



ТРАНСКРИПЦИЯ

Подготовила студентка 111 группы
Лечебного факультета
Вердиева Ангелина

Транскрипция - это синтез всех видов РНК по матрице ДНК, осуществляемый ферментом ДНК зависимой РНК-полимеразой.

◦ **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. Униполярность - синтез нуклеотидной цепи всегда направлен 5' -> 3'
- 4. Беззатравочность - транскрипция начинается с нуклеотидтрифосфата и не требует затравочных олигонуклеотидов.
- 5. Асимметричность - транскрибируется лишь одна из цепей ДНК - матричная цепь, смысловая цепь не транскрибируется

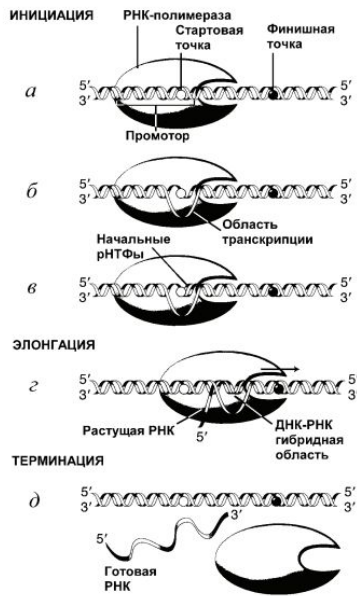
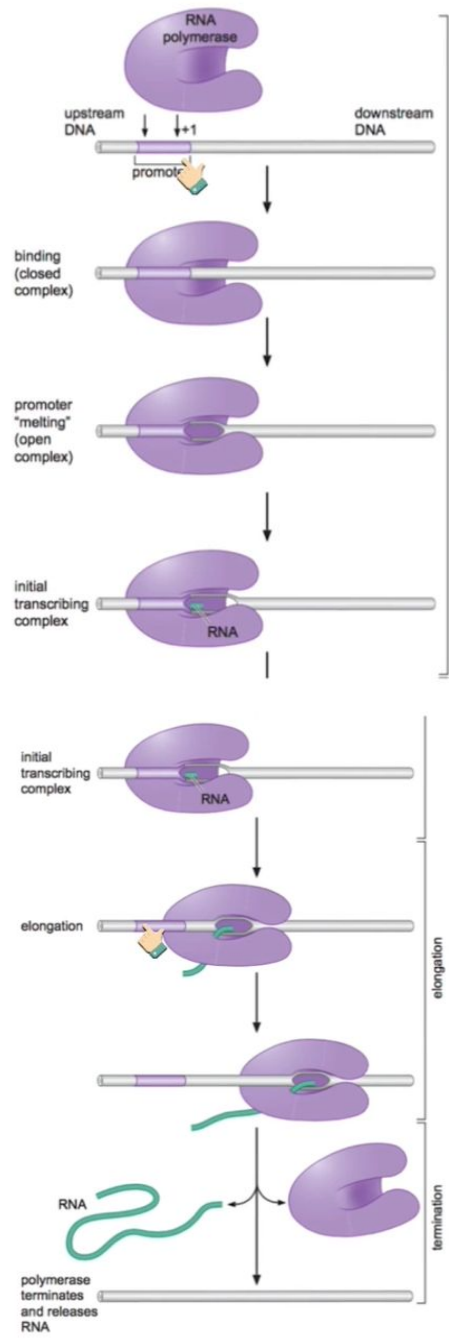


Рисунок 11.2 – Стадии транскрипции: а,б,в – инициация, г – элонгация, д – терминация



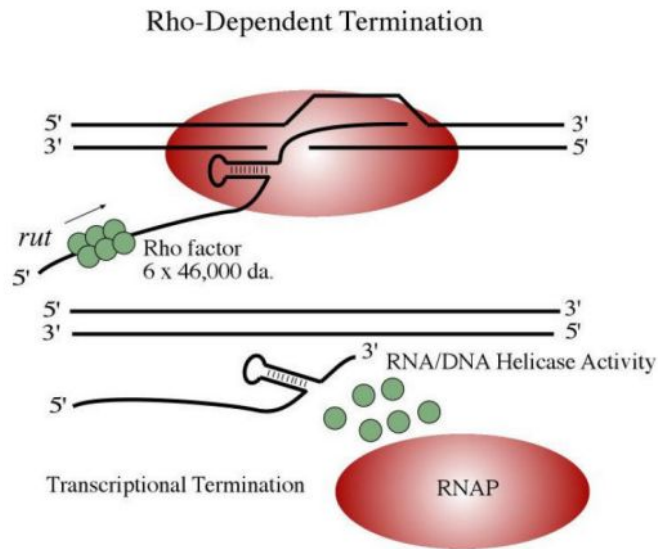
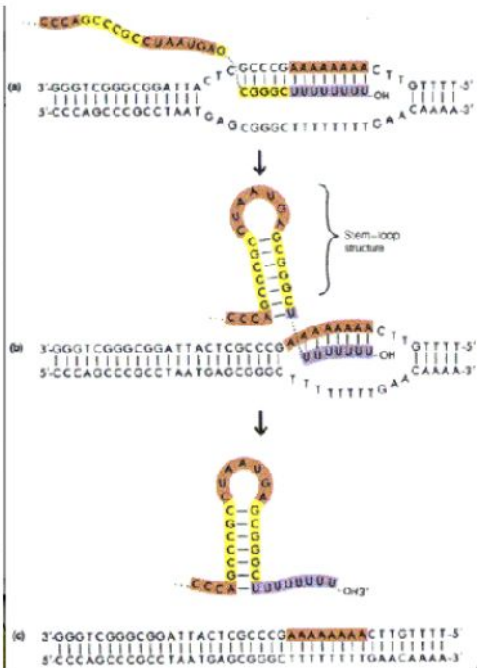
Узнавание промотора и прочное **связывание** - РНК-полимераза связывается с промотором при помощи основных факторов транскрипции, дополнительные факторы ингибируют или стимулируют присоединение

ИНИЦИАЦИЯ - образование первой фосфодиэфирной связи между Р_и и первым нуклеотидом. К пуринтрифосфату присоединяется нуклеотид комплементарный второму нуклеотиду ДНК с отщеплением пирофосфата от нуклеозидтрифосфата с образованием диэфирной связи

ЭЛОНГАЦИЯ (3'→5')- мРНК гомологичная нематричной (кодирующей, смысловой) ДНК, синтезируется на матричной ДНК; какая из двух цепей ДНК будет матрицей, определяется направлением промотора

терминация

Промотор - участок гена, на который происходит посадка РНК-полимеразы
Терминатор – участок гена, на котором происходит завершение транскрипции



◦ Терминация

◦ У бактерий есть два механизма терминации транскрипции:

◦ ро-зависимый механизм, при котором белок Rho (ро) дестабилизирует водородные связи между матрицей ДНК и мРНК, высвобождая молекулу РНК.

◦ ро-независимый, при котором транскрипция останавливается, когда только что синтезированная молекула РНК формирует стебель-петлю, за которой расположено несколько урацилов (...УУУУ), что приводит к отсоединению молекулы РНК от матрицы ДНК.

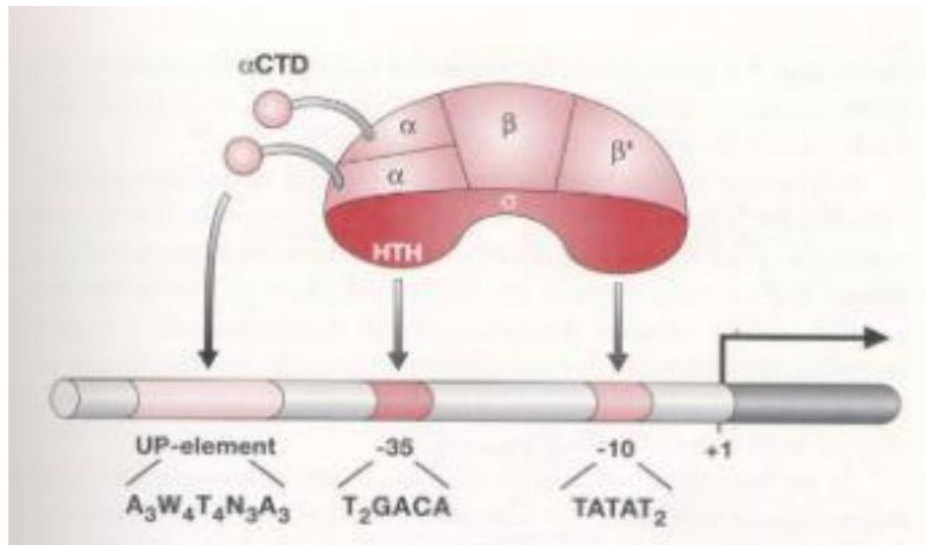
◦ Терминация транскрипции у эукариот менее изучена. Она завершается разрезанием РНК, после чего к её 3' концу фермент добавляет несколько аденинов (...АААА), от числа которых зависит стабильность данного транскрипта.

◦ Ингибиторы транскрипции

◦ • Рифампицин - ингибитор инициации. Связывается с центром инициации *E. coli*.

◦ • Стрептолидигин - ингибитор элонгации. Связывается с центром элонгации *E. coli*.

Транскрипция у прокариот



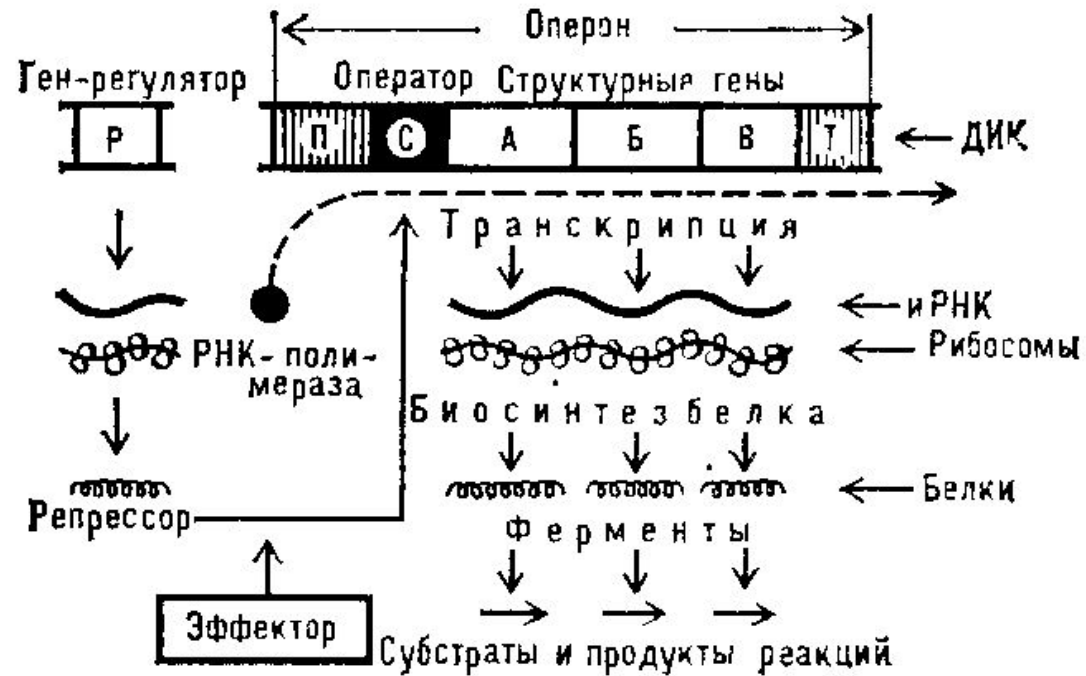
- Прокариоты не имеют ядерной мембраны, поэтому процессы транскрипции, трансляции могут проходить одновременно.
- Прокариотической транскрипции характерно иметь полицистронные мРНК (молекула **мРНК**, кодирующая последовательности более чем одного белка), для одновременного синтеза нескольких белков.
- Транскрипция начинается с промотора
- Не смотря на вариабельность промоторов среди прокариот, есть несколько консервативных элементов в позициях -10 и -35 от точки инициации транскрипции
- **ТГАЦА – блок Гилберта**, положение на ДНК - (-35), на лево относительно нулевой точки начала транскрипции. Это зона узнавания РНК-полимеразой места присоединения к ДНК перед началом транскрипции.
- **ТАТААТ – блок Прибнова**, положение на ДНК- (-10) – предназначен для сборки РНК-полимеразы.
- Скорость РНК-полимеразы составляет примерно 40 нуклеотидов в секунду

Регуляция транскрипции у прокариот

- Лактозный оперон, или **lac оперон** - участок генома бактерий, отвечающий за усвоение клеткой (гидролиз) лактозы.

- 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.

- Опероны по количеству цистронов делят на моно-, олиго- и полицистронные, содержащие, соответственно, только один, несколько или много цистронов (генов).



◦ В состав оперона входят:

- • Группа сцепленных структурных генов, кодирующих синтез ферментов для единого метаболического процесса

- • Регуляторные участки :

- • Промотор - регуляторный элемент, который служит участком связывания РНК-полимеразы

- • Оператор — участок ДНК, с которым взаимодействует регуляторный белок — репрессор

- •

- Терминатор – участок гена, на котором происходит завершение транскрипции



Франсуа Жакоб

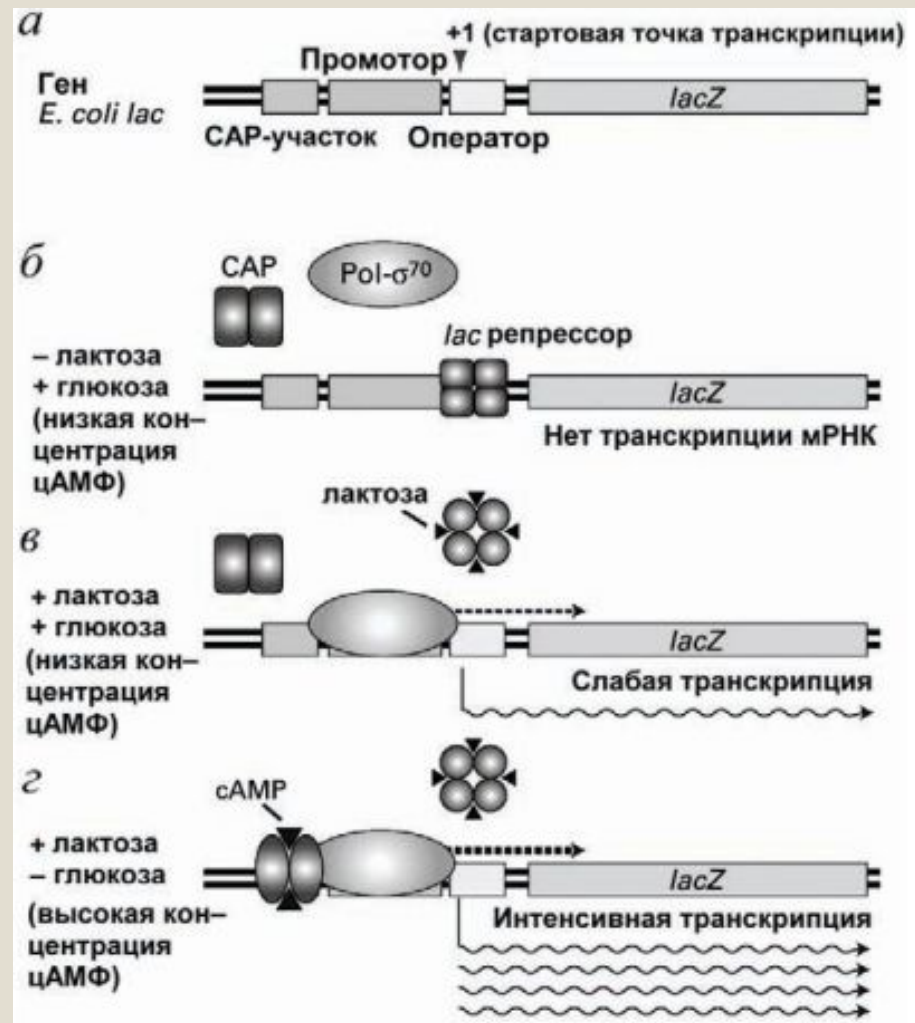


Жак Люсьен Моно

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

Позитивная и негативная регуляция экспрессии генов

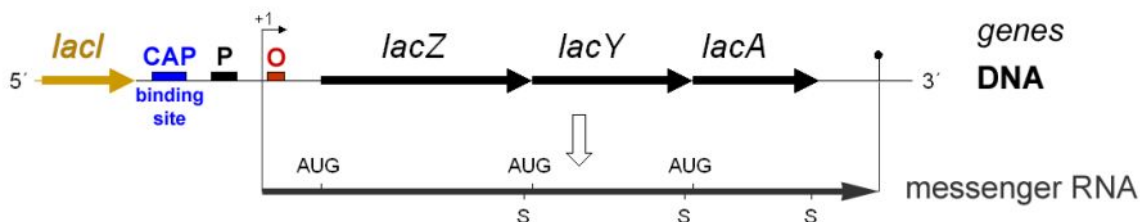
◦ Когда благодаря действию специфических регуляторных элементов уровень экспрессии генов возрастает, регуляция называется позитивной. Если уровень экспрессии генов понижается, говорят о негативной регуляции. Регуляторный элемент или молекулу, участвующие в качестве «посредников» в негативной регуляции, называют негативными регуляторами; элементы, осуществляющие позитивную регуляцию — позитивными регуляторами



Регуляция экспрессии *lac* оперона *E. coli*: а – участок управления транскрипцией, б – в отсутствие лактозы *lac*-репрессор связан с оператором, в – при наличии лактозы комплекс РНК-полимеразы с σ^{70} -фактором ($Pol-\sigma^{70}$) начинает транскрипцию мРНК, г – максимальная интенсивность транскрипции достигается в отсутствие глюкозы, когда комплекс САР-сАМФ связывается с САР-участком ДНК

