

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА

Транскрипция у эукариот

Лекция 8

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА. ТРАНСКРИПЦИЯ РНК ЭУКАРИОТ

Словарик



Словарик

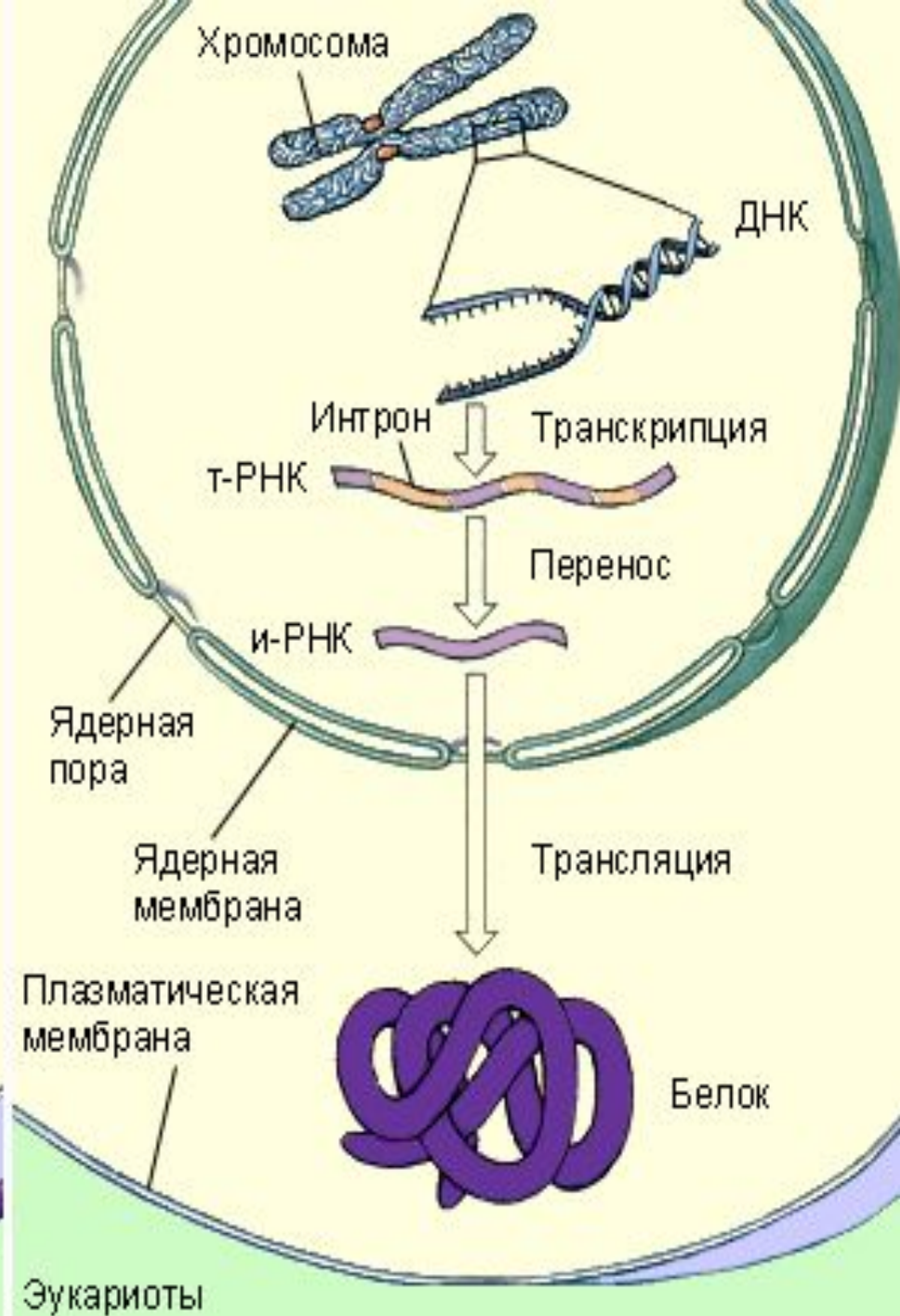
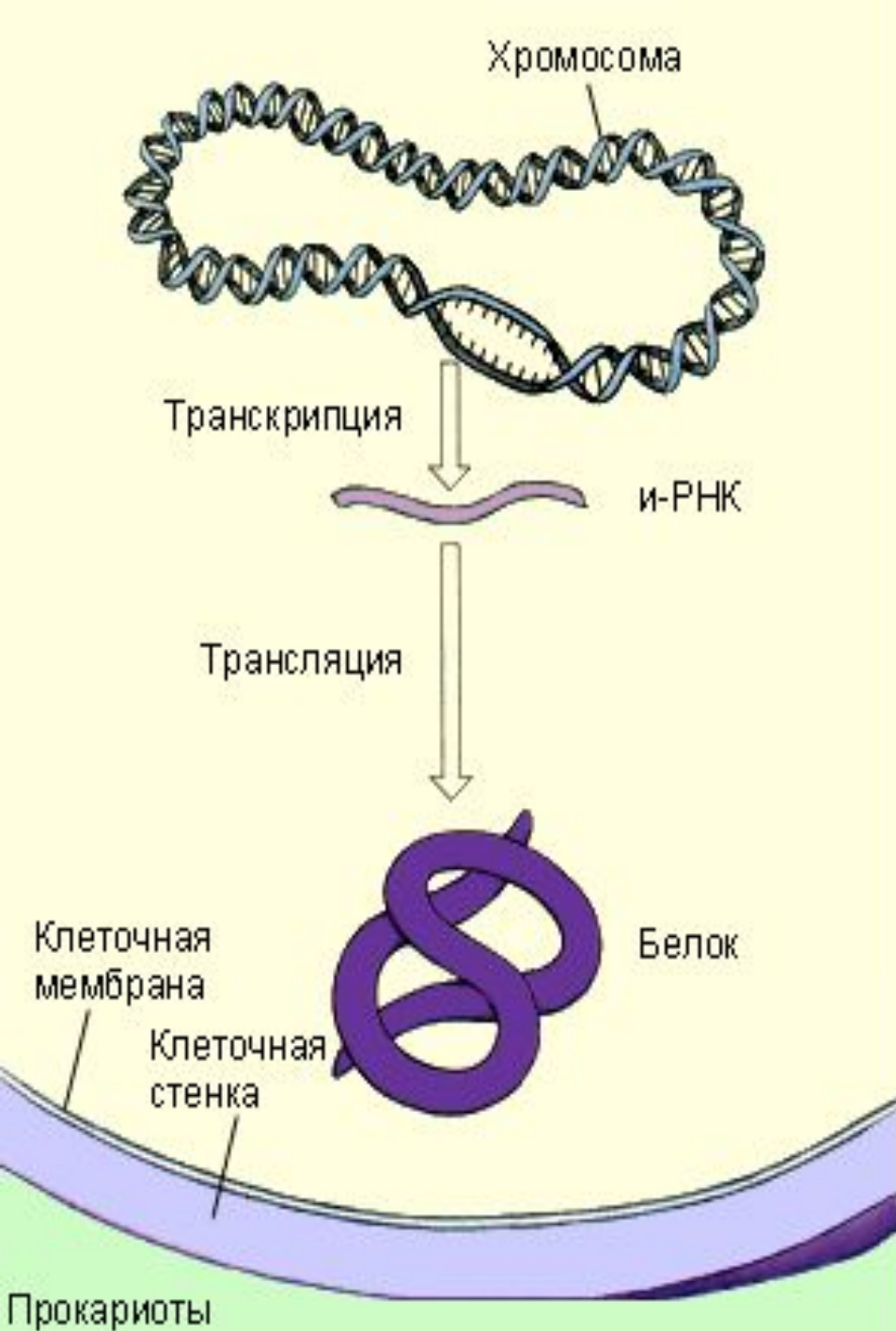
Фосфорилирование – процесс переноса остатка фосфорной кислоты от фосфорилирующего агента-донора к субстрату, катализируется киназами

Ацетилирование – замещение атомов водорода в органических соединениях остатком уксусной кислоты CH_3CO (ацетильной группой), катализируется ацетилтрансферазами

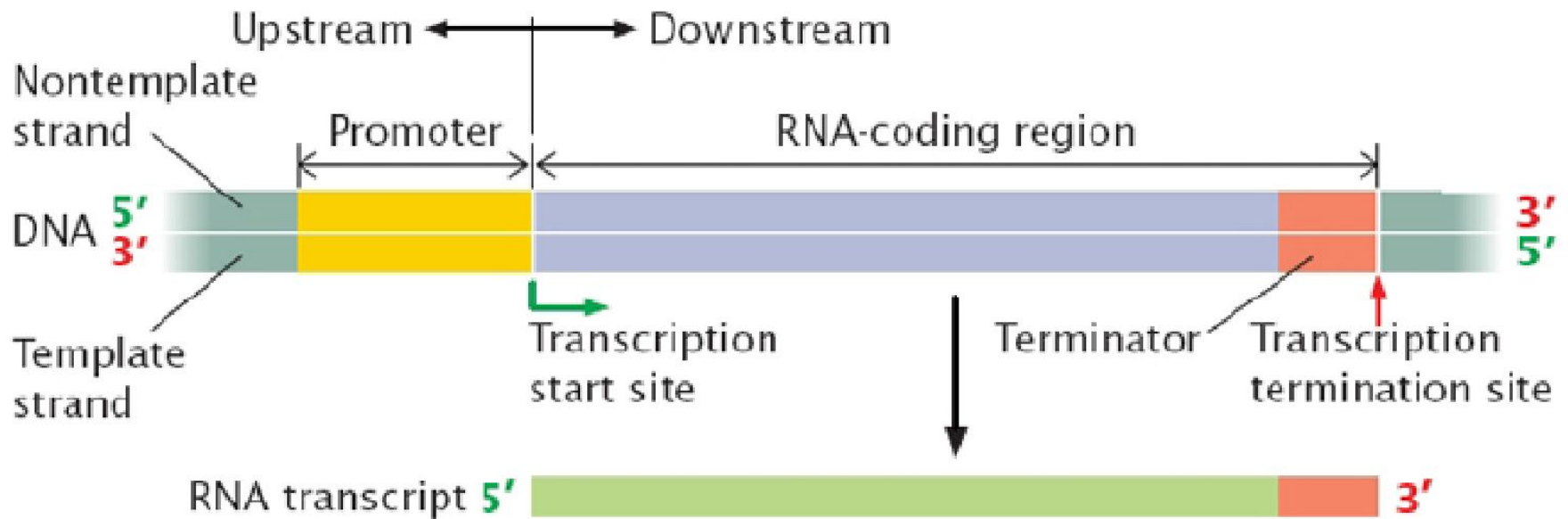
Энхансеры – последовательности ДНК, усиливающие транскрипцию при взаимодействии со специфическими белками

Сайленсеры – последовательности ДНК репрессирующие активность генов, ослабляющие транскрипцию при взаимодействии с белками

Инсуляторы – последовательности ДНК, определяющие специфичность действия энхансеров и сайленсеров



Обозначения структурных элементов транскриптона



Особенности транскрипта эукариот

1

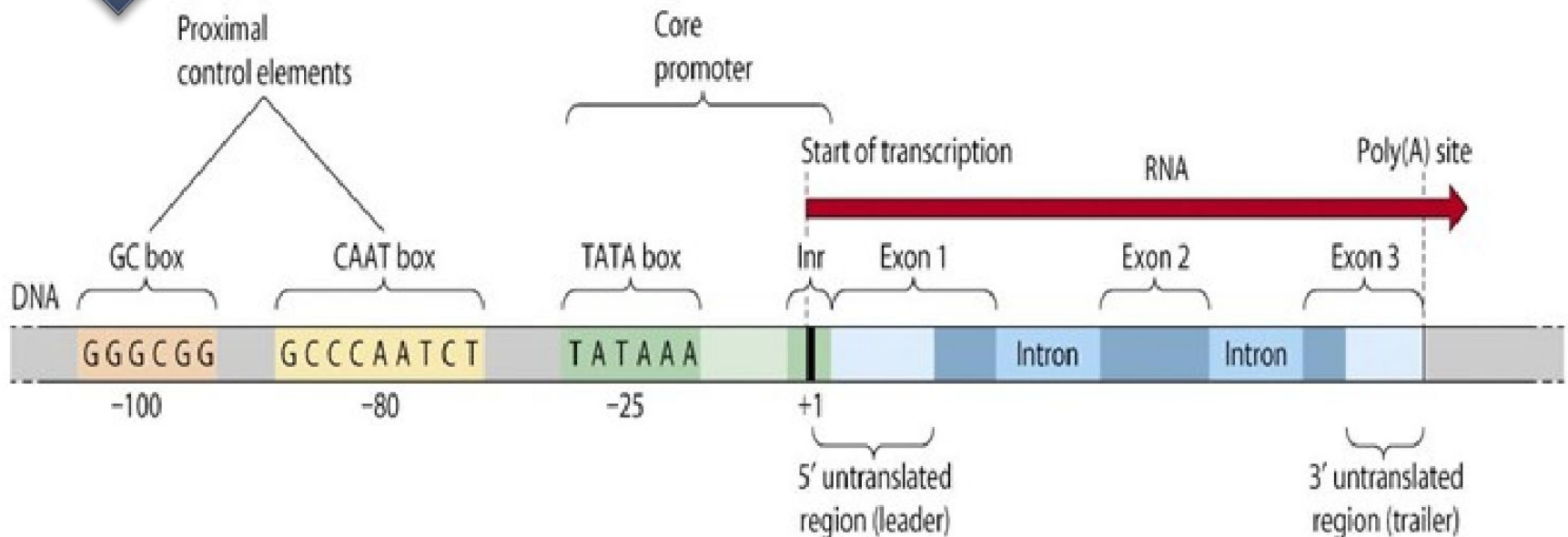
- единица транскрипции – ген

2

- оператор отсутствует

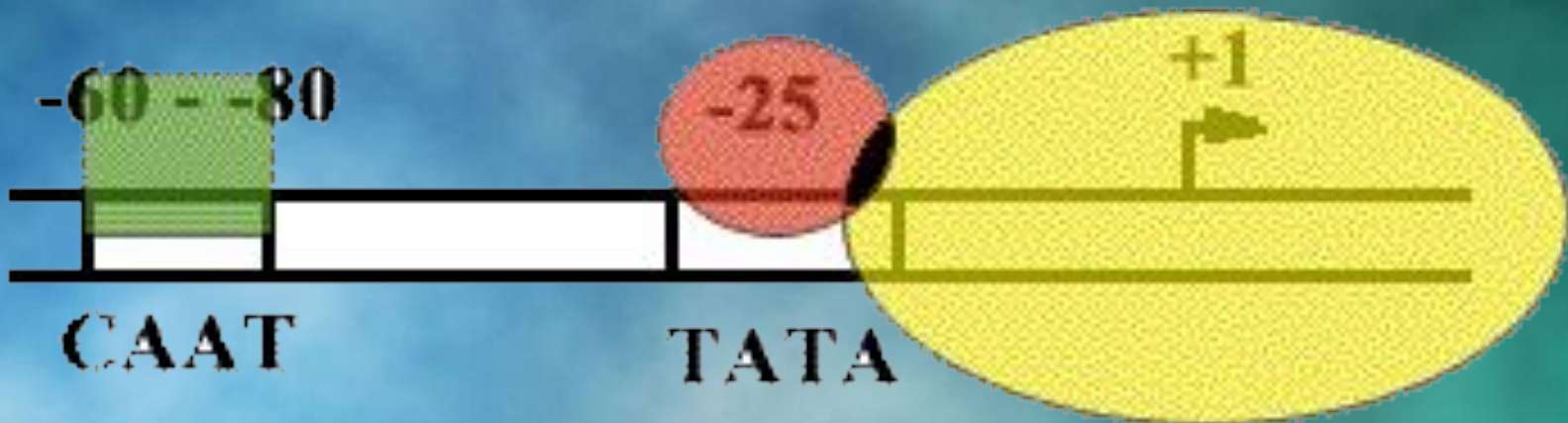
3

- иная структура промотора



Структура промотора эукариот

- На расстоянии -25 п.н. от +1 нукл. находится ТАТА-бокс, его позиция определяет точку инициации транскрипции
- На расстоянии -60-80 п.н. находится ЦААТ-бокс
- Расстояние между ЦААТ и ТАТА большое и РНК-полимераза не способна накрыть всю эту область. ЦААТ опознается своим белком, а ТАТА - своим.



МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА. ТРАНСКРИПЦИЯ РНК ЭУКАРИОТ

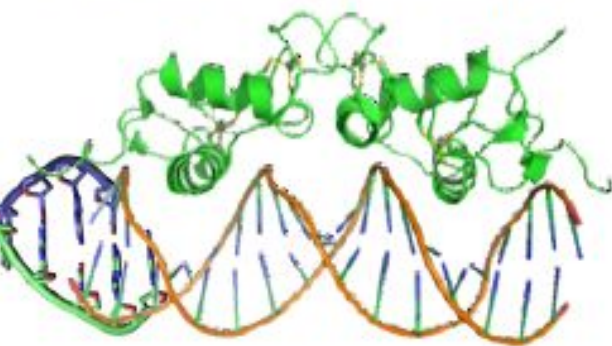
Факторы транскрипции эукариот



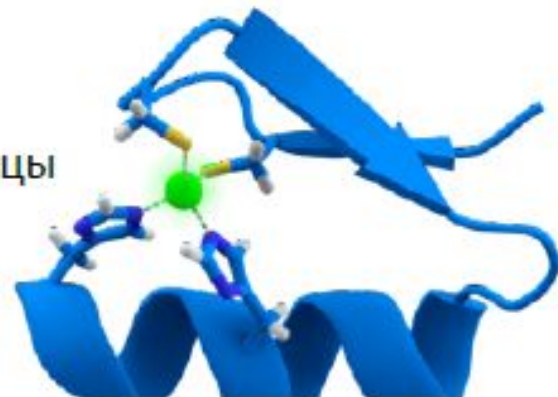
Основные ДНК-связывающие белки



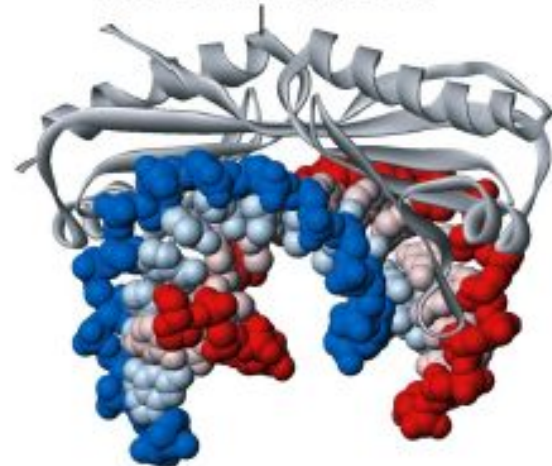
Спираль-поворот-спираль



Цинковые пальцы



Домен ТВР,
связывающийся с малой
бороздкой ДНК
TATA box-binding protein



Ядерные РНК-полимеразы



РНК-полимераза I

РНК-полимераза II

РНК-полимераза III

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА. ТРАНСКРИПЦИЯ РНК ЭУКАРИОТ

РНК-полимераза I



РНК-полимераза I. Функции

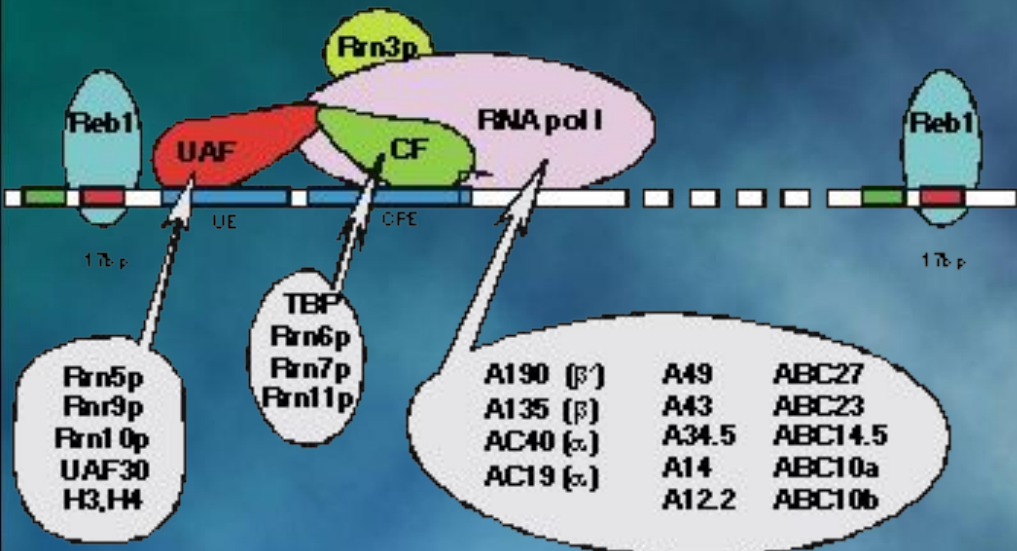
- РНК полимераза I транскрибирует гены 18S, 5.8S и 28S **rРНК**
- Транскрипция генов rРНК и сборка рибосом происходит в ядрышке

РНК-полимераза I

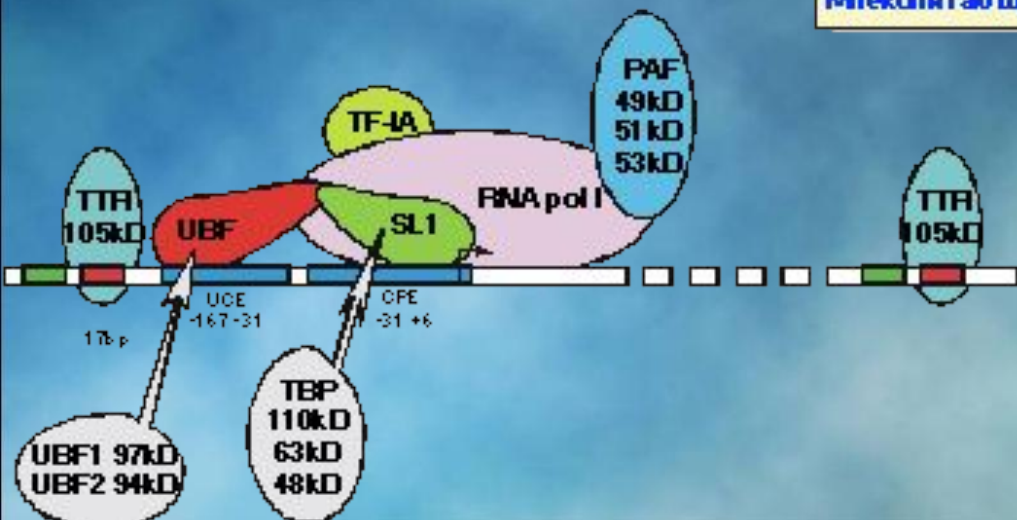
СОСТАВ

Структура регуляторных элементов гена rРНК

Др ссысы



Млекопитающие



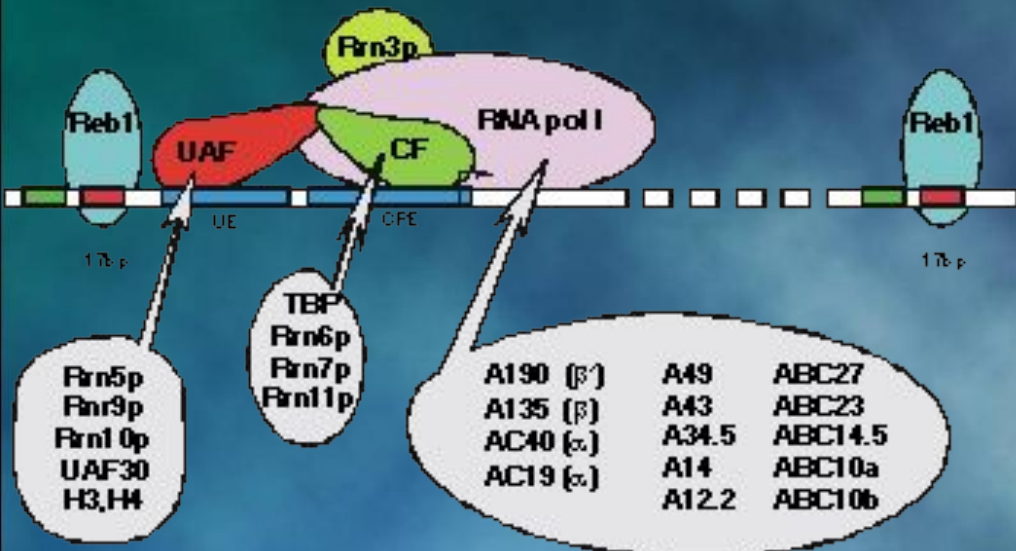
У млекопитающих промотор гена предшественника rРНК состоит из двух участков: CPE (core promoter element) UCE (upstream control element). С этими участками связываются белковые комплексы SL1 и UBF

РНК-полимераза I

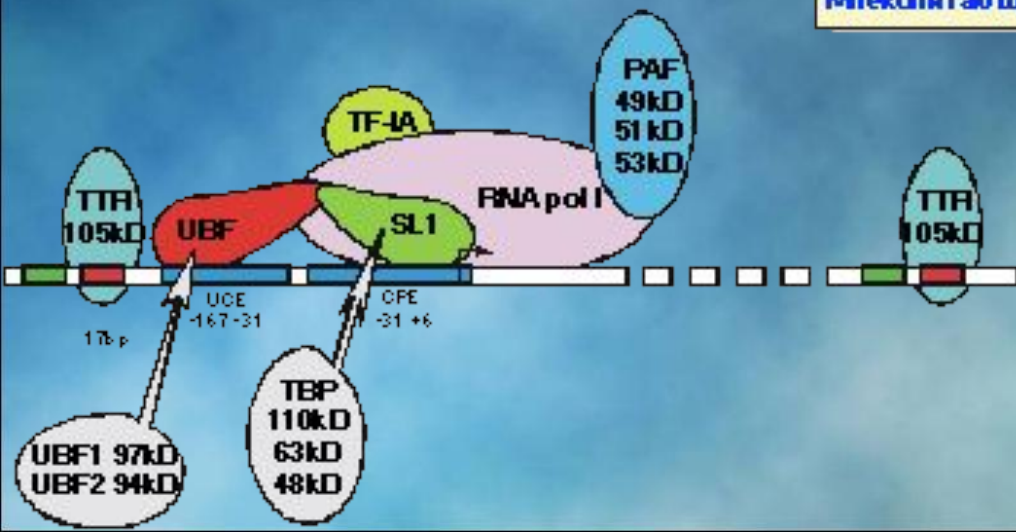
РНК полимераза I и белки, регулирующие транскрипцию rРНК

СОСТАВ

Древесина



Млекопитающие



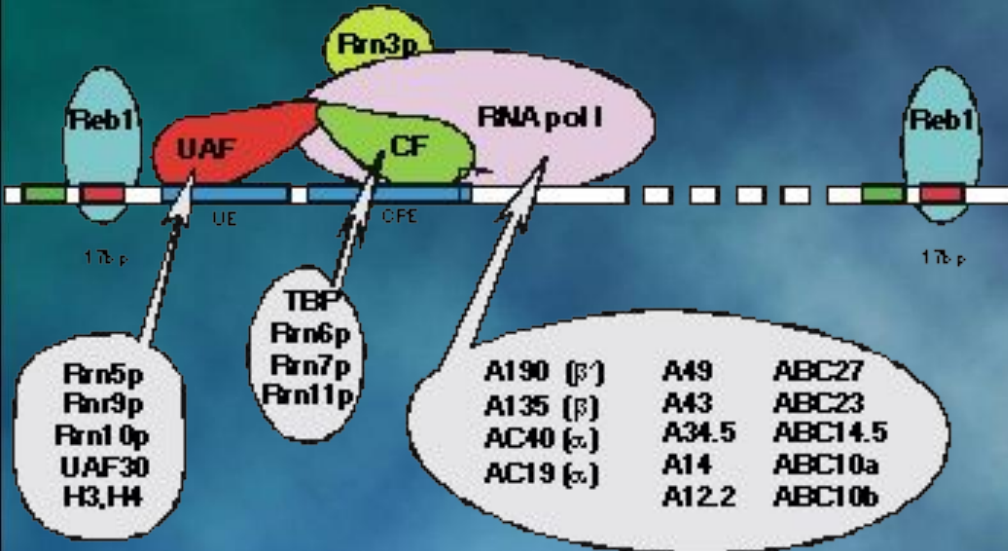
В состав SL1 входит белок TBP (TATA-box binding protein), хотя в промоторе rРНК нет TATA последовательности. В SL1 входят также три дополнительных белка, называемых TAFI110, TAFI63 и TAFI48.

