

В.М. Седова
Транскрипция - первый этап реализации
генетической информации.

Учебное пособие, УМО Техническая физика.
Из-во Санкт-Петербургский государственный
политехнический университет.

2009 г.

Введение.

Молекулярная биология – это та отрасль науки, где удивительно быстро идет накопление знаний. За последние 50 лет произошли основные открытия в этой области и были сформированы основные представления. Безусловно, основополагающим было открытие Уотсоном и Криком двойной спирали ДНК. Но нужно признать, что до этого эпохального события происходило систематическое накопление знаний в изучении химии и физики нуклеиновых кислот, которые и позволили Уотсону и Крику представить на суд ученой общественности свою модель.

И хотя возникновение молекулярной биологии как науки связывают именно с постулированием Уотсоном и Криком модели двойной спирали ДНК, трудно отрицать роль целой плеяды химиков и физиков, которые внесли несомненный вклад в возникновение этой науки как таковой.

Интерес к нуклеиновым кислотам у исследователей возник достаточно давно. Первые попытки швейцарского биохимика Фридриха Мишера выделить и охарактеризовать ядерное содержимое клеток относятся ко второй половине XIX века. Биохимики Ф.Аарон и Т. Левин в 20-х годах XX века установили, что в составе ДНК присутствуют аденин, гуанин, тимин и цитозин, а также дезоксирибоза и остатки фосфорной кислоты. Свои работы по исследованию пространственной структуры ДНК В.Т. Астборо проводил в еще в 1937 г. Весьма существенный вклад в открытие двойной спирали ДНК внесли работы Л. Поллинга по кристаллографии белков и ДНК. Продолжая работы о загадках наследственности, начатые в 1928 г. Фредериком Гриффитом, американский ученый Эйвери в содружестве с МакЛеодом и МакКарти в 1944 г. установил, что именно ДНК является носителем наследуемых признаков. Нобелевский лауреат Джошуа Ледерберг назвал полученные Эйвери результаты «исторической платформой современных исследований ДНК и молекулярной революцией в генетике и биомедицинской науке вообще».

В 30-е годы XX века известный советский ученый А.Н. Белозерский показал, что ДНК и РНК являются принадлежностью и животных и растительных клеток.

Е.Р.Дж.А. Шрёдингер – известный австрийский физик, в 1944 году опубликовал книгу *What is Life?*, в которой дискутировались вопросы негативной энтропии живых систем, и высказывалась, на тот момент совершенно спекулятивная, концепция о комплексе молекул со свойствами генетического кода для живых организмов. Высказанные Шрёдингером предположения оказали решающее влияние на мировоззрение Дж. Уотсона и Ф. Крика относительно того, как генетическая информация может храниться в молекулах.

Эрвин Чаргафф сформулировал в 30-х – 40-х годах XX века два правила, получивших его имя. Первое из них, касающееся специфического баланса пуриновых и пиримидиновых остатков в ДНК, нашло свое развитие в законе Уотсона-Крика. Второе правило Чаргаффа указывало на то, что относительное содержание остатков аденина, гуанина, тимина и цитозина в ДНК варьирует от вида к виду. Такая молекулярная вариабельность ДНК делала ее более вероятным, нежели белки, кандидатом на роль генетического материала. В то время ученые рассматривали генетическими носителями большого разнообразия наследуемых признаков скорее белки, чем достаточно просто организованную ДНК.

А. Херши и М. Чейз продолжили исследования, начатые Эйвери, и их исследования ознаменовали рождение современной генетики и молекулярной биологии.

Следует упомянуть также А.Стокса, М Вилькинса, Р.Франклин, Р. Гослина и Г. Вильсона, важность исследований которых для постулирования структурной организации ДНК была настолько значительна, что их работы были опубликованы в том же номере журнала Nature, что и статья Д. Уотсона и Ф. Крика о двойной спирали ДНК. Критические замечания Д. Донохью оказали существенное влияние на выводы, сделанные Уотсоном и Криком.

Раздел 1

Транскрипция – первый этап реализации генетической информации.

Глава 1. Химия нуклеиновых кислот. Структура и номенклатура нуклеозидов и нуклеотидов. Двойная спираль ДНК. Термические свойства нуклеиновых кислот.

1.1. Химический состав нуклеиновых кислот.

Нуклеотиды, найденные в клетках, являются производными гетероциклических высокоосновных соединений - пуринов и пиримидинов (Рис.1).

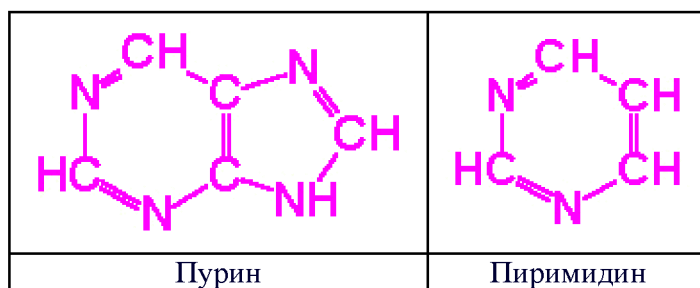
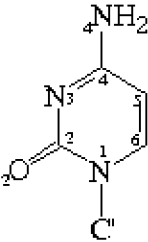
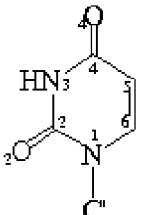
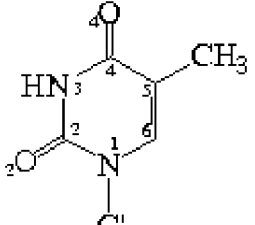
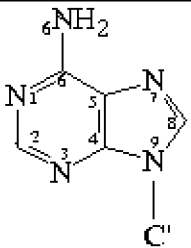
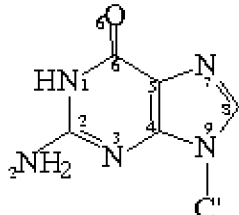


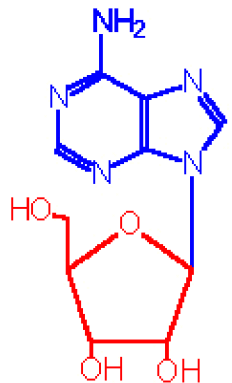
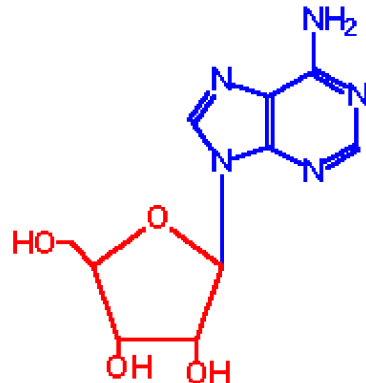
Рис.1. Химическая структура пуринов и пиримидинов.

В составе нуклеиновых кислот найдены два пуриновых производных - аденин и гуанин, и три пиримидиновых производных – тимин, цитозин и урацил. Существует общепринятая аббревиатура этих соединений: аденин – А (A), гуанин- Г (G), тимин – Т(Т), цитозин- Ц (C) и урацил – У (U) . Структурные формулы оснований приведены в таблице 1.

Таблица 1

Формула основания	Название и аббревиатура	Нуклеозид (название)	Нуклеотид = Основание+рибоза+ фосфат
	Цитозин, Ц (C)	Цитидин,Ц (C)	Цитидин Монофосфат ЦМФ (CMP)

	Урацил, У, (U)	Уридин, У(U)	Уридин монофосфат УМФ (UMP)
	Тимин, Т (Т)	Тимидин, Т (Т)	Тимидин монофосфот ТМФ, (TMP)
	Аденин, А (А)	Аденозин, А (А)	Аденозин монофосфат АМФ (AMP)
	Гуанин, Г (G)	Гуанозин, Г (G)	Гуанозин монофосфат, ГМФ (GMP)

	
syn-Аденозин	anti-Аденозин

Пуриновые и пиримидиновые соединения в клетке связаны с остатками пентоз и в этой форме они являются нуклеозидами. Нуклеозиды - это N-гликозиды пиримидиновых или пуриновых оснований, в которых 1-й углеродный атом сахара - пентозы связан гликозидной связью с атомом N¹ пиримидина или атомом N⁹ пурина. Такая связь называется β-N-гликозидной.

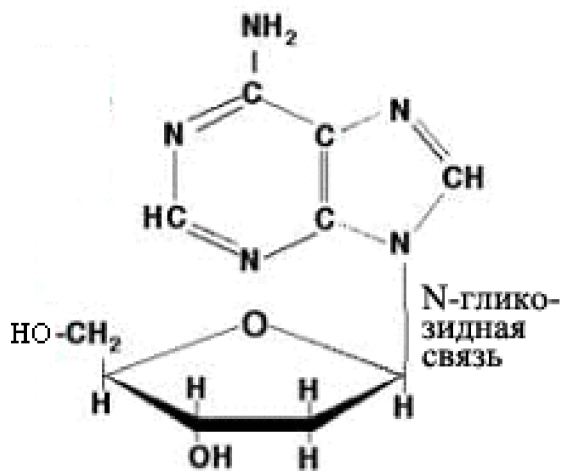


Рис. 2. Структурная формула аденозина.

Относительно N-гликозидной связи основания могут быть ориентированы в виде двух пространственных конформаций, которые называются *syn* и *anti*. Конформация *anti* встречается в естественных нуклеотидах чаще, чем конформация *syn* (Табл. 1)

Пентозы всегда присутствуют в фуранозной форме. Существует два ряда нуклеозидов: рибонуклеозиды, которые содержат в качестве сахарного компонента D-рибозу, и 2'-дезоксирибонуклеозиды, содержащие 2-дезоксид-рибозу.

Нуклеозиды в клетках могут подвергаться фосфорилированию, тогда они называются нуклеотидами. Фосфорилированию подвержена гидроксильная группа 5' атома углерода пентозы. В зависимости от количества присоединенных остатков фосфорной кислоты, нуклеотиды могут существовать в моно-, ди- и трифосфорилированной форме. Монофосфорилированная форма, например, аденозина называется аденозин-5'- монофосфат (АМФ), дифосфорилированная – аденозин-5'-дифосфат (АДФ), а трифосфорилированная – аденозин-5'- трифосфат (АТФ). Такой подход в названиях соблюдается и для других нуклеотидов. Аббревиатура АМФ, АДФ, АТФ указывает на то, что фосфорилирование в нуклеотидах имеет место по 5' атому углерода пентозы.

ДНК и РНК отличаются по пентозе, присутствующей в составе их нуклеотидов. В ДНК идентифицирована рибоза в 2'-дезоксид форме. Поэтому нуклеотиды, обнаруженные в ДНК, в составе которых присутствует 2'-дезоксирибоза, при сокращенном обозначении имеют букву d – dАМФ (2'-дезоксид аденозин-5'-монофосфат). Нуклеотиды, обнаруженные в составе РНК, содержат остаток D-рибозы и обозначаются соответственно АМФ, ГМФ, ЦМФ, УМФ. Остаток нуклеотида уридина

присутствует только в РНК, а остаток тимина почти исключительно в ДНК. Тимин найден в составе транспортных РНК, но не присутствует в рибосомных РНК и информационных РНК.

В составе нуклеиновых кислот обнаружены минорные основания. Одним из них является, идентифицированный в РНК псевдоуридин, который играет определенную роль в процессе биогенеза малых ядерных РНК. Это соединение интересно тем, что в его составе присутствует $C^5-C'^1$ гликозидная связь, которая более прочная, чем N-гликозидная связь.

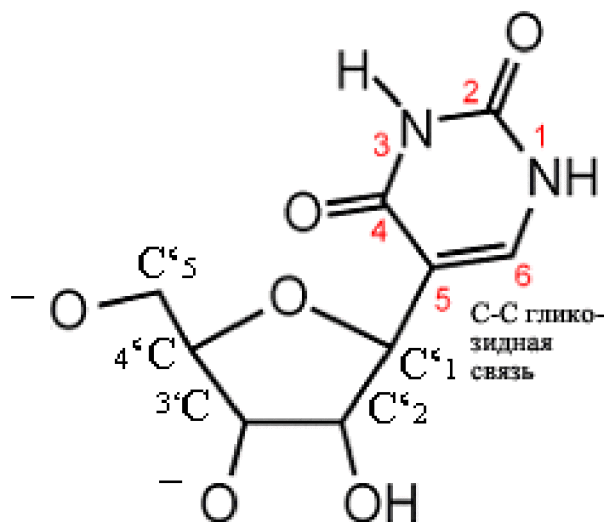


Рис. 3 Структурная формула псевдоуридина.

В составе нуклеиновых кислот идентифицированы модифицированные нуклеотиды. 5-метилцитозин обнаружен и в ДНК, и в РНК. Транспортные РНК содержат достаточно много модифицированных остатков нуклеотидов.

1.2. Производные нуклеотидов.

Нуклеотиды, помимо того, что являются мономерами ДНК и РНК, участвуют в большом количестве других важных функций клетки:

- 1) служат источником энергии в реакциях по переносу фосфатных групп. Эту функцию в большинстве реакций выполняет АТФ.
- 2) являются простетической группировкой ферментов: NAD^+ , $NADP^+$, FAD , CoA .
- 3) служат медиаторами в различных важных процессах передачи сигнала.
- 4) контролируют ряд ферментативных процессов посредством аллостерических влияний на соответствующие ферменты.

- 5) являются активированными интермедиатами, предшественниками в биосинтетических процессах.

Достаточно много модифицированных нуклеотидов обнаружено в клетках помимо нуклеиновых кислот. Они могут выполнять функции отличные от участия в контексте нуклеиновых кислот.

1.2.1. Производные аденозина.

Наиболее распространенным производным аденозина является его циклическая форма 3'-5'-циклический аденозин монофосфат – цАМФ. Это соединение выполняет ряд очень важных биологических функций:

- а) в составе цАМФ-зависимой протеин киназы (РКА) участвует в передаче сигнала с поверхности клетки на внутриклеточные белки. РКА фосфорилирует большой набор белков, тем самым регулируя их функциональную активность;
- б) ц-АМФ способен взаимодействовать с белками ионных каналов и таким образом регулирует активность ионных каналов.

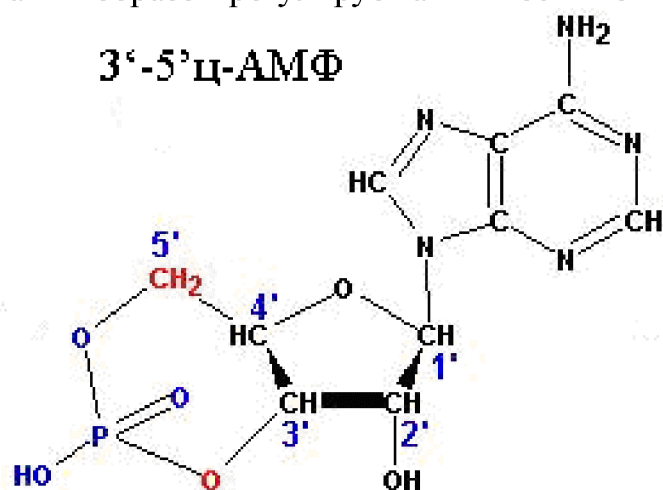


Рис. 4. Структурная формула циклического АМФ

Другое производное аденозина S-аденозилметионин. Это активная форма метионина, которая служит донором метильных групп в реакциях метилирования и источником пропиламина в синтезе полиаминов

1.2.2. Производные гуанозина

Известна циклическая форма гуанозин-5'-монофосфата (ц-ГМФ), которая выполняет функции во многих случаях антагонистические ц-АМФ.

Формирование ц-ГМФ наблюдается в ответ на активацию рецепторов, связанных с гуанилат циклазой. Наиболее важной является функция ц-ГМФ в фоторецепции при активации родопсина и других опсинов при абсорбции ими фотона света. Этот процесс вызывает активацию ц-ГМФ

специфической фосфодиэстеразы, что приводит к гидролизу ц-ГМФ до ГМФ.

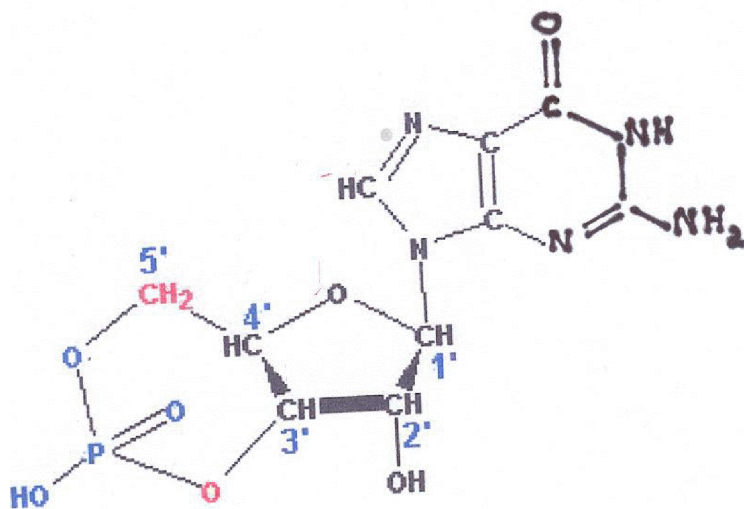


Рис. 5. Структурная формула циклического ГТФ.

Известна функция ц-ГМФ в регуляции активности ионных каналов.

Взаимодействие ц-ГМФ с белками ионных каналов вызывает закрытие канала и, как следствие, – гиперполяризацию клетки.

1.2.3. Синтетические аналоги нуклеотидов

Аналоги нуклеотидов используют в противовирусной терапии. В частности, в терапии ВИЧ (вирус приобретенного иммунодефицита человека) используют вещество AZT – азидотимидин и ddI – дидезоксиинозин. Некоторые аналоги пуринов используют для лечения подагры. Наиболее известный из них это аллопуринол, который является аналогом гипоксантина. Аминопуринол подавляет активность ксантин оксидазы, принимающей участие в биосинтезе пуринов *de novo*. Некоторые из аналогов пуринов применяют при трансплантации органов, когда необходимо подавить иммунную систему и снизить вероятность отторжения трансплантированного органа.

1.2.4. Полинуклеотиды

Полинуклеотиды образуются при конденсации двух или более нуклеотидов. Конденсация происходит между 5'-фосфатом одного и 3'-гидроксильной группой следующего нуклеотида с образованием фосфодиэфирной связи. Образование фосфодиэфирной связи в ДНК и РНК имеет направление 5'----3' по первичной структуре и может быть описано следующим образом: 5'-pApGpCpU-3'.

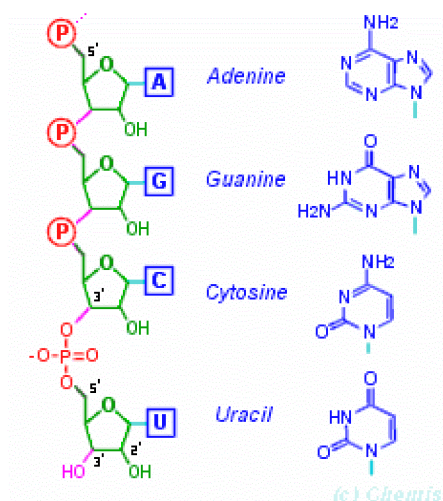


Рис. 6. Полинуклеотидная цепь РНК.

1.3. Двойная спираль ДНК

Используя данные рентгено-структурного анализа псевдокристаллов ДНК Дж. Уотсон и Ф. Крик предложили модель структуры ДНК, которая получила название двойной спирали и была отмечена Нобелевской премией 1953 г. Согласно этой модели ДНК существует в виде двух комплементарных антипараллельных цепей, которые закручены относительно друг друга и вокруг общей оси и стабилизированы водородными связями между основаниями соседних цепей. Согласно модели Уотсона-Крика пары оснований лежат в одной плоскости и расположены под углом почти 90° относительно оси спирали, т.е. сахаро-фосфатному остову. Диаметр спирали постоянен вдоль всей спирали и равен 1,80 нм. Длина витка спирали, которая соответствует периоду идентичности, составляет 3,40 нм. Период идентичности или один виток спирали состоит из 10 нуклеотидных остатков в одной цепи, т. е. межунауклеотидное расстояние составляет 0,34 нм. Соседние пары оснований повернуты относительно друг друга на 360° . Для поддержания регулярности спирали необходимо, чтобы против остатка пурина в одной цепи находился остаток пиримидина в другой. Уотсон и Крик установили, что это требование выполняется лишь в случае, если остаток А составляет пару с остатком Т, а остаток Г с остатком Ц. Такие пары оснований получили название комплементарных, а взаимодействие пар оснований – Уотсон-Криковским.

А-Т пара стабилизирована двумя водородными связями, ГЦ-пара – тремя, что делает эту пару более стабильной по сравнению с АТ (Рис.7).

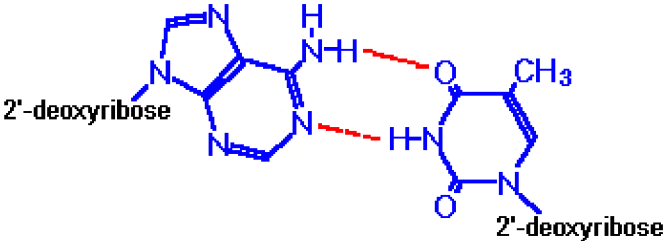
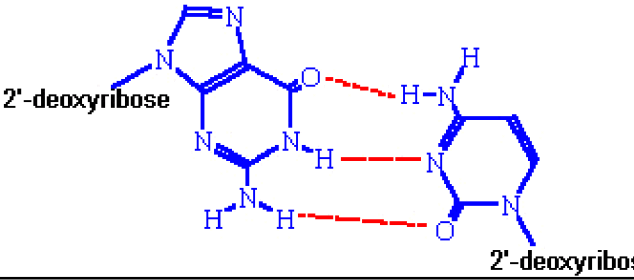
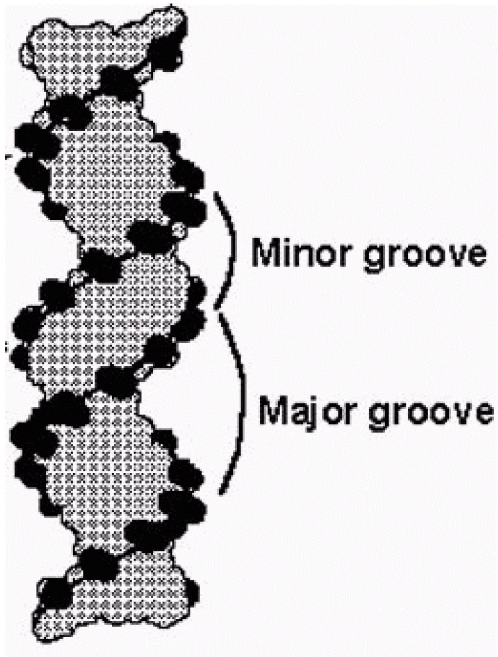
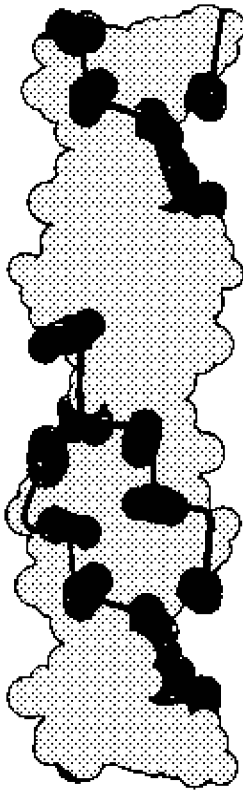
	
A-T пара оснований	G-C пара оснований
	
Структура В-формы ДНК	Структура ДНК в Z-форме

Рис.7. Структура двойной спирали ДНК в В- и Z-формах.