Схема негативной индукции Жакоба и Моно

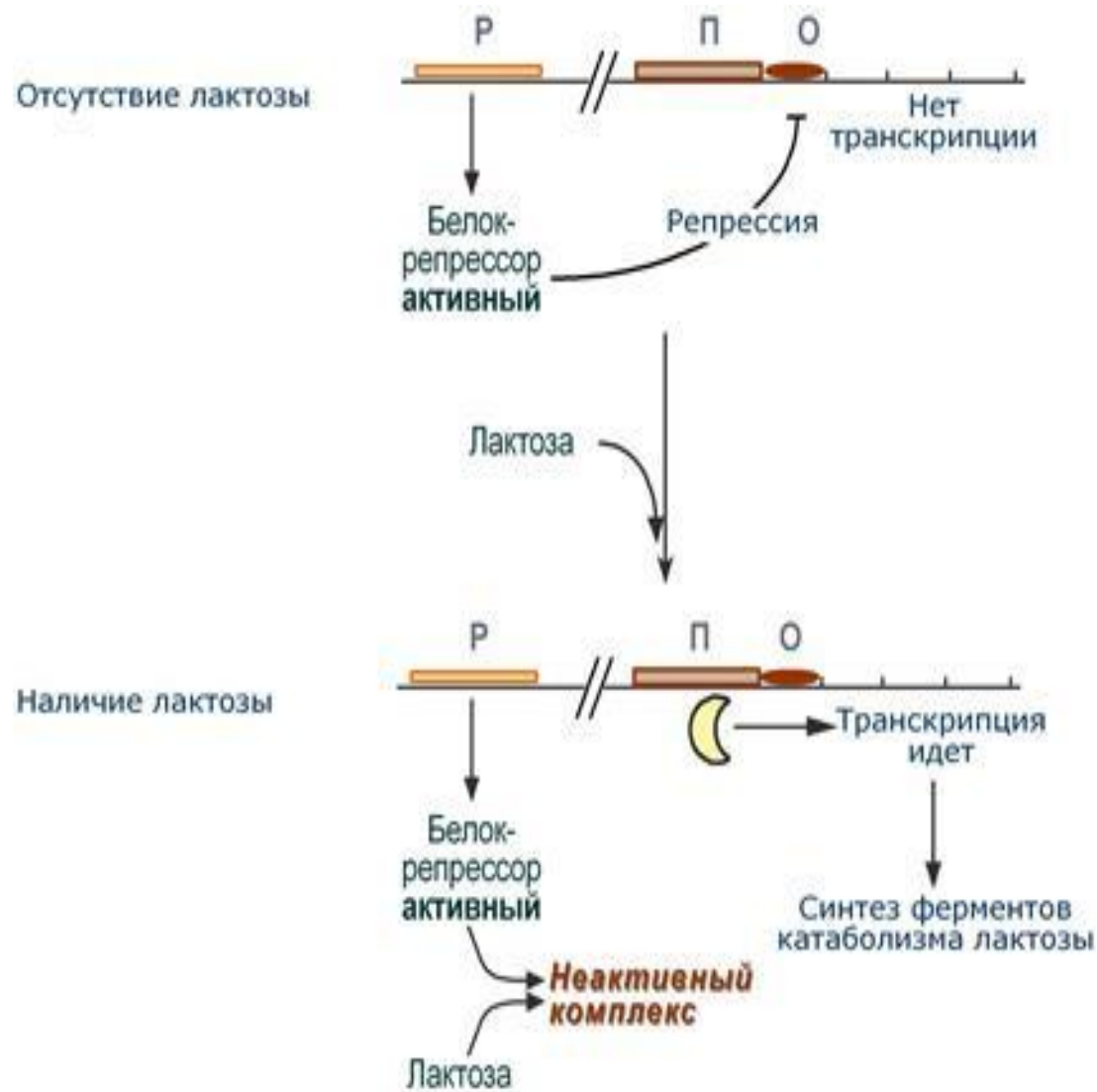
Лактозный оперон



- ***lacZ*** кодирует фермент β -галактозидазу, которая расщепляет дисахарид лактозу на глюкозу и галактозу.
- ***lacY*** кодирует β -галактозид пермеазу, мембранный транспортный белок, который переносит лактозу внутрь клетки.
- ***lacA*** кодирует β -галактозид трансацетилазу, фермент, переносящий ацетильную группу от ацетил-КоА на бета-галактозиды.
- ***lacI*** – репрессор

CAP (Catabolite Activator Protein) – активатор

Эта схема называется так потому, что контролирующим транскрипцию фактором является негативный фактор, "выключатель" - белок - репрессор. Индукция (включение) происходит при потере сродства белка - репрессора к оператору



1. При отсутствии лактозы активный белок-репрессор связывается с оператором и блокирует синтез мРНК, кодирующей ферменты катаболизма лактозы. В результате эти ферменты не образуются.

2. Если глюкозы нет, а лактоза есть, то последняя связывается с белком-репрессором и ингибирует его, не давая ему связаться с геном-оператором и препятствовать работе РНК-полимеразы. Это позволяет РНК-полимеразе считывать информацию, отвечающую за синтез ферментов катаболизма лактозы, и синтезировать мРНК. Таким образом, лактоза является индуктором транскрипции

Регуляции транскрип- ции у эука- риот

У эукариотов процессы транскрипции и трансляции разобщены во времени и пространстве (транскрипция - в ядре, трансляция - в цитоплазме)

Синтез молекул РНК начинается с промоторов, и завершается в сайтах терминации.

Единицей транскрипции у эукариот является отдельный ген, а не оперон, как у прокариот

- Амплификация – это увеличение количества генов, точнее многократное копирование одного гена. Естественно, все полученные копии равнозначны и одинаково активно обеспечивают транскрипцию.
- Эnhансеры (англ. to enhance – усиливать) – это участки ДНК в 10-20 пар оснований, способные значительно усиливать экспрессию генов той же ДНК. В отличие от промоторов они значительно удалены от транскрипционного участка и могут располагаться от него в любом направлении (к 5'-концу или к 3'-концу). Сами энхансеры не кодируют какие-либо белки, но способны связываться с регуляторными белками (подавляющими транскрипцию).
- Сайленсеры (англ. silence – молчание) – участки ДНК, в принципе схожие с энхансерами, но они способны замедлять транскрипцию генов, связываясь с регуляторными белками (которые ее активируют).
- Перестройка генов. К подобным процессам относится кроссинговер – обмен участками гомологичных хромосом, и более сложный процесс – сайт-специфичная рекомбинация, которая изменяет положение и порядок нуклеотидных последовательностей в геноме.
- Процессинг мРНК – некоторые пре-мРНК подвергаются разным вариантам сплайсинга (альтернативный сплайсинг) в результате чего образуются разные мРНК, и соответственно, белки с разной функцией.

Энхансеры и сайленсеры

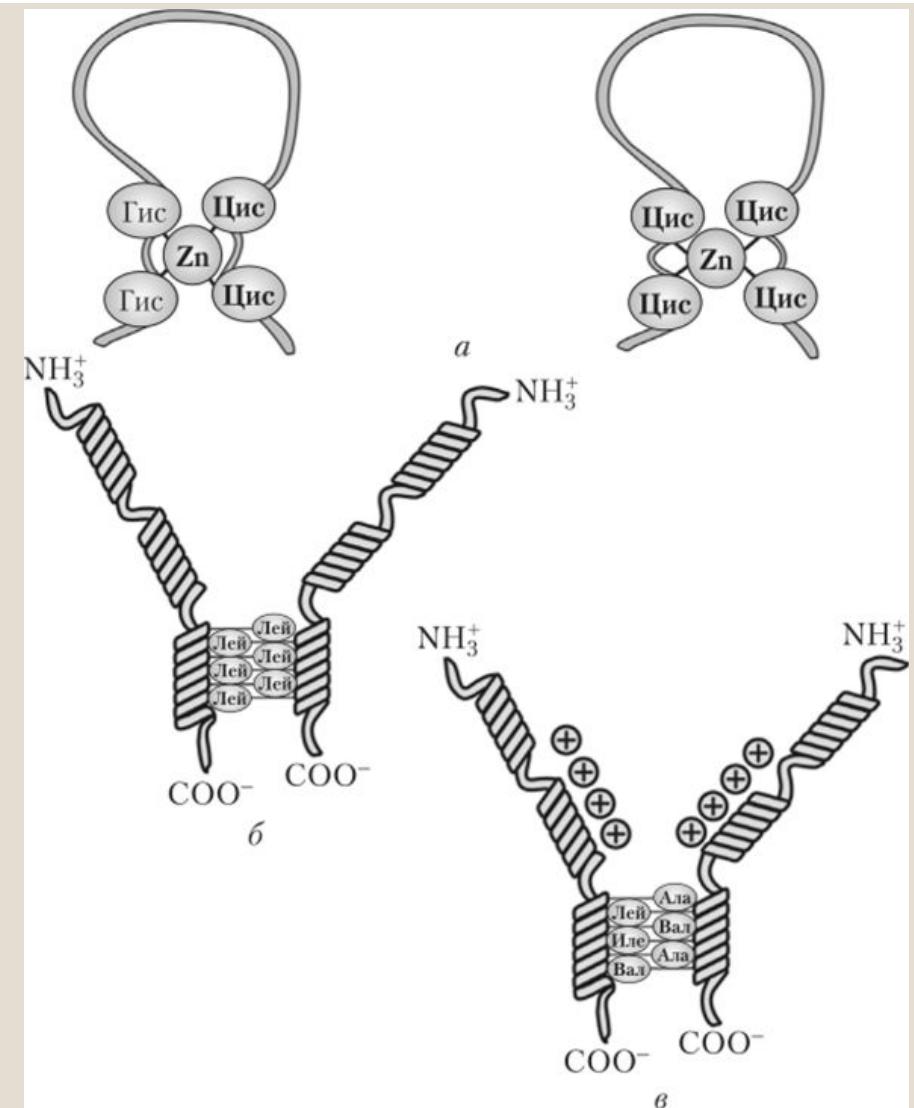
- участки связывания активаторов и репрессоров
- Энхансер + активатор = активация транскрипции
- Сайленсер + репрессор = подавление транскрипции
- Не зависят от ориентации
- Могут находиться на значительном расстоянии от промотора

Транскрип- -ционные факторы

- Транскрипционные факторы регулируют цис-действующие элементы
- **!Цис-действующие элементы** (или **цис-элементы**) — участки ДНК или РНК, регулирующие экспрессию генов, находящихся на той же молекуле генов эукариот.
- Транскрипционные факторы, которые связываются с цис-действующими элементами, называются транс-действующими факторами (трансфакторами), так как кодирующие их гены могут быть локализованы в любом месте генома.
- Трансфакторы, которые усиливают транскрипцию, называют *активаторами*, а трансфакторы, ингибирующие ее, - *репрессорами*.

Высоко консервативные, специальные структуры, связывающие ДНК и названные цинковыми пальцами (*Zinc finger*), лейциновой застежкой (*Leucine zipper*), основной молнией

- **Цинковые пальцы** представляют собой структуры, в которых важную роль играет Zn. Полипептидная цепь, образующая каждый палец, имеет сложную глобулярную структуру, в которой остатки двух молекул цистеина и двух молекул гистидина связаны с атомом цинка. Цинковые пальцы взаимодействуют с ДНК в виде мономеров
- Структура транскрипционных факторов, получившая название **лейциновой застежки**, имеет вид спирали протяженностью около 35 аминокислот, среди которых каждую седьмую позицию занимает лейцин.
- **Основная молния** является модификацией лейциновой молнии, она часто встречается среди трансфакторов растений и содержит в своем составе вместо лейцина другие гидрофобные аминокислоты.

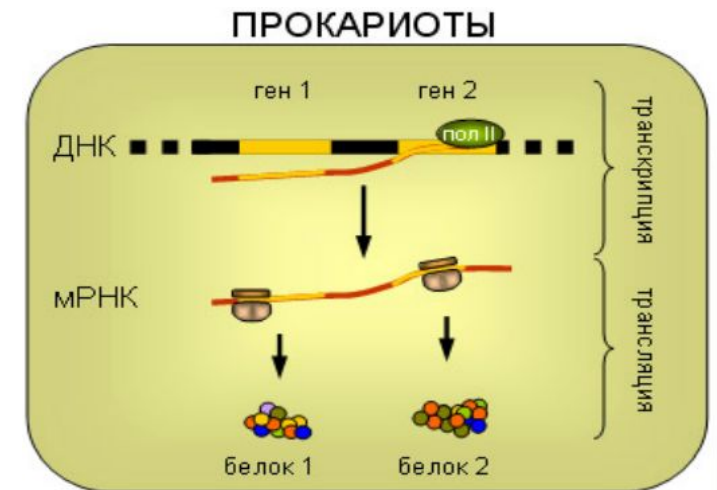
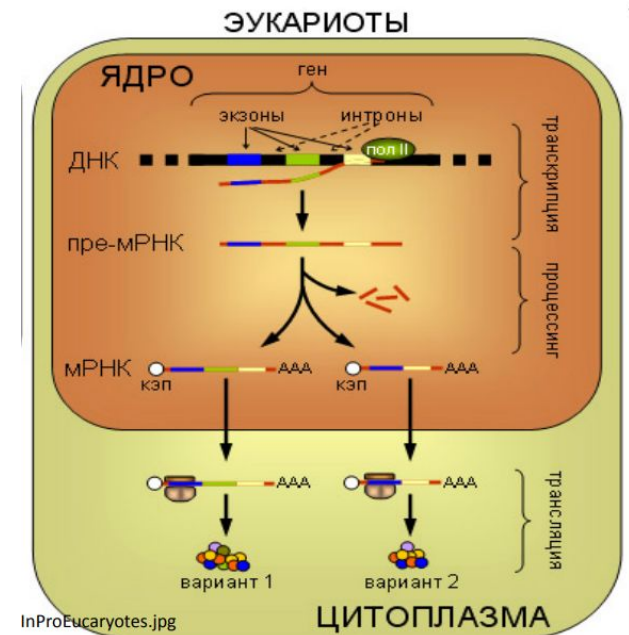


структура типичных регуляторных трансфакторов:

a – цинковый палец; *б* – лейциновая застежка; *в* – основная молния

Отличия транскрипции у про- и эукариот

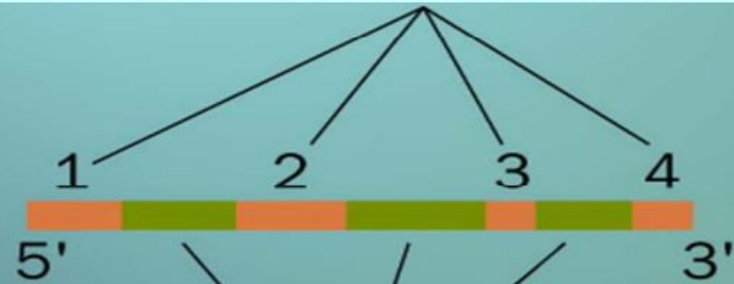
- Разобщение транскрипции и трансляции в пространстве и времени у эукариот, у прокариот - смежные процессы
- Транскрипты про- и эукариот.
- У прокариот – полицистронный транскрипт, транскриптомом является оперон. У эукариот – мооцистронный транскрипт, транскриптомом является ген.
- 3. РНК полимеразы прокариот и эукариот.
- У прокариот – единая РНК полимераз, которая транскрибирует любые гены. У эукариот РНК полимеразы специализируются:
 - РНК полимераз I: 18S rRNA, 28S rRNA, 5,8S rRNA
 - РНК полимераз II: mRNA, snRNA.
 - РНК полимераз III: tRNA, 5S rRNA



Сплайсинг мРНК

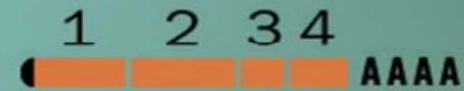
Пре-мРНК

Экзоны (последовательности, которые кодируют белок)



Интроны (последовательности, которые не кодируют белок)

Зрелая мРНК



Экзоны 1 – 4 после сплайсинга готовы к трансляции

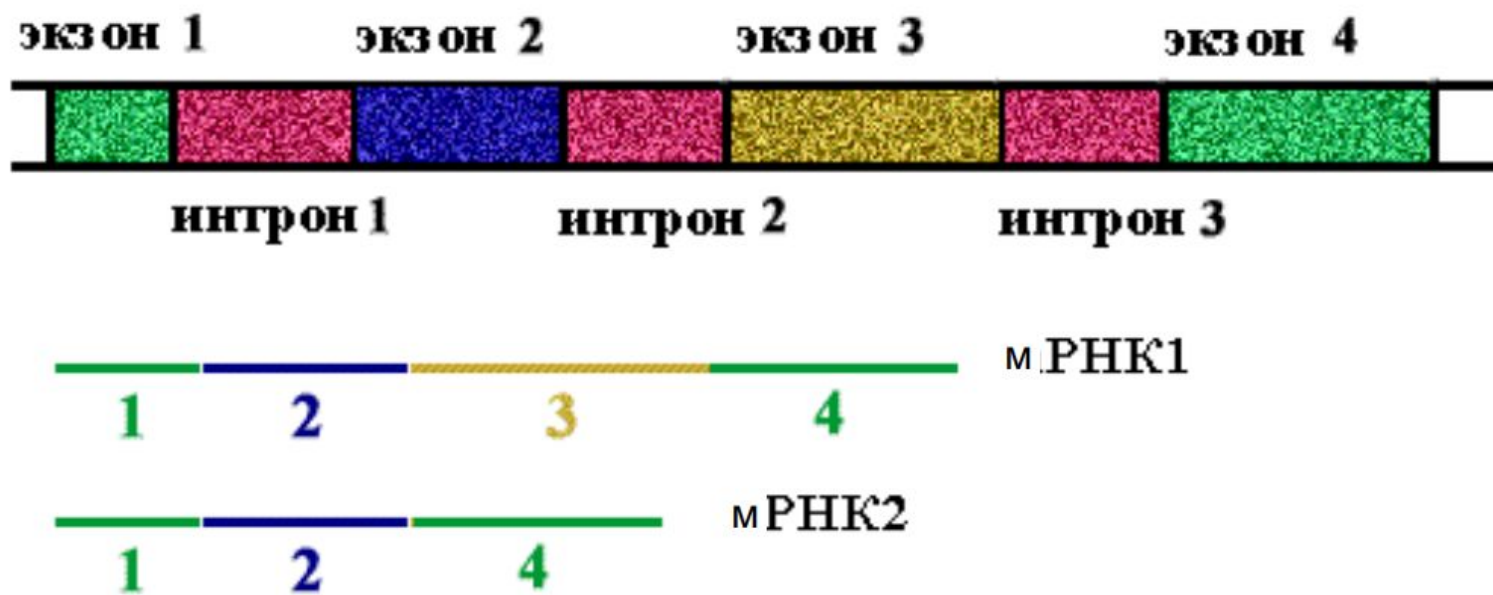
Альтернативный сплайсинг

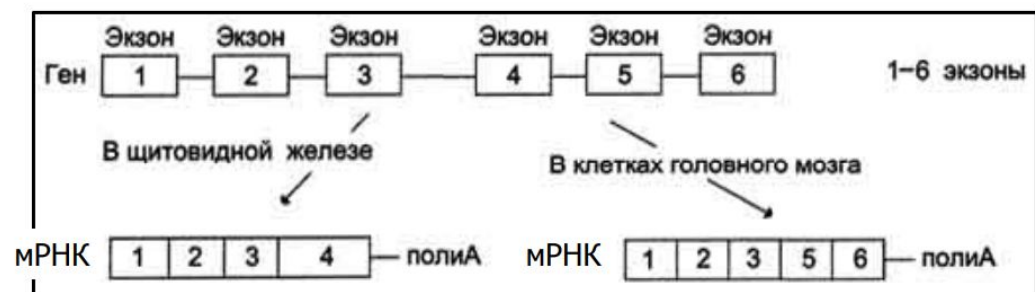
◦ В ходе созревания пре-мРНК в ядре сшиваться могут не все экзоны, и в разных условиях разные экзоны отбрасываются вместе с интронами.

◦ В результате этой сшивки получаются разные варианты, или изоформы мРНК, кодирующие разные белки, а весь процесс носит название альтернативного сплайсинга. Таким образом, из одного гена может быть в конечном итоге получено несколько разных белков



Альтернативный сплайсинг мРНК





После трансляции дает
белок – гормон
щитовидной железы
кальцитонин

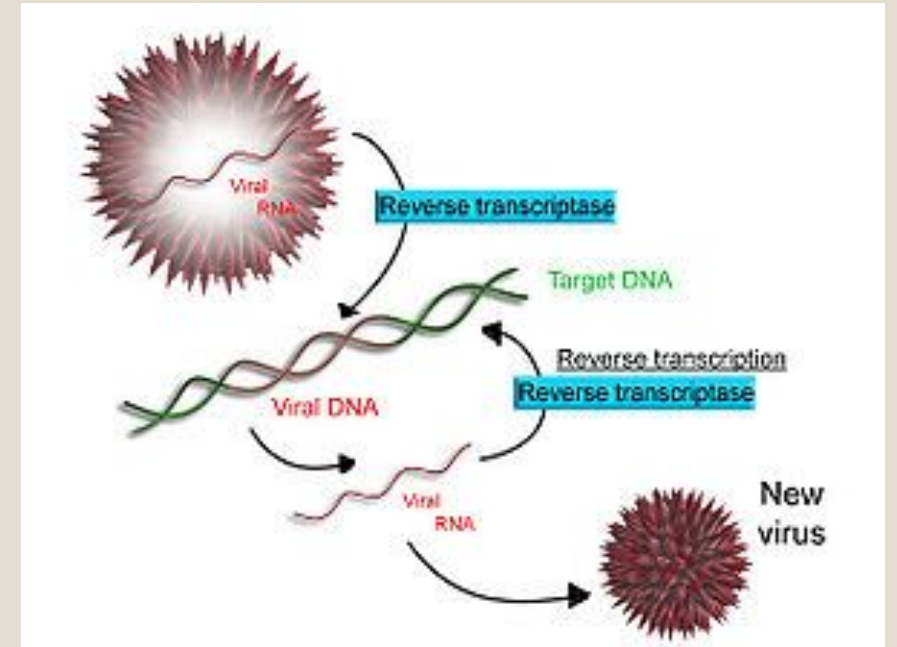


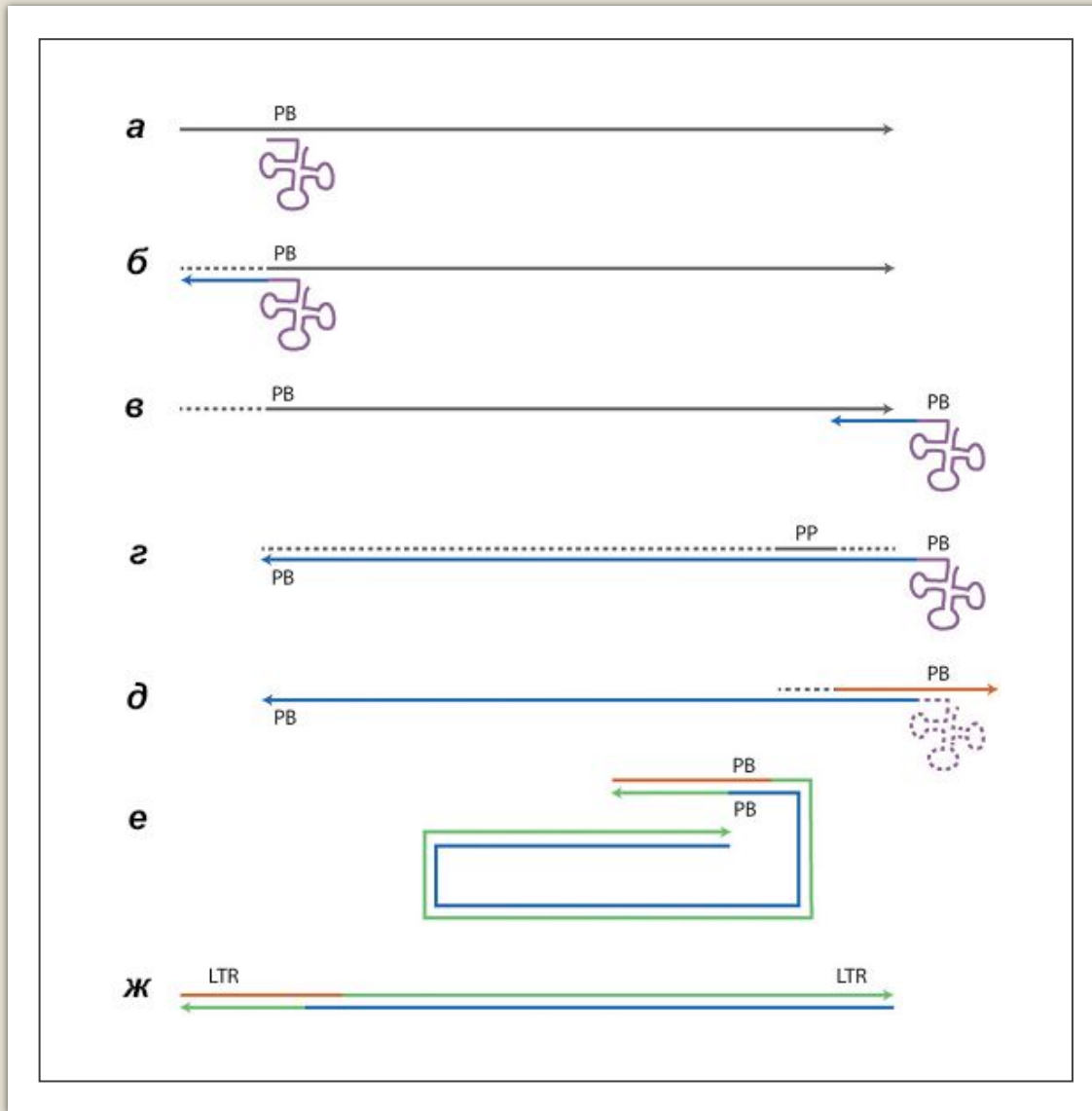
После трансляции дает
нейропептид головного
мозга

◦Тканеспецифичность

Обратная транскрипция

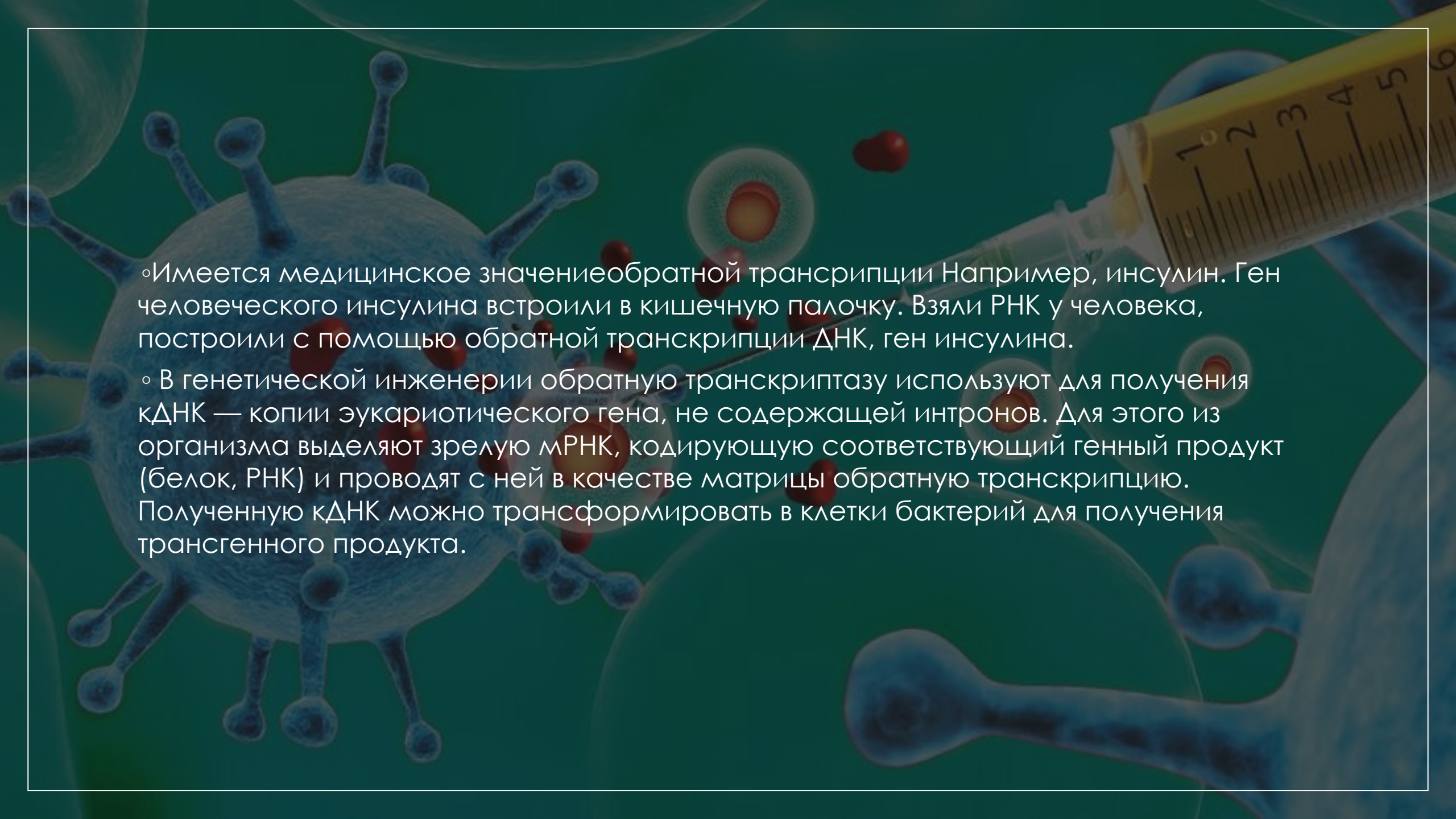
◦ Обратная транскрипция (или синтез кДНК) выполняется при участии фермента ревертазы на матрице РНК, в результате чего получается первая цепь кДНК.





◦ **Схема обратной транскрипции ВИЧ.**

- Участок 3'-конца тРНК (сиреневый трилистник) комплементарен области *PB* (от англ. *primer binding site* — сайт связывания с праймером) вирусного генома (*a*).
- Однако эта область находится не на конце генома, поэтому сразу синтезировать полногеномную кДНК (комплементарную ДНК) не получается. Сначала синтезируется один конец кДНК — формируется гетеродуплекс. Затем из гетеродуплекса за счет РНКазной активности обратной транскриптазы удаляется РНК (*б*).
- Синтезированная кДНК (синяя линия) отсоединяется от оставшейся РНК и отжигается на другом конце генома за счет повторов на его концах (*в*).
- Теперь ОТ (обратная транскриптаза) может достроить цепь до конца, а РНКаза — расщепить РНК (*г*). Так строится первая цепь кДНК.
- Вторая цепь начинает синтезироваться благодаря тому, что часть РНК в середине вирусного генома (полипуриновый участок) не деградирует и может служить праймером (*г, д*).
- Построение второй цепи (зеленая линия) сильно не отличается от синтеза первой и протекает в два этапа (*е, ж*)

- 
- Имеется медицинское значение обратной транскрипции. Например, инсулин. Ген человеческого инсулина встроили в кишечную палочку. Взяли РНК у человека, построили с помощью обратной транскрипции ДНК, ген инсулина.
 - В генетической инженерии обратную транскриптазу используют для получения кДНК — копии эукариотического гена, не содержащей интронов. Для этого из организма выделяют зрелую мРНК, кодирующую соответствующий генный продукт (белок, РНК) и проводят с ней в качестве матрицы обратную транскрипцию. Полученную кДНК можно трансформировать в клетки бактерий для получения трансгенного продукта.