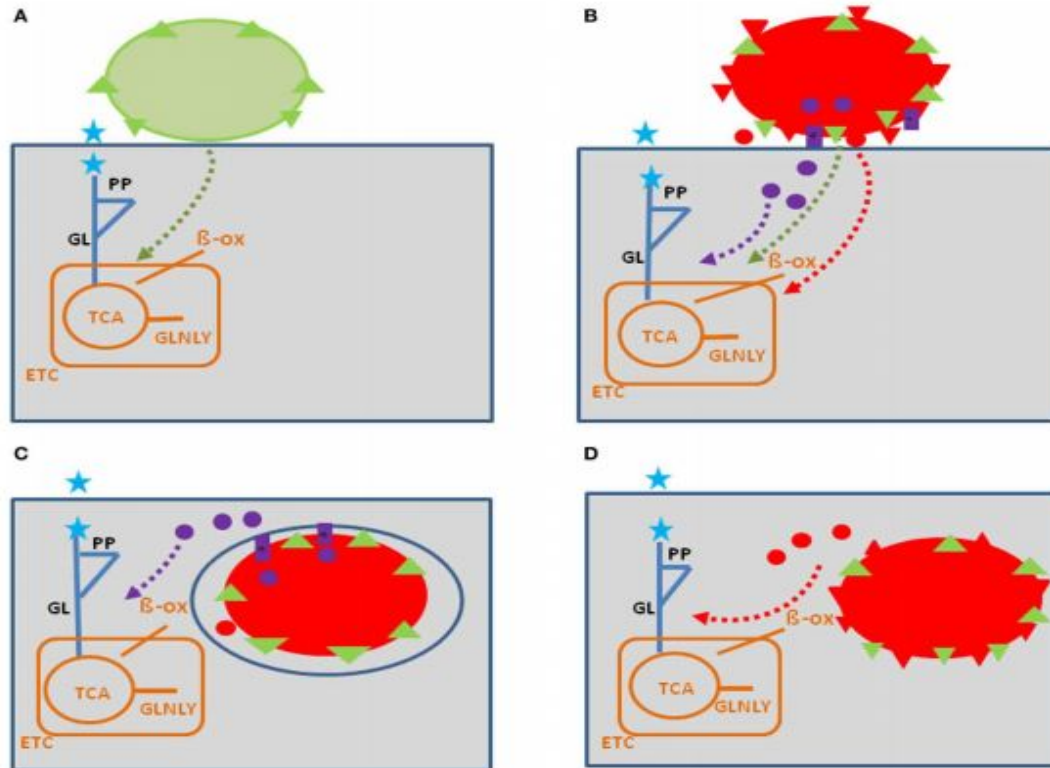


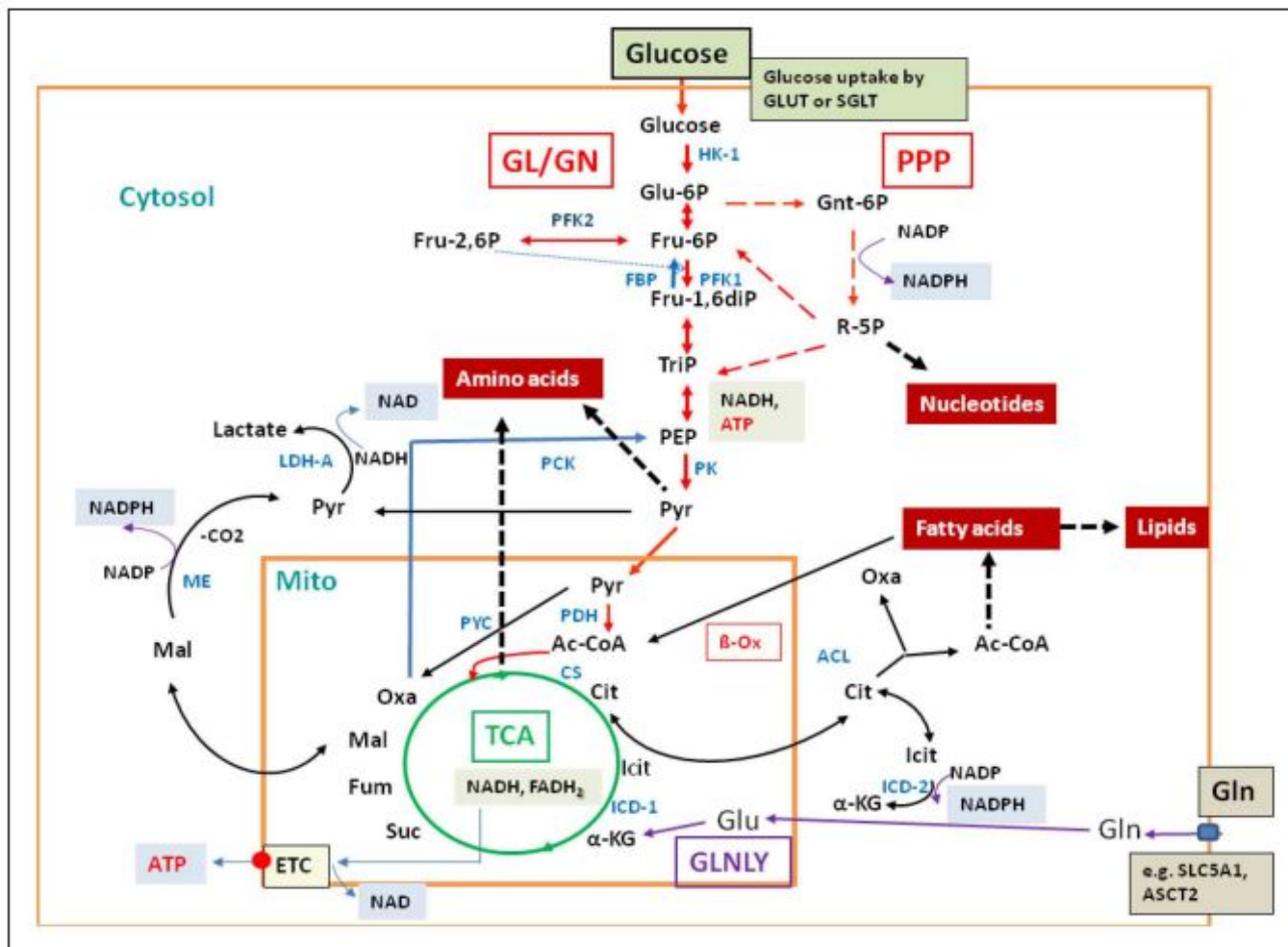
Генетический контроль  
метаболизма азота, фосфора и  
ретроградная регуляция  
Лекция 2

# Взаимодействие клеток бактерий и млекопитающих

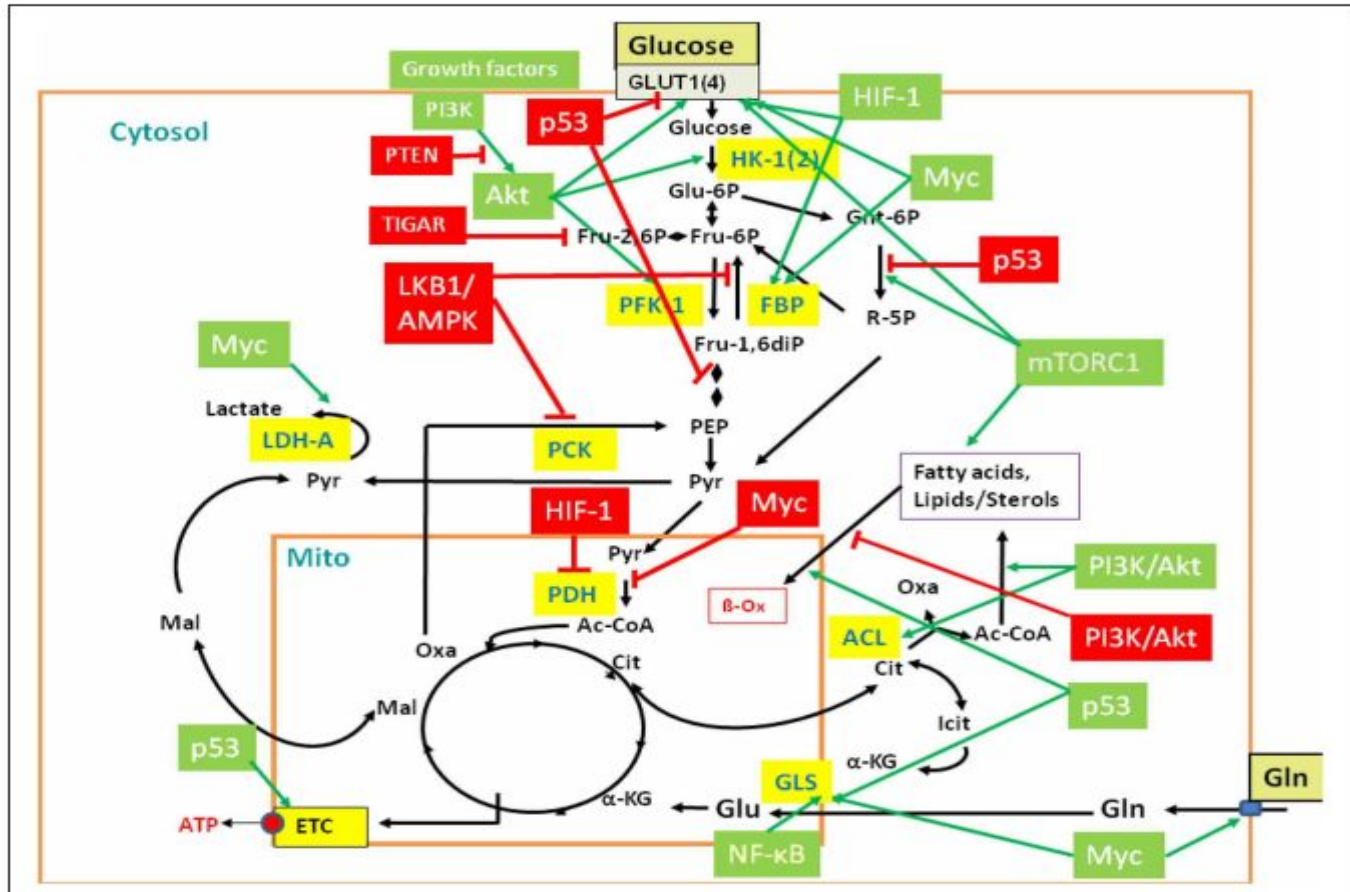


Синяя звездочка – потребление глюкозы, GL- гликолиз, PP-пентозо-фосфатный цикл, ETC- цепь переносчиков электронов, зеленые треугольники – патогены бактерий (общий ответ) –красные треугольники (специфический ответ)

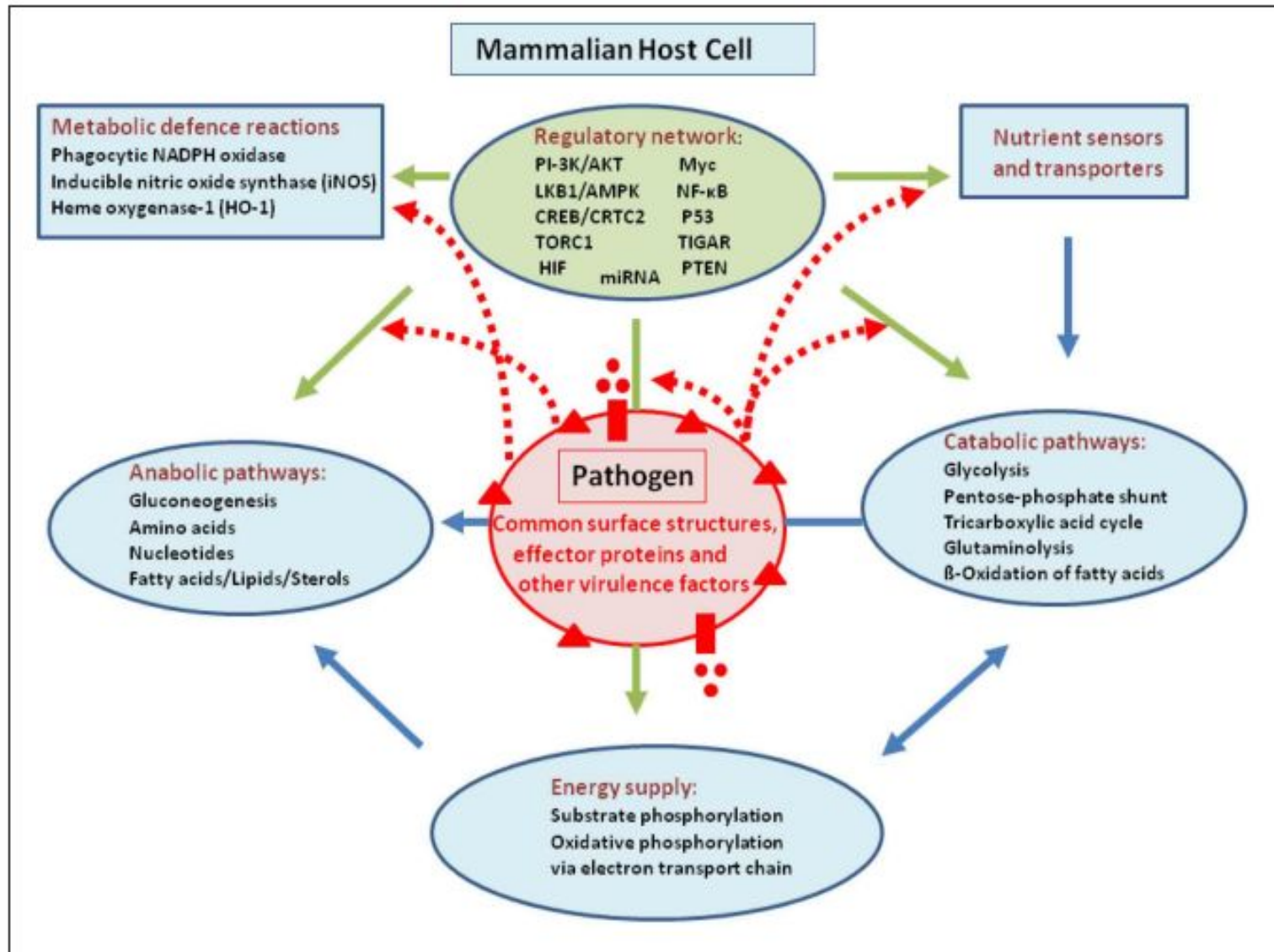
# Основные катаболические и анаболические пути в клетках млекопитающих



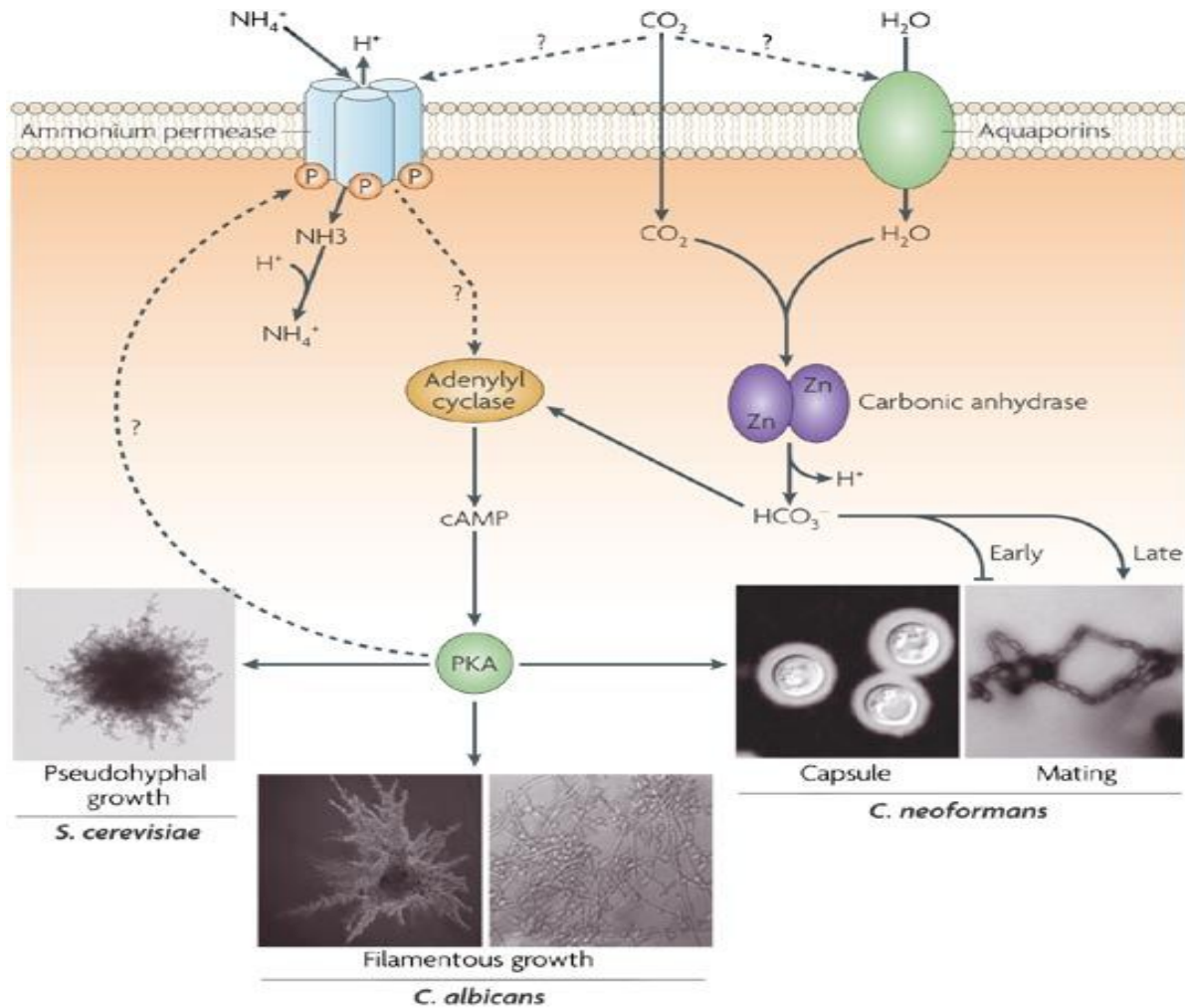
# Регуляция центральных метаболических путей сигнальными путями, прото-онкогенами и супрессорами опухолей



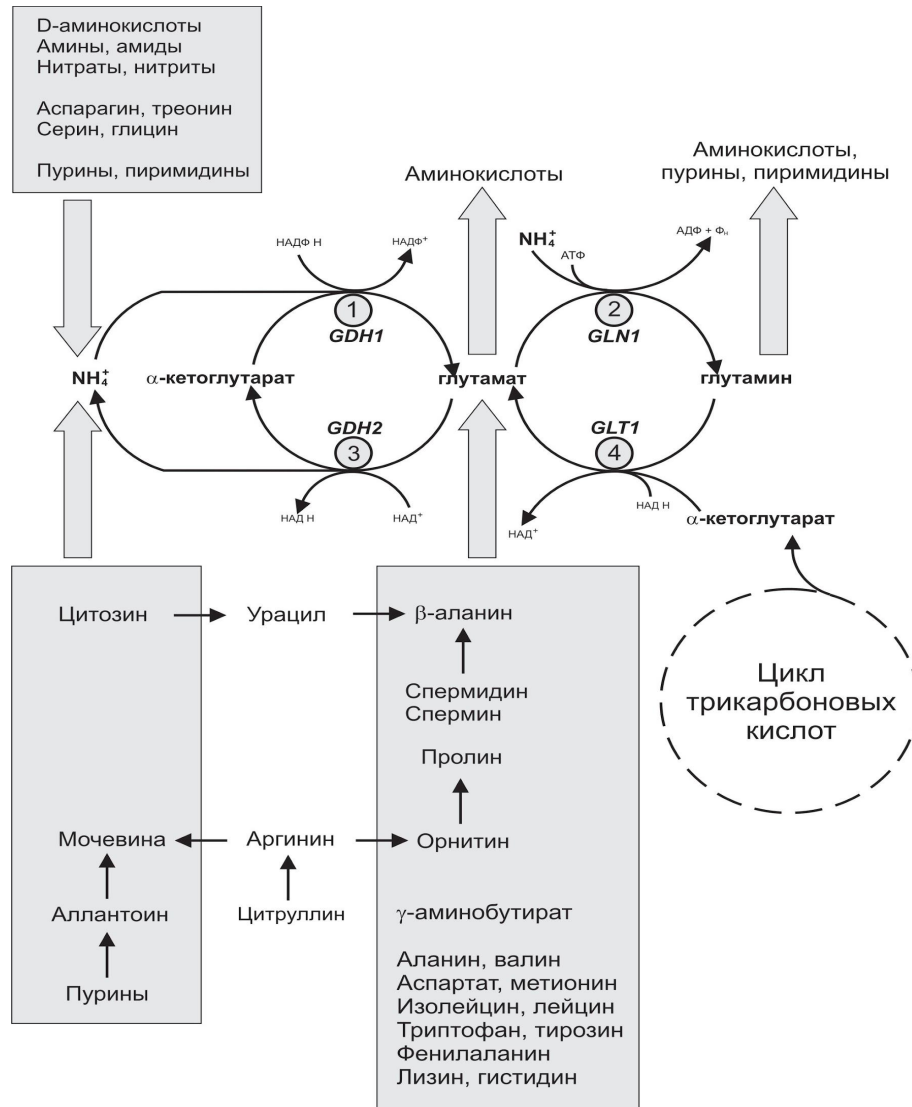
Патоген запускает иммунный ответ, воспалительный процесс, формирование эндосом, апоптоз, автофагию. Многие из этих процессов связаны с метаболизмом азота и углерода и их регуляторами.



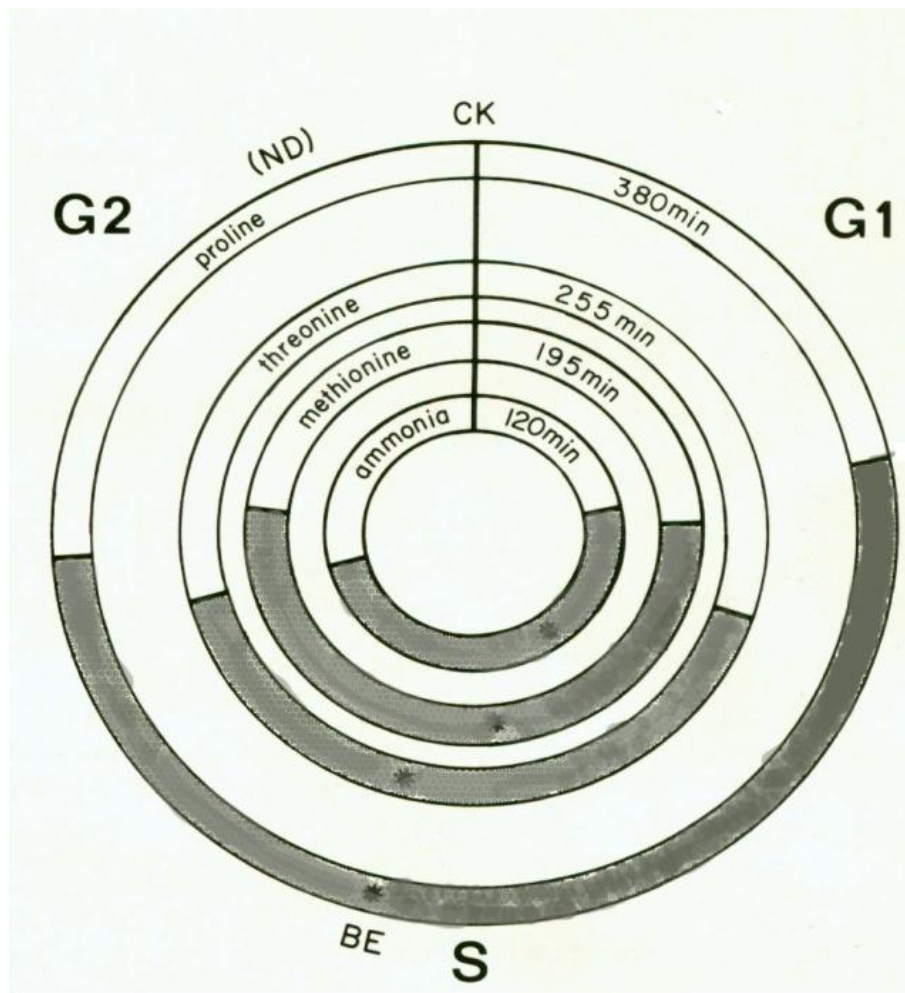
# Ответ клетки *S. cerevisiae* на дефицит азота



