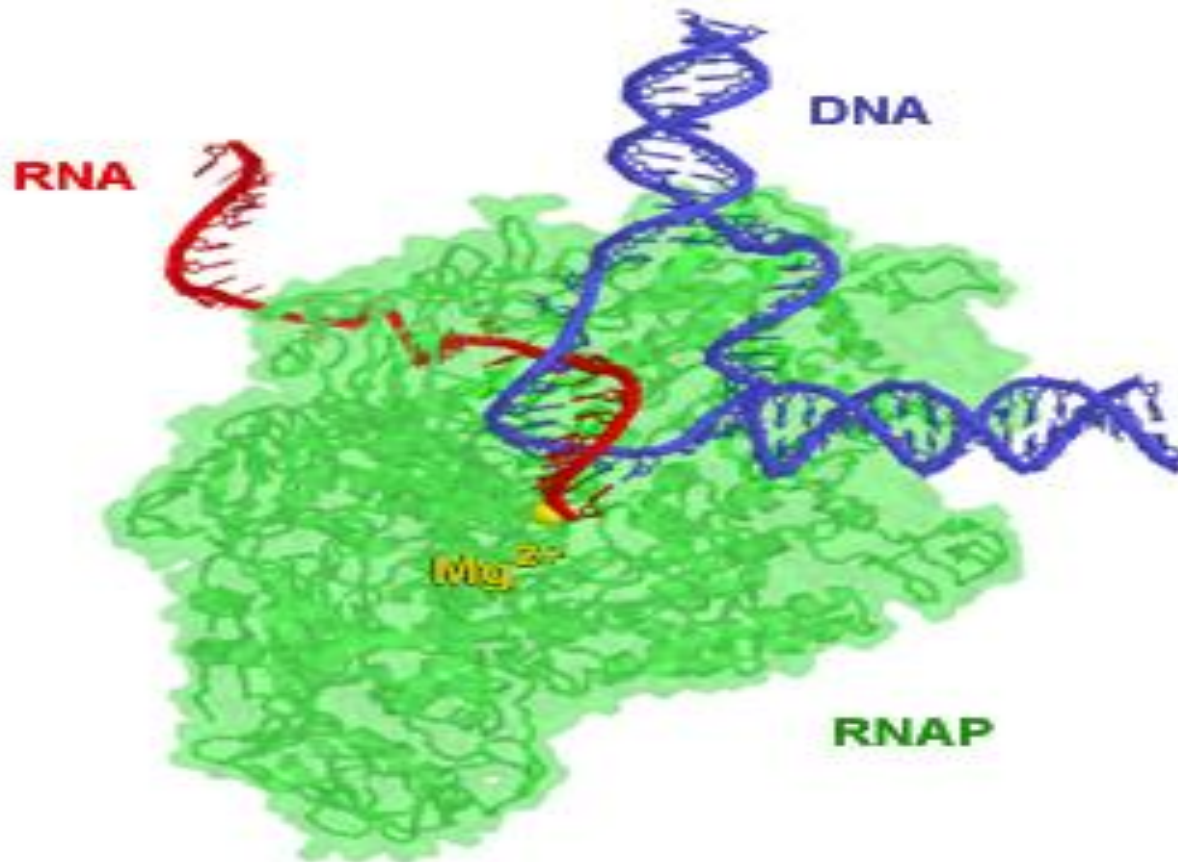


Метаболизм РНК



Транскрипция

- Экспрессия заложенной в гене информации происходит через образование молекулы РНК, транскрибируемой с матрицы ДНК.

- РНК выполняет свои функции в виде одноцепочечных молекул, которые складываются различными способами.
- гораздо более разнообразны (много разных типов).
- Выполняют клеточные функции (хранение и передача информации, катализ, регуляция клеточного метаболизма).

- В 1959 году Нобелевская премия присуждена С.Очоа (Severo Ochoa) и А.Корнбергу (A.Kornberg) за открытие механизма биологического синтеза ДНК и РНК.

Транскрипция

- Транскрипция у эукариот происходит в ядре.
- Транскрипция не связана с фазами клеточного цикла.
- Ускоряется и замедляется в зависимости от потребности клетки или организма в определённой белке.

- **Итальянский нейробиолог Рита Леви-Монтальчини и американский биохимик Стенли Коэн** за открытие факторов роста получили Нобелевскую премию по физиологии и медицине в 1986 году (фактор роста нервов, эритропоэтин, инсулиноподобный фактор).

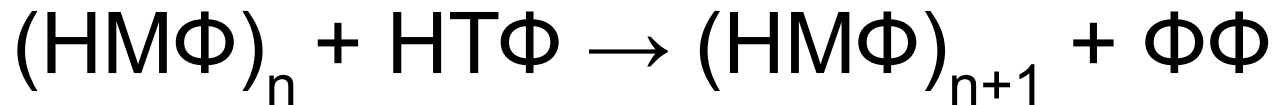
- Транскрибируются отдельные гены или группы генов –**транскриптон**.
- Клетка ограничивает экспрессию генетической информации.
- Вся совокупность молекул РНК, производимых клеткой в определенных условиях, называется **транскриптомом** клетки.

- ДНК-зависимый синтез РНК.
- Транскрипция похожа на репликацию своим механизмом, направлением синтеза (от 5' → 3' концу), наличием матрицы, названием этапов.
- Не требуется праймер.
- Матрицей для каждой конкретной молекулы РНК служит только одна цепь ДНК, которая называется **матричной**, вторая, комплементарная ей цепь, называется **кодирующей**.

