

Тема 13: РЕПЛИКАЦИЯ И РЕПАРАЦИЯ ДНК

Живым организмам присуща уникальная способность к передаче генетической информации от поколения к поколению с сохранением своих наследственных свойств.

Материальным носителем воспроизведения наследственной информации являются нуклеиновые кислоты, которые имеют для этого соответствующее химическое строение и биологические свойства. У большинства организмов эту функцию выполняет ДНК. Исключение составляют отдельные вирусы, в которых носителем информации является РНК.

С участием нуклеиновых кислот происходит образование всех белков, которые являются материальной основой жизненных процессов. Каждый живой организм содержит свой специфический набор белков (протеом), которым он отличается от других организмов. Информация, определяющая особенности структуры белков, закодирована в ДНК и передается в ряду поколений ее молекулами.

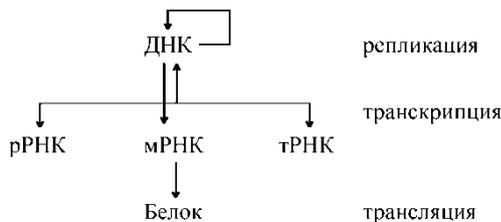
Процесс переноса генетической информации (одной из форм биологической памяти) является определяющим и очень важным для развития и нормальной жизнедеятельности клеток организма. Упрощенно его можно изобразить схемой.



Виды переноса генетической информации

Существует три вида переноса генетической информации, которые имеются на различных уровнях организации живой материи: репликация, транскрипция, трансляция.

Перенос генетической информации можно изобразить в виде схемы:



Направление переноса генетической информации от ДНК через РНК к белку называется центральным постулатом молекулярной биологии. Согласно с ним не может быть перенос информации от белка к РНК, но возможно - от РНК к ДНК.

Репликация (самоудвоение, копирование) - это копирование, «самовоспроизводство» ДНК - комплементарный синтез ДНК на матрице ДНК. Репликация имеет место только во время деления клетки (на стадии S-фазы митотического цикла) и сопровождается репликацией всей молекулы ДНК. Молекула ДНК расплетается, и на ее одиночных цепях в результате репликации образуются точные копии исходной ДНК, то есть синтезированные ДНК похожи друг на друга и на исходную материнскую; следовательно наследственная информация сохраняется.

Таким образом, вследствие репликации из одной молекулы образуются две новые одинаковые молекулы ДНК: одна из копий остается в материнской клетке, а другая переходит в дочернюю, т. е. репликация является полуконсервативной. Возможна также репликация отдельных фрагментов ДНК, которая называется амплификацией.

Для репликации ДНК необходимо наличие:

- 1) четырех видов дезоксирибонуклеозид-5-трифосфатов;
- 2) матрицы в виде двухцепочечной ДНК;
- 3) затравки (праймера);
- 4) ферментов и регуляторных факторов;
- 5) ионов металлов (Mg^{2+} , Mn^{2+}).

Рост цепи ДНК происходит в направлении от 5' к 3' концу. Субстратами реакции является 3'-конечная ОН-группа дезоксирибозы растущей цепи и дезоксирибонуклеозидтрифосфаты. Фермент, который катализирует эту реакцию - ДНК-зависимая ДНК-полимераза. Синтез ДНК с подобными механизмами осуществляется также при репарации повреждений и других процессах.

Механизм репликации в прокариот. Каждая стадия репликации происходит при участии соответствующих ферментов и белковых факторов. Репликация ДНК начинается с небольшого участка - ориджина (origin), где осуществляется инициация процесса, главным моментом которой является расхождение цепей ДНК. Далее по ходу репликации такой репликативный пузырь разрастается в двух противоположных направлениях. На каждой стороне пузыря существует так называемая репликативная вилка, в основе которой и происходит синтез ДНК. Участок ДНК, где осуществляется репликация и начинается с одной точки, называют репликацией.

Средняя скорость репликации на одну репликативную вилку составляет ~ 750 нуклеотидов в секунду у бактерий, 60-90 нуклеотидов в секунду у эукариотов. Синтез бактериальной хромосомы происходит за ~ 50 минут, полная репликация ДНК эукариотической клетки - за несколько часов.

Основные этапы репликации

1. Расплетаются белки разрывают водородные связи между комплементарными основаниями двойной спирали ДНК. В последнее время установлено, что цепи ДНК раскручиваются не полностью, а на коротком участке под влиянием расплетающих ферментов. Здесь образуется расплетенный участок, напоминающий своей формой латинскую букву V и получивший название «репликативной вилки». Характерно и то, что дальнейшее перемещение репликативной вилки возможно только при раскручивании материнской ДНК и одновременном синтезе обеих новых цепей ДНК.

Процесс расплетания двойной спирали (т. е. образование репликативной вилки) осуществляется ДНК-геликазами - АТФ-зависимыми ферментами.

Скорость расплетания ДНК отдельной геликазой равна ~ 35 нуклеотидов в секунду.

2. Затравочная ДНК-зависимая РНК-полимераза (РНК-полимераза или праймаза) - образует небольшую РНК-затравку (примерно 10 нуклеотидов) на одном из расплетенных цепей ДНК в направлении 5', 3'. Состав и порядок нуклеотидов в затравке задается ДНК-матрицей, а сшивка их 3', 5'-фосфодиэфирными связями осуществляется РНК-полимеразой. Необходимость синтеза РНК-затравки обусловлена тем, что основной фермент репликации - ДНК-полимераза - не способна самостоятельно начать синтез новой ДНК в направлении 5', 3' без затравки; она может только продлевать новую полинуклеотидную цепь.

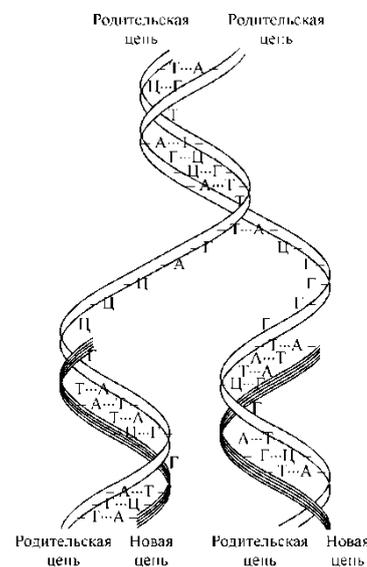
В отличие от ДНК-полимеразы, праймаза одинаково включает в праймер как дезоксирибо- так и рибонуклеотиды. Праймер является фрагментом именно РНК потому, что внутриклеточная концентрация рибонуклеозидтрифосфатов выше.

3. ДНК-полимеразы. У прокариот в процессе репликации участвуют три формы ДНК-полимеразы (I, II, III). Все они проявляют два вида активности: полимеразную - сшивают дезоксирибонуклеотиды 3', 5'-фосфодиэфирными связями и нуклеазную - гидролизуют фосфодиэфирные связи в случае образования ошибок в полинуклеотидной цепи.

ДНК-полимераза I действует как РНК-аза, расщепляя РНК-затравку и синтезируя на ее месте комплементарный фрагмент ДНК, которого не хватает.

ДНК-полимераза II проявляет очень низкую полимеразную активность. Ее функции в репликации мало изучены.

ДНК-полимераза III играет ведущую роль в процессе репликации. Для того, чтобы она могла начать синтез, необходимо существование уже готового небольшого фрагмента ДНК или РНК (затравки), что является комплементарным матрице ДНК и



содержит свободную 3'-ОН-группу, которая в дальнейшем участвует в полимеразной реакции. ДНК-полимераза III проявляет также 5,3 и 3,5'-ендонуклеазную активность.

4. Рибонуклеаза H. участвует в гидролизе РНК-затравки вместе с ДНК-полимеразой I.

5. ДНК-лигазы - сшивающие ферменты. Они участвуют в процессе сообщения друг с другом новосинтезированных фрагментов ДНК, образуя фосфодиэфирные связи.

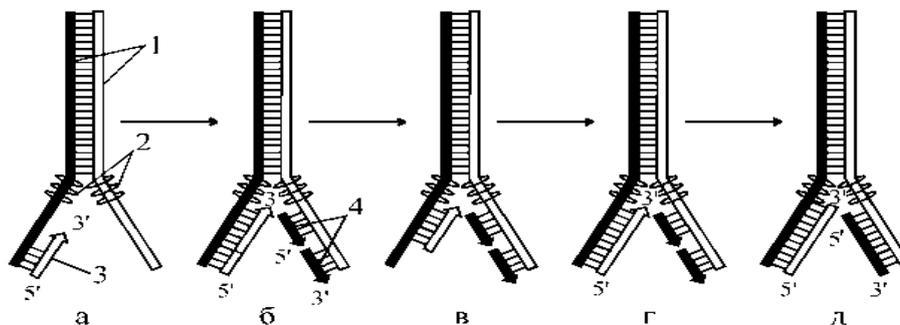
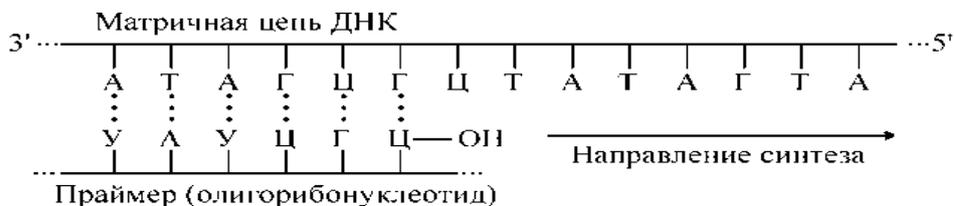
6. Топоизомеразы. Движение репликативной вилки с одновременным разрушением двойной спирали сопровождается прокруткой спирали, что создает положительные надспиральные витки - эластичные напряжения впереди вилки. Эластичное напряжение должно время от времени сниматься, иначе в конце концов оно полностью остановит движение реплисомы. Соответственно, процесс репликации требует вспомогательного действия топоизомераз, основная функция которых как раз и заключается в расслаблении надспирализованной ДНК. Топоизомеразы делятся на два класса.

Топоизомеразы I (мономерные белки), которые делятся на два подкласса 1a и 1b, осуществляют разрезание ДНК. Топоизомеразы 1a (присутствуют как в про-, так и в эукариотах) способны расслаблять только негативно надспирализованную ДНК. Фермент узнает дестабилизированный участок двойной спирали, делает одноцепочечный разрыв и протягивает сквозь него интактную цепь. Топоизомеразы 1b (только эукариотические) переводят любую ДНК в максимально расслабленное состояние.

Согласно электронно-микроскопическим и радиоавтографическим данным, в репликативной вилке с большой скоростью осуществляется синтез двух противоположно направленных полинуклеотидных цепей ДНК. Направление одной цепи 3,5 совпадает с направлением движения репликативной вилки.

Эту цепь называют лидирующей, ведущей. Вторая цепь называется отстающей (или опаздывающей) - ее синтез также идет в направлении 3,5. Чтобы этот процесс произошел, на второй цепи ДНК в направлении, противоположном движению репликативной вилки, строятся короткие фрагменты, которые затем сшиваются с образованием цепи, которая опаздывает. Это было показано в 1968 г. Р. Оказаки, который установил, что часть синтезированной ДНК находится в виде фрагментов, состоящих из 1000-2000 нуклеотидов.

В дальнейшем эти фрагменты получили название фрагментов Оказаки. Предполагают, что ведущая цепь растет непрерывно, постепенно передвигаясь по репликативной вилке.



Механизм репликации **ДНК** (по Е. О. Строеву, 1986):

а - разлечения цепей материнской ДНК и синтез РНК-затравки;

б - образование комплементарного гибридного звена РНК-ДНК и синтез фрагментов

Оказаки в направлении 5' → 3'; в - гидролиз РНК-затравки;

г - достройка комплементарной цепи ДНК на месте РНК затравки;

д - сшивание фрагментов комплементарной цепи ДНК; 1 - материнские цепи, 2 - расплетающий белок; 3 - РНК; 4 - фрагменты Оказаки.

Начинается репликация (стадия инициации) из образования в нескольких местах ДНК (чаще всего на внутренних ее участках) репликативных вилок под влиянием расплетающих белков. Как уже отмечалось, необходимым условием является наличие в начале новой цепи затравки (праймера), которая содержит на конце свободную 3'-ОН-группу.

После окончания синтеза РНК-затравки к ее 3'-ОН-концу присоединяется ДНК-полимераза III. Далее с участием этого фермента происходит присоединение к РНК-затравке дезоксирибонуклеозид-5-трифосфатов с высвобождением пирофосфатов (элонгация). Одновременно ДНК-полимераза III синтезирует на второй материнской цепи репликативной вилки короткие фрагменты Оказаки (синтез происходит челночно). Важным является тот факт, что во время синтеза ДНК-полимераза III может исправлять ошибки в случае неправильного включения нуклеотидов. Если произойдет ошибка, то этот нуклеотид сразу отщепляется ферментом благодаря нуклеазной активности, а при правильном включении нового нуклеотида присоединяет его к уже образованному фрагменту ДНК. Затем РНК-затравка удаляется или рибонуклеазой H, или ДНК-полимеразой I, а на ее месте достраивается цепь ДНК с участием ДНК-полимеразы I.

Соединение синтезированных фрагментов происходит с помощью ДНК-лигазы.

Образование фосфодиэфирной связи между соседними фрагментами Оказаки требует источника энергии и осуществляется в АТФ-зависимой реакции.

Терминация, или процесс завершения синтеза молекул ДНК, изучена недостаточно. В геноме некоторых бактерий терминацию осуществляет специальный участок - терминатор, в других же он отсутствует. Предполагается, что двусторонняя репликация заканчивается сразу же после встречи двух репликативных вилок.

Процесс репликации происходит с достаточно большой скоростью: 1000-2000 нуклеотидов в секунду. Характерна очень большая точность. Так, на 10¹⁰ пар нуклеотидов встречается только одна ошибка. Исправление ошибок происходит мгновенно путем их устранения и замены. Например, если в нуклеотиде вместо тимина появляется урацил, то с синтезированной полинуклеотидной цепи этот нуклеотид удаляется и на его место вводится тимидиловая кислота.

Репликация ДНК в эукариот. Детали репликации хромосом эукариот изучены недостаточно. Отличительным свойством репликации в эукариот является то, что реплицируются именно нуклеосомы. При синтезе дочерних цепей они на некоторое время разрушаются, но позади репликативной вилки снова собираются, причем в сборке участвуют как старые, так и новые гистоны.

Репликация ДНК в хромосомах эукариот происходит также полуконсервативным путем и состоит из трех основных стадий: инициации, элонгации и терминации. В эукариотических клетках содержатся разнообразные расплетающие ферменты и регуляторные факторы, ДНК-полимеразы, ДНК-лигазы.

Пять основных типов эукариотических ДНК-полимераз принято обозначать греческими буквами.

Полимераза α состоит из четырех субъединиц: одна выполняет структурную роль, вторая имеет ДНК-полимеразную активность, еще две субъединицы отвечают за РНК-полимеразную активность. Соответственно, полимеразы α выполняет роль праймазы: именно она синтезирует короткий РНК-праймер (6-10 нуклеотидов), который далее немного удлиняет как ДНК.

Полимераза α характеризуется низкой процессивностью и, в отличие от других ДНК-полимераз, не имеет экзонуклеазной активности.

Полимераза β - мономерный белок, основная роль которого заключается в заполнении однонуклеотидных пробелов при эксцизионной репарации оснований.

Полимераза γ - репликативная ДНК-полимераза митохондрий. Состоит из двух субъединиц, кроме ДНК-полимеразной имеет обе (3'- и 5') экзонуклеазные активности.

Полимеразы δ и ϵ - основные репликативные ДНК-полимеразы эукариот. Состоят из четырех (ϵ) или трех-пяти у разных видов (δ) субъединиц. Обе полимеразы могут работать в репликативной вилке на обоих цепях (лидирующей и на той, которая запаздывает). Кроме репликативного синтеза ДНК, полимеразы δ и ϵ осуществляют заполнение длинных многонуклеотидных пробелов как при соединении соседних фрагментов Оказаки, так и при репарационных процессах.

