

Механизмы регуляции транскрипции

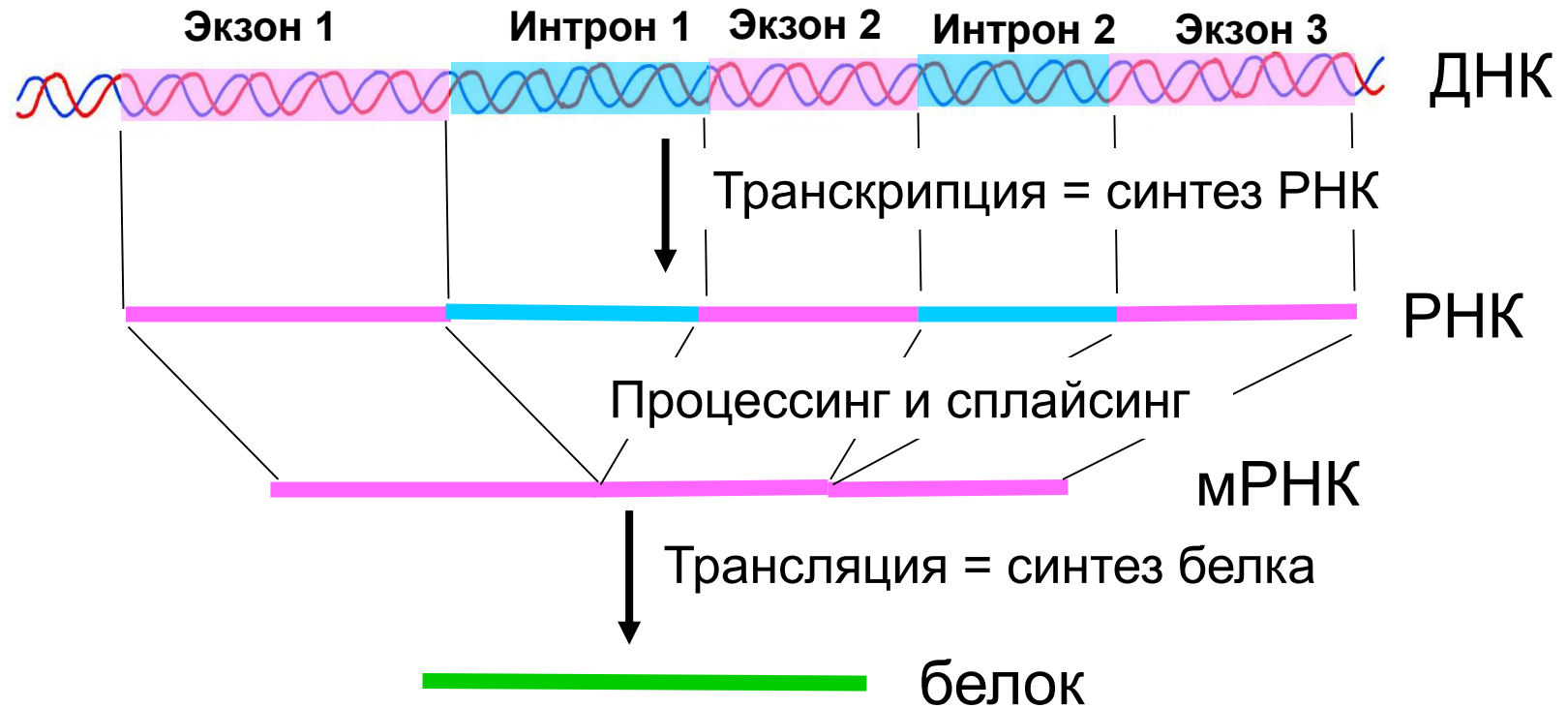
(Лекция 1)

Лектор - Игнатьева Елена Васильевна

к.б.н., с.н.с. лаб. эволюционной биоинформатики и
теоретической генетики



Экспрессия генов - последовательность реакций на пути от гена к белку



Экспрессия генов -

последовательность реакций на пути от гена к белку = процесс передачи генетической информации от ДНК через РНК к полипептидам и белкам.

Транскрипция - синтез РНК. Образуется незрелая РНК, содержащая участки, соответствующие экзонам и интронам

Процессинг - вырезание участков, соответствующих интронам,

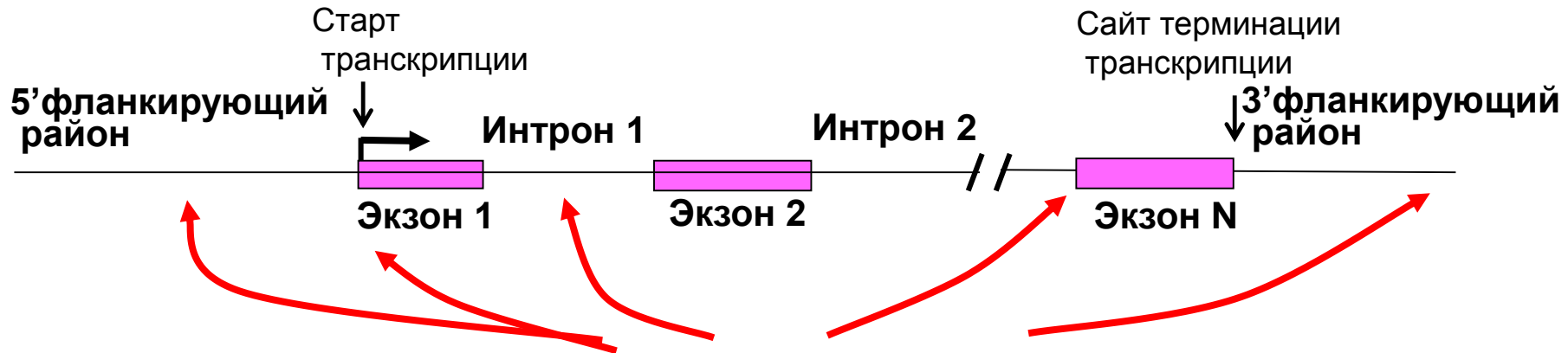
Сплайсинг - сшивание участков РНК, транскрибируемых с экзонов, в результате чего образуется матричная РНК

Трансляция - синтез белка в цитоплазме клетки при участии рибосом

Ген - структурная и функциональная единица наследственности живых организмов.

Ген представляет собой участок ДНК, задающий последовательность определённого полипептида либо функциональной РНК.

Ген - протяженный участок ДНК, несущий целостную информацию о строении одной молекулы белка или одной молекулы РНК. Ген включает участки, соответствующие экзонам и интронам, старт транскрипции, сайт терминации транскрипции.



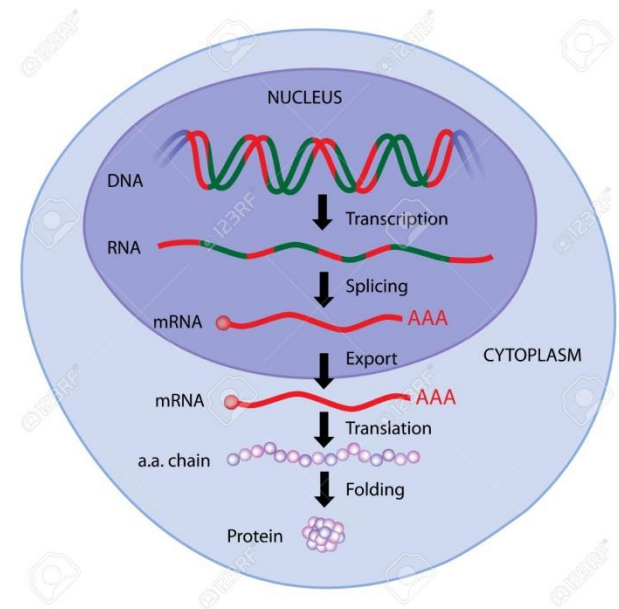
Районы, регулирующие транскрипцию

Понятие гена не ограничено только кодирующим участком ДНК, а представляет собой более широкую концепцию, включающую в себя и последовательности, регулирующие транскрипцию. Регуляторные последовательности могут находиться как в 5'- и 3'- фланкирующих районах гена, так и в интронах.

Регуляторные последовательности могут находиться как в непосредственной близости от старта транскрипции, так и на расстоянии многих миллионов пар оснований (нуклеотидов) от начала транскрипта.

Регуляция экспрессии генов может осуществляться на всех этапах.

Транскрипция - первый этап, на котором осуществляется выбор, будет ген экспрессироваться или нет.



В лекциях будут рассмотрены три вопроса:

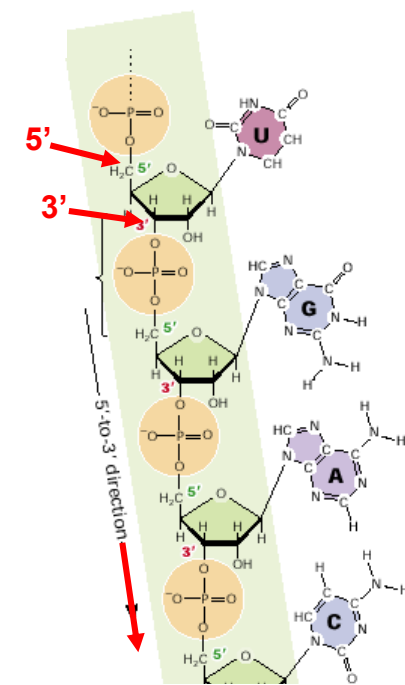
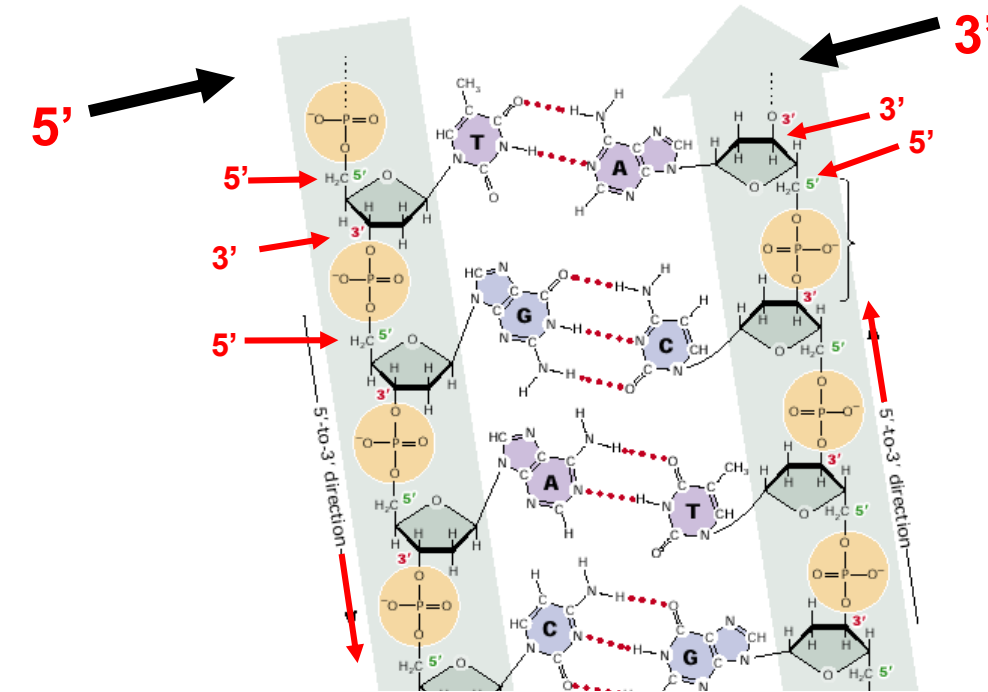
- как осуществляется транскрипция
- чем определяется старт транскрипции
- какие механизмы в клетке регулируют интенсивность транскрипции

Молекулы РНК и ДНК – линейные гетерополимеры, построенные из нуклеотидов



ДНК – состоит из двух комплиментарных и антипараллельных друг другу полинуклеотидных нитей

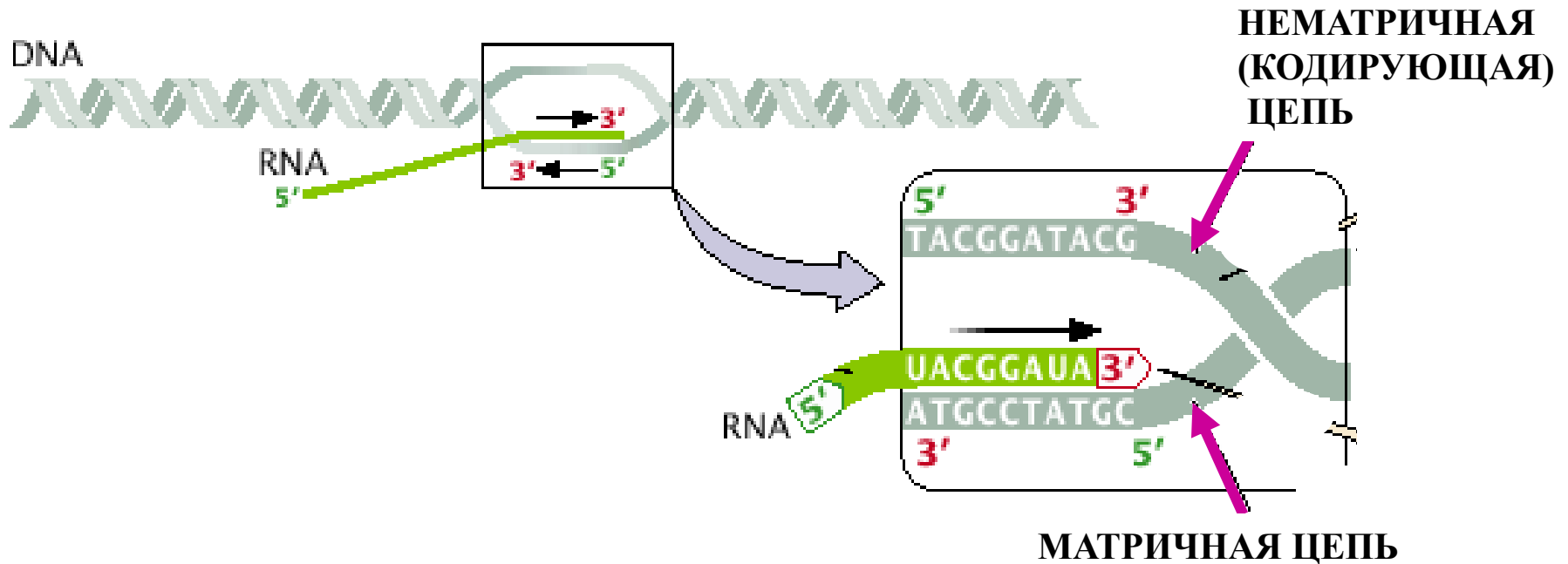
РНК – включает одну полинуклеотидную цепь



В каждой цепи РНК либо ДНК нуклеотиды соединены фосфодиэфирными связями, образованными с участием 3'-углеродного атома углевода одного нуклеотида и фосфатной группы, связанной с 5'-углеродным атомом углевода следующего нуклеотида.

Таким образом, каждая полинуклеотидная цепь в составе ДНК либо РНК имеют направление, которое определяется позициями углеродных атомов, взаимодействующих с фосфатными группами (5' или 3'), и концы цепей также обозначаются как 5' и 3', соответственно.

ТРАНСКРИПЦИЯ – СИНТЕЗ МОЛЕКУЛЫ РНК, КОМПЛИМЕНТАРНОЙ И АНТИПАРАЛЛЕЛЬНОЙ ОДНОЙ ИЗ ЦЕПЕЙ ДНК (МАТРИЧНОЙ ЦЕПИ)



В процессе транскрипции вместо тиминового нуклеотида, включающего основание Т (тимин), в РНК включается урациловый нуклеотид, содержащий основание U (урацил).

Цепь ДНК, на основе которой строится комплиментарная цепь РНК, называется **матричной цепью**.

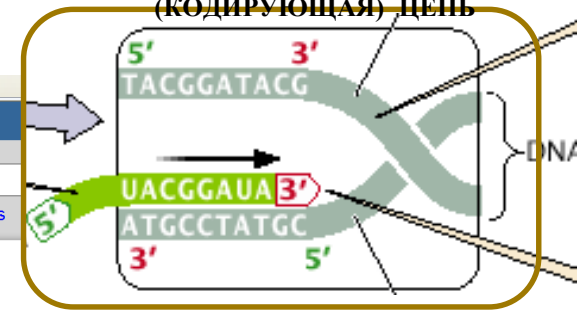
Другая цепь ДНК называется **кодирующей цепью**, поскольку ее последовательность идентична последовательности РНК (с учетом замены тиминового нуклеотида на урациловый).

РАСПОЛОЖЕНИЕ ГЕНОВ НА ХРОМОСОМЕ: ВИЗУАЛИЗАЦИЯ В БАЗЕ

EntrezGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>)

(15-ая хромосома человека)

НЕМАТРИЧНАЯ
(КОДИРУЮЩАЯ) ЦЕПЬ



NCBI Resources How To

Gene

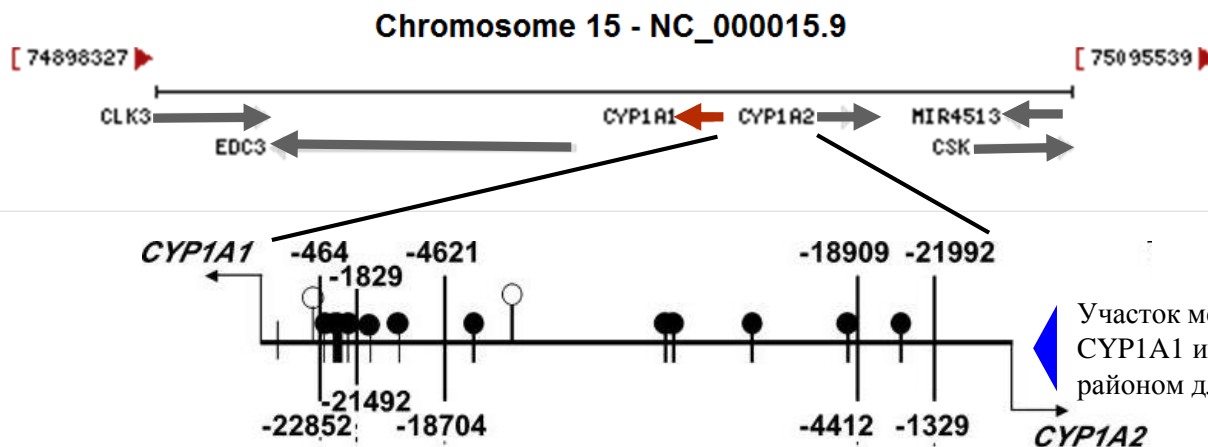
Display Settings: Full Report

CYP1A1 cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1
[*Homo sapiens* (human)]

Gene ID: 1543, updated on 15-Sep-2013

Genomic context

Location: 15q24.1
Sequence: Chromosome: 15; NC_000015.9
(75011883..75017951, complement)



Протяженность линий со стрелками соответствует длинам генов. Стрелками обозначено направление, в котором осуществляется транскрипция генов.

Участок между стартами транскрипции генов CYP1A1 и CYP1A2 является регуляторным районом для обоих генов

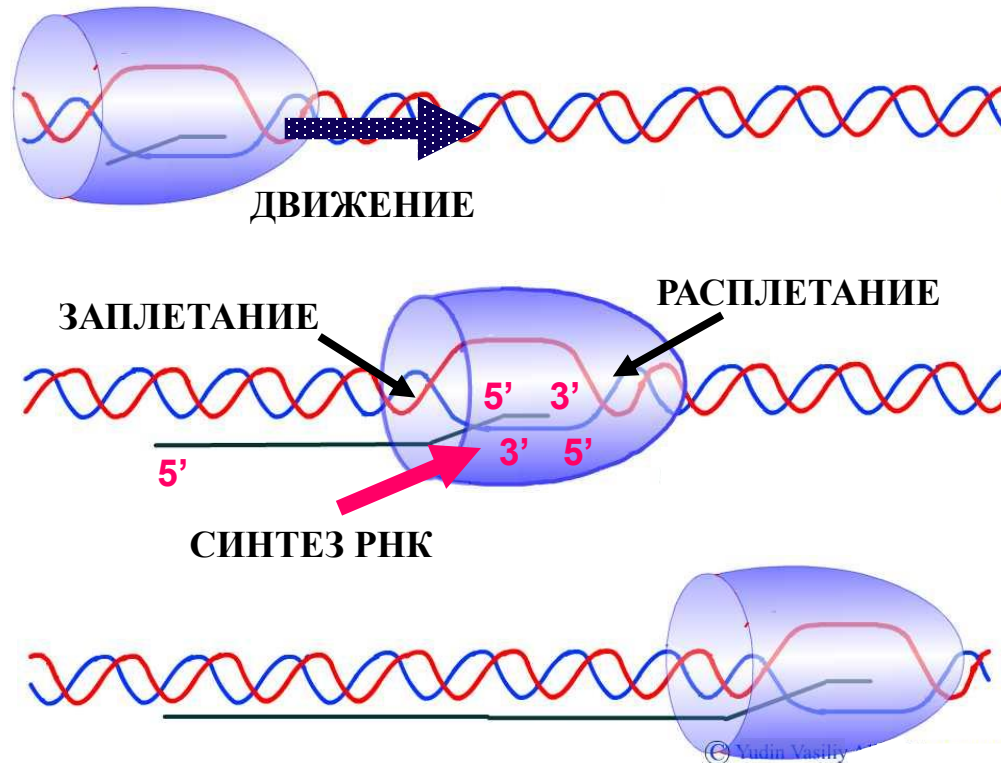
Цепи ДНК, входящие в состав хромосомы, обозначаются как прямая («+» цепь) и обратная («-» цепь). Для «+» цепи ДНК отсчет позиций нуклеотидов на хромосоме слева направо соответствует направлению цепи ДНК от 5' к 3' концу. Для «-» цепи ДНК отсчет позиций нуклеотидов на хромосоме слева направо соответствует направлению цепи ДНК от 3' к 5' концу.

Если транскрипция гена осуществляется слева направо, то прямая цепь ДНК будет для данного гена кодирующей (нематричной).

Если транскрипция гена осуществляется справа налево, то прямая цепь ДНК будет для данного гена матричной, а обратная цепь ДНК будет кодирующей

РНК-полимераза и ее функции

РНК-ПОЛИМЕРАЗА



ТРАНСКРИПЦИЯ ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ ПРИ УЧАСТИИ ФЕРМЕНТА – РНК ПОЛИМЕРАЗЫ.

РНК-ПОЛИМЕРАЗА В ХОДЕ ТРАНСКРИПЦИИ ВЫПОЛНЯЕТ СЛЕДУЮЩИЕ ФУНКЦИИ :

- ДВИЖЕНИЕ ВДОЛЬ ЦЕПИ ДНК

- РАСПЛЕТЕНИЕ И ЗАПЛЕТЕНИЕ ДНК

- СИНТЕЗ РНК (Скорость синтеза в бактериальных клетках составляет 40 нуклеотидов в секунду при 37° С).

Varying Rate of RNA Chain Elongation during *rrn* Transcription in *Escherichia coli*

P. P. Dennis^{1,*}, M. Ehrenberg², D. Fange², and H. Bremer³

+ Author Affiliations

ABSTRACT

The value of the rRNA chain elongation rate in bacteria is an important physiological parameter, as it affects not only the rRNA promoter activity but also the free-RNA polymerase concentration and thereby the transcription of all genes. On average, rRNA chains elongate at a rate of 80 to 90 nucleotides (nt) per s, and the transcription of an entire *rrn* operon takes about 60 s (at 37°C). Here we have analyzed a reported distribution obtained from electron micrographs of RNA polymerase molecules along *rrn* operons in *E. coli* growing at 2.5 doublings per hour (S. Quan, N. Zhang, S. French, and C. L. Squires, J. Bacteriol. 187:1632–1638, 2005). The distribution exhibits two peaks of higher polymerase density centered within the 16S and 23S rRNA genes. An evaluation of this distribution indicates that RNA polymerase transcribes the 5' leader region at speeds up to or greater than 250 nt/s. Once past the leader, transcription slows down to about 65 nt/s within the 16S gene, speeds up in the spacer region between the 16S and 23S genes, slows again to about 65 nt/s in the 23S region, and finally speeds up to a rate greater than 400 nt/s near the end of the operon. We suggest that the slowing

Скорость транскрипции у *E. coli*
(стадия элонгации)

80-90 нуклеотидов / сек

250 нуклеотидов / сек

400 нуклеотидов / сек

МЕХАНИЗМ ТРАНСКРИПЦИИ ИМЕЕТ СВОИ ОСОБЕННОСТИ У РАЗНЫХ ОРГАНИЗМОВ. МЫ БУДЕМ РАССМАТРИВАТЬ ДВА НАДЦАРСТВА:

Прокариоты – организмы , клетки которых не имеют ограниченного мембраной ядра. Это все бактерии, включая архе- и цианобактерии. Аналог ядра – структура, состоящая из ДНК, белков и РНК (генофор) закреплен на мембране клеток.

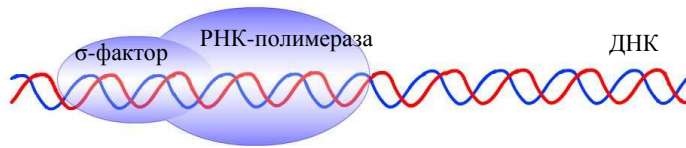
Представитель **E.Coli** – кишечная палочка.

Эукариоты - организмы, клетки которых содержат оформленные ядра.

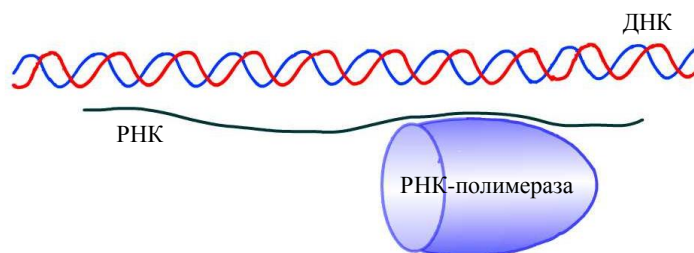
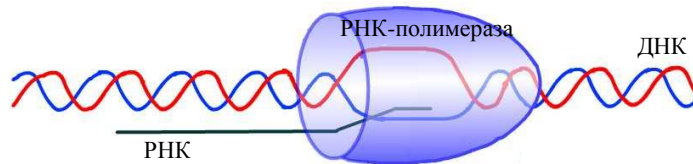
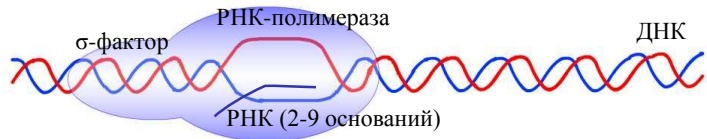
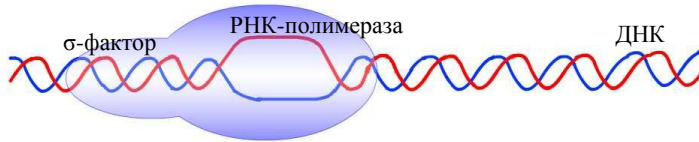
Примеры – высшие животные и растения, одноклеточные и многоклеточные водоросли, грибы.

ПРОКАРИОТЫ - ЭТАПЫ ТРАНСКРИПЦИИ:

1-ая стадия: закрытый комплекс



2-ая стадия: открытый комплекс



Связывание РНК-полимеразы с промотором

РНК-полимераза при участии вспомогательных белков (у *E.coli* σ -факторы) связывается с промотором и формирует закрытый комплекс, в котором ДНК сохраняет двуспиральную структуру. На этой стадии РНК-полимераза еще не способна начать синтез РНК. Далее закрытый комплекс превращается в открытый, в котором РНК-полимераза расплетает двойную спираль ДНК в районе точки инициации транскрипции.

Инициация

Синтез короткой цепи РНК (2-9 оснований), комплементарной матричной цепи ДНК; Этот этап завершается диссоциацией комплекса РНК-полимеразы с белками, обеспечившими ее специфическое взаимодействие с промотором: σ -фактором (у прокариот) либо базальными транскрипционными факторами (у эукариот).

Элонгация

Движение РНК-полимеразы вдоль ДНК, в ходе которого осуществляется синтез РНК, а также расплетание и заплетание ДНК.

Терминация

Окончание транскрипции, комплекс «ДНК-РНК-полимераза» распадается, и транскрипция заканчивается. Происходит после распознавания терминатора

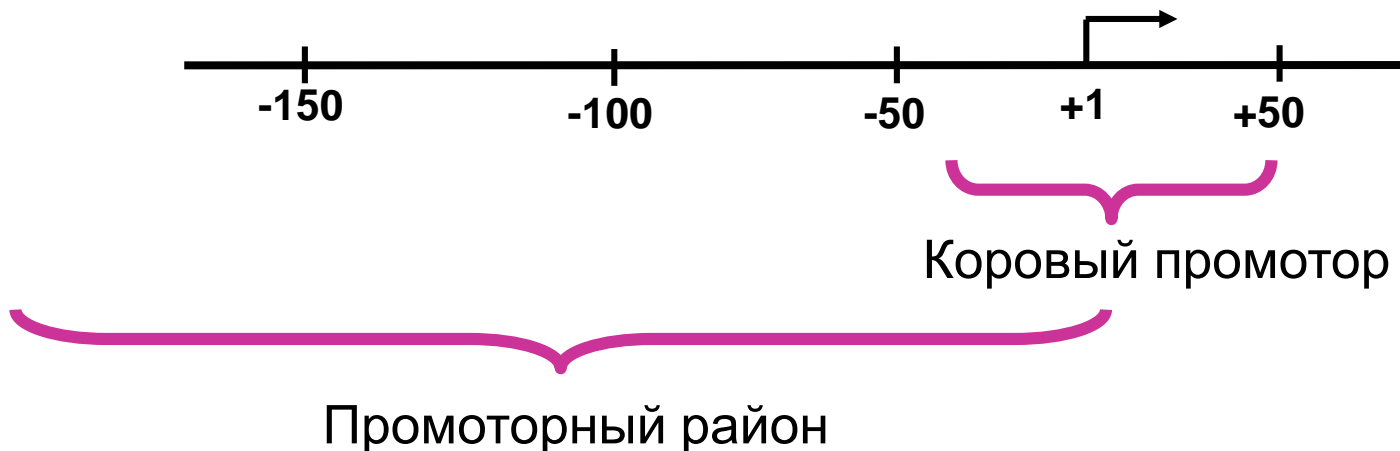
ГЕНОМ E.coli - $4 \cdot 10^6$ пар оснований

Каким образом РНК-полимераза находит нужное место, с которого должна начаться транскрипция конкретного гена ?????

ПРОМОТОР – участок, прилегающий к началу транскрипции. Содержит регуляторные элементы, которые опознаются с белками, обеспечивающими точную посадку РНК-полимераз в районе стартов транскрипции и инициацию транскрипции

Коровый промотор – участок приблизительно – 40 +50

Промоторный район – 5' фланкирующий район вплоть до старта транскрипции



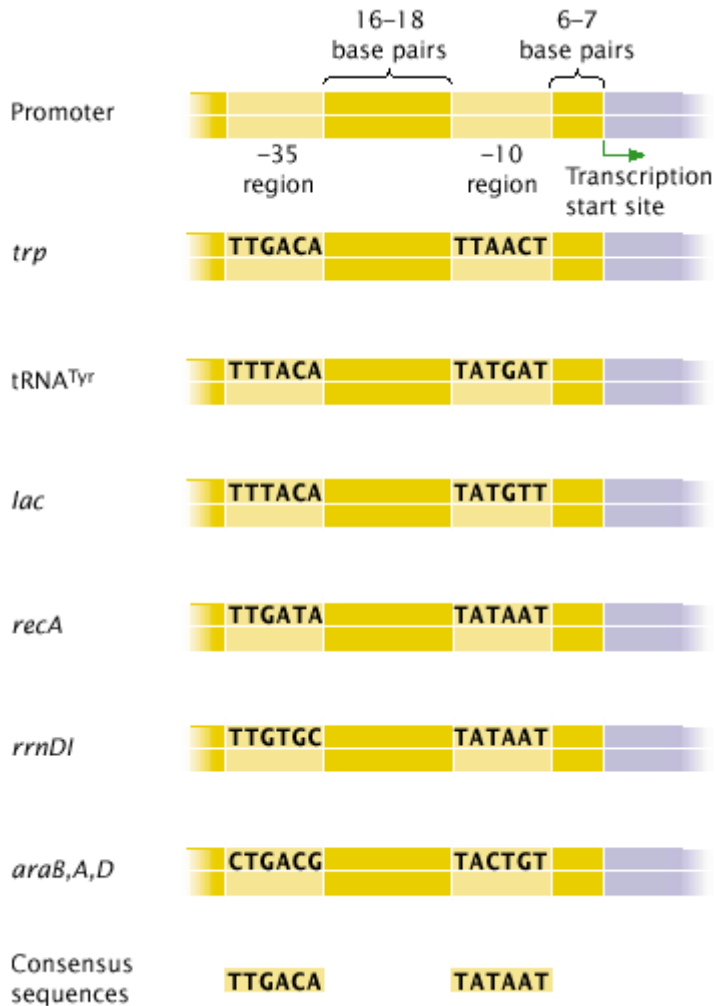
Анализ последовательностей более 100 промоторов у *E.coli* выявил сходное строение:

- 1) в районе старта транскрипции – пурины, часто «CAT»
- 2) в позиции «-10» гексамер ТАТААТ (последовательность «-10»)
- 3) в позиции «-35» гексамер ТТGАСА (последовательность «-35»)
- 4) расстояние между последовательностями «-35» и «-10» ~16-18 нуклеотидов

Изучение
функции
участка
с помощью
мутационного
анализа



Консенсусная последовательность

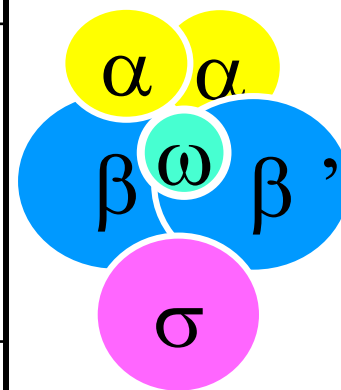


Консенсусная последовательность представляет собой результат множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей, включающих одинаковые по функциям мотивы. Консенсусная последовательность показывает, какие нуклеотиды наиболее представлены в каждой позиции выравнивания.

Например, реальная последовательность «-10» промоторов прокариот отличается от гексануклеотида «ТАТААТ», который является консенсусной последовательностью этого участка.

СУБЪЕДИНИЧНЫЙ СОСТАВ КОМПЛЕКСА СИГМА ФАКТОР – РНК ПОЛИМЕРАЗА (E.coli)

субъединица	Мол. Масса (кД)	Количество	Локализация	Функция
альфа	40.000	2	РНК полимеразы	Сборка фермента
бета	155.000	1	РНК полимеразы	Полимеразное действие: катализирует синтез РНК. Осуществляет инициацию и управляет элонгацией
бета'	160.000	1	РНК полимеразы	Неспецифически связывается с ДНК
омега	10.1		РНК полимеразы	Восстанавливает денатурированную РНК-полимеразу в дееспособную форму <i>in vitro</i> .
сигма	32-92.000	1	сигма фактор	Связывание с промотором



E.coli имеет несколько сигма факторов , специфичных для различных ситуаций, которые распознают промоторы разных групп генов

Пример фактора	Функция генов	Мол. Масса сигма фактора	«-35» последовательность	спейсер	«-10» последовательность
$\sigma 70$	общая	70.000	TTGACA	16-18 п.о.	TATAAT
$\sigma 32$	тепловой шок	32.000	CCCTTGAA	13-15 п.о.	CCCGATNT
$\sigma 54$	отсутствие азота	54.000	CTGGNA	6 п.о.	TTGCA
$\sigma 28$	хемотаксис	28.000	СТААА	15 п.о.	GCCGATAA



$\sigma 38$ (RpoS) - общий стресс и стационарная фаза

σ^{28} (RpoF) - жгутиковый аппарат и хемотаксис

σ^{24} (RpoE) - внецитоплазматические гены и экстремальный тепловой шок

σ^{19} (FecI) - транспорт цитрата железа (ген fec) и внецитоплазматические гены

ОСОБЕННОСТИ ТРАНСКРИПЦИИ У ЭУКАРИОТ:

1) У эукариот транскрипция осуществляется при участии РНК-полимераз трех типов, которые обозначаются как pol I, pol II, и pol III. Можно выделить три группы генов:

- pol I транскрибируемые: гены рРНК (18S, 5.8S и 28S)**
- pol II транскрибируемые: все белок-кодирующие гены + гены многих мяРНК + многие миРНК**
- pol III транскрибируемые : гены тРНК + гены низкомолекулярных РНК (5S рРНК, и др.)**

2) Каждая РНК-полимераза имеет сложное, многосубъединичное строение, например, pol II включает более 10 субъединиц;

3) Для точной посадки РНК-полимераз на участок, прилежащий к старту транскрипции, нужны вспомогательные белки – базальные (или общие) транскрипционные факторы;

4) Для достижения необходимого уровня транскрипции каждого гена, помимо базальных (общих) транскрипционных факторов, требуются другие белки (транскрипционные факторы, коактиваторы, корепрессоры, медиаторы и др.);

5) Промоторы генов, транскрибируемых каждым типом полимераз, имеют характерное строение

6) Транскрипция генов эукариот зависит от состояния хроматина и плотности нуклеосомной упаковки.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ РНК-ПОЛИМЕРАЗ ЭУКАРИОТ: гены, транскрибируемые РНК-полимеразами

РНК-полимераза I

- предшественник высокомолекулярной рибосомной РНК (пре-рРНК, у человека 45S rRNA), который затем расщепляется с образованием 18S, 5.8S и 28S рибосомных РНК (рРНК)

Организованы в форме повторов. У человека локализованы на 13, 14, 15, 21 и 22 хромосомах. Количество копий различно в зависимости от хромосомы и специфично для каждого индивида. В среднем по 30-40 повторов на каждой хромосоме. Не аннотированы на текущей версии генома человека.

Единичные гены

РНК-полимераза II

- все мРНК (у человека ~ 20500 генов, кодирующих белки),
- многие малые ядерные РНК (например, такие как U1, U2, U4, U5, U11, U12)
- большинство миРНК

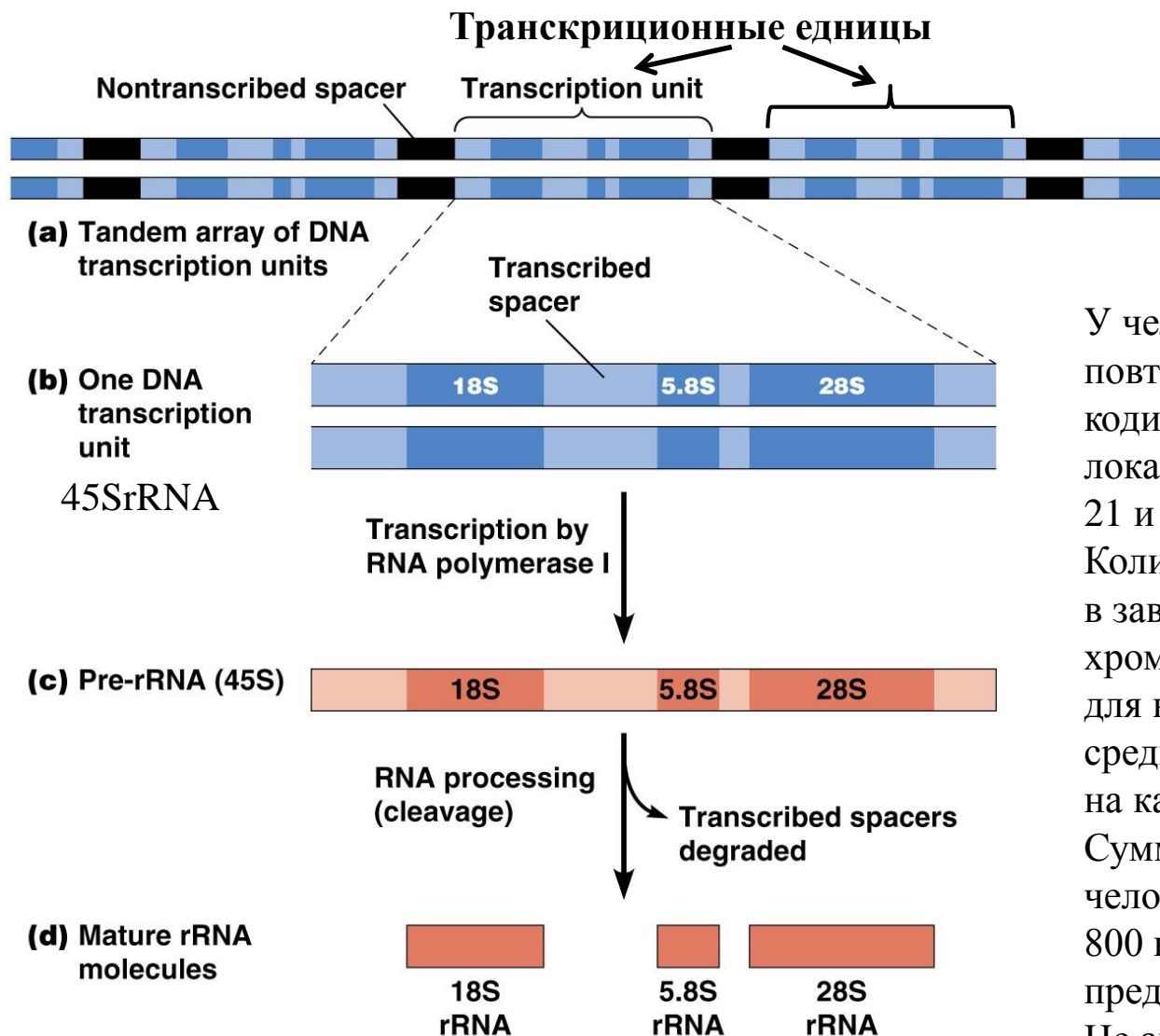
Большая часть
генома

РНК-полимераза III

- все транспортные РНК,
- низкомолекулярные РНК, выполняющих важные внутриклеточные функции: 5S рРНК, 7SL РНК (внутриклеточный транспорт белков),
- U6 РНК (сплайсинг мРНК),
- РНК-компонент рибонуклеазы MRP млекопитающих (пост-транскрипционный процессинг тРНК, созревание РНК-праймера при репликации митохондриальной ДНК),
- 7SK РНК (регуляция активности РНК-полимеразы II на стадии элонгации у позвоночных),
- BC1 и BC200 РНК (регуляция трансляции РНК в дендритных клетках грызунов и приматов)

Группы генов

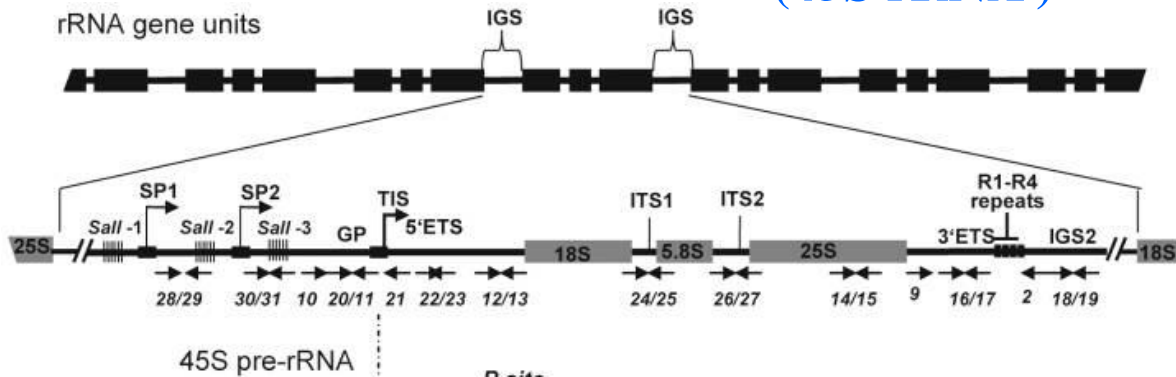
Схематическое строение кластера генов, транскрибируемых РНК-полимеразой I и кодирующих pre-rRNA (45S rRNA)



У человека тандемные повторы генов, кодирующих 45S rRNA локализованы на 13, 14, 15, 21 и 22 хромосомах. Количество копий различно в зависимости от хромосомы и специфично для каждого индивида. В среднем по 30-40 повторов на каждой хромосоме. Суммарно в геноме человека содержится более 800 копий гена предшественника 45S rRNA. Не аннотированы на текущей версии генома человека.

Arabidopsis thaliana

- строение кластера генов, кодирующих pre-rRNA (45S rRNA)



IGS = Intergenic spacer

SP1, SP2 -spacer promoters

ETS =External non transcribed sequence,

ITS1, ITS2 = Internal transcribed sequence,

TIS = Transcription Initiation Site

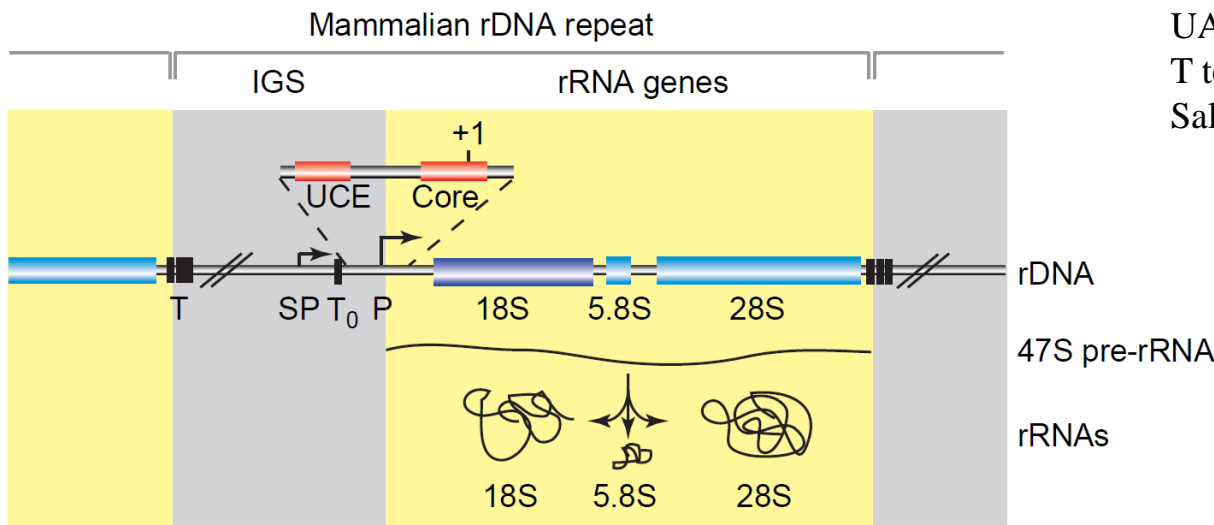
rGene = rRNA gene,

UAS = Upstream activator sequences,

T ter = transcriptional terminator region.

Sal Box-SalI restriction site.

47S rRNA (млекопитающие)



.Pontvianne F et al., Nucleolin is required for DNA methylation state and the expression of rRNA gene variants in Arabidopsis thaliana. PLoS Genet. 2010 Nov 24;6(11):e1001225.

Russell J1, Zomerdijsk JC. RNA-polymerase-I-directed rDNA transcription, life and works. Trends Biochem Sci. 2005 Feb;30(2):87-96.

ОСОБЕННОСТИ ТРАНСКРИПЦИИ У ЭУКАРИОТ:

1) У эукариот транскрипция осуществляется при участии РНК-полимераз трех типов, которые обозначаются как pol I, pol II, и pol III. Можно выделить три группы генов:

- pol I транскрибируемые: гены рРНК (18S, 5.8S и 28S)
- pol II транскрибируемые: все белок-кодирующие гены + гены многих мяРНК + многие миРНК
- pol III транскрибируемые : гены тРНК + гены низкомолекулярных РНК (5S рРНК, и др.)

2) Каждая РНК-полимераза имеет сложное, многосубъединичное строение, например, pol II включает более 10 субъединиц;

3) Для точной посадки РНК-полимераз на участок, прилежащий к старту транскрипции, нужны вспомогательные белки – базальные (или общие) транскрипционные факторы;

4) Для достижения необходимого уровня транскрипции каждого гена, помимо базальных (общих) транскрипционных факторов, требуются другие белки (транскрипционные факторы, коактиваторы, корепрессоры, медиаторы и др.);

5) Промоторы генов, транскрибируемых каждым типом полимераз, имеют характерное строение

6) Транскрипция генов эукариот зависит от состояния хроматина и плотности нуклеосомной упаковки.

СУБЪЕДИНИЧНЫЙ СОСТАВ РНК-ПОЛИМЕРАЗ ЭУКАРИОТ

У дрожжей: РНК-полимераза I включает 13 субъединиц,

РНК-полимераза II - 12 субъединиц

РНК-полимераза III - 15 субъединиц [Archambault J. & Friesen J.D. 1993].

Способ обозначения субъединиц, входящих в состав различных полимераз:

Pol I - “Rpa” (RNA polymerase A),
Pol II - “Rpb” (RNA polymerase B),
Pol III - “Rpc” (RNA polymerase C)

+

Номер, присвоенный каждой субъединице конкретной РНК-полимеразы в порядке убывания ее молекулярной массы

Например, субъединицы РНК-полимеразы II имеют обозначения RPB1–RPB12.

Субъединицы РНК-полимеразы II дрожжей (*S. cerevisiae*):

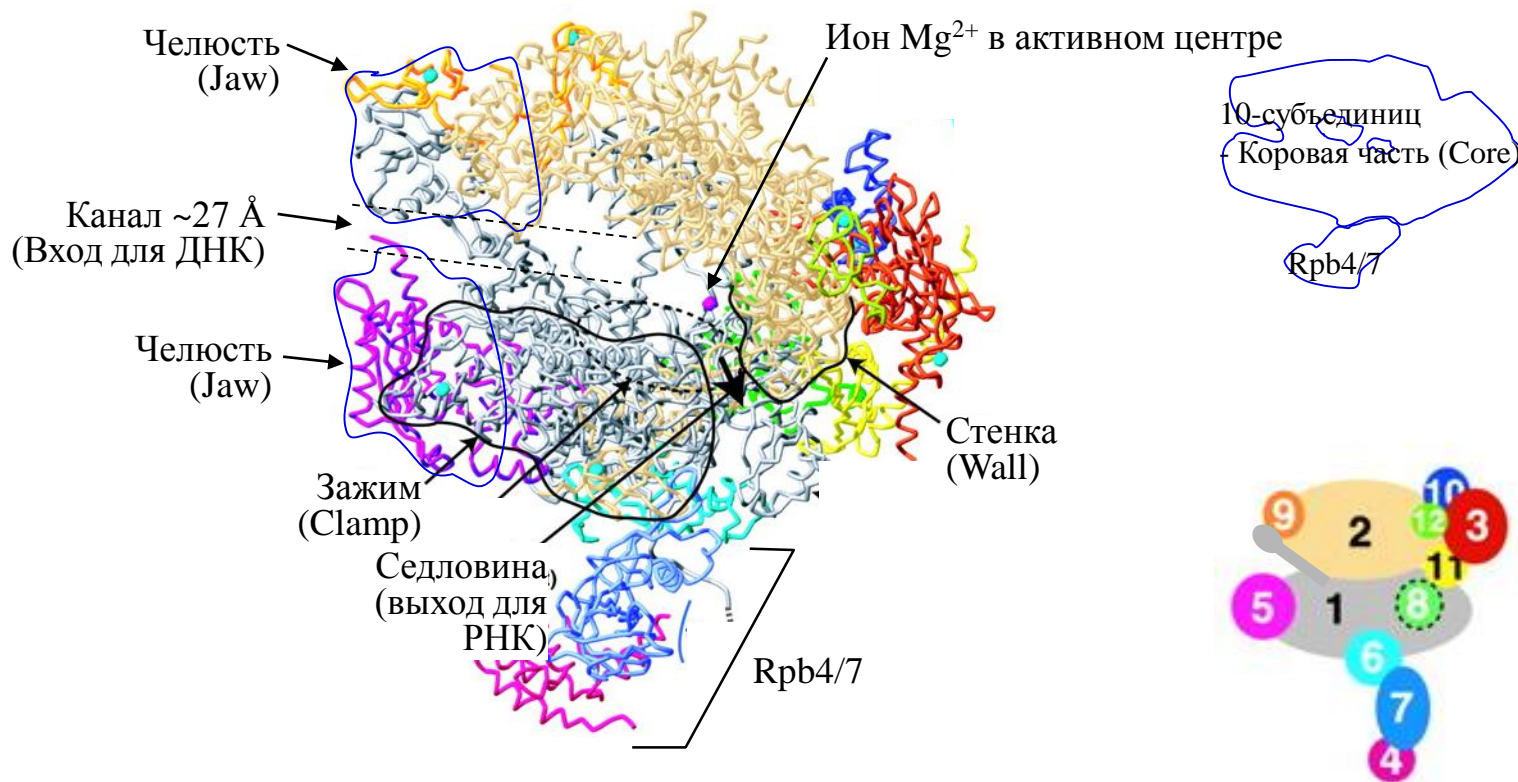
Масса субъединицы (kDa)	Ген
220	RPB1/RPO21
150	RPB2
45	RPB3
32	RPB4
27	RPB5
23	RPB6/RPO26
16	RPB7
14.5	RPB8
13	RPB11
12	RPB9
10	RPC10
10	RPB10

Наиболее крупными субъединицами всех трех полимераз эукариот являются Rpa1, Rpb1 Rpc1. У дрожжей их молекулярная масса составляет 190, 220 и 160 кДа соответственно.

Вторые по молекулярной массе субъединицы эукариотических РНК-полимераз имеют обозначение Rpa2, Rpb2, Rpc2. Их масса у дрожжей - 135, 150 и 128 кДа.

Структура полного 12-субъединичного комплекса РНК-полимеразы II дрожжей (*S. cerevisiae*).

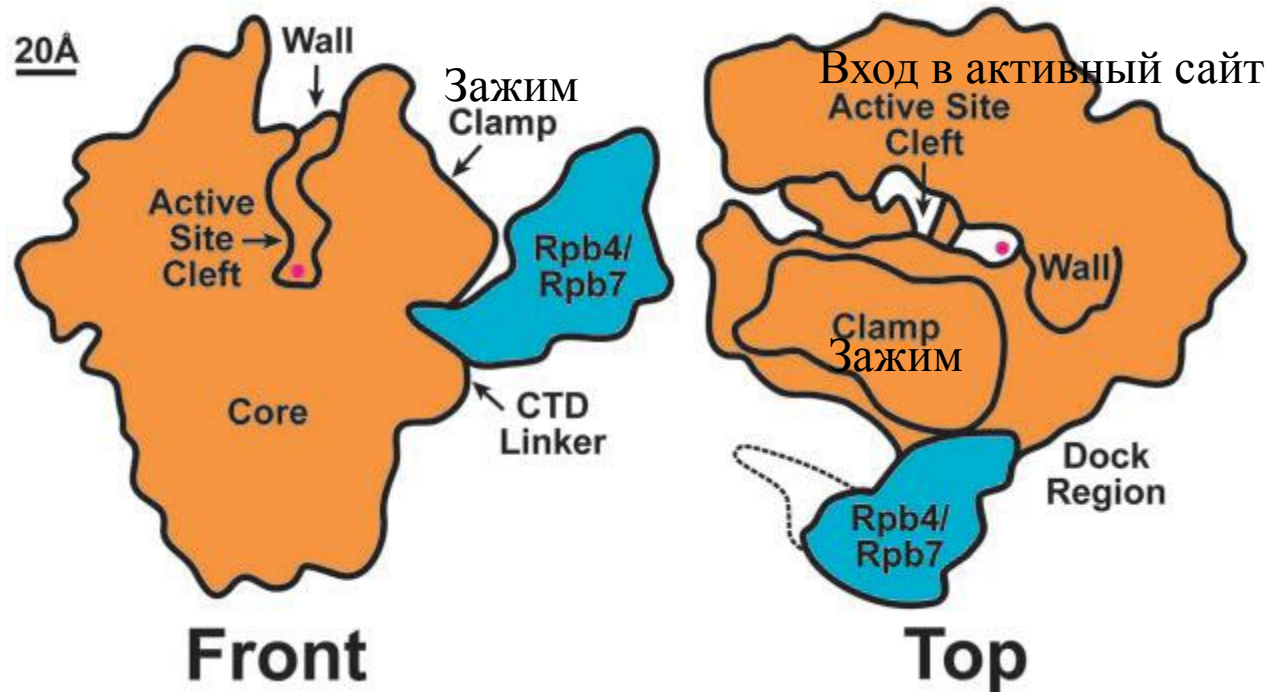
«Вид сверху» по данным входа 1NT9 из Банка белковых структур (PDB).



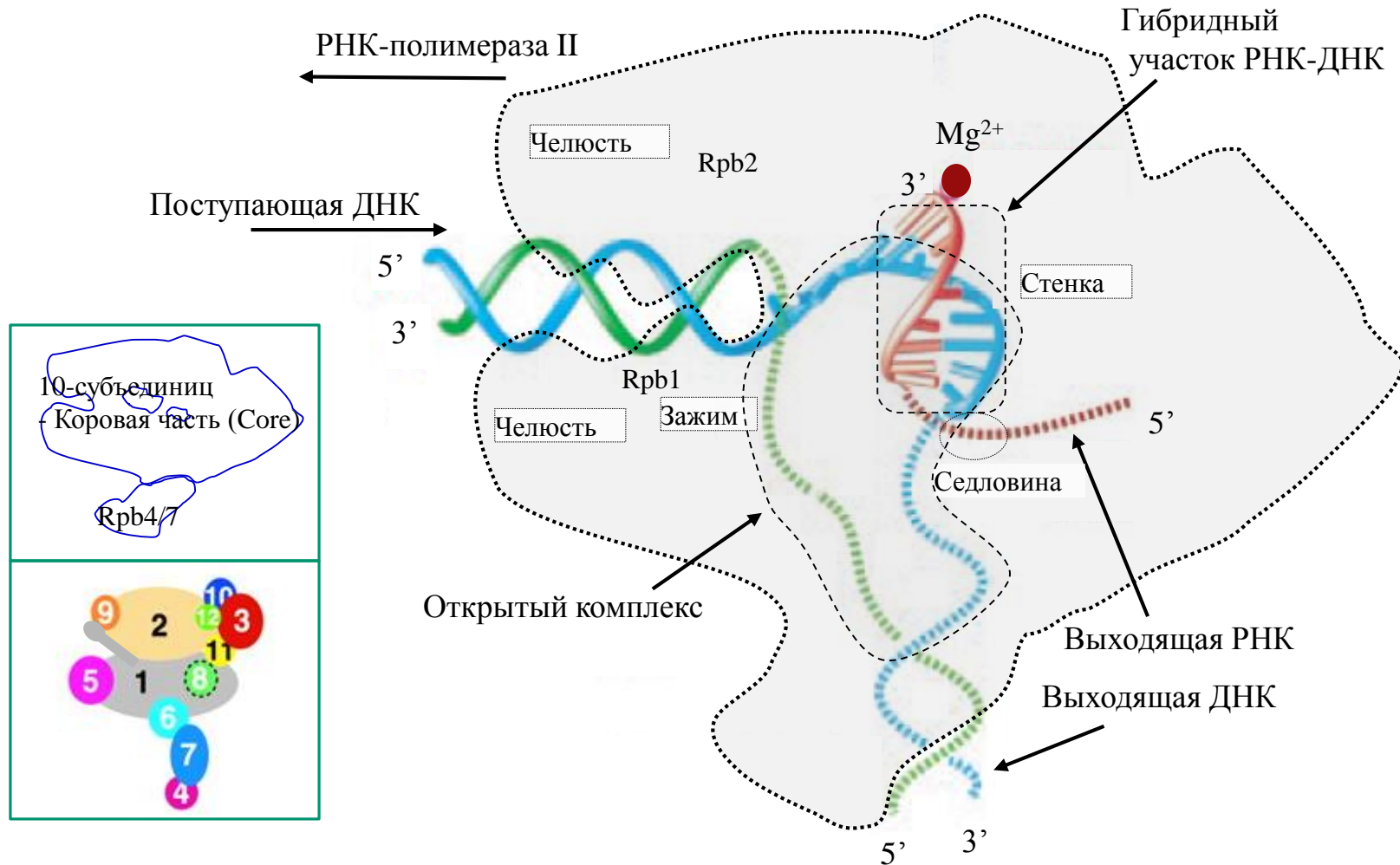
Модель построена на основе данных рентгеноструктурного анализа [Bushnell DA, and Kornberg RD. 2003; Armache K.J. et al., 2003]. Этот комплекс, напоминающий, как отмечают авторы, клешню краба или полукрытый рот лягушки, состоит из коровой части, включающей 10-субъединиц и дополнительной части, включающей субъединицы Rpb4 и Rpb7

Показано, что коровая часть фермента обладает элонгационной активностью, однако гетеродимер Rpb4/Rpb7 необходим для инициации транскрипции и полноценной регуляции на следующих стадиях.

Схема взаимного расположения отдельных функциональных доменов 12-субъединичного комплекса РНК-полимеразы II дрожжей (*S. cerevisiae*).



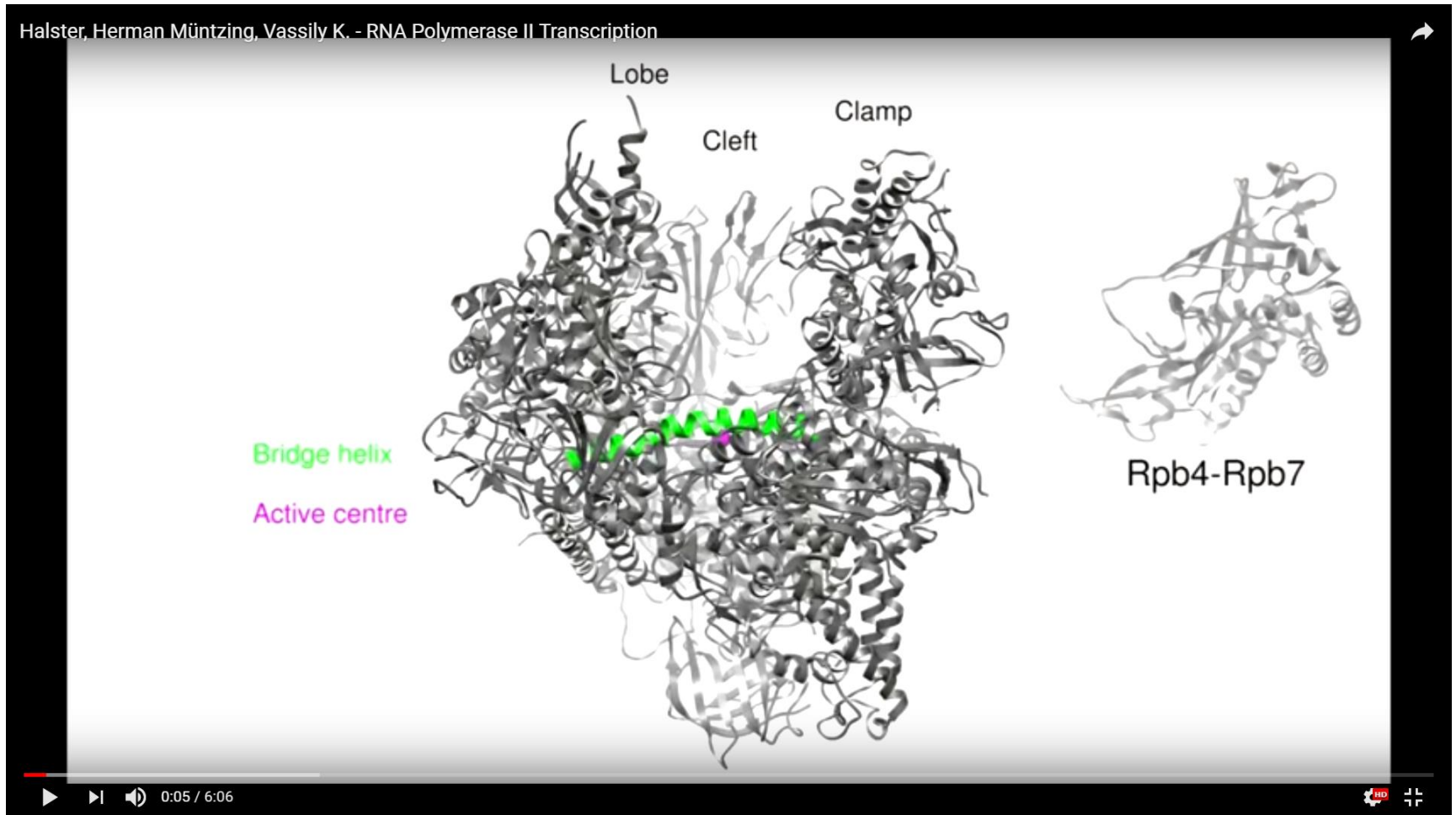
Схематическое представление комплекса РНК-полимераза II / ДНК / РНК на стадии элонгации «вид сверху».



Голубым обозначена матичная цепь ДНК, зеленым - нематричная (кодирующая) цепь ДНК, красным – вновь синтезированная цепь РНК. Mg^{2+} - ион магния, расположенный в активном центре РНК-полимераза II. В прямоугольниках, обведенных пунктиром, даны названия функциональных доменов РНК-полимераза II. Представлено по [Gnatt A.L. et al., 2001] с дополнениями.

Учебный фильм о функционировании РНК-полимеразы II

<https://www.youtube.com/watch?v=k5Pqyfx2sQ0>



Halster, Herman Müntzing, Vassily K. - RNA Polymerase II Transcription

Роджер Корнберг – Нобелевский лауреат в области химии, удостоенный награды за цикл работ, в которых исследована трехмерная структура дрожжевой РНК-полимеразы II и ее комплексов с ДНК на основе данных рентгеноструктурного анализа



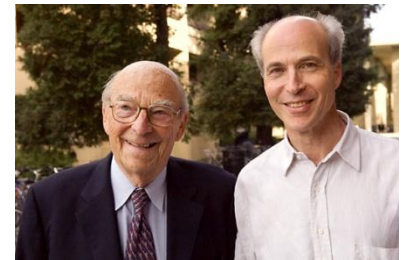
Роджер Корнберг,
Нобелевский
лауреат (2006 г.)

Роджер Дэвид Корнберг родился в 1947 году в США. Его отец, тоже нобелевский лауреат Артур Корнберг, признанный авторитет в области биохимии ферментов, получил премию по физиологии и медицине в 1959 году. 12-летний Роджер присутствовал на церемонии вручения награды отцу. В 1967 году Корнберг окончил Гарвардский университет, через пять лет получил ученую степень доктора в Стэнфордском университете. В качестве сотрудника научно-исследовательской лаборатории поработал в Кембриджском университете в Великобритании. Два года провел в Гарварде на должности доцента, а затем вернулся в Стэнфорд уже в качестве профессора. В 1997 году Корнберг стал лауреатом Премии Харви. А в 2006 году получил Нобелевскую премию в области химии за исследования механизма копирования клетками генетической информации (получение точных изображений молекул **РНК-полимеразы** в различные моменты процесса транскрипции)

Артур Корнберг - американский биохимик, удостоенный в 1959 Нобелевской премии по физиологии и медицине (совместно с С.Очоа) за открытие механизма биосинтеза нуклеиновых кислот. Исследуя механизм синтеза нуклеотидов – мономерных единиц ДНК и РНК – А. Корнберг подошел к проблеме их соединения друг с другом (полимеризации). Выделил и очистил фермент, называемый теперь **ДНК-полимеразой**, который катализирует копирование (репликацию) ДНК при делении клетки. Используя в качестве матрицы природную ДНК, А.Корнберг впервые осуществил синтез функционально активной ДНК *in vitro*.



Артур Корнберг,
Нобелевский
лауреат (1959 г.)



Артур Корнберг (слева) и
Роджер Корнберг (справа).
2006 г.

ОСОБЕННОСТИ ТРАНСКРИПЦИИ У ЭУКАРИОТ:

1) У эукариот транскрипция осуществляется при участии РНК-полимераз трех типов, которые обозначаются как pol I, pol II, и pol III. Можно выделить три группы генов:

- pol I транскрибируемые: гены рРНК (18S, 5.8S и 28S)
- pol II транскрибируемые: все белок-кодирующие гены + гены многих мяРНК + многие миРНК
- pol III транскрибируемые : гены тРНК + гены низкомолекулярных РНК (5S рРНК, и др.)

2) Каждая РНК-полимераза имеет сложное, многосубъединичное строение, например, pol II включает более 10 субъединиц;

3) Для точной посадки РНК-полимераз на участок, прилежащий к старту транскрипции, нужны вспомогательные белки – базальные (или общие) транскрипционные факторы;

4) Для достижения необходимого уровня транскрипции каждого гена, помимо базальных (общих) транскрипционных факторов, требуются другие белки (транскрипционные факторы, коактиваторы, корепрессоры, медиаторы и др.);

5) Промоторы генов, транскрибируемых каждым типом полимераз, имеют характерное строение

6) Транскрипция генов эукариот зависит от состояния хроматина и плотности нуклеосомной упаковки.

ОСНОВНЫЕ КЛАССЫ БЕЛКОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ ТРАНСКРИПЦИЮ ЭУКАРИОТ:

- 1) РНК-полимеразы;
- 2) Базальные транскрипционные факторы
= general transcription factors (GTFs);
- 3) Транскрипционные факторы;
- 4) Белки-медиаторы;
- 5) Корегуляторные белки (коактиваторы и корепрессоры);

ОПРЕДЕЛЕНИЯ:

Базальные **т**ранскрипционные **ф**акторы (GTFs = БТФ) - особый класс вспомогательных белков, необходимых для точной посадки РНК-полимераз на участки ДНК, прилежащие к стартам транскрипции. БТФ являются общими для всех генов и вовлечены в образование прединициаторного комплекса (ПИК) ;

Транскрипционные **ф**акторы (ТФ) белки, специфически связывающиеся с ДНК и регулирующие транскрипцию. Они взаимодействуют с короткими участками ДНК (сайтами связывания), которые расположены в различных районах генов. ТФ специфично регулируют определенные группы генов ;

Прединициаторный **к**омплекс (ПИК) или базальный транскрипционный комплекс - комплекс РНК-полимеразы с базальными транскрипционными факторами, обеспечивающий инициацию транскрипции.

Белки-медиаторы и корегуляторные белки (коактиваторы и корепрессоры) не имеют ДНК-связывающих доменов и участвуют в регуляции транскрипции без непосредственного специфического взаимодействия с ДНК

БАЗАЛЬНЫЕ ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ (БТФ)

-класс вспомогательных белков, необходимых для точной посадки РНК-полимераз на участки ДНК, прилежащие к стартам транскрипции. БТФ являются общими для всех генов и вовлечены в образование преинициаторного комплекса

Названия базальных транскрипционных факторов включают тип РНК-полимераз, с которыми они взаимодействуют.

Например, базальные транскрипционные факторы, обеспечивающие инициацию транскрипции генов с участием РНК-полимеразы II, обозначаются как:

TFIIA,
TFIIB,
TFIID,
TFIIE,
TFIIF,
TFIIN.

РОЛЬ БАЗАЛЬНЫХ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ:

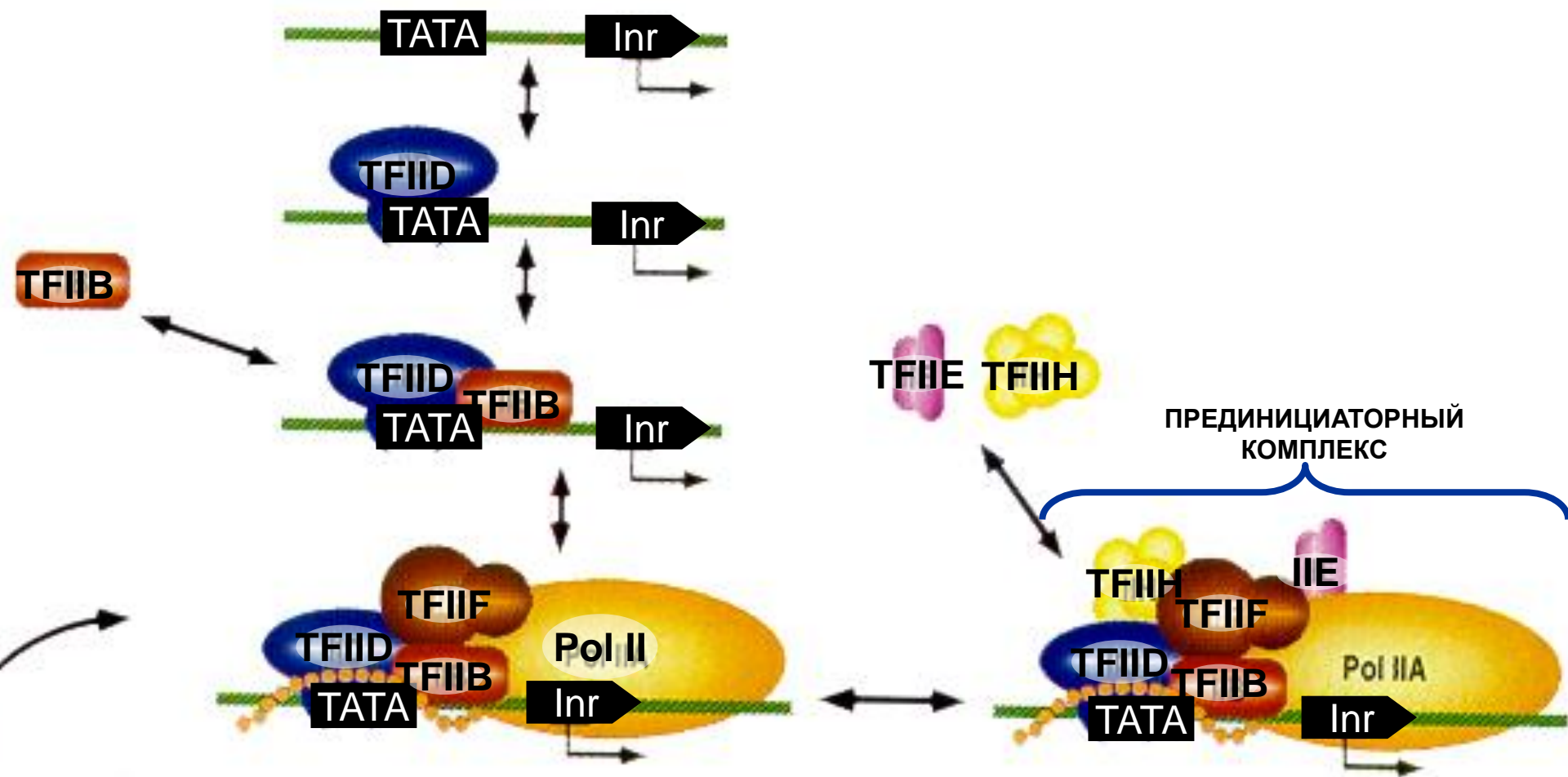
Формирование прединициаторного комплекса (ПИК), обеспечивающего:

- А) точную посадку РНК-полимеразы на участки ДНК, прилежащие к стартам транскрипции
- Б) инициацию транскрипции РНК-полимеразой

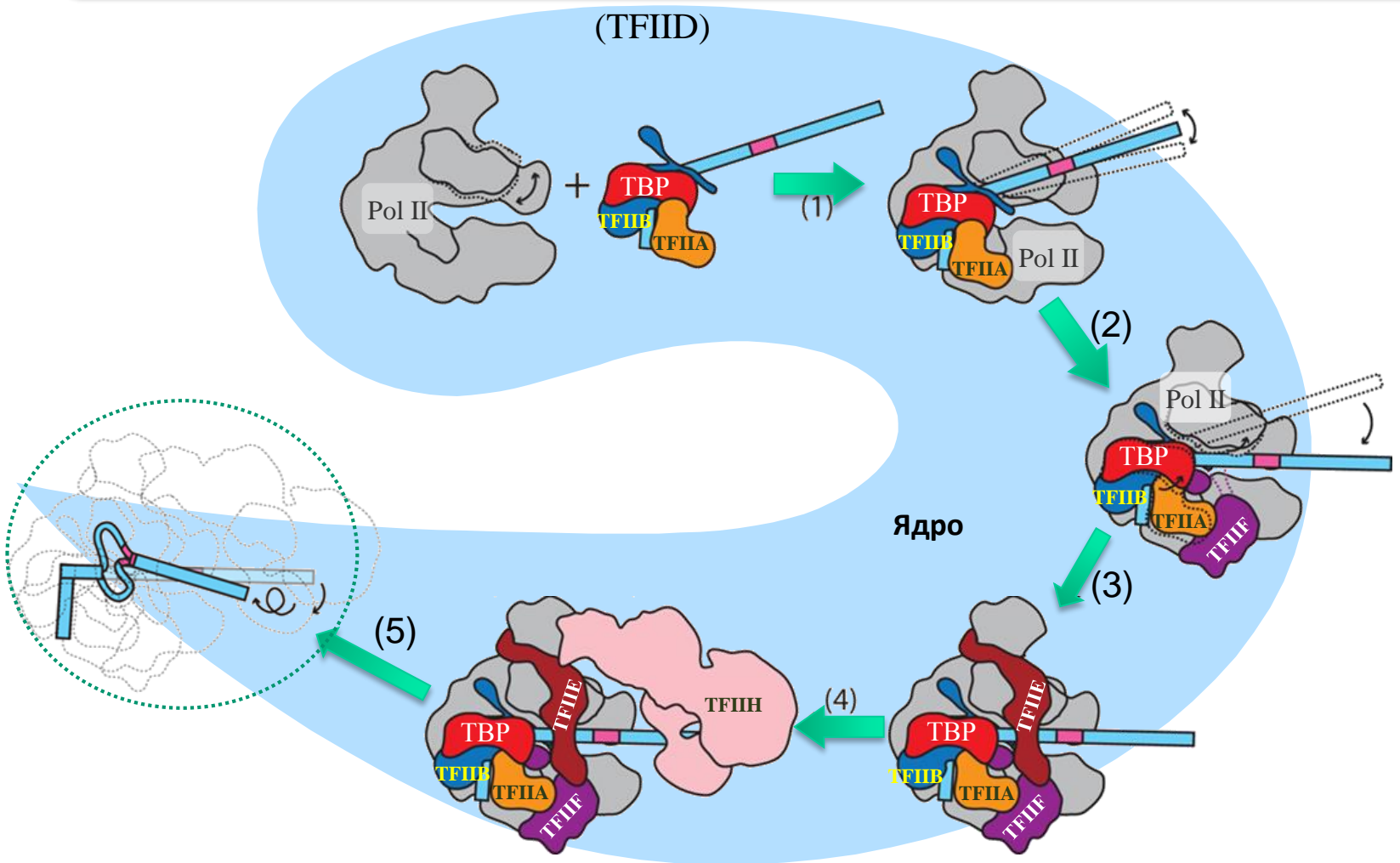
Предполагается два механизма формирования ПИК:

- 1) Пошаговая сборка;
- 2) Сборка с привлечением холоэнзима, включающего РНК-полимеразу II

ПЕРВЫЙ МЕХАНИЗМ (версия 1): схема пошаговой сборки прединициаторного комплекса (ПИК) в районе старта транскрипции гена, транскрибируемого РНК-полимеразой II
(по данным Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997)

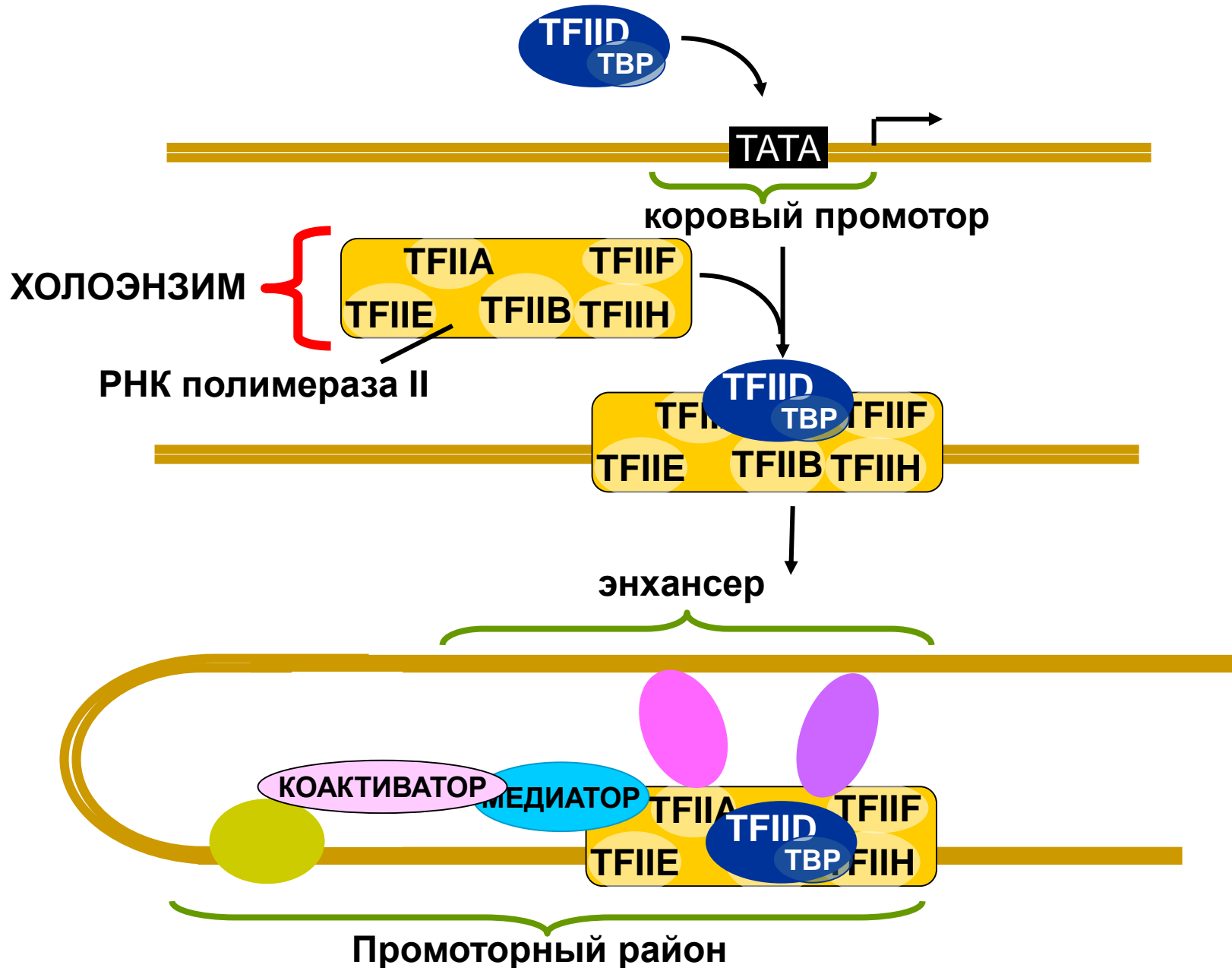


ПЕРВЫЙ МЕХАНИЗМ (версия 2): Схема сборки прединициационного комплекса (ПИК) и плавления участка ДНК в районе инициации транскрипции (по данным Nature, 2013)



He Y, Fang J, Taatjes DJ, Nogales E. Structural visualization of key steps in human transcription initiation. **Nature**. 2013, 495(7442):481-6.

Второй механизм: инициация транскрипции при участии холоэнзима, включающего РНК-полимеразу II



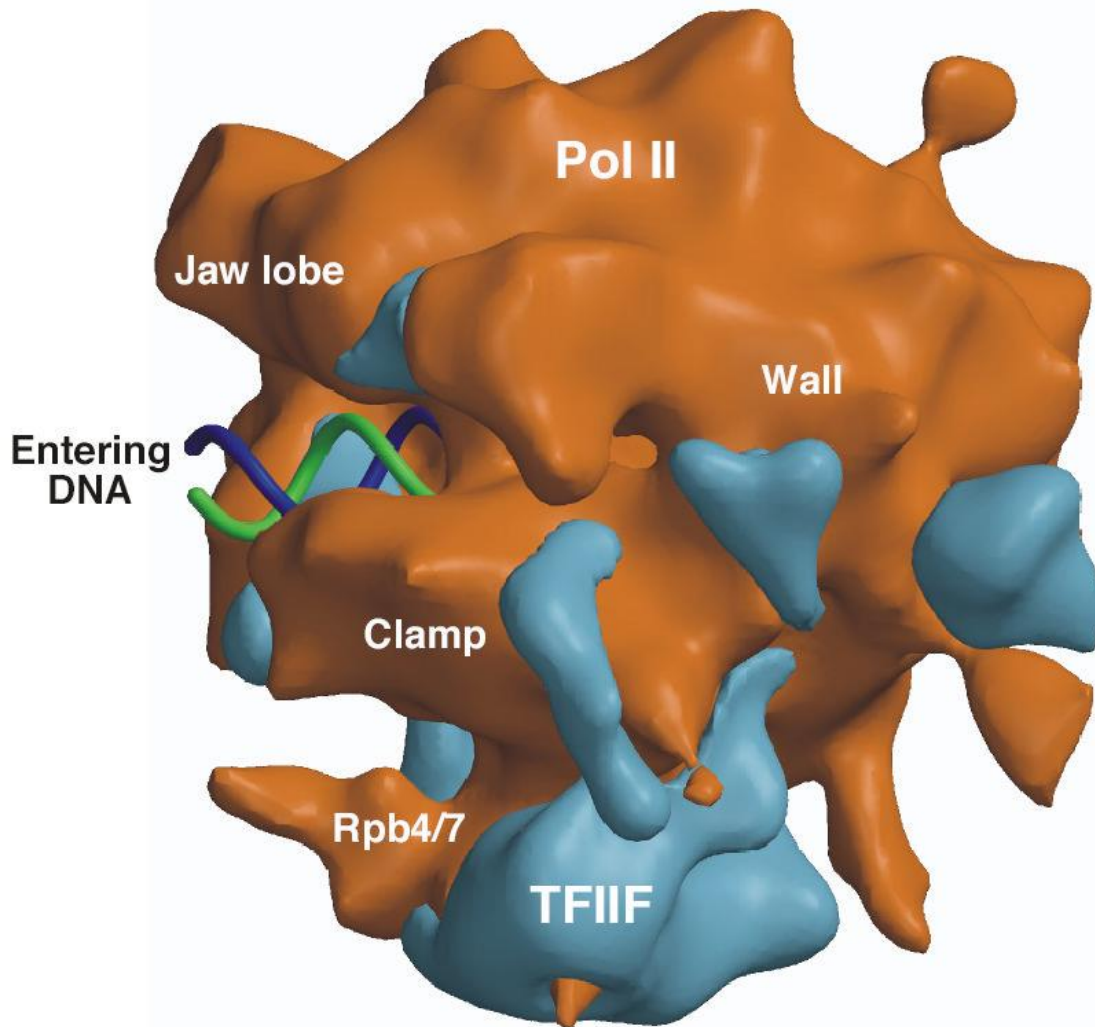
Субъединичный состав и основные функции базальных транскрипционных факторов и РНК полимеразы II

Фактор	Субъединичный состав	Функция
РНК-полимераза II (Pol II)	12 субъединиц	Инициация транскрипции и элонгация цепи РНК
TFIIA	Димер из одной α и одной β субъединицы	Контактирует с ТВР; стабилизирует взаимодействие ТВР-ТАТА
TFIIB	Отдельный полипептид	Связывается с комплексом ТВР/ТАТА; выбор сайта инициации; взаимодействие с активационными доменами транскрипционных факторов и с ТАФ-ами
TFIID	ТВР (=ТАТА binding protein) и большое количество ТАФs (= Transcription Activation Factors) У дрожжей 14 субъединиц	Связывается с ТАТА-боксом; служит центром сборки ПИК; ТВР контактирует с активационными доменами ТФ, с ТАФs, TFIIA, TFIIB, и TFIIF;. ТАФs контактируют с TFIIA, TFIIB и TFIIF и связываются с INR и DPE элементами на ДНК.
TFIIE	2 субъединицы	Способствует образованию и стабилизации открытого комплекса, усиливает киназную и АТФазную активность фактора TFIIH.
TFIIF	2 субъединицы: Rap74 (Tfg1), и Rap30(Tfg2)	Вовлекает Pol II в состав ПИК. В составе ПИК локализуется на участке промотора в позициях от -24 до -1.
TFIIH	Многосубъединичный комплекс	Включает субъединицы с ДНК-зависимой АТФазной, АТФ-зависимой киназной и геликазной активностями, а также серин-треонин-киназной активностью, обеспечивающей фосфорилирование STD РНК-полимеразы II. Необходим для образования открытого комплекса.

При взаимодействии с ТВР (ТАТА связывающий белок) ДНК изгибается



МОДЕЛЬ КОМПЛЕКСА POL II ДРОЖЖЕЙ С БАЗАЛЬНЫМ ТРАНСКРИПЦИОННЫМ ФАКТОРОМ TFIIF



Домен Rpb4/7 находится в тесном контакте с TFIIF

TFIIF – базальный транскрипционный фактор, включает субъединицы с ДНК-зависимой АТФазной, АТФ-зависимой киназной и **геликазной** активностями. TFIIF необходим для образования открытого комплекса

Конец 1-ой лекции