

УДК 577.21

ББК 28.4

М64

Авторы:

Людмила Николаевна Миронова — д-р биол. наук, профессор кафедры генетики и биотехнологии СПбГУ;

Марина Владимировна Падкина — д-р биол. наук, профессор кафедры генетики и биотехнологии СПбГУ;

Елена Викторовна Самбук — д-р биол. наук, профессор кафедры генетики и биотехнологии СПбГУ

Рецензенты:

Михаил Давидович Тер-Аванесян — член-корреспондент РАН, д-р биол. наук, заведующий лабораторией молекулярной генетики Института биохимии им. А. Н. Баха РАН;

Мария Федоровна Шишова — д-р биол. наук, профессор кафедры физиологии и биохимии растений СПбГУ

Научный редактор:

Сергей Георгиевич Инге-Вечтомов — академик РАН, д-р биол. наук, заведующий кафедрой генетики и биотехнологии СПбГУ

Миронова Л.Н.

М64 РНК: синтез и функции: учебное пособие / Л. Н. Миронова, М. В. Падкина, Е. В. Самбук; под ред. С. Г. Инге-Вечтомова. — СПб.: Эко-Вектор, 2017. — 287 с. : ил.

ISBN 978-5-906648-29-7

Настоящее издание представляет собой учебное пособие, предназначенное для студентов и аспирантов, специализирующихся в области молекулярной биологии и генетики. В нем освещены проблемы, связанные с биогенезом и функциями одного из основных биологических полимеров — РНК. Неослабевающий интерес биологов к этому типу макромолекул обусловлен многообразием функций РНК, перечень которых продолжает расширяться. Совмещение способности к хранению и воспроизведению генетической информации с каталитическими и регуляторными способностями, наблюдаемое только у РНК, позволяет думать, что именно с этих молекул началась эволюция жизни на нашей планете. В книге подробно рассмотрены процессы синтеза и деградации РНК, известные к настоящему моменту свойства РНК, а также клеточные процессы, в которых молекулы РНК играют ту или иную роль.

УДК 577.21
ББК 28.4

© Миронова Л.Н., Падкина М.В.,
Самбук Е.В., 2017
© ООО «Эко-Вектор», 2017

ISBN 978-5-906648-29-7

От редактора

Наряду с дисциплинами, развивающими представления о генетических процессах, происходящих на надмолекулярном уровне — клеточном, организменном, популяционном, важнейшая роль в генетическом образовании принадлежит дисциплинам, которые рассматривают молекулярные механизмы воспроизведения и переноса генетической информации: репликации, транскрипции и трансляции. Взаимоотношения между этими процессами символизирует так называемая «центральная догма молекулярной биологии», сформулированная Ф. Криком в конце 50-х гг. XX в. и дополненная в дальнейшем благодаря развитию представлений о матричных процессах. Характеристика матричных процессов нашла свое место в курсах, читаемых на кафедре генетики и биотехнологии Санкт-Петербургского государственного университета. Внимание к этой части генетического образования обусловлено логическим развитием общей парадигмы генетики: от менделизма к хромосомной теории, доказательству генетической роли ДНК и далее к матричному принципу, который в настоящее время можно считать обобщенным отражением механизмов воспроизведения генетического материала и реализации генетической информации.

Особое место среди этих процессов занимает синтез РНК (транскрипция) как первый и важнейший этап экспрессии генетической информации, а также функционирования различных типов РНК в клетке. Некоторые общие особенности матричных процессов позволяют следовать единой методологии их обсуждения. Эти же обстоятельства делают неизбежными некоторые повторы при описании разных матричных процессов. Поэтому авторы, рассказывая о транскрипции и функциях РНК, затрагивают и репликацию, и трансляцию, что лишним раз демонстрирует взаимосвязь этих процессов.

Сложность организации биологических систем диктует потребность в изложении множества конкретных деталей, касающихся структуры и функций больших и малых молекул, вовлеченных в описываемые процессы. Авторы пособия сумели соблюсти баланс между неизбежной детализацией и необходимыми обобщениями, что усиливает ценность настоящего пособия для системы генетического образования.

