

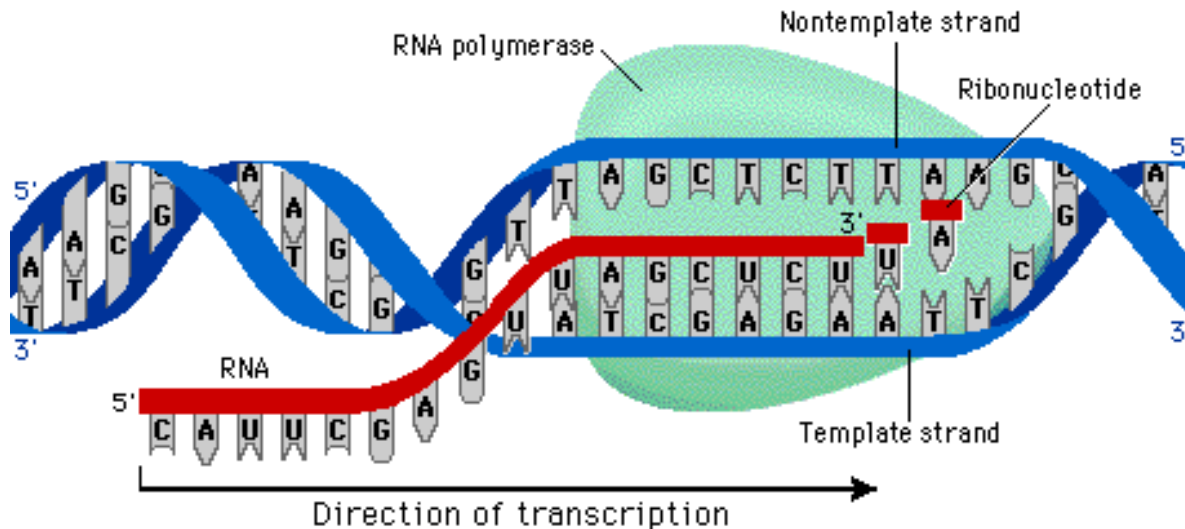
Курс молекулярной биологии

Тема лекции

**Общие принципы процесса транскрипции.
Транскрипция у прокариот. Регуляция экспрессии
генов на уровне транскрипции.**

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

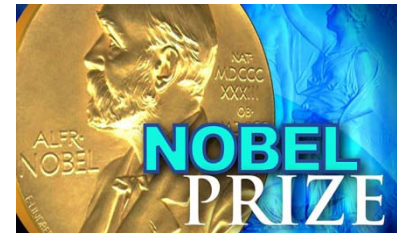
От лат. transcriptio — переписывание — процесс переноса генетической информации от ДНК к РНК



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

Открытие процесса транскрипции

- Э. Волкин и Л. Астрахан в 1956 г. обнаружили, что при заражении бактериальных клеток бактериофагом T2 последние начинают синтезировать новые типы РНК, комплементарные ДНК бактериофага
- В 1959 году Северо Очоа получил Нобелевскую премию по медицине за открытие механизма синтеза РНК.
- Новый тип РНК назван матричной или информационной (Сидней Бреннер, Франсуа Жакоб и Мэтью Мезельсон 1961 г.)
- РНК-полимераза у бактерий была открыта независимо Сэмом Вайссом и Джерардом Харвицем в 1960 г.



за

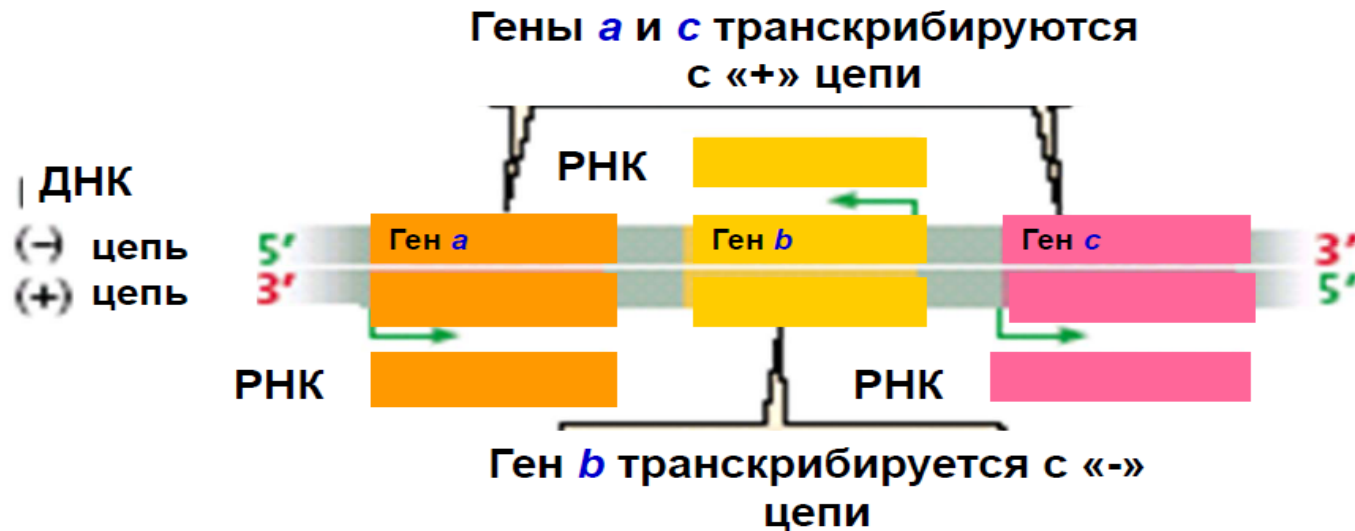
Общие принципы процесса транскрипции

- 1. Комплементарность**
- 2. Антипараллельность**

РНК синтезируется
комплементарно и
антипараллельно
транскрибируемой цепи ДНК

- 3. Униполярность** – Рост цепи РНК идет только в направлении 5' - 3'
- 4. Беззатравочность** – Для начала синтеза РНК фермент не нуждается в поли- или олигонуклеотидной затравке
- 5. Асимметричность** — транскрибироваться могут обе нити ДНК (в противоположных направлениях), но в каждом отдельном опероне только одна из них

Асимметричность – транскрибироваться могут обе нити ДНК, но, в каждом отдельном опероне только одна из них



Кодирующая (смысловая,) «+»цепь ДНК,— одна из цепей двухцепочечной молекулы ДНК, нуклеотидная последовательность которой идентична мРНК, транскрибированной с комплементарной антисмысловой цепи («-»цепь).

Транскрипция у прокариот

ПРОДУКТЫ ТРАНСКРИПЦИИ ПРОКАРИОТ

- Матричные РНК (мРНК)
- Рибосомальные РНК (рРНК)
- Транспортные РНК (тРНК)

Транскрипция у прокариот

- Единицей транскрипции у прокариот является **оперон**
- Концепцию оперона для прокариот предложили в 1961 году французские ученые Жакоб и Моно, за что получили Нобелевскую премию в 1965 году.
- **Оперон** – это последовательность ДНК, ограниченная **промотором** и **терминатором**, кодирующая одну молекулу мРНК и контролируемая **оператором**
- **Цистрон** – это структурный ген прокариот
- Опероны по количеству **цистронов** делят на моно-, полицистронные, содержащие, соответственно, только один или много цистронов



РНК-полимераза прокариот

Существует две формы РНК-полимеразы:
кор- и холофермент

Core-фермент состоит из субъединиц $2\alpha, \beta, \beta', \omega$

- Две α -субъединицы - каркас РНК-полимеразы
- β' -субъединица отвечает за прочное связывание с ДНК за счет кластера положительно заряженных аминокислот
- В β - субъединице находятся два каталитических центра. Один отвечает за **инициацию**, а другой - за **элонгацию**. Один центр работает в *holo-*, а другой - в *core-* ферменте
- Субъединица ω восстанавливает денатурированную РНК-полимеразу обратно в дееспособную форму *in vitro*. Также обнаружено ее защитное/шаперонное действие на β' -субъединицу

σ- фактор - сменный фактор специфичности

- **σ-субъединица** играет центральную роль в узнавании промоторов, плавлении ДНК и последующем уходе РНК-полимеразы с промотора
- В клетках *E. coli* имеется семь различных **σ-факторов**, каждый из которых обеспечивает узнавание промоторов с определенными последовательностями (т.е. определенные опероны или отдельные гены)

Нolo-фермент (полный фермент) – это

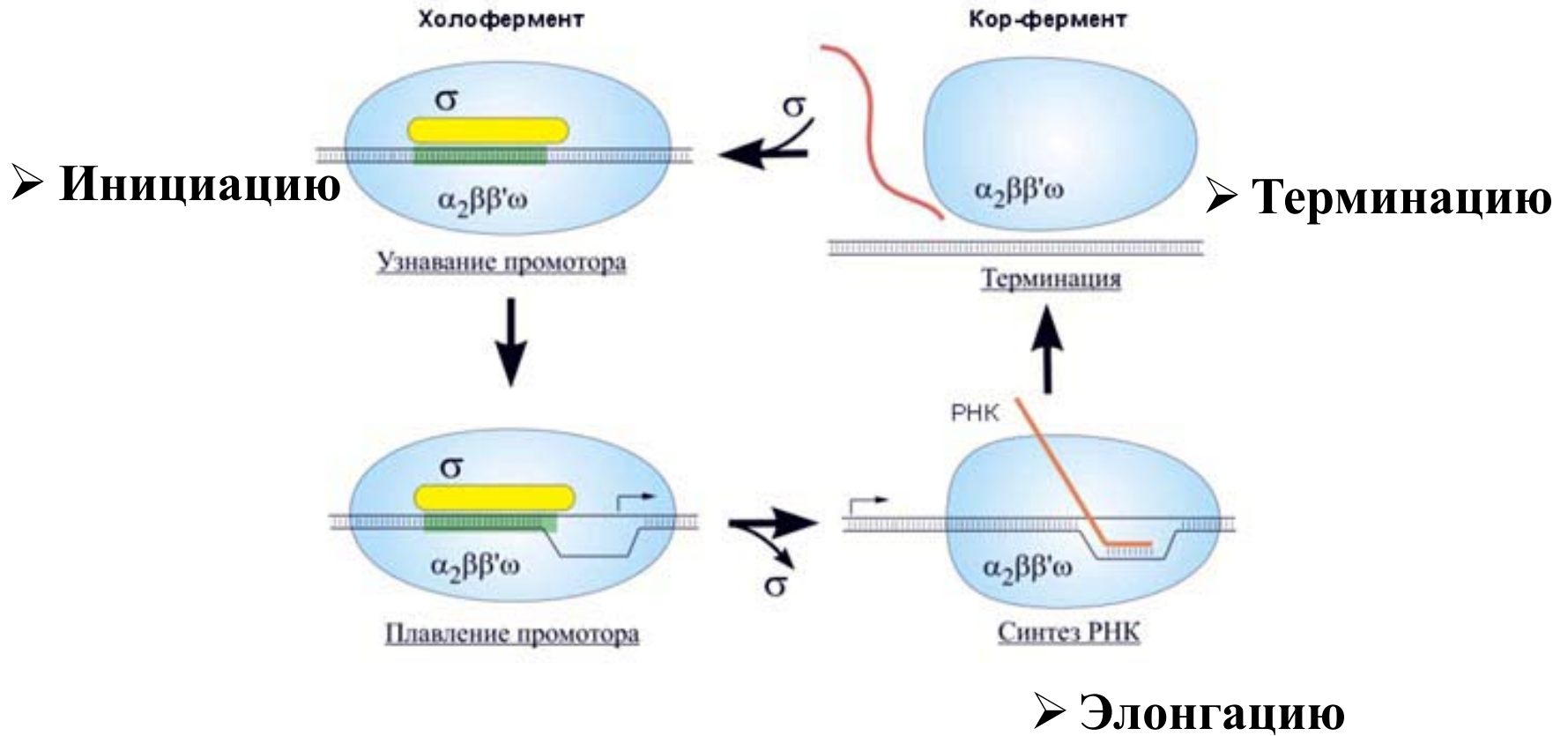
core-фермент + **σ- фактор** =

2α, β, β' ω σ

- Кор- фермент РНКП обладает каталитической активностью, но не способен к инициации транскрипции.
- Для узнавания специфических последовательностей ДНК (промоторов) необходимо присоединение фактора инициации - σ -субъединицы, - и образование холофермента РНК-полимеразы.