Сахаро-фосфатный остов спирали обращен наружу. Спираль закручена таким образом, что на ее поверхности можно видеть две бороздки: большую - шириной 2,20 нм и малую - шириной 1,20 нм. Спираль правозакрученная, а полинуклеотидные цепи в ней антипараллельны, т.е. 5'-концу одной цепи соответствует 3'-конец другой. Если двигаться вдоль оси спирали от одного ее конца к другому, то в одной цепи фосфодиэфирные связи будут встречаться в направлении 5'-3', а в другой - 3'-5'.

Позднее было установлено, что модель Уотсона - Крика описывает одну из нескольких форм двойной спирали ДНК, а именно В-форму. Это форма, в

которой в клетке существует большинство молекул ДНК. При изменении условий ДНК может принимать форму, отличную от описанной Уотсоном и Криком. При понижении влажности препарата ДНК, например при добавлении спирта, молекула ДНК может переходить в А-форму. Изменение структуры ДНК связано в первую очередь с изменением конформации пентозы в ее составе. Происходит уменьшение расстояния между остатками фосфатных группировок и, соответственно, уменьшение расстояния между парами нуклеотидов вдоль оси спирали. Оно снижается до 0,215 нм на пару, что приводит к изменению идентичности спирали до 11 пар нуклеотидов на виток. Пары оснований составляют с осью спирали угол в 20° . Диаметр спирали увеличивается, изменяется ширина и глубина бороздок, а пары оснований смещаются к периферии спирали. Внутри спирали возникает полость диаметром 0,40 нм. Позднее было установлено, что существует множество вариантов А и В форм спирали, т.е. имеет смысл говорить о семействах А и В-форм. Оба семейства - это правозакрученные спирали. Но возможно существование и левозакрученной формы спирали. Такая форма спирали называется Z. Эта форма была обнаружена *in vitro* при изучении конформации поли - dГЦ цепей. Это самокомплементарные цепи, которые в растворе с низкой ионной силой образуют конформацию в виде правозакрученной В-формы. При повышении ионной силы или добавлении спирта правозакрученная спираль может перейти в левозакрученную Z-форму. Повторяющаяся единица в Z-форме состоит из двух пар нуклеотидов, а не из одной как у А и В-форм. В результате линия, соединяющая фосфатные группы, имеет изломанный вид и принимает зигзагообразную форму. Отсюда и название Z-форма. Такая конформация может встречаться в виде отдельных участков протяженной В-формы, если в их составе будет достаточно много повторяющихся ГЦ-пар нуклеотидов. На существование Z-формы ДНК *in vivo* указывают белки, которые способны взаимодействовать лишь с Z-формой ДНК и не взаимодействуют с В-формой.

Таблица 2
Параметры спиралей ДНК

Параметры	А-форма	В-форма	Z-форма
Направление спирали	правая	правая	левая
Количество остатков на шаг спирали	11	10	12 пар оснований
Угол поворота спирали на одно основание (градусы)	33	36	-30

Угол наклона пары оснований к оси спирали (градусы)	20	90	7
Большая бороздка	Узкая и глубокая	Широкая и глубокая	плоская
Малая бороздка	Широкая и плоская	Узкая и глубокая	Узкая и глубокая
Ориентация N-гликозидной связи	анти	анти	Анти для Pu Syn для Pu
Примечания		Наиболее распространенная форма ДНК в клетке	Может возникать в протяженных участках, обогащенных ГЦ-парами

1.4. Термические свойства нуклеиновых кислот.

1.4.1. Денатурация – ренатурация ДНК.

Деление клеток требует полного копирования ДНК, т.е. ее репликации. Каждая из дочерних клеток должна получить полный набор генетического материала. Чтобы процесс репликации мог произойти, необходимо, чтобы цепи ДНК были разделены. Это явление называется денатурацией или плавлением двойной спирали. Внутримолекулярные взаимодействия, которые стабилизируют вторичную структуру ДНК, отличаются такой особенностью как кооперативность. Это означает, что двойная спираль ДНК при денатурации, вызванной, например, повышением температуры, превращается в две изолированные полинуклеотидные цепи. Все звенья спиральной структуры разрушаются одновременно. Нуклеотидный состав ДНК существенно отличается в различных участках одной молекулы и, соответственно, у ДНК из различных видов. Участки, где дуплексы образованы преимущественно из А-Т - пар отличаются меньшей термической стабильностью по сравнению с участками, обогащенными Г-Ц -парами. Процесс термической денатурации ДНК описывают кривой плавления, которая характеризуется температурой плавления (T_m), соответствующей температуре, при которой 50% вторичной структуры ДНК находится в расплавленном состоянии. T_m зависит от нескольких факторов, один из которых – нуклеотидный состав. Чем выше в составе ДНК содержание А-Т -пар, тем ниже значение T_m , и наоборот, чем больше в составе ДНК Г-Ц -пар, тем T_m у такой ДНК выше. Помимо этого T_m может зависеть от химического состава раствора и идентичности и

концентрации различных ионов в растворе. Плавление ДНК сопровождается повышением оптической плотности раствора (λ 260). Это явление называют гиперхромным эффектом.

Денатурация - процесс обратимый. Восстановление двуспиральной структуры ДНК называется ренатурацией, реассоциацией или отжигом. Восстановление вторичной структуры ДНК может быть достаточно совершенным, т.е. двойная спираль восстанавливается практически полностью.

Скорость ренатурации описывают уравнением:

$C/C_0 = 1 / 1 + K C_0 T$, где C - концентрация однотяжевой ДНК,

C_0 – концентрация суммарной ДНК,

T – время отжига,

K – константа скорости второго порядка.

1.4.2. Вторичная и третичная структура РНК

Двуспиральные РНК - это РНК, состоящие из двух комплементарных цепей, встречаются весьма редко и только в составе некоторых вирусов.

Макромолекулы природных РНК состоят из одной полинуклеотидной цепи.

Основной элемент их вторичной структуры – это сравнительно короткие двойные спирали, образованные комплементарными участками одной и той же полинуклеотидной цепи. Биспиральные участки разделены одноцепочечными. Полинуклеотидные цепи в биспиральных участках антипараллельны, двойная спираль в А – форме и далеко несовершенна, т.к. В ней присутствуют неспаренные пары нуклеотидов. Наряду с комплементарными или Уотсон-Криковскими парами А-Т и Г-Ц в двойных спиралях РНК могут встречаться пары Г-У. Двуспиральные участки в РНК называют шпильками.

В физиологических условиях одноцепочечные РНК могут иметь выраженную третичную структуру, которая возникает за счет взаимодействия между двуспиральными участками, т.е. образовавшиеся шпильки могут взаимодействовать между собой. Такое взаимодействие происходит за счет образования дополнительных водородных связей между гидроксильными группами рибозы и оснований. Элементы вторичной структуры могут сближать между собой комплементарные основания, разнесенные до этого пространственно, в результате чего образуются Уотсон-Криковские пары. В стабилизации третичной структуры существенную роль играют двухвалентные катионы, а также пары Г-У.

Третичная структура изучена для нескольких т-РНК и рибосомной 16S РНК.

Эти РНК относятся к классу стабильных, нетранслируемых РНК. Их пространственная структура очень существенна для выполнения биологической функции. 16S рибосомная РНК играет важную роль в формировании рибосом – органелл, где осуществляется синтез белка.

1.4.3. Денатурация и ренатурация РНК

Как и в случае ДНК, двуцепочечные, спиральные участки РНК могут разрушаться под действием температуры. Протяженность биспиральных участков в РНК относительно невелика, спирали несовершенны, поэтому они плавятся достаточно легко. Если после денатурации плавно понижать температуру, то происходит восстановление вторичной структуры РНК. Однако, в связи с тем, что биспирализация в РНК несовершенна, при ренатурации могут образовываться пространственные структуры, отличные от исходной.

Способность к ренатурации или реассоциации двуспиральной структуры нуклеиновых кислот была использована в методе молекулярной гибридизации. Этот метод позволяет оценить степень гомологии или комплементарности ДНК из различных источников или ДНК и РНК, т.к. расплавленные ДНК и РНК могут при отжиге образовывать между собой комплементарные гетеродуплексы. При этом происходит Уотсон-Криковское спаривание оснований: dA-rU, rA-dT, dG-rC, dC-rG. Пара rG-dC более стабильна, чем пара dG-rC, и обе эти пары стабильнее, чем dG-dC в ДНК.

Гомологичность цепей ДНК и РНК можно выражать количественно.

Гомологичными две нуклеиновые кислоты можно назвать, если их нуклеотидные последовательности идентичны или очень близки.

Метод молекулярной гибридизации широко применяется, например, в систематике растений.

1.4.4. Особенности нуклеотидного состава

Частота встречаемости в определенном соседстве любых двух оснований в ДНК бактерий, фагов и дрожжей зависит только от нуклеотидного состава и количественного содержания этих нуклеотидов в ДНК.

Частота, с которой встречаются в ДНК прокариот динуклеотидные варианты 5'G-C3' и 5'C-G3', 5'A-G3' и 5'G-A3' чисто статистическая. Но в ДНК эукариот, вирусов животных и в растениях частота встречаемости динуклеотидов 5'G-C3' и 5'C-G3' совершенно различны. Динуклеотид 5'C-G3' у эукариот встречается значительно реже, чем динуклеотид 5'G-C3'. Последовательность 5'C-G3' является мишенью для ферментов метилаз, которые метилируют остаток цитозина в этом динуклеотиде. Более 50% остатков цитозина в таком динуклеотиде в ДНК эукариот метилированы. А метилирование является важным фактором в регуляции экспрессии генов и дифференцировке.

Глава 2. Механизмы транскрипции у прокариот

2.1. Промотор, терминатор, транскриптон, оперон. Транскрипция – это первый шаг реализации генетической информации, закодированной в полинуклеотидной цепи ДНК. Информация на этапе транскрипции копируется с ДНК в полинуклеотидную последовательность РНК, т.е. продуктом транскрипции является РНК. В основе механизма копирования при транскрипции лежит структурный принцип комплементарного спаривания оснований. При этом комплементарным к остатку аденина (А) в ДНК становится остаток урацила (U) в РНК, таким образом, в составе РНК появляется урацил. Транскрипцию осуществляют ферменты ДНК-зависимые РНК-полимеразы, которым для синтеза РНК требуется матрица ДНК. Синтез РНК начинается на ДНК в определённых местах, которые называются **промоторами**, и заканчивается на определённых местах, которые называются **терминаторами**. Участок ДНК, ограниченный промотором и терминатором, называется **транскриптоном**. В пределах каждого транскриптона копируется только одна из цепей ДНК, которая называется матричной, смысловой или значащей. Считывание ДНК транскриптона осуществляется в направлении 3' – 5' и поэтому значащей может становиться только одна из цепей ДНК. Соседние транскриптоны отделены друг от друга нетранскрибируемыми участками, но могут и перекрываться. Разбиение ДНК на отдельные транскриптоны обеспечивает возможность независимого считывания отдельных генов, их индивидуальную регуляцию, т.е. включение, выключение, повышение и понижение интенсивности транскрипции.

У эукариот в состав транскриптона входит, как правило, один ген. Исключение представляют лишь ген рибосомной РНК, куда входят гены 28S, 18S и 5,5S РНК, которые транскрибируются в виде одного предшественника 45S РНК. Но это гены стабильных нетранслируемых РНК.

У прокариот транскриптоны чаще называют оперонами. Оперон содержит набор генов, необходимых для выполнения какой-либо функции, например, синтеза аминокислоты. Известны смешанные опероны, которые кодируют ген т-РНК и ген информационной РНК.

2.2. ДНК-зависимая РНК-полимераза прокариот. Прокариоты не имеют оформленного ядра, а генетический материал у них уложен в одну хромосому, которая называется нуклеоид. Транскрипцию всех типов РНК – информационных, рибосомных, транспортных, у прокариот осуществляет фермент - ДНК-зависимая РНК-полимераза (РНК-пол).

Структурную организацию РНК-пол. прокариот мы рассмотрим на примере фермента из кишечной палочки *Escherichia coli* (*E. coli*).

Различают функциональные состояния РНК-пол. как полного (Holo) фермента, когда в его составе присутствуют две субъединицы α , субъединицы β и β' ,

недавно открытая субъединица ω и каталитическая субъединица σ . Фермент без субъединицы σ называется коровым (core). РНК-пол. является Zn^{++} -содержащим ферментом, β и β' субъединица координационно связаны с Zn^{++} . Молекулярные массы, β и β' субъединиц составляют около 155 КДа, α субъединица 36 – КДа, ω – 10 КДа, субъединица σ основная -70 КДа. Для синтеза фосфодиэфирной связи РНК-пол. достаточно присутствия субъединиц $\alpha\beta\beta'\omega$. Но для корректной инициации транскрипции совершенно необходима субъединица σ , т.к. именно она осуществляет поиск и связывание промотора. После наступления продуктивной инициации σ -субъединица диссоциирует из транскрипционного комплекса, т.е. выполняет роль катализатора. В составе РНК-пол. всех изученных прокариот, β и β' субъединицы имеют сходную молекулярную массу. Молекулярная масса σ -субъединиц у различных прокариот колеблется весьма существенно. РНК-полимеразы прокариот располагают семействами σ -субъединиц, в которых выделяются основные, отвечающие за транскрипцию большинства генов в логарифмической фазе роста бактерий. Как уже указывалось основная σ -субъединица РНК-пол. *E.coli* имеет молекулярную массу 70 КДа. Основная σ -субъединица РНК-пол. *Bacillus subtilis* (*B.subt*) – 43 КДа. Помимо основных в семействе σ -субъединиц присутствуют минорные, которые отвечают за транскрипцию ограниченного числа генов. Они имеют меньшую, чем основная σ молекулярную массу. Анализ нуклеотидных последовательностей генов различных σ -субъединиц показал, что они произошли от одной предковой нуклеотидной последовательности. В бактериальной клетке количество σ -субъединиц всегда меньше количества коровых РНК-полимераз, т.е. уже на уровне сборки полного фермента имеет место регуляция транскрипции того или иного гена.

2.3. Цикл транскрипции.

Прежде, чем рассматривать полный цикл транскрипции, необходимо представить структуру гена так, как ее принято изображать, - схематически. Существенным элементом гена является промотор – это последовательность ДНК-матрицы, с которой связывается Нolo-РНК-пол. до начала транскрипции. В состав промотора могут входить последовательности, связывающие регуляторы белки. Нуклеотид на матрице ДНК, с которого начинается инициация транскрипции обозначают +1. Все нуклеотиды, лежащие до +1, обозначаются со знаком - , а направление называется вверх по течению или upstream. Нуклеотиды, расположенные после +1, которые собственно и транскрибируются, обозначаются со знаком +, а направление – вниз по течению или down stream.

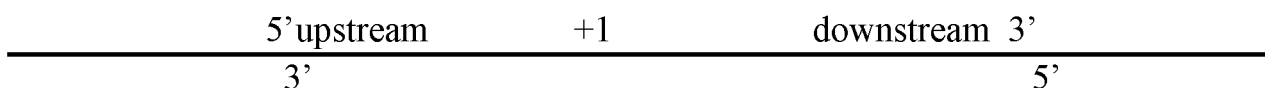


Рис.8. Схема расположения нуклеотидов относительно старта инициации транскрипции.

Анализ нуклеотидных последовательностей ДНК, которые узнавала Holo-РНК-пол, показал, что они весьма разнообразны. Но среди 70-80 пар оснований (п.о.), которые РНК-пол. защищает от действия ДНК-азы, в положении -10 и -35 локализованы последовательности, которые могут быть описаны некими консенсусами. У -10 – ТАТААТ – эта последовательность впервые была описана исследователем по имени Pribnow и получила название Pribnow-бокс или ТАТА-бокс. Консенсусная последовательность у -35 выглядит как ХХТТGACA, где Х- любой нуклеотидный остаток. Эти последовательности расположены на нематричной цепи ДНК.

Консенсусная или каноническая последовательность несимметрична, что имеет функциональное значение и задает направление транскрипции. Среди природных промоторов консенсусные последовательности не обнаружены, но, как показали исследования *in vitro*, такие последовательности являются наиболее сильными промоторами и точечные мутации в них приводят к снижению силы промотора, снижению сродства к ним РНК-пол. и, как результат, снижению частоты инициации транскрипции. Точечные замены между -10 и -35, не затрагивающие канонические последовательности, слабо влияют на силу промотора. У разных промоторов расстояние между центрами последовательностей -10 и -35 колеблется от 16 до 20 п.о., но оптимальным является 17. Отклонения от расстояния в 17 п.о. снижает силу промотора. Старт инициации транскрипции отстоит от центра Pribnow-бокс на 6-9 п.о. Первым нуклеотидом при инициации транскрипции в подавляющем большинстве генов является пурин, включение пиримидина –исключительно редкое явление. Такая организация промоторов свойственна генам не только *E.coli.*, но и другим прокариотам. У *B.subt.* промоторы описываются вполне выраженной канонической последовательностью, причем отклонения природных промоторов от канонической последовательности здесь менее выражено, чем у *E.coli.* Что касается промоторов, которые узнают минорные σ -субъединицы, то каждой из них соответствует своя весьма специфичная нуклеотидная последовательность у -10 и -35.

Весь цикл транскрипции можно описать как следующие стадии:

1. Поиск промотора и связывание ДНК;
2. Инициация транскрипции:
 - 2а. Переход «закрытого» комплекса в «открытый»;
3. Элонгация транскрипции;
4. Терминация транскрипции.

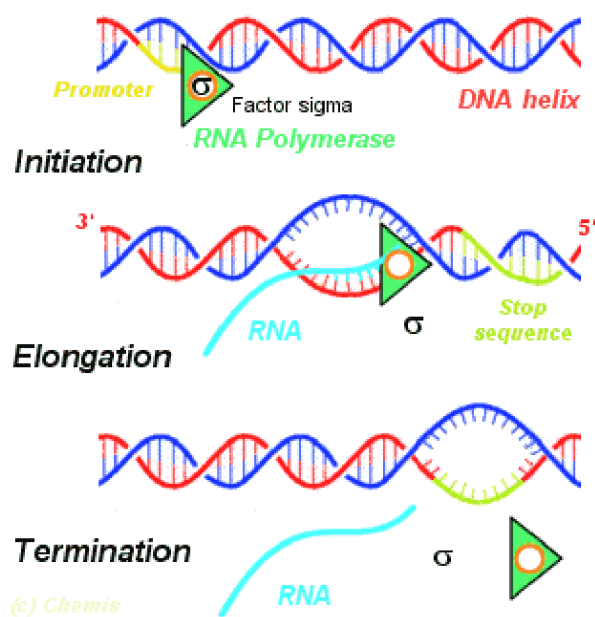


Рис. 9. Цикл транскрипции.

Рассмотрим эти этапы подробно.

1. Поиск промотора и связывание ДНК.

Holo-РНК-пол. связывается своей σ -субъединицей с промоторной последовательностью. Образуется закрытый комплекс, т.к. ДНК в его составе имеет двуспиральную структуру.

Инициация транскрипции пока невозможна, РНК-пол. может диссоциировать из закрытого комплекса.

2. Инициация транскрипции.

Закрытый комплекс становится открытым, когда РНК-пол. плавит участок ДНК в районе старта инициации транскрипции на протяжении одного витка спирали ДНК, это 10 п.о. для В-формы. Сродство РНК-пол. к расплавленной ДНК-матрице становится значительно более прочным, чем в закрытом комплексе. Процесс превращения закрытого комплекса в открытый – термозависимый, при низкой температуре он сильно сдвинут в сторону закрытого, а при повышении температуры – в сторону открытого комплекса. Плавление ДНК при переходе закрытого комплекса в открытый носит кооперативный характер.

Инициация транскрипции.

Требуется присутствие предшественников биосинтеза РНК – нуклеотид трифосфатов. Первый нуклеотид сохраняет свою трифосфатную группу, а далее происходит формирование фосфодиэфирной связи между фосфатом у 5' атома углерода предшественника и 3' ОН-группой последнего нуклеотидного остатка растущей цепи РНК. Это сопровождается высвобождением пирофосфата. Направление биосинтеза нуклеиновой кислоты всегда 5' - 3'. Включение первого и второго нуклеотидов еще не

означает, что началась устойчивая транскрипция. На этом этапе РНК-пол. еще может диссоциировать с матрицы и тогда инициация будет абортивной. Если произошло включение порядка 10 нуклеотидных остатков, то инициация заканчивается, σ -субъединица уходит из полного фермента, может объединиться с другой молекулой РНК-пол. и начать поиск нового промотора.

Далее наступает элонгация, т.е. имела место продуктивная инициация транскрипции, которая может закончиться биосинтезом полноценного РНК-продукта. Эффективность инициации на различных промоторах зависит от их «силы», т.е. от частоты инициации с этих промоторов при насыщающих концентрациях предшественников – нуклеотид трифосфатов, сродства РНК-пол. к промотору и скорости перехода «закрытого» транскрипционного комплекса в «открытый».

3. Элонгация транскрипции.

На стадии элонгации в расплавленном состоянии находятся около 18 п.о. ДНК, 12 из них образуют гибрид матричной ДНК с растущей цепью РНК, ДНК-РНК гетеродуплекс. По мере продвижения РНК-пол. происходит впереди плавление матрицы, позади фермента в ДНК восстанавливается вторичная структура. Одновременно происходит освобождение очередного нуклеотидного остатка вновь синтезированной РНК из гибрида с ДНК. По мере продвижения по ДНК происходит относительное вращения РНК-пол. и ДНК, что может приводит к возникновению дополнительной спирализации в ДНК. Для предотвращения этого РНК-пол. сопровождают ферменты – топоизомеразы, которые предотвращают появление в ДНК избыточной спирализации. Элонгация происходит с непостоянной скоростью. Иногда возникают паузы в продвижении РНК-пол. Особенно это заметно в бесклеточных системах *in vitro* при ограничении концентраций предшественников. Восстановление концентраций нуклеотидтрифосфатов позволяет РНК-пол. продолжить элонгацию вплоть до сайта терминации.

4. Терминация наступает в строго определенных местах матрицы ДНК. Здесь завершается биосинтез РНК и происходит высвобождение продукта транскрипции, т.е. РНК и core-РНК-пол. из транскрипционного комплекса и связи с матрицей ДНК. РНК-пол. далее способна снова ассоциировать с σ -субъединицей в полный фермент и начать новый раунд транскрипции. В основе терминации лежит достаточно сложный механизм, в котором задействованы нуклеотидные последовательности ДНК-матрицы, вновь синтезированной РНК и факторы терминации транскрипции.

В любой точке матрицы решение о добавлении к транскрипту одного основания или высвобождении растущей цепочки РНК представляет собой кинетическую конкуренцию между элонгацией и терминацией. При наступлении продуктивной транскрипции РНК-пол. теряет связь с промотором, σ субъединица отщепляется, РНК-пол. в форме core-фермента

претерпевает существенные конформационные изменения.

