

PROTEIN BIOSYNTHESIS: ELONGATION AND TERMINATION

A. S. SPIRIN

Two basic aspects of the elongation stage of translation are considered: 1) the unidirectional movement of the ribosome along an mRNA chain from 5' towards 3' end by trinucleotide steps; 2) the polar growth and folding of nascent polypeptide from its amino terminus to carboxyl terminus. The termination stage of translation is described in terms of a modified elongation cycle where the polypeptidyl-tRNA reacts with water molecule, instead of aminoacyl-tRNA.

Рассмотрены два основных аспекта функционирования рибосомы на стадии элонгации в ходе трансляции: 1) полярное потриплетное движение рибосомы вдоль цепи мРНК; 2) полярный рост и сворачивание растущей полипептидной цепи. Терминация трансляции представлена как модифицированный элонгационный цикл, где полипептидил-тРНК реагирует с молекулой воды вместо аминоксил-тРНК.

БИОСИНТЕЗ БЕЛКА: ЭЛОНГАЦИЯ ПОЛИПЕПТИДА И ТЕРМИНАЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ

А. С. СПИРИН

Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова

ВВЕДЕНИЕ

Трансляция одной кодирующей последовательности мРНК с производством одной завершённой полипептидной цепи включает три стадии: инициацию, элонгацию и терминацию. Это так называемый эпикл трансляции (см. статью “Принципы функционирования рибосом”: Соросовский Образовательный Журнал. 1999. № 4. Рис. 1). Инициация трансляции была рассмотрена в статье “Биосинтез белка: инициация трансляции” (Соросовский Образовательный Журнал. 1999. № 5). Здесь будут описаны основные принципы, которые лежат в основе двух последующих стадий трансляции: элонгации и терминации.

Элонгация — это и есть собственно трансляция кодирующей последовательности мРНК рибосомой. Она имеет два аспекта: генетический (сканирование значащих кодонов мРНК) и биохимический (синтез полипептидной цепи). Когда сканирующая рибосома в процессе элонгации встречает так называемый незначащий триплет (то есть триплет нуклеотидов, не кодирующий никакой аминокислоты), то происходит терминация трансляции: синтез полипептида прекращается и он освобождается из рибосомы.

ПОЛЯРНОЕ ПОТРИПЛЕТНОЕ ДВИЖЕНИЕ РИБОСОМЫ ВДОЛЬ ЦЕПИ мРНК

После того как произошла инициация трансляции, рибосома осуществляет прочный комплексный контакт связанных с ней молекул аминоксил-тРНК — инициаторной метионил-тРНК в *P*-участке рибосомы и первой “элонгаторной” аминоксил-тРНК в *A*-участке — с двумя смежными триплетами (кодонами) мРНК (рис. 1, *a*). В таком состоянии происходит реакция транспептидации между этими двумя аминоксил-тРНК, результатом чего является образование дипептидил-тРНК, связанной с триплетом (кодоном) в *A*-участке рибосомы (рис. 1, *b*). При последующей транслокации остаток тРНК этой молекулы дипептидил-тРНК двигается из *A*-участка в *P*-участок, таща за собой связанный с ней триплет мРНК (рис. 1, *в*). В итоге цепь мРНК протаскивается относительно рибосомы ровно на один триплет нуклеотидов, и теперь в *A*-участке устанавливается смежный с преды-

