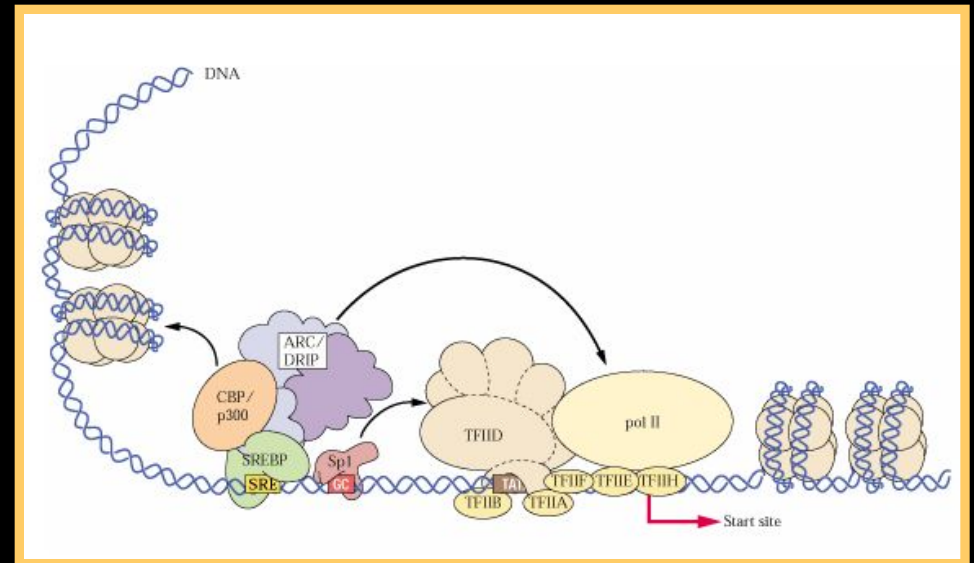


Регуляция экспрессии генов



- Известно, что гены определяют структуру всех молекул, из которых состоят клетки живых организмов, контролируют все метаболические процессы и содержат программу развития организма.
- В каждый момент времени любая клетка, от бактериальной до человеческой, использует лишь часть своих генов для синтеза определенных продуктов.
- Невозможна ситуация, когда все гены клетки работают одновременно. Мы говорим, что те гены, которые экспрессируются - **включены**, а те, которые не экспрессируются – **выключены**. Это означает, что экспрессия генов регулируется.

- В то же время известно, что в ходе индивидуального развития многоклеточного организма из оплодотворенной яйцеклетки образуются разнообразные типы клеток, входящих в состав определенных тканей. Но все клетки, как правило, несут **один и тот же набор генов**. В основе этого лежит **выборочное** использование генов, то есть **регуляция генов**.
- Но разных стадиях дифференцировки клетки, руководствуясь лишь отчасти внешними сигналами, избирательно используют тот или иной набор генов, что определяет пути их развития.

- Экспрессия гена регулируется не только в ходе онтогенеза, но также и в течении жизни дифференцированной клетки. Например, клетки кожи под действием солнечного ультрафиолетового облучения вырабатывают пигмент меланин. Структура гена, отвечающего за синтез пигмента, не изменяется в ответ на обучение, просто внеклеточный сигнал – ультрафиолетовые лучи включает этот ген.

Регуляция экспрессии генов осуществляется на различных уровнях:

Запрограммированные перестройки генома

Амплификация генов, формирование генов иммуноглобулинов и генов рецепторов Т-лимфоцитов, диминуция хроматина у нематод и некоторых членистоногих, формирование макронуклеуса из микронуклеуса у ресничных инфузорий и т.д.

Транскрипционный

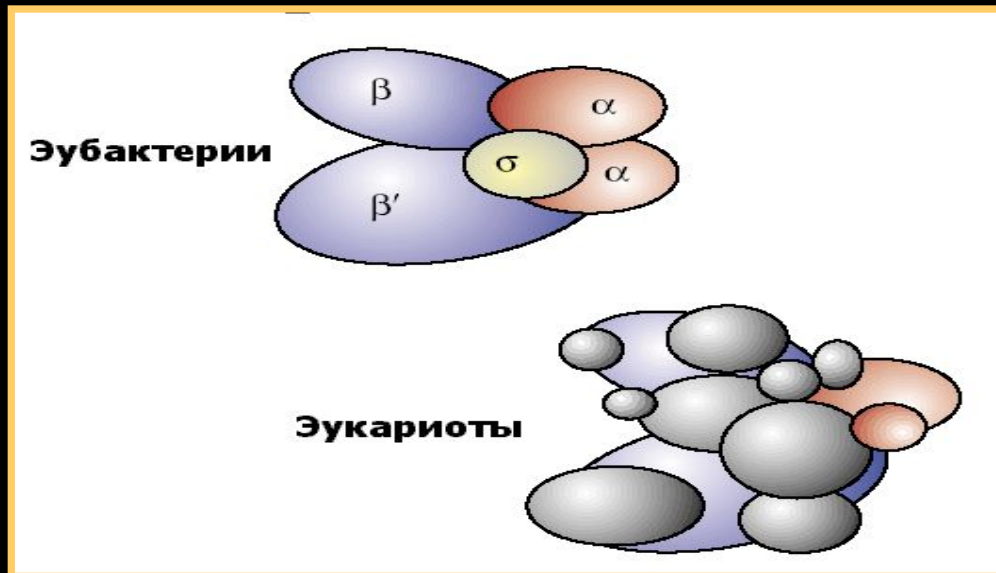
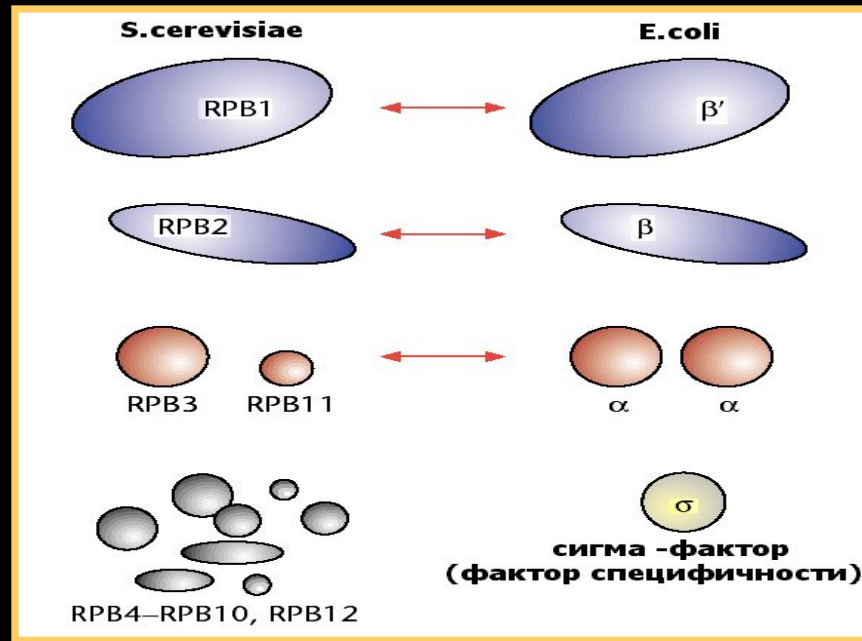
Посттранскрипционный

- А) Процессинг мРНК
- Б) Трансляционный (эффективность инициации трансляции, антисенс-РНК)
- В) Посттрансляционный (модификация белков)

ДАЛЕЕ МЫ РАССМОТРИМ РЕГУЛЯЦИЮ
ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ НА УРОВНЕ
ТРАНСКРИПЦИИ.

РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ У ПРОКАРИОТ

РНК-полимераза является мультисубъединичным комплексом

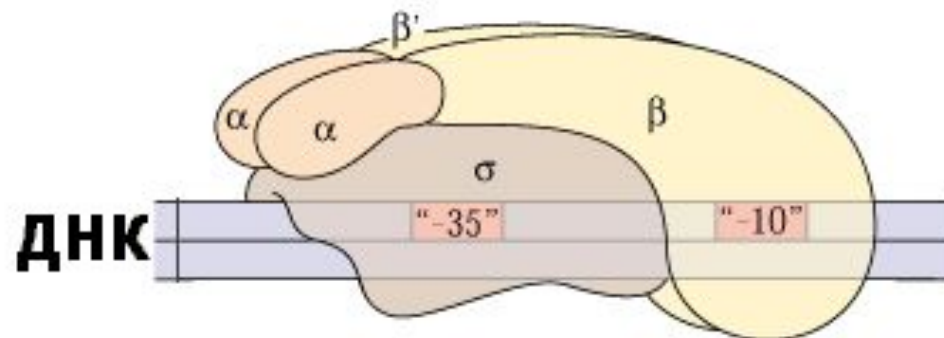


РНК-полимераза связывается с промотором

Структура типичного промотора



РНК-полимераза E.coli



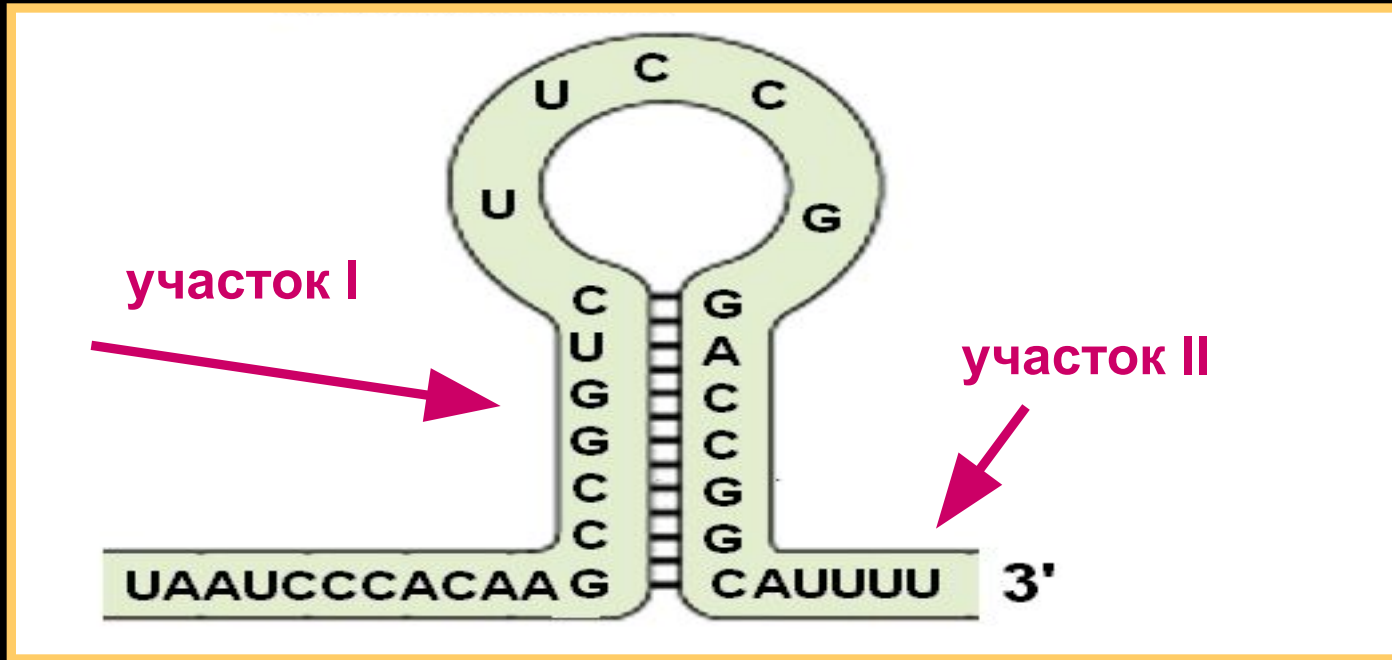
мРНК

Терминатор транскрипции



- Сигналами завершения синтеза мРНК являются терминаторы транскрипции.
- Информация о них содержится в ДНК, однако их пространственная структура и функционирование осуществляются на синтезируемой мРНК.

Структура терминатора транскрипции

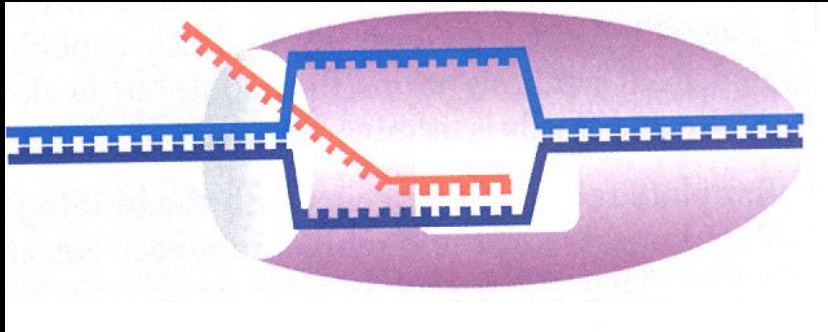


Rho-независимые терминаторы транскрипции имеют два характерных участка длиной около 40 п.н.

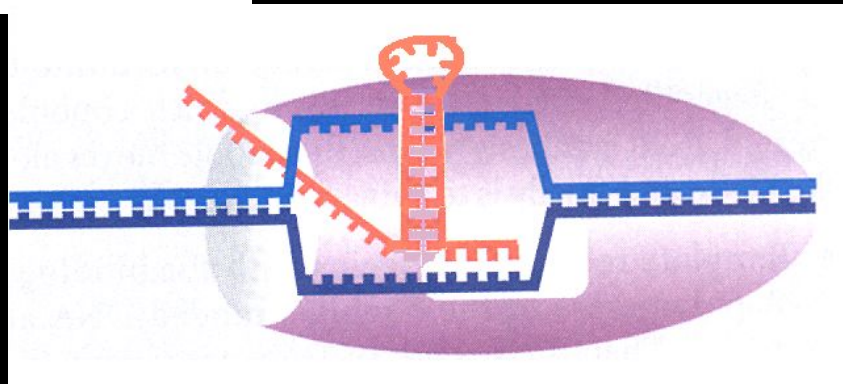
Первый участок содержит инвертированную последовательность, обогащенную GC-нуклеотидами, которая формирует участок двунитевой РНК - шпильку.

Второй участок состоит из нескольких уридиловых остатков.

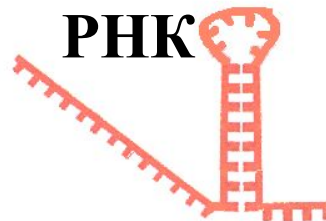
Терминация транскрипции



На первом участке движение РНК-полимеразы замедляется или останавливается, на втором — РНК-полимераза отсоединяется от РНК



ДНК



РНК



РНК-полимераза

Регуляция транскрипции генов прокариот

- Осуществляется с помощью регуляторных белков.
- Регулируемые гены содержат в лидерной части гена дополнительные элементы, с которыми связываются регуляторные белки.
- Регуляция может быть **негативной** (осуществляется белками-репрессорами) или **позитивной** (осуществляется белками-активаторами).

Регуляция транскрипции генов прокариот

В регуляции могут принимать участие низкомолекулярные соединения

Индуктор – небольшая молекула, которая запускает транскрипцию в результате взаимодействия с регуляторным белком - репрессором. Такая система регуляции называется индуцибельной.

Корепрессор – небольшая молекула, которая запускает репрессию в результате взаимодействия с неактивным белком-репрессором, который переходит в активную форму. Такая система регуляции называется репрессибельной.

- **Оперон** – группа тесно сцепленных генов, находящихся под контролем общего промотора и общего оператора и транскрибируемых как единая мРНК.

Модель оперона была предложена Ф.Жакобом и Ж.Моно в 1961 г. для объяснения регуляции генов у E.coli



Ж.Моно



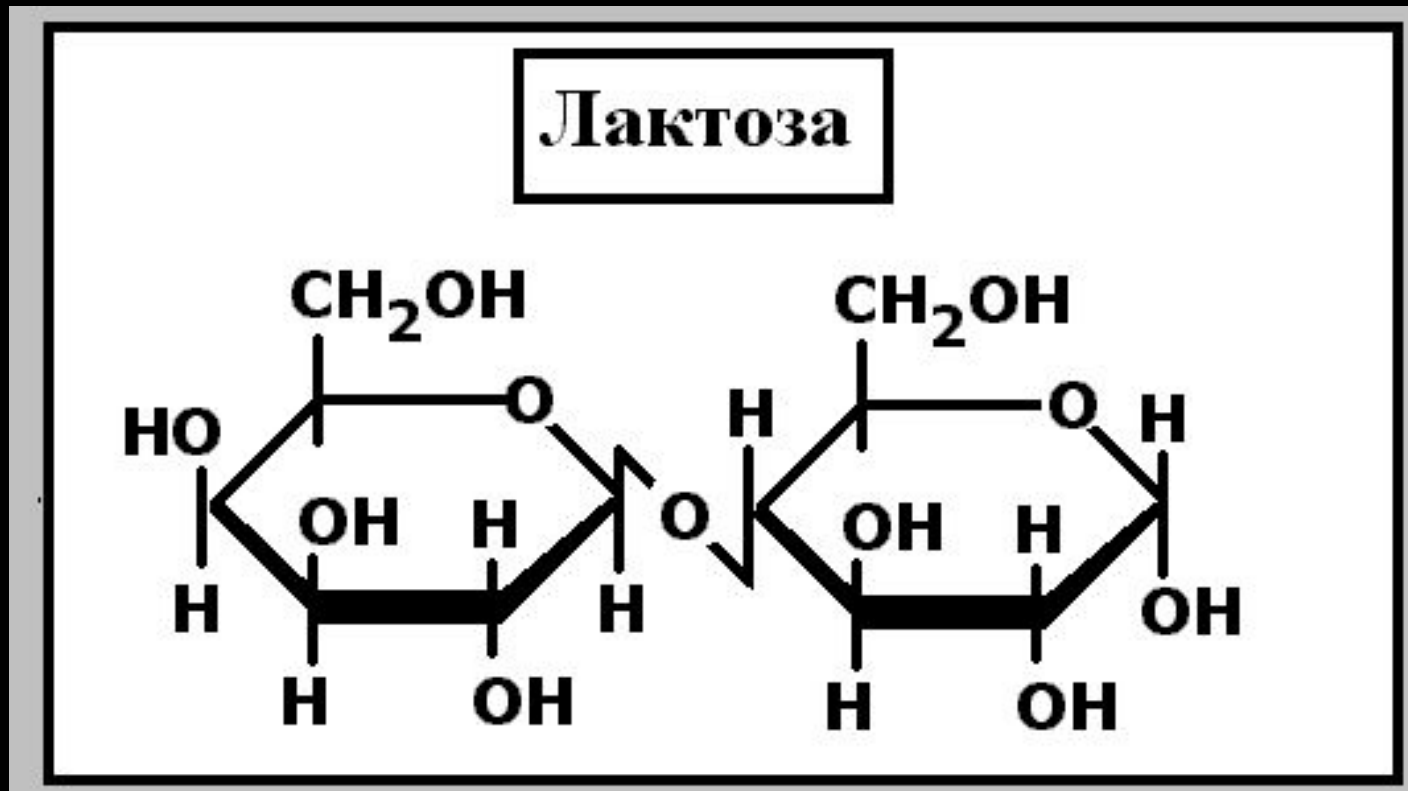
Ф.Жакоб

Нобелевская премия по физиологии и медицине, 1965 г

Модель оперона была предложена Ф.Жакобом и Ж.Моно в 1961 г. для объяснения регуляции генов у E.coli

- Изучение лактозного оперона *E.coli* заложило основы современной молекулярной генетики.
- Оно способствовало разработке концепции генетической регуляции, открытию мРНК и дало инструментальные средства, широко используемые в различных отраслях биологии.

