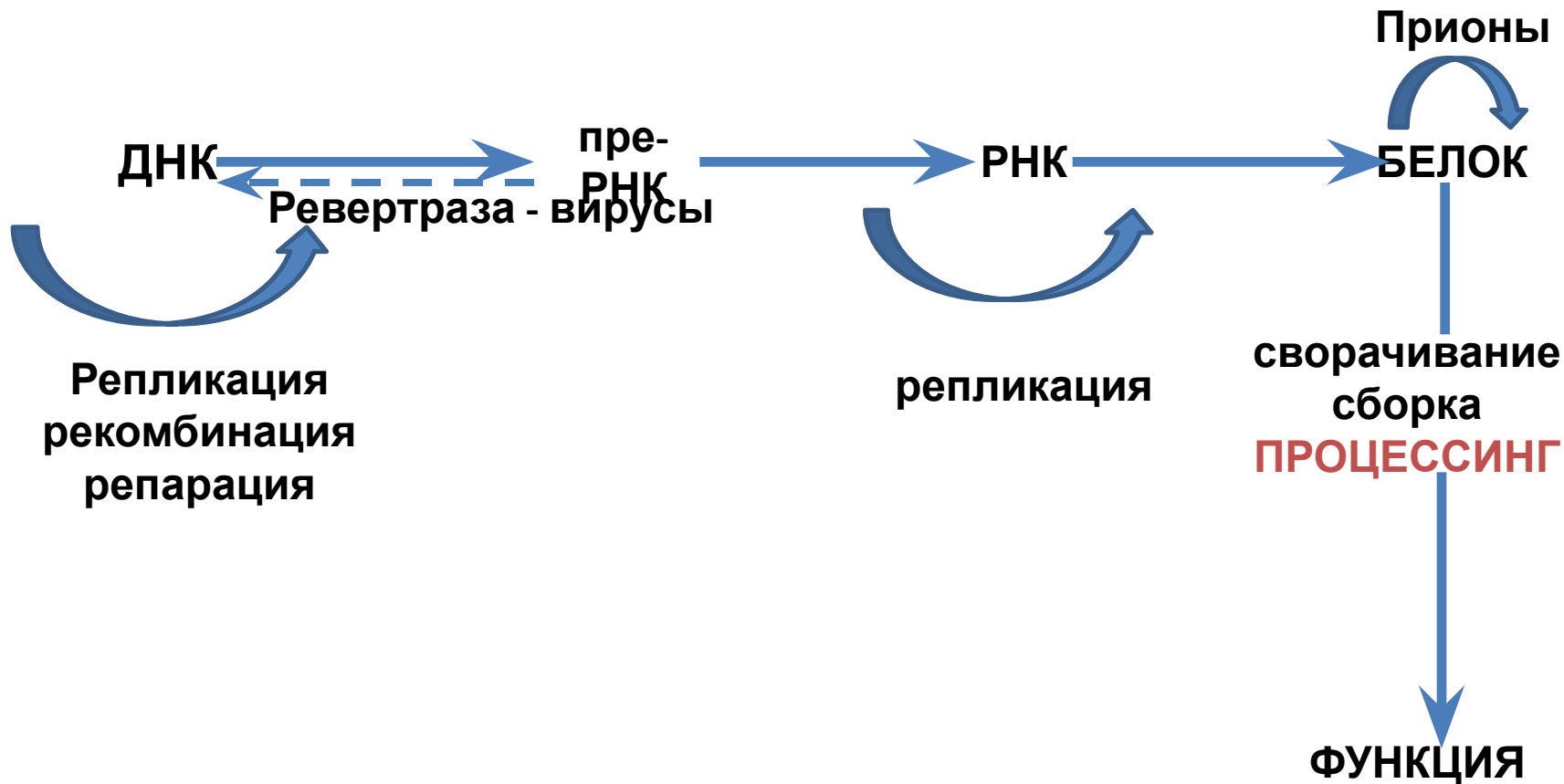


Молекулярные основы наследственности. Биосинтез белка. Транскрипция.



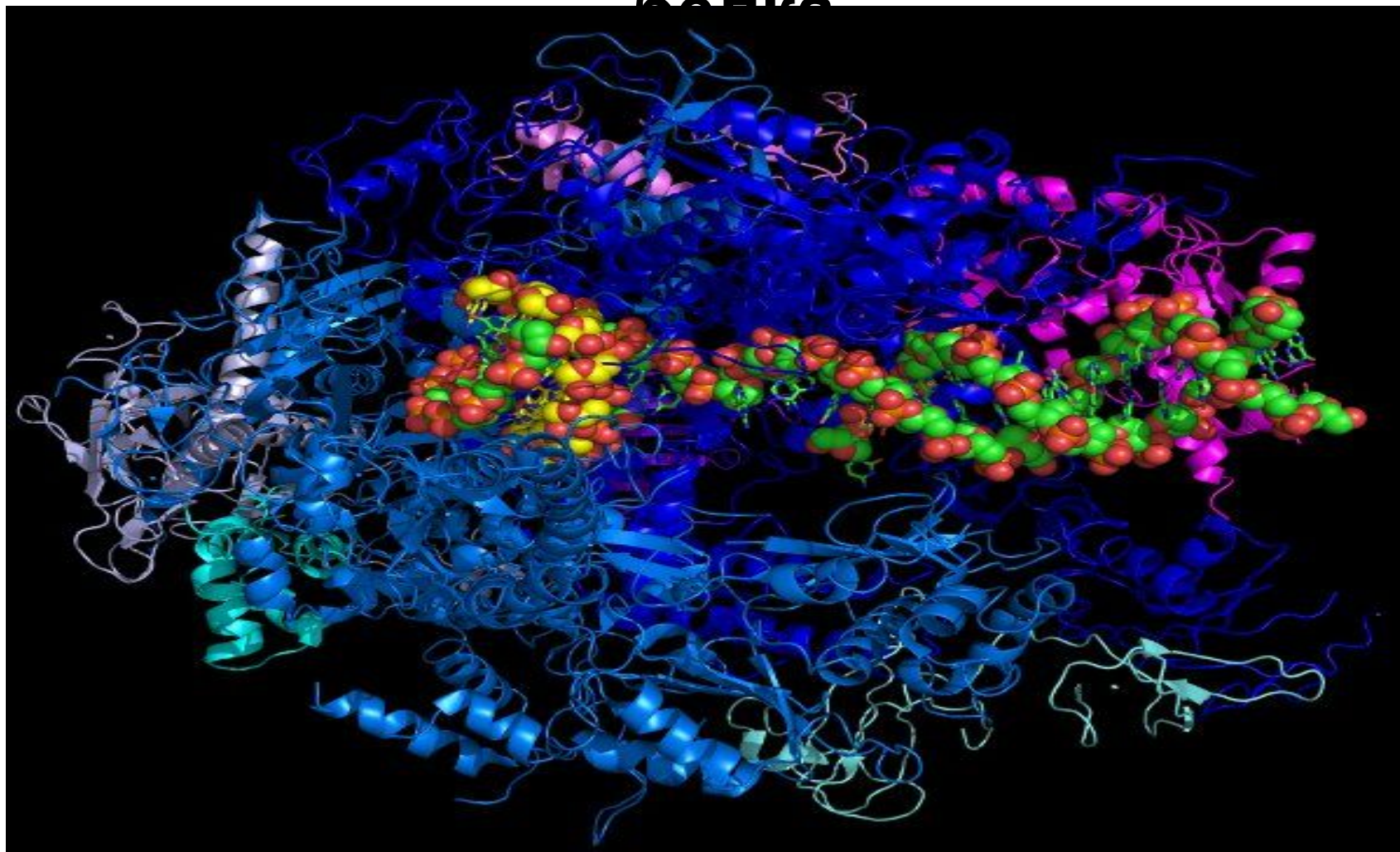
Процессинг РНК как компонент центральной догмы молекулярной биологии

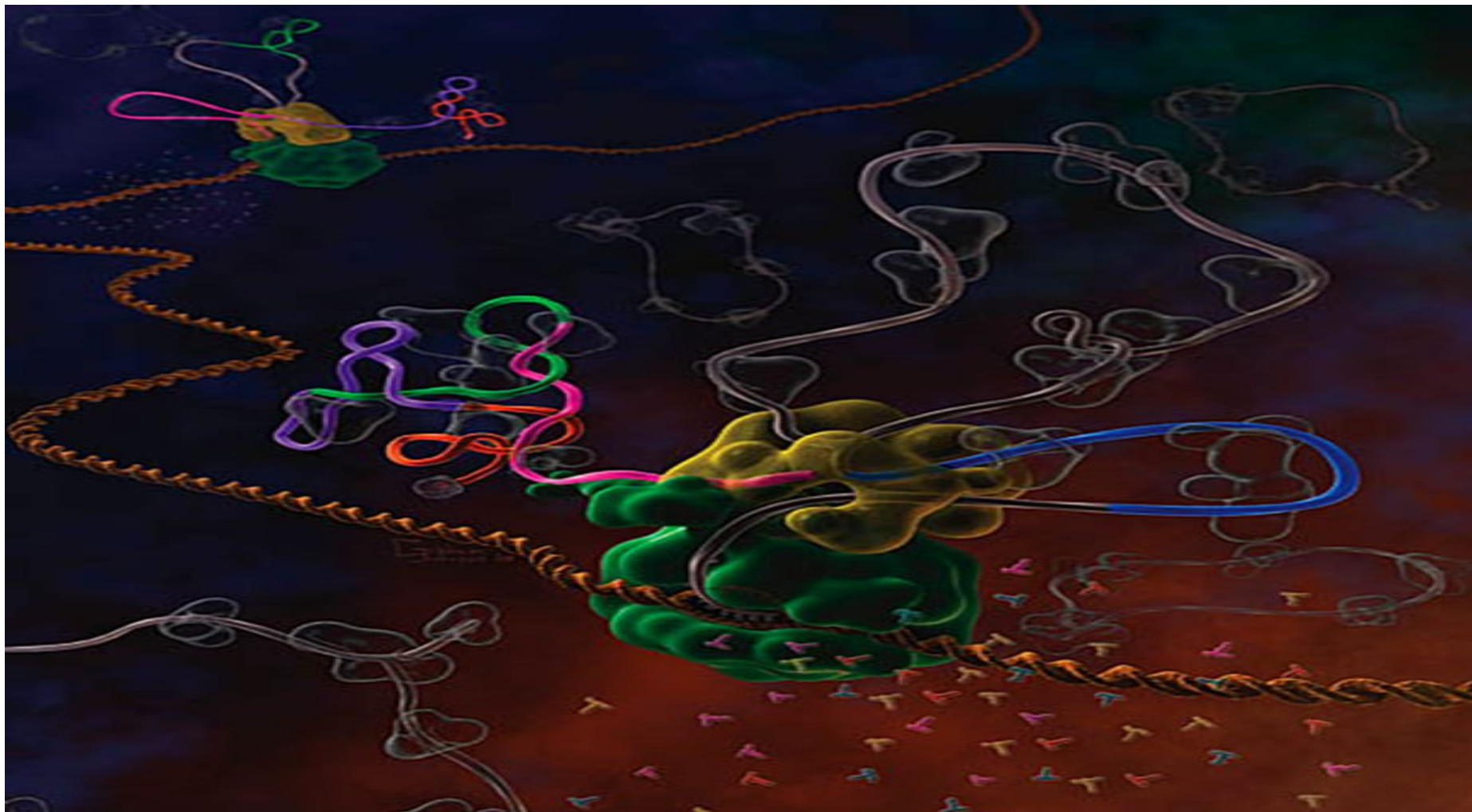


1. Особенности транскрипции.

Так выглядит транскрипция – синтез РНК для последующего производства

белка



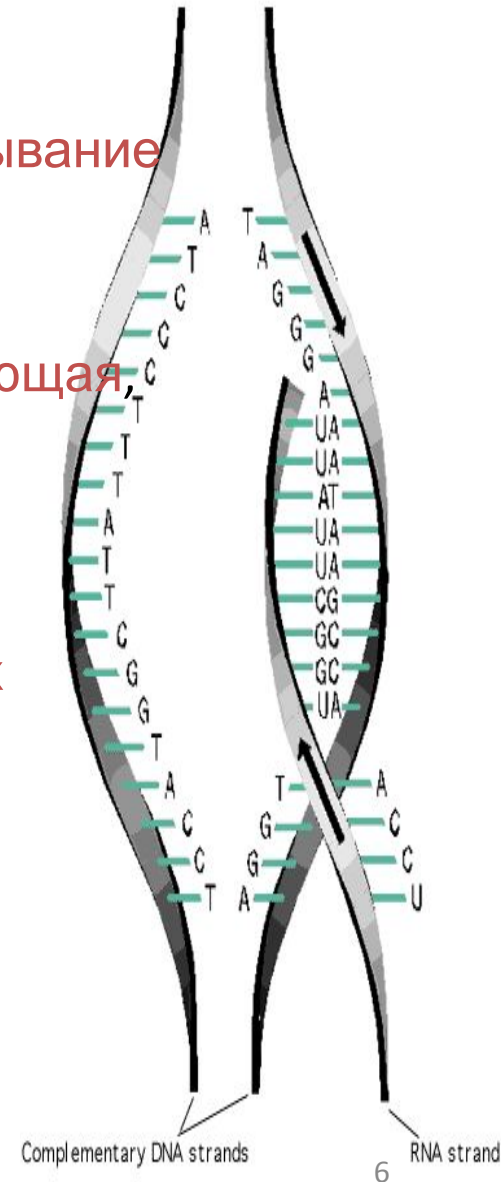


Фермент РНК-полимераза (зеленые комки) ползет по молекуле ДНК (скрученный тяж) и «считывает» ее, синтезируя молекулу РНК (разноцветная лента). В молекуле РНК интроны показаны серым, экзоны — яркими цветами. Вырезанные фрагменты РНК уплывают вдаль, облепленные разнообразными полупрозрачными РНК-связывающими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

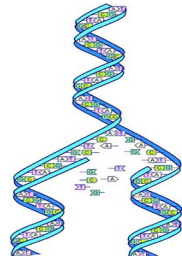
Транскрипция – биосинтез одноцепочечной молекулы

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 только 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 тимина на урацил)



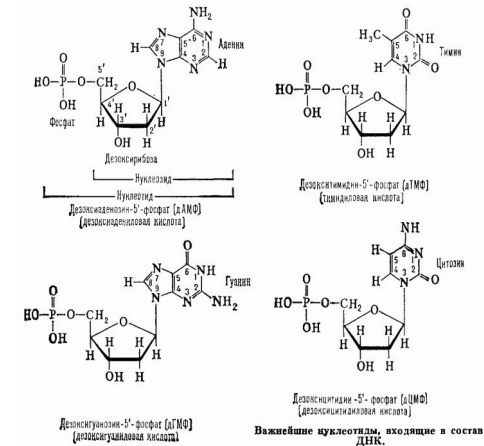
Для осуществления транскрипции необходимо наличие:



1. ДНК-матрицы;

