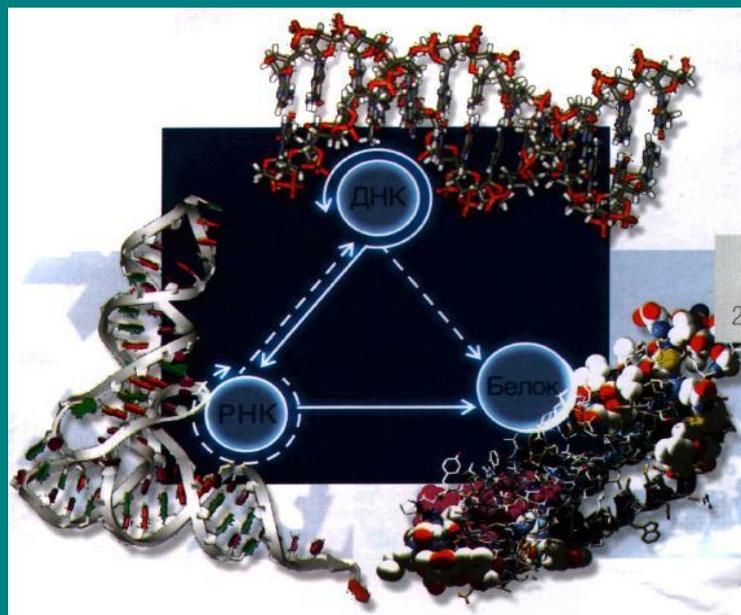
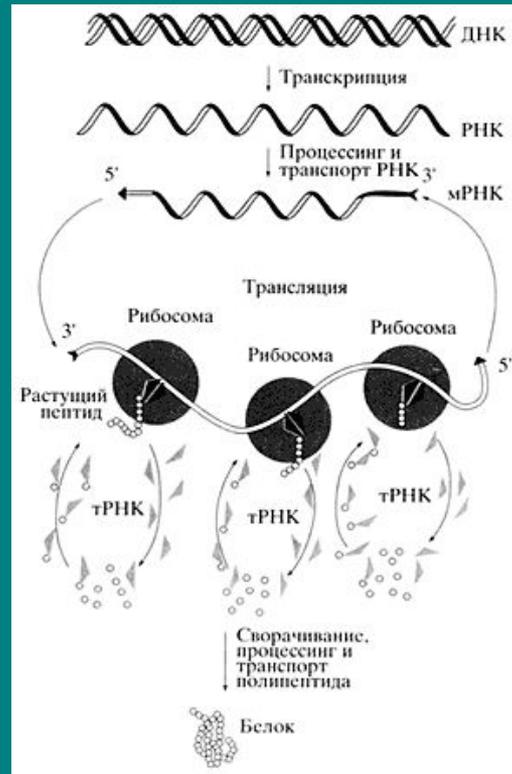


Молекулярно- генетический уровень жизни



Реализация генетической информации: матричные процессы



Экспрессия гена

процесс, в ходе которого наследственная информация процесс, в ходе которого наследственная информация от гена преобразуется в функциональный продукт — РНК процесс, в ходе которого наследственная информация от гена преобразуется в функциональный продукт — РНК или белок

Этапы экспрессии генов:

- транскрипция,
- процессинг РНК,
- трансляция,

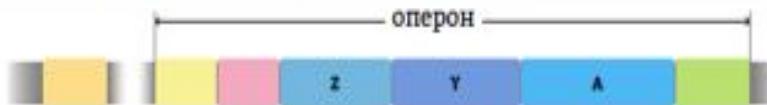
Основные отличия организации генов прокариот и эукариот

ПРОКАРИОТЫ

1. ДНК кольцевая



2. Гены собраны в кластеры – опероны



3. Интроны отсутствуют

4. Трансляция сопряжена с транскрипцией

ЭУКАРИОТЫ

1. Ядерная ДНК линейная



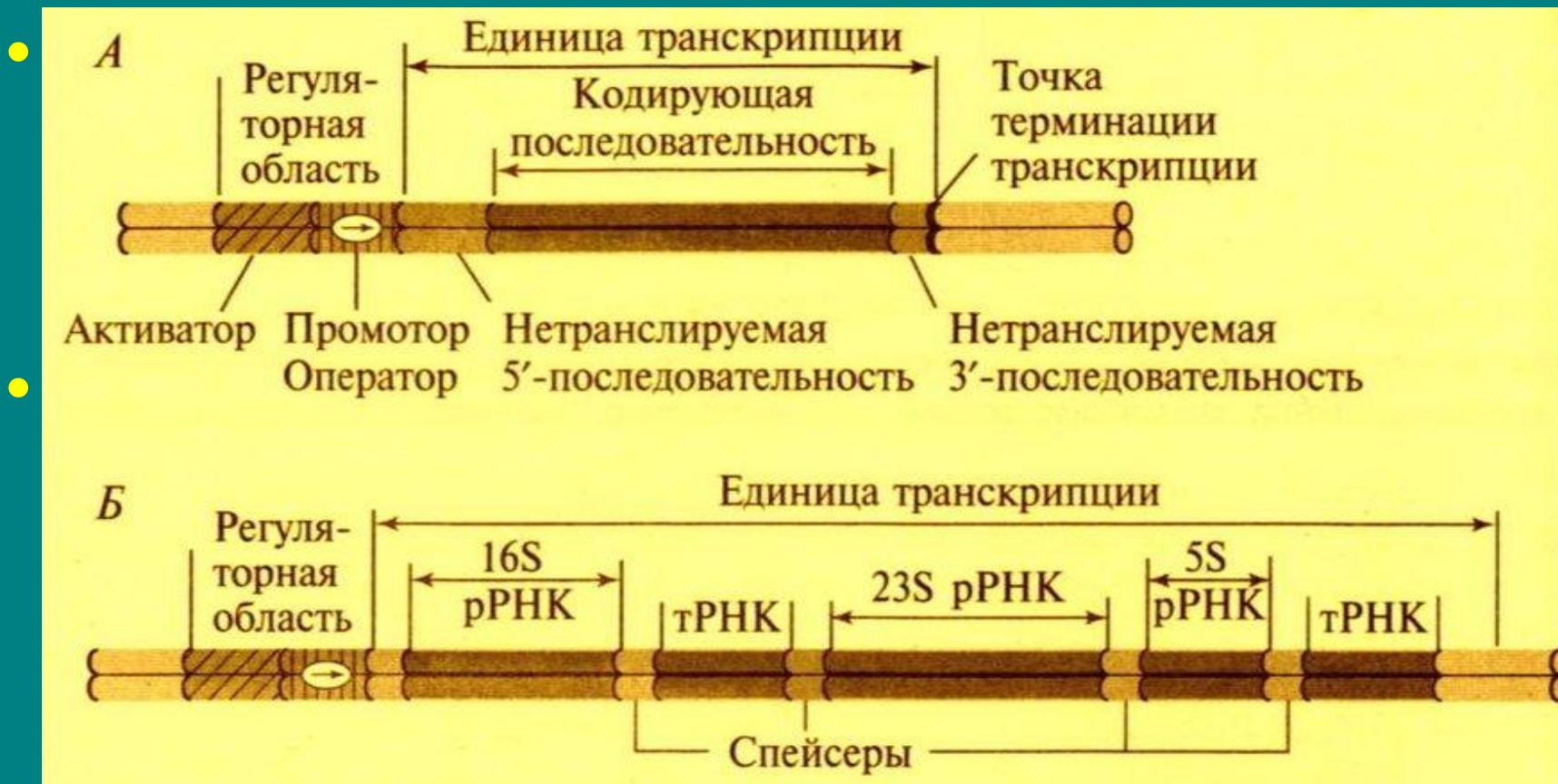
2. Опероны практически отсутствуют

3. Есть деление на экзоны и интроны



4. Сопряжение трансляции и транскрипции отсутствует

Организация генов прокариот - оперон



Организация генов прокариот

оперон

- **промотор** – регуляторная последовательность, узнаваемая ферментом **РНК-полимеразой**
- **оператор** – регуляторная последовательность, связывающаяся с **белком-репрессором**, выключающим процесс транскрипции
- **терминатор** – нуклеотидная последовательность ДНК, на которой завершается транскрипция гена или оперона
- **спейсер** (от англ. spacer – «разделитель») – участки нетранскрибируемой ДНК, расположенные между тандемно повторяющимися генами

Организация генов прокариот

оперон

- **энхансер** (англ. enhancer – усилитель, увеличитель) – небольшой участок ДНК, который после связывания с ним факторов транскрипции стимулирует транскрипцию с основных промоторов гена или группы генов.

Энхансеры не обязательно находятся в непосредственной близости от генов, активность которых они регулируют.

Молекулярный механизм действия энхансера заключается в том, что он благодаря собранному на нём белковому комплексу привлекает РНК-полимеразу и кофакторы транскрипции в область промотора

Организация генов прокариот

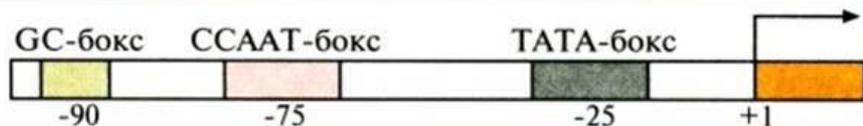
промотор



Организация генов эукариот - транскриптон

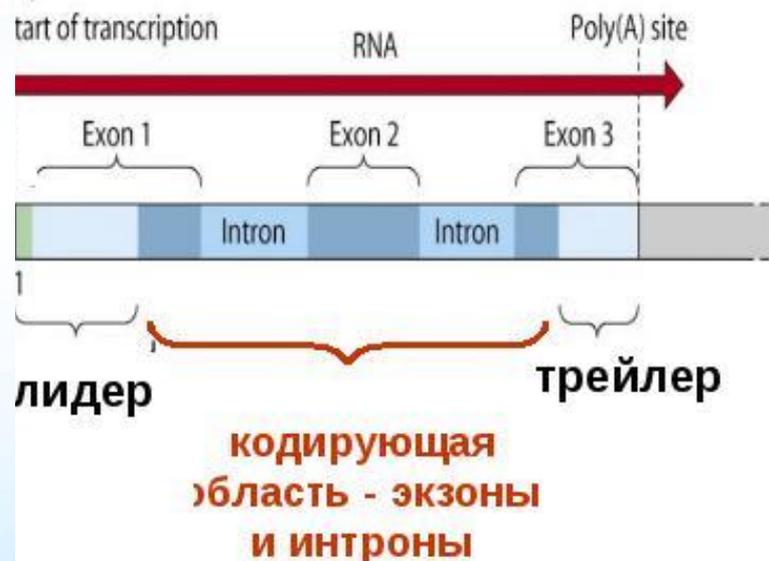
- более сложное строение регуляторного участка
- один структурный ген
- **интронно-экзонная** организация структурного гена
- **сайленсеры** – последовательность ДНК, с которой связываются белки-репрессоры (факторы транскрипции). Связывание белков-репрессоров с сайленсерами приводит к понижению или к полному подавлению синтеза РНК

Организация генов эукариот - транскриптон



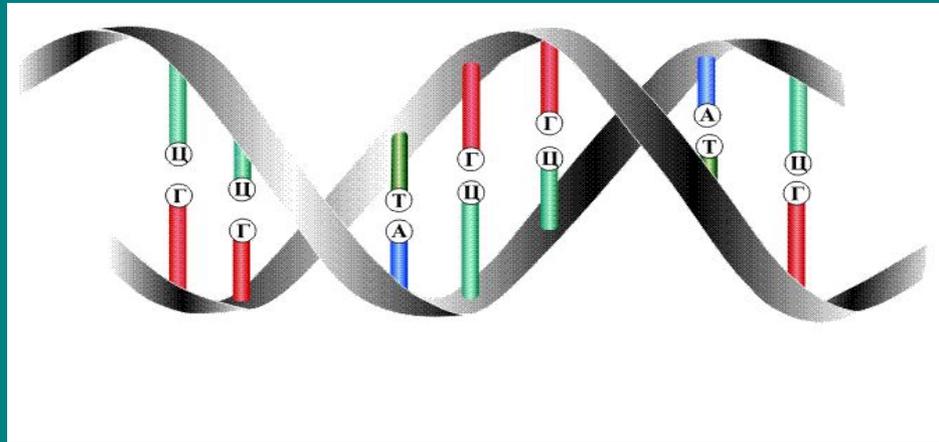
Каждый структурный ген эукариот имеет промоторный участок (TATA-бокс, или **бокс Хогнесса**) из 8 нуклеотидов, включающий последовательность TATA.

Последовательности CCAAT (CAT-бокс), участок из повторяющихся нуклеотидов GC (GC-бокс), энхансеры и сайленсеры участвуют в регуляции экспрессии генов.



Транскрипция ДНК

* Перенос информации на РНК



Транскрибируется:

- короткий участок ДНК
- одна цепь ДНК – транскрибируемая
- вторая цепь - смысловая

Стадии транскрипции:

- инициации
- элонгации
- терминации

РНК-полимеразы

Типы РНК-полимераз у эукариот

РНК-полимераза-I синтезирует рРНК (в ядрышке)

РНК-полимераза-II ----- мРНК и мяРНК

РНК-полимераза-III ----- тРНК

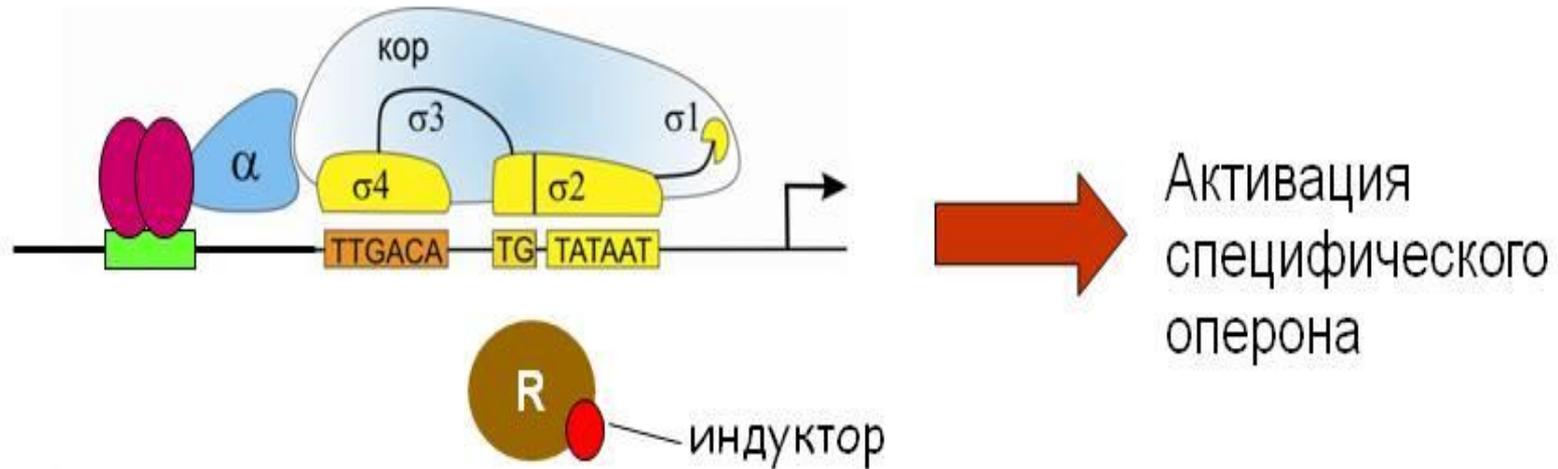
РНК-полимеразы митохондрий и пластид

У прокариот одна РНК-полимераза

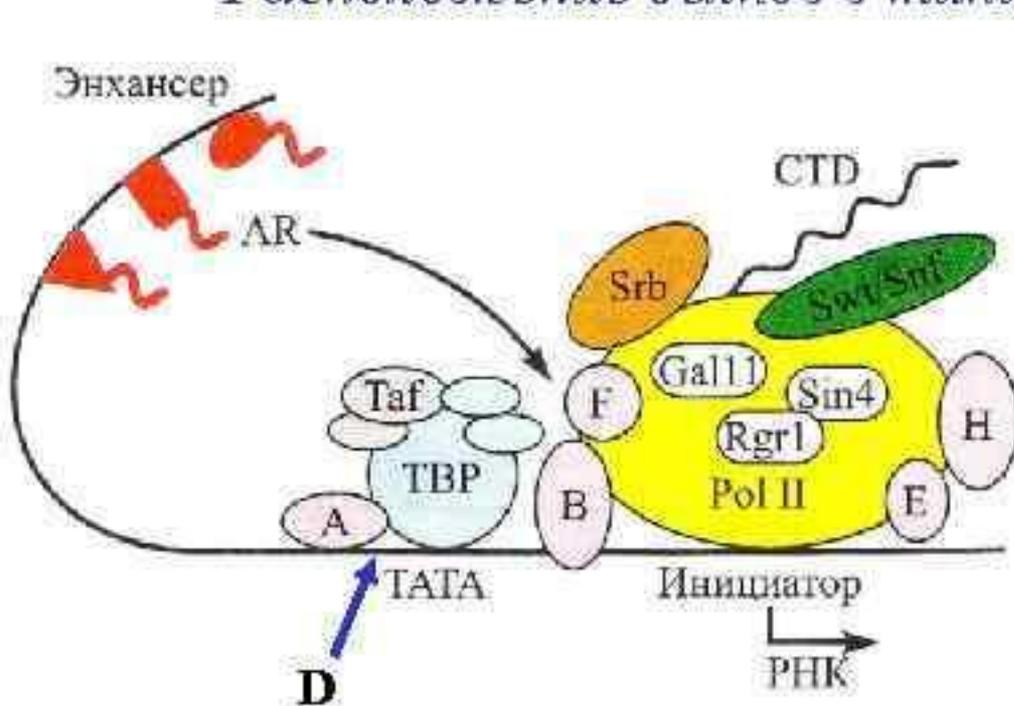
Инициация транскрипции

первый этап транскрипции, в ходе которого происходит связывание РНК-полимеразы с промотором и образование первой межнуклеотидной связи

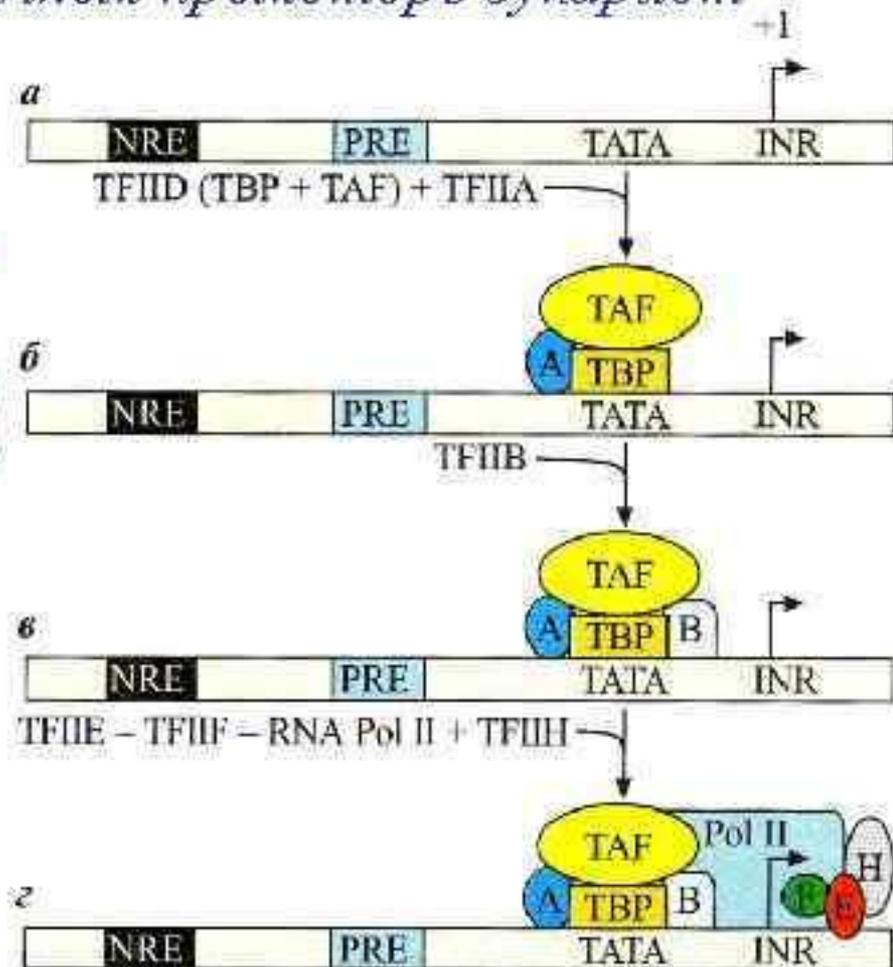
Инициация транскрипции - прокариоты



- В некоторых оперонах, например в лактозном, необходимо предварительное взаимодействие с промотором дополнительного белка (CAP изменяет структуру промотора, резко повышая его сродство к РНК-полимеразе)



Общие факторы транскрипции Pol II к настоящему времени выделены и очищены. Их шесть: TFIIA, TFIIВ, TFIIС, TFIIЕ, TFIIF и TFIIH (или, по другим данным, семь: +TFIIJ).

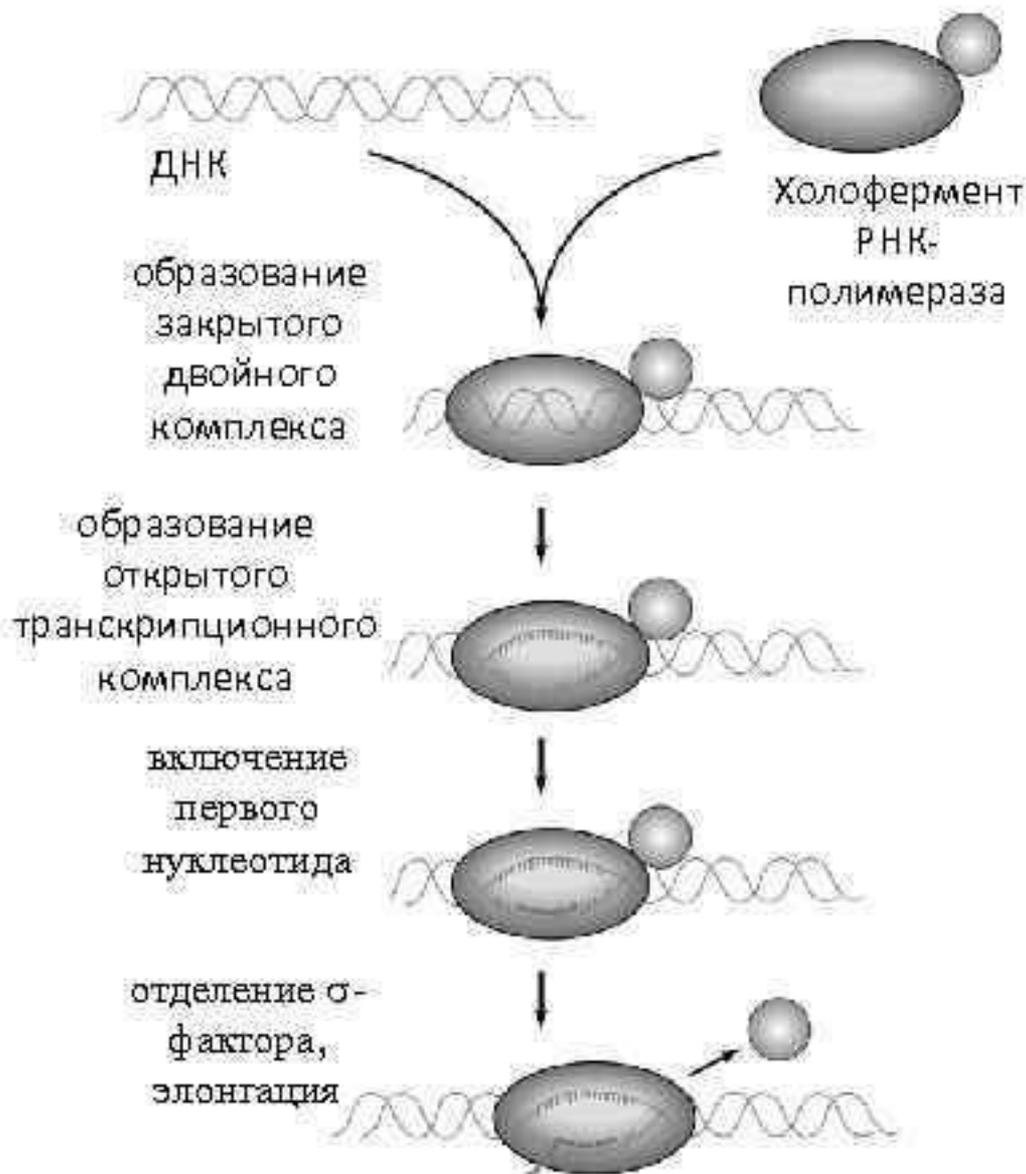


Сборка общего транскрипционного комплекса
a — типичный промотор гена эукариот, содержащий элемент инициации транскрипции (INR) и TATA-домен, а также некоторое число позитивных (PRE) и негативных регуляторных элементов (NRE);
б-г — порядок сборки общих факторов транскрипции и РНК-полимеразы II на промоторе
 Одна из субъединиц TFIIH обладает протеинкиназной активностью

Инициация транскрипции - эукариоты

- Промоторы эукариот устроены более сложно, чем прокариотические, и состоят из нескольких элементов. Из них самым близким к точке начала транскрипции является **ТАТА-домен**, называемый также **доменом Хогнесса**. Затем следуют домены **ЦААТ** и **ГЦ**.
- Домен **ЦААТ** играет существенную роль в инициации транскрипции, **ТАТА** и **ГЦ**, по-видимому, выполняют вспомогательные функции.

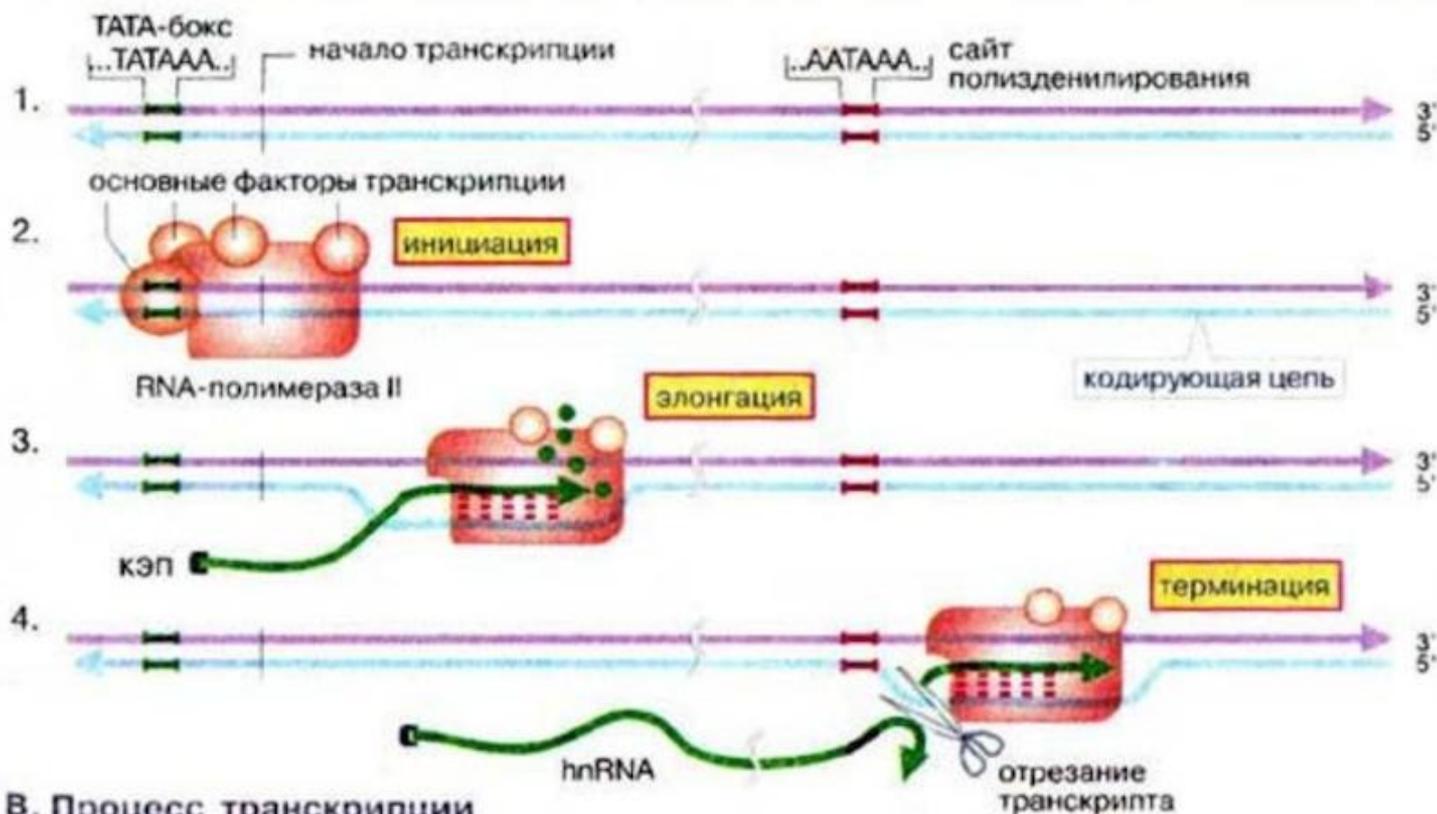
Этапы инициации транскрипции прокариот



Элонгация транскрипции

Транскрипция
Эл

Процесс транскрипции



7. РНК удаляется,
РНК-полимераза возвращается

В. Процесс транскрипции

Терминация транскрипции

- определяется особой нуклеотидной последовательностью ДНК, расположенной в зоне терминатора оперона.

В бактериальных оперонах выделяют два типа терминаторов:

ρ (ро) - независимые терминаторы (I типа);

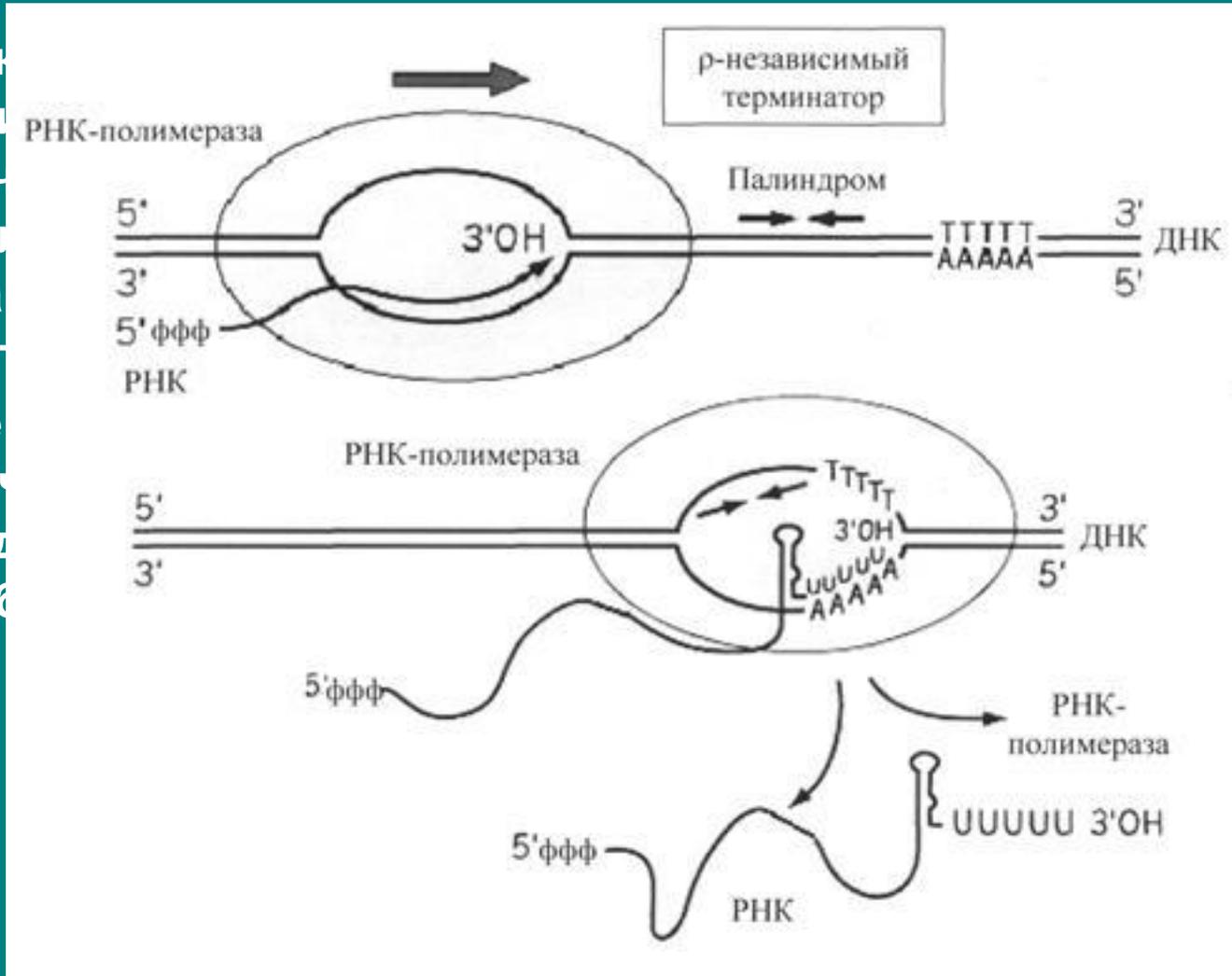
ρ - зависимые терминаторы (II типа).

Терминация транскрипции

- **ρ-независимые терминаторы** состоят из последовательностей, представляющих собой инвертированный повтор – **палиндром**, и располагаются за 16-20 нуклеотидных пар от точки терминации.
- **Палиндромы** (последовательности, которые читаются одинаково слева направо и справа налево) содержат большое количество Г-Ц-повторов.
- За этим участком на матричной цепи расположена олиго (А) - последовательность (4-8 адениловых нуклеотидов подряд).

Терминация транскрипции

- Транскрипция завершается, когда РНК-полимераза достигает «остановочного сигнала» — терминального участка ДНК. В этот момент происходит диссоциация РНК-полимеразы и РНК-полимераза высвобождает готовую РНК-цепь.
- Кроме того, существуют матричные РНК, которые содержат специальные последовательности, способствующие терминации транскрипции.

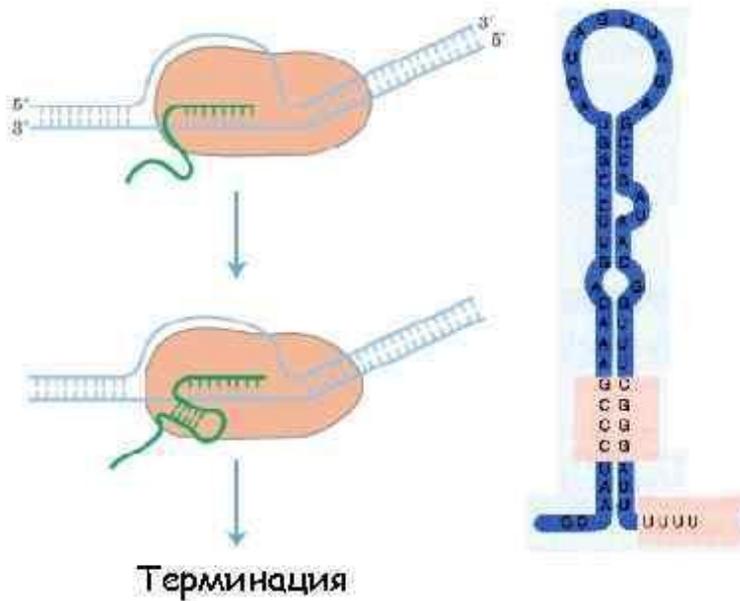


что в
ется
ка» —
онные
РНК в
сти в
РНК-
акже

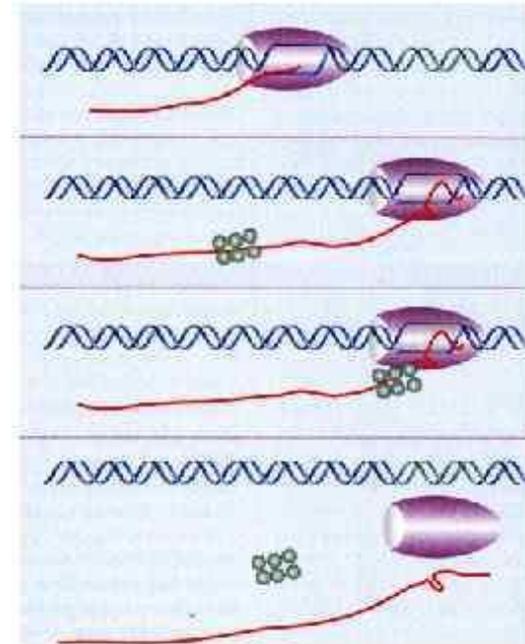
Терминация транскрипции

Механизмы терминации

ρ-независимая терминация



ρ-зависимая терминация



Синтезируемая РНК способна образовывать различные вторичные структуры, что имеет важное регуляторное значение

- ρ-з
- Од
- бе
- бе
- св
- 50
- ρ-с
- РН
- те
- св
- за
- ко

уру
бен
оло
рой
о в

Процессинг РНК

Посттранскрипционная модификация РНК

совокупность процессов, которые приводят к превращению первичного транскрипта в зрелую РНК

Процессинг РНК

Процессингу подвергаются:

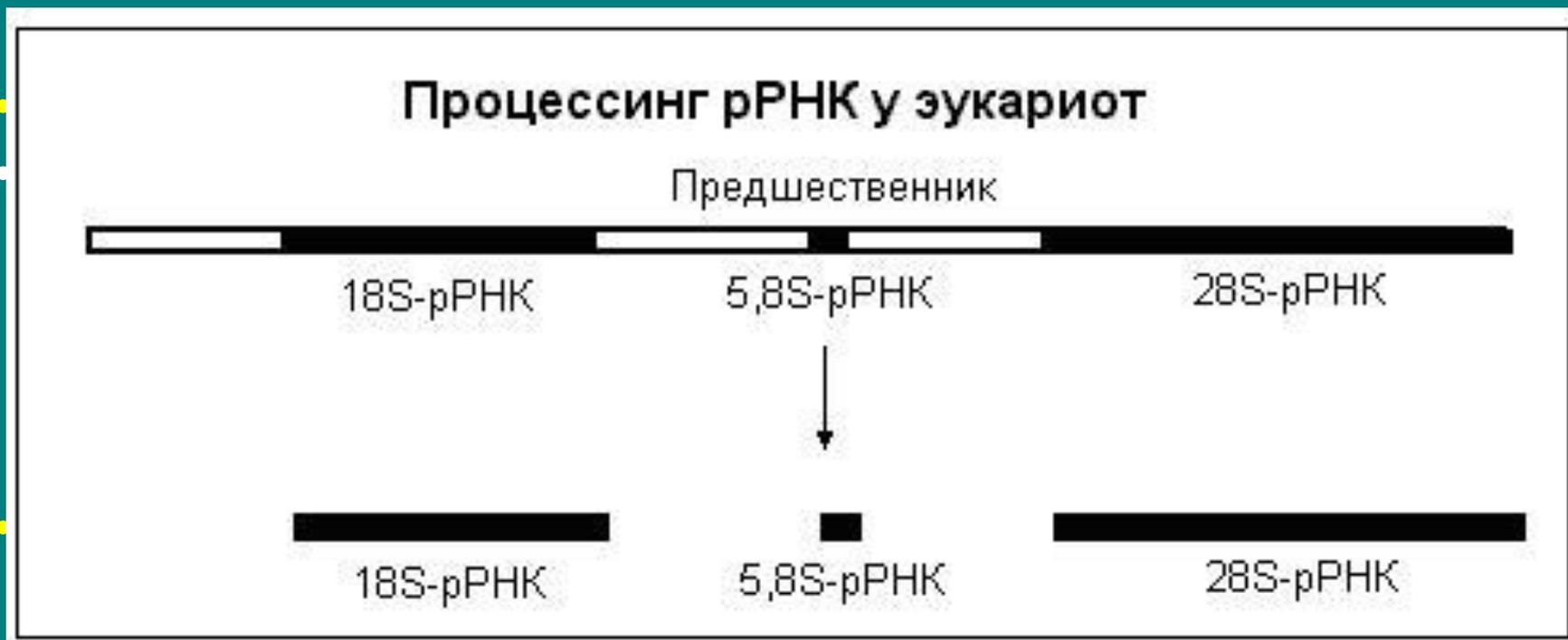
- мРНК, тРНК, рРНК эукариот
- тРНК, рРНК прокариот

**мРНК прокариот синтезируются
в активном виде!**

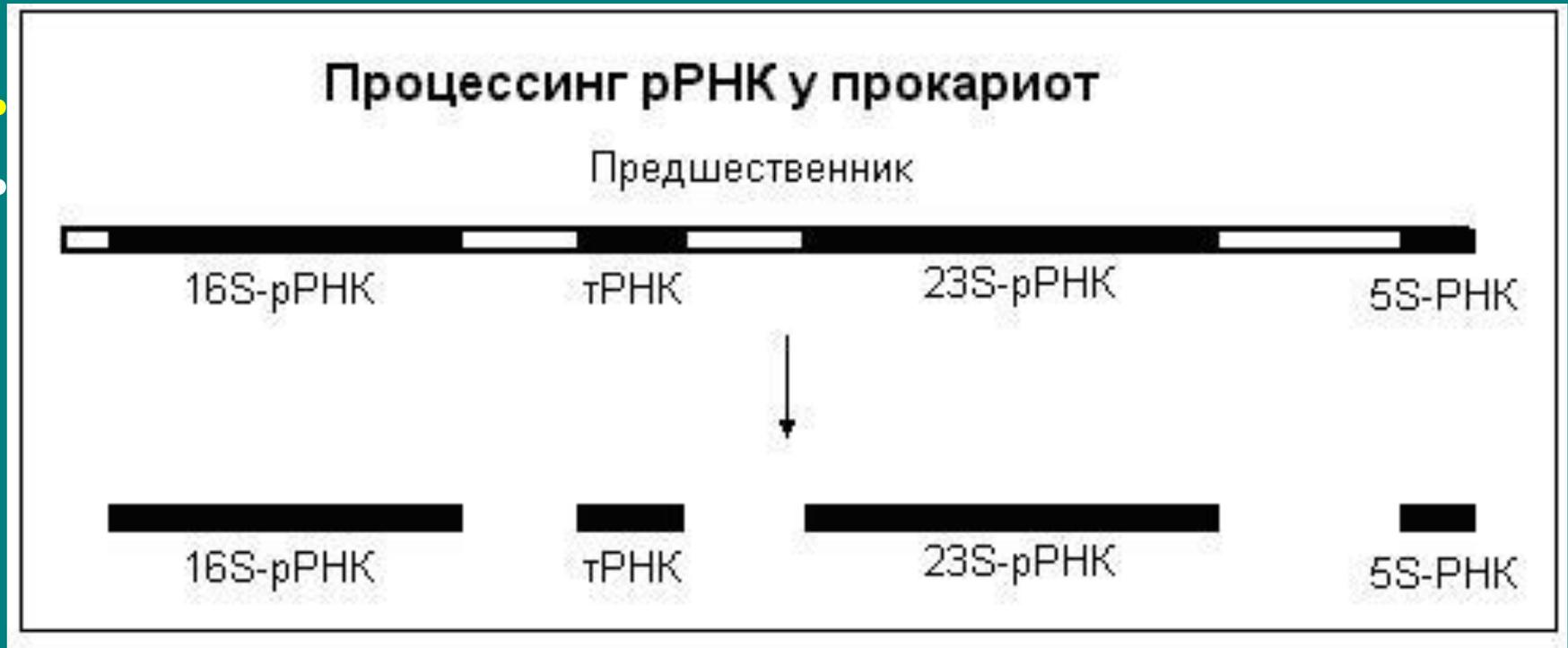
Процессинг РНК. рРНК

созревание сводится к разрезанию **эндонуклеазами прерибосомной РНК** на индивидуальные цепи, которые уже непосредственно участвуют в формировании рибосомы

Процессинг РНК. рРНК



Процессинг РНК. рРНК



Процессинг РНК. тРНК

Эукариоты:

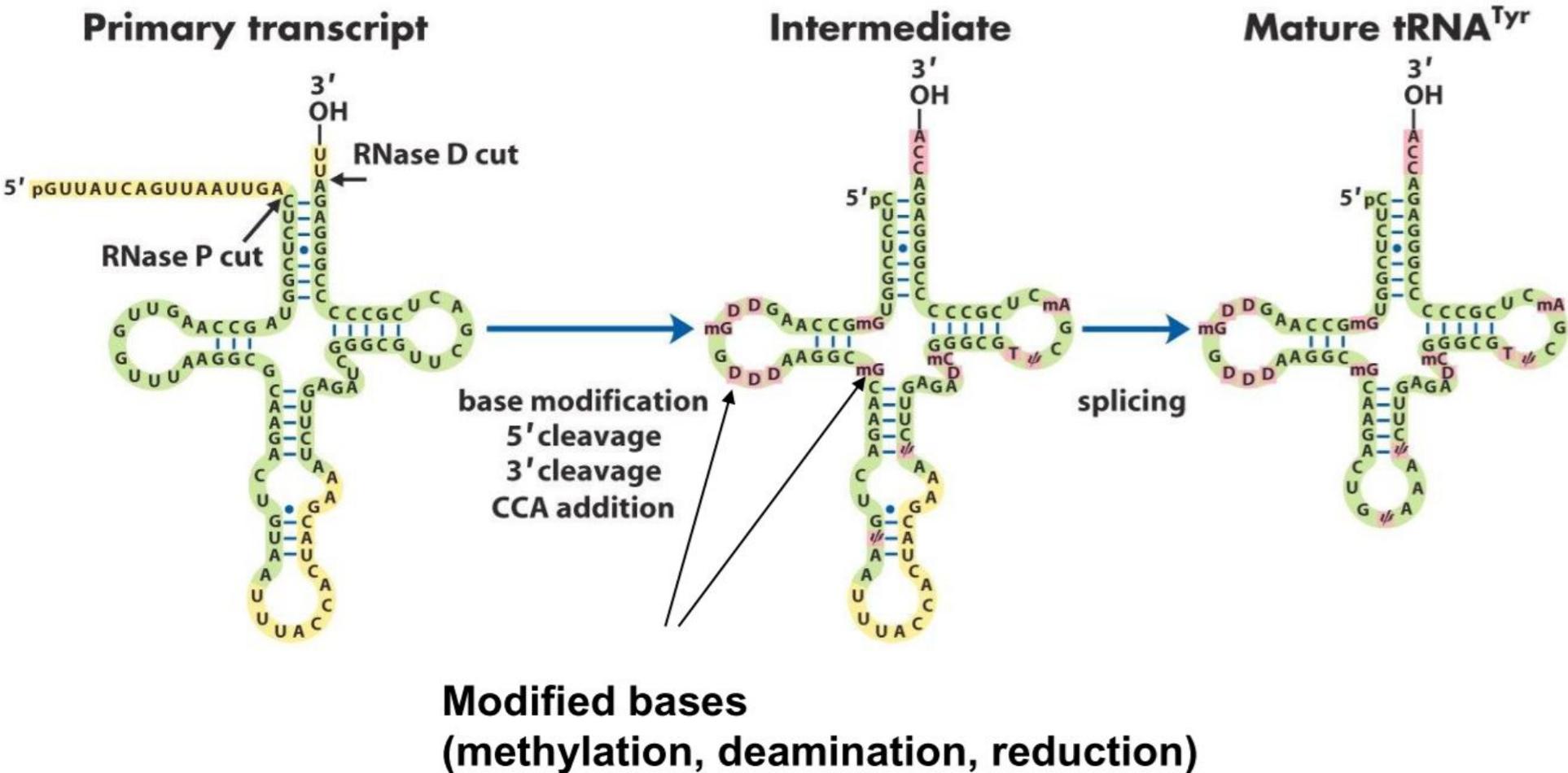
- **нуклеазное расщепление** – удаление лидерной последовательности с 5'-конца, концевой с 3'-конца
- **сплайсинг** – удаления интрона в средней части пре-тРНК и формирование антикодоновой петли
- **замена нуклеотидов на 3'-конце** последовательностью ЦЦА. Для этого у одних пре-тРНК с 3'-конца удаляются лишние нуклеотиды до «обнажения» триплета ЦЦА, у других идет присоединение этой последовательности
- **модификация нуклеотидов** в молекуле путем дезаминирования, метилирования, восстановления (образование инозина, метилуридина, псевдоуридина и дигидроуридина)

Процессинг РНК. тРНК

Прокариоты:

- **нуклеазное расщепление** – удаление лидерной последовательности с 5'-конца, концевой с 3'-конца
- **замена нуклеотидов на 3'-конце** последовательностью ЦЦА. Для этого у одних пре-тРНК с 3'-конца удаляются лишние нуклеотиды до «обнажения» триплета ЦЦА, у других идет присоединение этой последовательности.
- **модификация нуклеотидов** в молекуле путем дезаминирования, метилирования, восстановления (образование инозина, метилуридина, псевдоуридина и дигидроуридина)

Процессинг РНК. тРНК



Процессинг РНК. м(и)РНК

Пре-иРНК копирует всю нуклеотидную последовательность ДНК от промотора до терминатора транскриптона.

То есть она включает концевые нетранслируемые области (5' и 3'), интроны и экзоны.

Процессинг пре-иРНК включает в себя:

- кэпирование,
- полиаденилирование,
- сплайсинг,
- некоторые другие процессы (метилирование, редактирование).

Процессинг РНК. м(и)РНК

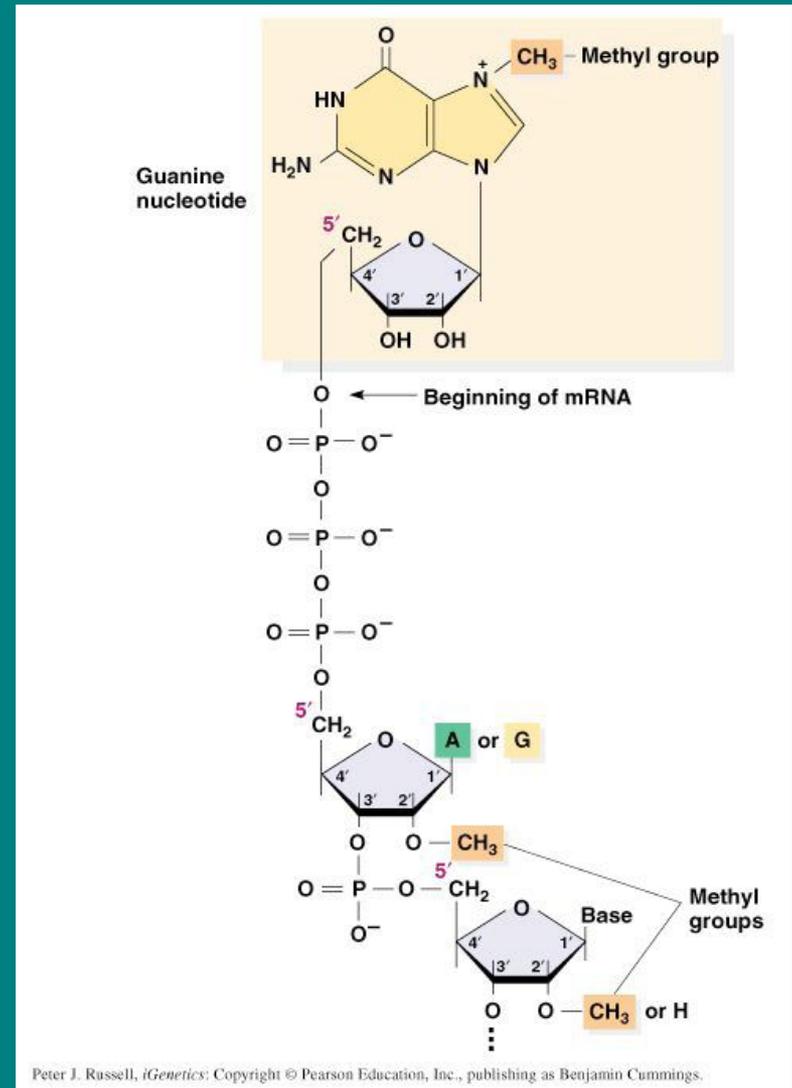
Кэпирование – это присоединение 7-метил-ГТФ (7-метилгуанозинтрифосфат) к 5'-концу РНК, а также метилирование рибозы двух первых нуклеотидов:

- модификации пре-мРНК начинаются на стадии элонгации – ко-транскрипционно,
- когда длина первичного транскрипта достигает примерно 30 нуклеотидных остатков, происходит кэпирование его 5'- конца.

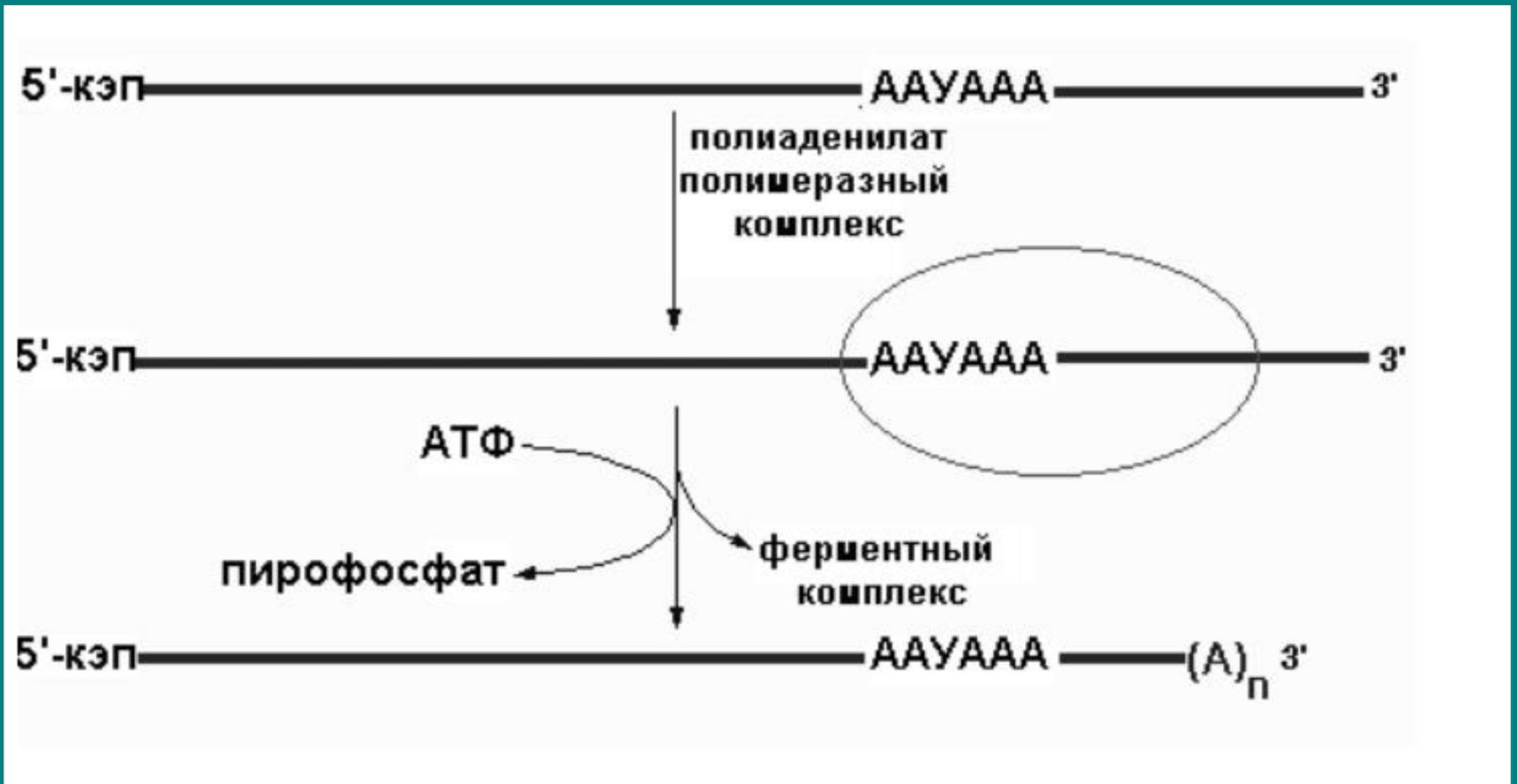
Процессинг РНК. м(и)РНК

Функции:

- защищает 5'-конец мРНК от действия нуклеаз
- обеспечивает правильное расположение мРНК на малой субъединице рибосомы при инициации трансляции
- необходимо для работы сплайсосомы, обеспечивающей удаление интронов



Процессинг РНК. м(и)РНК



Процессинг РНК. м(и)РНК

<https://youtu.be/fMnxyWvyZpY>

Процессинг РНК. м(и)РНК

Сплайсинг – вырезание интронов из пре-мРНК и сшивание экзонов с образованием мРНК

Осуществляется **сплайсосомой** – комплексом белков и малых ядерных РНК (мяРНК):

U1, U2, U4, U5, U6

Процессинг РНК. м(и)РНК

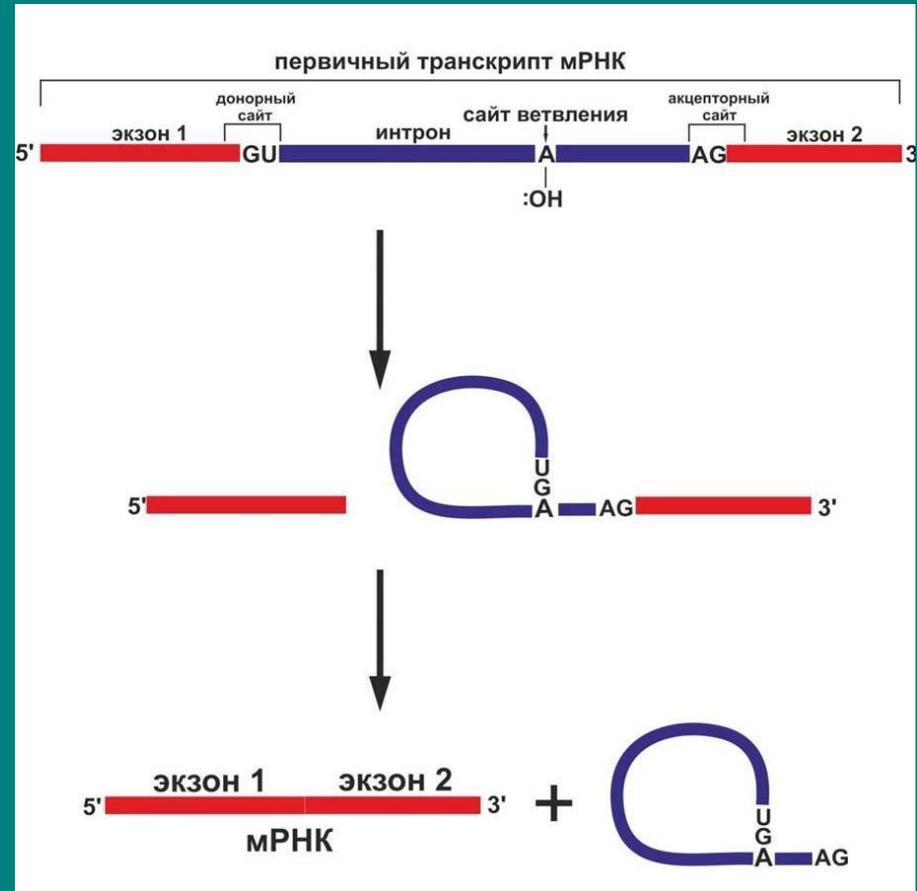
Точное разрезание границы интрон/экзон определяют три типа коротких последовательностей – *сайты сплайсинга*:

- 5'SS (донорный) ехон-G-U
- 3'SS (акцепторный) А-G-ехон
- BS – бранч-сайт (сайт разветвления) – внутри интрона, около 30 нуклеотидов в обратном направлении от сплайс-акцептора А

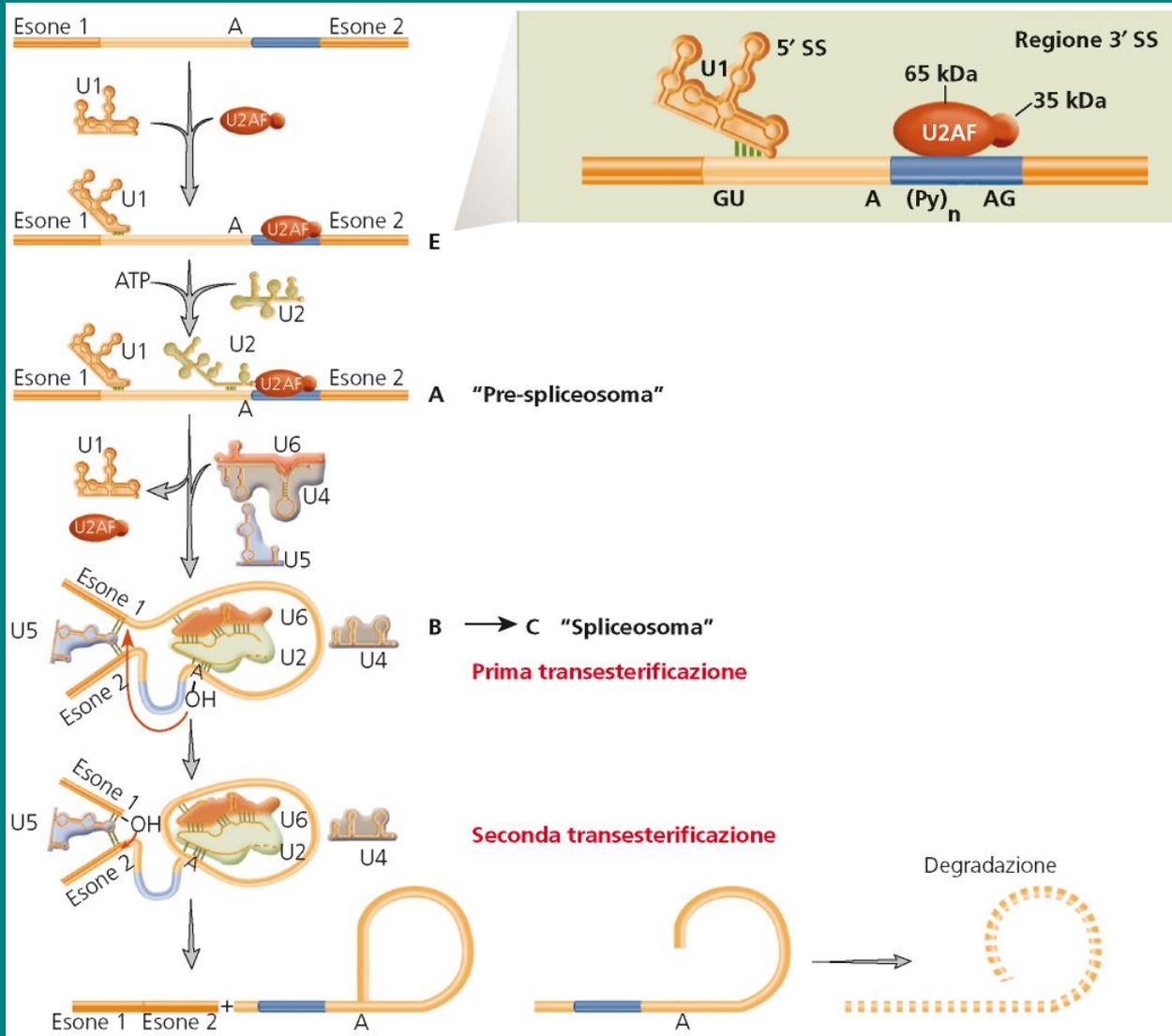


Процессинг РНК. м(и)РНК

В результате экзоны оказываются ковалентно соединенными обычной межнуклеотидной связью, а интрон уходит в виде структуры «лассо»



Процессинг РНК. м(и)РНК

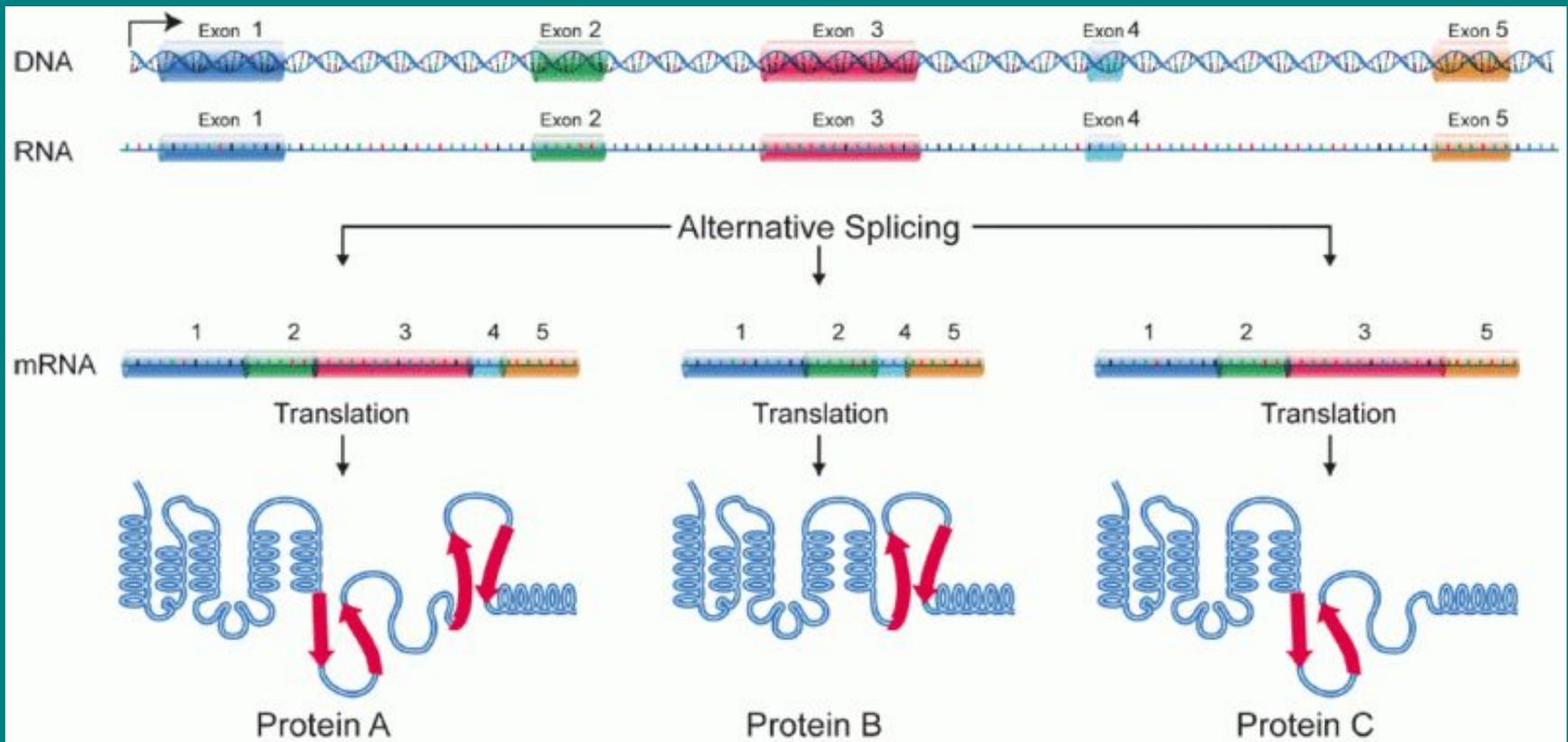


Процессинг РНК. м(и)РНК

<https://youtu.be/vL1P7U5Bhx8>

Процессинг РНК. м(и)РНК

Альтернативный сплайсинг –



Процессинг РНК. м(и)РНК

Функциональное:

- поддержание белкового разнообразия

Человек: ~20.000 генов, >100.000 белков

Разнообразие белков у млекопитающих повысилось не за счет роста числа генов, а за счет развития альтернативного сплайсинга и роста числа изоформ – они разные в разных тканях

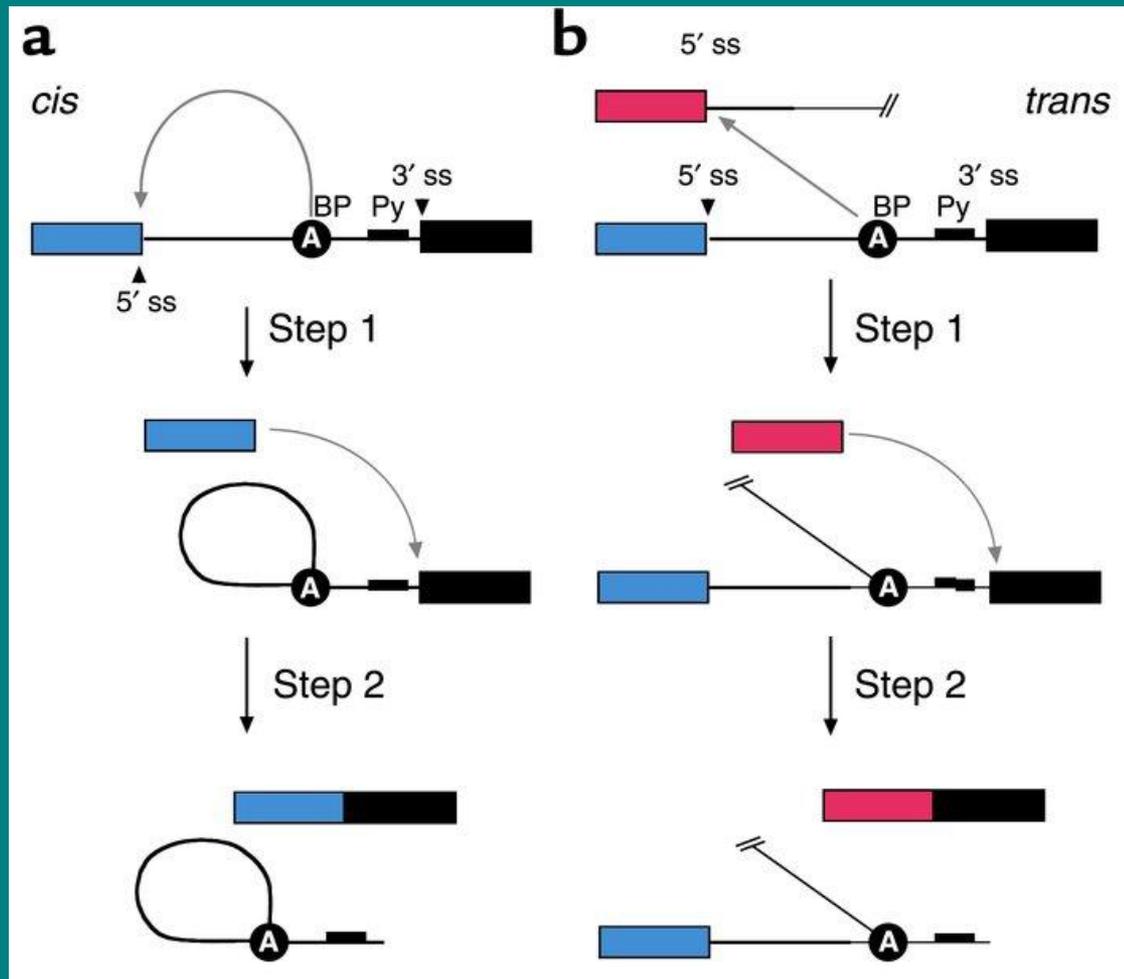
Эволюционное:

- альтернативный сплайсинг – это способ попробовать новые формы белков, не жертвуя старыми

Процессинг РНК. м(и)РНК

Транс-сплайсинг
особая форма процессинга РНК у эукариот, в ходе которого экзоны из двух разных первичных транскриптов РНК соединяются конец к концу

**нематоды,
динофлагелляты**

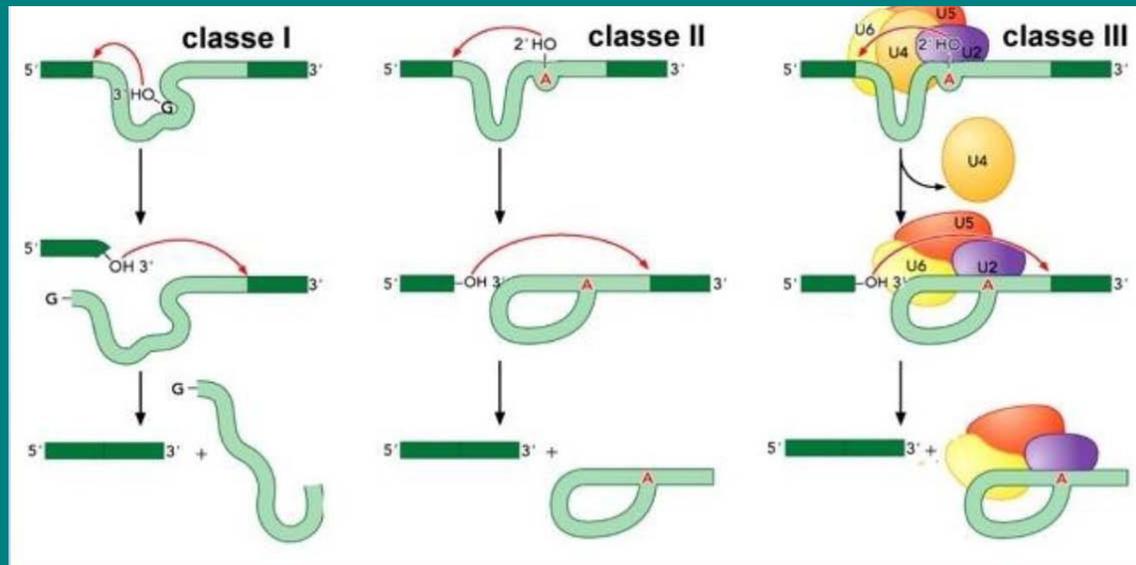


Процессинг РНК. м(и)РНК

Аутосплайсинг –

осуществляется без участия каких-либо белков, катализатором реакции становятся сами интроны РНК

Выявлен для генов рРНК у примитивных эукариот (*Tetrahymena*), мРНК и тРНК митохондрий и хлоропластов



Процессинг РНК. м(и)РНК

Редактирование – это изменение нуклеотидной последовательности РНК

Редактирование РНК включает:

- модификацию азотистых оснований, например, дезаминирование цитозина (С) в уридин (U), аденозина (А) в инозин,
- вставка нуклеотидов без ДНК-матрицы.

Тканеспецифично.

Может быть связано с **деградацией РНК**, может приводить к появлению **новых изоформ белка**, **механизм защиты** от ретротранспозонов.

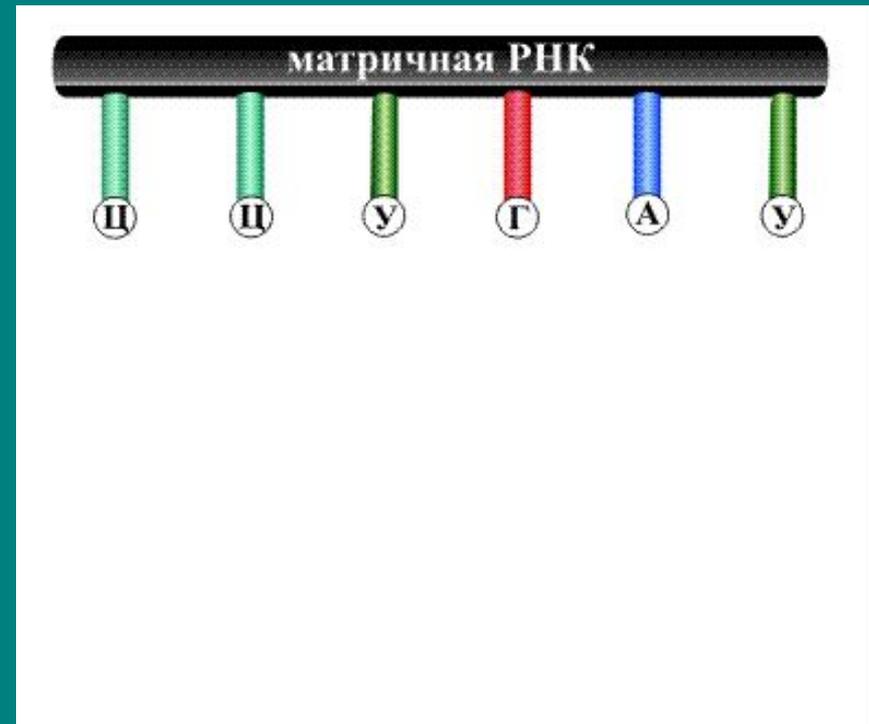
Трансляция мРНК

* синтез белка на рибосомах,
направляемый матрицей РНК

Стадии:

- активация аминокислот, или предварительный этап, или **рекогниция**
- **собственно трансляция:**

- ✓ инициация
- ✓ элонгация
- ✓ терминация



Трансляция мРНК.

Подготовительный этап

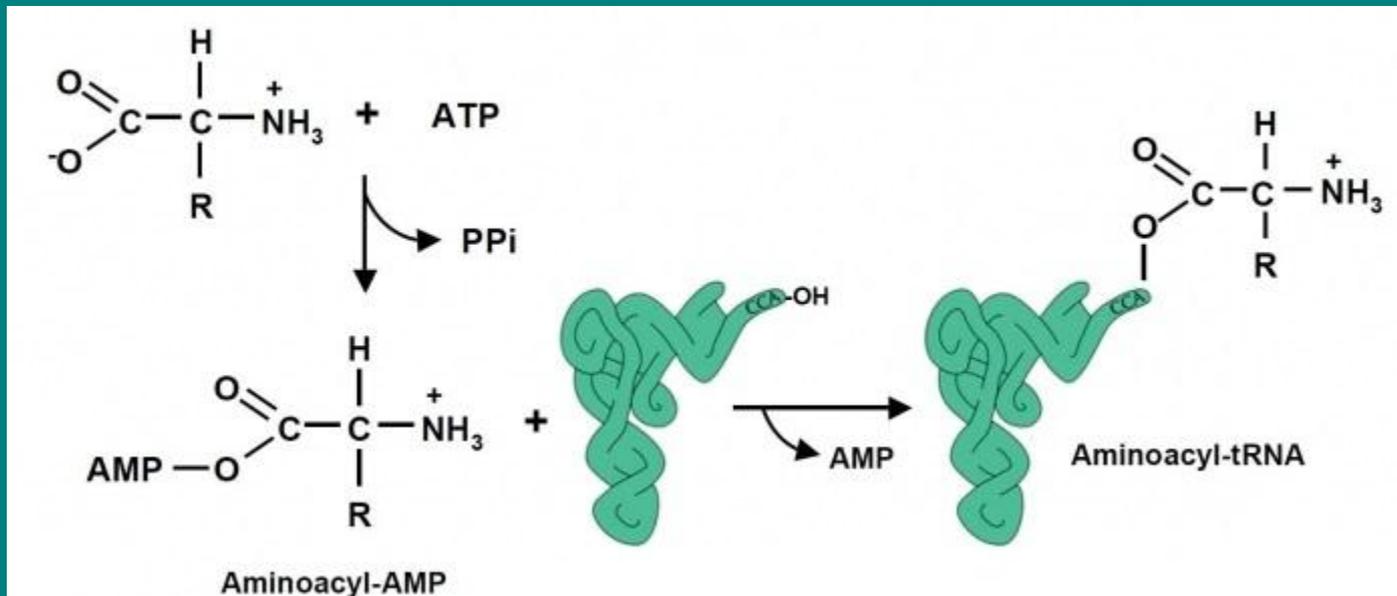
Проходит в цитоплазме

- 1. Активация аминокислот** – взаимодействие аминокислот с АТФ с образованием комплексов (аминоациладенилатов) под воздействием специфических ферментов **аминоацил-тРНК-синтетаз**.
- 2. Аминоацилирование тРНК** – присоединения аминокислотных остатков к тРНК (**аминоацил-тРНК-синтетазы**). Каждый аминокислотный остаток присоединяется к своему специфическому классу тРНК.

Трансляция мРНК.

Подготовительный этап

Для биосинтеза белка в клетке необходимы источники энергии, которые смещали бы равновесие реакции в сторону полимеризации. Таким источником является АТФ. Тратится 2 макроэргические связи. Поэтому энергии аминоксил-тРНК с избытком хватает на образование пептидной связи.



Трансляция мРНК.

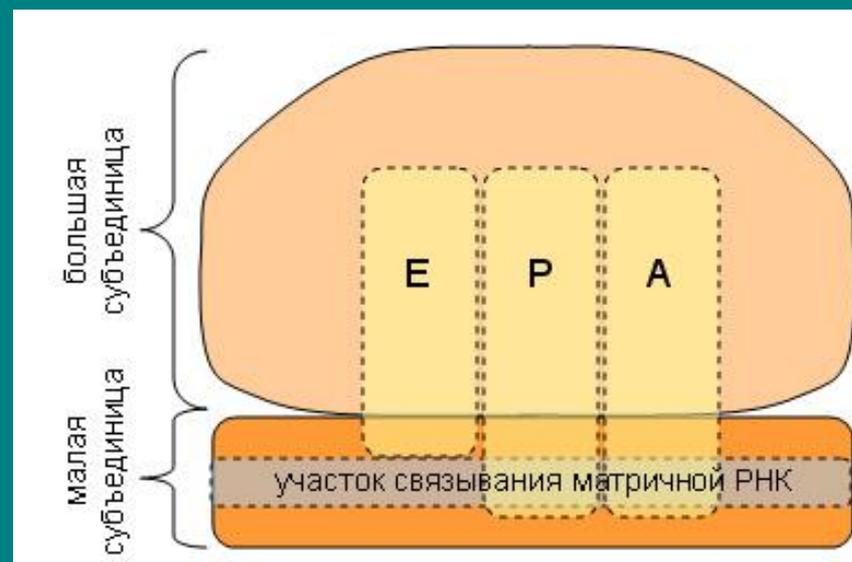
Полимеризация

В рибосоме выделяют

А-участок (аминоацильный),
куда приходят новые
аминоацил-тРНК, и

Р-участок (пептидильный),
где в момент прихода новой
аминоацил-тРНК находится
растущий пептид.

Иногда выделяют также **Е-
участок** (от empty — пустой), в
котором оказываются уже
отдавшие аминокислоту,
«пустые» тРНК.



Трансляция мРНК.

Полимеризация. Инициация

- Связывание малой субъединицы рибосомы с мРНК.
- Нахождение **инициаторного**, или **стартового**, кодона АУГ, как правило, это первый АУГ с 5'-конца мРНК
- Установка метионил-тРНК (или формилметионил-тРНК у прокариот) в **P-участок рибосомы**, привлечение следующей аминоацил-тРНК, присоединение большой субъединицы и сборка полной рибосомы. Процесс инициации обеспечивается специальными белками – **факторами инициации**.

Трансляция мРНК.

Полимеризация. Инициация

Механизмы инициации трансляции у про- и эукариот существенно отличаются:

- **прокариотические рибосомы** потенциально способны находить стартовый AUG и инициировать синтез на любых участках мРНК,
- **эукариотические рибосомы** обычно присоединяются к мРНК в области кэпа и сканируют её в поисках стартового кодона.

Трансляция мРНК.

Полимеризация. Инициация

Прокариоты:

- присоединение к МС рибосомы факторов инициации IF2-GTP (взаимодействует с тРНК), IF1 (повышает сродство МС к IF2-GTP, IF3), IF3 (препятствует связыванию с БС)
- узнавание МС последовательности Шайна-Дальгарно на мРНК (комплементарное связывание с 16SpРНК)
- узнавание стартового кодона АУГ
- присоединение инициаторной тРНК с первой АК
- присоединение БС, гидролиз ГТФ, диссоциация инициаторных факторов

Последовательность Шайна-Дальгарно (англ. Shine-Dalgarno sequence, Shine-Dalgarno box) – сайт связывания рибосом на молекуле мРНК прокариот, обычно на расстоянии около 10 нуклеотидов до стартового кодона АУГ.

Трансляция мРНК.

Полимеризация. Инициация

Эукариоты:

а) кепзависимый (сканирующий) механизм:

- присоединение МС рибосомы с иницирующими факторами eIF3, eIF1 и eIF2/GTP/Met-tRNA^{iMet} к 5-концу в области кепка, движение вдоль молекулы м РНК
- узнавание МС рибосомы последовательности Козак на мРНК и стартового кодона АУГ
- присоединение инициаторной тРНК с первой АК
- присоединение большой субъединицы, гидролиз ГТФ, диссоциация инициаторных факторов

Консенсусная последовательность Козак – последовательность в мРНК – включает 4-6 нуклеотидов, предшествующих старт-кодону, и один-два нуклеотида непосредственно после старт-кодона.

Трансляция мРНК.

Полимеризация. Инициация

Эукариоты:

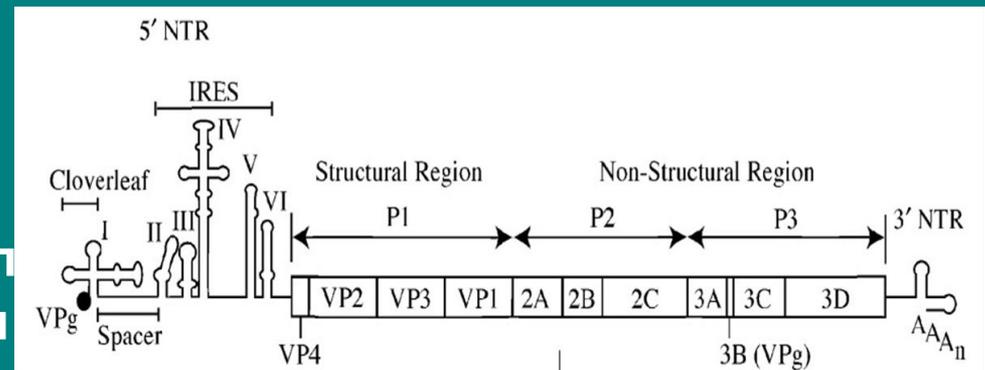
б) кепнезависимый (внутренняя инициация) механизм:

- присоединение МС рибосомы с иницирующими факторами на внутренний участок мРНК – IRES (хорошо выражена вторичная структура), которые чаще всего располагаются в 5'-нетранслируемой области (5'-НТО) недалеко от сайта инициации трансляции, минуя стадии узнавания кэпа и сканирования
- присоединение инициаторной тРНК с первой АК
- присоединение большой субъединицы, гидролиз ГТФ, диссоциация инициаторных факторов

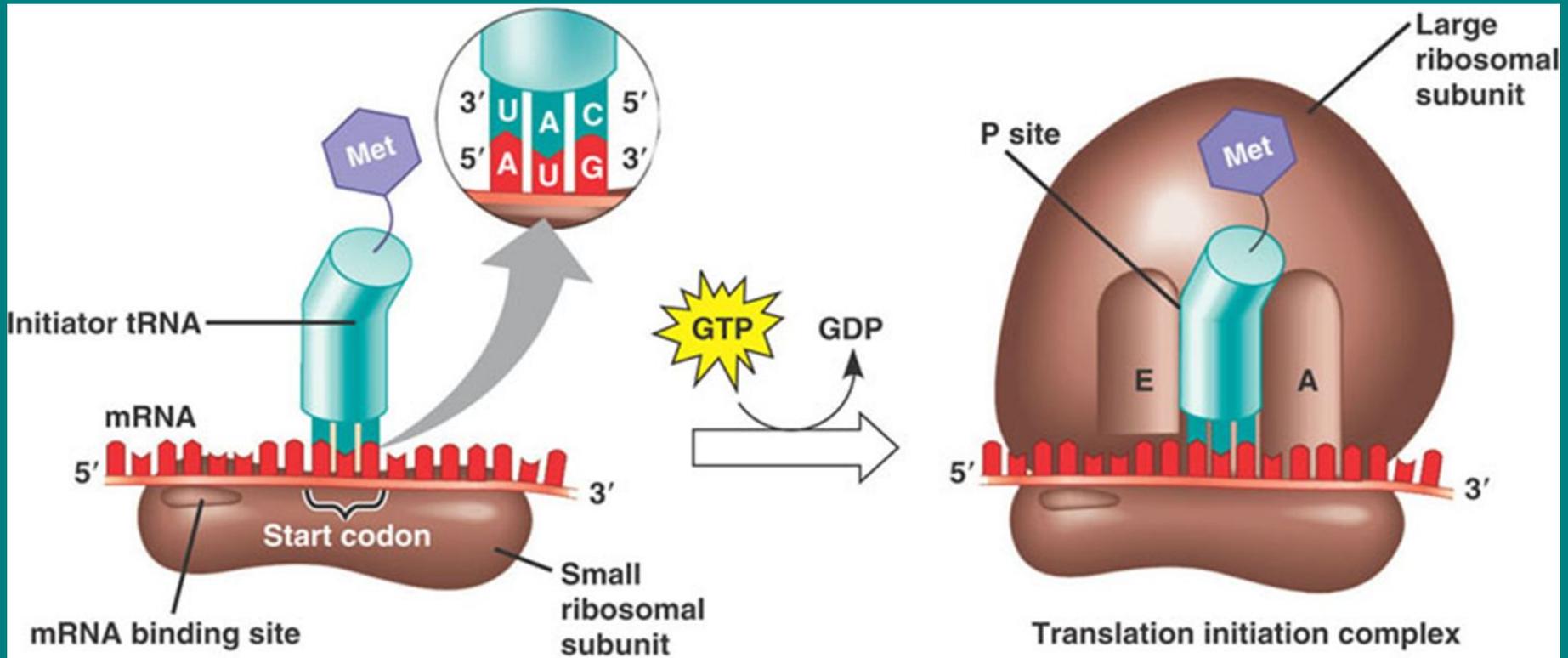
Трансляция мРНК.

Полимеризация. Инициация

В клетках IRES отвечают за посадку рибосом как на кэпированные, так и на некэпированные транскрипты в тех случаях, когда кэпзависимая инициация трансляции заингибирована (при стрессе, на определённой стадии клеточного цикла или при апоптозе), и тем самым обеспечивают непрерывный синтез необходимых белков.



Трансляция мРНК. Полимеризация. Инициация



Трансляция мРНК.

Полимеризация. Элонгация

Представляет собой цикл из 3 повторяющихся событий:

- **присоединение новой аминоацил-тРНК в А-участок** в соответствии с кодоном, который там оказался (кодон мРНК комплементарен антикодону тРНК)
- **образование пептидной связи – транспептидация** – с **перевешиванием растущего пептида** с тРНК в Р-участке на **новопришедшую аминоацил-тРНК в А-участке** за счет каталитической активности БС рибосомы (работает как рибозим)
- **транслокация** – шаг рибосомы на один триплет в сторону 3'-конца мРНК. Всё, что было в А-участке, оказывается в Р-участке, а А-участок теперь свободен для присоединения новой аминоацил-тРНК. Свободная тРНК уходит через Е-сайт

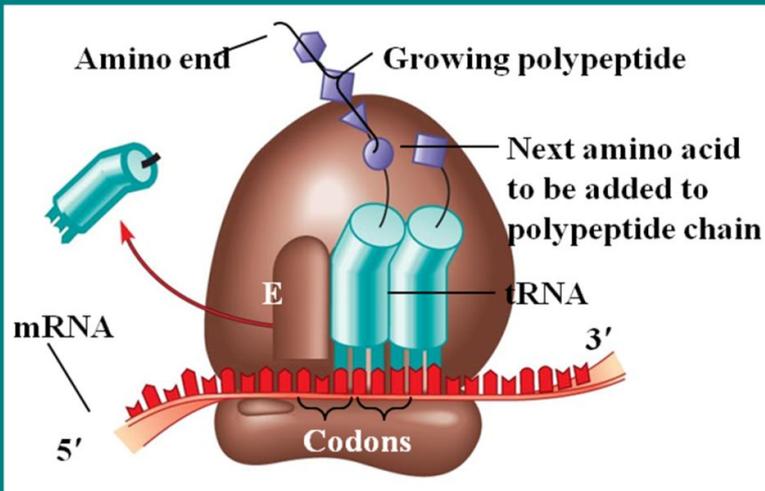
Трансляция мРНК.

Полимеризация. Элонгация

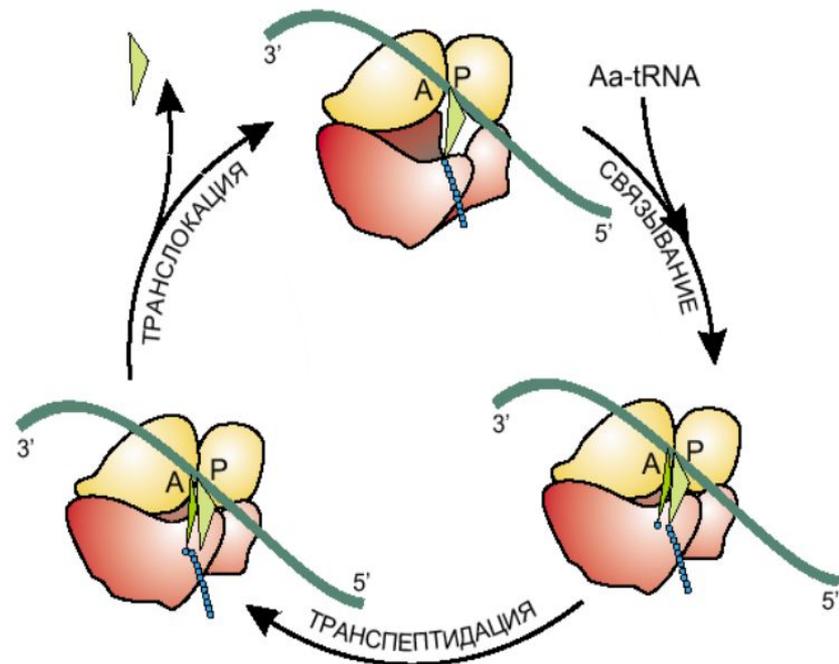
Факторы элонгации:

- Первый фактор – EF1a у эукариот, EF-Tu – у прокариот – переносит аминоацилированную («заряженную» аминокислотой) тРНК в А-сайт рибосомы.
- Второй белок – EF2 у эукариот, EF-G – у прокариот катализирует транслокацию.

Трансляция мРНК. Полимеризация. Элонгация



РАБОЧИЙ (ЭЛОНГАЦИОННЫЙ) ЦИКЛ РИБОСОМЫ

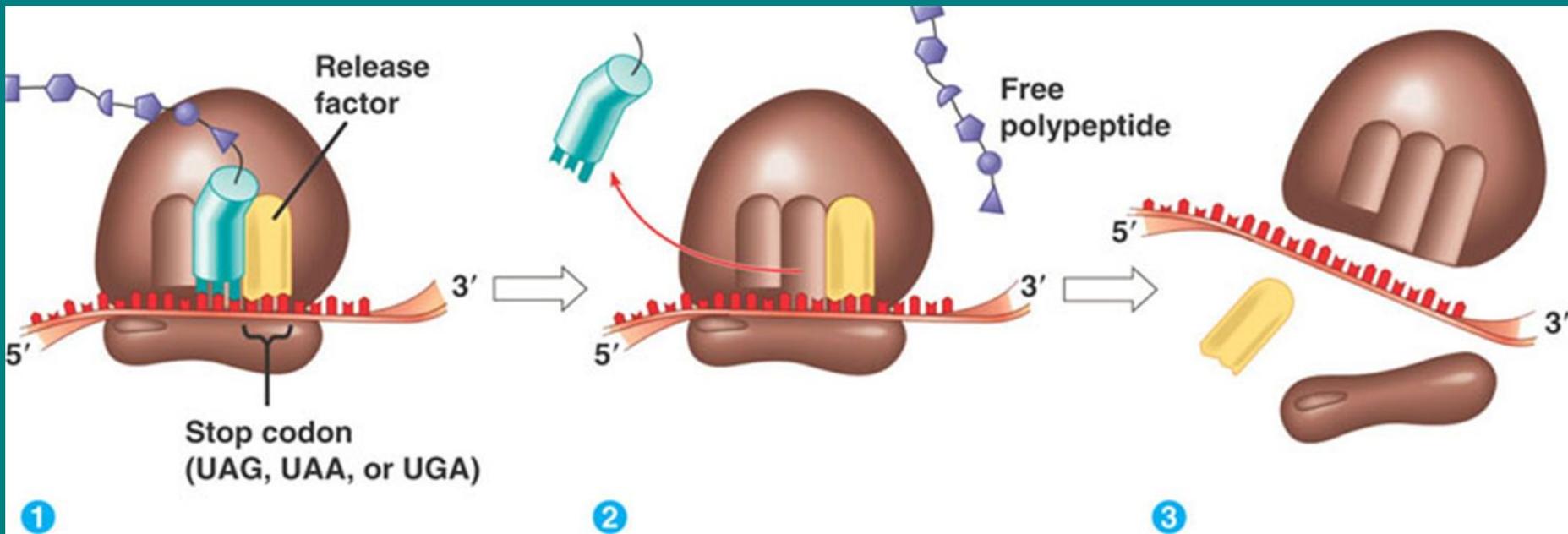


Трансляция мРНК.

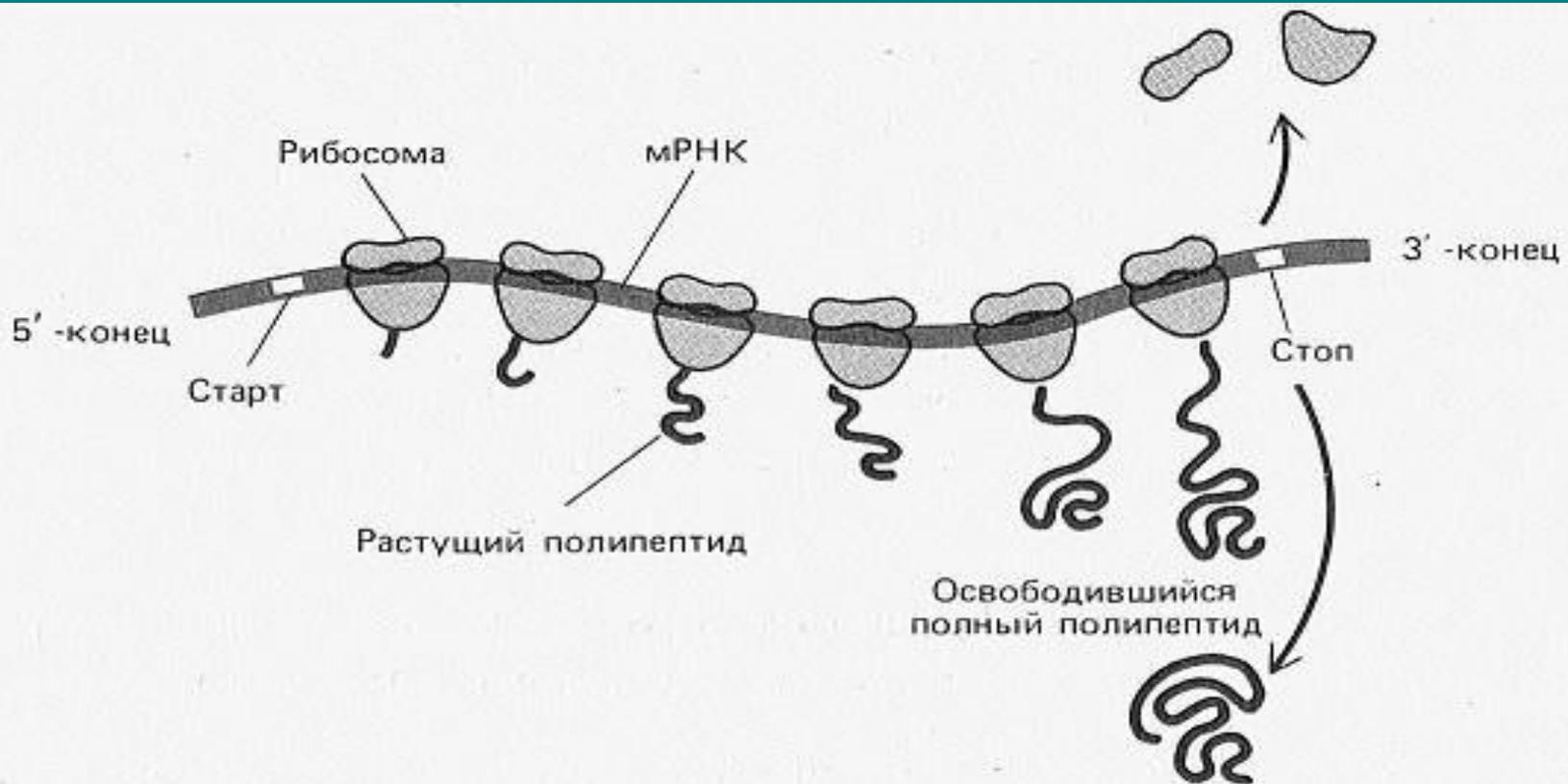
Полимеризация. Терминация

- Окончание синтеза белка, осуществляется, когда в А-сайте рибосомы оказывается один из **стоп-кодонов** – УАГ, УАА, УГА.
- Из-за отсутствия тРНК , соответствующих этим кодоном, пептидил-тРНК остаётся связанной с Р-сайтом рибосомы. Здесь в действие вступают специфические белки RF1 или RF2, которые катализируют отсоединение полипептидной цепи от мРНК, а также RF3, который вызывает диссоциацию мРНК из рибосомы. RF1 узнаёт в А-участке УАА или УАГ; RF-2 – УАА или УГА.
- С УАА терминация эффективнее, чем с другими стоп-кодонами.

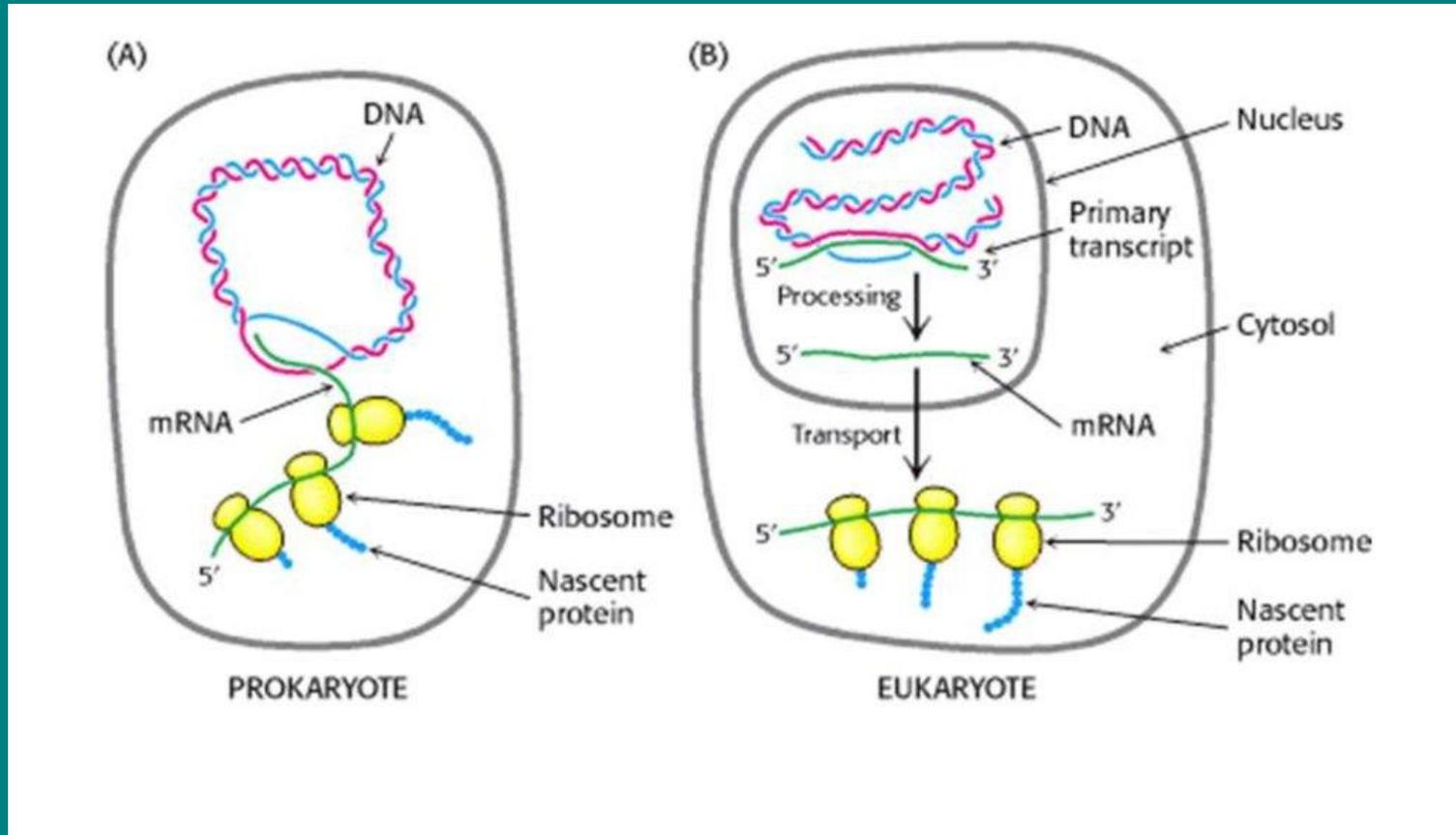
Трансляция мРНК. Полимеризация. Терминация



Трансляция мРНК. Полимеризация



Трансляция мРНК. Локация



Посттрансляционная модификация

Посттрансляционная модификация – это ковалентная химическая модификация белка после его синтеза на рибосоме

Завершает процесс биосинтеза белка!

Увеличивает разнообразие белков в клетке!

- Известно более двухсот вариантов посттрансляционной модификации белков
- Модификациям подвергается подавляющее большинство белков
- Один и тот же белок может подвергаться нескольким различным модификациям

Посттрансляционная модификация

К основным реакциям процессинга относятся:

- **удаление с N-конца** метионина или даже нескольких аминокислот специфичными **аминопептидазами**
- **образование дисульфидных мостиков** между остатками цистеина
- **частичный протеолиз** – удаление части пептидной цепи, как в случае с инсулином или протеолитическими ферментами ЖКТ
- **объединение протомеров** в единый олигомерный белок (гемоглобин, коллаген, лактатдегидрогеназа, креатинкиназа)

Посттрансляционная модификация

- **присоединение химической группы** к аминокислотным остаткам белковой цепи:
 - ✓ **фосфорной кислоты** – к сер, тре, тир используется при регуляции активности ферментов или для связывания Са
 - ✓ **карбоксильной группы** – при участии витамина К происходит γ -карбоксилирование глутамата в составе факторов свертывания, что позволяет связывать Са
 - ✓ **метильной группы** – метилирование аргинина и лизина в составе гистонов используется для регуляции активности генома
 - ✓ **гидроксильной группы** – к лизинам и пролину необходимо для созревания молекул коллагена при участии витамина С,
 - ✓ **йода** – необходимо для образования предшественников тиреоидных гормонов йодтиронинов

Посттрансляционная модификация

- включение простетической группы:
- ✓ **углеводных остатков** – гликирование требуется при синтезе гликопротеинов.
- ✓ **гема** – при синтезе гемоглобина, миоглобина, цитохромов, каталазы,
- ✓ **витаминовых коферментов** – биотина, ФАД, пиридоксальфосфата и т.п.

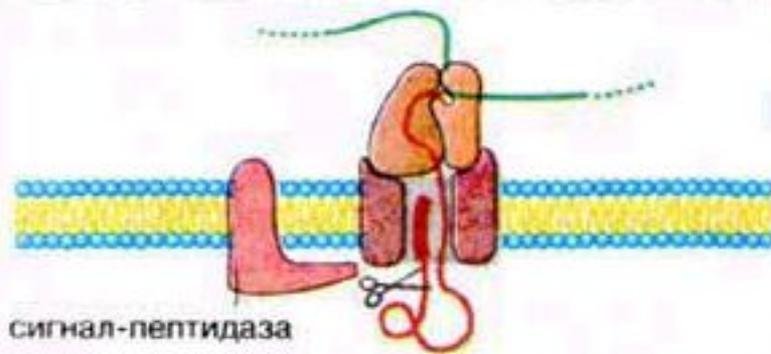
Посттрансляционная модификация

Фолдинг – это процесс укладки вытянутой полипептидной цепи в правильную трехмерную пространственную структуру.

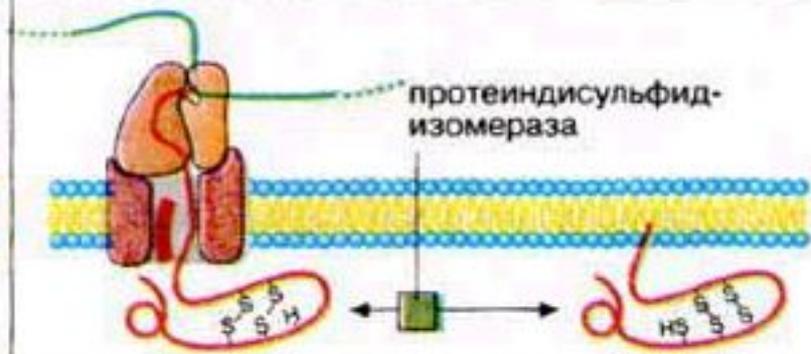
Для обеспечения фолдинга используется группа вспомогательных белков под названием **шапероны** (*chaperon*, франц. – спутник, нянька).

Они предотвращают взаимодействие новосинтезированных белков друг с другом, изолируют гидрофобные участки белков от цитоплазмы и «убирают» их внутрь молекулы, правильно располагают белковые домены.

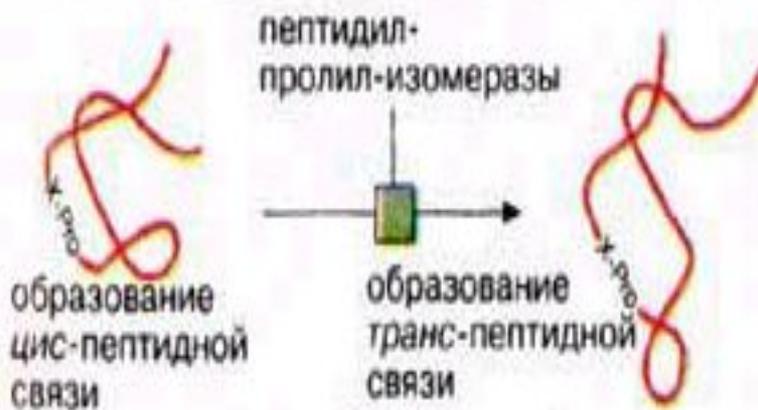
Посттрансляционная модификация



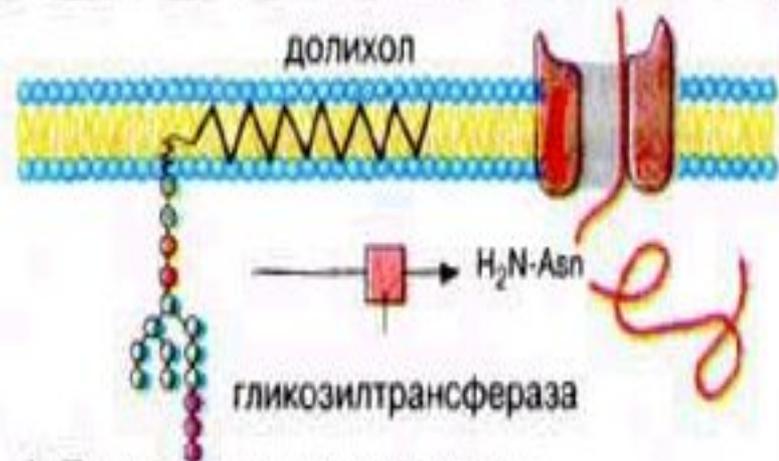
1. Отщепление сигнального пептида



2. Перестройка дисульфидных мостиков

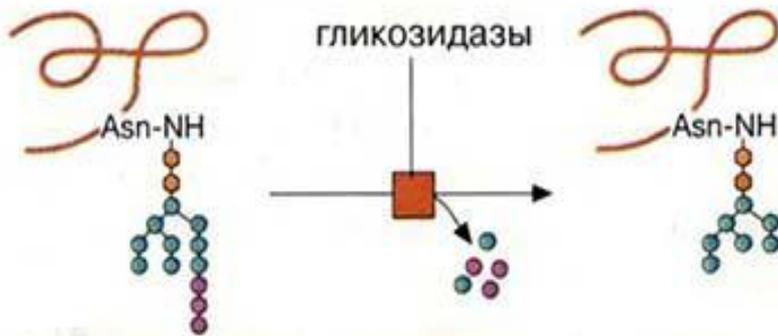


3. Изомеризация X-Pro-связей

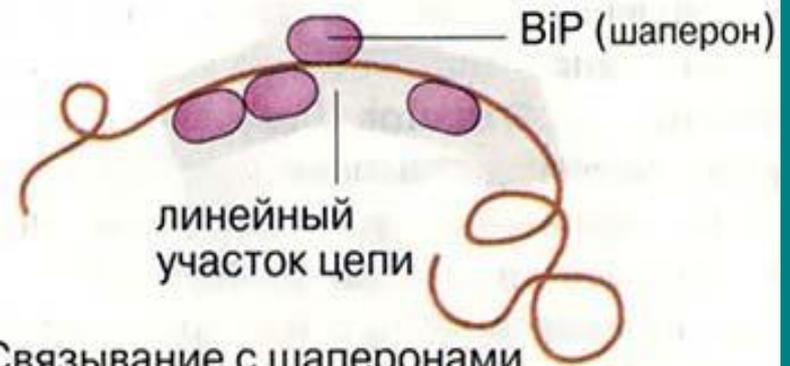


4. Перенос олигосахаридов

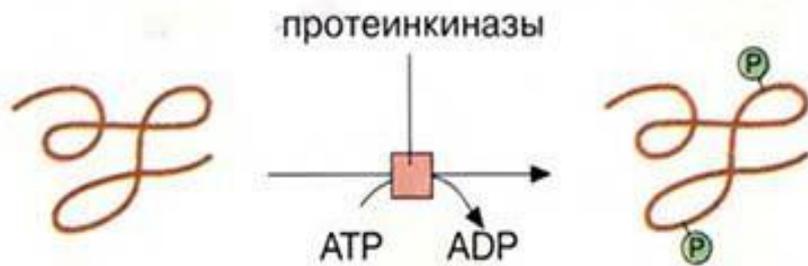
Посттрансляционная модификация



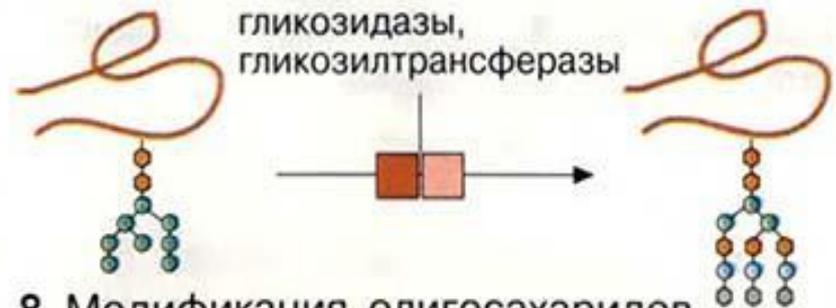
5. Укорачивание олигосахаридов



6. Связывание с шаперонами

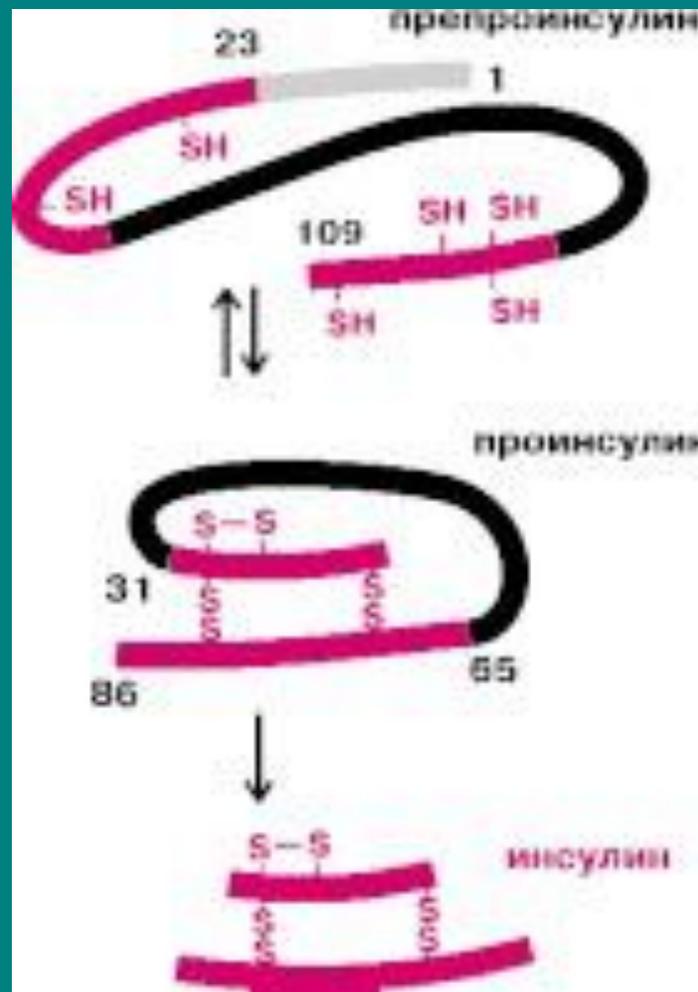


7. Фосфорилирование



8. Модификация олигосахаридов

Посттрансляционная модификация



• Крошка Ши •

