика, например, валин оказывается в местах, обычно занимаемых изолейцином, только в одном из 25000–50000 возможных случаев. Таким образом, точность первого шага на сложном пути считывания генетической информации обеспечивается четкой работой разных аминоацил-тРНК.

б. На рибосомах осуществляются спаривание аминоацил-тРНК с кодонами и сборка белковых цепей

Во всех клетках имеются рибосомы, играющие ключевую роль в синтезе белка; их число колеблется от 20000 до 50000 в зависимости от белоксинтезирующей активности клеток. Рибосомы индифферентны в отношении синтезируемых ими белков или тех клеточных мишеней, к которым они направляют синтезированные продукты. Тип синтезируемого рибосомой белка в каждом синтетическом цикле диктуется мРНК, с которой рибосома оказалась связанной. Внутри- или внеклеточная локализация белков определяется их структурными особенностями и – в зависимости от этих особенностей – характером взаимодействия со специализированными мембранами и органеллами.

Рибосомы про- и эукариот обладают в общем очень сходными структурой и функциями. Тем не менее из-за различий в структуре и организации про- и эукариотических мРНК и из-за того, что процессы транскрипции и трансляции у эукариот являются сопряженными во времени и в пространстве, тонкие различия между рибосомами про- и эукариот имеются. Типичными прокариотическими рибосомами являются рибосомы Е. coli, и поскольку их структура и функции изучены лучше остальных, мы используем эту модель в последующем обсуждении. Для сравнения мы остановимся на некоторых структурных особенностях рибосом эукариот.

Строение рибосомных частиц. Рибосомы прокариот состоят из малых и больших субчастиц. 30S-субчастицы состоят из единственной молекулы рРНК размером 1542 нуклеотида и 21 белка с разной мол. массой. 50S-субчастицы содержат две рРНК – большую, состоящую из 2904 нуклеотидов, и более мелкие, из 120 нуклеотидов; они связаны с 34 разными белками. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности всех рРНК и белков известны. Электронно-микроскопические исследования 70S-рибосом и построения их трехмерных моделей показали, что малая и большая субчастицы соприкасаются в нескольких точках, но самой характерной особенностью является наличие бороздки между ними, необходимой, по-видимому, для размещения в ней мРНК на время трансляции.

И малая, и большая рибосомные субчастицы могут диссоциировать на составляющие молекулы РНК и белка. Более того, даже после отделения друг от друга молекулы всех РНК и белков способны восстанавливать исходную функционально активную рибосомную субчастицу, если их смешать в соответствующих условиях. Это означает, что вся информация о сборке мультимерного комплекса заключена в структуре его компонентов. Эксперименты по реконструированию рибосом позволяют лучше понять характер взаимодействия между этими компонентами и определить возможный порядок, в котором собираются белки и РНК in vivo. Кроме того, в подобных экспериментах можно проверить совместимость эквивалентных РНК или белковых субчастиц из различных источников. Далее, с помощью этого метода можно оценить способность мутантных РНК или белков к взаимодействию с восстановлением структуры рибосом и проявлению различных видов активности, присущих реконструированным рибосомам.

Рибосомы эукариот, находящиеся в цитозоле, также состоят из малых и больших субчастиц. Малые субчастицы содержат одну молекулу РНК размером 1900 нуклеотидов и 30–35 белков; большие – три цепи РНК длиной 120, 160 и 4800 нуклеотидов и 45–50 белков. Рибосомы митохондрий и хлоропластов отличаются от цитозольных рибосом. Как правило, они меньше и содержат меньшее количество белков и различных рРНК. Данные по физическому и химическому реконструированию более сложных эука-риотических хромосом значительно уступают аналогичным данным, полученным для Е. coli.

Необходимо выделить два важных в функциональном отношении участка, образующихся при ассоциации субчастиц в процессе формирования 70S-рибосомы. Это участки, в которых происходит связывание двух тРНК – одной, присоединенной к растущей белковой цепи, и другой, несущей следующую добавляемую к цепи аминокислоту.

Особые тРНК и некоторые вспомогательные белки, участвующие в трансляции. Как у про-, так и у эукариот имеются два вида тРНК, которые связывают метионин. У прокариот они обозначаются как тРНК и тРНК, а у эукариот – соответственно тРНК и тРНК. Каждая из обоих видов тРНК как у про-, так и у эукариот аминоацетилируется метионином с помощью соответствующих аминоацил-тРНК-синтетаз. тРНК прокариот и тРНК эукариот обладают необычными свойствами, позволяющими им функционировать в качестве адапторов при инициации синтеза полипептидной цепи в соответствующих инициаторных AUG-кодонах. тРНК про- и эукариот узнают AUG-кодоны в белок-кодирующих последовательностях.

У прокариот аминогруппа метионил-тРНК, но не метионил-тРНК формилируется особым ферментом до Fmet-TPHK с использованием в качестве донора формильной группы М10-формилтетрагидрофолата. Очевидно, трансформилаза отличает met-TPHKот met-TPHK. Fmet-TPHK используется исключительно для инициации белковых цепей, a met-TPHKMMet – только для декодирования внутренних метиониновых кодонов. Несмотря на то, что тРНК эукариот также используется только для инициации, ее метионильная группа не подвергается формилированию. Очевидно, некие особые свойства, присущие тРНК и необходимые для выполнения ею специальной инициаторной функции, связаны исключительно с ее нуклеотидной последовательностью и / или трехмерной структурой.

Известны белки, которые только временно, на период трансляции, связываются с рибосомами. Они играют важную роль при инициации, элонгации и терминации синтеза белковой цепи. Прежде чем подробно обсуждать эти процессы, мы познакомим читателя с такими белками и кратко опишем их свойства и роль в трансляции.

Эти белки, называемые факторами инициации и обозначаемые IF-1, IF-2 и IF-3, необходимы для инициации трансляции мРНК с образованием белков. IF-1 и IF-3 связываются с 3. Важным этапом терминации или отделения белковой цепи от мРНК является гидролиз GTP.

**6. Трансляция мРНК у прокариот**

Зная всех участников процесса, мы можем теперь приступить к рассмотрению химических реакций, протекающих при синтезе полипептидов, т.е. реакций, участвующих в собственно трансляции. Несмотря на то, что этот процесс протекает непрерывно от старта к финишу, обычно выделяют три его этапа: инициацию, элонгацию и терминацию. Рассматривая каждый из этапов направляемого мРНК синтеза полипептидной цепи, мы должны учитывать два основных свойства этого процесса. Во-первых, полипептидные цепи синтезируются однонаправлен-но: с амино-конца к карбокси-концу. При этом карбоксильная группа уже образовавшегося участка полипептидной цепи соединяется с аминогруппой следующей присоединяемой аминокислоты с помощью пептидной связи. Это может произойти, лишь если карбоксильный конец растущей полипептидной цепи находится в активированном состоянии. Как мы уже отмечали, необходимая для этого энергия поступает в результате присоединения карбоксильной группы растущей полипептидной цепи и каждой присоединяемой аминокислоты к тРНК. Во-вторых, считывание мРНК начинается с кодона AUG, который обозначает 5'-конец кодирующей последовательности и детерминирует N-концевую аминокислоту синтезируемого полипептида. При инициации первая и вторая молекулы аминоацил-тРНК спариваются с первыми двумя кодонами мРНК. Далее трансляция продолжается в направлении 5'–>3' кодон за кодоном до тех пор, пока не достигнет стоп-сигнала, расположенного сразу же за кодоном, детерминирующим С-концевую аминокислоту.

а. Условия инициации

70S-рибосома способна осуществлять трансляцию последовательности мРНК, но не может инициировать этот процесс. При связывании инициаторных белков IF-1 и IF-2 с 30S-субчастицей происходит диссоциация 70S-рибосомы. 30S-субчастица в комплексе с IF-1 и IF-3 связывает IF-2, GTP и Fmet-тРНК. Такой полный комплекс связывается с 5'-концом кодирующей последовательности мРНК вблизи кодона AUG. Очевидно, IF-2 способен отличить Fmet-тРНК от тРНК, и эта специфичность отчасти обеспечивается N-формильной группой, отсутствующей у ТРНК Формирование полноценного функционального комплекса инициации завершается ассоциацией 50S^6-частицы с преинициаторным комплексом. С образованием функциональной 70S-субчастицы отделяются все три белка инициации.