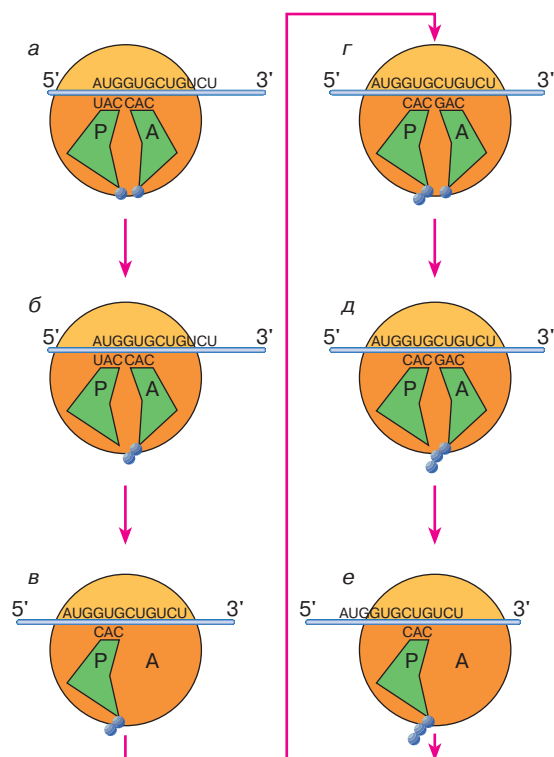


Рис. 1. Элонгация пептида на рибосоме: *а* – инициаторная аминоксил-тРНК (Met-tRNA_i) находится в *P*-участке, и первая элонгаторная аминоксил-тРНК (в данном случае Val-tRNA_{Val}, соответствующая следующему кодону GUG), приходит в *A*-участок; *б* – транспептидация приводит к переносу аминокислотного остатка (Met) от инициаторной тРНК на аминоксил-тРНК в *A*-участке: образуется дипептидил-тРНК (MetVal-tRNA_{Val}); *в* – транслокация перемещает тРНК из *A*-участка в *P*-участок, и эта тРНК увлечает за собой связанный с ней (комплементарный) кодон мРНК. Таким образом, мРНК оказывается сдвинутой относительно рибосомы на один триплет нуклеотидов, и в *A*-участке устанавливается очередной кодон (CUG); *г* – аминоксил-тРНК, комплементарная этому кодону (Leu-tRNA_{Leu}), связывается с *A*-участком; *д* – транспептидация переносит дипептид на аминоксил-тРНК в *A*-участке: образуется трипептидил-тРНК (MetValLeu-tRNA_{Leu}); *е* – транслокация перемещает тРНК из *A*-участка в *P*-участок, что приводит к сдвигу мРНК еще на один триплет. В *A*-участке устанавливается новый кодон (UCU). Далее процесс продолжается по описанной выше схеме (*г* → *д* → *е*)

дущим триплет нуклеотидов, то есть следующий кодон. (Более подробно описание событий при транспептидации и транслокации дано в статье “Принципы функционирования рибосом”.)

Далее события происходят аналогичным образом: 1) аминоксил-тРНК, соответствующая (комплементарная) вновь установленному в *A*-участке кодону, связывается из окружающей рибосому среды с этим кодомом в *A*-участке (рис. 1, *г*); 2) дипеп-

тидил-тРНК в *P*-участке реагирует с *новоявленной* аминоксил-тРНК в *A*-участке путем транспептидации, что приводит к образованию трипептидил-тРНК в *A*-участке (рис. 1, *д*), и 3) транслокация перебрасывает остаток тРНК молекулы трипептидил-тРНК из *A*-участка в *P*-участок вместе со связанным с ней триплетом мРНК (рис. 1, *е*) (см. также рис. 2 в статье “Принципы функционирования рибосом”). За этим следует аналогичный ряд событий (1–3), начинающийся с комплементарного связывания очередной аминоксил-тРНК с новым кодомом в *A*-участке.

Таким образом, благодаря триплет-триплетному связыванию (кодон-антиконовому взаимодействию) между мРНК и тРНК в рибосоме, транслокация тРНК каждый раз приводит к протягиванию цепи мРНК относительно рибосомы *ровно на три нуклеотида*. Так как рибосома асимметрична и транслокация перемещает тРНК только *одна*направленно из *A*-участка в *P*-участок, *потриплетное* перемещение цепи мРНК оказывается тоже *строго полярным*, *одна*направленным. В процессе трансляции (элонгации) оно может происходить только в направлении от 5'- к 3'-концу цепи.

В целом получается, что при трансляции (элонгации) рибосома работает как лентопротяжный механизм, перемещая с помощью тРНК цепь мРНК относительно себя с шагом по три нуклеотида. Важно отметить, что в процессе этого перемещения рибосома расплетает все попадающиеся на ее пути двуспиральные участки и более сложные элементы вторичной и третичной структуры мРНК.