2. Пула предшественников

(аденин-, гуанин-, цитозин- и урацилтрифосфатнуклеотиды),

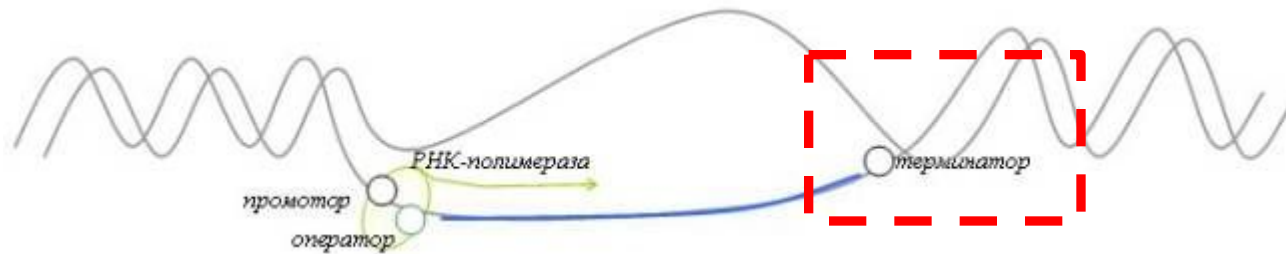
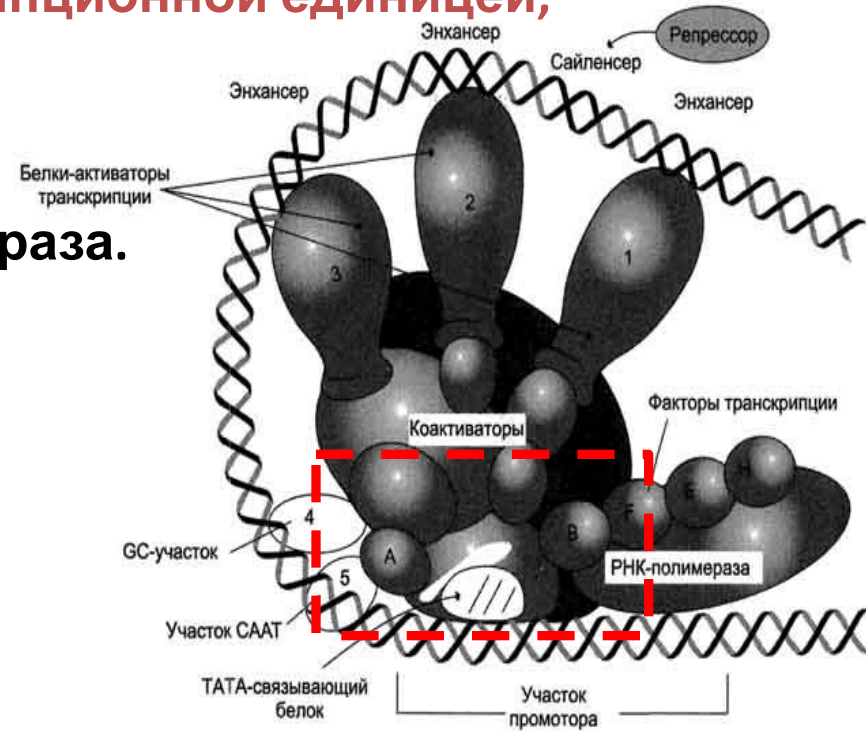


3. Соответствующего фермента (РНК-полимераза).




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

Промотор - сайт ДНК, с которым связывается РНК-полимераза.



Терминатор - последовательность ДНК, на которой РНК-полимераза прекращает синтез РНК

Транскрипция – матричный процесс, в котором выделяют три

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

2. Транскрипция у прокариот. Схема работы лактозного оперона.

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.).

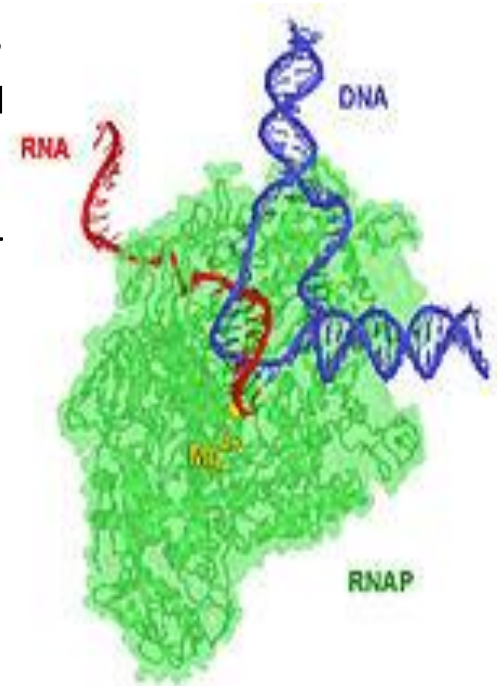
Оперон – группа тесно сцепленных генов, находящихся под контролем общего промотора и транскрибируемых как единая и-РНК.

Оперон – группа структурных генов управляемых одним геном-оператором.

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

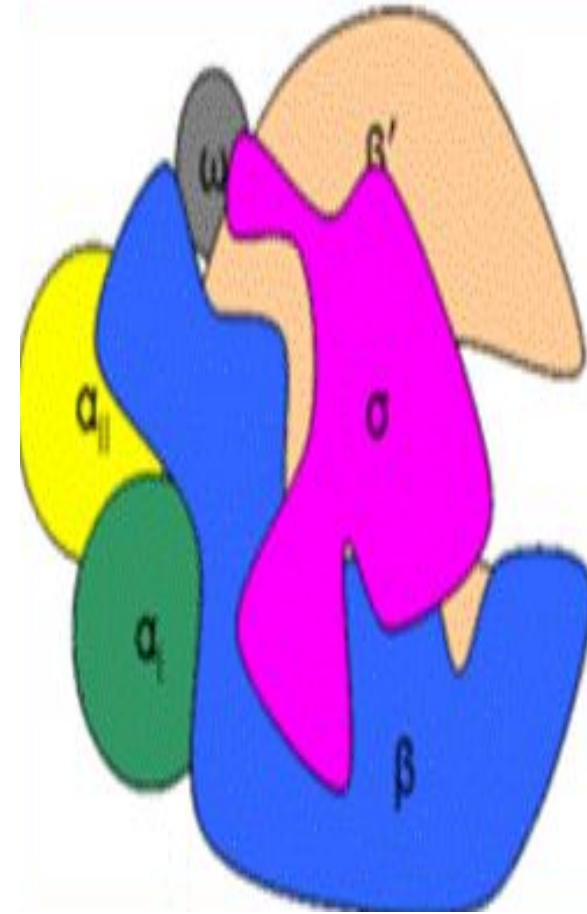
Структура РНК-полимеразы

- В структуре РНК-полимеразы присутствует канавка длиной 55 Å (5,5 нм) и шириной 25 Å (2,5 нм). Именно в эту канавку помещается двойная спираль ДНК, имеющая ширину 20 Å (2 нм). На длине канавки укладывается 16 нуклеотидов.
- Распределение зарядов на поверхности РНК-полимеразы обеспечивает ее функции. Распределение очень логично. Молекула нуклеиновой кислоты заряжена отрицательно. Поэтому полость главного канала, где должна удерживаться отрицательно заряженная ДНК, выложена положительными зарядами. Поверхность РНК-полимеразы выполнена отрицательно заряженными аминокислотами, чтобы ДНК к ней не прилипала.

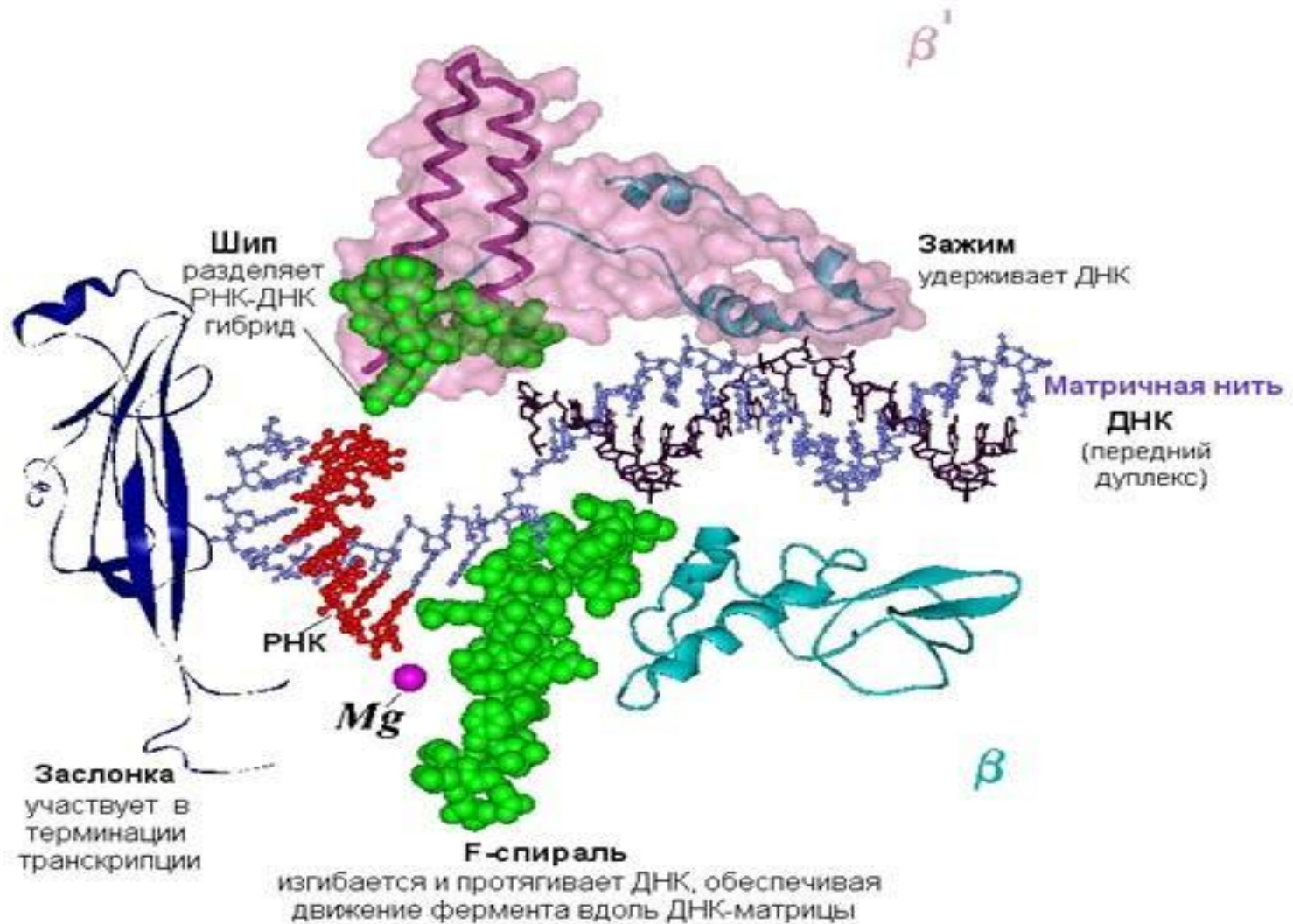


Структура РНК-полимеразы

- Бактериальная РНК-полимераза состоит из нескольких белковых-**субъединиц**: двух α -субъединиц (это маленькие субъединицы), β - и β' -субъединиц (большие субъединицы) и ω -субъединицы. Вместе они образуют так называемый минимальный фермент, или **кор-фермент**.
- К этому кор-ферменту может присоединиться **σ -субъединица**. σ -субъединица необходима для начала синтеза РНК, для инициации транскрипции.
- После того, как инициация осуществилась, σ -субъединица отсоединяется от комплекса, и дальнейшую работу (элонгацию цепи) ведет кор-фермент.
- При присоединении к ДНК σ -субъединица распознает участок, на котором должна начинаться транскрипция. Он называется промотор.

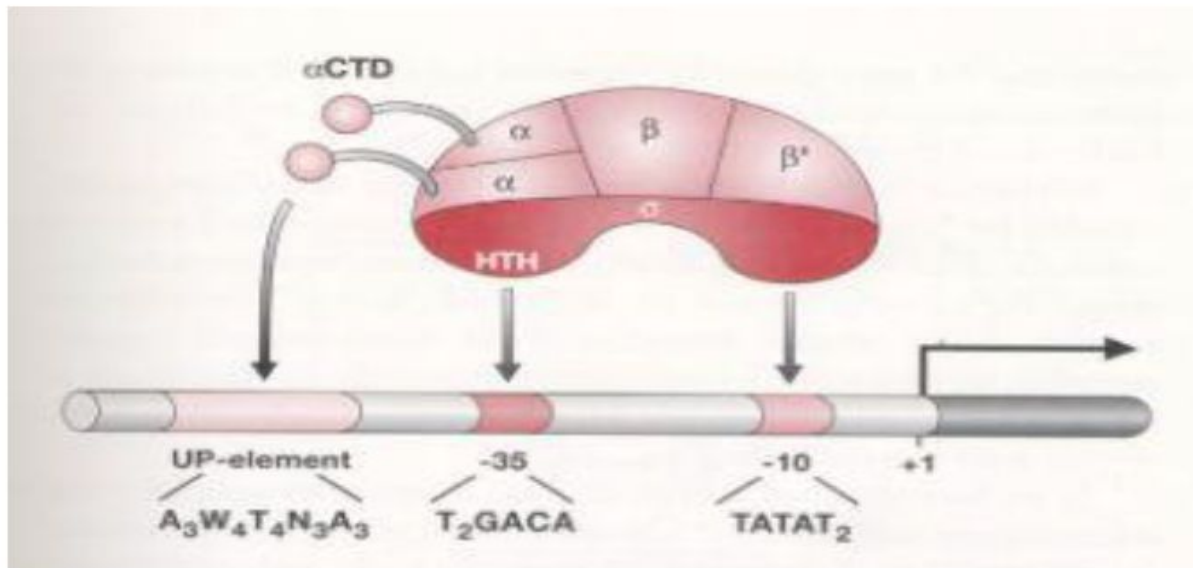


СТРУКТУРНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ



Инициация транскрипции. Структура промоторов

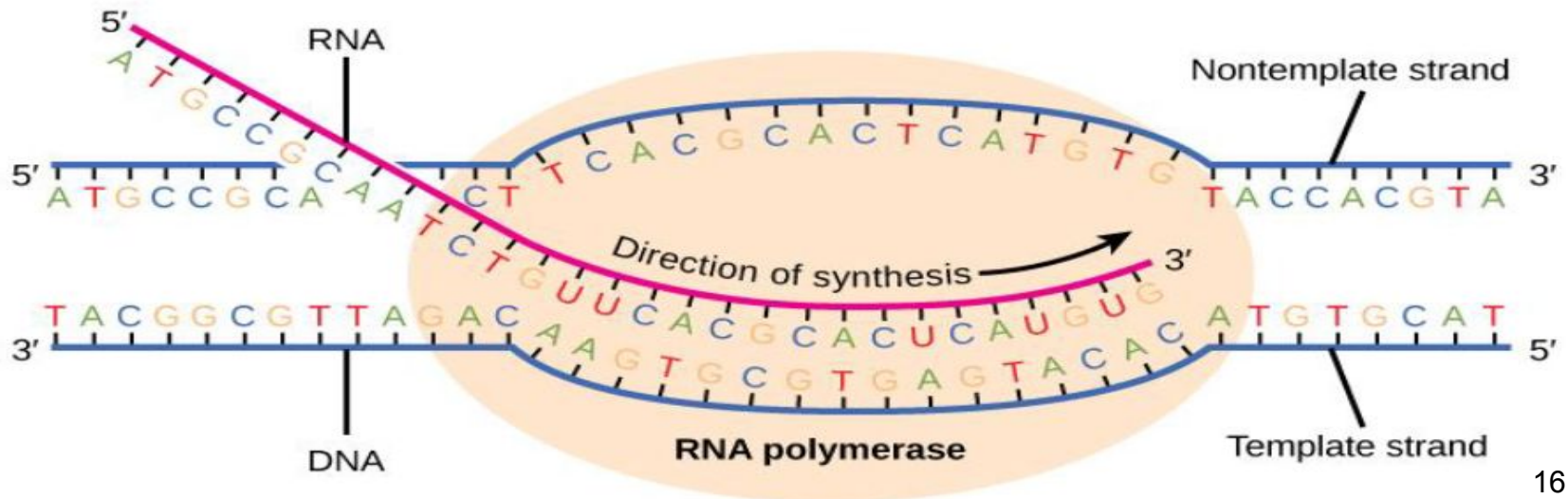
- Не смотря на вариабельность промоторов среди прокариот, есть несколько консервативных элементов в позициях -10 и -35 от точки инициации транскрипции
- Консенсус в позиции -10 называется TATA-бокс (TATAAT).
- Консенсус в позиции -35 имеет вид TTGACA, распознаётся и связывается с σ субъединицей.