Как узнается первый кодон? Связывание 30S-6-частицы с мРНК находится под строгим контролем нуклеотидной последовательности, расположенной примерно за 10 нуклеотидов до 5'-конца инициаторного кодона. Взаимодействию способствует комплементарное спаривание этой богатой пуринами последовательности из пяти-восьми нуклеотидов, называемой последовательностью Шайна-Дальгарно, с полипиримидиновым участком, находящимся вблизи 3'-конца 16S-pPHK. Эффективность инициации существенно зависит от степени комплементарности между последовательностями Шайна-Дальгарно и 16S-pPHK и от расстояния пурин-богатого участка до кодона AUG. Эта особенность наряду с другими, о которых будет сказано позднее, и объясняет различия в эффективности трансляции различных мРНК.

Процесс инициации зависит также от вторичной структуры того участка молекулы мРНК, в котором находится инициаторный кодон AUG. Если этот кодон окажется внутри двухцепочечного участка, то инициация будет неэффективна или вовсе блокируется. Именно таким образом может регулироваться доступность инициаторного AUG-кодона для 30S-рибосомы. AUG становится недоступным, если он оказывается спаренным при образовании конденсированной формы зрелой мРНК, и, напротив, доступным для инициации во время транскрипции мРНК или во время трансляции других кодирующих последовательностей на той же молекуле мРНК.

б. Элонгация полипептидной цепи

При ассоциации двух рибосомных субчастиц перед инициацией трансляции образуются два функциональных участка, необходимых для сборки белка: Р- и А-участки. Fmet-TPHKj» занимает Р-участок, а для образования первой пептидной связи необходимо, чтобы аминоацил-тРНК, соответствующая следующему кодону, заняла А-участок. Для этого аминоацил-тРНК должна сначала связать EF-Tu и GTP. Образовавшийся тройной комплекс и доставляет аминоацил-тРНК к А-участку. GTP в это время гидролизуется, и комплекс отделяется от рибосомы. Когда оба участка, А и Р, заняты, пептидилтрансферазная активность 50S-субчастицы катализирует перенос группы Fmet с ее тРНК на аминогруппу аминоацил-тРНК, находящейся в А-участке. В результате в А-участке оказывается дипептидил-тРНК, а в Р – свободная тРНК.

Для прочтения следующего кодона и удлинения полипептидной цепи еще на одну аминокислоту вся серия реакций должна повториться. Однако, прежде чем это произойдет, тРНК должна освободить Р-участок, образовавшаяся дипептидил-тРНК должна переместиться на него, а новый кодон должен быть готов к тому, чтобы занять освободившийся А-участок. Все эти процессы осуществляются с помощью EF-G при GTP-зависимой транслокации рибосомы. Источником энергии для перемещения рибосомы к следующему триплету кодирующей последовательности и удаления свободной тРНК из Р-сайта служит реакция гидролиза GTP до GDP. Теперь новый кодон, занявший А-сайт, готов к спариванию с родственной аминоацил-тРНК.

Сразу после связывания аминоацил-тРНК с А-участком высвобождается комплекс EF-Tu-GDP и происходит регенерация функционально активного EF-Tu-GTP. При этом EF-Tu-GDP взаимодействует с белком EF-Ts, что приводит к отделению GDP и образованию комплекса EF-Tu «EF-Ts. Далее EF-Tu «EF-Ts взаимодействует с GTP, происходит регенерация EF-Tu-GTP и отделение EF-Ts, и оба соединения оказываются готовыми к следующему циклу.

Необходимо отметить несколько особенностей процесса элонгации. 1. При образовании каждой пептидной связи расходуется энергия, равная четырем энергетическим эквивалентам: два эквивалента АТР потребляются при аминоацилировании тРНК и два эквивалента GTP-в каждом цикле элонгации. 2. При инициации трансляции IF-2 узнает Fmet-тРНКFMet среди всех других аминоацил-тРНК, a EF-Tu отличает тРНК,» от Fmet-тРНКMMet при внедрении в А-участок. 3. Факторы элонгации EF-Tu и EF-G то присоединяются, то отделяются от рибосомы в зависимости от того, связаны ли они с GTP или с GDP соответственно. 4. Растущая полипептидная цепь всегда соединена своим карбоксильным концом с тРНК, которая соответствует С-концевой аминокислоте в растущей полипептидной цепи. 5. Пептидилтрансфераза катализирует формирование пептидных связей между карбоксильным концом растущей цепи и аминогруппой аминоацил-тРНК.

