

**Кафедра молекулярной биологии и медицинской генетики
им. академика НАН РК Раисова Т.К.**

ТРАНСКРИПЦИЯ, ПОСТТРАНСКРИПЦИОННЫЕ МОДИФИКАЦИИ

**Коммити «Клеточный метаболизм»
Модуль 2**

Семей, 2021

Цели обучения (высокий уровень)	Цели обучения (средний уровень)	Цели обучения (низкий уровень)
Определяет внутриклеточное движение генетической (биологической) информации в процессе биосинтеза белка	Объясняет роль транскрипции в биосинтезе белка	Дает определение транскрипции
		Объясняет механизм транскрипции (инициации, элонгации, терминации)
	Определяет состав и последовательность нуклеотидов на иРНК, комплементарной цепи ДНК, с которой произошла транскрипция	Объясняет функции ферментов при транскрипции
		Характеризует модель Жакоб-Моно (оперонная модель)
	Объясняет роль посттранскрипционной модификации в экспрессии генов	Дает определение посттранскрипционной модификации
		Показывает и характеризует процессинг и сплайсинг гетерогенной ядерной РНК в виде схемы (гяРНК)

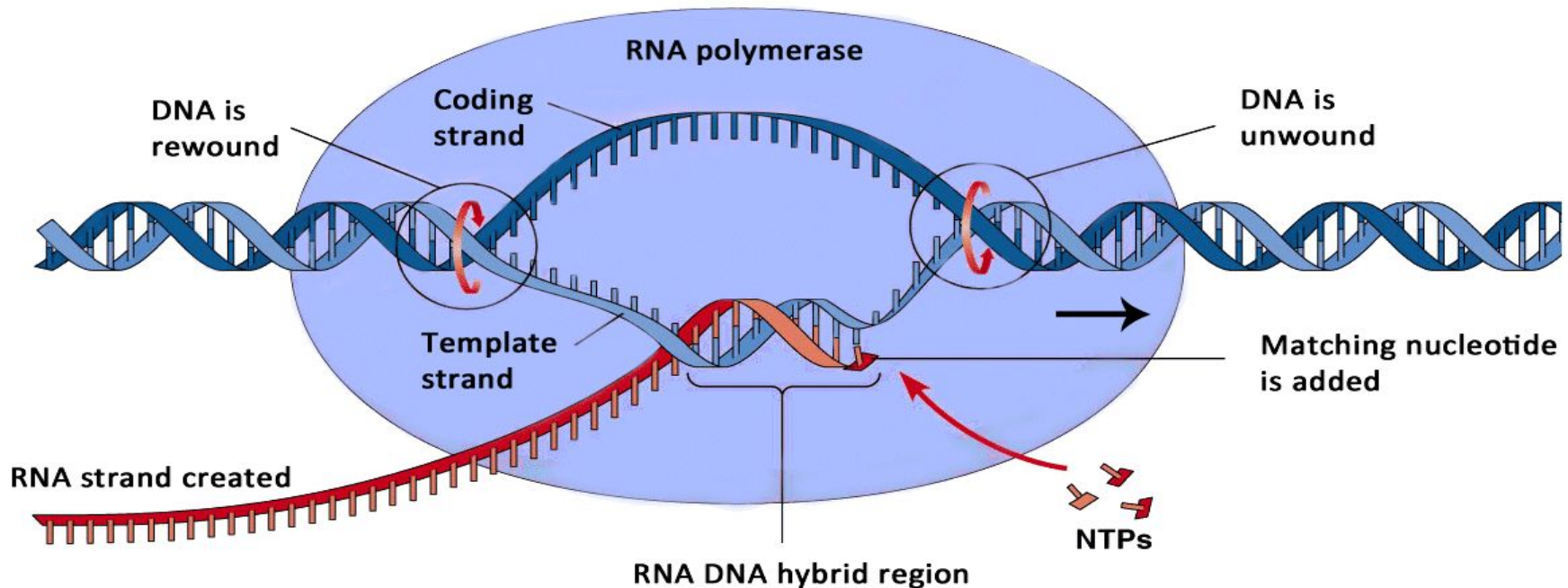
Транскрипция

В биологии процессы **транскрипции** и **трансляции** рассматривают в рамках биосинтеза белка. Хотя в процессе транскрипции никакого синтеза белка не происходит. Но без нее невозможна трансляция. Транскрипция предшествует трансляции.

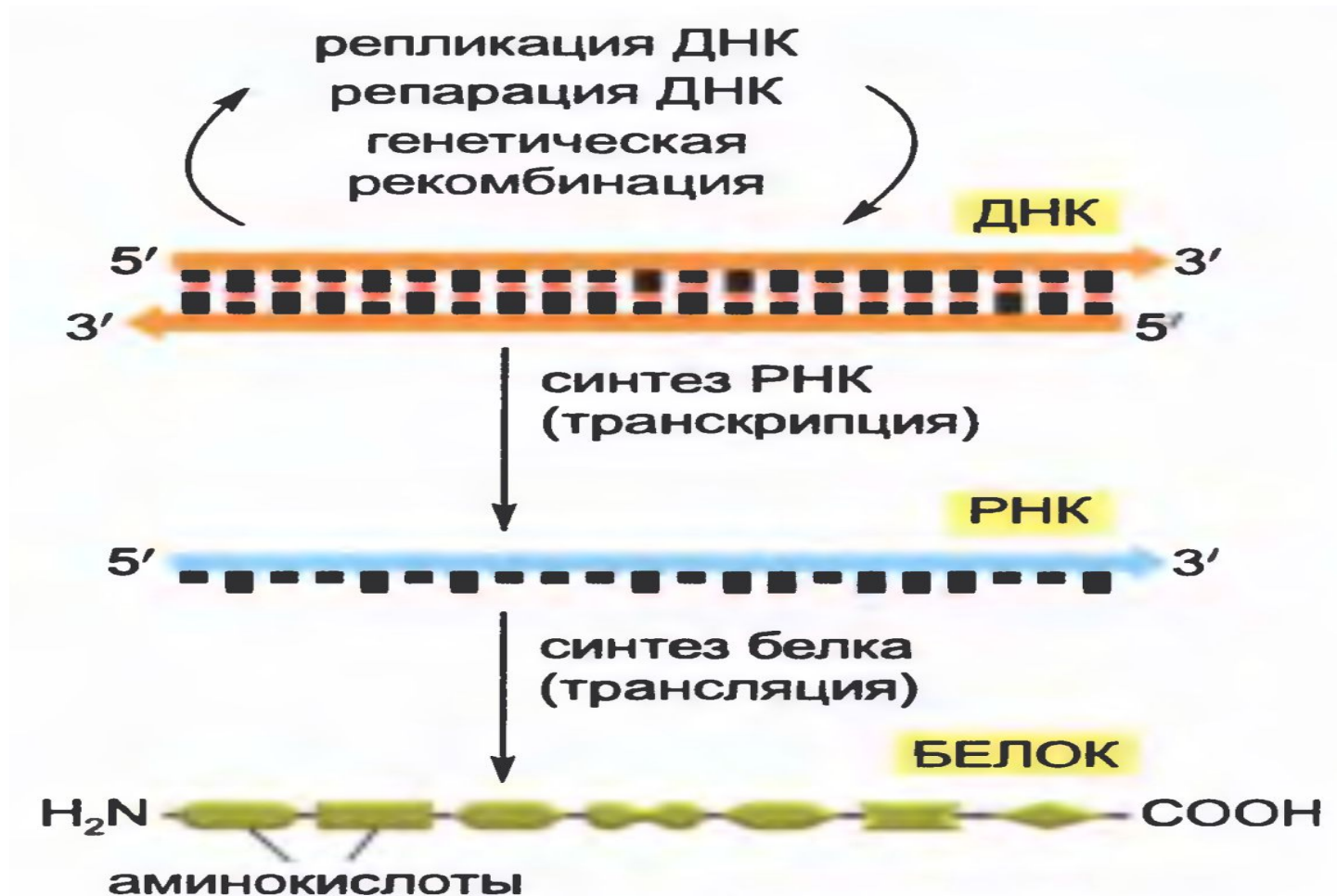
Протекающие в клетках **транскрипция** и **трансляция** согласуются с так называемой **догмой молекулярной биологии**: поток информации в клетках идет в направлении от нуклеиновых кислот к белкам, но никогда наоборот. Это значит, что нуклеиновая кислота может служить информационной матрицей для синтеза белка, а белок не может выступать таковой для синтеза нуклеиновой кислоты.

Транскрипция

- Процесс переписывания генетической информации с ДНК на и-РНК называется транскрипцией.
- Процесс транскрипции осуществляется в ядре с помощью специального фермента — ДНК — зависимой РНК — полимеразы или просто РНК — полимеразы путем комплементарного спаривания нуклеотидов ДНК и синтезируемой и-РНК.



Центральная догма молекулярной биологии



Транскрипция

Это первый этап биосинтеза белка!

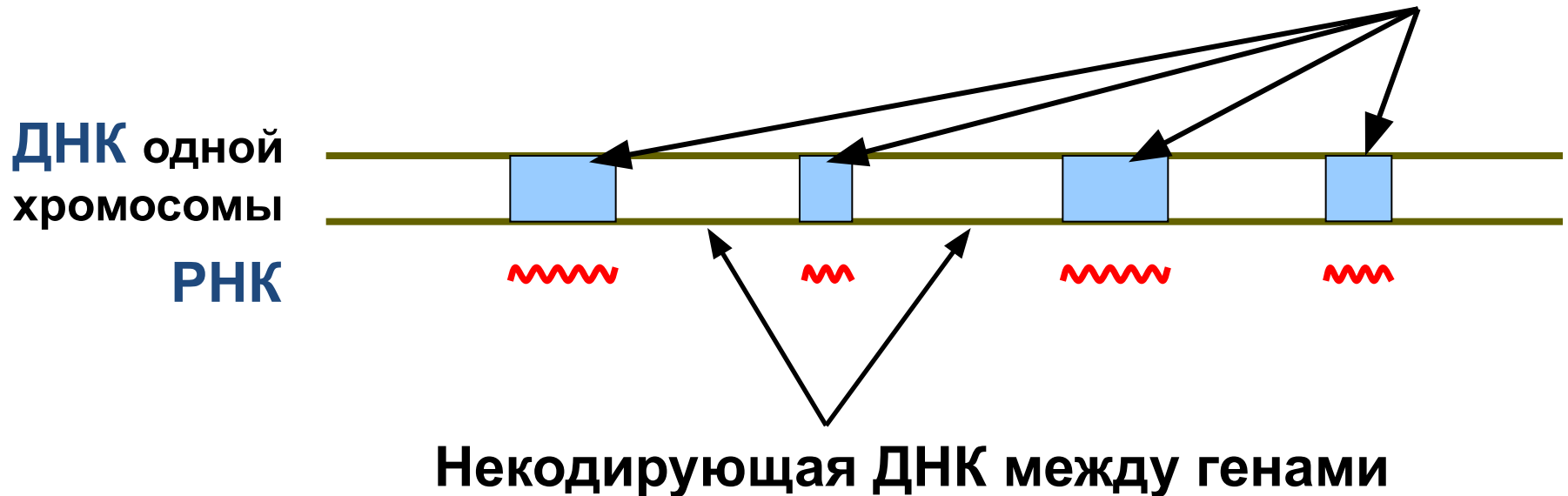
Транскрипция - это переписывание информации с последовательности нуклеотидов ДНК в последовательность нуклеотидов иРНК (матричный синтез).



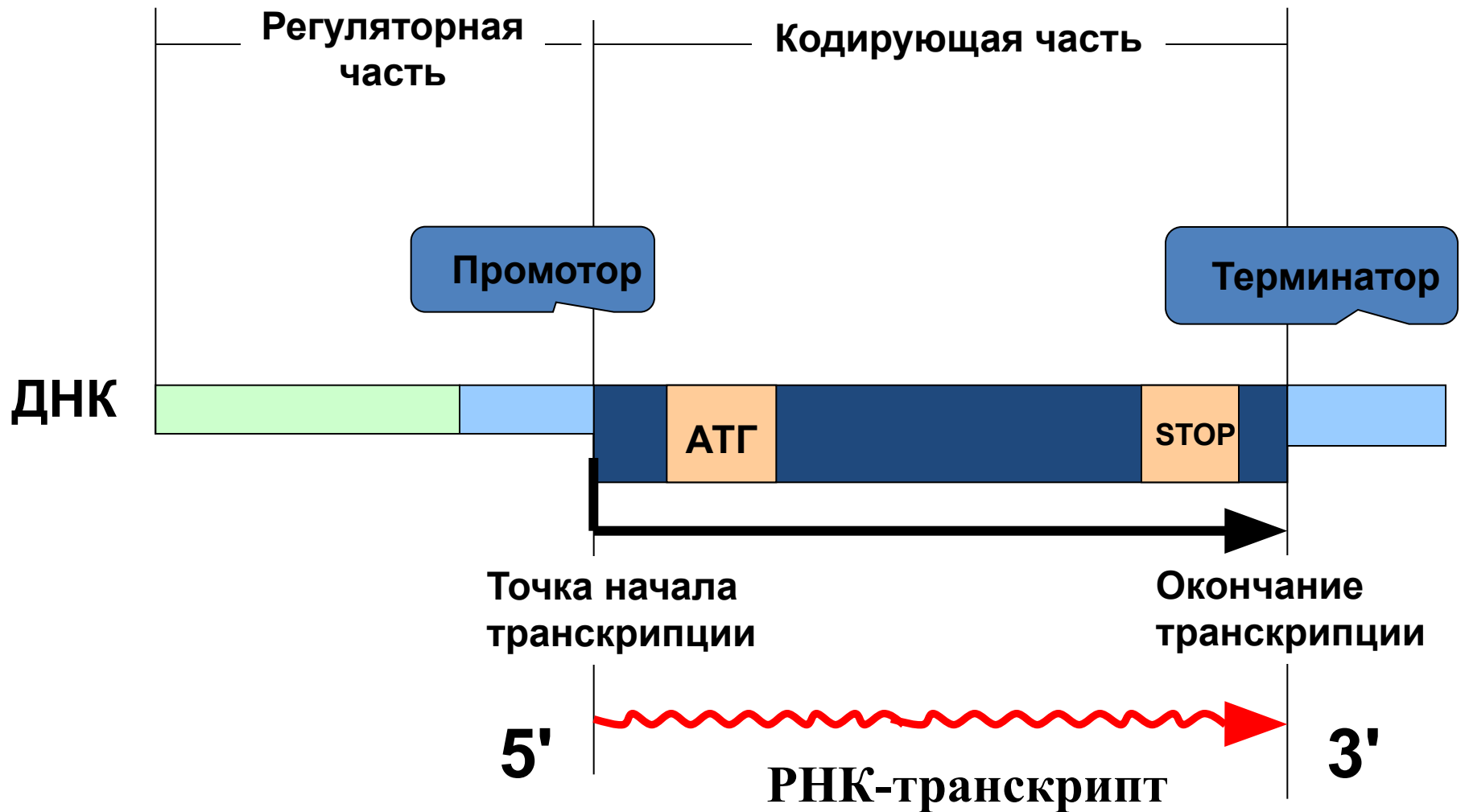
Рис. 22.2. Процесс транскрипции

Гены – транскрибируемые участки ДНК

- Транскрибируется не вся ДНК, а лишь отдельные ее участки – **гены**.



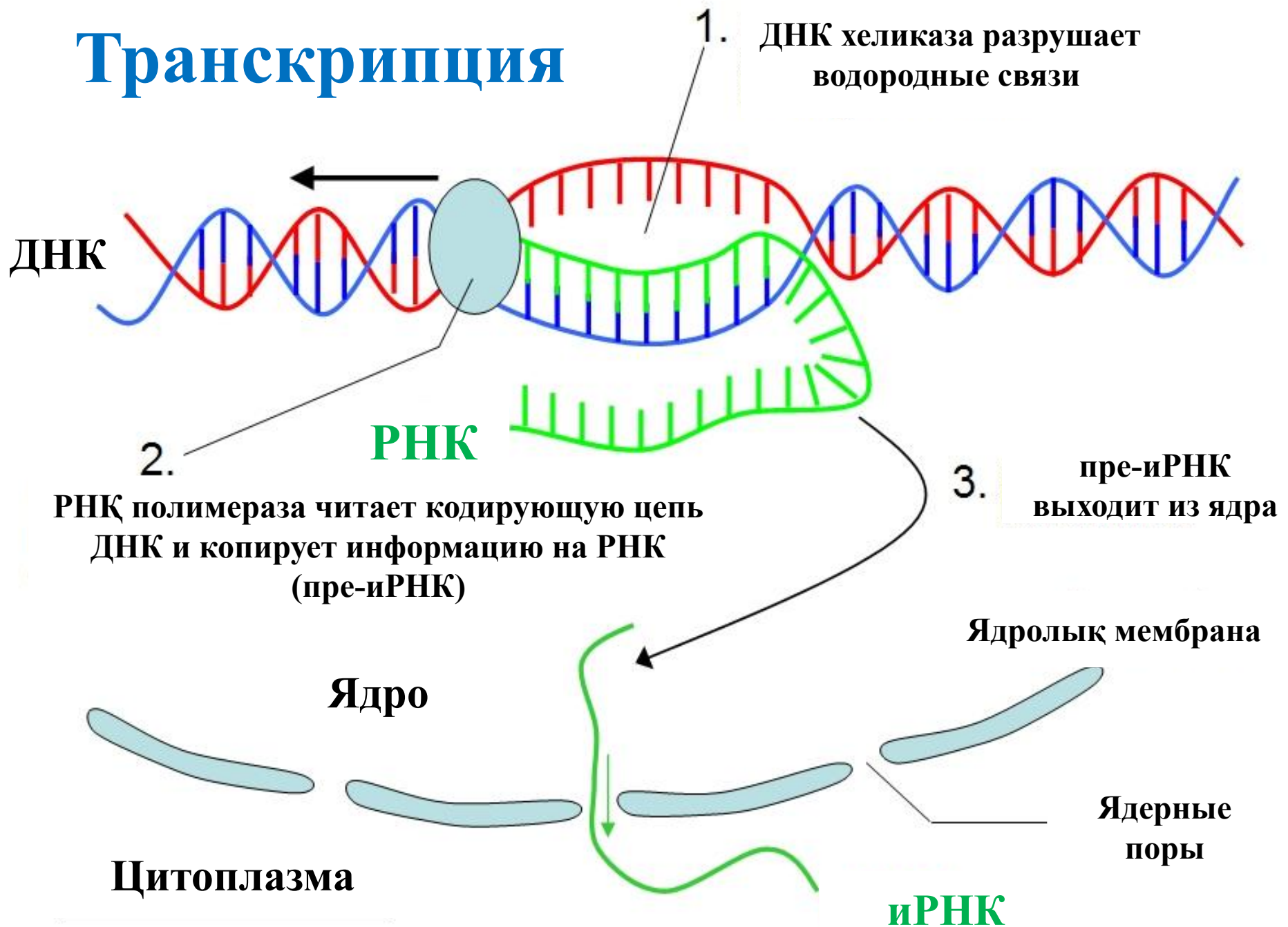
Строение гена



Транскрипция



Транскрипция



Принципы транскрипции

1. Комплементарность

РНК-полимераза синтезирует комплементарную реплику с транскрибируемого участка ДНК (А -U, G-C, C-G, T-A).

2. Антипараллельность

Синтезируемая цепь РНК направлена антипараллельно транскрибируемому участку.

3. Ассиметричность

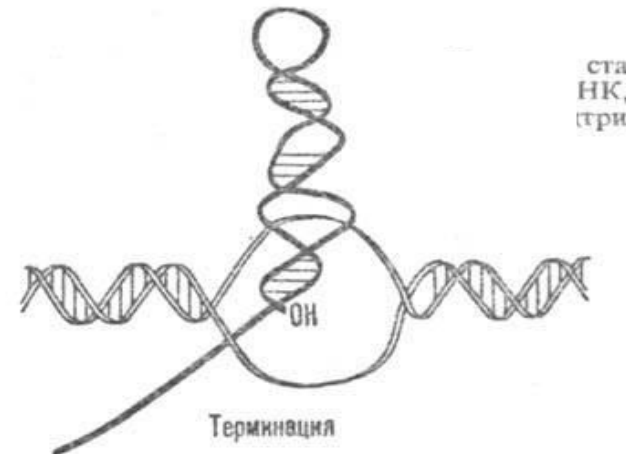
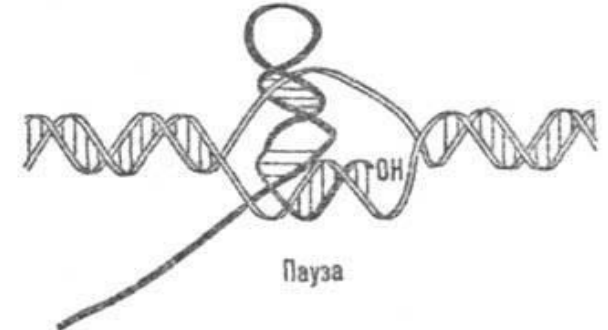
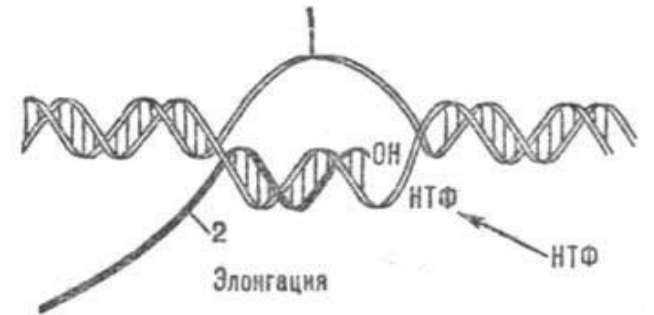
Транскрибируется лишь одна из цепей ДНК - матричная цепь, смысловая цепь не транскрибируется.

4. Униполярность:

синтез нуклеотидной цепи всегда направлен 5' -> 3'

5. Отсутствие потребности в затравке

Транскрипция начинается с нуклеотидтрифосфата и не требует затравочных олигонуклеотидов.



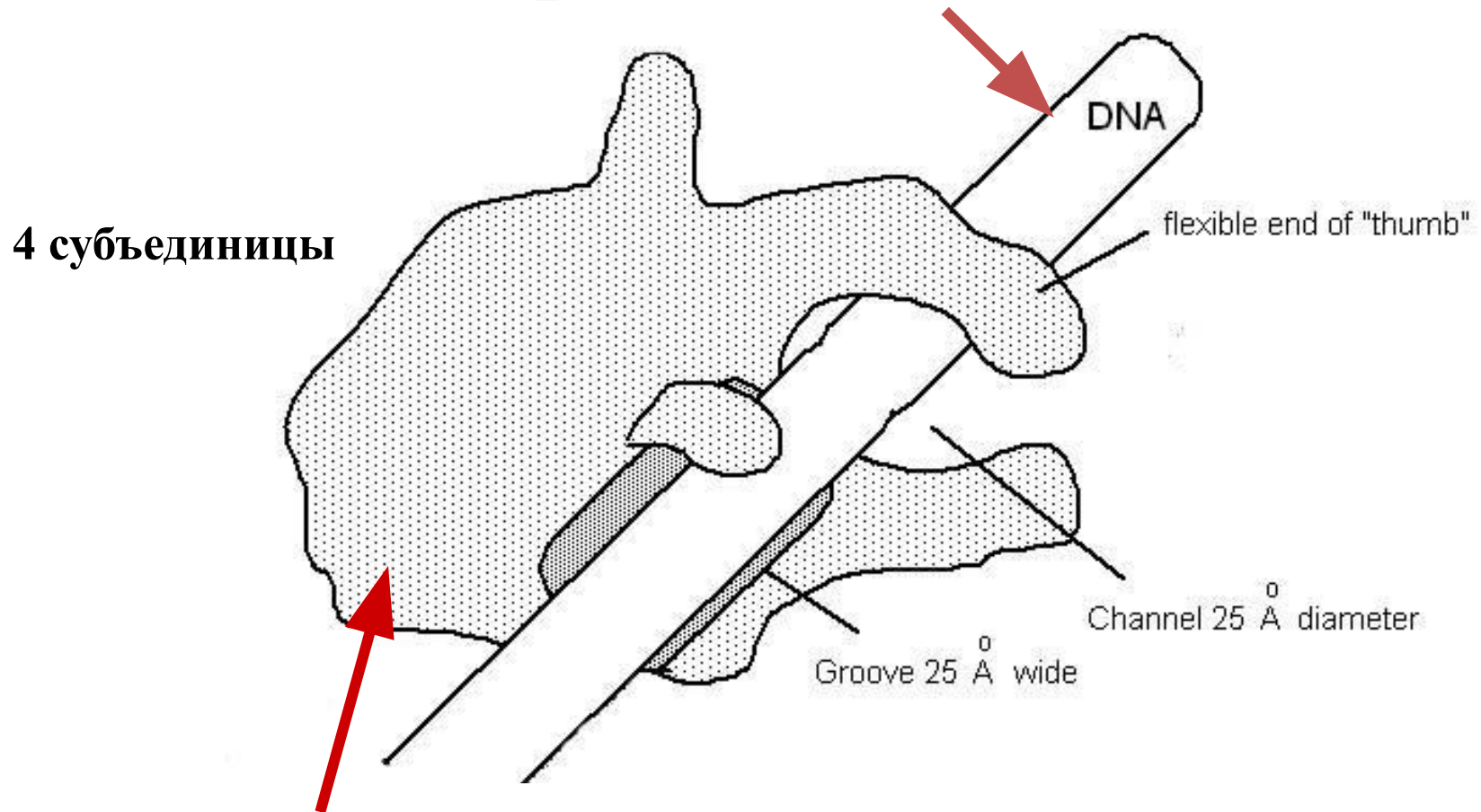
Для транскрипции нужны

1. Матрица – ДНК



Для транскрипции нужны

1. Матрица – ДНК



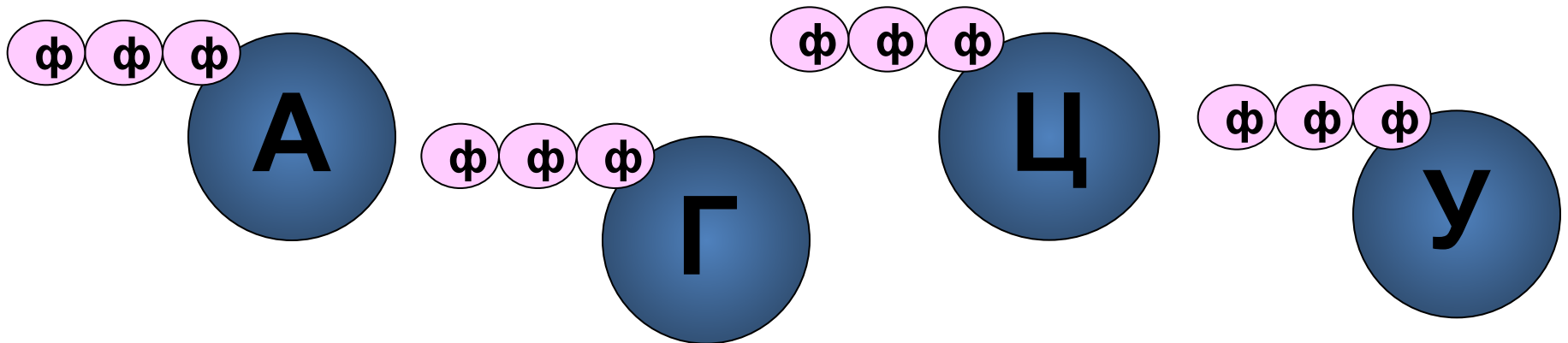
2. Фермент – РНК-полимераза

Для транскрипции нужны

3. Мономеры

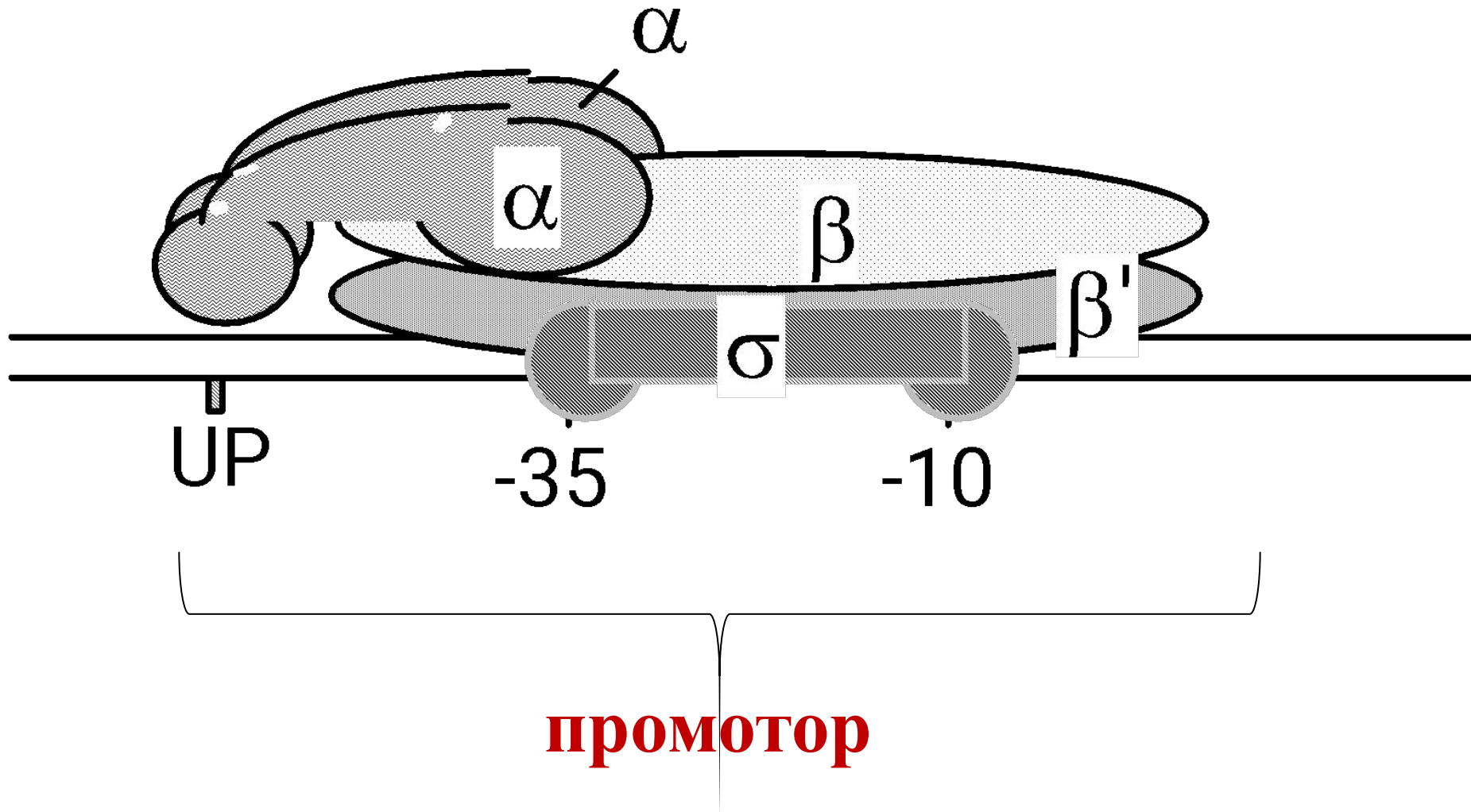
Активированные нуклеотиды

трифосфаты



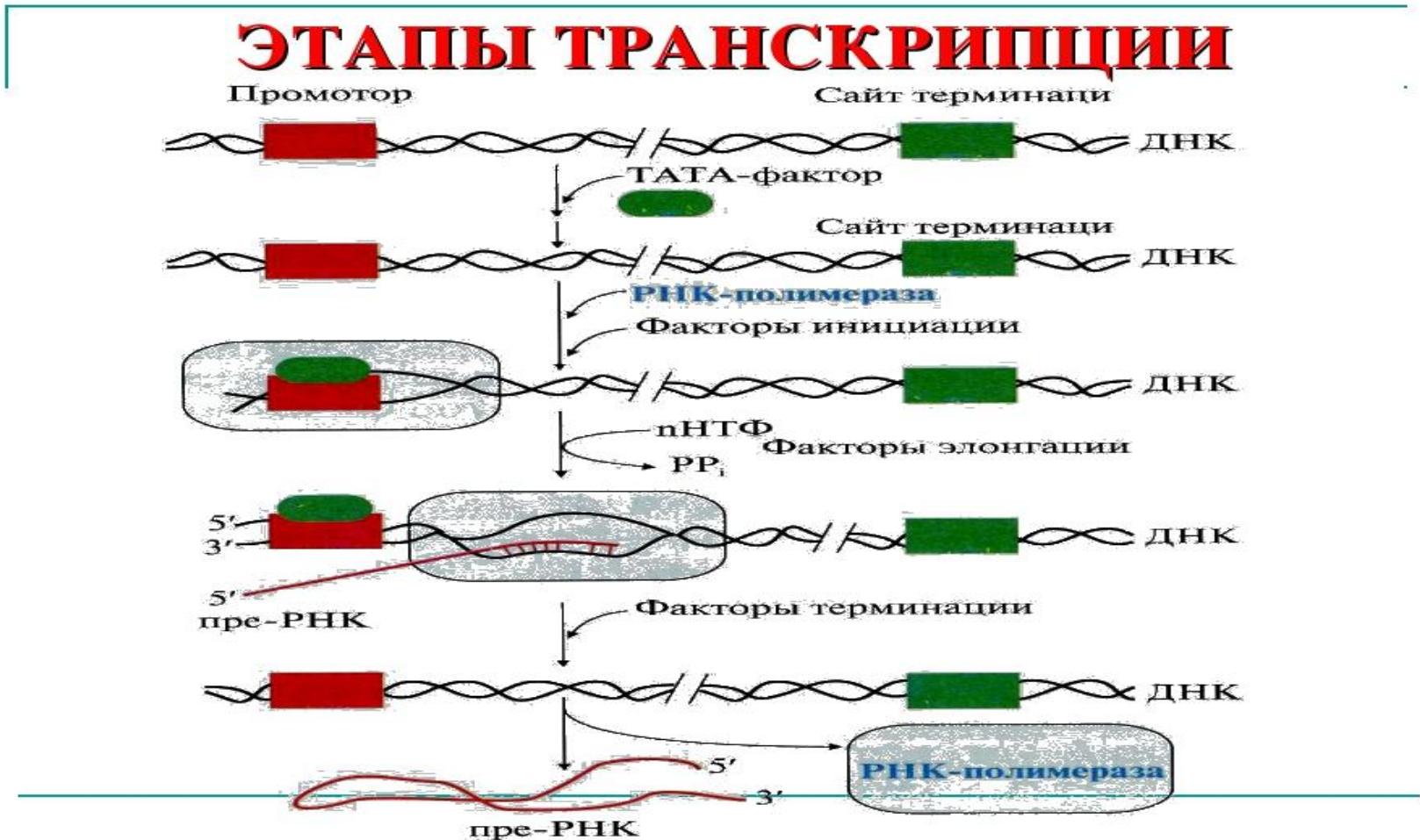
1. Инициация (начало)

РНК-полимераза узнает промотор



Транскрипция у эукариот

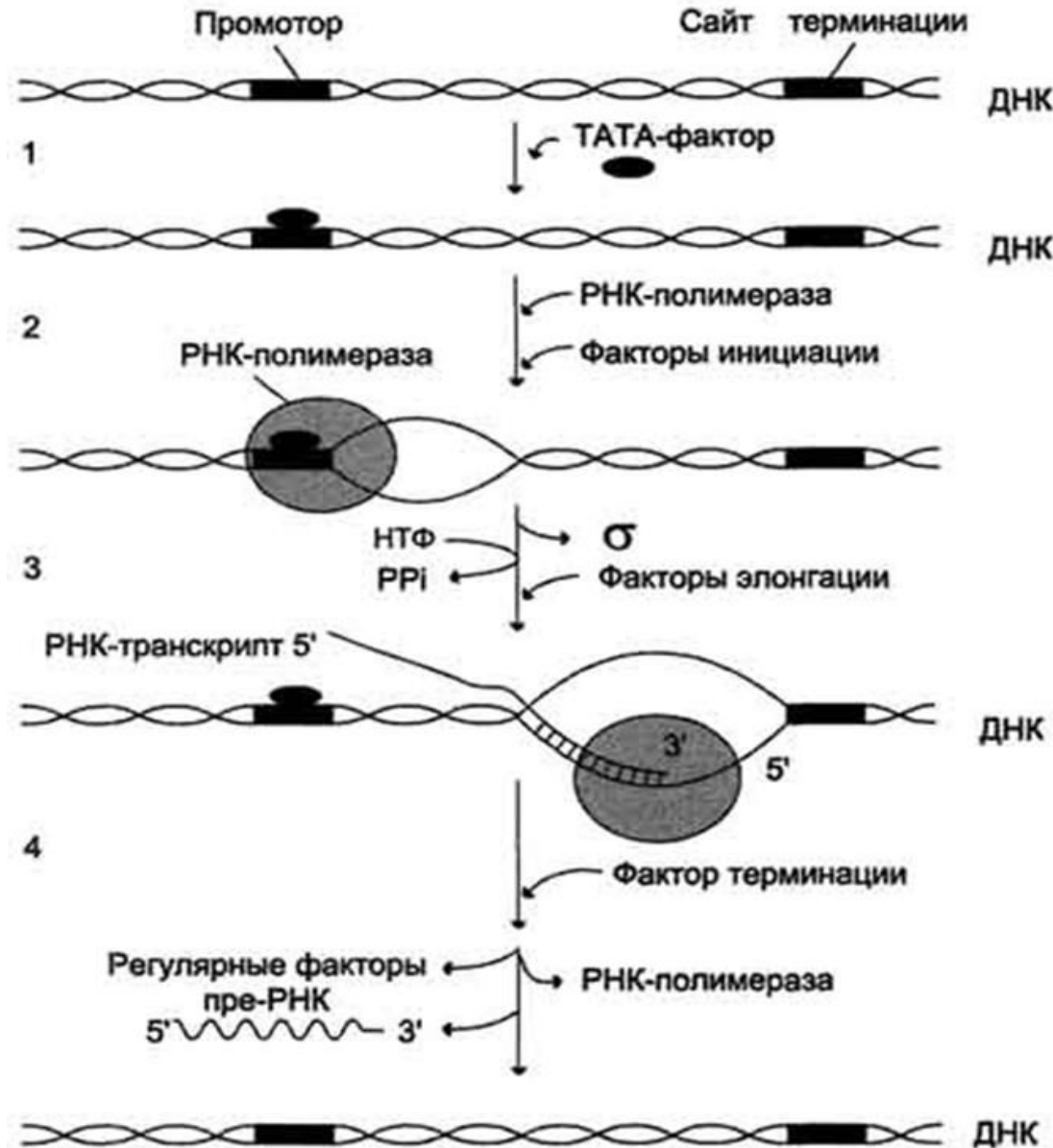
1.Инициация Активация промотора происходит с помощью большого белка - ТАТА-фактора, связывающегося с ТАТА-боксом;
Присоединение ТАТА-фактора облегчает взаимодействие промотора с РНК-полимеразой.



Транскрипция у эукариот

1. Инициация

- Факторы инициации вызывают изменение конформации РНК-полимеразы и обеспечивают раскручивание примерно одного витка спирали ДНК, т.е. образуется транскрипционная вилка, в которой матрица доступна для инициации синтеза цепи РНК.

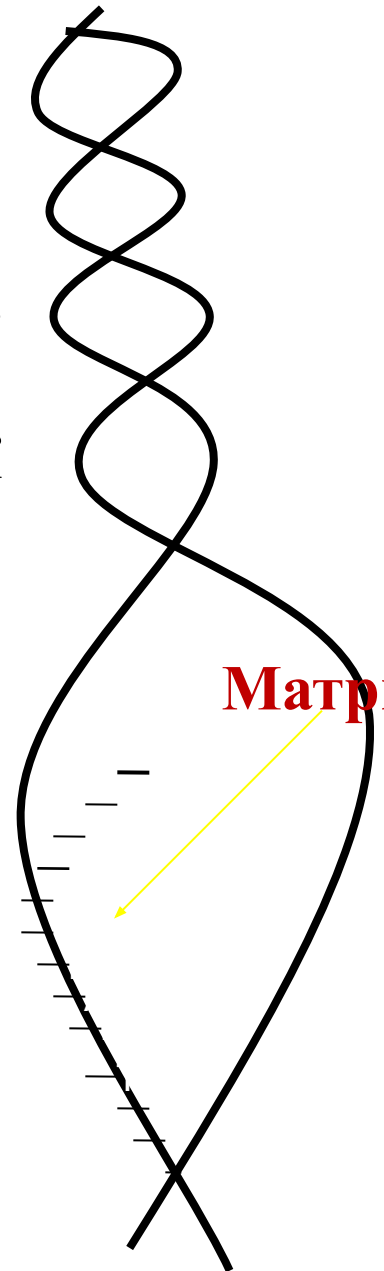


В определенном участке ДНК под действием ферментов белки-гистоны отделяются, водородные связи рвутся, и двойная спираль ДНК раскручивается. Одна из цепочек становится матрицей для построения и-РНК. Участок ДНК в определенном месте начинает раскручиваться под действием ферментов.

ДНК

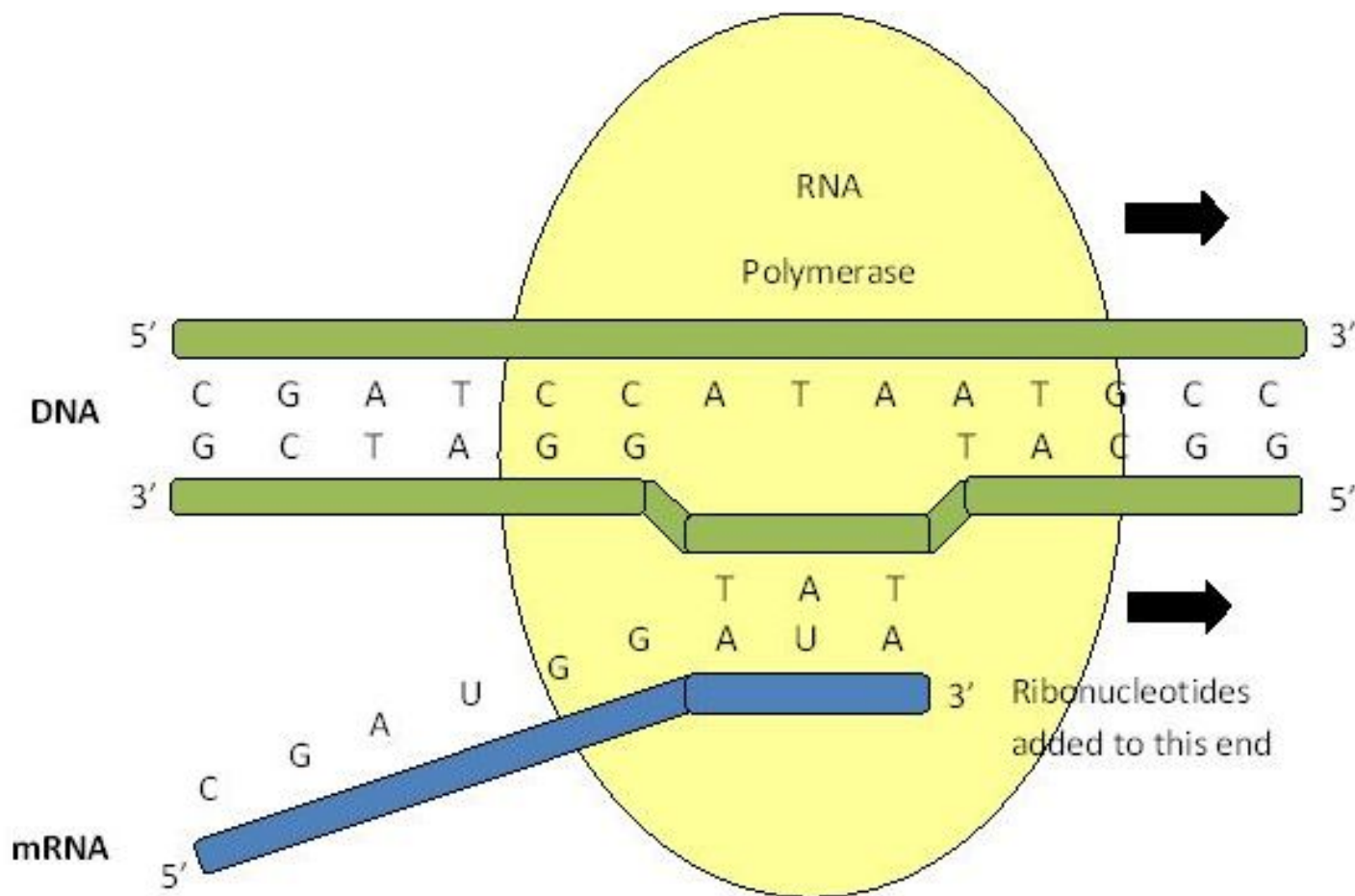


Матрица



2. Элонгация (рост цепочки РНК)

РНК-полимераза движется по гену



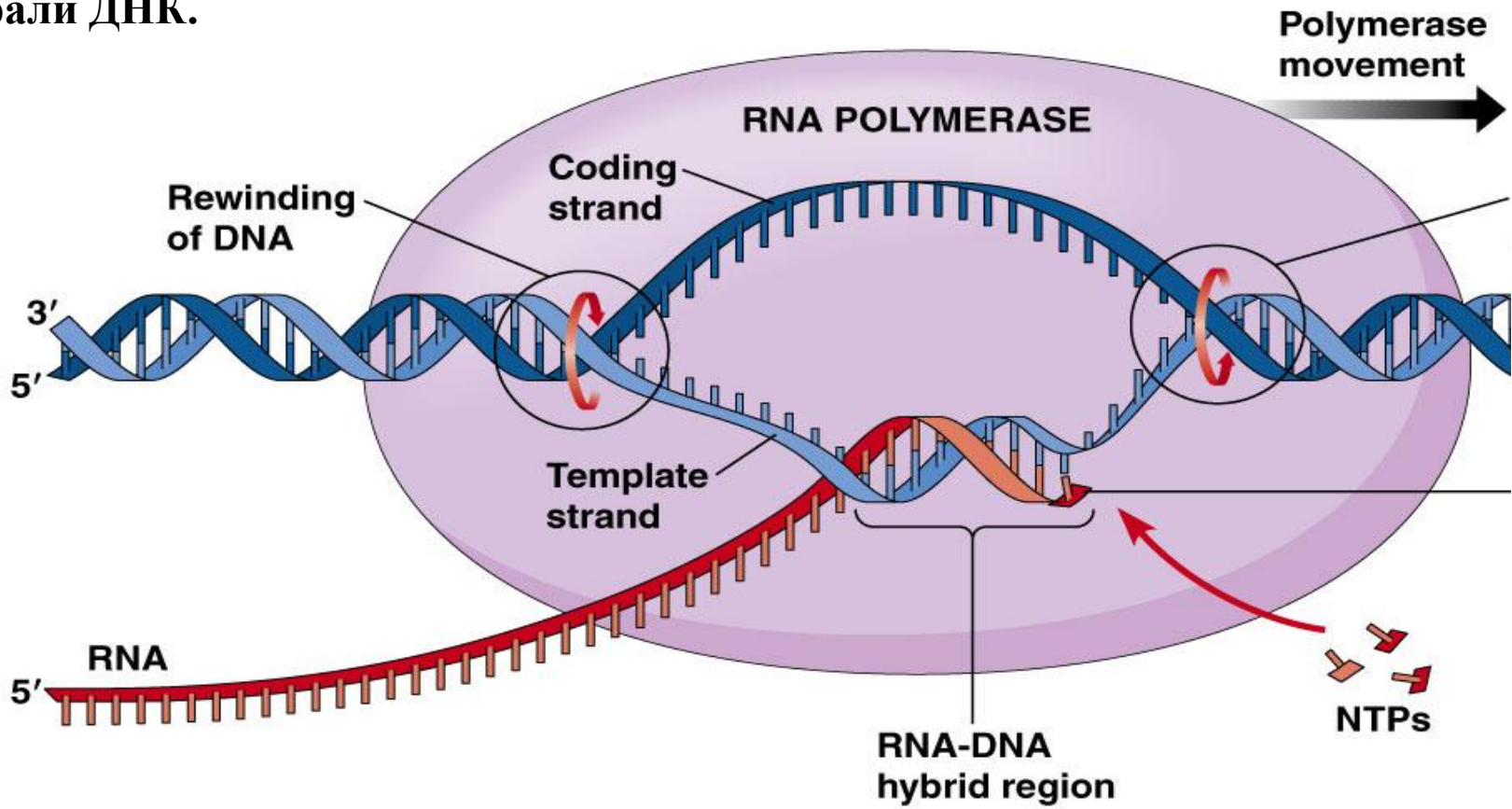
На стадии **элонгации** происходит последовательное присоединение по принципу комплиментарности свободных нуклеотидов к освобожденному участку ДНК. РНК-полимераза соединяет нуклеотиды в полирибонуклеотидную цепочку.

При синтезе РНК около 12 ее нуклеотидов комплементарно временно связаны с нуклеотидами ДНК. При движении РНК-полимеразы впереди нее цепочки ДНК расходятся, а сзади «сшиваются» с помощью ферментов. Цепь РНК постепенно растет и выдвигается из комплекса РНК-полимеразы.

Транскрипция у эукариот

2. Элонгация

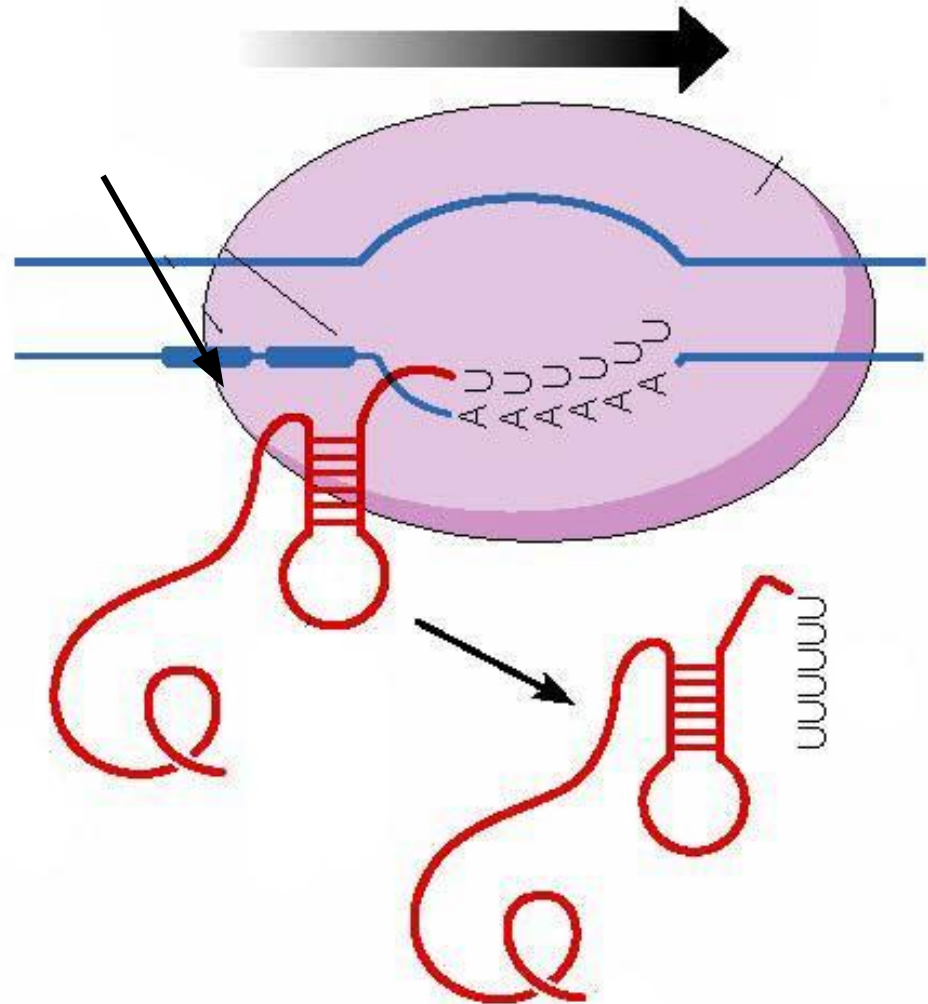
- На стадии элонгации, в области транскрипционной вилки, одновременно разделены примерно 18 нуклеотидных пар ДНК;
- Растущий конец цепи РНК образует временную гибридную спираль, около 12 пар нуклеотидных остатков, с матричной цепью ДНК;
- По мере продвижения РНК-полимеразы по матрице в направлении от 3'- к 5'-концу впереди неё происходит расхождение, а позади - восстановление двойной спирали ДНК.



3. Терминация

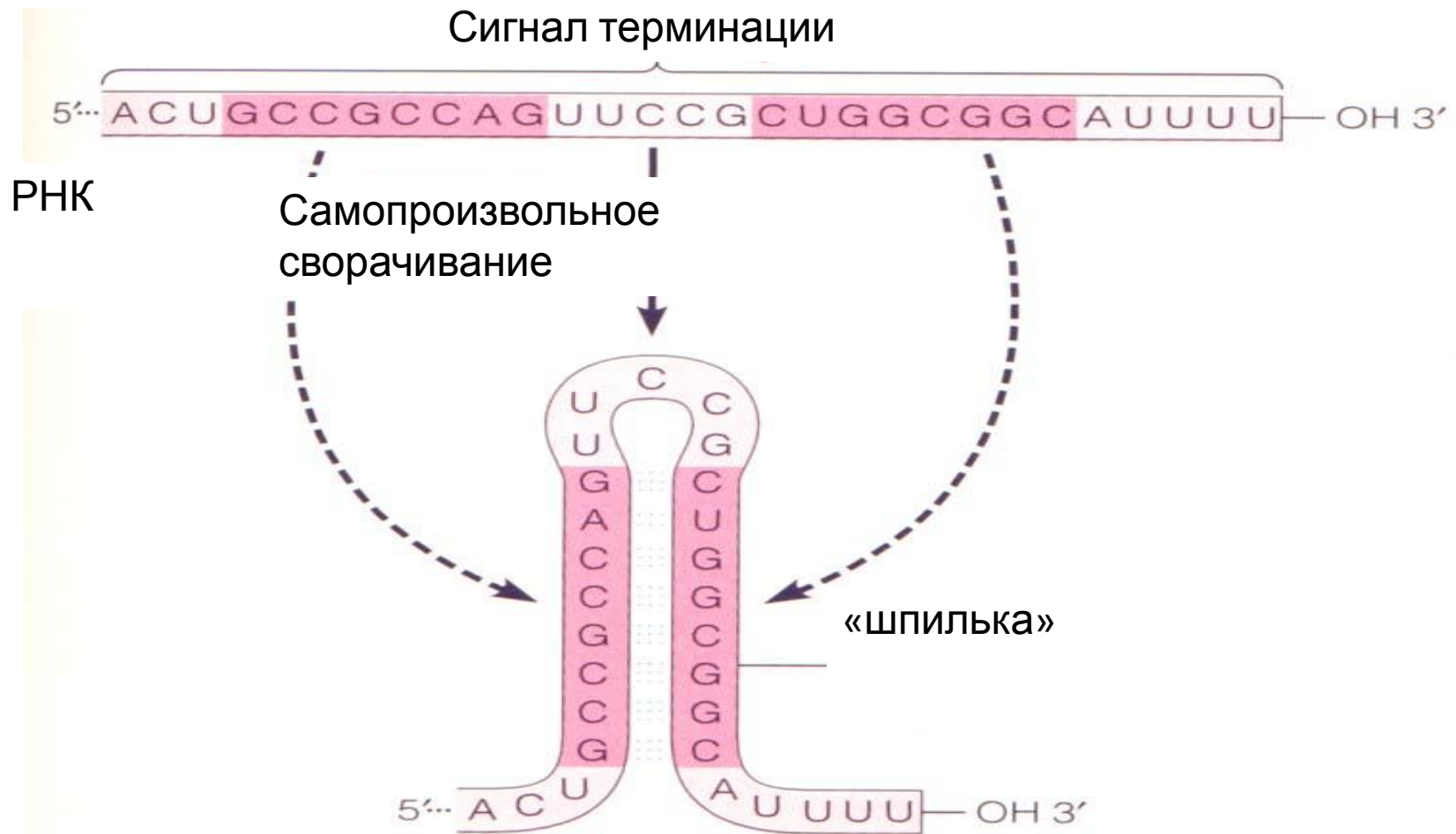
Терминатор (знак конца транскрипции)

направление транскрипции

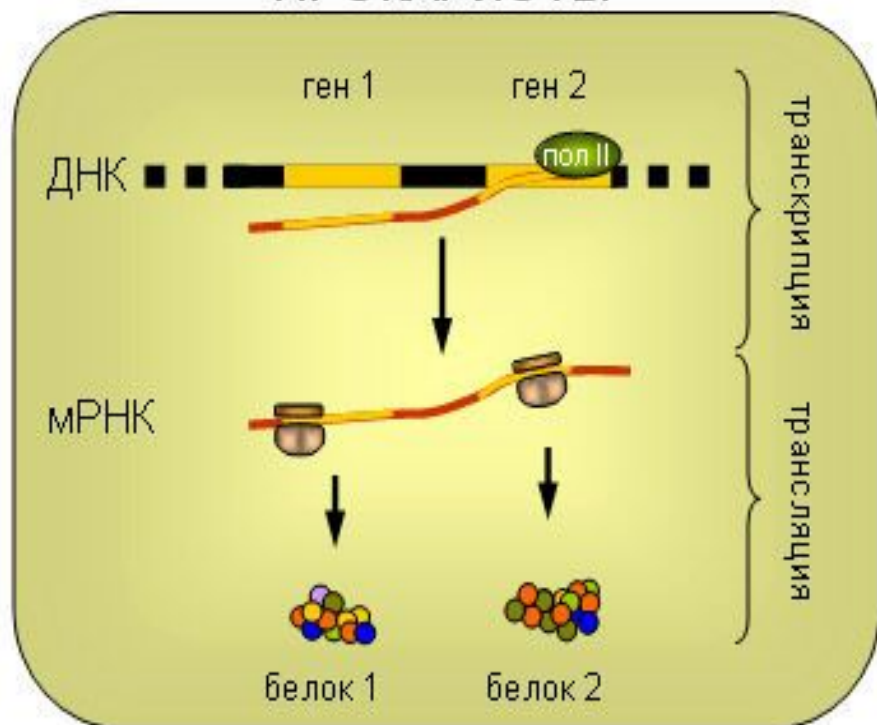


**В области терми
находится инвертиров
поворот, который прив
образованию петли на РНК**

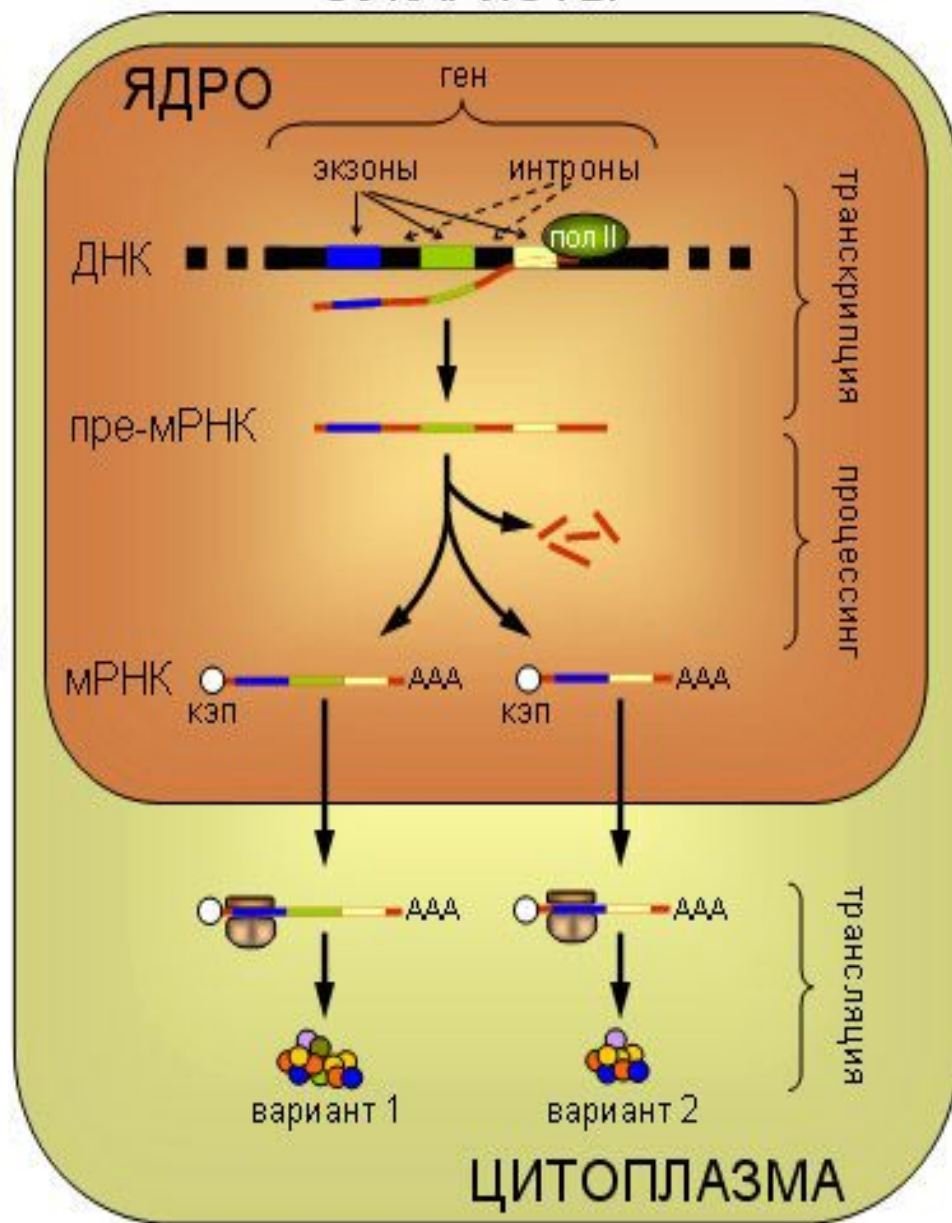
3. Терминация. Сигналом для этого служит образование «шпильки» на РНК, при этом РНК отсоединяется от ДНК



ПРОКАРИОТЫ



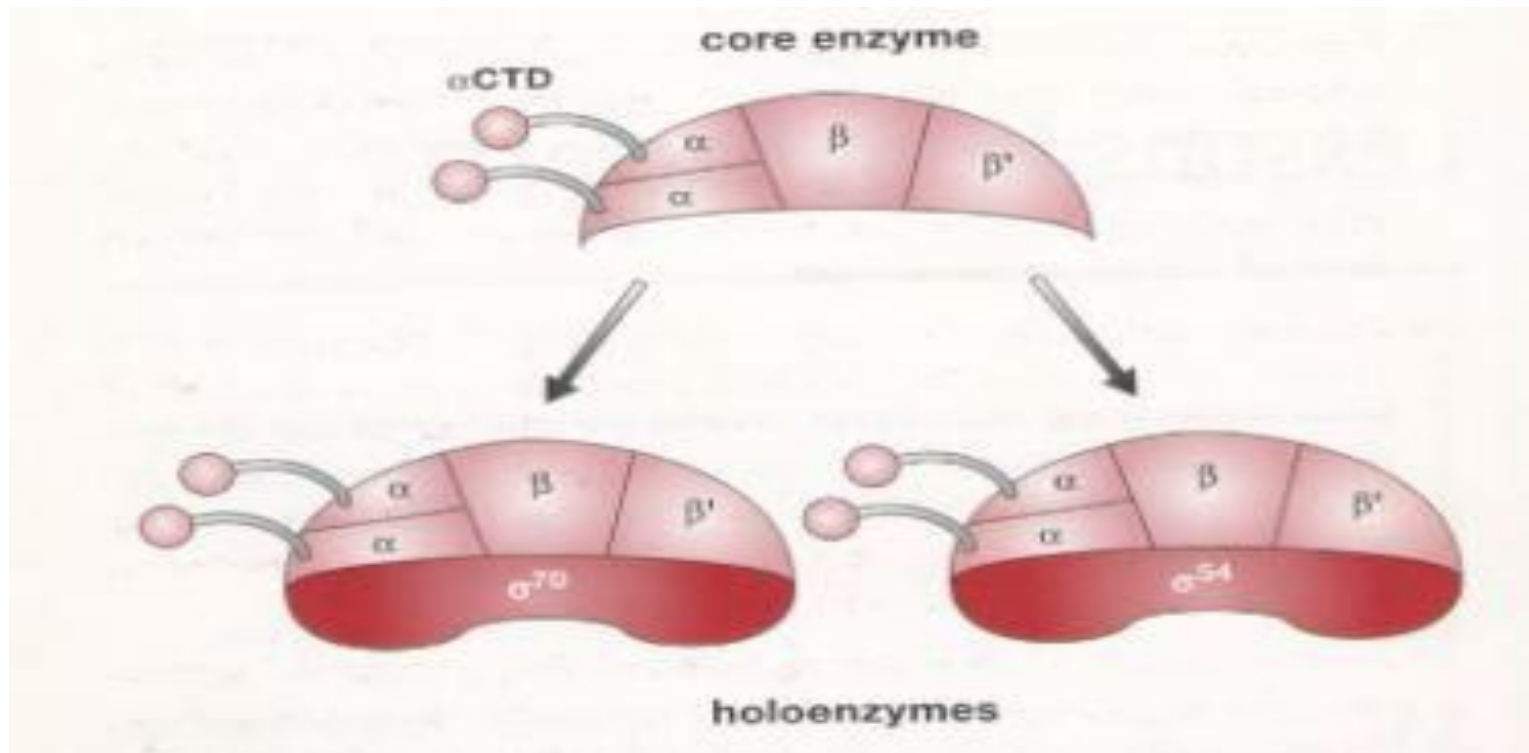
ЭУКАРИОТЫ



У эукариотов обнаружены 3 специализированные РНК-полимеразы: **РНК-полимераза I**, синтезирующая пре-рРНК; **РНК-полимераза II**, ответственная за синтез пре-мРНК; **РНК-полимераза III**, синтезирующая пре-тРНК. РНК-полимеразы - олигомерные ферменты, состоящие из нескольких субъединиц - 2α , β , β' , σ .

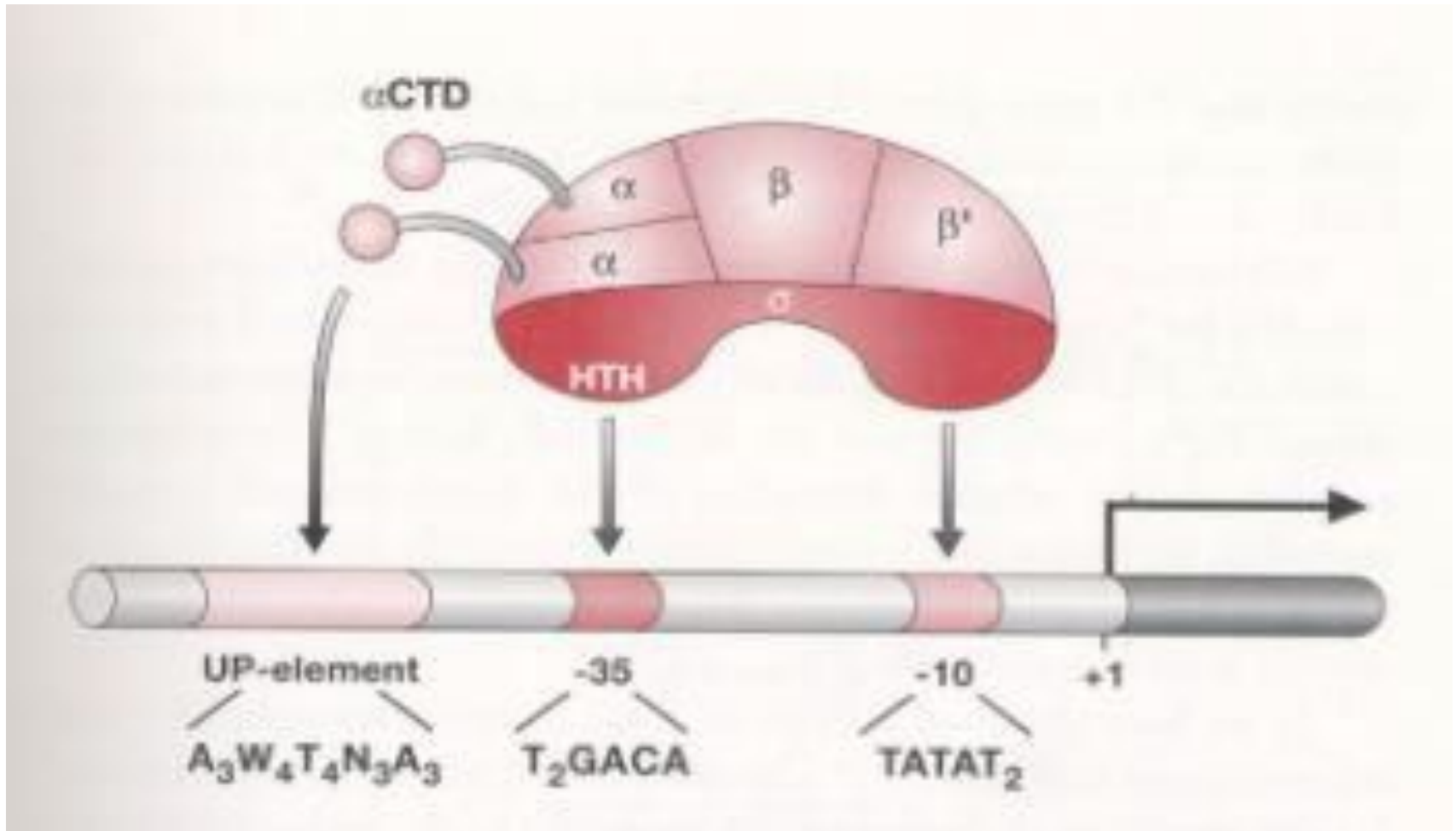
Транскрипция у прокариот

- Прокариоты не имеют ядерной мембраны, поэтому процессы транскрипции, трансляции могут проходить одновременно;
- Прокариотической транскрипции характерно иметь полицистронные мРНК, для одновременного синтеза нескольких белков



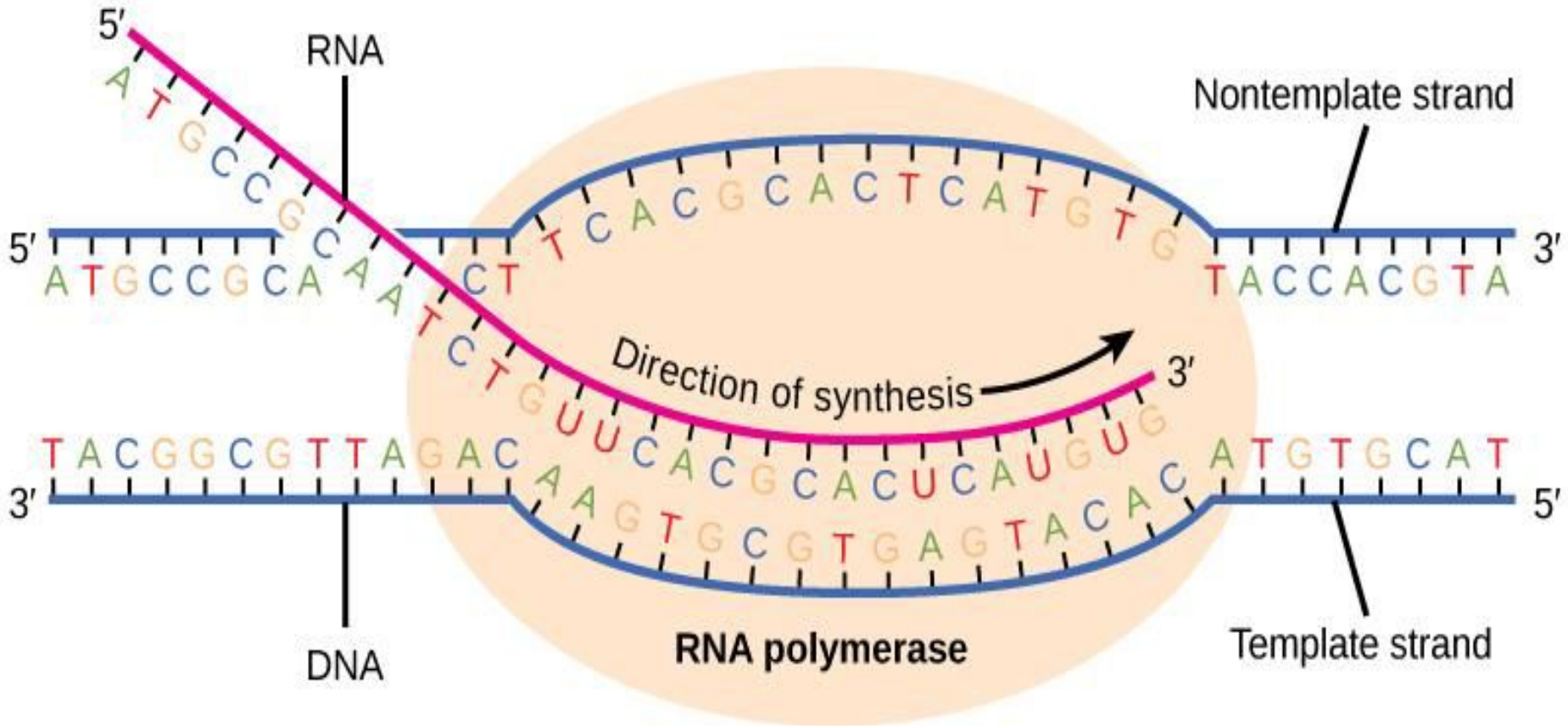
Транскрипция у прокариот

- Промотор – точка старта РНК-полимеразы;
- При инициации σ субъединица РНК-полимеразы освобождается



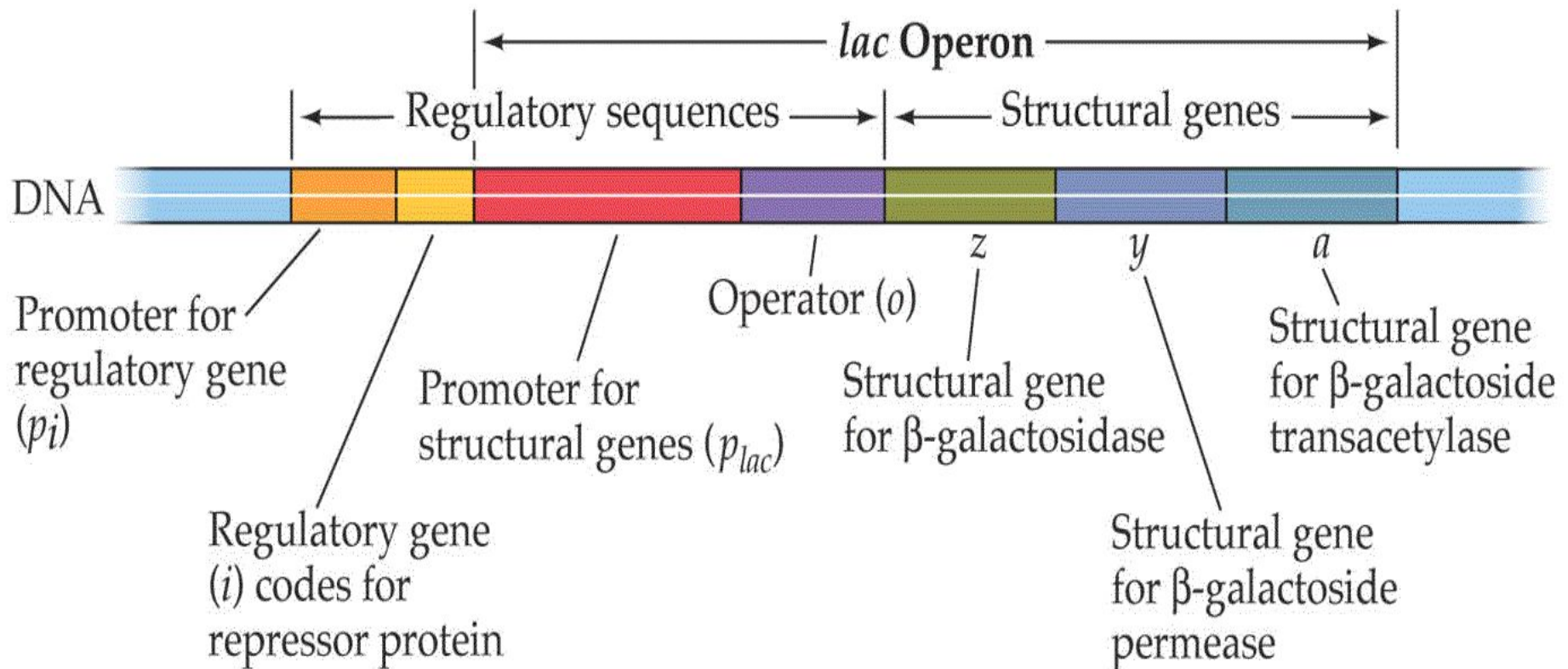
Транскрипция у прокариот

- Скорость РНК-полимеразы составляет примерно 40 нуклеотидов в секунду;
- В течении транскрипции ДНК перед РНК-полимеразой расплетается, а после неё обратно схлопывается - транскрипционный пузырь;



Транскрипция у прокариот

Оперон — функциональная единица генома у прокариот, в состав которой входят цистроны (гены, единицы транскрипции), кодирующие совместно или последовательно работающие белки и объединенные под одним (или несколькими) промоторами.



Концепцию оперона для прокариот предложили в 1961 году французские ученые Жакоб и Моно, за что получили Нобелевскую премию в 1965 году.

Впервые Ф. Жакоб и Ж.Моно (1961) на основе исследований индуцируемой системы синтеза фермента в (бетта) – галактозидазы у кишечной палочки, предложили модель, которая объяснила механизмы индукции (стимулирования) или репрессии (подавление) синтеза данного фермента.

Регуляция работы генов у прокариот

Схема регуляции транскрипции у прокариот была предложена Ф. Жакобом и Ф. Моно в 1961 году на примере **лактозного оперона**. Группа структурных генов, управляемая одним **геном-оператором**, образует **оперон**. В состав оперона входит также небольшой участок ДНК (**промотор**) – место первичного прикрепления **РНК-полимеразы** – фермента, катализирующего реакции ДНК-зависимого синтеза иРНК. **Ген-оператор** включает и выключает структурные гены для считывания информации, следовательно, они активны непостоянно. **Ген-регулятор**, находящийся обычно на некотором расстоянии от оперона, постоянно активен, и на основе его информации синтезируется особый **белок-репрессор**. Последний обладает **способностью блокировать ген-оператор**, вступая с ним в химическое взаимодействие, и тогда считывания информации со структурных генов не происходит, то есть **оперон «не работает»**.

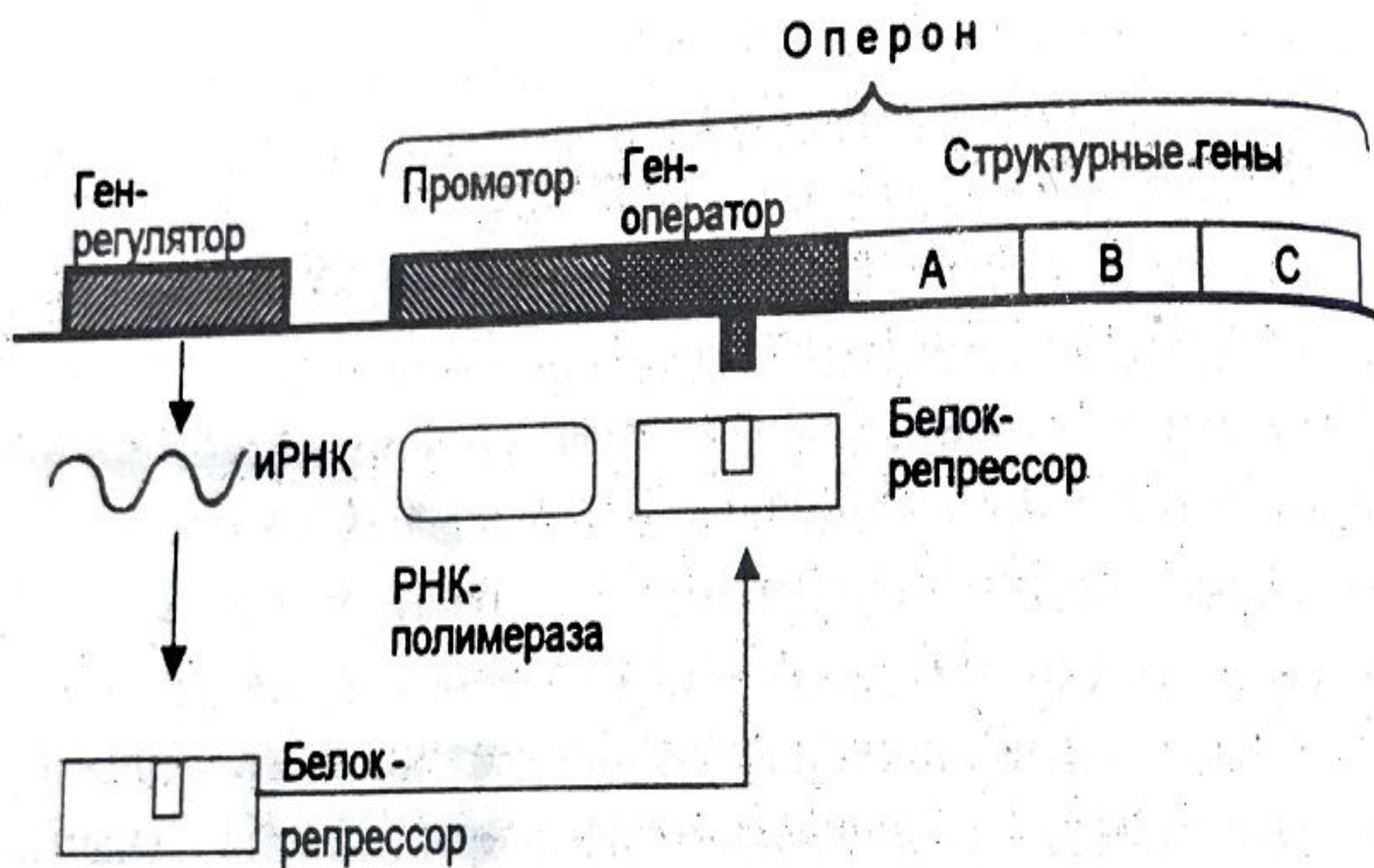
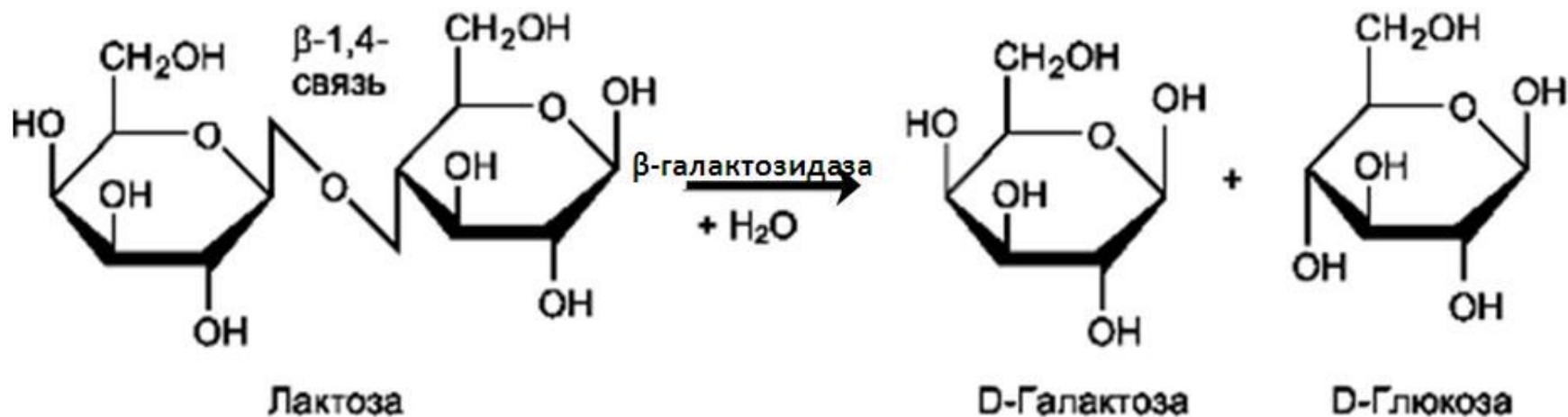
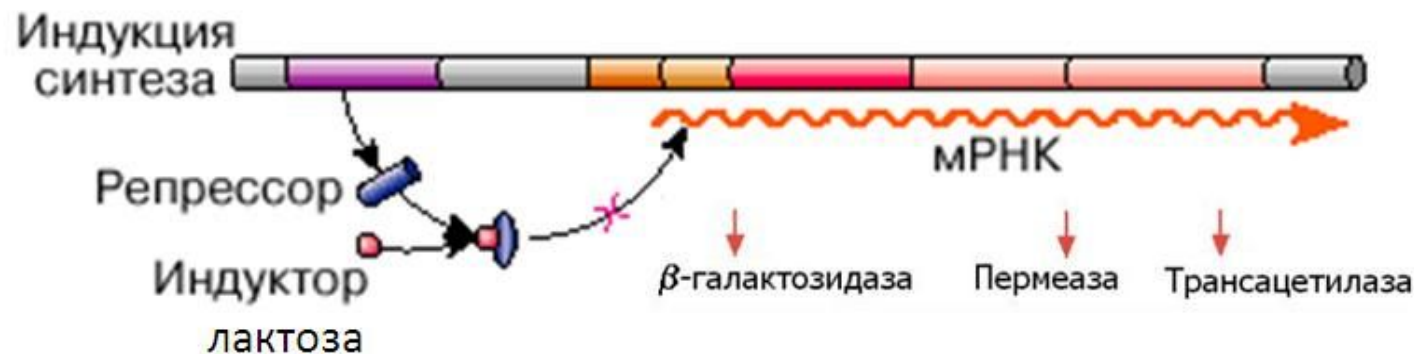
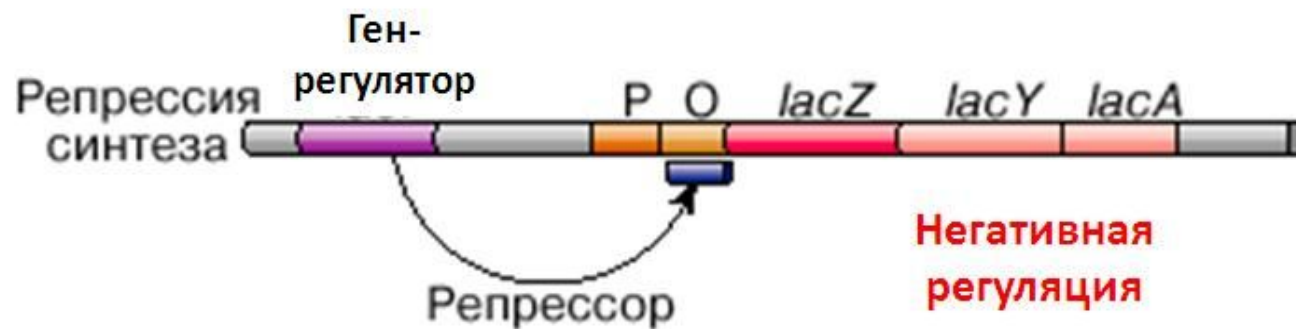
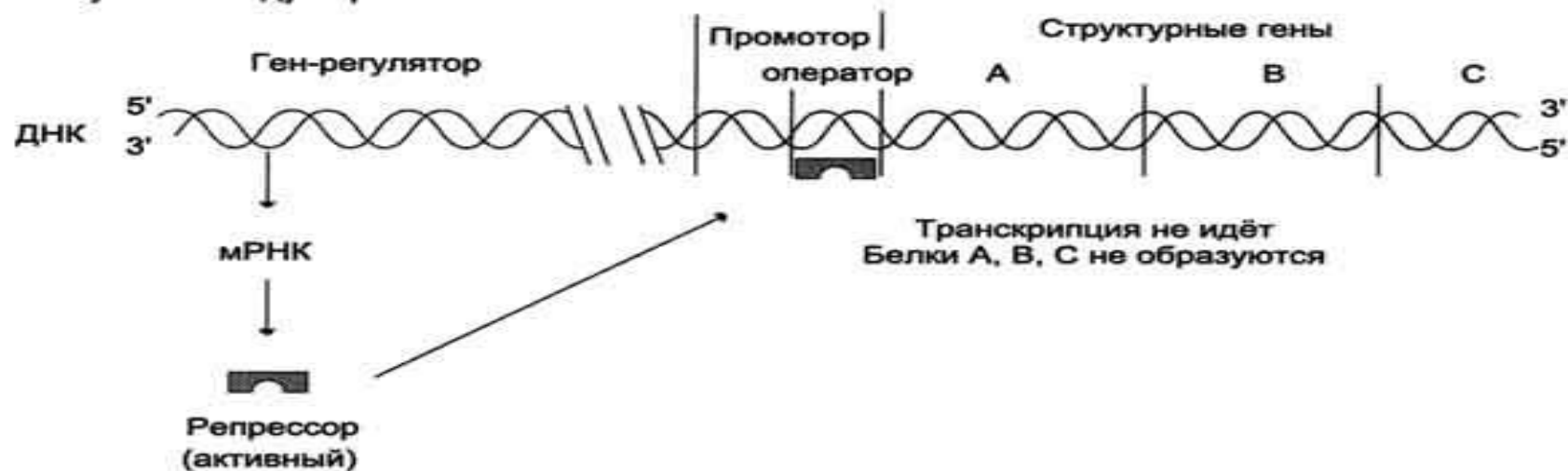


Рис. 31. Схема регуляции транскрипции у прокариот (оперон «не работает»; объяснение в тексте)

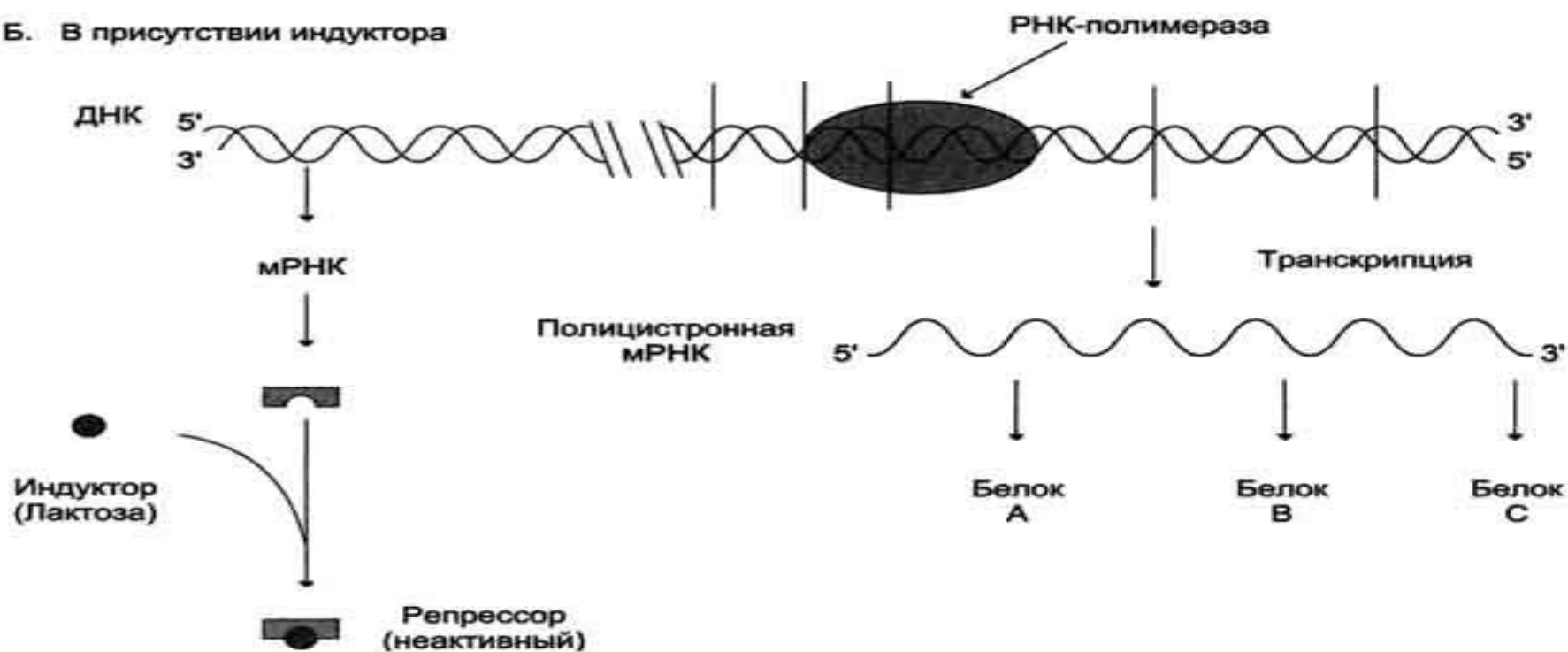
Лактозный оперон



А. В отсутствие индуктора



Б. В присутствии индуктора



Регуляция работы генов у прокариот

Если в клетку поступает **индуктор** (вещество, которое расщепляется под действием ферментов, закодированных в данном опероне), то он связывает **белок-репрессор** (образует с ним химическое соединение), **освобождая ген-оператор**. РНК-полимераза разрывает связи между двумя цепочками ДНК **оперона, начиная с промотора**, и по принципу комплементарности (порядок нуклеотидов) информация со структурных генов переписывается на иРНК. Затем иРНК идет в рибосомы, где синтезируются ферменты, разлагающие **индуктор**. Когда последние молекулы индуктора будут разрушены, **освобождается белок-репрессор**, который снова **блокирует ген-оператор**. Работа оперона прекращается, а при поступлении индуктора опять возобновляется.

Для каждого оперона имеется свой специфический индуктор. Например, для **лактозного оперона** индуктором является **лактоза**, для **фруктозного – фруктоза** и т.п. То есть **оперон «работает»**.

У прокариот процессы транскрипции и трансляции могут протекать одновременно, т.е. цепь иРНК еще продолжает синтезироваться, а к ее 5' - концу уже присоединяются рибосомы и начинается синтез полипептидов.

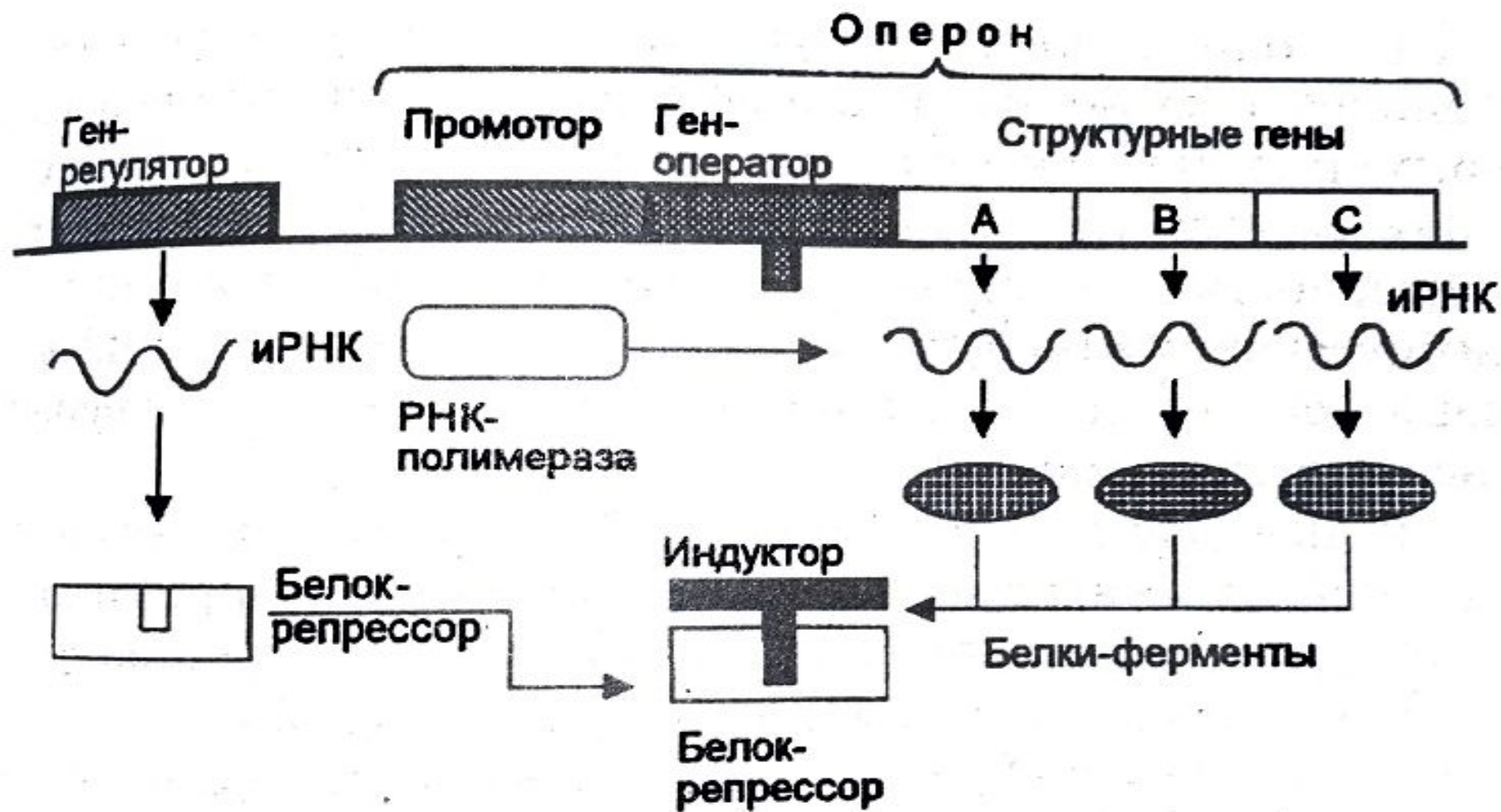
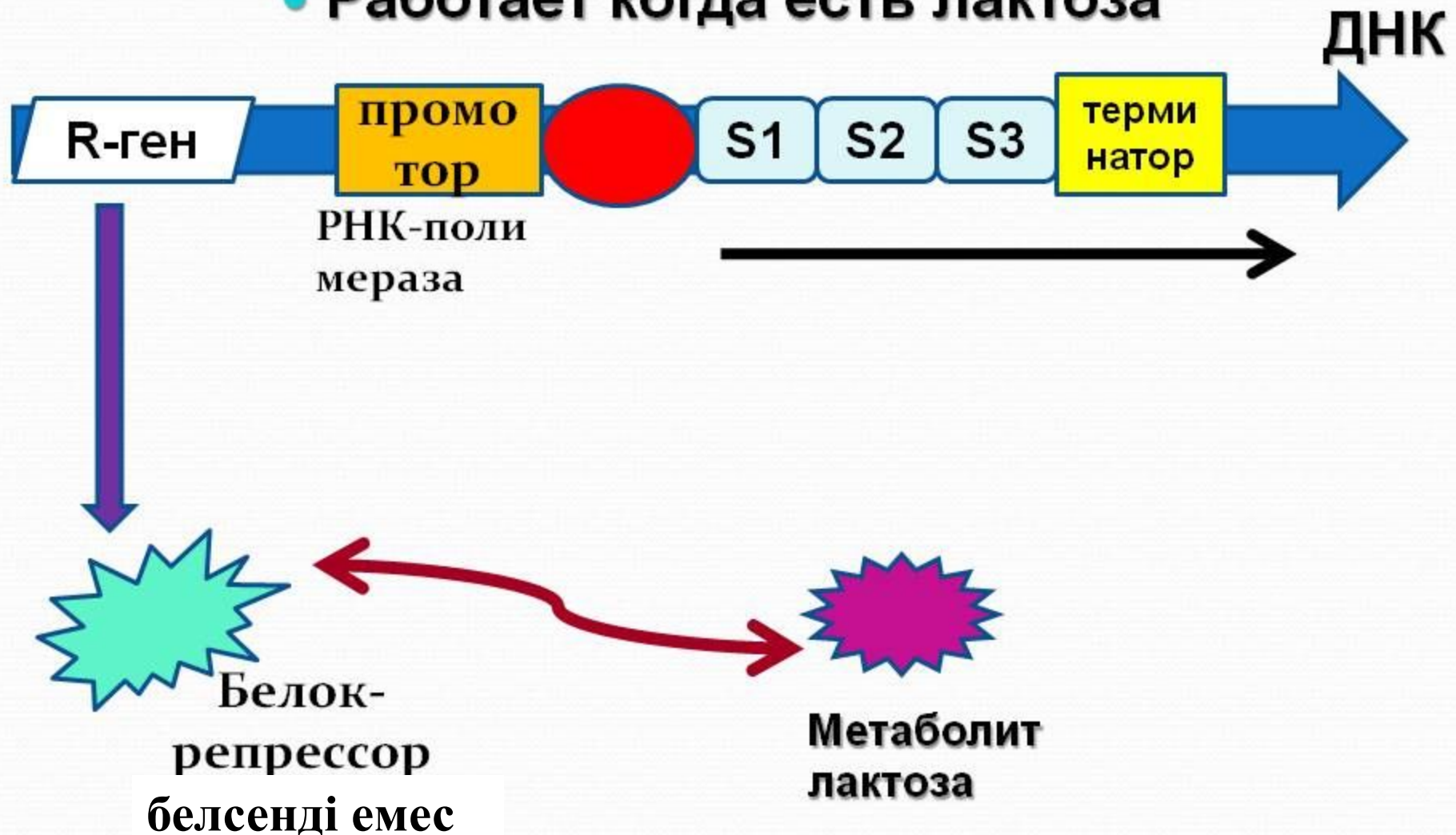


Рис. 32. Схема регуляции транскрипции у прокариот (оперон «работает»; объяснение в тексте)

Лактозный оперон E.coli

- Работает когда есть лактоза



**Функционирование оперона,
регулируемого по механизму
индукции:**

- а) Индуцибельные опероны**
- б) Репрессибельные опероны**

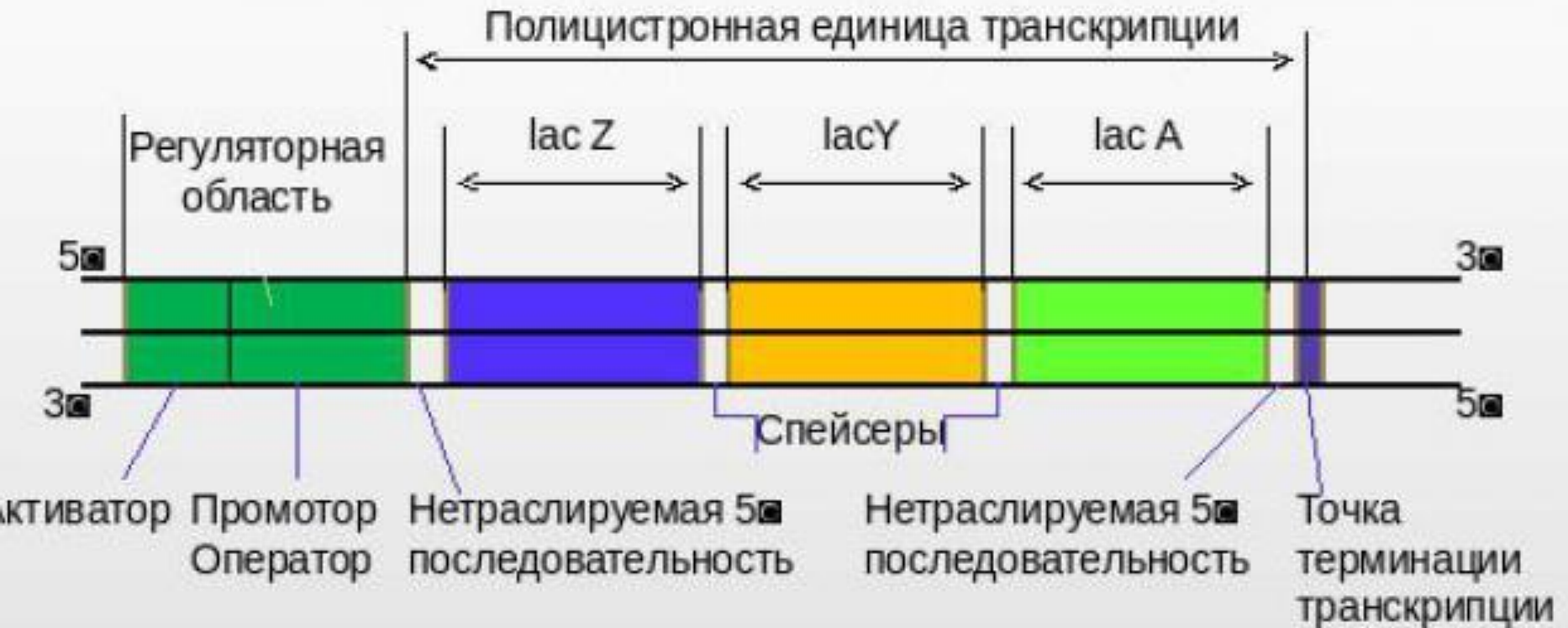
В зависимости от взаимодействия оператора с белком – репрессором у бактерий различают негативную и позитивную регуляцию оперонов.

1. Негативно – индуцибельный тип:
Такие опероны подвержены отрицательному контролю. Они не транскрибируются, когда оперон связан с репрессором. Индукция происходит, когда индуктор связывается с репрессором, изменяя его так, что он больше не связывается с оператором. (ЛАКТОЗНЫЙ ОПЕРОН).

2. Позитивно индуцибельный тип:
Положительно контролируемые опероны обычно не транскрибируются. Они становятся активными, когда коактиватор (небольшая молекула) связывается с белком – апоиндуктором. Приобретая соответствующую конфигурацию, апоиндуктор взаимодействует с ДНК и РНК – полимеразой, способствуя инициации транскрипции. (КАТАБОЛИЧЕСКАЯ РЕПРЕССИЯ).

3. Негативно репрессибельный тип:
Отрицательно контролируемые репрессибельные опероны обычно транскрибируются, однако если корепрессор связывается с апорепрессором, то этот комплекс прикрепляется к оперону, приводя к ингибированию транскрипции.

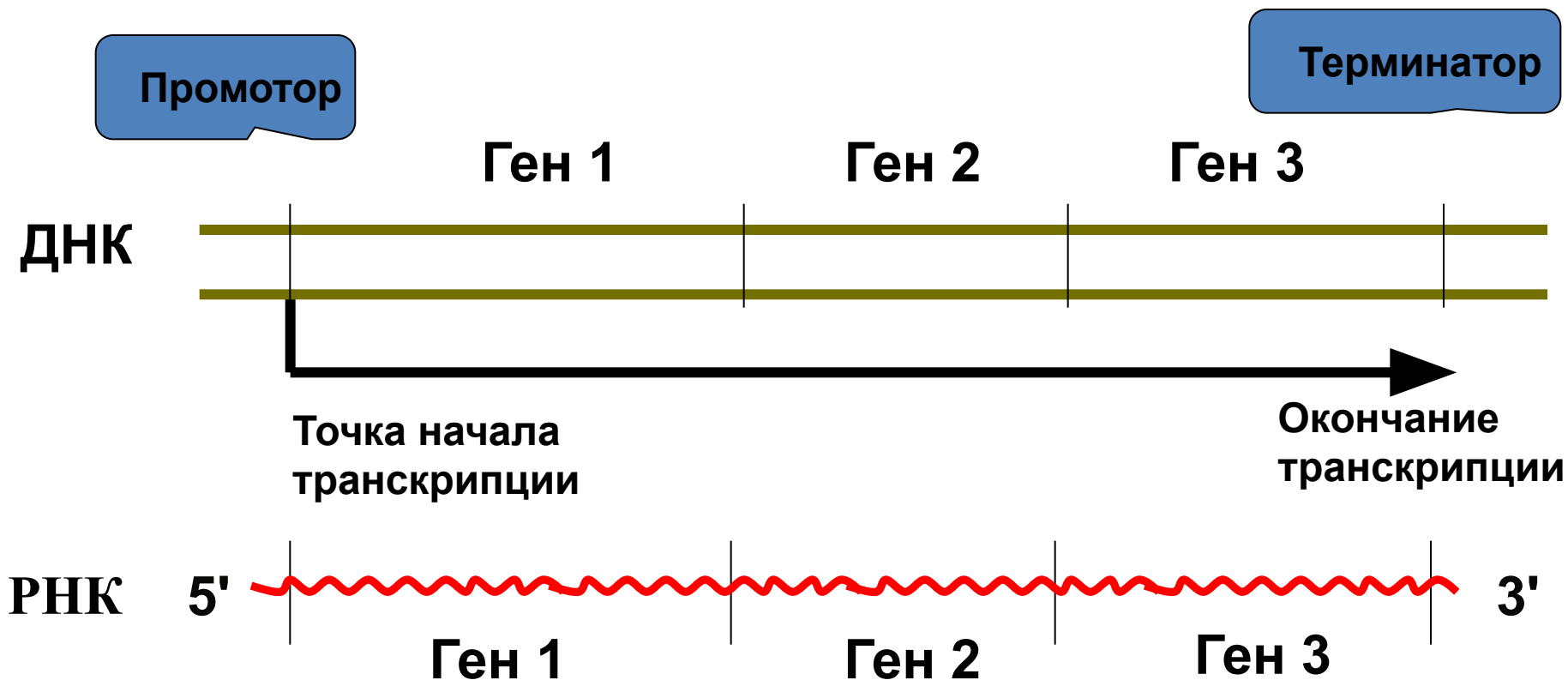
Схема строения *lac*-оперона



Бактериальная клетка синтезирует ферменты, принимающие участие в метаболизме лактозы, лишь в том случае, когда лактоза присутствует в

Оперон прокариот

Несколько генов под одним промотором



Транскрипция у эукариот

- Транскрипция у эукариот происходит в ядре;
- Синтез молекул РНК начинается с промоторов, и завершается в сайтах терминации;
- У эукариот имеется 3 типа РНК-полимераз (не считая митохондриальной и хлоропластной)

В 2006 году Роджеру Корнбергу была присуждена Нобелевская премия по химии за исследование транскрипции ДНК у эукариот



Регуляция работы генов у эукариот

Принцип регуляции сохраняется, но механизмы ее по сравнению с прокариотами более сложны. Единица транскрипции у эукариот называется **транскриптоном**. Он состоит из неинформативной (акцепторной) и информативной (структурной) зон. **Неинформативная зона** начинается промотором. Далее следует группа генов-операторов, за которыми расположена **информативная зона**. **Неинформативная зона** начинается промотором. Далее следует группа генов-операторов, за которыми расположена информативная зона. Информативная зона образована структурными генами, разделенными вставками (**спейсерами**). Спейсеры не содержат информации о структуре белков. В самих структурных генах эукариот также имеются вставки из неинформативных «молчащих» участков ДНК – **интронов**. Информативные участки структурных генов называются **экзонами**.

Регуляция работы генов у эукариот

Работу **транскриптона** регулирует несколько **генов-регуляторов**, дающих информацию для синтеза нескольких белков **белков-репрессоров**. Индукторами в клетках эукариот являются сложные молекулы (например, **гормоны**), для расщепления которых требуется несколько ферментов. Когда индукторы освобождают гены-операторы от белков-репрессоров, **РНК-полимераза** разрывает водородные связи между двумя цепочками ДНК транскриптона. По принципу комплементарности на нем сначала синтезируется большая молекула **проинформационной РНК**, списывающая информацию как с информационной, так и с неинформативной зон.

В дальнейшем в ядре клетки происходит **процессинг** — ферментативное разрушение неинформативной части РНК и расщепление ферментами **рестриктазами** информативной части на фрагменты, соответствующие экзонам.

Транскриптон

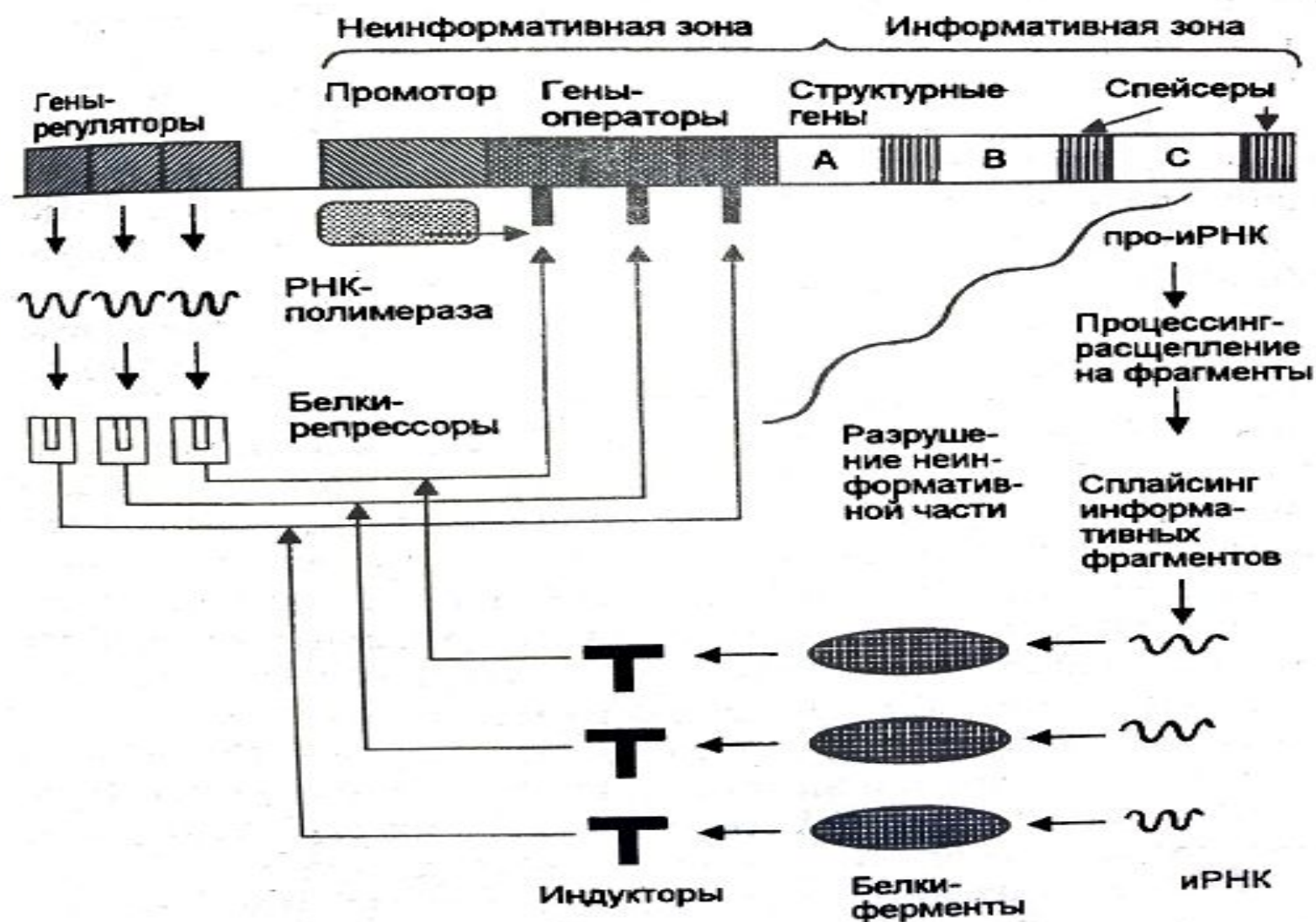


Рис. 33. Схема регуляции транскрипции у эукариот (объяснение в тексте)

Регуляция работы генов у эукариот

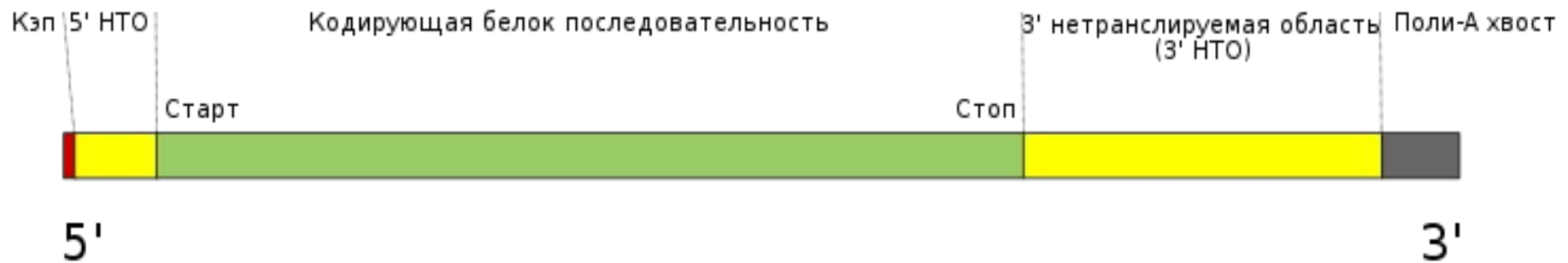
Молекулы иРНК формируются посредством сплайсинга (сплавления) отдельных информативных фрагментов ферментами **лигазами**. Этот процесс называется **созревaniem**.

Далее иРНК выходят из ядра и поступают в рибосомы, где и происходит **синтез белков-ферментов**, необходимых для расщепления индукторов. Включение и выключение транскриптона происходит принципиально так же, как и оперона.

Таким образом, у эукариот **синтез иРНК** и ее **трансляция** **происходит независимо друг от друга** в разных частях клетки в разное время — сначала транскрипция и созревание в ядре, а затем трансляция в рибосомах цитоплазмы.

Посттранскрипционные процессы. Процессинг (созревание) РНК (у эукариот)

В большинстве случаев в результате транскрипции не получается готовая РНК. «Сырая» РНК должна еще пройти процесс **процессинга**, при котором происходят ее модификационные изменения и она становится функционально активной.

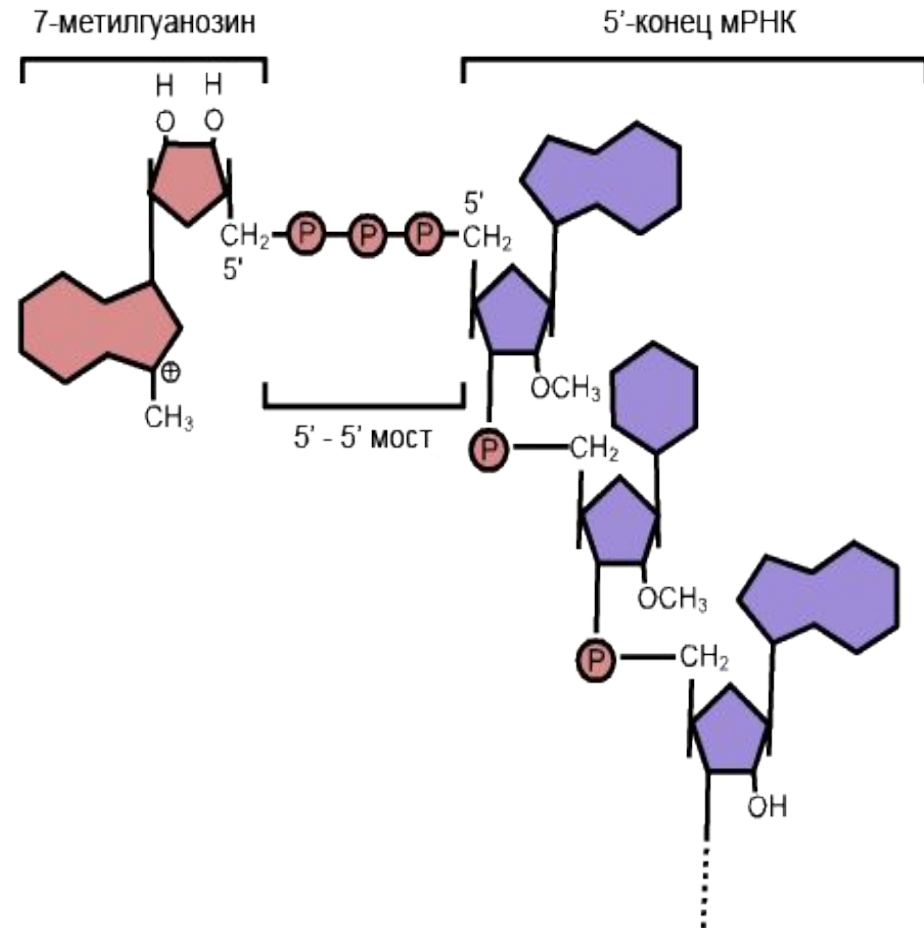


- Линейная цепь мРНК содержит несколько областей с различной функциональной ролью
- А) на 5'-конце находится т.н. **«колпачок»**
- Б) за «колпачком» идет **5'-нетранслируемый участок**-последовательность из нескольких десятков нуклеотидов
- В) трансляция же мРНК начинается с т.н. **инициирующего кодона**
- Г) за иницирующим кодоном в мРНК следует **кодирующая часть**, которая, собственно, и содержит информацию о последовательности аминокислот в белке
- Д) по окончании этой последовательности находится **кодон терминации**
- Е) за этим кодоном может следовать еще **3'-нетранслируемый участок**, значительно превышающий по длине 5'-нетранслируемую область
- Ж) Наконец, почти все зрелые мРНК эукариот на конце содержат **поли (А)-фрагмент** из 150-200 адениловых нуклеотидов

Процессинг м-РНК у эукариот: кэпирование

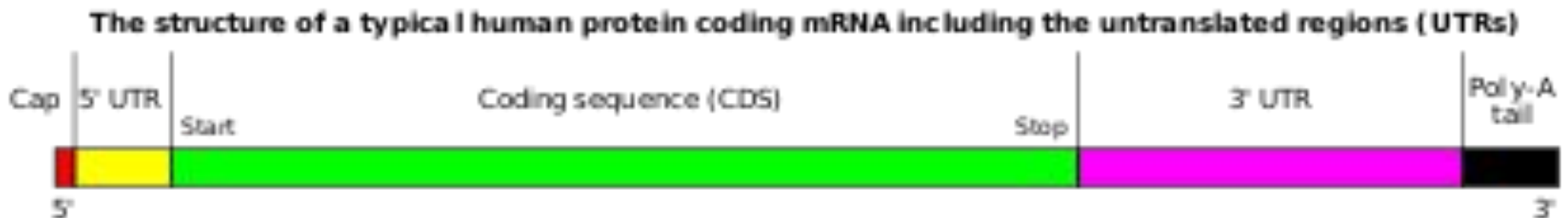
Модифицированный 5'-конец обеспечивает инициацию трансляции, удлиняет время жизни мРНК, защищая её от действия 5'-экзонуклеаз в цитоплазме.

Кэпирование необходимо для инициации синтеза белка, так как иницирующие триплеты AUG, GUG распознаются рибосомой только если присутствует кэп. Наличие кэпа также необходимо для работы сплайсосомы, обеспечивающей удаление интронов.



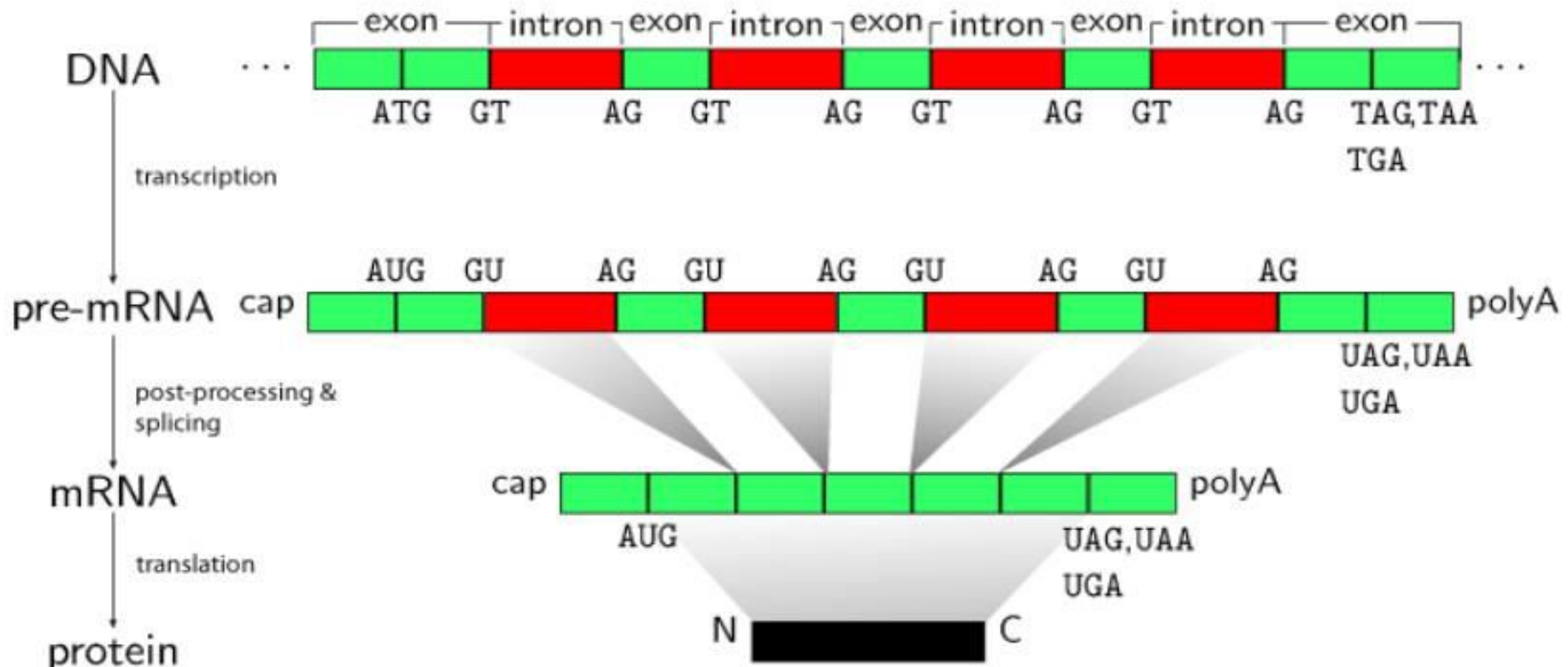
Процессинг м-РНК у эукариот: полиаденилирование

Специальным ферментом полиА-полимеразой формируется полиА-последовательность (полиА-"хвост"), состоящая из 100-200 остатков аденозина. Полиаденилирование необходимо для транспорта большинства мРНК в цитоплазму и защищает молекулы мРНК от быстрой деградации. Лишённые поли(А)-участка молекулы мРНК быстро разрушаются в цитоплазме клеток эукариот рибонуклеазами.



Процессинг м-РНК у эукариот: сплайсинг

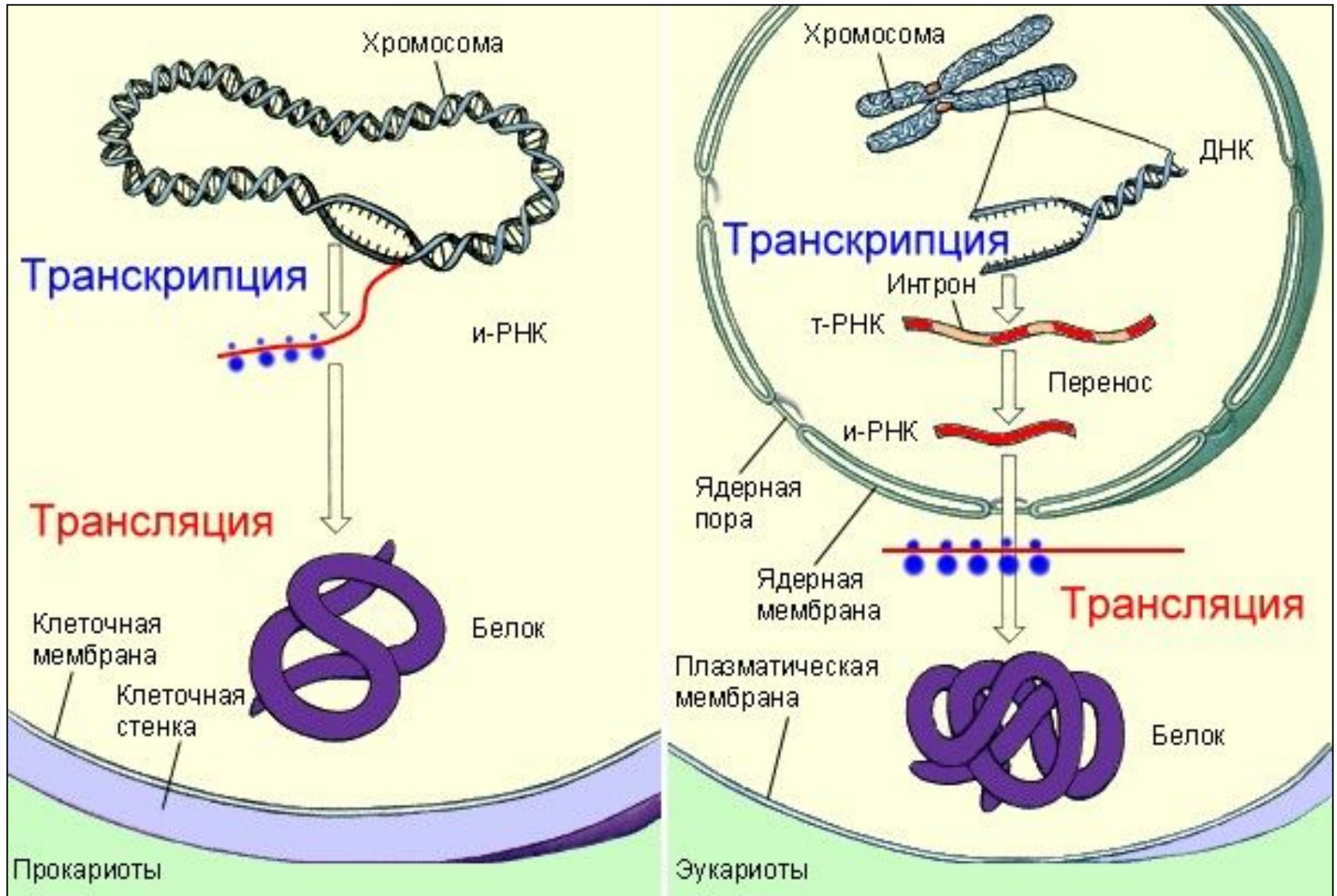
Последовательности интронов "вырезаются" из первичного транскрипта, концы экзонов соединяются. Гены эукариотов содержат больше интронов, чем экзонов, поэтому длинные молекулы пре-мРНК после сплайсинга превращаются в короткие молекулы цитоплазматической м-РНК



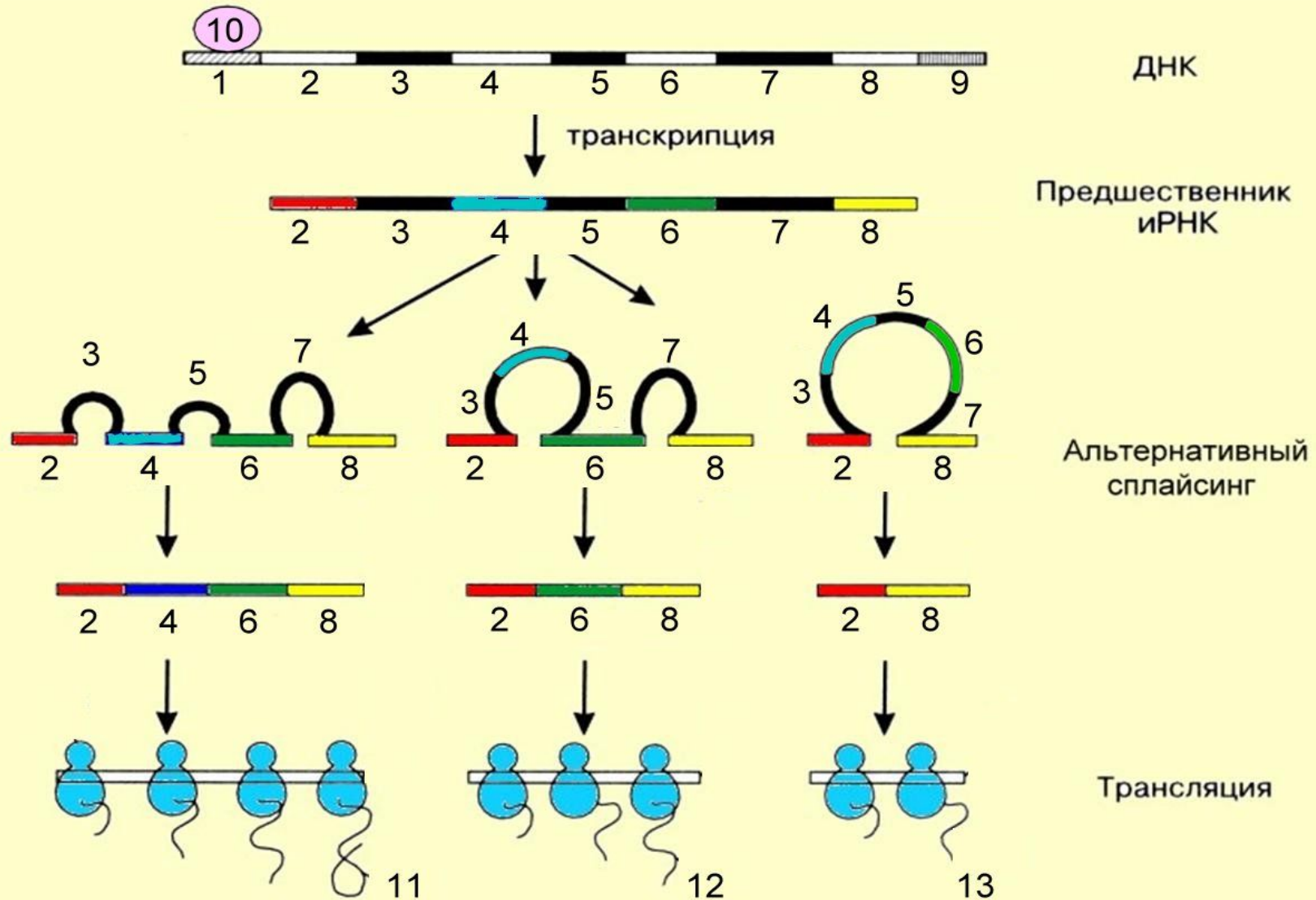
Альтернативный сплайсинг

- Возможен *альтернативный сплайсинг*, при котором вместе с интронами вырезаются и экзоны. При этом с одного гена могут образовываться разные белки.

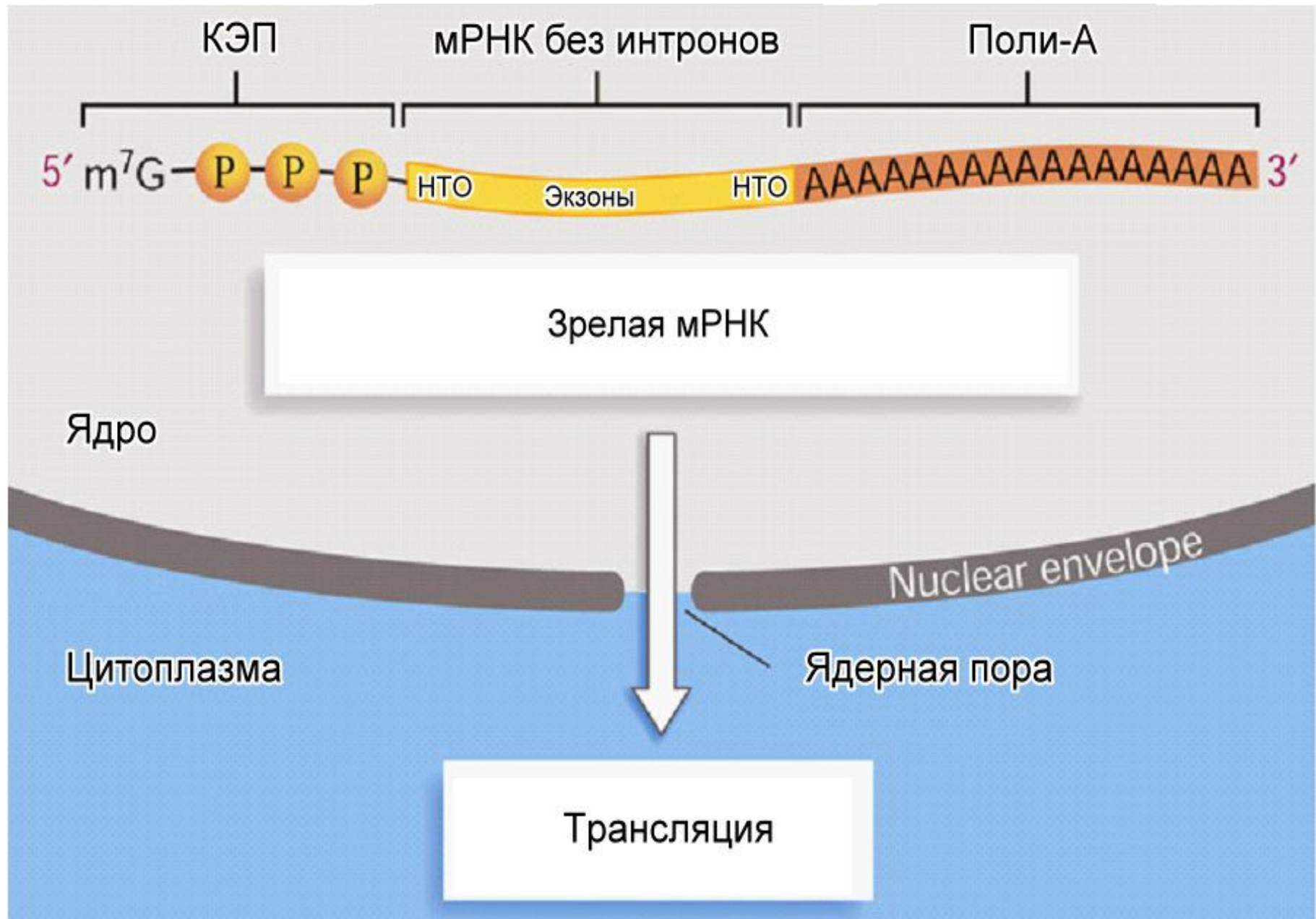
Транскрипция



Транскрипция



галактозидазу кодирует фермент β -галактозидазу,



ацетильную группу от ацетил-КоА кодирует β -

СРОП

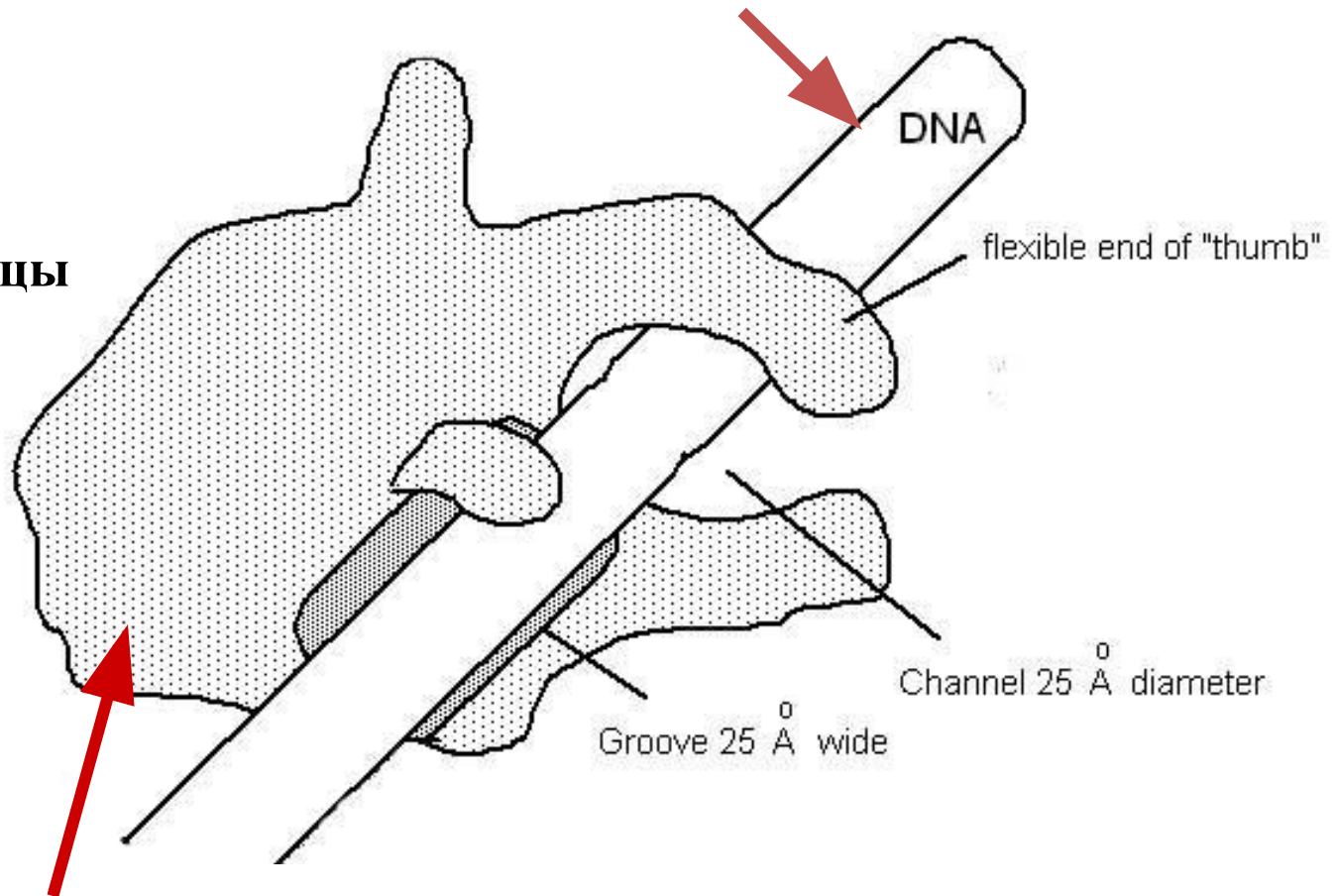
Для транскрипции нужны?

1.



Для транскрипции нужны

4 субъединицы

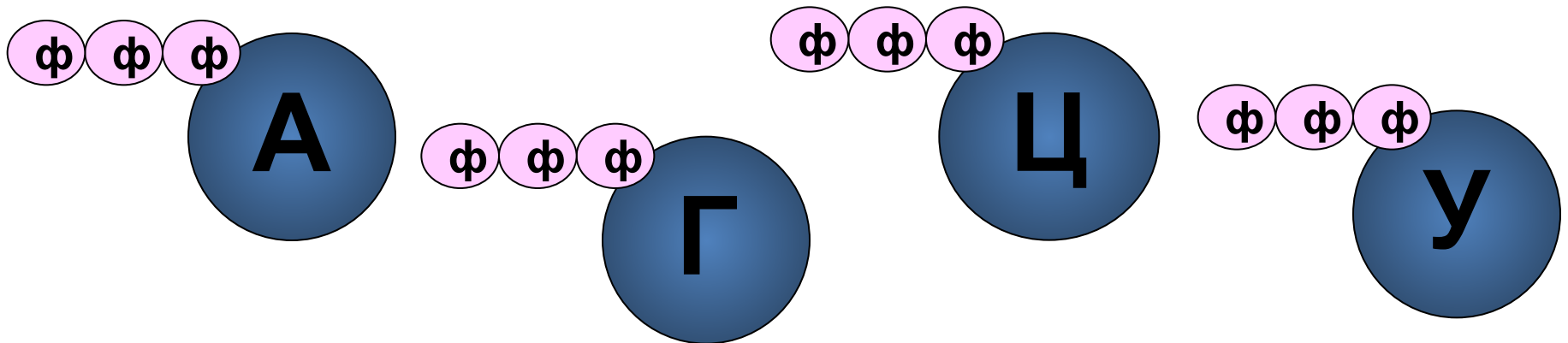


2.

Для транскрипции нужны

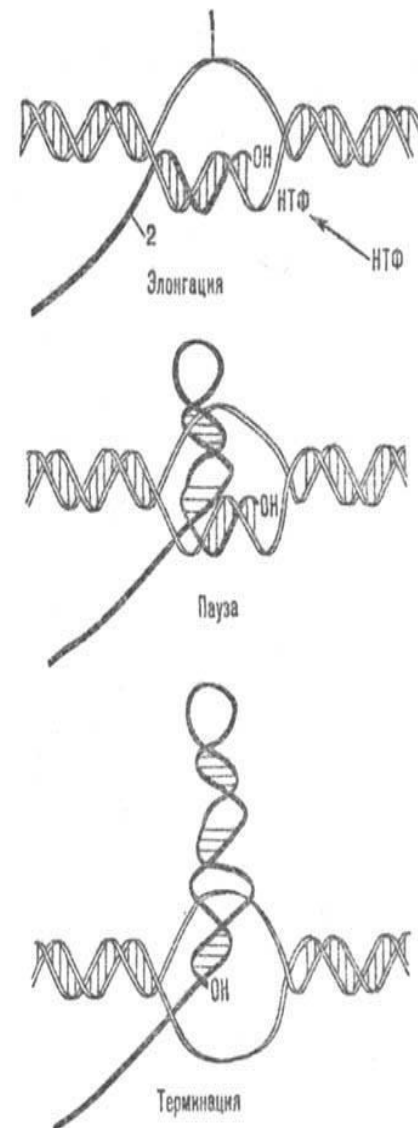
3.

трифосфаты



Принципы транскрипции

1.
2.
3.
4.
5.



***Функционирование оперона,
регулируемого по механизму
индукции делятся:***

а)

б)

Альтернативный сплайсинг?

Транскрипция?

Процессинг?

Терминация?

Элонгация?

Инициация?

Примеры решения задач

Задача 1. Фрагмент цепи ДНК имеет последовательность нуклеотидов: Г-Т-Г-А-Ц-Г-Т-Ц-А. Определите состав и последовательность нуклеотидов на иРНК, комплементарные триплеты нуклеотидов в антикодонах тРНК.

РЕШЕНИЕ. По принципу комплементарности (Г=Ц, А=У) с генетического кода ДНК выстраиваются нуклеотиды иРНК (транскрипция). К кодонам иРНК подбираются комплементарные антикодоны-триплеты нуклеотидов тРНК, и соединяются водородными связями (кодон=антикодон) тоже по принципу комплементарности. Каждый триплет тРНК приносит определенную аминокислоту, согласно генетическому коду. Цепь аминокислот и есть синтезируемый белок.

Ответ:

ДНК	Г	Т	Г	А	Ц	Г	Т	Ц	А
иРНК	Ц	А	Ц	У	Г	Ц	А	Г	У
тРНК	Г	У	Г,	А	Ц	Г,	У	Ц	А

Задача 2. В биосинтезе полипептида участвовали тРНК с антикодонами ЦУА, АГЦ, ЦГУ, АГУ. Определите нуклеотидную последовательность участка каждой цепи молекулы ДНК, которая несет информацию о синтезируемом полипептиде, и число нуклеотидов, содержащих аденин (А), гуанин (Г), тимин (Т), цитозин (Ц) в двухцепочечной молекуле ДНК, а также количество водородных связей, соединяющих две цепи ДНК. Ответ поясните

РЕШЕНИЕ

В этой задаче нужно произвести действия в обратной последовательности. Пользуясь принципом комплементарности, по тРНК можно восстановить иРНК (антикодону ЦУА комплементарен кодон ГАУ, антикодону АГЦ комплементарен кодон УЦГ, антикодону ЦГУ кодон ГЦА, антикодону АГУ кодон УЦА).

Таким образом, получаем **иРНК: ГАУ-УЦГ-ГЦА-УЦА.**

Используя принцип комплементарности, по иРНК можно восстановить последовательность нуклеотидов одной цепи **ДНК: ЦТА-АГЦ-ЦГТ-АГТ** (надо быть внимательными и помнить, что в ДНК отсутствует урацил, вместо него становится тимин). Теперь, опять же пользуясь принципом комплементарности, на полученной цепи ДНК строим **вторую цепь ДНК: ГАТ-ТЦГ-ГЦА-ТЦА.**

Остается посчитать количество нуклеотидов в двухцепочечной молекуле ДНК: количество А=6, столько же будет Т, поскольку они стоят в паре. Количество Г=6, столько же будет Ц, так как они тоже комплементарны. Теперь считаем количество водородных связей между двумя цепями ДНК.

Если учесть, что между А и Т образуется 2 водородные связи, а между Г и Ц - три водородные связи, то всего водородных связей, которые поддерживают двухцепочечную структуру ДНК, будет $(6 \times 2) + (6 \times 3) = 30$.

ОТВЕТ: 30 связей

Задачи для самостоятельного решения

Задача 1. Последовательность нуклеотидов фрагмента цепи ДНК: ЦТААТГЦАГГТЦАЦГ. Определите последовательность нуклеотидов на иРНК.

Задача 2. Участок цепи иРНК имеет последовательность нуклеотидов: Г-Ц-А-У-Г-Ц-У-А-Ц-У-Г-Г. Определите последовательность нуклеотидов на ДНК, антикодоны тРНК.

Задача 3. Участок молекулы иРНК состоит из последовательности нуклеотидов: ГЦУ-АГЦ-АГУ-УГУ-ЦАГ.

Определите последовательность нуклеотидов в цепи ДНК, с которой произошла транскрипция.

Задача 4. Определите триплеты (антикодоны) т-РНК, участвующие в синтезе белка, если кодирующий фрагмент ДНК состоит из нуклеотидов: Г-Г-Т-А-Ц-Г-А-Т-Г-Т-Ц-А-А-Г-А. Сколько тРНК участвует в синтезе белка?

Задача 5. Известно, что все виды РНК синтезируются на ДНК-матрице. Фрагмент цепи ДНК, на которой синтезируется участок центральной петли тРНК, имеет следующую последовательность нуклеотидов: ТТТГГЦТАТЦАГТТГ. Определите нуклеотидную последовательность участка тРНК, который синтезируется на этом фрагменте ДНК.

**Спасибо за
внимание!**



Наведите камеру телефона на QR код, чтобы перейти на сайт университета **semeumedicaluniversity.kz** на страницу с данными о кафедре молекулярной биологии и медицинской генетики имени академика НАН РК Раисова Т.К.