

PROTEIN BIOSYNTHESIS: INITIATION OF TRANSLATION

A. S. SPIRIN

The sequence of events during initiation of translation is described and general principles of the ribosome functioning in the process are formulated. The splitting of functions between two ribosomal subunits in the course of initiation is discussed; genetic and biochemical functions are attributed to the small and the large ribosomal subunits, respectively.

Описана последовательность событий в ходе инициации трансляции и сформулированы общие принципы функционирования рибосомных частиц в этом процессе. Обсуждается разделение функций между двумя рибосомными субчастицами при инициации трансляции. Генетические функции отнесены к малой рибосомной субчастице, тогда как биохимические – к большой.

БИОСИНТЕЗ БЕЛКА: ИНИЦИАЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ

А. С. СПИРИН

Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова

ВВЕДЕНИЕ. КЛЮЧЕВАЯ РОЛЬ ИНИЦИАЦИИ

Инициация трансляции – это серия молекулярных событий, происходящих с рибосомой, которая приводит к взаимодействию рибосомы с началом кодирующей нуклеотидной последовательности мРНК и последующему считыванию (трансляции) этой последовательности. Таким образом, за стадией инициации следует стадия собственно трансляции, или элонгации полипептидной цепи, которая заканчивается стадией терминации. Эпикл трансляции, состоящий из этих трех стадий – *инициации, элонгации и терминации*, – схематически показан на рис. 1 предыдущей статьи (см. [1]).

Для осуществления инициации Природа изобрела специальные механизмы. Дело в том, что способность рибосомы к трансляции матричного полинуклеотида (мРНК) и направляемому ей синтезу полипептидной цепи белка (см. [1]) еще далеко не обеспечивает пути вхождения в эти процессы. Прежде всего, как следует из рассмотрения элементарного элонгационного цикла рибосомы (см. рис. 2 в статье [1]), синтез полипептида требует присутствия преобразованной пептидил-тРНК в качестве одного из субстратов реакции транспептидации. Другими словами, донорный субстрат должен присутствовать в рибосомном *P*-участке, чтобы далее удлиняться за счет присоединения следующего аминокислотного остатка. Но когда рибосома начинает трансляцию, никакого пептида и соответствующего донорного субстрата в виде пептидил-тРНК в рибосоме еще нет. Для того чтобы решить эту проблему и запускаются специальные механизмы инициации: специальная инициаторная аминокислот-тРНК во взаимодействии со специальными белками (факторами инициации) связывается со специальным иницирующим участком мРНК на рибосоме. При этом связывающаяся инициаторная аминокислот-тРНК поступает именно в *P*-участок рибосомы, что позволяет ей служить в качестве донорного субстрата в образовании первой пептидной связи. Таким образом, инициаторная аминокислот-тРНК в *P*-участке рибосомы имитирует пептидил-тРНК, что и позволяет решить трудность начала элонгации пептида. У прокариотических организмов (бактерий) инициаторная аминокислот-тРНК похожа на пептидил-тРНК также и химически: ее аминокислотная группа формилирована, то есть связана с формильной группой амидной связью. Итак, введение донорного субстрата в

P-участок рибосомы и есть одна из основных функций механизма инициации трансляции.

Инициация трансляции, однако, означает не просто начало синтеза полипептидной цепи, то есть элонгационного процесса. Инициация также и начало считывания мРНК, которое должно всегда осуществляться со строго фиксированной определенной точки матричного полинуклеотида. Это начало считывания — никогда не начало полинуклеотидной цепи мРНК (то есть не ее 5'-конец), а всегда находится несколько или даже много отступя от начала цепи. Следовательно, требуется механизм точного узнавания первого кодона на мРНК, чтобы начать синтез полипептида именно с его первого аминокислотного остатка.