Академик РАН С. Г. Инге-Вечтомов

ОГЛАВЛЕНИЕ

От редактора.....	3
Предисловие.....	8
Введение.....	10
1. Структура РНК, основные типы РНК.....	10
2. Общая характеристика процесса транскрипции.....	14
<i>Литература</i>	17
Глава 1. Синтез РНК в клетках эубактерий.....	18
1.1. Промоторы прокариотических генов, оперонная организация транскрипционных единиц	18
1.2. РНК-полимераза <i>E.coli</i>	22
1.2.1. Структура фермента.....	22
1.2.2. Принцип работы РНК-полимеразы <i>E.coli</i>	25
1.2.3. Терминация транскрипции.....	27
1.3. Заключение.....	31
<i>Литература</i>	31
Глава 2. Регуляция транскрипции у эубактерий.....	33
2.1. Лактозный оперон <i>E.coli</i> и регуляция его экспрессии.....	33
2.2. Регуляция экспрессии арабинозного оперона <i>E. coli</i>	42
2.3. Триптофановый оперон <i>E.coli</i> и регуляция его экспрессии.....	45
2.4. Другие примеры регуляции за счет преждевременной терминации транскрипции.....	49
2.5. ДНК-связывающие домены прокариотических белков.....	51
2.6. Прокариотические энхансеры.....	53
2.7. Сигнальная трансдукция у бактерий.....	55
2.8. Регуляция транскрипции путем смены σ -субъединиц.....	56
2.9. Заключение.....	60
<i>Литература</i>	60
Глава 3. Синтез РНК в клетках эукариот.....	63
3.1. Общая характеристика эукариотических РНК-полимераз.....	63
3.2. РНК-полимераза II.....	64
3.2.1. Промоторы РНК-полимеразы II.....	66
3.2.2. Базальные транскрипционные факторы РНК-полимеразы II . . .	67
3.2.3. Комплексы белков, ассоциированных с РНК-полимеразой II _____	71
3.2.4. Терминация транскрипции и полиаденилирование 3'-конца мРНК.....	73
3.3. РНК-полимераза I.....	75
3.4. РНК-полимераза III.....	77
3.5. Биогенез ядерных РНК-полимераз и их посттранскрипционная судьба 80	
3.5.1. Синтез белков, входящих в состав полимераз, и сборка субкомплексов РНК-полимераз в цитоплазме; вспомогательные факторы сборки.....	80

3.5.2. Транспорт РНК-полимеразы II в ядро и сборка РНК-полимераз I и III.....	83
3.5.3. Деградация полимераз после завершения цикла и рециклинг ...	85
3.6. Заключение.....	85
<i>Литература</i>	86
Глава 4. Созревание транскриптов у эукариот.....	89
4.1. Посттранскрипционная модификация мРНК.....	89
4.1.1. Кэпирование 5'-конца мРНК.....	89
4.1.2. Редактирование мРНК.....	91
4.2. Созревание первичных транскриптов рРНК.....	94
4.3. Созревание первичных транскриптов РНК-полимеразы III.....	97
4.4. Заключение	100
<i>Литература</i>	101
Глава 5. Регуляция транскрипции у эукариот.....	103
5.1. Активация и репрессия генов, транскрибируемых РНК-полимеразой II.....	103
5.2. Регуляция утилизации галактозы у дрожжей.....	106
5.3. Механизм глюкозной репрессии у дрожжей.....	108
5.4. Регуляция ответа эукариотической клетки на тепловой шок.....	110
5.5. Сигнальная трансдукция.....	111
5.5.1. Внутриклеточные рецепторы.....	112
5.5.2. Рецепторы, представляющие собой трансмембранные белки... 114	
5.5.3. Рецепторы, ассоциированные с ионными каналами.....	115
5.5.4. Рецепторы, ассоциированные с G-белками.....	116
5.6. Регуляция активности РНК-полимераз I и III.....	119
5.7. Заключение.....	119
<i>Литература</i>	121
Глава 6. Мозаичная структура эукариотических генов. Сплайсинг.. 122	
6.1. Сплайсинг цитоплазматических тРНК.....	124
6.2. Сплайсинг мРНК.....	126
6.3. Альтернативный сплайсинг.....	132
6.4. Транс-сплайсинг.....	138
6.5. Автосплайсинг.....	140
6.6. Митохондриальные интроны дрожжей; мобильность интронов I и II типов.....	146
6.7. Заключение	151
<i>Литература</i>	151
Глава 7. Каталитические свойства РНК. Мир РНК.....	153
7.1. Структура и функции рибозимов.....	153
7.2. Мир РНК.....	157
7.3. Использование рибозимов в прикладных целях.....	158
7.4. Заключение.....	159
<i>Литература</i>	159

Глава 8. Ремоделирование хроматина и транскрипция.....	161
8.1. Структура хроматина и нуклеосомы.....	161
8.2. Посттрансляционная модификация гистонов.....	162
8.2.1. Ацетилирование гистонов.....	162
8.2.2. Деацетилазы гистонов.....	166
8.2.3. Метилирование гистонов.....	167
8.2.4. Другие модификации гистонов.....	169
8.2.5. Неканонические гистоны	170
8.2.6. Комплексы ремоделирования хроматина.....	172
8.2.7. Семейство SWI/SNF.....	174
8.2.8. Семейство INO80.....	177
8.2.9. Пространственная структура комплексов INO80 и SWI	180
8.2.10. Семейство ISWI.....	180
8.2.11. Комплексы ISWI дрожжей.....	181
8.2.12. Комплексы ISWI человека.....	182
8.2.13. Пространственная структура комплексов семейства ISWI ..	184
8.2.14. Семейство CHD.....	184
8.2.15. Механизм действия комплексов ремоделирования хроматина	187
8.3. Заключение.....	189
<i>Литература</i>	190
Глава 9. Пространственная организация процессов транскрипции в ядре эукариот.....	192
9.1. Внутренняя мембрана клетки и ламина	193
9.2. Ламина.....	195
9.3. Ядерный поровый комплекс и транскрипция.....	198
9.4. Хромосомы и хромосомные территории.....	204
9.5. Транскрипционные фабрики и организация транскрипции.....	204
9.6. Заключение.....	207
<i>Литература</i>	207
Глава 10. РНК и трансляция.....	209
10.1. Транспортные РНК.....	209
10.2. Рибосомные РНК	217
10.3. Заключение.....	222
<i>Литература</i>	223
Глава 11. РНК как регулятор у бактерий.....	225
11.1. Антисмысловые РНК эубактерий.....	225
11.2. Малые регуляторные РНК бактерий.....	228
11.3. Системы CRISPR — Cas у архей и эубактерий	229
11.4. Рибосвитч.....	233
11.5. Транспортно-матричные РНК.....	235
11.6. Заключение.....	237
<i>Литература</i>	238

Оглавление

Глава 12. РНК как регулятор у эукариот.....	239
12.1. Косупрессия у растений и аналогичные явления у других организмов.....	240
12.2. Обнаружение микроРНК (miРНК), их биогенез и функции.....	240
12.3. Малые интерферирующие РНК (siРНК).....	245
12.4. Другие типы малых интерферирующих РНК.....	248
12.5. Регуляция транскрипции с помощью 7SK РНК	249
12.6. Длинные некодирующие РНК	249
12.7. Заключение.....	256
<i>Литература</i>	257
Глава 13. Внутриклеточный транспорт РНК	261
13.1. Экспорт мРНК.....	262
13.2. RAN-зависимый экспорт РНК.....	263
13.3. Роль РНК в секреции белков.....	265
13.4. Заключение	266
<i>Литература</i>	267
Глава 14. Деградация РНК .:.....	268
14.1. Деградация нормальных транскриптов.....	268
14.2. Деградация aberrantных транскриптов.....	272
14.3. Заключение.....	276
<i>Литература</i>	277
Глава 15. Транскриптомика (РНОмика).....	278
15.1. Нозерн-гибридизация.....	278
15.2. ДНК-микрочипы.....	280
15.3. Метод SAGE.....	283
15.4. Полимеразная цепная реакция в реальном времени.....	284
15.5. Заключение.....	284
<i>Литература</i>	285
Заключение.....	286

11.2. Малые регуляторные РНК бактерий

Помимо антисмысловых РНК в регуляции экспрессии генов у бактерий принимают участие малые регуляторные РНК (sRNA). Их размеры обычно не превышают 100 нуклеотидов. Часто они работают как антисмысловые РНК, но закодированы в других участках генома. В связи с этим их комплементарность мишеням может быть неполной в отличие от истинных антисмысловых РНК. Предполагается, что общее число малых регуляторных РНК в клетках *E. coli* составляет 200-300, хотя пока найдено лишь несколько десятков таких РНК. Важно отметить, что многие из малых РНК *E. coli* консервативны и присутствуют у родственных *E. coli* видов бактерий.