РНК-полимераза I

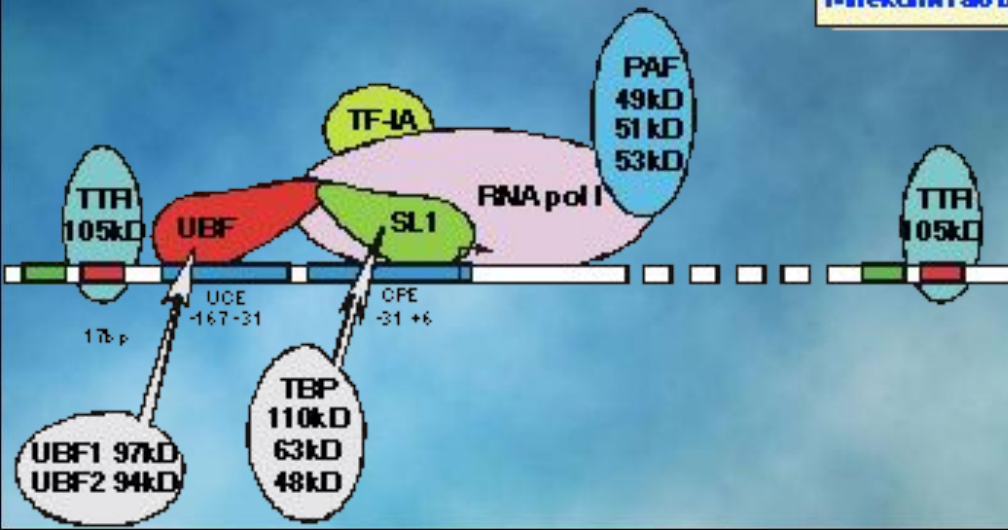
РНК полимераза I и белки, регулирующие транскрипцию rРНК

СОСТАВ

Дрoжки



Млекопитающие



Факторы регулирующие транскрипцию rРНК, ассоциированы с РНК-полимеразой I

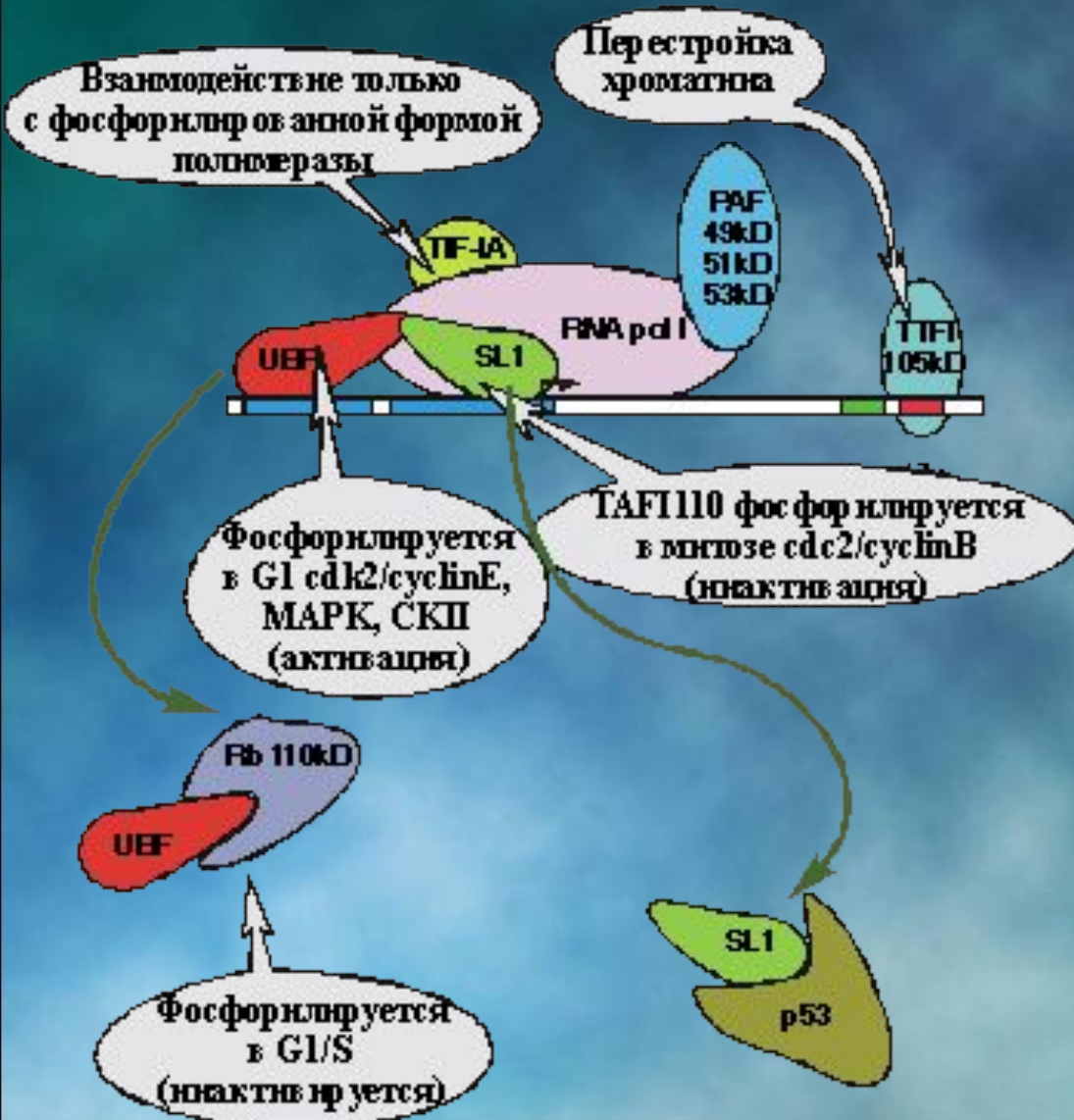
Белок TIF-IA связывает полимеразу и SL1

PAF53 - другой белок млекопитающих, ассоциированный с полимеразой, взаимодействует с UBF

РНК-полимераза I

РЕГУЛЯЦИЯ

Регуляция транскрипции гена rРНК



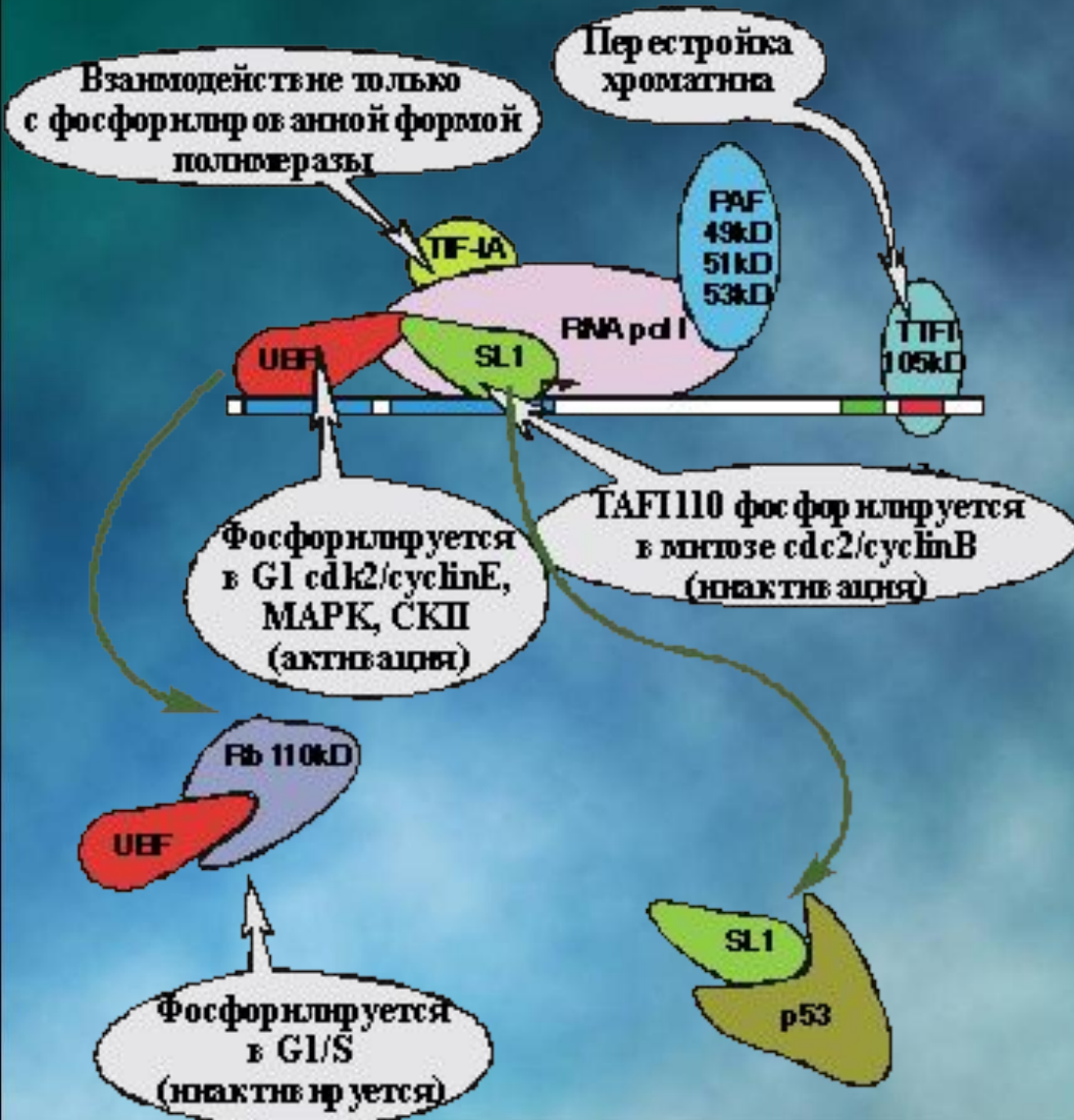
Транскрипционная активность РНК полимеразы I зависит от:

1. фазы клеточного цикла (ингибируется при митозе);
2. пролиферативной активности клеток (при интенсивном делении требуется много rРНК).

РНК-полимераза I

РЕГУЛЯЦИЯ

Регуляция транскрипции гена rРНК

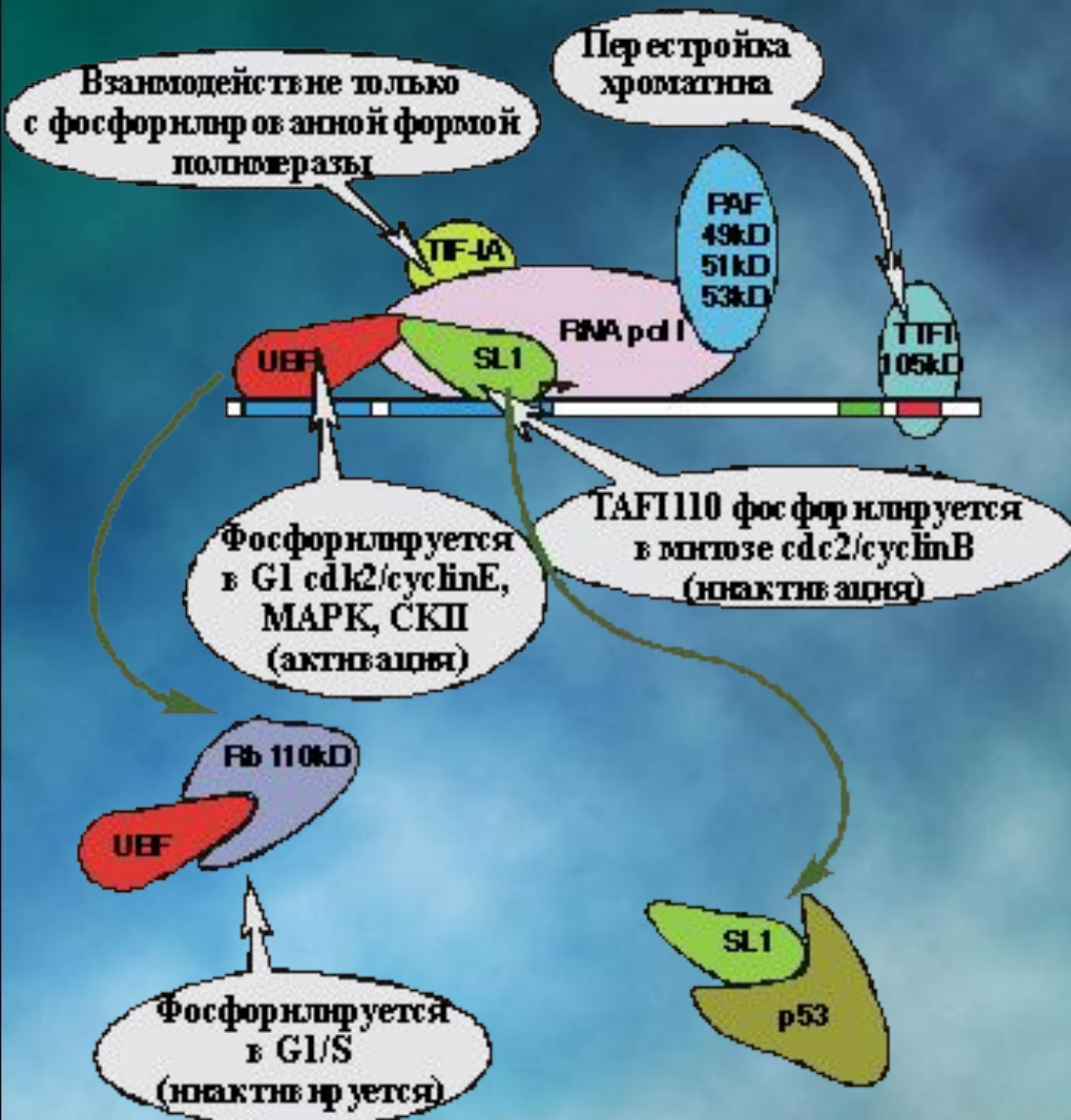


РНК-полимераза I должна быть фосфорилирована для успешного взаимодействия с TIF-1A

РНК-полимераза I

РЕГУЛЯЦИЯ

Регуляция транскрипции гена rРНК



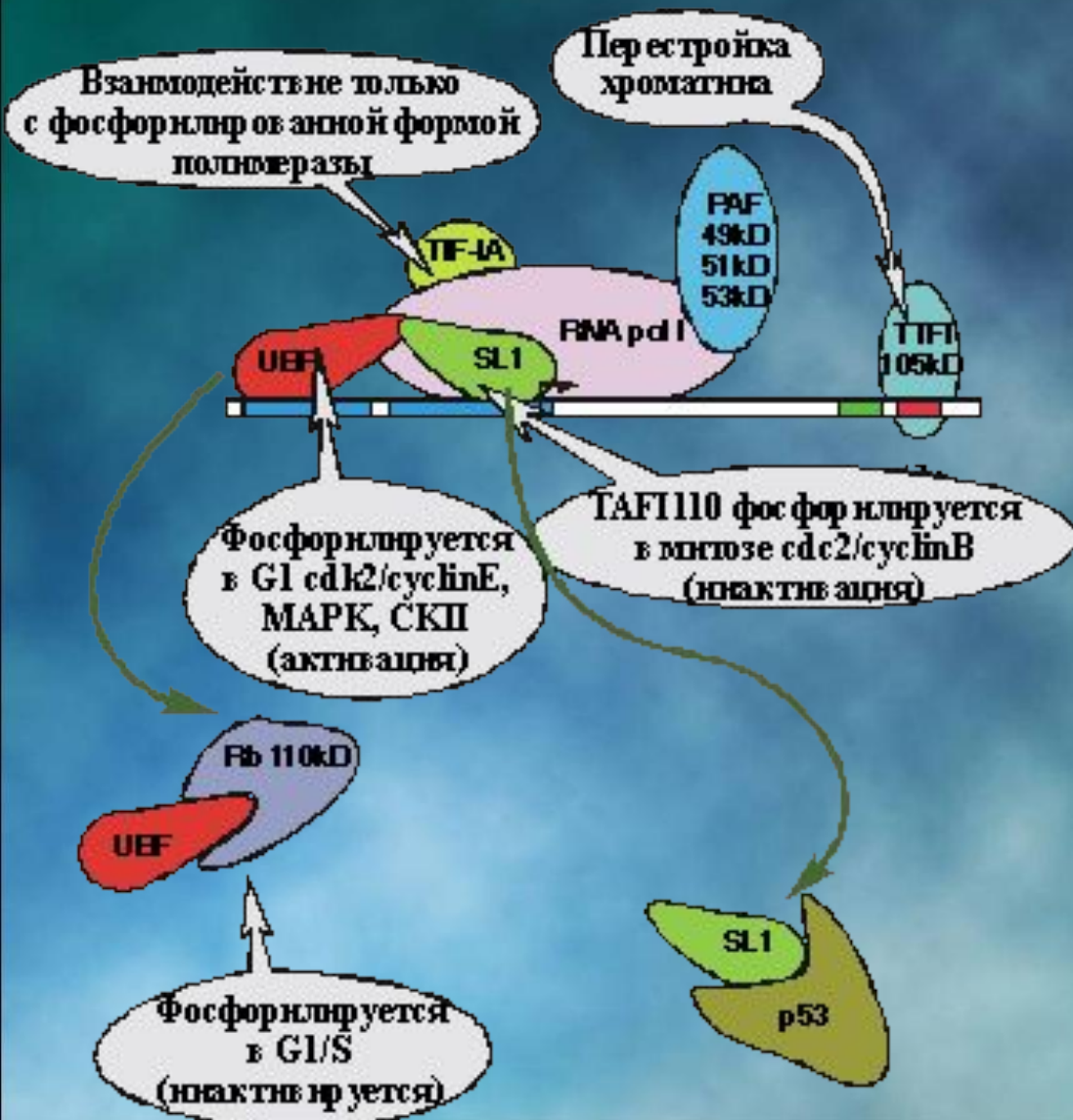
Активность основных факторов инициации (SL1 и UBF) регулируется в зависимости от фазы клеточного цикла:

1. SL1 инактивируется в митозе при помощи фосфорилирования.
2. UBF активируется фосфорилированием в G1 фазе.

РНК-полимераза I

РЕГУЛЯЦИЯ

Регуляция транскрипции гена rРНК

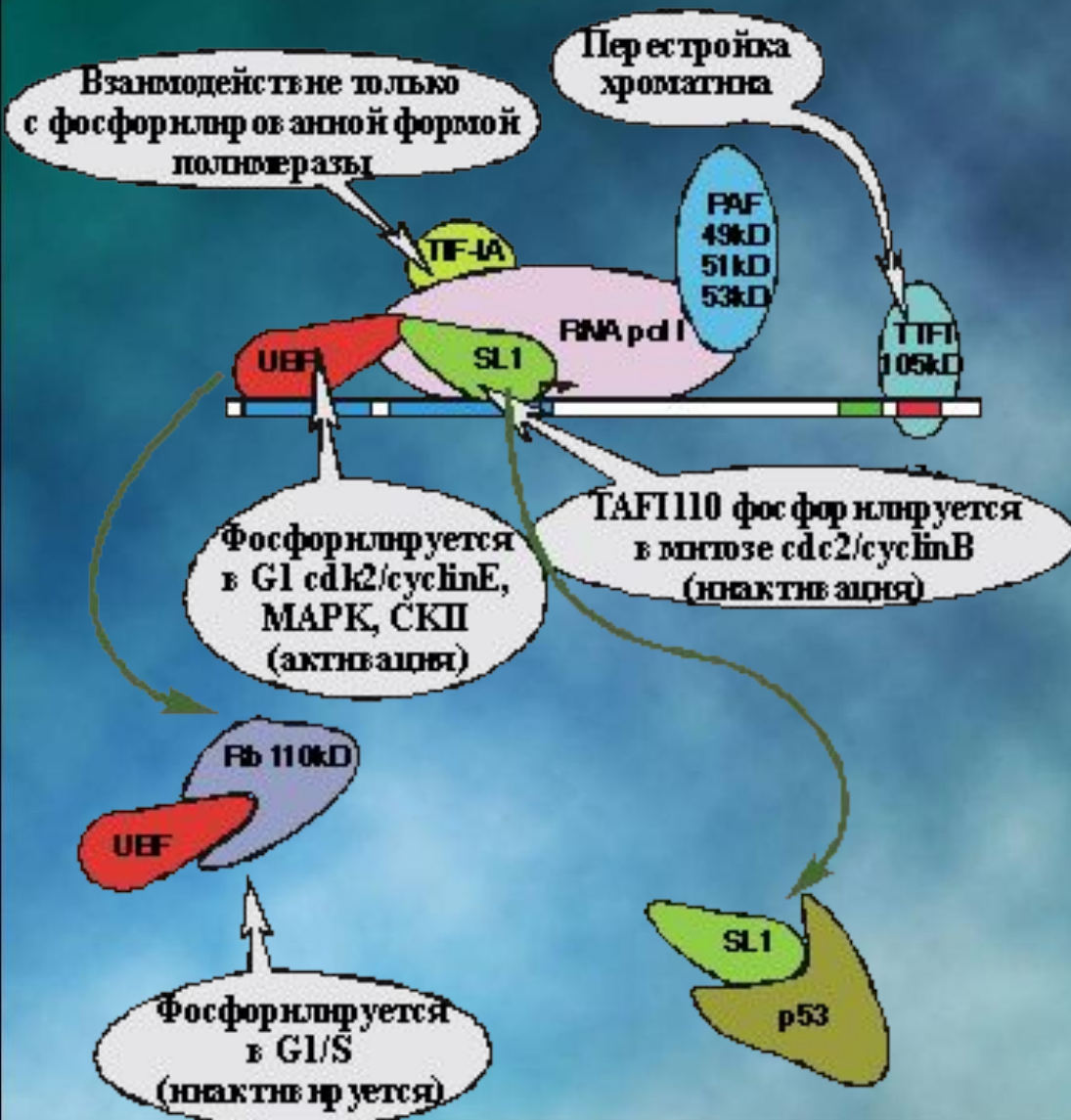


Концентрация активного UBF регулируется связыванием с белком, ассоциированным с ретинобластомой Rb. Его ингибирующая активность подавляется при фосфорилировании в S фазе. Подобным образом p53 инактивирует TBP, входящий в состав SL1.