Как и в прокариот, в репликативной вилке одна цепь - лидирующая, а вторая - отстающая. Ведущая цепь синтезируется непрерывно, тогда как цепь отстающая - фрагментами Оказаки. Инициация начинается с образования РНК-затравки, которая синтезируется, возможно, РНК-полимеразой I. Существенным отличием эукариотической системы репликации является то, что каждая хромосома является полирепликоном: общий геном, например млекопитающих, содержит около 40 тыс. точек инициации - ориджинов.

Скорость движения репликативных вилок медленнее - около 60-100 нуклеотидов в секунду, но в эукариотических хромосомах одновременно работают тысячи или даже большее количество репликативных вилок.

Метилирование ДНК

После репликации ДНК происходит ее метилирование - важная ковалентная модификация, необходимая для регуляции активности генов.

Субстратом метилирования ДНК является цитозин (метильная группа присоединяется к пятому атому кольца с образованием 5-метилцитозина). Процесс тканеспецифического метилирования ДНК является результатом двух процессов: поддержание метилированного статуса после репликации и метилирования *de novo*.

Поддерживающая ДНК-метилтрансфераза срабатывает в течение 1-2 минут после репликации: две дочерние молекулы ДНК содержат родительскую цепь ДНК и синтезированную цепь, где цитозин не является метилированным. Фермент узнает такие полуметилированные динуклеотидные контакты и восстанавливает симметрию относительно метилирования. За счет этого процесса места метилирования воспроизводятся в дочерних клетках, которые являются, вместе с восстановлением модификаций гистонов, одним из важных механизмов эпигенетического наследования.

Другие ДНК-метилтрансферазы осуществляют метилирование ДНК *de novo*. Особенно важен этот процесс на ранних стадиях эмбрионального развития, когда ДНК является тотально деметилированной. В процессе дифференциации осуществляется массовое метилирование ДНК, что определяет специфическое выключение определенных групп генов в специализированных клетках. Кроме того, деметилирование возможно и в дифференцированных клетках, где метилтрансферазы используются для восстановления метилированного статуса.

Удлинение концов эукариотической хромосомы

Характерное отличие эукариотической хромосомы заключается в том, что она, в отличие от прокариотической, линейная - имеет два конца. Вследствие этого на 3'-концах матричных цепей ДНК остаются одноцепочечные хвосты: два РНК-праймера. Одноцепочечные хвосты подвергаются быстрой нуклеазной деградации и после каждой репликации хромосома должна укоротиться.

Концевые участки ДНК эукариотической хромосомы - теломеры - состоят из небольших элементов последовательности, которые тандемно повторяются (теломерные

повторы). Удлинение теломер после репликации осуществляется с помощью специального фермента - теломеразы, которая является РНК-зависимой ДНК-полимеразой. РНК-матрица входит в состав самого фермента и содержит участок, комплементарный теломерному повтору. Используя этот участок в качестве матрицы и 3' конец как праймер, теломераза пошагово достраивает к 3'-концу несколько копий теломеразного повтора. Далее удлиненный одноцепочечный хвост используется как матрица для синтеза другой цепи по обычному репликативному механизму. Удаление РНК-праймера после этого не является проблемой, так как хромосома уже является удлиненной.

Теломераза активна в развивающихся и злокачественно трансформированных клетках и неактивна - в дифференцированных соматических клетках высших эукариот. Соответственно, определенное критическое сокращение теломер, которое происходит в таких клетках после нескольких десятков клеточных делений, является одним из механизмов активации программы их гибели.

Репарация поврежденной ДНК

Под воздействием химических, физических и других факторов внешней среды в молекулах ДНК могут происходить различные повреждения, связанные, главным образом, с нарушением процессов репликации, разрывом молекул ДНК и т.д., что приводит к серьезным последствиям.

Так, ультрафиолетовое (УФ) облучение в больших дозах оказывает летальное, а в малых - антимиотическое и мутагенное действие. При этом в молекуле ДНК возникает ряд изменений, например:

а) окислительное дезаминирование азотсодержащих пуриновых и пиримидиновых оснований, входящих в состав ДНК. Например, цитозин может превращаться в урацил, аденин - на 6 гидроксипурин, гуанин - на 2,6-дигидроксипурин, что нарушает процесс комплементарности (урацил становится комплементарным аденину, а образованные производные аденина и гуанина - цитозину), что в дальнейшем приводит к нарушению в структуре закодированного белка;

б) между двумя рядом расположенными остатками тимидиловой кислоты в одной цепи ДНК, или между ее цепями, в результате реакции фотодимеризации молекулы тимина образуют димеры - двойные тиминовые кольца с образованием между ними 5,6-циклобутанового кольца. Между димерами возникают ковалентные связи, которые нарушают стерические условия, необходимые для репликации ДНК, то есть возникают препятствия при репликации ДНК;

в) возможно появление участков локальной денатурации ДНК (расхождение цепей), которые также препятствуют репликации.

В процессе эволюции в клетках живых организмов образовались определенные механизмы репарации (восстановления) поврежденного ДНК. В клетке существует

система репарационных ферментов, функция которых заключается в устранении повреждений в генетическом материале. Большинство репарационных процессов предусматривает удаление поврежденного одноцепочечного участка с последующим синтезом ДНК с помощью ДНК-полимеразы. Но существуют и процессы, связанные с непосредственным «исправлением» поврежденного элемента за счет прямого действия определенных ферментов.

Один из процессов репарации, что происходит в результате действия света, называют фотореактивацией. Существует фермент (ДНК-фотолиаза), который, присоединяясь к хромофору, поглощает видимый свет, доставляя необходимую для осуществления реакции энергию. Фермент специфически взаимодействует с тиминным димером, расщепляя его на мономеры. При этом восстанавливаются водородные связи между освобожденными двумя тиминами и аденинами в комплементарных полинуклеотидных цепях ДНК. Функция ДНК восстанавливается примерно на 90-95%.

Фотолиаза (или ее собственные аминокислотные остатки, или связанные с белком простетические группы) способна поглощать свет, что приводит к активации фермента. То есть свет, вызывая образование пиримидиновых димеров, одновременно активирует фотолиазу, которая катализирует разрыв ковалентных связей между соседними пиримидинами, а следовательно, восстановление структуры ДНК.

Другой изучен процесс репарации, который не зависит от наличия света, получил название темновой репарации или эксцизионной (от лат. *Excisio* - вырезание). В этом случае удаляются поврежденные участки с участием целого комплекса ферментов. При эксцизионной репарации азотистых оснований (Base Excision Repair BER), что происходит во всех организмах, модифицированное азотистое основание удаляется ферментом гликозилазой. Существует определенное количество специфических гликозилаз, распознающих различные модифицированные основания.

Эксцизионная репарация нуклеотидов - процесс, связанный с вырезанием участка ДНК, содержащим повреждения (модифицированное основание, тиминный димер и т.д.). В клетках *E. coli* за этот путь отвечает система *uvrABC* (*uvr* - ultra violet repair). Сначала специфический комплекс белков узнает повреждения и связывается с ДНК в этом месте. Белки в составе этого комплекса приобретают эндонуклеазную активность; один из них делает одноцепочечный разрез в поврежденной цепи за несколько нуклеотидов в направлении 5'-конца от повреждения; другой - разрез с другой стороны от повреждения. Длина участка между разрезами равна 12 (или 13 в случае для тиминового димера) нуклеотидам. Далее геликаза разрушает двойную спираль между двумя разрезами, то есть удаляет поврежденный участок. Оставшийся пробел заполняется ДНК-полимеразой I, лигаза окончательно восстанавливает целостность цепи.

Аналогичная система эксцизионной репарации работает в эукариотических клетках. К ней привлечено около 17 белков, причем за разрушение двойной спирали отвечает геликазная часть общего фактора транскрипции ТFIИН. Повреждения распознаются или особыми белковыми факторами, или РНК-полимеразой, которая делает остановку на поврежденном нуклеотиде. После этого геликаза разрушает участок двойной спирали длиной 24-32 пары оснований, поврежденный участок вырезается эндонуклеазой и пробел заполняется ДНК-полимеразой δ / ϵ .

Если повреждения охватывают обе цепи ДНК, то указанные повреждения не могут быть ликвидированы системами репарации, поскольку застройка прорыва требует наличия матрицы - неповрежденной цепи ДНК.

С помощью темновой репарации может происходить исправление большинства потенциально летальных нарушений генома. Так, у бактерий она может устранять разрывы полинуклеотидных цепей ДНК, вызванные действием рентгеновских лучей; может удалять сшивки пуриновых оснований в ДНК, вызванные действием иприта.

Таким образом, системы репарации повышают стабильность носителя наследственной информации - ДНК.

Некоторые наследственные заболевания человека связаны с дефектами в репарации повреждений ДНК, например, пигментная ксеродерма. Больные ксеродермой чрезвычайно чувствительны к солнечному свету; у них часто возникает рак кожи. Доказано, что эта болезнь кожи в одних больных связана с инактивацией УФ-эндонуклеазы, в других - клетки не способны репарировать ДНК, имеющие одонитевые разрывы, в связи с отсутствием, вероятно, ДНК-полимеразы I.

ТЕМА 14. ТРАНСКРИПЦИЯ. ПРОЦЕССИНГ И СПЛАССИНГ ПРЕ-мРНК. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОД

В живых организмах синтезируются тысячи различных специфических белков. Они отличаются друг от друга в первую очередь первичной структурой, информация о которой содержится в молекуле ДНК. Однако сама ДНК не используется как непосредственная матрица для синтеза белка.

Информация о структуре белка, записанная в геноме ДНК, передается в рибосомы с помощью информационной РНК (иРНК), которая служит связующим звеном между генами и системой белкового синтеза. Этот процесс называется **транскрипцией** или переписыванием.

Транскрипция - процесс, с помощью которого имеющаяся в ДНК генетическая информация «переписывается» в молекулу РНК. Она образуется на участке одной цепи ДНК по принципу комплементарности и подобна участку второй полинуклеотидной цепи ДНК. Разница заключается лишь в том, что вместо тимидилового нуклеотида в РНК находится уридилловый, и вместо дезоксирибозы нуклеотиды содержат рибозу. В отличие от репликации происходит копирование не всей молекулы ДНК, а только ее отдельных фрагментов (цистронов). При транскрипции образуются различные виды РНК (мРНК, тРНК, рРНК), которые принимают участие в биосинтезе белка. Цистроны ДНК содержат информацию о структуре всех типов РНК и о структуре всех белков данного вида организма.

Различают транскрипцию **прямую** (от ДНК к РНК) и **обратную** (от РНК к ДНК).

Обратную транскрипцию впервые было установлено для РНК-содержащих онкогенных вирусов. Обеспечивается она специальным ферментом - обратной транскриптазой, или **ревертазой**. Сначала в матрице РНК вируса с помощью этого фермента комплементарно присоединяются дезоксирибонуклеозидтрифосфаты. Синтезируется одна цепь ДНК и образуется объединенная гибридная молекула РНК-ДНК. Затем фермент РНКазы удаляет рибонуклеотидную цепь с гибридной молекулы, а на цепи ДНК комплементарно в присутствии фермента ДНК-полимеразы осуществляется синтез второй цепи ДНК. Образованная ДНК (копия вирусной РНК) встраивается в ДНК клетки-хозяина и вызывает опухолевую трансформацию клетки.

В эукариотических клетках в процессе транскрипции сначала синтезируется предшественник - пре-иРНК, который потом уже превращается в иРНК. Затем иРНК переходит в цитоплазму к рибосомам и выполняет роль матрицы (поэтому ее чаще называют матричной РНК (мРНК)). Другие разновидности РНК (рРНК, тРНК) также синтезируются на молекуле ДНК и являются частью аппарата белкового синтеза.

В норме поток генетической информации в клетке идет в таком направлении:



Молекулярные основы транскрипции

Элементарную структурную единицу транскрипции в прокариот и эукариот обычно называют **транскриптомом**. Прокариотические транскрипты называются также **операми**. Длина транскриптов варьируется от 300 до 10^8 нуклеотидов (последняя цифра характерна для эукариот, у которых размеры транскриптов намного больше, чем у прокариот). Отдельные участки транскриптов выполняют различную функцию: одни являются информативными, то есть несут информацию о структуре полипептида или нематричных РНК (рРНК, тРНК), другие - неинформативные, которые не содержат генетической информации. Особенно значительна неинформативная часть в эукариот. Участки структурных генов, несущих информацию о составе полипептидов, называют **экзонами**, а неинформативные участки - **интронами**.

В последние годы в ДНК хромосом найдены подвижные участки, получившие название мобильных генов или **транспозонов**, которые могут передвигаться вдоль полинуклеотидной цепи. Перемещение (миграцию) транспозонов объясняют механизмом обратной транскрипции. Функцию этих «прыгающих» генов еще полностью не выяснено. Считают, что они могут приводить к изменению в участках ДНК, рядом с которыми они встраиваются. например, вклиниваясь рядом с онкогеном, который в норме не функционирует, транспозоны активируют его, что может привести к перерождению ткани и возникновению опухоли. Вместе с этим транспозоны, участвуя в перестройке некоторых участков хромосом, также влияют на изменчивость, приспособляемость организмов и их эволюцию.

Схема структурно-функциональной организации транскриптов у прокариот и эукариот (И - интроны, Э - экзоны)



1. Участок транскриптона, с которого начинается транскрипция - **промотор**. К нему присоединяются белки, облегчающие начало процесса, и фермент транскрипции - РНК-полимераза. Промотор позволяет узнать, какая именно из двух цепей ДНК является кодирующей для данного гена. Различные промоторы различаются по средству к

ферменту (силой промотора). Соответственно, узнавание слабых промоторов зависит от дополнительных, специфических для данного гена или группы генов, факторов инициации.

2. **Оператор** - регуляторный участок, который взаимодействует с белками-регуляторами транскрипции (репрессорами).

3. **Структурные гены** - несут информацию о последовательности аминокислот в полипептидных цепях. У прокариот в состав оперона входит несколько генов, кодирующих структуру ферментов одной метаболической цепи (обмен одного вещества).

4. **Терминатор** - несет информацию о прекращении синтеза пре-мРНК (определенный стоп-сигнал об окончании транскрипции).

У транскриптонов эукариот есть участок, получивший название *акцепторной или управляющей зоны*. С ней взаимодействуют различные регуляторы, которые влияют на транскрипцию: усилители или «энхансеры» - повышают начальный уровень транскрипции, «сайленсеры» - участки, которые ослабляют транскрипцию, «аттенуаторы» - прерывают транскрипцию.

Процесс транскрипции состоит из трех фаз: **инициации** (начало синтеза мРНК), **элонгации** (удлинения) и **терминации** (окончания).

Стадия *инициации* начинается с присоединения к промотору фермента ДНК-зависимой РНК-полимеразы. Промотор проявляет высокое сродство к указанному ферменту. У прокариот РНК-полимераза состоит из 5 различных белковых субъединиц.

В эукариот есть три РНК-полимеразы (I, II и III). Это белки, которые построены из нескольких субъединиц, и отличаются друг от друга спецификой транскрипции. РНК-полимераза I отвечает за транскрипцию генов рРНК, РНК-полимераза II - за синтез мРНК, а РНК-полимераза III отвечает за синтез тРНК и 5S-рРНК. Эти ферменты катализируют наращивание полинуклеотидной цепи только в направлении 5'→ 3', поэтому 5' конец имеет всегда трифосфат, а 3'- свободную ОН группу. Начинается синтез всех цепей или с АТФ, или с ГТФ, которые соединяются комплементарно со стартовыми основаниями транскриптонов.

Процесс *элонгации* связан с передвижением РНК-полимеразы вдоль матрицы ДНК, разрывом водородных связей между цепями ДНК транскриптона и одновременным присоединением комплементарных рибонуклеозидтрифосфатов (с отщеплением пирофосфатов), которые связываются между собой с помощью фосфодиэфирных связей с образованием растущей цепи пре-мРНК.