Рассмотрим несколько классических примеров таких регуляторных РНК. Например, РНК, известная как Spot-42 *E. coli*. Ее длина составляет 109 нуклеотидов, она участвует в катаболитной репрессии, в частности в регуляции галактозного оперона, связываясь с последовательностью Шайна - Далгарно в мРНК гена *galK* и блокируя трансляцию этой мРНК. Соответственно, синтез самой Spot-42 активирует глюкоза.

Сейчас у *E. coli* известно свыше 20 малых РНК, действующих аналогично Spot-42, то есть ингибирующих трансляцию путем связывания с транскриптом. К представителям этого класса относятся РНК, обозначаемые *micF*, *micA*, *micC*. Эти РНК, не превышающие по своей длине 100 нуклеотидов, репрессируют синтез белков наружной мембраны (OMP, Outer Membrane Protein), связываясь с инициаторными участками мРНК генов *ompF*, *ompA* и *ompC*, кодирующих эти белки, и образуя несовершенные дуплексы с ними длиной около 20 нуклеотидов.

Известны также примеры позитивной регуляции трансляции малыми РНК. В этом случае взаимодействие РНК с началом транскрипта мешает образованию шпильки, в которой находится последовательность Шайна - Далгарно. Результатом является активация трансляции данного транскрипта. Взаимодействие малых регуляторных РНК с транскриптом часто зависит от белка Hfq, выполняющего функции РНК-шаперона.

Возможны и принципиально иные механизмы регуляции с помощью малых некодирующих РНК. Так, например, 6S РНК взаимодействует не с транскриптом, а с РНК-полимеразой. Эта РНК состоит из 184 нуклеотидов и была первой секвенированной некодирующей РНК *E. coli*. На выяснение механизма ее действия ушло больше 30 лет. В итоге оказалось, что 6S РНК конкурирует с промоторами σ^{70} за связывание с РНК-полимеразой. Максимум ее активности наблюдается в стационарной стадии роста, когда количество этой РНК в клетке возрастает примерно в 11 раз и составляет около 10 000 молекул на клетку. В результате примерно 75% молекул

РНК-полимеразы оказываются связанными с 6S РНК, что приводит к репрессии большинства генов.

Еще один возможный способ регуляции с помощью малой не-кодирующей РНК иллюстрирует система, одним из компонентов которой является регуляторный белок CsgA (carbon storage regulator). Этот белок ингибирует инициацию трансляции, связываясь с мРНК. В основном мишенями CsgA являются мРНК генов, экспрессия которых должна быть ингибирована в стационаре. Активность самого CsgA зависит от некодирующих РНК *csrB* и *csrC*. Эти РНК содержат повторы, которые позволяют одной молекуле РНК связать около 18 молекул CsgA; в результате чего образуется глобулярный рибонуклеопротеиновый комплекс. Это взаимодействие приводит к снятию блока экспрессии генов, ингибируемых CsgA.

11.3. Системы CRISPR — Cas у архей и зубактерий

Регуляторный механизм, в основе которого лежит подавление (интерференция) экспрессии гена с помощью РНК, обеспечивается системами CRISPR — Cas, обнаруженными и охарактеризованными в последнее десятилетие как у зубактерий, так и у архей. Интерференция, опосредованная РНК, несколько раньше была обнаружена у эукариот, и какое-то время считали, что этот способ регуляции используется только в эукариотических клетках. Его описанию посвящена значительная часть следующей (12-й) главы, здесь же упомянем лишь то, что у эукариот РНК-интерференция представляет собой либо способ регуляции экспрессии собственных генов за счет малых РНК, закодированных в геноме, либо способ защиты от трансгенов, тем или иным способом попавших в клетку. В этом случае интерферирующие РНК образуются с помощью обратной транскрипции из самого чужеродного генетического материала. В обоих случаях подавление экспрессии происходит на посттранскрипционном уровне.

У бактерий РНК-интерференция также представляет собой способ защиты от чужеродного генетического материала, но механизм этой защиты существенно отличается от эукариотического. Во-первых, подавление экспрессии трансгенов происходит на уровне транскрипции, во-вторых, интерферирующие РНК, комплементарные последовательностям трансгенов, закодированы в геноме клетки-хозяина. Системы, обеспечивающие такую адаптивную иммунную реакцию, получили название систем CRISPR — Cas. Аббревиатура CRISPR означает Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (короткие палиндромные повторы, располагающиеся в виде регулярных кластеров); Cas — это белки, ассоциированные с CRISPR. Эти белки в составе рибонуклеопротеиновых комплексов обеспечивают связывание интерферирующих