- Сочетание последовательностей "-10«(TATA- или Прибнов-бокс) и "-35" назвали **классическим промотором**, т.к. она была описана первой.
- Если есть TATA-бокс, но нет последовательности «-35», однако есть дополнительно два нуклеотида, и этого достаточно, чтобы σ -субъединица распознала промотор, то такая структура называется **расширенным промотором**.

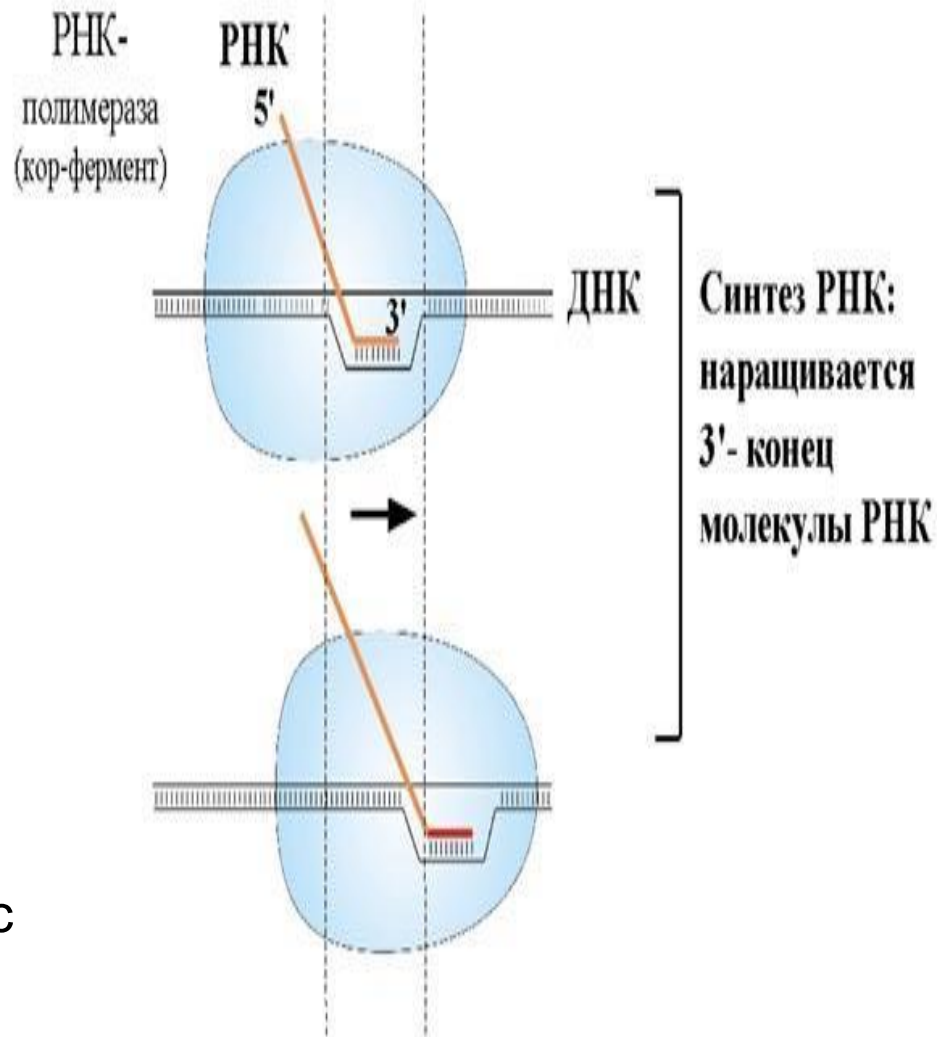
Инициация транскрипции

- После того, как σ -субъединица в составе кор-фермента связалась с промотором, ДНК на этом участке начинает плавиться. Затем начинается синтез РНК, растущая цепь РНК выталкивает σ -субъединицу и происходит диссоциация σ -субъединицы от кор-фермента.
- Инициация транскрипции начинается с освобождения σ субъединицы от РНК полимеразы
- Скорость РНК-полимеразы составляет примерно 40 нуклеотидов в секунду
- В течении транскрипции ДНК перед РНК-полимеразой расплетается, а после неё обратно схлопывается - транскрипционный пузырь.



Элонгация транскрипции

- РНК наращивается на 3'-конце. Присоединением каждого нуклеотида кор-фермент делает шаг по ДНК и сдвигается на один нуклеотид.
- После того, как синтезируется фрагмент РНК **более 12 нуклеотидов**, σ -фактор необратимо диссоциирует и транскрипция вступает в стадию элонгации.
- Комплекс кор-фермента с ДНК и РНК называется **элонгационным комплексом**. В нем находится **ДНК-РНК гибрид**. То есть это участок, на котором ДНК спарена с РНК, и 3'-конец РНК открыт для дальнейшего роста. Размер этого гибрида – **9 пар оснований**. Расплетенный участок ДНК занимает примерно 12 пар



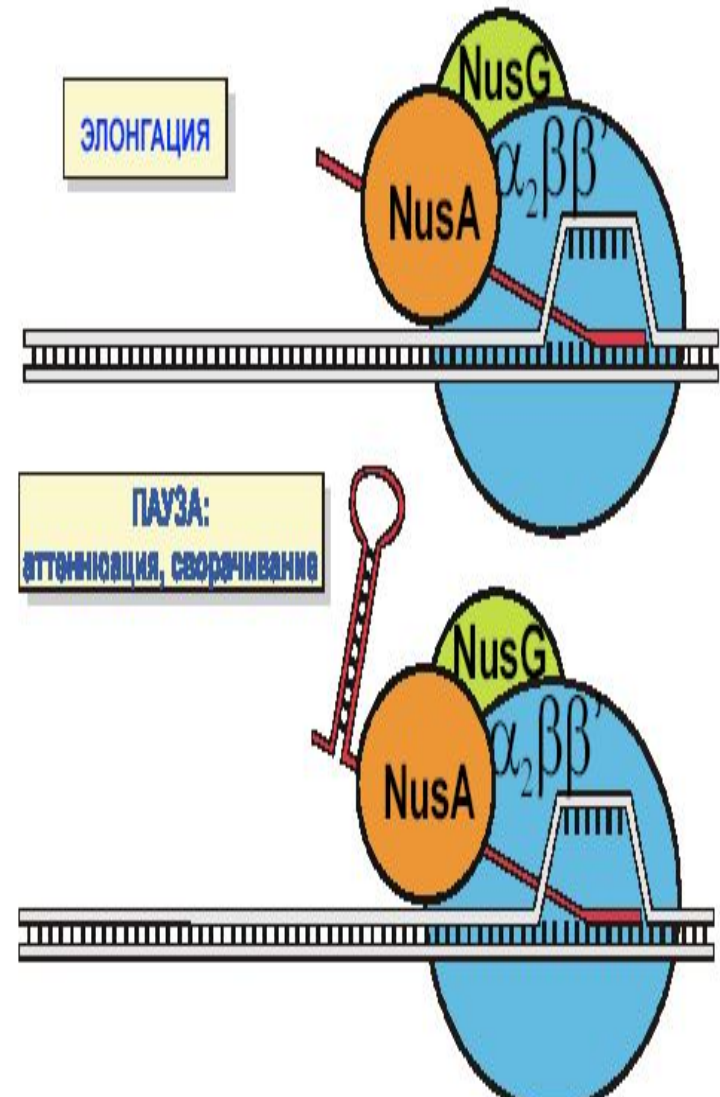
Элонгация транскрипции

После того, как σ -фактор диссоциирует с элонгирующей РНК-полимеразой, с ней начинают взаимодействовать несколько белков – **факторов элонгации**.

Все дополнительные факторы не являются необходимыми для ферментативной активности самой РНК-полимеразы.

Белок NusA, 56kD, способствует паузам РНК-полимеразы на некоторых участках ДНК, необходимых для правильного сворачивания вторичной структуры РНК.

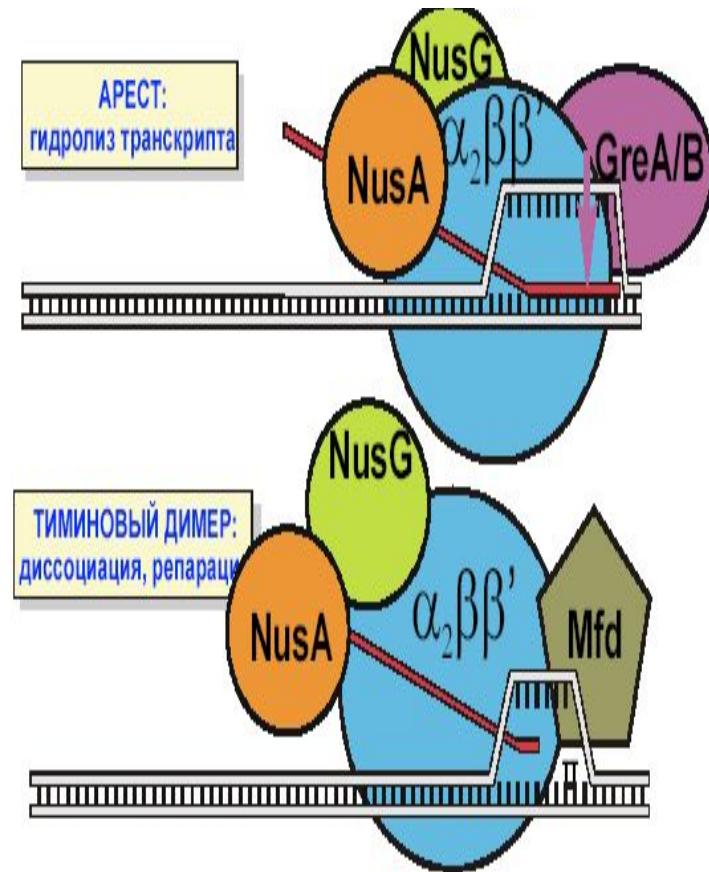
NusG также фактор, ассоциированный с элонгирующей РНК-полимеразой. В отличие от NusA, он наоборот, подавляет остановки РНК-полимеразы. Они играют роль в регуляции терминации.



Элонгация транскрипции

Белки GreA и GreB узнают так называемые «арестованные» комплексы. Эти комплексы образуются если РНК-полимераза сдвигается против хода элонгации. При этом в активном центре оказывается не 3'-конец синтезируемой РНК, а РНК-ДНК дуплекс. Такие комплексы стабильны и не могут ни вернуться к элонгации ни диссоциировать самостоятельно. Белки Gre узнают «арестованные» комплексы и способствуют гидролизу РНК-транскрипта РНК-полимеразой в ее активном центре. После этого элонгация может быть продолжена.

Другим препятствием для РНК-полимеразы могут быть дефекты ДНК, такие, как тиминные димеры. РНК-полимераза, остановившая транскрипцию в местах повреждения ДНК, узнается **белком Mfd**, который способствует диссоциации полимеразного комплекса и присоединению белков репарации **uvrABC** к ДНК.



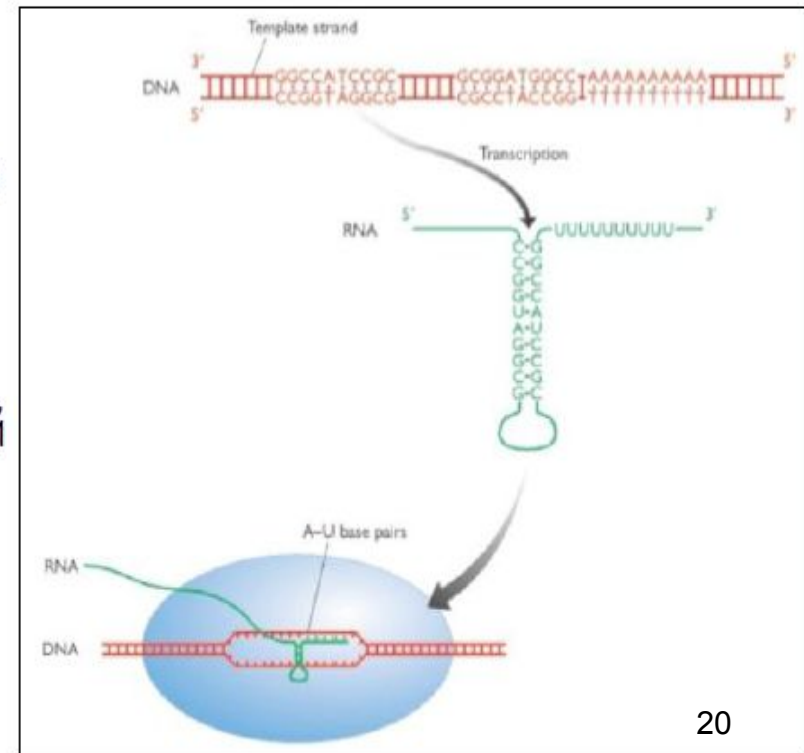
Терминация транскрипции может осуществляться по двум вариантам:

Rho-зависимая терминация

- контролируется Rho белком
- фактор Rho связывается с растущей цепью РНК
- в местах р-зависимой терминации транскрипции РНК- полимераза прекращает элонгацию
- белок Rho дестабилизирует водородные связи между матрицей ДНК и мРНК, высвобождая молекулу РНК

Rho-независимая терминация

- Контролируется последовательностью в ДНК-матрице
- РНК-полимераза доходит до CG-богатого участка
- Синтезированная молекула РНК формирует стебель-петлю, за которой расположено несколько урацилов, что приводит к отсоединению молекулы РНК от матрицы ДНК.



