

Транскрипция

ДНК



РНК

ГЕН



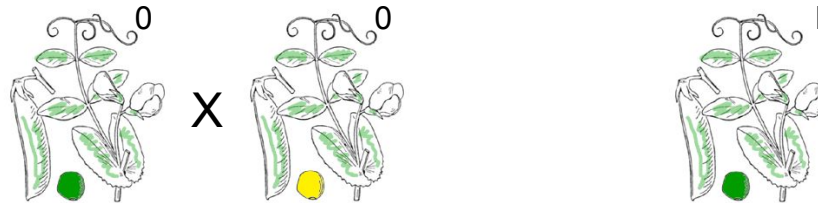
© Mendel Museum of Genetics
www.mendelmuseum.muni.cz

Грегор Иоганн Мендель
(Gregor Johann Mendel)
1822-1884



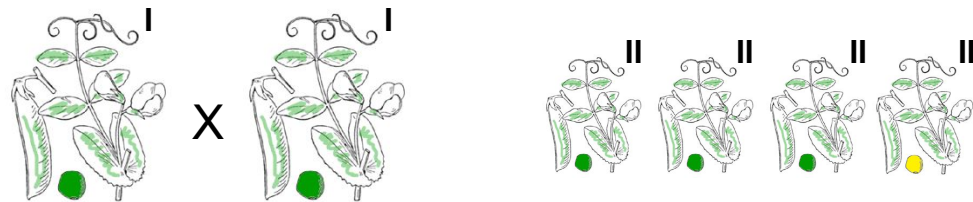
www.agroatlas.ru

Законы Менделя



1. Закон единообразия гибридов первого поколения

У потомков первого поколения от скрещивания родителей, имеющих два варианта одного признака (н-р, цвет цветков), будет присутствовать только один вариант (доминантный) этого признака. Непроявившийся вариант – рецессивный.

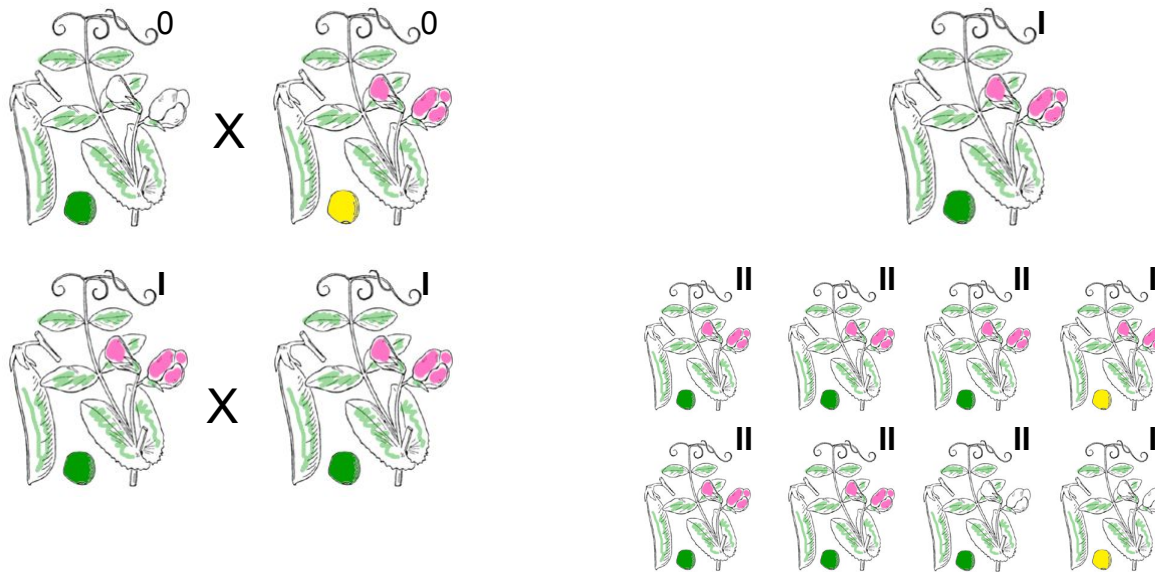


2. Закон расщепления признаков

Во втором поколении (полученном с помощью скрещивания потомков первого поколения) появляются оба варианта признака в соотношении доминантный:рецессивный = 3:1.

ГЕН

Законы Менделя



3. Закон независимого наследования признаков

Варианты одного признака проявляются в потомстве независимо от вариантов другого признака, и их проявление подчиняется 1-му и 2-му закону.

Mendel, Gregor. Versuche über Pflanzenhybriden.

Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brünn, Bd. IV für das Jahr 1865, Abhandlungen, 3-47.

Дискретный наследственный фактор

ГЕН

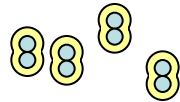
Эксперимент Гриффита (1928)



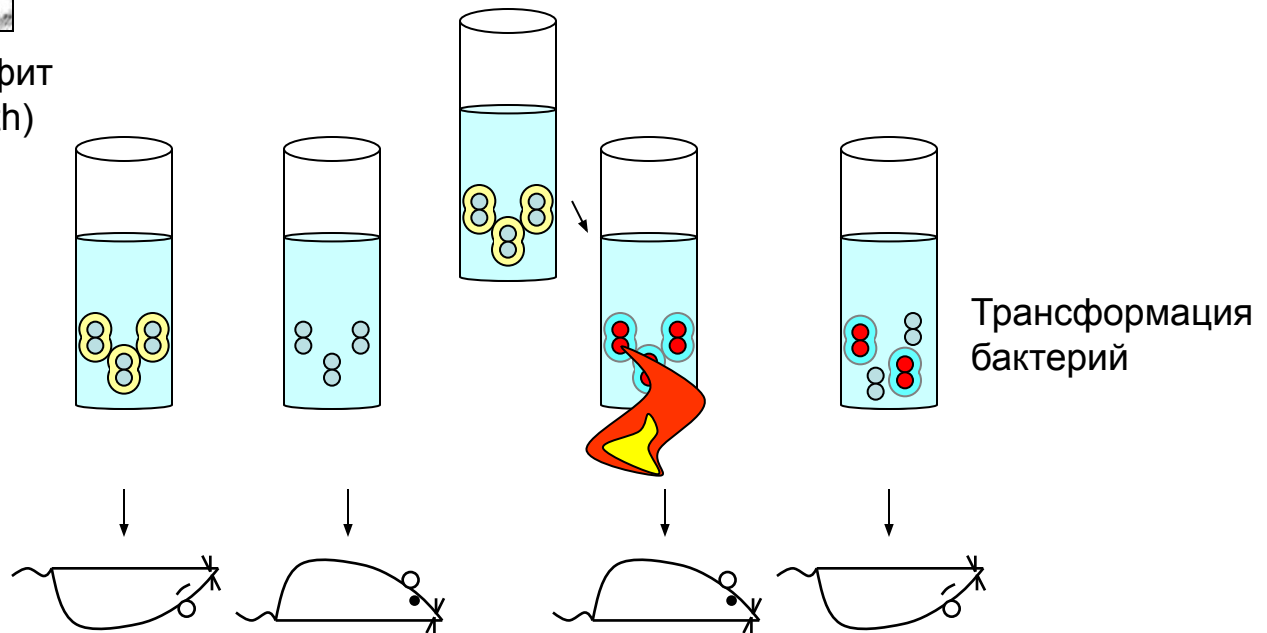
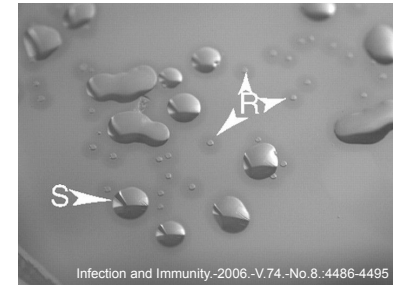
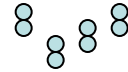
Фредерик Гриффит
(Frederick Griffith)
1879-1941

Streptococcus pneumoniae

Тип S

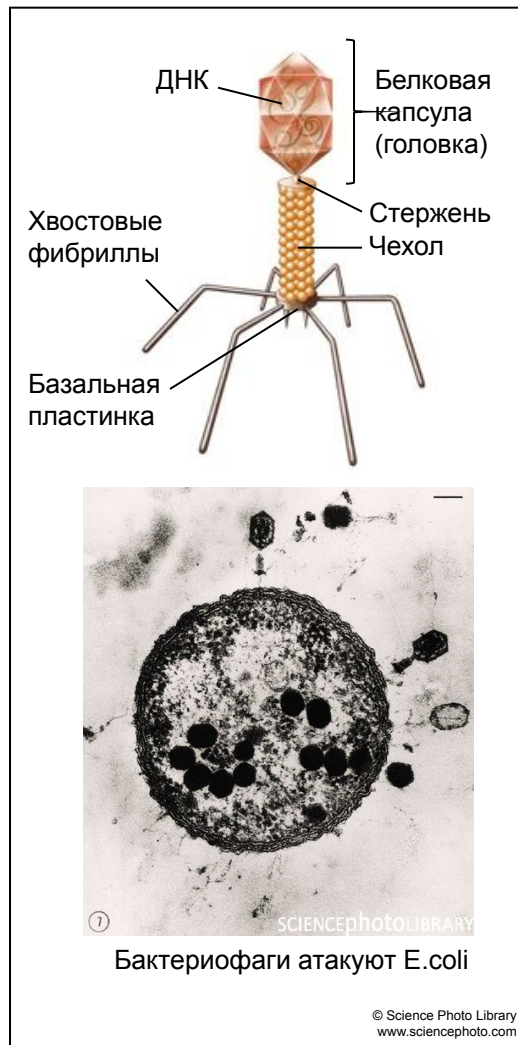


Тип R



ГЕН

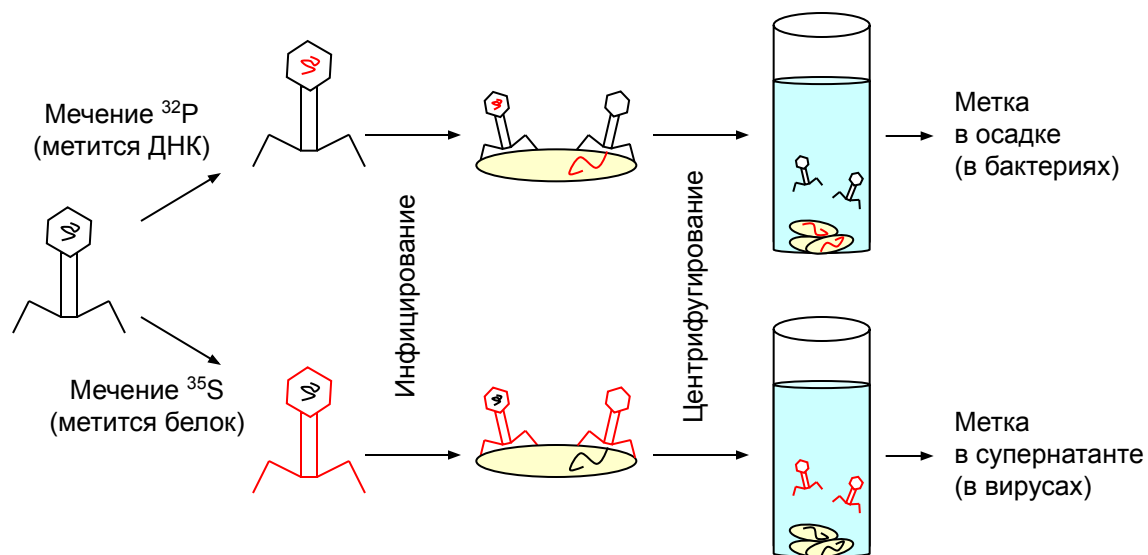
Эксперимент Херши-Чейз (1952)



Memorial University of Newfoundland
www.mun.ca

Марта Чейз (Martha Cowles Chase) 1927-2003

Альфред Херши (Alfred Day Hershey) 1908-1997



Единица наследственности (и мутагенеза) – ограниченный в пространстве участок генома (ДНК или РНК), ответственный за проявление определенной функции (белка или РНК).

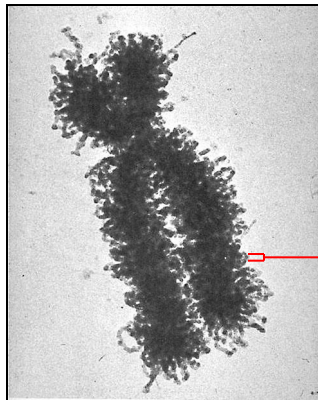
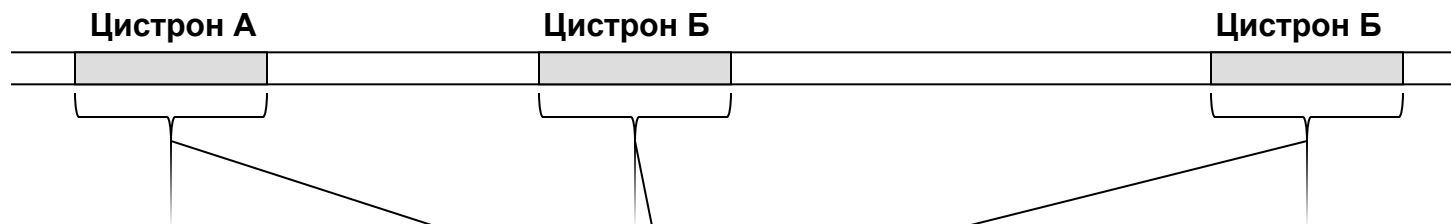
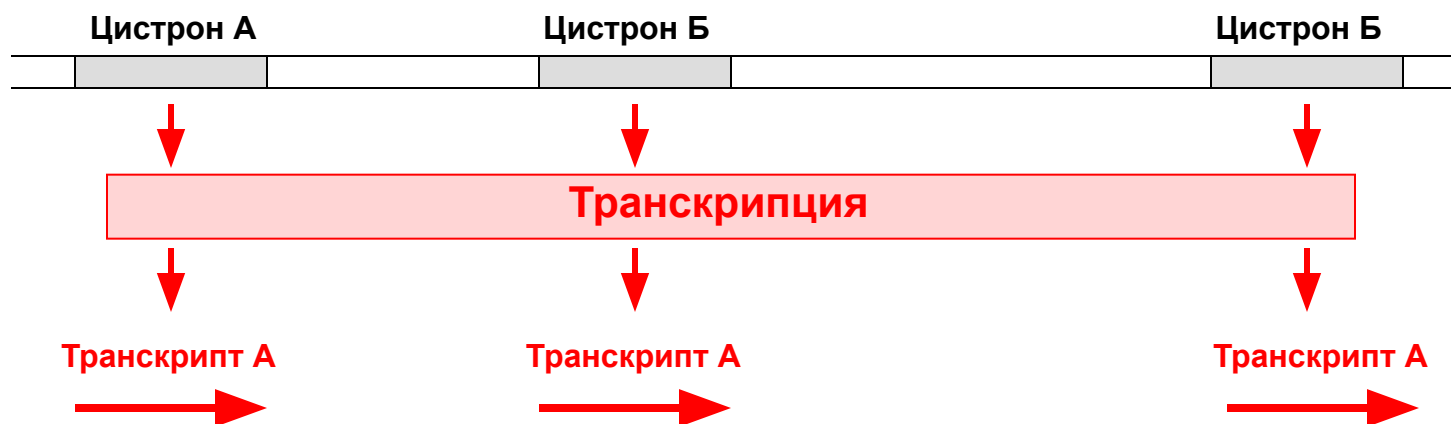


FIGURE 1-14
An electron micrograph of a human chromosome.
Chromosome XII from a HeLa cell culture. (Courtesy
of Dr. E. Du Praw.)

Цистрон

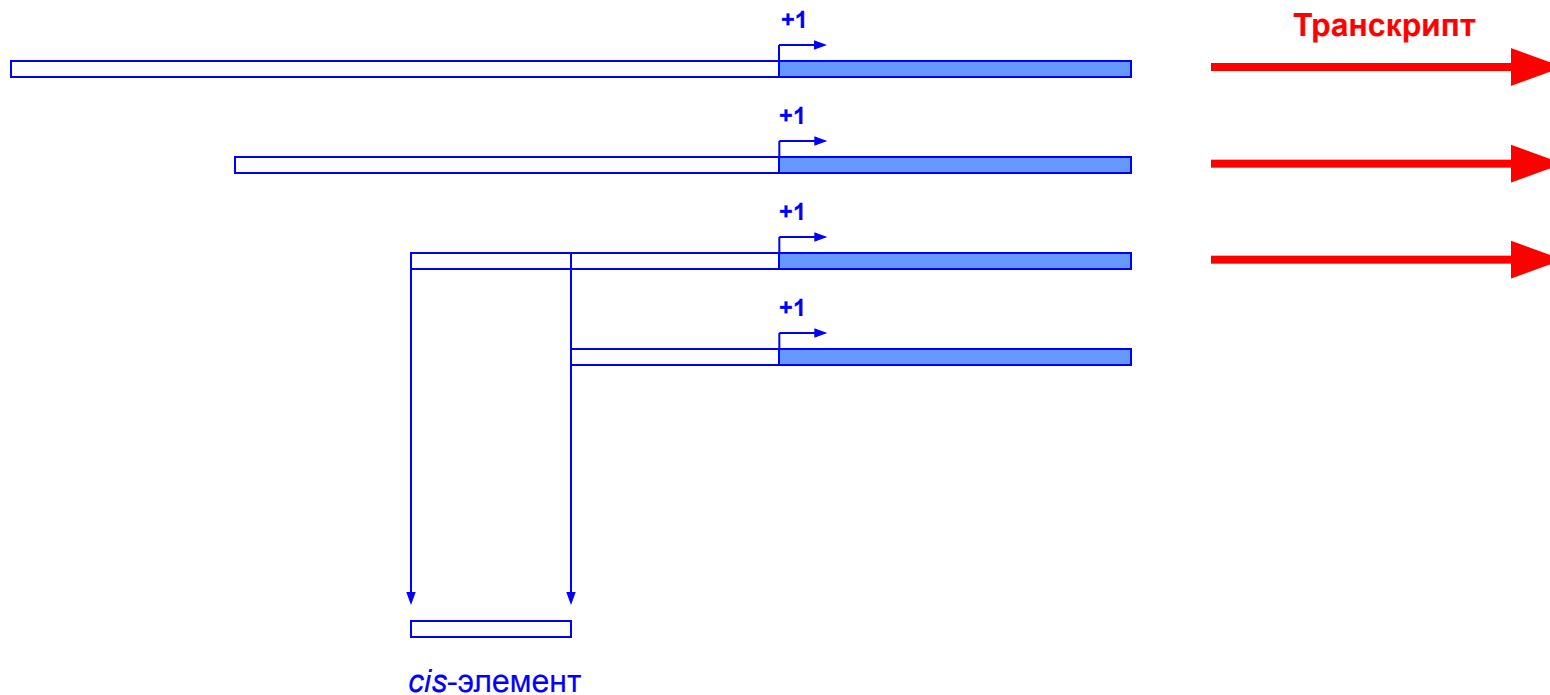


Цистрон – локус генома (участок ДНК),
ответственный за образование белка (РНК)



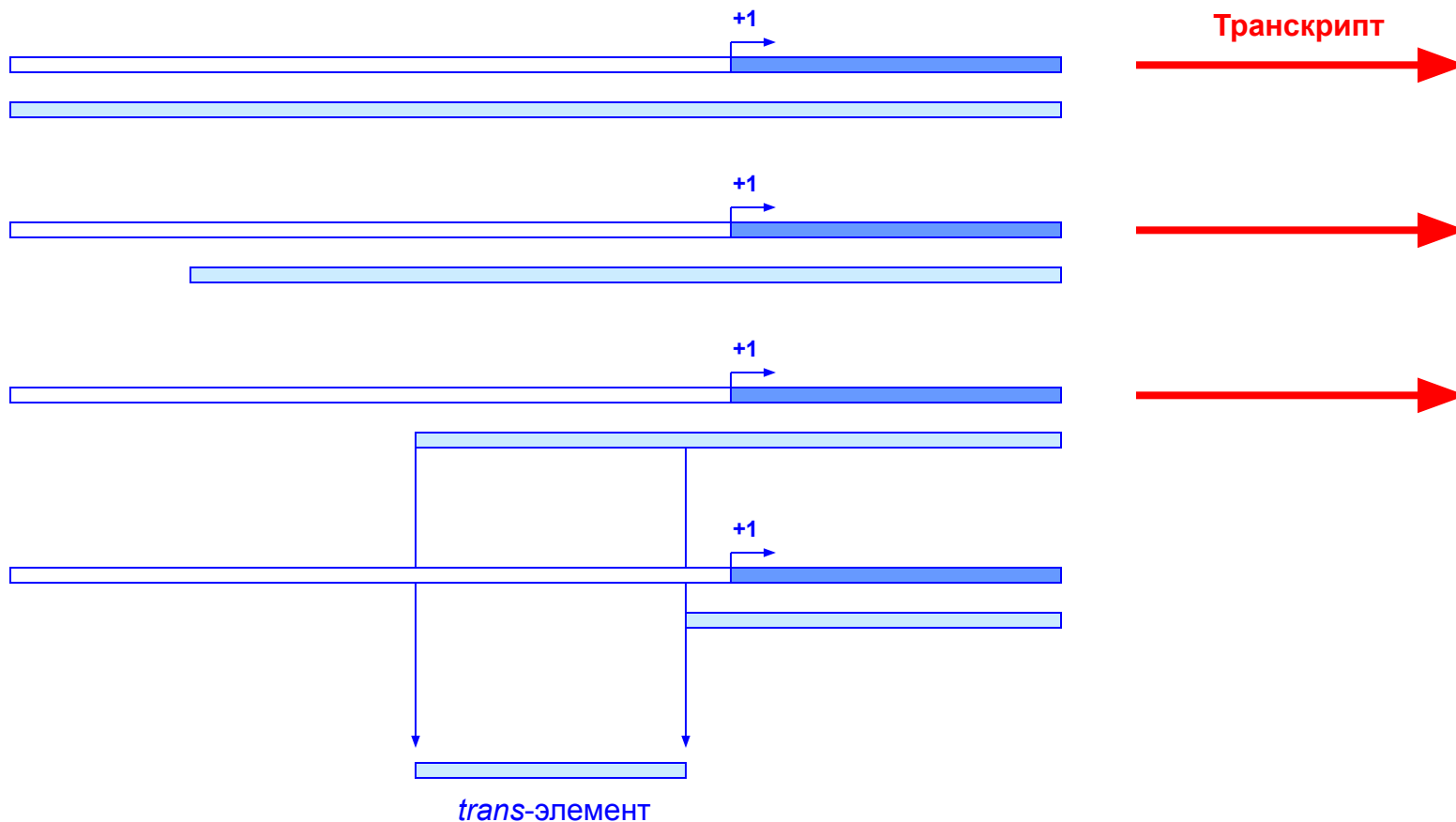
cis-элементы, *trans*-элементы и *trans*-факторы

Элемент – участок ДНК, влияющий на транскрипцию



cis-элемент – участок **той же** молекулы ДНК, с которой считывается целевой транскрипт

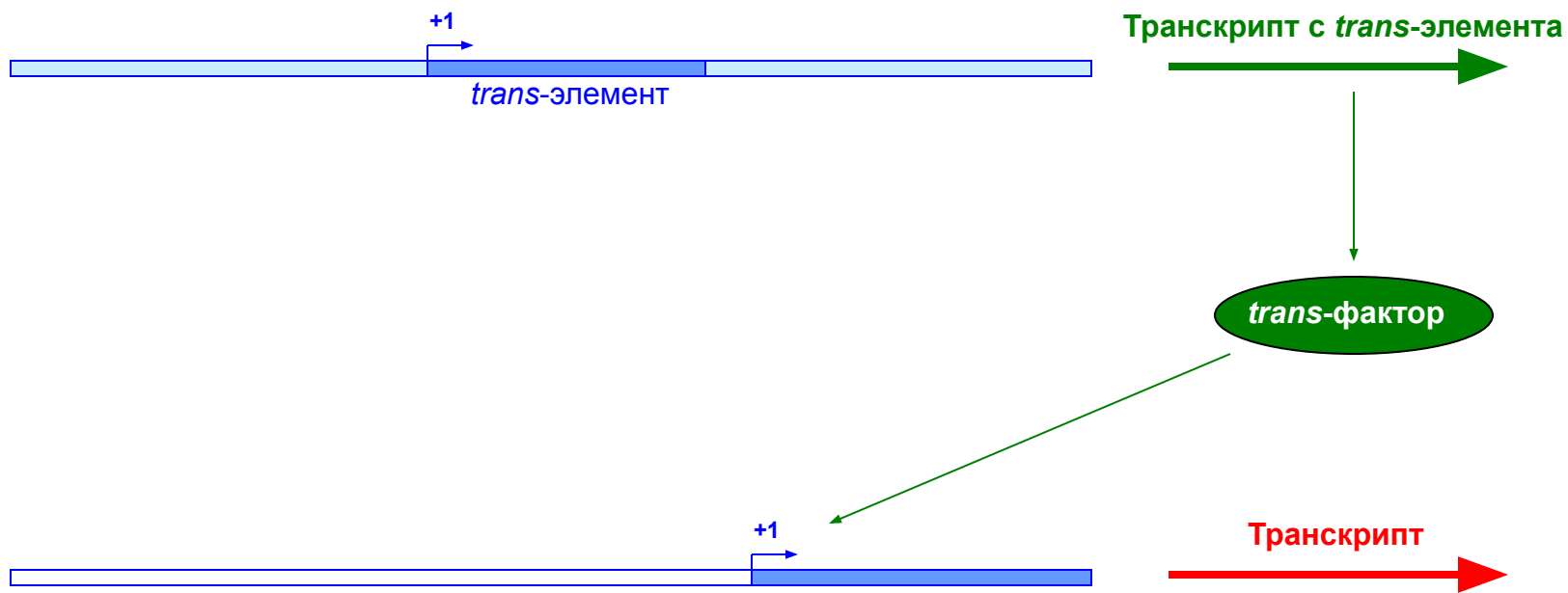
cis-элементы, *trans*-элементы и *trans*-факторы



***trans*-элемент – участок молекулы ДНК, с которой не считывается целевой транскрипт**

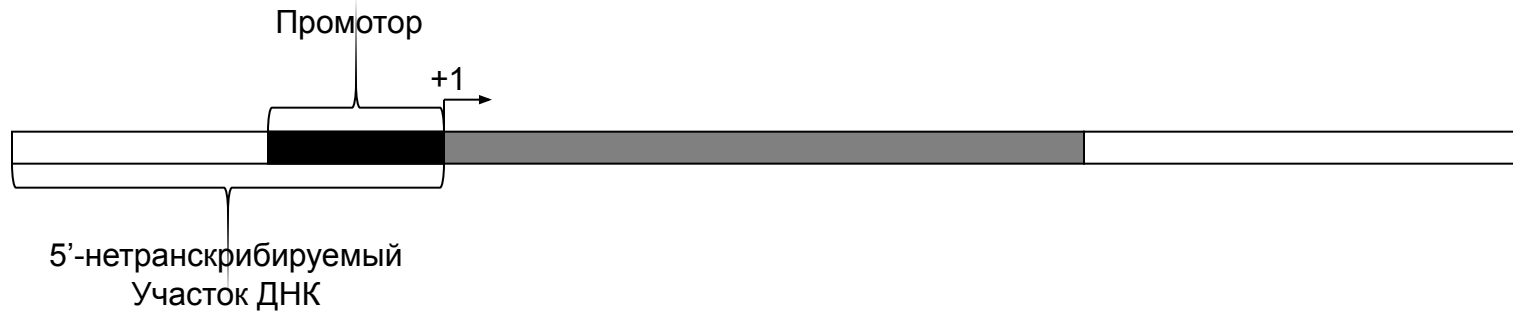
cis-элементы, *trans*-элементы и *trans*-факторы

Фактор – молекула неДНКовой природы, влияющая на транскрипцию

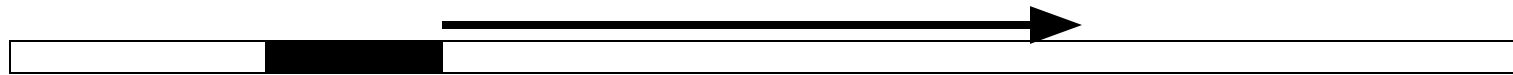


Транскрипция

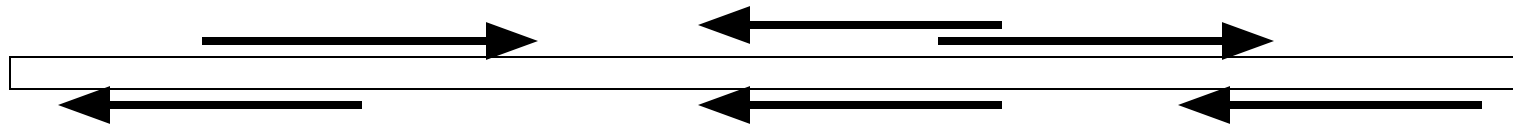
Промотор



**Промотор обеспечивает
корректное начало и направление транскрипции**

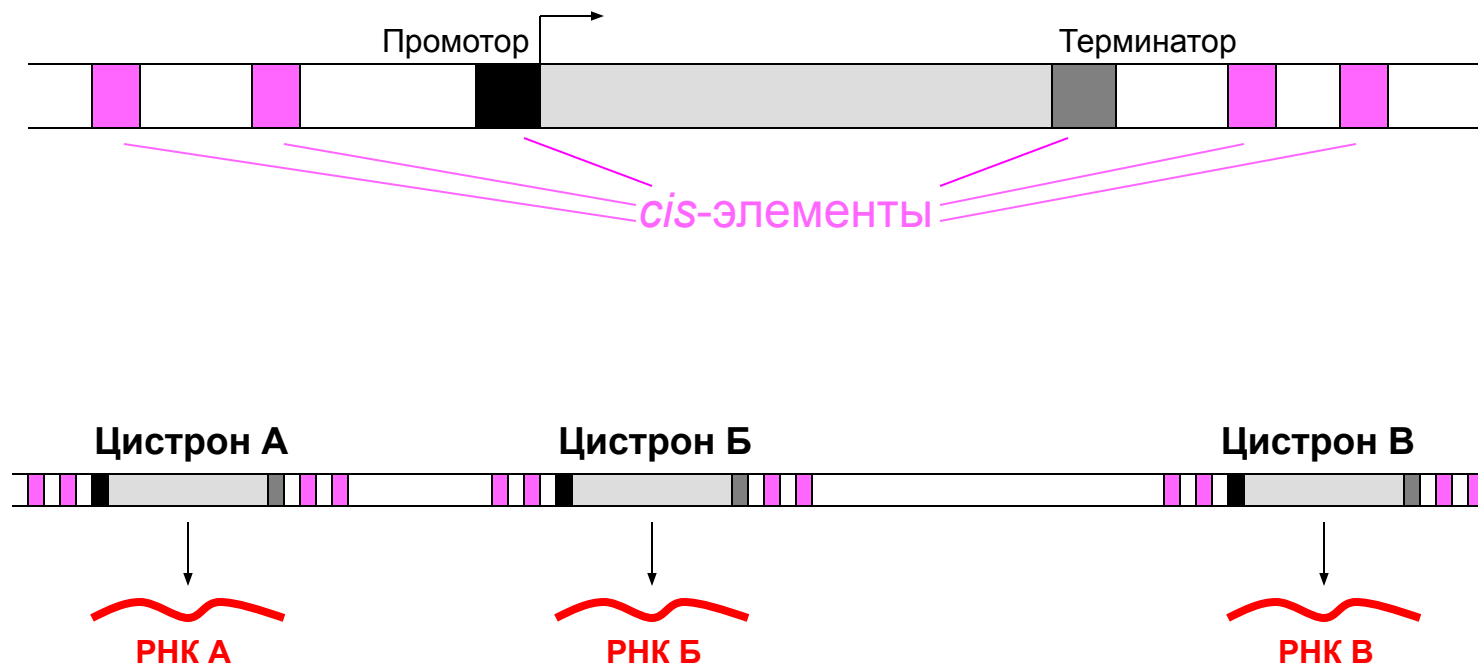


**Удаление промотора
приводит к сильному подавлению транскрипции,
началу транскрипции со случайных точек и в любом направлении**



Цистрон

Цистрон окружен *cis*-элементами, необходимыми для его регуляции



Генетическая регуляция синтеза ферментов, информационная РНК и оперон



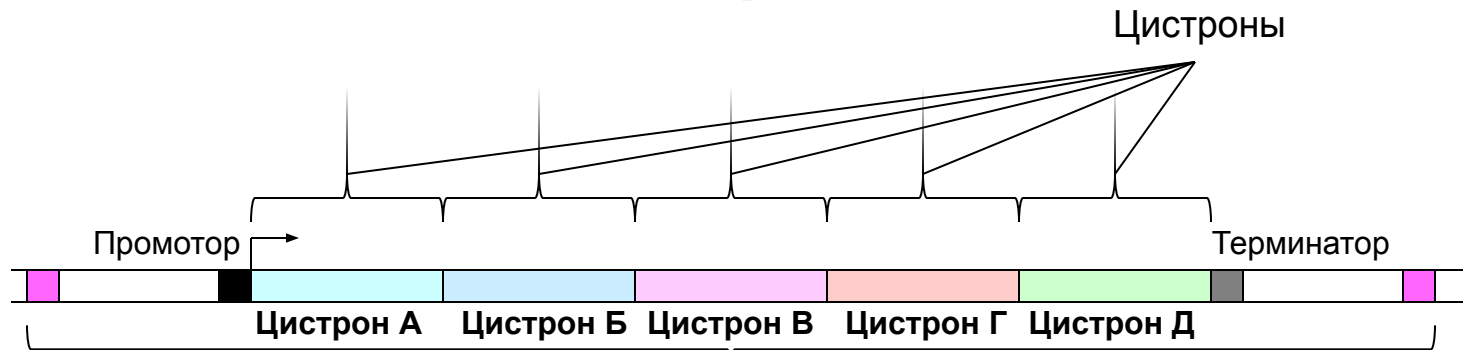
© The Nobel Foundation

Франсуа Жакоб
(François Jacob)
1920 г.р.

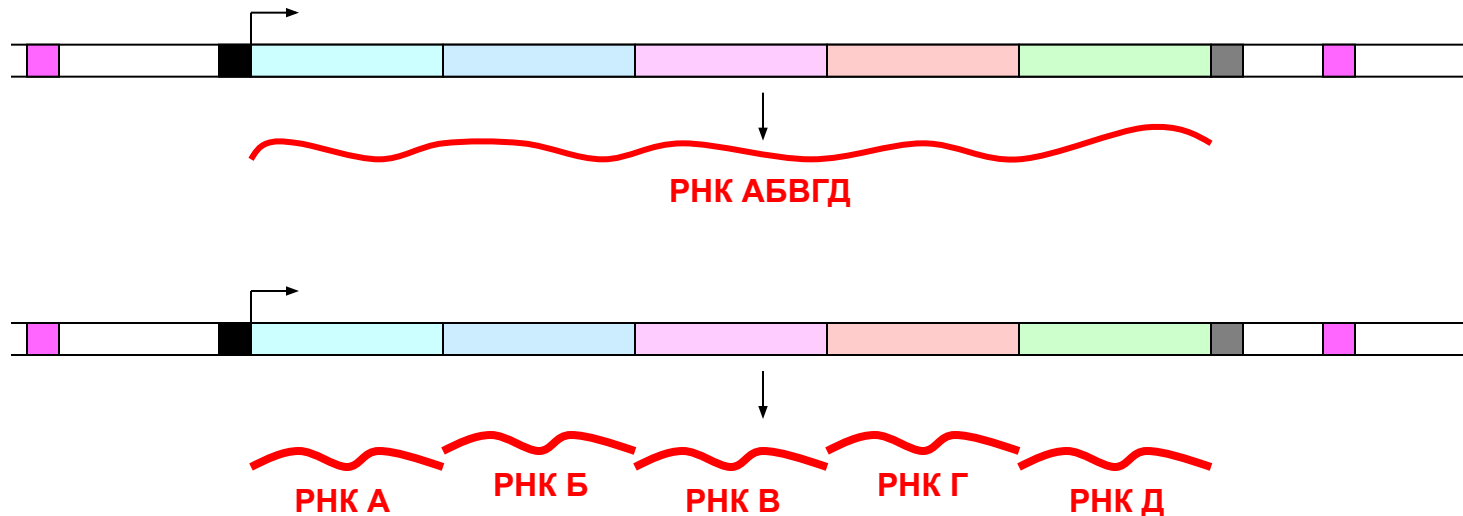
Андре Мишель Львов
(André Michel Lwoff)
1902-1994

Жак Люсьен Моно
(Jacques Lucien Monod)
1910-1976

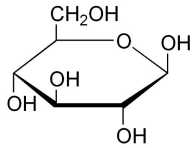
Оперон



Оперон – локус генома (участок ДНК),
ответственный за образование нескольких белков (РНК) одновременно



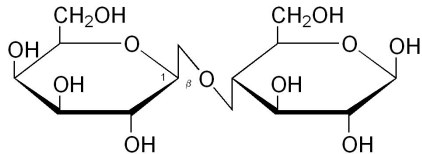
Лак-оперон



Основной источник энергии для бактерий

D-Глюкоза

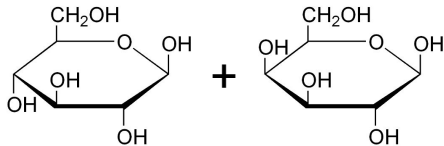
При замене глюкозы на лактозу в бактериях появляются 3 фермента



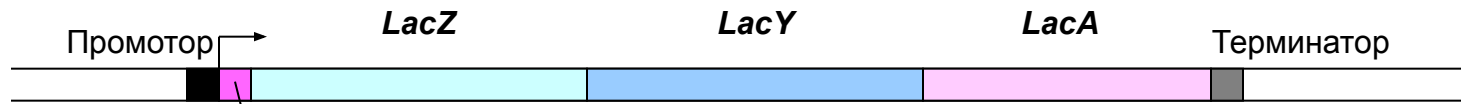
Лактоза



β -галактозид пермеаза – обеспечивает проникновени лактозы в клетку
 β -галактозидаза (гидролаза) – гидролизует O-гликозидную связь
 β -галактозид трансацетилаза (трансфераза) – ацетилюет лактозу

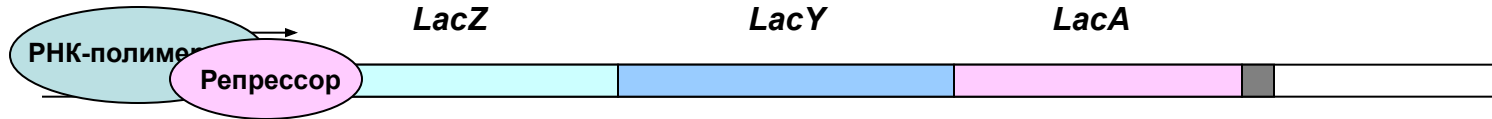


Лак-оперон

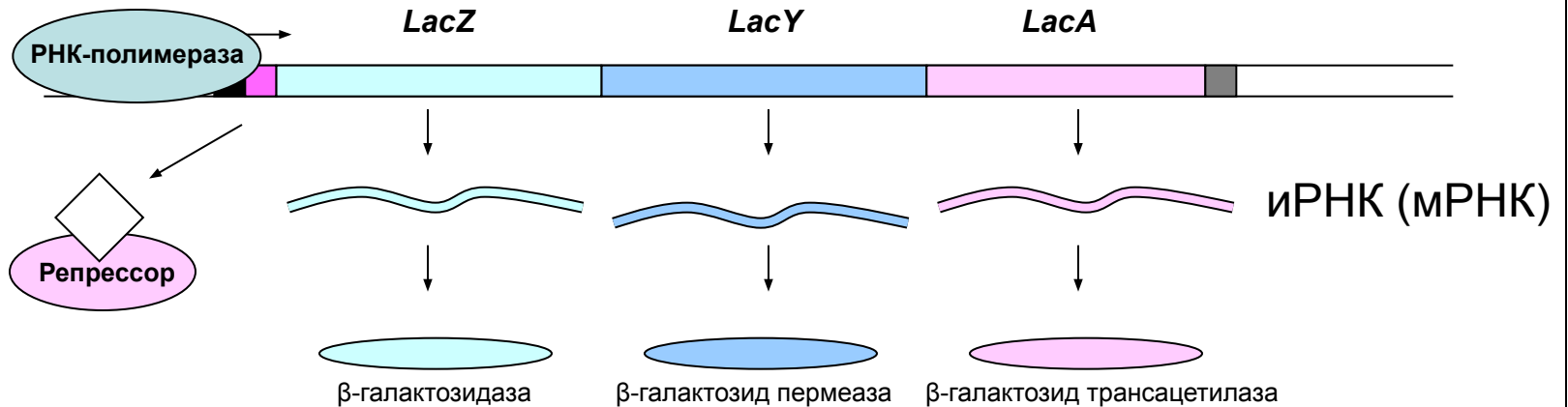


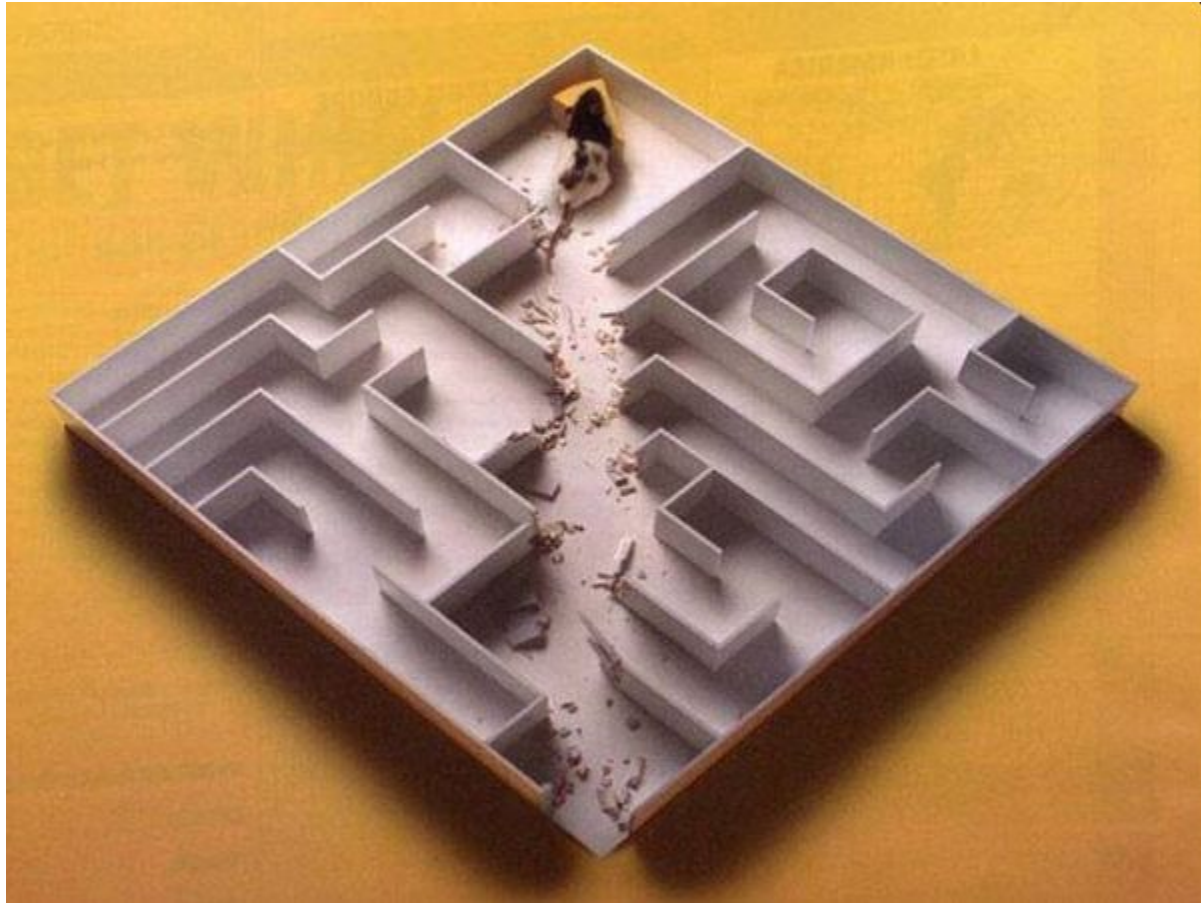
LacY – кодирует β-галактозид пермеазу
LacZ – кодирует β-галактозидазу
LacA – кодирует β-галактозид трансацетилазу

В среде без лактозы



В среде с лактозой (◇)

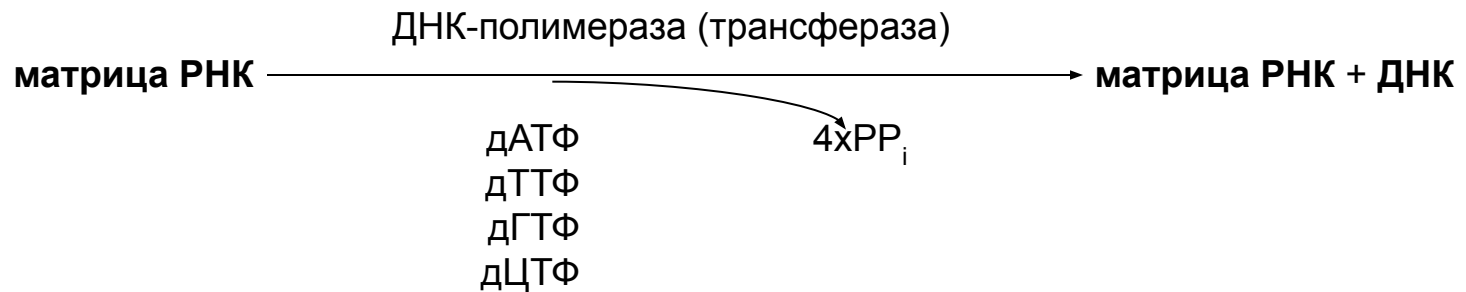
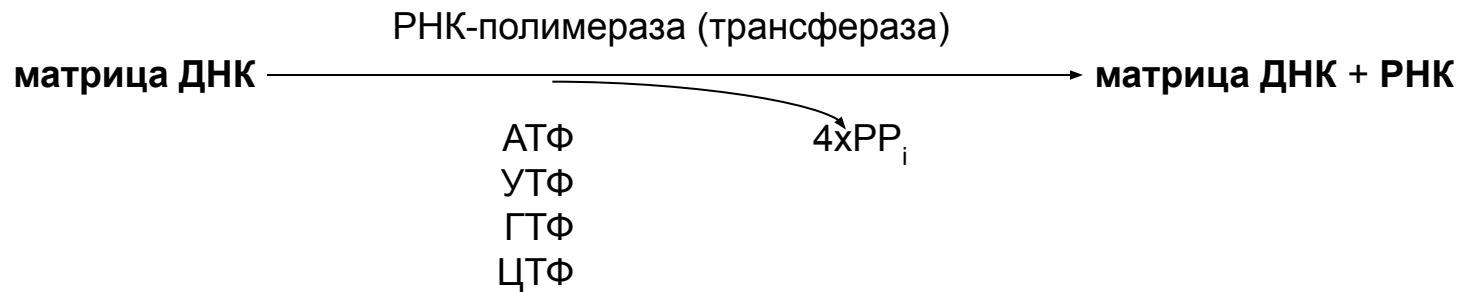




ТРАНСКРИПЦИЯ
реализация генетической информации

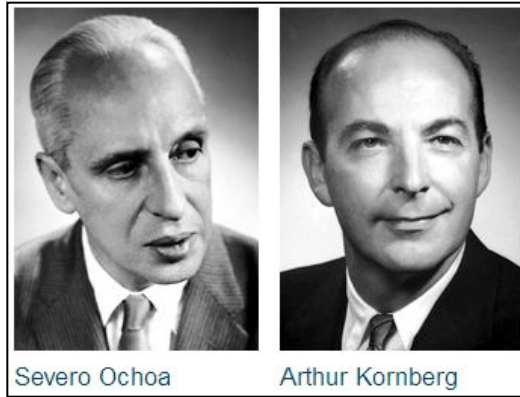
Транскрипция

ДНК-зависимая РНК-полимераза и РНК-зависимая ДНК-полимераза



Транскрипция

РНК-полимераза



© The Nobel Foundation

Нобелевская премия 1959 г.

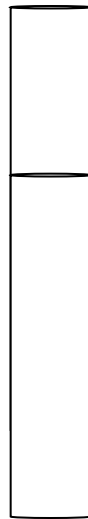
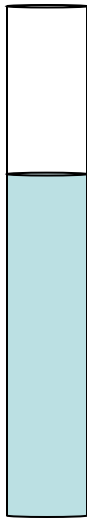
«За открытие механизмов биосинтеза рибонуклеиновой кислоты и дезоксирибонуклеиновой кислоты»

Транскрипция

РНК-полимераза

Фракция, обогащенная белком

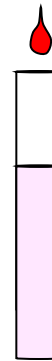
Экстракт ткани



Добавляем фракцию, обогащенную белком



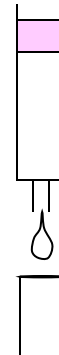
Добавляем радиоактивно меченные рибонуклеотиды



Инкубируем



Удаляем нуклеотиды



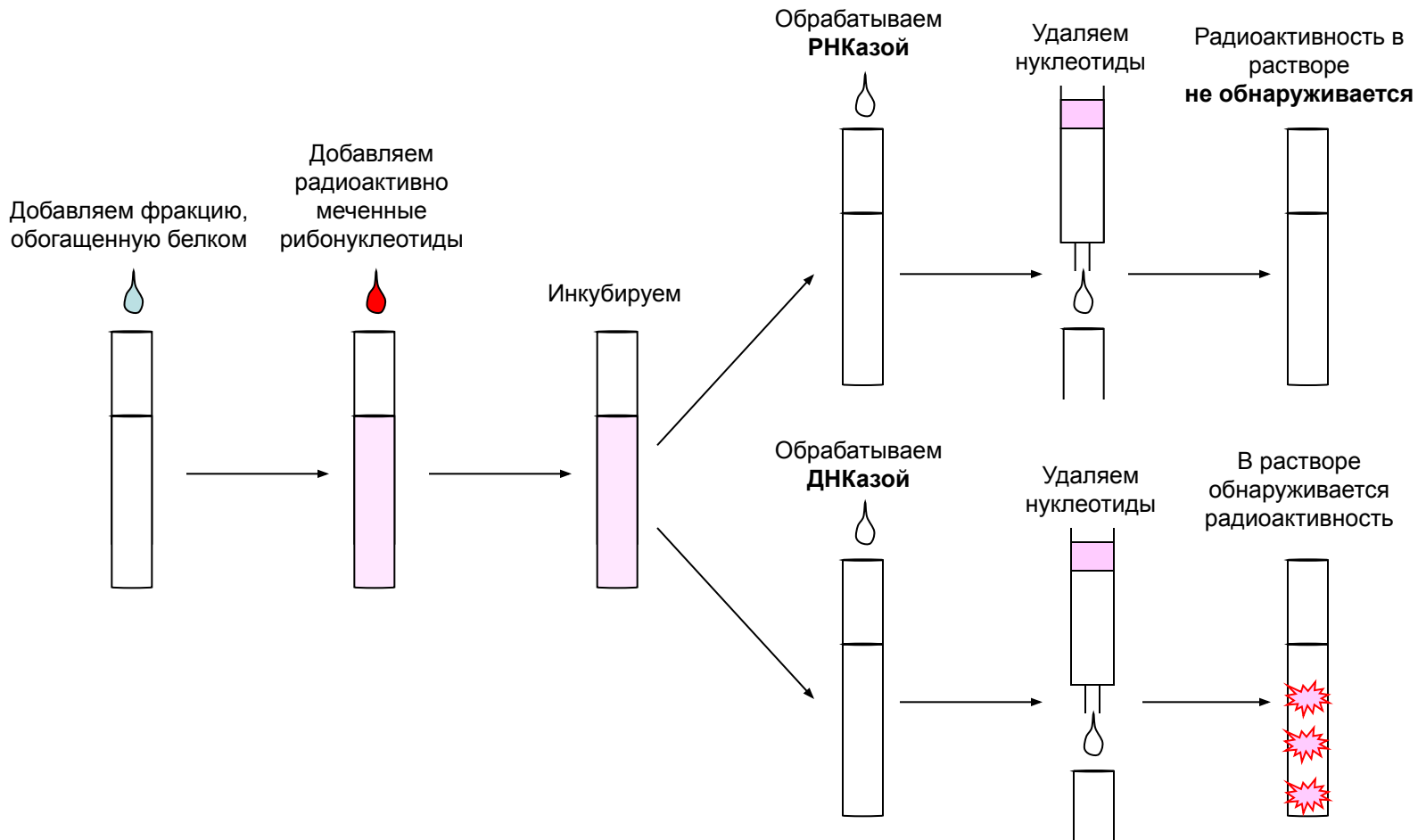
В растворе обнаруживается радиоактивность



Следовательно, метка включилась в полимер нуклеиновой кислоты

Транскрипция

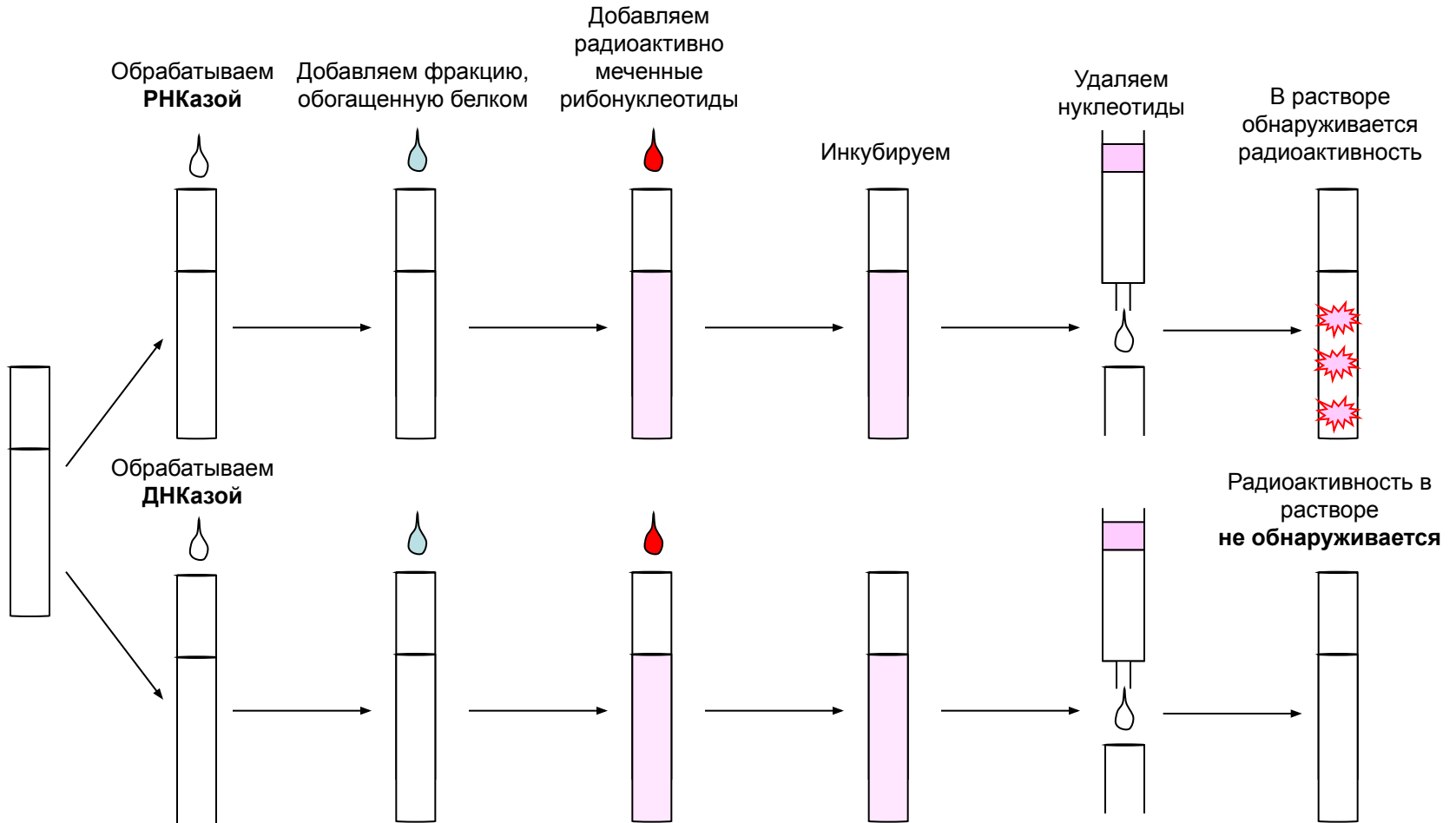
РНК-полимераза



Следовательно, полученная молекула – полимерная РНК

Транскрипция

РНК-полимераза



**Следовательно, для синтеза РНК нужна полимерная ДНК
(а полимерная РНК не нужна)**

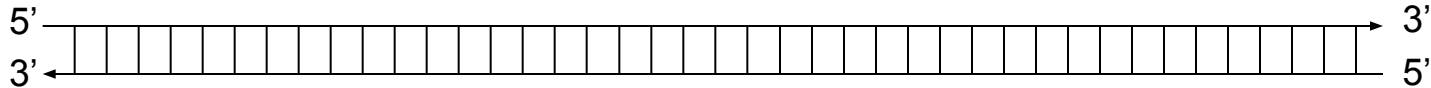
РНК-полимераза

1. РНК-полимераза требует наличия матрицы (ДНК).
2. РНК-полимераза присоединяет рибонуклеозидмонофосфат в соответствии с правилом комплементарности относительно нуклеотида матрицы.
3. РНК-полимераза работает только на одноцепочечной ДНК.
4. РНК-полимераза не требует наличия праймера.
5. РНК-полимераза присоединяет рибонуклеозидмонофосфат к 3'-ОН группе рибозы.
6. РНК-полимераза – белок с четвертичной структурой.
7. РНК-полимераза работает только на определенных участках ДНК.