в. Терминация элонгации полипептидной цепи

Процесс последовательной трансляции кодонов в конце концов доходит до того момента, когда в А-участке оказывается один из трех терминирующих кодонов – UAG, UAA или UGA. Из-за отсутствия тРНК, отвечающих этим кодонам, полипептидил-тРНК остается связанной с Р-участ-ком. Здесь вступают в действие специфические факторы RF-1 и RF-2, которые катализируют отсоединение полипептидной цепи от тРНК, отделение их обоих от рибосомы, а 70S-рибосомы – от мРНК. RF-1 узнает в А-участке кодон UAA или UAG; RF-2 включается в том случае, когда в А-участке оказывается UAA или UGA; RF-3 облегчает работу двух других факторов. Если терминирующим кодоном является UAA, то эффективность процесса терминации оказывается наибольшей, поскольку этот кодон узнают оба фактора – RF-1 и RF-2. Однако, каким бы из стоп-кодонов ни обеспечивалась терминация, ее эффективность зависит от фланкирующих эти кодоны последовательностей в мРНК. Хотя общие черты и даже некоторые детали процесса терминации известны, точный его механизм и каталитическая роль факторов RF-1 и RF-2 пока неясны.

**7. Некоторые общие особенности процесса трансляции**

В предыдущем разделе мы подробно рассмотрели события одного цикла трансляции мРНК на рибосоме. Здесь акцент будет сделан на некоторых общих принципах процесса в целом и на нарушении или блокировании его отдельных стадий.

а. Одновременная трансляция молекулы мРНК более чем одной рибосомой

После инициации трансляции 70S-рибосома перемещается от сайта инициации по мере считывания каждого последующего кодона. Когда расстояние от рибосомы до сайта инициации достигнет величины 100–200 нуклеотидов, в этом сайте может произойти новая инициация. Более того, как только вторая рибосома пройдет такое же расстояние, может произойти третья инициация, и т.д. Итак, одну и ту же белок-кодирующую последовательность мРНК могут одновременно транслировать несколько рибосом. Подобные мультирибосомные трансляционные комплексы называются полирибосомами или полисомами. Каждая рибосома полисомы обязательно целиком транслирует кодирующую последовательность с образованием полноразмерного полипептида. От каждой рибосомы в полисоме отходит полипептид, длина которого соответствует расстоянию, пройденному рибосомой от сайта инициации. Эта длина пропорционально увеличивается по мере продвижения рибосомы по мРНК, начиная с 5'-конца кодирующей последовательности.

б. Трансляция бактериальных мРНК может осуществляться параллельно транскрипции

Образование мРНК при транскрипции гена или кластера генов начинается с 5'-конца в направлении к 3'-концу. Следовательно, формирование комплекса инициации трансляции может произойти сразу же после того, как будет транскрибирована последовательность, в пределах которой находится инициирующий кодон. И в самом деле, синтез полипептидной цепи обычно начинается до завершения транскрипции 3'-концевой части мРНК.

Если бактериальная транскрипционная единица содержит более одной кодирующей белок последовательности, как, например, в случае trp- или lac-оперонов, то на рибосомах может начаться и даже завершиться трансляция первой из этих кодирующих последовательностей еще до окончания транскрипции остальных. Матричные РНК, состоящие из многих белок-кодирующих участков, часто транслируются последовательно, т.е. инициация, элонгация и терминация трансляции первой кодирующей последовательности сопровождаются такими же событиями на втором, третьем и последующих кодирующих сегментах. После того как рибосомы доходят до сигнала терминации в первой или любой другой кодирующей последовательности, они отделяются от мРНК, и со следующим инициаторным участком связывается новый комплекс. Однако в некоторых случаях рибосомы не отделяются от мРНК, а перемещаются вдоль молекулы, образуя новые комплексы инициации в других сайтах.

в. Рибосомы начинают новый раунд после трансляции кодирующей последовательности

Как мы уже говорили, когда осуществляющая трансляцию 70S-рибосома доходит до терминирующего кодона, полноразмерная полипептидная цепь отделяется от мРНК, а обе они – полипептид и тРНК – отделяются от рибосомы, и происходит разделение 70S-рибосомы и мРНК. 70S-рибосомы не способны к инициации новых раундов синтеза полипептидов и, следовательно, должны диссоциировать на составляющие их 50S- и 30S-субчастицы. Такая диссоциация контролируется фактором инициации IF-3 совместно с IF-1. «Рибосомный» цикл завершается ассоциацией 50S-субчастицы с 30S-субчастицей, связанной с мРНК и несущей IF-2, Fmet-тРНКFMet и GTP, с образованием функционального трансляционного 70S-аппарата. Таким образом, изменяя количество 30S- и 50S-субчастиц по отношению к их предшественнику - 70S-рибосоме, – фактор IF-3 осуществляет общий контроль уровня белкового синтеза.

Затем проделывает третья рибосома и т.д. В результате на одной и той же мРНК могут одновременно синтезироваться сразу несколько полипептидов.

г. Взаимодействие кодона и антикодона

Большинство молекул тРНК спаривается более чем с одним кодоном. Поскольку кодоны транслируются при участии антикодонов разных тРНК, можно было бы ожидать, что для каждого из 61 кодона, детерминирующего аминокислоты, имеется своя тРНК. Однако не существует ни разных тРНК для каждого из четырех валиновых или глициновых кодонов, ни разных тРНК для обоих тирозиновых или обоих лизиновых кодонов. Действительно, эксперименты in vitro и in vivo показали, что некоторые тРНК могут транслировать более чем один кодон. Так, кодоны UAU и UAC транслирует единственная тРНКТуг. Поскольку антикодон этой тРНКТуг имеет последовательность 5'-GUA-3', он может образовать комплементарные пары с первыми двумя основаниями любого из этих кодонов. Соответственно G способен спариваться как с U, так и с С, находящимися в третьем положении кодонов; аналогичным образом U, находясь на 5'-конце какого-либо антикодона, может спариться и с А, и с G, находящимися на 3'-конце соответствующих кодонов. На самом деле трансляция всех пар кодонов, у которых в третьей позиции стоит U или С, может осуществляться одной и той же тРНК, у которой первым основанием в антикодоне оказывается G или какое-то модифицированное основание. По-видимому, при спаривании кодонов и антикодонов в А- и Р-участках включаются какие-то стабилизирующие взаимодействия, отличные от тех, которые имеют место при обычном комплементарном спаривании оснований.

Анализ генетического кода показывает, однако, что существуют специфические взаимодействия, позволяющие различать кодоны, у которых в третьей позиции стоит А или G. Например, тРНК, расшифровывающая кодон AUG как метионин, должна отличать этот триплет от кодона AUA, обозначающего изолейцин, а тРНК'1\*11' должна отличать триптофановый кодон UGG от терминирующего кодона UGA. Специфичность обеих этих операций декодирования определяется спариванием С антикодона с G, находящимся в третьем положении кодона.

Модификация оснований в антикодонах может еще сильнее ограничить диапазон возможных взаимодействий кодон-антикодон. Например, гипоксантин, занимая место аденина в той позиции антикодона, по которой происходит спаривание с третьим основанием кодона, может обусловить спаривание такого антикодона с кодонами, у которых в последней позиции стоят основания U, С или А. Разнообразие модификаций оснований в антикодо-нах или–что встречается наиболее часто – оснований, соседствующих с антикодоном, изменяет специфичность взаимодействия аминоацил-тРНК–кодон. Таким способом обычно предотвращаются ошибки при считывании третьего основания кодонов и обеспечивается надежность процесса декодирования.

Правила спаривания оснований, согласно которым молекулы тРНК одного типа могут узнавать несколько разных кодонов, называются правилами неоднозначного соответствия. Следует отметить, однако, что термин «качание», используемый для описания некоторой свободы спаривания третьего основания кодона, просто как бы затушевывает тот факт, что мы до конца не знаем, какие именно химические и структурные особенности обусловливают кодон-антикодоновые взаимодействия в Р-и А-участках рибосомы.

Мутации в кодонах и антикодонах. Мутации, затрагивающие различные компоненты трансляционного аппарата, могут изменить результат считывания кодирующей последовательности. Наиболее драматичные последствия вызывают те мутации в гене, кодирующем белок, которые превращают кодон, отвечающий какой-то аминокислоте, в терминирующий кодон и тем самым приводят к преждевременному завершению синтеза из-за досрочной терминации трансляции в мутировавшем сайте. Примером может служить превращение лизинового кодона ААА в UAA и глутаминового кодона CAG в UAG. Аналогично любая мутация, в результате которой происходит замена аминокислотного кодона на кодон UGA, тоже вызовет преждевременную остановку синтеза полипептидной цепи. Однако, если в результате второй мутации произойдет изменение соответствующего основания в антикодоне тРНК, терминация может быть предотвращена, или супрессирована, и образуется полноразмерный, хотя и измененный, белок. Например, если тРНК, тРНК или тРНК изменятся подобным образом, то они смогут прочитать кодон UAG как аминокислотный. С помощью различных механизмов может произойти ошибочная трансляция и таких мутантных кодонов, как UAA и UGA. Мутации в тРНК-генах, затрагивающие основания, отличные от тех, которые составляют антикодон, могут привести к изменению специфичности или стабильности взаимодействий кодона и антикодона. Благодаря таким механизмам может быть предотвращена преждевременная терминация синтеза полипептида, если терминирующий кодон будет прочитан как смысловой. Подобная супрессия терминации, как правило, не очень эффективна, поэтому наряду с полноразмерными образуются и укороченные, преждевременно терминированные полипептидные цепи. Благодаря относительной неэффективности такой трансляционной супрессии не приносит большого вреда и случайное проскакивание терминирующих кодонов, находящихся на естественных концах кодирующих мРНК.

Миссенс-мутации, т.е. мутации, приводящие к аминокислотным заменам и соответственно к утрате белком его функции, также могут быть ревертированы благодаря супрессорным мутациям, вызывающим ошибочное считывание мутантного кодона. Это может произойти в том случае, если тРНК, несущая нужную аминокислоту или любую другую, которая может быть включена в данный сайт белковой цепи, имеет антикодон, способный к спариванию с мутантным кодоном. Мутации, вызывающие сдвиг рамки считывания кодирующей последовательности, также могут быть супрессированы, если мутантные тРНК или рибосомы случайно транслируют два или четыре основания вместо трех.

Итак, ошибки трансляции могут компенсировать последствия нарушений кодирующей последовательности. Мутационные изменения в антикодоне тРНК–это наиболее распространенный механизм супрессии; изменения в других участках молекулы тРНК могут привести к неправильной этерификации аминокислот аминоацил-тРНК-синтетазами или ошибочному спариванию на рибосоме. Ошибки в трансляции могут возникать и в том случае, если в результате мутаций происходит изменение белков или РНК-компонент рибосом, участвующих в кодон-антикодоновом взаимодействии. Точность трансляции уменьшается и под действием некоторых химических соединений, которые связываются с рибосомными белками в 30S-субчастице. Такие случаи нарушения процесса трансляции приводят к более тяжелым последствиям.

**8. Трансляция мРНК у эукариот**

Процесс трансляции эукариотической мРНК в основном аналогичен таковому прокариотической мРНК. За некоторыми отмеченными выше исключениями, генетический код универсален и кодоны последовательно транслируются с помощью специфических аминоацил-тРНК-синтетаз на рибосомах. Есть, однако, и три явных различия, обусловленных определенными свойствами эукариотических клеток. Во-первых, аппараты транскрипции и трансляции у эукариот физически разобщены, поскольку транскрипция осуществляется в ядре, а трансляция – в цитоплазме. Во-вторых, на 5'- и 3'-концах эукариотических мРНК имеются особые структуры. И в-третьих, эукариотические мРНК, за исключением мРНК, транскрибируемых с ДНК геномов вирусов, обычно содержат только одну белок-кодирующую последовательность.

Структура и свойства участников трансляции эукариотической мРНК пока изучены гораздо хуже, чем у прокариот. И хотя у эукариот выделяют те же три стадии процесса – инициацию, элонгацию и терминацию, – на каждой из них требуется больше нерибосомных белковых факторов. Несмотря на эти различия, последовательности, кодирующие белки прокариот, нормально транслируются эукариотическими системами трансляции при условии соответствующей модификации их мРНК на 3'- и 5'-концах. И наоборот, кодирующие последовательности эукариот эффективно транслируются системами прокариот, если у них перед 5'-концом инициаторного кодона AUG имеется последовательность Шайна-Дальгарно. Это значит, что трансляционные аппараты обоих типов организмов могут осуществлять свои функции, несмотря на особенности нуклеотидных последовательностей мРНК из разных источников.

