

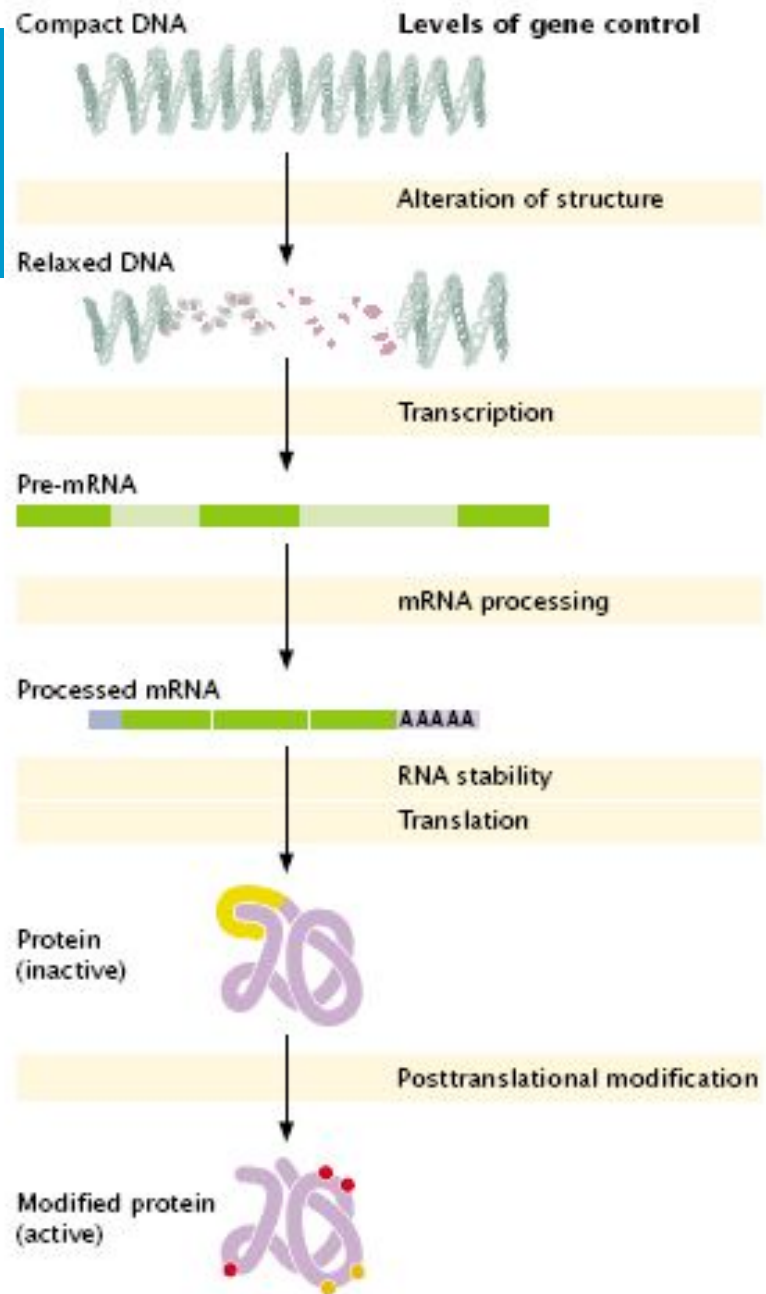


Трансгенная мышь с геном гормона роста

Как определить экспрессию гена

1. Найти мРНК данного гена с помощью молекулярного зонда
2. Обнаружить белок с помощью АТ
2. Выделить тотальную мРНК, получить кДНК и с помощью зонда найти кДНК данного гена

Регуляция экспрессии генов на разных уровнях





1 уровень регуляции активности генов

Это формирование активно транскрибируемого эухроматина и молчащего, компактизованного гетерохроматина

Гетерохроматин подразделяется на конститутивный и факультативный

Метилирование лизина по положению 9 в гистоне H3 – подавление транскрипции

Конститутивный – в цетромерах, теломерах, интеркалярный. Наполнен повторяющимися последовательностями и мобильными элементами



