



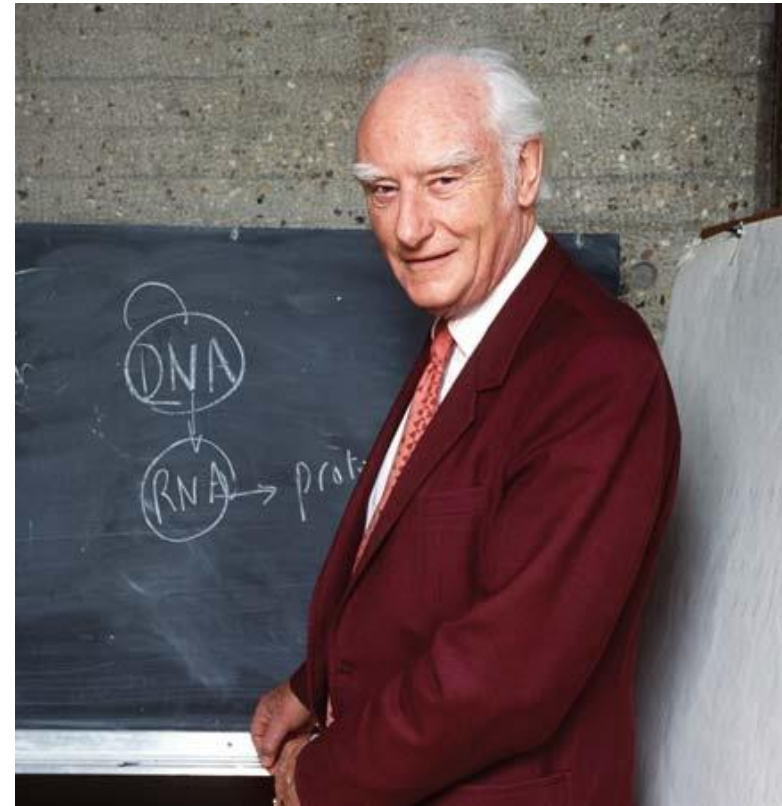
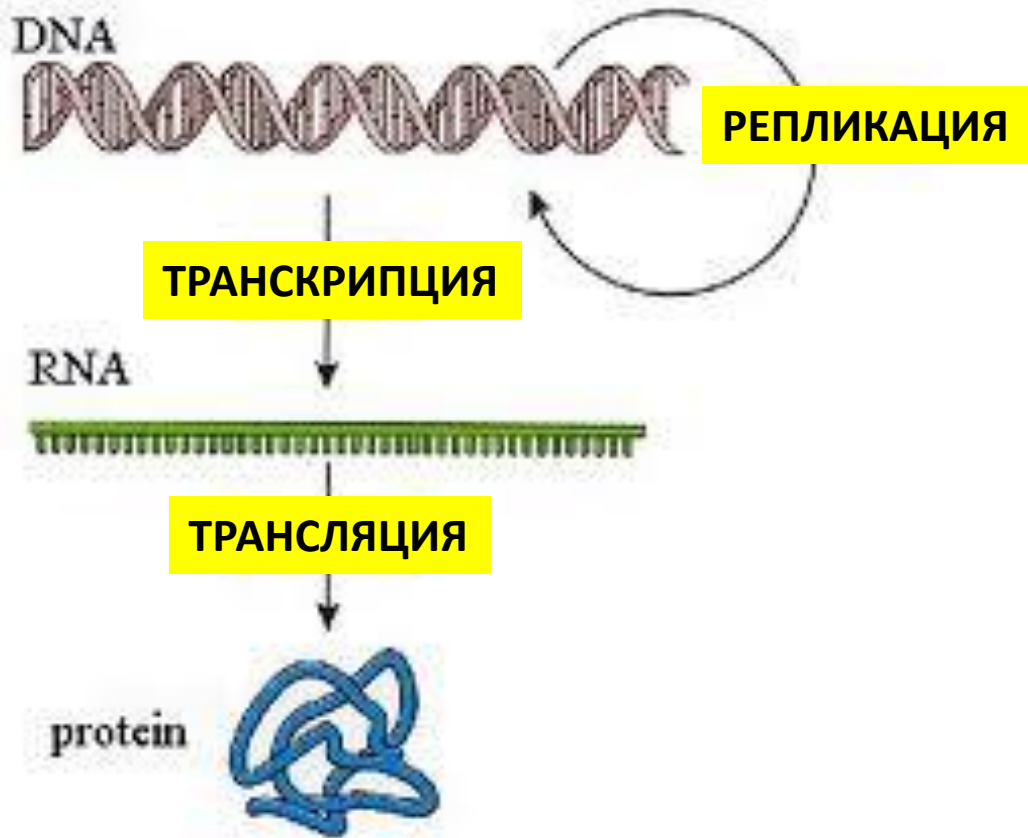
Молекулярная биология

Лекция 8. Транскрипция.

Скоблов Михаил Юрьевич

Часть 1. *Транскрипция у прокариот*

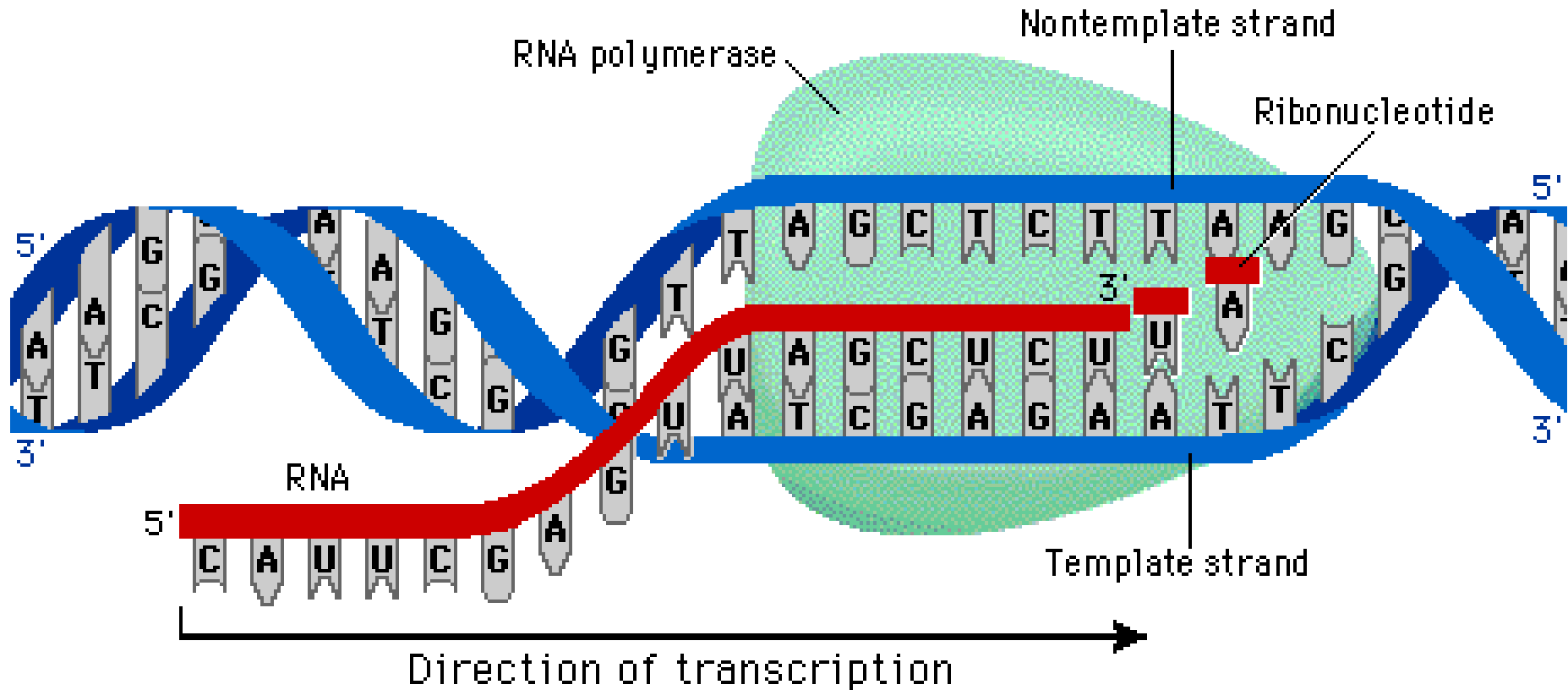
1957 г. Центральная догма молекулярной биологии.



Francis Crick

Транскрипция

- От лат. transcriptio — переписывание — процесс синтеза РНК с использованием ДНК в качестве матрицы