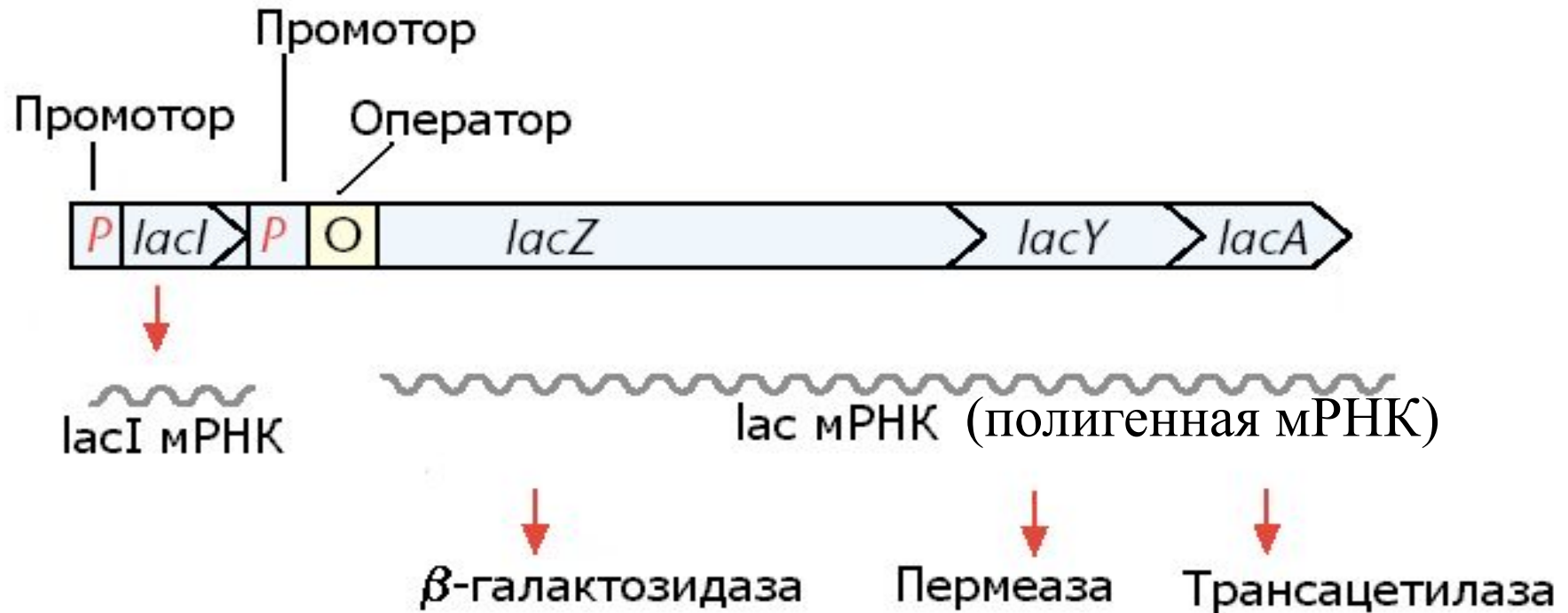
Структурная формула лактозы



β -галактозидаза (продукт гена *lacZ*) катализирует гидролиз лактозы на глюкозу и галактозу.

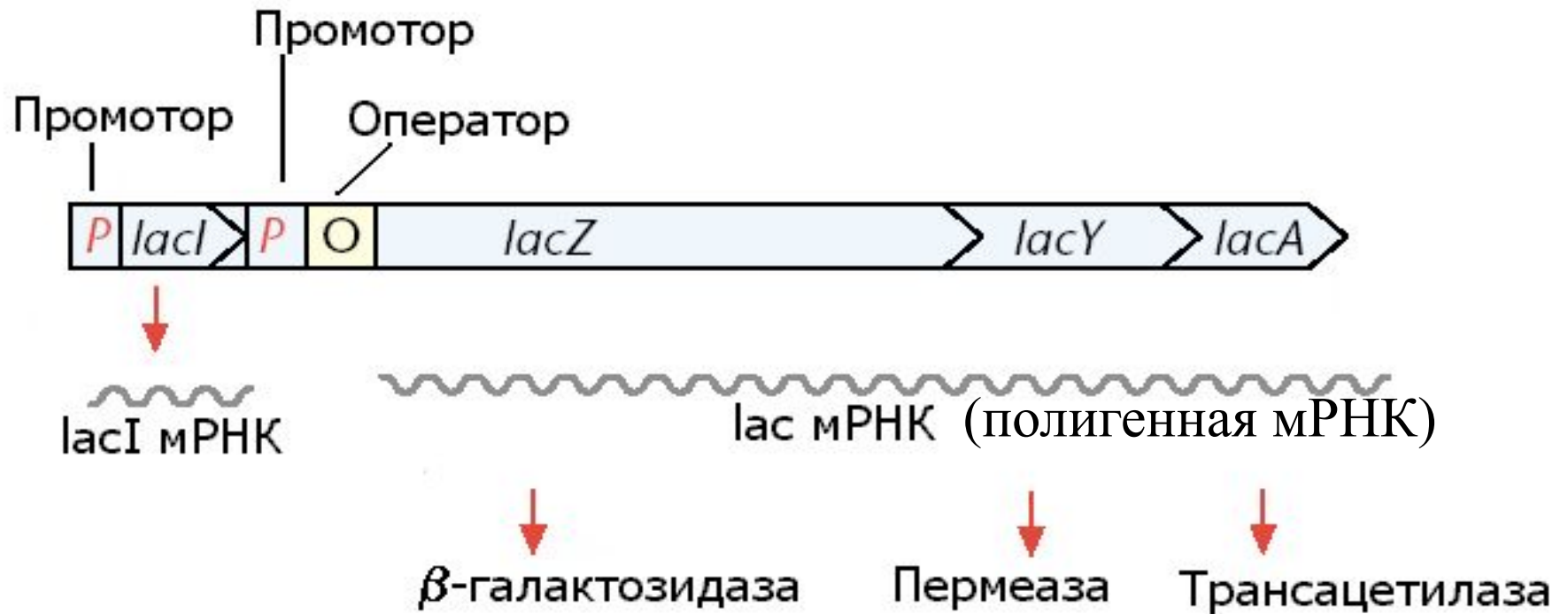
Лактоза является индуктором синтеза β -галактозидазы

lac-оперон



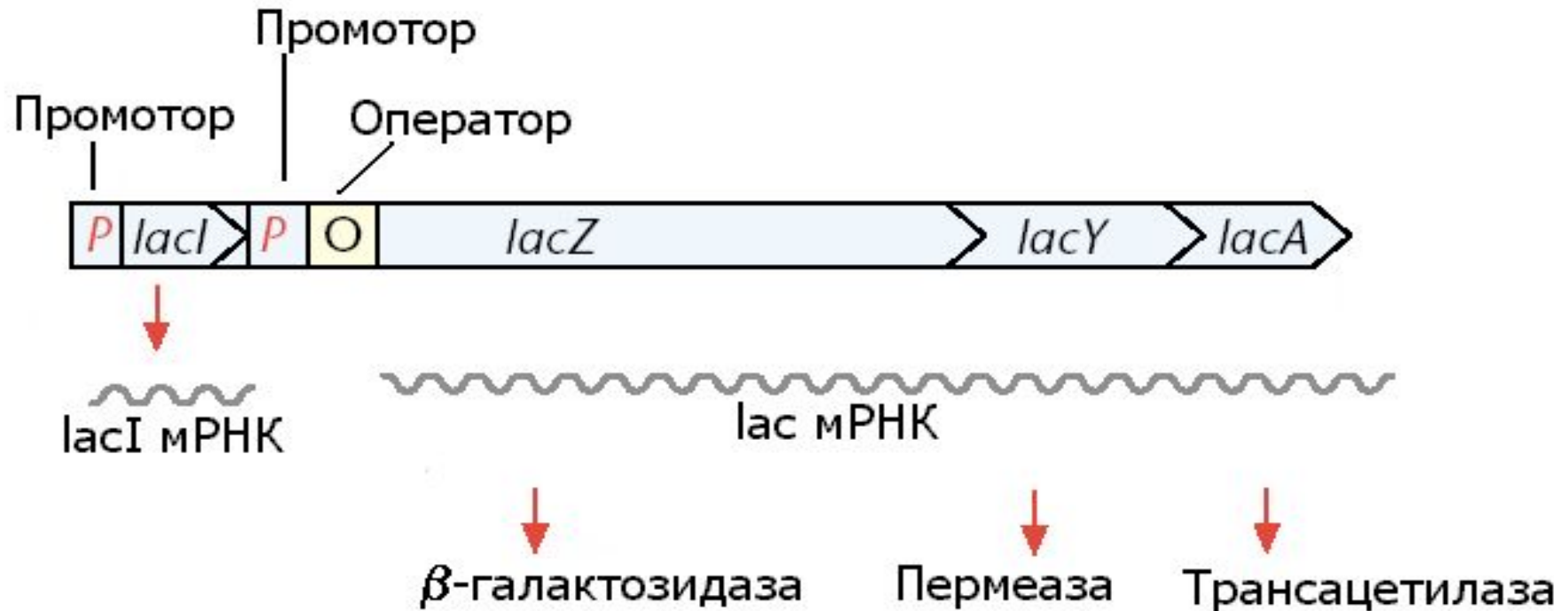
Лактозный оперон состоит из **трех структурных генов** – *lacZ*, *lacY* и *lacA*, продукты которых необходимы для использования лактозы в качестве источника углерода, **промотора**, с которым связывается РНК-полимераза, и **операторного участка (оператора)**, с которым связывается белок-репрессор – продукт гена *lacI*.

lac-оперон



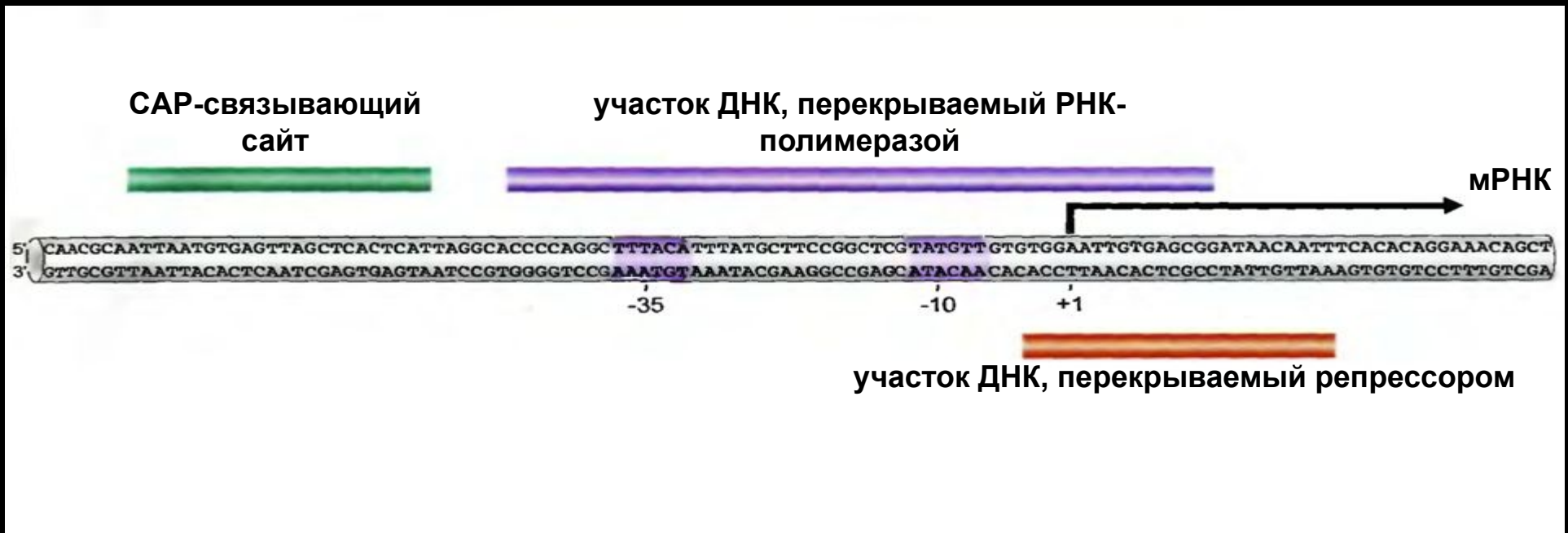
Оперон имеет один промотор и перекрывающийся с ним оператор, а также один основной терминатор транскрипции, поэтому все входящие в оперон гены транскрибируются как одна полигенная мРНК.

lac-оперон

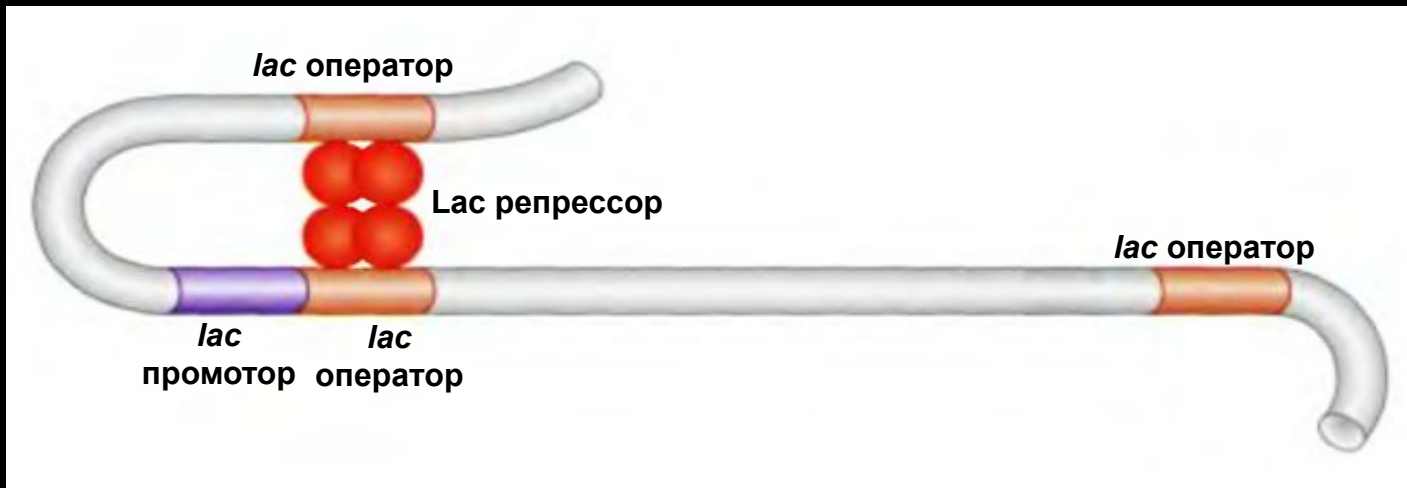


Ген-регулятор лактозного оперона (*lacI*) кодирует белок-репрессор. В активной форме белок-репрессор связывается с оператором. **Оператор** – это участок ДНК, с которым связывается белок-репрессор. Сам ген *lacI* в состав оперона не входит, поскольку его экспрессия осуществляется с собственного промотора. Это конститутивный ген, т.е. нерегулируемый.

Регуляторный район *lac*-оперона



Показана нуклеотидная последовательность и организация регуляторной области *lac*-оперона. Закрашенные полосы указывают участки ДНК, перекрываемые РНК-полимеразой и регуляторными белками. Известно, что *Lac*-репрессор перекрывает больший участок, чем предполагаемый минимальный операторный сайт, а РНК-полимераза – участок, больший чем минимальный промотор.

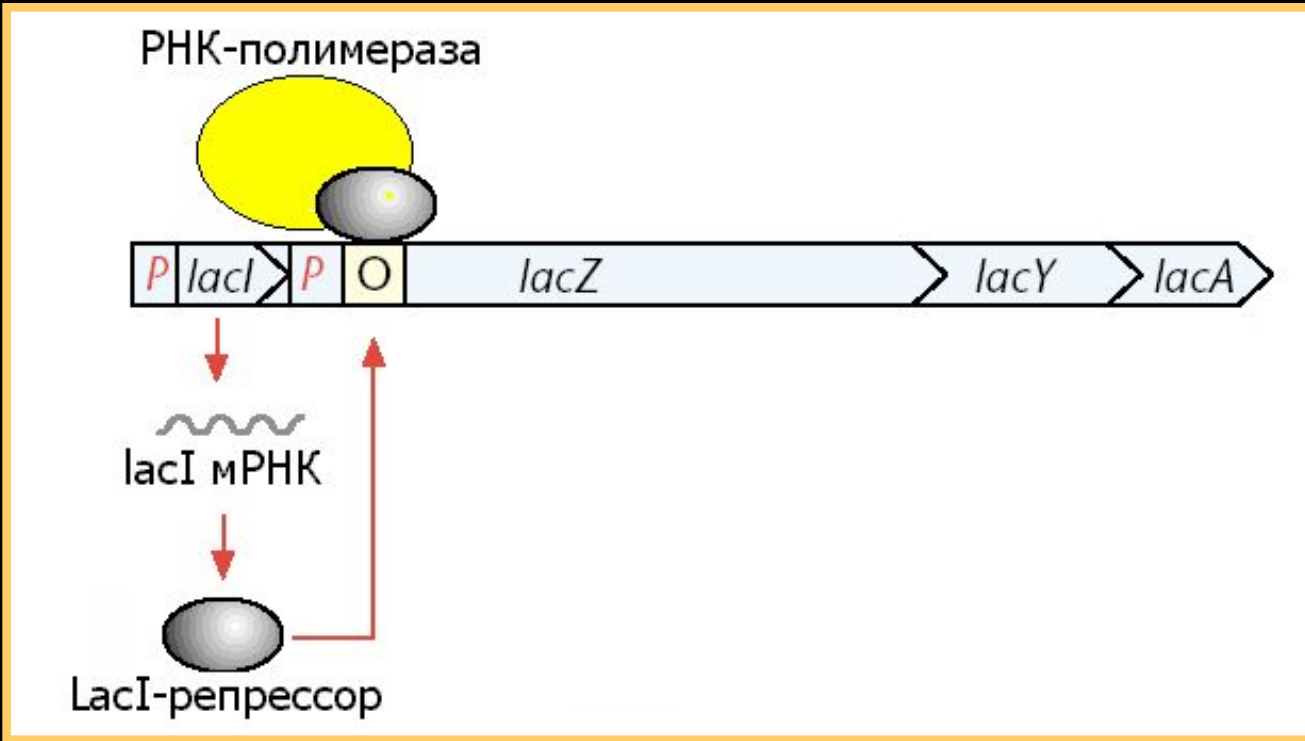


Lac-репрессор в виде тетрамера связывается с двумя операторными участками.

Петля, показанная на рисунке, образуется между Lac-репрессором, связанным с первичным операторным участком и выше расположенным операторным районом. Аналогичная петля может альтернативно формироваться с участком, расположенным ниже первичного оператора. Первичный операторный участок расположен непосредственно около промотора. На рисунке каждый мономер репрессора показан в виде кружка.