Процесс транскрипции подразделяется на

Общая схема транскрипционного цикла



Инициация транскрипции

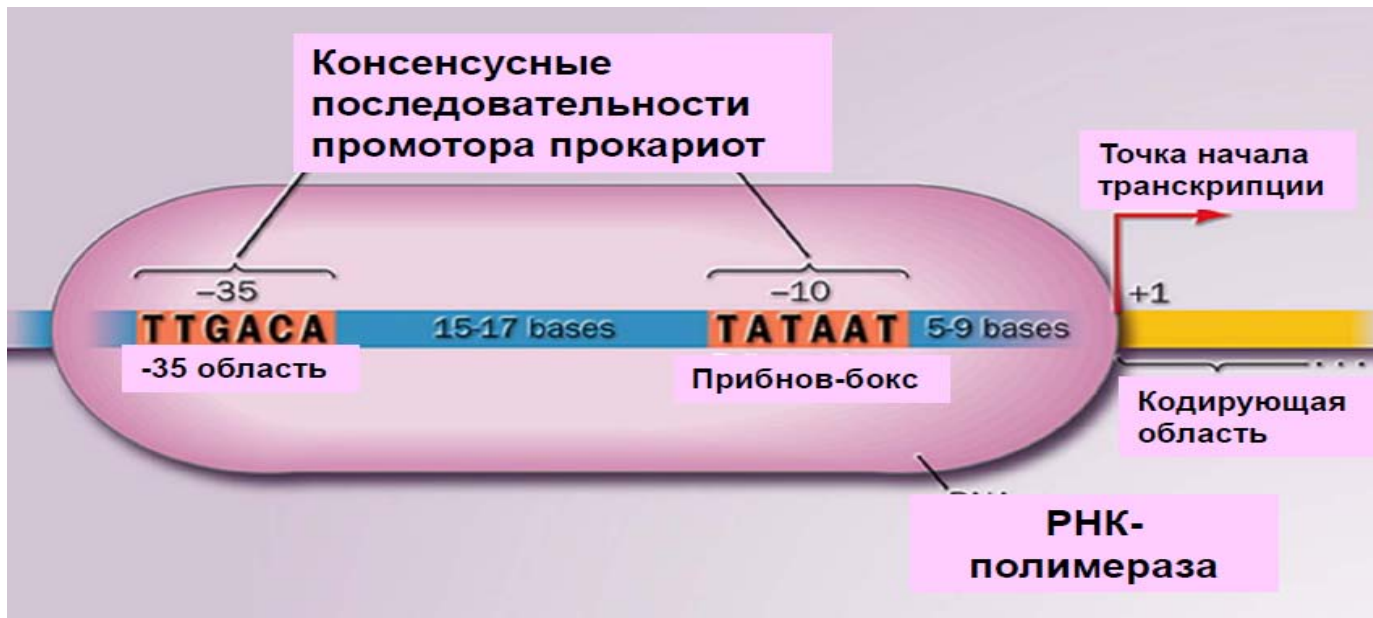
Необходимо:

- ✓ холофермент,
- ✓ нуклеозидтрифосфат (всегда АТР или ГТР)
- ✓ наличие специального участка в ДНК - *промотора*

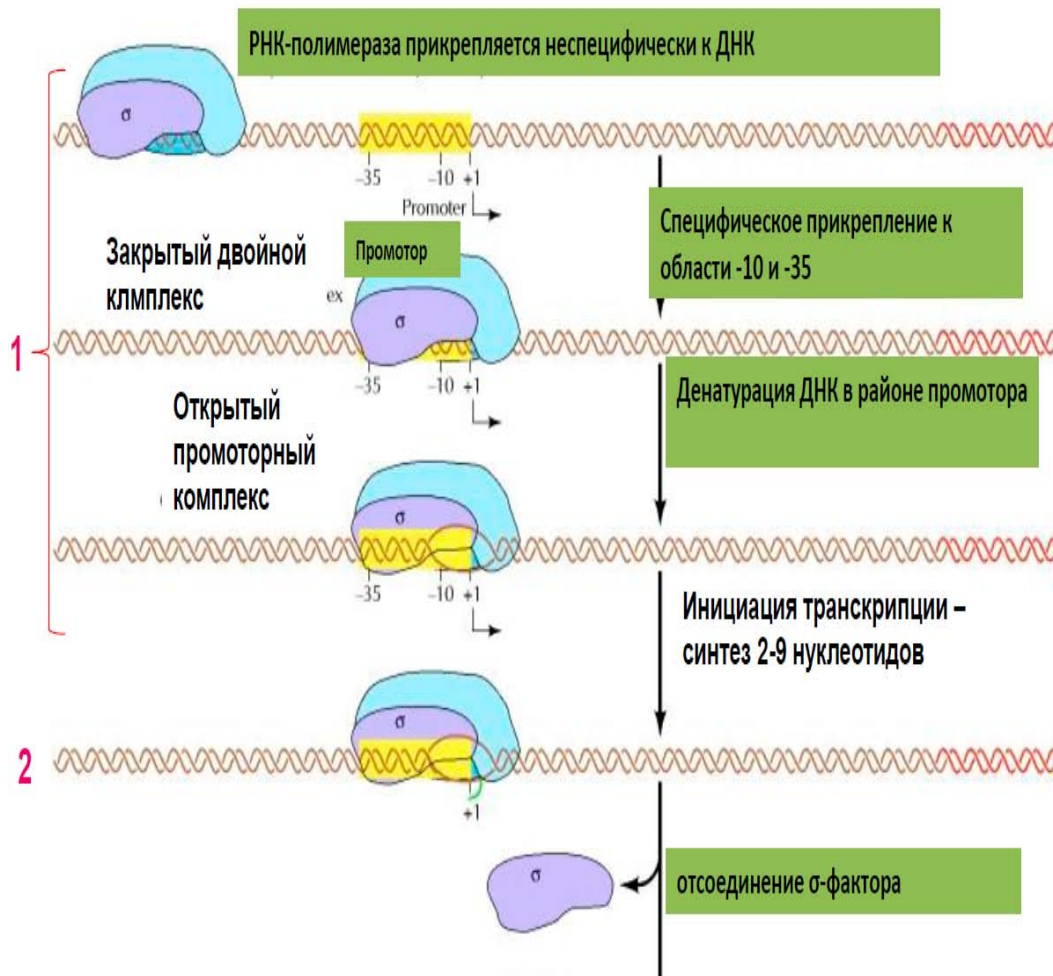
Промотор - предшествующая гену последовательность нуклеотидов, которую узнает фермент РНК-полимераза

Особенности бактериальных промоторов:

- Наличие стартовой точки транскрипции (обозначается +1, нуклеотиды слева обозначаются «-», справа «+»)
- ТАТА-бокс (Прибнова) последовательность 5'-ТАТААТ-3' , начиная с положения -10 - присутствуют почти у всех промоторов. С этой последовательностью связывается σ -субъединица РНК-полимеразы.
- Последовательность 5'-ТТГАСА-3', начиная с положения -35 - место посадки σ -субъединицы РНК-полимеразы.
- Расстояние, разделяющее последовательности -10 и -35 составляет 16 - 18 п.н. в 90% случаев, что согласуется с формой РНК-полимеразы.



Узнавание промоторов РНК-полимеразой и инициация транскрипции



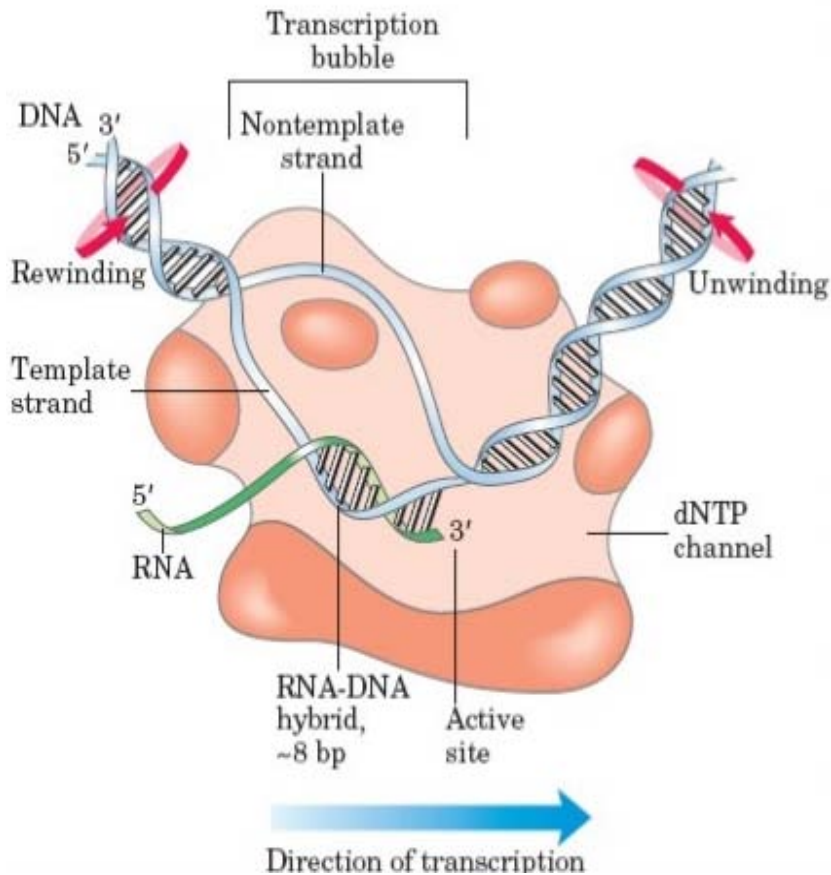
Закрытый промоторный комплекс - ДНК остается в ds виде

Локальное плавление ДНК и образование открытого комплекса

Разрыв контактов с промотором сопровождается диссоциацией σ -субъединицы и переходом транскрипции в стадию элонгации

Элонгация транскрипции у прокариот

- отделение сигма-фактора
- первая транслокация молекулы фермента вдоль матрицы
- стабилизация транскрипционного комплекса, который кроме РНК-полимеразы включает растущую цепь РНК и транскрибируемую ДНК



На стадии элонгации корфермент РНК-полимеразы осуществляет поэтапное присоединение нуклеотидов, комплементарных матричной цепи ДНК

Комплекс РНКП с ДНК и синтезируемой РНК называется **элонгационный комплекс (ЭК)**

РНК-полимераза обеспечивает высокую точность синтеза

- **эффективная дискриминация правильных и неправильных субстратов в процессе присоединения нуклеотидов к 3'-концу РНК**
- **детекция неправильно присоединенного к 3'-концу РНК нуклеотида**
- **удаление неправильного нуклеотида (или нескольких нуклеотидов) за счет реакции расщепления РНК**

