

Курс молекулярной биологии

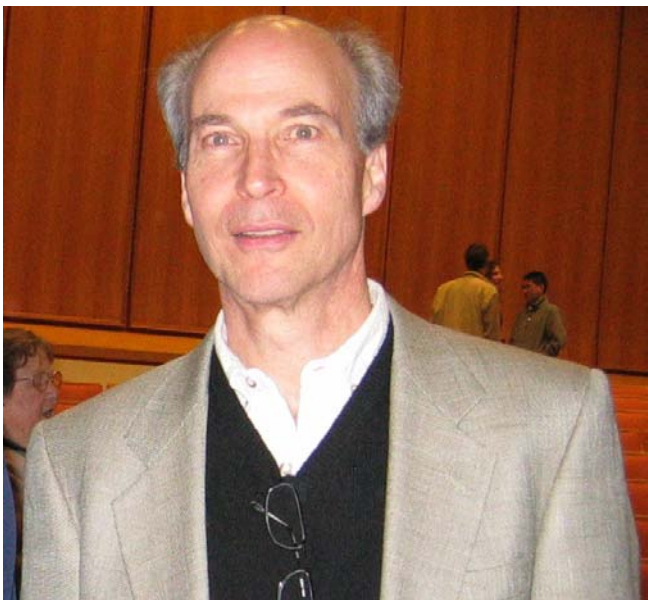
Тема лекции

Транскрипция у эукариот. Процессинг.

**Захарова Ирина Борисовна,
к.б.н., доцент**

ПРОДУКТЫ ТРАНСКРИПЦИИ ЭУКАРИОТ

- Гетерогенные ядерные РНК–предшественники мРНК (mRNA)
- Рибосомальные РНК (rRNA)
- Транспортные (tRNA)
- Малые ядерные (snRNA)
- Малые ядрышковые РНК (snoRNA)
- МикроРНК (miRNA)
- Малые интерферирующие РНК (siRNA)



Роджер Дэвид Корнберг

Roger David Kornberg

**2006 Нобелевская премия
по химии
«За работы о молекулярных
основах транскрипции
эукариот»**



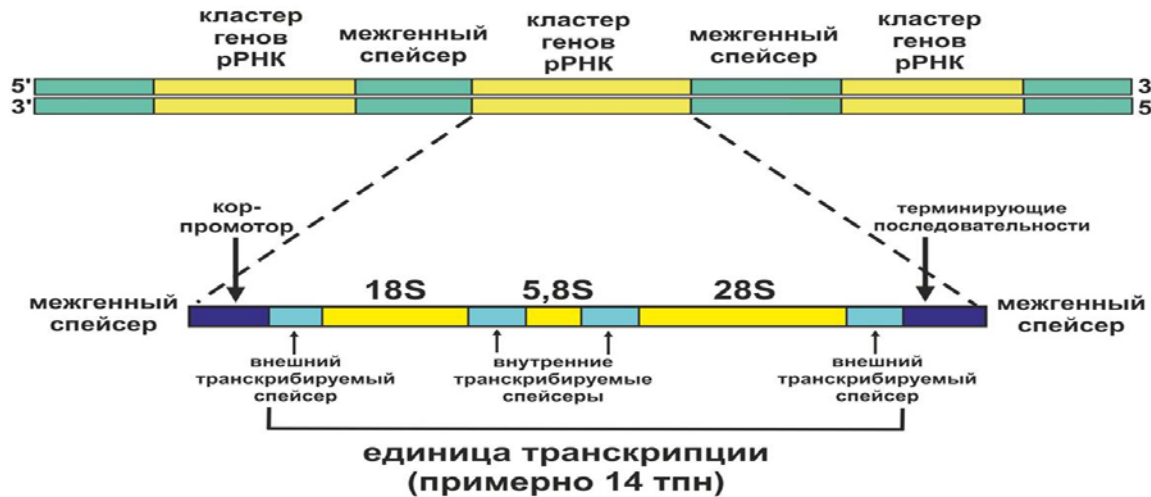
Транскрипция у эукариот

- **Транскрипционный аппарат сосредоточен в ядре (есть еще митохондриальная РНК полимераз)**
- **Транскрипция и трансляция пространственно разделены**
- **У эукариот существует несколько РНК полимераз (по меньшей мере три ядерных РНК полимеразы + митохондриальная)**

Три типа эукариотических РНК-полимераз

Тип	Локализация	Субстрат	Чувствительность к аманитину
RNA Pol I	Ядрышко	Рибосомные гены (кроме 5S рРНК)	Не чувствительна
RNA Pol II	Нуклеоплазма	Гены РНК, кодирующих белки, и некодирующих (регуляторных) РНК	Чувствительна
RNA Pol III	Нуклеоплазма	тРНК, 5S рРНК, U6 snРНК и ряд других малых РНК	Относительно чувствительна

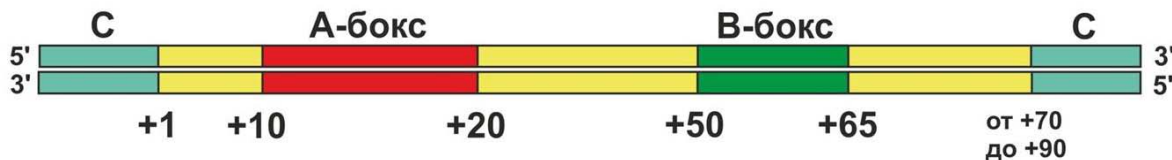
РНК полимераза I транскрибирует гены 18S, 5.8S и 28S рРНК



- Эти РНК синтезируются как один большой предшественник, который затем подвергается многоступенчатому разрезанию на “зрелые” рРНК.
- Между генами рРНК и кластерами расположены спейсеры (вставки), которые удаляются при созревании молекул рРНК.
- Гены, кодирующие предшественник рРНК располагаются тандемными повторами до нескольких сотен транскрипционных единиц.

РНК полимераза III

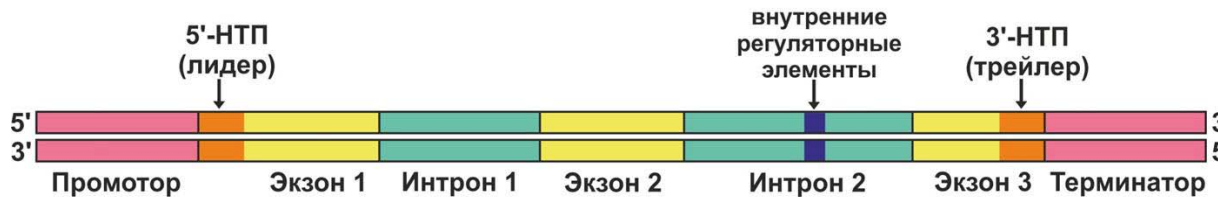
Транскрибирует ген 5S рРНК, транспортных РНК (тРНК) и малых ядерных РНК (мяРНК)



- Гены разных тРНК сгруппированы в кластеры и расположены в разных хромосомах. У человека на гаплоидный геном приходится 1300 генов тРНК.
- Промотор генов тРНК располагается внутри кодирующей последовательности и имеет два района (А- и В-боксы).
- В генах тРНК есть один интрон размером от 14 до 60 нп. Он располагается через один нуклеотид от 3'-конца антикодона.

РНК-полимераза II

Транскрибирует гены, кодирующие матричные РНК и некоторые малые ядерные РНК. Узнаёт промоторы класса II

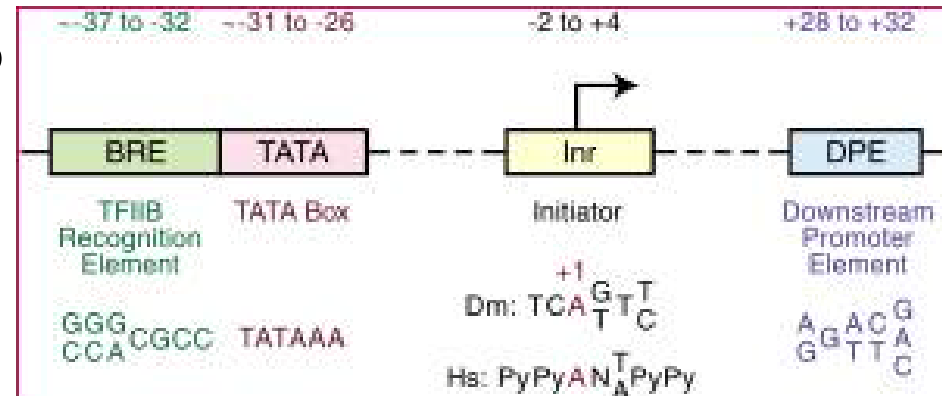


- Гены имеют прерывистое строение. **Экзоны** (кодирующие последовательности) чередуются с **интронами** (некодирующие последовательности). *Единица транскрипции всегда начинается и заканчивается экзонами.*
- На 5'- конце единицы транскрипции располагаются 5'-нетранслируемые последовательности (5'UTR)
- На 3'- конце - 3'-нетранслируемые последовательности (3'UTR)

Структура промотора эукариот

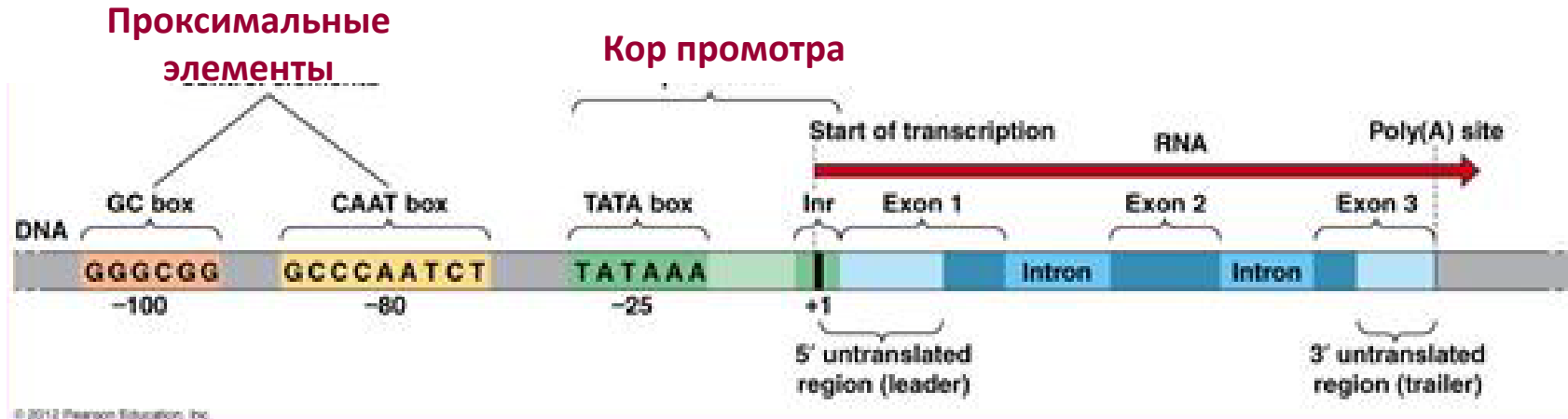
Классический базальный элемент промотора класса II содержит

1. **TATA-бокс** - последовательность, лишённую GC пар расположенную приблизительно за 25 пар оснований от участка старта транскрипции
2. **инициаторный элемент** - специфическую нуклеотидную последовательность, находящуюся в районе старта



Существуют неканонические промоторы класса II, не содержащие TATA или инициатора.

Структура промотора эукариот



Проксимальные элементы располагаются в пределах 50-200 пар оснований от участка старта транскрипции и содержат сайты связывания белков - активаторов транскрипции.

GC бокс (-100)

CAAT бокс (-80)

Энхансеры - могут располагаться на произвольном расстоянии в любой ориентации по отношению к участку старта транскрипции

Инициация транскрипции РНК полимеразой II

Эукариотические РНК полимеразы не способны сами по себе инициировать транскрипцию. Для этого им необходимы вспомогательные белки - **факторы инициации**, формирующие совместно с полимеразой **преинициаторные комплексы (PIC)**

Для правильной инициации транскрипции РНК полимеразой II в зоне промотора должны собраться инициаторные факторы, называемые **базальными факторами инициации транскрипции**

TFII (Transcription Factors of RNA polymerase II)

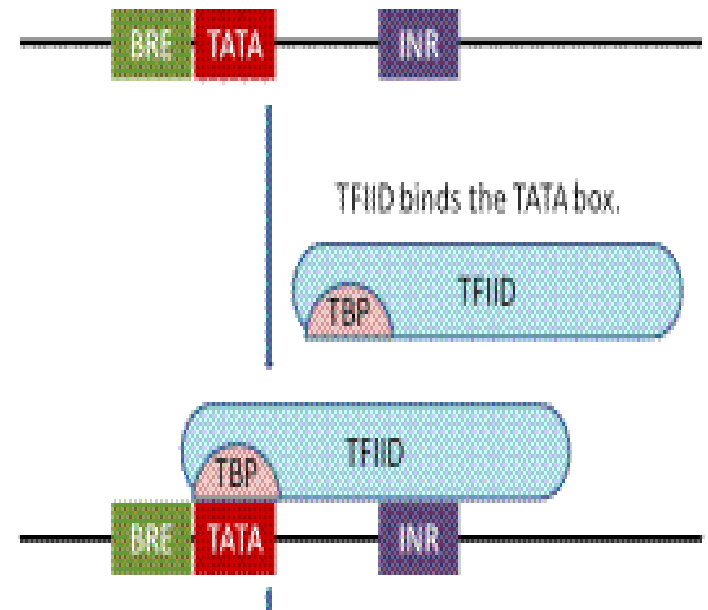
TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIЕ, TFIIF, TFIIN

Формирование преинициаторного комплекса PIC

Ключевая стадия инициации транскрипции РНК полимеразой II – посадка на промотор

1. TFIID присоединяется к промоторной области ДНК

В основе этого события лежит специфическое взаимодействие TATA - связывающего компонента TFIID белка **TBP (TATA Binding Protein)** с соответствующим участком ДНК

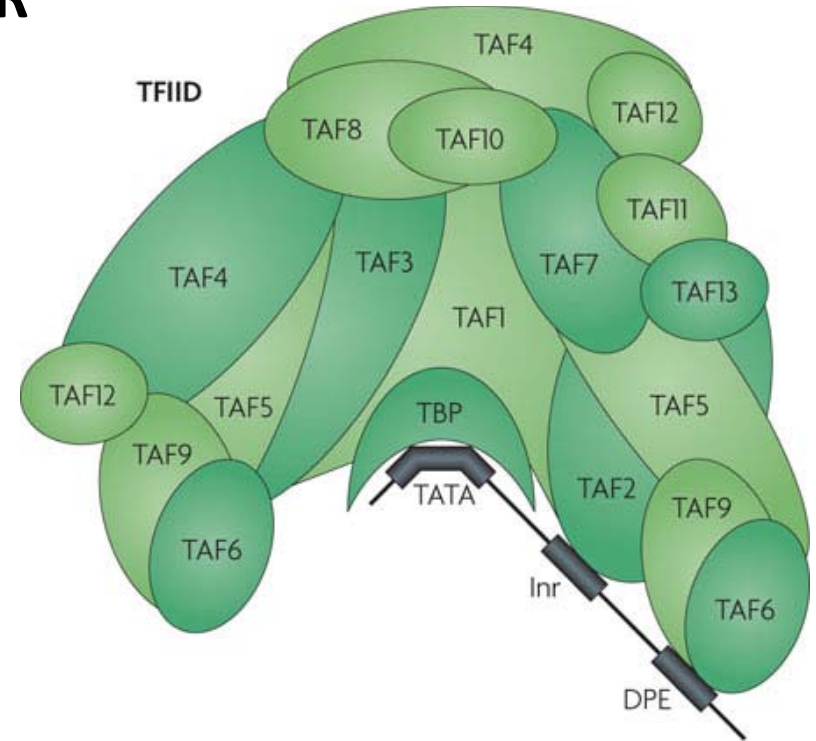


Формирование PIC

В результате связывания **TFIID(TBP)** с ТАТА-боксом происходит изгиб ДНК на 70 градусов.

