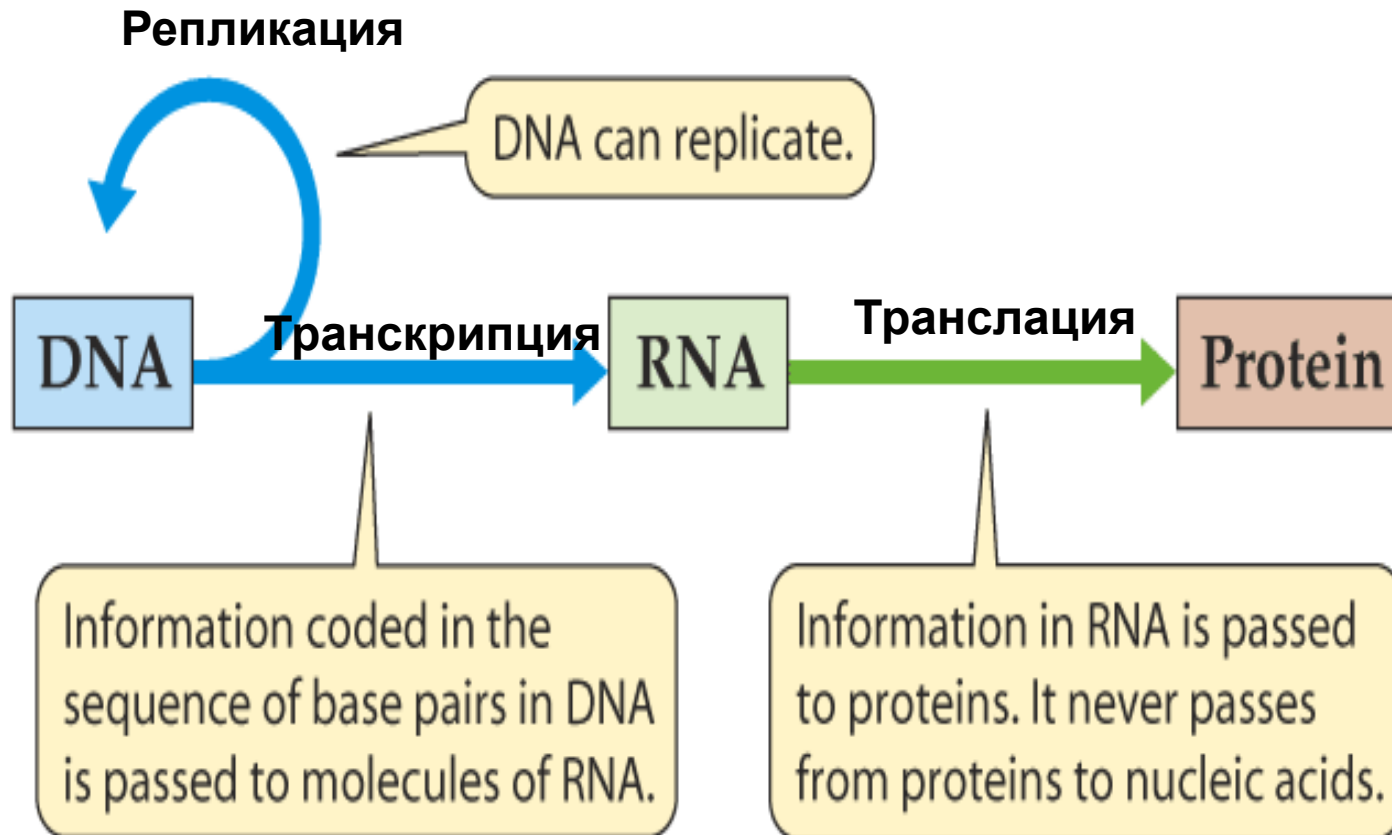


Синтез на РНК - транскрипция

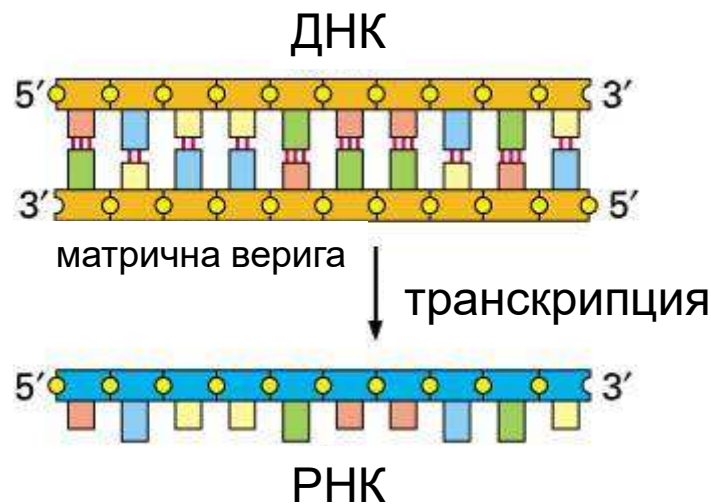
Доц. Милена Атанасова, д.б.
Ръководител сектор “Биология”
МУ-Плевен

ДНК, РНК, посока на информацията



Функции на ядрото. Реализация на генетичната информация – транскрипция, транспорт и зреене на РНК. Механизъм на транскрипцията – ензими и фактори. Видове ядрени РНК и РНП

Транскрипция
ДНК → РНК

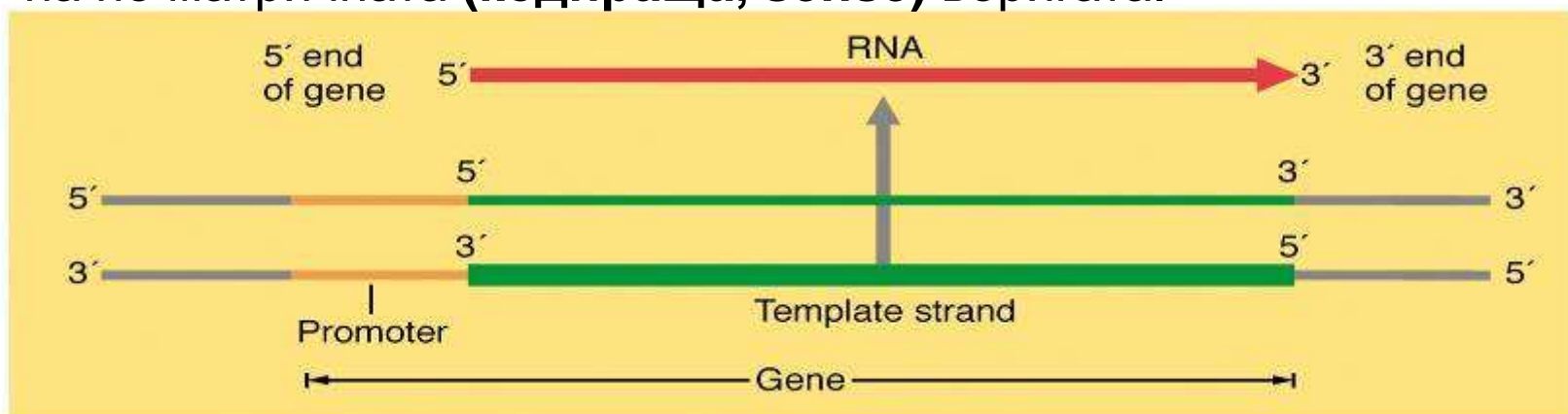


- Процес на презаписване на информацията от ДНК в РНК

- **Матричен принцип** (комплементарност А-**U**, G-C, използват се рибонуклеозид трифосфати)

- **Крайни продукти** на процеса: рибозомна РНК, информационна РНК, транспортна РНК хетерогенни ядрени РНКи

Транскрипцията е **асиметрична** – само една от веригите на ДНК в областта на определен ген се транскрибира в молекула РНК; матрицата (**не-кодираща, non-sense**) верига РНК транскриптът има същата последователност като тази на не матричната (**кодираща, sense**) веригата.



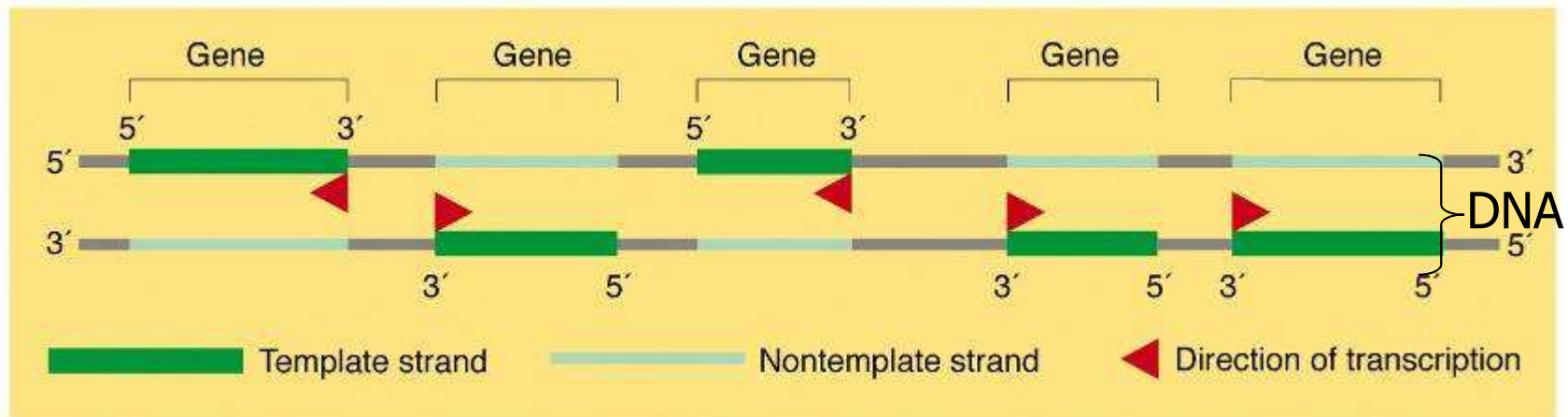
РНК се синтезира в посока от 5' към 3'

Матричната верига се чете в посока от 3' към 5'



Всяка от веригите на молекулата на ДНК може да служи за матрица в процеса транскрипция.