Регуляция транскрипции у прокариот

В состав оперона входит:

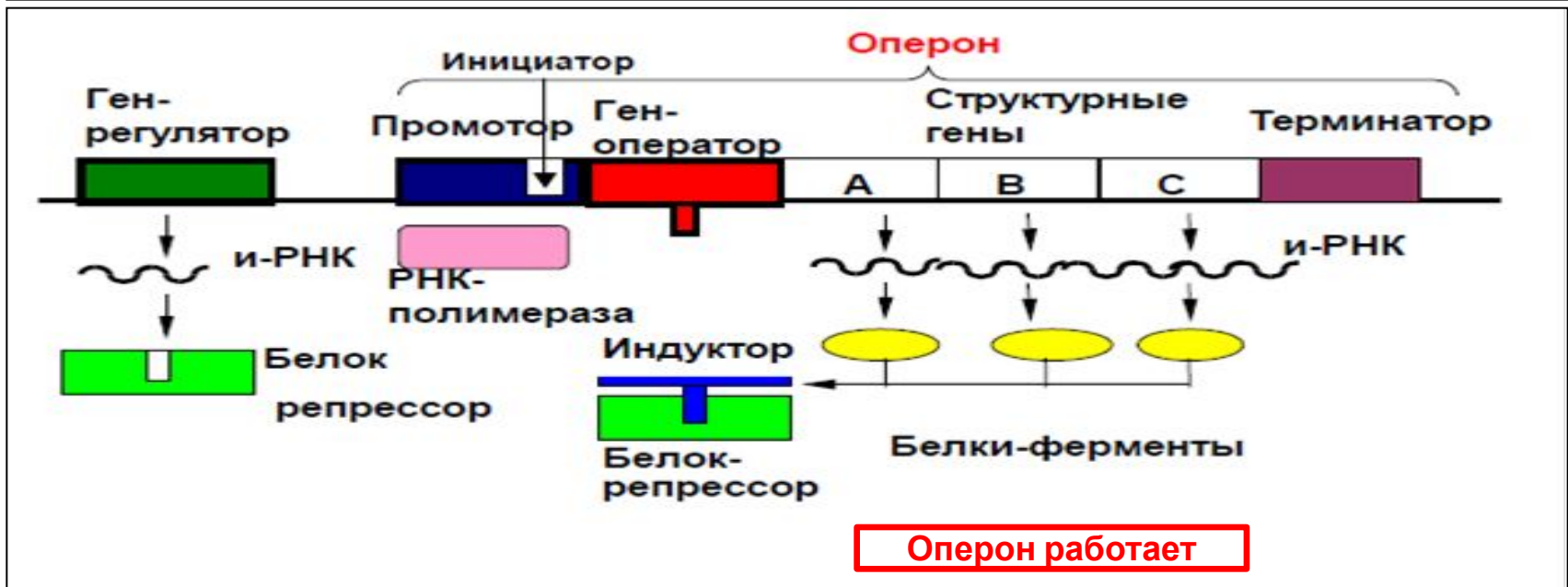
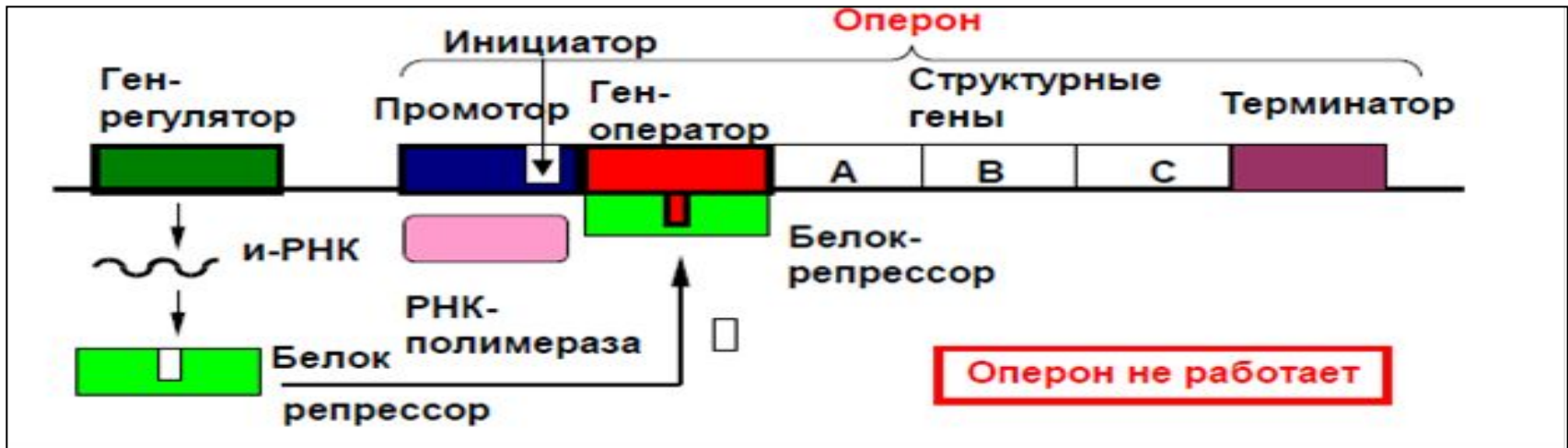
1. Промотор
2. Инициатор
3. Ген-оператор
4. Структурные гены
5. Терминатор

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

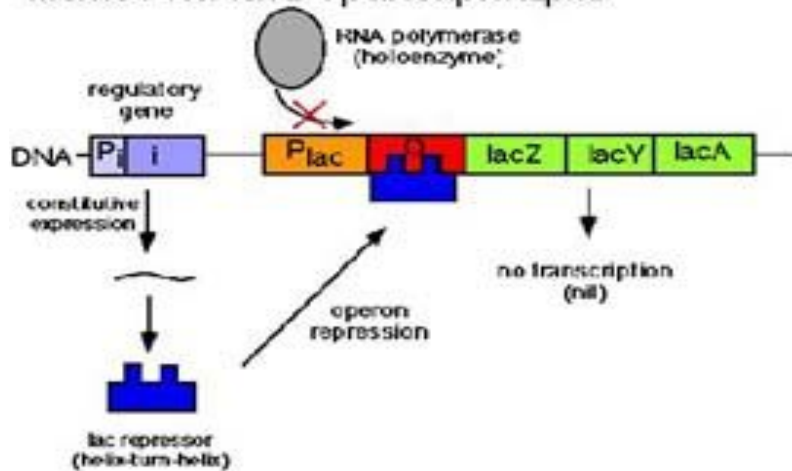


Регуляция работы генов у прокариот

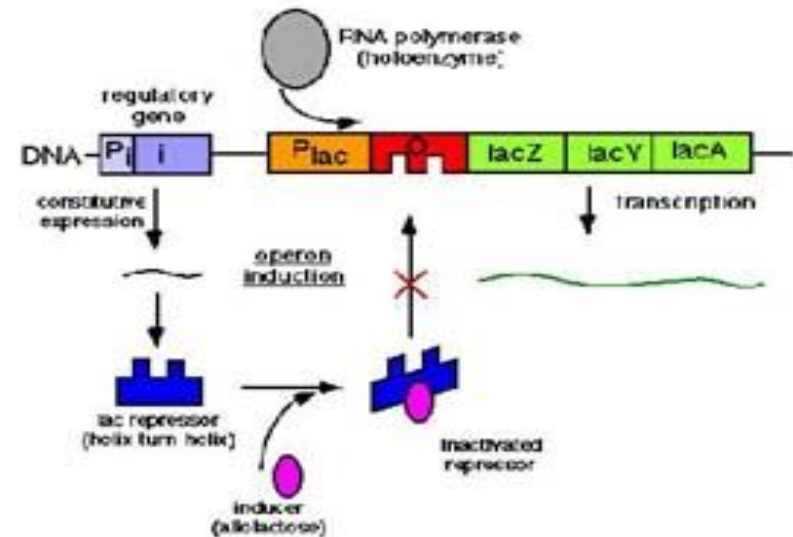
Регуляция активности генов: *lac*-оперон бактерии *E.coli*

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.



3. Транскрипция у эукариот.

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

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. У эукариот **транскрипция** происходит **в ядре** и сопровождается процессингом пре-РНК транскрипта, **трансляция - в цитоплазме** на рибосомах.



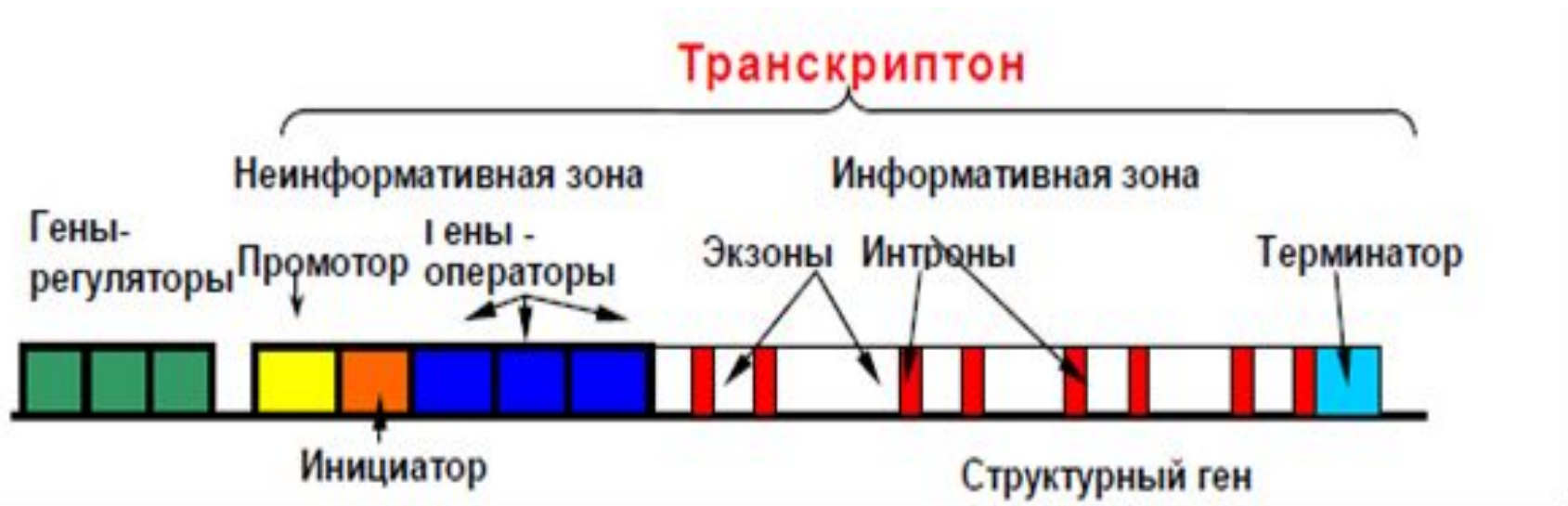
Транскрипция у эукариот

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

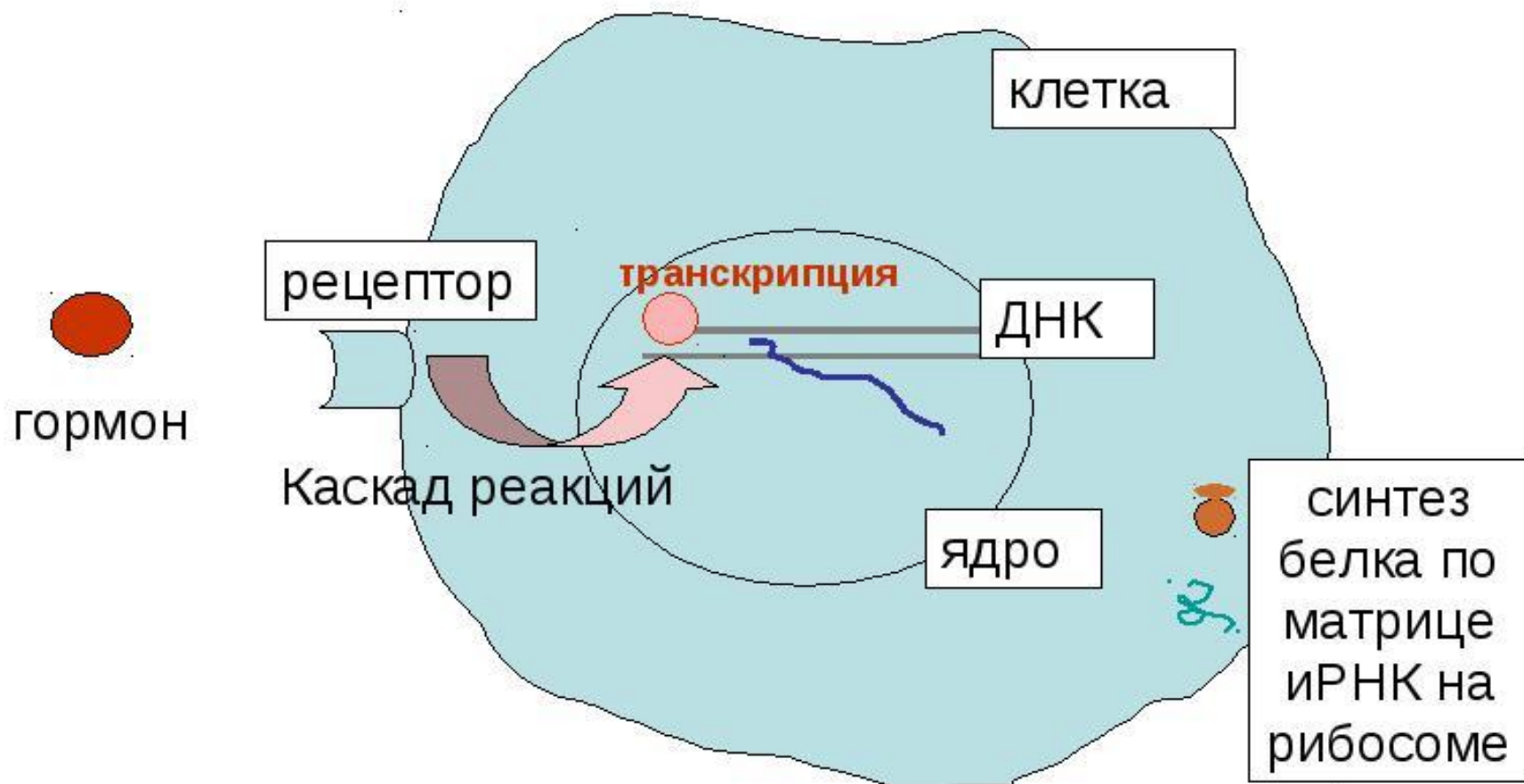
Неинформативная зона начинается **промотором** с **инициатором**. Далее следует **группа генов-операторов**, за которым расположена информативная зона.

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

Заканчивается транскриптон **терминатором**.

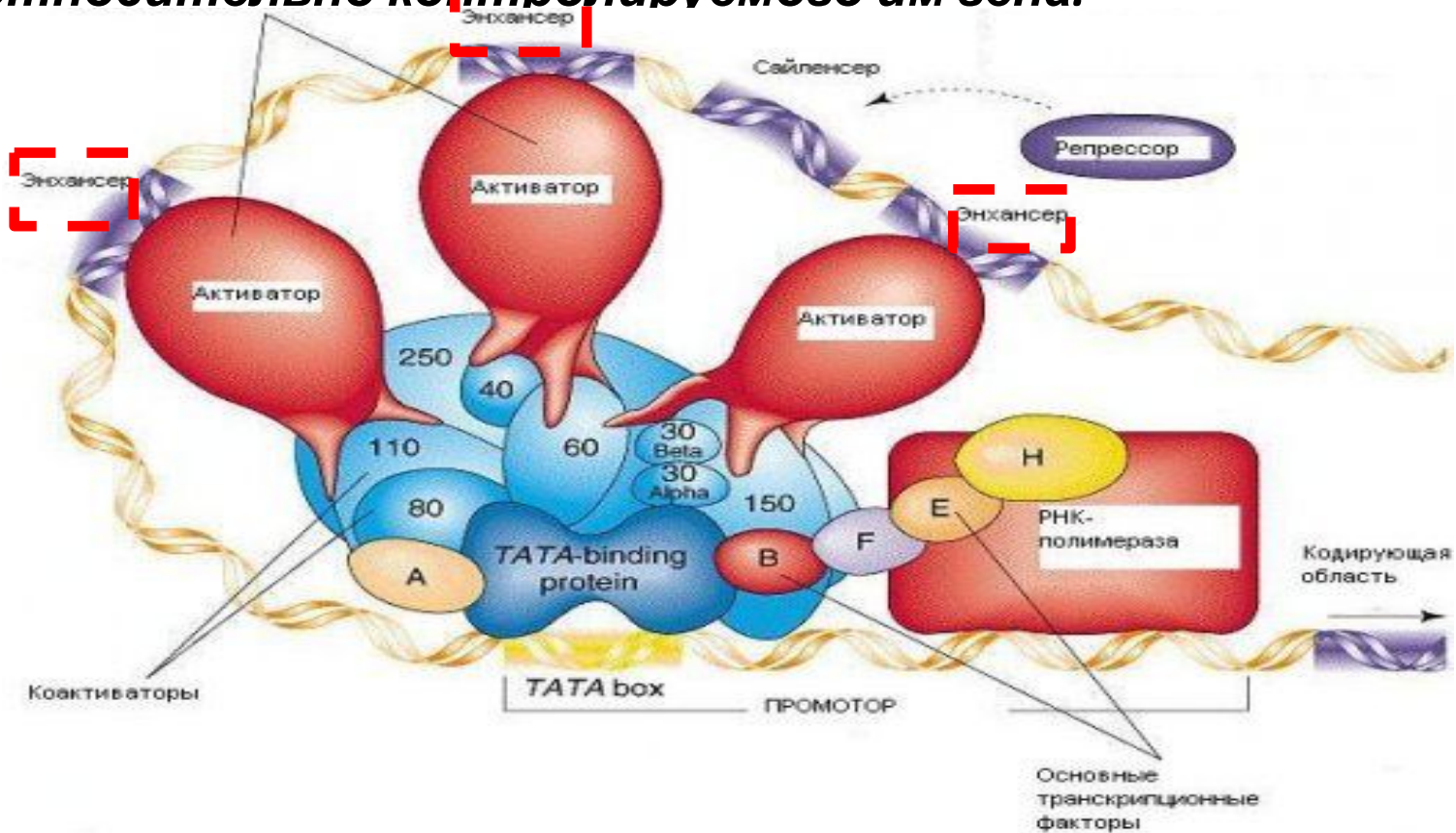


Часто в роли регуляторов транскрипции выступают гормоны



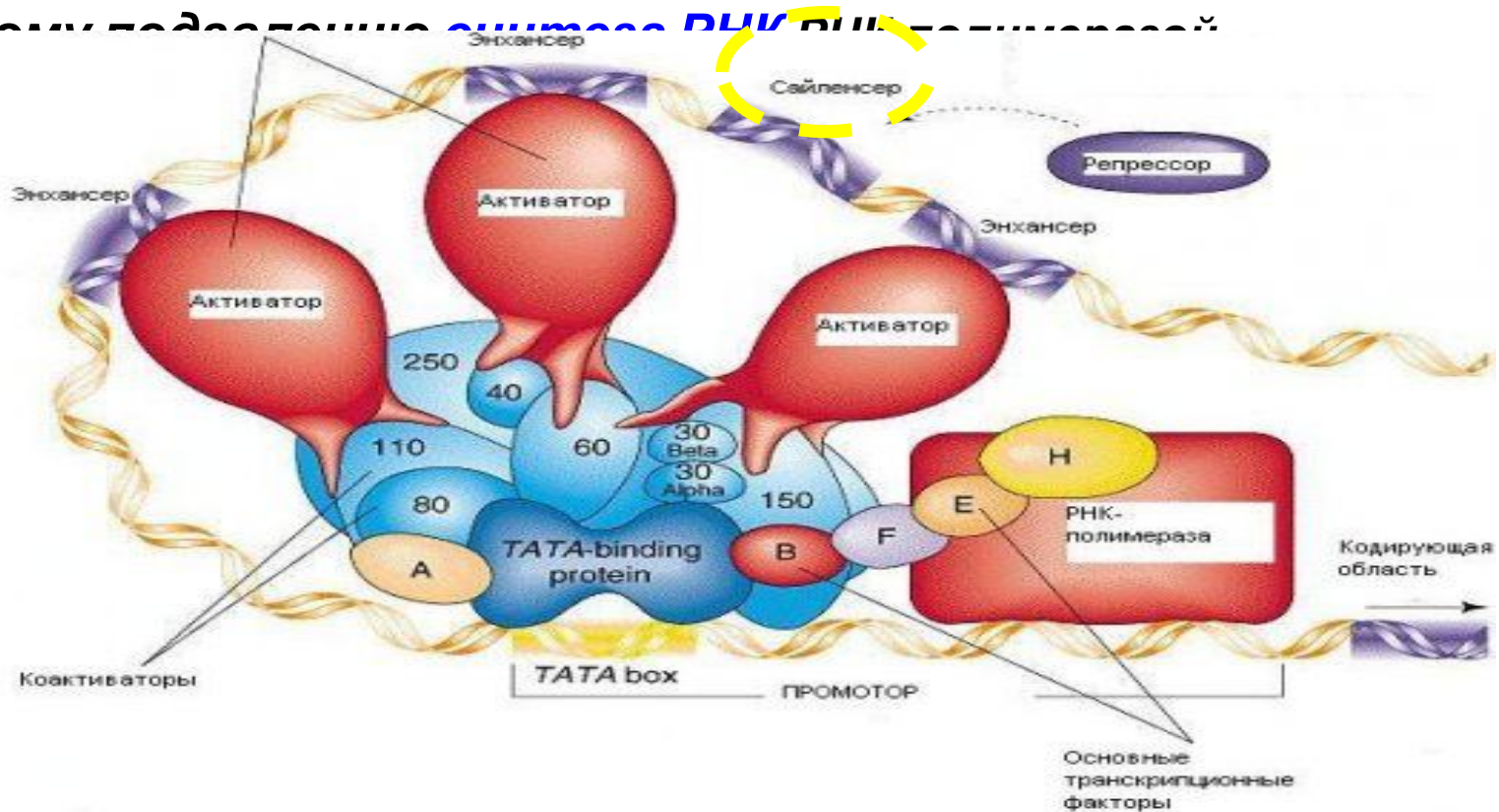
Энхансеры

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.



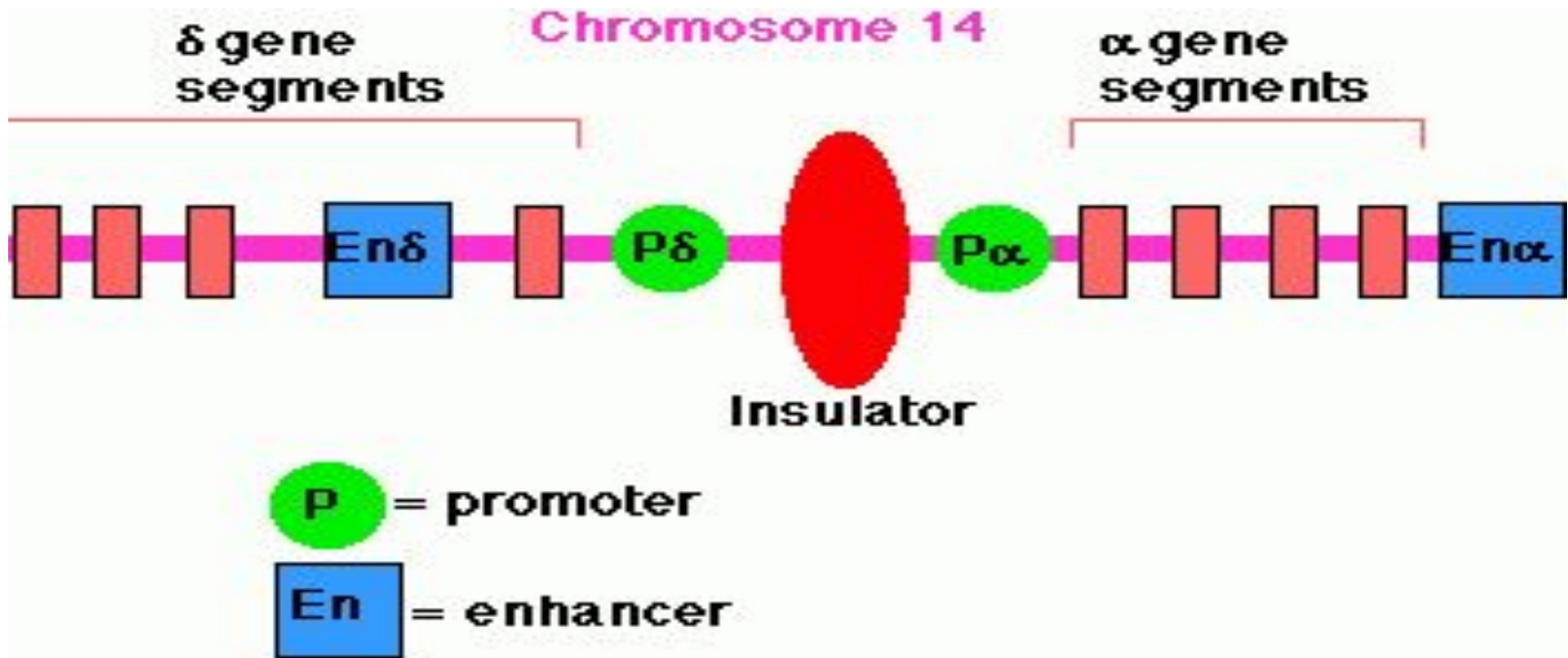
Сайленсеры

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 геноме и от расстояния от промотора. Связывание белков-репрессоров с сайленсерами приводит к понижению или к полному подавлению активности ДНК промотора.

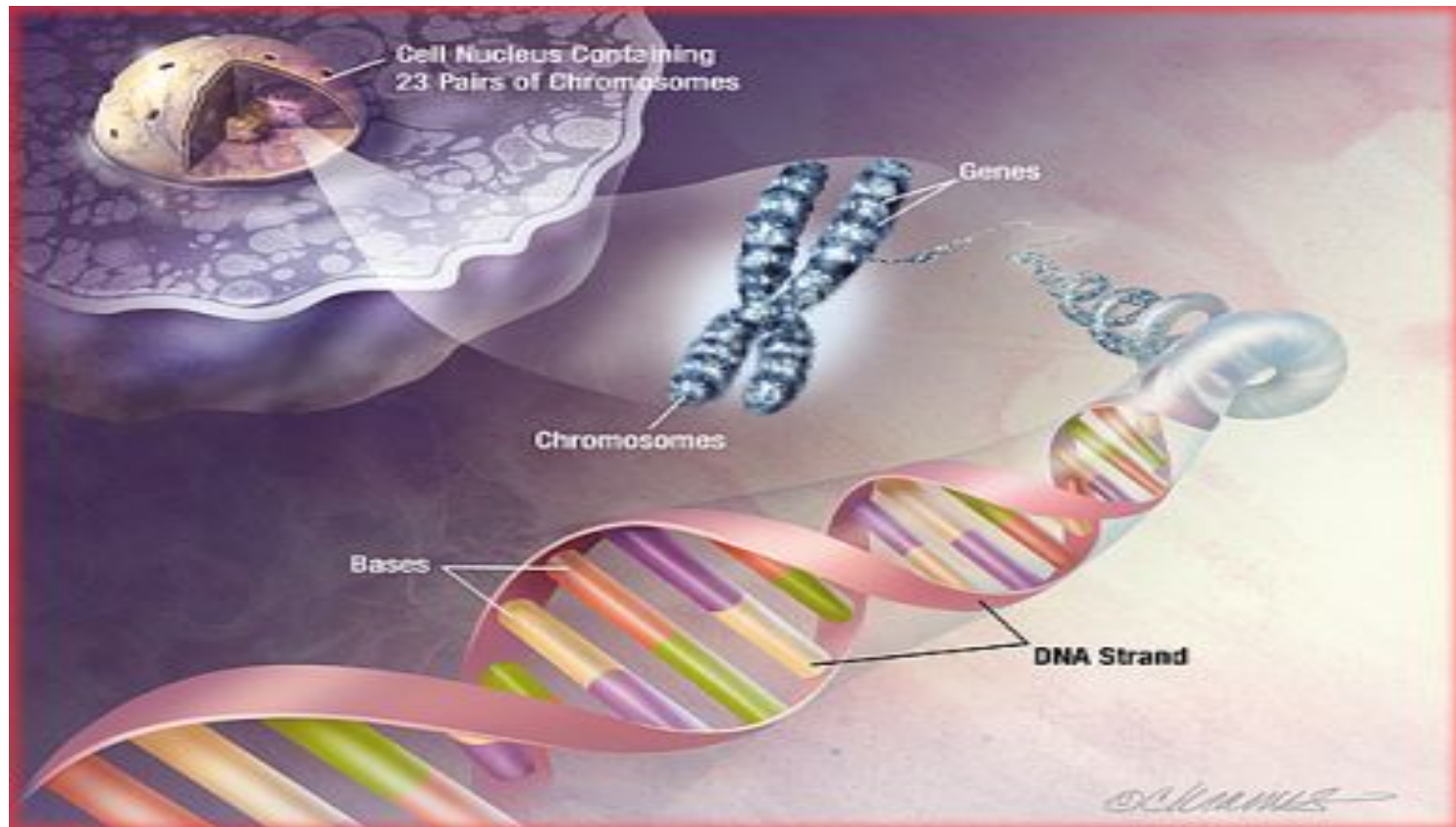


Инсуляторы

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



Биосинтез белка. Трансляция.