РНК-полимераза I

РЕГУЛЯЦИЯ

Регуляция транскрипции гена rРНК



Белок TTF1 способствует передвижению нуклеосом по ДНК для эффективной транскрипции РНК полимеразой I.

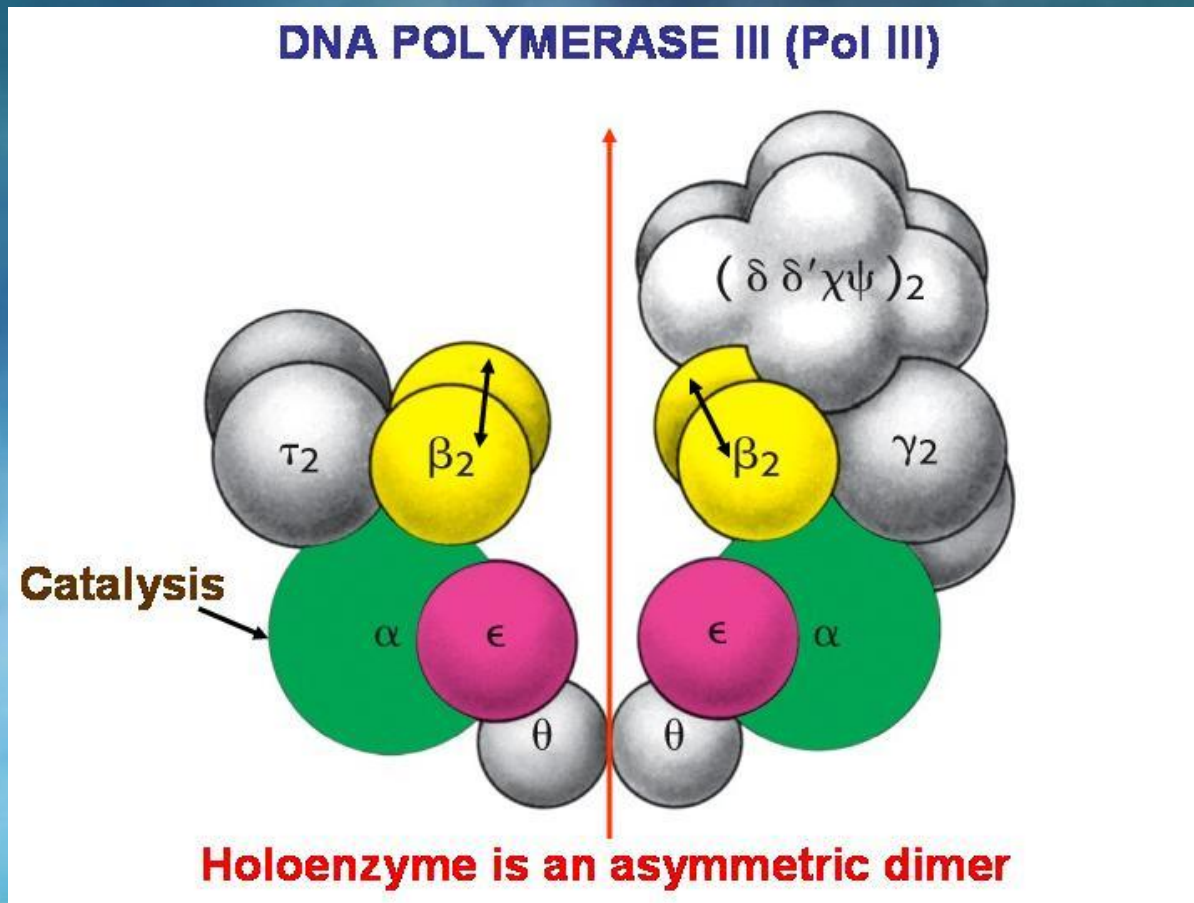
МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА. ТРАНСКРИПЦИЯ РНК ЭУКАРИОТ

РНК-полимераза III



РНК-полимераза III. Функции.

- РНК полимераза III транскрибирует гены 5S rРНК, tРНК и snРНК

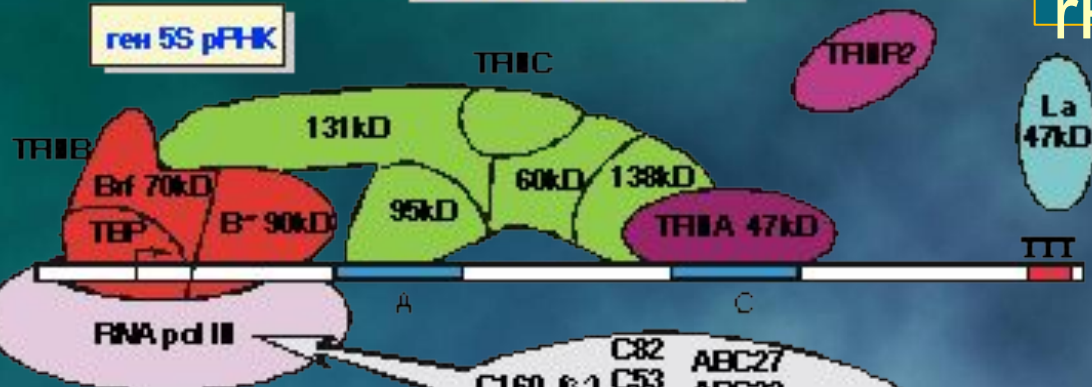


РНК-полимераза III

Регуляция транскрипции гена 5S rРНК

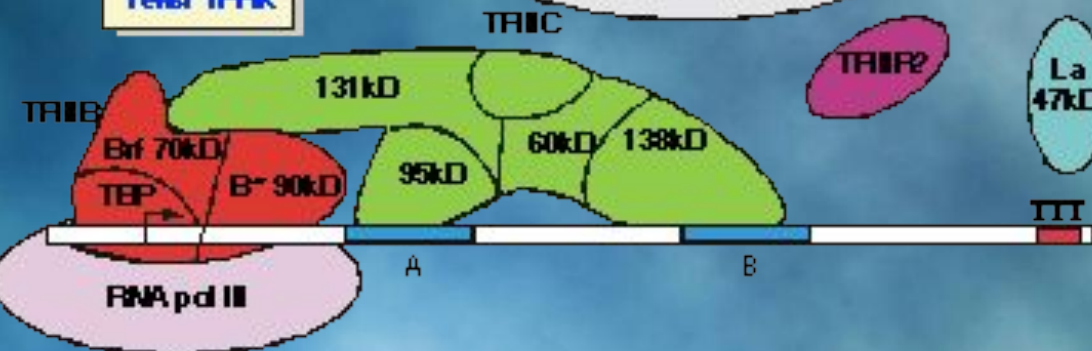
ГЕНЫ, ФАКТОРЫ

ген 5S рРНК

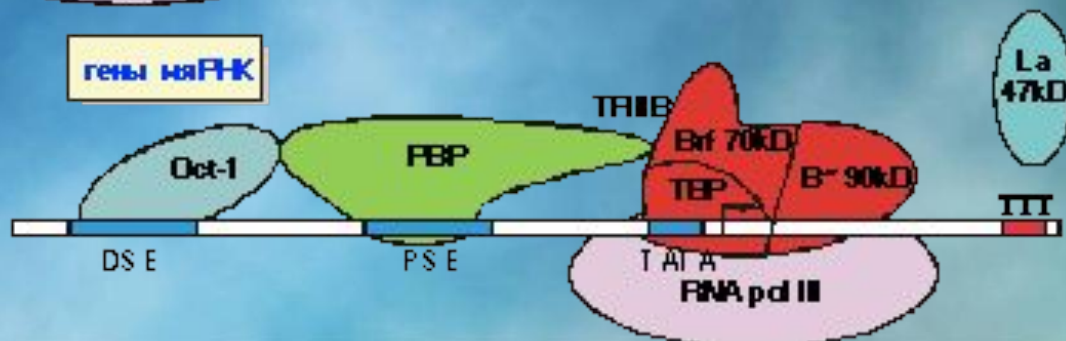


Ген 5S rРНК содержит внутренний промотор, области А и С

гены тРНК



гены мтРНК



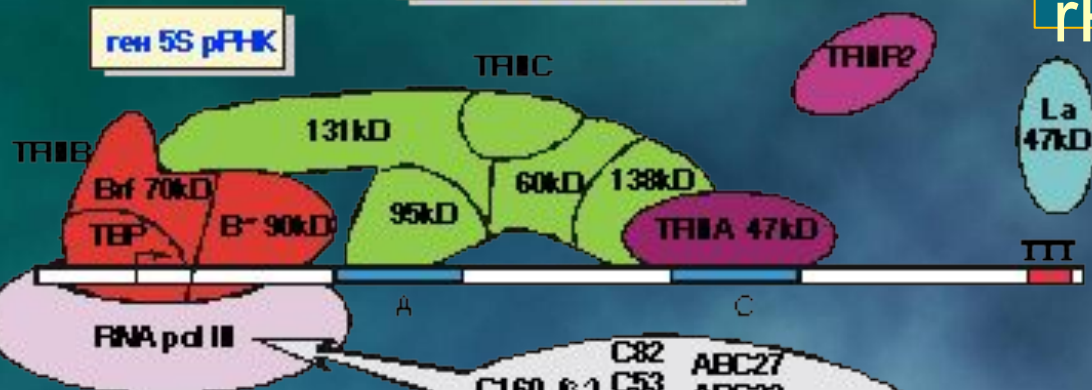
РНК-полимераза III

ГЕНЫ, ФАКТОРЫ

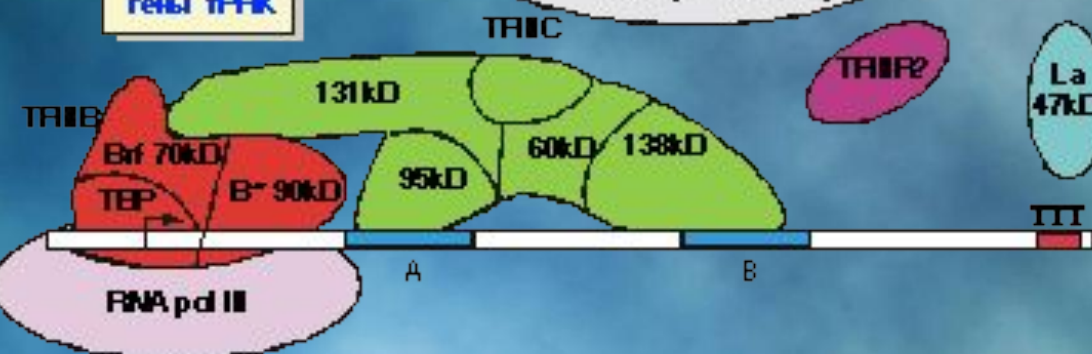
Факторы транскрипции гена 5S rРНК

TFIIIA, 5S rРНК специфичный транскрипционный фактор, взаимодействует с C последовательностью внутри гена 5S rРНК. Это приводит к посадке белкового комплекса – TFIIIC

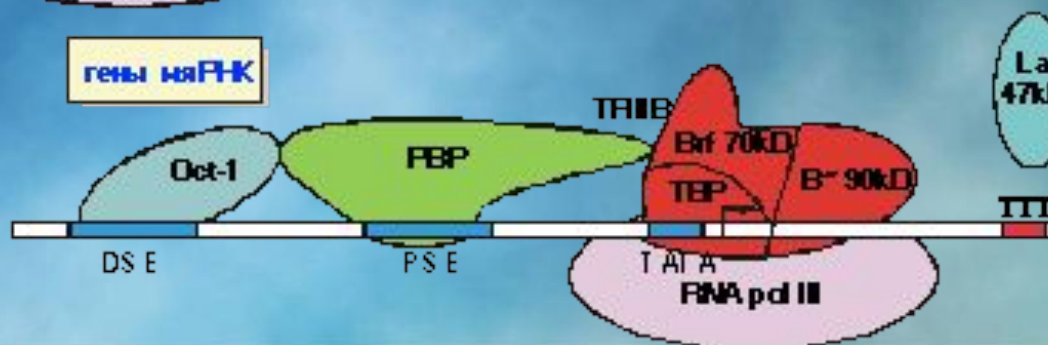
ген 5S рРНК



гены тРНК



гены мРНК

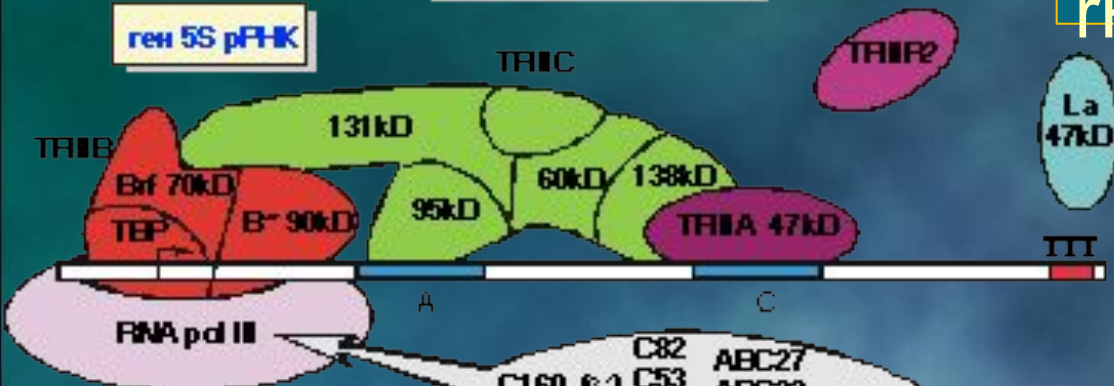


РНК-полимераза III

ГЕНЫ, ФАКТОРЫ

Факторы транскрипции гена 5S rРНК

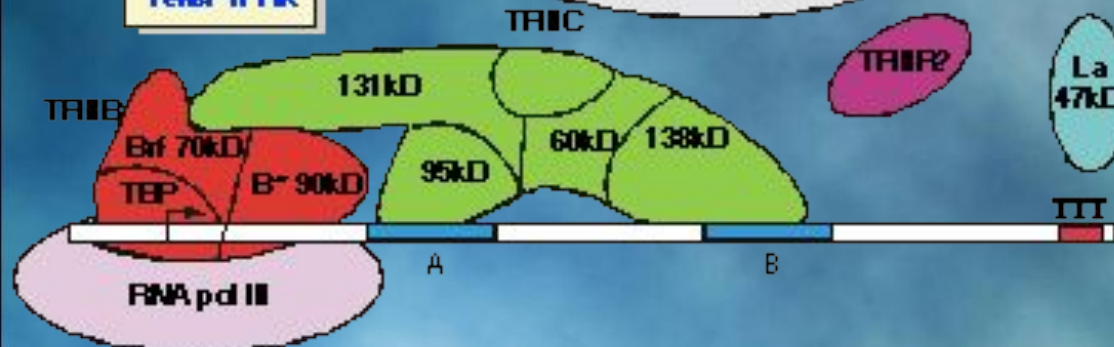
ген 5S рРНК



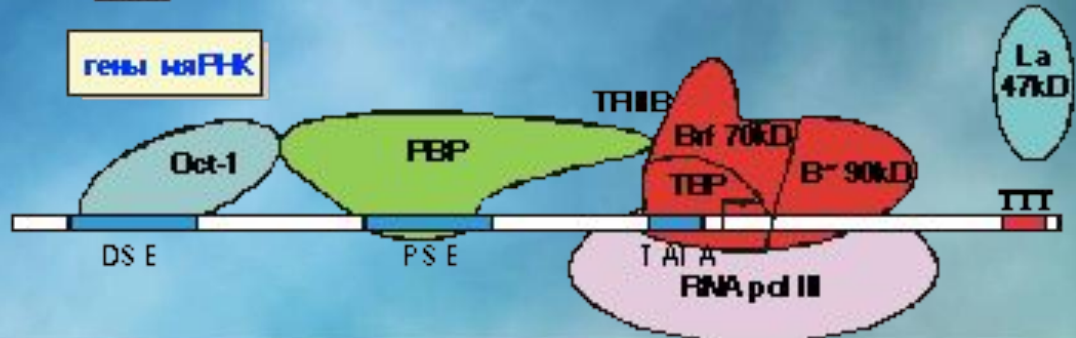
- | | |
|-------------------|--------|
| C82 | ABC27 |
| C160 (β) | C53 |
| C128 (β) | C37 |
| AC10 (α) | C34 |
| AC19 (α) | C31 |
| C25 | ABC10a |
| C11 (TFIIS, GreA) | ABC10b |

TFIIC связывает A-последовательность ДНК, без этого невозможна эффективная транскрипции гена. После соединения TFIIC, с геном 5S rРНК связывается TFIIB

гены rРНК



гены мРНК

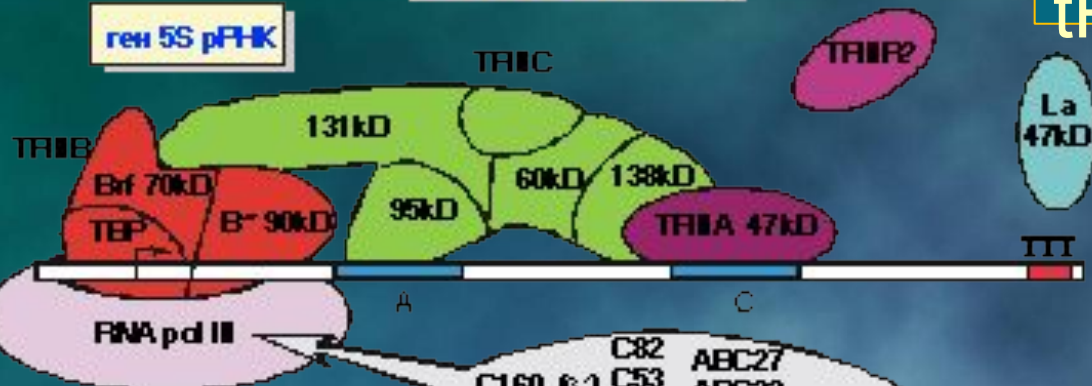


РНК-полимераза III

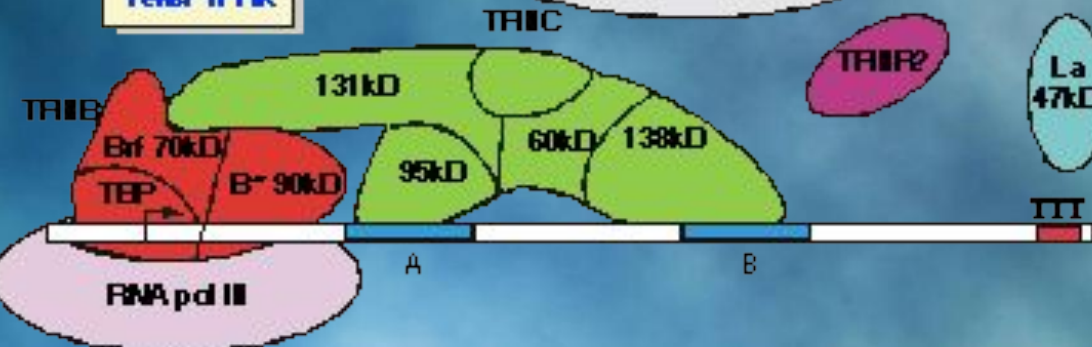
ГЕНЫ, ФАКТОРЫ

Факторы транскрипции гена tРНК

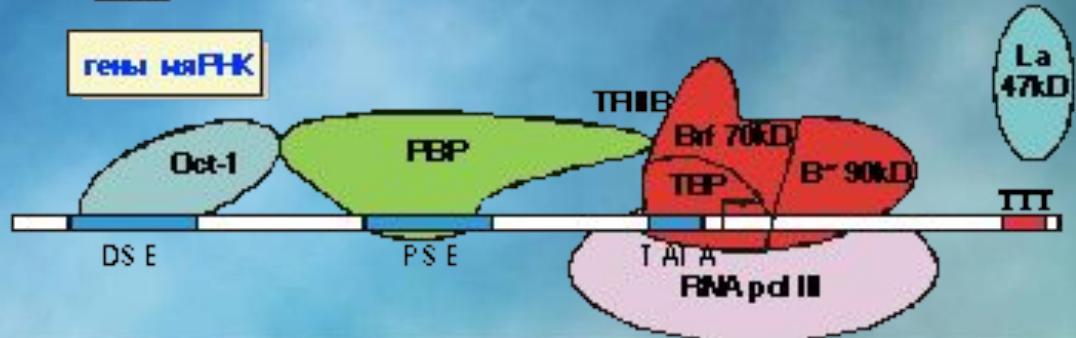
ген 5S рРНК



гены tРНК



гены мтРНК



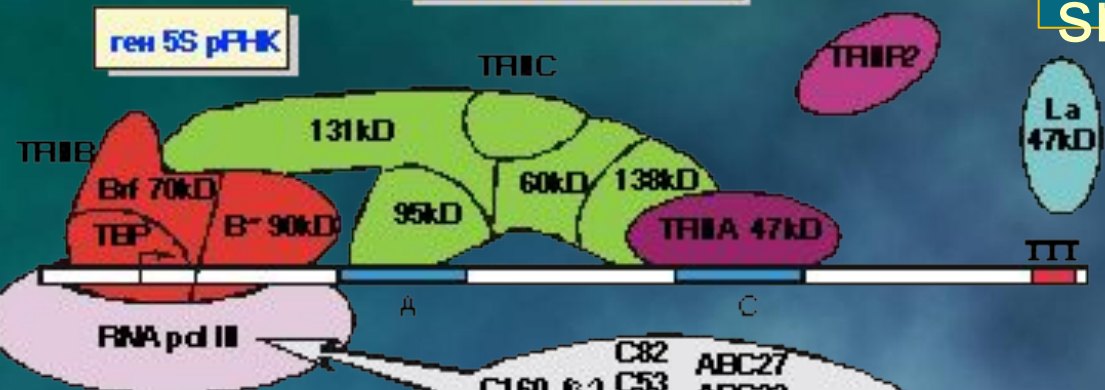
Гены tРНК содержат дополнительный участок ДНК – В, способствующий связыванию TFIIC. Белок-белковое взаимодействие TFIIA и TFIIC заменяется ДНК-белковым. Далее, TFIIC присоединяет TFIIB и РНК полимеразу III

РНК-полимераза III

Факторы транскрипции гена snРНК

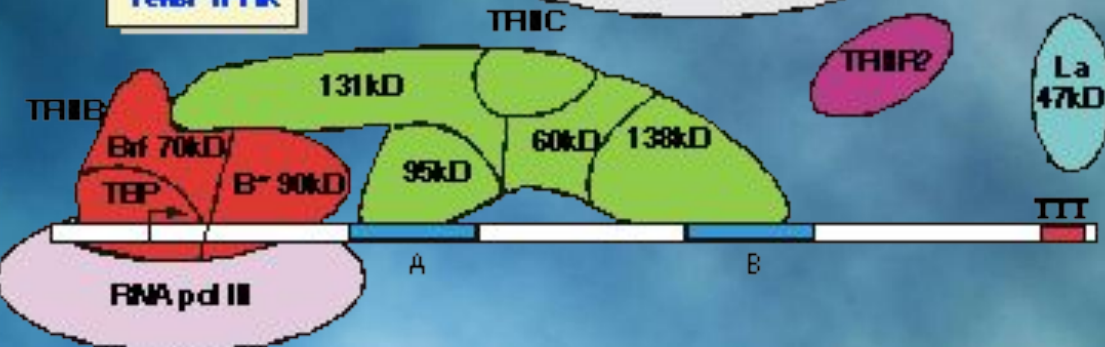
ГЕНЫ, ФАКТОРЫ

ген 5S рРНК

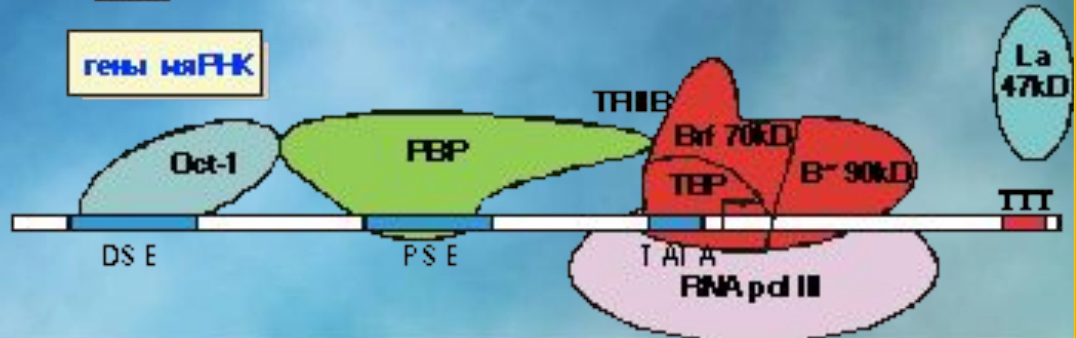


- C82 ABC27
- C160 (β) C53 ABC23
- C128 (β) C37 ABC14.5
- AC10 (α) C34 ABC10a
- AC19 (α) C31 ABC10b
- C25
- C11 (TFIIS, GreA)