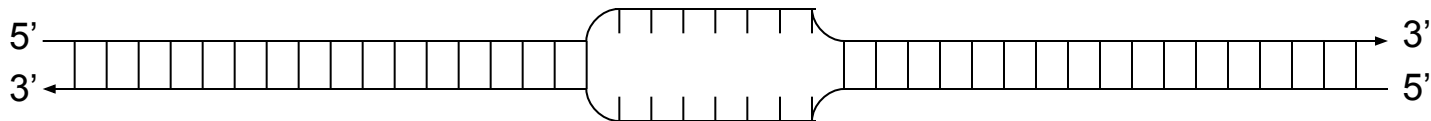
Транскрипция

РНК-полимераза

РНК-полимераза работает только на одноцепочечной ДНК



Для работы РНК-полимеразы требуется
локальное плавление двухцепочечной ДНК
(образование транскрипционного пузыря)



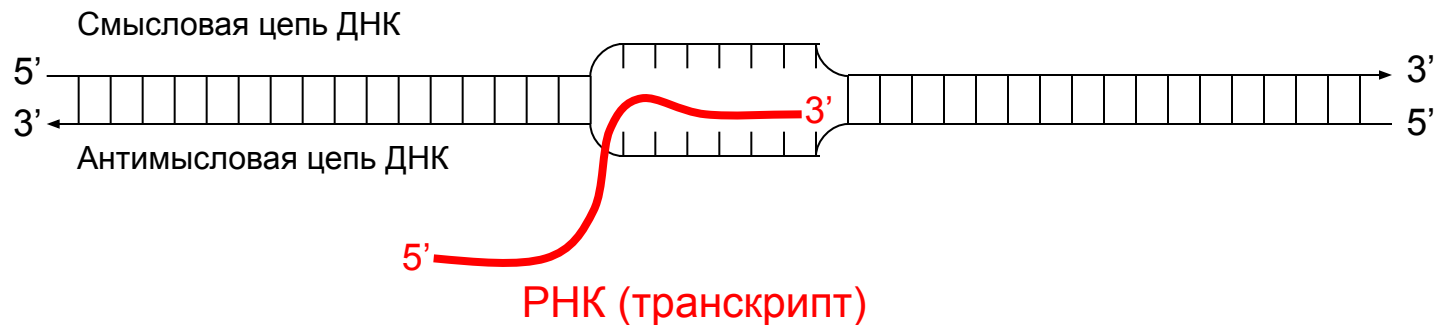
Транскрипция

РНК-полимераза

РНК-полимераза присоединяет рибонуклеотидмонофосфат к 3'-ОН группе рибозы

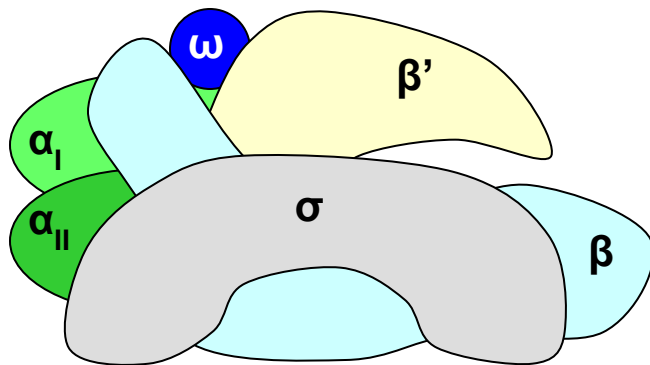
Цепь РНК растет в направлении 5'-3'

Матрицей служит цепь ДНК в направлении 3'-5', т.е. АНТИСМЫСЛОВАЯ ЦЕПЬ ДНК



РНК-полимераза

РНК-полимераза – белок с четвертичной структурой



2 α , β , β' – основной фермент

ω – необходима для сборки фермента

σ – необходима для начала транскрипции

Бактериальная РНК-полимераза

состоит из 6 субъединиц – 2 α , β , β' , σ и ω

молекулярный вес ~480 кДа

(1 Да = 1 а.е.м = 1/12 атома ^{12}C)

РНК-полимеразы

Эукариоты

РНК-полимераза бактерий

РНК-полимераза архей

РНК-полимераза вирусов
(У бактериофагов - 1 субъединица,
нет четвертичной структуры)

Ядерные РНК-полимеразы

РНК-полимераза I

РНК-полимераза II

РНК-полимераза III

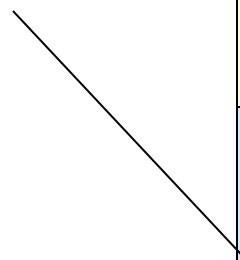
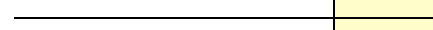
РНК-полимераза IVa

РНК-полимераза IVb

Неядерные РНК-полимеразы

РНК-полимераза митохондрий

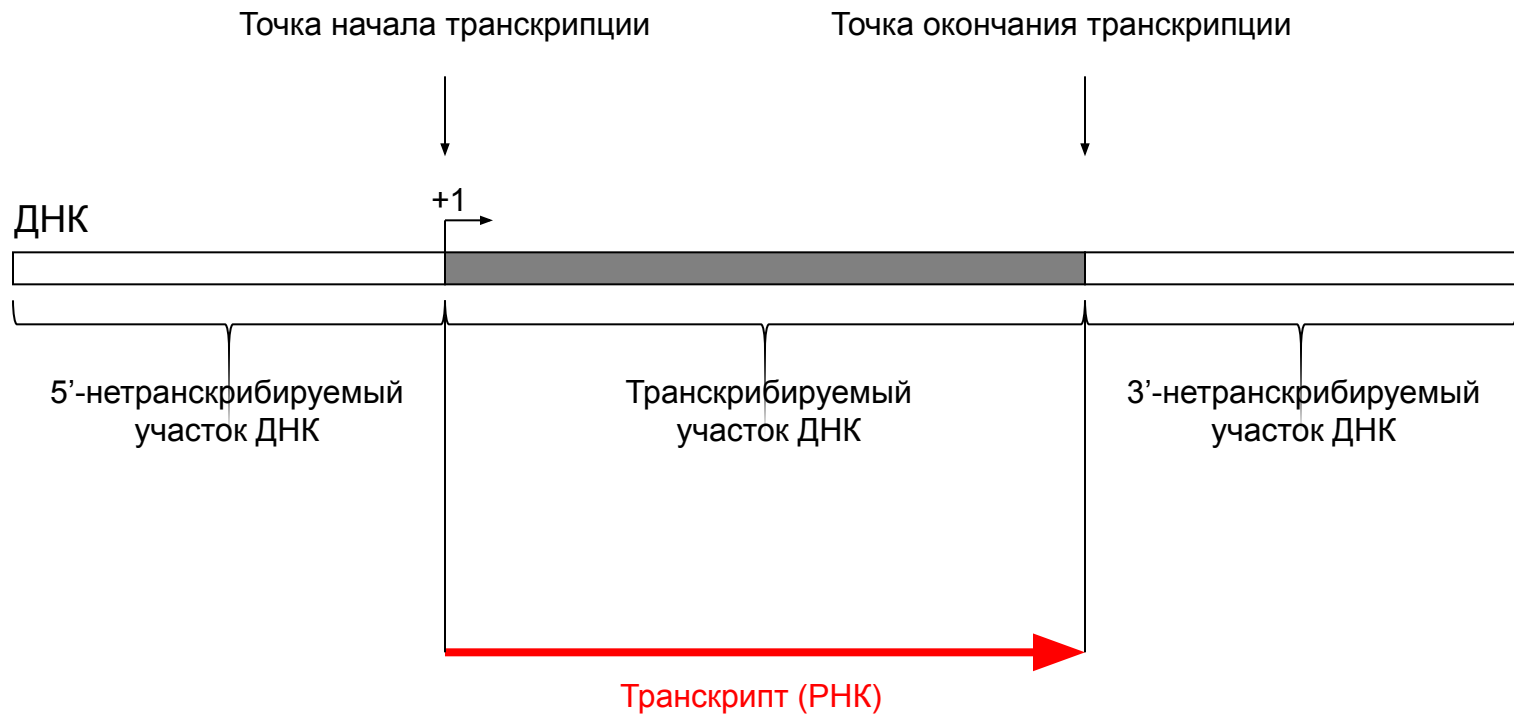
РНК-полимераза хлоропластов

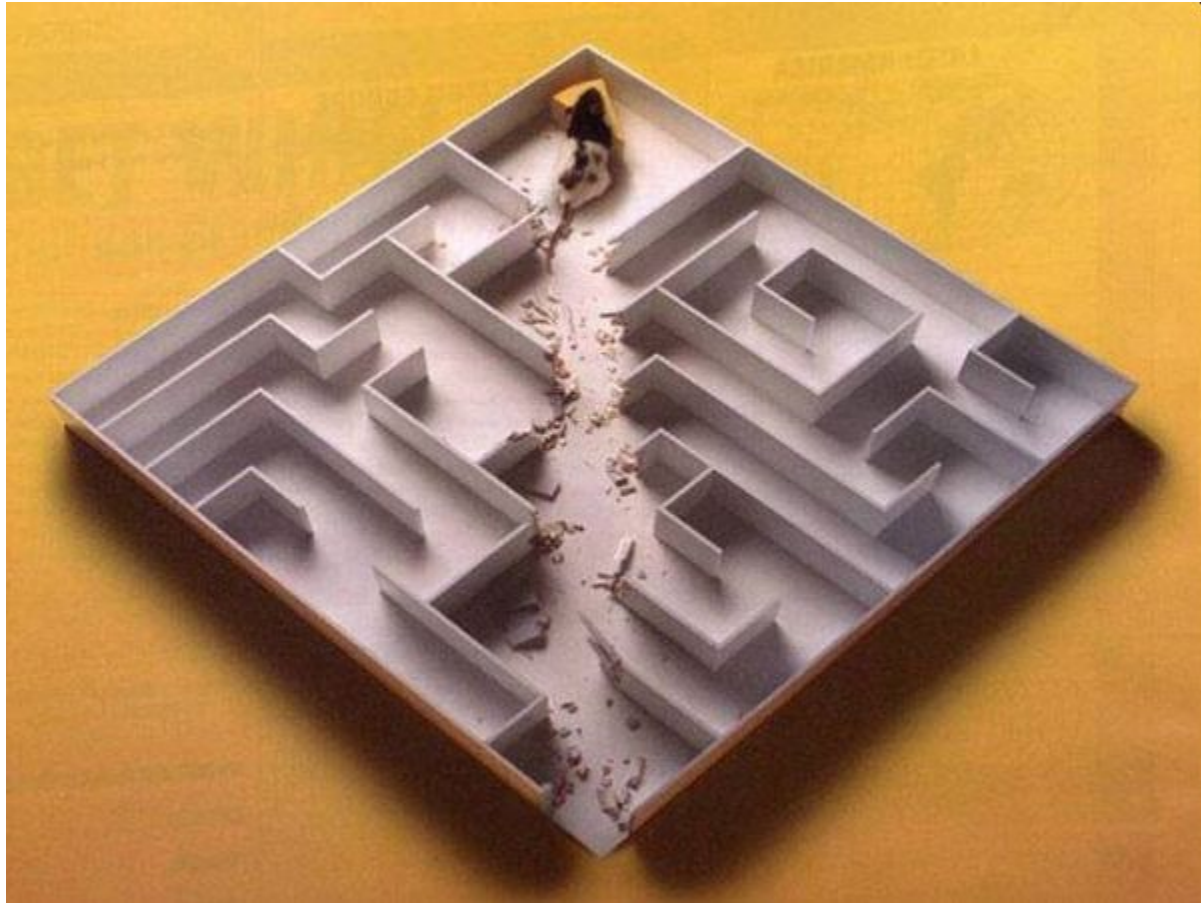


Транскрипция

РНК-полимераза

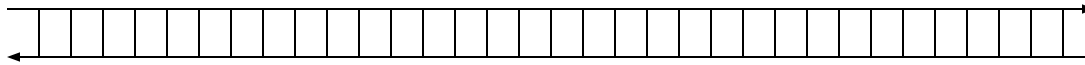
РНК-полимераза работает только на определенных участках ДНК



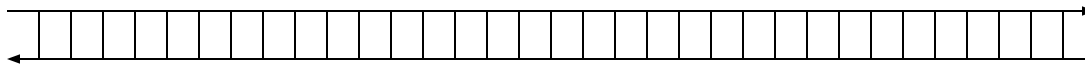


Транскрипция

Этапы транскрипции



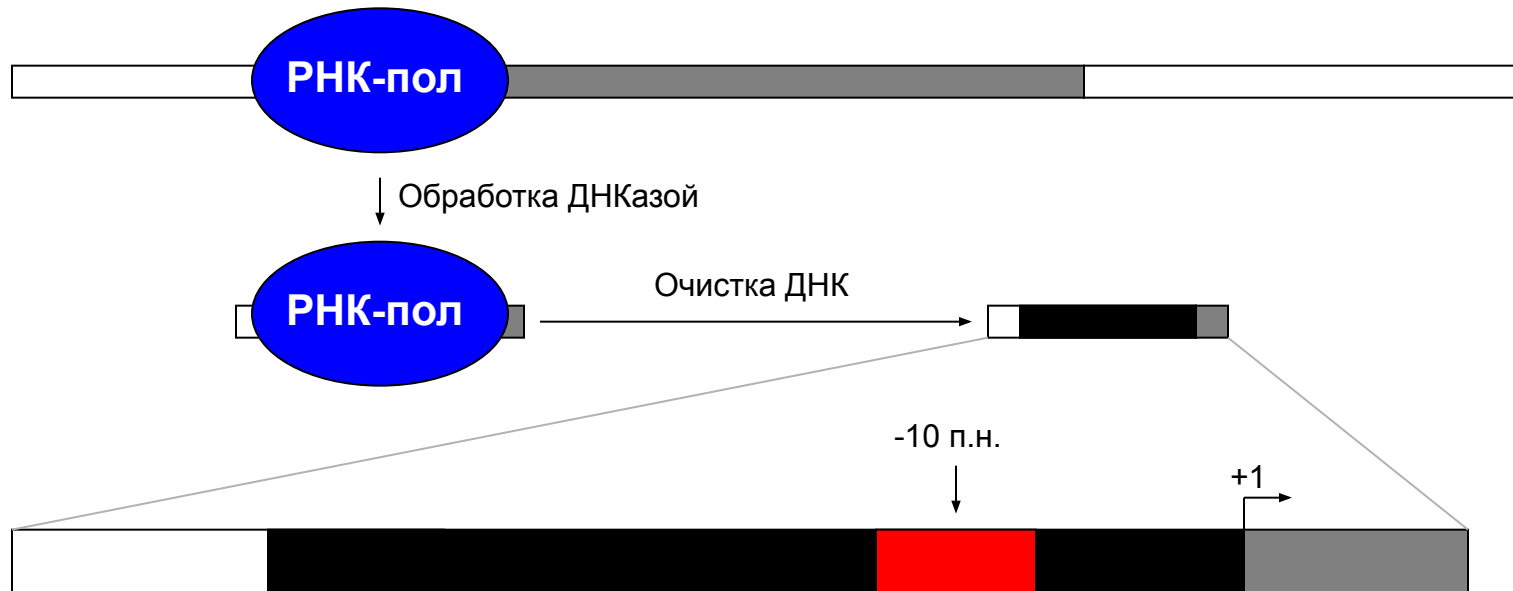
1. Инициация
2. Элонгация РНК
3. Терминация



Инициация транскрипции у бактерий

Промоторные *cis*-элементы бактерий

Бокс Прибноу-Шаллера, 1975 (элемент -10)



	Т	А	Т	А	А	Т	
Вероятность	Т	82	7	52	14	19	89
присутствия	Г	7	1	12	15	11	2
нуклеотида	Ц	8	3	10	12	21	5
	А	3	89	26	59	49	3

Консенсус = ТАТААТ

Транскрипция

Инициация транскрипции у бактерий

Промоторные *cis*-элементы бактерий

Бокс Гилберта, 1976 (элемент -35)

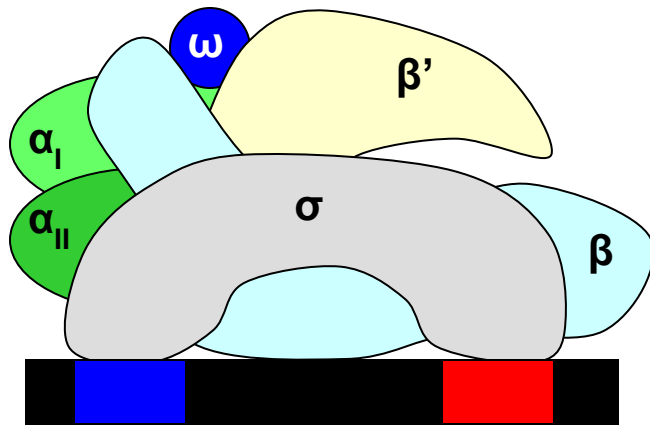


Т	Т	Г	А	С	А	
78	82	15	20	10	24	Т Вероятность
10	5	68	10	7	17	Г присутствия
9	3	14	13	52	5	Ц нуклеотида
3	10	3	58	32	54	А

Консенсус = ТАГАЦА

Транскрипция

Инициация транскрипции у бактерий

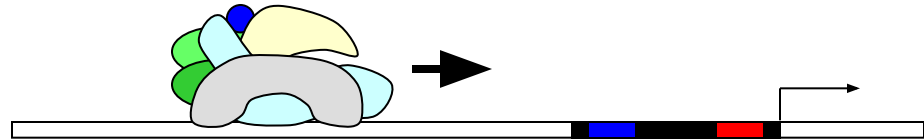


**Элементы -35 и -10
определяют правильность
посадки РНК полимеразы,
т.е. точку начала и
направление транскрипции**

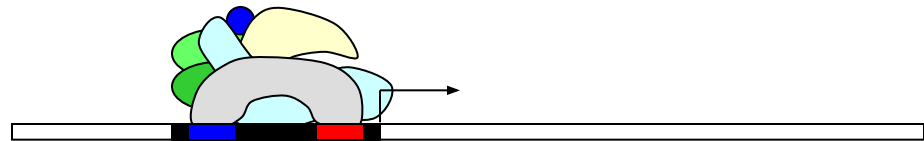
1. РНК-полимераза связывается с ДНК



2. РНК-полимераза «ищет» промотор



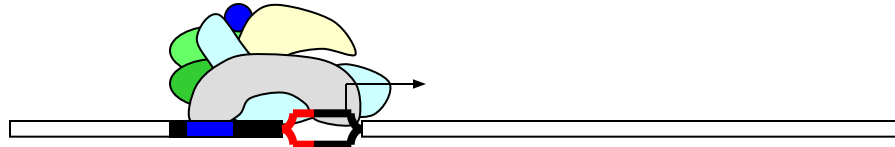
3. РНК-полимераза находит промотор, образуется
закрытый транскрипционный комплекс



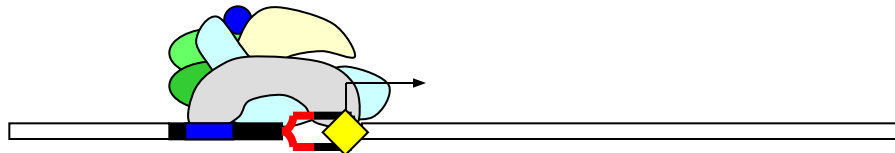
Транскрипция

Инициация транскрипции у бактерий

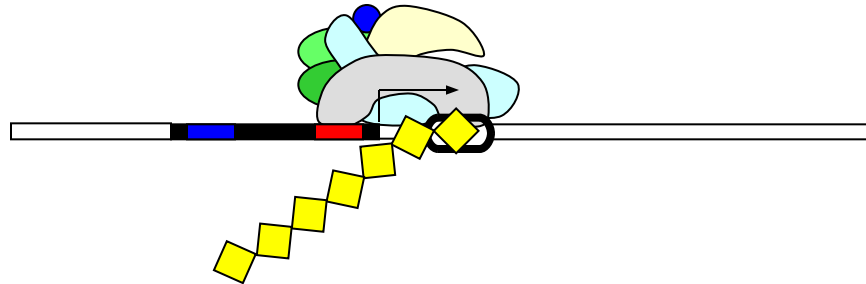
4. РНК-полимераза плавит ДНК между элементом -10 и точкой начала транскрипции, образуется **открытый** транскрипционный комплекс



5. РНК-полимераза включает первый нуклеотид



6. РНК-полимераза включает несколько первых нуклеотидов



Инициация транскрипции у эукариот

Ядерные РНК-полимеразы

РНК-полимераза I

РНК-полимераза II

РНК-полимераза III

Рибосомная РНК
45S рРНК

мРНК

тРНК
5S рРНК

↓
28S рРНК
18S рРНК
5.8S рРНК

Гены I класса

Гены II класса

Гены III класса

Транскрипция

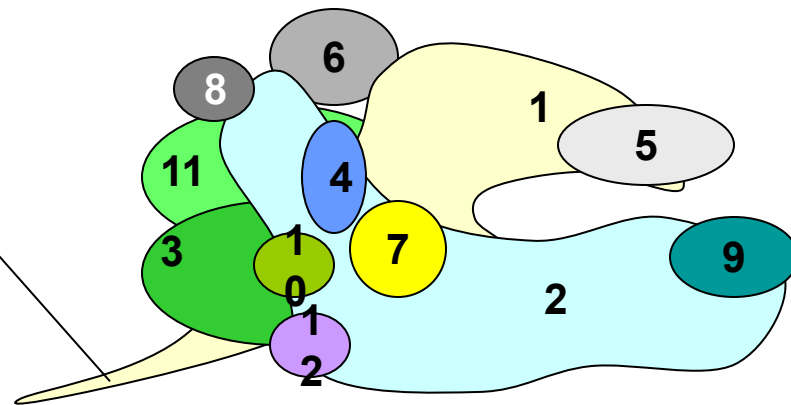
Инициация транскрипции у эукариот

РНК-полимераза II

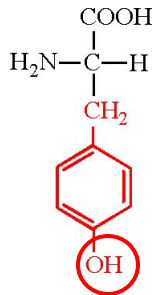
С-концевой домен
РНК-полимеразы II (CTD)

от 25 до 52 повторов
последовательности

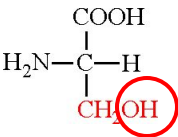
Тир-Сер-Про-Тре-Сер-Про-Сер



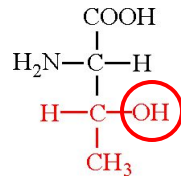
тирозин



серин



треонин

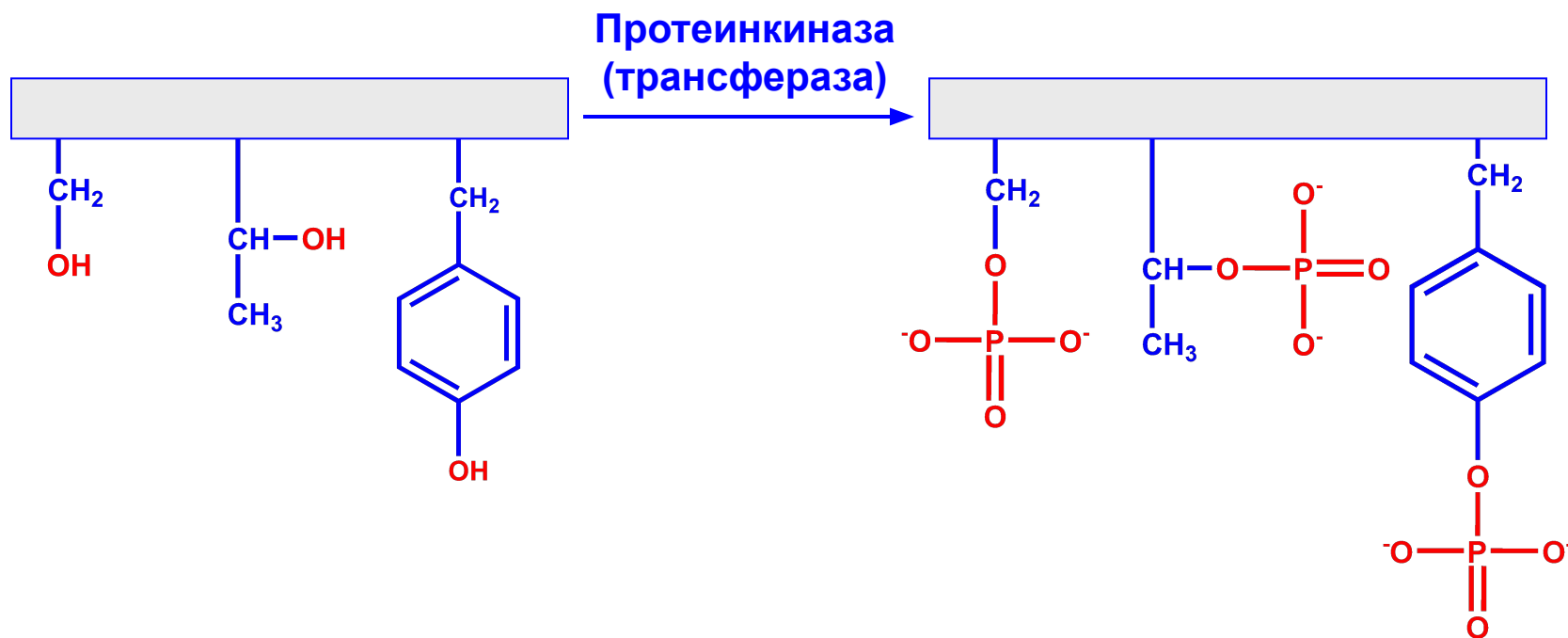


РНК-полимераза II

состоит из 12 субъединиц
молекулярный вес ~550 кДа

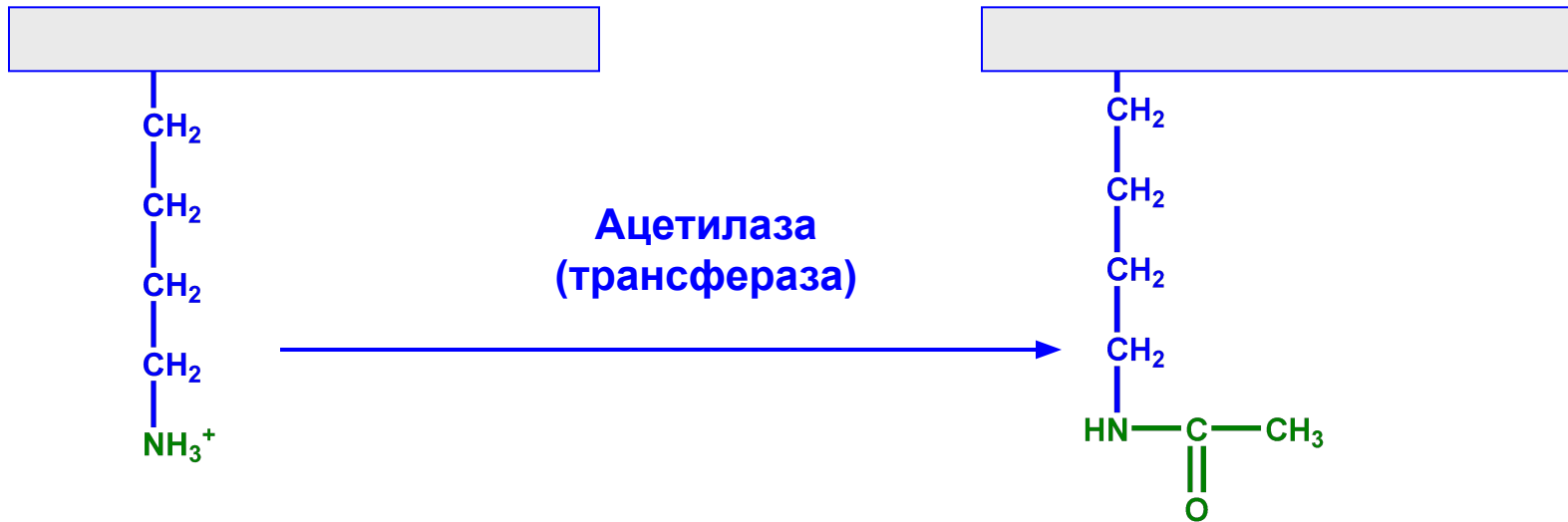
Ковалентные модификации белков

Фосфорилирование

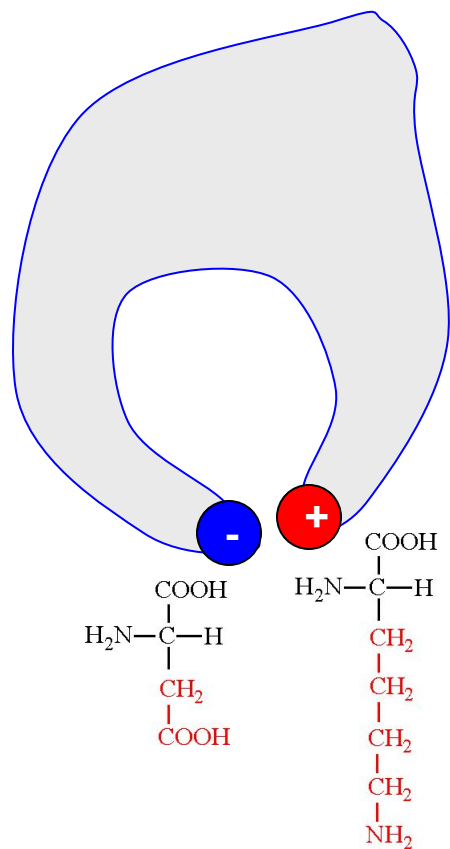


Ковалентные модификации белков

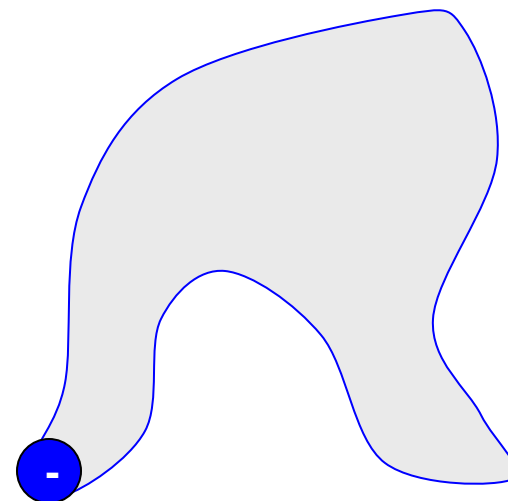
Ацетилирование



Ковалентные модификации белков



Ацетилирование



Инициация транскрипции у эукариот

Общие факторы инициации транскрипции РНК-полимеразы II

**Для инициации транскрипции РНК-полимеразе
требуется вспомогательные факторы**

**Гомология
с σ -субъединицей
бактериальной
РНК-полимеразы**

Базальные факторы транскрипции

TFIIA – 3 субъединицы

TFIIB – 1 полипептид

TFIID – до 17 субъединиц

TFIIE – 4 субъединицы

TFIIF – 2 субъединицы

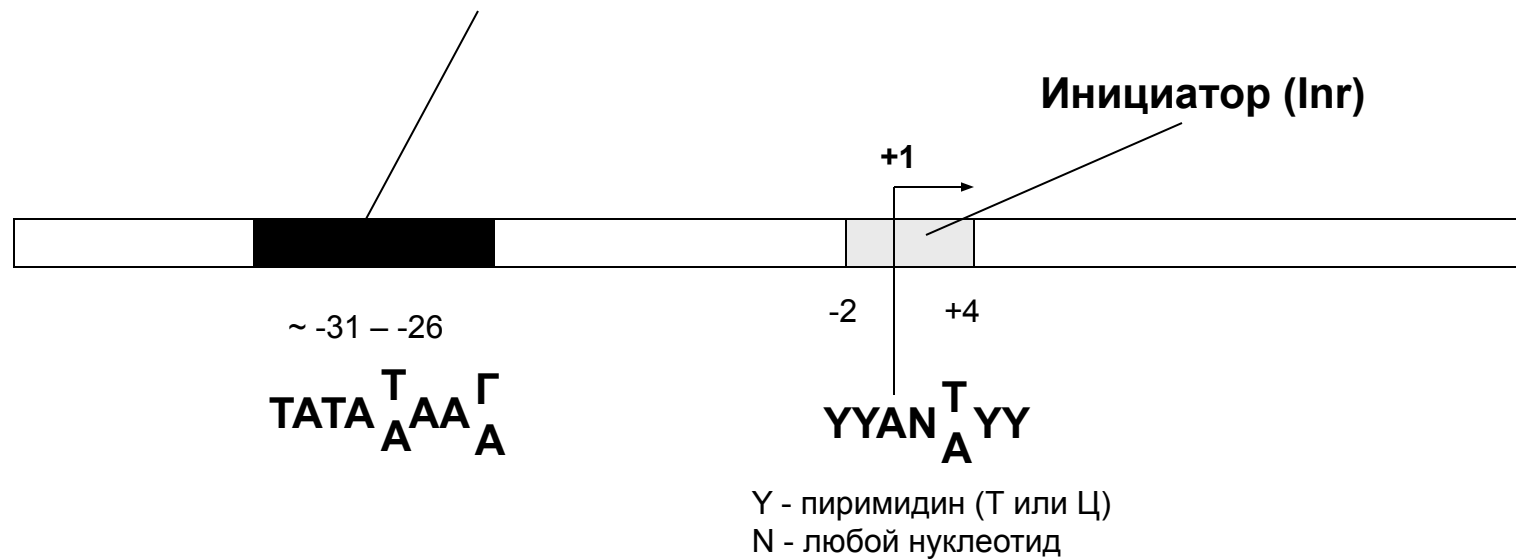
TFIIH – 10 субъединиц

Транскрипция

Инициация транскрипции у эукариот

Промоторы генов II класса

ТАТА-бокс (бокс Голдберга-Хогнеса, 1978)