Такая деформация

- облегчает расплетание двойной спирали в районе старта,
- координирует сборку преинициаторного комплекса ,
- позиционирует ДНК таким образом, что с ней могут связываться новые базальные факторы транскрипции.



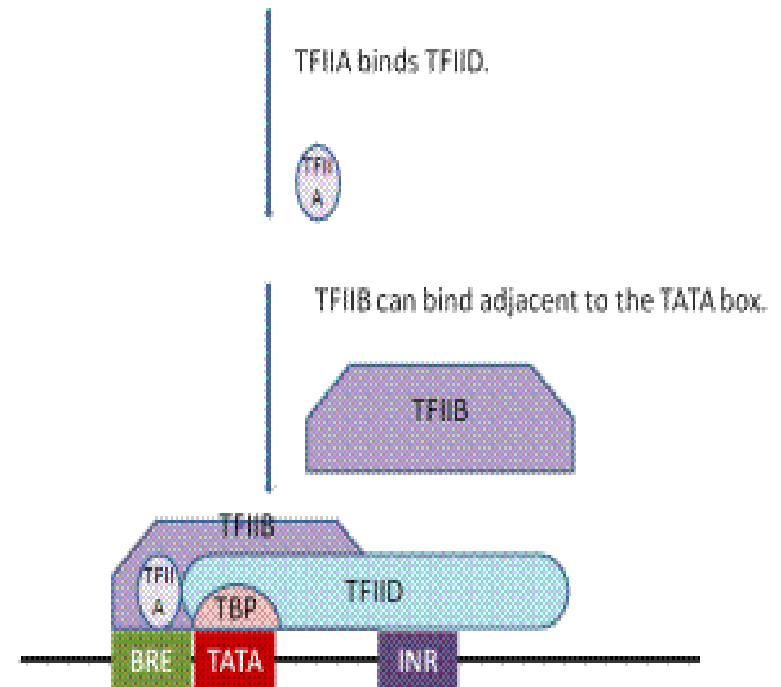
Формирование PIC

Затем к TATA-боксу присоединяются белки **TFIIA** и **TFIIB**

2. TFIIA стабилизирует комплекс TFIID/TATA-бокс

3. TFIIB контролирует правильность посадки TFIID/ TBP на TATA-бокс

TFIIB способствует также посадке комплекса РНК полимеразы II и белка TFIIF



Формирование PIC

Присоединяются

4. комплекс

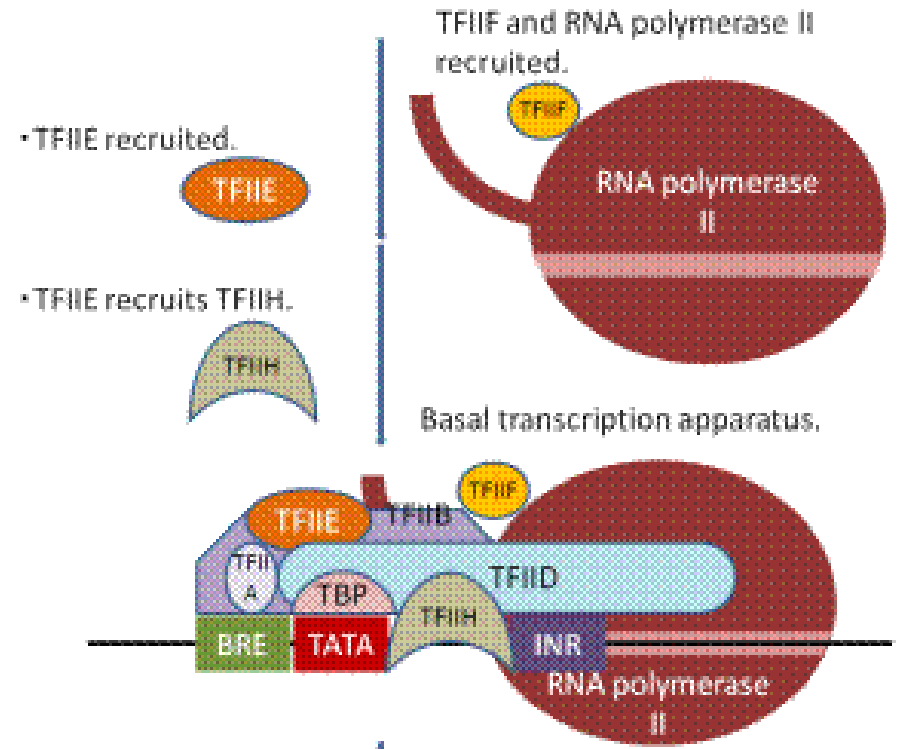
РНК полимеразы II и белка TFIIF

После присоединения РНК полимеразы, с инициаторным комплексом связывается

5. TFIIЕ и, в свою очередь, присоединяет

6. TFIIН

TFIIН обладает *хеликазной активностью* и *киназой* С-концевого домена РНК полимеразы

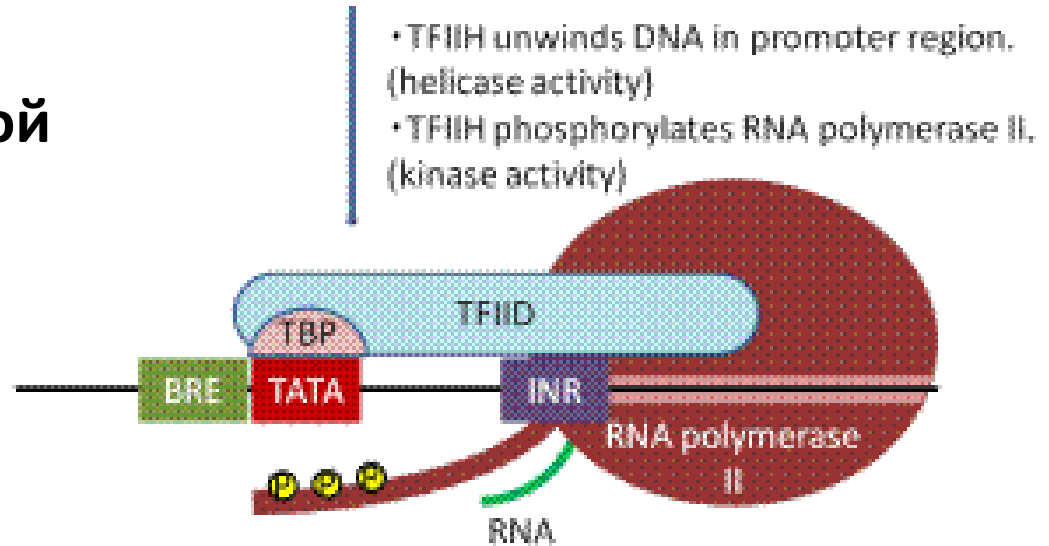


Сформирован “закрытый” преинициаторный комплекс

Формирование PIC

TFIIH проявляет

- киназную активность - фосфорилирует С-концевой домен большой субъединицы РНК полимеразы II
- хеликазная активность расплетает двойную спираль ДНК в районе старта транскрипции



Формируется "открытый" комплекс

Полимераза уходит с промотора и начинает элонгацию

1. TFIID –TBP

связывается с промотором

2. TFIIA и TFIIB

присоединяются к TFIID

3. RNA-pol*TFIIF –

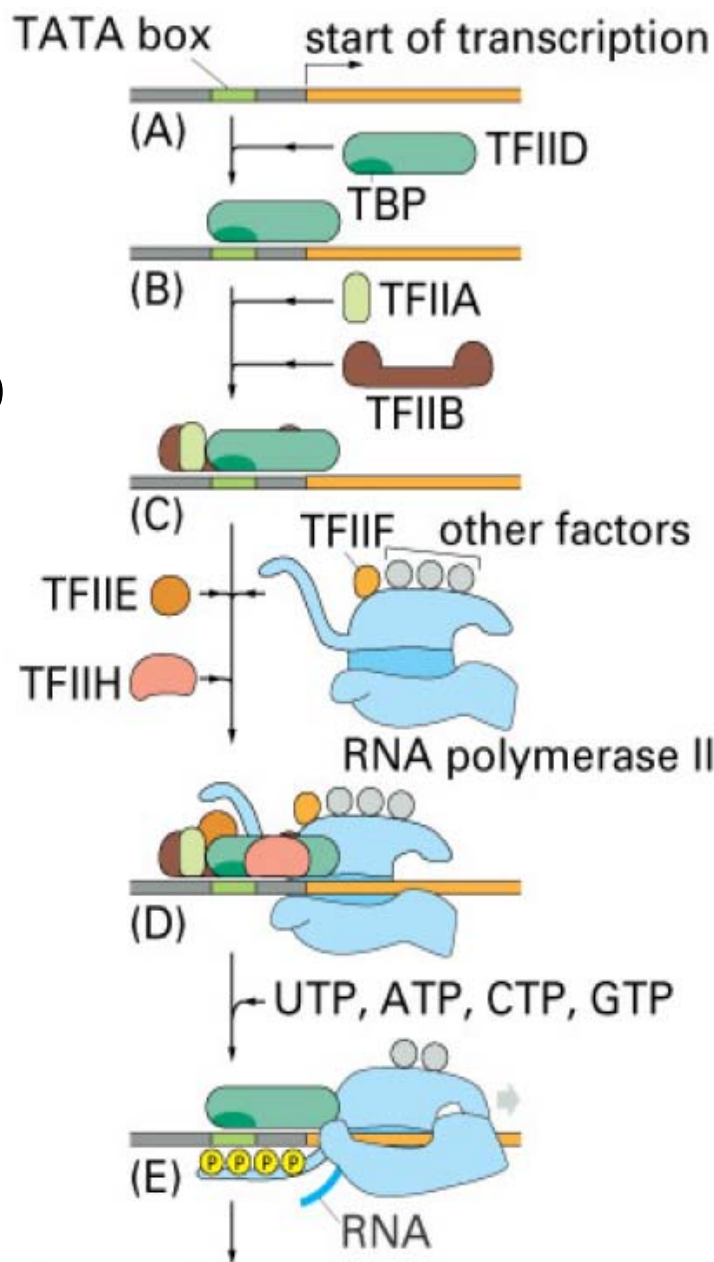
комплекс

присоединяется к TFIIB

4. TFIIЕ

5. TFIIH

DAVpolFEN

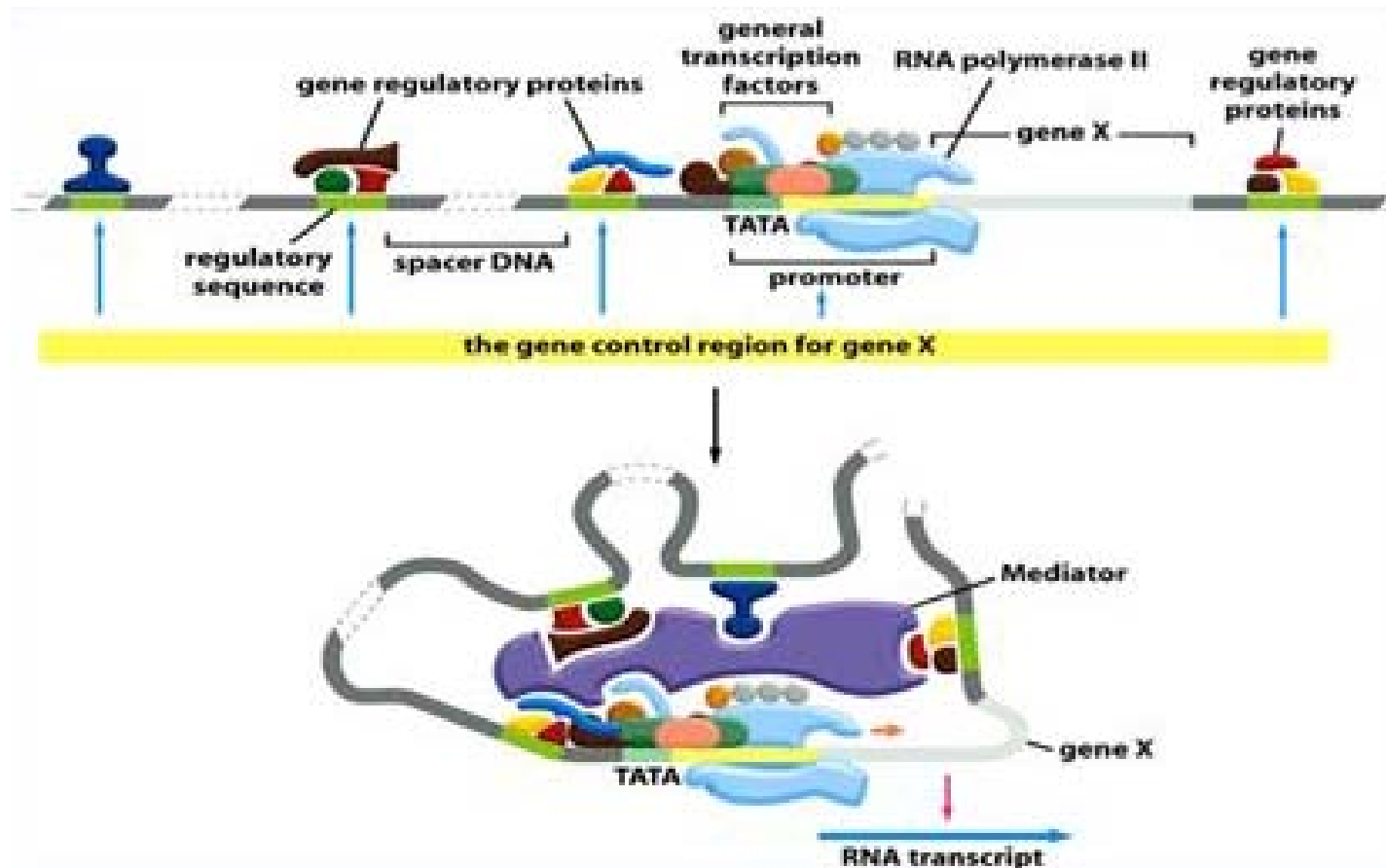


PIC

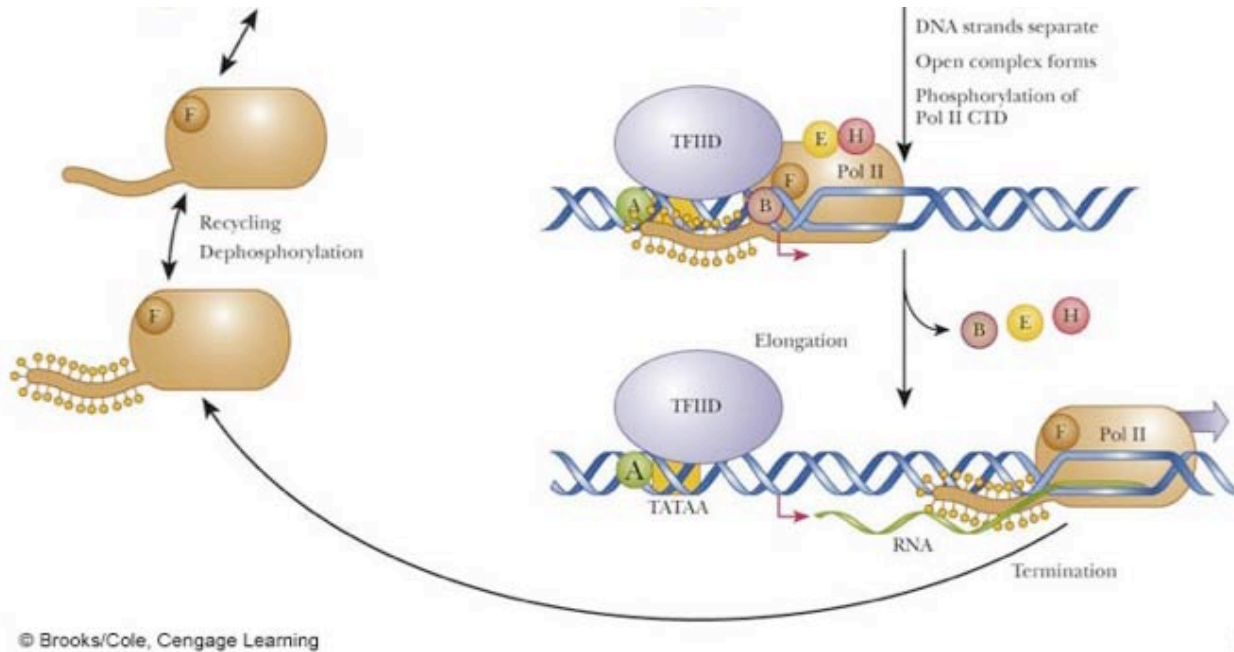
“закрытый”

“открытый”

Кроме описанных факторов в инициации транскрипции РНК полимеразой II участвует множество других



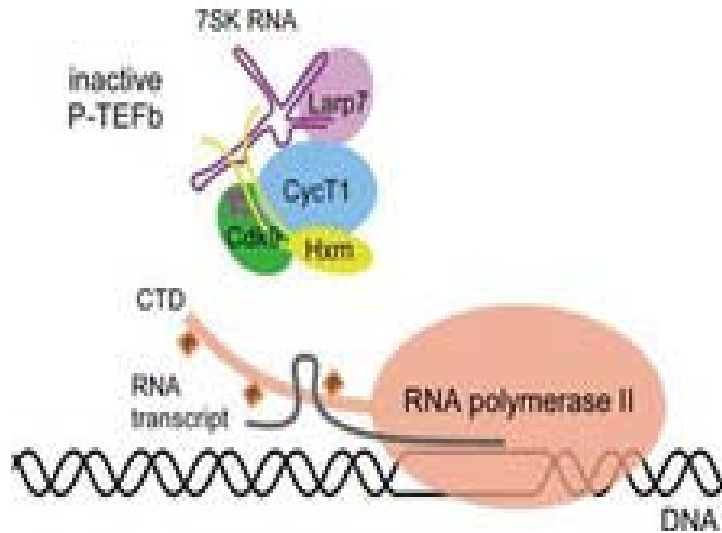
Элонгация транскрипции РНК полимеразой II



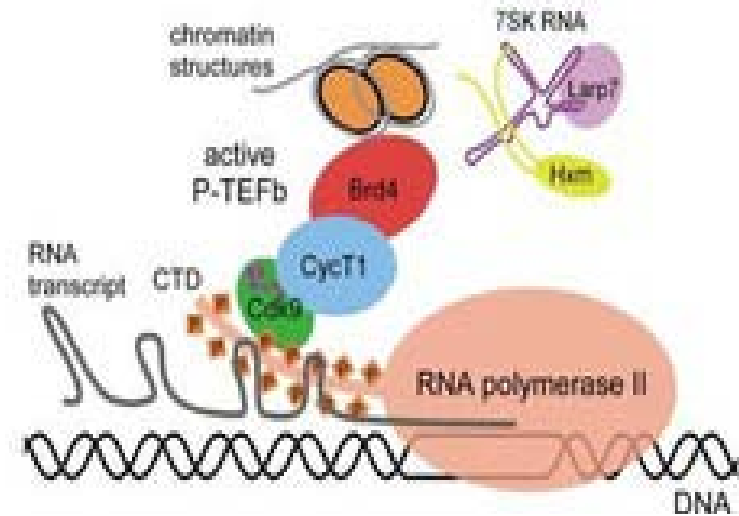
Основной маркер элонгационного состояния РНК полимеразы II - фосфорилированный CTD

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.

transcription arrest

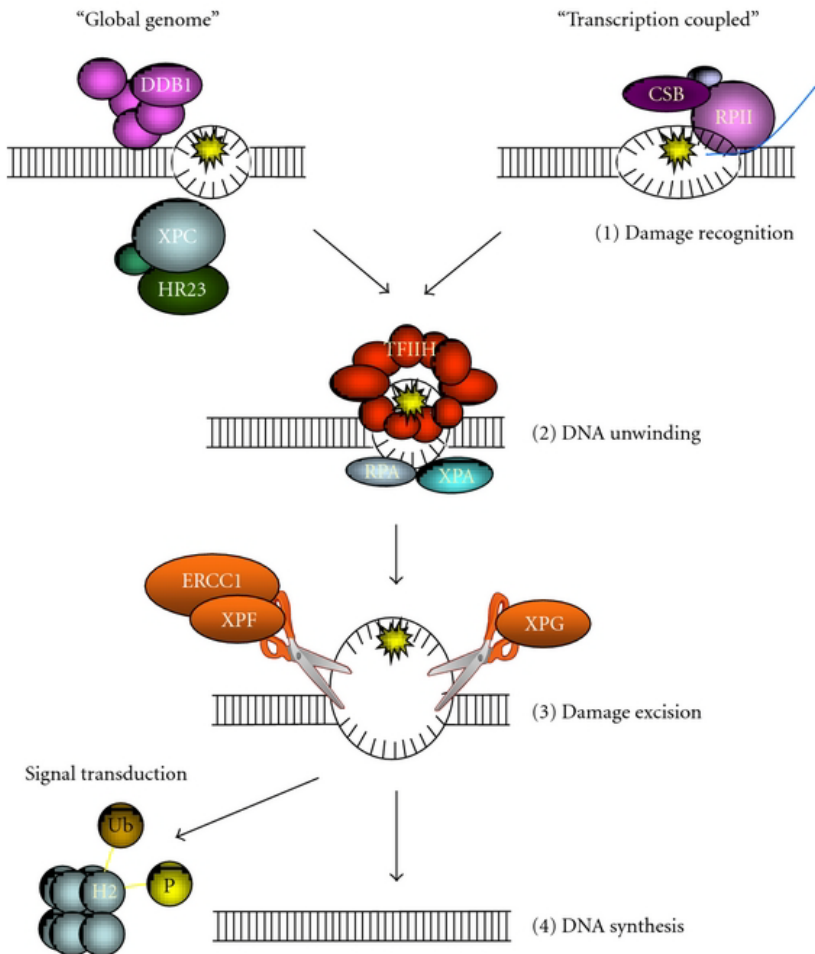


transcription elongation



В процессе элонгации РНК полимеразы может встретиться повреждение ДНК, вызывающее паузы и попадание в арестованное состояние

Сопряжение транскрипции с репарацией NER



Повреждение ДНК задерживает РНК-полимеразу

TFIIH – комплекс рекрутирует структурные белки XPA и RPA, присоединяющиеся к ssDNA

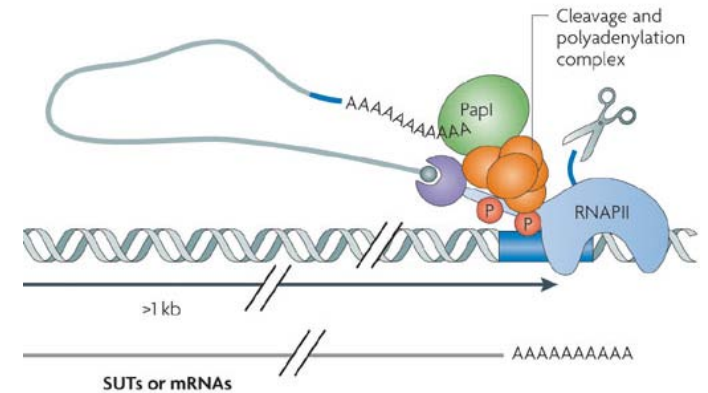
Эндонуклеазы ERCC1 / XPF и XPG вырезают поврежденный участок

Заполнение пропусков с помощью нового синтеза ДНК

Во время обработки поражений, другие белки, находящиеся в непосредственной близости, в том числе гистоны, модифицируются

Терминация транскрипции РНК полимеразой II

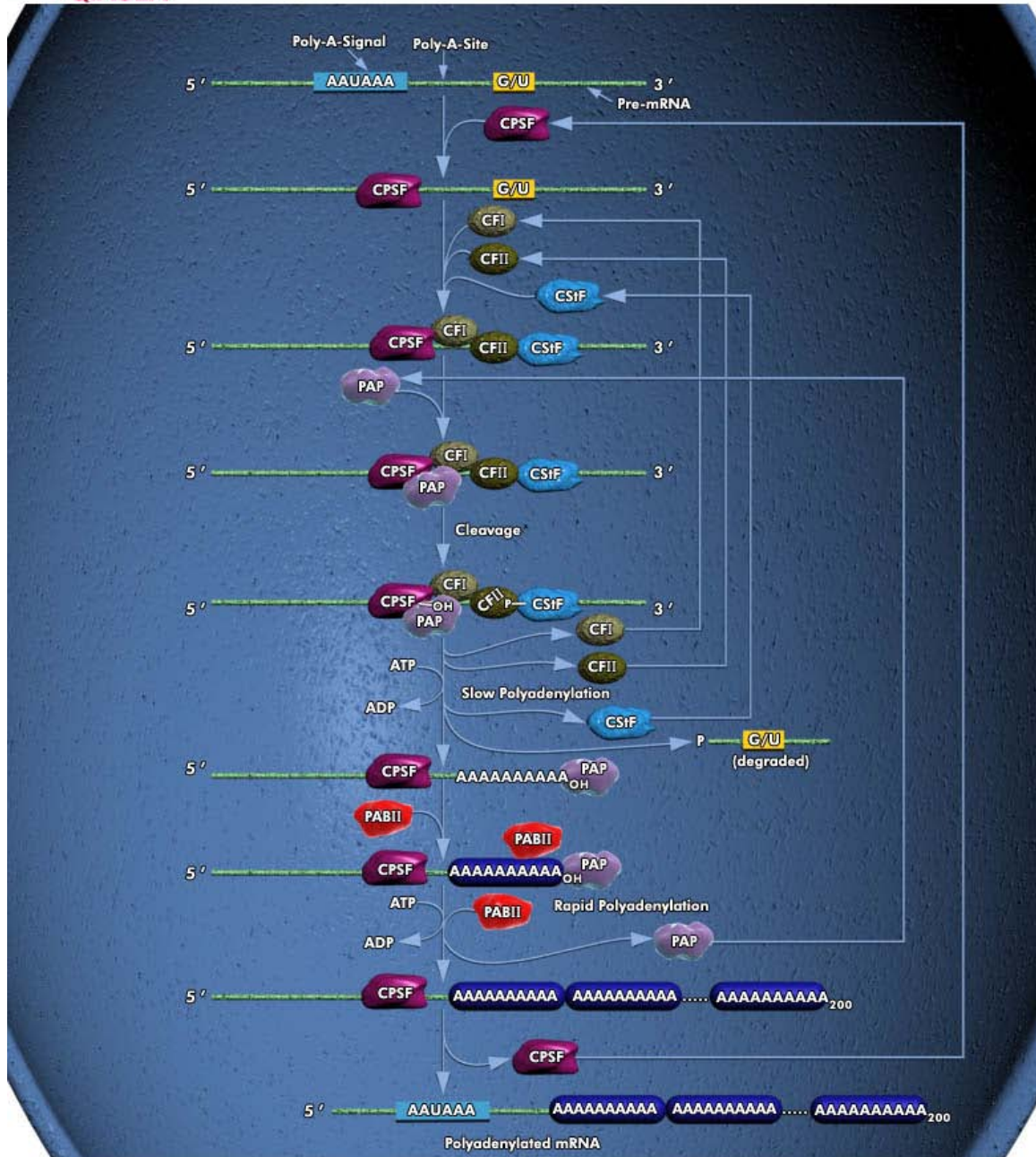
- У эукариот РНК-полимераза II, как правило, продолжает транскрипцию за пределы гена и проходит через одну или более последовательностей ААТААА, которые лежат за пределами 3'-конца кодирующей области
- В пре-мРНК это ААУААА, находящаяся на 10-30 нуклеотидов левее сайта расщепления-полиаденилирования (СА)
- 3'-конец РНК отщепляется **CPSF** в указанной точке, затем происходит полиаденилирование этого конца молекулы РНК



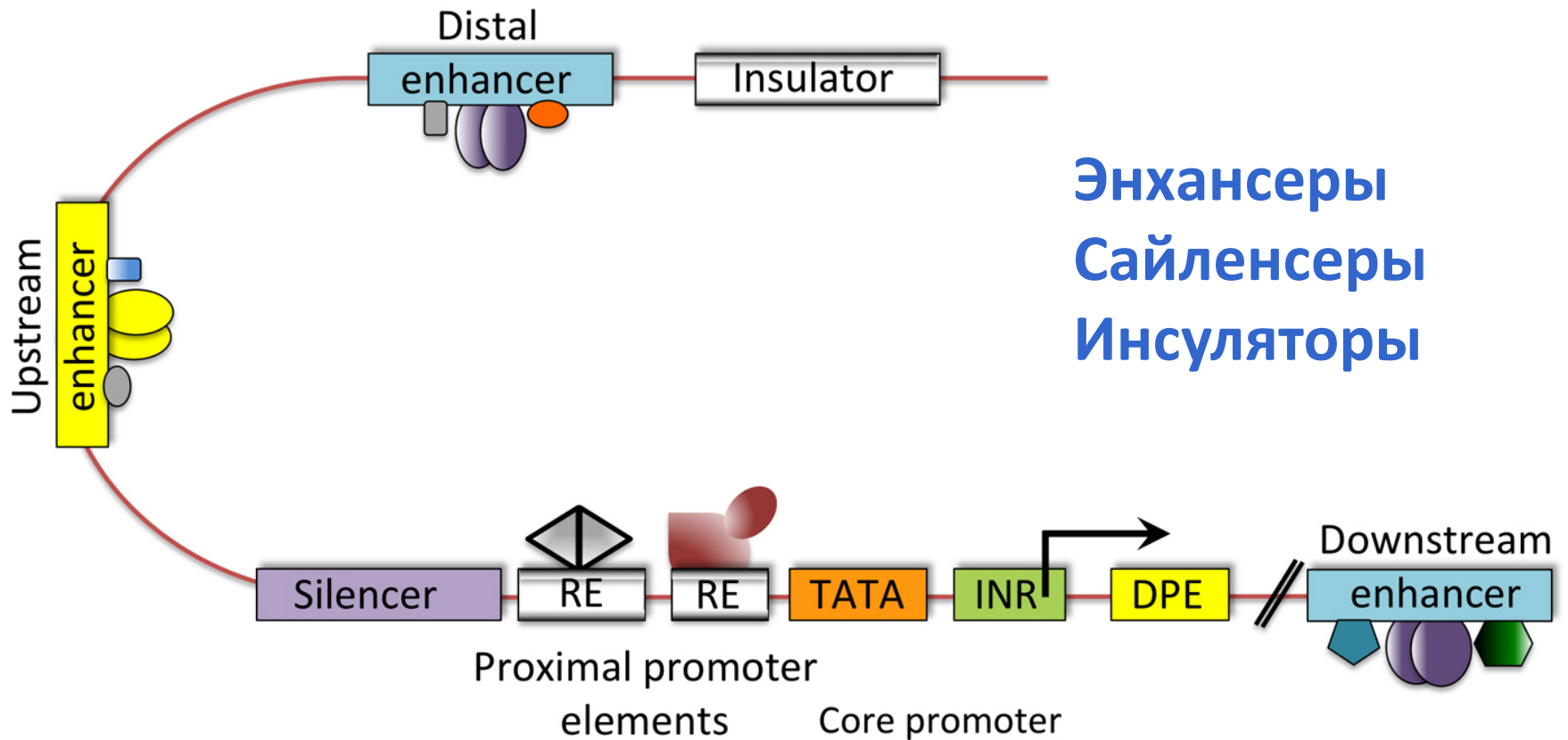
Nature Reviews | Genetics

CPSF (Cleavage and polyadenylation specificity factor) специфический фактор расщепления и полиаденилирования

Cleavage and Polyadenylation of Pre-mRNA

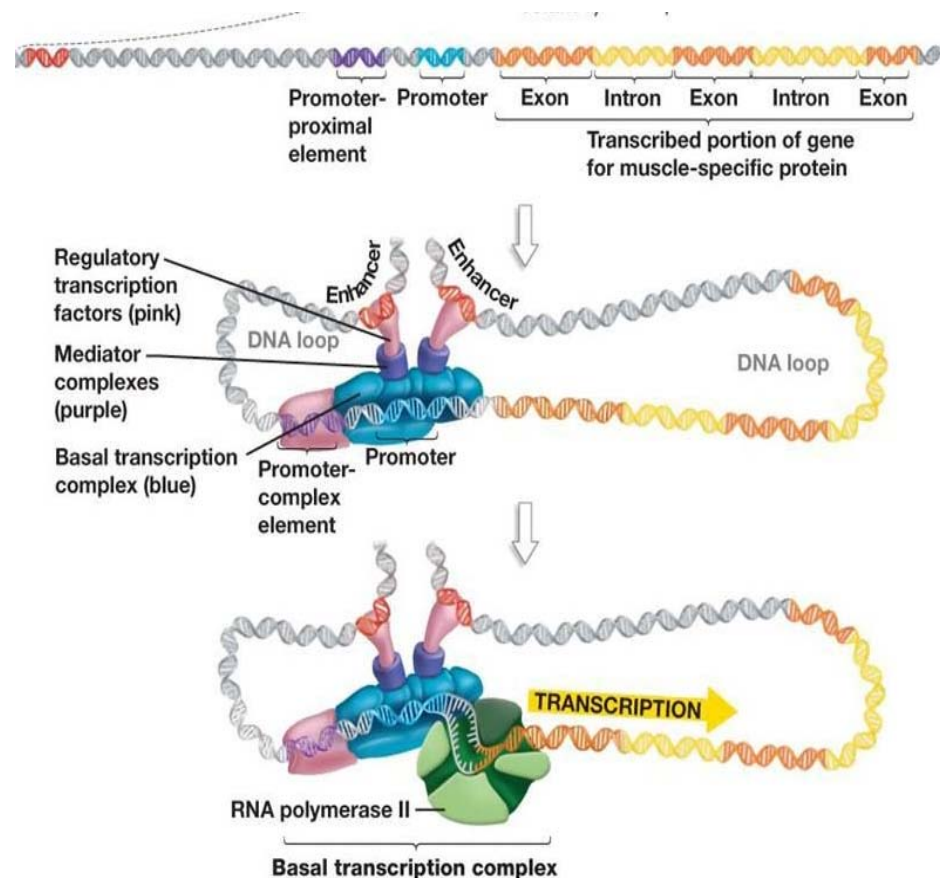


Некодирующие регуляторные элементы эукариот



Энхансер — последовательности ДНК (модули), с которыми связываются соответствующие регуляторные белки, что усиливает транскрипцию с любого доступного промотора.

Модули - это отдельные части энхансеров.



©11 Pearson Education, Inc.

Сайленсер — последовательность ДНК, с которой связываются белки-репрессоры. Связывание белков-репрессоров с сайленсерами приводит к понижению или к полному подавлению синтеза РНК

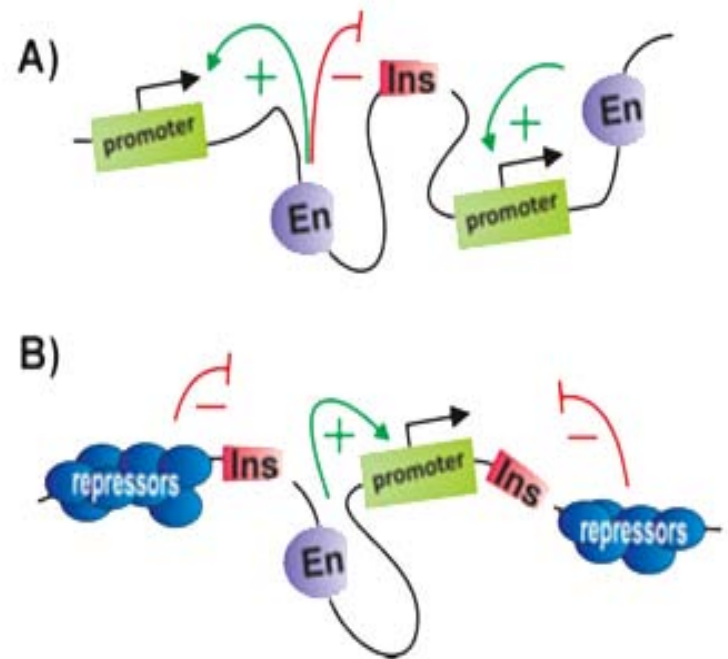
Инсуляторы (пограничные элементы) - специальный класс регуляторных элементов, осуществляющих разделение генома на обособленные домены, защищенных от воздействия регуляторных элементов соседних доменов.

Типы активности инсуляторов.

1. Блокирующая активность.

Функция инсулятора зависит от его окружения; он может блокировать активность энхансера (или сайленсера), если находится между ним и его промотором.

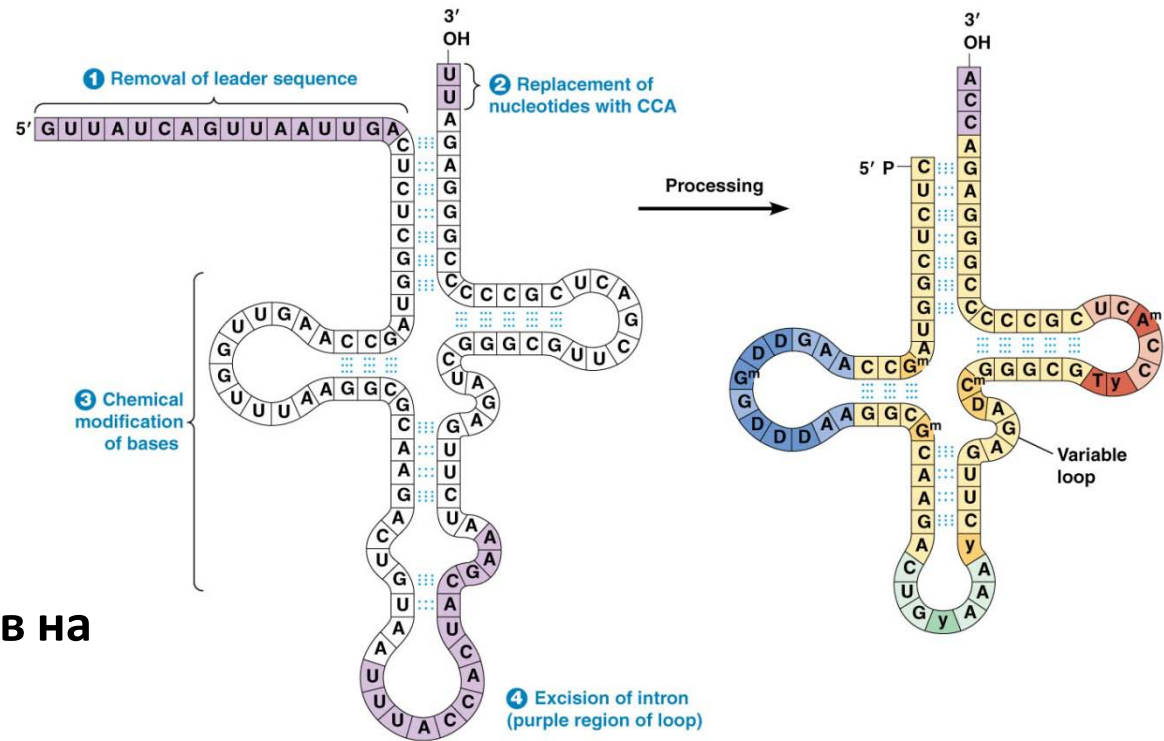
2. Барьерная активность. Инсуляторы, ограничивающие ген с обеих сторон, защищают его от распространения гетерохроматина.



Процессинг тРНК

Процессинг тРНК у эукариот

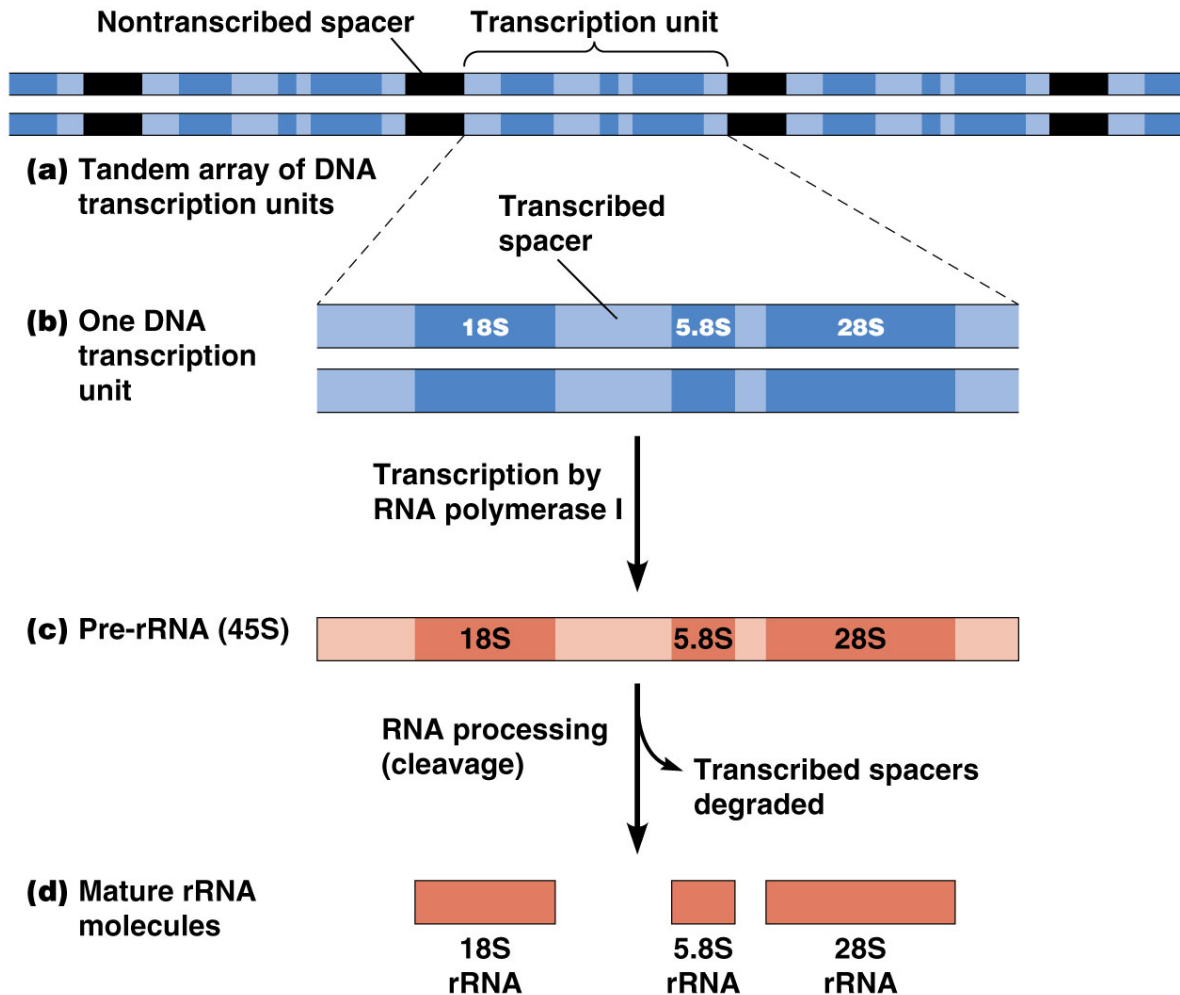
1. Удаление лидерной последовательности
2. Замена 3' нуклеотидов на ССА
3. Удаление интрона
4. Модификация оснований



(a) Primary transcript (precursor) for yeast tyrosine tRNA

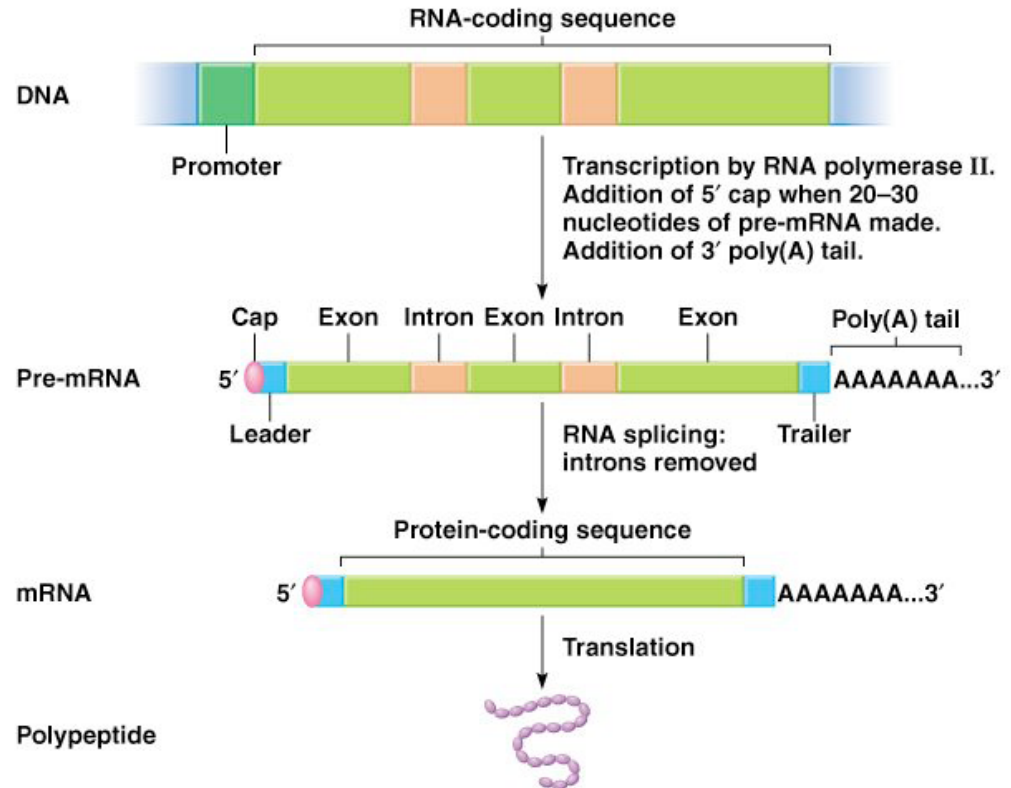
(b) Mature tRNA, secondary structure

Процессинг рРНК у эукариот



Этапы процессинга пре-мРНК эукариот

- **Кэпирование** - модификация 5'-конца
- **Полиаденилирование** - модификация 3'-конца
- **Сплайсинг** - удаление интронов и соединение экзонов

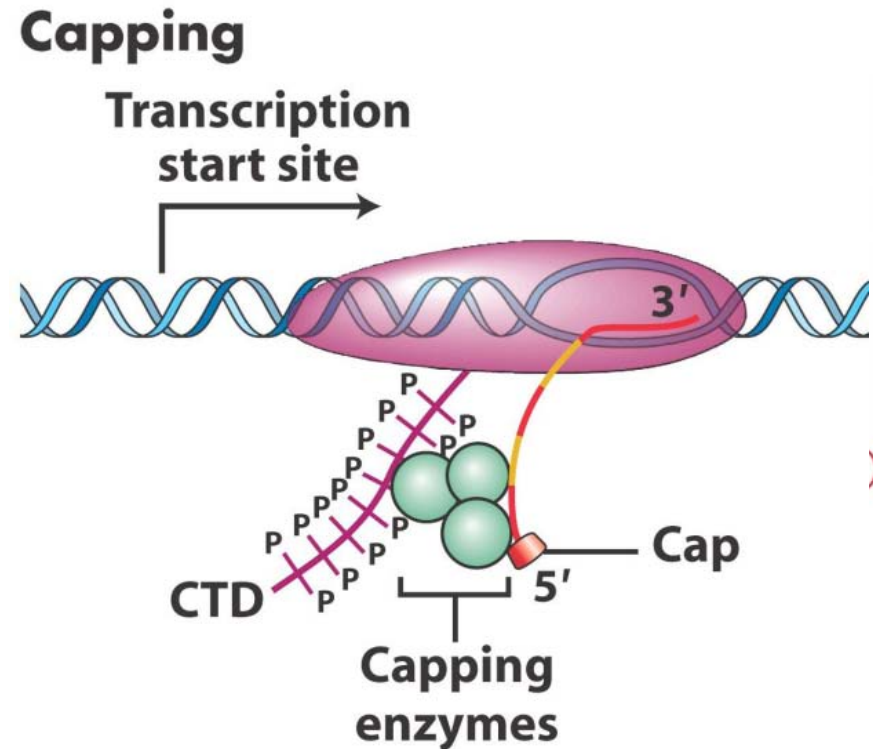


Модификация 5'-конца - кэпирование

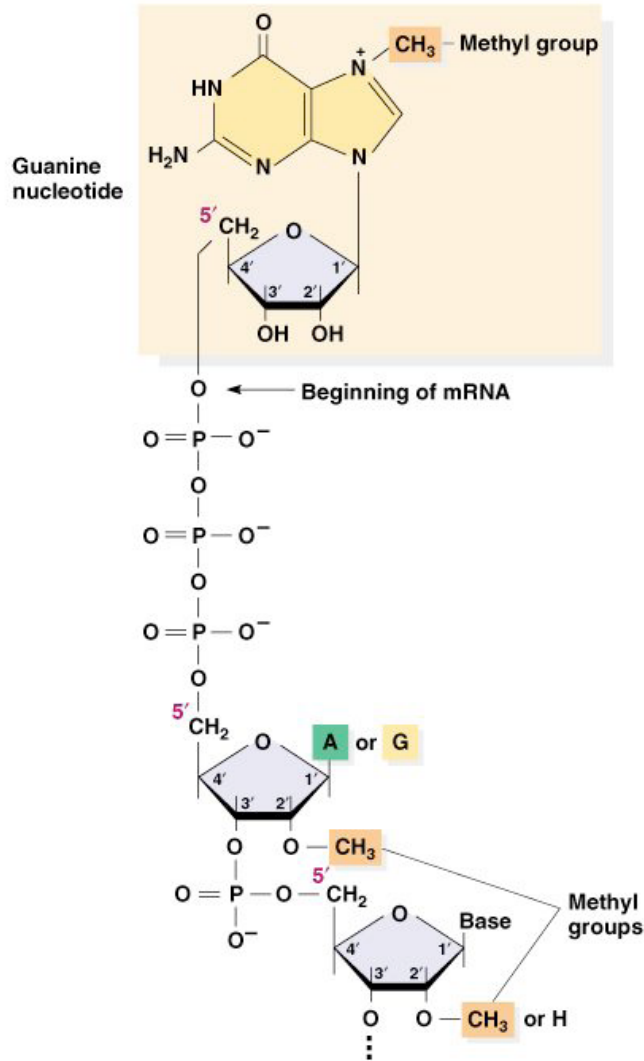
Модификации пре-мРНК начинаются на стадии элонгации – ко-трансляционно.

Когда длина первичного транскрипта достигает примерно 30 нуклеотидных остатков, происходит кэпирование его 5'-конца:

- к первому 5'-трифосфату мРНК присоединяется метилгуанозинтрифосфат в ориентации 5' - 5'
- метилирование рибозы в первых двух нуклеотидах мРНК



Модификация 5'-конца - кэпирование



Функции

- Кэп защищает 5'-конец мРНК от действия нуклеаз
- Обеспечивает правильное расположение мРНК на малой субъединице рибосомы при инициации трансляции
- Наличие кэпа также необходимо для работы сплайсосомы, обеспечивающей удаление интронов.

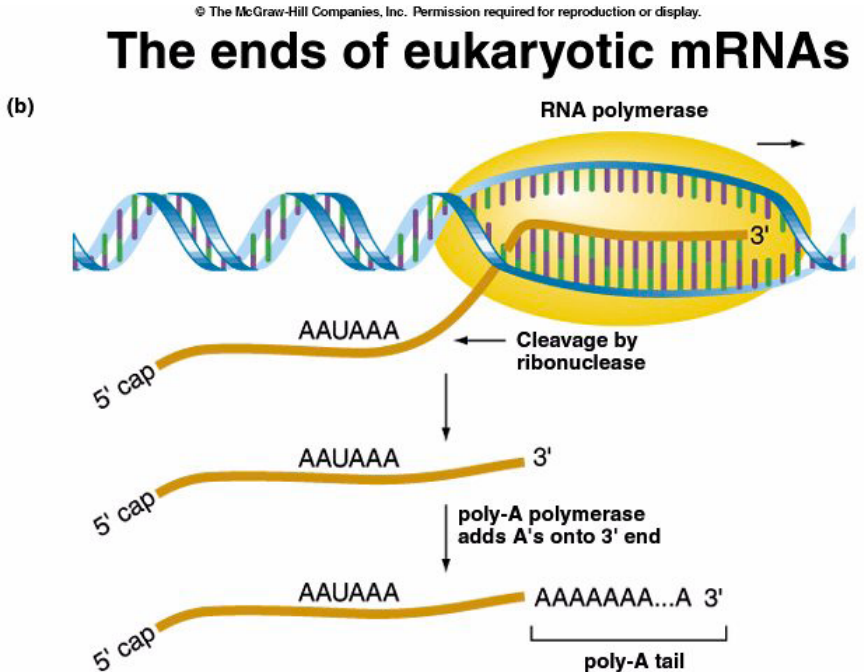
Кэпируются 100% мРНК

Модификация 3'-конца - полиаденилирование

Когда синтез про-мРНК завершен,

- на расстоянии примерно 20 нуклеотидов в направлении к 3' - концу от последовательности 5'-AAUAAA-3' происходит разрезание специфической эндонуклеазой

- к новому 3'-концу присоединяется до 300 остатков АМФ (*безматричный синтез*)



Функции

«полиА-хвоста»

- Защищает 3'-конец от гидролиза, т.к. покрыт полиА-связывающими белками.
- способствуют экспорту зрелых мРНК из ядра
- В значительной степени время жизни мРНК коррелирует с длиной полиА-хвоста.

**мРНК ряда генов не полиаденилируется
(например гистоновых генов)**

Сплайсинг

Сплайсинг РНК (от англ. to splice - сшивать без узлов) открыл в 1978г. Филипп Шарп

Сплайсинг – вырезание интронов из пре-мРНК и сшивание экзонов с образованием мРНК

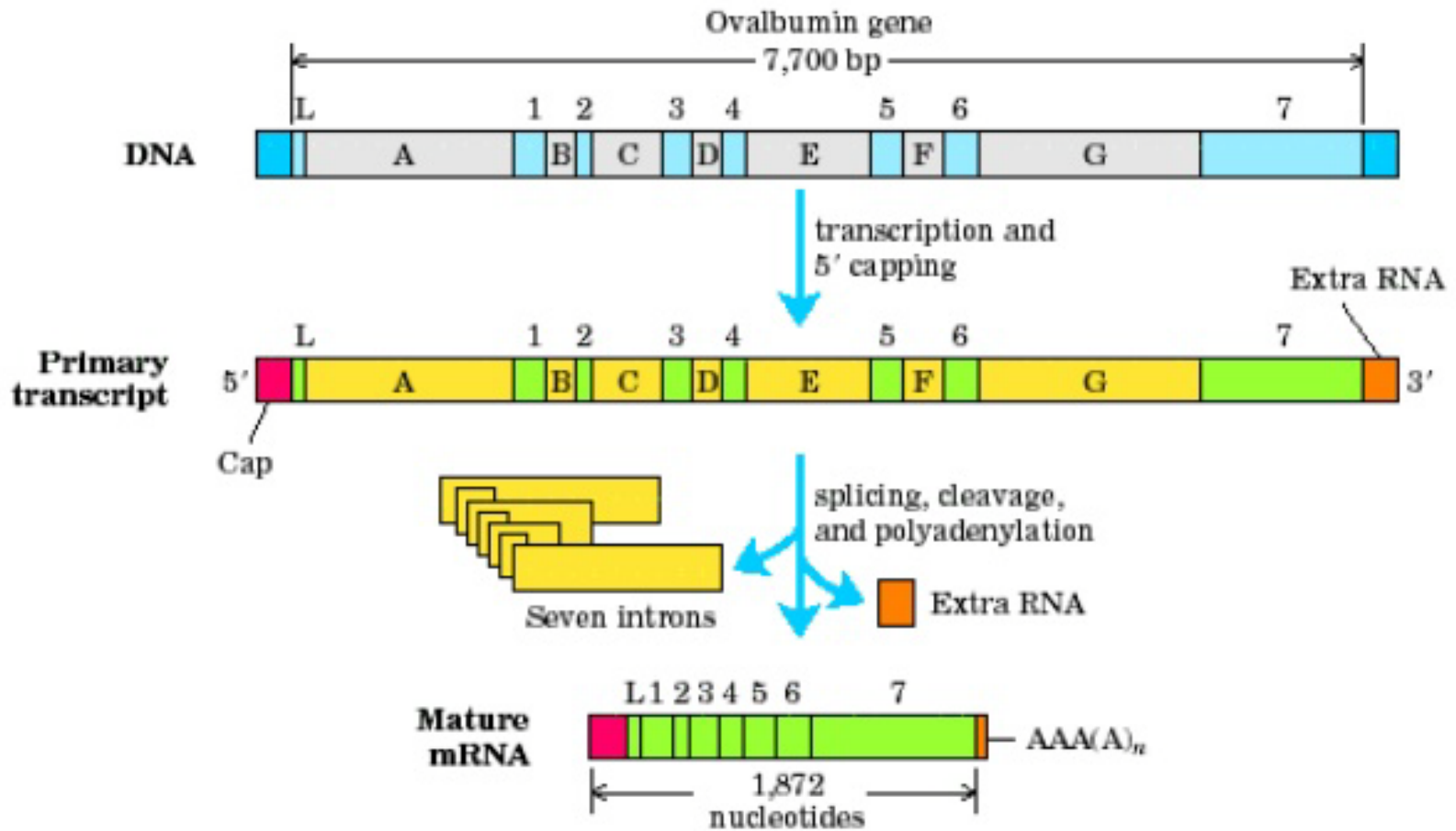
экзоны - кодирующие участки генов.

интроны - некодирующие участки генов

В сплайсинге пре-мРНК у высших эукариот задействован комплекс белков и *малых ядерных РНК (мяРНК):*

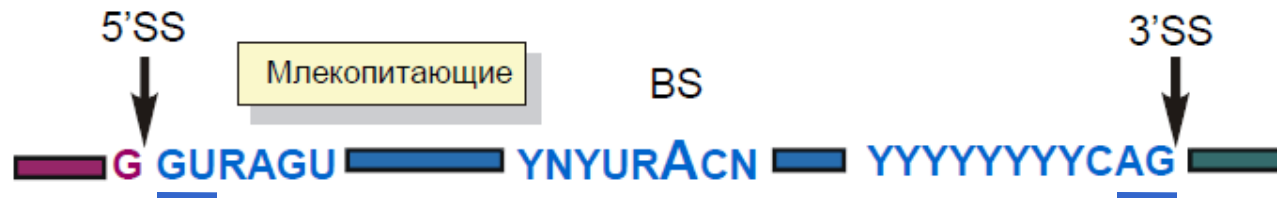
U1, U2, U4, U5, U6, называемый *сплайсосомой*

mRNA splicing



Точное разрезание границы интрон/экзон определяют три типа коротких последовательностей –

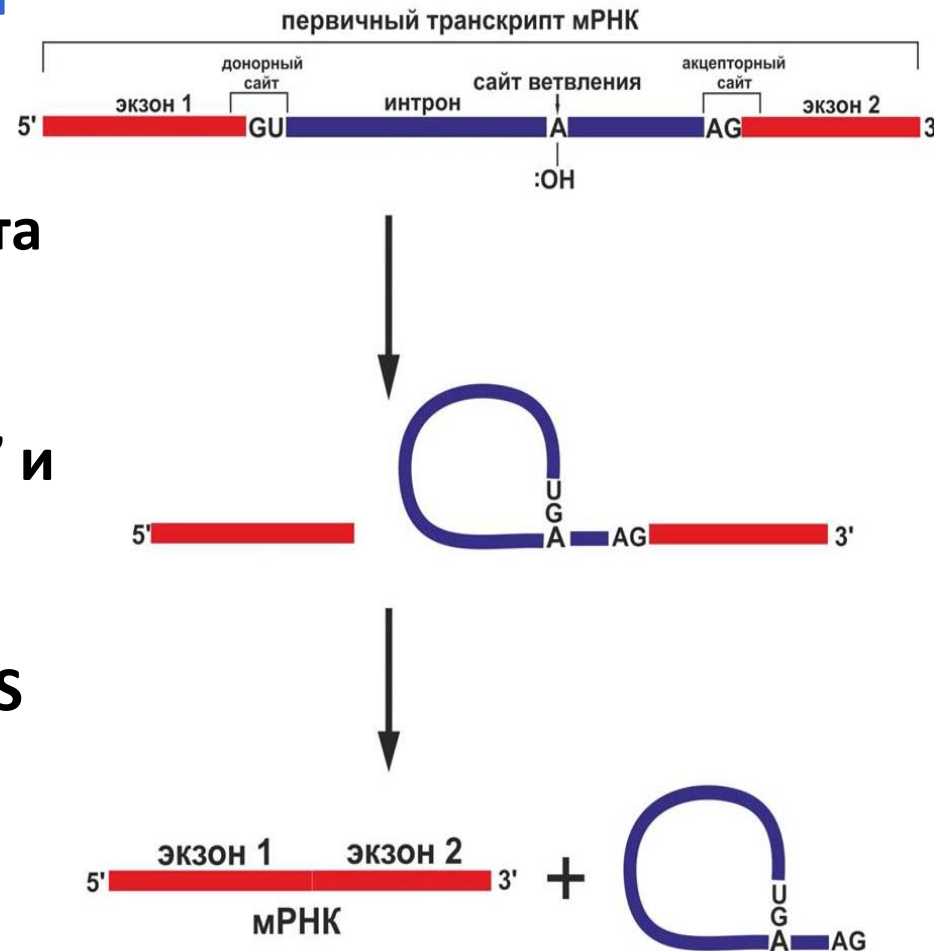
сайты сплайсинга



- 5'SS (донорный) **exon-G-U**
- 3'SS (акцепторный) **A-G-exon**
- BS - бранч-сайт (сайт разветвления) - внутри интрона, около 30 нуклеотидов в обратном направлении от сплайс-акцептора A

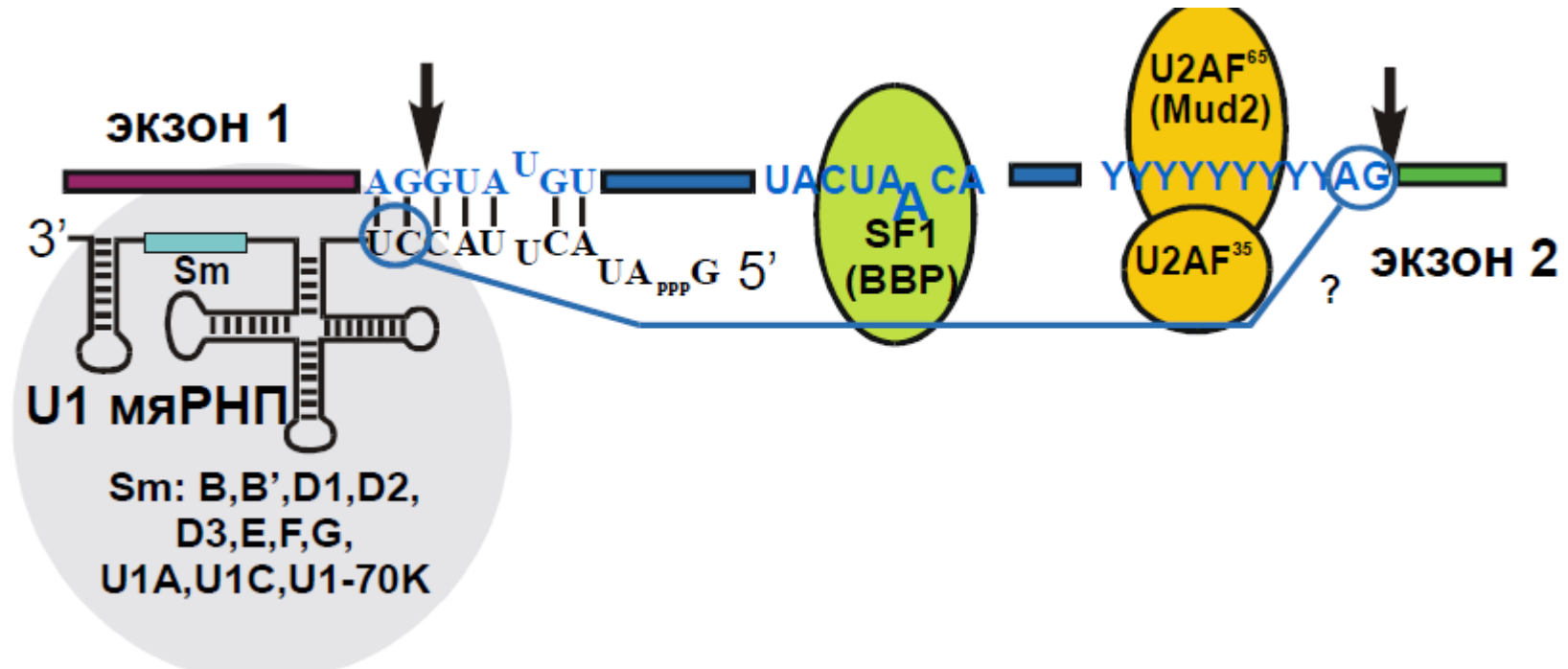
Механизм сплайсинга

- 2'-гидроксил аденозина места разветвления атакует фосфодиэфирную связь 5'SS
- образуется структура "лассо" и свободный 3'-гидроксил 5'-концевого экзона
- этот 3'-гидроксил атакует 3'SS



В результате экзоны оказываются ковалентно соединенными обычной межнуклеотидной связью, а интрон уходит в виде структуры "лассо"

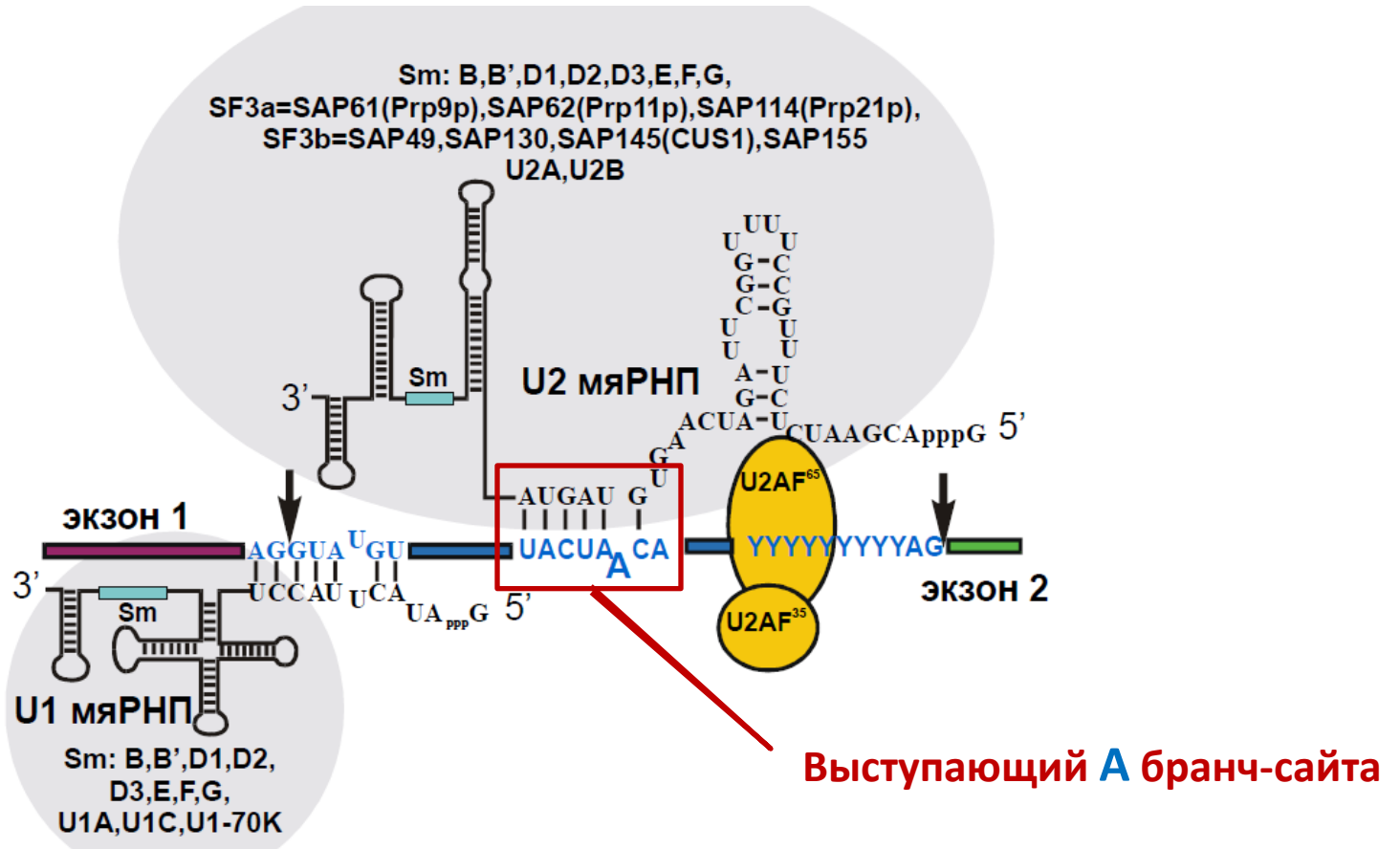
Механизм сплайсинга (формирование сплайсосомы) Первичное узнавание интрона



U1 мяРНК узнает 5'-сайт сплайсинга

Механизм сплайсинга

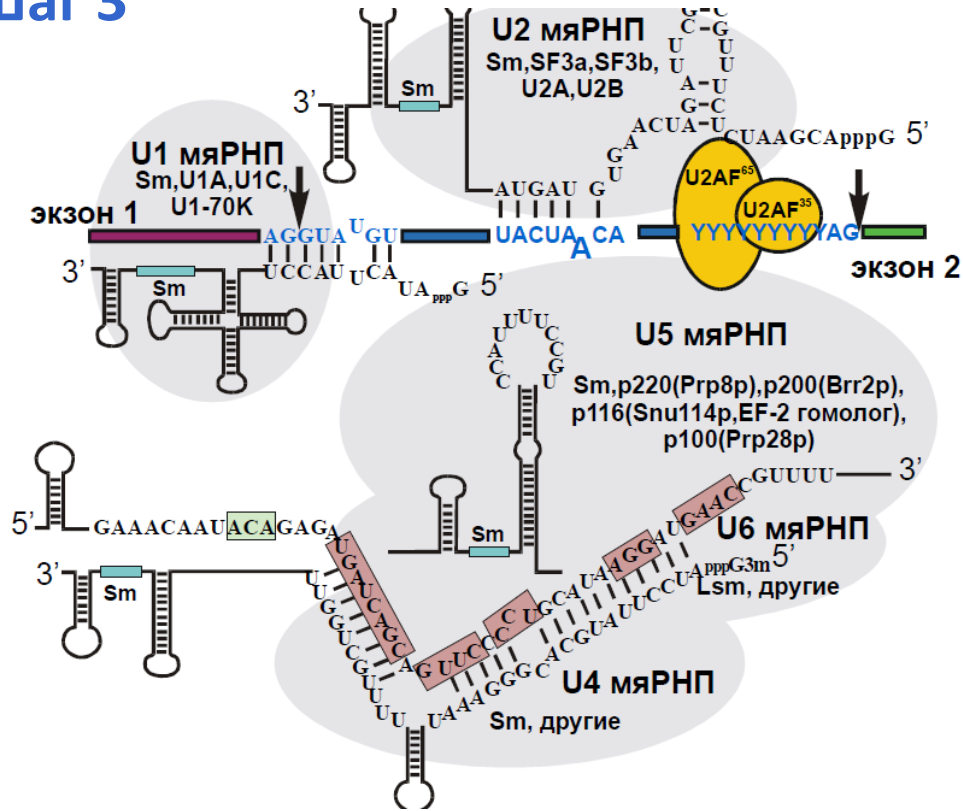
Шаг 2



С сайтом разветвления связывается U2 мЯРНП

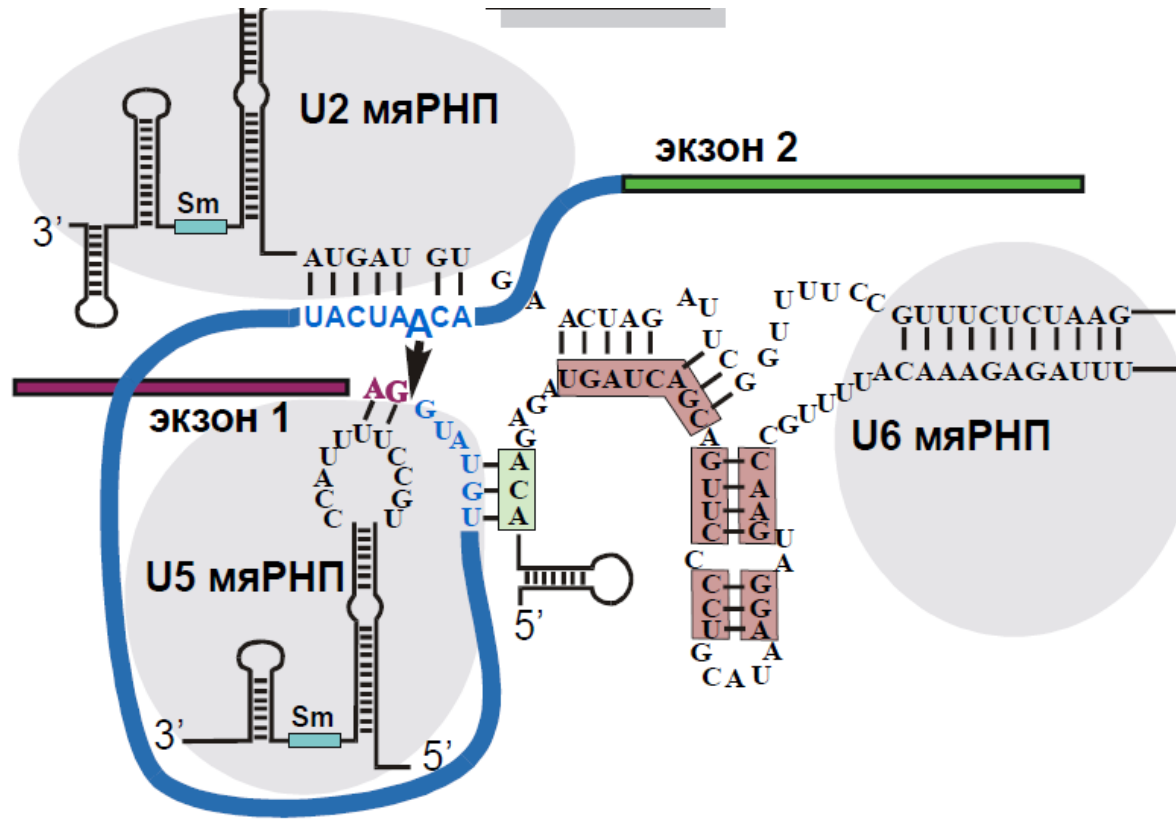
Механизм сплайсинга

Шаг 3

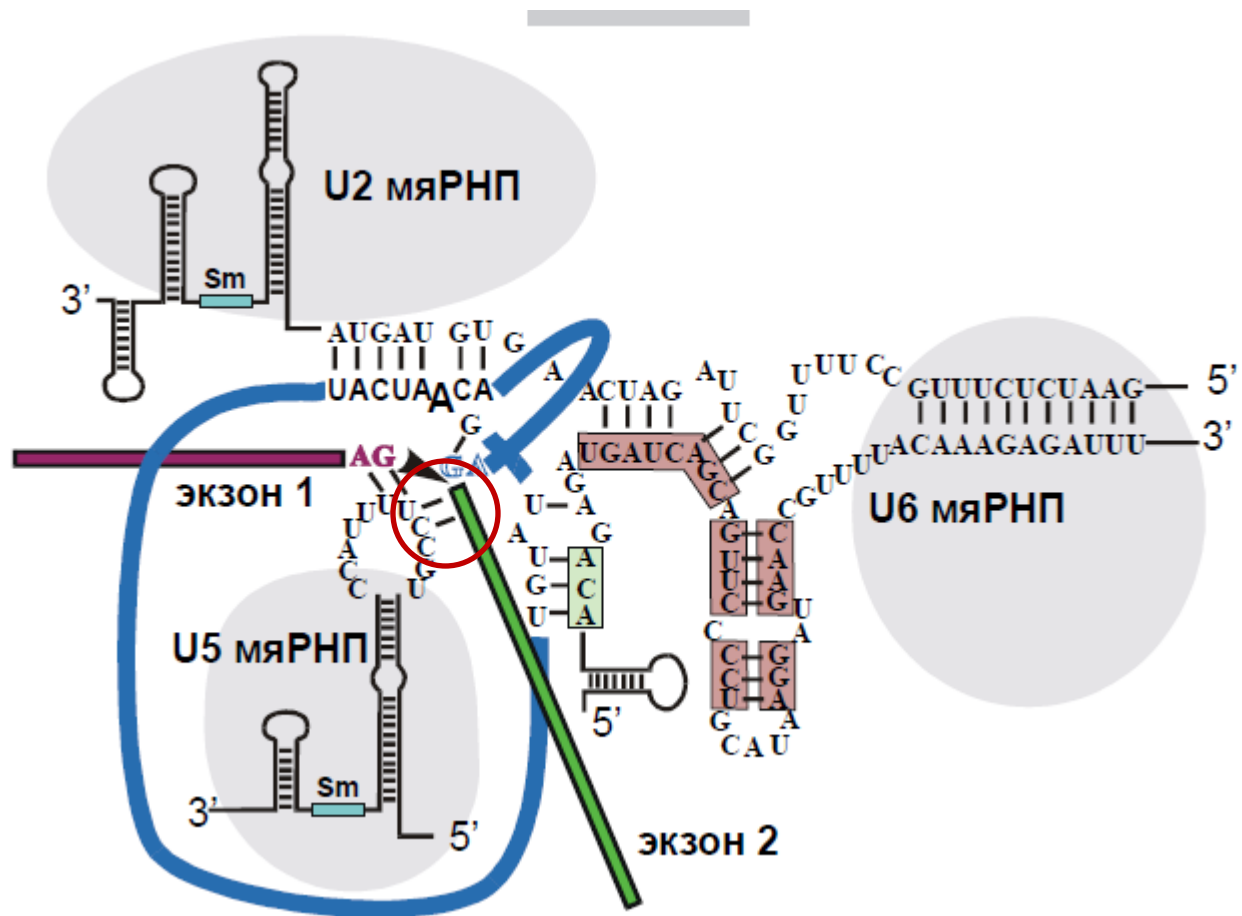


После связывания U2 мЯРНП к сплайсосоме (т.е. комплексу, осуществляющему сплайсинг) присоединяется крупный рибонуклеопротеид, содержащий 3 мЯРНК: U4, U5 и U6

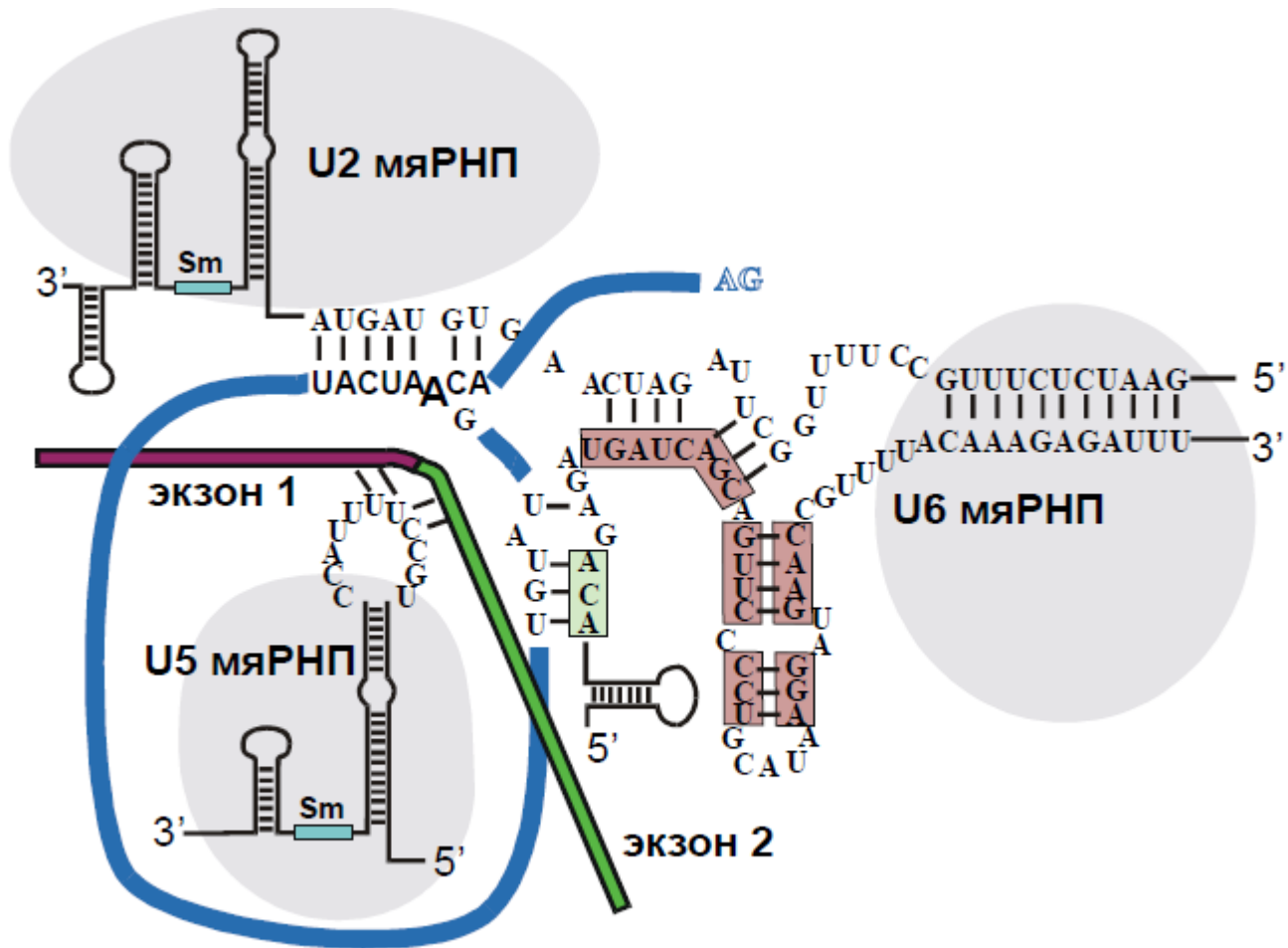
Механизм сплайсинга Шаг 4



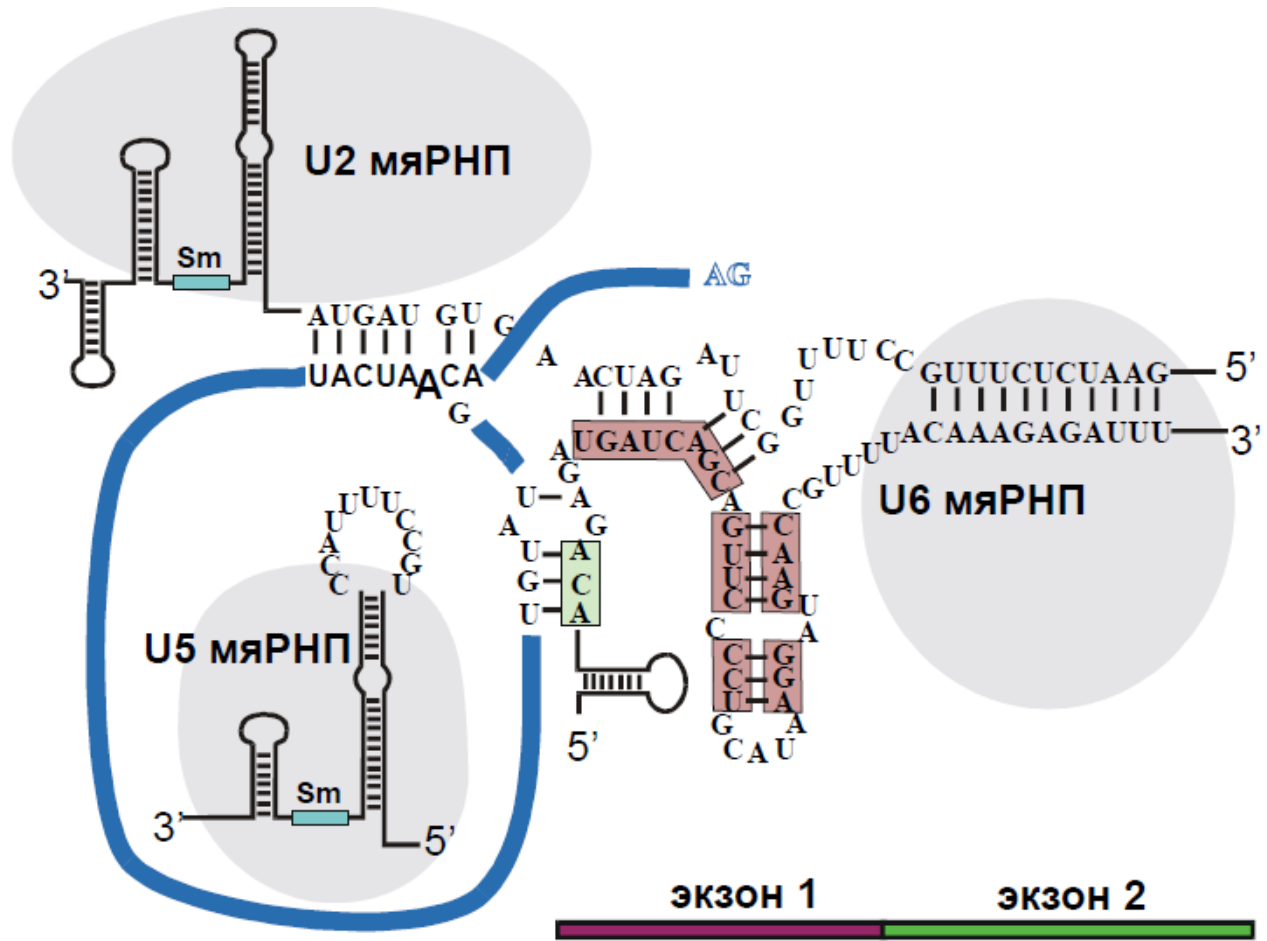
- теряется связь U1 мРНК с 5'SS
- образуется дуплекс между U5 мРНК и 5'SS
- U5 связывает место разветвления и 5'-сайт сплайсинга
- нуклеофильная атака 2'-ОН выпетливающегося аденозина на межнуклеотидную связь 5'SS



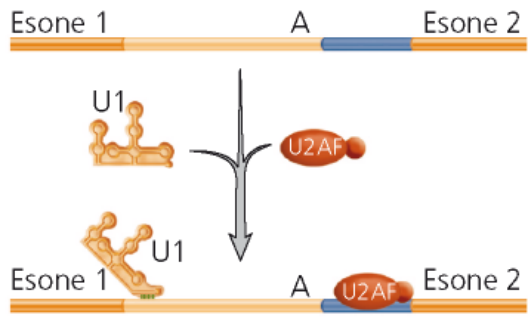
- подстановка 3'SS в активный центр сплайсосомы
- образование лассообразной структуры
- освобождение 3'-гидроксила 5'-концевого экзона



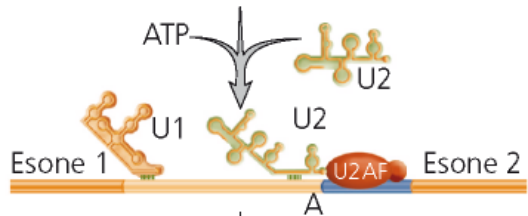
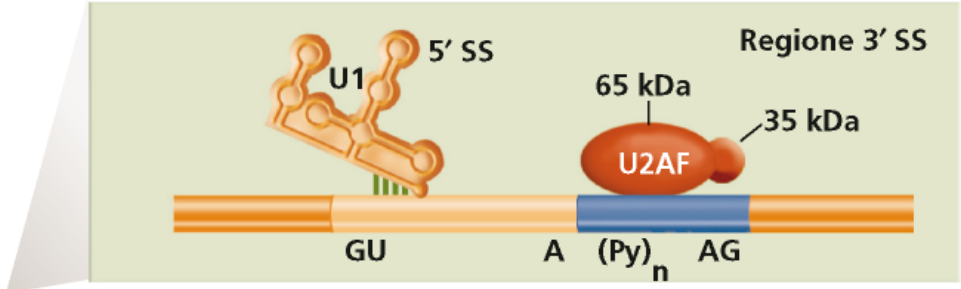
Атака 3'-гидроксила первого экзона на межнуклеотидную связь между интроном и 3'-концевым экзonom
Лигирование экзонов и полное выщепление интрона



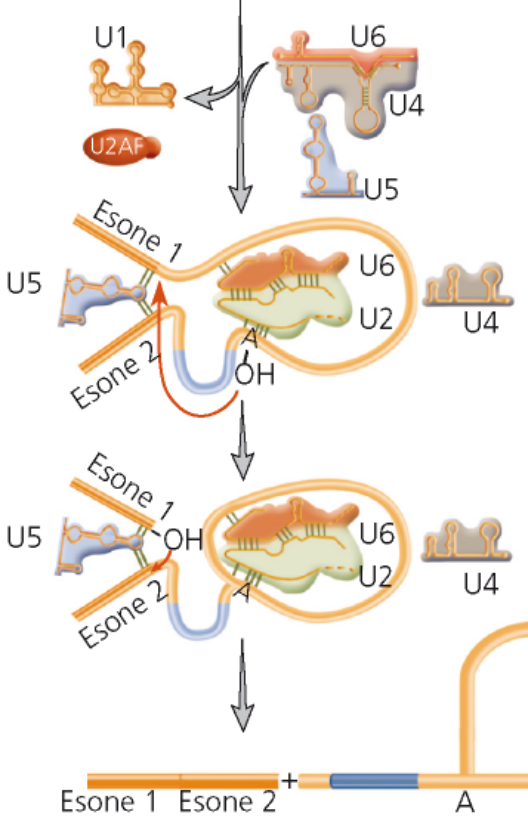
Высвобождение интрона и лигированных экзонов



E



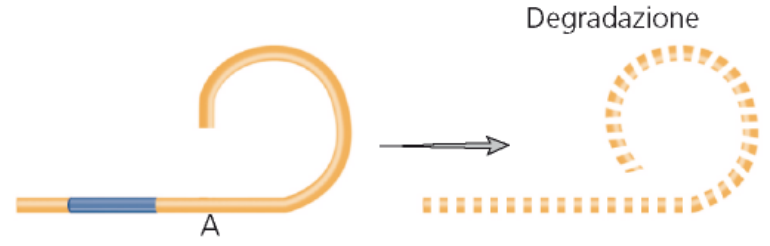
A "Pre-spliceosoma"



B → C "Spliceosoma"

Prima transesterificazione

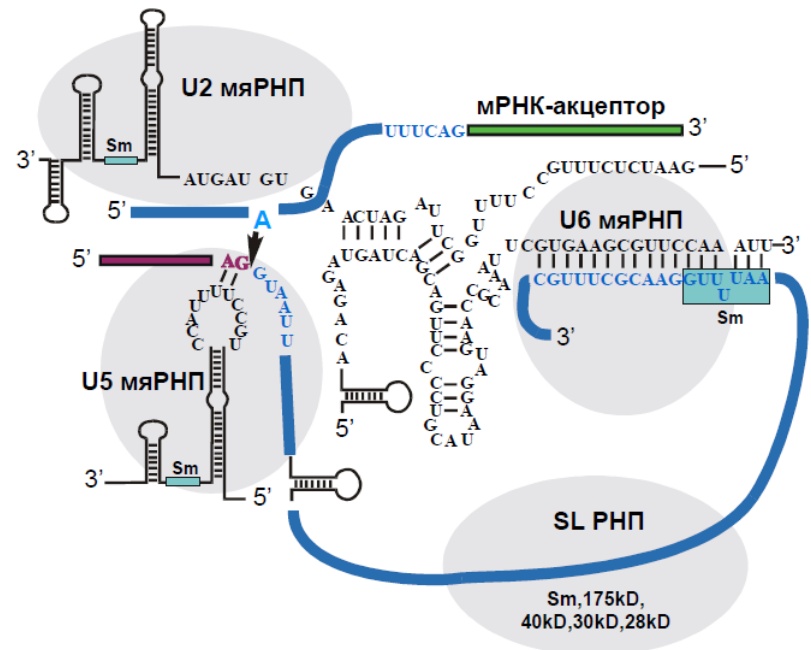
Seconda transesterificazione



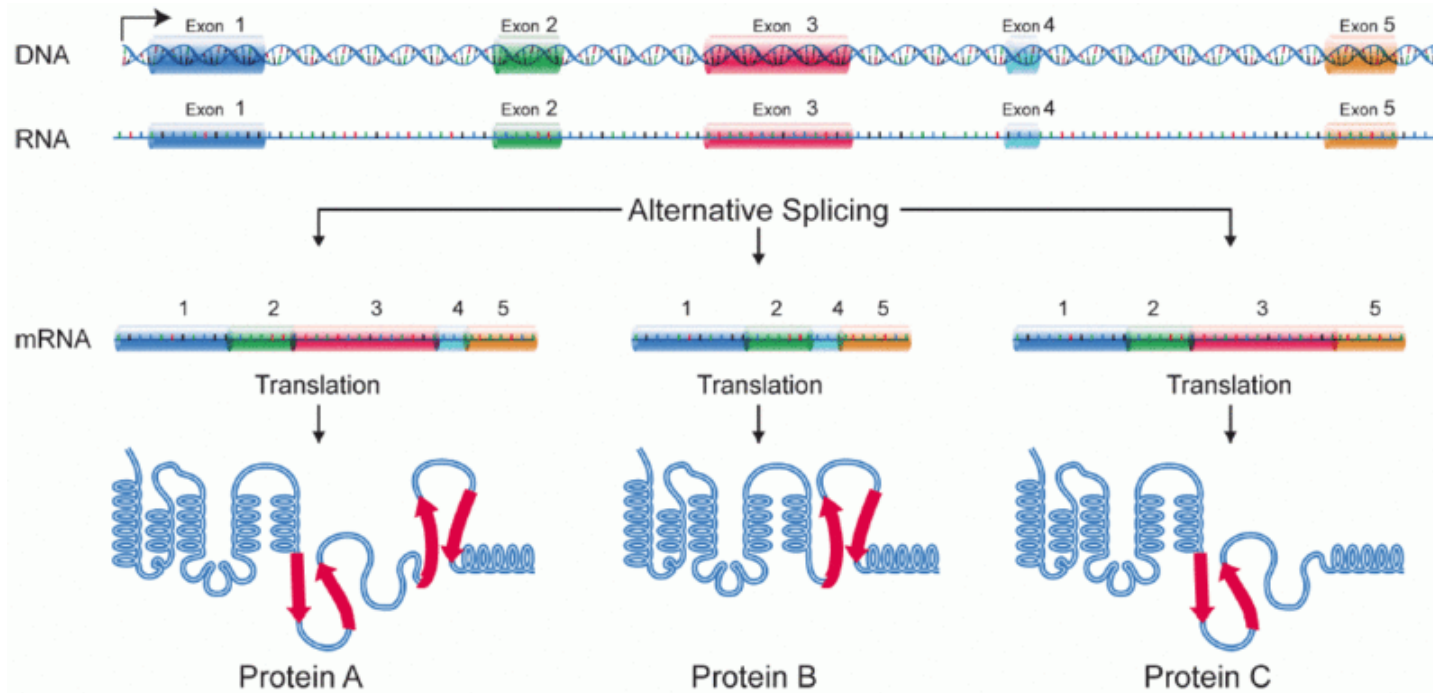
Транс-сплайсинг

Транс-сплайсинг это объединение в одну молекулу мРНК экзонов, находящихся на разных транскриптах

