

БИОТЕХНОЛОГИЯ

**Курс лекций для студентов IV курса факультета
биологии РГПУ им. А.И. Герцена**

Направление 050100 Педагогическое образование

Профиль 01 Биологическое образование

**Профессор кафедры Зоологии
проф. Цымбаленко Надежда Васильевна**

д.б.н.,

Т Р А Н С К Р И П Ц И Я

(эукариоты)

- У эукариотов процессы транскрипции и трансляции разобщены во времени и пространстве (транскрипция - в ядре, трансляция - в цитоплазме).
- У эукариотов существуют **специализированные РНК-полимеразы**.

В ядре выделяют 3 типа РНК-полимераз:

РНК-полимераза I - синтезирует рРНК (кроме 5S рРНК).

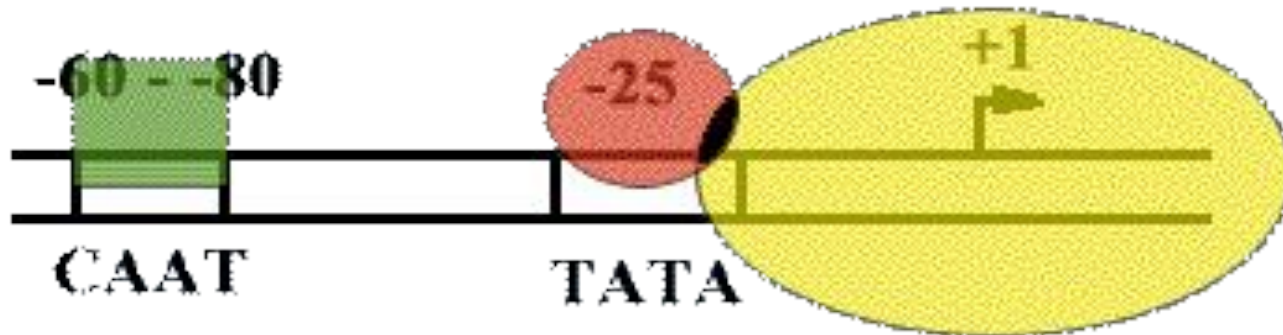
РНК-полимераза II - синтезирует мРНК и некоторые sРНК.

РНК-полимераза III - синтезирует тРНК, некоторые sРНК и 5SpРНК.

РНК-полимеразы различаются количеством субъединиц, их аминокислотным составом, и зависимостью от катионов магния и марганца. Для РНК-полимераз I и III необходимое для работы соотношение $[Mn^{2+}]/[Mg^{2+}] = 2$. Для РНК-полимеразы II - $[Mn^{2+}]/[Mg^{2+}] = 5$.

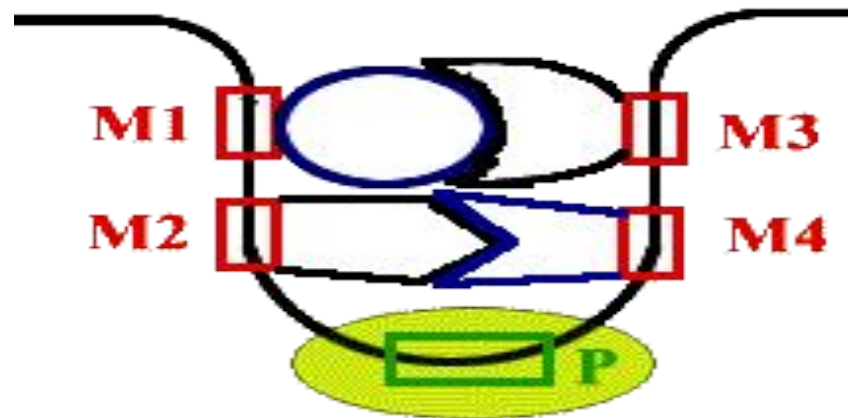
Помимо ядерных РНК-полимераз у эукариот есть еще РНК-полимеразы хлоропластов и митохондрий.

- Особенности транскрипции эукариот
- Единицей транскрипции у эукариот является отдельный **ген**, а не оперон, как у прокариот.
- Оператор, как таковой, отсутствует. Промотор есть, но он организован иначе.



- **Базальные факторы транскрипции** - белки, необходимые для инициации транскрипции
- **Базальные факторы транскрипции необходимы для инициации транскрипции всеми тремя ядерными РНК-полимеразами.**

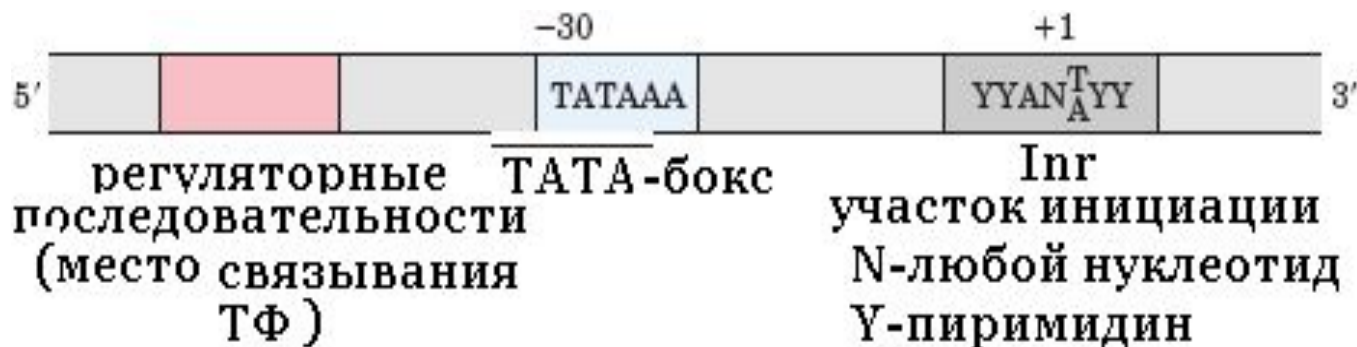
- Для любого гена, кодирующего белок, есть **энхансеры** (усилители).
- **Энхансеры** - последовательности ДНК, усиливающие транскрипцию при взаимодействии со специфическими белками.
- $M1+M2+M3+M4$ - один энхансер, но он состоит из 4-х модулей.