гены тРНК



гены мтРНК



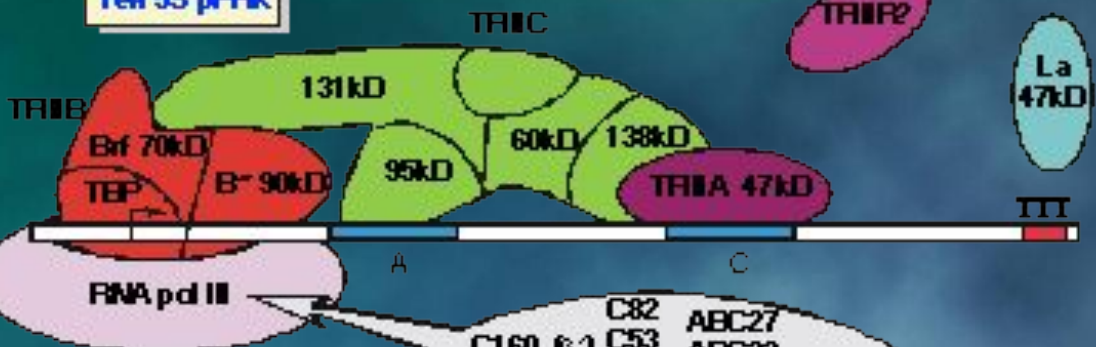
С PSE связывается белок FBP
 С DSE – фактор Oct-1.
 Связывание Oct-1 и FBP приводит к присоединению TFIIB

РНК-полимераза III

ГЕНЫ, ФАКТОРЫ

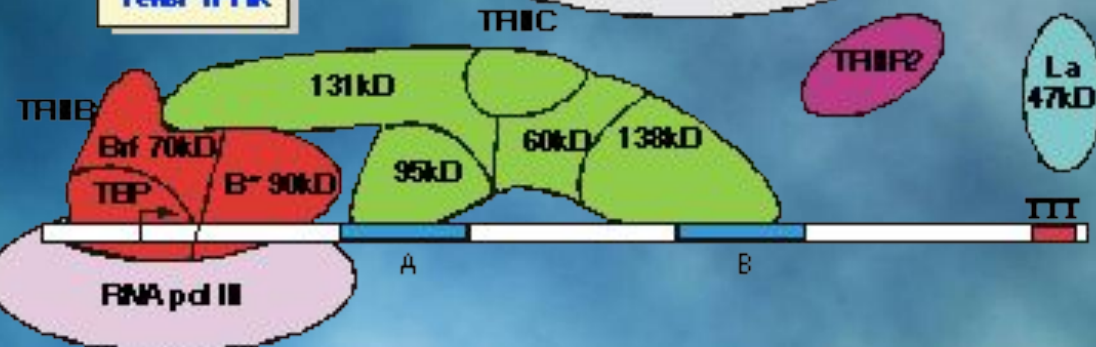
Факторы транскрипции гена snРНК

ген 5S рРНК

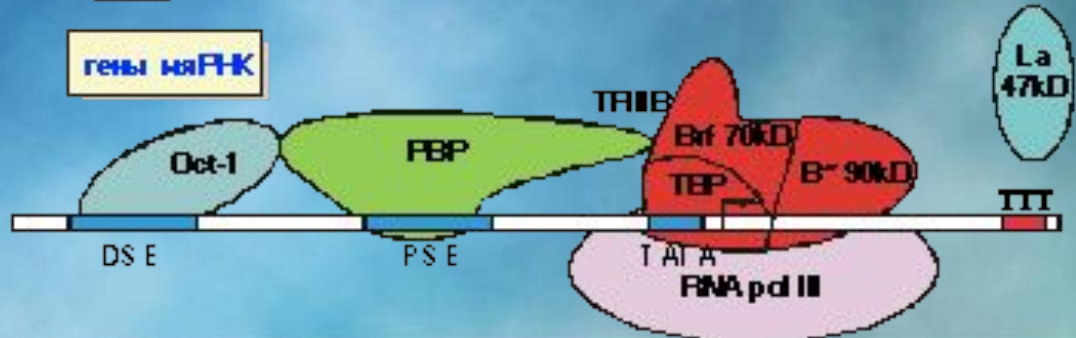


- C82 ABC27
- C160 (β) C53 ABC23
- C128 (β) C37 ABC14.5
- AC10 (α) C34 ABC10a
- AC19 (α) C31 ABC10b
- C25
- C11 (TFIIS, GreA)

гены тРНК



гены мтРНК



Промотор содержит ТАТА-бокс.

Промоторы snРНК, транскрибируемых РНК полимеразой III схожи с промоторами РНК полимеразы II.

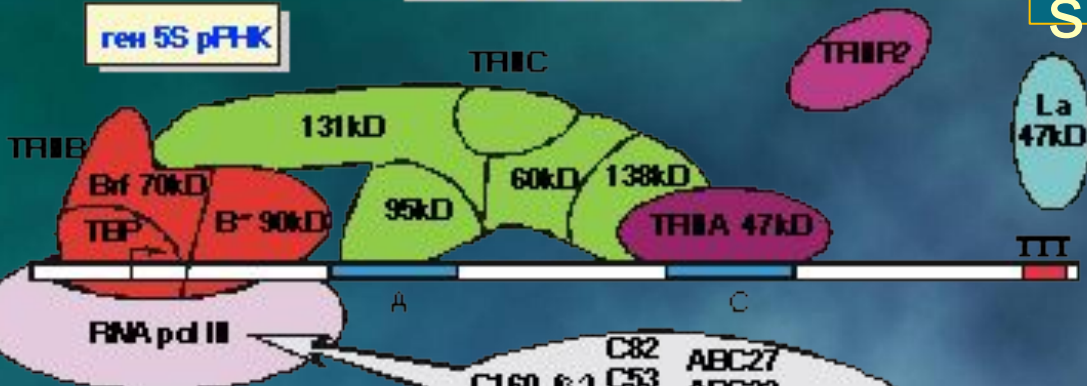
Для всех трех типов промоторов общий механизм - это посадка TFIIB на промотор при помощи ДНК-связывающих белков-активаторов

РНК-полимераза III

Факторы транскрипции гена snРНК

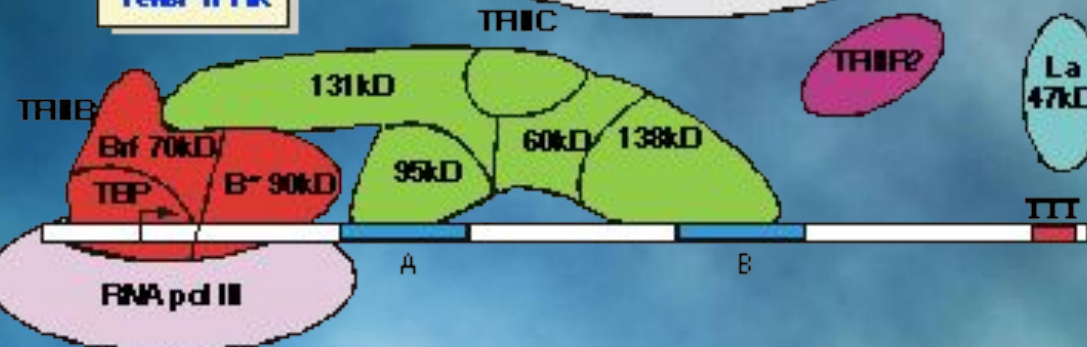
ГЕНЫ, ФАКТОРЫ

ген 5S рРНК

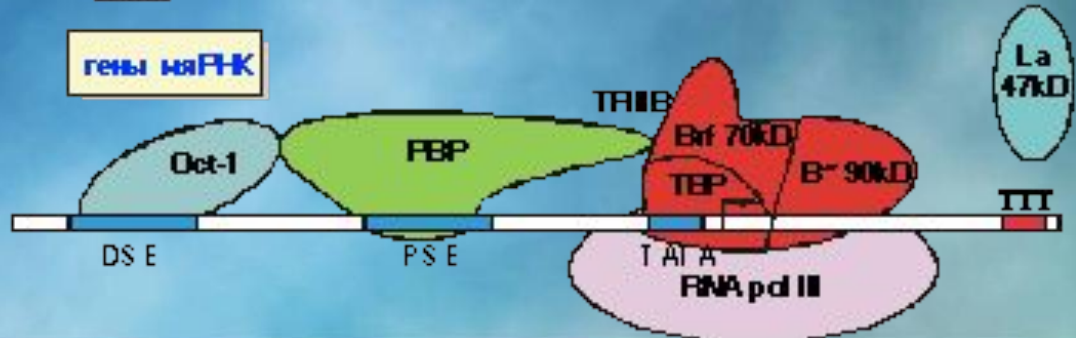


- C82 ABC27
- C160 (β) C53 ABC23
- C128 (β) C37 ABC14.5
- AC10 (α) C34 ABC10a
- AC19 (α) C31 ABC10b
- C25
- C11 (TFIIS, GreA)

гены tРНК



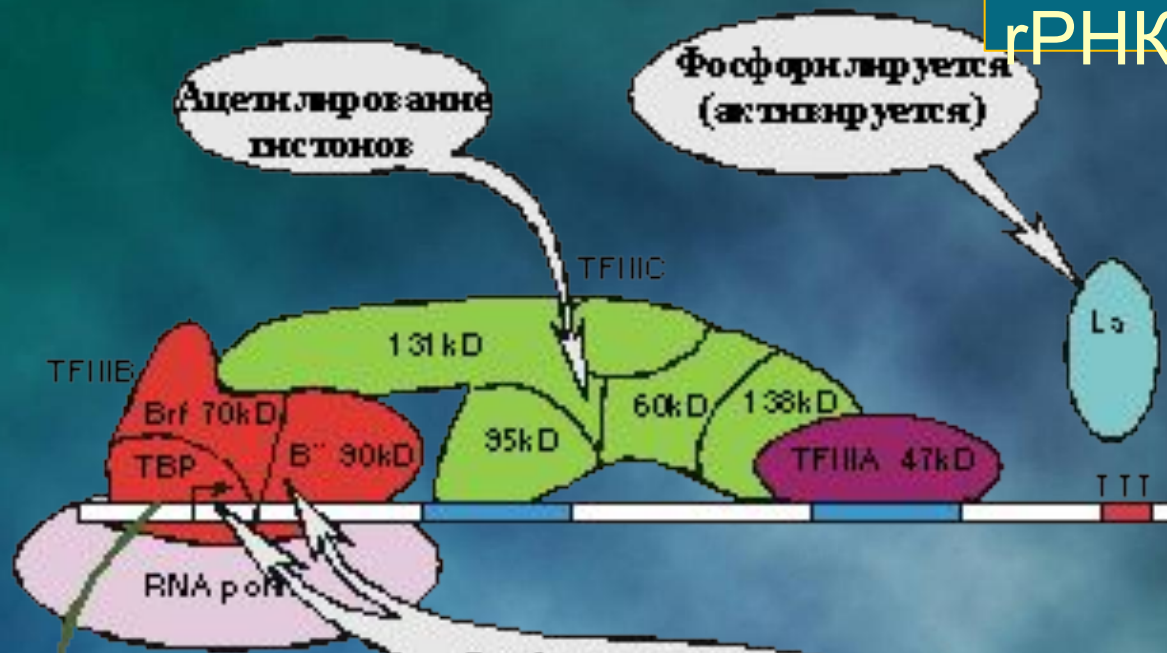
гены мРНК



Терминация транскрипции для РНК полимеразы III изучена плохо. Известно, что транскрипты оканчиваются последовательностью, с которой связывается белок La, способствующий процессингу и стабильности транскриптов

РЕГУЛЯЦИЯ

Регуляция транскрипции гена 5S rРНК



Работа РНК полимеразы III, регулируется в зависимости от фазы клеточного цикла

Фосфорилируется в митозе cdc2/cyclin B (инактивация)

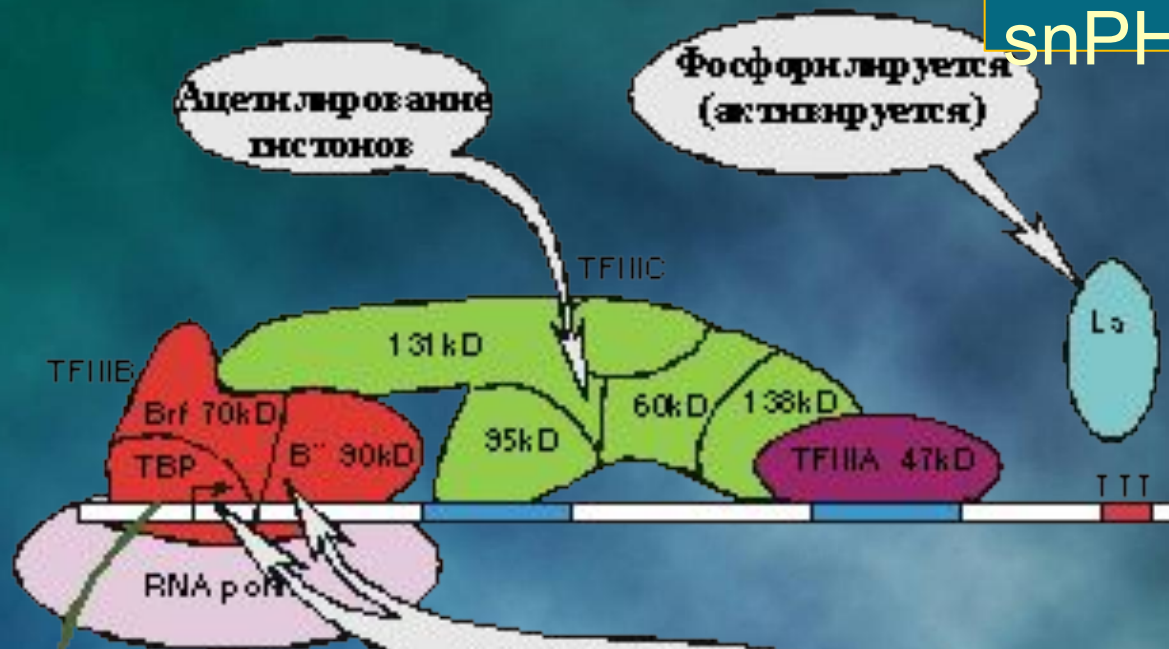
Фосфорилируется СК II (активируется)

Фосфорилируется в G1/S (инактивируется)



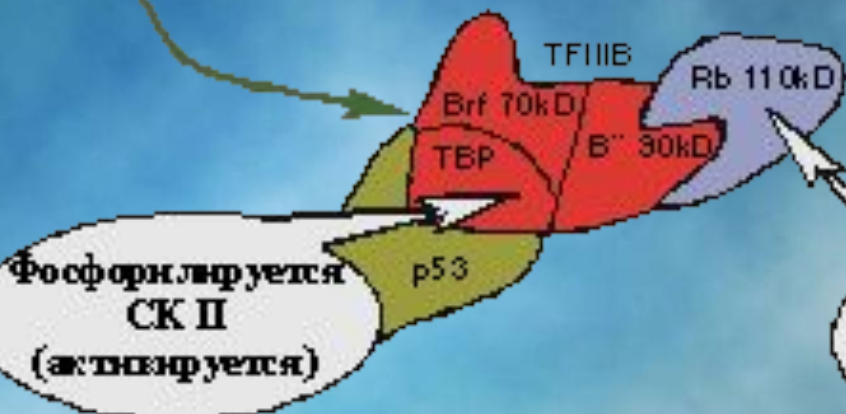
РЕГУЛЯЦИЯ

Регуляция транскрипции гена snРНК



Фосфорилирование направлено на подавление транскрипции во время митоза. La белок активируется при фосфорилировании

Фосфорилується в митозе cdc2/cyclin B (инактивується)

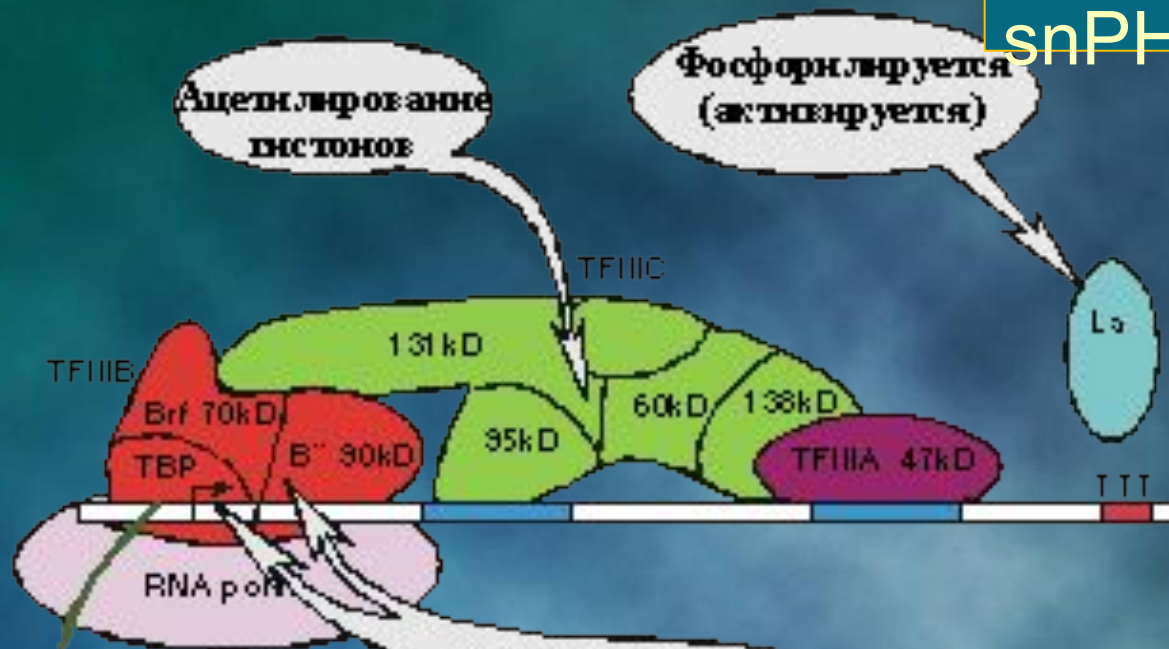


Фосфорилується СК II (активується)

Фосфорилується в G1/S (инактивується)

РЕГУЛЯЦИЯ

Регуляция транскрипции гена snРНК



Ацетируется анне
гистонов

Фосфорилируется
(активируется)

TFIIF

TFIIB

B' 70kD

TBP

B'' 30kD

131kD

95kD

60kD

138kD

TFIIA 47kD

TTT

RNA pol III

Фосфорилируется
в митозе cdc2/cyclinB
(инактивация)

Транскрипция РНК
полимеразой III
чувствительна к
структуре хроматина

Фосфорилируется
СК II
(активируется)

p53

TFIIB

B' 70kD

TBP

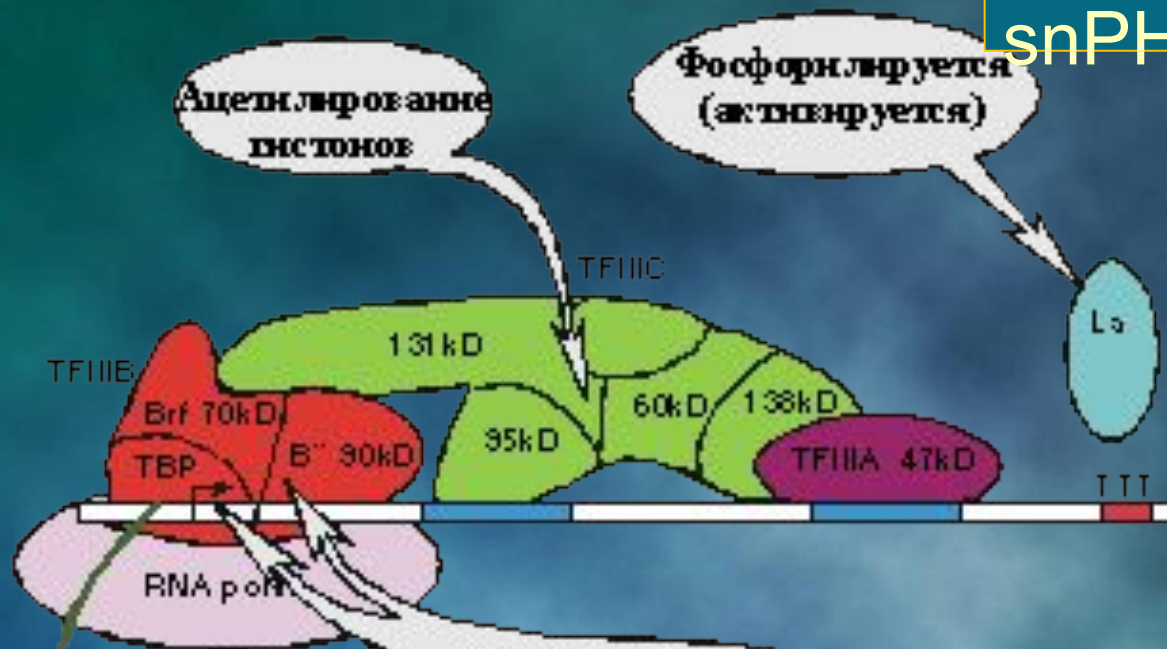
B'' 30kD

110kD

Фосфорилируется
в G1/S
(инактивируется)

РЕГУЛЯЦИЯ

Регуляция транскрипции гена snРНК



Фосфорилируется в митозе *cdc2/cyclinB* (инактивируется)

Субъединица 131 kD фактора TFIIE способна ацетилировать гистоны и, таким образом, изменять структуру хроматина, благоприятным для транскрипции образом



МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА. ТРАНСКРИПЦИЯ РНК ЭУКАРИОТ

РНК-полимераза II

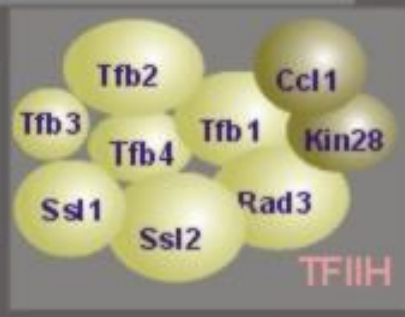
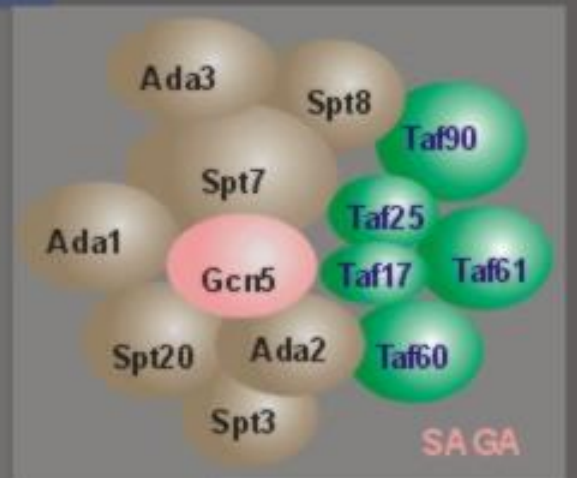
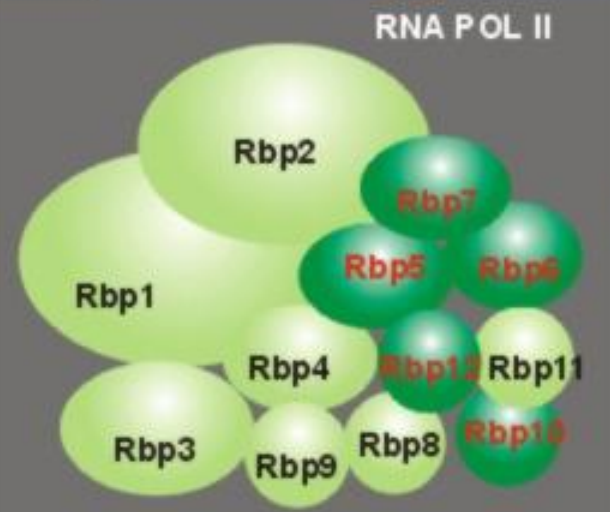
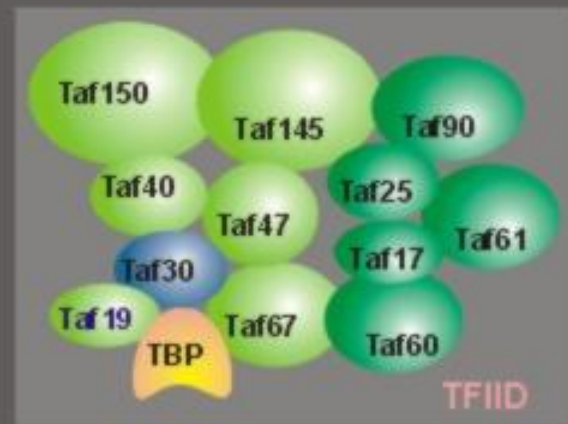
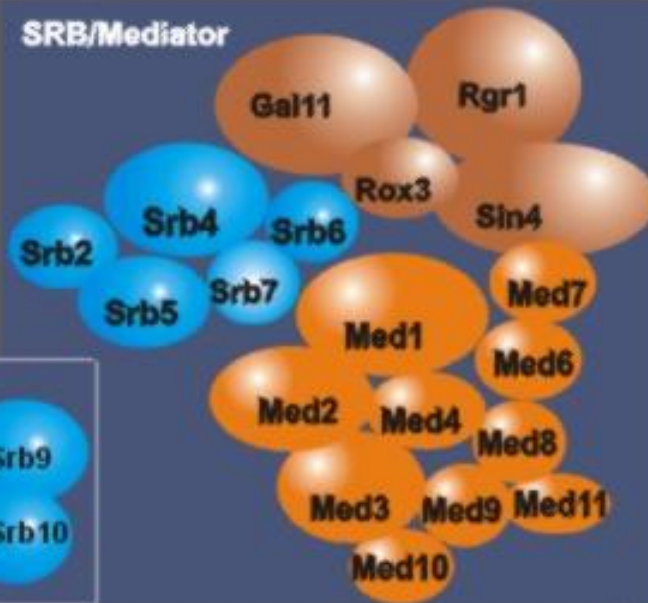
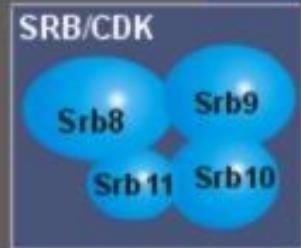
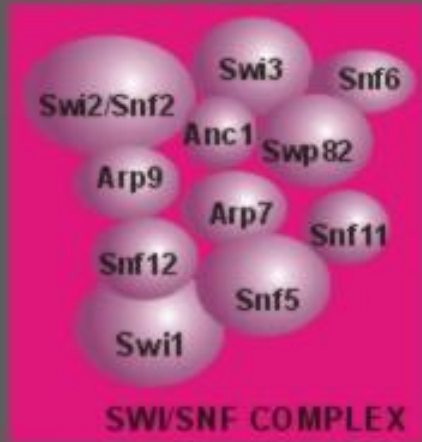


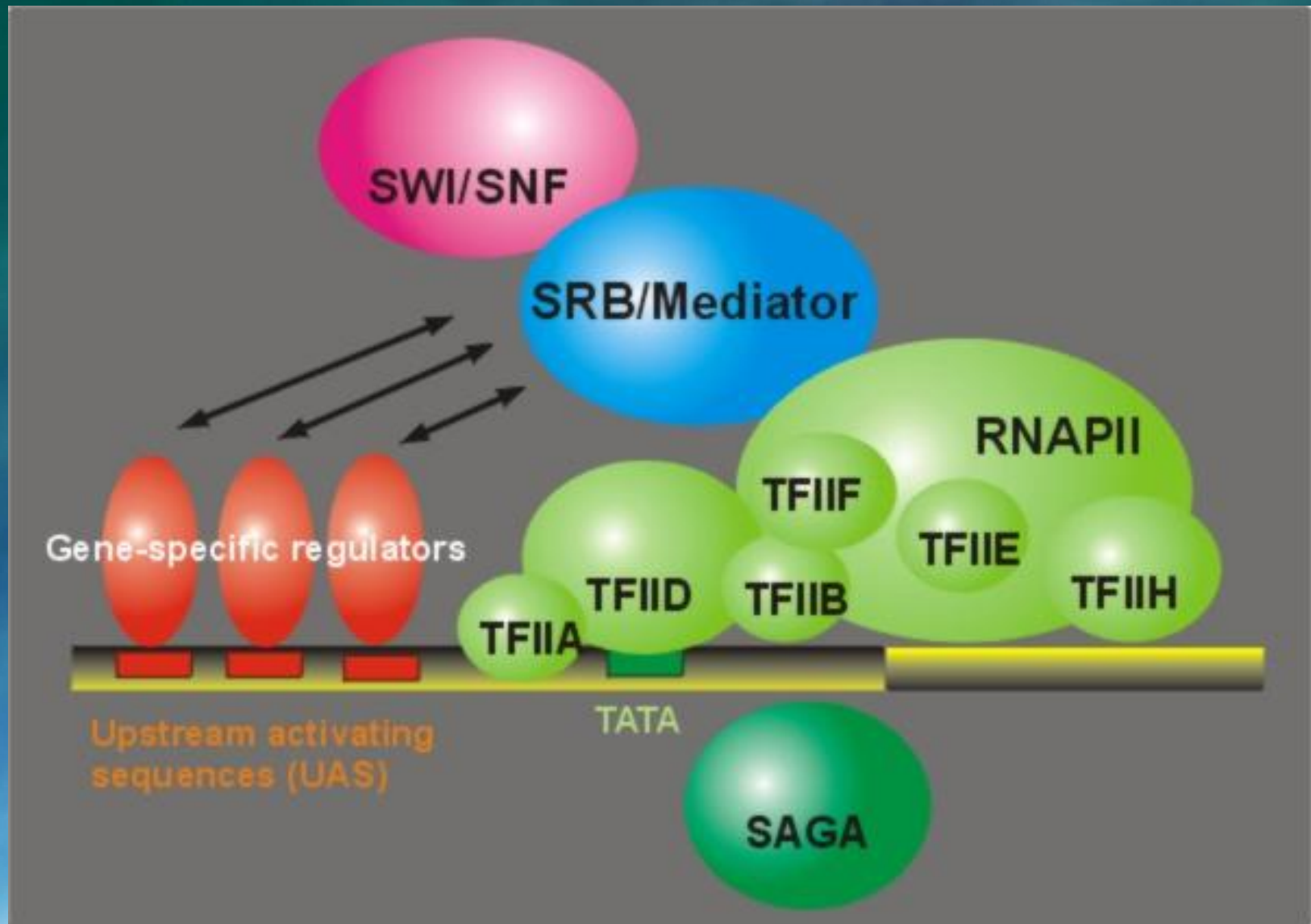
РНК-полимераза II. Функции

- транскрибирует **mРНК**, а также некоторые **sРНК**
- наиболее подверженный регуляции фермент из трех РНК полимераз
- состоит из 17 субъединиц, одной из особенностей строения наибольшей субчастицы РНК полимеразы II является ее С-концевой домен **CTD**, построенный из повторяющихся гептамеров. Количество этих повторов варьирует для разных организмов, составляя в среднем несколько десятков.
- Последовательное укорочение С-концевого домена приводит к гибели клеток.

RNA POL II COMPLEXES

COMPLEXES SUBUNITS





Основные стадии транскрипции

Инициация

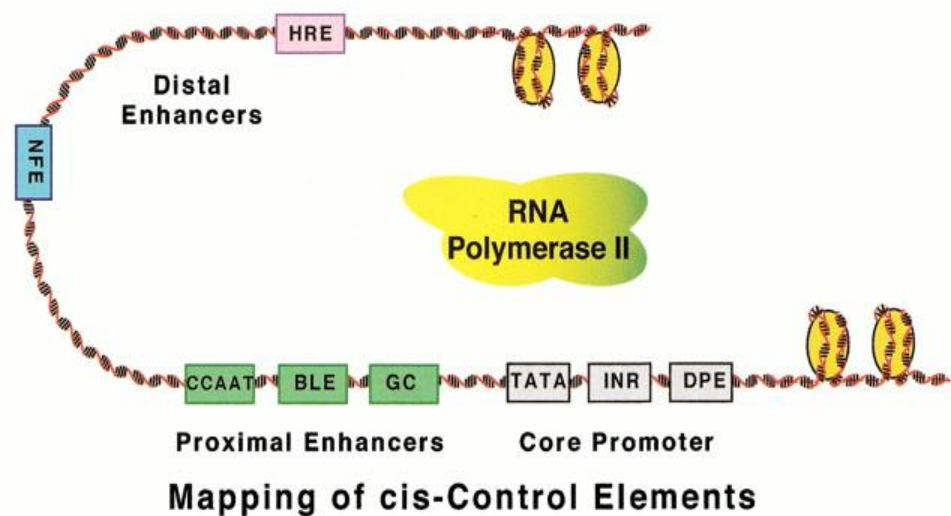
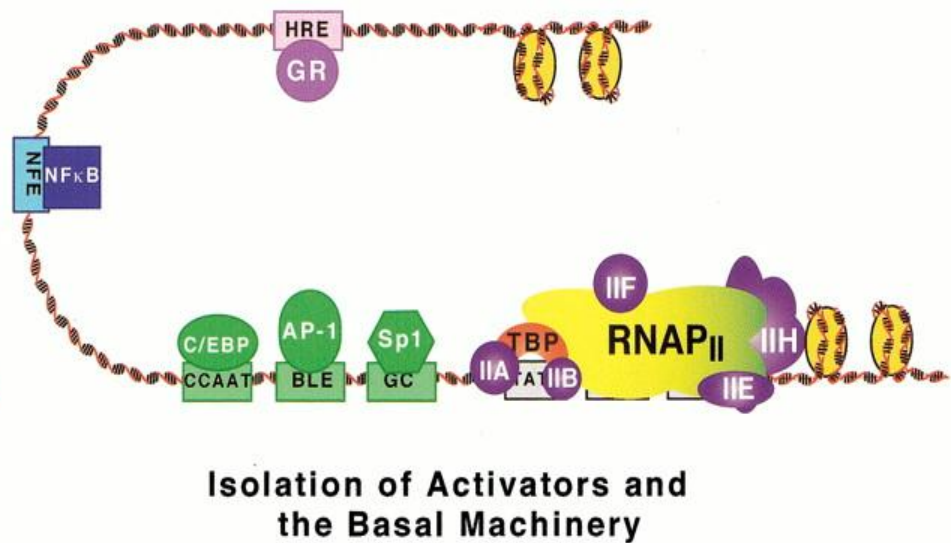
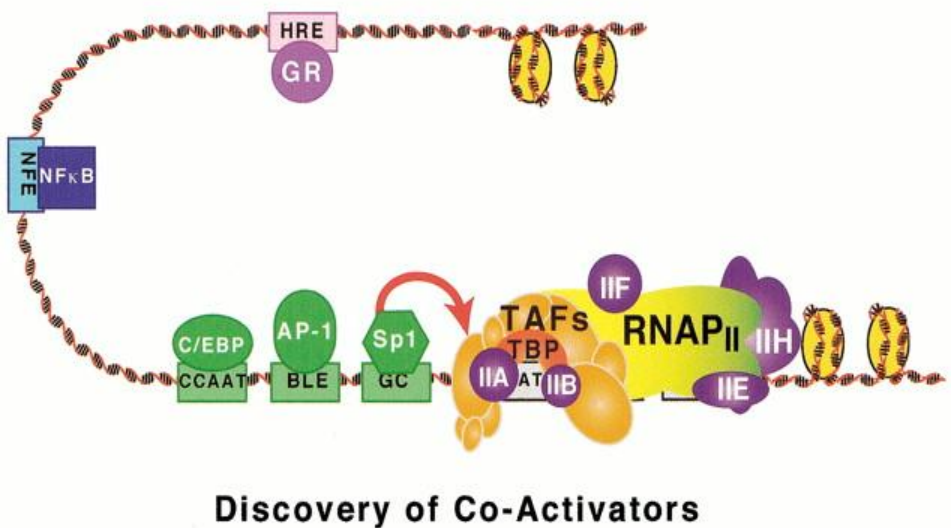
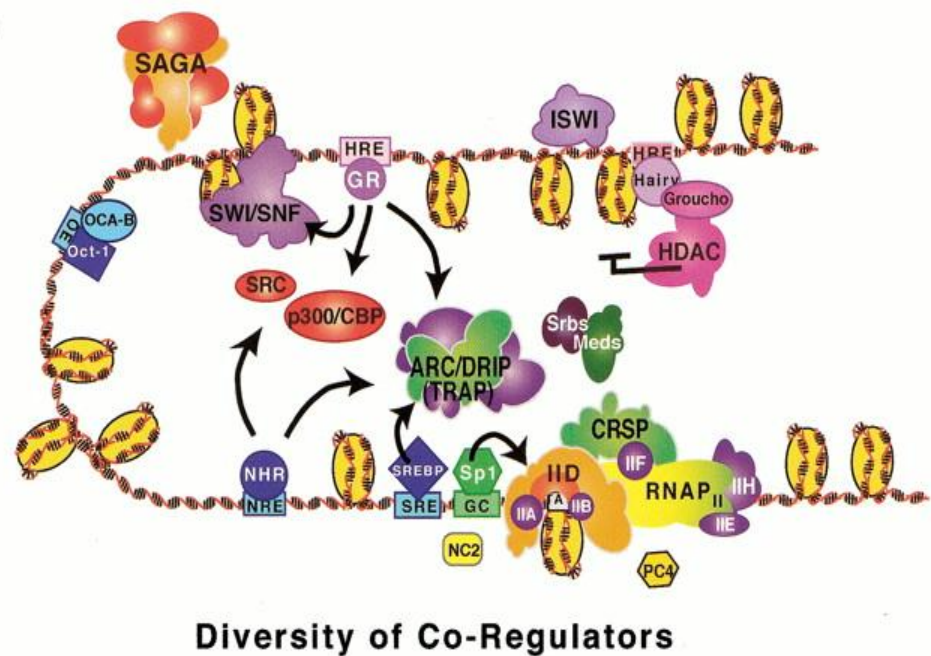
- Образование базального комплекса
- Начало синтеза цепи РНК

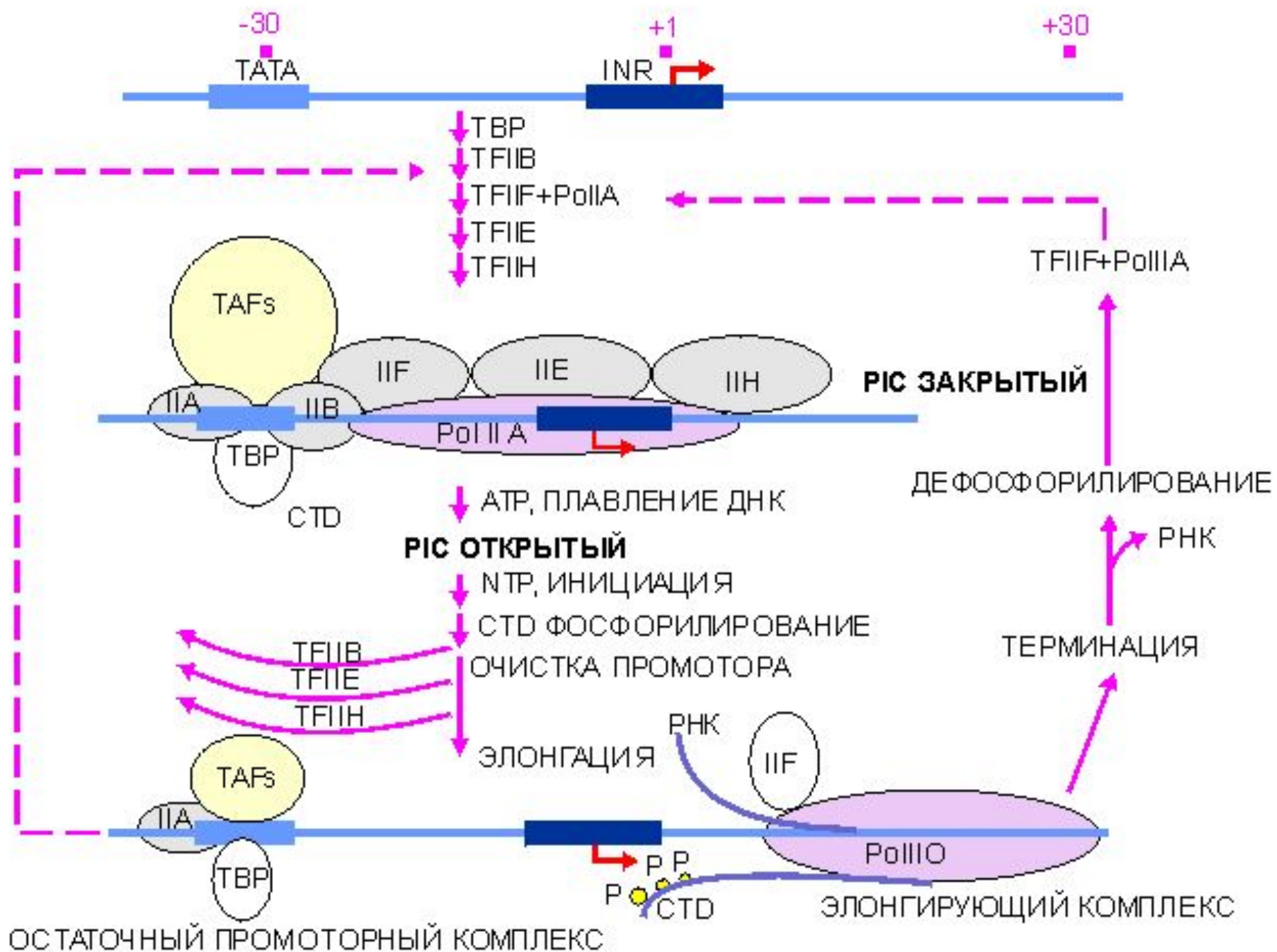
Элонгация

- Продолжение процесса транскрипции, рост дочерней цепи РНК

Терминация

- Завершение процесса транскрипции

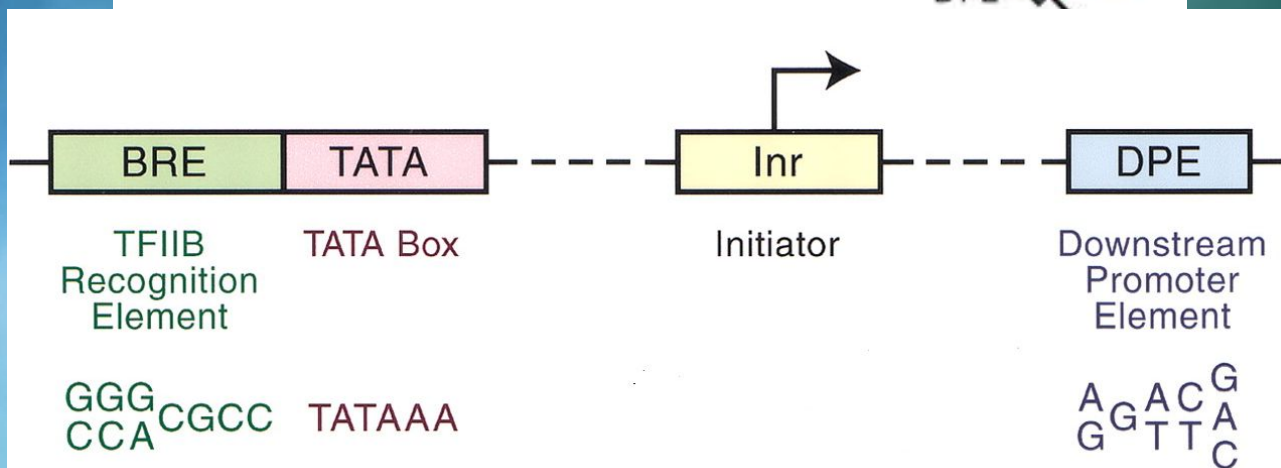
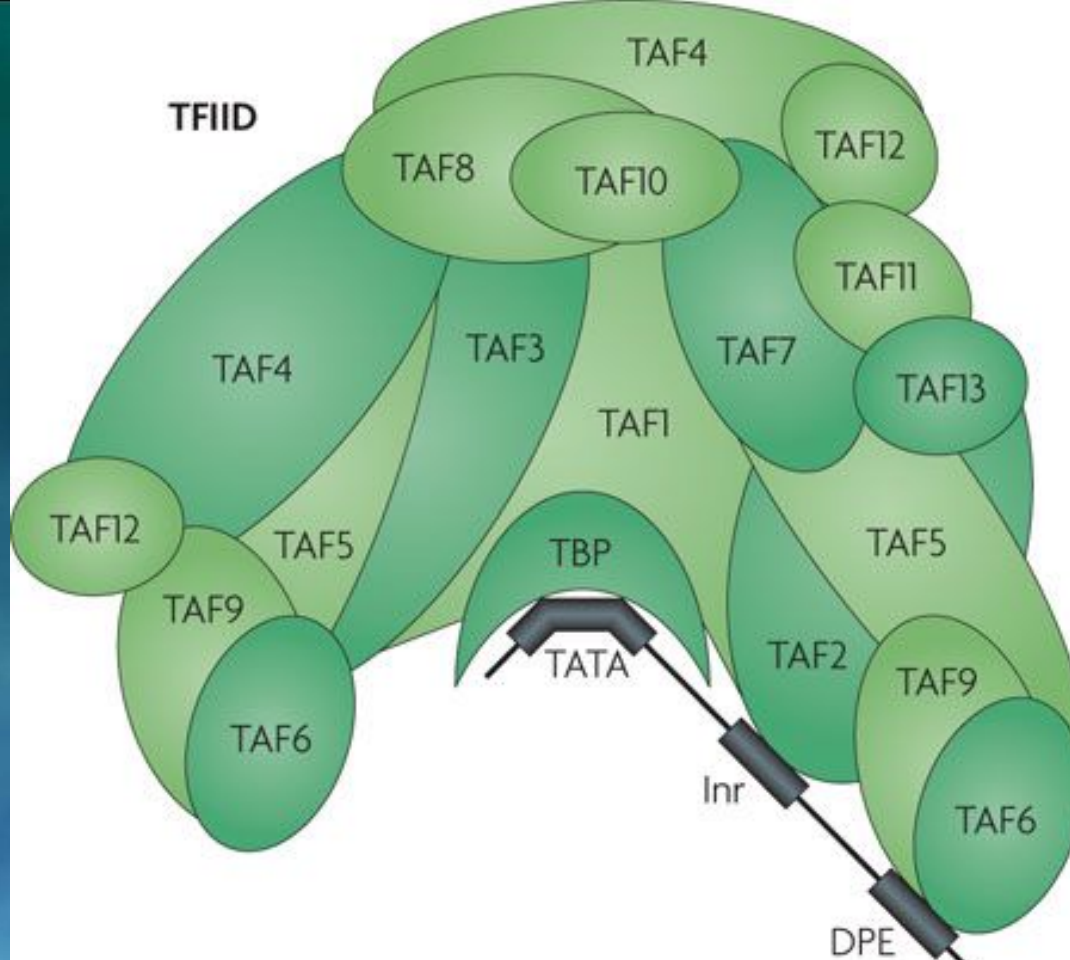
A**B****C****D**



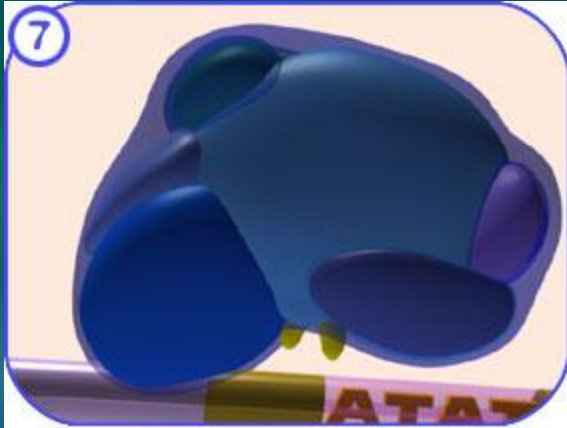
Инициация транскрипции «в комиксах»



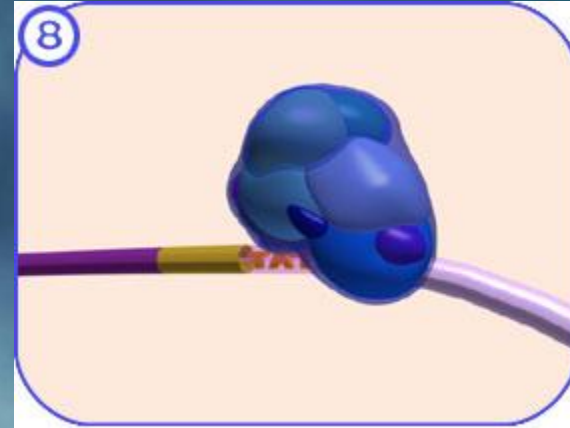
TFIID самый крупный фактор транскрипции. Желтый участок - TBP



Инициация транскрипции «в комиксах»

