

Транскрипция у эукариот. Обратная транскрипция. Трансляция

1. Транскрипция у эукариот

Роджер Конберг — это известный ученый, который получил Нобелевскую премию по химии за исследование транскрипции у дрожжей. Он выделил РНК-полимеразу, выяснил ее кристаллическую структуру и активный центр. Он проделал большую работу по выделению 2 граммов РНК-полимеразы из 15 кг дрожжей.

2. Сравнение транскрипции эукариот с транскрипцией прокариот

Ключевой момент — наличие ядра у эукариот. Транскрипция у них происходит именно там. Транскрипция у прокариот происходит прямо в цитоплазме.

У прокариот (как упоминалось в предыдущей лекции) РНК-полимераза одна. У эукариот их известно 3. Наиболее изученная — **РНК-полимераза II**, которая осуществляет синтез кодирующей мРНК. **РНК-полимераза I** осуществляет синтез в ядрышках 18s и 28S рРНК (рибосомная РНК). **РНК-полимераза III** отвечает за синтез малых ядерных РНК, малых ядрышковых РНК, 5S рРНК.

У человека различают 10 основных субъединиц, составляющих комплекс РНК-полимеразы II, в том числе собственно субъединицу, обладающую полимеразной активностью. Одни белки помогают садиться полимеразе, другие активируют ее, третьи помогают в работе. На сегодняшний день функции этих белков изучают.

3. Инициация транскрипции

Регуляторная область — **промотор** — может быть как ТАТА-бокс содержащей, так и ТАТА-бокс не содержащей. Тата-бокс это ранее упоминавшаяся последовательность нуклеотидов типа ТАТА, которая находится недалеко от точки инициации транскрипции (см. рис. ??). Эта последовательность узнается особым белком, который называется ТАТА-фактор. Он привлекает РНК-полимеразу, при этом ее сигма-субъединица отваливается от полимеразного комплекса. В этот момент считают инициацию транскрипции завершённой и начинается этап элонгации. На этом этапе РНК-полимераза синтезирует комплементарную нить РНК со скоростью около 50 – 60 нукл./сек.

4. Транскрипционные факторы

Транскрипционные факторы — это белки, которые специфически связываются с ДНК и регулируют их транскрипцию. В геноме человека обнаружено более 2600 белков, имеющих ДНК-связывающий домен, и большинство из них предположительно является факторами транскрипции. Около 10% всех генов в геноме кодируют транскрипционные факторы. Это самое большое семейство клеточных белков.

5. Элонгация транскрипции эукариот

Существуют специальные факторы, которые помогают РНК-полимеразе продвигаться по ДНК. При этом размер транскрипционной вилки примерно составляет 18 разъединенных нуклеотидных пар.

6. Терминация транскрипции у эукариот

Терминация транскрипции отличается от таковой у прокариот. У эукариот существует два механизма терминации. Первый — через фактор терминации. Он связывается с РНК-полимеразой и облегчает ее отделение от ДНК-матрицы. Модель торпеды — второй механизм терминации. При этом РНК-полимераза синтезирует РНК и движется по ДНК до сайта полиаденилирования, который означает, что на нем транскрипт должен

