

Экспрессия генов и механизмы регуляции



Особенности механизмов контроля инициации транскрипции



- Экспрессия генов осуществляется с разной интенсивностью на протяжении жизни бактерии.
- Ингибирование транскрипции не приводит к полному «выключению» гена. Синтез иРНК замедляется и остается на очень низком уровне («базальный уровень транскрипции»).
- Решение о синтезе фермента, метаболизирующего субстрат клетка «принимает» в случае если в среде есть субстрат, но нет предпочтительного источника углерода.

Особенности белков-активаторов



- На оперон могут воздействовать одновременно специфический и общий активаторы.
- Активаторы не являются особой группой белков.. Многие метаболические ферменты являются активаторами.
- Пример: репаративный белок Ada устраняет алкильные группы. Алкильные (метильные) группы переносятся на сам белок, его метилированная модификация (meAda) – служит активатором транскрипции собственного гена.

Энхансеры и удаленные сайты



- Сайты активации расположенные на большом удалении от промотора – *Энхансеры*. Обнаружены у эукариот но встречаются и у бактерий.
- Белки, связывающиеся с энхансерами активируют транскрипцию, взаимодействуя с НУР-полимеразой. Часто происходит изгибание петли ДНК, при этом энхансер и промотор сближаются.
- Мобильные энхансеры бактериофагов. РНК-полимераза содержит кодируемый фагом фактор $\sigma 55$. Репликация активируется при узнавании одноцепочечных разрывов ДНК. Репликационная вилка служит их источником.

Аттенуация

на примере оперона синтеза триптофана



- После начала транскрипции лидерного региона процесс может быть остановлен – *аттенуация*.
- Причина – особенности последовательности лидерного региона. Последовательность РНК (аттенуатор) формирует 4 региона, комплиментарных друг другу (1-2, 2-3, 3-4).
- Соединение петель 1-2 и 3-4 приводит к образованию вилки препятствующей продвижению РНК-полимеразы далее за лидерный регион. Соединение петель 2-3 формирует антитерминаторную петлю и транскрипция продолжается.