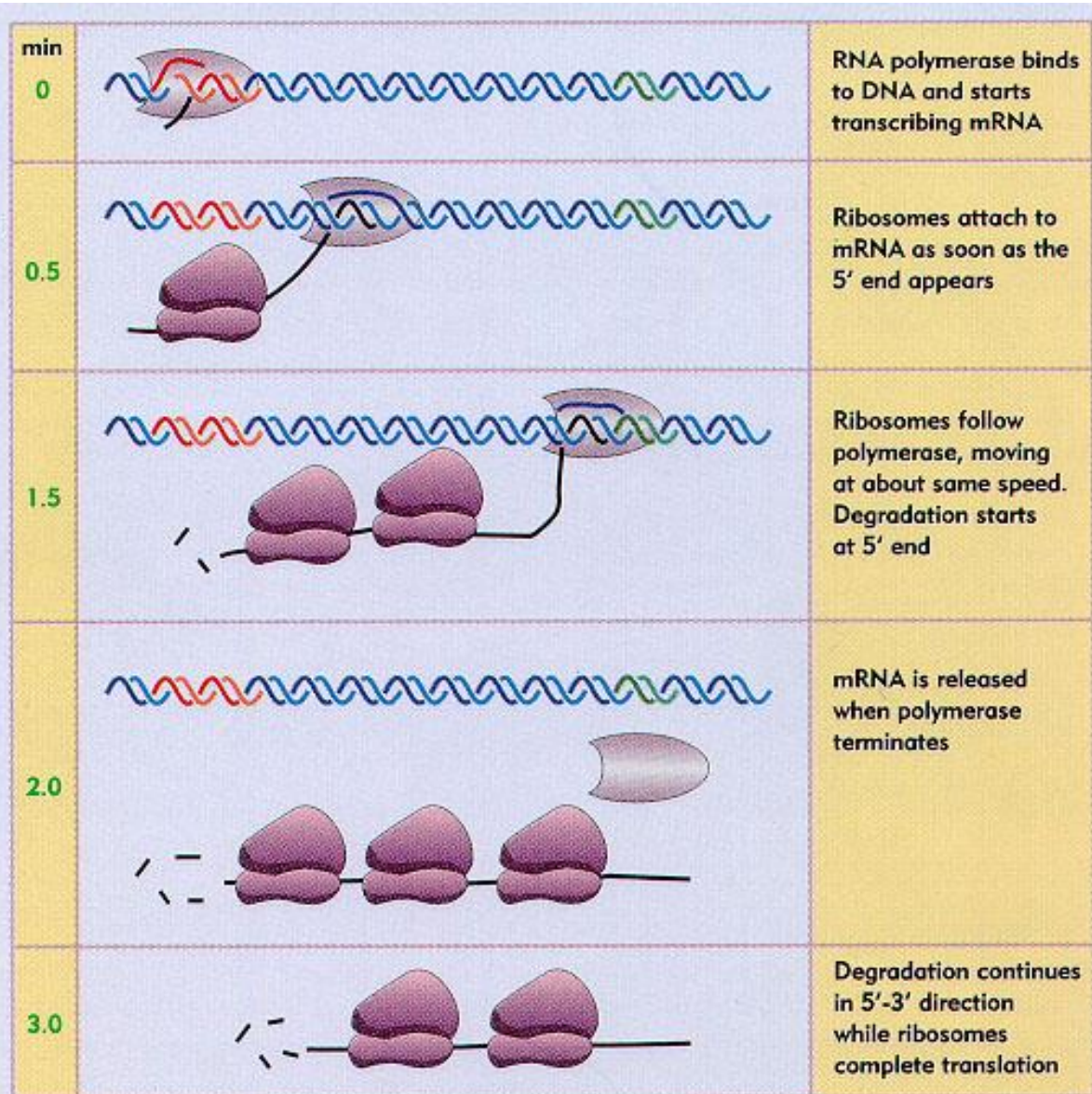


Важные моменты

- Направление транскрипции от 5' конца в сторону 3'
- В РНК рибонуклеотиды
- Вместо тимидина в РНК уридин

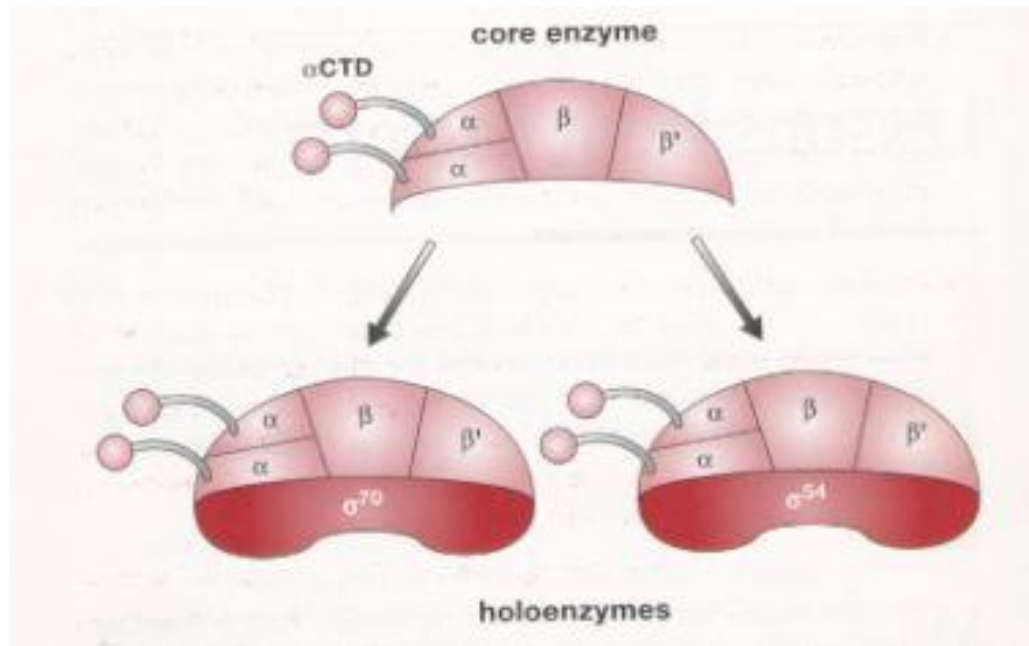
Транскрипция у прокариот

Overview: transcription, translation, and degradation of mRNA all proceed simultaneously in bacteria. The times apply to a unit of 5000 bp, whose expression starts at time 0.



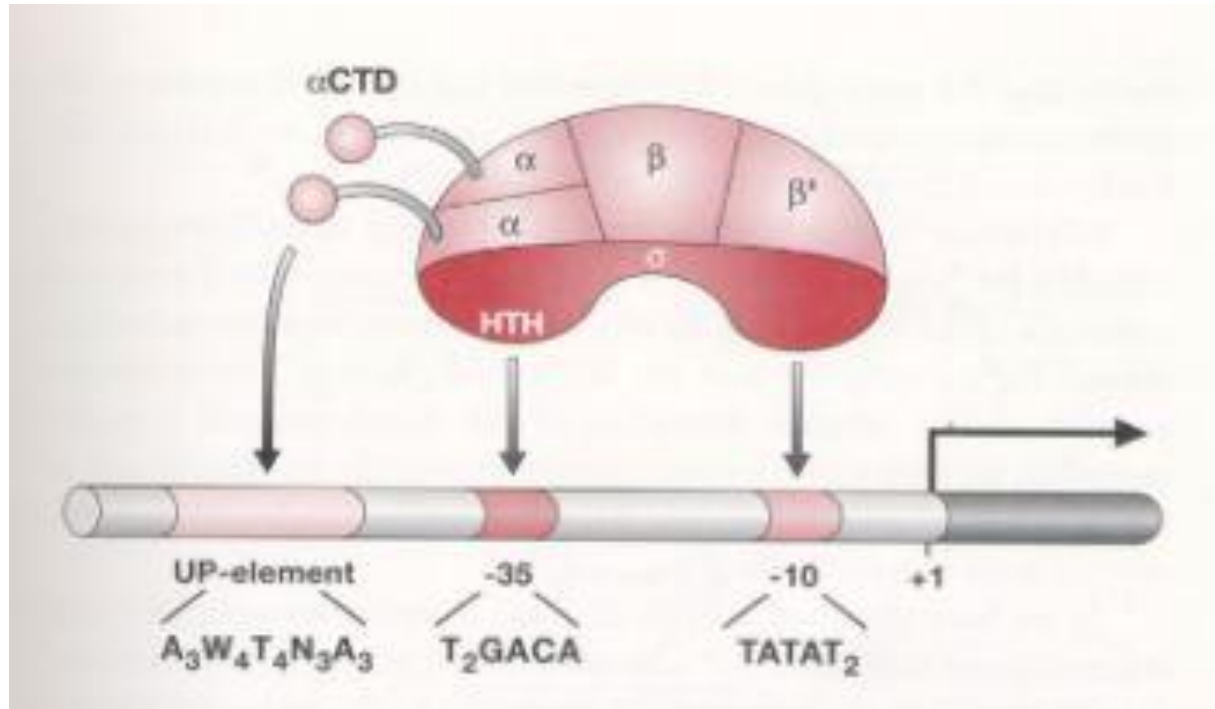
Транскрипция у прокариот

- Прокариоты не имеют ядерной мембраны, поэтому процессы транскрипции, трансляции и мРНК деградации могут проходить одновременно.
- Прокариотической транскрипции характерно иметь полицистронные мРНК, для одновременного синтеза нескольких белков.
- РНК-полимераза состоит из 5 полипептидов (холоэнзим), которые собираются вместе каждый раз когда необходима транскрипция гена:
 - α – необходима для сборки полимераз на ДНК
 - β – связывает трифосфаты
 - β' – связывается с цепью ДНК
 - σ – вовлечена в инициацию транскрипции



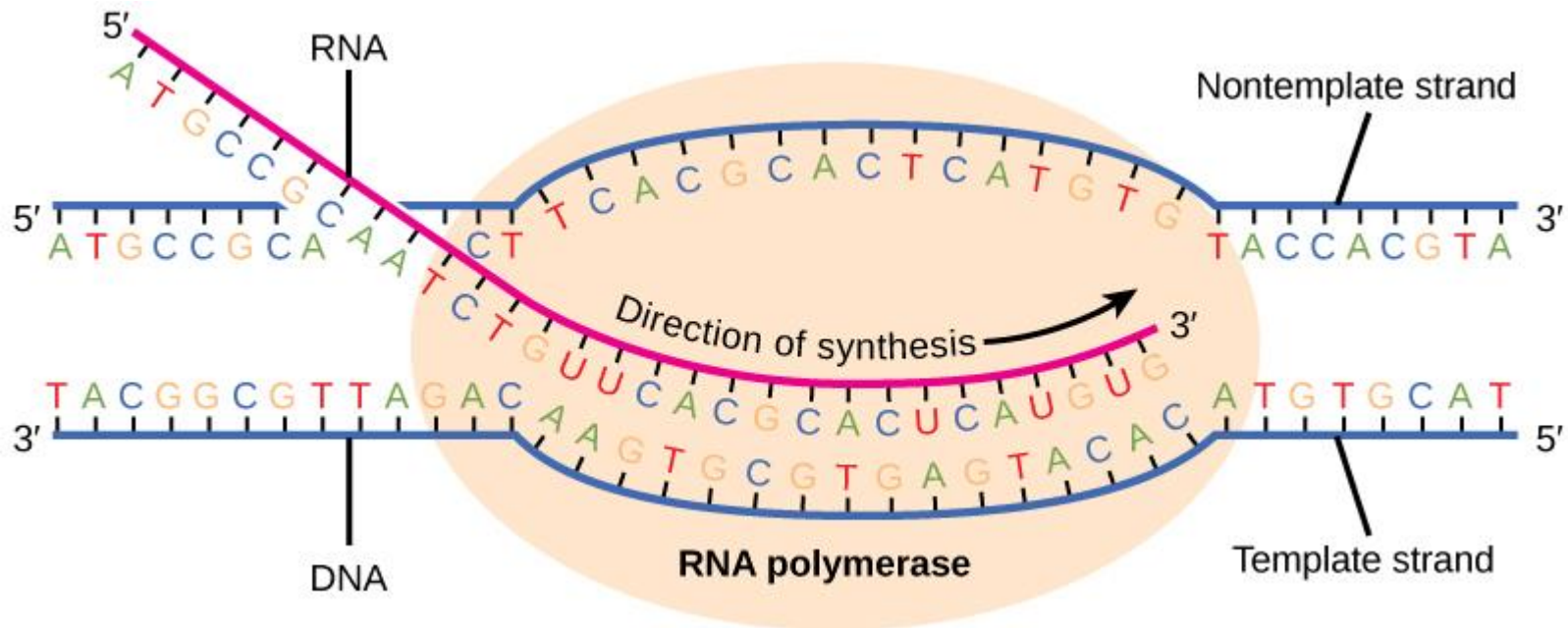
Транскрипция у прокариот

- Транскрипция начинается с промотора
- Не смотря на вариабельность промоторов среди прокариот, есть несколько консервативных элементов в позициях -10 и -35 от точки инициации транскрипции
- Консенсус в позиции -10 называется ТАТА-бокс (ТАТААТ).
- Консенсус в позиции -35 имеет вид ТТGACA, распознаётся и связывается с σ субъединицей.