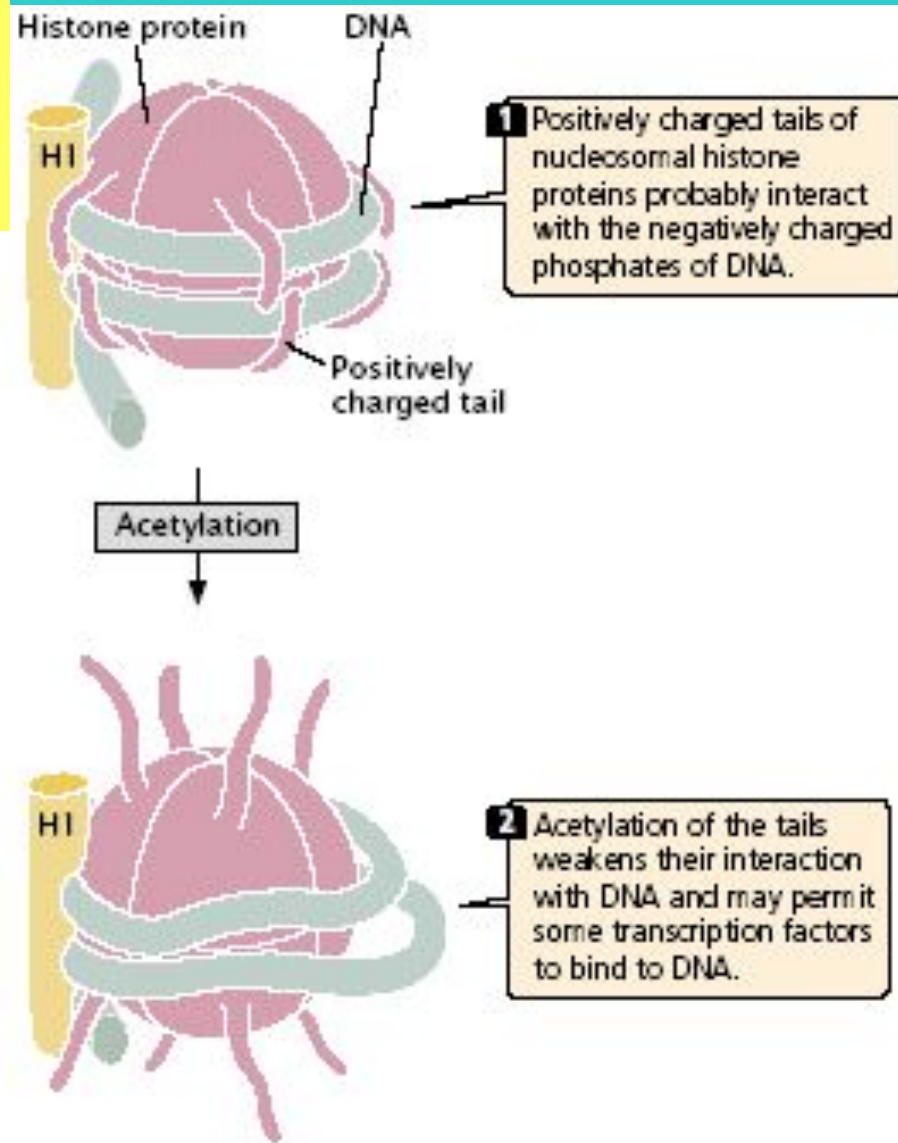
Роль модификации и ремоделирования нуклеосом в регуляции генетических процессов

**Нуклеосома – октамер гистонов с намотанной
ДНК в 146 п.н. Имеет кор и хвосты гистонов**

Модификация нуклеосом включает –

- Ремоделирование**
- Ковалентная модификация гистонов**
- Замена гистонов**

Модификация гистонов В регуляции активности генов





Нуклеосома – это октамер гистонов и 1,7 витка суперспирали фрагмента ДНК длиной 146 пар оснований