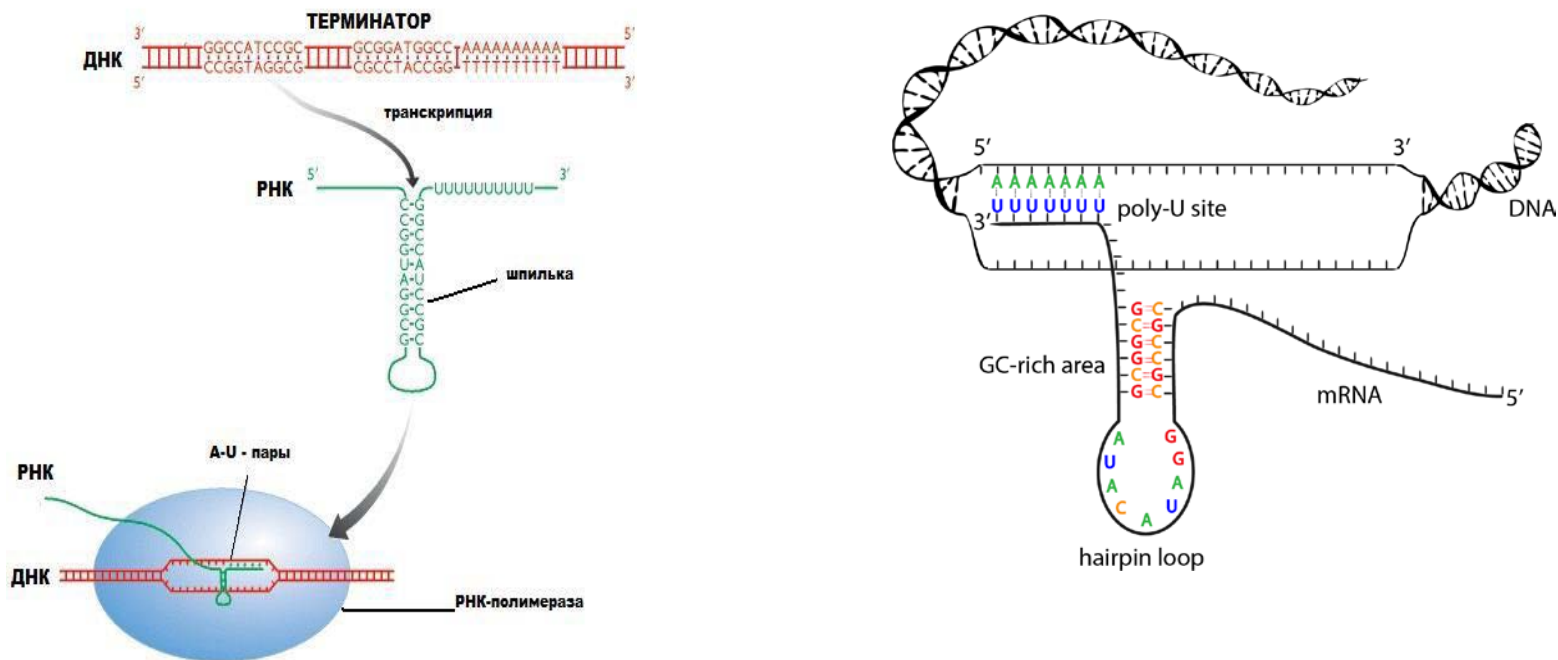
Терминация транскрипции

Терминатор – участок гена, на котором происходит завершение транскрипции

Терминаторы необходимы

- для разграничения независимо транскрибируемых областей
- являются важными элементами в процессах регуляции транскрипции

ρ-независимая терминация



Классический терминатор ρ-независимого пути представляет собой G/C-богатую РНК-шпильку и следующую за ней олиго-U последовательность

Синтез примерно 80% транскриптов *E.coli* terminates по ρ-независимому пути

Rho (ρ)-зависимый путь

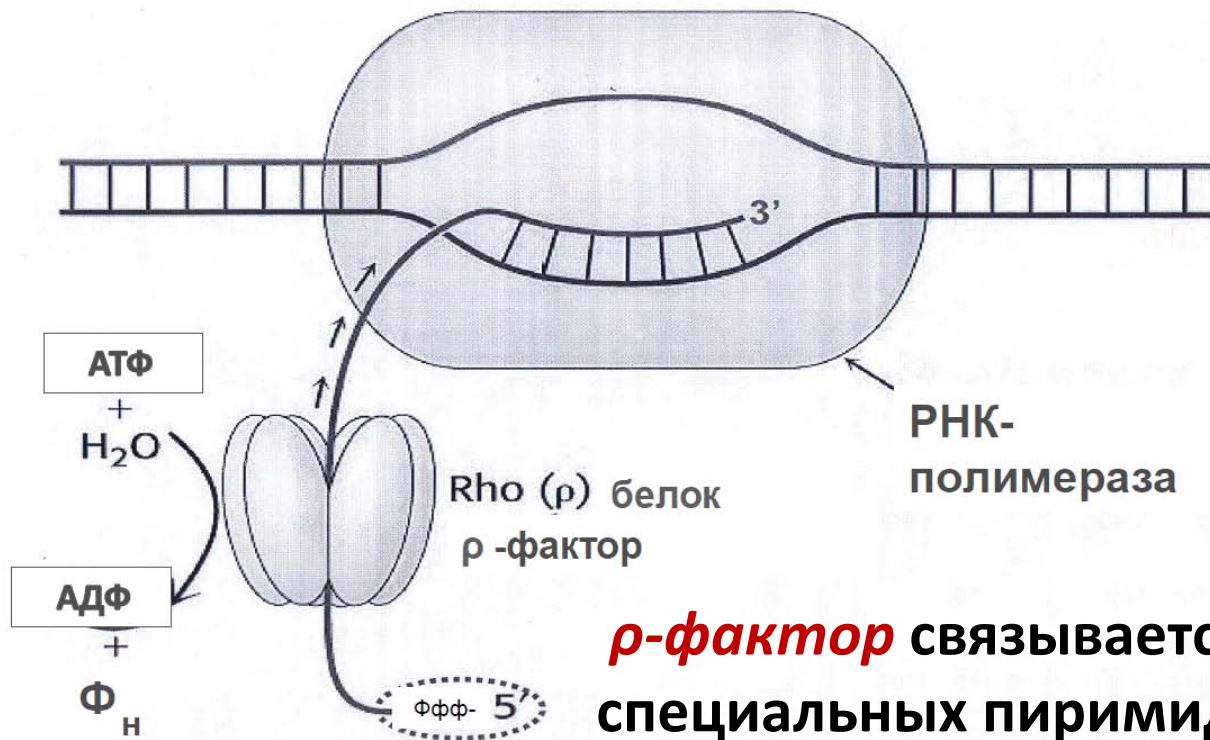
ρ -фактор – гомогексамерный белок

Имеет АТФ-зависимые активности

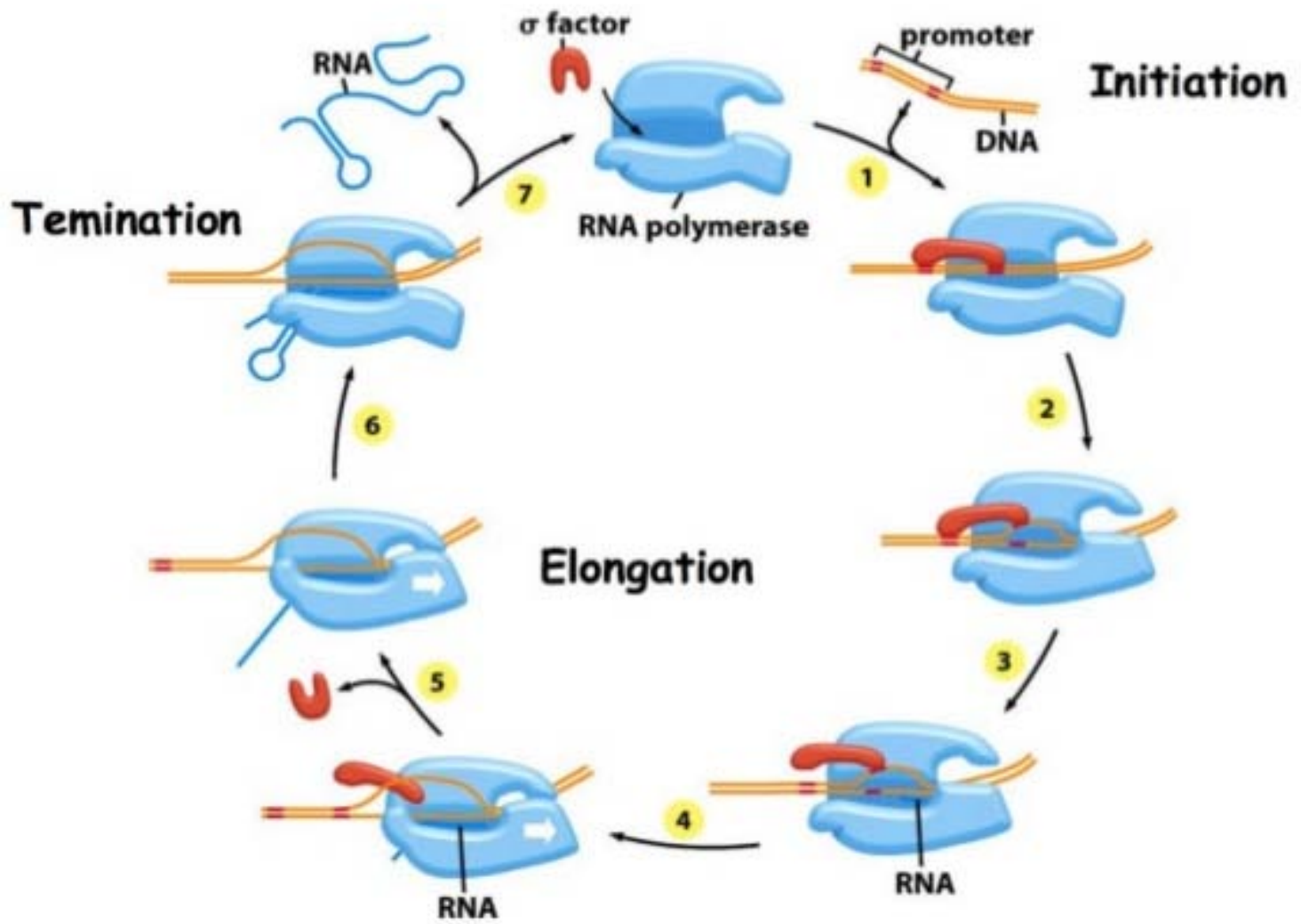
- транслоказную
- хеликазную

rut (Rho utilization) – сайт связывания ***ρ -фактора*** с транскрибируемой РНК

ρ-зависимая терминация транскрипции



ρ-фактор связывается с РНК в специальных пиримидин-богатых rut-сайтах, и, за счет транслоказной активности, движется в направлении 3'-конца молекулы, пока не догонит РНКП. После этого происходит диссоциация элонгационного комплекса.



Регуляция экспрессии генов у прокариот

Структурные гены делятся на:

- ***Конститутивные*** гены – транскрипция таких генов происходит постоянно и не требует регуляции
- ***Индукцибельные*** гены – транскрипция этих генов регулируется с помощью специальных белков-регуляторов (репрессоров или активаторов)

Регуляция на уровне транскрипции:

- за счет ***модификации структуры РНК-полимеразы*** (например, ее β -субъединицы) изменяется способность РНК-полимеразы к связыванию с промотором и скорость транскрипции соответствующих генов.
- ***изменение пространственной структуры ДНК***, что влияет на способность РНК-полимеразы связываться с определенными промоторами и инициировать синтез РНК.
- ***ингибирование или стимулирование взаимодействия РНК-полимеразы с промоторами при участии регуляторных белков – репрессоров и активаторов.***

Существуют два типа регуляции экспрессии генов — позитивная и негативная

- **Негативная** регуляция инициации транскрипции, или репрессия, осуществляется **белками-репрессорами**, которые связываются с операторами. Поскольку последовательности оператора и промотора часто перекрываются, связывание репрессоров со своими операторами ограничивает доступ РНК-полимеразы к промотору, подавляя тем самым инициацию транскрипции.
- **Позитивная** регуляция может осуществляться путем связывания **активаторных белков** с нуклеотидными последовательностями, расположенными в области промотора. Связанный активаторный белок способствует ассоциации РНК-полимеразы с промотором и, следовательно, увеличивает вероятность инициации транскрипции.

Концепция оперона в регуляции экспрессии генов у прокариот

Оперон — регулируемая единица транскрипции - это последовательность специальных функциональных сегментов ДНК, а также структурных генов, которые кодируют и регулируют синтез определенной группы белков одной метаболической цепи.

Оперон состоит из следующих структурных частей

- **Промотор** — участок ДНК, к которому присоединяется РНК-полимераза и начинается транскрипция
- **Оператор** — участок промотора, связывающий белок-регулятор.
 - В случае негативных регуляторов, оператор, как правило, располагается непосредственно за промотором или перекрывается с ним.
 - В случае позитивных регуляторов (активаторов) оператор обычно располагается перед промотором.

