

Министерство образования и науки Российской Федерации  
Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского  
Национальный исследовательский университет

Учебно-научный и инновационный комплекс  
«Физические основы информационно-телекоммуникационных систем»

Стручкова И.В.  
Брилкина А.А.  
Веселов А.П.

## Регуляция биосинтеза белка (Учебно-методическое пособие)

Мерприятие 1.2. Совершенствование образовательных технологий, укрепление материально-технической базы учебного процесса

Учебная дисциплина: «Биохимия с основами молекулярной биологии»  
Специальность «020201 Биология»

Учебная дисциплина «Основы экологической биохимии»  
Направление «020800 Экология и природопользование»

Учебная дисциплина «Биохимия»  
Специальность «020207 Биофизика»

Нижний Новгород  
2010

УДК 571.113(07)  
ББК 28.072  
С-87

С-87 Стручкова И.В. Брилкина А.А., Веселов А.П.,  
РЕГУЛЯЦИЯ БИОСИНТЕЗА БЕЛКА: Учебно-методическое  
пособие. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет,  
2010. – 100 с.

Рецензент: профессор **В.В Новиков**

В настоящем пособии изложены современные представления о основах регуляции биосинтеза белка у прокариотических и эукариотических организмов. Даны представления о контроле за синтезом белка на уровне транскрипции и трансляции. Кроме того, в учебно-методическом пособии отдельно рассматриваются механизмы РНК-интерференции, а так же уделяется внимание природным и искусственным ингибиторам синтеза белка.

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов биологов, специализирующихся в области физико-химической биологии. Пособие представляет интерес студентам медицинских вузов, естественно-научных и технических высших учебных при изучении вопросов регуляции метаболизма на молекулярно-генетическом и клеточном уровне.

УДК 571.113(07)  
ББК 28.072

© Нижегородский государственный  
университет им. Н.И. Лобачевского, 2010

## Оглавление

	стр.
Введение.....	6
1. Базовые сведения о путях и принципах регуляции биосинтеза белка на уровне транскрипции (на примере прокариотических организмов).....	8
1.1. Лактозный и триптофановый опероны <i>E. coli</i> : типичные способы регуляции синтеза белка у прокариот.....	9
1.1.1. Механизм индукции ферментов метаболизма лактозы (схема Жакоба-Моно).....	10
1.1.2. Репрессируемые ферменты: триптофановый оперон.....	12
1.2. Другие способы регуляции синтеза белка у прокариот.....	12
1.2.1. Регуляция на этапе инициации транскрипции.....	12
1.2.1.1. “Сильные” и “слабые” промоторы.....	12
1.2.1.2. Катаболическая репрессия.....	14
1.2.1.3. Роль $\sigma$ -субъединицы прокариотической РНК-полимеразы.....	14
1.2.2. Регуляция на этапе элонгации и терминации транскрипции.....	17
1.2.2.1. Как вирус заставляет бактерию на него работать (изменение свойств $\beta$ -субъединицы РНК-полимеразы).....	17
1.2.2.2. Регуляция с помощью ффГфф (строгий ответ).....	18
1.2.2.3. $\rho$ -зависимые и $\rho$ -независимые терминаторы, их роль в регуляции.....	19
1.2.2.4. Антитерминация транскрипции.....	21
1.2.2.5. Атенюация транскрипции.....	21
1.3. Главные особенности прокариотической регуляции белкового синтеза на уровне транскрипции.....	23
1.4. Вопросы для самоконтроля по материалу главы 1.....	23
2. Регуляция на стадии транскрипции у эукариот: механизмы и системы.....	25
2.1 Особенности организации эукариот требуют специфики в регуляции синтеза белка.....	25
2.2. Компоненты системы регуляции транскрипции.....	26
2.2.1. Регуляторные элементы – последовательности на ДНК.....	26
2.2.2. Регуляторные белки.....	27
2.2.3. Эффекторы.....	28
2.2.4. Медиатор.....	29
2.3. Регуляция при инициации транскрипции у эукариот.....	31
2.3.1. Множественность РНК-полимераз.....	31
2.3.2. Воздействие на общие и специфические факторы инициации транскрипции и варьирование их комбинаций в инициаторном комплексе.....	31
2.3.3. Изменение структуры хроматина – метилирование ДНК,	

регуляция гистонами и другими белками.....	31
2.3.4. Роль энхансеров и сайленсеров в регуляции сборки инициаторного комплекса.....	35
2.4. Регуляция при элонгации и терминации транскрипции: роль белковых факторов.....	36
2.5 Принципы регуляции транскрипции сигнальными веществами.....	37
2.6. Роль процессинга мРНК, ее транспорта и стабильности для регуляции синтеза белков.....	39
2.7. Вопросы для самоконтроля по материалу главы 2.....	41
3. Регуляция трансляции у прокариот и эукариот.....	42
3.1 Регуляция на стадии инициации трансляции.....	42
3.1.1. Инициация трансляции как ключевой этап осуществления регуляции трансляции в целом.....	42
3.1.2. Дискриминация мРНК (регуляция количеством рибосом).....	43
3.1.3. Трансляционная репрессия.....	43
3.1.4. Маскирование мРНК у эукариот.....	44
3.1.5. Регуляция через белковые факторы трансляции. Тотальная регуляция трансляции у эукариот.....	46
3.2. Регуляция на стадии элонгации и терминации трансляции.....	48
3.3. Регуляция экспрессии генов на посттрансляционном уровне – контроль “прибыли” и “убыли” функционально активных белковых молекул.....	49
3.3.1. “Срок службы” белков регулируется.....	49
3.3.2. Роль фолдинга в посттрансляционной регуляции.....	50
3.3.3. Контроль расщепления белковых молекул. Роль лизосом и протеасом в протеолизе.....	51
3.4. Вопросы для самоконтроля по материалу главы 3.....	55
4. Нетранслируемые РНК в регуляции синтеза белка.....	56
4.1. Участие некодирующих РНК в регуляции экспрессии генов.....	56
4.2. Антисмысловые РНК и механизм РНК-интерференции.....	56
4.3. Роль микроРНК в трансляционной репрессии.....	62
4.4 Контроль трансляции через регуляцию метилирования ДНК.....	63
4.5. Вопросы для самоконтроля по материалу главы 4.....	63
5. Природные и искусственные ингибиторы синтеза белка, их функции в межвидовых взаимодействиях и применение в экспериментальной биологии и медицине.....	64
5.1. Соединения с функцией “защиты от поедания”.....	66
5.2. Соединения с функцией нападения.....	68
5.3. Соединения с функцией подавления конкурентов.....	72
5.4. Вопросы для самоконтроля по материалу главы 5.....	76

Приложение	
Приложение 1. Регуляция синтеза белка на стадии репликации.....	77
Приложение 2. Ферменты, кодируемые $\lambda$ с-опероном. Аллолактоза – истинный индуктор $\lambda$ с-оперона.....	78
Приложение 3. Примеры $\sigma$ - субъединиц РНК-полимеразы и контролируемых ими процессов.....	79
Приложение 4. Транскрипционные факторы (ТФ): их классификация, активирующие воздействия и специфика функционирования в норме и при патологии.....	81
Приложение 5. Индукция синтеза металлотионеинов как защита от воздействия тяжелых металлов.....	85
Приложение 6. Влияние метилирования ДНК на уровень синтеза проэнкефалина человека.....	87
Приложение 7. Белки теплового шока.....	88
Приложение 8. Циклины и другие регуляторы клеточного цикла.....	91
Приложение 9. Убиквитин и убиквитилирование.....	93
Приложение 10. Малые регуляторные РНК: классификация, роль, происхождение.....	95
Литература.....	98

## ВВЕДЕНИЕ

Живые организмы в зависимости от возраста и фазы развития организма, типа ткани или условий окружающей среды изменяют количество и набор (спектр) синтезируемых белков, то есть:

- один и тот же белок в одних условиях активно синтезируется, в других – синтезируется слабо, в третьих – его синтез полностью прекращается;
- для разных белков возможна не только совместная (общая, единая для нескольких белков), но и независимая регуляция синтеза; усиление синтеза одного белка не обязательно означает, что усиливается синтез другого.

Способность регулировать синтез белков необходима для успешного выживания любым организмом. Эта регуляция как у про-, так и у эукариот осуществляется на уровне разных процессов: репликации, транскрипции, посттранскрипционных воздействий на мРНК, а также при трансляции и через воздействие на уже синтезированные белки (пост-трансляционно).

Живой мир в целом использует две глобальных стратегии регуляции биосинтеза белка. Одна основана на немедленном использовании производимой генами мРНК и ее быстром разрушении, так что переключение с одной программы синтеза белка на другую осуществляется путем включения и выключения генов (уровень транскрипции). Энергетически и организационно выгоднее сменить матрицу-РНК, чем позднее изменять каждую из синтезированных по этой матрице белковых молекул. В основном эту стратегию (транскрипция – деградация) используют прокариоты.

У эукариот дополнительно существует и другая стратегия – наработка мРНК не по потребности данного момента, а заранее, впрок. Такие метаболически стабильные мРНК могут храниться в неактивной форме, не участвуя в трансляции. Когда определенный белок становится нужен – мРНК активируется, когда необходимость в продукте трансляции исчезает – мРНК может быть инактивирована.

Так как большинство регуляторных механизмов так или иначе связаны со стадией транскрипции, то основное внимание в пособии уделяется механизмам регуляции синтеза белков именно на транскрипционном уровне. Рассмотрены также некоторые аспекты регуляции, осуществляемой на трансляционном и посттрансляционном уровнях. Сведения о регуляции на уровне репликации для заинтересованного читателя изложены в Приложении 1.

Принципы регуляции синтеза белка как у про-, так и у эукариот подчиняются общим кибернетическим принципам, применимым также и для других биологических процессов. Так, регуляция синтеза белка происходит на основе кибернетического принципа обратной связи, то есть у клетки имеется способ для сообщения о результате, полученном после изменения белкового синтеза. Обратные связи могут быть положительными (упрощенно: “чем больше вещества А, тем сильнее его синтез”), и отрицательными (чем больше А, тем слабее его синтез”).

В регуляции синтеза белка на любом уровне участвуют следующие виды молекул:

- регуляторные участки нуклеиновых кислот (ДНК или мРНК),
- регуляторные белки, способные связываться с ДНК (в том числе – белки, называемые белковыми факторами)
- вспомогательные белки, не способные связываться с ДНК или РНК, но нужные для изменения активности регуляторных белков или других вспомогательных белков
- небелковые вещества, влияющие на активность вспомогательных белков.

Общая схема регуляции на стадии транскрипции следующая: эффектор связывается с регуляторным белком и меняет способность регуляторного белка влиять на регуляторные элементы ДНК. В зависимости от вида регуляторного белка это приводит либо к ускорению построения мРНК и, следовательно, усилению синтеза белка, либо, наоборот, к прекращению названных процессов.

## 1. Базовые сведения о путях и принципах регуляции биосинтеза белка на уровне транскрипции (на примере прокариотических организмов)

Для того, чтобы понять общие принципы регуляции биосинтеза белка, удобно рассмотреть синтез белков-ферментов у просто устроенных и хорошо изученных прокариотических организмов. У прокариот большинство генов “включено” (с них идет синтез белков), поэтому задача регуляции у них чаще всего сводится к их “выключению” с помощью веществ-репрессоров, причем один определенный репрессор влияет только на свой ген (или на небольшую группу генов) и не действует на другие. Упрощает регуляцию синтеза белка прокариотами наличие у них координированной регуляции: если несколько разных цистронов (то есть генов, кодирующих белки) регулируются одной регуляторной зоной (промотор + оператор), то воздействием на эту зону можно регулировать синтез сразу всех белков, закодированных этими цистронами.

Для больших геномов эукариот такой механизм не подходит, так как у них потребовалось бы чрезвычайно много разных репрессоров, что привело бы к слишком затратной и ненадежной регуляции. Эукариоты решают проблему контроля синтеза белка на уровне транскрипции другими способами (см. раздел II).

Прокариоты в большинстве случаев используют негативную регуляцию, через ген-специфичные репрессоры, действующие на промоторы структурных генов.

Все ферменты прокариот (как и белки другого функционального назначения) можно разделить на **конститутивные** и **регулируемого синтеза** (рис.1).

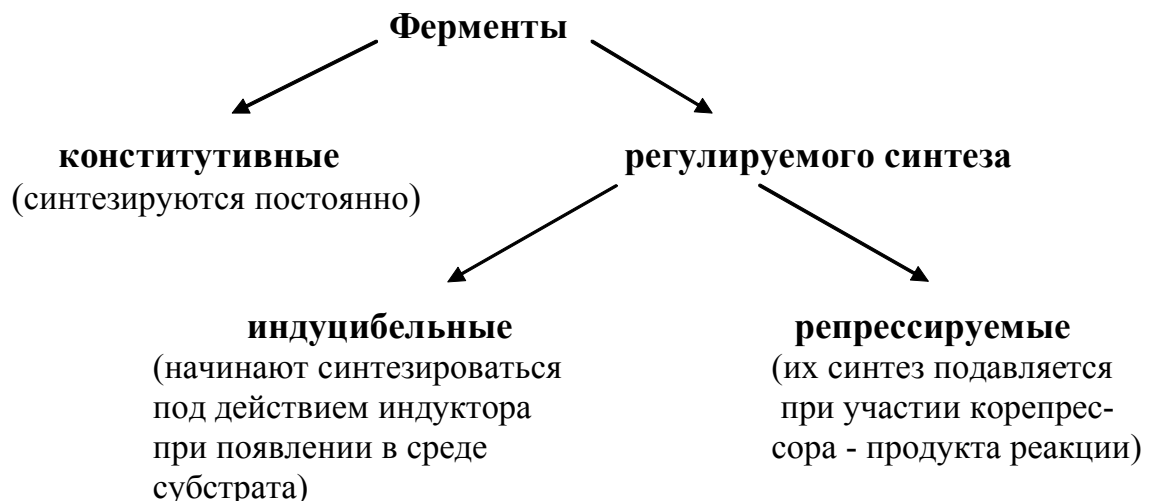


Рис.1 Группы ферментов в соответствии с особенностями их регуляции

**Конститутивные** (от лат. *constitutus* – утвердившийся, определенный) белки образуются постоянно при любых обстоятельствах. Их количество мало



изменяется в процессе жизнедеятельности организма или при изменении состава окружающей бактерию среды. Клетка «предполагает», что эти ферменты будут нужны ей всегда, поэтому кодирующие их гены постоянно экспрессируются («включены»). Поскольку глюкоза является основным сахаром, а другие сахара можно направить по пути метаболизма глюкозы, ферменты, метаболизирующие глюкозу, попадают в категорию конститутивных.

Так как на образование ферментов затрачиваются значительные ресурсы и энергия, клетке не выгодно синтезировать белок, если в данный момент он ей не нужен. Обеспечить экономию позволяет наличие **ферментов регулируемого синтеза**, скорость синтеза и концентрацию которых клетка может изменять (иногда в тысячи раз) в соответствии со своими нуждами. Клетка синтезирует только те белки (ферменты), которые необходимы в данных условиях.

В случае **индуцибельных** (от англ. induce – вызывать, побуждать, стимулировать) белков регуляция направлена на “включение” синтеза ранее не требовавшегося фермента, когда в нем возникла необходимость. “Включение” синтеза белка называется индукцией, а “включающее” синтез химическое вещество – индуктором (или депрессором). Индуктор реагирует с репрессором, инактивируя его. Как правило, индуцибельными являются ферменты катаболических путей (сбраживание сахаров, распад аминокислот и др.).

В случае **репрессируемых** (лат. *repressio* – подавление) ферментов цель регуляции – прекращение (репрессия) их синтеза. Обычно репрессируемыми являются ферменты анаболизма (синтеза аминокислот, азотистых оснований и т.д.).

### **1.1. Лактозный и триптофановый опероны *E. coli*: типичные способы регуляции синтеза белка у прокариот**

Оперон – это участок ДНК, ограниченный с одной стороны промотором (местом присоединения РНК-полимеразы), с другой – терминатором (местом ее отсоединения). Оперон кодирует одну молекулу мРНК, на основе которой позже могут синтезироваться один или несколько белков. В опероне имеется оператор, “разрешающий” или “не разрешающий” работу РНК-полимеразы (см. [Ошибка! Источник ссылки не найден.]).

Лактозный оперон у *E. coli* объединяет 3 структурных гена – *z*, *y* и *a*, кодирующих соответственно белки *Z* ( $\beta$ -галактозидазу), *Y* (галактозидпермеазу) и *A* (галактозидтрансацилазу) – индуцибельные ферменты, необходимые для усвоения дисахарида лактозы. Подробнее об участии этих ферментов в метаболизме лактозы см. в Приложении 2.

Рассмотрим случай, когда *E. coli* растет на среде, содержащей два источника углерода – глюкозу и лактозу. Для *E. coli* глюкоза в качестве пищевого ресурса предпочтительнее лактозы. Пока в среде есть глюкоза,

бактерия использует в пищу именно ее (с помощью конститутивных ферментов), а лактозу игнорирует. Когда глюкозы в среде не остается, бактерия, чтобы выжить, вынуждена использовать в пищу лактозу, для чего ей требуется “включить” и максимально ускорить синтез ферментов Z, Y и A. Если глюкоза вновь появится или лактоза полностью исчерпается – следует “выключить” синтез ферментов лактозного метаболизма. Такую регуляцию в соответствии с изменяющимся пищевым ресурсом обеспечивают два основных механизма – индукции ферментов метаболизма лактозы и катаболической репрессии. Они схематично показаны на рис.2 и 6. В контроле *lac*-оперона независимо друг от друга задействованы два белка-регулятора: негативный контроль обеспечивает *lac*-репрессор, а позитивный – активатор транскрипции CAP (он же БРЦ). Роль CAP в механизме отрицательного контроля в метаболической репрессии подробно рассмотрена в разделе 1.2.1. (рис. 5, 6).

### 1.1.1. Механизм индукции ферментов метаболизма лактозы (схема Жакоба-Моно)

Известно много индуцибельных ферментов как у прокариот, так и у эукариот. Индукция синтеза ферментов метаболизма лактозы у *E.coli* была подробно исследована французскими микробиологами Ф. Жакобом и Ж. Моно.

Смысл этого способа регуляции состоит в следующем: появление в среде субстрата (лактозы) “включает” синтез белков-ферментов, расщепляющих этот субстрат. Если субстрат в среде отсутствует, то синтез ферментов для его расщепления следует прекратить.

“Включение-выключение” синтеза ферментов метаболизма лактозы Z, Y и A обеспечивается конститутивным вспомогательным белком – ***lac*-репрессором**. Этот белок закодирован в ДНК *E. coli* в особом, не входящем в состав *lac*-оперона, гене-регуляторе (*i*-ген на рис.2). Постоянно синтезируясь в клетке, *lac*-репрессор связывается с оператором – регуляторным участком оперона, расположенным после промотора. В таком связанном с оператором состоянии *lac*-репрессор представляет собой непреодолимое препятствие для РНК-полимеразы. Как следствие, она не может считывать находящиеся после оператора гены *z*, *y* и *a* и построить соответствующую мРНК, поэтому ферменты Z, Y и A не синтезируются.

Появившись в среде, лактоза выступает в качестве индуктора: она воздействует на молекулы *lac*-репрессора, меняя их конформацию. Эти изменения приводят к потере *lac*-репрессором способности присоединяться к оператору. Свободный оператор “разрешает” РНК-полимеразе построить мРНК для дальнейшего синтеза ферментов Z, Y и A, то есть происходит индукция синтеза этих белков. Ферменты Z, Y и A начинают расщеплять лактозу, снижая ее концентрацию. В результате инактивирующее воздействие лактозы на *lac*-репрессор исчезает, конформация его восстанавливается, и он опять присоединяется к оператору, блокируя *lac*-оперон.

Имеется механизм, препятствующий “включению” lac-оперона при наличии очень малых количеств лактозы в среде, когда начинать синтез ферментов Z, Y и A не рентабельно. Этот механизм описан в Приложении 2.

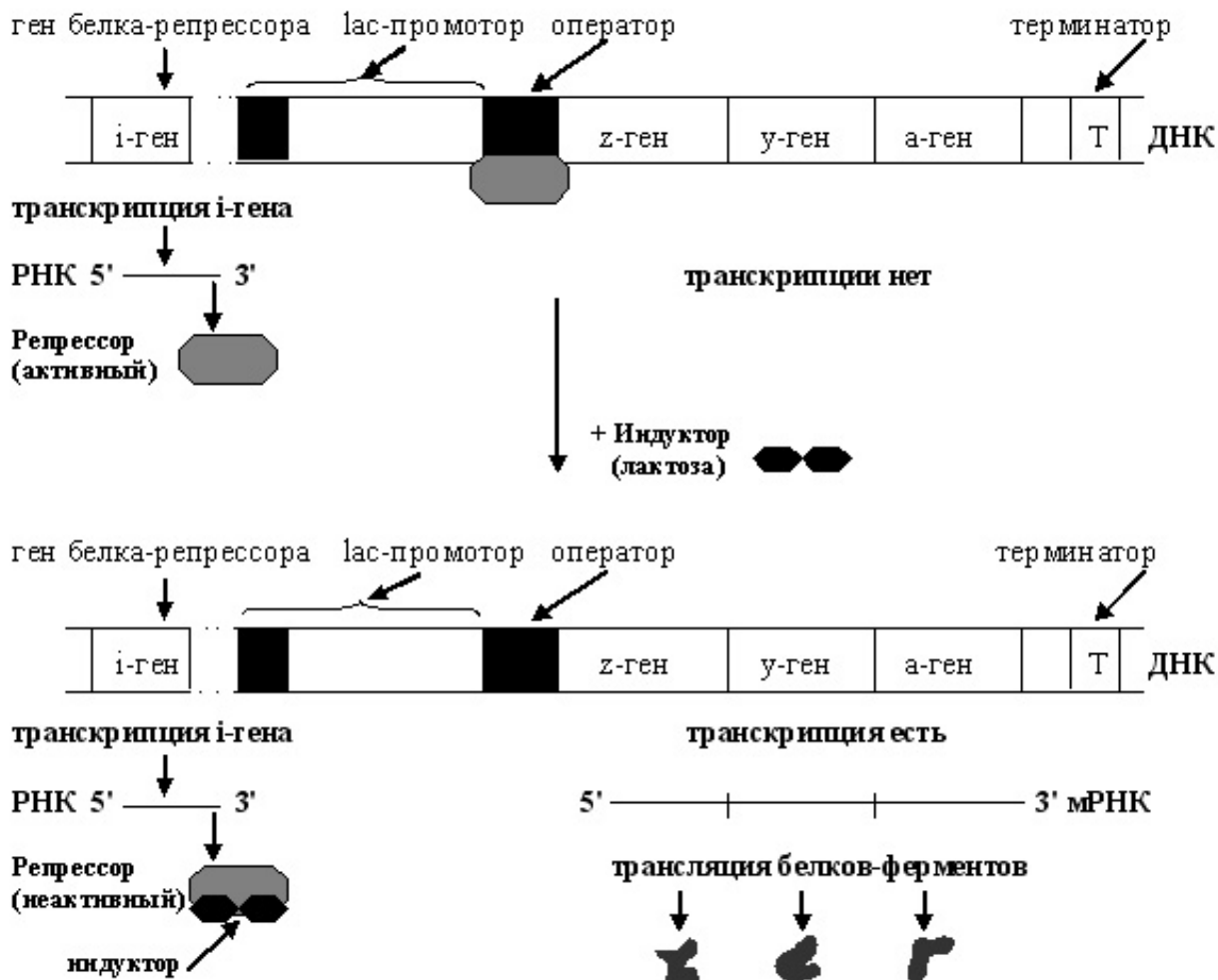


Рис. 2 Индукция синтеза ферментов метаболизма лактозы

В верхней части рисунка: так как лактозы нет,  
 Лактозы нет  
 lac-репрессор активен  
 ↓  
 lac-репрессор + оператор = блокирование оператора  
 ↓  
 lac-оперон “выключен”  
 ↓  
 РНК-полимераза не строит мРНК  
 ↓  
 Нет синтеза ферментов Z, Y и A

В нижней части рисунка: при появлении лактозы оперон “включен”  
 Лактоза есть  
 lac-репрессор активный + лактоза  
 ↓  
 lac-репрессор неактивный  
 ↓  
 Оператор не блокирован  
 ↓  
 lac-оперон “включен”  
 ↓  
 РНК-полимераза строит мРНК по генам z, y и a  
 ↓  
 Синтезируются ферментов Z, Y и A  
 ↓  
 Расщепление лактозы  
 ↓  
 Лактозы нет, см. вариант с выключенным опероном

Таким образом, регуляция индуцибельных ферментов происходит при участии репрессора, синтезирующегося в изначально активной, то есть способной связываться с оператором, форме, и индуктора – субстрата реакции, переводящего репрессор в неактивную форму.

### **1.1.2. Репрессируемые ферменты: триптофановый оперон**

**Триптофановый оперон** (*trp*-оперон, рис.3) клеток *E. coli*, содержащий пять структурных генов (A, B, C, D, E), необходим для образования трех ферментов, участвующих в синтезе триптофана. Эти ферменты являются репрессируемыми.

Смысл этого способа регуляции: накопление в среде излишков продукта реакции (триптофана) “выключает” синтез белков-ферментов, синтезирующих этот продукт.

Как и *lac*-оперон, *trp*-оперон “выключается” воздействием репрессора (*trp*-репрессора) на оператор (рис.4). Однако, в отличие от *lac*-репрессора, *trp*-репрессор синтезируется в неактивной форме, поэтому не может сразу после своего синтеза блокировать оператор. В активную форму *trp*-репрессор переводит присоединение к нему корепрессора – триптофана. Активный *trp*-репрессор присоединяется к оператору, что приводит к невозможности построения мРНК на основе структурных генов оперона. В результате синтез белков-ферментов для синтеза триптофана становится невозможен.

Таким образом, регуляция репрессируемых ферментов происходит при участии изначально неактивного репрессора, который приобретает активность лишь при взаимодействии с корепрессором – продуктом катализируемой реакции.

## **1.2. Другие способы регуляции синтеза белка у прокариот**

### **1.2.1. Регуляция на этапе инициации транскрипции**

#### **1.2.1.1. “Сильные” и “слабые” промоторы**

Скорость образования мРНК (а в результате – и количество кодируемого ею белка) в первую очередь определяется частотой инициации транскрипции данного гена. Эта частота может варьировать у разных генов, так как они имеют промоторы разной «силы». Например, промотор *lac*-оперона является «слабым», а промоторы оперонов, кодирующих белки, нужные клетке постоянно и в больших количествах – к “сильным”. «Сильные» промоторы будут часто иницировать транскрипцию, что приведет к образованию многочисленных мРНК и далее – молекул белка. Сила промотора задается последовательностью оснований в боксах Прибнова и боксе “-35”, расстоянием

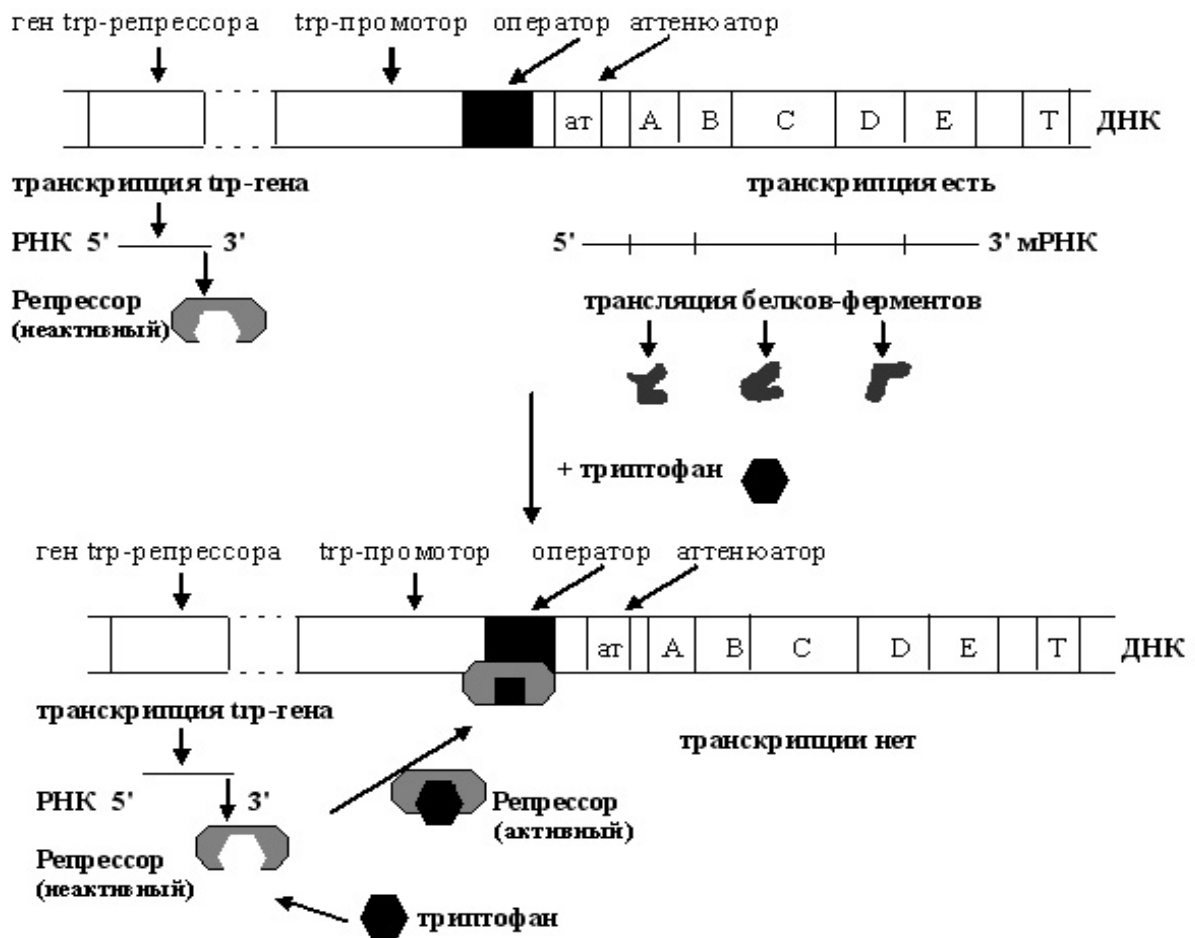


Рис. 3 Репрессия синтеза ферментов, синтезирующих триптофан

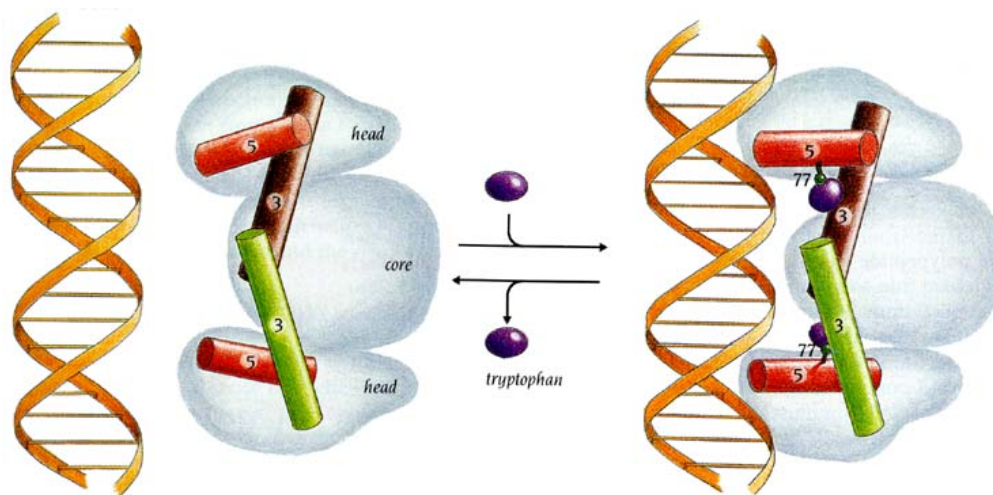


Рис. 4 Схема действия trp-репрессора

Трp-репрессор состоит из двух субъединиц, имеющих общую часть (*core*) и головки (*head*). На фоне общего бледно-серого контура полной молекулы трp-репрессора показаны  $\alpha$ -спиральные участки полипептидных цепей (показаны как цилиндры, обозначенные цифрами “3” и “5”), между которыми “садится” триптофан. Только после присоединения триптофана спирали “5” могут связаться с ДНК.

между ними и азотистыми основаниями в участке от “+1” до “+10” (о боксах промотора см. [**Ошибка! Источник ссылки не найден.**]).

### 1.2.1.2. Катаболическая репрессия

У прокариот имеются специальные механизмы изменения силы промотора. Превращение “слабого” промотора в “сильный” лежит в основе **катаболической репрессии** – позитивной регуляции работы *lac*-оперона с помощью белка CAP. Этот механизм можно считать зачатком системы «тонкой» регуляции синтеза белка, характерной для эукариот.

В случае *lac*-оперона катаболическая репрессия позволяет бактерии «ощутить», что глюкоза исчерпана, и только в этих условиях резко усилить потребление лактозы. Эффективная индукция синтеза ферментов Z, Y и A (по схеме Жакоба – Моно) возможна лишь в отсутствии глюкозы.

Промотор *lac*-оперона является «слабым», то есть присоединение к нему РНК-полимеразы для инициации транскрипции очень затруднено. Если РНК-полимераза редко и с трудом присоединяется к промотору, то она построит очень мало мРНК. Это означает, что даже если лактоза освободит оператор от *lac*-репрессора (по схеме Жакоба – Моно), то все равно без «посторонней помощи» транскрипция *lac*-оперона будет идти на низком уровне и молекул ферментов Z, Y и A будет синтезироваться недостаточно, чтобы начать питаться лактозой. Так происходит в случае, когда в среде существования бактерии имеется либо одна глюкоза, либо и глюкоза, и лактоза.

Катаболиты – это продукты распада, расщепления. Для случая катаболической репрессии *lac*-оперона важны катаболиты – продукты расщепления глюкозы. Эти катаболиты имеют свойство связывать цАМФ, тем самым, снижая концентрацию свободного цАМФ в бактериальной клетке.