Терминация наступает по достижении ферментом участка терминатора. Считают, что такими стоп-сигналами в транскриптоне могут быть поли- (А) последовательности, поэтому в пре-мРНК на 3'-конце находятся комплементарные им поли- (У) последовательности. Выделен также специальный ρ фактор - белок, который имеет отношение к терминации, определенным образом взаимодействуя с

терминирующими последовательностями транскриптона. Благодаря терминаторам, образуются цепи пре-мРНК только определенной длины.

Образованная пре-мРНК является абсолютной копией одной цепи транскриптона ДНК и содержит как информативные, так и неинформативные участки.

При транскрипции образуются все типы РНК (мРНК, рРНК и тРНК). Из этого следует, что цистроны ДНК содержат информацию не только о структуре полипептидной цепи, но и структуре тРНК и рРНК. Все пре-РНК представляют собой линейные цепи, которые не замыкаются в кольцо. Они намного длиннее, чем цитоплазматические РНК, и далее в ядре подвергаются **процессингу** (созреванию).

Пре-мРНК содержат от 5000 до 50000 нуклеотидов, в то время как мРНК относительно короткие; их средний размер составляет около 2000 нуклеотидов. Каждая молекула пре-мРНК чаще всего дает начало только одной молекуле мРНК. При этом большая часть цепи пре-мРНК (иногда до 90%), что соответствует некодирующей зоне ДНК, подвергается ферментативному расщеплению и в цитоплазму не поступает. Для прокариот процессинг не характерен.

Все операции процессинга происходят во время транскрипции на РНК-полимеразном комплексе, то есть процессинг является неотъемлемой частью транскрипции.

Ферменты экзо- и эндонуклеазы вырезают неинформативные участки (интроны) благодаря гидролизу фосфодиэфирных связей, начиная с 5'-конца. Полученные экзоны объединяются в единую полинуклеотидную цепь с помощью малых ядерных РНК (мя РНК). Процесс сшивания экзонов называется *сплайсингом* (англ. Splicing - сшивание канатов без узлов).

Сплайсинг происходит в эукариотических клетках в процессе биосинтеза как мРНК, так и рРНК, тРНК. При этом восстанавливается непрерывность кодонов, кодирующих полипептидные цепи.

Катализ обеих реакций сплайсинга осуществляется *молекулами РНК*. По аналогии с белковыми ферментами, молекулы РНК, которые имеют каталитическую активность, называют *рибозимами*. Одним из таких рибозимов является сплайсосома.

Затем идет модификация 5'- и 3'-концов образованной мРНК. К 5'-концу присоединяется олигонуклеотид, который называют «колпачком» или «кэпом». Он состоит, как правило, из двух или трех метилированных нуклеотидов, в которых конечным нуклеотидом является минорный 7 метилгуанозин, соединенный с остальной частью мРНК не 5'→3', а 5'→5' - фосфодиэфирной связью. «Колпачок» защищает мРНК от разрушения 5'-экзонуклеазой. Кроме того, именно кэп является первичной точкой сборки рибосомы и других элементов инициации белкового синтеза. К 3'-концу присоединяется полиадениловый фрагмент - поли-(А), состоящий примерно из 200 нуклеотидов. Присоединение осуществляется с помощью поли(А)-полимеразы. Считают,

что он необходим для транспорта мРНК из ядра в цитоплазму. В отличие от прокариот, в эукариот есть ядерная мембрана, через которую доставляют мРНК в цитоплазму особые транспортные белки *информоферы* (те, что несут информацию), открытые О. С. Спириным, Г. П. Георгиевым.

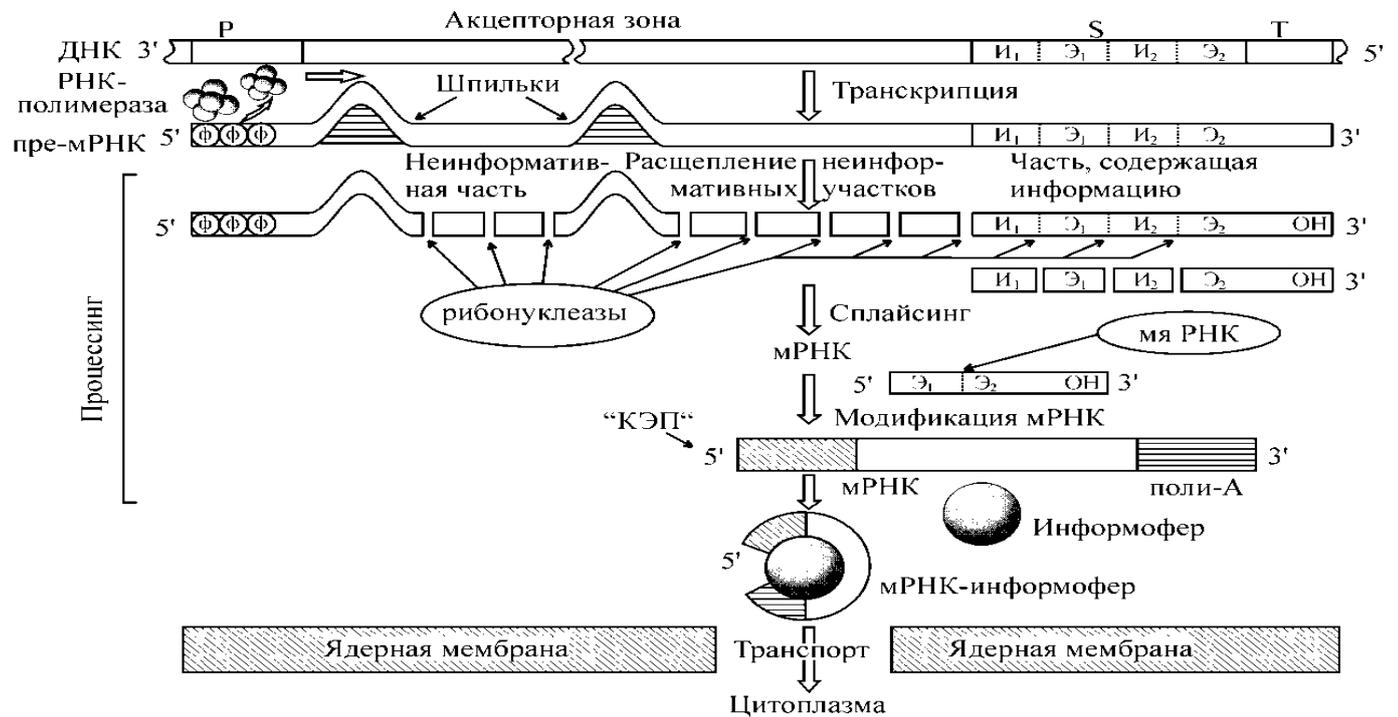


Рис. 76. Схема транскрипции и посттранскрипционных процессов в ядре эукариот

Процессинг пре-мРНК

В эукариотических клетках мРНК всегда находится в комплексе с белком. Рибонуклеопротеиновый комплекс - это единственная форма существования мРНК в животной и растительной клетке с момента синтеза пре-мРНК в ядре до распада мРНК в цитоплазме. Информоферы доставляют мРНК в рибосомы цитоплазмы, где и происходит синтез белка, то есть осуществляется процесс перевода нуклеотидных последовательностей мРНК на аминокислотную последовательность полипептидной цепи белка. Этот процесс получил название **трансляции**.

Альтернативный сплайсинг

Пре-мРНК, которая синтезируется во время транскрипции, может подвергаться сплайсингу и полиаденилированию различными альтернативными путями: несколько экзонов в начале или внутри гена могут вырезаться из транскрипта, последний может обрезаться и подвергаться полиаденилированию за счет использования поли(А)-сигнала внутри одного из интронов, и др. В результате образуются различные молекулы мРНК, содержащих различные наборы экзонов и, соответственно, кодирующих различные белки.

Транс-сплайсинг

Для эукариотических генов также достаточно характерно явление транс-сплайсинга - объединение в составе мРНК экзонов различных генов. Основой для транс-сплайсинга является то обстоятельство, что для многих генов существует не одна, а несколько альтернативных стартовых точек транскрипции, в том числе такие, которые расположены достаточно далеко от гена и одновременно являются стартовыми точками других генов. В результате транскрипция иногда осуществляется через несколько генов, и сплайсинг происходит на уровне таких «объединенных» первичных транскриптов.

Генетический код

Генетический код объединяет последовательность нуклеотидов в ДНК и последовательность аминокислот в белках. Итак, для каждой аминокислоты существует свой **кодон (кодовое слово)** для перевода последовательности нуклеотидов в кодированную аминокислоту. Используя 4-буквенный алфавит нуклеотидных оснований ДНК (А, Г, Т, Ц), сделав только математические расчеты, можно предположить следующее:

1. Если аминокислота кодируется одной основой, то можно получить полипептидную цепь только с 4 разновидностей аминокислот ($4^1 = 4$).

2. Если предположить, что кодон для каждой аминокислоты содержит два подряд расположенных нуклеотида (дуплет), то возможны $4^2 = 16$ сообщений (такого количества кодонов тоже недостаточно для кодирования 20 аминокислот). В этом случае полипептидная цепь состояла бы только из 16 разновидностей аминокислот.

3. Если взять комбинации по три нуклеотида (триплет), то получим $4^3 = 64$ кодона, то есть с избытком.

РНК - аминокислотный код

Первый нуклеотид	Второй нуклеотид				Третий нуклеотид
	У	Ц	А	Г	
У	Фен	Сер	Тир	Цис	У
	Фен	Сер	Тир	Цис	Ц
	Лей	Сер	-	-	А
	Лей	Сер	-	Три	Г
Ц	Лей	Про	Гис	Арг	У
	Лей	Про	Гис	Арг	Ц
	Лей	Про	Глн	Арг	А
	Лей	Про	Глн	Арг	Г
А	Иле	Тре	Асн	Сер	У
	Иле	Тре	Асн	Сер	Ц
	Иле	Тре	Лиз	Арг	А
	Мет	Тре	Лиз	Арг	Г
Г	Вал	Ала	Асп	Гли	У
	Вал	Ала	Асп	Гли	Ц
	Вал	Ала	Глу	Гли	А
	Вал	Ала	Глу	Гли	Г

Генетическая информация (порядок размещения нуклеотидов в гене ДНК) передается в процессе биосинтеза белков на мРНК. Процесс перевода (трансляции) с 4-буквенного нуклеотидного алфавита мРНК на 20-буквенный алфавит полипептидной цепи стал основой для расшифровки нуклеотидно-аминокислотного кода.

Свойства генетического кода

Генетический код обладает следующими свойствами: триплетность, вырожденность, неперекрываемость, специфичность, универсальность, координатность.

1. Триплетность. Триплет (кодон) состоит из трех последовательно расположенных пуриновых или пиримидиновых азотистых оснований на мРНК, которые отвечают за присоединение определенной аминокислоты в полипептидной цепи. Вследствие проведенных экспериментов были раскрыты все 64 триплеты, из них 61 триплет считается содержательными, т. е. отвечают определенным аминокислотам, а три (УАА, УАГ, УГА), не кодируют аминокислоты и названы «бессодержательными». Однако этим кодонам принадлежит важная роль в биосинтезе белка - они обеспечивают конец синтеза полипептидной цепи (терминацию).

2. Генетический код является *вырожденным* (избыточным), поскольку каждой аминокислоте (кроме метионина и триптофана) отвечает больше, чем один кодон. Например, для глицина, аланина существует четыре, для серина – шесть, для многих других аминокислот – по два кодона.

В большинстве случаев триплеты, кодирующие одну и ту же аминокислоту, различаются только благодаря третьему нуклеотиду в кодоне. Так, в кодонах аланина (ГЦУ, ГЦЦ, ГЦА, ГЦГ) первые два нуклеотида одинаковые, отличается только третий. Это повышает надежность функционирования белоксинтетической системы. Вырожденность кода сформировалась в процессе эволюции как фактор приспособления. Она делает более надежной систему хранения и передачи генетической информации, особенно тогда, когда происходит мутация на мРНК и тРНК, т.е. вырожденность может свести к минимуму пагубное воздействие мутаций. Это подтверждается тем, что в случае изменения третьего основания в 32 кодонах их содержание не меняется. В 26 кодонах содержание не меняется, если одно пуриновое или пиримидиновое основание заменяется на такие же другие.

3. Неперекрываемость - каждый из триплетов не зависит от другого. Каждый из нуклеотидов кодона не может транслироваться в сочетании с другими триплетами. Ниже показана разница между триплетами, которые не перекрываются и перекрываются:



Кодоны не перекрываются Кодоны перекрываются
1, 2, 3 - номера триплетов

Код не имеет сигналов разделения (знаков пунктуации), которые обозначают начало одного и конец другого триплета. Поэтому исключительно большое значение имеет определение начала считывания (рамки). Если будет сбита рамка считывания, может синтезироваться дефектный белок, что имеет место во время действия отдельных антибиотиков на биосинтез белка у микроорганизмов и является причиной их гибели (например, стрептомицин и др.).

4. Специфичность - каждой аминокислоте соответствуют только определенные кодоны, которые не могут кодировать другие аминокислоты.

5. Колинеарность - соблюдается соответствие линейной последовательности триплетов в мРНК и аминокислот в полипептиде.

6. Универсальность. Тринуклеотиды, кодирующие одну и ту же аминокислоту, имеют одинаковый состав и последовательность для всех организмов (бактерий, растений, животных и человека). Хотя код и универсален, возможны незначительные видовые отклонения, которые возникли в процессе эволюции и дифференциации.

Тема 15: БИОСИНТЕЗ БЕЛКА. ТРАНСЛЯЦИЯ. МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ БИОСИНТЕЗА БЕЛКА

Биосинтез белка является центральным вопросом биохимии. Исследование его имеет важное теоретическое и практическое значение. Учение о биосинтезе белка тесно связано с такими важнейшими проблемами, как наследственность, изменчивость, приспособляемость, естественный отбор, выведение новых форм растительных и животных организмов, разработка методов управления процессами жизнедеятельности организма.

Расшифровка процессов биосинтеза белка и его регуляции имеет первостепенное значение и для охраны здоровья, в том числе - для фармации; позволяет разобраться в природе наследственных заболеваний, ставит вопрос их профилактики и лечения; способствует направленному синтезу фармпрепаратов, в том числе антиметаболитов, которые используются для подавления процессов биосинтеза белка у онкологических больных: антимуагенов, обеспечивающих охрану ДНК от мутационных изменений, радиопротекторов, защищающих нуклеиновые кислоты от радиационных и других повреждений; позволяет раскрывать механизмы действия некоторых лекарственных средств, например, антибиотиков, которые подавляют на том или ином этапе биосинтез белков у микроорганизмов и вирусов, раскрывая необходимость осторожного и умного их использования.

Достижения последних лет в области молекулярной биологии стали основой для развития генной инженерии, которая позволяет получать ряд ценных продуктов (белки, аминокислоты и др.), в том числе и лекарственных средств (инсулин, интерферон, гормон роста, брадикинин и др.).

Биосинтез белка или **трансляция** происходит в небольших субклеточных образованиях – *рибосомах*. Рибосомы представляют собой плотные округлые гранулы сферической формы, которые состоят из двух субъединиц: большой и малой. Они характеризуются коэффициентом или константой седиментации, которая определяется ультрацентрифугированием и обозначается буквой S (единица Сведберга, $1 \cdot 10^{-13}$ с). По размерам и молекулярной массе все рибосомы разделяют на три группы.