# метаболизм азота у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

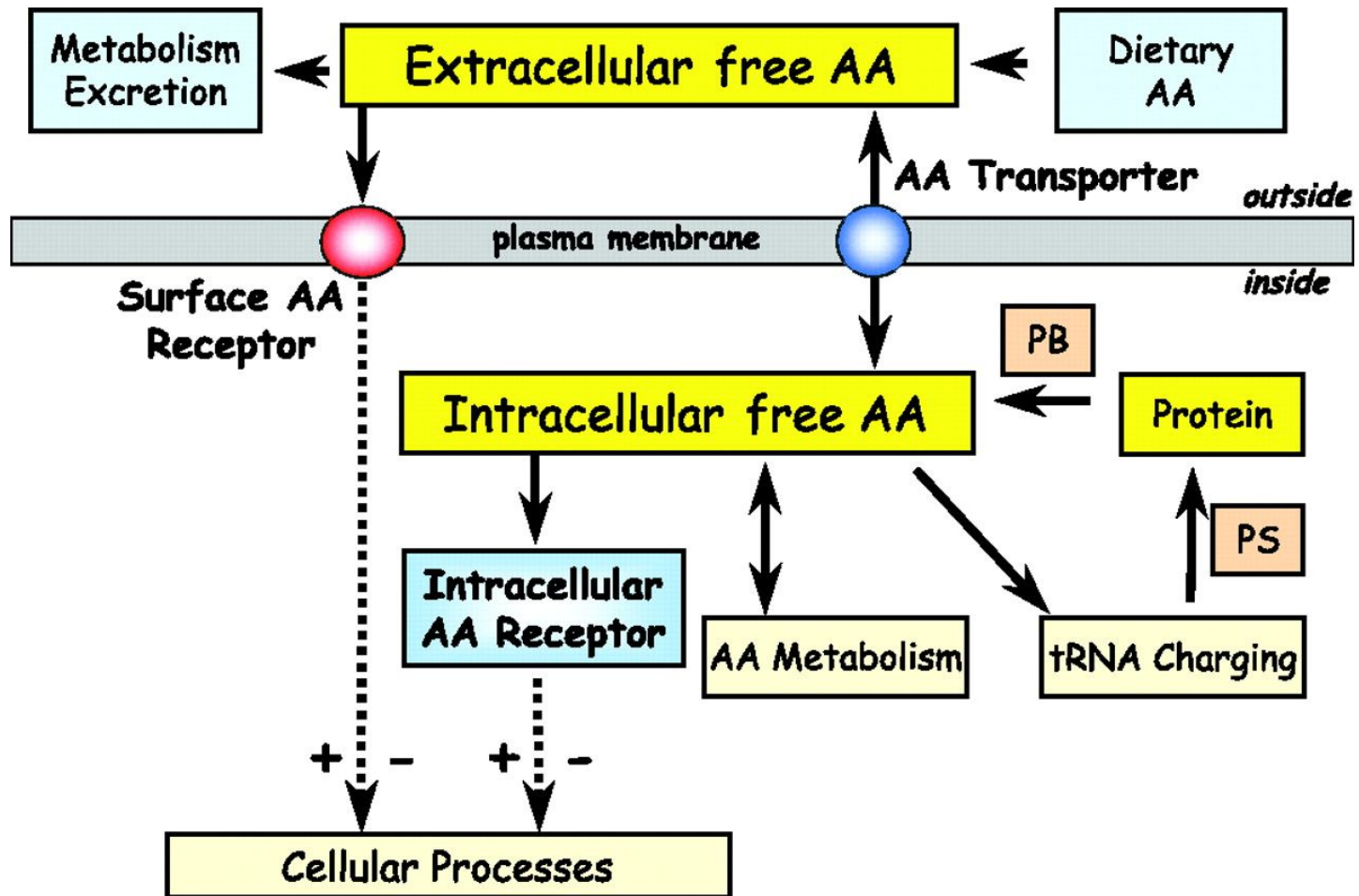


# Зависимость клеточного цикла от источника азота





# Система транспорта аминокислот у эукариот

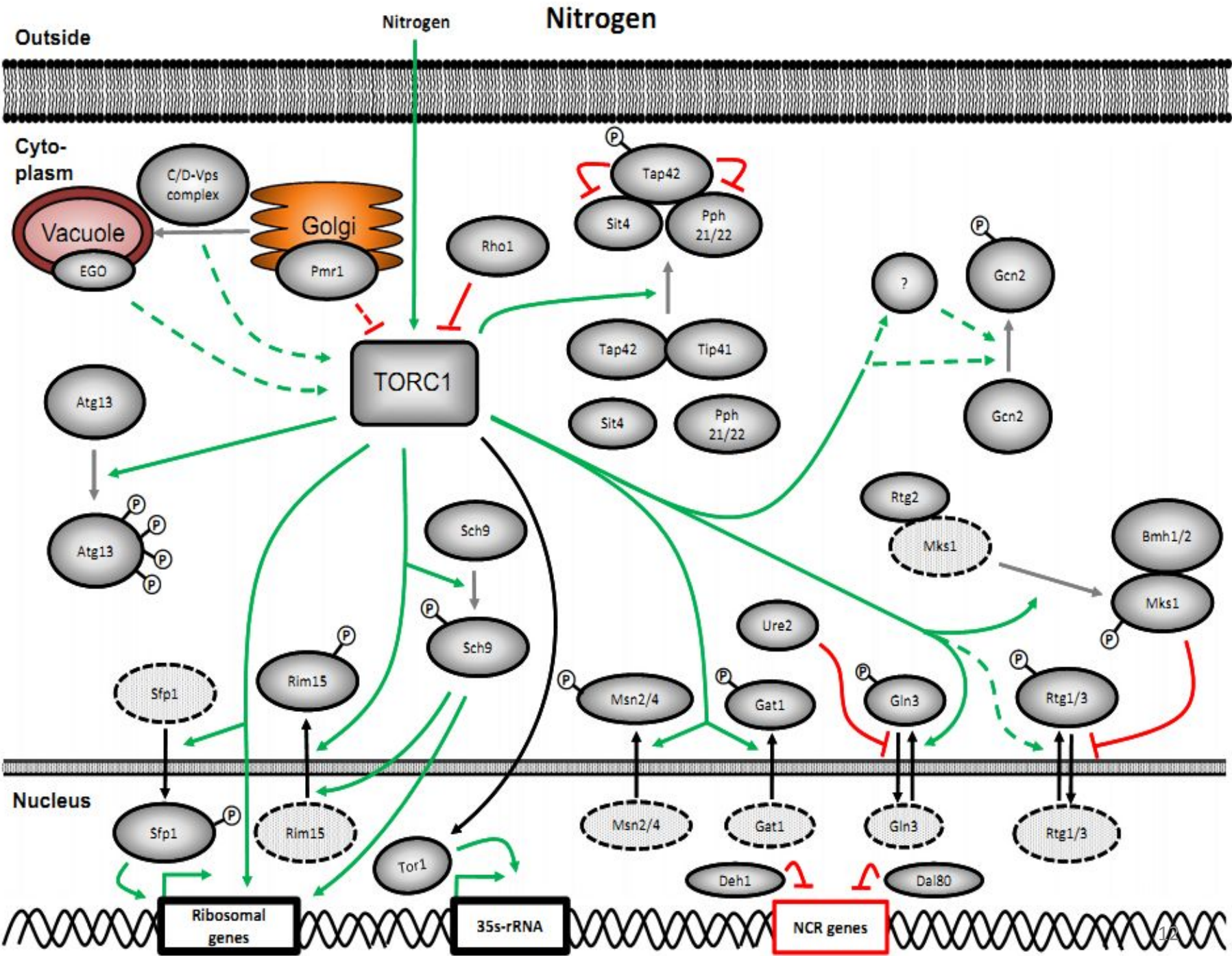


# Пермеазы соединений азота

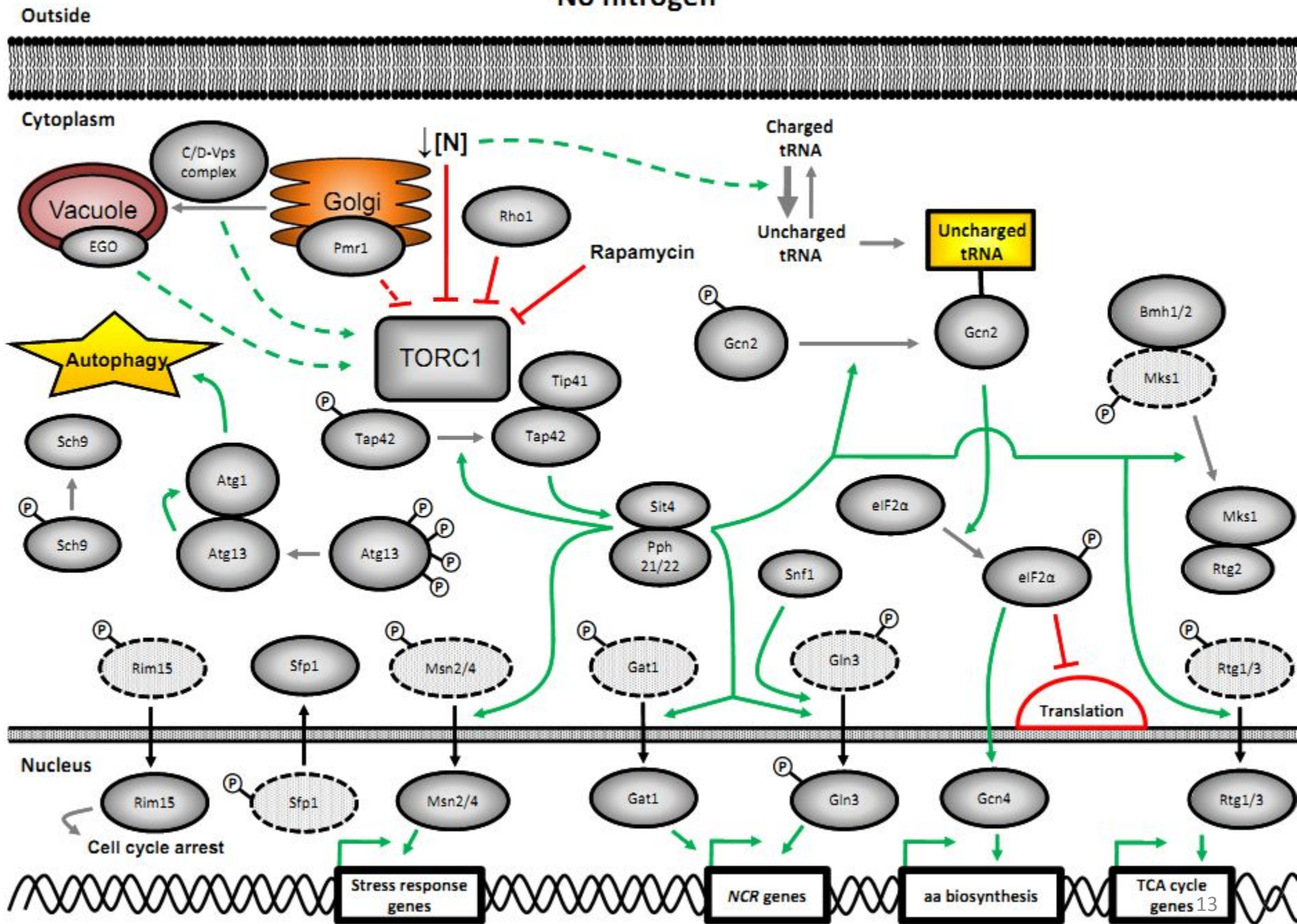
- *GAP1* — ген кодирует основную пермеазу аминокислот (трансцептор), способную транспортировать внутрь клетки большинство разновидностей аминокислот, даже не входящих в состав белков.
- Специфические переносчики аминокислот и пептидов (гены *AGP1*, *VAR2*, *VAR3*, *DIP5*, *GNP1*, *TAT1*, *TAT2*, *PTR2*, *MUP1*)
- *Var2p*, *Var3p* и *Tat1p* – переносят лейцин, цистеин, аланин и фенилаланин
- *Tat2* - тирозин и триптофан .
- *Gnp1p* - глутамин, аспарагин .
- *Dip5p* – глутамат и аспарат.
- *Mup1p* - метионин .
- *Agp1* – пермеаза аминокислот с широкой специфичностью , но с меньшей, чем у *Gap1p*, аффинностью.
- *Ptr2p* отвечает за транспорт ди- и трипептидов

# Механизмы азотной катаболитной репрессии

- Качество и количество источника азота контролируют транскрипционную активность генов азотного метаболизма (NCR-гены).
- «Плохие источники» азота являются индукторами соответствующих генов, например генов катаболизма пролина и аргинина .
- NCR - гены, как правило, регулируются системой общего контроля биосинтеза аминокислот ( активатор Gcn4p).
- Регуляция транскрипции генов, кодирующих некоторые пермеазы аминокислот, осуществляется при помощи SSY1-пути, который позволяет клетке чувствовать аминокислотный состав среды.



# No nitrogen



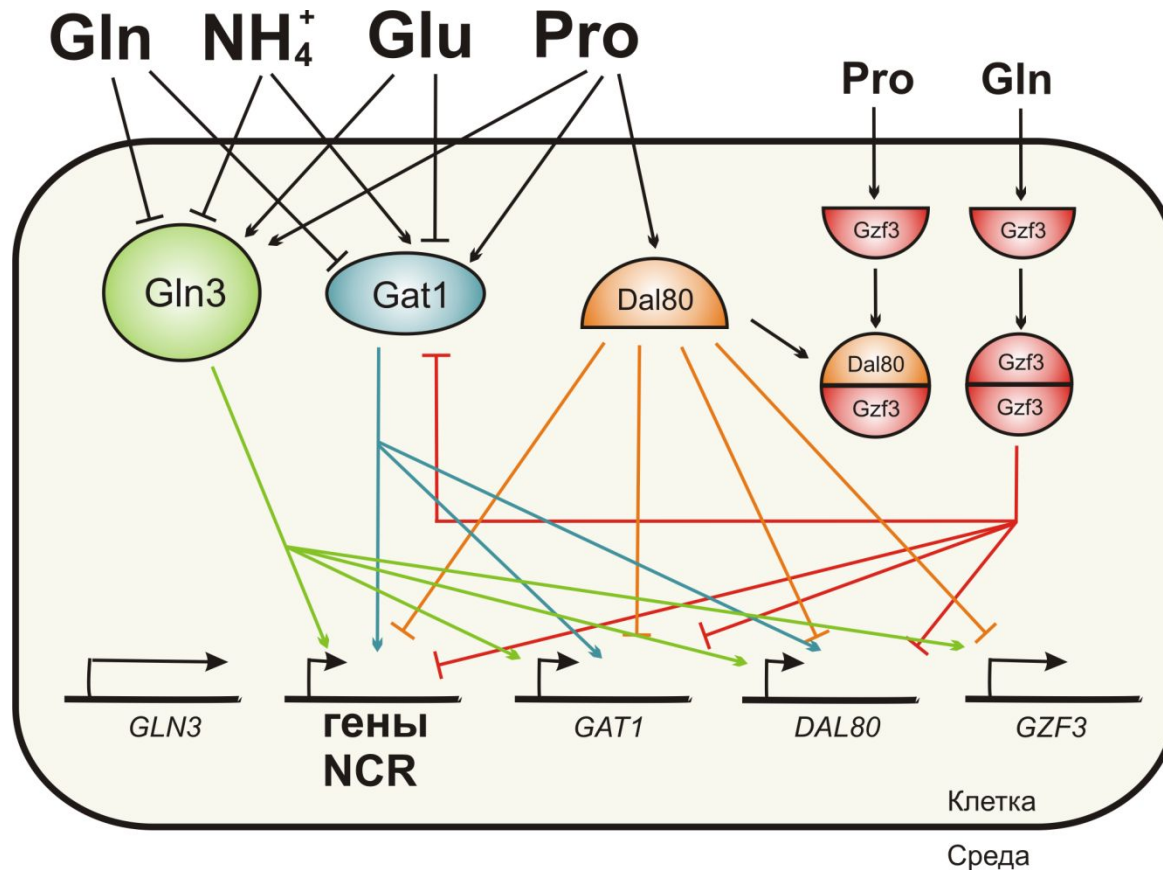
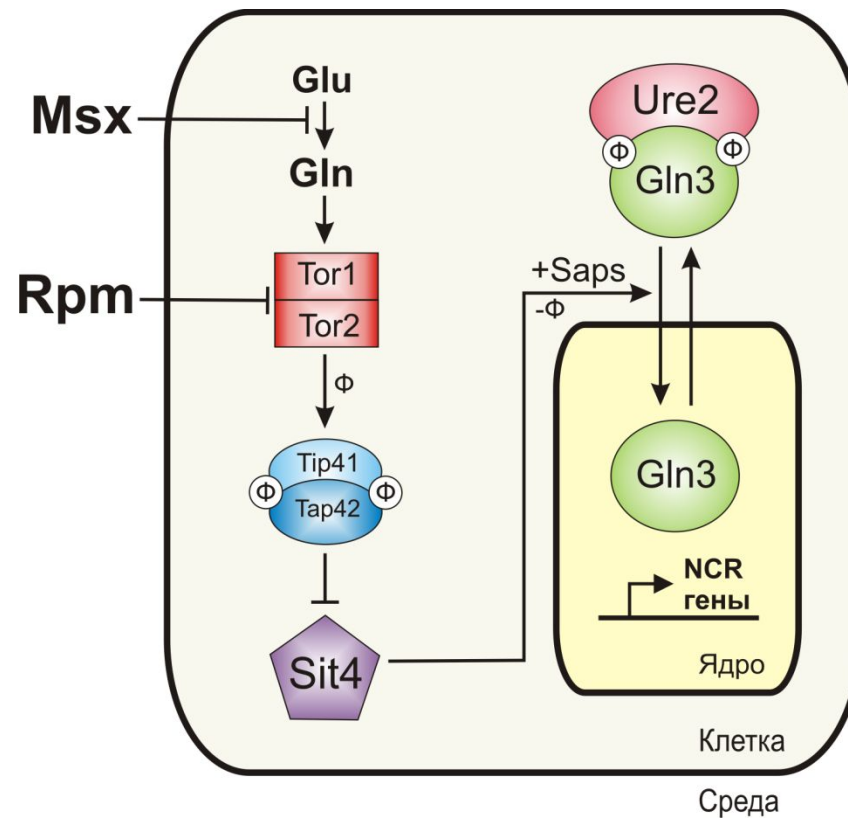
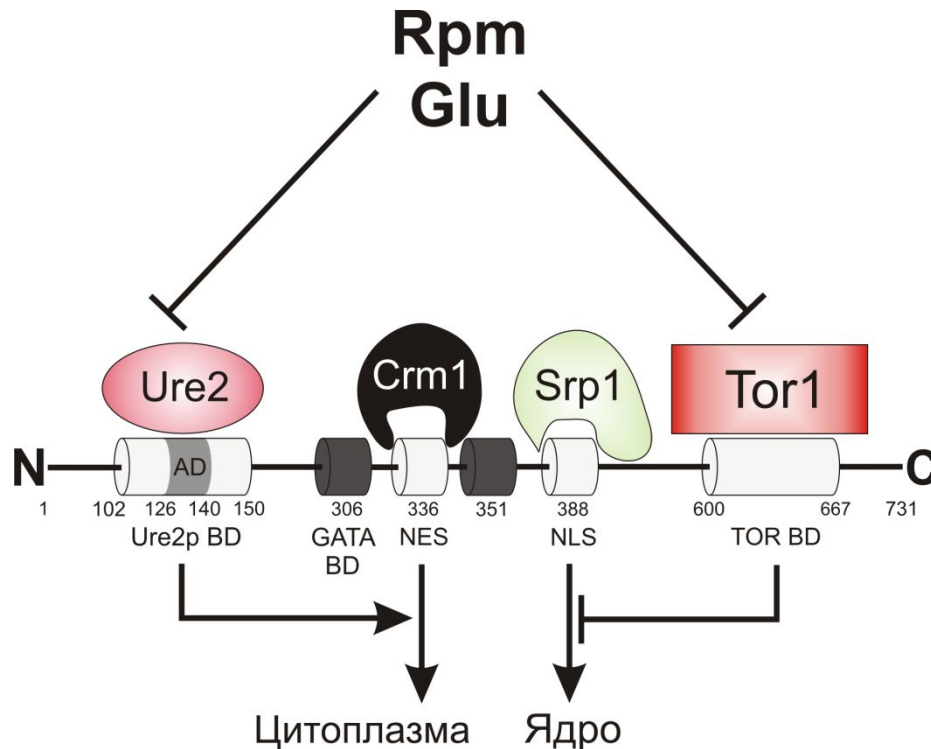


Схема взаимной регуляции GATA-факторов: активаторов Gln3p и Gat1p, репрессоров Gzf3p и Dal80p, а также транскрипции собственных генов *GLN3*, *GAT1*, *DAL80*, *GZF3* и NCR-чувствительных генов в зависимости от типа источника азота в среде (глутамин, аммоний, глутамат, пролин). Ген *GLN3* экспрессируется конститутивно, ген *GZF3* также, но на базальном уровне. В гетеродимере Gzf3p/Dal80p главную роль играет фактор Dal80p.

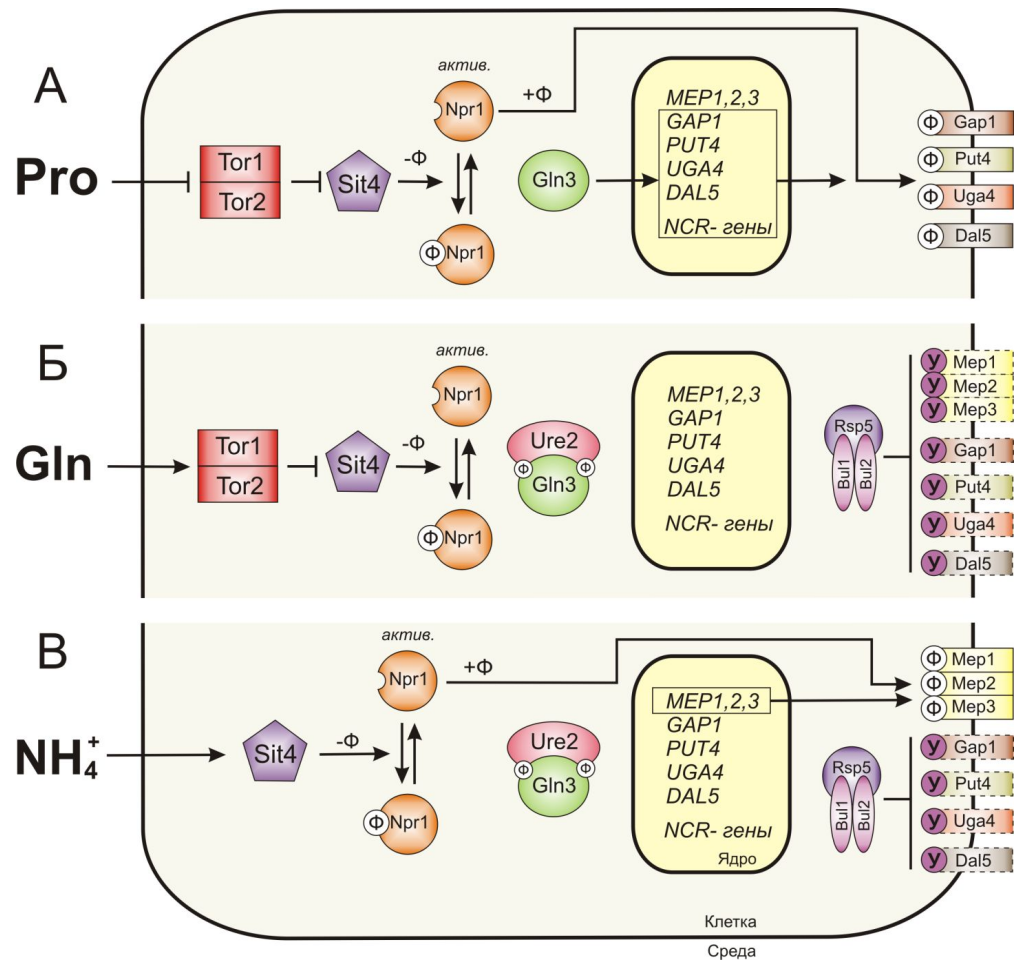


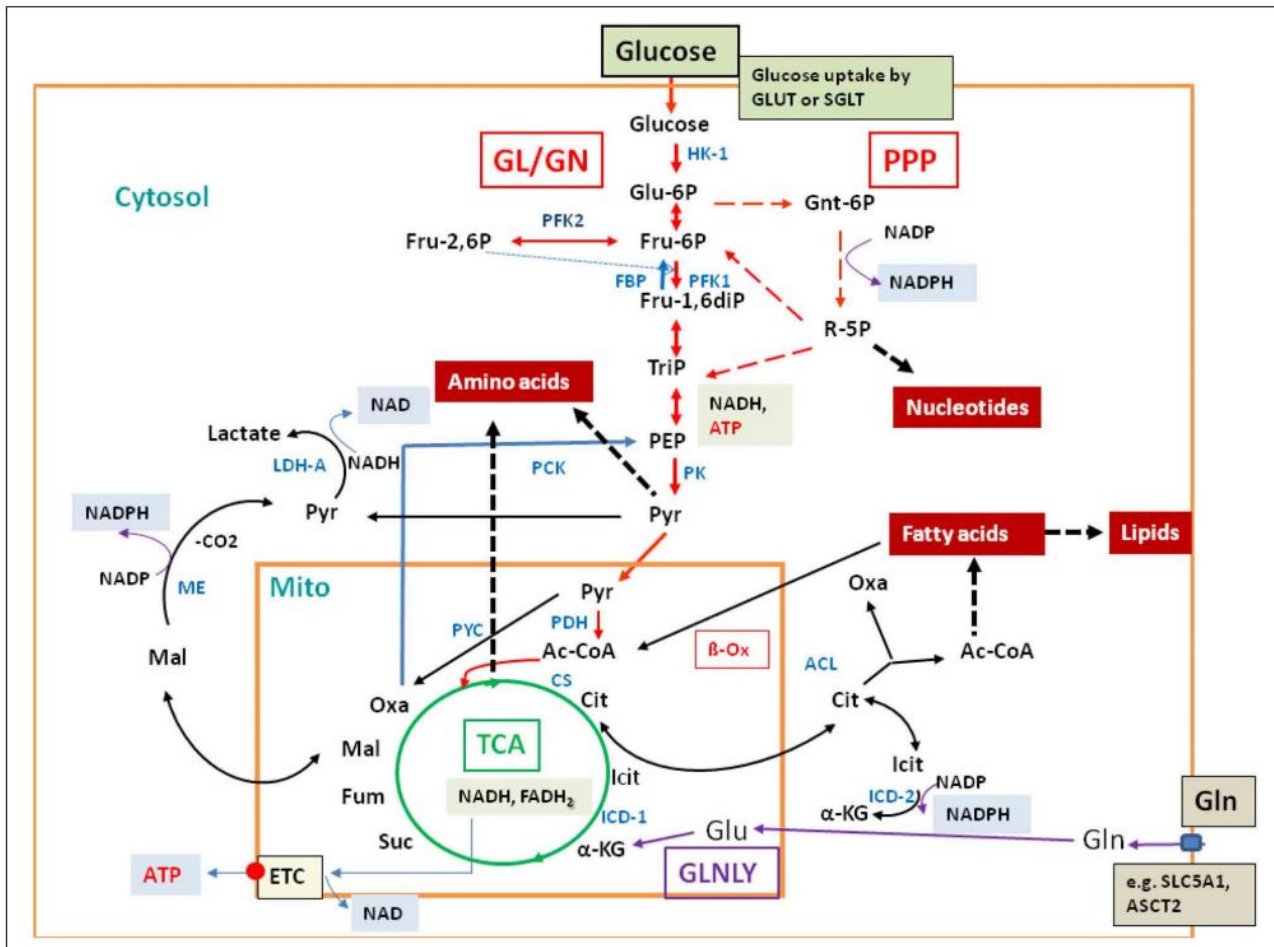
# Структура GATA-фактора Gln3p и регуляция его внутриклеточной локализации

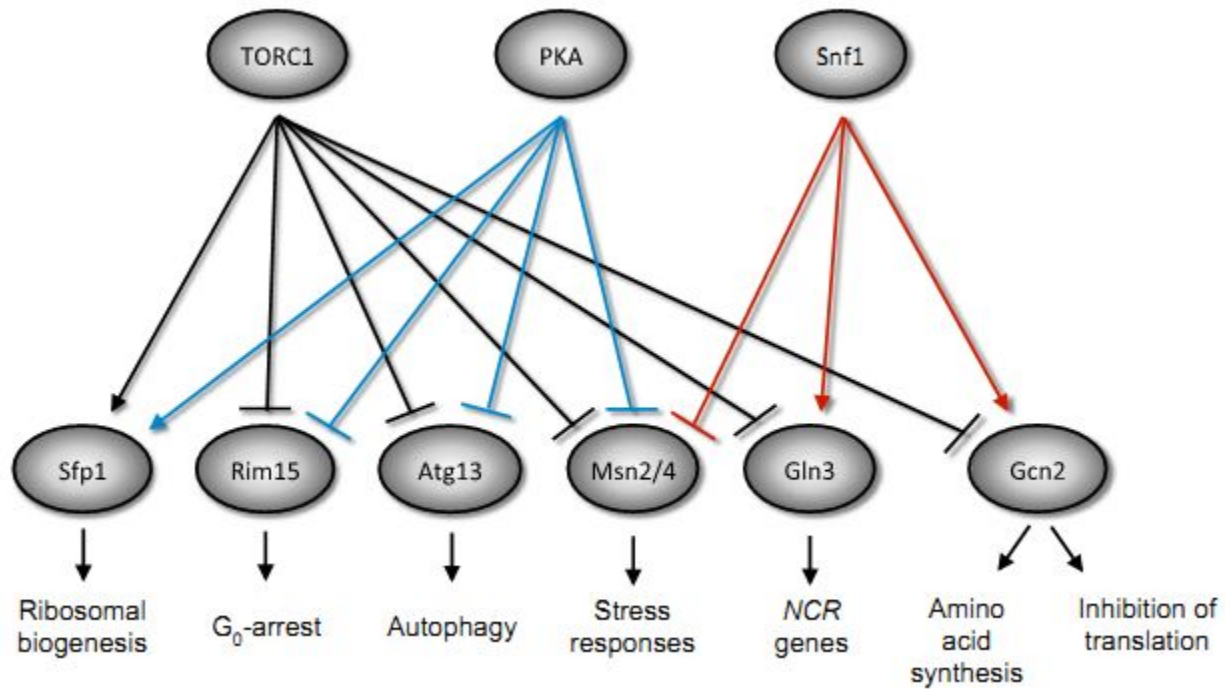


Показаны домены транскрипционного активатора Gln3p. В зависимости от условий среды Gln3p перемещается между цитоплазмой и ядром при участии экспортина Crm1p, который связывается с последовательностью NES (ак 336-345), и кариоферина Srp1p, который взаимодействует с последовательностью NLS (ак 388-394). Белки Ure2p и Tor1p распознают аминокислотные последовательности Ure2p BD (ак 102-150) и TOR BD (ак 600-667) соответственно. AD – активирующий домен, расположен в районе 126-140 ак. ДНК-связывающие домены расположены в районах 306 и 351 ак.









# Состав комплекса серин-треониновых киназ TOR у дрожжей *S. cerevisiae*

Комплекс TOR	TORC1	TORC2
Белки, входящие в состав комплексов	Tor1 или Tor2, Lst8, Tco89, Kog1	Tor2, Avo1, Avo2, Avo3, Lst8, Bit61, Bit2.
	Только TORC1 способен взаимодействовать с рапамицином	

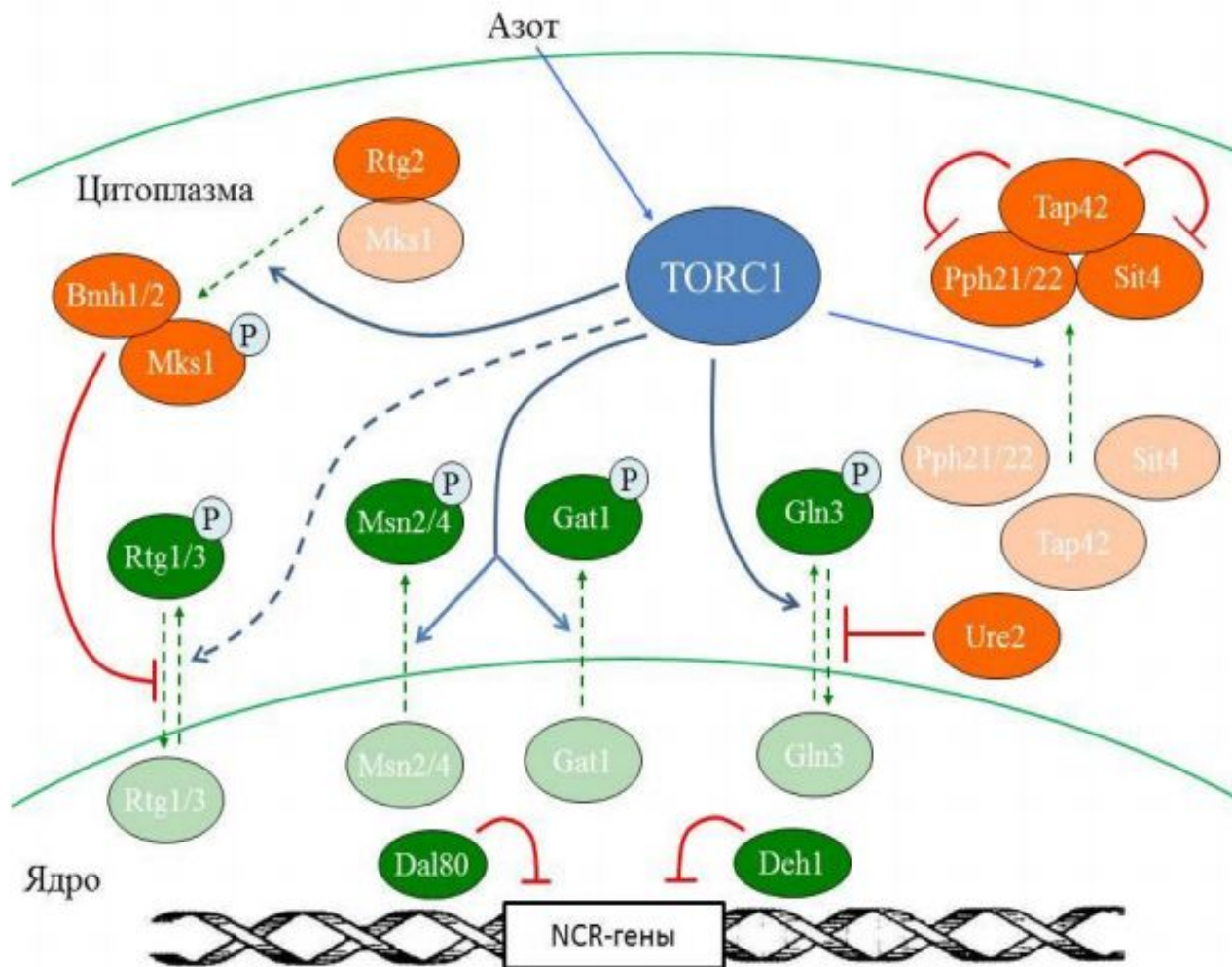


Рисунок 4. Схема работы TOR-киназного комплекса и его основных мишеней. Ключевым

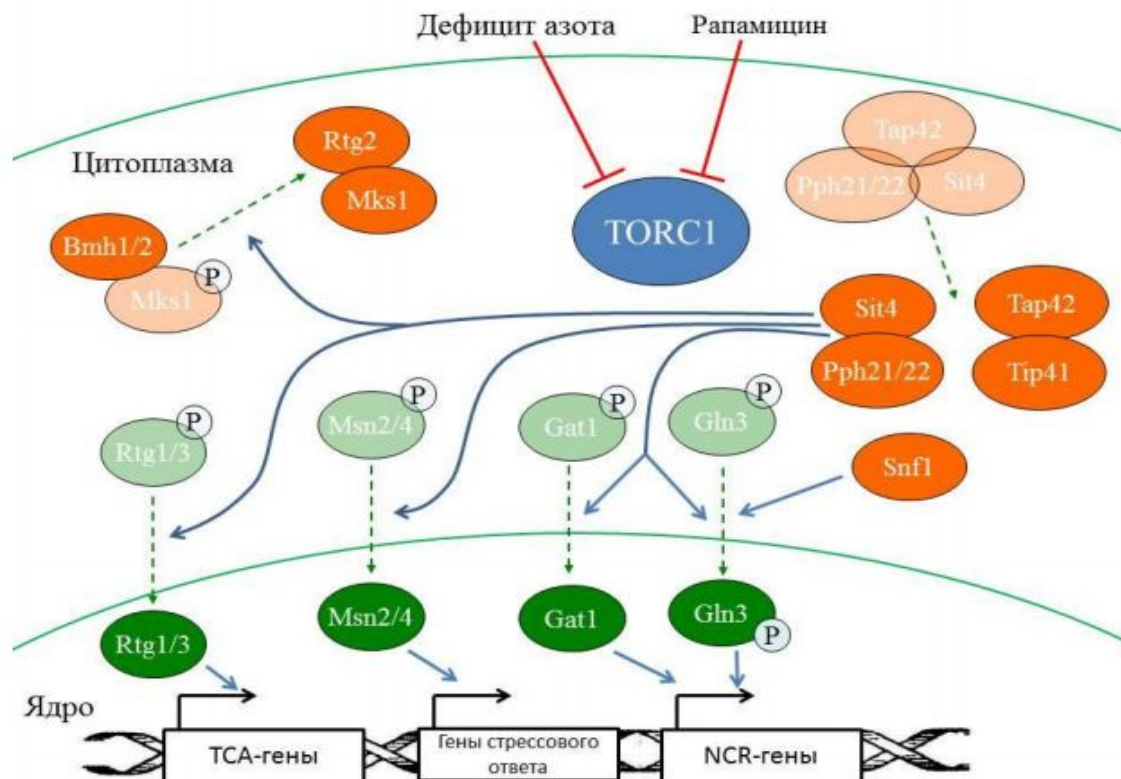


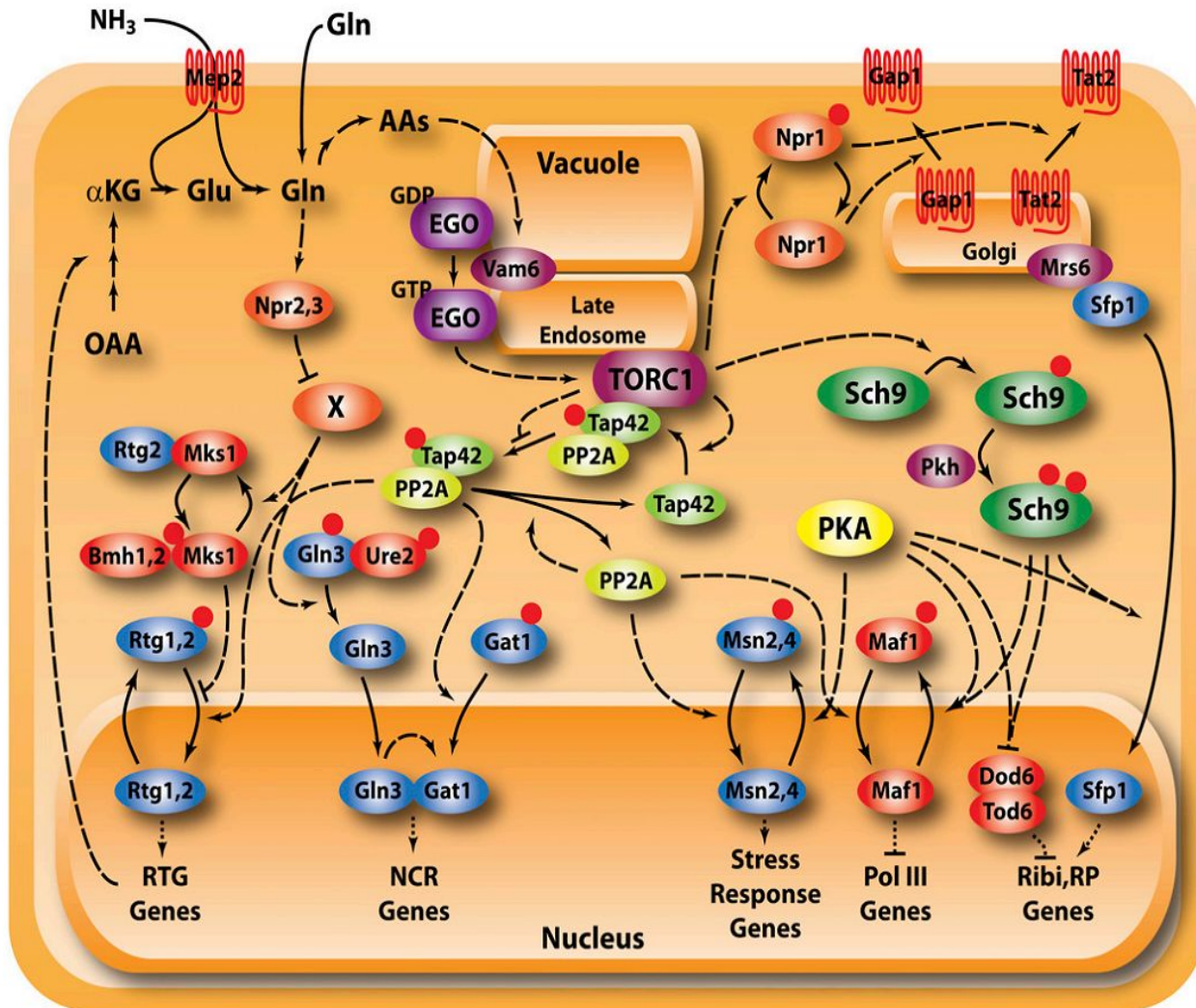
Рисунок 5. Ответ клетки дрожжей на дефицит азота. При дефиците азота (либо при воздействии рапамицином) активность комплекса TORC1 снижается. При этом фосфатазы Sit4 и Pph21/22 освобождаются от Tap42p и таким образом активируются. Их мишенями являются транскрипционные факторы Gln3p и Gat1p. Дефосфорилирование Gln3p и Gat1p ведет к их импорту в ядро, где они инициируют экспрессию генов, ранее подверженных азотной репрессии. Snf1p при этом фосфорилирует Gln3p, однако это фосфорилирование в отличие от TORC1-опосредованного фосфорилирования способствует перемещению Gln3p в ядро. Кроме этого, Sit4p и Pph21/22p способствуют ядерной локализации транскрипционных факторов Msn2/4p, отвечающих за ответ на стресс и Rtg1/3p, обеспечивающих ретроградную регуляцию (мод. по Conrad, 2014).

# Ретроградная регуляция

- Внутриклеточная коммуникация между митохондриями и ядром достигается с помощью ретроградной регуляции.
- У *S. cerevisiae* – это RTG путь.

- RTG позитивно регулируется белками Rtg1, Rtg2, Rtg3 and Grr1 и негативно белками Mks1, Lst8 и двумя белками 14-3-3, Bmh1/2.
- Активация ретроградного сигнала ведет к активации Rtg1/3, (два basic helix-loop-helix leucine zipper TF). Для активации этого комплекса требуется цитоплазматический белок Rtg2.
- Rtg2 принадлежит к семейству /Hsp70/sugar kinase superfamily. Этот белок имеет АТФ-связывающий домен. Rtg2 связывает и инактивирует Mks1, поэтому активируется Rtg1/3 и RTG путь.
- Когда путь неактивен, Mks1 диссоциирует от Rtg2 и связывается с Bmh1/2, что предотвращает активацию Rtg1/3. Предполагают, что диссоциация происходит в результате изменения концентрации АТФ.





**Figure 4** TORC1 and nitrogen regulation. Two pathways, one mediated by TORC1 and a second less well-defined nitrogen catabolite repression pathway, adjust growth as well as expression of genes required for use of alternate nitrogen sources in response to the quality and quantity of available nitrogen sources through regulation of transcriptional activators (blue icons) and repressors (red icons). TORC1 likely responds to intracellular amino acid levels sensed through the Ego complex and regulates growth primarily through Sch9, regulates stress, and alternative nitrogen source through protein phosphatase 2A and regulates permease sorting through Npr1. Npr2/3 lie upstream of NCR gene expression but whether they regulate TORC1 or the ill-defined NCR pathway is not clear.

# Генетический контроль регуляции кислой фосфатазы у дрожжей-сахаромицетов

## Лекция 3

# Фосфор - один из основных биогенных элементов клетки

- В живых организмах фосфор представлен в основном в виде ортофосфата ( $\text{HPO}_4^{2-}$ )
- У дрожжей  $\text{P}_\text{н}$  встречается как свободный ион, но большая часть  $\text{P}_\text{н}$  связана в виде фосфолипидов, нуклеотидов, фосфопротеидов и фосфорилированных углеводов.
- Избыток  $\text{P}_\text{н}$  накапливается в клетке в виде полифосфатов – линейных полимеров ортофосфорной кислоты. В полифосфатах атомы фосфора связаны ангидридными связями, в результате чего они способны к запасанию энергии и выделению большого ее количества при гидролизе этих связей (Кулаев, 1975).
- $\text{P}_\text{н}$  играет важную роль в поддержании внутриклеточного pH.
- $\text{P}_\text{н}$  действует как субстрат и эффектор многих ферментов

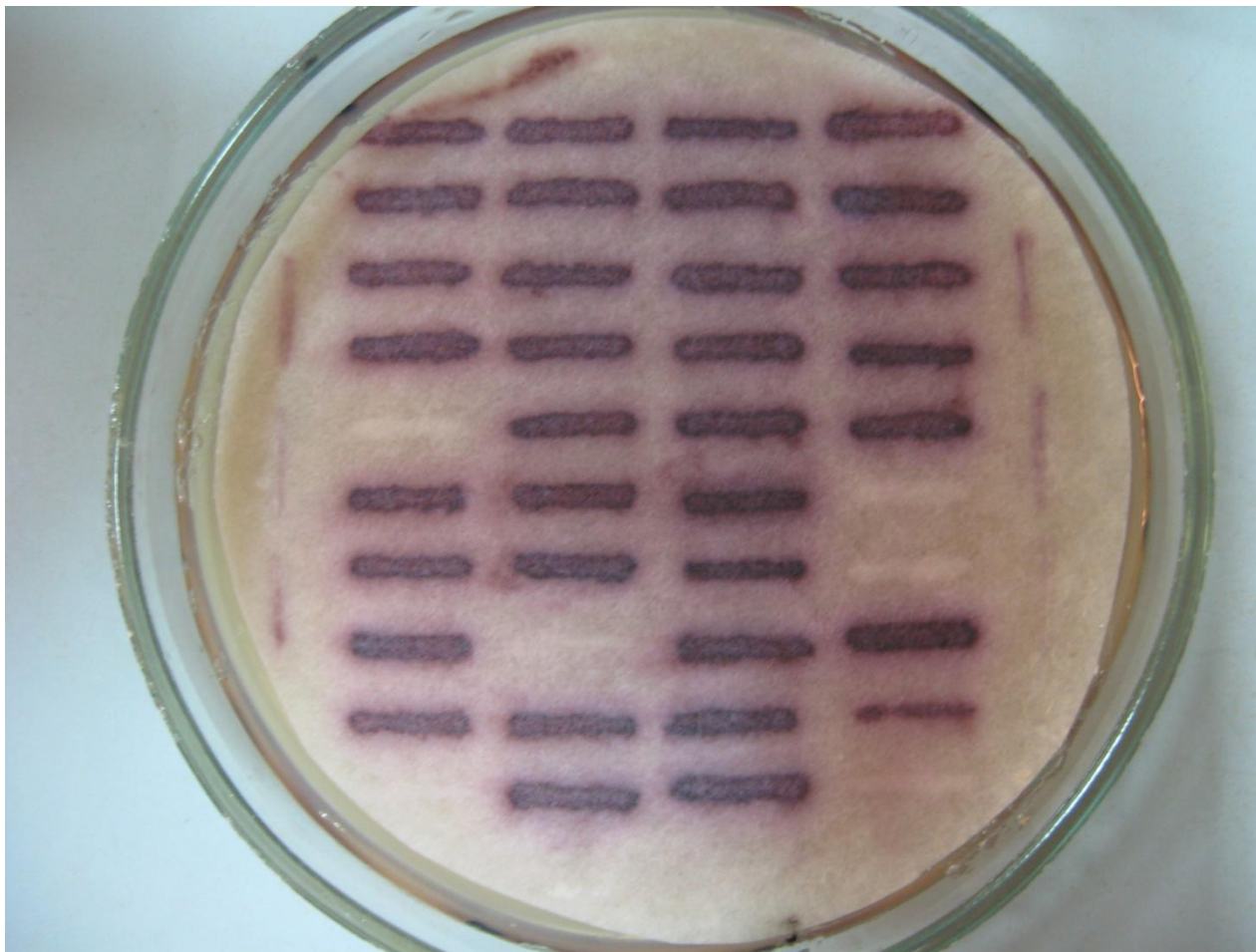
# Внутренние резервы $\Phi_H$

- При снижении концентрации  $\Phi_H$  в цитоплазме и в среде уровень его может быть восстановлен за счет внутренних резервов клетки.
- 1. АТФ - образуется в результате синтеза аминокислот, нуклеотидов, жирных кислот, функционирования протонной помпы и анаэробных реакций, таких как цикл Кребса;
- 2. Фосфоенолпируват, образующийся при синтезе ароматических аминокислот;
- 3. Сахарофосфаты – трегалоза и сахара, образующиеся в ходе глюконеогенеза;
- 4. Полифосфаты.

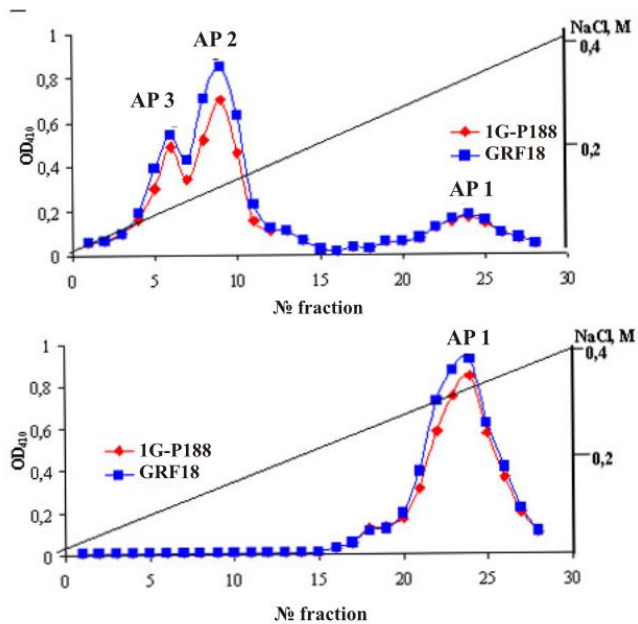
# Ферменты метаболизма ФН

- изозимы кислой фосфатазы (КФ)
- транспортные белки – пермеазы с разным сродством к ФН,
- щелочные фосфатазы, полифосфатазы и полифосфаткиназы, обеспечивающие расщепление резервных полифосфатов

# АКТИВНОСТЬ КФ



# Биохимические характеристики КФ дрожжей



Гель-фильтрация кф : А – низкая концентрация Ф ( ПЕП), В- ПЕПФО

# Генетический контроль синтеза кф1 (Pho3p)

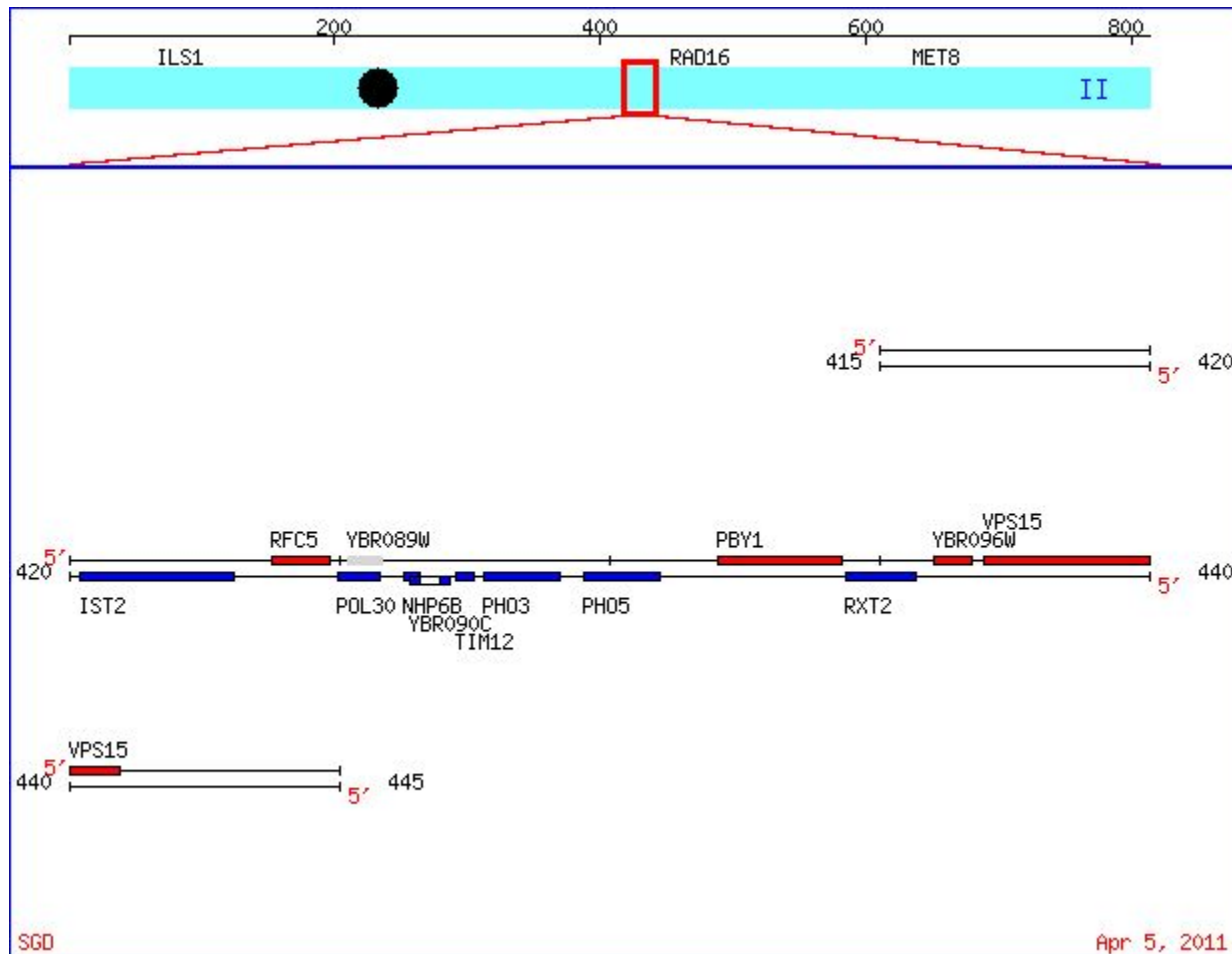
- КФ1 – структурный ген *PHO3*
- Не регулируется фосфатом
- мутации, снижающие активность КФ1, возникают как минимум еще в 6 генах
- добавление тиаминпирофосфата – подавляет транскрипцию *PHO3*
- Ген *PHO3* клонирован и кодирует белок с молекулярным весом 57 кДа, на 87% идентичный Pho5p



# Pho5p

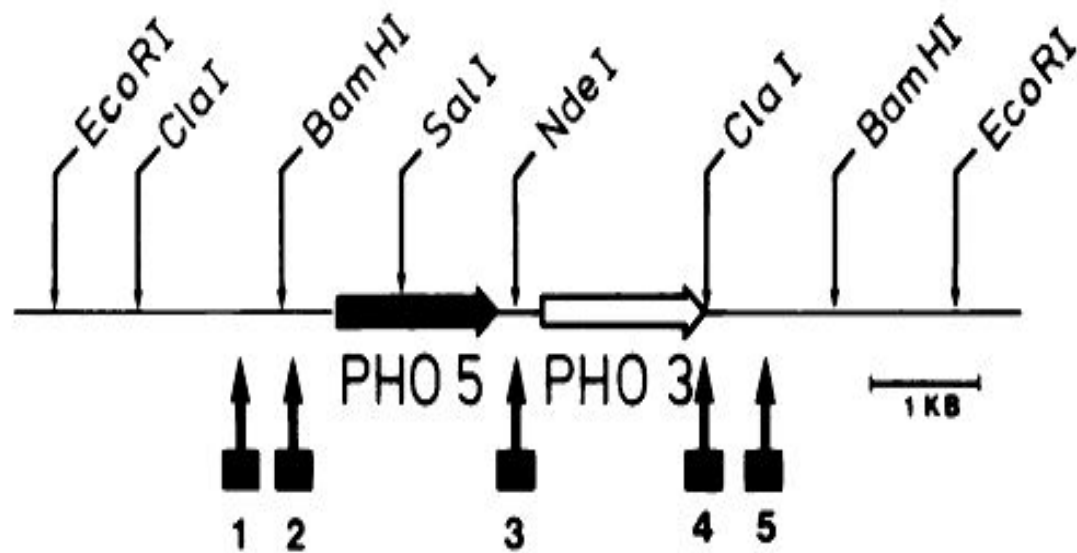
- Репрессия фосфатом
- Структурный ген *PHO5*
- *Промотор используется в биотехнологии*
- *Структурная часть гена используется в качестве репортерного гена*

# Хромосомная локализация кластера *PHO5- PHO3*



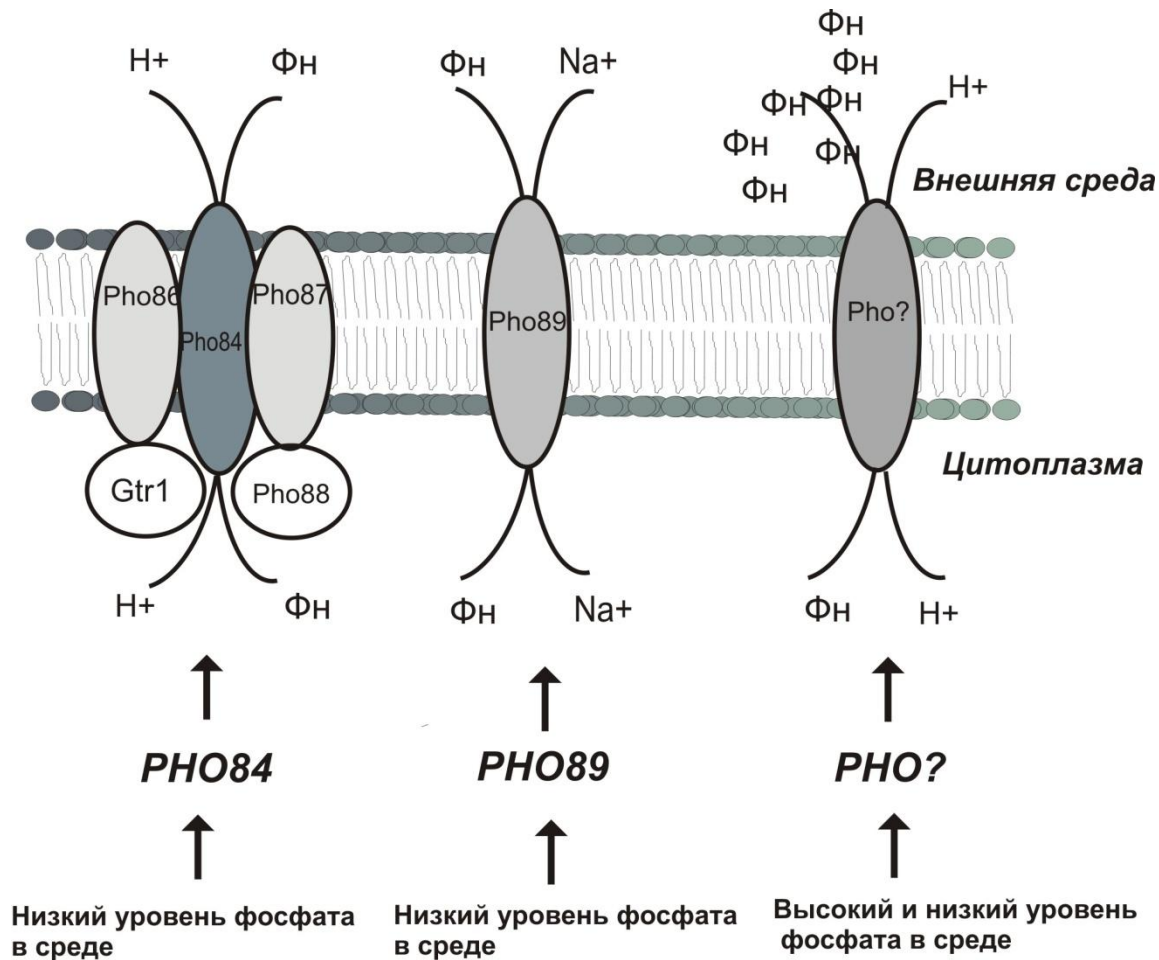
# Генетический контроль синтеза КФ2 и КФ3

ген	Продукт гена	Тип регуляции	Проявление в гетерозиготе
<i>PHO 5</i>	Кф2, 60 кДа	Репрессируется Фн	рецессивное
<i>PHO11</i>	Кф3, 56 кДа	Репрессируется Фн	рецессивное
<i>PHO 84</i>	Пермеазы с высоким сродством к фосфату		
<i>PHO89</i>		Репрессируется Фн	рецессивное
<i>PHO 86 –PHO91, GTR1</i>	Пермеазы с низким сродством к фосфату	Не зависит от концентрации Фн	рецессивное
<i>PHO2</i>	Транскрипционный фактор (Homeobox)	Репрессируется Фн	рецессивное
<i>PHO4</i>	Транскрипционный фактор (bHLH)	Репрессируется Фн	Рецессивное, дом.



**Fig. 4.** Map of hypersensitive sites at the PHO5/PHO3 gene locus. The positions of the hypersensitive sites 1–5 are shown.

# Белки - переносчики фосфата



# Позитивные регуляторы *PHO5*

- ***PHO4***
- Мутации **рецессивные**, снижающие активность репрессибельных КФ на среде без фосфата.
- Мутации *pho4* эпистатируют все другие регуляторные мутации *pho*, что позволило считать Pho4p позитивным активатором *PHO5*.
- Кроме того, в гене *PHO4* возникают **доминантные** конститутивные мутации - *PHO4<sup>C</sup>*, которые затрагивают область взаимодействия белка Pho4p с Pho80p.
- Ген *PHO4* локализован в VI хромосоме и кодирует небольшой белок 34 кДа (309 а. к.), состоящий из N-терминального (1-109) кислого активирующего и C-терминального основного ДНК-связывающего доменов .
- N – терминальная часть молекулы содержит последовательность (1-31), которая необходима для взаимодействия с циклином Pho80p, а также область (73-99), необходимую и достаточную для активации транскрипции.
- Центральная часть молекулы содержит участки (154-200) и (200-218), взаимодействующие с Pho80p и Pho2p, соответственно.
- C-терминальная часть молекулы Pho4p содержит bHLH (helix-loop-helix) – мотив, найденный и в других активаторах эукариот .
-

# 1 Superclass: Basic Domains

## 1.2 Class: Helix-loop-helix factors (bHLH)

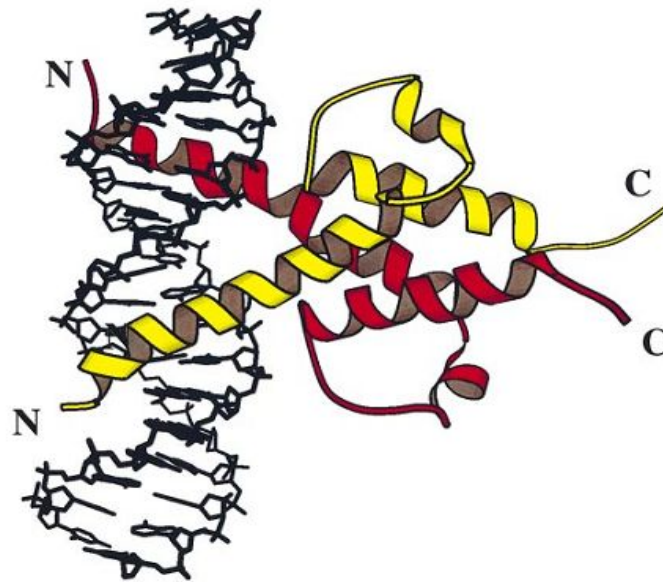


Fig. 2. Overview of the PHO4-DNA complex drawn with the program MOLSCRIPT (Kraulis, 1991). Helical regions are represented by ribbons; non-regular secondary structure elements by thin tubes. Molecules A and B are colored red and yellow, respectively. Helical structure is clearly seen in the loop region.

**Связываются в виде гомо- или гетеродимеров с E-box CANNTG**  
**Представители: MioD, Pho4p и др.**

# Активность Pho4p регулируется на нескольких уровнях:

1. **На уровне локализации белка в компартментах.** В фосфорилированном состоянии Pho4p находится в цитоплазме, в нефосфорилированном - в ядре
2. **На уровне фосфорилирования белковой молекулы.** Pho80p - Pho85p фосфорилирует Pho4p по пяти Ser в положении 100, 114, 128, 152, 233.

**Фосфорилирование** Ser114 и Ser128 - экспорт Pho4p из ядра при помощи экспортного рецептора Msn5p ,

**Фосфорилирование** Ser152 ингибирует ядерный импорт Pho4p, предотвращая связывание с белком - импортером Pse1p

**Фосфорилирование** сайта Ser233 ингибирует связывание Pho4p с Pho2p.

**На среде с высокой концентрацией**  $\Phi_n$  Pho4p фосфорилирован по сайтам Ser114, Ser128, Ser233,

**на среде без фосфата** Pho4p не фосфорилирован,

**на промежуточной концентрации** фосфата всегда фосфорилирован сайт Ser233, но не всегда Ser114, Ser128.

3. **Регуляция Pho4 может осуществляться на уровне димеризации**



# Pho2p

Pho2p - (Bas2, Grf10) транскрипционный активатор генов *PHO*-регулона, с молекулярной массой 83 кДа.

Ген *PHO2* локализован в хромосоме IV, мутации *pho2* приводят к отсутствию экспрессии генов *PHO* и нарушению споруляции.

В N-терминальной области Pho2p расположен сигнал ядерной локализации

Белок содержит консервативную последовательность «homeobox», которая участвует в связывании с ДНК, а также кислую и богатую глутамином области, характерные для белков - активаторов транскрипции.

Для взаимодействия с Pho4p необходима C-терминальная область Pho2p

Pho4p инициирует освобождение промотора *PHO5* от нуклеосом, а Pho2p либо дестабилизирует взаимодействие гистон - ДНК, либо обеспечивает их взаимодействие с Pho4p

Активность Pho2p также регулируется фосфорилированием, которое осуществляет циклин-зависимая фосфопротеинкиназа Cdc28p и только в фосфо-форме он может взаимодействовать с Pho4 и активировать *PHO5*<sup>41</sup>

# *PHO81*

В гене *PHO81* возникают мутации двух типов – рецессивные, приводящие к отсутствию дерепрессии гена *PHO5*, и доминантные мутации, приводящие к конститутивной экспрессии гена *PHO5*.

в промоторной области идентифицированы сайты связывания для Pho4p и Pho2p, а также негативная регуляторная последовательность (NRS).

Делеция этой области в 4 раза повышает уровень экспрессии *PHO81*.

В регуляции транскрипции гена *PHO81* участвуют основные регуляторные белки *PHO*-регулона.

Белок Pho81p (134кДа), в белке была идентифицирована область 80 аминокислот (645-724 а.к.), которая достаточна для связывания с циклинкиназным комплексом.

Белок Pho81 преимущественно локализован в ядре, но может находиться и в цитоплазме, и в эндоплазматических мембранах, транспорт этого белка в ядро осуществляется при помощи Pho80p .

Комплекс Pho81p-Pho80p-Pho85p существует всегда и на среде без фосфата, и на среде с фосфатом, но только на среде без фосфата Pho81p способен ингибировать киназу Pho85p.

Возможна протеолитическая деградация

# Негативные регуляторы синтеза КФ

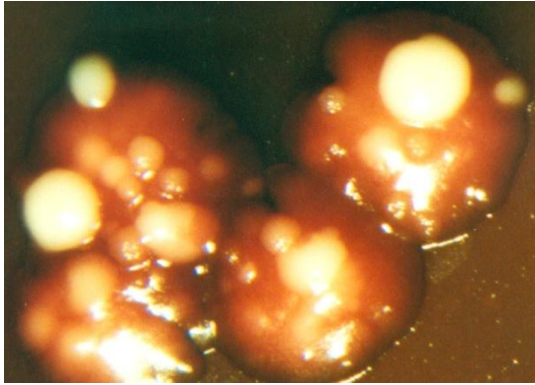
Pho85 – циклин-зависимая киназа. Ген *PHO85* локализован в XVI хромосоме, содержит интрон и кодирует белок с молекулярной массой около 35 кДа.

Семейство CDK : Cdc28p, Ssn3p, Kin28p , Pho85p, Cak1p

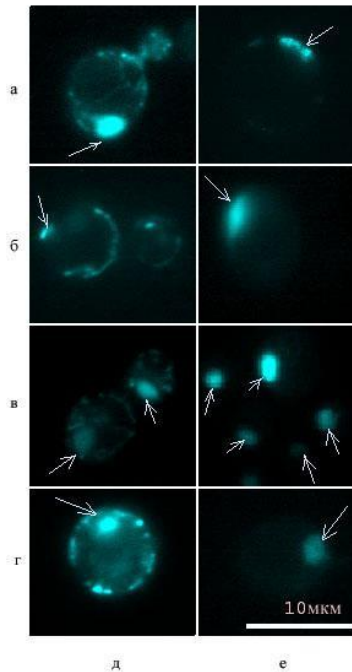
Pho80 - В отличие от истинных циклинов Pho80p можно отнести к циклинам лишь условно, так как экспрессия гена *PHO80* не меняется в ходе клеточного цикла.

в гене *PHO80* были идентифицированы мутации двух типов: рецессивные, приводящие к конститутивному синтезу КФ и полудоминантные мутации со сниженной активностью КФ на среде с фосфатом .

Ген *PHO80* (1,8 т.п.о.) локализован в хромосоме XV и кодирует белок 293 а. к.



# Плейотропные эффекты Pho85



Штаммы с мутациями *pho85*, как правило,

- не растут при 37°C,
- имеют нарушенную морфологию клеток,
- не способны расти на глицерине и спирте,
- накапливают гликоген ,
- чувствительны к аминогликозидным антибиотикам
- Диплоиды, гетерозиготные по мутации *pho85*, плохо спорулируют
- дыхательно некомпетентны
- Следует отметить, что мутации *pho85* приводят к постоянной локализации Pho4p в ядре.

# Циклины CDK Pho85



## Подсемейство Pho80

- Pho80p, Pcl6p, Pcl7p, Pcl8p, Pcl10p
- Контроль метаболизма, ответ на стресс



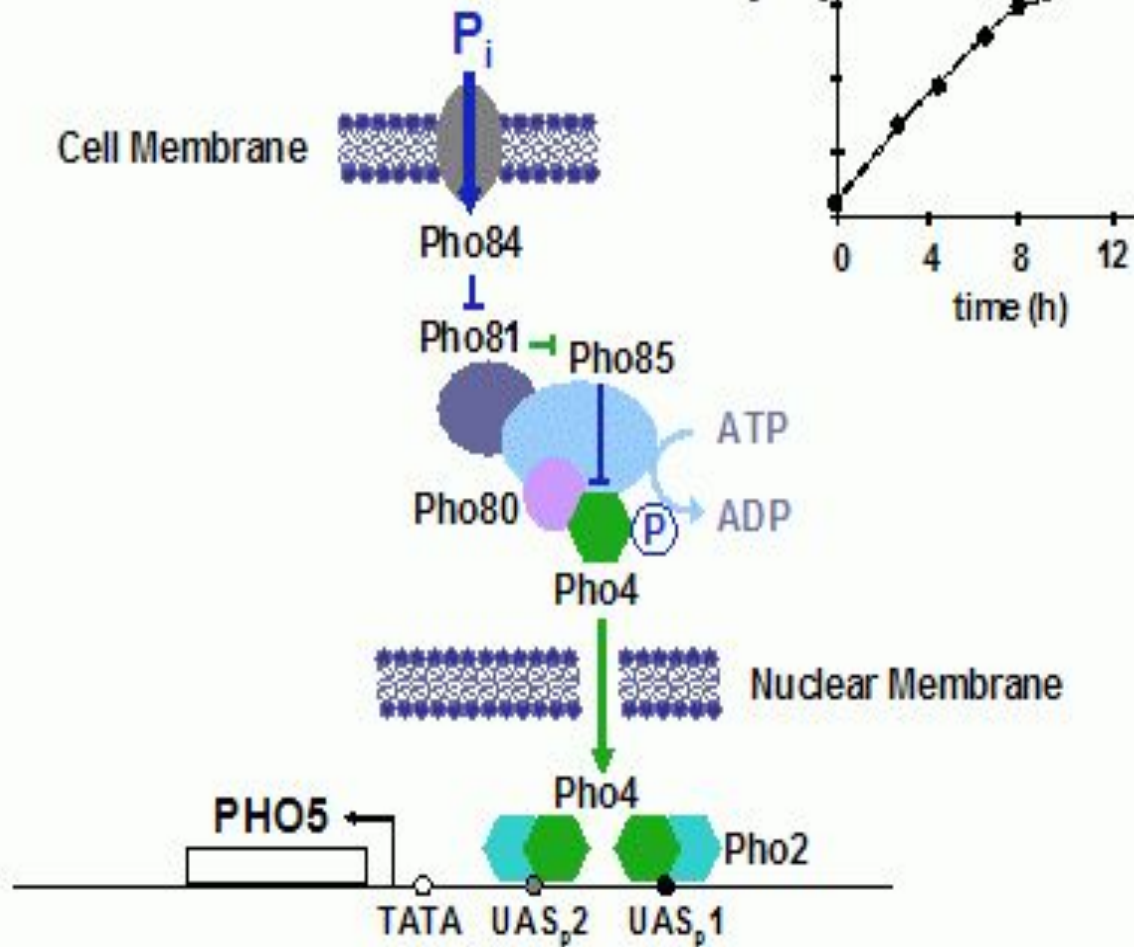
## Подсемейство Pcl1,2

- Pcl1p, Pcl2p, Pcl5p, Pcl9p, Clg1
- Клеточный цикл

# Субстраты циклинов Pho85

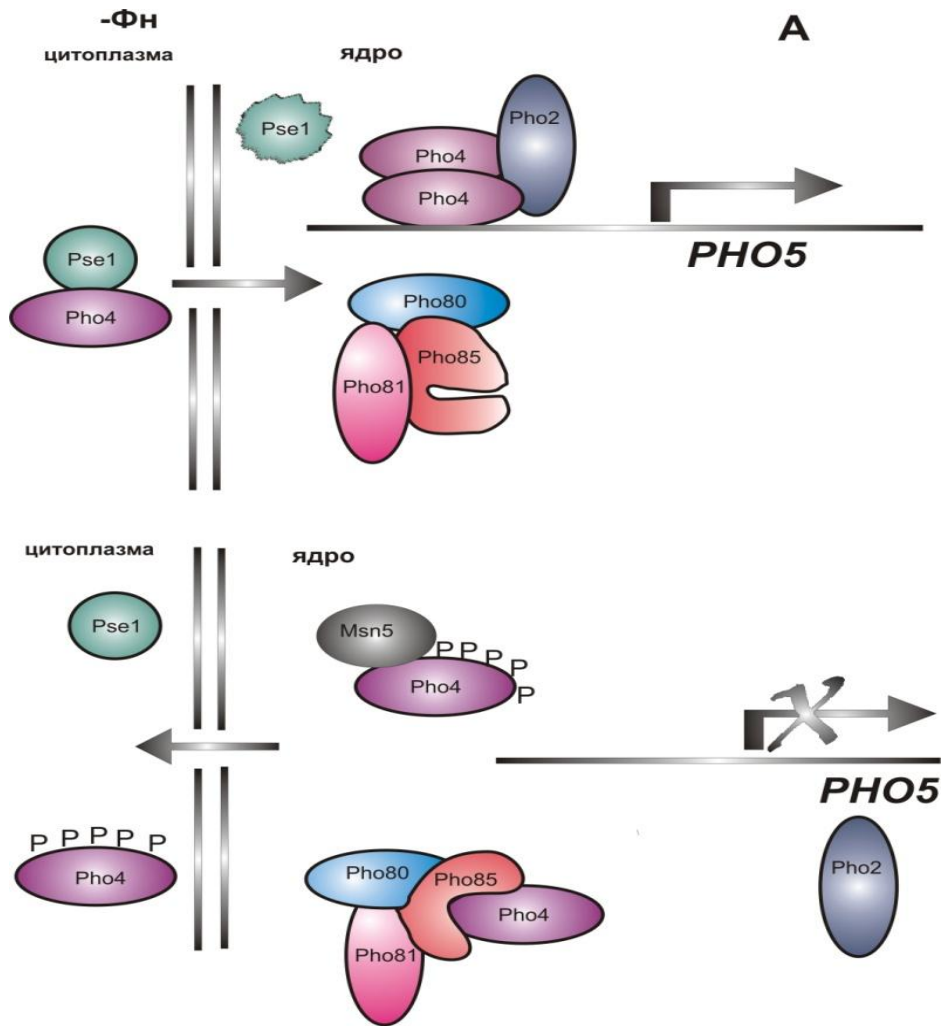
ЦИКЛИН	субстрат	процесс
Pho80	Pho4	метаболизм фосфата
Pcl6	Pho4	Синтез гликогена
Pcl7	Glc8- ингибитор фосфатазы Glc7	
Pcl8	Gsy2 -гликогенсинтаза	Синтез гликогена
Pcl 10	Glc8- ингибитор фосфатазы Glc7	Синтез гликогена
Pcl1, Pcl2 , Pcl9	Rvs167	цитоскелет
Clg1	?	
Pcl5	Gcn4	Биосинтез аминокислот

# PHO Signaling Pathway

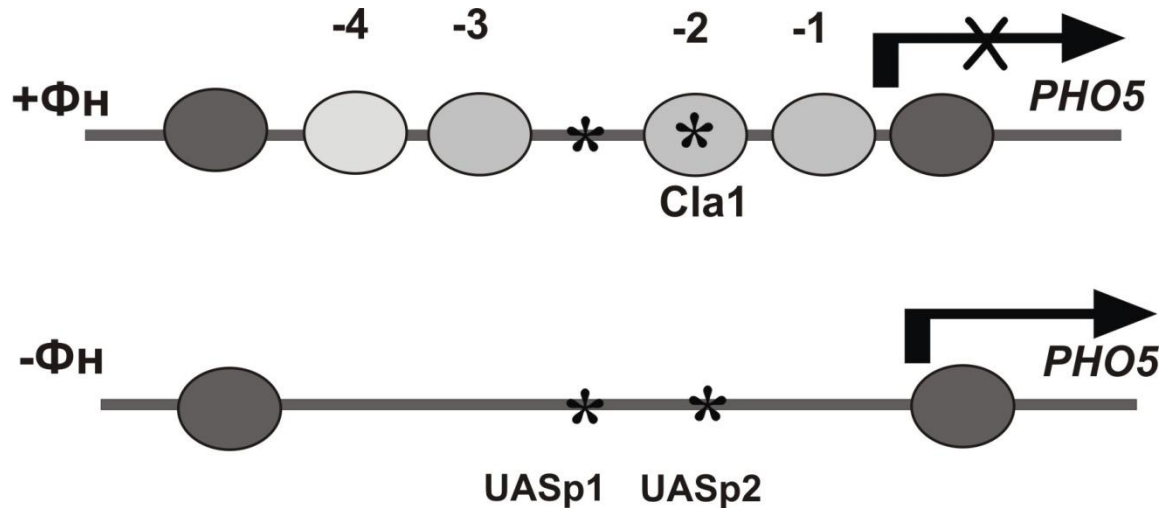




# Модель регуляции КФ



# Расположение нуклеосом в промоторе *PHO5*



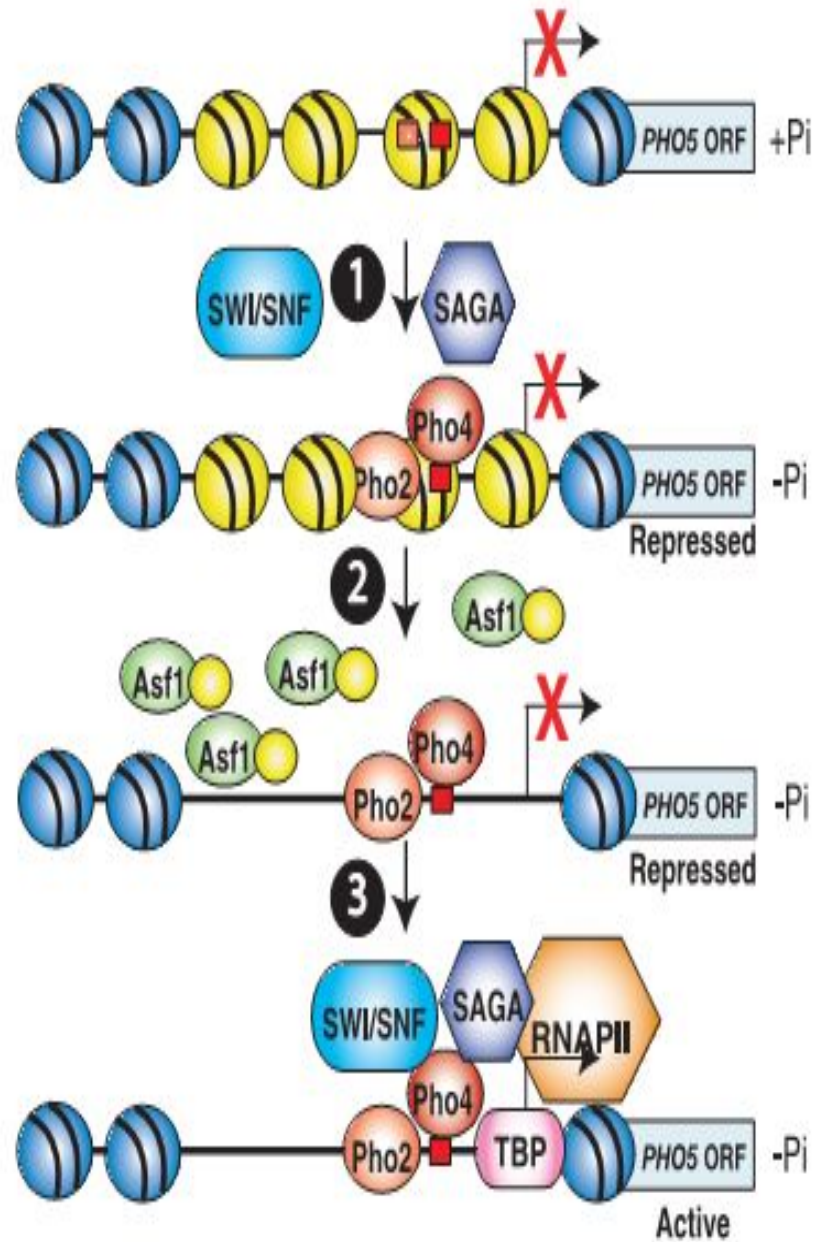
## На экспрессию *PHO5* влияют компоненты комплекса *SAGA*:

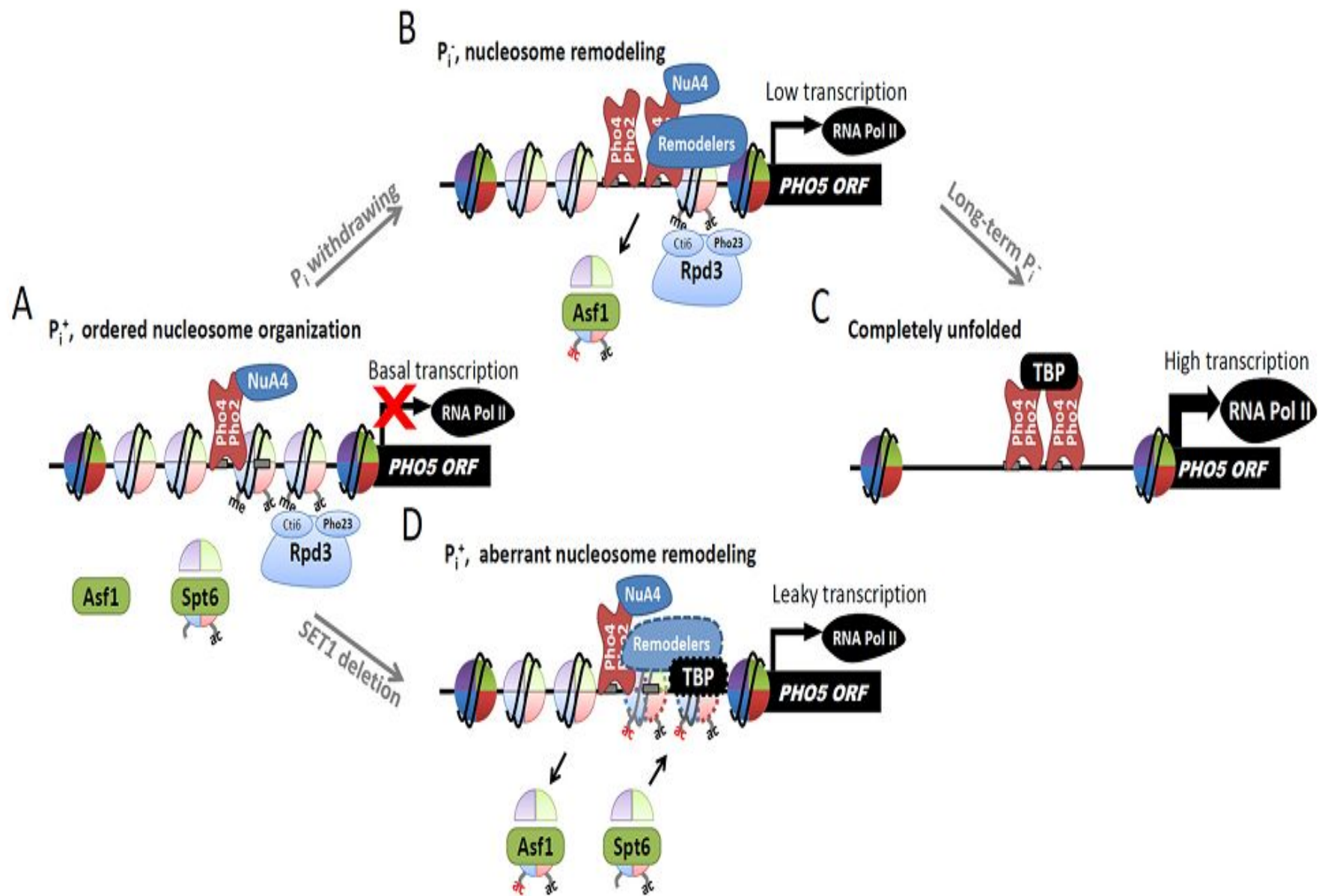
*Gcn5* – ацетилтрансфераза гистонов,  $\Delta gcn5$  – изменение нуклеосомной структуры промотора

*Spt3* - ослабляет связывание TBP с промотором

Мутанты  $\Delta gcn5 \Delta spt3$  – комплекс не собирается

мутант *ada2*- задержка ремоделирования хроматина





# Регуляторные некодирующие РНК дрожжей

30 марта 2011 г.

Савинов В.А.

# Этапы изучения РНК-сайленсинга

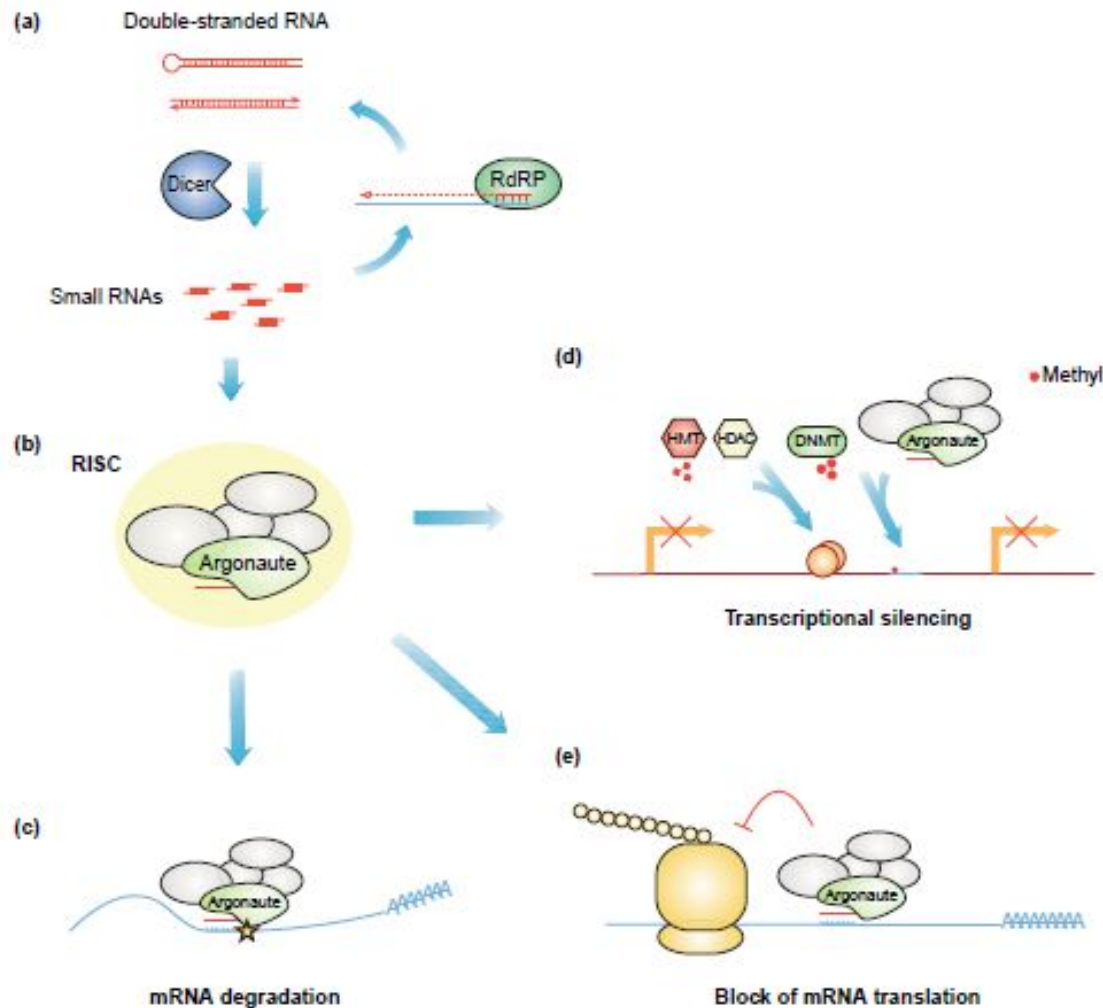
- «ко-супрессия» у растений (1990 г.)
- quelling («подавление») у *Neurospora crassa* (1996 г.)
- «РНК-интерференция» (RNAi) у *C. elegans* (1998 г., 2000 г.)
- регуляция с помощью миРНК у *C. elegans* (2000-2001 гг.)

## РНК-сайленсинг:

- *посттранскрипционный генный сайленсинг* (PTGS) - с участием комплементарных (антисмысловых) молекул РНК, распознающих целевую РНК и образующих с ней дуплексы;
- *транскрипционный генный сайленсинг* (TGS) – с формированием гетерохроматина. Показан для *Schizosaccharomyces pombe* (Almeida & Allshire, 2005).

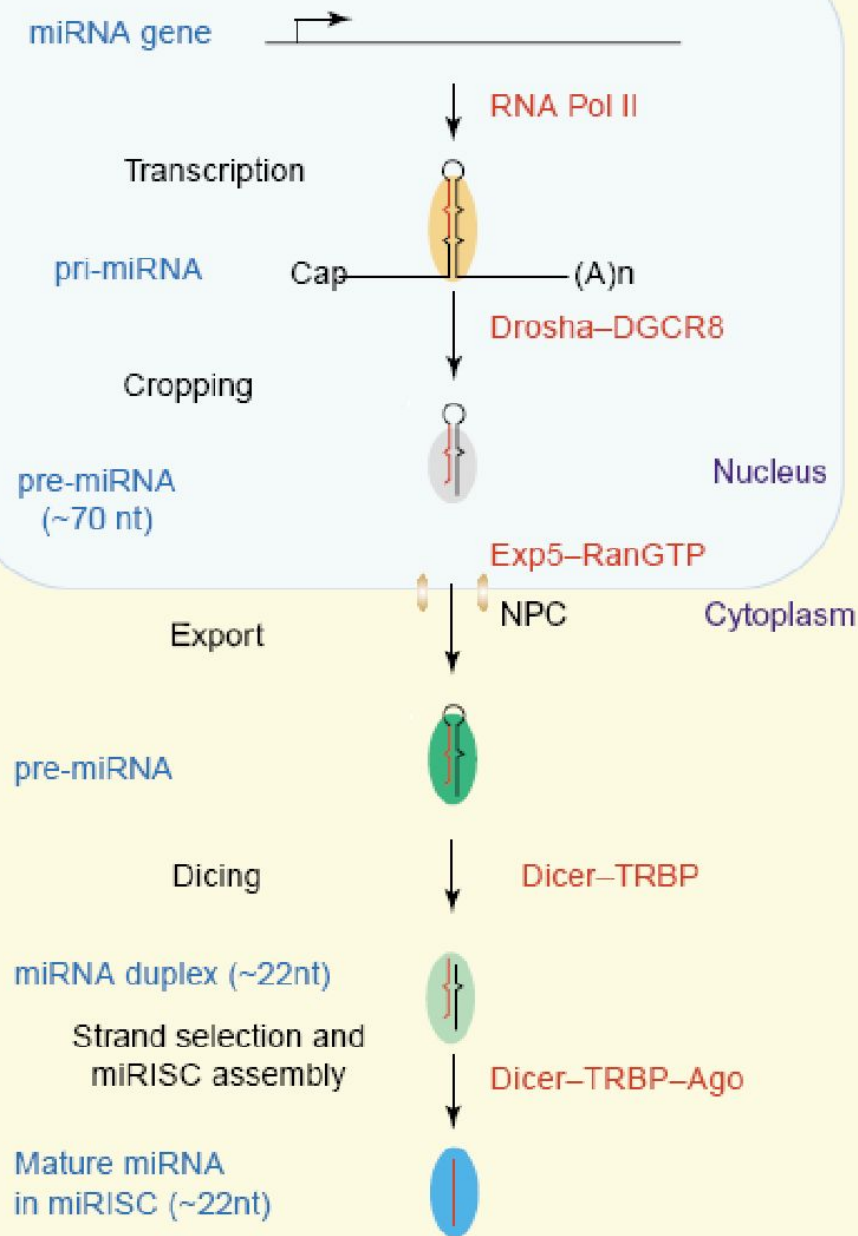
## Glossary

<b>5-Me-C</b>	5-Methylcytosine
<b>DNMT</b>	DNA <i>de novo</i> methyltransferase
<b>dsRNA</b>	Double-stranded RNA
<b>HDAC</b>	Histone deacetylase
<b>HMT</b>	Histone methyltransferase



**Figure 1.** The different forms of RNA silencing. **(a)** Double-stranded RNA molecules derived from complementary transcripts or from a stem-loop structure are recognized by Dicer (in blue) and cleaved into small RNAs. The RdRP protein (in green) acts in a positive-feedback loop for the siRNA signal by producing complementary strands of the target RNA molecule, either by recognition of its 'aberrant' nature or by using small RNAs as primers [61], thus generating more homologous double-stranded RNAs for Dicer processing. **(b)** The RISC complex, primed with a small RNA, can exert silencing in a variety of forms. In all cases, the small RNA confers target specificity, whereas the protein components within the RISC complex effect, or recruit mediators of, repression. **(c)** The conventional RNAi, PTGS or quelling pathway is depicted on the left, where the RISC complex associates with the target mRNA and employs the RISC 'slicing' activity of Argonaute protein to cleave the transcript [82,83] **(d)**. RISC can also induce transcriptional gene silencing (TGS) by using the siRNA specificity to direct silent chromatin modifications over homologous DNA loci. Target DNA (magenta line) and overlapping histones become methylated through the recruitment of DNA *de novo* methyltransferase (DNMT), histone deacetylase (HDAC) and histone methyltransferase (HMT) activities by a variant of the RISC complex, which can result in the shutdown of transcription. **(e)** A typical miRNA-loaded RISC does not affect mRNA turnover but binds to the 3'-UTR of the target transcript (blue line) and effectively blocks its translation by an unknown manner. It has been found recently that specific miRNAs can direct target mRNA cleavage and that an siRNA-loaded RISC can also block mRNA translation (see above), which suggests that it is the nature of the small RNA sequence, rather than the composition of RISC, that defines which process occurs [84,85].

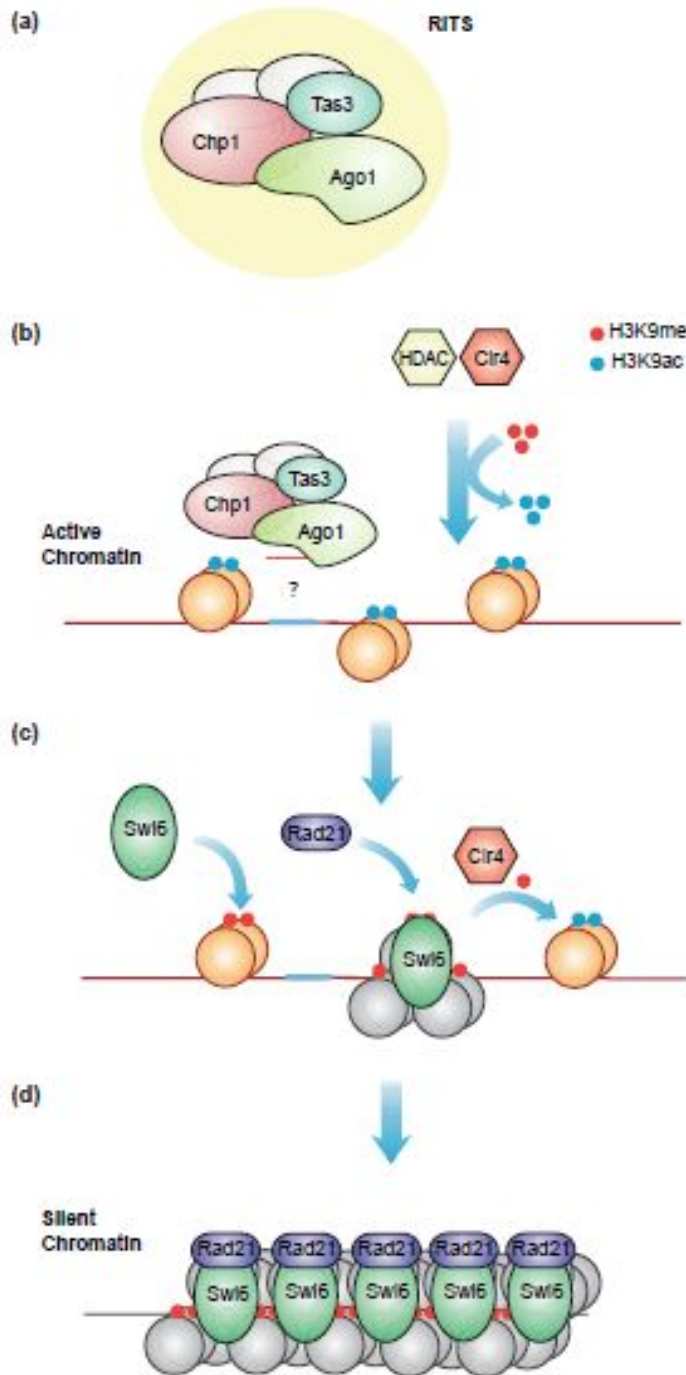
# Биогенез миРНК



**Figure 2.** Model for miRNA biogenesis. miRNA genes are transcribed by an RNA polymerase II (Pol II) to generate the primary transcripts (pri-miRNAs). The initiation step (cropping) is mediated by the Drosha–DGCR8 complex (also known as the microprocessor complex). Drosha and DGCR8 are located mainly in the nucleus. The product of the nuclear processing is ~70-nt pre-miRNA, which possesses a short stem plus ~2-nt 3' overhang. This structure can serve as a signature motif that is recognized by the nuclear export factor, Exportin-5 (Exp5). Pre-miRNA constitutes a transport complex together with Exp5 and its cofactor Ran (the GTP-bound form). Upon export, the cytoplasmic RNase III Dicer participates in the second processing step (dicing) to produce miRNA duplexes. The duplex is separated and usually one strand is selected as the mature miRNA, whereas the other strand is degraded. In *Drosophila*, R2D2 forms a heterodimeric complex with Dicer and binds to one end of the siRNA duplex, thereby selecting one strand of the duplex. It is not known if miRNAs use the same machinery for strand selection. It is also unclear whether an R2D2 homolog functions in animals other than *Drosophila*.



# TGS у *S. pombe*



Области формирования гетерохроматина:

- перичентромерные участки ДНК;
- локус типа спаривания.

**Figure 2.** RNA-mediated heterochromatin formation in fission yeast. **(a)** The RISC-variant RITS complex with its known components: the *Argonaute*/PPD protein Ago1, the chromodomain protein Chp1 and Tas3. **(b)** RITS attracts Ctr4 and an unknown HDAC to deacetylate and methylate histone H3-K9 over target DNA (blue line). It is still unclear whether the target recognition process involves RNA-DNA interactions between the small RNA and the target DNA or RNA-RNA interactions with a nascent transcript. **(c)** Nucleosomes bearing H3K9me are preferentially bound by Swi6/HP1, which promotes the recruitment of heterochromatin proteins, such as the cohesin subunit Rad21, and allows spreading of the heterochromatin domain to upstream and downstream regions. **(d)** This results in the assembly of a patch of heterochromatin that is rich in Swi6/HP1 and Rad21, as well as being transcriptionally silent.

В 2008 году у дрожжей *S. pombe* выявлены короткие нкРНК, синтезируемые в промоторе гена *fbp1* при удалении глюкозы из среды (Hirota et al., 2008).

Эти нкРНК запускают перестройки хроматина в промоторе, необходимые для инициации транскрипции.

Показана позитивная регуляция экспрессии, в основе которой лежат процессы, противоположные TGS: РНК-полимераза II синтезирует «смысловую» нкРНК, которая вызывает раскрытие хроматина в области промотора и активацию транскрипции.

# Регуляторные некодирующие РНК дрожжей *S. cerevisiae*

У дрожжей *S. cerevisiae* нет РНК-интерференции!!!

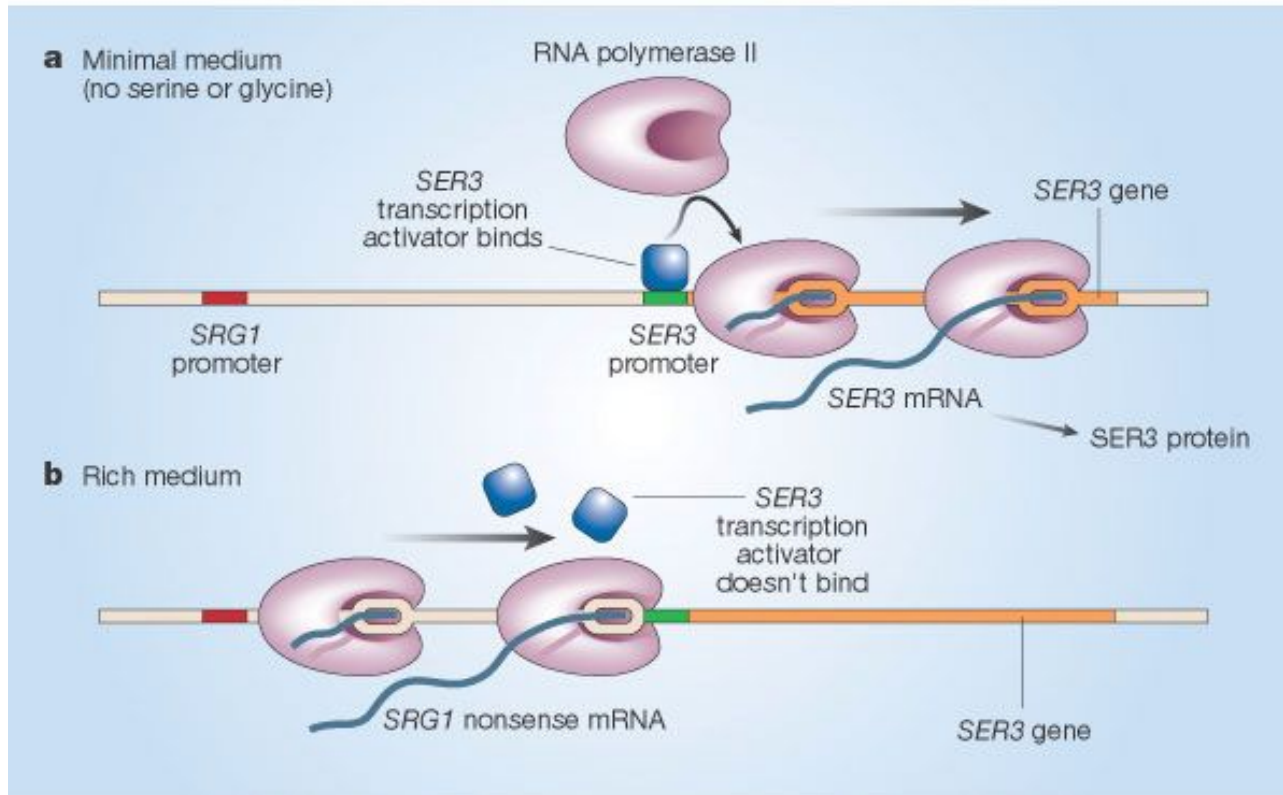
... но есть нкРНК, в том числе асРНК.

## Источники нкРНК у дрожжей:

- *Двунаправленная транскрипция* – многие промоторы могут запускать транскрипцию в обоих направлениях; выявлено большое количество кластеров нкРНК (около 250 н.); большинство таких РНК считывается или начинает считываться в межгенной области между двумя близко расположенными генами; промотор второго гена работает в обоих направлениях; получается «сенс»-нкРНК для второго гена и «антисенс»-нкРНК для первого гена.
- *Транскрипция коротких «сенс»-нкРНК с альтернативных точек инициации* выше точки начала синтеза мРНК.
- *Транскрипция «сенс»- и «антисенс»-нкРНК с разных скрытых внутренних точек инициации* – регуляция скрытой транскрипции, аналогично альтернативному сплайсингу, может быть механизмом синтеза альтернативных белковых продуктов.

Наиболее распространен у дрожжей первый способ синтеза нкРНК.

# нкРНК *SRG1* (*SER3* regulatory gene 1)



- ТАТА-бокс для транскрипции *SRG1* (-558)
- ТАТА-бокс для мРНК *SER3* (-108)

- нет гомологии
- *цис*-регуляция
- «транскрипционная интерференция»

(Martens et al., 2004, 2005)

# асРНК в локусе *IME4* (*Initiator of Meiosis 4*), кодирующем РНК-

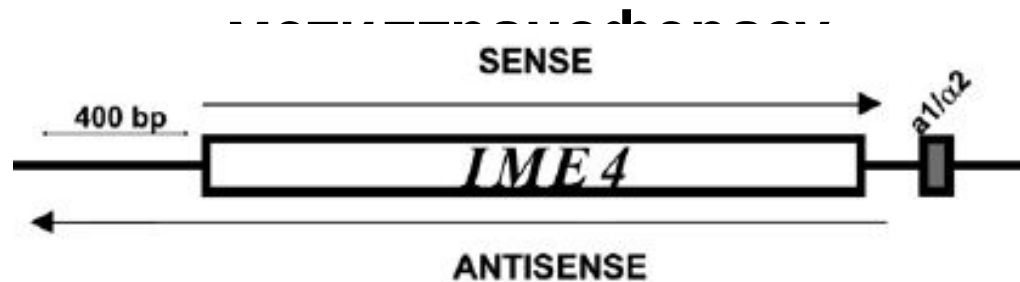
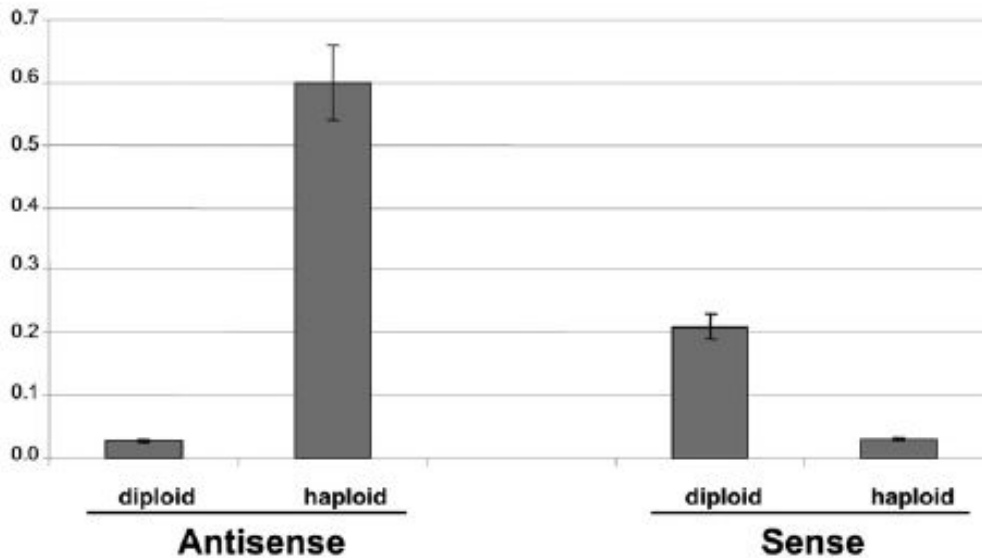


Figure 1. The *IME4* Gene Produces Two Different Transcripts According to Cell Type



- асРНК гена *IME4* только в гаплоидных клетках
- мРНК только в диплоидах
- *цис*-инактивация
- различия по длине
- гетеродимер белков  $\alpha 1/\alpha 2$  блокирует старт ас-транскрипции

Figure 5. Antisense Transcription Effectively Reduces, but Does Not Completely Abolish, Sense Transcription and Vice Versa

(Hongay et al., 2006)

## Идентифицированы асРНК для 1555 генов дрожжей

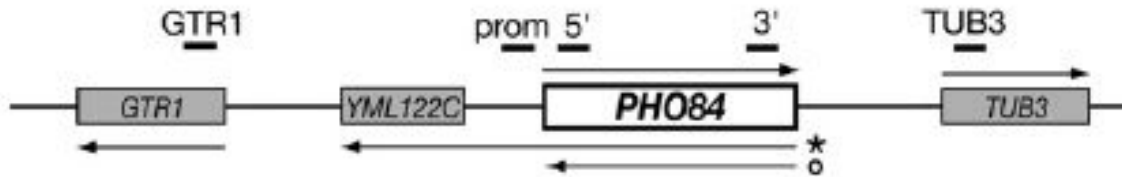
Например, обнаружена асРНК для гена *SPO22*, экспрессия которого специфична для мейоза на ранних этапах.

Перед точкой инициации ас-транскрипции в этом локусе расположен участок связывания для фактора Cbf1, который чувствителен к сигналам о составе среды и вовлечен в регуляцию репликации.

Предполагается, что ас-транскрипция запускается в условиях, неблагоприятных для мейоза, т.е. в богатой среде, в результате чего подавляется активность гена *SPO22* и вход в мейоз.

Фактор Cbf1 активирует ас-транскрипцию и подавляет транскрипцию гена *SPO22*.

# асРНК в локусе *PHO84*, кодирующем пермеазу с высоким сродством к фосфату



(A) Map of the *PHO84* genomic locus. Arrows indicate the transcription direction of the *PHO84*, *GTR1*, and *TUB3* genes. Arrows below *PHO84* represent the long *PHO84+YML122C* antisense RNA ("\*o") and the shorter *PHO84* antisense RNA ending before *YML122C* ("o").

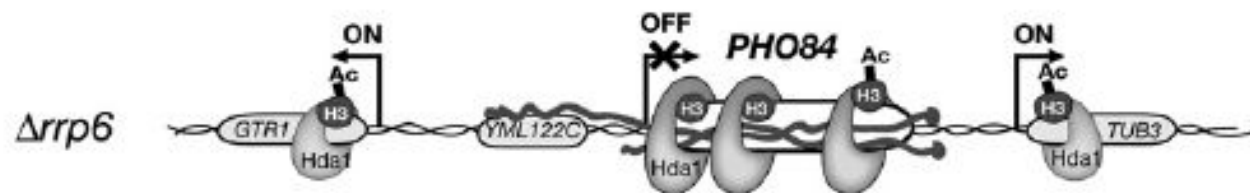
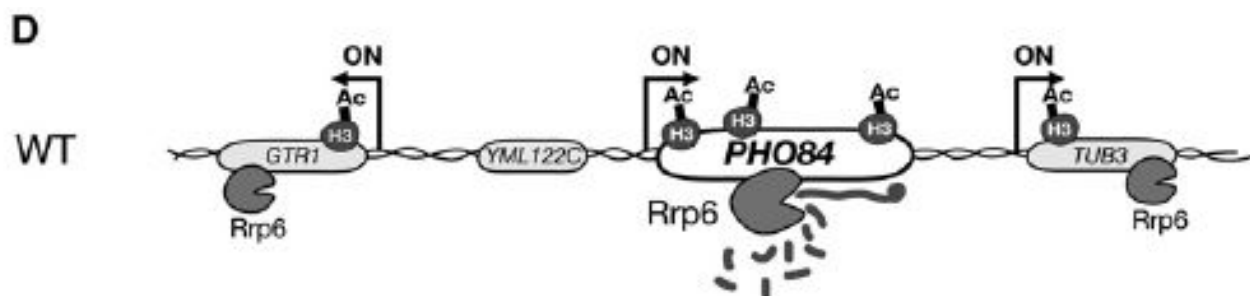
- уровень синтеза мРНК *PHO84* через 10 дней культивирования становится в 20 раз меньше по сравнению с 3х-дневной стадией
- снижение транскрипции мРНК сопряжено с появлением более длинного ас-транскрипта
- точки старта ас-транскрипции на расстоянии около 20 и 80 н.п. ниже стоп-кодона гена *PHO84*
- асРНК накапливалась на фоне мутации *rrp6*
- при росте в полной среде (YEPD) в клетках дикого типа ас-транскрипт *PHO84* не синтезируется
- уровень мРНК *PHO84* не снижается в стареющих клетках у мутантов с дефектными гистон-деацетилазами (HDAC) Hda1,2,3

(Camblong et al., 2007)



# асРНК в локусе *PHO84*, кодирующем пермеазу с высоким сродством к фосфату

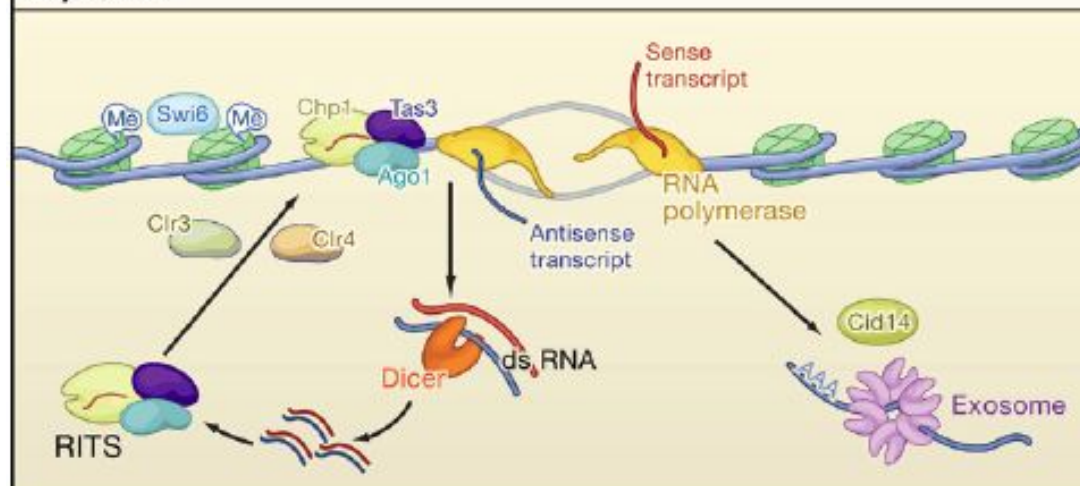
Репрессия гена *PHO84* в стареющих клетках осуществляется по новому для *S. cerevisiae* механизму TGS, уже описанному ранее у дрожжей *S. pombe*. Механизм основан на сайленсинге через накопление асРНК и РНК-индуцированное деацетилирование гистонов.



(D) Model. *PHO84* antisense RNA stabilization is paralleled by Hda1 recruitment, histone deacetylation, and *PHO84* transcriptional repression. In WT cells, Rrp6 rapidly degrades *PHO84* antisense transcripts, allowing efficient *PHO84* gene transcription (top). In the absence of Rrp6 or in aging cells, in which Rrp6 dissociates from the gene, *PHO84* antisense transcripts are stabilized (bottom). This accumulation correlates with the recruitment of Hda1 to *PHO84* and adjacent loci. However, Hda1-induced histone deacetylation is restricted to regions encoding antisense RNA, resulting in specific *PHO84* gene repression. The following abbreviations are used: acetylated histone H3 (H3-Ac) and nonacetylated histone H3 (H3).

(Camblong et al., 2007)  
(Bird et al., 2006)

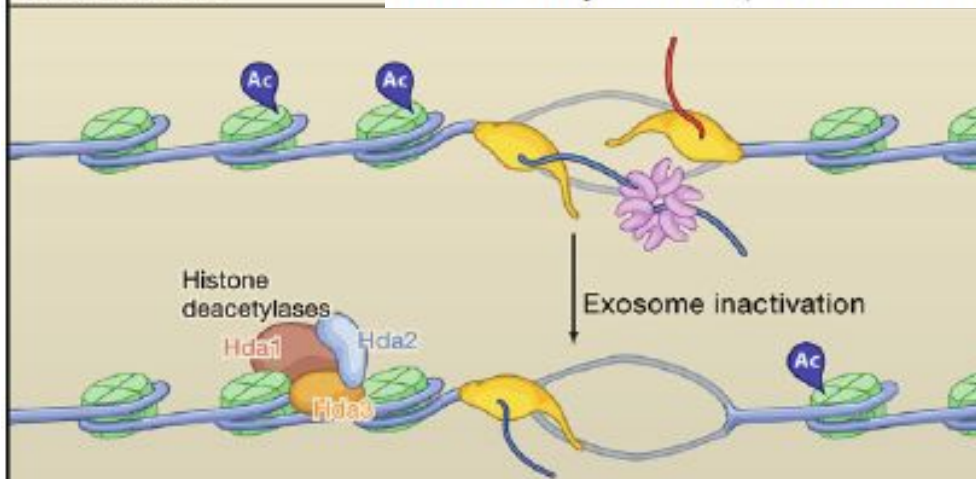
## *S. pombe*



### Figure 1. Parallel Mechanisms for Gene Silencing in Yeast

(Top) In *S. pombe*, heterochromatin is maintained through synthesis of double-stranded RNA (dsRNA) generated through low-level transcription from both DNA strands by RNA polymerase II with subsequent amplification by RNA-dependent RNA polymerase. Double-stranded RNA is degraded either by the exosome or Dicer. Dicer generates siRNAs that are incorporated into the RITS complex, which then targets homologous chromatin resulting in gene silencing by histone tail deacetylation and methylation followed by recruitment of Swi6. (Bottom) In *S. cerevisiae*, specific genes generate antisense transcription, which is normally suppressed by exosome-mediated degradation. However, if exosome activity is limited, antisense cryptic unstable transcripts (CUTs) accumulate. This causes recruitment of histone deacetylases to nearby chromatin, resulting in gene silencing. Swi6 is an Hp1 homolog; Clr3 and Hda1-3 are histone deacetylases; Clr4 is a histone methyltransferase; Cid14 is an exosome-activating polyA polymerase.

## *S. cerevisiae*



## асРНК внутри гена *GAL10*, кодирующего УДФ-глюкозо-4- эпимеразу

- два ас-транскрипта, 4000 и 2800 н.
- ас-транскрипция запускается в отсутствие галактозы, т.е. в репрессивных условиях для гена *GAL10*
- гены *GAL1* и *GAL10* расположены рядом и разнонаправлены
- асРНК начинается около 3'-конца *GAL10*, проходит через общий промотор *GAL1-GAL10* и терминируется внутри гена *GAL1*
- фактор Reb1 связывается с ДНК рядом с точкой инициации асРНК
- в область кластера привлекается метилтрансфераз Set2, это приводит к ди- и триметилированию H3K4 в гене *GAL10*, триметилированию H3K36 и деацетилированию H3 в нуклеосомах по всему локусу
- репрессия генов кластера *GAL* за счет формирования гетерохроматина (TGS)

Выявлены 215 сайтов связывания Reb1 в кодирующих областях по всему геному дрожжей. Эти сайты были выявлены в повторяющихся генах рРНК и в теломерных областях. Сайт для Reb1 был обнаружен в 3'-области локуса *PHO84* рядом с точкой инициации ас-транскрипции.

(Houseley et al., 2008)

# Авторегуляция транскрипции генов биосинтеза гуанидина *IMD2* и урацила *URA2*

## *URA2*:

- при достаточном количестве нуклеотидов используется альтернативный TATA-сайт
- этот сайт расположен в промоторе немного выше TATA, с которого считывается мРНК в условиях истощения У-нуклеотидов
- синтезируются короткие нестабильные нкРНК
- ранний старт транскрипции приводит к синтезу *цис*-регуляторного элемента (R-бокса) в структуре нкРНК, который распознается специальными факторами

## *IMD2*:

- механизм аттенюации
- 2 TATA-сайта: ранний «G» и мРНК-овый «A», который занимается полимеразой при нехватке ГТФ

ГТФ-зависимая аттенюация открыта для гена *PSA1*. Тут регуляция позитивная: TATA-бокс «G» расположен ниже и служит для инициации мРНК.

Гены *URA8*, *IMD3* *ADE12* – другие авторегулируемые гены биосинтеза нуклеотидов, также связанные с короткими нестабильными нкРНК.  
(2008 г.)

# нкРНК *ZRR1* против гена *ADH1*, кодирующего основную цинк-зависимую алкоголь-дегидрогеназу

- активатор *Zap1* связывается с ДНК выше локуса *ADH1* и запускает межгенный синтез нкРНК *ZRR1* в прямой ориентации
- нкРНК транскрибируется через UAS активатора *Rap1* в промоторе гена *ADH1*, тем самым закрывая этот сайт от связывания и выключая ген

Такой же механизм регуляции был показан для локуса *ADH3*, нкРНК называется *ZRR2*.

# асРНК в локусе *PHO5*, кодирующем репрессибельную кислую фосфатазу

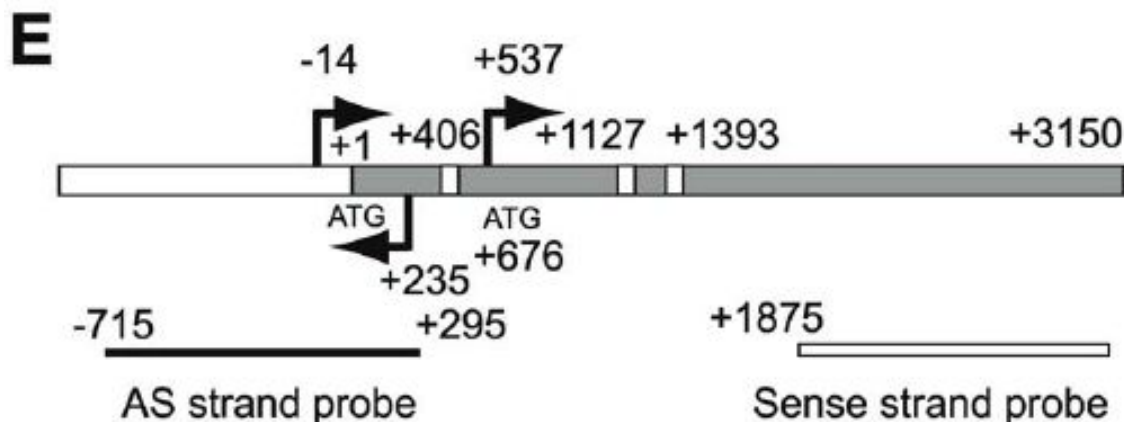
- единственный известный пример позитивной регуляции с асРНК у *S. cerevisiae*
- длина асРНК = 2400 н., превышает размер гена *PHO5* (1400 н.п.)
- асРНК синтезируется с 3'-конца гена до точки -950 в промоторе
- в репрессирующих условиях, т.е. при высокой концентрации фосфата в среде
- вызывает перестройки хроматина в области промотора
- в результате перестроек разбираются четыре нуклеосомы, освобождается участок 600 н.п.
- эти перестройки усиливают ответ клетки при снижении уровня фосфата в среде

# Укороченная РНК и асРНК в локусе *KCS1*, кодирующем $IP_6$ -протеинкиназу

- сигнал о снижении концентрации фосфата принимает транскрипционный активатор Pho4
- сигнал об истощении фосфатов передается разновидностью инозитол-полифосфатов,  $IP_7$
- ген *KCS1* кодирует киназу, синтезирующую 5-PP- $IP_5$  (5-дифосфо-миоинозитол-пентафосфат)
- киназа Vip1 синтезирует другие изомеры  $IP_7$ : 4- или 6-PP- $IP_5$
- изомеры  $IP_7$ , синтезированные с участием Vip1, запускают дерепрессию *PHO*-регулона
- сверхпродукция киназы Kcs1 ослабляет дерепрессию гена *PHO5*
- при снижении концентрации фосфата внутри гена *KCS1* иницируются транскрипции двух видов молекул РНК: укороченной смысловой РНК и короткой нкРНК в обратной ориентации, в результате чего не происходит синтез полноразмерного белка Kcs1

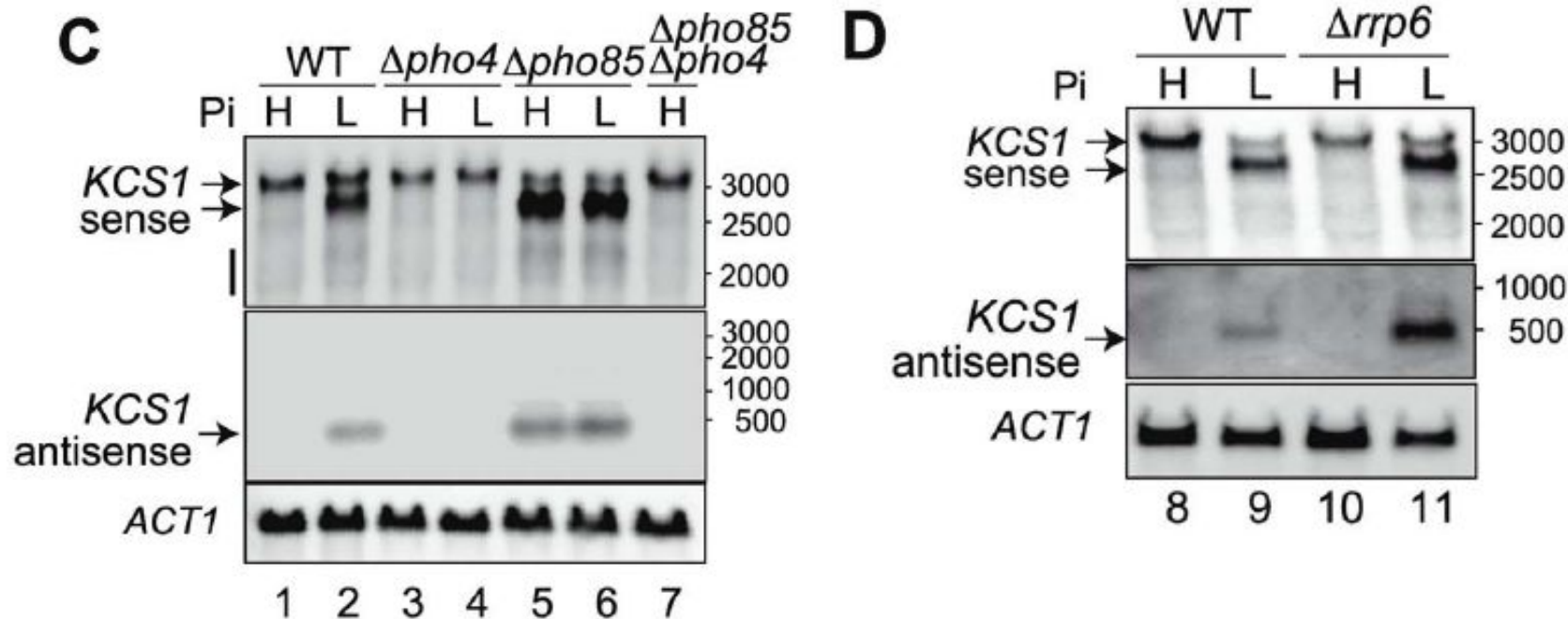
## Укороченная РНК и асРНК в локусе *KCS1*, кодирующем $IP_6$ -протеинкиназу

- выявлены три предполагаемых внутренних сайта связывания фактора Pho4 (+406, +1127, +1393), которые распознаются активатором только при снижении фосфатов
- один внутренний ATG (+676)
- три точки старта транскрипции: -14 – начало полноразмерной мРНК, +537 - начало укороченного сенс-транскрипта, +237 – точка старта транскрипции асРНК в направлении промотора гена *KCS1*



(E) A schematic representation of the structure of the *KCS1* gene showing the positions of the ATG codon at +1 and +676, taking A of the initiating ATG as +1. The blank bar represents the promoter region, and the shaded one is the coding region. The white boxes in the coding region are the prospective Pho4 binding sites at +406, +1127, and +1393. The arrows on the bar designate the major transcription start points of the sense RNA in the 5'-upstream region (at -14) and in the ORF (at +537), and that below the bar is that of the AS RNA (+235), determined by the 5'-RACE method. The





**Figure 3. Pi- and Pho4-Dependent Antisense and Intragenic RNA Species in the *KCS1* Locus**

(C) Northern analysis of *KCS1* sense and AS RNA expression in the wt and various *pho* mutant strains as designated under high (H)- or low (L)-Pi conditions using strand-specific DIG-RNA probes. For detection of *KCS1* sense transcripts, an RNA probe specific to the 3' region of *KCS1* was employed (see Figure 3E). The arrows on the left-hand side of the panel indicate the positions of the *KCS1* sense (the top panel) and AS transcripts (the middle panel), respectively. The vertical bar on the left-hand side of the top panel designates short *KCS1* sense transcripts ranging from 2,300 to 1,800 nt. The positions of RNA size markers are shown on the right. *ACT1* is the loading control.

(D) Effect of a  $\Delta rrp6$  mutation on the levels of the *KCS1* sense and AS RNA expression. Total RNA was isolated from the wt or  $\Delta rrp6$  mutant cells grown under different Pi conditions as described above and subjected to northern analysis using strand-specific DIG-RNA probes as designated. The positions of RNA size markers are shown on the right. *ACT1* is the loading control.

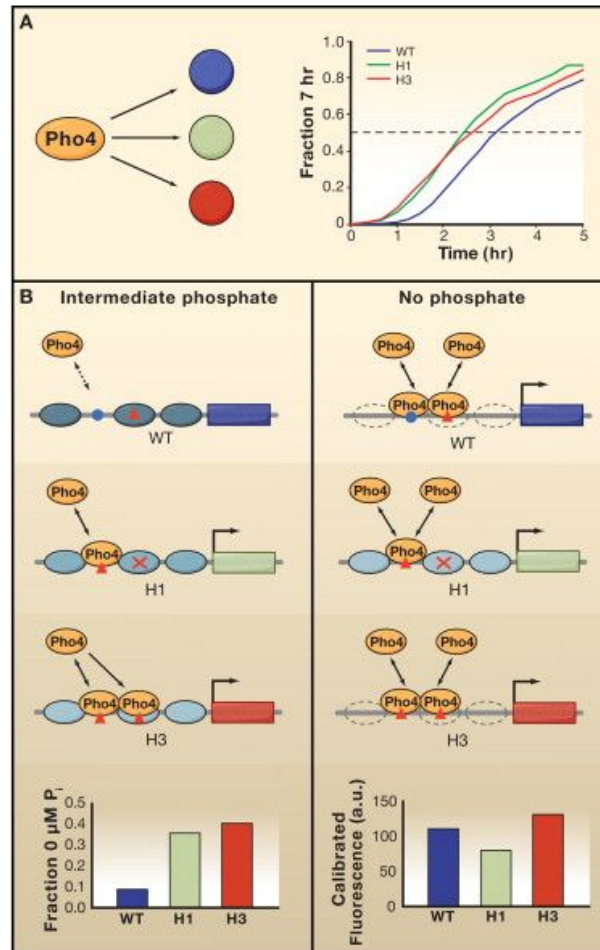
## асРНК, транскрибируемая с мобильного элемента *Ty1*

- *транс*-регуляция
- эти асРНК подавляют транскрипцию мРНК репортерных генов и эндогенной мРНК других элементов *Ty1*
- аналог РНК-интерференции

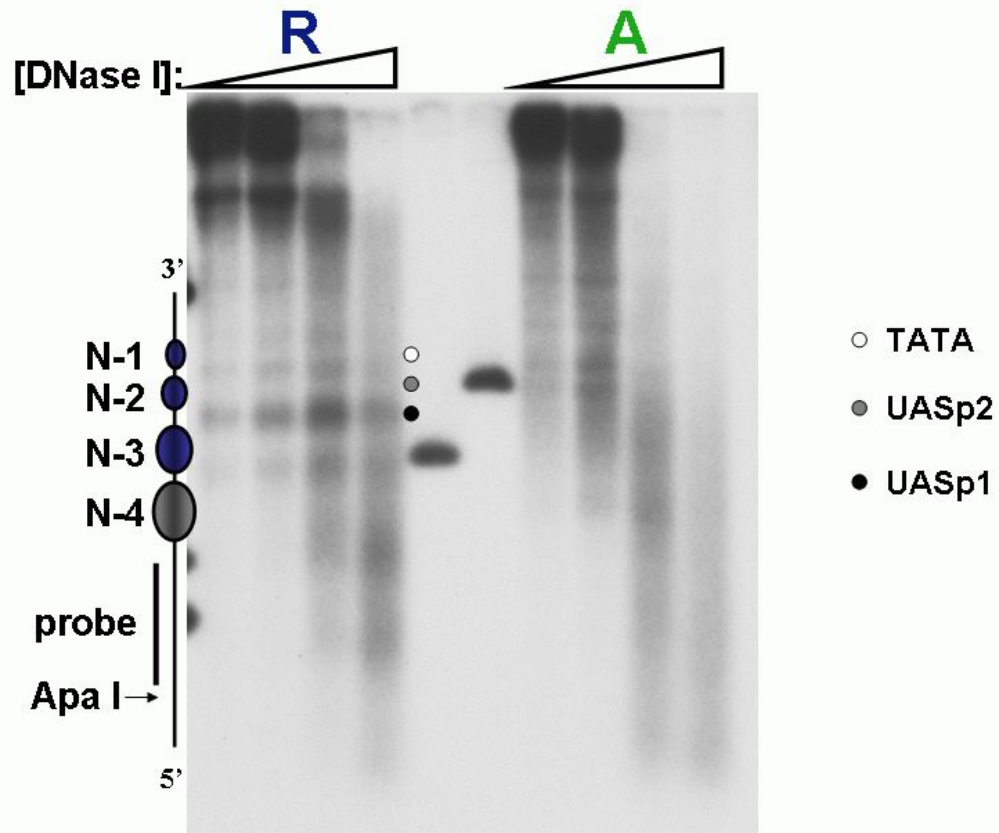


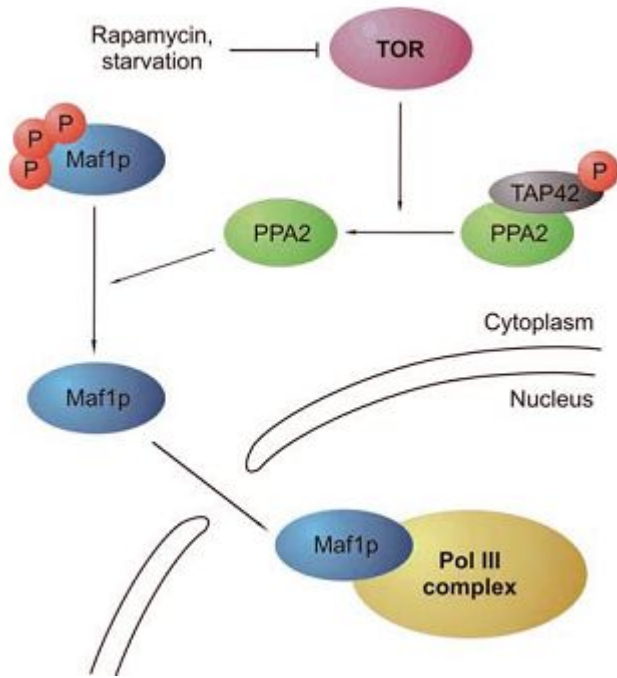




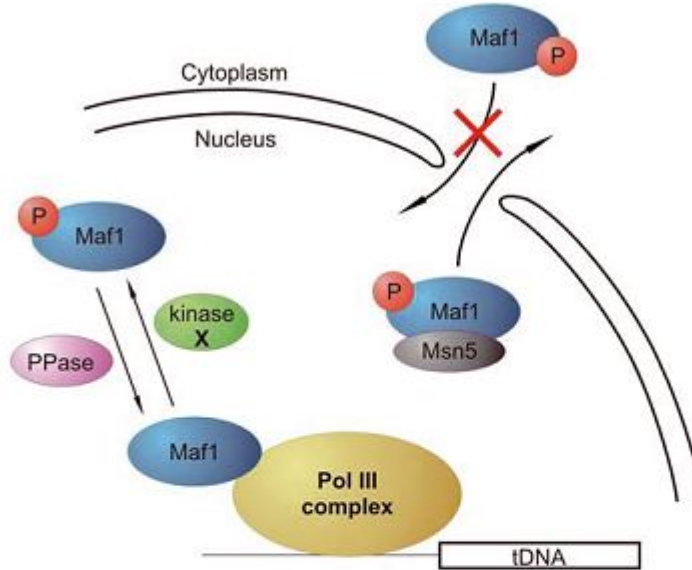


## DNase I Accessibilities at the *PHO5* Promoter





**B**

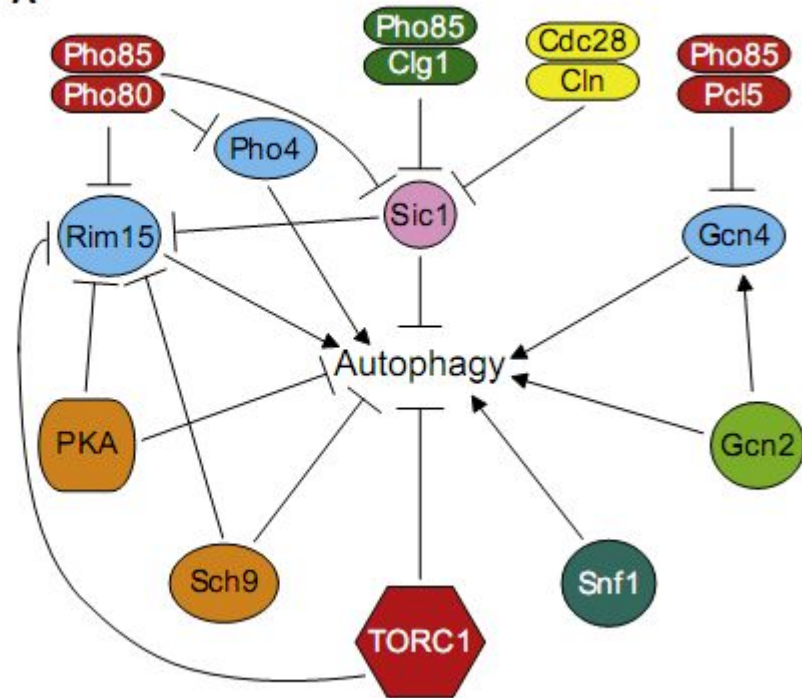


**Figure 1. Model of Maf1 regulation.**

**A.** Repression of Pol III by Maf1. Under rapamycin stress Maf1 is activated by dephosphorylation and imported into the nucleus (according to Oficjalska-Pham *et al.*, 2006). **B.** Derepression of Pol III under favorable growth conditions in the presence of glucose. Maf1 is phosphorylated thereby decreasing its interaction with Pol III. Phosphorylated Maf1 is exported out of the nucleus by Man5 carrier (according to Towpik *et al.*, 2008).

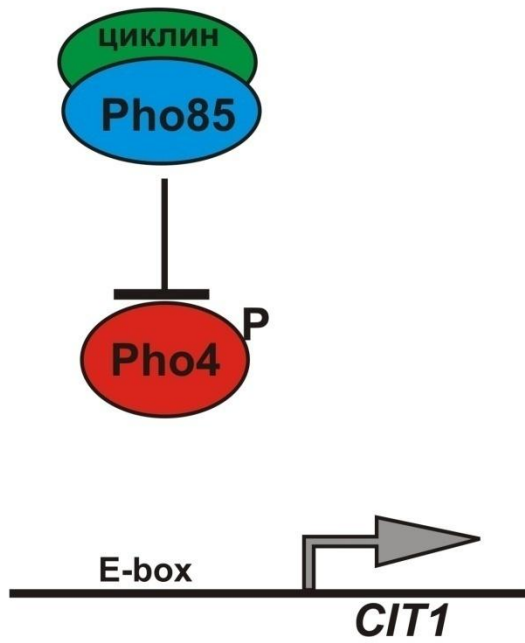


A



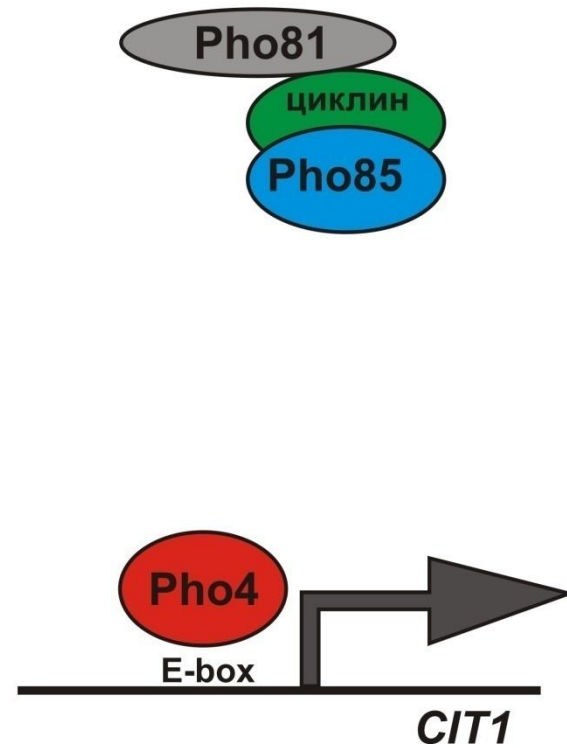
+ФН

+ глюкоза



-ФН

+ глюкоза



Все три статьи на флэшке в папке  
activator(3)

# Evolution of Transcription Networks – Lessons from Yeasts

Hao Li<sup>1</sup> and Alexander D. Johnson<sup>1,2</sup>

coordinatec

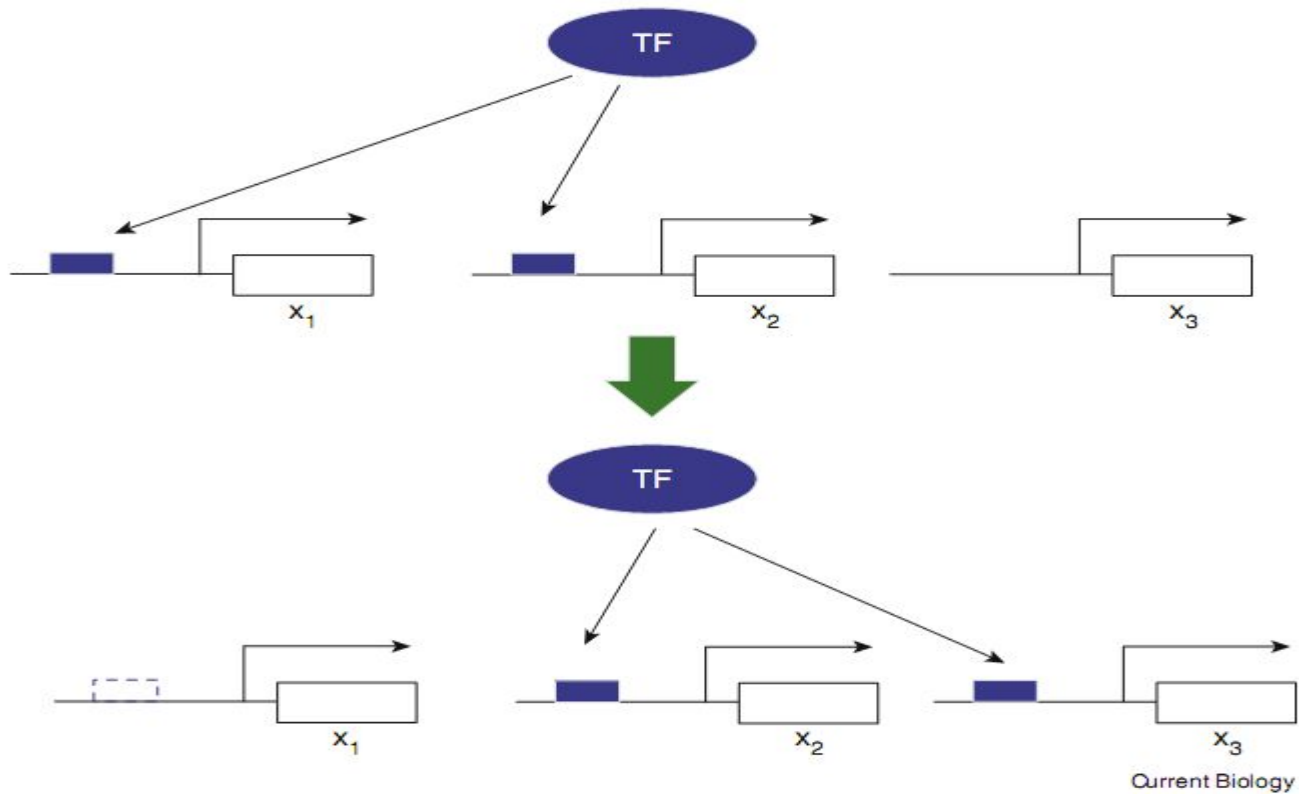
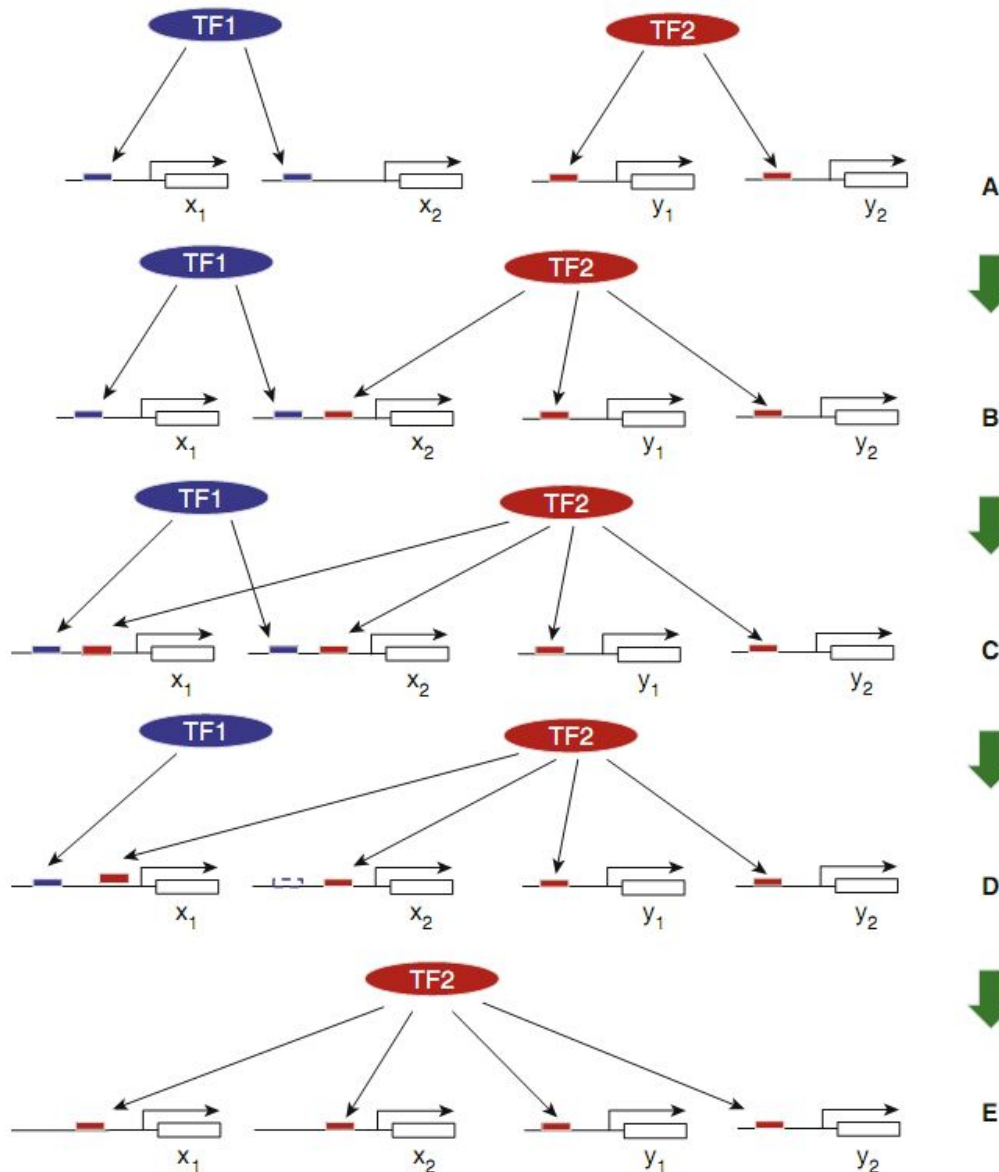


Figure 1. Change of regulon membership via transcription factor binding site turnover.

*Cis*-regulatory mutations created a new binding site in the promoter of  $x_3$  (the blue box) and destroyed an old binding site in the promoter of  $x_1$  (the dashed box), moving  $x_3$  in and  $x_1$  out of the regulon.

Figure 2. Handover of a regulon from one transcription factor to another.

The regulation of  $x_1$  and  $x_2$  by a transcription factor (TF1) in the ancestral circuit (A) has been taken over by a different factor (TF2) in the extant circuit (E). The rewiring may have occurred gene by gene, through intermediates with redundant regulation (B–D).



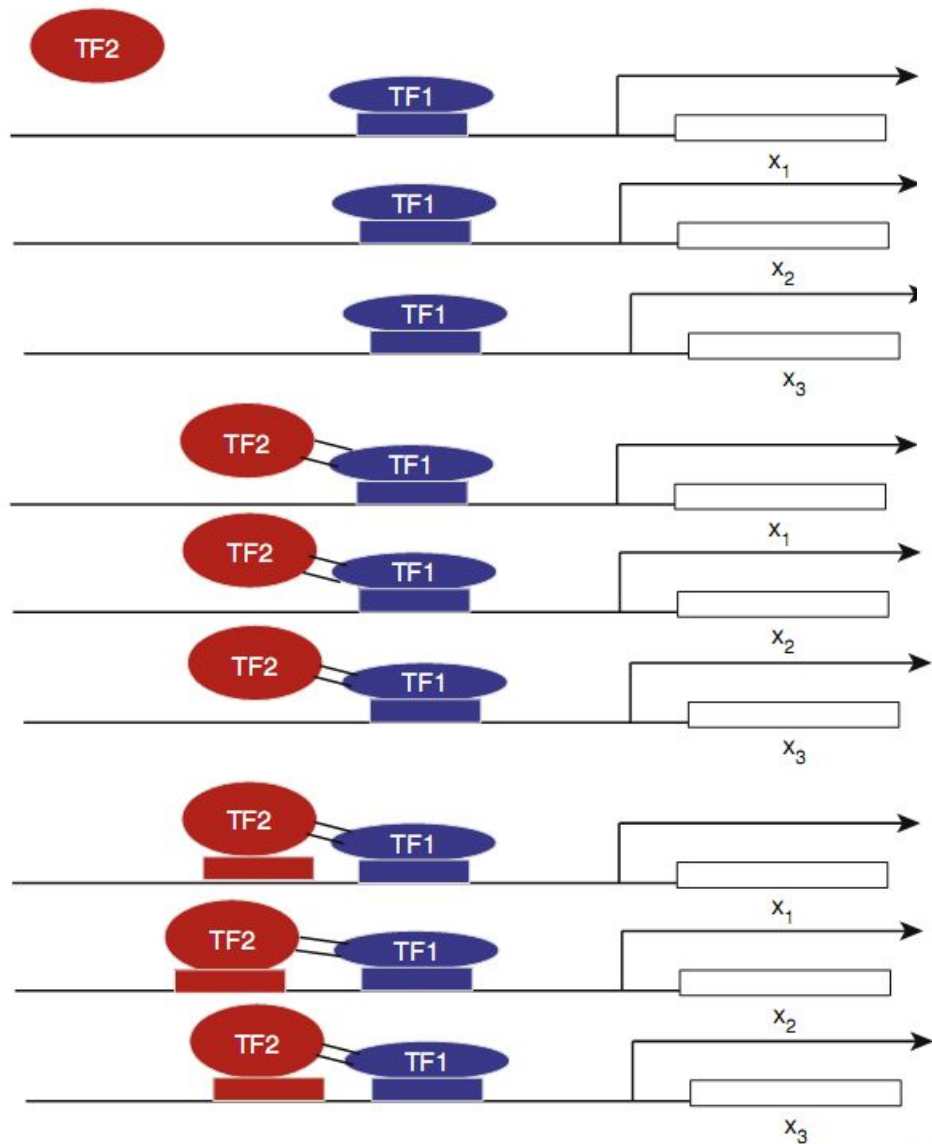




Figure 3. Recruiting a new transcription factor to an existing regulon by the evolution of a new combinatorial interaction.

The formation of a new interaction between TF1 and TF2 brings TF2 to the regulon controlled by TF1, effecting a concurrent rewiring of the full regulon (A,B). The new circuit can then be improved by step-wise *cis*-regulatory changes that stabilize the binding of TF2 to the promoters (C).

# Evolutionary Tinkering with Conserved Components of a Transcriptional Regulatory Network

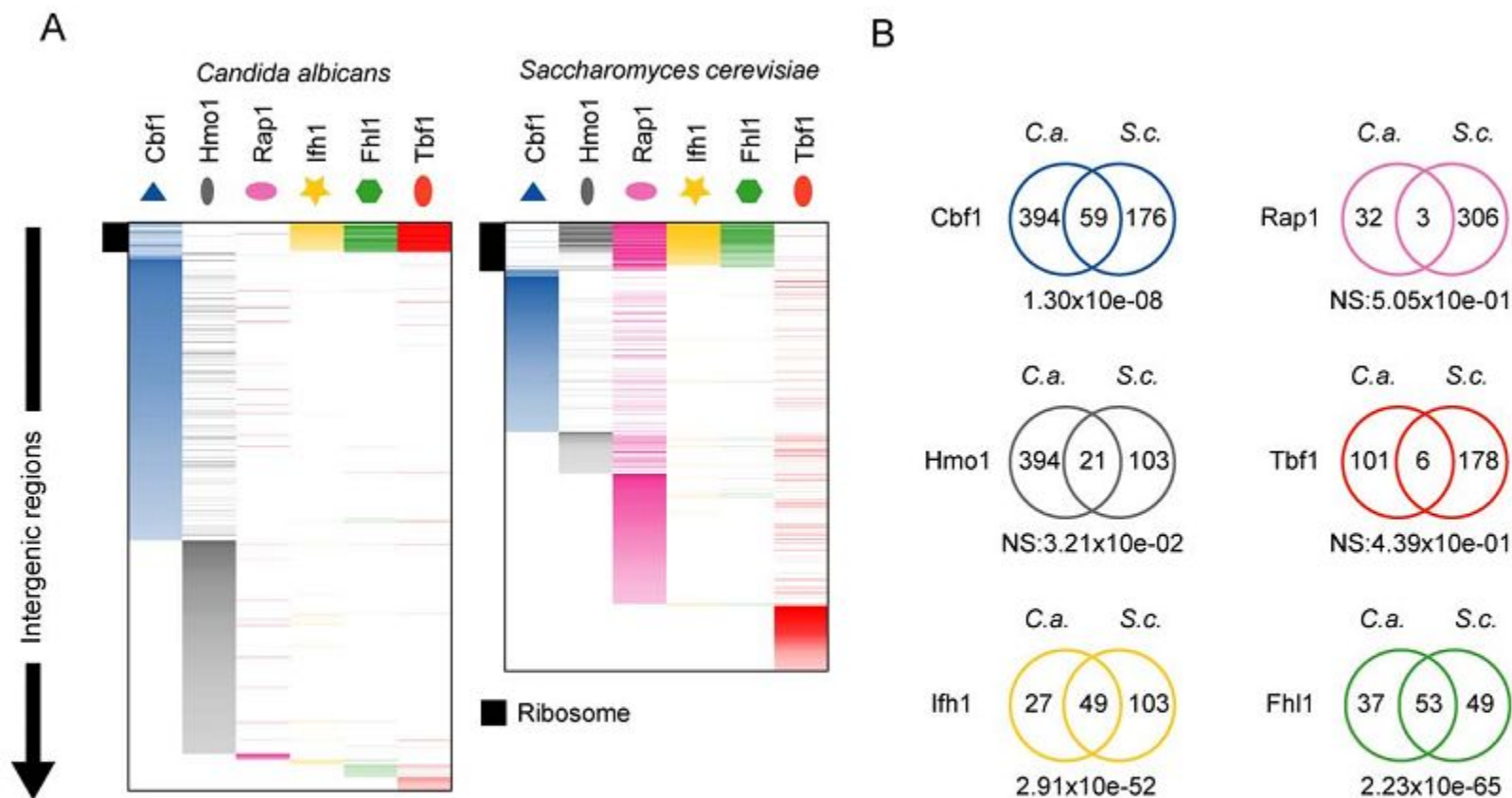
**Hugo Lavoie<sup>1,2\*</sup>, Hervé Hogues<sup>1</sup>, Jaideep Mallick<sup>1</sup>, Adnane Sellam<sup>1,3</sup>, André Nantel<sup>1,3</sup>, Malcolm Whiteway<sup>1,2\*</sup>**

**1** Biotechnology Research Institute, National Research Council, Montreal, Quebec, Canada, **2** Department of Biology, McGill University, Montreal, Quebec, Canada, **3** Department of Anatomy and Cell Biology, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

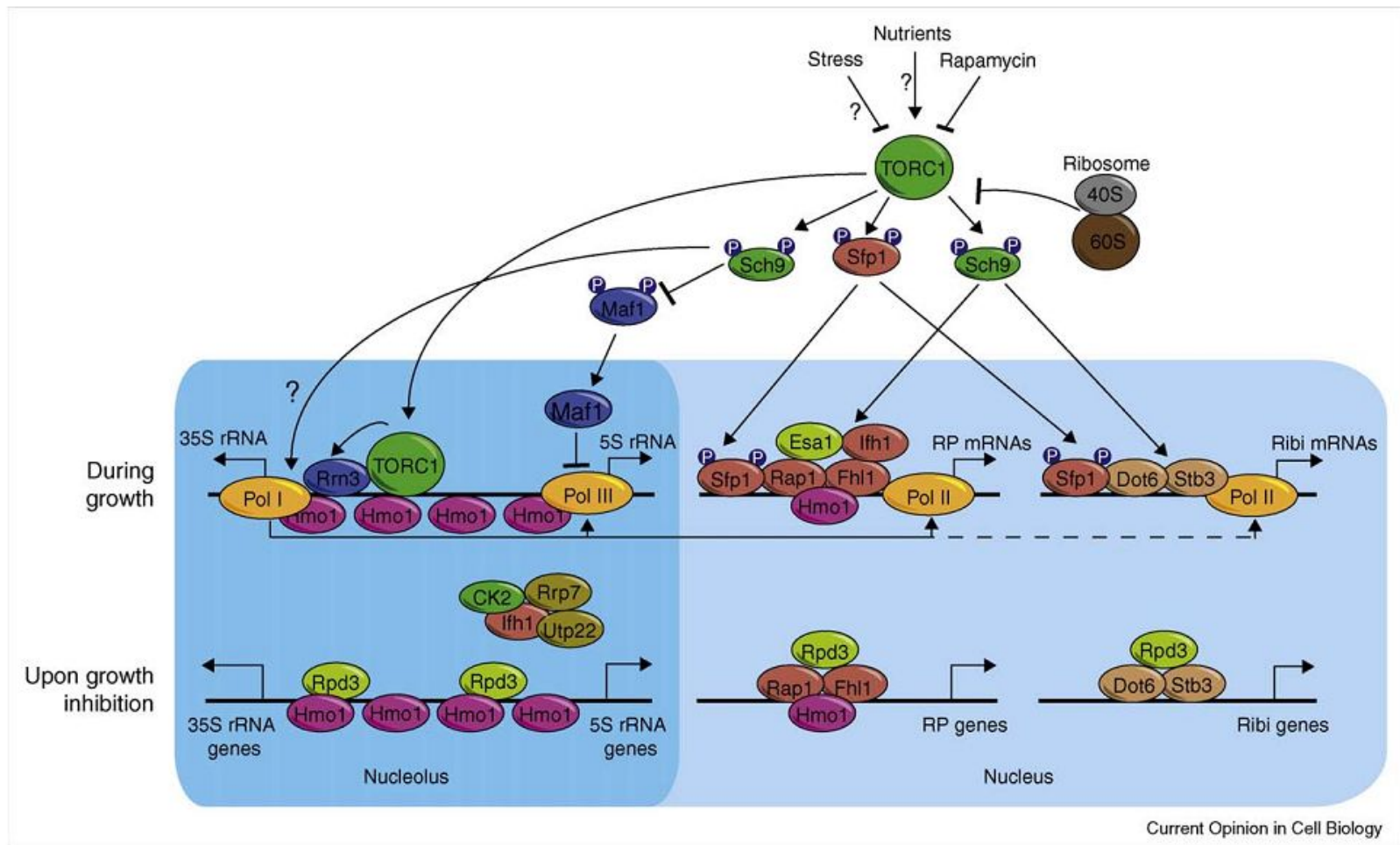
	Intergenic regions	Genes	Coverage	2 Starts	1 Start
					
<i>C. albicans</i>					
▲ Cbf1	718	819	13.41%	268	283
● Hmo1	624	752	12.31%	215	322
● Rap1	36	46	0.75%	14	18
★ Ifh1	95	114	1.87%	32	50
● Fhl1	104	102	1.67%	25	52
● Tbf1	126	127	2.08%	35	57
<b>Total</b>	<b>1342</b>	<b>1481</b>	<b>24.25%</b>	<b>436</b>	<b>609</b>
<i>S. cerevisiae</i>					
▲ Cbf1	440	384	5.81%	123	138
● Hmo1	218	246	3.73%	82	82
● Rap1	602	698	10.57%	219	260
★ Ifh1	128	156	2.36%	52	52
● Fhl1	128	180	2.73%	65	50
● Tbf1	293	371	5.62%	127	117
<b>Total</b>	<b>1198</b>	<b>1245</b>	<b>18.85%</b>	<b>394</b>	<b>457</b>

**Figure 1. Summary of the transcription factor maps established in *C. albicans* and *S. cerevisiae*.**  
doi:10.1371/journal.pbio.1000329.g001





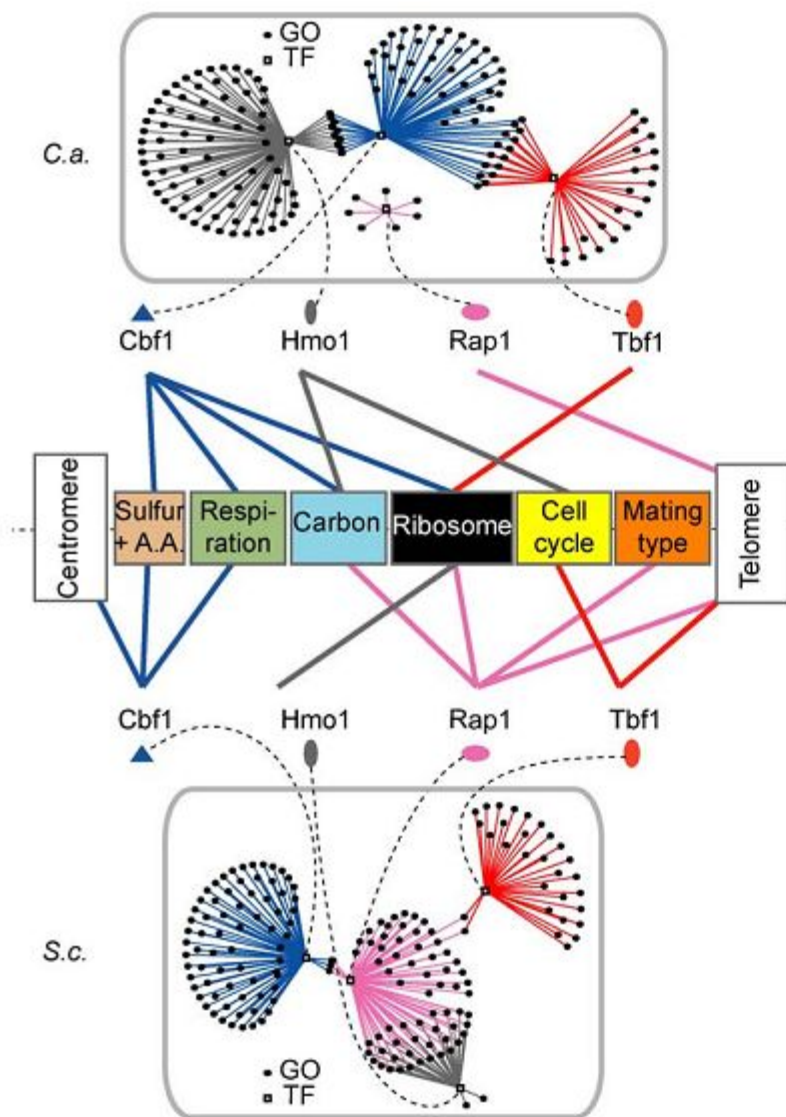
**Figure 2. Evolution of the genome coverage of transcription factors involved in the RP transcriptional regulatory network.** (A) Visual display of TF binding sites in the genomes of *S. cerevisiae* and *C. albicans*. Color saturation follows the  $\log_2$  fold enrichment values in ChIP-chip experiments. Intergenic regions were first sorted by function (ribosome, sulfur starvation/amino acid biosynthesis, and glycolysis) and then by fold change for each regulatory protein. (B) Overlaps between the sets of targets of orthologous TFs of *C. albicans* and *S. cerevisiae*. The  $p$  values of each overlap were calculated using a hypergeometric distribution and is shown beneath each Venn diagram. NS stands for non-significant overlap. doi:10.1371/journal.pbio.1000329.g002



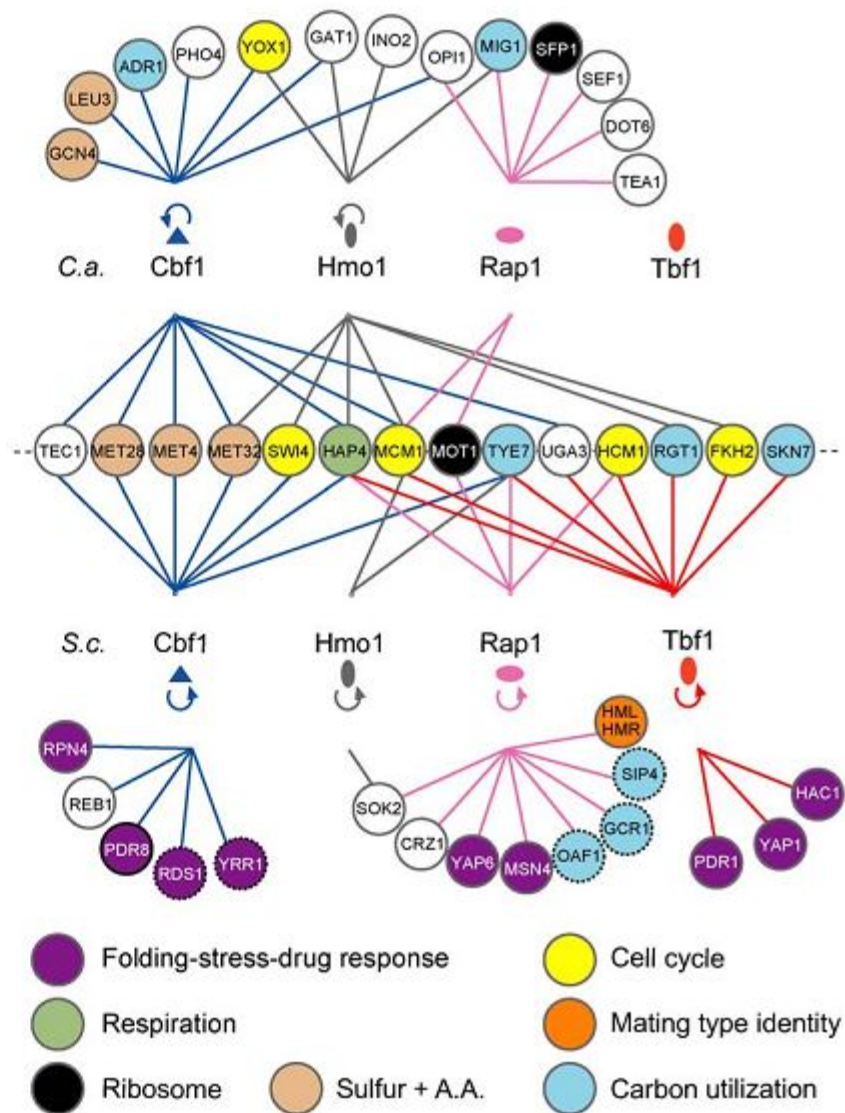
Current Opinion in Cell Biology

Regulatory network from TORC1 to ribosomal gene expression in *S. cerevisiae*. Major transcriptional regulators of rRNA, RP, and Ribi gene expression, and their regulation by the nutrient-sensitive and stress-sensitive TORC1 kinase under optimal growth conditions are indicated (upper panel). In addition, the RNAP I-dependent regulation of RNAP II and III activities is highlighted. Lower panel shows the promoter architecture under growth inhibiting conditions. The Ifh1 containing 'CURI' (CK2, Utp22, Rrp7, and Ifh1) complex, presumably localized to the nucleolus, is illustrated. Also the feedback mechanism from ribosome function to the regulation of TORC1 activity is illustrated. For simplification, not all pathway components and connections are illustrated. Question marks indicate signaling connections that are poorly understood. For further details see the main text.

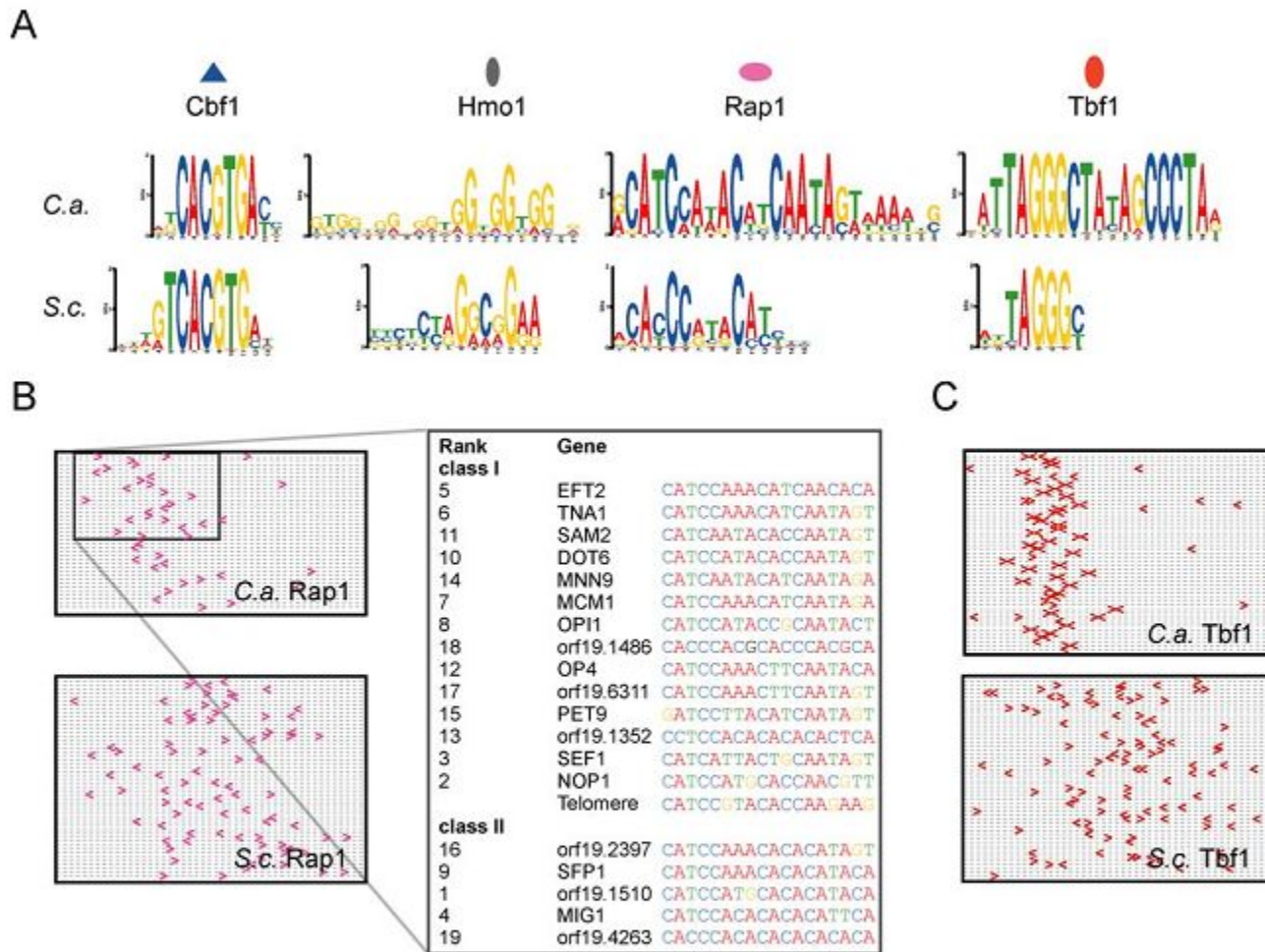
A



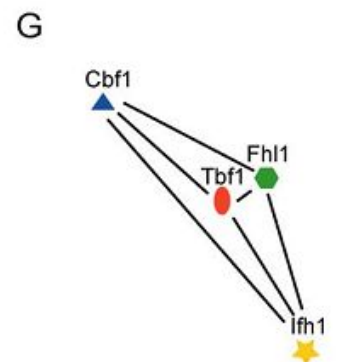
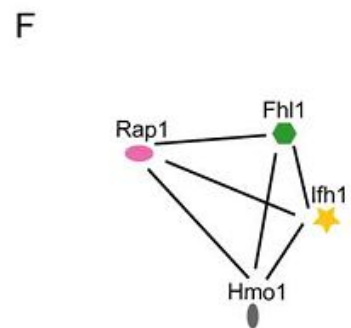
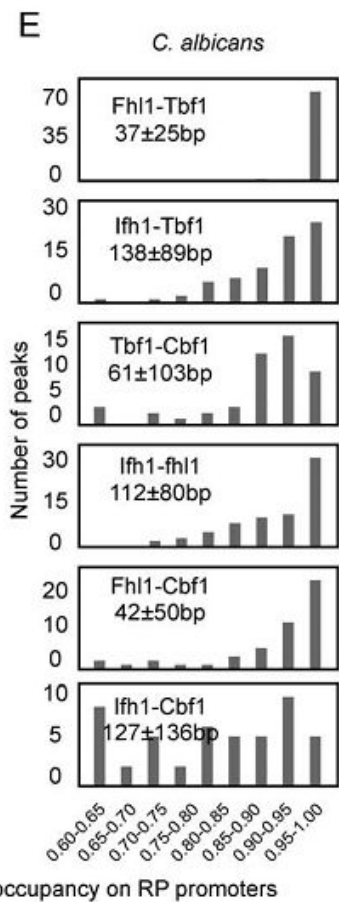
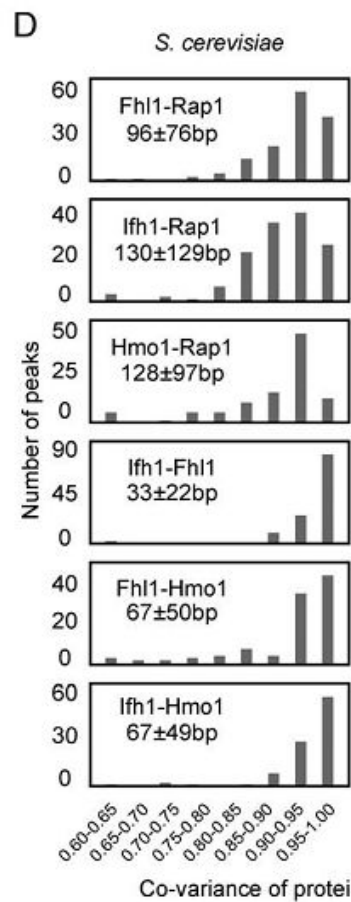
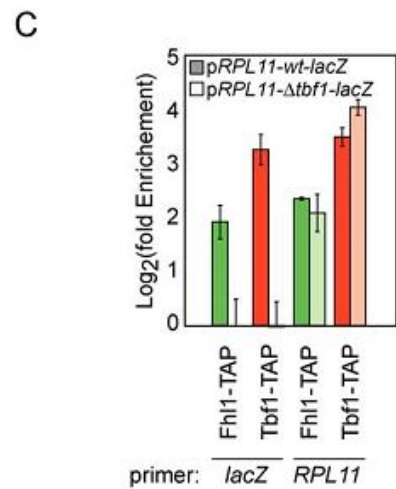
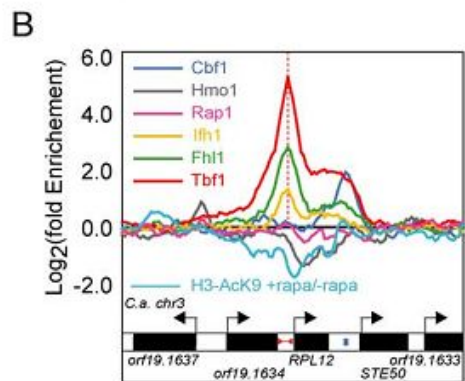
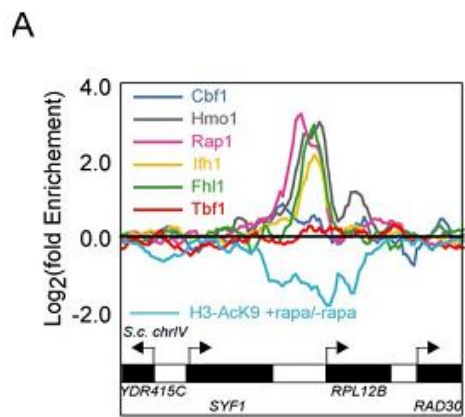
B

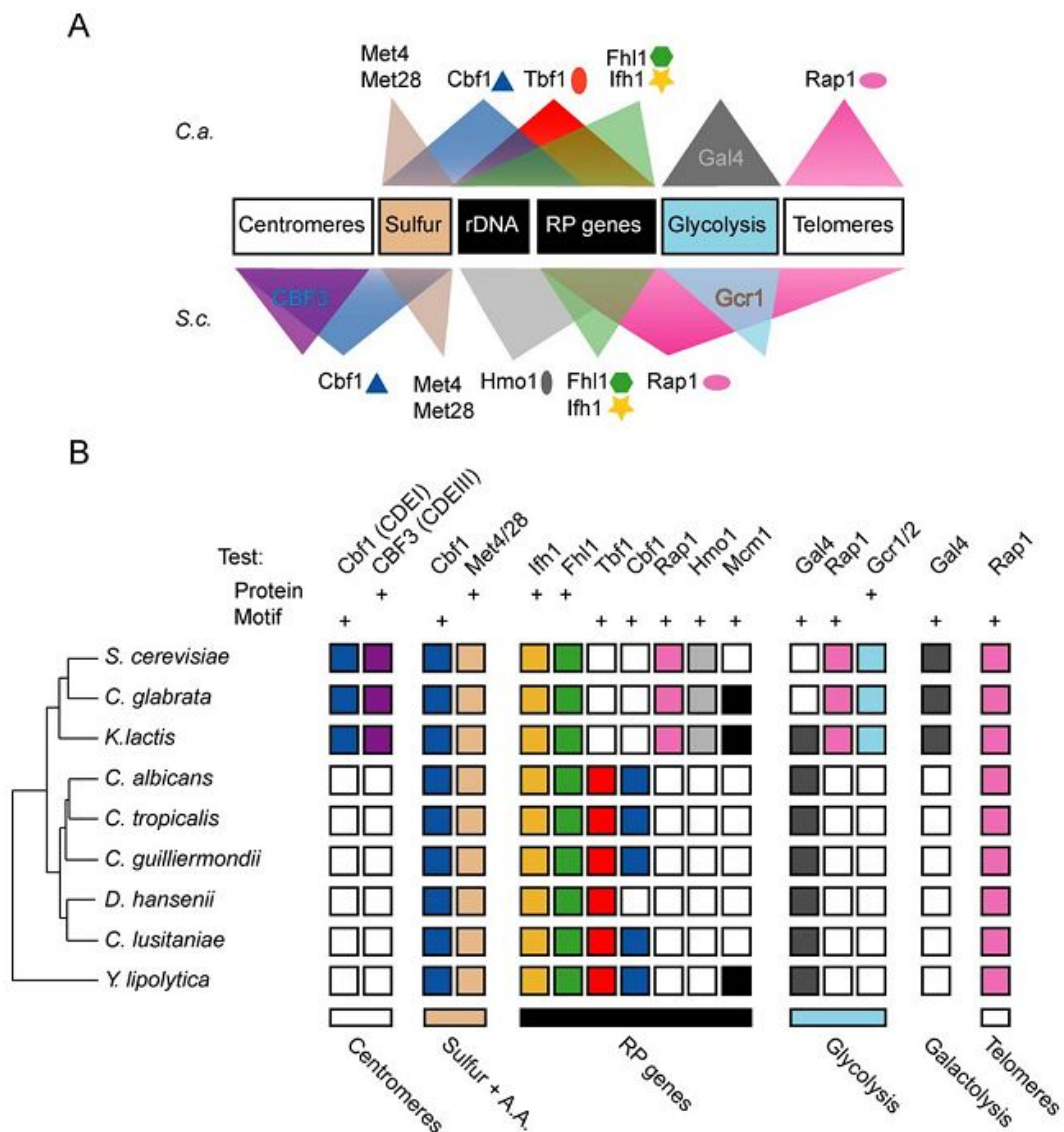


**Figure 3. Functional involvement of generalist TFs of the RP transcriptional regulatory network has drastically changed between *S. cerevisiae* and *C. albicans*.** (A) GO categories significantly enriched ( $p < 1 \times 10^{-02}$ ) in the target gene sets of each pleiotropic TF were displayed in a graph representing TF-GO interactions. A simplified representation of the regulatory interactions with major functional categories and chromosomal structures is presented between each species TF-GO interaction network. (B) Evolution of TF hierarchies between *S. cerevisiae* and *C. albicans*. A map



**Figure 4. Evolution of the DNA-binding specificities of generalist TFs.** (A) De novo prediction of DNA elements bound by each pleiotropic TF in each species with MEME [122]. (B) Representation of the positions and orientations of Rap1-bound elements in target promoters. Loci bound by *C. albicans* Rap1 yield a 16 bp consensus sequence. (C) Tbf1 has a strict requirement for a TTAGGGN6CCCTAA palindrome in *C. albicans* while TTAGGG motifs with random spacing and orientation are required for the binding of *S. cerevisiae* Tbf1.  
doi:10.1371/journal.pbio.1000329.g004





**Figure 6. Evolution of the ribosomal transcriptional regulators of fungi.** (A) Regulons and chromosomal structural elements are bound by combinations of transcription factors and co-factors that evolved between *C. albicans* and *S. cerevisiae*. (B) Simplified representation of motif enrichment and protein conservation at the different loci and biological functions bound by RP regulators in nine hemiascomycetes species. Motif enrichments were previously described [40]. Phylogenetic profile of protein conservation was derived from a recent analysis of gene conservation in the ascomycetes lineage [41].

# Genomic analysis reveals a tight link between transcription factor dynamics and regulatory network architecture

Raja Jothi<sup>1,5,\*</sup>, S Balaji<sup>2,5,6</sup>, Arthur Wuster<sup>3</sup>, Joshua A Grochow<sup>4</sup>, Jörg Gsponer<sup>3</sup>, Teresa M Przytycka<sup>2</sup>, L Aravind<sup>2</sup> and M Madan Babu<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup> Biostatistics Branch, National Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health, Research Triangle Park, NC, USA, <sup>2</sup> National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA, <sup>3</sup> MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK and <sup>4</sup> Department of Computer Science, University of Chicago, Chicago, IL, USA

<sup>5</sup> These authors contributed equally to this work

<sup>6</sup> Present address: Center for Cancer Systems Biology and Department of Cancer Biology, Dana-Farber Cancer Institute, and Department of Genetics, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA

\* Corresponding authors. R Jothi: Biostatistics Branch, National Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health, 111 TW Alexander Drive, MD A3-03, Research Triangle Park, NC 27709, USA. Tel.: + 1 919 316 4557; Fax: + 1 301 541 4311; E-mail: jothi@mail.nih.gov or MM Babu, MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge CB20QH, UK. Tel.: + 44 (0)1223 402208; Fax: + 44 (0)1223 213556; E-mail: madanm@mrc-lmb.cam.ac.uk

Received 18.11.08; accepted 7.6.09