а. Особые модификации мРНК эукариот

У эукариотических мРНК, транскрибированных с ядерных или вирусных геномов РНК-полимеразой II, всегда модифицированы 5'-концы, которые в этом случае называют «кэпами». РНК, транскрибируемые эукариотическими РНК-полимеразами I и III, не кэпированы и имеют обычные 5'-фосфатные концы. У большинства мРНК, синтезируемых РНК-содержащими вирусами животных, также имеются кэпы, хотя они синтезируются вирусными РНК-транскриптазами. Многие некэпированные мРНК неэффективно транслируются эукариотическими белоксинтезирующими системами из-за слабого связывания рибосом с мРНК. Кэпирование происходит на 5'-нуклеозидтрифосфате вскоре после инициации синтеза РНК-транскриптов и задолго до его завершения.

На 3'-концах эукариотических мРНК имеются еще и полиаденилатные последовательности. Такой 3' – «хвост» из 50–200 аденилатных остатков не кодируется смысловыми последовательностями соответствующих генов, а присоединяется посттранскрипционно, после разрезания транскрипта в специфическом месте за сигналом терминации трансляции.

б. Инициация трансляции на 5'-кэпированных концах малыми рибосомными субчастицами

Как мы уже говорили, обязательным этапом при инициации трансляции прокариотической мРНК является диссоциация 70S-рибосомы; точно так же и 80S-рибосомы должны диссоциировать до начала трансляции эукариотических мРНК. Малая субчастица в комплексе со множеством белков-помощников, из которых один или несколько нужны для диссоциации рибосомы на составляющие субчастицы, связывает особую инициаторную met-тPHK. И вновь для связывания инициаторной аминоацил-тРНК необходимы GTP и особый белок – eIF-2. У эукариот, однако, met-TPHK не подвергается N-формилированию; но, как и у прокариот, структура тРНК отличается от структуры тPHKMMet. Комплекс 40S, содержащий met-тPHKIMet, GTP и целую армию других факторов eIF, связывается с мРНК вблизи кэпированного 5'-конца или прямо с этим концом; по крайней мере один из этих факторов узнает кэп и связывается с ним. Малая субчастица перемещается при помощи неизвестного пока механизма от кэпированного конца до первого кодона AUG. Никакой последовательности вблизи кодона AUG, аналогичной последовательности Шайна-Дальгарно, пока не обнаружено. Однако эффективность работы AUG в качестве инициатор-ного кодона зависит от наличия определенных фланкирующих нуклеотидов. Такой преинициаторный комплекс объединяется с 60S-субчастицей в ходе энерго- и фактор-зависимой реакции с образованием функционального комплекса инициации. Инициация белкового синтеза может регулироваться фосфорилированием и дефосфорилированием eIF-2.

в. Элонгация и терминация полипептидной цепи

Поэтапная трансляция последовательных кодонов с помощью аминоацил-тРНК у эу- и прокариот в принципе сходна. GTP и фактор элонгации eEF-1, соответствующий прокариотическому комплексу EF-Tu и EF-Ts, периодически поставляют рибосомам аминоацил-тРНК. GTP и eEF-2, являющиеся функциональными аналогами прокариотического EF-G, осуществляют транслокацию. Терминация трансляции у эукариот также происходит в одном из трех стоп-кодонов и сопровождается отделением свободных полипептидных цепей, мРНК и, возможно, 80S-рибосом от мРНК. По-видимому, всю серию терминационных событий осуществляют один фактор eRF и GTP.

В результате последовательных актов инициации образуются полисомы и одновременно, как и у прокариот, начинается трансляция множества кодирующих белки последовательностей. Заметное отличие трансляции у эукариот состоит в том, что клеточные мРНК обычно содержат одну-единственную кодирующую последовательность. Если в мРНК имеется несколько таких областей, то последующие либо вовсе не транслируются, либо транслируются неэффективно.

Кроме регуляции на уровне трансляции при образовании рибосомных белков осуществляется также регуляция по типу обратной связи при транскрипции оперонов рибосомных белков. Мы не будем обсуждать регуляцию этих оперонов на уровне транскрипции, а лишь отметим, что могут происходить репрессия и аттенуация транскрипции рибосомными субчастицами или даже целыми рибосомами. Наиболее вероятно, однако, что ключевым пунктом в регуляции скорости синтеза рибосом является образование рРНК. Таким образом, синтез рибосомных белков и тем самым сборка рибосом регулируются путем изменения содержания рРНК.