Аттенуация

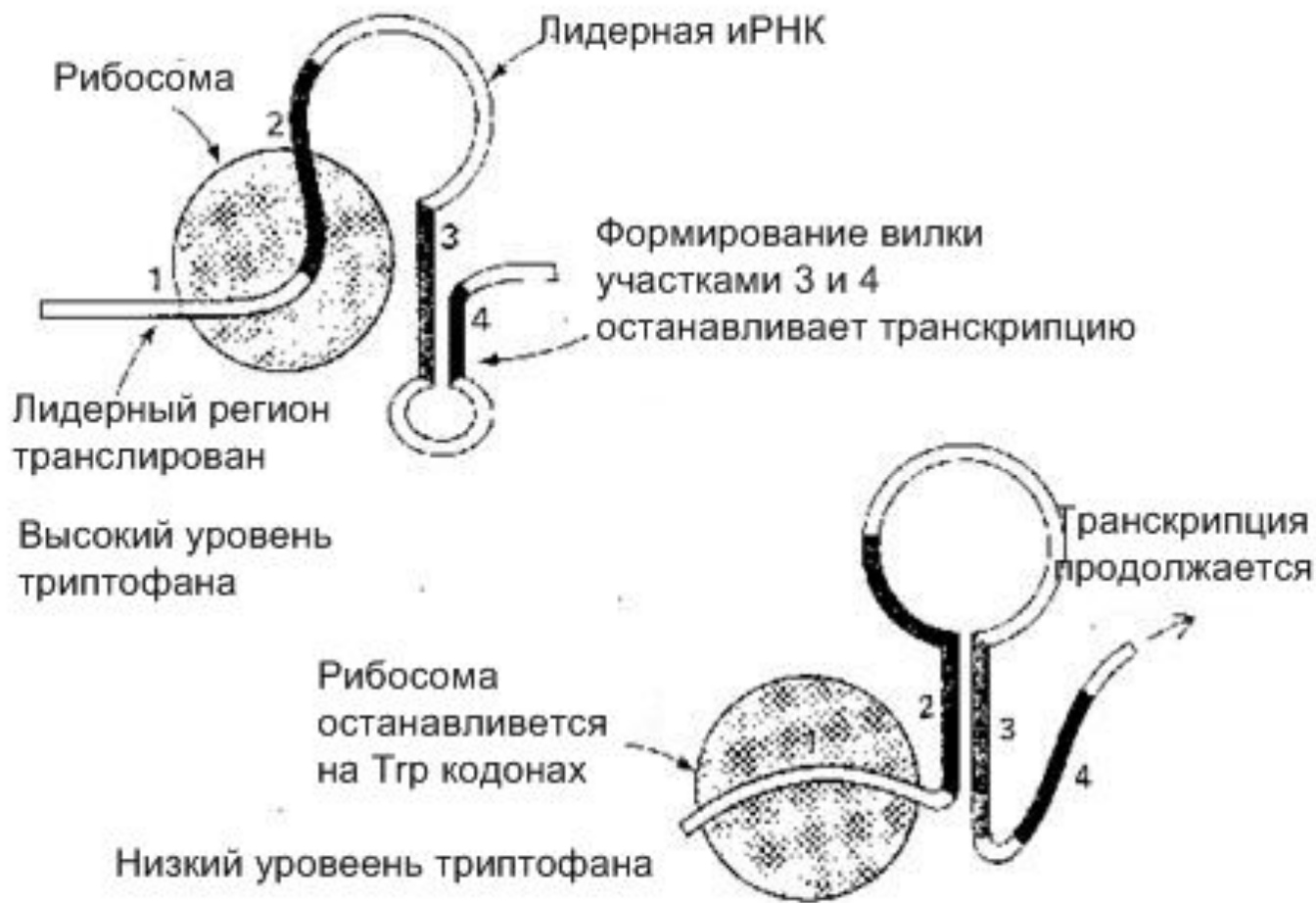
на примере оперона синтеза триптофана

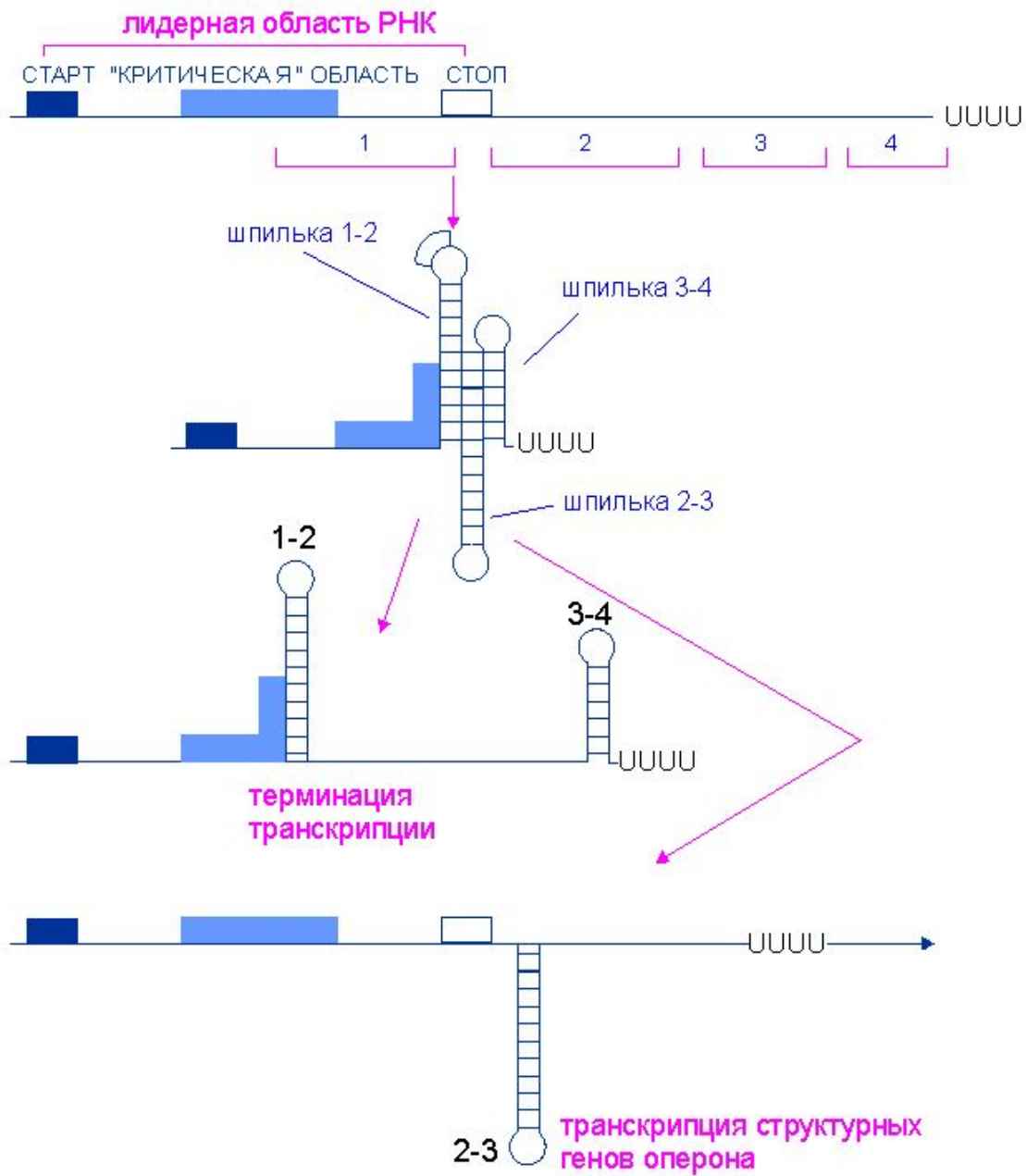


- Причина – содержание 2 кодонов Trp в области 1, если тРНК-Trp мало – рибосома задерживается, связывая петлю 1, петли 2 и 3 соединяются и не препятствуют транскрипции
- Высокий уровень триптофана обеспечит беспрепятственную трансляцию 1 и 2 участков. При этом 3 и 4 образуют вилку и рибосома будет вынуждена диссоциировать от иРНК.

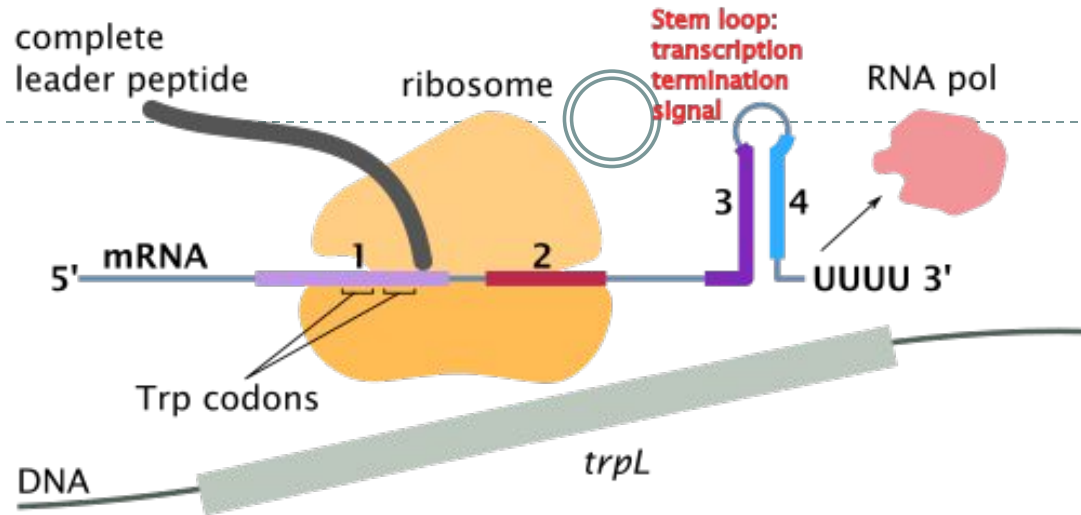
Аттенуация

на примере оперона синтеза триптофана

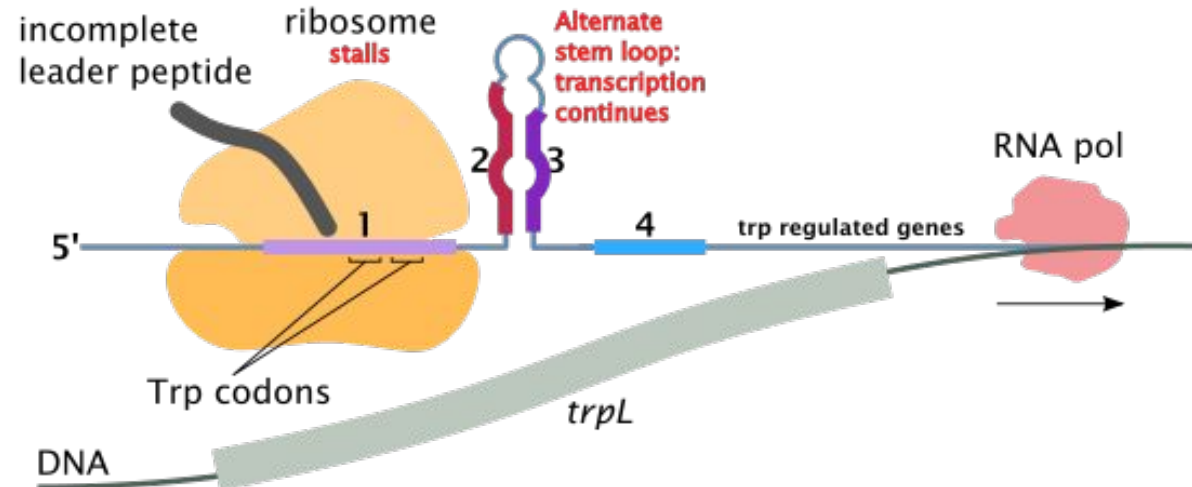




High level of tryptophan



Low level of tryptophan



РНК-переключатели (riboswitch)



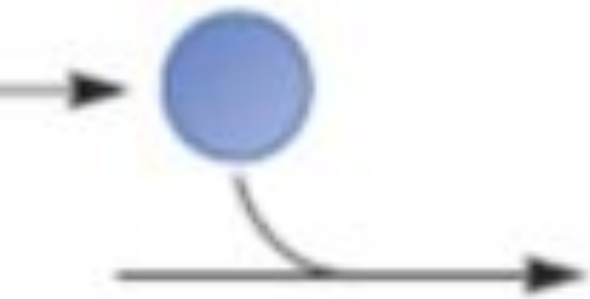
- Особая форма аттенуации в ходе транскрипции без участия рибосом. Лидерный регион иРНК (РНК-переключатель) формирует различные конформации включая и выключая транскрипцию.
- Смена конформаций происходит в ответ на связывание молекул эффекторов (метаболитов), что считалось функцией исключительно белков.
- Пример: Синтез рибофлавина у *Bacillus subtilis*. Флаavinмононуклеотид (ФМН) – продукт рибофлавина, связывается с лидерным регионом иРНК останавливая транскрипцию.

РНК-переключатели



Экспрессия гена выключена

ФМН (метаболит)



Регуляция путем рекомбинации ДНК



- Сайт-специфическая реципрокная рекомбинация с перестройкой структуры генов может многократно включать и отключать гены, обеспечивая адаптацию.
- Пример: Синтез 2 типов белка жгутиков – флагеллина у бактерий. Продукт варианта В экспрессируется совместно с белком, который служит репрессором экспрессии белка варианта А.
- Также совместно с белком экспрессируется фактор *hin*, катализирующий инверсию путем рекомбинации. Инвертированный промотор варианта В не запускает синтеза белка В и репрессора, Транскрипция варианта А идет беспрепятственно.