Транскрипция

- Транскрипция у *E.coli* осуществляется специальным ферментом **ДНК-зависимой РНК-полимеразой**.
- Рибонуклеозид-5'- трифосфаты -ЦТФ, ГТФ, АТФ, УТФ - субстраты и источники энергии.
- ионы Mg^{+2} , Zn^{+2}

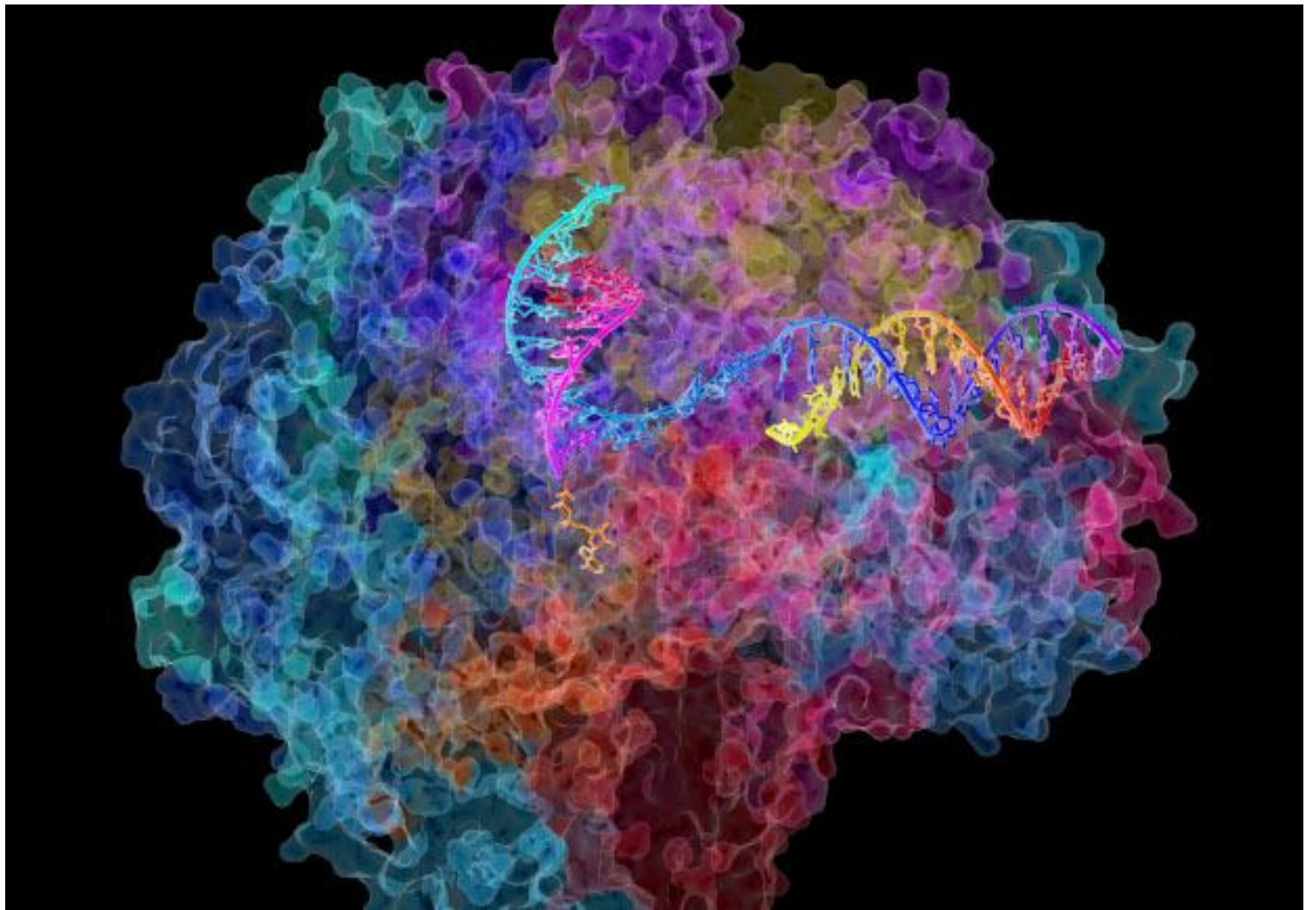
РНК-полимераза удлиняет цепь РНК, добавляя нуклеотиды к 3-гидроксильному концу (нуклеофил, атакует α -фосфат поступающего нуклеотида)



- **ДНК-зависимая РНК-полимераза E.coli** - олигомерный фермент, состоящий из 5-ти субъединиц – $\alpha_2\beta\beta'\omega$ – кор-фермент (Mr = 390 000)
 - **σ -** субъединица (сигма), различной молекулярной массы.

- Все 6 субъединиц ($\alpha_2\beta\beta'\omega + \sigma$ - субъединица) РНК-полимеразы называются **холоферментом**.

- С помощью различных σ - субъединиц клетка может координировать экспрессию под физиологические потребности.
- Какой именно набор генов будет экспрессироваться, зависит от доступности различных σ - субъединиц, что определяется рядом факторов.



- РНК-полимеразы не имеют независимой 3'→5' -экзонуклеазной активности для исправления ошибок, поэтому частота ошибок выше, 1 ошибка на $10^4 - 10^5$ встроенных нуклеотидов.
- Молекулы РНК разрушаются и удаляются.