В целом нуклеосомная упаковка ограничивает узнавание последовательности ДНК факторами транскрипции, репликации и рекомбинации

По отдельным генам нуклеосомы распределяются неслучайным образом - позиционирование

Позиционирование нуклеосом на промоторе может быть фактором регуляции транскрипции, как +, так и -



Ремоделирование нуклеосом – это изменение их связывания с ДНК. Осуществляют белки

- **Перемещение нуклеосом**
- **Изменение расстояния между нуклеосомами**
- **Удаление гистонов**
- **Сборка гистонов**



Ковалентная модификация включает –

- **Ацетилирование – деацетилирование**
- **Фосфорилирование – дефосфорилирование**
- **Метилирование**
- **убиквитирование**

Метилирование лизина по положению 9 в гистоне H3 – подавление транскрипции, часто это сочетается с метилированием ДНК по цитозину

Ацетилирование лизина по положению 9 в гистоне H3 в сочетании с метилированием лизина в положении 4– подавление транскрипции



Гистоновый код-

**1. Аминокислотный остаток – разные АМК могут
Подвергаться модификации – Лиз, Арг, Сер, Тре**

2. Модифицирующие ферменты – их много

3. Белки, воспринимающие модификацию гистонов

Комбинация всех этих факторов – и есть гистоновый код

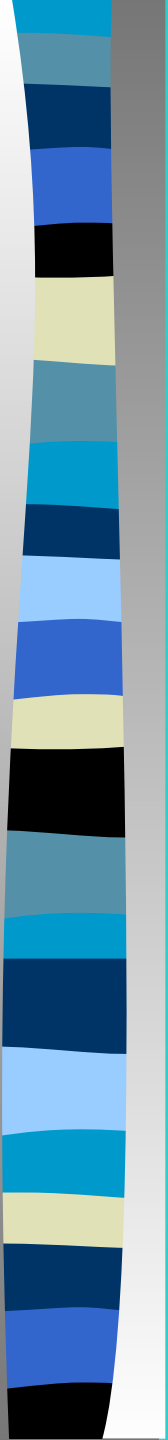
**Обеспечивают активацию и сайленсинг генов, очевидно
помогая факторам транскрипции**

Регуляция изменением количества генов и структуры ДНК

- Утрата генетического материала – диминуция хроматина, разрушение ядра у эритроцитов
- Амплификация генов – Р-гликопротеина, рРНК
- Реаранжировка генных сегментов
 - А) в генах И
 - Б) у сальмонеллы инверсия промотора обуславливает разные типы флагеллина и обеспечивает ускользание от И.О.
- Роль транспозонов в регуляции активности генов.
- Эу- и гетерохроматин. Двойная спираль может принимать разные формы
 - Инактивация X-хромосомы
 - Роль метилирования ДНК в регуляции экспрессии генов

Активный хроматин – эухроматин

- Нуклеосомная упаковка изменена или отсутствует
- Длинные участки, чувствительные к ДНК-азе 1, указывающие на возможность транскрипции
- Гиперчувствительные сайты к ДНК-азе 1, ассоциированные с энхансерными элементами у начала гена
- Более слабая упаковка ДНК под электронным микроскопом
- В политенных хромосомах – это пуфы





Метилирование ДНК

Открыто еще до открытия Уотсона и Крика, но до сих пор остается много интригующих загадок

Метилируется цитозин в 5 положении и аденин в 6 положении

1. Регуляция транскрипции
2. Клеточная дифференцировка и эмбриональное развитие
3. Геномный импринтинг
4. Инактивация мобильных элементов
5. Канцерогенез
6. Генетические заболевания человека
7. Замалчивание генов



Загадки-

Отсутствует у дрозофилы и др.

Обеспечивает накопление мутаций

У Dp дрожжейи C.elegans метилирования нет.
Нарушение метилирования у человека приводит к остановке эмбрионального развития. Метилирование запрещено в сайтах старта транскрипции почти половины генов человека.

метилирование связано с гетерохроматином

При раке метилирование понижено, что приводит к геномной нестабильности, может и наоборот – повышение метилирования генов –супрессоров

Метилтрансфераза в соответствии с матрицей метилирует сайт на дочерней нити ДНК. Как узнает ???



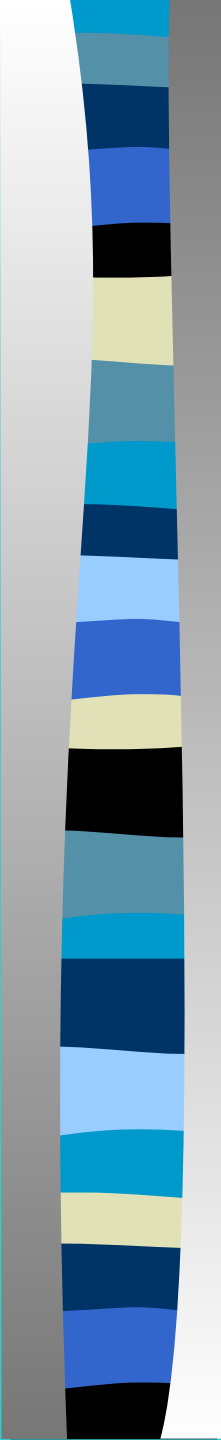
Неактивный хроматин – гетерохроматин

**Конститутивный - центромера, теломера,
интеркалярный**

**Факультативный - при гаметогенезе в X-хромосоме
гетерохроматин превращается в эухроматин**

Транспозоны имеют рег элементы

- Транспозоны ограничены инвертированными повторами. При вырезании Т они сближаются и точно отрезаются от основной ДНК. Затем транспозаза делает разрез в новом месте, куда внедряется Т по типу «вырезание-встраивание»
 - Ретротранспозоны – ограничены длинными концевыми повторами распространяются с пом обр транскрипции с использованием закодированной в них интегразы
1. Нарушают работу гена
 2. Вызывают мутации
 3. Меняют регуляцию гена



Величина генома может быстро
увеличиваться за счет распространения
транспозонов

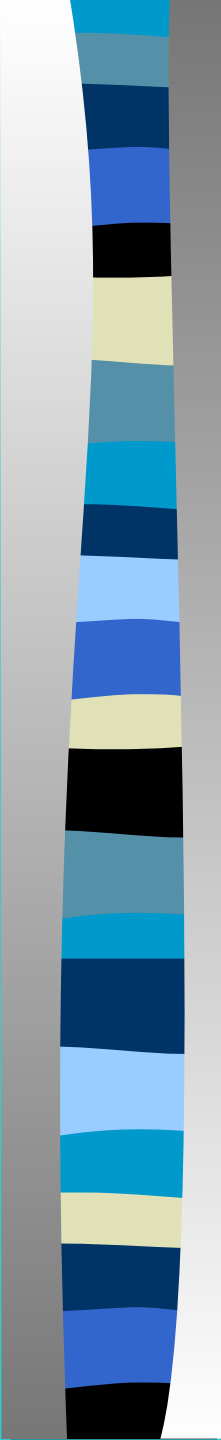
4 хр-ма Др. буквально набита Т

У-хр-ма человека, X хр-ма, 21 и 22 содержат
много Т

Сайт-специфические ретроТ- это те,
которые внедряются только в определенном
месте. Например Het.Nart, у Др отвечают за
целостность теломер

Р-элемент Др внедряется в 5' регулятор
область БТШ 70

Т могут одомашниваться, т.е. выполнять
функцию промотора, инсулятора и т.д.



