

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М. В. ЛОМОНОСОВА**

ФИЛИАЛ В ПУЩИНО

Кафедра молекулярной биологии

Программа курса

БИОСИНТЕЗ БЕЛКА И ЕГО РЕГУЛЯЦИЯ

Направление: 020200.68 – «Биология», квалификация – магистр биологии

Специализации: – «Биохимия и молекулярная биология», «Биофизика»

Составитель курса: д.б.н., профессор, академик РАН Л.П. Овчинников

Пущино

2003 (обновлено 2009)

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

Курс «Биосинтез белка и его регуляция» является составной частью общей программы специализации по молекулярной биологии. Курс рассчитан на студентов, занимающихся по программе магистерской подготовки, а также на аспирантов, специализирующихся в области молекулярной биологии, и научных сотрудников, начинающих работать в этой области.

В курсе дается описание основных компонентов белок-синтезирующего аппарата, молекулярного механизма сложного многостадийного процесса белкового синтеза (трансляции), специфических особенностей этого процесса у про- и эукариот; рассматривается действие антибиотиков и токсинов. Подробно анализируются механизмы регуляции трансляции в нормальных клетках и при их заражении фагами и вирусами. Особое внимание уделяется описанию классических экспериментов, заложивших основы наших знаний по белковому синтезу.

Курс «Биосинтез белка и его регуляция» непосредственно связан с рядом других курсов специализации по молекулярной биологии:

«Принципы структурной организации белков и нуклеиновых кислот»;

«Молекулярная генетика прокариот»;

«Молекулярная генетика эукариот»;

«Методы химии белка»;

«Физические методы в молекулярной биологии»;

«Классические работы и современные проблемы молекулярной биологии»

и должен проводиться параллельно с ними.

Прохождение курса предполагает выполнение лабораторных работ (включенных в Практикум по специализации) по синтезу белка в бесклеточной системе трансляции.

Курс состоит из лекций и семинарских занятий, общая трудоемкость – 120 часов.

Аудиторная нагрузка – 54 часа,

из них: лекции – 36 часов,

семинарские занятия – 18 часов;

самостоятельная работа студентов – 66 часов.

Форма контроля знаний: 9 семестр – экзамен.

ПРОГРАММА

1. Общая характеристика процесса биосинтеза белка (трансляции):

- 1) уравнение суммарной химической реакции;
- 2) энергетическое обеспечение процесса трансляции;
- 3) компоненты аппарата трансляции;
- 4) полярность трансляции.

2. Бесклеточные системы белкового синтеза.

3. Три стадии химической реакции биосинтеза белка:

- 1) активация аминокислот;
- 2) акцептирование аминокислотных остатков на тРНК;

- 3) последовательное замещение тРНК на аминоксил-тРНК в рибосоме. Ферменты, катализирующие отдельные реакции.

4. Активация аминокислоты с помощью АТФ.

Химия процесса. Тип образующейся химической связи. Обратимость реакции и способ достижения необратимости. Ферменты, их выделение, названия. Специфичность ферментов по отношению к различным аминокислотам. Аминоацил-аденилат-ферментный комплекс.

5. Акцептирование аминокислотного остатка на тРНК.

- 1) Адапторная гипотеза Крика (1955г.). Принцип комплементарности как основа гипотезы.
- 2) Открытие тРНК и процесса акцептирования аминокислот (Хогланд и Замечник, 1957г.; Огата и Нахара, 1957г.).
- 3) Общая характеристика первичной структуры тРНК: длина цепи, универсальная 3'-концевая последовательность.
- 4) Реакция акцептирования аминоксила. Химия процесса. Тип образующейся химической связи. Значение ССА конца тРНК. Ферменты, участвующие в акцептировании, их название. Единство обеих ступеней процесса – активации и акцептирования – как реакций, катализируемых одним ферментом.

6. Экспериментальная проверка адапторной гипотезы.

- 1) Аминоацил-тРНК как форма поступления аминокислоты в рибосому.
- 2) Специфичность тРНК по отношению к различным аминокислотам. Узнавание ферментами индивидуальных тРНК. Разделение индивидуальных тРНК. О гетерогенности тРНК с одинаковой специфичностью к аминокислоте (множественность изоакцепторных тРНК).
- 3) Окончательное доказательство адапторной гипотезы: опыт с превращением цистеинил-тРНК в аланил-тРНК (Шапвиль, Липман и Бензер, 1962г.)
- 4) Роль аминоксил-тРНК-синтеаз в адапторном механизме.

7. Изучение структуры тРНК.

- 1) Первичная структура, минорные нуклеотиды.
- 2) Универсальность макромолекулярной структуры тРНК. Вторичная структура: “клеверный лист”, двуспиральные и односпиральные участки.
- 3) Третичная структура тРНК.
- 4) Локализация функциональных центров на молекуле тРНК.
- 5) Синтез и процессинг тРНК.