Транскрипция

- В процессе транскрипции различают стадии:
- **инициации**
- **элонгации**
- **терминации**

- **Процесс инициации транскрипции** состоит из двух основных этапов:
- связывания РНК-полимеразы с ДНК.
- собственно инициация.

- **Первый этап:**
- **σ - субъединица временно связывается с кор-ферментом и в составе холофермента направляет фермент к специфическому участку (последовательности) в молекуле ДНК - промотору.**

- В составе бактериальных промоторов выделяют консервативные последовательности.
- Эти последовательности называют **консенсусными последовательностями** (TATAAT, TTGACA). Расположены на 10 и 35 нуклеотидов левее положения начала транскрипции.

- Эффективность связывания РНК-полимеразы с промотором определяется консенсусными последовательностями, расстоянием между ними и их удаленностью от точки начала транскрипции.

- В состав некоторых промоторов входит богатый АТ основаниями UP-элемент (upstream promoter).
- У *E.coli* α - субъединица РНК-полимеразы связывается с UP-элементом.

- **Промотор** не несет информации и служит для присоединения и ориентации РНК-полимеразы.
- Определяется рамка считывания информации с матрицы ДНК.

- Второй этап инициации:
- в результате холофермент РНК-полимераза связывается с ДНК (интактная) и образуется закрытый промоторный комплекс, в котором ДНК остается в двухцепочечном виде.

- **Закрытый промоторный комплекс:**
- В результате раскручивания цепей ДНК разрываются водородные связи между парами нуклеотидов ДНК и образуется открытый транскрипционный комплекс
- процесс синтеза коротких фрагментов РНК (2-9 нуклеотидов).
-

- Эти короткие фрагменты РНК провоцируют разрыв контактов РНК-полимеразы с промотором.
- σ - субъединица отсоединяется и замещается белком NusA, а σ - субъединица спонтанно диссоциирует.
- Транскрипция переходит в стадию элонгации.

- На стадии элонгации кор-фермент РНК-полимераза осуществляет поэтапное присоединение нуклеотидов, комплементарных матричной цепи ДНК.
- Комплекс РНК-полимераза с ДНК и синтезируемой РНК называется **элонгационный комплекс.**

- Механизм присоединения нуклеотидов:
- связывание входящего нуклеотида.
- если нуклеотид комплементарен нуклеотиду матричной цепи ДНК, то активный центр закрывается.
- катализ синтеза фосфодиэфирной связи, освобождение пирофосфата.

- Транслокация: перемещение РНК-полимеразы на 1 нуклеотид вперед по матрице ДНК.
- Присоединение следующего нуклеотида.
- Элонгация цепей РНК ингибируется антибиотиком **актиномицином D**, **акридином**.

- **Рифампицин** связывается с β -субъединицей бактериальной РНК-полимеразы, препятствуя высвобождению промотора при транскрипции.

Терминация

- *E. coli* имеет два типа сигналов терминации:
- зависимый от присутствия ρ -белкового фактора
- ρ -независимый

- ρ-независимые терминаторы имеют два свойства:
- первое: содержат последовательность, транскрипт которой имеет комплементарные участки, образующие структуры в виде шпильки (G/C богатую), расположенные на расстоянии 15-20 нуклеотидов от дальнего конца цепи РНК.

- Во-вторых: их матричная цепь содержит консервативную последовательность из трех остатков А, которые при транскрипции превращаются в остатки U вблизи 3' - конца шпильки.