В отсутствии глюкозы бактерии становится жизненно важно сделать синтез ферментов Z, Y и A более эффективным и быстрым. Это возможно, превратив «слабый» *lac*-промотор в «сильный», то есть, изменив свойства промотора таким образом, чтобы облегчить присоединение к нему РНК-полимеразы.

Превращение «слабого» промотора *lac*-оперона в «сильный» происходит при помощи особого белка CAP (от англ. catabolite activator protein – белок-активатор катаболитных оперонов; он же БРЦ – белок-рецептор цАМФ) и самого цАМФ (рис. 5 и 6).

### 1.2.1.3. Роль $\sigma$ -субъединицы прокариотической РНК-полимеразы

Присоединение РНК-полимеразы к промотору можно ускорить не только с помощью изменений промоторной области ДНК, но и воздействуя на структуру самой РНК-полимеразы. Например, набор тех генов, к промоторам

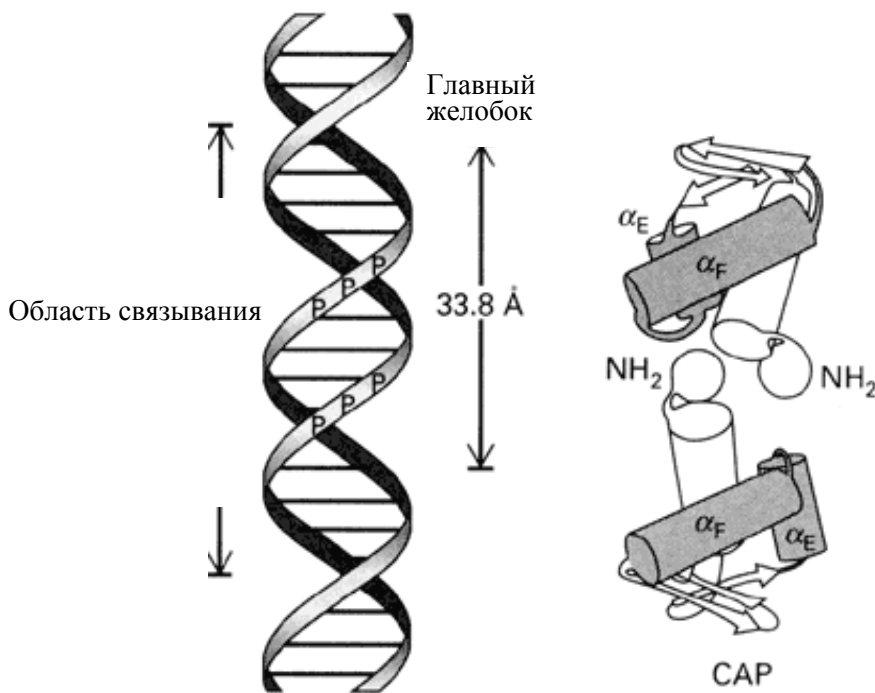


Рис. 5 Участок ДНК (слева) и белок CAP (справа)

У белка CAP показаны только части молекулы, непосредственно участвующие в ДНК-белковом взаимодействии. Серые цилиндры –  $\alpha$ -спиральные участки, вытянутые незакрашенные стрелки –  $\beta$ -складчатые структуры. CAP становится способным связаться с ДНК только после взаимодействия с цАМФ (на рисунке не показан)

которых будет присоединяться РНК-полимераза, определяется с помощью  $\sigma$ -субъединицы (сигма-субъединицы) этого фермента. Сигма-субъединица (рис. 7) “позволяет” или “не позволяет” РНК-полимеразе “прилипнуть” к нужному промотору. Если присоединения к промотору не произошло, то белок с гена, контролируемого данным промотором, синтезироваться не будет.

Распространена гипотеза сменных  $\sigma$ -субъединиц: в зависимости от того, к какому промотору следует присоединиться РНК-полимеразе, в коровой части фермента будет присутствовать  $\sigma$ -субъединица то одного, то другого типа (так же, как мы меняем насадки миксера или пылесоса при выполнении разной работы). Нуклеотидные последовательности промоторов, опознаваемых разными  $\sigma$ -субъединицами, существенно различаются и, как правило, не могут быть распознаны более чем одной  $\sigma$ -субъединицей. Например, у бактерии *Bacillus subtilis* один тип  $\sigma$ -субъединиц распознает последовательность ТТГАЦА, расположенную в положении “-35” и последовательность ТАТААТ в положении “-10”. Для распознавания другим типом  $\sigma$ -субъединиц этой же бактерии указанные последовательности должны быть АТАТТ и АТАЦА соответственно.

Транскрипцию практически всех жизненно важных генов, обеспечивающих гомеостатические клеточные процессы (репликацию ДНК, транскрипцию, трансляцию и т.д.), обеспечивают  $\sigma$ -субъединицы, называемые

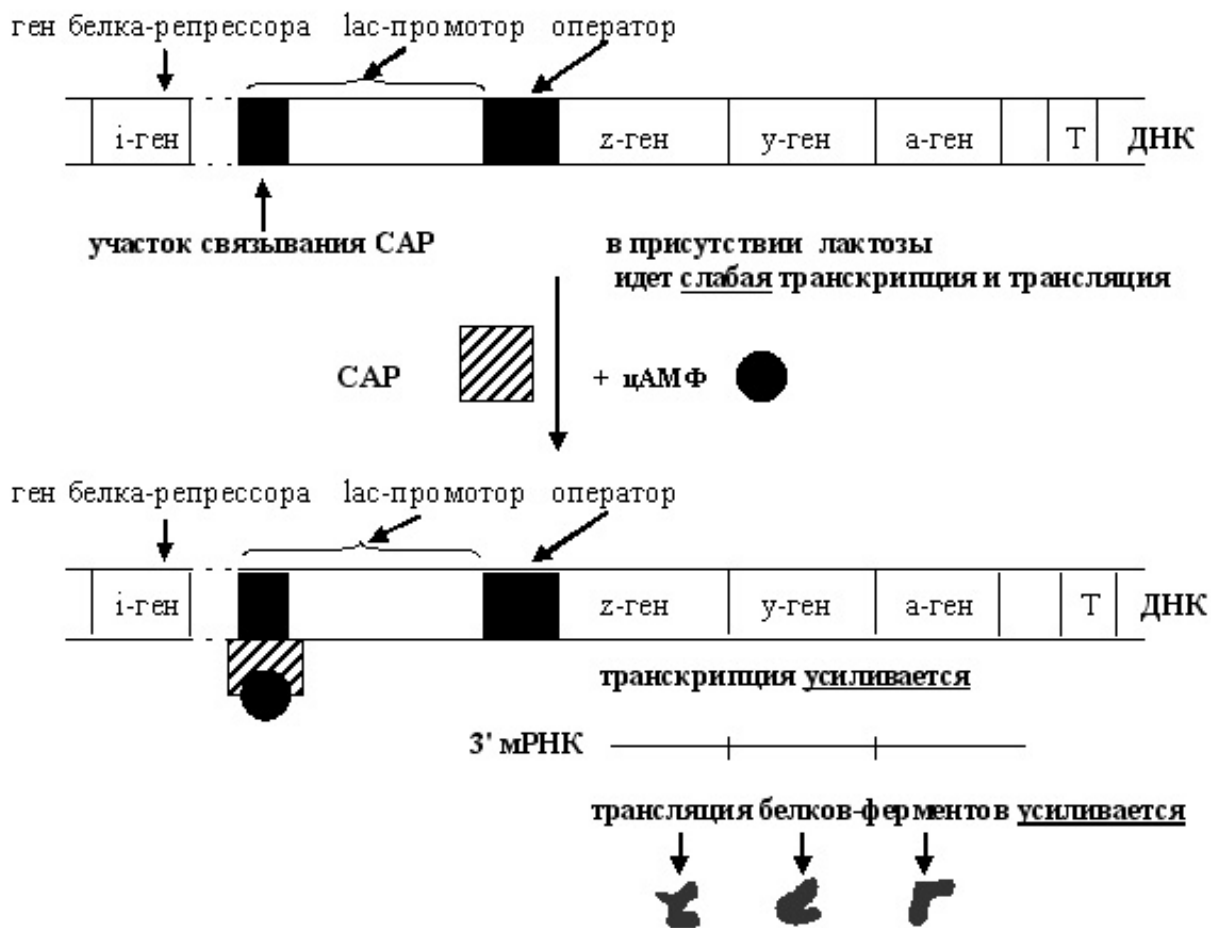


Рис. 6 Механизм катаболической репрессии (на примере lac-оперона)

В верхней части рисунка 6: наличие глюкозы в среде вызывает образование ее катаболитов, которые забирают на себя молекулы цАМФ, тем самым не давая им взаимодействовать с CAP. Без свободного цАМФ активации CAP, его присоединения к промотору, а, следовательно, и увеличения “силы” промотора, не происходит. Промотор остается слабым, с трудом присоединяет РНК-полимеразу, а белки Z, Y и A даже при наличии индуктора – лактозы синтезируются очень слабо.

В нижней части рисунка 6 отсутствие глюкозы (и ее катаболитов) не мешает цАМФ активировать белок CAP. Комплекс [CAP+цАМФ] связывается с ДНК на участке, соседствующем с местом связывания РНК-полимеразы в lac-промоторе. Это вызывает изгиб двойной спирали на участке присоединения и, как следствие, превращение промотора из “слабого” в “сильный”. В итоге резко возрастает скорость синтеза белков Z, Y и A.

основными. Остальные процессы требуют альтернативных  $\sigma$ -субъединиц, которых в настоящее время описано не менее десяти. Например, у *E. coli* при резком повышении температуры (тепловом шоке) начинает синтезироваться альтернативная субъединица  $\sigma^{32}$  (с молекулярной массой 32 кДа). Ее присутствие придает РНК-полимеразе способность находить промоторы генов, кодирующие защитные белки – БТШ (белки теплового шока). Дополнительная информация о разнообразии  $\sigma$ -субъединиц *E. coli* и контролируемых ими процессах приведена в Приложении 3, о БТШ – в Приложении 4.



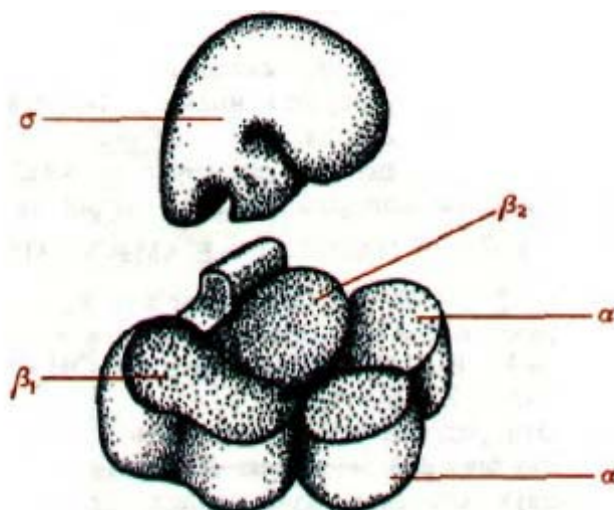


Рис. 7 Субъединицы РНК-полимеразы (на примере фермента *E. coli*)  
Отдельно от коровой части фермента показана  $\sigma$ -субъединица.

У прокариот  $\sigma$ -субъединицы позволяют эффективно контролировать целые блоки генов. Являясь обычно конечным (реже – промежуточным) звеном какого-либо регуляторного каскада, они не детектируют изменение средовых условий сами, а полагаются в этом на другие белки. Поэтому синтез и функционирование  $\sigma$ -субъединиц обычно также подвержены регуляции.

## 1.2.2. Регуляция на этапе элонгации и терминации транскрипции

Два важнейших способа регуляции транскрипции на стадии элонгации – индукция субстратом и репрессия продуктом – рассмотрены нами в разделе 1.1. Кроме этих базовых, имеются и другие механизмы, изменяющие синтез белка через воздействие на **элонгацию транскрипции**. Наиболее хорошо изученные из них рассмотрены ниже.

### 1.2.2.1. Как вирус заставляет бактерию на него работать (изменение свойств $\beta$ -субъединицы РНК-полимеразы)

Прямое воздействие на РНК-полимеразу, приводящее к изменению ее свойств, используют некоторые бактериофаги (то есть вирусы бактерий), такие как бактериофаг Т4. Цель такого воздействия – изменить свойства бактериального фермента таким образом, чтобы переключить его на транскрипцию своего собственного генома. При этом синтез бактериальных РНК прекращается. Особый фаговый белок взаимодействует с  $\beta$ -субъединицей РНК-полимеразы *E. coli*, в результате чего уже начавший транскрипцию фермент перестает воспринимать в качестве матрицы для транскрипции обычную бактериальную ДНК, содержащую цитозин, а воспринимает только измененную ДНК (фаговую), где вместо цитозина содержится 5-

гидроксиметилцитозин. В итоге вместо нужных бактериальной клетке мРНК и белков синтезируются продукты, необходимые вирусу.

В рассмотренном случае на РНК-полимеразу оказывает воздействие не низкомолекулярный эффектор, а белок, однако, как и под воздействием ффГфф (см. ниже), регуляция элонгации основана на изменении способности РНК-полимеразы распознавать определенные особенности ДНК-матрицы.

### 1.2.2.2. Регуляция с помощью ффГфф (строгий ответ)

Элонгация транскрипции может регулироваться с помощью прямого воздействия низкомолекулярного эффектора на РНК-полимеразу. В качестве одного из таких эффекторов рассмотрим необычный нуклеозидтетрафосфат – ффГфф (рис.8).

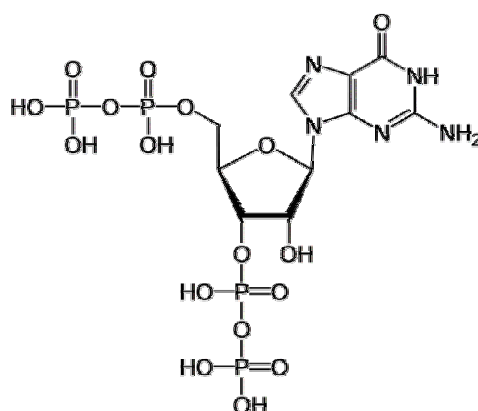


Рис. 8 Формула гуанозинтетрафосфата – ффГфф

Если внутри клетки бактерии *E.coli* возникает недостаток аминокислот, являющихся материалом для построения белковых молекул на рибосомах, то в целях экономии следует прекратить синтез новых рибосом. Механизм, с помощью которого происходит “выключение” синтеза рРНК (и одновременной стимуляции синтеза РНК с оперонов, контролирующих биосинтез аминокислот), представлен на рис. 9. Этот способ регуляции носит название **строгого ответа** клеток на аминокислотное голодание. Он присущ практически всем бактериям. Для осуществления строгого ответа нужны несколько структурных генов, но наиболее изученным из них является ген *relA*, кодирующий белок RelA.

Кроме замедления синтеза рРНК и усиления транскрипции оперонов биосинтеза аминокислот, при строгом ответе также снижается скорость синтеза тРНК и некоторых мРНК, необходимых для синтеза рибосомных белков, факторов элонгации EF-Ts, EF-Tu и EF-G,  $\alpha$ -субъединицы РНК-полимеразы. Общий синтез РНК снижается в итоге до 5-10% от нормального. Возрастает скорость деградации белка, уменьшается синтез нуклеотидов, липидов и углеводов.

Отметим, что строгий ответ можно вызвать любыми условиями, нарушающими образование аминоацил-тРНК. Например, недостаток АТФ будет иметь тот же эффект, что и аминокислотное голодание, так как АТФ необходим для присоединения аминокислоты к тРНК.

Некоторые из бактерий приспособили строгий ответ еще и для регуляции других клеточных функций. Так, миксобактерии используют ффГфф как сигнал к образованию плодовых тел – скоплений клеток, служащих для последующего возникновения в них бактериальных спор.

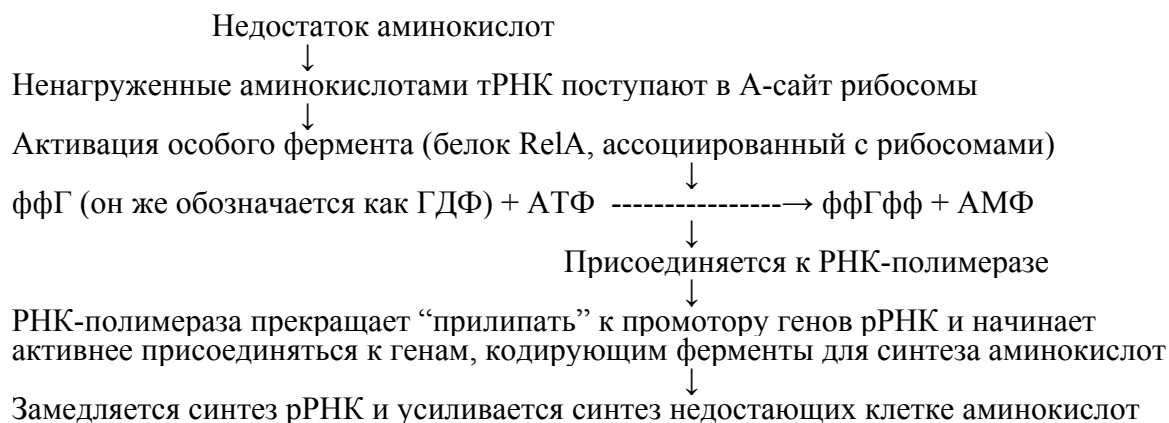


Рис. 9 Строгий ответ при аминокислотном голодании *E. coli*

### 1.2.2.3. $\rho$ -зависимые и $\rho$ -независимые терминаторы, их роль в регуляции

Существуют белковые факторы, одни из которых препятствуют, а другие – способствуют терминации. В случае  **$\rho$ -зависимой терминации** регуляция синтеза белка возможна через воздействие на активность  **$\rho$ -белка**. Для прокариот известно два типа терминации транскрипции:  $\rho$ -зависимая и  $\rho$ -независимая. Процесс  $\rho$ -зависимой терминации показан на рис. 10.

Главным фактором терминации транскрипции у бактерий является белок  $\rho$  (“ро”), или  **$\rho$ -фактор**, или **Rho-фактор**, состоящий из шести субъединиц.

До последнего времени считалось, что  $\rho$ -фактор, присоединившись к 5'-концу РНК, начинает двигаться по ней с той же скоростью, с какой РНК-полимераза движется по ДНК. В районе  $\rho$ -зависимого терминатора, отличающегося большим содержанием Г-Ц-пар азотистых оснований, РНК-полимераза притормаживает, так как ей трудно разрывать по три водородные связи в парах “гуанин – цитозин”. Поэтому  $\rho$ -белок, скорость которого осталась прежней, догоняет РНК-полимеразу и взаимодействует с ней, изменяя ее конформацию. В результате РНК-полимераза отделяется от ДНК. Согласно данной модели,  $\rho$ -фактор первоначально связан только со строящейся РНК, но не с РНК-полимеразой. Лишь позднее он взаимодействует с этим ферментом.

По современным представлениям,  $\rho$ -фактор сразу связывается с РНК-полимеразой на старте транскрипции, еще до возникновения какого-либо

фрагмента РНК. Как только строящаяся РНК становится достаточно длинной,  $\rho$ -фактор “продевает” ее сквозь себя, при этом образуя из нее петлю, и начинает тормозить движение РНК-транскрипта с использованием энергии АТФ. Из-за образования петли нарастает пространственное напряжение, которое в районе  $\rho$ -зависимого терминатора приводит к изменению конформации  $\rho$ -фактора. Это, в свою очередь, изменяет конформацию РНК-полимеразы и инактивирует ее. В итоге элонгационный комплекс останавливается в зоне терминатора, а затем медленно распадается на составные элементы.

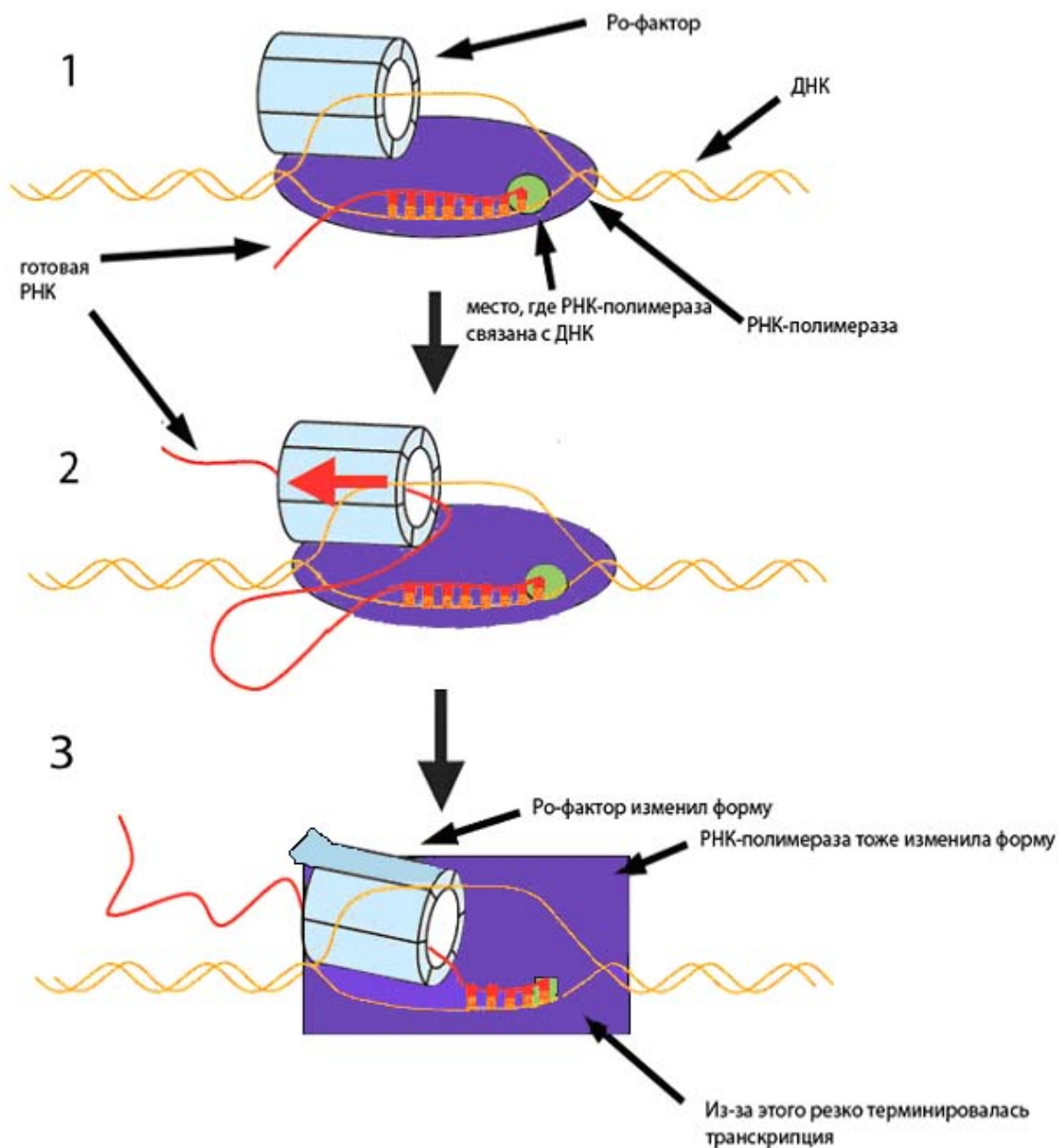


Рис. 10 Терминация при участии  $\rho$ -фактора

#### 1.2.2.4. Антитерминация транскрипции

Антитерминация транскрипции – это подавление активности некоторых терминаторов. Например, у бактериофага  $\lambda$  есть специальные белки-антитерминаторы N и Q. Белок N связывается с определенной структурой на строящейся мРНК и обеспечивает присоединение к ней четырех белков : S10, NusA, NusB, NusG. Образуется РНК-белковый комплекс, взаимодействующий с РНК-полимеразой и мешающей ей завершить трансляцию на  $\rho$ -зависимых и некоторых  $\rho$ -независимых терминаторах. Белок Q подавляет активность терминатора, связываясь не с РНК, а с ДНК.

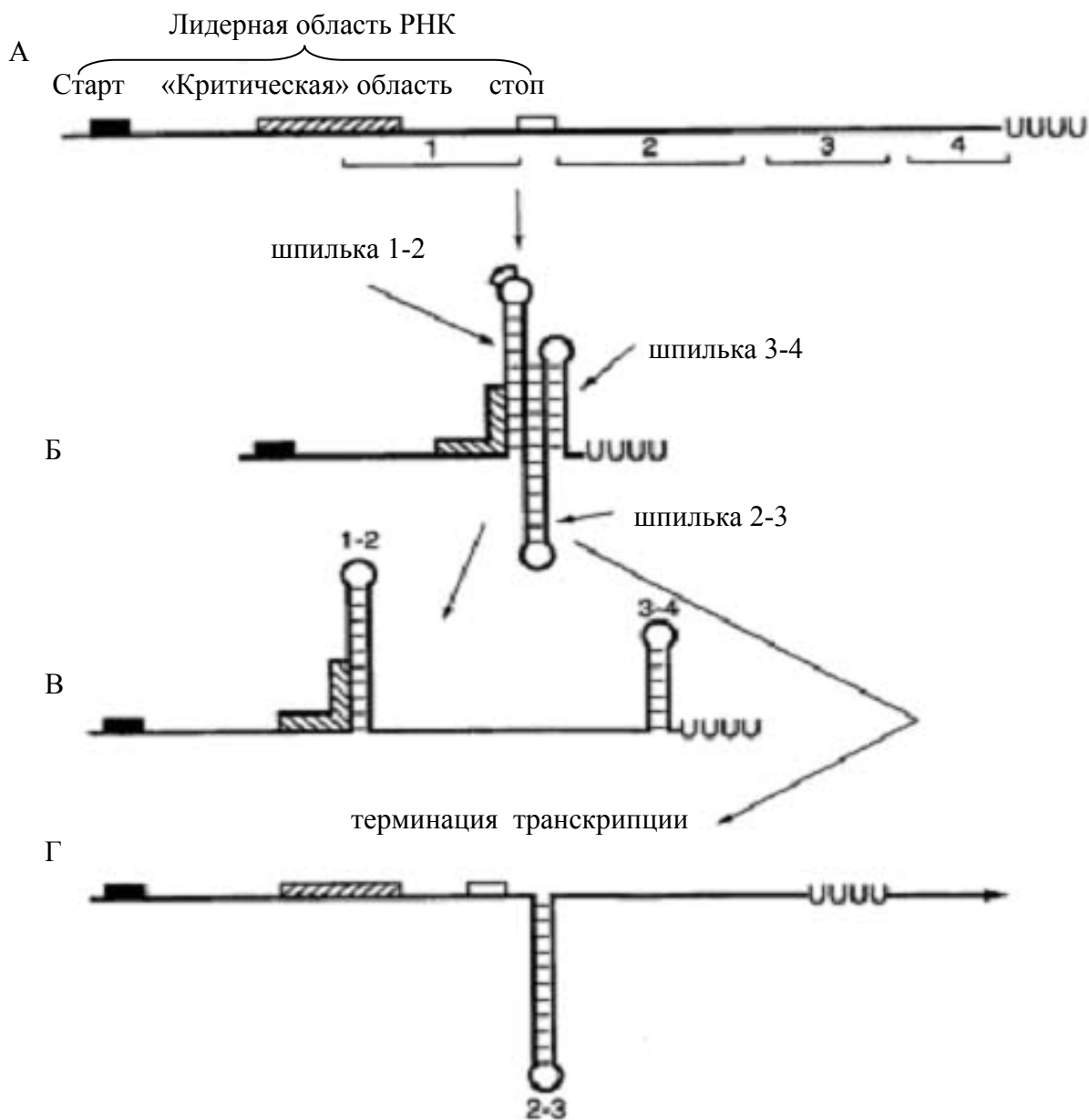
#### 1.2.2.5. Аттenuация транскрипции

Аттenuация – это регулируемая терминация, которая происходит лишь в том случае, если строящаяся мРНК приобретает определенную вторичную структуру. Механизм аттenuации удобно рассмотреть на примере уже знакомого нам триптофанового оперона. Смысл этого способа регуляции – остановить синтез ферментов А, В и С, закодированных в *trp*-опероне, если в клетке достаточно триптофана (как и в случае репрессии этого оперона, рассмотренной в разделе I.1). Схема процесса представлена на рис. 11.

На ДНК внутри лидерной последовательности оперона, после оператора, но приблизительно за 180 пар нуклеотидов до структурных генов белков-ферментов синтеза триптофана расположен **аттenuатор** (*attenuate* – ослаблять, затухать; см. рис. 3). Зона аттenuатора транслируется в участок на мРНК, в котором закодирован **лидерный пептид** из 14 аминокислот, в том числе – нескольких триптофановых остатков подряд. После своего синтеза этот пептид очень быстро разрушается.

Перед аттenuатором находятся несколько участков ДНК, последовательности которых обладают центральной симметрией. Это приводит к тому, что мРНК, построенная РНК-полимеразой комплементарно к таким участкам, способна образовать две взаимоисключающие комбинации – либо две шпильки (из участков, обозначенных на рисунке 1-2 и 3-4) либо только одну шпильку (из участков 2-3). Если возникнет структура из двух шпилек, то наличие в ней шпильки 3-4 приведет к терминации транскрипции на аттenuаторе. В этом случае мРНК для синтеза ферментов А, В и С синтезироваться не будет. Если сформируется единственная шпилька 2-3, то РНК-полимераза беспрепятственно минует аттenuатор и проведет транскрипцию генов, кодирующих ферменты синтеза триптофана (А, В, С) до конца.

Так как у прокариот трансляция начинается еще до завершения транскрипции, лидерный пептид строится рибосомой еще до того, как РНК-полимераза начнет строить мРНК на цистронах триптофанового оперона. Двигаясь по участку мРНК, содержащему “пропись” лидерного пептида,



транскрипция структурных генов оперона

Рис. 11 Механизм аттенюации на примере триптофанового оперона

А – функционально важные участки на мРНК, еще не образовавшей шпилек. Лидерная область РНК кодирует лидерный пептид. В “критической” области закодированы остатки триптофана;

Б – процесс выбора одной из двух альтернативных шпилечных структур;

В – структура из двух шпилек, в образовании которых участвуют последовательности 1 - 2 и 3 - 4. Наличие терминирующей шпильки 3 - 4 приводит к терминации транскрипции;

Г – структура из одной шпильки 2 - 3, возникающей при остановке рибосомы на “критическом” участке лидерной РНК. Отсутствие терминирующей шпильки обеспечивает беспрепятственное построение мРНК со структурных генов.

рибосома поочередно присоединяет аминокислотные остатки, синтезируя заданную пептидную цепочку, и доходит до места, где в цепи должны

находиться остатки триптофана. Если в клетке триптофан отсутствует, рибосома не может вставить его в пептид и останавливается на соответствующем месте мРНК. Остановившись, она закрывает собой последовательность 1. Это делает невозможным формирование шпильки 1-2 и сопутствующей ей второй (терминаторной) шпильки 3-4. В соответствии с этим терминации транскрипции не происходит, РНК-полимераза переходит в область структурных генов оперона и строит там мРНК для синтеза ферментов А, В, С. В итоге отсутствие триптофана “включает” процесс его синтеза ферментами А, В, С.

Если триптофана в клетке достаточно, то рибосома использует его, включая в цепь лидерного пептида и движется дальше, не останавливаясь на критическом участке мРНК. Поэтому препятствий для формирования ансамбля шпилек 1-2 и 3-4 не возникает. Терминаторная шпилька 3-4 обеспечивает терминацию транскрипции на аттенуаторе, не доходя до структурных генов. То есть при достаточном количестве триптофана построения ферментов для его синтеза не происходит.

Таким образом, в бактериальной клетке уровень транскрипции регулируется содержанием триптофана. Если триптофан (Trp) в избытке, то девять из десяти молекул РНК-полимеразы, начавших транскрипцию триптофанового оперона, прекращают синтез РНК на аттенуаторе. Чем триптофана меньше, тем больше молекул полимеразы сможет завершить полный синтез мРНК, а, следовательно, возрастет количество ферментов, нужных для синтеза этой аминокислоты.

### **1.3. Главные особенности прокариотической регуляции белкового синтеза на уровне транскрипции**

1. Основная регуляция происходит на этапе инициации транскрипции.

2. Так как большинство генов прокариот находятся во “включенном” состоянии, регуляторные воздействия у прокариот обычно направлены на их “выключение”. Для каждого набора генов имеется свой специфический репрессор.

3. Одна регуляторная область на ДНК часто регулирует работу не одного, а нескольких генов.

4. Имеется небольшое количество возможных уровней синтеза белка (“включено”, “выключено” и ряд промежуточных уровней), “плавная” регуляция с тонкой настройкой отсутствует.

### **1.4. Вопросы для самоконтроля по материалу главы 1**

1. Перечислите известные вам пути регуляции биосинтеза белка на уровне транскрипции у прокариотических организмов.

2. Каковы организация и строение лактозного оперона и возможные способы регуляции его работы.
3. Каковы организация триптофанового оперона и возможные способы регуляции его работы.
4. Опишите строение РНК-полимеразы прокариот и значение ее  $\sigma$ -субъединицы для регуляции транскрипции
5. Охарактеризуйте понятие «строогого ответа» и функции  $\sigma$ -фактора
6. Назовите функции  $\rho$  белка в регуляции транскрипции
7. Дайте понятие антитерминации транскрипции, раскройте ее возможности в регуляции синтеза белка
8. Выявите взаимосвязь структурных особенностей клеток прокариот, их генома и регуляции биосинтеза белка.



## 2. Регуляция на стадии транскрипции у эукариот: механизмы и системы

### 2.1 Особенности организации эукариот требуют специфики в регуляции синтеза белка

Эукариоты устроены значительно сложнее прокариот. Особенности организации их систем делают невозможным управление синтезом белков на прокариотическом уровне. Укажем лишь наиболее ярко выраженные особенности эукариот, выдвигающие новые требования к системам и путям регуляции синтеза белка:

- эукариоты намного больше прокариот по размерам генома, клетки, организма в целом,
- могут состоять из разных типов клеток,
- их жизненный цикл более сложен и продолжителен,
- ядерная ДНК находится не в одной молекуле, а представлена несколькими разными молекулами, уложенными в хромосомы.
- генотип в большинстве случаев диплоидный
- кроме ядерной ДНК, имеется ДНК митохондрий и хлоропластов, которая должна находиться под контролем ядра,
- из-за наличия ядра процессы транскрипции и трансляции разделены в пространстве и по времени.

Поэтому способы регуляции синтеза белка у эукариот более разнообразны, сложны и часто сильно отличаются от прокариотических.

В отличие от прокариот, у эукариот большинство генов “выключено”, репрессировано (работают механизмы, запрещающие синтез с них каких-либо продуктов), поэтому регуляция направлена на их “включение”. Большинство клеток эукариотического организма содержит полный набор генов, но обычно из этого набора для построения белков используется крайне незначительный объем информации. Постоянно транскрибируется не более 7 – 10% генов. Основная масса генов, активно функционирующих в большинстве клеток организма на протяжении онтогенеза, это гены, которые обеспечивают синтез белков общего назначения (рибосомальные белки, гистоны, тубулины и т.д.), тРНК и рРНК. Кроме этих постоянно необходимых генов имеется много других генов, синтез белков с которых возможен только в определенных типах клеток, при определенных метаболических условиях или во время дифференцировки (зависит от тканевой принадлежности клетки, от периода ее жизненного цикла и стадии индивидуального развития всего организма).

Второй особенностью эукариот является возможность более “плавной” регуляции. Если у прокариот скорость синтеза белка может принимать очень ограниченное число значений (“выключено” – “включено” или, в лучшем случае, с добавлением к этим крайним нескольких промежуточных положений), то у эукариот число возможных уровней интенсивности белкового синтеза резко возрастает.

Третьей особенностью эукариот является широкое использование ими принципов комбинирования (составления комбинаций): целый управляющий “сигнал” регуляторного воздействия, компонент системы регуляции или сама “пропись” белка (при альтернативном сплайсинге) составляется, как в детском конструкторе, из определенного набора элементов. Это комбинирование дает возможность собрать огромное количество уникальных управляющих “сигналов” из небольшого числа “деталей”. Например, относительно небольшое количество белковых факторов инициации транскрипции, образуя на промоторах разных генов разные сочетания, дают возможность РНК-полимеразе II выбрать нужный ген и начать его транскрибировать, а необходимая активность каждого гена эукариот регулируется сочетанным влиянием большого количества генов-регуляторов.

В качестве четвертой особенности можно указать активное использование эукариотами стратегии наработки мРНК не по потребности данного момента, а более или менее заранее, впрок. Такие метаболически стабильные мРНК необязательно сразу вступают в трансляцию, а их активность избирательно регулируется во времени и во внутриклеточном пространстве путем активации – инактивации.

## 2.2. Компоненты системы регуляции транскрипции

### 2.2.1. Регуляторные элементы – последовательности на ДНК

В эукариотических клетках содержится несколько молекул ДНК. В связи с этим на ДНК различают следующие виды регуляторных последовательностей:

– **цис-элементы** (cis-acting elements) – регуляторные элементы, находящиеся на той же молекуле ДНК, что и регулируемый ими ген. К цис-элементам относится, например, промоторная область и энхансеры;

– **транс-элементы** (trans-acting elements) – находятся на другой молекуле ДНК, не на той, которая несет регулируемый ген. Примерами транс-элементов являются гены, кодирующие многие транскрипционные факторы.

У эукариот регуляторные элементы собраны в регуляторные регионы, имеющие сложную блочно-иерархическую организацию. Основной регуляторный элемент эукариот – это **коровый (базальный) промотор**. Он обеспечивает сборку базального транскрипционного комплекса (из *основных* факторов транскрипции и РНК-полимеразы) и инициацию транскрипции на базальном (исходном, базовом) уровне. Часто этот уровень так низок, что приводит к синтезу лишь единичных молекул РНК и, в дальнейшем, белков. Кроме корового промотора, экспрессия гена эукариот контролируется **энхансерами** (усилителями транскрипции – от англ. enhancer) и **сайленсерами** (глушителями, успокоителями, от англ. silencer) – регионами, подавляющими транскрипцию), которые могут быть расположены на ДНК очень далеко от

точки начала транскрипции. На ДНК также имеются **инсуляторы** (англ. insulate – разобщать, изолировать) – это “пограничные столбы”, определяющие зону действия данного энхансера или сайленсера.

Транскрипция одного гена обычно зависит от суммы воздействий целого набора энхансеров, сайленсеров и других регуляторных районов ДНК.

### 2.2.2. Регуляторные белки

Регуляторные элементы ДНК могут оказывать свое влияние на транскрипцию гена лишь опосредованно, через **регуляторные белки**. Регуляторные белки, кодируемые транс-элементами (то есть не на той же самой молекуле ДНК, что и регулируемый ген), называют **транс-действующими регуляторными факторами**. Если белок кодируется цис-элементом, его называют **цис-действующим фактором**.

Белки, регулирующие транскрипцию благодаря их собственному высокоспецифическому взаимодействию с ДНК или стехиометрическому (но не ферментативному!) взаимодействию с другим ДНК-связывающим белком, называют **транскрипционными факторами** (ТФ). Гистоны не относят к транскрипционным факторам, так как они при связывании с ДНК проявляют низкую специфичность (то есть могут связаться с ДНК практически по всей ее длине, а не на определенном коротком участке).

Регуляторные белки имеют домены для прикрепления к определенному регуляторному элементу ДНК и домены для белок-белковых взаимодействий. Для связывания с ДНК регуляторным белкам служат типичные фрагменты вторичной структуры – ДНК-связывающие мотивы. Известен целый ряд таких мотивов: “цинковые пальцы”, “спираль-поворот-спираль”, “лейциновая молния”, “спираль-петля-спираль” и другие. Два из названных мотивов представлены на рис. 12. Классификация транскрипционных факторов представлена в Приложении 4.

В отличие от прокариот, эукариотические регуляторные белки оказывают свой эффект не по одному, а в сочетаниях (комплексах). В **транскрипционном комплексе** (см. [7]) число **общих** и **специфических** факторов может достигать до 50, причем замена или отсутствие хотя бы одного из факторов приводит к изменению способности РНК-полимеразы инициировать транскрипцию на данном промоторе. Общие белковые факторы обязательны при сборке транскрипционного комплекса в районе промотора любого гена и на любой стадии развития, тогда как набор специфических белковых факторов будет меняться в зависимости от транскрибируемого гена, типа клеток, фазы жизненного цикла, средовых условий и т.д. (см. Приложение 4, классификация белковых факторов в зависимости от их функции).

Транскрипционные факторы, активирующие транскрипцию, называются позитивными, или **активаторами**, а подавляющие транскрипцию – негативными, или **репрессорами**. И те, и другие могут пребывать в активном и

неактивном состоянии. Переход из неактивного состояния в активное у разных транскрипционных факторов происходит разными способами (рис.13).

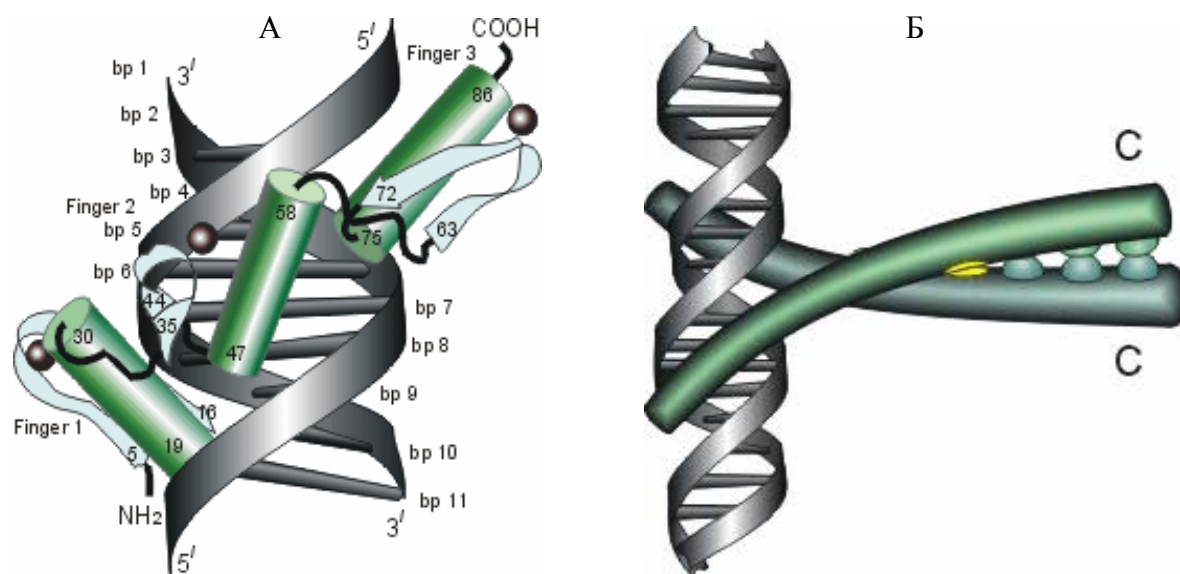


Рис. 12 Примеры ДНК-связывающих мотивов в регуляторных белках

А) "цинковые пальцы" (черные шарики - ионы Zn). Цинковый палец, "finger" (этот домен можно отрезать от целого белка и выделить отдельно) - самый маленький из известных глобулярных белков. На представленном фрагменте видны 3 "цинковых пальца".

Б) "лейциновая молния". Когда лейциновая молния не связана с ДНК, она представляет собой просто димер из параллельных  $\alpha$ -спиралей, "слипшихся" по всей длине своими гидрофобными поверхностями из боковых радикалов лейцинов (показаны в виде выступов). Однако одна (на каждой спирали) из этих групп – не гидрофобна: желтым пятном отмечен вкрапленный в гидрофобную поверхность полярный незаряженный аспарагин. Он необходим для образования именно димера. Его замена на более гидрофобный остаток приводит к тому, что спирали "будут слипаться" не по две, а по три и более.

На каждой полипептидной цепи указан С-конец.

Перейдя в активное состояние, специфические транскрипционные факторы могут изменять активность основных транскрипционных факторов (например, TFIIB или TFIID) или конкурировать с ними за сайты связывания на ДНК. Например, некоторые эукариотические факторы-репрессоры связываются с ДНК так близко от промотора, что закрывают доступ к нему РНК-полимеразы. Другие транскрипционные факторы могут конкурировать с белками обратного действия. Например, репрессор может занять сайт на ДНК, предназначенный для белков-активаторов (так называемое "гашение" – quenching). В этом случае активаторы не могут присоединиться к ДНК и облегчить инициацию транскрипции.

### 2.2.3. Эффекторы

**Эффекторы** – это белки, сами не способные связываться с ДНК, но регулирующие функционирование белков, способных к такому связыванию (общих и специфических факторов). Взаимодействие эффектора с

регуляторными белками изменяет их способность влиять на регулируемые гены. Например, эффектором является ингибиторный белок, после отщепления которого транскрипционный фактор переходит в активное состояние (рис.13).

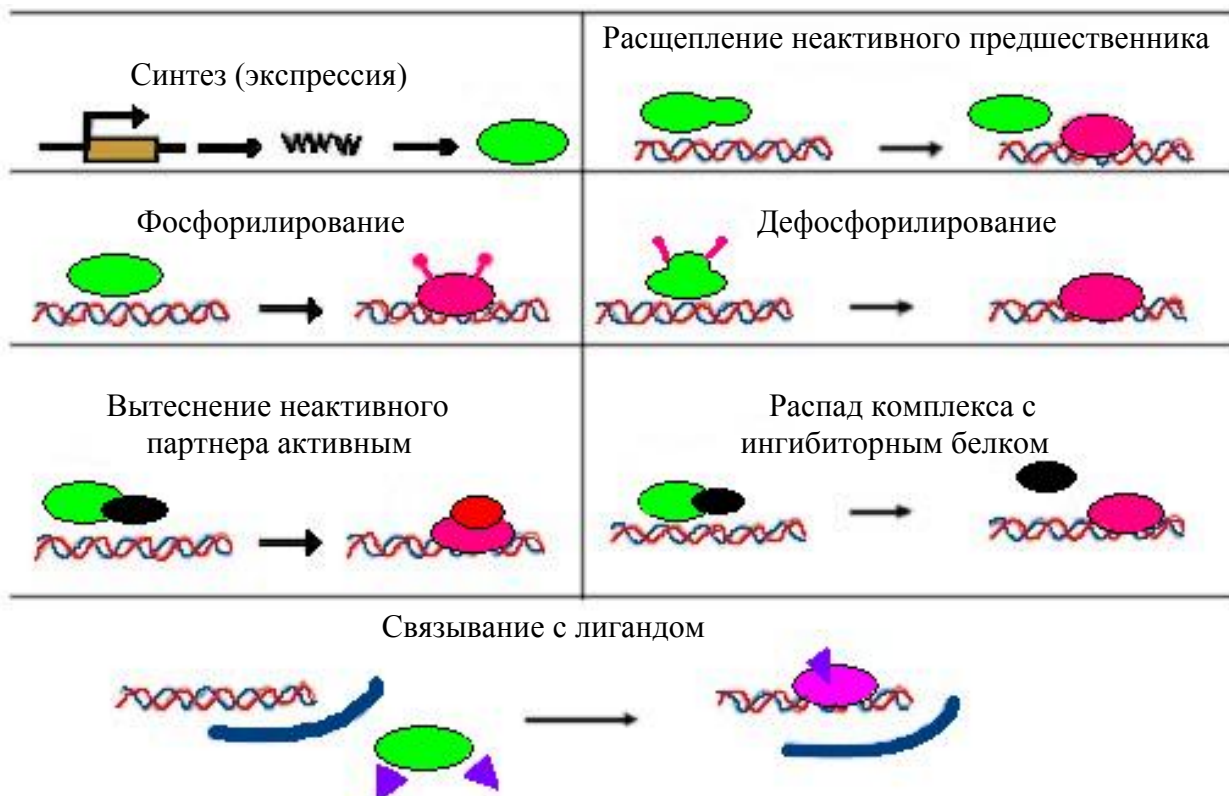


Рис. 13 Основные пути активации транскрипционных факторов  
Зеленым цветом показано функционально неактивное состояние транскрипционного фактора, красным – активное.

Белки-эффекторы, присоединение которых заставляет функционировать активаторы, называются **коактиваторами**, взаимодействующие с репрессорами – **корепрессорами**. Как и сами транскрипционные факторы, и коактиваторы, и корепрессоры могут переходить из функционально активной формы в неактивную и обратно.

#### 2.2.4. Медиатор

**Медиаторами** называют белковые комплексы эукариот, осуществляющие передачу регулирующего сигнала с белка-активатора (или репрессора), связавшегося с регуляторным элементом (энхансером, сайленсером), на общие факторы транскрипции в транскрипционном комплексе РНК-полимеразы II. Важно, что медиатор способен собирать и интегрировать регуляторные сигналы от многих активаторов и репрессоров (а, следовательно, от многих регуляторных элементов ДНК) и активно влиять на РНК-полимеразу II уже на основе этого интегрированного сигнала. Медиатор,

взаимодействующий с регуляторными белками и РНК-полимеразой II, изображен на рис. 14.

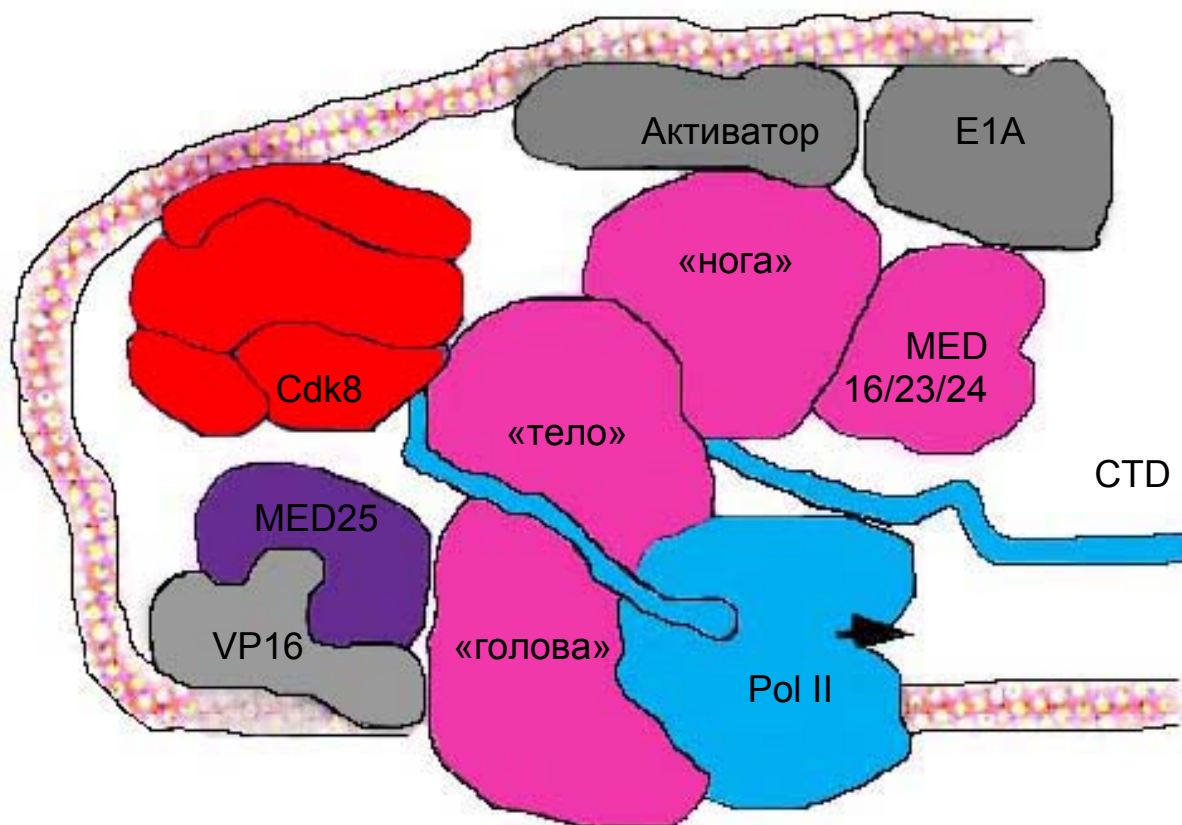


Рис. 14 Медиаторный комплекс

Более чем 20 белков, входящих в медиатор (обозначены розовым цветом), делятся на модули «головой» (head), «тела» (body) и «ноги» (leg). До сих пор обсуждается выделение четвертого модуля (на рисунке обозначен красным цветом), в состав которого входит пара из циклина и фермента – циклин-зависимой киназы cdk8 (о циклинах см. Приложение 8). Эта пара действует на С-концевой домен главной субъединицы РНК-полимеразы (обозначен как CTD) и при определенных условиях инактивирует его до инициации транскрипции.

Модуль «головой» прямо взаимодействует с РНК-полимеразой II и влияет на ее активность. Модуль «тела» соединяет части медиатора и С-концевой домен РНК-полимеразы II. Модуль «ноги» содержит белки, взаимодействующие с белками - активаторами или ингибиторами транскрипции.

Белки медиатора способны изменять свою активность под действием различных химических сигналов. В качестве примера на рисунке представлены воздействия на медиатор белка простого герпеса VP16 (влияет на компоненты «головой» медиатора) и аденовирусный белок E1A (изменяет функционирование белков четвертого модуля). Воздействия белков этих вирусов изменяют активность РНК-полимеразы, что приводит к изменению синтеза белков, кодируемых транскрибируемым геном.

## **2.3. Регуляция при инициации транскрипции у эукариот**

### **2.3.1. Множественность РНК-полимераз**

Эукариоты имеют несколько РНК-полимераз (см. [**Ошибка! Источник ссылки не найден.**]). Для инициации транскрипции каждая из этих РНК-полимераз должна присоединиться к соответствующим промоторным последовательностям на ДНК.

В отличие от прокариот, которые при поиске различных промоторов используют разные  $\sigma$ -факторы одной и той же РНК-полимеразы, более сложно устроенные эукариоты прибегают к другой стратегии – специализации молекул РНК-полимераз (не менее 3х форм РНК-полимераз в ядре + РНК-полимеразы митохондрий и хлоропластов). Работу этих разных РНК-полимераз можно регулировать независимо, тем самым независимо регулируя скорость образования тех или иных продуктов (в том числе – белков в случае РНК-полимеразы II).

### **2.3.2. Воздействие на общие и специфические факторы инициации транскрипции и варьирование их комбинаций в инициаторном комплексе**

Эукариоты имеют возможность изменять скорость инициации транскрипции с помощью белковых факторов, участвующих в этом процессе. Так как для эффективного присоединения РНК-полимеразы к ДНК необходимо образование транскрипционного комплекса из многих белковых факторов, то регуляция возможна:

- за счет изменения активности каждого фактора по отдельности (пути такой регуляции указаны на рис. 13);
- за счет создания уникальных сочетаний белковых факторов (как общих, так и специфических) в условиях, требующих изменения интенсивности синтеза или спектра образуемых белков.

Пример того, как добавление специфического металл-активируемого транскрипционного фактора способствует “включению” синтеза белков, защищающих от тяжелых металлов, приведен в Приложении 5.

### **2.3.3. Изменение структуры хроматина – метилирование ДНК, регуляция гистонами и другими белками**

“Выключенное” состояние, типичное для большинства эукариотических генов, может достигаться особой компактной укладкой хроматина (гетерохроматином), которая образуется в результате взаимодействия ДНК со специфическими хромосомными белками.

В ряде случаев образование гетерохроматина объясняют метилированием ДНК. Метилированные участки ДНК транскрибируются менее активно, чем неметилированные. Напротив, деметилирование ДНК может сопровождаться активацией гена (см. Приложение 6). Наиболее часто метилируются цитозиновые нуклеотиды, особенно – стоящие в цепи ДНК сразу после гуаниновых. За поддержание метилированного состояния отвечает комплекс ферментов ДНК-метилтрансфераз (ДНК-метилаз), а также хроматиновых белков.

Без метилирования невозможно нормальное развитие млекопитающих. Метилированными оказываются прицентромерный гетерохроматин, инактивированная X-хромосома млекопитающих, различные повторы и мобильные элементы. Эмбрионы мыши с генетически неактивной ДНК-метилтрансферазой останавливаются в развитии на очень ранних стадиях и погибают. Метилируются также регуляторные области генов при их инактивации, причем у растений в ряде случаев активное/инактивированное состояние стабильно наследуется в ряду поколений, давая так называемые **эпигенетические аллели**. С другой стороны, метилирование опасно для организма: цитозин образует метилцитозин, который при самопроизвольном дезаминировании превращается в тимин, то есть место Ц занимает Т, что при репликации приведет к замене Г≡Ц-пары на А=Т-пару и, следовательно, изменению кодирующей последовательности нуклеотидов в гене. В итоге функции белка, кодируемого этим геном, могут быть нарушены. Обычный, неметилированный цитозин не опасен, так как при дезаминировании превращается в урацил (Ц в У), после чего специальные ферменты репарации устраняют урацил из ДНК, заменяя его снова цитозином.

Кроме метилирования, “выключенное” состояние генов может также достигаться посредством укладки ДНК в нуклеосомные структуры в области их промоторов. Нуклеосомы закрывают сайты на ДНК, предназначенные для связывания нужных для транскрипции белков – ферментов-полимераз, транскрипционных факторов (рис. 15). Более того, нуклеосомные цепочки могут укладываться в пространстве таким образом, что произойдет репрессия транскрипции очень протяженных участков хромосом. Известны также специальные белки-репрессоры, препятствующие транскрипции через воздействие на гистоны.

У эукариот имеется также небольшое количество генов, которые должны быть постоянно “включены”. В этом случае встает задача защиты промоторов таких генов от образования нуклеосомных структур. Это достигается следующими путями:

- факторы транскрипции успевают присоединиться к реплицируемой ДНК в зоне промотора до присоединения гистонов (то есть до сборки нуклеосом);

- факторы транскрипции или специализированные белки связываются с промоторами, содержащими нуклеосомы, вызывая дестабилизацию и устранение последних.



“Выключенные” эукариотические гены должны “включаться” – в определенных условиях, в нужное время, на конкретной стадии развития организма, в определенной ткани. Для “включения” необходимо изменить пространственную укладку ДНК, то есть:

- дестабилизировать нуклеосомный кор;
- передвинуть мешающие нуклеосомы;
- изменить взаимосвязь отдельных нуклеосом в фибриллах и петлях.

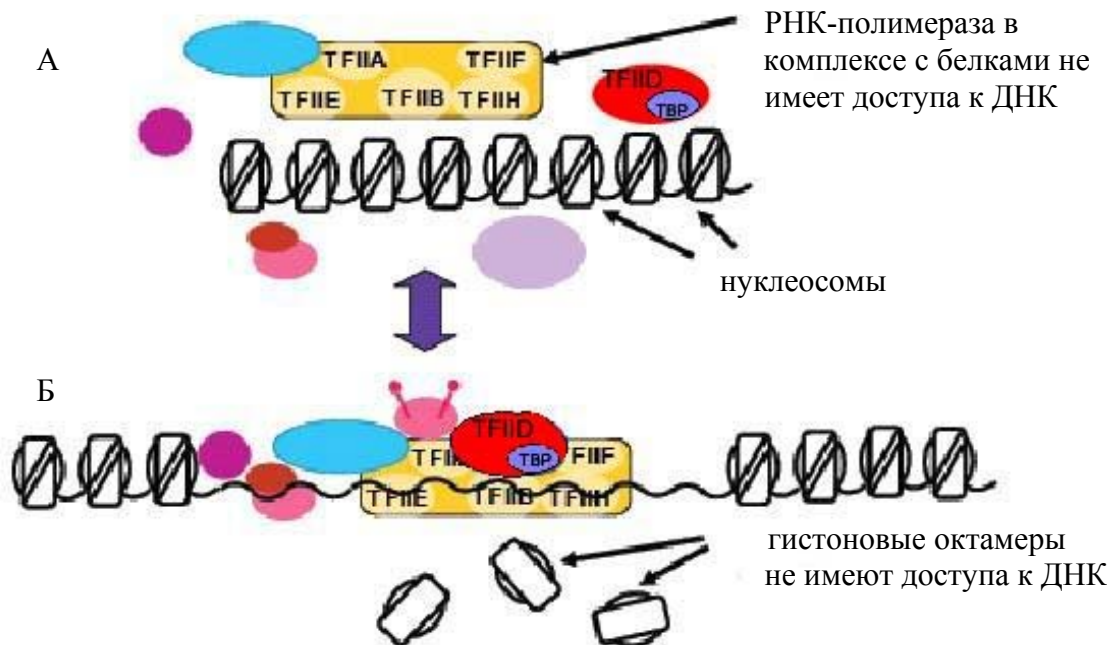


Рис. 15 Конкуренция между гистоновыми белками и транскрипционными факторами за доступ к ДНК

А – ген “выключен”, так как нуклеосомная укладка ДНК в области промотора препятствует сборке на нем транскрипционного комплекса.

Б – нуклеосомная укладка устранена, транскрипционный комплекс в районе промотора собран и начал транскрипцию.

Это возможно лишь после ослабления связи положительно заряженных гистонов с отрицательно заряженной ДНК. Положительный заряд гистонов и их сродство к ДНК уменьшаются при ацетилировании (оно нейтрализует положительный заряд лизина, рис. 16) или фосфорилировании (придает отрицательный заряд серину) аминокислот в области их N-конца. Фосфорилирование гистонов происходит, например, как реакция на действие белковых гормонов, а после прекращения их действия гистоны дефосфорилируются и, как следствие, восстанавливается нуклеосомная укладка.

Ацетилирование N-концов гистонов на промоторах активируемых генов осуществляют **ацетилазы гистонов** (НАТ – histone acetyltransferase). Их делят на две основные группы – НАТ А и НАТ В. НАТ В ацетилюет вновь синтезированные гистоны (находящиеся в свободном состоянии) и обеспечивает их направленную доставку к реплицируемой ДНК. После

связывания гистонов с ДНК характер их ацетилирования изменяется под действием НАТ А.

Обратный процесс – удаление остатков уксусной кислоты с N-концевой области гистонов – осуществляют **деацетилазы гистонов** (histone deacetylase – Hd).

Взаимодействие специфических регуляторных транскрипционных факторов с эффекторами-коактиваторами заставляет ацетилазу ацетилировать гистоны и перестраивать хроматин, а взаимодействие их с корепрессорами заставляет деацетилазу снимать ацетилирование и возвращать хроматин в репрессированное состояние. Компоненты этих систем распознают конкретные промоторные последовательности ДНК и друг друга.

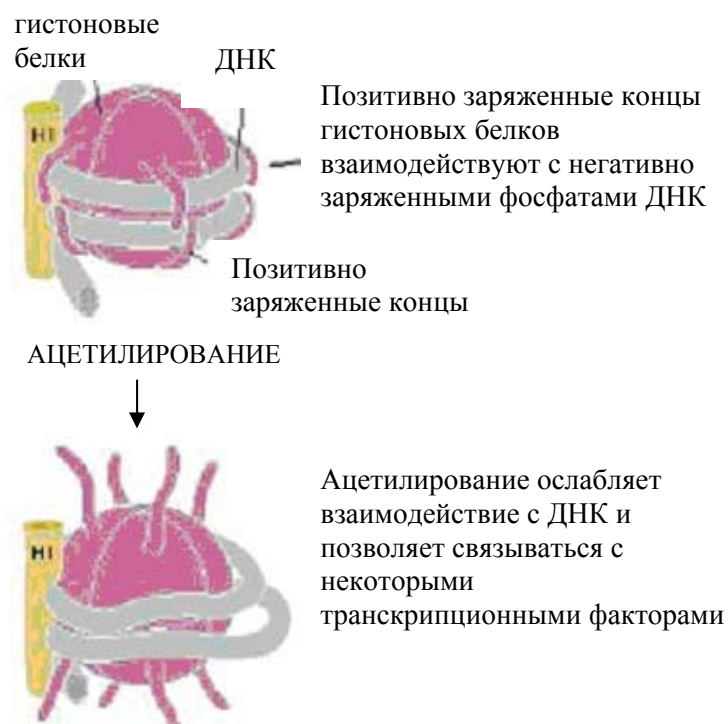


Рис. 16 Ацетилирование гистонов

Кроме ацетилирования и фосфорилирования, возможны другие химические модификации гистонов, влияющие на их взаимодействие с ДНК и отражающиеся на матричной активности ДНК при транскрипции. Примеры таких модификаций схематично показаны на рис. 17. Совокупность ковалентных модификаций гистонов, неодинаковая в разных районах генома (например, в гетерохроматине и активно работающих генах) представляет собой так называемый **гистоновый код**.

У эукариот разного систематического положения имеются специальные комплексы из многих белков, обеспечивающие дестабилизацию нуклеосомного кода и перемещение нуклеосом по ДНК с затратой энергии АТФ. Эти комплексы называют **“switch”** (**“переключатель”**) и **“imitation switch”** (**“псевдопереключатель”**). “Switch”-комплекс (у дрожжей обозначаемый как Swi/Snf, см. рис. 18), нарушает структуру кода нуклеосомы, “imitation switch”

меняет расположение нуклеосом на ДНК. Белковые комплексы действуют в четко обозначенных местах хроматина, реагируя на гистоновый код. В итоге хроматин меняет структуру: участки генома становятся доступными для транскрипционных факторов либо, напротив, переходят в компактное неактивное состояние.

Ацетилазы, деацетилазы и комплексы, изменяющих структуру нуклеосом, действуют не на все промоторы, а лишь на некоторые. Такая избирательность достигается их точной доставкой в нужные места хроматина с помощью определенных белков, в частности – с помощью самой РНК-полимеразы II, узнающей нужные последовательности на ДНК.

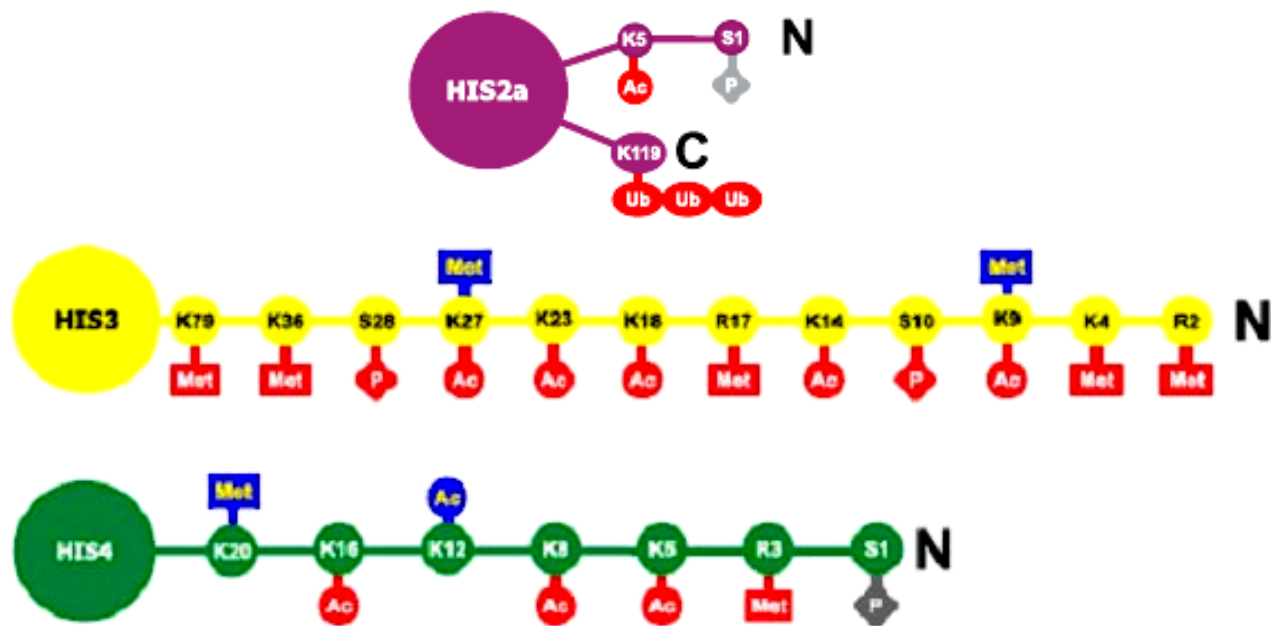


Рис. 17 Варианты ковалентных модификаций гистонов

Гистоны обозначены как HIS с соответствующим номером по классификации. Подлежащие модификациям аминокислоты в N-концевых районах гистонов обозначены однобуквенным кодом и номером, соответствующим их положению в полипептидной цепи, начиная с N-конца.

Ac – ацетилирование, Met – метилирование, P – фосфорилирование, Ub – убиквитинилирование (о белке убиквитине см. главу 4 и Приложение 9), АДФ – АДФ-рибозилирование.

Метилированы могут быть лизин и аргинин, ацетируется лизин, фосфорилируется серин, АДФ-рибозилируется глутаминовая кислота. Синим цветом обозначены модификации, характерные для репрессированного хроматина, красным – для активного. Серым цветом отмечены модификации, связанные с конденсацией хромосом при митозе либо гаметогенезе.

### 2.3.4. Роль энхансеров и сайленсеров в регуляции сборки инициаторного комплекса

Если у прокариот несколько разных цистронов регулируются одной регуляторной зоной (**скоординированная регуляция**), то у эукариот, наоборот, один структурный ген регулируется сочетанным влиянием большого

количества генов-регуляторов (**комбинационная регуляция**), в том числе – энхансеров и сайленсеров.

Предполагаемый механизм влияния энхансера на транскрипцию, известный как “петлевая модель”, показан на рис. 17. На основе данных рентгеноструктурного анализа подробную динамичную картину действия комплекса инициации транскрипции с участием РНК-полимеразы II, факторов транскрипции и медиатора удалось построить исследовательской группе Р. Корнберга. За эти исследования Р. Корнберг был удостоен Нобелевской премии (2006 г.).

Под действием очень разнообразных и многочисленных специфических транскрипционных факторов-активаторов, взаимодействующих с энхансерами, базальный уровень транскрипции сильно возрастает. В разных средовых условиях и в разных типах клеток будут работать разные активаторы. Например, клетки печени содержат полный набор активаторов, нужных для усиления транскрипции гена альбумина. Эти факторы связываются со всеми необходимыми энхансерами, помогая осуществить эффективную транскрипцию гена, кодирующего альбумин. В клетках мозга некоторые из активаторов отсутствуют, что приводит к значительному снижению уровня транскрипции альбуминового гена. В итоге концентрация альбумина в мозге очень мала, а в печени – велика.

#### **2.4. Регуляция при элонгации и терминции транскрипции: роль белковых факторов**

Как и на стадии инициации, на дальнейших стадиях транскрипции требуются вспомогательные белки – факторы элонгации и терминции. Аналогично факторам инициации, эти белки бывают общие и специальные (регуляторные). Так, общие факторы элонгации обеспечивают эффективную транскрипцию любых генов (для РНК-полимеразы II – любых генов, кодирующих белки). Специальные факторы нужны для элонгации транскрипции только отдельных генов или генных семейств. Находясь в активном состоянии, они препятствуют задержке элонгации, обеспечивают правильную ориентацию 3'-конца строящейся РНК в активном центре РНК-полимеразы, помогают РНК-полимеразе проходить через препятствия в виде нуклеопротеиновых комплексов или определенных специфических последовательностей ДНК.

При элонгации транскрипции С-концевой домен РНК полимеразы II должен быть постоянно фосфорилирован. Правильное фосфорилирование важно и для терминции транскрипции, и для последующего процессинга пре-мРНК. За поддержание фосфорилированного состояния в процессе элонгации отвечает фактор **pTEFb** (**positive transcription elongation factor b**), состоящий из циклина Т и циклинзависимой киназы cdk9. Любые воздействия, приводящие к

инактивации этого фактора, “выключат” транскрипцию определенного набора генов.

Кроме рTEFb, фактором элонгации РНК полимеразы II является белок элонгин (S II), состоящий из компонентов А, В и С. Негативный регулятор этого фактора – VHL, связывает компоненты В и С, не давая им соединиться с А. Это приводит к прекращению элонгации.

В процессе элонгации РНК полимеразы может встретиться повреждение ДНК, участки, вызывающие паузы и попадание в “арестованное” состояние. Если РНК-полимеразе встречается поврежденный участок ДНК, то с таким остановленным комплексом связываются белки CSA и CSB. Эти белки опосредуют посадку белков – факторов репарации на повреждение, а также играют важную роль для восстановления транскрипции после репарации. Мутации CSA и CSB вызывают синдром Кокейна.

За супрессию пауз ДНК-полимеразы II отвечает TFIIIF, а за выход из “арестованного” состояния – TFIIIS.

Терминация транскрипции у эукариот еще мало изучена, однако уже известны некоторые эукариотические факторы терминации, помогающие закончить транскрипцию разным типам РНК-полимераз. Так, у дрозофилы белок N-TEF индуцирует освобождение РНК-транскриптов, синтезированных РНК-полимеразой II. У дрожжей белок Reb-1 связывается с природными терминаторами транскрипции на ДНК, обеспечивая как остановку элонгирующей РНК-полимеразы I на этих терминаторах, так и последующее освобождение РНК из транскрипционных комплексов. У мышей фактор TTF-1, связывающийся с ДНК, нужен для правильной терминации транскрипции РНК-полимеразой I, а белок LA, специфически взаимодействующий с РНК обеспечивает освобождение РНК при работе РНК-полимеразы III. Несомненно, что негативное или позитивное воздействие на белковые факторы терминации транскрипции РНК-полимеразы II способно внести свой вклад в регуляцию всего процесса синтеза белка.

## **2.5 Принципы регуляции транскрипции сигнальными веществами**

Химические коммуникационные агенты – сигнальные вещества – переносят информацию между клетками внутри организма или между отдельными организмами. Примерами сигнальных веществ являются гормоны и феромоны животных, ростовые вещества растений, цитокины (см. Приложение 8) и др.

Сигнальные вещества (лиганды) могут быть как индукторами, так и репрессорами элонгации транскрипции, но оказывают влияние на транскрипцию только после взаимодействия с соответствующими белками-рецепторами (примеры см. в Приложении 4). Поэтому специфичность регулирующего действия конкретного сигнального вещества задается:

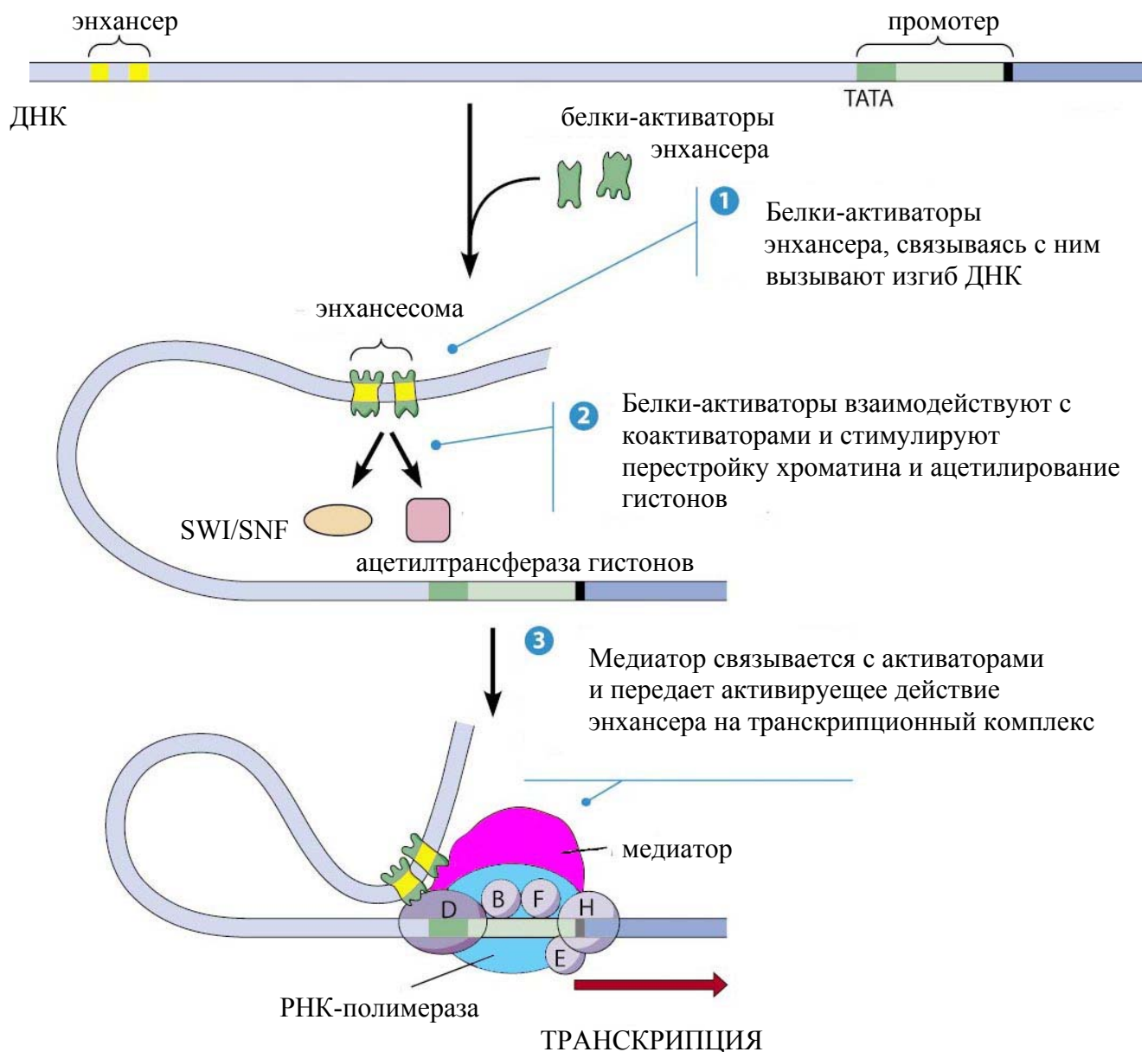


Рис. 18 “Петлевая модель” действия энхансера

а) природой самого сигнального вещества;

б) присутствием в клетке белка, способного воспринять сигнал, то есть наличием рецептора данного сигнального вещества.

Все сигнальные молекулы по физико-химической природе подразделяются на гидрофильные (водорастворимые) и гидрофобные (жирорастворимые). Большинство сигнальных веществ, являющихся по своей химической природе пептидами, белками, а также производными аминокислот, гидрофильны. Они не проникают через плазматическую мембрану внутрь клетки из-за наличия в ней слоя липидов. Рецепторы для таких сигнальных веществ расположены в клеточной мембране. Присоединившись к рецептору, гидрофильное сигнальное вещество вызывает в рецепторе такие изменения, которые приводят к образованию определенных низкомолекулярных веществ (например, цАМФ) или фосфорилированию определенных белков уже внутри

клетки. Низкомолекулярные вещества, называемые **вторичными посредниками** (или **вторичными мессенджерами**), или фосфорилированные белки своим появлением запускают целую серию биохимических реакций, в итоге приводящую к изменению метаболизма клетки. Примеры и пути действия водорастворимых сигнальных веществ – лигандов приведены в Приложении 4.

Жирорастворимые молекулы (например, стероидные гормоны) свободно проникают через клеточную мембрану и связываются с внутриклеточными рецепторами. Это также вызывает сложный каскад реакций. Механизм действия и эффекты стероидов представлены на рис. 19, примеры транскрипционных факторов – рецепторов стероидных гормонов – в Приложении 4.

## 2.6. Роль процессинга мРНК, ее транспорта и стабильности для регуляции синтеза белков

Эукариоты широко используют возможность регулировать синтез белка на посттранскрипционном уровне. Возникшая при транскрипции пре-мРНК у эукариот претерпевает **процессинг** (подробно о нем – см. [**Ошибка! Источник ссылки не найден.**]). Регулировать образование зрелых мРНК можно через изменение активности ферментов и вспомогательных белков, нужных для экзирования, образования полиА-хвоста, обычного и альтернативного сплайсинга.

**Альтернативный сплайсинг** позволяет получить различные белковые продукты с одного гена благодаря “сшиванию” разных наборов экзонов и интронов при построении разных мРНК. Большое значение имеют присущие эукариотическим клеткам механизмы управления альтернативным сплайсингом. Характер сплайсинга регулируется белками, способными связываться с пре-мРНК в районе интронов или на границе “экзон-интрон”. Присоединение таких регуляторных белков может блокировать удаление одних интронов, одновременно активируя вырезание других. Например, с гена кальцитонина может синтезироваться как сам гормон кальцитонин, так и пептид другого строения. В С-клетках щитовидной железы активен один набор регуляторов сплайсинга, поэтому в результате сплайсинга объединяются экзоны 1–4 пре-мРНК, которые кодируют кальцитонин. В чувствительных нейронах работает другой набор регуляторов сплайсинга, поэтому образуется альтернативная мРНК, в которой отсутствует экзон 4, но прибавляются экзоны 5 и 6. В результате вместо кальцитонина синтезируется иной по строению пептид.

На конечный результат – синтез белка – влияет также скорость транспорта РНК из ядра в цитоплазму, время “полужизни” мРНК, степень ее стабильности в цитоплазме, скорость поступления на рибосомы и эффективность связывания с ними.

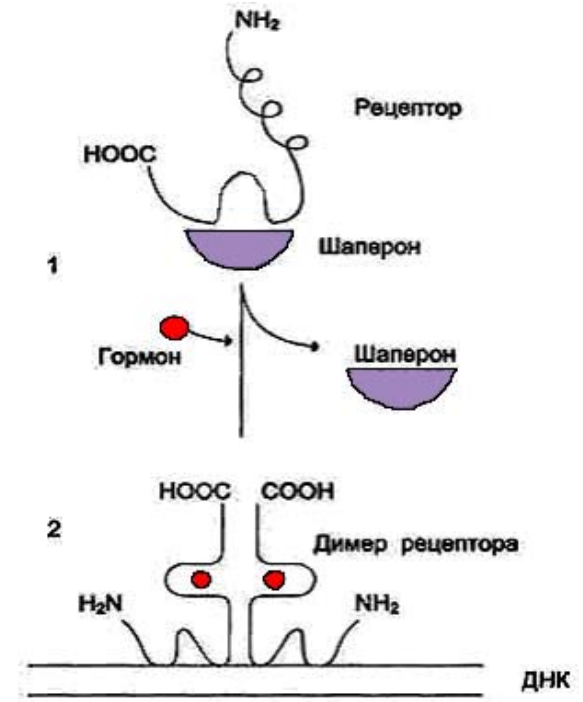
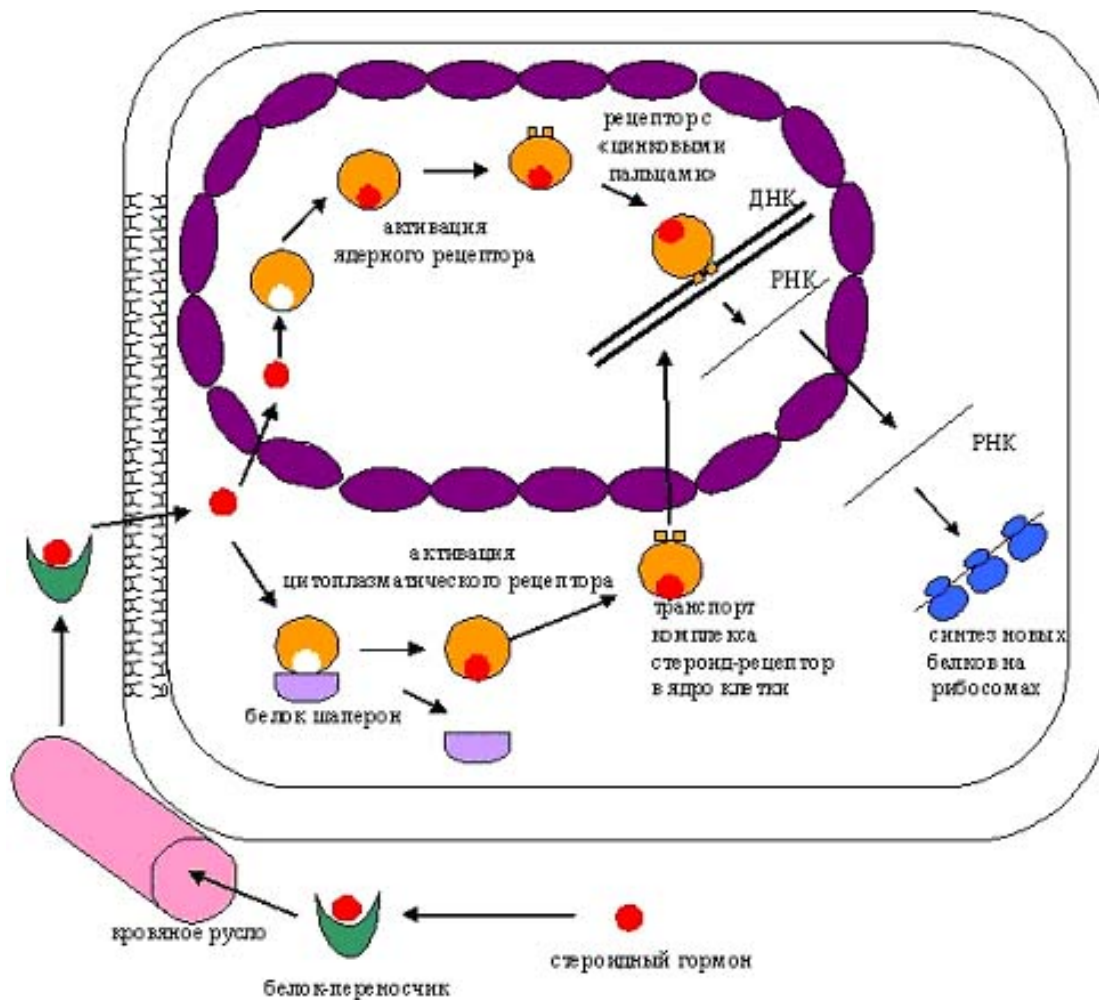


Рис. 19 Механизм действия стероидных гормонов на синтез белков в клетке

- а) Путь стероидного гормона от места синтеза в ядро клетки-мишени
- б) Механизм активации транскрипционного фактора - рецептора

Стероидный гормон в комплексе с белком-переносчиком по кровяному руслу доходит до клетки-мишени и, будучи гидрофобным, свободно пересекает липидный слой клеточной мембраны. Внутри клетки гормон распознается белком – цитоплазматическим рецептором и связывается с ним. В отсутствие гормона белок-рецептор находится в комплексе с белком-шапероном, поэтому не может связаться с ДНК (б, 1). Гормон «сбрасывает» шаперон с рецептора и делает его способным к активации (б, 2). При поступлении гормонального сигнала рецептор освобождается от шаперона, две молекулы рецептора объединяются. Получившийся димер присоединяется к ДНК и вызывает активацию транскрипции.



”Временем полужизни” называют время, в течение которого популяция молекул данного типа мРНК уменьшается наполовину. Известно, что время существования мРНК увеличивается с удлинением ее полиА-хвоста. Время полужизни большинства мРНК дрожжей составляет 10-20 мин, хотя для некоторых оно уменьшается до 1 мин, а для других возрастает до 35 мин. У млекопитающих время полужизни мРНК обычно составляет несколько часов.

Клетка имеет возможность резко снизить время полужизни нежелательных мРНК (например, вирусных): с помощью особых малых РНК и специальных белковых комплексов такие мРНК обнаруживаются и расщепляются. Этот механизм носит название **РНК-интерференции**, или **посттранскрипционного геномного сайленсинга** (см. главу 5).

Скорость освобождения РНК от сопровождающих белков и поступления на рибосомы регулируется белками, окружающими ее в инферосомах (РНК-комплексах). В цитоплазме мРНК могут определенное время храниться в виде нетранслируемых мРНК-комплексов.

Некоторые из белков этих комплексов участвуют в регуляции матричной активности мРНК. Например, если в РНК-комплексе на одну молекулу мРНК приходится 5 – 10 молекул белка р50, трансляция этой РНК ингибируется, если 1 – 4 молекулы – активируется. Предполагают, что при более высоком содержании белка его С-концевые части освобождаются от контактов с РНК и начинают взаимодействовать между собой. Это приводит к мультимеризации белка и переходу мРНК в конденсированное (нетранслируемое) состояние.

## 2.7. Вопросы для самоконтроля по материалу главы 2

1. Раскройте понятия: цис-элементы; транс-действующие факторы; энхансеры; сайленсеры; инсуляторы; транскрипционные факторы; активаторы и репрессоры; процессинг мРНК
2. Опишите строение медиатора.
3. Какова роль ковалентных модификаций гистонов в регуляции матричной активности ДНК?
4. Перечислите принципы регуляции транскрипции сигнальными веществами.
5. Чем отличаются принципы и пути регуляции транскрипции у эукариот по сравнению с прокариотами. Какие преимущества дают эукариотам новые возможности регуляции

### 3. Регуляция трансляции у прокариот и эукариот

#### 3.1 Регуляция на стадии инициации трансляции

##### 3.1.1. Инициация трансляции как ключевой этап осуществления регуляции трансляции в целом

Механизмы регуляции на стадии трансляции менее экономичны, зато отличаются быстротой реагирования на изменения потребности клетки в данном белке.

Регуляторные механизмы трансляции направлены на то, чтобы:

а) разрешить или не разрешить синтез белка по мРНК. Специальные механизмы “не разрешают” всем или только некоторым уже построенным мРНК являться матрицами при синтезе белковых молекул. Такие мРНК в неактивной форме могут храниться “про запас”.

б) если синтез разрешен, задать скорость (эффективность) построения белковой молекулы. Скорость синтеза белка данного вида можно изменить, изменив число рибосом, прошедших по данной мРНК: чем больше рибосом – тем больше молекул белка будет синтезировано.

Как при транскрипции, в большинстве случаев регуляция трансляции идет через регуляцию ее инициации.

Для этого существуют 3 основных способа:

1. **Дискриминация мРНК** (*discriminate* – уметь отличать, распознавать; имеется как у про-, так и у эукариот). Рибосомы либо сами (у прокариот), либо с помощью белковых факторов инициации (у эукариот) “распознают”, с каких мРНК им строить много копий белка, а с каких – мало. Это способ позитивной регуляции на основе сродства мРНК к рибосомам и факторам инициации трансляции.

2. **Трансляционная репрессия** (как у про-, так и у эукариот) и **маскирование мРНК** (только у эукариот) – негативная регуляция либо с помощью белков, либо с помощью особых микроРНК, находящихся в составе белковых комплексов. В первом случае белок-репрессор связывается с определенным участком на мРНК, тем самым, мешая присоединению к мРНК рибосомы. Вещество-эффектор, появляясь в среде, снимает белок-репрессор с мРНК и разблокирует синтез белка. Во втором случае присоединение к мРНК антисмысловой микроРНК также вызывает трансляционную реPRESSION, причины которой в настоящее время продолжают изучаться.

Способами 1 и 2 трансляция каждой мРНК может контролироваться независимо от других мРНК.

3. **Тотальная регуляция** трансляции всей совокупности мРНК клетки (только у эукариот). Она осуществляется через изменение активности факторов инициации трансляции (обычно – через инактивацию фактора eIF2).

### 3.1.2. Дискриминация мРНК (регуляция количеством рибосом)

Разные мРНК могут сильно отличаться по скорости и частоте “нанизывания” на них рибосом – то есть при инициации трансляции. Одни мРНК – **сильные** – легко связываются с рибосомой, в единицу времени на них успевает “нанизаться” много рибосом, поэтому и белка синтезируется много. На рис. 20 сильная мРНК показана внизу. На другие мРНК – **слабые** – рибосомы нанизываются значительно хуже (на рис. 20 вверху), поэтому и продукция белка невысока. Структурные белки мембран, рибосомные белки, факторы элонгации, белки оболочки вирусов и другие белки, требующиеся в больших количествах кодируются сильными мРНК, а многие специализированные ферменты и регуляторные белки – слабыми мРНК.

Сильной или слабой окажется мРНК – зависит от строения ее 5'-концевых иницирующих и рибосомсвязывающих участков. У **прокариот** дискриминация идет из-за разного сродства рибосом к этим участкам, а у **эукариот** – из-за разного сродства к этим же участкам белков – факторов инициации трансляции.

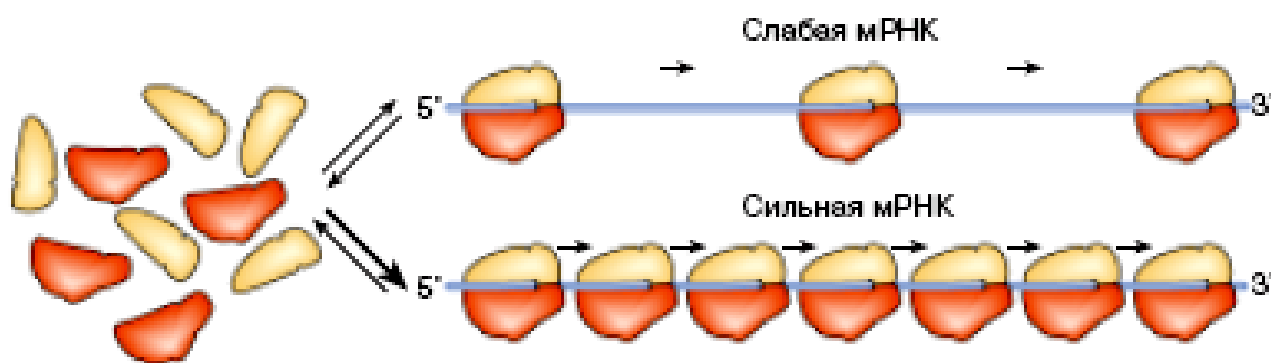


Рис. 20 Сборка рибосом из отдельных субъединиц на сильной и слабой мРНК  
На схеме по слабой мРНК движется всего 3 рибосомы, тогда как по сильной – 7 рибосом

Если молекула синтезируемого белка состоит из нескольких полипептидов-субъединиц, то сила мРНК или ее отдельных цистронов, кодирующих эти субъединицы, координирована с пропорцией субъединиц в структуре. Например, мембранный комплекс протонной АТФазы бактерий построен из субъединиц типов *a*, *b*, *c* в соотношении 1:2:10 (то есть на 1 субъединицу типа *a* приходится 2 субъединицы типа *b* и 10 – типа *c*). Соответственно субъединица типа *c* кодируется очень сильным цистроном мРНК, субъединица *a* – слабым, а субъединица *b* – средней силы.

### 3.1.3. Трансляционная репрессия

Механизмы трансляционной репрессии обеспечивают пути модуляции скоростей инициации трансляции в широких пределах либо в зависимости от внешних сигналов (эффекторов), либо по типу обратной связи. Трансляционная

репрессия используется для тонкой регуляции белкового синтеза как у про-, так и у эукариот.

Трансляционная репрессия может вызываться:

– специальными белками-репрессорами (рис. 21),  
– особыми комплексами, в состав которых входят микроРНК – комплексы **miRISC**.

Участие **микроРНК** в трансляционной репрессии и предполагаемые механизмы действия miRISC на процесс трансляции рассматриваются в главе V.

Трансляционная репрессия с помощью белков заключается в том, что белок-репрессор, связываясь с рибосомсвязывающим участком на 5'-конце мРНК, мешает рибосомной субъединице присоединиться к мРНК.

Репрессором может быть:

1) сам синтезируемый по данной мРНК белок. Например, если в бактериальной клетке возникает избыток фермента треонил-тРНК-систетазы, этот фермент становится репрессором, блокируя свой собственный синтез.

2) специальный белок, на данной мРНК не закодированный. Способность такого белка связываться с определенными мРНК зависит от присутствия того или иного низкомолекулярного компонента – эффектора. Например, у животных синтез железозапасающего белка ферритина заблокирован белком-репрессором IRP и разблокируется лишь после взаимодействия репрессора с эффектором – ионами железа.

Если железа в среде мало, то ферритин – белок для его связывания – не нужен. В этих условиях **репрессор IRP** (iron-regulatory protein) присоединен на мРНК, кодирующей ферритин, к специальному **регуляторному элементу IRE** (iron-responsive element). Если в среде появляется железо, оно связывается с IRP и в 50 – 100 раз понижает сродство репрессора к мРНК. В результате мРНК разблокируется, и с нее начинается синтез ферритина. Он идет до тех пор, пока не иссякнет запас железа в среде. **ВНИМАНИЕ!** Процесс очень похож на регуляцию синтеза металлотioneинов, но синтез ферритина регулируется белком, воздействующим на мРНК (на стадии трансляции), а синтез металлотioneинов – на ДНК (на стадии транскрипции).

### 3.1.4. Маскирование мРНК у эукариот

При маскировании **маскирующие белки-репрессоры** присоединяются не к 5'-концевым областям мРНК (как в случае трансляционной репрессии), а к ее 3'-концевым областям. Присоединение белка делает мРНК недоступной не только для инициации трансляции, но и для других процессов ее изменения.

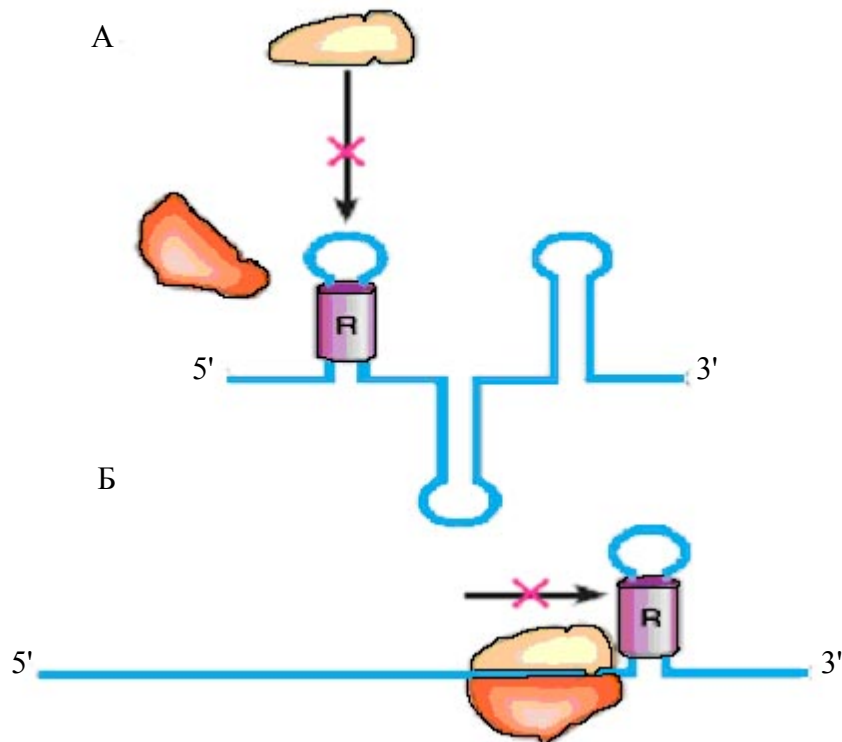


Рис. 21 Трансляционная репрессия с участием белков

Белок-репрессор R на стадии “А” связывается с имеющим структуру шпильки рибосомсвязывающим участком на 5'-конце мРНК. На стадии “Б” рибосома останавливается на образованном белком-репрессором барьере и не доходит к месту инициации транскрипции.

Механизм маскирования в настоящее время до конца не известен. Доказано, что маскирующий белок связывается со специальным участком (**сегментом маскирования**) в нетранслируемой 3'-концевой области мРНК (на рис. 22 обозначена как 3-UTR (3-UnTranslated Region)). Это защищает мРНК от расщепления 3'-экзонуклеазами, делает невозможным появление у мРНК полиА-хвоста и блокирует инициацию трансляции на 5'-конце мРНК.

Маскирование обеспечивает эукариотам возможность накопить мРНК “впрок”. Например, при образовании яйцеклетки происходит запасание некоторых материнских мРНК в маскированной форме. В ответ на химические вещества, вносимые в яйцеклетку при оплодотворении, часть запасенных в яйцеклетке маскированных мРНК демаскируется (становится активна). Именно по этим демаскированным мРНК строятся белки на самых ранних стадиях эмбриогенеза.

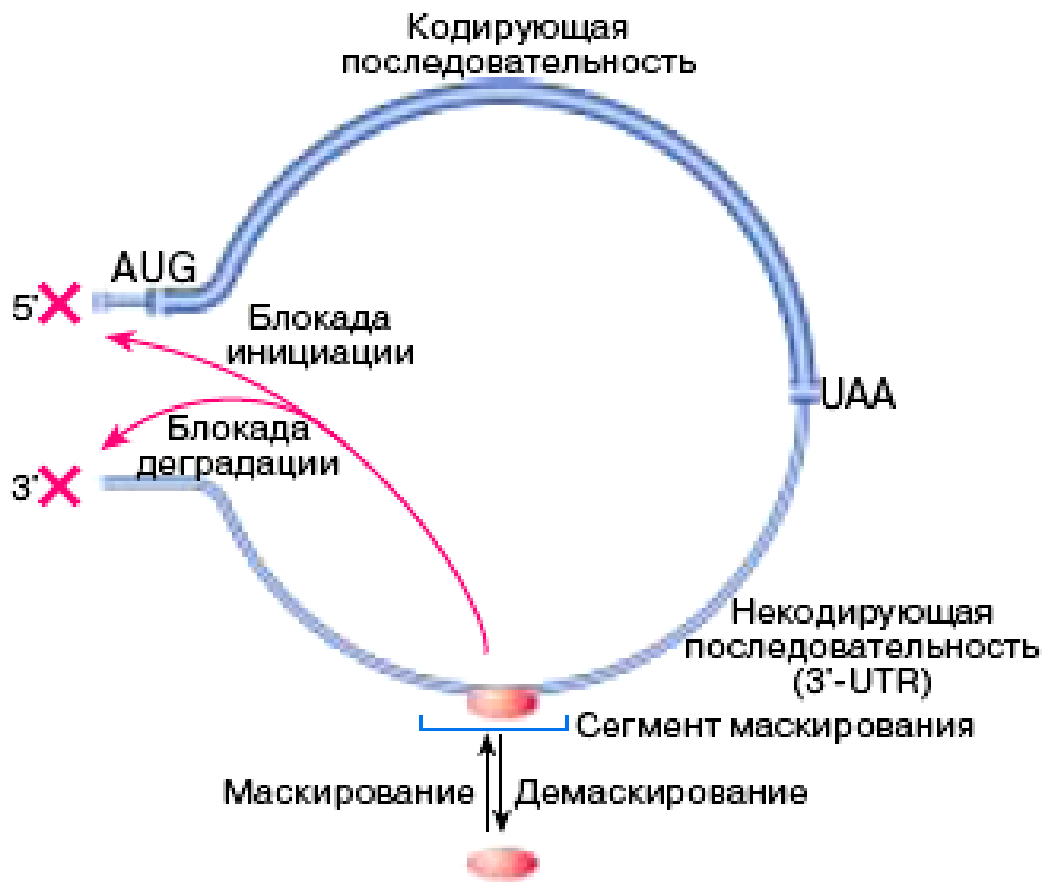


Рис. 22 Маскирование мРНК у эукариот  
Маскирующий белок показан как овальное тельцо

### 3.1.5. Регуляция через белковые факторы трансляции. Тотальная регуляция трансляции у эукариот

Чаще всего тотальная регуляция осуществляется через **фактор инициации трансляции eIF2**, активная форма которого нефосфорилирована. Без этого фактора невозможна инициация трансляции любых мРНК клетки. У животных и грибов в определенных условиях активируются специальные ферменты – особые киназы, которые фосфорилируют  $\alpha$ -субъединицу белка eIF2, инактивируя его. Механизм воздействия на eIF2 через киназу представлен на рис. 23.