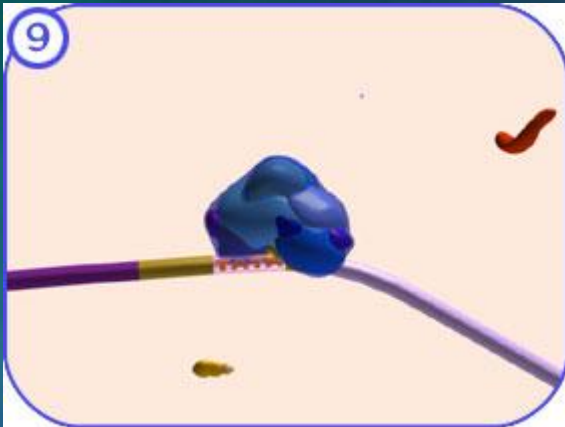


ТВР связывается с ТАТА боксом и располагается рядом с сайтом инициации

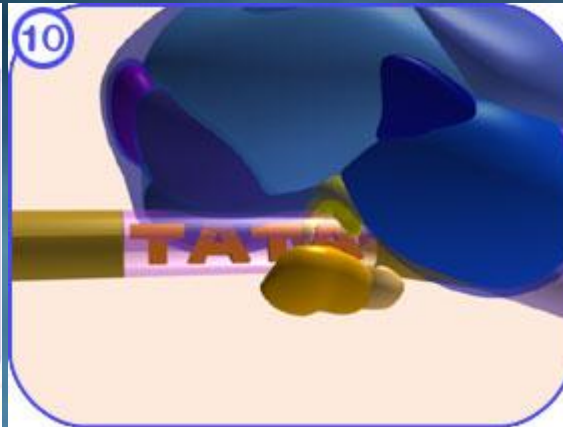


Это присоединение вызывает формирование изгиба ДНК

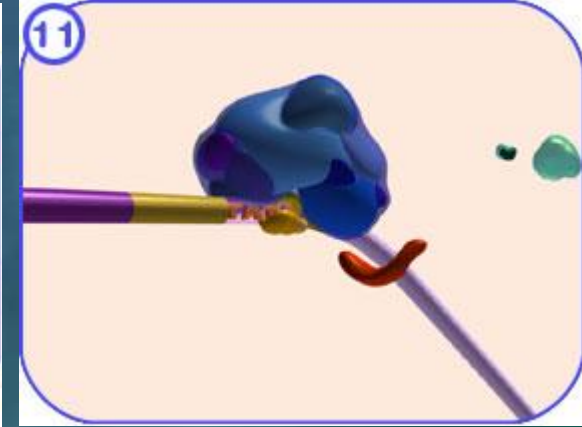
Инициация транскрипции + Pol II «В КОМИКСАХ»



Затем подходят факторы TFIIA (оранжевый) и TFIIB (красный)

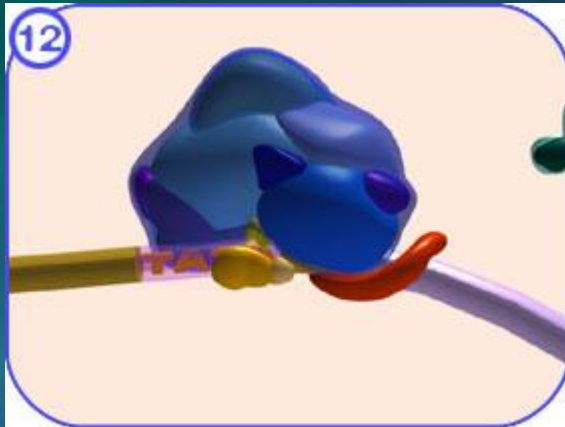


TFIIA присоединяется к TATA рядом с TFIID

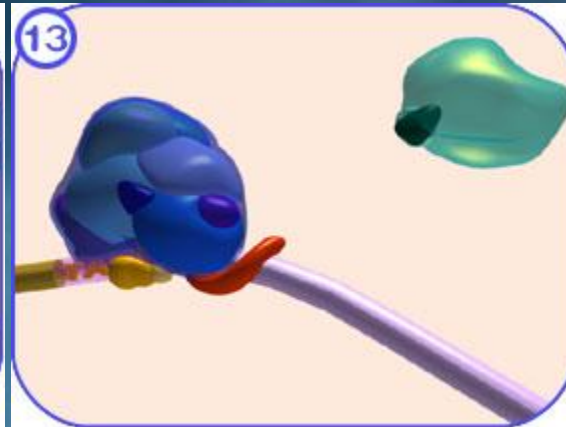


TFIIB подходит к TATA.
Pol II собирается дистанционно

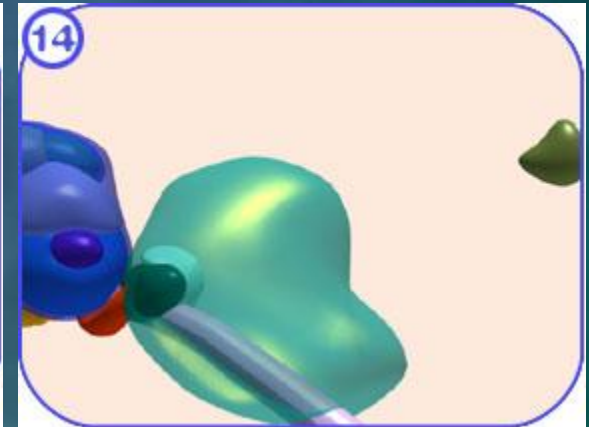
Инициация транскрипции + Pol II «В КОМИКСАХ»



TFIIB связывается с TATA и TFIID и способствует присоединению Pol II

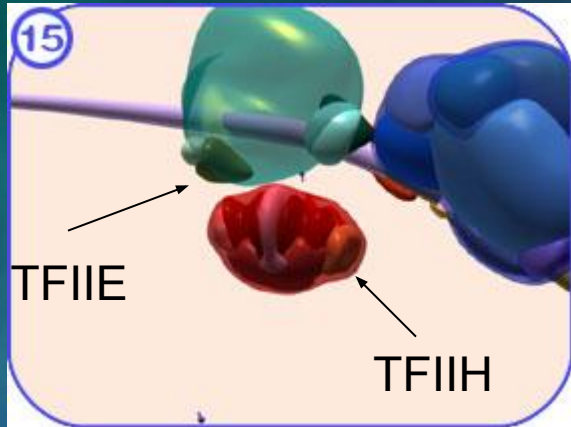


Pol II собран и подходит к точке инициации транскрипции

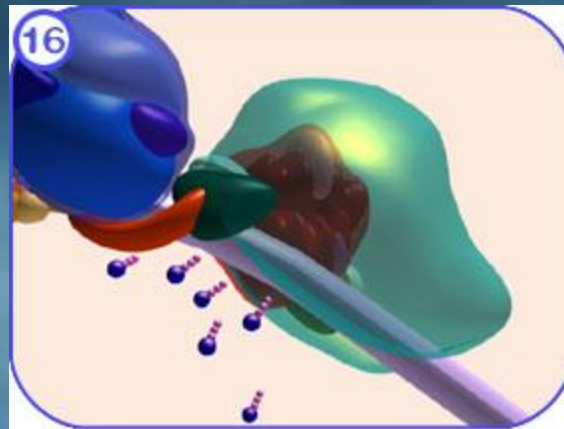


К сформированному комплексу подходит фактор TFIIE

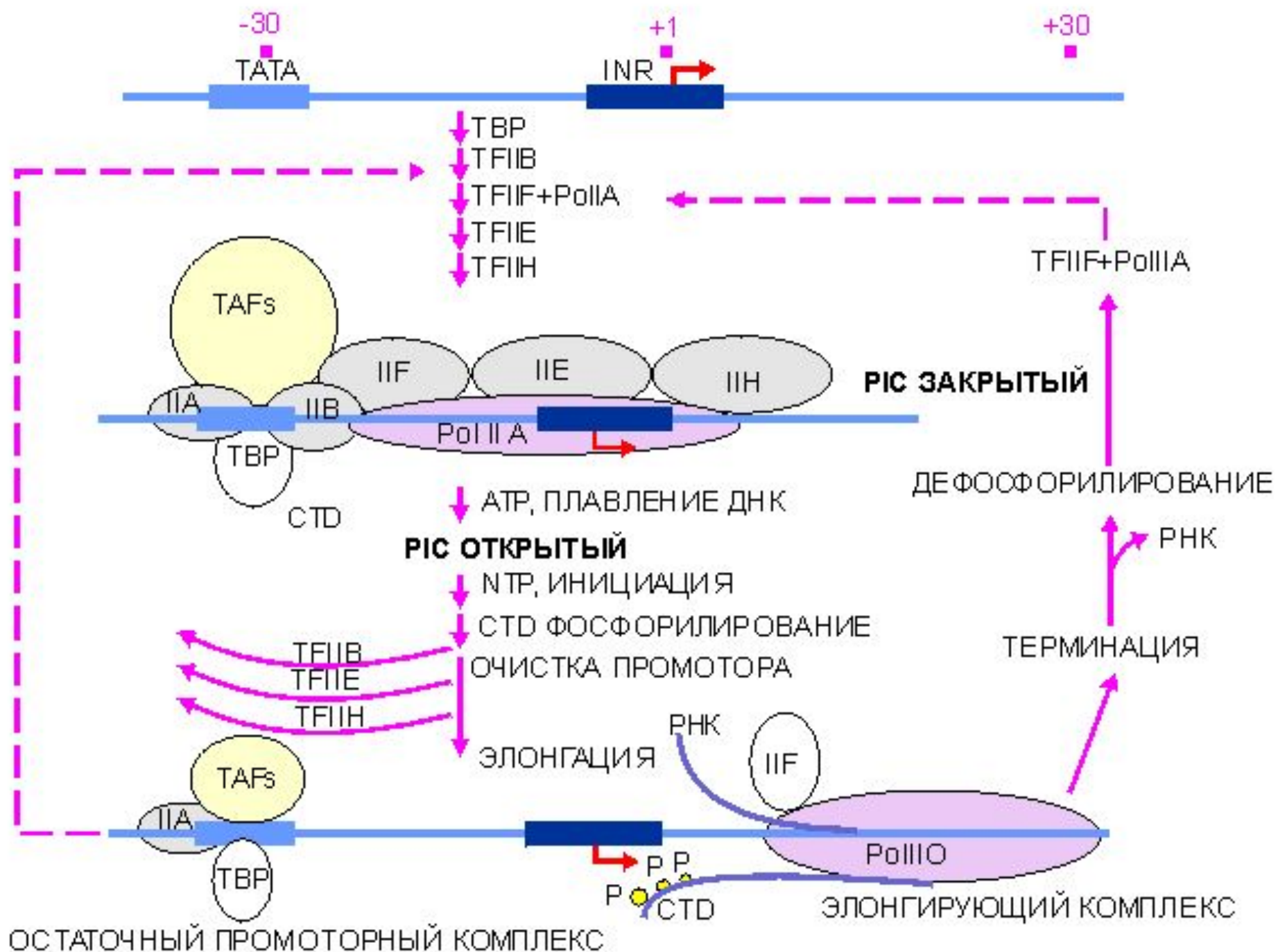
Инициация транскрипции + Pol II «В КОМИКСАХ»



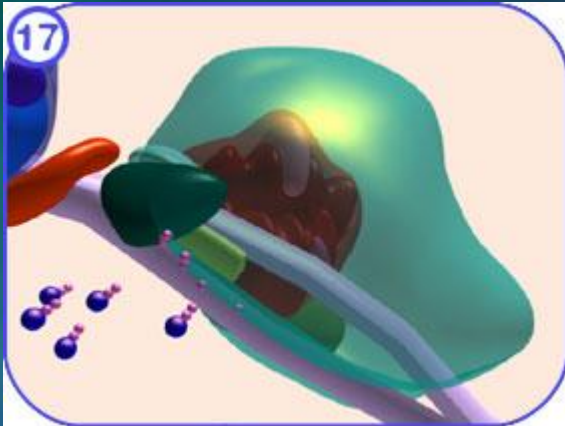
TFIIE связывается,
подходит TFIIH



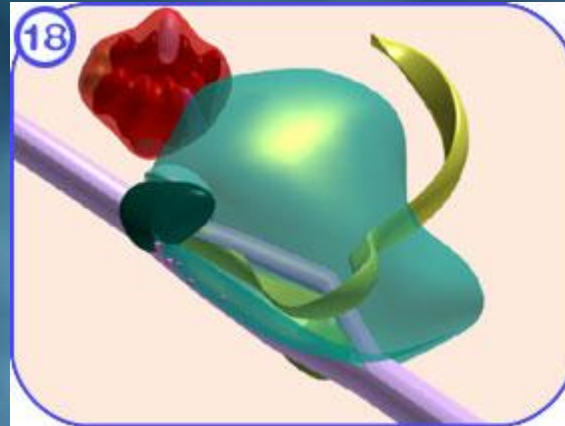
Все готово и для
инициации
транскрипции
требуется энергия
АТФ



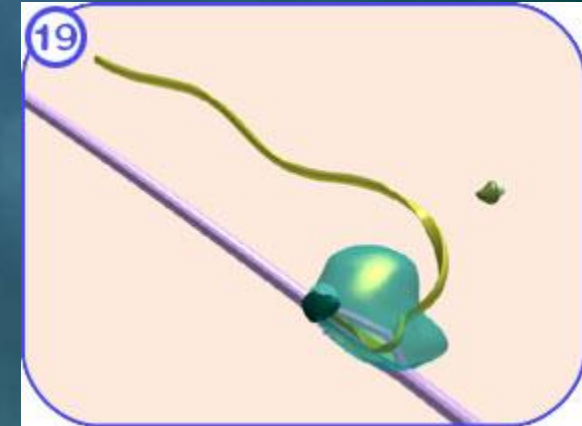
Элонгация транскрипции «В КОМИКСАХ»



В двухцепочечной ДНК формируется «глаз», обеспечивающий доступ Pol II к единице транскрипции и начинается синтез мРНК

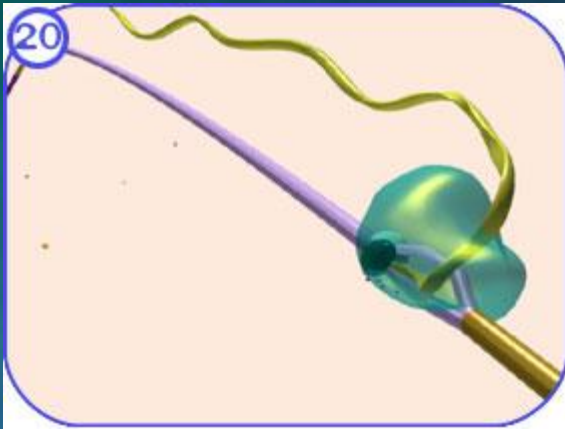


Начинается элонгация цепи и факторы TFIIE, TFIIH, TFIIA, TFIIB отсоединяются

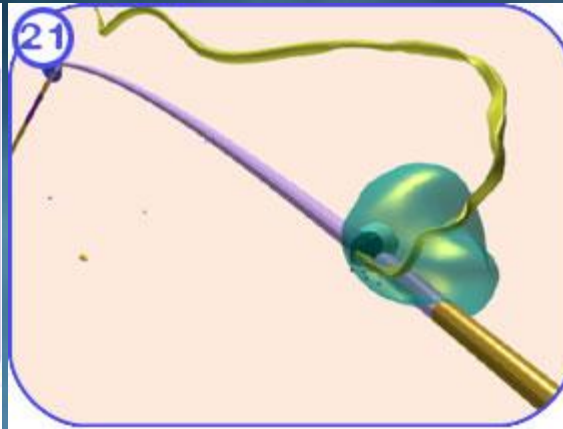


TFIIE действует дистанционно и мРНК быстро растёт

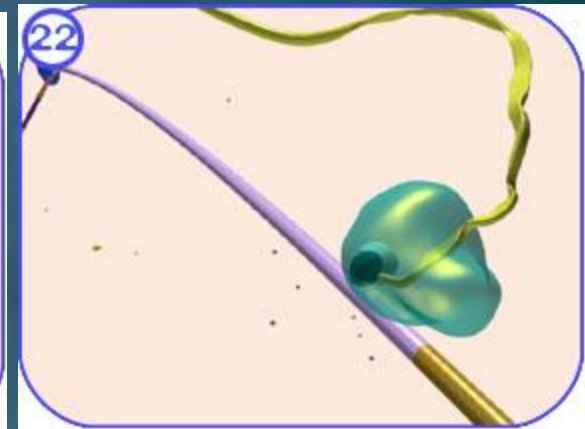
Элонгация транскрипции «В КОМИКСАХ»



Элонгация мРНК
завершается когда
достигается конец
транскрипта

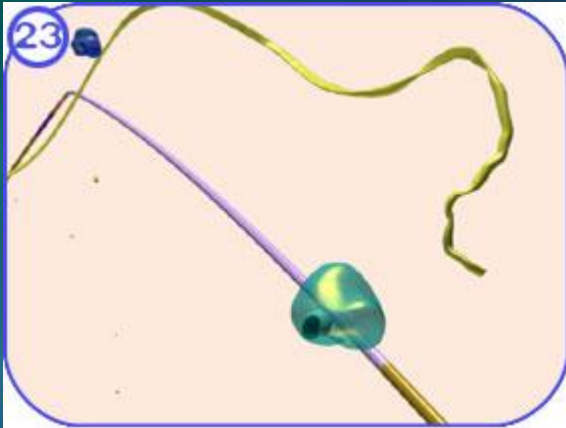


Закрывается
«глаз» в ДНК

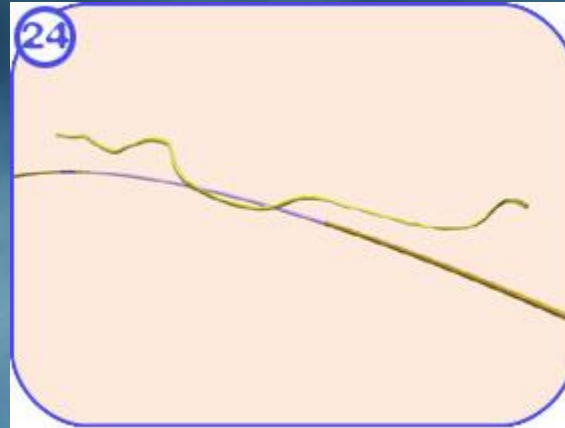


Pol II освобождается
вместе с
полученными от АТФ
фосфатами

Терминация транскрипции «В КОМИКСАХ»



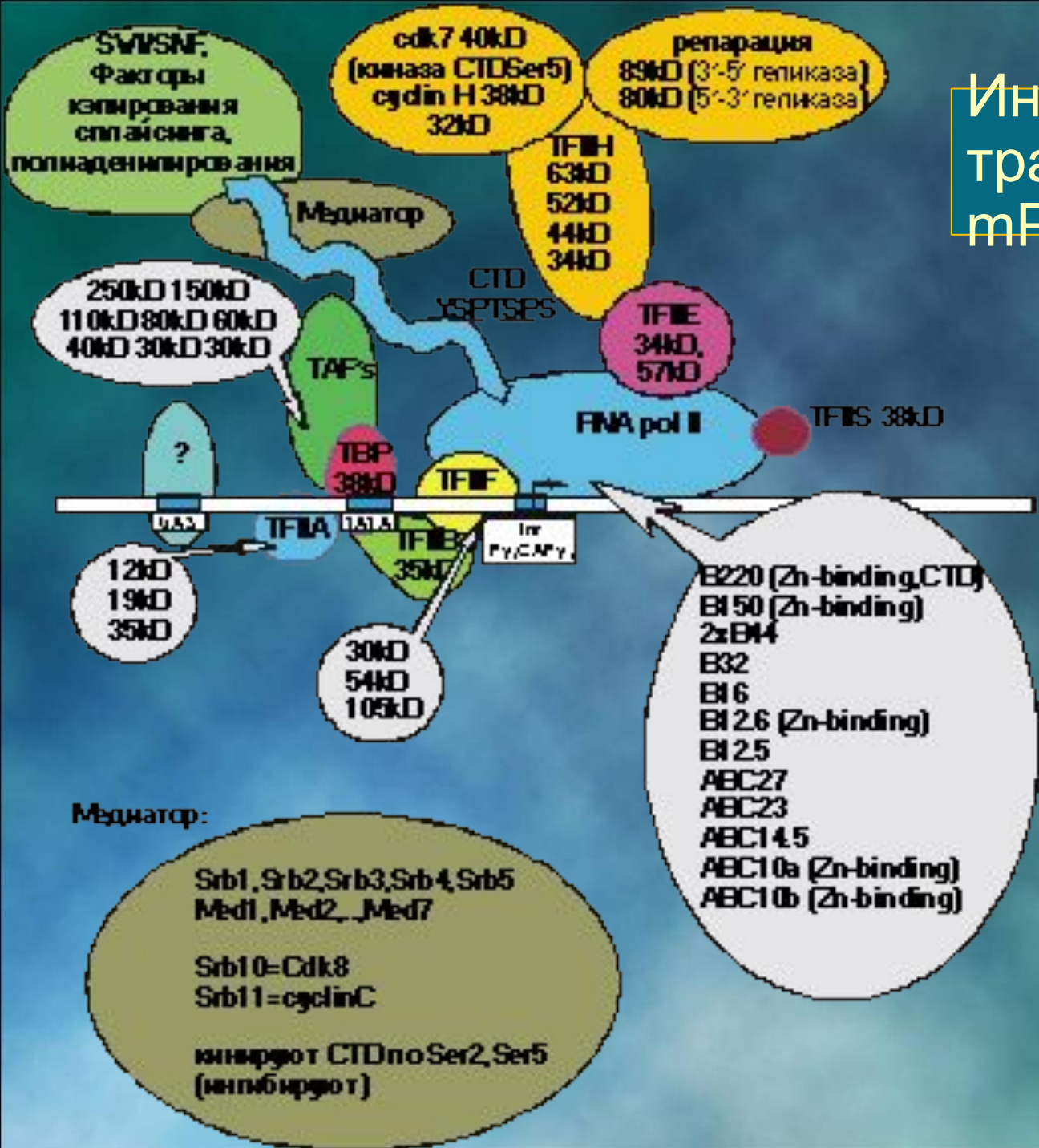
Комплекс Pol II отходит, мРНК освобождается. Фактор TFIIID отходит, позволяя ДНК вернуться в В-форму.



Первичный транскрипт готов и после процессинга будет транспортирован из ядра клетки

Инициация транскрипции мРНК

Ключевая стадия инициации транскрипции РНК полимеразой II – это посадка на промотор, а именно на **TATA** бокс, **TBP** и ассоциированных с ним факторов



Mediator:

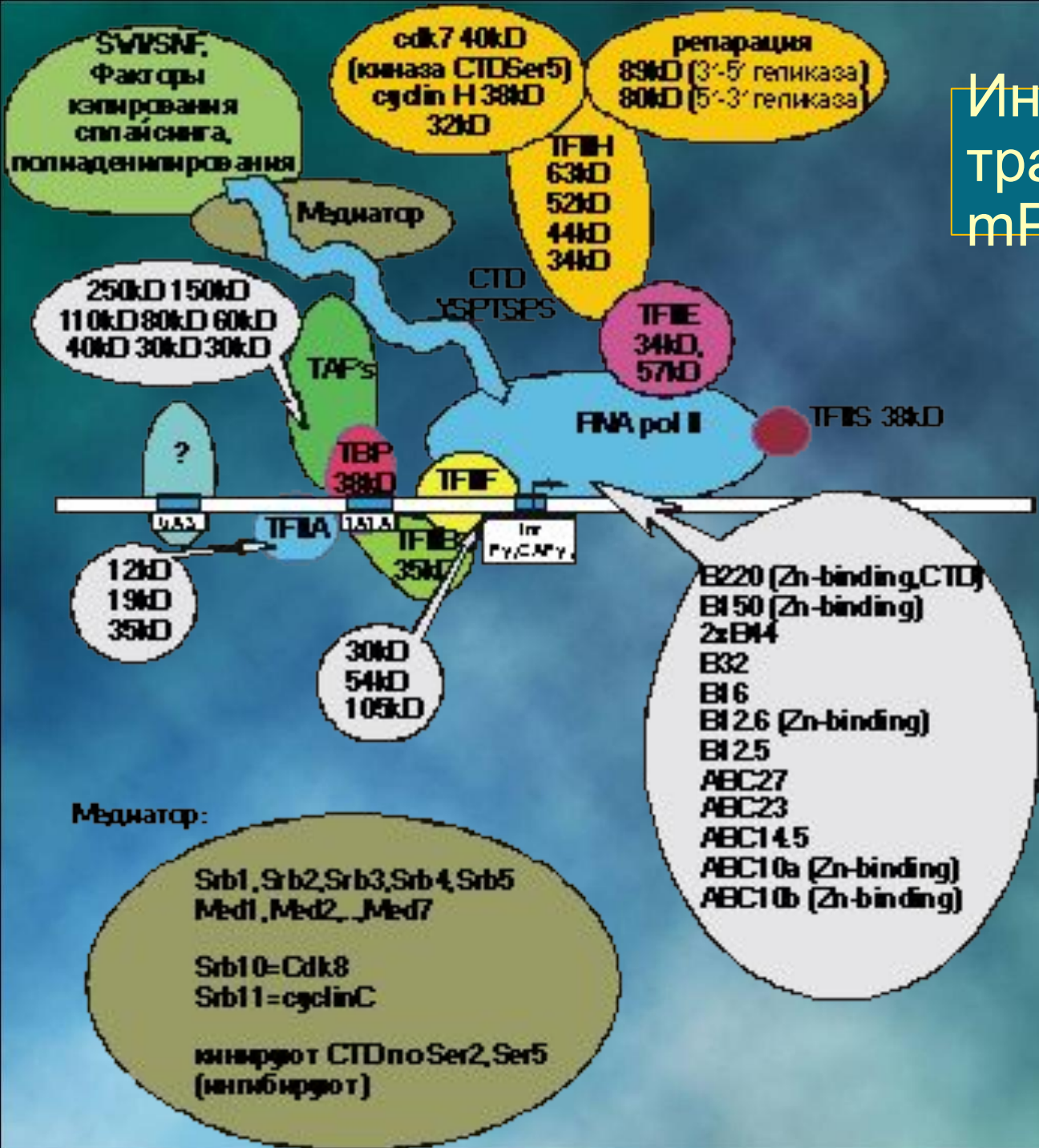
Srb1, Srb2, Srb3, Srb4, Srb5
Med1, Med2, Med7

Srb10=Cdk8
Srb11=cyclinC

киназа CTD по Ser2, Ser5 (ингибирует)

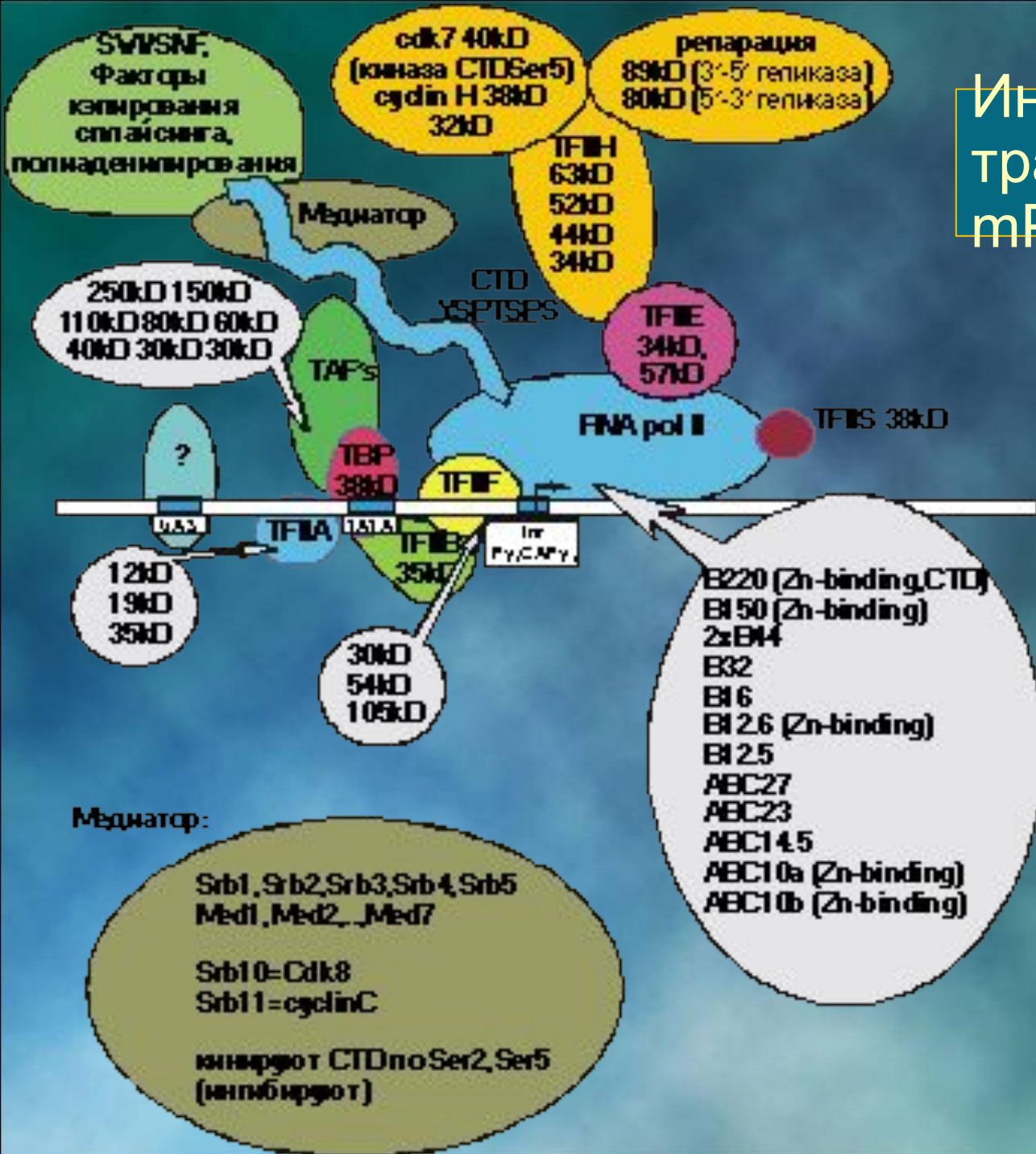
- B220 (Zn-binding, CTD)
- B150 (Zn-binding)
- ZnB14
- B32
- B16
- B126 (Zn-binding)
- B125
- ABC27
- ABC23
- ABC145
- ABC10a (Zn-binding)
- ABC10b (Zn-binding)

Инициация транскрипции мРНК



Большая субъединица белка TFIIF фосфорилируется. Эта субъединица является АТР-зависимой ДНК хеликазой

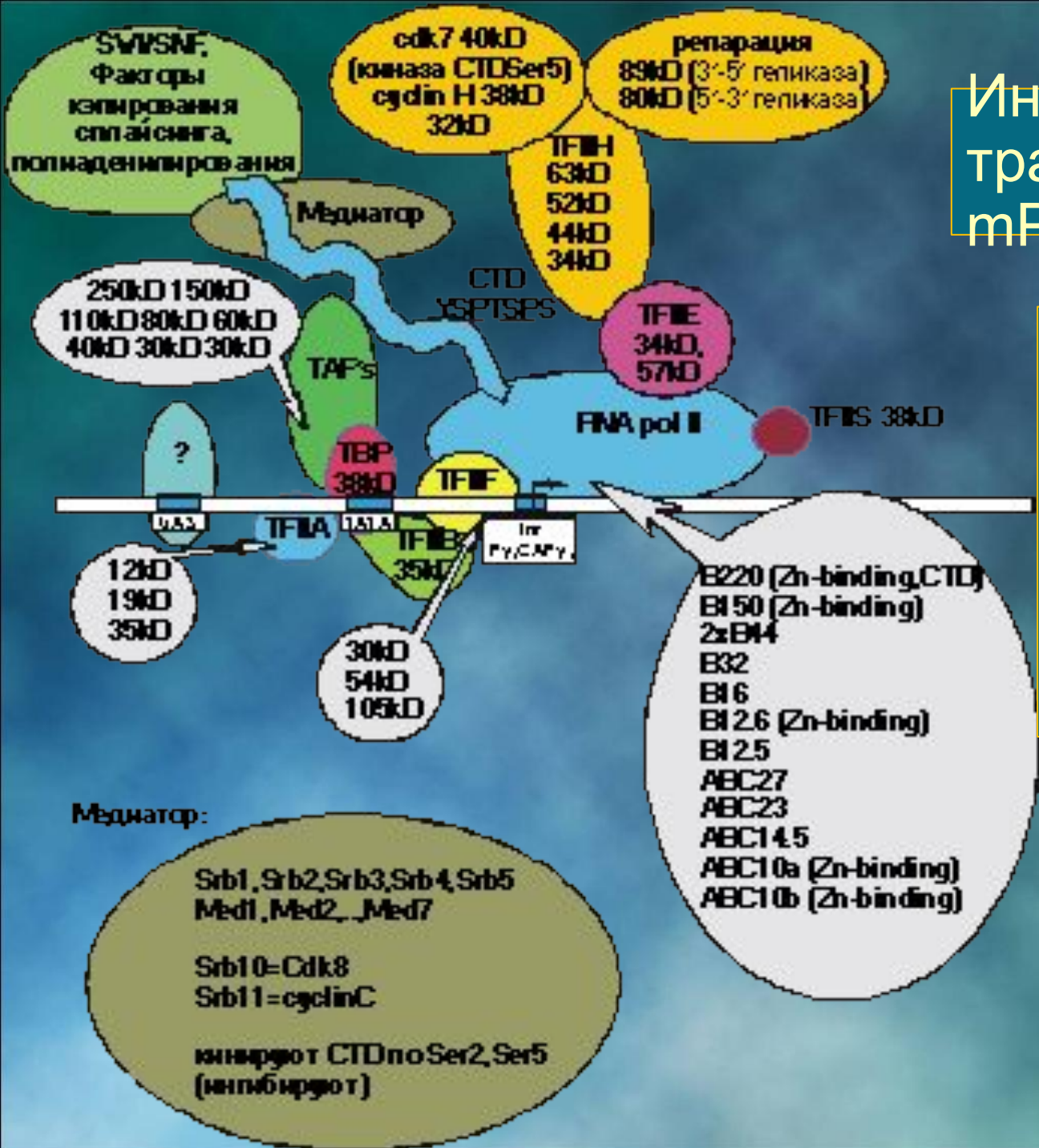
Инициация транскрипции мРНК



TFIIH - комплекс, важный для репарации и транскрипции. В его состав входят хеликазы, локально расплетающие ДНК в двух направлениях (5' и 3') и киназа С-концевого домена РНК полимеразы

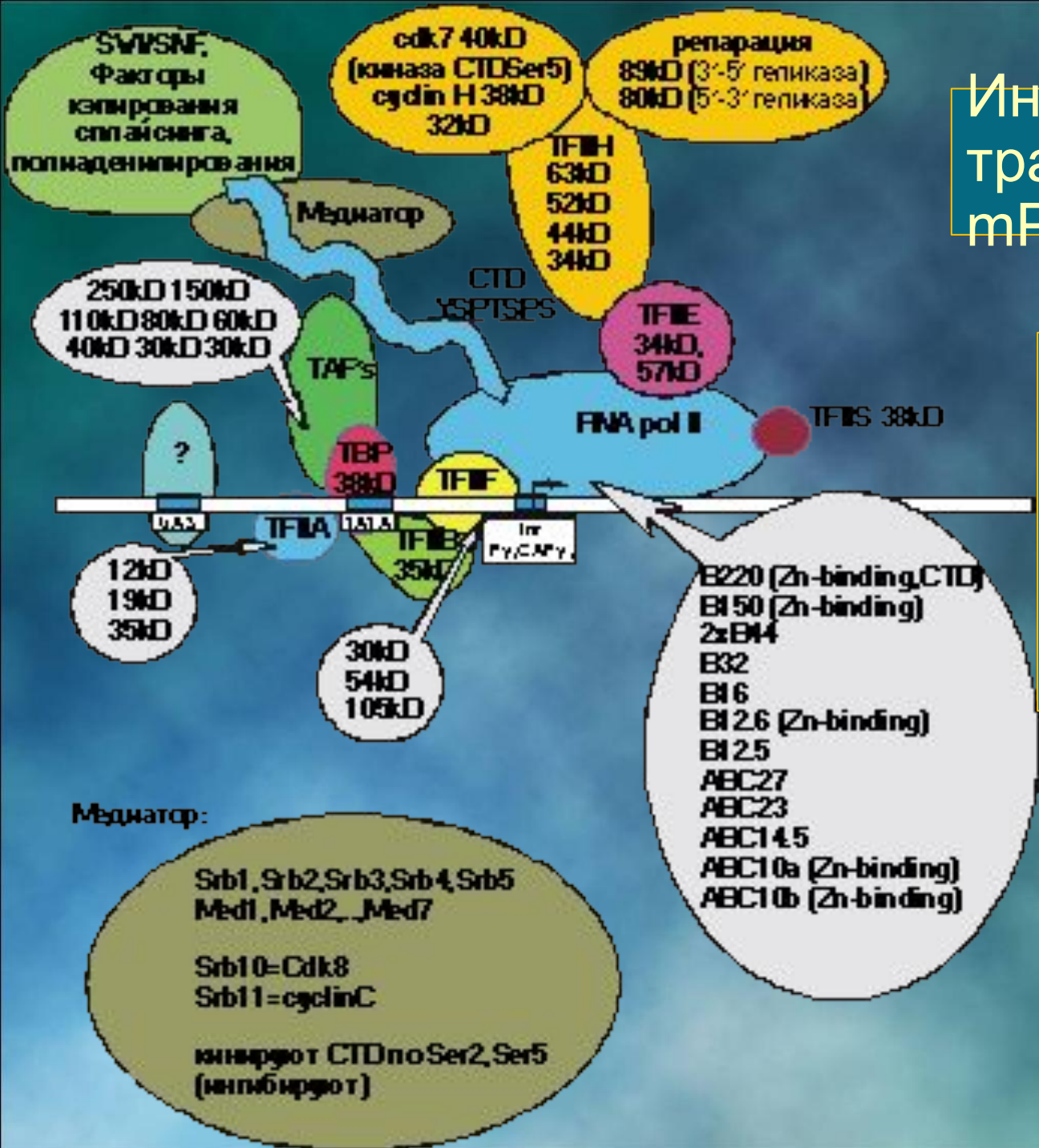
Инициация транскрипции мРНК

После фосфорилирования С-концевого домена CTD, РНК полимераза теряет сродство в инициаторному комплексу и начинает синтез РНК.



Инициация транскрипции мРНК

Помимо CTD, TFIIN фосфорилирует (активируя) несколько циклин-зависимых киназ: cdk2, 4 и 6, а также TFIIE (56kD) и TFIIF (74kD)



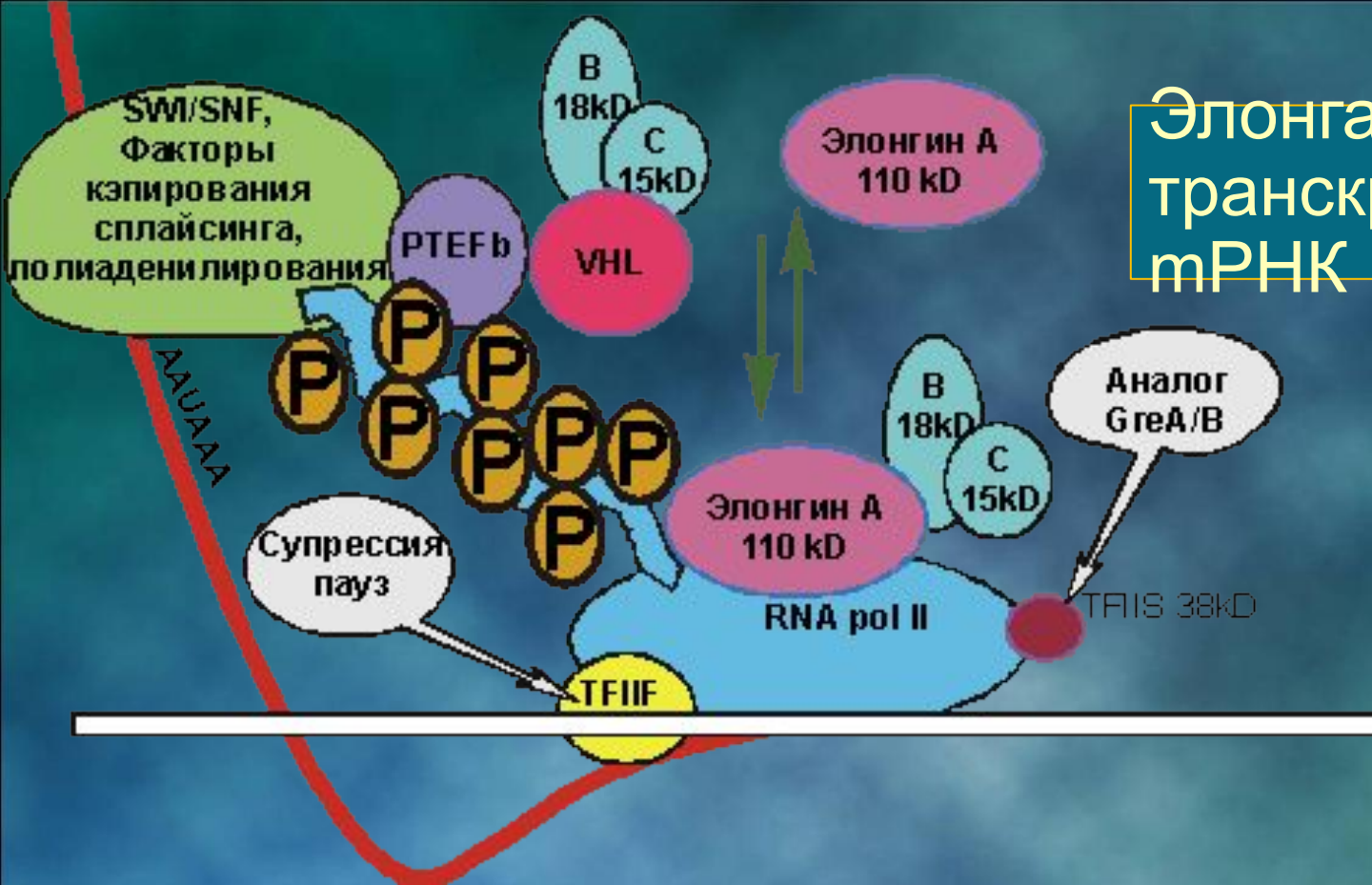
Меднатор:

- Srb1, Srb2, Srb3, Srb4, Srb5
- Med1, Med2, Med7
- Srb10=Cdk8
- Srb11=cyclinC
- киназа CTD по Ser2, Ser5 (ингибирует)

- B220 (Zn-binding, CTD)
- BI50 (Zn-binding)
- ZnB14
- B32
- BI6
- BI26 (Zn-binding)
- BI25
- ABC27
- ABC23
- ABC145
- ABC10a (Zn-binding)
- ABC10b (Zn-binding)

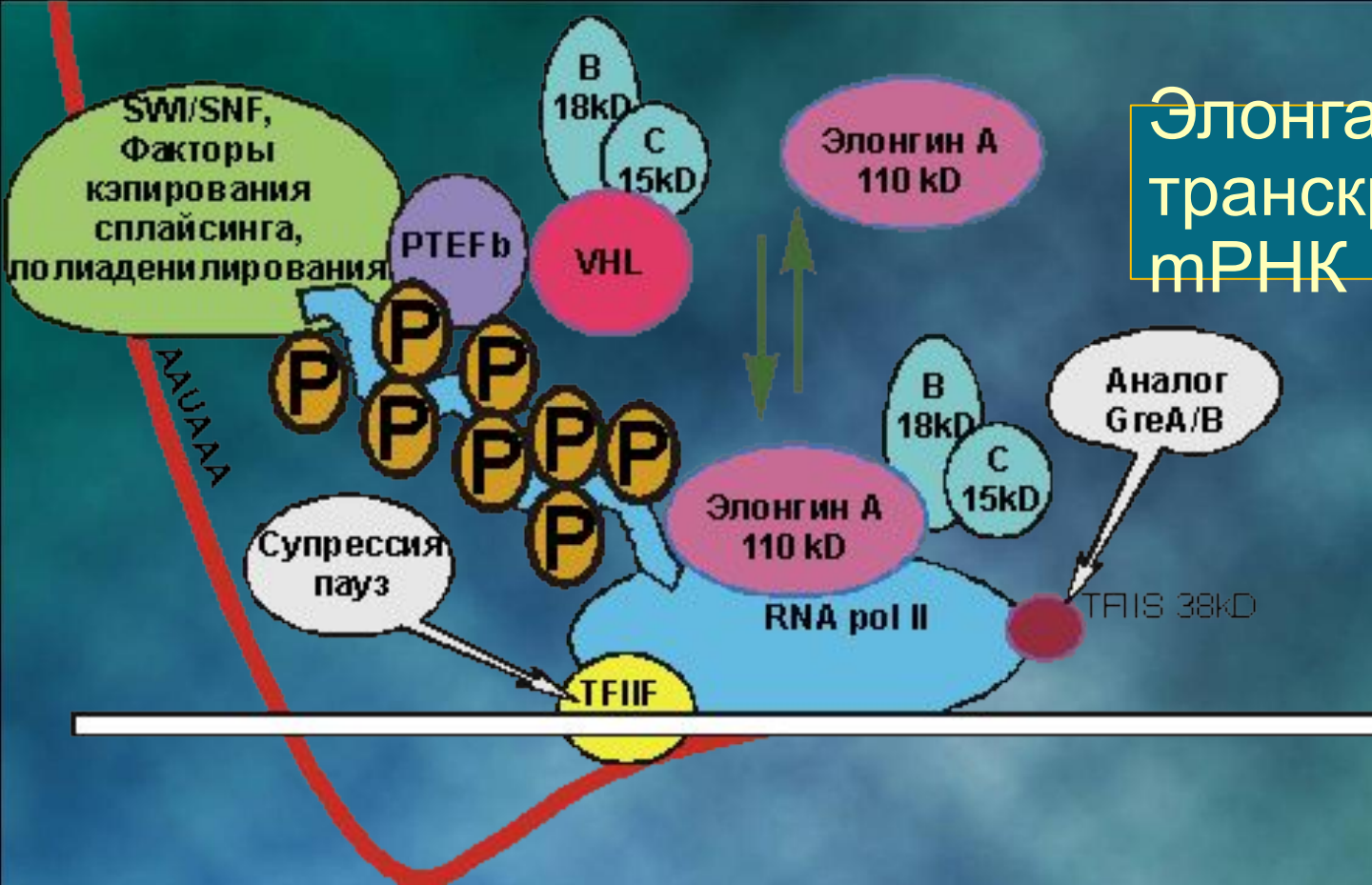
- Кроме описанных факторов в инициации транскрипции РНК полимеразой II участвует множество других.
- Они обеспечивают регуляцию транскрипции различных генов.

Элонгация транскрипции мРНК



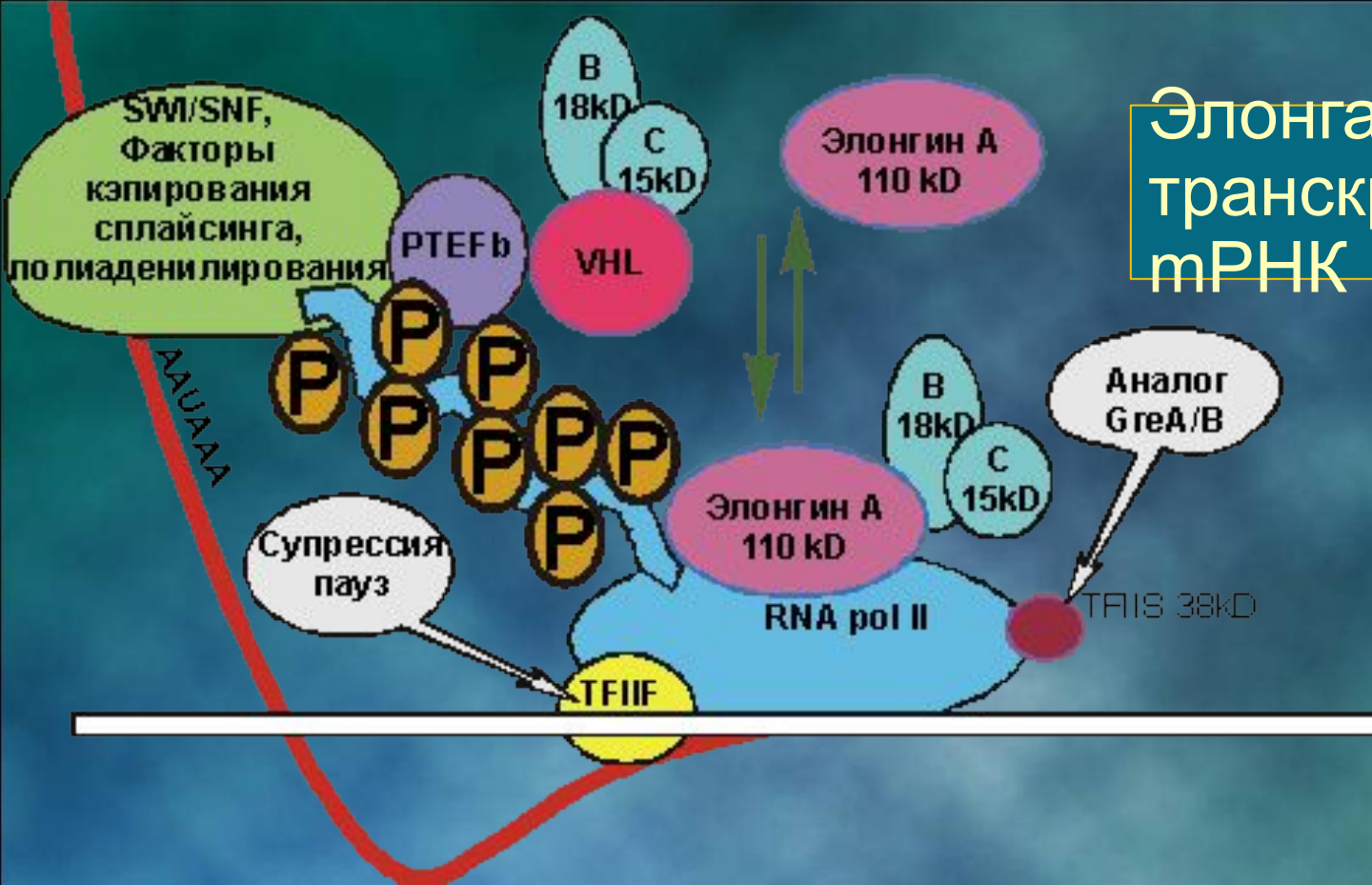
Кроме рTEFb, фактором элонгации РНК полимеразы II является гетеротример элонгин А.
Негативный регулятор этого фактора – VHL. Он связывает комплекс элонгинов В и С и предотвращает их ассоциацию с элонгином А

Элонгация транскрипции мРНК



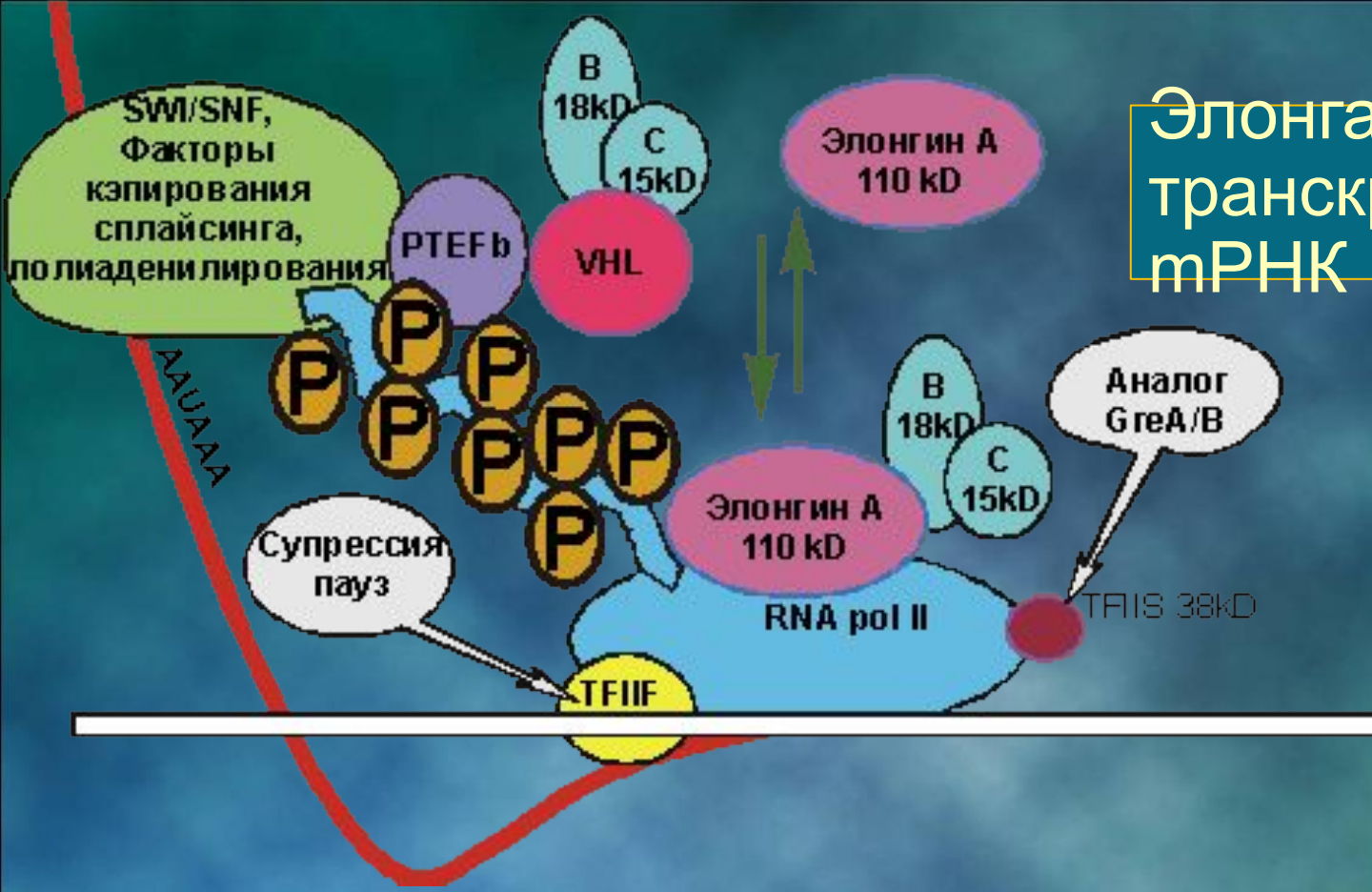
В процессе элонгации РНК полимеразы может встретиться те же проблемы, что и прокариотическая РНК полимеразы: повреждения ДНК, участки, вызывающие паузы и попадание в арестованное состояние

Элонгация транскрипции мРНК



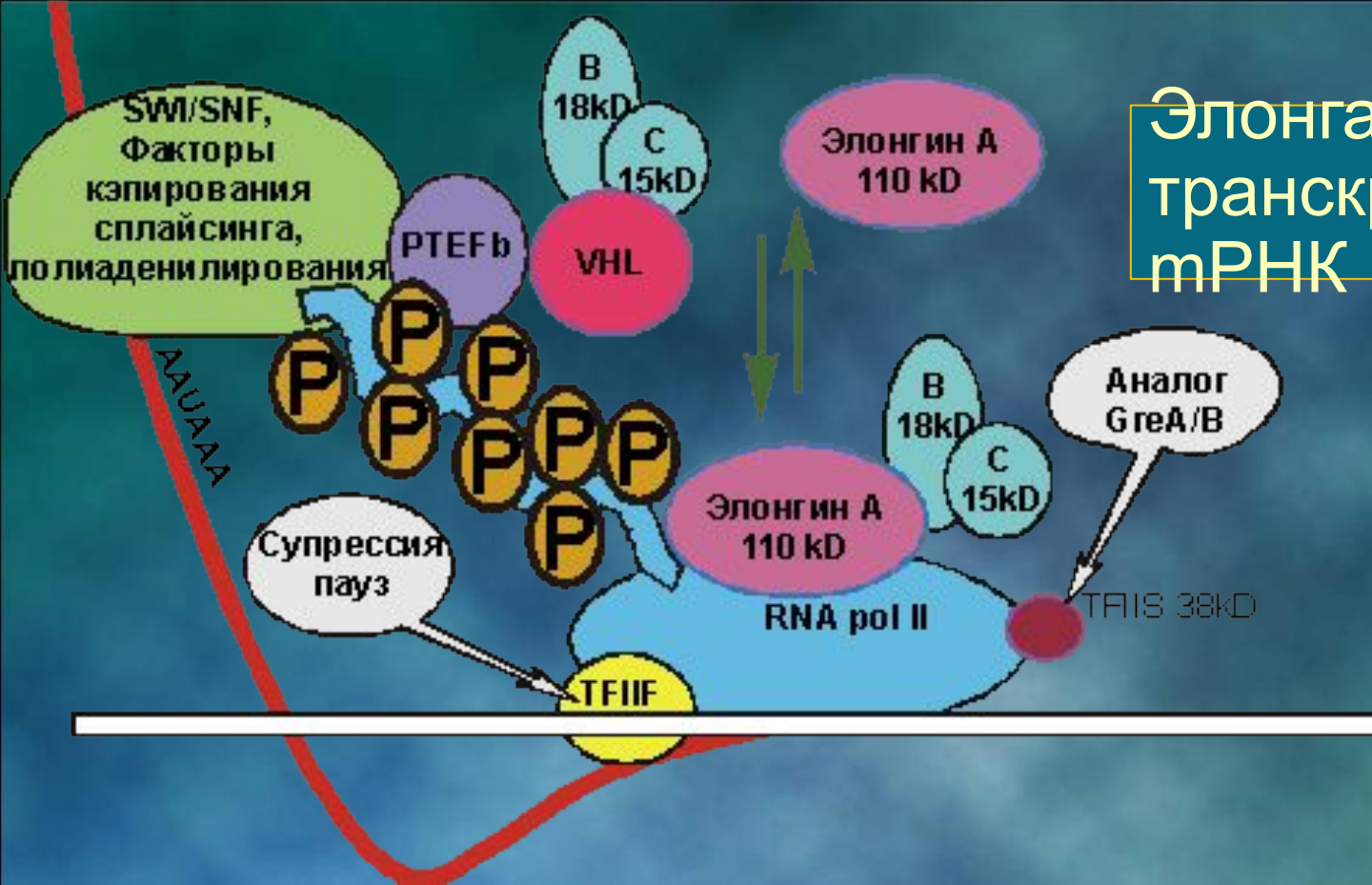
Если работающая РНК-полимераза встретит повреждение ДНК, нуждающееся в репарации, то с таким остановленным комплексом связываются белки **CSA** и **CSB**. Эти белки опосредуют посадку факторов репарации на повреждение, а также играют важную роль для восстановления транскрипции после репарации.

Элонгация транскрипции мРНК



За супрессию пауз РНК-полимеразы отвечает TFIIF, а за выход из арестованного состояния – TFIIS.

Элонгация транскрипции мРНК



Кроме факторов, обеспечивающих элонгацию транскрипции, с фосфорилированной формой РНК полимеразы II связываются белки, участвующие в процессинге пре-мРНК. Среди них и аппарат разрезания - полиаденилирования, отвечающий за терминацию транскрипции.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА. ТРАНСКРИПЦИЯ РНК ЭУКАРИОТ

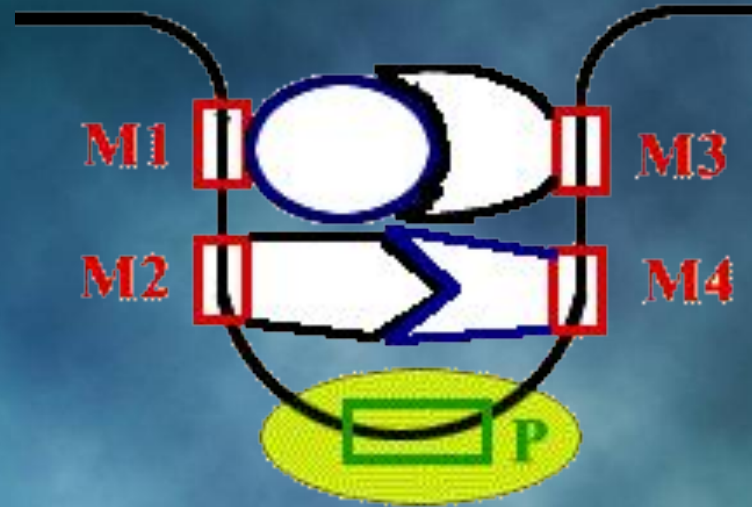
Регуляция транскрипции



Некодирующие регуляторные элементы

- Геном животных и человека – сложнейшая система с многоуровневой системой регуляции.
- Важную роль в процессах регуляции играют некодирующие последовательности: энхансеры, сайленсеры, инсуляторы. Они определяют уровень транскрипции генов.

Энхансеры. Структура.



Энхансеры - это последовательности ДНК, формирующие модули.

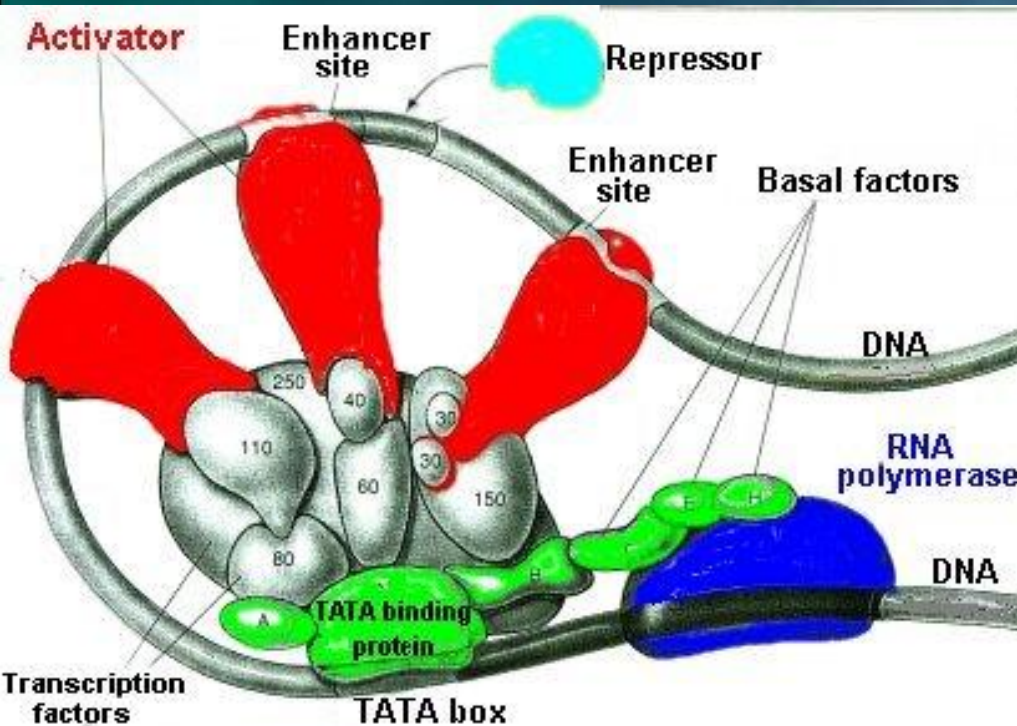
Модули - это отдельные части энхансеров.

Например, M1+M2+M3+M4 - один энхансер, но он состоит из 4-х модулей.

Все 4 модуля узнаются своими белками, а они, сидя на ДНК, взаимодействуют друг с другом.

Если в клетке присутствуют все соответствующие белки, то участку ДНК придается определенная конформация и начинается синтез РНК.

Энхансеры: «петлевая модель» действия



Активаторы (Activators) - белки, связывающиеся с энхансерами, которые помогают РНК-полимеразе правильно начать транскрипцию.

Репрессоры (Repressor)- белки, которые связывают активаторы, чем снижают или прекращают транскрипцию.

Основные факторы (Basal factors)- белки, которые ориентируют РНК-полимеразу на начало структурной части гена. TATA box (или Pribnow box)- часть промотора, являющаяся сайтом связывания для белковых факторов.

Транскрипционные факторы (Transcription factors)- помогают занять правильную позицию активаторам и РНК- полимеразе.

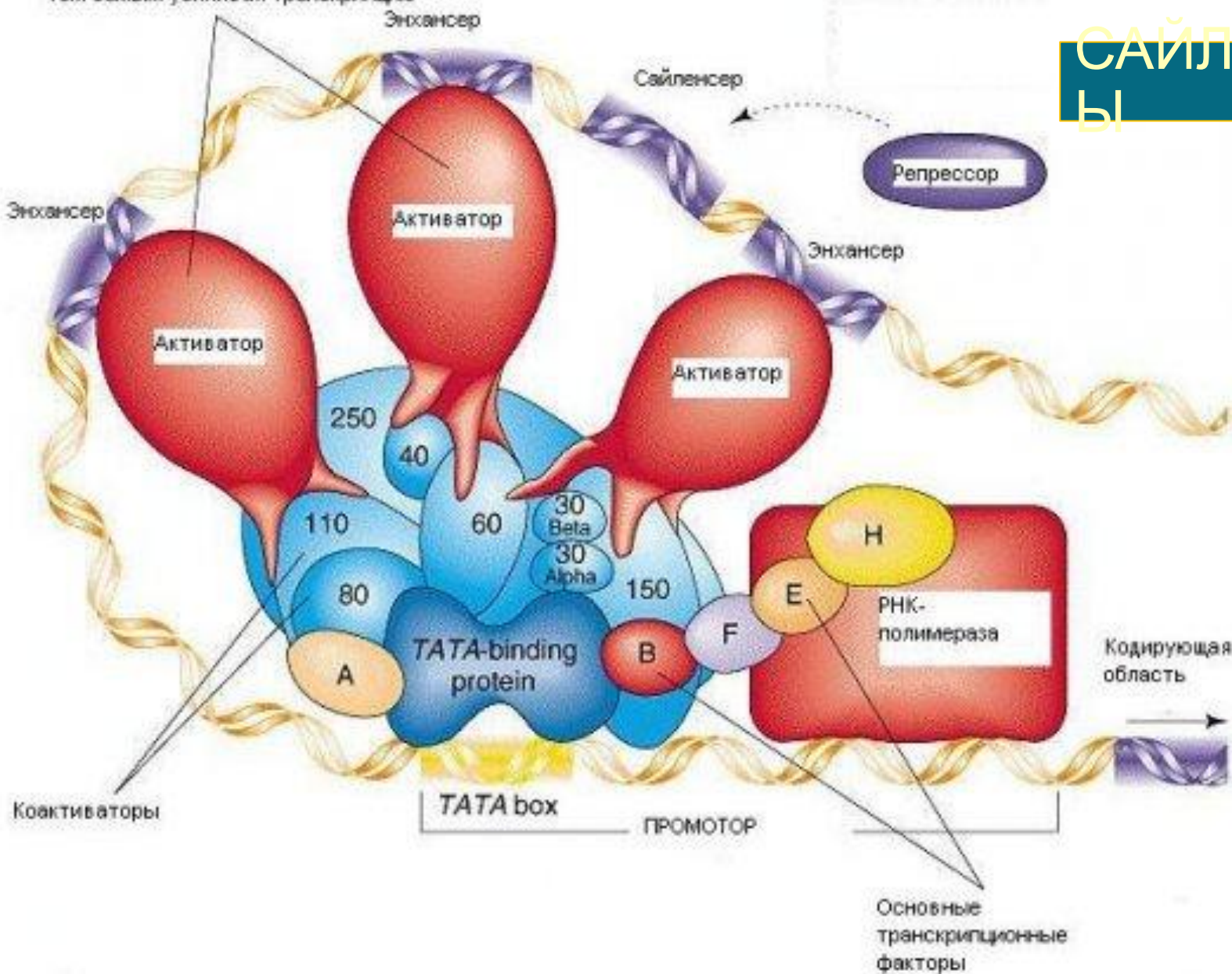
АКТИВАТОРЫ

Активаторы связываются с энхансерами, помогая определить какие гены являются активными и тем самым усиливая транскрипцию

РЕПРЕССОР

Репрессор связывается с сайленсером, подавляя функционирование активаторов, снижая транскрипцию

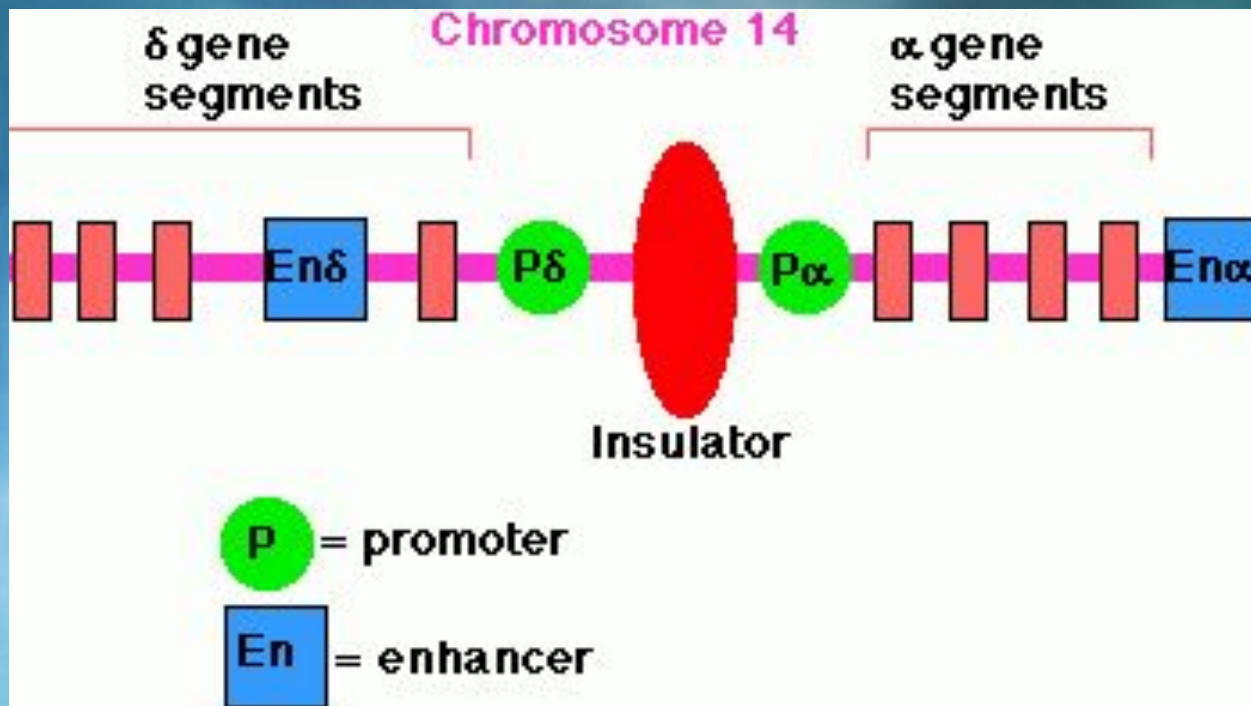
САЙЛЕНСЕРЫ



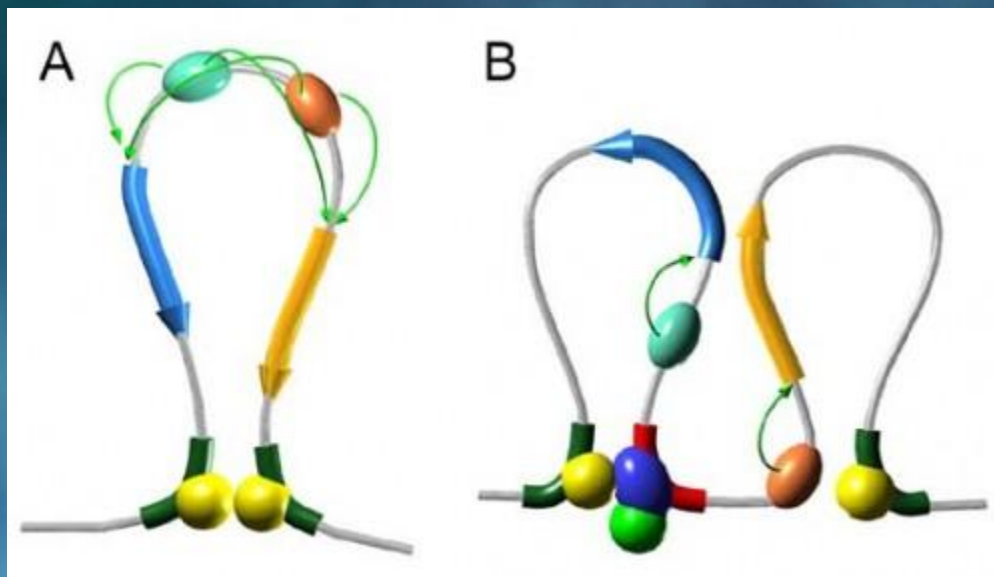
Инсуляторы (англ. insulate - изолировать)

Последовательности нуклеотидов, которые могут подавлять позитивное и негативное влияние эухроматина и гетерохроматина на экспрессию генов, 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.

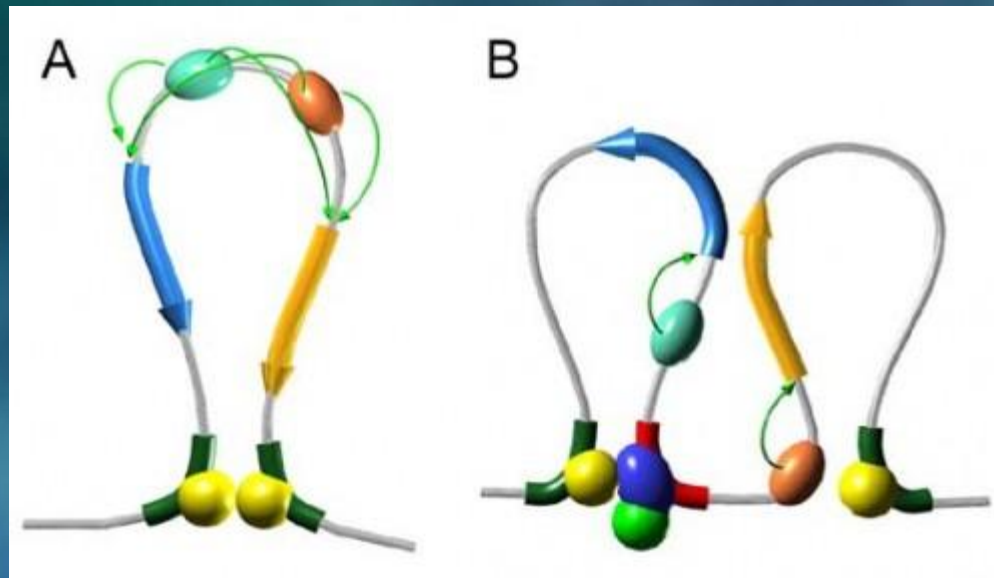


Механизм действия инсуляторов



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

Механизм действия инсуляторов



В Если пограничный элемент, 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 инсулятора. Энхансер может активировать транскрипцию с промотора голубого гена, который остался в том же домене.