У прокариотических организмов (бактерий), где ДНК не отделена мембраной от цитоплазмы и присутствующих там рибосом, последние начинают трансляцию на цепях мРНК, еще находящихся в стадии роста на комплексах ДНК с РНК-полимеразами (рис. 2). Другими словами, молекулы РНК-полимеразы ползут по ДНК и синтезируют цепи мРНК, начиная от 5'-конца РНК в направлении к 3'-концу, а рибосомы присоединяются к свешивающимся с полимераз 5'-концевым участкам, инициируют трансляцию и двигаются в процессе элонгации по направлению к молекуле полимеразы. Это явление получило название сопряженной транскрипции-трансляции. Интересно, что в бактериальных клетках скорость синтеза РНК (транскрипции) – около 30–45 нуклеотидов в секунду при 37°C – строго координирована со скоростью трансляции – около 10–15 триплетов в секунду, так что один триплет нуклеотидов синтезируется приблизительно за то же время, за которое он прочитывается и образуется одна пептидная связь. Таким образом, сопряжение транскрипции и трансляции у прокариот осуществляется как в пространстве (комплекс ДНК : РНК-полимераза: мРНК), так и во времени (координация скоростей транскрипции и трансляции).

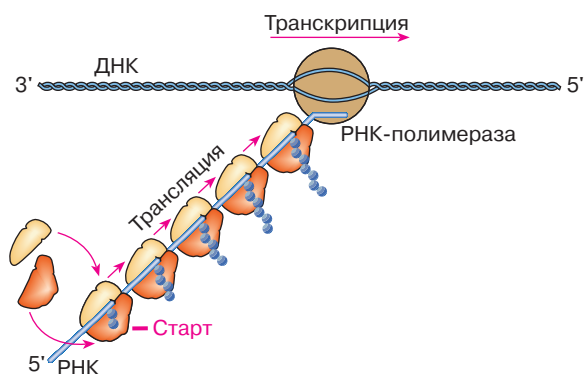


Рис. 2. Сопряженная транскрипция-трансляция у прокариот

У эукариот сопряжение транскрипции и трансляции невозможно. Во-первых, ДНК (хромосомы) эукариот отделены от цитоплазмы, содержащей рибосомы, ядерной мембраной. Эукариотическая мРНК синтезируется полностью в клеточном ядре, а лишь затем транспортируется из ядра в цитоплазму, где и встречается с рибосомами (см. статью “Принципы структуры рибосом”: Соросовский Образовательный Журнал. 1998. № 11. Рис. 1). Во-вторых, для инициации трансляции мРНК эукариотическими рибосомами требуется не только 5'-концевая часть мРНК, но и готовая 3'-концевая часть, являющаяся “усилителем” инициации (см. статью Л.П. Овчинникова “Что и как закодировано в мРНК”: Соросовский Образовательный Журнал. 1998. № 4). В отличие от бактерий скорость элонгации у эукариот варьирует в широких пределах, обычно от 1 до 10 триплетов в секунду, в зависимости от типа клеток, их физиологического состояния и природы транслируемой мРНК, будучи регулируема с помощью каких-то пока неизвестных клеточных механизмов.

ПОЛЯРНЫЙ РОСТ И СВРАЧИВАНИЕ РАСТУЩЕЙ ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ

Согласно описанной выше картине (рис. 1), каждый раз вслед за связыванием аминоксил-тРНК с А-участком рибосомы происходит реакция транспептидации между этой аминоксил-тРНК (акцепторный субстрат) и сидящей в Р-участке молекулой пептидил-тРНК (донорный субстрат). Реакция приводит к замещению остатка тРНК в молекуле пептидил-тРНК на остаток аминоксил-тРНК, так что аминоксил-группа аминоксил-тРНК образует пептидную связь с карбоксильной группой пептидильного остатка (подробнее см. статью “Принципы функционирования рибосом”, рис. 2 и 3):