(по Watson J.D. *et al.*, Molecular biology of the gene, 5ed., Pearson, 2004)

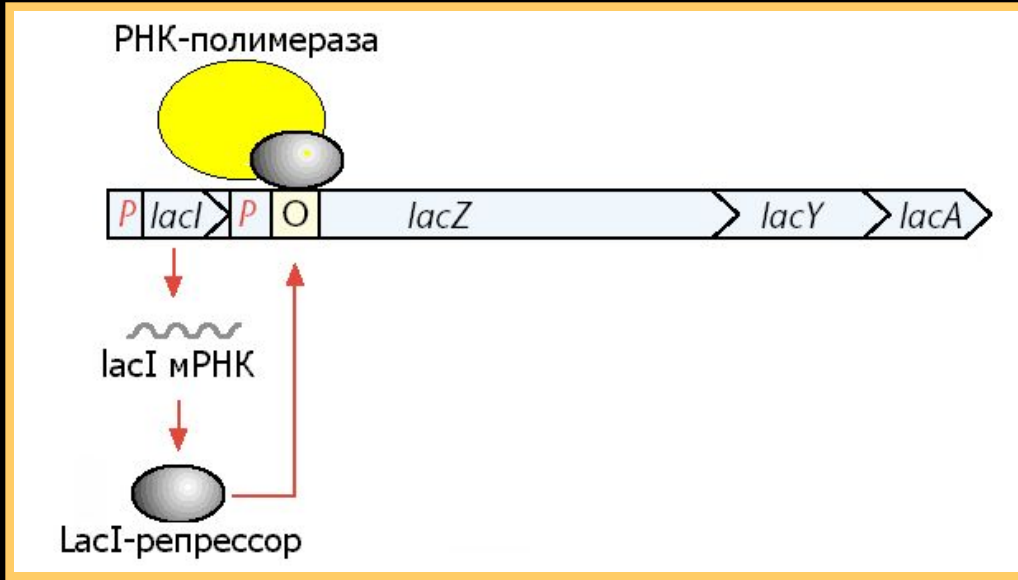
Схема регуляции *lac*-оперона



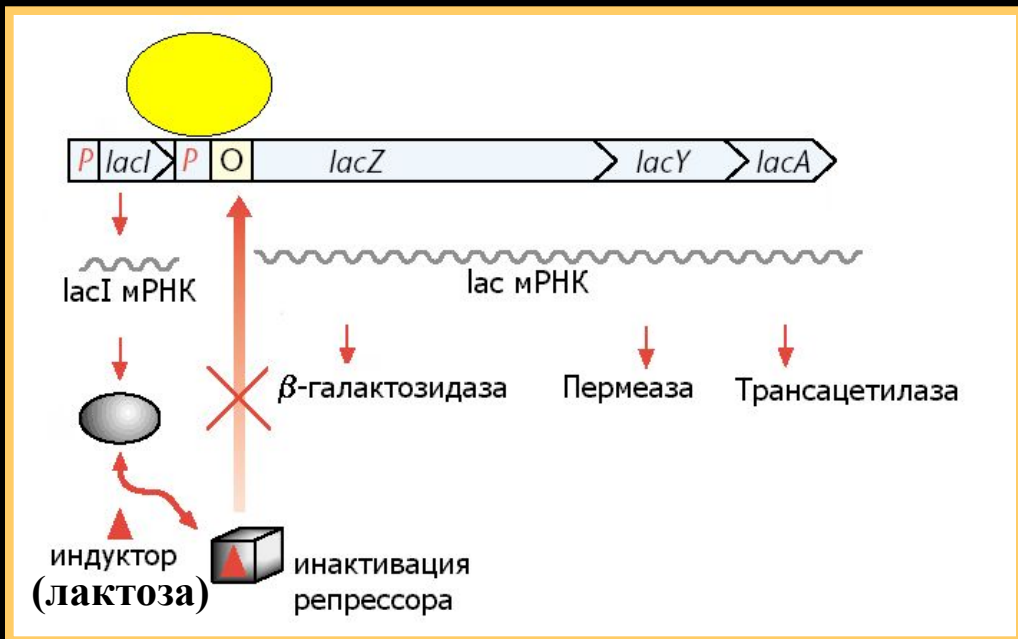
Ген *lacI* экспрессируется конститутивно, поэтому в отсутствии индуктора (лактозы) транскрипция оперона репрессируется (негативная регуляция)

Ген-регулятор лактозного оперона (*lacI*) кодирует белок-репрессор. В активной форме этот белок-репрессор связывается с оператором. **Оператор** – это участок ДНК, с которым связывается белок-репрессор. Сам ген *lacI* в состав оперона не входит, поскольку экспрессия его осуществляется с собственного промотора. Это конститутивный ген, т.е. нерегулируемый.

Схема регуляции *lac*-оперона



Ген *lacI* экспрессируется конститутивно, поэтому в отсутствии индуктора (лактозы) транскрипция оперона репрессируется.
(негативная регуляция)

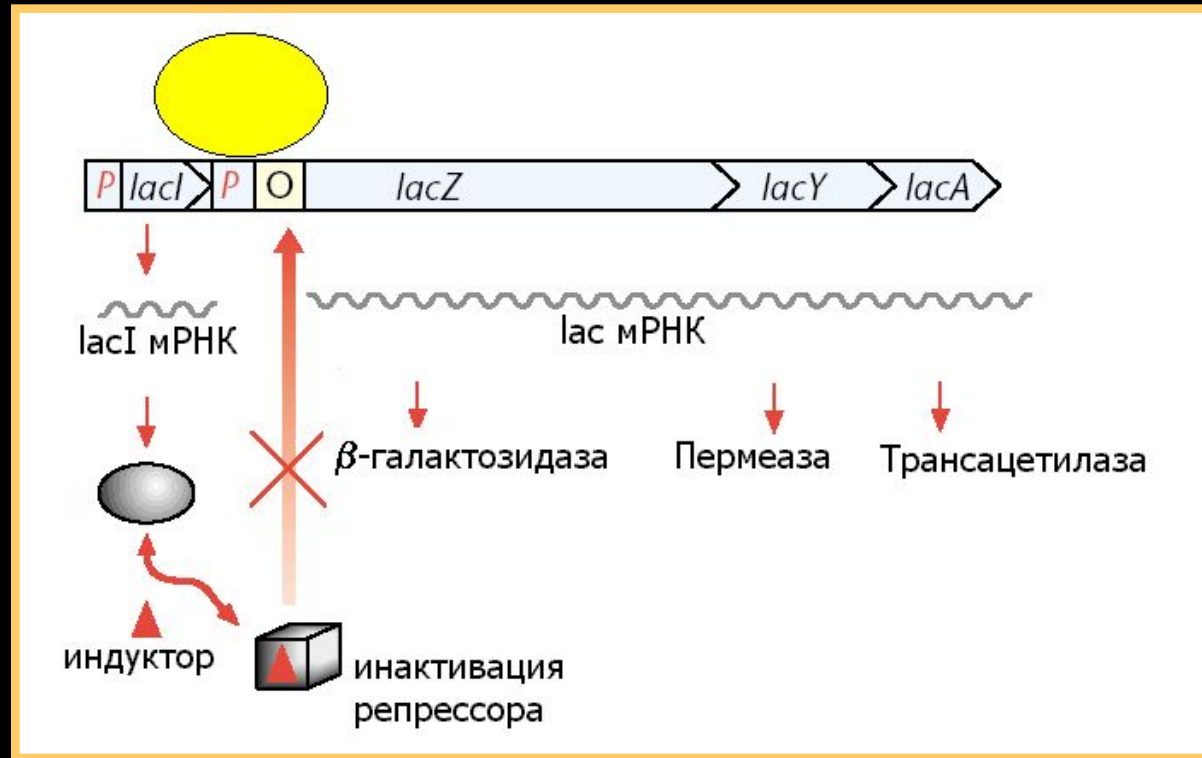


Таким образом, в отсутствии лактозы клетки *E. coli* содержат все три белка только в следовых количествах.

Схема регуляции *lac*-оперона

При выращивании бактерий на среде с лактозой в качестве единственного источника углерода и энергии количество ферментов увеличивается в 1000 раз. Следовательно, лактоза является индуктором синтеза всех трех ферментов.

Схема регуляции *lac*-оперона



Индуктор инактивирует репрессор

В регуляции могут принимать участие низкомолекулярные соединения.

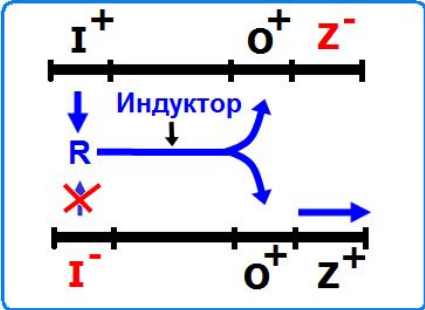
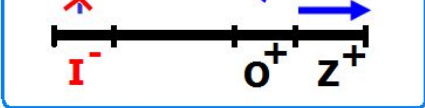
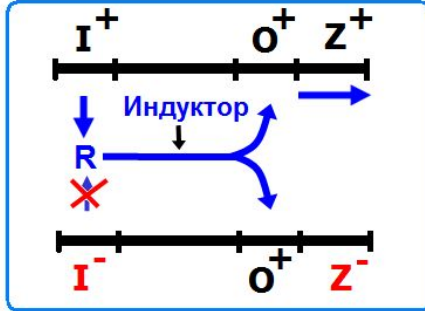
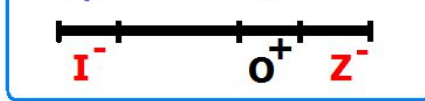
Индуктор – небольшая молекула, которая запускает транскрипцию в результате взаимодействия с регуляторным белком.

Фенотипы гаплоидных штаммов с мутацией в гене *lacI*

	Генотип	Активность β -галактозидазы		Фенотип (по активности β -галактозидазы)
		- лактоза	+ лактоза (индукция)	
1.		-	+	индуцибельный дикий тип (норма)
2.		+	+	конститутивный

1. В клетках дикого типа синтез всех трех ферментов, кодируемых *lac*-опероном, осуществляется координированно и является индуцибельным.
2. Клетки с мутациями в гене *lacI* конститутивны по синтезу всех трех ферментов – т.е. синтез ферментов осуществляется независимо от присутствия индуктора, поскольку в клетках отсутствует функциональный репрессор.

Фенотипы гетерозиготных диплоидных штаммов (мерозигот) с мутацией в гене *lacI*

	Генотип	Активность β -галактозидазы		Фенотип (по активности β -галактозидазы)
		- лактоза	+ лактоза (индукция)	
3.	<div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: center;"> <div style="margin-bottom: 10px;"> Плазмида F'  </div> <div> Хромосома  </div> </div>	-	+	индуцибельный
4.	<div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: center;"> <div style="margin-bottom: 10px;"> Плазмида F'  </div> <div> Хромосома  </div> </div>	-	+	индуцибельный

3. Аллель дикого типа *lacI*⁺ доминирует над мутантным аллелем *lacI*⁻. Следовательно, мутации по регуляторному гену *lacI* являются рецессивными.

4. Продукт гена *lacI* является транс-действующим белком, поскольку регулирует структурные гены оперона, находящиеся как в цис-, так и в транс-положениях.

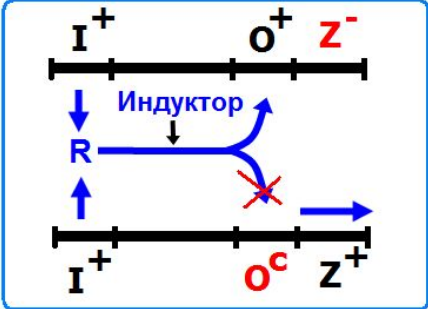

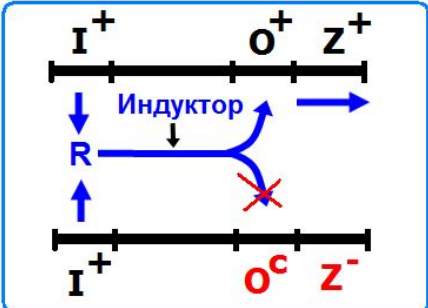
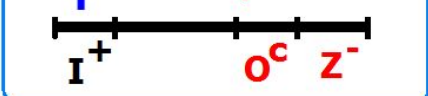
Фенотипы гаплоидных штаммов с мутацией в операторе

Генотип	Активность β -галактозидазы		Фенотип (по активности β -галактозидазы)
	- лактоза	+ лактоза (индукция)	индуцибельный дикий тип (норма)
	-	+	
	+	+	конститутивный

Конститутивный синтез продуктов *lac*-оперона возможен не только в случае мутаций по гену *lacI*, но также и в случае мутаций в операторе.

Такие мутации приводят к утрате способности оператора связываться с репрессором. В этом случае синтез *lac*-ферментов будет осуществляться даже в присутствии активного репрессора.

Фенотипы гетерозиготных диплоидных штаммов (мерозигот) с мутацией в операторе

	Генотип	Активность β -галактозидазы		Фенотип (по активности β -галактозидазы)
		- лактоза	+ лактоза (индукция)	
Плаزمид F'				конститутивный
Хромосома		+	+	
Плазмид F'				индуцибельный
Хромосома		-	+	

Мутация $lacO^c$ влияет только на функционирование генов, с которыми находится в цис-положении (на одной молекуле).

Вывод: Мутация $lacO^c$ является цис-доминантной.

Позитивный контроль

- Почему *lac*-оперон не транскрибируется (т.е. репрессирован), если в среде находятся одновременно лактоза и глюкоза?
- Почему в этих условиях не работает индуктор (лактоза)?
- Почему транскрипция оперона начинается только после того, как клетки полностью утилизируют глюкозу?

Это пример катаболитной репрессии или глюкозного эффекта, выражающийся в неспособности клеток *E. coli* катаболизировать различные углеводы в присутствии глюкозы, как наиболее эффективного источника энергии.

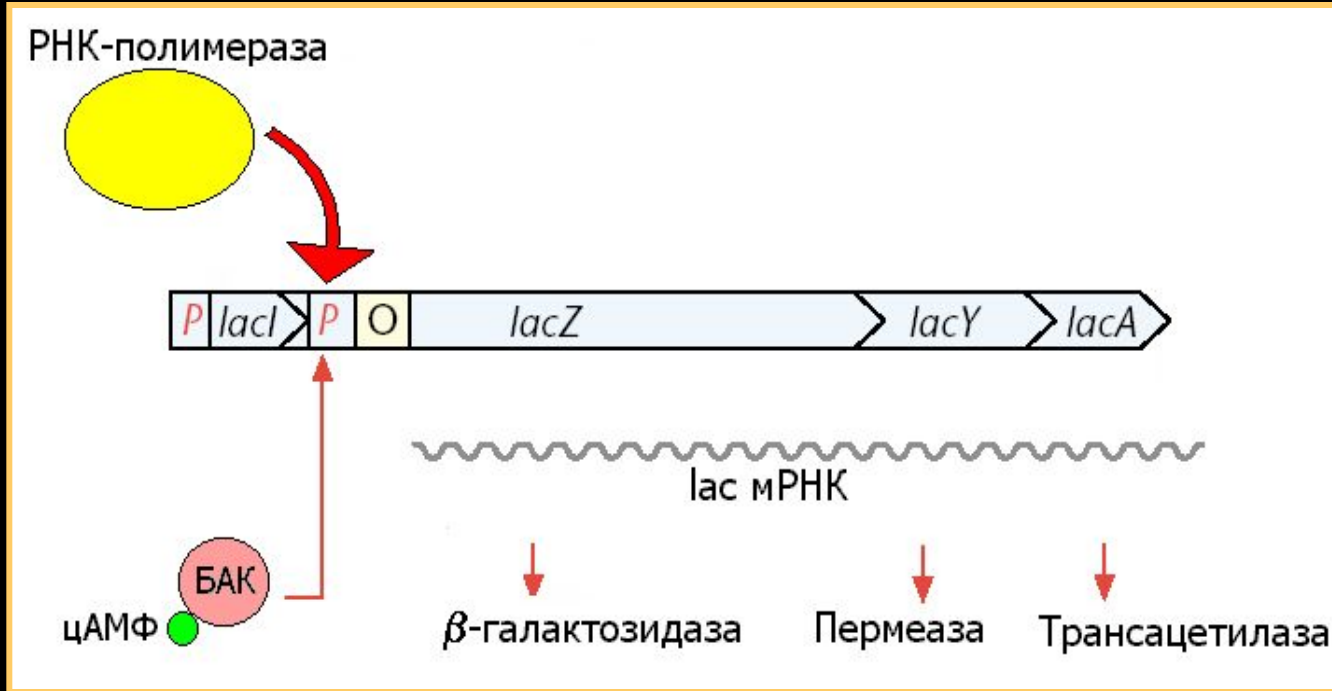
lac-оперон находится также и под позитивным контролем

Детальный генетический анализ показал, что мутации в двух локусах, локализованных за пределами *lac*-оперона приводят к 50-ти кратному уменьшению синтеза β -галактозидазы.

Ген ***сya*** кодирует аденилатциклазу, превращающую АТФ в цАМФ.

Ген ***сар*** кодирует белок CAP - *catabolite activator protein* (БАК – белок активатор катаболизма).

Позитивная регуляция *lac*-оперона

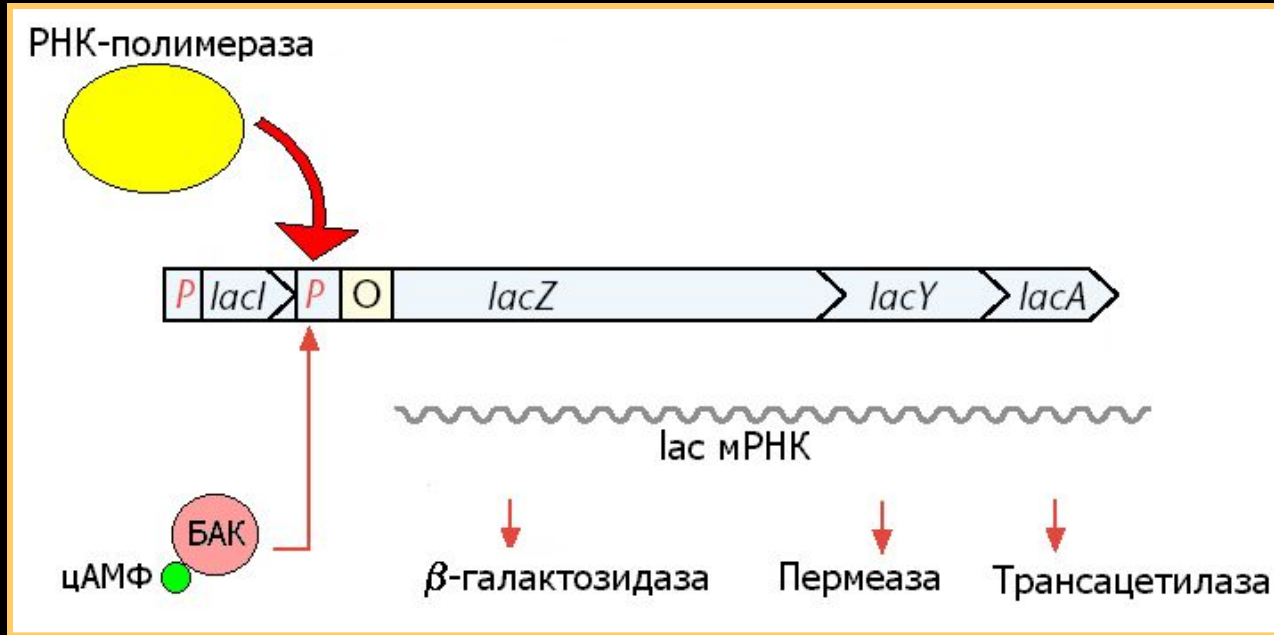


Белок БАК образует комплекс с цАМФ, активируется и связывается с БАК-сайтом, расположенным в промоторной области *lac*-оперона. Это необходимо для связывания РНК-полимеразы с промотором и обеспечения транскрипции.