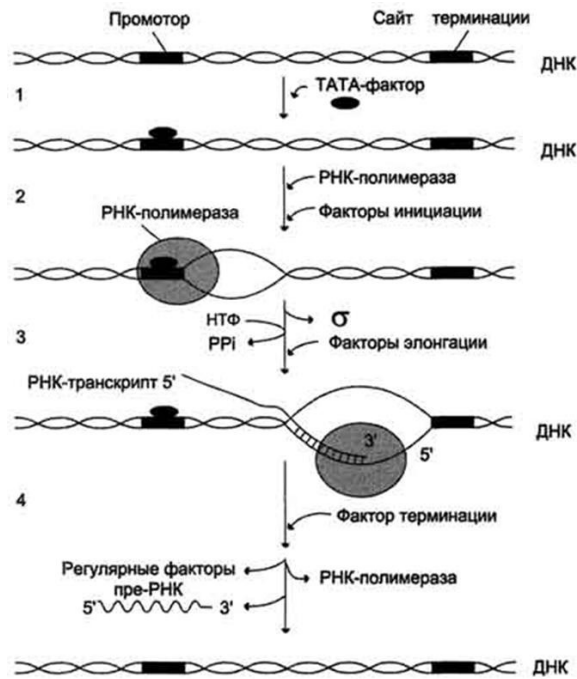


Рис. 1: Транскрипция

кончится. Этот сайт распознается ферментами, транскрипт отрезается от всей остальной РНК и полиаденилируется (пре-РНК). РНК-полимераза все еще продолжает синтезировать РНК. Белок Хm2 связывается с остатком РНК, расщепляет ее, добирается до РНК-полимеразы и освобождает ДНК.

Какой из этих двух механизмов терминции транскрипции превалирует на сегодняшний день сказать сложно.

7. Процессинг матричной РНК

Первичный транскрипт претерпевает процессинг. При этом происходят модификации 5'-конца, 3'-конца, сплайсинг (в том числе, альтернативный), а также посттранскрипционные модификации РНК и редактирование. Кроме того, у эукариот есть ядро, поэтому нужно транспортировать РНК к месту синтеза белка. У прокариот же РНК-полимераза сразу синтезирует матрицу для синтеза белка без всяких модификаций.

Модификация 5'-конца Модификация 5'-конца эукариот также известна как «кэпирование». Все мРНК и длинные некодирующие РНК имеют на 5'-конце так называемый кэп, или **7-метилгуанозинтрифосфат** (см. рис. ??). Кэпирование происходит с помощью фермента гуанилтрансферазы. Этот фермент пришивает ГТФ (гуанозинтрифосфат) в ориентации 5'- к 5'-концу, то есть инвертировано. Затем происходит метилирование этого нуклеотида.

Кэп сохраняет РНК от деградации. Любая РНК без кэпа в клетке разрушается РНК-азами. Кэп также участвует в распознавании РНК рибосомой. На этот модифицированный конец садятся белки, которые привлекают рибосому для синтеза белка.

Модификация 3'-конца На 3'-конце у мРНК есть **полиА-хвост** (см. рис. ??). Он может быть разной длины, но в среднем он составляет около 100 – 200 адениловых нуклеотидов. В образовании полиА-хвоста участвует белок CPSF. Во время транскрипции он сидит на РНК-полимеразе. Когда полимеразе синтезировался участок РНК с сигналом полиаденилирования, CPSF вступает с этим участком во взаимодействие, привлекает белки с экзонуклеазной активностью, которые отрезают лишний кусок РНК. ПолиА-полимераза (аденилат-полимераза) наращивает полиА-хвост на 3'-конце РНК. Другой белок PAB2 связывается с ново-синтезированной полиА-последовательностью и увеличивает сродство РНК к аденилат-полимеразе.

ПолиА-хвост также предотвращает преждевременную деградацию РНК-азами. Кроме того, полиА-хвост важен при транспорте РНК из ядра в цитоплазму.

Сплайсинг Этот процесс присущ только эукариотам. В пре-РНК есть экзонные и интронные участки. При созревании интроны вырезаются из первичного транскрипта, а экзоны сшиваются между собой (см. рис. ??).