Транскрипция у прокариот

- Инициация транскрипции начинается с освобождения σ субъединицы от РНК полимеразы
- Скорость РНК-полимеразы составляет примерно 40 нуклеотидов в секунду
- В течении транскрипции ДНК перед РНК-полимеразой расплетается, а после неё обратно схлопывается - транскрипционный пузырь.



Транскрипция у прокариот

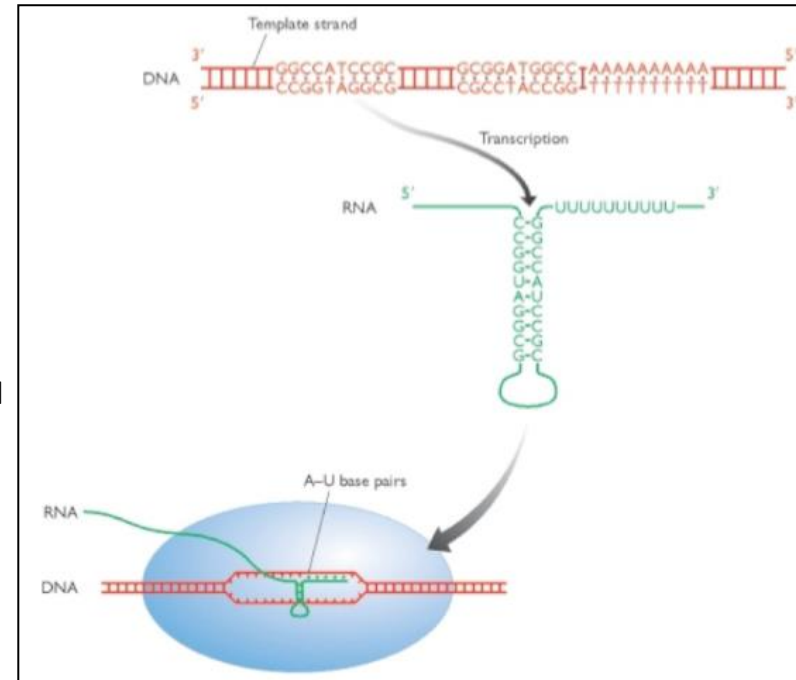
Терминация транскрипции может осуществляться по двум вариантам:

Rho-зависимая терминация

- контролируется Rho белком
- фактор Rho связывается с растущей цепью РНК
- в местах р-зависимой терминации транскрипции РНК- полимераза прекращает элонгацию
- белок Rho дестабилизирует водородные связи между матрицей ДНК и мРНК, высвобождая молекулу РНК

Rho-независимая терминация

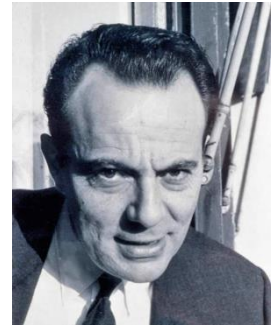
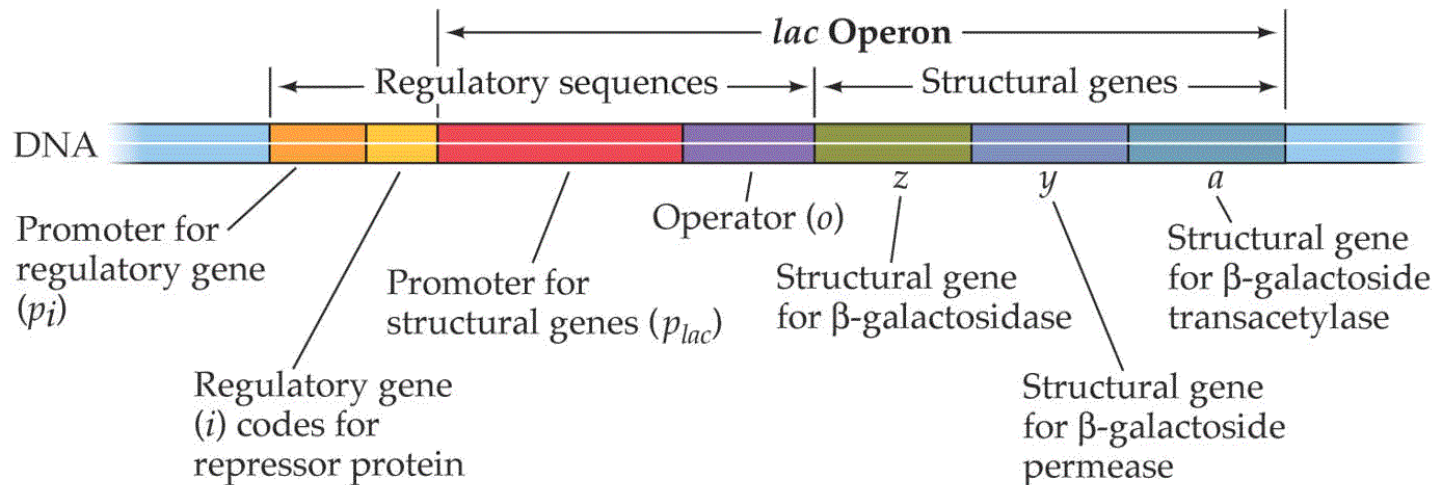
- Контролируется последовательностью в ДНК-матрице
- РНК-полимераза доходит до СГ-богатого участка
- Синтезированная молекула РНК формирует стебель-петлю, за которой расположено несколько урацилов, что приводит к отсоединению молекулы РНК от матрицы ДНК.



Регуляция транскрипции у прокариот

- **Оперон** — функциональная единица генома у прокариот, в состав которой входят цистроны (гены, единицы транскрипции), кодирующие совместно или последовательно работающие белки и объединенные под одним (или несколькими) промоторами.
- Опероны по количеству цистронов делят на моно-, олиго- и полицистронные, содержащие, соответственно, только один, несколько или много цистронов (генов).
- Концепцию оперона для прокариот предложили в 1961 году французские ученые Жакоб и Моно, за что получили Нобелевскую премию в 1965 году.