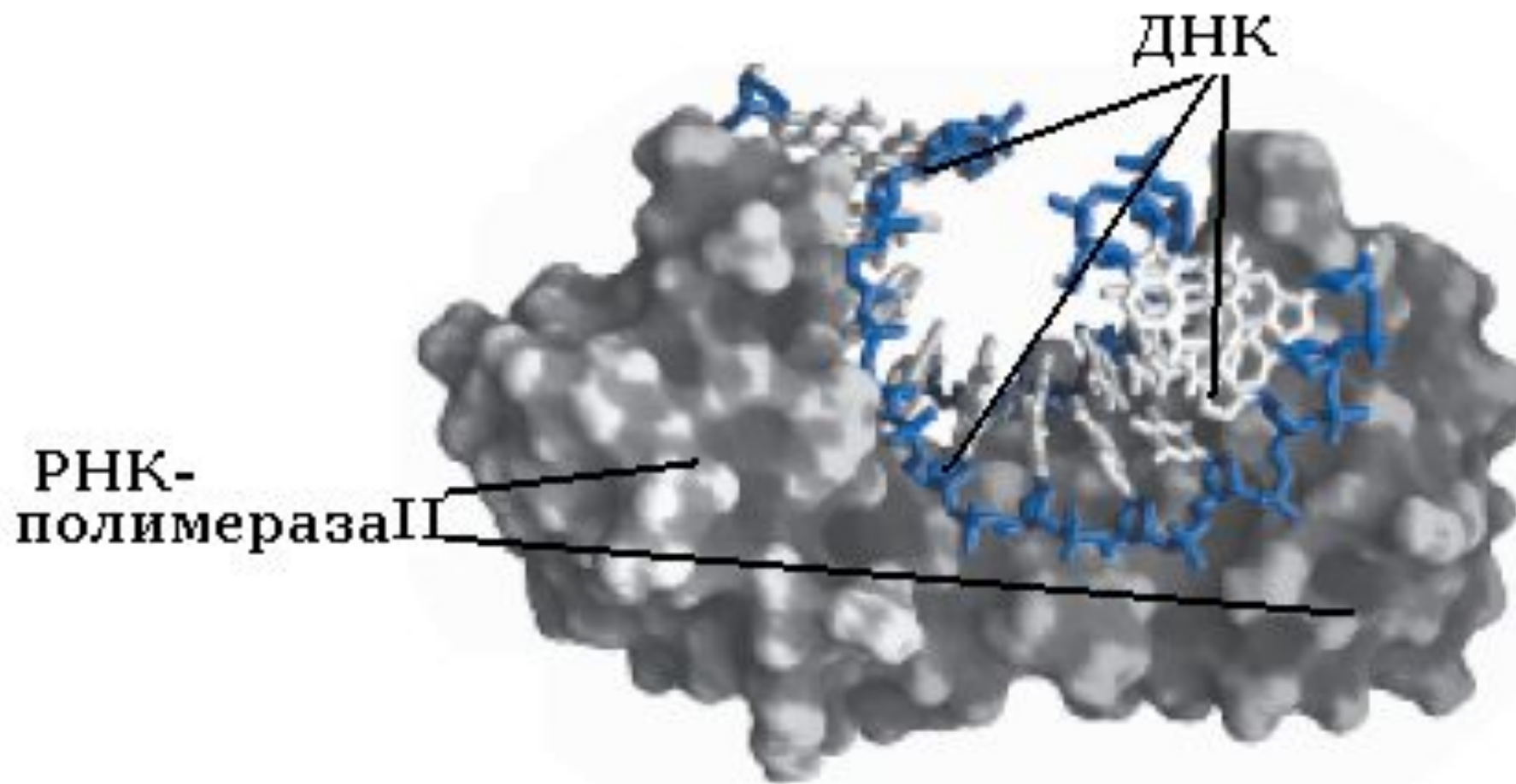
- Экспрессируются лишь те гены, у которых все энхансерные модули узнаны своими белками и эти белки взаимодействуют друг с другом

- Экспрессируются лишь те гены, у которых все энхансерные модули узнаны своими белками и эти белки взаимодействуют друг с другом.
- Кроме энхансеров есть **сайленсеры** (ослабители).
- **Сайленсеры** - последовательности ДНК, ослабляющие транскрипцию при взаимодействии с белками.
- При соответствующем наборе белков экспрессия отдельных генов в клетке может быть подавлена

- РНК-полимераза II для осуществления своей работы требует много различных белковых факторов (транскрипционные факторы – ТФ).
- РНК-полимераза II состоит из 12 субъединиц, часть которых выполняют функции, подобные субъединицам РНК-полимеразы прокариотов.
- Самая большая субъединица на С-конце содержит много раз повторяющийся (консенсусный) гепта-повтор, очень важный для функции этого фермента.