Но за всеки конкретен ген само една от веригите е матрица.



Ензими осъществяващи транскрипцията – РНК полимерази

- използват рибонуклеозидтрифосфати
- катализират нарастване на молекулата РНК в посока 5' → 3'
- за разлика от ДНК полимеразите могат да започнат синтеза **без** праймер (повече грешки – 1 грешка на 10⁴ н.)

Основни характеристики и разлики в транскрипцията при про- и еукариотни клетки

1. РНК полимерази

прокариоти

Един вид синтезира
всички РНКи
(5 субединици)

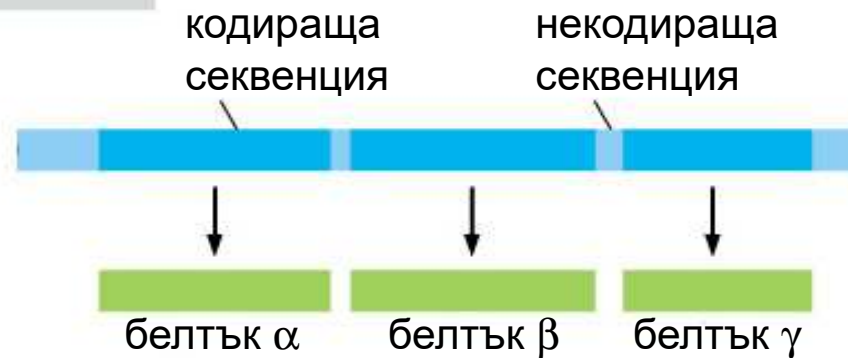
еукариоти

- РНК полимераза I (А) – р РНК
- РНК полимераза II (В) – иРНК
- РНК полимераза III (С) – тРНКи и 5S рРНК
(9 до 11 субединици)

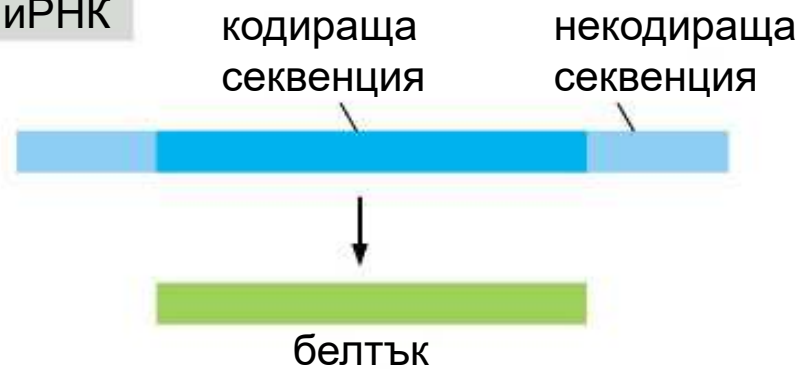
Разлики в транскрипцията при про- и еукариотни клетки

2. Брой на белтъците кодирани от една РНК молекула

прокариотна иРНК



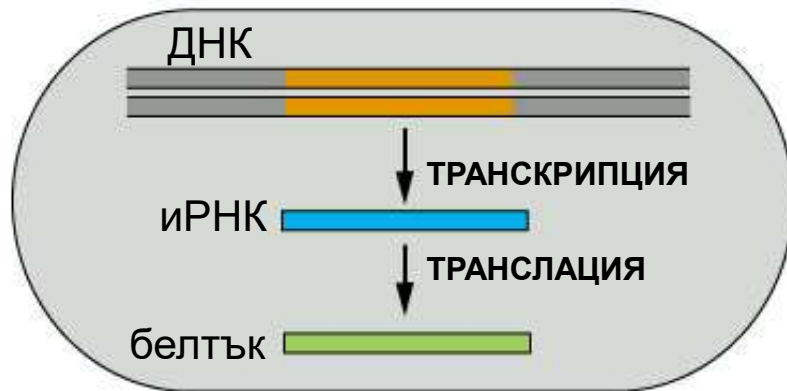
еукариотна иРНК



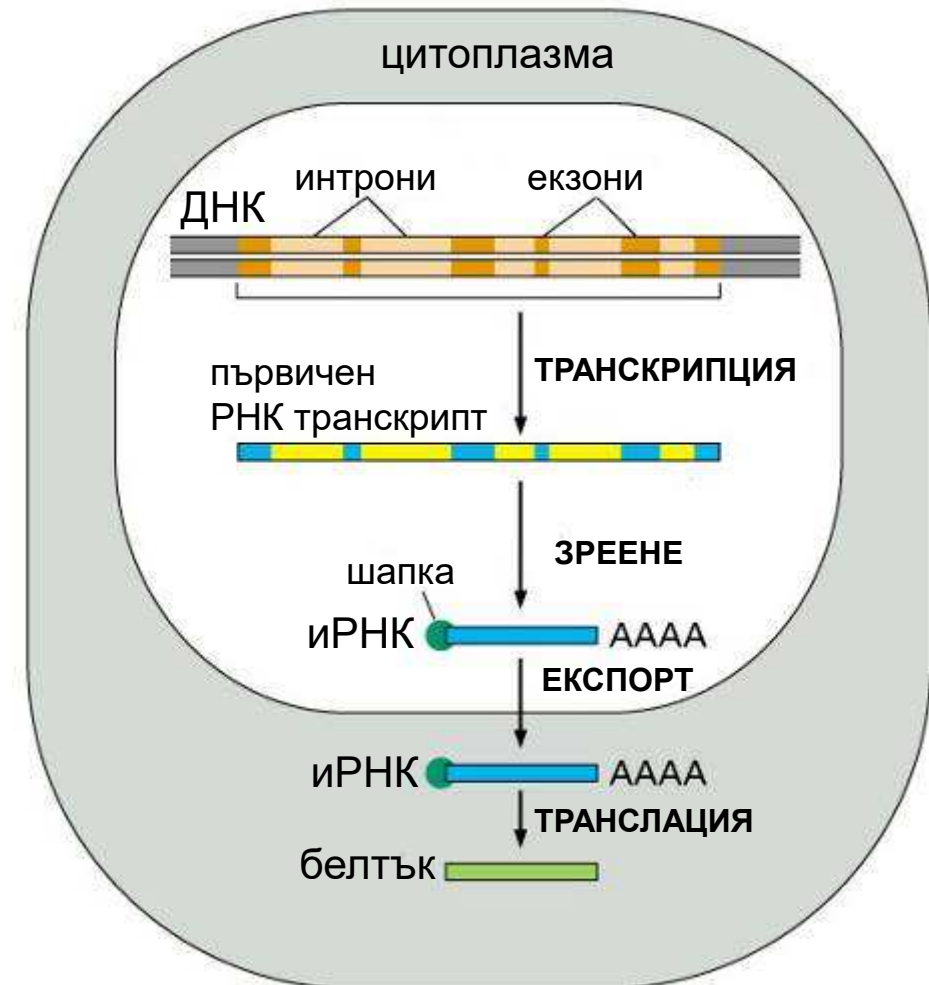
Разлики в транскрипцията при про- и еукариотни клетки

3. Модификации на РНК

Прокариоти



Еукариоти



Необходими условия

1. ДНК - матрица

- **Промотор** - ДНК-участък, за който се залавя РНК-полимеразата преди да започне транскрипцията; определя коя от двете ДНК-вериги да се транскрибира; определя от къде да започне транскрипцията
- **TATA box** – ДНК-последователност в промотора, за която са залавят самата РНК-полимераза с нейния **σ фактор** при прокариоти, или транскрипционни фактори при еукариоти; еволюционно консервативна последователност 5'-TATAA-3'

2. Четирите рибонуклеозидтрифосфати

Необходими условия

- **РНК-полимераза** - основен ензим на транскрипцията, синтезира РНК от ДНК, изгражда фосфодиестерната връзка в РНК-молекулата.
- **Сигма-фактор** - разпознава и залавя промотора (**инициация**), след което към него се присъединяват и другите субединици на ензима = **холоензим** (изгражда фосфодиестерните връзки)
- 3. **Транскрипционни фактори** - само при транскрипцията на *еукариотите*, подпомагат свързването на РНК-полимераза-II към промотора.

Необходими условия

5. Специфични белтъци:

- продукт на гена nus A - присъединява се към РНК-полимеразата след отделянето на сигма-фактора и разпознава терминиращия участък от ДНК;
- ро-белтък - терминира транскрипцията по собствен механизъм;
- белтъци, подпомагащи зреенето на първичния транскрипт;
- белтъци, транспортиращи еукариотната иРНК до рибозомите.