Регуляция и метаболизм РНК



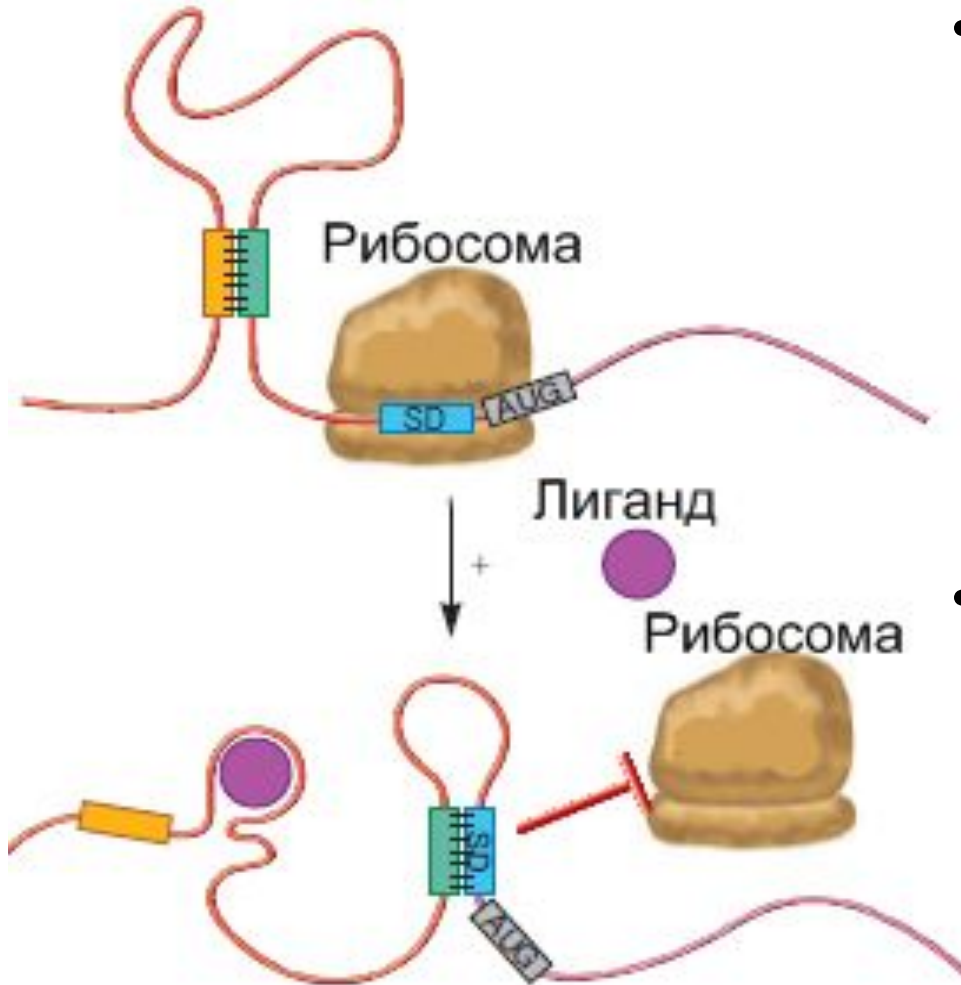
- Обычно РНК у прокариот транслируется в том же виде что синтезируется. Исключение составляют некоторые бактериофаги и некоторые полицистронные РНК бактерий. Пример: оперон *rrn*, РНК которого содержит 23S-, 16S-, 5S- рРНК и несколько тРНК последовательностей.
- Для предотвращения бесполезной трансляции РНК подвергается деградации.

Регуляция на уровне трансляции



- РНК-переключатели грамотрицательных бактерий регулируют трансляцию иРНК, блокируя ее инициацию. У грамположительных бактерий чаще встречается РНК-переключатели терминирующие транскрипцию.
- Регуляция с помощью малых РНК, некодирующих РНК и антисмысловых РНК.
- Использование редких кодонов-синонимов.

РНК-переключатели



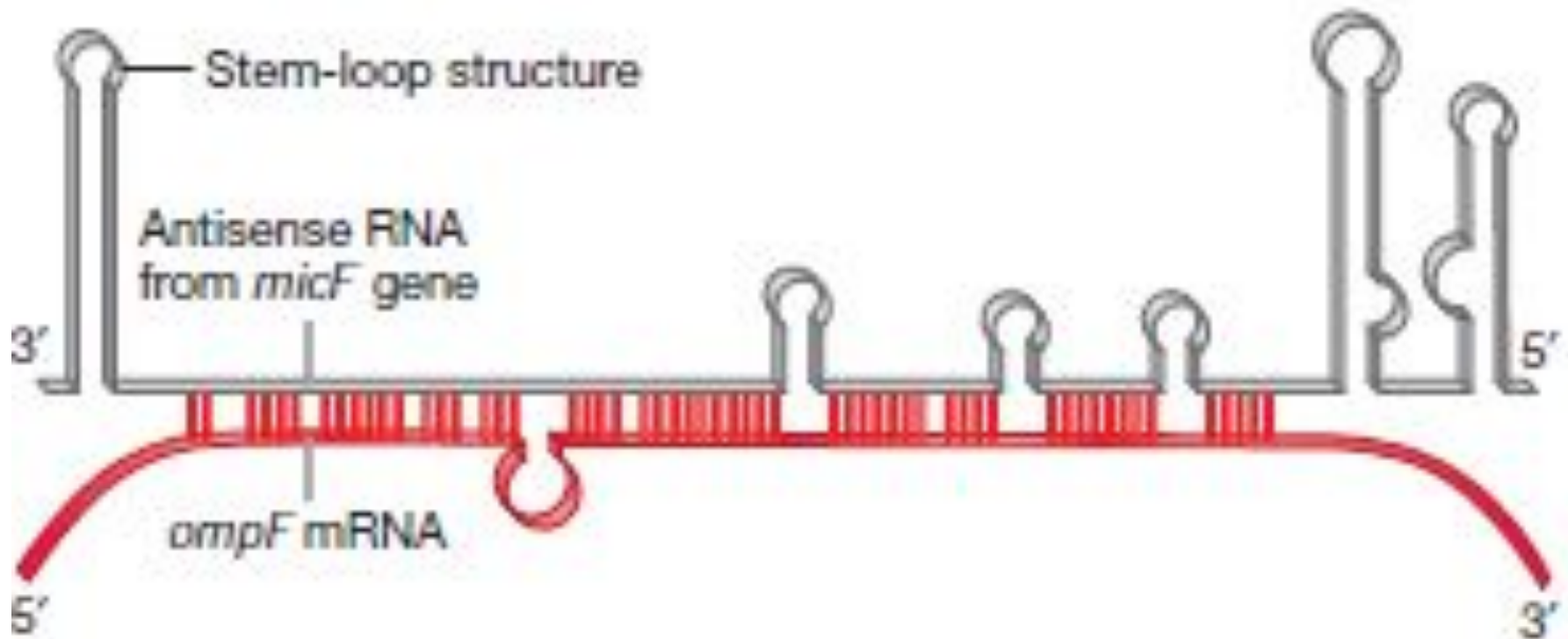
- В отсутствие метаболита (лиганда), комплиментарные последовательности на лидерной РНК связаны, рибосома имеет доступ к Шайн-Дельгарно последовательности.
- Лиганд блокирует одну из комплиментарных последовательностей, вторая связывается с участком инициации. Трансляции нет.

Малые РНК



- Известно множество молекул РНК не относящихся к тРНК, иРНК или рРНК – *малые РНК*.
- У *E.coli* известно более 40 мРНК от 40 до 400 нуклеотидов. Предполагается, что у эукариот насчитывается сотни и тысячи мРНК.
- У *E.coli* мРНК регулируют трансляцию, комплиментарно соединяясь с лидерными последовательностями иРНК – антисмысловая РНК.

Малые РНК



- Трансляция гена *ompF* (белка порина) регулируется антисмысловой РНК *MicF* – продукта гена *micF*.

Общие регуляторные системы



- Помимо систем регуляции на уровне отдельных оперонов, изменения условий среды требует согласованной работы оперонов. Общие регуляторные системы управляют многими генами и метаболическими путями.
- Так, для синтеза белков требуется более 150 продуктов, которые контролируются разными оперонами и требуется общая координация. В то же время механизмы регуляции отдельных оперонов могут функционировать независимо.

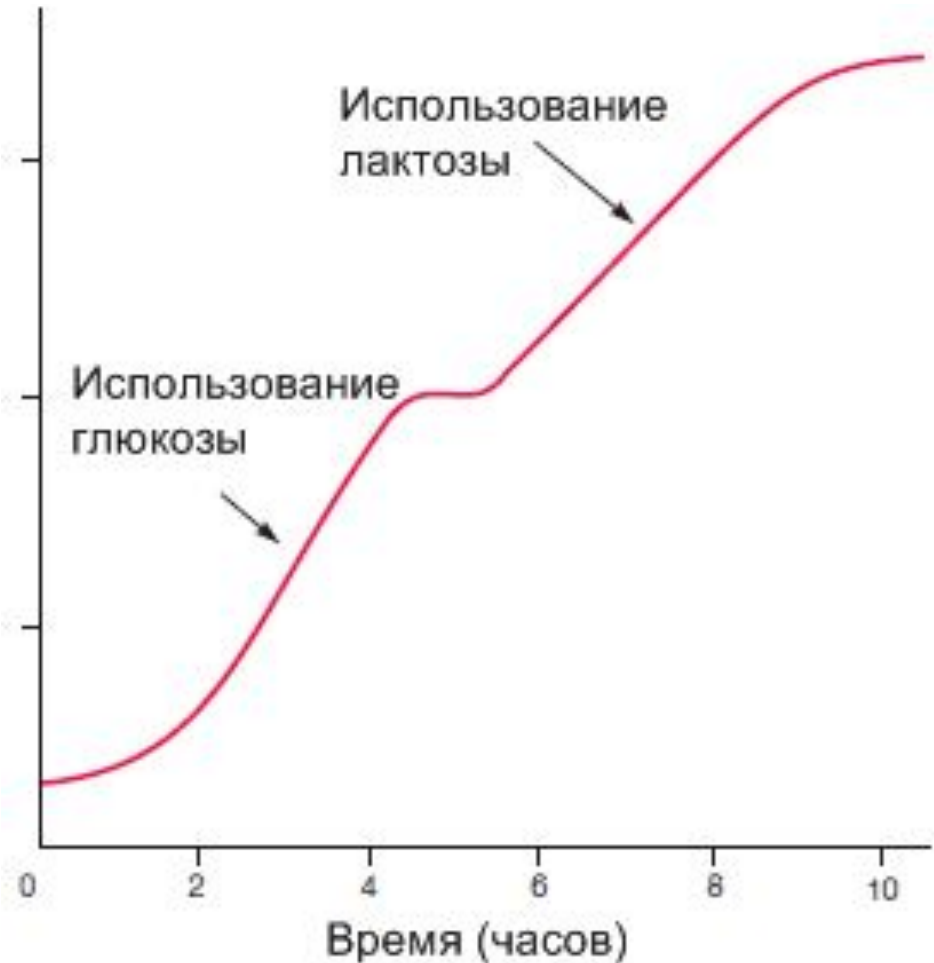
Группы оперонов



- Опероны (сходные функции), которые регулируются общим регуляторным протеином – *регулон*.
- Опероны (общее направление), которые регулируются одним общим регуляторным белком, но каждый из оперонов также подвержен отдельным частным механизмам регуляции – *модулон*.
- Опероны (общий стимул), которые функционируют совместно в ответ на воздействие окружающей среды -- *стимулон*. Может содержать несколько регулонов или модулонов.

Катаболическая репрессия

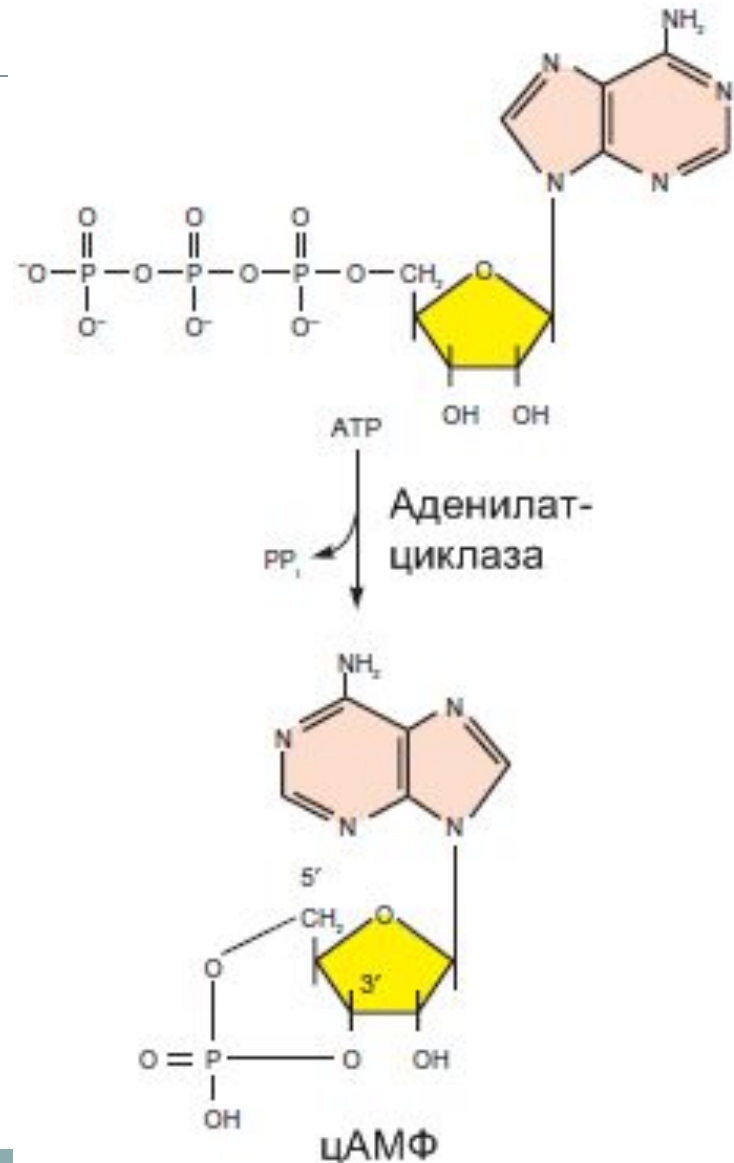
- Наличие предпочтительного источника углерода (углерода) требует скоординированной репрессии генов, кодирующих альтернативные пути получения энергии (катаболизм арабинозы, мальтозы, лактозы).
- Переход на другой источник энергии определяет характерную форму кривой



цАМФ



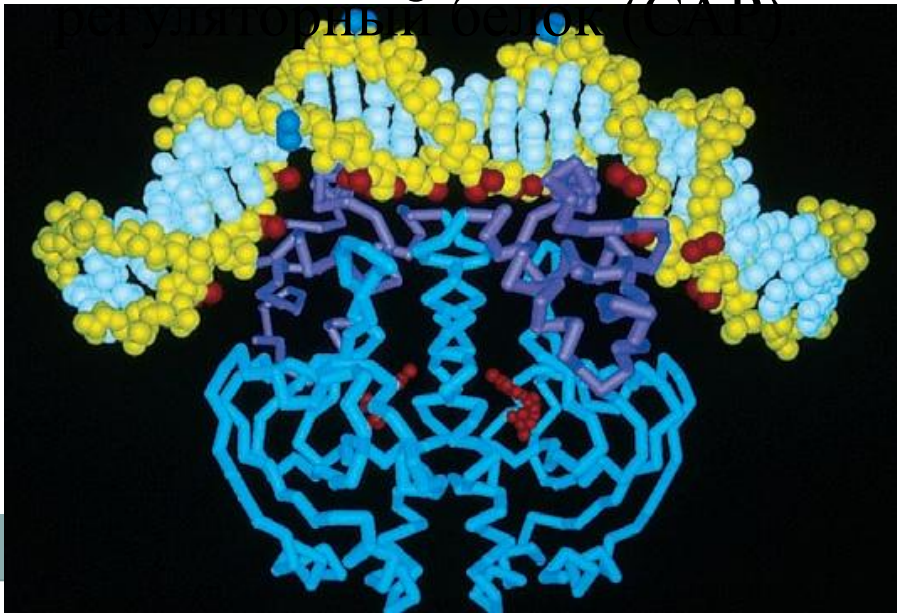
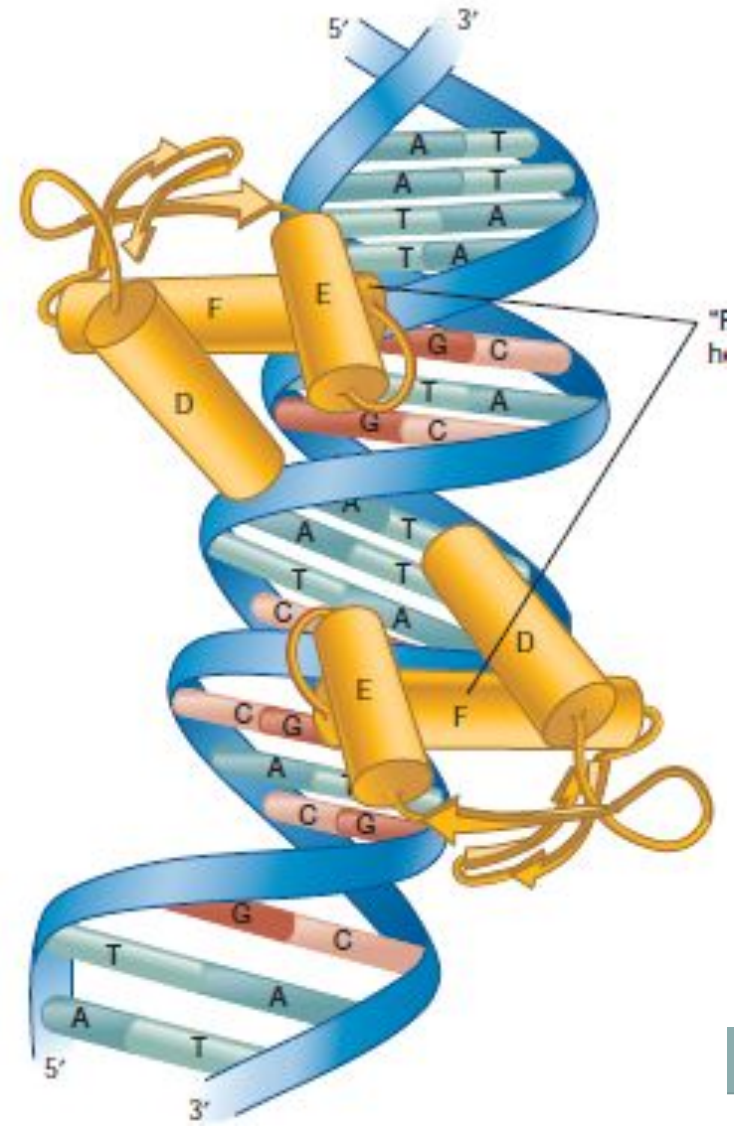
- Координация катаболических оперонов осуществляется при помощи цАМФ-рецепторного протеина. Активация происходит при связывании цАМФ.
- Уровень цАМФ регулируется аденилатциклазой, активность которой возрастает при недостатке глюкозы в клетке.



Катаболическая репрессия



- Катаболические опероны контролируются 2 типами белков:
- 1) Специфическим для оперона
- 2) Общий механизм – цАМФ



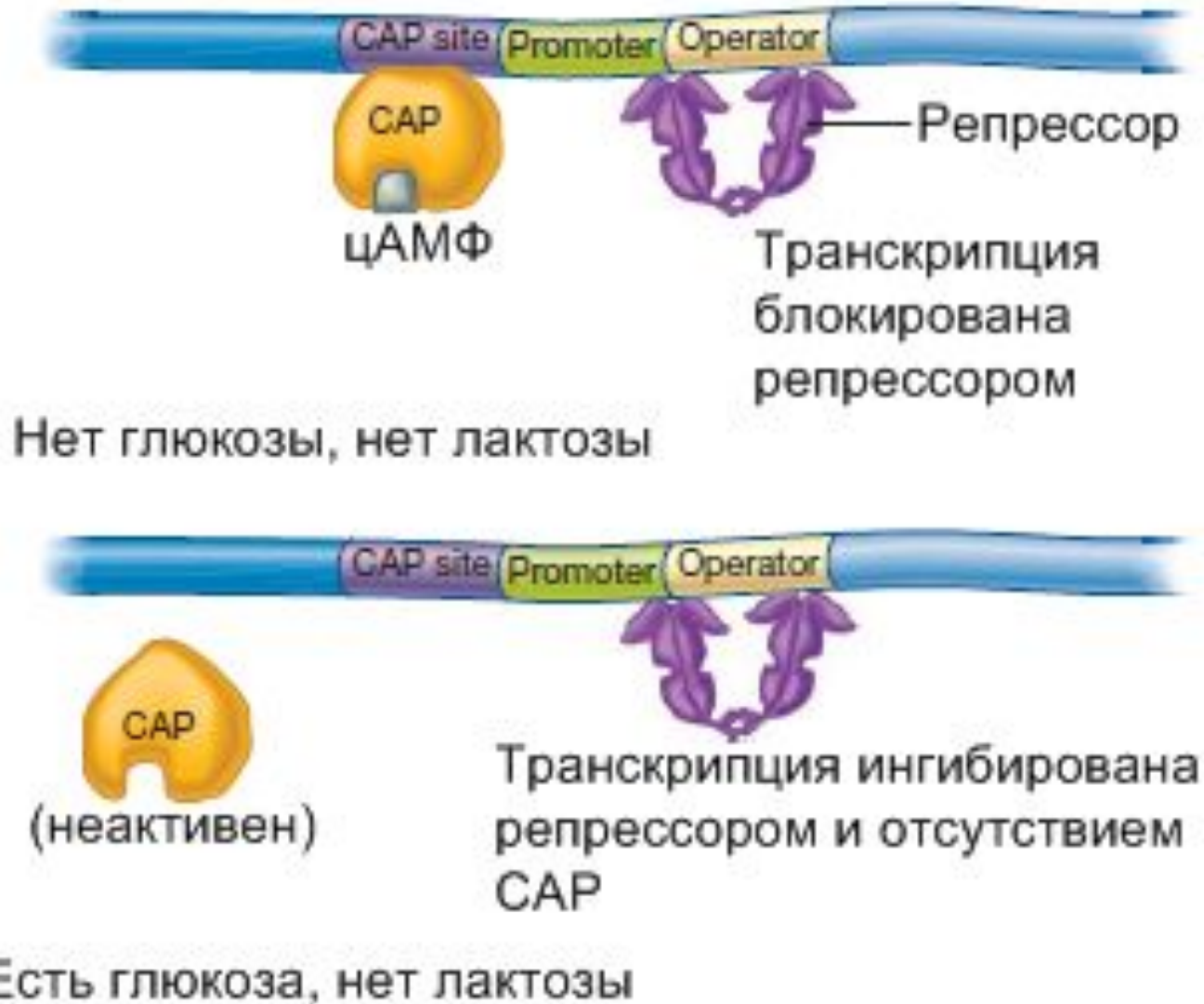
Катаболическая репрессия на примере лактозного оперона



Есть лактоза, нет глюкозы



Катаболическая репрессия на примере лактозного оперона



«Ощущение кворума» (Quorum Sensing)



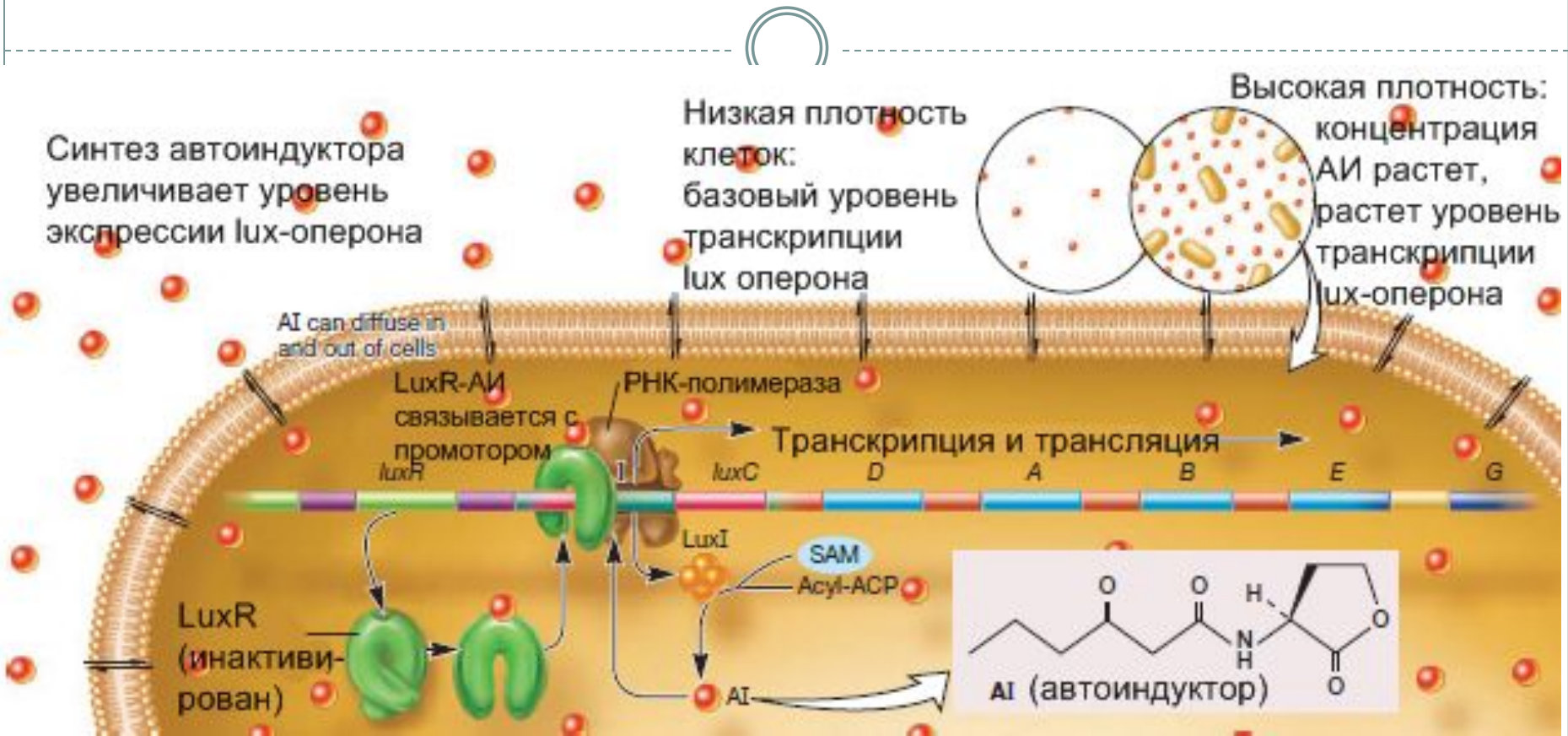
- В микробных популяциях большую роль в координации экспрессии генов играют сигнальные молекулы.
- Впервые явление обнаружено у морской биоллюминесцентной бактерии *Vibrio fischeri*, которые светятся только в популяциях с высокой плотностью клеток.
- Quorum sensing у ряда грамотрицательных микроорганизмов использует сигнальную молекулу N-ацетил гомосерин лактон (АГЛ).
- Ген *luxI*, кодирующий АГЛ имеет активатор транскрипции (*LuxR*), который, в свою очередь, активируется АГЛ.

«Ощущение кворума» (Quorum Sensing)



- Небольшие количества АГЛ в популяциях с низкой плотностью микробных клеток выходит во внешнюю среду по градиенту концентрации.
- При возрастании плотности клеток, концентрация АГЛ вне клеток превышает внутриклеточную и АГЛ поступает в клетки.
- В клетке он связывается LuxR и активирует транскрипцию гена luxI и расположенный рядом ген билюминесценции luxCDABEG.
- Quorum sensing также называют автоиндукцией, АГЛ – автоиндуктором (АИ).

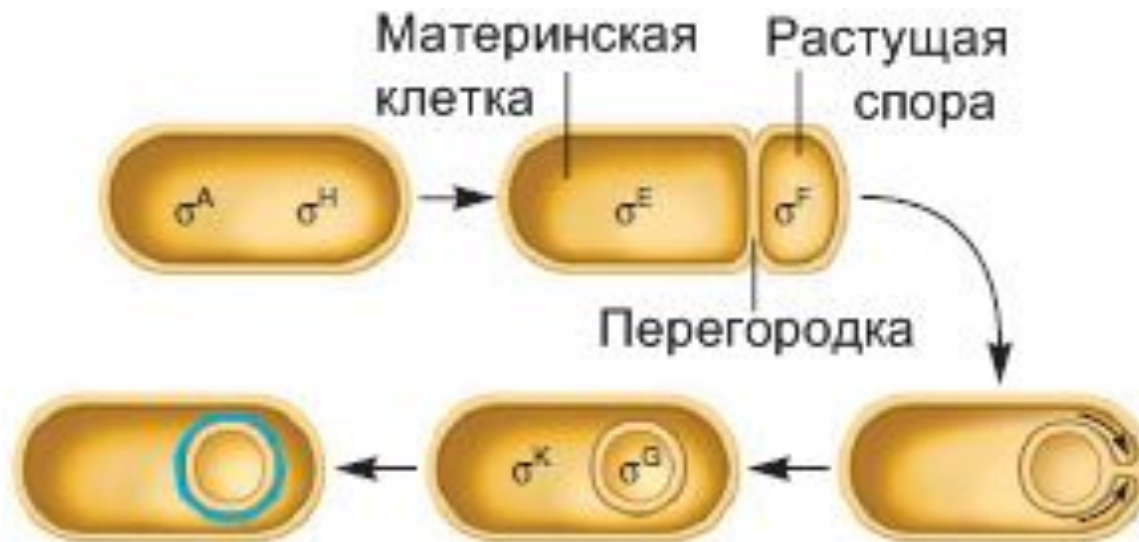
Quorum Sensing у *Vibrio fischeri*



Регуляция споруляции



- Переход к спорообразованию в условиях недостатка питательных веществ запускается автофосфорилазой KinA.
- KinA в свою очередь фосфорилирует Spo0F, который запускает транскрипцию генов необходимых для споруляции и тормозит экспрессию остальных.

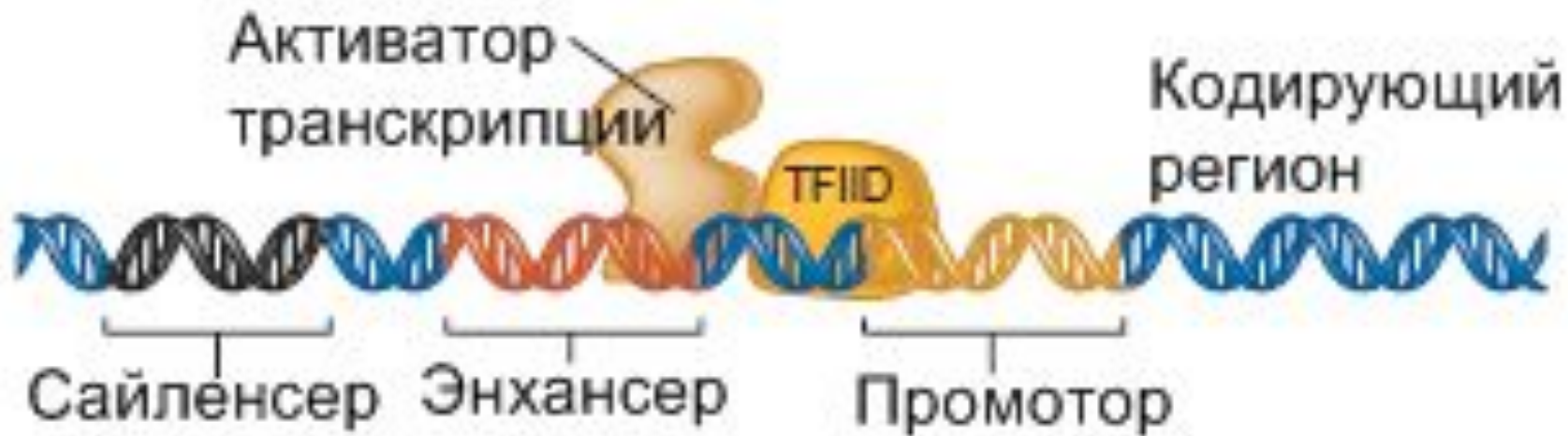


Регуляция экспрессии у Эукариот и Архей



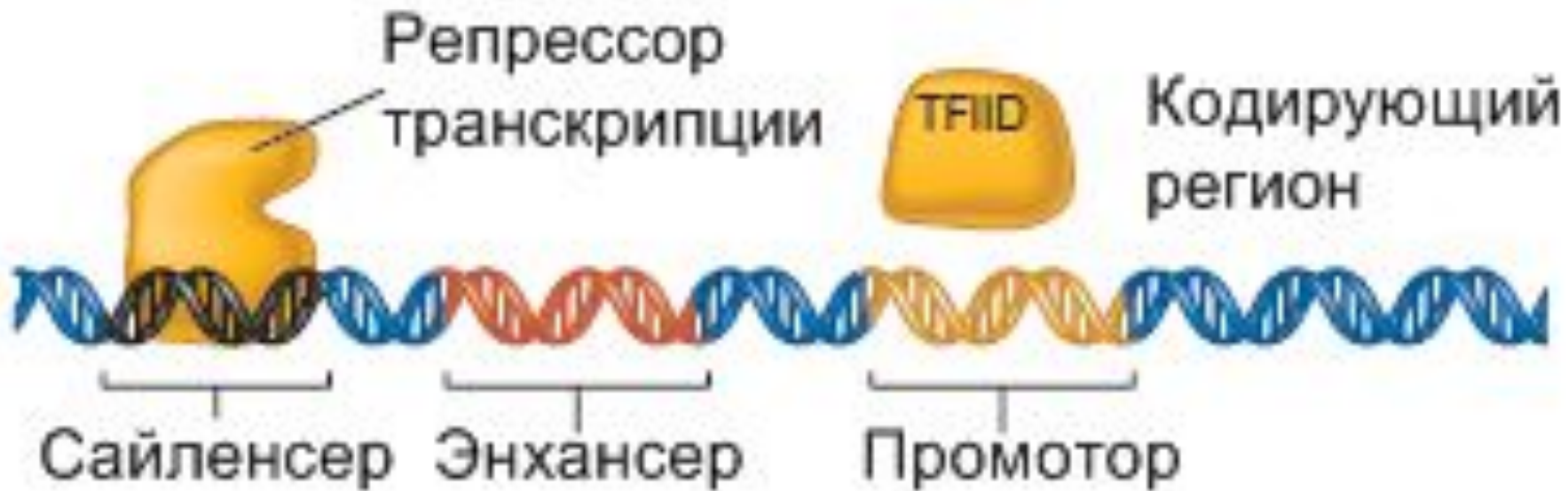
- Подобно Эубактериям, регуляция у Эукариот и Архей осуществляется на этапах транскрипции, трансляции и посттрансляции.
- Организация ДНК в *хроматин* – дополнительные возможности регуляции Эукариот.
- Факторы транскрипции у Эукариот (активаторы и репрессоры) связываются с *энхансерами и сайленсерами*.
- У Архей – организация генома подобна бактериям, однако молекулярных механизмы транскрипции и трансляции схожи с процессами Эукариот.

Регуляторные факторы транскрипции Эукариот



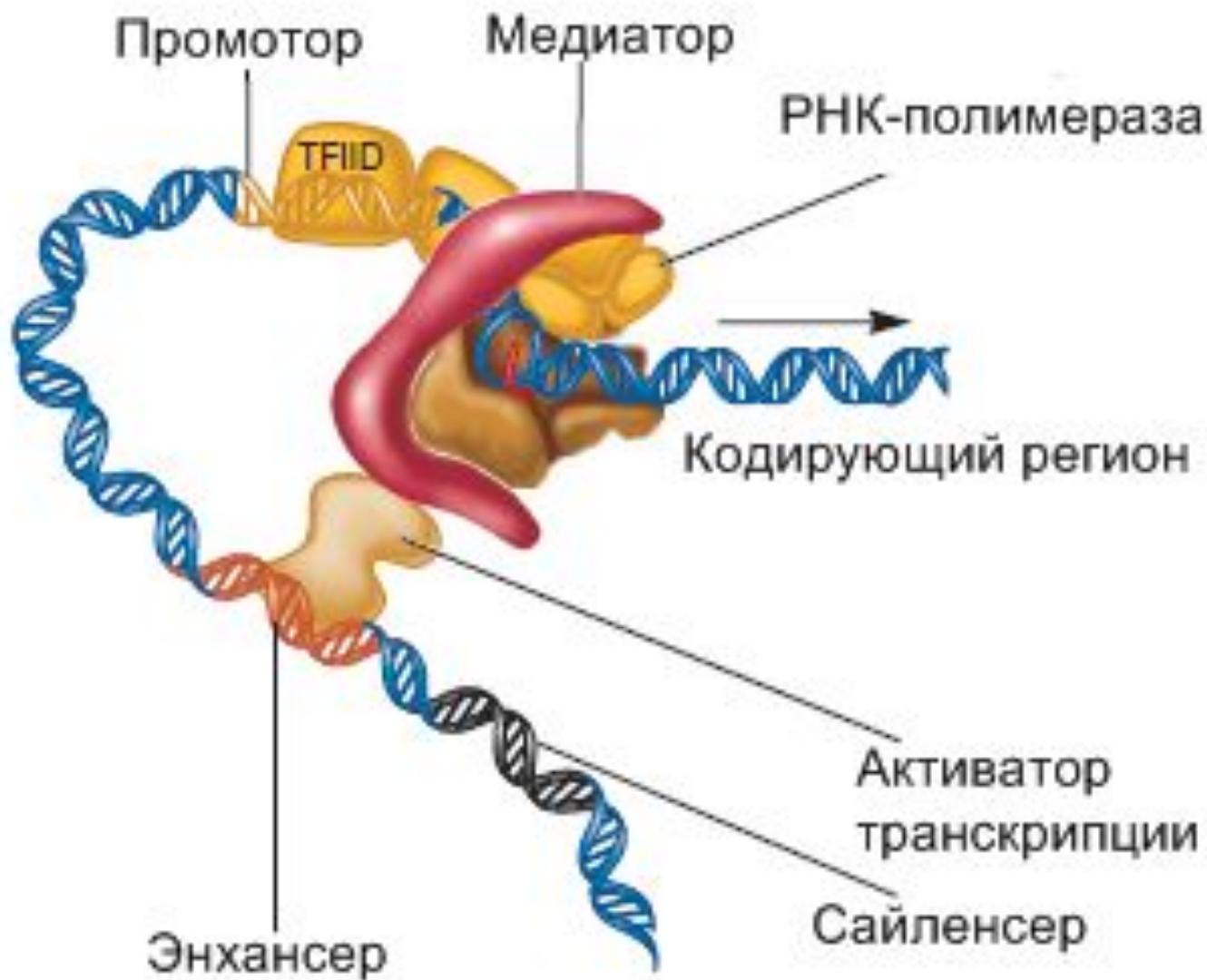
Активатор транскрипции способствует размещению TFIID на промоторе. Запуск транскрипции.