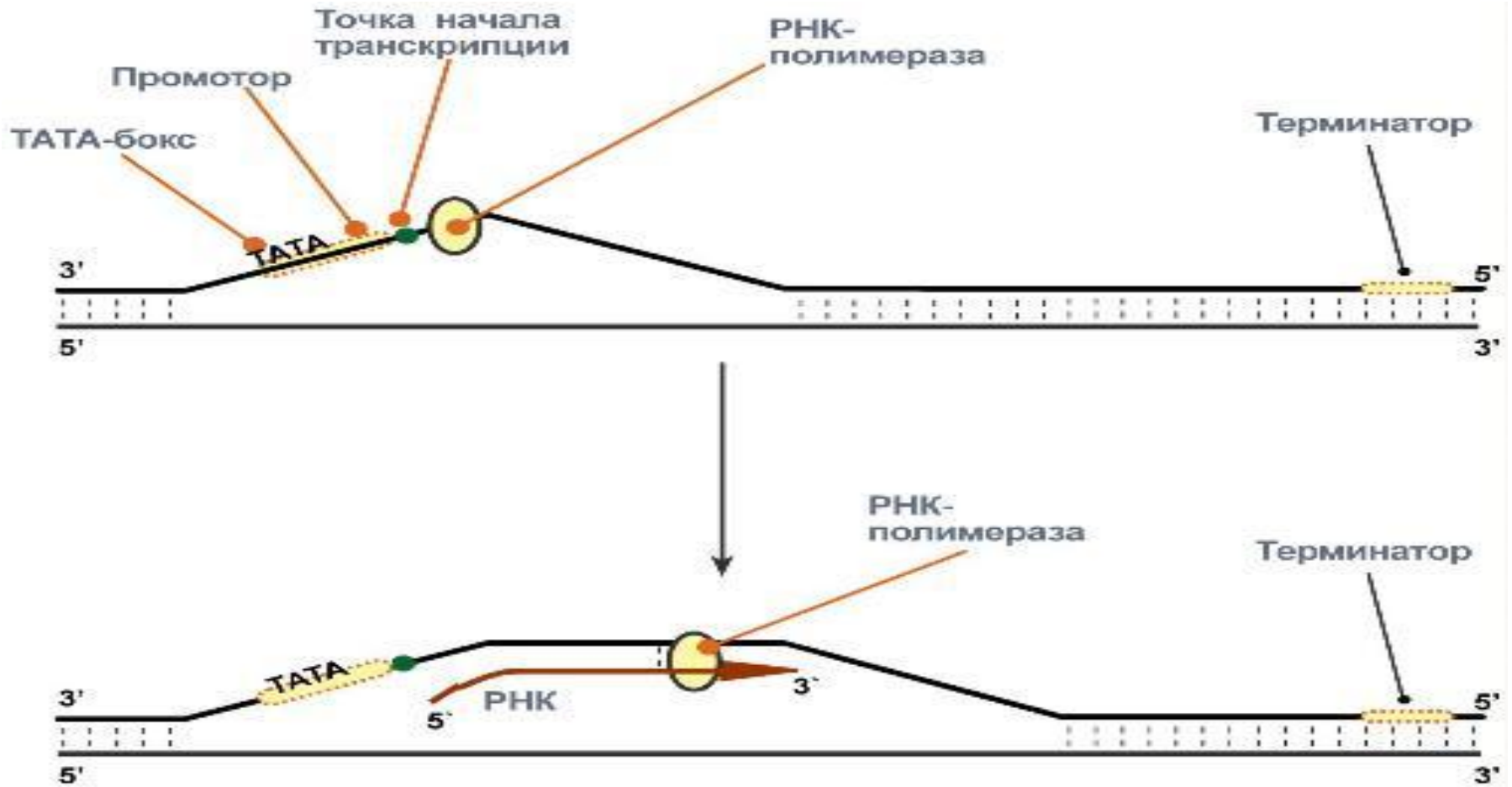
- Взаимодействие новосинтезированного олиго U-участка РНК с РНК-полимеразой приводит к возникновению транскрипционных пауз.
- За это время успевает сформироваться шпилька, что приводит к диссоциации элонгационного комплекса.

- Синтез ~80% транскриптов E.coli терминируется по ρ -независимому пути.
- **ρ -зависимый путь:** необходим **ρ -фактор** – гомогексамерный белок, обладающий АТФ-зависимой хеликазной и транслоказными активностями, позволяющими перемещаться белку вдоль РНК и при терминации осуществлять гидролиз АТФ.

- ρ-фактор связывается с РНК в специальных пиримидин-богатых сайтах RUT (Rho utilization) и движется в направлении 3' – конца молекулы.
- ρ-фактор ингибируется выделяющимся пирофосфатом при реакции синтеза молекулы РНК.

- ρ -фактор настигает транскрипционный комплекс на сайте терминации, пирофосфат перестает выделяться, ρ -фактор гидролизует АТФ, после чего происходит диссоциация элонгационного комплекса и высвобождение РНК-транскрипта.

Транскрипция



- В клетках эукариот обнаружено 3 вида **РНК-полимераз (I, II, III)**.
- состав комплекса
- каждая полимераза выполняет особые функции и присоединяется к специфической промоторной последовательности.

- **POL I** – синтез прерибосомной РНК (пре-рРНК)
- **POL II** – синтез мРНК
- промоторы **POL II** обладают несколькими общими свойствами, содержат ТАТА бокс (консенсусная последовательность ТАТААА) – точка сборки преинициаторных комплексов.

- **POI III** образует молекулы тРНК, 5S рРНК и другие небольшие специализированные молекулы РНК.

- **POI II** играет ведущую роль в экспрессии эукариотических генов.
- состоит из 12 субъединиц ($M_r = 10\ 000-220\ 000$).

- RVP1 – гомология с β' - субъединицей прокариотической РНК-полимеразы.
- RVP2 – гомология с β - субъединицей прокариотической РНК-полимеразы.
- 2RVP3 – гомология с α_2 - субъединицей прокариотической РНК-полимеразы.

- Для формирования активного транскрипционного комплекса POL II нуждается в ряде белков – факторы транскрипции (TF II) для каждого промотора POL II.
- Консервативны у всех эукариот.

ИНИЦИАЦИЯ

- ТАТА-связывающий белок (ТВР) взаимодействует с ТАТА-боксом.
- ТВР связывается с фактором транскрипции ТFIIB, который связывается с ДНК.
- образуется комплекс ТFIIB- ТВР на ДНК.

- комплекс TFIIВ- ТВР связывается с другим комплексом TFIIF- РОL II.
- TFIIF помогает точной стыковке РОL II и с промотором.
- Присоединяются TFIIЕ и TFIIН и образуется закрытый комплекс.

- ТFIИН обладает хеликазной активностью и начинает раскручивание ДНК вблизи точки начала транскрипции РНК, гидролизуя АТФ.
- Образуется открытый комплекс. Входит в его состав более 30 полипептидов.
- Фосфорилирование РOL II протеинкиназами и ТFIИН.

- Фосфорилирование РОР II приводит к конформационным изменениям и инициирует транскрипцию.
- По мере синтеза первых 60-70 нуклеотидов сначала из комплекса выходит ТФИЕ, потом ТФИИ и РОР II начинает стадию элонгации.

