МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ

ФЕДЕРАЦИИ

ФГОУ ВПО «ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт леса

Кафедра биологии

Реферат

Тема: Экспрессия генов

Выполнил: студент 2 курса ИЛ группы 8217 Варламов С.

Проверил: Красавина А.А.

Благовещенск 2009 г.

**План**

Введение

1. Транскрипция.

1.1 ДНК-зависимые РНК-полимеразы

1. Регуляция экспрессии генов на уровне транскрипции у прокариот
2. Трансляция у эукариот

Заключение

Список использованной литературы.

**Введение**

Конечным результатом экспрессии генов, кодирующих белки или нуклеиновые кислоты, должно быть образование этих полноценных в функциональном отношении макромолекул, сопровождаемое формированием определенного фенотипа организма. В соответствии с основным постулатом молекулярной биологии генетическая информация в процессе ее реализации передается однонаправленно от нуклеиновых кислот к белкам. При этом реализуется следующая обобщенная схема: ДНК ↔ РНК → белок, которая подчеркивает, что в ряде специальных случаев возможна передача генетической информации от РНК к ДНК с использованием механизма обратной транскрипции. До сих пор не обнаружена передача генетической информации от белков к нуклеиновым кислотам. На первом этапе экспрессии генов происходит переписывание генетической информации, заключенной в генах, на матричные (информационные) РНК (мРНК – messenger RNA, mRNA), которые являются местом промежуточного хранения этой информации при ее реализации. В некоторых случаях уже сами РНК являются конечным результатом экспрессии генов, и после ряда ферментативных модификаций они непосредственно используются в клеточных процессах. Это относится, прежде всего, к рибосомным и транспортным РНК (рРНК и тРНК), которые вместе составляют основную часть суммарной РНК клетки. К таким РНК принадлежат и малые ядерные РНК (мяРНК), участвующие в процессинге предшественников мРНК эукариот, РНК, входящие в состав ферментов, и природные антисмысловые РНК.

Синтез РНК происходит в результате сложной последовательности биохимических реакций, называемой транскрипцией. Появление русифицированного термина "мРНК" связано с тем, что на втором этапе реализации генетической информации, называемом трансляцией, последовательность нуклеотидов мРНК согласно генетическому коду однозначно определяет последовательность аминокислотных остатков синтезируемых белков, т.е. является матрицей, в соответствии с последовательностями нуклеотидов которой происходит соединение аминокислотных остатков друг с другом в полипептидных цепях белков во время их биосинтеза. Таким образом, экспрессию генов определяют два глобальных молекулярно-генетических механизма: транскрипция генов и трансляция синтезированных мРНК рибосомами, которая завершается образованием полипептидных цепей, кодируемых генами. Однако процесс экспрессии генов не ограничивается их транскрипцией и трансляцией. Существенными моментами экспрессии генов являются посттранскрипционные и посттрансляционные модификации мРНК и белков, которые включают процессинг их предшественников (удаление избыточных последовательностей и другие ковалентные модификации последовательностей РНК и белков). Посттранскрипционные модификации предшественников мРНК обеспечивают подготовку мРНК к эффективной трансляции рибосомами и определяют продолжительность ее существования в цитоплазме. Посттрансляционные модификации белков также необходимы для их полноценного функционирования.

**1. Транскрипция**

В процессе транскрипции генов происходит биосинтез молекул РНК, комплементарных одной из цепей матричной ДНК, сопровождаемый полимеризацией четырех рибонуклеозидтрифосфатов (ATP, GTP, CTP и UTP) с образованием 3'–5'-фосфодиэфирных связей и освобождением неорганического пирофосфата. Основными ферментами, осуществляющими транскрипцию, являются ДНК-зависимые РНК-полимеразы, которые функционируют с участием многочисленных факторов транскрипции – регуляторных белков, осуществляющих высокоспецифические белок–белковые и белково–нуклеиновые взаимодействия. Взаимодействия факторов транскрипции с регуляторными нуклеотидными последовательностями генов, друг с другом и с молекулами РНК-полимеразы необходимы для правильного узнавания транскрипционным комплексом регуляторных последовательностей в составе генов и приводят к повышению или понижению уровня транскрипции соответствующих последовательностей как ответ клеток на внешние или внутренние регуляторные сигналы. Благодаря факторам транскрипции и регуляторным последовательностям генов становится возможным специфический синтез РНК и осуществляется регуляция экспрессии генов на уровне транскрипции.

**1.1 ДНК-зависимые РНК-полимеразы**

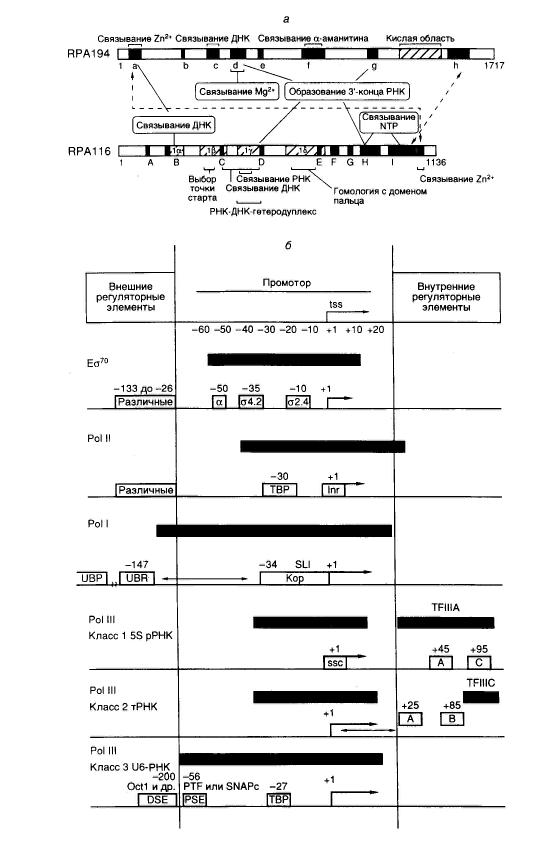
В соответствии с субъединичным составом РНК-полимеразы подразделяются на две группы. К первой группе относятся ферменты, состоящие только из одной субъединицы, среди них – РНК-полимеразы митохондрий и небольших бактериофагов, например SP6 и T7. Эти РНК- полимеразы транскрибируют небольшое число генов простых геномов, и для их функционирования не требуется сложных регуляторных воздействий. Вторую группу составляют сложно устроенные РНК-полимеразы бактерий и эукариот, которые представляют собой многосубъединичные белковые комплексы, транскрибирующие сотни и тысячи различных генов. Такие ферменты во время своего функционирования реагируют на многочисленные регуляторные сигналы, поступающие от регуляторных последовательностей нуклеотидов и белковых факторов. Не исключено, что общепринятое разделение РНК-полимераз по структурно-функциональному признаку является упрощением. Имеются данные, указывающие на то, что и просто устроенные фаговые РНК- полимеразы функционируют in vivo в комплексе с другими белками бактериальных клеток, которые могут существенно изменять их ферментативные свойства.

РНК-полимераза E. coli. Наиболее изученной из бактериальных ферментов является РНК-полимераза E. coli. Она осуществляет транскрипцию всех бактериальных генов. Фермент состоит из пяти субъединиц: β‘- (молекулярная масса 165 кДа), β- (155 кДа), двух α- (35 кДа каждая) и σ- (чаще всего 70 кДа (σ70)). Комплекс из четырех субъединиц ββ‘αα, часто обозначаемый буквой Е (enzyme), образует так называемый минимальный (кор-) фермент E. coli, который способен осуществлять все основные этапы транскрипции, за исключением правильной инициации (см. ниже). Для инициации транскрипции требуется присутствие определенной регуляторной σ-субъединицы, необходимой для распознавания РНК-полимеразой промоторов бактериальных генов, определяющей специфичность взаимодействия РНК-полимеразы с промоторами и, возможно, последующую изомеризацию комплекса РНК-полимераза–промотор, необходимую для начала синтеза РНК.

Полный фермент, включающий σ70-субъединицу, часто называют холоферментом и обозначают Еσ70. РНК-полимераза Еσ70 способна транскрибировать большинство (но не все) генов E. coli. В частности, для транскрипции генов теплового шока, оперонов gln или nif требуется включение в состав полного фермента другой регуляторной субъединицы – σ54 (молекулярная масса 54 кДа) вместо σ70 с образованием фермента Eσ54. В настоящее время описано до десяти различных σ-факторов, объединение которых с минимальным ферментом дает возможность образующимся холоферментам узнавать разные промоторы. Все четыре субъединицы кор- фермента обеспечивают контакт РНК-полимеразы с промоторами. При этом β‘-субъединица участвует в связывании фермента с ДНК, β-субъединица образует каталитический активный центр, а α-субъединицы обеспечивают правильное взаимодействие фермента с промоторами. Утверждения, заключенные в двух последних предложениях, нужно воспринимать с известной долей скепсиса. Данные такого рода обычно получают с использованием ферментов, у которых под действием мутаций изменены конкретные субъединицы, и если, например, мутация в гене α-субъединицы нарушает связывание РНК-полимеразы с ДНК, делаются соответствующие выводы. Такая методология (впрочем, одна из самых плодотворных среди существующих), к сожалению, напоминает известный способ локализации органа слуха у тараканов путем обрывания ног – поскольку тараканы без ног не реагируют на звуки убеганием, делается вывод, что они воспринимают звуковые сигналы ногами. Любая мутантная субъединица в составе олигомерного фермента может изменять его общую конформацию и придавать ферменту самые неожиданные свойства. Более прямым методом определения мест контакта макромолекул при белок– белковых и белково–нуклеиновых взаимодействиях является метод поперечных сшивок с использованием бифункциональных химических агентов. Такие химические соединения образуют ковалентные связи (поперечные сшивки) между близкорасположенными реакционноспособными группами. Однако сам факт наличия контакта между макромолекулами еще нельзя однозначно интерпретировать в пользу его функциональной значимости.В отличие от эубактерий, которые, как уже упоминалось выше, при транскрипции различных наборов генов используют разные σ-факторы, эукариоты для достижения тех же целей прибегают к другой стратегии –специализации молекул РНК-полимераз. В ядрах эукариот обнаружены по меньшей мере три специализированные формы РНК-полимераз. РНК-полимераза I осуществляет транскрипцию генов рибосомных РНК (рРНК), синтезируя в ядрышках предшественники 18S и 28S рРНК; РНК-полимераза II участвует в образовании мРНК, а РНК-полимераза III транскрибирует гены транспортных (тРНК), 5S и других низкомолекулярных РНК. Каждый из этих ферментов представляет собой многосубъединичный белковый комплекс, состоящий из двух больших (120–220 кДа) и 5–13 малых (10–100 кДа) субъединиц. Несколько малых субъединиц являются общими для разных форм РНК-полимераз. Большие же субъединицы гомологичны своими аминокислотными последовательностями участкам β- и β’-субъединиц эубактерий, что, возможно, отражает фундаментальное сходство в структуре и функционировании активных центров этих ферментов. Более того, аминокислотные последовательности α-субъединиц бактериальных РНК- полимераз, необходимые для их взаимодействия с большими субъединицами минимального фермента, имеют гомологи в третьей по размеру большой субъединице РНК-полимеразы II, а также в субъединице, общей у РНК-полимераз I и III. Несколько небольших субъединиц эукариотических РНК-полимераз, не имеющих аналогов у бактериальных ферментов, являются общими для всех РНК-полимераз, что может указывать на их одинаковые функции в транскрипции, осуществляемой соответствующими ферментами, и на их возможное участие в координации функционирования разных РНК-полимераз.

РНК-полимераза I эукариот (Pol I). Как и большинство других высокомолекулярных полипептидов, большие субъединицы РНК-полимераз содержат хорошо различимые структурные и функциональные домены:дискретные участки полипептидных цепей, несущие конкретную функциональную нагрузку. Клонирование генов соответствующих субъединиц и определение их первичной структуры позволили выявить эволюционно консервативные участки полипептидных цепей и провести мутационный анализ функциональной значимости их отдельных доменов. Для этой цели в

Рис. I.4. Структурные и функциональные домены больших субъединиц эукариотической РНК-полимеразы I (а) и особенности структуры промоторов эубактерий и эукариот (б)



а – Полипептидные цепи двух больших субъединиц изображены в виде горизонтальных прямоугольников, в которых черным цветом и латинскими буквами отмечены участки, консервативные у большинства известных РНК-полимераз. Кислая область и участки Iα-Iδ характерны для РНК-полимераз I. Обозначены зоны полипептидных цепей, формирующие активный центр фермента и необходимые для выполнения соответствующих функций (например связывания Mg2+). Пунктирные стрелки указывают на участки субъединиц, контактирующие друг с другом. Незаштрихованными прямоугольниками обозначены известные структурные элементы промоторов, необходимые для инициации или активации транскрипции. Внутри прямоугольников приведены названия факторов транскрипции, взаимодействующих с соответствующими элементами промоторов, а также названия сайтов или взаимодействующих с ними белков, находящихся над сайтами. Стрелки ↔ обозначают фиксированные расстояния между элементами промоторов, а → – 5′-концевые части элонгируемых транскриптов. Черными прямоугольниками обозначены участки промоторов, защищаемые от действия ДНКазы I или других агентов Eσ70, а также эукариотическими транскрипционными комплексами, обеспечивающими базальный уровень транскрипции. tss – точка инициации транскрипции.

Pol I мышей, которые являются функциональными аналогами β'- и β- субъединиц РНК-полимеразы E. coli. РНК-полимераза I эукариот является большим ферментом, построенным по меньшей мере из 11 субъединиц. Минимальный фермент Pol I содержит два обсуждавшихся выше больших полипептида с молекулярной массой 194 и 116 кДа, которые ассоциированы с несколькими малыми субъединицами (от трех до 14 в зависимости от метода очистки), молекулярные массы которых лежат в пределах 15–60 кДа. Третья по величине субъединица Pol I мышей с молекулярной массой 53 кДа, названная PAF53 (polymerase associated factor 53), играет важную роль в узнавании Pol I своих промоторов и, по-видимому, является структурным и функциональным аналогом белка RPA49 дрожжей. Pol I дрожжей в отсутствие субъединиц RPA49 и RPA35.5 (так называемая Pol I\*) эффективно транскрибирует при низких концентрациях солей\_\_искусственную матрицу poly[d(A-T)], но не нативную двухцепочечную ДНК.

Полагают, что эти субъединицы необходимы для эффективного образования инициационных комплексов.

Используя антитела к отдельным субъединицам Pol I и последующую иммунопреципитацию, установили, что в клетке, по крайней мере, часть Pol I находится в составе больших комплексов, с которыми ассоциированы факторы транскрипции. Пять компонентов такого холофермента Pol I изучены в настоящее время наиболее детально. Мышиный фактор TIF-IB (Pol I-specific transcription initiation factor B), известный также, как фактор D, обеспечивает Pol I селективность в отношении промоторов генов рРНК (рДНК). Аналогичный белок у человека назван hSL1, у крыс – rSL1 и у X. laevis – Rib 1. Взаимодействие фактора TIF-IB/SL1 с промотором рДНК обеспечивает связь холофермента Pol I с промотором и сборку прединициационного комплекса. Фактор TIF-IB/SL1 состоит из четырех субъединиц, одна из которых является основным фактором транскрипции TBP, необходимым для функционирования РНК-полимераз всех трех классов. Три других субъединицы с молекулярными массами 110, 63 и 48 кДа представляют собой разные TBP-ассоциированные факторы TAFI, индивидуально и специфически взаимодействующие с TBP, а также друг с другом, образуя прочный комплекс. В составе комплекса TAFI48 обеспечивает контакт TIF-IB/SL1 с фактором UBF (см. ниже), а TAFI63 и TAFI110 участвуют в распознавании промотора. Факторы TAFI не обнаруживают гомологии с соответствующими факторами TAFII, специфичными в отношении Pol II. Более того, первый из связавшихся с TBP факторов TAFI предотвращает взаимодействие с TBP факторов TAFII (и наоборот), что делает невозможным образование непродуктивных химерных комплексов. Одновременно взаимодействие TAFI48 с TBP изменяет ДНК-связывающие свойства последнего, после чего тот перестает узнавать TATA-бокс – характерный структурный элемент Pol II-промоторов, и, следовательно, теряет способность обеспечивать инициацию транскрипции Pol II. Другой белок, входящий в состав холофермента Pol I, UBF (upstream binding factor) высоко консервативен у разных видов животных. UBF является членом семейства факторов транскрипции, содержащих ДНК-связывающий\_\_HMG-домен (high mobility group domain) – основную последовательность из 80 аминокислот. С помощью ЯМР-спектроскопии установлено, что полипептидная цепь HMG-домена организована в три α-спирали, расположенные в виде буквы L, которые формируют три ДНК-связывающих поверхности с внешней стороны L. В клетке UBF присутствуют в двух формах – UBF1 и UBF2 с молекулярными массами 97 и 95 кДа, которые образуются в результате альтернативного сплайсинга. UBF1 содержит пять HMG-доменов, фланкированных N-концевым димеризующим мотивом и короткой кислой C-концевой последовательностью. Интересно, что соседние HMG-домены одного и того же UBF обладают гораздо меньшей гомологией, чем соответствующие домены UBF разных видов (например шпорцевой лягушки и человека). Полагают, что каждый HMG-домен обеспечивает особую, эволюционно консервативную функцию молекулы UBF. Такими функциями могут быть распознавание специфических последовательностей ДНК, создание молекулярных интерфейсов для белок–белковых взаимодействий между Pol I и TIF-IB/SL1, а также различными репрессорами и активаторами транскрипции рДНК. С-Концевая последовательность UBF содержит несколько фосфорилируемых остатков Ser и необходима для активации транскрипции рДНК. Одной из основных характеристик белков, содержащих HMG-бокс, является их способность изгибать молекулу ДНК и прочно связываться с ее крестообразными структурами. Всеми этими свойствами обладает UBF, и они детально исследованы. Белок CPBF (core promoter binding factor), выделенный из асцитных клеток аденокарциномы молочных желез крыс, специфически взаимодействует с коровым участком промотора рДНК. CPBF, прочно взаимодействующий с Pol I, состоит из двух субъединиц USF1 и USF2 с молекулярными массами 44 и 39 кДа соответственно. Гомодимеры USF1 и USF2 являются сильными ингибиторами транскрипции Pol I, тогда как гетеродимеры USF1/USF2 стимулируют транскрипцию in vitro.Полагают, что CPBF участвует в регуляции транскрипции Pol I in vivo. TIF-IA – другой компонент холофермента Pol I, также участвует в регуляции синтеза рРНК этим ферментом. В его отсутствие инициационный комплекс не может образовывать первой фосфодиэфирной связи, а следовательно, и инициировать синтез РНК. TIF-IA освобождается после инициации транскрипции и может вновь входить в состав собирающихся прединициационных комплексов. По этим и ряду других критериев TIF-IA рассматривают в качестве функционального аналога бактериального фактора σ70. TIF-IA является мономерным глобулярным белком с молекулярной массой 70–80 кДа. Активность этого фактора или его внутриклеточное содержание уменьшается при подавлении синтеза белка, истощении сыворотки или дифференцировке клеток и возрастает в ответ на митогенные стимулы, что коррелирует с подавлением или стимуляцией синтеза рРНК. Хроматографически и с помощью иммунопреципитации было установлено, что жизненно важный фактор TIF-IC в растворе ассоциирован с Pol I. Этот фактор необходим как для сборки инициационных комплексов, так и образования первой фосфодиэфирной связи. Его присутствие предотвращает неспецифическую инициацию транскрипции и ее преждевременную терминацию, что проявляется в образовании гомогенных транскриптов правильной длины. По этим критериям фактор TIF-IC рассматривают в качестве функционального аналога TFIIF (RAP30/74) Pol II.

РНК-полимераза II (Pol II). Pol II человека содержит более 10 субъединиц, которые трудно назвать субъединицами в обычном смысле из-за слабой ассоциации друг с другом. Некоторые из них принадлежат к основным факторам транскрипции (GTFs – general transcription factors). Вообще же понятие холофермента Pol II эукариот не является устоявшимся. Лишь недавно в лабораториях Р.Янга и Р.Корнберга было установлено, что некоторые основные факторы транскрипции уже находятся в комплексе с РНК- полимеразой до ее включения в прединициационный комплекс. По мнению Янга, которое становится все более обоснованным, в состав холофермента Pol II дрожжей входят по меньшей мере 14 белков и белковых комплексов, перечисленных в табл. I.3. Среди факторов, которые отличаются от основных факторов транскрипции, но играют особую роль в транскрипции у дрожжей, следует отметить так называемые SRB-белки (suppressor of RNA polymerase B). Последние являются неотъемлемой частью холофермента Pol II и относятся к коактиваторам транскрипции. SRB-Белки идентифицированы с помощью генетических методов при отборе мутаций у дрожжей, которые супрессировали условно-летальные мутации в CTD-домене Pol II (С-концевом домене большой субъединицы РНК-полимеразы II). Такой генетический скрининг привел к открытию девяти генов SRB. С помощью тех же мутантов установлено, что SRB-белки необходимы для осуществления инициации транскрипции РНК-полимеразой in vivo. Вскоре было подтверждено физическое и функциональное взаимодействие между SRB-белками и CTD-доменом Pol II, которые, как оказалось, образуют с РНК-полимеразой прочный комплекс. Транскрипция с участием холофермента Pol II стимулируется активатором GAL4–VP16, что не происходит в присутствии только одних очищенных основных факторов транскрипции и Pol II. На этом основании был сделан вывод, что истинный холофермент Pol II содержит дополнительные компоненты, которые позволяют ему реагировать на действие белков- активаторов транскрипции. Более того, показано, что антитела к CTD-домену вызывают диссоциацию многосубъединичного комплекса, содержащего Pol II, SRB-белки, TFIIF, GAL11/SPT13, SUG1 и еще 10 белков, часть из которых относится к классу белков-коактиваторов транскрипции. Этот комплекс белков получил название медиаторного комплекса. Он оказался необходимым для осуществления функциональной связи между Pol II и белками-активаторами транскрипции. Субъединичное строение РНК-полимераз разного происхождения, вероятно, отражает их функциональную роль в акте транскрипции. Действительно, все РНК-полимеразы простого строения транскрибируют узкоограниченный круг генов или небольшие части генома, что имеет место, например при синтезе РНК-затравок для фрагментов Оказаки в процессе репликации ДНК у бактерий. Промоторы, узнаваемые РНК-полимеразами простого строения, не отличаются разнообразием и обладают простой структурой. Показательно, что при сложном строении генома четных T-фагов, в процессе развития которых происходит многократное переключение транскрипции с одних групп генов на другие, используется сложная РНК- полимераза бактерии-хозяина, а не индуцируется простой фермент, как это имеет место у бактериофага T7. РНК-полимеразы бактерий и эукариот должны, во-первых, узнавать разные промоторы, во-вторых, реагировать на различные белки-регуляторы и, в-третьих, изменять специфичность узнавания последовательностей нуклеотидов матричных ДНК под действием разнообразных белковых эффекторов. Отсюда следует, что у живых организмов, начиная с бактерий, возникает потребность в РНК-полимеразах сложной структуры, способных осуществлять обширную программу реализации генетической информации. Вероятно, поэтому наблюдается иерархия в степени сложности строения указанных ферментов, которая достигает верхнего предела в случае РНК- полимераз эукариот.

Тем не менее, элементарные акты основных этапов транскрипции обеспечиваются молекулами РНК-полимераз простого строения, такими как у фагов T7, митохондрий и других объектов. Эти ферменты, по мнению Р.Б. Хесина, можно рассматривать в качестве эволюционных предшественников сложных олигомерных РНК-полимераз, способных самостоятельно осуществлять все основные функции в процессе транскрипции. Действительно, у олигомерных РНК-полимераз, как и у большинства сложноустроенных ферментов, по-видимому, только одна субъединица (β – у

РНК полимераз эубактерий) является собственно каталитической, а остальные, возможно, выполняют функции регуляторных.

**2. Регуляция экспрессии генов на уровне транскрипции у прокариот**

Регуляция транскрипции в клетках осуществляется на уровне индивидуальных генов, их блоков и даже целых хромосом. Возможность управления многими генами, как правило, обеспечивается наличием у них общих регуляторных последовательностей нуклеотидов, с которыми взаимодействуют однотипные факторы транскрипции. В ответ на действие специфических эффекторов такие факторы приобретают способность с высокой точностью связываться с регуляторными последовательностями генов. Следствием этого является ослабление или усиление транскрипции (репрессия или активация) соответствующих генов. Три основных этапа транскрипции – инициация, элонгация и терминация, рассмотренные нами выше, используются бактериальными клетками для регуляции синтеза РНК. То же, по-видимому, характерно и для остальных живых организмов. Ниже приведены примеры регуляторных воздействий на транскрипцию.

Регуляция на уровне инициации транскрипции

Активность многих генов прокариот регулируется с помощью белковых факторов, взаимодействующих с регуляторными участками промоторов генов. При этом происходят как активация транскрипции генов, так и подавление считывания генетической информации РНК-полимеразами. В первом случае регуляторные белковые факторы называют активаторами, осуществляющими позитивную регуляцию транскрипции, а во втором – репрессорами. Регуляцию, связанную с подавлением транскрипции, называют негативной. Механизмы, при помощи которых активаторы стимулируют инициацию транскрипции, могут быть рассмотрены с двух точек зрения – кинетической и структурной. Поскольку активация промоторов путем образования открытых комплексов является лимитирующей стадией на пути активации транскрипции в целом, действие различных активаторов может быть охарактеризовано по изменению (увеличению) значений кинетических параметров реакций, происходящих на разных этапах активации. Так, при действии активирующего комплекса Crp–cAMP на lac-промотор происходит десятикратное увеличение равновесной константы ассоциации KB РНК-полимеразы с промотором с образованием закрытого комплекса. Активация промотора PRM фага λ, опосредованная cI-белком (см. ниже), характеризуется пяти–десятикратным увеличением константы скорости kf перехода закрытых комплексов в открытые. Активирующее действие белка λ-cII на промотор РRE сопровождается изменением обоих вышеупомянутых кинетических параметров. Активация транскрипции может быть также опосредована увеличением скорости освобождения промотора РНК-полимеразой после инициации синтеза РНК. Многие активаторы транскрипции, в том числе и Crp–cAMP, сгибают молекулу ДНК после взаимодействия с ней, причем центр такого изгиба находится в сайте связывания активатора. Однако с использованием мутантных белков было установлено, что изгибание ДНК и связывание активаторов с ДНК как таковое еще не обеспечивают активацию транскрипции. В большинстве случаев абсолютно необходимым условием активации является наличие контакта между специфическими областями поверхностей молекул активатора и РНК-полимеразы, часто с ее α-субъединицами. Важным следствием образования контактов между активаторами и холоферментом РНК-полимеразы является часто наблюдаемый синергизм в связывании обоих белков с соответствующими промоторами. При этом мутации в сайтах связывания активаторов или промоторе как таковом могут предотвращать активацию транскрипции путем изменения конформации молекулы связанного активатора или контактного участка на РНК-полимеразе. Последовательности нуклеотидов промоторных участков генов, с которыми взаимодействуют молекулы репрессора, получили название операторов. Во многих случаях репрессор связывается с оператором только в присутствии низкомолекулярного лиганда, специфически взаимодействующего с репрессором. Такие низкомолекулярные эффекторы получили название корепрессоров. Они часто требуются и для функционирования белков- активаторов транскрипции. Простейший механизм репрессии заключается встерическом блокировании связывания РНК-полимеразы с промотором. Это происходит в том случае, если последовательности нуклеотидов мест посадки РНК-полимеразы на промотор и репрессора на оператор перекрываются. Некоторые бактериальные белки-репрессоры могут оказывать свое негативное действие на этапы инициации, происходящие после связывания РНК-полимеразы с промотором. Например, молекулы репрессора gal- оперона E. coli, связавшиеся с операторами OE и OI, центры последовательностей которых расположены соответственно на расстояниях –60,5 и +53,5 по отношению к точке инициации транскрипции, вызывают образование петли участка ДНК, заключенного между ними, но не препятствуют взаимодействию РНК-полимеразы с промотором. Они оказывают свое действие на последующие этапы инициации, предшествующие образованию первой фосфодиэфирной связи. В том случае, если лишь одна молекула репрессора связывается с внешним оператором OE, он частично ингибирует транскрипцию путем взаимодействия с α-субъединицей РНК-полимеразы. Это сопровождается понижением уровня, но не полным прекращением синтеза РНК gal-оперона, т.е. более тонким изменением уровня экспрессии соответствующих генов. Распространенным механизмом активации транскрипции с помощью белков-активаторов является облегчение ее инициации РНК-полимеразой после образования контакта между ферментом и белком-активатором, связанными с регуляторной областью промотора, что сопровождается конформационными изменениями РНК-полимеразы. У бактерий имеются белки- регуляторы, обладающие активностью как репрессора, так и активатора транскрипции. Такими "амфотерными" свойствами обладает, в частности, репрессор cI фага λ. Белок-активатор катаболитных оперонов (Crp-белок) активирует транскрипцию бактериальных генов, продукты которых участвуют в расщеплении (катаболизме) различных органических соединений (преимущественно сахаров), используемых растущей бактериальной клеткой в качестве источника углерода. Свои свойства активатора Crp-белок приобретает лишь в комплексе с циклическим AMP (сAMP). Внутриклеточная концентрация сAMP возрастает у бактерий, растущих на бедных питательных средах, и понижается в условиях избытка легко усвояемых источников углерода, например глюкозы. Поэтому система Crp–сAMP обеспечивает включение экспрессии катаболитных оперонов лишь на бедных питательных средах. Crp- белок может выступать и в роли репрессора транскрипции генов галактозного оперона E. coli. Если все гены катаболитных оперонов активируются Crp-белком в присутствии сAMP, то негативная регуляция их транскрипции происходит индивидуально. Хорошо известными примерами такого рода являются регуляции транскрипции lac-оперона E. coli под действием Lac- репрессора, а также галактозного и арабинозного оперонов специфическими белками-репрессорами этих оперонов. Низкомолекулярные эффекторы могут изменять активность РНК-полимеразы не только опосредованно через белки-регуляторы, но и непосредственно при взаимодействии с ферментом. С помощью гуанозинтетрафосфата (ppGpp) в клетках E. coli осуществляется координация экспрессии генов рибосомных РНК (рРНК) и белков. Этот необычный нуклеотид (известный также под названием "магического пятна") синтезируется бактериальными клетками в условиях внутриклеточного недостатка аминокислот, что приводит к значительному снижению интенсивности транскрипции генов рРНК и белков и одновременной стимуляции синтеза РНК оперонов, контролирующих биосинтез аминокислот. В присутствии ppGpp очищенная РНК-полимераза прекращает синтез рРНК с одного из двух промоторов этих оперонов, что приводит к ослаблению, но не полному прекращению их транскрипции. Известны мутации, локализованные в гене β-субъединицы РНК-полимеразы E. coli, приводящие к прекращению влияния ppGpp на синтез РНК, что подтверждает наличие непосредственного контакта между нуклеотидом и ферментом в процессе транскрипции. Некоторые регуляторные элементы бактерий, участвующие в активации транскрипции, так же как и энхансеры эукариот, могут располагаться на большом расстоянии (нескольких сотен нуклеотидов) от промоторов, на которые они оказывают свое действие. В этом случае контакт активатора с РНК-полимеразой обеспечивается благодаря выпетливанию участка ДНК, расположенного между данными регуляторными элементами, что приводит к пространственному сближению двух белков. Прямое доказательство образования таких петель на ДНК E. coli было, в частности получено с помощью электронной микроскопии для белков NtrC и NifA, действующих соответственно на промоторы генов glnA и nifH. Другим путем достижения белком-активатором молекулы РНК-полимеразы на удаленном промоторе (например промоторе поздних генов бактериофага Т4) является его перемещение вдоль отрезка ДНК, разделяющего эти два регуляторных элемента. Процесс такого перемещения может быть инициирован последовательностями нуклеотидов, расположенными выше или ниже промотора на расстоянии нескольких сотен пар оснований. Одним из давно обсуждающихся вопросов является необходимость изменения структуры ДНК в окрестностях промоторов под действием белков- активаторов для активации транскрипции. В ряде случаев такие доказательства были получены. Так, в mer-локусе E. coli, обеспечивающем устойчивость бактериальных клеток к ионам ртути, связывание Mer-белка с регуляторным участком промотора (merT) в присутствии ртути сопровождается раскручиванием спирали ДНК в районе промотора на 50о. Это приводит к образованию правильного расстояния между сайтами связывания активатора и промотором, так как первый расположен необычно – между нуклеотидами в положениях –35 и –10 промотора. Без такого изменения структуры ДНК связавшийся с ним активатор не может образовать правильного контакта с РНК-полимеразой.

**3. Трансляция у эукариот**

Бактерии обладают единственной универсальной системой трансляции, основные механизмы функционирования которой были кратко рассмотрены выше. В отличие от этого, клетки животных кроме основной системы трансляции, локализованной в цитоплазме, имеют дополнительную систему трансляции митохондрий, которая по ряду свойств приближается к бактериальной. Клетки растений обладают еще одной дополнительной системой биосинтеза белка, функционирующей в хлоропластах. Большинство данных о механизмах биосинтеза белка у эукариот было получено с использованием бесклеточных белоксинтезирующих систем. В последнее время важные результаты о механизмах трансляции у эукариот были получены с использованием стабильно трансформированных клеток животных и растений, выращиваемых в культуре. В ходе этих исследований установлено, что у растений и животных в основном функционируют одни и те же механизмы трансляции. Инициация биосинтеза белка эукариотическими рибосомами Как будет видно из дальнейшего изложения, инициация трансляции эукариотических мРНК может осуществляться, по крайней мере, тремя способами. В соответствии с первым наиболее распространенным механизмом (модель сканирования) рибосомы после взаимодействия с 5'-концевой последовательностью мРНК осуществляют поиск инициирующего AUG-кодона, перемещаясь вдоль 5'UTR. При реализации второго механизма рибосомы инициируют биосинтез белка на внутренних AUG-кодонах, удаленных от 5'-концевой кэп-группы. И, наконец, после освобождения полипептида из транслирующего комплекса рибосомы, не отделяясь от мРНК, способны реинициировать биосинтез белка на следующем инициирующем кодоне.

Факторы инициации трансляции. Большинство молекулярных механизмов, осуществляющих регуляцию экспрессии генов на уровне трансляции, реализуется на стадии инициации биосинтеза белка. По-видимому, этот факт находит свое отражение в большой сложности аппарата инициации трансляции. Помимо субъединиц эукариотических рибосом и белков, обычно ассоциированных с 5'- и 3'-концевыми последовательностями мРНК, в инициации принимают участие по меньшей мере 11 белковых факторов, построенных более чем из 25 полипептидов Элонгация полипептидных цепей в ходе эукариотической трансляции традиционно пользовалась меньшим вниманием исследователей по сравнению с инициацией, поскольку считалось, что ее механизмы в основных чертах идентичны таковым бактерий. Дальнейшие исследования показали, что данная точка зрения в основном соответствует действительности, хотя эукариотическая система трансляции обладает более сложным набором факторов элонгации.

Факторы и механизмы элонгации. Эукариотические клетки содержат в большом количестве фактор элонгации eEF1A, который является функциональным гомологом бактериального фактора EF1A(EF-Tu). Так же как и у бактерий, этот фактор образует тройной комплекс с GTP и аминоацил-тРНК, обеспечивая вхождение последней в А-участок элонгирующей рибосомы. Два других эукариотических фактора eEF1B и eEF2 резко отличаются от бактериальных функциональных аналогов EF1B(EF-Ts) и EF2(EF-G) по аминокислотным последовательностям. Гетеротримерный фактор eEF1B, как и его бактериальный аналог, катализирует обмен GDP на GTP в комплексе eEF1A–GDP. Фактор eEF2, по аналогии с бактериальными системами, обеспечивает транслокацию пептидил-тРНК в P-участок рибосом и перенос деацилированной тРНК в E-участок. У высших организмов этот фактор служит мишенью регуляторных воздействий через фосфорилирование. Замечательным свойством факторов eEF1A и eEF2 является способность связываться с компонентами цитоскелета эукариотических клеток. Полагают, что это их свойство может обеспечивать один из механизмов внутриклеточного транспорта мРНК, направляющих ее в полисомы. Растущий полипептид выводится в цитоплазму через канал, начало которого расположено на поверхности рибосомы, где он взаимодействует с белками, распознающими сигнальную последовательность, или с другими цитоплазматическими факторами, которые обеспечивают его направленный транспорт внутри эукариотической клетки. У бактерий растущая полипептидная цепь может вызывать уменьшение скорости элонгации, а природа предпоследней аминокислоты оказывает сильное влияние на терминацию трансляции. Предполагают, что такого рода эффекты являются следствием взаимодействия между строящимся пептидом и факторами трансляции, рРНК или непосредственно каналом, через который он переносится к поверхности рибосомы. Подобные механизмы, по-видимому, функционируют и у эукариот. У дрожжей, как и у E. coli, скорость элонгации трансляции снижается в присутствии редко встречающихся кодонов в мРНК. Наличие определенного числа таких кодонов вблизи сайта инициации трансляции значительно снижает скорость считывания соответствующих ОРС. На скорость декодирования мРНК рибосомами оказывают влияние и характер фолдинга строящихся полипептидных цепей, а также сигнальные последовательности аминокислот, определяющие направление их посттрансляционного транспорта внутри эукариотических клеток.

Терминация трансляции

В эукариотических белоксинтезирующих системах терминация трансляции, как и у бактерий, контролируется специфическими рилизинг-факторами. Однако у эукариот эти факторы менее разнообразны. В частности, у них отсутствует функциональный аналог бактериального фактора RRF/RF4.

Факторы терминации. По современным представлениям, элонгирующая эукариотическая рибосома распознает стоп-кодоны, находящиеся в одной рамке с основными ОРС, после взаимодействия с гетеродимерным комплексом рилизинг-факторов (RF), в состав которого входят факторы eRF1 и eRF3. Фактор eRF1 необходим для распознавания всех трех терминирующих кодонов (UAA, UAG и UGA) и освобождения синтезированного полипептида. Фактор eRF3 является GTPазой, обладающей гомологией с eEF1A, которая, гидролизуя GTP, стимулирует терминацию независимо от последовательности нуклеотидов в терминирующих кодонах.

**Заключение**

Определение функций продуктов новых генов на основе их первичной структуры осложняется тем, что многие белки и нуклеиновые кислоты проявляют свою активность и функционируют только в составе больших надмолекулярных комплексов, размеры которых часто приближаются к размерам рибосом. При этом многие белки сами по себе не обладают ферментативной активностью, а выполняют вспомогательные функции, например, молекул-адаптеров, обеспечивающих сборку комплексов и создающих молекулярные интерфейсы для их взаимодействия с регуляторными и каталитическими субъединицами. Наличие таких комплексов, как это было установлено в последнее десятилетие, особенно характерно для клеток эукариотических организмов. Так, исследование молекулярных механизмов транскрипции у эукариот привело к развитию представления о транскриптосоме, гигантскому белковому комплексу, в который кроме холофермента РНК-полимеразы с ее многочисленными субъединицами входят факторы транскрипции, белки-адаптеры, белковые компоненты системы репарации и т.п. При этом размер транскриптосомы приближается к таковому целых рибосом. В гигантские надмолекулярные комплексы организованы и молекулярные машины системы синтеза ДНК (реплисомы), процессинга и редактирования РНК (сплайсомы и эдитосомы), молекулярные компоненты системы протеолитической деградации белков (протеасомы). Создается впечатление, что организация генетических систем, функционирующих на основных этапах реализации генетической информации, в гигантские пространственно упорядоченные комплексы, является общебиологическим принципом.

**Список использованной литературы**

1. Патрушев Л.И. Экспрессия генов. – М.: Наука, 2000. – 800 с., ил.
2. Айала Ф., Кайдегер Дж.. Современная генетика: т.2. М.: Мир, 1988.
3. Биология: в 2 кн. Кн. 1: Жизнь. Гены. Клетка. Онтогенез. Человек./ под ред. В.Н.Ярыгина.
4. Биология: Большой энциклопедический словарь/ гл. ред. М.С.Гиляров.
5. Вилли К., Детье В.. Биология (биологические процессы и законы). М.:Мир, 1975.