

Национальный фармацевтический университет
Кафедра биотехнологии
Специальность «Промышленная биотехнология»
Дисциплина «Молекулярная биотехнология»

Нанобиотехнологии прокариот.
Экпрессия генов

Молекулярные механизмы считывания генетической информации

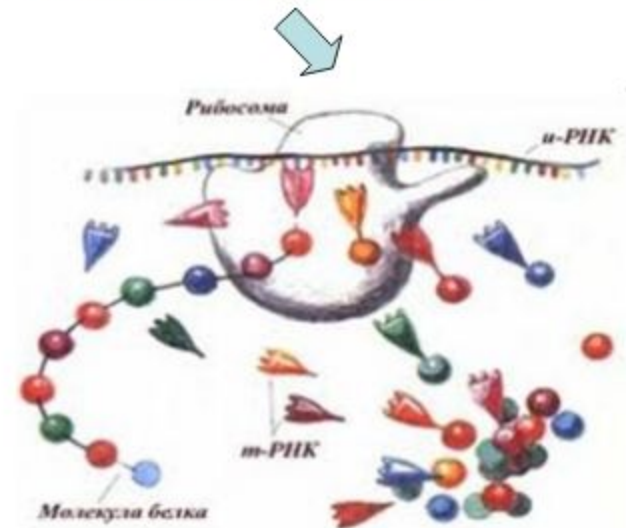
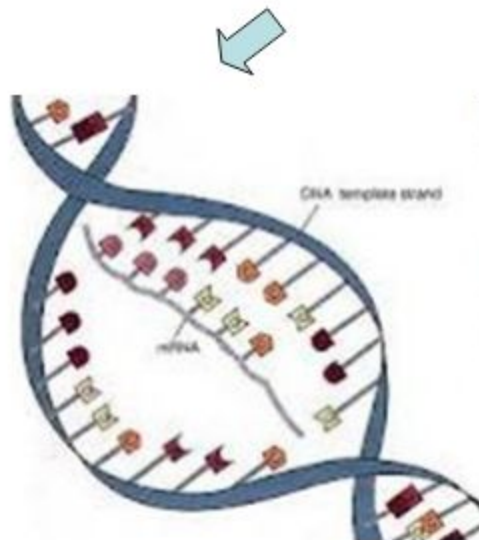
В нанобиотехнологии широко используются прокариоты в качестве организма-хозяина для клонирования генов и их экспрессии.

Основной целью экспериментов по клонированию генов является подбор условий для эффективной экспрессии в нужном организме. Причем сам факт встраивания того или иного гена в клонирующий вектор еще не означает, что этот ген будет экспрессирован.

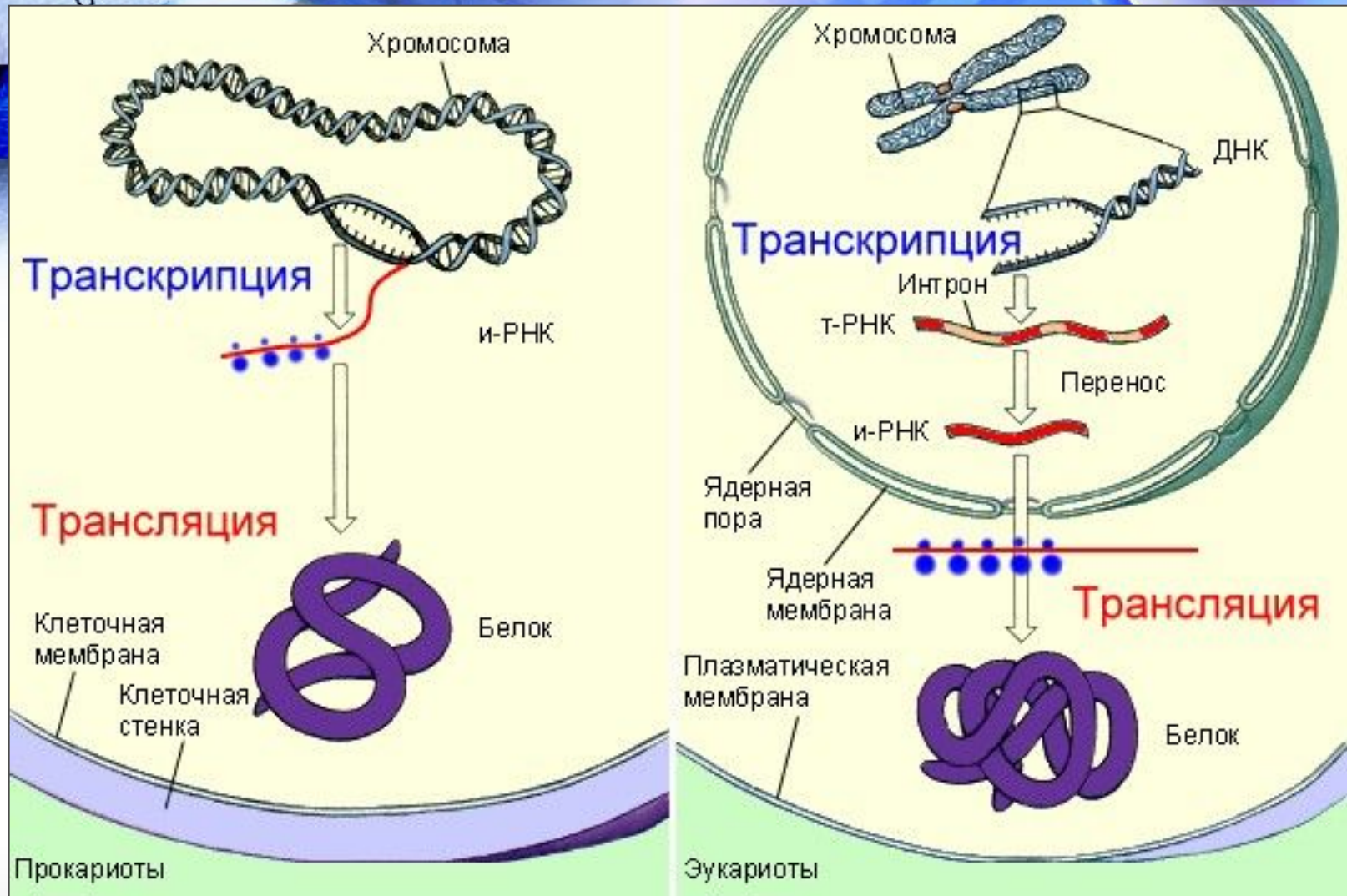
В то же время для экономической целесообразности – уровень синтеза продукта должен быть достаточно высоким.

Экспрессия генов - процесс реализации генетической информации, который включает два этапа

транскрипцию и **трансляцию**.



Экспрессия генов



Центральная догма молекулярной биологии: ДНК→РНК→белок.

Молекулярные механизмы считывания генетической информации

Структура ДНК.

Молекула ДНК состоит из двух антипараллельных полинуклеотидных цепей, образующих двойную спираль. Индивидуальными генетическими элементами со строго специфичной нуклеотидной последовательностью, кодирующими определенные продукты, являются гены. Одни из них кодируют белки, другие – только молекулы РНК.

Информация, содержащаяся в генах, которые кодируют белки (структурных генах), расшифровывается в ходе двух последовательных процессов: синтеза РНК (транскрипции) и синтеза белка (трансляции).

Молекулярные механизмы считывания генетической информации

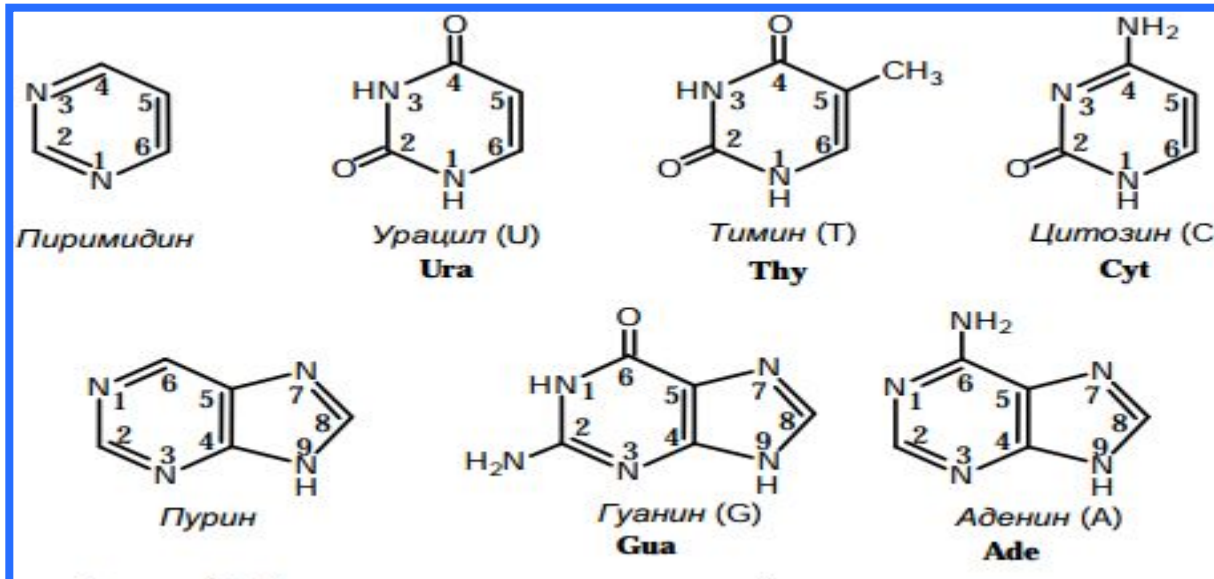
Структура ДНК.

Сначала на определенном участке ДНК как на матрице синтезируется матричная РНК (мРНК). Затем в ходе согласованной работы многокомпонентной системы при участии транспортных РНК (тРНК), мРНК, ферментов и различных белковых факторов осуществляется синтез белковой молекулы. Все эти процессы обеспечивают правильный перевод зашифрованной в ДНК генетической информации с языка нуклеотидов на язык аминокислот.

Молекулярные механизмы считывания генетической информации

Структура ДНК.

Нуклеиновые кислоты являются нерегулярными полимерами, мономерами которых называются нуклеотидами. В нуклеиновых кислотах встречаются 5 нуклеиновых (азотистых оснований), 3 пиримидиновых — урацил, тимин, цитозин и 2

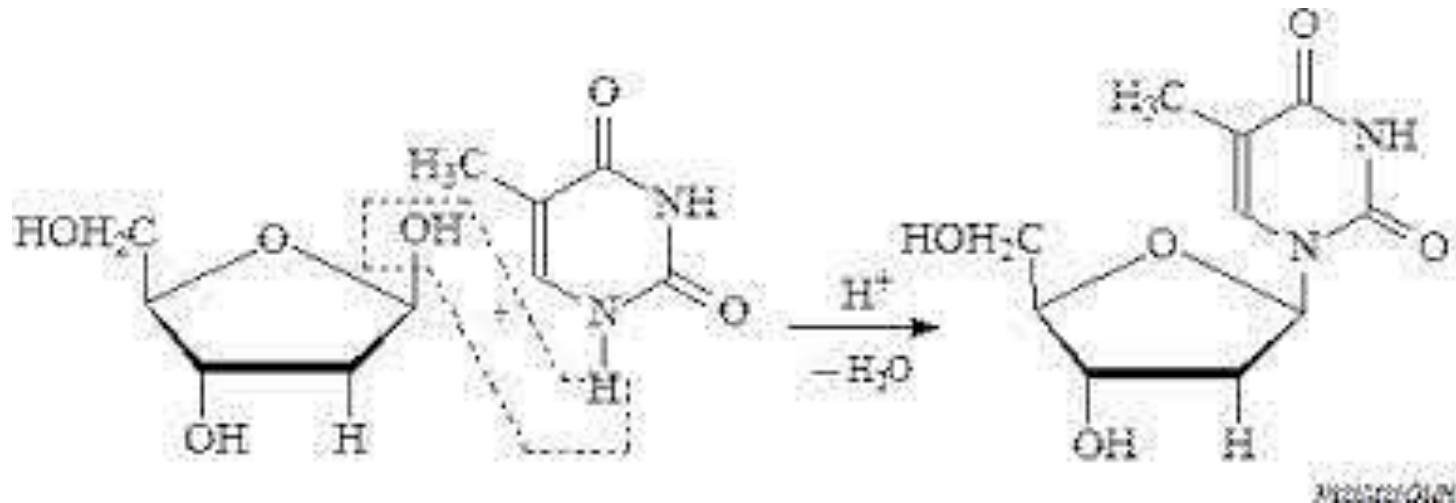


Строение
нуклеиновых
оснований

Молекулярные механизмы считывания генетической информации

Структура ДНК.

Нуклеозиды представляют собой гликозиды, в которых D-рибофураноза (в рибонуклеозидах), либо дезокси-D-рибофураноза (в дезоксирибонуклеозидах) связана гликозидной связью с атомом N1 пиримидиновых или атомом N9 пуриновых оснований.

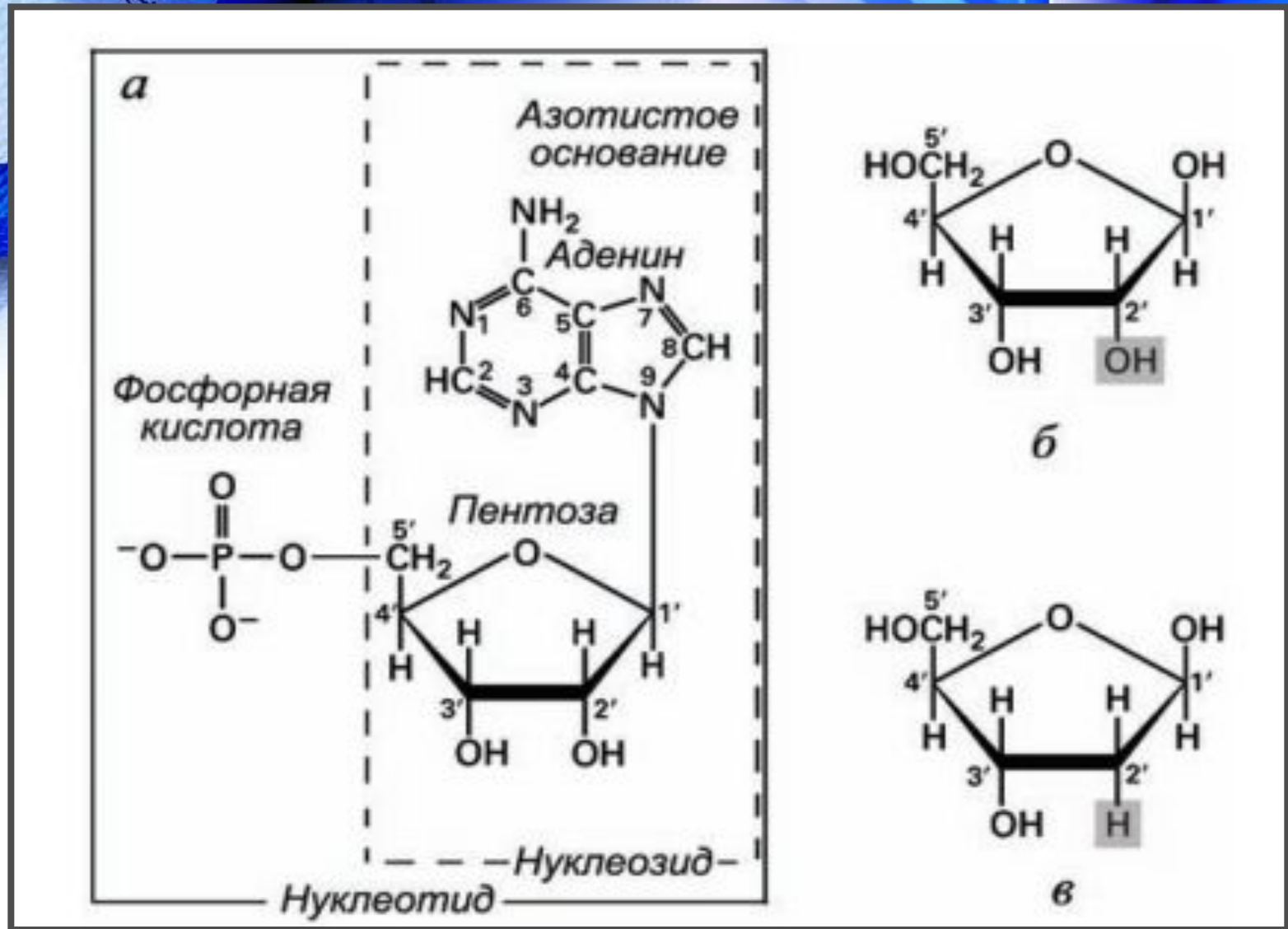


Молекулярные механизмы считывания генетической информации

Структура ДНК.