Структура регуляторной области *lac*-оперона

Позитивная регуляция *lac*-оперона

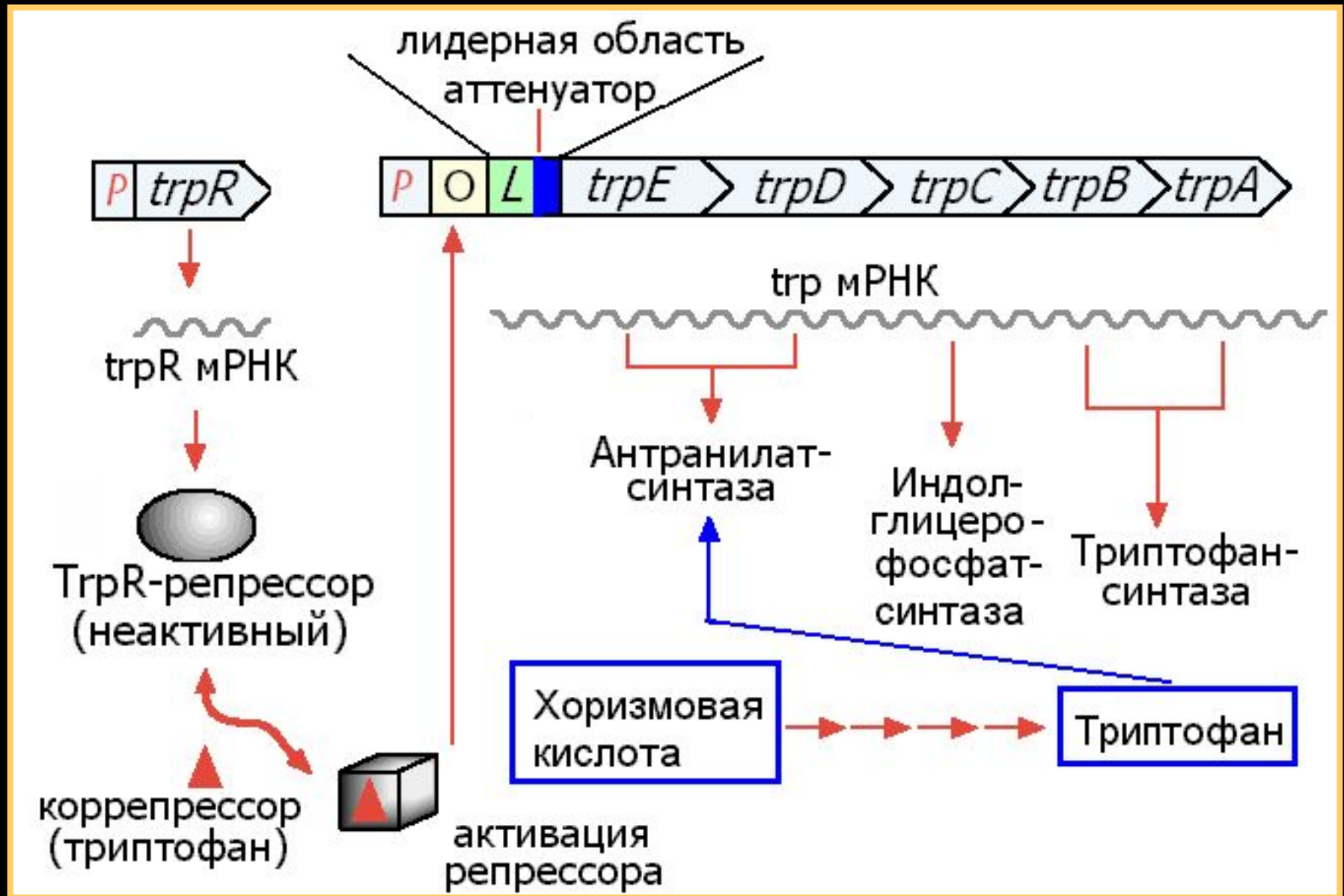


Глюкоза вызывает катаболитную репрессию, снижая уровень циклического АМФ



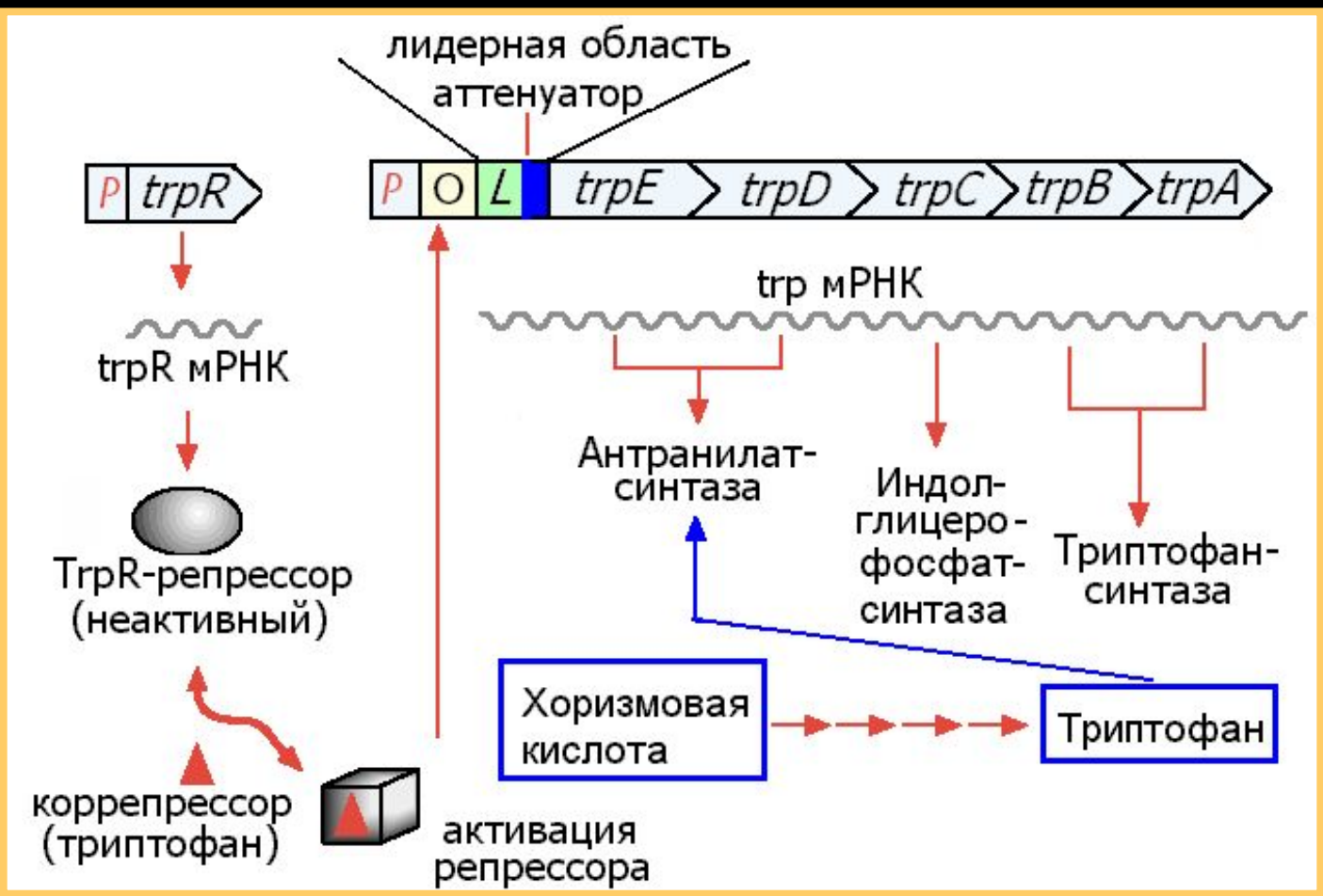
цАМФ – сигнал энергетического голода

Схема регуляции триптофанового оперона у *E.coli*



Регуляции триптофанового оперона осуществляется на трех уровнях

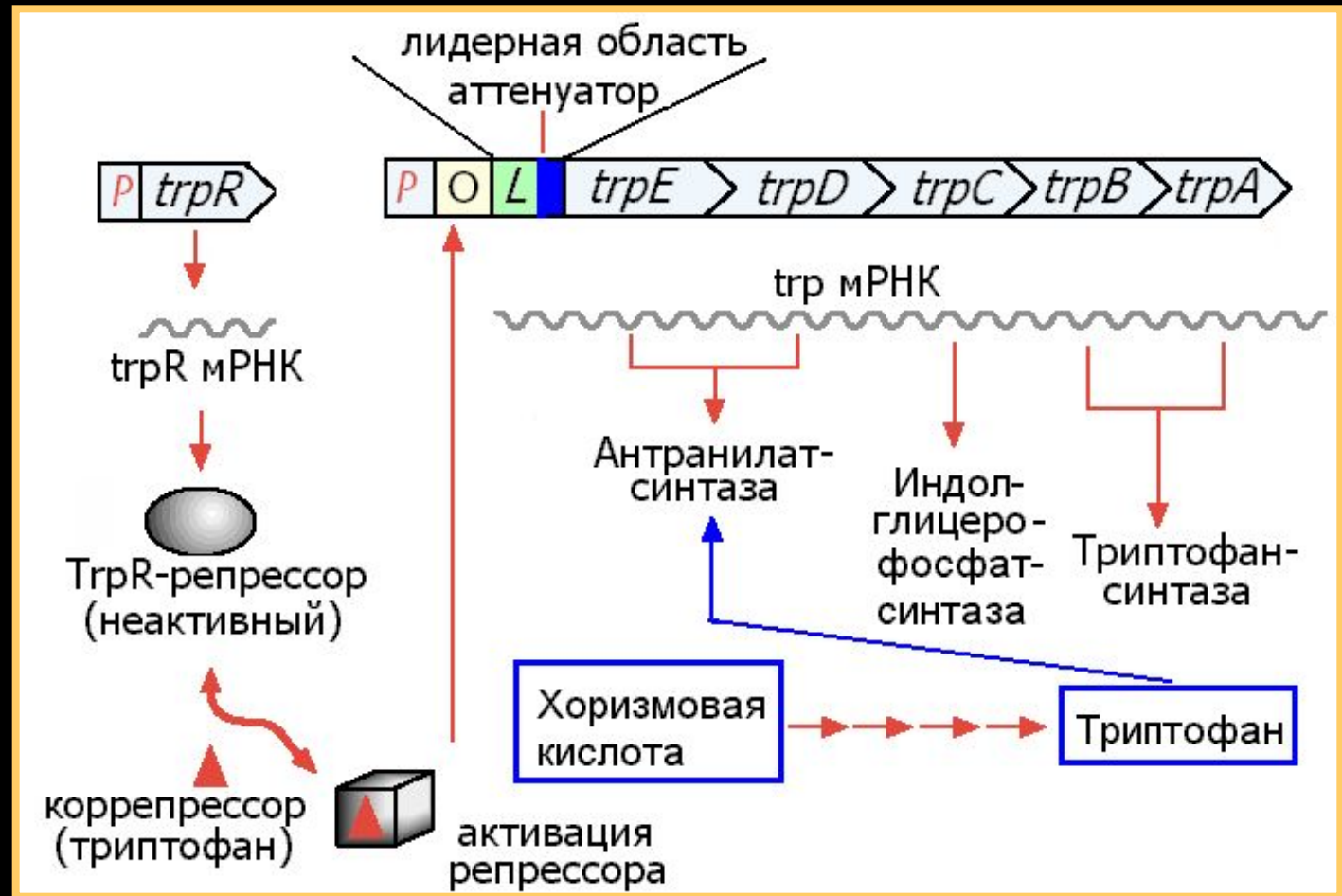
Первый из них связан с ингибированием конечным продуктом



При высокой концентрации триптофана в среде анранилатсинтаза обладает значительно меньшим сродством к своим субстратам – глутаминовой и хоризмовой кислотам.
Т.е. триптофан ингибирует анранилатсинтазу.

Регуляции триптофанового оперона осуществляется на трех уровнях

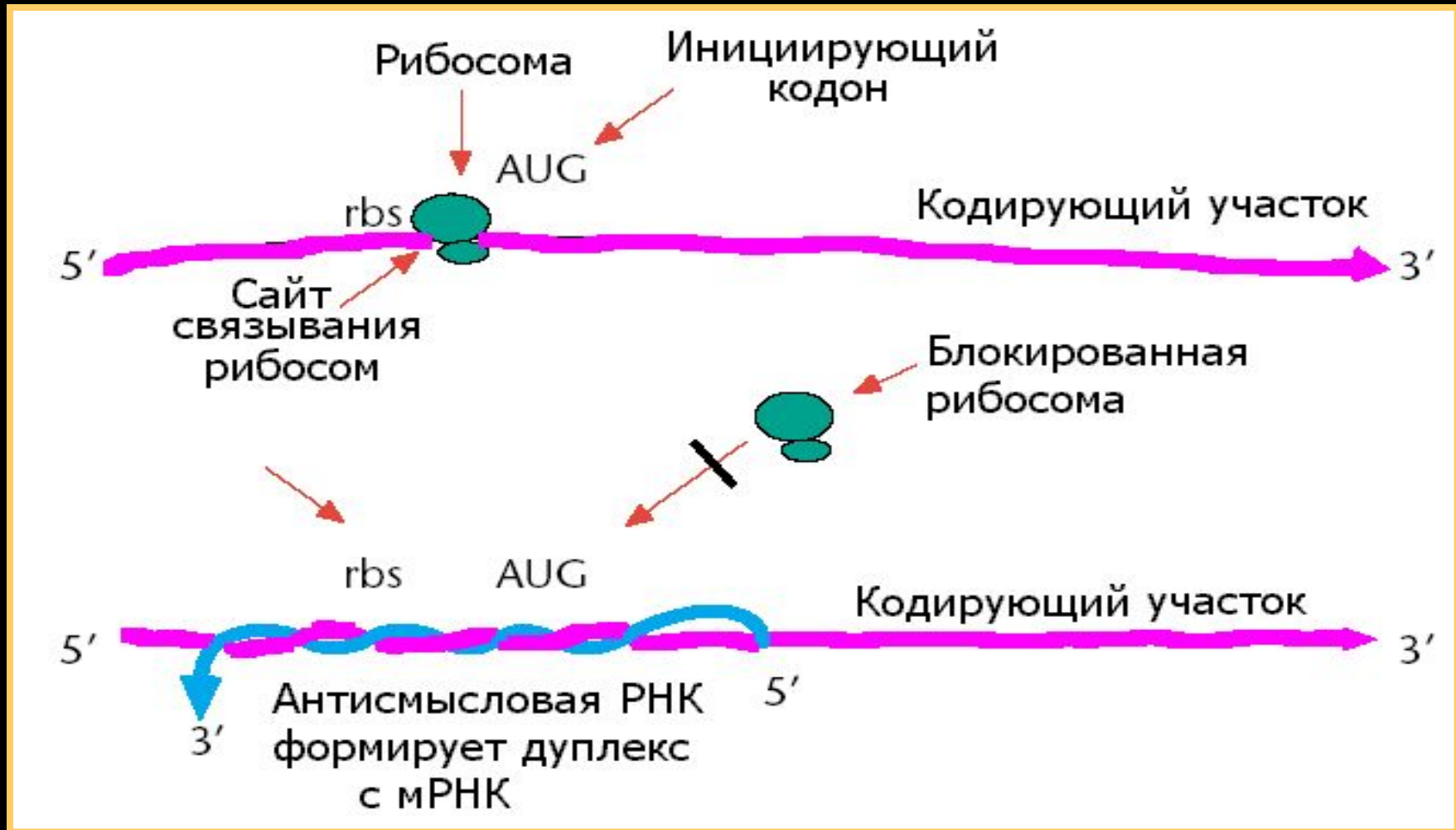
Второй уровень – взаимодействие репрессора с оператором



Репрессор способен связываться с оператором только в присутствии триптофана (конечного продукта этого метаболического пути). Т.е. триптофан является коррепрессором. Таким образом триптофановый оперон находится под негативным контролем.
Оперон является репрессируемым.

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ НА
ТРАНСЛЯЦИОННОМ И
ПОСТТРАНСЛЯЦИОННОМ УРОВНЯХ

Регуляция экспрессии генов с помощью трансляционных репрессоров (антисмысловых РНК)



Антисмысловые РНК комплементарны транскрибируемой мРНК

Регуляция экспрессии генов на посттрансляционном уровне многообразна

1. Стабильность полипептидов в клетках зависит от протеаз, играющих важную регуляторную роль. Они осуществляют процессинг при их секреции и транспорте через мембраны, превращают неактивные пре-белки в активные белки, отщепляют N-концевой формилметионин и т.д.
2. Протеазы гидролизуют нефункциональные, денатурированные, испорченные в процессе работы белки и мультиферментные комплексы.

Регуляция экспрессии генов на посттрансляционном уровне многообразна

3. Специальные белки-шапероны обеспечивают правильную третичную структуру белков.
4. Специальные ферментные системы осуществляют модификацию белков, добавляя или удаляя химические группы. Эти изменения в структуре и функции белков являются чувствительным методом клеточной регуляции. Реакции модификации включают фосфорилирование, ацетилирование, метилирование, аденилирование, рибозилирование, убиквитинирование и т.д. В большинстве случаев модификация белков является обратимой.

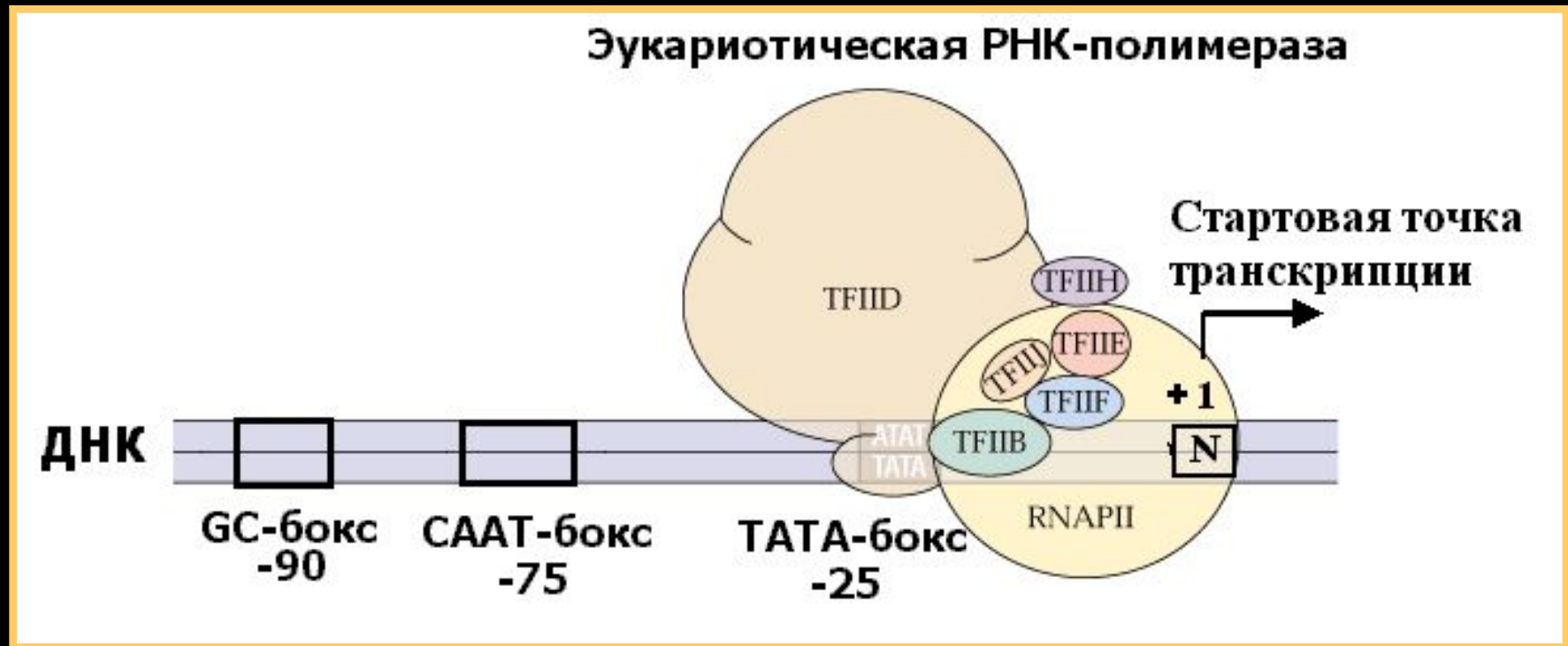
РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ У ЭУКАРИОТ

1

Эукариотические клетки содержат три различные РНК-полимеразы

- РНК-полимераза I – синтез рибосомных РНК (рРНК).
- РНК-полимераза II – синтез матричной РНК (мРНК) и большую часть небольших ядерных РНК (snРНК).
- РНК-полимераза III – синтез транспортных РНК (тРНК) и 5S-рибосомной РНК (5SRНК).