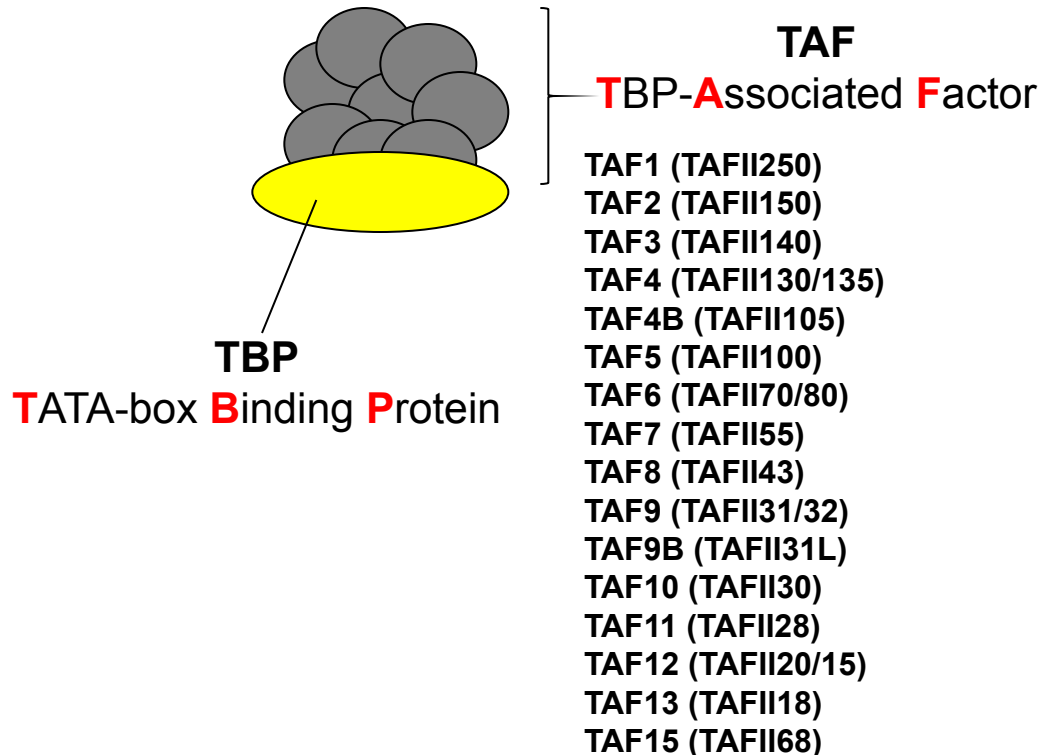


Инициация транскрипции у эукариот

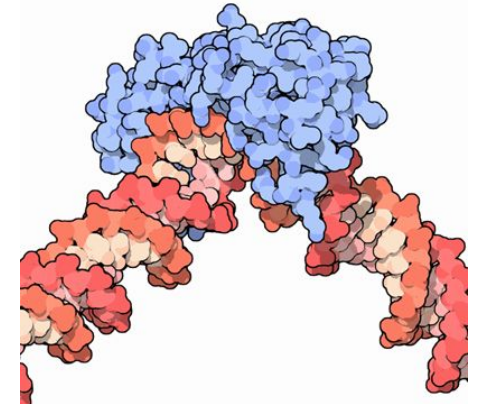
Связывание базальных факторов транскрипции с промотором

Шаг 1. TFIID (TBP) связывается с TATA-боксом

TFIID = TBP + белки TAF



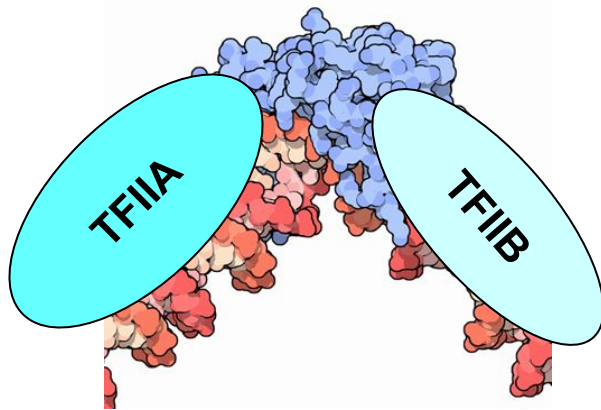
TBP связывается с малой бороздкой ДНК TATA-бокса и изгибает ДНК



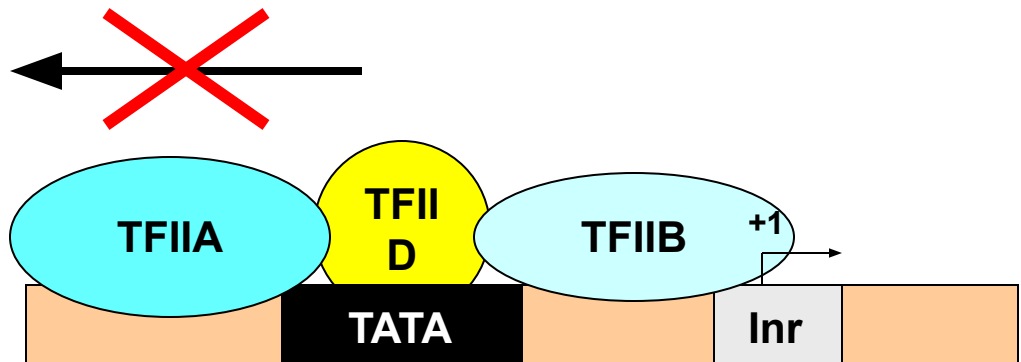
Инициация транскрипции у эукариот

Связывание базальных факторов транскрипции с промотором

**Шаг 2. TFIIA и TFIIB связываются с TFIID
(образуется комплекс DAB)**



Это связывание определяет точку начала и направление транскрипции

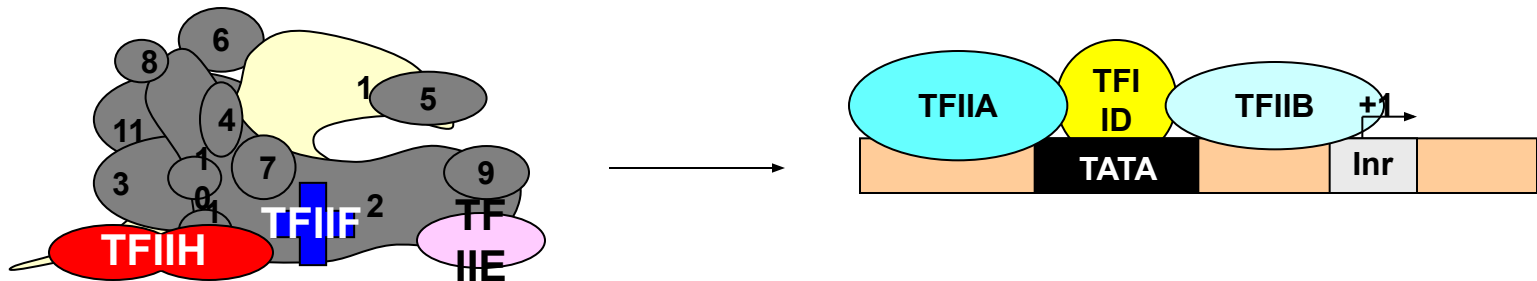


Транскрипция

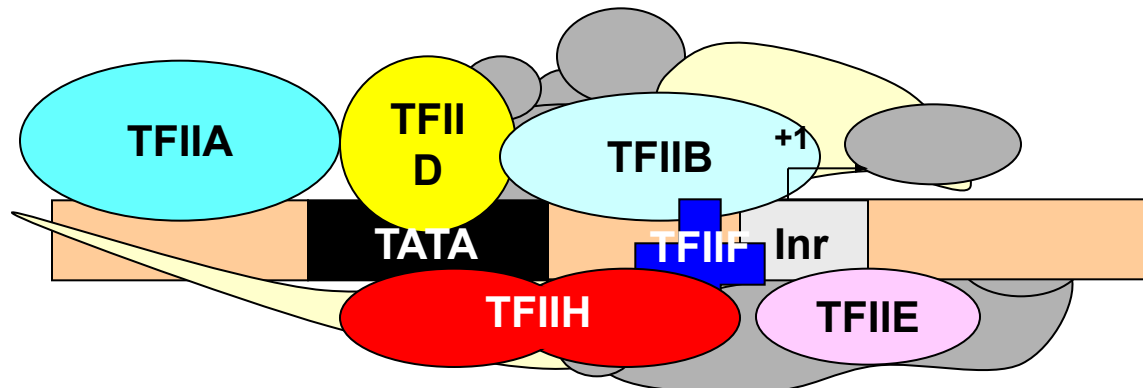
Инициация транскрипции у эукариот

Связывание базальных факторов транскрипции и РНК-полимеразы с промотором

Шаг 3. С DAB связывается РНК-полимераза II в комплексе с TFIIF, TFII E и TFII H



TFIIF обеспечивает взаимодействие с TFIIB
CTD РНК-полимеразы II связывается с DAB
Образуются закрытый транскрипционный комплекс



Транскрипция

Инициация транскрипции у эукариот

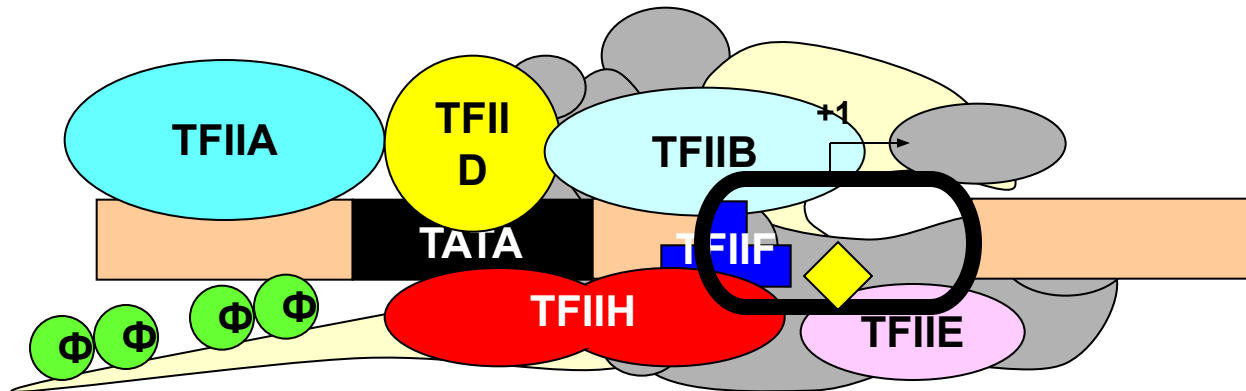
Начало транскрипции

Шаг 4(а). TFIID плавит ДНК, TFIIЕ стабилизирует транскрипционный пузырь

Образуется открытый транскрипционный комплекс

Шаг 4(б). РНК-полимераза включает первый нуклеотид

Шаг 4(в). TFIID фосфорилирует СТД РНК-полимеразы II, РНК-полимераза утрачивает связь с DAB и начинает синтезировать РНК

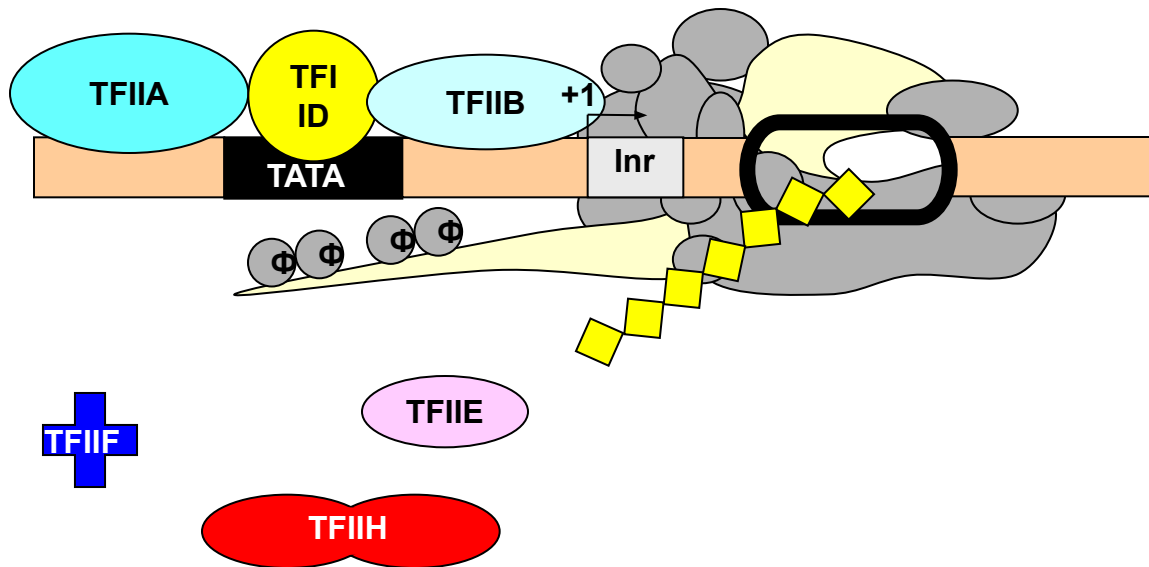


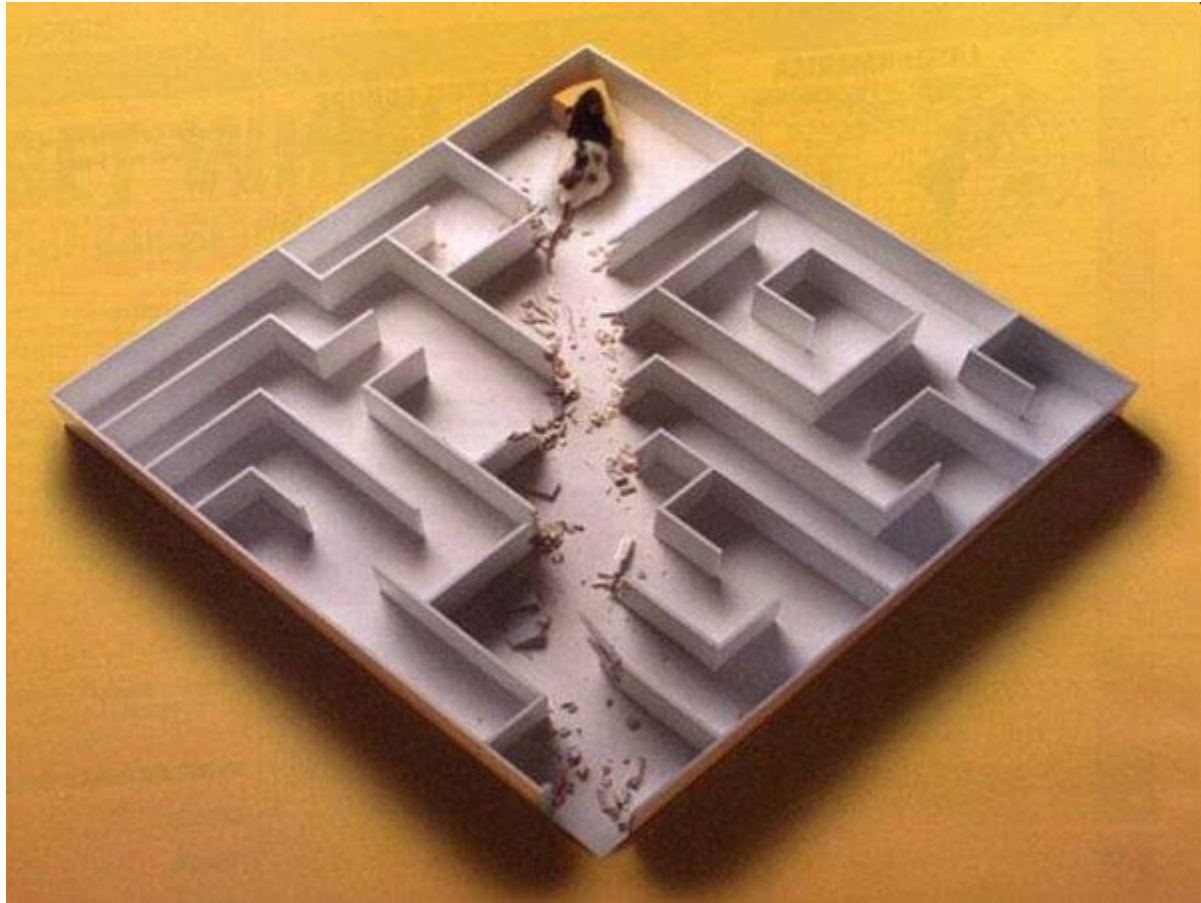
Транскрипция

Инициация транскрипции у эукариот

Начало транскрипции

Шаг 5. РНК-полимераза включает несколько нуклеотидов в цепь РНК и останавливается

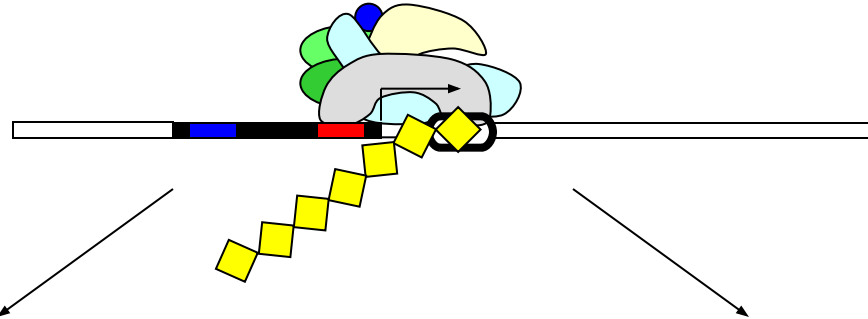




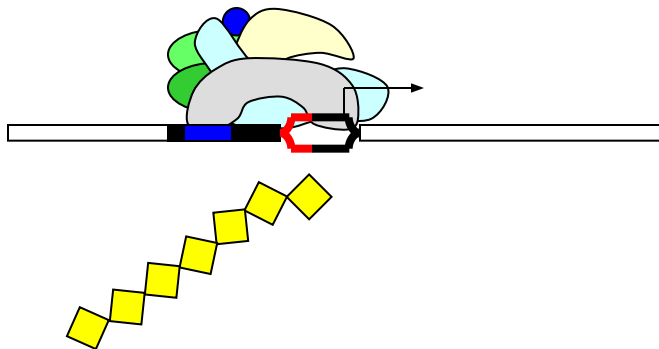
Транскрипция

Элонгация транскрипции у бактерий

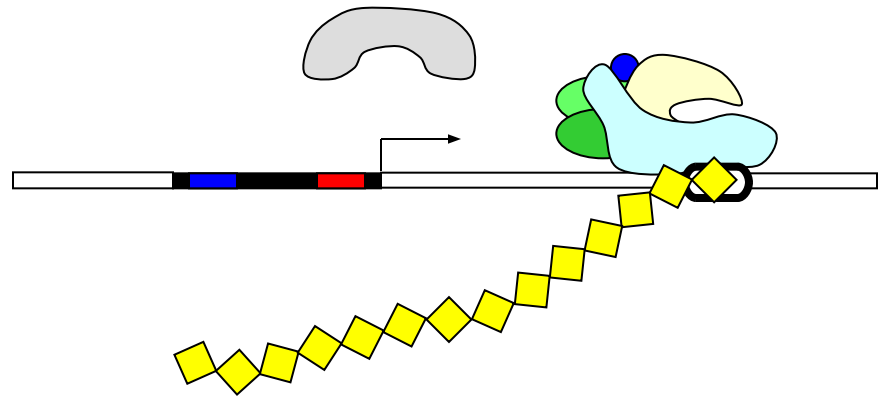
6. РНК-полимераза включает несколько первых нуклеотидов