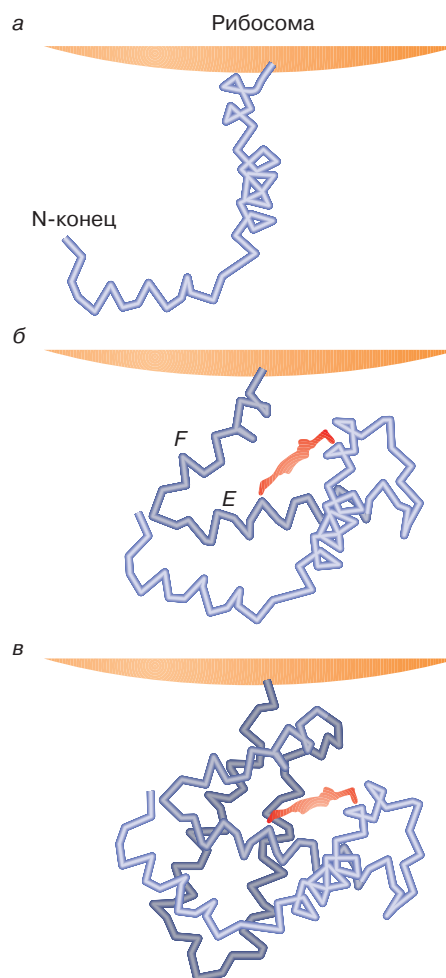
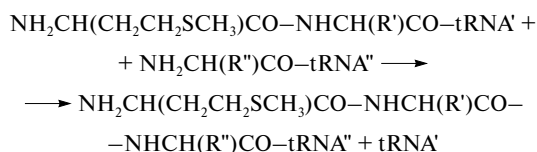


Рис. 3. Котрансляционное сворачивание растущей цепи глобина на рибосоме: а – формирование начальных спиральных участков в растущей полипептидной цепи до момента связывания гема; б – формирование спиралей E и F, связывание гема между ними и складывание цепи в третичную структуру; в – дальнейший рост цепи и завершение формирования вторичной и третичной структуры глобина на рибосоме

Таким образом, в процессе элонгации в каждом шаге прочитывания триплета и транспептидации новый аминокислотный остаток добавляется к карбоксильному концу (или С-концу) пептида. Другими словами, рост пептида в рибосоме идет от N-конца к С-концу.

Итак, точкой роста пептида в рибосоме является его С-конец и, следовательно, в течение роста пептида его N-конец все более отодвигается от точки роста, то есть от пептидилтрансферазного центра рибосомы. Довольно скоро N-концевой сегмент растущего пептида высвобождается из рибосомы в окружающую ее среду. Показано, что рибосома может вмещать не более чем 10–30 аминокислотных

остатков растущего полипептида, считая от его С-конца или пептидилтрансферазного центра. Как правило, полные полипептидные цепи синтезируемых рибосомой белков состоят из 100–300 и более аминокислотных остатков. Это значит, что через какое-то время после начала трансляции N-концевая часть растущего полипептида оказывается вне рибосомы и затем по мере роста полипептида все большая часть его свешивается с рибосомы в среду.

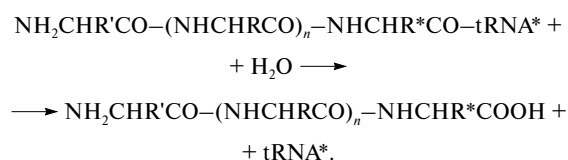
Естественно, поскольку рибосому окружает физиологическая среда, а не денатурирующий раствор, полипептидная цепочка в такой среде не может оставаться в виде развернутой цепи: ее гидрофобные боковые группы взаимодействуют друг с другом, а гидрофильные – с окружающей водой и ионами. Это создает условия для сворачивания, компактизации и самоорганизации внерибосомной части растущего полипептида в пространственную (вторичную и третичную) структуру. Следовательно, сворачивание полипептида в компактную структуру происходит по мере его роста, то есть в течение трансляции, а значит, тоже полярно, от N-конца к С-концу. Такое постепенное полярное сворачивание растущей полипептидной цепи на рибосоме обозначается как котрансляционное формирование структуры белка (котрансляционное сворачивание). Рис. 3 иллюстрирует это на примере котрансляционного формирования глобулярной структуры глобина – субъединицы гемоглобина, кислородпереносящего белка крови.