- На стадии элонгации TFIIF- POL II остаются в комплексе.
- Усиливается факторами элонгации, которые препятствуют остановке транскрипции.
- Вовлечены в посттранскрипционный процессинг молекул РНК.

- В фазе терминации **POI II** освобождается, дефосфорилируется, и может участвовать в **НОВОМ СИНТЕЗЕ**.

- Бледная поганка синтезирует α -аманитин, который прерывает образование мРНК в клетках, блокируя **POL II**, а в высоких концентрациях и **POL III**.
- Интересно, **POL I**, бактериальная **РНК-полимераза** и **РНК-полимераза II** самого гриба нечувствительны к этому яду.

Процессинг РНК

- Многие молекулы РНК бактерий и практически все молекулы РНК эукариот после синтеза подвергаются процессингу.

процессинг матричной РНК

- **Модификация 5'-конца:**
- Модификации пре-мРНК начинаются на стадии элонгации. Когда длина первичного транскрипта достигает примерно 30 нуклеотидных остатков, происходит кэпирование его 5'-конца – метилирование гуанина. Осуществляет кэпирование гуанилилтрансфераза.

процессинг матричной РНК

- Модифицированный 5'-конец удлиняет время жизни мРНК, защищая её от действия 5'-экзонуклеаз в цитоплазме.
- Кэпирование необходимо для инициации синтеза белка, так как иницирующие триплеты АУГ, ГУГ распознаются рибосомой только если присутствует кэп.
- Наличие кэпа также необходимо для работы сложной ферментной системы, обеспечивающей удаление интронов.

процессинг матричной РНК

- **Модификация 3'-конца**
- 3'-конец большинства транскриптов, также подвергается модификации, при которой специальным ферментом полиА-полимеразой формируется полиА-последовательность (полиА- «хвост»), состоящая из 100-200 остатков адениловой кислоты.

процессинг матричной РНК

- полиА- «хвост» эукариот защищает мРНК от ферментативного расщепления.
- Многие молекулы мРНК прокариот имеют полиА- «хвост», но это стимуляция распада мРНК.
- Наличие полиА-последовательности на 3'-конце облегчает выход мРНК из ядра и замедляет её гидролиз в цитоплазме.

- Первичные транскрипты эукариот строго комплементарны матрице (ДНК), содержат как экзоны, так и интроны.
- обычно содержат один ген, но последовательности, кодирующие полипептид, могут быть разделены **некодирующими фрагментами – интронами.**
- **кодирующие фрагменты – экзоны.**

- первичные транскрипты прокариот также могут содержать интроны (бактерии, археи).

- в процессе **сплайсинга** («сплайсинг» от англ, to splice - сращивать) интроны удаляются из первичного транскрипта, а экзоны соединяются с образованием непрерывной последовательности, зрелой функциональной РНК.