7. РНК удаляется, РНК-полимераза возвращается в точку начала транскрипции

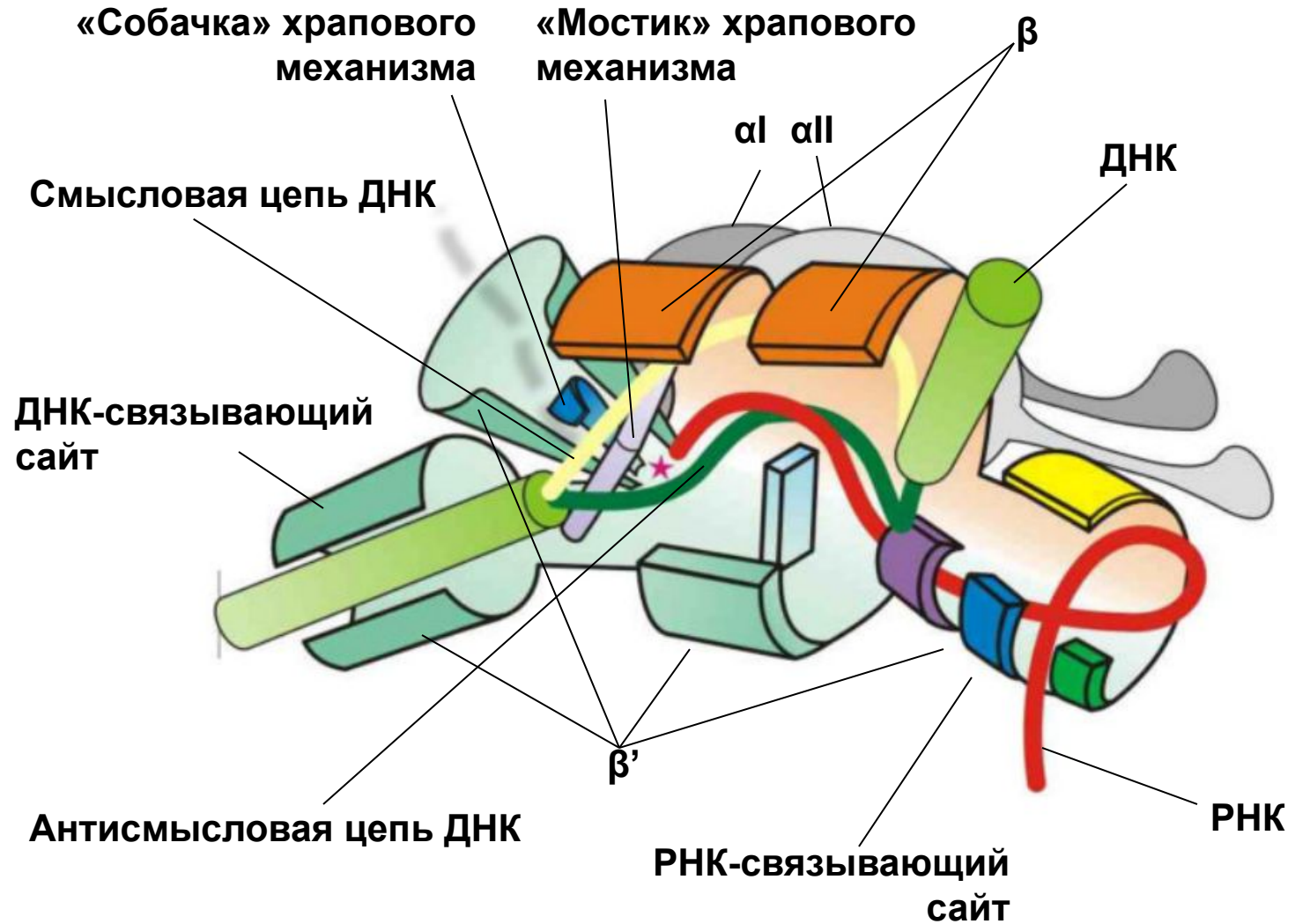


7. Субъединица σ диссоциирует, РНК-полимераза продолжает синтезировать РНК



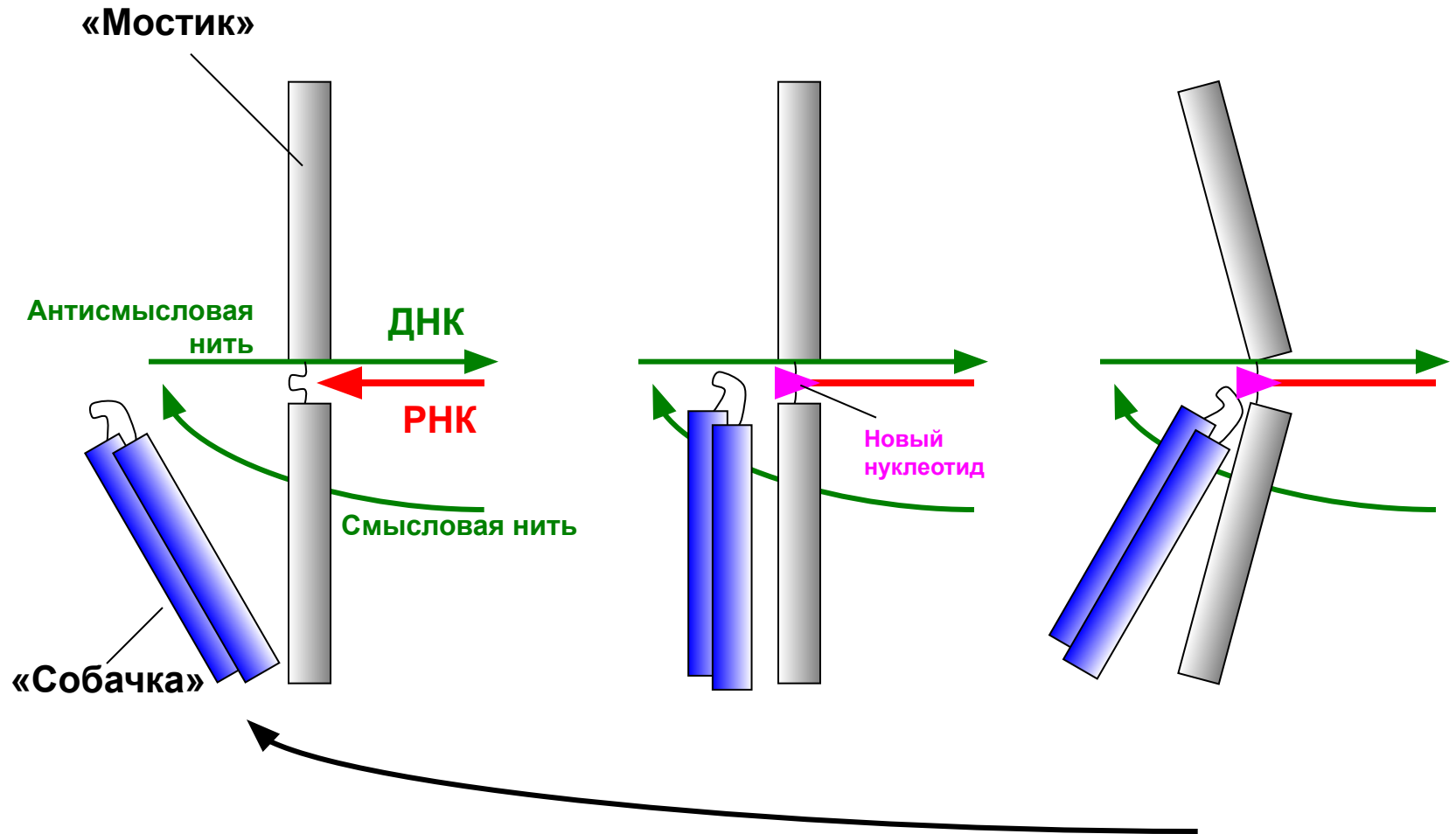
Транскрипция

Элонгация транскрипции у бактерий



Транскрипция

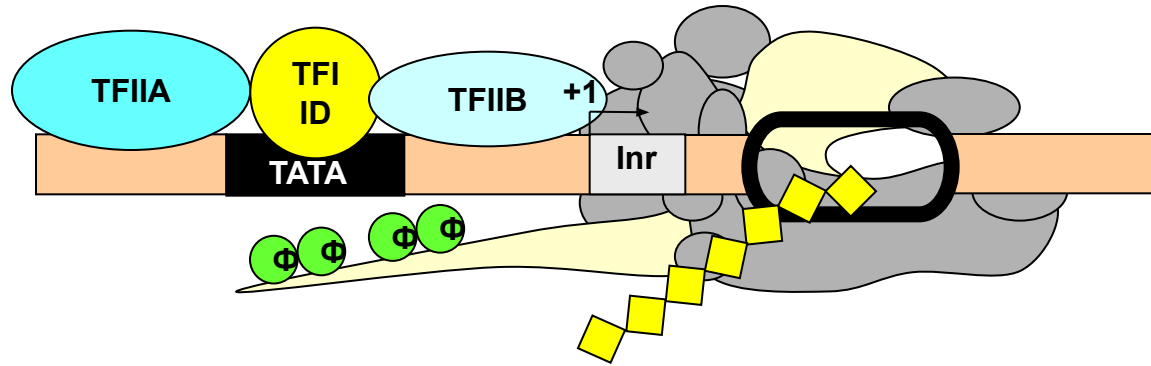
Работа храпового механизма



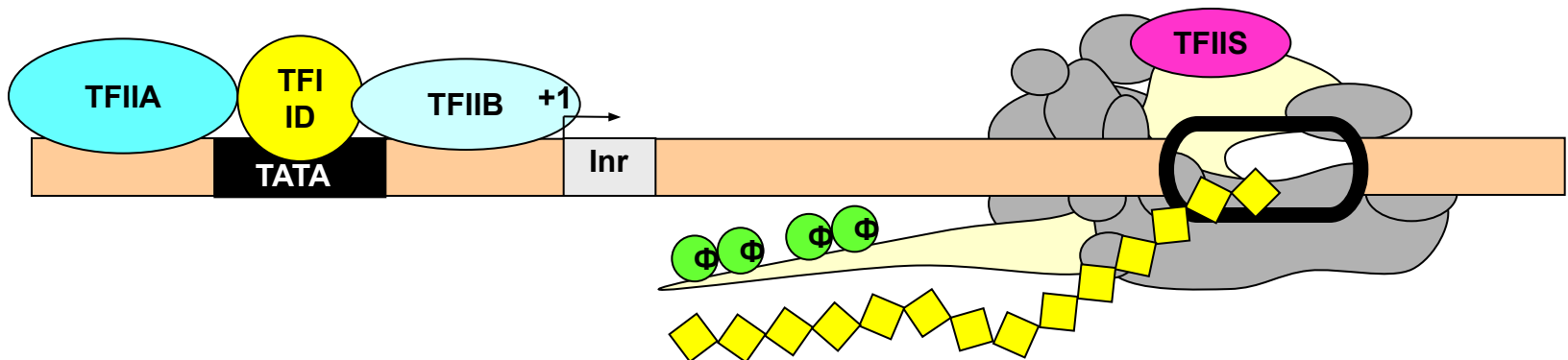
Транскрипция

Элонгация транскрипции у эукариот

Шаг 5. РНК-полимераза включает несколько нуклеотидов в цепь РНК и останавливается



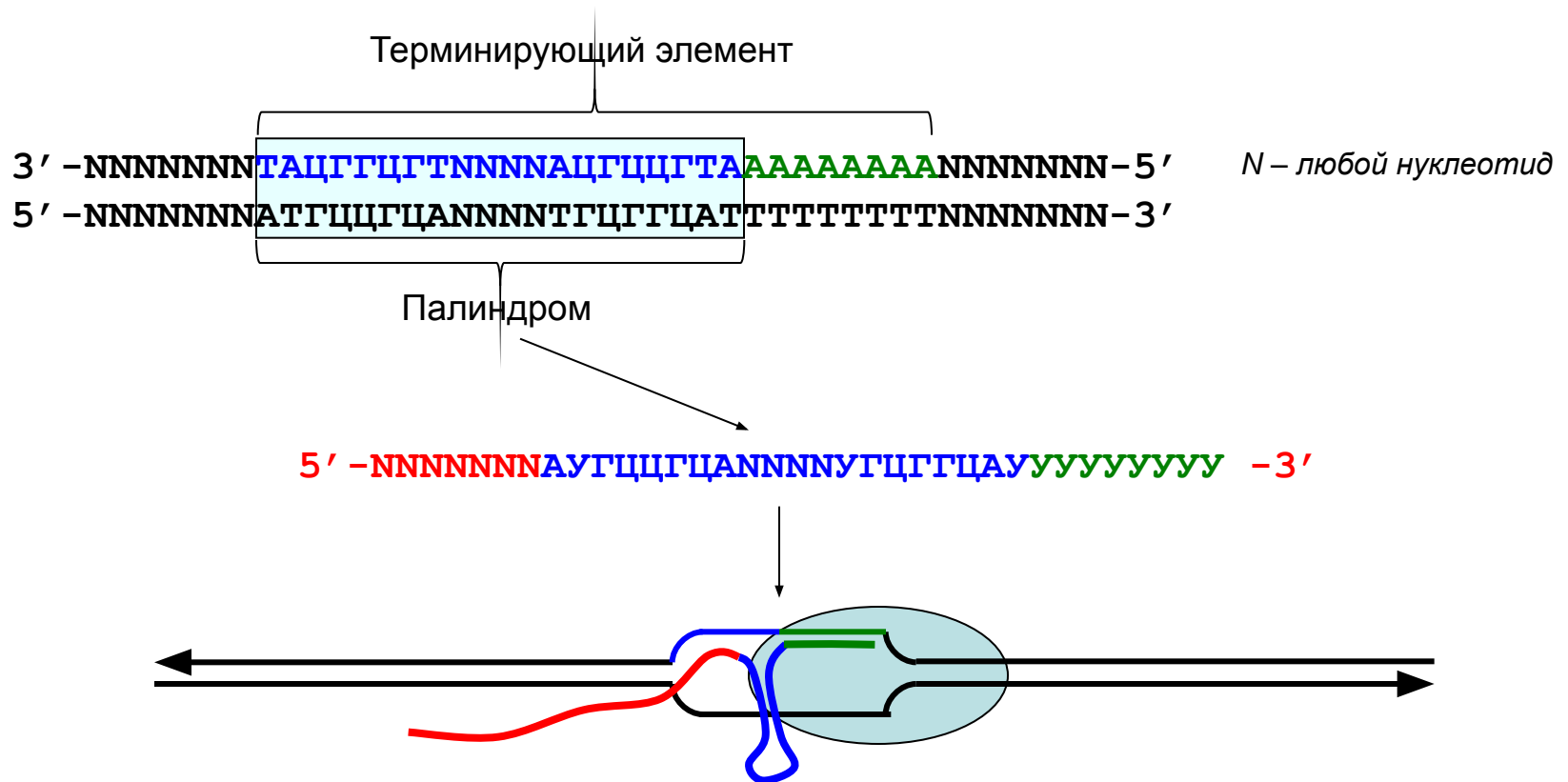
Шаг 6. С РНК-полимеразой связываются факторы элонгации (TFIIS и другие), которые снижают вероятность остановок РНК-полимеразы



Транскрипция

Терминация транскрипции у бактерий

Терминация без вспомогательных белков



Образование шпильки замедляет транскрипцию

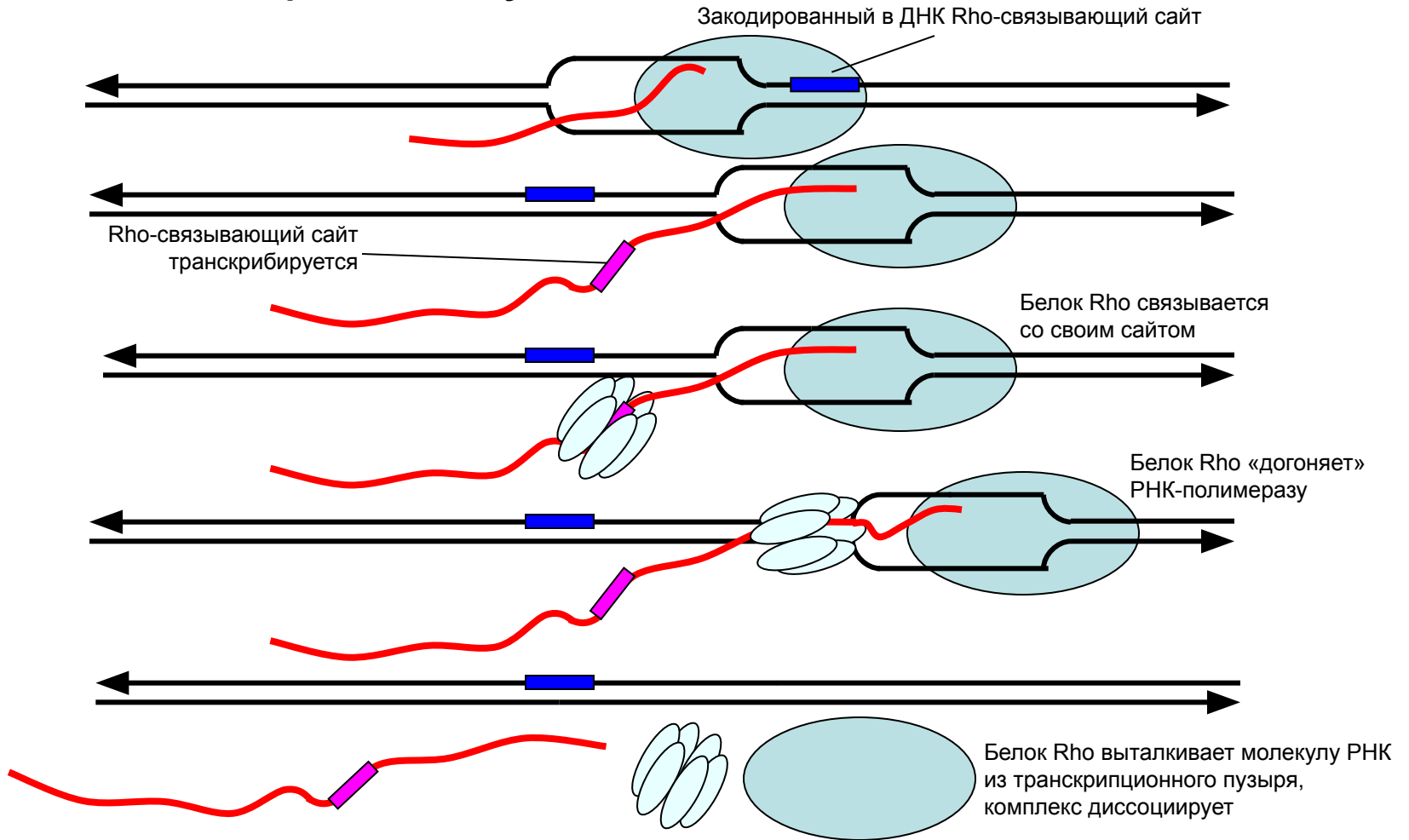
Длинный тракт УУУУУУУУ образует слабую связь с матрицей АААААААА.

Это приводит к диссоциации комплекса РНК-полимеразы и транскрипта с матрицы ДНК

Транскрипция

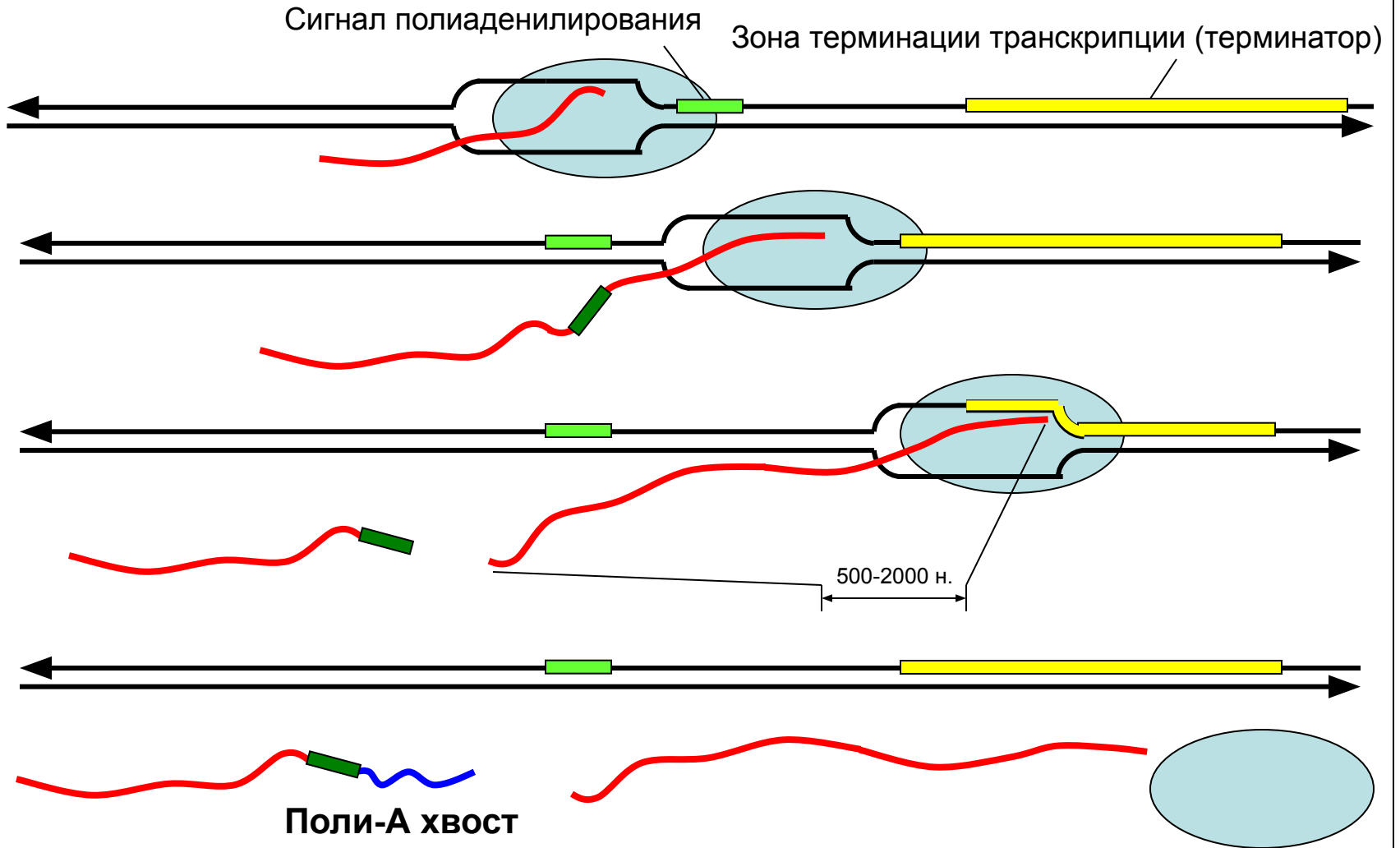
Терминация транскрипции у бактерий

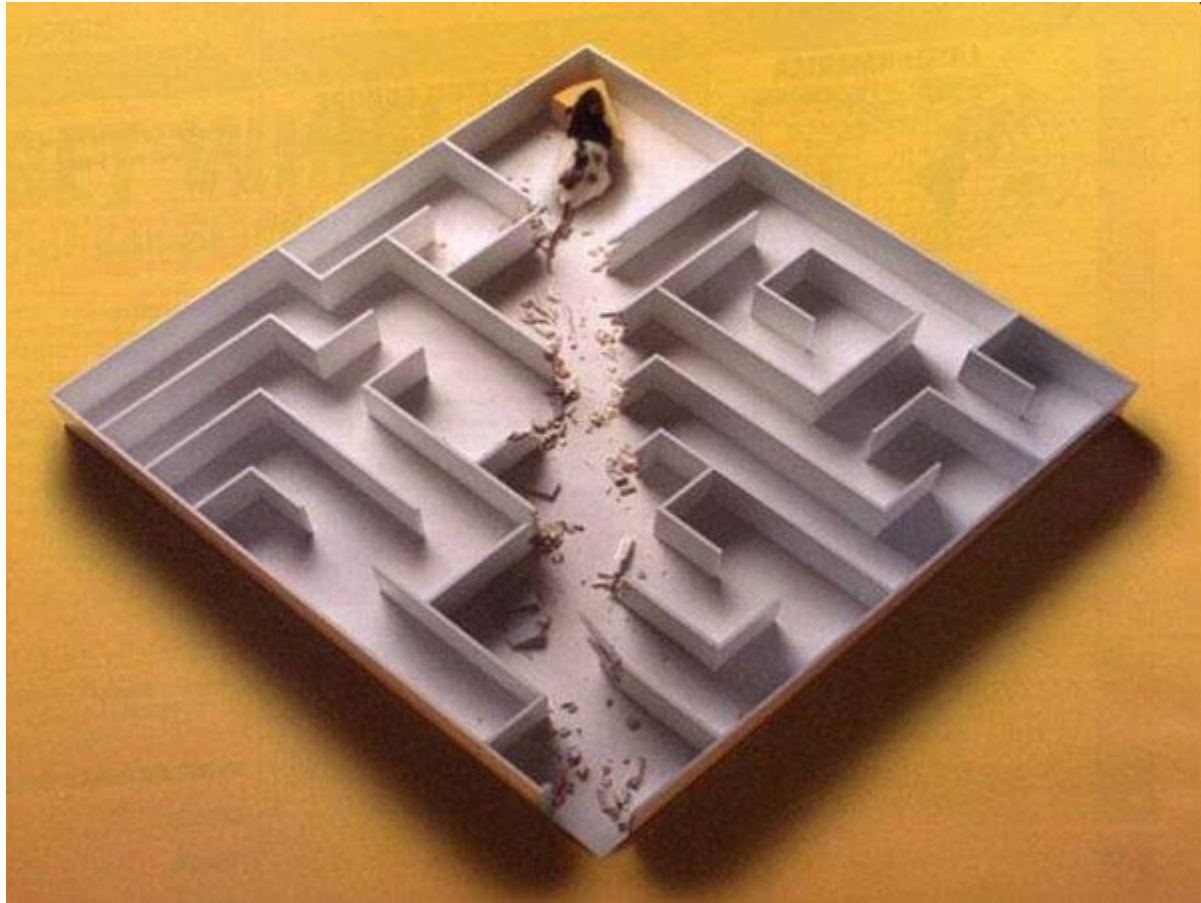
Терминация с участием вспомогательных белков



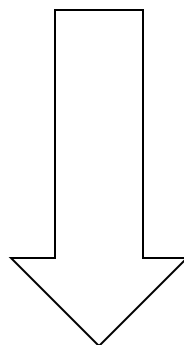
Транскрипция

Терминация транскрипции у эукариот



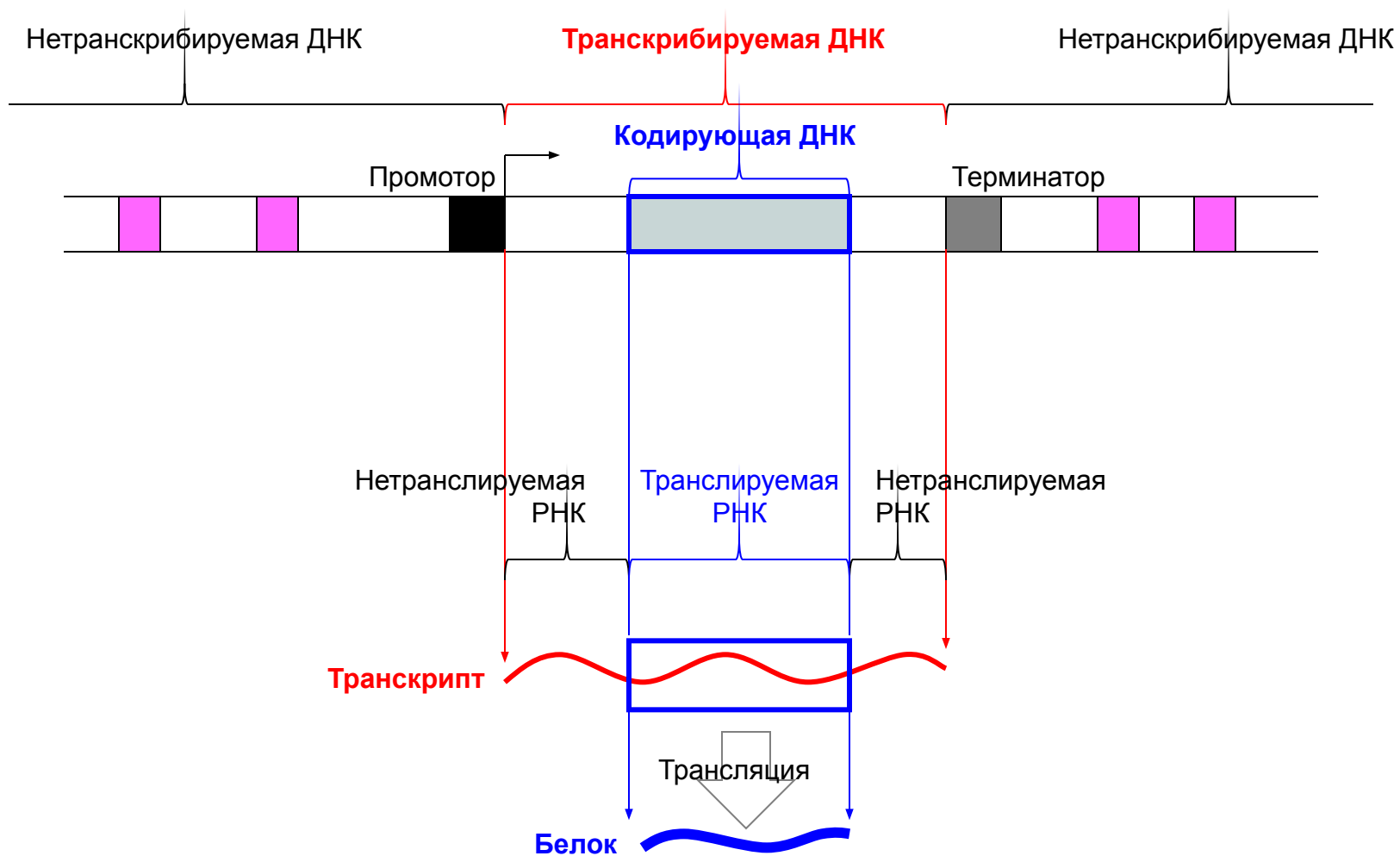


Транскрипция



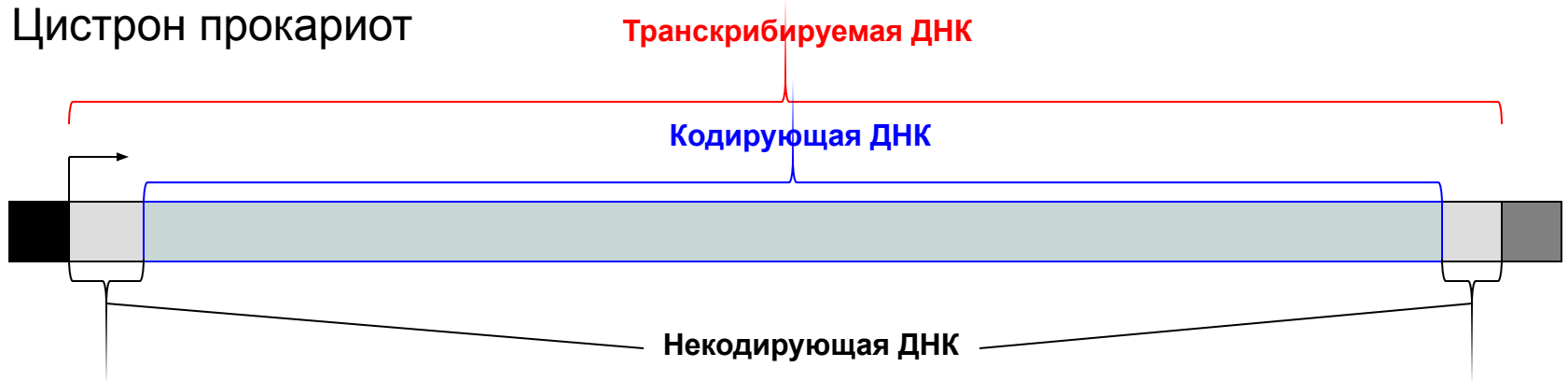
Транскрипт (РНК)