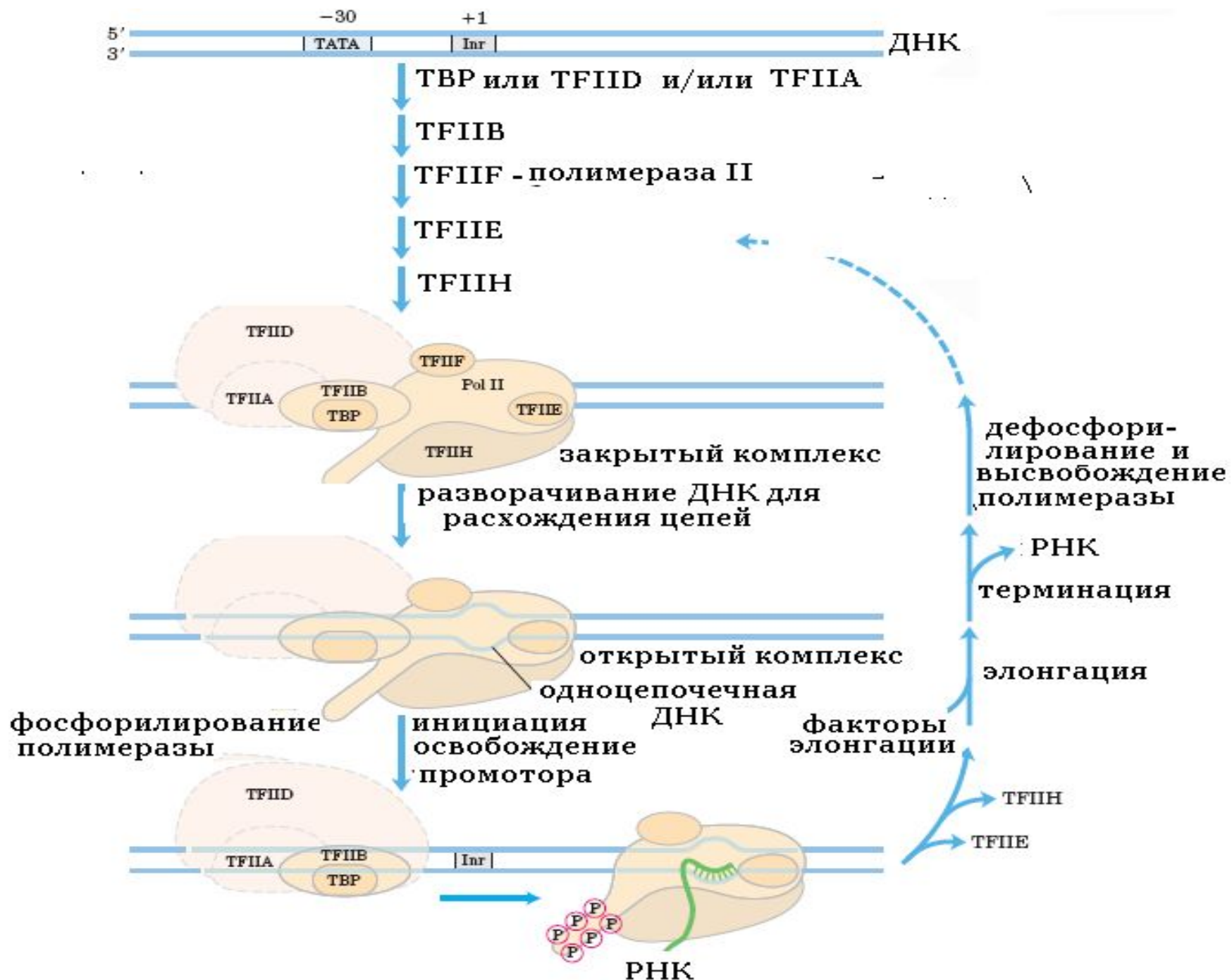


Комплекс ДНК и РНК-полимеразы II



Белки, необходимые для инициации транскрипции на эукариотических промоторах РНК-полимеразой II

<i>Transcription protein</i>	<i>Number of subunits</i>	<i>Subunit(s) M_r</i>	<i>Function(s)</i>
Initiation			
Pol II	12	10,000–220,000	Catalyzes RNA synthesis
TBP (TATA-binding protein)	1	38,000	Specifically recognizes the TATA box
TFIIA	3	12,000, 19,000, 35,000	Stabilizes binding of TFIIIB and TBP to the promoter
TFIIB	1	35,000	Binds to TBP; recruits Pol II–TFIIF complex
TFIIE	2	34,000, 57,000	Recruits TFIIH; has ATPase and helicase activities
TFIIF	2	30,000, 74,000	Binds tightly to Pol II; binds to TFIIB and prevents binding of Pol II to nonspecific DNA sequences
TFIIH	12	35,000–89,000	Unwinds DNA at promoter (helicase activity); phosphorylates Pol II (within the CTD); recruits nucleotide-excision repair proteins
Elongation[*]			
ELL [†]	1	80,000	
p-TEFb	2	43,000, 124,000	Phosphorylates Pol II (within the CTD)
SII (TFIIS)	1	38,000	
Elongin (SIII)	3	15,000, 18,000, 110,000	



ИНГИБИТОРЫ РНК-ПОЛИМЕРАЗ

Актиномицин D и акридин – подавляют работу на стадии элонгации

α -аманитин (токсин бледной поганки) полностью подавляет работу РНК-полимеразы II в концентрации 10^{-8} М и РНК-полимеразы III (в концентрации 10^{-6} М). РНК-полимераза I фактически нечувствительна к этому токсину.

Процессинг мРНК

Процессинг мРНК состоит из нескольких этапов.

1. **Кепирование** 100% мРНК
2. **Полиаденилирование** ~95% мРНК
3. **Сплайсинг** ~95% мРНК. Сплайсингу подвергаются только полиаденилированные мРНК.
4. **Редактирование**. Показано лишь для нескольких мРНК.

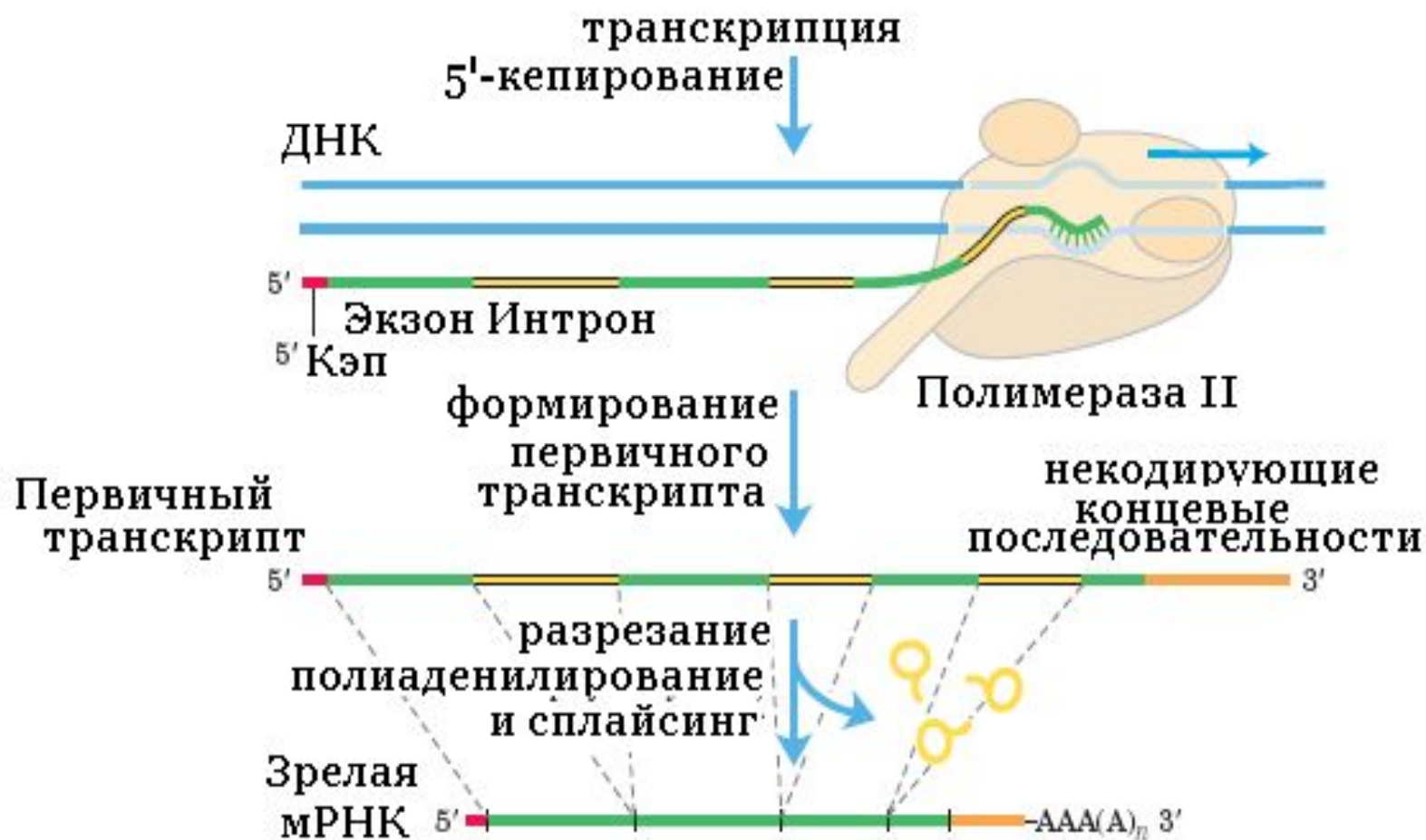
Все стадии процессинга мРНК происходят в РНП-частицах (рибонуклеопротеидных комплексах).

мРНК не бывает свободной от белков.

Полисома - комплекс мРНК с несколькими или многими рибосомами.

В составе информосом мРНК может жить от нескольких минут до нескольких дней, не подвергаясь действию нуклеаз

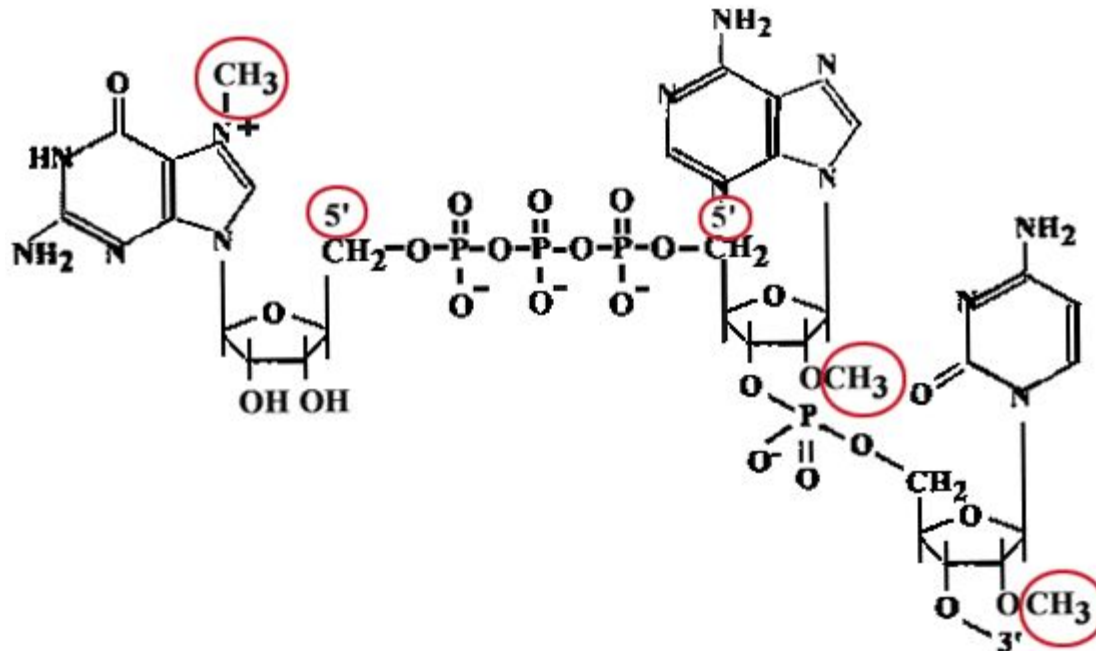
Процессинг мРНК



Кепирование

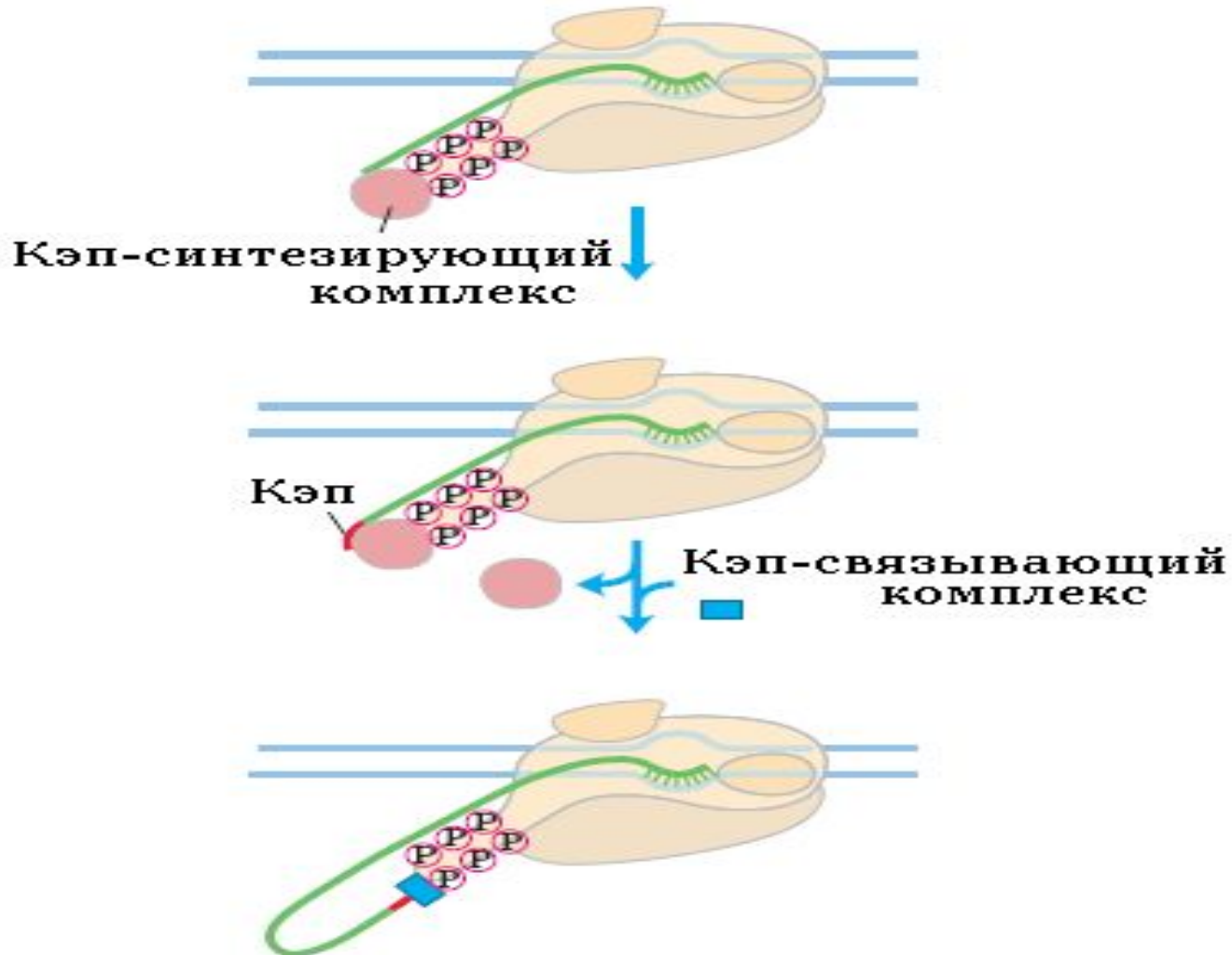
Кепирование - надевание "шапочки".

"Cap" представляет собой метилированный GTP, присоединенный в необычной позиции 5'-5' и две метилированные рибозы в первых двух нуклеотидах мРНК. По мере образования пре-мРНК (еще до 30-ого нуклеотида), к 5'-концу, несущему пуринтрифосфат, присоединяется гуанин, после чего происходит метилирование



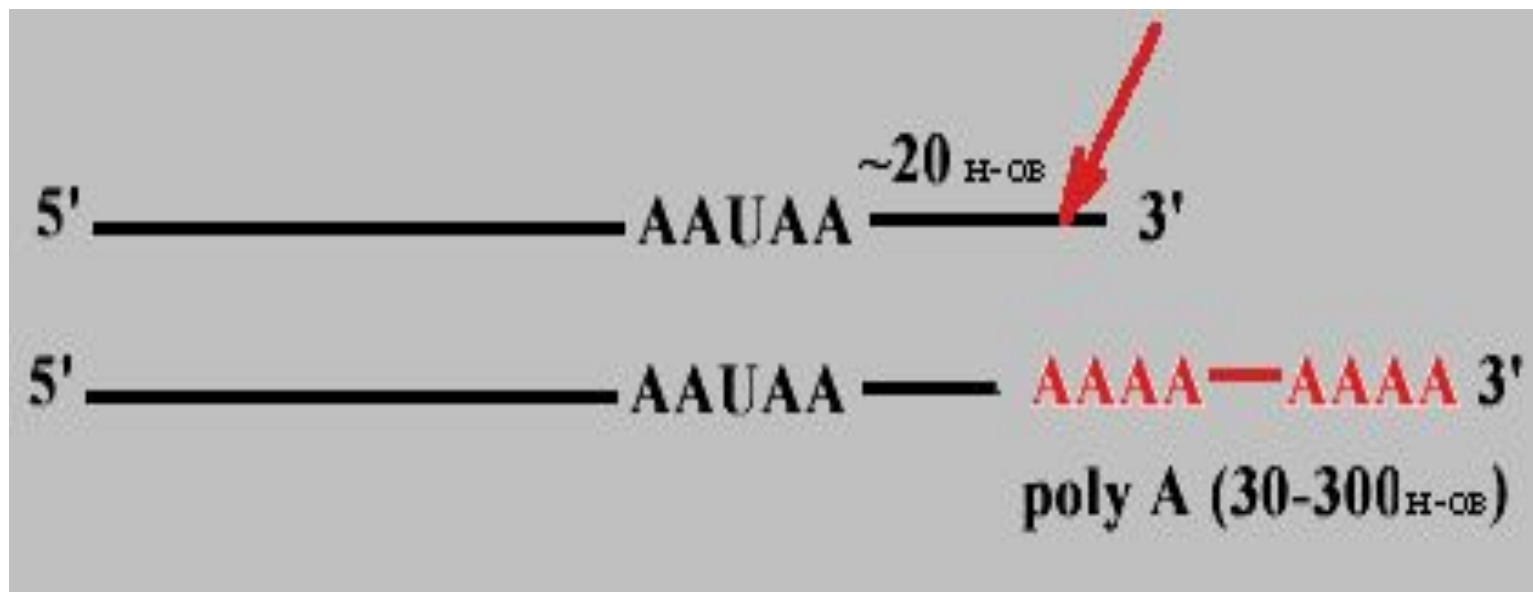
Назначение “Кэп”

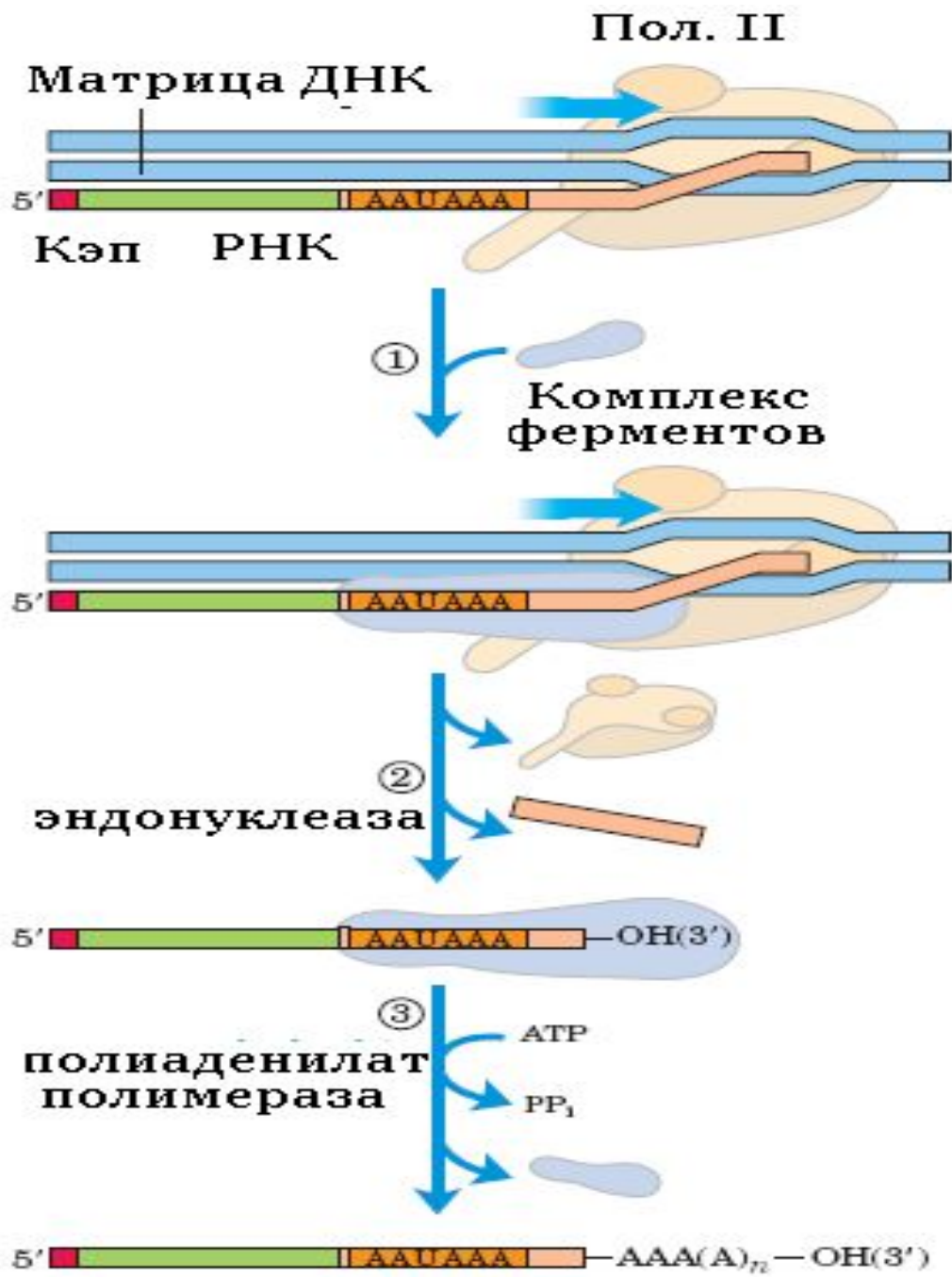
- 1. *Защита 5'-конца мРНК от действия экзонуклеаз.*
- 2. *За счет узнавания “Кэп” связывающими белками происходит правильная установка мРНК на рибосоме*



Полиаденилирование

Когда синтез пре-мРНК завершен, то на расстоянии примерно 20 нуклеотидов в направлении к 3' - концу от последовательности 5'-AAUAA-3' происходит разрезание специфической эндонуклеазой и к новому 3'-концу присоединяется от 30 до 300 остатков АМР (безматричный синтез).





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

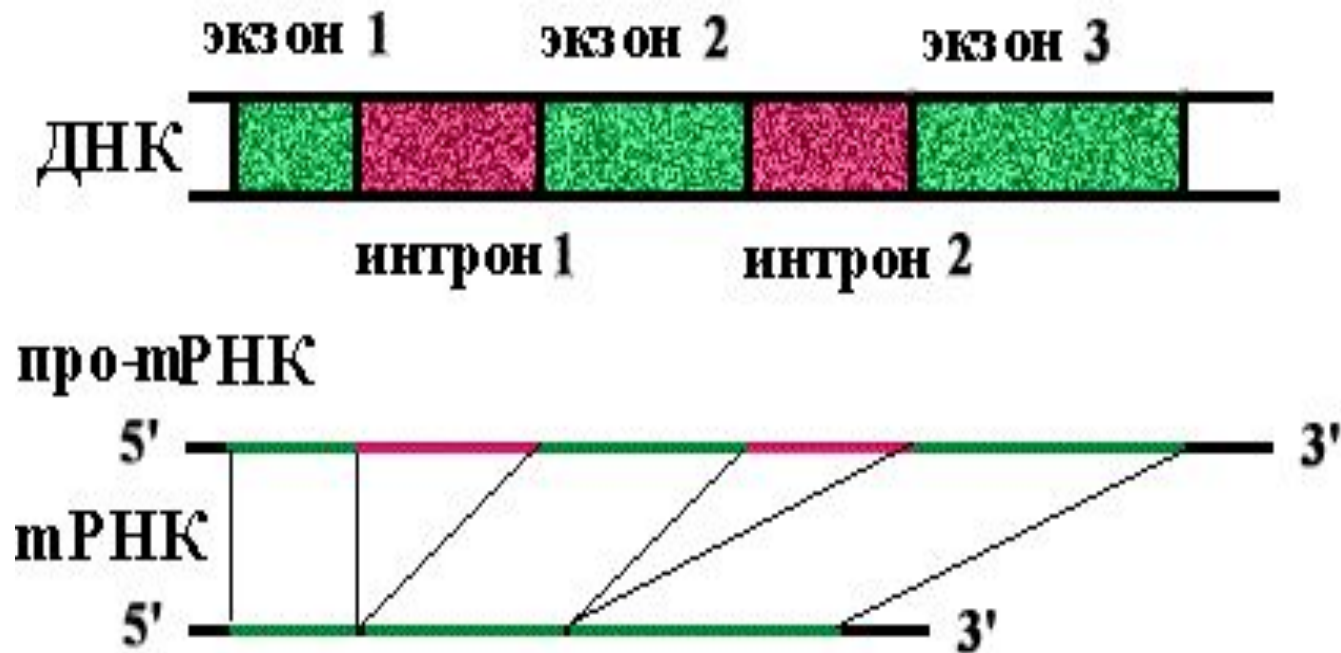
***Полиаденилированные пре-мРНК
подвергаются сплайсингу.***

Сплайсинг

Экзоны - кодирующие участки генов.

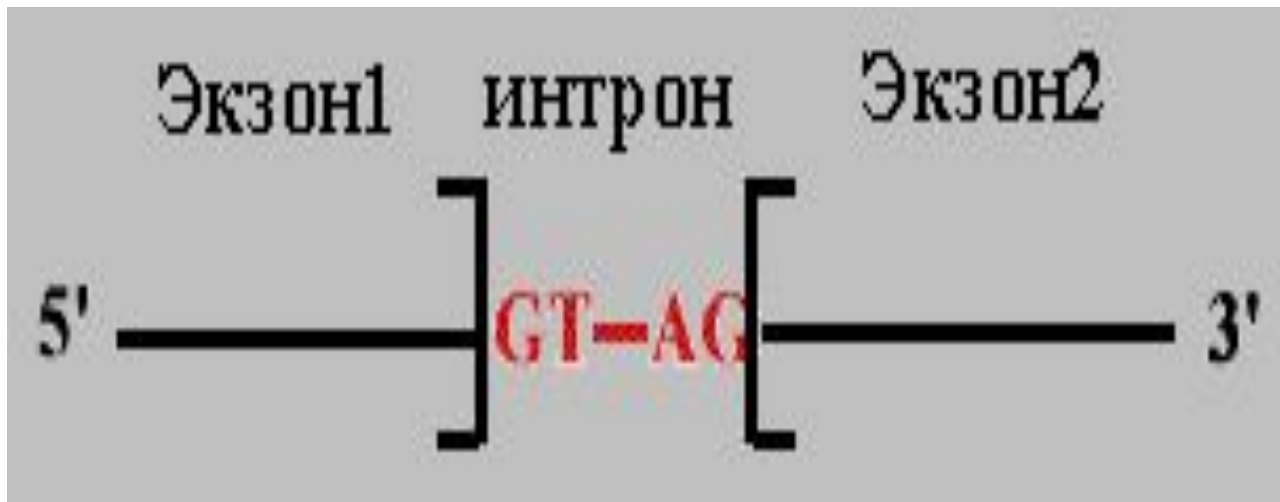
Интроны - некодирующие участки генов.

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

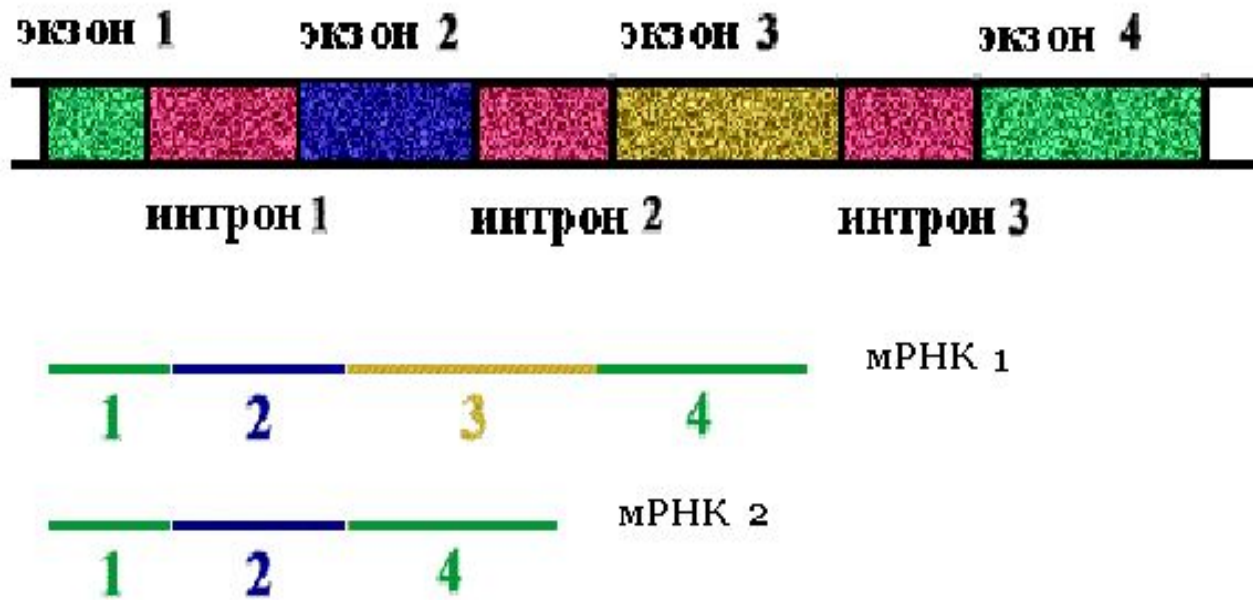


Для мРНК высших организмов существуют обязательные правила сплайсинга:

Правило 1. 5' и 3' концы интрона очень консервативны: $5'(GT-интрон-AG)3'$.



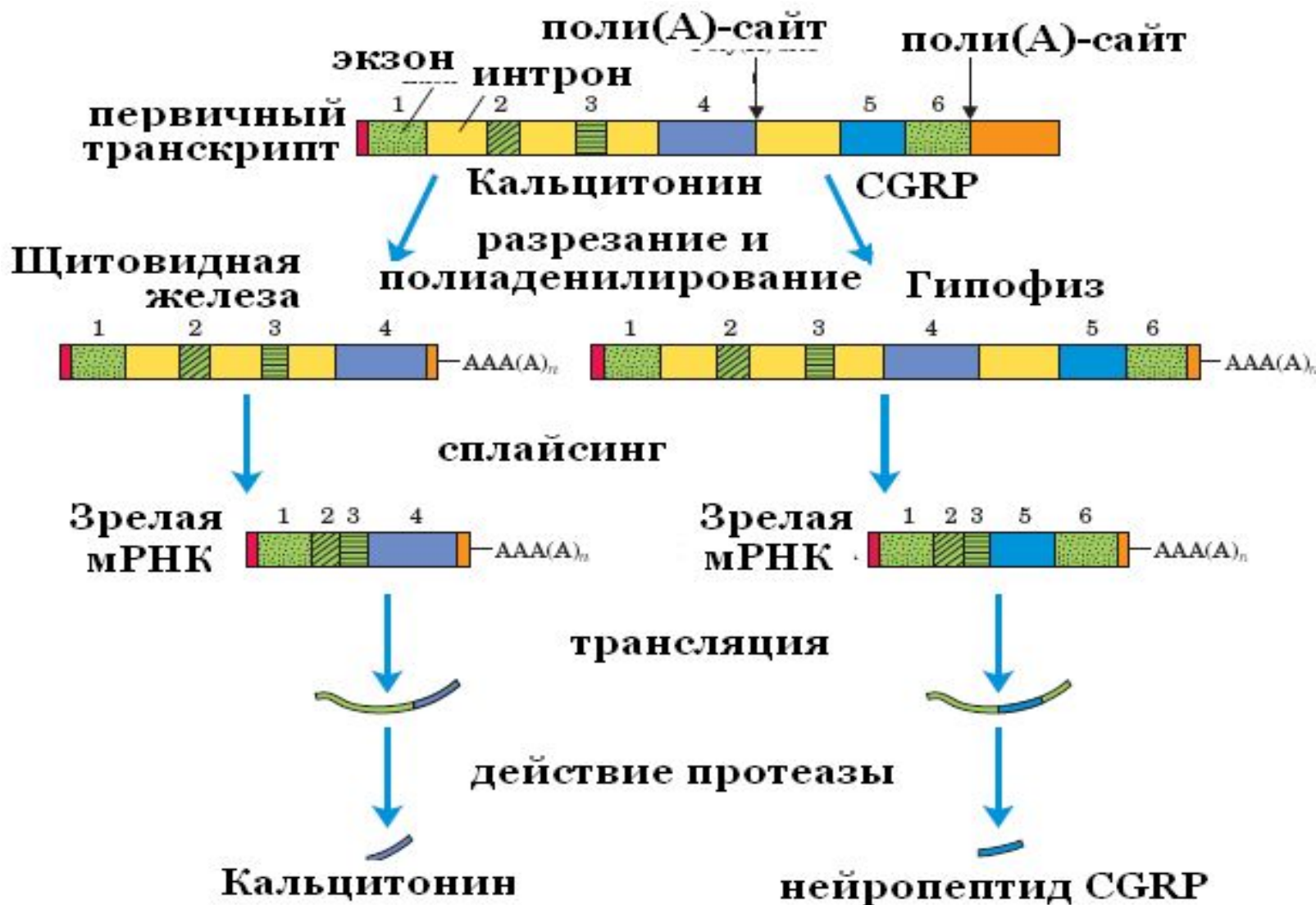
Правило 2. При сшивании копий экзонов соблюдается порядок их расположения в гене, но могут быть выброшены некоторые из них.



Сплайсинг осуществляется белковыми комплексами - *сплайсосомами*, в которых помимо ферментов, вырезающих и сшивающих участки пре-мРНК, имеются белки, придающие про-мРНК нужную конформацию, и несколько sРНК. Сплайосома непосредственно связана с ферментами, занимающимися полиаденилированием.

Альтернативный сплайсинг мРНК

кальцитонинового гена у млекопитающих (крыса)



Редактирование

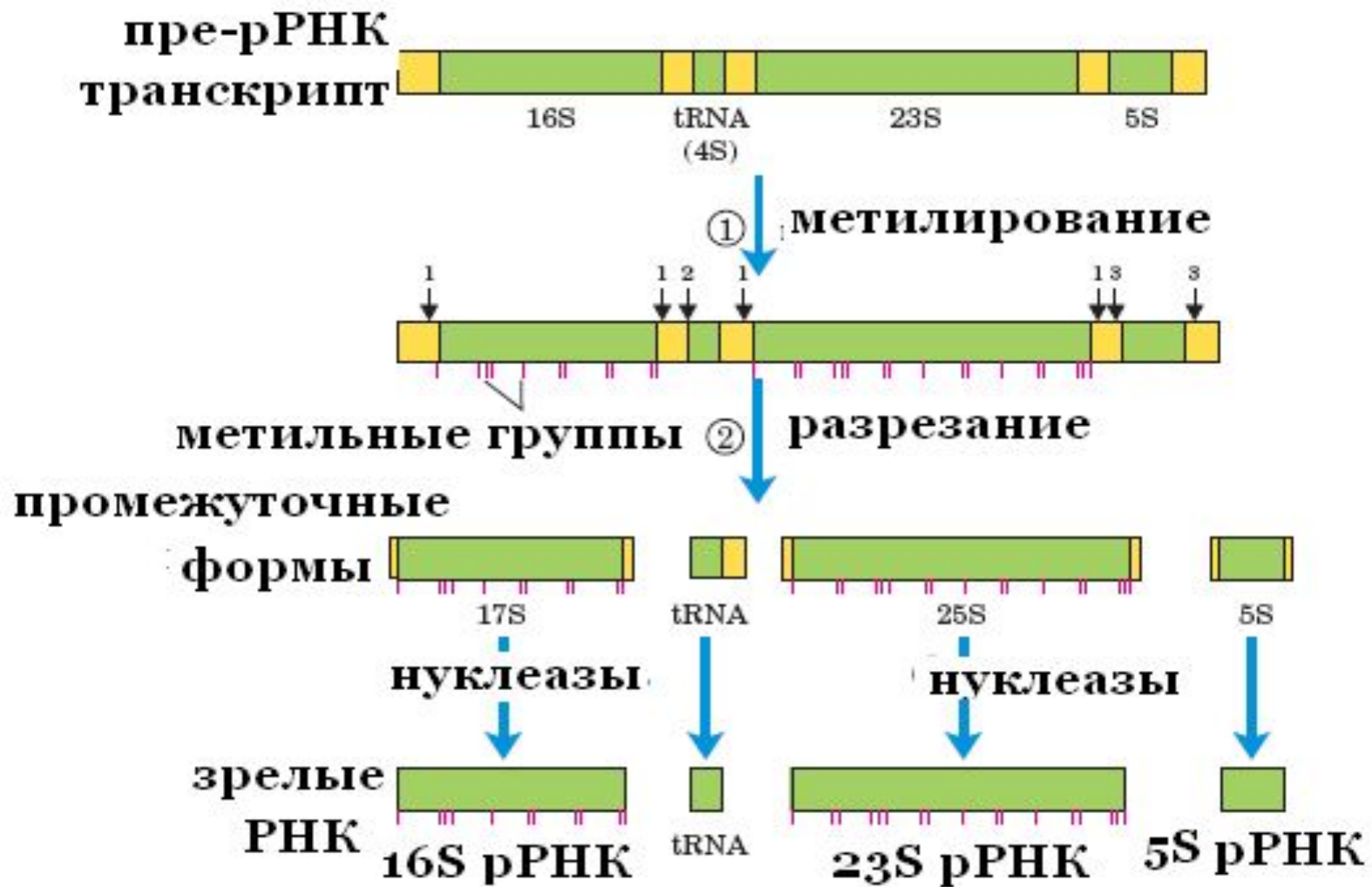
- **Редактирование** - изменение генетической информации на уровне мРНК.
- Пример- редактирование мРНК цитохромоксидазы у трипаносомы: когда трипаносома в человеке – синтезируется только две субъединицы цитохромоксидазы, в мухе – три.
- Происходит сдвиг рамки считывания и отредактированная мРНК кодирует новый полипептид - третью субъединицу цитохромоксидазы

coxII



coxIII

Процессинг пре-рРНК у бактерий

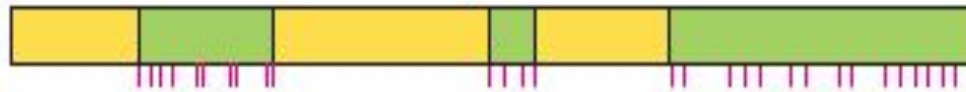


Процессинг пре-рРНК у эукариотов

пре-рРНК
транскрипт
(45S)

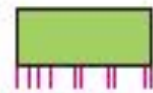


① метилирование



② метильные группы
разрезание

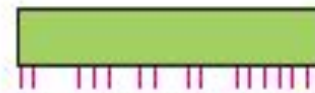
зрелые рРНК



18S
рРНК



5,8S
рРНК



28S
рРНК