

Основы молекулярной биологии. Биосинтез белка. Транскрипция.

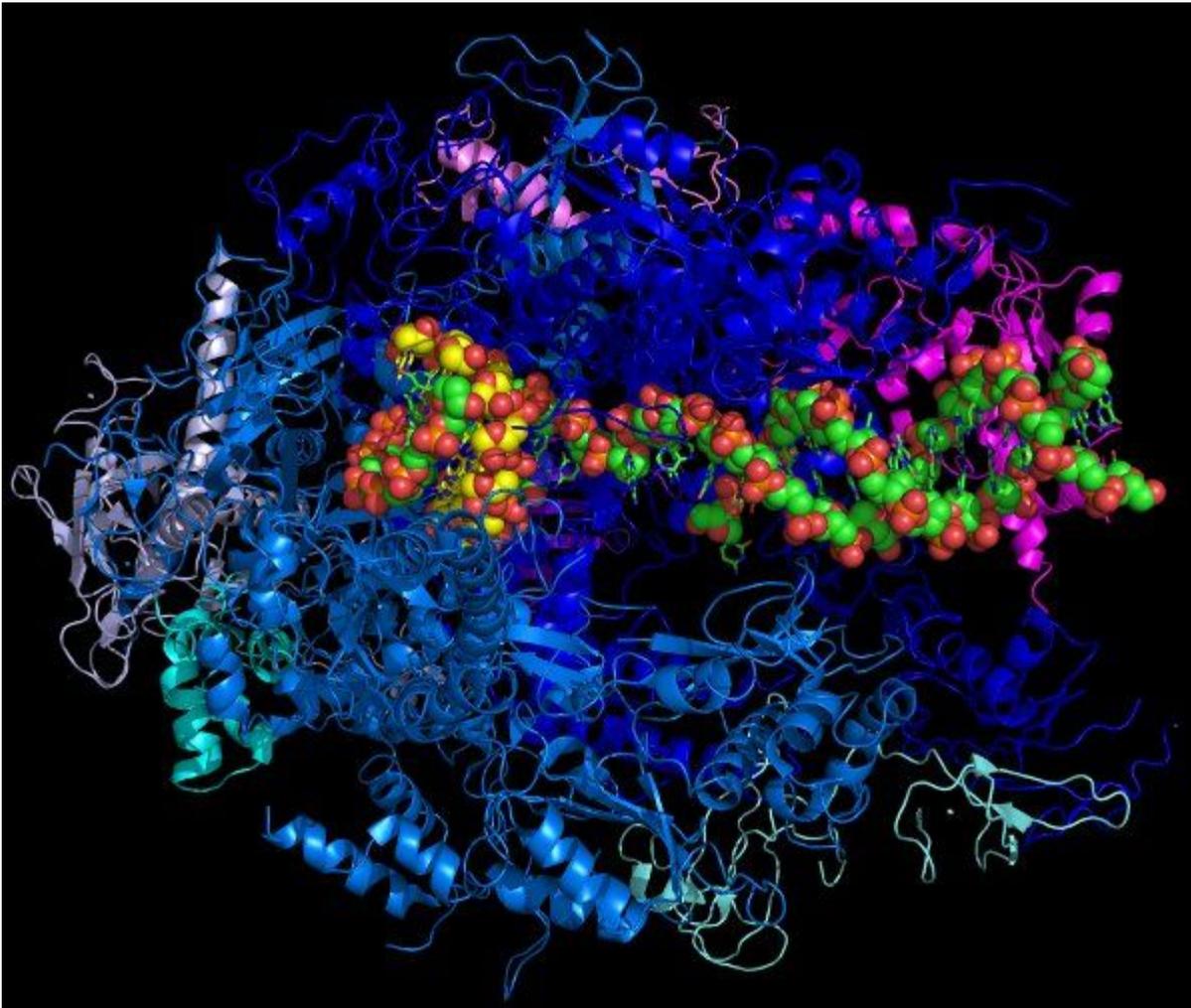


СОСТАВИТЕЛЬ:

**Доцент кафедры биологии ОмГМУ, к.б.н.
Лазуткина Екатерина Александровна**

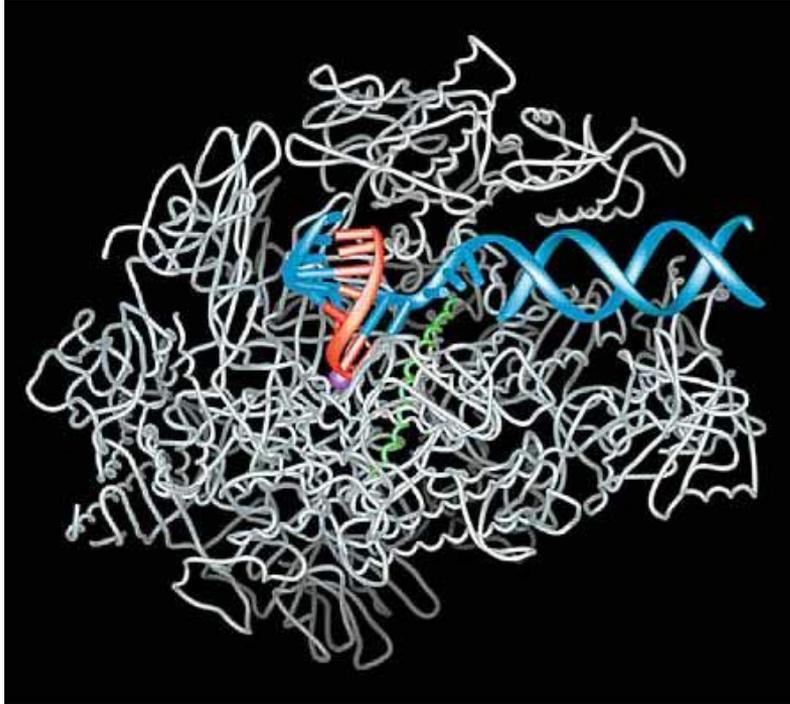
План

- 1. Стадии и ферменты транскрипции (особенности РНК-полимераз)**
- 2. Транскрипция у прокариот. Регуляция транскрипции у прокариот. Схема работы лактозного оперона.**
- 3. Транскрипция у эукариот:**
 - А) процессинг первичных транскриптов**
 - Б) сплайсинг. Альтернативный сплайсинг**
 - В) регуляция транскрипции у эукариот**

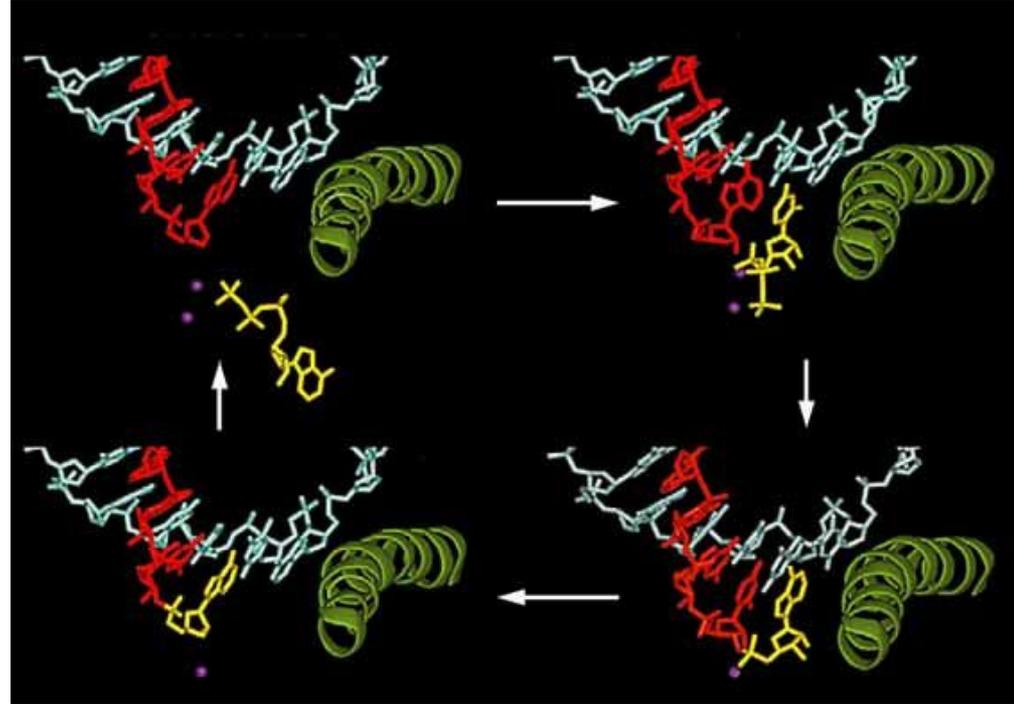


Так выглядит транскрипция – синтез РНК для последующего производства белка.

Стадии и ферменты транскрипции (особенности РНК-полимераз)



Фрагмент структуры РНК-полимеразы II, содержащий щель, в которой локализован активный центр фермента. Показаны спираль ДНК (синяя), растущая цепь РНК (красная), ион металла в активном центре в виде фиолетовой сферы и “мостиковая” α -спираль (зеленая).

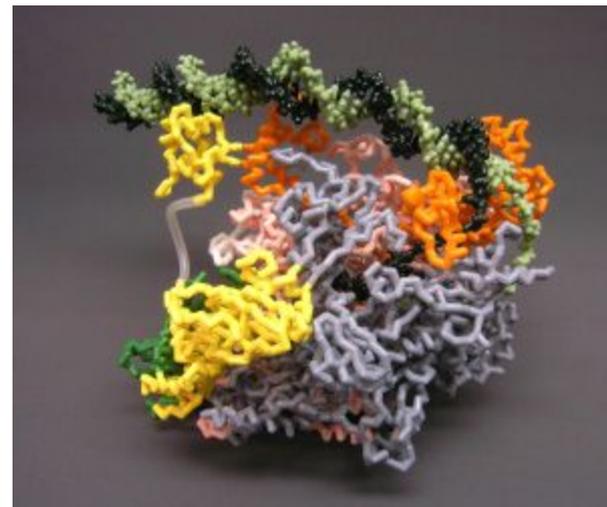


4 кристаллических структуры комплексов РНК-полимеразы II с нуклеозидтрифосфатами

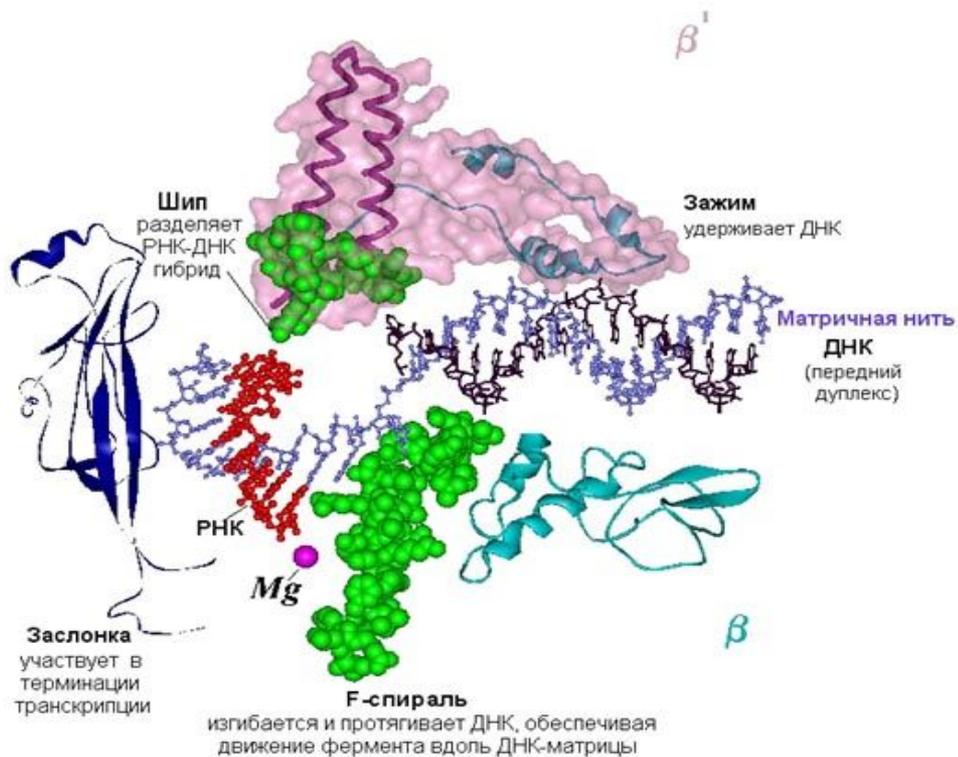
http://vivovoco.rsl.ru/VV/JOURNAL/NATURE/01_07/CHEMISTRY.HTM

РНК-полимераза

Нейлоновая модель фермента РНК-полимеразы, застигнутой в тот момент, когда она уже присоединилась к промотору, расплела двойную спираль ДНК и собирается приступить к прочтению генетической информации.



СТРУКТУРНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ



Особенности РНК-полимераз

Отличия от ДНК-полимераз:

- субстратами ферментов являются рибонуклеотиды
- РНК-полимераза сама расплетает ДНК
- во время синтеза только часть молекулы РНК спарена с матрицей (с молекулой ДНК)
- РНК-полимеразам не требуется затравка для начала синтеза РНК
- у РНК-полимеразы нет корректирующей активности, то есть, РНК-полимераза не может сама исправлять ошибки при синтезе РНК

Фермент РНК-полимераза (зеленые комки) ползет по молекуле ДНК (скрученный тяж) и «считывает» ее, синтезируя молекулу РНК (разноцветная лента). В молекуле РНК интроны показаны серым, экзоны — яркими цветами. Вырезанные фрагменты РНК уплывают вдаль, облепленные разнообразными полупрозрачными РНК-связывающими белками.

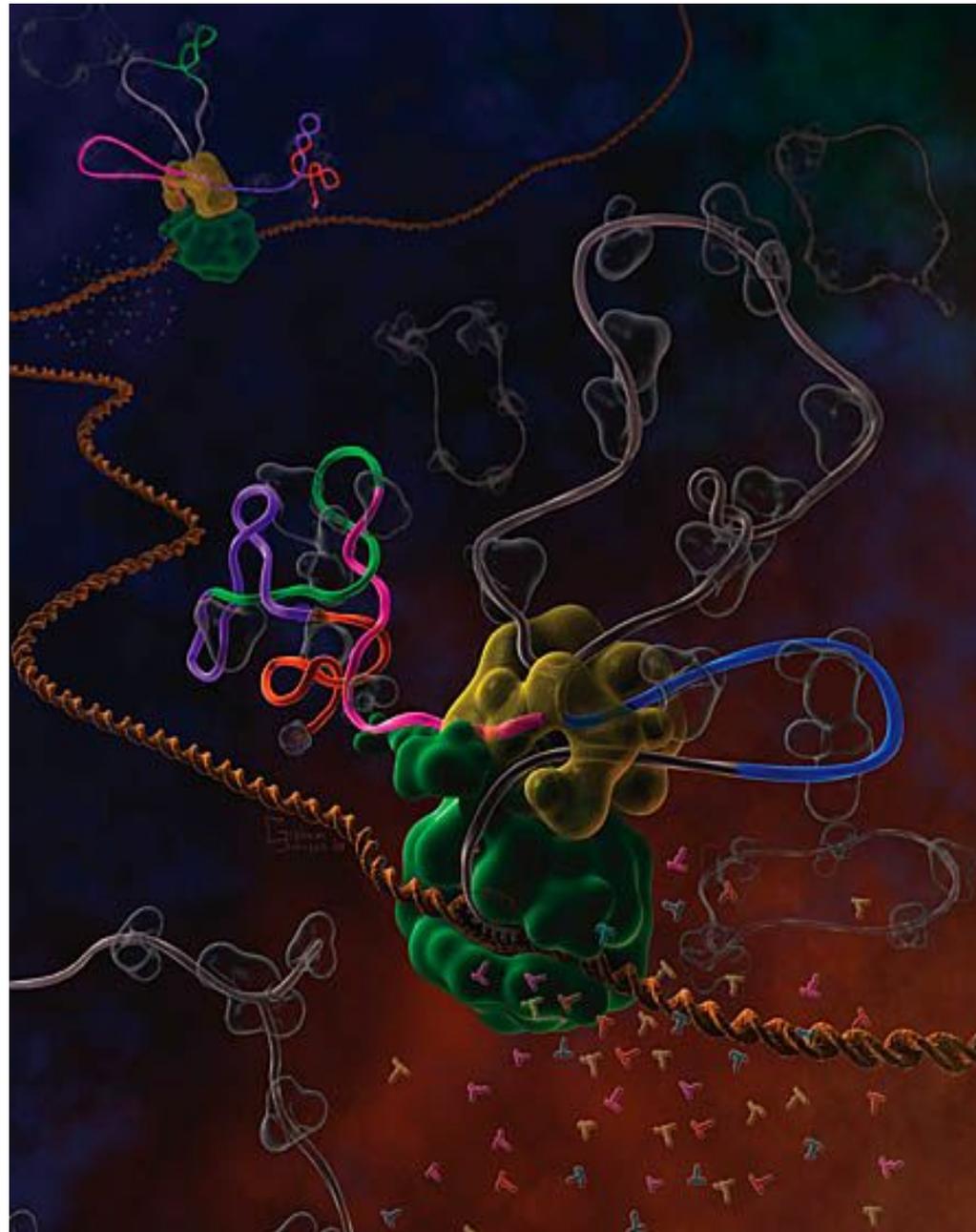
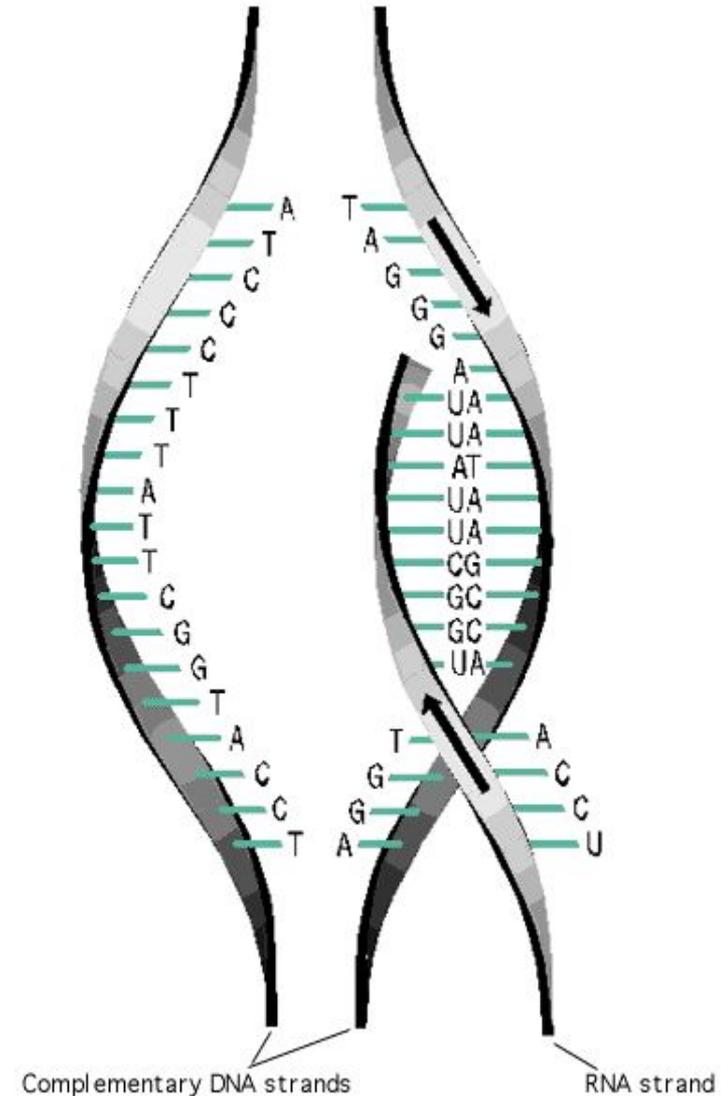


Рис. © Graham T. Johnson. с сайта www.hhmi.org

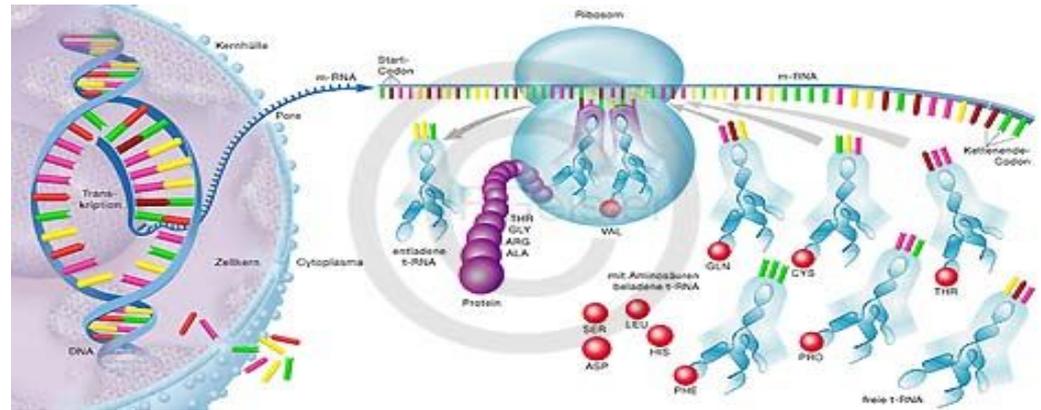
Стадии и ферменты транскрипции

Транскрипция – биосинтез одноцепочечной молекулы РНК на матрице ДНК:

1. Синтез молекул РНК идет в направлении 5'–3'; считывание матричной ДНК идет в направлении 3'–5'.
2. Для каждого гена одна из цепей ДНК кодирующая то есть, каждая молекула РНК считывается только с одной цепи ДНК.
3. Разные гены могут считываться с противоположных цепей ДНК.
4. Синтезированная молекула РНК идентична кодирующей цепи ДНК
(кроме замены основания тимин на урацил)

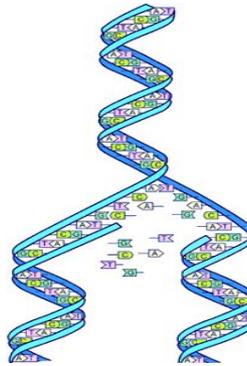


Стадии и ферменты транскрипции

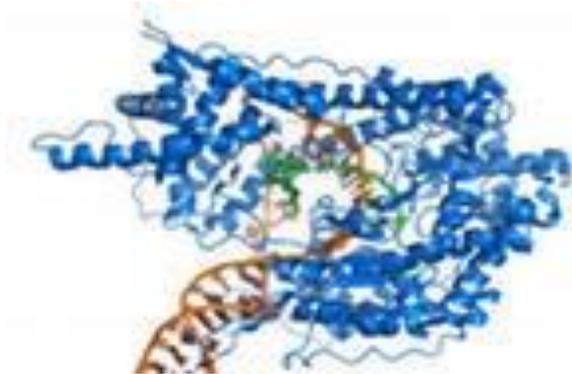


Для осуществления транскрипции необходимо наличие:

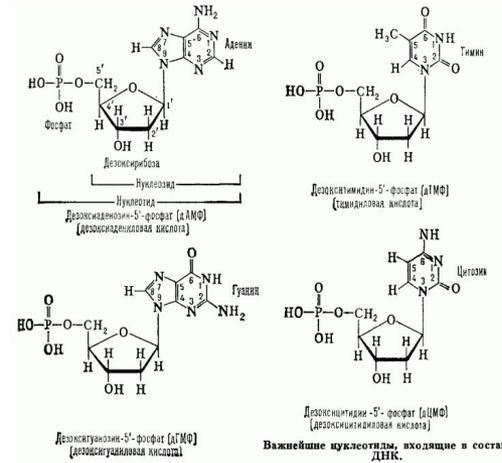
1. ДНК-матрицы,



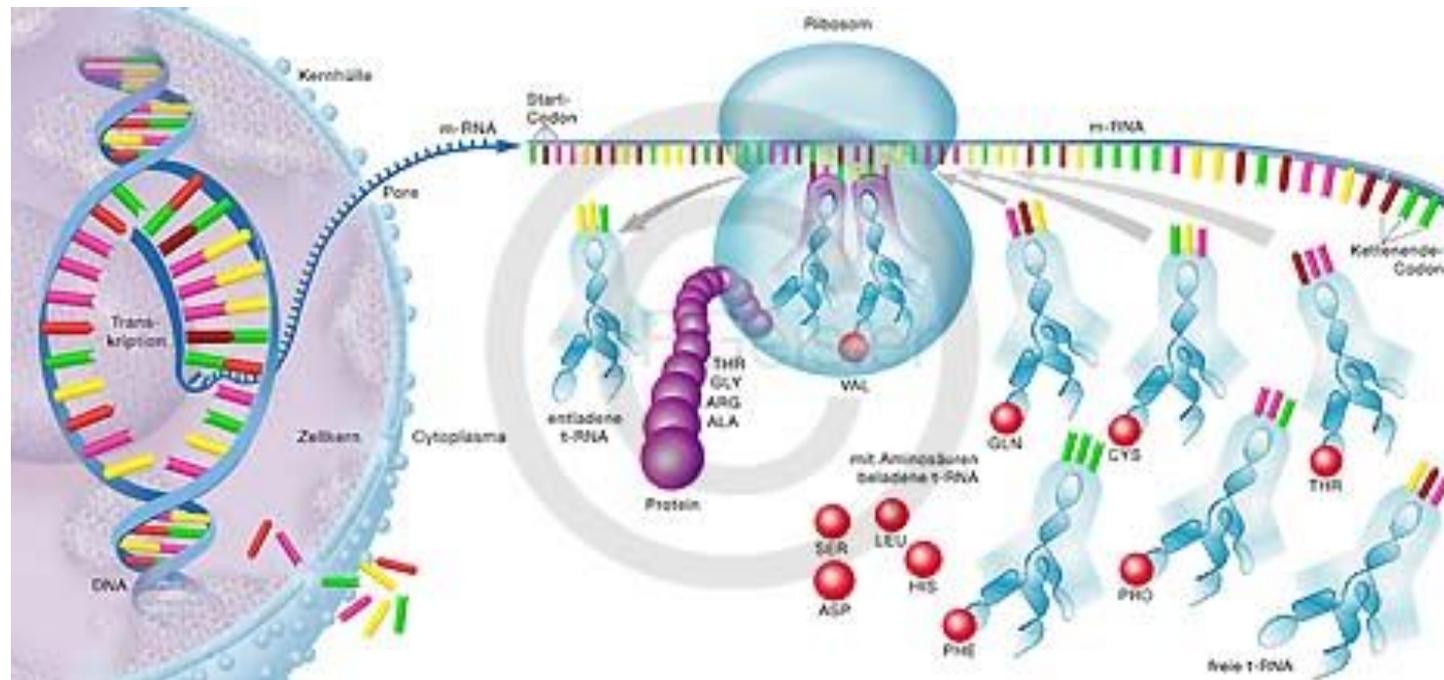
3. соответствующего фермента (РНК-полимераза).



2. пула предшественников
(аденин-, гуанин-, цитозин- и урацилтрифосфатнуклеотиды),



Стадии и ферменты транскрипции



Транскрипция – матричный процесс, в котором выделяют стадии инициации, элонгации и терминции

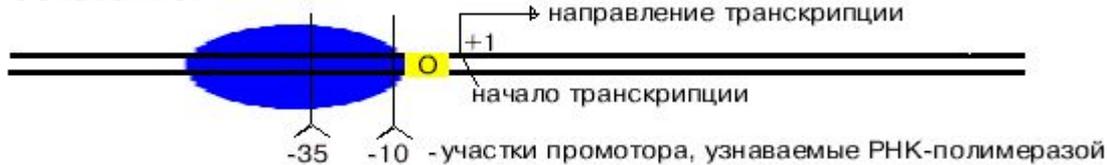
Стадии транскрипции

Стадии транскрипции	Процессы, происходящие на стадиях транскрипции
<p>ИНИЦИАЦИЯ (самая медленная стадия) промотор</p> 	<ol style="list-style-type: none">1. Связывание РНК-полимеразы с ДНК2. Расплетание ДНК на участке 10-20 нуклеотидов3. Формирование первых фосфодиэфирных связей
<p>ЭЛОНГАЦИЯ (самая длительная стадия)</p> 	<p>Удлинение цепи РНК</p>
<p>ТЕРМИНАЦИЯ (самая короткая стадия) терминатор</p>	<ol style="list-style-type: none">1. Остановка синтеза РНК2. Распад тройного комплекса ДНК----РНК-полимераза-----РНК

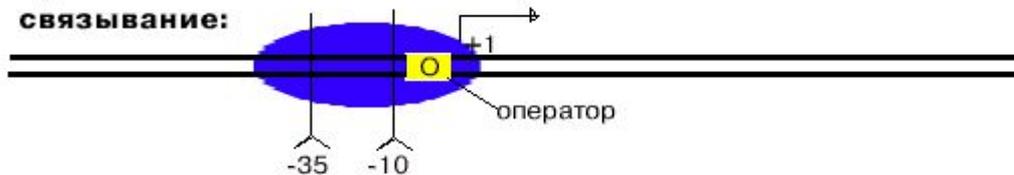
Этапы транскрипции

1. Узнавание и прочное связывание

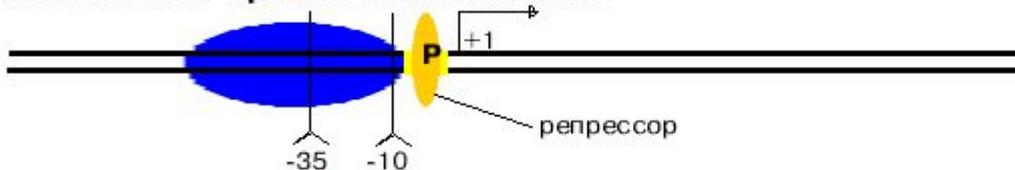
Узнавание:



Прочное связывание:



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

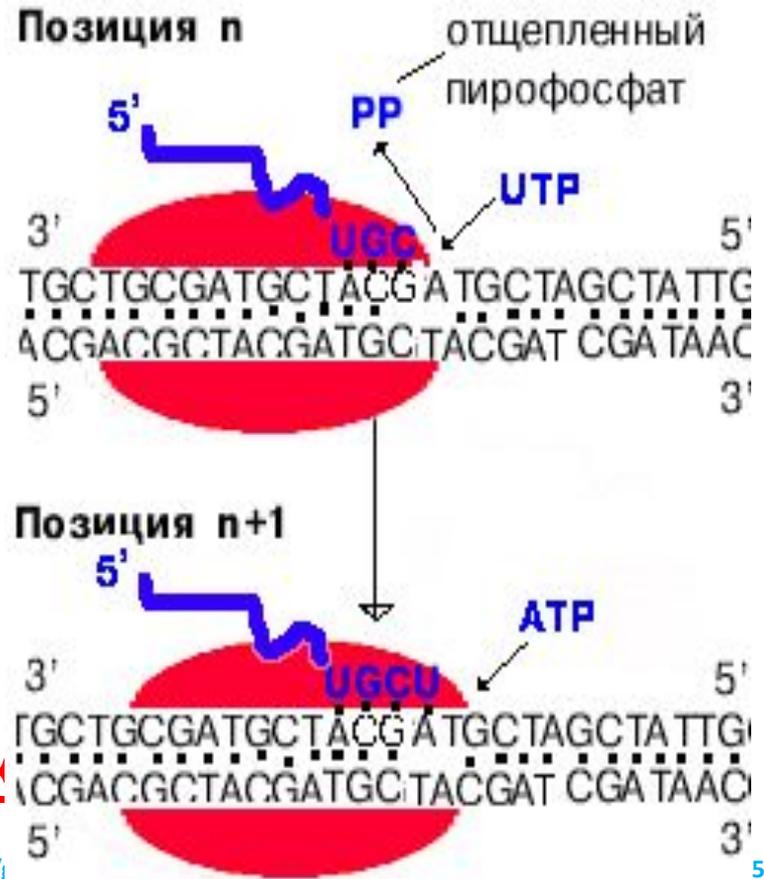


2. *инициация* заключается в образовании первой фосфодиэфирной связи между пури-трифосфатом (АТФ или ГТФ) и следующим нуклеотидом.

Этапы транскрипции

3. Элонгация - последовательное наращивание цепи РНК (или продолжение транскрипции).

- Скорость элонгации 40-50 нукл./сек.



- Существует множество ингибиторов транскрипции. Они действуют по разным механизмам и на разных стадиях.

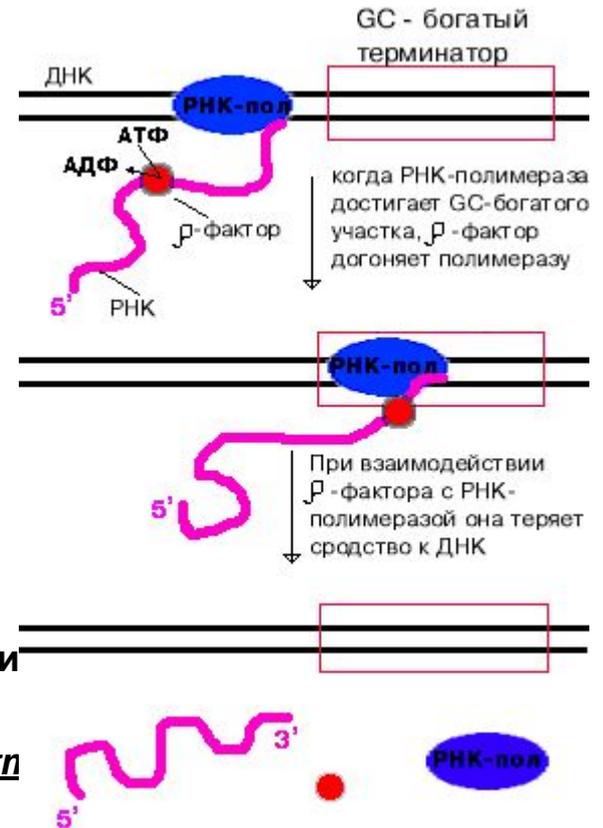
Большинство из них - **антибиотики**

<http://>

5

Этапы транскрипции

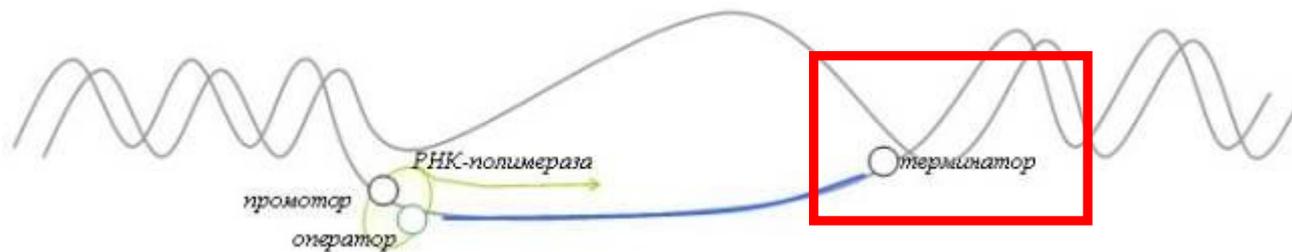
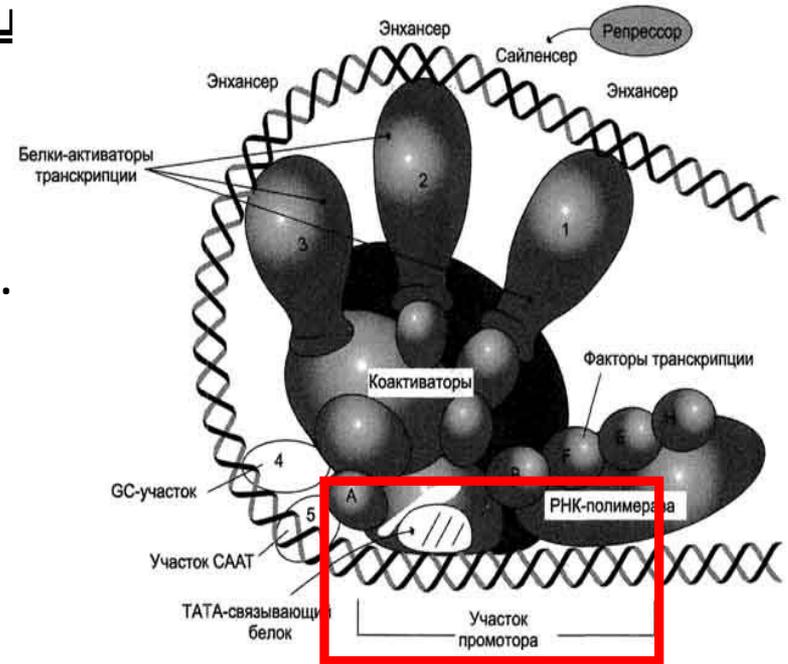
4. Терминация



В терминаторе много Г-Ц пар (с тремя водородными связями вследствие чего РНК-полимераза замедляет ход, ρ-фактор (ρ-фактор - это имеющий четвертичную структуру белок, обладающий АТФ-азной активностью) ее догоняет, изменяет конформацию фермента - и синтез РНК прекращается.

Последовательность ДНК, транскрибируемая в одну молекулу РНК, начинающаяся промотором и заканчивающаяся терминатором, называется транскрипционной единицей или транскриптоном.

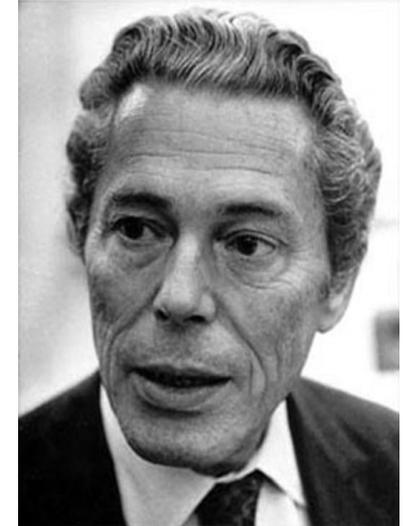
Промотором называется сайт ДНК, с которым связывается РНК-полимераза.



Терминатором называется последовательность ДНК, на котором РНК-полимераза прекращает синтез РНК

Регуляция транскрипции у прокариот

Схема регуляции транскрипции у прокариот (гипотеза оперона) была предложена Ф. Жакобом и Ж. Моно в 1961 г. на примере лактозного оперона для объяснения регуляция генов у *E. coli*



(Нобелевская премия по физиологии и медицине, 1965 г.).

Оперон – группа тесно сцепленных генов, находящихся под контролем общего промотора и транскрибируемых как единая иРНК.

Оперон – группа структурных генов управляемых одним геном-оператором.

Оперон – участок ДНК, на котором синтезируется и-РНК, определяющая синтез белка

Регуляция транскрипции у прокариот

В состав оперона входит:

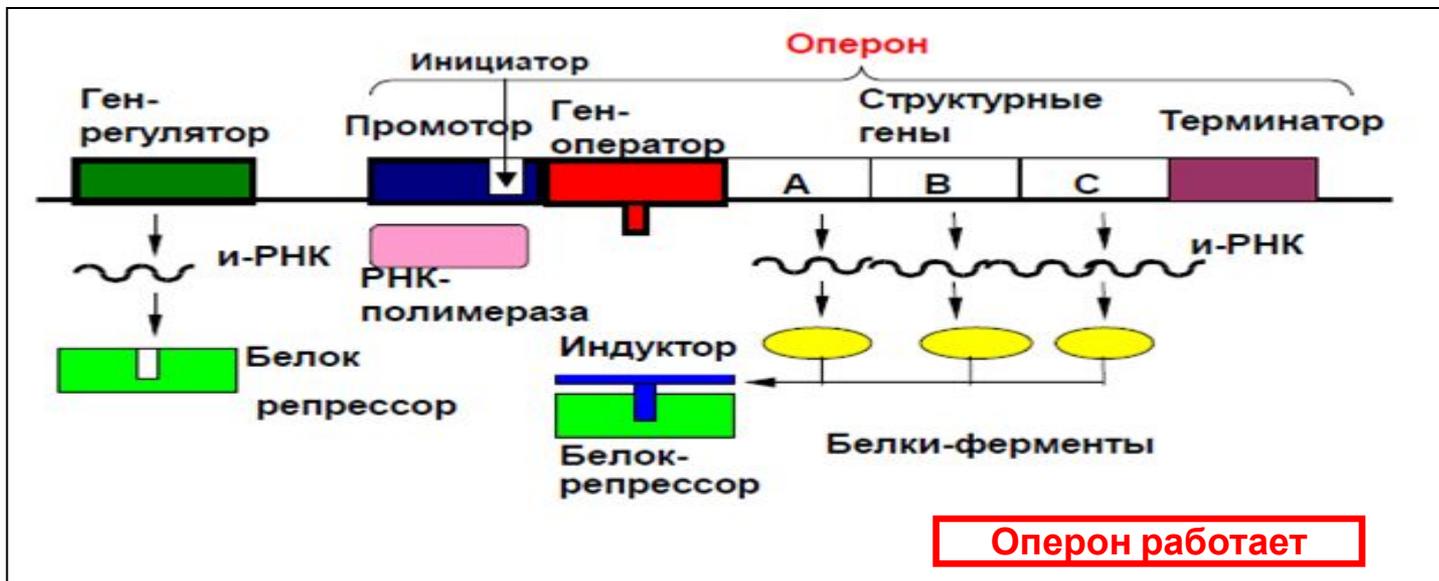
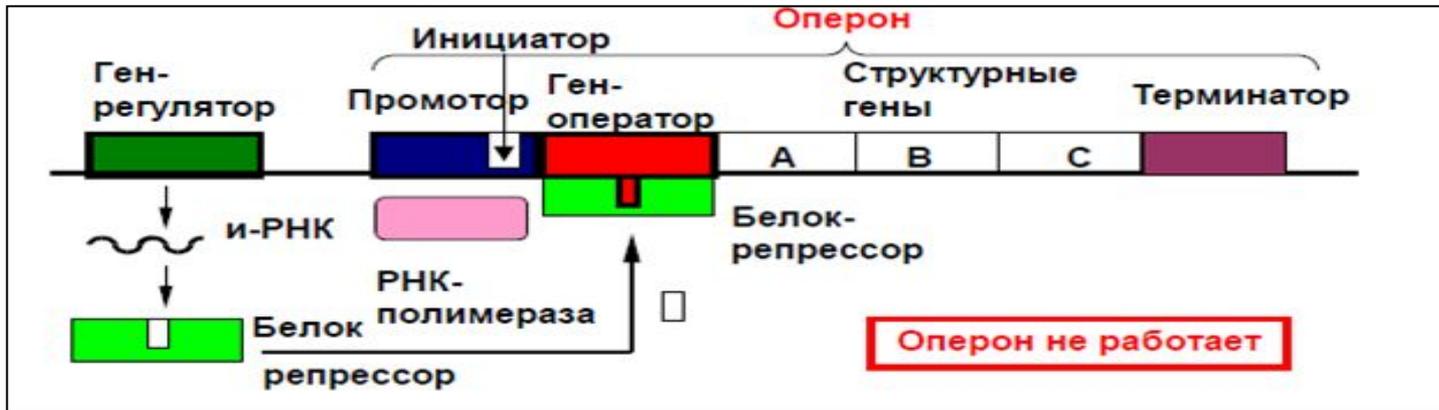
1. Промотор
2. Инициатор
3. Ген-оператор
4. Структурные гены
5. Терминатор

Ген-регулятор не является частью оперона, он активен постоянно и на основе его информации через и-РНК синтезируется особый **белок-репрессор**.

Белок-репрессор связывается **индуктором**.

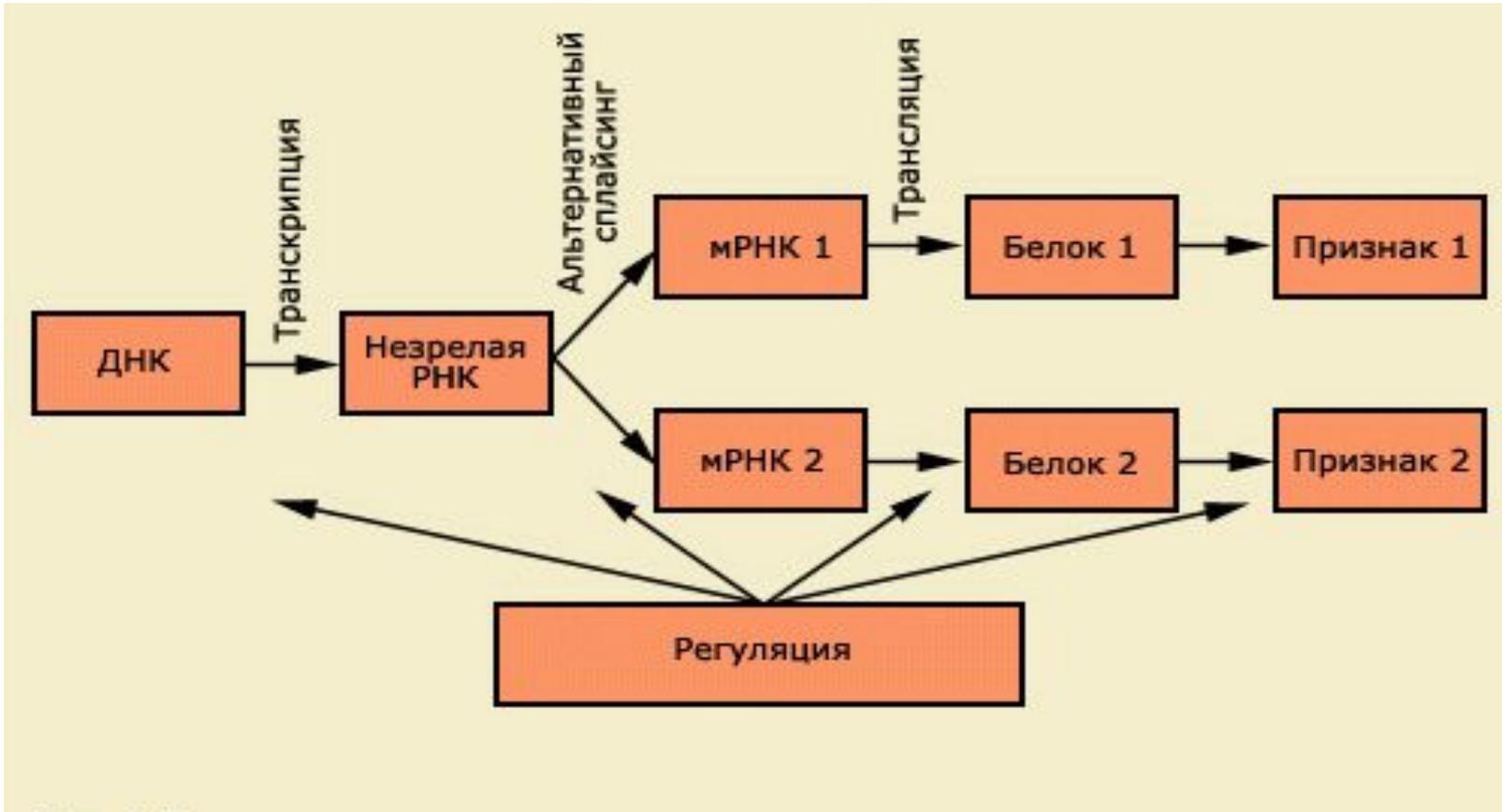
Индуктор – вещество, инициирующее синтез фермента, который его разлагает.

Схема работы лактозного оперона



Регуляция экспрессии генов

Регуляция экспрессии генов осуществляется на разных этапах



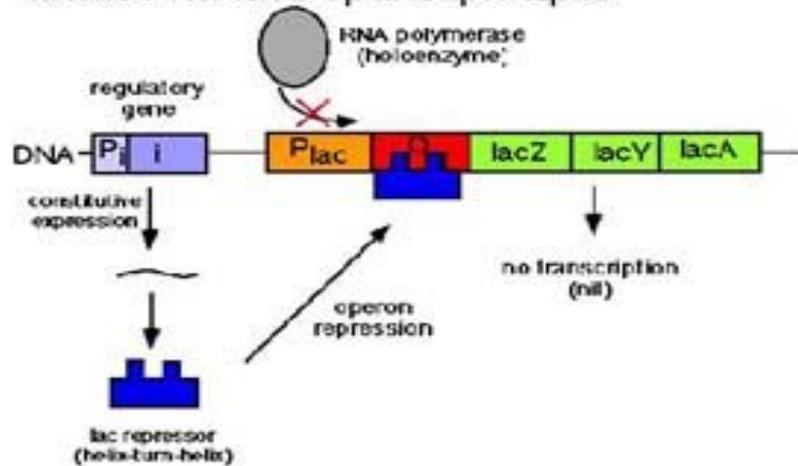
<http://imp.rudn.ru/psychology/psychogenetic/9.html>

Регуляция работы генов у прокариот

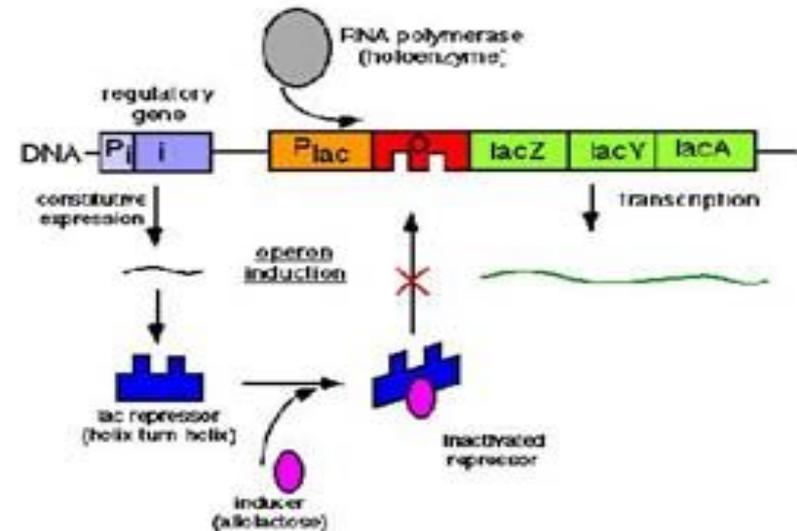
Регуляция активности генов: *lac*-оперон бактерии *E.coli*

гены метаболизма лактозы работают, когда лактоза есть в клетке

В отсутствии лактозы белок-репрессор связывается с оператором. РНК-полимераза не может начать транскрипцию



Лактоза инактивирует белок-репрессор и он теряет сродство к оперону. Транскрипция возможна.



Индукция синтеза ферментов метаболизма лактозы

В верхней части рисунка: так как лактозы нет,

Лактозы нет

lac-репрессор активен

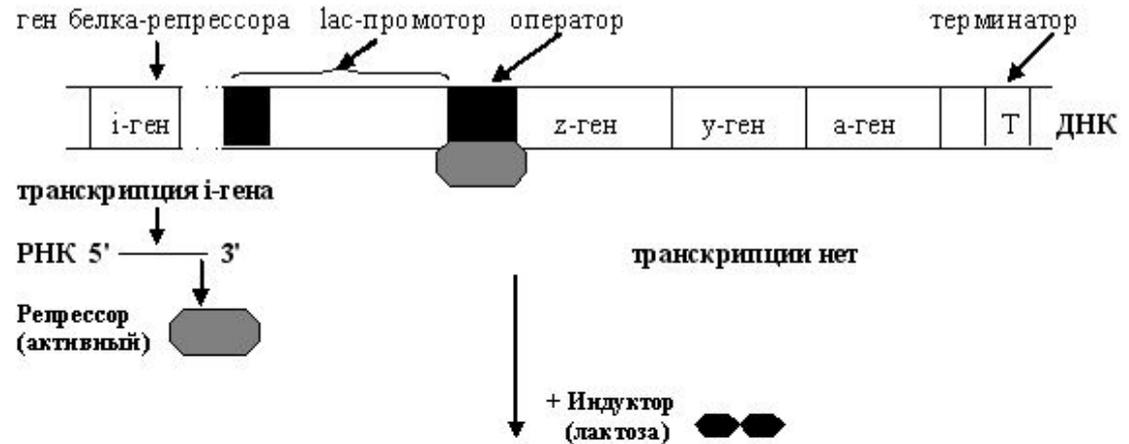
↓
lac-репрессор + оператор = блокирование

↓
оператора

lac-оперон “выключен”

↓
РНК-полимераза не строит мРНК

↓
Нет синтеза ферментов Z, Y и A



В нижней части рисунка: при появлении лактозы оперон “включен”

Лактоза есть

lac-репрессор активный + лактоза

↓
lac-репрессор неактивный

↓
Оператор не блокирован

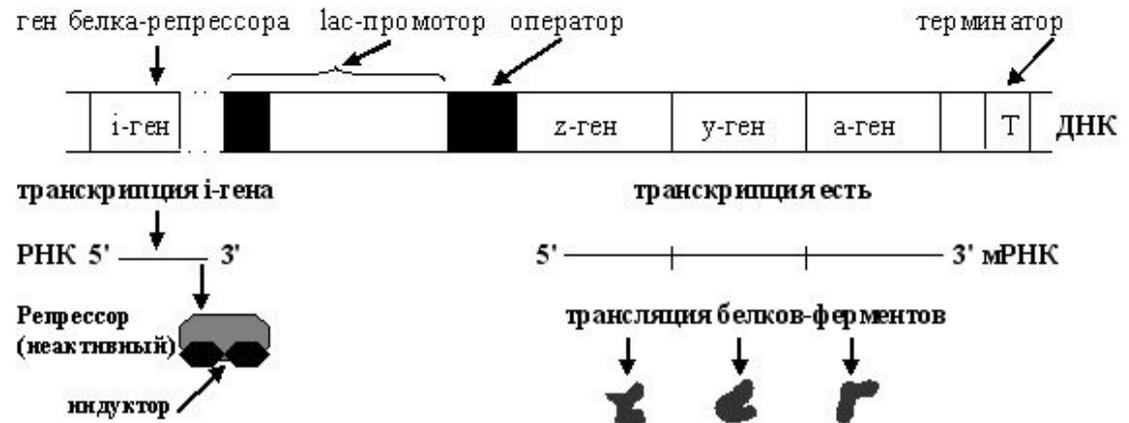
↓
lac-оперон “включен”

↓
РНК-полимераза строит мРНК по генам z, y и a

↓
Синтезируются ферментов Z, Y и A

↓
Расщепление лактозы

↓
Лактозы нет, см. вариант с выключенным опероном



Транскрипция у эукариот

Схема регуляции транскрипции у эукариот разработана Георгием Павловичем Георгиевым (1972 г.) и получила название

гипотезы транскриптона.



Единица транскрипции у эукариот также транскриптон

Принцип регуляции (обратная связь) сохраняется, но механизмы ее более сложные.

В прокариотической клетке наследственный материал и аппарат биосинтеза белка пространственно не разобщены, поэтому транскрипция и трансляция происходят почти одновременно.

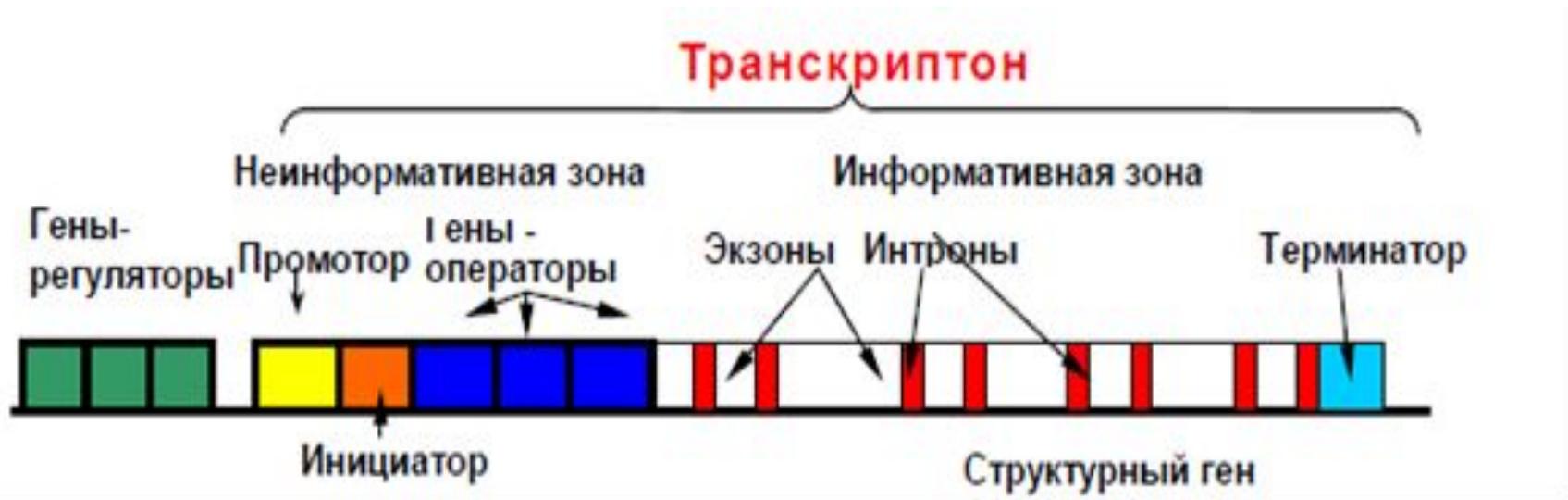
Транскрипция у эукариот

Транскриптон состоит из **неинформативной** (акцепторной) и **информативной** (структурной) зон.

Неинформативная зона начинается **промотором** с **инициатором**. Далее следует **группа генов-операторов**, за которым расположена информативная часть.

Информативная зона образована **структурным геном**, разделенным на экзоны и интроны.

Заканчивается транскриптон **терминатором**.

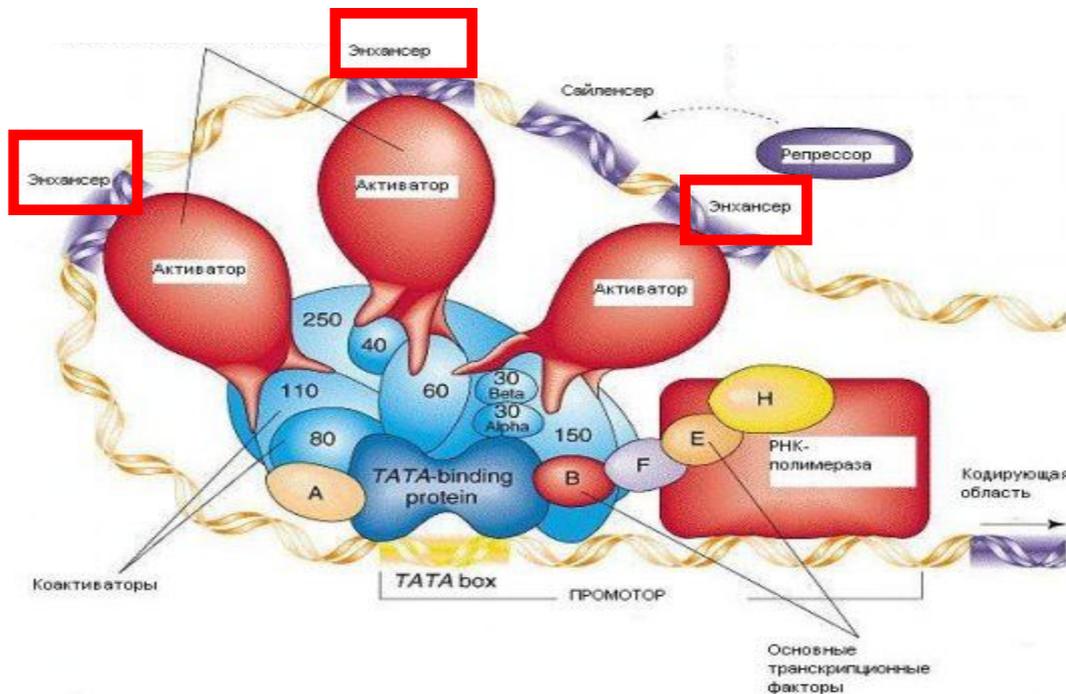


Энхансеры

Энхансер (усилители транскрипции, англ. *enhance* — увеличивать, усиливать) – это генетический элемент, обладающий усиливающим **транскрипцию** действием, которое практически не зависит от расположения элемента относительно контролируемого им гена.

Энхансеры **представлены** короткими последовательностями ДНК, включающих десятки нуклеотидных пар. Энхансер увеличивает эффективность транскрипции гена в десятки и сотни раз.