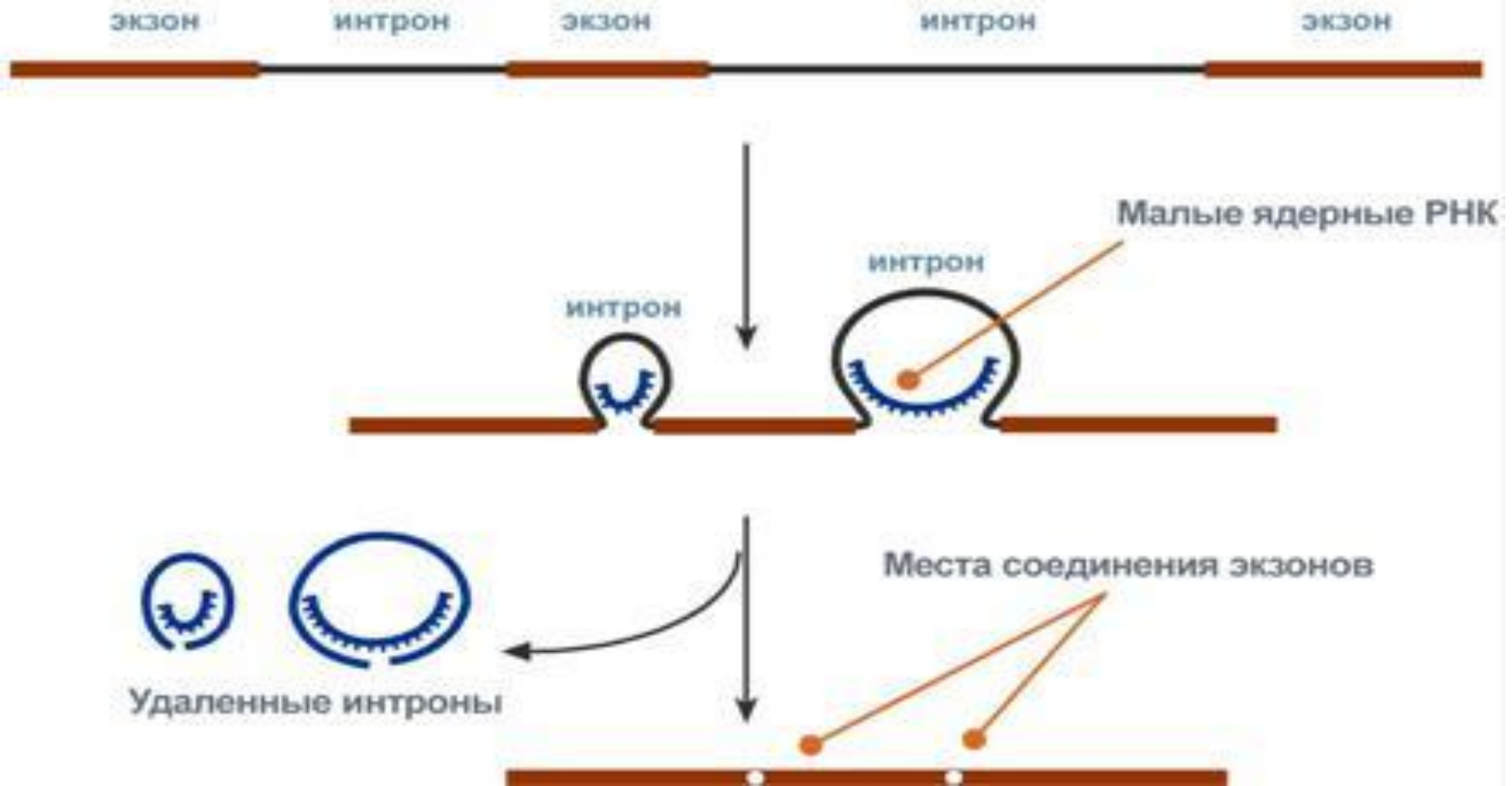
процессинг матричной РНК

- сплайсинг происходит в ядре, в цитоплазму поступает уже "зрелая" мРНК
- некоторые реакции процессинга катализируют каталитические РНК – **рибозимы.**

аутосплайсинг

- Процесс "вырезания" некоторых интронов протекает при участии самих РНК.
- впервые это было обнаружено Томасом Чеком в 1982 году.

Сплайсинг



- Большинство интронов являются **сплайсосомными интронами.**
- Удаление происходит и катализируется внутри крупного белкового комплекса **сплайсосомы.**

- **Сплайсосома** состоит из специализированных РНК-белковых комплексов – **малых ядерных рибонуклеопротеинов (мяРНП)**.
- Каждый **мяРНП** содержит одну молекулу эукариотической РНК (100-200 нуклеотидов).

- В реакциях сплайсинга участвуют 5 мяРНК (ядро эукариот) и примерно 50 белков.
- Белки и РНК в мяРНК высококонсервативны у всех эукариот.
- Часть белков участвует и в других процессах, кроме сплайсинга (перенос мРНК в цитоплазму, трансляция и расщепление мРНК).

- на 5' конце сплайсосомные интроны имеют GU-последовательность.
- на 3' конце – AG-последовательность.
- Эти последовательности указывают место сплайсинга.

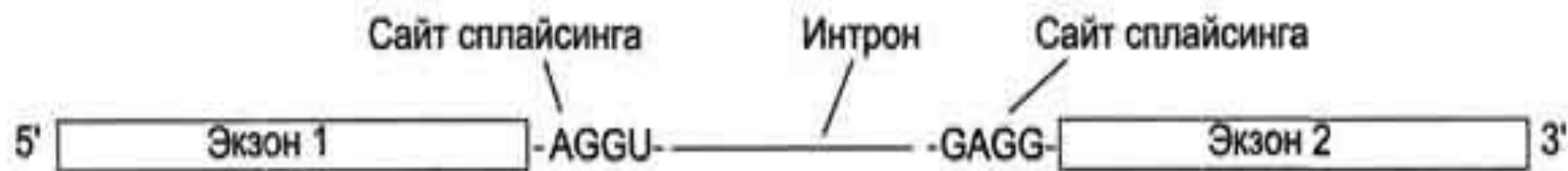
- Сложность организмов не коррелирует с количеством генов, кодирующих белки.
- Из некоторых транскриптов эукариотических мРНК образуется только одна зрелая мРНК и один соответствующий полипептид.

Альтернативный сплайсинг

- В результате процессинга могут образовываться различные мРНК из первичного транскрипта.
- Первичный транскрипт содержит молекулярные сигналы для всех альтернативных путей процессинга, предпочтительный путь определяется факторами процессинга – РНК-связывающими белками, которые запускают один конкретный путь.

- Альтернативные варианты сплайсинга РНК могут использоваться для одновременного синтеза двух разных гормонов:
- кальцитонин (обмен кальция) в щитовидной железе крысы.
- пептид, связанный с обменом кальцитонина в мозге у крысы.

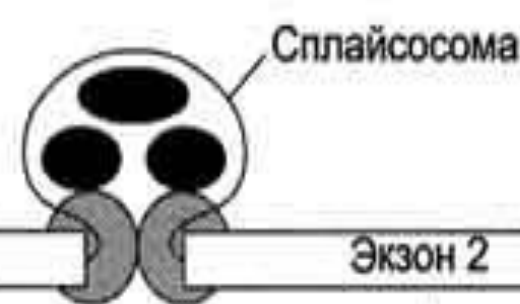
- Многие гены у млекопитающих подвергаются альтернативному сплайсингу, что значительно увеличивает количество кодируемых генами белков.