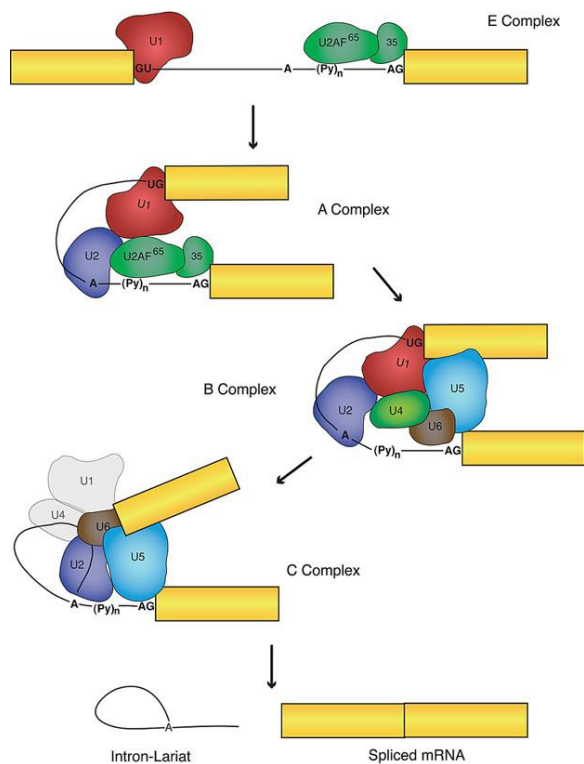


Рис. 4: Слайсосома

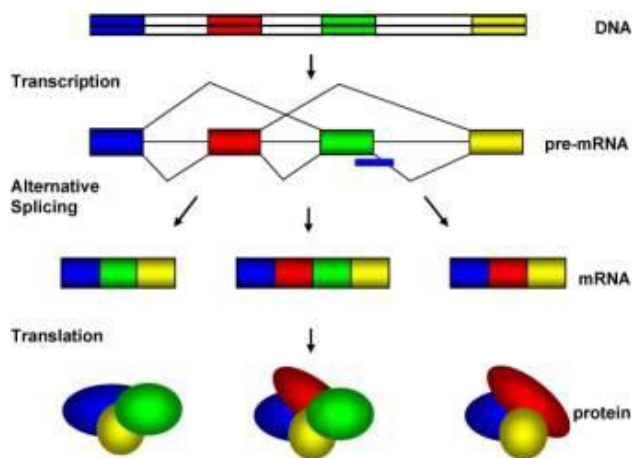


Рис. 5: Альтернативный сплайсинг

силу своих размеров и формы, имеют особые механизмы доставки мРНК в определенные области клетки, чтобы именно там произошел синтез белка.

10. Обратная транскрипция

Фермент, осуществляющий эту реакцию — **РНК-зависимая-ДНК-полимераза**, или **ревертаза**, или **обратная транскриптаза**. Этот фермент вирусного происхождения был открыт в 1975 году Дэвидом Балтимором, Ренато Дульбекко и Говардом Темным. Они выяснили, что из вирусной РНК с помощью ревертазы может образовываться кДНК (кодирующая ДНК), которая способна встраиваться в геном клетки. Интересно, что в качестве затравки РНК-зависимая-ДНК-полимераза использует тРНК хозяйской клетки. Потом затравка удаляется из кДНК.

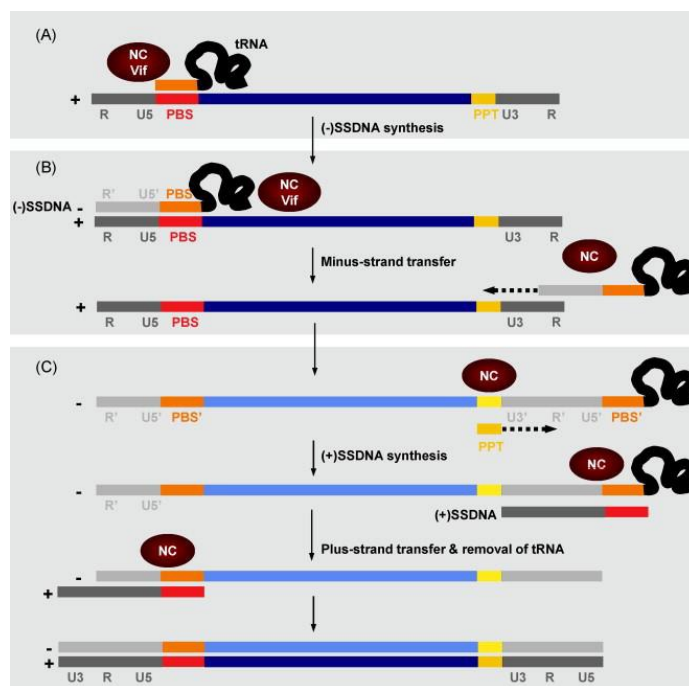


Рис. 6: Обратная транскрипция

11. Трансляция у прокариот

Третий этап, отраженный в Центральной догме молекулярной биологии — трансляция. Трансляция (от лат. *translatio* — перевод) — процесс синтеза белка из аминокислот на матрице РНК, осуществляемый рибосомой. Трансляция состоит из трех этапов:

- Инициация,
- Элонгация,
- Терминация.

За изучение структуры и функции рибосомы в 2009 году была присуждена Нобелевская премия V.Ramakrishnan, T.Steitz, A.Yonath.

В общем виде трансляция выглядит следующим образом (см. рис. ??). По мРНК движется рибосома и переводит язык триплетов нуклеотидов в язык аминокислот. В активный центр рибосомы поступают тРНК с аминокислотами. При комплементарном взаимодействии антикодона тРНК и кодона мРНК, рибосома присоединяет аминокислоту к синтезирующейся пептидной цепи и продвигается на один триплет вперед по мРНК.

Транспортная РНК, или тРНК Все молекулы тРНК имеют длину от 73 до 93 нуклеотидов, они довольно консервативны. Транспортные РНК синтезируются РНК-полимеразой I в виде единой последовательности, затем претерпевают процессинг. При этом удаляется 5'-лидерная последовательность, 3'-конец, добавляется ССА на 3'-конец, вырезаются интроны и иногда происходит модификация отдельных нуклеотидов.

К 3'-концу готовой тРНК с помощью аминокил-тРНК-синтетаз прикрепляется аминокислоты. Важно, что для прикрепления определенной аминокислоты к определенной тРНК нужна определенная аминокил-тРНК-синтетаза.

12. Рибосома прокариот

Рибосома состоит из двух субъединиц: 50S и 30S (см. рис. ??). В большую субъединицу рибосомы входят 23S и 5S рРНК (рибосомальная РНК) и множество рибосомальных белков. Малая субъединица образована 16S рРНК и белками. Вместе большая и малая субъединицы образуют прокариотическую 70S рибосому. Буква «S» обозначает коэффициент седиментации, или скорость осаждения частиц в центрифуге.

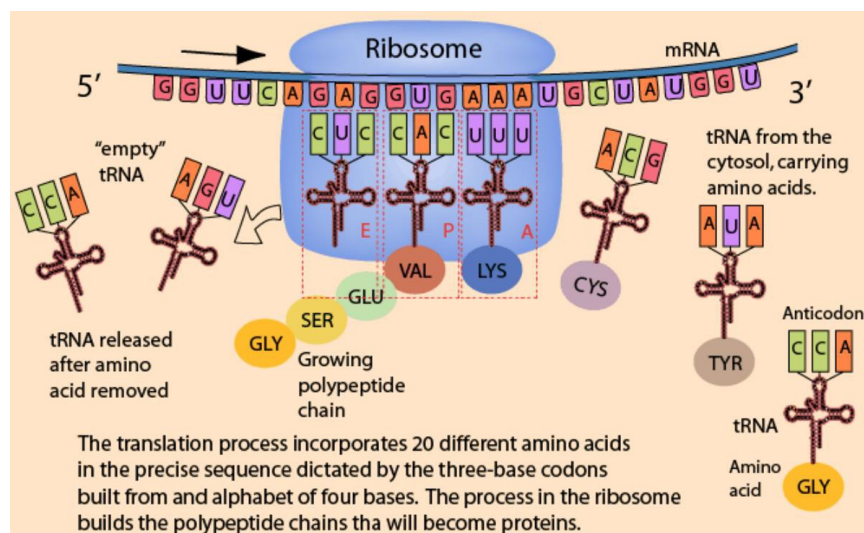


Рис. 7: Трансляция

13. Инициация трансляции у прокариот

У прокариот на мРНК есть специальная последовательность, которая называется **последовательность Шайна-Дальгарно**. Она открыта и исследована австралийскими учеными Джоном Шайном и Ланн Дальгарно. Последовательность состоит из шести нуклеотидов AGGAGG. 16S рРНК на 3'-конце содержит комплементарную последовательность CCUCCU. Инициация трансляции происходит во время комплементарного взаимодействия 16S рРНК и мРНК. Последовательность Шайна-Дальгарно консервативна и определяет уровень трансляции. Чем консервативнее участок, тем больше белка получится.

Не все мРНК имеют эту последовательность, но если она есть, то находится недалеко от инициаторного кодона.

У прокариот трансляция начинается с триплета ATG. Осуществляется это по следующему механизму. Необходимы специальные факторы инициации трансляции: **IF1, IF2-GTP, IF3**; кроме того, необходима **инициаторная тРНК**. IF2 связывается с этой тРНК и с 30S субъединицей рибосомы, далее с этим комплексом связывается 50S субъединица с образованием функциональной рибосомы.

14. Элонгация трансляции у прокариот

Этот этап начинается с момента сборки рибосомы на мРНК. Для понимания работы рибосомы необходимо знать ее активные центры. Ее центры (А, Р, Е) отвечают за разную работу. **Сайт А** отвечает за связывание тРНК и мРНК, **сайт Р** — за образование пептидной связи между аминокислотой и пептидом, **сайт Е** участвует в отсоединении тРНК без аминокислоты от рибосомы.

Продвижение рибосомы по мРНК осуществляется факторами элонгации трансляции (см. рис. ??). На сегодняшний день описано три фактора:

- EF-Tu связывается с тРНК с аминокислотой и направляет ее в сайт А рибосомы.
- Фактор EF-Ts связывается с EF-Tu и освобождает его из рибосомы. Далее осуществляется синтез пептидной связи.
- Фактор EF-G катализирует перемещение рибосомы на один триплет мРНК. Транспортная РНК оказывается вне рибосомы и открепляется от мРНК.

Далее цикл повторяется.