8. Аминоацил –тРНК-синтеазы.

- 1) Два класса аминоксил-тРНК-синтеаз. Субъединичная структура. Особенности доменной организации и расположения функциональных центров. Особенности аминоксилации тРНК.
- 2) Мультиферментные комплексы синтеаз у эукариот.
- 3) Специфичность аминоксил-тРНК-синтеаз по отношению к аминокислоте и тРНК; ошибки при аминоксилации и механизмы коррекции.
- 4) Синтез алармонов.

9. Специфические модификации аминокислотных остатков после акцептирования на тРНК.

10. Общие свойства генетического кода.

- 1) Понятие о кодовом отношении, о неперекрываемости кодонов, отсутствии запятых, вырожденности и универсальности генетического кода.
- 2) Экспериментальное доказательство неперекрываемости кодонов с помощью точечных мутаций.
- 3) Экспериментальное доказательство триплетности кода и отсутствия запятых с помощью мутаций, индуцированных акридиновыми красителями.

11. Расшифровка генетического кода.

- 1) Искусственные полирибонуклеотиды как матрицы для синтеза полипептидов. Открытие Ниренбергом и Маттеи эффекта полиуридиловой кислоты (1961г.).
- 2) Принцип метода экспериментальной расшифровки состава кодонов при использовании искусственных матричных полирибонуклеотидов. Использование гомополимеров (кодоны UUU, CCC, AAA). Использование гетерополимеров различного состава (пример с поли (UC)). Состав кодонов.
- 3) Принцип метода экспериментальной расшифровки последовательности нуклеотидов в кодонах. Открытие Ниренберга и Ледера (1964г.): связывание аминоацил-тРНК с тринуклеотидами на рибосоме. Составление кодовой таблицы.
- 4) Окончательное подтверждение строения и функции кодонов путем использования синтетических матриц заданной регулярной нуклеотидной последовательности (Хорана, 1966г.). Окончательная кодовая таблица.
- 5) Вырожденность генетического кода и некоторые закономерности этой вырожденности; универсальность и некоторые особенности генетического кода разных организмов и митохондрий.
- 6) Рекодирующие сигналы (изменение значения кодона, сдвиги рамки считывания, пропуск нуклеотидов при считывании).

12. Гипотеза Крика о нестрогом соответствии при кодон-антиконовом спаривании.

Правила Крика (1966г.); поправки к правилам Крика.

13. Открытие информационной (матричной РНК).

- 1) Несоответствие нуклеотидного состава тотальной РНК составу ДНК. Корреляция нуклеотидного состава небольшой фракции РНК с составом ДНК (Белозерский и Спирин, 1957-1958гг.).
- 2) «Фагово-специфическая» РНК, ее быстрая обмениваемость (нестабильность и быстрый синтез), ДНК-подобный состав (Фолькин и Астрахан, 1956-1958гг.).
- 3) Обнаружение нестабильной РНК, несущей информацию от генов к рибосомам при фаговой инфекции: опыт Бреннера, Жакоба и Мезельсона (1961г.) по центрифугированию в градиенте плотности CsCl.
- 4) Обнаружение меченой «Фагово-специфической» РНК путем центрифугирования в сахарозном градиенте (до и после депротеинизации): опыт Гро и Уотсона (1961г.).
- 5) Обнаружение меченой мРНК в нормальных клетках путем центрифугирования в сахарозном градиенте после пульсовой метки (до и после депротеинизации). Принцип метода пульсовой метки.

14. Свойства и процессинг матричных РНК.

- 1) Время жизни мРНК в клетке и способ его определения.
- 2) Полицистронные и моноцистронные мРНК, транслируемые и нетранслируемые области в мРНК.

- 3) Кэпирование мРНК эукариот; значение кэп-структуры для функционирования мРНК.
- 4) Полиаденилирование мРНК эукариот; сигналы ядерного и цитоплазматического полиаденилирования; значение полиаденилирования для стабильности и активности мРНК.
- 5) Интроны в мРНК и их предполагаемое значение; последовательность нуклеотидов на границе экзон/интрон (правило Шамбона); сплайсинг мРНК; альтернативный- и транс-сплайсинг; последовательность химических реакций при сплайсинге; малые ядерные РНП и их участие в сплайсинге; вспомогательные белки.
- 6) Редактирование мРНК.

15. Информосомы (мРНП) как форма существования мРНК в эукариотической клетке.

Классы информосом, их внутриклеточная локализация, состав и особенности строения. Мажорные и минорные белки информосом разных классов.

16. Рибосома: два основных типа рибосом, морфология, химический состав: рибосомные РНК и рибосомные белки.

- 1) Локализация рибосом в клетке. Свободные и мембраносвязанные рибосомы; микросомы. Принцип препаративного выделения рибосом.
- 2) Прокариотический и эукариотический типы рибосом. Рибосомы митохондрий и хлоропластов.
- 3) Размер, внешний вид и подразделение рибосом на две субчастицы. Морфология рибосомных субчастиц. Объединение субчастиц в целую рибосому.
- 4) Рибосомные РНК. Их распределение по субчастицам. Первичная и вторичная структура. Гомология первичной структуры рРНК разных организмов и систематика. Структурные домены и компактная самоупкладка молекул РНК.
- 5) Рибосомные белки. Разнообразие, номенклатура. Первичные структуры. Пространственные структуры. Белковые комплексы. Взаимодействие с рибосомными РНК.

17. Структурные превращения рибосом.

- 1) Диссоциация рибосом на субчастицы: факторы, способствующие и противодействующие диссоциации.
- 2) Разворачивание субчастиц; кооперативность.
- 3) Разборка субчастиц; стадии разборки; кооперативность.
- 4) Самосборка рибосом. Стадии сборки. «Карта» сборки.

18. Исследование структуры рибосом.

- 1) Взаиморасположение рибосомной РНК и белков. Периферическое расположение белков на ядре РНК. Топография белков: определение соседствующих белков, измерение расстояний между белками, иммунная электронная микроскопия. Топография РНК: иммунная электронная микроскопия, привязка к топографии белков. Четвертичная структура низкого разрешения.
- 2) Кристаллизация и рентгеноструктурный анализ рибосом. Атомарная структура рибосом.

19. Биогенез рибосом.

- 1) Процессинг рРНК и сборка рибосом в бактериальной клетке.

2) Созревание рРНК и сборка рибосом в эукариотических клетках.

20. Общая характеристика процесса трансляции в рибосоме.

Динамическая модель работы рибосомы (Уотсон, 1964-1965гг.).

Экспериментальная проверка следствий из динамической модели: два состояния пептидил-тРНК на рибосоме; передвижение мРНК.

21. Функциональные центры рибосомы и их локализация.

- 1) Функции связывания: связывание и удержание мРНК, удержание пептидил-тРНК, связывание аминоацил-тРНК, связывание белковых факторов трансляции и GTP.
- 2) Каталические функции: GTP-аза, пептидилтрансфераза.
- 3) Функции перемещения лигандов (транслокация).

22. Инициация трансляции у прокариот.

- 1) Иницирующие кодоны, инициаторная тРНК, белковые факторы инициации.
- 2) Последовательность событий в процессе инициации.

23. Особенности инициации у эукариот.

- 1) Инициация по кэп-зависимому сканирующему механизму. Факторы инициации трансляции эукариот. Узнавание кэп-структуры и сканирование лидерной последовательности мРНК; гидролиз АТР. Участие поли(А) хвоста мРНК и мажорных беков мРНК в процессе инициации. «Шунтирование» в процессе инициации. Полирибосомы и их роль в рециклировании рибосом при инициации трансляции.
- 2) Инициация по кэп-независимому механизму внутреннего входа рибосом на вирусных и клеточных мРНК. Дополнительные белки, необходимые для внутренней инициации и потеря зависимости от некоторых или всех факторов инициации.

24. Элонгация полипептидных цепей.

- 1) Элонгация у прокариот. Факторы элонгации. Последовательность событий в процессе элонгации: поступление аминоацил-тРНК в рибосому, транспептидация, транслокация. Роль гидрогиза GTP.
- 2) Особенности элонгации у эукариот.
- 3) Бесфакторная элонгация и безматричная элонгация в бесклеточной системе.

25. Терминация трансляции у прокариот.

- 1) Кодоны терминации.
- 2) Белковые факторы терминации.
- 3) Последовательность событий в процессе терминации.
- 4) Рециклирование рибосом.
- 5) Терминация трансляции при утрате терминирующего кодона на мРНК; роль тмРНК в терминации таких мРНК у прокариот.

26. Особенности терминации трансляции у эукариот.

Факторы терминации эукариот.

27. Ложное кодирование.

Основные типы ложного спаривания; факторы, способствующие ложному кодированию. Кинетические механизмы ложного кодирования и его коррекции.

28. Компарментализация белков эукариотического аппарата трансляции на полирибосомах.

29. Взаимодействие рибосомы и растущего пептида с мембраной.

Котрансляционный трансмембранный транспорт.

- 1) Синтез белков свободными и мембрано-связанными полирибосомами.
- 2) Способы соединения рибосомы с мембраной.
- 3) N-концевая сигнальная последовательность растущего полипептида.
- 4) Сигнал-узнающие частицы и их мембранные рецепторы.
- 5) Последовательность событий при синтезе и процессинге секретируемых белков.
- 6) Особенности синтеза мембранных и митохондриальных белков.