Сигналами для активации киназ, фосфорилирующих eIF2, могут быть:

- тепловой шок и другие стрессорные воздействия, причем степень подавления белкового синтеза варьирует в зависимости от уровня стресса.
- недостаток аминокислот, железа, ростовых факторов;
- вирусные инфекции и др.

По такому же пути осуществляется контроль биосинтеза гемоглобина под действием гема. Трансляция глобиновой мРНК в бесклеточной системе биосинтеза белка из ретикулоцитов кроликов в отсутствие гема (окисленной

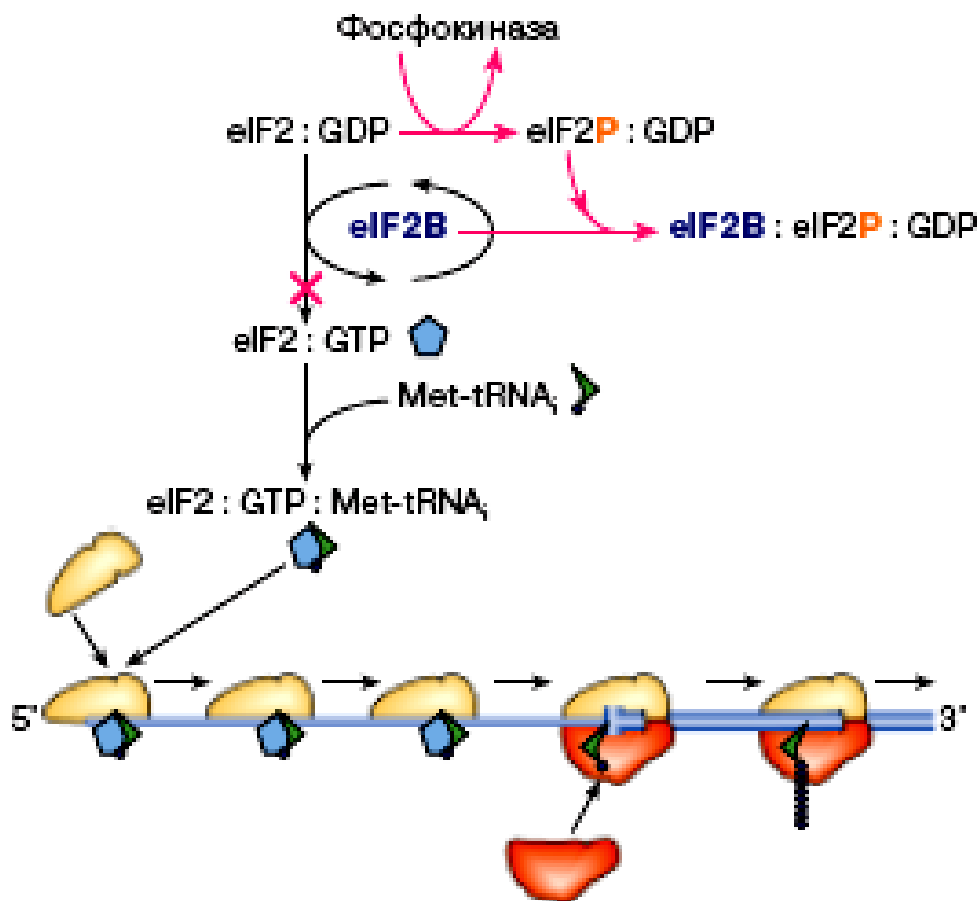


Рис. 23 Блокирование трансляции через фосфорилирование белкового фактора eIF2

Для инициации транскрипции необходимо образование комплекса [eIF2:ГТФ]. При дальнейшей сборке рибосомы на мРНК ГТФ этого комплекса гидролизует до ГДФ. Получившийся комплекс [eIF2:ГДФ] неактивен и не может принять участие в сборке на мРНК следующей рибосомы. Чтобы его регенерировать до активного [eIF2:ГТФ], необходим другой фактор - eIF2В.

В определенных средовых условиях особая протеинкиназа (фосфокиназа) переходит в активную форму. Активация этой киназы приводит к включению альтернативного пути, мешающего регенерации активной формы фактора eIF2. Под действием фосфокиназы фактор eIF2, не выходя из комплекса с ГДФ, переходит в фосфорилированное состояние (eIF2P). Образовавшийся комплекс [eIF2P:ГДФ] необратимо связывает eIF2В. Запасы eIF2В в клетке истощаются, а без него переход комплекса [eIF2:ГДФ] → [eIF2:ГТФ] становится невозможен. В итоге блокируется сборка всех рибосом и, как следствие, синтез любых белков.

формы гема) быстро останавливается. Отсутствие гема активируют киназу, фосфорилирующую фактор eIF2. Фосфорилированная форма eIF2P связывает eIF2В и в составе комплекса остается в связанном с рибосомами состоянии. В результате трансляция глобиновой мРНК останавливается. Гемин, находящийся в избытке в системе трансляции, взаимодействует с протеинкиназой и инактивирует ее. Протеинкиназа утрачивает способность фосфорилировать фактор eIF2 и, как следствие, блокирует трансляцию.

Еще один **белковый фактор**, через модификацию которого регулируется инициация трансляции – **eIF4E**. Он распознает кэп-структуры мРНК, благодаря

чему она присоединяется к 40S субъединице эукариотических рибосом. В отличие от eIF2, активность фактора eIF4E в фосфорилированном состоянии увеличивается. Определенные киназы, активируемые в ответ на внеклеточные воздействия гормонами, факторами роста, митогенами, цитокинами, а также в условиях повышенной нагрузки на сердце, фосфорилируют фактор eIF4E (у мышей остаток фосфорной кислоты присоединяется в основном к аминокислоте серину-209). Сродство фосфорилированного eIF4E к кЭП-участку мРНК возрастает, что ускоряет инициацию трансляции.

Имеется и другой способ регуляции активности фактора eIF4E – через небольшие белки-ингибиторы (молекулярная масса ~12 кДа) 4E-BP1, 4E-BP2 и 4E-BP3 (от англ. eIF4E-binding proteins 1, 2 and 3). Если эти белки находятся в фосфорилированном (активном) состоянии, то, связавшись с eIF4E, мешают ему связаться с другим фактором – eIF4G. Фосфорилирование полипептидных цепей ингибиторов происходит по действием киназ, активируемых в присутствии гормонов (инсулин, ангиотензин, гастрин), факторов роста (EGF, PDGF, NGF, IGF1, IGF2), цитокинов (IL-3, GM-CSF), митогенов (TPA) и во время аденовирусной инфекции. Например, ингибиторы 4E-BP1 и 4E-BP2 фосфорилируются протеинкиназой FRAP/mTOR – очень большого белка, принадлежащего к семейству киназ РИК, родственных киназам фосфатидилинозитола.

В то же время, в клетках некоторых типов тепловой шок и полиовирусная инфекция сопровождаются, наоборот, снижением уровней фосфорилирования ингибиторов.

### 3.2. Регуляция на стадии элонгации и терминации трансляции

Рибосома строит белковую цепь постепенно и неравномерно, с приостановками биосинтеза. Полагают, что соответствие пауз границам структурных доменов полипептидной цепи способствует их нормальному созреванию. На скорость элонгации трансляции действует пространственная укладка мРНК. Для свободного движения рибосомы мРНК должна частично развернуться. Отдельные участки мРНК, обладающие неодинаковой стабильностью, разворачиваются с разной скоростью, что приводит к различиям в скорости трансляции рибосомами разных участков мРНК. Также предполагается возможность изменения пространственной структуры мРНК под действием особых микроРНК и связанных с ними комплексов (см. главу 4).

Обнаружен ряд регуляторных белков, которые после взаимодействия с транслирующей рибосомой избирательно временно задерживают трансляцию в определенных местах мРНК. Например, у эукариот есть рибонуклеопротеиновая частица (**сигнал-распознающая частица SRP** – signal recognition particle), содержащая 7S-РНК, которая узнает особую N-концевую гидрофобную аминокислотную последовательность растущего полипептида, направляемого в ЭПР. Эта частица присоединяется к рибосомам и блокирует



трансляцию до тех пор, пока рибосома не вступит во взаимодействие с мембраной эндоплазматического ретикулума. Этот процесс помогает во внутриклеточной сортировке синтезированных белков, направляя нужные белки внутрь (то есть в люмен) ЭПР.

Полная терминация трансляции любого белка требует наличия белковых факторов терминации трансляции. Регуляция этого процесса возможна за счет воздействия на эти белковые факторы.

### **3.3. Регуляция экспрессии генов на посттрансляционном уровне – контроль “прибыли” и “убыли” функционально активных белковых молекул**

#### **3.3.1. “Срок службы” белков регулируется**

Будет ли синтезированный на рибосомах белок выполнять присущие ему функции, зависит от того,

- через какое время он разрушится;
- синтезируется ли он сразу в активной форме или должен будет сначала претерпеть посттрансляционные перестройки и “усовершенствования” (приобретение правильной пространственной структуры, ковалентные модификации, переход из зимогенной в функционально активную форму и др.);
- попадет ли он в нужное место клетки или организма, где должен функционировать.

В связи с этими процессами после синтеза на рибосомах белки претерпевают:

- частичный или полный протеолиз;
- гликозилирование;
- ацетилирование;
- метилирование;
- фосфорилирование;
- сульфатирование остатков тирозина;
- пренилирование (присоединение изопреновых звеньев);
- объединение нескольких протомеров – субъединиц;
- образование внутри- и межцепочечных S-S-связей;
- ковалентное присоединение кофакторов.

Время существования внутриклеточных белков может различаться на несколько порядков в зависимости от их функции и структуры. Около 1/3 вновь синтезированных полипептидных цепей сразу же после синтеза расщепляются до аминокислот ферментами протеиназами.

Обычно быстро распадаются регуляторные белки, что позволяет клетке быстро переключаться с одной функциональной программы на другую. Структурные и постоянно нужные клетке белки существуют гораздо дольше.

Время “полужизни” белковых молекул диктуется их структурой. Так, для цитоплазматических белков, начинающихся с арг, это время составляет 2мин, асп или лиз – 10мин, глу или илей – 30мин. Кроме того, многие полипептиды с короткой полужизнью содержат 1 или более регионов, богатых пролином (в однобуквннй системе обозначений аминокислот – P), глутаминовой кислотой (E), серином (S) и треонином (T), поэтому они называются PEST-регионами. Белки с длинной полужизнью лишены PEST-регионов и, видимо, поэтому менее доступны для разрушения протеиназами.

По времени полужизни белки животных принято делить на четыре группы:

1) очень быстро обновляющиеся белки (существуют не больше 1 - 2ч), например, регуляторный белок-супрессор опухолей p53, фермент орнитиндекарбоксилаза, циклины – регуляторы клеточного цикла;

2) быстро обновляющиеся белки (время полужизни – 1 – 24 ч): ферменты РНК-полимераза I, триптофан-2,3-диоксигеназа,  $\gamma$ -глутамилтрансфераза, тирозинаминотрансфераза, белок теплового шока Hsp70, рецептор инсулина, убиквитин;

3) медленно обновляющиеся белки (время полужизни 1 – 5 дней): тубулины, актины, белки протеасомы, ферменты каталаза, альдолаза, лактатдегидрогеназа, аргиназа, особые протеиназы катепсины;

4) очень медленно обновляющиеся белки (время полужизни > 5 дней): гемоглобин, гистоны в интерфазном ядре, миозин, эластин, коллаген, митохондриальная фумараза, цитохромы b и c.

Большинство белков избегает немедленного расщепления протеиназами из-за наличия на их N-конце сигнальной последовательности, позволяющей им взаимодействовать другими белками, предназначенными для защиты синтезируемого белка как на рибосоме, так и по дороге к месту назначения в клетке. Например, если на N-конце синтезируемого белка имеется определенная сигнальная последовательность из гидрофобных аминокислот, с ней взаимодействует комплекс белков сигнал-распознающей частицы SRP. Эти вспомогательные белки предохраняют растущий полипептид от расщепления протеиназами и направляют его к мембранам эндоплазматического ретикулума. Если сигнальной последовательности нет, растущую полипептидную цепь защищают белки-шапероны, в частности – Hsp70 и Hsp40 (о них см. Приложение 7).

### 3.3.2. Роль фолдинга в посттрансляционной регуляции

Синтезированные на рибосомах полипептидные цепи еще не являются готовым к выполнению своей функции белком. Они должны пройти процессы посттрансляционной модификации и приобрести необходимую пространственную структуру – претерпеть **фолдинг** (folding – складывание).

Различные сигнальные последовательности на N-конце обеспечивают направленную доставку вновь синтезированных белков к внутриклеточным органеллам и микрокомпартаментам, влияют на характер фолдинга, посттрансляционные модификации и метаболическую стабильность.

В клетке белковая цепь приобретает правильную пространственную конфигурацию под опекой специальных белков – **шаперонов**. "Малые" шапероны, такие как hsp70 (heat shock protein – белок теплового шока с молекулярной массой 70 кДа), связываются с белком, предохраняя его от агрегации и расщепления протеазами, а потом сбрасываются (на что расходуется АТФ). "Большие" шапероны, такие как GroEL, GroES и TriC работают в основном с многодоменными белками, и особенно – с белками, домены которых составлены из отдаленных участков полипептидной цепи. Эти шапероны образуют как бы "емкость" – "ячейку Анфинсена" (диаметром в несколько нм, с "крышечкой"), куда поступает новосинтезированный (и предварительно "облепленный" шаперонами типа hsp70 и/или hsp40) белок или его домен.

Эндоплазматический ретикулум (ЭПР) эукариот представляет собой клеточный компартмент, условия которого чрезвычайно благоприятны для фолдинга. ЭПР содержит необходимые для фолдинга шапероны и ферменты, а также обладает уникальным окислительным потенциалом, облегчающим образование дисульфидных связей в процессе укладки белка. Благодаря специальным N-концевым последовательностям в ЭПР получают направление около трети всех белков.

Из ЭПР белки с корректной укладкой отправляются к месту назначения. Белки с нарушенной укладкой подвергаются **ассоциированной с эндоплазматической сетью деградации (ERAD — Endoplasmic Reticulum Associated Degradation)**: неправильно упакованный белок в ЭПР "помечается" особым ферментом, что вызывает отправку этого белка обратно в цитозоль для последующего разрушения.

### **3.3.3. Контроль расщепления белковых молекул.**

#### **Роль лизосом и протеасом в протеолизе**

Расщепление белков обеспечивают ферменты протеиназы. В клетке расщепляются отработавшие или "бракованные" белковые молекулы, но не затрагиваются нужные, функционирующие белки. Это происходит благодаря тому, что:

- протеиназы с широкой субстратной специфичностью, способные разрушить любой белок до аминокислот, изолированы от цитоплазмы в лизосомах и вакуолях;
- свободные цитоплазматические протеиназы (сериновые) узкоспецифичны и расщепляют небольшой набор определенных белков и –

гораздо медленнее – стареющие белки с некоторыми нарушениями пространственной структуры;

– протеиназы в особых цитоплазматических белковых комплексах – **протеасомах** – способны расщеплять лишь белки, особым образом подготовленные к расщеплению. В этом случае изолированным компартментом является внутренняя полость протеасомы, в которой расположено несколько центров с протеолитической активностью.

Обычно внутри лизосом расщепляются долгоживущие белки, преимущественно – связанные с мембранами и захваченные во время эндоцитоза. В лизосомы способны проникнуть только специально “помеченные” белки. Механизмы нелизосомального протеолиза используются для разрушения белков с относительно короткой полужизнью.

Деградация 80–90% внутриклеточных белков осуществляется в протеасомах, имеющих как у прокариот, так и у эукариот. Протеасома представляет собой комплекс полипептидных цепей-субъединиц, образующих “бочонок с крышечкой”. Протеасому как с одной, так и с двумя “крышечками” традиционно обозначают как 26S PR (где S – коэффициент седиментации, выраженный в единицах Сведберга), хотя константа седиментации протеасомы с двумя “крышечками” равна 30S.

В протеасоме различают (рис. 24):

- **коровую часть** – 20S CP, “бочонок” из 28 субъединиц, уложенных в стопку из четырех колец;
- **регуляторные частицы** – 19S RP, “крышечки”. Они могут замещаться другими (альтернативными) регуляторными частицами или другими мультисубъединичными белковыми комплексами. Гетерогенность регуляторных частиц и число комбинаций, в которых они могут присоединяться к коровой части, дают целый набор протеасом с разными функциями. Тканеспецифичные изоформы полипептидов регуляторных частиц возникают в результате альтернативного сплайсинга предшественников их мРНК.

Основная функция коровой части – это протеолиз попавших внутрь протеасомного “бочонка” белков. Функцией регуляторных частиц является связать именно тот белок, который требует расщепления, развернуть его и “протолкнуть” в канал коровой части.

Протеасома находится под постоянным контролем. Содержание разных вариантов протеасом и их локализация в клетке динамично изменяются, подстраиваясь к потребностям клетки и определенным стрессовым условиям. Содержание конкретного вида протеасомных субъединиц и целых протеасом зависит, в частности, от пола организма и от типа ткани. Протеасома постоянно собирается и разбирается, а ее субъединицы постоянно взаимодействуют со множеством белков, которые ее стабилизируют, регулируют активность, помогают в узнавании субстратов и т.д.

Протеасомы способны деградировать белки двумя способами: убиквитин-зависимым и убиквитин-независимым. **Убиквитин (Ub)** – небольшой белок,



Рис. 24 Протеасома (по данным компьютерной томографии)

Два внешних кольца коровой части состоят из полипептидных цепей, называемых  $\alpha$ -субъединицами. Они образуют физический барьер, ограничивающий доступ белков во внутреннюю протеолитическую полость, а также взаимодействуют с регуляторными комплексами, влияющими на функции протеасомы. Пора, образуемая  $\alpha$ -субъединицами, открывается лишь при активации протеасомы и тогда имеет диаметр 13 Å.

Два внутренних кольца коровой части состоят из  $\beta$ -субъединиц, отвечающих за протеолитическую активность протеасомы.

ферментативное присоединение которого дает возможность белку-субстрату проникнуть внутрь протеасомы. При убиквитинзависимой деградации цепь полиUb не менее чем из четырех молекул убиквитина является “меткой”, распознаваемой регуляторными частицами протеасомы. Обычно полиUb формирует изопептидную связь с  $\epsilon$ -аминогруппой лизина в молекуле расщепляемого белка. При входе в канал “бочонка” протеасомы полипептидная цепь “помеченного” убиквитином белка разворачивается и протягивается через него, гидролизуясь до коротких пептидов (от 3 до 25 аминокислотных остатков), которые выходят из противоположного отверстия канала. Сам убиквитин внутрь протеасомы не заходит, а после уничтожения «отмеченной» молекулы освобождается и метит другую молекулу. Механизм убиквитинзависимой деградации раскрыли А.Кичановер, А.Хершко и И.Роуз, за что в 2004 г. были удостоены Нобелевской премии по химии. Этапы убиквитинзависимой деградации представлены на рис. 25, подробности процесса и дополнительные сведения о строении и функциях убиквитина приведены в Приложении 9.

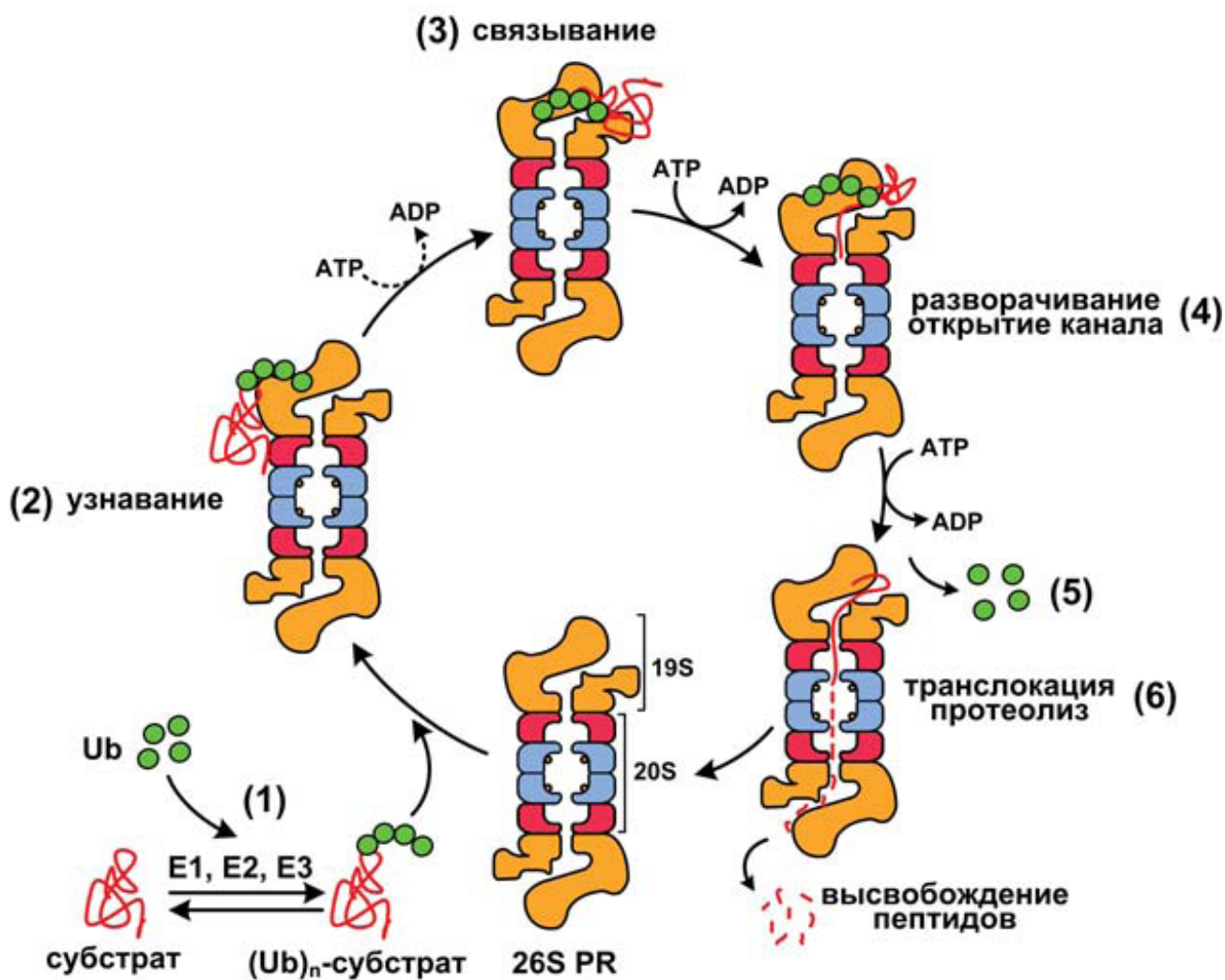


Рис. 25 Модель убиквитин-зависимой деградации белков протеасомой

- (1) - ферменты E1, E2 и E3 выбирают белок-субстрат и присоединяют к нему убиквитин (Ub);  
 (2) - регуляторная частица протеасомы (19S) узнает четвертичную структуру полиубиквитиновой цепи, (3) связывает и (4) разворачивает белок-субстрат, что вызывает открытие канала;  
 (5) - с помощью протеасомы и деубиквитирующих ферментов Uch37 и Usp14/Ubr6 убиквитин отделяется от субстрата;  
 (6) - полипептидная цепь белка-субстрата проталкивается в протеолитическую полость и гидролизуется протеазными субъединицами коровой части протеасомы.

### 3.4. Вопросы для самоконтроля по материалу главы 3

1. Расшифруйте термины сильные и слабые мРНК; маскирующие белки-репрессоры; сигнал-распознающая частица; шапероны.
2. Раскройте механизм: дискриминации мРНК, трансляционной репрессии, маскирование мРНК у эукариот Тотальная регуляция трансляции у эукариот.
3. Какова роль белковых факторов в регуляции трансляции?
4. Опишите известные вам способы регуляции синтеза белка на посттрансляционном уровне.
5. В чем заключается фолдинг белков?
6. Опишите строение протеасомы и ее роль в контролируемом разрушении белковых молекул.
7. Для чего существует убиквитилирование белков.

## 4. Нетранслируемые РНК в регуляции синтеза белка

### 4.1. Участие некодирующих РНК в регуляции экспрессии генов

В регуляции разных этапов синтеза белка как многостадийного процесса задействованы различные типы нетранслируемых РНК. Так, инициация репликации ДНК невозможна без **праймеров РНК-овой природы**.

Инициация транскрипции может регулироваться специальными малыми РНК через их воздействие на процесс метилирования ДНК (о роли метилирования ДНК в регуляции см. раздел 2.3).

В регуляции “дозревания” – **процессинга пре-мРНК** эукариот особенно значительна роль **малых ядерных РНК (мяРНК) U1 – U6**, входящих в состав сплайсосомы и избирательно распознающих сайты сплайсинга (см. [7]).

В контроле трансляции белковых молекул принимают участие особые **антисмысловые РНК (antisense RNA, miRNA)**. Их название подчеркивает тот факт, что эти РНК комплементарны к “**смысловой**” мРНК – той, на которой закодирован белок. Антисмысловые РНК были сначала обнаружены у бактерий, затем – у эукариот. По принципу антисмысловых строятся РНК, регулирующие синтез белка по механизму **РНК-интерференции** или **посттранскрипционного генного сайленсинга**. На сегодняшний день известны два класса малых регуляторных РНК, способных вызвать устранение мРНК-матрицы или репрессию трансляции – **siРНК** и **miРНК**. Ниже изложены основные принципы и механизмы посттранскрипционного контроля синтеза белков с помощью антисмысловых РНК, а также сведения о роли малых РНК в регуляции транскрипции через контроль метилирования ДНК.

### 4.2. Антисмысловые РНК и механизм РНК-интерференции

Если для клетки почему-либо нежелателен синтез белка с уже построенной мРНК (своей или попавшей извне), следует лишить эту мРНК возможности транслироваться рибосомами. Эту задачу клетка решает с помощью **антисмысловых РНК**. В основе действия всех антисмысловых РНК лежит известное явление: комплементарные нуклеотидные цепочки способны образовывать двуцепочечные ДНК-ДНК, ДНК-РНК или РНК-РНК-спирали. Экспериментально показано, что связывание мРНК с комплементарным ей поли- или олигорибонуклеотидом (то есть с антисмысловой РНК) может заблокировать ее трансляцию рибосомами.

Бактериофаги используют антисмысловые РНК для регуляции своего жизненного цикла.

У бактерий антисмысловые РНК используются в регуляции:

- репликации и поддержания плазмид (например, инициации репликации плазмиды ColE I);
- транскрипции (например, гена белка, являющегося рецептором цАМФ)



– трансляции (например, при подавлении экспрессии одного из белков внешней мембраны *E. coli*).

У эукариот также было обнаружено участие антисмысловых РНК в регуляции синтеза белка. Мутации, нарушающие нормальное протекание посттранскрипционного сайленсинга у них приводят к возрастанию восприимчивости к вирусной инфекции, повышенной подвижности транспозонов, дефектам в митозе, мейозе, к стерильности и другим нарушениям развития.

**РНК-интерференция** (*interference* – “помеха”, “препятствие”) – это недопущение мРНК до трансляции на рибосомах с помощью маленьких антисмысловых РНК и специальных белковых комплексов. В 1990х годах явления РНК-интерференции, открытые у разных эукариотических организмов, называли по-разному: у растений – косупрессией (“**co-suppression**”), у грибов – подавлением (“**quelling**”) и только у нематод – РНК-интерференцией. Позднее, когда был установлен единый механизм всех перечисленных явлений, в литературе закрепился общий термин “РНК-интерференция”.

За открытие механизма РНК-интерференции Крейг Меллоу и Эндрю Файер были удостоены Нобелевской премии (2006 г.). РНК-интерференция нужна для защиты клетки от проникающих извне вирусов, от чрезмерной активности содержащихся внутри клетки мобильных элементов генома – транспозонов, а также для регуляции жизненного цикла. Известно два основных класса малых РНК, способных вызвать РНК-интерференцию:

- **siРНК** – малые интерферирующие РНК (**s**mall **i**nterfering **R**ibo**N**ucleic **A**cids), длиной 19 – 25 нуклеотидов;
- **miРНК** – микроРНК, обычная длина которых – 21-22 нуклеотида.

Эти два класса малых РНК схожи по строению и механизму действия, но отличаются по происхождению, консервативности и группам регулируемых генов:

- miРНК закодированы в ДНК клетки в специальных геномных локусах, отличных от других генов, тогда как siRNA могут иметь два источника – “собственные” транспозоны клетки или проникающие извне вирусы. Строение генов клетки, кодирующих miРНК, схематично показано в Приложении 10;
- miРНК синтезируются из одноцепочечной РНК, сложившейся вдвойне с образованием короткой “шпильки”, а siРНК – из длинных двуцепочечных РНК или протяженных “шпилек”. Процесс формирования siРНК представлен на рис. 26, miРНК – на рис. 28;
- из одной молекулы-предшественника в случае miРНК формируется единственная двуспиральная структура “miРНК: miРНК”, а в случае siРНК – много двуцепочечных siРНК;
- у родственных организмов последовательности miРНК очень сходны, а вирусные и даже эндогенные siРНК редко проявляют сходство.

На рис. 26 представлен процесс образования siРНК и механизм РНК-интерференции с ее участием. Образование siРНК – это, в первую очередь, защитная реакция клетки на внешнего агрессора. Как известно, РНК-

содержащие вирусы размножаются следующим образом: сначала на матрице одноцепочечной вирусной РНК строится антисмысловая цепь, затем на антисмысловой цепи синтезируется множество новых вирусных цепей РНК. Понятно, что в процессе удвоения РНК возникают ее двуцепочечные формы (дцРНК). Именно из-за появления таких РНК – двуцепочечных, отклоняющихся от нормы – клетка узнает о вторжении агрессора.

Кроме того, сигнал для включения РНК-интерференции может иметь и внутреннюю природу – инвертированные повторы некоторых мобильных элементов в геноме самой клетки.

В любом случае, в клетке сначала возникают длинные (от 70 до 200 пар нуклеотидов) двуцепочечные РНК. Каждую такую дцРНК многократно разрезает Dicer – белок, имеющий несколько доменов с разными функциями:

- домен, отвечающий за связывание с дцРНК,
- домен с функцией РНК-хеликазы (для частичного расплетания дцРНК),
- два тандемно расположенных домена с функцией РНКазы III (для расщепления дцРНК на фрагменты),
- RAZ-домен.

Для работы Dicer требуется затрата АТФ. В результате образуются короткие двуцепочечные siРНК с двухнуклеотидными одноцепочечными “хвостиками” на 3'-концах обеих цепей.

Термин “Dicer” происходит от “dicing”(англ.) – нанесение линейных надрезов заданной глубины на поверхность заготовки при изготовлении микросхем.

Каждый короткий фрагмент – двуцепочечная siRNA – собирает на себя **белковый комплекс RISC (Ribonucleic Acid Induced Silencing Complex)**. RISC раскручивает двойную спираль siРНК и освобождается от смысловой нити. Антисмысловая нить siRNA в составе RISC находит комплементарный участок мРНК–мишени и прикрепляется к нему. Другие компоненты RISC разрезают мРНК на участке, расположенном примерно за 10 пар нуклеотидов от 5'-конца siRNA. Образуются два продукта разрыва. У них отсутствуют защитные структуры (в одном – 3'-концевой polyA-хвост, в другом – 5'-концевой кэп), поэтому эти продукты быстро расщепляются клеточными нуклеазами до отдельных нуклеотидов. RISC освобождается и может участвовать в повторении процесса. Так как реакция RISC – каталитическая и повторяется несколько раз, это обеспечивает очень эффективное и долговременное ингибирование экспрессии определённого белка.

Возникнув в одном месте организма, интерферирующая РНК способна распространяться в окружающие ткани, регулируя синтез белка и осуществляя защитную функцию уже в них.

В описанном процессе из единственной длинной дцРНК “нарезается” много мелких siРНК. На этой стадии первичный сигнал об агрессии значительно усиливается, так как в дальнейших событиях участвует уже не одна молекула дцРНК, а большое число образованных из нее siРНК.

