Транскрипция

- Транскрипция - ***биосинтез РНК на матрице ДНК***
- Последовательность рибонуклеотидов в молекуле РНК ***комплементарна последовательности дезоксирибонуклеотидов*** одной из цепи ДНК.
- Цепь ДНК, по которой непосредственно идет транскрипция РНК-молекул, называется ***кодирующей цепью***.
- Другую цепь называют ***некодирующей цепью*** соответствующего гена.

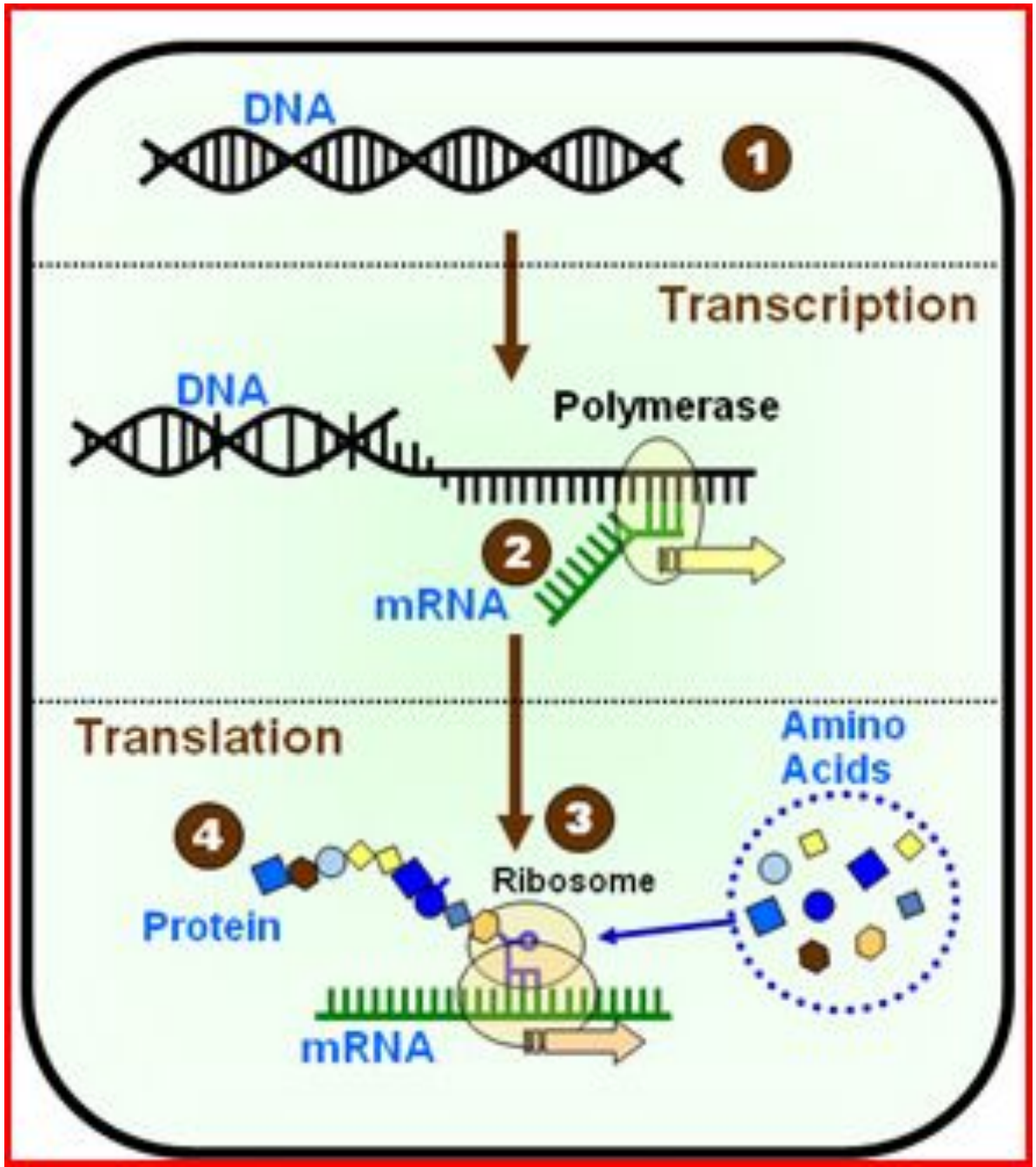
- Считывание информации с ДНК-матрицы на РНК, синтез идет с помощью РНК-полимераз.
  У эукариот **три** РНК-полимеразы: (для **синтеза тРНК, мРНК, рРНК).**
  У прокариот **одна** РНК-полимераза **синтезирует все виды РНК.**

- **Транскрипция не связана с определенным этапом клеточного цикла.**
  Она предшествует трансляции – синтезу белка.

- **Механизм РНК-полимеразной реакции тот же, что и ДНК-полимеразной, направление синтеза 5’□3’, (субстратами служат нуклеозидтрифосфаты, тимину ДНК комплементарен урацил в РНК).**

- **РНК-полимераза – олигомерный белок из 6-ти субъединиц. Причем, σ – одинакова для всех полимераз и отвечает за связывание с промотором.**

- **РНК-полимераза не требует «затравки».**
- **РНК-полимераза не редактирует свои ошибки.**


DNA
1
Transcription
DNA
Polymerase
2
mRNA
Translation
Amino
Acids
4
3
Ribosome
Protein
mRNA

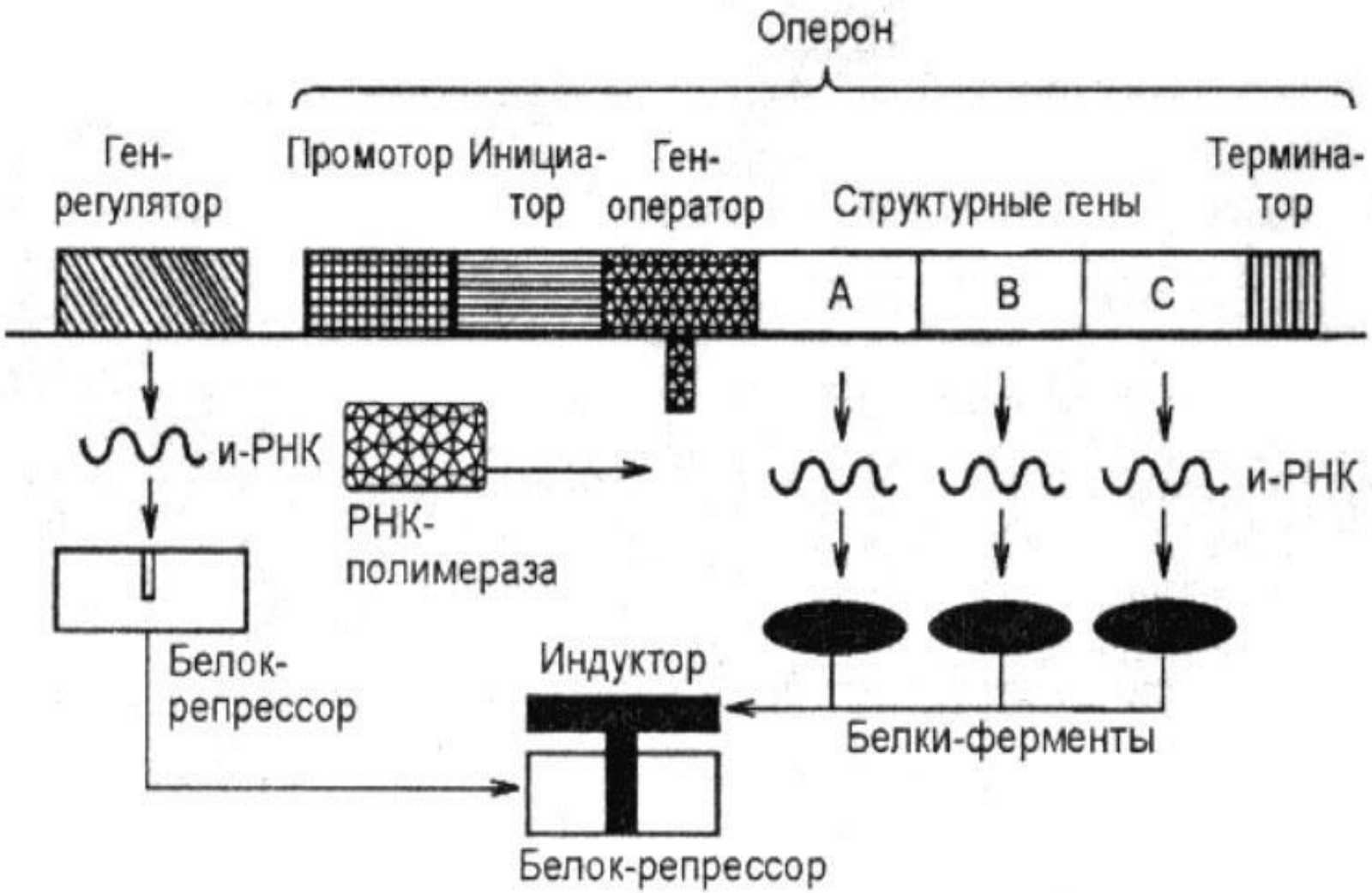
Оперон и транскриптон

- Единицей транскрипции ***у прокариот*** является ***оперон***
- Единицей транскрипции ***у эукариот транскриптон***

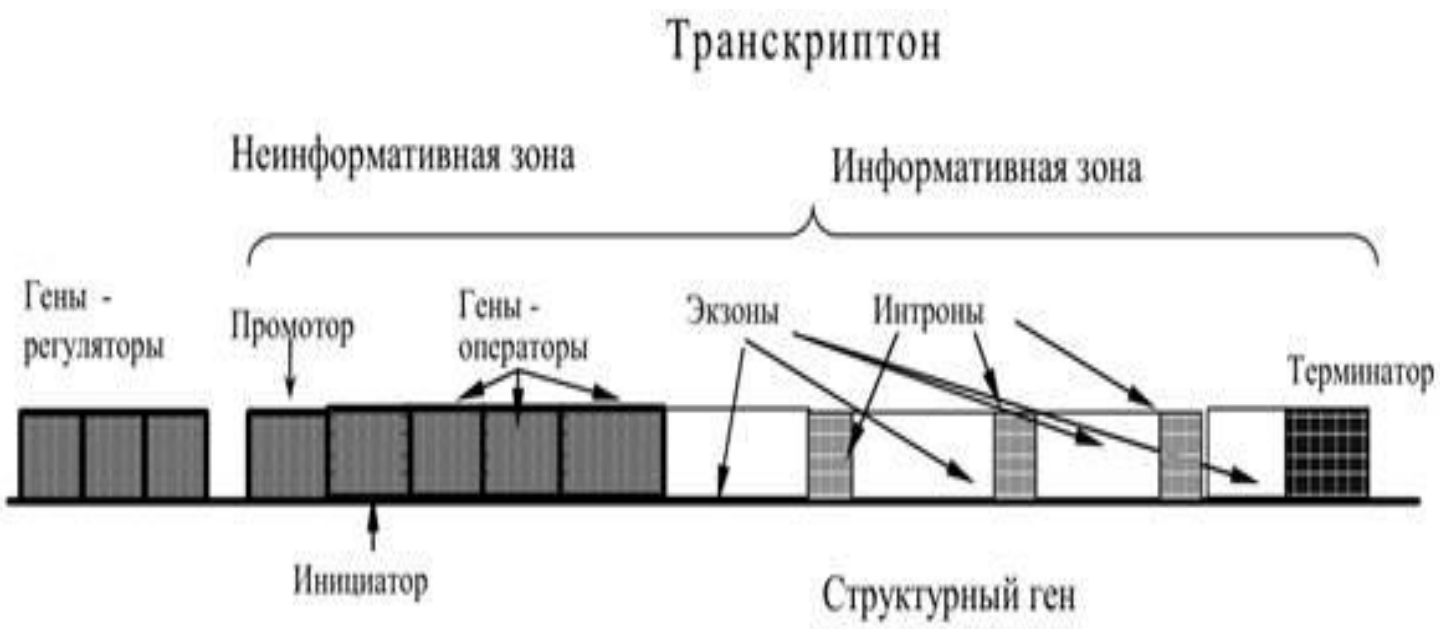
Структура оперона

- ***Промотор*** - место инициации транскрипции, к которому присоединяется фермент РНК-полимераза; в ДНК *E. coli* имеется 2000 промоторов на $4{,}8\times10^6$ пар оснований;
- ***Ген-оператор*** (или ***акцепторная зона*** у эукариот) - место связывания регуляторных белков, например, белка-репрессора;
- ***Структурные гены***, включающие информативные участки - ***экзоны*** и неинформативные участки - ***интроны***;
- ***Терминатор*** - последовательность нуклеотидов, сигнализирующая о завершении транскрипции.

Структура оперона



Структура транскриптона



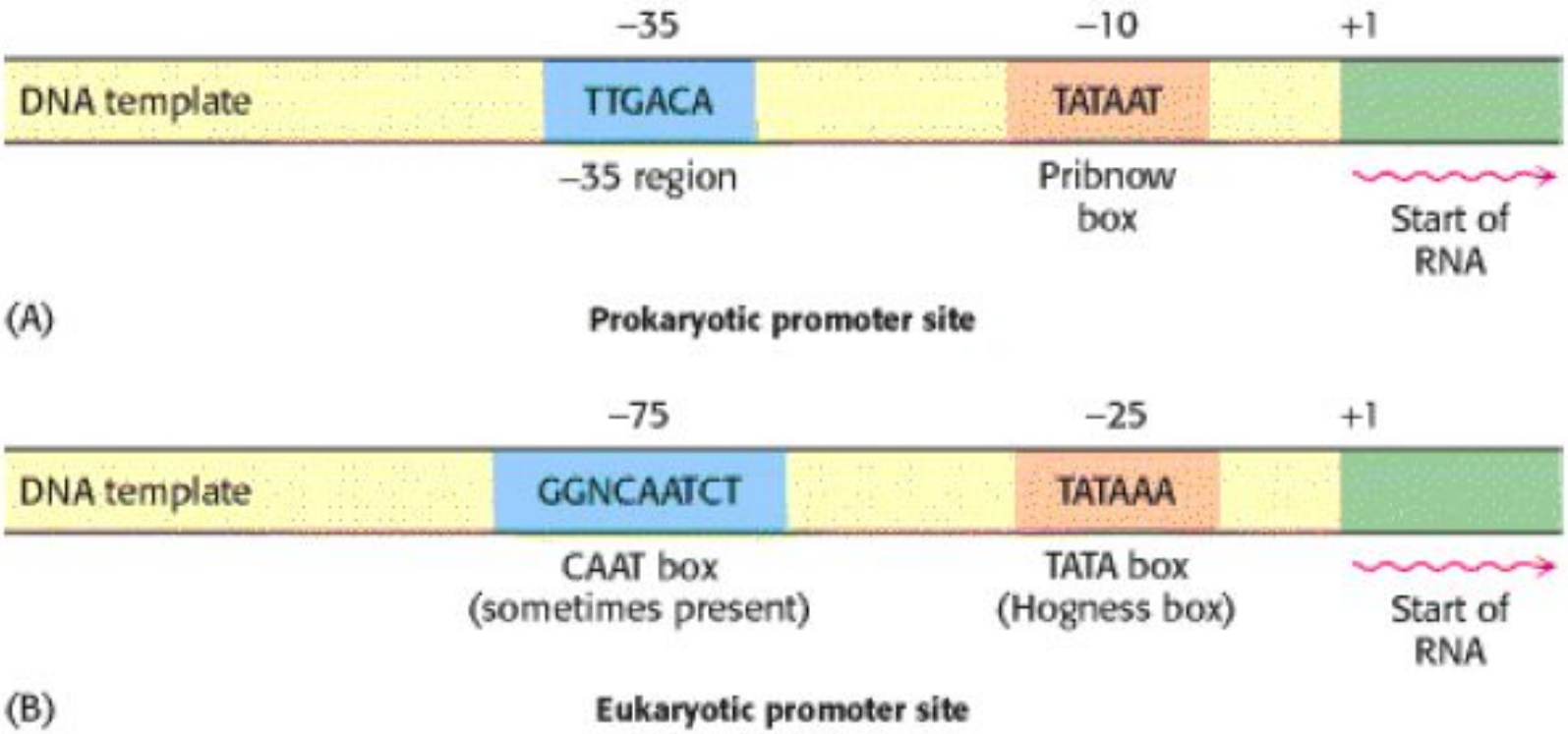
Промотор прокариот

- У бактерий функцию промотора выполняют ***две последовательности*** нуклеотидов на 5′-конце молекулы.
- Одна из них называется ***блок Прибнова*** (ТАТААТ), центр которого располагается в положении ***-10*** (10 нуклеотидов на 5′-конце от первого транскрибируемого нуклеотида, обозначаемого +1).
- Другая последовательность, называемая ***-35*** область, имеет последовательность ***ТТГАЦА.***

Промотор эукариот

- Эукариотические гены, кодирующие белки, имеют ***блок Хогнесса*** (ТАТААА) в положении ***-25***, а также ***ЦААТ-блок*** (ГГЦЦААТЦТ) в положении ***-75***.
- Транскрипция у эукариот регулируется ***энхансерными*** (усиливающими) последовательностями, которые находятся далеко от стартового нуклеотида.

Промотор прокариот и эукариот



Терминация синтеза

- Терминацию синтеза РНК вызывают длинные блоки АТ-последовательностей нуклеотидов в ДНК - терминатор (стоп-сигнал);
- У ряда прокариот обнаружен белок, называемый ρ-фактором, который в участке терминации освобождает РНК от матрицы ДНК.

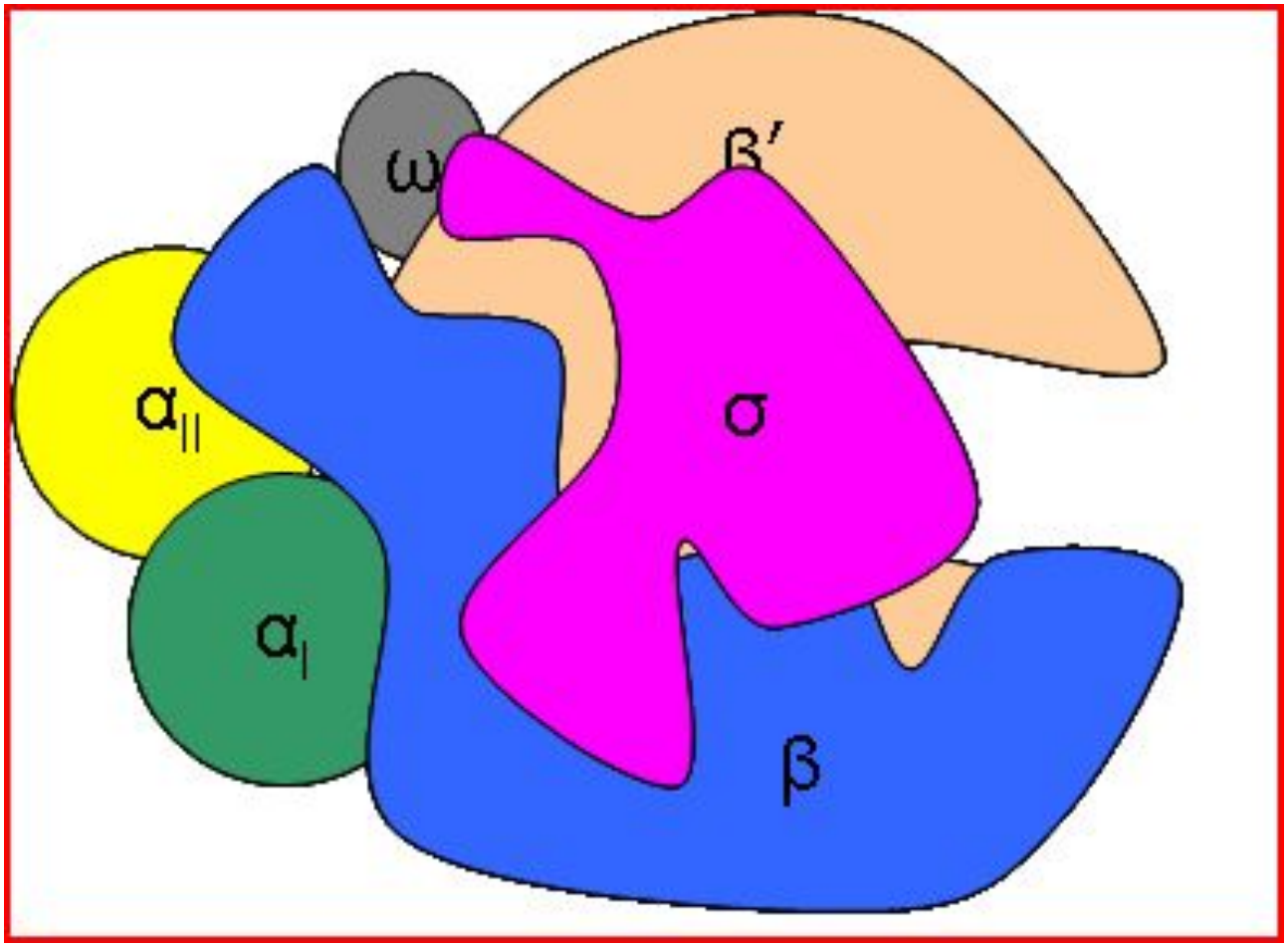
Факторы, необходимые для транскрипции

- ***Матрица***, которой является неспаренная цепь ДНК. В отличие от репликации транскрипция происходит на определенном фрагменте ДНК.
- ***Субстраты.*** Для синтеза РНК необходимы четыре типа рибонуклеозид-5′-трифосфатов: АТФ, ГТФ, ЦТФ, УТФ. Разрыв макроэргической связи между α и β-остатками фосфорной кислоты обеспечивает процесс синтеза энергией.
- Фермент ***ДНК-зависимая РНК-полимераза.***

РНК-полимераза

- РНК-полимераза *E.coli* состоит из ***5 субъединиц*** ($\alpha_2\beta\beta'\omega$, м.м. 390 000) и шестой **σ-субъединицы.**
- Фермент, состоящий из 6 субъединиц, называется ***холоферментом***.
- ***β -***субъединица участвует в связывании рибонуклеозидтрифосфатов (катализирует синтез РНК),
- ***β'-***субъединица – в связывании фермента с ДНК-матрицей,
- ***2α- субъединицы*** участвуют в инициации транскрипции;
- ***ω-субъединица*** восстанавливает.
- Структура фермента без σ-субъединицы называется ***кор-ферментом***.

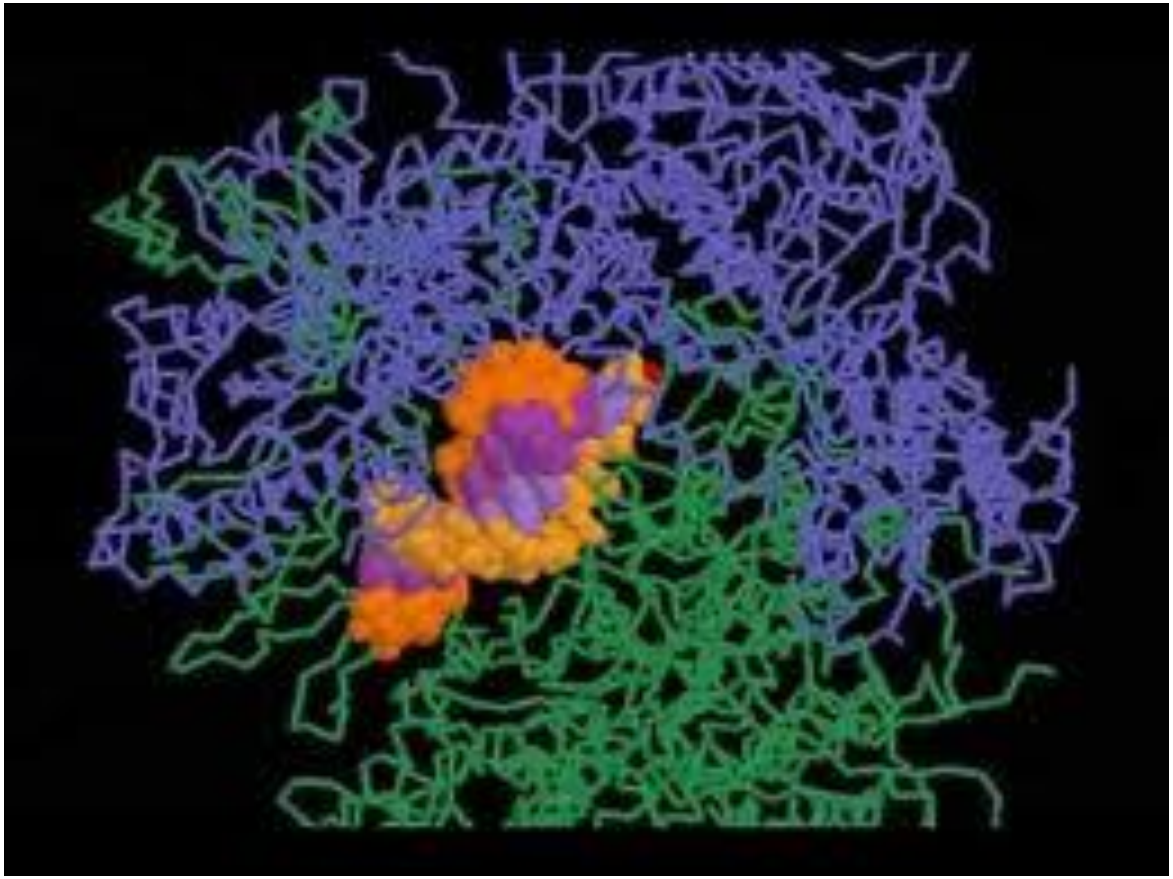
РНК-полимераза



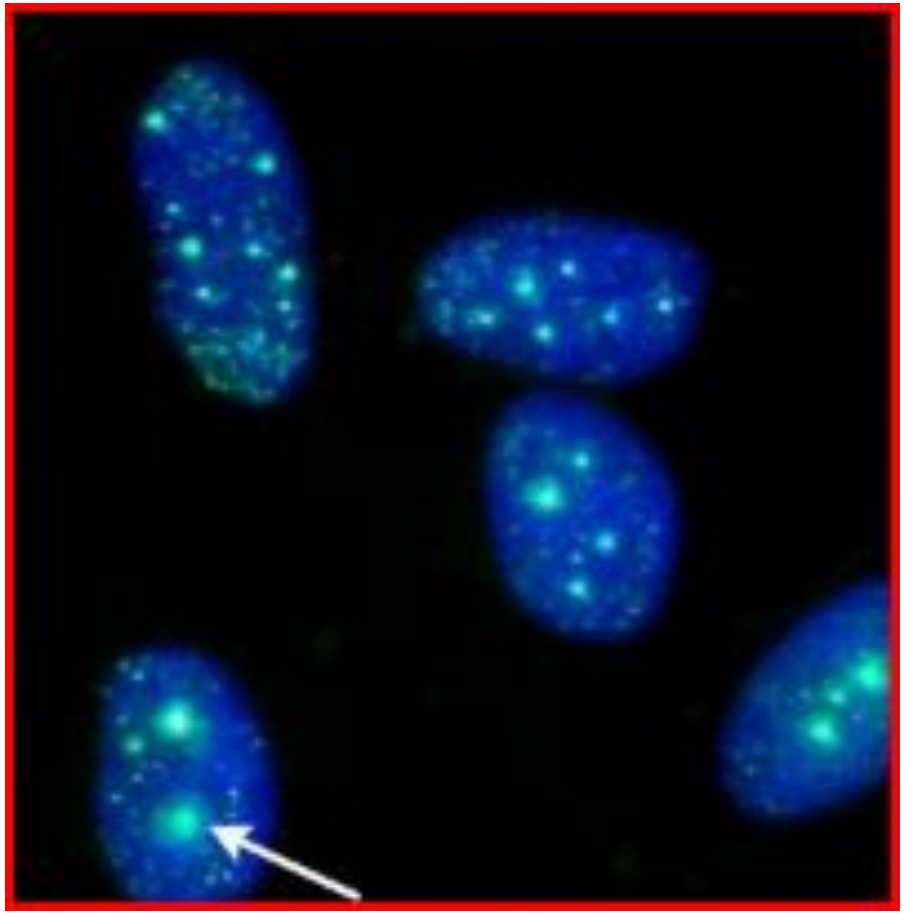
РНК-полимераза (продолжение)

- В эукариотических клетках присутствуют *3 ядерные* ***РНК-полимеразы*** *– I, II, III.*
- РНК полимераза I находится в ядрышке и участвует главным образом в биосинтезе рРНК;
- РНК-полимераза II – осуществляет синтез мРНК;
- РНК-полимераза III отвечает за синтез тРНК и 5S-рРНК.

РНК-полимераза



РНК-полимераза



Стадии транскрипции

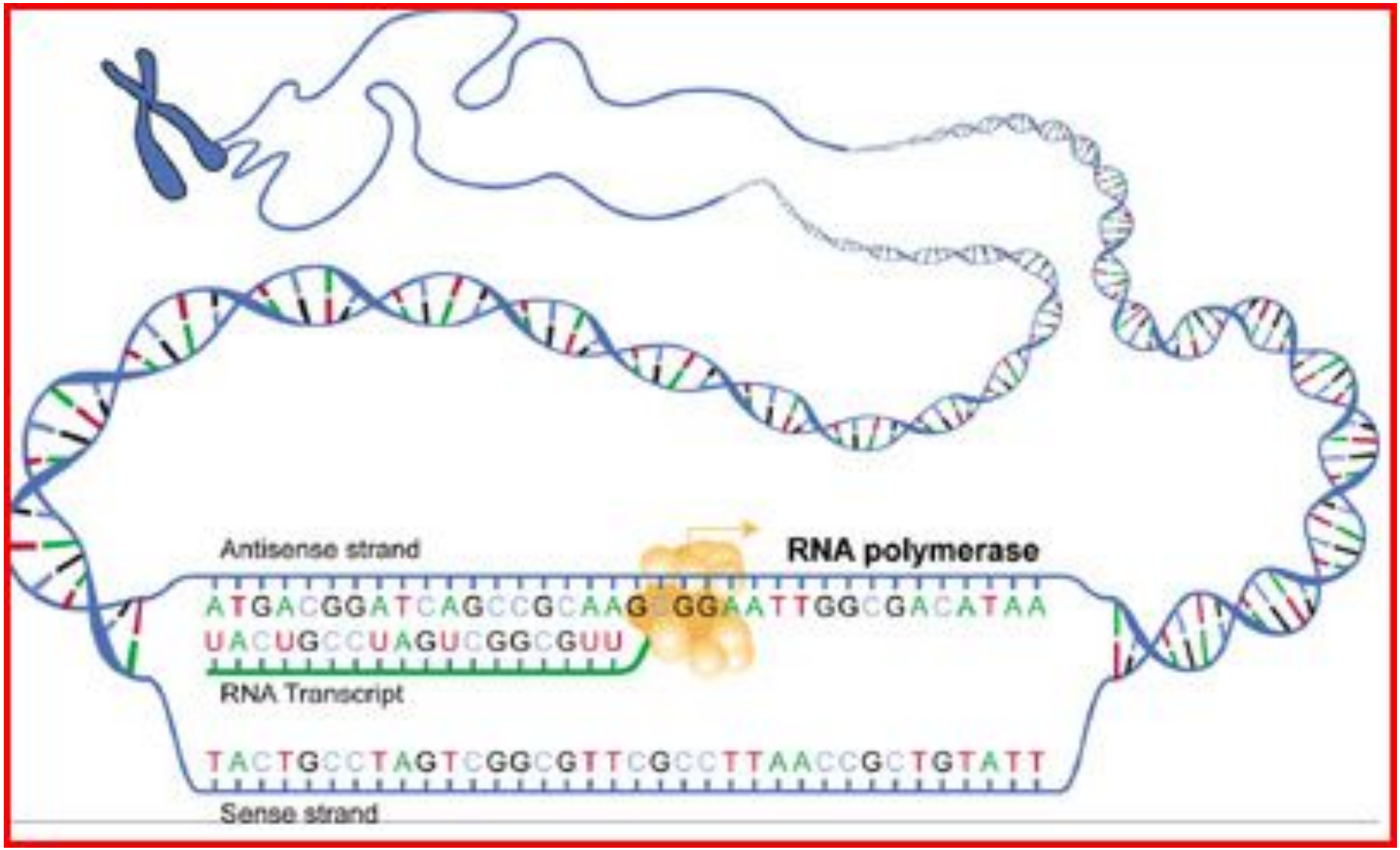
- Инициация
- Элонгация
- Терминация

Стадия инициации

- ***РНК-полимераза*** с помощью σ-субъединицы через серию случайных актов ассоциации-диссоциации ***находит промотор*** и происходит присоединение всей молекулы фермента.
- ***После синтеза*** цепочки РНК примерно из ***8*** рибонуклеотидов ***σ-субъединица отделяется*** от холофермента и присоединяется к другой молекуле РНК-полимеразы.
- Синтезируемые цепи РНК имеют на ***5'-конце*** обычно остаток ***ГТФ*** или ***АТФ*** (pppA, либо pppГ).
- В отличие от синтеза ДНК ***затравка*** в этом случае ***не нужна***.
- Новообразованная цепь РНК имеет трифосфатную группу на 5′-конце и свободную ***ОН-группу на 3'-конце.***

Стадия элонгации

- РНК полимераза синтезирует цепь РНК в направлении ***5'→ 3' антипараллельно матричной*** цепи ДНК (т.е. матричная ДНК копируется в направлении 3′→5′).
- В ходе транскрипции новосинтезированная цепь РНК временно образует короткие отрезки ***гибридной спирали ДНК-РНК***.
- По мере того, как расплетается очередной участок ДНК, транскрибированный участок ***восстанавливает свою двуспиральную конформацию***.

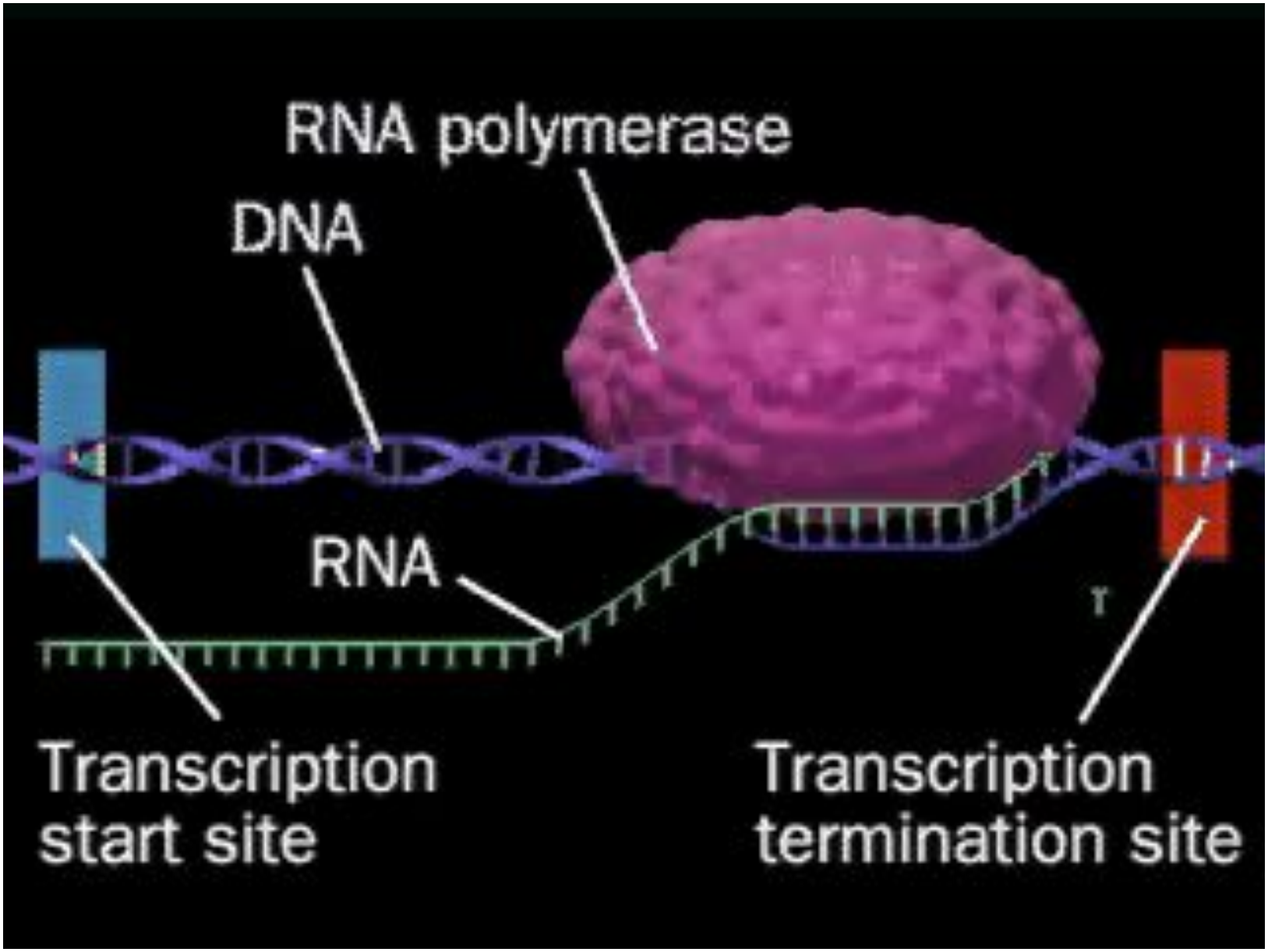

Antisense strand
RNA polymerase
ATGACGGATCAGCCGCAAGCGGAATTGGCGACATAA
UACUGCCUAGUCGGCGUU
RNA Transcript
TACTGCCTAGTCGGCGTTCGCCTTAACCGCTGTATT
Sense strand

Стадия элонгации (продолжение)

- Максимальная скорость элонгации составляет примерно ***50 нуклеотидов в секунду***.
- В отличие от ДНК-полимеразы ***РНК-полимераза не проверяет*** правильности ***новообразованной полинуклеотидной цепи.***
- В связи с этим ***надежность транскрипции значительно ниже***, чем ***надежность репликации***.
- Частота ошибок при синтезе РНК составляет примерно одну ошибку на 10^4-10^5 нуклеотидов, что в ***10^5 раз выше***, чем при синтезе ДНК.
- Гораздо более низкую надежность синтеза РНК клетка обходит тем, что с одного ***гена синтезируется много копий РНК-транскриптов.***

Стадия терминации

- *Сигнал терминации* синтеза молекулы РНК представляет собой ***определенную последовательность нуклеотидов***, расположенную в рамках кодирующей цепи ДНК.
- Процесс терминации у эукариот не достаточно изучен. У E.coli существует два механизма терминации: 1) с участием специфического белка, называемого ***ρ-фактором*** *и* 2) ***ρ-независимый механизм***.


RNA polymerase
DNA
RNA
Transcription
start site
Transcription
termination site

Посттрансляционная модификация РНК

- В результате транскрипции образуются *три типа* **предшественников РНК** (*первичные транскрипты*): предшественник мРНК, или гетерогенная ядерная РНК (пре-мРНК или гяРНК), предшественники рРНК (пре-рРНК).
- Они представляют ***собой копию оперона*** и содержат информативные и неинформативные последовательности.
- ***Образование функционально активных*** молекул РНК называется ***процессингом*** и продолжается после завершения транскрипции.

Посттрансляционная модификация РНК

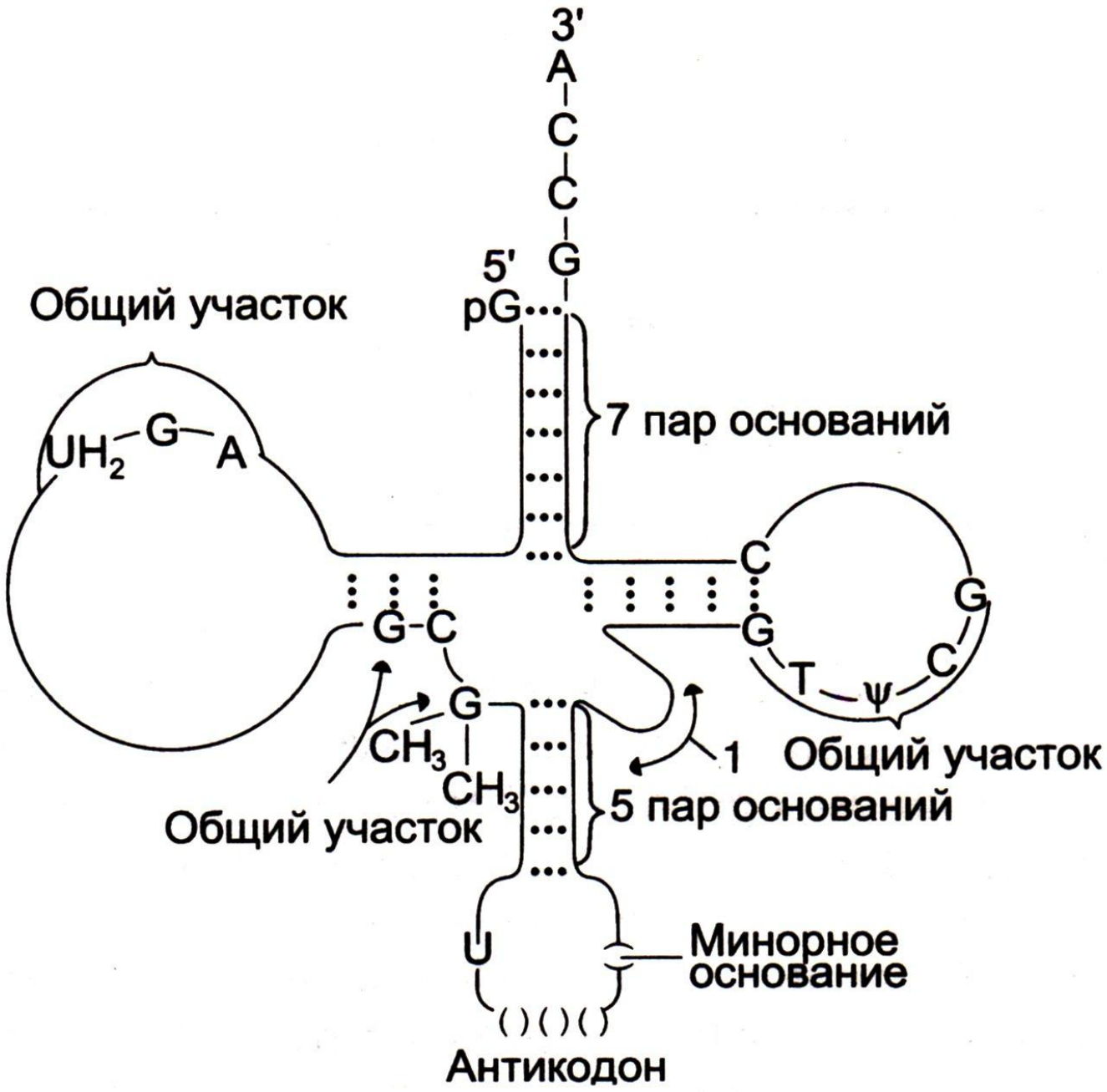
- ***Вырезание*** неинформативных участков (интронов) из пре-мРНК.
- ***Сращивание*** информативных участков (экзонов) – сплайсинг.
- ***Модификация 5’- и 3’-концевых*** участков РНК.

Посттрансляционная модификация мРНК

- Вырезание неинформативных участков пре-мРНК происходит с помощью ***рибонуклеаз и/или рибозимов***
- В ядре происходит ***модификация 5' и 3'-концов мРНК*.**
- К ***5'-концу мРНК*** присоединяется олигонуклеотид, называемый «кэпом» (cap), который способствует стабилизации мРНК и связыванию мРНК с рибосомой для инициации трансляции.
- К ***3'-концу*** присоединяется полиадениловая последовательность (поли-А), состоящая из 50-200 нуклеотидов, который также защищает мРНК от ферментативного разрушения.
- Затем мРНК связывается с белком ***информофером*** и транспортируется в цитоплазму к рибосомам.

Посттрансляционная модификация тРНК

- ***Расщепление*** большого предшественника на молекулы тРНК.
- ***Присоединение характерного ЦЦА-триплета*** к 3′-концу молекулы (акцепторный участок), к которому будет присоединяться соответствующая аминокислота.
- ***Метилирование*** предшественников тРНК млекопитающих происходит в ядре, в расщепление и присоединение ЦЦА-триплета – в цитоплазме.


3'
A
C
C
G
5'
pG
Общий участок
UH2
G
A
7 пар оснований
C
G
G
C
G
T
ψ
C
G
CH3
CH3
1
Общий участок
Общий участок
5 пар оснований
U
Минорное основание
Антикодон

Посттрансляционная модификация рРНК

- ***Метилирование*** на участках, формирующих в дальнейшем ***зрелые молекулы рРНК.***
- Расщепление общего первичного транскрипта на зрелые рРНК.
- Формирование рибосом (большой и малой субъединицы) происходит в комплексе с белками.

Обратная транскрипция

ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ

- Обратная транскриптаза содержится в ***РНК-ретровирусах,*** обладает тремя видами активности:

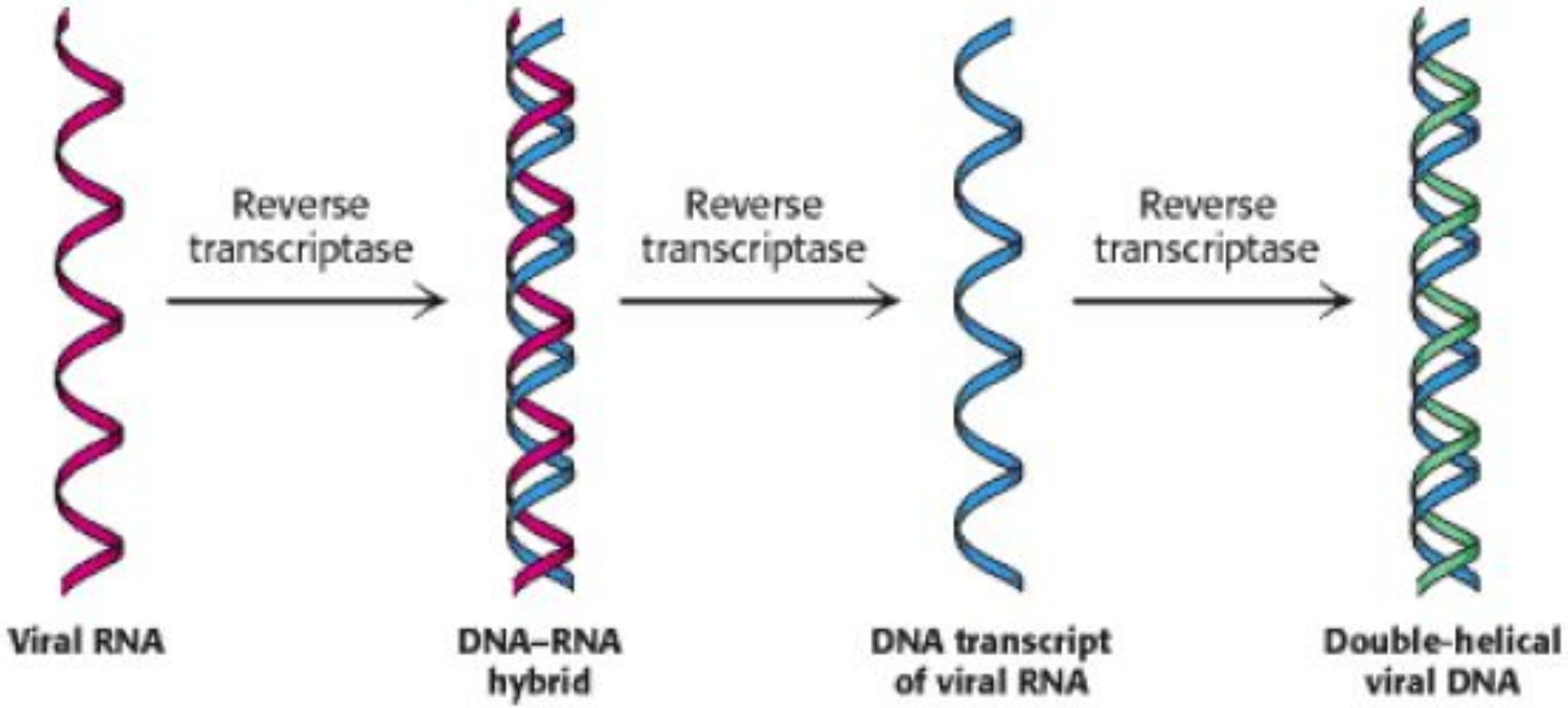
1) РНК-зависимой ДНК-полимеразной;

2) рибонуклеазной;

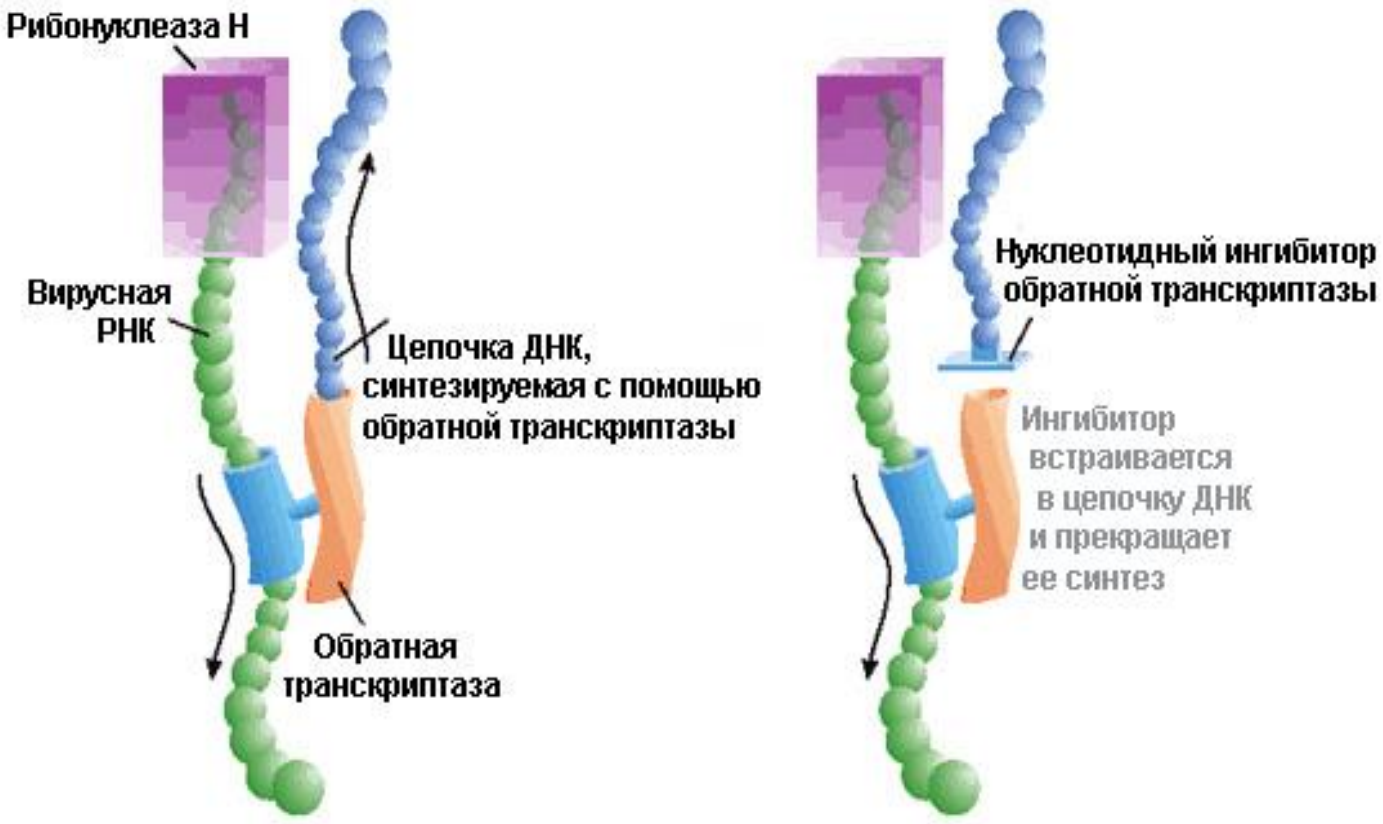
3) ДНК-зависимой ДНК-полимеразной.

Стадии обратной транскрипции

- На матрице РНК по принципу комплементарности синтезируется ДНК - комплементарная ДНК (кДНК).
- Происходит гидролиз РНК.
- На кДНК синтезируется 2-я цепь ДНК.


Reverse transcriptase
Reverse transcriptase
Reverse transcriptase
Viral RNA
DNA–RNA hybrid
DNA transcript of viral RNA
Double-helical viral DNA

Ингибиторы обратной транскриптазы

- По принципу действия ингибиторы обратной транскриптазы делятся на нуклеозидные (НИОТ), нуклеотидные (НтИОТ) и ненуклеозидные (ННИОТ).
- НИОТ поставляют для вирусной ДНК - неправильные нуклеозиды. Действие НтИОТ поставляют неправильные нуклеотиды.

Ингибиторы обратной транскриптазы