Транскрибируемая и кодирующая ДНК

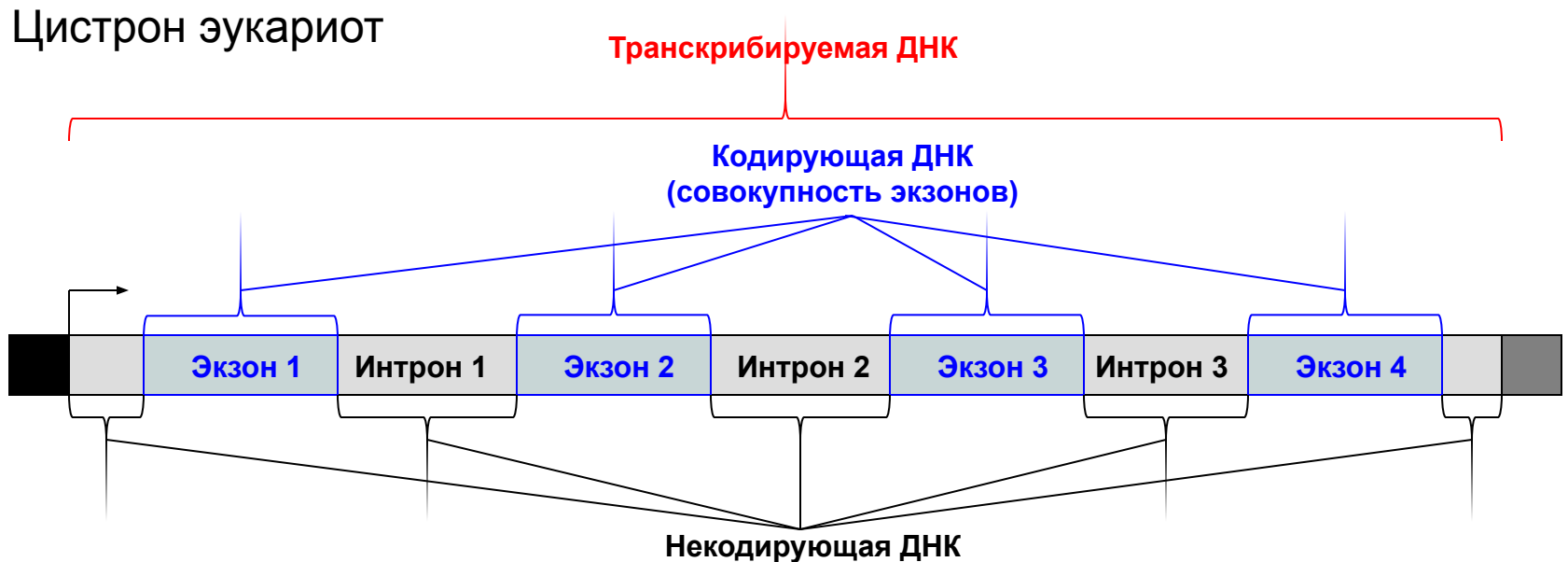


Экзон-интронная структура цистронов эукариот

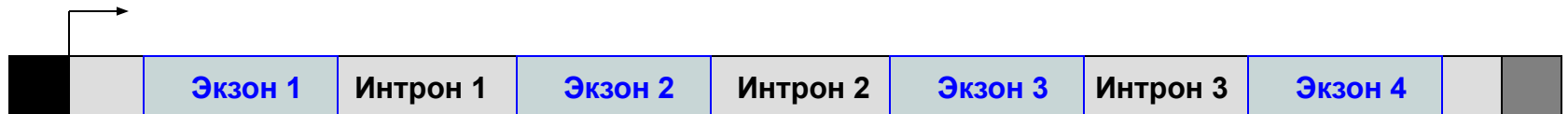
Цистрон прокариот



Цистрон эукариот



Экзон-интронная структура цистронов эукариот



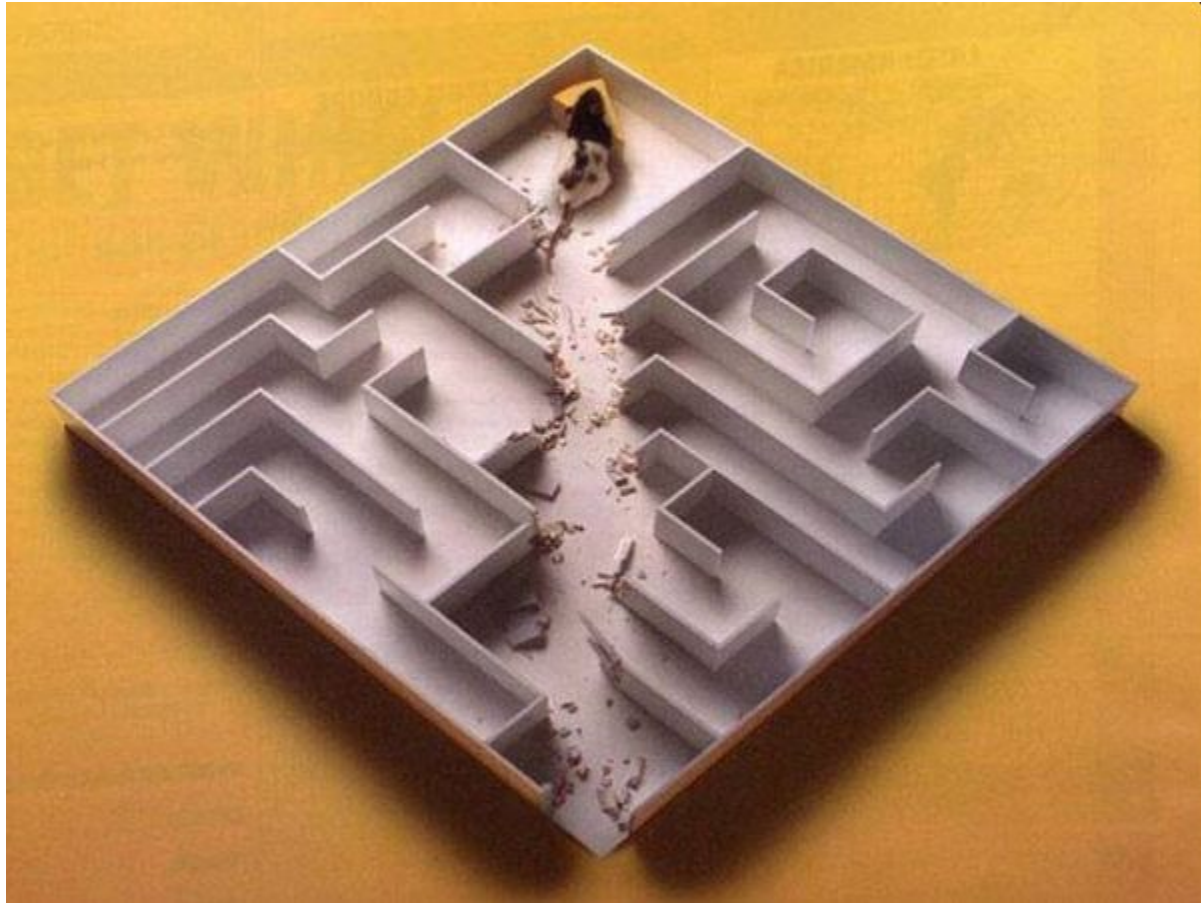
Транскрипция

Транскрипт = Незрелая РНК



Созревание



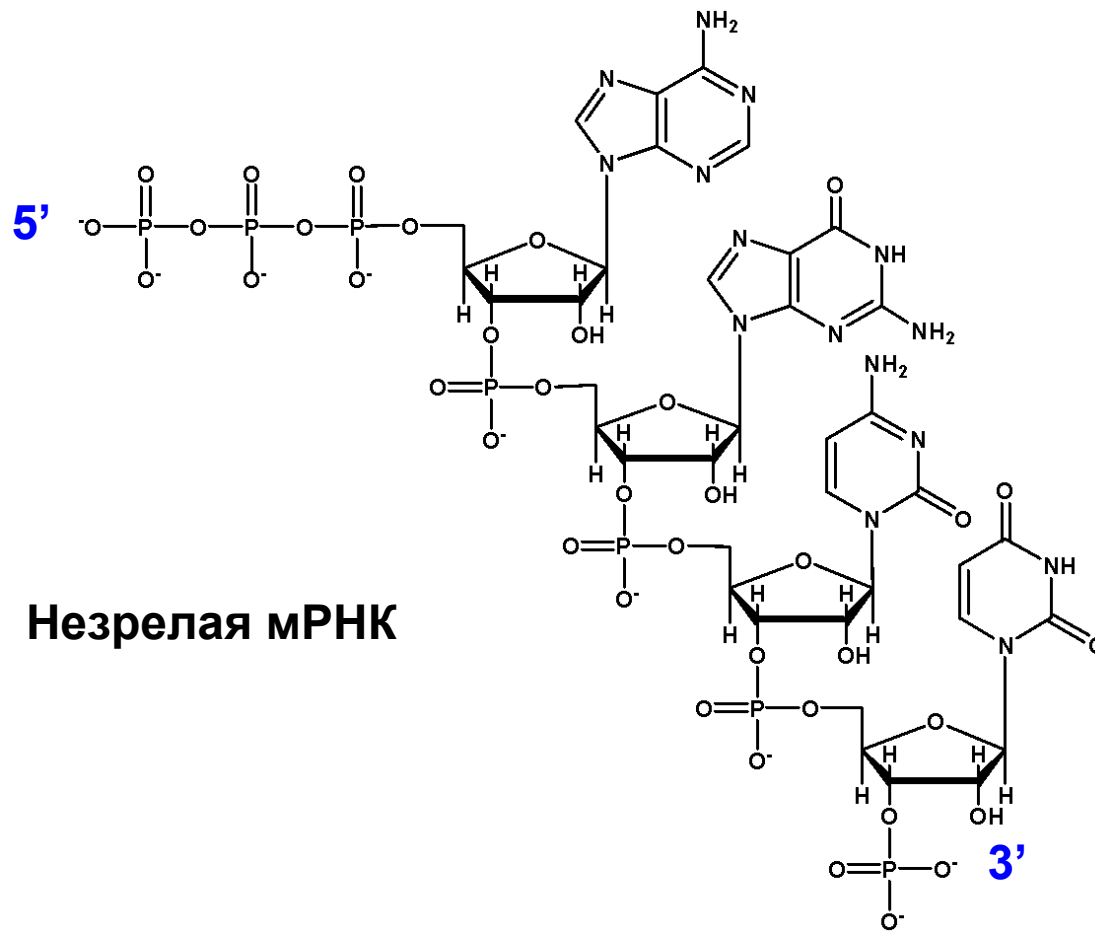


ПРОЦЕССИНГ мРНК

Этапы процессинга

- 1. Кэпирование**
- 2. Полиаденилирование**
- 3. Сплайсинг**

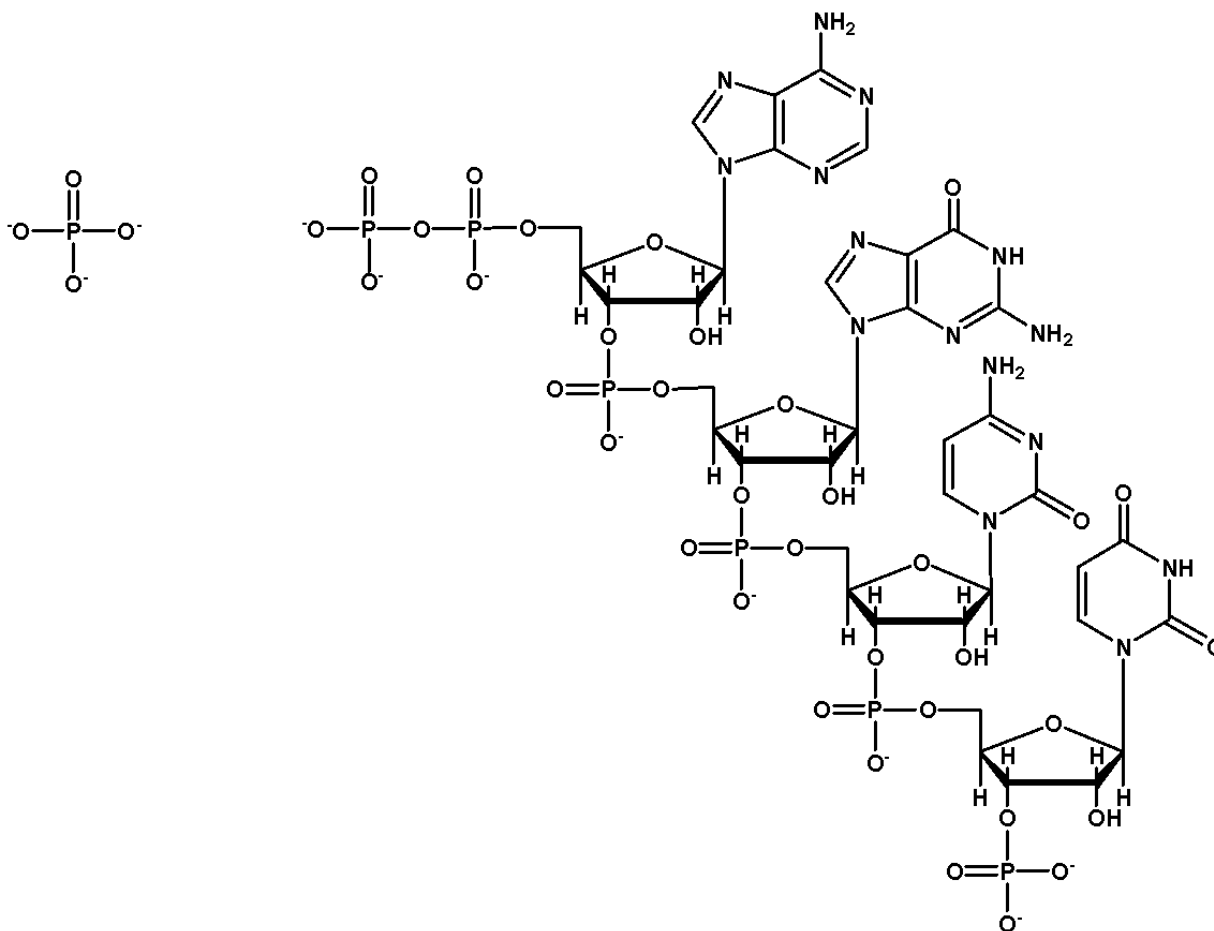
Кэпирование



Незрелая мРНК

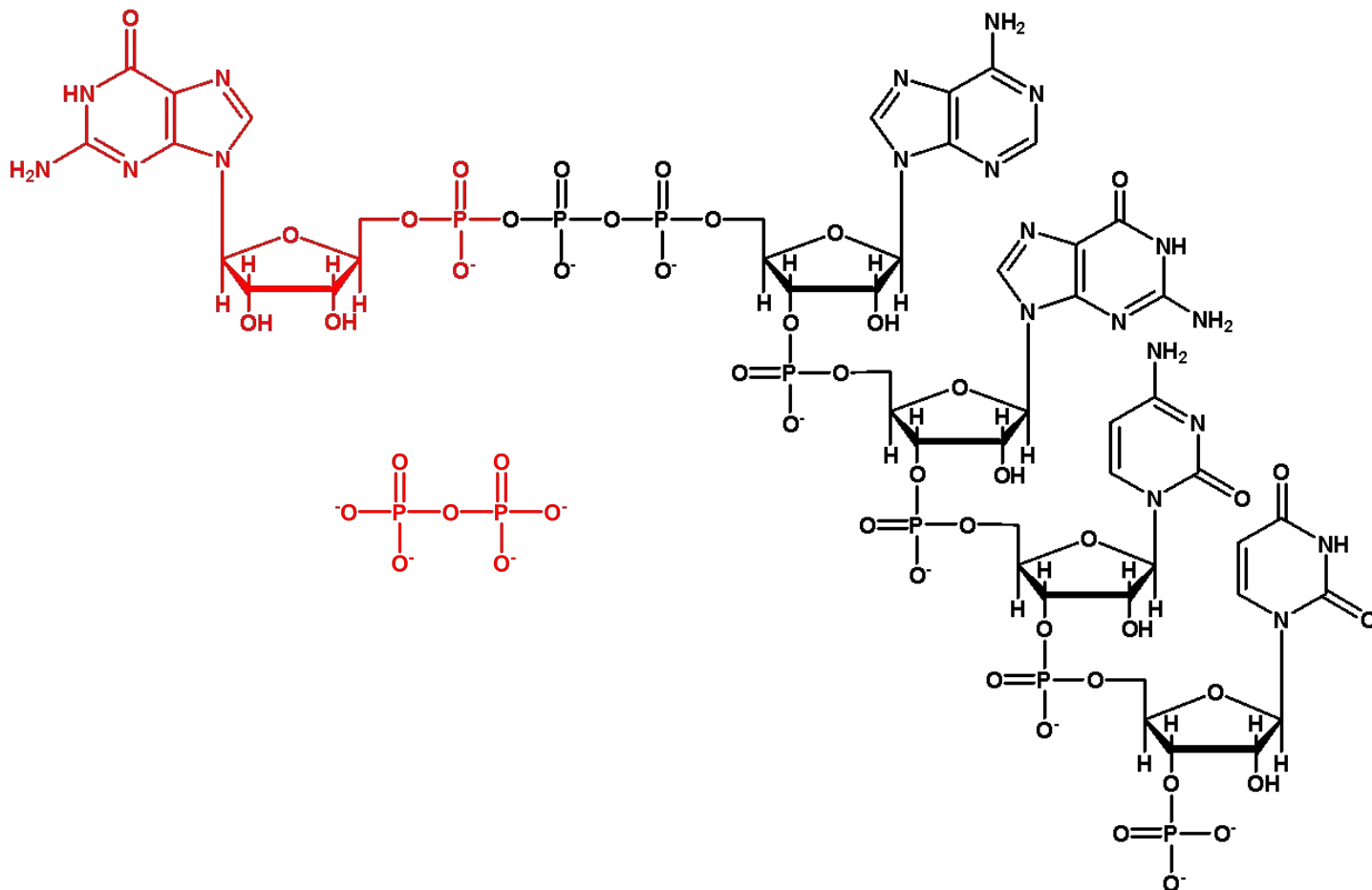
Процессинг мРНК - кэприрование

1. Гидролиз одной 5'-концевой фосфатной группы



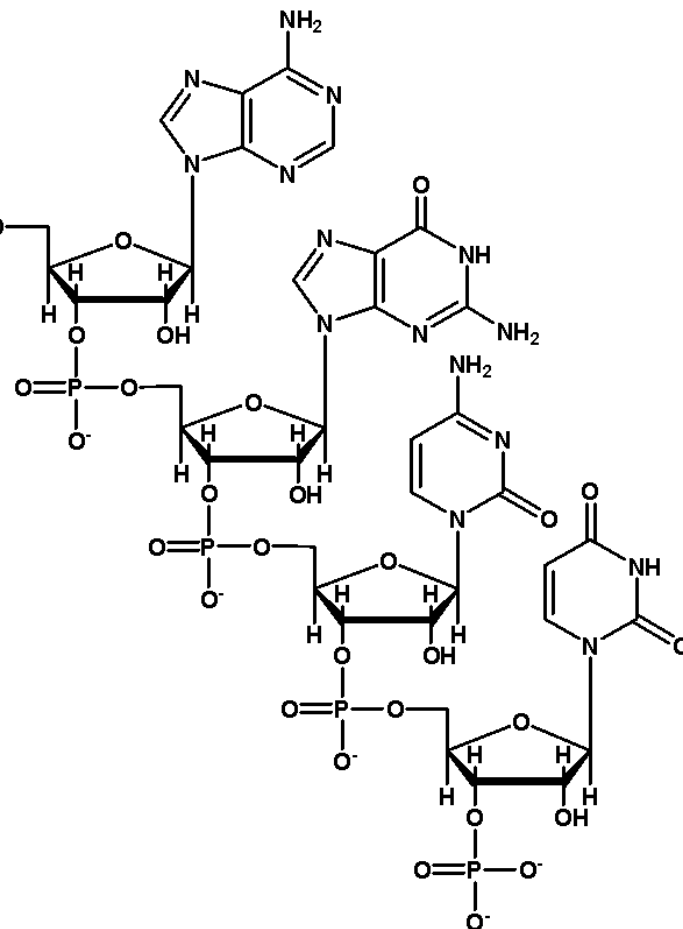
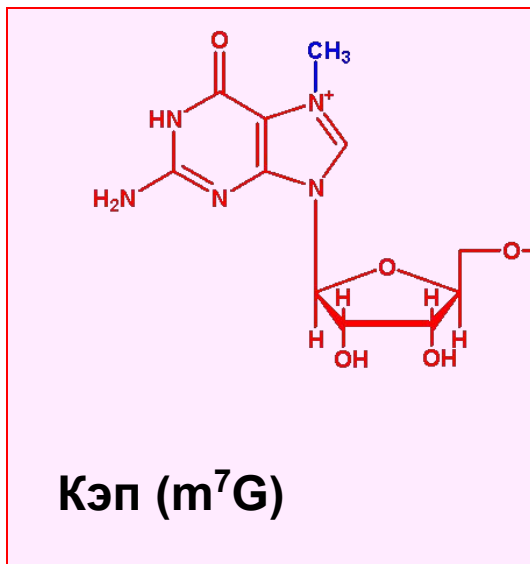
Процессинг мРНК - кэприрование

2. Присоединение ГТФ (минус пиррофосфат)



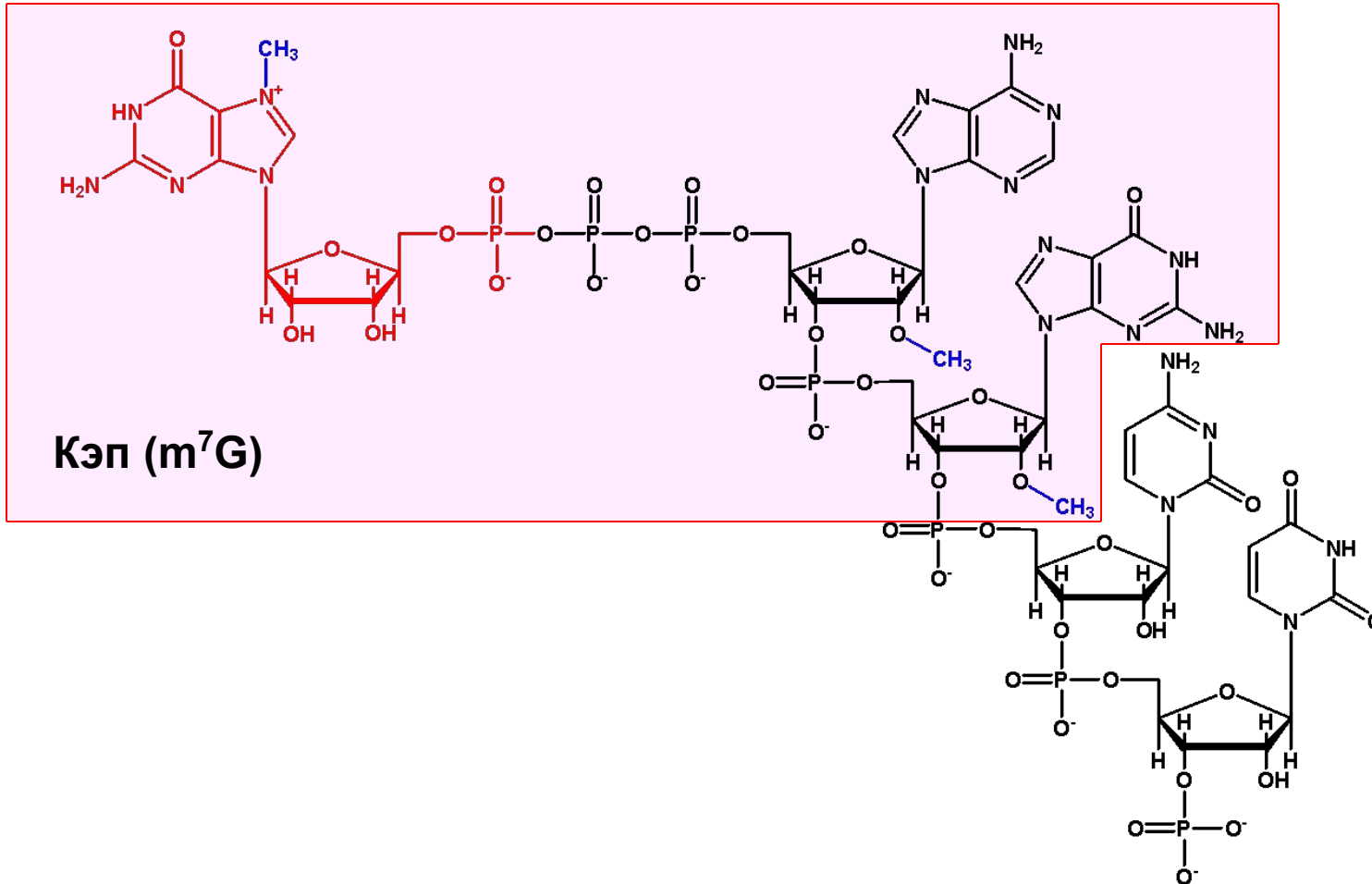
Процессинг мРНК - кэпирование

3. Метилирование по 7 атому гуанина



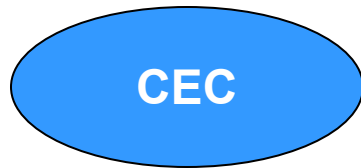
Процессинг мРНК - кэприрование

4. Метилирование нескольких нуклеотидов по 2' атому рибозы



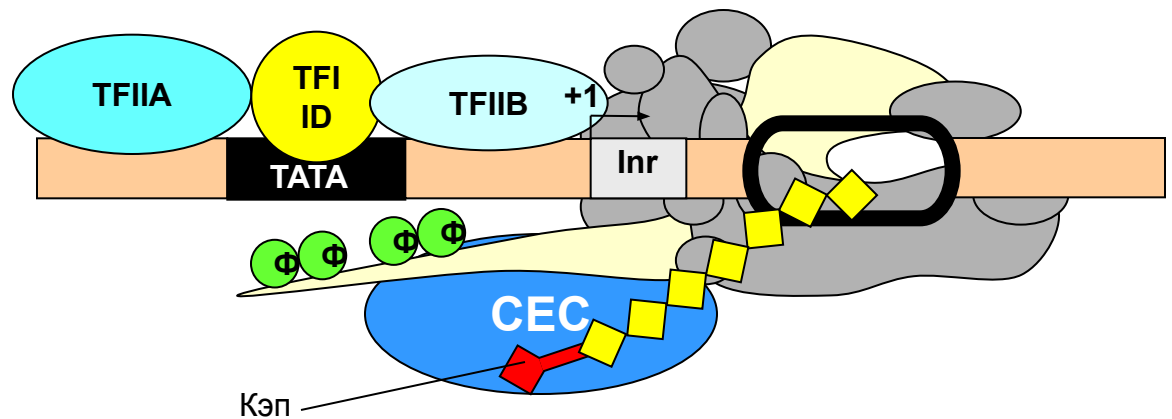
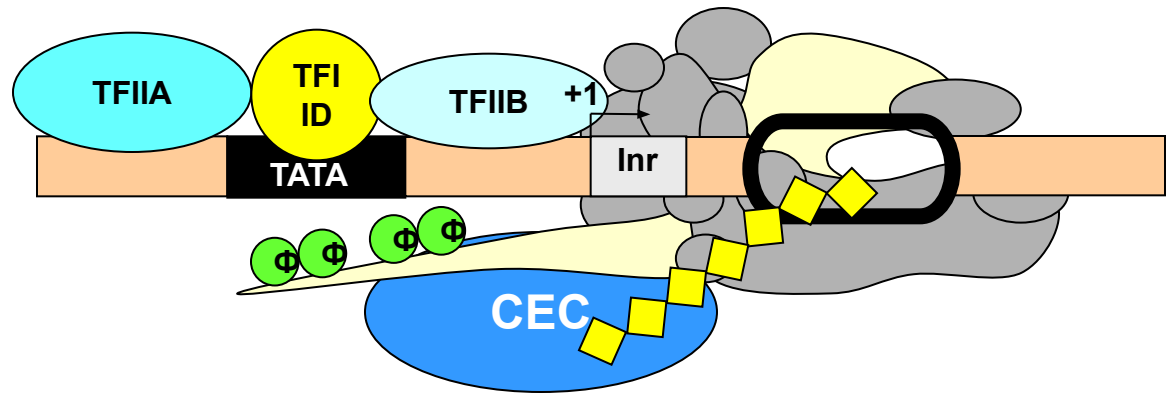
Процессинг мРНК - кэпирование

Кэпирование происходит непосредственно в процессе транскрипции РНК-полимеразой II



Capping
Enzyme
Complex

(Комплекс ферментов кэпирования)