Транскрипционный комплекс становится стабильным элонгирующим комплексом, передвигается по матрице ДНК, наращивая РНК в процессивной манере. Синтез РНК в этой фазе транскрипции подвержен жесткой регуляции и кинетически и термодинамически через сиквенс-зависимое взаимодействие core-РНК-пол. с ДНК-матрицей и РНК-транскриптом, а также посредством взаимодействия элонгирующего комплекса с белковыми факторами. Продвижение элонгирующего комплекса вдоль ДНК нерегулярно: и уровень синтеза РНК, и стабильность комплекса существенно колеблются в зависимости от положения на матрице, т.е. зависят от нуклеотидной последовательности. Элонгирующий комплекс имеет в позиции на матрице два выбора – удлинить РНК-транскрипт на один нуклеотид либо, используя свойства ДНК или РНК последовательности (возможно при участии специфических факторов терминации), превратить элонгирующий комплекс в нестабильный терминирующий. Такой комплекс обладает способностью диссоциировать с ДНК-матрицы, в результате чего происходит высвобождение РНК-транскрипта.

Механизм терминации транскрипции осуществляется в сайтах-терминации на ДНК двух типов:

а) нативные терминаторы заставляют комплекс включить вместо элонгирующей моды транскрипции терминирующую посредством механизма, зависящего только от **нуклеотидной последовательности**, без дополнительных факторов;

б) **Rho-зависимые терминаторы несут сигналы в ДНК, а возможно и в РНК**, которые заставляют элонгирующий комплекс останавливаться в паузе в этих сайтах. Однако реализация РНК-транскрипта зависит от взаимодействия стоящего в паузе комплекса с **фактором терминации транскрипции Rho**.

Далее мы рассмотрим оба эти механизма.

Терминация без дополнительных факторов. РНК-пол. способна терминировать транскрипцию без дополнительных факторов на последовательности ДНК, которая включает GC-богатый участок с внутренней симметрией, а следом за ним расположен поли-А участок в значащей цепи ДНК, который реализуется в поли-U последовательность в РНК. Терминация наступает на поли-А или сразу за ней. В процессе транскрипции во вновь синтезированной РНК образуется GC-богатая шпилька, которая заставляет РНК-пол. Приостанавливаться в паузе. Эффективность такой терминации зависит от совершенства GC-богатой шпильки в РНК. Мутации, приводящие к нарушению спаривания нуклеотидных остатков в GC-шпильке, снижают эффективность терминации. Усиление прочности AU-гибрида ДНК-РНК, если размер поли-А в матрице меняется, также ослабляет терминацию. Минимальный размер поли-А – четыре остатка. Наступление терминации

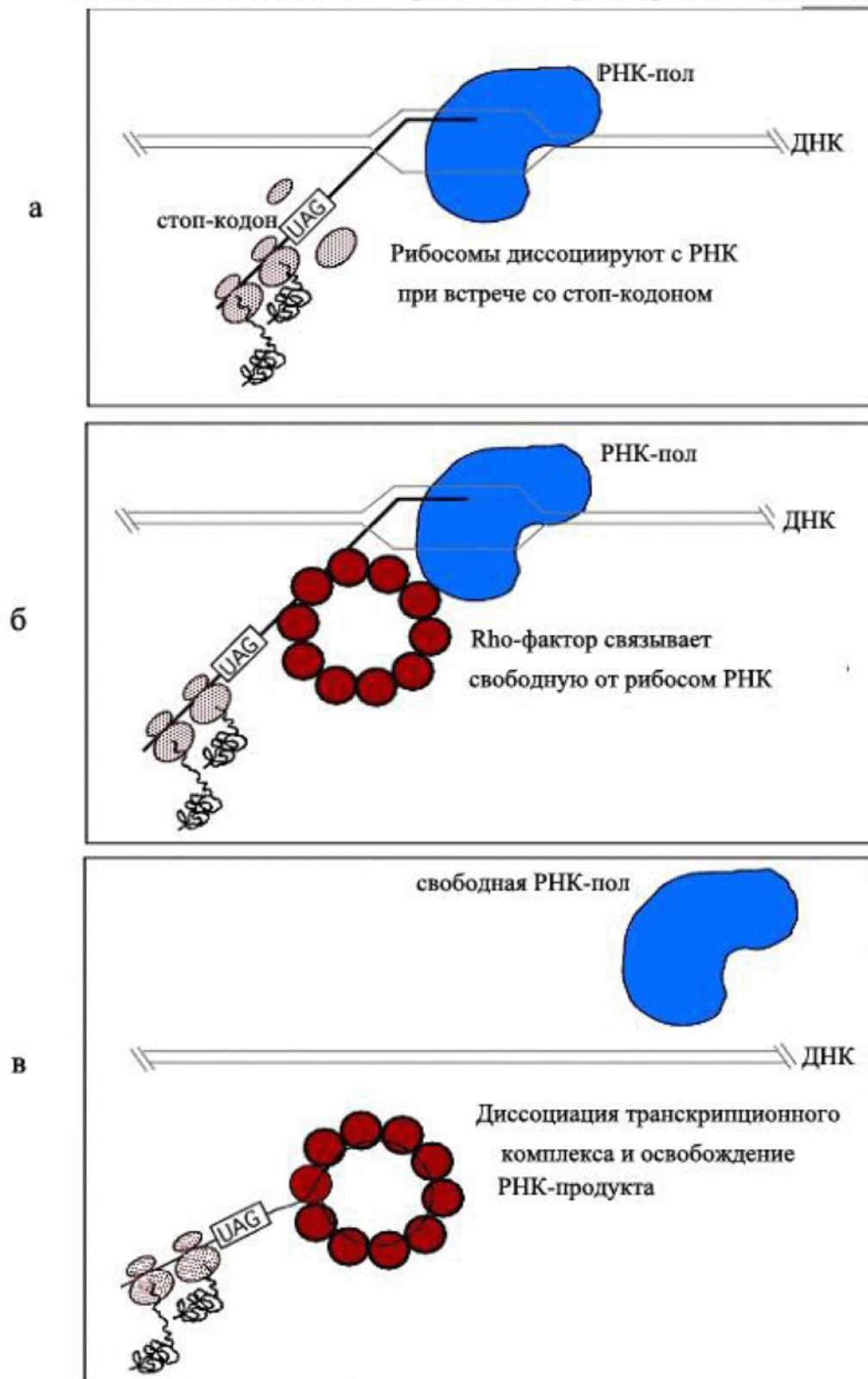
является балансом кинетики плавления AU-гибрида ДНК-РНК и прочности GC-богатой шпильки в РНК, т.к. AU-пары стабилизированы двумя водородными связями, GC-пары – тремя, то плавление AU-гибрида обеспечивает высвобождение РНК из транскрипционного комплекса, затем комплекс покидает РНК-пол.

Rho-зависимая терминация транскрипции. Терминация без участия факторов терминации не полностью моделирует процесс, имеющий место в клетке. Известно несколько факторов, участвующих в терминации. Наиболее изучен механизм, опосредованный белковым фактором Rho. Rho - белок очень консервативен и важен для жизнедеятельности бактерий. Он включает 419 аминокислотных остатков, молекулярная масса составляет 45 кДа, N-терминальный домен (1-151 аминокислотный остаток) содержит консервативный мотив связывания РНК. В С-терминальной части Rho локализован домен, который обладает аденизинтрифосфатазной активностью, связывает и гидролизует АТР. Эта ферментативная активность белка Rho проявляется только в присутствии однонитевой РНК. Белку Rho присуща еще одна ферментативная активность – он способен расплетать гибрид РНК-ДНК, т.е. является РНК-ДНК – геликазой. Активен Rho-фактор в виде олигомера (рис.10,б). Rho-фактор связывается с растущей РНК до того, как РНК-пол. достигает терминатора, и транслоцируется по РНК в направлении 5' -3'. Необходимым условием Rho-зависимой терминации является торможение РНК-пол. в паузе. Существует две модели, которые объясняют механизм Rho-зависимой терминации:

I модель) Rho фактор движется по синтезируемой РНК за счет гидролиза АТР. Когда РНК-пол. останавливается в паузе (рис. 10,б), Rho-фактор догоняет ее и вытесняет РНК из транскрипционного комплекса (рис. 10,в).

II модель) Rho-фактор движется за РНК-пол. без отставания. При нормальной скорости элонгации освобождающийся в результате образования фосфодиэфирной связи пирофосфат угнетает аденозинтрифосфатазную активность Rho. Когда РНК-пол. останавливается в паузе прекращается образование пирофосфата. Это приводит к активации аденозинтрифосфатазной активности Rho-фактора, что способствует диссоциации из комплекса РНК. Связыванию Rho-фактора с РНК мешают рибосомы, т.к. синтезирующаяся РНК немедленно подвергается трансляции (рис. 10,а). Это делает ее недоступной Rho-фактору. Особенно это существенно для Rho-зависмых терминаторов, локализованных внутри генов. Наличие таких терминаторов имеет следующий смысл: если синтез белка по какой-либо причине подавлен, то внутригенный терминатор доступен Rho-фактору, и последний сигнализирует РНК-пол. о бессмысленности транскрипции этой информации, т.к. она не транслируется.

Рис.10 Rho-зависимая терминация транскрипции (модель I)



2.4. Регуляция активности промоторов у прокариот.

2.4.1. Негативная регуляция экспрессии лактозного оперона

Активность многих промоторов регулируется с помощью особых регуляторных белков, которые могут связываться с определенными нуклеотидными последовательностями ДНК и либо мешают, либо способствуют РНК-пол. в транскрипции того или иного оперона. Таким образом можно говорить о негативной и позитивной регуляции активности транскрипции. Белки, осуществляющие негативную регуляцию, называются **репрессорами**, а позитивную – **активаторами**. Некоторые белки могут осуществлять и ту, и другую функцию, т.е. выступать в роли репрессоров и активаторов транскрипции. Участок взаимодействия репрессора с ДНК называется **оператор**. Способность репрессора связывать оператор может зависеть от низкомолекулярных лигандов – **эффекторов**. Эффекторы, снижающие сродство репрессора к оператору, называются **индукторами**. В отсутствие индуктора репрессор связывает оператор и препятствует РНК-пол. в инициации транскрипции с промотора, промотор репрессирован. Если репрессор связан с индуктором, то он теряет способность связываться с оператором, что приводит к активации промотора и транскрипции. Существуют репрессоры, который способны связываться с оператором только в комплексе с эффектором. Эффектор в таком комплексе называется **корепрессором**.

E. Coli всем источникам углерода предпочитает глюкозу. Ферменты, обеспечивающие катаболизм глюкозы экспрессируются конститутивно, т.е. постоянно. Отсутствие в среде глюкозы вынуждает микроорганизмы использовать в качестве источников углерода другие сахара, в том числе и лактозу.

Лактоза – это дисахарид β -галактозы и глюкозы. Лактозный оперон включает три гена, кодирующих ферменты катаболизма лактозы (рис. 11).

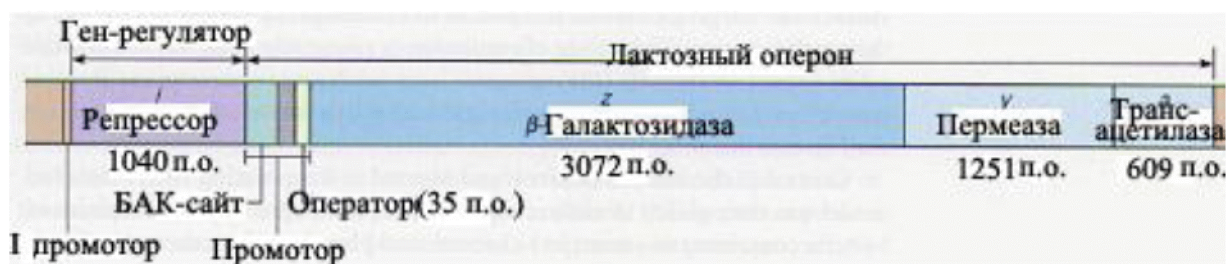


Рис. 11. Структура лактозного оперона.

LacZ – кодирует фермент β -галактозидазу, расщепляющий лактозу до β -галактозы и глюкозы.

LacY- кодирует пермеазу- фермент, участвующий в транспорте β -галактозы в клетку.

LacA- кодирует фермент β -галактозидаза трансацилазу, роль которого до конца неясна.

Все три гена представляют собой оперон, который транскрибируется в полицистронную матрицу с промотора, расположенного upstream от гена LacZ. В отсутствие индуктора этот оперон не транскрибируется. Все, кодируемые опероном ферменты, участвуют в катаболизме лактозы. Регуляция лактозного оперона негативная, ген LacI, кодирующий репрессор, расположен рядом с лактозным опероном и экспрессируется конститутивно. В отсутствие индуктора репрессор постоянно подавляет активность промотора лактозного оперона, связываясь с оператором. Индуктором лактозного оперона служит лактоза. При замене в среде глюкозы на лактозу, последняя связывает репрессор, репрессор теряет способность связываться с оператором, который расположен между промотором и сайтом инициации транскрипции. Это первые 26 п.о. ДНК гена LacZ. В отсутствие блока на промоторе РНК-пол. получает возможность транскрибировать лактозный оперон, а клетка – утилизировать лактозу. Репрессор лактозного оперона – это белок, состоящий из 360 аминокислотных остатков. Активен в форме тетрамера. Имеет два сайта связывания: один для индуктора, второй для оператора. Связывание индуктора вызывает аллостерические изменения в сайте связывания с оператором, что приводит к диссоциации из комплекса с оператором, результатом чего является активация транскрипции лактозного оперона и синтез ферментов, обеспечивающих катаболизм лактозы.

2.4.2. Позитивная регуляция экспрессии лактозного оперона

Лактозный оперон является объектом и позитивной регуляции. При понижении в среде концентрации глюкозы у прокариот наблюдается синтез ц-АМФ. Наличие ц-АМФ служит показателем голодания клетки не только по глюкозе, но и по аминокислотам. Ц-АМФ связывается с белком –активатором катаболизма углеводов, который называется БАК. Комплекс ц-АМФ-БАК имеет высокое сродство к сайтам позитивной регуляции экспрессии оперонов (рис. 11), которые участвуют в катаболизме сахаров, кроме глюкозы, катаболизм, которой не требует дополнительных ферментов. После взаимодействия ц-АМФ-БАК с сайтами на ДНК, РНК-пол. получает возможность связаться с относительно слабыми промоторами лактозного, галактозного или мальтозного оперонов и транскрибировать их. Система регуляции с помощью ц-АМФ-БАК позволяет клетке включать опероны менее легко усвояемых, по сравнению с глюкозой, сахаров. В присутствии достаточной концентрации глюкозы включение этих

оперонов не происходит. БАК-это белок, активен в виде димера, т.е. состоит из двух одинаковых полипептидов. Каждая субъединица образует два домена: С-терминальный домен отвечает за связывание ДНК, N-терминальный – ц-АМФ и межсубъединичные контакты в димере. Взаимодействие идет по большой бороздке ДНК в В-форме, в сайте присоединения происходит изгиб ДНК. Сайты связывания ц-АМФ-БАК по разному локализованы по отношению к промотору в разных оперонах. Они могут перекрывать опероны, могут примыкать к ним. Но связываясь с сайтом, комплекс цАМФ-БАК делает доступными для РНК-пол. опероны, ранее недоступные.

2.5. Аттенуация - регуляция активности триптофанового оперона.

Триптофановый оперон включает гены пяти белков, которые после трансляции дают четыре фермента, необходимых для биосинтеза триптофана из хоризмовой кислоты: антринилат синтаза (компонент I), антринилат синтаза (компонент II), антринилат изомеразы и триптофан синтаза. Эти белки образуются согласованно при трансляции полицистронной м-РНК, транскрибируемой с триптофанового оперона. Уровень экспрессии триптофанового оперона может отличаться на несколько порядков и зависит от содержания триптофана внутри клетки. В регуляции экспрессии триптофанового оперона задействованы два почти независимых механизма, действия которых позволяют клетке очень существенно менять уровень биосинтеза триптофана.

Один из механизмов – это регуляция с помощью белка-репрессора, активность которого зависит от присутствия триптофана внутри клетки. Только в комплексе с триптофаном белок-репрессор способен связывать оператор и препятствовать взаимодействию РНК-пол. с промотором, т.к. последовательности оператора и промотора в триптофановом опероне частично перекрываются. Транскрипция триптофанового оперона подавлена, и ферменты, участвующие в синтезе триптофана не образуются. Такая ситуация имеет место, когда клетка располагает достаточным количеством триптофана. Но в отсутствие триптофана белок-репрессор не связан с этой аминокислотой в комплекс и не способен взаимодействовать с оператором. Это позволяет РНК-пол. инициировать транскрипцию на промоторе триптофанового оперона и синтезировать м-РНК, которая после трансляции реализуется в белки, необходимые для синтеза триптофана.

Исследователями было замечено, что репрессия триптофанового оперона никогда не бывает полной, т.е. существует другой механизм, который также участвует в регуляции экспрессии триптофанового оперона. Наблюдали синтез коротких транскриптов с триптофанового оперона, которые, однако, не могли служить полицистронной матрицей. Эти короткие транскрипты получили название «лидерных», а последовательность ДНК в триптофановом опероне, с которой они транскрибировались, – «лидерной» последовательности. Лидерная

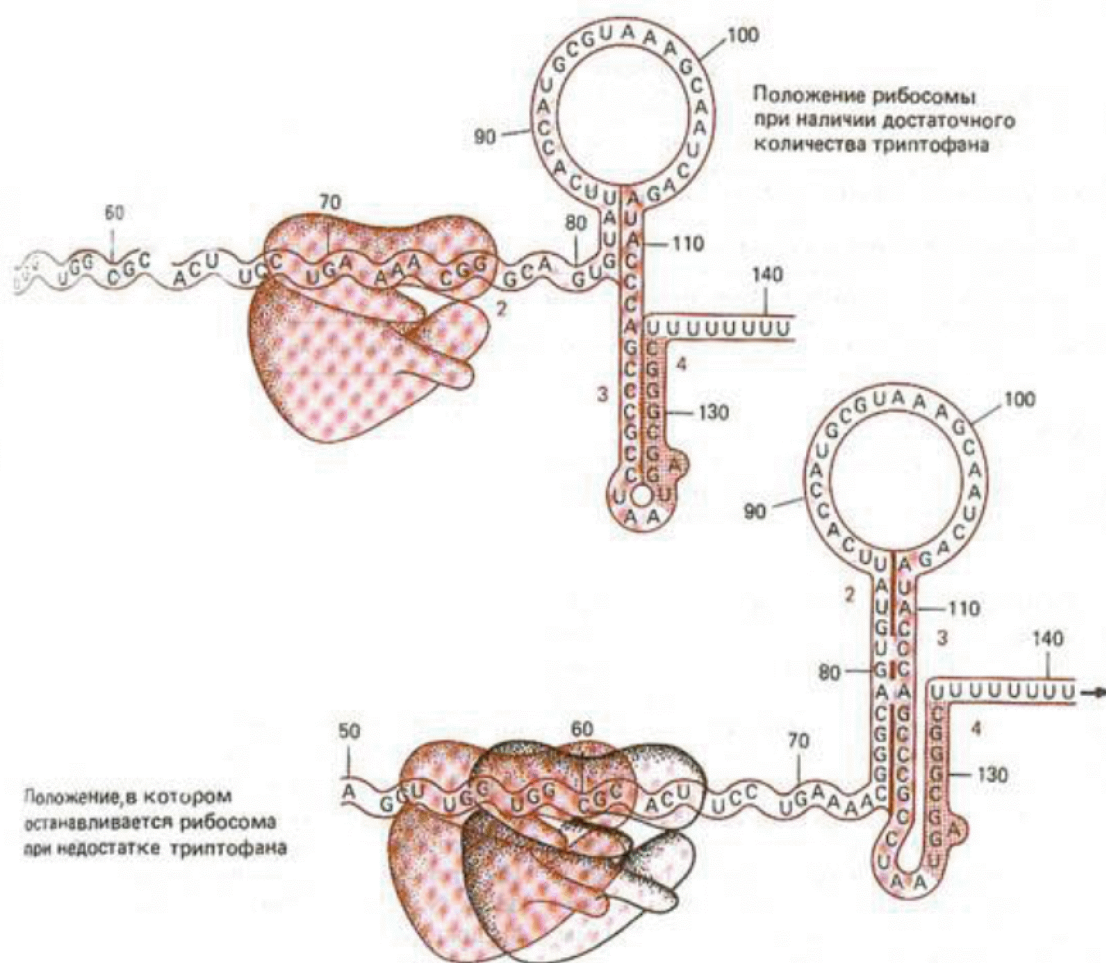
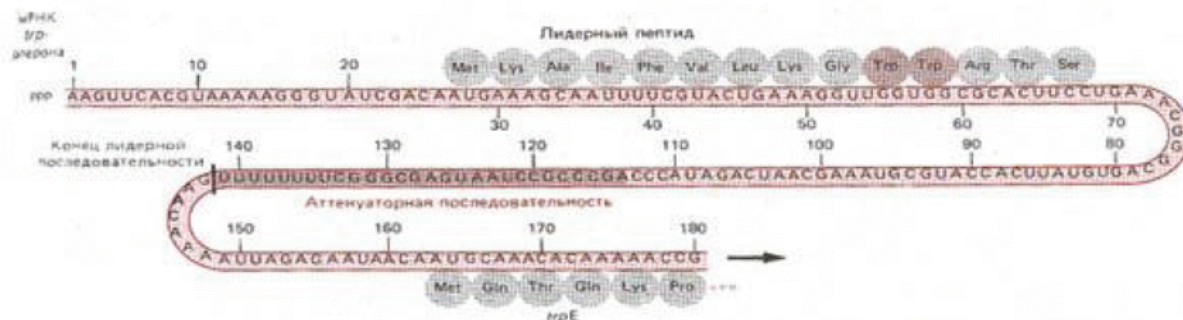


Рис. 12. Структура лидерной последовательности и аттенуация (UGG – триптофановый кодон).

последовательность включает аттенуаторную (ослабитель) структуру, где происходит выбор между элонгацией растущей цепи РНК и ее досрочной

терминацией. В лидерной последовательности были обнаружены несколько инвертных повторов, которые при транскрипции могут образовывать шпильчатые структуры.

Формирование этих структур зависит от концентрации аминоацил-тРНК, заряженных триптофаном.

В составе м-РНК, которая немедленно одевается рибосомами и транслируется, присутствует AUG-кодон или иницирующий кодон, последовательность Шайна-Долгарно (SD-последовательность), ответственная за связывание рибосом, и лидерная последовательность размером около 140 нуклеотидных остатков, имеющая инвертные повторы. РНК, транскрибированная с лидерной последовательности, может образовать три шпильчатые структуры: 1-2, 2-3 и 3-4. Одновременно все три шпильки образоваться не могут. Образование шпильки 1-2, детерминирует образование терминирующей шпильки 3-4. Если шпилька 1-2 образоваться не может, образуется антитерминирующая шпилька 2-3, а образование шпильки 3-4 при этом также невозможно (рис.12)

Образование альтернативных шпилек зависит от того, как транслируется лидерная последовательность м-РНК. При трансляции лидерной последовательности образуется пептид, в составе которого находятся три остатка триптофана, два из которых расположены тандемно, кодоны – UGG - этих остатков триптофана расположены на последовательности 1 шпильки 1-2. Если трансляция пептида происходит без остановок, т.е. в клетке достаточно заряженных триптофаном аминоацил-тРНК, то вторичная структура м-РНК формируется по мере ее транскрипции. Образуется шпилька 1-2, шпилька 2-3 образоваться не может, что делает возможным образование шпильки 3-4, и наступает терминация.

Если в клетке недостаток триптофана, т.е. недостаточно заряженных триптофаном аминоацил-тРНК, рибосома останавливается на последовательности 1, т.к. именно там расположены кодоны для двух остатков триптофана. Арест этой последовательности разрешает образование шпильки 2-3, которая является антитерминаторной, что ведет к транскрипции полноразмерной м-РНК триптофанового оперона и биосинтезу ферментов, необходимых для синтеза триптофана.