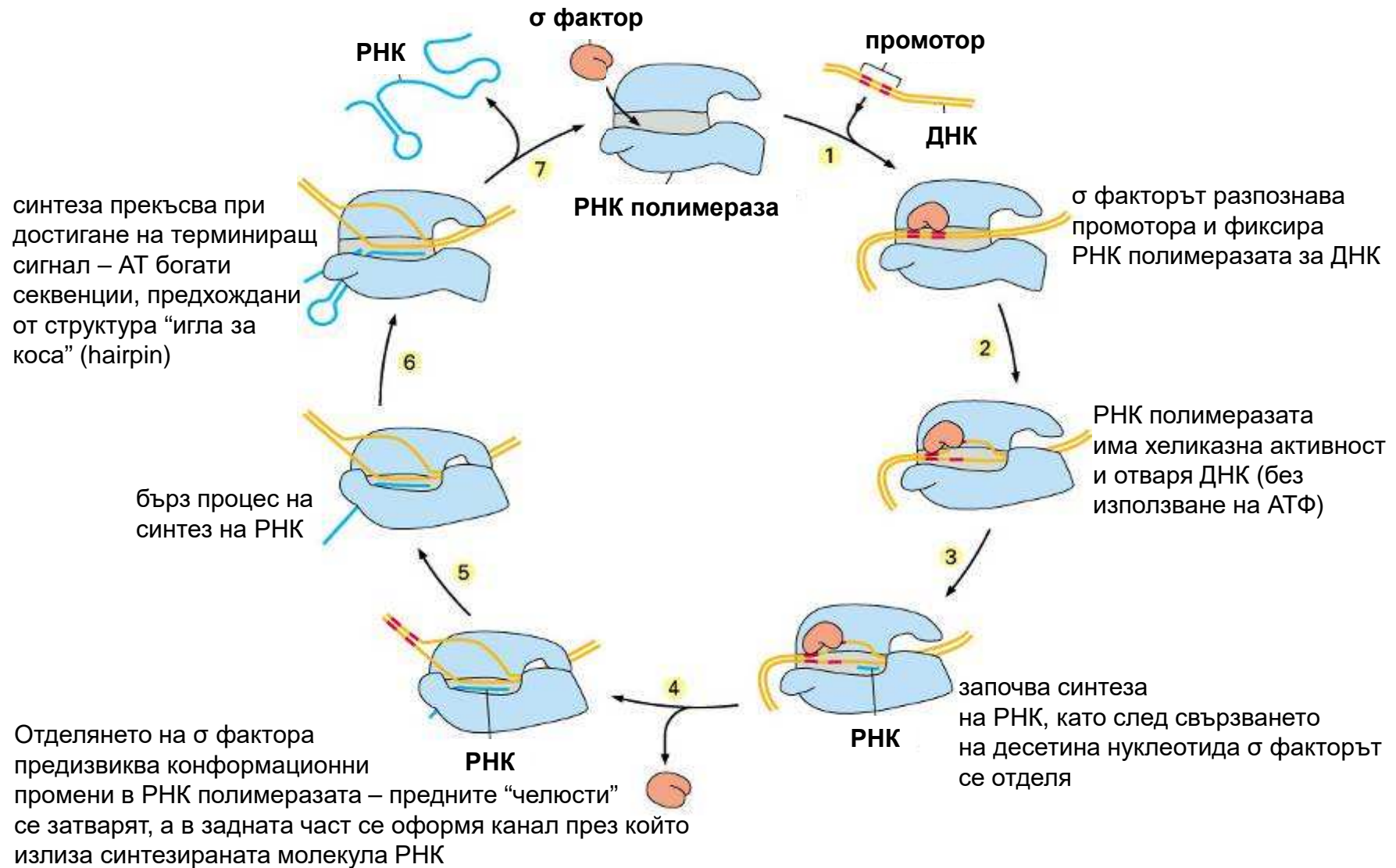
6. Топоизомеразы - отстраняват свръхспирализацията в ДНК-дуплекса непосредствено преди транскрибирания участък.

7. Хеликази – при еукариоти!

Етапи в процеса на транскрипция

- 1. Инициация** – започва от специфични места – промотори
промоторите определят:
 - началото на гена който ще се транскрибира
 - честотата на транскрипция
 - коя верига ще се транскрибира- извършва се с помощта на инициращи фактори
- 2. Елонгация** - удължаване на веригата на матричен принцип
- 3. Терминация** - прекратяване на синтеза след достигане на “стоп” сигнал и освобождаване на синтезираната молекула РНК

1. Механизъм на транскрипцията при прокариоти



По проф. В. Сарафян, МУ-П ловдив

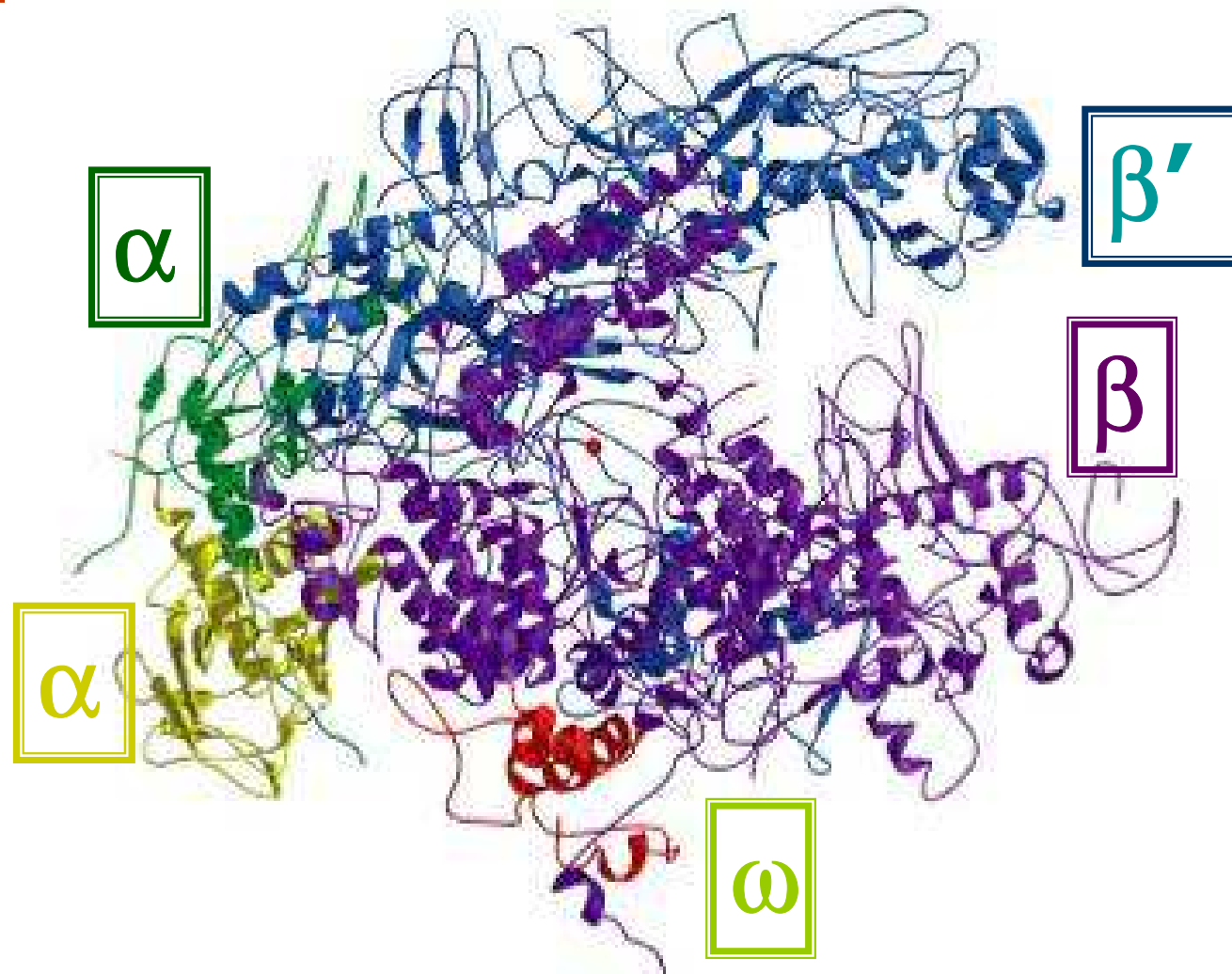
РНК полимераза Прокариоти

Един вид РНК полимераза (~400 kDa):

- Транскрибира иРНК, рРНК и тРНК
- Транскрипцията и транслацията са спрегнати
- При E.coli има 7000 РНК полимеразни молекули (2000-5000 в употреба)
- РНК полимераза е съставена от 5 субединици
 - $\alpha_2\beta\beta'\epsilon\sigma$ = холоензим - 6 субединици: $\alpha_2\beta\beta'\sigma\omega$ (~480 kDa).
 - $\alpha_2\beta\beta'\epsilon$ = корензим

Бактериална РНК полимераза

Корензимът синтезира РНК – има полимеразна активност



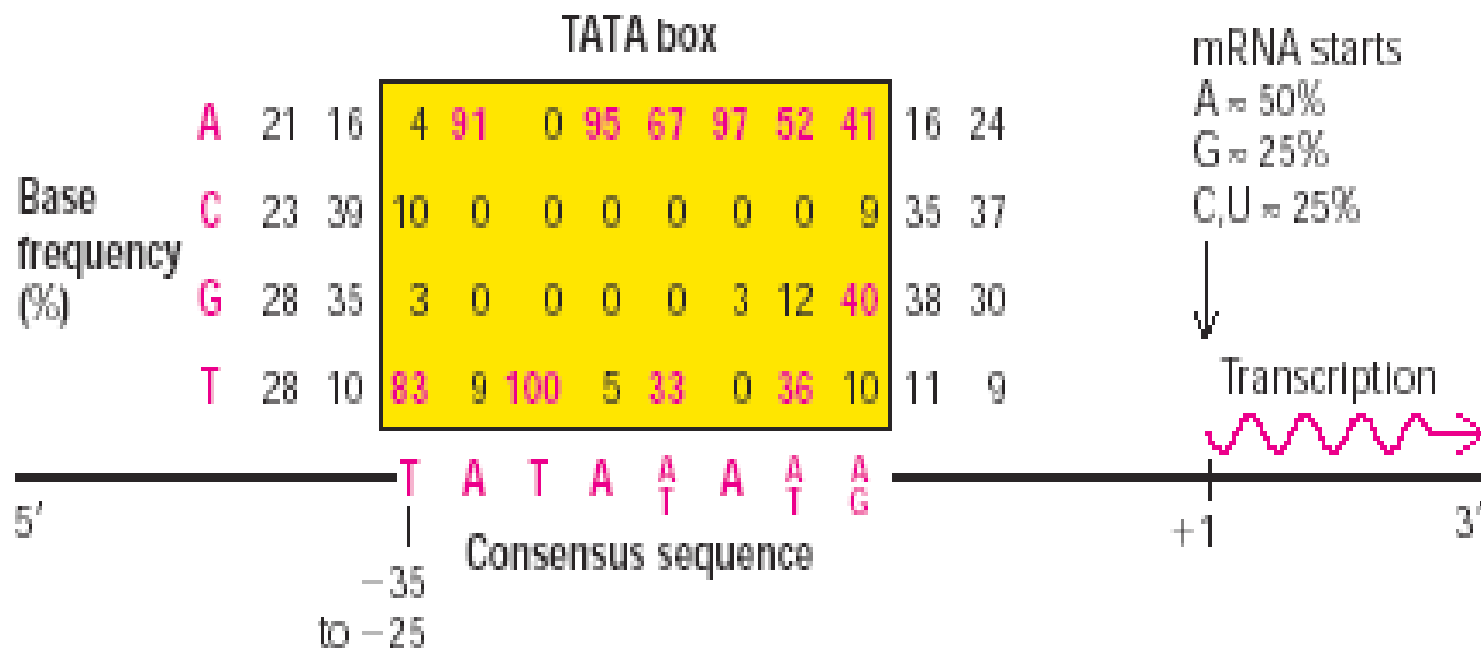
Субединици на РНК-полимераза

- $\alpha 2$: Две α субединици асемблират ензима и свързват регулаторните фактори. Всяка субединица има два домена: α CTD (С-краен домен) свързва участък до промотора, и α NTD (N-краен домен) свързва останалите полимеразни субединици.
- β : има полимеразна активност (катализира синтеза на РНК).
- β' : свързва ДНК (неспецифично).
- ω : възстановява денатурираната РНК полимераза до функционалната и форма в *in vitro* условия.

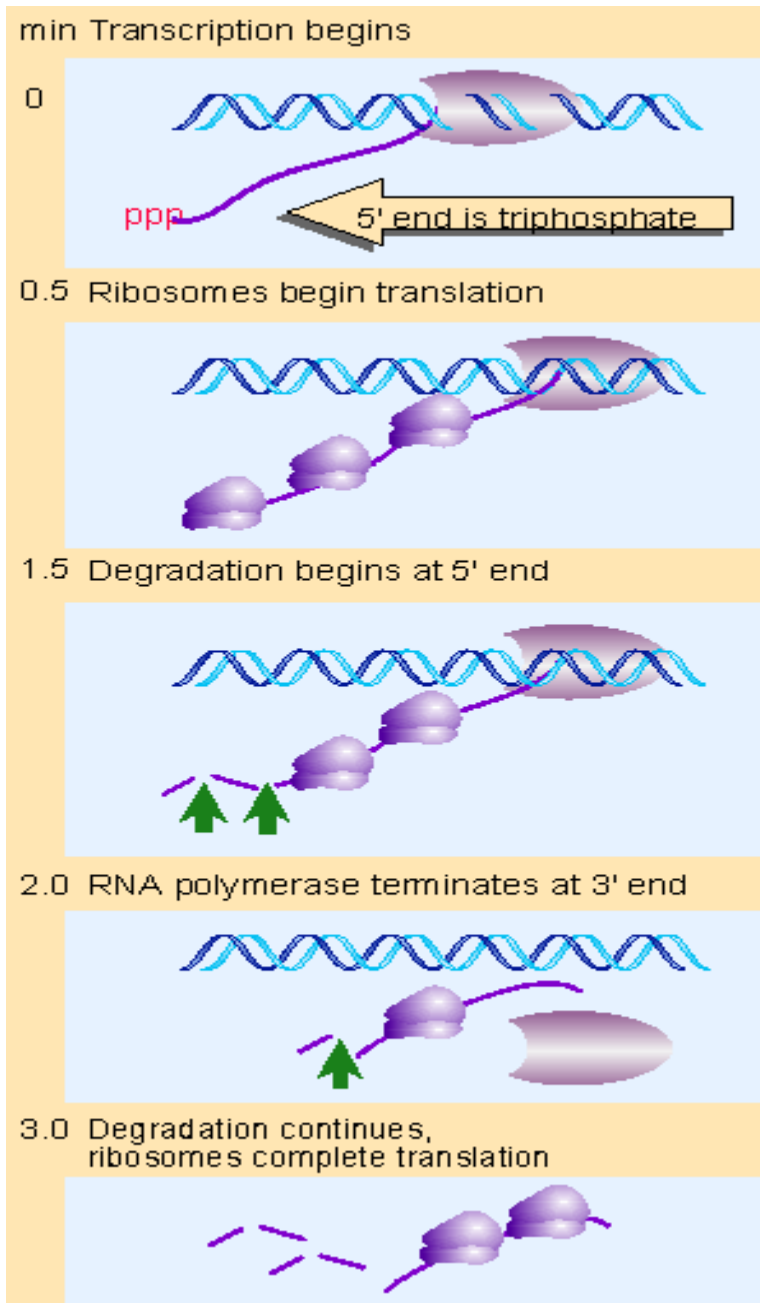
Промотор

- σ фактор от РНК-полимеразата – разпознава промотора (70 нд)
- При **прокариоти** хомология се установява само за къси участъци от промотора от типа ТАТААТ на около -10 нд – **блок на Pribnow** (box), както и на -35 нд ТТГАЦА
- Съществуват различни по сила промотори и това зависи от вида на нуклеотидите в състава им.
- Силата на промотора се определя от това до каква степен -10 и -35 последователностите съвпадат с консенсусните последователности. При по-голямо съвпадение, полимеразата се свързва по-често и транскрибира гена, т.е. промотора е по-силен. И обратно.

Консервативната секвенция на ТАТА бокс/кутия



Нуклеотидната последователност преди стартовата точка (-35 до -26) за синтеза на иРНК е анализирана при 900 различни **еукариотни** белтък-кодиращи гени. При сравняване честотата (в %) на всяка база във всяка позиция се наблюдава максимална хомоложност в 8-базова област, наречена **ТАТА бокс**. Отдолу е показана нуклеотидната последователност в нея.

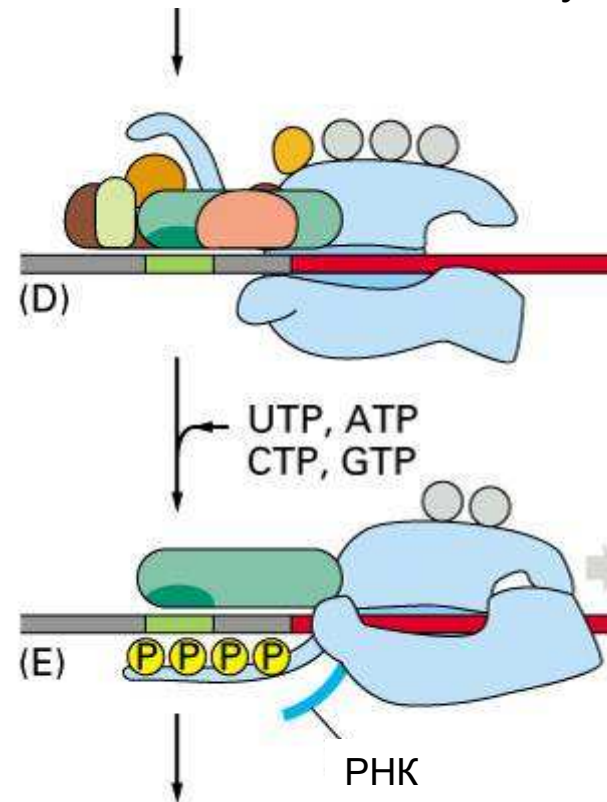
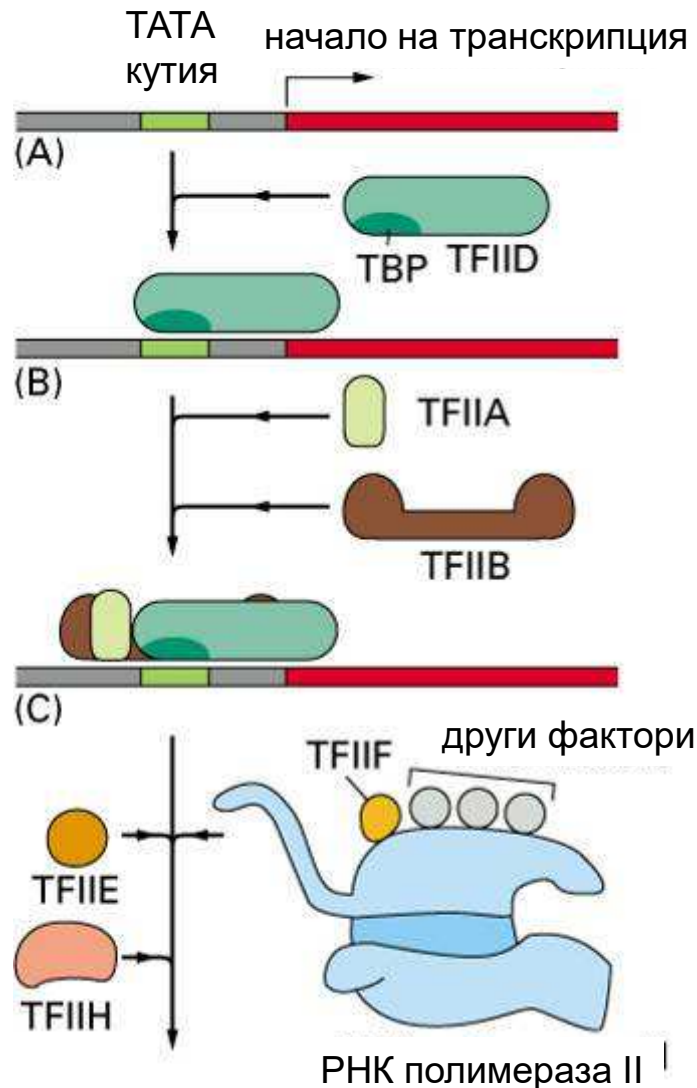


Тясна връзка между транскрипцията и трансляцията при бактериите.

Със започването на транскрипцията рибозомите се захващат за 5' края на иРНК и започват трансляцията преди цялата РНК да е транслирана. Полизомата се движи по дължината на иРНК докато тя се синтезира. Рибозомите продължават да транслират РНК, докато тя съществува, но тя бързо се разгражда (за няколко минути) в 5' → 3' посока.

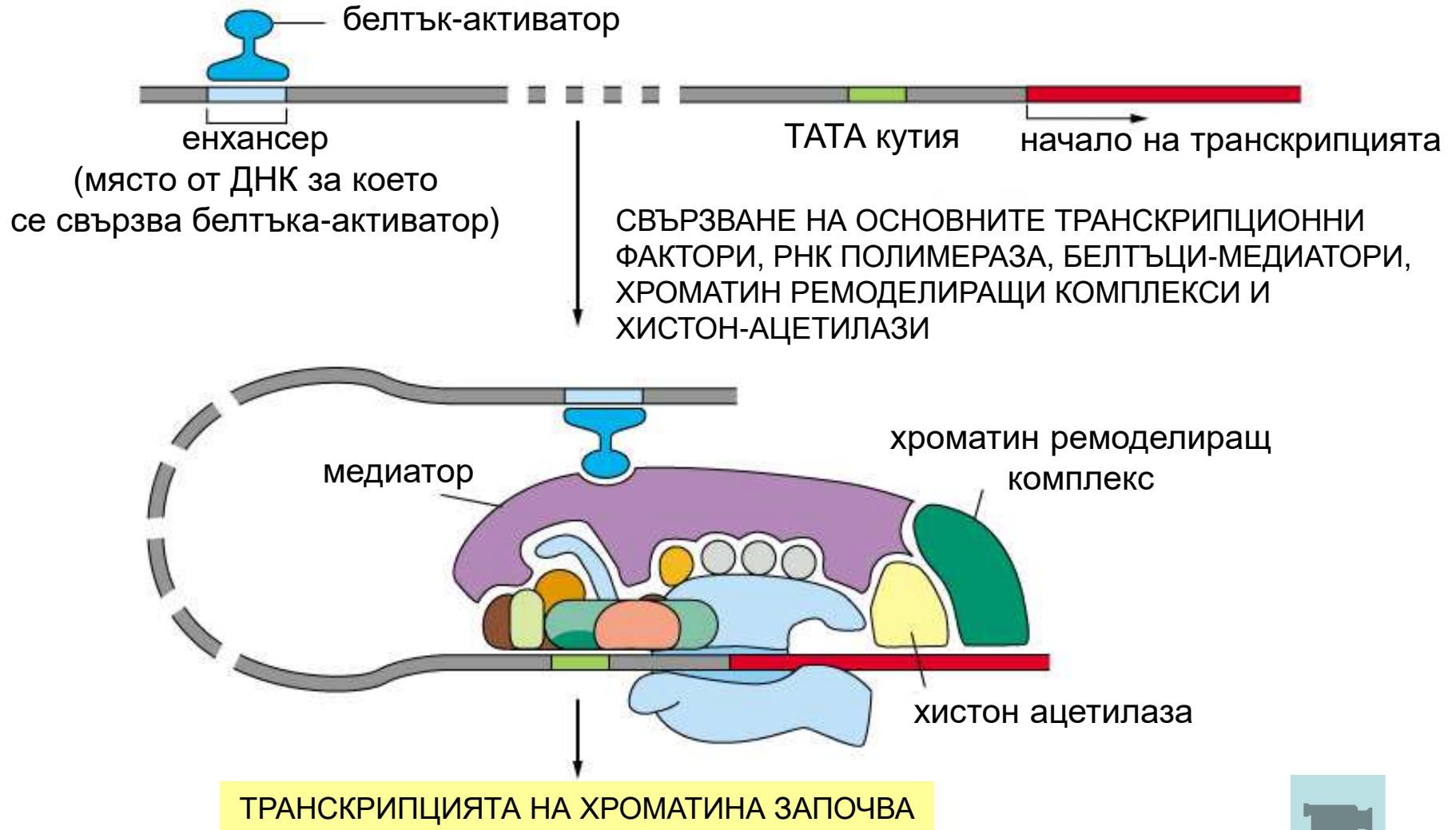
2. Механизъм на транскрипцията при еукариоти (РНК полимераза II)

Основни транскрипционни фактори – достатъчни за транскрипция върху “гола” молекула ДНК



Тази последователност на събитията е установена *in vitro*. Възможно е в клетката първо да се събира целия комплекс и тогава да се закача за ДНК.

Активатори, медиатори и комплекси, изменящи хроматина – фактори, които работят заедно с основните при транскрибиране на хроматин в клетката

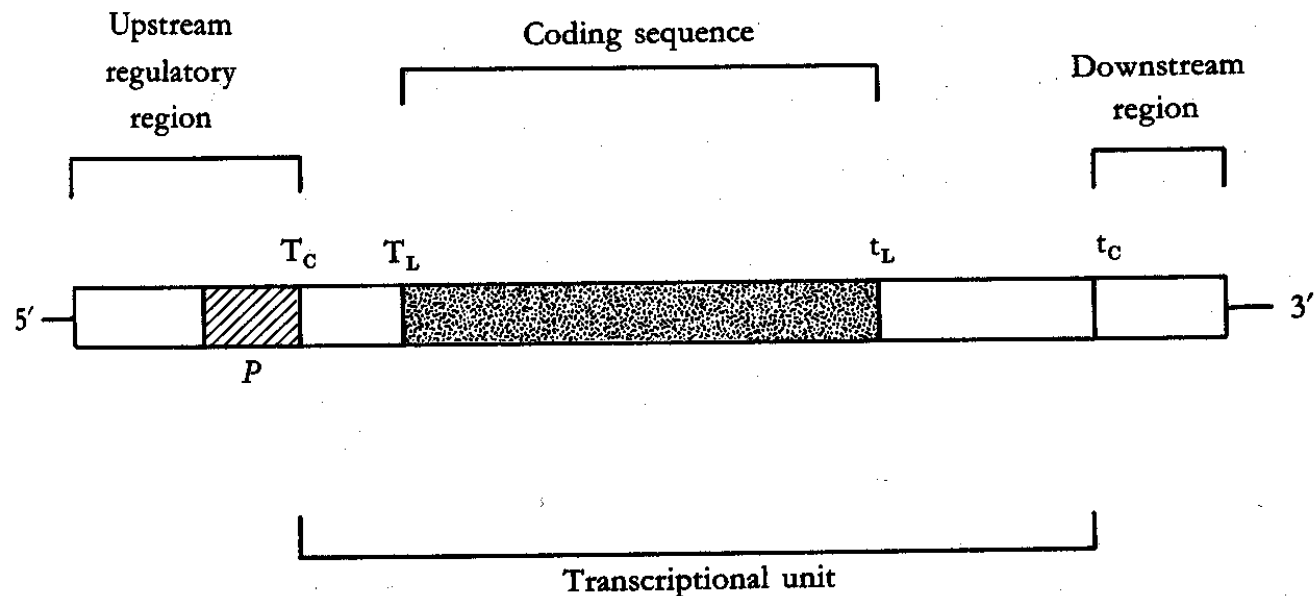


РНК-полимерази при еукариотите

- Докато бактериите презаписват всичките си гени с един ензим, еукариотната клетка има 3 РНК-полимерази само в ядрото си. Те се означават с I, II и III и разпознават различни промотори.
- РНК-полимераза I синтезира високомолекулните рРНК,
- РНКII – мРНК и някои малки ядрени РНК
- РНКIII – останалите малки РНК (тРНК, 5S рРНК, мяРНК, мцРНК, т.е. малките ядрени и цитоплазмени РНК).

Транскрипционни фактори, които действат заедно с РНК полимеразата II:

- **Главни фактори** – свързват се с РНК-полимеразата до образуване на комплекс около стартовата точка.
- Т.н. **upstream** фактори са ДНК свързващи белтъци, които разпознават специфични къси участъци от ДНК разположени нагоре от стартовата точка. Тяхната активност не подлежи на регулация.
- Функцията на **индуцируемите** фактори е същата като на предните, но те подлежат на регулация. Те се синтезират или активират в специфично време или в специфична тъкан.
- Транскрипцията на много еукариотни гени може да бъде стимулирана от контролни елементи, локализирани на разстояние от хиляди бази от стартовата точка. Такива далечни транскрипционни елементи се наричат **енхансери**. Те се срещат много рядко в бактериалните геноми. Енхансерите могат да бъдат разположени нагоре от промотора, надолу от него, вътре в някой интрон и дори след последния екзон на гена.

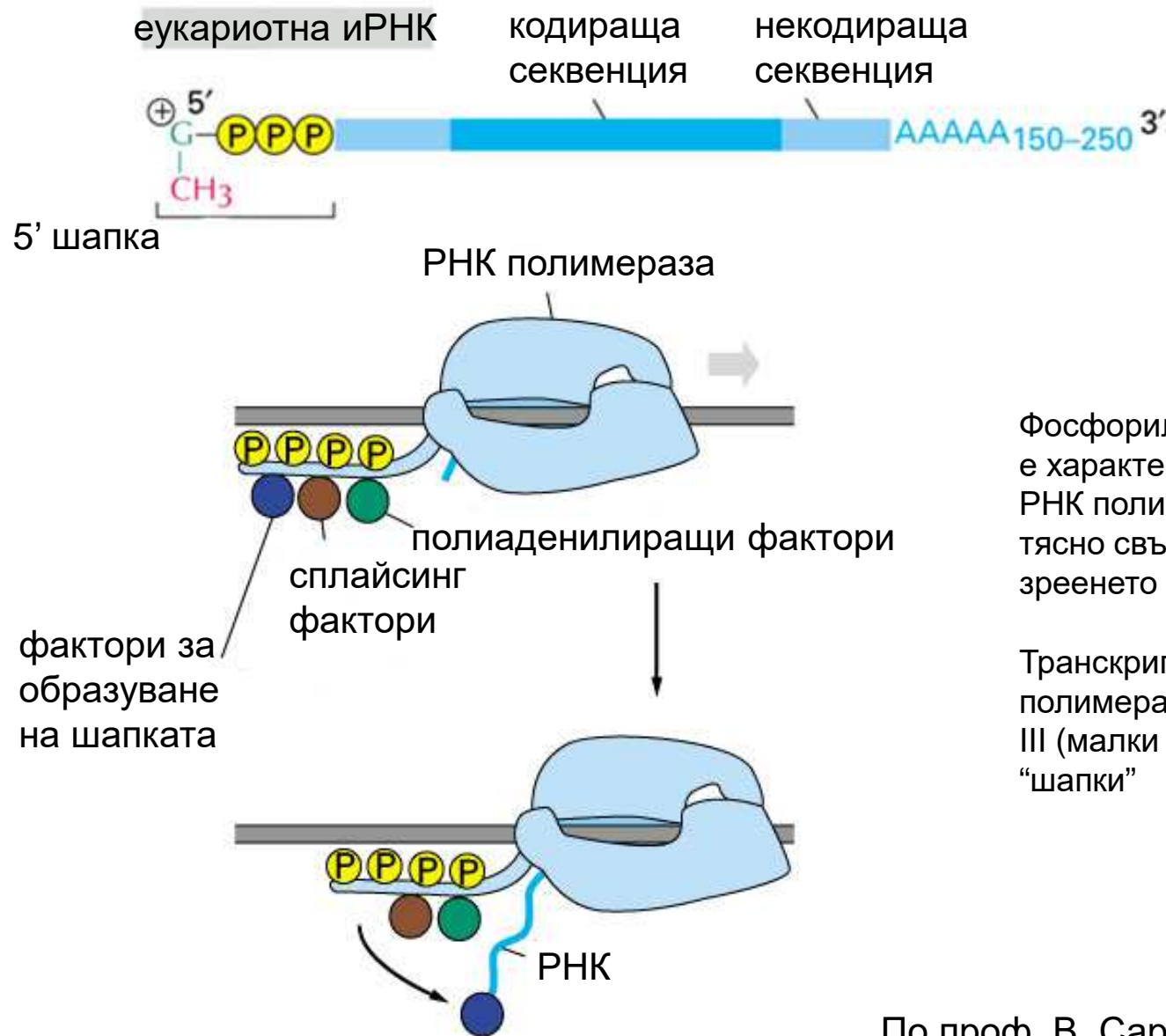


Организация на гена. Транскрипционната единица продуцира РНК молекула и започва с транскрипционен старт (T_C) и стоп сайт (t_C). В транскрипционната единица лежи кодиращата последователност. В левия край е регулаторната област, където се разполагат контролиращи елементи, такива като енхансери или оператори, както и промотора (P), който е място за свързване на РНК-полимераза, за да започне процеса на транскрипция.

Терминация

- В стоп сайта (tc) се намира терминатора на оперона, който най-често е комплементарен **палиндром** (боб, поп, капак)
 - При E.coli бива:
 1. **Р (Rho)-независима** в терминатори съдържащи Г-Ц палиндроми, следван от къса А последователност. Връзката им с У е слаба и иРНК лесно се отделя
 2. **ρ (Rho)-зависима** – позната като вътрешна терминация
 - Rho = голям протеин, АТФ-зависима хеликаза
 - Присъединява се към вече изградения транскрипт на място преди образуваната вече бримка
 - Свързва се с РНК-полимеразата
 - Транскрипцията спира
 - Разпада се хибрида ДНК-РНК
 3. Белтъчен продукт на **гена nus A** се присъединява към РНК-полимераза, който разпознава терминатора
- Кор-ензимът на свободната РНК-полимераза се дисоциира и се свързва отново със σ-фактора

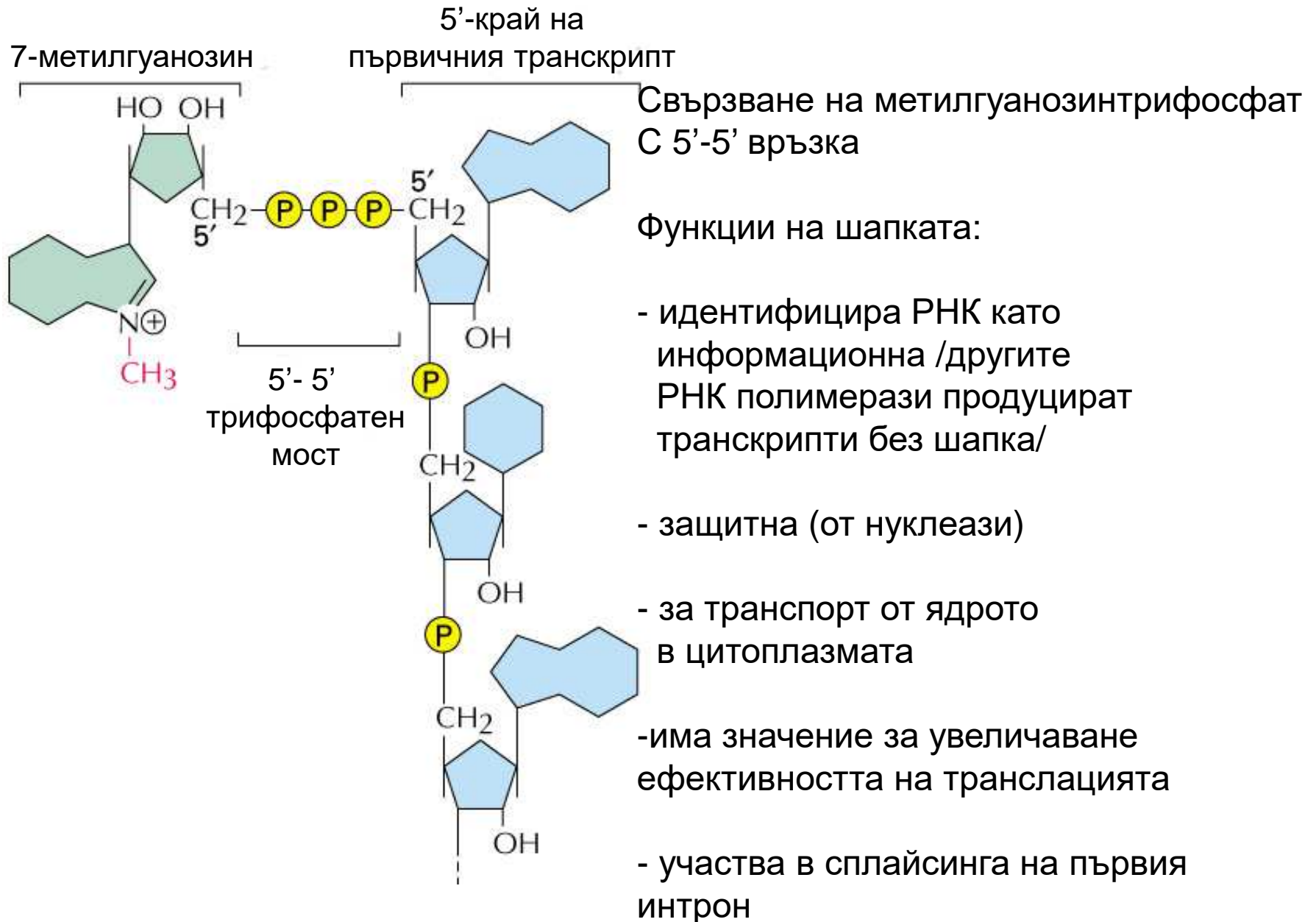
3. Зреене на информационната РНК (еукариоти)



Фосфорилираната опашка е характерна само за РНК полимераза II. Тя е тясно свързана със зреенето на иРНК

Транскриптите на РНК полимерази I (рРНК) и III (малки РНК) нямат "шапки"