Структура лактозного оперона



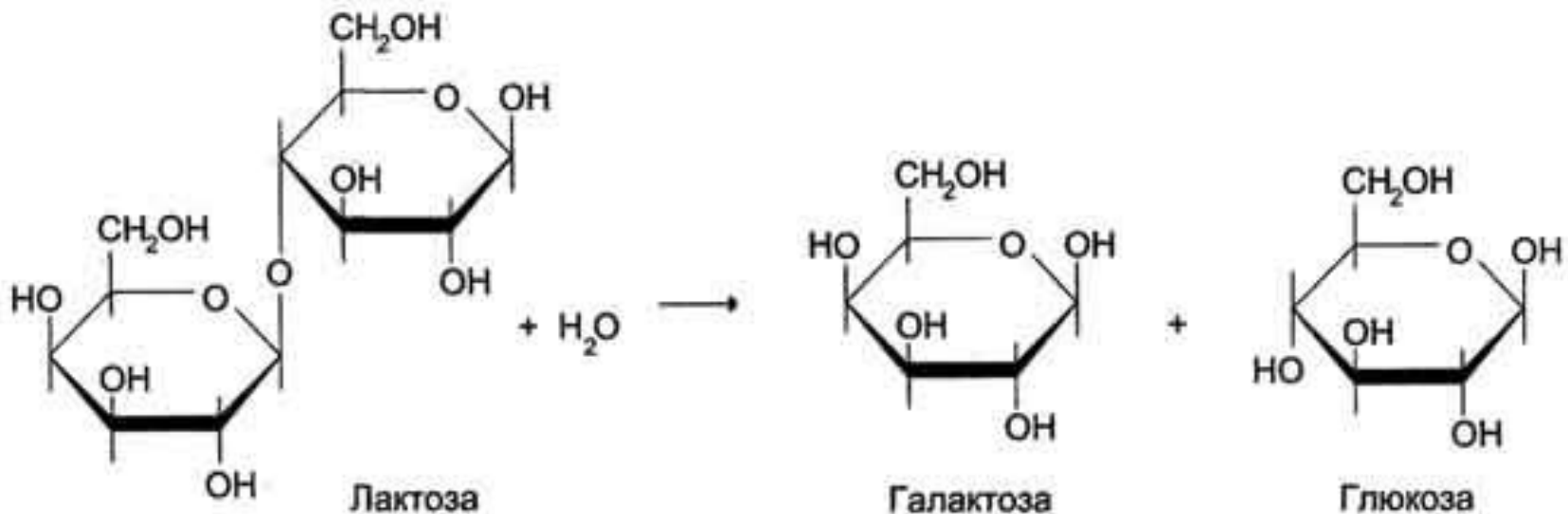
Франсуа Жакоб



Жак Люсьен Моно

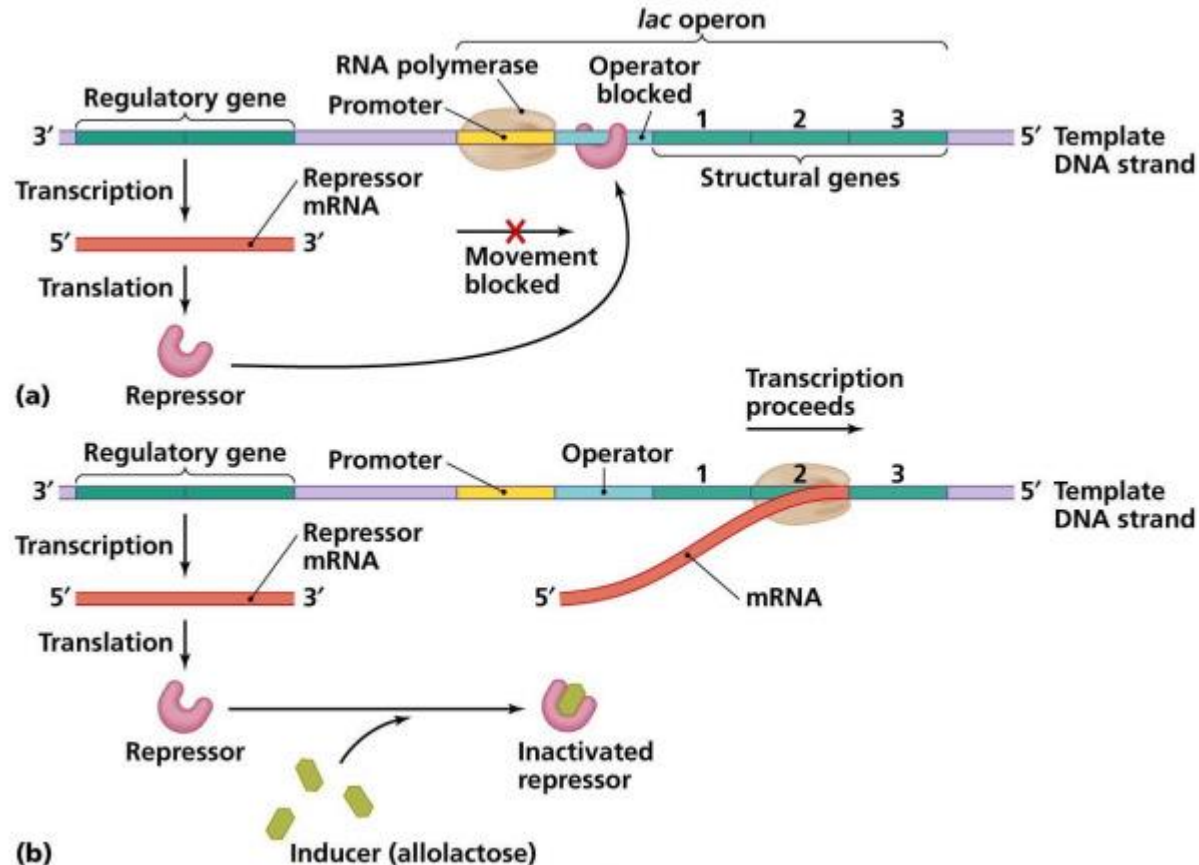
Механизм работы лактозного оперона

- Клетки *E. coli* обычно растут на среде, используя в качестве источника углерода глюкозу.
- Если в среде культивирования глюкозу заменить на дисахарид лактозу, то клетки адаптируются к изменившимся условиям, начав синтез трёх белков, обеспечивающих утилизацию лактозы.
- Один из этих белков - фермент β -галактозидаза, катализирующий гидролитическое расщепление лактозы до глюкозы и галактозы



Механизм работы лактозного оперона

- a) В отсутствие индуктора (лактозы) белок-репрессор связан с оператором. РНК-полимераза не может присоединиться к промотору, транскрипция структурных генов оперона не идёт
- b) В присутствии лактозы белок-репрессор присоединяет её, изменяет свою конформацию и теряет сродство к оператору. РНК-полимераза связывается с промотором и транскрибирует структурные гены.



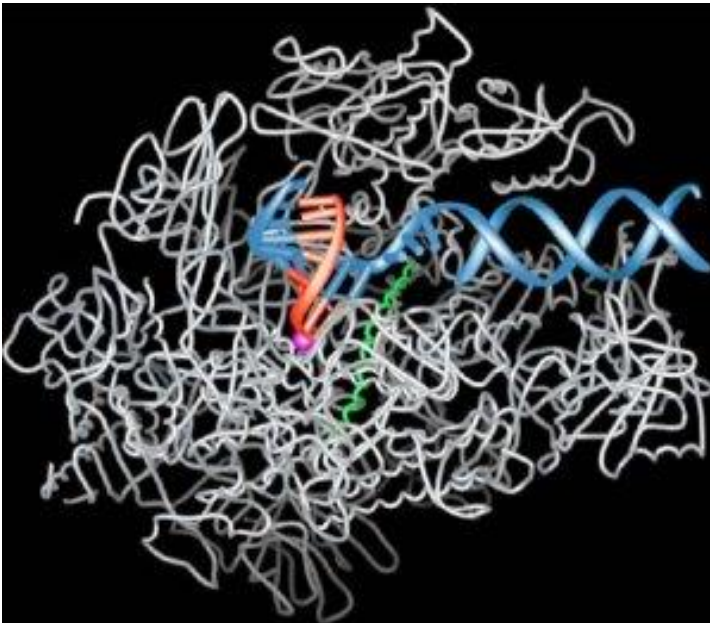
Часть 2. *Транскрипция у эукариот*

Транскрипция

- В 2006 году была присуждена Нобелевская премия по химии за исследование транскрипции ДНК у эукариот
- Из 10 000 литров наработанной культуры дрожжей, что соответствовало 150 кг самих дрожжей, было выделено 2 гр чистой РНК-полимеразы.
- Корнберг сумел получить кристаллографическую картину различных состояний аппарата транскрипции, установить молекулярную структуру РНК-полимераз и других белков, участвующих в синтезе мРНК, а также выявить механизмы, регулирующие процесс транскрипции



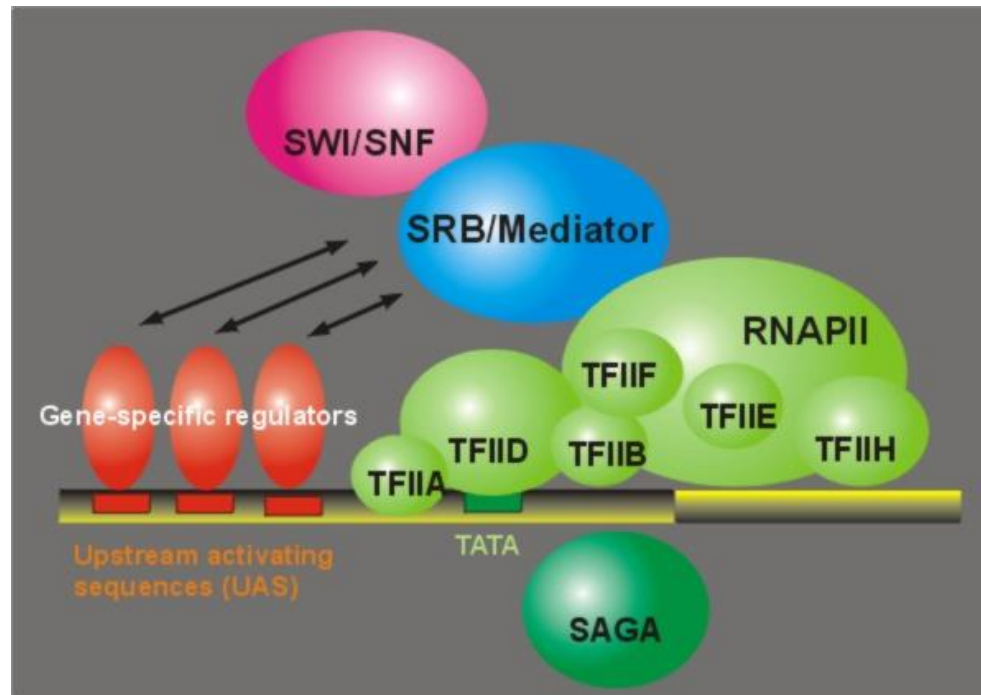
Роджер Корнберг



Структура транскрибирующего комплекса РНК-полимеразы II (синяя спираль - ДНК, красная - синтезируемая мРНК)

Транскрипция у эукариот

- Транскрипция у эукариотов происходит в ядре
- Синтез молекул РНК начинается с промоторов, и завершается в сайтах терминации.
- У эукариот имеется 3 типа РНК-полимераз (не считая митохондриальной и хлоропластной):
 - РНК полимераза I - синтезирует в ядрышках рибосомные RNA (18S и 28S рРНК, кроме 5S);
 - **РНК-полимераза II** - синтезирует mRNA и некоторых sRNA;
 - РНК-полимераза III - синтезирует tRNA, sRNA, 5S rRNA.



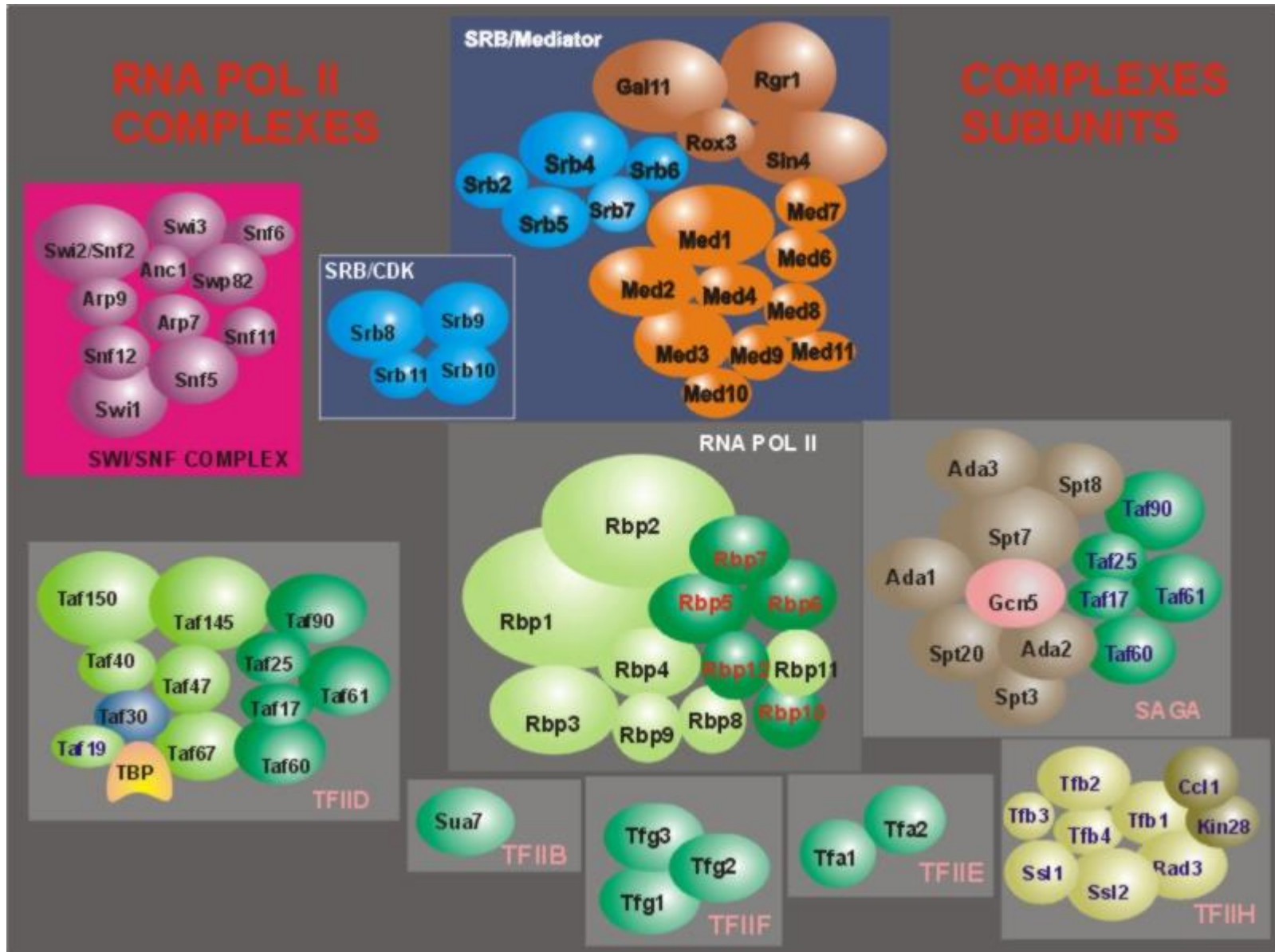
Транскрипция у эукариот

PolII Человека содержит более 10 субъединиц, слабо ассоциирующих друг с другом. Некоторые из них принадлежат к основным факторам транскрипции (GTF).