30. Котрансляционные и посттрансляционные ковалентные модификации белков.

Отщепление N-концевой формильной группы, N-концевого метионина, N-концевой сигнальной последовательности, образование дисульфидных связей, N-гликозилирование; фосфорилирование, полигликозилирование, сульфатирование, ацетилирование, метилирование, ADP- и полиADP-рибозилирование, добавление аминокислот на N-конец. N-концевое правило Варшавского, определяющее время жизни белков в клетке.

31. Механизм действия антибиотиков на белковый синтез.

32. Механизм действия бактериальных и растительных токсинов:

- 1) колицина E₃, альфа-сарцина;
- 2) дифтерийного токсина, экзотоксина A;
- 3) дизентерийного токсина;
- 4) рицина, абрина, модецина, трихосантина, рибосоминоактивирующих белков растений.
- 5) Направленные токсины и перспективы их применения в медицине.

33. Регуляция трансляции в бактериальной клетке.

- 1) Регуляция трансляции РНК РНК-содержащих фагов (MS2, f2, Qβ, R17).
- 2) Регуляция трансляции белков фага T4 белком RegA.
- 3) Особенности трансляции полицистронных мРНК бактерий.
- 4) Регуляция синтеза рибосомных белков. Координация с синтезом рибосомных РНК.
- 5) Автoreгуляция синтеза треонил-tРНК-синтетазы.
- 6) Посттранскрипционная регуляция синтеза белков у бактерий при холодовом шоке.
- 7) Регуляция трансляции мРНК субъединицы σ^{32} РНК полимеразы за счет плавления вторичной структуры мРНК (РНК как сенсор температуры).
- 8) Регуляция трансляции за счет связывания с мРНК небелковых лигандов (аптамеры, рибосвич).

34. Посттранскрипционная регуляция биосинтеза белка у эукариот.

- 1) Регуляция на уровне процессинга мРНК.
- 2) Регуляция инициации трансляции под действием белков, специфически взаимодействующих с 5' НТО мРНК.
- 3) Регуляция инициации трансляции под действием белков, специфически взаимодействующих с 3' НТО мРНК.

- 4) Глобальный контроль белкового синтеза за счет изменения соотношения двух мажорных белков мРНК (РАВР и УВ-1).
- 5) Маскирование мРНК в цитоплазме. Модели маскирования мРНК.
- 6) Регуляция инициации трансляции за счет комплементарных РНК (tcРНК, iРНК)
- 7) Посттранскрипционная регуляция белкового синтеза в результате РНК-интерференции (dsРНК, miРНК, мкрРНК).
- 8) Регуляция трансляции за счет деградации мРНК.
- 9) Посттранскрипционная регуляция низкомолекулярными лигандами, специфически взаимодействующими с мРНК и осуществляющими «рибосвич».
- 10) Регуляция за счет ковалентных модификаций (фосфорилирования, ограниченного протеолиза) факторов инициации трансляции.
- 11) Регуляция элонгации полипептидных цепей.
- 12) Регуляция трансляции, опосредуемая открытыми рамками считывания, предшествующими иницирующему кодону.
- 13) Дискриминация мРНК при трансляции и роль лидерной последовательности и активности (содержания) компонентов аппарата трансляции.

Л И Т Е Р А Т У Р А

ОСНОВНАЯ

1. Дж. Уотсон. Молекулярная биология гена, М., “Мир”, 1978.
2. А. С. Спирин. Молекулярная биология. Структура рибосомы и биосинтез белка, М., “Высшая школа”, 1986.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ

1. М. Ичас. Биологический код, М., “Мир”, 1971.
2. Ф. Шапвиль, А-Л. Энни. Биосинтез белка, М., “Мир”, 1977.
3. Л. Л. Киселев, А. Д. Вольфсон. Аминоацил-тРНК-синтетазы высших эукариот. Успехи биологической химии. Пушино, ОНТИ ПНЦ РАН, 1995, т.35, сс.3-65.
4. В. С. Высоцкая, М.Б. Гарбер. Регуляция экспрессии генов рибосомных белков *Escherichia coli*. Успехи биологической химии. Пушино, ОНТИ ПНЦ РАН, 1995, т.35, сс.67-95.
5. А. С. Спирин. Регуляция трансляции мРНК-связывающими факторами у высших эукариот. Успехи биологической химии. Пушино, ОНТИ ПНЦ РАН, 1996, т.36, сс. 3-48.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ДЛЯ УГЛУБЛЕННОГО ИЗУЧЕНИЯ ПРЕДМЕТА

- A. S. Spirin. Ribosomes, Benjamin/Cummings Publishing Company, Menlo Park, California, 1998.