Оперон состоит из следующих структурных частей

Структурные гены (цистроны) — участки ДНК, кодирующие мРНК конкретных белков

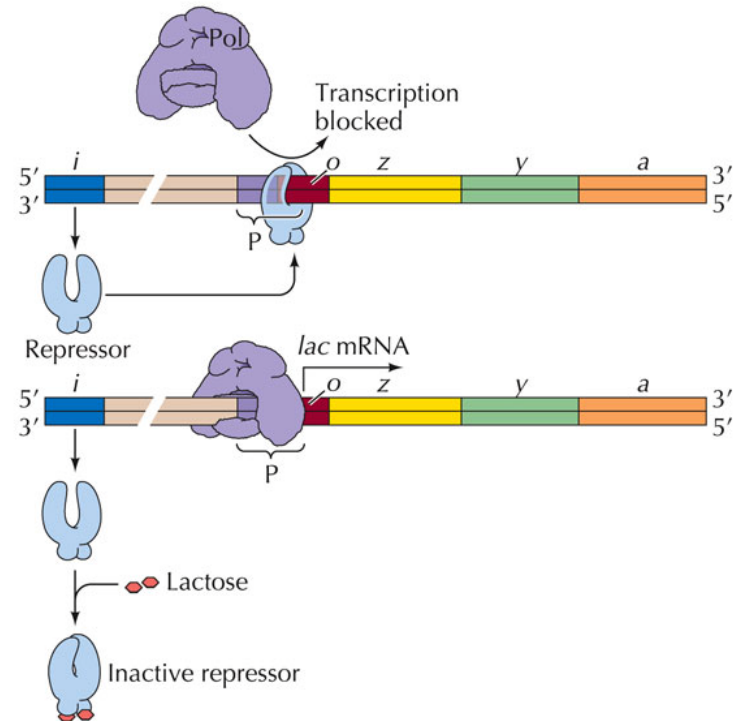
Терминаторный участок ДНК несет сигнал об остановке транскрипции.

Не входит в оперон, но является необходимой частью регуляторной системы ***ген-регулятор***, кодирующий регуляторный белок, связывающийся с оператором.

Результаты связывания регуляторного белка с оператором

В случае репрессоров связывание

- создает стерическое затруднение для связывания РНК-полимеразы с промотором
- препятствует дальнейшему продвижению РНК-полимеразы в тех случаях, когда оператор расположен после промотора



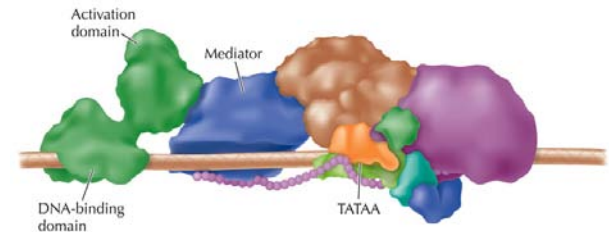
Результаты связывания регуляторного белка с оператором

В случае **активаторов**

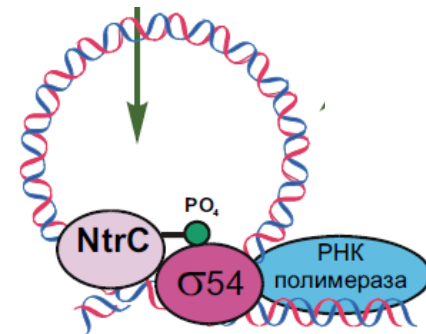
Непосредственное взаимодействие активатора с полимеразой, обеспечивающее более сильное связывание с промоторной областью

Облегчение локального расплетания ДНК в области промотора (необходимого для инициации транскрипции)

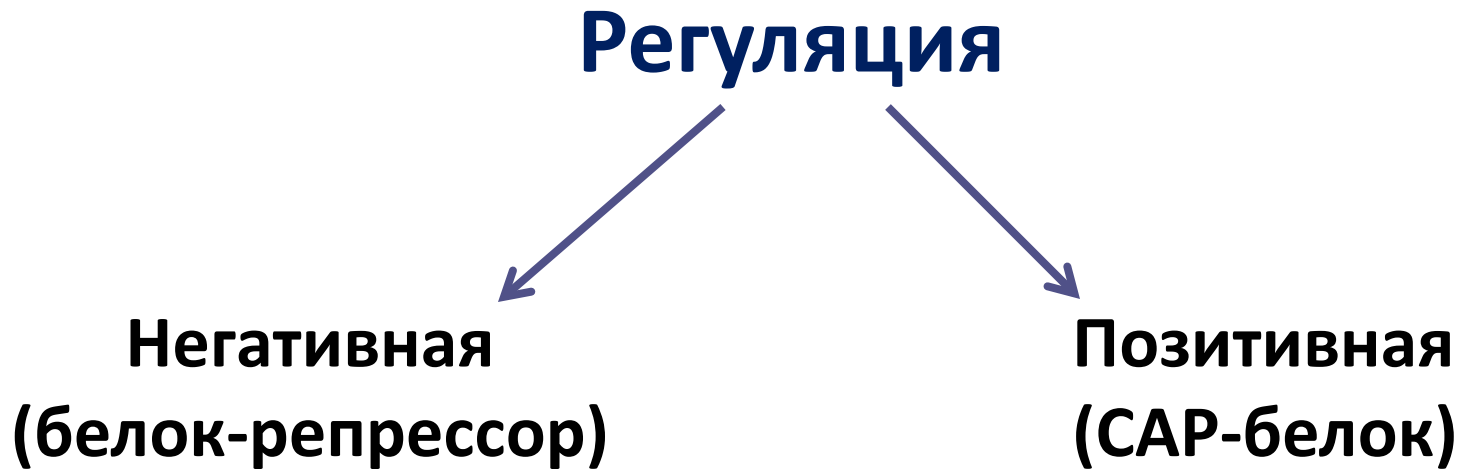
- за счет внесения изгиба в ДНК
- за счет увеличения отрицательной суперскрученности



THE CELL, Fourth Edition, Figure 7.28 © 2005 Garland Science and Elsevier Associates, Inc.

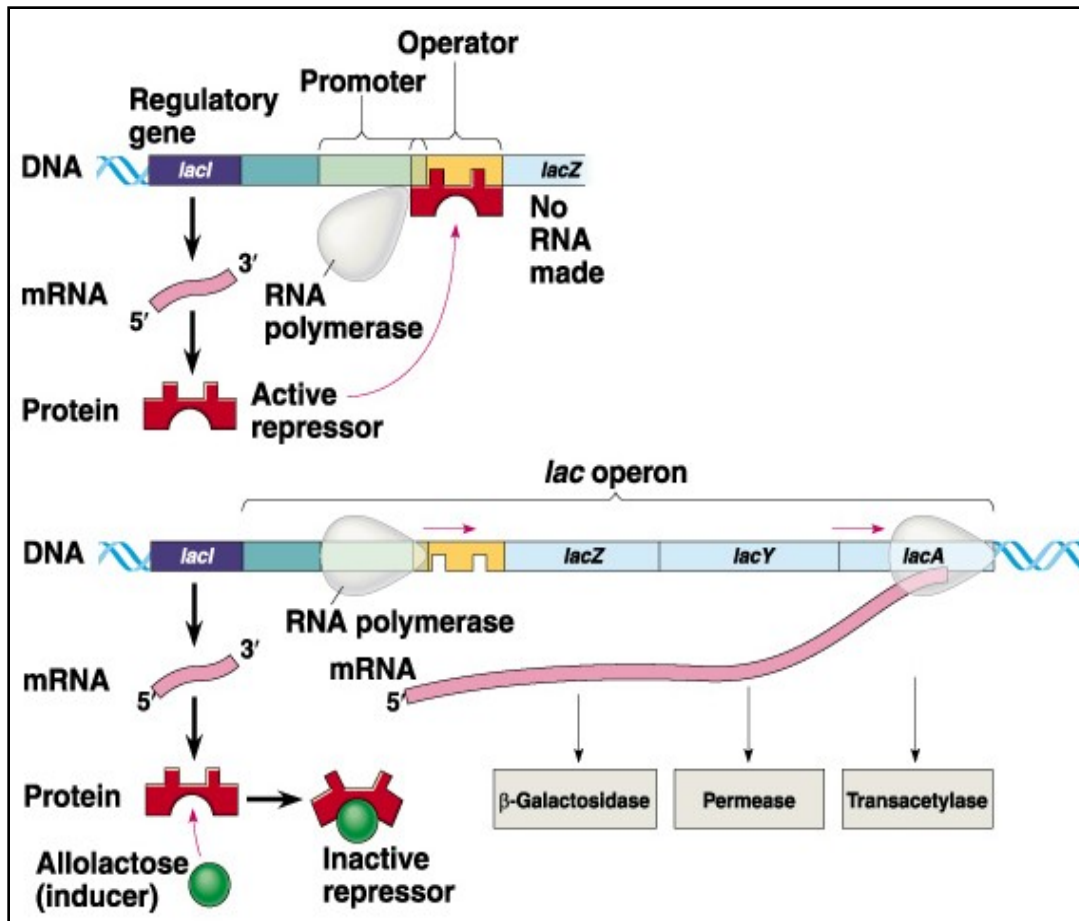


Лактозный оперон



В 1961 г. Франсуа Жакоб и Жак Моно описали ставшую теперь классической модель оперона метаболизма лактозы у кишечной палочки

- **Продукт гена-регулятора Lac-оперона экспрессируется конститутивно**
- **Lac-репрессор — продукт гена-регулятора — обладает высоким сродством к соответствующему оператору**
- **Присоединившись к оператору, репрессор препятствует присоединению РНК-полимеразы**
- **В его присутствии подавляется экспрессия Z, Y и A-генов лактозного оперона**



Ген *LacZ* отвечает за синтез фермент β -галактозидазы, гидролизующего лактозу до галактозы и глюкозы.

Ген *LacY* отвечает за синтез пермеазы, осуществляющей активный транспорт лактозы в клетку.

LacA - кодирует фермент β -галактозид трансацетилазу, переносящий ацетильную группу от ацетил-КоА на β -галактозиды

Негативная индукция - контролирующим транскрипцию фактором является негативный фактор, "выключатель" - белок - репрессор. Индукция (включение) происходит при потере сродства белка - репрессора к оператору.

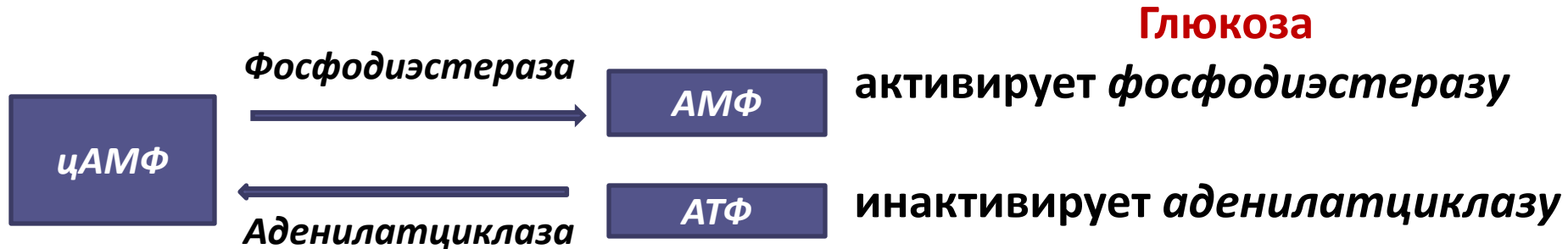
Все три гена лактозного оперона транскрибируются в виде общей **полицистронной** молекулы мРНК, содержащей **независимые для каждого цистрона**

- кодоны начала трансляции (AUG)
- стоп-кодоны (UAA)

Полицистронная мРНК — молекула мРНК, кодирующая аминокислотные последовательности более чем одной полипептидной цепи; образуется при транскрипции двух или нескольких генов, входящих в состав одного оперона

Позитивный контроль работы *lac*-оперона

Катаболитная репрессия — замедление или остановка синтеза ферментов, участвующих в катаболизме.