Узнавание рибосомой стартовой точки трансляции мРНК должно быть очень точным еще по одной причине. Рибосома читает кодоны мРНК строго последовательно, триплет за триплетом, и это устанавливает так называемую *рамку* или *фазу* считывания. Никаких “пробелов” или “запятых” между триплетами нет: их правильное считывание определяется только изначально заданной триплетной рамкой. Поэтому начало потриплетного считывания одним нуклеотидом раньше или одним нуклеотидом позже привело бы к *сдвигу рамки*, а тем самым не только к утрате первой аминокислоты пептида, но и к полной бессмысленности всей остальной аминокислотной последовательности. Это можно проиллюстрировать на примере любого буквенного текста, где отсутствуют пробелы. Например, набор букв АНАШКОТОТКРЫЛРОТ будет читаться осмысленно только при строгом потриплетном начале с буквы Н: “Наш Кот ОткРыл Рот”, а начало потриплетного чтения с А даст полную бессмыслицу — Ана Шко Тот Кры Лро... (сдвиг рамки –1) или Ашк Ото Ткр Ылр... (сдвиг рамки +1). Таким образом, строгое, безошибочное нахождение рибосомой первого кодона определяет и старт, и рамку трансляции мРНК, и это есть еще одна фундаментальная функция механизма инициации.

Наконец, третий важнейший аспект при рассмотрении функциональной значимости механизма инициации — это его ключевая роль в регуляции биосинтеза белка на уровне трансляции. Именно инициация является точкой приложения регуляторных механизмов, определяющих интенсивность трансляции различных мРНК и, следовательно, продукцию соответствующих белков в клетке, а также прекращение трансляции под действием определенных внутриклеточных сигналов или, наоборот, индукцию трансляции прежде “молчавших” мРНК. Регуляция биосинтеза белка на уровне трансляции может быть рассмотрена как разрешение или запрещение инициации на данной мРНК. Этим путем достигается избирательная или преимущественная трансляция лишь определенных мРНК и, наоборот, трансляционная инактивация других мРНК. Кроме того, различные скорости инициации на различных

мРНК определяют необходимые соотношения продукции разных белков.

ПРОКАРИОТЫ И ЭУКАРИОТЫ ИСПОЛЬЗУЮТ ДВА РАЗЛИЧНЫХ ПУТИ К ИНИЦИИРУЮЩЕМУ КОДОНУ

Имеются два способа, два пути поиска стартовой точки трансляции на мРНК в живой природе. У высших организмов — эукариот — рибосомная частица, как правило, сначала присоединяется к 5'-концу мРНК, а затем движется вдоль цепи мРНК и сканирует ее, пока не встретит иницирующий кодон (рис. 1, вверху). Этот способ получил название *терминальной инициации*. Для осуществления этого пути эукариотические клетки обладают набором специальных мРНК-связывающих белков, помогающих рибосомной частице узнать 5'-конец мРНК и далее двигаться вдоль цепи мРНК, и в том числе расщеплять АТФ и использовать энергию ее расщепления для расплетания вторичной структуры мРНК и движения.

Другой путь — так называемая *внутренняя инициация* (рис. 1, внизу) используется главным образом одноклеточными прокариотическими организмами. В этом случае рибосомная частица ассоциирует непосредственно с локальной структурой мРНК, содержащей иницирующий кодон независимо от 5'-конца мРНК и его удаленности от начала кодирующей последовательности. Так как у прокариот очень часто одна длинная полинуклеотидная цепь мРНК содержит несколько кодирующих последовательностей для различных белков (полицистронные мРНК), то этот способ обеспечивает инициацию трансляции сразу нескольких кодирующих последовательностей внутри такой мРНК более или менее независимо друг от друга.

Следует отметить, что в некоторых специальных случаях эукариоты тоже могут использовать путь внутренней инициации. Так, мРНК, кодирующие некоторые регуляторные белки, необходимые для эмбрионального развития, транслируются, по-видимому, через внутреннюю инициацию. Наиболее изученный пример внутренней инициации у эукариот — трансляция мРНК некоторых малых вирусов (так называемых пикорнавирусов) при инфекции ими человеческой или животной клетки. Такие мРНК имеют специальные внутренние структуры, привлекающие рибосомные частицы хозяйской клетки и связывающие их, после чего происходит инициация трансляции в точке этого связывания.

ИНИЦИАЦИЯ НАЧИНАЕТСЯ С ДИССОЦИАЦИИ РИБОСОМЫ

Диссоциация рибосомы на составляющие ее субчастицы, малую и большую (см. [2]), является необходимой предпосылкой для инициации трансляции. На самом деле тенденция к диссоциации рибосом наблюдается сразу после того, как рибосома дочитала кодирующую последовательность мРНК и

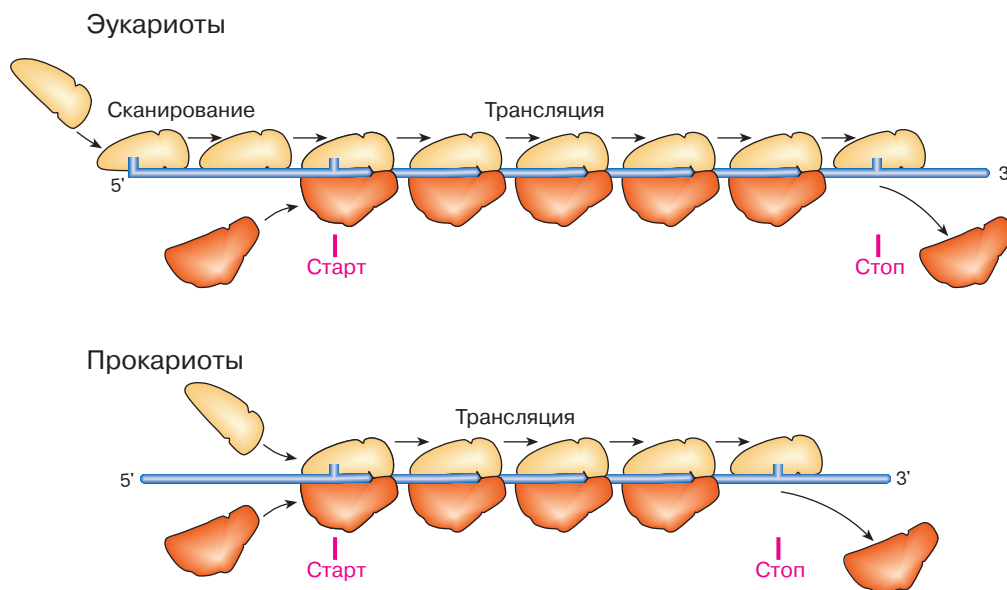


Рис. 1. Схематическое представление двух способов выхода рибосомной частицы (малой рибосомной субчастицы) на стартовую позицию трансляции мРНК: способ терминальной инициации, свойственный эукариотам (вверху), и способ внутренней инициации, используемый в основном прокариотами (внизу)

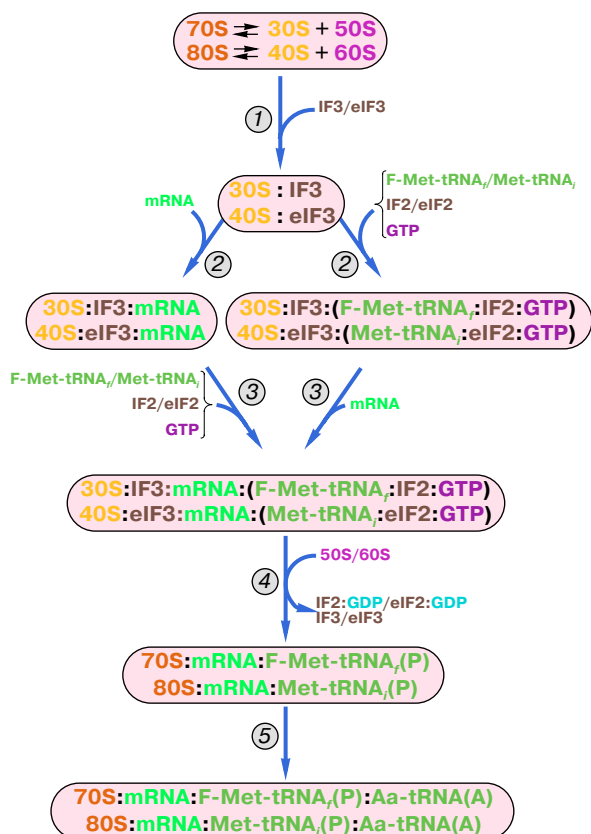


Рис. 2. Последовательность событий в процессе инициации трансляции

терминировала — окончила синтез полипептида. После терминации рибосомные субчастицы становятся слабо ассоциированными друг с другом (и с мРНК) и скорее находятся в динамическом равновесии с ассоциированной формой, чем в прочной ассоциации (рис. 2, вверху). Специальные белки вмешиваются в это равновесие таким образом, что, связываясь со свободной малой рибосомной субчастицей (30S в случае прокариот или 40S в случае эукариот), препятствуют ее реассоциации с большой субчастицей и тем самым сдвигают равновесие в сторону диссоциации. Именно свободная малая рибосомная субчастица, а не целая рибосома вовлекается в дальнейший процесс инициации.

МАЛАЯ РИБОСОМНАЯ СУБЧАСТИЦА СОПРОВОЖДАЕТСЯ СПЕЦИАЛЬНЫМИ БЕЛКАМИ – ФАКТОРАМИ ИНИЦИАЦИИ

Свободная малая субчастица рибосомы имеет средство к уже упоминавшимся выше специальным белкам, называемым факторами инициации или IF (Initiation Factors). Таких белков у прокариот три, а у эукариот — целая дюжина, и обозначаются они как IF1, IF2, IF3 и т.д. Из них будут рассмотрены два главных фактора инициации, взаимодействующие с малой рибосомной субчастицей и сопровождающие ее в процессе инициации, — это белки IF2 и IF3 (при обозначении эукариотических факторов инициации часто используют префикс e — eIF2 и eIF3). Белок IF3 первым вступает в дело: именно он ввиду сильного сродства к свободной малой субчастице связывается с ней и выводит ее из равновесной

реакции ассоциации с большой рибосомной субчастицей (рис. 2, шаг 1), поэтому этот белок иногда называют также фактором диссоциации.

Имеются все основания считать, что и другие факторы инициации, включая IF2, также садятся на свободную малую субчастицу, особенно после ее ассоциации с IF3, и далее сопровождают ее в ходе дальнейших событий инициации вплоть до присоединения большой субчастицы. Такие свободные субчастицы, нагруженные факторами инициации и не ассоциирующие в полные рибосомы, иногда называют нативными субчастицами (в отличие от “производных” субчастиц, получаемых в результате искусственной диссоциации полных рибосом, например при понижении концентрации ионов магния в растворе). Однако белку IF2 принадлежит особая роль: он хоть и может находиться на свободной малой субчастице, но главную функцию начинает выполнять лишь на последующих стадиях инициации, при взаимодействии с гуанозин-трифосфатом (ГТФ) и инициаторной аминоксил-тРНК.

МАЛАЯ РИБОСОМНАЯ СУБЧАСТИЦА ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С мРНК И ИНИЦИАТОРНОЙ тРНК

Дальнейшие события инициации могут разрываться в двух направлениях: либо нативная малая субчастица сначала садится на мРНК, а затем связывает инициаторную аминоксил-тРНК в комплексе с IF2 и ГТФ (рис. 2, шаги 2 и 3, левый путь), либо к малой субчастице сначала присоединяется инициаторная аминоксил-тРНК с IF2 и ГТФ, а затем этот комплекс ассоциирует с мРНК (рис. 2, шаги 2 и 3, правый путь). Считается, что оба пути могут сосуществовать в клетке или бесклеточной системе трансляции. В обоих случаях достигается один и тот же результат: образуется так называемый *инициаторный комплекс*, состоящий из малой рибосомной субчастицы, мРНК, инициаторной аминоксил-тРНК и инициаторных факторов.

Уже отмечалось, что взаимодействие рибосомной частицы с мРНК в прокариотах и эукариотах происходит по-разному. Вообще говоря, малая субчастица всегда обладает некоторым собственным сродством к любому матричному полинуклеотиду, может сесть на него и скользить вдоль него, а затем диссоциировать и снова лабильно реассоциировать. У прокариот малая рибосомная субчастица с факторами инициации имеет повышенное сродство к специальному внутреннему (неконцевому) участку мРНК, называемому инициаторным, или рибосомосвязывающим участком. Поэтому, когда субчастица путем “проб и ошибок” (за счет лабильной ассоциации, скольжения, диссоциации и реассоциации) оказывается в контакте с этим участком мРНК, она закрепляется там. Если рибосомная субчастица еще не была связана с инициаторной аминоксил-тРНК, то она на этом месте ждет ее прихода. Приход инициаторной аминоксил-тРНК в этом случае (рис. 2,

шаг 3, левый путь) сопровождается взаимодействием инициаторного кодона, находящегося в данном рибосомосвязывающем участке мРНК, с антикодонным аминоксил-тРНК. Если реализуется альтернативный путь — рибосомная частица, уже несущая на себе инициаторную аминоксил-тРНК, связывается с инициаторным участком мРНК (рис. 2, шаг 3, правый путь), то антикодон инициаторной аминоксил-тРНК участвует в закреплении рибосомной частицы на данном участке за счет кодон-антикодонного взаимодействия. Таким образом, в обоих случаях малая рибосомная субчастица оказывается точно установленной на начале кодирующей последовательности мРНК.

У эукариот малая рибосомная субчастица с факторами инициации (“нативная” субчастица) имеет большое сродство к 5'-концевому участку мРНК и, как правило, ассоциирует с ним. Считается, что эукариотическая малая субчастица взаимодействует с инициаторной аминоксил-тРНК преимущественно до ассоциации с мРНК, то есть идет в основном по правому пути рис. 2. Связавшись с 5'-концом мРНК и неся на себе инициаторную аминоксил-тРНК и факторы инициации, малая рибосомная субчастица начинает двигаться от 5'-конца по направлению к 3'-концу (вниз по течению) и сканировать нуклеотидную последовательность мРНК, потребляя энергию АТФ. В АТФ-зависимом расплетании вторичной структуры мРНК и сканировании первичной структуры ей помогает специальный эукариотический фактор инициации eIF4, обладающий АТФазной и геликазной (спиралерасплетающей) активностью. Когда сканирующая рибосомная частица встречается с инициаторным кодоном, антикодон инициаторной аминоксил-тРНК взаимодействует с ним, и сканирование прекращается: рибосомная частица нашла начало кодирующей последовательности мРНК.

В качестве иницирующего кодона в большинстве случаев выступает триплет AUG; у эукариот он практически единственный инициаторный кодон, а у прокариот 90% всех кодирующих последовательностей начинаются с него. Однако некоторая часть прокариотических мРНК иницирует трансляцию на других триплетях — GUG, реже UUG и совсем редко на некоторых других. Очевидно, что у прокариот способность некоторых триплетов быть иницирующими определяется их положением в инициаторном, или рибосомосвязывающем участке мРНК. Эти же триплеты, когда они встречаются в кодирующей последовательности в ходе элонгации, кодируют ту или иную аминокислоту: AUG — метионин, GUG — валин, UUG — лейцин.

Инициаторная аминоксил-тРНК всегда метионил-тРНК, как у прокариот, так и у эукариот. Однако у прокариот, как уже отмечалось, ее аминокислотная группа блокирована формильным остатком, так что она представляет собой формил-метионил-тРНК. Ее антикодон всегда CAU, так что он полностью

комплементарен кодону AUG и частично комплементарен другим возможным инициаторным кодам прокариот (например, GUG и UUG):



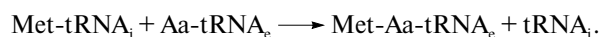
Структура остатка тРНК молекулы инициаторной метионил-тРНК несколько отличается от структур других — элонгаторных тРНК, в том числе и от структуры элонгаторной метионил-тРНК, что и делает ее функцию в качестве инициатора трансляции уникальной. Особенности структуры инициаторной метионил-тРНК обеспечивают ее специфическое комплексование с белком IF2 при наличии ГТФ (ГТФ, присоединяясь к белку, наводит сродство белка к инициаторной метионил-тРНК). Универсальность инициации с участием инициаторной метионил-тРНК приводит к тому, что всегда и везде любая полипептидная цепь, синтезируемая на рибосоме, начинается с метионина. Лишь потом, в ходе трансляции или после нее, этот концевой метионин может отщепиться специальной протеазой, что и происходит в большинстве случаев.

БОЛЬШАЯ РИБОСОМНАЯ СУБЧАСТИЦА ЗАВЕРШАЕТ ИНИЦИАЦИЮ

Итак, по завершении трех описанных выше шагов процесса инициации (рис. 2, шаги 1–3) малая рибосомная субчастица оказывается сидящей на инициаторном кодоне — стартовом триплете кодирующей последовательности мРНК со связанной инициаторной метионил-тРНК, своим антикодонным взаимодействующей с иницирующим кодоном, и с набором факторов инициации; при этом фактор инициации IF2 несет на себе нерасщепленную молекулу ГТФ и взаимодействует с инициаторной метионил-тРНК. На этом этапе в процесс включается свободная большая рибосомная субчастица (рис. 2, шаг 4). Она, ассоциируя с малой субчастицей и взаимодействуя со связанным IF2, наводит ГТФазную активность на IF2, в результате чего ГТФ гидролизует на ГДФ и ортофосфат, сродство IF2 к инициаторной метионил-тРНК теряется и IF2 с ГДФ легко вытесняются из рибосомы. При этом инициаторная метионил-тРНК после ухода IF2 оказывается в *P*-участке рибосомы. Большая субчастица при ассоциации с малой субчастицей вытесняет и все другие факторы инициации, включая IF3. В итоге образуется полная 70S (у прокариот) или 80S (у эукариот) рибосома с *P*-участком, занятым инициаторной метионил-тРНК, и с вакантным *A*-участком.

За этим завершающим шагом процесса инициации начинаются образование и элонгация пептида: вакантный *A*-участок принимает первую элонгаторную аминоксил-тРНК в комплексе с фактором элонгации EF1 и ГТФ, после чего ГТФ гидролизует, EF1 с ГДФ уходят из рибосомы, а элонгаторная

аминоацил-тРНК, связанная в *A*-участке, остается бок о бок с инициаторной метионил-тРНК, связанной в *P*-участке (рис. 2, шаг 5). В результате аминоксил-тРНК получает возможность реагировать с инициаторной метионил-тРНК в реакции транспептидации, катализируемой большой субчастицей рибосомы (см. [1]):



Так образуется первая пептидная связь.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из последовательности событий, описанной в предыдущих разделах и на рис. 2, видно, что все операции с мРНК в ходе инициации трансляции осуществляет малая субчастица рибосомы, а большая субчастица присоединяется к ней фактически только на стадии подготовки образования первой пептидной связи. Это находится в полном соответствии с принципом “разделения труда” между малой и большой субчастицами рибосомы: малая субчастица ответственна за генетические (декодирующие) функции, а большая — за биохимические (энзиматические).

Конкретные генетические функции малой рибосомной субчастицы в ходе инициации трансляции могут быть разделены на три группы процессов или операций с генетическим материалом — мРНК. Во-первых, малая рибосомная субчастица, связывая мРНК, служит первичным *приемником генетической информации* для белоксинтезирующего аппарата. Во-вторых, она с участием факторов инициации осуществляет *распознавание инициаторного участка* на мРНК либо путем непосредственного узнавания его структуры и присоединения (у прокариот), либо путем сканирования цепи мРНК (у эукариот). И в-третьих, малая рибосомная субчастица обеспечивает *кодон-антикодонное взаимодействие* инициаторного кодона мРНК с антикодоном инициаторной тРНК. Как видно, выполнение этих функций охватывает большую часть событий в ходе инициации трансляции, следовательно, малая рибосомная субчастица является главным “действующим лицом” всего сценария инициации.

Большая рибосомная субчастица включается в процесс на завершающем этапе процесса инициации и в соответствии с указанным выше “разделением труда” исполняет биохимическую часть функций. Она индуцирует гидролиз ГТФ на факторе инициации IF2, вытесняет все факторы инициации с малой рибосомной субчастицы, надлежащим образом устанавливает субстраты — инициаторную метионил-тРНК и связывающуюся с *A*-участком аминоксил-тРНК — в своем пептидилтрансферазном центре и, наконец, катализирует реакцию транспептидации между субстратами.

Последовательность событий инициации, разыгрывающихся сначала только на малой рибосомной субчастице, а затем в полной рибосоме с участием большой рибосомной субчастицы, схематически

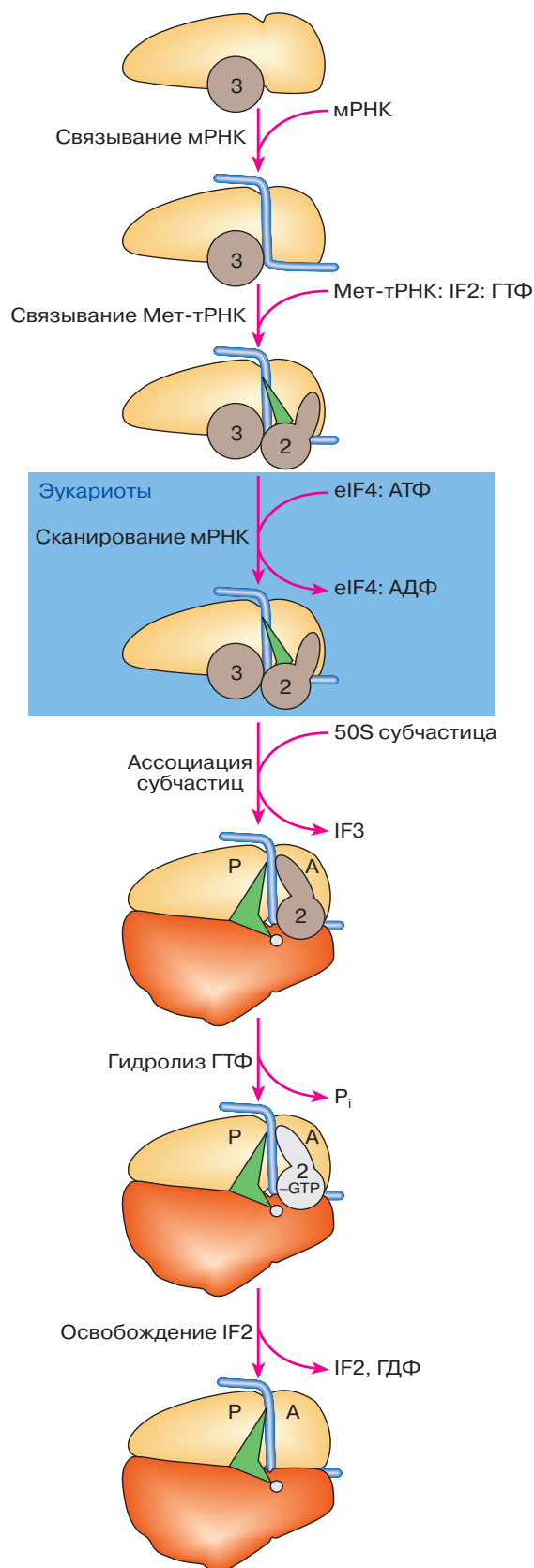


Рис. 3. Схема, демонстрирующая участие двух рибосомных субчастиц – малой (желтая) и большой (красная) – в процессе инициации трансляции. А и Р – два участка связывания тРНК. Цифрами обозначены соответствующие факторы инициации (IF2, IF3). Инициаторная тРНК изображена в виде зеленой фигуры с кружком (метионином) на акцепторном конце, мРНК показана синей линией

представлена на рис. 3. Следует еще раз указать на два важных момента. Здесь последовательность событий дана в соответствии с левым путем рис. 2: сначала малая субчастица связывает мРНК, а затем инициаторную метионил-тРНК. Это классическая последовательность событий для прокариот. Однако инициаторная метионил-тРНК может также связываться с малой субчастицей до связывания мРНК в соответствии с правым путем на рис. 2. У эукариот реализуется, по-видимому, в основном правый путь. Второй момент – это свойственное эукариотам сканирование мРНК малой рибосомной субчастицей, сопровождающееся расплетанием спиралей мРНК и гидролизом АТФ, на стадии, непосредственно предшествующей присоединению большой рибосомной субчастицы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Спири́н А.С. Принципы функционирования рибосом // Соросовский Образовательный Журнал. 1999. № 4. С. 2–9.
2. Спири́н А.С. Принципы структуры рибосом // Там же. 1998. № 11. С. 65–70.
3. Спири́н А. С. Молекулярная биология: Структура рибосомы и биосинтез белка. М.: Высш. шк., 1986. 300 с.
4. Уотсон Дж. Молекулярная биология гена. М.: Мир, 1978. 700 с.

* * *

Александр Сергеевич Спири́н, доктор биологических наук, профессор и зав. кафедрой молекулярной биологии МГУ, директор Института белка РАН, действительный член РАН и член Президиума РАН, действительный член РАЕН, Российской академии биотехнологии и многих международных и зарубежных академий и организаций. Область научных исследований – структура и функция белоксинтезирующего аппарата, регуляция биосинтеза белков, бесклеточные системы биосинтеза белков, котрансляционное сворачивание белков. Автор одного из томов (“Структура рибосомы и биосинтез белка”) трехтомного учебника для вузов “Молекулярная биология”, монографии “Рибосома” (два издания) на русском языке и трех монографий, изданных в США и Германии на английском языке, переведенных также на другие языки. Автор около 300 публикаций в российских и международных журналах.