Первую группу образуют относительно мелкие бактериальные рибосомы. Рибосомы прокариот имеют константу седиментации 70 единиц Сведберга и обозначаются 70S. Они диссоциируют на две субъединицы с молекулярной массой

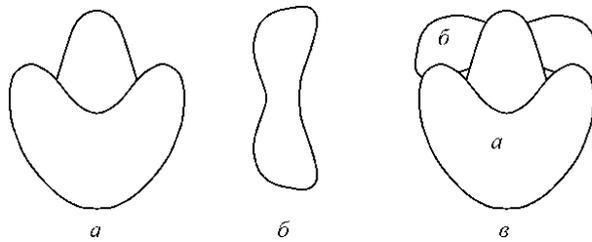
(М.м.):

```
graph TD; 70S --> 30S["30S, М.м. = 1·106"]; 70S --> 50S["50S, М.м. = 2·106"]
```

Вторую группу образуют большие рибосомы

эукариотических клеток. Они имеют константу седиментации 80S и состоят из двух субъединиц:

```
graph TD; 80S --> 40S["40S, М.м. = 1,7·106"]; 80S --> 60S["60S, М.м. = 3,0·106"]
```



Большая (а) и меньшая (б) субчастицы рибосом (в)

Третью группу составляют рибосомы митохондрий и хлоропластов эукариотических клеток. Рибосомы митохондрий относятся к классу 70S, однако они отличаются коэффициентом седиментации в различных групп эукариот.

В основном рибосомы изображают в виде симметричной фигуры, в которой 30S субчастица лежит на 50S-субъединице, которая имеет сферическую форму.

В состав рибосом входят рРНК, белки, низкомолекулярные соединения: ди- и полиамины, различные соли, ионы двухвалентных металлов Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} и др.

Химический состав:



Характеристика рРНК.

Рибосомные РНК образуют каркас, с которым сочетаются белки, образуя компактный рибонуклеопротеиновый комплекс.

Белковый состав рибосом гетерогенный. Молекулярная масса рибосомных белков варьирует от 5000-7000 до 50000-75000. В настоящее время полностью расшифрована первичная структура всех рРНК в 70S и 80S рибосомах. Рибосомы активны только в полностью объединенном виде. Рибосомы, которые не участвуют в синтезе белка, легко диссоциируют на свои субчастицы.

Этапы биосинтеза белка

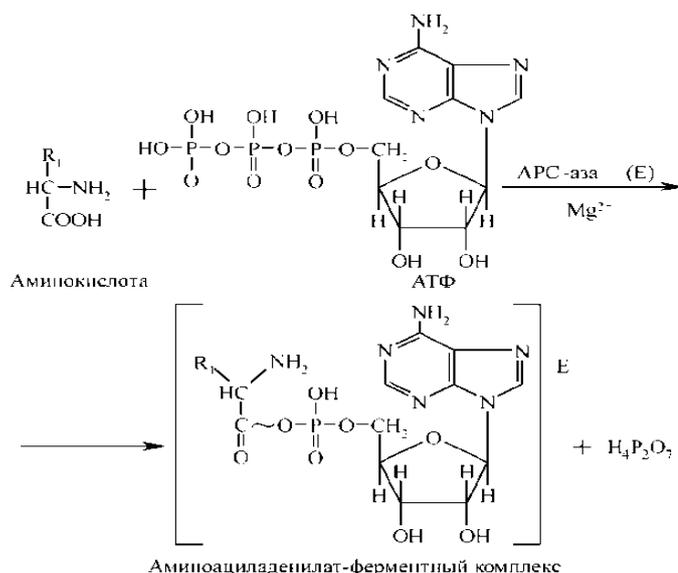
1. Активация аминокислот, сопряжение их с тРНК и перенос в рибосомы.

Этот процесс идет в одну стадию, но для удобства и лучшего толкования его разбивают на два этапа:

а) активирование аминокислот - образование аминоациладенилатов.

Аминокислоты в цитоплазме находятся в неактивном состоянии. Они активируются по карбоксильной группе благодаря энергии АТФ, в присутствии солей Mg^{2+} с помощью специальных ферментов *аминоацил-тРНК-синтетаз*, которые обозначаются сокращенно *АРСазы*. Эти ферменты обеспечивают оба этапа процесса - активацию аминокислот и соединение их с тРНК. Каждый фермент оказывает двойную специфичность: к определенной аминокислоте и к соответствующей ей тРНК.

Процесс активации аминокислот схематически можно изобразить следующим образом:



б) перенос аминоациладенилатов к месту синтеза белка - к рибосомам.

Активированные аминокислоты должны переноситься в рибосомы. Этот перенос осуществляется тРНК. Транспортные РНК - низкомолекулярные РНК, полинуклеотидная цепь их состоит в среднем из 75-90 нуклеотидов, М.м. = 23000-30000. На их долю приходится 10-20% суммарной РНК клеток.

Разновидностей тРНК столько, сколько аминокислот, то есть каждая из 20 аминокислот имеет свою тРНК, а некоторые и больше (например, существуют пять различных тРНК, которые переносят серин).

В настоящее время установлена нуклеотидная последовательность для многих тРНК. При их сравнении удалось обнаружить много общих черт, характерных для структуры тРНК. Во всех тРНК найдено, кроме четырех обычных рибонуклеотидов (А, Г, Ц, У), 8-19% минорных нуклеотидов, среди которых - различные метилированные пиримидины (в том числе и тимин), аденин, гуанин и т.д., но самыми распространенными и универсальными среди них есть псевдоуридин и дигидроуридин.

Молекулы тРНК представляют собой одиночную полинуклеотидную цепь, которая образует сложную пространственную структуру. Для удобства раскрытия роли пространственной конформации тРНК в процессе биосинтеза белка ее изображают в виде «клеверного листа».

«Клеверный лист» содержит 4 спирализованные петли и 2 ветви:

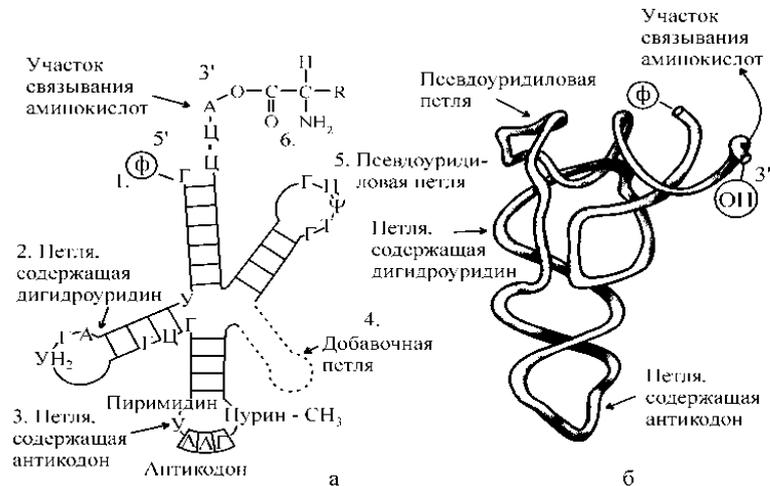
- ветвь с '5 конца во всех тРНК начинается остатком ГМФ;
- дигидроуридиновая петля, которая содержит несколько остатков дигидроуридина ($УН_2$) - обеспечивает присоединение тРНК к ферменту аминоксил-тРНК-синтетазе;

- антикодоновая петля содержит специфический для каждой тРНК тринуклеотид, называемый «антикодоном», отвечающий за присоединение тРНК к мРНК. Антикодон -

это три подряд расположенные пуриновые и пиримидиновые основания на тРНК, комплементарные кодону на мРНК;

- дополнительная петля (ее функция мало изучена);

- псевдоуридиновая петля (ЦψТ) содержит необычный для РНК нуклеозид риботимидин (Т) и нуклеозид псевдоуридин (ψ), в котором азотистое основание и пентоза соединены необычной углерод-углеродной связью. Предполагают, что именно этой петлей тРНК взаимодействует с рибосомой;

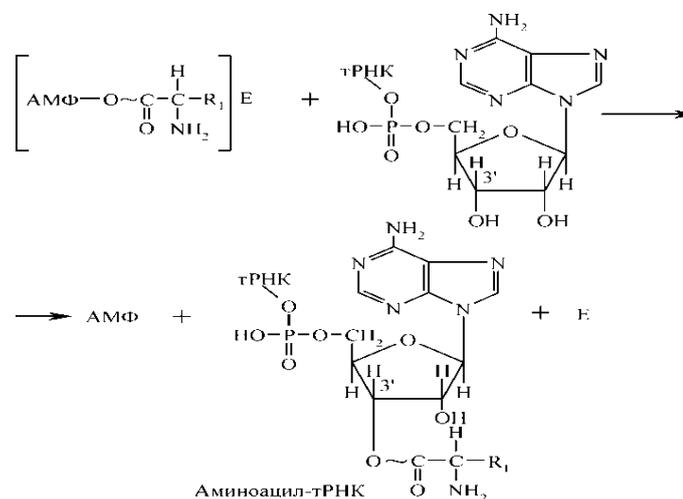


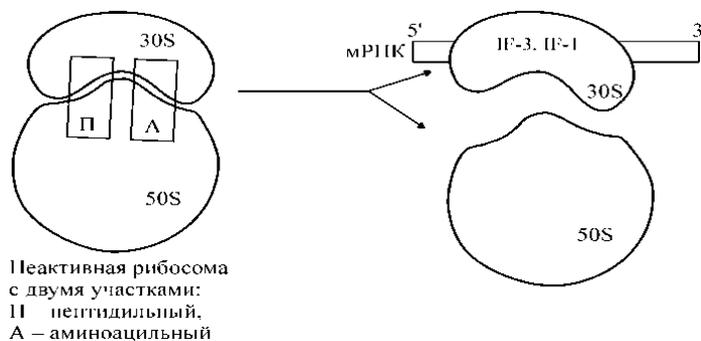
Структура тРНК: а - общая структура разных тРНК, б - пространственная структура тРНК

- акцепторный конец - полинуклеотидная цепь всех тРНК заканчивается одинаковым тринуклеотидом, состоящим из двух цитидиловых кислот и одной адениловой кислоты со свободным 3'-ОН концом, к которому прикрепляется эфирной связью специфическая аминокислота.

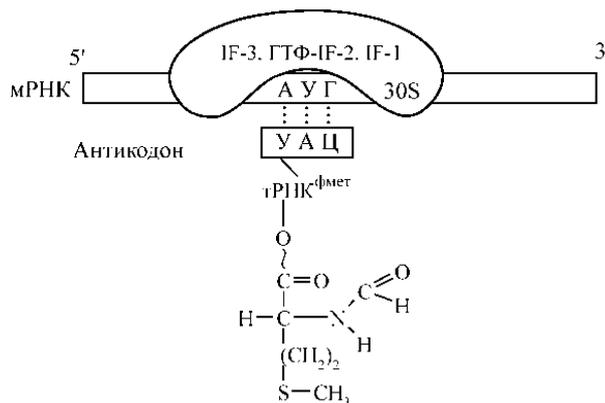
Таким образом тРНК связывает в единое целое мРНК, рибосому, специфическую аминокислоту.

Присоединение активированной аминокислоты к специфической тРНК происходит путем образования сложноэфирной связи между СООН-группой соответствующей аминокислоты и 3'-ОН группой концевой остатка адениловой кислоты тРНК:



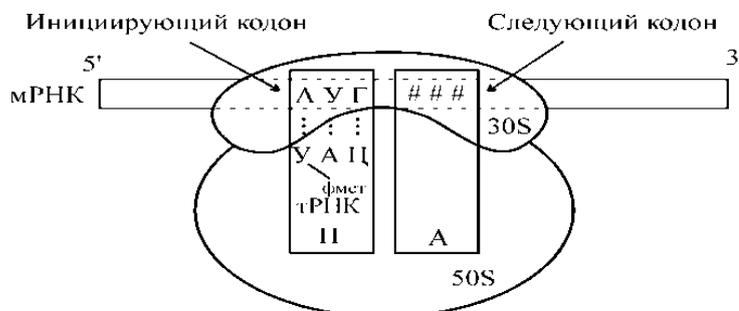


2. Затем образованный комплекс связывается с фактором инициации IF-2, соединенным с ГТФ и с иницирующей N-формилметионил-тРНК^{фмет}, которая присоединяется своим антикодоном к иницирующему кодону (АУГ) мРНК:



3. На третьем этапе инициации происходит взаимодействие этого комплекса с 50S-субъединицей рибосомы; одновременно молекула ГТФ, связанная с IF-2, гидролизуется до ГДФ и H_3PO_4 , которые, как и факторы инициации, высвобождаются из комплекса. В результате образуется функционально активная 70S-рибосома, которая называется иницирующим комплексом.

Правильное расположение тРНК^{фмет} в полностью собранном иницирующем комплексе обеспечивается двумя точками узнавания и связывания. Во-первых, антикодон иницирующей тРНК^{фмет} образует комплементарную пару с кодоном АУГ на мРНК. Во-вторых, тРНК^{фмет} присоединяется к пептидильному участку рибосомы. В рибосоме, как уже отмечалось выше, есть два участка для присоединения аминокил-тРНК: А-участок и П-участок.



Оба они образованы благодаря специфическому строению зон 30S и 50S субчастиц. Иницирующая тРНК^{фмет} может связываться только с П-участком, однако это исключение, поскольку все остальные аминокил-тРНК, которые поступают в рибосомы, связываются с А-участком. П-участок предназначен для выхода «пустых» (т.

е. освобожденных от аминокислот) тРНК и в нем закрепляется пептидил-тРНК (т. е. тРНК с полипептидной цепью), которая увеличивается.

У эукариот инициаторной (первой) также считается метионил-тРНК, однако, в отличие от таковой у прокариот, она не формилируется, а реагирует с факторами инициации eIF-1, eIF-2, eIF-3, с 40S-субъединицей рибосом и с мРНК. Реакции происходят по той же схеме, что и у прокариот.

б) Стадия элонгации процесса трансляции.

По окончании стадии инициации в П-участке находится иницирующая тРНК^{фмет}. При этом А-участок свободен, но в нем уже находится следующий кодон мРНК. На первом этапе элонгации происходит поступление второй аминокислоты, например, тРНК^{фен} в А-участок рибосомы и комплементарном ее соединении с кодоном мРНК (УУУ). В этом процессе принимают участие факторы элонгации и ГТФ. На втором этапе элонгации образуется пептидная связь в А-участке, где находится вторая аминоацил-тРНК^{фен}. В А-участок из П-участка перемещается остаток N-формилметионина от переносящей его тРНК^{фмет} на аминокислотную группу фенилаланил-тРНК^{фен}, и образуется первая пептидная связь с участием фермента *пептидилтрансферазы*. При этом образуется дипептидил-тРНК^{фен} (N-формилметионил-фенилаланил-тРНК^{фен}). Далее (третий этап) происходит процесс *транслокации* - перемещение рибосомы на один кодон относительно мРНК и дипептидил-тРНК^{фен}. В результате этого процесса дипептидил-тРНК^{фен} попадает в зону пептидильного центра рибосомы, однако остается соединенной со вторым кодоном мРНК (УУУ), а тРНК^{фмет} без N-формилметионина выталкивается из рибосомы. При транслокации участвует внерибосомный белок - фактор элонгации - G, который называется *транслоказой*. Дальнейшее удлинение полипептидной цепи происходит путем повторения этих этапов: но уже присоединяется в А-участок третья аминокислота, например, аланин в виде аланил-тРНК^{ала}, соответствующая третьему кодону (ГЦУ) на мРНК. Затем дипептидильный остаток с тРНК^{фен} переносится на поступившую аминокислоту, соединенную с тРНК^{ала}, то есть образуется вторая пептидная связь и трипептид N-формилметионил-фенилаланил-аланил-тРНК^{ала}. Цикл элонгации повторяется многократно, то есть столько, сколько аминокислот входит в состав полипептидной цепи. Скорость элонгации велика: синтез полипептида из 150-200 аминокислот длится около 1-3 мин. Остаток первой аминокислоты N-формилметионин или формильная группа, или пептид, содержащий N-формилметионин, занимающие в растущей полипептидной цепи N-концевое положение, отщепляются при участии специфических ферментов еще во время элонгации (однако в некоторых белках сохраняются).

в) Стадия терминации.