Образуване на шапка



Поли-А опашка

3' полиаденилиране

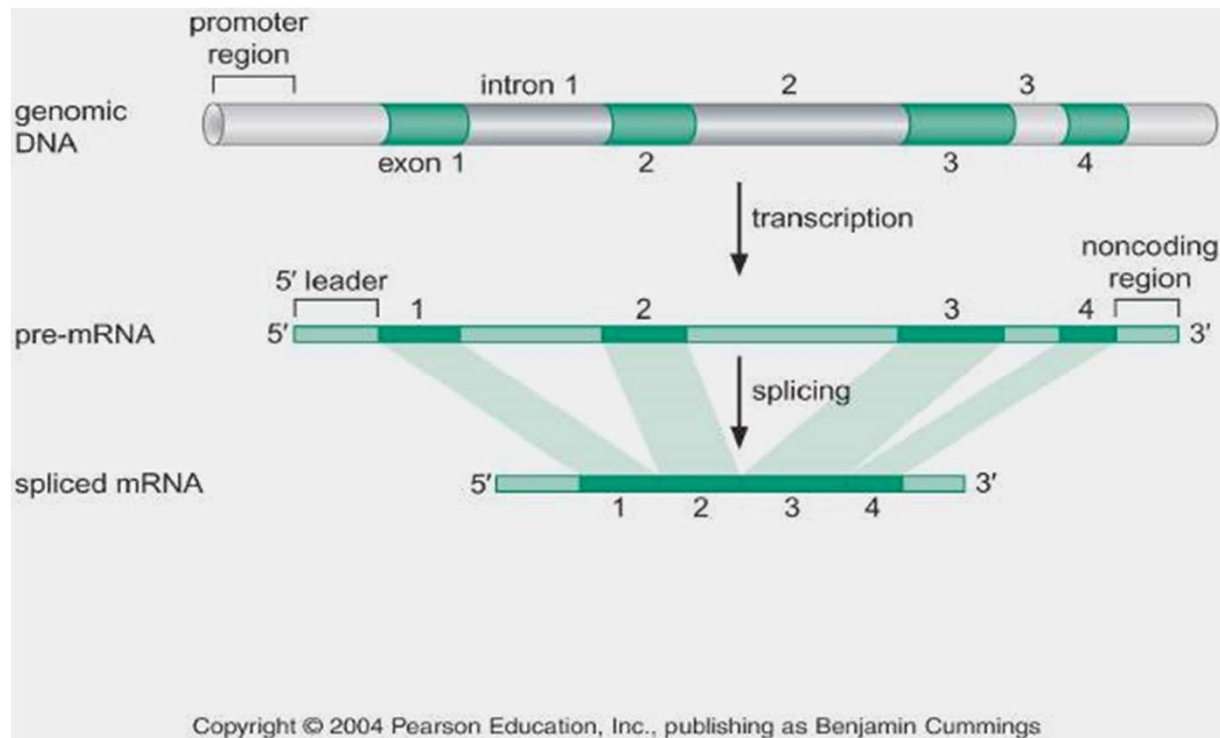
- поли-А полимераза (**PAP**) добавя ~ 200 А към 3' края на РНК, използвайки АТФ като субстрат
- Има значение за термиране на транскрипцията
- Повишава стабилността на иРНК
- Увеличава ефективността на трансляцията
- Сплайсинг на последния интрон



АААААА

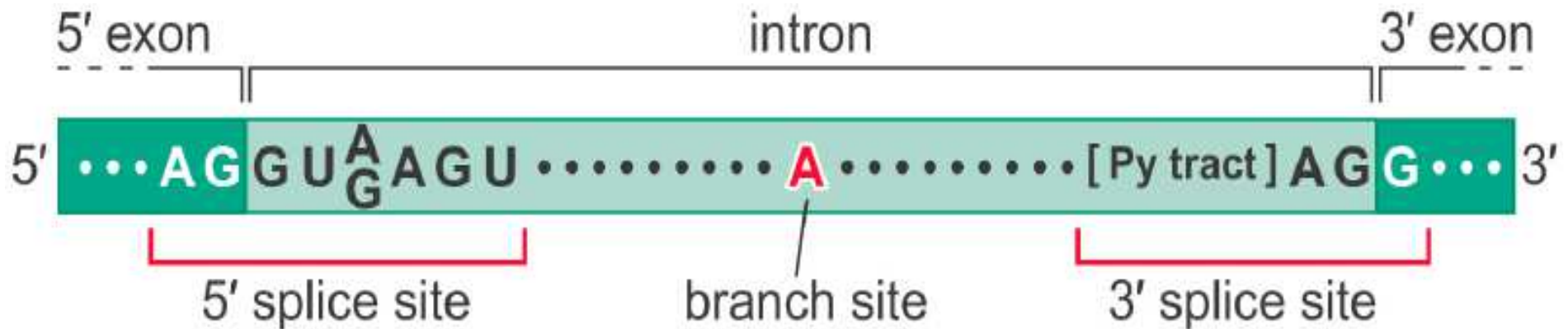
Сплайсинг

- Най-често еукариотния ген е съставен от кодиращи и некодиращи участъци – екзони и интрони
- Премахването на некодиращите участъци преди транслацията се нарича **сплайсинг**



Механизъм на РНК сплайсинга

- Последователности в РНК определят къде ще се осъществи сплайсинг
- Границите между екзони и интрони се маркират от специфични нуклеотидни последователности в първичния транскрипт (пре иРНК)

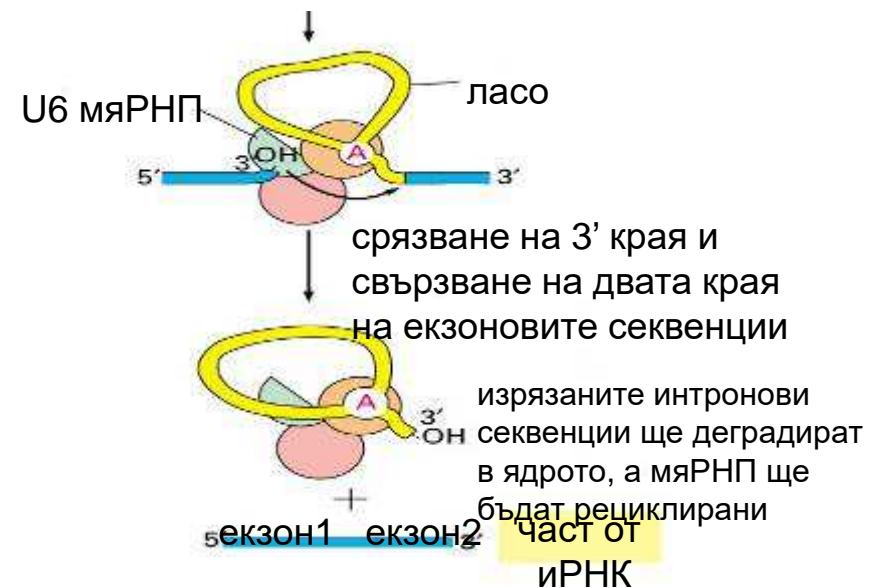
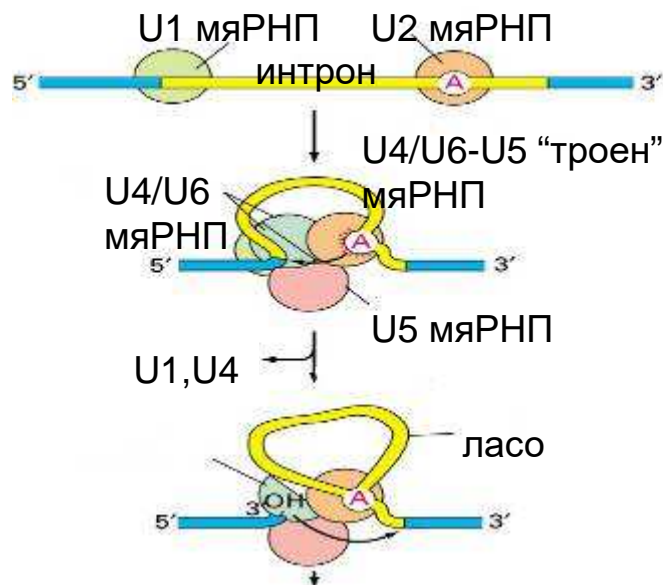


Механизъм на РНК сплайсинга

- Осъществява го комплекс – **сплайсозома**, съставена от около 150 протеини и 5 мяРНК
- Много от функциите се осъществяват от РНК компонентите
- U1, U2, U4, U5, и U6 са **малките ядрени РНК** (snRNAs)
- Комплексът мя РНК и белтъци се нарича **мяРНП** (snRNP)

Три роли на мяРНП при сплайсинга

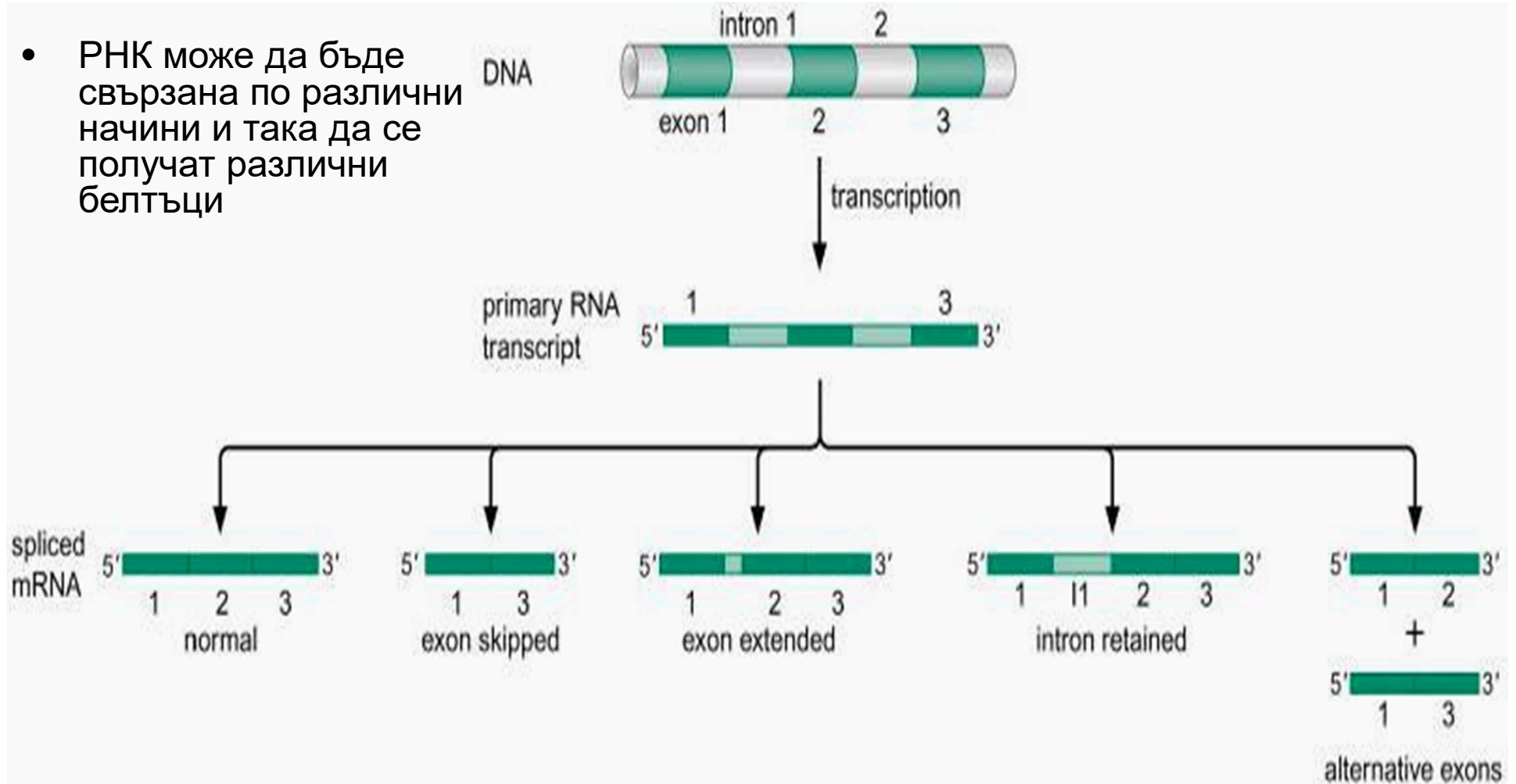
- Разпознават 5' сплайсинг мястото
- Поставят местата за свързване в конкретна близост в пространството
- Катализират или подпомагат катализата на изрязване и свързване между РНК сегментите