Такая регуляция присуща практически всем оперонам, ответственным за синтез аминокислот. Лидерные последовательности этих оперонов кодируют специфические пептиды, включающие по несколько остатков той аминокислоты, синтез которой обеспечивается этим опероном. В лидерном пептиде оперона фенил-аланина содержится семь остатков фенил-аланина, в которые вклинились остаток аланина и остаток треонина. В лидерном пептиде оперона гистидина – семь остатков гистидина. При отсутствии в клетке достаточного количества соответствующей аминокислоты рибосома задерживается на ее кодонах и обеспечивает образование антитерминальной шпильки. Терминация аттенуируется, т.е. ослабляется, а транскрипция

структурной области оперона активируется. При достаточной концентрации соответствующей аминокислоты рибосома движется по последовательности 1 без задержек, что приводит к образованию шпильки 1-2, а затем 3-4 (рис.12). Терминация наступает по механизму, независимому от Rho-фактора, на лидерной последовательности, до структурной области оперона. Суммарный эффект репрессии и аттенуации заключается в том, что оба механизма содействуют оптимальной экспрессии триптофанового оперона. Если в клетке избыток триптофана, то механизм репрессии блокирует синтез м-РНК. Это приводит к постепенному снижению концентрации триптофана внутри клетки и количества комплексов триптофан-репрессор. Такая ситуация ведет к возобновлению транскрипции триптофанового оперона. При этой концентрации триптофана его вполне достаточно, чтобы рибосомы не застревали на 1-2 шпильке лидерной последовательности. Терминация лидерной последовательности имеет место. Но общий уровень экспрессии триптофанового оперона достаточно низок. Концентрация триптофана внутри клетки при такой экспрессии может и далее понижаться, что приведет к полному снятию репрессии, т.к. белок репрессор не сможет вступать в комплекс с триптофаном, ввиду наличия последнего в достаточной концентрации. Если концентрация аминоацил-тРНК, заряженных триптофаном, снижается до уровня, когда трансляция м-РНК уже невозможна, то аттенуируется терминация лидерной последовательности, и запускается транскрипция м-РНК. Это позволяет клетке запустить синтез ферментов с большой скоростью. Максимум экспрессии триптофанового оперона достигается при отсутствии репрессии комплексом репрессор-триптофан и максимальной аттенуации терминации внутри оперона. Наоборот, экспрессия минимальна при практически полной репрессии комплексом репрессор-триптофан и в отсутствии аттенуации терминации лидерной последовательности.

2.6. σ -субъединицы РНК- полимеразы *E. coli*.

σ -субъединицы РНК-пол. можно рассматривать как регуляторные белки, которые способны включать определенные группы генов. σ -субъединица способна связывать промотор только в составе РНК-пол. Особый интерес представляет изменение концентрации определенных белков как активация их генов при тепловом шоке, т.е. ответ клетки на кратковременное повышение температуры. Промоторы генов теплового шока имеют несколько другую нуклеотидную последовательность, поэтому для транскрипции этих генов РНК-пол. использует другую σ -субъединицу, а именно σ^{32} , т.е. имеющую молекулярную массу (м.м.) 32 кДа. σ^{32} имеет короткое время жизни в клетке и быстро подвергается протеолизу, но при тепловом шоке количество этой субъединицы резко возрастает, что вызывает усиление экспрессии белков теплового шока, которые обеспечивают защиту клетки в

ответ на повышение температуры.

σ^{60} участвует в транскрипции ряда генов, ответственных за метаболизм азота. Промоторы этих генов отличаются по локализации канонической последовательности от промоторов σ^{70} .

Всего РНК-пол. *E.coli* располагает семью σ –субъединицами. Количество генов в геноме *E.coli* составляет около 4000, количество молекул РНК-пол. не превышает 2000, таким образом важен выбор необходимых генов для транскрипции и обеспечение интенсивности экспрессии этих генов, особенно при изменении условий внешней среды.

σ^{70} – большинство генов логарифмической фазы роста,

σ^{60} - гены метаболизма азота,

σ^{38} или σ^s – субъединица для стационарной фазы. При переходе клеток от интенсивного деления к стационарной фазе происходит адаптация клеток и замещение σ^{70} на σ^s . Такой переход может происходить из-за недостатка питания, при большой плотности клеток в среде. Клетки способны оповещать друг друга об изменении условий и необходимости адаптации, и происходит переключение экспрессии генов. Если в экспоненциальной фазе роста транскрибируется около 1000 генов, то в стационарной фазе происходит репрессия большинства из них, начинается экспрессия других генов, которые требуют другой σ - σ^s . Синтез σ^s - сигнал клетки к изменению метаболизма, снижению его. Но и в этих условиях какое-то количество генов транскрибируется с участием σ^{70} . Синтез σ^s регулируется на нескольких уровнях: транскрипции, трансляции и обмена белков. Деградация σ^s в стационарной фазе резко снижается за счет угнетения активности протеазы, которая специфически деградирует σ^s в экспоненциальной фазе.

У *E.coli* известны анти- σ факторы к σ^{70} , σ^F и σ^E . Эти факторы способны связывать родственную им σ - субъединицу и ингибировать ее активность. Фактор анти σ^{70} практически не идентифицируется в логарифмической фазе роста, но при вступлении в стационарную фазу этот фактор начинает экспрессироваться и связывать σ^{70} , что, безусловно, помогает *E.coli* адаптироваться к изменившимся условиям;

σ^{32} – гены теплового шока,

σ^{28} - гены стадии флагеллята,

σ^{24} – гены экстремального теплового стресса,

σ^{19} – гены, ответственные за транспорт железа.

2.7. Регуляция транскрипции генов рибосомных РНК прокариот.

Гены рибосомных РНК организованы в опероны 16S-23S-5S. Таких оперонов 7. Перед каждым из оперонов имеется два промотора P1-сильный, на расстоянии 100 п.о. от него P2-слабый. Рибосомные РНК – это структурные нетранслируемые РНК, которые участвуют в организации рибосом – фабрик синтеза белков. Синтез рибосомных РНК и рибосомных белков строго

координирован, поэтому в клетке нет существенных количеств ни свободных рРНК, ни свободных рибосомных белков. Механизмы этой координации необычайно сложны, поэтому мы рассмотрим лишь один из них – это регуляция транскрипции рРНК с участием гуанозин тетрафосфата. При аминокислотном голодании происходит синтез этого полифосфатного соединения, которое выполняет роль эффектора. Накопление его в клетке ведет к замедлению синтеза рРНК и м-РНК рибосомных белков. Механизм действия гуанозин тетрафосфата вероятно через РНК-пол., т.к. мутации по ее β – субъединице приводят к потере чувствительности рибосомного синтеза к гуанозин тетрафосфату. Подавлению с помощью гуанозин тетрафосфата промоторной активности рибосомного оперона заметно только по промотору P1, промотор P2 не подавляется. Поэтому подавление рибосомного синтеза никогда не бывает полным, тотальным. Это имеет биологический смысл, т.к. полное подавление рибосомного синтеза ведет к гибели клетки.

Глава 3. Механизмы транскрипции эукариот.

3.1. ДНК-зависимые РНК-полимеразы эукариот. У эукариотических организмов основная генетическая информация сосредоточена в ядре, здесь и происходит первый этап ее реализации.

Транскрипцию генетической информации в ядрах эукариот осуществляют три ДНК-зависимые РНК-пол. (номенклатурное название полинуклеотидил трансферазы): РНК-пол. I, РНК-пол. II и РНК-пол. III.

В зависимости от того, какая из РНК-пол. участвует в транскрипции, гены подразделяются на классы. РНК-пол I транскрибирует гены класса I, куда относят гены 28S, 18S и 5,8S рибосомных РНК (рРНК). Все три гена рРНК считываются в виде одного предшественника 45S рРНК, после созревания которого образуются 28S, 18S и 5,8S рРНК.

РНК-пол. II транскрибирует структурные гены - гены информационных или матричных РНК, которые далее транслируются, т.е. перекодируются в белки, а также гены малых ядерных (мя) U1, U2, U3, U4, U5, U7, U8, которые являются стабильными и не транслируются.

РНК-пол. III транскрибирует все гены транспортных РНК (тРНК), 5S рРНК, U6 мя РНК, некоторых вирусных РНК. Все РНК, относящиеся к классу III являются стабильными, нетранслируемыми РНК.

В ядре РНК-пол. I локализована в ядрышке, где и происходит рибосомный синтез. РНК-пол. II и РНК-пол. III локализованы в нуклеоплазме. Для разделения индивидуальных форм РНК-пол. применяют ионнообменную хроматографию на ДЭАЭ- Сефадексе А25. В градиенте концентраций таких солей как хлористый калий или сернокислый аммоний происходит разделение РНК-пол. на отдельные формы: РНК-пол. I элюируется с колонки ДЭАЭ-

Сефадекс А25 при низкой ионной силе, РНК-пол. II при более высокой, а при дальнейшем повышении ионной силы происходит элюция РНК-пол. III. РНК-пол. различают также по их чувствительности к специфическому токсину - α -аманитину, гексапептиду, выделенному из бледной поганки *Amanita phalloides*. РНК-пол. I нечувствительна к этому токсину даже в достаточно высоких концентрациях, до 100 мкг/мл. Активность РНК-пол. II подавляется на 50% уже при концентрации α -аманитина 0,1 мкг/мл. РНК-пол. III чувствительна к действию токсина в гораздо меньшей степени, чем РНК-пол. II. В процессинге и трансляции информационных РНК принимают участие большое число разнообразных РНК молекул. Информационные РНК могут многократно участвовать в трансляции и таким образом давать множество генных продуктов. Транскрипт гена стабильной РНК дает лишь одну копию конечного РНК-продукта. Поэтому спрос на стабильные РНК клетка удовлетворяет за счет многокопийности этих генов в геноме.

3.2. Транскрипция генов класса I.

3.2.1. Структура рибосомных генов.

Рибосомные РНК - это стабильные, нетранслируемые РНК, функциональная роль которых заключается в формировании рибосом - частиц, где происходит синтез белка.

Гены рибосомных РНК 18S, 5,8S и 28S сгруппированы в одну транскрипционную единицу и распределены тандемно в кластерах, где может быть сосредоточено от 100 до 150 копий этой единицы, из которых почти 50% непрерывно транскрибируются. Сосредоточены гены рибосомных РНК в специфическом компартменте ядрышка, - ядрышковом организаторе, там же находится РНК-пол. I. и происходит транскрипция предшественников рРНК - 45S рРНК, которая в результате процессинга превращается в 18S, 5,8S и 28S рРНК (рис. 13). На одном гене рРНК может быть сосредоточено до 100 молекул РНК-пол. I, что соответствует 1 молекуле фермента на каждые 70 п.н. ДНК.

Такая сверхплотная упаковка РНК-пол. I на генах рРНК позволяет продуцировать около 40 рибосом в минуту. Столь интенсивная транскрипция говорит о большой важности рибосомного синтеза в жизнедеятельности клетки. Среди трех ферментов транскрипции эукариот, РНК-пол. I синтезирует наибольшее количество РНК. В логарифмической фазе роста дрожжей на долю рибосомного синтеза приходится 60% тотального синтеза РНК клетки.

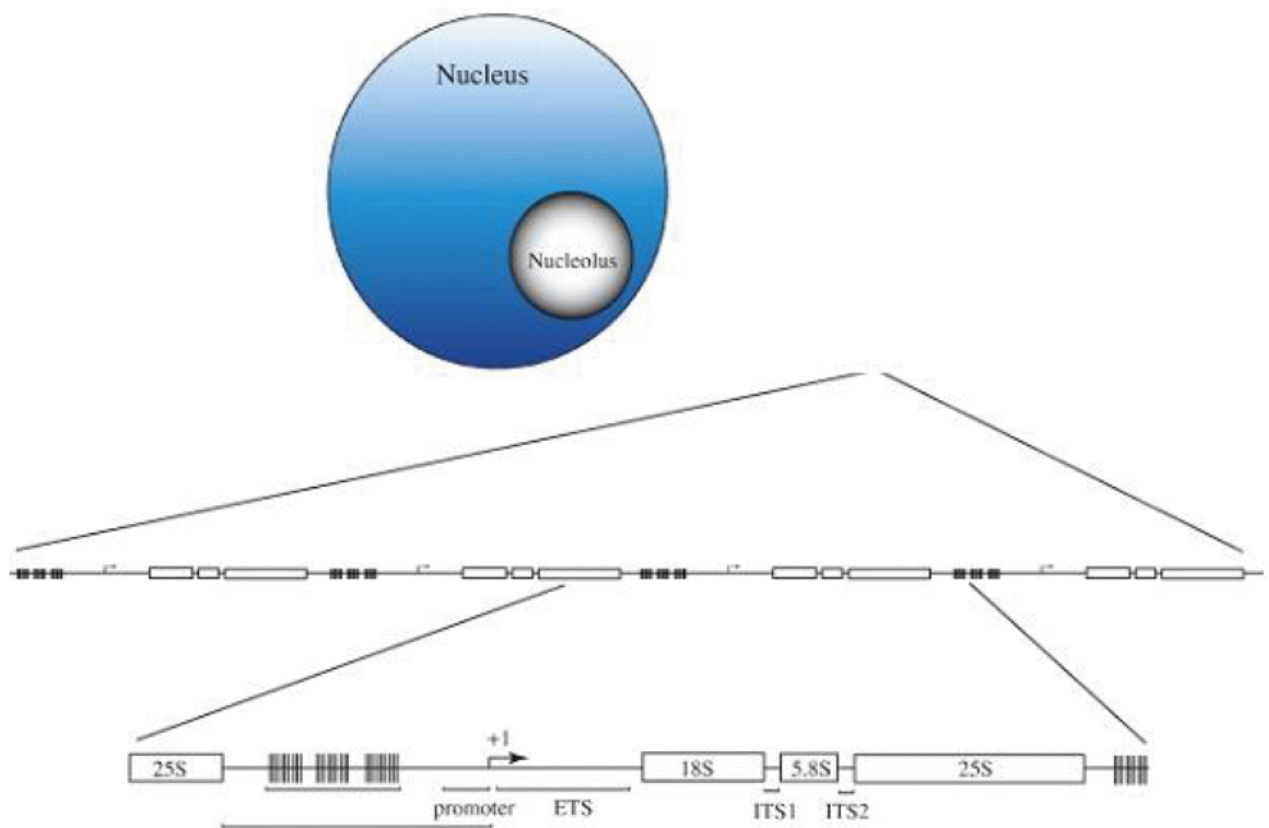


Рис. 13. Структура генов р-РНК.

Полная транскрипционная единица 18S, 5,8S и 28S рРНК содержит два внутренних некодирующих спейсера (внутренние транскрибируемые спейсеры –ITS1 и ITS2), которые разделяют три кодирующие области 18S, 5,8S и 28S рРНК. Перед 18S рРНК и после 28S рРНК находятся некодирующие области, называемые внешними транскрибируемыми спейсерами - ETS.

У эукариот рРНК весьма консервативны по размерам, поэтому межвидовые колебания размеров транскрипционной единицы связаны с различиями в длине спейсерных участков. Весьма существенными для транскрипции РНК-пол. I являются последовательности ДНК, локализованные по обе стороны от 5'-конца ETS. В отличие от кодирующих областей рРНК генов, эти последовательности имеют выраженные видовые отличия, что отчасти объясняет видоспецифичность транскрипции РНК-пол. I, которой для связывания с этими последовательностями требуются видоспецифичные факторы транскрипции.

3.2.2. Промоторы генов класса I

Промотор у эукариот может быть определен как набор последовательностей, достаточный для обеспечения формирования преиницирующего комплекса и корректного определения точки старта инициации транскрипции.

Нуклеотидная последовательность, которая контролирует транскрипцию рибосомных генов, сосредоточена в области от +18 до -140 и, следовательно, включает точку старта инициации транскрипции. Подробный мутационный анализ позволил установить, что минимальным или коровым промотором можно считать последовательность от -12 до -40. Но минимальный промотор способен обеспечить формирование транскрипционного комплекса только в присутствии лежащего выше по течению контрольного элемента UCE (upstream control element), локализованного от -40 до -140. Взаимное расположение корового и UCE элементов очень существенно. Изменение их пространственной ориентации приводит к потере промоторной функции, это *cis*-действующие элементы. Последовательность от -1 до +18 называется стартовой и также весьма существенна в транскрипции генов рРНК. Все три последовательности промотора генов класса I высоко консервативны и GC-богаты. Коровая последовательность (-12 - -40) узнается только видоспецифичными транскрипционными факторами.

3.2.3. ДНК- зависимая РНК-полимераза I

РНК-пол. I - это мультисубъединичный белок, молекулярная масса которого может достигать 650 кДа. В составе фермента, выделенного из дрожжей, идентифицировано 13 субъединиц. Самая крупная субъединица с молекулярной массой 190 кДа имеет Zn-связывающий домен, который очень важен для формирования самой молекулы РНК-пол I. В составе второй по величине субъединицы (135 кДа) также присутствует Zn-связывающий домен, консервативный среди всех исследованных РНК-пол I. Как показали электронно-микроскопические исследования РНК-пол I, С-концевые домены двух самых крупных субъединиц связаны между собой и образуют бороздку размером 3-4 нм, в которую может быть уложена двойная спираль ДНК размером 35-40 п.н. Обе субъединицы могут участвовать в образовании активного центра фермента. Фермент нечувствителен к α -аманитину и способен транскрибировать *in vitro* нативную ДНК. Субъединицы РНК-пол. I могут фосфорилироваться. Однако эта модификация может ингибировать активность фермента, по другим данным - совершенно необходима для активного состояния РНК-пол. I. Протеинкиназа, фосфорилирующая РНК-пол. I, выделена и является аутоантигеном.

3.2.4. Транскрипционные факторы генов класса I

Формирование транскрибирующего комплекса на промоторах генов рРНК начинается со связывания промоторных элементов специфическими факторами или факторами транскрипции. Эти факторы выделены, очищены до

гомогенного состояния и охарактеризованы.

TIF-IA

TIF-IA из клеток млекопитающих представляет собой полипептид с молекулярной массой 75 кДа. Этот фактор принимает участие только в инициации транскрипции. Отличается высоким сродством к РНК-пол. I, способен связываться с фактором TIF-IB, но только в комплексе с РНК-пол. I. Преиницирующий комплекс может быть сформирован и без участия TIF-IA, но для синтеза первой фосфодиэфирной связи его присутствие совершенно необходимо. После инициации транскрипции TIF-IA покидает транскрибирующий комплекс и в элонгации не участвует. Клетки дрожжей, нокаутированные по гену TIF-IA, не выживают. Эмбрионы мышей с инактивированным геном TIF-IA погибают не позднее 9 дня развития. При этом в клетках эмбрионов наблюдается разрушение ядрышек.

TIF-IB

Это ключевой фактор инициации транскрипции генов класса I, который узнает коровый элемент промотора. В его составе идентифицирован ТАТА-бокс связывающий белок (TBP) и три ассоциированных фактора (TAF). TIF-IB, полученный из клеток человека, носит название SL1. При выраженном консерватизме TBP этот фактор отличается видоспецифичностью, т.е. даже в опытах *in vitro* TIF-IB дрожжей не способен заменить SL1, если система транскрипции *in vitro* содержит матрицу и РНК-пол. I, выделенные из клеток человека. Только транскрипция генов класса I отличается видоспецифичностью. Это связано, скорее всего, с ассоциированными с TBP факторами. Это три белка с м. м. 110, 63 и 48 кДа. Функция TBP, а точнее его С-концевого домена, которая заключается в связывании ТАТА-последовательности, при транскрипции генов рРНК скорее всего не используется, т.к. промоторные последовательности этих генов GC-богаты. Конформация фактора SL1 такова, что в его составе антитела против консервативного С-концевого домена TBP, с ним не взаимодействуют.

UBF (upstream binding factor)

Транскрипционный фактор, связывающий UCE-последовательность. Его относят к факторам, активирующим транскрипцию генов рРНК, т.к. он связывает контрольный элемент, не являющийся минимальным промотором. Однако роль этого фактора в формировании преиницирующего комплекса очень существенна.

UBF млекопитающих имеет две изоформы с м. м. 97 и 94 кДа, которые являются продуктами альтернативного сплайсинга. Характерной особенностью UBF является наличие в его молекуле HMG-боксов, аминокислотных последовательностей, характерных для группы белков хроматина,

отличающейся высокой электрофоретической подвижностью - High mobility group. Это последовательности длиной в 70-80 аминокислотных остатков, повторенные 5-6 раз. Они играют важную роль в связывании не только последовательности UCE, но и энхансеров. Кроме того, UBF способен взаимодействовать непосредственно с РНК-пол.І. С-концевой домен UBF кислый по своей природе, обогащен остатками серина, аспарагина и глицина и обеспечивает взаимодействие с TIF-IB. Это взаимодействие является принципиальной детерминантой для видоспецифичности транскрипции генов рРНК.

Активирующий эффект UBF на формирование преинициаторного комплекса связан с взаимодействием с TIF-IB, РНК-пол.І, а также с фактором негативной регуляции транскрипции рибосомных генов. Такой фактор известен - это Ku аутоантиген, который участвует в подавлении синтеза рРНК при аутоиммунном заболевании.

TIF-IC

Фактор инициации и элонгации транскрипции генов рРНК. Отличается настолько высоким родством к РНК-пол.І, что его рассматривали как субъединицы фермента. Но он был выделен и охарактеризован группой исследователей под руководством Томсона. Это белок, состоящий из трех полипептидов с молекулярной массой 55, 50 и 42 кДа. В состав преиницирующего комплекса не способен вступать самостоятельно, а только в ассоциированном с РНК-пол.І состоянии. В отсутствие TIF-IC РНК-пол.І не способна инициировать транскрипцию. При формировании преиницирующего комплекса TIF-IC вызывает диссоциацию РНК-пол.І из связи с неспецифичной промоторной последовательностью. После инициации транскрипции TIF-IC обнаруживается в элонгирующем комплексе. Известно, что находящаяся в паузе элонгации РНК-пол.І, нуждается в помощи TIF-IC для ее преодоления.

3.2.5. Модель формирования транскрипционного комплекса генов класса І

Формирование преиницирующего комплекса начинается с селекции промотора транскрипционным фактором TIF-IB (SL1). Но транскрипция с участием только минимального промотора малоэффективна, поэтому одновременно происходит активация формирования комплекса посредством взаимодействия UBF с элементом промотора UCE. Факторы TIF-IB и UBF вступают в преиницирующий комплекс практически одновременно, они активируют друг друга, связываясь с промоторными элементами через ДНК-белковое, а между собой через белок-белковое взаимодействия.

Формирующийся комплекс становится компетентным к привлечению или рекрутированию РНК-пол.І. РНК-пол.І вступает в преиницирующий комплекс, уже ассоциированная с TIF-IA и TIF-IC, которые стабилизируют преиницирующий комплекс. В результате получается "закрытый" преиницирующий комплекс. Переход от "закрытого" к "открытому" не зависит

от АТФ, т.е. для такого перехода не нужна экзогенная энергия. Роль РНК-пол. I, TIF-IA и TIF-IC в этом переходе критична. После инициации транскрипции TIF-IB (SL1) и UBF остаются связанными с промоторными элементами. TIF-IA покидает транскрипционный комплекс. Элонгацию продолжает РНК-пол. I в ассоциации с TIF-IC. Присутствие дополнительных факторов элонгации транскрипции не показано.

3.2.6. Терминация транскрипции р-РНК генов.

Сайт терминации транскрипции, расположенный у 3'-конца 28S РНК - это не очень строгий, но очень существенный терминатор, т.к. точечные мутации в его составе приводят к полной потере терминаторных свойств. В такой ситуации РНК-пол. I будет продолжать транскрипцию через спейсерную область до строгого терминатора, локализованного у 5'-конца следующего гена рРНК.

3.3. Транскрипция генов класса II

3.3.1. Промоторы генов класса II.

Минимальный промотор генов класса II - это ТАТА-богатая последовательность (ТАТА-бокс) в положении -35, консенсусная последовательность ТАТАААА. Роль ТАТА-бокса трудно переоценить, т.к. точечные мутации в нем очень сильно снижают возможность формирования преиницирующего комплекса. Но не все гены класса II имеют в положении -35 ТАТА-последовательность. Очень многие гены этого класса ТАТА-бокса лишены. Для таких генов особую роль приобретает инициаторная последовательность (Inr), которая локализована от -2 до +3 и включает точку старта транскрипции. Инициаторный элемент совершенно необходим для корректной инициации транскрипции в генах, лишенных ТАТА-последовательности. В генах, содержащих ТАТА-бокс, Inr служит для усиления промоторной функции. Как показал мутационный анализ, в инициаторном элементе существенен каждый нуклеотид. Консенсусная последовательность Inr выглядит следующим образом: $Pu_{-2}Pu_{-1}A_{+1}N_{+2}T_{+3}/A_{+3}Pu_{+4}Pu_{+5}$, особенно важно пиримидиновое окружение A_{+1} . Для генов, лишенных ТАТА-последовательности, очень существенна еще одна последовательность, идентифицированная в положении от +5 до +35 и достаточно консервативная. Последовательность получила название DPE -downstream promotor element, элемент промотора, лежащий ниже старта инициации. Вероятно активность минимального промотора можно рассматривать как ТАТА-направляемую и DPE-направляемую. Эукариотические гены, содержащие только минимальные промоторы, *in vivo* являются фактически молчащими или весьма слабо транскрибируемыми. Такой уровень транскрипции называется базальным и является мишенью для активаторов.

3.3.2. ДНК-зависимая РНК-полимераза II

РНК-пол. II – это сложный белок, в составе которого идентифицировано от 9 до 14 субъединиц с м. м. от 10 кДа до 220 кДа. Общая молекулярная масса нативной РНК-пол. II достигает 550 кДа. Самая крупная субъединица РНК-пол. II имеет высокое сродство к ДНК. В ее составе идентифицирован С-концевой домен (СТД), который представляет собой повтор из 7 аминокислотных остатков: Tyr-Ser²-Pro-Thr-Ser⁵-Pro-Ser. Этот повтор может быть представлен большим числом копий, от 7 у мыши до 52 у человека. Функциональная роль этого домена многоплановая: отличается выраженным сродством к ДНК, участвует в узнавании матрицы, через этот домен происходит регуляция транскрипции посредством связывания активаторов и супрессоров. Несомненная роль СТД в переходе транскрипционного комплекса от инициации транскрипции к элонгации. После наступления продуктивной инициации происходит фосфорилирование СТД, и только в таком модифицированном по СТД состоянии РНК-пол. II становится компетентной к элонгации транскрипции. Фосфорилируется СТД по остатку серина в пятом положении. Остаток серина во втором положении также фосфорилируется, но эта модификация отвечает за процессинг РНК-продукта. В связи с тем, что степень фосфорилирования самой крупной субъединицы РНК-пол. II меняется в зависимости от стадии транскрипции, м. м. этой субъединицы также может колебаться от 190 до 220 кДа. Фосфорилирование СТД протекает достаточно быстро. На роль протеинкиназ, которые могут участвовать в фосфорилировании СТД претендуют целый ряд ферментов, в том числе и фактор транскрипции TFIIN, обладающий ДНК-зависимой протеинкиназной активностью. Из клеток HeLa выделена протеинкиназа, состоящая из двух субъединиц: каталитической и регуляторной ДНК-зависимой. Активность ее проявляется лишь в присутствии РНК-пол. II, ДНК и факторов транскрипции TFIIB, TFIID и TFIIF. Все эти факторы являются компонентами транскрипционного комплекса, т.е. эта протеинкиназа фосфорилирует СТД РНК-пол. II лишь в составе транскрипционного комплекса. Фосфорилирование является одним из триггеров, превращающих иницирующий комплекс в элонгирующий. Ингибирование α -аманитином происходит через взаимодействие с самой крупной субъединицей РНК-пол. II, подавляется элонгация, поэтому подавление транскрипции этим токсином никогда не бывает полным. Вторая по молекулярной массе субъединица 140 кДа участвует в связывании предшественника и формировании фосфодиэфирной связи. В связывании матрицы участвует также субъединица с м. м. 23 кДа. Эта субъединица (23 кДа) а также субъединицы 27, 14,5, 10 α и 10 β кДа являются общими для всех трех РНК-полимераз, т.е. все три формы фермента имеют пять общих по м. м. субъединиц. Мутации в генах общих субъединиц ферментов летальны для дрожжей. Существует понятие core- и holo- фермента РНК-пол. II. Core- это собственно

фермент РНК-пол. II. Что касается функционального комплекса holo-фермента, то разные исследователи включают в его состав, помимо РНК-пол. II, различные наборы факторов. Сюда относят базальный фактор транскрипции TFIIF, Srb-медиаторный комплекс и комплекс SWI/SNF. Srb белки супрессируют мутации по СТД домену самой крупной субъединицы РНК-пол. II, которые могут влиять на активность фермента. Комплекс SWI/SNF- это факторы, которые участвуют в ремоделировании хроматина, изменении недоступной для инициации транскрипции структуры хроматина в доступную.

3.3.3. Транскрипционные факторы РНК-полимеразы II.

Даже базальный уровень транскрипции генов класса II требует кроме РНК-пол. II присутствия транскрипционных факторов.

Номенклатура факторов транскрипции основана на порядке их элюции с колонки ионообменника фосфоцеллюлоза P11.

TFIIA

Впервые о существовании в клетках культуры *D.melanogaster* активности, элюируемой низкой ионной силой с колонки фосфоцеллюлозы P11 и влияющей на транскрипцию генов класса II, сообщил Гринлиф. В дальнейшем этот фактор был выделен из различных источников, очищен до гомогенного состояния и охарактеризован. Оказалось, что TFIIA достаточно вариабелен и по субъединичной структуре, и по молекулярной массе. Не выявлена консервативность по аминокислотной последовательности в составе его субъединиц. Относительно его роли в формировании преиницирующего комплекса нет единого мнения. TFIIA стабилизирует взаимодействие другого фактора TFIID с ДНК во время формирования преиницирующего комплекса, но сформированный преиницирующий комплекс может лишиться TFIIA и это никак не скажется на его стабильности.

Существует представление, что TFIIA связывает ингибиторы, которые могут препятствовать формированию преиницирующего комплекса на ТАТА-содержащих промоторах.

TFIIB

TFIIB – это белок, состоящий из одной субъединицы с молекулярной массой 35 кДа в клетках дрозофилы и 41 кДа – в клетках человека. Определена аминокислотная последовательность TFIIB из клеток HeLa, на основе которой синтезирована с-ДНК. Так было установлено, что в геноме клеток HeLa присутствует лишь одна копия гена TFIIB. Белок TFIIB человека состоит из 316 аминокислотных остатков, N-концевой домен отвечает за связывание с РНК-пол. II. В аминокислотной последовательности обнаружена гомология с σ -фактором *E.coli*, но роль ее неизвестна.

В преиницирующий комплекс TFIIB вступает после посадки на промотор TFIID и отвечает за рекрутирование РНК-пол. II, являясь также мишенью для действия активаторов. Известна последовательность ДНК, которую узнает

TFIIВ. Она локализована сразу выше по течению от ТАТА-бокса. С этой последовательностью TFIIВ взаимодействует по большой бороздке ДНК. Ниже по течению от ТАТА-последовательности TFIIВ взаимодействует с ДНК по малой бороздке. Такая асимметрия связывания с матрицей вносит вклад в определение направления транскрипции. Кроме того, вступление TFIIВ в преиницирующий комплекс позволяет покрыть матрицу от промотора до +10, т. е. происходит перекрывание формирующимся комплексом точки старта транскрипции.

TFIID

Основная функция этого фактора – узнавание ТАТА-последовательности промотора. Это сложный белок, в составе которого как консервативный компонент присутствует TBP, а также несколько TAF. В настоящее время охарактеризовано 12 TAF.

Структура TBP и взаимодействие с ТАТА-последовательностью.

Молекулярная масса TBP, выделенного из разных организмов, колеблется от 27 до 34 кДа. Наиболее подробно изучен TBP из дрожжей. Это белок из 240 аминокислотных остатков с м. м. 27 кДа. К С-концевому домену TBP относят 180 остатков, отличающихся высокой консервативностью по первичной структуре, которая достигает 80% от дрожжей до человека. С-концевой домен отвечает за связывание с ТАТА-боксом и отличается высокой аффинностью к ДНК. Устойчив к действию протеолитических ферментов. Центральная область С-концевого домена TBP представляет собой основной кор, состоящий из повторов остатков лизина, и два прямых повтора, что очень существенно для пространственной организации TBP. Прямые повторы образуют субдомены антипараллельной β -складчатости, а спираль, связывающая эти субдомены соответствует основным лизиновым повторам

N-терминальный домен TBP вариабелен по аминокислотному составу, у дрожжей включает 60 аминокислотных остатков, у человека – 159, у растений – 18. В составе N-концевого домена идентифицированы сайты чувствительности к трипсину и хемотрипсину. Удаление N-концевого домена из TBP приводит к усилению аффинности С-концевого домена к ДНК.

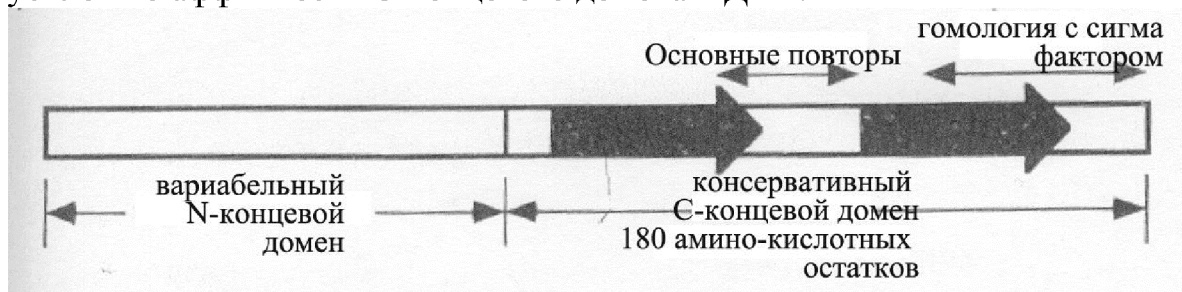


Рис.14. Структура ТАТА-бокс связывающего белка (TBP).

Конформация, которая возникает при взаимодействии С-концевого домена с

ТАТА-последовательностью, была исследована методом рентгено-структурного анализа. Для ко-кристаллизации были использованы гомологичное и гетерологичное связывание ТВР из дрожжей с ТАТА-последовательностями гена *CYC1* дрожжей и растительного объекта *Arabidopsis*.

5' G\TATATAAA/ACG 3'

5' GC\TATAAAAG/GGCA 3'

3' C\ATATATTT/TGC 5'

3' CG\ATATTT TC/CCGT 5'

Конформация ТВР имеет седловидную форму с четырьмя α -спиралями (рис.15а, б,в) расположенными на поверхности седла (рис.15в). На каждой стороне седла расположены две петли, образованные антипараллельными β -складками. Эти β -складки образуют подобие стремян (рис.15в), в каждом из которых находится остаток фенил-аланина. Остатки фенил-аланина очень существенны для связывания ТАТА-бокса. Геометрия комплекса ТВР-ДНК такова, что длинная ось белка почти параллельна оси ДНК (рис.15 б,в). ДНК расположена по внутренней стороне седла и образует почти арку с углом 20° . ТВР в этом взаимодействии с ТАТА-последовательностью является формой, которая формирует сильно изогнутую конформацию, отличающуюся от В-формы двуспиральной ДНК. Такой сильный изгиб в ТАТА-боксе происходит по большой бороздке, а малая бороздка экспонирована к поверхности внутренней стороны седла, изогнута и развернута, по словам Клуга, в беспрецедентной степени. ТАТА-бокс делится на два почти симметричных сегмента по 4 пары нуклеотидов.

В ответ на изгиб ТАТА-бокс существенно раскручивается, тем самым достигается почти полный контакт малой бороздки ДНК с внутренней поверхностью седла ТВР (рис.15 в). Это приводит к изменению углов между плоскостями пар оснований до $18,5^\circ$ (36° в В-форме ДНК). Такой жесткий изгиб возникает как результат взаимодействия между парами оснований 1-2 и 7-8 и остатками фенил-аланина в стремянах ТВР. Взаимодействие имеет место по малой бороздке. После высвобождения ТАТА-последовательности из взаимодействия с транскрипционным комплексом ДНК ТАТА-бокса быстро восстанавливает В-форму. Такая деформация ТАТА-элемента может быть внутренним шагом в дальнейшем плавлении ДНК от промотора до сайта старта инициации транскрипции, хотя стартовый нуклеотид достаточно далеко удален от ТАТА-последовательности (-35). Но, по заключению Клуга, это открытие ворот (gateway) для транскрипции. ТВР не только прямо взаимодействует с ТАТА-боксом при транскрипции генов класса II, но определяет корректность старта инициации, является ядром формирования преинициирующего комплекса, вносит вклад в силу промотора.

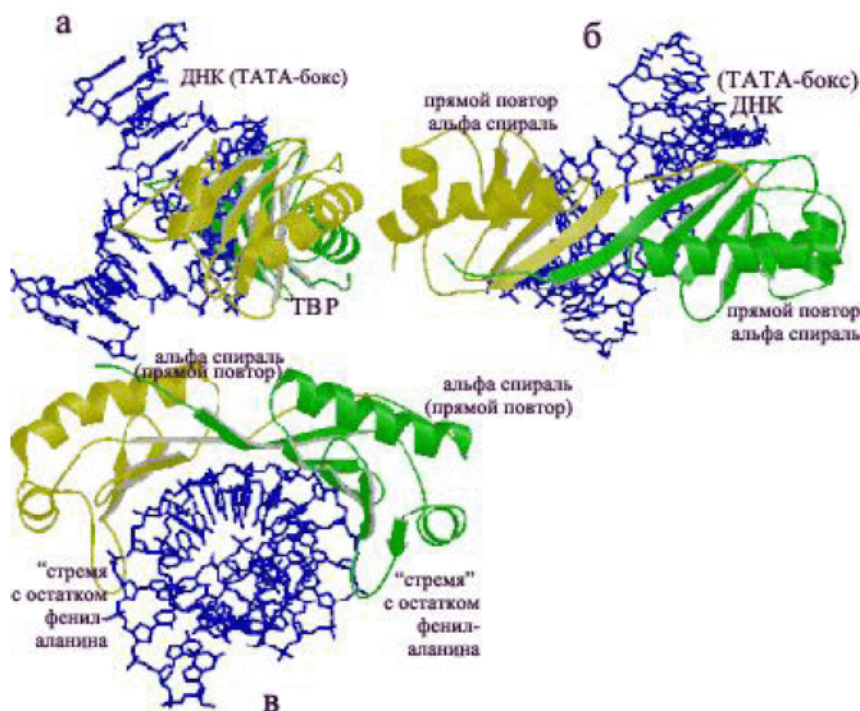


Рис.15. Пространственная структура взаимодействия ТВР с ТАТА-боксом в трех проекциях.

Как показали исследования последних лет у высших организмов экспрессируются два вида ТВР, канонический ТВР и ТВР-like, т.е. ТВР-подобный, названный ТЛР. Он является ортологом ТВР, т.е. дивергировал в результате видообразования, и отличается от канонического ТВР функционально. В 90-х годах XX века господствовало представление о том, что ТВР является общим базальным белком в транскрипции всех трех классов генов. Но сейчас известно, что в транскрипции генов класса III в ряде случаев именно ТЛР замещает ТВР в составе TFIIIB. Отличается ТЛР от ТВР и по структуре. Если ТВР по С-концевому домену, отвечающему за связывание с ДНК, консервативен среди охарактеризованных ТВР на 80%, то ТЛР - лишь на 60%. Особенно существенным является тот факт, что у ТЛР отсутствуют остатки фенил-аланина в позициях, обеспечивающих жесткие контакты с 1-2 и 7-8 парами у ТАТА-бокса. Поскольку ТЛР пока известен только в эмбриональных клетках, не исключено, что он лишь для них и характерен. Но это справедливо только для генов, содержащих в промоторе ТАТА-последовательность.

Что касается промоторов генов класса II, у которых нет ТАТА-последовательности, то таких генов достаточно. Это гены гистонов, основных белков хроматина, гены белков теплового шока, выполняющих защитную функцию в клетке, особенно при изменении внешних условий. В таких генах ключевую роль играет Inr последовательность, а также последовательность у

-70 - CAT-последовательность (CAAT), и последовательность в положении +5 - +35, DPE-последовательность.

Ассоциированные факторы.

В составе TFIID помимо TBP присутствуют ассоциированные с TBP факторы - TAF. У высших эукариот TBP находится в прочной связи с TAF, у низших эукариот (дрожжи) возможно существование TBP в свободном не связанном с TAF состоянии. В составе TFIID высших эукариот идентифицировано 12 TAF с молекулярной массой от 250 до 17 кДа. Это белки с различными функциональными свойствами. Они могут выполнять адапторные функции, т.е. служить мостиками для взаимодействия с активаторами или ингибиторами транскрипции, либо с факторами, отвечающими за модификации.

TAF в составе TFIID взаимодействуют:

- а) со специфическими активаторами и ингибиторами транскрипции;
- б) базальными факторами транскрипции;
- в) другими TAF;
- г) со специфичными нуклеотидными последовательностями - DPE, промоторными элементами, и тем самым вносят вклад в селективное связывание с промотором.

TAF в составе TFIID проявляют сходные свойства с комплексами, ремоделирующими хроматин. TAF_{II250} обладает гистоновой ацетилтрансферазной активностью и способен ацетилировать остатки лизина в гистонах H2A, H2B, H3 и H4. Этот TAF обладает также протеин киназной активностью и участвует в фосфорилировании TFIIIF, самого себя, а также TFIIA и TFIIIE. TAF_{II250} играет очень важную роль в формировании TFIID, т.к. он непосредственно взаимодействует с TBP, а остальные TAF вступают в комплекс TFIID через взаимодействие с TAF_{II250}.

TFIIIE

TFIIIE человека выделен и очищен до гомогенного состояния. Белок включает две субъединицы 57 и 34 кДа. Субъединица 57 кДа обладает свойствами полного TFIIIE, а субъединица 34 кДа усиливает ее активность. Масса нативного TFIIIE 180 кДа, т.е. это гетеродимер, в котором каждая из субъединиц представлена дважды.

Обладает сродством к РНК-пол. II, не взаимодействует с ДНК. Необходим для формирования преиницирующего комплекса на промоторах всех генов класса II. Обеспечивает вступление в преиницирующий комплекс TFIIIN, необходим для АТФ-зависимого перехода закрытого транскрипционного комплекса в открытый до формирования первой фосфодиэфирной связи.

TFIIIF

Этот фактор имеет еще одно название RAP30/RAP74 по субъединицам в него входящим и по высокому сродству к РНК-пол II (RAP- RNA Pol. associated Protein). Активен в виде гетеродимера из двух субъединиц RAP30 и двух RAP74. Гетеродимер способен взаимодействовать с РНК-пол. II в отсутствие ДНК. В состав преиницирующего комплекса РНК-пол. II рекрутируется в комплексе с TFIIIF, причем РНК-пол. II находится в нефосфорилированном по СТД самой крупной субъединицы состоянии. Субъединица RAP74 в комплексе с РНК-пол. II участвует и в элонгации транскрипции.

TFIIH

Это крупный, сложно организованный белок, в составе которого идентифицировано 9 полипептидов с м. м. от 89 до 32 кДа. TFIIH обладает несколькими ферментативными активностями:

- а) протеин киназной; участвует в фосфорилировании СТД самой крупной субъединицы РНК-пол. II, что необходимо для перехода в элонгацию транскрипции;
- б) АТФ-зависимой геликазной; две самые крупные субъединицы TFIIH способны расплетать ДНК в направлении 3'-5'(субъединица XPB) и направлении 5'-3'(субъединица XPD), т.е. TFIIH – это геликаза, плавающая ДНК в обоих направлениях; участвует в плавлении промотора в районе старта инициации транскрипции и в превращении «закрытого» комплекса в «открытый»;
- в) АТФ-азной; гидролиз АТФ необходим для продвижения РНК-пол. II и высвобождения промотора.

TFIIH стимулирует формирование первой фосфодиэфирной связи, хотя непосредственно в этом не участвует. В отсутствие TFIIH с большей вероятностью наступает «абортная» транскрипция.

Кроме всех этих функций TFIIH участвует в репарации повреждений ДНК.

Субъединица TFIIH 85кДа является продуктом гена человека ERCC-2, который имеет непосредственное отношение к репарации ДНК. Мутации по этому гену приводят к усилению чувствительности к УФ и являются причиной заболевания Xeroderma pigmentosum, которое связано с нарушениями репарации ДНК.

Субъединица 85 кДа отвечает за геликазную активность TFIIH. Известно, что процессы транскрипции и репарации тесно связаны, и транскрибируемая ДНК репарируется гораздо активнее.

Возможно в будущем TFIIH будут рассматривать как два независимых фактора, один – транскрипционный, другой – фактор репарации. Но в данный момент это один фактор, возможно биологический смысл его функциональной сложности заключается в привлечении репаративного комплекса для сохранения в корректном состоянии матрицы ДНК в активно транскрибирующихся генах.

TFII(I)

Транскрипционный фактор, который очень важен для генов, промоторы которых лишены ТАТА-бокса.

3.3.4. Модель формирования преиницирующего транскрипционного комплекса РНК-пол II.

Мы рассмотрели все основные факторы базального уровня транскрипции. Как же происходит формирование преиницирующего и инициаторного комплексов РНК-пол. II?

Модель формирования преиницирующего комплекса, инициации, элонгации и терминации транскрипции РНК-пол II приведена на рис. 16 (Использована иллюстрация из статьи R. G. Roeder, Trends Biochem. Sci. (1996) 21:327-335.)

Первый шаг формирования комплекса заключается в узнавании TFIID, его белком TBP, ТАТА-последовательности промотора. TFIID взаимодействует с ДНК в области промотора от -37 до -17 (рис. 16, б)

После этого к нему может присоединиться TFIIA, и тогда комплекс покрывает последовательность от -42 до -17. Такой комплекс TFIID-ДНК-TFIIA устойчив к ДНК-азе и консервативен, TFIIA повышает сродство TFIID к ДНК.

Этот комплекс компетентен к присоединению TFIIВ. Присоединение TFIIВ превращает комплекс в преиницирующий, т.к. в его составе появляется последовательность ДНК до +10, т.е. в формирование комплекса вовлечена точка старта инициации транскрипции +1. Известна последовательность ДНК, которую узнает TFIIВ. Она локализована сразу выше по течению от ТАТА-бокса. С этой последовательностью TFIIВ взаимодействует по большой бороздке ДНК. Ниже по течению от ТАТА-последовательности TFIIВ взаимодействует с ДНК по малой бороздке. Такая асимметрия связывания с матрицей вносит вклад в определение направления транскрипции.

Комплекс на этой стадии способен рекрутировать РНК-пол. II. В преиницирующий комплекс РНК-пол. II вступает в ассоциации с TFIIF и TFIIH, а также с медиаторным комплексом, который может осуществлять ремоделирование хроматина (рис. 16, а). Вся структура связана на ДНК не только с сайтом инициации, но и двумя витками спирали ниже старта инициации вплоть до +15 - +20 на кодирующей и не кодирующей цепях, соответственно.

Далее присоединяется TFIIE и защищает еще один виток спирали ДНК. Это еще "закрытый" комплекс, но именно он становится "открытым" и осуществляет инициацию транскрипции. Переход "закрытого" комплекса в "открытый" зависит от АТФ. Энергия, выделяющаяся при гидролизе АТФ, расходуется на переход в "открытый" комплекс. АТФ-азной активностью обладает TFIIH и одна из субъединиц РНК-пол. II. Переход - процесс достаточно сложный и, скорее всего, является результатом суммарного приложения и энергии гидролиза АТФ, и энергии, запасенной в деформированном ТАТА-боксе, связанном с TBP. Плавление ДНК связано непосредственно с

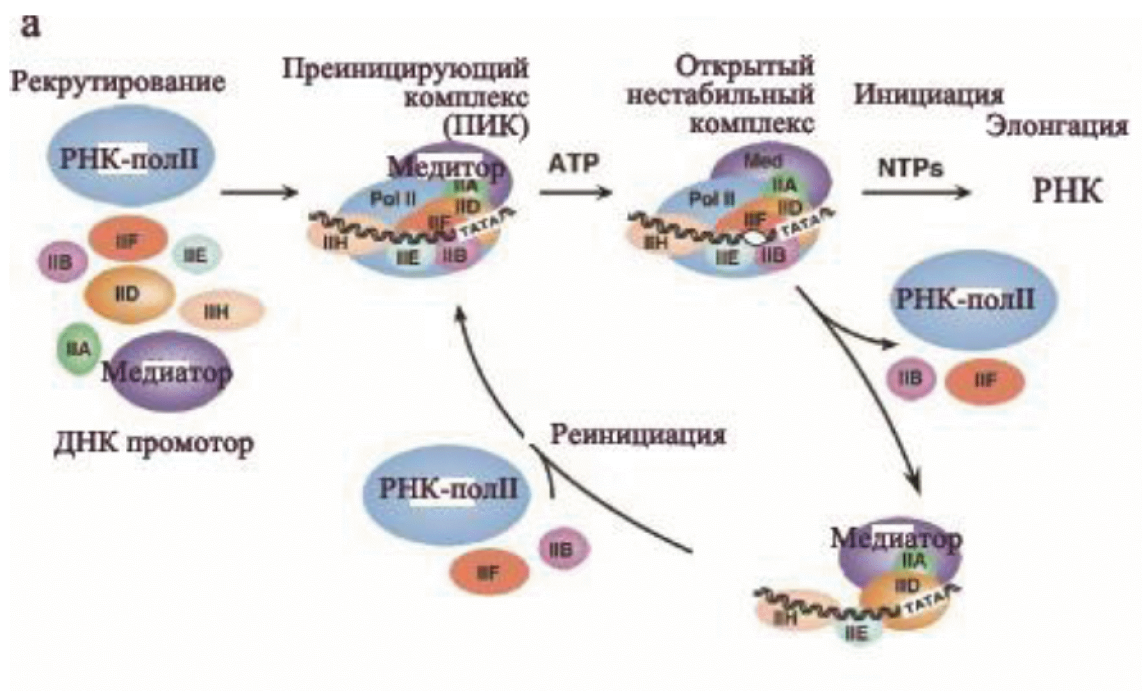
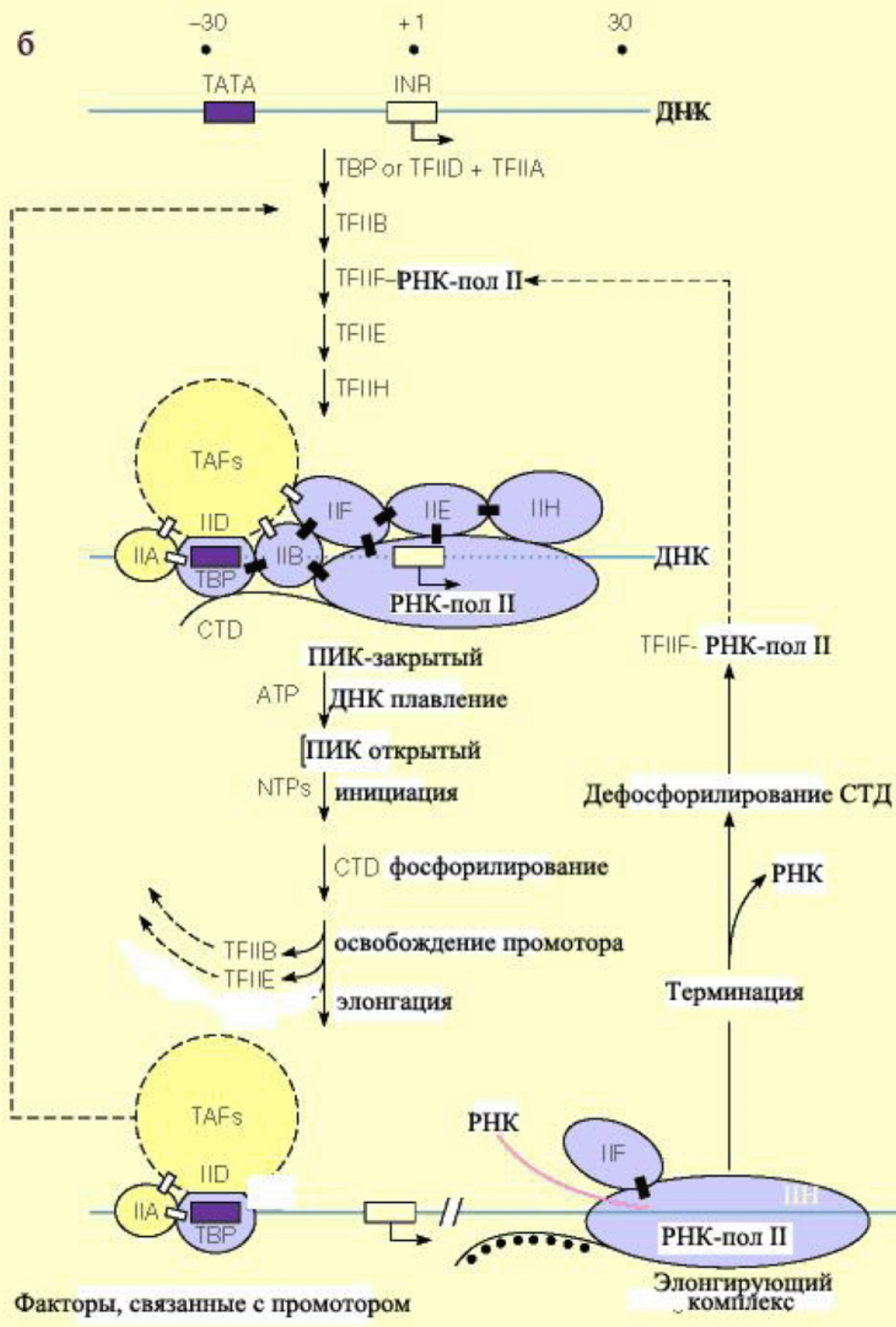


Рис. 16 (а и б) Модель формирования преиницирующего комплекса, инициации, элонгации и терминации транскрипции РНК-пол II.

6



функционированием РНК-пол. II. Фермент не только плавит матрицу, но и, сканируя матрицу, определяет старт инициации. Не исключено, что инициация начинается у -4 нуклеотида, а созревание РНК-продукта включает гидролиз 5'-конца. Для продуктивной транскрипции необходимо присутствие предшественников - нуклеотид трифосфатов. Наступает продуктивная транскрипция после включения во вновь синтезированную РНК 9-10 остатков нуклеотидов. На этой стадии транскрипционный комплекс покидают TFIIE и субъединица RAP 34 TFIIIF. TFIID и TFIIA остаются связанными с промоторной последовательностью. РНК-пол. II остается связанной с RAP 70 и TFIIH. Для вступления в элонгацию фермент модифицируется. СТД самой крупной субъединицы РНК-пол. II, который представляет собой повтор из 7 аминокислотных остатков: Tyr-Ser²-Pro-Thr-Ser⁵-Pro-Ser, фосфорилируется по 5 остатку серина (рис. 16,б). Лишь после этого РНК-пол. II становится компетентной к элонгации транскрипции.

3.3.5. Элонгация транскрипции

РНК-полимеразы являются процессивными ферментами: если фермент освобождает растущую цепь РНК до завершения транскрипции гена, то он не в состоянии связать эту РНК вновь и продолжить транскрипцию. Поэтому каждый новый раунд синтеза РНК начинается с реинициации транскрипции на промоторе. Такие биохимические особенности РНК-полимераз объясняют, почему стабильность третичного транскрибирующего комплекса, в который входит ДНК-матрица-РНК-пол-РНК-продукт, является одним из его критических свойств.

Существует модель, описывающая процесс элонгации. Она получила название "inch-worm". В 1992 г. М. Чамберлин с сотрудниками разработали модель элонгации РНК, которая содержала целый ряд новых идей. Прежде всего было постулировано, что процессы перемещения РНК-пол по ДНК-матрице и присоединение нуклеотидов к растущей цепи РНК в активном центре фермента разделены во времени. Это разделение становится возможным благодаря наличию в молекуле РНК-пол. двух ДНК-связывающих сайтов, каждый из которых перекрывает на матричной ДНК ~10 пар нуклеотидов. Сайт I находится в задней по отношению к направлению транскрипции части фермента, а сайт II – в передней. Предполагается также, что эти два сайта могут перемещаться вдоль ДНК в процессе элонгации независимо друг от друга. В соответствии с предложенной моделью, молекула РНК-пол. перемещается вдоль ДНК наподобие гусеницы: когда один из сайтов связывания ДНК фиксирован, другой может двигаться вперед. Еще одной новой чертой модели было предположение о том, что растущая цепь РНК удерживается внутри элонгирующего комплекса не 12-нуклеотидным ДНК-РНК-гибридом, а двумя

сайтами связывания самой РНК-пол., каждый из которых перекрывает ~10 нуклеотидов матрицы. При этом длина участка РНК, заключенного между сайтами связывания, составляет 30–40 нуклеотидов. Предполагалось также, что перемещение каталитического центра молекулы РНК-пол. сопряжено с движением переднего сайта (II) связывания ДНК и может происходить независимо от переноса заднего сайта (I) вперед вдоль РНК-связывающего сайта I во время заполнения этого сайта и добавления нуклеотидов к растущей цепи РНК.

Согласно предложенной модели элонгация цепей РНК представляется в виде циклического процесса. В начале цикла каталитический центр молекулы РНК-пол. располагается у задней границы РНК-связывающего сайта I в соответствии с положением 3'-ОН-конца РНК. Последовательно присоединяя нуклеотиды к растущей цепи РНК, каталитический участок перемещается относительно РНК-связывающего сайта I и в конце концов заполняет этот сайт десятью нуклеотидами вновь синтезированного участка РНК. Во время этой фазы элонгации ДНК-связывающий сайт I остается фиксированным на ДНК, тогда как ДНК-связывающий сайт II перемещается вперед синхронно с каталитическим участком на десять нуклеотидов. В конце фазы добавления нуклеотидов ДНК- и РНК-связывающие сайты II фиксируются на своих лигандах, а ДНК-связывающий сайт I переносится вперед на десять нуклеотидов в новое фиксированное положение. Это перемещение освобождает РНК-связывающий сайт I, делая его готовым к повторению цикла перемещения. Модель элонгации транскриптов, выдвинутая группой М.Чамберлина, довольно быстро получила экспериментальное подтверждение и была дополнена рядом существенных моментов. Оказалось, что перемещение третичного комплекса вдоль транскрибируемой ДНК не всегда скачкообразно. Большую часть транскрипции РНК-полимеразы проходят монотонно, регулярно присоединяя к растущим цепям РНК нуклеотид за нуклеотидом.

Прерывистая, скачкообразная элонгация РНК имеет место лишь на участках матричной ДНК, в которых происходит задержка транскрипции или ее полное прекращение. При встрече с препятствием в виде специфической последовательности нуклеотидов или белков, связанных с ДНК, молекула РНК-пол. в составе третичного комплекса переходит во внутренне напряженное состояние, которое может разрешиться тремя путями: а) преодолеть препятствие, переместив свою переднюю границу вперед за пределы препятствия и продолжить монотонную элонгацию; б) терминировать транскрипцию; в) полностью прекратить синтез РНК. При полном прекращении транскрипции каталитический участок фермента смещается назад по отношению к синтезированной РНК и ее 3'-концевой нуклеотид становится недоступным для элонгации. Отщепление 3'-концевого фрагмента РНК в комплексе, прекратившем элонгацию, с освобождением 3'-ОН конца растущего транскрипта, реактивирует транскрипцию.

Элонгация транскрипции происходит с не одинаковой скоростью. РНК-пол. II может останавливаться в "паузах", преодолевать которые она может самостоятельно, либо в сайтах "ареста". Для преодоления последних ей необходим дополнительный фактор элонгации - TFIIIS.

TFIIIS

Механизм действия TFIIIS заключается в том, что он, обладая эндонуклеазной активностью, расщепляет транскрипт до нуклеофильного 3'-ОН. Это заставляет фермент откатываться назад до первого нуклеофильного 3'-гидроксила, а далее РНК-пол. II снова становится способной к элонгации транскрипции.

Элонгин (SIII)

Известны еще несколько факторов элонгации. Наиболее полно изучен элонгин (SIII), нарушения в функционировании которого являются причиной синдрома von Hippel-Lindau. Функционально активный элонгин представляет собой комплекс из белков А, В и С. Транскрипционная активность элонгина связана с его субъединицей А, а белок С стимулирует эту активность. Роль субъединицы В - подобная шаперону, он не способен стабильно связываться с белком А в отсутствие элонгина С. При синдроме von Hippel-Lindau элонгин является мишенью действия продукта антионкогена VHL. Мутации в этом гене связывают с возникновением многих видов рака у человека. Белок VHL взаимодействует с комплексом элонгин ВС, что регулирует взаимодействие этого комплекса с белком А (рис. 17,б). Мутации в гене VHL снижают прочность взаимодействия белка VHL с элонгином ВС, что приводит к нарушению, ускорению, элонгации транскрипции и малигнизации (рис. 17,а).

3.3.6. Терминация транскрипции РНК-пол. II

Сайты терминации транскрипции генов класса II имеют одно общее свойство, в них всегда присутствует кластер из нескольких остатков тимина. Известен фактор терминации транскрипции РНК-пол. II. Это белок N-TEF дрожжей, он индуцирует освобождение транскриптов, синтезированных РНК-пол. II. При его функционировании происходит расщепление АТР. Одним из основных факторов терминации транскрипции у высших эукариот является сложный белковый комплекс, обеспечивающий процессинг 3'-концевых последовательностей у предшественников м-РНК (пре-м-РНК), синтезируемых РНК-пол. II. Терминация транскрипции тесно сопряжена с процессингом пре-м-РНК – сложным молекулярным механизмом. Существенную роль в терминации генов класса II играет полиаденилирование 3'-конца пре-м-РНК. Но не все пре-м-РНК подвергаются полиаденилированию, однако и в этих случаях роль процессинга в терминации транскрипции критична.

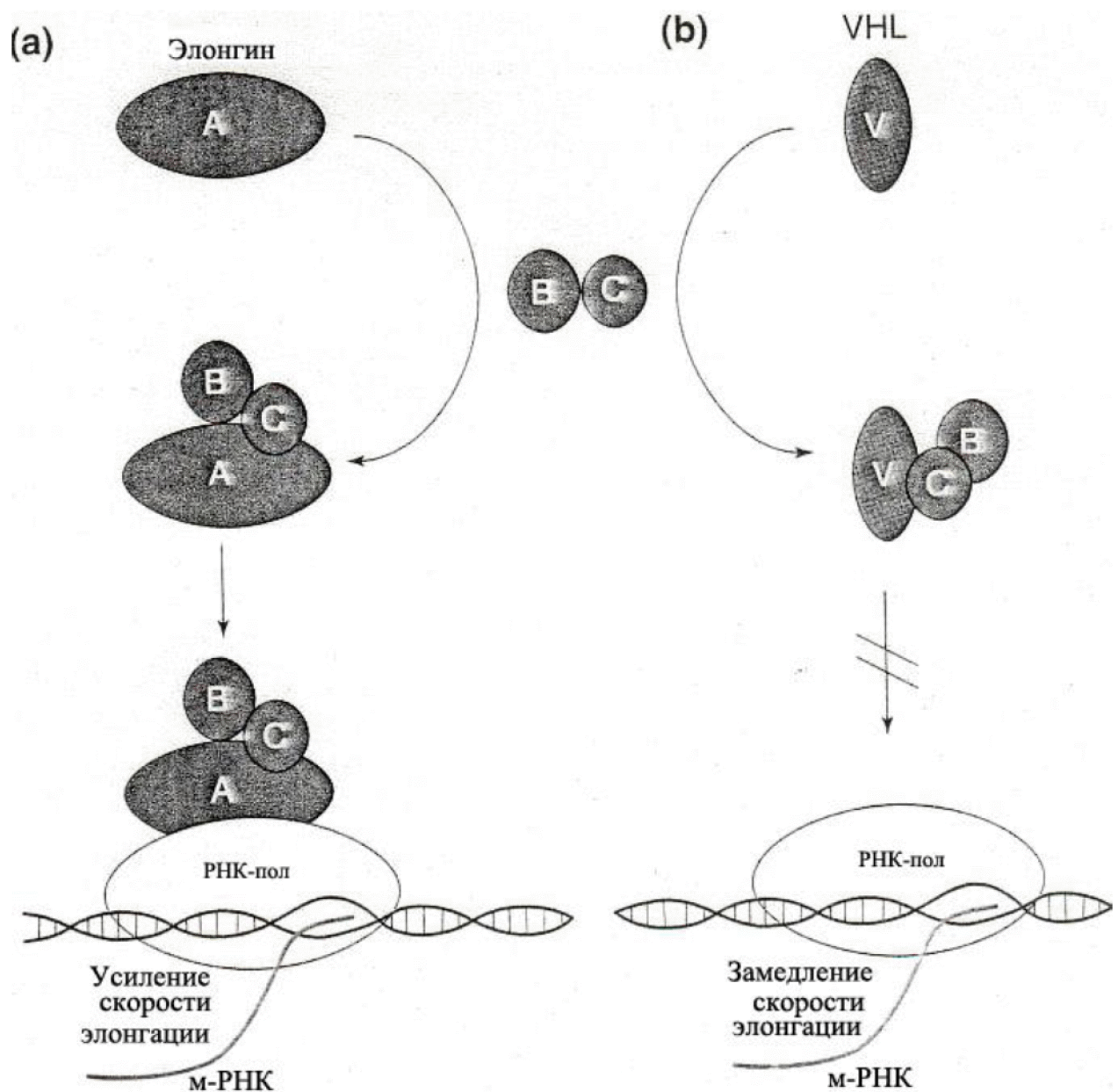


Рис. 17. Регуляция элонгации РНК-пол. II при синдроме van Hippel-Lindau

Глава 3.4. Транскрипция генов класса III

3.4.1. Разнообразие генов класса III. К классу III относят гены 5S рРНК, гены всех тРНК, ряда вирусных РНК, 7SL и 7SK РНК и U6 мяРНК.

Гены 5S у высших и низших эукариот сцеплены с генами рРНК, исключение обнаружены только у грибов. Гены 5S рРНК не имеют интронов, длина 5S рРНК составляет 120 нуклеотидов. Гены 5S рРНК многих эукариот многократно повторены в геноме и образуют семейства длинных tandemных повторов. В составе повтора идентифицирован нетранскрибируемый АТ-

богатый спейсерный участок и ГЦ-богатая структурная часть 5S рРНК гена. На долю структурного сегмента приходится не более 20% всего повтора. Число копий в геномах различных видов существенно колеблется, но это многокопийные гены. У дрозофилы около 160 копий 5S рРНК генов собраны в tandemный повтор во второй хромосоме. Они, по-видимому, образуют единый непрерываемый кластер. В геномах различных видов амфибий 5SpРНК гены образуют два семейства. Одно из них представлено в виде тысячи копий и экспрессируется только в ооцитах. Другое семейство состоит из гораздо меньшего числа генов и экспрессируется и в ооцитах, и в соматических клетках. У дрожжей все гены рРНК, в том числе и гены 5S рРНК, сцеплены и находятся в одной повторяющейся единице. Однако транскрипция 5S рРНК осуществляется РНК-пол. III с цепи ДНК, комплементарной той, с которой происходит считывание полицистронного 45S предшественника рРНК. В эукариотических геномах гены тРНК присутствуют в большом числе копий, но расположены достаточно беспорядочно. Многокопийные гены одной и той же тРНК могут находиться в одном кластере или в разных. Некоторые гены тРНК содержат интроны, другие – нет. Интроны генов тРНК, как правило, короткие, не более 45 п.о., и находятся с 3'-стороны от антикодоновой последовательности.

Мя РНК и малые цитоплазматические РНК также относятся к классу III. Мя РНК играют ключевую роль в процессинге первичных продуктов транскрипции с образованием зрелых информационных, матричных РНК и рРНК. В геномах эукариот функциональные гены мяРНК организованы в кластеры. Кодировующие последовательности генов мяРНК входят в состав длинного сегмента, который образует повтор. В составе повтора кодирующая последовательность фланкирована последовательностями, которые могут содержать регуляторные участки. Копии мяРНК не столь многочисленны как рРНК, семейство U1 мяРНК человека представлено в геноме 30 копиями.

7SL-РНК является основным компонентом цитоплазматической сигнал распознающей РНП-частицы, которая участвует в переносе секретируемых и связанных с мембранами полипептидов через липидный бислой эндоплазматического ретикулума. Эта малая цитоплазматическая РНК отличается существенным консерватизмом. В геноме человека обнаружены три копии гена 7SL-РНК.

3.4.2. Промоторы генов класса III

В генах класса III различают несколько типов промоторов.

1 тип - промоторы генов 5S рРНК- это локализованные внутри структурной части гена промоторы. Для корректной и продуктивной транскрипции 5S рРНК гена совершенно необходима последовательность, расположенная от +50 до +97 п.н. Это прерывистая структура, носит название ICR (рис.18, type 1), включает А-бокс, промежуточный элемент (IE) и С-бокс.

А-бокс локализован между +67 до 72;

С-бокс локализован от +80 до +97;

IE последовательность локализована между +72 и +80.

В последовательности от +50 до +80 важен каждый нуклеотид, любая делеция в ней приводит к потере промоторной функции.

Важна также последовательность от -3 до +10, которая перекрывает старт инициации транскрипции, мутации по ней препятствуют образованию стабильного иницирующего комплекса и либо редуцируют, либо вообще выключают транскрипцию,.

А-бокс имеет высокое сродство к транскрипционному фактору TFIIIC, меньшее - к TFIIIA.

С-бокс отличается сродством к TFIIIA.