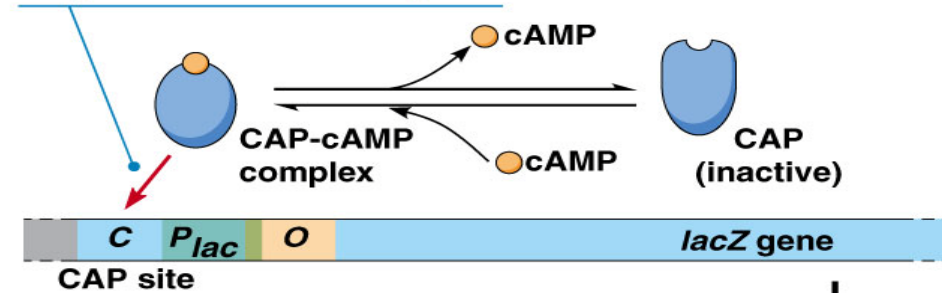


Чем больше ГЛЮКОЗЫ, тем меньше цАМФ

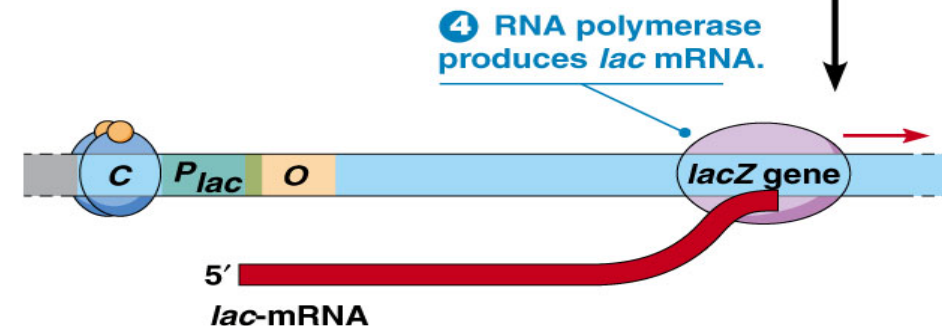
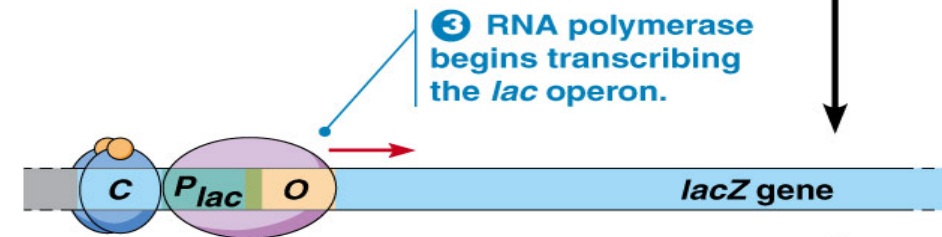
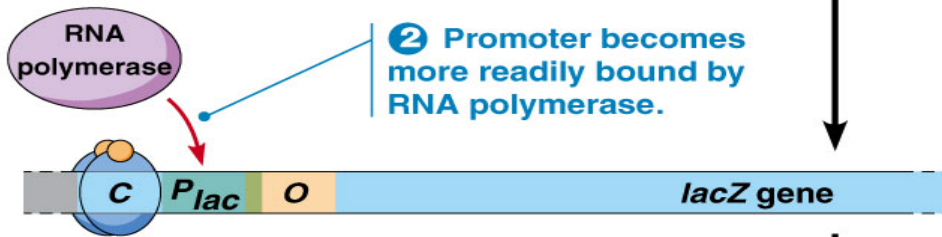
БАК (CAP-англ.) – Белок-Активатор Катаболизма

- активируется при соединении с цАМФ
- комплекс цАМФ + БАК связывается со специфическим сайтом перед промотором
- усиливает транскрипцию в 20 - 50 раз

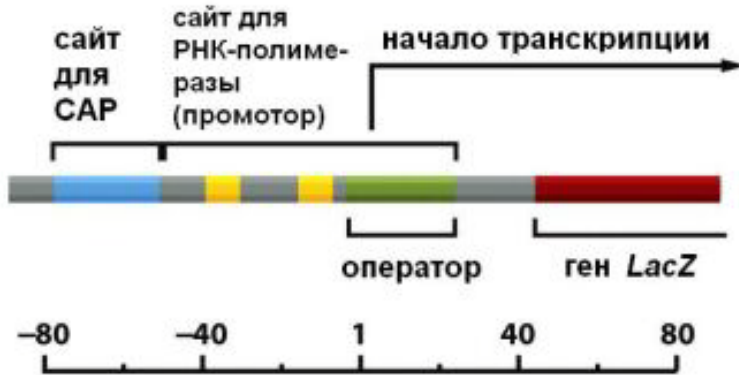
1 CAP-cAMP complexes bind to the CAP recognition site (C) near the promoter of the *lac* operon.



Позитивный контроль работы *lac*-оперона



Регуляция *lac*-оперона



+ ГЛЮКОЗА
+ ЛАКТОЗА



Низкий уровень экспрессии

+ ГЛЮКОЗА
- ЛАКТОЗА



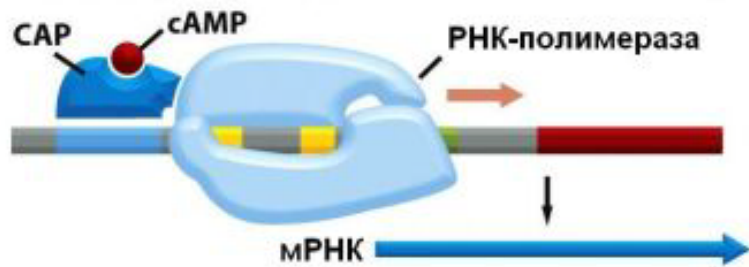
Оперон выключен, т.к. отсутствует активатор CAP и присутствует репрессор

- ГЛЮКОЗА
- ЛАКТОЗА



Оперон выключен, т.к. присутствует репрессор

- ГЛЮКОЗА
+ ЛАКТОЗА

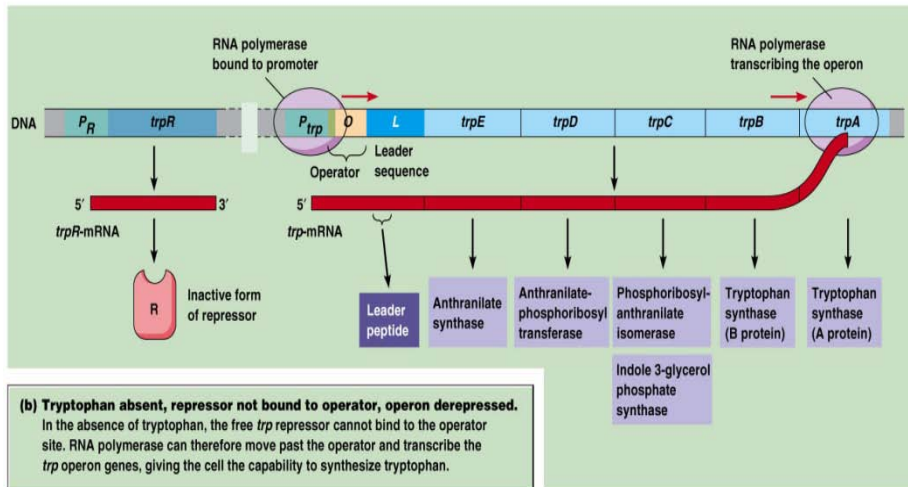
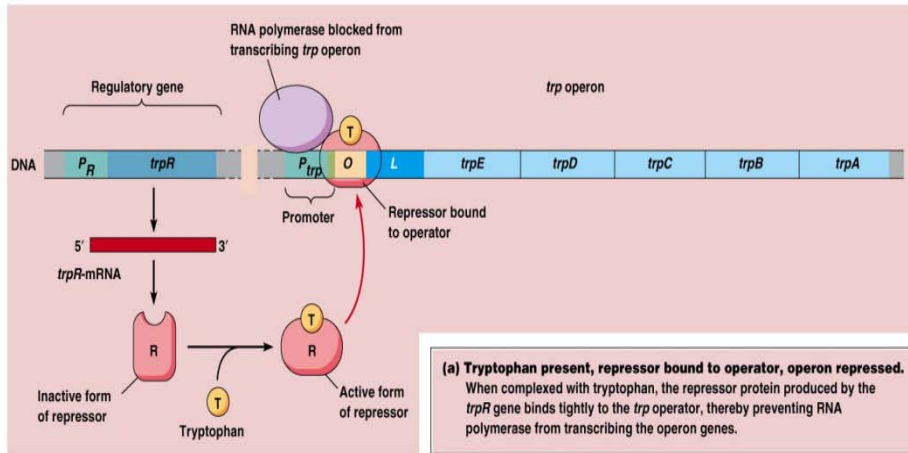


Оперон **ВКЛЮЧЕН**

Триптофановый оперон

негативная репрессия

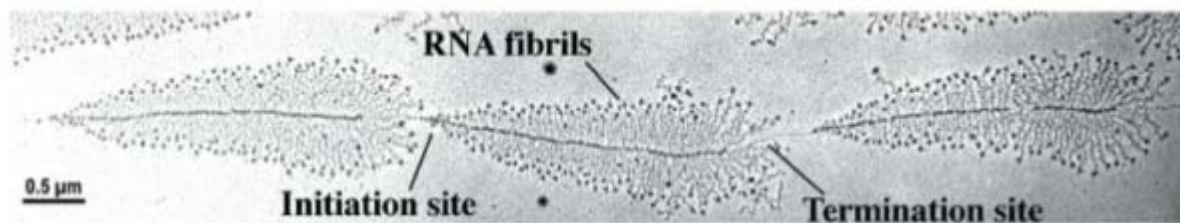
В норме оперон работает. Белок - репрессор неактивен: в форме апорепрессора не способен садиться на оператор



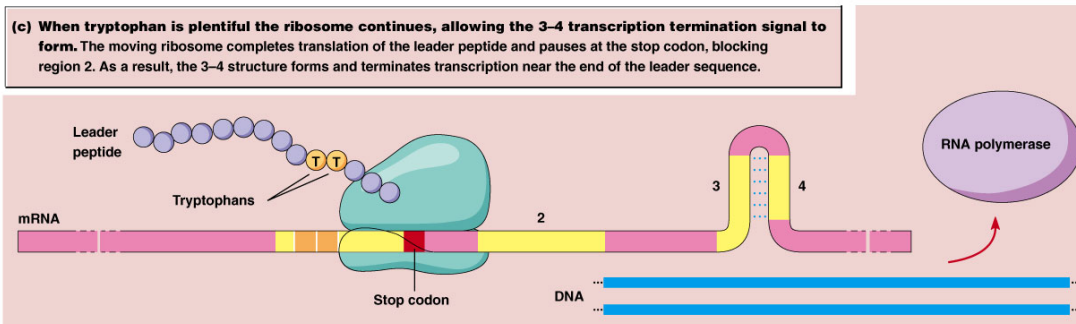
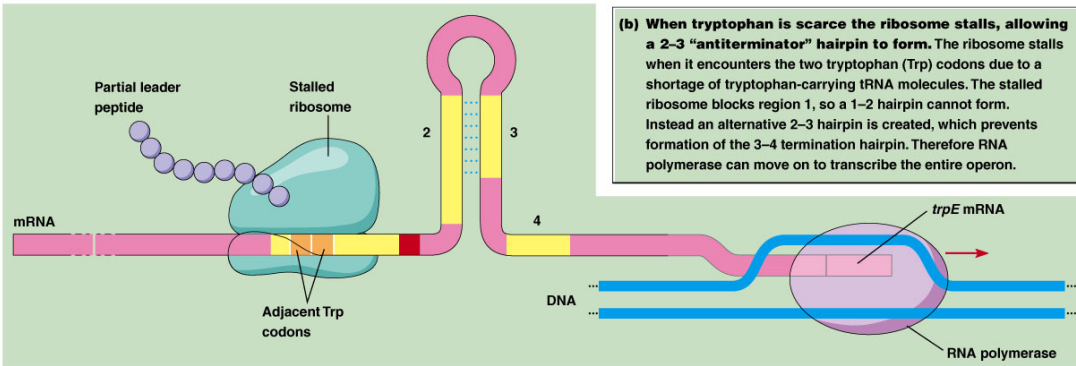
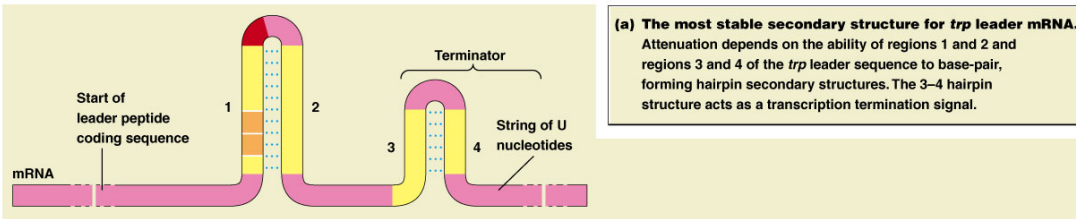
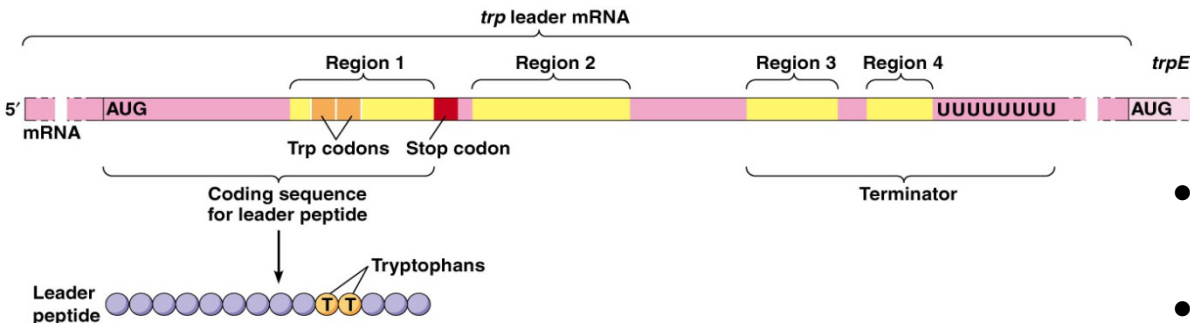
Клетке нужно N молекул триптофана. N+1-ая молекула взаимодействует с апорепрессором. Он меняет конформацию, садится на оператор и синтез РНК прекращается - **репрессия конечным продуктом**.