Регуляция на уровне репликации –
В ядрышках ооцитов образуются
экстрахромосомные копии генов рРНК.
Этим достигается усиление синтеза
рибосом

Регуляция генной активности на уровне транскрипции

- Регуляция транскрипции у прокариот (лактозный оперон)
- Позиционирование нуклеосом
- Регуляция транскрипции гормонами - один гормон, например ГК, может регулировать несколько ГК зависимых генов. ГК связывается с R – это и есть фактор транскрипции
- Транскрипция с разных промоторов (альтернативные промоторы)
- Базальный транскрипционный комплекс
- Факторы транскрипции.
- Локусконтролирующие районы
- РНК-интерференция
- Транскрипционная синергия
- Рибопереключателы – аптамеры, например соединенные с глицином. Когда его много, они включают гены для использования его как источник энергии

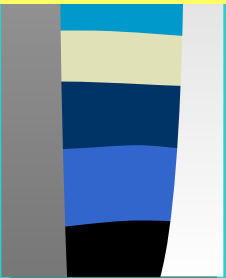
ДНК-связывающий домен

Домены активации транскрипции

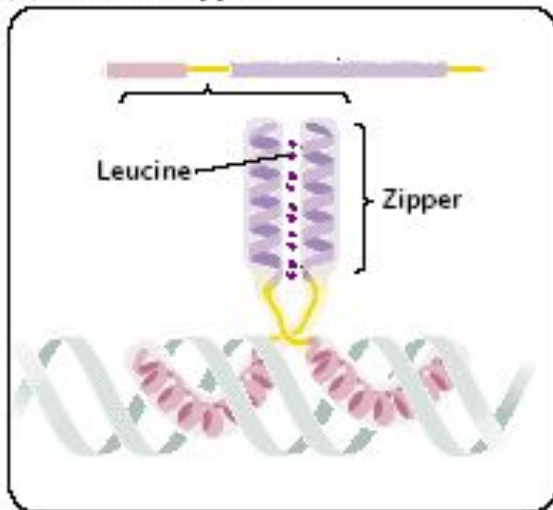
Антирепрессорные домены

Домены, связывающие лиганды

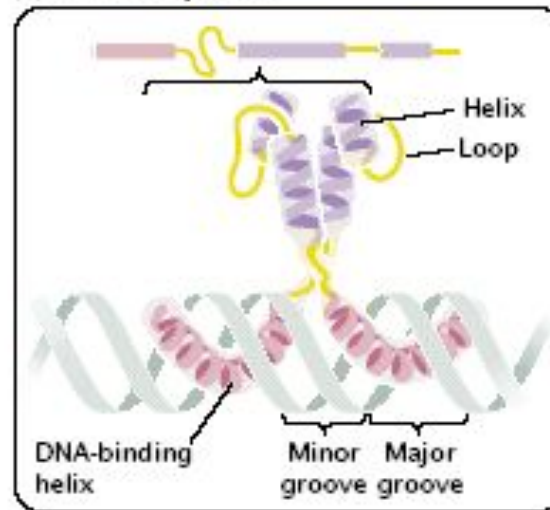
Лиганды-индукторы –гормоны, ретиноевая кислота, гормон щитовидной железы и лиганды –репрессоры-конечные продукты метаболических путей



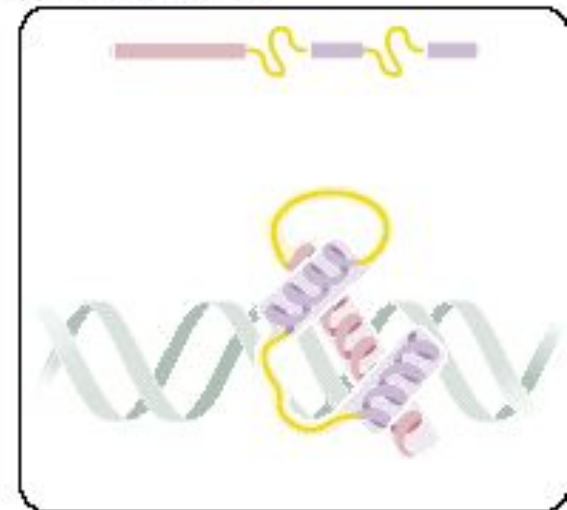
(d) Leucine zipper



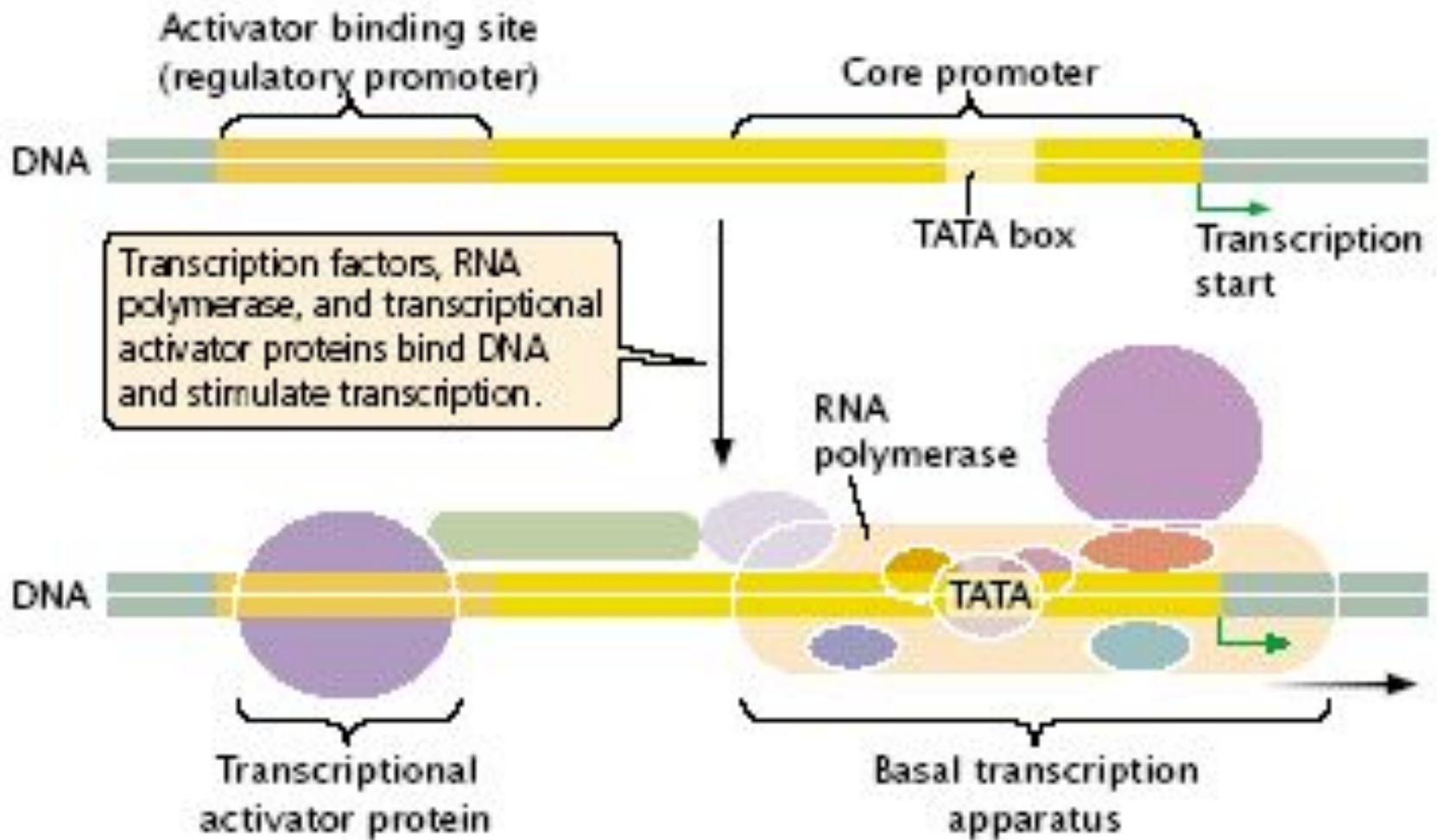
(e) Helix-loop-helix



(f) Homeodomain



Типы факторов транскрипции



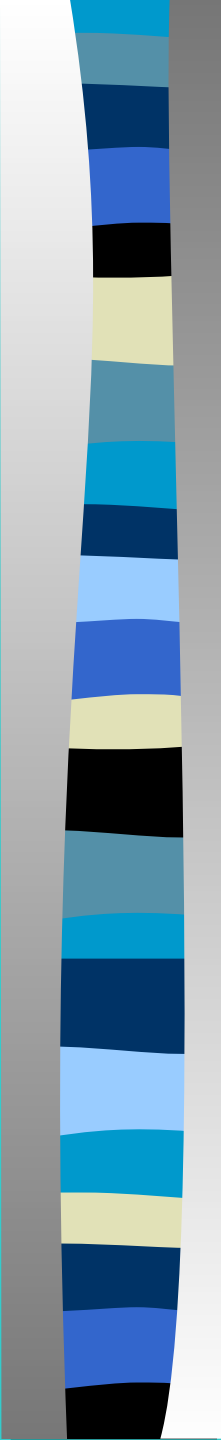
**Факторы транскрипции – главные регуляторы
генной активности**

Транскрипция с разных промоторов

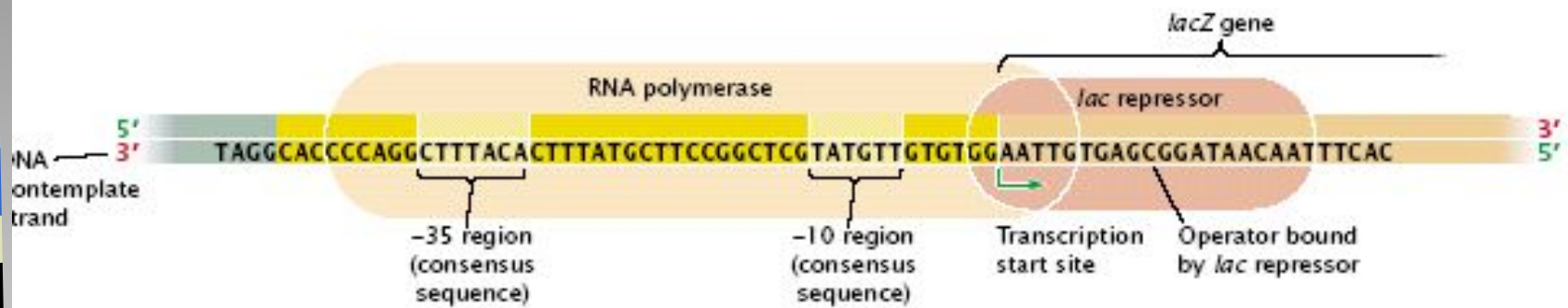
В гене коллагена 43 экзона и 2 промотора варианты транскрипции приводят к образованию 3 изоформ белка – 1 короткой и 2 длинных. Дисбаланс изоформ приводит к патологии сетчатки глаза

Фрагмент С-концевого участка коллагена – эндостатин содержит 2 дисульфидные связи (183 АМК)

