

Тема: «Экспрессия генов прокариот»

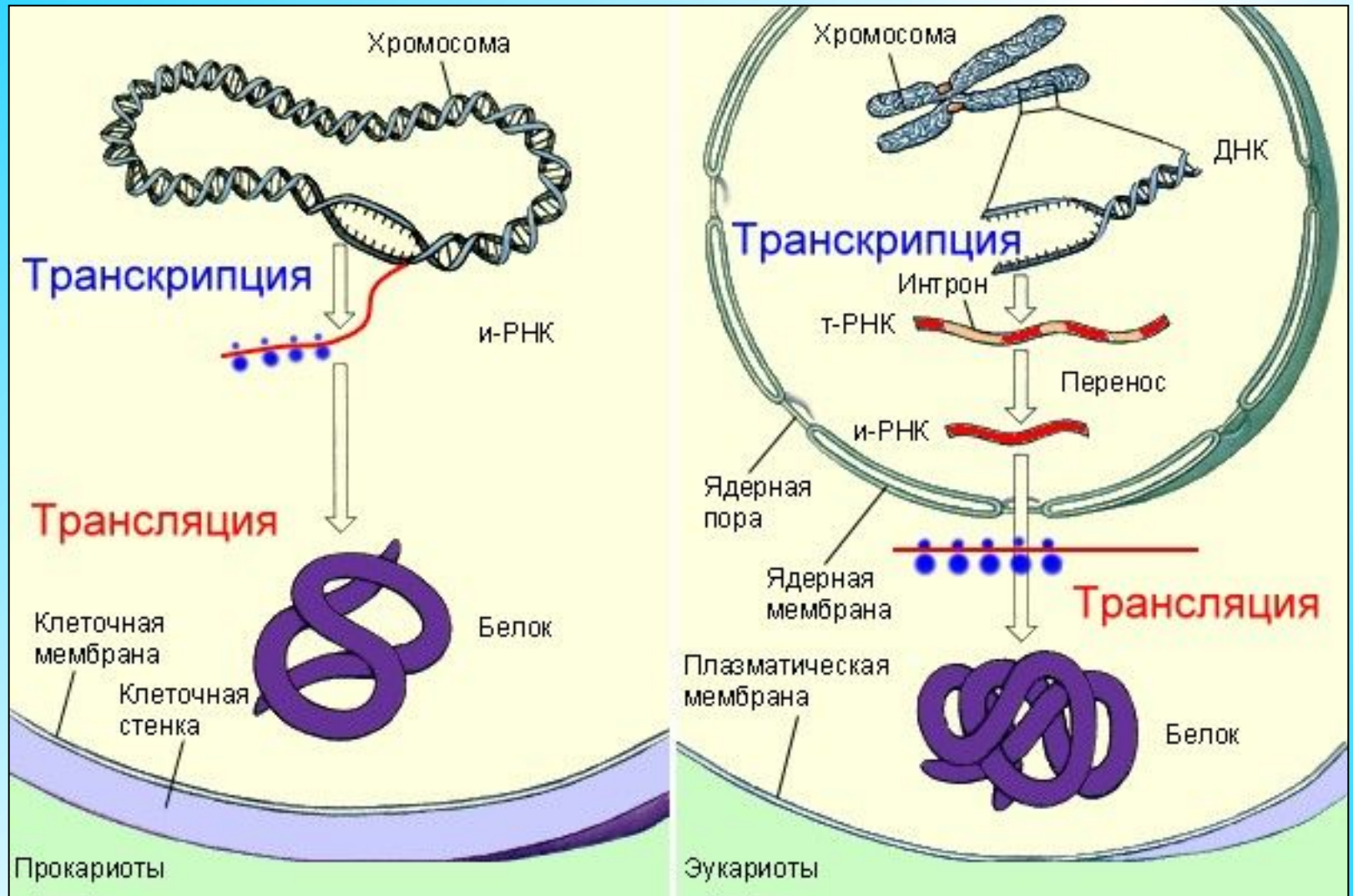
Задачи:

Дать характеристику особенностям экспрессии генов прокариот

Литература

1. Б.Глик, Дж.Пастернак. Молекулярная биотехнология, принципы и применение. Москва «Мир» 2002.
2. А.Я.Николаев. Биологическая химия. Москва «Медицинское информационное агентство» 2004.
3. М.Сингер, П.Берг. Гены и геномы. Москва «Мир» 1998.
4. Н.А.Шишкинская. Словарь биологических терминов. Саратов, издательство «Лицей», 2005

Экспрессия генов



Центральная догма молекулярной биологии: ДНК→РНК→белок.

Экспрессия генов прокариот

Генетическая информация, заключенная в каждой соматической клетке многоклеточного организма, практически идентична. Экспрессия генетической информации должна регулироваться.

Клетки млекопитающих обладают объемом генетической информации в 1000 раз большим, чем клетки *Escherichia coli*.

Экспрессия генов прокариот

Существуют лишь два типа регуляции экспрессии генов — **позитивная и негативная**. Когда благодаря действию специфических регуляторных элементов **уровень экспрессии генетической информации количественно возрастает**, регуляция называется **позитивной**.

Если **уровень экспрессии благодаря действию иных регуляторных элементов понижается**, говорят о **негативной регуляции**.

Регуляторный элемент или молекулу, участвующие в качестве «посредников» в негативной регуляции, называют **негативными регуляторами**; элементы, осуществляющие позитивную регуляцию — **позитивными регуляторами**.

Экспрессия генов прокариот

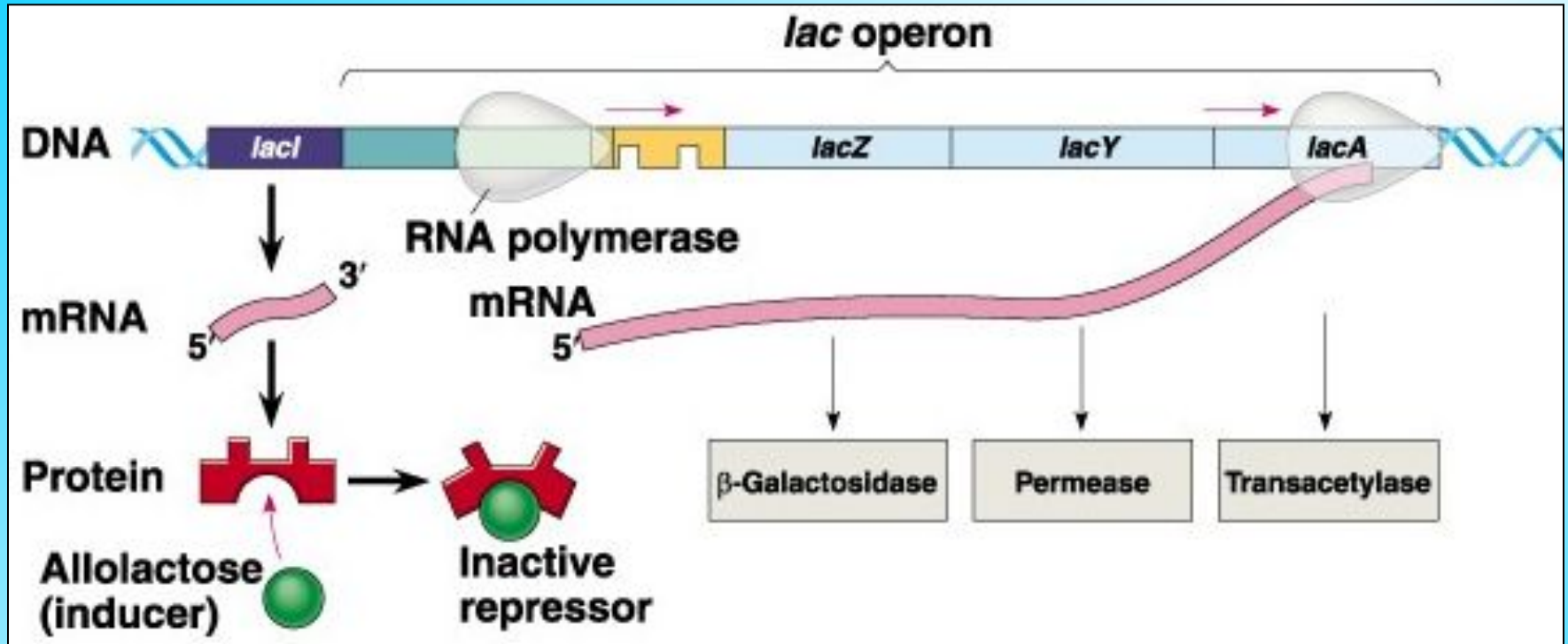
Перед тем как обратиться к регуляции экспрессии, необходимо остановиться на некоторых терминах, принятых для прокариотических систем. *Цистрон* — наименьшая единица генетической экспрессии. Некоторые ферменты и белки состоят из нескольких неидентичных субъединиц. Таким образом, известная формула

«один ген — один фермент»

не является абсолютно строгой. Цистрон — это минимальная экспрессируемая генетическая единица, кодирующая одну субъединицу белковой молекулы. Поэтому вышеупомянутую формулу можно перефразировать как

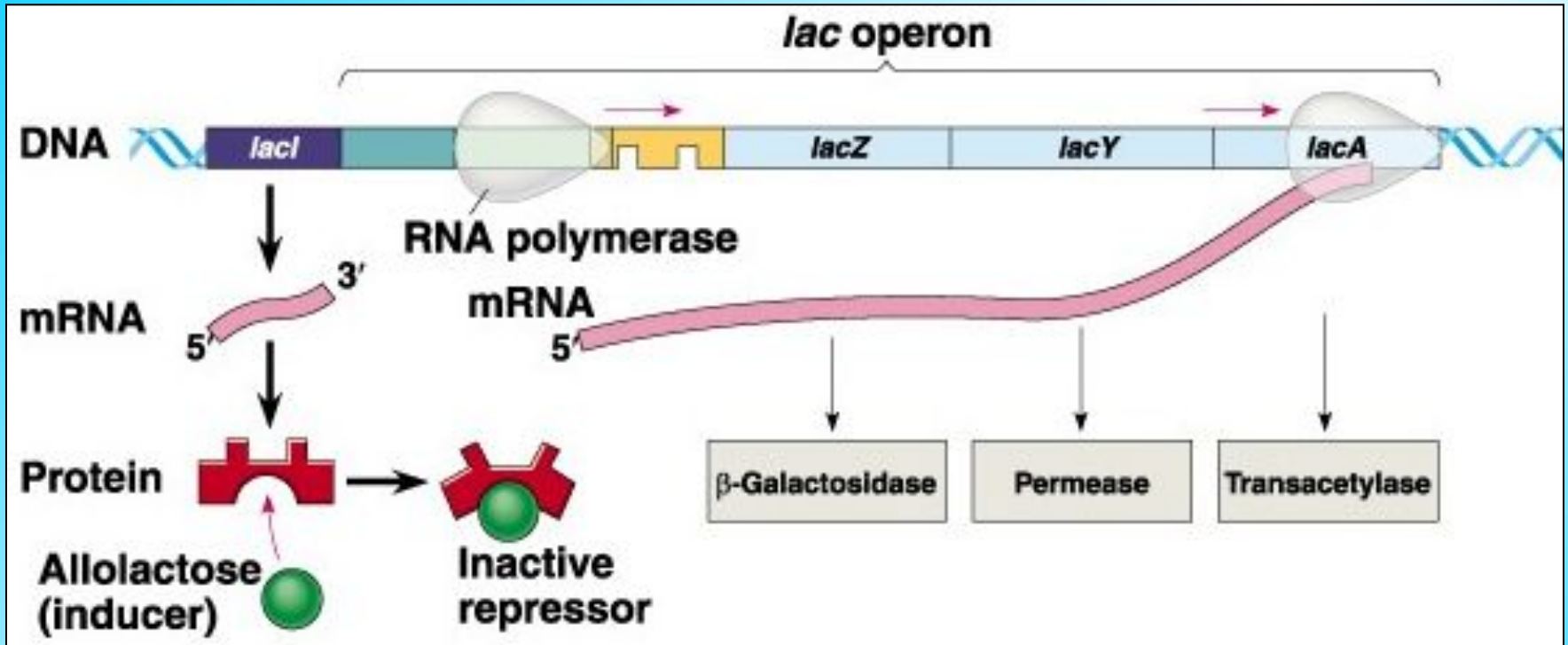
«один цистрон — одна субъединица».

Экспрессия генов прокариот



Лас-оперон. В 1961 г. *Франсуа Жакоб и Жак Моно* описали ставшую теперь классической модель оперона. Их концепция в значительной мере была основана на изучении регуляции метаболизма **лактозы** у кишечной палочки *E. coli*. Молекулярный механизм регуляции генов, участвующих в метаболизме лактозы, на сегодняшний день наиболее изучен.

Экспрессия генов прокариот

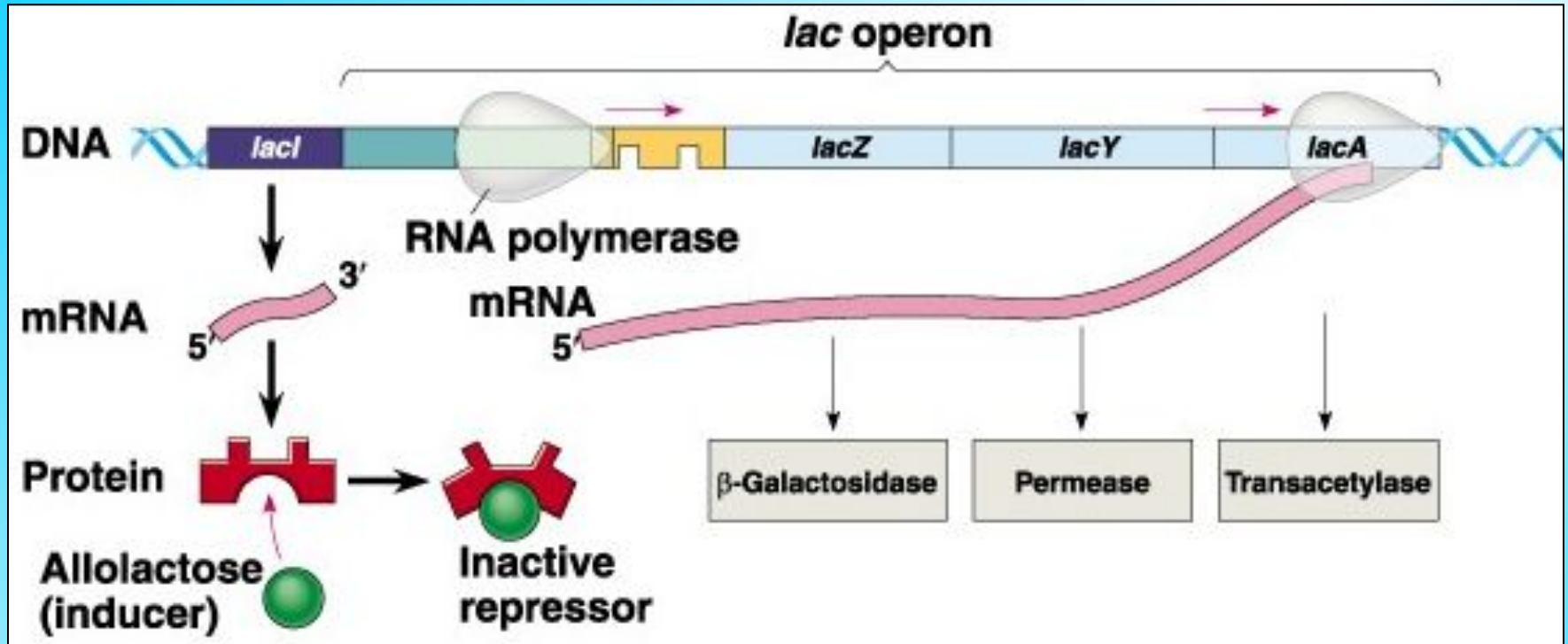


Ген *LacZ* отвечает за синтез фермента β -галактозидазы, гидролизующего лактозу до галактозы и глюкозы.

Ген *LacY* отвечает за синтез пермеазы, осуществляющей активный транспорт галактозы в клетку.

Функциональное значение гена *LacA* неизвестно.

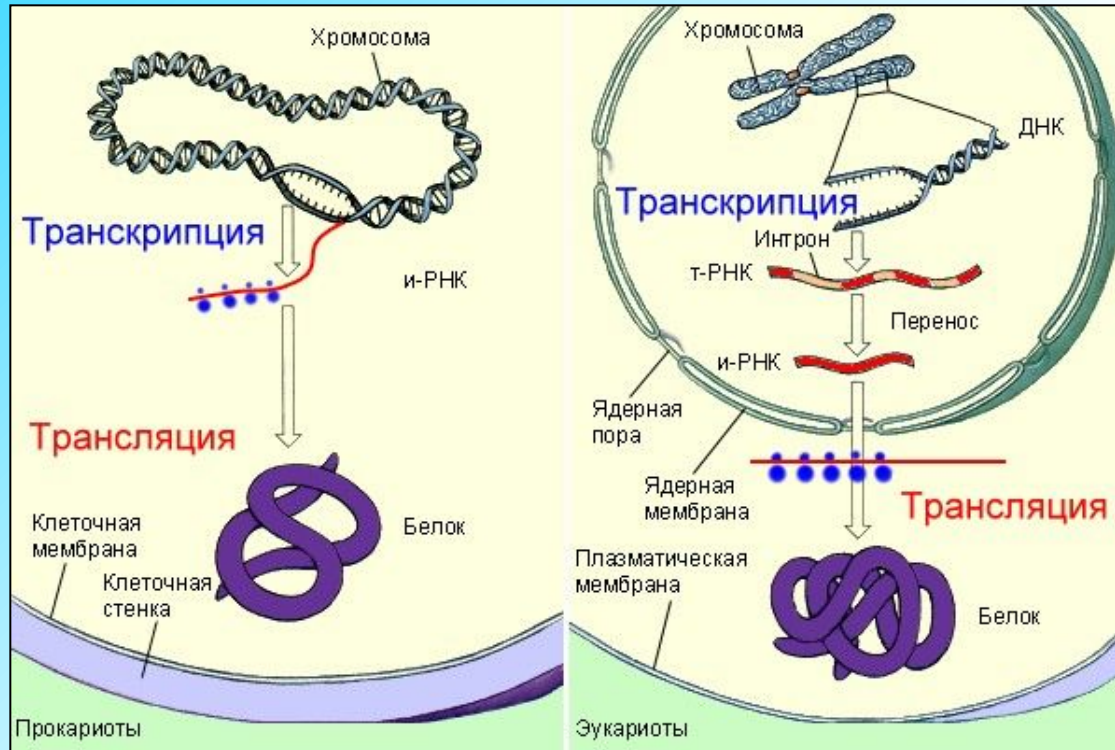
Экспрессия генов прокариот



Структурные гены трех соответствующих ферментов связаны физически и образуют так называемый **Лак-оперон**. Такая генетическая компоновка структурных и соответствующих регуляторных генов обеспечивает скоординированную экспрессию всех трех ферментов метаболизма лактозы.

Все три гена транскрибируются в виде общей молекулы мРНК, содержащей независимые кодоны начала трансляции (AUG) и стоп-кодоны (UAA) для каждого цистрона.

Экспрессия генов прокариот



Такой тип мРНК называется **полицистронной мРНК**. Образование полицистронных мРНК характерно главным образом для прокариотических организмов.

У прокариот синтез всех видов РНК (мРНК, рРНК, тРНК) осуществляется единственным видом ферментов – ДНК-зависимой РНК-полимеразой.

Экспрессия генов прокариот



Транскрипция – *синтез РНК на матрице ДНК*. РНК-полимераза может присоединиться только к промотору, который находится на 3'-конце матричной цепи ДНК, и двигаться *только от 3'- к 5'-концу* этой матричной цепи ДНК.

Промотор имеет два сайта связывания для РНК-полимеразы. Один из них обычно представляет собой нуклеотидную последовательность

TATAAT
ATATTA

ТАТА-бокс, или **бокс Прибнова** (аналог бокса Хогнесса эукариот) состоит из 6 или 7 пар оснований и расположен на расстоянии примерно 10 нуклеотидов до того нуклеотида, с которого начинается транскрипция.

Экспрессия генов прокариот

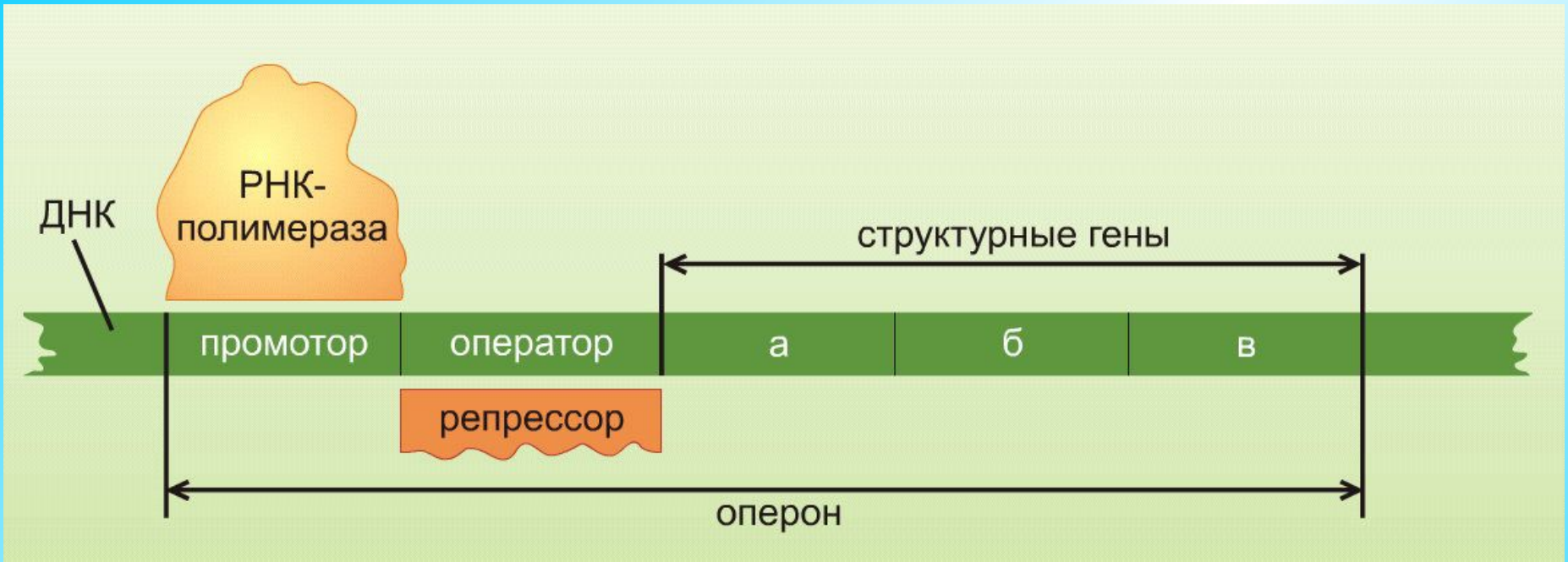


Вторая последовательность

TTGAC
AACTG

расположена на расстоянии примерно 35 нуклеотидов до сайта инициации (-35-последовательность). -35-последовательность участвует в связывании РНК-полимеразы, которое предшествует перемещению фермента в Прибнов-бокс.

Экспрессия генов прокариот



Когда клетки *E. coli* выращивают в среде, содержащей **смесь лактозы и глюкозы**, в качестве единственных источников углерода, то в первую очередь метаболизируется глюкоза.

После исчерпания глюкозы в среде рост клеток временно приостанавливается, пока не пройдет индукция лактозного оперона.

Экспрессия генов прокариот



Физиология индукции Лас-оперона в настоящее время хорошо изучена. Экспрессия нормального **гена-регулятора** Лас-оперона проявляется в наработке с постоянной скоростью субъединиц **белка-репрессора**.

Белковая молекула Лас-репрессора состоит из четырех идентичных субъединиц. Репрессор — продукт гена-репрессора — обладает высоким сродством к соответствующему **операторному локусу**.

Операторный локус — это определенный участок последовательности двуцепочечной ДНК, участвующий в регуляции транскрипции структурных генов.

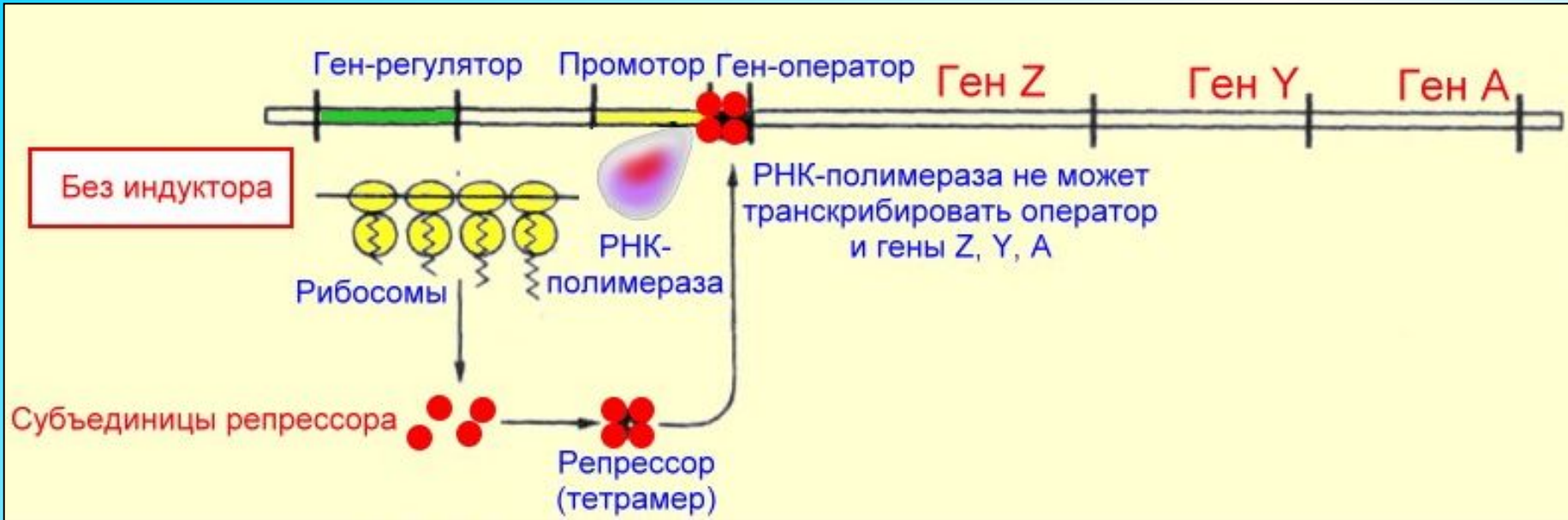
Экспрессия генов прокариот



Операторный локус находится между промотором, к которому перед началом транскрипции присоединяется ДНК-зависимая РНК-полимераза, и началом гена Z— структурного гена (β-галактозидазы.

Присоединившись к оператору, репрессор препятствует транскрипции операторного локуса и дистальных структурных генов Z, Y и A. Таким образом, репрессор является **негативным регулятором**; в его присутствии подавляется экспрессия Z, Y и A-генов.

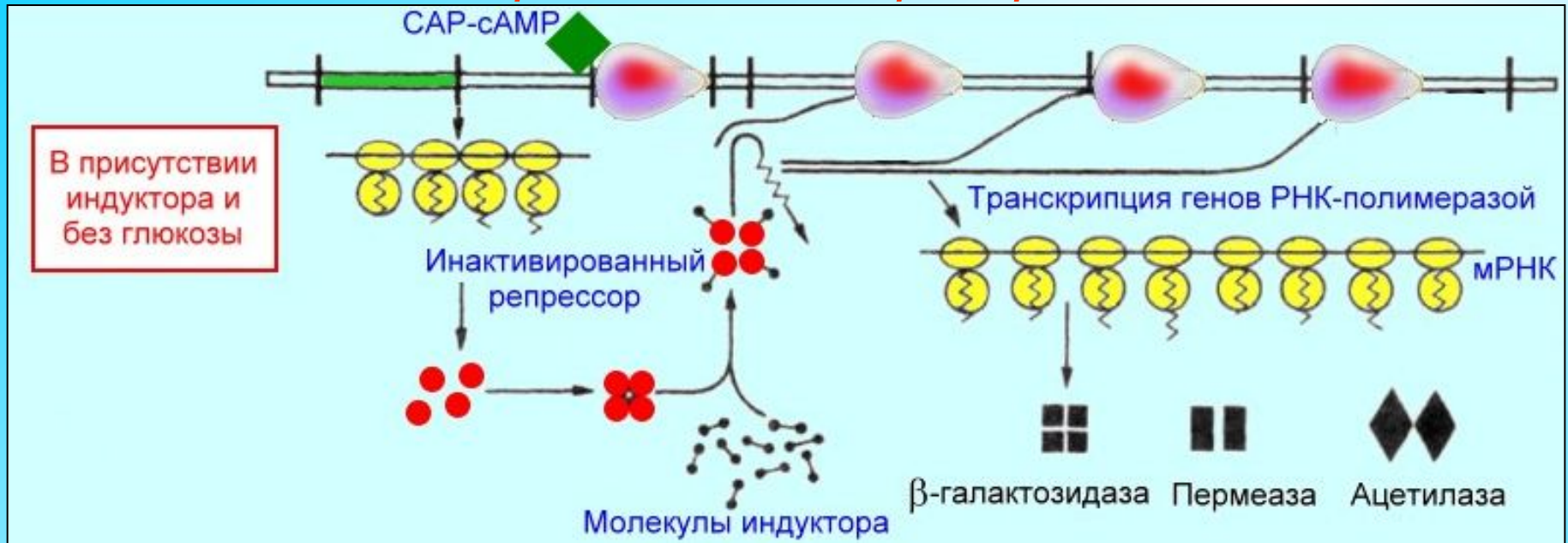
Экспрессия генов прокариот



Молекулы репрессора, как связанные с операторным локусом, так и находящиеся в свободном виде в цитоплазме, обладают сродством к молекулам индуктора – лактозы, поступающей в клетку.

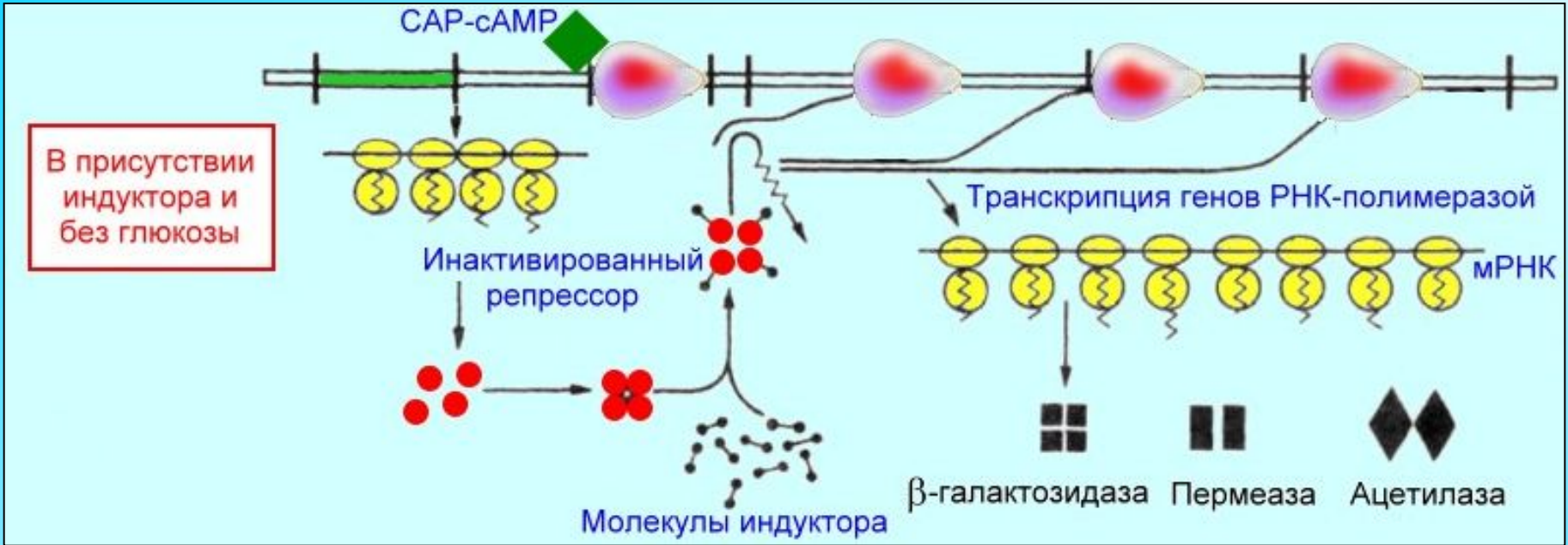
Связывание индуктора с молекулой репрессора, прикрепленной к операторному локусу, вызывает конформационные изменения структуры репрессора и приводит к диссоциации его комплекса с ДНК.

Экспрессия генов прокариот



Для связывания РНК-полимеразы с последовательностью промотора необходимо наличие комплекса белка-активатора CAP с cAMP.

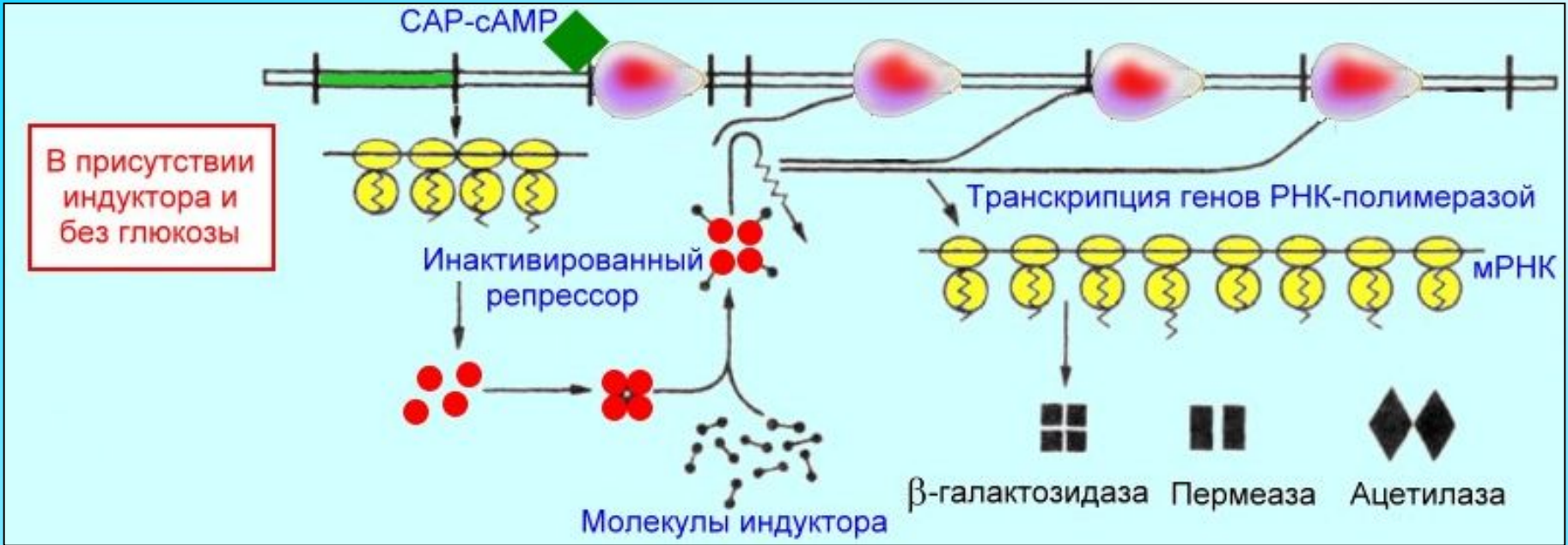
Экспрессия генов прокариот



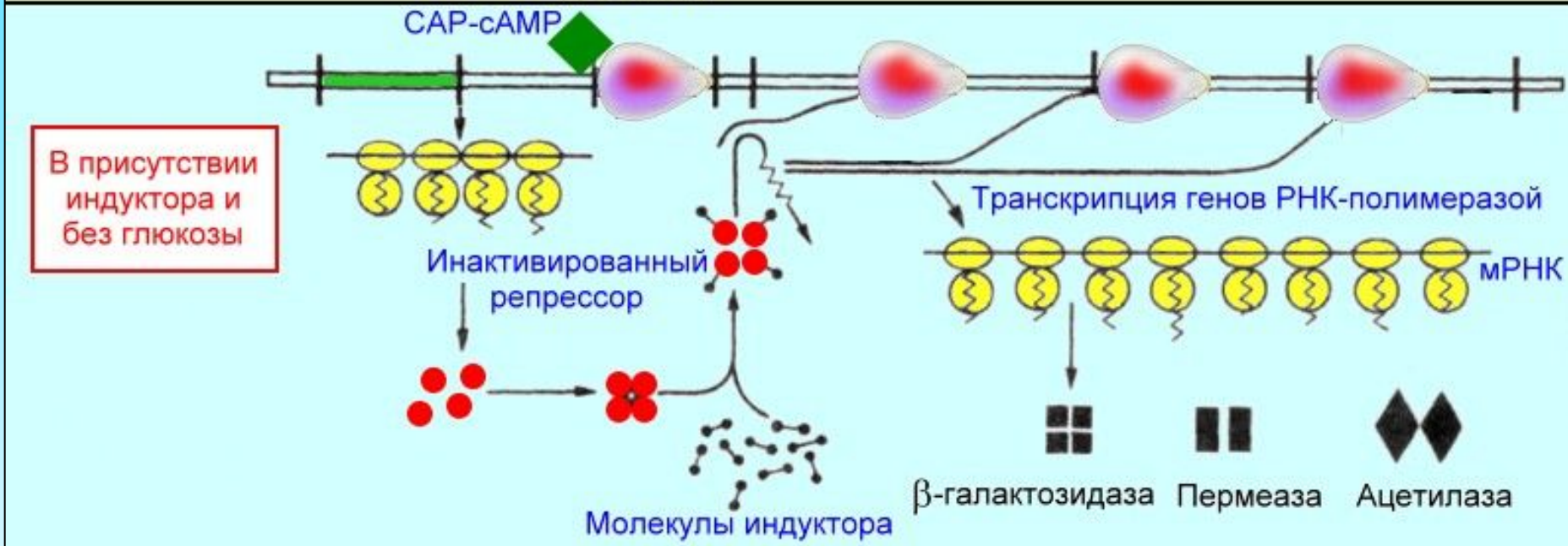
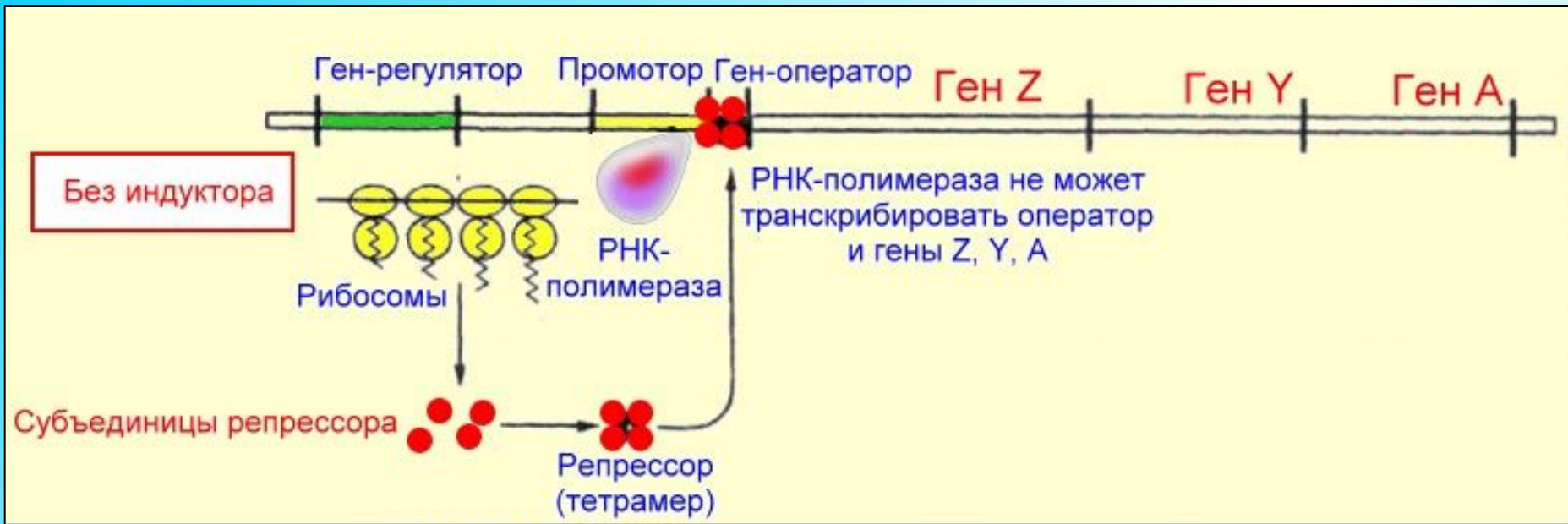
Накопление сАМР происходит независимым образом только при недостатке в питательной среде глюкозы.

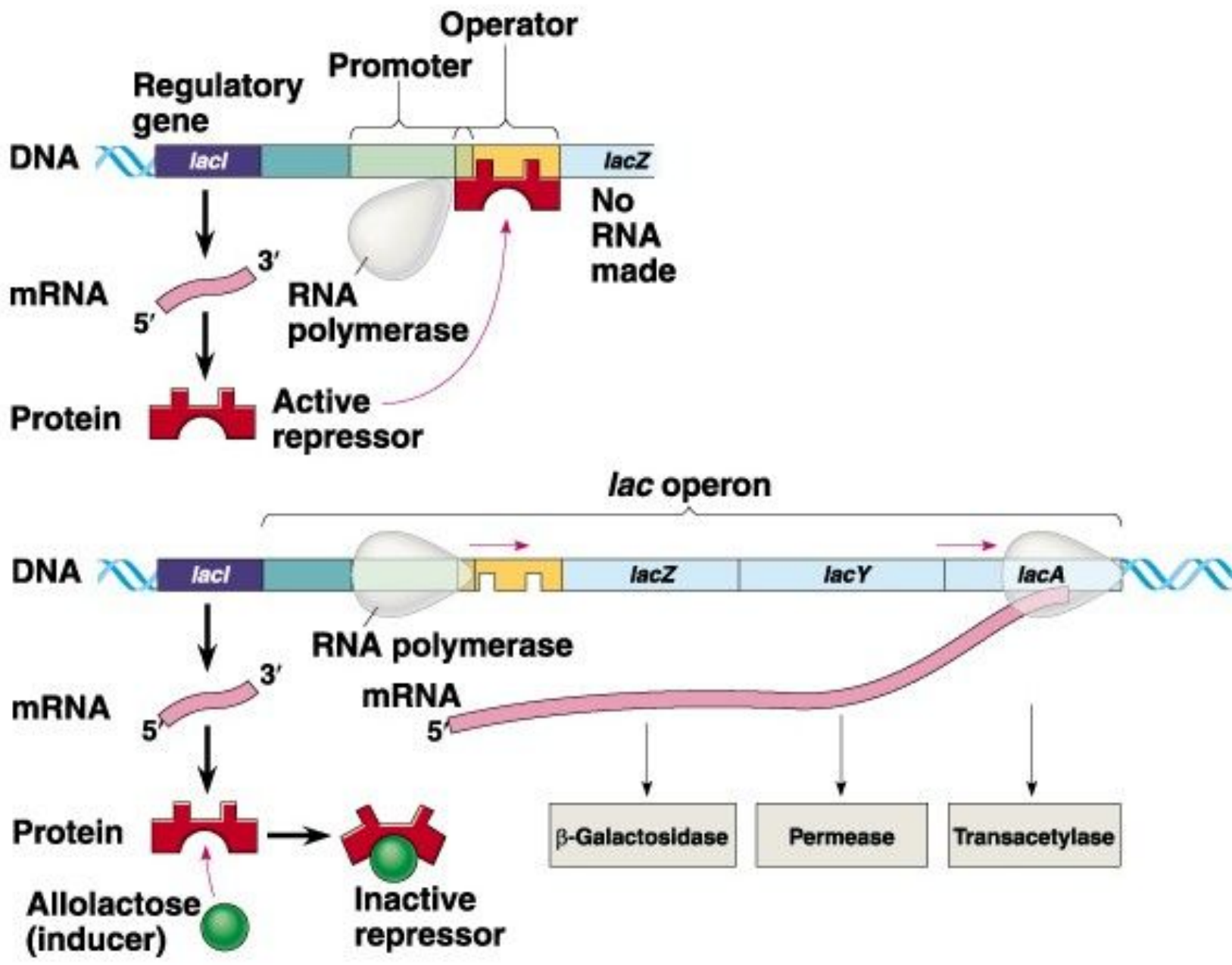
В присутствии глюкозы концентрация сАМР в бактерии оказывается недостаточной для образования комплекса с CAP и ДНК-зависимая РНК-полимераза не может начать транскрипцию Lac-оперона. Транскрипция начинается только при наличии комплекса CAP-сАМР, связанного с промотором.

Экспрессия генов прокариот

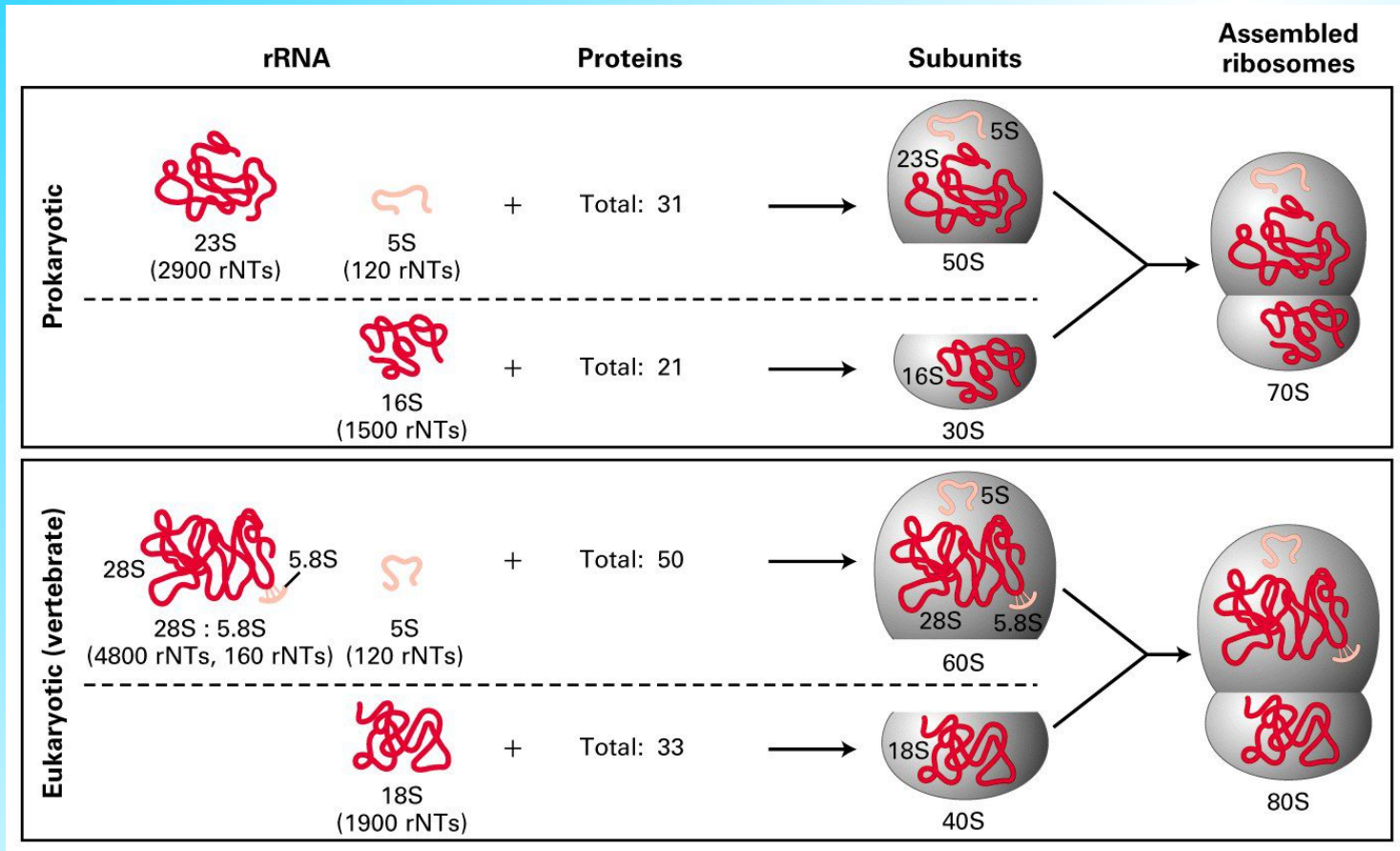


Комплекс CAP-cAMP действует как позитивный регулятор, поскольку его присутствие необходимо для обеспечения экспрессии генов. Таким образом, Lac-оперон является объектом как позитивной, так и негативной регуляции.





Трансляция у прокариот



Прокариотические рибосомы мельче эукариотических, содержат 3 молекулы рРНК и 52 молекулы белка.

Трансляция у прокариот

В малой субъединице рибосомы расположен **функциональный центр** (ФЦР) с двумя участками — **пептидильным (Р-участок)** и **аминоацильным (А-участок)**. В ФЦР может находиться шесть нуклеотидов иРНК, три - в пептидильном и три - в аминоацильном участках.

Различают три этапа в трансляции:

инициацию, элонгацию и терминацию.

Инициация. Трансляция инициируется метиониновой инициаторной тРНК.

Последовательность Шайна-Дальгарно (Ш-Д), находящаяся вблизи 5'-конца мРНК связывается с комплементарной 3'-последовательностью рРНК. Антикодон (UAC) инициаторной fMet-тРНК^{fMet} спаривается со стартовым кодоном (AUG) мРНК. К образовавшемуся комплексу присоединяется большая рибосомная субъединица, и образуется комплекс инициации. Аминогруппа метионина, связанного с инициаторной тРНК, формилирована (СНО) (на рисунке не изображено). После трансляции формилметионин отщепляется от белковой цепи.

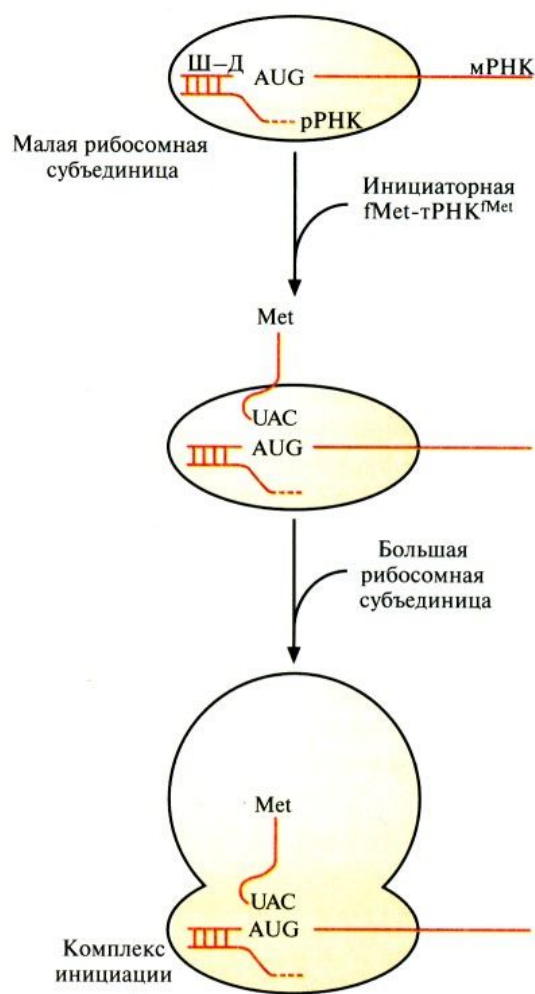
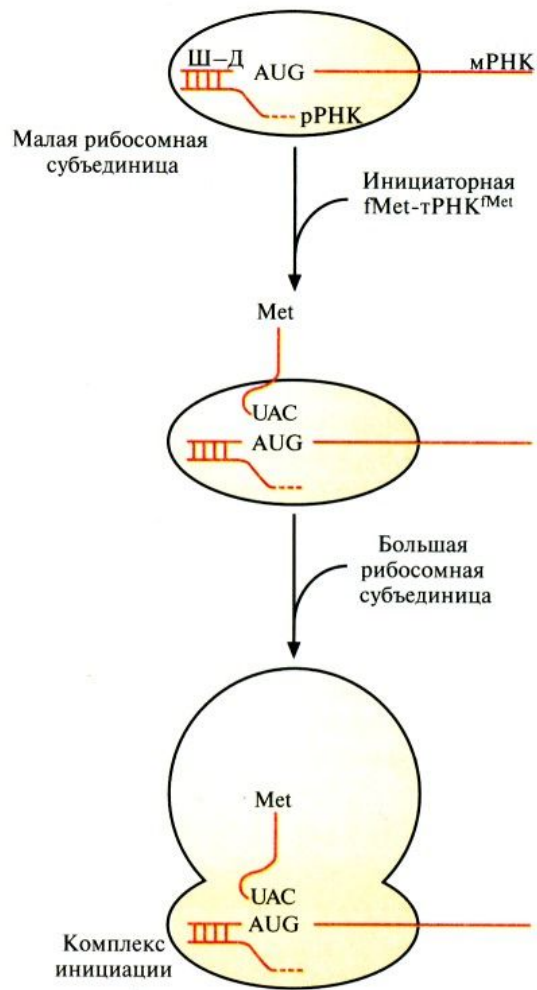


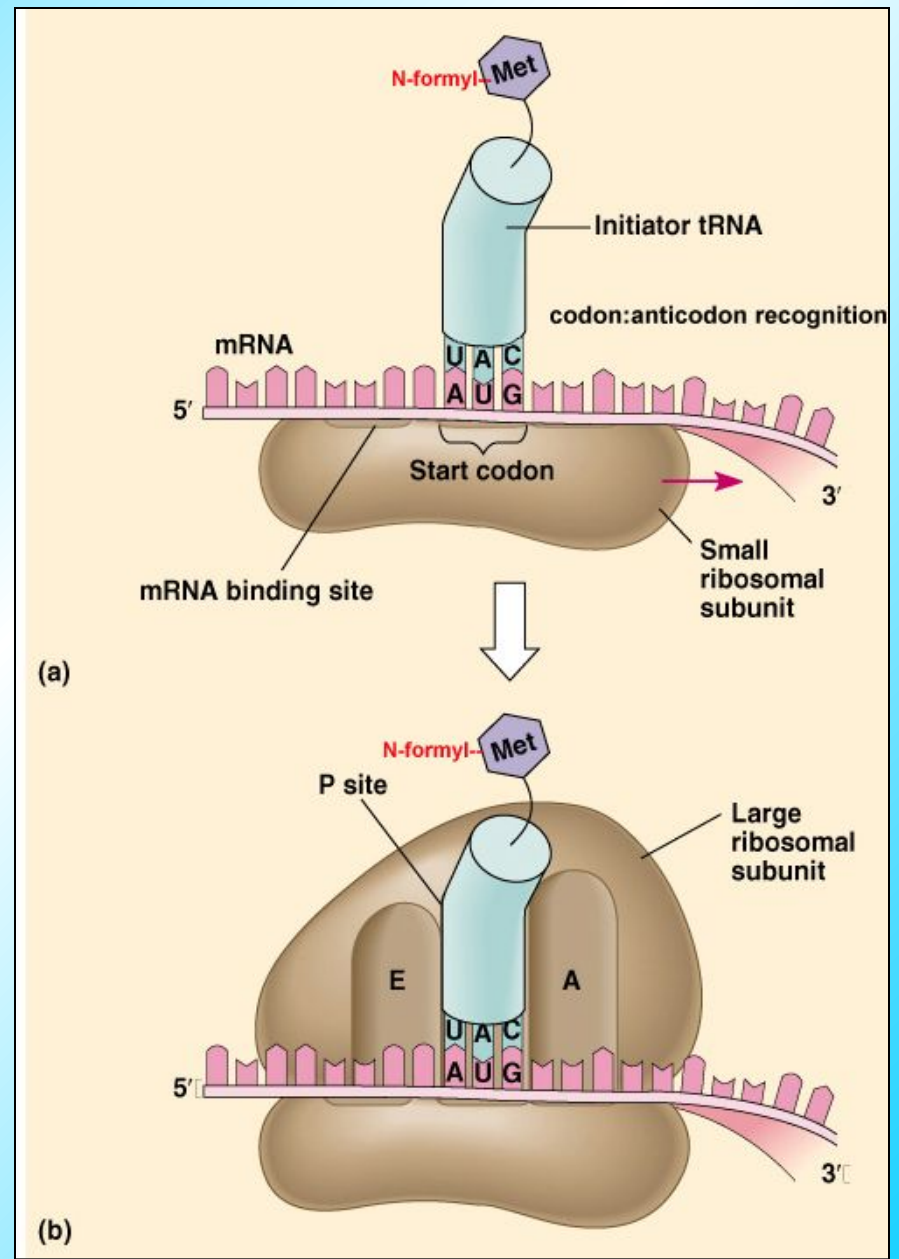
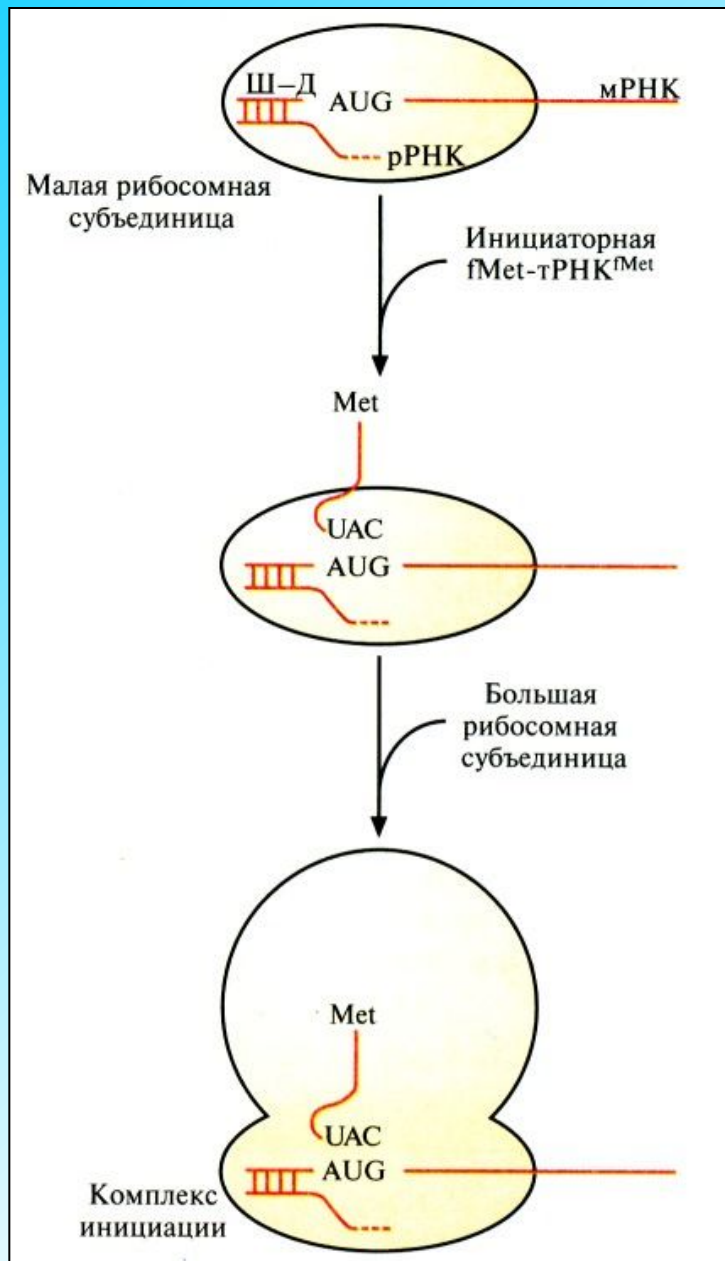
Рис. 3.15. Инициация трансляции в прокариотической клетке. Последовательность Шайна-Дальгарно (Ш-Д), находящаяся вблизи 5'-конца мРНК, связывается с комплементарной 3'-концевой последовательностью рРНК, образующей комплекс с малой рибосомной субъединицей. Антикодон (UAC) инициаторной fMet-тРНК^{fMet} спаривается со стартовым кодоном (AUG) мРНК. К образовавшемуся комплексу присоединяется большая рибосомная субъединица, и образуется комплекс инициации. Аминогруппа метионина, связанного с инициаторной тРНК, формилирована (СНО) (на рисунке не изображено). После трансляции формилметионин отщепляется от белковой цепи.

Трансляция у прокариот.

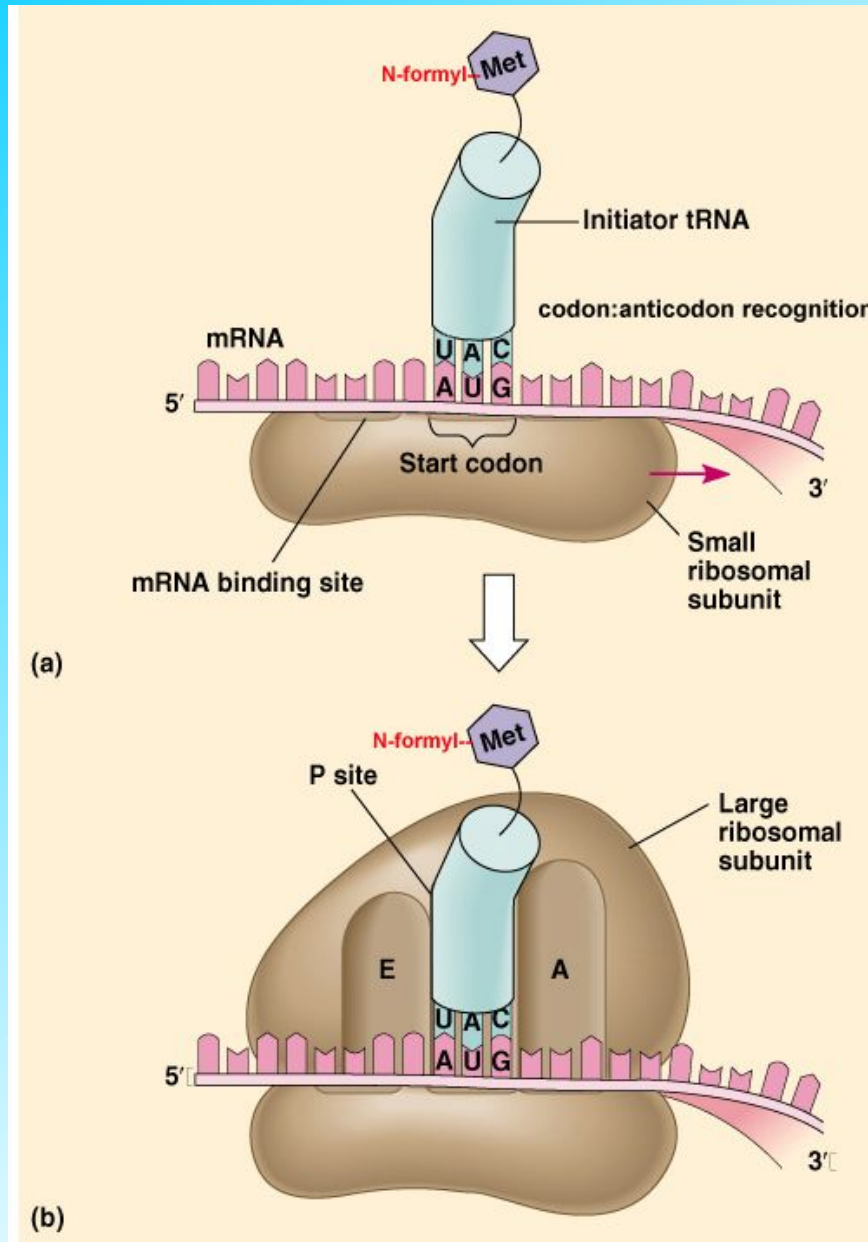


При участии белковых факторов антикодон 3'-UAG-5' инициаторной тРНК связывается с кодоном 5'-AUG-3' мРНК, образующий комплекс с малой рибосомной субъединицей. К образовавшемуся комплексу присоединяется большая субъединица рибосомы и начинается элонгация.

Рис. 3.15. Инициация трансляции в прокариотической клетке. Последовательность Шайна–Дальгарно (Ш–Д), находящаяся вблизи 5'-конца мРНК, связывается с комплементарной 3'-концевой последовательностью рРНК, образующей комплекс с малой рибосомной субъединицей. Антикодон (UAC) инициаторной t^{Met} -tРНК^{fMet} спаривается со стартовым кодоном (AUG) мРНК. К образовавшемуся комплексу присоединяется большая рибосомная субъединица, и образуется комплекс инициации. Аминогруппа метионина, связанного с инициаторной тРНК, формилирована (СНО) (на рисунке не изображено). После трансляции формилметионин отщепляется от белковой цепи.

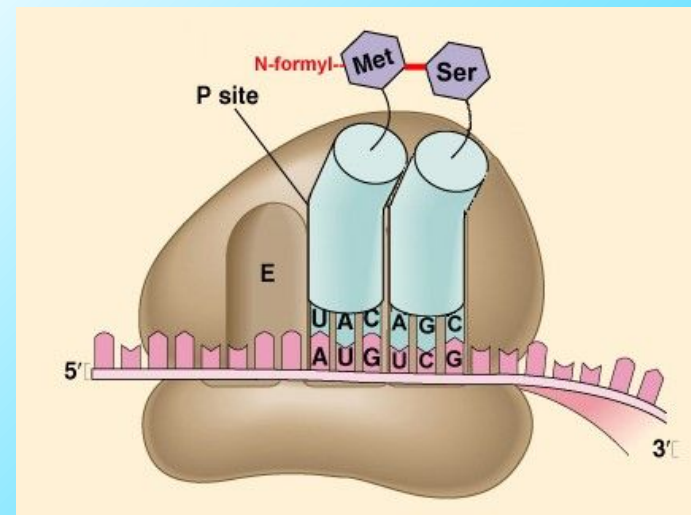


Трансляция у прокариот



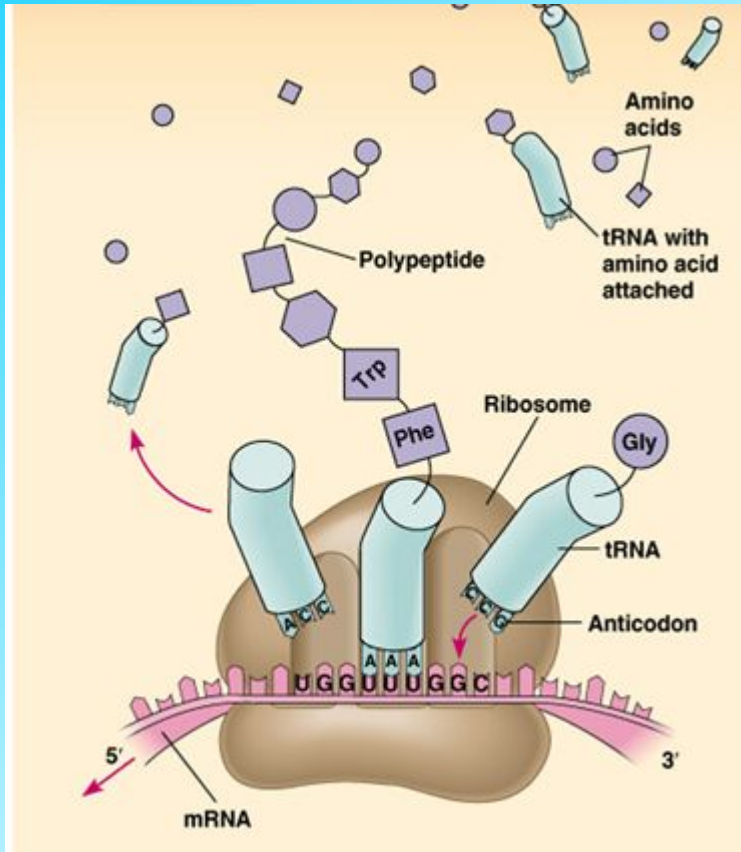
Элонгация. В А-участок ФЦР поступает вторая тРНК, чей антикодон комплементарно спаривается с кодоном иРНК, находящимся в А-участке.

Пептидилтрансферазный центр большой субъединицы за счет ГТФ катализирует образование пептидной связи между метионином и второй аминокислотой.



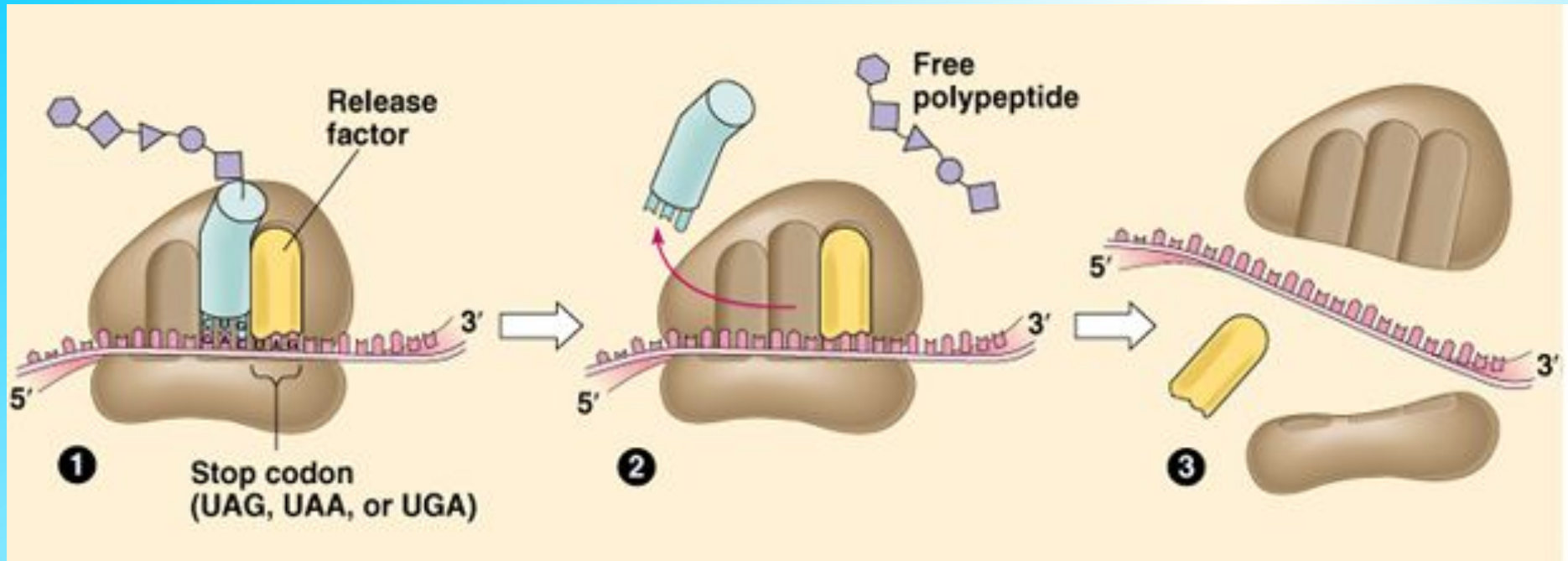
Трансляция у прокариот

Как только образовалась пептидная связь, метиониновая тРНК отсоединяется от метионина, а рибосома передвигается на следующий кодовый триплет иРНК, который оказывается в А-участке рибосомы, а метиониновая тРНК выталкивается в цитоплазму.



На один цикл расходуется 2 молекулы ГТФ. В А-участок заходит третья тРНК, и образуется пептидная связь между второй и третьей аминокислотами. Синтез полипептида идет от N-конца к С-концу, то есть пептидная связь образуется между карбоксильной группой первой и аминогруппой второй аминокислоты.

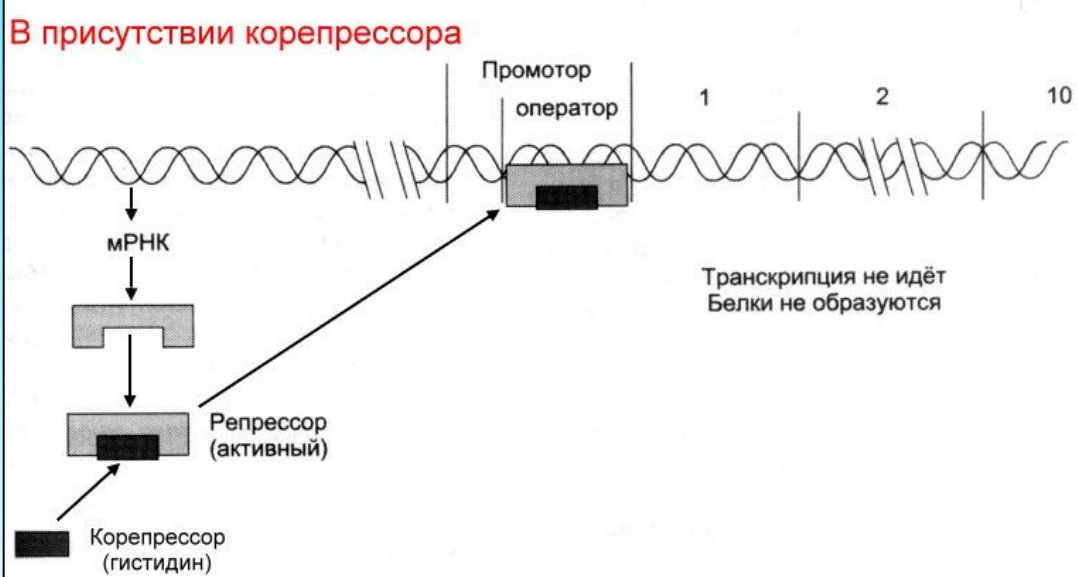
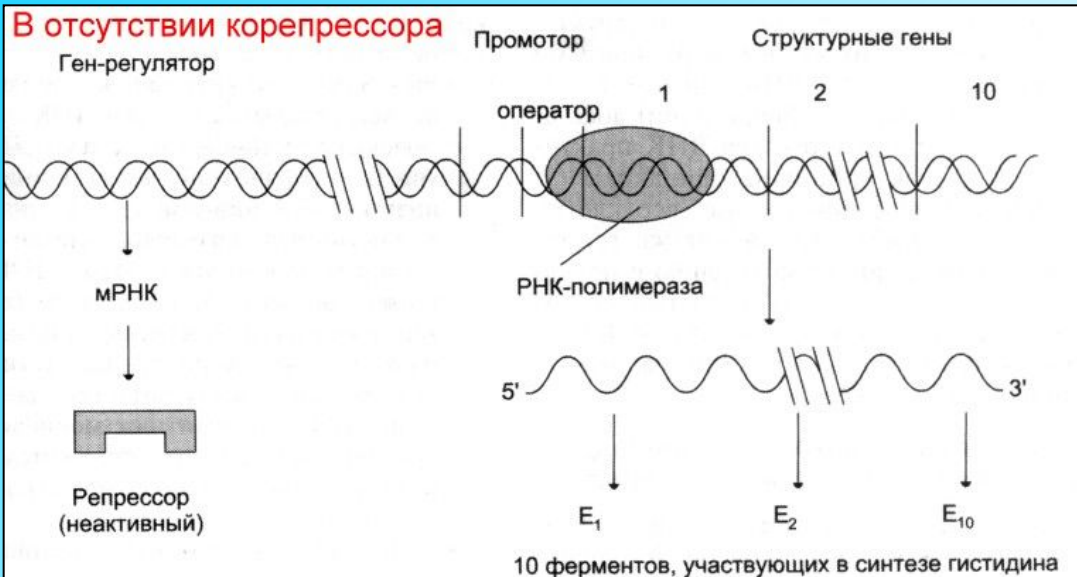
Трансляция у прокариот



Терминация. Когда в А-участок попадает кодон-терминатор (УАА, УАГ или УГА), с которым связывается особый белковый фактор освобождения, полипептидная цепь отделяется от тРНК и покидает рибосому. Происходит диссоциация, разъединение субъединиц рибосомы.

А так как мРНК прокариот часто полицистронны, то на общей мРНК может быть несколько иницирующих и терминирующих участков.

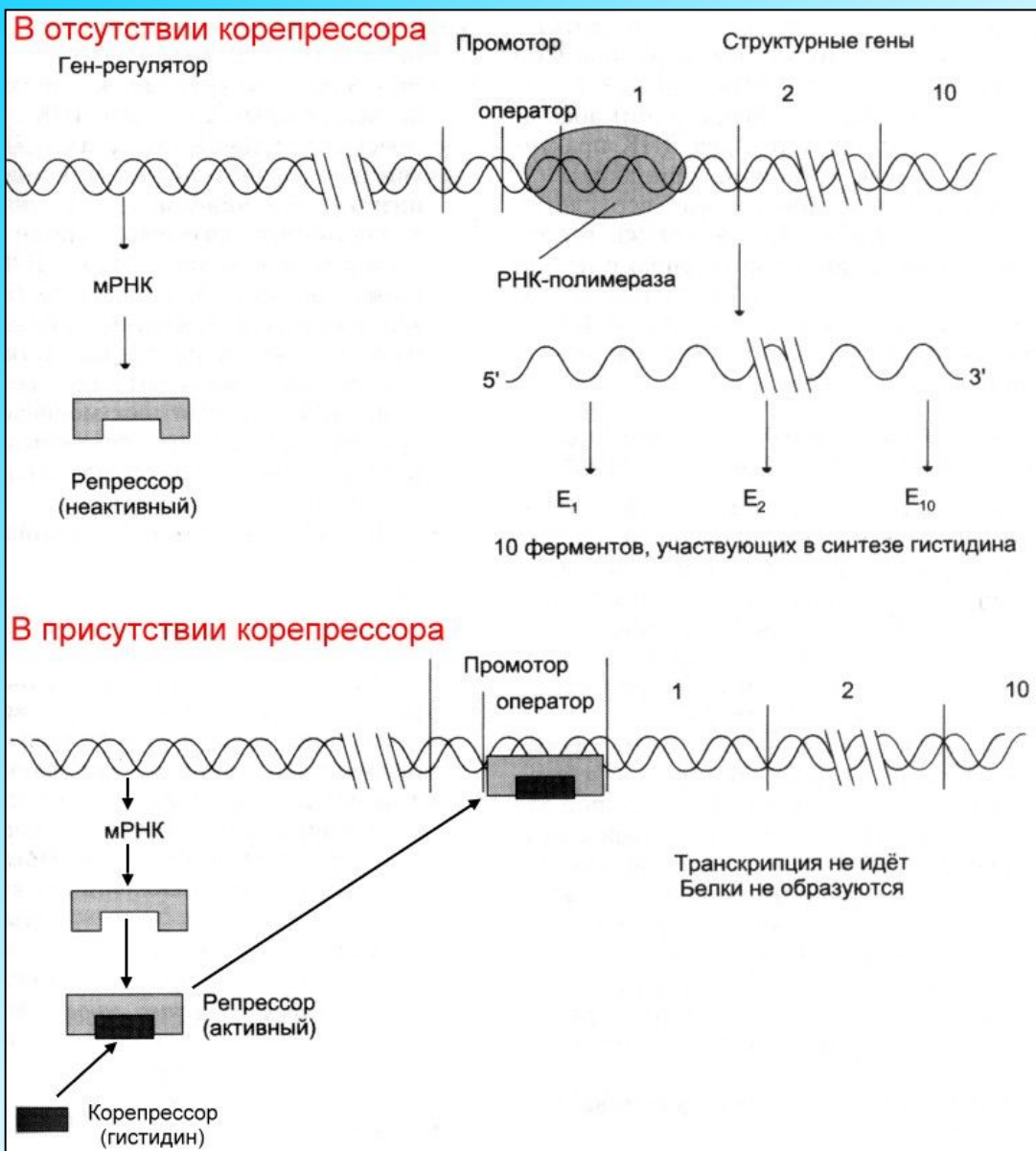
Репрессия синтеза белков. Триптофановый и гистидиновый опероны



Снижение концентрации фермента может осуществляться путем репрессии синтеза фермента. Если в среде есть аминокислоты, например **триптофан** или **ГИСТИДИН**, то клетка перестает вырабатывать весь набор ферментов, необходимых для синтеза этих аминокислот.

Такая репрессия называется **репрессией конечным продуктом**.

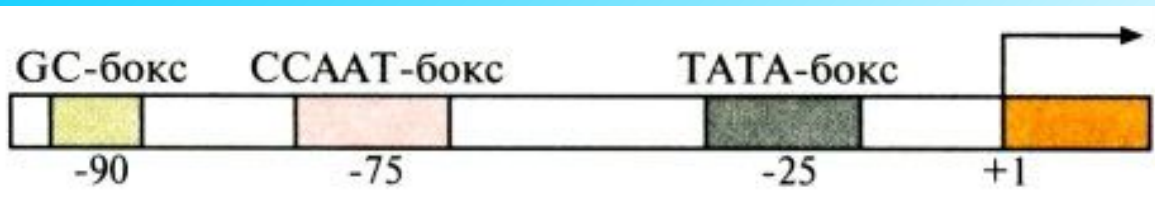
Репрессия синтеза белков. Триптофановый и гистидиновый опероны



При отсутствии аминокислот **Гис** или **Три** регуляторный белок репрессор не имеет сродства к оператору и происходит синтез ферментов, осуществляющих синтез ЭТИХ аминокислот.

Когда в среде избыток аминокислоты, то эта молекула, получившая название **«корепрессор»** связывается с репрессором, который приобретает сродство к оператору и синтез ферментов прекращается.

Транскрипция у эукариот



Каждый структурный ген эукариот имеет промоторный участок (ТАТА-бокc, или бокc Хогнесса) из 8 нуклеотидов, включающий последовательность ТАТА.

Последовательности ССААТ (САТ-бокc), участок из повторяющихся нуклеотидов GC (GC-бокc), энхансеры и сайленсеры участвуют в регуляции экспрессии генов.

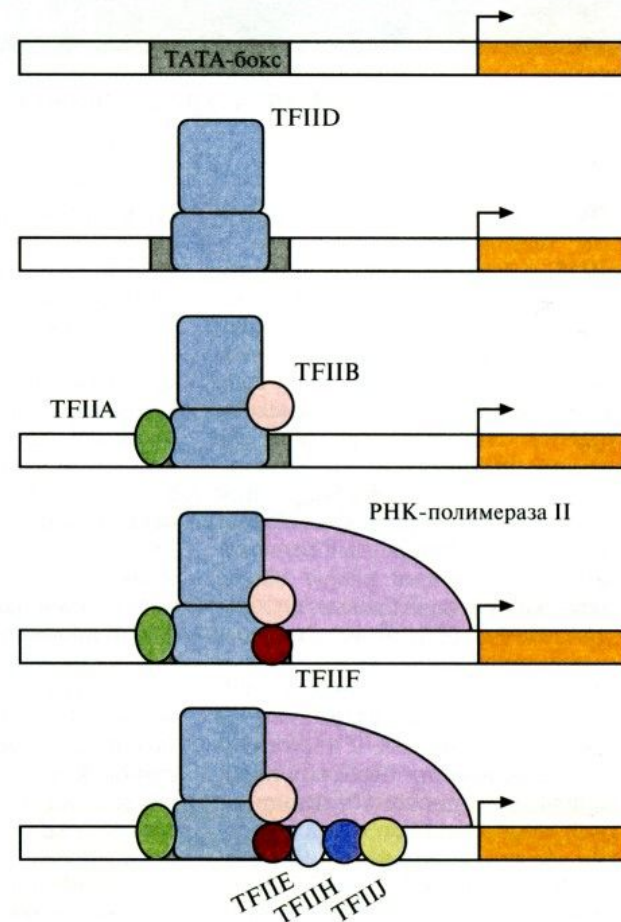


Рис. 3.24. Инициация транскрипции структурного гена эукариот. Сначала фактор транскрипции TFIID связывается с ТАТА-боксом, затем происходит присоединение других факторов транскрипции и РНК-полимеразы II и, наконец, вспомогательных факторов, запускающих транскрипцию. Стрелка – направление транскрипции.

Транскрипция у эукариот

В регуляции эволюции генов иногда происходит амплификация (увеличение числа) генов.

В результате может образоваться большое число повторяющихся генов. Мутации в дополнительных копиях могут приводить к появлению новых функций, которые попадут под контроль отбора.

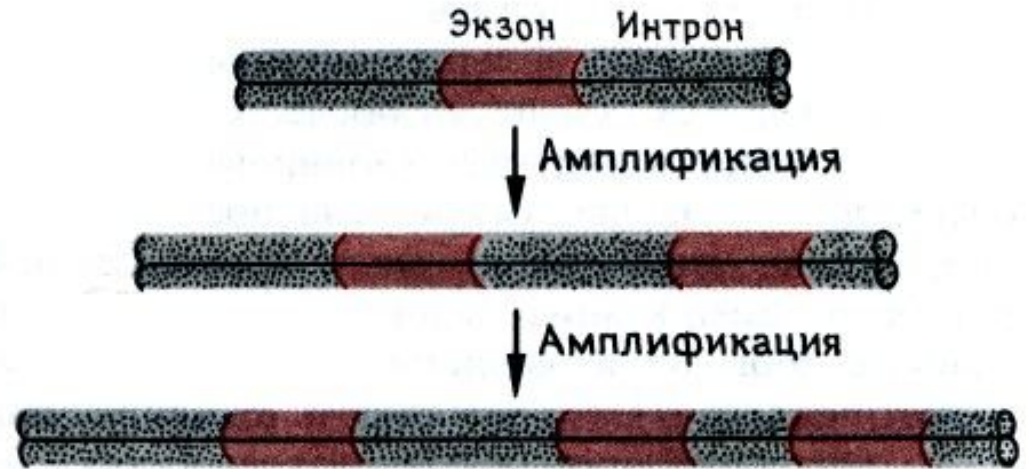


РИС. III.10.

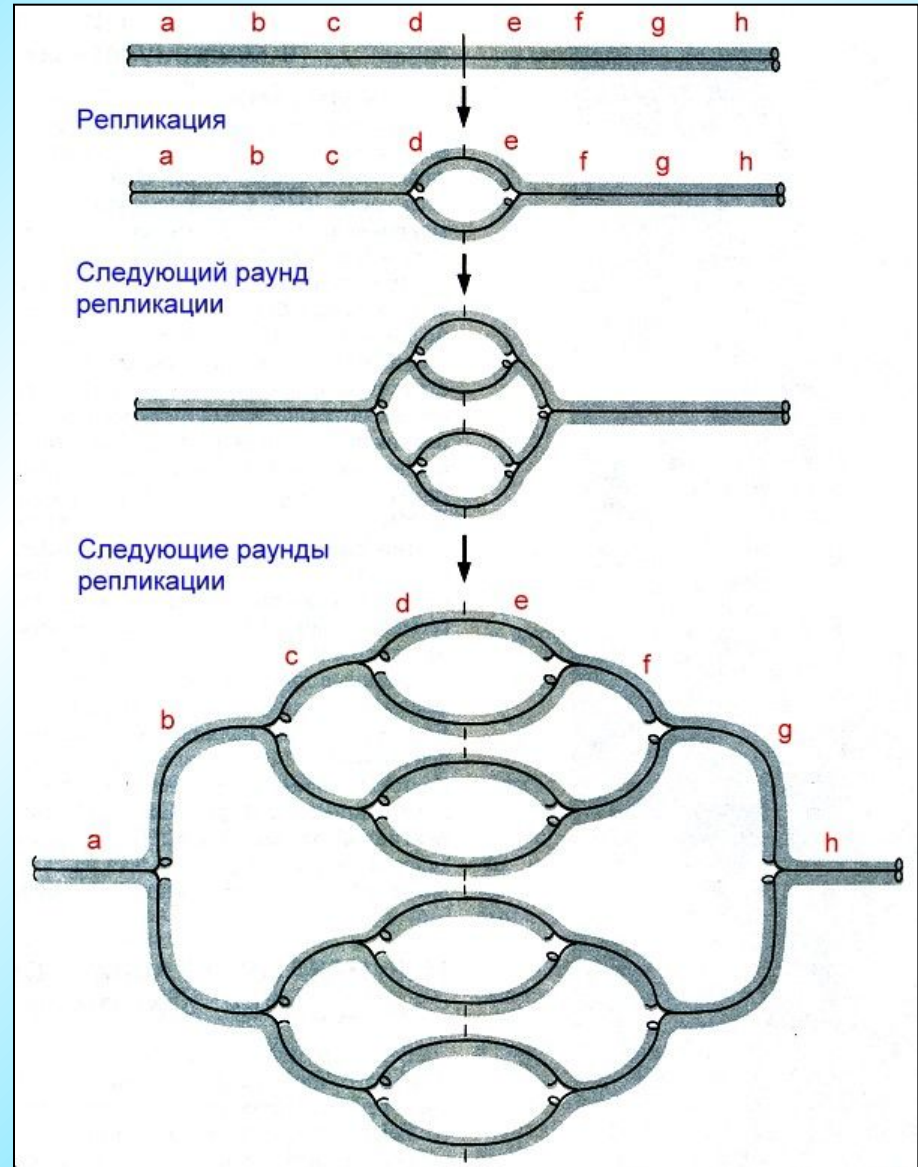
Некоторые гены эволюционировали путем тандемной амплификации одного-единственного экзона. В качестве примера можно привести гены коллагена и α -фето-протеина млекопитающих (разд. 9.4.а).

Транскрипция у эукариот

В регуляции генной экспрессии иногда участвует запрограммированная амплификация (увеличение числа) специфических сегментов ДНК.

В результате образуется огромное число генных копий, синтезируется большое количество данного генного продукта.

Сайт начала репликации активируется второй, третий и т.д., раз, в результате образуется множество копий данной области.



Словарь-справочник

Позитивная регуляция –

Если уровень экспрессии генетической информации количественно возрастает, регуляция называется позитивной.

Негативная регуляция –

Если уровень экспрессии благодаря действию иных регуляторных элементов понижается, говорят о негативной регуляции.

Цистрон –

это минимальная экспрессируемая генетическая единица, кодирующая одну субъединицу белковой молекулы.

Оперон –

Участки молекулы ДНК, содержащие информацию о группе функционально связанных структурных белков и регуляторную зону, контролирующую транскрипцию этих генов.

Общая молекула иРНК, образованная на структурных генах Лас-оперона содержит кодонов инициаторов ..., кодонов терминаторов

....

Три кодона инициатора и три кодона терминатора

Словарь-справочник

Операторный локус –

Определенный участок последовательности двуцепочечной ДНК, участвующий в регуляции транскрипции структурных генов.

Регуляторный локус –

Участок молекулы ДНК, кодирующий информацию о белке-репрессоре.

Репрессор –

Белок, присоединяющийся к оператору и блокирующий возможность присоединения к промотору РНК-полимеразы.

Индуктор Лас-оперона –

Молекулы лактозы, которые дерепрессируют Лас-оперон связываясь с репрессором и вызывая его уход с операторного участка.

Негативный регулятор в работе Лас-оперона –

Белок-репрессор.

Позитивный регулятор в работе Лас-оперона –

Лактоза; CAP-белок в комплексе с cAMP.

Словарь-справочник

Амплификация –

Многократное копирование гена в связи с повышенной потребностью организма в его продукте. Примером служат гены, кодирующие структуру рРНК.

Бокс Прибнова –

Промотор имеет два сайта связывания для РНК-полимеразы. Один из них обычно представляет собой нуклеотидную последовательность

TATAAT
ATATTA

(ТАТА-бокс, или бокс Прибнова состоит из 6 или 7 пар оснований и расположен на расстоянии примерно 10 нуклеотидов до того нуклеотида, с которого начинается транскрипция (+1).

Последовательность Шайна – Дальгарно –

Последовательность нуклеотидов, находящаяся вблизи 5'-конца мРНК связывающаяся с комплементарной 3'-последовательностью рРНК.