Схема регуляции - негативная репрессия, потому что белок репрессор "выключает" оперон.

У прокариот транскрипция и трансляция сопряжены во времени и пространстве



Аттенуация – регуляция транскрипции на уровне трансляции



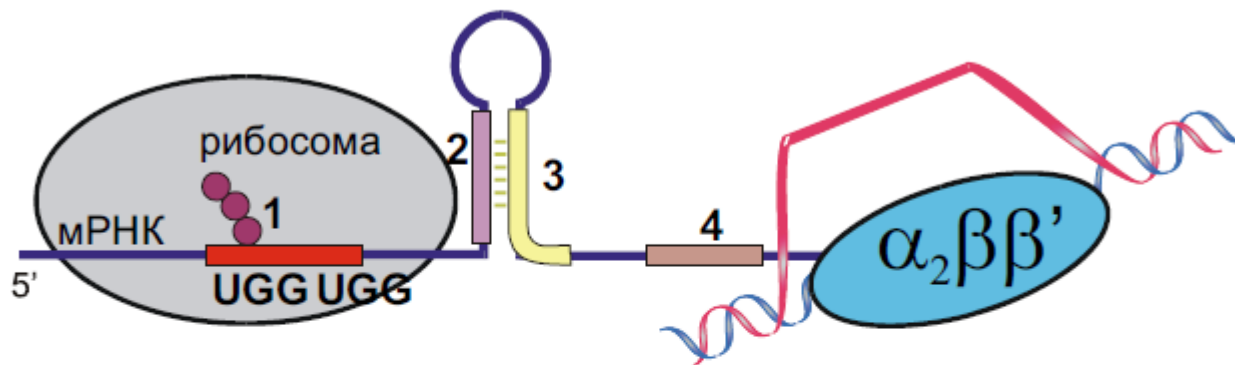
Лидерная последовательность *trpL*

- Сегмент лидерного пептида с 2 кодонами для триптофана
- Инвертированные повторы, образующие альтернативные шпильки

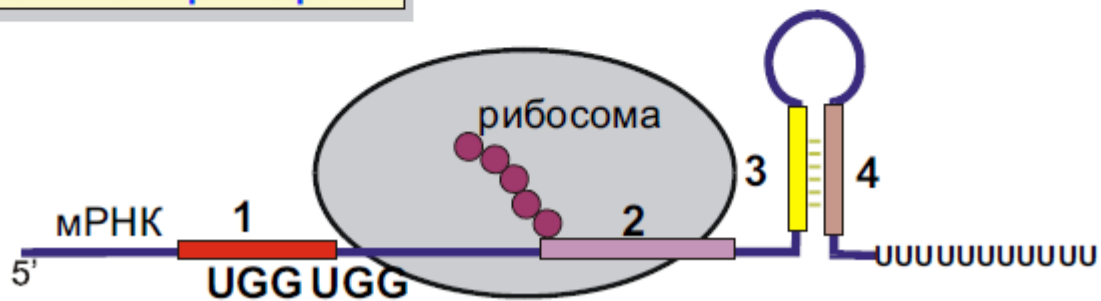
Шпилька между повторами 2+3 не препятствует транскрипции – *антитерминатор*

Шпилька между повторами 3+4 – *терминатор* транскрипции

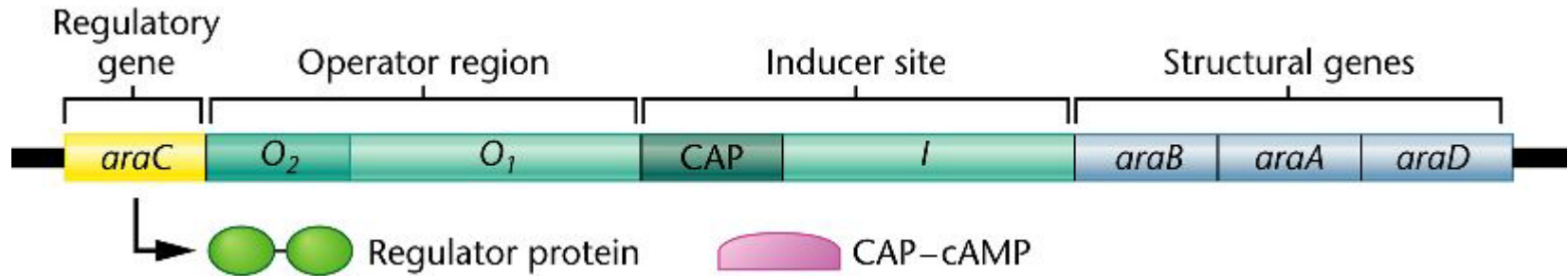
НЕДОСТАТОК триптофана



ИЗБЫТОК триптофана



Арабинозный оперон



Всего за утилизацию арабинозы отвечает 6 генов – пять структурных и один регуляторный (*araC*).

- Три гена *araBAD* образуют оперон
- Регуляторный ген *araC* расположен перед опероном
- Гены *araE* и *araF* расположены отдельно

И *araBAD* оперон и гены *araE*, *araF* контролируются одной системой регуляции. Такая организация называется регулоном

Регулон – группа генов и (или) оперонов, необходимых для выполнения одной физиологической функции, не сцепленных между собой, но находящихся под общим контролем

Формы продукта *araC*

Ara C-ind

Присоединение арабинозы превращает его в индуктор

Ara C-rep

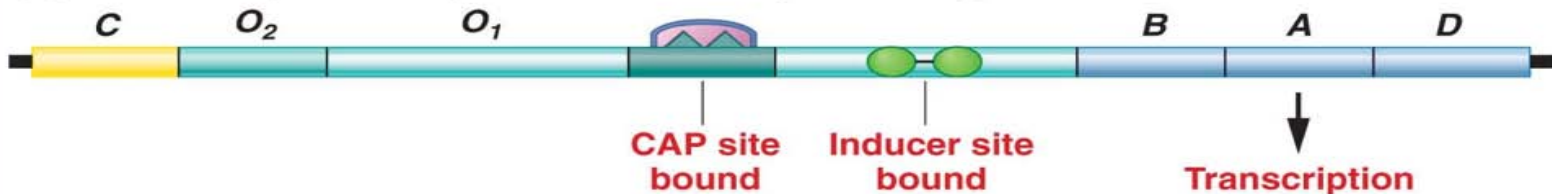
Непосредственно продукт гена *araC* является репрессором



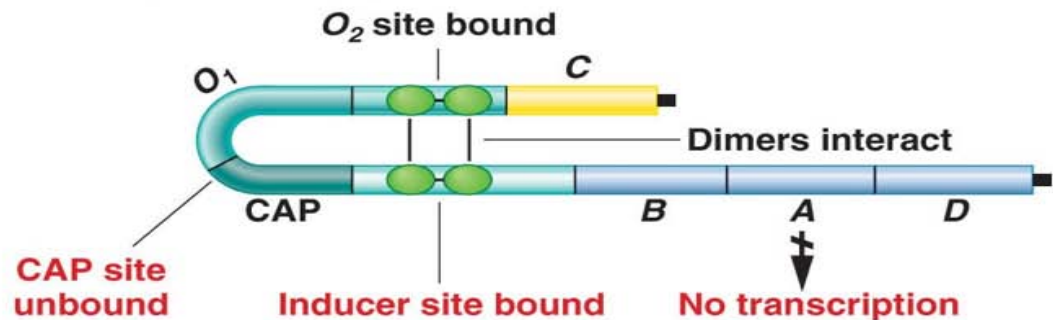
Две формы продукта *araC* имеют разные сайты
связывания

В присутствии арабинозы, белок **Ara C-ind** связывается с ara I регионом и, в присутствии комплекса **цАМФ-CAP**, активирует транскрипцию структурных генов – **позитивная регуляция**

(b) Arabinose present; operon is induced – positive regulation



(c) Arabinose absent; operon is repressed – negative regulation

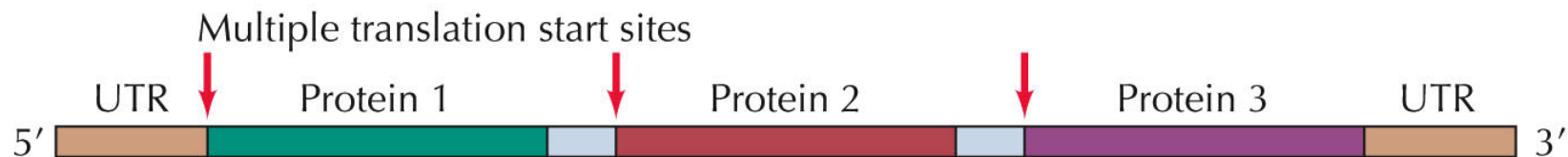


Copyright © 2009 Pearson Education, Inc.