Биосинтез белков

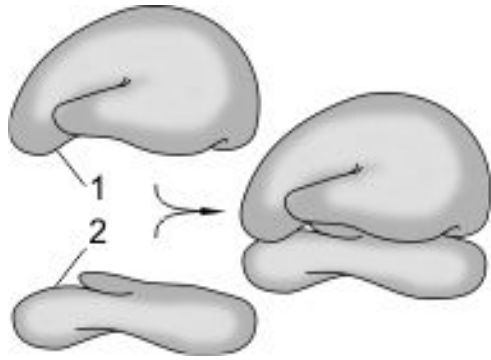
1. Наиболее сложный из генетических процессов;
2. Наиболее энергоемкий процесс;
3. Протекает с высокой скоростью

(при 37° белок из 100 аминокислотных остатков синтезируется E. coli за 5 секунд)

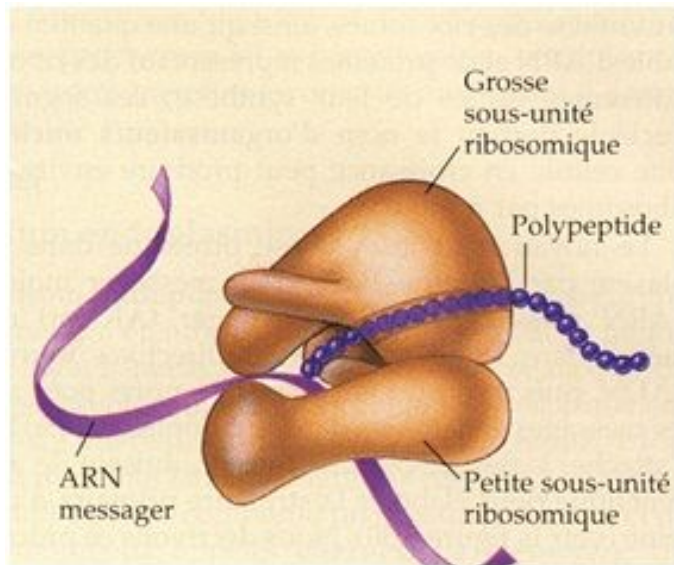
В 2009 году В. Рамакришнан (Великобритания), Т. Стейтс (США) и А. Йонат (Израиль) получили Нобелевскую премию "за исследования структуры и функции рибосомы".

Собственно трансляция осуществляется

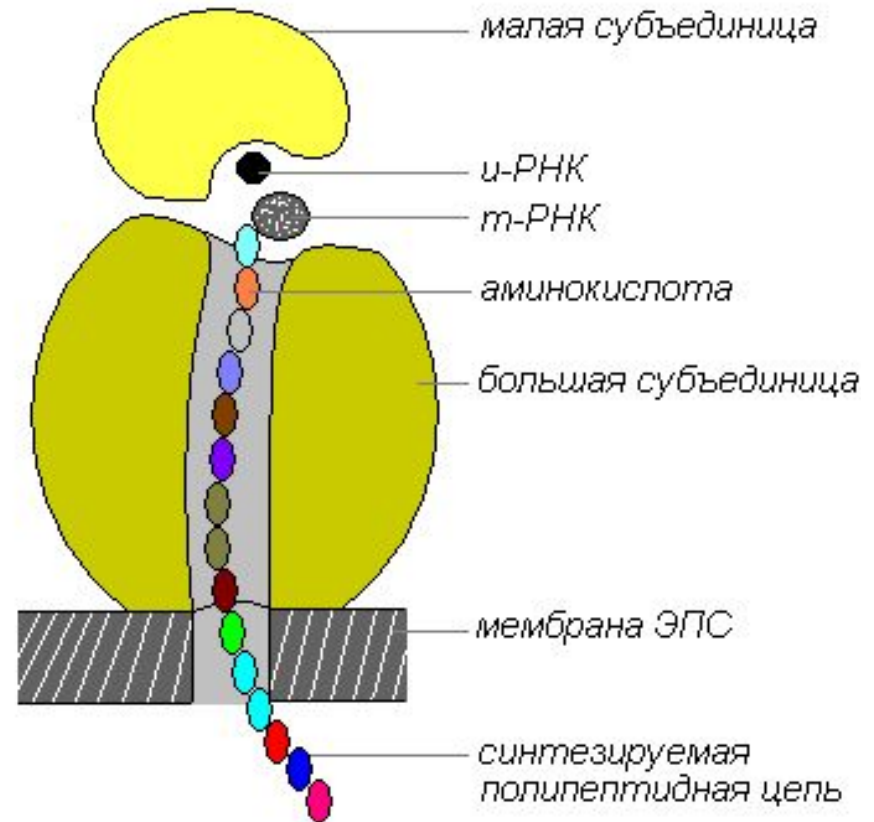
Строение рибосомы



1 — большая субъединица; 2 — малая субъединица.



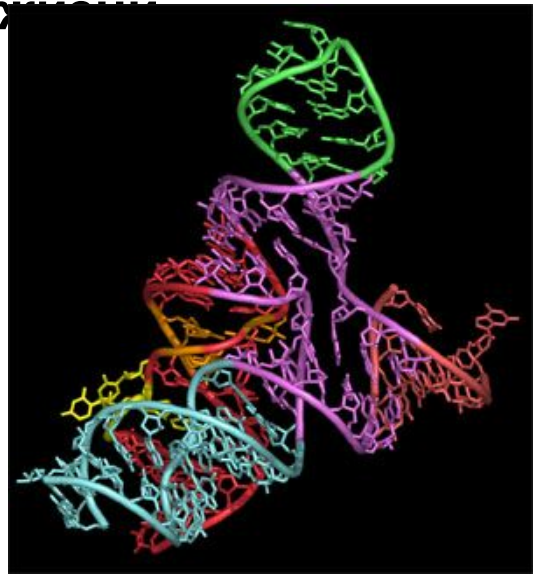
Строение рибосомы



- <http://biouroki.ru/material/plants/kletka.html>

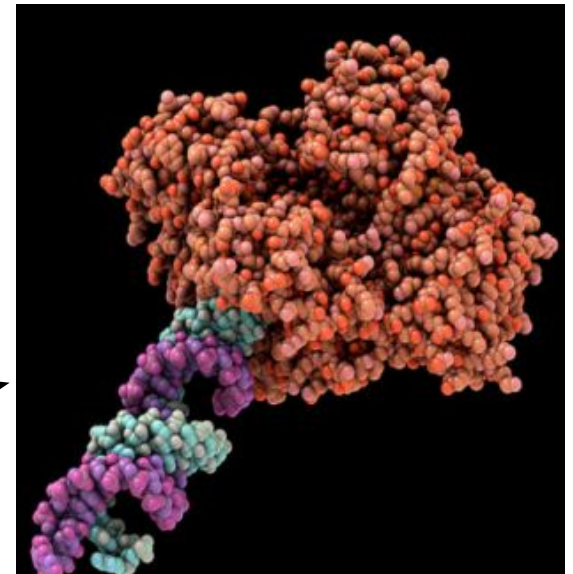
Рибозимы — катализаторы древнего мира

Уникальные свойства ферментов рибозимов — их способность к низкотемпературному катализу — позволяла им обеспечивать сборку новых молекул РНК на самых ранних этапах возникновения жизни.



← Рибозим

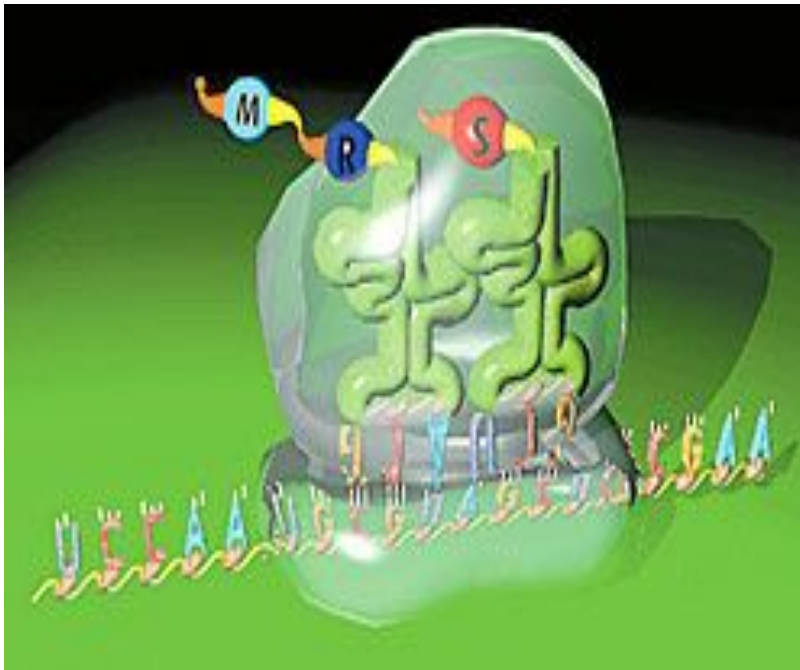
Рибозим + РНК



Рибозимы — не совсем ферменты: по своей химической природе это не белки, а тоже молекулы РНК, только выполняющие специальные функции. Они служат катализаторами при расщеплении и сшивании других молекул РНК. У рибозимов есть интересная особенность: максимум их активности приходится на низкие температуры. То есть они фактически обеспечивают

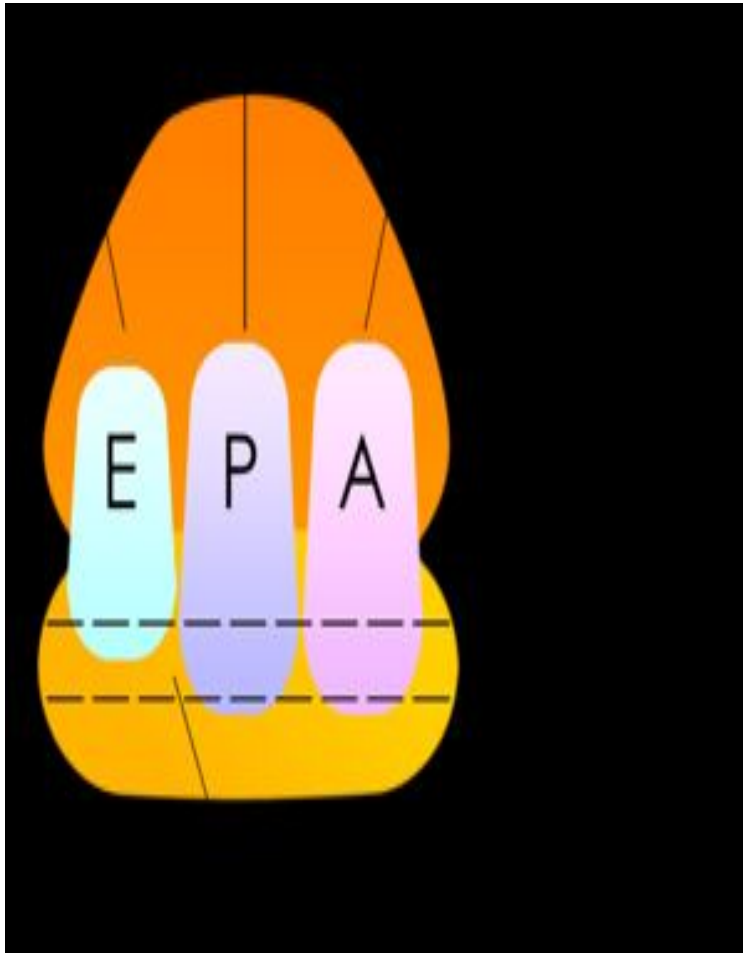
Рибосома:

1. химически – рибонуклеопротеид,
2. физически – компактная частица, диаметром около 30 нм,
3. функционально – молекулярная машина, протягивающая вдоль себя мРНК, считывающая закодированную в мРНК генетическую информацию и нуклеотидную цепь.

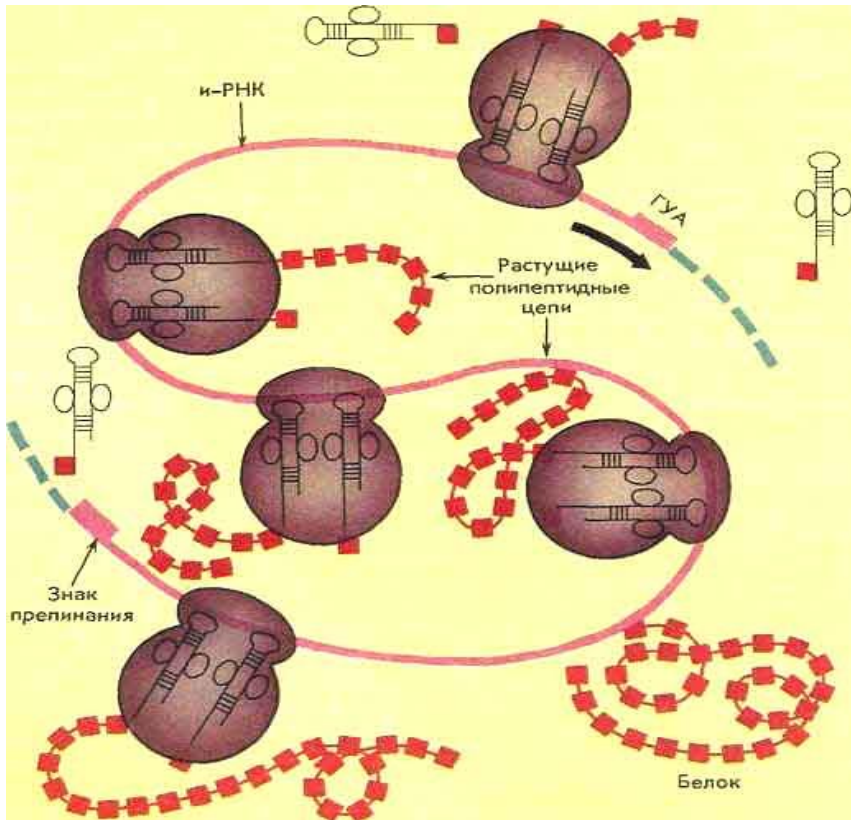


Схематическое изображение рибосомы. Рибосома „считывает“ код и присоединяет нужную аминокислоту к строящейся пептидной цепочке.

На рисунке аминокислоты обозначены буквами: М — метионин, R — аргинин, S — серин.

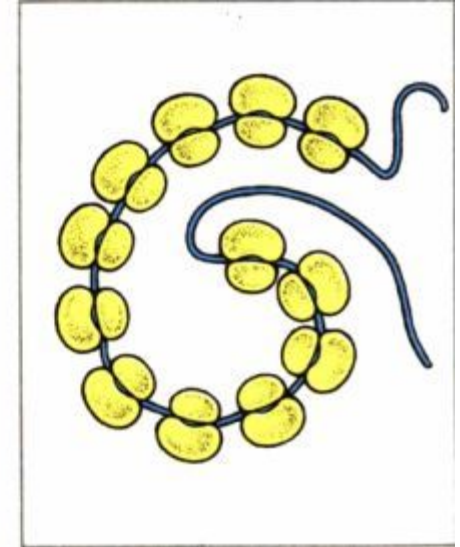
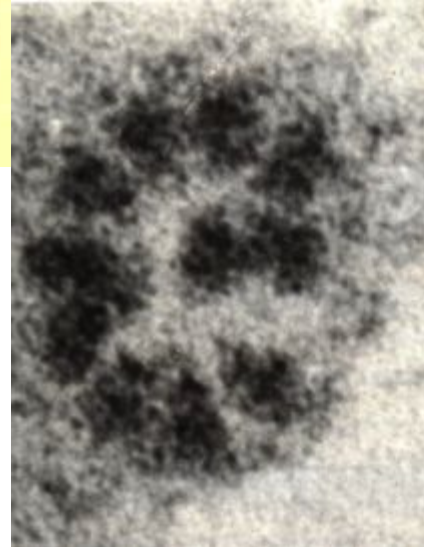
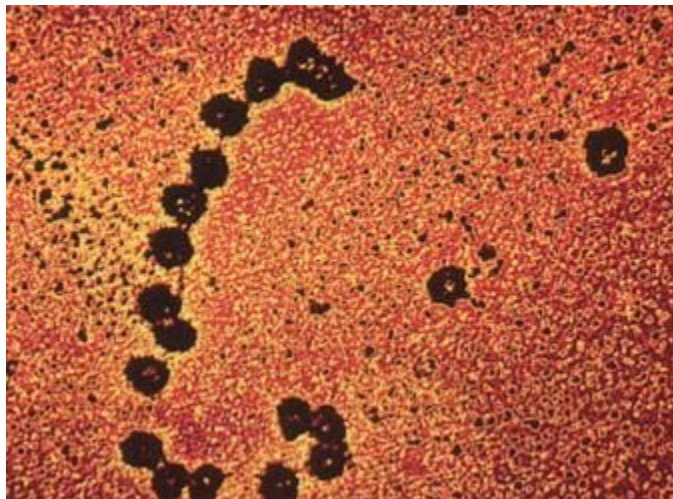


- А-сайт – место связывания очередной аа-тРНК.
- Р-сайт. В начале процесса трансляции с пептидильным центром связывается иницирующая аа-тРНК. На последующих стадиях трансляции в пептидильном центре находится пептидил-тРНК, содержащая уже синтезированную часть пептидной цепи.
- Е-сайт (exit — выход)



Полирибосомы (полисомы) –

синтезирующие белок внутриклеточные комплексы, каждый из которых состоит из молекулы мРНК и многих связанных с ней рибосом.



**б). эписикл трансляции:
инициация, элонгация,
терминация**

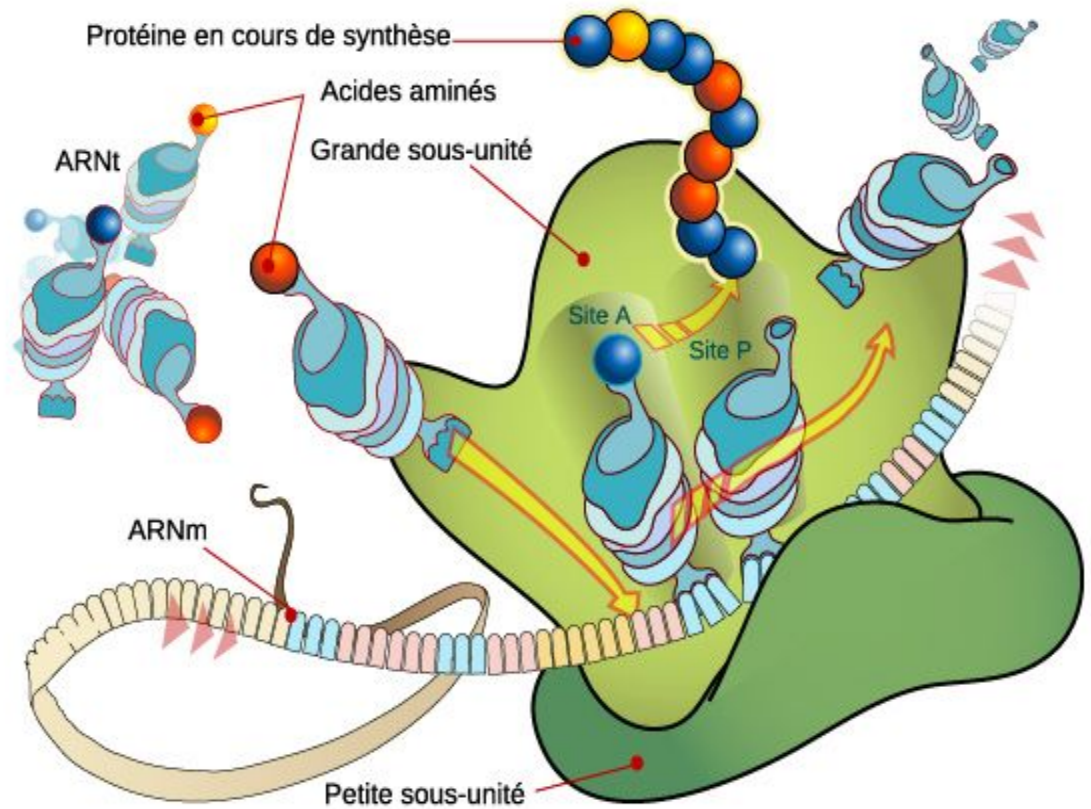
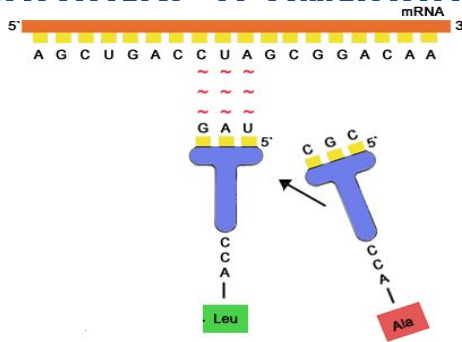
Синтез белков молекулой РНК



<http://nrm.ru/blogs/rab44/>

Трансляция

Трансляция – матричный процесс, включающий в себя определенные стадии в определенной последовательности (инициация, элонгация, терминация)



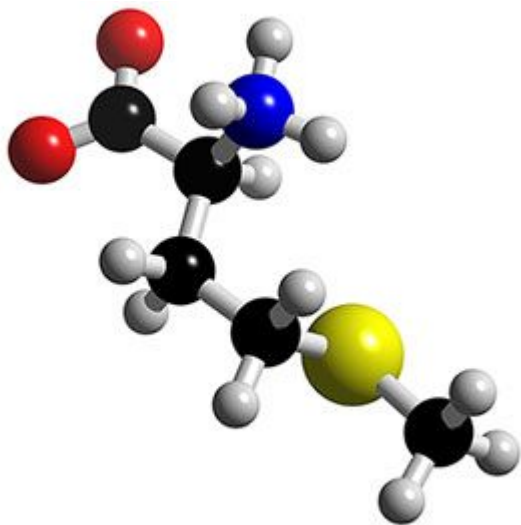
Инициация трансляции

- Это серия молекулярных событий, происходящих с рибосомой, которая приводит к взаимодействию рибосомы с началом кодирующей нуклеотидной последовательности мРНК и последующему считыванию (трансляции) этой последовательности.
- **Начинается** с распада рибосомы на субчастицы (диссоциации рибосомы).
- **Малая субчастица:**
 - 1. связывает специальные белки-факторы инициации;
 - 2. распознает специальный инициаторный кодон иРНК;
 - 3. обеспечивает взаимодействие инициаторного кодона иРНК с антикодоном специальной инициаторной метионил-тРНК;
 - 4. задает рамку считывания.
- После этого **большая субчастица** связывается с малой, что завершает инициацию.

У эукариот иницирующий (стартовый) кодон – кодон аминокислоты **метионина – АУГ.**

У прокариот (а также в митохондриях) к метионину присоединяется формильная группа **с образованием формилметионина.**

Аминокислоты

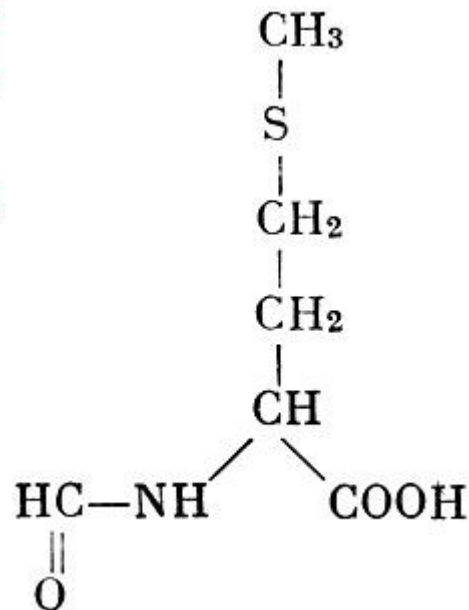


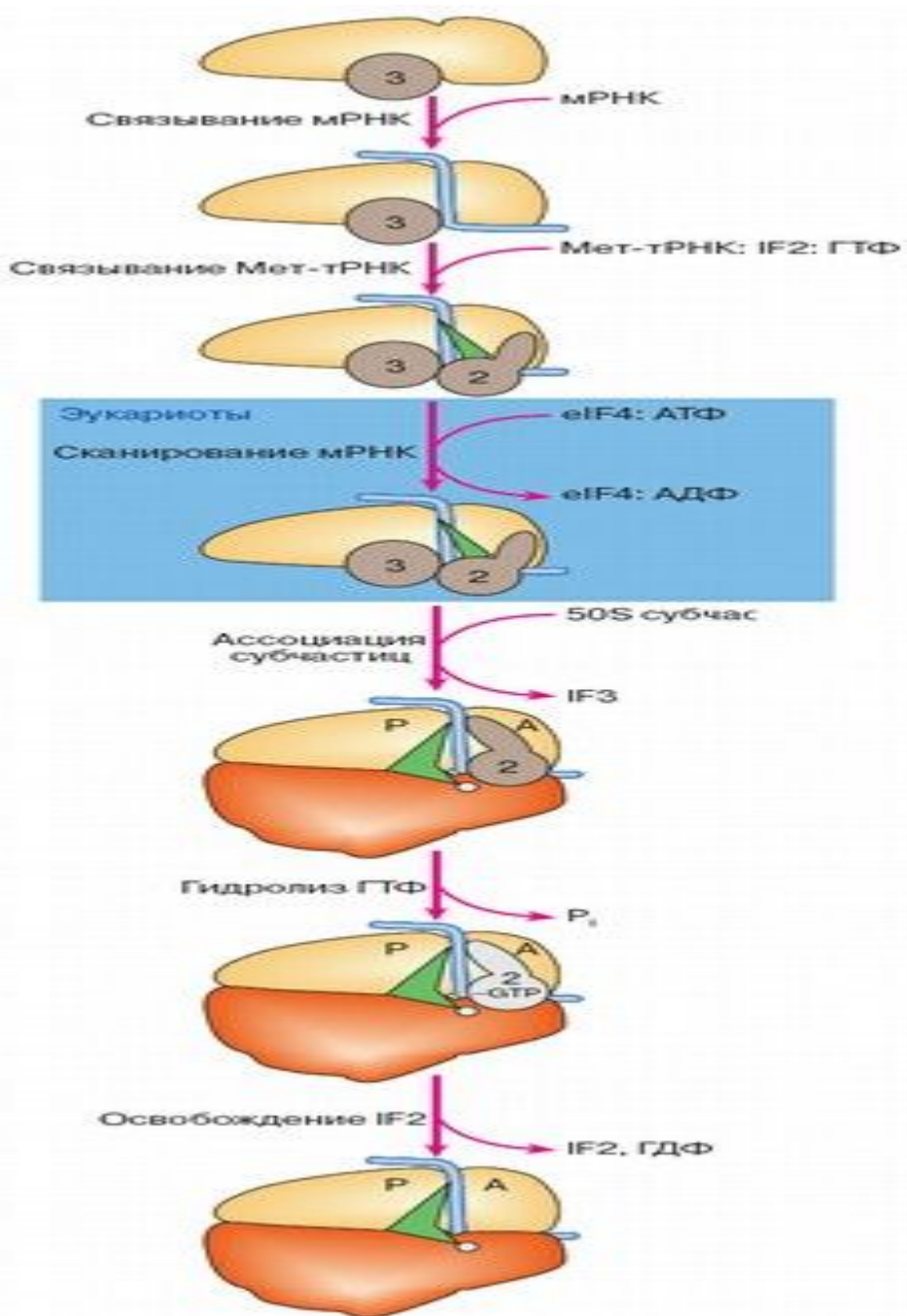
tРНК метионина может присоединять в результате ферментативной реакции формильную группу к аминокислоте: Такая формилметиониновая tРНК может присоединиться к двум кодомам АУГ и ГУГ, если только они расположены в начале цепи иРНК. В случае, когда эти кодоны располагаются в середине иРНК, АУГ кодирует метионин, а ГУГ - валин.

Только формилметиониновая tРНК



Формилмет ионин





инициирующая участвует в процессе инициации трансляции.

инициаторная тРНК изображена в фигуре с кружком и линией.

мет-тРНК (красная) — в процессе инициации трансляции.

инициаторная тРНК изображена в фигуре с кружком и линией.

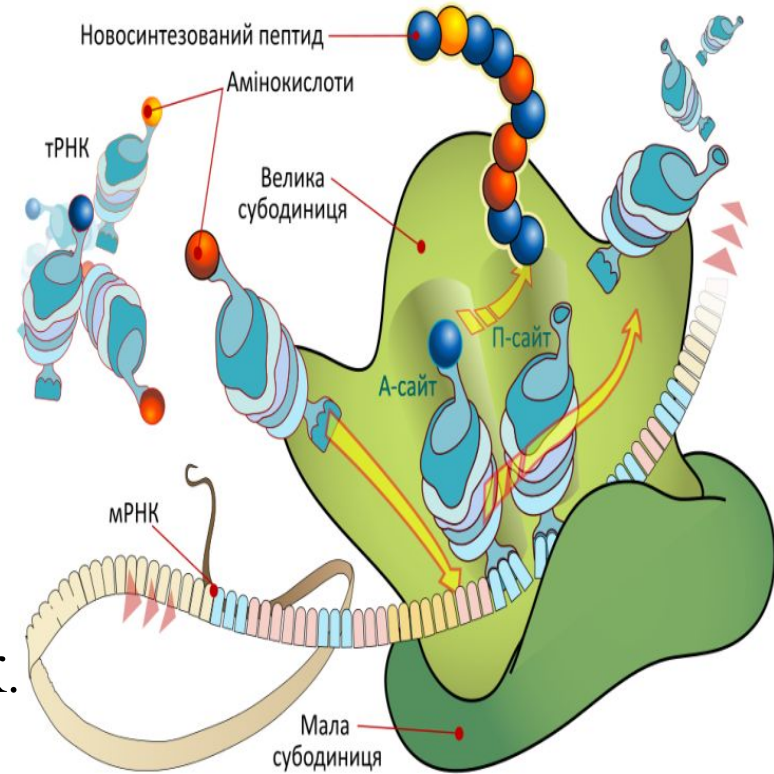
инициаторная тРНК изображена в фигуре с кружком и линией.

инициаторная тРНК изображена в фигуре с кружком и линией.

В рибосоме имеются три различных участка, с которыми связываются РНК, - один для иРНК и два для тРНК (Р-участок и А-участок)

Пептидил-тРНК-связывающий участок или **Р-участок** удерживает молекулу тРНК, присоединенную к растущему концу полипептидной цепи.

Аминоацил-тРНК-связывающий участок , или **А-участок** служит для удержания только что прибывшей молекулы тРНК, нагруженной аминокислотой. Т-РНК прочно прикрепляется лишь в случае, Если ее антикодон комплиментарен кодону иРНК.



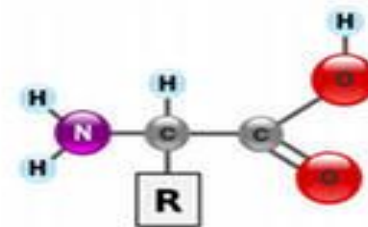
Элонгация полипептидной цепи на рибосомах слагается из трех отдельных этапов

- **На первом этапе** молекула аминокил-тРНК связывается со свободным участком рибосомы, примыкающим к занятому Р-участку. *Связывание осуществляется путем спаривания трех нуклеотидов антикодона с тремя нуклеотидами иРНК, находящимися в А-участке.*
- **На втором этапе** карбоксильный конец полипептидной цепи отделяется в Р-участке от молекулы тРНК и образует пептидную связь с аминокислотой, присоединенной к молекуле тРНК в А-участке.

Соединение аминокислот в цепи возможно потому, что у каждой из них имеются две разные химические группы: обладающая основными свойствами аминогруппа, NH_2 , и кислотная карбоксильная

группа, COOH . Карбоксильная группа одной аминокислоты может образовать амидную (пептидную) связь с аминогруппой другой аминокислоты.

- **На третьем этапе** новая пептидил-тРНК переносится в Р-участок рибосомы, в то время как рибосома продвигается вдоль молекулы иРНК ровно на три нуклеотида.
- Таким образом, в результате элементарного элонгационного цикла полипептид удлиняется на одну аминокислоту.



Элонгационный цикл составляют три последовательных шага: связывание аминоксил-тРНК, транспептидация и транслокация.

Элонгация

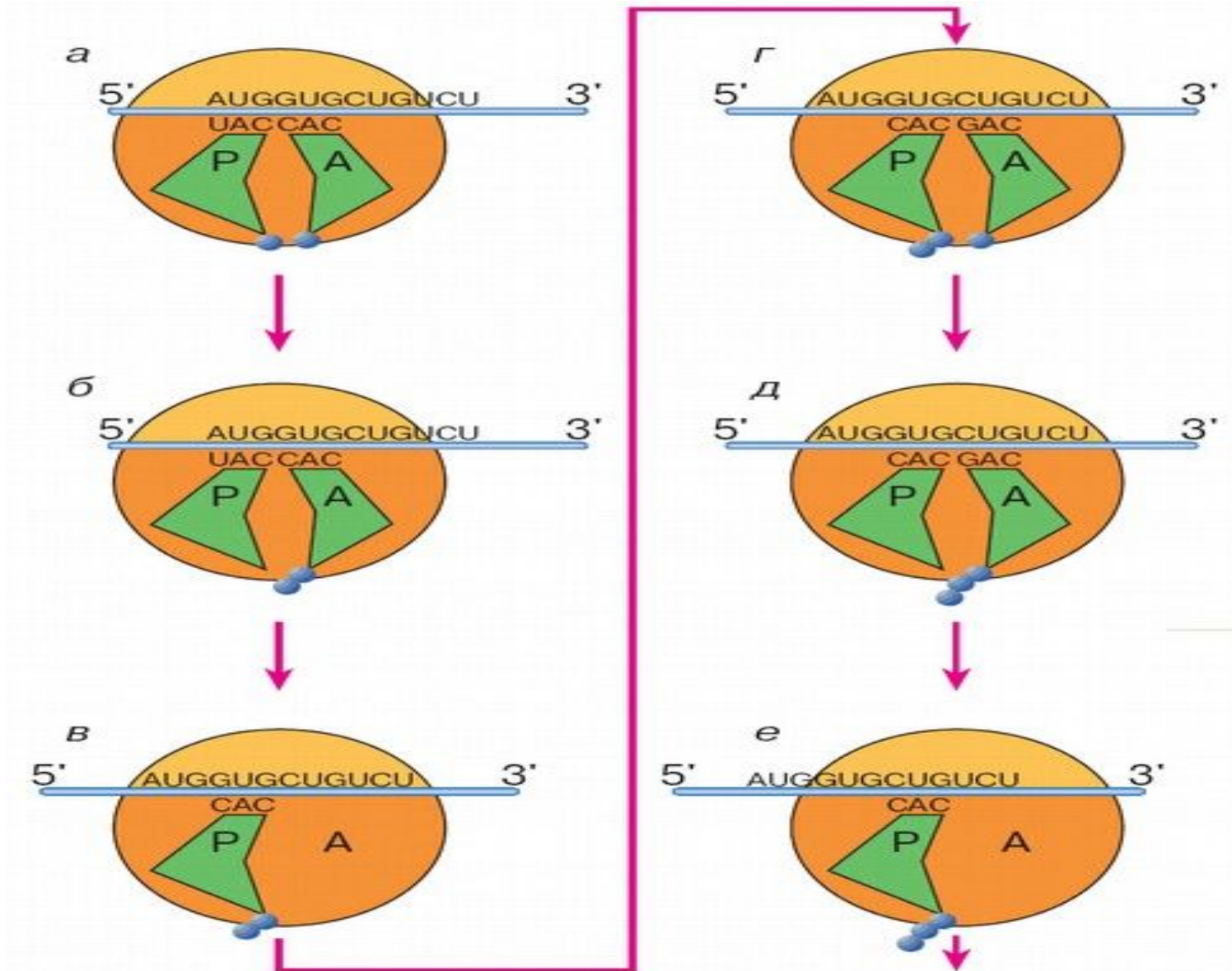


Схема элонгации пептида на рибосоме:

а — инициаторная аминоацил-тРНК находится в Р-участке и первая элонгаторная аминоацил-тРНК приходит в А-участок;

б — транспептидация приводит к переносу аминокислотного остатка от инициаторной тРНК на аминоацил-тРНК в А-участке;

в — транслокация перемещает тРНК из А-участка в Р-участок, и эта тРНК увлекает за собой связанный с ней (комплементарный) кодон мРНК. Таким образом, мРНК оказывается сдвинутой относительно рибосомы на один триплет нуклеотидов, и в А-участке устанавливается очередной кодон (CUG);

г — аминоацил-тРНК, комплементарная этому кодону связывается с А-участком;

д — транспептидация переносит дипептид на аминоацил-тРНК в А-участке;

е — транслокация перемещает тРНК из А-участка в Р-участок, что приводит к сдвигу мРНК еще на один триплет. В А-участке устанавливается новый кодон (UCU). Далее процесс продолжается по описанной выше схеме (г >> д >> е).

Стадии трансляции:

Терминация

Общая картина трансляции:

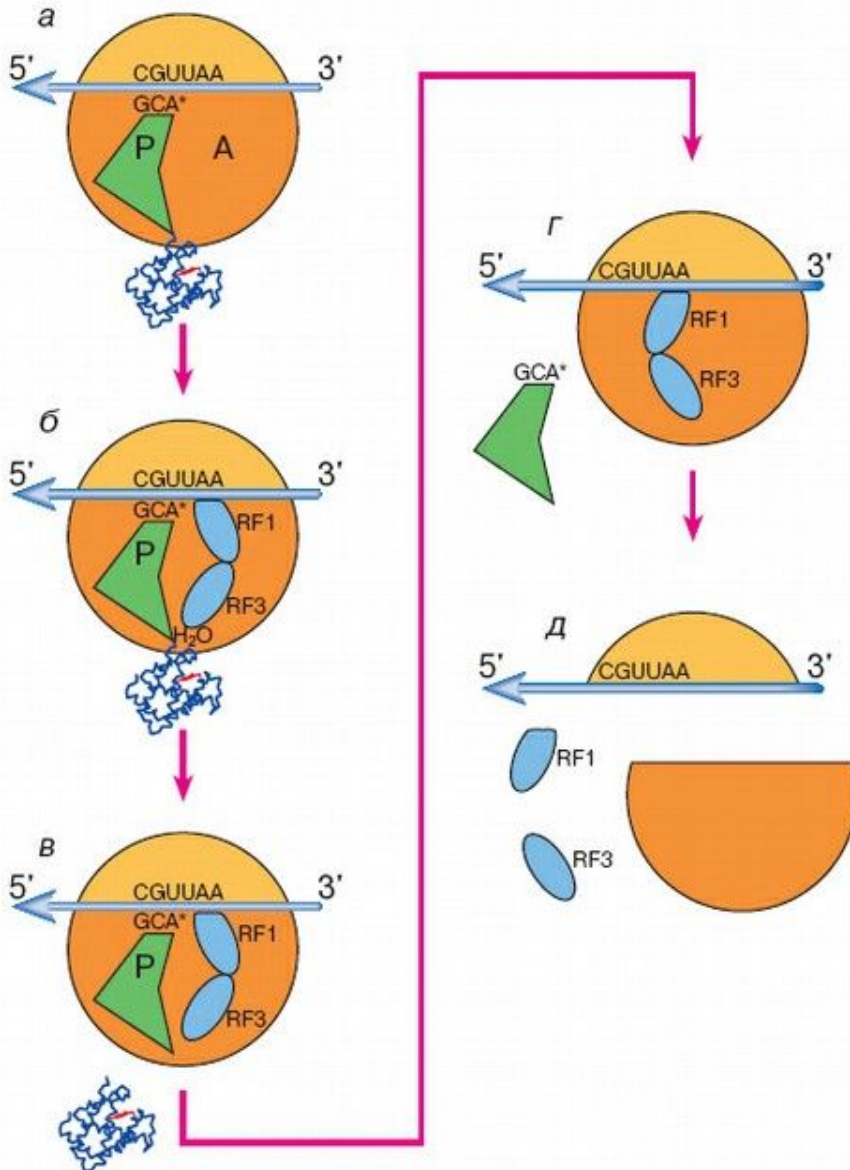
а — после добавления последнего аминокислотного остатка к растущему полипептиду, т.е. образования последней пептидной связи в А-участке устанавливается триплет, не кодирующий никакой аминокислоты — кодон терминации (UAG, UAA или UGA);

б — А-участок с кодоном терминации воспринимает специальные белки — факторы терминации RF1 (или RF2, RF3);

в — пептидилтрансферазный центр рибосомы под действием факторов терминации катализирует реакцию переноса С-конца синтезированного полипептида от тРНК на молекулу воды: происходит гидролиз связи между тРНК и полипептидом, и полипептид освобождается из рибосомы в среду;

г — деацилированная тРНК освобождается из рибосомы;

д — «пустая» рибосома легко диссоциирует на субчастицы, причем малая субчастица может некоторое время оставаться в лабильной ассоциации с мРНК и скользить вдоль нее, находя следующий кодон инициации (реинициация следующей кодирующей последовательности в полицистронных мРНК). Удалению деацилированной тРНК и диссоциации рибосом может содействовать специальный белок — фактор освобождения (RRF).



Терминация — узнавание терминирующего кодона (стоп-кодона) и отделение продукта.

Из 64 возможных кодонов мРНК три:

УАА, УАГ, УГА, являются терминирующими или стоп-кодонами: они останавливают трансляцию.

а — после добавления последнего аминокислотного остатка к растущему полипептиду, т.е. образования последней пептидной связи в А-участке устанавливается триплет, не кодирующий никакой аминокислоты — кодон терминации (UAG, UAA или UGA);

б — А-участок с кодоном терминации воспринимает специальные белки — факторы терминации RF1 (или RF2, RF3);

в — пептидилтрансферазный центр рибосомы под действием факторов терминации катализирует реакцию переноса С-конца синтезированного полипептида от тРНК на молекулу воды: происходит гидролиз связи между тРНК и полипептидом, и полипептид освобождается из рибосомы в среду;

г — деацилированная тРНК освобождается из рибосомы;

д - «пустая» рибосома легко диссоциирует на субчастицы, причем малая субчастица может некоторое время оставаться в лабильной ассоциации с мРНК и скользить вдоль нее, находя следующий кодон инициации (реинициация следующей кодирующей последовательности в полицистронных мРНК). Удалению деацилированной тРНК и диссоциации рибосом может содействовать специальный белок — фактор освобождения (RRF).

Свойства генетического кода

- Основное свойство генетического кода — его триплетность. Каждая аминокислота кодируется тройкой нуклеотидов.
- Избыточность - многие аминокислоты кодируются не одним кодоном, а несколькими.
- Однозначность - каждый кодон соответствует только одной аминокислоте.
- Непрерывность - считывание триплетов сразу друг за другом.
- Неперекрываемостью — каждый нуклеотид может входить в состав только одного триплета.
- Универсальности - генетический код един для всех организмов на Земле.
- Помехоустойчивость – при единичных мутациях снижается вероятность изменения аминокислоты в силу избыточности генетического кода.

1-е основание	2-е основание								3-е основание
	U		C		A		G		
U	UUU	(Phe/F) Фенилаланин	UCU	(Ser/S) Серин	UAU	(Tyr/Y) Тирозин	UGU	(Cys/C) Цистеин	U
	UUC		UCC		UAC		UGC		С
	UUA	(Leu/L) Лейцин	UCA		UAA	Стоп (Охра)	UGA	Стоп (Опал)	А
	UUG		UCG		UAG	Стоп (Янтарь)	UGG	(Trp/W) Триптофан	Г
C	CUU	(Leu/L) Лейцин	CCU	(Pro/P) Пролин	CAU	(His/H) Гистидин	CGU	(Arg/R) Аргинин	U
	CUC		CCC		CAC		CGC		С
	CUA		CCA		CAA	(Gln/Q) Глутамин	CGA		А
	CUG		CCG		CAG		CGG		Г
A	AUU	(Ile/I) Изолейцин	ACU	(Thr/T) Треонин	AAU	(Asn/N) Аспарагин	AGU	(Ser/S) Серин	U
	AUC		ACC		AAC		AGC		С
	AUA		ACA		AAA	(Lys/K) Лизин	AGA	(Arg/R) Аргинин	А
	AUG		ACG		AAG		AGG		Г
G	GUU	(Val/V) Валин	GCU	(Ala/A) Аланин	GAU	(Asp/D) Аспарагиновая кислота	GGU	(Gly/G) Глицин	U
	GUC		GCC		GAC		GGC		С
	GUA		GCA		GAA	(Glu/E) Глутаминовая кислота	GGA		А
	GUG		GCG		GAG		GGG		Г