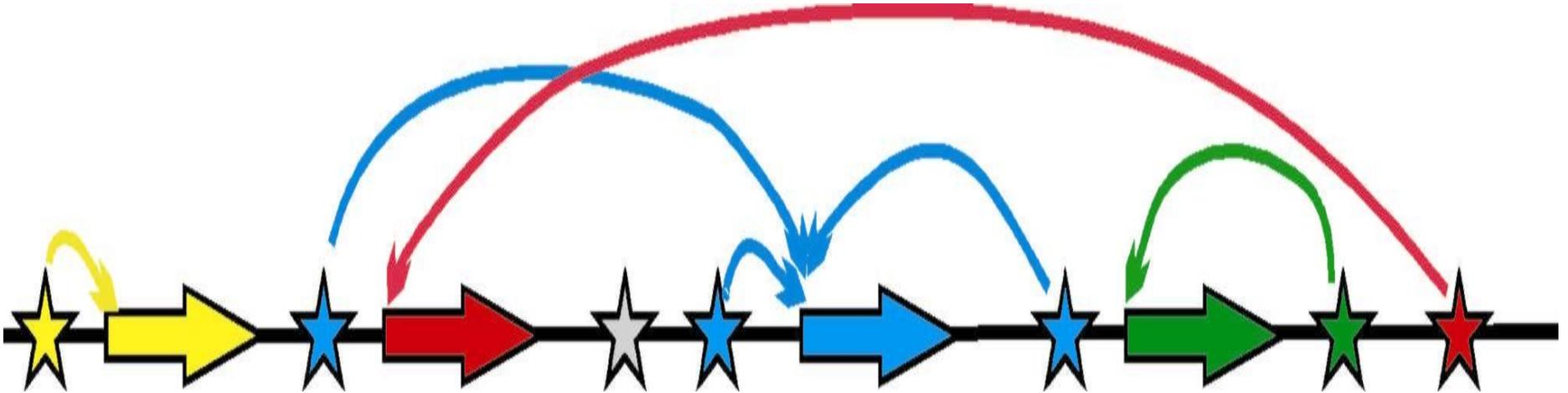
Энхансеры способны активировать гены на больших расстояниях, достигающих нескольких десятков тысяч пар нуклеотидов. В некоторых случаях они могут активировать транскрипцию генов, расположенных на других хромосомах. Эти регуляторные элементы действуют вне зависимости от положения и ориентации относительно направления транскрипции гена.



http://moikompas.ru/compas/regulation_gene

Энхансер

Энхансер увеличивает эффективность транскрипции гена в десятки и сотни раз. Особенность энхансеров состоит в том, что они способны действовать на больших расстояниях (более чем 1000 п.н.) и вне зависимости от ориентации по отношению к направлению транскрипции гена. Еще одной важной характеристикой энхансера является его способность активировать любой промотор, расположенный

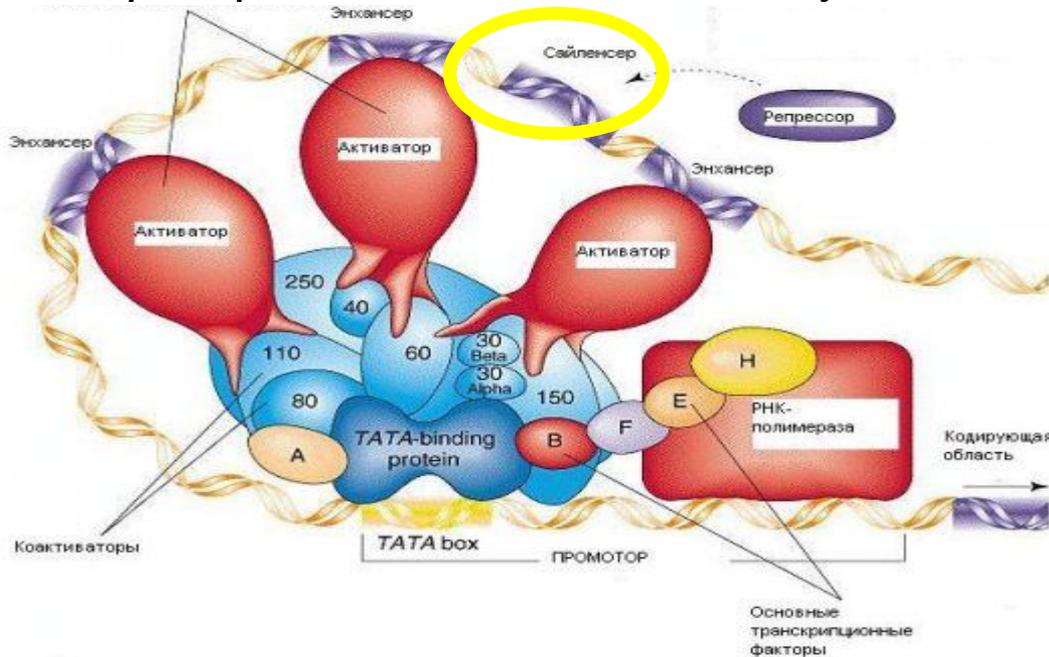


Энхансеры - основное средство регуляции транскрипции в клетках высших эукариот. Для взаимодействия энхансера с промотором необходимо приблизить эти сайты друг к другу. Возможность такого контакта может определяться другими регуляторными участками, формирующими петлевую укладку хроматина.

Сайленсер

Транскрипцию нужно не только активировать, но и подавлять. Для этого существуют сайленсеры.

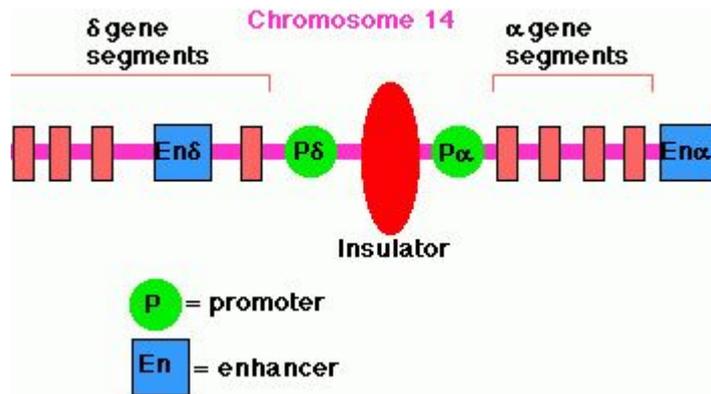
Сайленсер (ослабители транскрипции, англ. *silence* — заглушать) – это регуляторный участок ДНК, который подавляет активность промотора. Также как энхансеры, сайленсеры действуют в определенной степени независимо от ориентации в гене и от расстояния от промотора. Связывание белков-репрессоров с сайленсерами приводит к понижению или к полному подавлению синтеза РНК РНК-полимеразой.



Ингибирование транскрипции с использованием регуляторных элементов, называемых сайленсерами, - активный процесс. В этом случае происходит прямое подавление инициации транскрипции путем разрушения транскрипционного комплекса на промоторе или посредством его инактивации иным способом. Первый из описанных в 1986 г. сайленсеров обладал классическими энхансероподобными свойствами, действуя на промоторы, расположенные в цис-положении (на той же молекуле ДНК) на большом расстоянии. При этом активность сайленсера, подобно энхансеру, не зависела от его ориентации по отношению к регулируемому промотору. Активность других сайленсеров зависит от положения их по отношению к регулируемому промотору и ориентации относительно него, и прямо пропорциональна числу их копий.

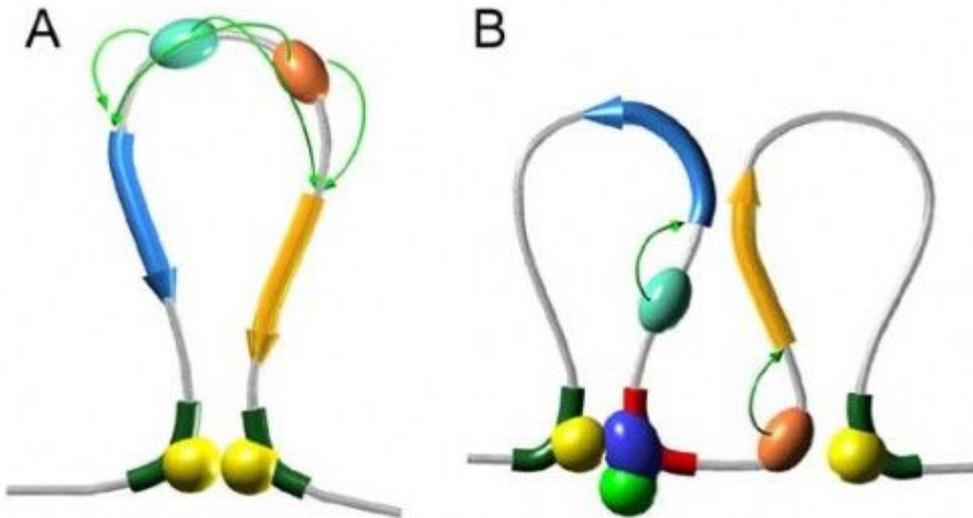
Инсуляторы

Специфичность действия энхансеров и сайленсеров определяется инсуляторами, которые блокируют активность энхансера или сайленсера.



Существуют определенные последовательности нуклеотидов длиной в несколько сотен пар оснований, которые обладают способностью подавлять позитивное и негативное влияние эухроматина и гетерохроматина на экспрессию трансгенов, интегрированных в этот хроматин и фланкированных указанными последовательностями в новом сайте интеграции. Такие участки ДНК как бы изолируют ген, находящийся между ними, способствуя сохранению его обычной пространственной структуры. Эти последовательности известны под названием инсуляторов (англ. insulate - изолировать) и как регуляторные области локусов (LCR - locus control regions). Введение одного из таких элементов между энхансером и промотором регулируемого гена приводит к функциональной изоляции энхансера и подавлению экспрессии гена.

Инсуляторы



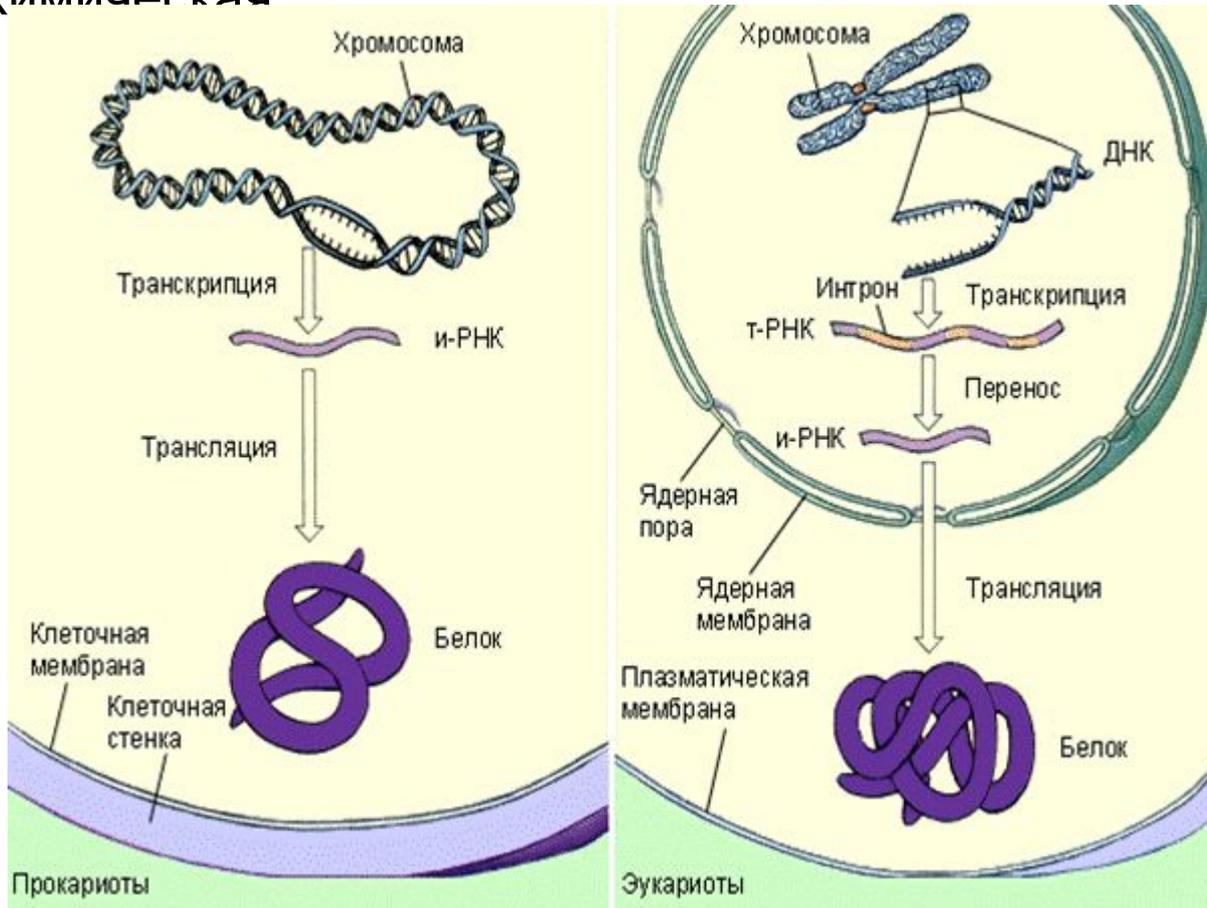
На схеме показано действие инсулятора на функционирование энхансера с помощью образования нового хромосомного домена.

A Схема функционирования двух генов (темно-желтый и голубой), локализованных в домене, контролируемом двумя инсуляторами (темно-зеленый) и белками, которые связываются с инсуляторами (желтый). Энхансеры локализуются между двумя генами (вместе с транскрипционными факторами, обозначенными бирюзовым и оранжевым), они могут активировать транскрипцию с промотора каждого гена.

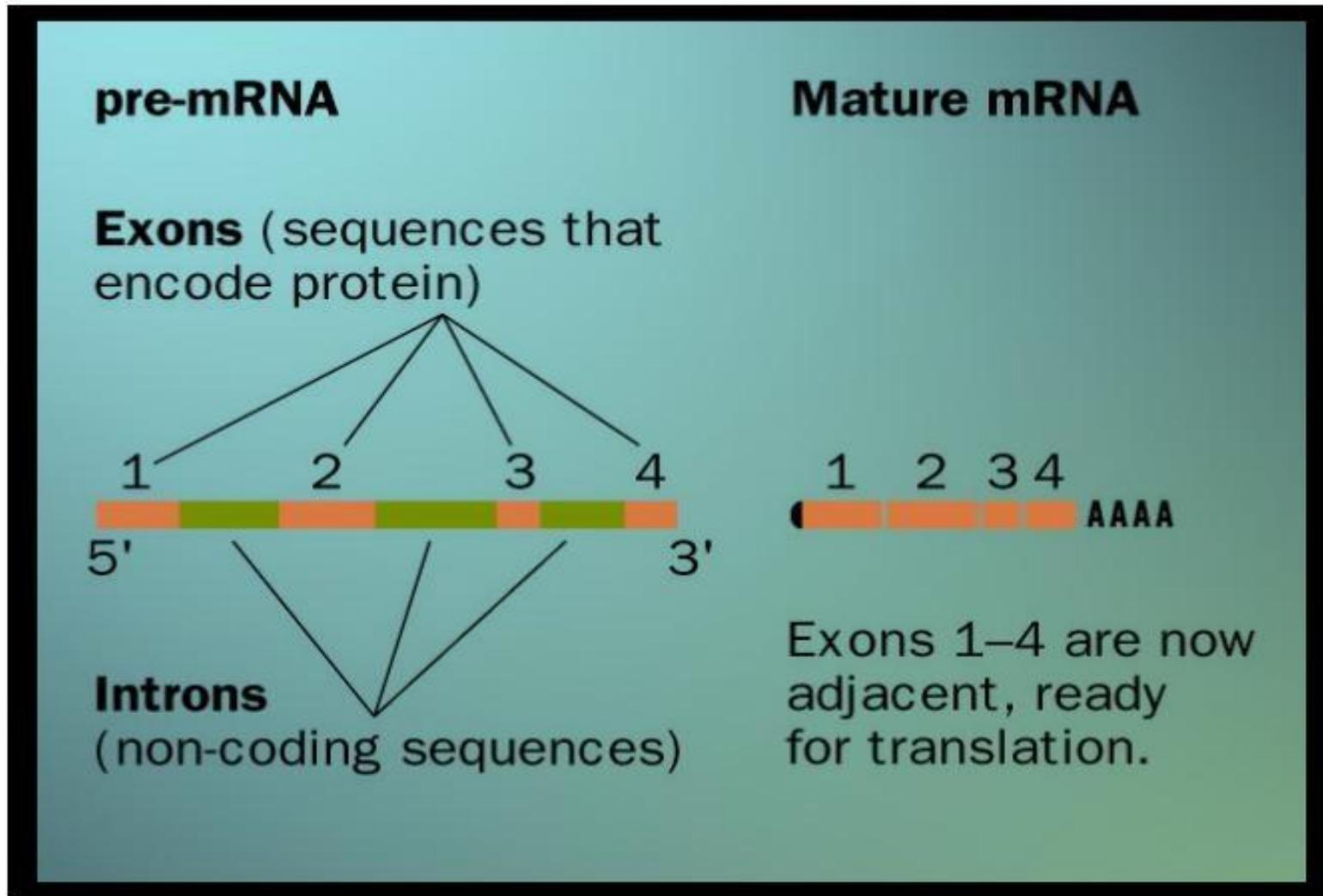
B Если пограничный элемент, например, *gypsy*-инсулятор (красный) расположен между двумя энхансерами, формируется новый хромосомный домен, в результате голубой ген остается в одном, а темно-желтый - в другом домене. Бирюзовый транскрипционный фактор не может действовать на промотор темно-желтого гена в соответствии с локализацией второго *gypsy*-инсулятора. Энхансер может активировать транскрипцию с промотора голубого гена, который остался в том же домене.

Процессинг первичных транскриптов

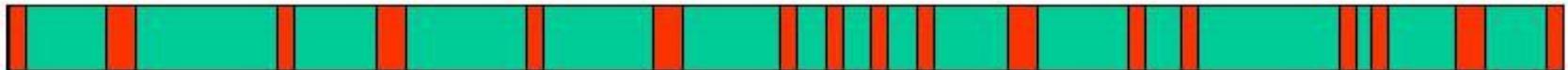
Процессинг (созревание) РНК – совокупность биохимических реакций, в результате которых происходит модификация пре-РНК с образованием зрелых молекул РНК: структурная (уменьшается молекулярная масса) и химическая

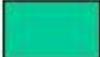


Процессинг



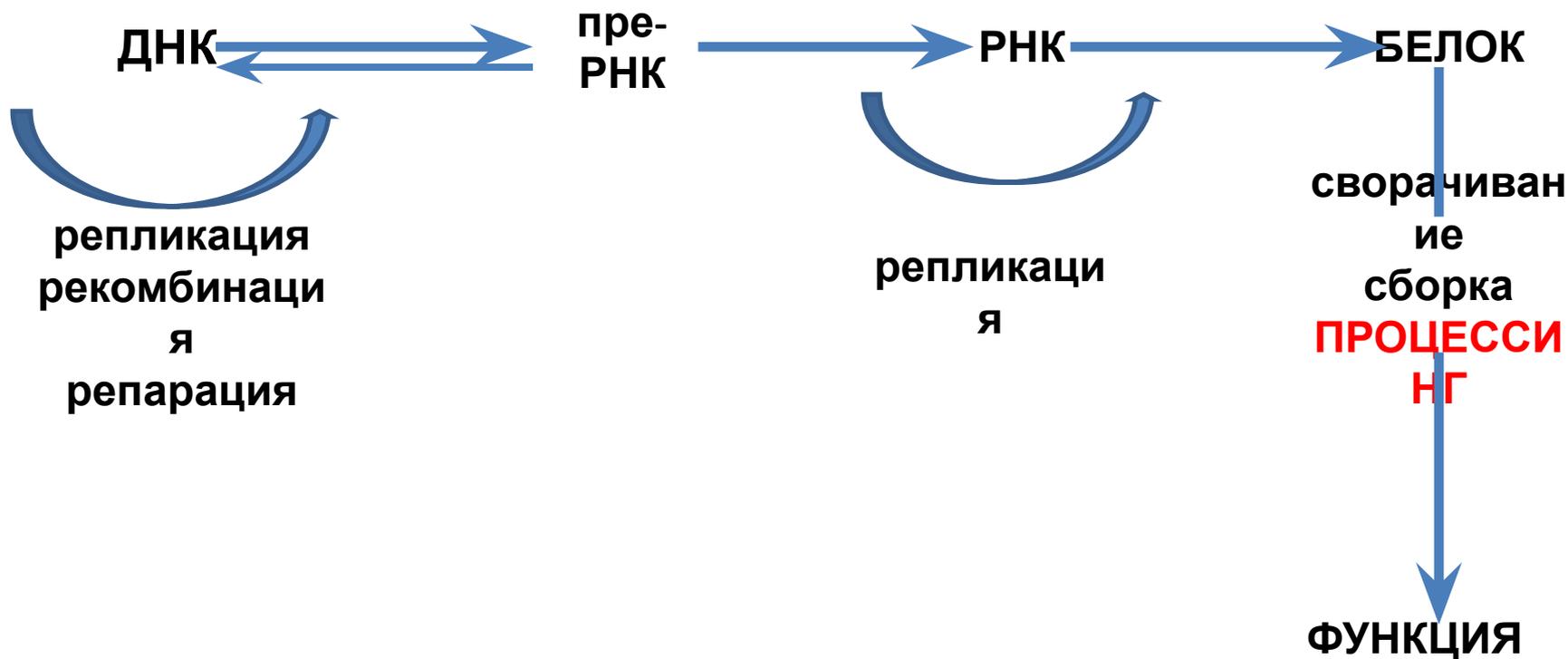
Ген кональбумина



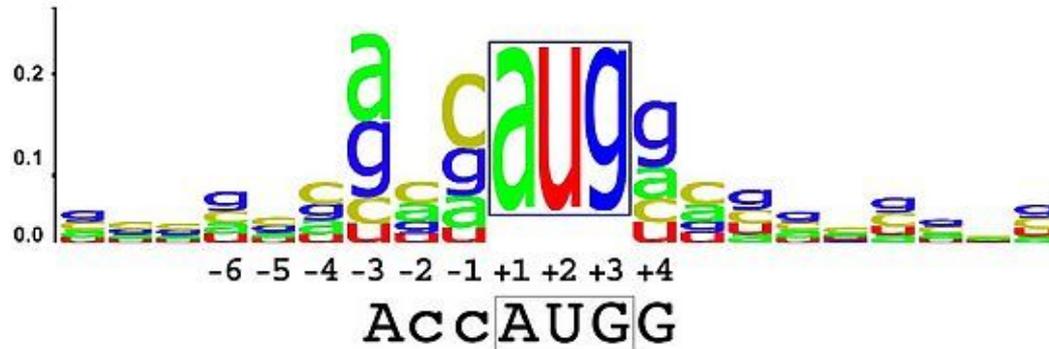
 интроны (7500 пн)

 17 экзонов (2500 пн)

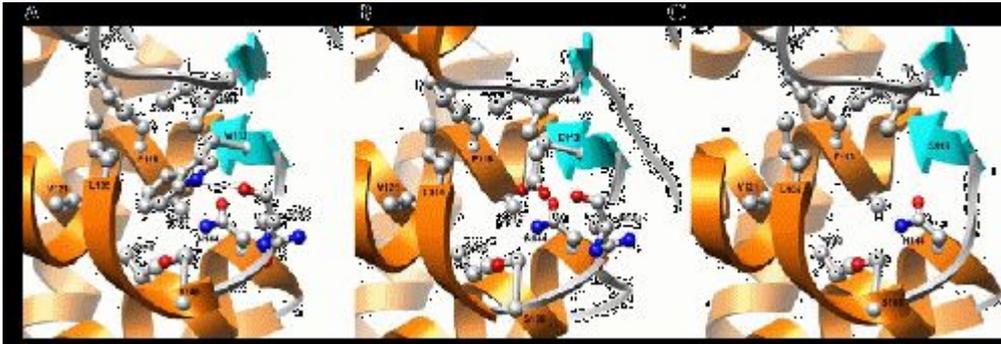
Процессинг РНК как компонент центральной догмы молекулярной биологии



Консенсусная последовательность – последовательность нуклеотидов в составе молекулы иРНК эукариот, окружающая старт-кодон и важная для инициации трансляции. Консенсусная последовательность включает четыре-шесть нуклеотидов, предшествующих старт-кодону, и один-два нуклеотида непосредственно после старт-кодона, впервые описана Мэрилин Козак в 1986 году.



Показаны наиболее консервативные основания, окружающие стартовый кодон в структуре различных мРНК человека.

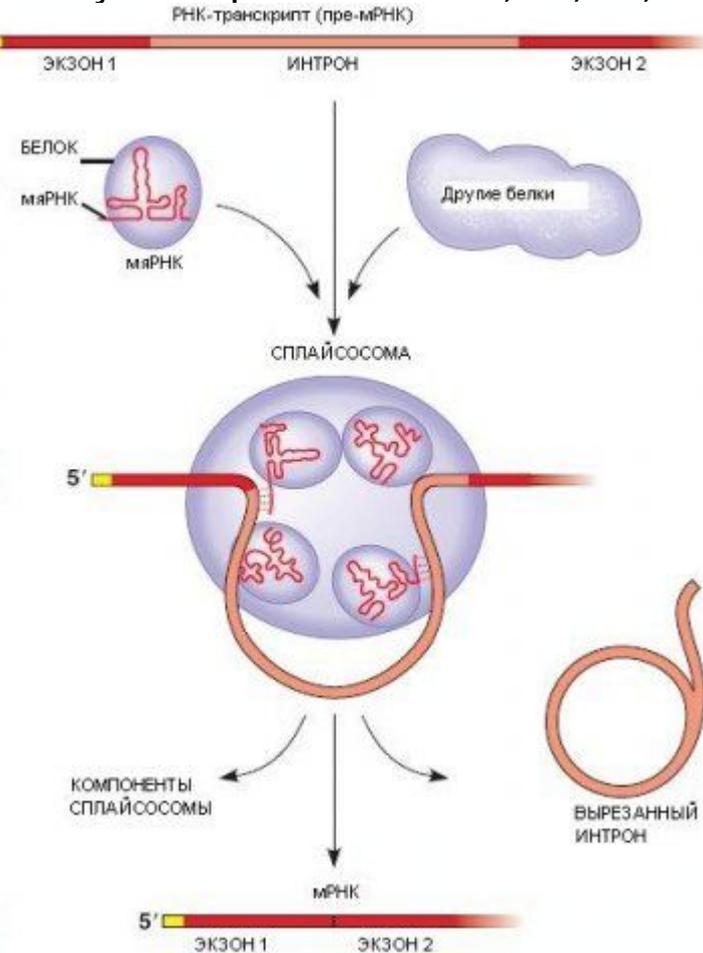
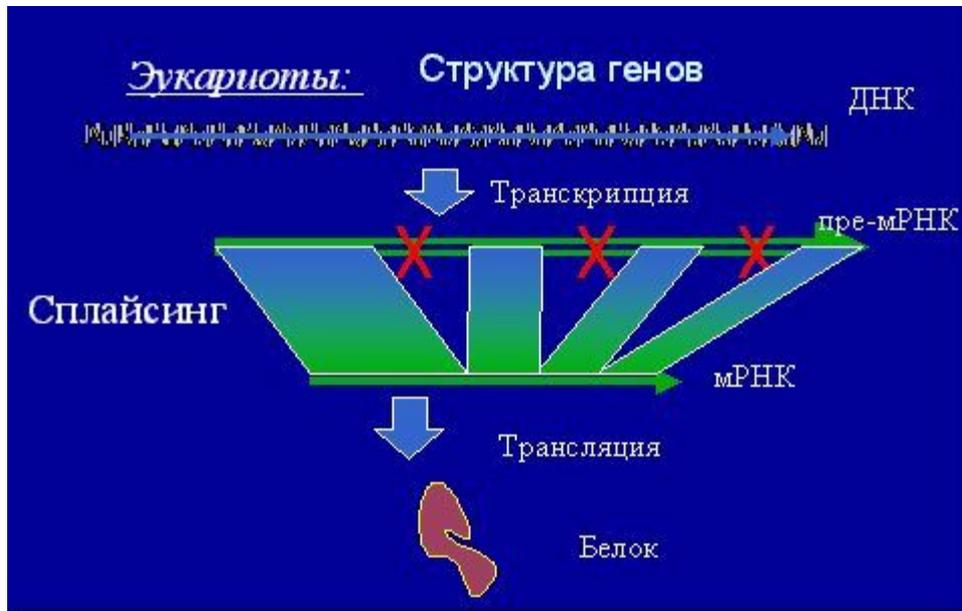


Структуры участков трех типов LcrV *Y. pestis*, примыкающих к аминокислотному остатку 113. "Консенсусная" последовательность белка LcrV содержит в этом положении триптофан (A), а штаммы I-2359 и I-3455 – глютаминовую кислоту (B) или глицин (C), соответственно.

<http://skachate.ru/biolog/3000/index.html?page=2>

Сплайсинг

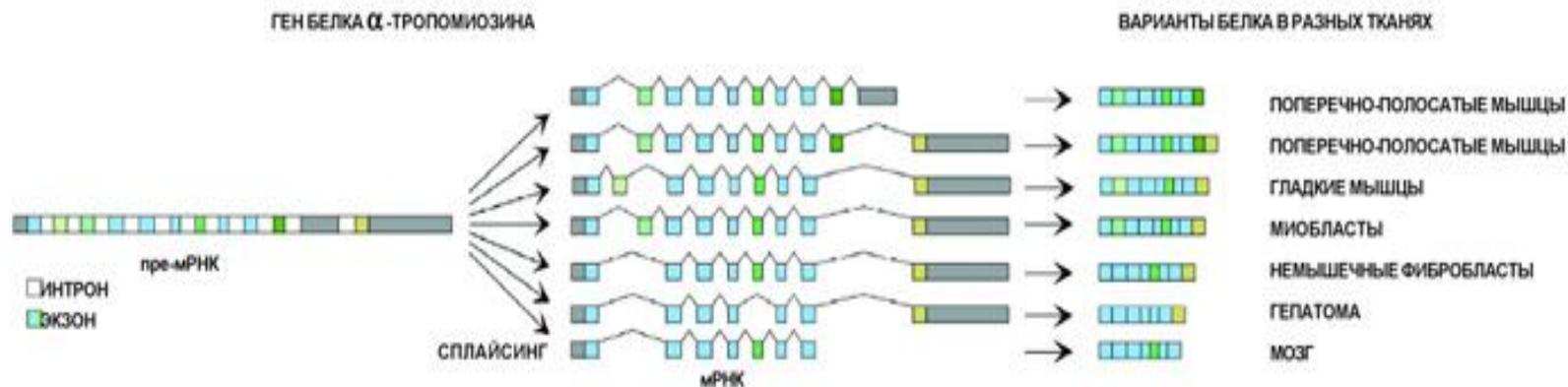
Сплайсосома – структура, состоящая из молекул РНК и белков и осуществляющая удаление некодирующих последовательностей (интронов) из молекулы-предшественника матричной РНК. Этот процесс называется сплайсингом, от англ. splicing – сращивание. Сплайсосому составляют пять малых ядерных рибонуклеопротеинов – U1, U2, U4, U5 и U6 – и несколько дополнительных белковых факт



Альтернативный сплайсинг

Альтернативный сплайсинг:

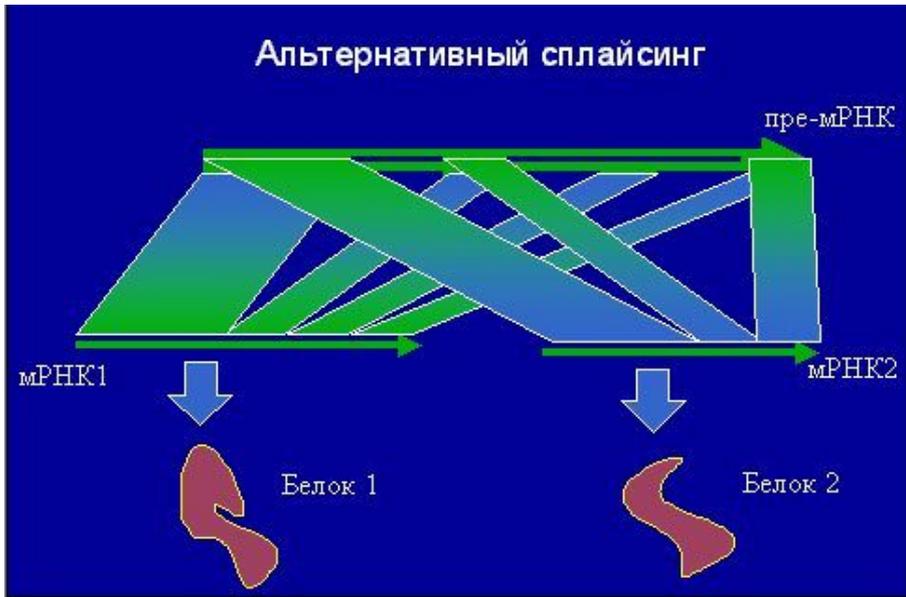
- обеспечивает кодирование одним геном различных конечных продуктов (структурно и, как правило, функционально различающихся полипептидов), что определяется спецификой клетки (ткани), то есть, один ген обеспечивает образование изоформ белка, специфичных для различных конкретных тканей;
- является эффективным и экономичным способом кодирования множества продуктов ограниченным числом нуклеотидов;
- служит одним из механизмов порождения белкового разнообразия у высших эукариот;
- Играет огромную роль в генетическом определении пола



Пример альтернативного сплайсинга у человека.

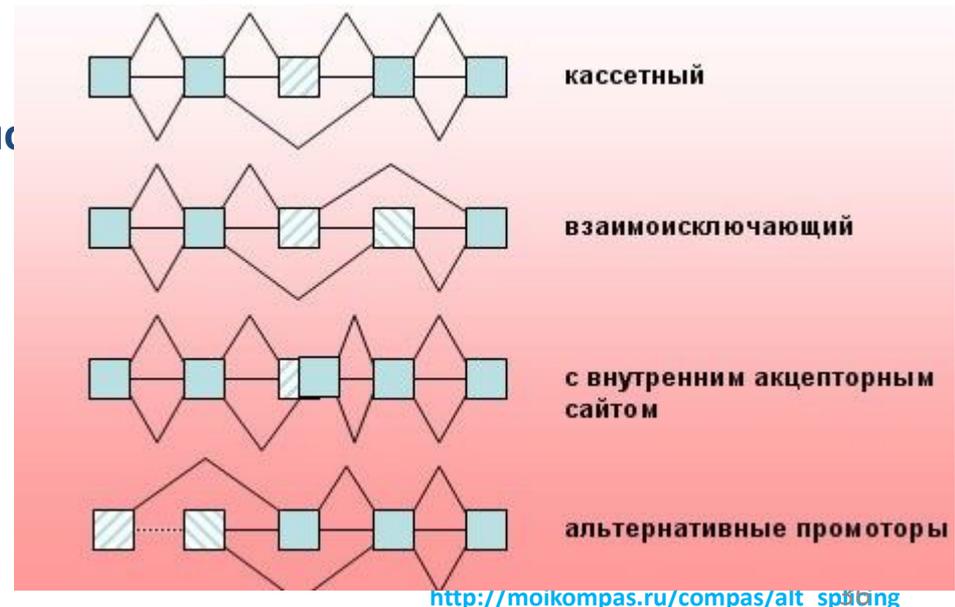
Ген структурного белка тропомиозина даёт начало разным вариантам этого белка, которые синтезируются в разных тканях .

Альтернативный сплайсинг



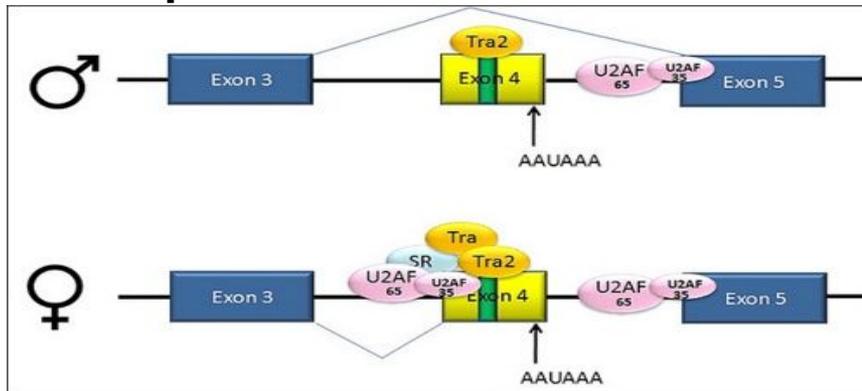
Выделяют типы альтернативного сплайсинга

- кассетный
- взаимоисключающий
- с внутренним акцепторным сайтом
- альтернативные промоторы.



Альтернативный сплайсинг

Альтернативный сплайсинг гена у самца и самки дрозофилы: РНК и белки, которые определяют границы монтируемых участков. Альтернативный экзон показан жёлтым.



Сплайсинг пре-мРНК гена кальцитонина в клетках щитовидной железы и мозга