Белки **holo-фермента Pol II дрожжей:**

- Pol II - РНК-Полимеразная активность, взаимодействует с множеством общих и тканеспецифических факторов транскрипции, участвует в выборе точки инициации транскрипции.
- TFIIB - Связывает Pol II и TBP на промоторе, участвует в выборе точки инициации транскрипции
- TFIIF - Взаимодействует с Pol II, стимулирует элонгацию транскрипции Pol II, компонент субкомплекса SRB/медиатор
- TFIIN - Активность ДНК-зависимой АТФазы, ДНК-геликазная активность, обладает активностью CTD-киназы
- SRB2, SRB5 - Участвуют в образовании инициационного комплекса, стимулируют базальный и индуцированный синтез РНК, взаимодействуют с TBP, компоненты субкомплекса SRB/медиатор
- GAL11/SPT13 - Участвуют в образовании инициационного комплекса, стимулируют базальный и индуцированный синтез РНК, компоненты субкомплекса SRB/медиатор, предположительно взаимодействуют с активаторами транскрипции
- SUG1 - Компонент субкомплекса SRB/медиатор, предположительно взаимодействует с активаторами транскрипции
- SRB4, SRB6, SRB7, SRB8, SRB9, SRB10, SRB11 - Компоненты субкомплекса SRB/медиатор, предположительно взаимодействуют с CTD-доменом Pol II

Транскрипция у эукариот



Транскрипция у эукариот

Промоторы

ТАТА-бокс содержащие

Около 24% генов человека

- На расстоянии 27-30 п.н. от кэп-сайта расположен ТАТА-мотив, усредненный вариант которого можно представить как ТАТА(А/Т)А(А/Т).
- Положение ТАТА-элемента строго определяет сайт инициации транскрипции, т.е. 5'-конец транскрипта.
- При повреждении или удалении ТАТА-элемента образуется набор молекул РНК с разными 5'-концами.
- Отдельные нуклеотидные замены в ТАТА-элементе могут приводить к резкому снижению эффективности транскрипции.

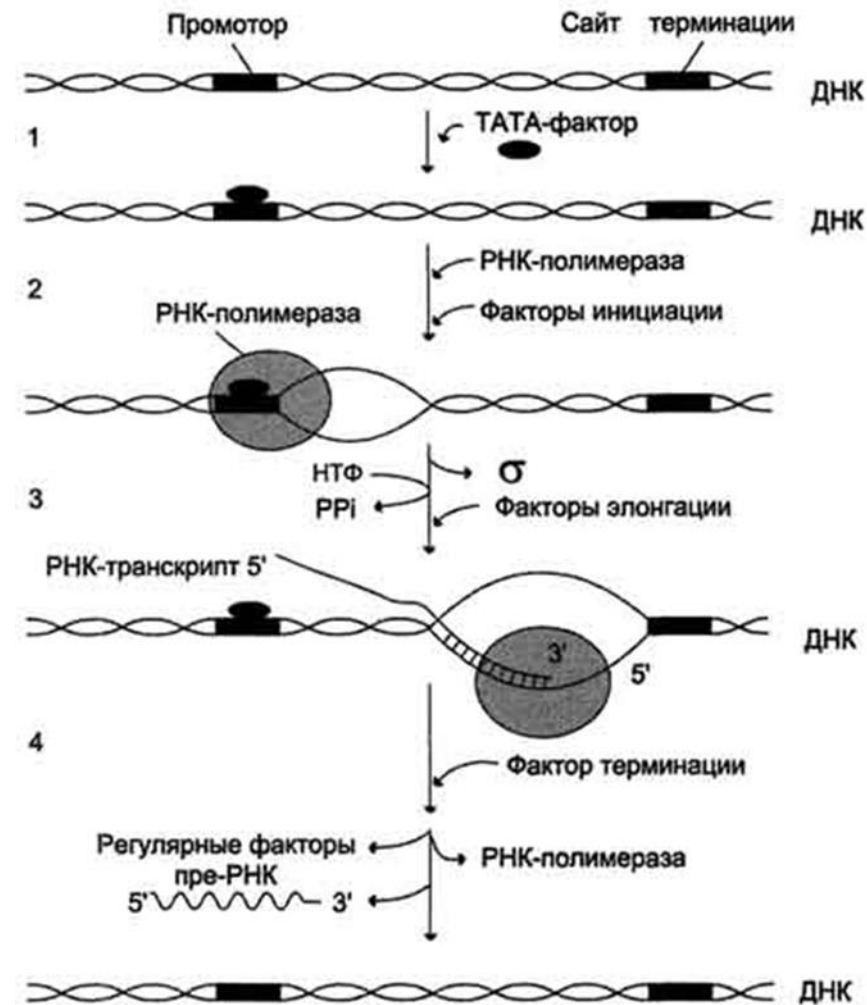
ТАТА-бокс не содержащие

- Участвуют различные транскрипционные факторы

Транскрипция у эукариот

Инициация

- Активация промотора происходит с помощью большого белка - ТАТА-фактора, связывающегося с ТАТА-боксом.
- Присоединение ТАТА-фактора облегчает взаимодействие промотора с РНК-полимеразой.
- Факторы инициации вызывают изменение конформации РНК-полимеразы и обеспечивают раскручивание примерно одного витка спирали ДНК, т.е. образуется транскрипционная вилка, в которой матрица доступна для инициации синтеза цепи РНК.
- После того как синтезирован рибоолигонуклеотид из 8-10 нуклеотидных остатков, σ -субъединица отделяется от РНК-полимеразы, а вместо неё к молекуле фермента присоединяются несколько факторов элонгации.



Транскрипция у эукариот

Элонгация

- Факторы элонгации повышают активность РНК-полимеразы и облегчают расхождение цепей ДНК.
- На стадии элонгации, в области транскрипционной вилки, одновременно разделены примерно 18 нуклеотидных пар ДНК.
- Растущий конец цепи РНК образует временную гибридную спираль, около 12 пар нуклеотидных остатков, с матричной цепью ДНК.
- По мере продвижения РНК-полимеразы по матрице в направлении от 3'- к 5'-концу впереди неё происходит расхождение, а позади - восстановление двойной спирали ДНК.

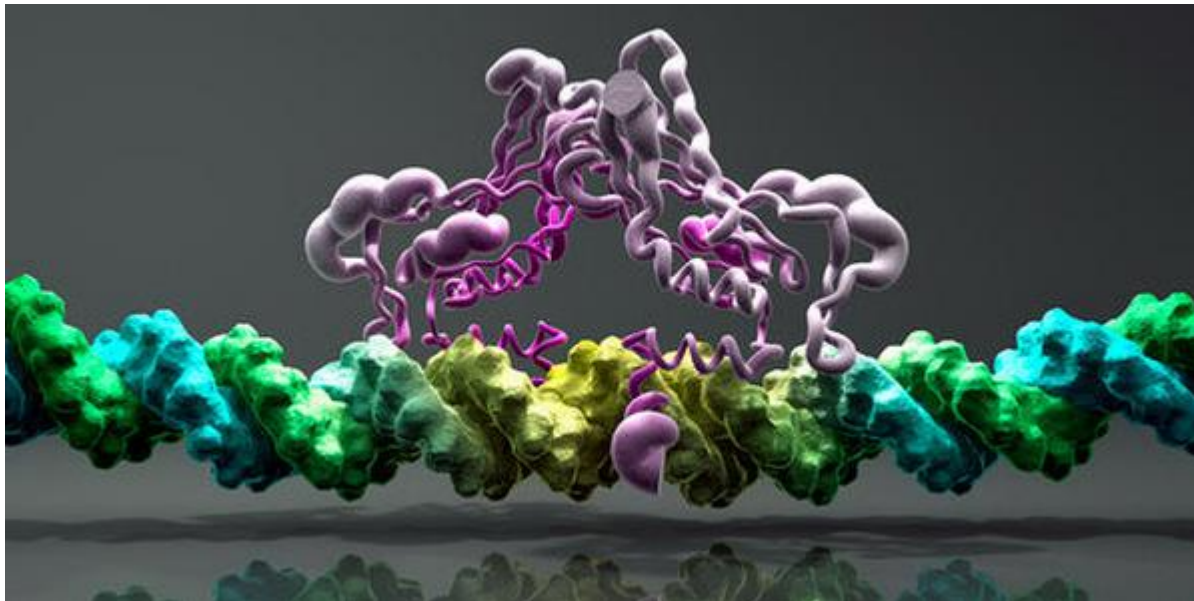
Терминация

- Завершается синтез РНК в строго определенных участках матрицы - сайты терминации транскрипции
- Раскручивание двойной спирали ДНК в области сайта терминации делает его доступным для фактора терминации.
- Фактор терминации облегчает отделение первичного транскрипта (пре-мРНК), комплементарного матрице, и РНК-полимеразы от матрицы. РНК-полимераза может вступить в следующий цикл транскрипции после присоединения субъединицы σ .

Транскрипция у эукариот

Транскрипционный фактор - это белок, который после его перемещения в ядро клетки регулирует транскрипцию, специфически взаимодействуя с ДНК, либо стехиометрически взаимодействуя с другим белком, который может образовывать специфичный к последовательности ДНК комплекс "белок-ДНК".

- В геноме человека обнаружено более 2600 белков, имеющих ДНК-связывающий домен, и большинство из них предположительно являются факторами транскрипции.
- Около 10 % всех генов в геноме кодируют транскрипционные факторы, являясь самым большим семейством белков человека.



Транскрипция у эукариот

ТФ, связывающиеся с ДНК, могут влиять на транскрипцию генов через несколько механизмов:

1. В большинстве изученных к настоящему времени случаев ТФ стимулируют формирование комплекса преинициации на ТАТА-боксе - инициаторном элементе за счет взаимодействия их транс-активирующих доменов с компонентами базального транскрипционного комплекса (либо непосредственно, либо через коактиваторы/медиаторы).
2. Некоторые ТФ вызывают изменения структуры хроматина, делая его более доступным для РНК-полимераз.
3. Другие ТФ являются вспомогательными, создавая оптимальную конформацию ДНК для действия других транскрипционных факторов.
4. Известны ТФ, которые подавляют транскрипцию за счет непосредственного действия своих ингибирующих доменов, либо нарушая совместное функционирование комплекса транскрипционных факторов внутри регуляторной области гена (промотора, энхансера).
5. Наконец, имеются ТФ, которые сами не связываются с ДНК, а объединяются в более сложные комплексы посредством белок-белковых взаимодействий.

Процессинг матричной РНК

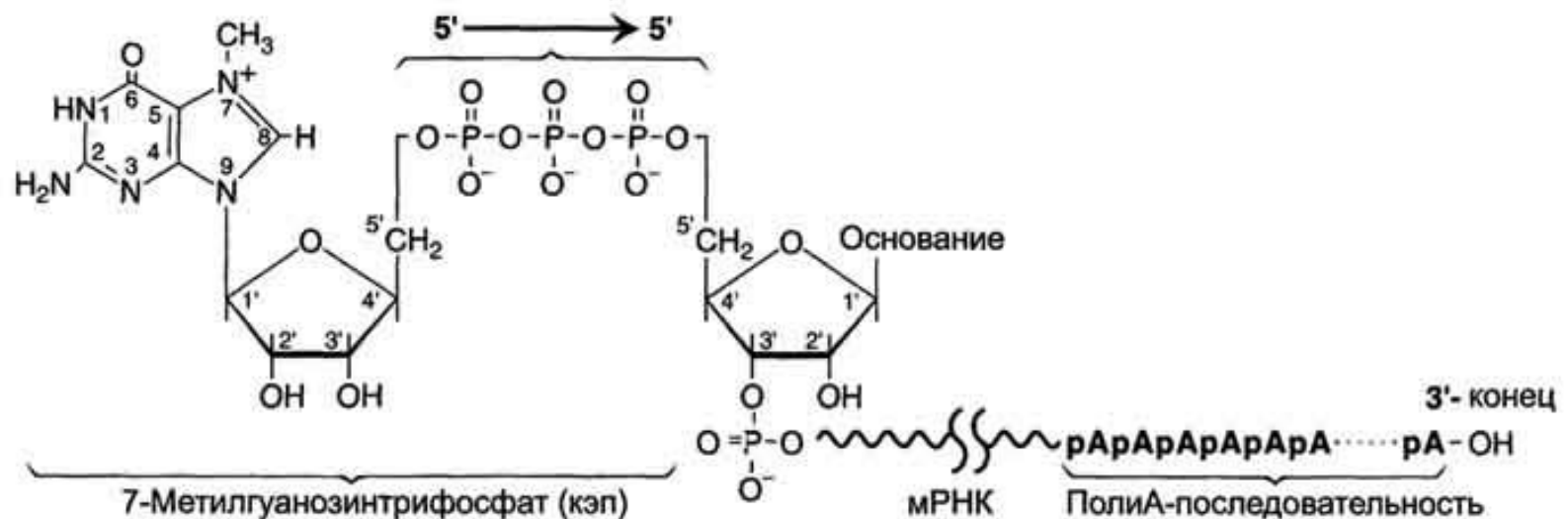
Первичные транскрипты мРНК, прежде чем будут использованы в ходе синтеза белка, подвергаются ряду ковалентных модификаций. Эти модификации необходимы для функционирования мРНК в качестве матрицы.

- Модификация 5'-конца
- Модификация 3'-конца
- Сплайсинг первичных транскриптов мРНК
- Альтернативный сплайсинг

Процессинг матричной РНК

Модификация 5'-конца

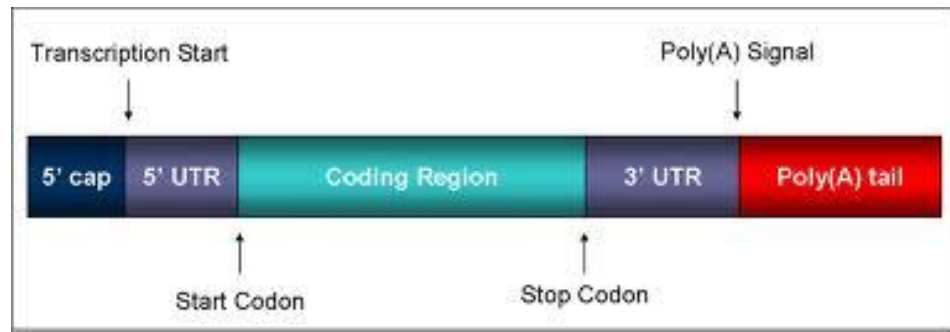
- Модификации пре-мРНК начинаются на стадии элонгации. Когда длина первичного транскрипта достигает примерно 30 нуклеотидных остатков, происходит кэпирование его 5'-конца.
- Осуществляет кэпирование гуанилилтрансфераза. Фермент гидролизует макроэргическую связь в молекуле ГТФ и присоединяет нуклеотиддифосфатный остаток 5'-фосфатной группой к 5'-концу синтезированного фрагмента РНК с образованием 5', 5'-фосфодиэфирной связи.
- Последующее метилирование остатка гуанина в составе ГТФ с образованием N7-метилгуанозина завершает формирование кэпа
- Модифицированный 5'-конец обеспечивает инициацию трансляции, удлиняет время жизни мРНК, защищая её от действия 5'-экзонуклеаз в цитоплазме.
- Кэпирование необходимо для инициации синтеза белка, так как иницирующие триплеты AUG, GUG распознаются рибосомой только если присутствует кэп. Наличие кэпа также необходимо для работы сплайсосомы, обеспечивающей удаление интронов.



Процессинг матричной РНК

Модификация 3'-конца

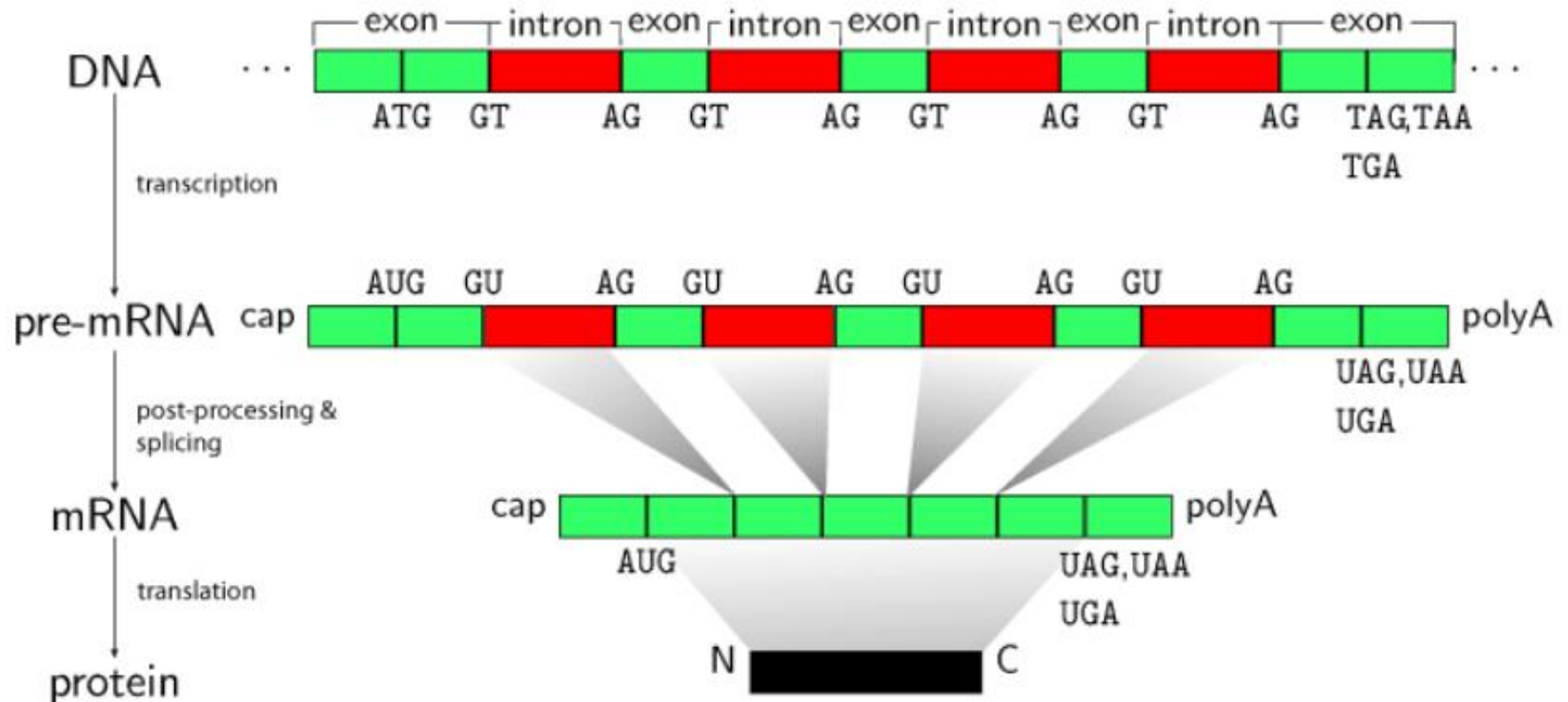
- 3'-Конец большинства транскриптов, синтезированных РНК-полимеразой II, подвергается модификации
- Специальным ферментом полиА-полимеразой формируется полиА-последовательность (полиА-"хвост"), состоящая из 100-200 остатков аденозина.
- Сигналом к началу полиаденилирования является последовательность -AAUAAA- на растущей цепи РНК. Фермент полиА-полимераза, проявляя экзонуклеазную активность, разрывает 3'-фосфоэфирную связь после появления в цепи РНК специфической последовательности -AAUAAA-.
- К 3'-концу в точке разрыва полиА-полимераза наращивает полиА-"хвост". Наличие полиА-последовательности на 3'-конце облегчает выход мРНК из ядра и замедляет её гидролиз в цитоплазме.
- Ферменты, осуществляющие кэширование и полиаденилирование, избирательно связываются с РНК-полимеразой II, и в отсутствие полимеразы неактивны.
- Полиаденилирование необходимо для транспорта большинства мРНК в цитоплазму и защищает молекулы мРНК от быстрой деградации. Лишённые поли(А)-участка молекулы мРНК быстро разрушаются в цитоплазме клеток эукариот рибонуклеазами.



Процессинг матричной РНК

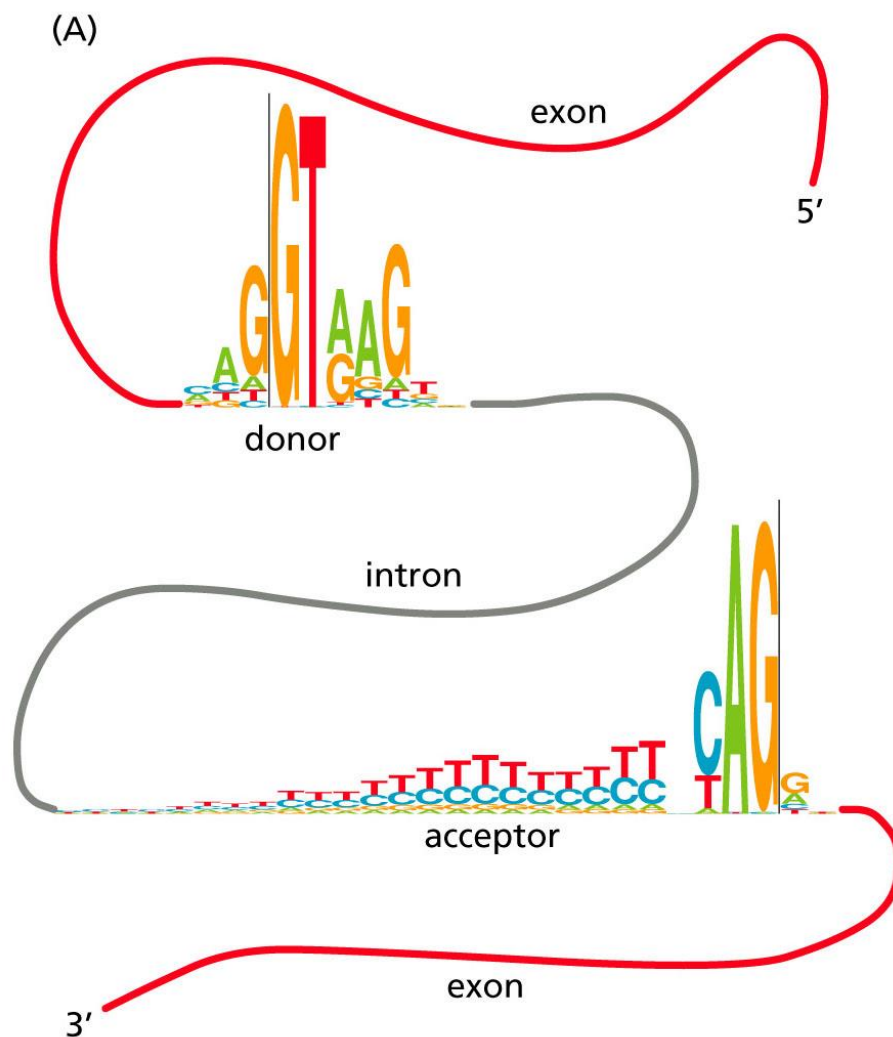
Сплайсинг первичных транскриптов мРНК

- Последовательности интронов "вырезаются" из первичного транскрипта, концы экзонов соединяются друг с другом.
- Гены эукариотов содержат больше интронов, чем экзонов, поэтому очень длинные молекулы пре-мРНК (около 5000 нуклеотидов) после сплайсинга превращаются в более короткие молекулы цитоплазматической мРНК



Процессинг матричной РНК

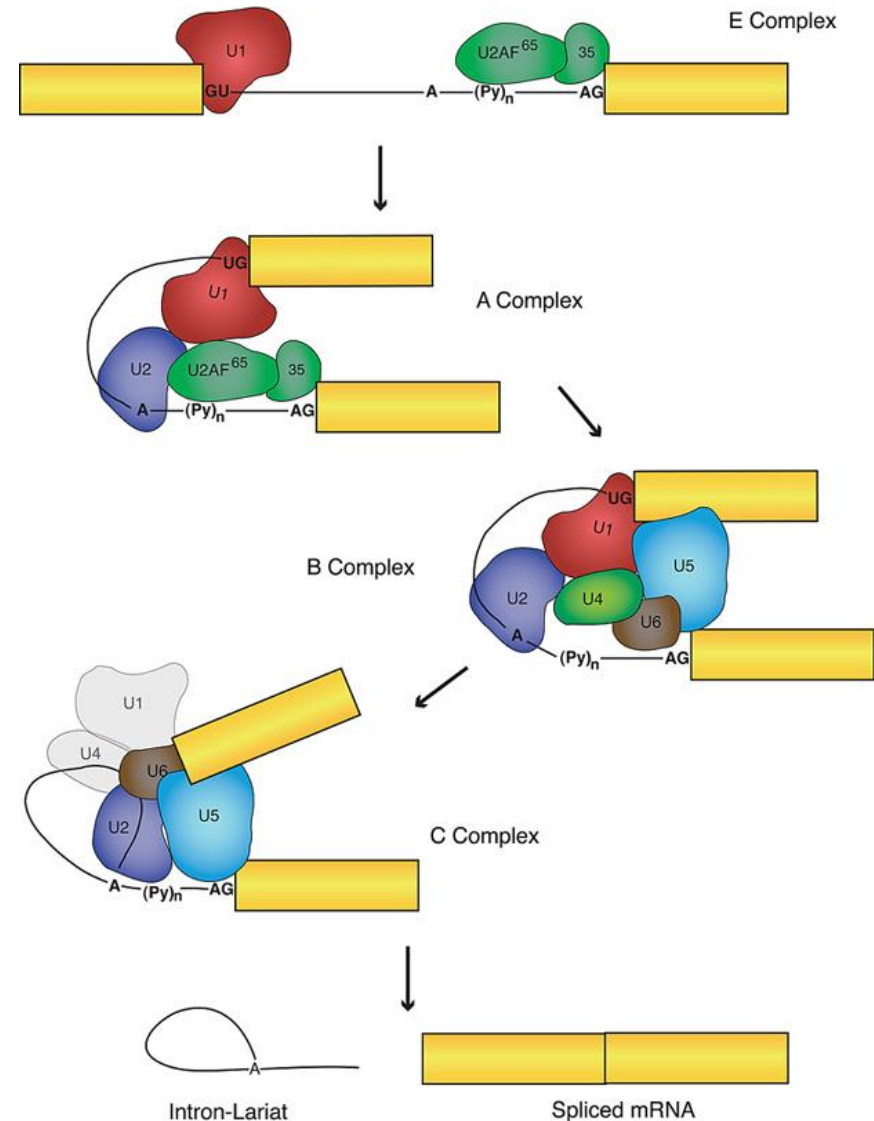
Сплайсинг первичных транскриптов мРНК



Процессинг матричной РНК

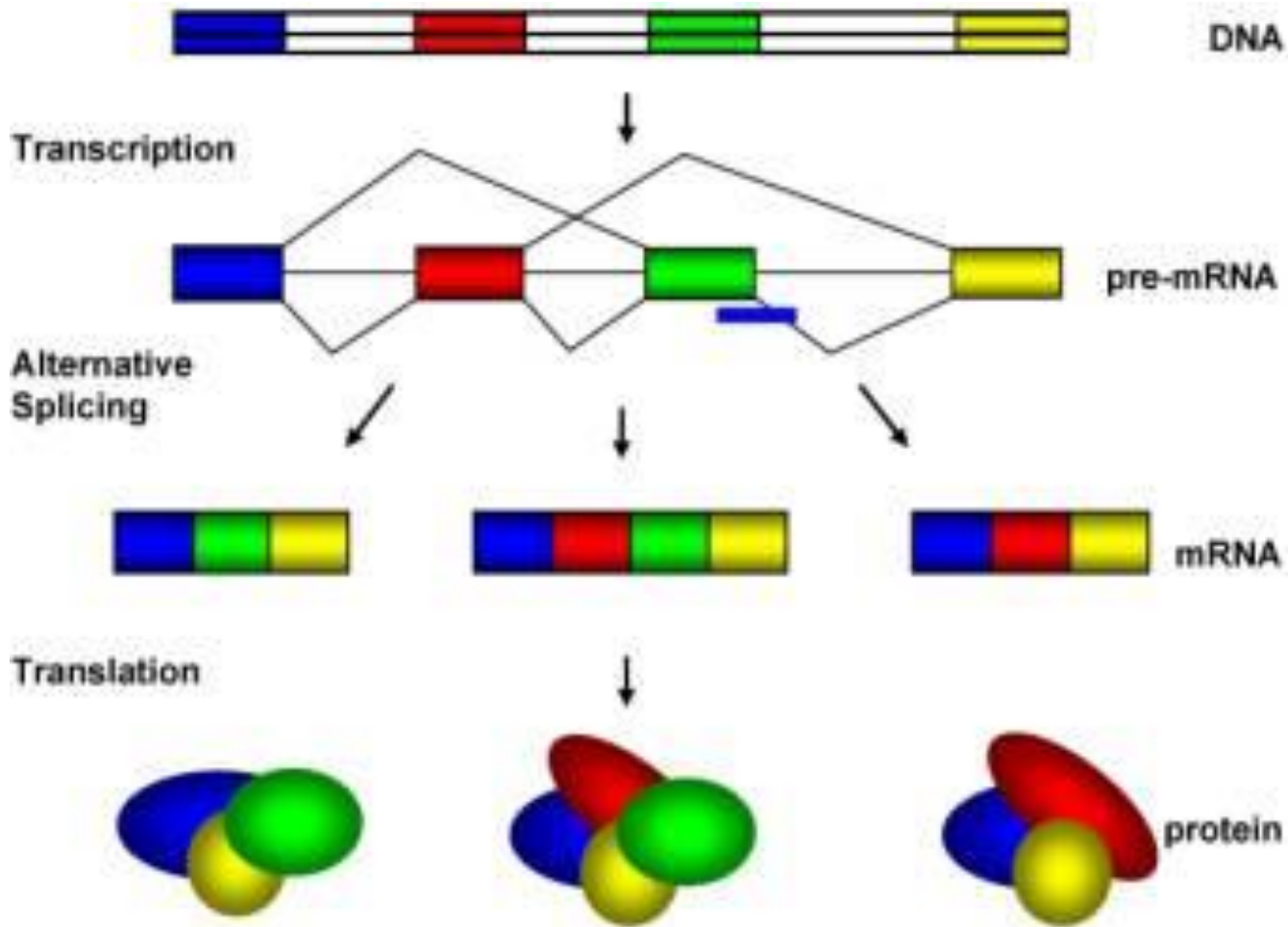
Сплайсинг первичных транскриптов мРНК

- Процесс "вырезания" интронов протекает при участии малых ядерных рибонуклеопротеинов (мяРНП)
- На первой стадии процесса мяРНП связываются со сайтами сплайсинга
- Далее к ним присоединяются другие мяРНП.
- При формировании структуры сплайсосомы 3'-конец одного экзона сближается с 5'-концом следующего экзона.
- Сплайсосома катализирует реакцию расщепления 3',5'-фосфодиэфирной связи на границе экзона с интроном.
- Последовательность интрона удаляется, а два экзона соединяются.
- Образование 3',5'-фосфодиэфирной связи между двумя экзонами катализируют мяРНК (малые ядерные РНК), входящие в структуру сплайсосомы.



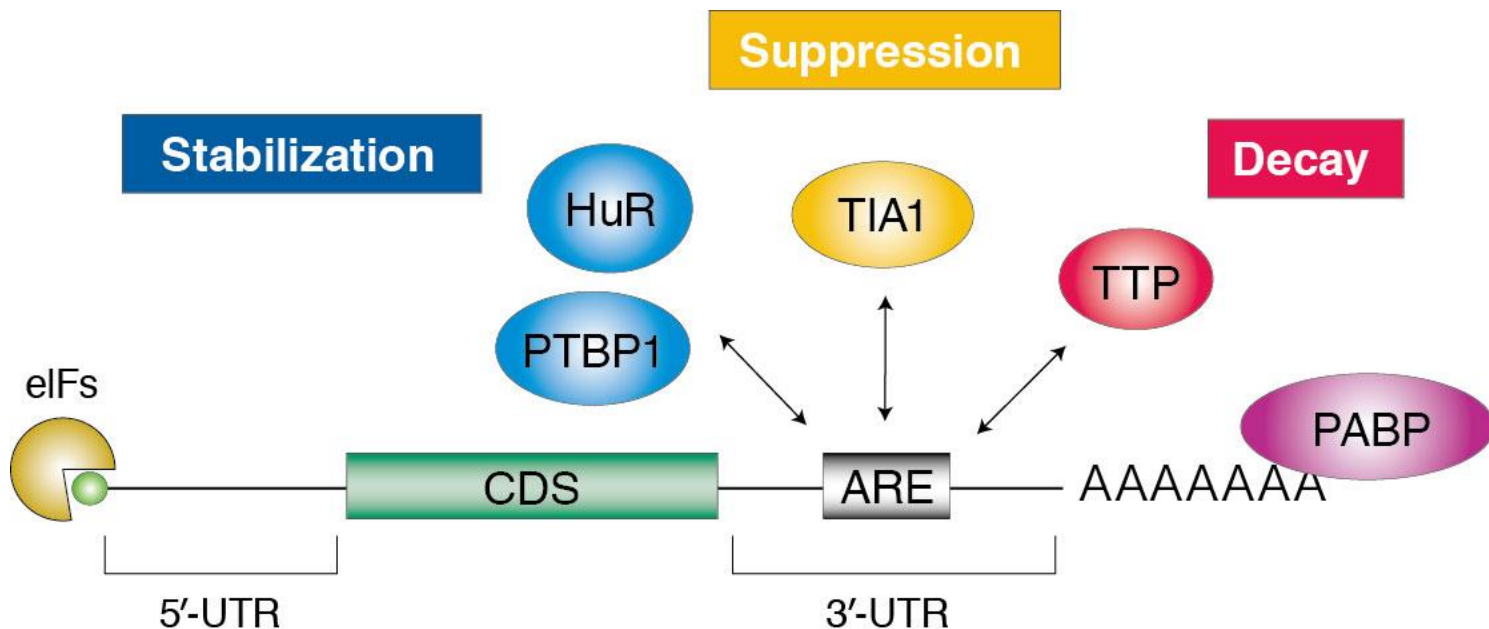
Процессинг матричной РНК

Альтернативный сплайсинг первичных транскриптов мРНК



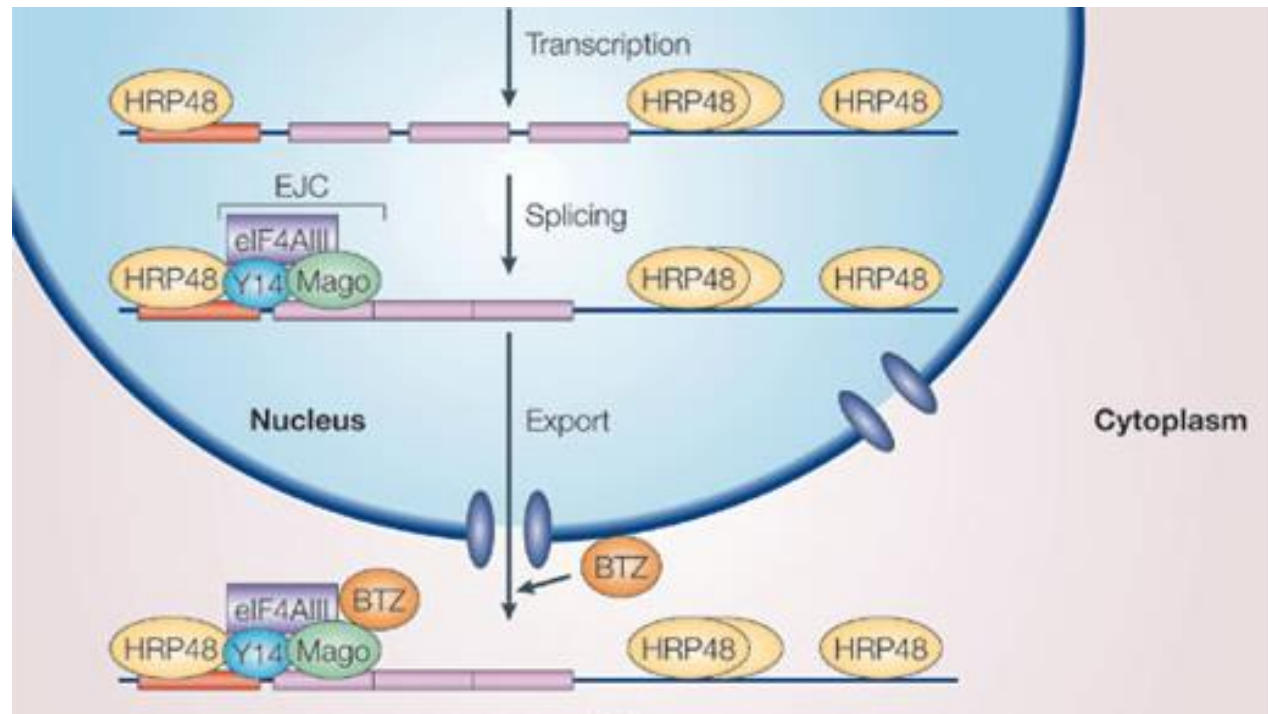
Стабильность и время жизни матричной РНК

- У некоторых мРНК в их 3'-UTR районах встречаются ARE элементы (AU-rich element), с высокой частотой аденина (A) и уридина (U)
- Связывание ряда белков из семейства RBP (RNA-binding proteins) с ARE элементом индуцирует деградацию мРНК.
- Гены раннего ответа, которые отвечают на широкий спектр внешних сигналов, включая онкогены и цитокины, имеют относительно короткое время жизни из-за ARE элементов в их мРНК
- Другой тип RBP белков, включая HuR, связываясь с ARE регулирует стабильность мРНК за счет препятствия доступа к ней эндонуклеаз.



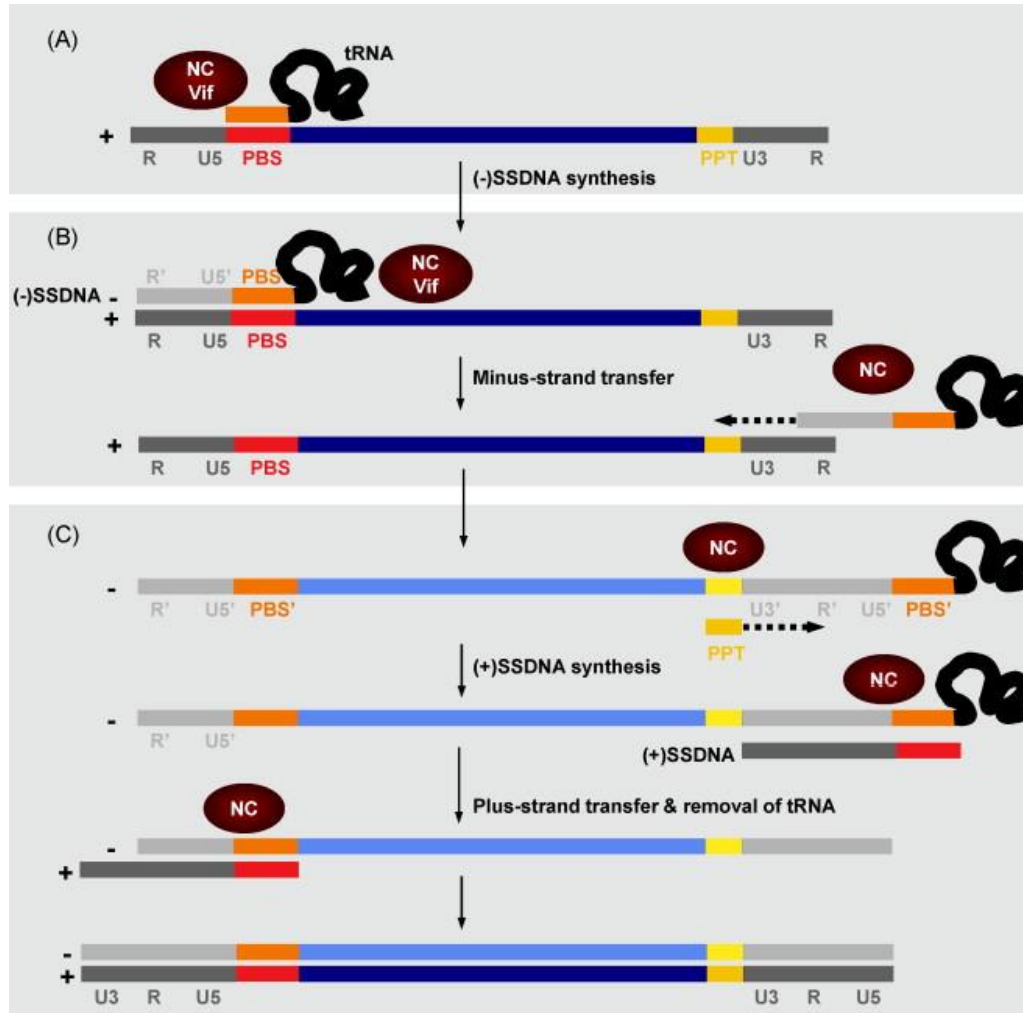
Транспорт матричной РНК

- Зрелые мРНК распознаются по наличию модификаций и покидают ядро через ядерные поры
- В цитоплазме мРНК образует нуклеопротеидные комплексы — информосомы, в составе которых транспортируется к рибосомам
- Многие мРНК содержат сигналы, которые определяют их локализацию



Обратная транскрипция

- The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1975 was awarded jointly to David Baltimore, Renato Dulbecco and Howard Martin Temin "for their discoveries concerning the interaction between tumour viruses and the genetic material of the cell".



Дэвид Балтимор



Ренато Дульбекко



Говард Темин