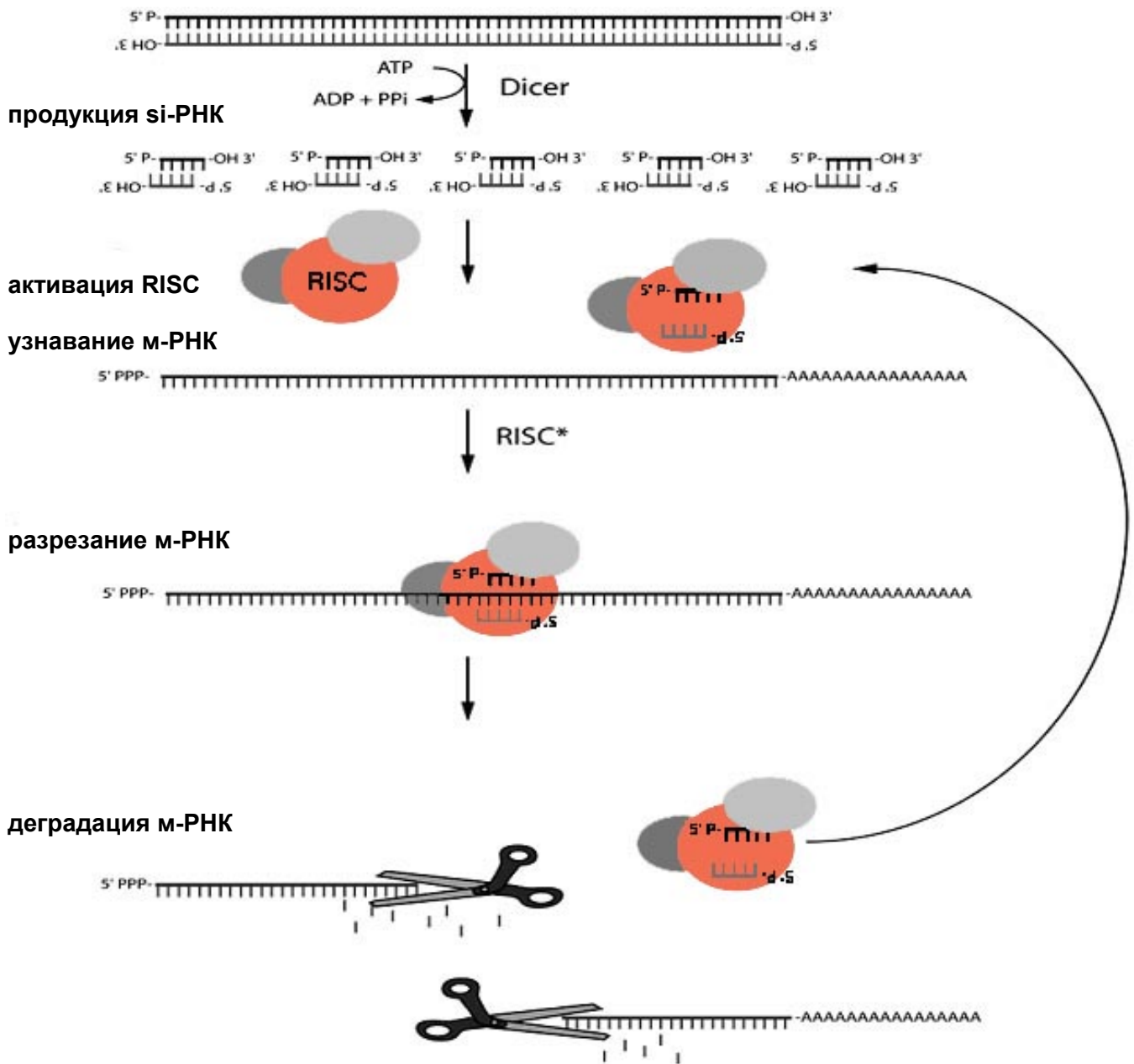


Рис. 26 Процесс РНК-интерференции с участием siРНК

Dicer – эндогенная рибонуклеаза III;

siRNA – малые интерферирующие РНК, показаны одноцепочечные “хвосты” на 3'-концах обеих цепей.

RISC – белковый комплекс, индуцирующий сайленсинг РНК

RISC\* – RISC в активированном состоянии (одна из цепей – смысловая siРНК - не нужна для дальнейших событий и удаляется).

“Ножницы” обозначают последовательное “отрезание” нуклеазами отдельных нуклеотидов от фрагментов мРНК-мишени: у одного фрагмента – начиная с 3'-конца, у другого – с 5'-конца.

Еще один механизм усиления первичного сигнала для “включения” пост-транскрипционного сайленсинга является продолжением первого. Возникшие описанным выше путем siРНК используются для построения дополнительных длинных дцРНК, а, следовательно, и для увеличения числа siРНК (в других

случаях – miРНК). Этот механизм, называемый “переходной” (transitive) РНК-интерференцией, представлен на рис. 26.

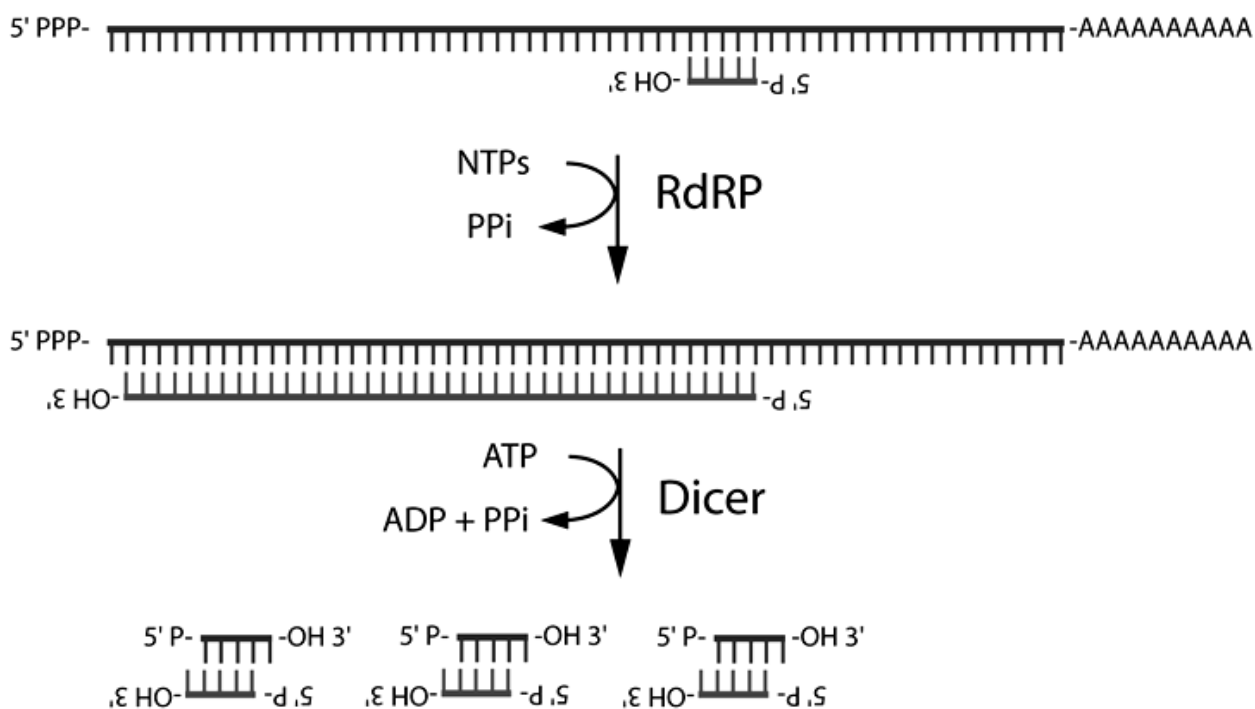


Рис. 27 “Переходная” (transitive) РНК-интерференция – механизм получения дополнительных дцРНК и малых регуляторных РНК

Связавшись с мРНК-мишенью, siRNA становится праймером для синтеза комплементарной РНК (кРНК) с помощью особых РНК-зависимых РНК-полимераз (RdRP). Исходная мРНК вместе с построенной на ее основе кРНК образует дцРНК, которую Dicer распознает и режет на вторичные siРНК. Кроме того, источником одноцепочечных интерферирующих РНК может быть сама кРНК.

Считают, что “переходную” РНК-интерференцию вызывает повышенная концентрация смысловых транскриптов.

Способность siРНК на посттрансляционной стадии обеспечить «молчание» генов, ассоциированных с конкретными заболеваниями, открывает широкие перспективы применения РНК-интерференции в лечении инфекционных, онкологических и нейродегенеративных заболеваний, таких как боковой амиотрофический склероз, хорея Хантингтона, болезнь Альцгеймера и другие. Потенциальная возможность синтеза искусственной siРНК, комплементарной к любой известной информационной РНК, а также совершенствование способов доставки молекулы siRNA в клетку открывают реальные перспективы применения новых, основанных на явлении РНК-интерференции, действенных способов лечения заболеваний.

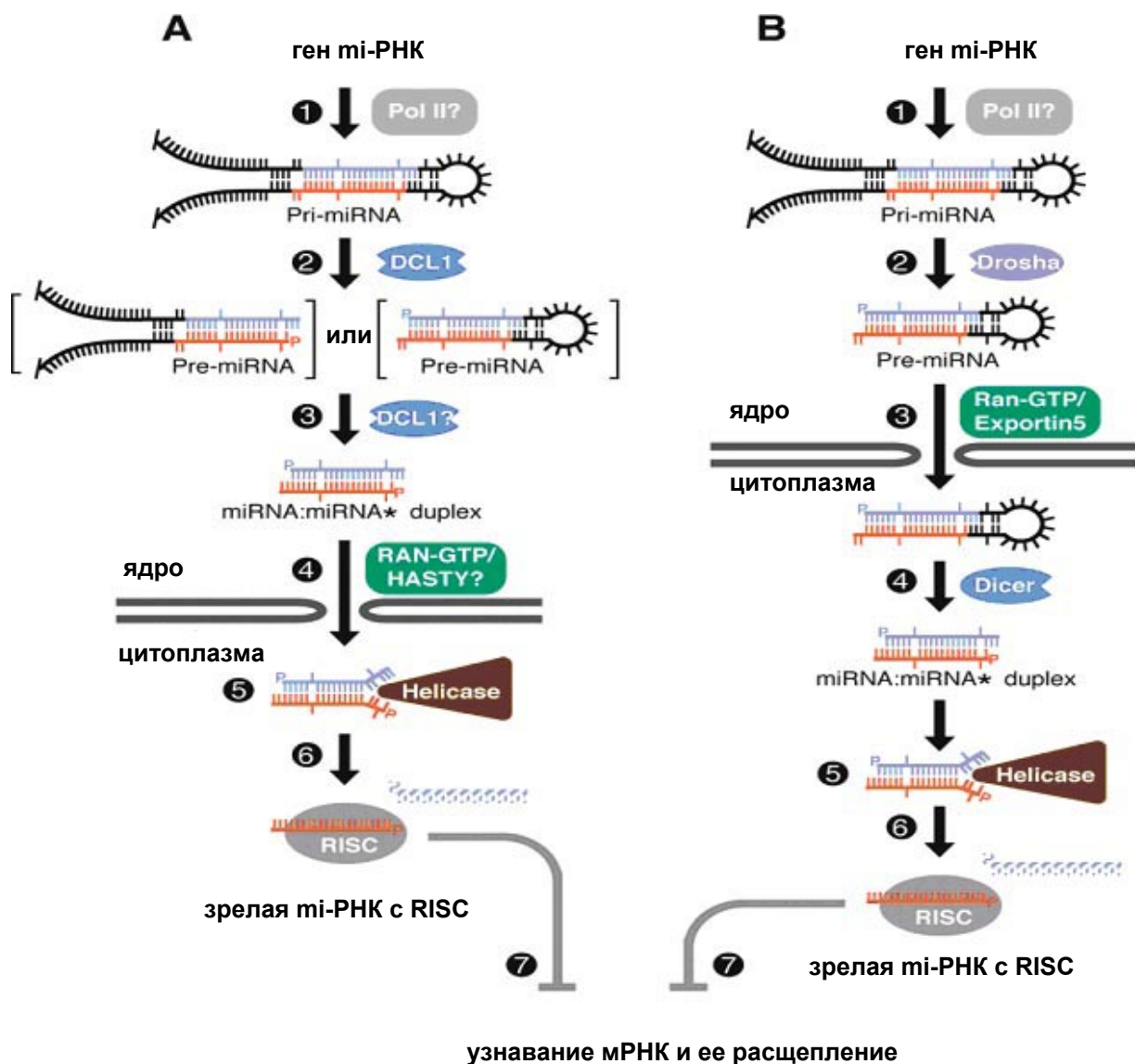


Рис. 28 Путь формирования miRNA: А – у растений, В – у животных

Красный цвет – антисмысловая последовательность, комплементарная участку мРНК-мишени, синим – смысловая последовательность. **1** – образование первичной РНК (pri-miRNA). По матрице гена, расположенного на ДНК клетки и кодирующего miRNA, строится одноцепочечная РНК-заготовка (первичная РНК), которая сразу складывается во вторичную структуру в форме “шпильки”. Pol II – РНК-полимераза II, предположительно катализирующая транскрипцию гена; **2** – образование пре-miRNA. У животных в ядре происходит процессинг: эндонуклеаза Drosha отрезает “шпильку” от остальной части первичной РНК. Возникает пре-miRNA. У растений наличие пре-miRNA не доказано, но предполагается (показаны в скобках). В образовании пре-miRNA вероятно участвует Dicer-подобный белок DCL1.3, **4** – образование зрелой двуцепочечной miRNA (miRNA: miRNA\*) У растений она образуется в ядре и затем переносится в цитоплазму предполагаемым белковым переносчиком. У животных зрелая miRNA образуется в цитоплазме, куда из ядра поступает пре-miRNA с помощью белка экспортина-5 (Exportin5). В цитоплазме белок Dicer разрезает пре-miRNA с образованием дуплекса miRNA: miRNA\*. загружается в белок Argonaute (ago) для активации комплекса RISC. **5** – раскручивание и разъединение дуплекса miRNA: miRNA\* неустановленной хеликазой на антисмысловую miRNA и смысловую miRNA\*. **6** – антисмысловая miRNA включается в комплекс RISC, а miRNA\* распадается. Для загрузки miRNA важно наличие в составе RISC белков семейства Argonaute (RDE-1 у червей, QDE2 – у грибов, AGO1 – у растений). **7** – в составе RISC miRNA связывается с комплементарными последовательностями в 3'-нетранслируемой области мРНК-мишени и вызывает ее расщепление аналогично действию siRNA. На данном рисунке показан гетеросайленсинг, то есть устранение мРНК, синтезированной с гена, не связанного с геном, кодирующим данную miRNA.

Второй класс известных сегодня малых регуляторных РНК – **микроРНК (miРНК)**. МикроРНК способны вызывать не только расщепление мРНК – РНК-интерференцию (аналогично siРНК), но и другой эффект – **трансляционную репрессию**. Процесс возникновения микроРНК показан на рис. 28, примеры miРНК и выполняемых ими функций приведены в Приложении 10.

### 4.3. Роль микроРНК в трансляционной репрессии

Определенные микроРНК могут блокировать трансляцию не по механизму РНК-интерференции – без деградации мРНК-мишени. Цепи miРНК этой группы только по краям комплементарны мРНК-мишени, а в середине нуклеотиды не совпадают. Это приводит к “выпячиванию” середины после присоединения к мРНК-мишени, что и вызывает трансляционную репрессию. В настоящее время предложены несколько вероятных механизмов трансляционной репрессии, некоторые из которых иллюстрирует рис. 29.

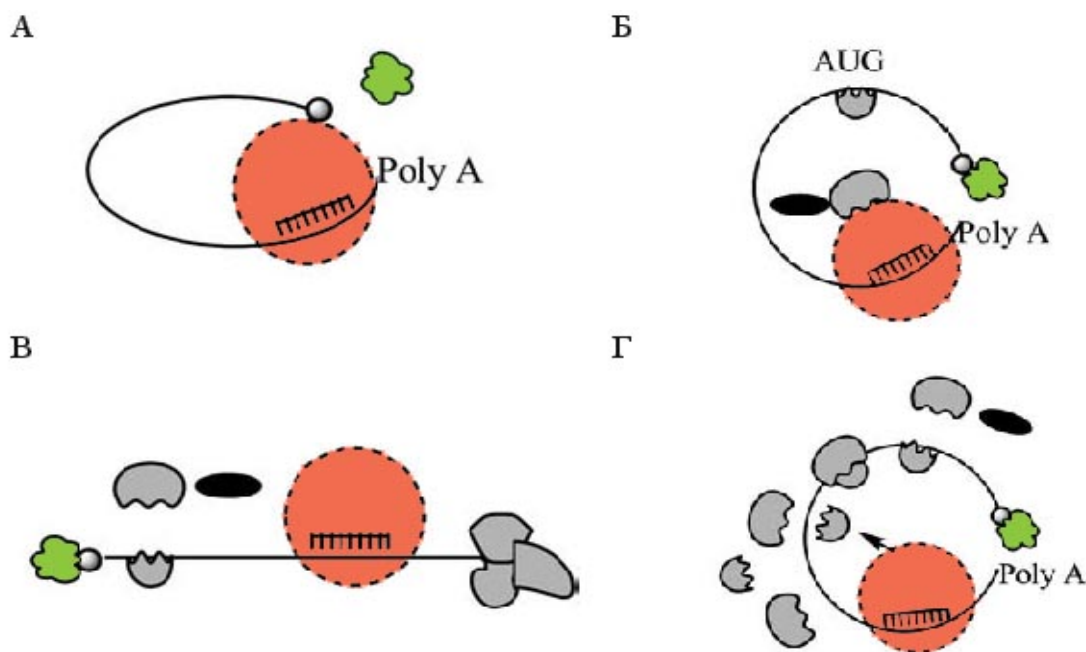


Рис. 29 Предполагаемые механизмы трансляционной репрессии, вызываемой miРНК. Показано, что miРНК связывается с мРНК-мишенью в ее 3'-концевой области.  
 (а) Конкуренция за связывание кэпа. Присоединяясь к мРНК, miRISC закрывает область кэпа, предназначенную для фактора инициации трансляции eIF4E.  
 (б) Конкуренция за большую субъединицу рибосомы: miRISC забирает на себя рибосомальную 60S-субъединицу, не давая ей присоединиться к собранному ранее 40S-прединициационному комплексу.  
 (с) Блокирование “закольцовывания” мРНК. Присоединение miRISC не дает мРНК приобрести правильную конформацию, необходимую для трансляции.  
 (d) Репрессия на стадии элонгации трансляции. Присоединение miRISC к мРНК-мишени приводит к преждевременному отсоединению ее от рибосом.

#### 4.4 Контроль трансляции через регуляцию метилирования ДНК

В последние годы получены данные о роли siРНК в регуляции синтеза белка через изменение структуры хроматина. Наличие такой регуляции показано у дрожжей, инфузории *Tetrahymena thermophila*, высших растений, млекопитающих, насекомых.

Для осуществления метилирования и перестройки хроматина следует привлечь комплекс белков-ферментов к определенному региону генома. Предполагается, что сначала на основе транспозонов, находящихся в составе ДНК, образуются siРНК по пути, показанному на рис. 26. В составе RITS эти siРНК обеспечивают связывание с мишенью – комплементарной последовательностью. По мнению разных авторов, мишенью может быть либо участок ДНК, либо РНК, синтезированная на этом участке ДНК. В пользу предположения о РНК-овой природе мишени свидетельствуют данные о том, что siРНК-зависимые изменения хроматина происходят, только если последовательность-мишень транскрибируется. Так как комплементарное спаривание требует присутствия одноцепочечной мишени (РНК или ДНК), существуют белки, обеспечивающие локальное расплетание двуцепочечных структур.

После присоединения комплекса активированного присутствием siРНК RISC, к последовательности мишени за счет белок – белковых взаимодействий привлекаются метилазы и другие белки, влияющие на укладку и функциональное состояние хроматина. Изменения, происходящие с молекулой ДНК, будут определяться свойствами белкового комплекса, ассоциированного с siРНК. В итоге обычно наблюдается репрессия гена, несущего последовательности – мишени для siРНК.

#### 4.5. Вопросы для самоконтроля по материалу главы 4

1. Расшифруйте термины антисмысловые РНК; siРНК и miРНК.
2. Раскройте биологический смысл РНК-интерференции.
3. Назовите типы микро-РНК, признаки сходства и различия между разными типами микро-РНК.
4. Опишите механизмы трансляционной репрессии, вызываемой miРНК
5. Обрисуйте строение и функционирование RISC-комплекса
6. Каковы различия в формировании miРНК у растений и животных.
7. В чем заключается влияние siРНК на структуру хроматина

## 5. Природные и искусственные ингибиторы синтеза белка, их функции в межвидовых взаимодействиях и применение в экспериментальной биологии и медицине

Живые существа активно используют химические соединения в межорганизменных взаимодействиях. В частности, организмами выделяются вещества, влияющие на синтез белковых молекул.

Чаще всего имеют место не прямые воздействия на синтез белка, когда соединения действуют аналогично сигнальным веществам, описанным в разделе 2.5. В этом случае вещество, выделяемое одним организмом, воздействует на определенные рецепторы, имеющиеся у другого организма. Воздействие на рецепторы запускает многоступенчатый процесс внутриклеточной передачи сигнала, что в итоге приводит к постепенным изменениям в синтезе белков. Непрямые воздействия на синтез белка могут оказывать соединения как внутривидового, так и межвидового взаимодействия: феромоны, элиситоры фитоалексинов, аллелопатические вещества и др.

В то же время некоторые организмы способны продуцировать вещества-ингибиторы прямого действия, нарушающие белковый синтез вплоть до полной его остановки. Ингибиторы синтеза белка – мощное и разрушительное оружие, применяемое только против особей другого вида и только тогда, когда решаются задачи, перечисленные ниже.

1) **Защита от поедания** представителем более высокого трофического уровня посредством его отпугивания, сдерживания его пищевой и репродуктивной активности (функция оборонительного биохимического оружия). С помощью подавления синтеза белка у фитофагов защищаются многие растения. Примерами защитных соединений растительного происхождения являются абрин, канаванин, рицин и др. Известны такие соединения и у грибов ( $\alpha$ -аманитин бледной поганки).

2) **Атака** на представителей более низкого трофического уровня (наступательное оружие). Таковы токсины паразитических биотрофных грибов (кордицепин), патогенных бактерий (дифтерийный токсин, экзотоксин А, веротоксины), ряда хищных животных (педерин у жука-хищника из рода *Paederus*).

3) **Сдерживание видов-конкурентов** того же самого трофического уровня (одновременно и оборонительное, и наступательное оружие). Устранение конкурента через подавление его белкового синтеза с помощью выделяемых антибиотиков – очень распространенная стратегия у бактерий и микроскопических грибов. Несколько реже ингибиторы синтеза белка встречаются среди аллелопатических веществ растений (ликорицидинол, канаванин, азетидин-2-карбоновая кислота). У животных в конкурентной борьбе ингибиторы синтеза белка участвуют очень редко.

Следует отметить, что ингибиторы биосинтеза белка – важный, но не единственный способ решения перечисленных задач межорганизменного взаимодействия: для достижения тех же целей организмы способны



использовать вещества, изменяющие или останавливающие другие важные метаболические процессы, такие как клеточное дыхание, фотосинтез, работу цитоскелета и т.д.

Встречающиеся в природе ингибиторы биосинтеза белка разнообразны по химической структуре и механизму действия. Избирательное ингибирование строго определенных звеньев механизма синтеза белков, характерное для многих природных соединений, позволяет использовать их как инструмент в научных исследованиях. Например, с помощью токсина бледной поганки  $\alpha$ -аманитина экспериментатор может избирательно ингибировать эукариотическую РНК-полимеразу II, не затрагивая работу других РНК-полимераз клетки. Избирательно “выключить” тот или иной этап синтеза белковой молекулы можно с помощью антибиотиков. Например, рифамицин ингибирует транскрипцию (на стадии ее инициации), пурамицин – трансляцию (на стадии элонгации). Другие примеры антибиотиков и механизмы их действия изложены в таблице 1.

В медицине наиболее широкое применение нашли ингибиторы биосинтеза белка, выделяемые микроорганизмами с целью подавления конкурентов. Таким действием – бактериостатическим, бактерицидным – обладают многие антибиотики. Антибактериальные соединения медицинского назначения должны ингибировать синтез белка исключительно у прокариот, но не у эукариот, и быть малотоксичными для человека. В медицине также используются ингибиторы синтеза белка противоопухолевого назначения, принцип действия которых основан на большей восприимчивости к ним белоксинтезирующих структур раковых клеток.

Ниже приведены примеры соединений, ингибирующих различные этапы биосинтеза белка. Соединения сгруппированы в соответствии с задачами межорганизменных взаимодействий, для решения которых они используются.

Отметим, что для решения разных экологических задач могут использоваться вещества с одинаковым биохимическим механизмом действия. Например, у растений действующие одинаковым способом небелковые аминокислоты участвуют как в защите от фитофагов, так и в подавлении конкурентов: из-за структурного сходства аминоацил-tРНК-синтетазы активируют их как обычные аминокислоты, присоединяя к tРНК. Однако сходство небелковой аминокислоты с обычной лишь частичное, поэтому как у растения-непродуцента, так и у фитофага либо полностью ингибируется синтез белка, либо синтезируются дефектные белки. Растение-продуцент защищено от собственных токсинов благодаря наличию аминоацил-tРНК-синтетаз, способных различать белковые и небелковые аминокислоты и не использовать последние в качестве субстрата.

С другой стороны, для решения одной и той же экологической задачи могут использоваться ингибиторы синтеза белка, обладающие абсолютно разным механизмом действия. Так, для подавления конкурентов бактерии продуцируют соединения, мишенью которых являются как нуклеиновые

кислоты, так и белки-ферменты, белковые факторы или рибосомальные белки (см. табл. 1).

### 5.1. Соединения с функцией “защиты от поедания”

1)  **$\alpha$ -Аманитин** – токсин бледной поганки *Amanita phalloides* (рис. 30).

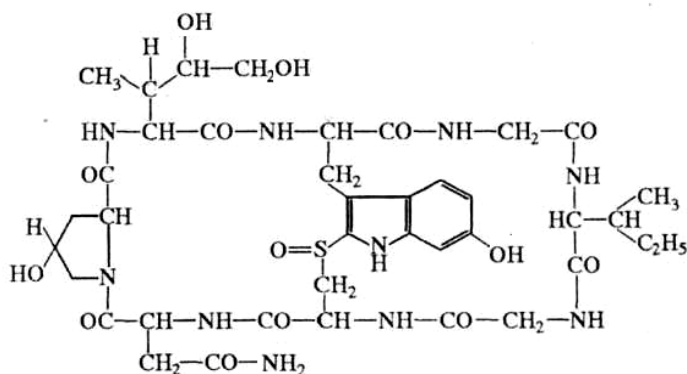


Рис. 30 Внешний вид бледной поганки и формула  $\alpha$ -аманитина

В составе  $\alpha$ -аманитина – 3 небелковых аминокислоты (дигидроксиизолейцин, оксипролин, триптатионин). Дигидроксиизолейцин расположен слева вверху, под ним – оксипролин. Триптатионин, являющийся производным триптофана и цистеина, расположен в центре.

**$\alpha$ -Аманитин** ингибирует транскрипцию в клетках съевшего гриб животного, связываясь с РНК-полимеразой II (действующая концентрация  $10^{-8}$  М). Для ингибирования РНК-полимеразы III требуются значительно более высокие концентрации токсина ( $10^{-6}$  М), РНК-полимераза I не чувствительна к этому токсину.

Представляет собой пептид бициклического строения из восьми L- и D-аминокислот.

Вызывает необратимую дисфункцию печени и почек. Для человека LD<sub>50</sub> (доза, при которой погибает 50% лиц, получивших токсин) составляет 0,1 мг/кг массы тела. В 100 г свежего гриба содержится около 10 мг  $\alpha$ -аманитина.

2) **Канаванин** – токсин, синтезируемый некоторыми растениями сем. Бобовых – вьющимися бобами *Diosclea megacarpa*, канавалией мечевидной *Canavalia ensiformis*. В семенах последней может накапливаться до 8% канаванина от их сухой массы.

Является небелковой аминокислотой – аналогом аргинина. В канаванине по сравнению с аргинином добавляется атом кислорода в боковом радикале и уменьшается количество CH<sub>2</sub>-групп (рис. 31).

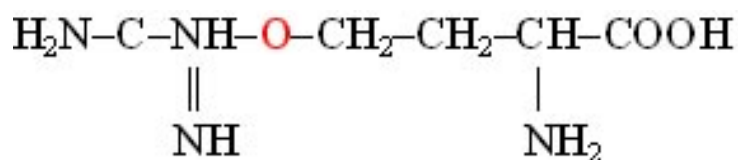


Рис. 31 Формула канаванина

Распознается аргининовой тРНК-синтетазой и в процессе трансляции занимает место аргинина в синтезируемых белках. Однако из-за наличия дополнительного атома кислорода канаванин несет значительно меньший положительный заряд, чем аргинин. Замена аргинина на канаванин приводит к утере белками способности функционировать, а в результате – к смерти клетки и организма в целом. Способен проявлять токсическое действие, ингибируя и другие процессы с участием аргинина.

Канаванин может накапливаться в самом растении или выводиться в окружающую среду (почву). В первом случае его действие будет направлено на фитофага, съевшего растение, во втором случае – будет являться аллелопатическим агентом в конкурентной борьбе против других растений.

3) **Рицин** – токсин клещевины *Ricinus communis* (сем. Молочайные), ингибитор трансляции у фитофагов.

Это гликопротеин – глобулярный белок из двух субъединиц – А и В (на рис. 32 – “ленты” красного и зеленого цвета соответственно), соединенных S-S-связью. Субъединицы состоят из аминокислотных остатков и небольшой доли сахаров (серые циклические структуры). Субъединица В благодаря своему углеводному компоненту “узнает” углевод галактозу, расположенную на поверхности мембраны клетки съевшего клещевину животного, и связывается с этим моносахаридом. Это связывание вызывает расщепление дисульфидной связи, и субъединица А проникает в клетку, где присоединяется к 60S-субъединице рибосом и удаляет один остаток аденина из 28S рРНК этой субъединицы. Потеря азотистого основания нарушает взаимодействие рРНК с факторами элонгации. В результате синтез белка у организма, съевшего клещевину, нарушается.

Субъединицы по отдельности нетоксичны, токсическое действие проявляется только при их совместном действии. Однако, будучи порознь введенными в организм, субъединицы самопроизвольно соединяются, и молекула рицина реконструируется, обретая токсичность. Для человека ЛД<sub>50</sub> – 0,003 мг/кг (перорально), через кожу не проникает.

Из-за высокой токсичности рицина лечение маслом из семян клещевины – касторовым маслом – проводят короткими курсами, так как длительное употребление может нарушить работу кишечника и даже вызвать гибель больного.



Рис. 32 Внешний вид клещевины и строение ее токсичного белка – рицина

#### 4) Тубулозин и эметин.

Тубулозин – токсин древесного растения погонопуса *Pogonopus speciosus* (сем. *Мареновые*, рис. 33). Эметин – токсин растения *Sephaelis ipecacuanha* (ипекакуана, рвотный корень). Оба токсина являются алкалоидами, селективно ингибируют элонгацию трансляции в клетках эукариот. Они препятствуют транслокации рибосомы по мРНК через воздействие на фактор элонгации EF2.

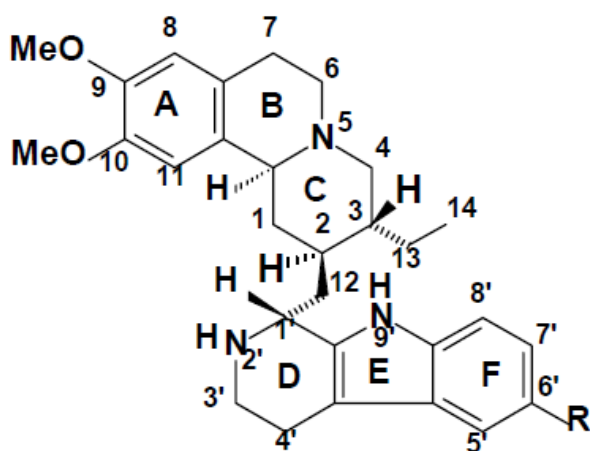


Рис.33 Формула тубулозина и цветущий побег погонопуса  
R= -OH, Me = -CH<sub>3</sub>

б) **Педерин** – защитное вещество жуков-синекрылов р. *Paederus* (сем. *Staphylinidae*, Нижнее Поволжье, Восточная Африка, Маршалловы острова) (рис. 34).

Обнаружено, что синтезирует токсин не сам жук, а обитающий в теле жука вид эндосимбиотических бактерий р. *Pseudomonas*. При раздавливании жука или его поедании хищником педерин, накапливающийся в гемолимфе насекомого, попадает на кожные покровы или слизистые. У человека в большинстве случаев поражается внешний слой эпидермиса, возникают конъюнктивиты, при значительных дозах токсина развиваются тяжелые

дерматиты. Педерин сначала ингибирует синтез белка, затем – ДНК (но не РНК). Токсин представляет интерес для медицины, так как ингибирует деление хромосом в опухолевых клетках.

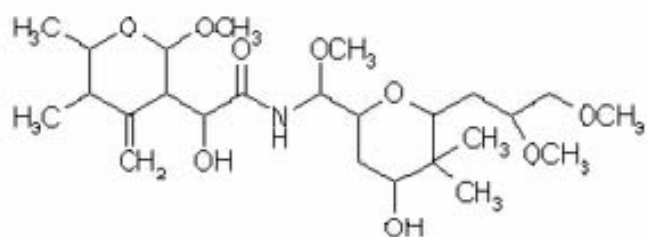


Рис. 34 Структура педерина и внешний вид жука-синекрыла

Схожие с педерином по функции, строению и механизму действия токсины обнаружены также у некоторых губок: микаламид – у *Mycale sp.*, оннамид А – у *Theonella swinhoei*.

## 5.2. Соединения с функцией нападения

1) **Кордицепин – ингибитор элонгации транскрипции и процессинга мРНК.** Синтезируется грибами рода *Cordyceps*, паразитирующих на насекомых, реже – на пауках (рис. 35.). Аскоспоры кордицепса, попадая на покровы насекомого-хозяина, прорастают, и их ростковые трубки внедряются в тело хозяина и начинают выделять кордицепин.