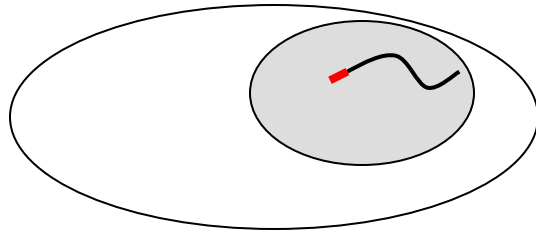


Процессинг мРНК - кэпирование

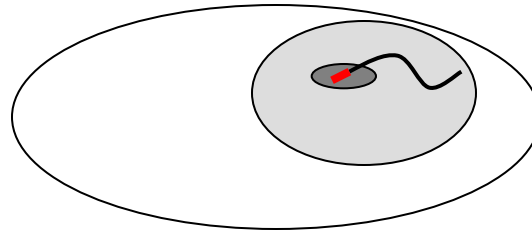
Функции кэпа

Транспорт из ядра в цитоплазму

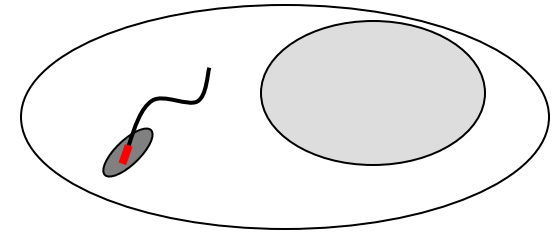
мРНК кэпируется



С кэпом связывается транспортирующий белок



Транспортирующий белок переносит мРНК в цитоплазму



Защита от 5'-экзонуклеаз

Некэпированная мРНК быстро гидролизуетя

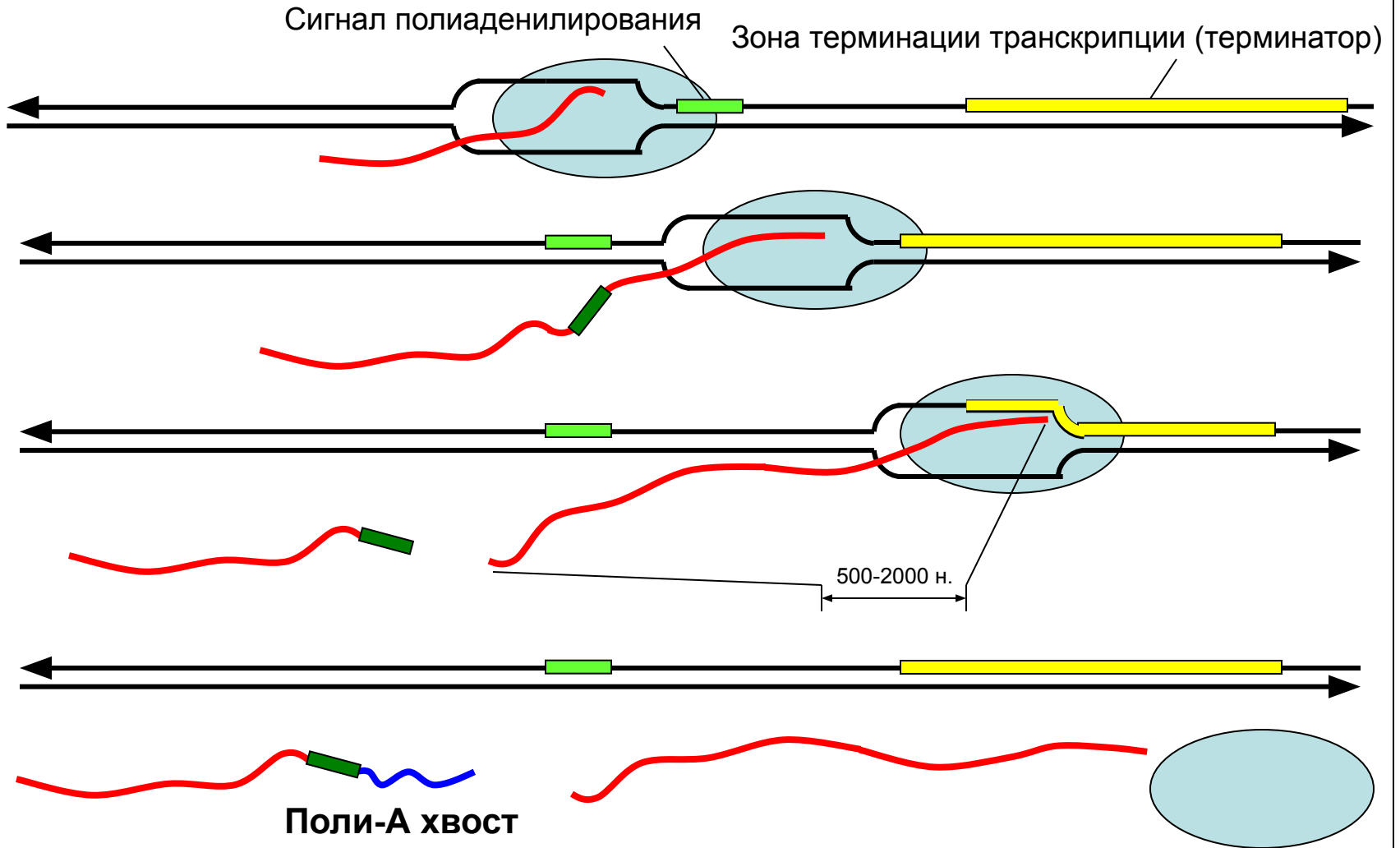


Кэпированная мРНК устойчива к нуклеазам



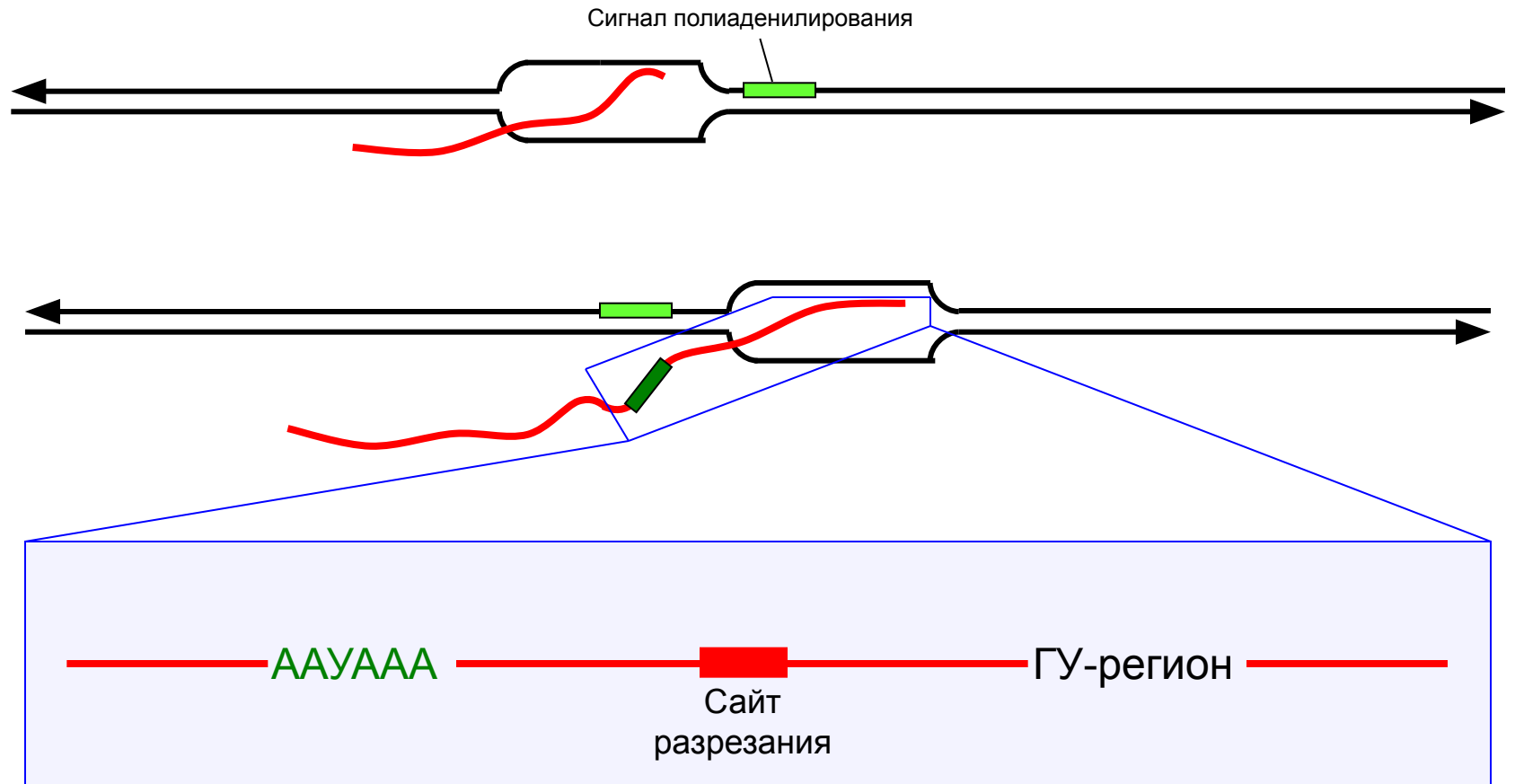
Транскрипция

Терминация транскрипции у эукариот



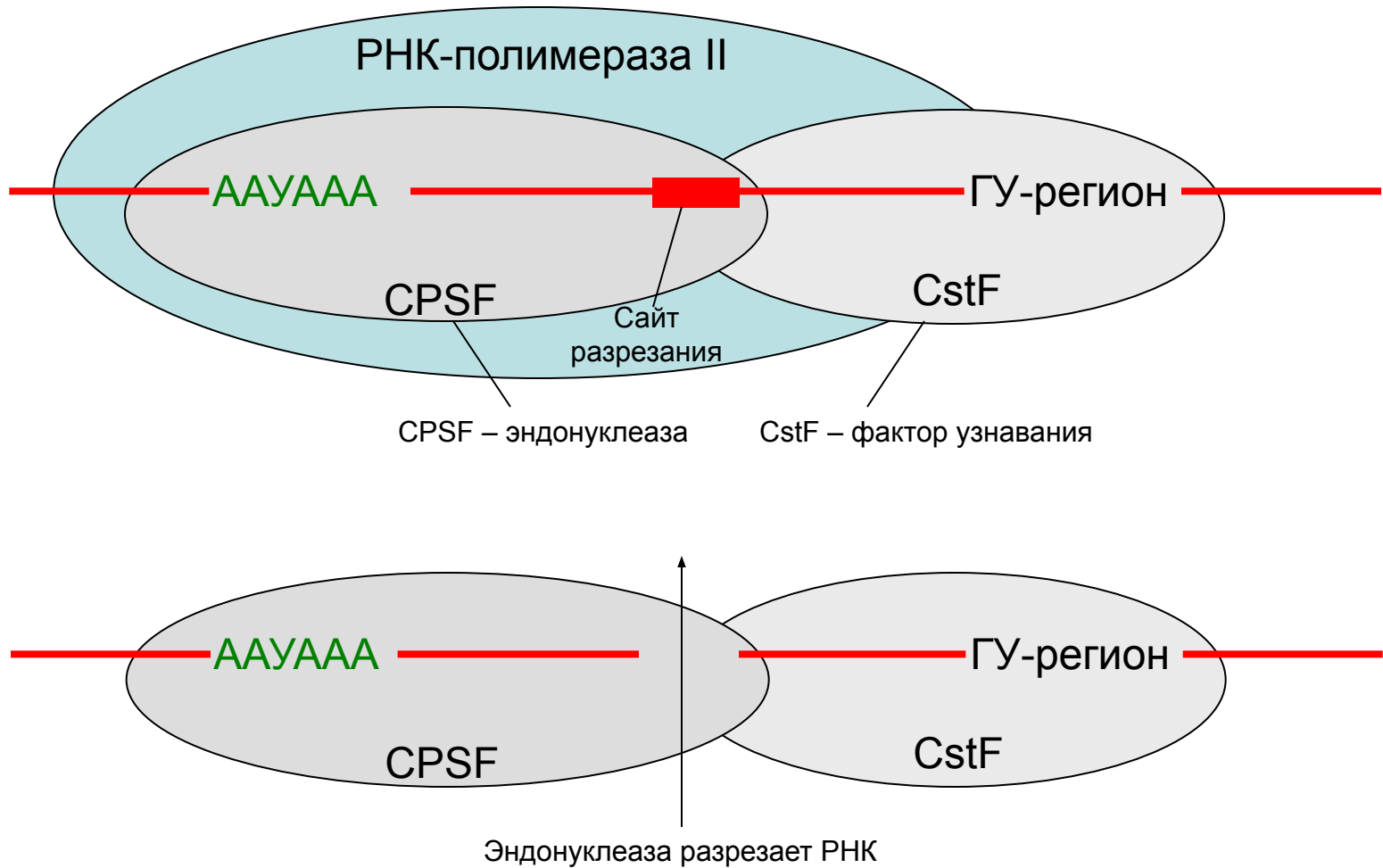
Процессинг мРНК

Полиаденилирование



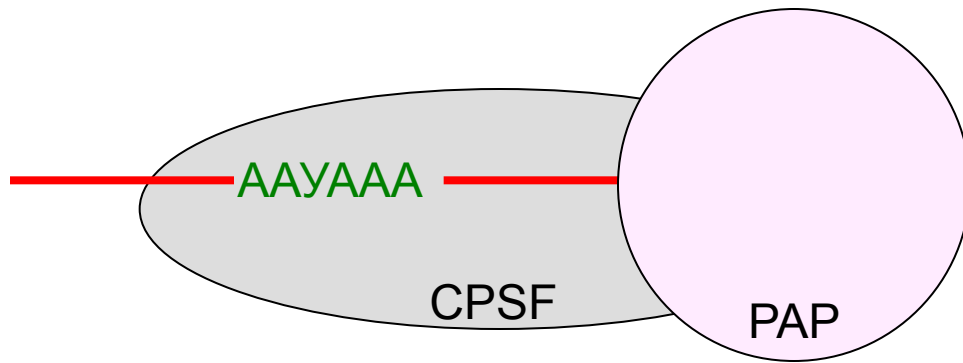
Процессинг мРНК - полиаденилирование

Нуклеаза разрезает РНК у сайта полиаденилирования

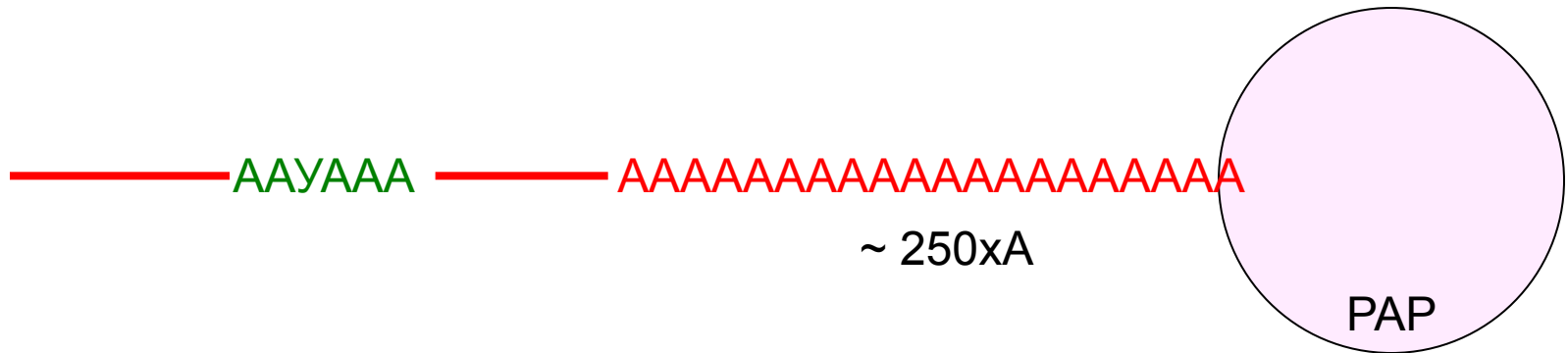
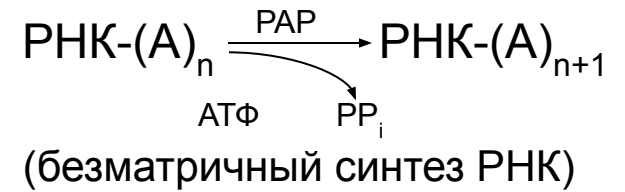


Процессинг мРНК - полиаденилирование

Полиаденилатполимераза строит поли-А-хвост



PAP – полиаденилатполимераза



Процессинг мРНК

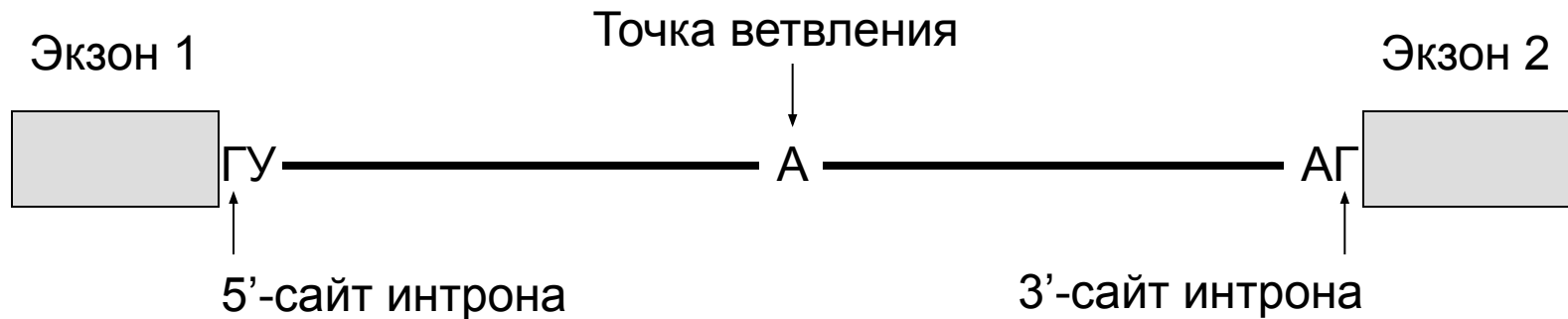
Сплайсинг



Вырезание интронов

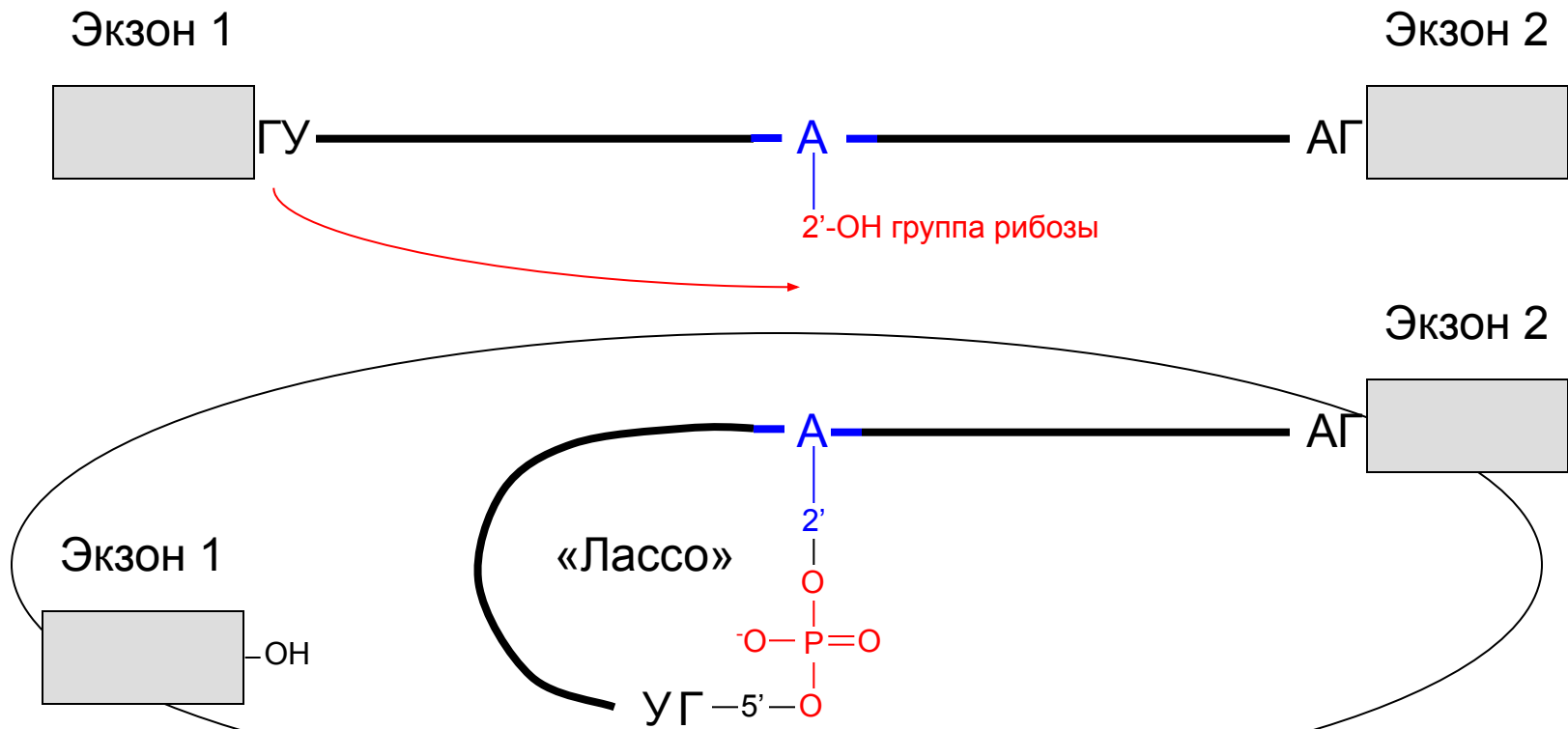
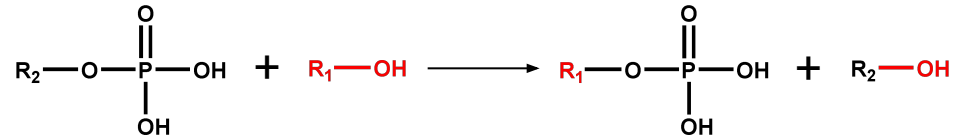


Структура интрона



Процессинг мРНК - сплайсинг

Переэтерификация точки ветвления и 5'-сайта интрона

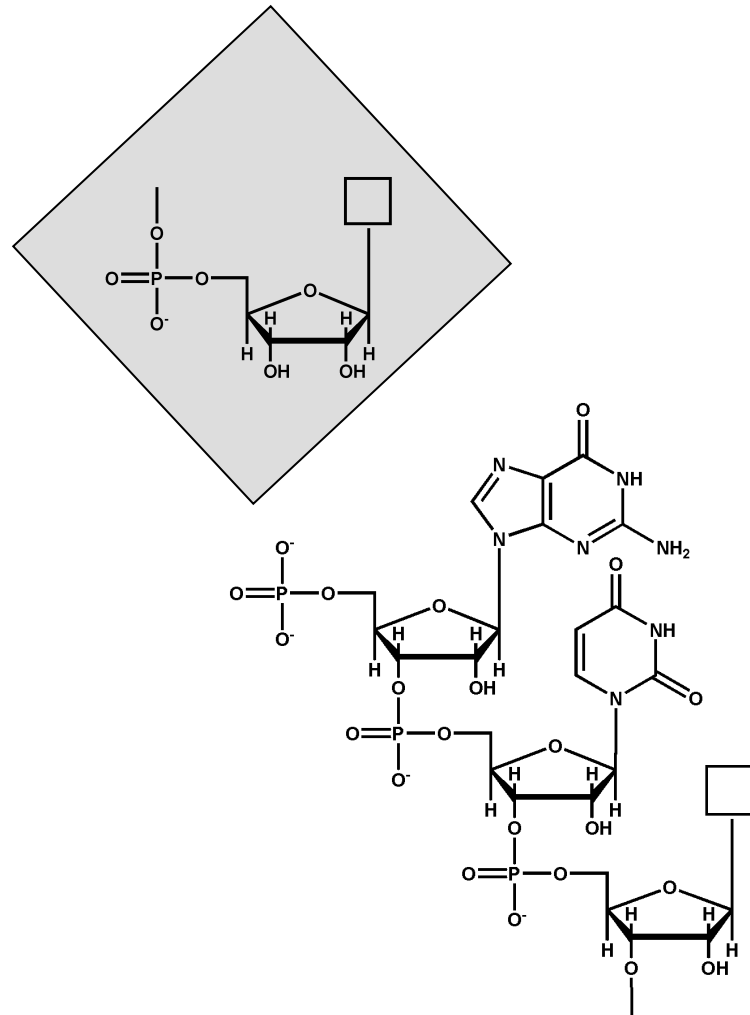
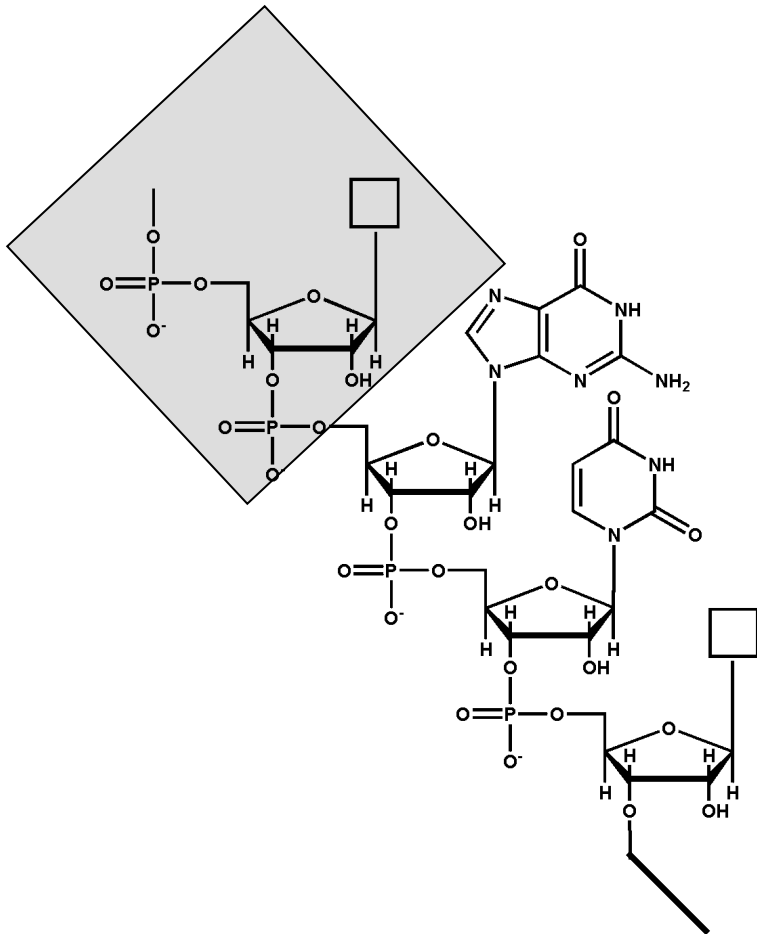




ГГ

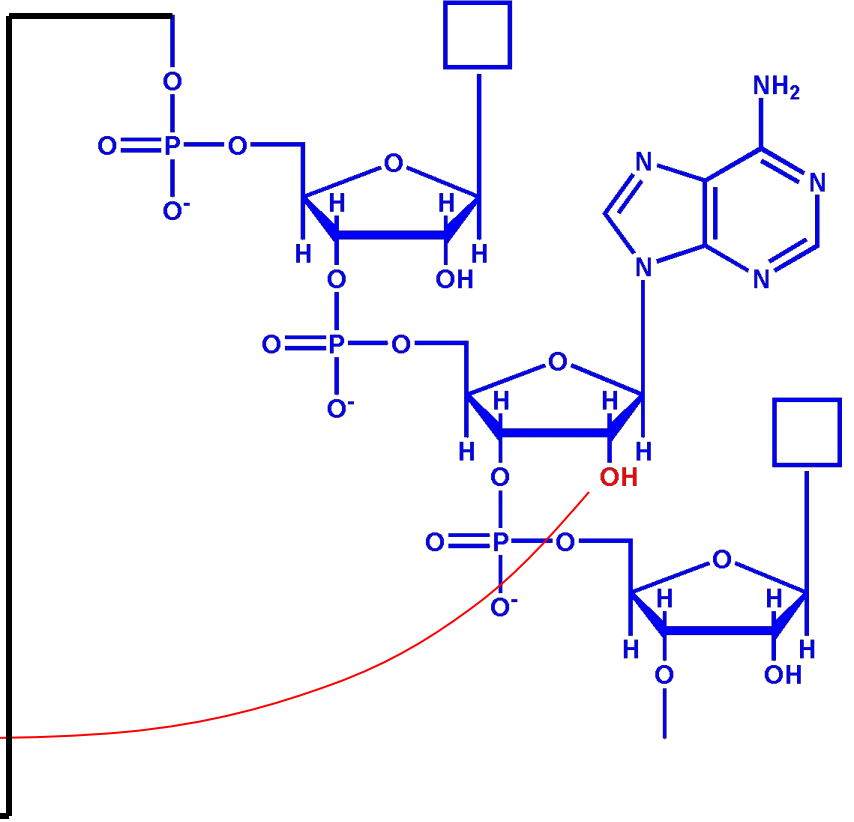
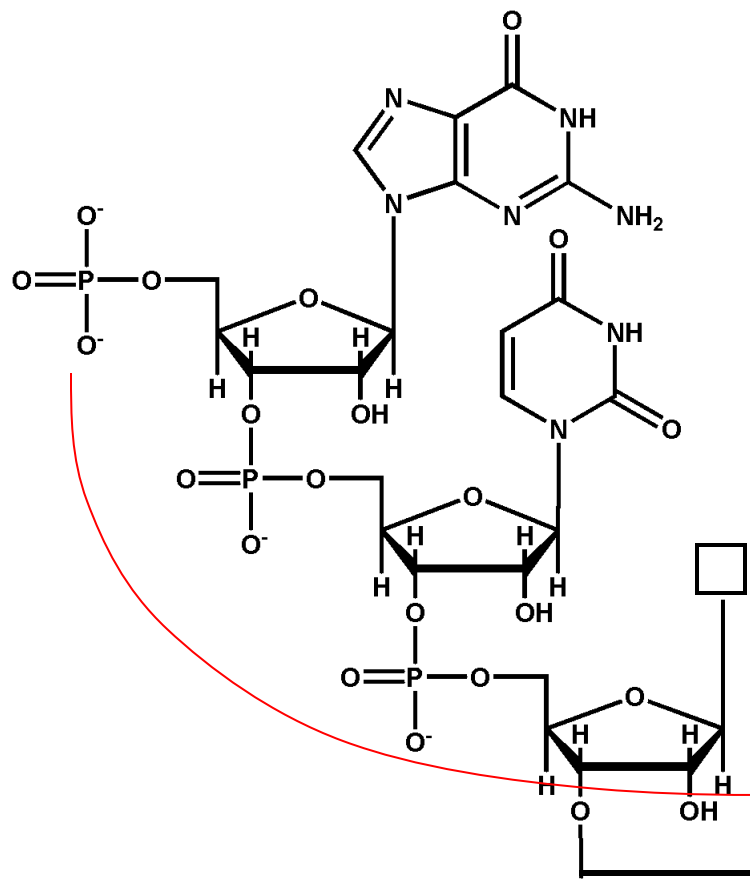
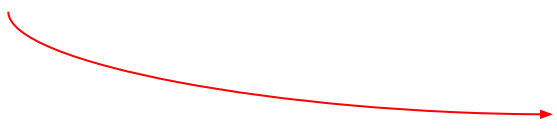


ГГ



ГУ ————— А —

2'-ОН группа рибозы



«Лассо»

A

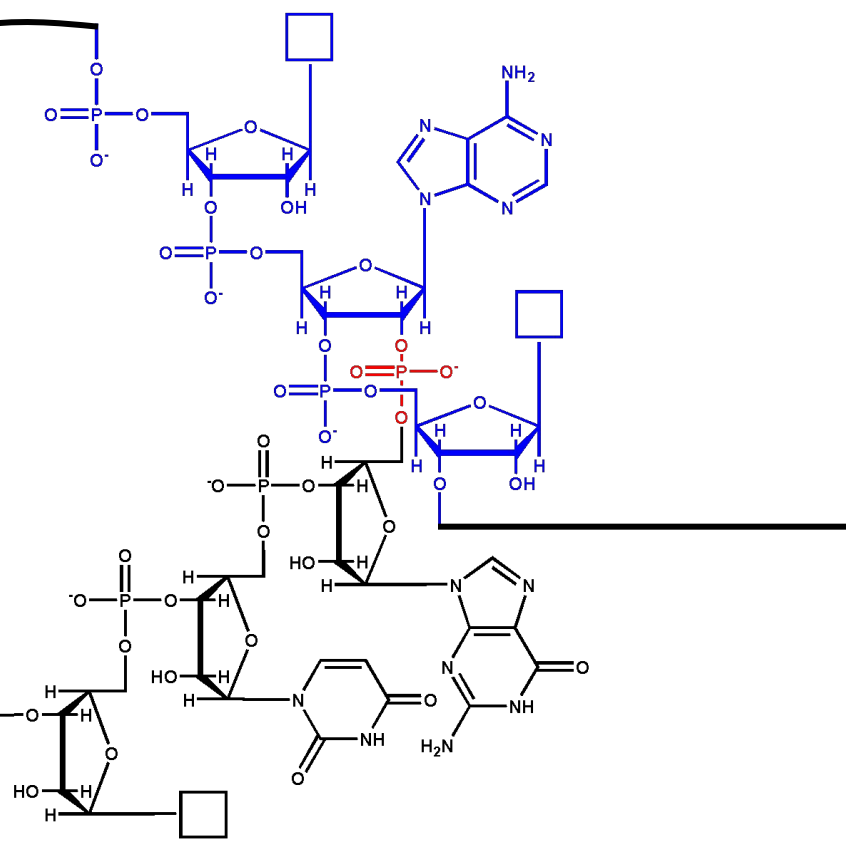
2'

O



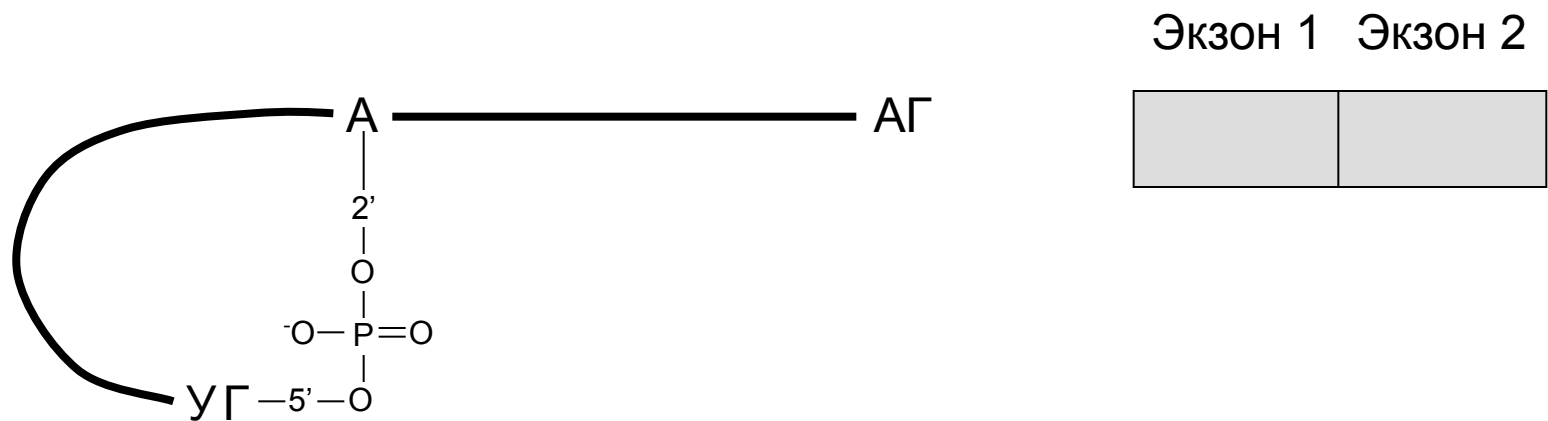
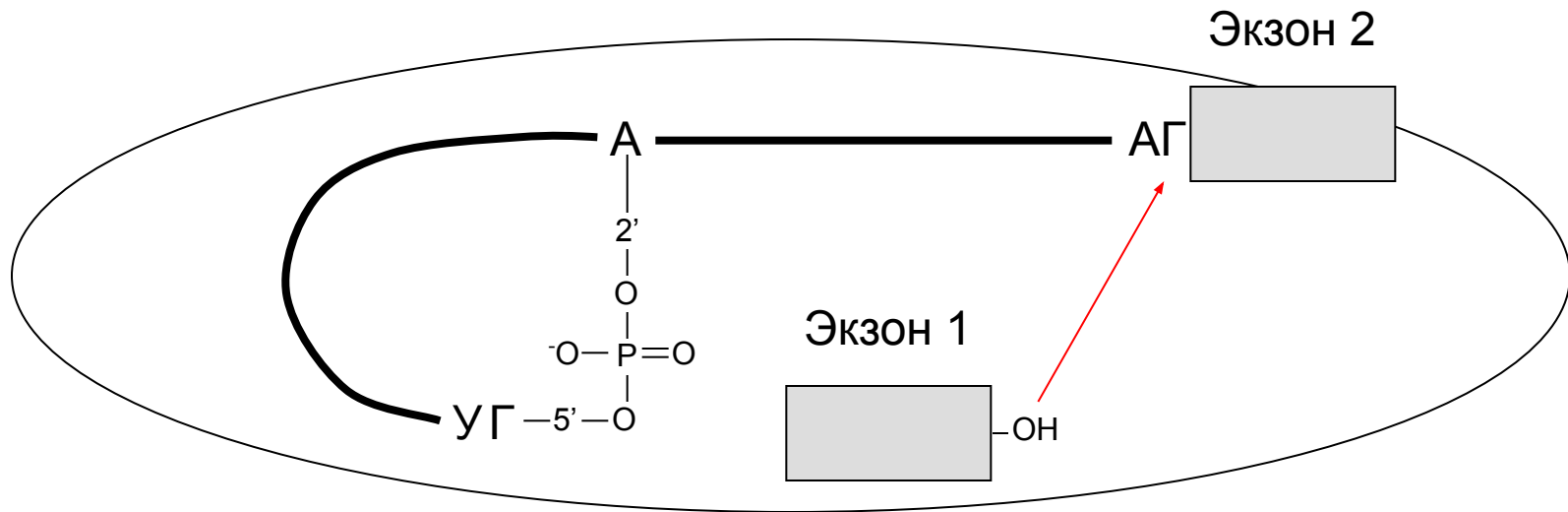
O

УГ-5'



Процессинг мРНК - сплайсинг

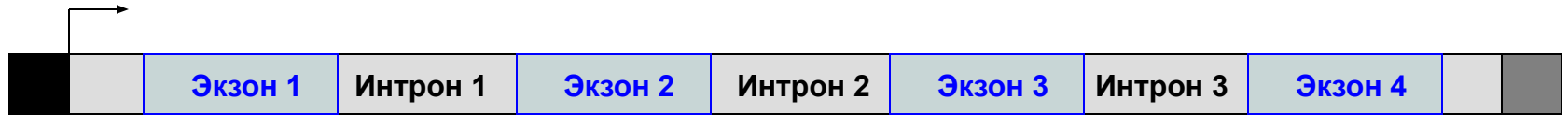
Вытеснение лассо



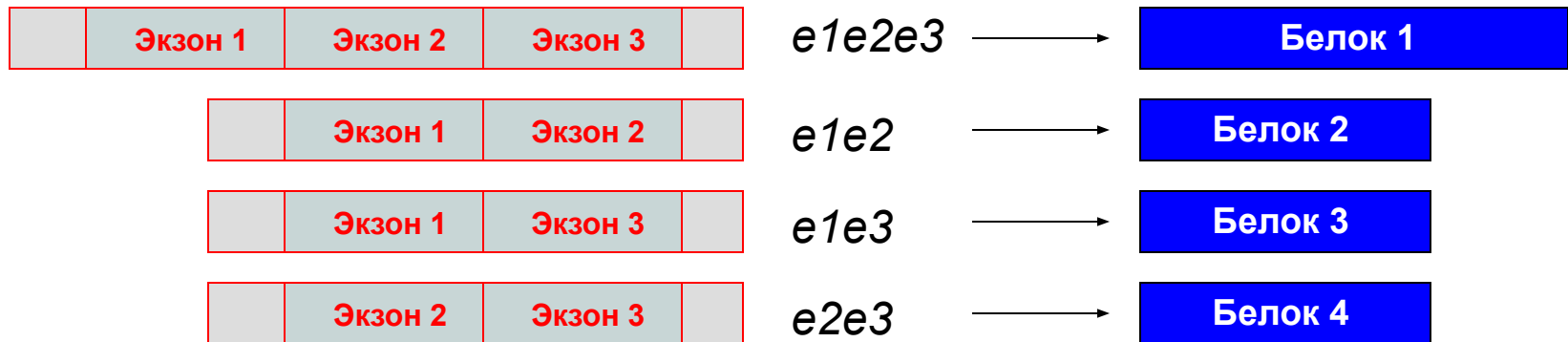
Процессинг мРНК - сплайсинг

Роль интронов и сплайсинга

Защита кодирующей части гена от повреждений

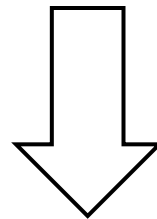
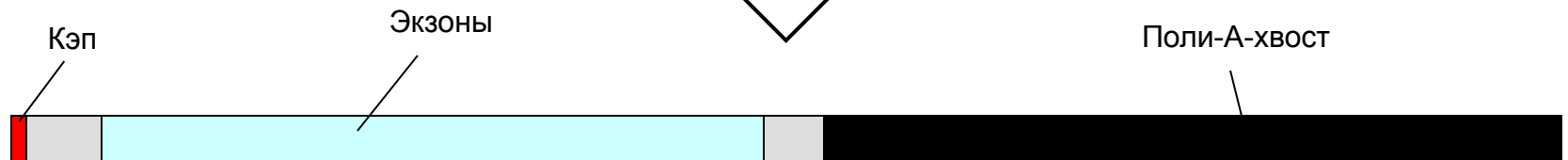
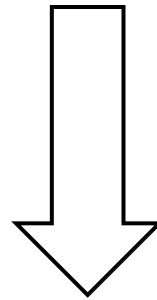
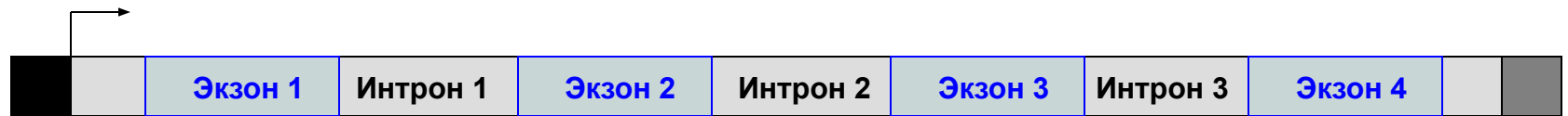


Кодирование одним геном нескольких белков Альтернативный сплайсинг

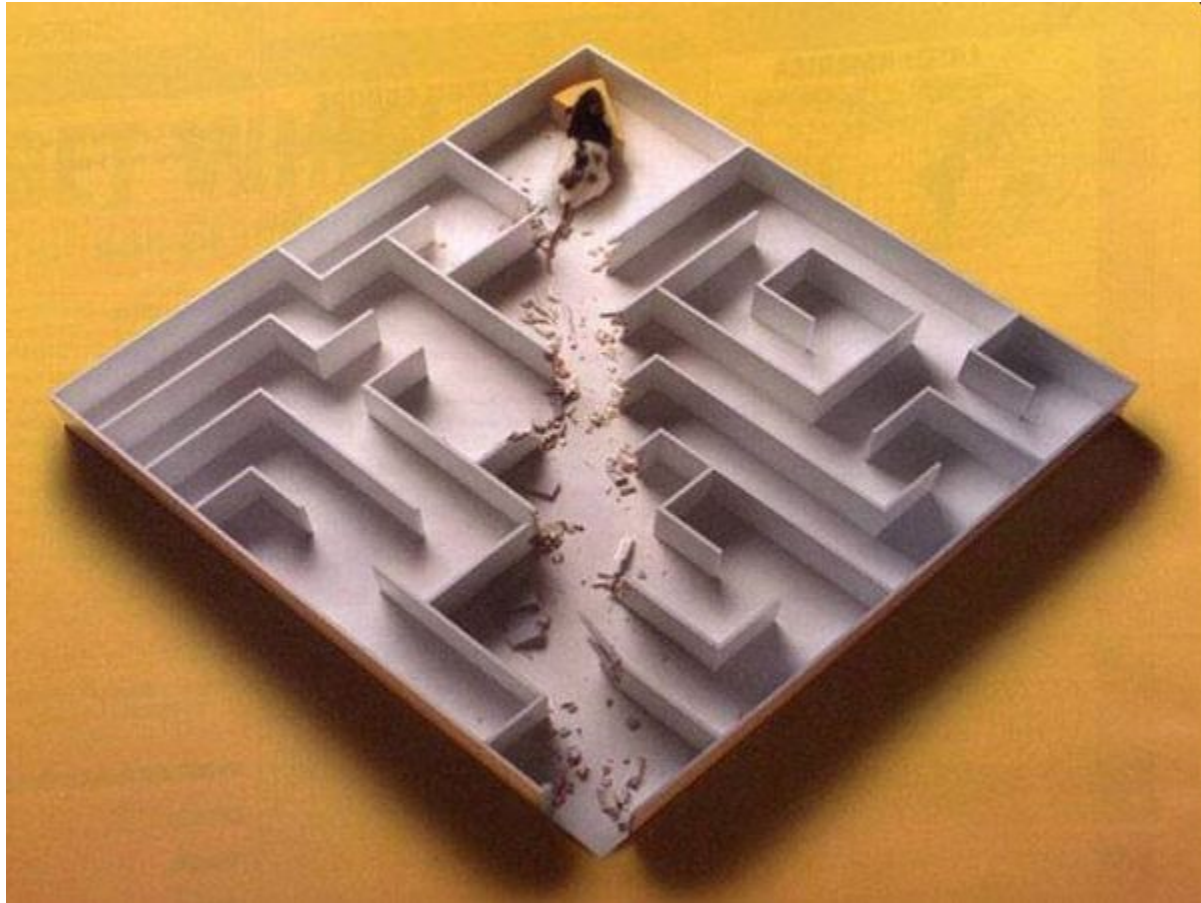


Процессинг мРНК

Зрелая мРНК



Трансляция



Методы изучения Нозерн-блоттинг

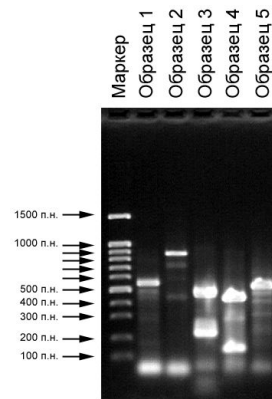
Саузерн-блоттинг (1975)



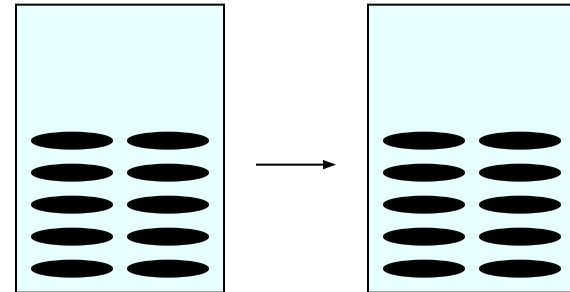
The Journal of the American Medical Association. -2005.-Vol.294.-No.11.-P.1327-1330

Эдвин Мэллор Саузерн
(Edwin Mellor Southern)
1938 г.р.

Электрофорез ДНК



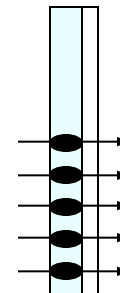
Вымачивание в щелочи для расхождения цепей ДНК



Гель, вид сбоку



Перенос (блоттинг) на фильтр



Фильтр, вид сбоку



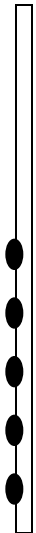
Транскрипция

Методы изучения

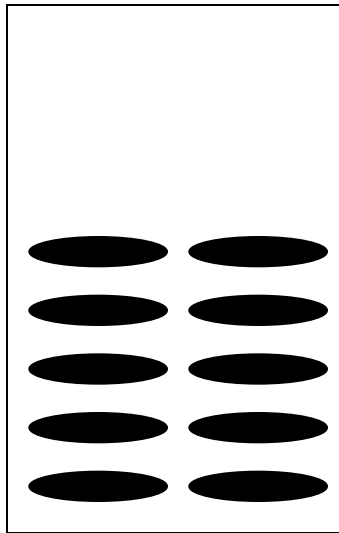
Нозерн-блоттинг

Саузерн-блоттинг

Фильтр,
вид сбоку

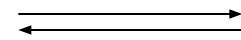


Денатурированная
ДНК на фильтре



Задача:
определить, присутствует
ли среди этих молекул
ДНК участок, который нас
интересует
(например, какой-то ген)

Интересующий нас фрагмент ДНК



+

ДНК-полимераза I

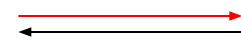
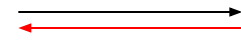
+

α -[³²P]-дАТФ

α -[³²P]-дГТФ

α -[³²P]-дЦТФ

α -[³²P]-дТТФ

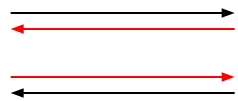


Транскрипция

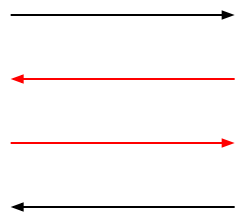
Методы изучения Нозерн-блоттинг

Саузерн-блоттинг

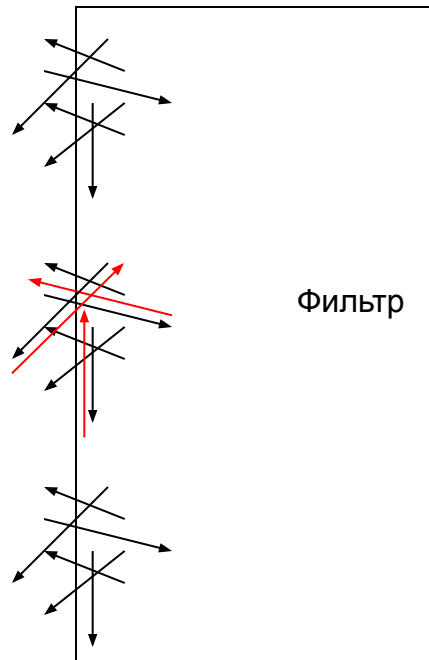
Радиоактивно меченный
фрагмент ДНК,
интересующий нас



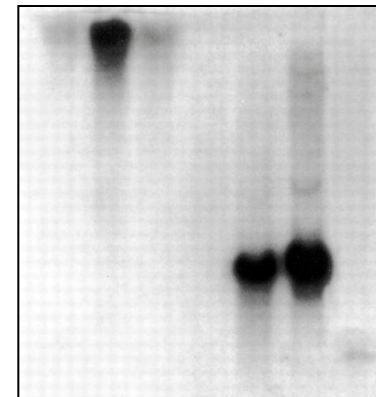
Денатурация



Гибридизация с денатурированными
образцами ДНК на фильтре



Авторадиография
на рентгеновской пленке



Транскрипция

Методы изучения Нозерн-блоттинг

«Southern» (Саузерн) – «южный»

«Northern» (нозерн) – «северный»

Перенос на фильтр РНК

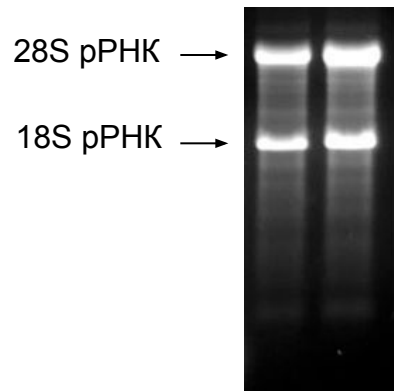
«Western» (вестерн) – «западный»

**Перенос на фильтр белков
(иммуноблоттинг)**

«Eastern» (истерн) – «восточный»

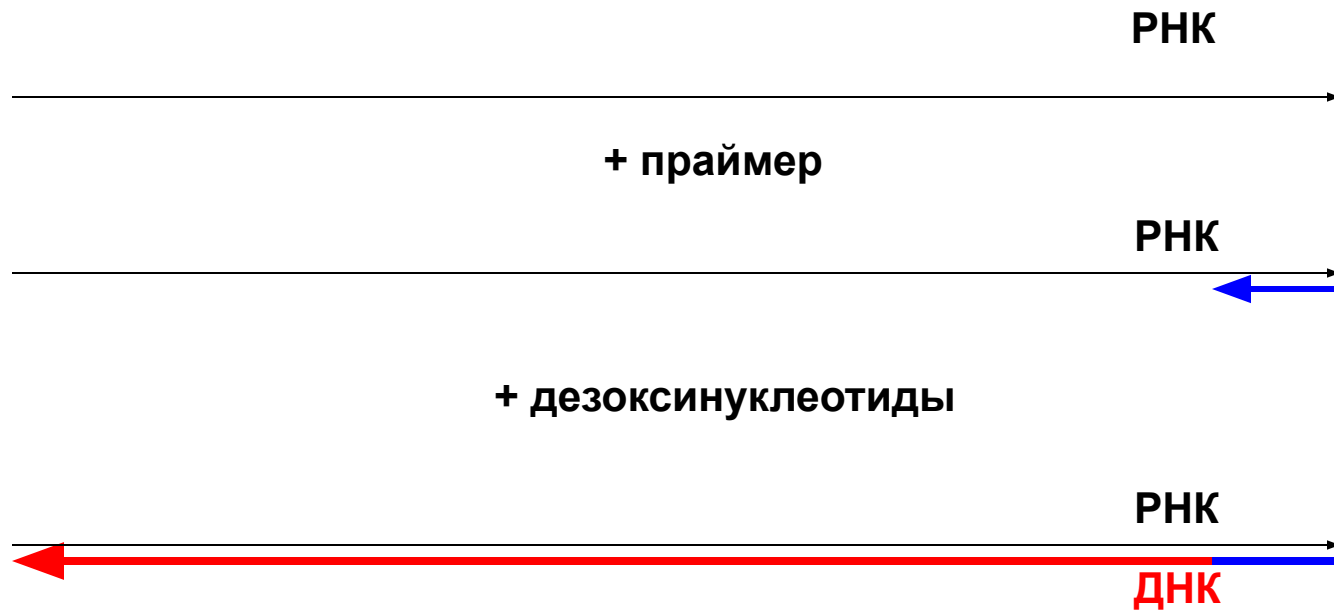
**Перенос на фильтр белков
после изоэлектрофокусирования**

Методы изучения Нозерн-блоттинг



Транскрипция

Обратная транскриптаза (ДНК-зависимая РНК-полимераза)

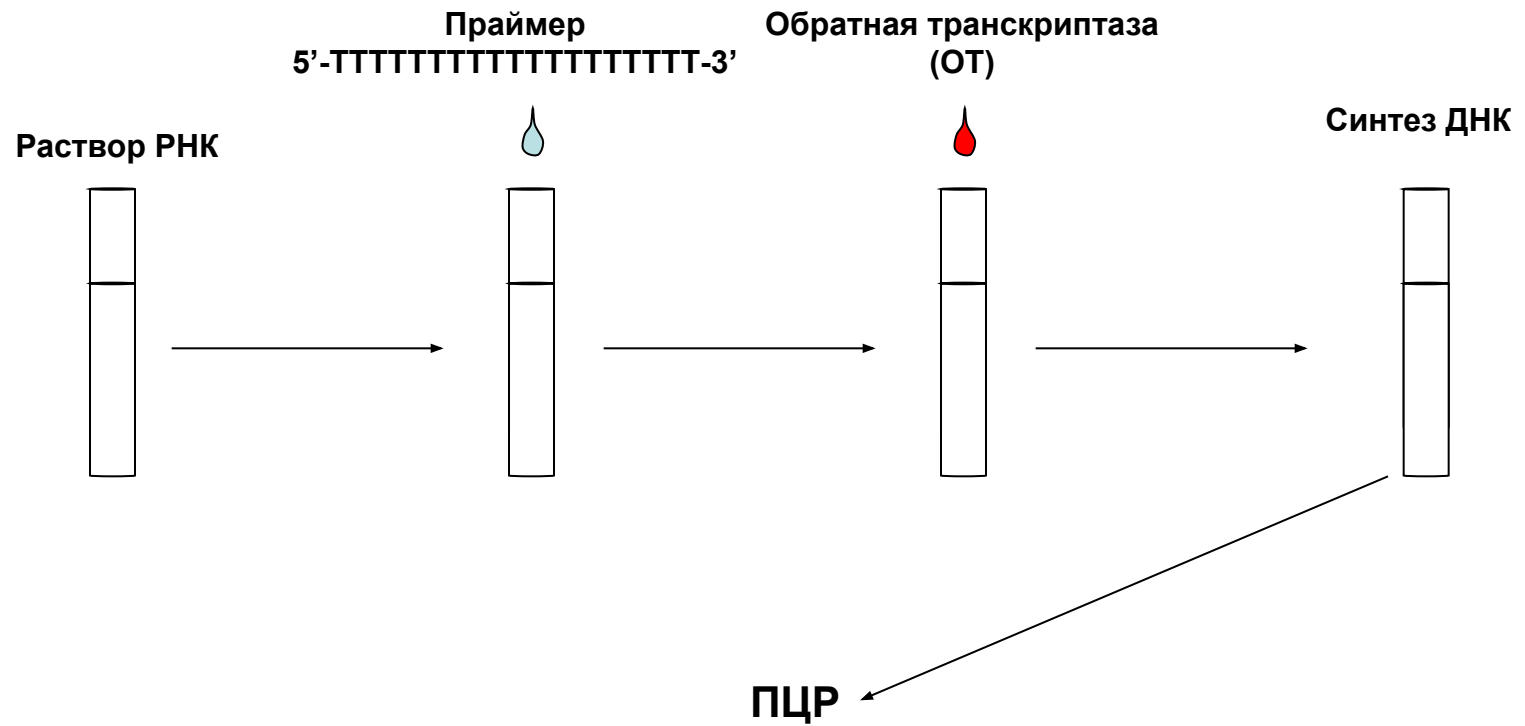


Транскрипция

Методы изучения

ОТ-ПЦР

Задача: определить наличие в клетках РНК, транскрибированной с определенного гена

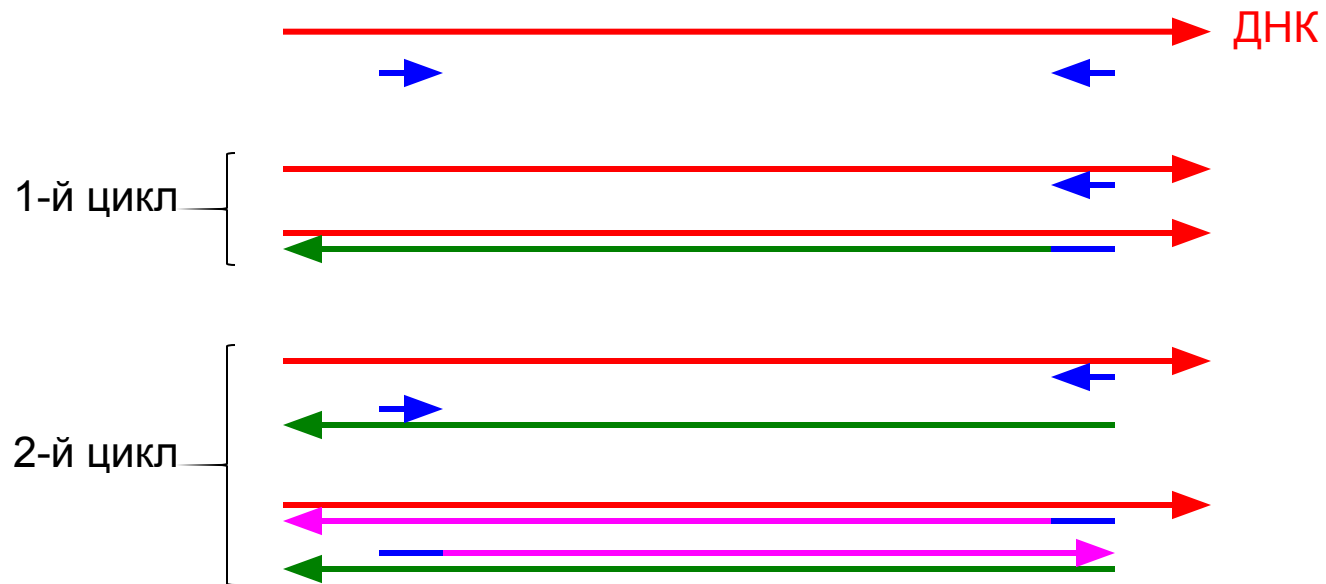


Транскрипция

Методы изучения

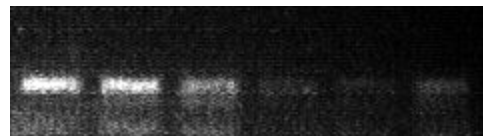
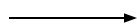
ОТ-ПЦР

ПЦР с праймерами, соответствующими интересующему нас гену



Электрофорез

.....



Количество транскриптов
интересующего нас гена
уменьшается