Алтернативен сплайсинг

Пет начина за пренареждане и сплайсинг на РНК

- РНК може да бъде свързана по различни начини и така да се получат различни белтъци



Алтернативен сплайсинг

- **Конституитивен** : от един първичен транскрипт винаги се получават повече продукти
- **Регулаторен**: В различни моменти или в различни тъкани от един и същ първичен транскрипт се аранжират различни комбинации от екзони, т.е. различни зрели иРНК
- Протеини, регулиращи сплайсинга се свързват към специфични места в РНК, наречени екзонни или интронни ехансери (ESE or ISE) в ролята им на **активатори** или сайленсери (ESS and ISS) - **репресори**

РНК модифициране

- Модификацията на РНК след транскрипцията настъпва и по отношение на базите, като това е друг начин за промяна на нуклеотидната последователност
- I. Сайт-специфично дезаминиране :**
1. Специфичен Ц остатък в иРНК се дезаминира и така се превръща в У
 2. Процесът протича само в определени тъкни и е обект на регулация

РНК модифициране

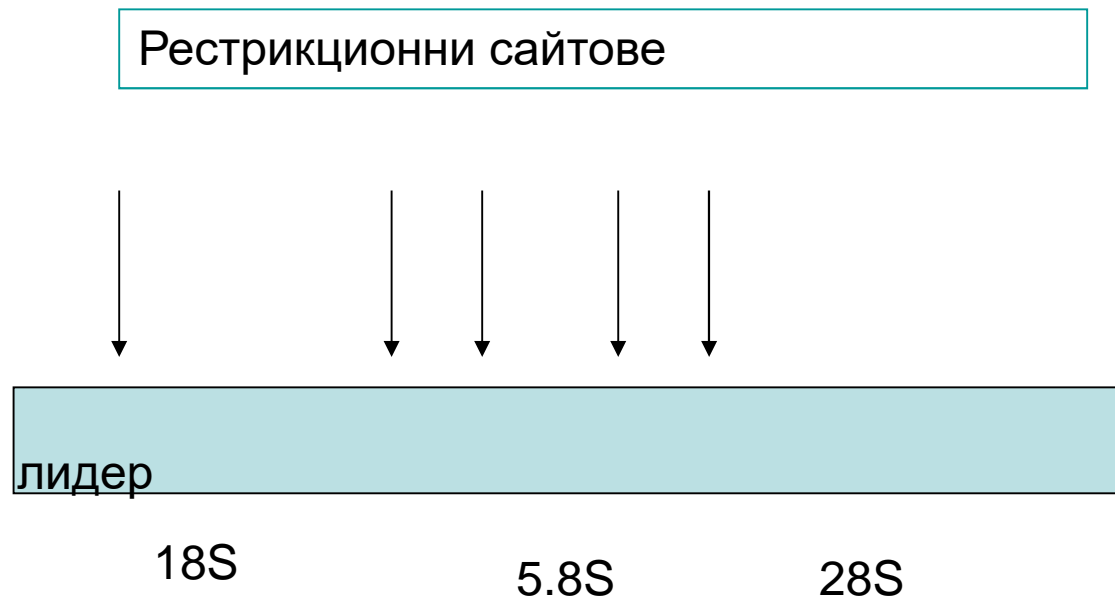
3. А също може да се дезаминира. Ензимът ADAR (adenosine deaminase acting on RNA) превръща А в Инозин. Инозинът от своя страна може да се сдвоява само с Ц, така че се променя изцяло последователността на кодирания протеин.
4. Дезаминиране на А се осъществява йонен канал, експресиран в мозък на бозайници

II. Контролирана инсерция или делеция на У в РНК

1. Форма на РНК модификация, установена в митохондрии на трипанозоми
2. Множество У се вмъкват в специфична област на иРНК след завършване на транскрипцията (или У се редуцират/изрязват).
3. Добавянето на У променя кодоните и рамките за четене, променяйки напълно “значението” на записаната информация.

Транскрипция на рРНК и тРНК

- И те се скъсяват и модифицират
- Начален общ първичен транскрипт
- Презаписват се от РНК-полимераза I в ядърцето – рРНК
- И от РНК-полимераза III - 5S рРНК и всички тРНК



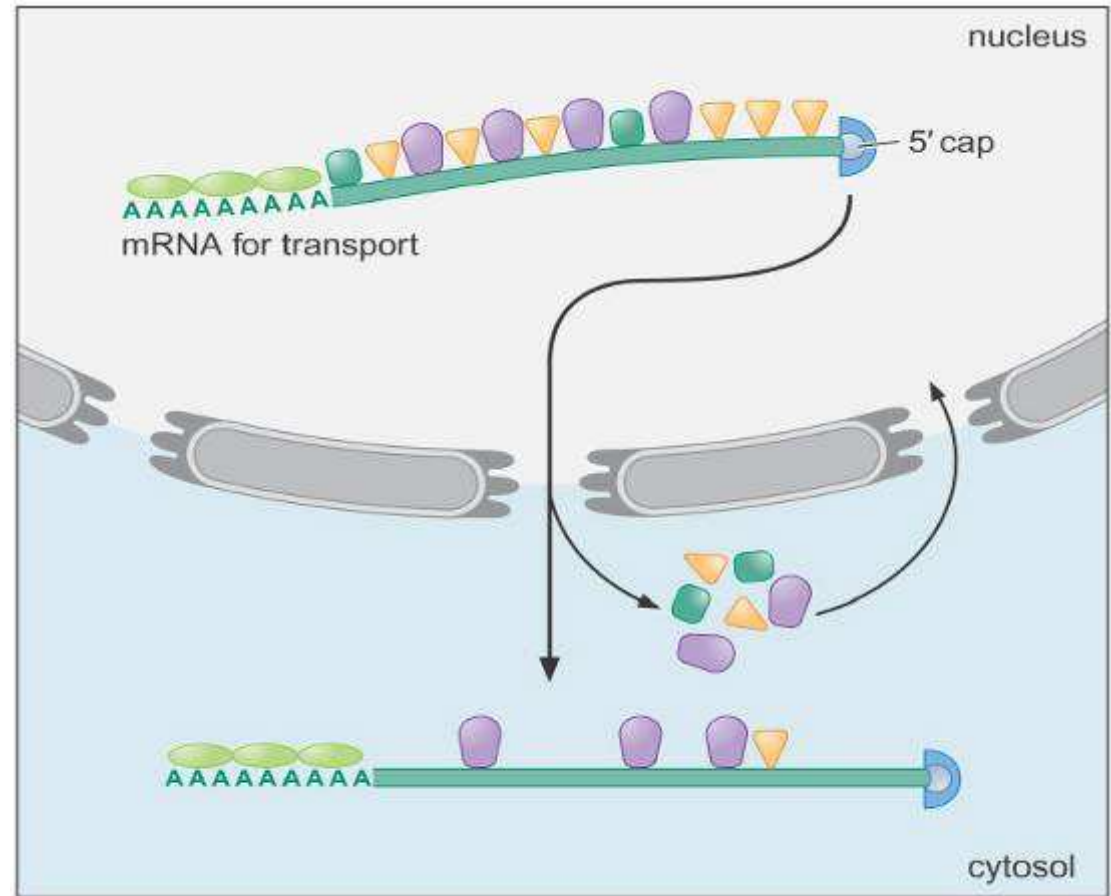
Зреене на рибозомната РНК при бозайниците

Транспорт на иРНК

- След узряването в ядрото, иРНК се пакетира и изнася в цитоплазмата, за да участва в транслация
- Пренасянето от ядрото към цитоплазмата е активен и прецизно регулиран процес
- Интроните остават в ядрото и се разграждат
- Поради липсата на шапка тРНК и рРНК се свързват със специални сигнални ядрени протеини

Транспорт на иРНК

- Зрялата иРНК носи комплекс от протеини, които я бележат като готова за транспортиране.
- Експортът се осъществява през комплекс белтъци на я.мембрана, изграждащи пори.
- След преминаване на комплекса в цитоплазмата, част от протеините се отделят и се транспортират обратно в ядрото, за да участват в транспортирането на нови молекули иРНК. Част остават свързани с иРНК и участват в процеса трансляция.



Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings