

- Все клетки содержат одинаковую генетическую информацию (геном) и общий план строения

Но!!! Различные клетки имеют:

- структурные особенности,
- набор белков (протеином),
- специфические функции

Парадигма молекулярной биологии



Тема лекции

Регуляция экспрессии генов

Зачем необходима регуляция экспрессии генов?

- **Позволяет приспособить организм к изменяющимся условиям среды.**
- **В клетке в каждый момент ее существования должны синтезироваться и функционировать только необходимые белки и в нужном количестве.**

Особенности экспрессии генов

(1)

Прокариоты	Эукариоты
Число структурных генов невелико (~4000 у кишечной палочки)	Число структурных генов огромное (у человека 30 000 пар)
Активно до 95% генов	Активно до 10% генов
Форма организации генов - оперон	Форма организации генов – кластеры, повторяющиеся гены
Структурные гены состоят, в основном, из кодирующих последовательностей	Структурные гены состоят из экзонов и интронов (мозаичные гены)
Регуляция экспрессии, в основном, происходит на уровне транскрипции	Регуляция экспрессии происходит на всех уровнях, существует много

Особенности экспрессии генов

(2)

Прокариоты	Эукариоты
Координированная регуляция экспрессии (принцип – все или ничего)	Комбинационная регуляция экспрессии генов на разных уровнях с использованием разных механизмов
Преобладает негативный контроль регуляции	Преобладает позитивный контроль регуляции
РНК-полимераза непосредственно присоединяется к промотору и начинает транскрипцию	РНК-полимераза присоединяется к транскрипционному комплексу из специальных белков
Структурные гены (мРНК) имеют полицистронное строение	Структурные гены (мРНК) имеют моноцистронное строение
мРНК нестабильная, кратко живущая и быстро разрушается	мРНК длительно сохраняет свою стабильность, может временно инактивироваться

Типы генов (1)

- **Конститутивные («гены домашнего хозяйства»)** – постоянно включены (гены тРНК, рРНК, ДНК-полимеразы, гистонов, рибосомальных белков и др.)
- **Индукцибельные («гены роскоши»)**– функционируют на определенных этапах онтогенеза (гены, контролирующие ход онтогенеза, и гены, определяющие структуру и функции клеток и организма, в целом)

Типы генов (2)

- **Структурные гены** – несут информацию о белках.
- **Функциональные гены:**
 - гены, регулирующие работу структурных генов (гены-операторы и гены-регуляторы)
 - гены, усиливающие или ослабляющие действие структурных генов (гены модуляторы)

Теория регуляции активности генов Жакоба и Моно (1961 г)

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



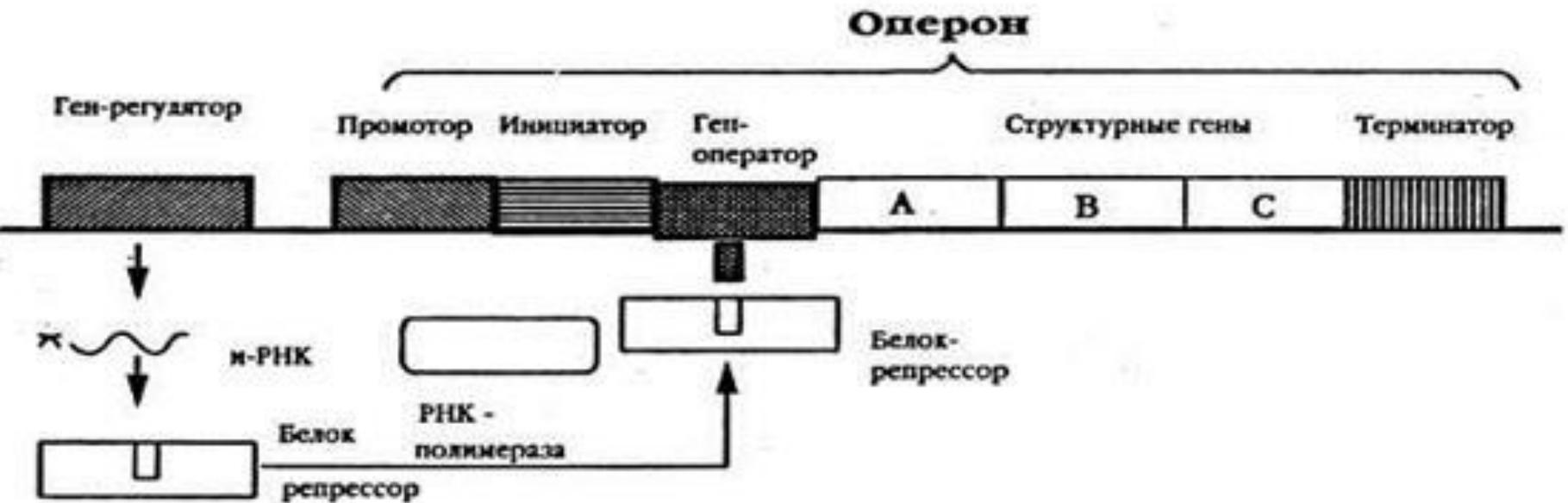
Ж.Моно



Ф.Жакоб

Нобелевская премия по физиологии и медицине, 1965 г

Транскрипционная единица у прокариот



Разберемся в терминах...

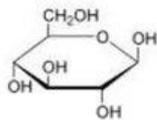
- **Гены-операторы** включают и выключают структурные гены для транскрипции (активны непостоянно).
- **Гены-регуляторы** кодируют синтез белка репрессора (активны постоянно)
- **Белок-репрессор** может связываться с геном-оператором и блокировать транскрипцию гена (т.е. оперон «не работает»)
- **Индуктор** – молекула, которая связывается с белком репрессором

Типы регуляции

Тип	Механизм	Результат
Негативная регуляция	Индуктор инактивирует белок-репрессор	Транскрипция происходит
	Индуктор активирует белок-репрессор	Транскрипция не происходит
Позитивная регуляция	Индуктор активирует белок-активатор	Транскрипция происходит
	Индуктор инактивирует белок-активатор	Транскрипция не происходит

Пример негативной регуляции

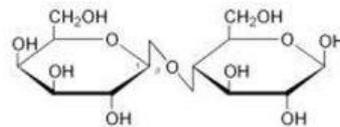
Лак-оперон



D-Глюкоза

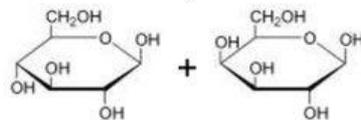
Основной источник энергии для бактерий

При замене глюкозы на лактозу в бактериях появляются 3 фермента



Лактоза

β-галактозид пермеаза – обеспечивает проникновени лактозы в клетку
β-галактозидаза (гидролаза) – гидролизует O-гликозидную связь
β-галактозид трансацетилаза (трансфераза) – ацетилирует лактозу



Механизм негативной регуляции

- При отсутствии индуктора белок-репрессор блокирует оператор и оперон неактивен.
- Если в клетку поступает индуктор (например, лактоза), то он связывается с белком репрессором и освобождает ген-оператор.
- Информация с гена переписывается в мРНК, которая переносится на рибосомы, где происходит синтез ферментов для расщепления молекул индуктора.
- Расщепление последних молекул индуктора освободит белок-репрессор, который снова блокирует ген-оператор, и работа оперона прекращается.

Схема работы лактозного оперона

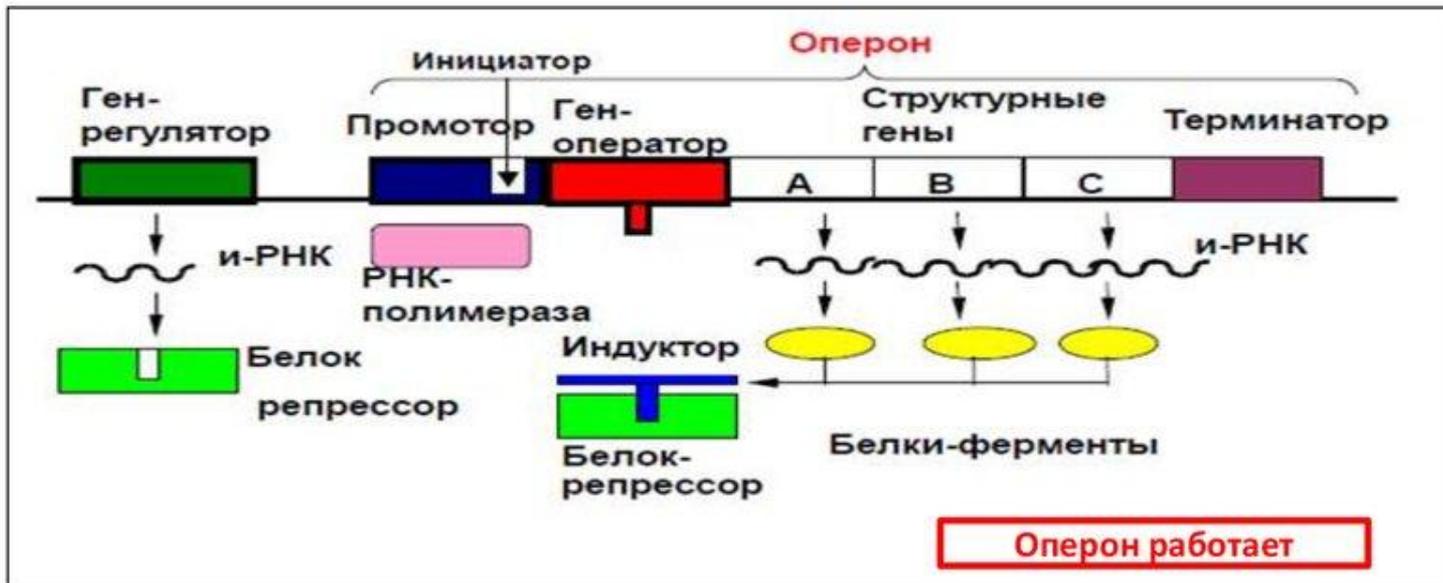
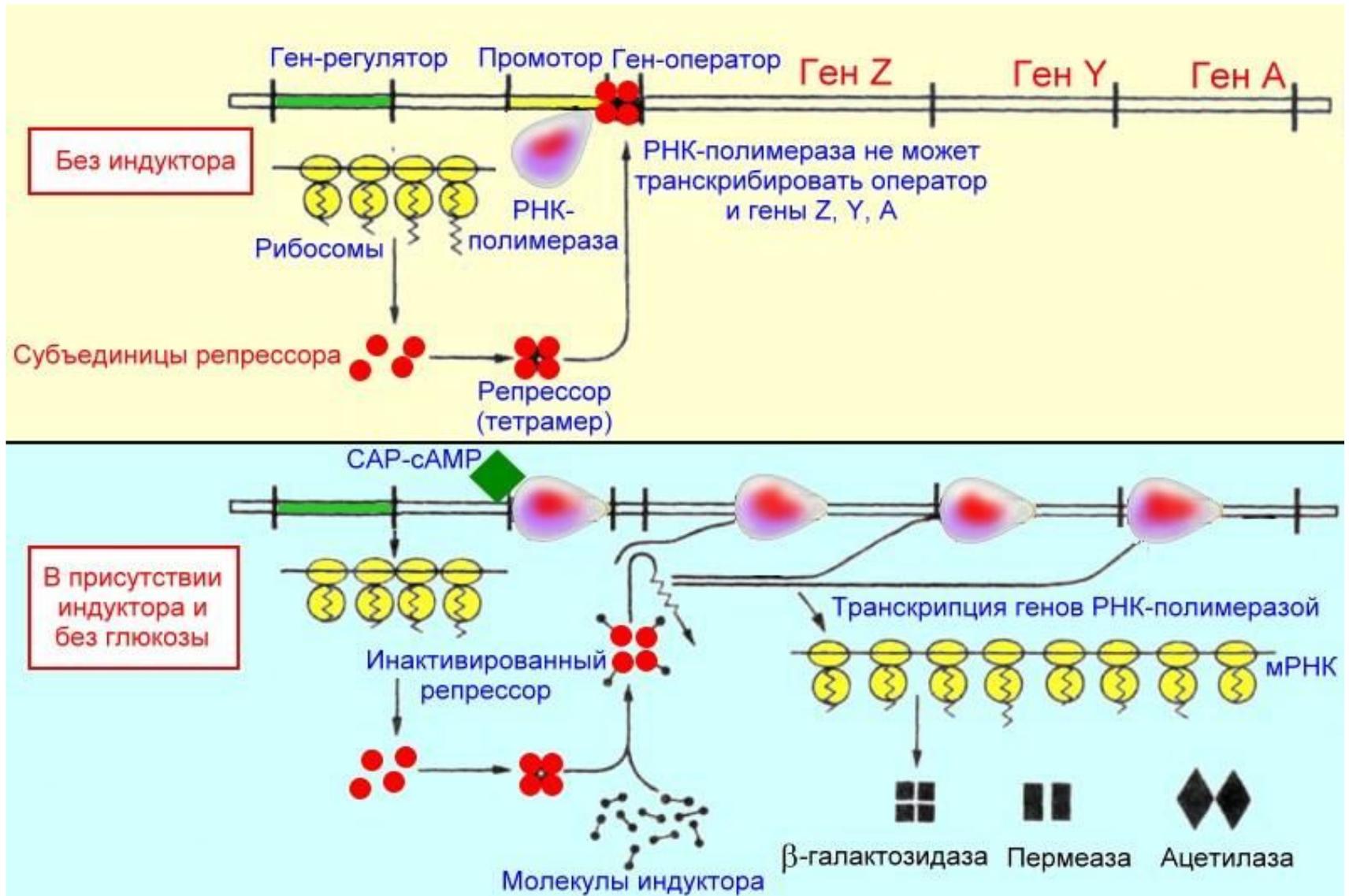


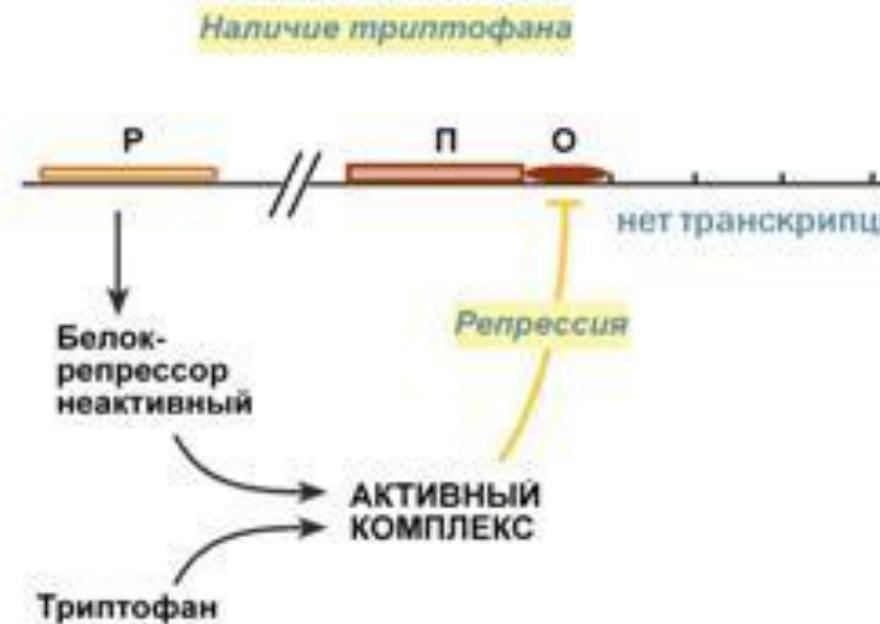
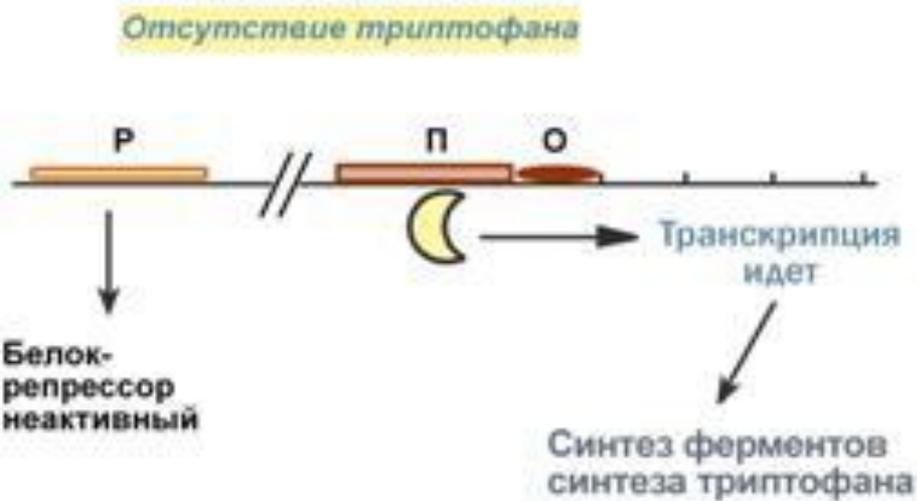
Схема работы лактозного оперона



Механизм регуляции на примере триптофанового оперона (1)

- Синтез триптофановых ферментов контролируются содержанием триптофана в клетке.
- Белок-репрессор блокирует ген-оператор только в комплексе с индуктором. При отсутствии триптофана ген-оператор свободен и информацию переписывается с гена и транслируется на рибосомах, обеспечивая синтез необходимых ферментов.
- При появлении избытка триптофана в среде, молекулы избыточного триптофана связываются с белком-репрессором и, вместе блокируют ген-оператор.
- Таким образом, триптофан может работать как ко-репрессор, активирующий белок-репрессор.

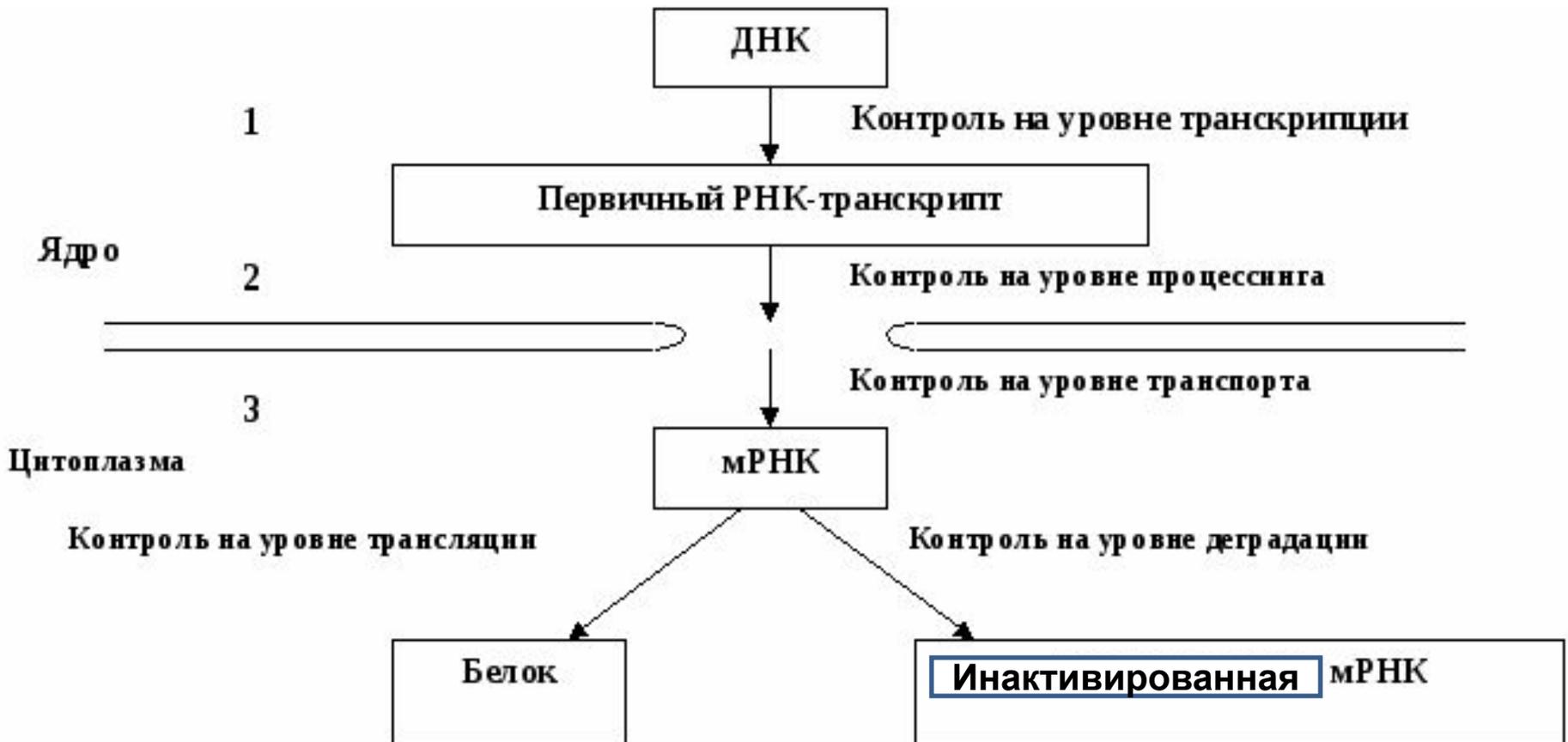
Механизм регуляции на примере триптофанового оперона (2)



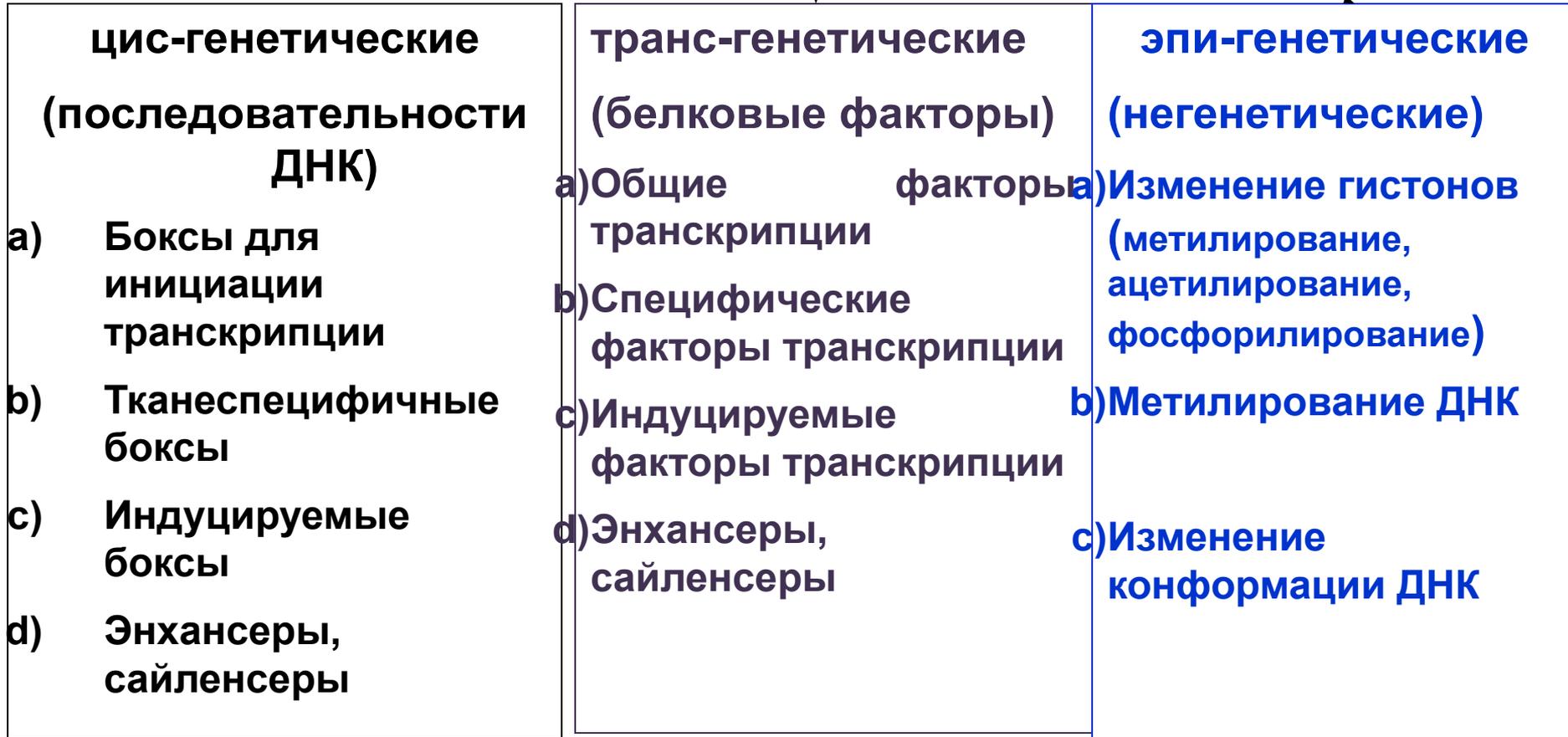
Регуляция активности генов у эукариот

- Схема регуляции была разработана Г.П.Георгиевым (1972).
- Принцип регуляции (по типу обратной связи) сохраняется, но механизмы регуляции намного сложнее.
- Единица транскрипции – транскриптон.
- Регуляция осуществляется на нескольких уровнях при участии различных факторов (цис-факторы, транс-факторы и эпигенетические факторы)
- Индукторы у эукариот – это более сложные молекулы (например, гормоны), для их расщепления необходимо несколько ферментов и реакции протекают в несколько этапов.

Регуляция активности генов у эукариот происходит на уровнях:



Факторы контроля экспрессии генов



Уровни контроля экспрессии генов

Претранскрипционный – деконденсация ДНК, изменения гистонов, деметилирование ДНК (эпигенетический, обратимый, генетически обусловленный)

Транскрипционный – определение промотора, образование комплекса инициации, уровень транскрипции

Посттранскрипционный – процессинг РНК, альтернативный сплайсинг, редактирование мРНК, перенос мРНК в цитоплазму

Трансляционный – выбор матрицы, образование комплекса инициации, контроль качества полипептида, стабильность мРНК

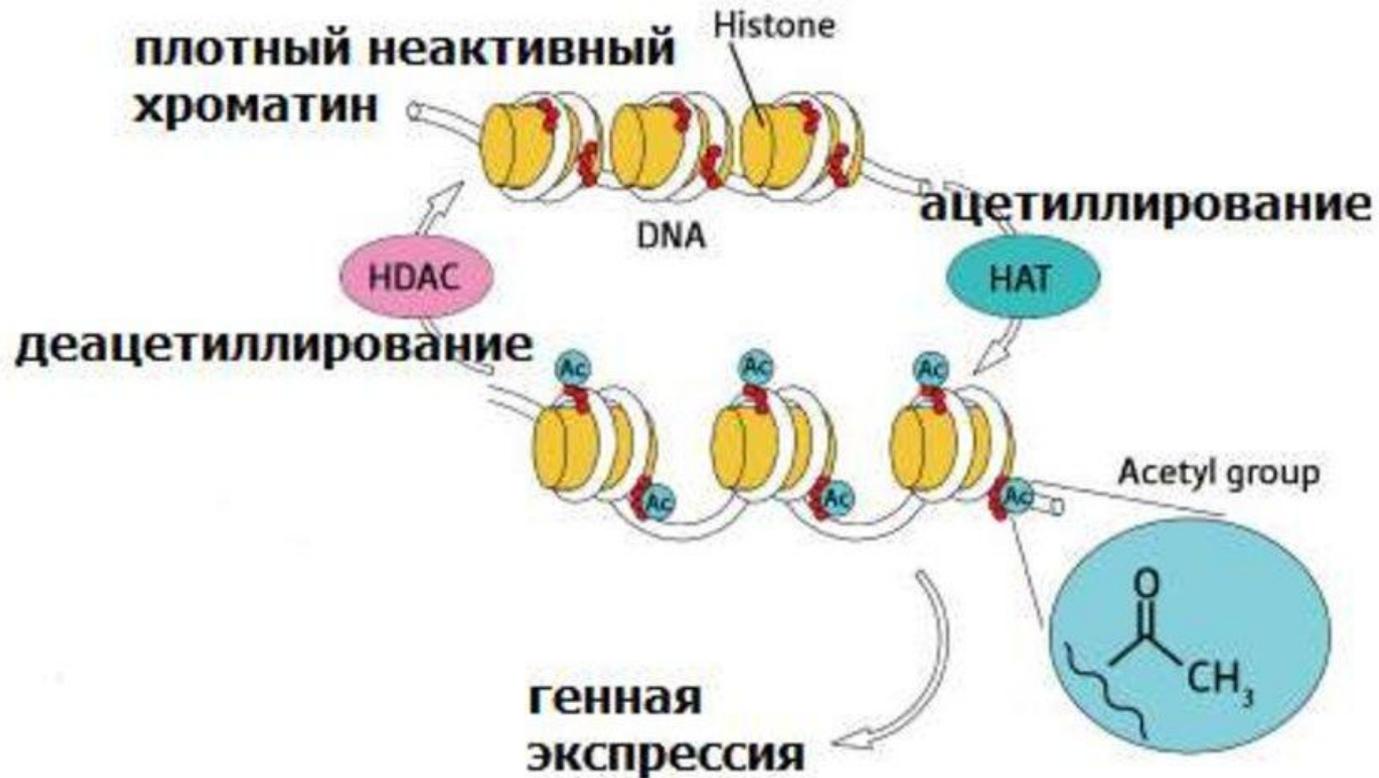
Посттрансляционный – процессинг полипептида, перенос белков к месту назначения

Претранскрипционный контроль

1. Изменение гистонов:

- метилирование H_3 (Lys₄) – активация генов
- метилирование H_3 (Lys₉) – уменьшение уровня транскрипции
- ацетилирование гистонов – деконденсация хроматина
- деацетилирование гистонов – конденсация хроматина
- фосфорилирование H_1 – упаковка хроматина
- дефосфорилирование H_1 – деконденсация хроматина

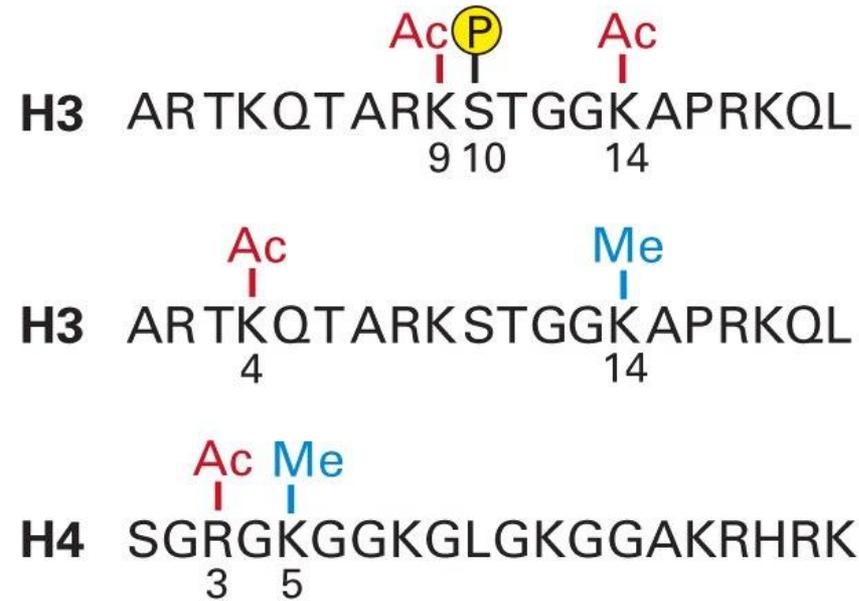
Ацетилирование гистонов



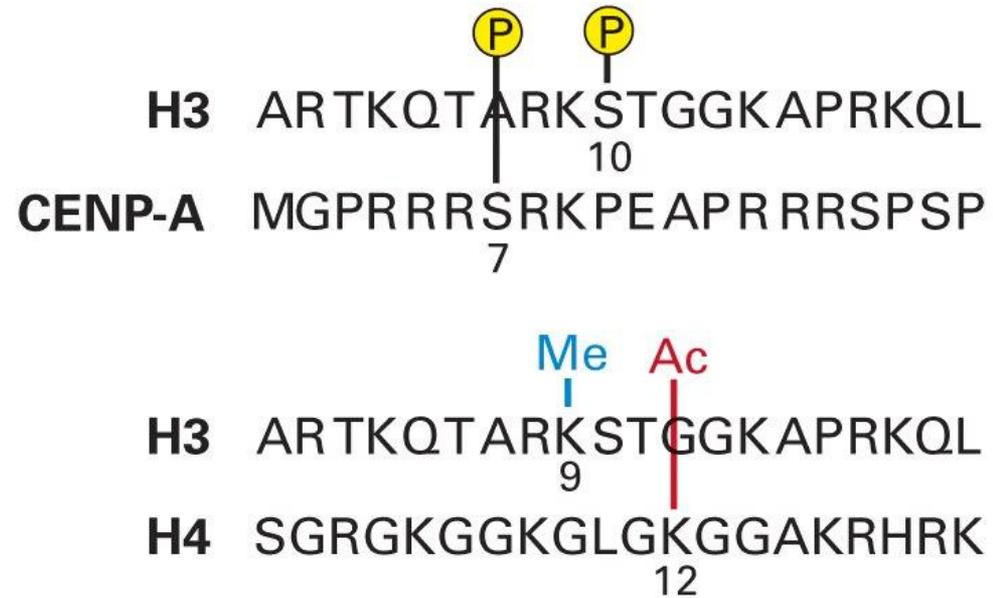
Гистон ацетилаза

Гистон деацетилаза

Euchromatin (active/open)



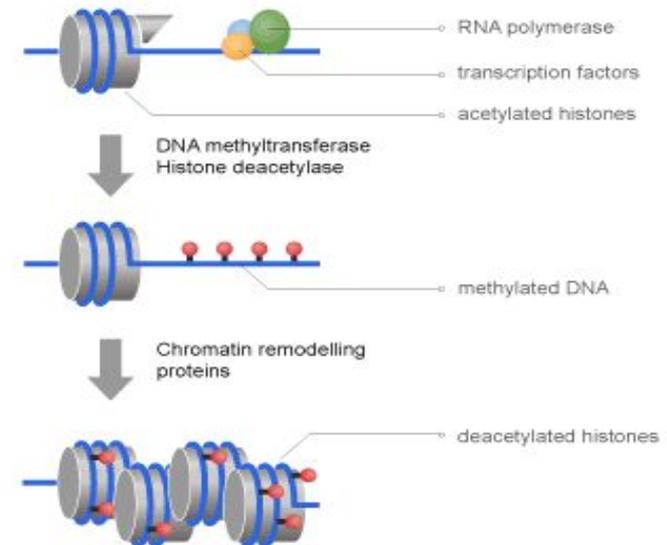
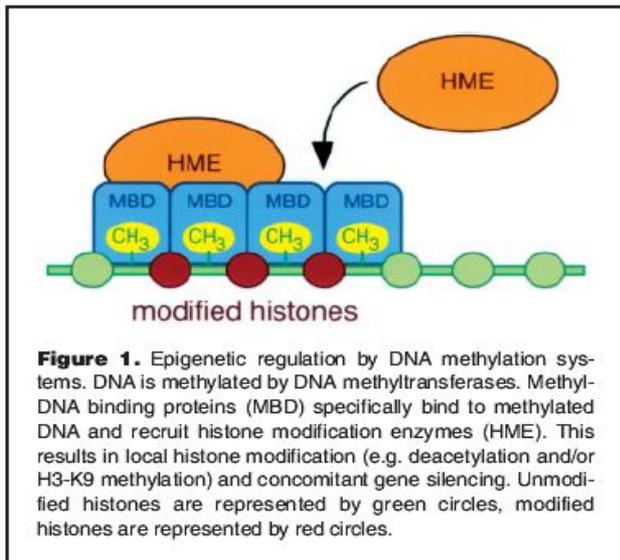
Heterochromatin (inactive/condensed)



Претранскрипционный контроль

2. Метилирование ДНК (островки 5MeCpG , обычно в промоторе) – инактивация транскрипции.

!!! Метилирование ДНК деацетилирование гистонов
репрессия транскрипции



3. Изменение конформации ДНК:

форма В форма Z блокирование гена (кроме промотора)

- **Активные гены расположены в гиперацетилированном хроматине, неактивные – в гипoaцетилированном**
 - **-При онкологических заболеваниях и вирусных инфекциях нарушается свойственный нормальной клетке баланс между ацетилированием и деацетилированием гистонов**
- **С возрастом снижается уровень ацетилирования гистонов**

Транскрипционный контроль

- один из основных уровней,
- осуществляется при участии факторов транскрипции и модуляторных последовательностей,
- характеризуется двумя механизмами:
 - - негативный контроль
 - - позитивный контроль.

Контроль транскрипции

!!! Активация генов при помощи специфических факторов транскрипции

!!! Образование комплекса инициации

!!! Контроль уровня транскрипции

Инициация транскрипции у эукариот

Общие факторы инициации транскрипции РНК-полимеразы II

Для инициации транскрипции РНК-полимеразе
требуется вспомогательные факторы

Гомология
с σ -субъединицей
бактериальной
РНК-полимеразы

Базальные факторы транскрипции

TFIIA – 3 субъединицы

TFIIB – 1 полипептид

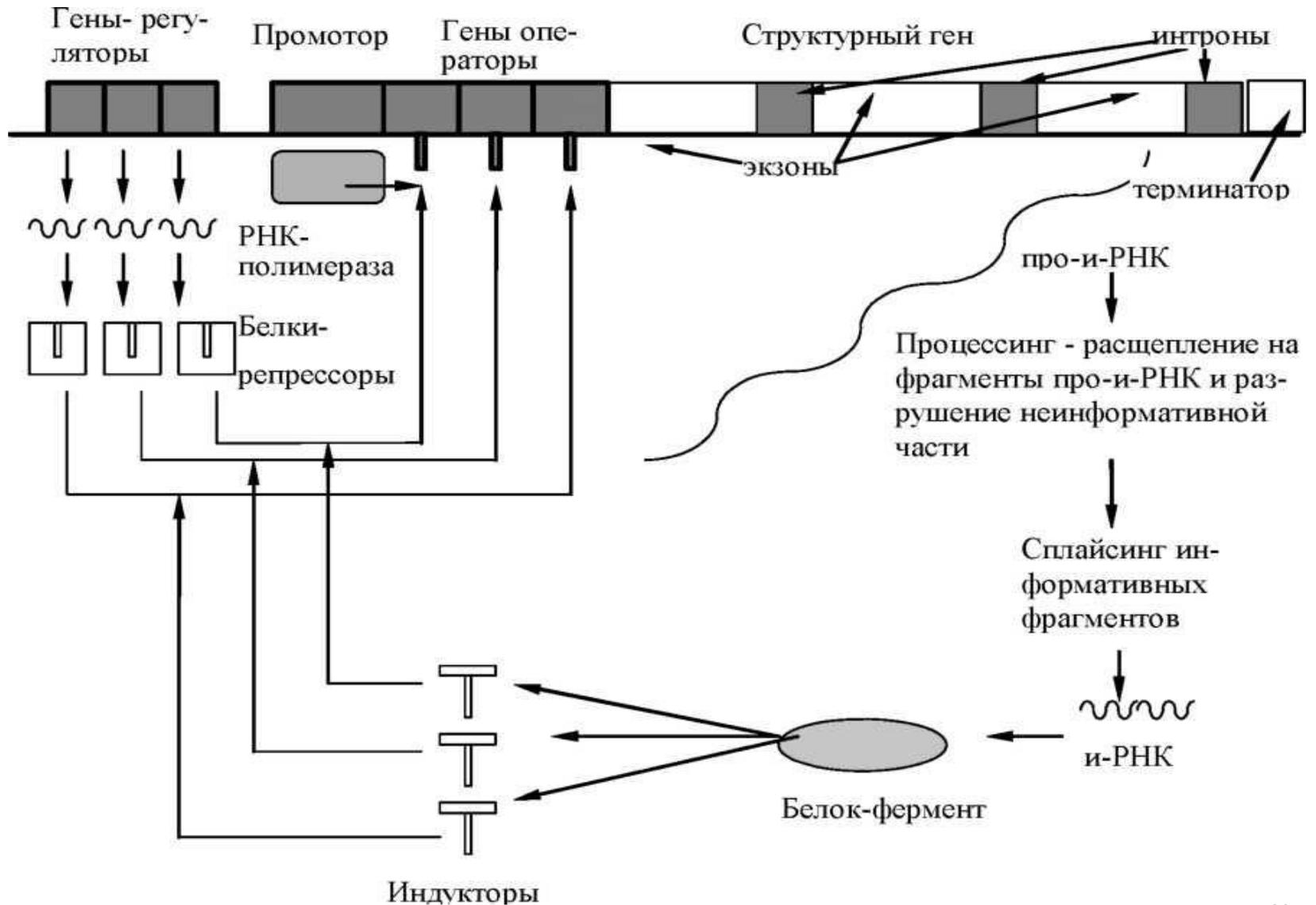
TFIID – до 17 субъединиц

TFIIE – 4 субъединицы

TFIIF – 2 субъединицы

TFIIH – 10 субъединиц

Схема транскриптона



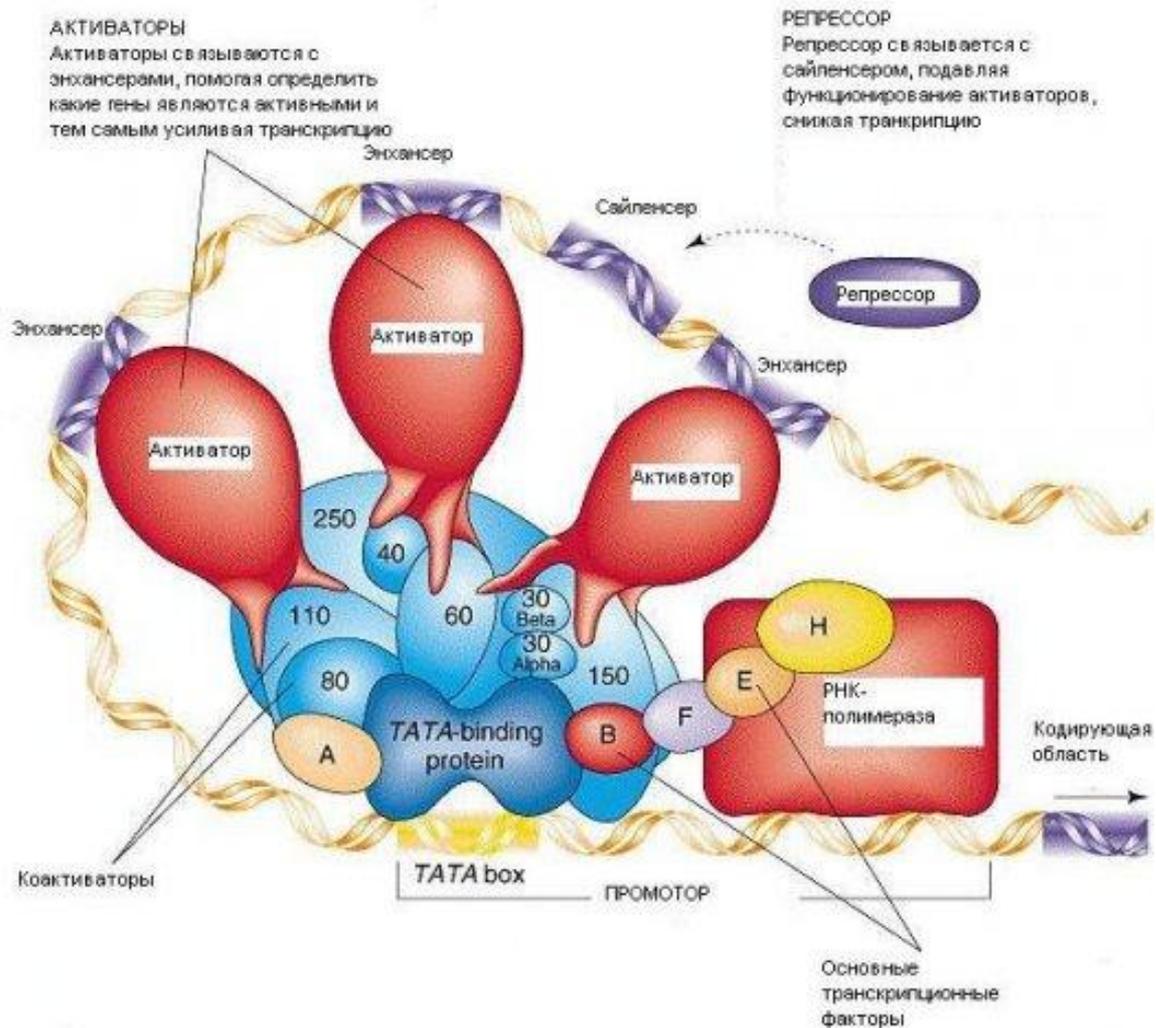
Регуляции транскрипции у эукариот

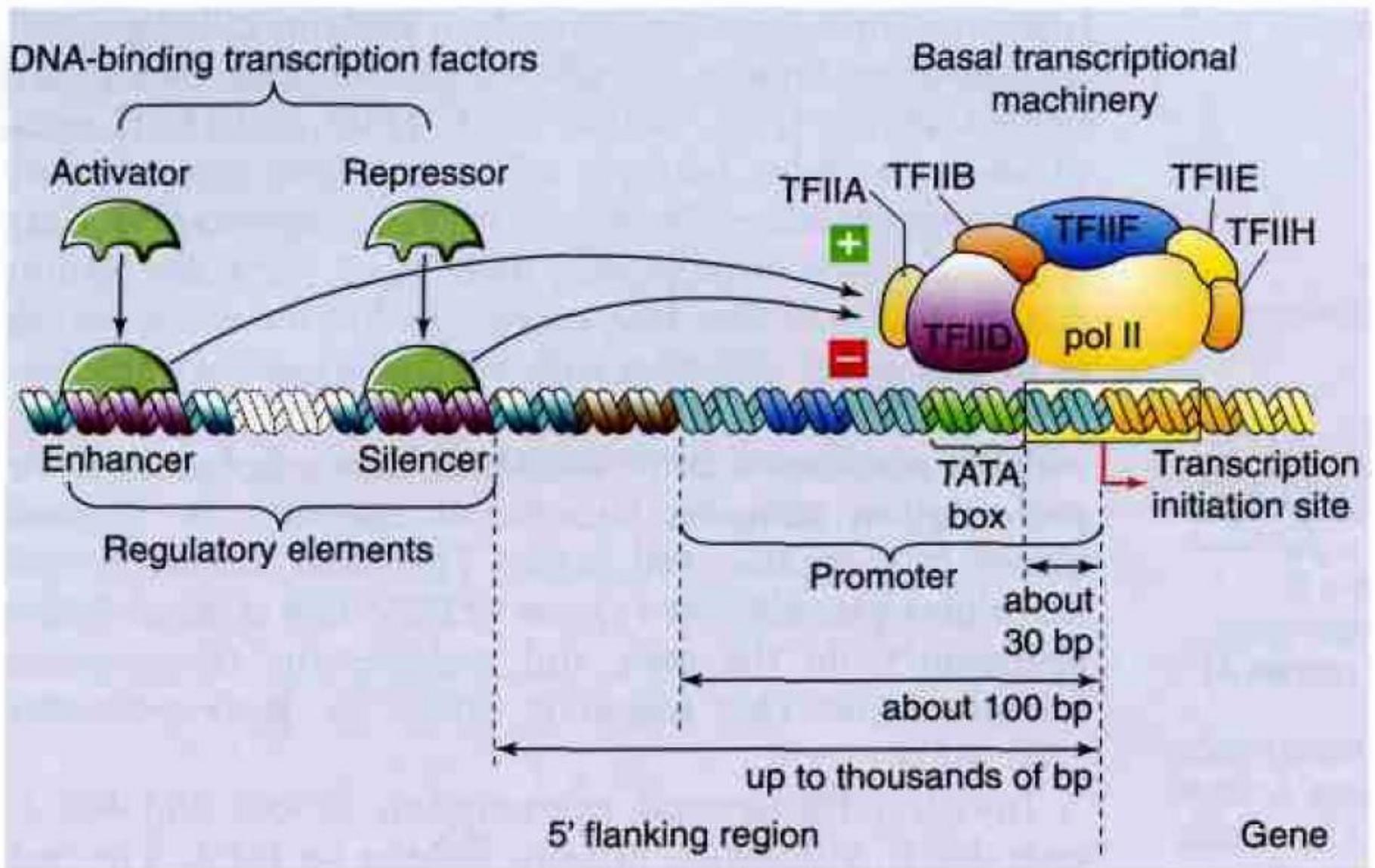
- Работу транскриптона регулируют несколько генов-регуляторов
- Индукторами могут быть сложные белки, например гормоны
- РНК-полимераза начинает транскрипцию только при наличии специальных факторов транскрипции, которые распознают промотор

Усиление и ослабление транскрипции

- Эnhансеры – участки ДНК вне промотора, которые связываются с определенными факторами транскрипции и усиливают ее.
- Сайленсеры – участки ДНК вне промотора, которые связываются с определенными белками и подавляют транскрипцию, разрушая факторы транскрипции

Адаптивная регуляция транскрипции у эукариот





Посттранскрипционный контроль

- осуществляется после транскрипции;
- характеризуется следующими механизмами:
 - - процессинг и сплайсинг,
 - - инаktivация мРНК,
 - - редактирование мРНК,
 - - селективная деградация мРНК.

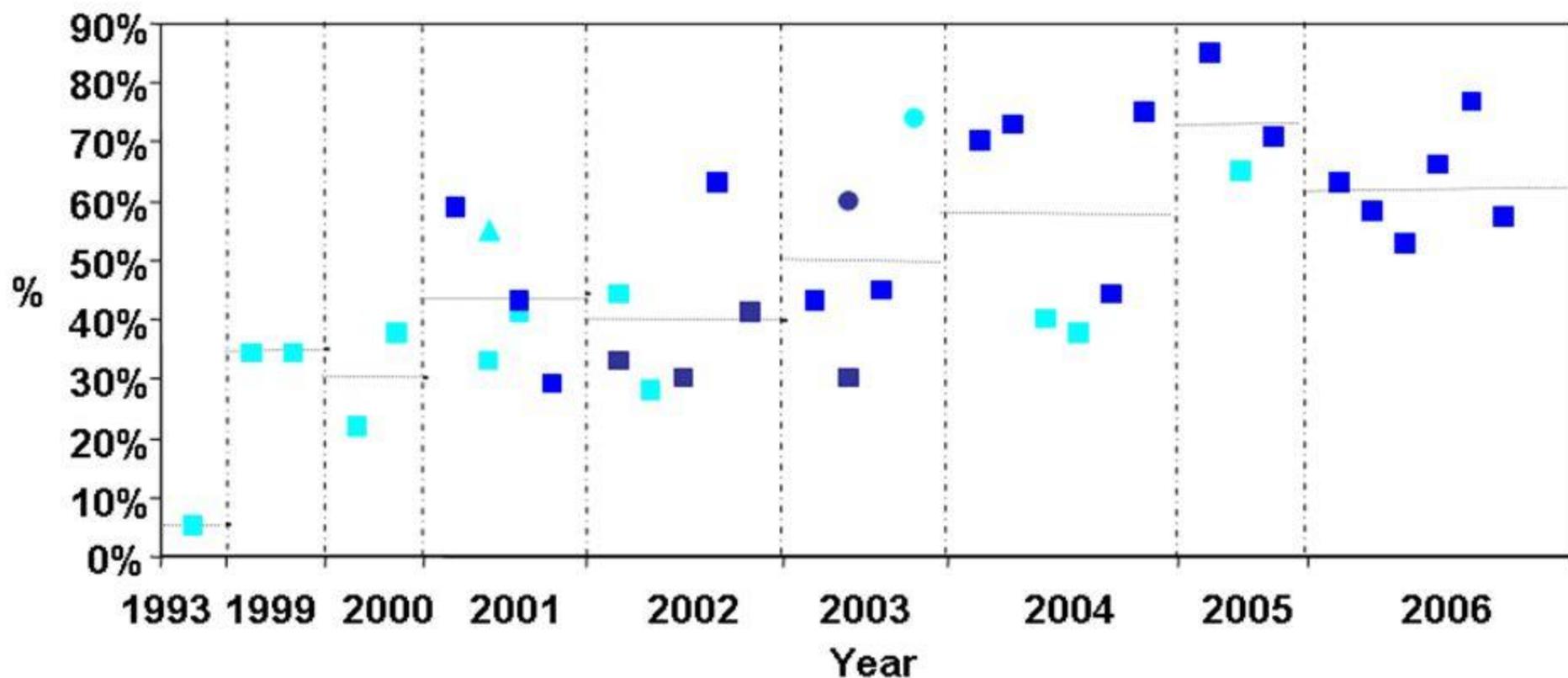
EDAS: альтернативный сплайсинг генов человека

20809 генов;
114568 мРНК;
91835 белков;
51713 альтернатив,
из них 31746
элементарных

The screenshot displays the EDAS (EST-Derived Alternative Splicing Database) interface in a Microsoft Internet Explorer browser window. The main content area shows the gene **COL16A1** on **Chromosome 1**. A genomic map displays exons as vertical bars and introns as lines. A legend below the map identifies supporting evidence: brown bars for Protein(s), blue bars for ESTs from several clone libraries, green bars for mRNA(s), and red bars for ESTs from a single clone library. A 'View in scale' button is present. Below the map, the 'Confirmation level' is set to 'Optimized'. The 'Alternatives' section contains a table with the following data:

Alternative description	Coordinates	Observation level
Cassette type alternative is observed between 212 and 3934	212,1822..1928,3934, 212,3934,	Observed on the level of mRNA(s) Observed on the level of 1 EST(s) library
Cassette type alternative is observed between 24007 and 24364	24007,24364, 24007,24198..24245,24364,	Observed on the level of 3 EST(s) library Observed on the level of protein(s)
Cassette type alternative is observed between 32434 and 35194	32434,35194, 32434,33403..33447,35194,	Observed on the level of 1 EST(s) library Observed on the level of protein(s)
Donor site type alternative is observed between 38431 and 38815	38431..38466,38815, 38431..38545,38815,	Observed on the level of protein(s) Observed on the level of 1 EST(s) library

Оценки % альтернативно сплайсируемых генов млекопитающих (по году публикации)



■ Человек (выборка из генома)

■ Все гены

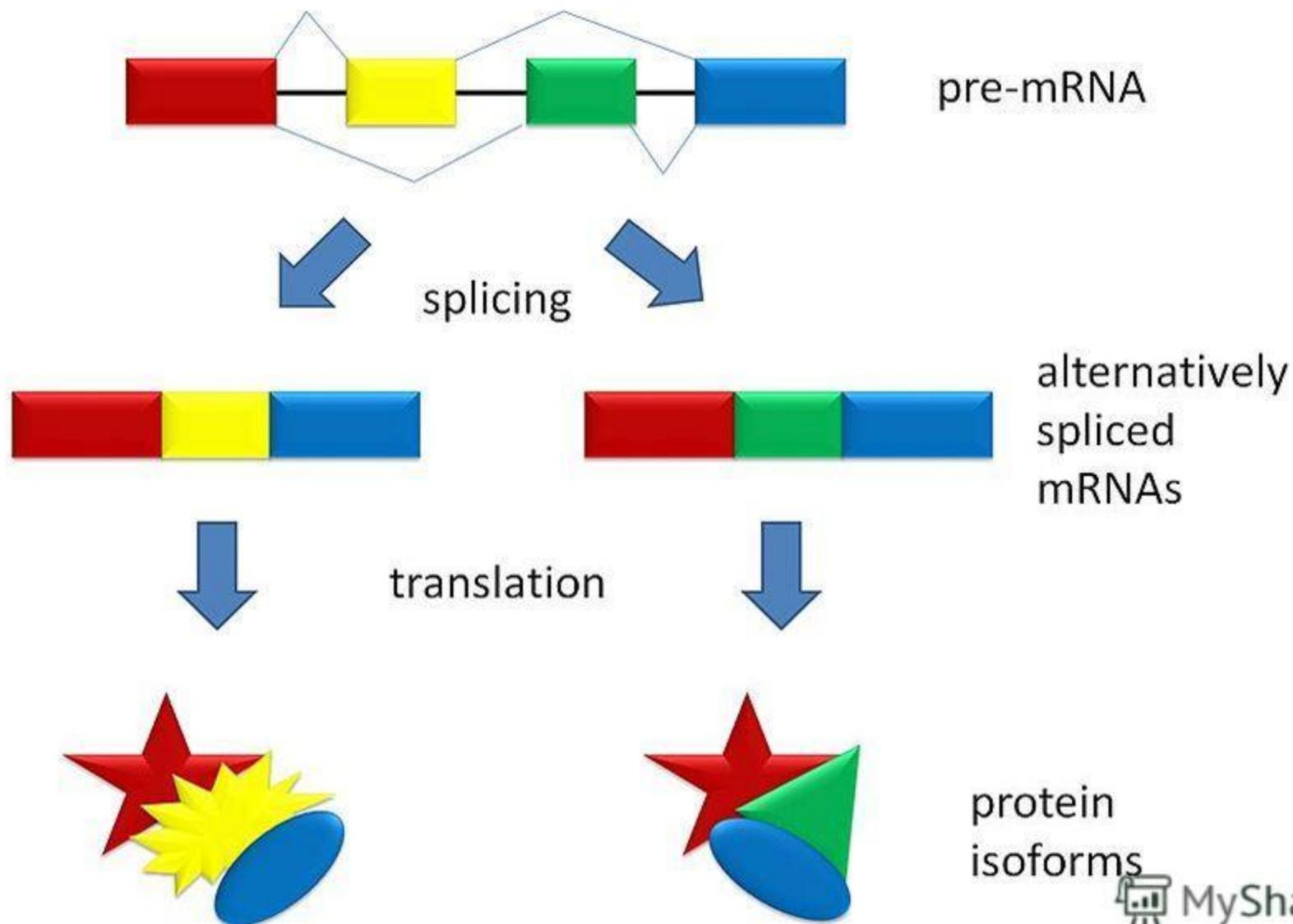
■ Человек (полные хромосомы)

● Только гены с ≥ 2 экзонами

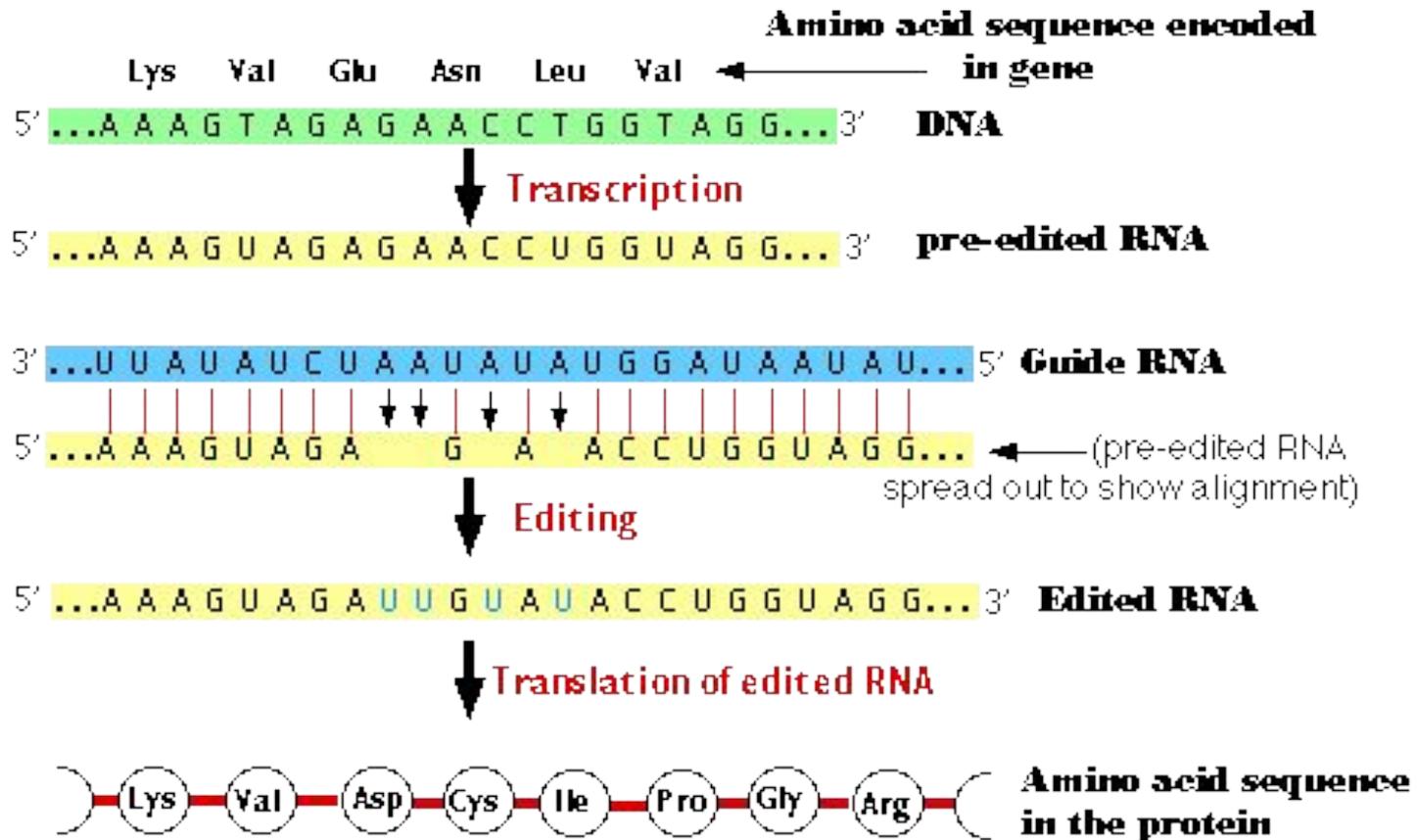
■ Мышь (выборка из генома)

▲ Гены с высоким покрытием EST

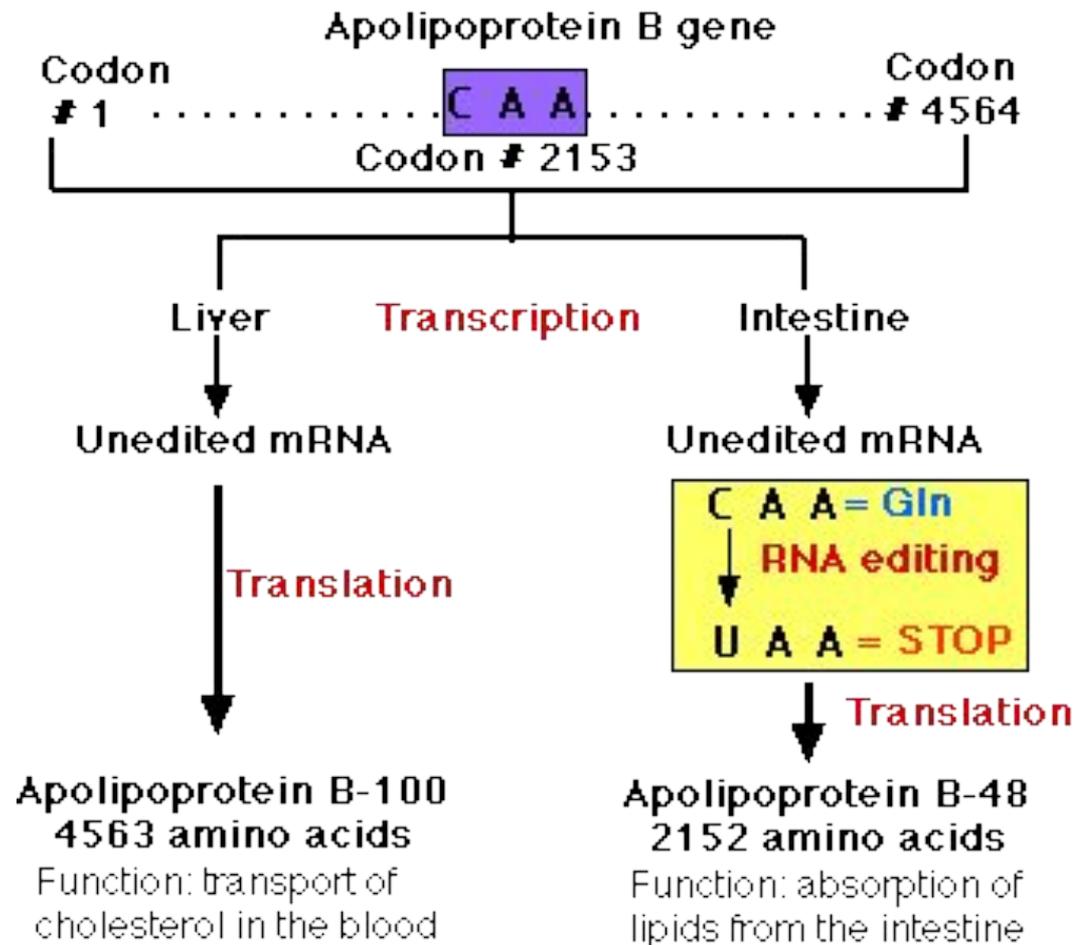
Альтернативный сплайсинг приводит к появлению изоформ белков



Посттранскрипционные изменения мРНК (редактирование мРНК)



Посттранскрипционные изменения мРНК



Трансляционный контроль

- Выбор мРНК для трансляции
- Локализация мРНК в цитоплазме
- Количество рибосом
- Нетранслируемый участок
- Факторы трансляции

Факторы трансляции

Инициация

eIF-2 - активирует комплекс Met-ARNt_{met}

eIF-3 – обеспечивает присоединение 40S к мРНК

eIF-4A – распознает Кэп мРНК

eIF-4B – обеспечивает стабильность мРНК

eIF-5 – обеспечивает присоединение 60S субчастицы

eIF-6 – предупреждает преждевременное присоединение 60S к 40S

Элонгация

eEF-1 α – присоединение аминоацит-тРНК к рибосоме

eEF-1 $\beta\gamma$ – гидролиз ГТФ

eEF-2 – транслокация рибосомы

Терминация

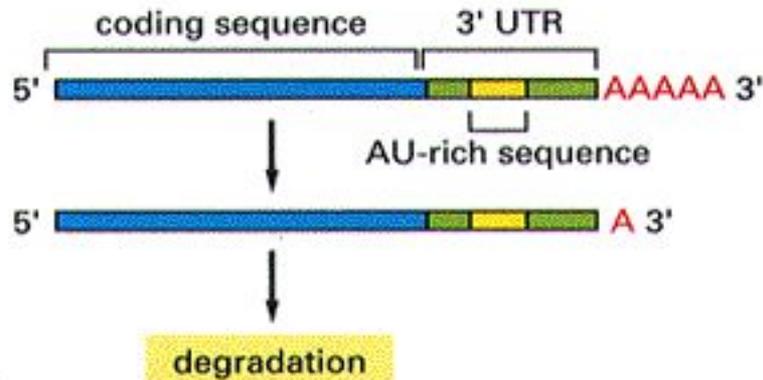
RF-1 – распознает кодоны STOP UAA și UAG

RF-2 – распознает кодоны STOP UGA și UAA

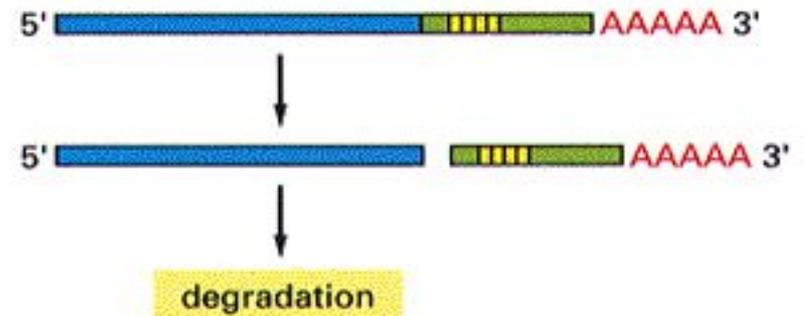
RF-3 – контролирует работу RF-1 și RF-2.

Механизмы деградации мРНК

TWO MECHANISMS OF EUKARYOTIC mRNA DECAY



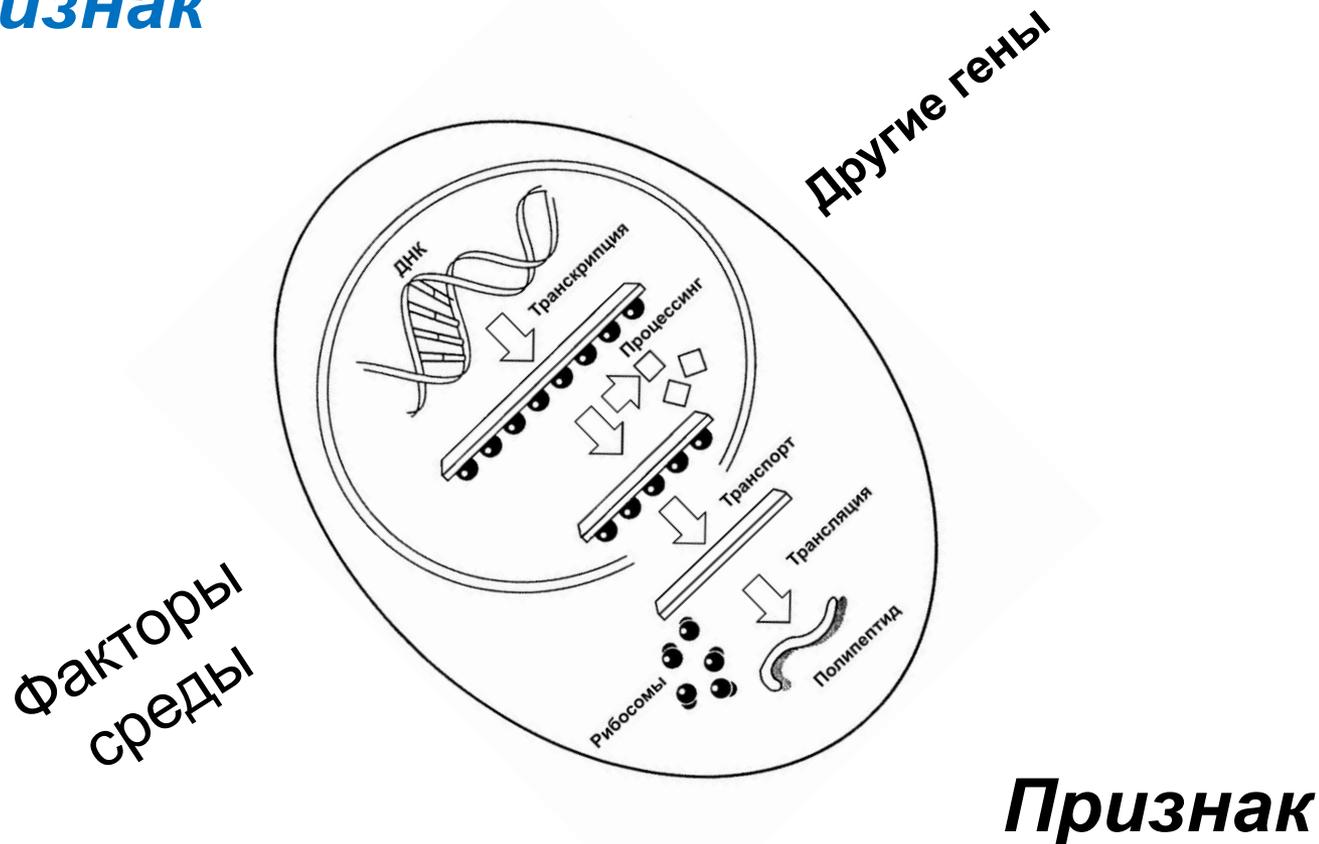
an evolutionarily conserved 50-nucleotide AU-rich sequence in the 3' UTR promotes the removal of the poly-A tail and causes the mRNA to become unstable



a repeated sequence in the 3' UTR promotes cleavage of the 3' UTR by a specific endonuclease. The fragments are rapidly degraded

Механизмы реализации генетической информации у эукариот

- *ДНК-мРНК-белок- биохимическая реакция-признак*

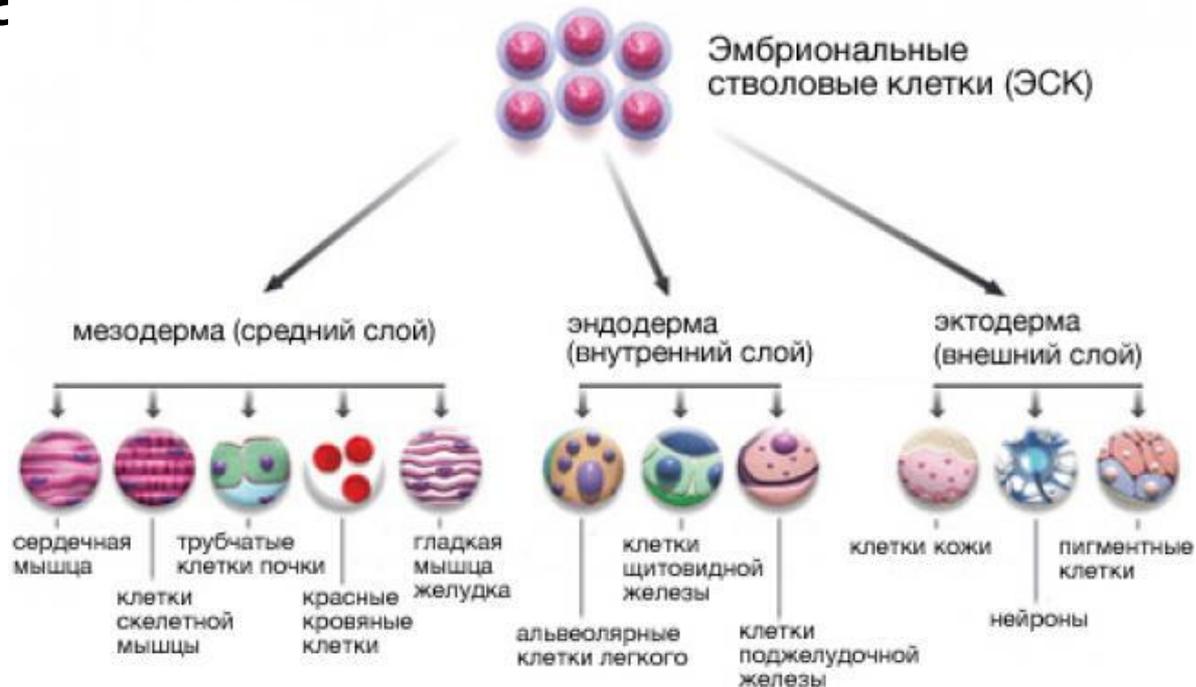


Представим себе возможный механизм дифференцировки стволовых клеток...

- Недифференцированные клетки имеют в цитоплазме разные молекулы-индукторы
- Молекулы индукторы активируют разные транскриптоны, что приводит к синтезу разных ферментов.
- Эти разные ферменты запускают разные процессы и синтез различных белков, в том числе тканеспецифических.

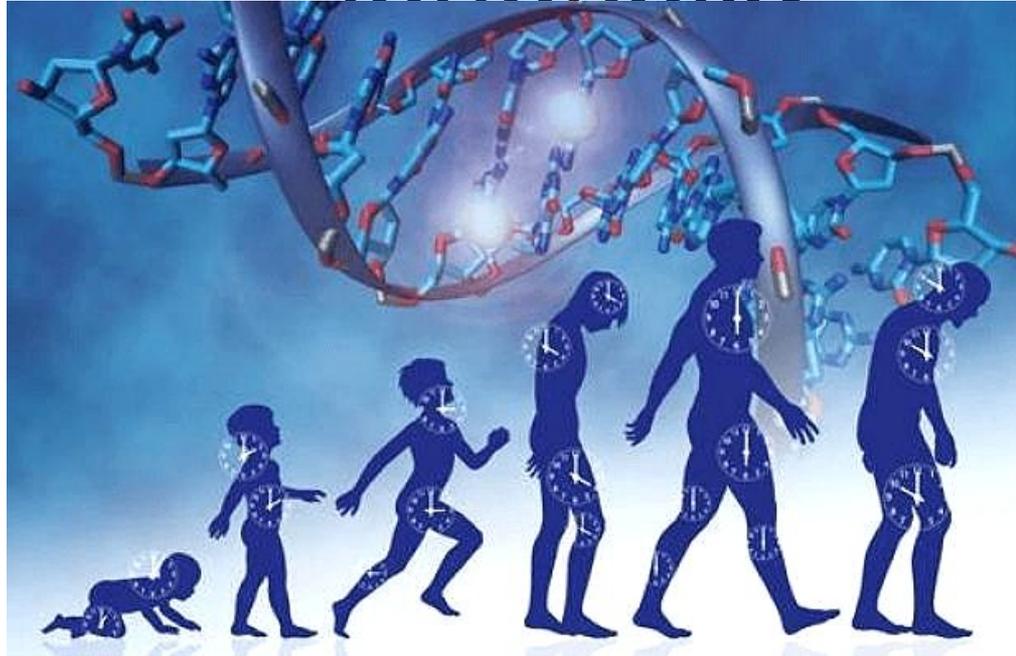
Следовательно...

- Главный механизм дифференцировки клеток – это активация и подавление различных транскриптонов на определенных этапах развития организма



- Изменение активности генов, не затрагивающее первичную структуру ДНК, но влияющее на проявление тех или иных свойств и признаков, и составило предмет эпигенетики
- Эпигенетика — сравнительно молодое направление науки (1942)
- Согласно эпигенетики функции живого организма не обусловлены одной только закодированной в генах информацией, а во многом служат ответом на сигналы из окружающей среды.
- То, как происходит эпигенетически обусловленное включение и выключение определенных генов, стало одним из важных

Эпигенетика и старение человека



При старении уменьшается число генов, «работающих» в молодости, и активируются гены, которые «спали» в молодом организме. И хотя пока не найдены группы генов, запускающие каскад молекулярных событий в стареющей клетке, осуществление программы старения в последнее время часто связывают с эпигенетическими механизмами...

***«Генетика предполагает, а
эпигенетика располагает»***

Peter B. Medawar, английский биолог

От классической генетической концепции – к эпигенетике