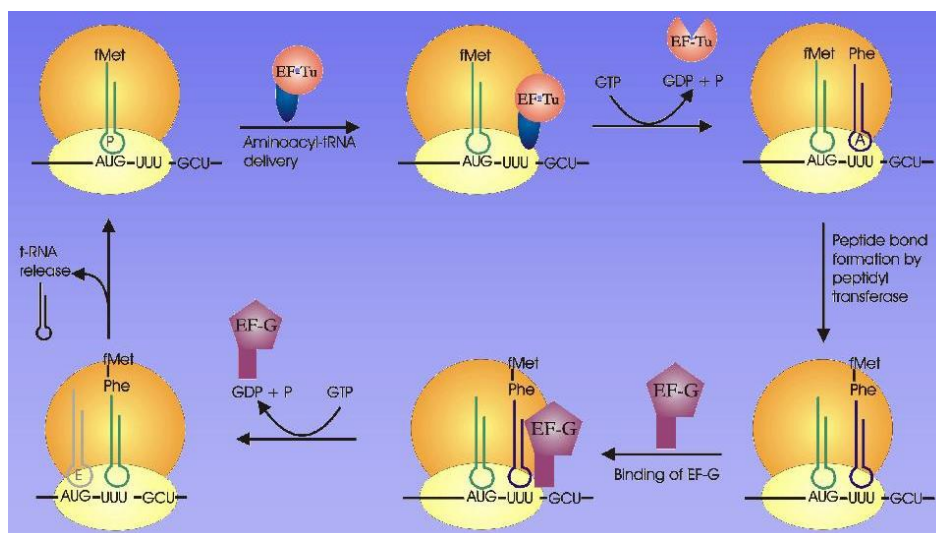


Рис. 8: Элонгация трансляции у прокариот

15. Терминация трансляции у прокариот

Этот этап также контролируется белковыми факторами трансляции. **RF1** узнает кодоны терминации трансляции UAA и UAG, **RF2** узнает терминирующие кодоны UAA и UGA. **EF3** облегчает работу двух других факторов. Механизм терминации трансляции относительно малоизучен. Известно, что нет тРНК, комплементарной стоп-кодонам. Когда рибосома находится на стоп-кодоне матричной РНК в ожидании комплементарной тРНК долгое время, факторы терминации трансляции катализирует диссоциацию рибосомы на субъединицы.

Сдвиг рамки считывания Терминация не всегда происходит по вышеописанному механизму. Рибосома может пропустить стоп-кодон и продолжить синтез пептида. Обычно сдвиг происходит, если мРНК образует какие-то вторичные структуры типа псевдоузлов. Перед вторичными структурами рибосома замедляется и за счет напряжения в преодолении этой структуры она может сдвинуться на 1 – 2 нуклеотида или даже пропустить триплет без сдвига рамки считывания. Таким образом, рибосома минует стоп-кодон и синтезирует белок дальше. Этот механизм называется «фреймшифтинг». Также сдвиг может произойти из-за самой последовательности мРНК.

У некоторых прокариот этот механизм носит адаптационный характер: некоторые белки синтезируются лишь в определенных случаях.

Позже выяснилось, что такая же система есть и у эукариот. Но она не ярко выражена.

16. Трансляция у эукариот

Основное отличие трансляции эукариот от трансляции прокариот в более сложном строении рибосомы. Коэффициент седиментации всей рибосомы — 80S, большой субъединицы — 60S, малой — 40S. Рибосома также состоит из рРНК (28S и 5S, 18S) и белков.

У эукариот трансляция происходит в цитоплазме, поэтому мРНК транспортируется из ядра специальными белками. Существует гипотеза, что трансляция у эукариот происходит не во всей цитоплазме клетки, а в отдельных областях цитоплазмы, условно называемых «трансляционными компартментами».

Инициация трансляции начинается с последовательности Козак, которая находится прямо перед старт-кодоном. В большинстве случаев старт-кодон — это AUG, который кодирует метионин, но не всегда это именно AUG. **Последовательность Козак** (CA или CAC) узнается одним из факторов инициации трансляции. Фактор привлекает рибосому на мРНК. Последовательность Козак не является сайтом для связывания с рибосомой. Рибосома связывается с мРНК, на 5'-конце которой есть кэп. С кэпом взаимодействуют белки, которые делают возможной посадку рибосомы на это место. При этом, малая субъединица рибосомы садится на 5'-конец мРНК в области кэпа и двигается вдоль молекулы мРНК, сканируя матрицу в поисках стартового кодона AUG.

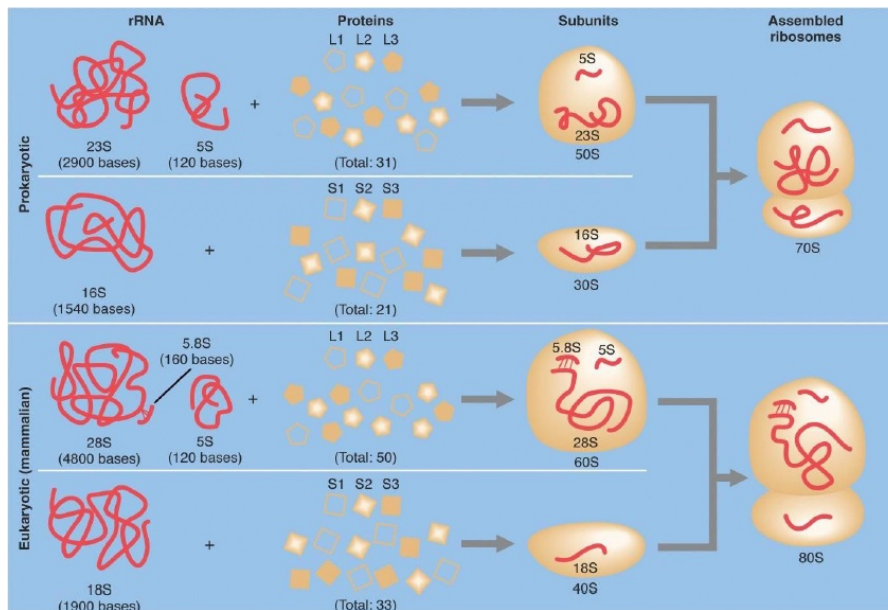


Рис. 9: Прокариотическая и эукариотическая рибосома

Поиск стартового кодона может проходить по альтернативному, кэп-независимому пути, через механизм внутренней инициации. Этот механизм распространен у вирусов. У мРНК могут быть внутренние последовательности **IRES** (Internal Ribosomal Entry Site), которые образуют сложную вторичную структуру. У каждого вируса она своя, последовательности IRES очень вариабельны. Они узнаются специальными факторами связывания и привлекают рибосому для трансляции с этого участка.

Механизм связывания рибосомы через IRES элементы достаточно широко распространен среди эукариот. Это было показано в экспериментах с клетками, которые подверглись стрессовому воздействию. В таких клетках падает кэп-зависимое распознавание мРНК рибосомой и возрастает распознавание через IRES элементы. В результате получаются нетипичные стрессовые белки, составляющие около 10% от всех закодированных в ДНК белков.

Например, у гена p53 в мРНК есть два элемента типа IRES. Поэтому в одних случаях получается нормальный белковый продукт, а в других — укороченный, который получается в стрессовых условиях.

В классическом варианте для инициации трансляции все же нужен кэп. Комплекс белков на кэпе образует из мРНК петлю (см. рис. ??). Эти белки взаимодействуют одновременно как с кэпом, так и с полиА-хвостом. 40S субъединица распознает этот комплекс и начинает синтез белка. Такой комплекс белков и мРНК обеспечивает возможность ре-инициации. При этом рибосома как бы проскакивает на еще один круг по петле мРНК, что приводит к повышению уровня трансляции.

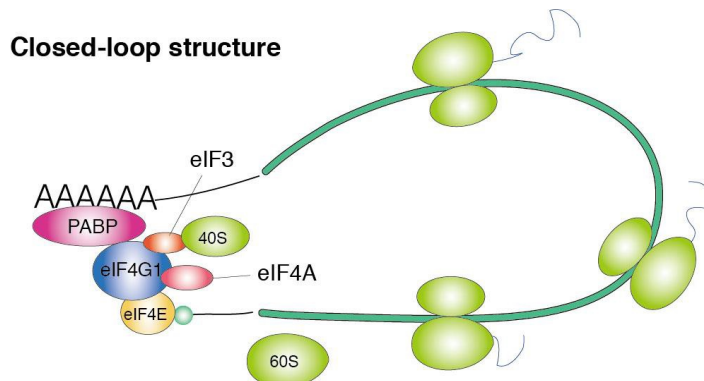


Рис. 10: Реинициация трансляции у эукариот

Механизм работы самой рибосомы практически не отличается от такового у прокариот. Имеются те же сайты А, Р, Е рибосомы и факторы элонгации трансляции, которые помогают продвижению рибосомы по

Внимание: конспект не проверялся преподавателями — всегда используйте рекомендуемую литературу при подготовке к экзамену!

мРНК и синтезу пептида с высвобождением тРНК.

У эукариот за **терминацию трансляции** отвечает только один белок **eRF**, способный распознавать сразу все три терминирующих кодона.