Элонгация завершается тогда, когда в А-участке появляется один из трех терминирующих триплетов: УАГ, УГА, УАА. Наличие их в любом участке мРНК обрывает белковый синтез. В зоне этих триплетов с участием факторов терминации происходит

гидролитическое расщепление связи между полипептидом и последней тРНК. Освобождается синтезированный белок, который покидает рибосому. При этом рибосома диссоциирует на субъединицы. Терминацию синтеза белка у эукариот обуславливают те же триплеты.

На включение в полипептид каждой аминокислоты расходуется энергия 4 высокоэнергетических связей (для образования аа-тРНК необходима энергия 2-х высокоэнергетических связей АТФ; гидролиз 2-х молекул ГТФ обеспечивает сочетание аа-тРНК с кодоном и транслокацию). При образовании иницирующего комплекса рибосома присоединяется к 5'-концу мРНК, а в ходе трансляции передвигается в направлении 3'-конца. Как только освобождается 5'-конец, к мРНК присоединяются новые рибосомы, на которых также начинается биосинтез полипептидов. На молекуле мРНК может разместиться от 3 до 80-100 рибосом, образуя полирибосомы. Чем длиннее молекула мРНК, тем длиннее образующаяся полипептидная цепь закодированного белка, и тем большее количество рибосом в полирибосоме. Некоторые мРНК содержат информацию о нескольких белках - полицистронные мРНК. Каждый из белков закодирован в отдельном участке мРНК - цистроне, который имеет свои иницирующие и терминирующие триплеты.

Вторичная и третичная структуры белков формируются в процессе трансляции по мере удлинения полипептидной цепи. Трехмерную конформацию белок окончательно приобретает уже после своего отделения.

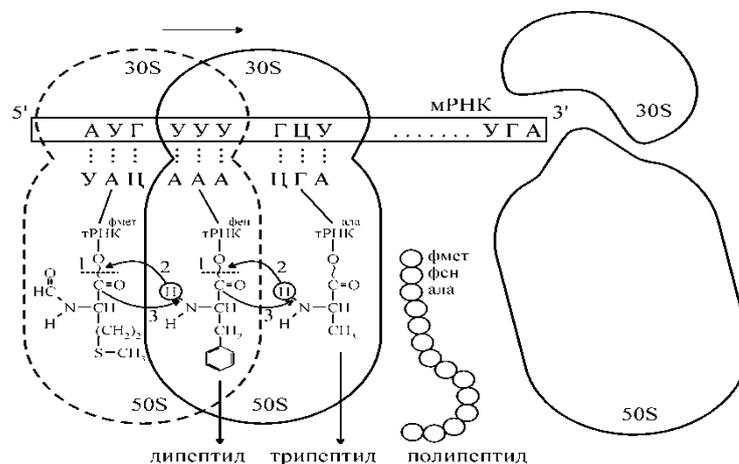


Схема трансляции у прокариот

3. Посттрансляционные изменения белков.

Результатом процесса трансляции не всегда является образование функционально активного белка. Во многих случаях необходимы последующие трансформации (преобразования). Так, инсулин образуется из своего предшественника проинсулина путем ограниченного протеолиза, т. е. отщепления от него пептида с участием ферментов-протеиназ в цитоплазме клетки. Большое количество неактивных проферментов (пепсиногены, трипсиноген и др.) также активируются, превращаясь в активные ферменты путем частичного протеолиза.

Регуляция биосинтеза белков у прокариот

Впервые схема регуляции биосинтеза белков у прокариот была предложена французскими учеными Ф.Жакоб и Ж.Моно в 1961 г. Она была разработана на примере лактозного оперона кишечной палочки (*lac*-оперона). В настоящее время полностью известна первичная структура лактозного оперона - число и порядок чередования нуклеотидов в каждой функциональной области, осуществлен его синтез, доказан принцип работы. Кишечная палочка *E. coli* в качестве источника энергии и углерода при отсутствии глюкозы в среде может использовать дисахарид лактозу. Если выращивать бактерии кишечной палочки *E. coli* в среде, где отсутствует лактоза (β -галактозид), то ее клетки содержат всего лишь от одной до десяти молекул фермента галактозидазы (лактазы). При добавлении в питательную среду лактозы, количество фермента увеличивается за несколько минут в сотни и тысячи раз, то есть под влиянием субстрата (индуктора) стимулируется появление большого количества фермента лактазы, который гидролитически расщепляет лактозу на D-глюкозу и D-галактозу. Согласно концепции Ф. Жакоба и Ж. Моно в *lac*-опероне различают неоднородные по функции гены.

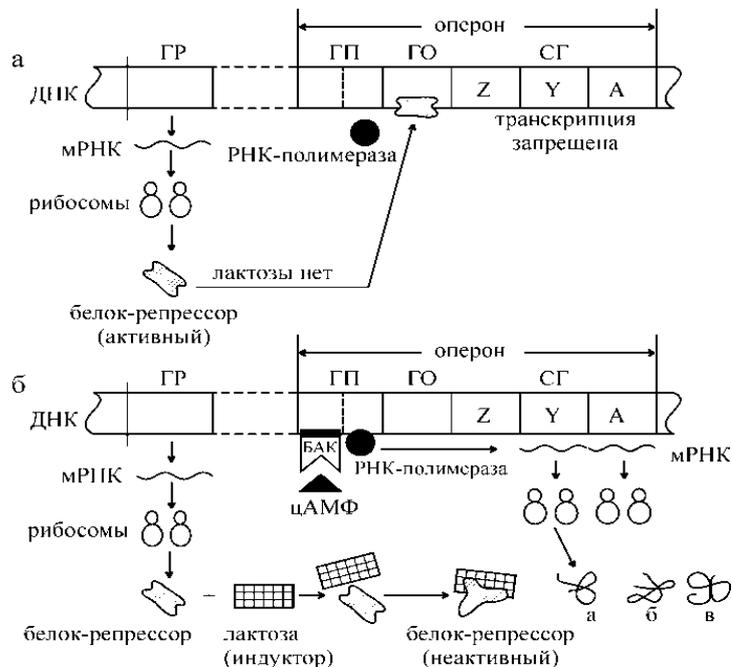
1. Структурные гены (СГ) несут информацию о структуре трех ферментов: β -галактозидазы (а), которая гидролизует лактозу до глюкозы и галактозы; β -галактозидпермеазы (б), которая обеспечивает транспорт лактозы через мембрану в клетку; β -галактозидацетилазы (в), функция которой неизвестна. При перемещении фермента РНК-полимеразы по ДНК, СГ испытывают транскрипции, образуется полицистронна мРНК, которая, попадая в рибосомы, начинает синтез трех вышеупомянутых ферментов.

2. Ген-оператор (ГО) располагается между геном-промотором (ГП) и СГ. Это пусковой механизм, который в зависимости от условий запускает или тормозит процесс транскрипции, а следовательно - и образование мРНК. Если ГО свободен, т. е. не связан с белком-репрессором, то СГ транскрибируются. Если же он связан с белком-репрессором, транскрипция СГ прекращается.

3. Ген-промотор (ГП) состоит из двух частей. Одна из них служит местом прикрепления РНК-полимеразы. Вторая часть ГП служит местом фиксации комплекса, который образуется путем присоединения цАМФ к специальному белку, обозначаемому БАК (*белок-активатор катаболитного гена*, или катаболитный ген-активирующий белок).

Это является обязательным условием образования открытого комплекса РНК-полимеразы с промотором и началом ее работы. Образование комплекса БАК-цАМФ определяется концентрацией цАМФ, которая, в свою очередь, зависит от наличия глюкозы. В отсутствие последней содержание цАМФ в клетке значительно повышается, что способствует образованию комплекса. Комплекс, связываясь с промотором, изменяет пространственную структуру данного участка ДНК таким образом, что

становится возможным присоединение к нему РНК-полимеразы. Это увеличивает скорость транскрипции оперона. В присутствии глюкозы содержание цАМФ уменьшается, комплекс БАК-цАМФ не образуется и РНК-полимераза не может связаться с промотором; поэтому транскрипция *lac*-генов не происходит. Следовательно, в клетке есть еще один, дополнительный БАК-цАМФ регулятор, который действует как положительный регулятор, поскольку его присутствие является необходимым для начала работы гена.



Регуляция синтеза белка (по Ф. Жакоб и Ж. Моно)

Циклический аденозинмонофосфата (цАМФ) является универсальным внутриклеточным регулятором, образуется из АТФ в присутствии фермента аденилатциклазы. Содержание самого цАМФ также регулируется состоянием активности ферментов аденилатциклазы и фосфодиэстеразы, разрушающей цАМФ.

4. Ген-регулятор (ГР) обеспечивает синтез особого *белка-репрессора*. Свое название он получил благодаря тому, что его действие на ген-оператор тормозит (репрессирует) функционирование последнего, в результате чего останавливается транскрипция. Белок-репрессор в отсутствие индуктора обладает сильным сродством к гену-оператору и может легко присоединяться к нему. С другой стороны, белок-репрессор способен к специфическому взаимодействию с определенными низкомолекулярными веществами (индукторами), в частности для *lac*-оперона - с лактозой. В отсутствие лактозы оператор блокируется за счет присоединения к нему белка-репрессора, т. е. процесс транскрипции не происходит. Белок-репрессор находится в связанном состоянии с оператором до тех пор, пока не появится лактоза, и он вступит во взаимодействие с ней. Лактоза, связываясь с белком-репрессором, меняет его конформацию, в результате чего он теряет способность присоединяться к оператору.

Оператор освобождается и начинается транскрипция и синтез ферментов катаболизма лактозы.

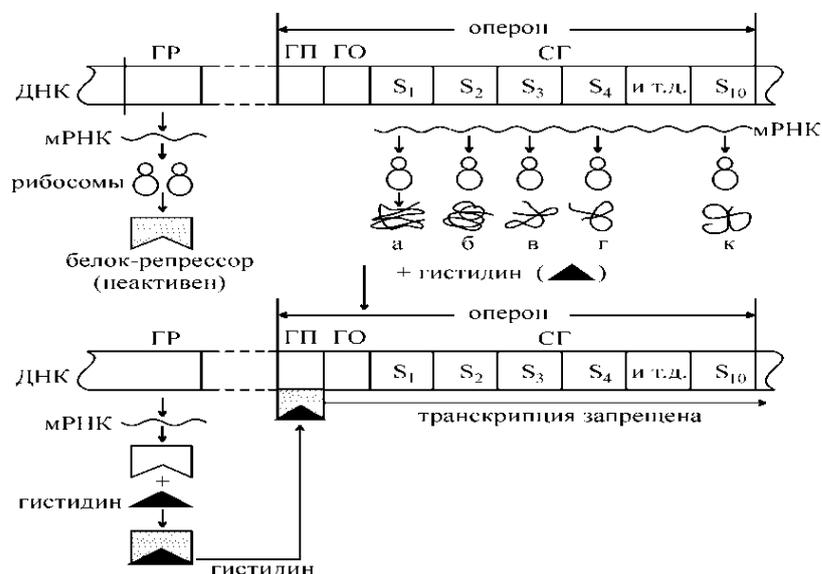
Таким образом, при участии белка-репрессора, который образуется первоначально в активной, то есть способной к связыванию с оператором форме, и индуктора, который переводит белок-репрессор в неактивную форму, происходит регуляция синтеза индуцибельных ферментов.

Белки, скорость синтеза которых резко меняется в зависимости от различных условий, получили название *адаптивных или индуцибельных*. Количество молекул индуцибельных белков варьируется в значительных пределах. Обычно, индуцибельный фермент содержится в бактериальной клетке только в мизерных количествах. Если же в среде появится значительное количество его субстрата, например, при добавлении в питательную среду, особенно если этот субстрат представляет собой единственный источник энергии и углерода для клеток, то концентрация такого фермента может быстро возрасти в тысячу и более раз.

Кроме индуцибельных различают белки *конститутивные*. Конститутивные белки, и в том числе конститутивные ферменты - это белки, которые синтезируются клеткой в постоянных количествах с постоянной скоростью независимо от наличия других субстратов. Уровень конститутивного синтеза зависит от скорости синтеза мРНК, скорости прикрепления к ней рибосом, считывания матрицы и срока жизни мРНК. Транскриптон, который отвечает за синтез конститутивного белка, не содержит активно действующего оператора. К ним относятся и ферменты, участвующие в главных путях катаболизма, например в гликолизе.

В клетках кроме индукции генов происходит и их *репрессия*. Действие этих оперонов также контролируется с помощью белков-репрессоров, но в отличие от индукции, они синтезируются изначально в неактивной форме. И только присоединение к ним накопленного продукта ферментативной реакции - *корепрессора* переводит их в активную форму, что сопровождается их связыванием с оператором и прекращением синтеза белка.

Как пример регуляции путем репрессии синтеза белков-ферментов можно взять гистидиновый оперон бактерий. Этот оперон содержит 10 структурных цистронов, кодирующих 10 ферментов, необходимых для синтеза гистидина. Ферменты образуются только в том случае, когда в среде нет гистидина и клетки вынуждены сами синтезировать его из других веществ. Добавление в среду гистидина прекращает синтез ферментов.



Репрессия конечным продуктом гистидинового оперона

В большинстве изученных случаев индуцибельными являются опероны, ответственные за синтез ферментов, катализирующих катаболические реакции (распад аминокислот, дисахаридов, сбраживание сахаров и др.). Индукторами таких оперонов, которые переводят активный репрессор в неактивную форму, являются субстраты этих катаболических ферментов. Чаще всего репрессируемые опероны - это системы синтеза анаболических ферментов, которые катализируют реакции синтеза аминокислот, азотистых оснований и т.д. В качестве корепрессора, активирующего белок-репрессор, выступают продукты, синтезируемые ферментами данного оперона.

Приведенные выше механизмы регуляции скорости белкового синтеза на уровне транскрипции не исчерпывают все известные на сегодняшний день данные в этой области исследований. Существуют механизмы регуляции биосинтеза белка и на уровне трансляции. Регуляторную роль здесь выполняют в основном тРНК. Активация, угнетение синтеза тРНК, нарушение их структуры являются факторами регуляции биосинтеза белка на этом уровне.

Важнейшим достижением в области регуляции биосинтеза белка стало выделение белка-репрессора и изучение его химического строения. В последние годы выделен ряд репрессоров: репрессор синтеза аргинина, триптофана, *lac*-оперона и др.

Регуляция биосинтеза белков у эукариот

Механизм регуляции биосинтеза белков у эукариот изучен гораздо меньше, чем у прокариот. В последние годы благодаря исследованиям в области генной инженерии был достигнут значительный прогресс в понимании экспрессии эукариотических генов.

Считают, что основные принципы регуляции у них аналогичны таковым у прокариот, но в целом этот процесс сложнее и происходит иначе. У эукариот существует ряд точек приложения регуляторных воздействий, полностью отсутствующих у прокариот. Для эукариот не характерна прямая субстратная регуляция, распространенная у прокариот. У эукариот не найдено регуляторных белков типа

белков-репрессоров бактерий, которые сочетают в себе функции распознавателя химических сигналов метаболизма (специфически связывают свои метаболиты) и регулятора транскрипции оперонов. У млекопитающих и высших растений хроматин, организованный в хромосомы, устроен значительно сложнее, чем у бактерий. Генетический материал находится в ядре, которое окружается ядерной мембраной. Поэтому процессы транскрипции (ядро) и трансляции (цитоплазма) разделены, поскольку рибосомы находятся в основном в цитоплазме. Экспрессия генов у эукариот состоит из гораздо большего количества этапов, чем у прокариот, особенно это касается процессинга пре-мРНК. Сложной является и обратная связь - влияние метаболитов и других химических регуляторов цитоплазмы на активность генов (что легко осуществляется у бактерий). В отличие от прокариот, опероны эукариот, как правило, моноцистронны, с очень большими регуляторными зонами.

Все структурные гены эукариот условно делят на три типа: а) гены, которые функционируют во всех клетках организма (например, гены, которые отвечают за синтез ферментов энергетического обмена); б) гены, которые функционируют только в тканях одного типа (в частности, синтез миозина в мышечной ткани); в) гены, необходимые для выполнения клетками специфических функций (например, синтез белка хрусталика).

Было показано, что на экспрессию эукариотических генов влияет амплификация и перестройка генов. Известно, что в формировании хроматина участвуют ДНК, белки и небольшое количество РНК. ДНК ассоциирована с *гистонами и негистоновыми белками*. Установлено, что гистоны и негистоновые белки (НГБ) играют важную роль в проявлении активности генома. У прокариот гистоны отсутствуют. Негистоновые белки отличаются большим разнообразием. Известно около 500-600 фракций, поэтому считается, что они выполняют роль специфических регуляторов транскрипции.

В эукариотических организмах широко распространена регуляция активности генов особыми сигнальными веществами, которые вырабатываются другими клетками. Примерами таких сигнальных соединений могут быть гормоны, действующие на клетки-мишени, нейромедиаторы, биогенные амины.

Регуляция на уровне трансляции возможна благодаря действию регуляторов на различные белковые факторы, которые контролируют в рибосомах различные этапы трансляции, и на разные функциональные участки рибосом.

Тема 16: БИОХИМИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ В ОРГАНИЗМЕ

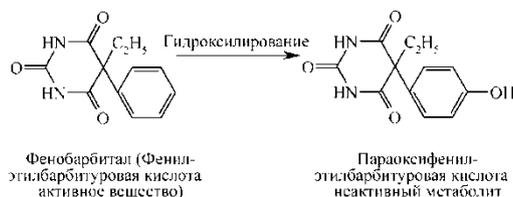
В организме человека и высших животных происходят разнообразные процессы превращения лекарственных веществ, что отражается на их фармакологической активности. Сущность процессов метаболизма лекарственных соединений состоит в превращении их в наиболее приемлемую для выведения из организма форму. Метаболические превращения лекарственных веществ обычно приводят к введению в их молекулу новых полярных функциональных групп ($-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$, $-\text{COOH}$ и др.), которые могут ослаблять или усиливать их фармакологическое действие, токсичность, приводить к дезактивации или активации метаболитов. В последующем при взаимодействии лекарства и его метаболитов с эндогенными молекулами нормального обмена организма (УДФГК, ФАФС, ацетил-КоА, аминокислотами и др.) происходит блокировка функциональных групп с образованием более полярных и водорастворимых молекул и их дезактивация.

Отдельные лекарственные соединения в организме не подвергаются метаболизму и покидают его в неизменном виде (закись азота, в значительной степени этиловый эфир, хлороформ, веронал и др.). Однако метаболическая инертность относительна и применение более чувствительных методов биофармацевтического анализа обнаруживает наличие метаболизма. Например, снотворное средство веронал после введения в организм на 95% выводится с мочой в неизменном виде и только 5% метаболизируется путем гидроксилирования. Большинство лекарственных веществ подвергается в организме различным метаболическим превращениям, давая от одного и более метаболитов. Так, найдено 6 метаболитов мепробамата, 11 – апрессина, свыше 15 продуктов превращения аминазина.

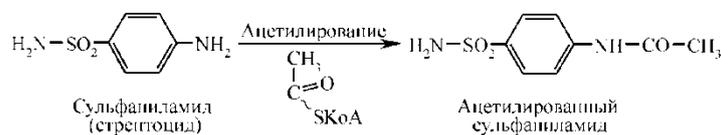
Изучение метаболизма и характера действия метаболитов позволяет повысить эффективность и безопасность лечения.

В процессе метаболизма лекарственных веществ отмечают:

1. Инактивация (дезактивация) лекарственного препарата, т.е. потеря лекарственной или биологической активности и токсичности. В качестве примера инактивации можно привести превращение фенобарбитала (люминала):



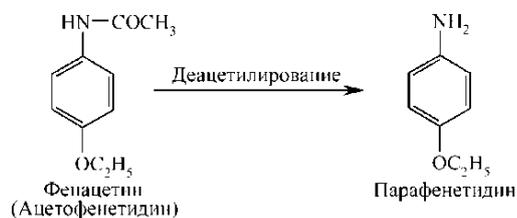
В качестве другого примера инактивации лекарственного средства можно привести превращение антимикробных сульфаниламидов путем присоединения эндогенного субстрата ацетил-КоА.



Следовательно, одни лекарства, оказав определенное действие, инактивируются в организме через образование нетоксических промежуточных соединений, которые легко выводятся из него.

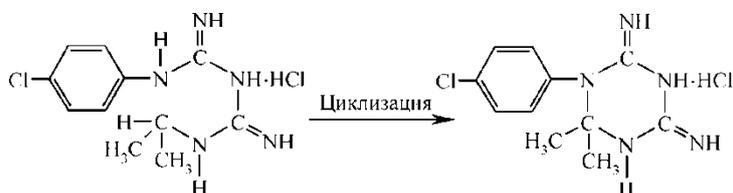
2. Усиление токсичности лекарственного препарата (токсификация). Например, жаропонижающий, болеутоляющий и противовоспалительный препарат фенацетин при метаболизме образует парафенетидин, вызывающий гипоксию за счет образования метгемоглобина.

В последние годы установлено, что фенацетин обязан своим анальгетическим действием парацетамолу – одному из продуктов его метаболизма. Это привело к внедрению в лечебную практику парацетамола, который менее токсичен, чем фенацетин, и при его применении менее вероятна опасность образования метгемоглобина.



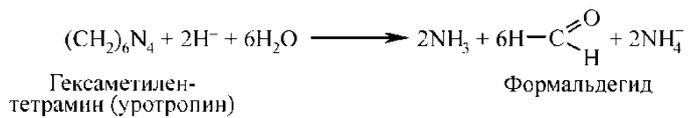
Если промежуточные продукты метаболизма лекарственного вещества более токсичны, чем само лекарство и могут вызвать побочные тяжелые эффекты – такое соединение не может быть лекарственным средством. Например, ранее выпускаемый препарат талидомид (ФРГ), применяемый как седативное средство, давал в определенных условиях серьезное побочное действие. Так, оказалось, что при pH среды 6,0–6,5 талидомид дает 12 различных метаболитов и среди них ацилирующий агент, вызывающий тератогенное действие (от греч. teratos – урод), в результате отмечалось рождение детей с ластообразными, как у тюленя, конечностями. В связи с этим, при внедрении новых лекарственных препаратов обязательным требованием Фармакологического Комитета является изучение их тератогенного и эмбриотоксического действия.

3. Активация, т.е. проявление активности неактивного медикамента. Некоторые лекарственные средства сами по себе не проявляют фармакологического действия, и только в организме в процессе метаболизма приобретают его. Если в организме недостаточно ферментов, обеспечивающих такой метаболизм, то процесса активации не происходит, отсюда лечебного эффекта не наблюдается. Неактивный препарат, накапливаясь, может вызвать осложнения, отравления. Например, противомаларийное средство бигумаль (прогуанил) становится активным после метаболического превращения – циклизации в 1, 3, 5-триазиновое производное:

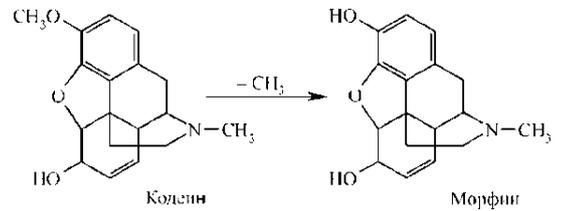


Новарсенол и миарсенол превращаются в тканях в арсеноксид, который обладает более сильным спорохетоцидным эффектом.

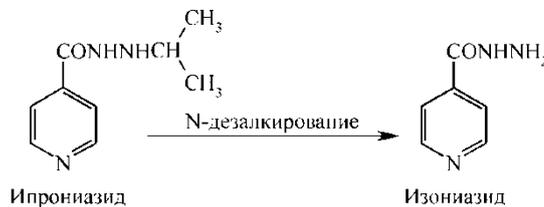
Уротропин, который в кислой среде в мочеточниках превращается в формальдегид, обладающий бактерицидным действием, нашел применение в урологической практике. В щелочной среде он не активен.



4. Усиление активности лекарственного вещества. Например, болеутоляющий анальгетик кодеин, деметилируясь (теряя CH_3 -группу), превращается в морфин – оказывающий более сильное действие (наркотический анальгетик). Установление этого факта привело к снятию кодеина из свободной продажи.



5. Изменение направленности фармакологического действия в процессе модификации препарата в организме. Например, стимулятор центральной нервной системы ипрониазид



(N-изопропилизоникотиновый гидразид), метаболизируясь путем N-деалкилирования, превращается в изониазид – препарат противотуберкулезного действия.

Основные реакции превращения лекарственных веществ

Лекарственные ксенобиотики могут проходить при своем метаболизме две фазы: модификации (несинтетическая) и конъюгации (синтетическая). Фаза модификации – это процесс ферментативных метаболических превращений лекарственных веществ, осуществляемых соответствующими ферментами (оксидоредуктазами, гидролазами, изомеразами, лиазами), ведущий к нарушению их структуры в связи с окислением, восстановлением, деалкилированием, дезаминированием, циклизацией, дециклизацией (разрывом кольца), гидролизом и другими модификационными реакциями. В результате чего исчезают одни функциональные группы и появляются другие ($-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$ и др.). При этом трудноокисляемые молекулы становятся более полярными и могут выводиться в таком виде через почки или соединяться с другими соединениями (конъюгация) и также выводиться.

Во второй фазе существенное место занимают биосинтетические конъюгационные механизмы. Это осуществляется путем присоединения к молекулам фармпрепаратов и их метаболитам различных, имеющихся в организме соединений

(глюкуроновой, уксусной, серной кислот, аминокислот, пептидов и др.), а также реакциями детоксикации, происходящими с участием сульфгидрильных групп.

В результате конъюгационного метаболизма липофильные, труднорастворимые в воде молекулы переводятся, как правило, в более водорастворимые, т.е. полярные соединения, что облегчает дальнейшее выведение их из организма почками.

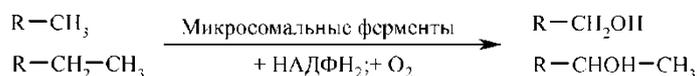
Некоторые лекарственные вещества метаболизируются только в одну фазу, другие – в две.

Фаза модификации. При действии микросомальных ферментов лекарственные соединения подвергаются разнообразным химическим превращениям. Наиболее широкий круг этих изменений относится к реакциям окисления, многие из которых могут быть сведены к общему механизму – к гидроксигированию, т.е. появлению гидроксигруппы у окисляемого вещества. Гидроксигирующая система, как уже указывалось, включает НАДФН(Н⁺), ФП, белок, содержащий негемовое железо, цитохром Р-450 (его изоферменты) и кислород. Отсюда при недостаточном снабжении организма кислородом и, в особенности печени, процесс окисления фармпрепаратов значительно замедляется, что имеет особенное значение при отравлении лекарственными веществами и поражении функций печени при ее заболеваниях.

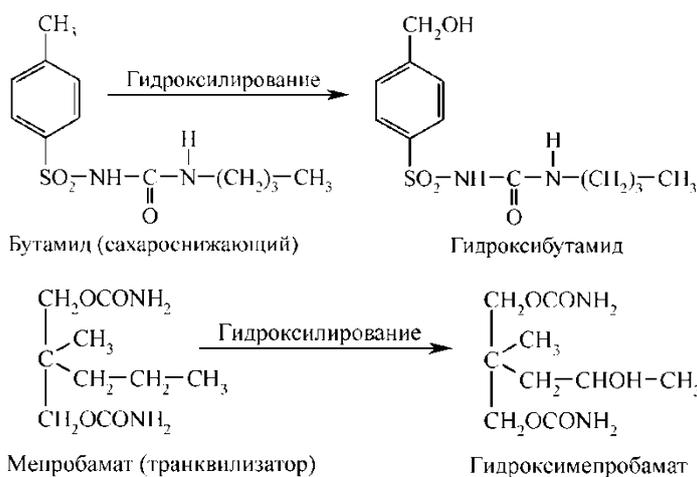
Путем гидроксигированного окисления протекают реакции алифатического, алициклического, ароматического и гетероциклического окисления; О-, S-, N-дезакилирования, дезаминирования, сульфоокисления и др.

1. **C-гидроксигирование** – появление ОН-группы у атома углерода:

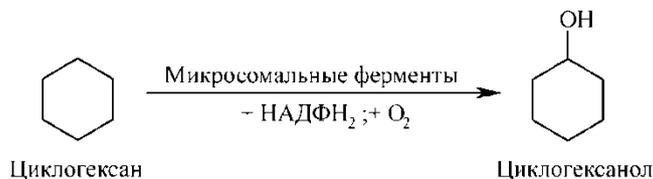
а) алифатических соединений (группировок), общий вид:



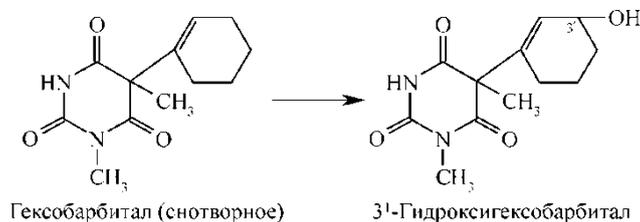
Например:



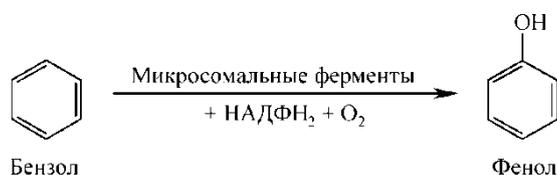
б) алициклических соединений, общий вид:



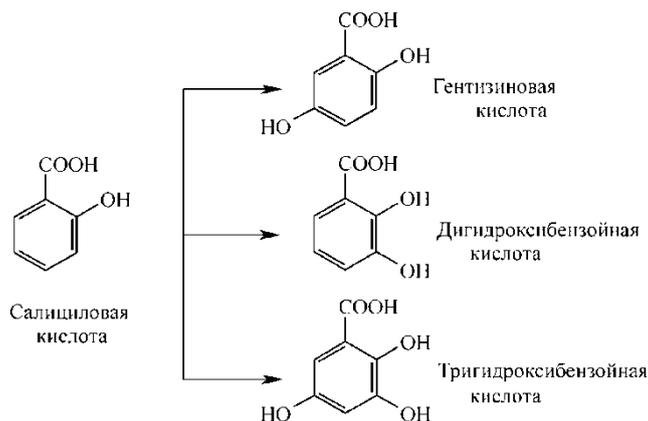
Например:



в) ароматических соединений, общий вид:



Например:



г) гетероциклических соединений с одним гетероатомом.

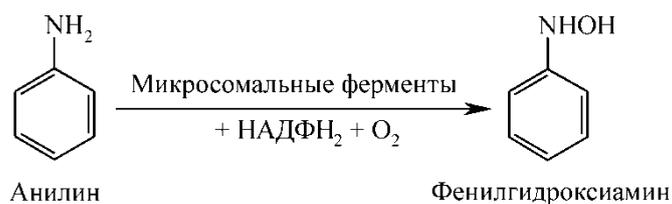
В случае гетероциклических азотистых соединений таких, как пиридин, гидроксилирование происходит в третьем положении, а если бензольное кольцо присоединено к гетероциклу, то гидроксилирование происходит, кроме того, и в орто- и в пара-положениях по отношению к атому азота, т.е. в положениях 3-, 6-, 8-. Общий вид:



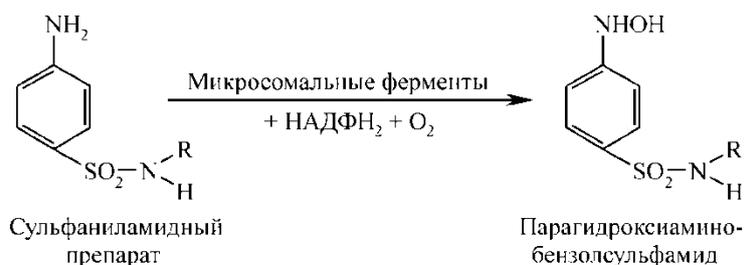


2. **N-гидроксилирование** – присоединение гидроксильной группы к азоту. Ароматические амины претерпевают биологическое гидроксилирование аминогруппы, образуя гидроксиаминовые соединения.

Общий вид:



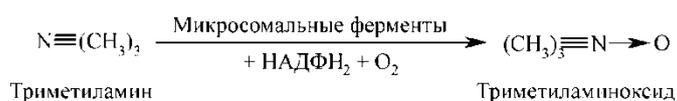
Например:



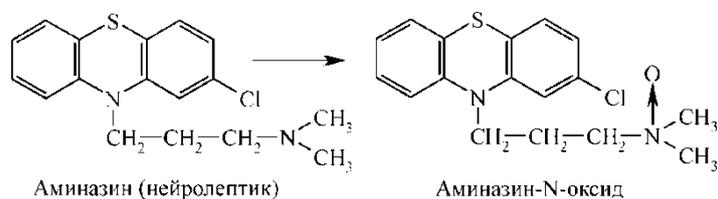
3. N-окисление.

Третичный амин окисляется микросомальными ферментами печени – до N-оксида.

Общий вид:



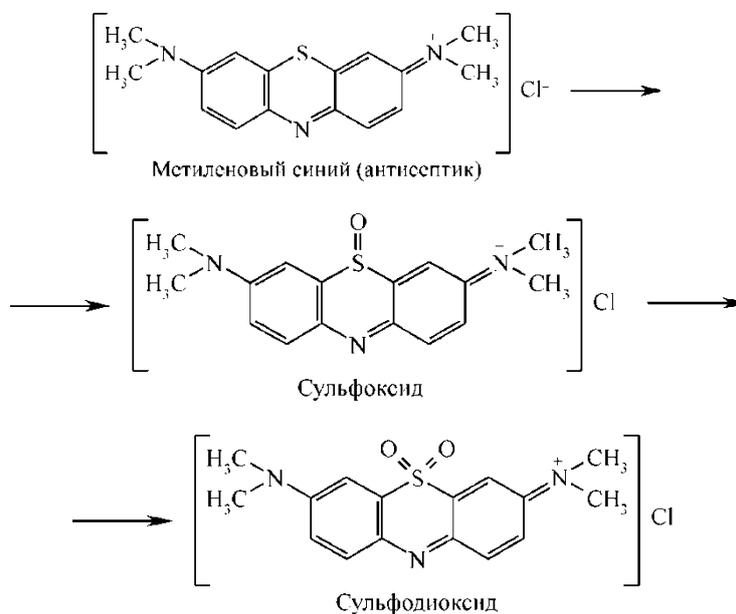
Например:



4. S-окисление.

Гетероциклический атом серы может окисляться до сульфоксида и сульфодиоксида.

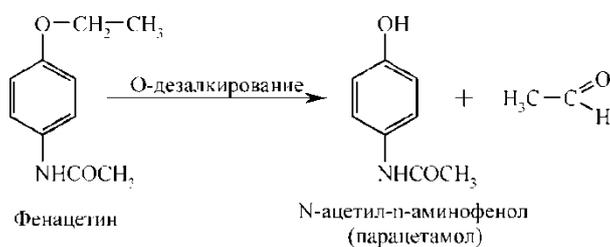
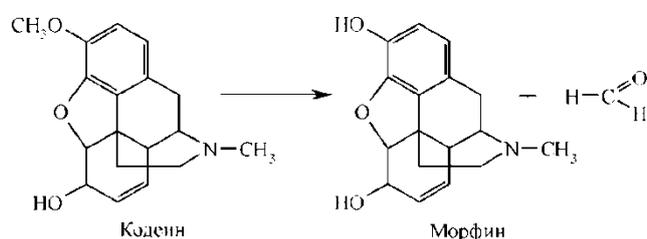
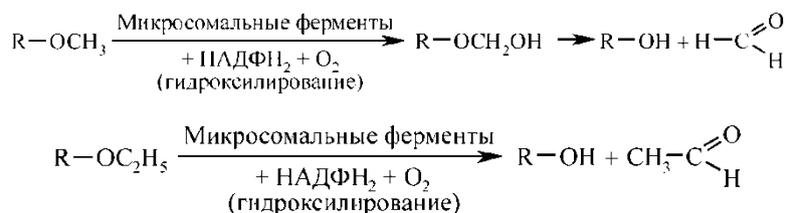
Например:



5. Дезалкилирование.

Это метаболизм путем потери метильной, этильной и других групп.

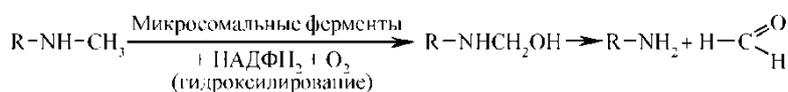
а) О-дезалкилирование. Общий вид:



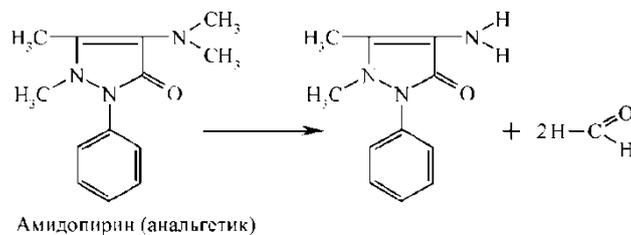
б) N-дезалкилирование.

Вторичные и третичные амины подвергаются дезалкилированию, образуя первичные амины.

Общий вид:

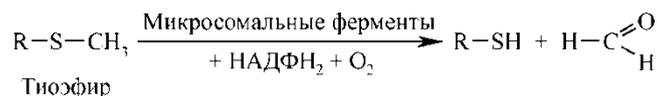


Например:



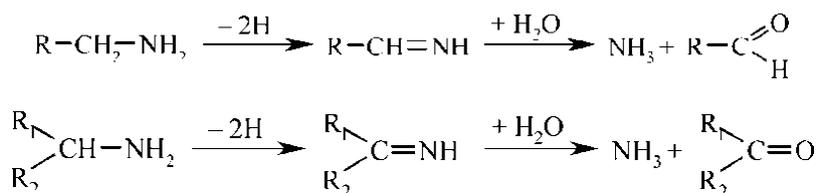
в) S-деалкилирование.

Удаление метильных групп у тиозэфиров ведет к образованию соответствующего тиола и формальдегида. Общий вид:

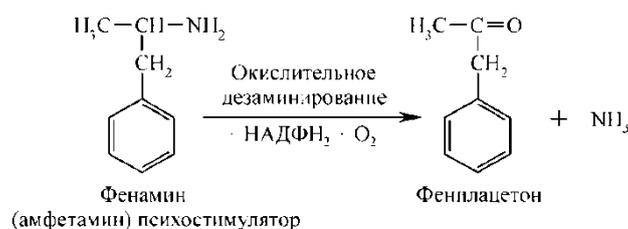


6. Окислительное дезаминирование.

Дезаминирование характеризуется отщеплением аминогрупп от молекул фармакологических препаратов. Микросомальные аминоксидазы (моно- и диаминооксидазы) в присутствии НАДФН₂ и кислорода дезаминируют чужеродные амины. Общий вид:



Например:



7. Десульфирование.

Ряд лекарственных веществ, содержащих серу, например, тиобарбитурат (снотворное) метаболизируются в соответствующий кислородный аналог посредством замещения атома серы кислородом (сульфоокисление). Например:



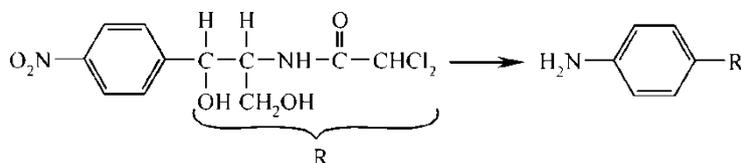
Помимо окислительных ферментных систем эндоплазматический ретикулум печени содержит восстановительные ферменты.

Эти ферменты катализируют восстановление ароматических нитро- и азосоединений в амины. По химической природе восстановительные ферменты являются флавопротеинами, у которых небелковой группой является ФАД. Предполагается, что в этой системе за счет НАДФ·Н₂ или НАД·Н₂ восстанавливается ФАД в ФАД·Н₂, который затем неферментативным путем восстанавливает чужеродные субстраты. Восстановление – сравнительно редкий путь превращения лекарственных веществ.

8. Восстановление нитросоединений. Общий вид:

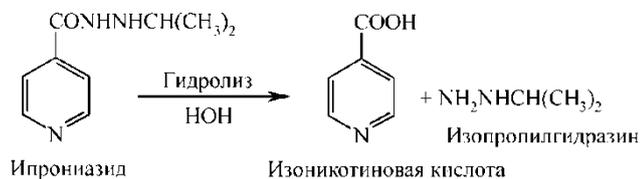


Например, левомицетин (антибиотик):



Микросомальные ферменты печени принимают участие также в реакциях гидролиза лекарственных веществ (сложных эфиров и амидов). При гидролизе происходит расщепление сложноэфирной связи с присоединением воды. Эстеразы, катализирующие этот процесс, имеют более или менее выраженную специфичность.

Например:

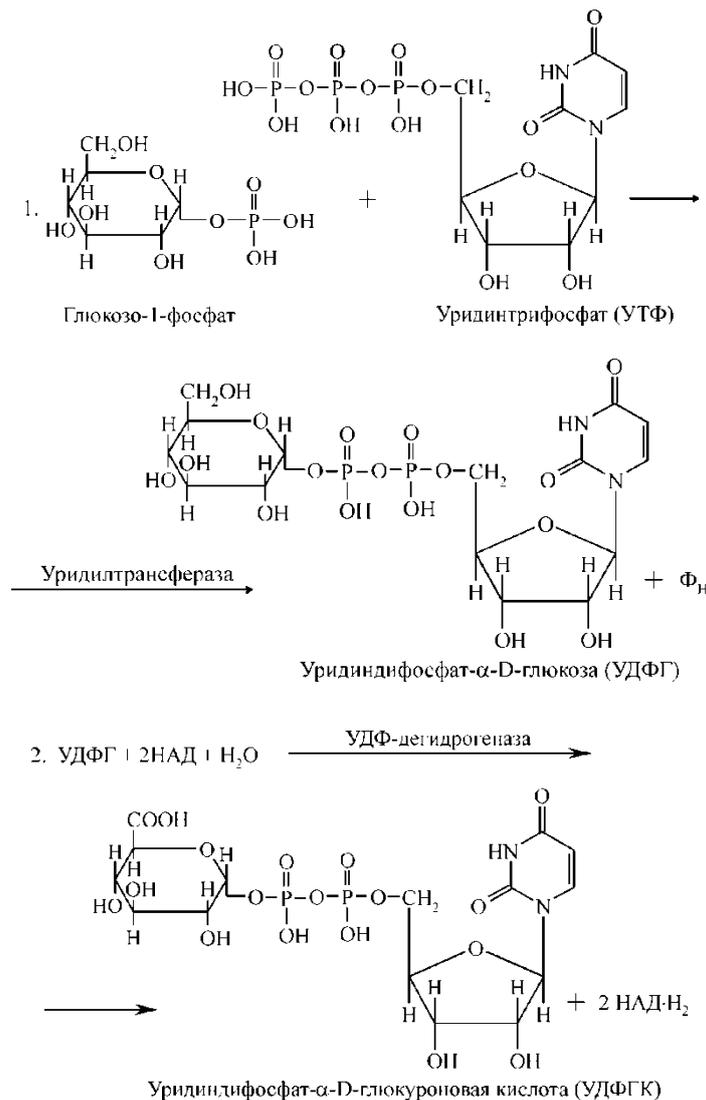


Лекарственные ксенобиотики метаболизируются в организме и посредством немикросомальных ферментов. В митохондриях имеются аминоксидазы, которые катализируют превращение аминов в альдегиды, и ферменты, которые превращают насыщенные алициклические соединения в ароматические соединения. Ряд ферментов вызывают циклизацию и дециклизацию гетероциклических соединений. Кроме того, имеются ферменты алкогольдегидрогеназа, альдегидоксидаза и ксантинооксидаза, окисляющие спирты в альдегиды. В плазме крови, в желудочно-кишечном тракте найдена большая группа гидролаз, вызывающая гидролиз, например, аспирина, атропина, новокаина и др. Существуют метаболические превращения чужеродных веществ, для которых ферменты и их локализация все еще не известны.

Конъюгационные механизмы. Синтетическая фаза метаболизма лекарств – процесс конъюгации – происходит путем присоединения к функциональной группе

(гидроксильной, аминной, карбоксильной и др.) фармпрепарата или его метаболитов различных соединений нормального обмена веществ организма: глюкуроновой кислоты, сульфата, аминокислот, пептидов, ацетильных и других групп. В результате этого их молекулы становятся более полярными, менее липидорастворимыми и поэтому быстрее выводятся из организма.

1. **Уридинфосфатные коферменты.** Конъюгация с глюкуроновой кислотой является наиболее важным механизмом конъюгации у человека и включает два основных этапа: биосинтез УДФГК и перенос остатка глюкуроновой кислоты на инактивируемое вещество.

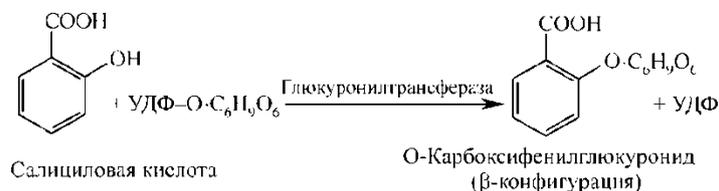


Ниже УДФГК обозначается как УДФ-О-С₆Н₉О₆

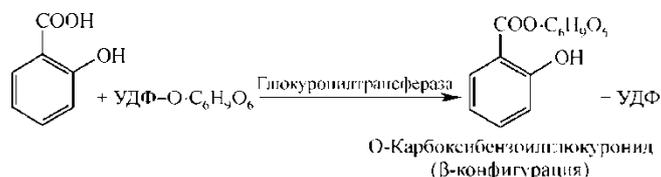
Различают O-, N- и S-глюкурониды.

а) Образование O-глюкуронидов. Они образуются из фенолов, спиртов, карбоновых кислот.

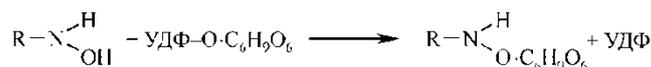
Например, эфирный тип:



Сложноэфирный тип:

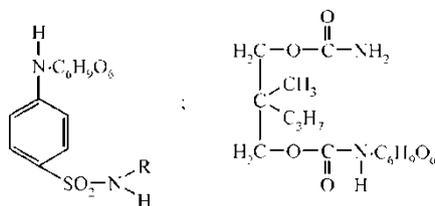


Гидроксиламиновый тип:



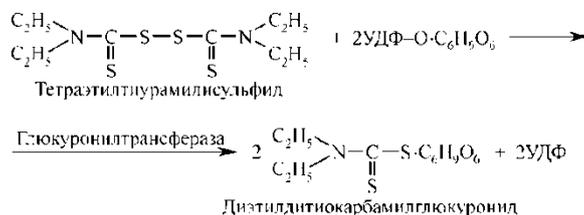
б) Образование N-глюкуронидов.

Например, с сульфаниламидами и мепробаматом:



в) Образование S-глюкуронидов.

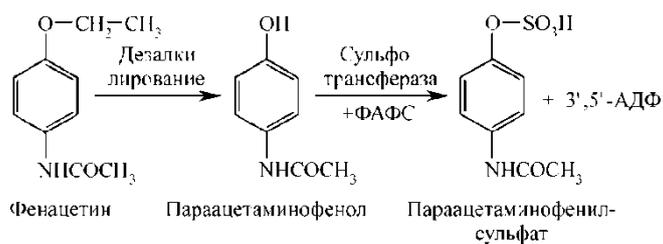
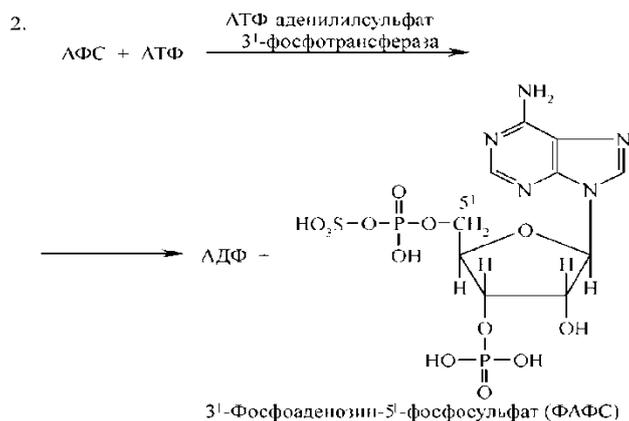
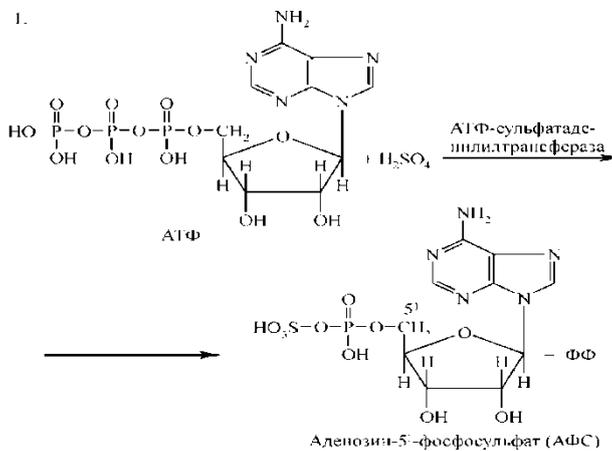
Например, антабус (тетурам) – средство для лечения алкоголизма:



Образование глюкуронидов осуществляется в основном в печени и в меньшей степени в почках, желудочно-кишечном тракте и коже.

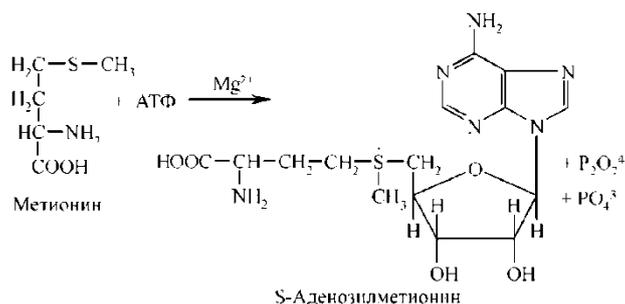
2. Сульфатная конъюгация:

а) с помощью 3¹-фосфоаденозин-5¹-фосфосульфата (ФАФС) образуются сложные эфиры серной кислоты. Процесс включает два основных этапа: образование ФАФС и непосредственно конъюгата, например, с фенацетином:



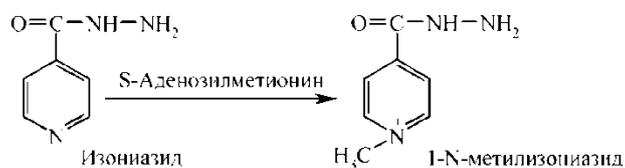
3. Метильная конъюгация.

С помощью S-аденозилметионина осуществляется O-, N- и S-метилирование.

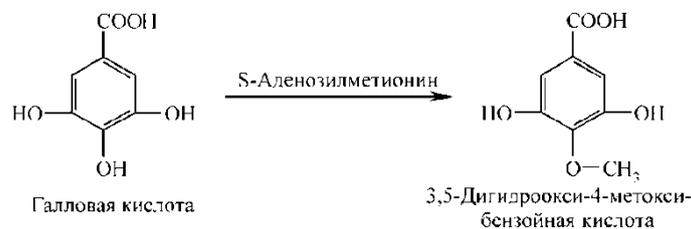


1. N-метилирование.

Например:



2. O-метилирование.

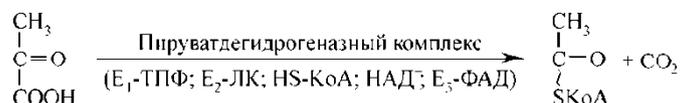


Процесс метилирования наиболее интенсивно протекает в печени.

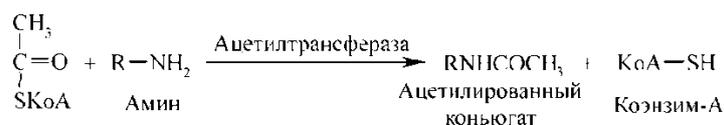
4. **Ацетильная конъюгация.**

Процесс ацетилирования происходит в основном с участием ферментов, которые находятся в митохондриальной фракции клеток печени и почек. Кроме того, ацетилирование может осуществляться в клетках РЭС селезенки и легких и в слизистой оболочке желудка и тонкого кишечника. Это основной путь метаболизма ароматических аминов, сульфамидов.

Ацетилирование проходит в присутствии кофермента ацетилирования, который образуется при обмене углеводов, липидов и белков из пировиноградной кислоты по реакции:

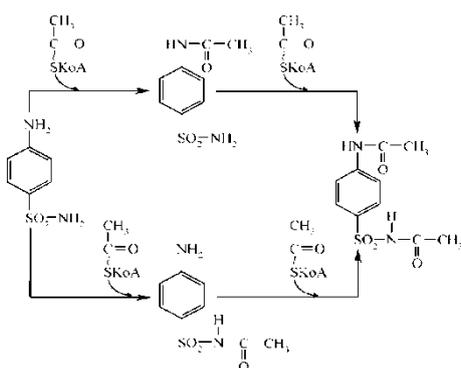


Общий вид реакции ацетилирования:



Антимикробные сульфаниамиды могут ацетилироваться по двум положениям молекулы следующим образом:

Схема ацетильной конъюгации сульфаниаида:

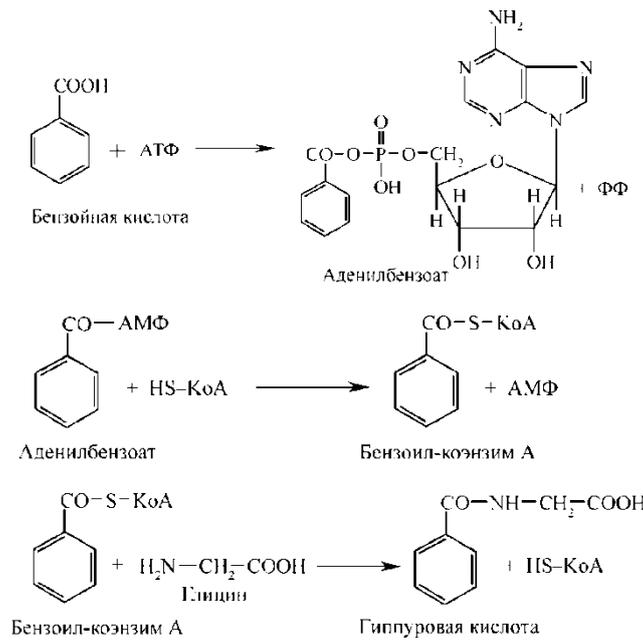


N-Ацетилирование является основным метаболическим путем превращения бактериостатических сульфаниамидных препаратов.

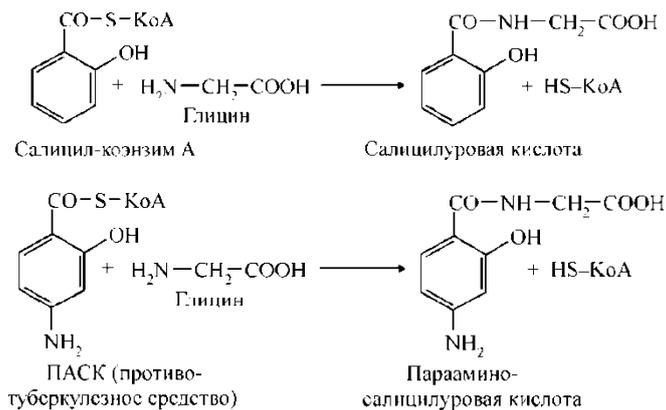
Под влиянием ферментов в присутствии ацетил-КоА антимикробные сульфаниамиды ацетилируются и в таком виде выводятся с мочой.

5. **Пептидная конъюгация** – конъюгация лекарственных веществ и их метаболитов с аминокислотами (глицином, цистеином, глутаминовой кислотой), а также с трипептидом глутатионом. Она характерна для ароматических и гетероциклических

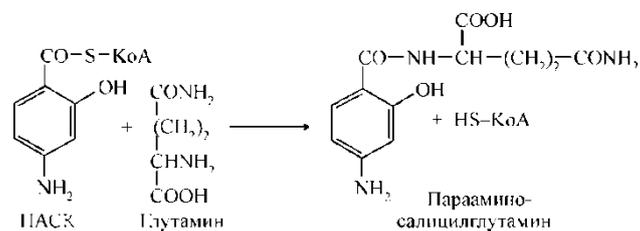
кислот. Механизм пептидной конъюгации заключается в образовании коэнзим-А-производных чужеродных карбоновых кислот, что можно проследить на примере образования гиппуровой кислоты в процессе метаболизма бензойной кислоты:



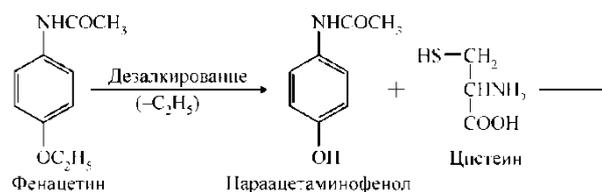
1. Глициновая конъюгация с лекарственными веществами:

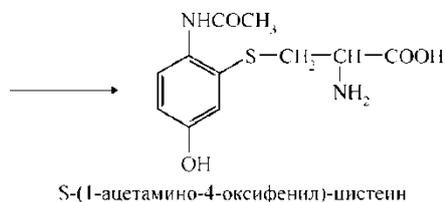


2. Глутаминовая конъюгация.



3. Цистеиновая конъюгация.





4. **Глутатионовая конъюгация.** Глутатион – трипептид, в состав которого входит три аминокислоты: глутаминовая кислота, цистеин и глицин.

5. **Двойная конъюгация.** Наблюдается с глюкуроновой кислотой, глицином и сульфатом по двум функциональным группам лекарственного вещества или его метаболитов.

Кроме рассмотренных конъюгационных механизмов, по-видимому, существуют и другие, однако они мало изучены.

При рассмотрении биотрансформации лекарственных веществ следует иметь в виду, что обычно лекарства метаболизируются различными путями, образуя множество метаболитов.

Факторы, влияющие на метаболизм лекарственных средств

Лекарственные вещества как чужеродные соединения обычно метаболизируются несколькими различными путями, образуя один или несколько метаболитов. Скорость, с которой протекает каждая из этих реакций, и их относительная важность зависят от многих факторов, которые могут быть генетическими, физиологическими и связанными с окружающей средой.

Генетические факторы. Различия в реакциях организма на лекарства часто вызываются генетически обусловленными дефектами ферментов, в результате чего происходят отклонения в картине метаболизма лекарственных веществ. Эта область науки известна как «фармакогенетика», изучающая влияние наследственности на метаболизм фармпрепаратов.

Индукция и репрессия метаболизма лекарственных веществ. Некоторые лекарственные средства могут вызвать индукцию, т.е. стимулирование образования ферментных систем, участвующих в метаболизме лекарственных и токсических веществ. Вследствие этого явления понижается уровень активного фармпрепарата в крови и тканях и уменьшается лечебный эффект. Одним из наиболее активных является фенobarбитал (люминал), употребление которого увеличивает скорость гидроксилирования, например, барбитуратов и мепробамата, дезалкилирования амидопирина и других микросомальных биотрансформаций. Фенobarбитал вызывает индукцию ферментов гладкого эндоплазматического ретикулаума клеток за счет увеличения синтеза белка в микросомах, в том числе и ферментов, а также уменьшает скорость их распада. Предварительное введение фенobarбитала приводит к увеличению гладких мембран эндоплазматического ретикулаума и к увеличению содержания в них белка, РНК и фосфолипидов. В основе индуцирования синтеза белков лежит депрессия

гена-оператора генетических систем, ведающих синтезом микросомальных ферментов, аналогично предполагаемому механизму действия гормонов.

Указанное активирование угнетается веществами, ингибирующими биосинтез белка, например, антибиотиком актиномицином D – ингибитором синтеза иРНК. Одновременное введение актиномицина D также устраняет стимулированное фенобарбиталом увеличение активности окислительного дезаминирования, усиленное образование цитохрома P-450 и микросомального белка. При прекращении введения фенобарбитала происходит обратное развитие этого индуцированного синтеза, а уровень ферментативной активности и содержание ферментного белка медленно возвращается к норме.

Медикаменты, которые вызывают стимулирование микросомальных ферментов, имеют различающуюся в широких пределах фармакологическую активность. К ним относятся барбитураты, болеутоляющие, противовоспалительные средства, антигистаминные средства, транквилизаторы и многие другие.

Наряду с лекарственными веществами, стимулирующими метаболизм лекарственных средств, известна группа препаратов, которые подавляют активность микросомальных ферментов. Такими свойствами обладают, например, препараты, которые угнетают биосинтез белков (антибиотики группы тетрациклина, ипрониазид, имипрамин, морфин, кодеин и др.). Ингибиторы моноаминоксидазы тормозят дезаминирование адреналина, тирамина, серотонина и других веществ, имеющих аминогруппы, поэтому при применении ингибиторов моноаминоксидаз у больных могут возникнуть осложнения (гипертонический криз).

Хотя механизм ингибирования не изучен полностью, тем не менее известно, что в основе ингибирования микросомальных ферментов различными ингибиторами лежат различные механизмы (конкуренция за активный центр фермента, разобщение окислительных процессов, изменение проницаемости липопротеиновых мембран и др.).

Ингибирующий и стимулирующий эффекты одних лекарственных веществ на метаболизм других зачастую приводит к изменению фармакологической активности, что можно наблюдать при комбинированной химиотерапии.

Ускоренный метаболизм лекарственного вещества при повторных его приемах за счет его индуцирующего воздействия на микросомальные ферменты может служить причиной развития толерантности к данному лекарству. Такие лекарства ускоряют свой собственный метаболизм (фенобарбитал, фенилбутазон, мепробамат и др.).

Приведенный материал свидетельствует о том, что при лечении больных врач и фармацевт, работая в тесном сотрудничестве, должны использовать знания о взаимодействии лекарств и индивидуальных особенностях организма. «Лечить не болезнь, а больного» – это старое правило приобретает на сегодняшний день новое звучание.

К физиологическим факторам, которые влияют на метаболизм лекарств, относятся возраст, развитие ферментативных систем, пол, состояние питания, половые различия, беременность и различные заболевания. К факторам окружающей среды относятся: стресс из-за неблагоприятных условий, облучение ионизирующей радиацией, загрязнение окружающей среды и др.

Таким образом, задачи провизора на сегодняшнем этапе фармакотерапии значительно расширяются. Кроме соблюдения правил хранения, отпуска лекарственных средств и информирования врачей о поступающих в аптеку фармпрепаратах, провизор должен также: 1) разрабатывать и внедрять рациональные методы применения лекарственных веществ (включая биофармацевтические); 2) информировать врачей об отрицательных побочных явлениях лекарственной терапии, особенно обусловленных метаболическими превращениями в организме; 3) в содружестве с врачами инструктировать больных о правилах применения ряда фармакологических препаратов в зависимости от приема пищи, биоритмов, наличия сопутствующей патологии печени, почек, желудочно-кишечного тракта; 4) осуществлять фармакокинетический контроль в процессе фармакотерапии теми препаратами, которые проявляют вариабельность в своем действии вследствие генетических и приобретенных свойств организма (клинический провизор); 5) в необходимых случаях проводить коррекцию дозирования фармпрепаратов у конкретного больного, т.е. совместно с врачом осуществлять индивидуальную фармакотерапию.

Осуществление этих мероприятий позволит повысить эффективность и безопасность фармакотерапии.