В некоторых случаях белок, синтезируемый рибосомой, не предназначен для немедленного использования в клеточной цитоплазме, а должен быть сначала транспортирован через мембрану либо вне клетки, либо в одну из внутриклеточных органелл (например, в митохондрию или хлоропласт). Транспорт белков через мембрану требует несвернутого состояния их полипептидной цепи. В таких случаях используются две альтернативные стратегии: 1) рибосомы, синтезирующие белок, предназначенный для транспорта через мембрану, сами сидят на мембране (мембраносвязанные рибосомы), и растущий полипептид в развернутом виде поступает из них непосредственно в мембрану; 2) свободные (не прикрепленные к мембране) рибосомы цитоплазмы синтезируют полипептидную цепь, которая по мере выхода из рибосомы взаимодействует со специальными белками – молекулярными шаперонами. Шапероны препятствуют полному сворачиванию белка в компактную структуру и поддерживают его недосвернутое состояние в растворе. После освобождения из рибосомы эти недосвернутые белки взаимодействуют с мембраной и транспортируются через нее. Поддержание недосвернутого состояния белков шаперонами может требоваться также и для интеграции этих белков в надмолекулярные структуры клетки, для сборки четвертичных структур сложных белков, для вступления в комплексы с некоторыми лигандами и т.п. В этих случаях белки до-

сворачиваются уже в составе указанных структур и комплексов.

ТЕРМИНАЦИЯ: ОСВОБОЖДЕНИЕ ПОЛИПЕПТИДА И ДИССОЦИАЦИЯ РИБОСОМЫ

Сканируя цепь мРНК по триплетам и соответственно удлиняя полипептидную цепь, транслирующая рибосома доходит до конца кодирующей последовательности и встречается с одним из трех триплетов, не кодирующих аминокислоты и обозначаемых как стоп-кодона, или кодоны терминации – UAG, UAA или UGA (раньше их называли незначимыми, или бессмысленными, триплетами). В результате завершающей транслокации полипептидил-тРНК оказывается связанной с последним значащим триплетом в P-участке рибосомы, а в A-участке устанавливается кодон терминации (рис. 4, а). В клетке нет аминоацил-тРНК, способных комплексарно связываться с терминирующим кодоном, и потому A-участок не заполняется обычным акцепторным субстратом, каковым является аминоацил-тРНК. Вместо этого в дело вступают специальные белки, называемые факторами терминации, или факторами освобождения (release factors, RF). Один из них, RF1 (или похожий на него RF2), взаимодействует непосредственно с кодоном терминации в A-участке, а другой, RF3, при содействии первого и с участием ГТФ – с большой субчастицей рибосомы (рис. 4, б) и, возможно, непосредственно с пептидилтрансферазным центром. Результатом связывания этих факторов с рибосомой является наведение гидролазной активности в рибосоме: пептидилтрансферазный центр рибосомы катализирует реакцию взаимодействия полипептидил-тРНК как донорного субстрата с молекулой воды как акцепторным субстратом:



Таким образом, связь между синтезированным полипептидом (его С-концом) и тРНК гидролизуеться и полипептид уже не удерживается в рибосоме и освобождается в раствор в виде готового белка (рис. 4, в).

Заключительным актом терминации является выход деацилированной тРНК из P-участка и диссоциация рибосомы на субчастицы. Диссоциация происходит спонтанно вследствие ослабления связи между двумя рибосомными субчастицами в отсутствие лигандов (пептидил-тРНК и аминоацил-тРНК), и у бактерий может значительно ускоряться под действием специального белка, называемого фактором освобождения рибосом.

После диссоциации терминирующей рибосомы на субчастицы малая субчастица не обязательно покидает мРНК: она может задержаться на ней и в

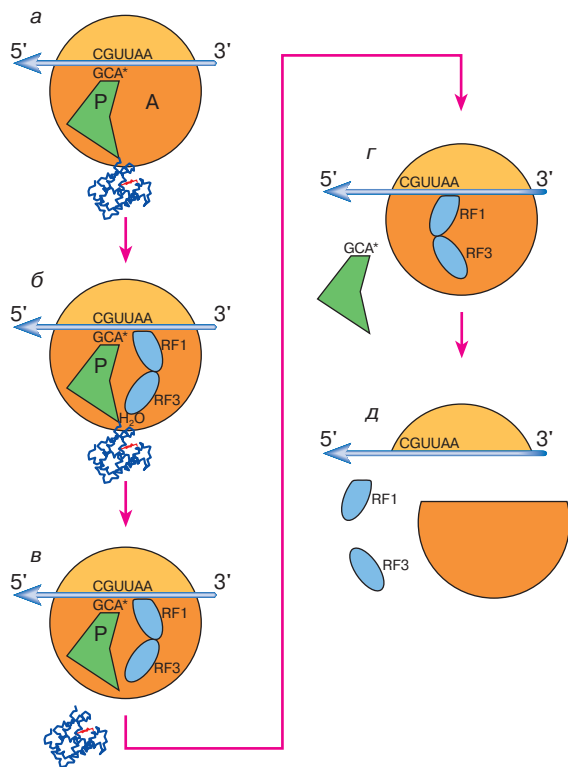


Рис. 4. Терминация трансляции: а – после добавления последнего (С-концевого) аминокислотного остатка к растущему полипептиду, то есть образования последней пептидной связи, и завершающей транслокации, в А-участке устанавливается триплет, не кодирующий никакой аминокислоты – кодон терминации (UAG, UAA или UGA). Завершенный полипептид остается ковалентно связанным с тРНК, которая принесла последний аминокислотный остаток в рибосому; б – А-участок с кодоном терминации воспринимает специальные белки – факторы терминации RF1 (или RF2), непосредственно узнающий кодон терминации на малой субчастице рибосомы, и RF3, взаимодействующий с большой субчастицей рибосомы вблизи пептидилтрансферазного центра; в – пептидилтрансферазный центр рибосомы под действием факторов терминации катализирует реакцию переноса С-конца синтезированного полипептида от тРНК на молекулу воды: происходит гидролиз связи между тРНК и полипептидом и полипептид освобождается из рибосомы в среду; г – далее, вероятно вследствие гидролиза ГТФ, связанного с RF3, деацилированная тРНК освобождается из рибосомы; д – “пустая” рибосома легко диссоциирует на субчастицы, причем малая субчастица может некоторое время оставаться в лабильной ассоциации с мРНК и скользить вдоль нее, находя следующий кодон инициации (реинициация следующей кодирующей последовательности в полицистронных мРНК). Удалению деацилированной тРНК и диссоциации рибосом может содействовать специальный белок – фактор освобождения (RRF)

случае полицистронных мРНК у прокариот (см. статью “Биосинтез белка: инициация трансляции”) проскользнуть по цепи мРНК до начала следующей кодирующей последовательности и иницировать новую трансляцию (реинициация). Так как малая субчастица до инициации слабо удерживается на мРНК, то, если ей нечего реиницировать на этой же цепи мРНК, она скоро соскочит с нее и окажется среди пула свободных субчастиц цитоплазмы, готовых к инициации трансляции других мРНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, полный эпикл трансляции состоит из стадий инициации, элонгации и терминации (см. статью “Принципы функционирования рибосом”, рис. 1). На стадии элонгации происходит собственно трансляция кодирующей части мРНК. Эта стадия состоит из повторения элементарных элонгационных циклов, каждый из которых приводит к прохождению одного кодона мРНК и синтезу одной пептидной связи (см. статью “Принципы функционирования рибосом”, рис. 2). Элонгационный цикл, в свою очередь, составляют три последовательных шага: связывание аминоацил-тРНК, транспептидация и транслокация. Сравнение стадий инициации и терминации с элонгационным циклом рибосомы приводит к выводу, что и они строятся по схожим образом и могут рассматриваться как модифицированный элонгационный цикл.

Действительно, стадия инициации (см. статью “Биосинтез белка: инициация трансляции”) начинается со связывания аминоацил-тРНК со специальной – инициаторной – аминоацил-тРНК. Так же как белковый фактор EF1 с ГТФ помогает связыванию аминоацил-тРНК в элонгационном цикле, гомологичный ему фактор IF2 с ГТФ помогает связыванию инициаторной метионил-тРНК при инициации. Отличие состоит в том, что инициаторное связывание аминоацил-тРНК происходит с малой субчастицей рибосомы, а не с полной рибосомой. Так как при инициации отсутствует второй субстрат, то никакой реакции транспептидации не может иметь места; этот шаг, свойственный элонгационному циклу, здесь отсутствует. Далее, когда к иницирующей малой субчастице присоединяется большая субчастица и образуется полная рибосома, инициаторная метионил-тРНК транслоцируется в Р-участок и имеются все основания полагать, что фактор IF2, осуществляющий гидролиз ГТФ, ведет себя подобно фактору транслокации EF2 в элонгационном цикле.

Стадия терминации еще больше напоминает элонгационный цикл. Она тоже начинается с шага связывания, но с кодоном терминации в А-участке связывается не аминоацил-тРНК, а белок RF1 (или RF2), рассматриваемый как аналог аминоацил-тРНК. Ему помогает белок RF3 с ГТФ, что похоже на роль EF1 с ГТФ при связывании аминоацил-тРНК

в элонгационном цикле. Следующий шаг – реакция, катализируемая пептидилтрансферазным центром, но при терминации пептидный остаток перебрасывается не на очередную аминоацил-тРНК, как в элонгационном цикле, а на молекулу воды. Это аналог реакции транспептидации. Наконец, по-видимому, при участии RF3 с сопутствующим гидролизом ГТФ происходит что-то похожее на транслокацию: RF1 (или RF2) убирается из *A*-участка, а деацилированная тРНК – из *P*-участка.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Спирин А.С.* Молекулярная биология: Структура рибосомы и биосинтез белка. М.: Высш. шк., 1986. 300 с.
2. *Уотсон Дж.* Молекулярная биология гена. М.: Мир, 1978. 700 с.
3. *Buckingham R.H., Grentzmann G., Kisselev L.* Polypeptide Chain Release Factors // *Mol. Microbiol.* 1997. Vol. 24. P. 449–456.
4. *Komar A.A., Kommer A., Krasheninnikov I.A., Spirin A.S.* Cotranslational Folding of Globin // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. P. 10646–10651.
5. *Zubay G.* *Biochemistry.* Menlo Park (Calif.): Addison-Wesley Publ. Co, 1983. Ch. 26.

* * *

Александр Сергеевич Спирин, доктор биологических наук, профессор и зав. кафедрой молеку-

лярной биологии МГУ, директор Института белка Российской академии наук, действительный член Российской академии наук и член Президиума Российской академии наук, член ряда международных и зарубежных академий и организаций, в том числе Европейской молекулярно-биологической организации (EMBO), Европейской академии (Academia Europaea), Германской академии естествоиспытателей “Леопольдина”, Американского философического общества. Основной круг научных исследований – структура и функция белоксинтезирующего аппарата, регуляция биосинтеза белков, бесклеточные системы биосинтеза белков, котрансляционное сворачивание белков. Редактор трехтомного учебника для вузов “Молекулярная биология” и автор одного их томов (“Структура рибосомы и биосинтез белка”), автор монографии “Рибосома” (два издания) на русском языке и трех монографий, изданных в США и Германии на английском языке (“Macromolecular Structure of Ribonucleic Acids” N.Y.: Reinhold, 1964; “The Ribosome” Heidelberg: Springer-Verlag, 1969; “Ribosome Structure and Protein Synthesis” Menlo Park: Benjamin/Cummings, 1986), переведенных также на другие языки. Автор около 300 публикаций в российских и международных журналах.