2 тип - промоторы генов тРНК - как и тип I, локализованные внутри генов промоторы (рис.18, type 2). В их составе различают:

А-бокс, локализованный от +8 до +19 и

В-бокс, локализованный от +52 до +62.

Это последовательности консервативны у генов индивидуальных тРНК, особенно А-бокс. Расстояние от точки старта инициации транскрипции до А-бокса постоянно для генов индивидуальных тРНК.

Расстояние между А и В боксами может существенно варьировать, от 31 до 93 п.н., что не влияет на корректность транскрипции, а является скорее количественной детерминантой силы промотора.

3 тип - промоторы генов U6 мя РНК, 7SK и 7SL РНК (рис.18, type 3).

Промоторные последовательности этих генов локализованы у -25 - ТАТА-бокс, -50 проксимальный элемент (proximal sequence element - PSE), на расстоянии более -200 дистальный элемент (distal sequence element - DSE).

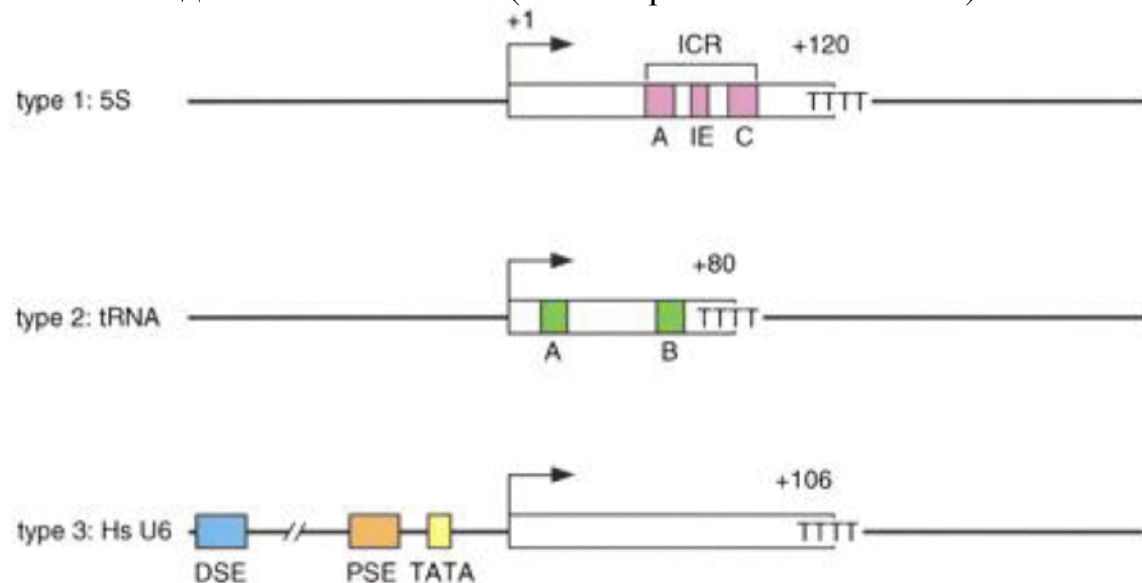


Рис. 18. Структура генов класса III с промоторами различного типа.

3.4.3. РНК-полимераза III. РНК-пол. III как и две другие формы является мультисубъединичным ферментом, в составе которого определено до 15 субъединиц с молекулярной массой от 160 до 7 кДа. Молекулярная масса нативного фермента определена в 600-650 кДа. Известна роль отдельных субъединиц РНК-пол. III. Субъединица с молекулярной массой 128 кДа фермента, выделенного из дрожжей, существенна для терминации транскрипции, 40 кДа – для сборки собственно молекулы РНК-пол. III, а субъединицы - 53, 34 и 31 кДа специфичны для синтеза тРНК. В составе РНК-пол. III не все субъединицы представлены в стохиометрических соотношениях, что может указывать на существование субтипов РНК-пол. III, участвующих в транскрипции генов класса III, отличающихся различными типами промоторов. Все три формы РНК-полимераз имеют общего предка. Вероятнее всего это фермент транскрипции археобактерий.

3.4.4. Транскрипционные факторы РНК-пол. III. Как и другие формы фермента, РНК-пол. III для корректной транскрипции необходимы специфичные наборы транскрипционных факторов.

TFIIIA

TFIIIA участвует в транскрипции только генов 5S рРНК. Формирование преинициирующего комплекса на генах 5S рРНК начинается с взаимодействия TFIIIA с ICR (в ядрах ооцитов шпорцевой лягушки) или с ICR-С-бокс (ядра дрожжей). Это белок с молекулярной массой около 38 кДа, отличительной особенностью которого является присутствие в его составе специфичной вторичной структуры - Zn-пальцы, повторенной до девяти раз. Эти структуры связывают более 50 п.н. в гене 5S рРНК.

Вторичная структура TFIIIA весьма консервативна и определяет его биологическую функцию. Все Zn-пальцы участвуют в связывании рибосомных генов и вновь синтезируемой 5S рРНК. В связывании TFIIIA принимают участие промоторные последовательности 5S рРНК генов, любая замена в А, С-боксах или ICR-последовательности редуцирует сродство TFIIIA к этим последовательностям. TFIIIA более жестко взаимодействует с некодирующей цепью ДНК С-бокса 5S рРНК гена, менее выраженное взаимодействие наблюдается с А-боксом. Zn-пальцы N-концевого домена TFIIIA осуществляют жесткий контакт по большой бороздке 80-97 п.н. С-бокса.

5S рРНК имеет специфичную вторичную и третичную структуру, с которой взаимодействует TFIIIA.

TFIIIB

В составе TFIIIB присутствует TBP (ТАТА-бокс связывающий белок). Помимо TBP в состав TFIIIB входят два TAF (ассоциированных фактора). Это TFIIIB 70 или Brf (TFIIIB-related factor), TAF с молекулярной массой 70 кДа. Второй TAF обозначают как TFIIIB'' или TFIIIB 90, т.к. его молекулярная масса составляет 90 кДа. Роль, которую отводят TFIIIB 90, заключается в превращении «закрытого» преинициирующего комплекса в «открытый».

TFIIIB привлекает или рекрутирует РНК-пол. III в преинициирующий комплекс и отвечает за корректную инициацию транскрипции.

TFIIC

Наиболее сложно организованный фактор транскрипции РНК-пол. III. Функциональная роль TFIIC заключается в селекции промотора при транскрипции всех генов тРНК.

TFIIC из клеток человека включает пять субъединиц с молекулярной массой 220, 110, 102, 90 и 63 кДа. Известна субформа TFIIC, которая не содержит субъединицу 110 кДа. Присутствие субъединицы 110 кДа, по мнению исследователей, характерно для активной формы фактора.

TFIIC дрожжей содержит четыре субъединицы – 138, 131, 95 и 60 кДа.

Субъединицы 138 и 95 кДа имеют сродство к ДНК.

TFIIC узнает В-бокс в промоторе генов тРНК и связывается с ним. За это связывание отвечает субъединица 95 кДа, за взаимодействие с А-боксом – субъединица 138 кДа.

TFIIE

TFIIE – фактор, который способен сильно стимулировать общий уровень транскрипции тРНК генов. По мнению исследователей его описавших (группа Отторелло и Спрак) этот фактор обеспечивает множественность раундов транскрипции генов класса III.

SNAPc

Модели транскрипции генов тРНК и 5S рРНК имеют одну общую особенность. Формирование «транскрипционных машин» этих генов происходит на внутри генных промоторных последовательностях.

Гены класса III, которые располагают промоторными элементами на 5'-последовательностях, лежащих выше точки старта транскрипции (гены U6 мРНК, 7SK и 7SL РНК), располагают ТАТА-боксом у -25.

Как известно, РНК-пол. II транскрибирует гены U1 – U5 мРНК, но промоторы этих генов либо не имеют ТАТА-бокса в положении -25, либо лишены ТАТА-последовательности вообще. Вопрос о селективном выборе этих промоторов

РНК-пол. II или РНК-пол. III долгое время не находил решения. Роль ТВР-содержащих ни других базальных факторов РНК-пол. II и РНК-пол. III в этой селекции не была выявлена. Первые результативные эксперименты относятся к 1995 г. Группа исследователей под руководством Хернандеса и Кобаяши показала, что при транскрипции генов мРНК работает совершенно другой набор факторов, который получил название SNAPc. В составе этого комплекса присутствует ТВР и ассоциированные факторы: SNAP190, SNAP50, SNAP45, SNAP43 и SNAP19. SNAP190 содержит повторы, ответственные за связывание с ДНК, ассоциированный фактор SNAP19 детерминирует сборку собственно SNAPc. ТВР в составе SNAPc может отличаться от ТВР, участвующего в транскрипции генов класса II. Это TLP (TBP-like protein). SNAPc связывает промоторную PSE - последовательность, расположенную у -50-55, и является ядром для сборки «транскрипционной машины» при транскрипции генов мРНК и РНК-пол. II, и РНК-пол. III.

3.4.5. Терминация транскрипции генов класса III

Терминация генов класса III выглядит достаточно простой и понятной. Сайт терминации может включать четыре или более остатка Тимина (рис.18). Такой сигнал терминации отличается эволюционным консерватизмом. Он установлен и в генах класса III дрожжей, и у амфибий. Участие транскрипционных факторов в терминации транскрипции неизвестно.

Однако есть данные, что РНК-пол. III может регулироваться и другими сигналами терминации. В генах 5S рРНК мышей Т кластер отсутствует, но это не нарушает корректную терминацию транскрипции.

В последние годы представления о простоте механизма терминации у генов класса III претерпели существенные изменения. Тот факт, что транскрипция генов тРНК и 5S рРНК очень интенсивная, заставил задуматься о механизмах регуляции и поддержания столь высокого уровня транскрипции. В 1996 г. Дейси и Сентенак выдвинули гипотезу о том, что при транскрипции генов тРНК, 5S рРНК и VAI РНК может происходить не классическая терминация транскрипции, когда диссоциация транскрипта сопровождается разрушением третичного комплекса РНК-пол. III-матрица-РНК-продукт, а по предположению авторов может иметь место рециклизация транскрипции РНК-пол. III на преобразованном транскрипционном комплексе ДНК тРНК гена-TFIIIB-TFIIIC. РНК-пол. III прямо переходит от сайта терминации к сайту старта инициации. При этом во время терминации транскрипционный комплекс не диссоциирует, т.е. РНК-пол. III имеет возможность быть снова рекрутированной к точке старта. Как показано в опытах *in vitro* на системе из дрожжей, такое рекрутирование РНК-пол. III может осуществить даже комплекс, лишенный TFIIIC, достаточно участия в комплексе TFIIIB. Гены тРНК и 5SpРНК достаточно короткие, поэтому их рецикличная многораундовая транскрипция может поддерживаться комплексом ДНК-TFIIIB, т.к. он очень стабилен.

Участие TFIIIC может ограничиваться только формированием нового преиницирующего комплекса и запуском инициации транскрипции. Модель, предложенная Дейси и Сентенаком, выглядит следующим образом: рис.19.

(использован рисунок из статьи Giorgio Dieci and André Sentenac «Facilitated Recycling Pathway for RNA Polymerase III». Cell, Volume 84, Issue 2, 26 January 1996, Pages 245-252):

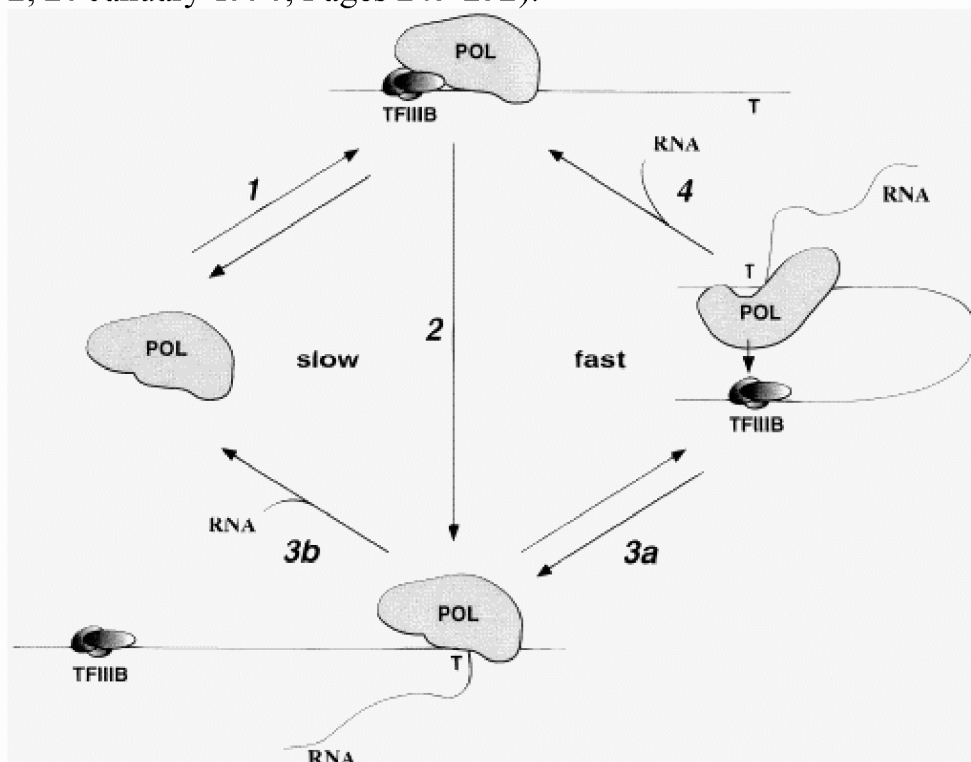


Рис. 19. Модель терминции- реинициации транскрипции генов класса III.

Шаг 1: ингибируется гепарином, т.е. имеет место инициация транскрипции, а гепарин является конкурентом ДНК и ингибитором инициации;

Шаг терминции может происходить двумя альтернативными путями: РНК-пол. III может диссоциировать из транскрипционного комплекса (шаг 3в) и снова участвовать в формировании преиницирующего комплекса (шаг 1)- это медленные шаги.

Альтернативой является шаг 3а и далее шаг 4: высвобождение РНК-продукта не ведет к диссоциации транскрипционного комплекса от матрицы, что позволяет быстро реиницировать транскрипцию (шаг 4).

Эти шаги устойчивы к гепарину, т.к. высвобождение матрицы не происходит и гепарин не может связывать компоненты «транскрипционной машины», обладающие сродством к ДНК.

Но участие TFIIIC нельзя полностью исключать из многораундовой транскрипции, т.к. одна из субъединиц TFIIIC способна взаимодействовать с

терминаторной последовательностью, а TFIIIC, как указывалось выше, осуществляет селекцию А и В-боксов промоторов 2 типа. Для РНК-пол. III из клеток человека также показана рециклизация транскрипции. Открыт фактор, который участвует в такой терминации-рециклизации генов VAI. Этот фактор взаимодействует со специфическим локусом внутри сайта терминации и двумя субъединицами TFIIIC – 220 и 110 кДа. Этот фактор принадлежит семейству NF1. Вероятно, у генов класса III терминация и реинициация – тесно связанные события. Последовательности, прилежащие к терминатору, стабилизируют комплекс TFIIIC-ДНК и влияют не только на терминацию, но и на инициацию, обеспечивая таким образом многораундовую транскрипцию и высокий уровень экспрессии генов класса III. Такой механизм справедлив если не для всех генов класса III, то для некоторых, т.к. гены человека 7SK РНК содержат сайты связывания для NF1, а 5S рРНК и тРНК – нет. Но нельзя исключить существование еще каких-то факторов терминации.

3.5. Транскрипция в митохондриях.

3.5.1. ДНК митохондрий. В клетках эукариот помимо ядерной ДНК присутствует ДНК, которая называется нехромосомной, но кодирует важную для жизнедеятельности клетки генетическую информацию. Локализована эта ДНК в митохондриях, а у растений еще и в хлоропластах. Митохондриальные геномы представляют собой замкнутые кольцевые сверхспирализованные двухцепочечные ДНК. Они существенно различаются по размеру. У животных они относительно малы и не превышают 20 тысяч п.н. У дрожжей митохондриальная ДНК включает около 80 тысяч п.н. Что касается растений, то размеры ДНК митохондрий у них варьируют от нескольких сотен до нескольких тысяч п.н. Отличительным свойством митохондриальных ДНК является отсутствие у них метилирования. Объем генетической информации, закодированной в митохондриальной ДНК млекопитающих составляет не менее 1% от общей генетической информации клетки. Геномы митохондриальных ДНК млекопитающих организованы очень рационально и не имеют избыточной ДНК, между генами практически нет промежутков. В отличие от большинства эукариотических генов, каждый из которых является независимой транскрипционной единицей, обе цепи генома митохондрий транскрибируются с образованием одной длинной молекулы РНК. Кроме того, синтезируются короткие транскрипты. Их синтезируется во много раз больше, чем длинных, в результате процессинга они дают 12S рРНК, 16S рРНК, а также тРНК^{Phe} и тРНК^{Val}. Большое число коротких транскриптов позволяет получить достаточное для формирования рибосомных частиц количество рРНК. Из длинных транскриптов в результате процессинга образуются информационные РНК и другие тРНК. В геноме митохондрий может быть закодировано не менее 13 полипептидов, именно столько полипептидов транслируют рибосомы

митохондрий млекопитающих.

3.5.2. РНК-полимераза митохондрий. Транскрипцию всего генетического материала митохондрий осуществляет специфическая ДНК-зависимая РНК-полимераза митохондрий (мРНК-пол.). митохондриальные РНК-пол. видоспецифичны. Ген мРНК-пол. локализован в ядре, после трансляции молекулы фермента импортируются в митохондрии. МРНК-пол. дрожжей – это фермент, состоящий из одной субъединицы с молекулярной массой 145 кДа. Изучение нуклеотидной последовательности гена мРНК-пол. показало, что это открытая рамка считывания, не несет интронов и не имеет гомологии ни с одной из известных субъединиц мультисубъединичных РНК-пол. эубактерий и эукариот. Гомология прослеживается с субъединицами РНК-пол. нечетных бактериофагов T3 и T7. Нечетные фаги имеют собственный транскрипционный аппарат – односубъединичный фермент РНК-пол. Четные фаги для транскрипции используют «транскрипционную машину» клетки-хозяина. М РНК-пол. дрожжей хорошо изучена. Это полипептид, состоящий из 1350 аминокислотных остатков. С-концевой домен включает почти 2/3 молекулы мРНК-пол. В С-терминальном домене расположены 8 высококонсервативных аминокислотных последовательностей, которые участвуют в селекциях промотора и инициации транскрипции, а также организации активного центра фермента. N-концевой домен необходим для поддержания стабильности митохондриального генома, т.к. мРНК-пол. обеспечивает координацию транскрипции и репликации митохондриальной ДНК, именно она осуществляет синтез РНК-праймеров при репликации.

3.5.3. Промотор мРНК-полимеразы. Промотор, который узнает мРНК-пол. дрожжей отличается простотой, локализован непосредственно у сайта инициации транскрипции, ТАТА-богат, но это не каноническая ТАТА-последовательность. Промоторы млекопитающих неодинаковы у разных видов. Это сегменты ДНК длиной 40 п.н. или менее, которые находятся выше и ниже точки старта инициации.

3.5.4. Эволюция РНК-полимераз. Подводя итоги, следует отметить, что одну и ту же функцию и одну и ту же ферментативную реакцию способны осуществлять белки с различной структурой. Конечно, РНК-полимеразы простого строения транскрибируют ограниченный набор генов или небольшие части генома, как в случае синтеза РНК-праймеров для фрагментов Оказаки. Промоторы, которые эти ферменты узнают, также просты. Много субъединичные РНК-полимеразы селективируют разные промоторные последовательности: ТАТА-содержащие и ТАТА-несодержащие, прерывистые, АТ-богатые и ГЦ-богатые, внутригенной и внегенной локализации. Они реагируют на вмешательство различных регуляторов, а также изменяют специфичность узнавания ДНК - последовательностей под действием различных белковых эффекторов. Отсюда следует, что у живых организмов для

реализации обширной программы, заложенной в геноме, возникает необходимость в РНК-полимеразах с усложненной структурой. Можно наблюдать иерархию в сложности строения РНК-полимераз, которая достигает верхнего предела у ферментов эукариот.

Относительно эволюционного подхода, то по мнению известного российского биолога Р. Хесина односубъединичные РНК-пол. митохондриальные и нечетных фагов, а также ДНК-полимеразы, можно рассматривать как предшественники сложных мультисубъединичных ферментов.

Но существуют и другие представления об эволюции ферментов транскрипции. Эти представления предполагают деградацию мультисубъединичных ферментов до односубъединичных.

Все известные ДНК-зависимые РНК-пол. можно условно рассматривать как два семейства: мультисубъединичные ферменты, которые несут гомологию по аминокислотным последовательностям, входящих в их состав полипептидов; второе семейство – односубъединичные РНК-полимеразы, ДНК-пол. I и обратная транскриптаза - неродственные мультисубъединичным ферментам по первичной структуре.

Несмотря на отсутствие строгого подобия между этими семействами, существенные элементы транскрипционного цикла остаются консервативными: узнавание промоторной последовательности, формирование закрытого и открытого транскрипционных комплексов, формирование фосфодиэфирной связи и существование на первых шагах транскрипции ДНК-РНК дуплекса или гибрида не менее 8-9 п.н. при переходе от инициации к элонгации.

Глава 4 Хроматин

4.1. Что такое хроматин? Это сложная система веществ, из которой построены хромосомы. Система состоит из ДНК, гистонов и негистоновых белков.

Соотношение ДНК:белок равняется приблизительно 1:1. Основная масса белков хроматина - это гистоны, основные, высоко консервативные белки. Все гистоны подразделяют на пять классов: H1, H2A, H2B, H3 и H4. Это небольшие белки, размер полипептидных цепей которых колеблется от 220 (H1) до 102 (H4) аминокислотных остатков. Гистон H1 сильно обогащен остатками лизина, гистоны H2A и H2B умеренно богаты лизином, H3 и H4 обогащены остатками аргинина. В каждом классе гистонов различают субтипы, отличающиеся по перичной структуре, кроме гистона H4. Особенно это известно для гистона H1 млекопитающих. В этом классе гистонов различают семь субтипов: H1.1, H1.2, H1.3, H1.4, H1.5, H1_o и H1t.

Важным результатом взаимодействия ДНК с гистонами является ее компактизация. Компактизация происходит неравномерно, различают эухроматин, который менее компактизован, и гетерохроматин, который компактизован сильнее. В эухроматине локализованы активно экспрессирующиеся гены. Гетерохроматин считается инертным в плане экспрессии, локализованных в нем генов, но полная инертность гетерохроматина сейчас оспаривается. В его составе находят активно экспрессирующиеся гены. Гетерохроматизацию или переход хроматина в более компактизованное состояние связывают с подавлением экспрессии генов.

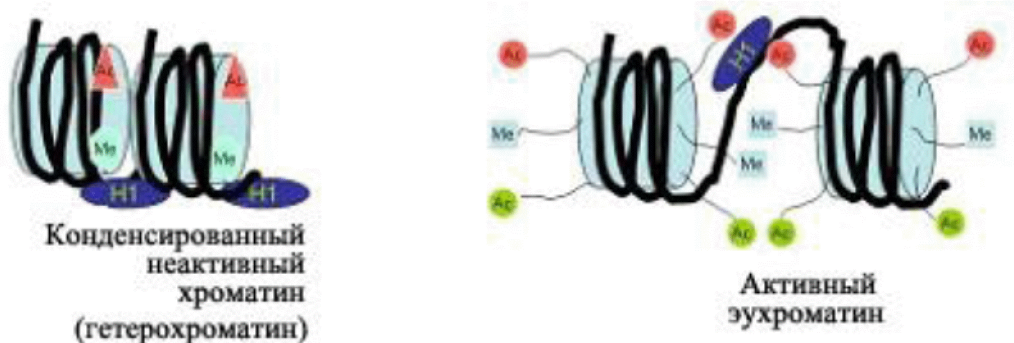


Рис.

4.1.1. Структурная организация хроматина и хромосом эукариот.

В структуре хроматина различают три уровня организации:

1) **нуклеосомная фибрилла**. Это регулярная структура, которую наблюдают в хроматине при низкой, ниже физиологической, ионной силе и в присутствии двухвалентных катионов. Это протяженные фибриллы, диаметром около 10 нм, которые в электронном микроскопе выглядят как "бусины на нитке". Эти бусины или нуклеосомы расположены довольно регулярно на расстоянии 10-20 нм друг от друга. По данным рентгено-структурного анализа была построена модель нуклеосомы (модель Круга) как фрагмента ДНК размером около 146 пар оснований (п.о.) в В-форме, намотанный вокруг октамера гистонов H2A, H2B, H3 и H4, каждый из которых представлен дважды. В центральной части нуклеосомы расположены гистоны H3 и H4, на периферии H2A и H2B (рис.). Это нуклеосомная "коровая" частица. Коровые частицы отделены друг от друга линкерной ДНК. Именно с линкерной ДНК связан гистон H1. Общая длина ДНК, организованной в полную нуклеосомную частицу в хроматине животных, составляет около 200₋+15 п.о. Но это усредненное значение, т.к. размер ДНК в

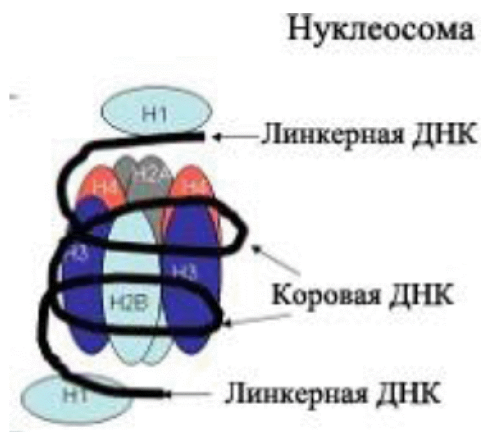


Рис. Структура нуклеосомы.

нуклеосоме может колебаться довольно существенно.

2) **соленоид или нуклеомеры**. Это второй уровень организации хроматина. При повышении ионной силы в присутствии гистона H1, который является конденсирующим агентом, в хроматине происходит структурный переход. В результате образуется равномерная фибрилла диаметром 30 нм, нуклеосомы в ней расположены вплотную друг к другу. Считается, что именно такая структура на этом уровне конденсации преобладает в хроматине *in vivo*. Этот уровень организации хроматина получил название соленоида, нуклеомеры или супербидов. Согласно модели Клуга на один шаг соленоида приходится не менее 6 нуклеосом, т.е. исходная длина 10 нм фибриллы уменьшается в 6 раз. Это достаточно упрощенная модель второго уровня укладки хроматина - симметрично построенный соленоид, который состоит из нуклеомеров, частиц диаметром 30 нм. Симметрия соленоида нарушается при взаимодействии с негистоновыми белками.

3) **петельно-доменный уровень компактизации хроматиновой фибриллы**. В интерфазных ядрах нуклеосомные фибриллы, упакованные в соленоид, содержащий нуклеомеры, организованы в виде топологически независимых петель, длина которых в среднем составляет около 50-100 тысяч п.о. Это следующий уровень укладки - хромомерный. Таким образом петли - это хромомеры. С помощью электронного микроскопа было обнаружено, что нити хроматина в хромомерах имеют дополнительную специфическую укладку в виде розет, собранных у основания. От основания отходят еще и малые петли размером около 5 тысяч п.о. Образование таких розеток становится возможным благодаря тому, что в хромомерах присутствуют последовательности ДНК, которые взаимодействуют с ядерным матриксом или скафолдом. Это сетчатая структура, образованная внутри интерфазных ядер РНК и белками. Участки ДНК, которые взаимодействуют с ядерным матриксом, получили название MAR (matrix associated region) или SAR (scaffold associated region), чаще их обозначают MAR/SAR последовательности. Они часто располагаются в

непосредственной близости от генов класса II. Известно, что активно транскрибируемые гены организованы в небольшие петли, а молчащие гены - в длинные петли.

MAR/SAR последовательности можно описать следующими общими свойствами:

- их длина составляет 300-1000 п.о., все содержат сайты взаимодействия с белками и АТ-богаты;
- обладают способностью обратимо связываться с ядерным матриксом метафазных хромосом и локализованы исключительно в некодирующих последовательностях генома, реже в интронах;
- расстояния между MAR/SAR последовательностями может составлять от 3 до 112 тысяч п.о., и они фланкируют один или несколько активно экспрессирующихся генов;

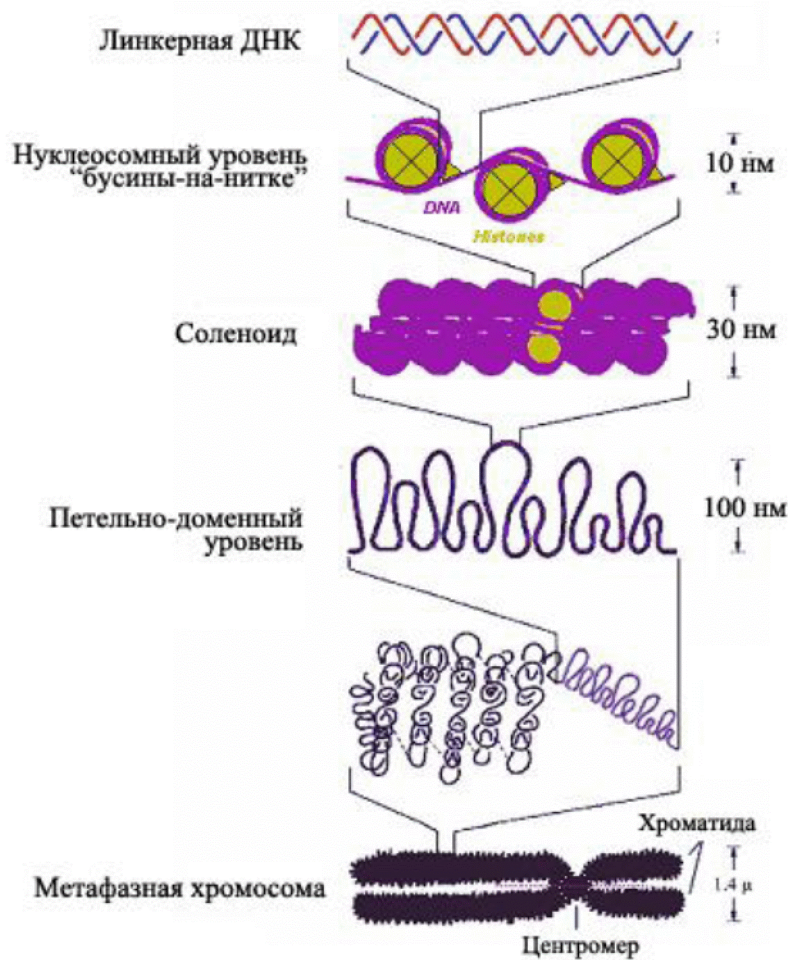


Рис. Уровни организации хроматина.

- могут быть потенциальными сайтами инициации репликации;
- идентифицируются рядом с энхасероподобными регуляторными элементами.

Все это указывает на их несомненную функциональную роль. Одна из функций MAR/SAR последовательностей - пространственное разграничение функциональных доменов хроматина в интерфазных ядрах эукариот.

В некоторых типах клеток MAR/SAR последовательности могут выполнять роль инсуляторов (insulate - изолировать), т.е. последовательностей, которые пространственно разделяют функционально важные сайты. Например, могут разделять энхансер и промотор, результатом чего является подавление экспрессии гена. Такая их роль не является конститутивной, а зависит от типа клеток и стадии развития организма. Примером может служить модельный эксперимент, выполненный на трансгенных мышах. В клетках эмбрионов мышей MAR/SAR последовательности гена β -интерферона человека фланкируют ген теплового шока БТШ70 и функционируют как инсуляторы. Но в дифференцирующихся тканях новорожденных и взрослых мышей эти последовательности как инсуляторы не функционируют. Вероятно, топологические домены хромосом, выделяемые MAR/SAR последовательностями, не являются статическими образованиями, а могут изменяться в процессе индивидуального развития организма.

4.1.2. Негистоновые белки хроматина. Негистоновые белки - это кислые белки, которые присутствуют в хроматине и оказывают значительное влияние на его структуру и функционирование генов.

Это в первую очередь HMG-белки (high mobility group), название которых отражает их высокую подвижность при электрофорезе в полиакриламидном геле. Среди HMG-белков выделяют три наиболее существенные группы: 14/17, 1/2 и 1/Y.

HMG 14/17- белки небольшой молекулярной массы, около 12 кДа, полипептидная цепь которых несет большой локальный заряд при физиологических значениях pH. N-терминальная часть этих белков обладает основными свойствами, C-терминальная - кислыми. Коровые частицы нуклеосом располагают двумя молекулами HMG 14/17, которые соединяют на поверхности нуклеосомы цепи ДНК двух соседних витков. Белки HMG 14/17 могут замещать гистон H1 в активно транскрибируемых генах. Почти 10% коровых частиц *in vivo* связаны с белками HMG 14/17.

HMG 1/2 - это более крупные белки с молекулярной массой 25-30 кДа. Они специфически связывают одноцепочечные участки ДНК, образующие крестообразные структуры в сайтах, содержащих палиндромные последовательности. Это указывает на их возможное участие в процессах рекомбинации, репликации и репарации.

HMG-1/Y взаимодействуют преимущественно с АТ-богатыми участками ДНК, что характерно и для гисноа H1. Вероятно, *in vivo* имеет место конкуренция за промоторы в области начала репликации ДНК.

Помимо группы HMG-белков в хроматине присутствует большое количество белков, выполняющих различные функции: внутриядерные ферменты и

различные факторы.

ДНК-топоизомеразы и их роль в поддержании структуры и

функционирования хроматина. Уровень суперскрученности ДНК, который может изменяться в процессах репликации, транскрипции, гомологичной рекомбинации и перестроек хроматина, контролируют ДНК-топоизомеразы. Эти ферменты релаксируют суперскрученные напряженности цепи ДНК посредством внесения одно или двухцепочечных разрывов и последующим лигированием этих разрывов.

ДНК-топоизомеразы I -это мономерные белки, осуществляют одноцепочечные разрывы и релаксируют ДНК без затрат дополнительной энергии.

Для внесения одноцепочечных разрывов ДНК-топоизомеразы I используют остаток тирозина, который осуществляет нуклеофильную атаку фосфатной группы ДНК с образованием фосфотирозина. В результате фермент оказывается ковалентно связанным по 3'- и 5'- концам ДНК в одноцепочечном разрыве.

Образование такой ковалентной связи исключает необходимость затраты энергии при восстановлении разрыва.

ДНК-топоизомеразы II функционируют в виде димеров, расщепляют обе цепи ДНК, для чего используют энергию гидролиза АТФ. Лигирование осуществляется после релаксации цепей ДНК через разрыв.

В ядрах эукариот ДНК-топоизомераза II содержится в больших количествах. In vivo известно два сайта на хромосомах, по которым происходит расщепление с помощью ДНК-топоизомеразы II. Это активно транскрибируемые участки хроматина, которые чувствительны к нуклеазам. Второй тип сайтов - MAR/SAR-последовательности. Таким образом, ДНК-топоизомераза II является одним из ключевых факторов для разрешения топологических проблем, возникающих при транскрипции, репликации и т.д. и связанных с этими процессами изменениями структуры хроматина.

По современным представлениям структура генома высоко упорядочена.

I уровень такой упорядоченности - это последовательность генов и других нуклеотидных последовательностей - таксономический признак.

II уровень упорядоченности, не менее важный, это распределение генома в объеме интерфазных ядер. После завершения митоза хроматин находится в деконденсированном состоянии, т.е. не видны структурно оформленные хромосомы. Но при этом они имеют высокоупорядоченную укладку и неперемешаны между собой и занимают вполне определенные

микрокомпартменты. Определенные участки хромосом маркированы специфическими нуклеотидными последовательностями, в частности MAR/SAR, которые обеспечивают прикрепление хромосом к ядерному матриксу и ядерной мембране. Эти контакты деконденсированных хромосом с ядерным матриксом и ядерной мембраной необходимы для реализации генетической информации при экспрессии генов и для эффективной конденсации хромосом и расхождения их в митозе и мейозе.

Глава 5. Хроматин и транскрипция

В клетках эукариот матрицей в транскрипции является ДНК в составе хроматина. Так как хроматин - это высоко организованная структура, то естественно предположить, что хроматин является серьезным препятствием для формирования иницирующего комплекса и его перемещения вдоль матрицы ДНК. *In vivo* эти препятствия успешно преодолеваются, и, более того, наличие нуклеосом предотвращает неспецифическую транскрипцию инактивированных генов.

5.1. Инициация транскрипции в хроматине. Существует несколько моделей инициации транскрипции на хроматине.

5.1.1. Инициация промоторов конститутивных генов. Для формирования иницирующего функционально активного комплекса, включающего РНК-пол. и транскрипционные факторы, необходима деструкция какой-то части хроматина в районах промотора и регуляторных последовательностей. Так как нуклеосомная структура несовместима с активацией транскрипции, необходимо:

- 1) образование достаточно протяженных участков ДНК либо свободных от нуклеосом, либо нуклеосомы должны быть деструктурированы;
- 2) индукция активации транскрипции должна вызывать разрушение нуклеосом.

Первый механизм работает в случае конститутивной транскрипции, т.е. на промоторах генов, которые экспрессируются в течение длительного времени либо в течение всей жизни клетки. Обеспечивают конститутивную транскрипцию белковые факторы, которые могут разрушать нуклеосомную структуру хроматина или препятствовать ее образованию, например при репликации ДНК. Формирование высоко упорядоченной структуры хроматина в течение клеточного цикла имеет промежуточные стадии. Сборка нуклеосом в процессе репликации идет в два этапа. Сначала с ДНК связывается тетрамер H3/H4. После этого к созревающей нуклеосоме доставляются гистоны H2a и H2b, чем и завершается построение коровых частиц. Такая двустадийность подтверждается тем фактом, что вновь синтезируемая эукариотическая ДНК отличается повышенной чувствительностью к нуклеазам, что может объясняться ее более "открытой", недостаточно конденсированной структурой по сравнению со структурой интерфазного, т.е. сформированного хроматина. Стадия образования тетрамера H3/H4 на ДНК не исключает доступности определенных участков ДНК для транскрипционных факторов. Зрелые нуклеосомы делают взаимодействие транскрипционных факторов с ДНК невозможным.

Кроме того, незрелый хроматин обеднен гистоном H1, а именно этот гистон стабилизирует нуклеосомы и структуры высшего порядка в хроматине. Между созреванием нуклеосомной структуры хроматина и его активацией могут существовать конкурентные взаимоотношения, хотя такая конкуренция скорее

всего детерминирована типом клеток и уровнем индивидуального развития организма.

5.1.2. Инициация транскрипции индуцированных генов. Второй механизм - разрушение нуклеосом, характерен для генов теплового шока. Осуществляют его транскрипционные факторы и специфический фактор GAGA, они поддерживают структуру хроматина в состоянии, способном ответить на индукцию неблагоприятным воздействием или фактором. До наступления индукции нуклеосомы присутствуют на промоторах, но во время индукции, например тепловым шоком, транскрипционные факторы связываются с промоторами генов домашнего хозяйства и изменяют структуру нуклеосом в соответствующих локусах ДНК. Такой же механизм реализуется при активации генов, находящихся под контролем глюкокортикоидных гормонов.

5.1.3. Ремоделирование хроматина. Механизмы действия белков, активирующих транскрипцию в хроматине, стал проясняться сравнительно недавно. Но эти исследования очень бурно развивались, и сейчас эти механизмы достаточно полно описаны.

Рассмотрим два из них.

5.1.3.1 .Ацетилирование гистонов. Впервые эффект зависимости активации транскрипции и гистоновой ацетилтрансферазной активности был показан на простейшем организме *Tetrahymena* (инфузория). Ацетилирование гистонов в составе нуклеосом происходит по эпсилон-аминогруппе лизина в N-терминальной области гистонов, которые расположены на поверхности коровой частицы. Ацетилирование приводит к уменьшению суммарного положительного заряда коровой частицы и ослабляет взаимодействие гистонов с ДНК. Общая структурная целостность нуклеосомы при этом может сохраниться, но возможны конформационные изменения, приводящие к нарушению образования структур более высокого порядка и, соответственно, депрессии транскрипции. Повышенный уровень ацетилирования гистонов связан с активно транскрибируемыми участками хроматина, а гетерохроматизированные участки - гипoaцетилированы.

Ферменты, ацетилирующие гистоны, охарактеризованы. Это гистоновые ацетилтрансферазы или НАТ. Их подразделяют на два семейства НАТ *A* и НАТ *B*. НАТ *A* локализована в ядре и ацетилюет гистоны в составе коровых частиц. НАТ *B* локализована в цитоплазме и ацетилюет свободные гистоны H3 и H4, что важно для их транспорта в ядро.

Сбалансированный уровень ацетилирования гистонов поддерживается координированным действием гистоновых ацетилтрансфераз и гистоновых деацетилаз (HdAc). Гистоновые деацетилазы подразделяют на два семейства Hd*A* и Hd*B*. Hd*A* деацетилюет все четыре коровых гистона. В составе Hd*B* содержится субъединица Rpd3, функция которой необходима не только для полного подавления экспрессии, но и для полной активации большого числа генов, т.е. имеет место достаточно тонкая регуляция активной транскрипции

генов.

Помимо собственно ферментов гистоновых ацетилтрансфераз и деацетилаз, НАТ и HdAc активностью обладают ряд транскрипционных факторов, коактиваторов и корепрессоров. Субъединица TAF₁₂₅₀ транскрипционного фактора TFIID обладает собственной НАТ активностью. Слабой НАТ активностью обладает базальный транскрипционный фактор TFIIB. Различные коактиваторы обладают НАТ активностью, которая селективно ацетилирует гистон H4, другие - гистон H3, некоторые способны ацетилировать все четыре коровых гистона.

Ацетилирование коровых гистонов происходит по эписон аминогруппе лизина, что приводит к снижению общего положительного заряда гистона и ослаблению жесткого взаимодействия гистонов с ДНК в составе коровой нуклеосомной частицы.

Ацетилтрансферазная активность впервые была идентифицирована в составе уже известных транскрипционных факторов, например, TAF₁₂₅₀. Как известно, это ассоциированный компонент TFIID, обладающий целым рядом ферментативных активностей: ацетилтрансферазной, протеин киназной, гистоновой убиквитин-конъюгирующей. Помимо этого эти модифицирующие активности проявляются большими белковыми комплексами, которые включают много субъединиц. Эти субъединицы обладают дополнительными функциями, например, способны взаимодействовать с ДНК-связывающими активаторами, мишенью которым служат специфические промоторы, привлекать другие базальные факторы, узнавать специфические мишени для модификаций, таких как остатки лизина, специфические гистоны и нуклеосомы. Реализация этих функций приводит к тому, что модификации гистонов и деструкция структуры хроматина происходят в нужном месте и в нужное время. Эти комплексы функционируют в тесном контакте с другими крупными комплексами, которые могут вызывать ремоделирование нуклеосомной структуры другими, отличных от ацетилирования, механизмами.

Рис.

5.1.3.2. Специализированные белки, изменяющие структуру хроматина, АТФ-зависимое ремоделирование. В настоящее время выделены и охарактеризованы два специфических белковых комплекса, обеспечивающих изменение структуры нуклеосом во время транскрипции. Комплекс Swi/Snf был впервые обнаружен в клетках дрожжей генетическими методами как позитивный регулятор транскрипции большого числа генов, экспрессия которых контролируется разными механизмами. Похожий по механизму действия комплекс NURF (nucleosome remodeling factor) был выделен из эмбрионов дрозофилы.

Оба комплекса мультисубъединичны. В составе Swi/Snf идентифицировано одиннадцать субъединиц, одна из них Snf2 обладает АТФ-

азной активностью, зависимой от присутствия ДНК. В составе комплекса NURF присутствуют четыре полипептида, самый крупный из них с молекулярной массой 215 кДа, обладает АТФазной активностью, зависимой от нуклеосомной структуры. Оба комплекса влияют на контакты между гистонами и ДНК. Однако для них характерно отсутствие общих компонентов, и они различаются по механизмам стимуляции АТФаз. Такие различия между комплексами позволяют предполагать, что они действуют на разные субстраты и могут функционировать независимо друг от друга.

Первые указания на то, что факторы Swi/Snf участвуют в изменении структуры хроматина, были получены генетическими методами. Индивидуальные мутации *SWI* или *SNF*, ингибирующие экспрессию ряда генов, супрессировались мутациями, повышающими внутриклеточный уровень гистонов. Комплексы Swi/Snf, выделенные из клеток дрожжей и человека, содержали, по крайней мере, десять различных белков.

Недавно комплекс Swi/Snf удалось выделить в составе холофермента РНК-полимеразы II, так что не исключено, что этот комплекс является неотъемлемой частью транскрибирующего фермента и присутствует в инициационных комплексах всех промоторов.

Белковый комплекс NURF впервые был описан как кофактор уже упоминавшегося выше фактора транскрипции GAGA, который необходим для активации промотора гена теплового шока дрозоды *BTШ70*. *In vivo* в этом промоторе была обнаружена последовательность длиной в 200–300 нуклеотидов с повышенной чувствительностью к ДНКазе, в состав которой входят ТАТА-бокс и сайты связывания факторов GAGA и HSF (heat shock factor – фактор теплового шока). Поскольку фактор GAGA сам по себе не обладает АТФазной активностью, в результате очистки белков с этой активностью и был идентифицирован комплекс NURF. Этот комплекс может разрушать нуклеосомы или изменять их положение в промоторе гена *BTШ70* и в отсутствие фактора GAGA. Однако присутствие NURF стимулирует связывание этого фактора со своим сайтом на промоторе, что, в свою очередь, ускоряет перестройку нуклеосом в этом участке гена. АТФазная активность NURF не стимулируется свободной ДНК или гистонами, однако усиливается в присутствии интактных нуклеосом, что отличает этот фермент от АТФазы Swi/Snf.

Специфичность функционирования АТР-зависимых белковых комплексов, изменяющих структуру нуклеосом, предполагает их точную доставку в нужные места хроматина. Как и в уже рассмотренном случае ацетилаз и деацетилаз гистонов, специфический характер взаимодействия комплексов с ДНК обеспечивается дополнительными белками. Как уже упоминалось комплекс Swi/Snf входит в состав холофермента РНК-полимеразы II, что обеспечивает его доставку к соответствующим промоторным последовательностям. Кроме того, этот комплекс может взаимодействовать с рецептором глюкокортикоидов и в

таким образом оказывать влияние на структуру нуклеосом. Формирование таких комплексов, по-видимому, является одним из существенных моментов активации рецепторов глюкокортикоидных гормонов.

Вопросы для повторения: