

Молекулярная биология

**Курс лекций для студентов IV курса факультета
биологии РГПУ им. А.И. Герцена**

Направление 06.03.01 Биология

Профиль «Общая биология»

ЛЕКЦИЯ 3

**Профессор кафедры Зоологии, д.б.н., профессор
Цымбаленко Надежда Васильевна**

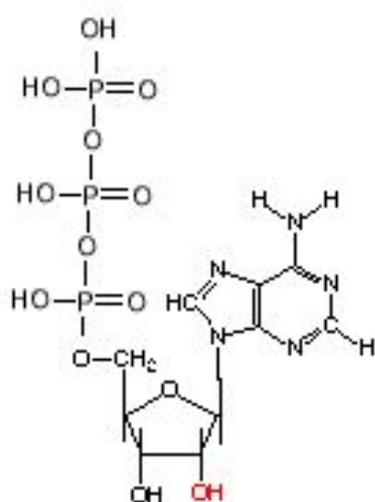
Тема 3(2). **ФУНКЦИИ ДНК**
ТРАНСКРИПЦИЯ

Т Р А Н С К Р И П Ц И Я

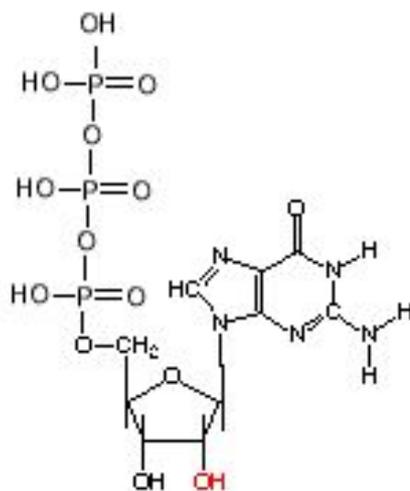
(прокариоты)

- **Транскрипция** - это синтез всех видов РНК по матрице ДНК, осуществляемый ферментом ДНК-зависимой РНК-полимеразой.

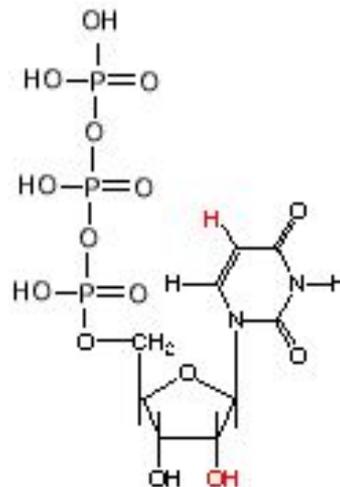
Активированные рибонуклеотиды



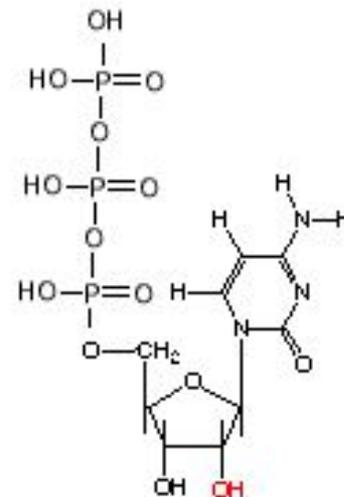
Аденозинтрифосфат
(АТФ)



Гуанозинтрифосфат
(GTP)



Уридинтрифосфат
(UTP)



Цитидинтрифосфат
(CTP)

Пуриновые

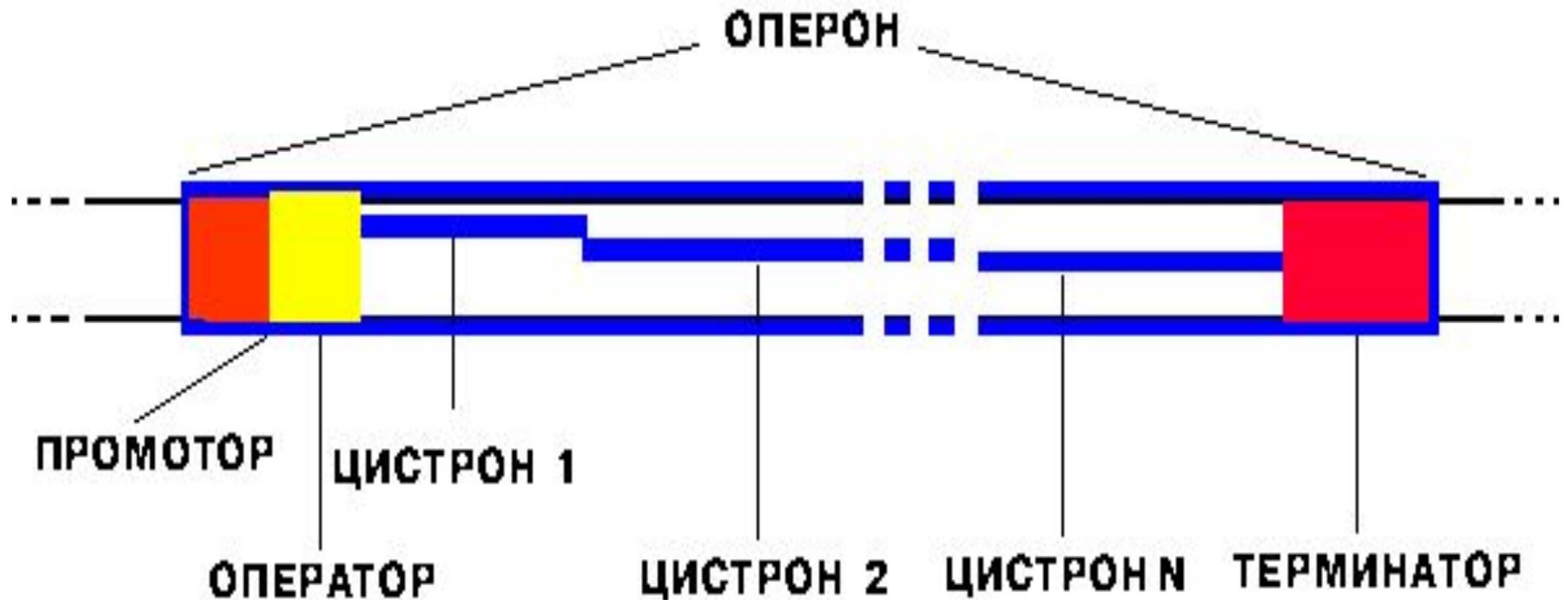
Пиримидиновые

Принципы транскрипции:

- 1. *Комплементарность.*
 - 2. *Антипараллельность.*
 - 3. *Униполярность.*
 - 4. *Беззатравочность.*
 - 5. *Асимметричность.*
-
- РНК синтезируется комплементарно и антипараллельно транскрибируемой цепи ДНК. Рост цепи РНК идет только в направлении $5' \rightarrow 3'$. Для начала синтеза РНК фермент не нуждается в поли- или олигонуклеотидной затравке.
 - *Первый нуклеотид в РНК всегда пурин в форме трифосфата.*

Поняtie об опероне

Оперон - единица транскрипции у прокариот



Промотор - особая последовательность нуклеотидов ДНК, узнаваемая РНК-полимеразой как посадочная площадка и старт синтеза РНК.

Только с промотора может начаться синтез специфической РНК.

Терминатор - особая последовательность нуклеотидов ДНК, узнаваемая РНК-полимеразой как финиш транскрипции.

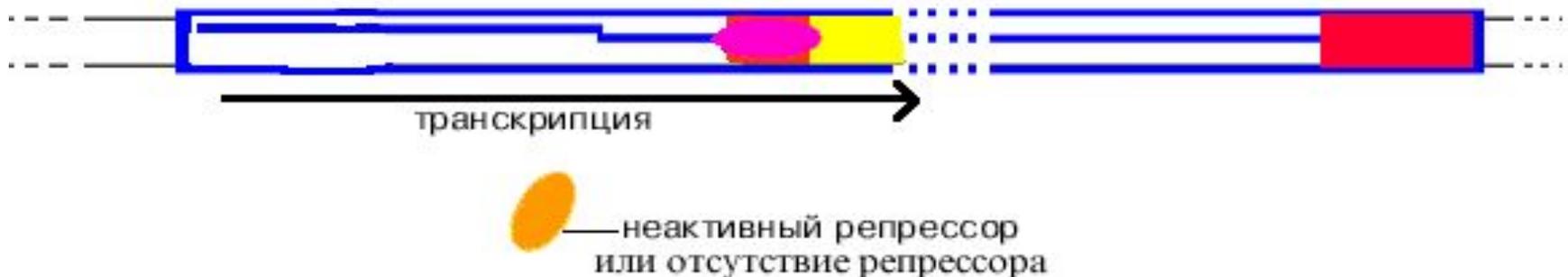
Цистрон - последовательность нуклеотидов ДНК, кодирующая один полипептид (в большинстве случаев - белок) или одну тРНК, или одну рРНК

Оператор - особая последовательность нуклеотидов ДНК, узнаваемая белком-репрессором.

- На операторе - белок репрессор. Оперон не транскрибируется.

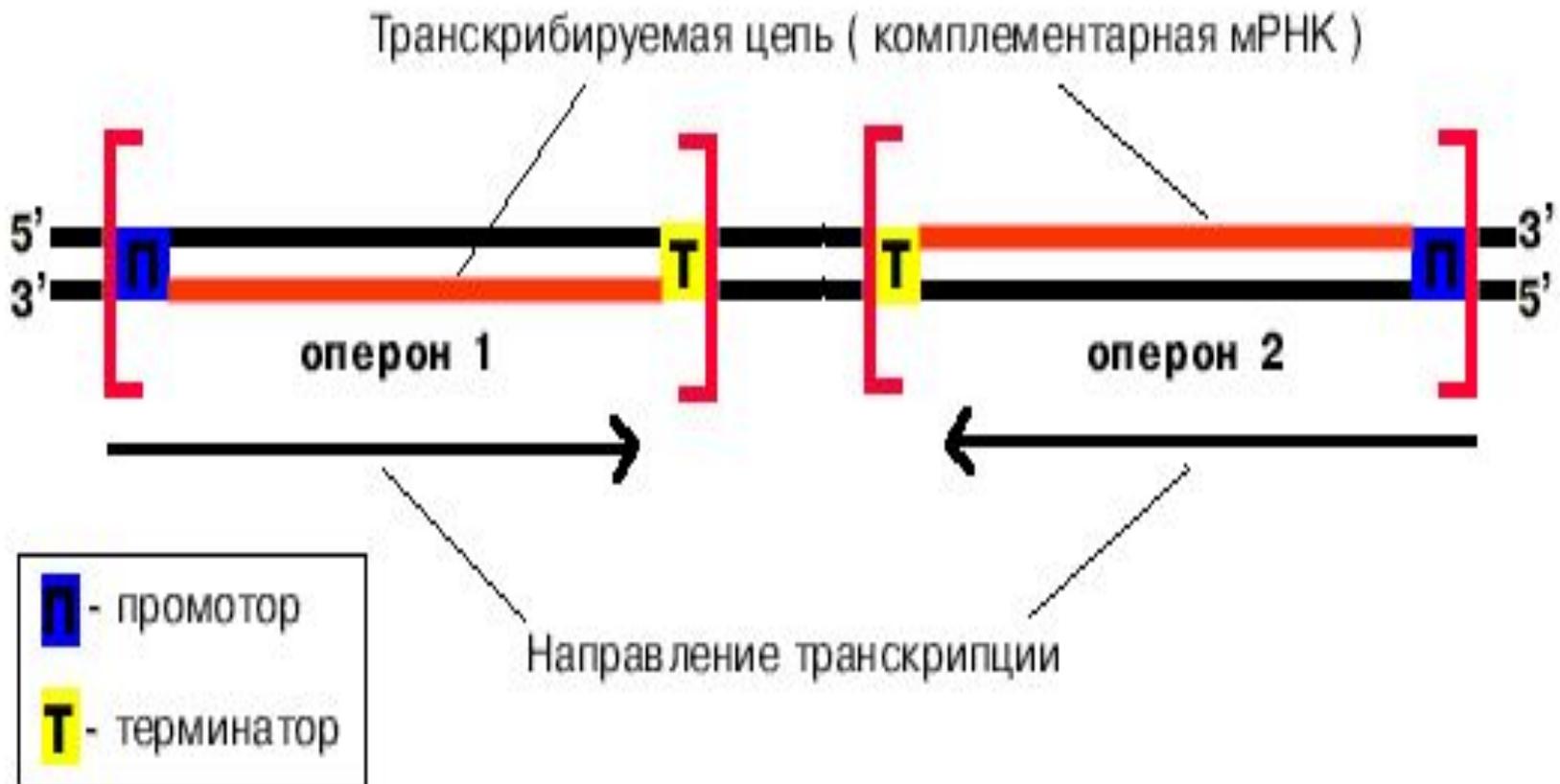


Оператор свободен. Оперон транскрибируется.

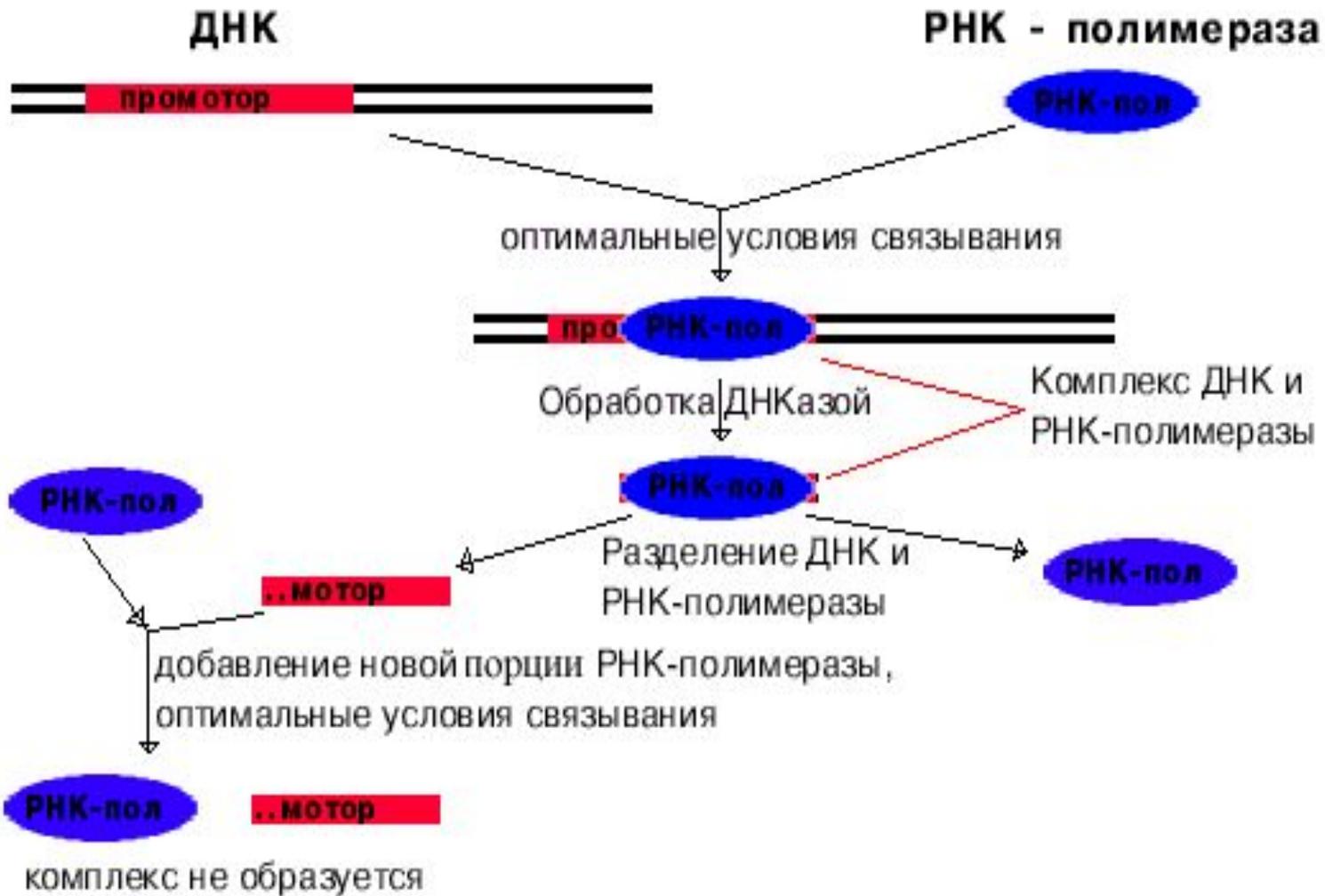


Асимметричность

Транскрибируются обе цепи ДНК, но в каждом отдельном опероне только одна из них. Какая именно, определяется положением промотора и терминатора.



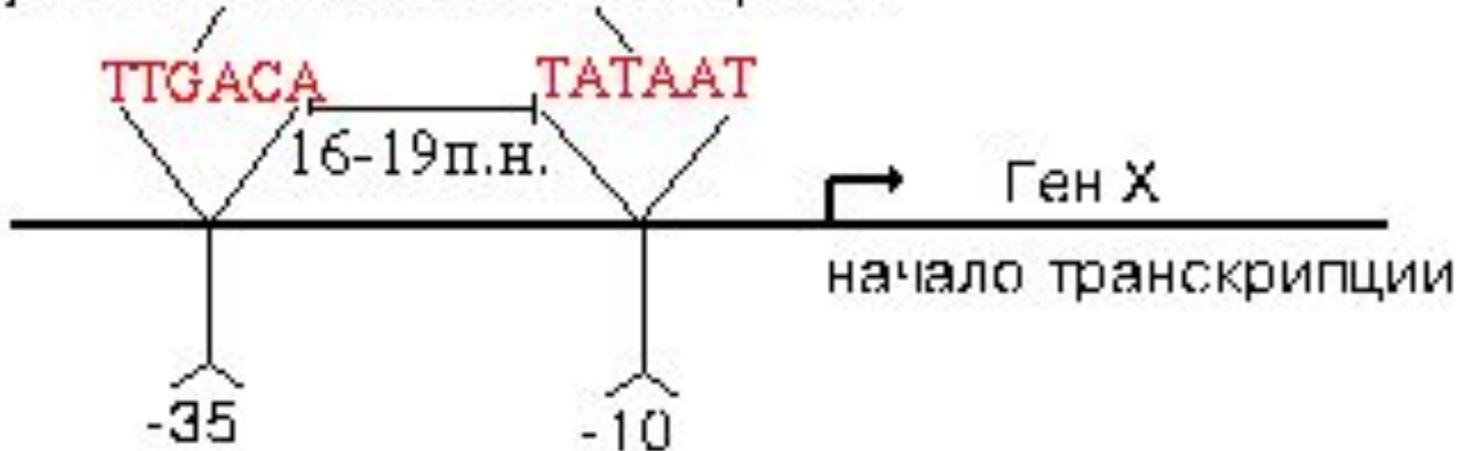
Особенности структуры промотора



Узнавание и прочное связывание происходит на разных участках ДНК.

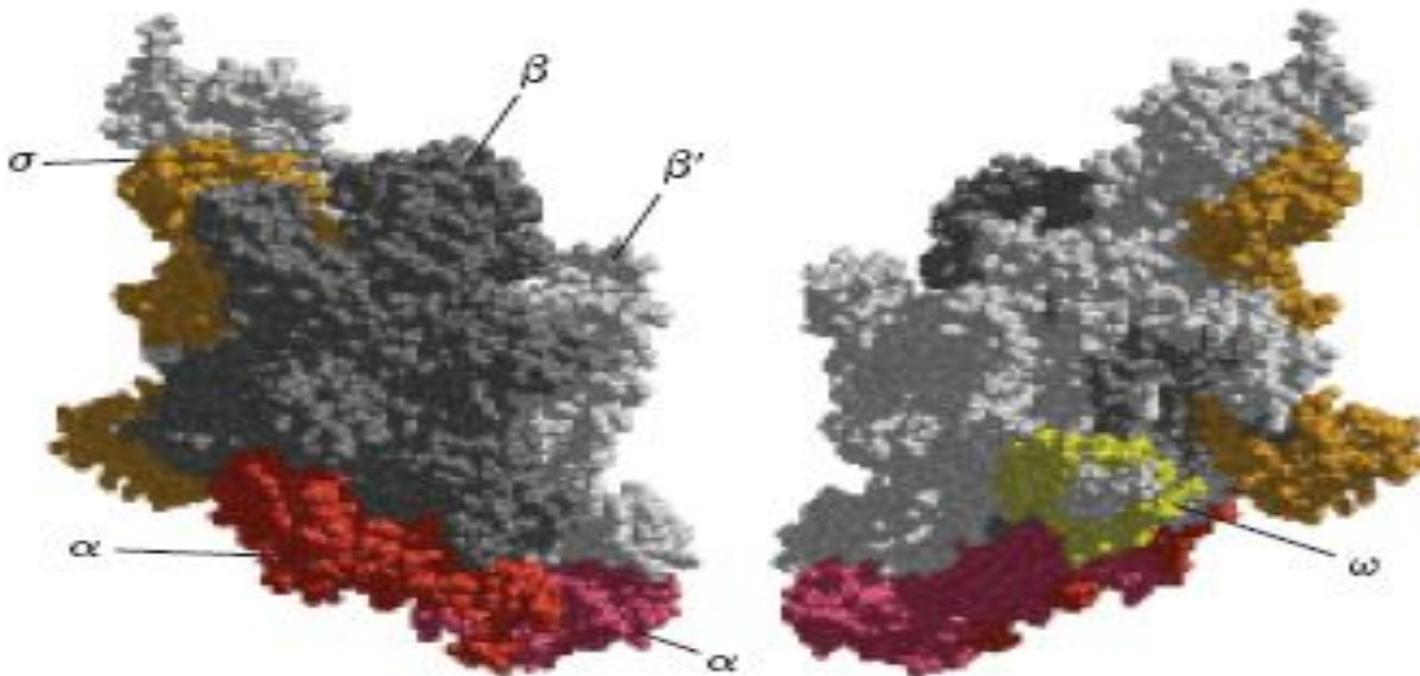
Эти участки отличаются и по первичной, и по вторичной структуре. Путем секвенирования выявили структуру многих промоторов. У большинства из них имеется общее свойство.

консенсусные АТ-богатые последовательности,
узнаваемые РНК-полимеразой



Структура ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E.coli*

6 субъединиц: 2α β β' ω δ - **холо**фермент
 2α β β' ω - **core**-фермент
Кофактор: ионы Mg

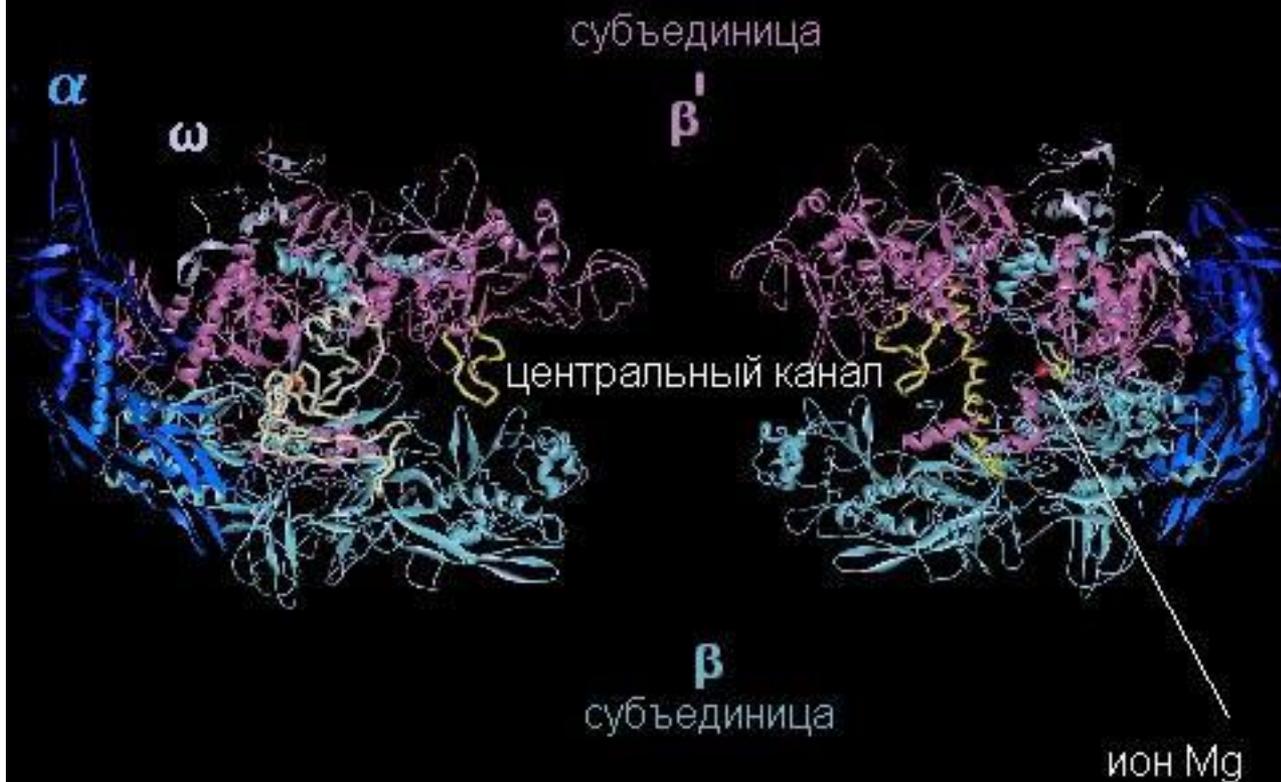


- **$\alpha 2$** : две α -субъединицы связывают остальные элементы фермента и распознают регулирующие факторы. Каждая субъединица состоит из двух доменов: α СКД (С-концевой домен) связывает первый элемент промотора, и α НКД (N-концевой домен) связывается с остальными компонентами полимеразы.
- **β** : эта субъединица обладает собственно полимеразным действием, катализируя синтез РНК. Она осуществляет инициацию процесса и управляет элонгацией.
- **β'** : неспецифически связывается с ДНК.
- **ω** : восстанавливает денатурированную РНК-полимеразу обратно в дееспособную форму *in vitro*. Также обнаружено ее защитное/шаперонное действие на β' -субъединицу у *Mycobacterium smegmatis*.
- Для связывания с промоторными областями ДНК, основной фермент нуждается в еще одной субъединице — сигма (**σ**). Сигма-фактор значительно снижает сродство РНК-полимеразы к неспецифичным областям ДНК, и в то же время повышает ее чувствительность к определенным промоторам, в зависимости от своей структуры. С его помощью транскрипция начинается с нужного участка ДНК.

Бактериальная РНК-полимераза: структура кор-фермента

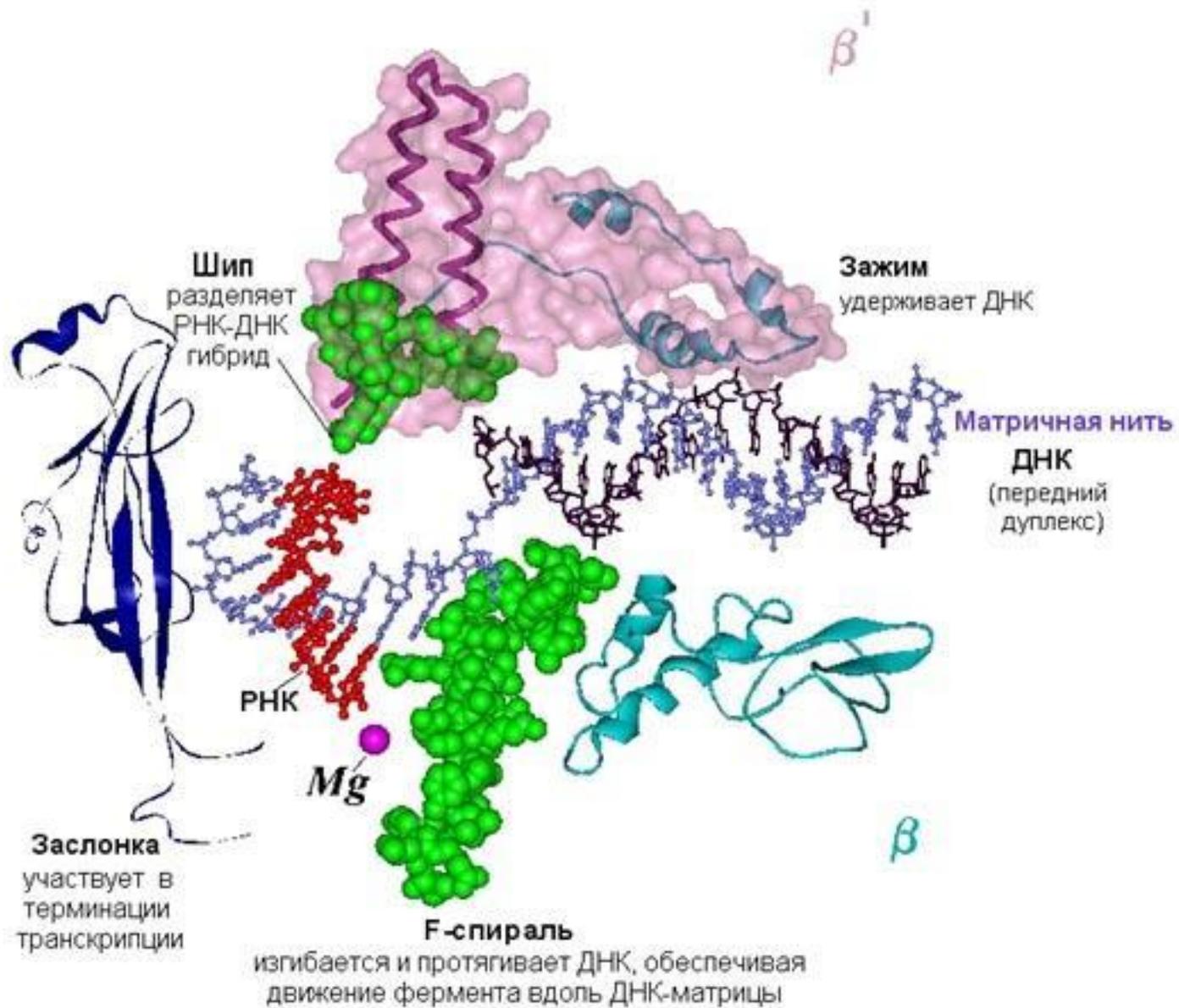
вид справа

вид слева

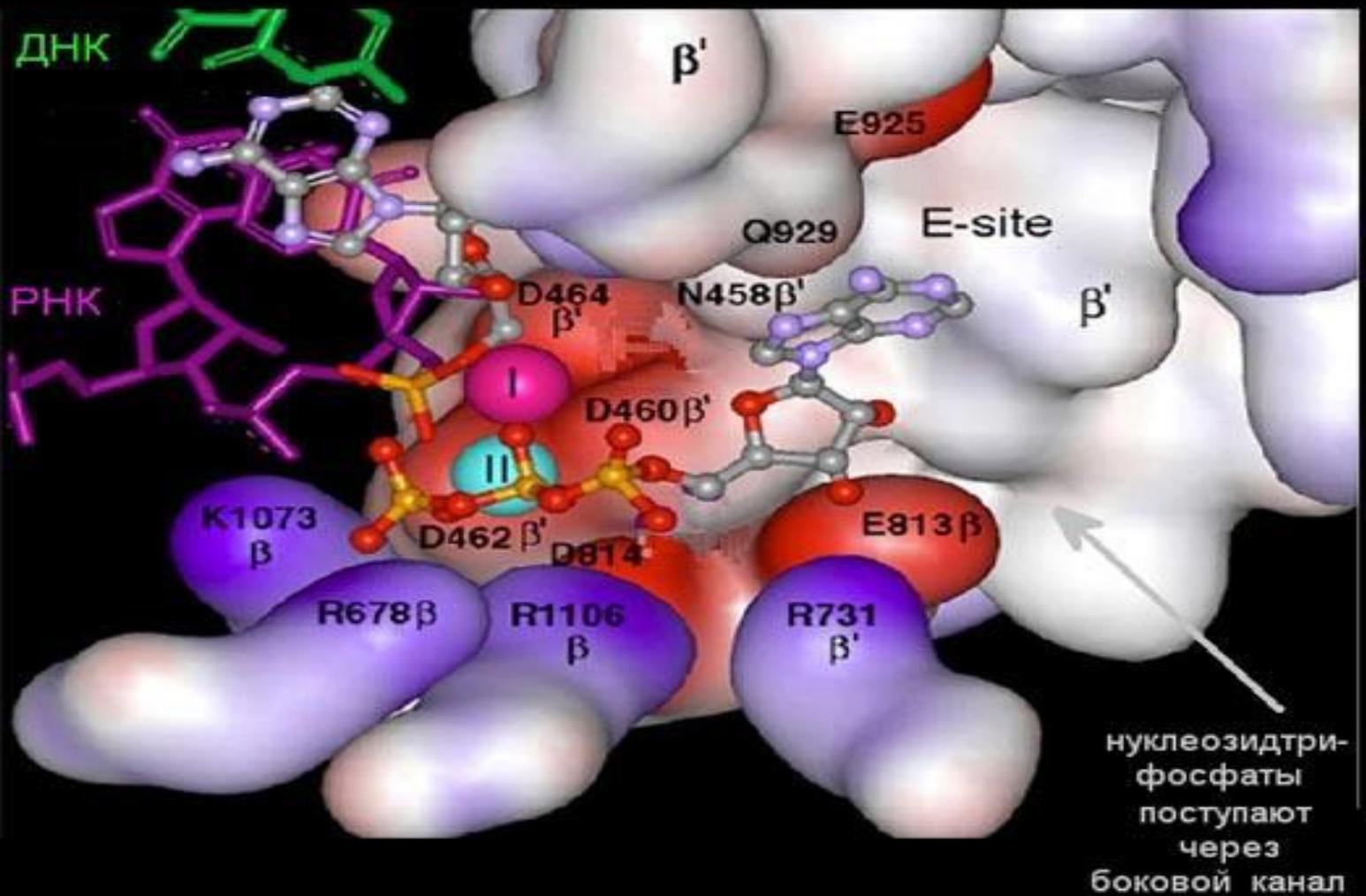


желтым указаны элементы структуры
(заслонка, шип и F-спираль),
приведенные на следующем рисунке

СТРУКТУРНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ



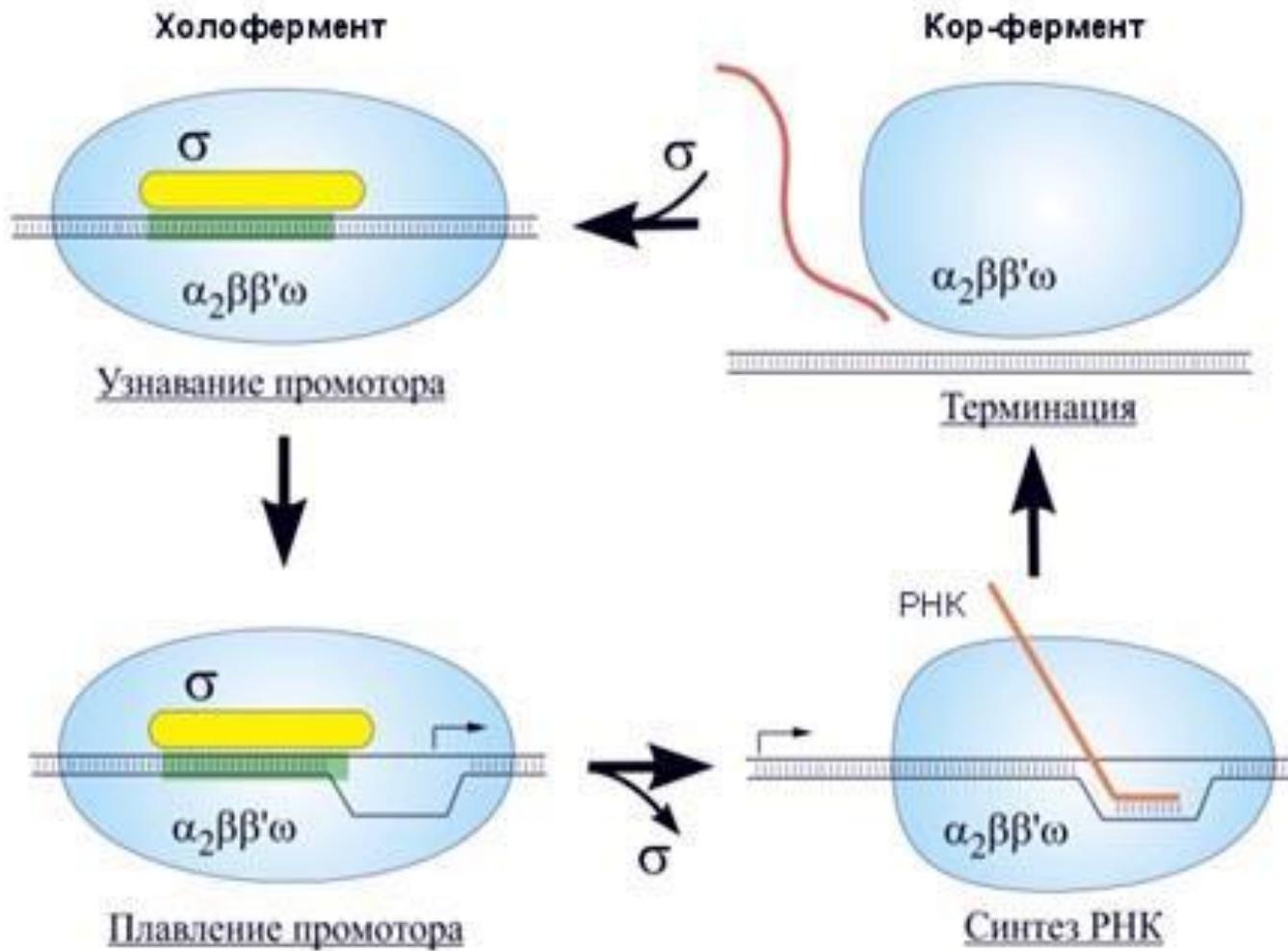
СТРУКТУРА АКТИВНОГО ЦЕНТРА РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ



I II - ионы Mg

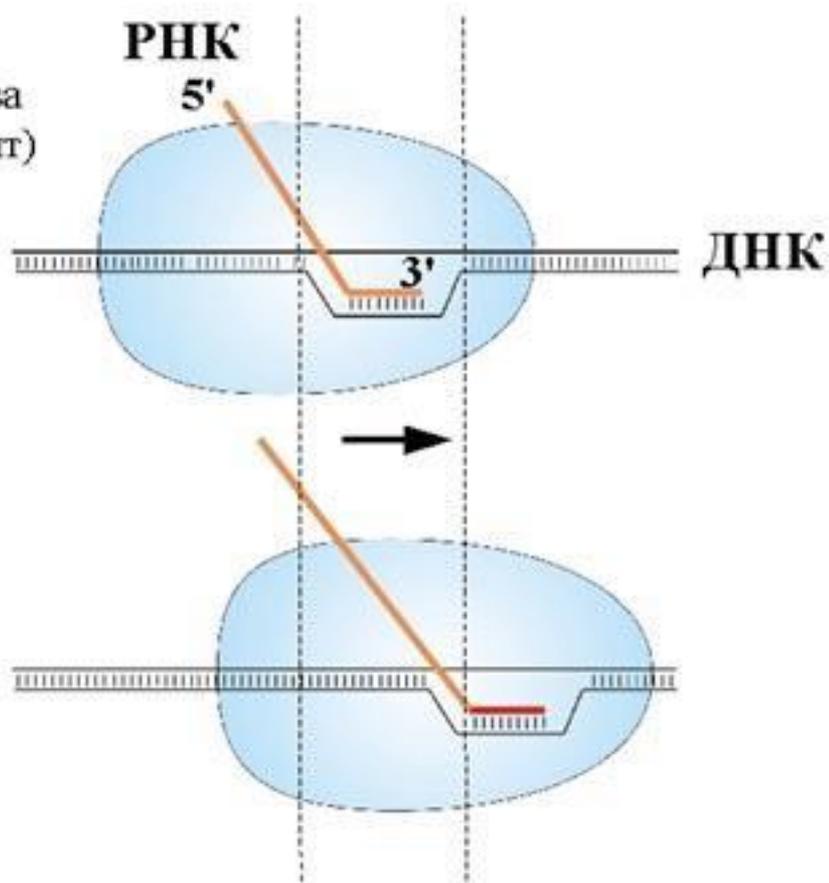
Указаны номера аминокислотных остатков β и β' субъединиц, участвующих в формировании активного центра

Общая схема транскрипционного цикла



ЭЛОНГАЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ

РНК-
полимераза
(кор-фермент)



Синтез РНК:
наращивается
3'-конец
молекулы РНК

Элонгационный комплекс

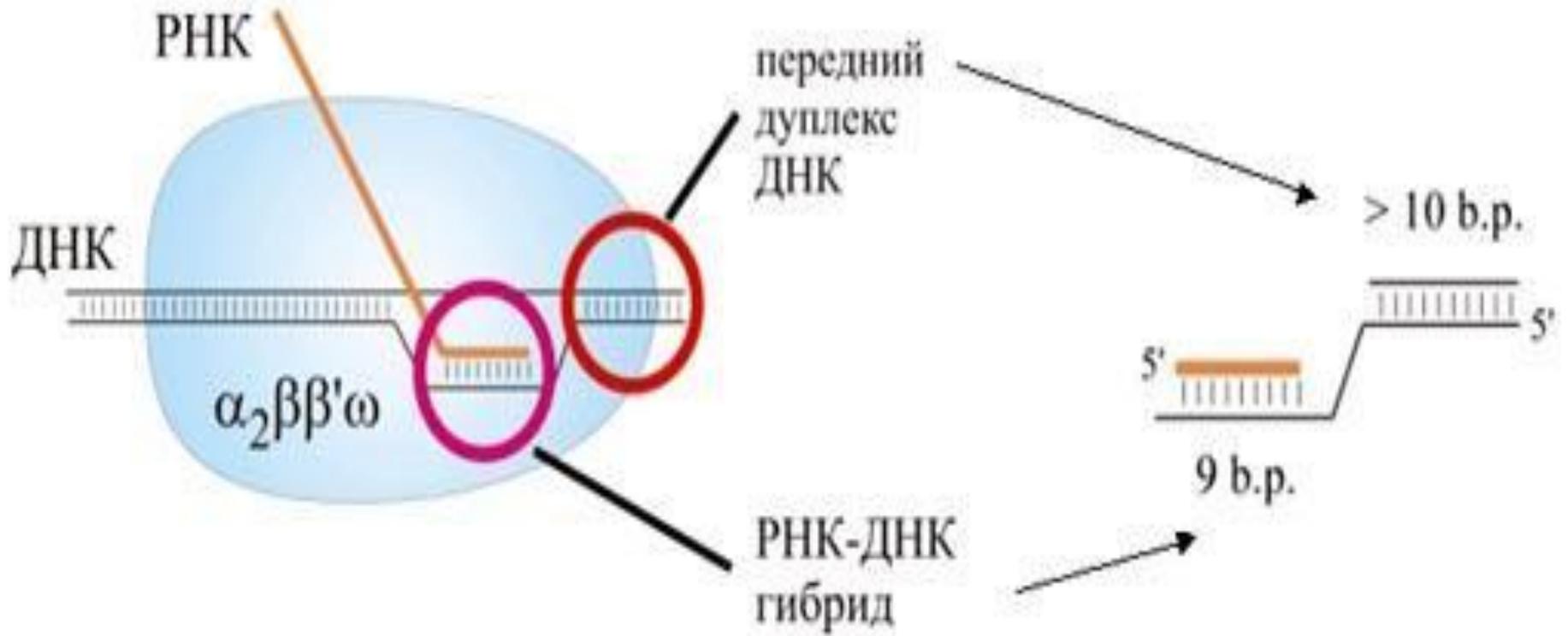
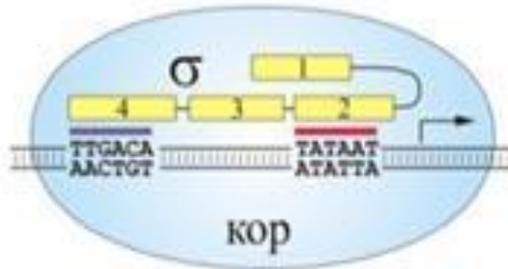
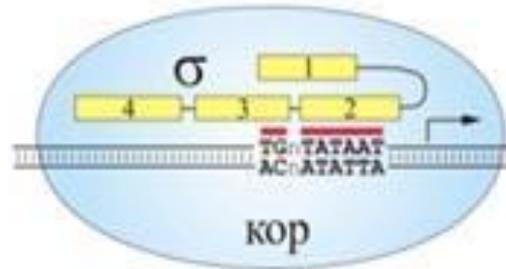


СХЕМА ИНИЦИАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ

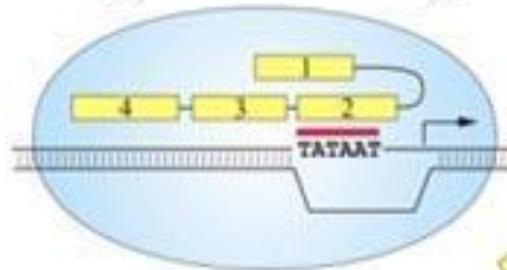
Взаимодействие холофермента с
"классическим промотором"



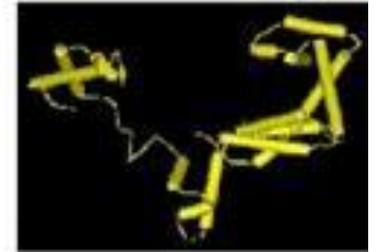
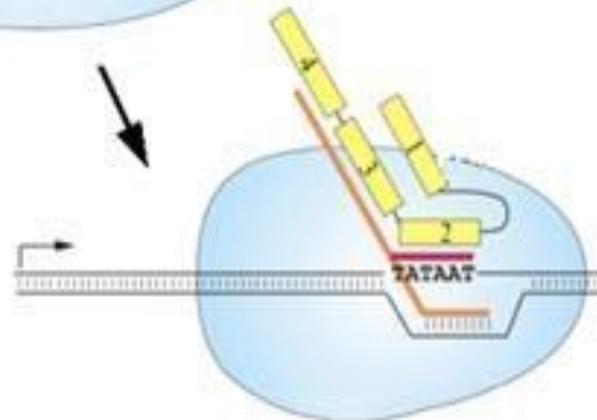
Взаимодействие холофермента с
"расширенным промотором"



Образование
"открытого комплекса"
(плавление участка ДНК)



синтезируемая РНК
вытесняет σ -субъединицу

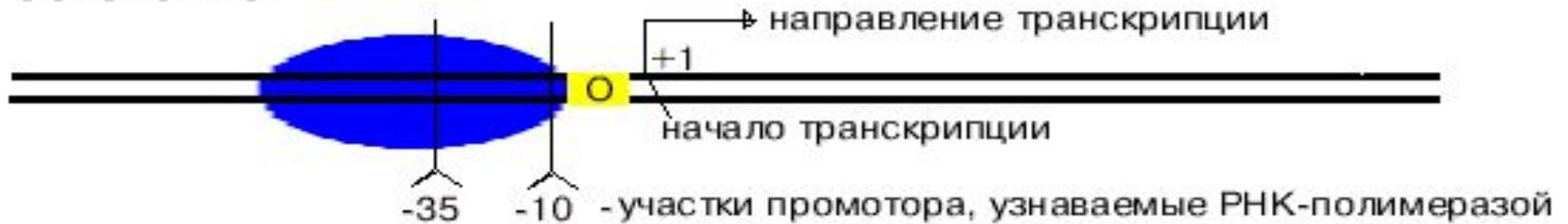


Третьичная структура
 σ -субъединицы
(цилиндры изображают
альфа-спирали)

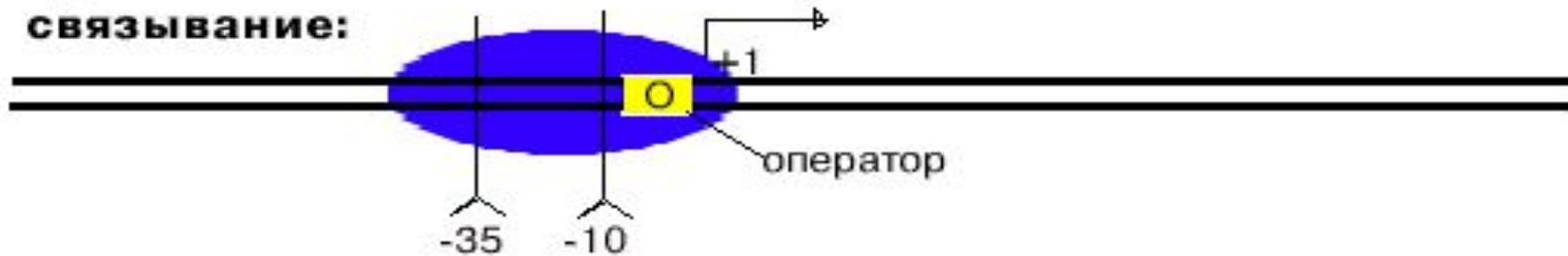
Этапы транскрипции

1. Узнавание и прочное связывание

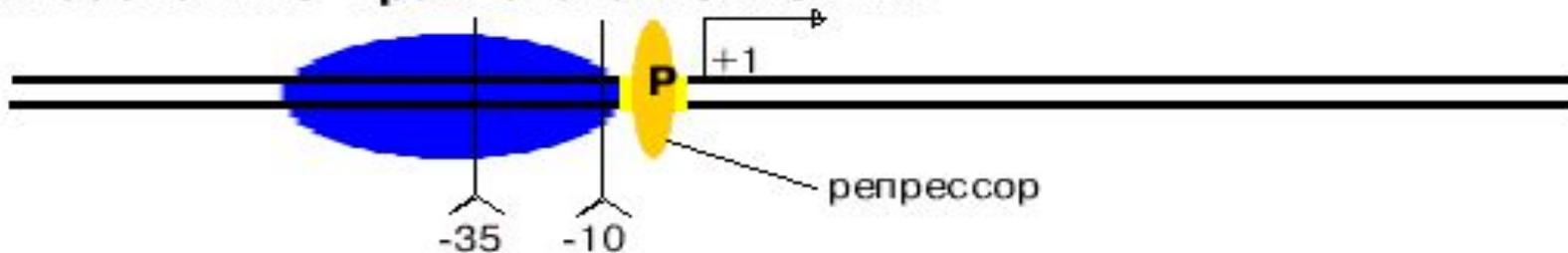
Узнавание:



Прочное связывание:



Белок-репрессор мешает переходу из состояния узнавания в состояние прочного связывания:



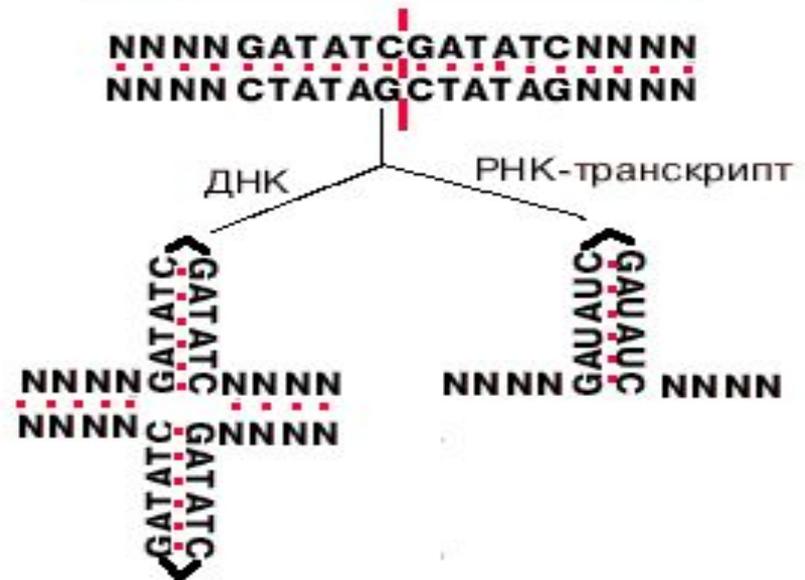
Примерно 5% промоторов у прокариот имеют только участок "-10", однако, тем не менее, хорошо узнаются РНК-полимеразой. Такие промоторы представлены **палиндромными** последовательностями, принимающими форму креста при суперспирализации кольцевых молекул ДНК.

Палиндромы - последовательности, которые читаются одинаково слева направо и справа налево.

Словесные палиндромы:

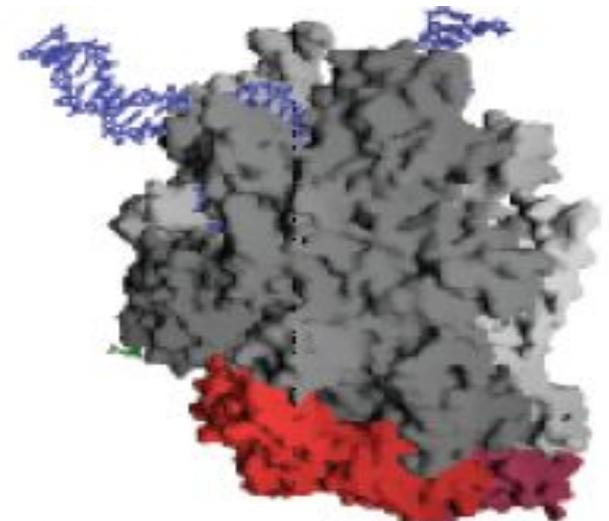
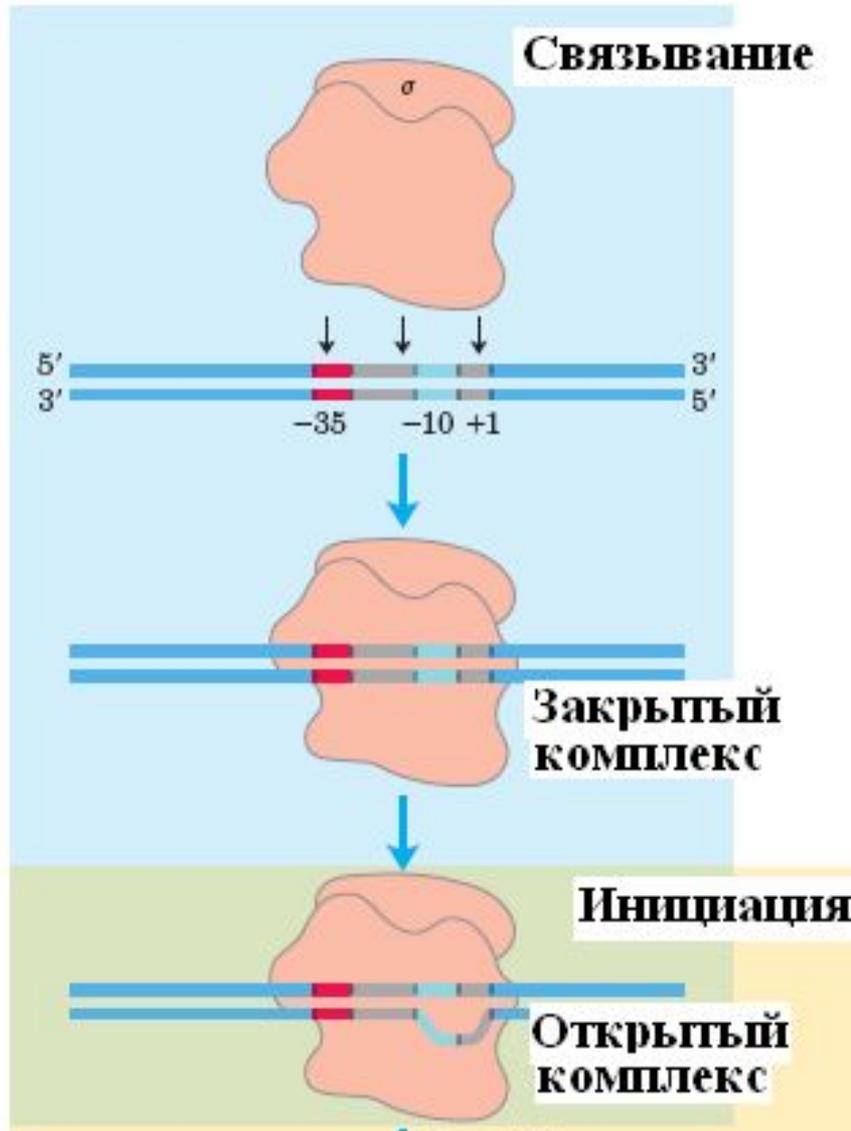
КАЗАК
 А РОЗА УПАЛА НА ЛАПУ АЗОРА

Палиндромы
 в нуклеиновых кислотах:

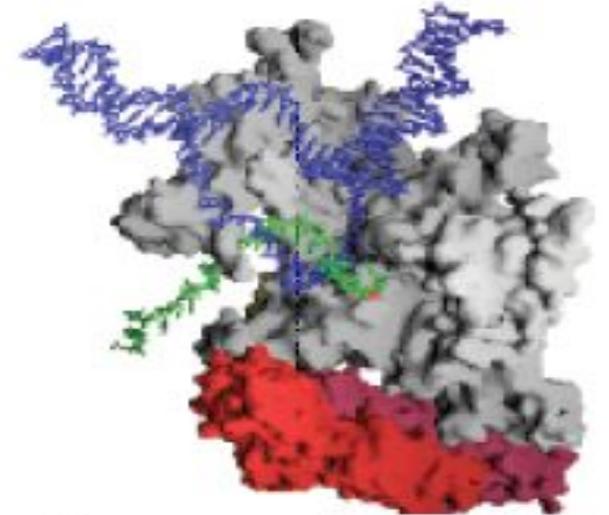


- 2. Инициация** заключается в образовании первой фосфодиэфирной связи между пури-трифосфатом (АТФ или ГТФ) и следующим нуклеотидом. После инициации - фактор покидает фермент.
- 3. Элонгация** - последовательное наращивание цепи РНК (или продолжение транскрипции).
- 4. Терминация.** Специфическая терминация бывает: - - рнезависимой и рзависимой.
- "Мотором" транскрипции является энергия, высвобождающаяся при отщеплении пирофосфата от каждого рибо-НТФ.
- **Ингибиторы транскрипции**
 - *Рифампицин* - ингибитор инициации. Связывается с центром инициации *holo*-РНК-полимеразы *E. coli*.
 - *Стрептолидигин* - ингибитор элонгации. Связывается с центром элонгации *core*-РНК-полимеразы *E. coli*.

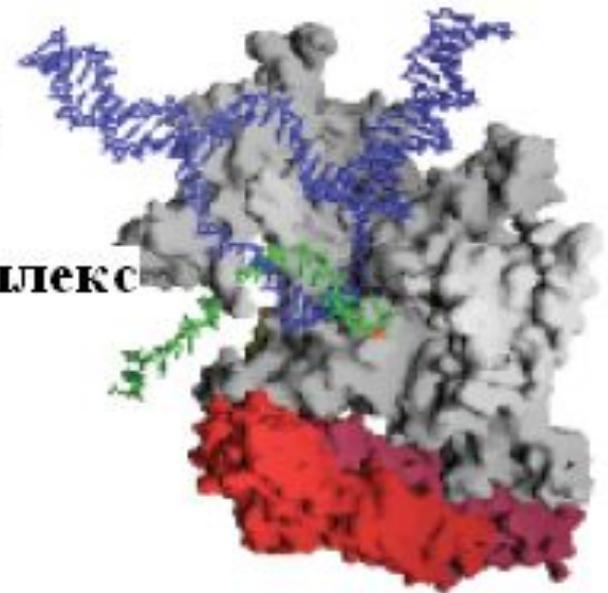
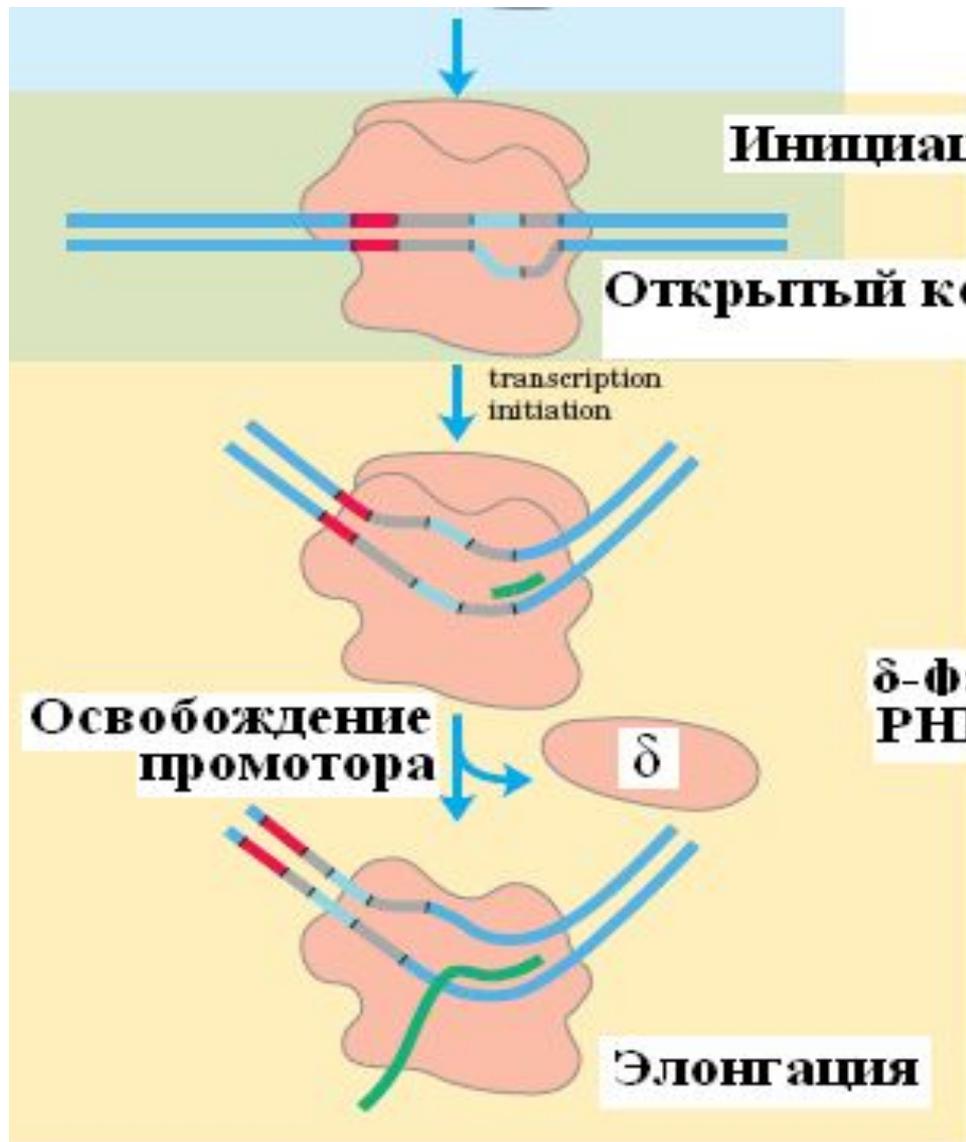
СХЕМА ЭТАПОВ ТРАНСКРИПЦИИ



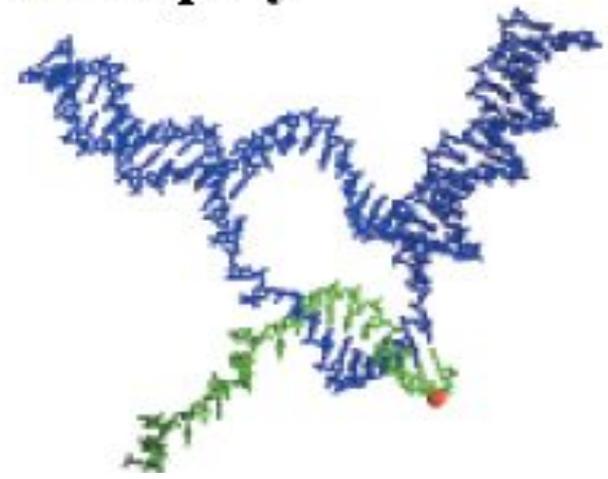
Закранный комплекс



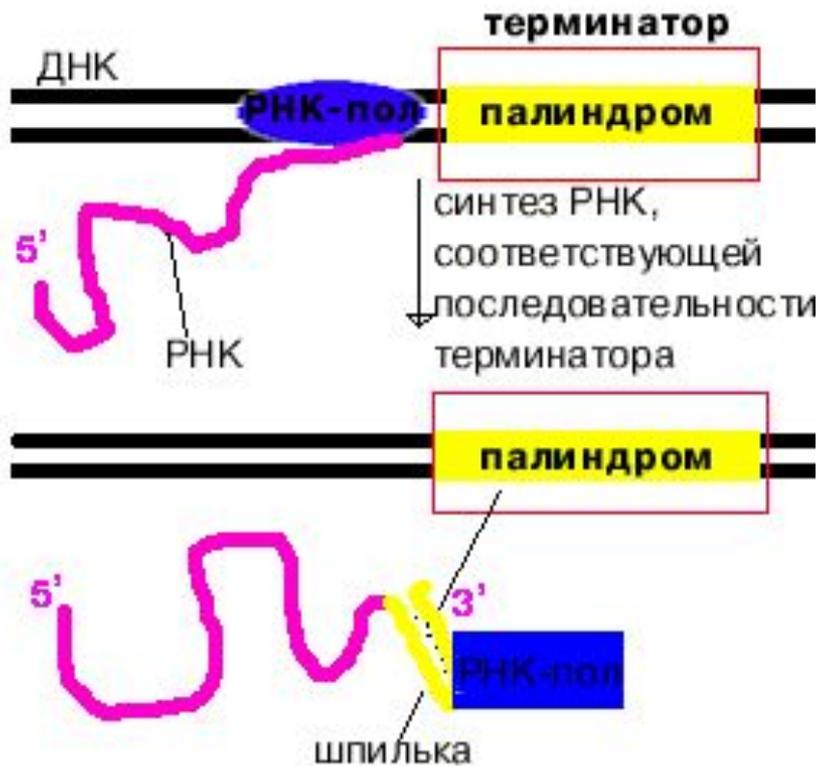
Открытый комплекс



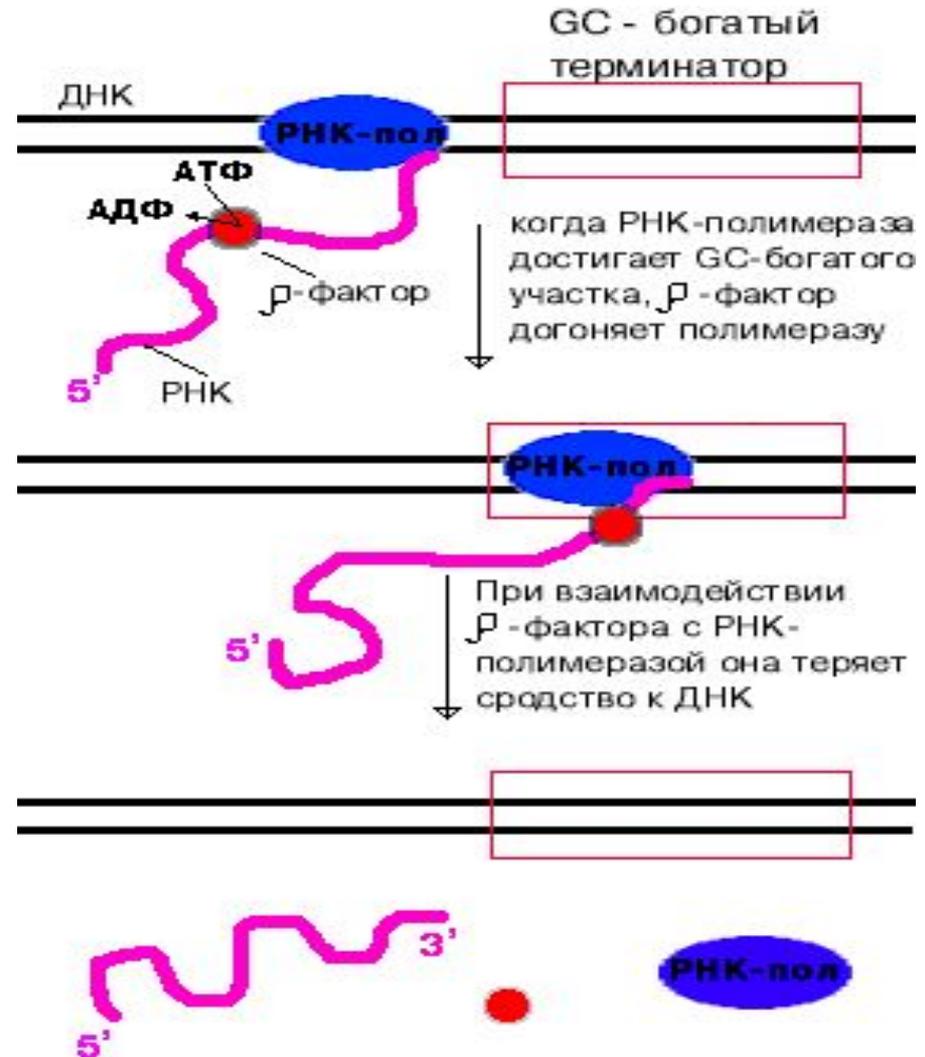
δ -Фактор покидает РНК-полимеразу



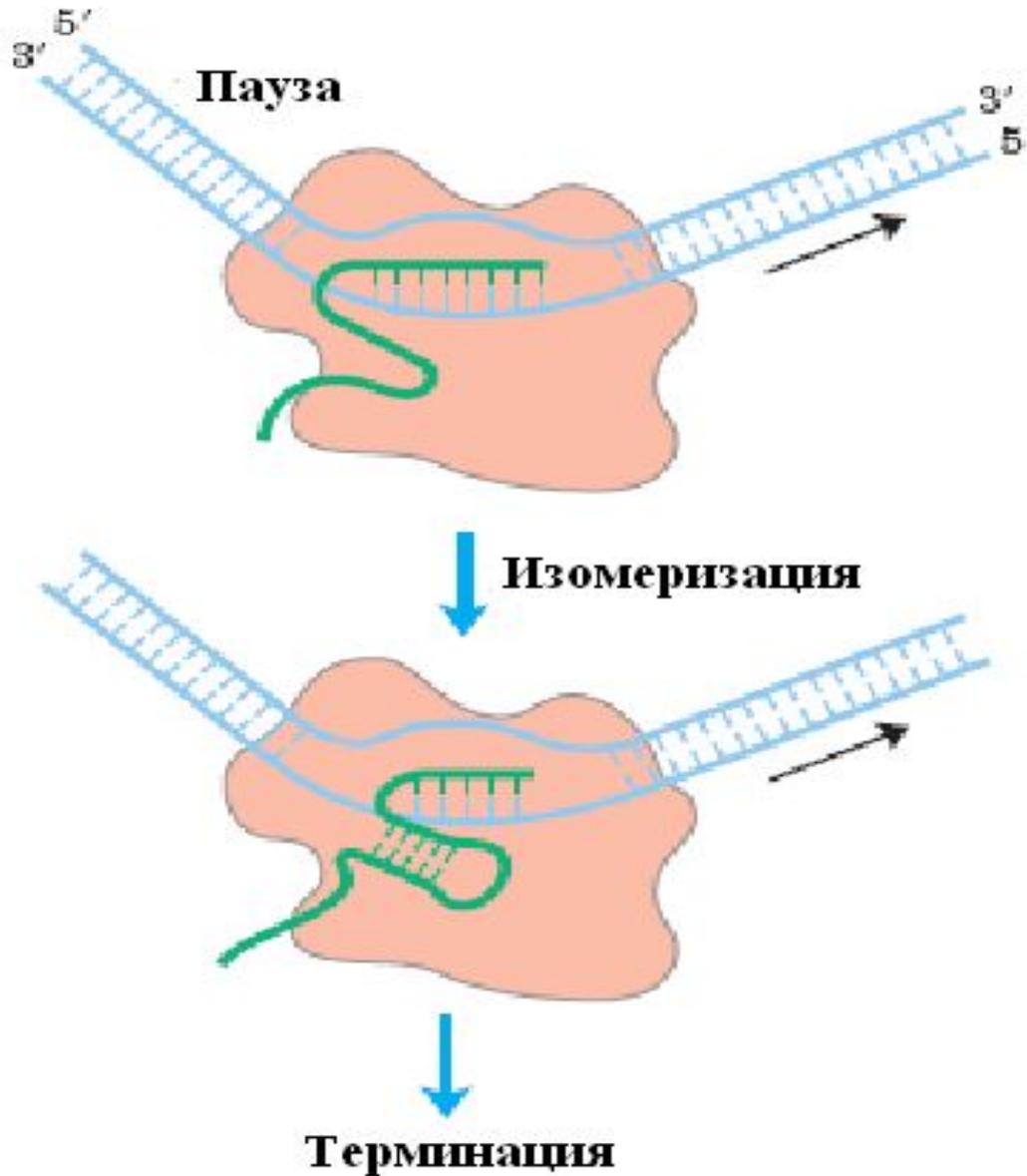
ρ - независимая терминация



ρ - зависимая терминация



ρ - независимая терминация



Регуляция транскрипции у прокариот

Схема негативной индукции Жакоба и Моно

- ***Lac-оперон*** *E. coli* содержит 3 гена, отвечающие за образование белков, участвующих в переносе в клетку дисахарида лактозы и в ее расщеплении.
- ***Z - галактозидаза*** (расщепляет лактозу на глюкозу и галактозу).
- ***Y - галактозидпермеаза*** (переносит лактозу через мембрану клетки).
- ***A - тиогалактозидтрансациетилаза*** (ацетилирует галактозу).

Эта схема называется так потому, что контролирующим транскрипцию фактором является **негативный** фактор, "выключатель" - белок - **репрессор**. **Индукция** (включение) происходит при потере сродства белка - репрессора к оператору

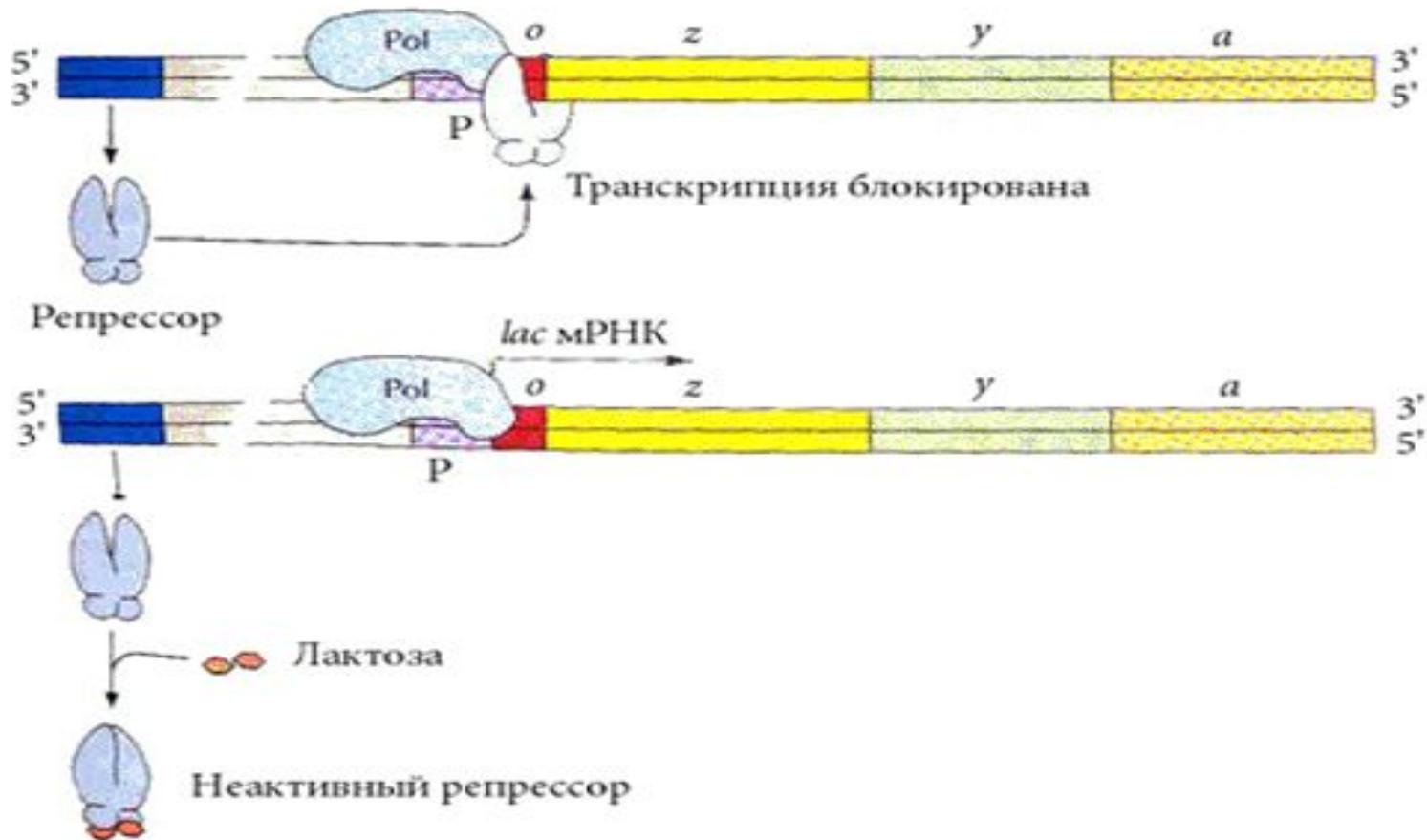


Схема позитивной индукции Ara-оперон E. coli

Эта схема регуляции называется **ПОЗИТИВНОЙ индукцией**, поскольку контролирующий элемент - белок - **активатор** "включает" работу оперона.

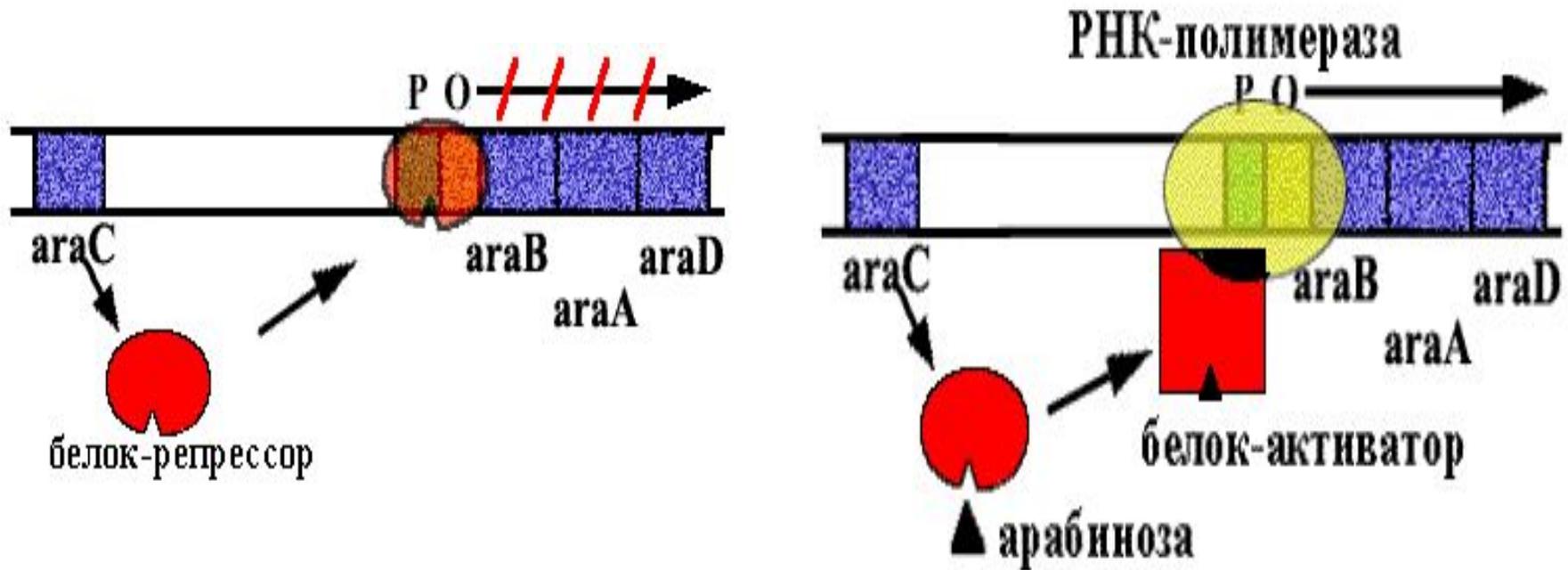


Схема позитивной репрессии

Оперон синтеза *рибофлавина* у *Bacillus subtilis*.

Позитивная репрессия, поскольку в регуляции участвует белок - *активатор*, а сама регуляция заключается в *выключении* транскрипции.

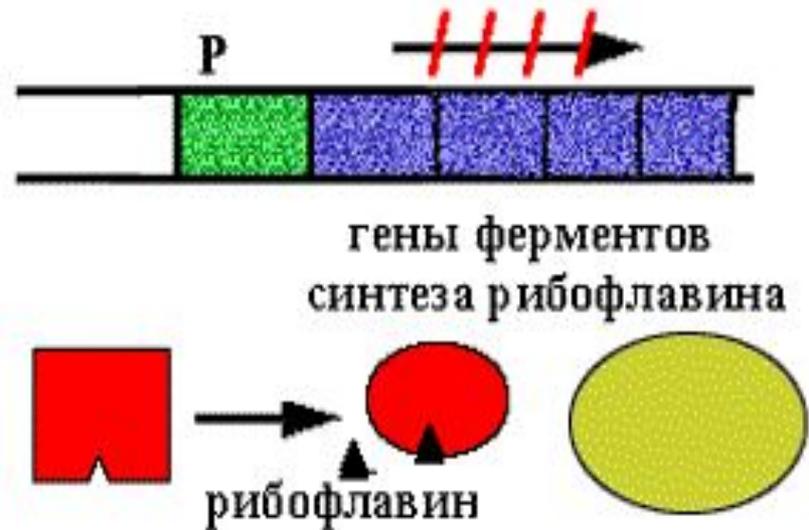
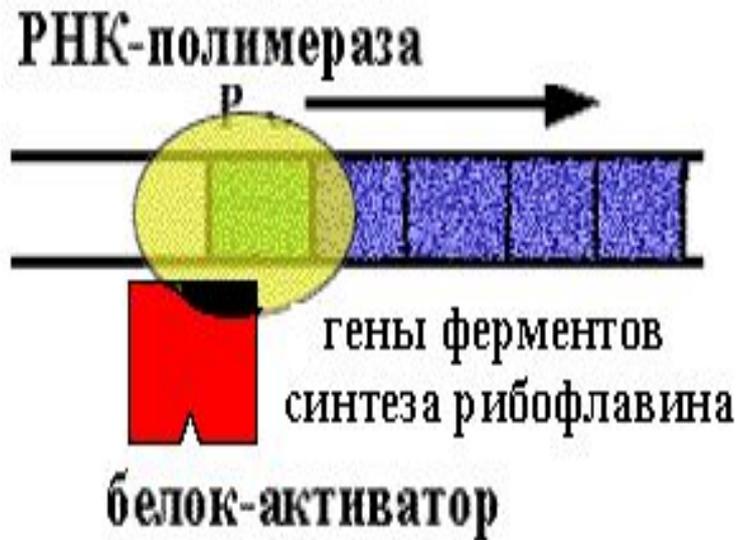
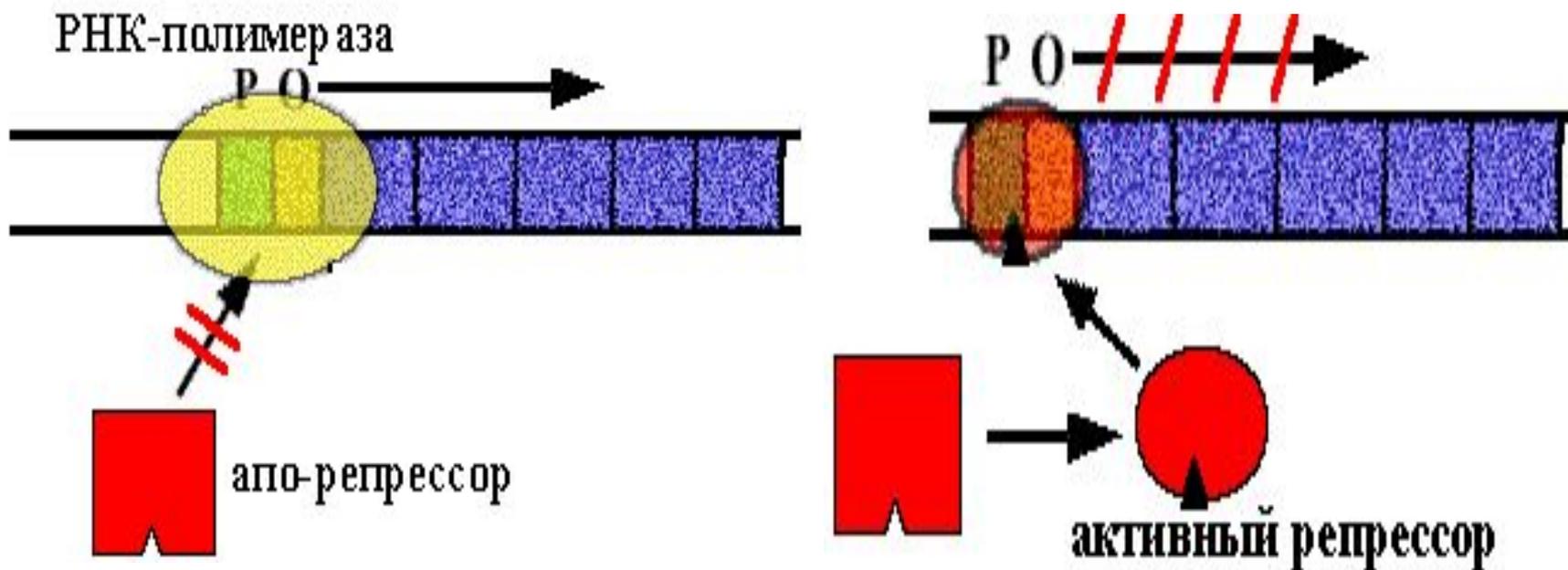


Схема негативной репрессии

Оперон синтеза *триптофана* у *E. coli*.

Схема регуляции - **негативная репрессия**, потому что белок **репрессор** "выключает" оперон



Т Р А Н С К Р И П Ц И Я

(эукариоты)

ЛЕКЦИЯ 8

- У эукариотов процессы транскрипции и трансляции разобщены во времени и пространстве (транскрипция - в ядре, трансляция - в цитоплазме).
- У эукариотов существуют **специализированные РНК-полимеразы**.

В ядре выделяют 3 типа РНК-полимераз:

РНК-полимераза I - синтезирует рРНК (кроме 5S рРНК).

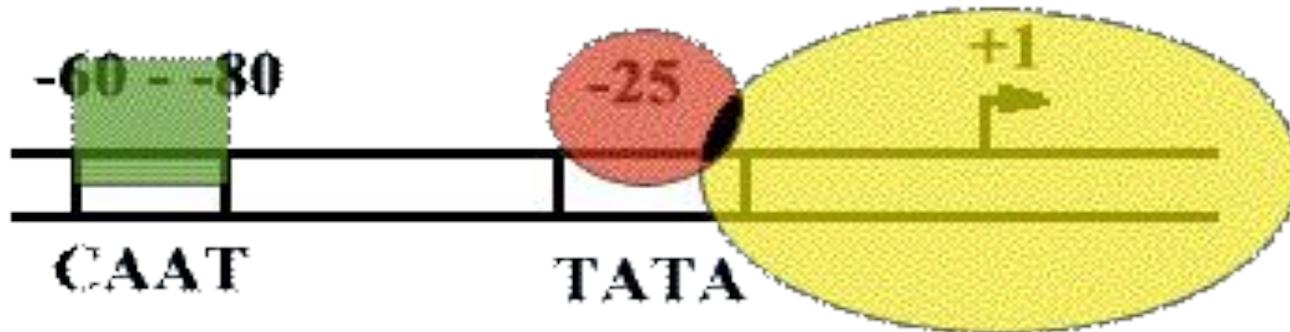
РНК-полимераза II - синтезирует мРНК и некоторые sРНК.

РНК-полимераза III - синтезирует тРНК, некоторые sРНК и 5SpРНК.

РНК-полимеразы различаются количеством субъединиц, их аминокислотным составом, и зависимостью от катионов магния и марганца. Для РНК-полимераз I и III необходимое для работы соотношение $[Mn^{2+}]/[Mg^{2+}] = 2$. Для РНК-полимеразы II - $[Mn^{2+}]/[Mg^{2+}] = 5$.

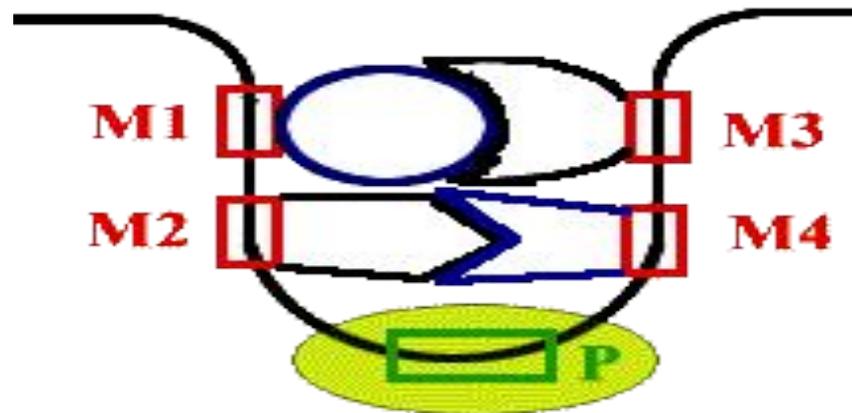
Помимо ядерных РНК-полимераз у эукариот есть еще РНК-полимеразы хлоропластов и митохондрий.

- Особенности транскрипции эукариот
- Единицей транскрипции у эукариот является отдельный **ген**, а не оперон, как у прокариот.
- Оператор, как таковой, отсутствует. Промотор есть, но он организован иначе.



- **Базальные факторы транскрипции** - белки, необходимые для инициации транскрипции
- **Базальные факторы транскрипции необходимы для инициации транскрипции всеми тремя ядерными РНК-полимеразами.**

- Для любого гена, кодирующего белок, есть **энхансеры** (усилители).
- **Энхансеры** - последовательности ДНК, усиливающие транскрипцию при взаимодействии со специфическими белками.
- $M1+M2+M3+M4$ - один энхансер, но он состоит из 4-х модулей.



- Экспрессируются лишь те гены, у которых все энхансерные модули узнаны своими белками и эти белки взаимодействуют друг с другом

- Экспрессируются лишь те гены, у которых все энхансерные модули узнаны своими белками и эти белки взаимодействуют друг с другом.
- Кроме энхансеров есть **сайленсеры** (ослабители).
- **Сайленсеры** - последовательности ДНК, ослабляющие транскрипцию при взаимодействии с белками.
- При соответствующем наборе белков экспрессия отдельных генов в клетке может быть подавлена

Этапы транскрипции

- **Инициация** – выбор фиксированного места начала транскрипции (специфическое связывание РНК-пол с матричной нитью), **промотор**
- **Элонгация** – синтез РНК после оставления РНК-пол промотора (очищение промотора)
- **Терминация** – окончание транскрипции, **терминатор**

INITIATION

Template recognition: RNA polymerase binds to duplex DNA



DNA is unwound at promoter

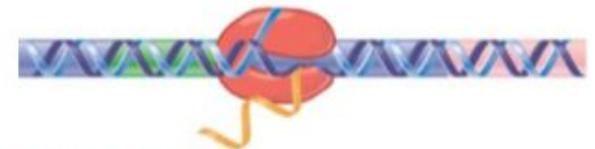


Very short chains are synthesized and released



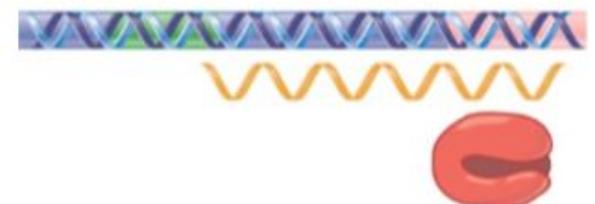
ELONGATION:

Polymerase synthesizes RNA



TERMINATION:

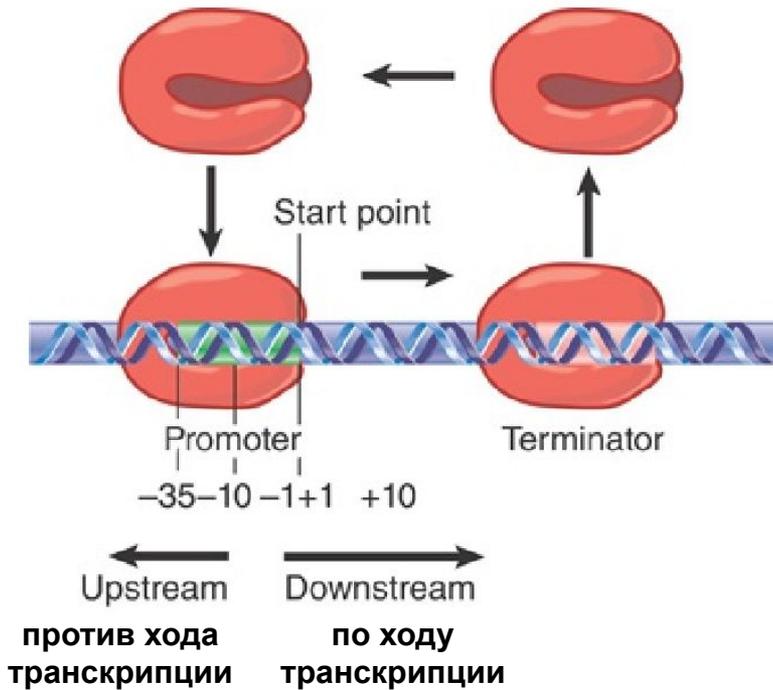
RNA polymerase and RNA are released



Три этапа транскрипции

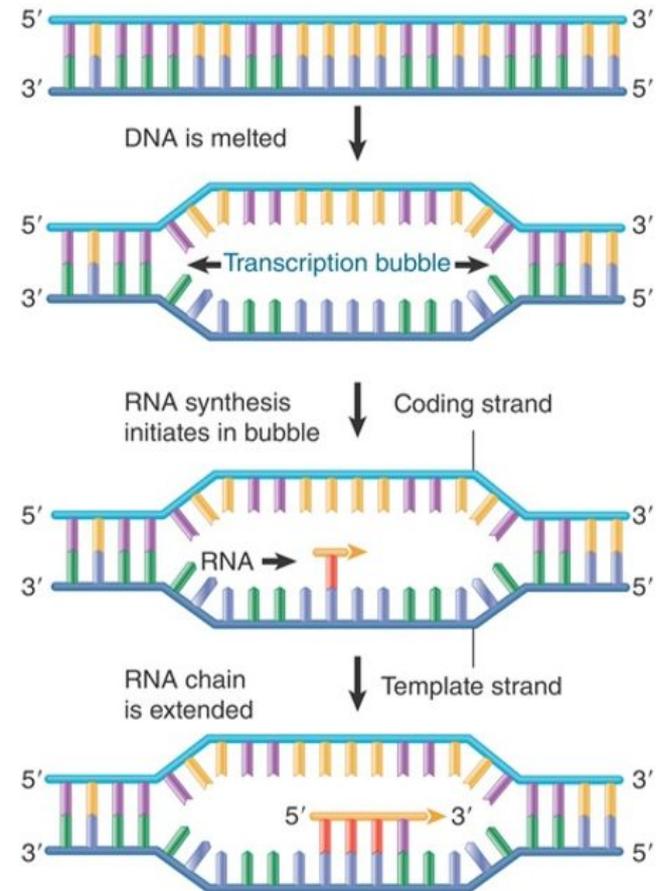
Инициация

Координаты транскрипции



Стартовая точка транскрипции, или TSS – transcription start site (+1)

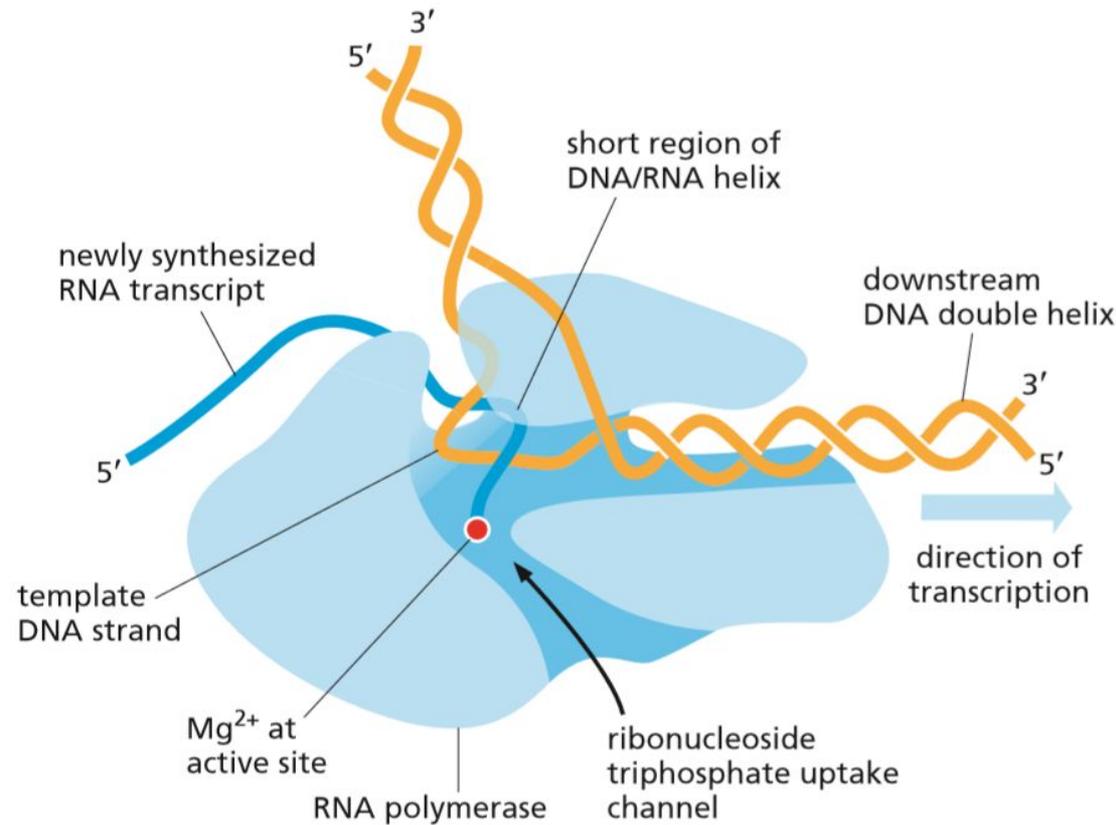
Формирование транскрипционного пузыря



- 12-14 п.н.
- Синтез РНК в направлении от 5'-конца к 3'-концу

Три этапа транскрипции

Элонгация



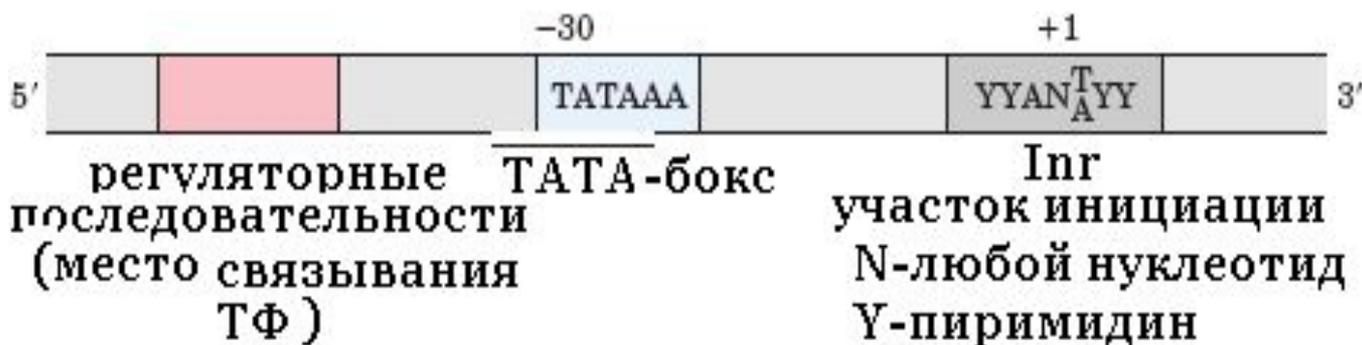
Нематричная нить –
кодирующая (кодогенная)

Матричная нить –
транскрибируемая

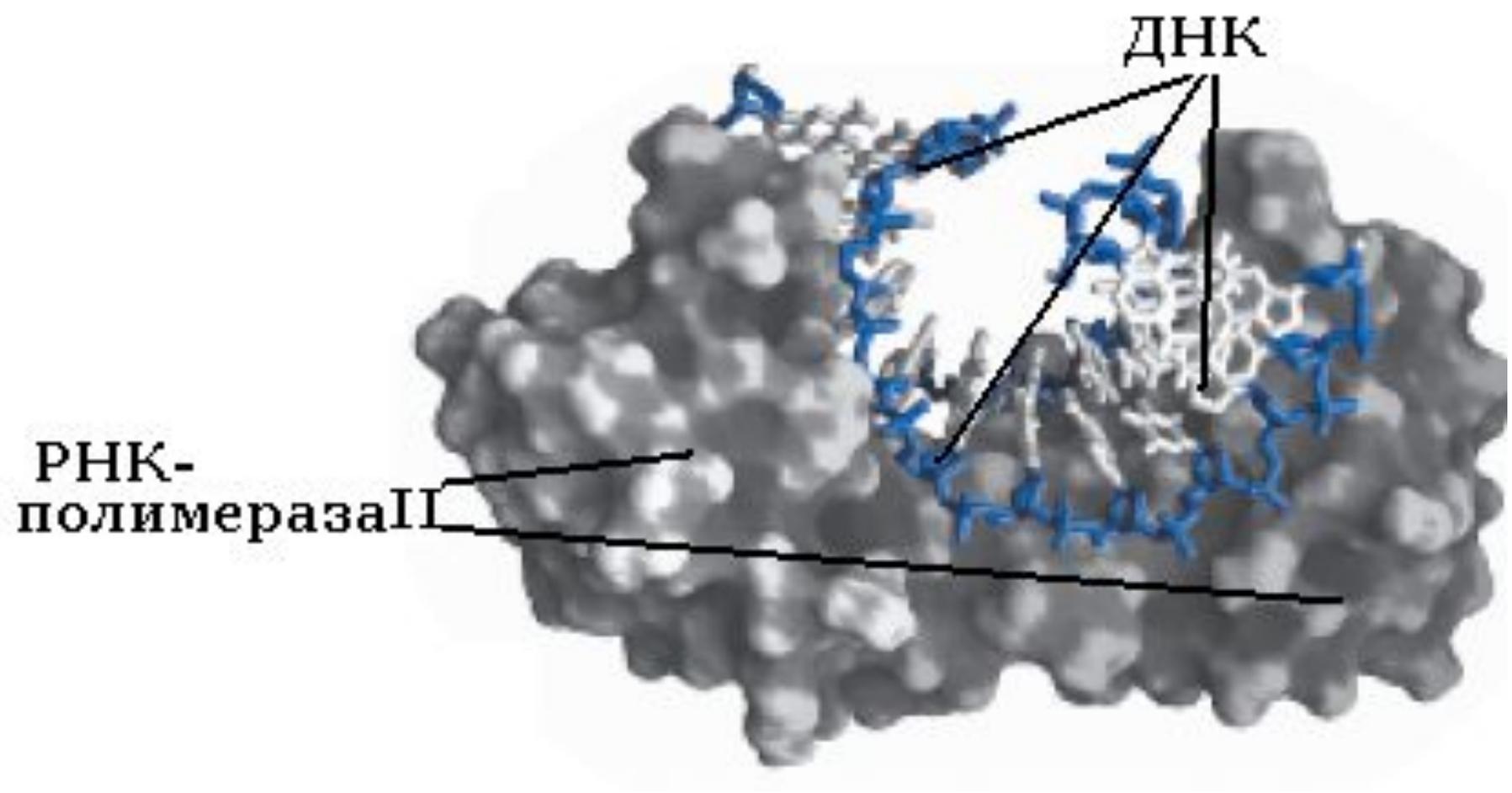
РНК-пол движется по
нити ДНК в направлении
3'(ОН)→5'(PO₄)

Записи в базах даны по
кодирующей нити

- РНК-полимераза II для осуществления своей работы требует много различных белковых факторов (транскрипционные факторы – ТФ).
- РНК-полимераза II состоит из 12 субъединиц, часть которых выполняют функции, подобные субъединицам РНК-полимеразы прокариотов.
- Самая большая субъединица на С-конце содержит много раз повторяющийся (консенсусный) гепта-повтор, очень важный для функции этого фермента.

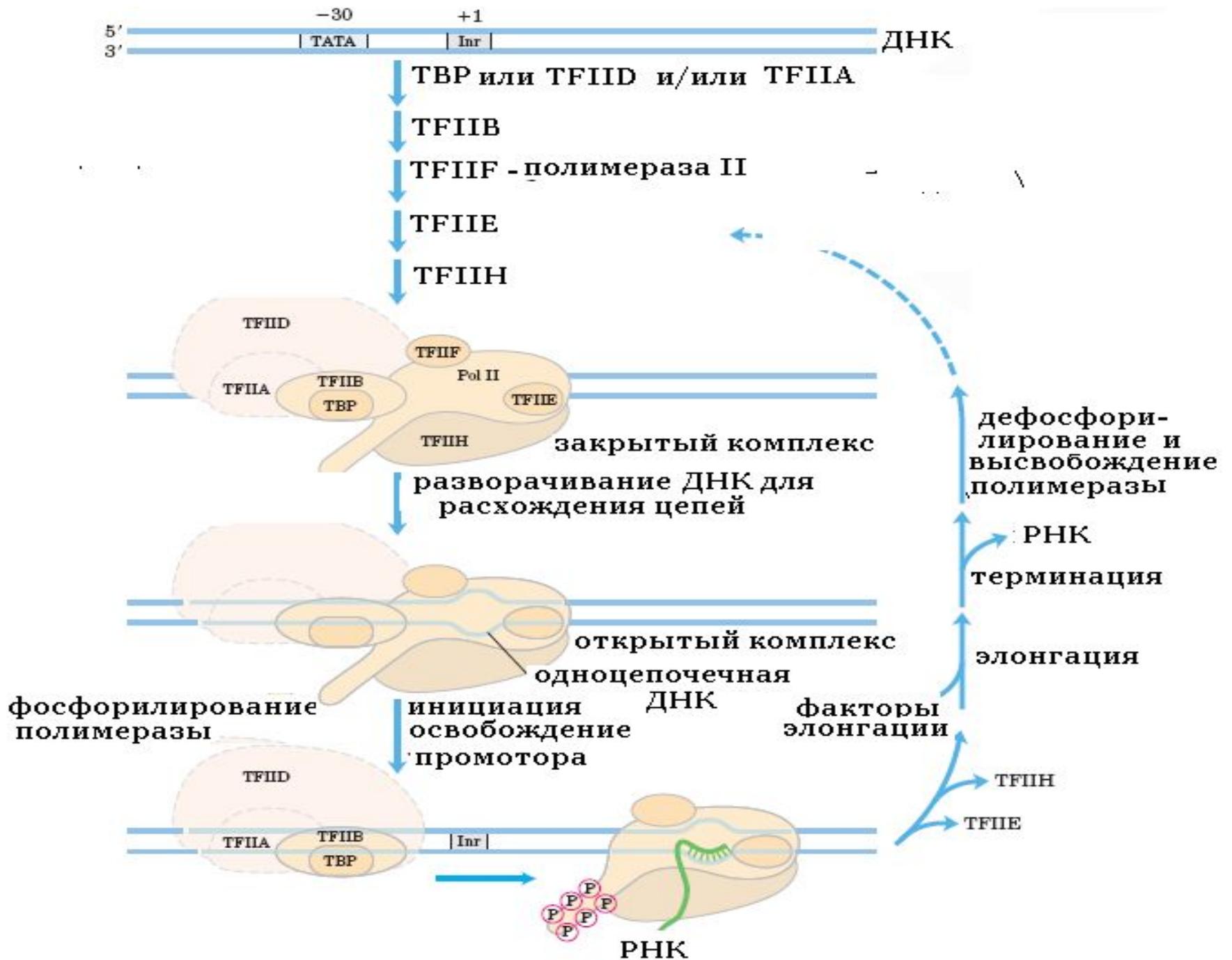


Комплекс ДНК и РНК-полимеразы II



Белки, необходимые для инициации транскрипции на эукариотических промоторах РНК-полимеразой II

<i>Transcription protein</i>	<i>Number of subunits</i>	<i>Subunit(s) M_r</i>	<i>Function(s)</i>
Initiation			
Pol II	12	10,000–220,000	Catalyzes RNA synthesis
TBP (TATA-binding protein)	1	38,000	Specifically recognizes the TATA box
TFIIA	3	12,000, 19,000, 35,000	Stabilizes binding of TFIIIB and TBP to the promoter
TFIIB	1	35,000	Binds to TBP; recruits Pol II–TFIIF complex
TFIIE	2	34,000, 57,000	Recruits TFIIH; has ATPase and helicase activities
TFIIF	2	30,000, 74,000	Binds tightly to Pol II; binds to TFIIB and prevents binding of Pol II to nonspecific DNA sequences
TFIIH	12	35,000–89,000	Unwinds DNA at promoter (helicase activity); phosphorylates Pol II (within the CTD); recruits nucleotide-excision repair proteins
Elongation*			
ELL [†]	1	80,000	
p-TEFb	2	43,000, 124,000	Phosphorylates Pol II (within the CTD)
SII (TFIIS)	1	38,000	
Elongin (SIII)	3	15,000, 18,000, 110,000	



ИНГИБИТОРЫ РНК-ПОЛИМЕРАЗ

Актиномицин D и акридин – подавляют работу на стадии элонгации

α -аманитин (токсин бледной поганки) полностью подавляет работу РНК-полимеразы II в концентрации 10^{-8} М и РНК-полимеразы III (в концентрации 10^{-6} М). РНК-полимераза I фактически нечувствительна к этому токсину.

Процессинг мРНК

Процессинг мРНК состоит из нескольких этапов.

1. **Кепирование** 100% мРНК
2. **Полиаденилирование** ~95% мРНК
3. **Сплайсинг** ~95% мРНК. Сплайсингу подвергаются только полиаденилированные мРНК.
4. **Редактирование**. Показано лишь для нескольких мРНК.

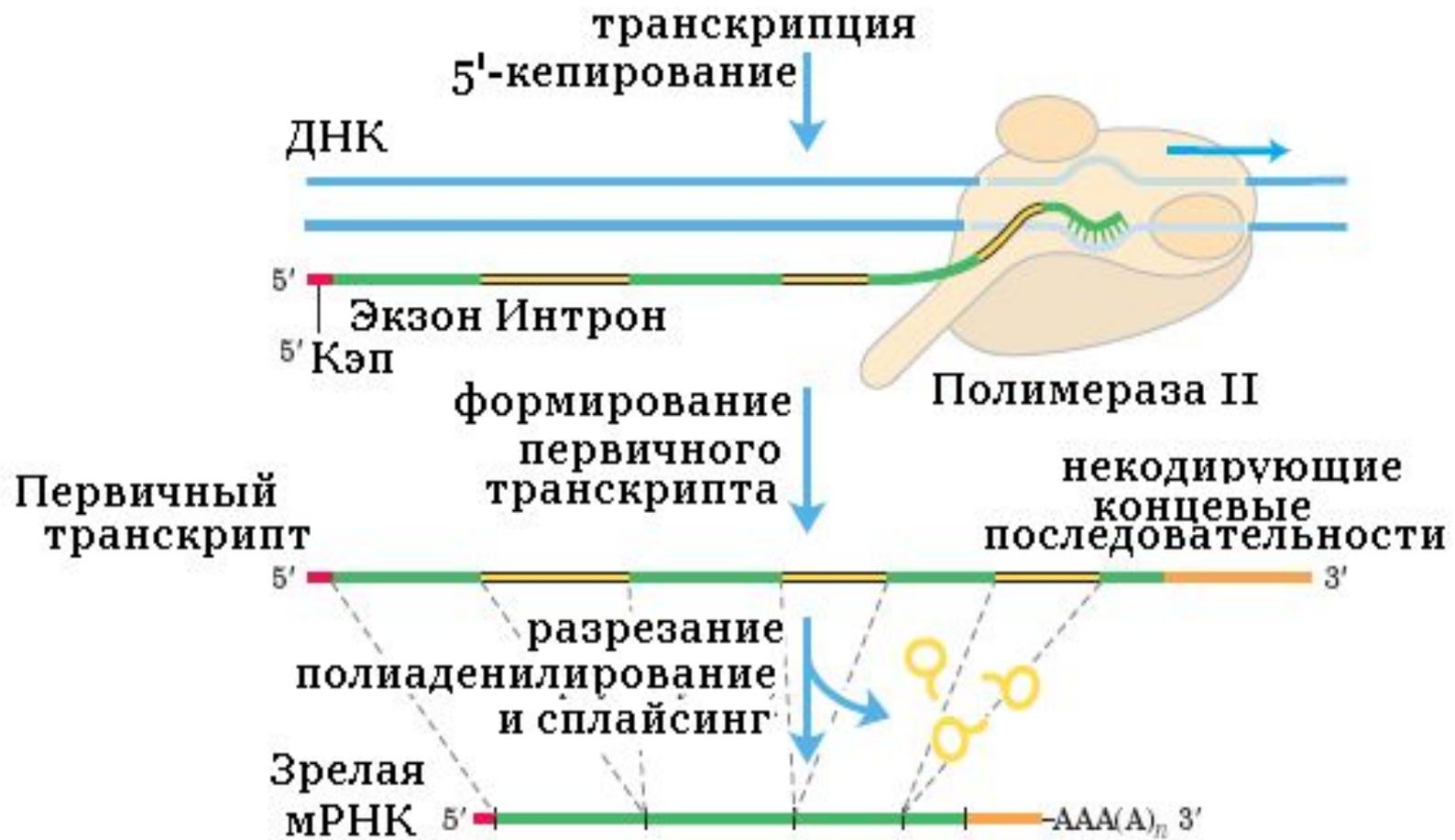
Все стадии процессинга мРНК происходят в РНП-частицах (рибонуклеопротеидных комплексах).

мРНК не бывает свободной от белков.

Полисома - комплекс мРНК с несколькими или многими рибосомами.

В составе информосом мРНК может жить от нескольких минут до нескольких дней, не подвергаясь действию нуклеаз

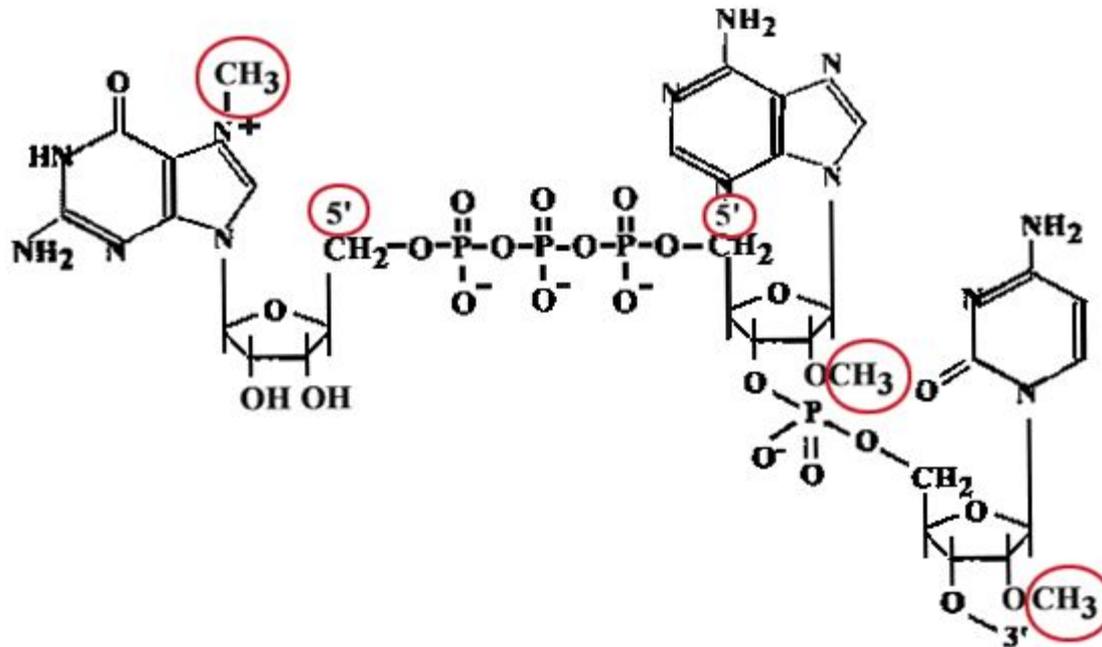
Процессинг мРНК



Кепирование

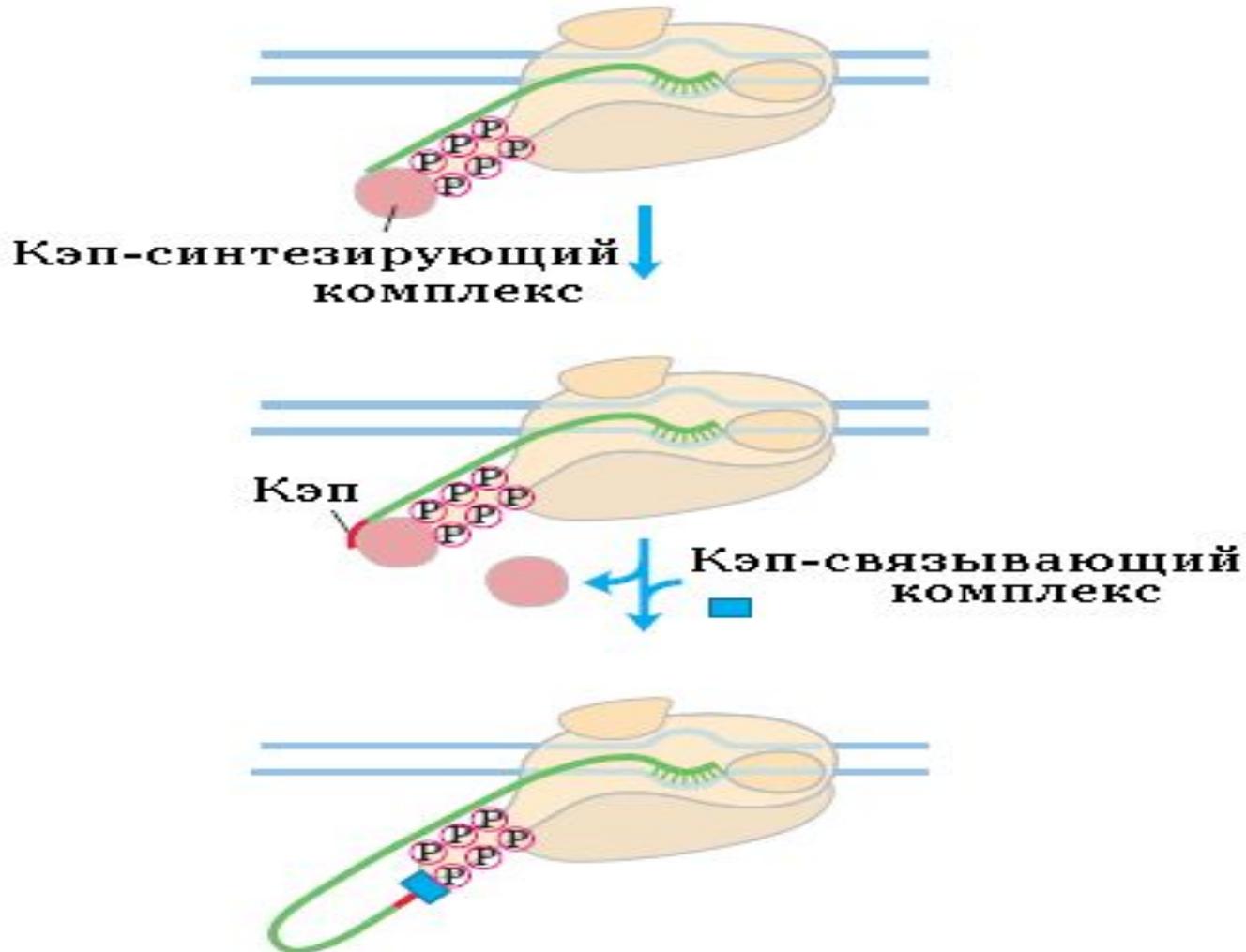
Кепирование - надевание "шапочки".

"Cap" представляет собой метилированный GTP, присоединенный в необычной позиции 5'-5' и две метилированные рибозы в первых двух нуклеотидах мРНК. По мере образования пре-мРНК (еще до 30-ого нуклеотида), к 5'-концу, несущему пуринтрифосфат, присоединяется гуанин, после чего происходит метилирование



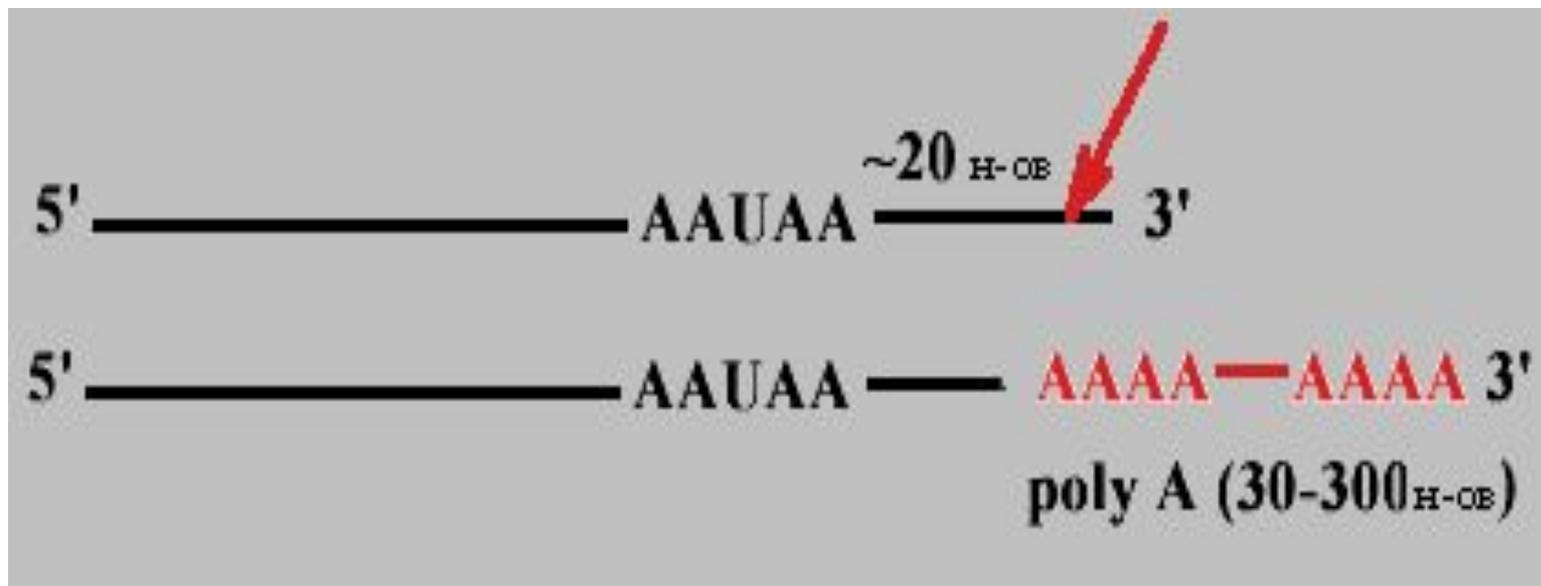
Назначение “Кэп”

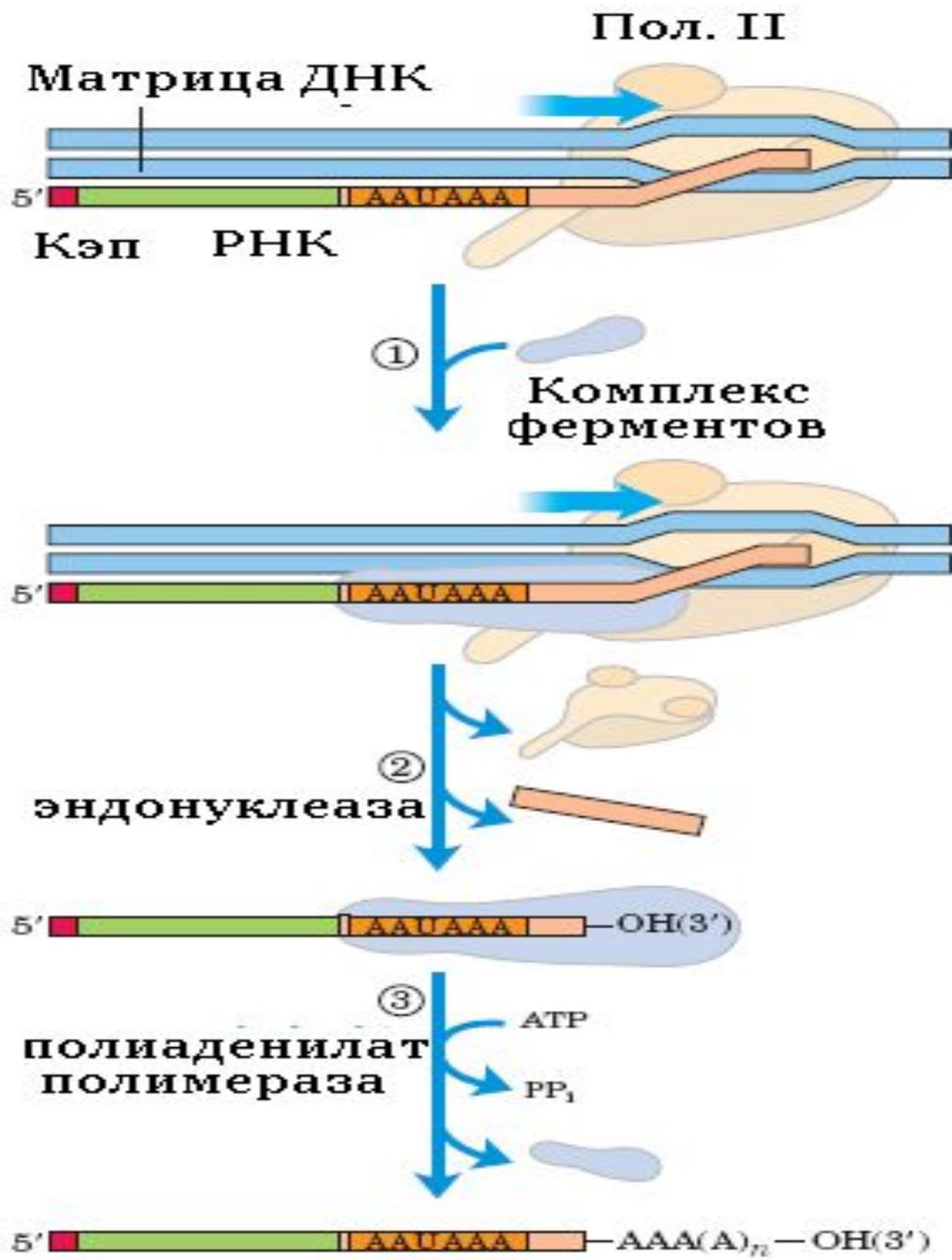
- 1. *Защита 5'-конца мРНК от действия экзонуклеаз.*
- 2. *За счет узнавания “Кэп” связывающими белками происходит правильная установка мРНК на рибосоме*



Полиаденилирование

Когда синтез пре-мРНК завершен, то на расстоянии примерно 20 нуклеотидов в направлении к 3' - концу от последовательности 5'-AAUAA-3' происходит разрезание специфической эндонуклеазой и к новому 3'-концу присоединяется от 30 до 300 остатков АМР (безматричный синтез).





***мРНК ряда генов не
полиаденилируется (например
гистоновых генов).***

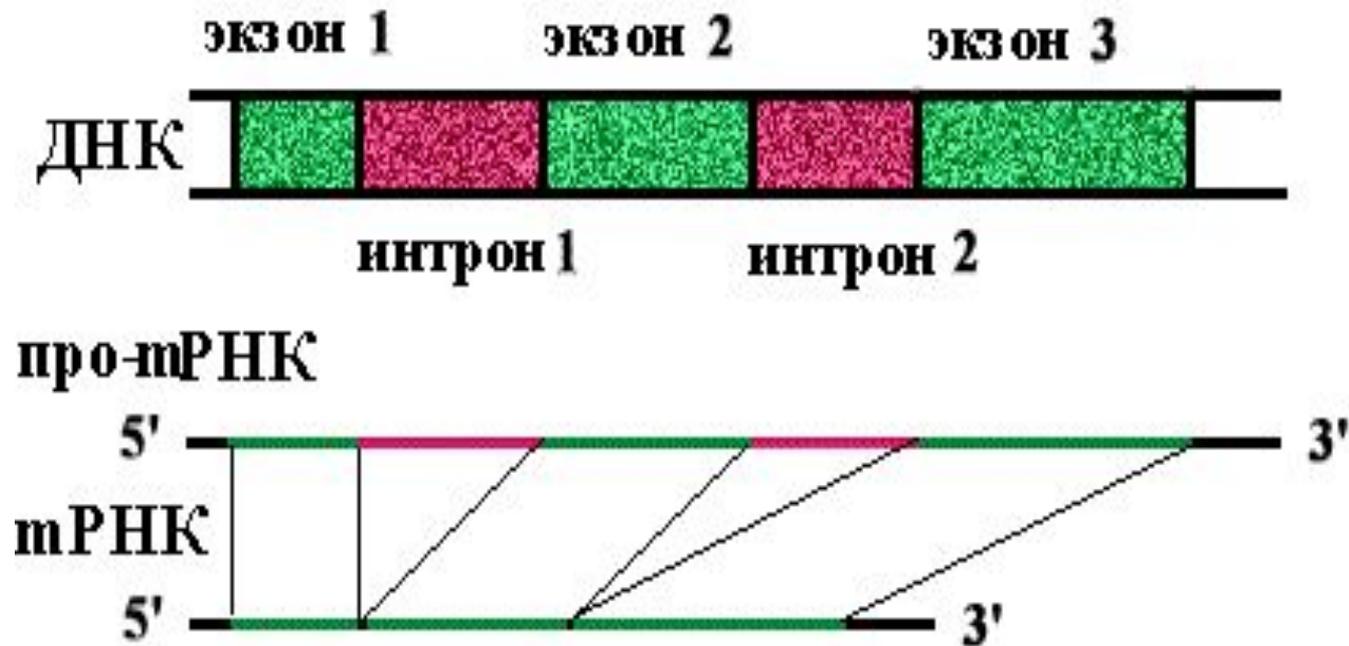
***Полиаденилированные пре-мРНК
подвергаются сплайсингу.***

Сплайсинг

Экзоны - кодирующие участки генов.

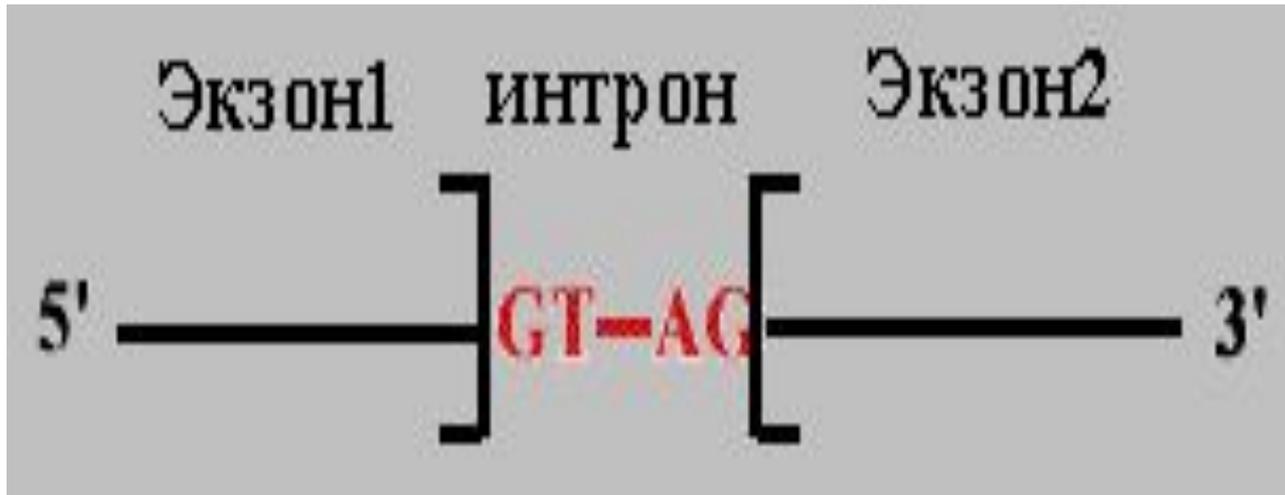
Интроны - некодирующие участки генов.

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

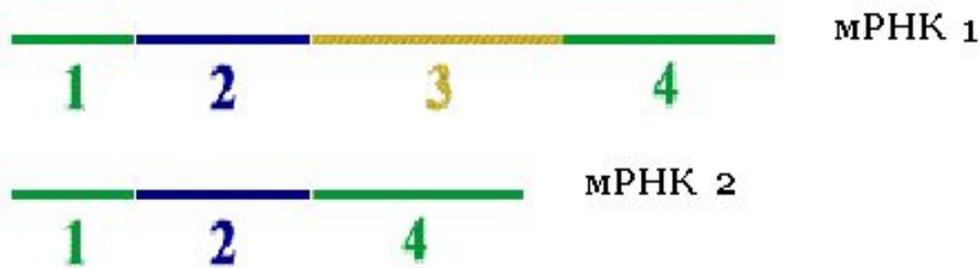


Для мРНК высших организмов существуют обязательные правила сплайсинга:

Правило 1. 5' и 3' концы интрона очень консервативны: $5'(GT-интрон-AG)3'$.



Правило 2. При сшивании копий экзонов соблюдается порядок их расположения в гене, но могут быть выброшены некоторые из них.

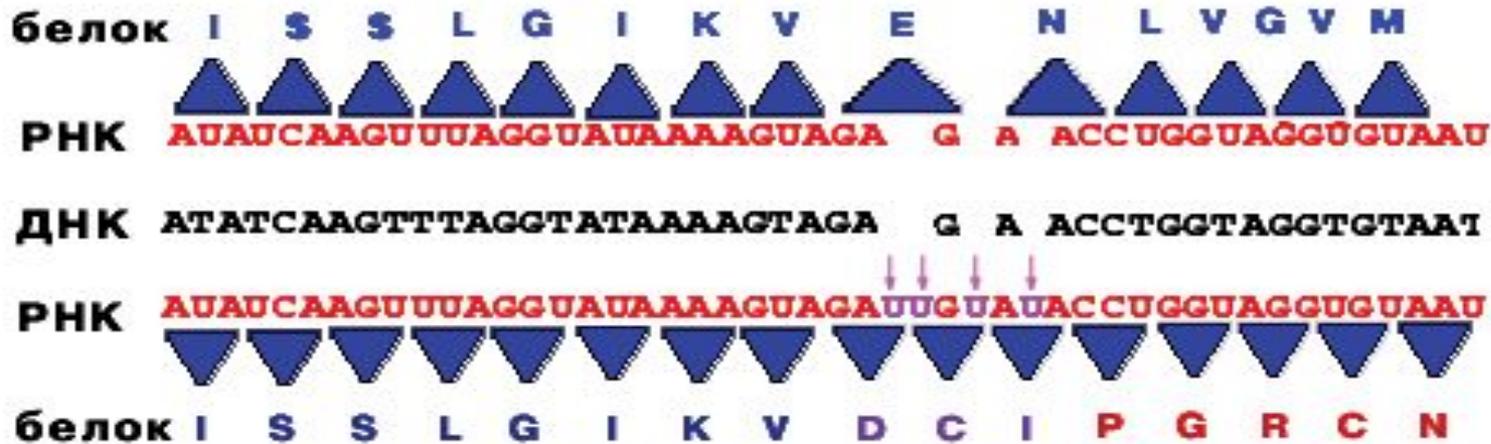


Сплайсинг осуществляется белковыми комплексами - *сплайсосомами*, в которых помимо ферментов, вырезающих и сшивающих участки пре-мРНК, имеются белки, придающие про-мРНК нужную конформацию, и несколько sРНК. Сплайосома непосредственно связана с ферментами, занимающимися полиаденилированием.

Редактирование

- **Редактирование** - изменение генетической информации на уровне мРНК.
- Пример- редактирование мРНК цитохромоксидазы у трипаносомы: когда трипаносома в человеке – синтезируется только две субъединицы цитохромоксидазы, в мухе – три.
- Происходит сдвиг рамки считывания и отредактированная мРНК кодирует новый полипептид - третью субъединицу цитохромоксидазы

coxII



coxIII

Процессинг РНК в клетках прокариот и эукариот

ЛЕКЦИЯ 9

Этапы реализации генетической информации

- **Транскрипция** – синтез молекул РНК, образование первичного транскрипта (пре-РНК)
- **Процессинг** – модификация первичного транскрипта (пре-РНК) и образование зрелых молекул РНК
- **Трансляция** – синтез полипептида-предшественника белка
- **Процессинг белка** – получение зрелого функционального белка

Процессинг РНК в клетках прокариот

- **Ген** – это участок молекулы ДНК, кодирующий синтез функциональной молекулы РНК
- **Цистрон** – участок молекулы мРНК, который кодирует синтез одной полипептидной цепи
- Молекулы мРНК прокариот полицистронны, т.е. они служат матрицей для одновременного синтеза нескольких полипептидов
- **мРНК прокариот не процессируются**

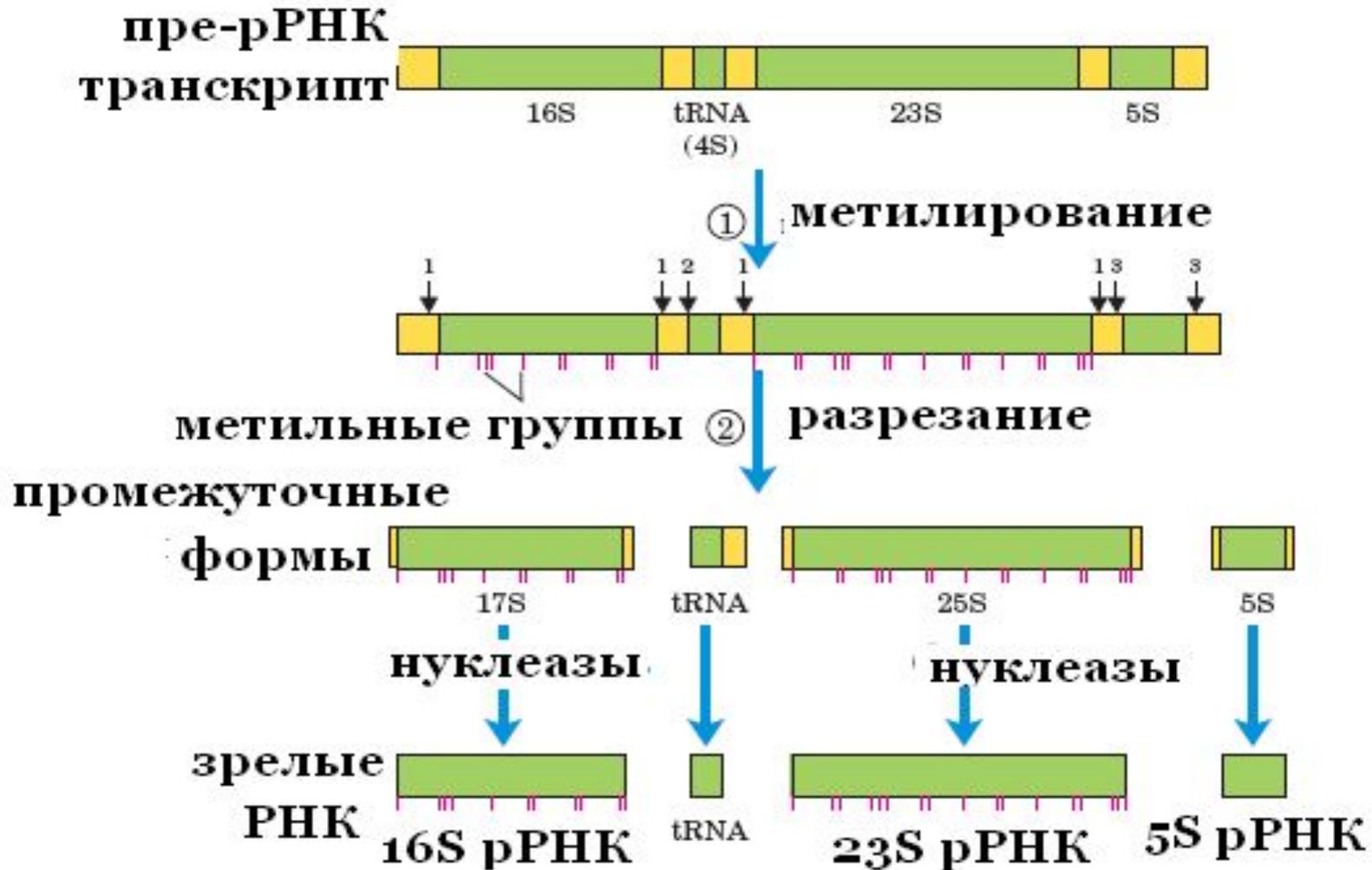
Процессинг рРНК и тРНК

- Зрелые молекулы рРНК и тРНК образуются у прокариот и эукариот в результате эндо- и экзонуклеазных воздействий на их предшественники.
- У эукариот в некоторых случаях вырезаются копии интронов из пре-рРНК и пре-тРНК

Процессинг пре-рРНК у бактерий

Гены рРНК и тРНК образуют транскрипционный блок (кластер).
Спейсер – это участок ДНК между генами.

РНказы- ферменты, которые разрезают молекулы РНК.

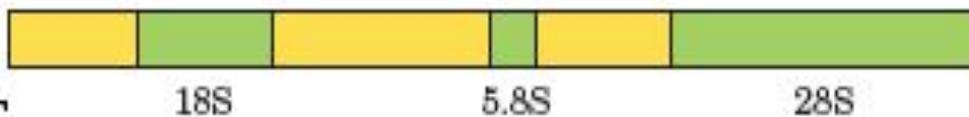


Процессинг рРНК эукариот

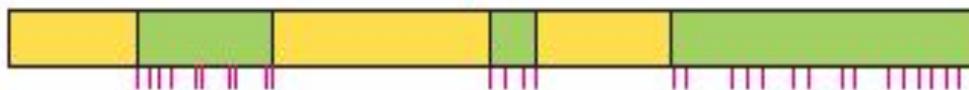
- Транскрипционный блок содержит гены **18S** ; **5,8S**; **28S** - рРНК, разделенные спейсерами
- три зрелые молекулы рРНК образуются при расщеплении спейсеров эдонуклеазой
- Некоторые эукариоты содержат интрон в 28S пре- рРНК, который вырезается (аутосплайсинг) и образуется 26S рРНК

Процессинг пре-рРНК у эукариотов

пре-рРНК
транскрипт
(45S)

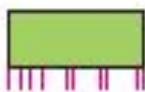


① метилирование



② метильные группы
разрезание

зрелые рРНК



18S
рРНК

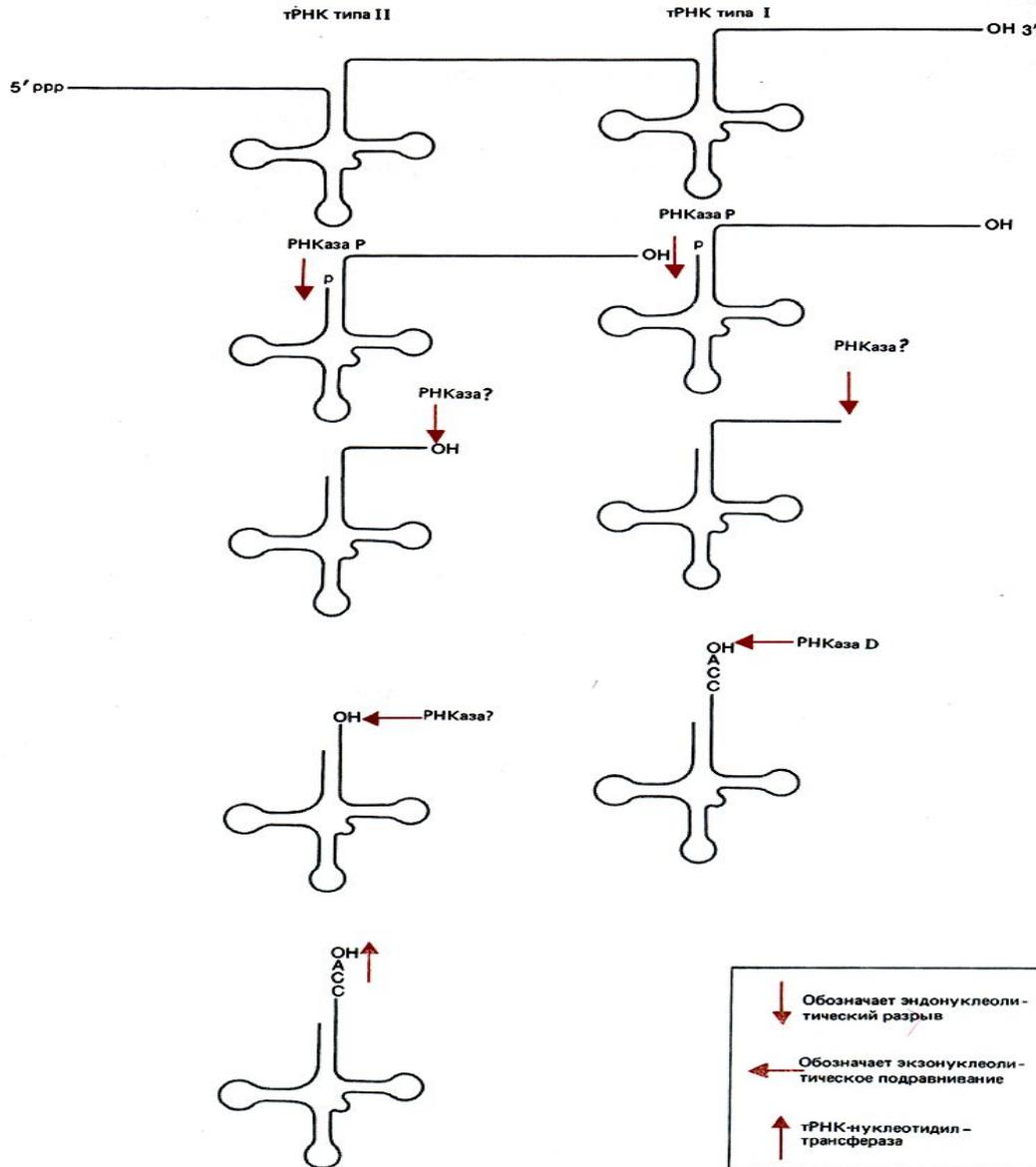


5,8S
рРНК



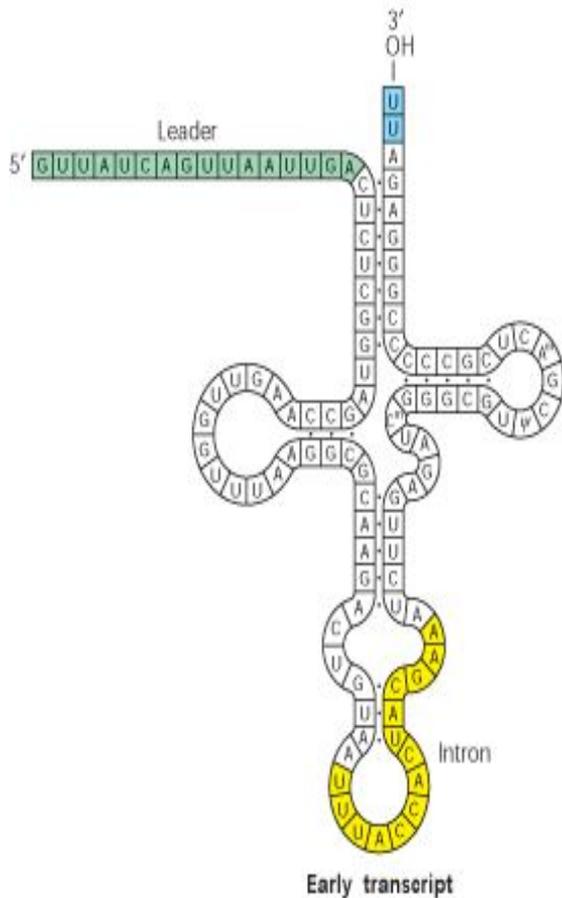
28S
рРНК

Этапы процессинга тРНК прокариот:

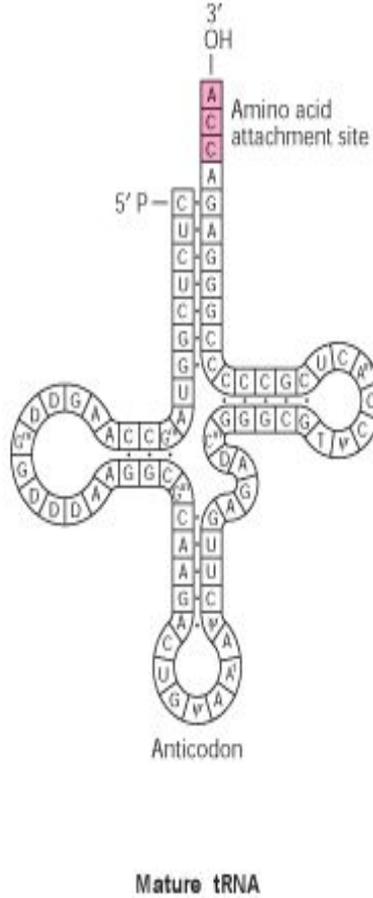


- Модификация 5' – конца - RNКаза P
- Модификацию 3' – конца осуществляет **RNКаза D**
- Модификация некоторых азотистых оснований и формирование зрелой структуры тРНК

Этапы процессинга тРНК дрожжей (эукариоты)

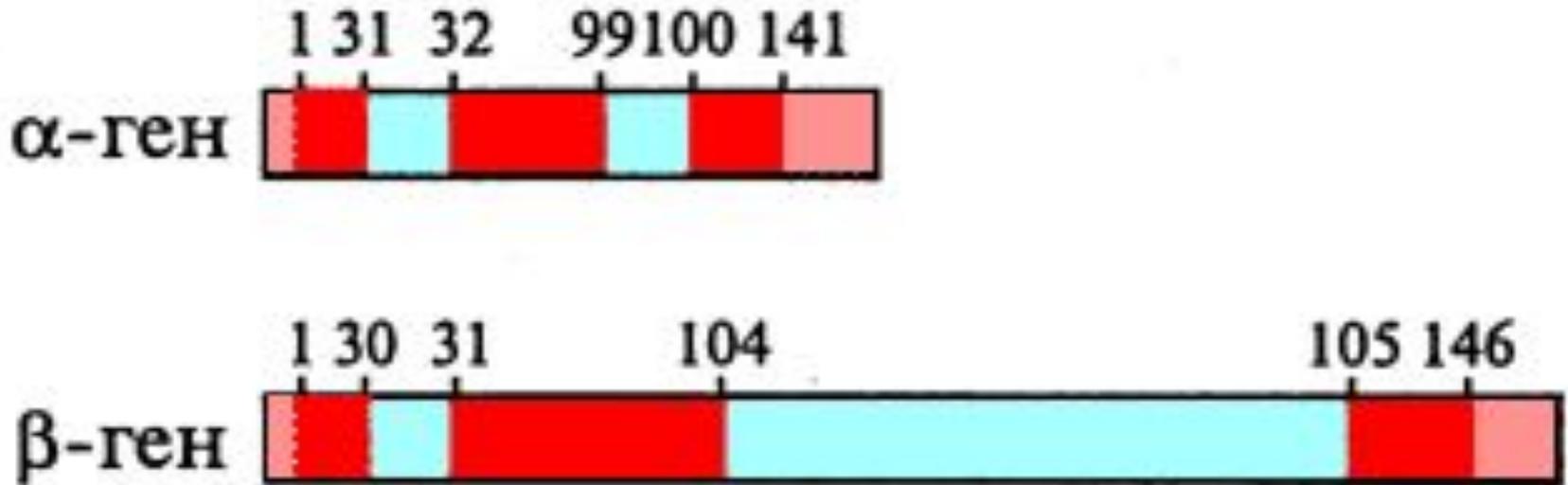


Processing →



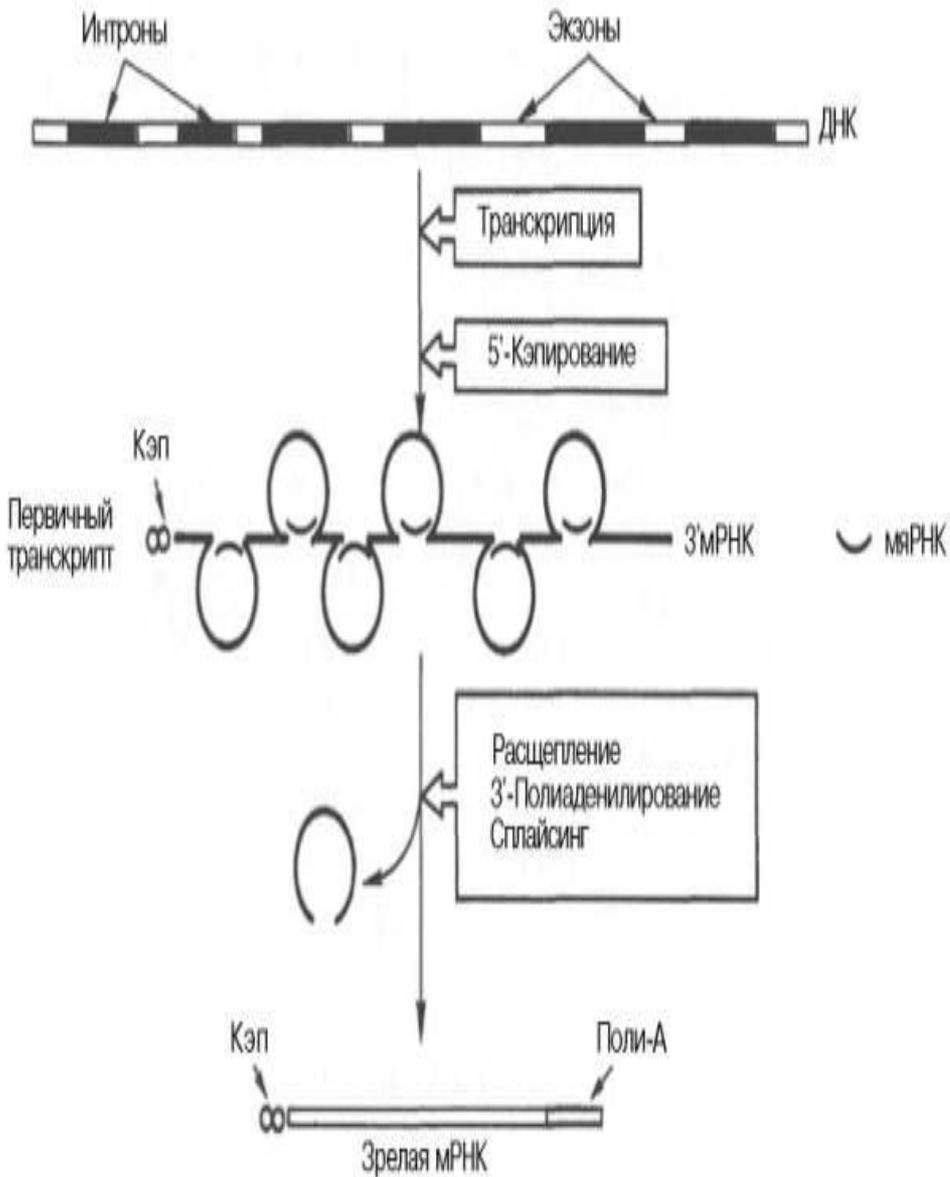
- Удаление интрона
- Вырезание 5' конца (лидер)
- Удаление UU с 3' конца
- Присоединение **ССА** к 3' концу -тРНК
- Модификация азотистых оснований

Экзон-интронная структура генов эукариот

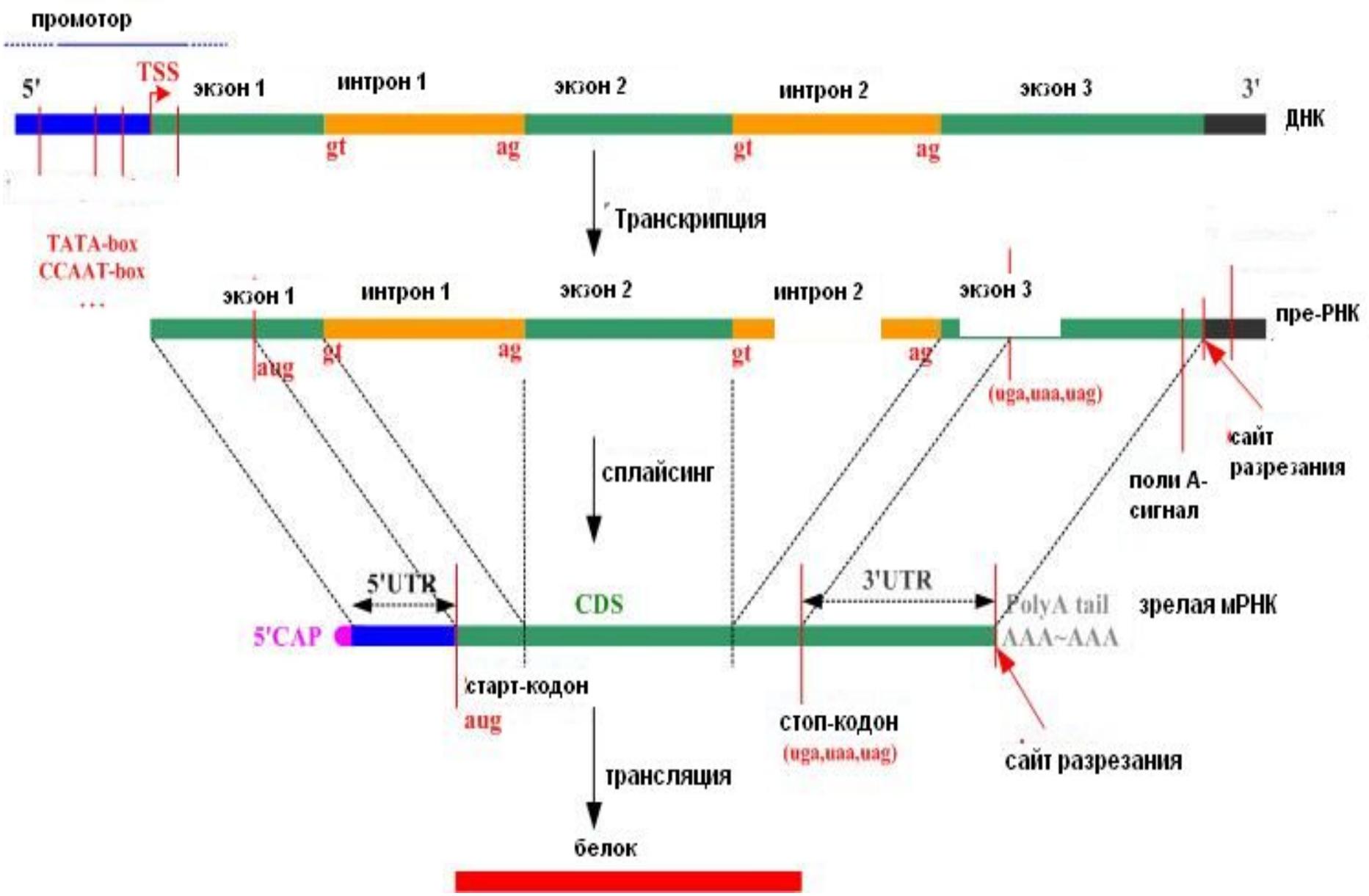


- Структура α - и β -глобиновых генов
- Экзоны (тёмно-красный цвет), разделены интронами (голубой цвет). Цифры над генами указывают аминокислотные остатки кодируемого полипептида.
- 5'-3'- не транслируемые области содержатся в первом и последнем экзонах (розовый цвет). Они присутствуют в зрелой мРНК, но не транслируются.

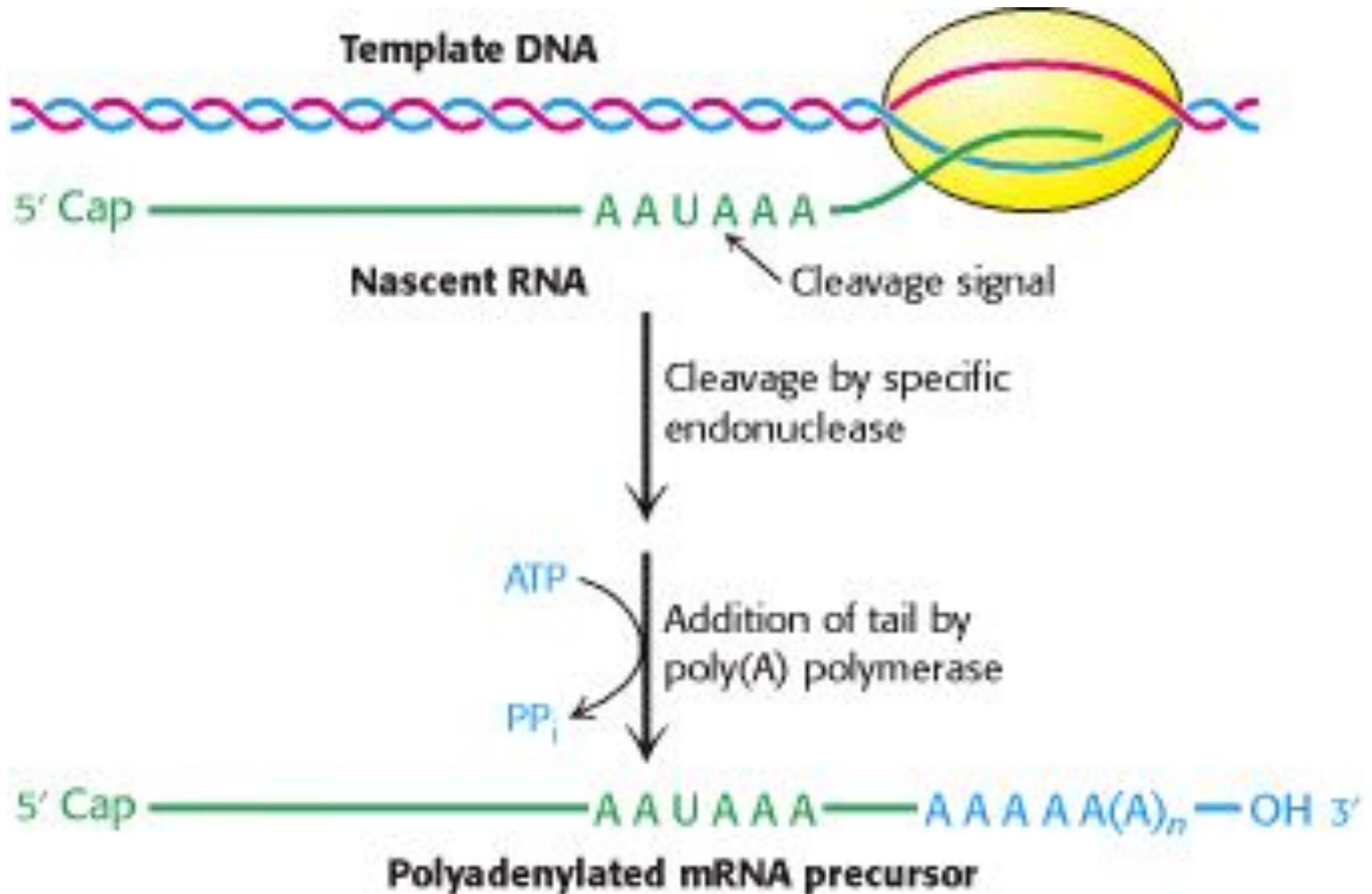
Этапы процессинга пре-мРНК эукариот



- **Кэпирование** - модификация 5'-конца
- **Полиаденилирование** - модификация 3'-конца
- **Сплайсинг** - удаление интронов и соединение экзонов



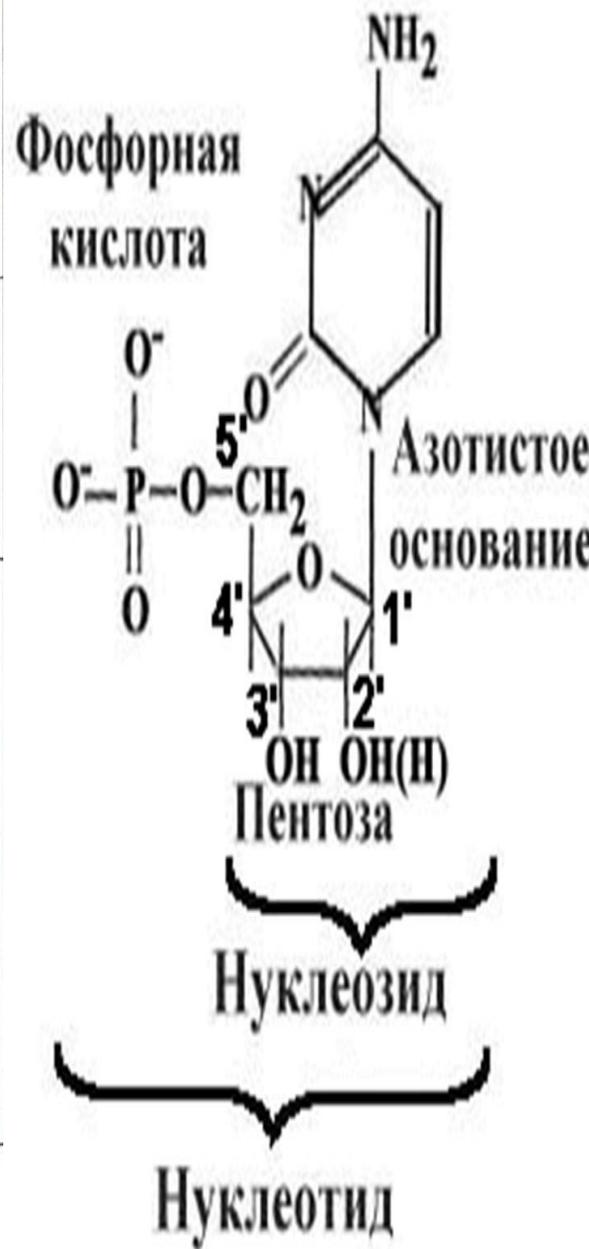
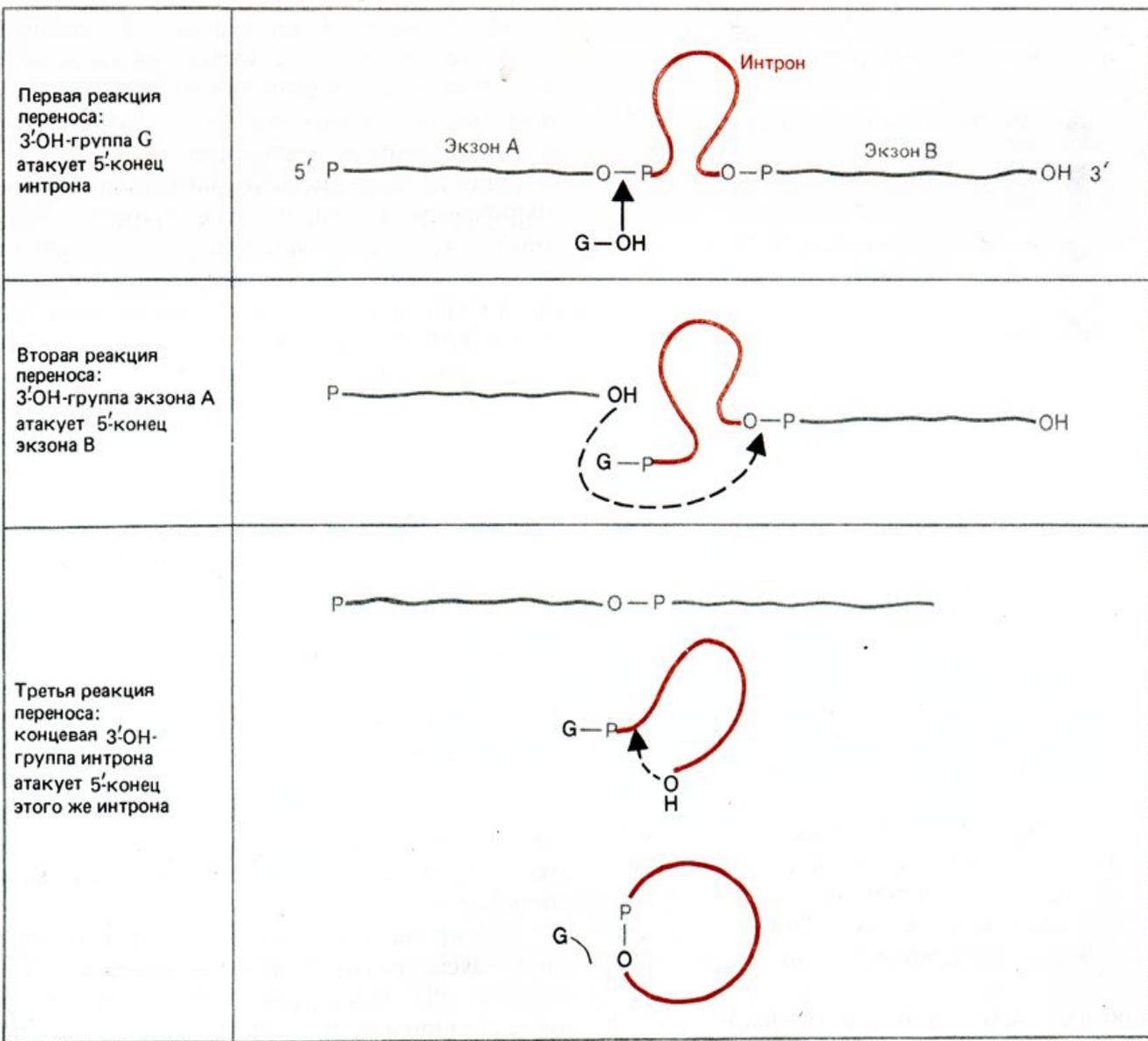
Модификация 3'-конца пре-мРНК - полиаденилирование



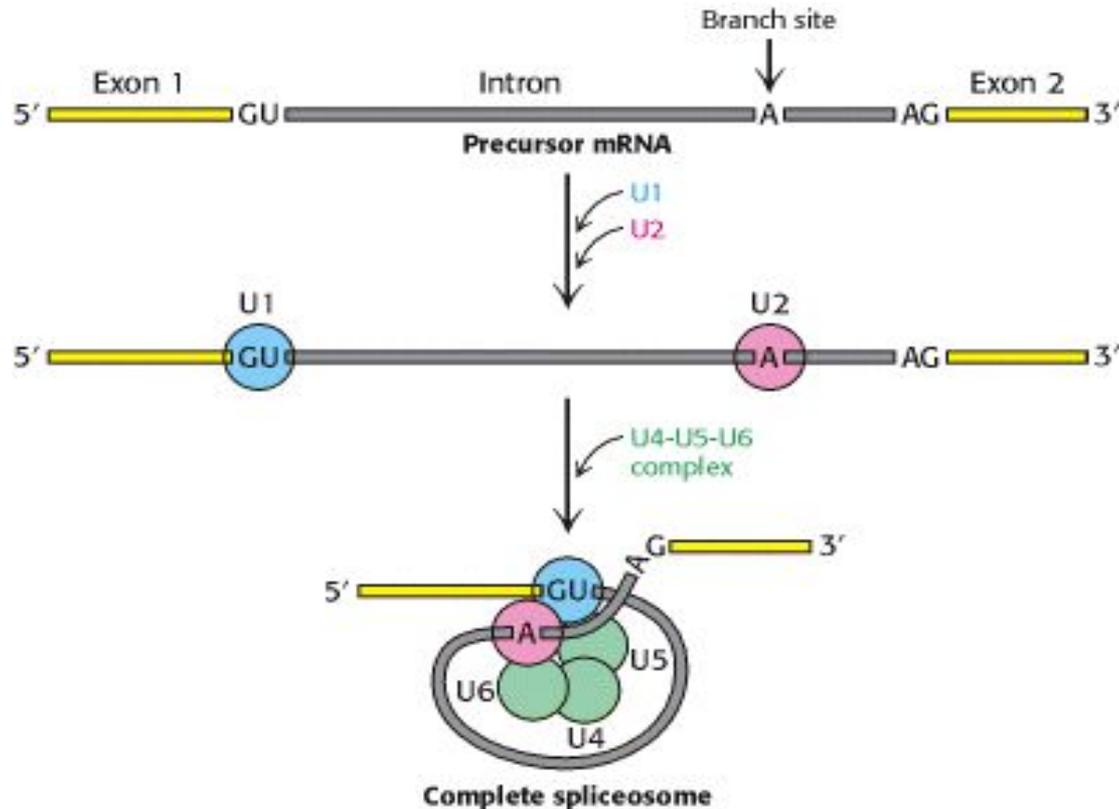
Механизмы сплайсинга интронов:

- **Тип I** - интроны подвергаются аутосплайсингу в присутствии только ионов Mg^{+2} и гуанозина (пре - рРНК *Tetrahymena physarum*)
- **Тип II** – интроны подвергаются аутосплайсингу и имеют концевые последовательности 5'-GU_AG-3' (некоторые РНК митохондрий у дрожжей)
- **Тип III** - интроны мРНК, имеющие концевые последовательности 5'GU_AG3', подвергаются сплайсингу в ядре с участием мяРНК

Сплайсинг интронов типа I

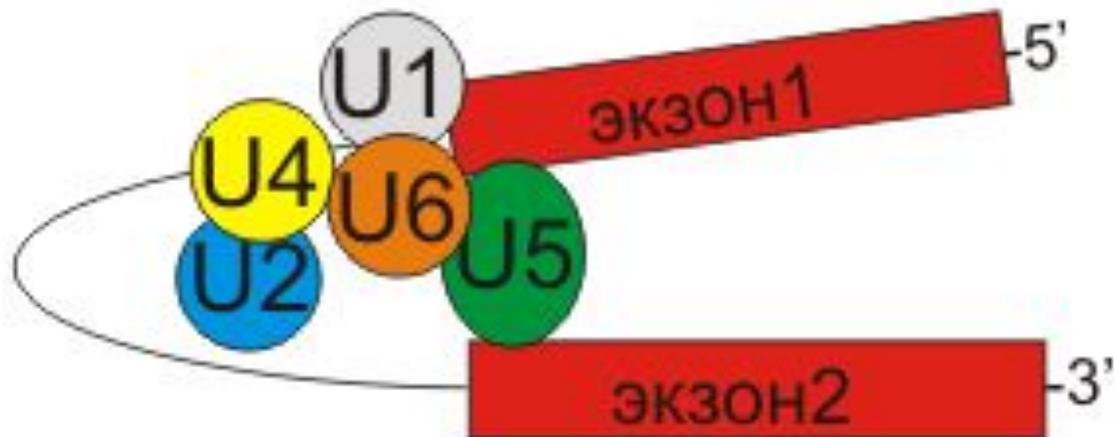


Сплайсинг ядерной мРНК происходит в сплайсосоме



- **Сплайсосома** - специальная ядерная структура, в которой происходит сплайсинг
- В состав сплайсосомы входят **snРНК** (U1, U2, U4, U5 и U6) и 145 молекул белков

Взаимодействие компонентов сплайсосомы с экзонами и интронами РНК



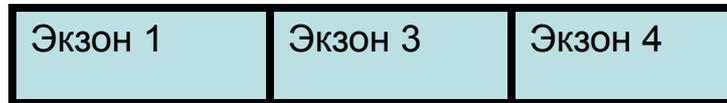
Механизмы альтернативного сплайсинга:

- Альтернативный выбор промотора
- Альтернативный выбор сигнала полиаденилирования
- Альтернативный выбор разных наборов экзонов
- Транс-сплайсинг

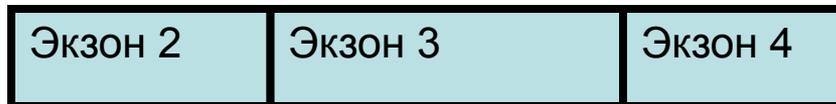


1. Схема фрагмента гена, содержащего 2 промотора, 4 экзона и 3 интрона.

2. Фрагмент мРНК после сплайсинга (выбор промотора P1)



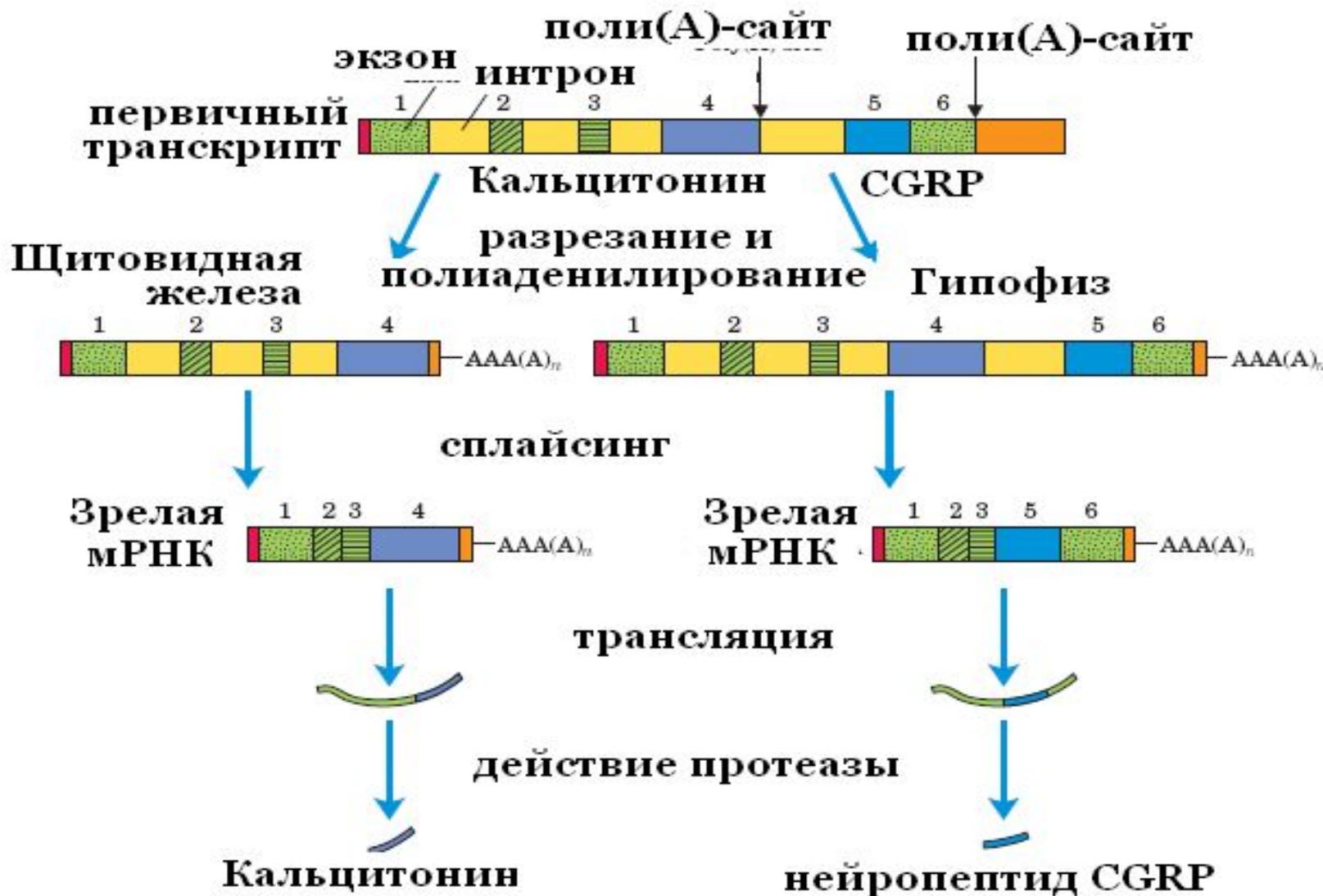
3. Фрагмент мРНК после сплайсинга (выбор промотора P2)



Направление транскрипции 

Альтернативный сплайсинг мРНК

кальцитонинового гена у млекопитающих (крыса)



Структура мРНК прокариот



- Лидер - это 5' не транслируемый участок - 5' UTR (*UnTranslated Region*)
- Трейлер – это 3' не транслируемый участок (3'UTR)
- Рамка считывания – участок мРНК, кодирующий синтез полипептида – от старт кодона до стоп-кодона

Строение мРНК эукариот



- 5'-кэп- 7 метил-гуанозин
- Лидер – 5' нетранслируемый участок - 5' UTR (*UnTranslated Region*)
- Кодированная последовательность
- Трейлер – 3' нетранслируемый участок (3'UTR)
- 3'-поли(А)-фрагмент