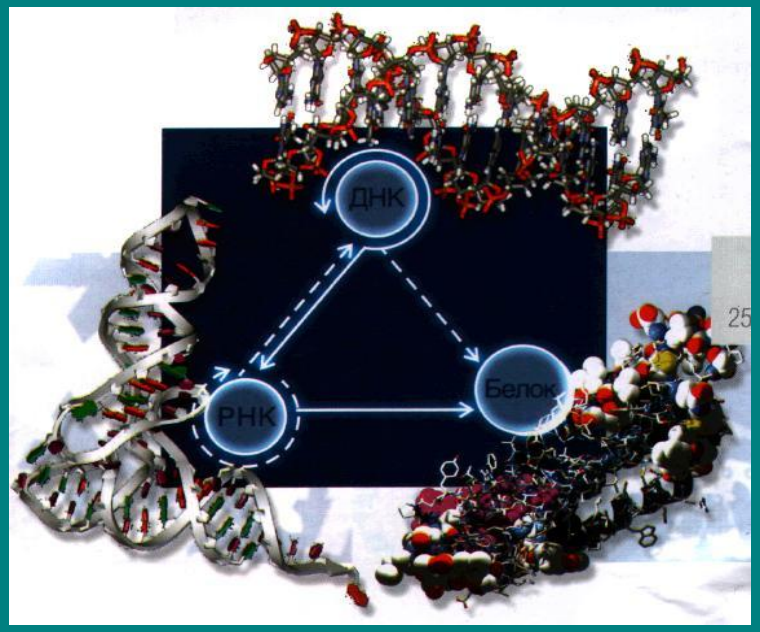
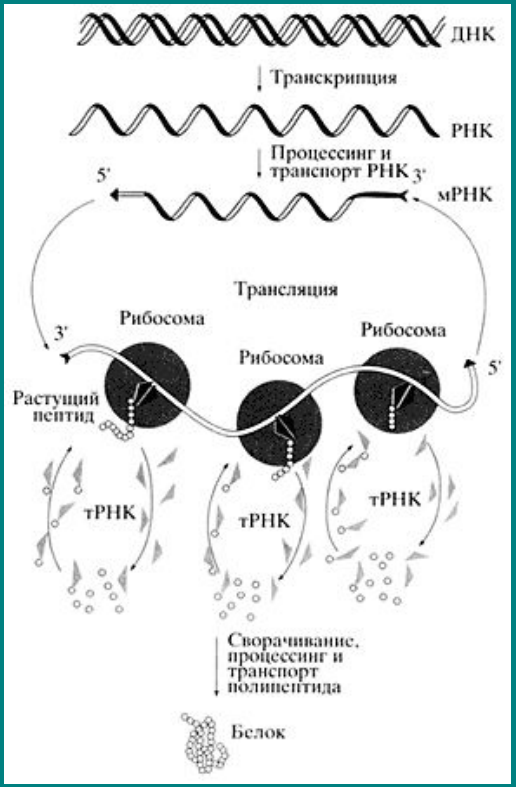
Молекулярно-генетический уровень жизни



Реализация генетической информации: матричные процессы



Экспрессия гена

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

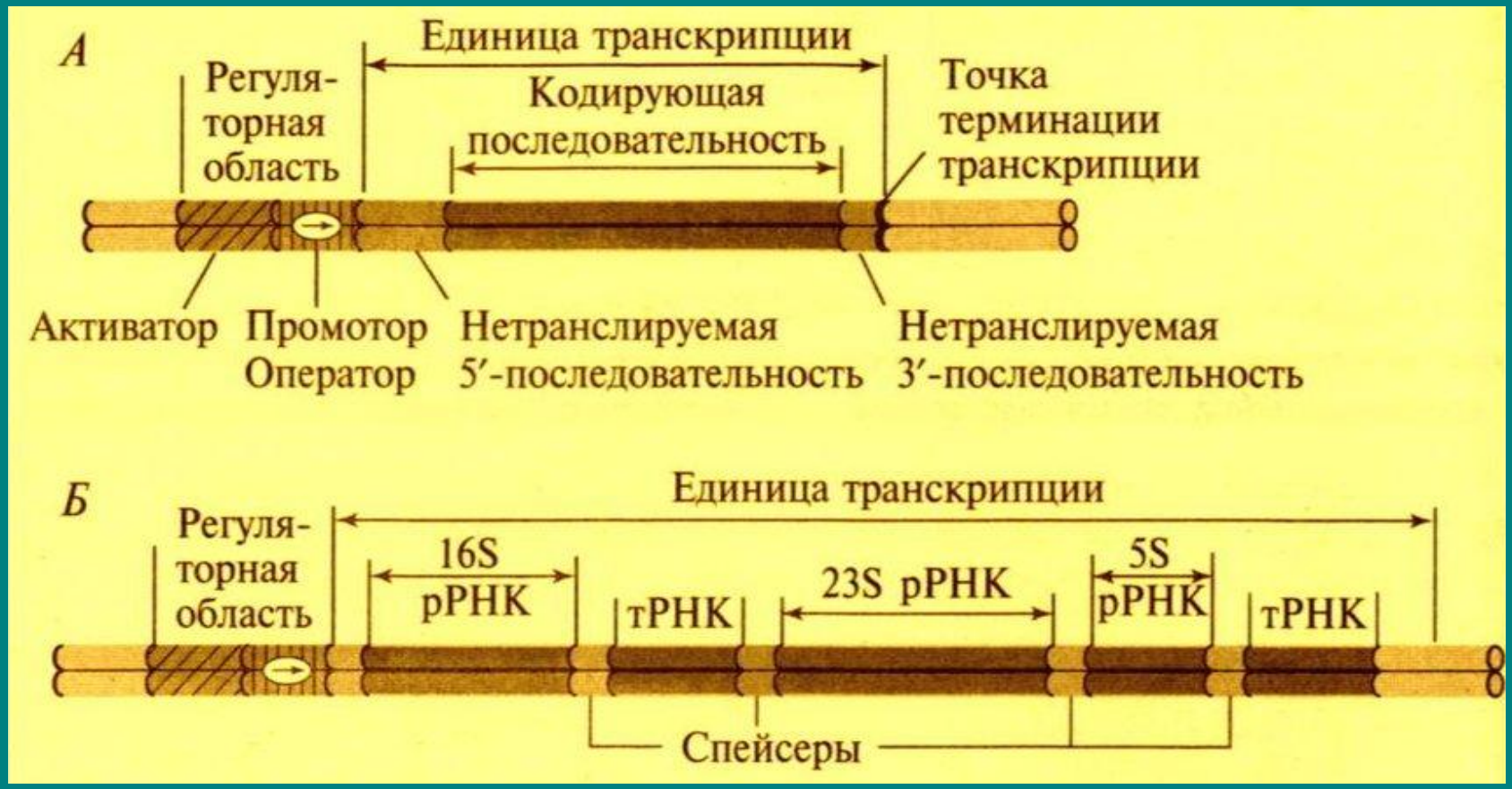
Этапы экспрессии генов:

- транскрипция,
- процессинг РНК,
- трансляция,

Основные отличия организации генов прокариот и эукариот

ПРОКАРИОТЫ	ЭУКАРИОТЫ
1. ДНК кольцевая	1. Ядерная ДНК линейная
2. Гены собраны в кластеры – опероны	2. Опероны практически отсутствуют
3. Интроны отсутствуют	3. Есть деление на экзоны и интроны
4. Трансляция сопряжена с транскрипцией	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.

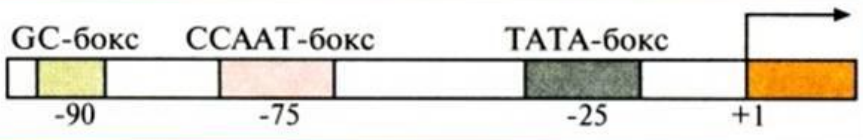
Молекулярный механизм действия энхансера заключается в том, что он благодаря собранному на нём белковому комплексу привлекает РНК-полимеразу и кофакторы транскрипции в область промотора

Организация генов прокариот
промотор

Организация генов эукариот - транскриптон

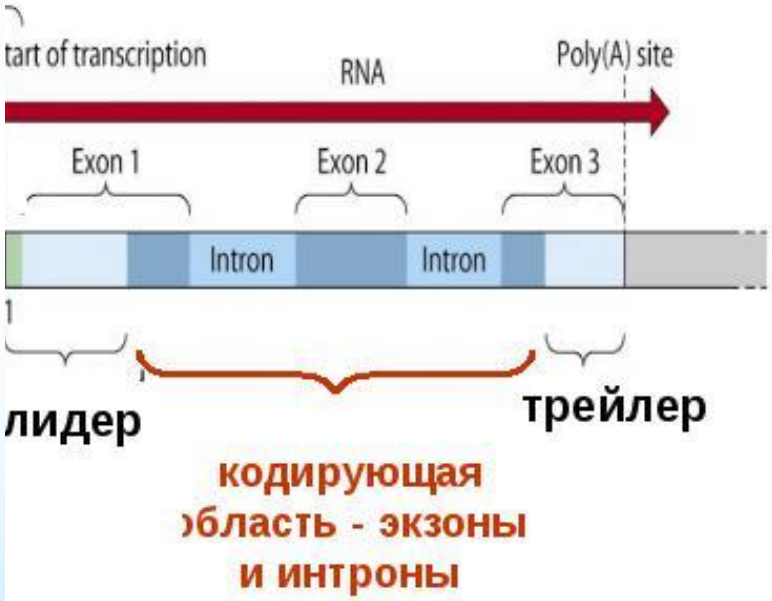
- более сложное строение регуляторного участка
- один структурный ген
- интронно-экзонная организация структурного гена
- сайленсеры – последовательность ДНК, с которой связываются белки-репрессоры (факторы транскрипции). Связывание белков-репрессоров с сайленсерами приводит к понижению или к полному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

Организация генов эукариот - транскриптон



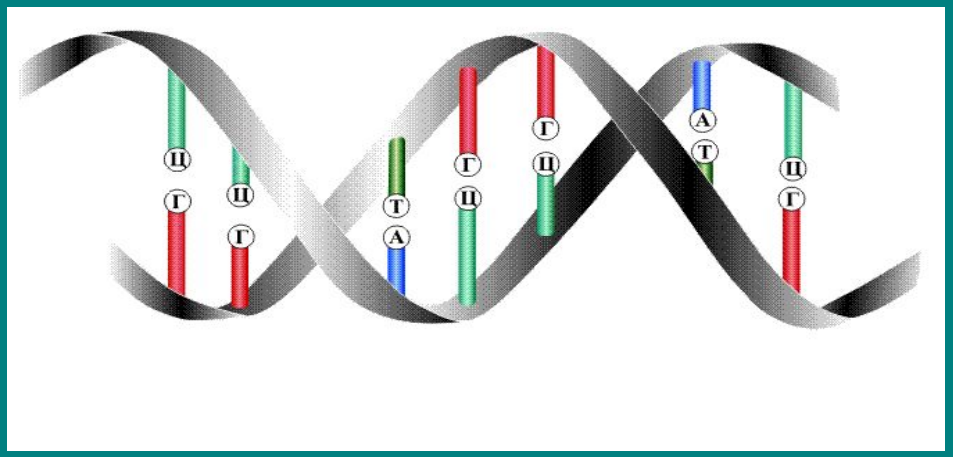
Каждый структурный ген эукариот имеет промоторный участок (ТАТА-бокс, или бокс Хогнесса) из 8 нуклеотидов, включающий последовательность ТАТА.

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



Транскрипция ДНК

*** Перенос информации на РНК**



<u>Транскрибируется:</u>

- **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**

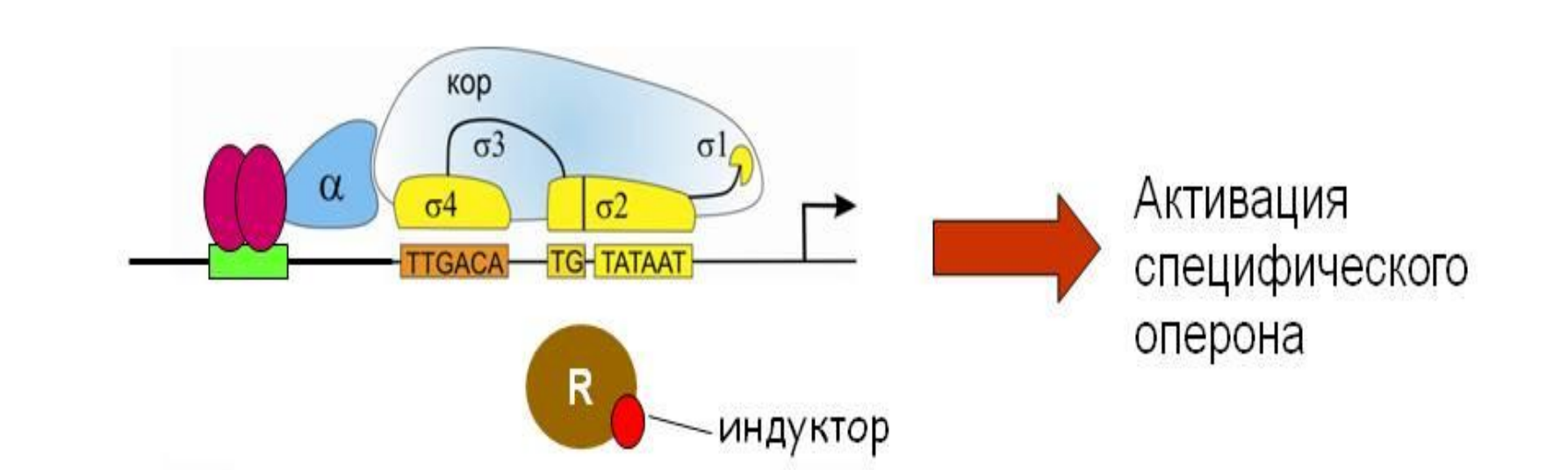
РНК-полимеразы митохондрий и пластид

У прокариот одна РНК-полимераза

Инициация транскрипции

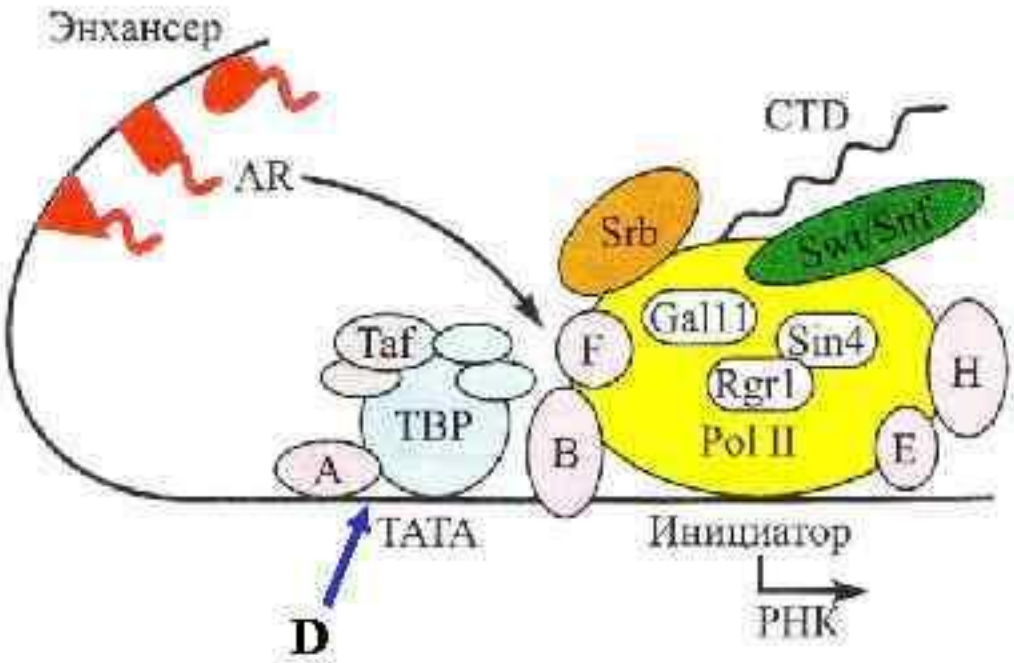
первый этап транскрипции, в ходе которого происходит связывание РНК-полимеразы с промотором и образование первой межнуклеотидной связи

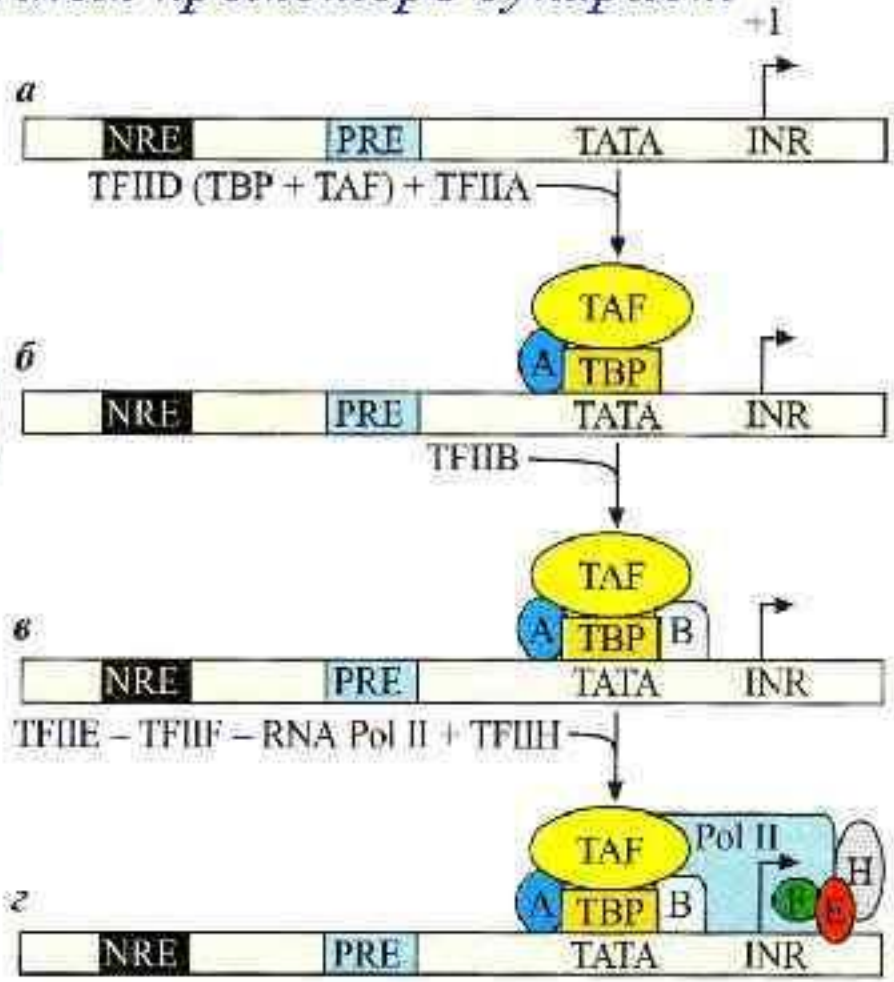
Инициация транскрипции - прокариоты



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

Расположение белков в типичном промоторе эукариот





Сборка общего транскрипционного комплекса
а — 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

Общие факторы транскрипции PolII к настоящему времени выделены и очищены. Их шесть: TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF и TFIIH (или, по другим данным, семь: +TFIIJ).

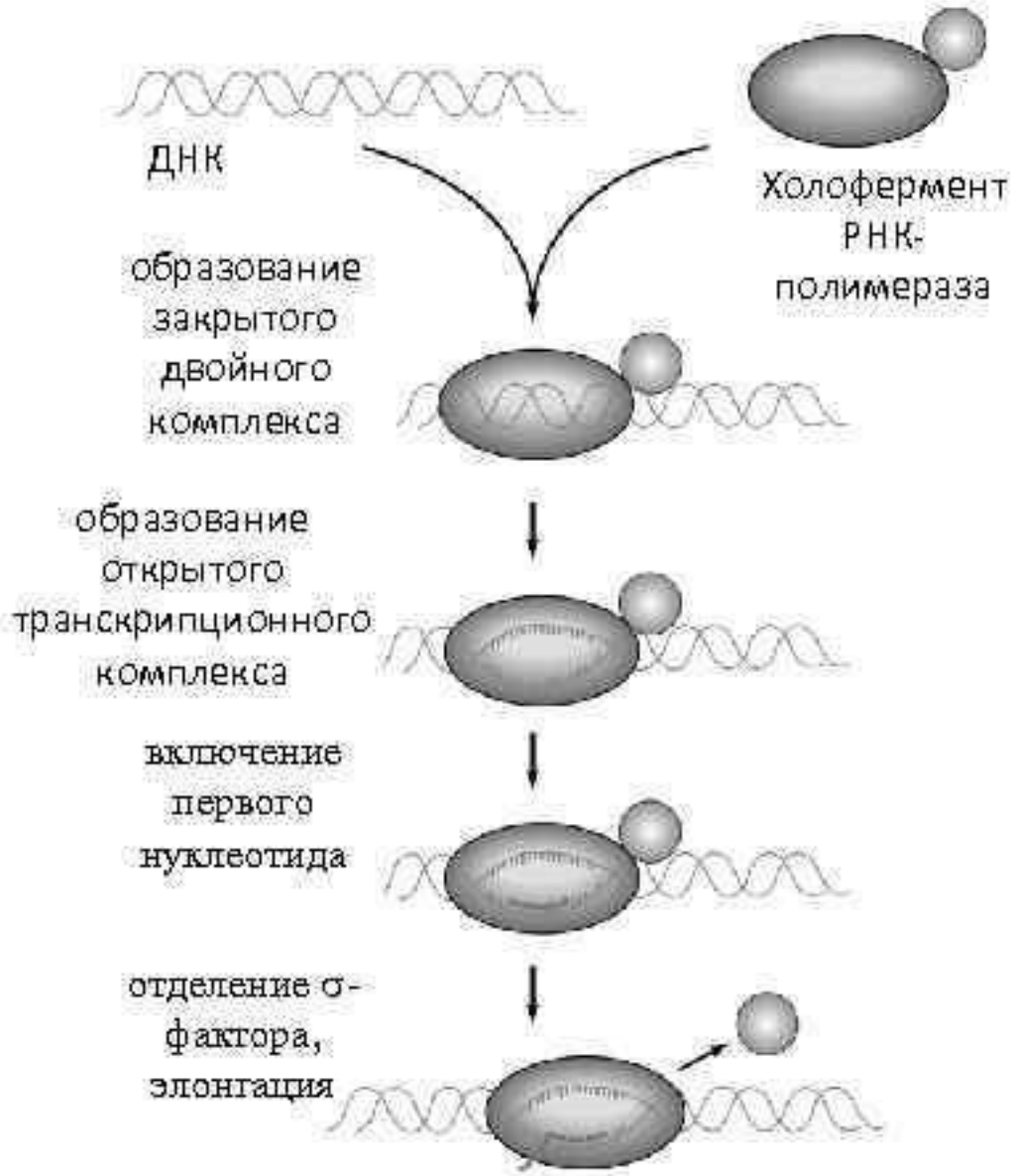
Одна из субъединиц TFIIH обладает протеинкиназной активностью

Инициация транскрипции - эукариоты

- Промоторы эукариот устроены более сложно, чем прокариотические, и состоят из нескольких элементов. Из низ 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

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);

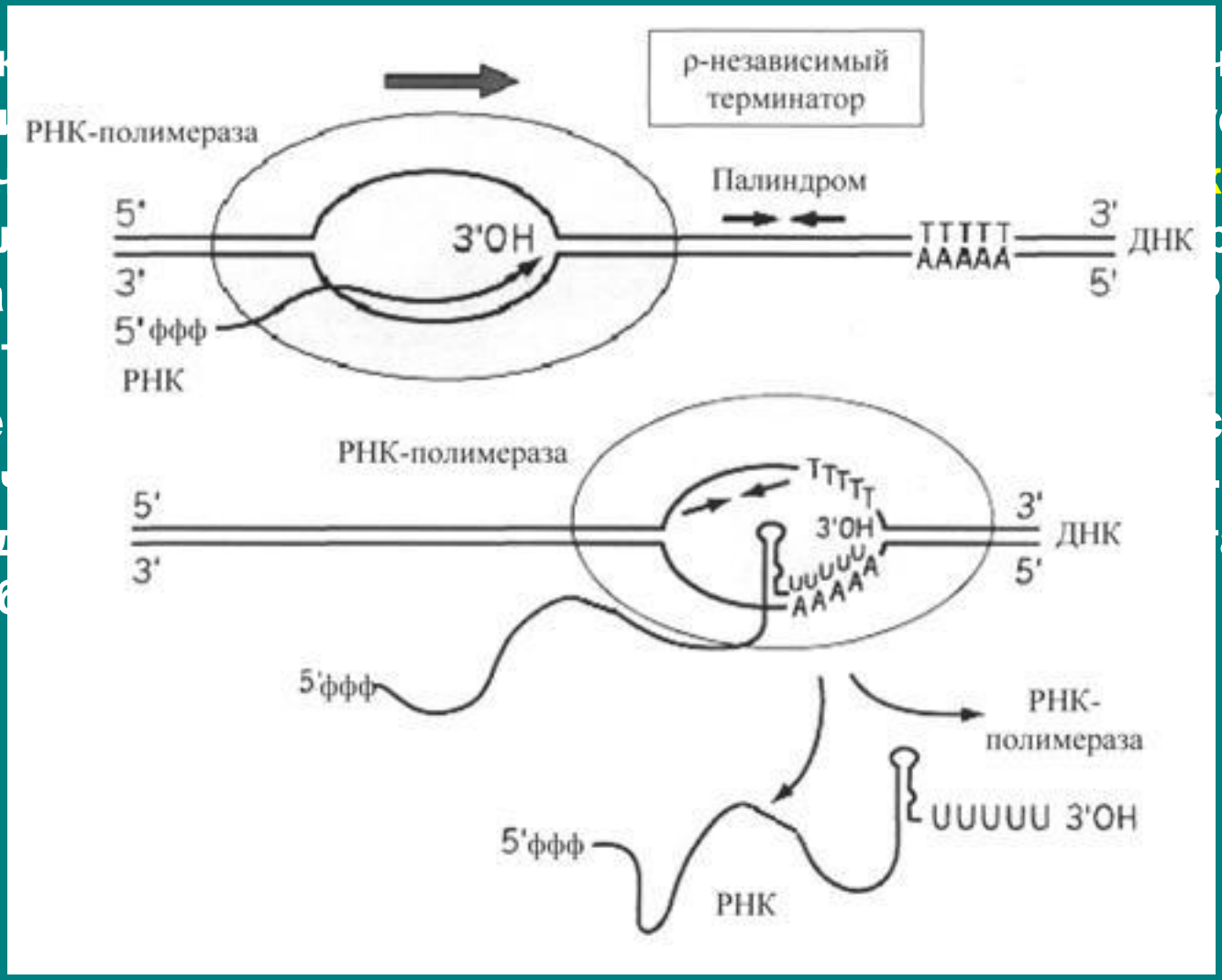
ρ - зависимые терминаторы (II типа).

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).

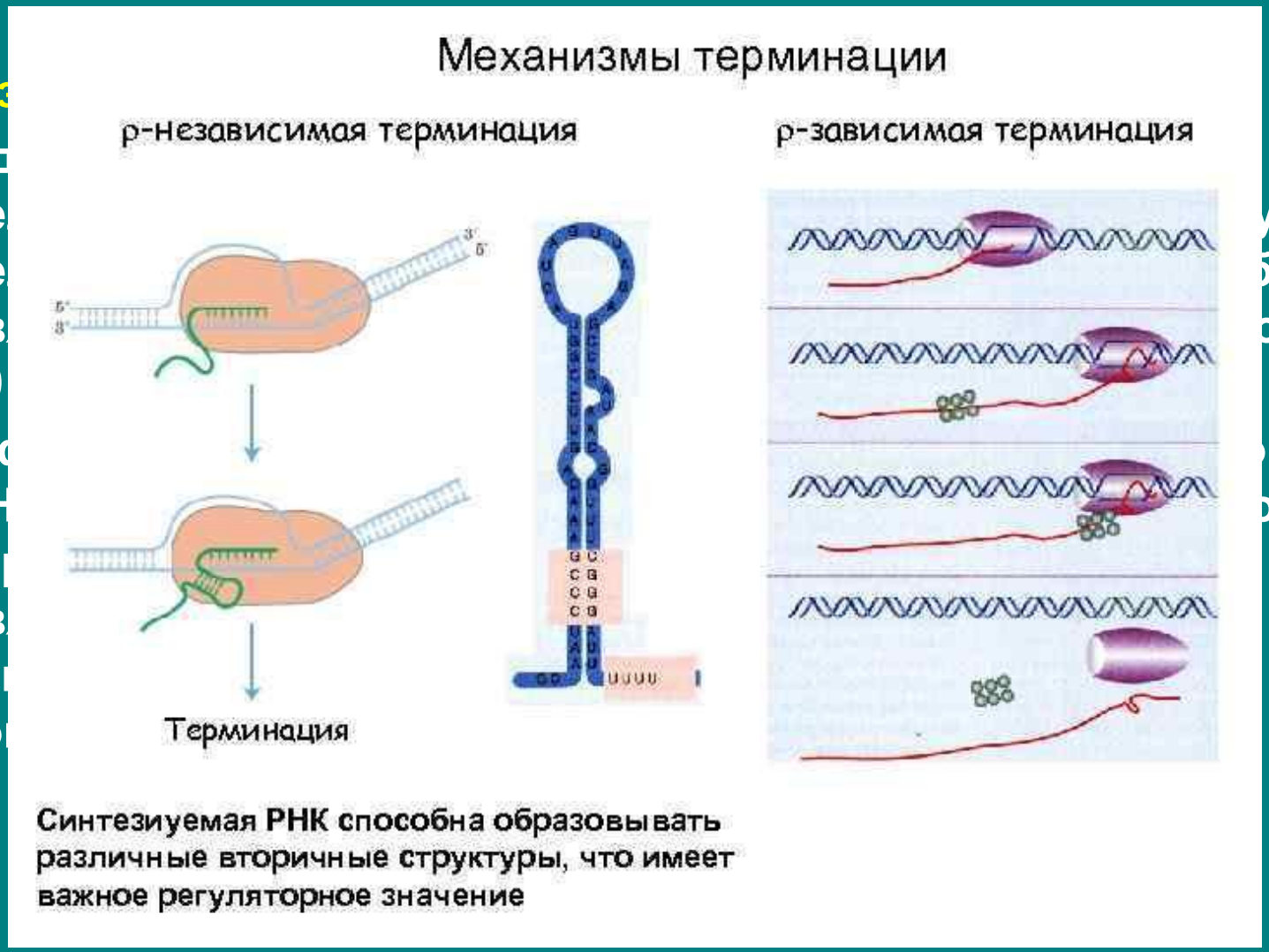
Терминация транскрипции

- Транск нто в получ ется устойч ка» – спира оные Г-Ц-па НК в откры
- Кроме сти в матри РНК- гибрид также способ



Терминация транскрипции

- 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:

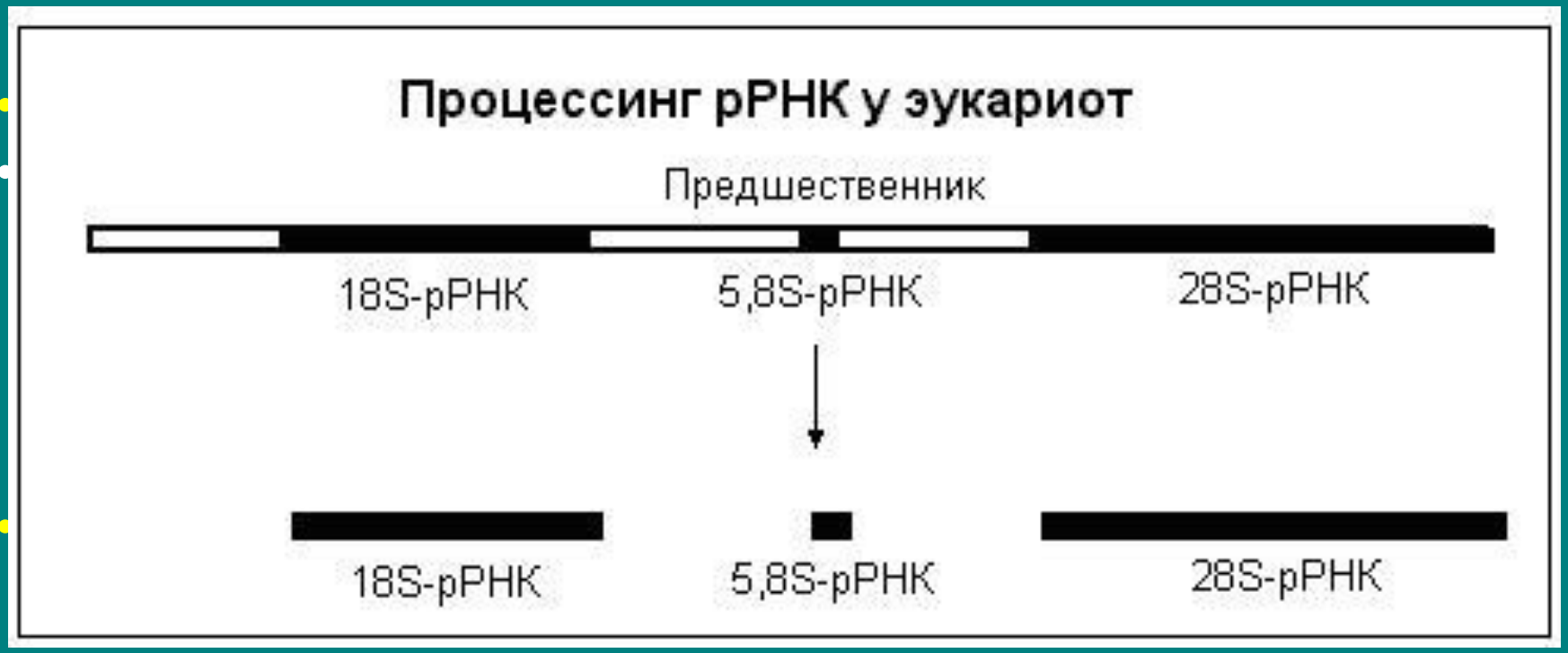
- мРНК, тРНК, рРНК эукариот
- тРНК, рРНК прокариот

мРНК прокариот синтезируются в активном виде!

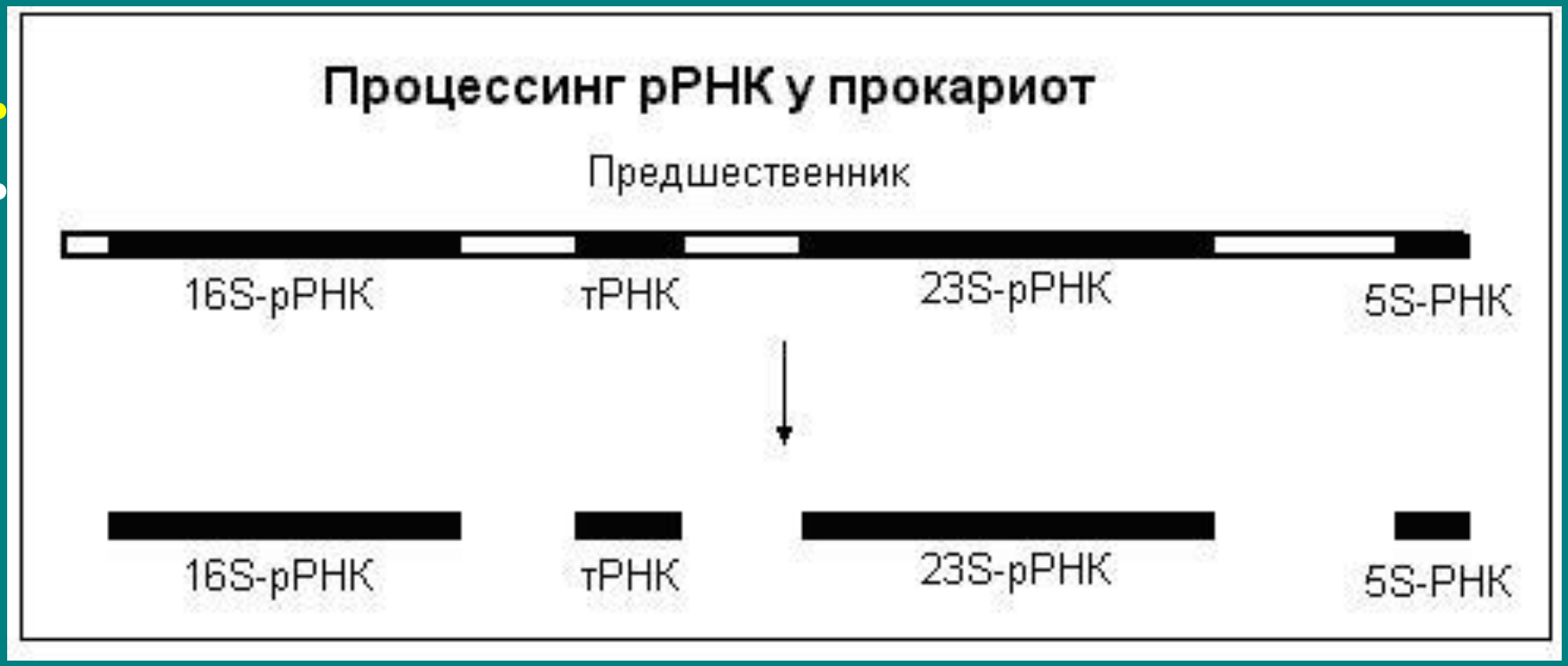
Процессинг РНК. рРНК

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:

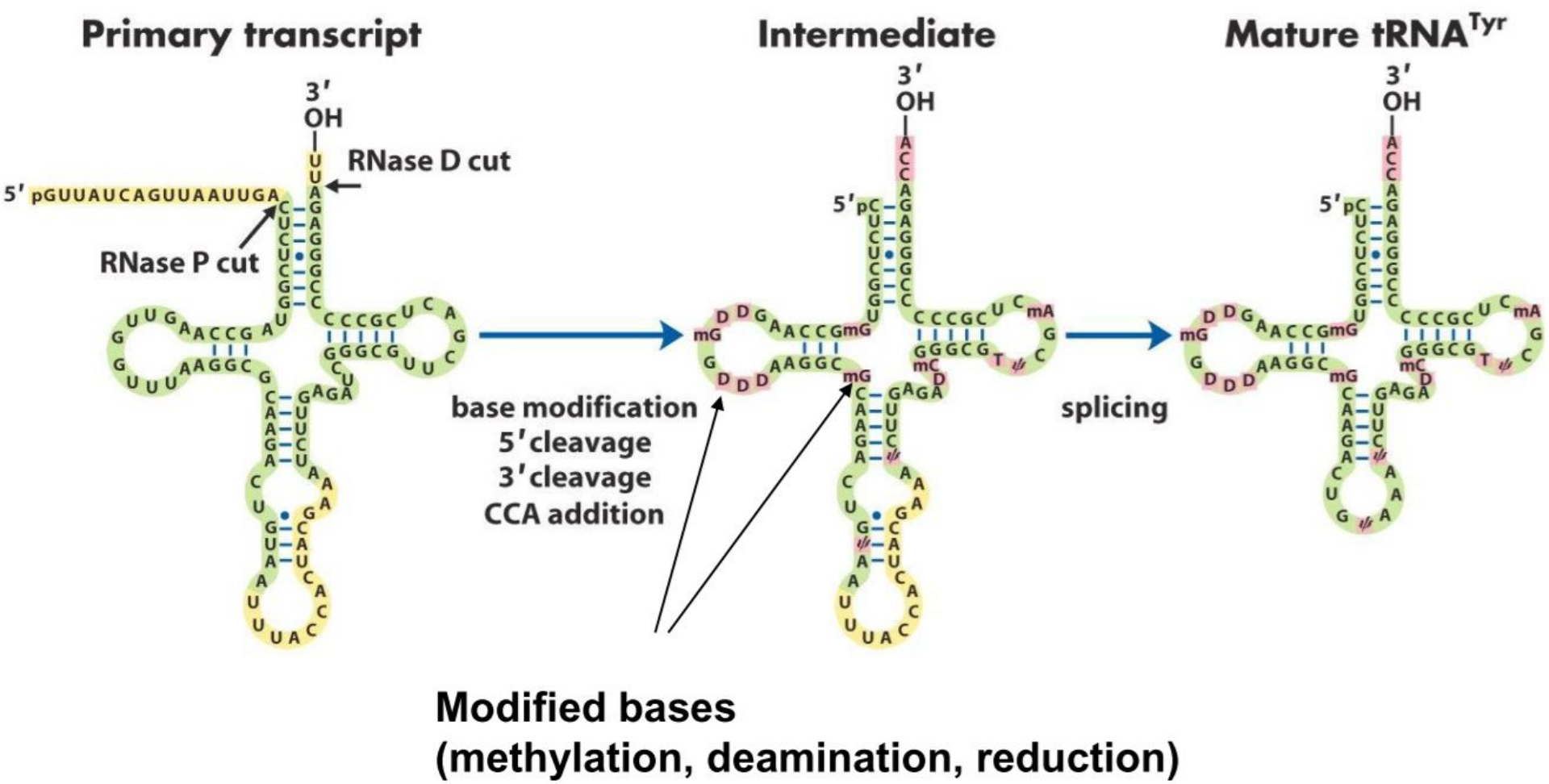
- нуклеазное расщепление – удаление лидерной последовательности с 5'-конца, концевой с 3'-конца
- сплайсинг – удаления интрона в средней части пре-тРНК и формирование антикодоновой петли
- замена нуклеотидов на 3'-конце последовательностью ЦЦА. Для этого у одних пре-тРНК с 3'-конца удаляются лишние нуклеотиды 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

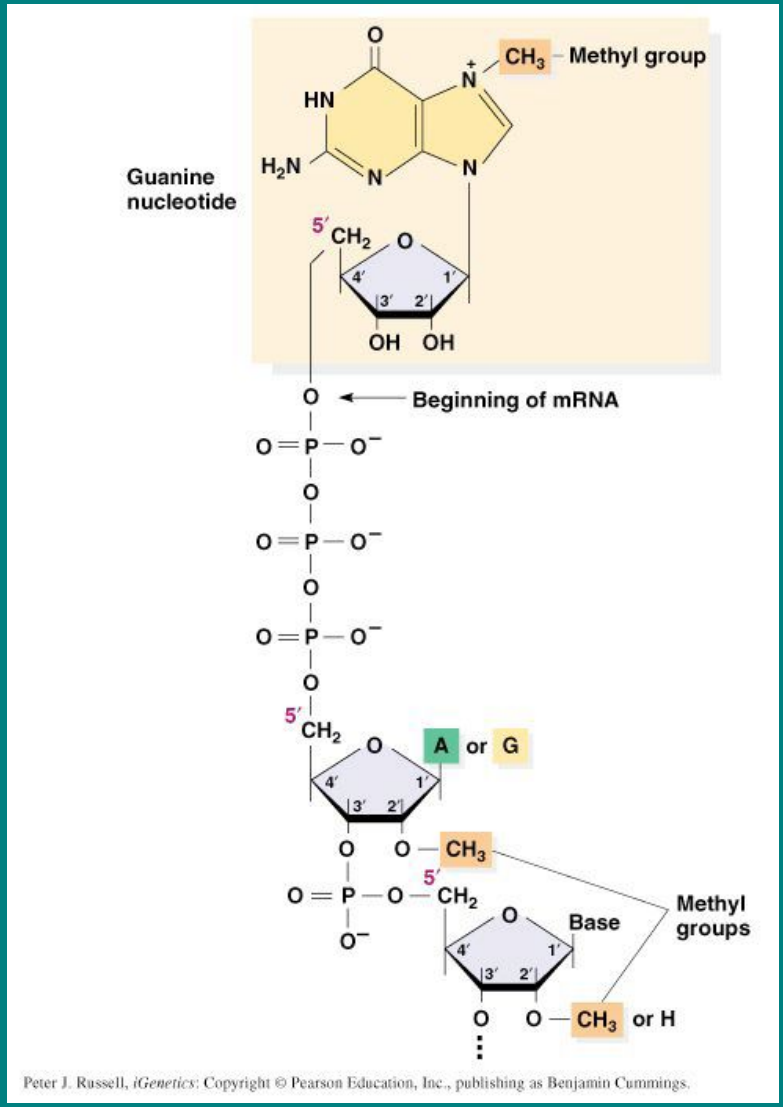
Кэпирование – это присоединение 7-метил-ГТФ (7-метилгуанозинтрифосфат) к 5'-концу РНК, а также метилирование рибозы двух первых нуклеотидов:

- 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

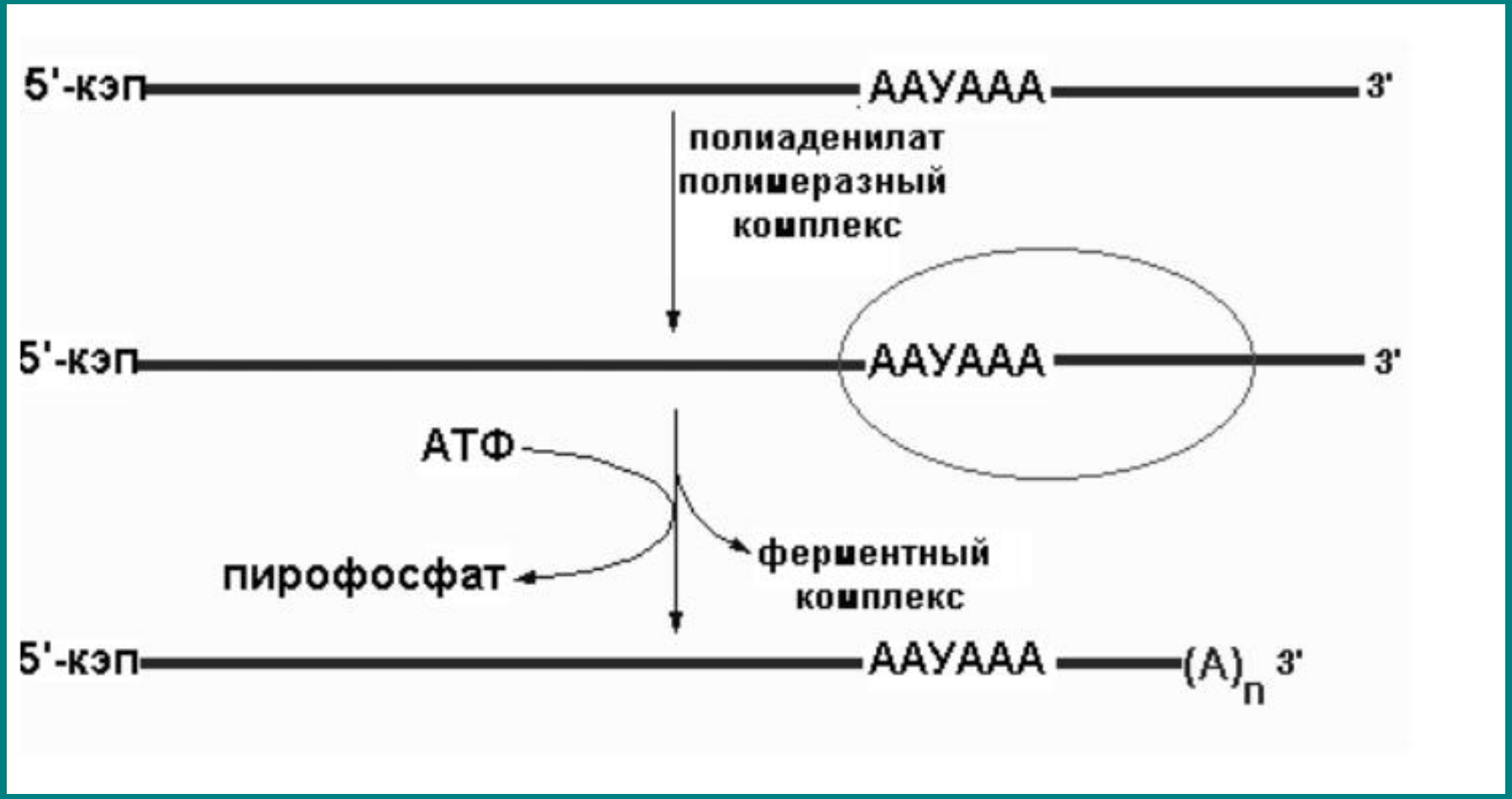
Функции:

- 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



Peter J. Russell, *iGenetics*: Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

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

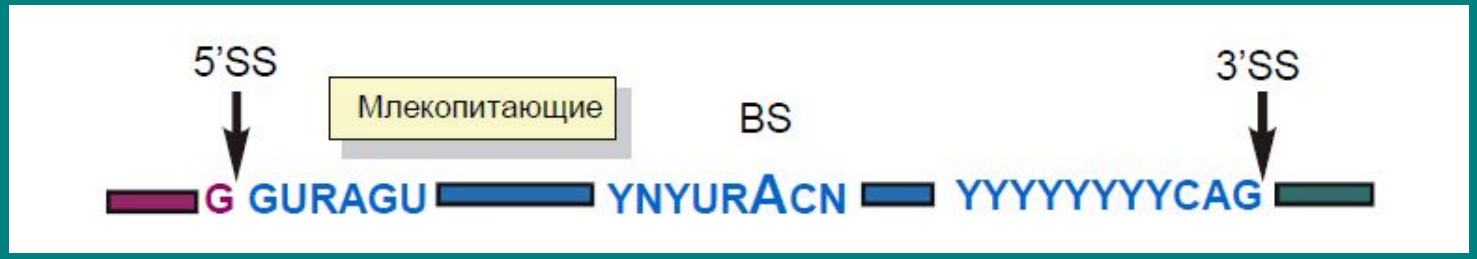
Осуществляется **сплайсосомой** – комплексом белков и малых ядерных РНК (мяРНК):

U1, U2, U4, U5, U6

Процессинг РНК. м(и)РНК

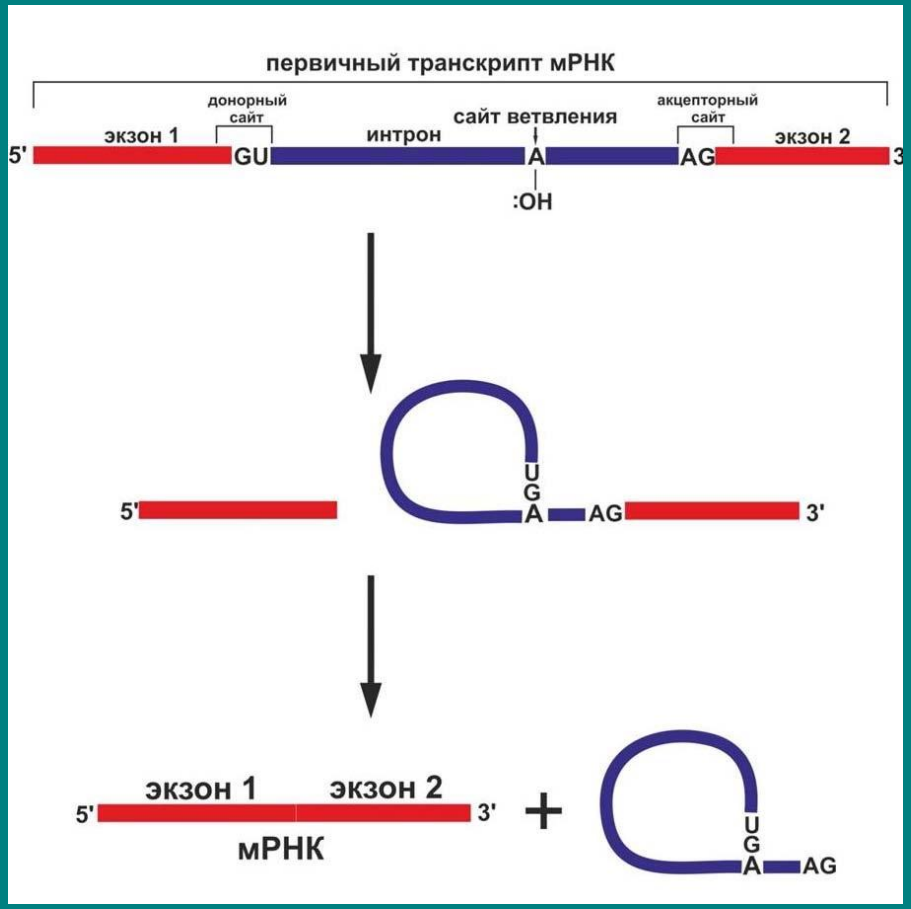
Точное разрезание границы интрон/экзон определяют три типа коротких последовательностей – *сайты сплайсинга:*

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

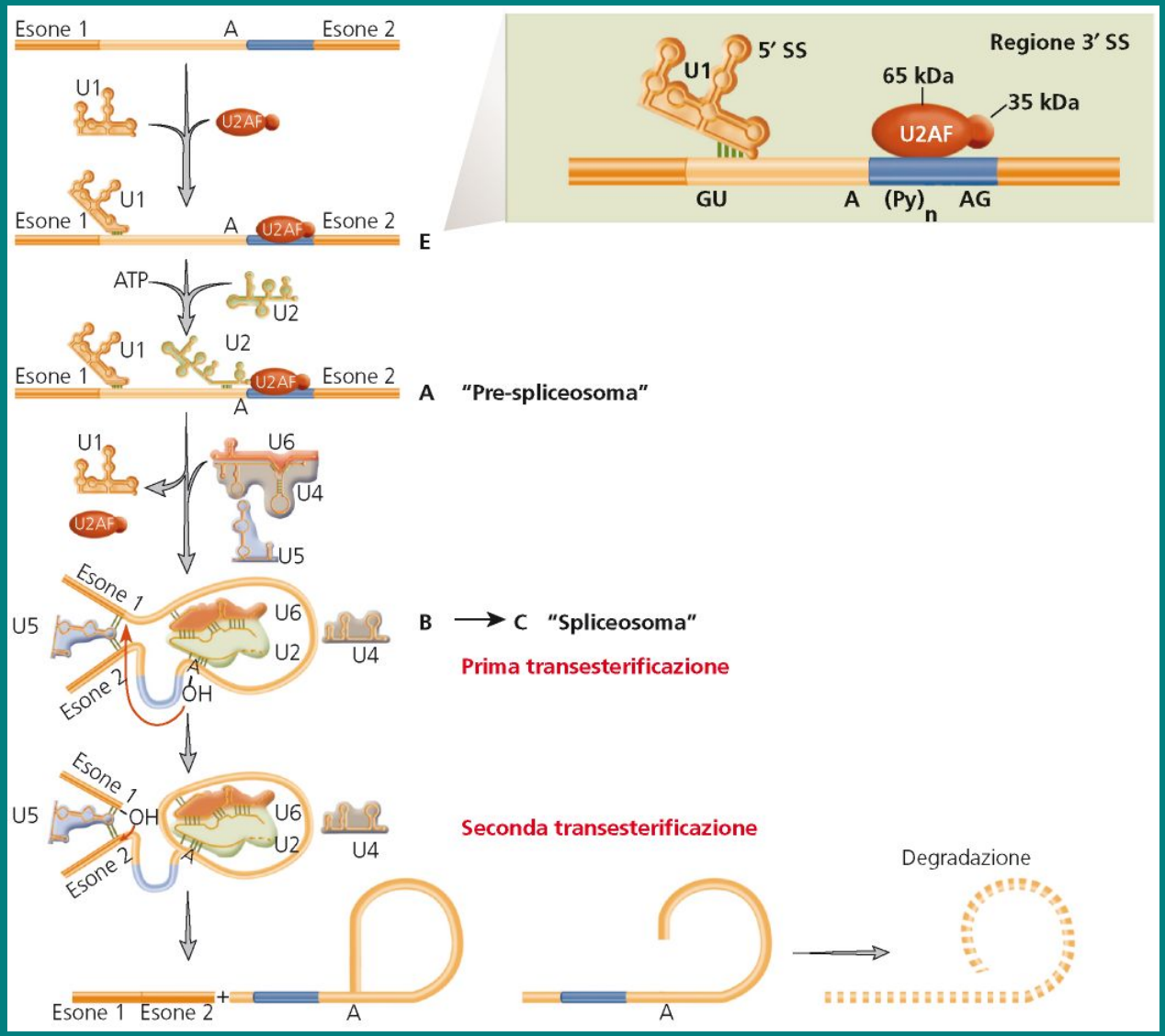


Процессинг РНК. м(и)РНК

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



Процессинг РНК. м(и)РНК

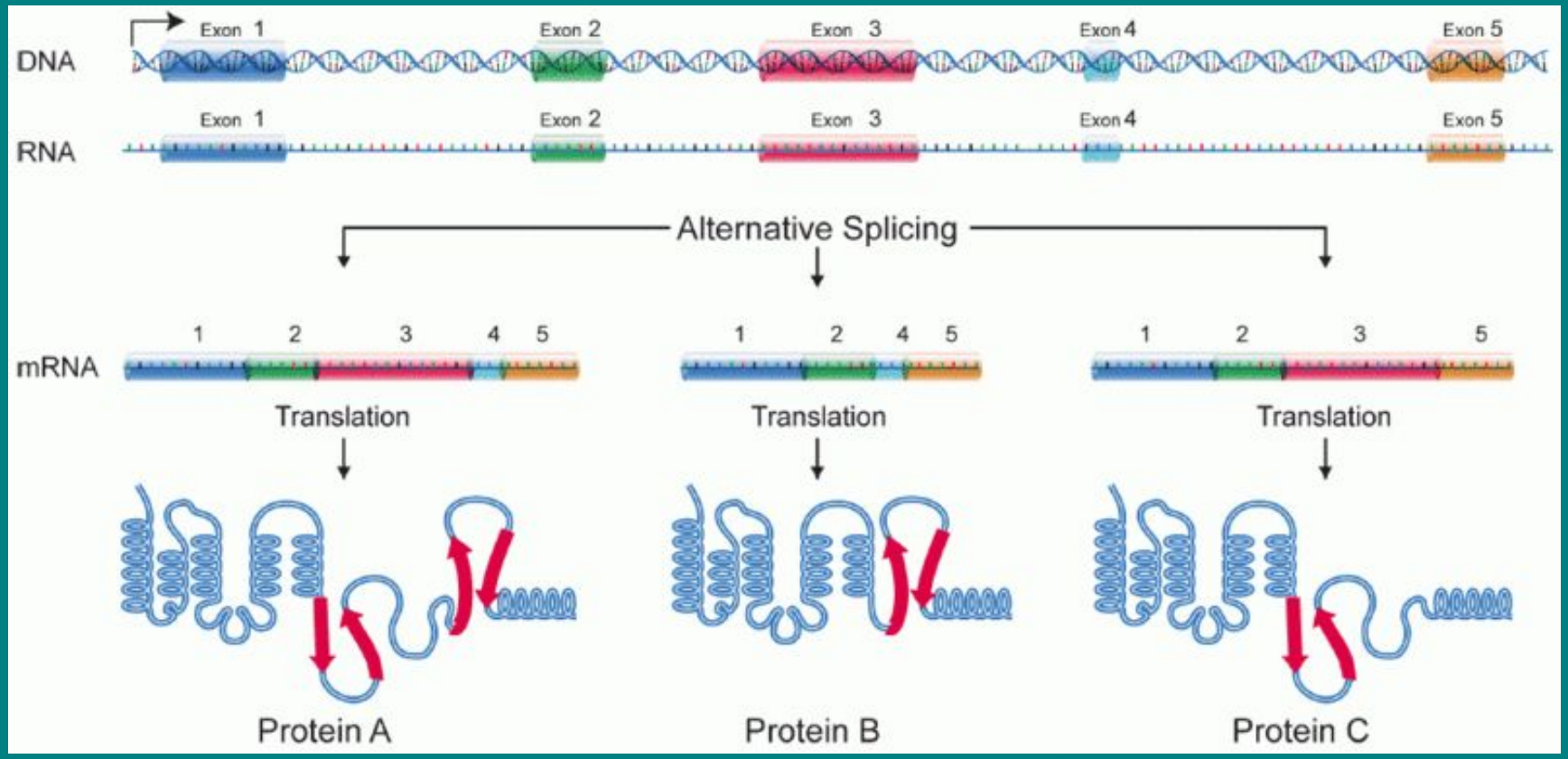


Процессинг РНК. м(и)РНК

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

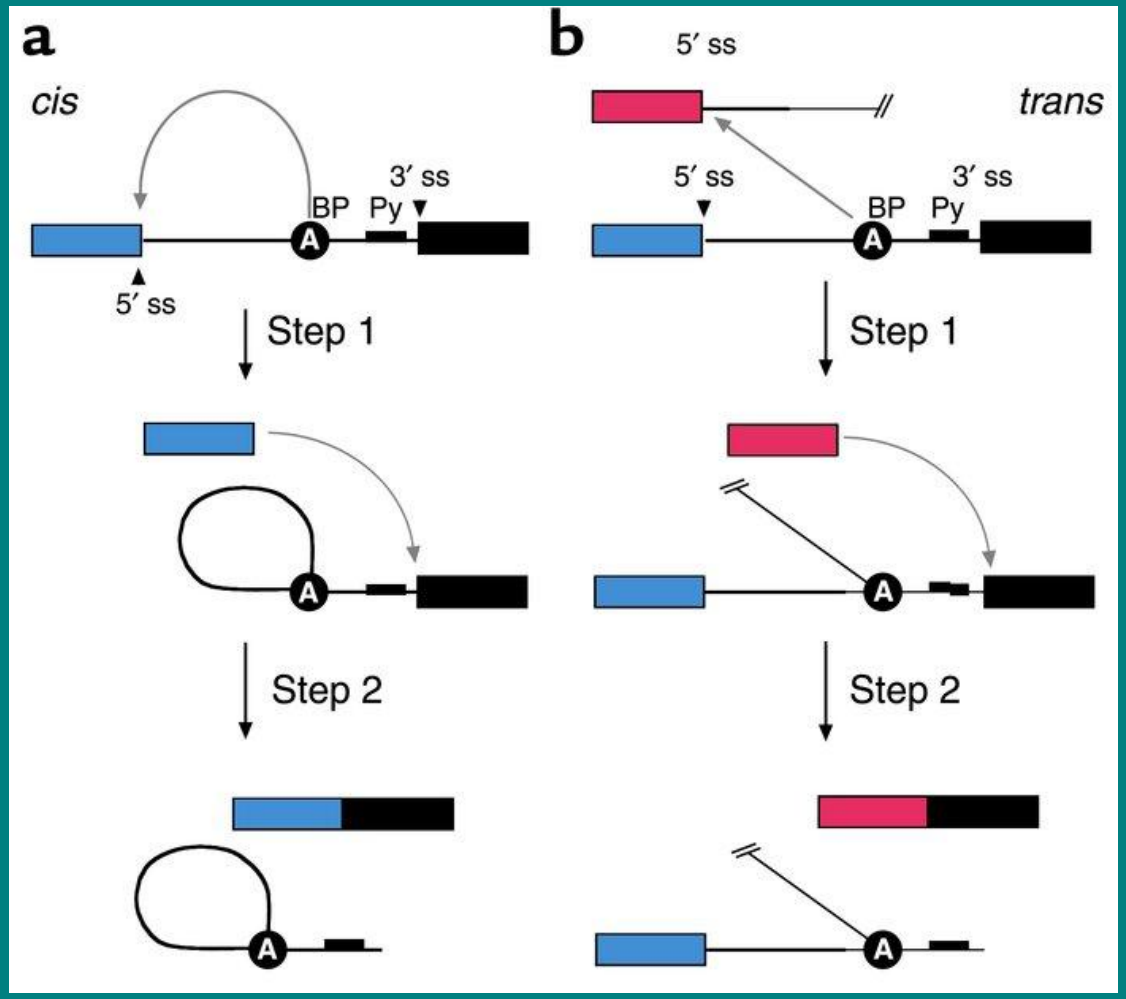
Эволюционное:

- 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



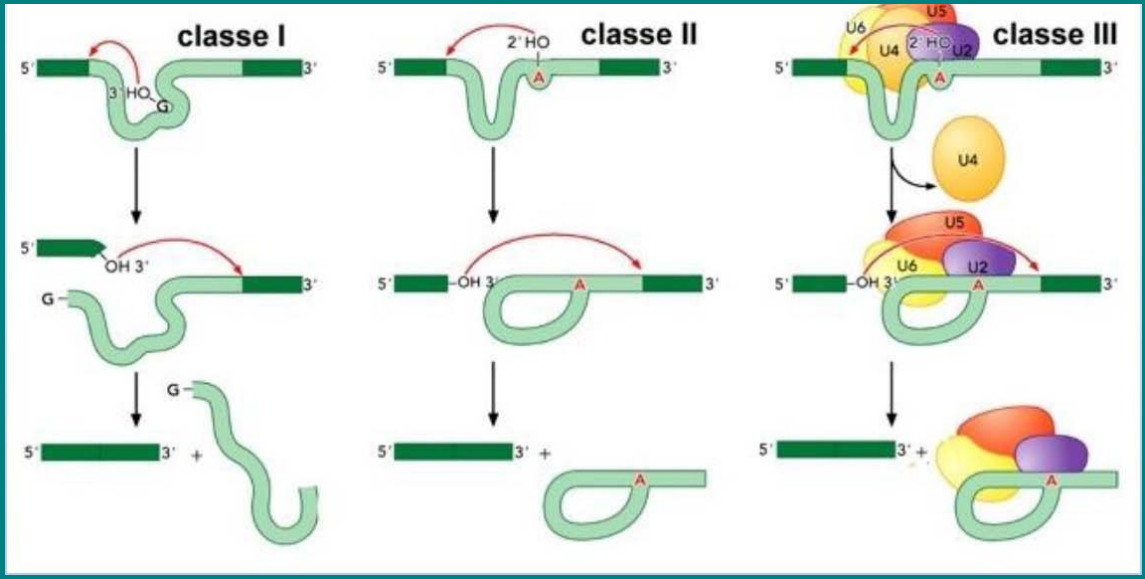
нематоды, динофлагелляты

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 (C) в уридин (U), аденозина (A) 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.

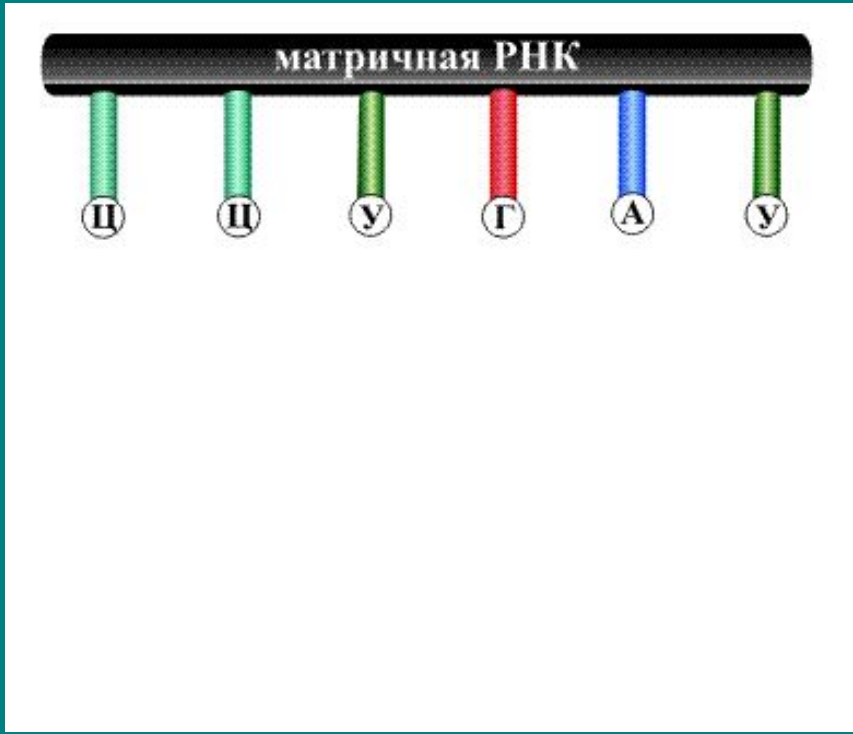
Трансляция мРНК

*** синтез белка на рибосомах, направляемый матрицей РНК**

Стадии:

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

✔ **инициация**
✔ **элонгация**
✔ **терминация**



Трансляция мРНК.
Подготовительный этап

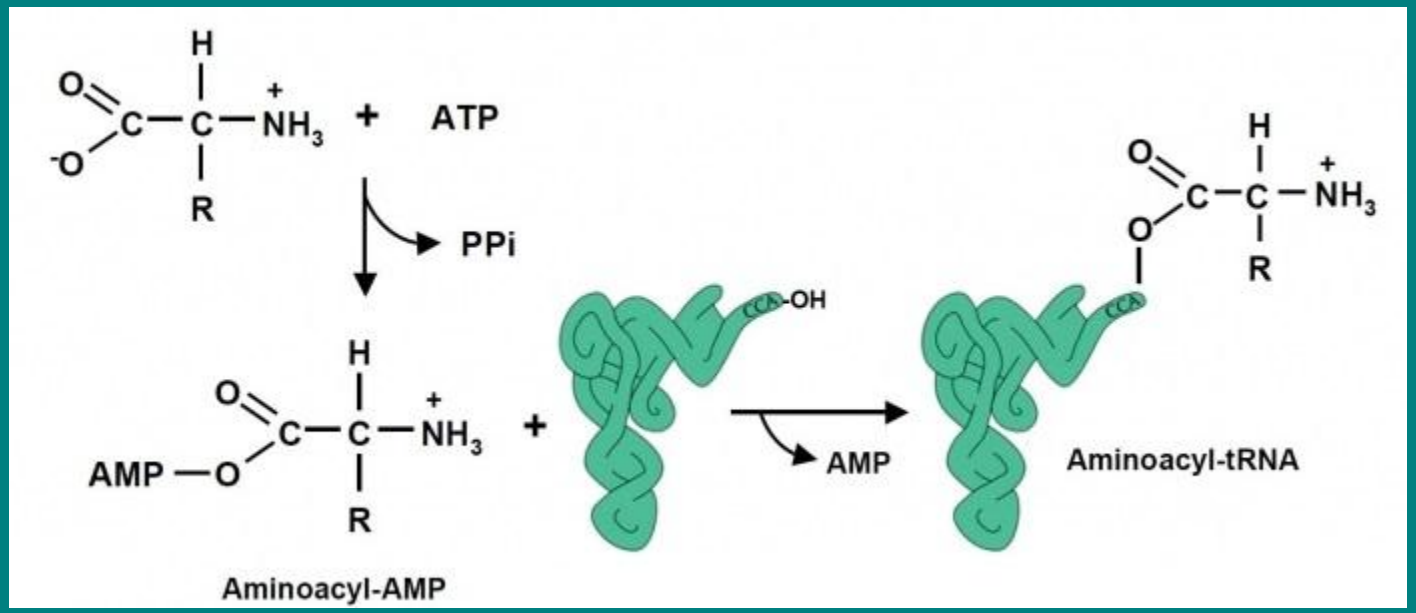
Проходит в цитоплазме

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 аминоацил-тРНК с избытком хватает на образование пептидной связи.



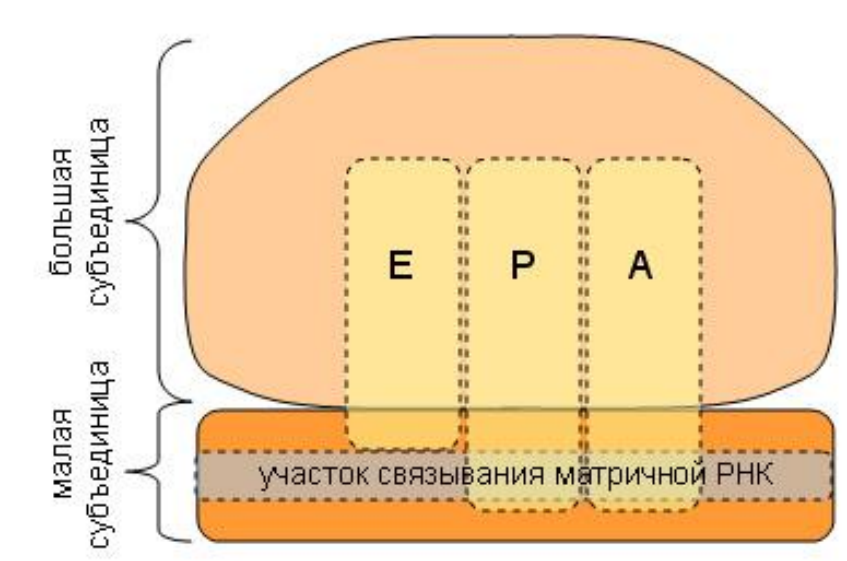
Трансляция мРНК.
Полимеризация

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 Р-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 16SрРНК)
- 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 инициирующими факторами eIF3, eIF1 и eIF2/GTP/Met-tRNAiMet к 5-концу в области кепа, 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

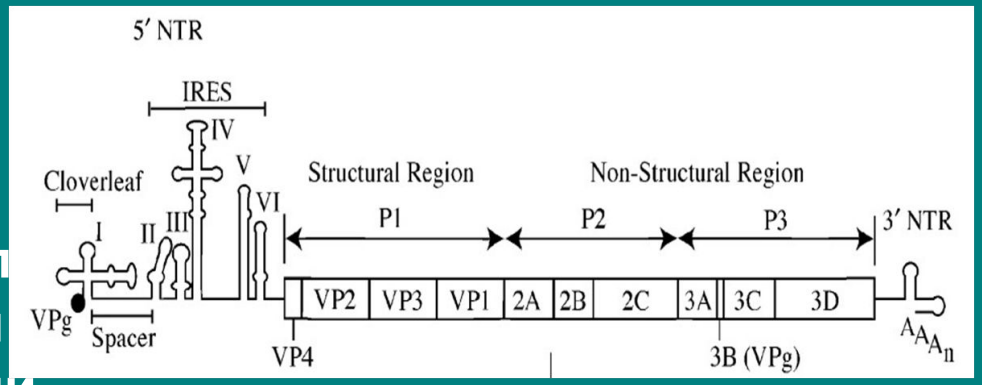
Эукариоты:

б) **кепнезависимый (внутренняя инициация) механизм**:

- **присоединение МС рибосомы с инициирующими 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**

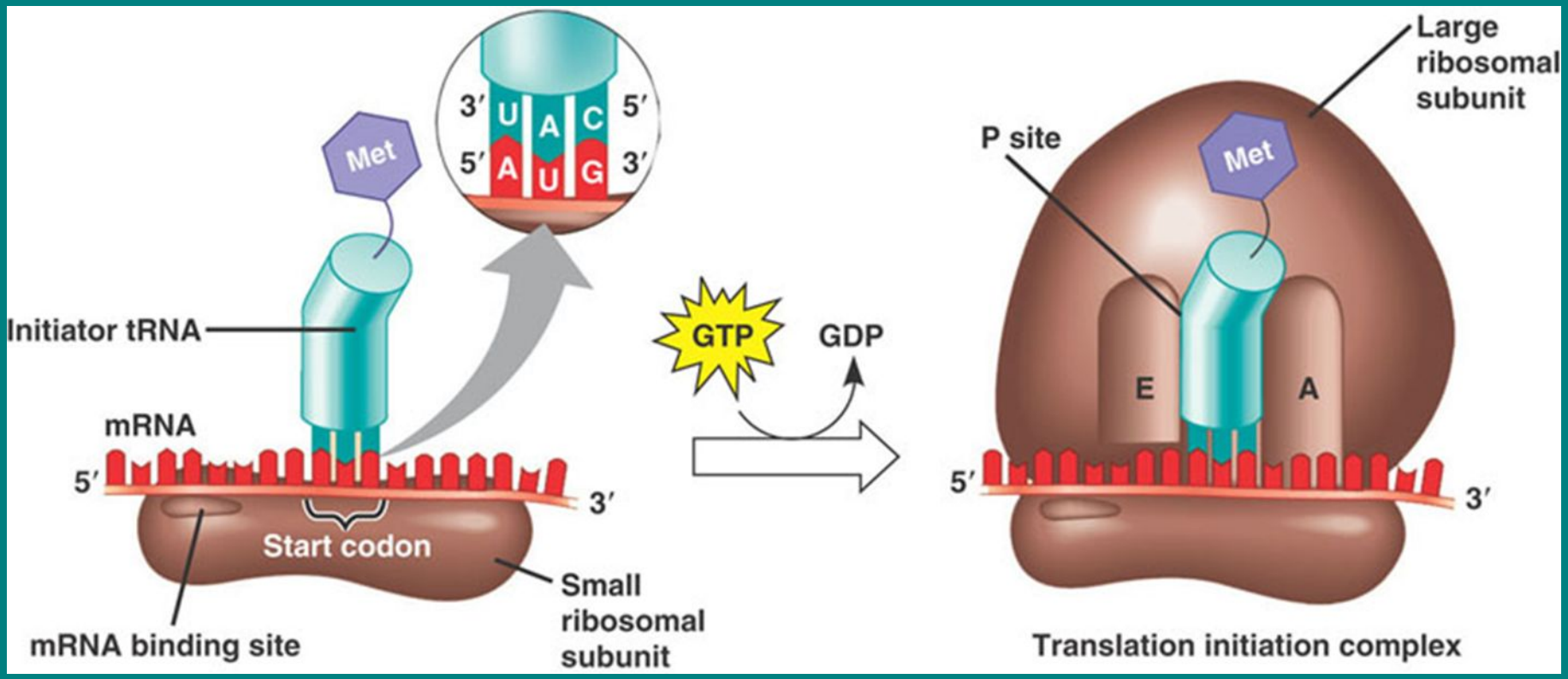
Трансляция мРНК.
Полимеризация. Инициация

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 ил 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:

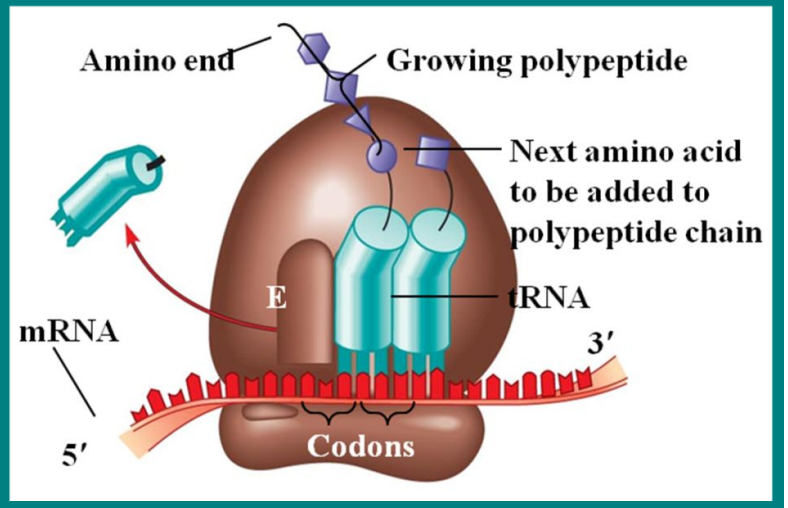
- **присоединение новой аминоацил-тРНК** в **А-участок** в соответствии с кодоном, который там оказался (кодон мРНК компелементарен антикодону тРНК)
- образование пептидной связи – **транспептидация** – с **перевешиванием растущего пептида** с тРНК в Р-участке на новопришедшую аминоацил-тРНК в А-участке 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

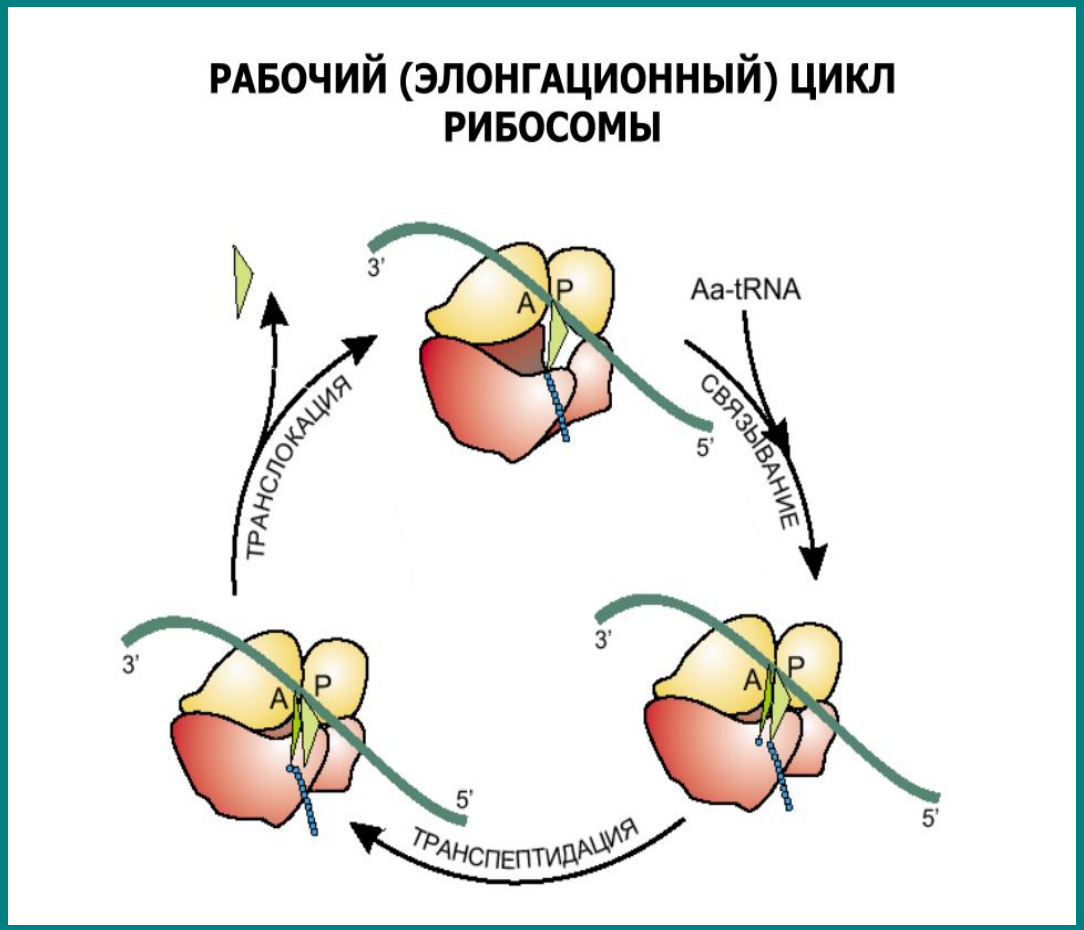
Трансляция мРНК.
Полимеризация. Элонгация

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



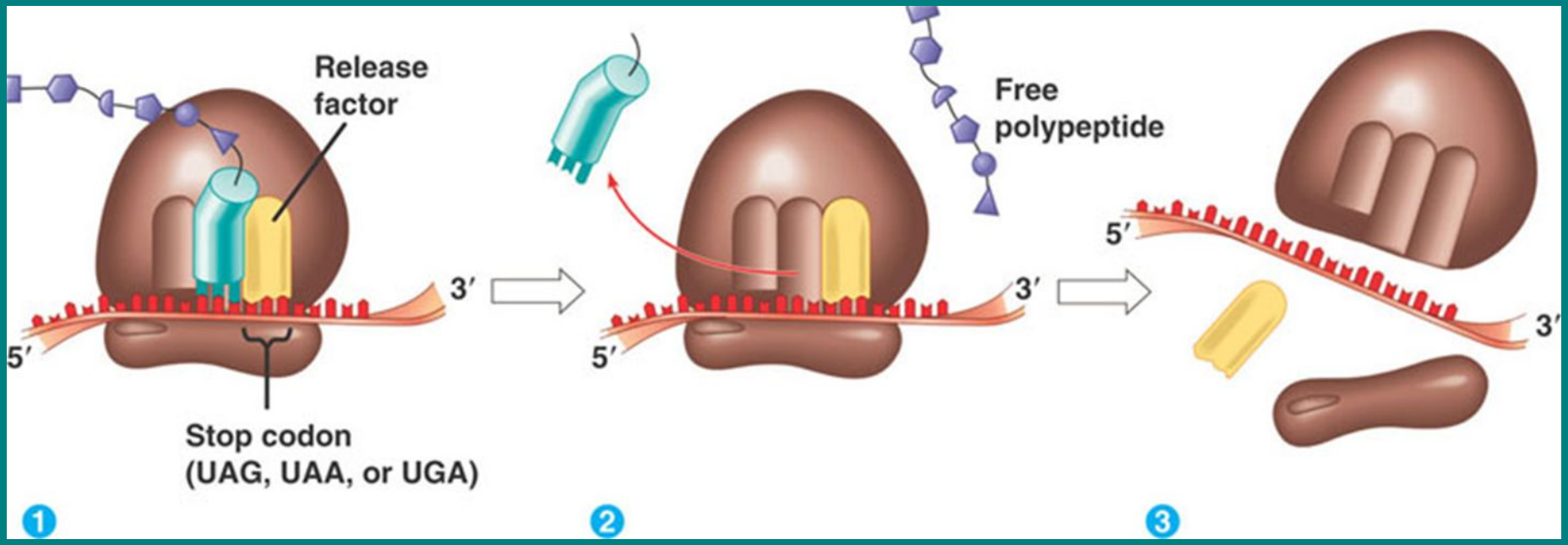


Трансляция мРНК.
Полимеризация. Терминация

- Окончание синтеза белка, осуществляется, когда в А-сайте рибосомы оказывается один из стоп-кодонов – УАГ, УАА, УГА.
- Из-за отсутствия тРНК , соответствующих этим кодонам, 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.

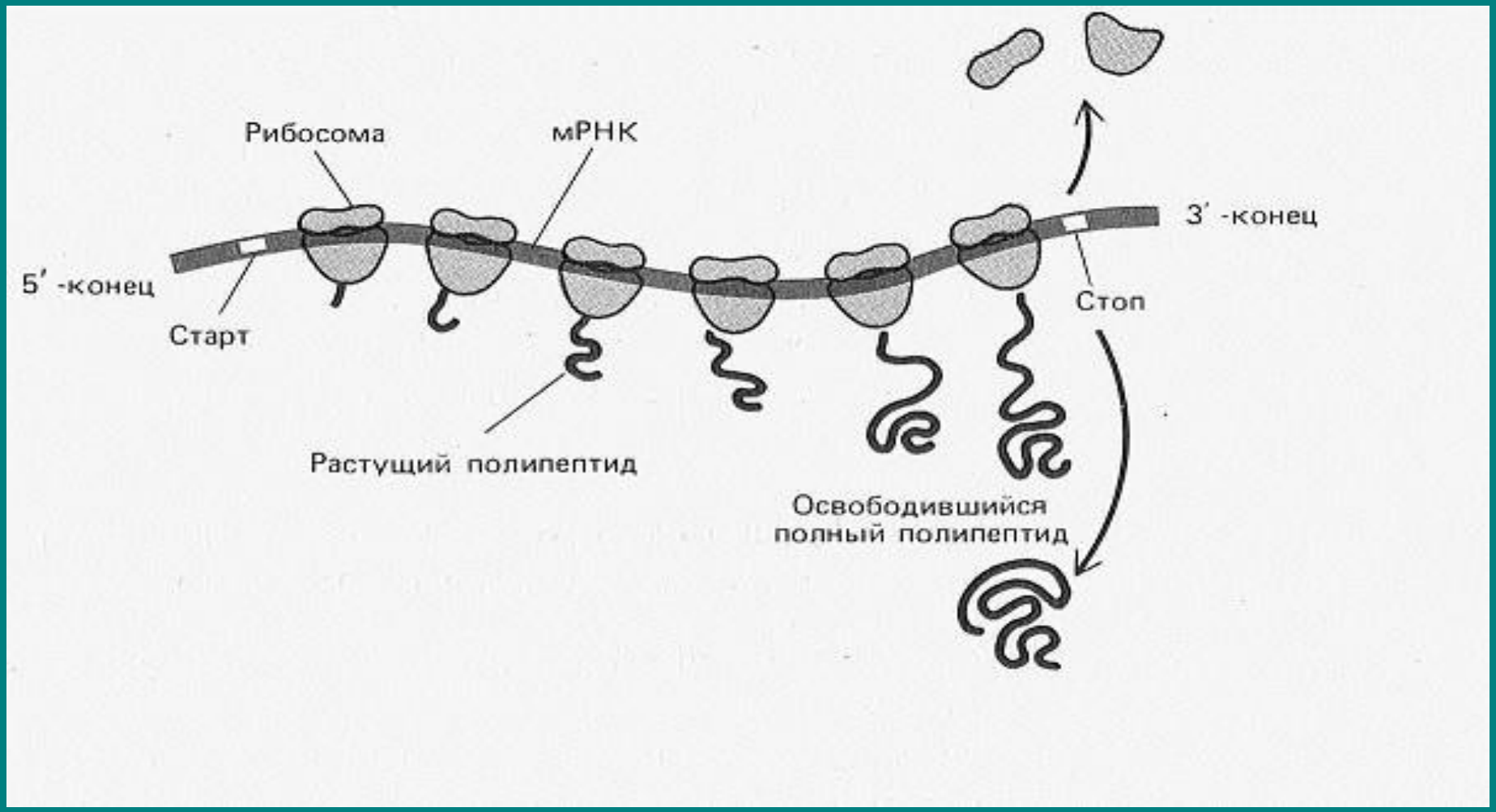
Трансляция мРНК.

Полимеризация. Терминация

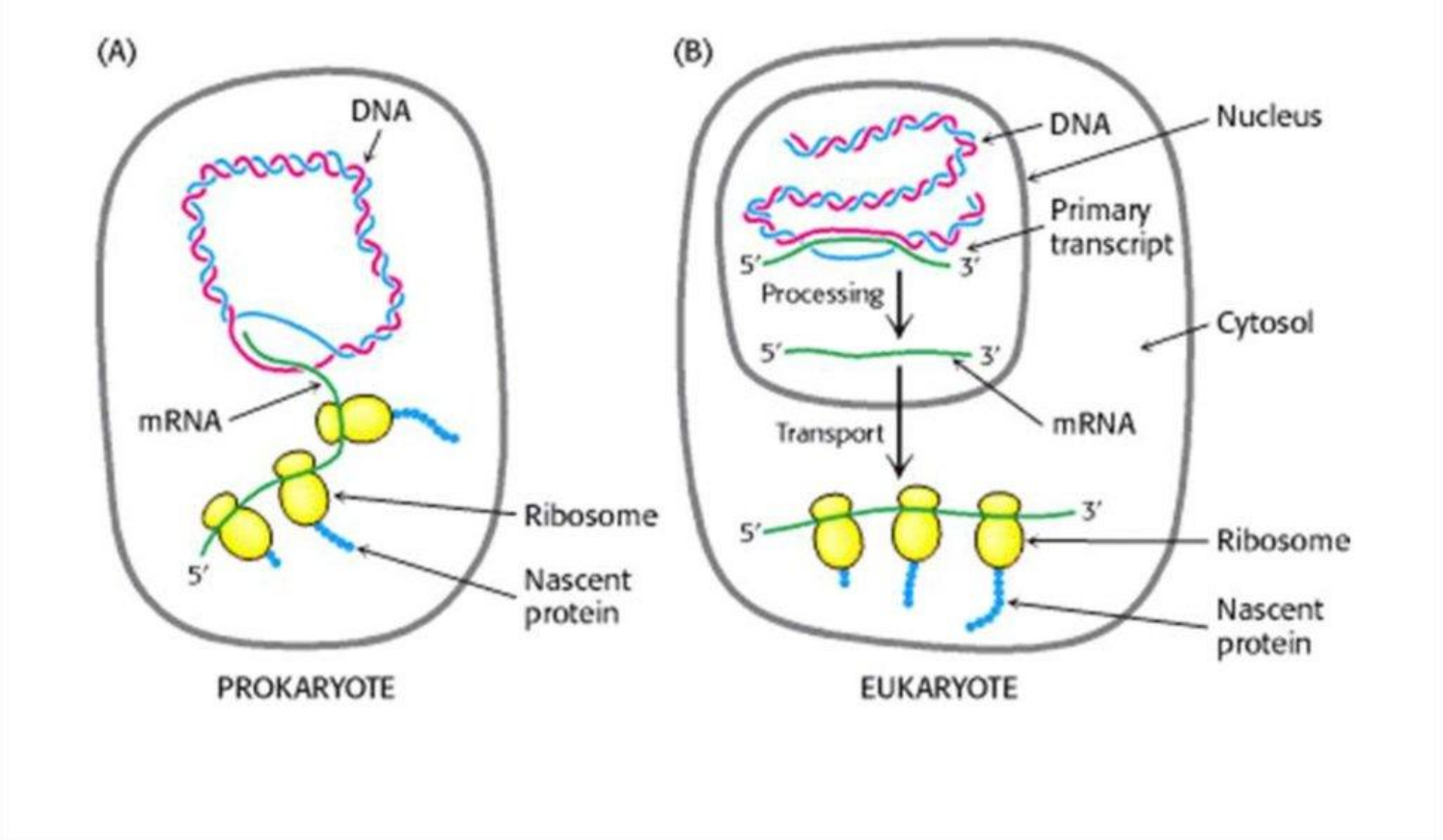


Трансляция мРНК.

Полимеризация



Трансляция мРНК. Локация



Пострансляционная 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

Пострансляционная модификация

К основным реакциям процессинга относятся:

- **удаление с N-конца** метионина или даже нескольких аминокислот специфичными **аминопептидазами**
- **образование дисульфидных мостиков** между остатками <u>цистеина</u>
- **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)

Пострансляционная 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 глу в составе факторов свертывания, что позволяет связывать Са

✔ **метильной группы** – метилирование арг и лиз в составе гистонов используется для регуляции активности генома

✔ **гидроксильной группы** – к лиз и про необходимо для созревания молекул коллагена при участии витамина С,

✔ **йода** –необходимо для образования предшественников тиреоидных гормонов йодтиронинов

Пострансляционная модификация

- включение простетической группы:

✔ углеводных остатков – гликирование требуется при синтезе гликопротеинов.

✔ гема – при синтезе гемоглобина, миоглобина, цитохромов, каталазы,

✔ витаминных коферментов – биотина, ФАД, пиридоксальфосфата и т.п.

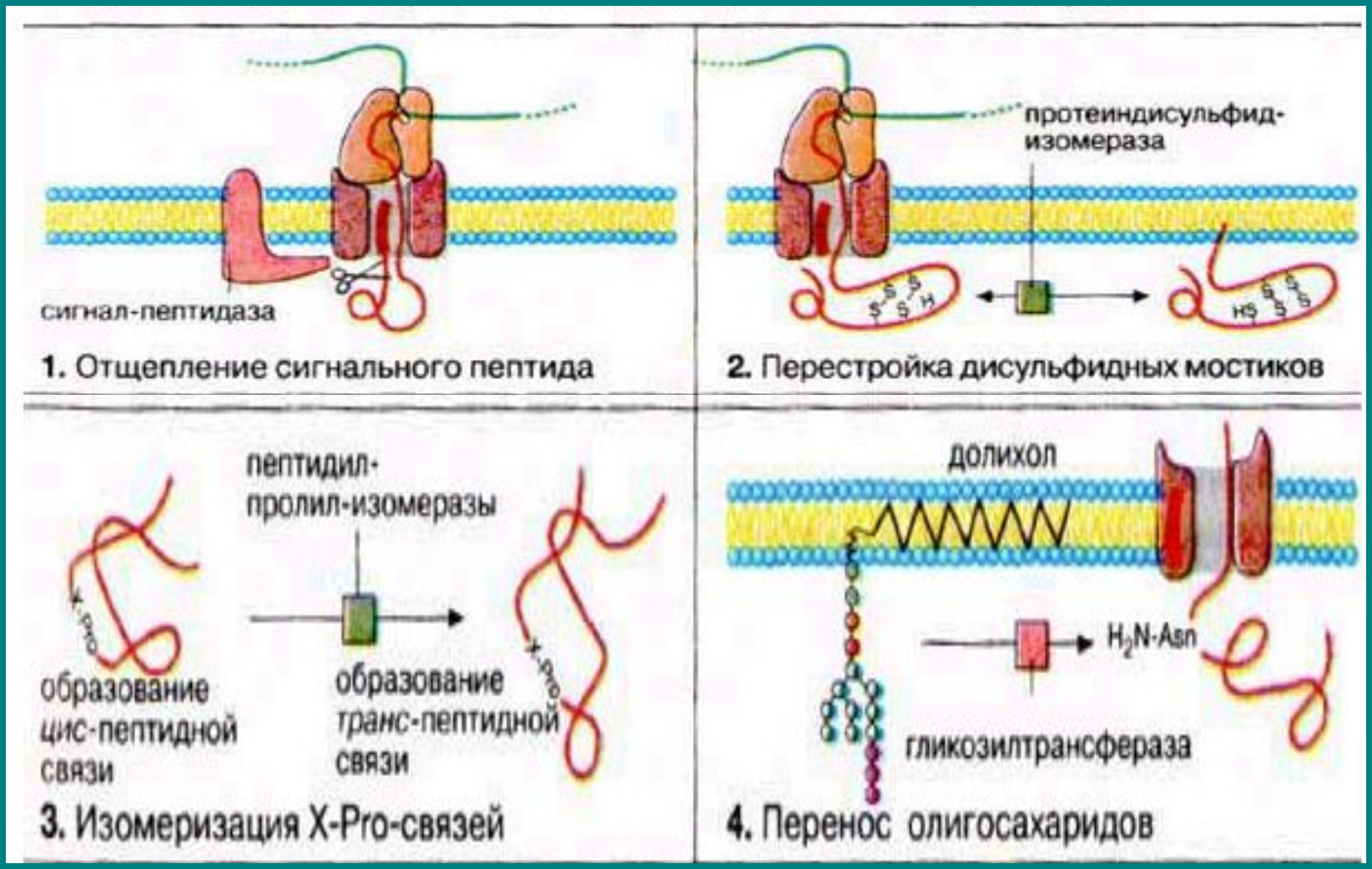
Пострансляционная модификация

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

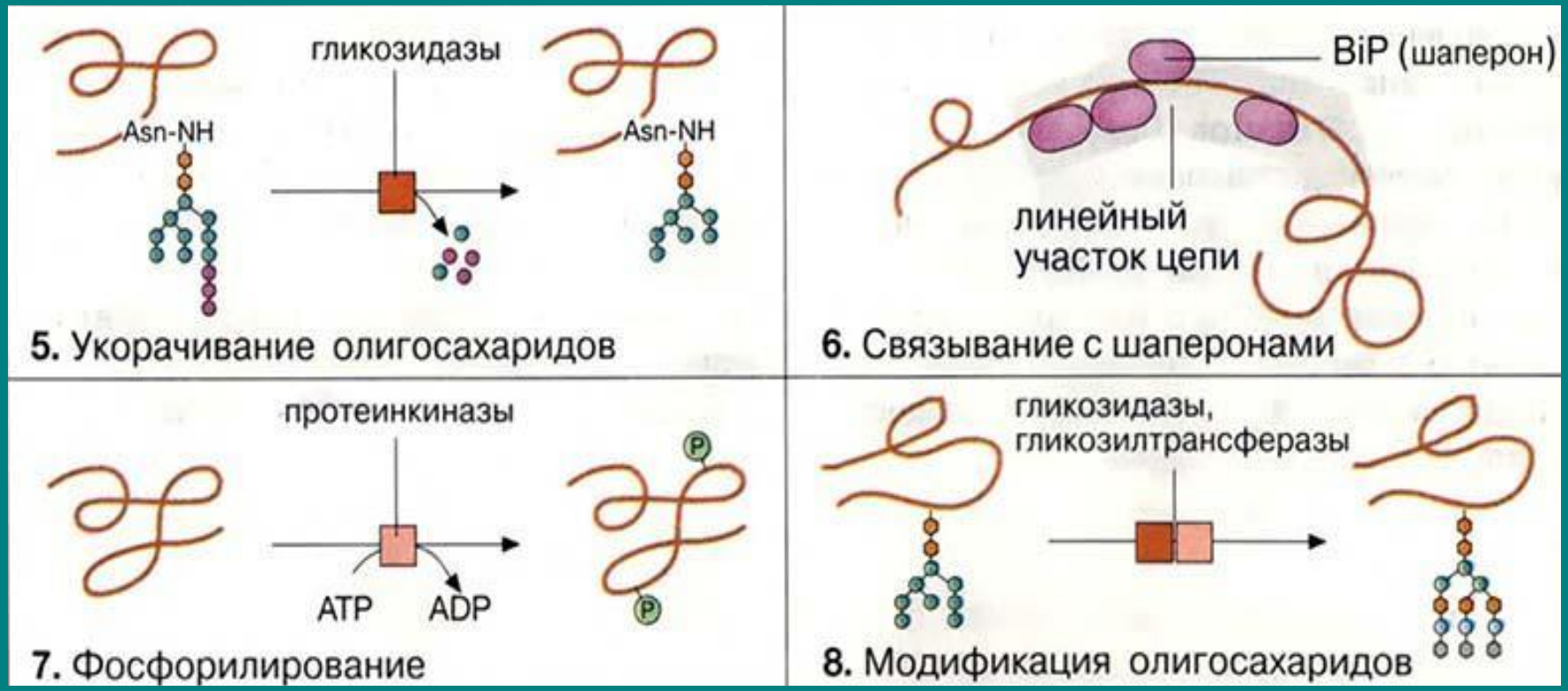
Для обеспечения фолдинга используется группа вспомогательных белков под названием шапероны (*chaperon*, франц. – спутник, нянька).

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

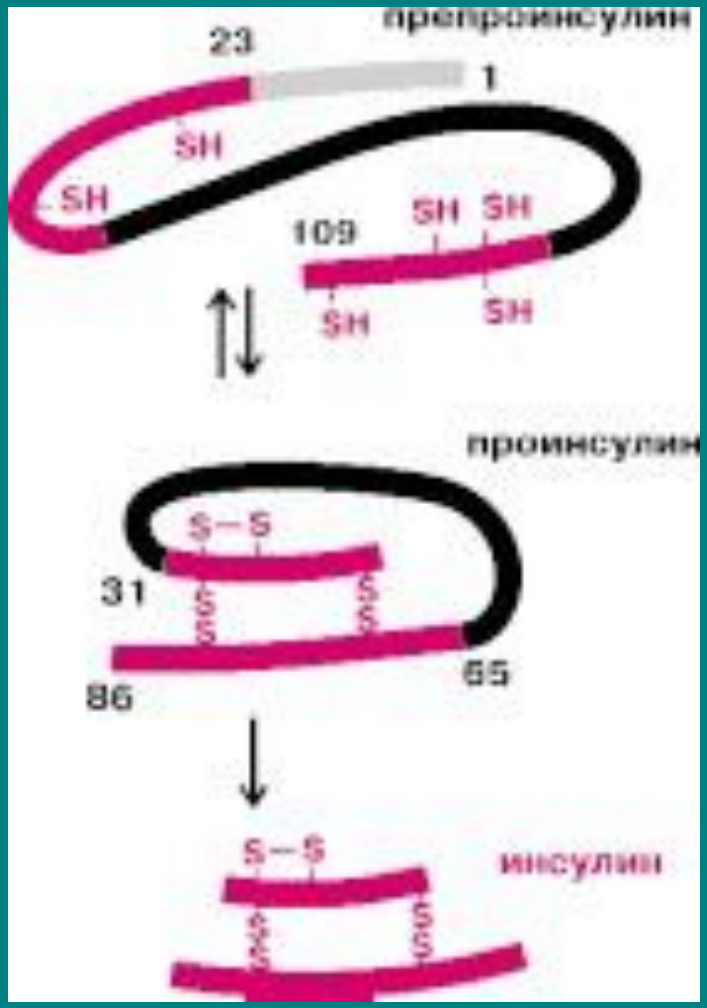
Постранслляционная модификация



Постранслляционная модификация



Постранслляционная модификация



•Крошка ШИ•