У некоторых организмов, таких, например, как нематода *Caenorhabditis elegans*, у примерно 10% мРНК 5'-концевая часть образуется в ходе транс-сплайсинга, а у трипаносом все мРНК получают в результате этого процесса



Альтернативный сплайсинг

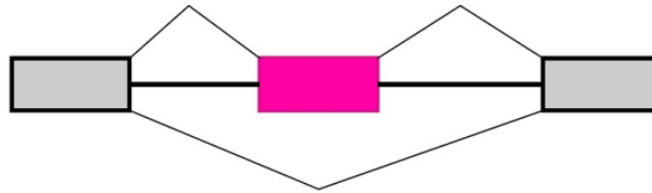


Процесс, в результате которого первичный транскрипт может сплайсироваться разными способами и давать начало разным мРНК, называется

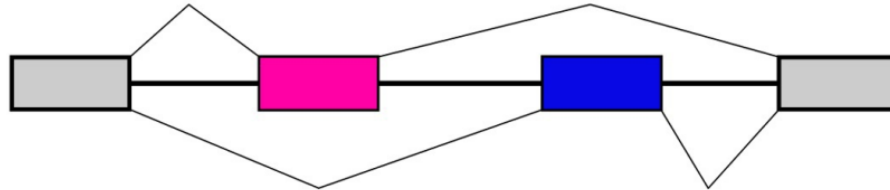
альтернативным сплайсингом

Основные типы альтернативного сплайсинга

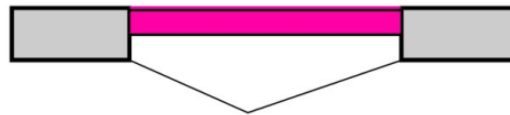
Кассетный экзон



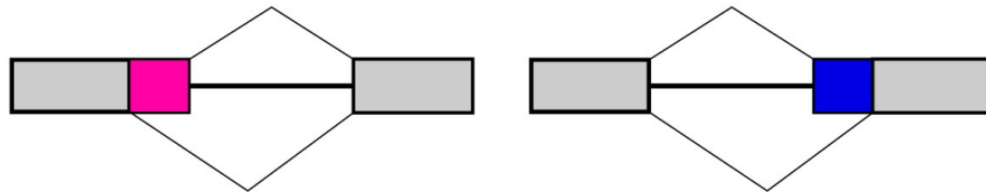
Взаимоисключающие экзоны



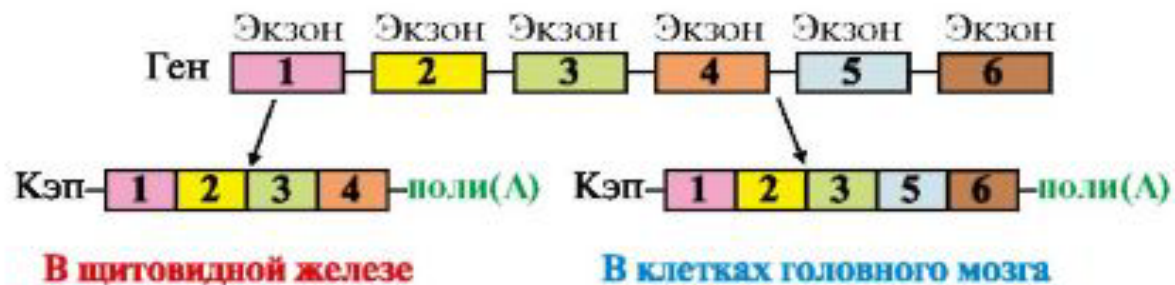
Удержание интрона



Альтернативные 5' или 3' сайты сплайсинга



Сплайсинг пре-мРНК гена кальцитонина в клетках щитовидной железы и мозга



Ген кальцитонина может кодировать гормон **кальцитонин** и относящийся к кальцитониновому гену **пептид альфа**.

- В С-клетках щитовидной железы в результате сплайсинга объединяются **экзоны 1-4**, которые кодируют **кальцитонин**.
- В чувствительных же нейронах процессируется мРНК, где **экзон 4 отсутствует, но добавятся 5 и 6 экзоны**. В результате клетки будут синтезировать уже не кальцитонин, а относящийся к кальцитониновому гену **пептид альфа**.

Значение альтернативного сплайсинга

- **Функциональное:**

- поддержание белкового разнообразия

Человек: ~20.000 генов, >100.000 белков

*Разнообразие белков у млекопитающих повысилось не за счет роста числа генов, а за счет развития **альтернативного сплайсинга** и роста числа **изоформ** – они разные в разных тканях*

- **Эволюционное**

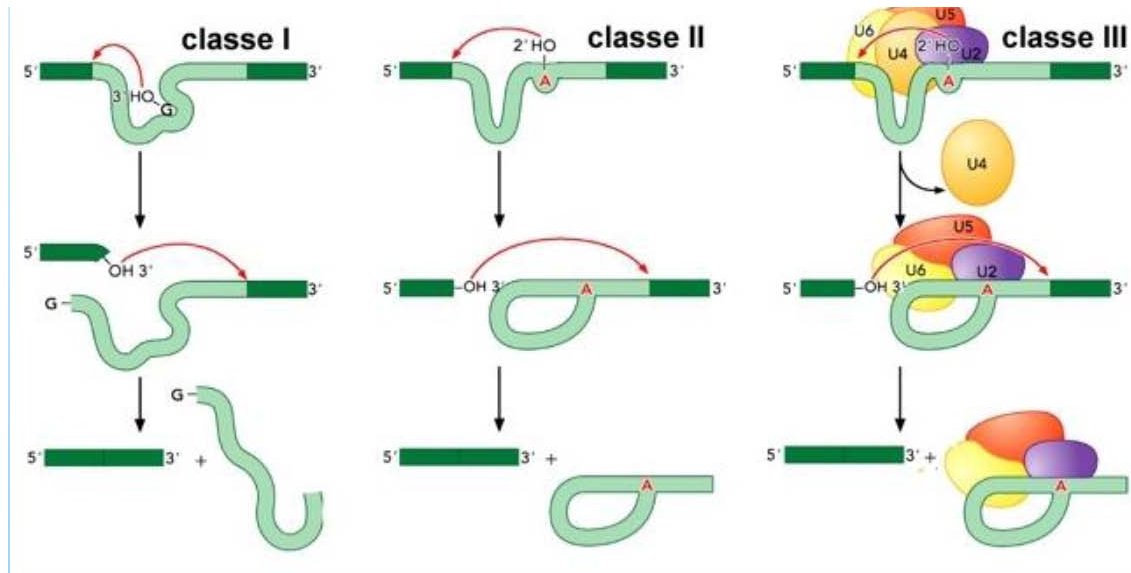
альтернативный сплайсинг – это способ попробовать новые формы белков, не жертвуя старыми

Аутосплайсинг

Аутосплайсинг осуществляется без участия каких-либо белков

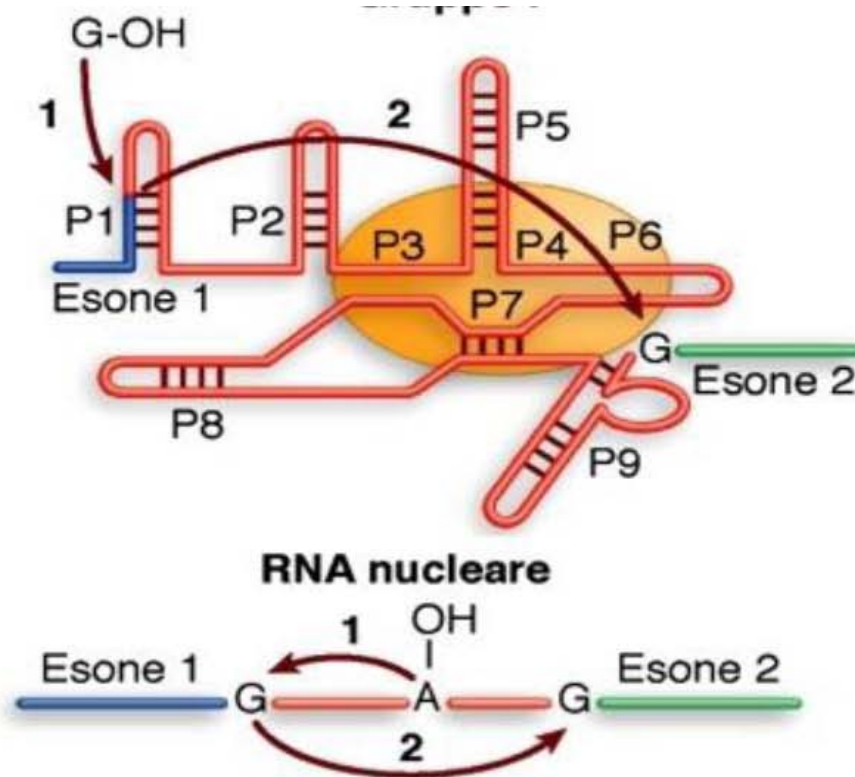
Выявлен для генов рРНК

- у примитивных эукариот (Tetrahymena), мРНК и тРНК
- митохондрий и хлоропластов

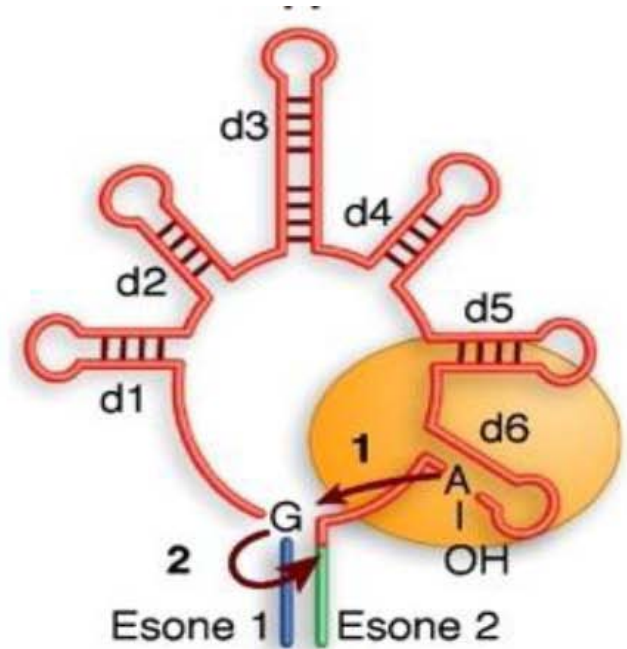


Аутосплайсинг

Интроны класса I



Интроны класса II



Редактирование РНК

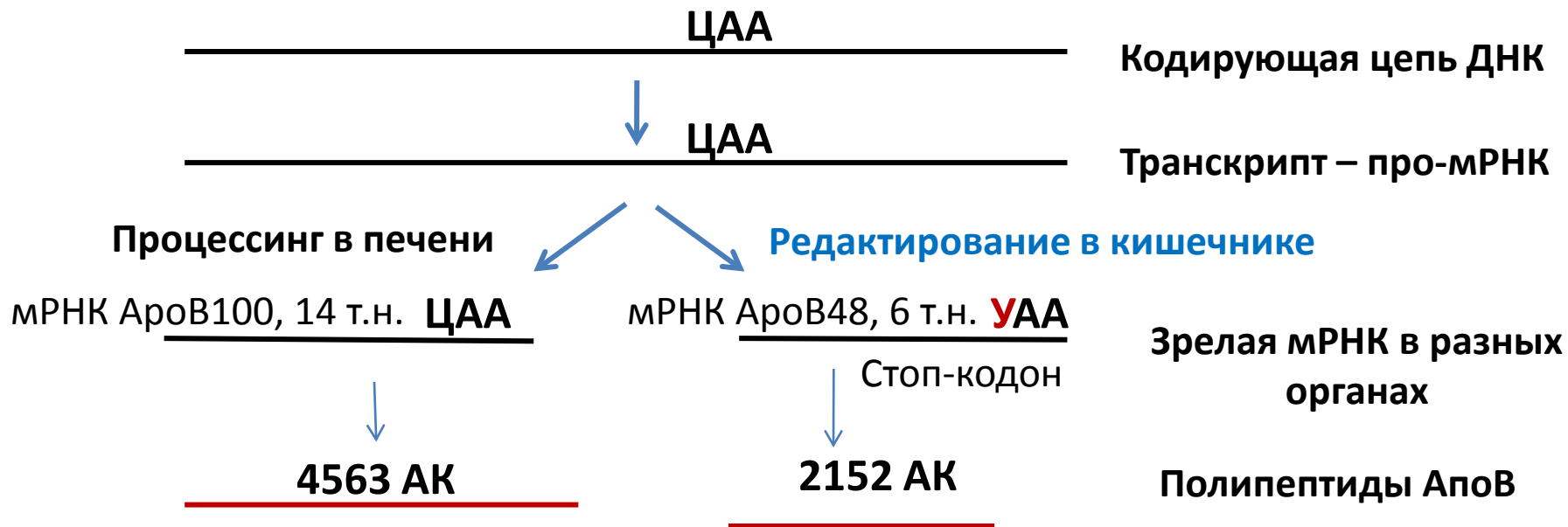
Редактирование - это изменение нуклеотидной последовательности РНК

Редактирование РНК включает

- **модификацию азотистых оснований, например, дезаминирование цитозина (С) в уридин (U), аденозина (А) в инозин,**
- **вставка нуклеотидов без ДНК-матрицы**

Тканеспецифичное редактирование мРНК аполипопротеина В у человека

Ген ApoB – 29 экзонов, 43 т.п.н.



ApoB 100 участвует в транспорте эндогенно синтезированных триглицеридов и холестерина

ApoB48 участвует в транспорте жиров, поступающих с пищей и всасывающихся в кишечнике;
нет С-концевого домена, который отвечает за связывание с рецептором липопротеидов низкой плотности

Ген фермента цитидиндезаминазы, которая дезаминирует Ц в У, экспрессируется только в тонком кишечнике

Отличия транскрипции у про-и эукариот

	Прокариоты	Эукариоты
РНК-полимераза	1	3 ядерные 1 митохондриальная 1 хлоропластов
Единица транскрипции	оперон	Ген (кроме рРНК)
Кэпирование Полиаденилирование	нет	мРНК
Сплайсинг	нет	мРНК, тРНК
Разрезание первичного транскрипта и удаление спейсеров	рРНК, тРНК	рРНК, тРНК
Сопряженность транскрипции и трансляции	да	нет