РНК-полимераза связывается с промотором



TFIID – позиционирующий фактор, обеспечивает связывание РНК-полимеразы с промотором.

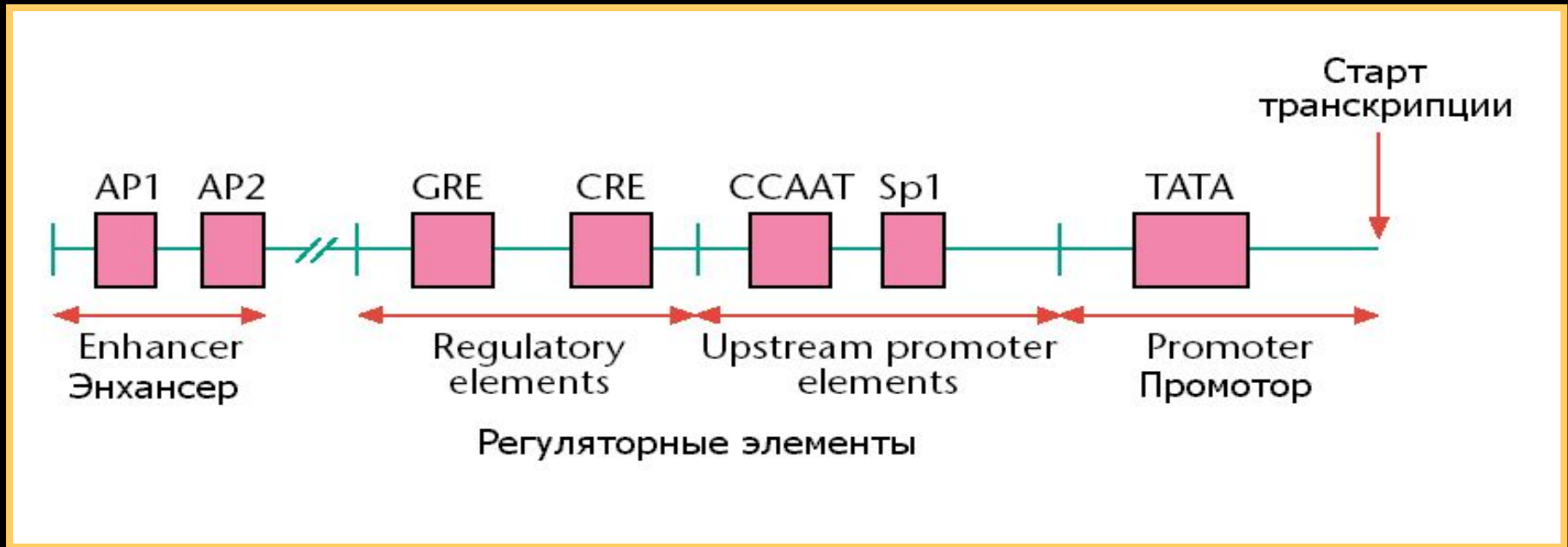
СТРУКТУРА ЭУКАРИОТИЧЕСКОГО ПРОМОТОРА РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ II

- Длина 100-200 п.н.
- В структуре промотора различают *базовую (core)* и *дополнительную (promoter-proximal)* части.
- I. *Базовая* часть служит для точной ориентации РНК-полимеразы II (РНКПII) относительно первого транскрибируемого нуклеотида (обычно это А, его координата +1). Гены, имеющие только базовую часть экспрессируются в любых клетках и не подвержены тканеспецифическому контролю. *Базовая* часть в свою очередь состоит из двух элементов:
 - *инициатор*, включает первый транскрибируемый нуклеотид и предшествующий ему нуклеотид (обычно это С, его координата -1), а также окружающие их пиримидины; общая формула инициатора Py₂CAPy₅.
 - *TATA-бокс*, его консенсусная последовательность TATAAAA, координата -25.
- РНКПII и набор транскрипционных факторов (TFs), работающих на базовой части, образуют базовый транскрипционный аппарат, который обеспечивает минимальный уровень транскрипции любого гена. Субъединица фактора транскрипции TFIID – TBP (TATA-box-binding protein) распознает TATA-бокс и связывается с ним. Это способствует связыванию TFIIB с инициатором и последующему формированию комплекса, который образуется TFIID, TFIIB и другими базовыми TFs (TFIIA, E, F, H, G, и др.), что обеспечивает посадку РНКПII на базовую часть промотора.

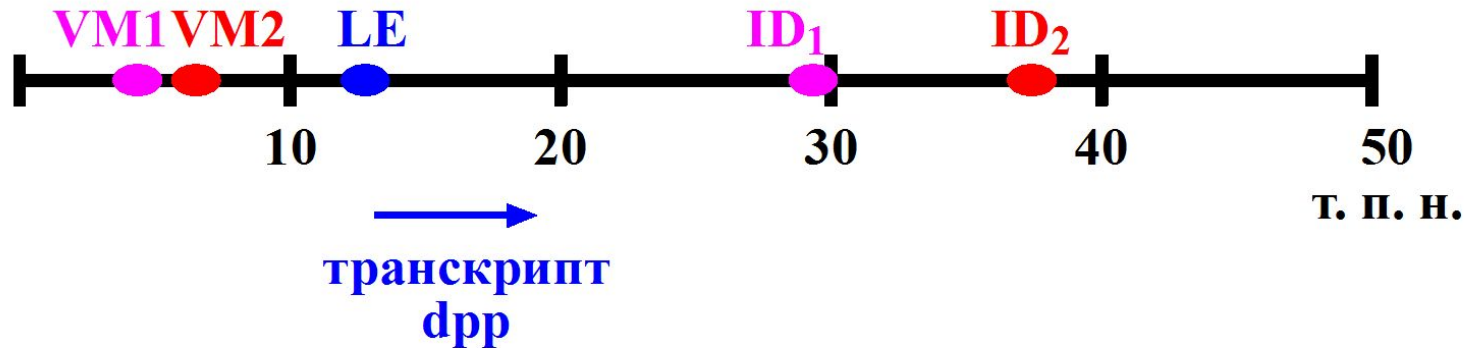
СТРУКТУРА ЭУКАРИОТИЧЕСКОГО ПРОМОТОРА РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ II

- **II. Дополнительная часть промотора включает в себя два или более бокса, характерных для большинства генов. Это СААТ-бокс (консенсус GGCCAATCT, координата -75 – -100) и GC-бокс (консенсус GGGCCG, координата -90 – -200) и другие боксы, участвующие в регуляции.**
- **III. Однако, для обеспечения максимального уровня экспрессии гена использование этих элементов недостаточно. Максимальный уровень транскрипции может быть достигнут с помощью дополнительных distant-independent цис-активных элементов – энхансеров (enhancers) (противоположный эффект вызывают т.н. глушители – silencers). Указанные элементы могут находиться на расстоянии до 100 т.п.н. от базовой части промотора. Их функционирование основано на связывании энхансеров со специфическими белками – активаторами (соответственно – с репрессорами для глушителей). Эукариотические гены, как правило, экспрессируются на высоком уровне только в определенных тканях и только в ответ на сигналы, такие как гормоны или патогены. Разнообразие комбинаций транскрипционных факторов и других регуляторных белков, связывающихся с различными энхансерами/глушителями может обеспечить широкое разнообразие образцов генной экспрессии.**

Регуляторная зона эукариотического гена



Физическая карта гена *dpp* у дрозофилы



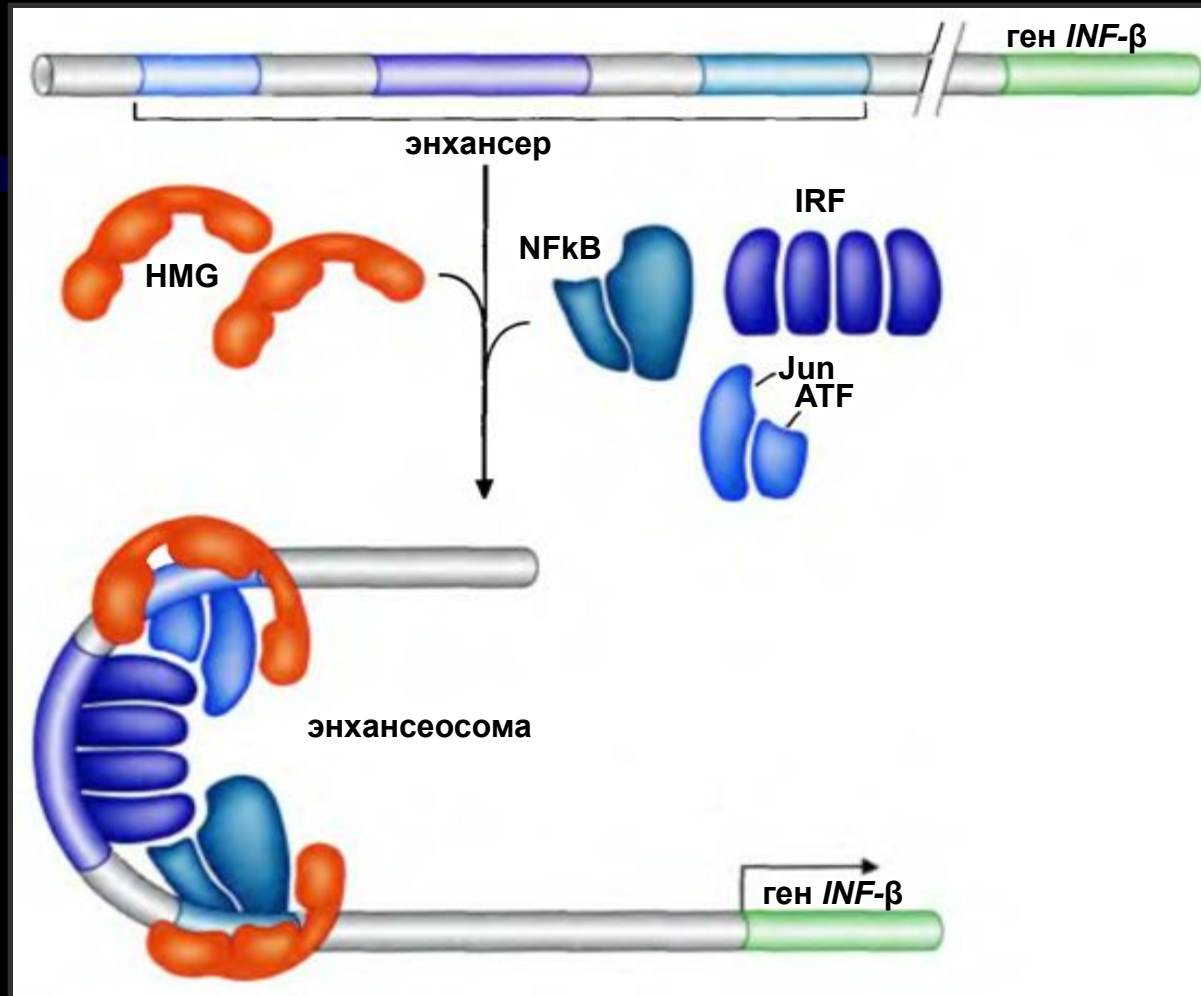
Представлены некоторые из многих энхансерных элементов гена *dpp* дрозофилы на участке 50 т. п. н.

VM1 активирует развитие мезодермы внутренних органов (3-й зародышевый листок) передней части зародыша,

VM2 - задней части.

ID - один из многих энхансерных элементов, активирующих экспрессию имагинальных дисков

Энхансеосома, образуемая в регуляторной области человеческого гена β -интерферона.



Активация гена β -интерферона происходит за счет кооперативного связывания трех активаторов со структурным белком HMG.

Инсуляторы блокируют активность энхансеров

Инсуляторы — последовательности ДНК, особые регуляторные элементы, которые обладают способностью блокировать сигналы, исходящие от окружения. Эта функция инсуляторов включает две активности.

Во-первых, они блокируют взаимодействие между энхансером и промотором, если находятся между ними. Введение инсулятора между При этом инсулятор выполняет только разделительную функцию и не влияет на активность энхансера и промотора по отдельности.

Во-вторых, инсулятор выполняет барьерную функцию для распространения конденсации Х. Показано, что инсуляторы могут разделять два участка Х, различающиеся по степени компактизации.

Энхансеры не обладают специфичностью действия, следовательно, у эукариот существуют механизмы, обеспечивающие невозможность активации генов в ненужном месте или в неправильное время энхансерами соседнего гена.

Инсуляторы представляют собой сайты связывания специфических инсуляторных, белков.

В выяснении механизма действия инсуляторов большую роль сыграло выявление белков, отвечающих за их функцию. Впервые белки, которые блокируют взаимодействие между энхансером и промотором, были охарактеризованы для **su(Hw)-инсулятора дрозофилы**.

su(Hw)-инсулятор содержит 12 сайтов связывания для одного белка, кодируемого геном *su(Hw)*. Сайты фланкированы АТ-богатыми участками, которые способствуют изгибанию молекулы ДНК, необходимому для правильных ДНК-белковых взаимодействий.

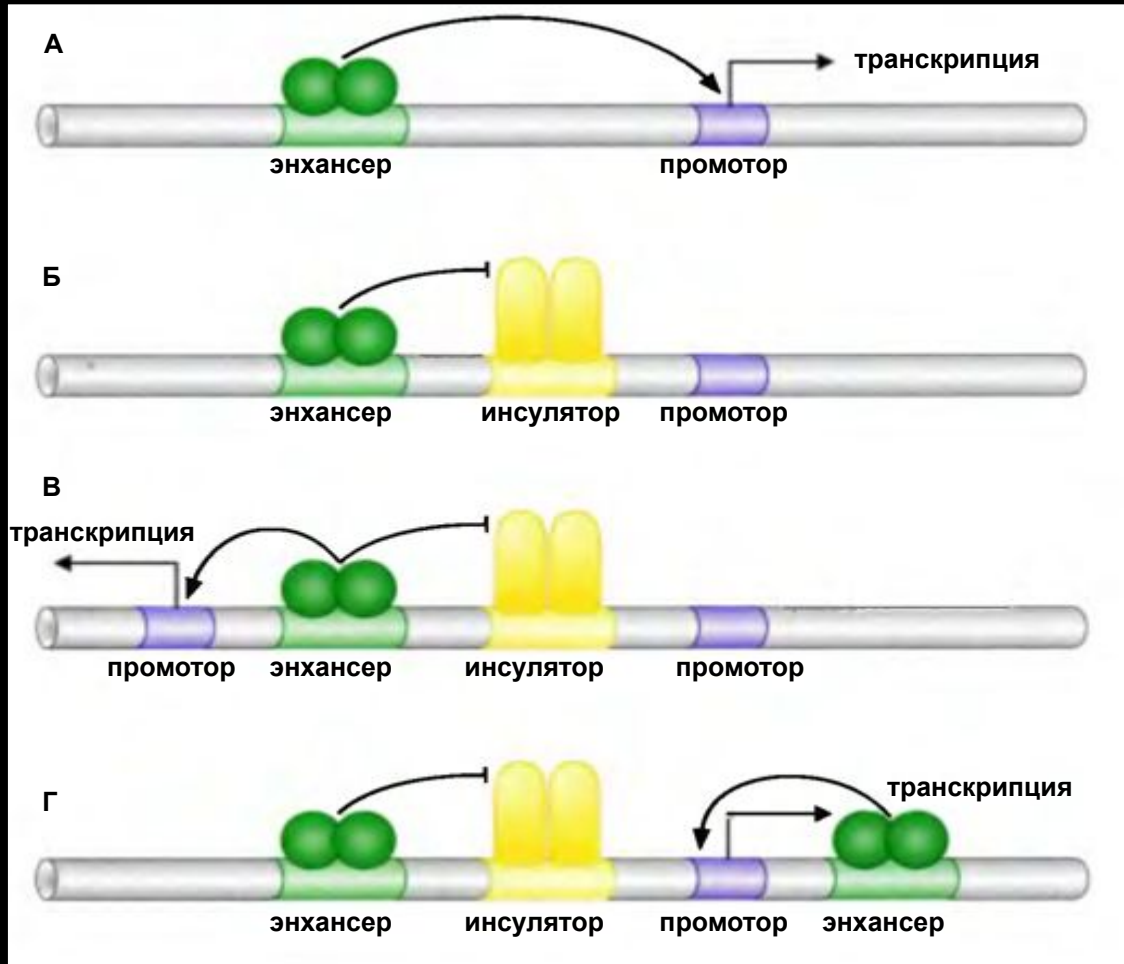
Белок Su(Hw) содержит ДНК-связывающий домен, состоящий из 12 доменов типа цинковые пальцы и домен типа лейциновая молния. Поскольку последний домен обычно требуется для осуществления белок-белковых взаимодействий, полагают, что для функционирования этого инсулятора кроме белка *su(Hw)* необходимы и другие белки.

Куриный β -глобиновый инсулятор является первым инсулятором, открытым у позвоночных. Активность этого инсулятора зависит от трех сайтов связывания с инсуляторным белком **CTCF**. При этом увеличение числа сайтов связывания повышает активность инсулятора.

Интересно, что сайты связывания для белка CTCF были найдены в нескольких других идентифицированных инсуляторах позвоночных. Белок CTCF имеет ДНК-связывающий домен, состоящий из 11 цинковых пальцев. Ранее этот фактор был известен и как активатор, и как репрессор транскрипции.

Была продемонстрирована функциональная роль β -глобинового инсулятора как разграничителя активного и неактивного хроматина.

Инсуляторы блокируют активность энхансеров



Сложные взаимодействия регуляторных элементов с участием инсуляторов обеспечивают многообразие нюансов экспрессии генов.

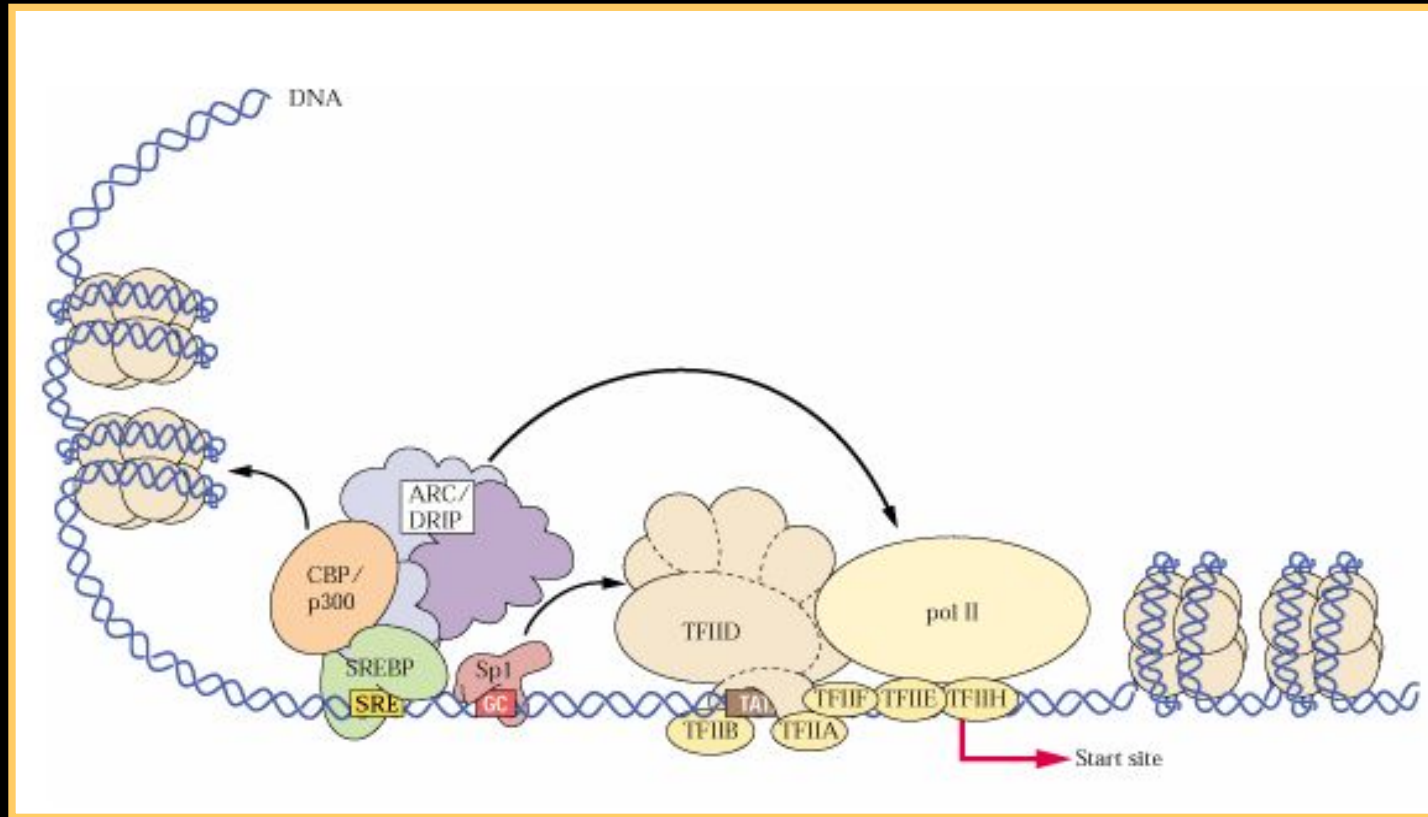
А – показан промотор, регулируемый активаторами, связанными с энхансером.

Б – между промотором и энхансером расположен инсулятор, который блокирует действие активаторов.

В – энхансер может активировать другой промотор в близлежащей области.

Г – промотор может активироваться за счет действия энхансера, расположенного в нижележащей последовательности.

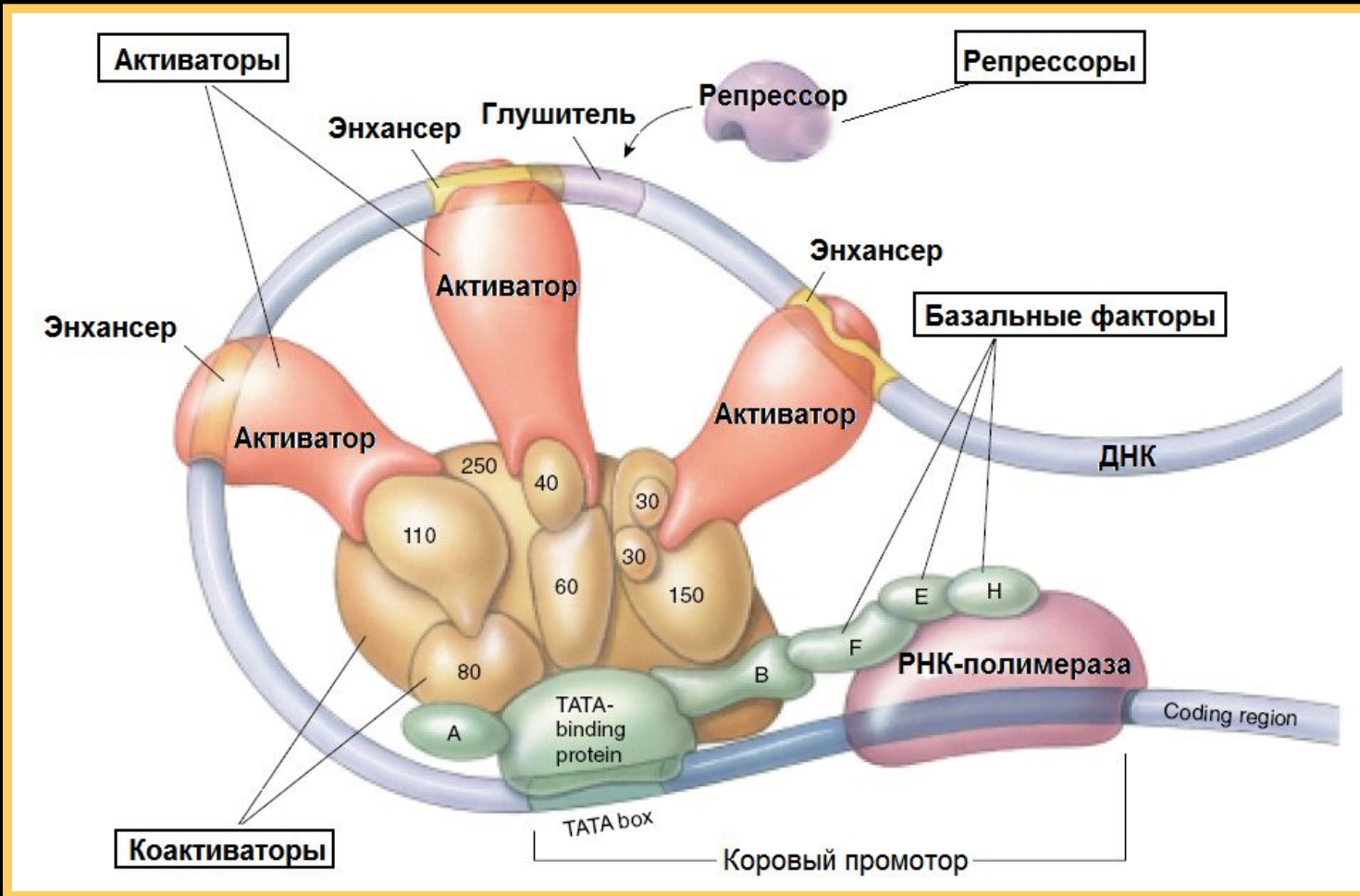
Регуляция транскрипции у эукариот



РНК-полимераза эукариот не может самостоятельно инициировать транскрипцию. Для ее активации необходимо большое число белков (факторов транскрипции), которые объединяются в комплекс.

Многие транскрипционные факторы синтезируются или активируются в ответ на определенные сигналы. Сигналами могут служить цАМФ, гормоны и т.д..

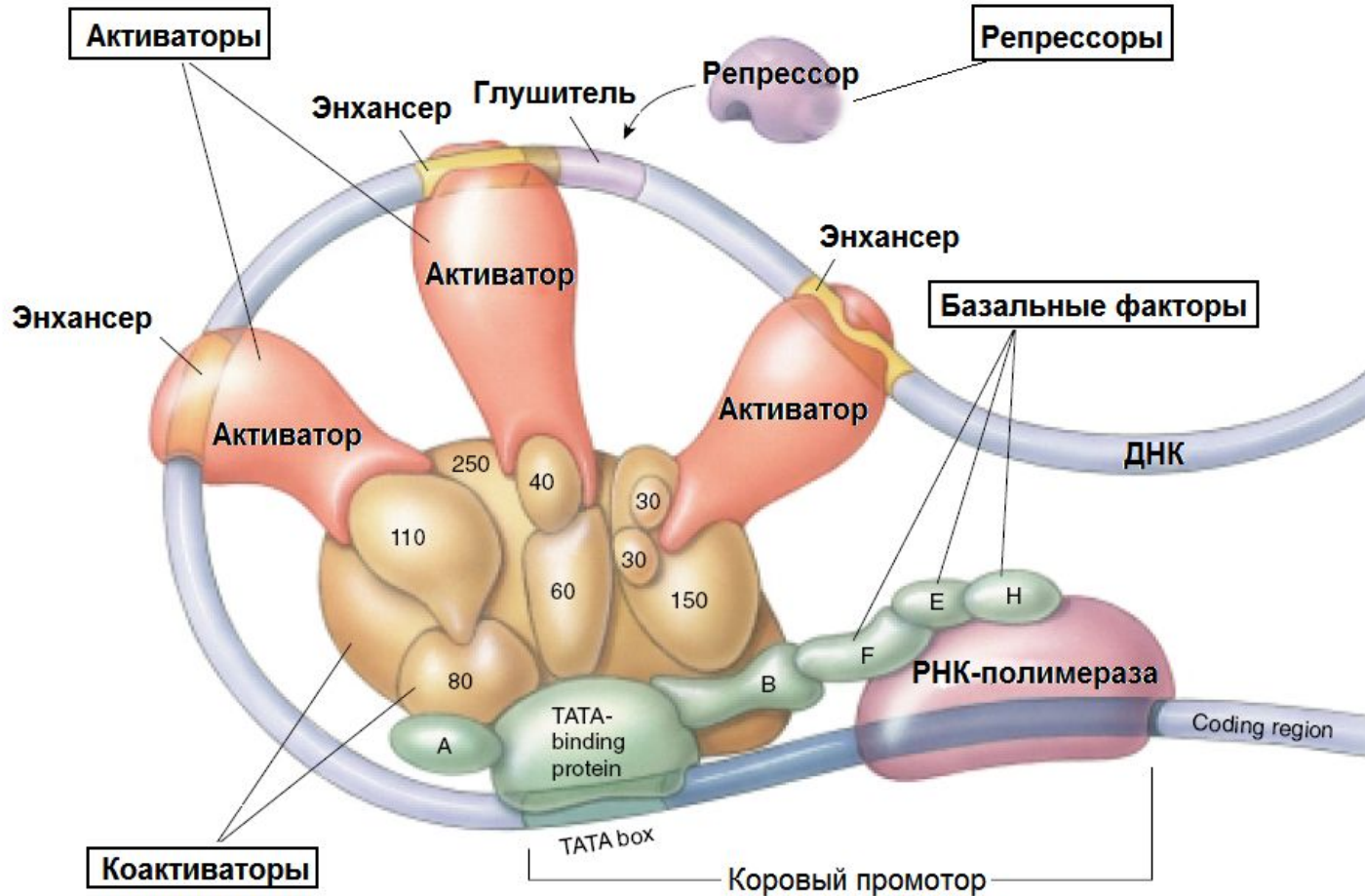
Структура транскрипционного комплекса у человека



Транскрипционный комплекс, позиционирующий РНК-полимеразу, состоит из 4-х типов белков:

1. **Базальные факторы** детерминируют стартовую точку транскрипции
2. **Коактиваторы** – факторы транскрипции, связывающие базальные факторы транскрипции с активаторами.

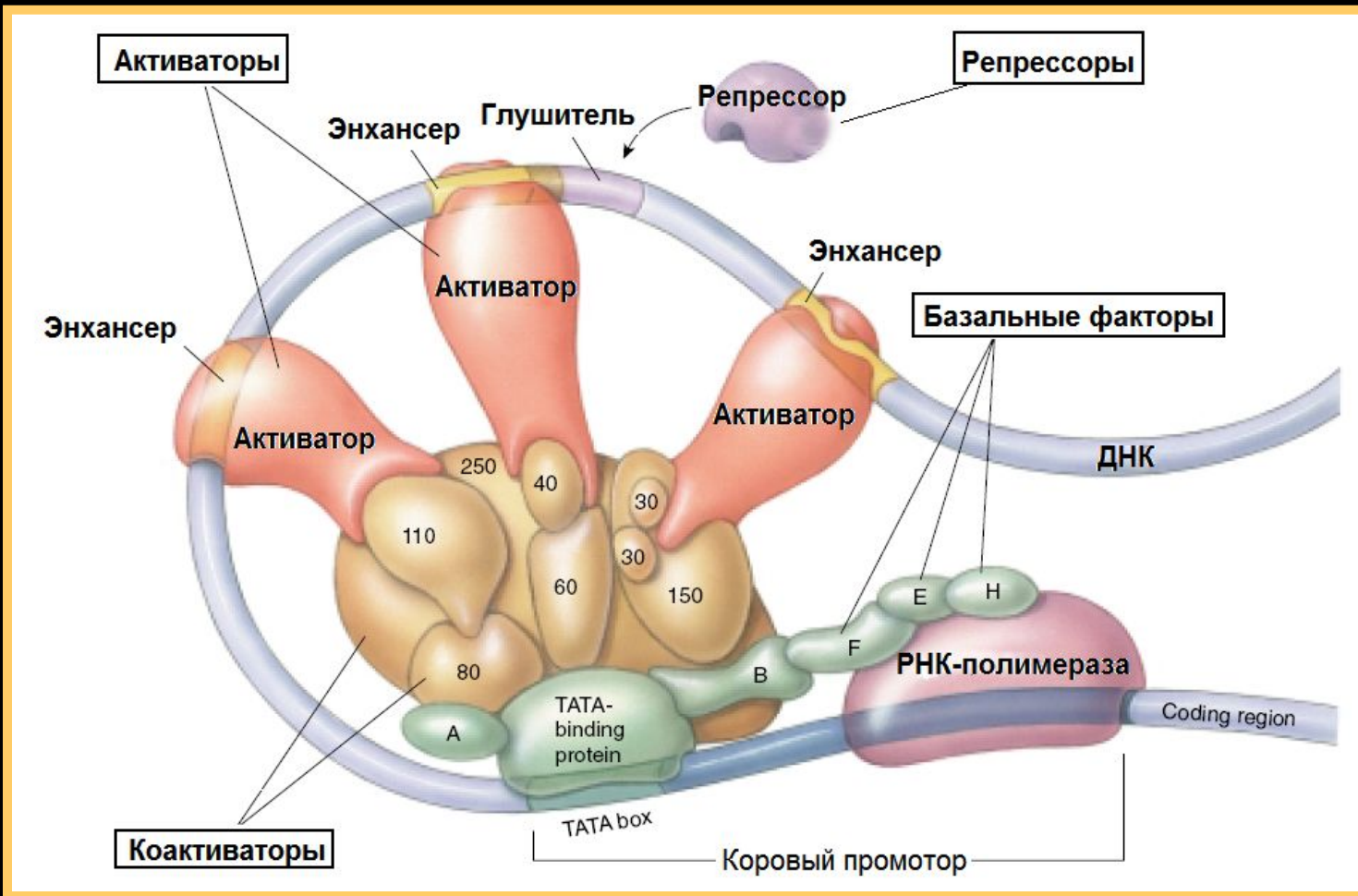
Структура транскрипционного комплекса у человека



Транскрипционный комплекс, позиционирующий РНК-полимеразу, состоит из 4-х типов белков:

3. **Активаторы** связываются с **энхансерами** и увеличивают эффективность связывания базальных факторов с промотором. Т.о. они увеличивают частоту транскрипции. Регуляторные последовательности находятся не только вблизи промотора, но и за тысячи п.н. от него.

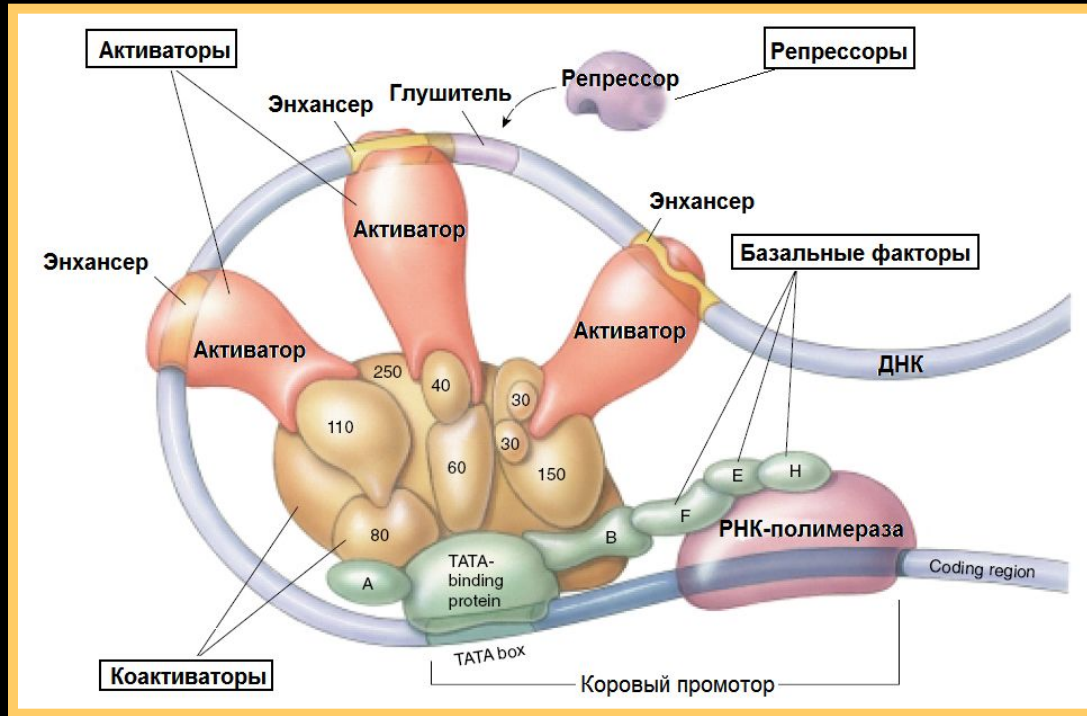
Структура транскрипционного комплекса у человека



Транскрипционный комплекс, позиционирующий РНК-полимеразу, состоит из 4-х типов белков:

4. **Репрессоры** связываются с **глушителями** (они обычно перекрывают энхансерную последовательность) и предотвращают связывание активаторов. Т.о. они снижают частоту транскрипции.

Структура транскрипционного комплекса у человека

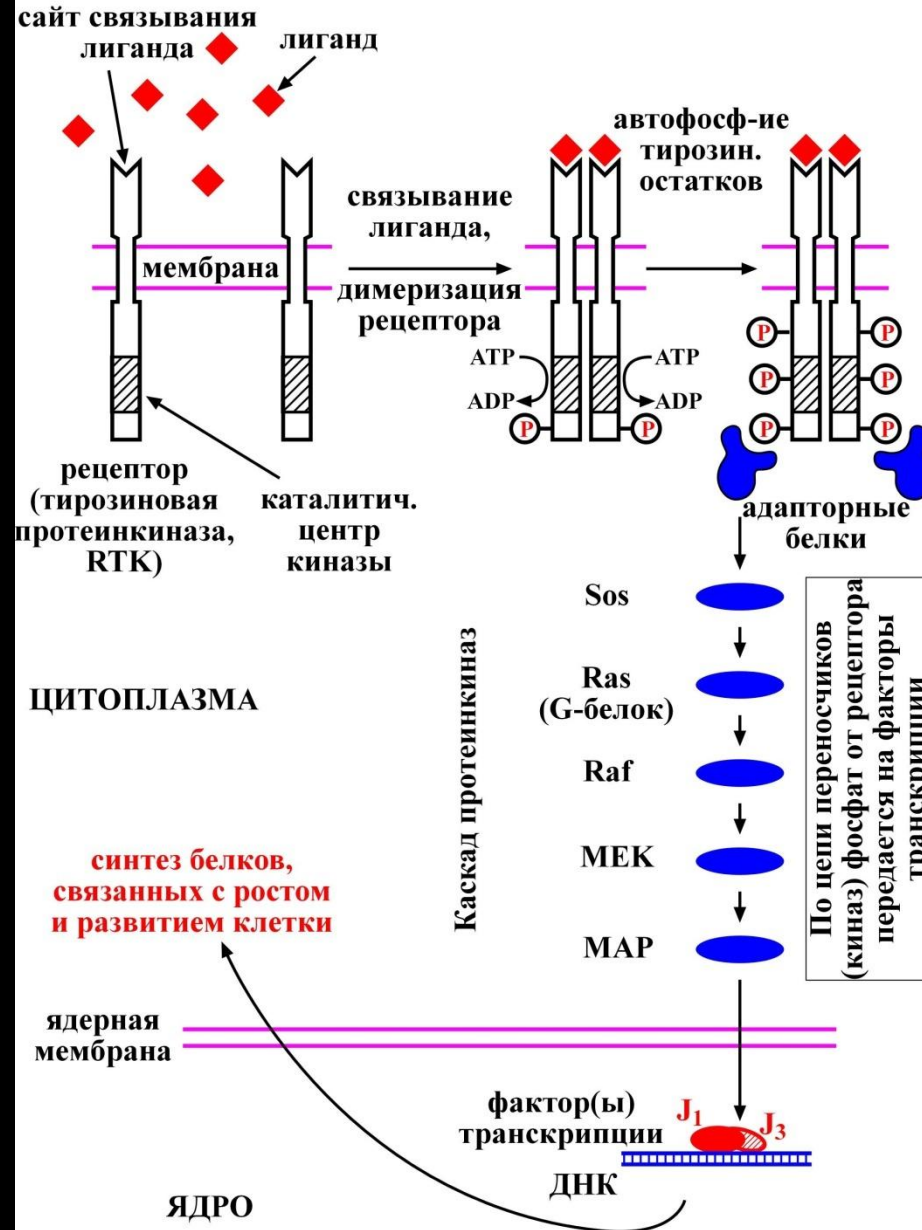


РНК-полимераза эукариот не может самостоятельно инициировать транскрипцию. Для ее активации необходимо большое число белков (факторов транскрипции), которые объединяются в комплекс.

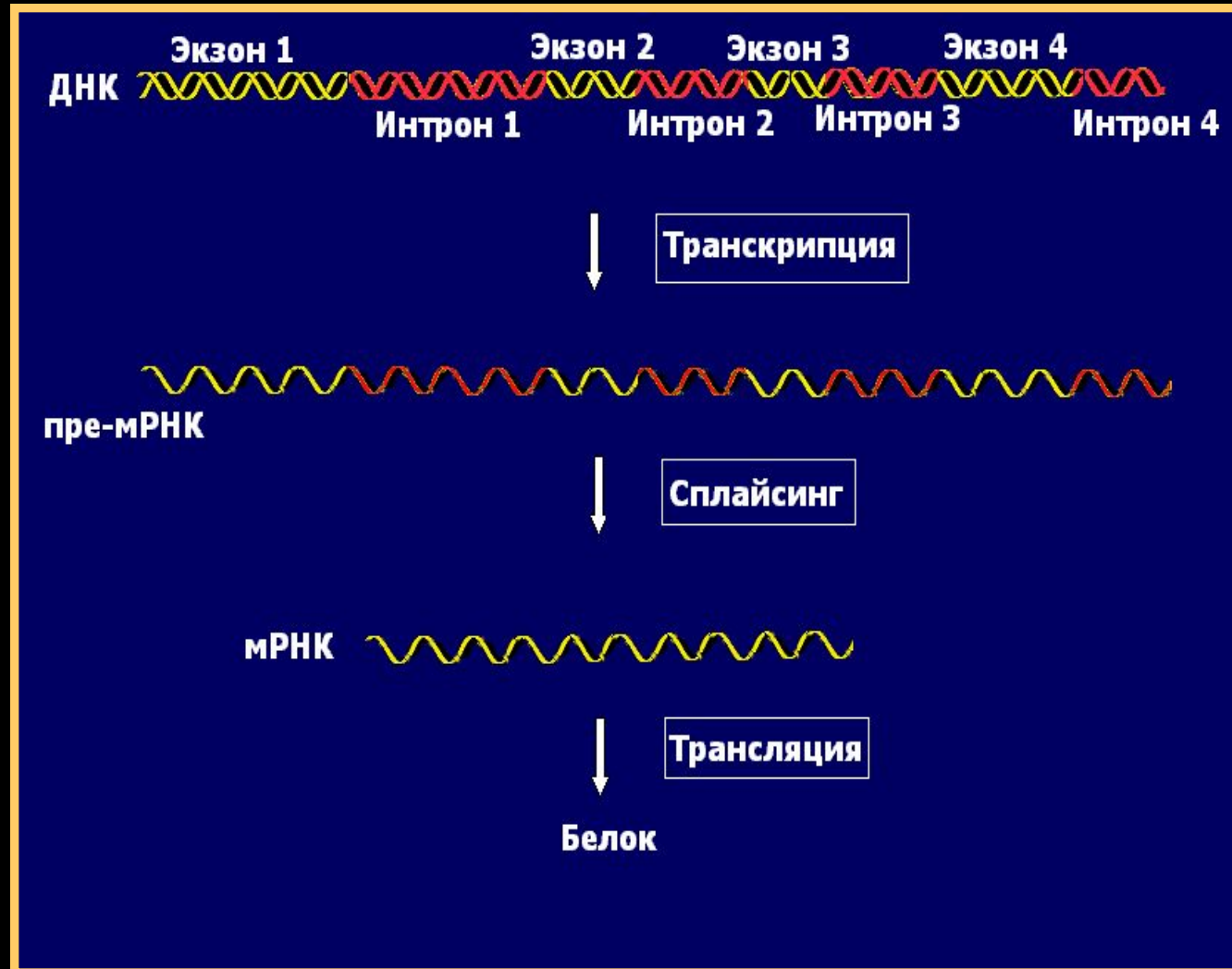
Регуляторные последовательности находятся не только вблизи промотора, но и за тысячи п.н. от него.

Многие транскрипционные факторы синтезируются или активируются в ответ на определенные сигналы. Сигналами могут служить цАМФ или гормоны.

Последовательность реакций передачи сигнала от полипептидного фактора роста (лиганда) к клеточному ядру (обобщенная схема)



Сплайсинг

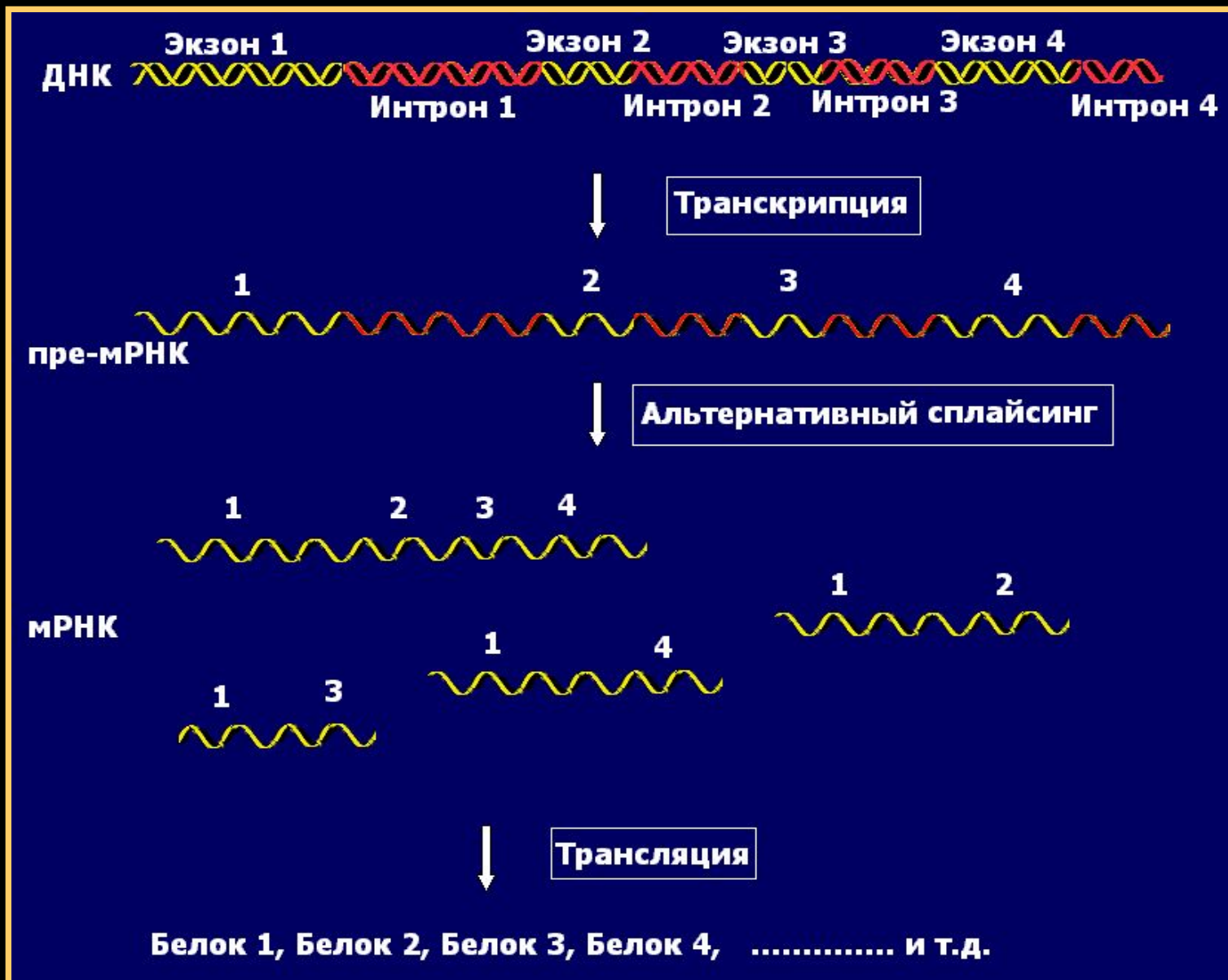


Глобин мыши – 2 интрона
Цитохром дрожжей – 6 интронов
Проколлаген – 50 интронов
Гистон – 0 интронов

Процесс удаления из пре-РНК интронов и соединение в одну последовательность экзонов называется **сплайсингом**.

- Альтернативный сплайсинг – процесс, позволяющий индивидуальным генам продуцировать множество различных активных белковых изоформ.

Альтернативный сплайсинг



Примеры альтернативного сплайсинга

- Кальцитонин и белок CGRP - различные пептиды, образующиеся в результате альтернативного сплайсинга одного гена. Кальцитонин образуется в клетках щитовидной железы и является пептидным гормоном, регулирующим уровень кальция в крови. Белок CGRP – синтезируется в нейронах и является сосудорасширяющим белком, участвующем в формировании вкусовых ощущений.
- Один из ядерных генов риса продуцирует два совершенно неродственных белка – один является митохондриальным рибосомным белком S14, второй – В-субъединицей митохондриальной сукцинатдегидрогеназы.

РНК-интерференция (RNA silencing)

- РНК-интерференция (RNA silencing) – это подавление экспрессии генов у эукариот (замалчивание генов) на посттранскрипционном уровне, индуцированное короткими интерферирующими РНК (small interfering RNA, siРНК).

The RNAi revolution

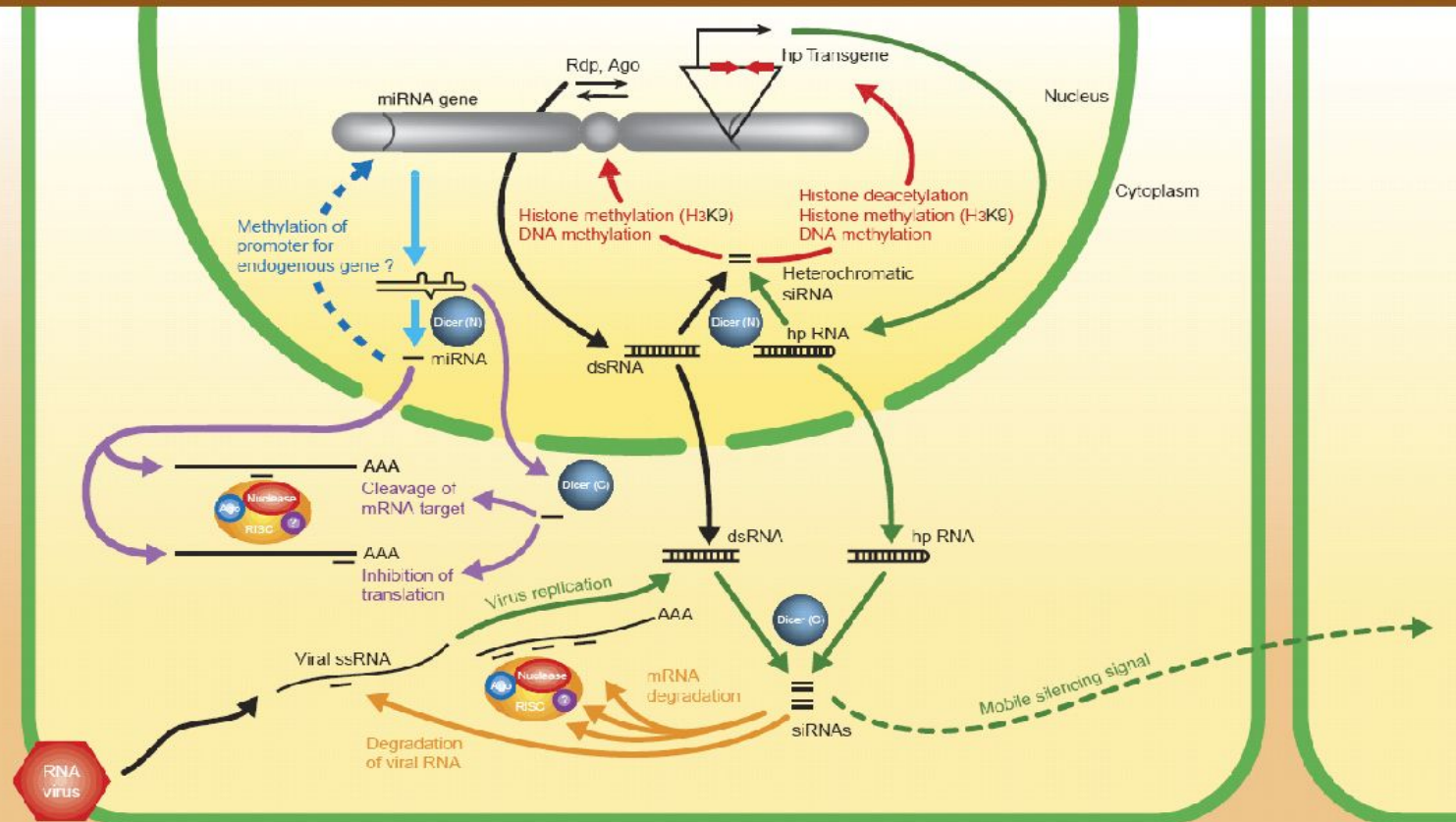
Carl D. Novina and Phillip A. Sharp

The term RNAi — short for RNA interference — crops up again and again in biology research these days. This is in part because of its power as a laboratory tool, and in part because it is a widespread natural phenomenon.

Journal of
Cell Science

The Small RNA World

E. Jean Finnegan and Marjori A. Matzke



Малые РНК

- разрезание матричной РНК (мРНК)
- репрессия трансляции
- ремоделирование хроматина

**регуляция экспрессии генов на
транскрипционном и
посттранскрипционном уровнях**

История открытия

1995 г. Guo S. and Kemphues K.J.
Метод антисмысловых РНК



В цитоплазму эмбрионов нематоты ***Caenorhabditis elegans*** вводили РНК в антисмысловой ориентации к гену *par-1*. Контроль: РНК в смысловой ориентации (соответствующая мРНК) к тому же гену.

Результат: замалчивание гена вызывала и антисмысловая РНК, и **смысловая РНК**

История открытия

1998 г. Fire A. and Mello C.

Объект: *Caenorhabditis elegans*



Эндрю Файер



Крэйг Меллоу

Продemonстрировали:

именно двунитевая РНК является непосредственным агентом в подавлении экспрессии генов, которая присутствовала в препаратах с однонитевыми молекулами как примесь.



агент, инициирующий замалчивание генов
dsRNA (double-strained RNA)



Нобелевская премия по физиологии и медицине в 2006 г.

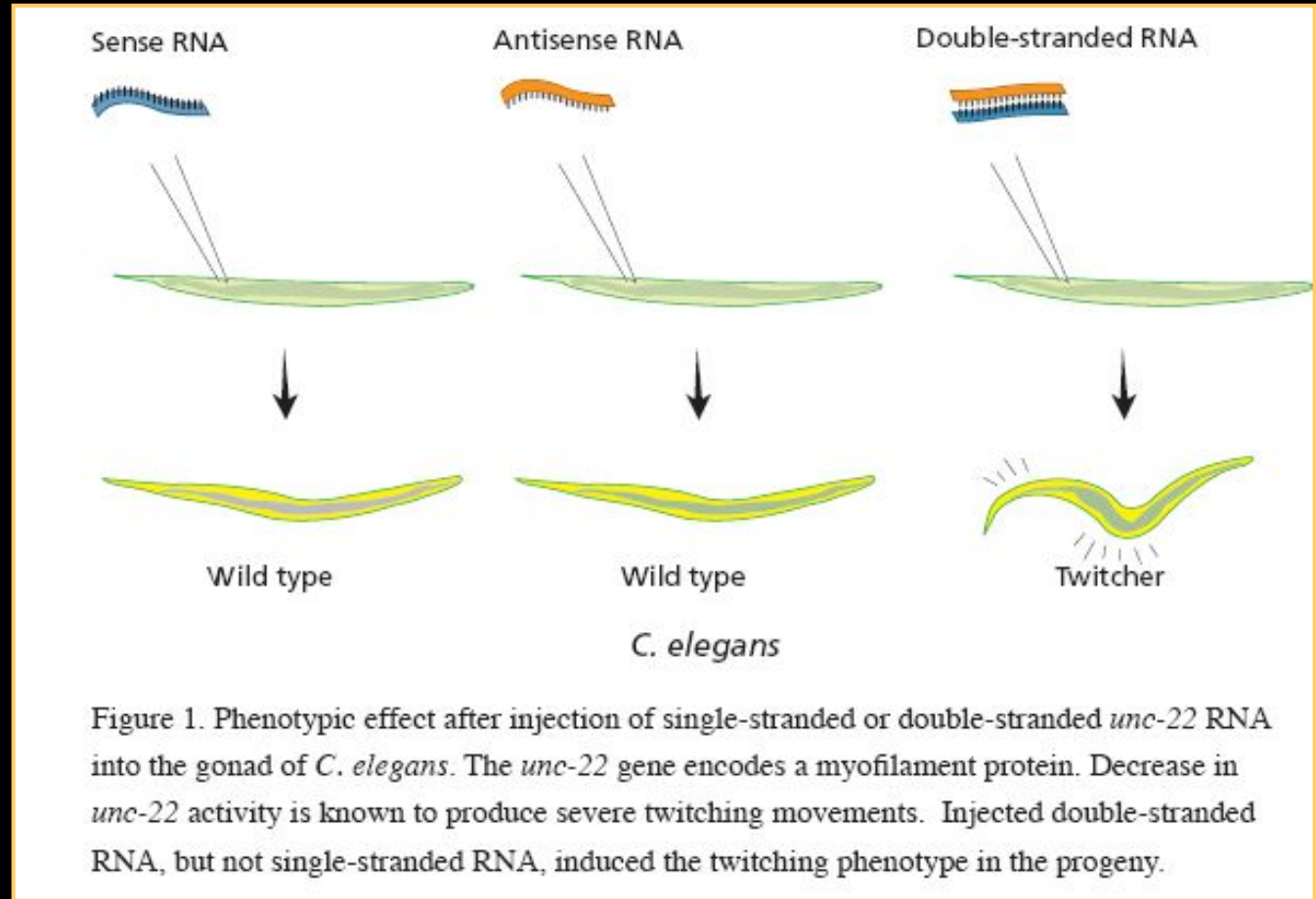
История открытия



Эндрю Файер



Крэйг Меллоу



Нобелевская премия по физиологии и медицине в 2006 г.
за открытие РНК-интерференции – замалчивание генов
двунитевой ДНК (gene silencing)

Основные свойства РНК-интерференции

- Специфичность (подавляется экспрессия только того гена, нуклеотидная последовательность которого полностью соответствует нуклеотидной последовательности вводимой dsРНК).
- РНК-интерференция реализуется на посттранскрипционном уровне (фрагменты dsРНК, соответствующие последовательностям промотора или интрона не вызывали РНК-интерференцию).
- Эффект РНК-интерференции, возникший в каком-либо участке тела *C. elegans* может распространяться по всему организму и передаваться по наследству потомкам.

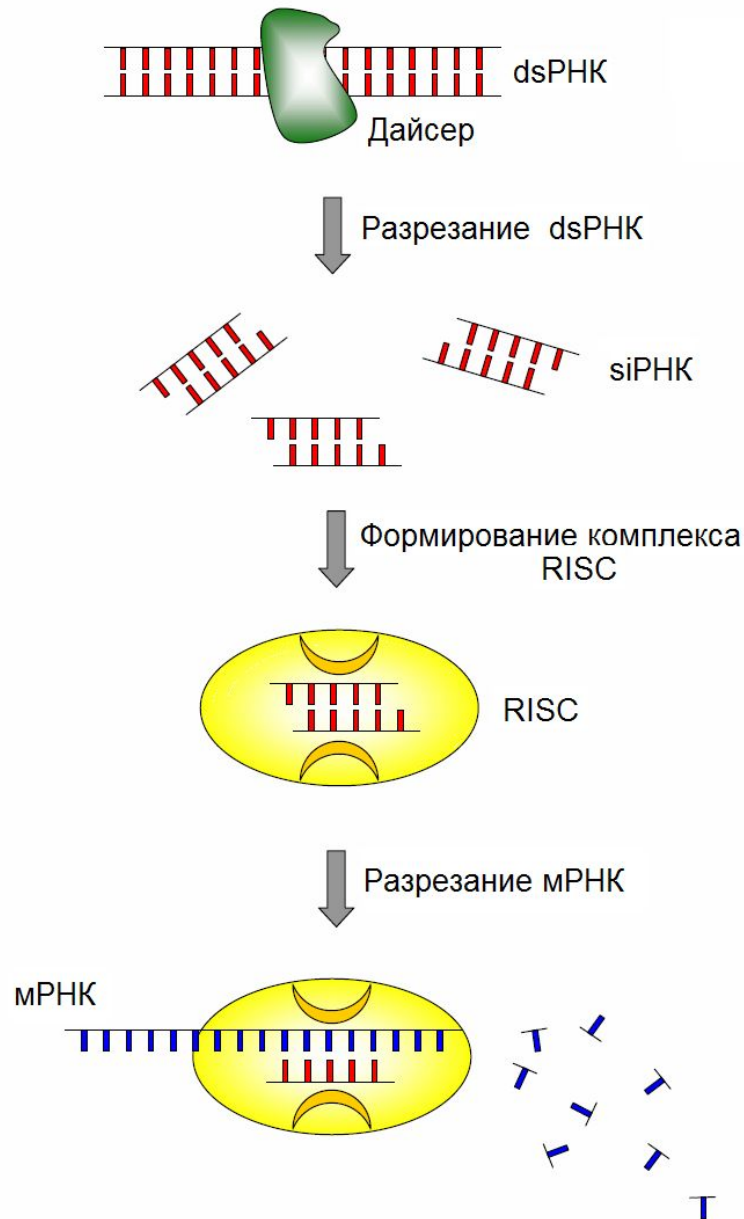
РНК-интерференцию обнаружили у большинства эукариотических организмов

в частности у

- простейших
- кишечнорастворимых
- насекомых
- грибов
- растений
- млекопитающих

Механизм РНК-интерференции

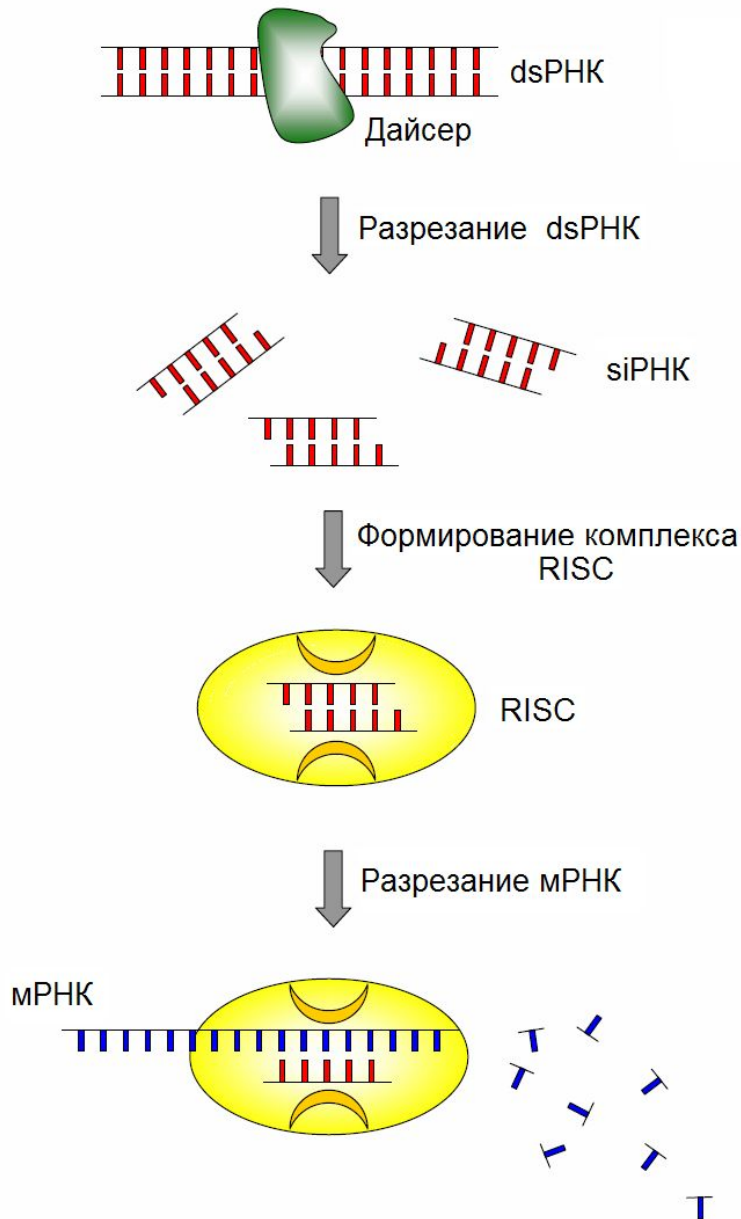
Появление в клетке dsРНК вызывает каскад событий, известный как РНК-интерференция.



1. Фермент Дайсер связывается с dsРНК и разрезает ей на короткие фрагменты в 21-23 п.н. – siРНК (short interfering RNA).

Механизм РНК-интерференции

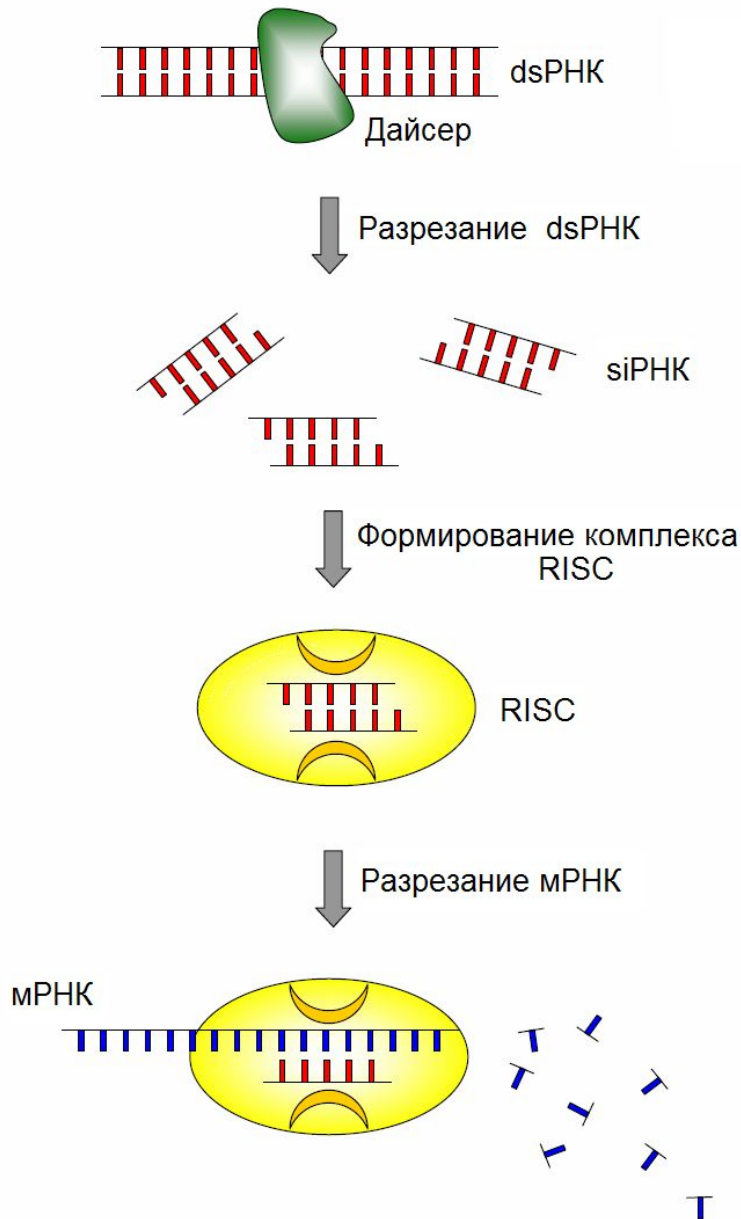
Появление в клетке dsРНК вызывает каскад событий, известный как РНК-интерференция.



2. siРНК связываются с ферментативным комплексом RISC (RNA-induced silencing complex), который использует одну её нить (комплементарную мРНК) для связывания с мРНК.

Механизм РНК-интерференции

Появление в клетке dsРНК вызывает каскад событий, известный как РНК-интерференция.



3. Нуклеазная активность комплекса RISC деградирует мРНК.

Caenorhabditis elegans-идеальный объект для генетических исследований

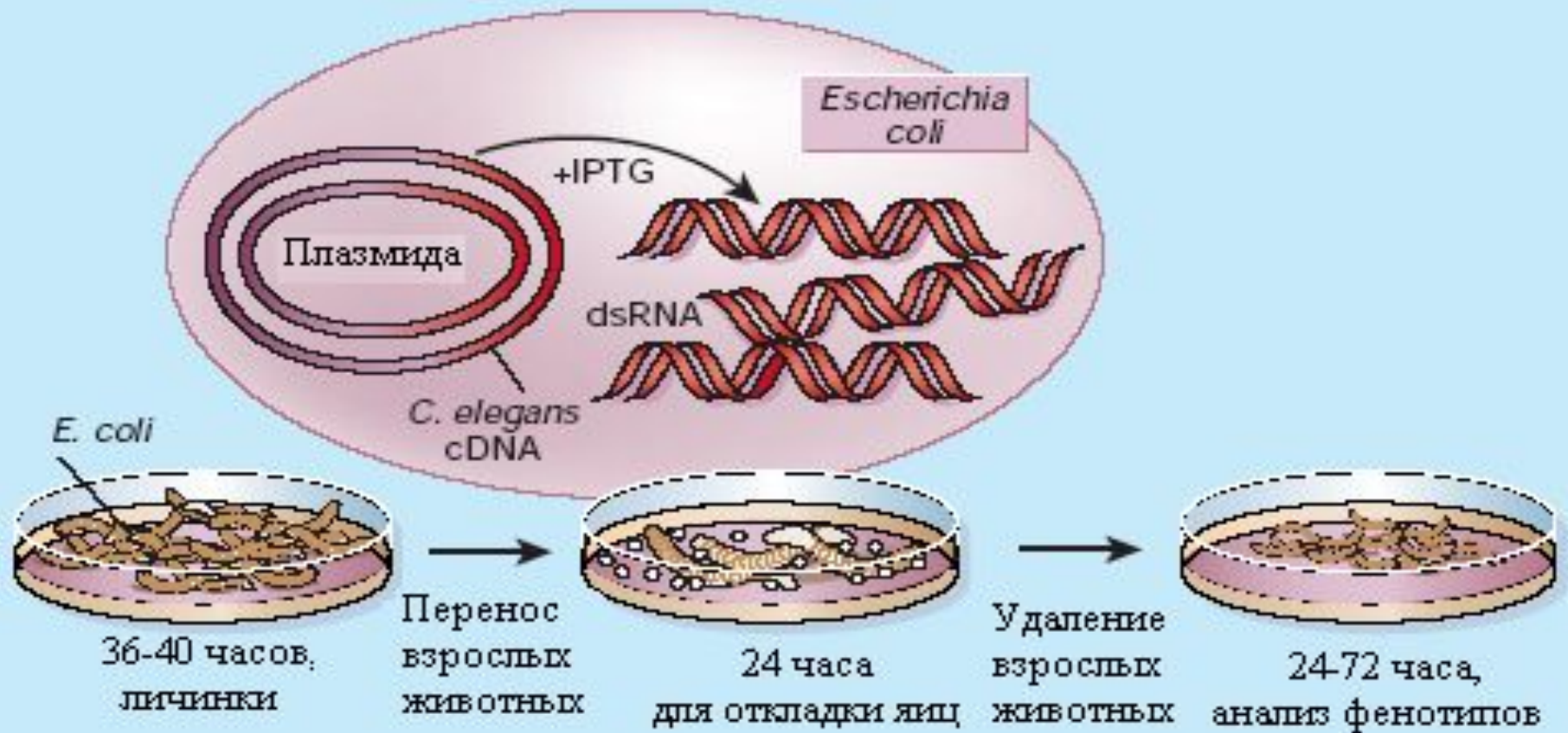


Современные методы
функциональной геномики
РНК-интерференция
получение делеционных
мутантов

- размер 1мм
- гермафродит
- короткий жизненный цикл (50 часов!)
- Известное число клеток (959 клеток)
- гаплоидный набор
5 аутосом, X-хромосома
- геном секвенирован,
~10 млн.п.н., 19 тыс. генов
- хранение мутантных особей криогенным способом

РНК-интерференция как инструмент функциональной геномики *C. elegans*

Kamath et al. и Ashafi et al. (2003)



Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi

Ravi S. Kamath*†, Andrew G. Fraser*†§, Yan Dong*, Gino Poulin*, Richard Durbin‡, Monica Gotta*§, Alexander Kanapin||, Nathalie Le Bot*, Sergio Moreno*¶, Marc Sohrmann‡§, David P. Welchman*, Peder Zipperlen* & Julie Ahringer*

* Wellcome Trust/Cancer Research UK Institute and Department of Genetics, University of Cambridge, Tennis Court Road, Cambridge CB2 1QR, UK

‡ Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, Cambridge CB10 1SA, UK

|| EMBL-European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, UK

¶ Centro de Investigacion del Cancer, CSIC / Univ. Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain

† These authors contributed equally to this work

A principal challenge currently facing biologists is how to connect the complete DNA sequence of an organism to its development and behaviour. Large-scale targeted-deletions have been successful in defining gene functions in the single-celled yeast *Saccharomyces cerevisiae*, but comparable analyses have yet to be performed in an animal. Here we describe the use of RNA interference to inhibit the function of ~86% of the 19,427 predicted genes of *C. elegans*. We identified mutant phenotypes for 1,722 genes, about two-thirds of which were not previously associated with a phenotype. We find that genes of similar functions are clustered in distinct, multi-megabase regions of individual chromosomes; genes in these regions tend to share transcriptional profiles. Our resulting data set and reusable RNAi library of 16,757 bacterial clones will facilitate systematic analyses of the connections among gene sequence, chromosomal location and gene function in *C. elegans*.

Пути РНК-интерференции

эндогенные
последовательности

транспозоны

вирусы

трансгены

dsRNA

miRNA/siRNA

амплификация сигнала

ТЗГ

метилирование
(ДНК/гистоны)

ПТЗГ

деградация
мРНК

подавление
трансляции

«замолкание»
транспозона

модификация
хроматина

ПТЗГ -
пост-
транскрипционное
замолкание генов
ТЗГ -
транскрипционное
замолкание генов

Биологическая роль РНК-интерференции

защита от ДНК- и РНК-содержащих вирусов (растения)

подавление активности мобильных генетических элементов

контроль развития организма

участие в детерминации клеток

изменение структуры гетерохроматина (РНК-зависимое метилирование)

Посттранскрипционное замолкание генов (PTSG; мишень РНК)

Транскрипционное замолкание генов (TSG; мишень ДНК)

Выводы:

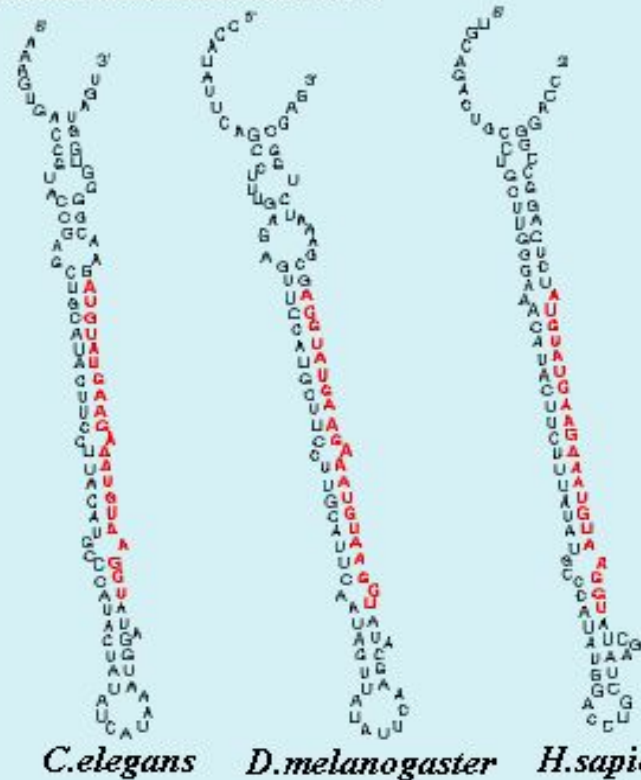
- РНК-интерференция - это подавление экспрессии генов у эукариот на посттранскрипционном уровне, индуцированное короткими интерферирующими РНК.
- Биологическая роль РНК-интерференции заключается в
 - антивирусной защите (растения)
 - контроле перемещения МГЭ
 - участии в регуляции процессов развития
 - ремоделировании хроматина
 - участие в процессе детерминации клеток
- Этот процесс является многоэтапным, контролируется набором генов, кодирующих белки семейства Argonaut, Dicer и др.
- РНК-интерференция – экспериментальный метод функциональной геномики эукариот и генотерапии.

МикроРНК : регуляция экспрессии генов

miR-1 :

5'P₀₄-UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUA-он 3'

Предшественники *miR-1*



микроРНК (miRNA)

- Консервативны у отдаленных видов.
- В процессированной форме представляют собой одноцепочечные РНК длиной около 22 нуклеотидов.
- Комплементарно (или частично комплементарно) связываются с мРНК, что приводит к ее разрушению или к ингибированию трансляции.

Кластер генов *miR*
D.melanogaster



Хромосома 2 г

Кластер генов *miR*
H.sapiens



Хромосома 13

микроРНК: особенности структурной и геномной организации

- Одинаковая последовательность может кодироваться разными генами.
- Гены миРНК чаще всего располагаются между белок-кодирующими генами.
- Могут располагаться в интронах белок-кодирующих генов. Транскрипция происходит параллельно с транскрипцией пре-мРНК данного гена.
- Гены миРНК организованы в кластеры, транскрибируемые как мультицистронные РНК-продукты.



Дополнительная литература

Гвоздев В.А. Транскрипция и механизмы регуляции активности генов. Современное естествознание. Энциклопедия. Т.8, 60-67.

Гвоздев В.А. Регуляция активности генов при созревании клеточных РНК. Современное естествознание. Энциклопедия. Т.8, 68-75.

Жимулев И.Ф. Современные представления о структуре гена у эукариот. Соросовский образовательный журнал, 2000, №7, 17-24.