Рибонуклеозиды входят в состав рибонуклеиновых кислот (РНК), а дезоксирибонуклеозиды — в состав дезоксирибонуклеиновых кислот (ДНК).

Нуклеотиды являются фосфорными эфирами нуклеозидов. Фосфорная кислота присоединена к одному из гидроксильных групп рибозного (или дезоксирибозного остатка). В зависимости от места присоединения различают 2'-, 3'- и 5'-нуклеотиды. Символ «'» (произносится как «штрих» или «прим») показывает, что соответствующий номер нумерует атомы пентозного кольца; атомы азотистого основания нумеруются без штриха.



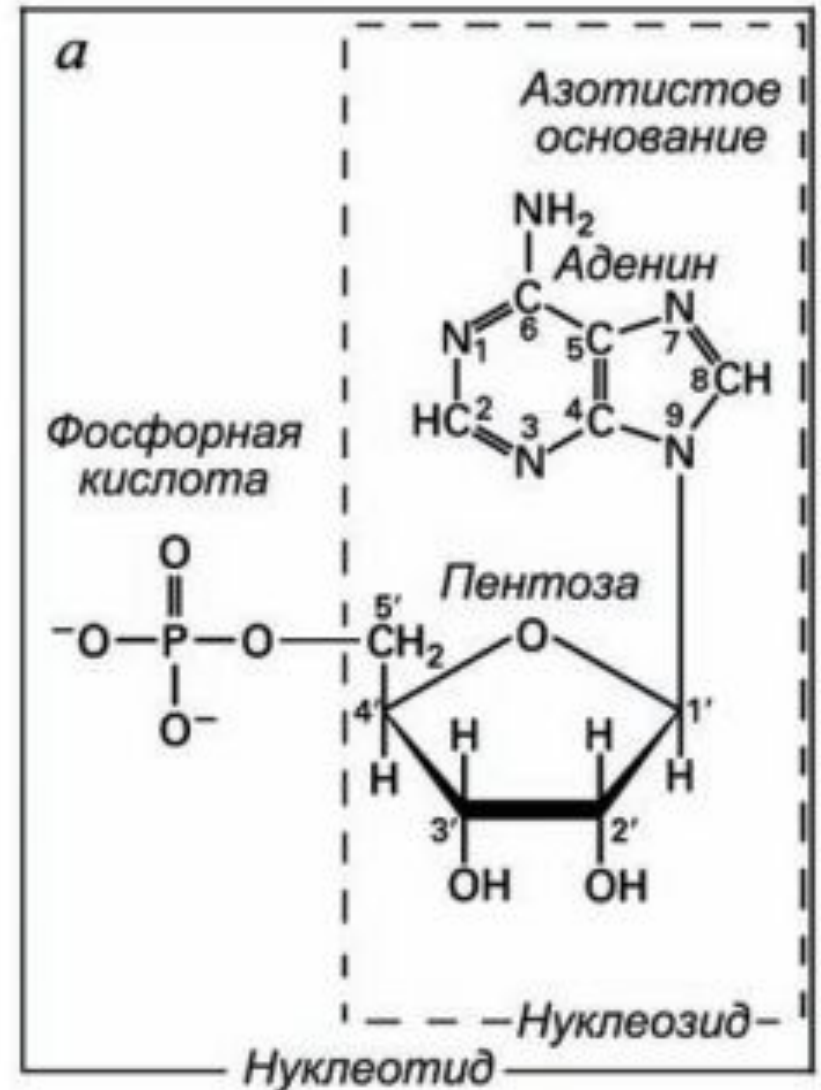
Строение нуклеотидов: а – аденозин монофосфат (АМФ); б – рибоза; в - дезоксирибоза

Молекулярные механизмы считывания генетической информации

Структура ДНК.

Нуклеотиды

соединяются друг с другом в полимерную цепочку с помощью фосфодиэфирных связей. Азотистые основания не принимают участия в соединении нуклеотидов одной цепи.



Молекулярные механизмы считывания генетической информации

Структура ДНК.

В природных полинуклеотидах остаток фосфорной кислоты всегда связывает 3'- и 5'-гидроксигруппы соседних нуклеозидов. Таким образом, полинуклеотидные цепи имеют определенную направленность, и каждая полинуклеотидная цепь имеет 5'- и 3'-концы.

Ковалентный сахарофосфатный остов нуклеиновой кислоты состоит из монотонно чередующихся фосфатных и пентозных групп. Нуклеиновые основания можно рассматривать как боковые радикалы, присоединенные к остову на равных расстояниях.

Молекулярные механизмы считывания генетической информации

Структура ДНК.

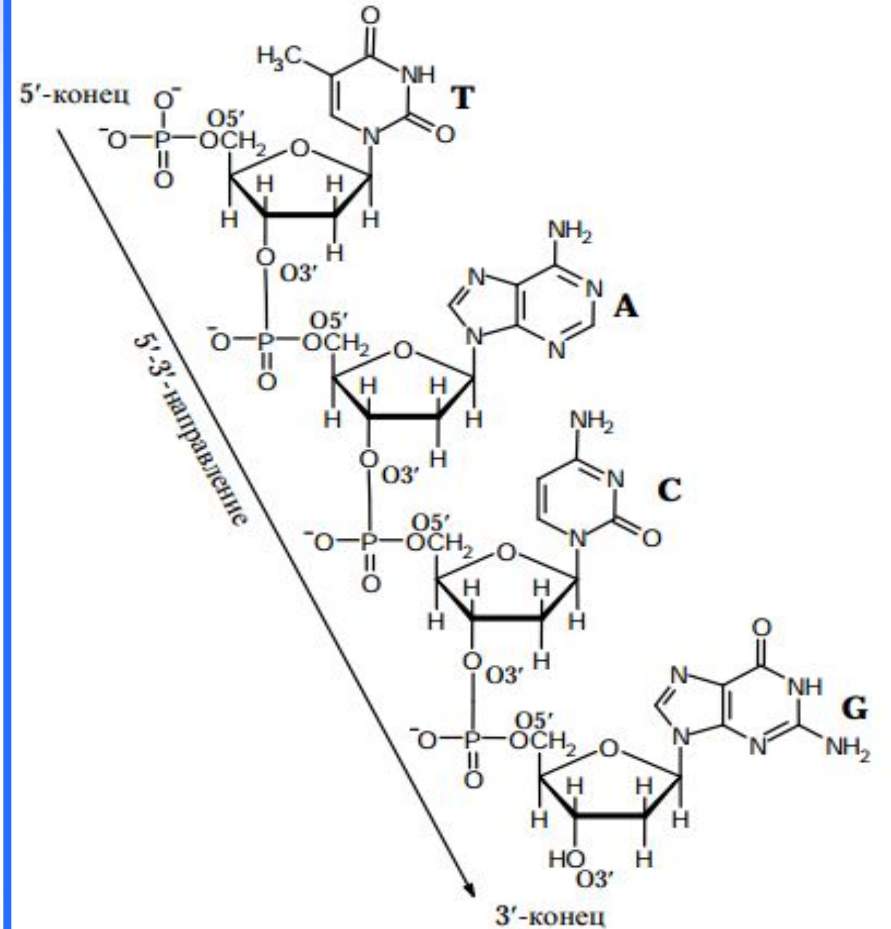
Сахарофосфатный остов нуклеиновой кислоты несет отрицательный заряд, поскольку фосфатные остатки ионизованы при рН 7.

Комплементарные друг другу одноцепочные молекулы нуклеиновой кислоты способны образовывать двухцепочную спиральную структуру. Внутри этой спирали аденин образует пару с тиминном (двумя водородными связями), а гуанин - с цитозинном (тремя водородными связями).

Молекулярные механизмы считывания генетической информации

Структура ДНК.

Наиболее известна наглядная модель двойной спирали ДНК в виде винтовой лестницы, в которой поперечные «ступеньки» - это комплементарные пары оснований, а «боковины» - сахарофосфатный остов.



Строение тетрадезоксинуклеотида 5'-d (TACG)

Молекулярные механизмы считывания генетической информации

- *Структура ДНК.*

Цепи молекулы ДНК антипараллельны: одна из них имеет направление $3' \rightarrow 5'$, другая $5' \rightarrow 3'$. В соответствии с принципом комплементарности, если в одной из цепей имеется нуклеотидная последовательность $5'$ -TAGGCAT- $3'$ $3'$ -ATCCGTA- $5'$. В этом случае двухцепочная форма будет выглядеть следующим образом:

$5'$ -TAGGCAT- $3'$

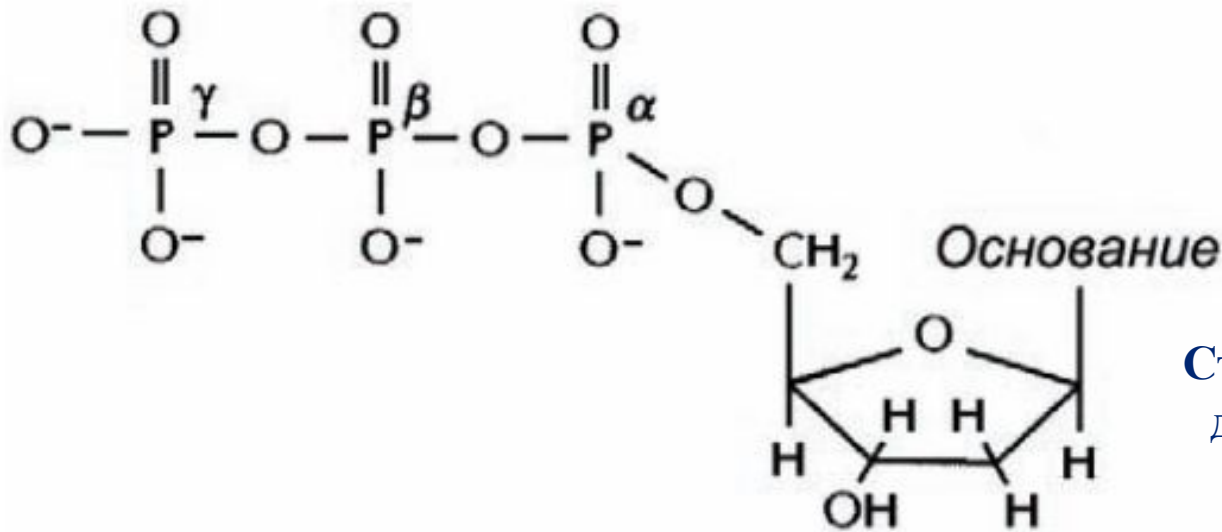
$3'$ -ATCCGTA- $5'$

В такой записи $5'$ -конец верхней цепи всегда располагают слева.

Молекулярные механизмы считывания генетической информации

РЕПЛИКАЦИЯ – это процесс удвоения ДНК.

Множество различных белков принимают участие, но прежде всего ДНК-полимеразы. Каждая мономерная единица, присоединяющаяся к растущей цепи, находится в форме дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфата.



Структурная формула
дезоксирибонуклео-
зидтрифосфата

Молекулярные механизмы считывания генетической информации

РЕПЛИКАЦИЯ Каждая из цепей ДНК служит матрицей для синтеза комплементарной цепи.

Комплементарность оснований противоположных цепей гарантирует идентичность новосинтезированной и исходной ДНК.

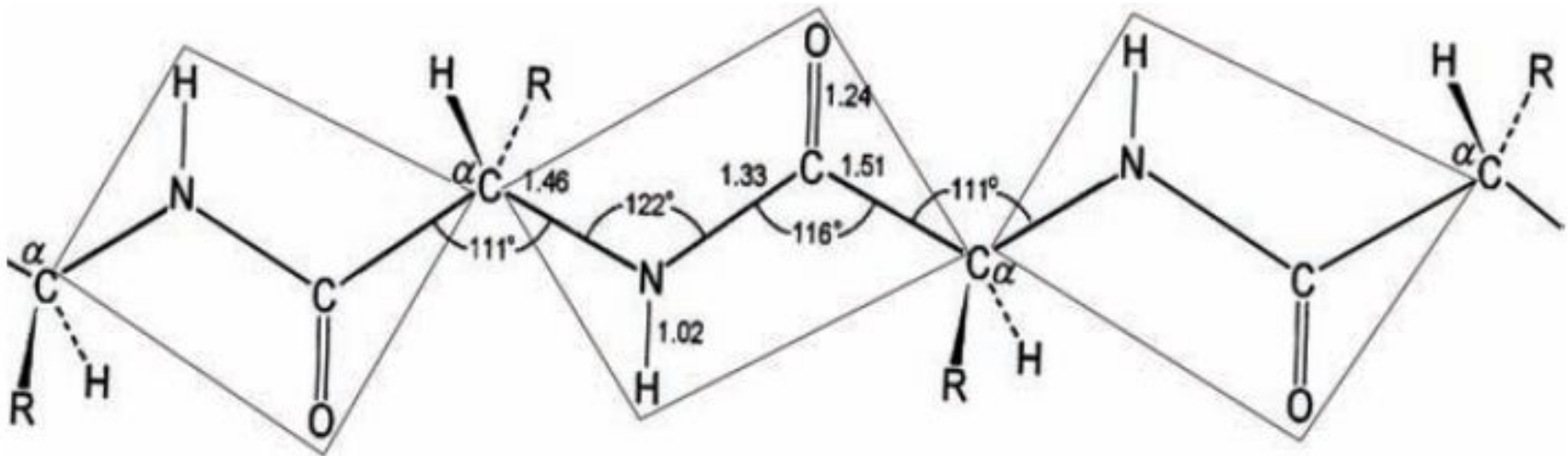
У бактерий репликация ДНК начинается в особой точке молекулы, которая называется ориджин (точка начала или сайт инициации репликации).

В ДНК эукариот имеется несколько таких сайтов, и репликация может начинаться в каждом из них. Образующиеся при этом сегменты эукариотической ДНК сшиваются друг с другом с помощью особых ферментов. Кроме того, у эукариот есть специальный фермент теломераза, который достраивает концы (теломеры) хромосом.

Молекулярные механизмы считывания генетической информации

РНК и белок.

Белковая молекула – полипептид, состоящий из аминокислот, которые соединены друг с другом пептидными связями. Существует 20 стандартных аминокислот. Соединяясь друг с другом пептидными связями, аминокислоты образуют полипептидную цепь. Пептидная связь образуется между карбоксильной группой одной аминокислоты и аминогруппой другой.



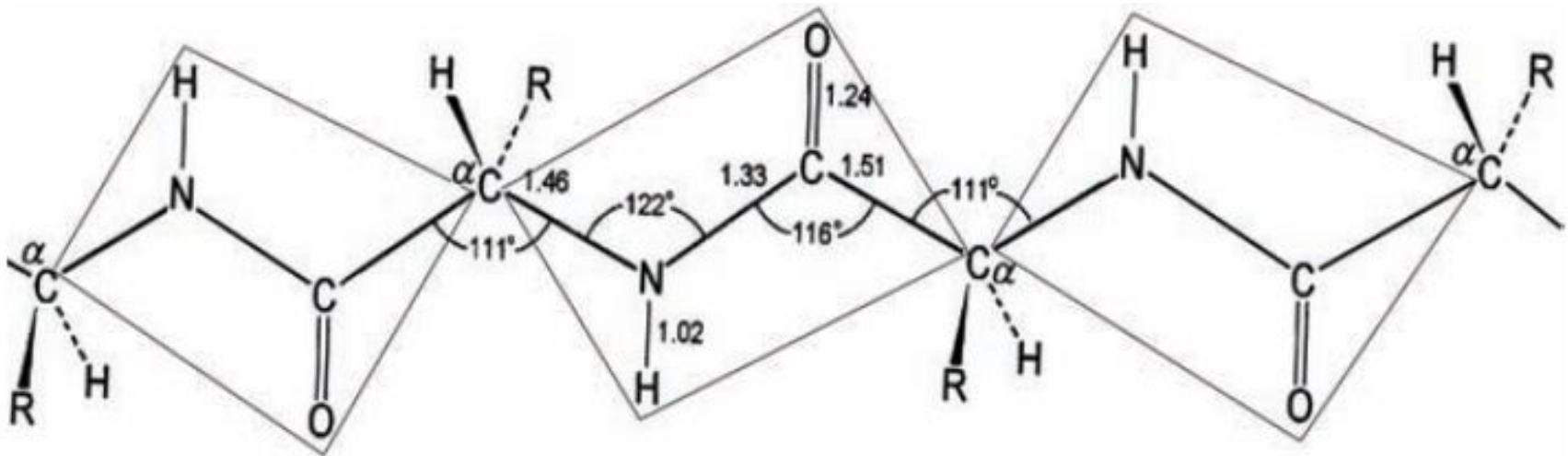
Пептидная связь. Межатомные расстояния даны в ангстремах

Молекулярные механизмы считывания генетической информации

РНК и белок.

Первая аминокислота белковой молекулы имеет свободную аминогруппу, а последняя – свободную карбоксильную группу.

Последовательность аминокислот в белке определяется последовательностью нуклеотидов в ДНК. В синтезе белков участвуют РНК, ферменты и белковые факторы.



Пептидная связь. Межатомные расстояния даны в ангстремах

Молекулярные механизмы считывания генетической информации

РНК и белок.

РНК – это линейная полинуклеотидная молекула, отличающаяся от ДНК в двух отношениях:

- моносахаридом в РНК является рибоза, содержащая не одну, а две гидроксильные группы; они связаны с 2' и 3'-атомами углерода;
- Одним из четырех оснований в РНК.

Большинство молекул РНК одноцепочные, хотя в них часто имеются взаимно комплементарные участки, образующие двухцепочные структуры – «шпильки».

Молекулярные механизмы считывания генетической информации

Транскрипция.

Все РНК синтезируются на ДНК как на матрице – транскрипция.

У большинства *прокариот* транскрипция всех РНК осуществляется с помощью *одной и той же РНК-полимеразы*.

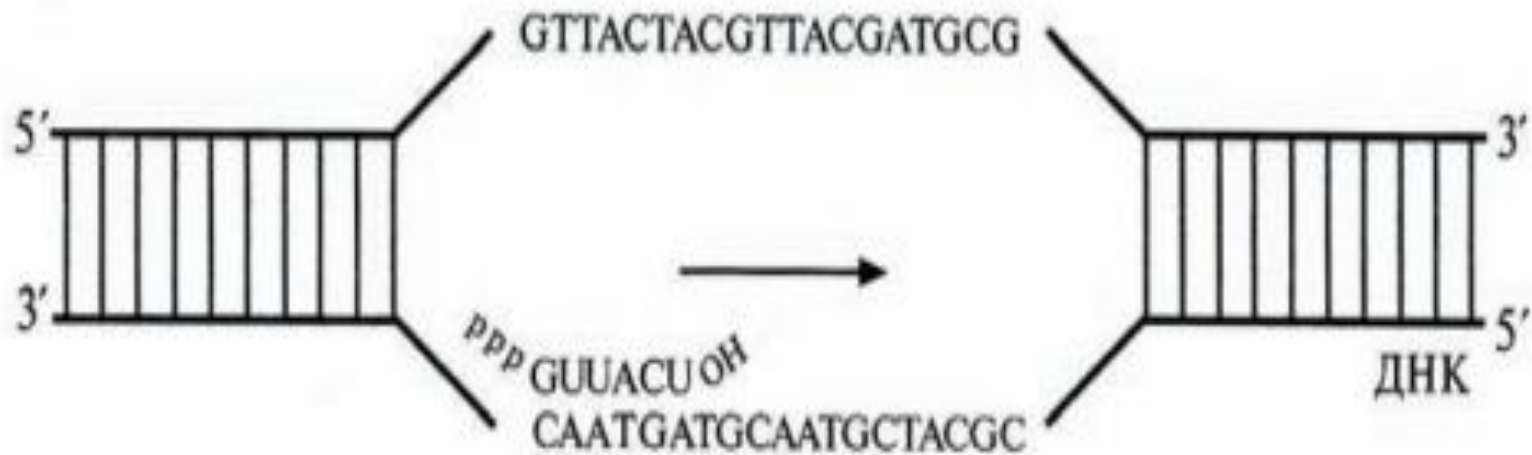
У *эукариот* мРНК, рРНК и тРНК транскрибируются разными РНК-полимеразами.

Транскрипция во многом сходна с репликацией. Матрицей при синтезе РНК служит определенный участок одной из цепей ДНК. РНК-полимераза копирует этот участок, последовательно соединяя друг с другом с помощью 3'-5'-фосфодиэфирных связей рибонуклеотиды в соответствии с правилом *комплементарности*.

Молекулярные механизмы считывания генетической информации

Транскрипция.

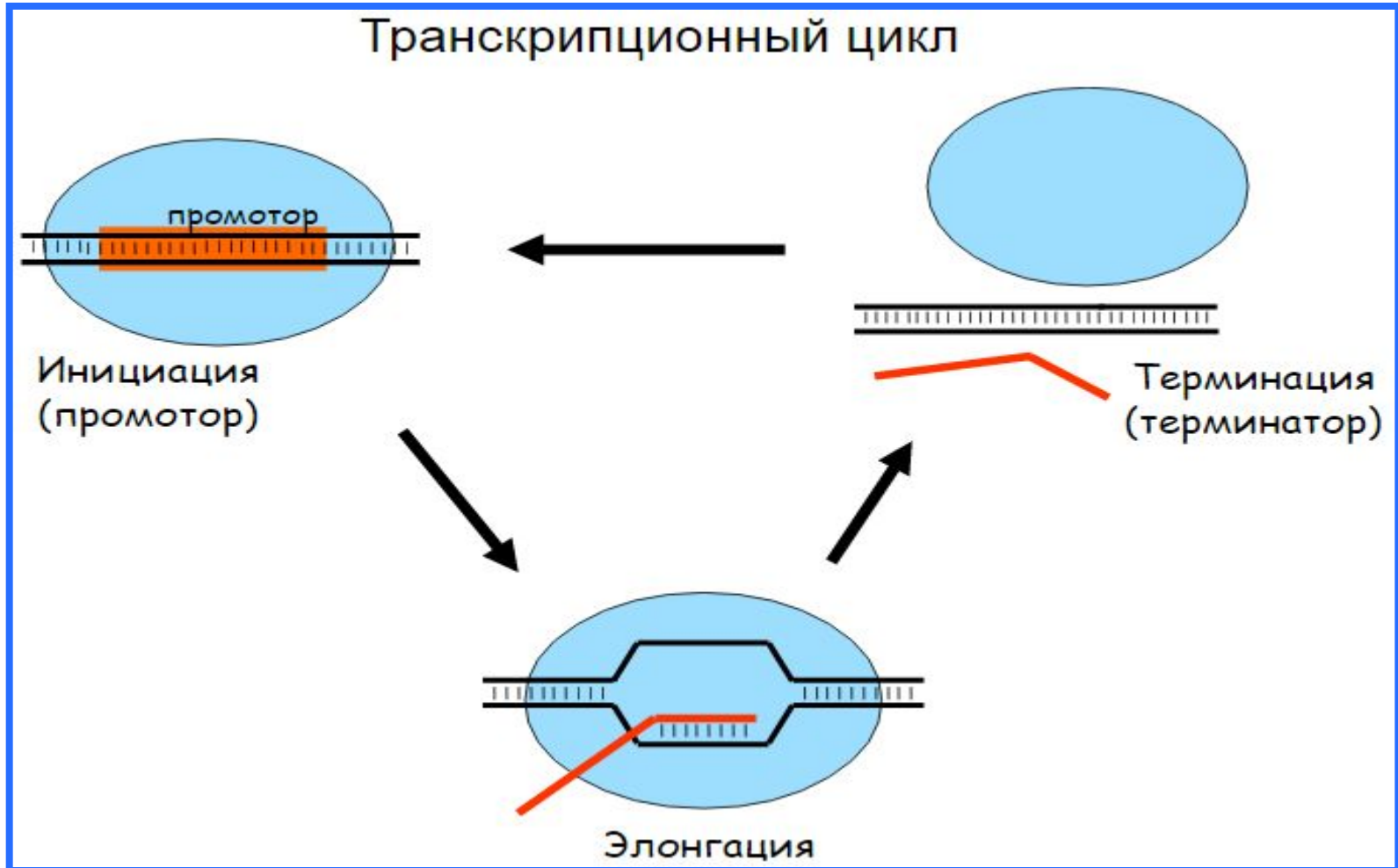
В ходе транскрипции новосинтезированная молекула РНК *отсоединяется* от ДНК, и двойная спираль ДНК *восстанавливается*.



Схематическое изображение транскрипции. Стрелкой указано направление

Молекулярные механизмы считывания генетической информации

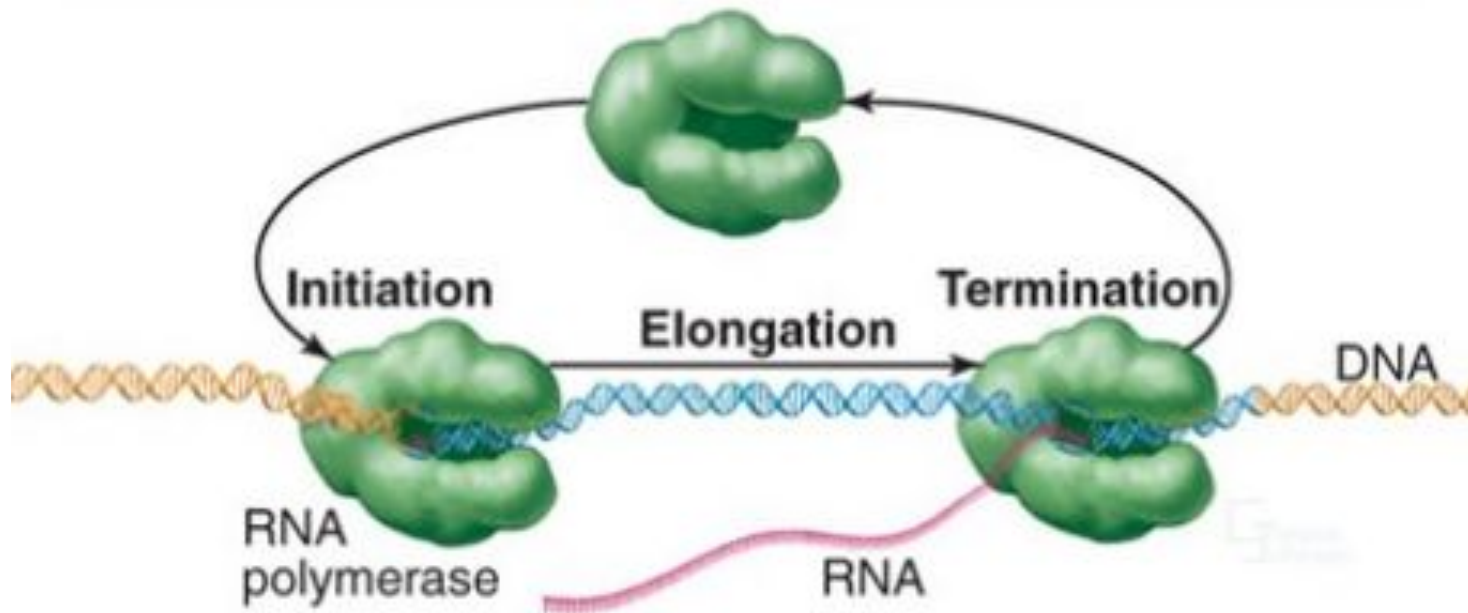
Транскрипция.



Молекулярные механизмы считывания генетической информации

Транскрипция.

Правильность транскрипции, то есть ее начало и завершение в нужных сайтах, обеспечивают специфические нуклеотидные последовательности в ДНК и белковые факторы.

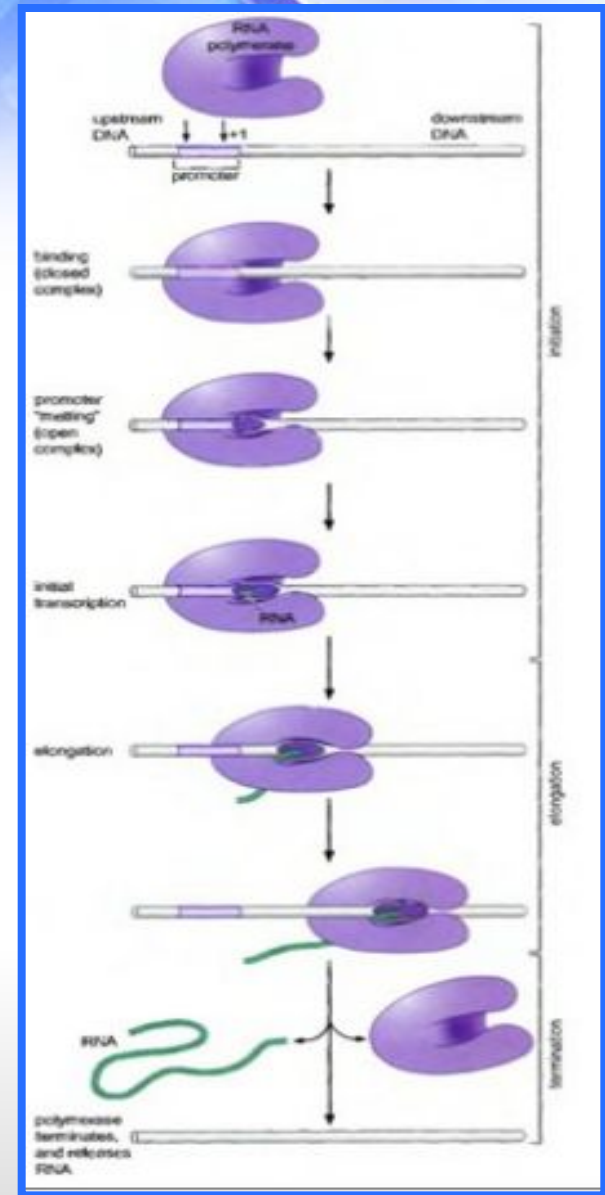


Молекулярные механизмы считывания генетической информации

Транскрипция.

Ген представляет собой специфическую последовательность, транскрибируемую в РНК. Подавляющее большинство транскрибируемых последовательностей ДНК составляют так называемые *структурные гены*, на которых синтезируются мРНК.

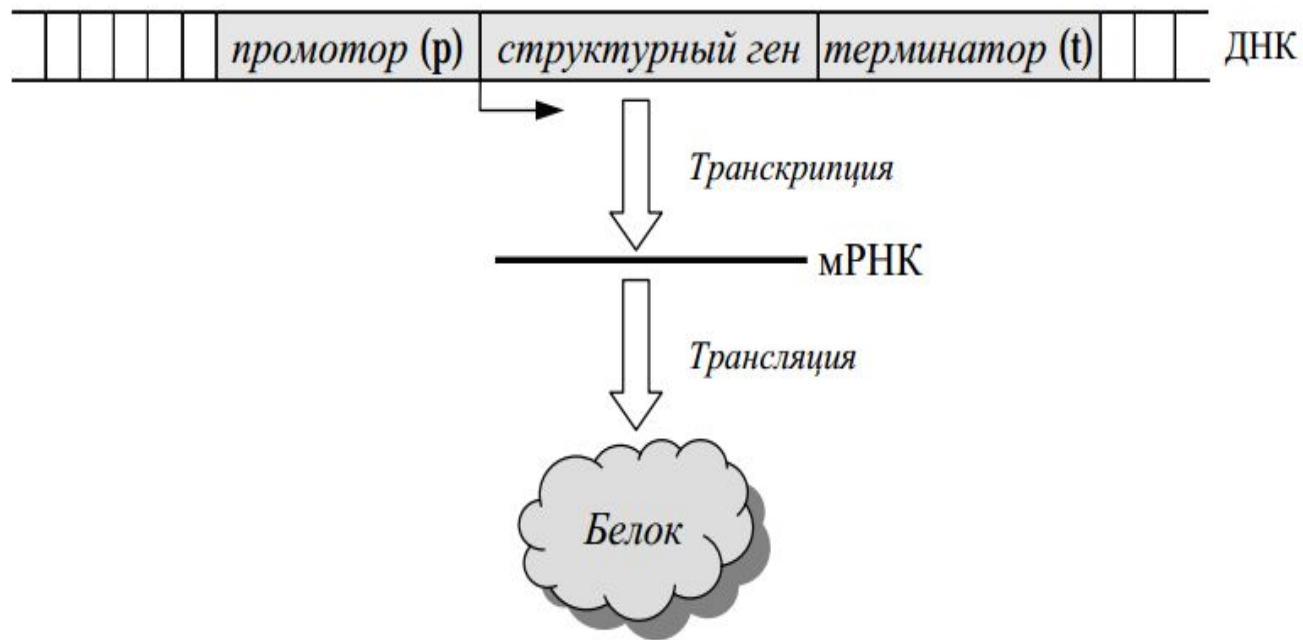
Сигнал *инициации* обычно располагается перед кодирующей последовательностью, а сигнал *терминации* – вслед за ней. Участок ДНК, предшествующий транскрибируемому гену, называется 5'-фланкирующей последовательностью, а расположенный за ним – 3'-фланкирующей.



Молекулярные механизмы считывания генетической информации

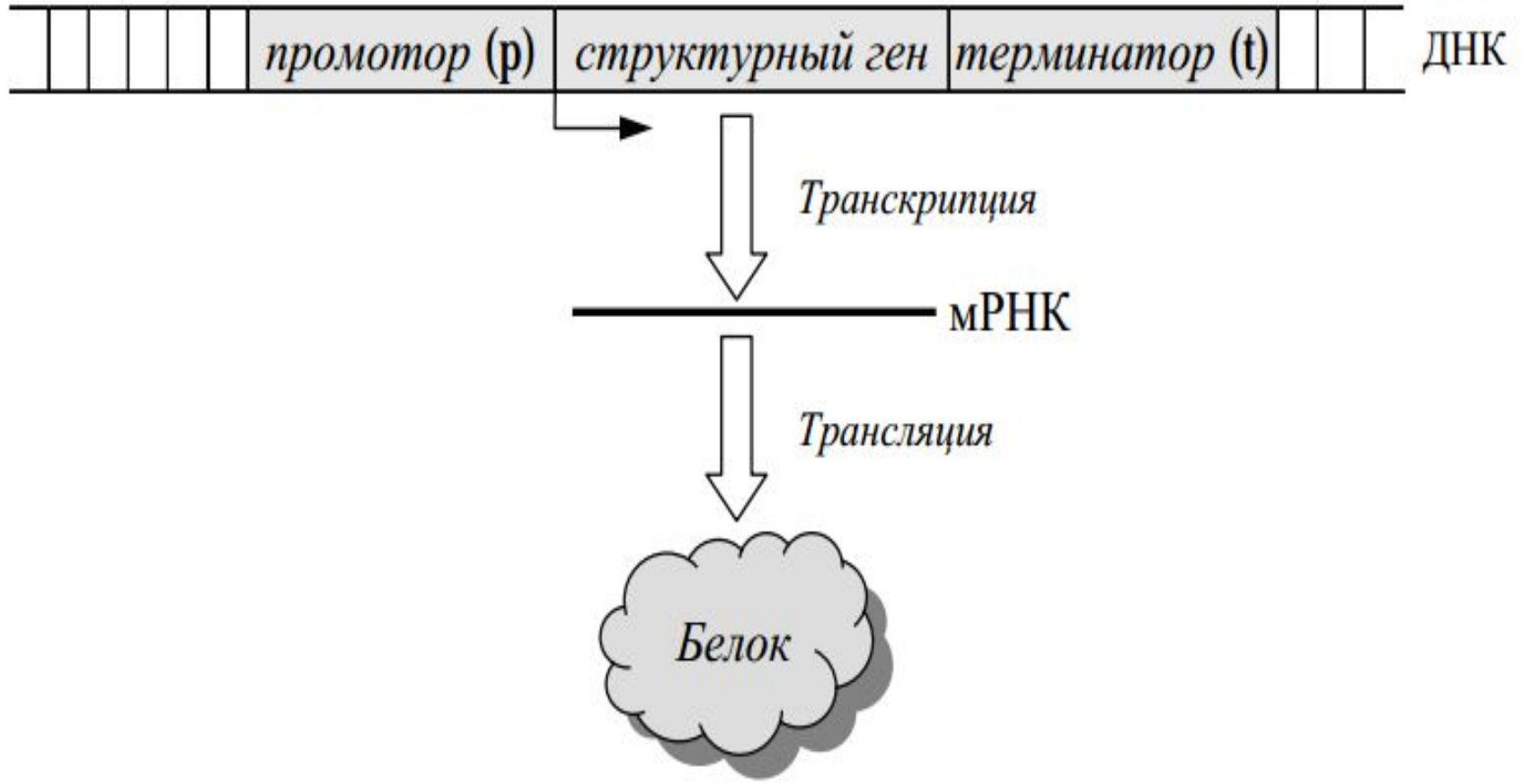
Конечным продуктом структурного гена является белок.

У прокариот структурный ген – *непрерывный* участок молекулы ДНК. Транскрипция начинается со связывания РНК-полимеразы с промотором, и далее последовательно копируется весь структурный ген (кодирующая область) от первого нуклеотида до последнего с образованием функциональной мРНК.



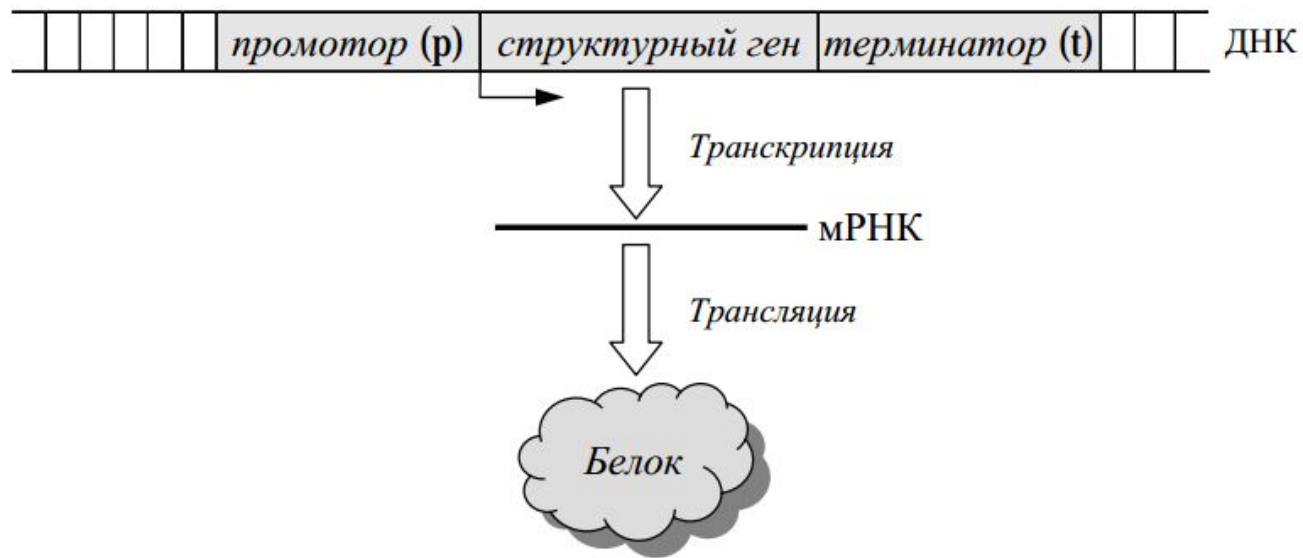
Молекулярные механизмы считывания генетической информации

Схема экспрессии прокариотического структурного гена



Молекулярные механизмы считывания генетической информации

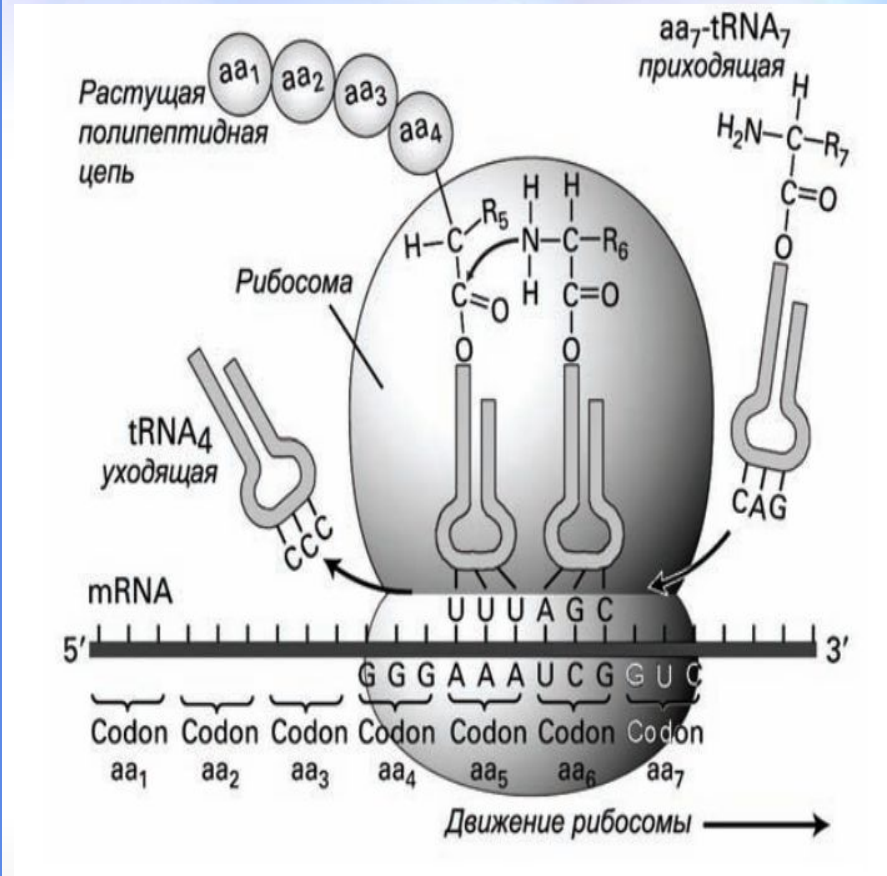
На рисунке указаны промотор (p), сайт инициации транскрипции и ее направление (горизонтальная стрелка), область терминации транскрипции (t), узнаваемая РНК-полимеразой. Сначала на ДНК, как на матрице, синтезируется мРНК (транскрипция), а затем осуществляется синтез белковой цепи (трансляция).



Молекулярные механизмы считывания генетической информации

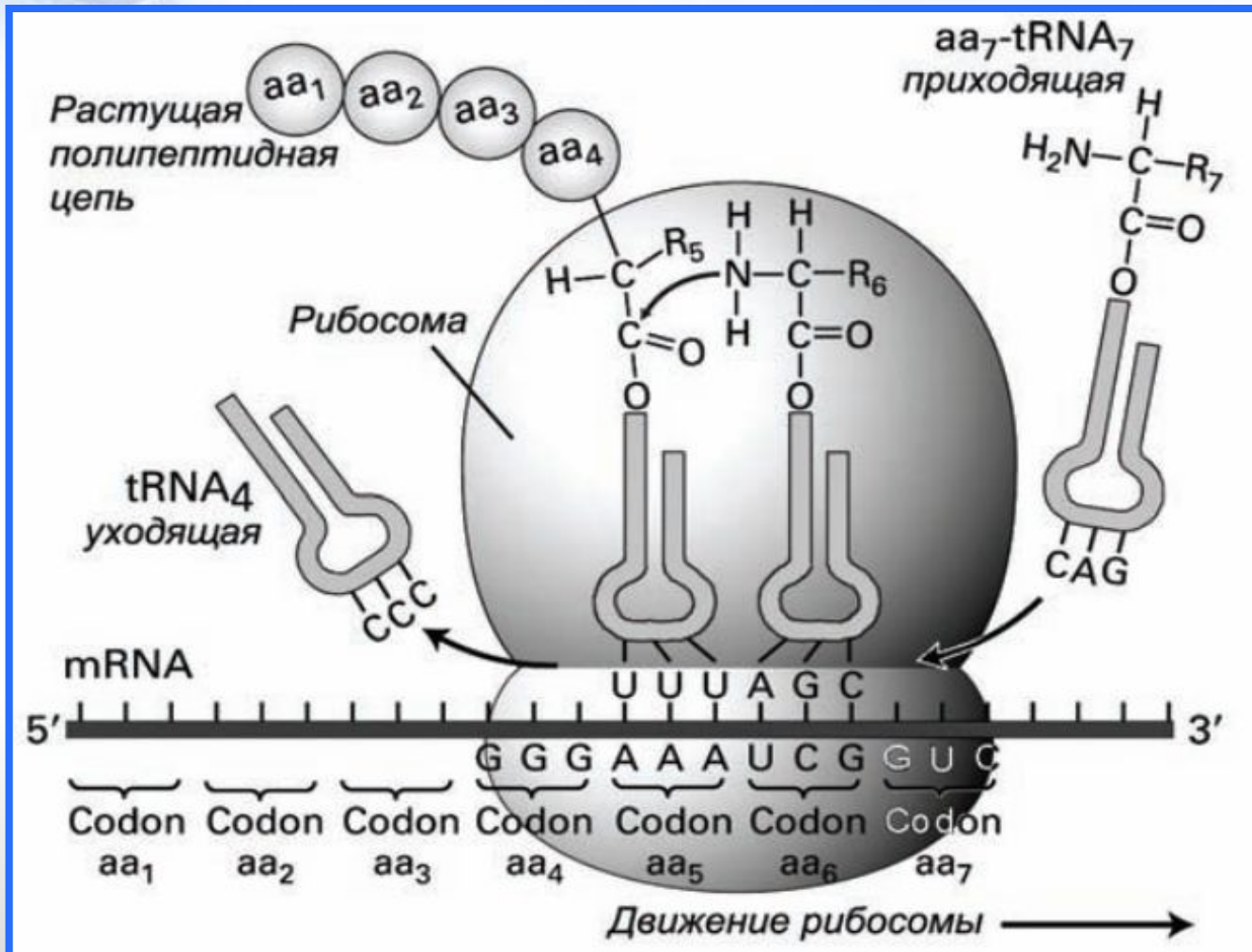
СИНТЕЗ БЕЛКА – ТРАНСЛЯЦИЯ

Важную роль играют молекулы тРНК и рРНК. В клетке существует более 50 разных тРНК, каждая строго специфически связывается своим 3'-концом с одной из 20 аминокислот. На другом конце молекулы тРНК (на так называемой антикодоновой петле) находится последовательность из трех нуклеотидов (антикодон), обеспечивающая связывание тРНК с комплементарным участком из трех нуклеотидов в молекуле мРНК, который называется кодоном.



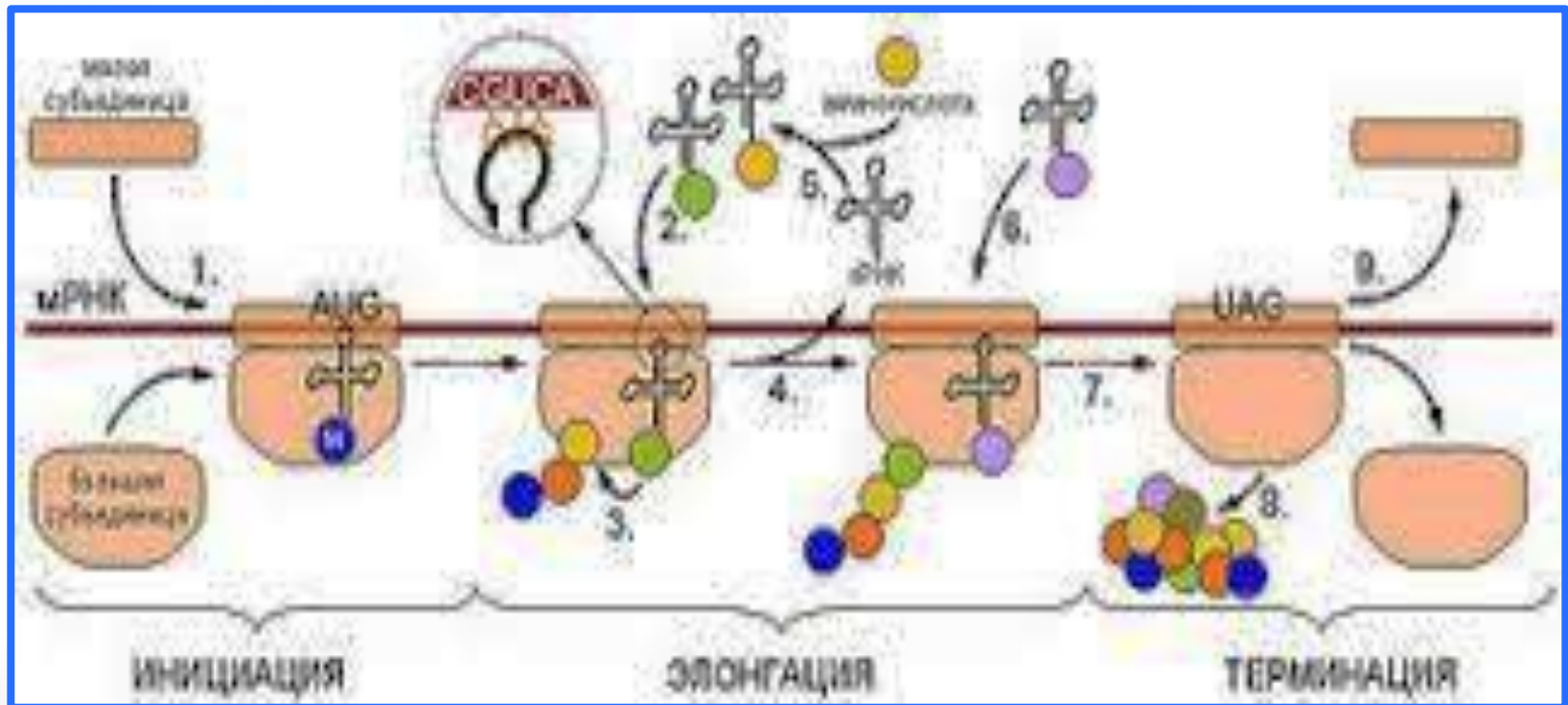
Молекулярные механизмы считывания генетической информации

Три функции РНК в трансляции. *aa* - обозначение аминокислот, *R* - обозначение аминокислотных остатков



Молекулярные механизмы считывания генетической информации

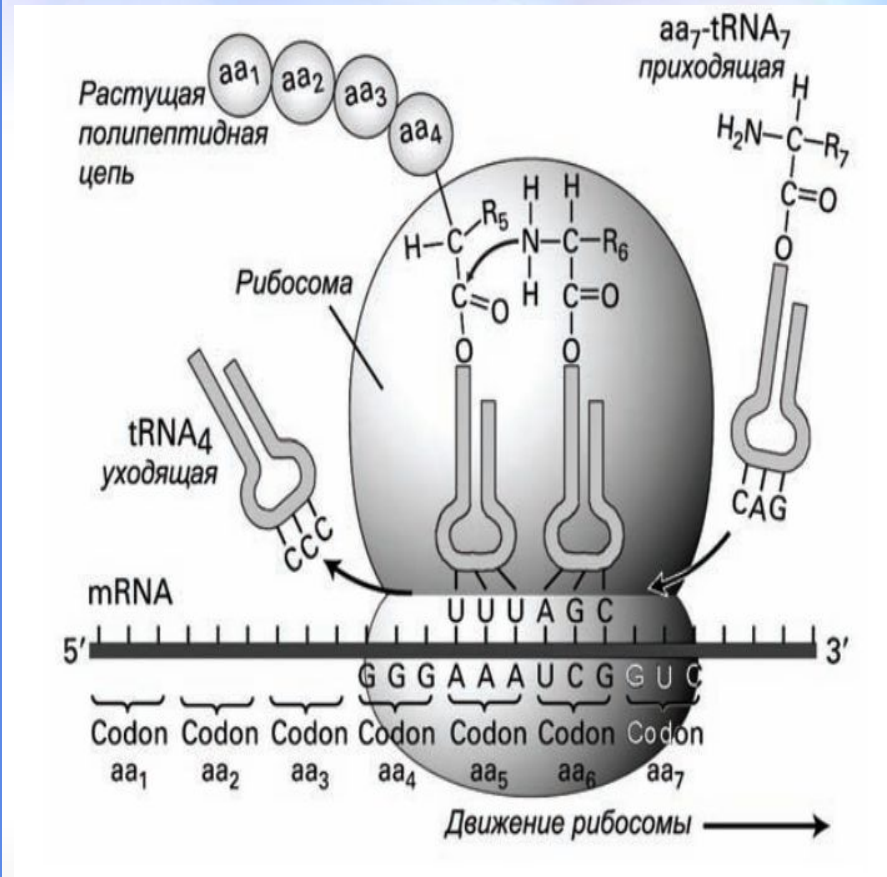
Синтез белка



Молекулярные механизмы считывания генетической информации

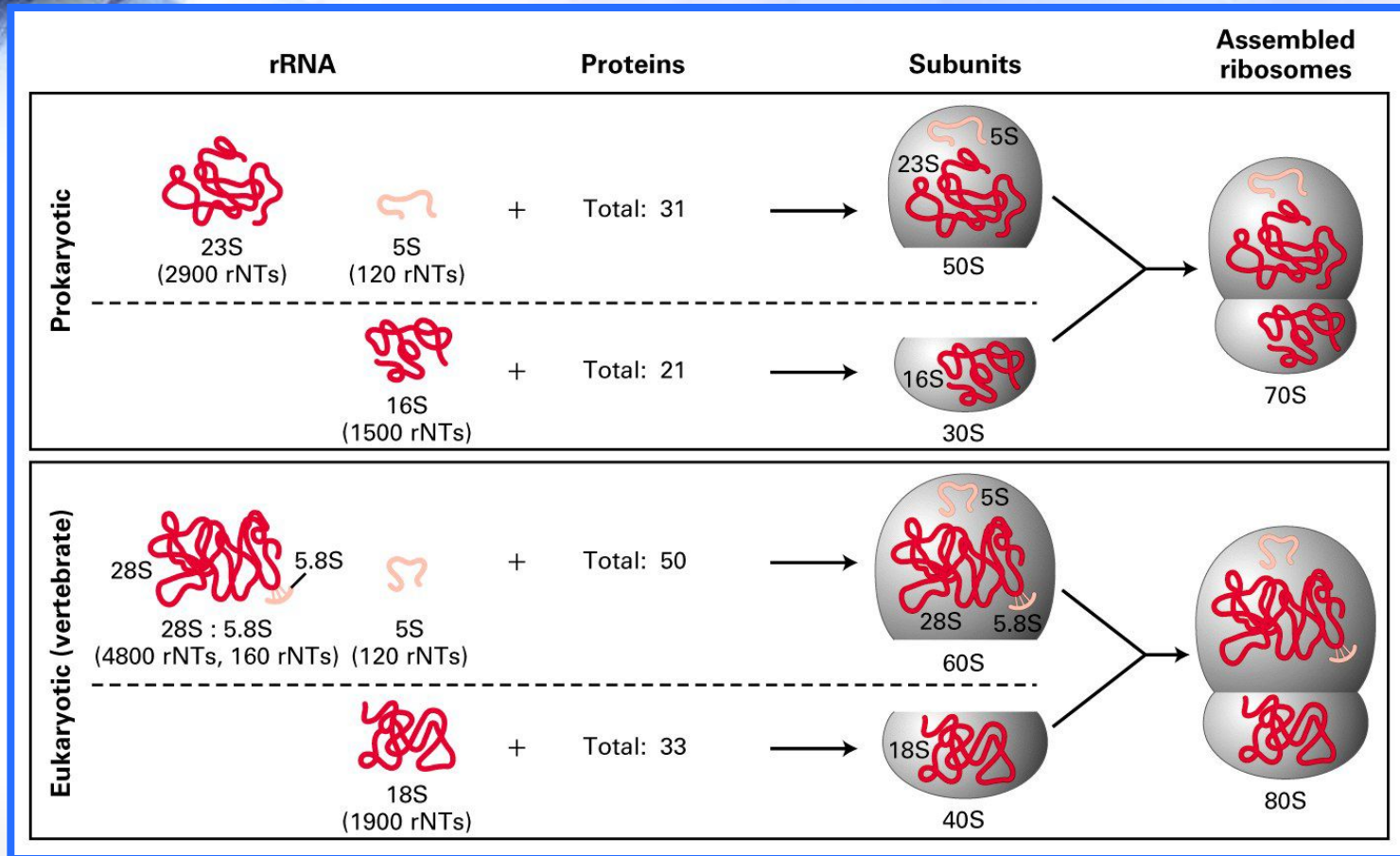
Трансляция.

Существуют две основные разновидности рРНК: малая и большая. Они формируют соответственно малую и большую субъединицы рибосомы – особой структуры, в которой и протекает синтез белка. У прокариот молекулы рРНК имеют меньший размер, чем у эукариот. У прокариот трансляция начинается со связывания мРНК с малой рибосомной субъединицей.



Молекулярные механизмы считывания генетической информации

Трансляция у прокариот



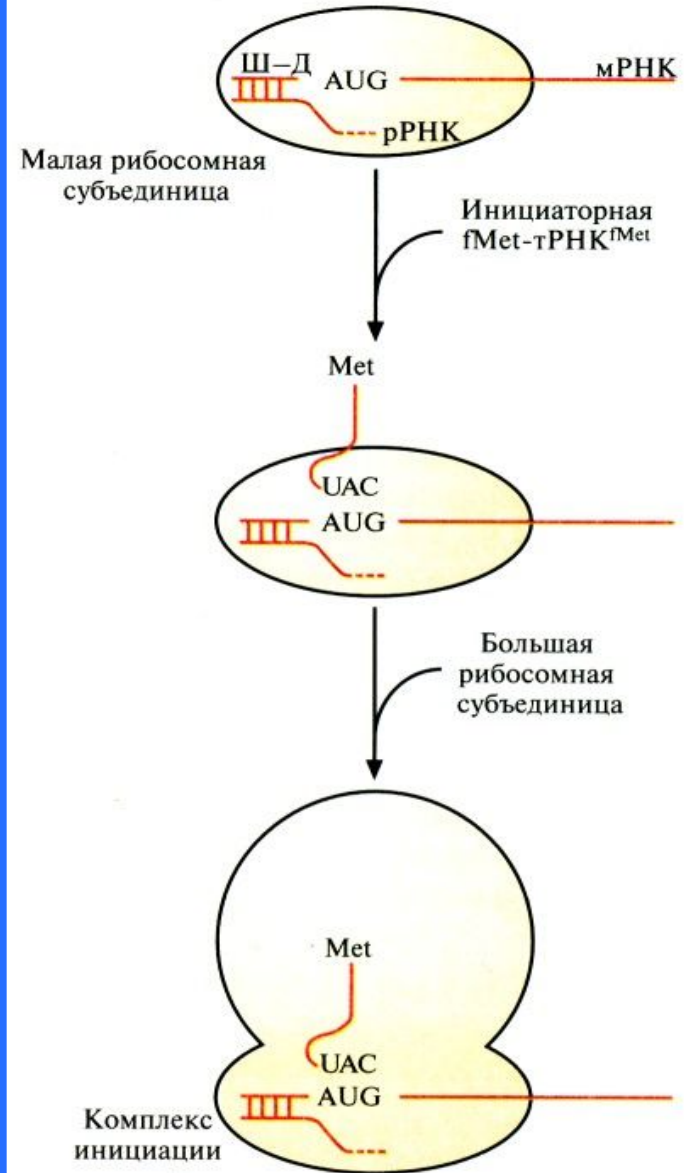
Прокариотические рибосомы мельче эукариотических, содержат 3 молекулы рРНК и 52 молекулы белка.

Молекулярные механизмы считывания генетической информации

Инициация трансляции.

В прокариотической клетке начинается с того, что последовательность Шайна-Дальгарно (Ш-Д) (последовательность из 8 нуклеотидов), 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 старт-кодоном (AUG) мРНК.



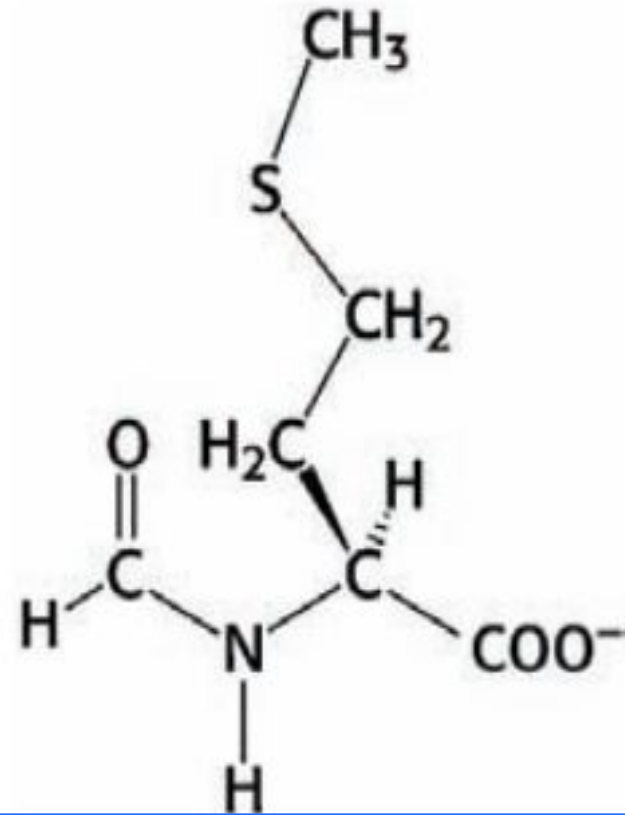
Молекулярные механизмы считывания генетической информации

Инициация трансляции.

К образовавшемуся комплексу присоединяется большая рибосомная субъединица, и образуется комплекс инициации.

Аминогруппа метионина, связанного с инициаторной тРНК, формилирована (группа $\text{H}-\text{C}=\text{O}$).

После трансляции формилметионин отщепляется от белковой цепи



Структурная схема формилметионина

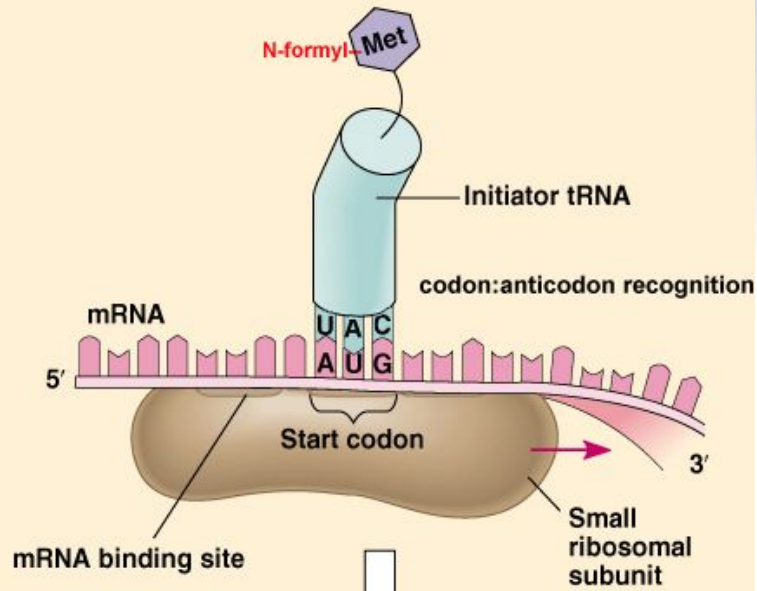
Молекулярные механизмы считывания генетической информации

Элонгация трансляции.

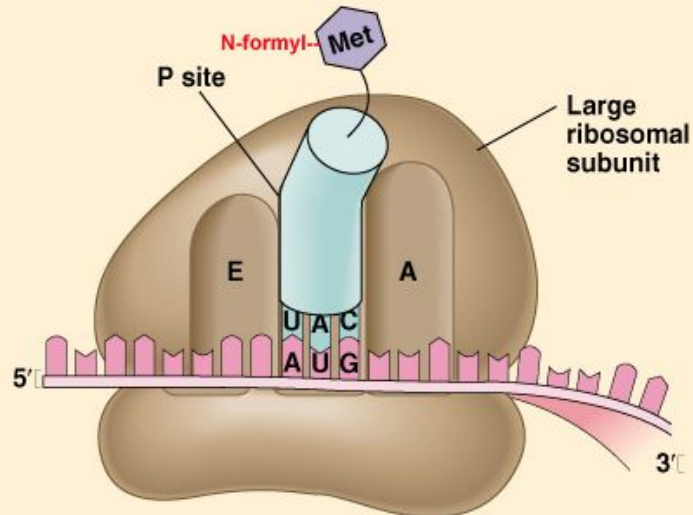
1. Второй кордон (например, CUG) в мРНК связывается с соответствующим антикодоном (GAC) Leu-тРНК^{Leu}
2. Метионин образует пептидную связь с лейцином, доставленным тРНК^{Leu}, освободившаяся от аминокислоты инициаторная тРНК отсоединяется.
3. Происходит транслокация комплекса пептидил-тРНК-мРНК с экспонированием следующего (третьего) кодона (например, UUU).
4. Третий кодон (UUU) спаривается с соответствующим антикодоном AAA Phe-тРНК^{Phe}.
5. Лейцин образует пептидную связь с фенилаланином, доставленным тРНК^{Phe}, освободившаяся от аминокислоты тРНК^{Leu} отсоединяется от рибосомы.
6. Происходит транслокация комплекса пептидил-тРНК-мРНК с экспонированием следующего кодона и т.д.

Эти события повторяются до тех пор, пока рибосома не дойдет до стоп-кодона. Антикодона, который был бы комплементарен стоп-кодону, нет ни у одной из тРНК.

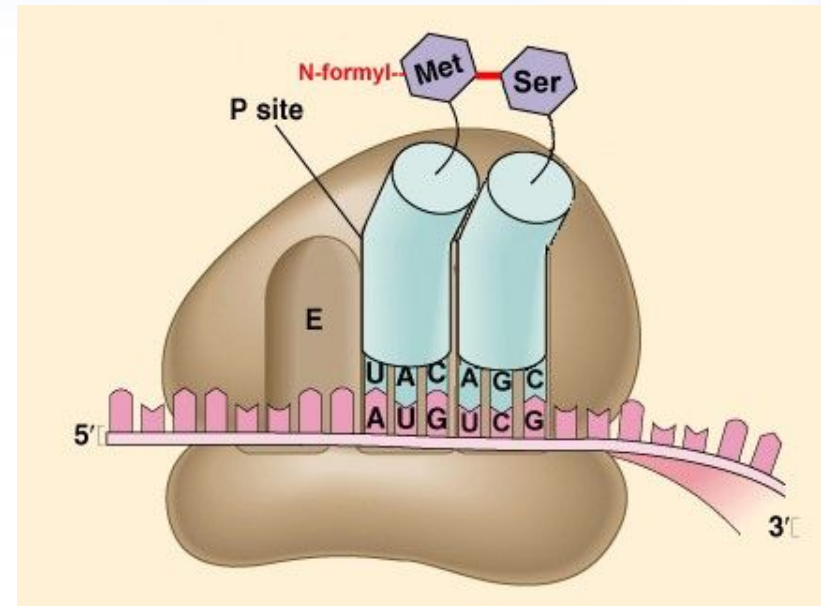
Трансляция у прокариот



(a)



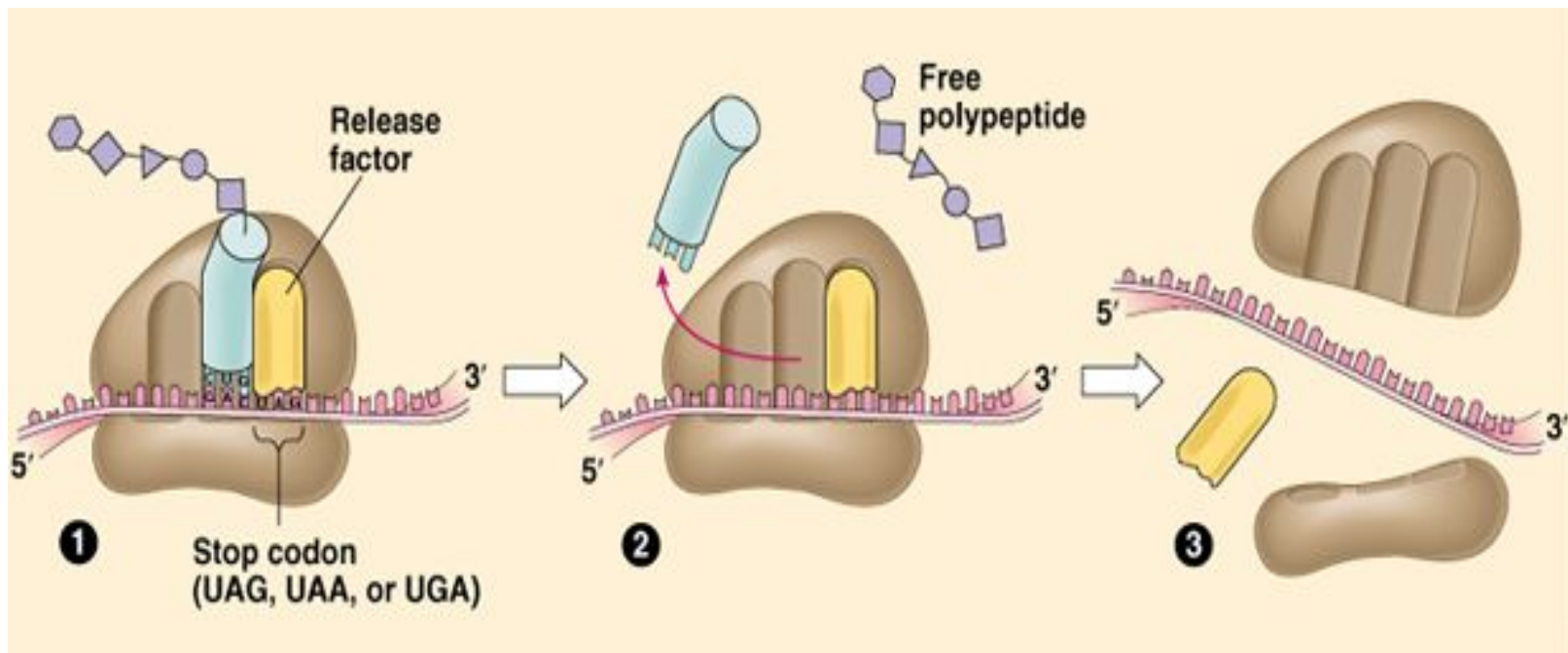
(b)



Молекулярные механизмы считывания генетической информации

Терминация трансляции.

Финальная стадия трансляции, так же как инициация и элонгация, требует специфических молекулярных сигналов, которые превращают стоп-сигнал стоп-кодона в диссоциацию комплекса мРНК-рибосома-тРНК-полипептид.

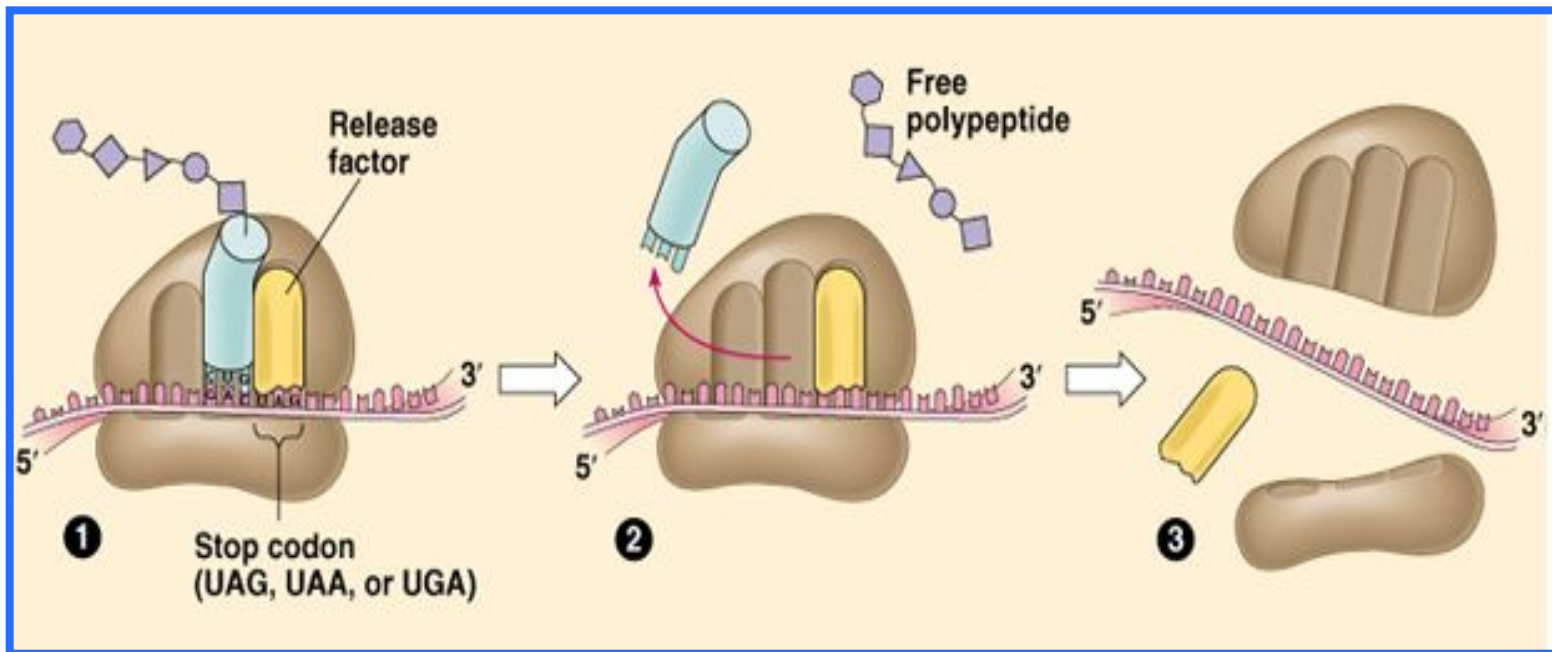


Молекулярные механизмы считывания генетической информации

Терминация трансляции.

Были обнаружены 2 особых белковых фактора терминации, которые называются факторами высвобождения (или отделения) полипептидной цепи от рибосомы (release factors, RF). У бактерий 2 ФАКТОРА ВЫСВОБОЖДЕНИЯ: RF1 и RF2 и GTP-связанный фактор RF3.

После высвобождения из рибосомы вновь синтезированный белок с помощью специальных белков шаперонов сворачивается в свою нативную трехмерную конформацию.



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.

Основные принципы регуляции транскрипции у бактерий

Синтез мРНК и соответственно синтез белка должны строго регулироваться, поскольку у клетки недостаточно ресурсов для одновременной транскрипции и трансляции всех структурных генов.

И прокариоты, и эукариоты ПОСТОЯННО синтезируют только те мРНК, которые необходимы для выполнения основных клеточных функций.

Экспрессия остальных структурных генов осуществляется *под строгим контролем* регуляторных систем, запускающих транскрипцию только в том случае, когда возникает потребность в определенной белке.

Основные принципы регуляции транскрипции у бактерий

У прокариот транскрипция инициируется связыванием РНК-полимеразы с последовательностями ТАТА и ТТГАС промоторной области структурного гена или оперона.

В промоторе большинства структурных генов E.coli имеются 2 сайта связывания для РНК-полимеразы. Один из них (ТАТА-бокс или бокс Прибнова):

*ТАТААТ
АТАТТА*

А второй –

*ТТГАС
ААСТГ*

ТАТА-бокс и последовательность ТТГАС расположены за 10 и 35 нуклеотидами до сайта инициации транскрипции соответственно.

Основные принципы регуляции транскрипции у бактерий

Обычно от участка (о) между ТАТА-боксом и нуклеотидом +1 во многом зависит, будет ли происходить транскрипция данного оперона.

В зависимости от способа регуляции транскрипции оперона этот участок называется **оператором** или **активатором**.

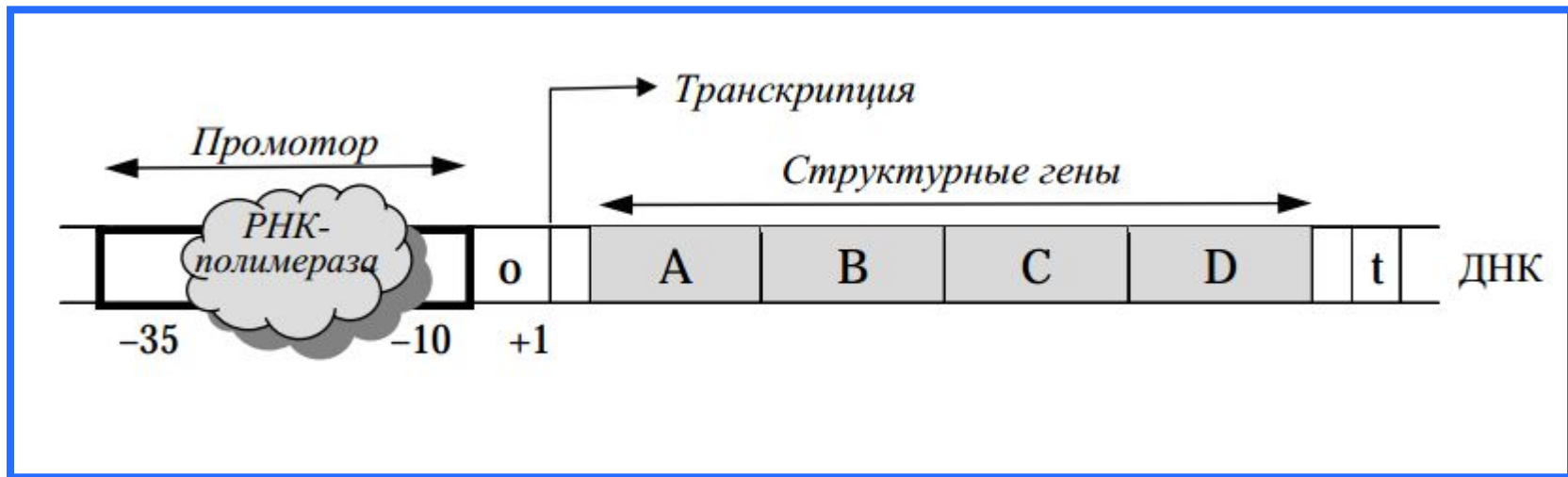
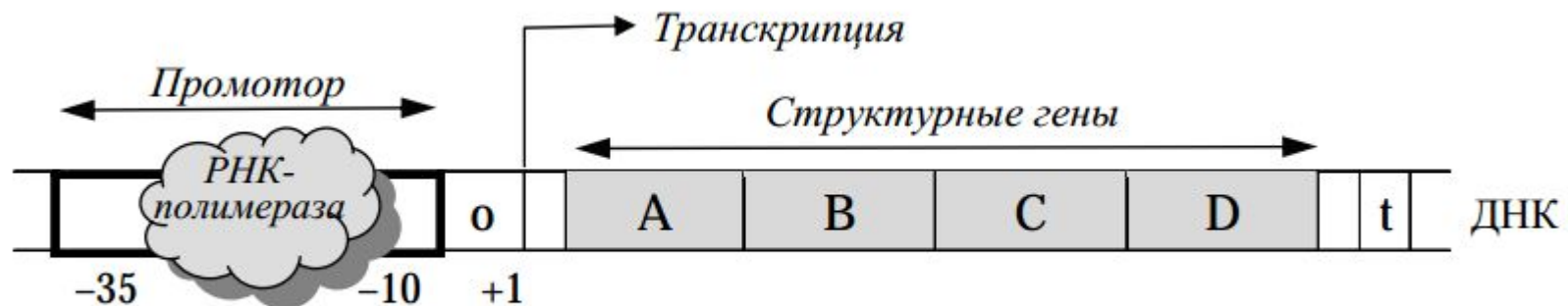


Схема прокариотического оперона

Основные принципы регуляции транскрипции у бактерий

Включение или выключение некоторых оперонов осуществляется при участии **эффектора**, который изменяет конформацию **белка-репрессора** и препятствует блокированию транскрипции.

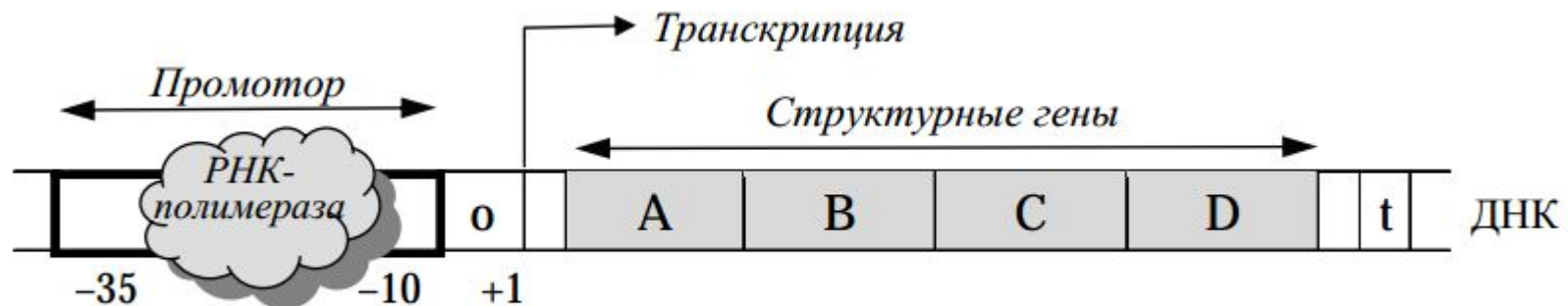
При уменьшении концентрации эффектора в клетке *репрессор* связывается с оператором (о) и препятствует перемещению РНК-полимеразы вдоль молекулы ДНК, блокируя таким образом транскрипцию.



Основные принципы регуляции транскрипции у бактерий

В других оперонах с оператором (o) связывается **белок-активатор**, который увеличивает скорость транскрипции.

Связывание эффектора с активатором может снижать скорость транскрипции. ДНК-белковые взаимодействия, ответственные за регуляцию транскрипции, строго специфичны в отношении определенных структурных генов или оперонов.



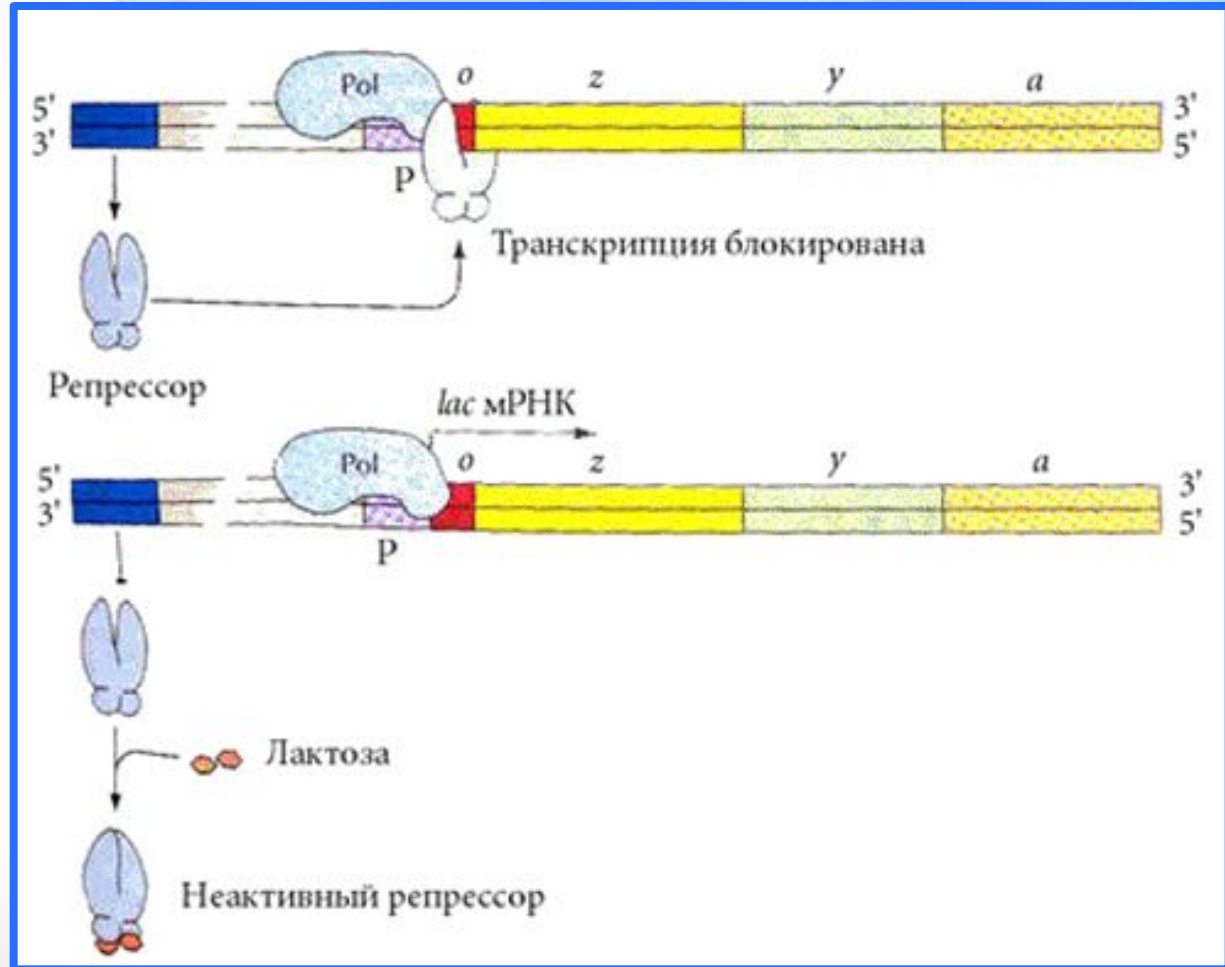
Основные принципы регуляции транскрипции у бактерий

Включение транскрипции бактериального оперона.

Репрессор (R) связывается с оператором и блокирует транскрипцию.

Связывание эффектора (E) с репрессором изменяет его конформацию, и он не может связаться с оператором.

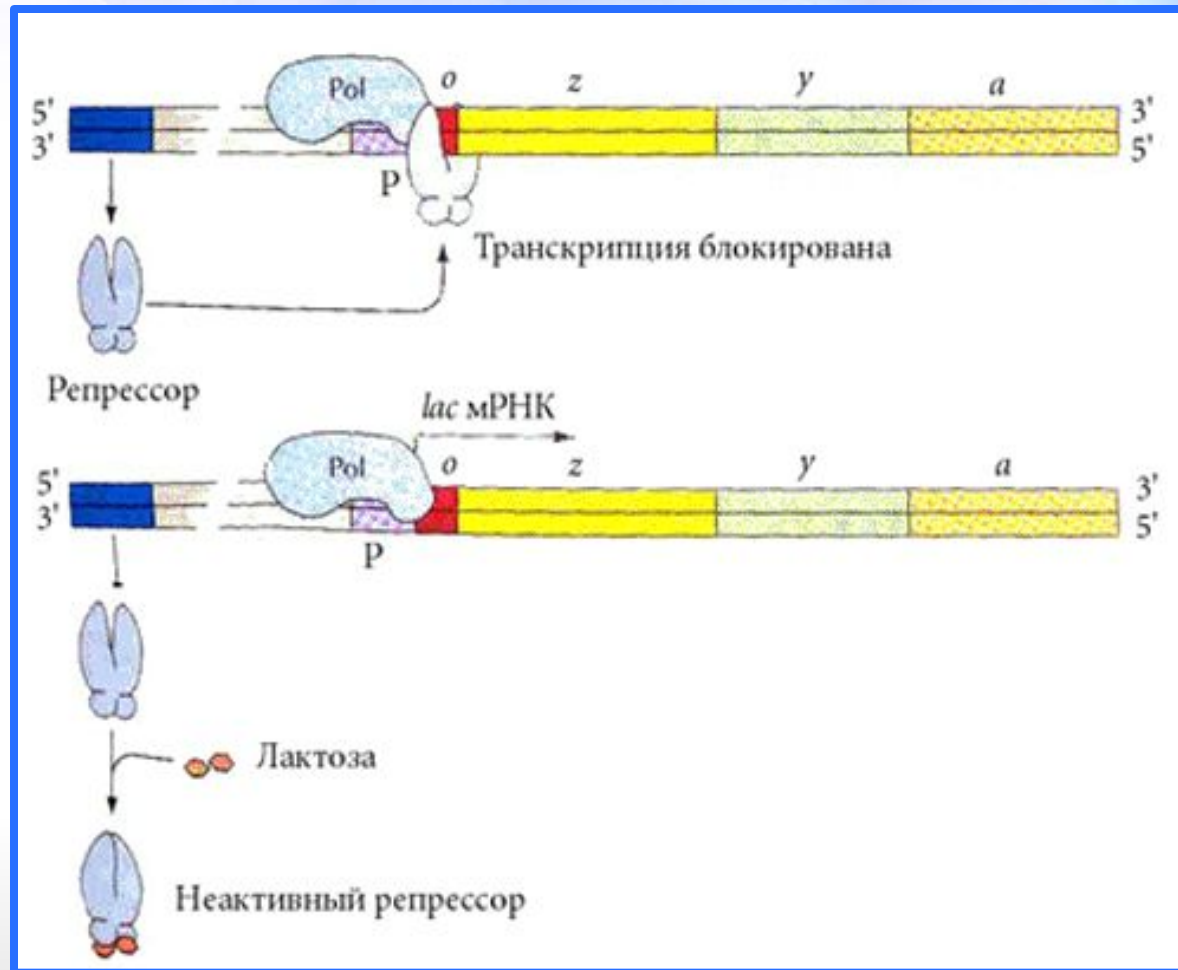
РНК-полимераза беспрепятственно перемещается вдоль молекулы ДНК, осуществляя транскрипцию.



Основные принципы регуляции транскрипции у бактерий

Выключение транскрипции бактериального оперона.

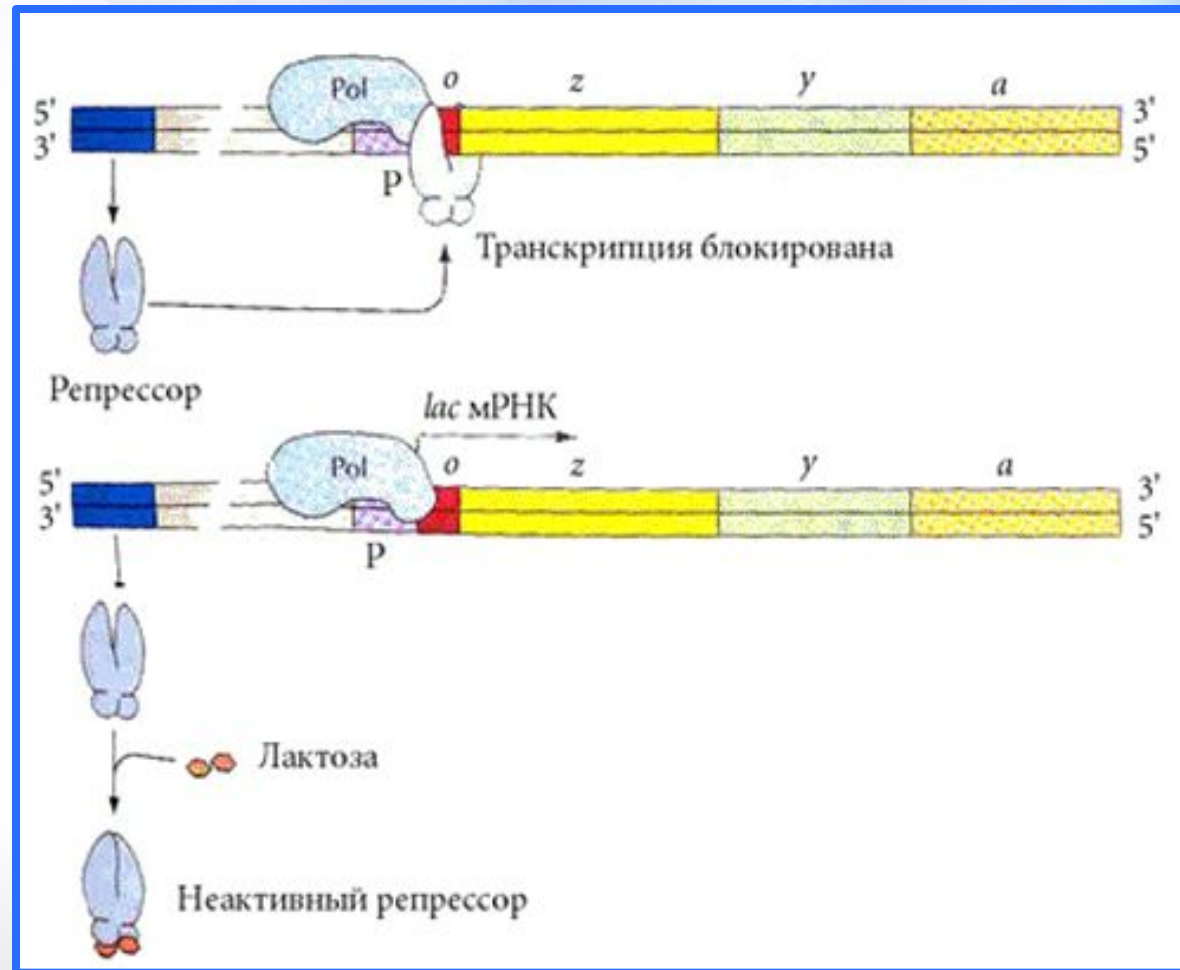
Связывание корепрессора (C) с неактивным репрессором (IR) изменяет конформацию последнего. Комплекс корепрессор-репрессор (C-IR) связывается с оператором и блокирует транскрипцию



Основные принципы регуляции транскрипции у бактерий

Изменение скорости транскрипции.

Активатор (Act) связан с участком между ТАТА-боксом и сайтом инициации транскрипции, скорость транскрипции повышена. Эффектор связывается с активатором и препятствует его соединению с ДНК; скорость транскрипции уменьшается.



ПРИМЕНЕНИЕ СИЛЬНЫХ РЕГУЛИРУЕМЫХ ПРОМОТОРОВ

В нанобиотехнологии широко используются прокариоты в качестве организма-хозяина для клонирования генов и их экспрессии.

Основной целью экспериментов по клонированию генов является подбор условий для эффективной экспрессии в нужном организме. Причем сам факт встраивания того или иного гена в клонирующий вектор еще не означает, что этот ген будет экспрессирован.

В то же время для экономической целесообразности – уровень синтеза продукта должен быть достаточно высоким.

ПРИМЕНЕНИЕ СИЛЬНЫХ РЕГУЛИРУЕМЫХ ПРОМОТОРОВ

Для достижения эффективной экспрессии создано много специфических векторов; для этого проводились манипуляции с целым рядом генетических элементов, контролирующих процессы транскрипции и трансляции, стабильность белков, секрецию продуктов из клетки-хозяина и т.д.

Молекулярно-биологические свойства систем экспрессии:

1. Тип промотора и терминатора транскрипции;
2. Прочность связывания мРНК с рибосомой;
3. Число копий клонированного гена и его локализация (в плазмиде или в хромосоме клетки-хозяина);

ПРИМЕНЕНИЕ СИЛЬНЫХ РЕГУЛИРУЕМЫХ ПРОМОТОРОВ

Молекулярно-биологические свойства систем экспрессии:

4. Конечная локализация синтезируемого продукта;
5. Эффективность трансляции в организме хозяина;
6. Стабильность продукта в клетке-хозяине.

Не существует универсальной стратегии оптимизации экспрессии клонированных генов. Большинство генов имеют уникальные молекулярные свойства, и оптимальные системы экспрессии для каждого из них приходится подбирать всякий раз заново.

Эффективность экспрессии любого чужеродного гена зависит также от его родства с организмом-хозяином.

ПРИМЕНЕНИЕ СИЛЬНЫХ РЕГУЛИРУЕМЫХ ПРОМОТОРОВ

Несмотря на то, что многие представители как прокариотических, так и эукариотических организмов способны к экспрессии чужеродных генов, для получения важных в коммерческом отношении продуктов с помощью технологии рекомбинантных ДНК используют в основном *Escherichia coli*. Это связано с тем, что генетические, молекулярно-биологические, биохимические и физиологические свойства этого микроорганизма детально изучены. Также используются дрожжи, сенная палочка и др.

Для эффективной экспрессии любого гена совершенно необходимо наличие ***сильного регулируемого промотора***, расположенного перед данным геном. Такой промотор имеет высокое сродство к РНК-полимеразе, поэтому прилегающие к нему последовательности эффективно (с высокой частотой) транскрибируются. Регулируемость промотора позволяет клетке (и исследователю) осуществлять строгий контроль транскрипции.

ПРИМЕНЕНИЕ СИЛЬНЫХ РЕГУЛИРУЕМЫХ ПРОМОТОРОВ

Для экспрессии клонированных генов широко используется промотор *lac* (лактозного) оперона кишечной палочки. Однако есть и другие промоторы, обладающие полезными для контроля экспрессии свойствами.

Для их идентификации *перед геном-репортером*, кодирующим легко регистрируемый продукт, но лишенным промотора, *встраивают случайные фрагменты ДНК*.

Хромосомную ДНК разрезают рестрицирующей эндонуклеазой и встраивают фрагменты в плазмиду. Если в результате такой вставки ген-репортер эффективно экспрессируется, то делают вывод, что клонированный фрагмент содержит функциональный промотор.

Большинство генов-репортеров кодируют либо продукты, обуславливающие *устойчивость* к антибиотикам, либо фермент, который идентифицируется с помощью достаточно простого *колориметрического* теста.

ПРИМЕНЕНИЕ СИЛЬНЫХ РЕГУЛИРУЕМЫХ ПРОМОТОРОВ

Встраивание клонированного гена в плазмиду так, чтобы он находился под контролем *постоянно* функционирующего сильного промотора, не всегда приводит к оптимальной экспрессии гена.

Непрерывная экспрессия чужеродного гена может оказаться губельной для клетки-хозяина, поскольку приводит к истощению ее энергетических ресурсов и нарушению метаболизма (*метаболическая перегрузка*).

Кроме того, плазмиды, несущие постоянно (конститутивно) экспрессирующийся ген, нередко *утрачиваются* после нескольких клеточных циклов, поскольку содержащие их клетки растут медленнее и со временем в культуре становятся преобладающими клетки, не содержащие рекомбинантных плазмид.

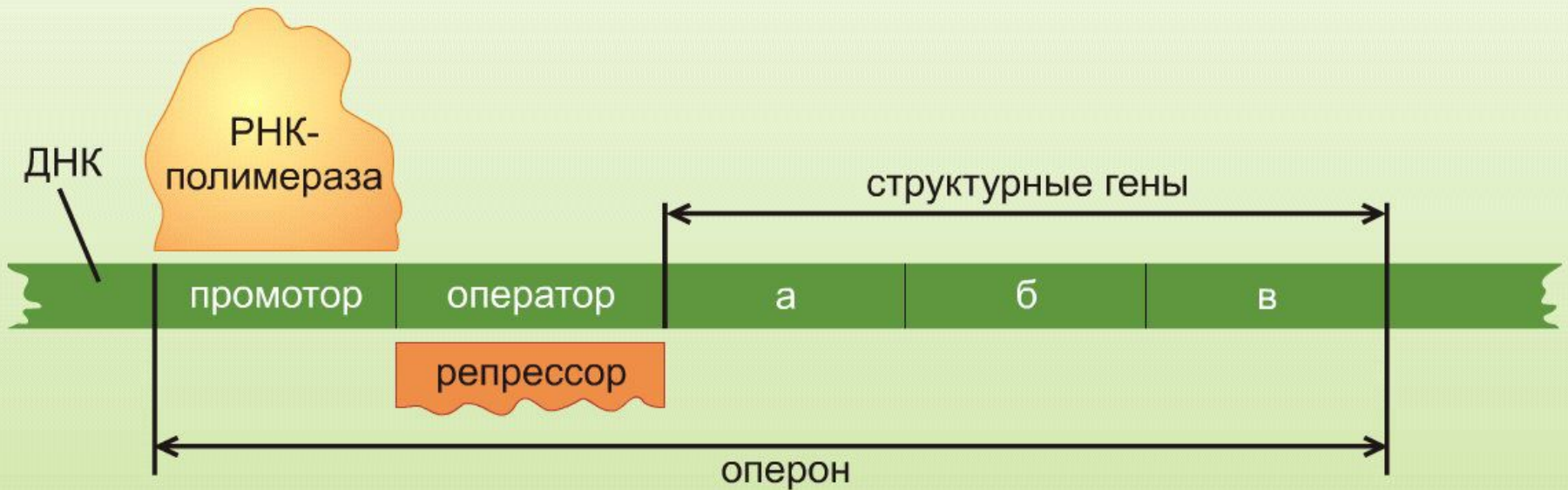
ПРИМЕНЕНИЕ СИЛЬНЫХ РЕГУЛИРУЕМЫХ ПРОМОТОРОВ

Нестабильность плазмид – это основная проблема, мешающая получению продукта – гена, локализованного в плазмиде, - в промышленных масштабах. Для ее решения нужно научиться контролировать экспрессию таким образом, чтобы клонированный ген экспрессировался *только в определенной фазе клеточного цикла и только в течение определенного времени*, а для этого нужно использовать сильные регулируемые промоторы. Плазмиды, разработанные для этих целей, называются *экспрессирующими векторами*.

Сильные регулируемые промоторы:

- промотор lac-оперона E.coli;
- промотор trp-оперона E.coli;
- специально сконструированный tac-промотор, включающий (-10)-область lac-промотора и (-35)-область trp-промотора (участки, находящиеся на расстоянии 10 и 35 bp до сайта инициации транскрипции);
- левый, или p^L , промотор бактериофага λ ;
- промотор гена 10 бактериофага T7.

ПРИМЕНЕНИЕ СИЛЬНЫХ РЕГУЛИРУЕМЫХ ПРОМОТОРОВ



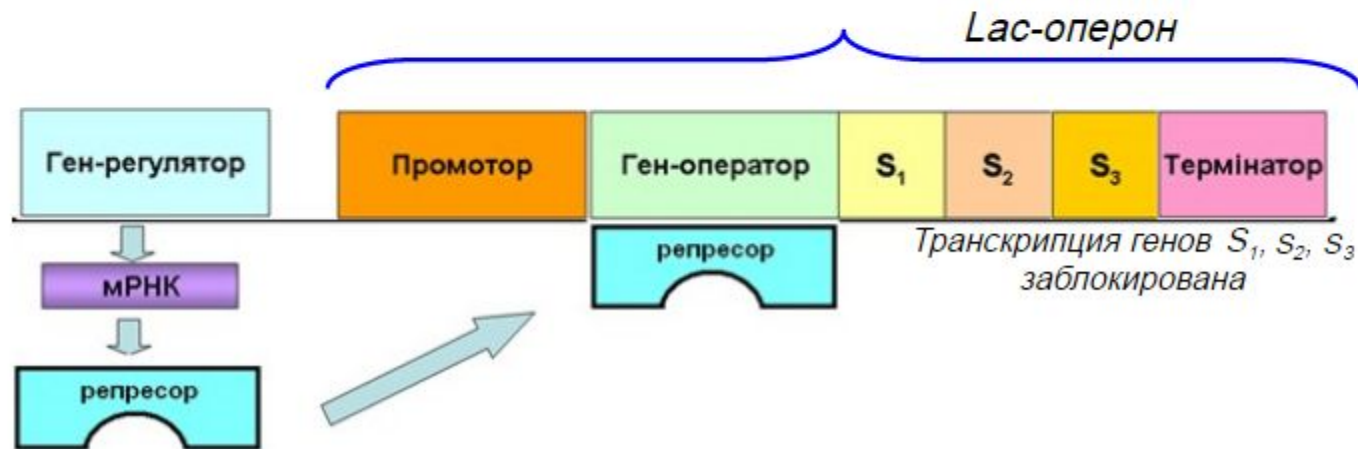
Когда клетки *E. coli* выращивают в среде, содержащей смесь лактозы и глюкозы, в качестве единственных источников углерода, то в первую очередь метаболизируется глюкоза.

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

ПРИМЕНЕНИЕ СИЛЬНЫХ РЕГУЛИРУЕМЫХ ПРОМОТОРОВ

Lac-оперон E.co li:

- Контролирует синтез ферментов катаболизма лактозы (β -галактозидазы и др.)
- При отсутствии лактозы в среде Lac-оперон находится в состоянии репрессии
- Активный белок-репрессор связывается с геном-оператором и блокирует транскрипцию структурных генов. β -галактозидаза не синтезируется

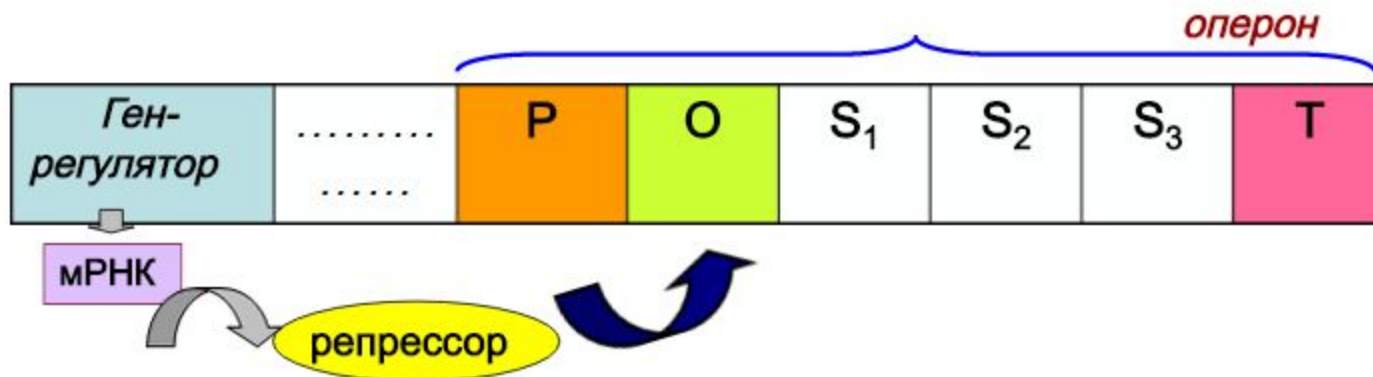


ПРИМЕНЕНИЕ СИЛЬНЫХ РЕГУЛИРУЕМЫХ ПРОМОТОРОВ

В состав оперона входят:

- **Промотор (P)** – сайт ДНК, к которому присоединяется РНК-полимераза
- **Оператор (O)** – сайт ДНК, к которому присоединяется белок-репрессор
- **Структурные гены (S)** – кодируют синтез ферментов
- **Терминатор (T)** – сайт окончания транскрипции

Ген-регулятор – кодирует синтез белка-репрессора.
Не входит в состав оперона



ПРИМЕНЕНИЕ СИЛЬНЫХ РЕГУЛИРУЕМЫХ ПРОМОТОРОВ

2. Лактоза выступает **индуктором** работы Лас-оперона и синтеза ферментов ее метаболизма

Лактоза связывает белок–репрессор и Лас-оперон переходит в **состояние индукции**:

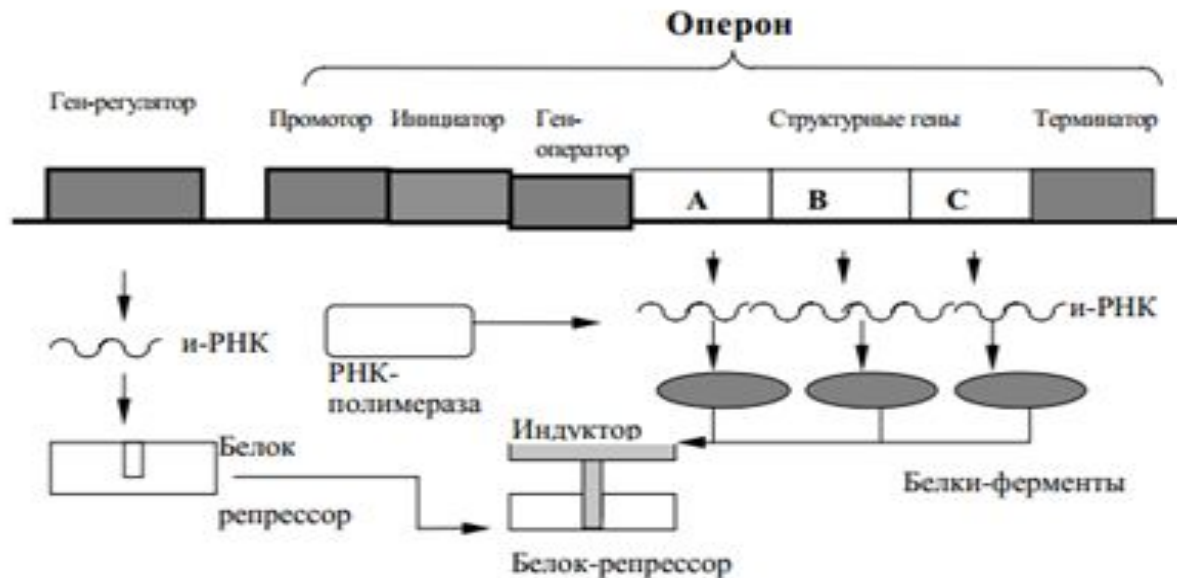
- ⊗ Ген-оператор освобождается
- ⊗ РНК-полимераза связывается с промотором
- ⊗ Происходит транскрипция структурных генов
- ⊗ Синтезируются ферменты метаболизма лактозы



ПРИМЕНЕНИЕ СИЛЬНЫХ РЕГУЛИРУЕМЫХ ПРОМОТОРОВ

С каждым из промоторов связываются соответствующие белковые *репрессоры*, которые включают или выключают транскрипцию специфических генов.

Кроме того, каждый из этих промоторов узнается РНК-полимеразой – холоферментом *E. coli*, в который входит основной сигма-фактор, присутствующий в клетке в значительно больших количествах, чем другие, минорные сигма-факторы. Благодаря этому транскрипция не останавливается по причине недостатка свободных сигма-факторов.



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 – группа генов, транскрибируемых в составе одной РНК; регулируются совместно и часто обладают общей функцией.

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.



СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!