В отсутствие арабинозы, белок **Ara C-rep** связывается как ara I и ara O₂ регионами, образуя петлю ДНК. Это связывание предотвращает транскрипцию оперона – **негативная регуляция**

Структура мРНК прокариот

Prokaryotic mRNA



- 5' нетранслируемый регион, включающий сайт посадки рибосомы (последовательность Shine-Dalgarno)
- Кодировущая область
- 3' нетранслируемый регион

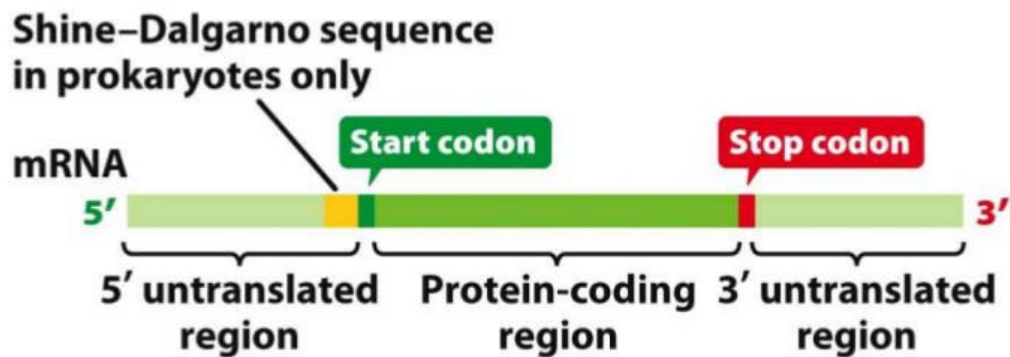


Figure 14.5
Genetics: A Conceptual Approach, Fourth Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company

Регуляция экспрессии генов с участием некодирующих РНК

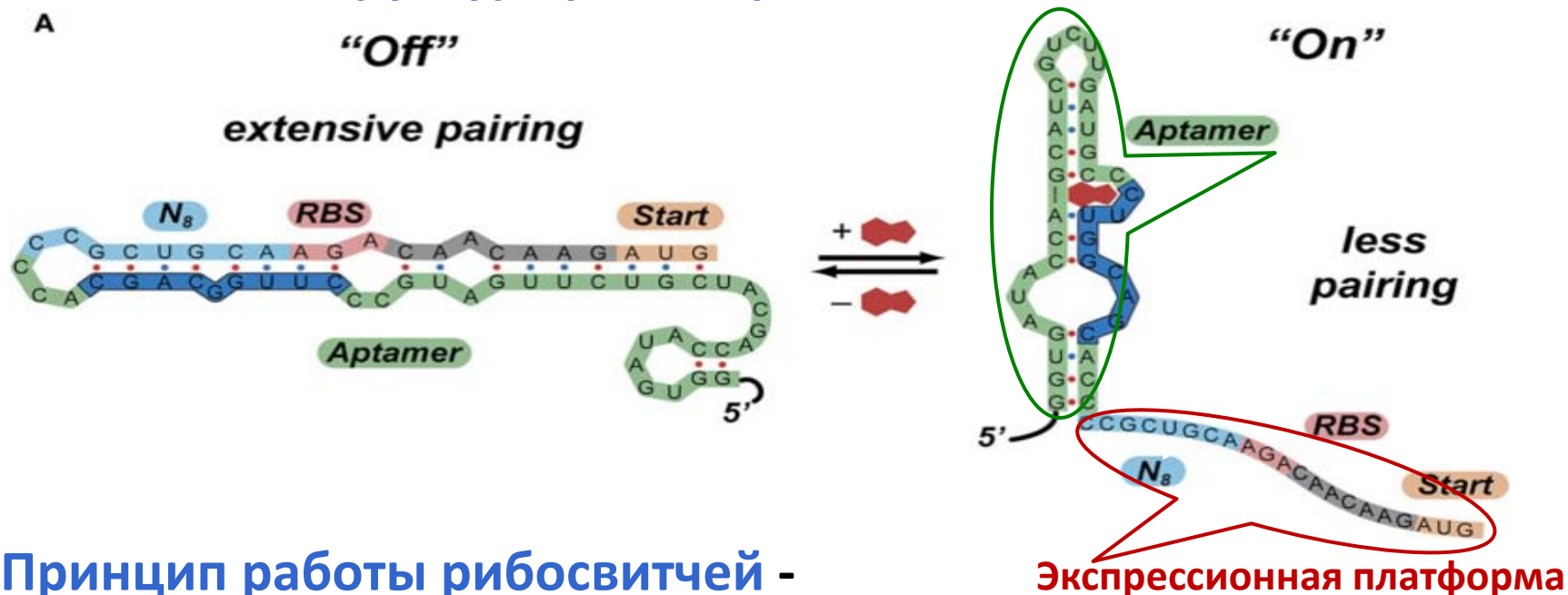
Рибопереключателн (Riboswitches):

Рибопереключателн – структурно-функциональные природные и искусственные аптамеры участвующие в регуляции транскрипции и трансляции. Локализуются в структуре м-РНК (чаще в 5'UTR)

Аптамеры – короткие одноцепочечные олигонуклеотиды, способные с высокой аффинностью и специфичностью связываться с молекулами различной природы

- Важным свойством рибопереключателн является способность напрямую, без помощи белковых посредников, распознавать и связывать определенные клеточные метаболиты.
- В результате связывания с метаболитом происходит «переключение» между альтернативными конфигурациями мРНК и, таким образом, осуществляется контроль транскрипции либо трансляции соответствующих мРНК.

Структура рибопереключателей



Принцип работы рибосвитчей -

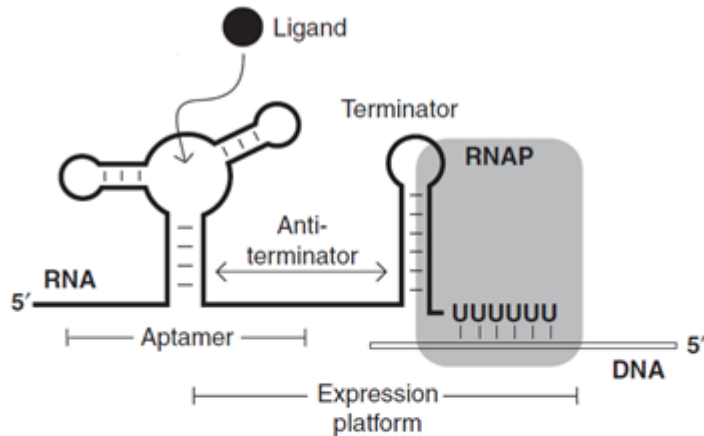
В присутствии или отсутствии молекулы лиганда аптамер формирует альтернативные вторичные структуры

Самый простой вариант структурной организации рибопереключателя:

- ✓ Аптамерный домен, связывающий определенный метаболит
- ✓ Экспрессионная платформа, включающая сайт посадки рибосомы (RBS)

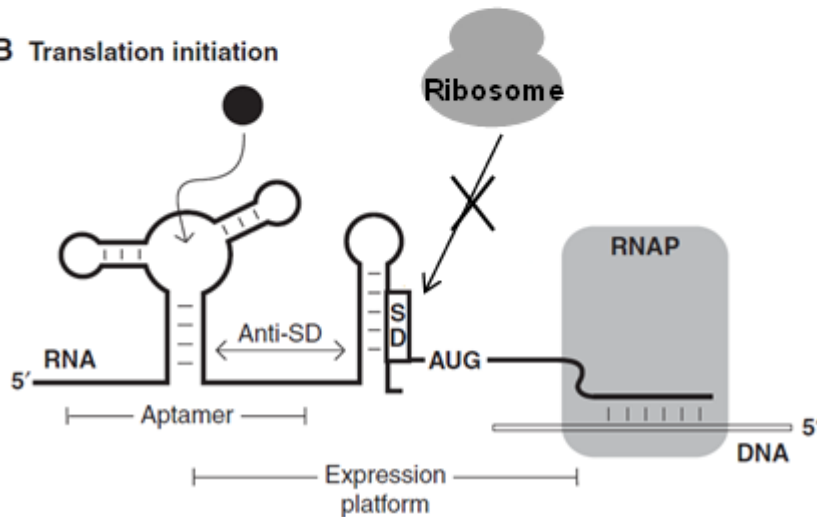
Основные механизмы регуляции экспрессии генов с участием рибопереключателей у бактерий

A Transcription termination



(А) регуляция транскрипции – ранняя терминация

B Translation initiation

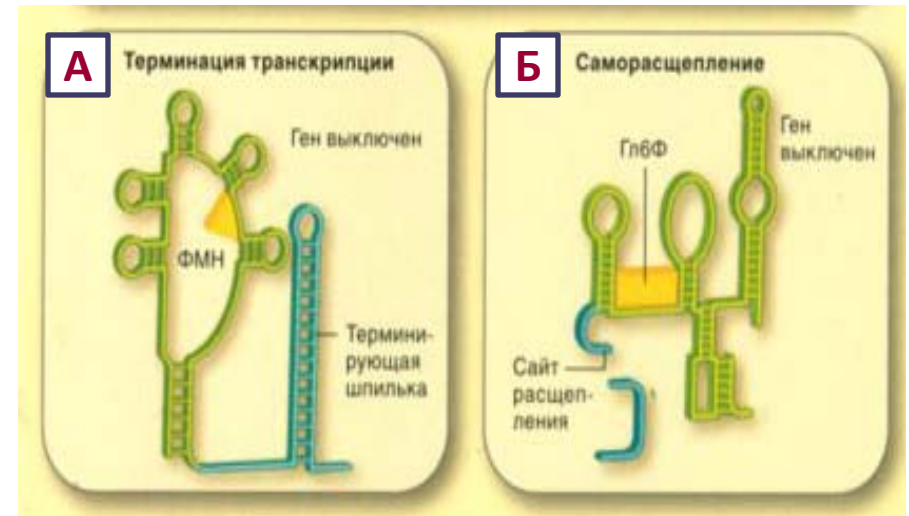


(Б) регуляция трансляции – блокирование инициации

Рибопереключатели, действующие на уровне транскрипции

1. Большинство рибопереключателей действуют по принципу **негативной регуляции**, т.е. в результате связывания с лигандом стабилизируется такая конфигурация лидерной мРНК, в результате которой образуется Rho-независимый терминатор, вызывающий преждевременную терминацию транскрипции прилегающих генов

2. Активируют экспрессию генов в ответ на связывание с метаболитом (**позитивная регуляция**).



Рибопереключатель, связываясь с лигандом,
А образует шпильку, прерывающую транскрипцию РНК
Б запускает процесс саморасщепления

Регуляция трансляции бактериальных генов с участием рибопереключателей

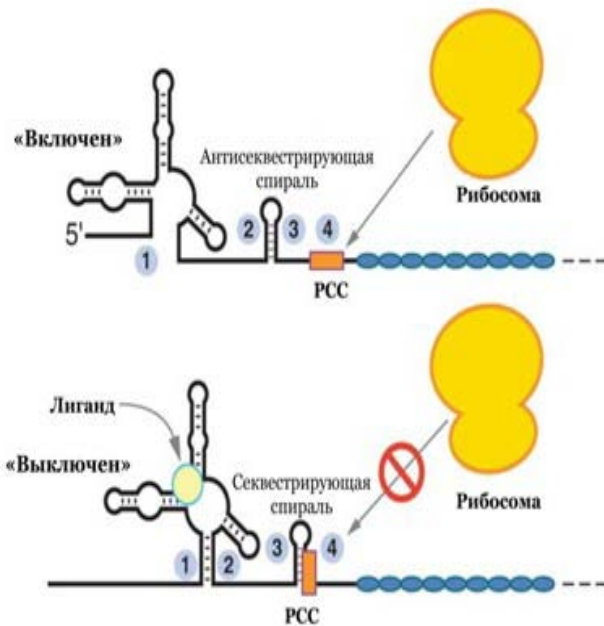
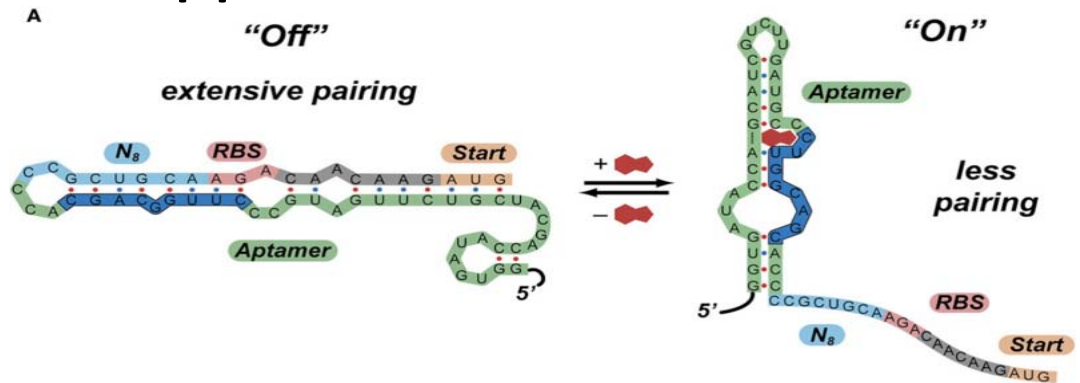
Как правило, происходит на стадии инициации. Экспрессионная платформа рибопереключателя содержит шпилечную структуру РНК, в формировании стебля которой принимает участие последовательность

Шайна-Дальгарно (SD) – сайт посадки рибосомы (RBS).