Формирование сплайсосомы

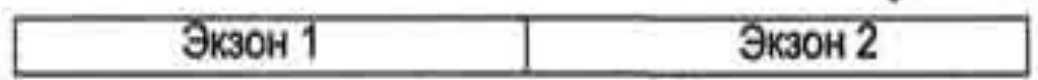
↓ мяРНП

↓ мяРНП



«Вырезанный» интрон

↙ ↓ ↘ мяРНП



«Зрелая» мРНК

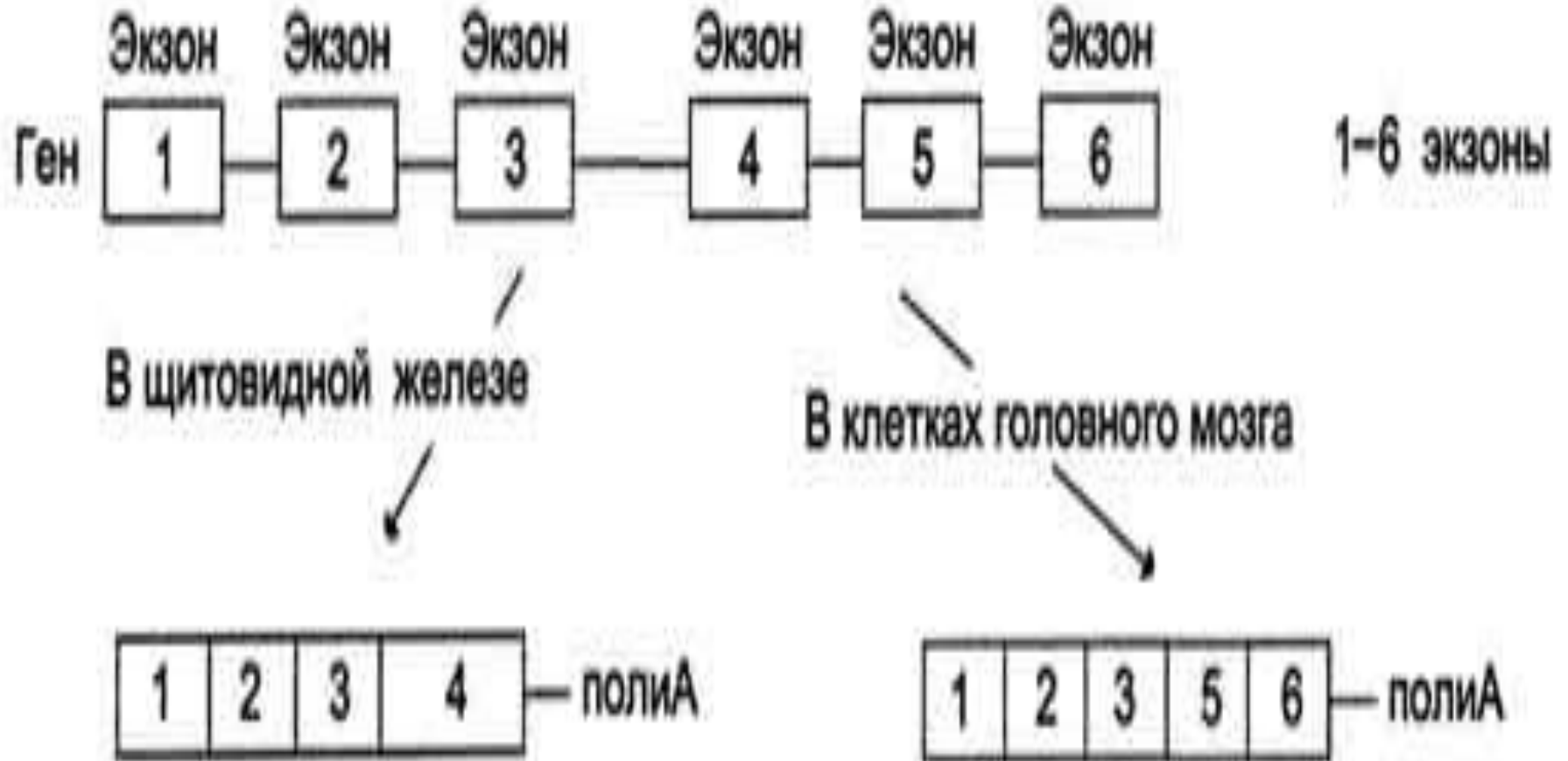
- Число идентифицированных классов специализированных РНК быстро растет: малая ядерная РНК, малая ядрышковая РНК, микро-РНК, малые интерферирующие РНК.
- микро-РНК (22 нуклеотида) участвуют в регуляции экспрессии генов. Комплементарны определенным участкам мРНК.

- Регулируют функции мРНК путем ее расщепления или подавления ее трансляции.
- Обнаружены у многоклеточных эукариот, в том числе и у человека.

Сплайсинг

- Нобелевская премия 1993 года была присуждена Р.Дж. Робертсу и Ф.А.Шарпу (Richard J.Roberts, Philip A.Sharp) за открытие расщепленных генов

Альтернативный сплайсинг



Регуляция транскрипции

- Потребности в продуктах любых генов изменяются в зависимости от состояния клетки и стадии развития.
- Транскрипция каждого гена строго регулируется, чтобы обеспечить синтез конкретного продукта в строго определенном количестве.

- Транскрипция – первая стадия в сложном и энергозатратном процессе синтеза белка, поэтому регуляция концентрации белков у бактерий и у эукариот часто осуществляется на уровне транскрипции, особенно на ранних ее стадиях.