Регуляторные факторы транскрипции Эукариот

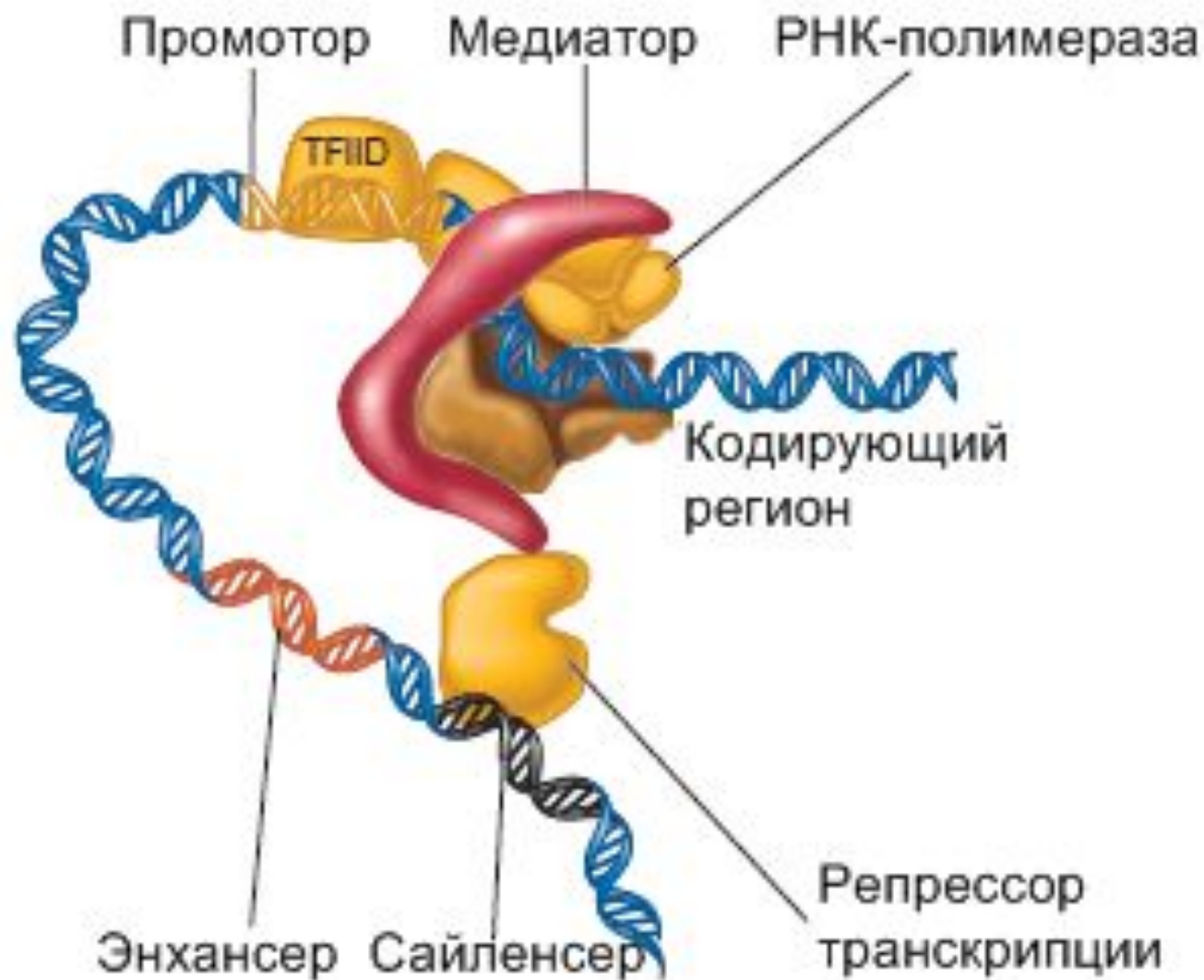


Репрессор ингибирует связывание TFIID.
Транскрипции не происходит.

Транскрипция



Транскрипция ингибирована



Природа взаимодействий белок-ДНК



- Регуляторные белки узнают последовательности ДНК (8-20 т. п.н.) из миллионов нуклеотидных пар.
- В структуре белков обнаружено 4 основных типа структур распознающих и связывающих ДНК: Спираль-виток-спираль; β -складка; Также 2 структуры не обнаруженные у прокариот: Лейциновая застежка-молния; Цинковые пальцы.
- Механизм неспецифических взаимодействий – водородные связи между атомами кислорода в составе фосфатной группы и NH-группами в составе основных аминокислот белков.
- Специфические взаимодействия гораздо более сильные: водородные, гидрофобные, ионные связи с участием боковых цепей и доступными основаниями ДНК.

Спасибо за внимание

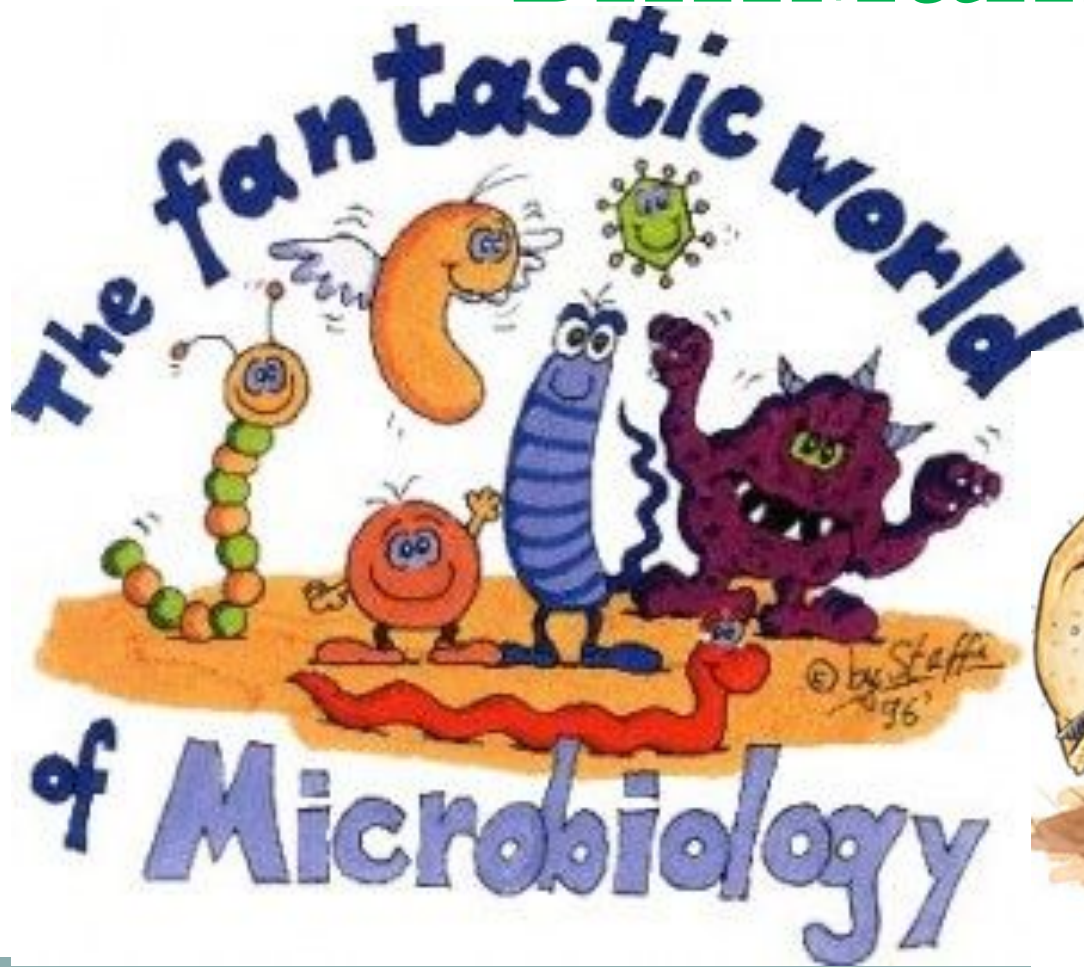


Illustration: Don Smith