Такая шпилька называется **секвестром**, поскольку она препятствует связыванию рибосомы с мРНК и, как следствие, эффективной трансляции структурных генов.

Позитивная регуляция

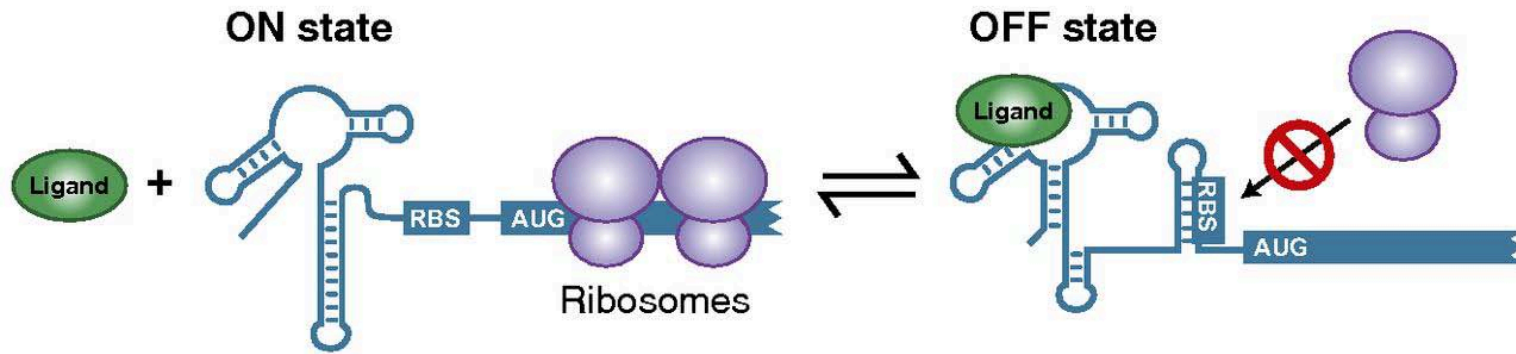
взаимодействие аптамерного домена с лигандом стабилизирует структуру антисеквестра в экспрессионной платформе, и в результате SD-последовательность оказывается в одноцепочечной конфигурации, что повышает эффективность ее связывания с рибосомой.



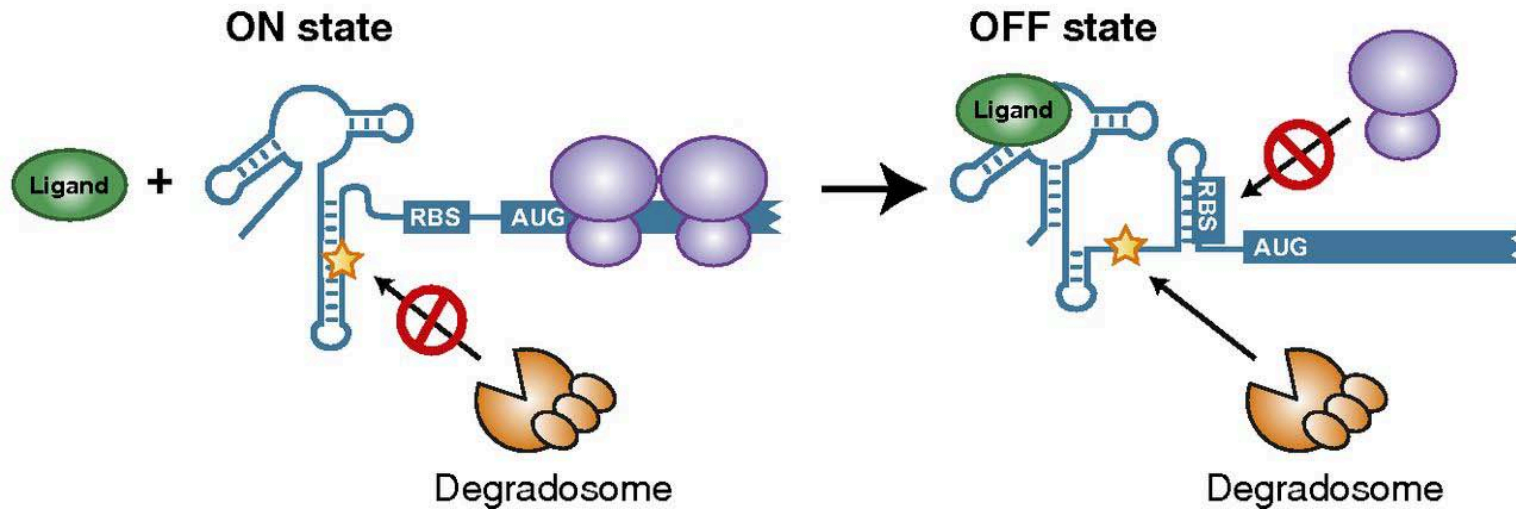
Негативная регуляция

связывание лиганда с рибопереключателем, действующем на уровне инициации трансляции, сопровождается формированием секвестра.

A Non-Nucleolytic Repression Mechanism
(*thiM* and *btuB* riboswitches)



B Nucleolytic Repression Mechanism
(*lysC* riboswitch)



Процессинг РНК у прокариот

Посттранскрипционный процессинг

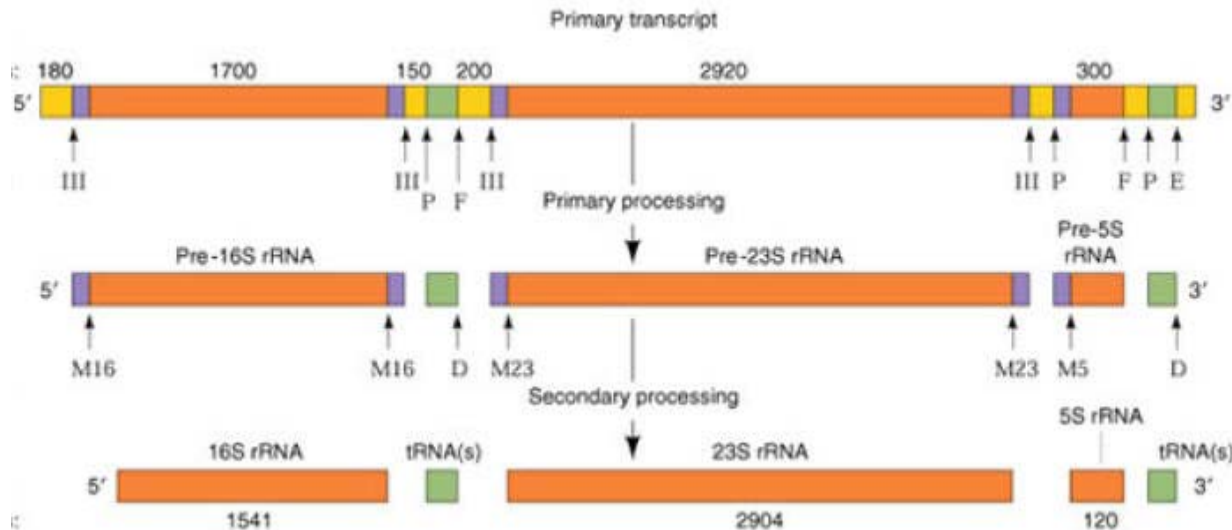
— это процесс созревания, при котором первичный РНК-транскрипт модифицируется и превращается в зрелую РНК

Молекулы мРНК у прокариот процессингу не подвергаются

- У большинства бактерий *транскрипция и трансляция сопряжены*, т. е. происходят одновременно.
- 5'-конец мРНК может транслироваться на рибосоме и затем подвергаться *деградации* еще до завершения синтеза ее 3'-конца.

Процессинг рРНК у прокариот

Три гена рРНК *E. coli* (16S, 23S и 5S) и несколько тРНК располагаются в одном блоке и транскрибируются в виде одной молекулы РНК

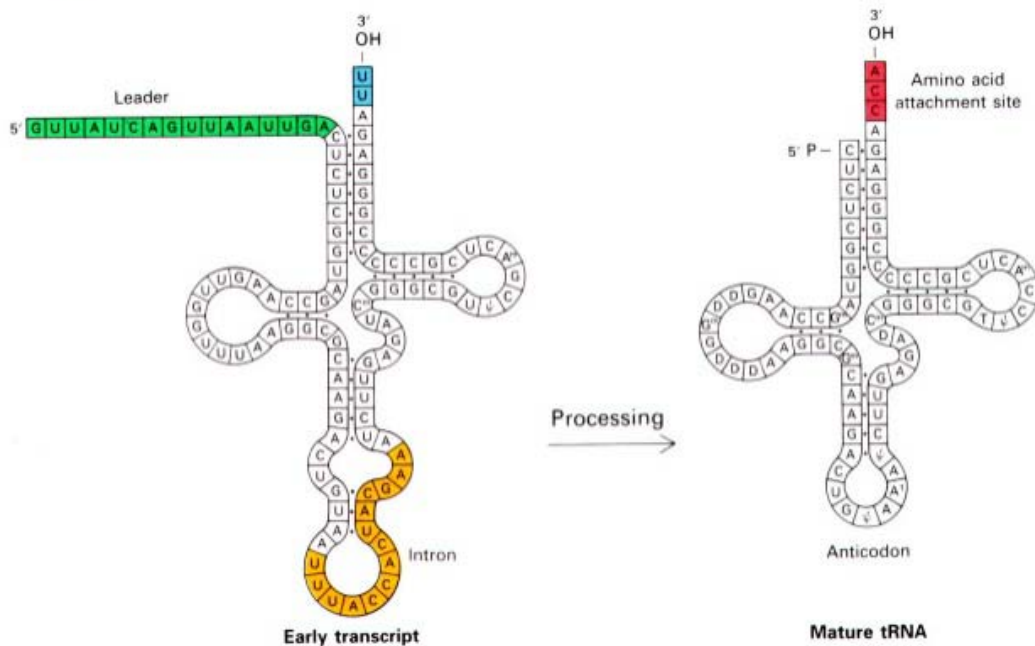


Расщепление
первичного
транскрипта (РНКаза III)

обрезка фланкирующих
участков

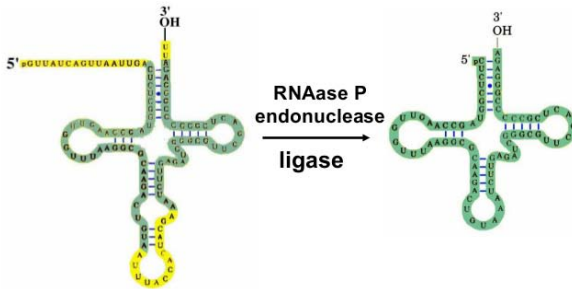
Процессинг тРНК

Процессингу подвергаются
как про- так и эукариотические пре-тРНК



Процессинг тРНК

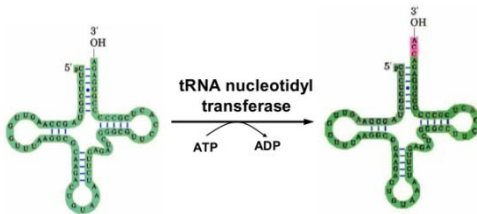
Cleavage



1. Удаление 3'- и 5'- фланкирующих регионов действием *РНказы D* у про- и *РНказы P* у эукариот

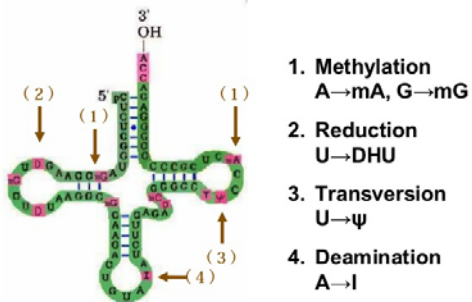
1а. Удаление интрона антикодоновой петли у эукариот (*t-RNA-специфические эндонуклеаза и лигаза*)

Addition of CCA-OH



2. Добавление триплета CCA к 3'-концу (*t-RNA specific nucleotidyl transferase*)

Base modification



3. Модификация оснований