- регуляция может происходить на любой стадии транскрипции, но чаще на стадии связывания РНК-полимеразы и инициации транскрипции.
- Какой именно набор генов будет экспрессироваться, зависит от доступности различных σ -субъединиц, что определяется рядом факторов.

- регулируемой скоростью синтеза и деградации РНК.
- постсинтетическими модификациями, переводящими σ - субъединицу из активной формы в неактивную и обратно.

- **специализированным классом анти σ -белков, связывающихся с определенным типом σ -субъединиц и делающих их недоступными для инициации транскрипции.**

- Решающим фактором, управляющим экспрессией генов является концентрация в клетке соответствующей мРНК, что определяется скоростью ее синтеза и распада.

- Скорость расщепления мРНК разных эукариотических генов различаются- от нескольких секунд до нескольких суток.
- Среднее время полужизни мРНК в клетках позвоночных 3 часа, бактериальной мРНК около 1,5мин.

- мРНК разрушается рибонуклеазами, присутствующими во всех клетках.
- Структура бактериальной мРНК с ρ-независимым терминатором обеспечивает защиту от расщепления.
- В клетках эукариот важное значение для стабильности мРНК имеют 3'-полиА-«хвост» и 5' кЭП.



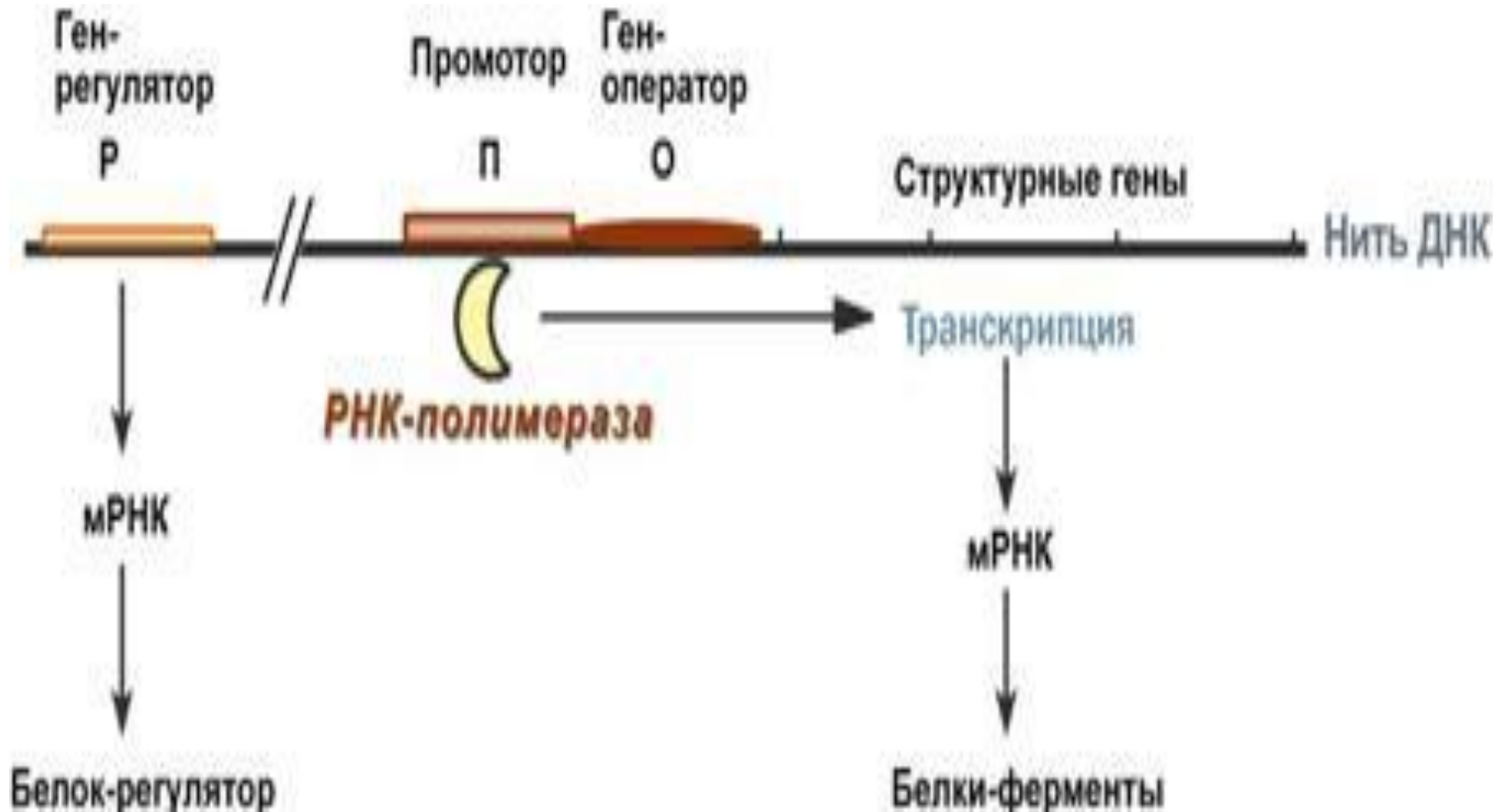
Спасибо за внимание



Транскрипция

- Транскрипция ДНК происходит отдельными участками, в которые входит один или несколько генов - **транскриптон**
- Каждый ген состоит из гена-регулятора
- Структурные гены - записана информация о структуре белка

Транскрипция



Транскрипция

- Транскриптон бактерий называется **опероном**