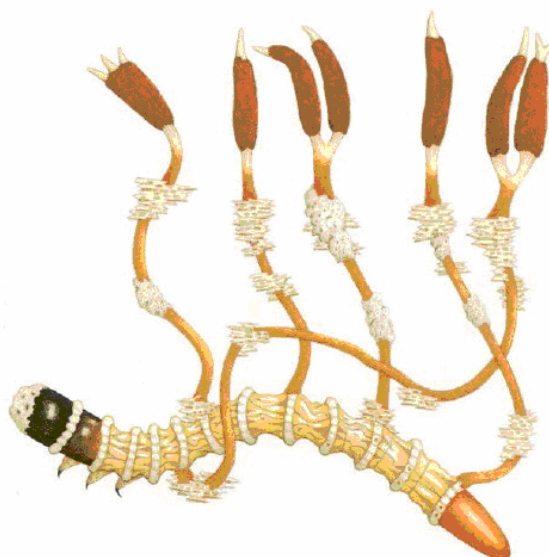
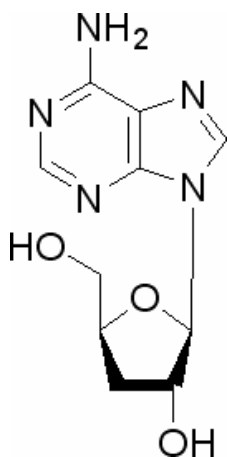


Рис. 35 Формула кордицепина и внешний вид гиф и плодовых тел гриба *Cordyceps sp.*, развившегося на личинке насекомого (показана внизу)

Ткани насекомых, убитых кордицепсами, не заселяются другими микроорганизмами и не разлагаются. В этом проявляется вторая функция кордицепина – защита питательного субстрата от потребления видами-конкурентами.

Кордицепин – ингибитор элонгации транскрипции. Он является структурным аналогом аденозина, в котором рибоза лишена кислорода в 3'-положении (3'-дезоксаденозин). Из-за своего сходства с аденозином способен распознаваться рядом ферментов, использующих аденозин в качестве субстрата, например – РНК-полимеразой, вводящей его в состав РНК. Встроившись в РНК, кордицепин вызывает преждевременную терминацию транскрипции.

Кроме того, кордицепин способен ингибировать процессинг РНК: его воздействие на фермент полиаденилат-полимеразу в концентрации 50 мкг/мл останавливает полиаденилирование – добавление к мРНК полиаденилатного хвоста.

Кордицепин также способен оказывать не прямое воздействие на синтез белка, через ингибирование некоторых протеинкиназ – ферментов, участвующих в путях передачи сигнала в клетке.

С древнейших времен кордицепин применяется в традиционной восточной медицине. Представляет интерес как противораковое, антимикотическое, противовирусное средство.

## 2) Веротоксины – ингибиторы трансляции на стадии элонгации: укорочение рРНК

*Shigella dysenteriae* серотипа 1 и некоторые другие клинически значимые бактерии, например Stx-продуцирующие *E. coli* (STEC), вырабатывают веротоксины (Stx-токсины). Веротоксины действуют по механизму, описанному для рицина. Как и рицин, они состоят из субъединиц двух типов: субъединица А обладает ферментативной активностью, а субъединица В “ищет” мишень и непосредственно взаимодействует с ней. Освобожденная субъединица А проявляет N-гликозидазную активность, отщепляя один адениновый остаток от 28S рРНК, что в итоге подавляет синтез белка в клетке организма-хозяина. К действию N-гликозидазы одинаково чувствительны рибосомы как про-, так и эукариот.

Кристаллическая структура пентамера В в Stx1-токсине и холотоксина в Stx-токсине показаны на рис. 36.



Рис. 36 Веротоксины: кристаллическая структура Stx-токсина *S. dysenteriae* и токсина I *E. coli*

### 3) Дифтерийный токсин и экзотоксин А *Pseudomonas spp.* – ингибиторы трансляции на стадии элонгации: воздействие на белковый фактор EF-2

Патогенные штаммы грамположительной бактерии *Corynebacterium diphtheriae* – возбудителя дифтерии – выделяют в окружающую среду (у человека – в слизистые зева и гортани) дифтерийный токсин. Строение зрелого дифтерийного токсина, путь его проникновения в клетку, а также активация ферментативной субъединицы А происходят аналогично рицину и веротоксином (рис. 37). Однако, в отличие от рицина и веротоксинов, субъединица А дифтерийного токсина катализирует реакцию инактивации фактора элонгации EF-2 (напоминая по действию тубулозин и эметин) через присоединение к нему АДФ-рибозы:



Потерявший активность АДФ-рибозилированный EF-2 не способен участвовать в процессах, приводящих к транслкации. Растущая полипептидная цепь блокирует А-сайт рибосомы, что останавливает синтез белка. Экзотоксин А, синтезируемый патогенными штаммами бактерий *Pseudomonas spp.*, также способен вызвать АДФ-рибозилирование фактора EF-2 по схожему механизму.

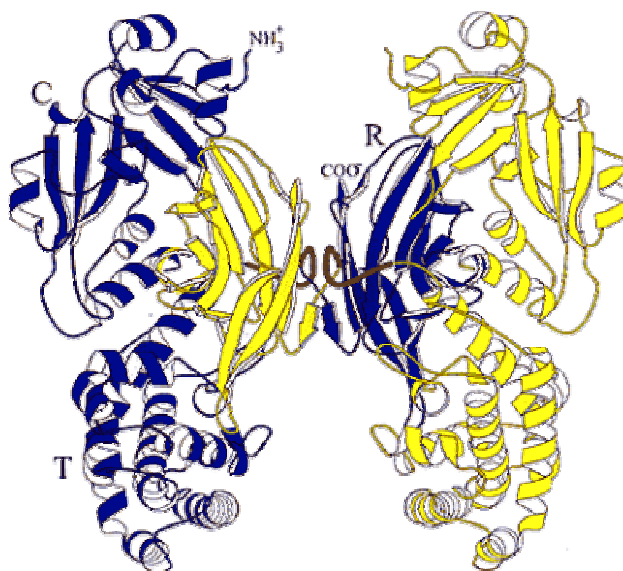


Рис. 37 Димерное строение дифтерийного токсина

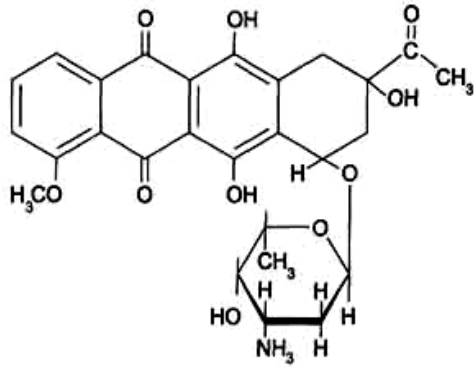
Из-за того, что фрагмент А является ферментом, одной его молекулы хватает на то, чтобы инактивировать все имеющиеся молекулы EF-2 и убить клетку. Резистентность многих животных к дифтерийному токсину объясняется трудностью проникновения токсина через мембрану их клеток, а не спецификой белоксинтезирующего аппарата.

### 5.3. Соединения с функцией подавления конкурентов

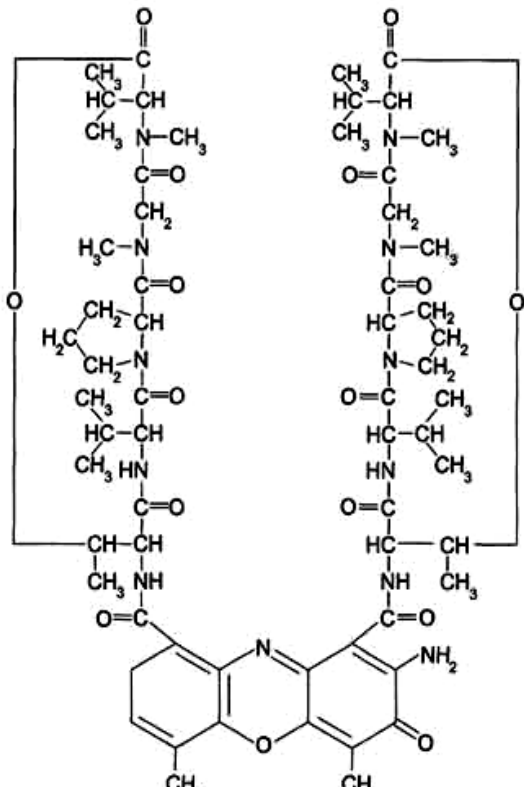
1) Антибиотики. Эти соединения очень разнообразны и сильно варьируют по структуре и механизму действия в зависимости от вида и штамма микроорганизма-продуцента. Примеры антибиотиков, выделяемых бактериями, приведены в таблице 1.

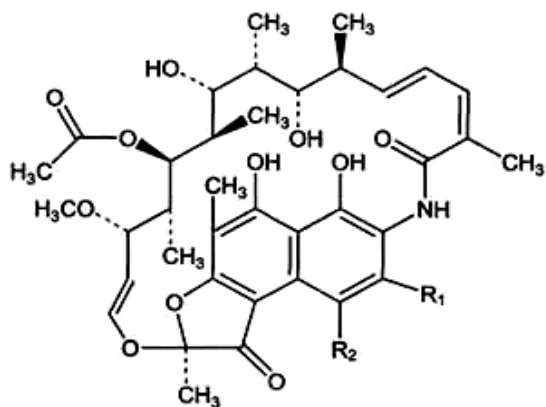
Таблица 1

#### Антибиотики - ингибиторы биосинтеза белка у видов-конкурентов

Антибиотики	Механизм действия
<b>Ингибиторы репликации - интеркалирующие антибиотики</b>	
<p><b>Дауномицин</b> (продуцент – <i>Streptomyces peucetius</i>, <i>S. coeruleorubidis</i>)</p>	<p>Их циклическая структура встраивается ("интеркалирует") между парами оснований G≡C, а углеводный компонент занимает малую бороздку ДНК. Это ведёт к локальному изменению структуры ДНК и ингибированию как репликации, так и транскрипции.</p> 
<p><b>Актиномицин D</b> (продуцент – бактерии <i>Streptomyces antibioticus</i>). Сильный бактерицид, противоопухолевый антибиотик для лечения злокачественных новообразований, но из-за высокой токсичности не используется в качестве лекарственного средства.</p>	<p>Специфически связывается с дГ(3'-5')дЦ-последовательностью ДНК, внедряется ("интеркалирует") между Г:Ц-парами, образуя стабильные комплексы и прекращая ДНК-зависимый синтез всех типов РНК, в особенности - мРНК. Действует на <u>любые</u> клетки с высокой скоростью синтеза ДНК и РНК и повышенной проницаемостью клеточных мембран, то есть на опухолевые клетки, а также на здоровые, но быстроделящиеся клетки организма (стволовые клетки кроветворной системы, клетки слизистой оболочки желудка и кишечника, фолликулов волос).</p>



	
<p><b>Новобиоцин</b> (продуцент – <i>Streptomyces spheroides</i> и ряд др. видов)</p>	<p>Ингибирует ДНК-топоизомеразу II, ответственную за суперспирализацию ДНК, нарушают репликацию и транскрипцию. Так как транскрипция некоторых генов идет лишь при определённом уровне суперспирализации ДНК, то изменение суперспирализации может ингибировать или активировать синтез определенных РНК.</p>
<p><b>Ингибиторы транскрипции</b></p>	
<p>Антибиотики группы <b>рифамицина</b> (продуцент – <i>Streptomyces mediterranei</i>). Широко применяются в клинике, имеют противотуберкулезную активность, эффективны против ДНК-содержащего вируса трахомы. Создан полусинтетический аналог рифамицина – рифампицин.</p>	<p>Связываются с <math>\beta</math>-субъединицей бактериальной, но не эукариотической ядерной РНК-полимеразы и препятствуют инициации транскрипции – образованию первой межнуклеотидной связи. При повышенных концентрациях ингибируют синтез РНК митохондрий</p>



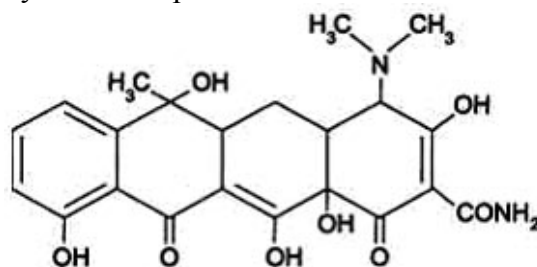
Рифамицин В ( $R_1 = \text{H}$ ;  $R_2 = \text{O}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ )

Рифампицин ( $R_1 = \text{CH} = \text{N}^+(\text{CH}_2)_5\text{N}-\text{CH}_3$ ;  $R_2 = \text{OH}$ )

### Ингибиторы трансляции (стадия элонгации)

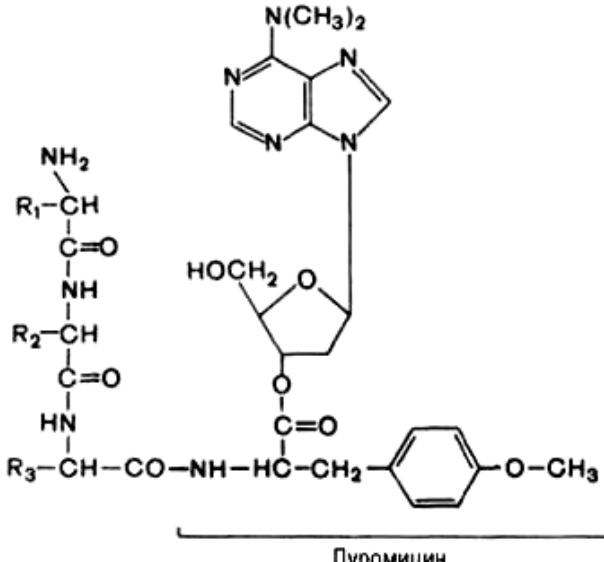
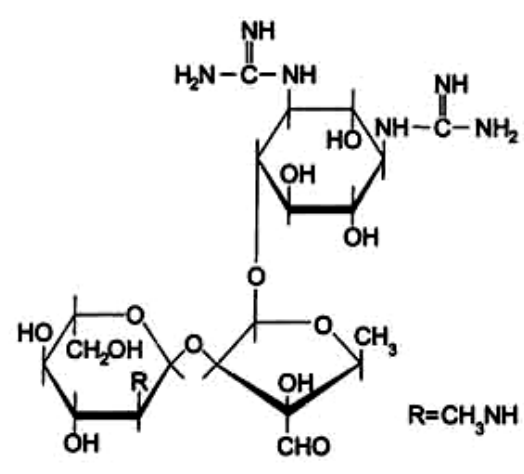
**Тетрациклины**  
(различные виды р. *Streptomyces*).  
Обладают широким спектром действия, легко проникают через клеточную мембрану

Обратимо связываются с малой (30S) субъединицей прокариотических рибосом и занимают в рибосоме место в А-сайте, мешая присоединению аминоацил-тРНК. У эукариот ингибирует процессы в митохондриальных рибосомах, намного меньше действует на 80S-рибосомы.



**Пуромицин**  
(продукт - *Streptomyces alboniger*)

В результате структурного сходства с концевым остатком АМФ в аминоацил-тРНК, он встает в А-сайт рибосомы и взаимодействует с пептидил-тРНК, принимая на себя растущую полипептидную цепь. В результате образуется пептидил-пуромицин. Поскольку пептидил-пуромицин не несет на себе антикодона, он легко отделяется от рибосомы, обрывая синтез белковой цепи. Пуромицин тормозит синтез белка как у прокариот, так и у эукариот.

	 <p style="text-align: center;">Пуромидин</p>
<p><b>Стрептомицин</b> (антибиотик аминогликозидной природы), родственные ему гентамицин и амикацин. Синтезируются бактериями pp. <i>Streptomyces</i>, <i>Micromonospora</i>, <i>Bacillus</i></p>	<p>Нарушают правильность элонгации. Связываясь с рибосомальным белком S12 в 30S-субъединице рибосомы, повышает сродство молекулы тРНК к А-сайту, в результате вызывает сбой в соответствии между кодонами мРНК и включаемыми в белок аминокислотами: например, кодон УУУ вместо фенилаланина начинает кодировать лейцин. Ошибочная трансляция приводит к образованию функционально неактивных белков.</p>  <p style="text-align: right;">R=CH<sub>3</sub>NH</p>
<p><b>Хлорамфеникол</b> (левомицетин) <i>Streptomyces venezuelae</i> Обладает широким спектром действия</p>	<p>Действуя на 50S-субъединицу, ингибирует пептидилтрансферазную активность рибосом прокариот. У эукариот не действует на 80S рибосомы, но ингибирует рибосомы митохондрий.</p>
<p><b>Эритромицин</b> (антибиотик группы макролидов, образуемый</p>	<p>То же, что и для хлорамфеникола</p>

стрептомицетами)	
<b>Циклогексимид</b> <i>(Streptomyces griseus)</i> Из-за выраженного токсического и тератогенного эффектов применяется только в экспериментальных исследованиях, но не в качестве лекарственного препарата	Ингибирует пептидилтрансферазную активность большой субъединицы рибосом эукариот

2) **Азетидин-2-карбоновая кислота** – аллелопатическое соединение, небелковая аминокислота, аналог пролина (рис. 38). Синтезируется некоторыми растениями сем. Лилейных, в том числе – ландышем. По механизму токсичного действия она сходна с описанной выше небелковой аминокислотой канаванином – аналогом аргинина: у восприимчивых растений распознается соответствующей (для данного токсина – пролиновой) аминоацил-тРНК-синтетазой и включается в состав синтезируемых полипептидных цепей, что приводит к образованию функционально неактивных белков.

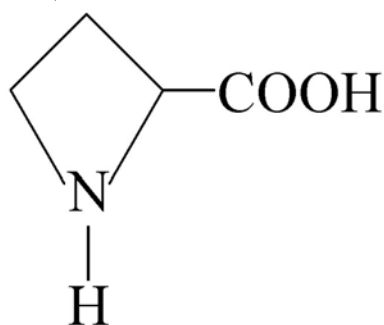


Рис. 38 Формула азетидин-2-карбоновой кислоты

#### 5.4. Вопросы для самоконтроля по материалу главы 5

1. Перечислите соединения ингибирующие синтез белка на стадии транскрипции, трансляции. Какие из них ингибируют активность белковых факторов, а какие – ферментов.
2. Назовите ингибиторы синтеза белка, продуцируемые растениями, грибами, бактериями, опишите механизмы их действия.
3. Являются ли ингибиторы биосинтеза белка алломонами, кайромонами, синомонами? Докажите вашу точку зрения.
4. Приведите примеры применения природных ингибиторов биосинтеза белка в практической деятельности человека.

# П Р И Л О Ж Е Н И Е

## ПРИЛОЖЕНИЕ 1

### Регуляция синтеза белка на стадии репликации

Регуляция на данной стадии возможна путем добавления (или удаления) кодирующих (или регуляторных) участков на ДНК. Суть данного способа заключается в следующем: если удалить матрицу (“деминуция”), то и синтеза белка с нее не будет, а если увеличить дозу определенного гена в ДНК (“амплификация”, “мультипликация”), то появится возможность ускорить построение белков на многих одинаковых матрицах.

В большинстве случаев наличие избыточной генетической информации отрицательно сказывается на жизнеспособности клеток, а ее недостаток, возникающий из-за недорепликации ДНК, приводит к их гибели из-за отсутствия жизненно важных генов. Однако в природе известны изменения дозы генов в нормальном клеточном цикле или онтогенезе организма. Такие процессы в норме идут под жестким контролем специальных механизмов.

Пример деминуции генов наблюдается у аскариды, теряющей в онтогенезе значительное число генов соматических клеток. Устранение генов из состава ДНК приводит к прекращению синтеза всех закодированных в них белков.

Примеры влияния амплификации на синтез белков:

1) Известно токсичное вещество метотрексат, ингибирующее фермент дигидрофолатредуктазу и из-за этого блокирующее метаболизм витамина - фолиевой кислоты. Однако у клеток, находящихся в условиях действия метотрексата, возможна амплификация (возрастание числа копий) гена **dhfr**, кодирующего дигидрофолатредуктазу. Число генов **dhfr** в линии клеток, устойчивых к метотрексату, варьирует от 40 до 400 в зависимости от строгости селекции и индивидуальной клеточной линии. С возросшего числа генов синтезируется значительно больше молекул этого фермента, что позволяет клетке восстановить нарушенный обмен витамина.

2) Клетки, устойчивые к тяжелому металлу кадмию, содержат увеличенное число копий генов, кодирующих белки металлотioneины (см. Приложение 5), осуществляющие обезвреживание этого токсичного металла.

Амплификация генов может происходить в несколько стадий, с постепенным увеличением числа копий данного гена.

## ПРИЛОЖЕНИЕ 2

### Ферменты, кодируемые *lac*-опероном. Аллолактоза – истинный индуктор *lac*-оперона

Кодируемые *lac*-опероном белки являются ферментами, необходимыми бактерии для усвоения и метаболизма лактозы (дисахарида, состоящего из моносахаридов  $\beta$ -галактозы и глюкозы). Первый фермент –  **$\beta$ -галактозидаза** – расщепляет лактозу на  $\beta$ -галактозу и глюкозу. Второй фермент – **галактозидпермеаза** – осуществляет транспорт лактозы из внешней среды в бактериальную клетку. Третий белок – **галактозидтрансацилаза** – участвует в защите клетки от любых неметаболизирующихся, потенциально токсичных  $\beta$ -галактозидов. В безлактозной среде *lac*-оперон почти полностью репрессирован, однако не “выключен” совсем. Это обеспечивает существование в клетке определенного, хотя и очень малого, количества молекул каждого из трех названных ферментов.

Если в среде появляется лактоза, имеющиеся немногочисленные молекулы галактозидпермеазы обеспечивают ее транспорт внутрь клетки, а имеющиеся молекулы  $\beta$ -галактозидазы начинают ее гидролиз, при котором в качестве побочного продукта образуется изомер лактозы – аллолактоза. Именно она, а не сама лактоза, является истинным индуктором *lac*-оперона. Аллолактоза способна расщепляться  $\beta$ -галактозидазой, но ее сродство к ферменту ниже, чем у лактозы. Поэтому, пока в клетку поступает лактоза (то есть в окружающей среде концентрация лактозы высока), аллолактоза накапливается в количестве, достаточном для индукции. Когда вся лактоза будет исчерпана,  $\beta$ -галактозидаза начнет использовать и аллолактозу, обеспечивая тем самым механизм терминации индукции. Таким образом, система постоянно тестирует скорость поступления лактозы, решая, стоит ли продолжать индукцию или нет. Если бы “включение” *lac*-оперона индуцировалось напрямую лактозой, то он бы “включался” и при следовых количествах этого дисахарида в среде, что бактерии не выгодно.

## ПРИЛОЖЕНИЕ 3

### Примеры $\sigma$ -субъединиц РНК-полимеразы и контролируемых ими процессов

Названия  $\sigma$ -субъединиц соответствуют их молекулярной массе в килодальтонах. Кроме того, для их обозначения пользуются аббревиатурой Rpo (от “**R**NA **p**olymerase”). В качестве примера рассмотрим разнообразие  $\sigma$ -субъединиц у кишечной палочки *E. coli*. У этой бактерии известно семь различных типов  $\sigma$ -субъединиц, перечисленных в таблице 1. Основным типом  $\sigma$ -субъединиц являются полипептиды с Мм 70 кДа, обозначаемые как  $\sigma^{70}$  или RpoD. Другие  $\sigma$ -субъединицы называют альтернативными. Они отличаются от основной по аминокислотным последовательностям и молекулярной массе.

Различные  $\sigma$ -субъединицы узнают промоторы разных групп генов. Например,  $\sigma^{32}$  узнает только промоторы генов основных белков теплового шока – шаперонов (GrpE, GroESL, DnaKJ, HtpG) и протеаз (Clp, Lon). Как правило, при распознавании промотора распознаются блоки, отстоящие на 10 и 35 нуклеотидов от точки начала транскрипции.

Количественное соотношение разных типов субъединиц изменяется в зависимости от фазы роста и условий, в которых находится бактериальная клетка. В таблице 1 приведено соотношение, типичное для растущей клетки *E. coli*, не подвергающейся стрессирующим воздействиям. В условиях стресса количество альтернативных субъединиц может значительно увеличиться.

Таблица 1

Основные и альтернативные сигма-субъединицы РНК-полимеразы *E. coli*

$\sigma$ -субъединица	Узнаваемые последовательности		Контролируемые процессы и/или отвечающие за них гены	Примерное кол-во молекул РНК-полимеразы, содержащих данную субъединицу, в растущей клетке бактерии
	“-35”	“-10”		
$\sigma^{70}$ (RpoD)	TTGACA	TATAAT	Большинство жизненно важных процессов: узнают промоторы генов “домашнего хозяйства” и большинства генов, связанных с процессами роста.	700

$\sigma^{54}$ ( $\sigma^N$ , RpoN)	CTGGNA	TTGCA	Гены, нужные для метаболизма азота и некоторые гены, участвующие в ответе на стресс	8
$\sigma^{38}$ ( $\sigma^S$ , RpoS)	Не приводится	Не приводится	Важна для транскрипции ряда генов, специфичных для стационарной фазы роста	> 1
$\sigma^{32}$ ( $\sigma^H$ , RpoH)	CCCTTGAA	CCCCATNTA	Гены, кодирующие белки теплового шока	> 10
$\sigma^{28}$ ( $\sigma^F$ , RpoF)	СТААА	GCCGATAA	Гены, нужные для работы жгутикового аппарата и осуществления хемотаксиса	370
$\sigma^{24}$ ( $\sigma^E$ , RpoE)	Не приводится	Не приводится	Гены, необходимые для ответа на экстремальный тепловой шок и гены внецитоплазматических продуктов	> 10
$\sigma^{19}$ ( $\sigma^{Fecl}$ , Fecl)	Не приводится	Не приводится	Система транспорта цитрата железа и регуляция транскрипции генов внецитоплазматических продуктов	> 1



## ПРИЛОЖЕНИЕ 4

### Транскрипционные факторы (ТФ): их классификация, активирующие воздействия и специфика функционирования в норме и при патологии

ТФ являются модульными по структуре и содержат следующие домены:

**ДНК-связывающий домен (DBD)** — взаимодействует со специфичными последовательностями ДНК, характерными для промоторов и энхансеров. Специфичность распознавания определенных последовательностей определяет набор генов, подверженных регуляции данным ТФ.

**Трансактивирующий домен (TAD)** — содержит участки связывания других белков, например, транскрипционных корегуляторов;

**Сигнальраспознающий домен (SSD)** (например, лиганд-связывающий домен), который чувствителен к внешним сигналам и отвечает за передачу сигнала к другим компонентам транскрипционного комплекса.

ТФ могут классифицироваться по (1) механизму действия, (2) регуляторной функции, (3) структуре ДНК-связывающего домена.

По механизму действия ТФ подразделяют на группы, как показано на рис. 1.



Рис. 1 Группы транскрипционных факторов и условия, “включающие” их синтез

По механизму действия выделяют два класса ТФ:

**1) Главные факторы транскрипции**, вовлеченные в образование инициационного комплекса.

2) **ТФ, взаимодействующие с upstream-участками ДНК**, (областями, расположенными до промотора, лежащими относительно него с другой стороны от кодирующей области гена). Этот класс включает в себя две группы ТФ: факторы первой группы не требуют активации или ингибирования для функционирования, факторы второй группы должны активироваться.

Классификацию ТФ в зависимости от выполняемой ими функции (условий, в которых они функционируют) отражает рис. 1. Факторы, присутствующие во всех типах клеток постоянно (конститутивные), образуют первую группу ТФ. К ним принадлежат **главные факторы транскрипции** (например, Sp1, TFIIA, TFIIБ, TFIIД, TFIIЕ, TFIIФ и TFIIН).

Вторая группа факторов появляется не во всех типах клеток и лишь в определенных условиях, то есть эти ТФ – индуцируемые. В зависимости от того, какие условия соответствуют активному состоянию, ТФ этой группы подразделяются на две подгруппы:

1) **участвующие в развитии организма** (клетко- и тканеспецифичные). Их экспрессия строго контролируется, но, начав экспрессироваться, они не требуют дополнительной активации – GATA, HNF, PIT-1, MyoD и др.

2) **сигналзависимые** – активируются лишь после поступления какого-либо сигнала. ТФ могут быть активированы/деактивированы путем воздействия на их сигнал-чувствительный домен различным образом: посредством связывания лиганда, через фосфорилирование или благодаря взаимодействию с другими ТФ и/или корегуляторными белками.

а) ТФ – рецепторы стероидов переходят в активное состояние при поступлении через мембрану клетки в цитоплазму гидрофобного внеклеточного сигнала – гормона стероидной природы, (подробнее см. гл. 2.5, рис. 18).

б) ТФ, зависимые от внутриклеточного сигнала, переходят в активное состояние в результате взаимодействия с низкомолекулярными внутриклеточными соединениями.

в) ТФ, активируемые сигналами, передаваемыми от мембраны клетки (например, STAT, R-SMAD, NF-κB, Notch, TUBBY, NFAT). Если ТФ этой группы как до активации, так и после нее локализован в ядре, он относится к **мембраносвязанным рецептор-зависимым** (CREB, AP-1, Mef2). Если ТФ в неактивном состоянии локализован в цитоплазме, а после активации транспортируется в ядро – он относится к **латентным цитоплазматическим факторам**.

Третий тип классификации ТФ – по структуре ДНК-связывающего домена. На основании сходства первичной структуры (что предполагает и сходство третичной структуры) ДНК-связывающих доменов все ТФ делятся на соподчиненные группы (надклассы, классы, семейства и т.д.) с присвоением определенного шифра. Например, фактор NF-κB относится к надклассу 4 – β-скаффолд-факторов с контактами по малому желобку, классу 4.1 – RHR (Rel homology region), семейству 4.1.1.

**Таблица 1**

Примеры специфических транскрипционных факторов человека, путей их активации, вызываемых эффектов в норме и при патологии

Транскрипционный фактор	Активация фактора	Эффект	Дефект гена / белка и его последствия
CREB (взаимодействует с цАМФ-чувствительным элементом)	Лиганд ↓ рецептор ↓ G-белок ↓ аденилатциклаза ↓ цАМФ ↓ протеинкиназа А ↓ CREB ↓ Транскрипция	Усиление транскрипции соматостатина, энкефалинов, глюкагона, вазоактивного желудочно-кишечного полипептида	Хромосомные aberrации, затрагивающие locus CREB ведут к острой миелоидной лейкемии. Аутосомно-доминантный тип наследования мутации гена, характеризующейся дефектами развития лица, психическими расстройствами, склонностью к опухолевому росту (синдром Рубенштейна-Тэйби)
AP-1 (c-Jun/c-Fos) Транскрипционный фактор, критичный для регуляции развития скелета	Фактор роста ↓ активация рецепторной тирозинкиназы ↓ Ras-каскад ↓ транскрипция	c-Jun и c-Fos образуют гетеродимер, входящий в состав AP-1 (activator protein).	При избыточной экспрессии гена c-Fos - заболевания костной ткани (остеосаркома, болезнь Педжета, фиброзная дисплазия). При избыточной экспрессии гена c-Jun - опухоли
Рецепторы йод-содержащих гормонов, кодируемые генами ERBA	Йодсодержащие гормоны (Т3 и Т4) ↓ образование гетеродимеров из активированного тиреоидного рецептора и рецептора 9-цис-ретиноевой кислоты (может не содержать лиганда) ↓	Усиливают потребление кислорода и образование тепла, глюконеогенез, распад гликогена, окисление глюкозы, липолиз	Мутация гена ERBA1 - причина врождённого кретинизма, наследующегося по аутосомно-доминантному типу. Мутация гена ERBA2 передаётся по аутосомно-доминантному типу и характеризуется генерализованной нечувствительностью к

	транскрипция		тиреоидным гормонам, известна аутосомно-рецессивная форма заболевания
Рецепторы андрогенов	<p>Гормоны тестостерон, дигидротестостерон</p> <p>↓</p> <p>образование гомодимеров из двух активированных рецепторов андрогенов</p> <p>↓</p> <p>Транскрипция (подробнее см. рис. 19)</p>	Стимулирует пролиферацию и дифференцировку клеток в тканях-мишенях	Мутации генов этих рецепторов приводят к синдрому тестикулярной феминизации. Дефект гена может привести к сцепленной с X-хромосомой спинальной и бульбарной мышечной атрофии. Аномальные рецепторы могут стимулировать митозы клеток простаты, приводящие к злокачественной опухоли железы
Рецептор прогестерона	<p>Гормон прогестерон</p> <p>↓</p> <p>образование гомодимеров из двух активированных рецепторов прогестерона</p> <p>↓</p> <p>Транскрипция (подробнее см. рис. 19)</p>	Стимулирует пролиферацию и дифференцировку клеток в тканях-мишенях	Дефект рецептора приводит к отсутствию характерных для секреторной фазы менструального цикла изменений эндометрия

## ПРИЛОЖЕНИЕ 5

### Индукция синтеза металлотионеинов как защита от воздействия тяжелых металлов

Специфически действующие факторы транскрипции часто переходят в функционально активное состояние лишь в строго определенном месте или в ответ на соответствующий сигнал. Примером является активация дрожжевого фактора транскрипции ACE1, который стимулирует транскрипцию гена металлотионеина в присутствии ионов меди. В этом случае ионы  $\text{Cu}^{2+}$ , взаимодействуя с фактором, вызывают конформационные изменения в полипептидной цепи. Только после этого фактор приобретает способность связываться с регуляторным участком гена металлотионеина и активировать его транскрипцию.

В ответ на воздействие тяжелых металлов в клетках животных, грибов, растений и некоторых бактерий синтезируются защитные металлсвязывающие белки – металлотионеины, очень богатые цистеином.

Металлотионеины разделяют на три класса с учетом химической структуры молекул:

MT1 – металлсвязывающие белки позвоночных,

MT2 – полипептиды, сходные по строению с MT1, но имеющие другое расположение остатков цистеина (они есть у цианобактерий и некоторых других прокариот, у растений, грибов, беспозвоночных животных),

MT3– фитохелатины, отличающиеся от других металлотионеинов особым способом синтеза – с помощью фитохелатинсинтазы (у высших растений, грибов, некоторых водорослей и беспозвоночных животных). Связанные этими белками металлы поступают в вакуоль, где и хранятся в виде не опасных для клетки комплексов с металлотионеинами или органическими кислотами.

Рассмотрим, как концентрация тяжелого металла в окружающей среде регулирует уровень синтеза металлотионеинов на примере дрожжевых организмов. Задача заключается в том, чтобы дать защитный ответ на угрожающе высокую концентрацию токсичного металла, но при низком его содержании или полном отсутствии синтез защитных белков не усиливать.

У дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* известен ген CUP1 (от *cuprum* – медь), кодирующий 61-аминокислотный металлотионеин, способный связать 8 атомов Cu. Известно, что, наряду с Cu, металлотионеин дрожжей может связывать и некоторые другие металлы (например, Ag), но менее эффективно. При инактивации гена CUP1

Когда ионы меди поступают в клетку, то связываются металлотионеином, концентрация которого в норме очень невелика, а также с другими белками (например, медьсодержащими ферментами). В этих условиях в ядро медь не поступает. Повышение концентрации меди во внешней среде приводит к появлению ионов металла, не связанных белками. В этом случае медь попадает в ядро, где, как лиганд, взаимодействует с конститутивно синтезируемым

ядерным белком ACE I – специфическим транскрипционным фактором. В N-концевой положительно заряженной области этого белка расположены 12 цистеиновых остатков, к части из которых способна присоединиться медь.

Присоединение меди меняет третичную структуру ACE I таким образом, что он активируется - становится способен связаться с ДНК. В промоторной области гена CUPI (приблизительно между -105 и -230 относительно сайта начала транскрипции) имеется не менее 4 цис-элементов (вероятно, энхансеров), к которым и присоединяются молекулы ACEI. Присоединение ACEI к регуляторным элементам резко повышает эффективность инициации транскрипции гена CUPI. Предполагают, что основную роль в этом процессе играет влияние ACEI через предполагаемый модулятор (не установленный в настоящее время) на один из общих факторов транскрипции – TFIID

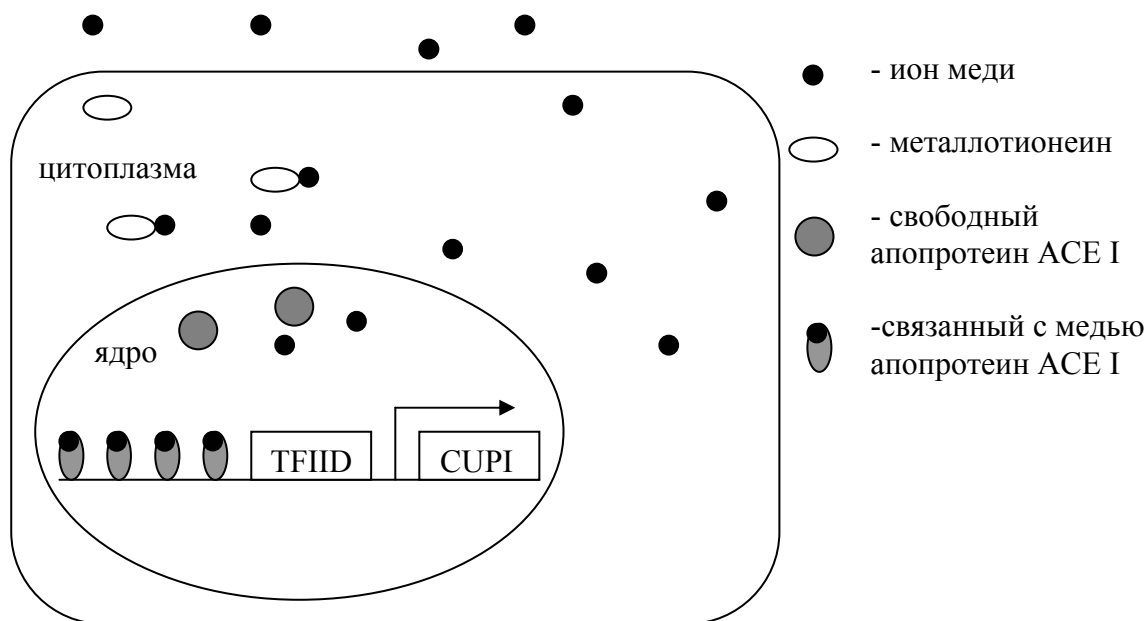


Рис 1 Активация транскрипции гена металлотиионеина в ответ на возрастание концентрации меди

CUPI – ген, кодирующий металлотиионеин (стрелкой отмечена точка начала транскрипции)  
 TFIID – транскрипционный фактор, важный для инициации транскрипции (относится к общим факторам транскрипции, обеспечивающим присоединение РНК-полимеразы II к промотору с низкой эффективностью)

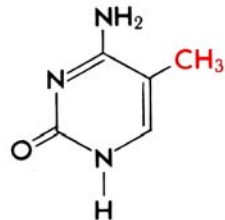
Места присоединения активированной формы ACEI к ДНК соответствуют расположению энхансерных цис-элементов в промоторной области гена CUPI.

Преимущественно индуцируют синтез металлотиионеинов Cd, Zn, Cu, Hg, Au, Ag, Co, Ni, Pb, хотя количество защитных белков, образуемых в ответ на разные металлы будет различно. Такие металлы, как Ca, Al, Na, Mg, U индукции металлотиионеинов не вызывают. Следует отметить, что синтез металлотиионеинов могут индуцировать не только тяжелые металлы, но и другие стрессирующие факторы: клеточное голодание, инфекции, высокое содержание O<sub>2</sub>, воздействие проникающей радиации и ряд химических соединений, включая некоторые биологически активные вещества.

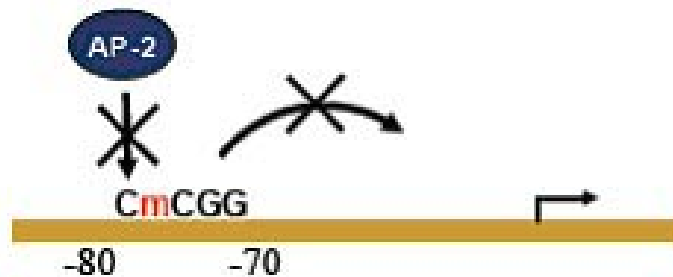
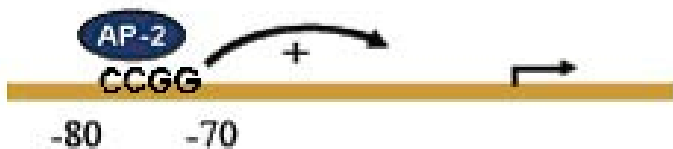
## ПРИЛОЖЕНИЕ 6

### Влияние метилирования ДНК на уровень синтеза проэнкефалина человека

Метилирование ДНК отражается на проэнкефалине – предшественнике опиоидных пептидов.



5-Метилцитозин (m<sup>5</sup>Cyt)



Метилирование цитозина приводит к образованию 5-метилцитозина

Ген проэнкефалина человека содержит сайт связывания транскрипционного фактора AP-2 в районе -80/-70 от старта транскрипции.

Если сайт связывания AP-2 находится в деметилированном состоянии, AP-2 эффективно взаимодействует с этим сайтом, что приводит к активации транскрипции гена

Метилирование нарушает связывание AP-2 с ДНК и трансляция снижается

## ПРИЛОЖЕНИЕ 7

### Белки теплового шока

Белки теплового шока (БТШ, Hsp – heat shock protein) были открыты в 1974 году. Они синтезируются в клетках всех живых организмов в ответ:

- на увеличение температуры;
- на ряд других неблагоприятных внешних факторов.

Основная роль этих специфических белков – помочь клетке выжить в условиях температурного (или иного) стресса, а после его прекращения вернуться к нормальной жизни.

БТШ у всех живых организмов представлены большим набором полипептидов, которые принято именовать в соответствии с молекулярной массой, выраженной в килодальтонах (кД). Например, БТШ с молекулярной массой 70 кД называют БТШ70. БТШ делят на группы высокомолекулярных (60–110 кД) и низкомолекулярных (15–40 кД) белков (табл. 1). Среди БТШ выделяют пять основных классов БТШ: БТШ100, 90, 70, 60 и малые БТШ (Hsp – small Hsp, sHsp). Малые белки теплового шока – очень большая и гетерогенная группа, объединяющая в своем составе белки с молекулярными массами от 8 до 43 кДа.

Таблица 1

Представители БТШ у про- и эукариот

Ориентировочная молекулярная масса, кДа	Прокариотические белки	Эукариотические белки	Функция
8 кДа			Убиквитин (см. Приложение 9)
<u>10 кДа</u>	GroES	Hsp10	Шапероны
20-30 кДа	GrpE	Группа белков теплового шока HspВ включает десять представителей у млекопитающих, в их числе <u>Hsp27</u>	При стрессе взаимодействуют с элементами хроматина, влияя на осуществление клеточного цикла. Повышают устойчивость клеток к некрозу.
<u>40 кДа</u>	DnaJ	Hsp40	Кофактор для Hsp70
<u>60 кДа</u>	GroEL, антиген массок 60 кДа	Hsp60	Группа шаперонов, называемых <i>шаперонинами</i> . Обеспечивают сборку четвертичной структуры



			белков, участвуют в фолдинге белков после их посттрансляционного транспорта в митохондрию или хлоропласт
<u>70 кДа</u>	DnaK	Группа белков теплового шока HspA. Включает в себя Hsp71, Hsp70, Hsp72, Grp78 (BiP). Причем Hsp70 обнаружен только у <u>приматов</u>	Относится у шаперонам, принимает участие в сворачивании и разворачивании белков, обеспечивает клетке нечувствительность к нагреванию. Предотвращает сворачивание белков в ходе посттрансляционного транспорта в митохондрии и хлоропласты.
<u>90 кДа</u>	HtpG, C62.5	Группа белков теплового шока HspC, включает в состав Hsp90, Grp94	Участвует в образовании комплекса стероидных гормонов с рецептором, а так же образует комплексы с некоторыми протеинкиназами, контролируя их активность. Поддерживает структуру стероидных рецепторов и факторов транскрипции
100 кДа	ClpB, ClpA, ClpX	Hsp104, Hsp110	Обеспечивает невосприимчивость к повышению температуры

Первичная структура многих БТШ, в частности - БТШ70, у насекомых, птиц, млекопитающих, грибов и растений отличается очень незначительно. Отдельные участки БТШ70 сохраняют свыше 90% гомологии у животных и человека. Это говорит о высокой консервативности БТШ в эволюции, что характерно для жизненно важных белков.

Каждое семейство БТШ кодируется, как правило, несколькими генами (семейством близких генов), различающихся главным образом по регуляции их активности. При стрессе активация генов БТШ происходит очень быстро: мРНК БТШ в клетках обнаруживаются через 5 минут, а сами БТШ - через 15 минут после начала стресса.

Такое стремительное включение синтеза БТШ на транскрипционном и трансляционном уровнях достигается в результате многих событий. Тепловой шок вызывает изменения в мРНК, синтезированных в клетке до шока,

происходит модификация белковых факторов трансляции и рибосомных белков.

Включение генов БТШ определяется **регуляторными элементами генов БТШ** (РЭ БТШ, **HSE** – англ.: heat shock element), присутствующими в промоторе любого hsp-гена. Как и сами БТШ, их регуляторные элементы обладают высокой степенью гомологии у многих организмов. HSE, вероятно, специализированны, и могут обеспечивать экспрессию генов БТШ в ответ на различные стрессовые факторы.

РЭ БТШ включают гены белков теплового шока после взаимодействия со специфическими регуляторными белками – **факторами транскрипции генов БТШ (HSF – heat shock factor)**. Семейство HSF содержит несколько белков, из которых у млекопитающих и человека экспрессируются HSF1, HSF2 и HSF4, причем HSF1 является универсальным стресс-реагирующим активатором. Эти факторы обладают некоторыми необычными свойствами, например, способностью образовывать гомотримеры посредством домена типа “лейциновой молнии”. Факторы теплового шока имеют ДНК-связывающий домен классического типа спираль-поворот-спираль.

В отсутствие стресса фактор **HSF** связан с Hsp70, что не дает ему взаимодействовать с ДНК.

В ответ на стресс комплекс “Hsp70+HSF” распадается на составные белки. Hsp70 начинает функционировать как шаперон. Факторы HSF образуют гомотримеры (“HSF1+HSF1+HSF1”) или гетеротримеры (“HSF1+HSF2+...”) и перемещаются в ядро, где связываются с элементами HSE на ДНК.

После окончания стресса освободившийся Hsp70 опять присоединяется к HSF, в результате чего последний утрачивает способность собираться в тримеры и связываться с ДНК. В итоге все возвращается в исходное состояние.

Предполагается, что белки теплового шока сами могут регулировать экспрессию своих генов через “петлю авторегуляции”. Согласно этой гипотезе, увеличение концентрации неправильно свернутых белков, возникшее при стрессе, приводит к связыванию специфических HSP и активации HSF.

## ПРИЛОЖЕНИЕ 8

### Циклины и другие регуляторы клеточного цикла

Известно множество различных внутриклеточных молекулярных сигналов. К ним относят собственно **регуляторы клеточного цикла** (циклины, циклин-зависимые протеинкиназы, их активаторы и ингибиторы) и онкосупрессоры.

#### 1. Собственно регуляторы клеточного цикла

Скоординированная деятельность циклинов, циклин-зависимых протеинкиназ, их активаторов и ингибиторов обеспечивает переход клеток от фазы к фазе клеточного цикла, а также точное выполнение событий каждой фазы. Нарушения в работе какого-либо компонента этой системы приводят к патологиям митоза и потере контроля за пролиферативными потенциями клетки, что может вызвать появление неконтролируемого клона, то есть рост опухоли. Клетки таких клонов называют трансформированными, или малигнизированными. Главная причина появления пролиферативно неконтролируемых клеток — мутации генов, кодирующих структуру регуляторов клеточного цикла. Вирусная инфекция также может вызвать опасные нарушения. Так, интеграция вируса гепатита В в ген одного из циклинов обнаружена при гепатоклеточной карциноме.

**Циклины** — регуляторные субъединицы p34-протеинкиназ. Идентифицировано шесть классов циклинов: А, В, С, D, Е, F. Название классов этих белков отражает цикличность процессов сборки и разборки макромолекулярного комплекса в процессе каждого клеточного цикла. Циклины различаются экспрессией на определенных стадиях клеточного цикла и соответственно на различных стадиях регулируют деление клетки. К середине М-фазы концентрация циклинов в клетке резко уменьшается с последующим нарастанием синтеза по мере прохождения всего цикла.

**Циклин-зависимые протеинкиназы Cdk** (cyclin dependent protein kinase) — ферменты, активируемые под действием циклинов. После активации фосфорилируют определенные субстраты, что обеспечивает возможность контролировать клеточный цикл, переключая его с одной фазы на другую (с G<sub>1</sub> на S или G<sub>2</sub> на M). Белки, связывающиеся с этим комплексом и ингибирующие его каталитическую активность, блокируют клеточный цикл в ответ на антипролиферативные сигналы.

Одним из многочисленных соединений, регулирующих работу циклинов и циклин-зависимых протеиназ является белок p27. При связывании его с циклином и Cdk блокируется входение клетки в S-фазу цикла. Определение p27 используют в диагностике рака молочной железы. Снижение уровня p27 является плохим прогностическим признаком.

#### 2. Онкосупрессоры

Онкосупрессоры — это вещества, подавляющие развитие опухолей. Одним из онкосупрессоров является белок p53 — транскрипционный фактор,

тетрамер, связывание которого с ДНК останавливает рост клеток в фазе G1 и запускает процессы репарации ДНК. Этот белок регистрирует различные сигналы при внешних воздействиях на клетку (вирусная инфекция, гипоксия) и состояние её генома (активация онкогенов, повреждения ДНК) и координирует ответ клетки на стресс. Не случайно ген p53 часто метафорически называют «стражем генома», «ангелом-хранителем», «геном совести клетки». В одних случаях p53 является репрессором, например – репрессирует компоненты транскрипционного фактора TFIIIB, участвующего в работе РНК-полимеразы III. В других случаях он выступает как активатор. Так, в стрессовых условиях p53 активирует транскрипцию генов, непосредственно отвечающих за остановку клеточного цикла и апоптоз. Среди наиболее известных генов - мишеней p53 упомянем p21 (ингибитор киназы клеточного цикла) и BAX - индуктор апоптоза.

В обычных условиях в нормальных, нетрансформированных клетках p53 нестабилен и достаточно быстро разрушается убиквитин-зависимым или убиквитин-независимым способом. Под воздействием стресса в клетках наблюдается усиление синтеза и стабилизация p53, поэтому в повреждённых клетках содержание этого транскрипционного фактора возрастает. Возросшая концентрация более стабильного p53 приводит к блокировке клеточного цикла до тех пор, пока нарушения не будут устранены. Это даёт клеткам шансы восстановить ДНК. При серьёзных повреждениях p53 инициирует самоубийство клетки — апоптоз.

Нарушения в функционировании p53 (например, в результате мутаций) обнаруживаются более чем в 50% случаев онкологических заболеваний.

## ПРИЛОЖЕНИЕ 9

### Убиквитин и убиквитилирование

**Убиквитин (Ub)** был открыт в середине 1970-х годов. Он представляет собой 76-аминокислотный белок с хорошо изученной  $\alpha/\beta$  укладкой (рис. 1), содержащий 7 функционально важных остатков лизина. Он постоянен для эукариот, но отсутствует у бактерий. У эукариот убиквитин кодируют несколько разных генов.

Если к субстрату присоединяется одна молекула убиквитина – это процесс **моноубиквитилирования**, если по одной в нескольких разных местах – это **множественное (или мульти-) убиквитилирование**, если несколько молекул убиквитина сцеплены между собой и затем присоединены к субстрату – это **полиубиквитилирование**.



Рис.1 Схема строения убиквитина (а) и убиквитинподобных белков SUMO (б).  
 $\beta$ -слои показаны стрелками

Моноубиквитинирование является распространенной регуляторной модификацией: для гистонов и транскрипционных факторов участвует в регуляции транскрипции, для ряда других белков - играет важную роль при репарации ДНК. Множественное моноубиквитинирование нужно для эндоцитоза субстрата и его последующей деградации в лизосомах. Полиубиквитилирование служит сигналом для протеасомной деградации субстрата, участвует в регуляции эндоцитоза, репарации ДНК, активации протеинкиназ. Минимальным сигналом деградации для протеасомы является цепь из четырех молекул Ub, последовательно соединенных изопептидной связью между С-концом одной молекулы и Lys-48 другой молекулы.

С момента открытия убиквитина было найдено несколько родственных ему белков. Их группируют в два класса:

- 1) белки с Ub-подобным доменом (UDP, ubiquitin-domain proteins) и
- 2) Ub-подобные модификаторы (Ubl, ubiquitin-like modifiers).

Активно изучаемыми представителями второго класса (Ubl) являются **белки SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifier)**. Строение молекулы такого белка показано на рис. ...Этот модификатор участвует в регуляции различных

клеточных процессов: ядерного транспорта, транскрипции, репарации и репликации ДНК, апоптоза и стабилизации белков. “Мечение” субстрата через присоединение к нему белка SUMO называется **сумоилированием**.

Процесс убиквитинирования осуществляется в каскаде реакций, катализируемых тремя ферментами: E1, E2 и E3. Упрощенно процесс полиубиквитинирования изображен на рис.2.

На первом этапе **Ub-активирующий фермент E1**, используя АТФ, активирует Ub с образованием высокоэнергетического тиолэфирного интермедиата (E1-S~Ub). Далее, один из **Ub-переносящих ферментов E2** (ubiquitin-carrier protein, UBC) через образование еще одного интермедиата (E2-S~Ub) переносит активированный Ub к E3-лигазе, специфично связанной с субстратом. В случае E3-лигаз, содержащих домен RING, Ub переносится лигазой сразу на субстрат. В случае НЕСТ-домен-содержащих E3-лигаз перенос Ub на субстрат проходит через образование еще одного интермедиата – E3-S~Ub. После присоединения первого Ub к субстрату E3-лигаза последовательно присоединяет еще несколько молекул Ub к остатку Lys на первой молекуле Ub. В некоторых случаях полиубиквитинирование идет при помощи дополнительных U-box-домен-содержащих E3-лигаз (другое название – E4-лигазы).

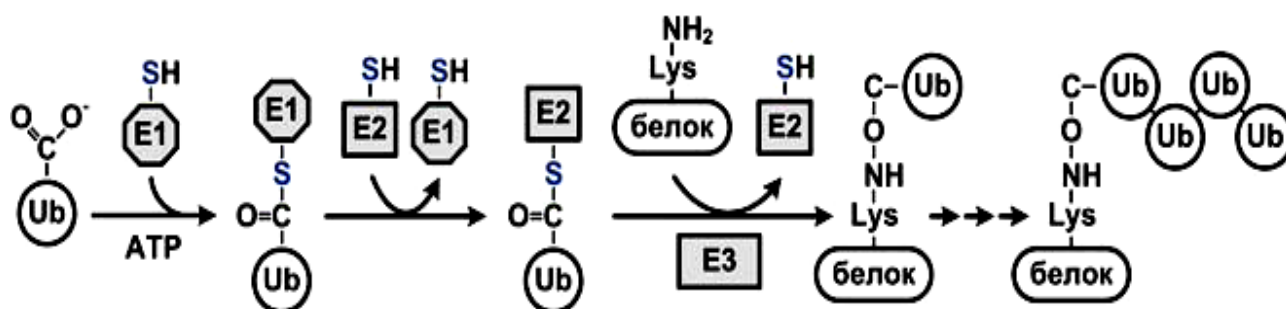


Рис. 2 Этапы полиубиквитинирования белка-субстрата

Убиквитин (Ub) активируется ферментом E1 и переносится на фермент E2. На последнем этапе E3-лигаза конъюгирует Ub с белком-субстратом (белок, с указанием NH<sub>2</sub> – группы в радикале лизина). Конечный продукт – полиубиквитинированный субстрат.

Система убиквитинирования у млекопитающих содержит несколько сотен разных ферментов, в том числе один E1-фермент, около 50 E2-ферментов и примерно 500 E3-лигаз. E3-лигазы играют ключевую роль в Ub-зависимой протеасомной деградации белков, так как именно они обеспечивают специфичность полиубиквитинирования субстрата.

## ПРИЛОЖЕНИЕ 10

### Малые регуляторные РНК: классификация, роль, происхождение

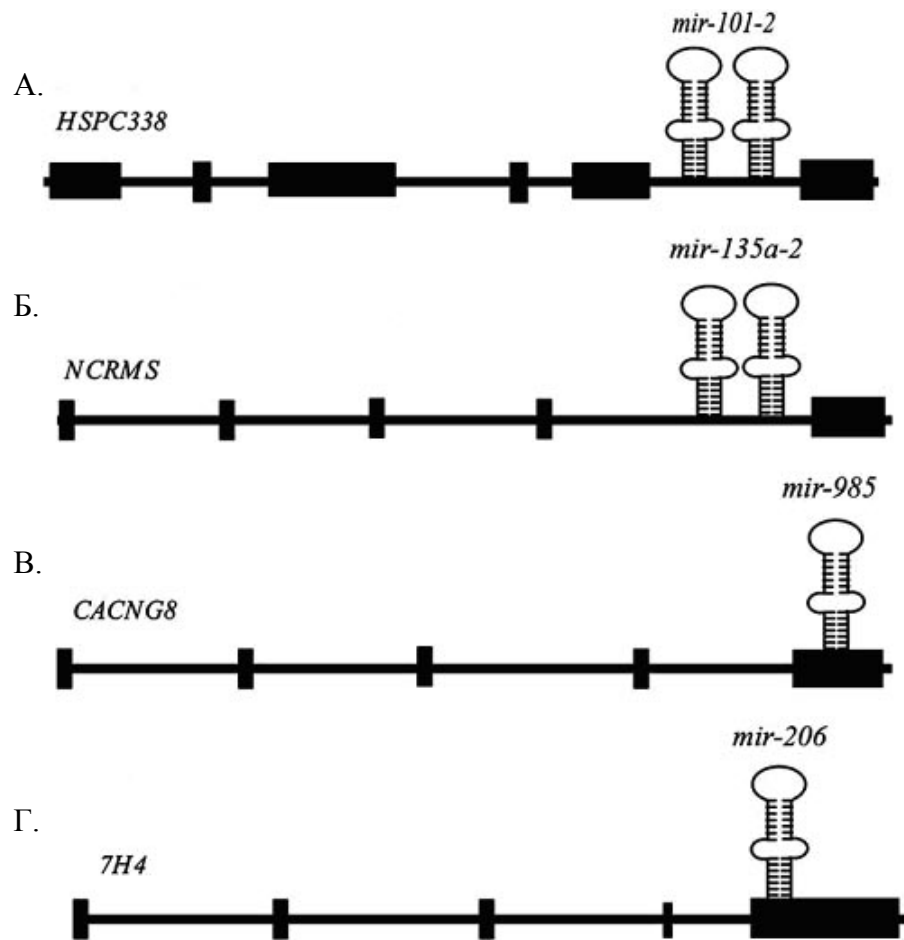


Рис. 1 Геномная организация и структура генов, кодирующих miРНК

МикроРНК (miРНК) могут кодироваться:

(А) интронами кодирующих транскрипционных единиц (ТЕ), например, кластер *mir-101-2*, обнаруженный в интроне гена *HSPC338*.

(Б) интронами некодирующих транскрипционных единиц, например кластер *mir-135a-2*.

(В) экзонами кодирующих транскрипционных единиц, например *mir-985* в гене *CACNG8*.

(Г) экзонами некодирующих транскрипционных единиц, например *mir-206*. Образующиеся miRNA условно показаны на “шпильках”, экзоны показаны как черные прямоугольники (масштаб не выдержан).

## Классы малых регуляторных РНК и их функции

Класс, представители	Организм - источник	Характеристика
<p>МикроРНК – miРНК</p> <p>Примеры: lin-4, let-7</p> <p>miR165/166, miR172 miR1</p>	<p>растения дрозофила нематода млекопитающие человек</p> <p>Нематоды</p> <p>Растения</p> <p>-“-</p> <p>Млекопитающие</p>	<p>Длина 19 – 25 нуклеотидов, закодированы в геномах большинства исследованных многоклеточных организмов. Блокируют транскрипцию или трансляцию генов вируса или клетки. Выполняют защитную функцию, регуляторную – при онтогенезе.</p> <p>Участие в регуляции по времени событий развития личинки</p> <p>Воздействие на осевую меристему и развитие листьев</p> <p>Регуляция формирования цветка и процесса цветения</p> <p>Регуляция развития нейронов</p>
Малые интерферирующие РНК – siРНК, делятся на группы:		
собственно siРНК	<p>растения дрозофилла нематоды млекопитающие человек</p>	<p>Двухцепочечные РНК, длина обычно 21-22 нуклеотидных пары. Являются важнейшим компонентом системы РНК-интерференции. Основная функция – защитная</p>
ta- siРНК	Найдены только у растений	<p>Источник – некодирующие районы гена. Вызывают расщепление определенных РНК. С одного гена Tas возникает целый ряд ta- siРНК, имеющих разные мишени</p>
nat- siРНК		<p>Источник – комплементарный транскрипт с гена SROS, который экспрессируется в ответ на солевой стресс</p>
ra- siРНК		<p>Длина 24 нуклеотида. Регулируют метилирование ДНК и гистонов в случае некоторых ретроэлементов и транспозонов</p>
Малые некодирующие РНК – tncРНК	Найдены только у нематод	<p>Функция не известна. Эволюционно не консервативны. Формируются без образования петли.</p>



<p>Малые моделирующие РНК – smРНК</p>	<p>Найдены только у млекопитающих</p>	<p>Регулируют экспрессию нейронспецифичных генов исключительно в зрелых нейронах</p>
<p>PIWI-РНК (piРНК)</p>	<p>Найдены только у дрозофиллы и млекопитающих</p>	<p>Группа малых РНК, необходимых для контроля над транспозонами. Экспрессируются с различных регионов генома, без образования петли на предшественнике. При синтезе этих РНК модифицируются 5'- и 3'-концы</p>

## ЛИТЕРАТУРА

1. Основы биохимии: учебник для вузов / под ред. проф. А.А. Анисимова. - М.: Высш. шк., 1986. - 551 с.
2. Биохимия: учебник для вузов / под ред. Е.С. Северина. - М.: ГЭОТАР-МЕД, 2003. - 784 с.
3. Комов В.П., Шведова В.Н. Биохимия: учебник для вузов. - М.: Дрофа, 2008. - 638 с.
4. Волькенштейн М.В. Биофизика. - М.: Наука, 1988. - 592 с.
5. Жимулев И.Ф. Общая и молекулярная генетика. - Новосибирск: изд-во Новосибирского университета, 2003. - 430 с.
6. Николайчик Е.А. Регуляция метаболизма клетки. - Минск: Изд-во БГУ, 2007. - 165 с.
7. Веселов А.П., Стручкова И.В., Брилкина А.А. Нуклеиновые кислоты: методические указания. - Н. Новгород: Изд-во ННГУ, 2006. - 63 с.
8. Абрамова Е.Б., Карпов В.Л. Протеасома: разрушение во имя созидания // Природа. - 2003. - №7. - С. 36-45
9. Гвоздев В.А. Регуляция активности генов при созревании клеточных РНК // Соросовский образовательный журнал. - 1996. - №12. - С. 11-18.
10. Лавров С.А., Кибанов М.В. Некодирующие РНК и структура хроматина // Успехи биологической химии. - 2007. - Т. 47. - С. 53-88.
11. Спирин А.С. Биосинтез белка: регуляция на уровне трансляции // Соросовский образовательный журнал. - 2000. - Т. 6, №5. - С. 2-7.
12. Blazek E., Mittler G., Meisterernst M. The Mediator of RNA polymerase II (review) // Chromosoma. - 2005. - V.113, №8. - P.399-408.
13. Krulko I., Ustyanenko D., Polischuk V. Role of siRNAs and miRNAs in the processes of RNA-mediated gene silencing during viral infections (review) // Cytology and Genetics. - 2009. - V. 43, № 1. - P. 63-72.
14. Montgomery M.K. RNA Interference. Historical overview and significance // Methods in molecular biology. - 2004. - V. 265. - P. 3-21.
15. Патрушев Л.И. Экспрессия генов. - М.: Наука, 2000. - 830 с.
16. Элиот В., Элиот Д. Биохимия и молекулярная биология. - М.: Изд-во НИИ Биомедицинской химии РАМН, 2000. - 366 с.
17. Якубке Х.-Д., Ешкайт Х. Аминокислоты. Пептиды. Белки. Пер. с нем. - М.: Мир, 1985. - 450 с.
18. Кольман Я., Рем К.-Г. Наглядная биохимия. Пер. с нем. М.: Мир, 2000. - 469 с.
19. Moore D., Frazer L.-A. Essential fungal genetics. N.-Y.: Springer, 2004. - 357 p.
20. The Alkaloids / ed. by A. Brossi. - N. Y.: Academic Press. - 1985. - 521 p.
21. Сорокин А. В., Ким Е.Р., Овчинников Л.П. Протеасомная система деградации и процессинга белков // Успехи биологической химии. - 2009. - Т. 49. С. 3-76.

22. Спирин А.С. Регуляция трансляции мРНК-связывающими факторами у высших эукариот // Успехи биологической химии. - 1996. - Т. 36. - С. 3-48.
23. Чумаков П.М. Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточном организме // Успехи биологической химии. - 2007. - Т. 47. - С. 3-52.
24. Bartel D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function (review) // Cell. - 2004. - V. 116. - P. 281-297.
25. Bence A.K., Crooks P.A. The mechanism of L-canavanine cytotoxicity: arginyl tRNA synthetase as a novel target for anticancer drug discovery // J. Enzyme Inhib Med Chem. - 2003. - V. 18, № 5. - P. 383-394.
26. Brivanlou A.H., Darnell J.E. Signal transduction and the control of gene expression (review) // Science. - 2002. - V. 295. - P. 813-818.
27. Epshtein V., Dutta D., Wade J., Nudler E. An allosteric mechanism of Rho-dependent transcription termination // Nature. - 2010. - V. 463, №14. - P. 245-250.
28. Bleiler J.A., Rosenthal G.A., Janzen D.H. Biochemical Ecology of Canavanine-Eating Seed Predators // Ecology. - 1988. - V. 69, № 2. - P. 427-433.
29. Maeda H., Fujita N., Ishihama A. Competition among seven *Escherichia coli*  $\sigma$  subunits: relative binding affinities to the core RNA polymerase // Nucleic Acids Research. - 2000. - V. 28, №18. - P. 3497-3503.
30. Matys V., Kel-Margoulis O. V., Fricke E., Liebich I., Land S., Barre-Dirrie A., Reuter I., Chekmenev D., Krull M., Hornischer K., Voss N., Stegmaier P., Lewicki-Potapov B., Saxel H., Kel A. E., Wingender E. TRANSFAC and its module TRANSCompel: transcriptional gene regulation in eukaryotes // Nucleic Acids Res. - 2006. - V. 34 -(Database issue): D108–110.
31. Piel J. A polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of Paederus beetles // PNAS. - 2002. - V. 99., № 22. - P. 14002-14007.
32. Stegmaier P., Kel A.E., Wingender E. Systematic DNA-binding domain classification of transcription factors // Genome informatics. International Conference on Genome Informatics. - 2004. - V. 15, № 2. - P. 276-286.
33. Thomadaki H., Tsiapalis C. M., Scorilas A. Polyadenylate polymerase modulations in human epithelioid cervix and breast cancer cell lines, treated with etoposide or cordycepin, follow cell cycle rather than apoptosis induction // Biol Chem. - 2005. - V. 386, № 5. - P. 471-80.
34. Wahid F., Shehzad A., Khan T., Kim Y.Y. MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. Review // Biochimica et Biophysica Acta. - 2010. V. 1803, № (11). - P.1231-1243.
35. База данных по белкам «**Protein Data Bank**»  
<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>

Ирина Валерьевна **Стручкова**  
Анна Александровна **Брилкина**  
Александр Павлович **Веселов**

## **РЕГУЛЯЦИЯ БИОСИНТЕЗА БЕЛКА**

*Учебно-методическое пособие*

Государственное образовательное учреждение высшего  
профессионального образования «Нижегородский государственный  
университет им. Н.И. Лобачевского».  
603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23.

Подписано в печать . Формат 60x84 1/16.  
Бумага офсетная. Печать офсетная. Гарнитура Таймс.  
Усл. печ. л. . Уч.-изд. л. .  
Заказ № . Тираж 200 экз.

Отпечатано в типографии Нижегородского госуниверситета  
им. Н.И. Лобачевского  
603600, г. Нижний Новгород, ул. Большая Покровская, 37  
Лицензия ПД № 18-0099 от 14.05.01