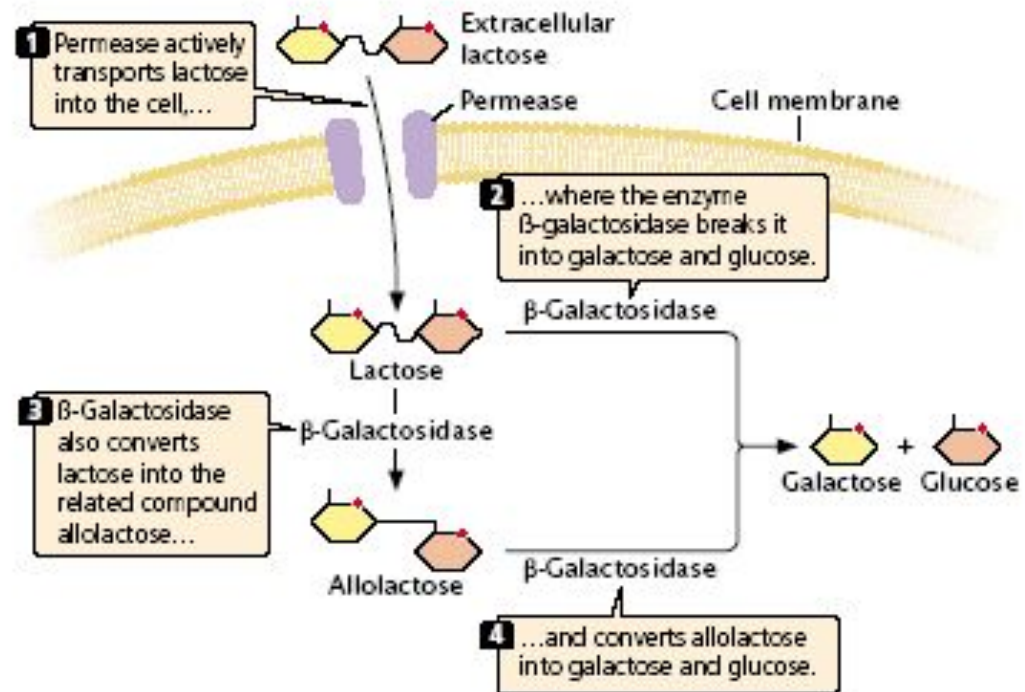
Рецептор пролактина имеет 3 промотора, обладающих разн тканеспецифичностью



Регуляция экспрессии генов у прокариот – на примере лактозного оперона



В *lac*-опероне оператор перекрывает промотор и 5-конец 1 структурного гена

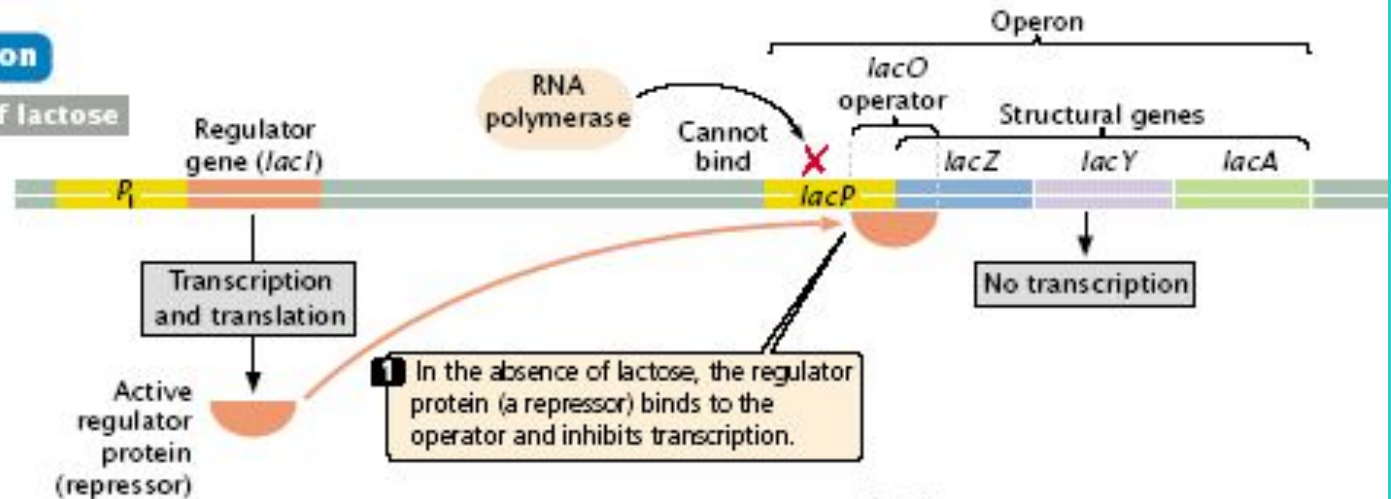


16.6 Lactose, a major carbohydrate found in milk, consists of 2 six-carbon sugars linked together.

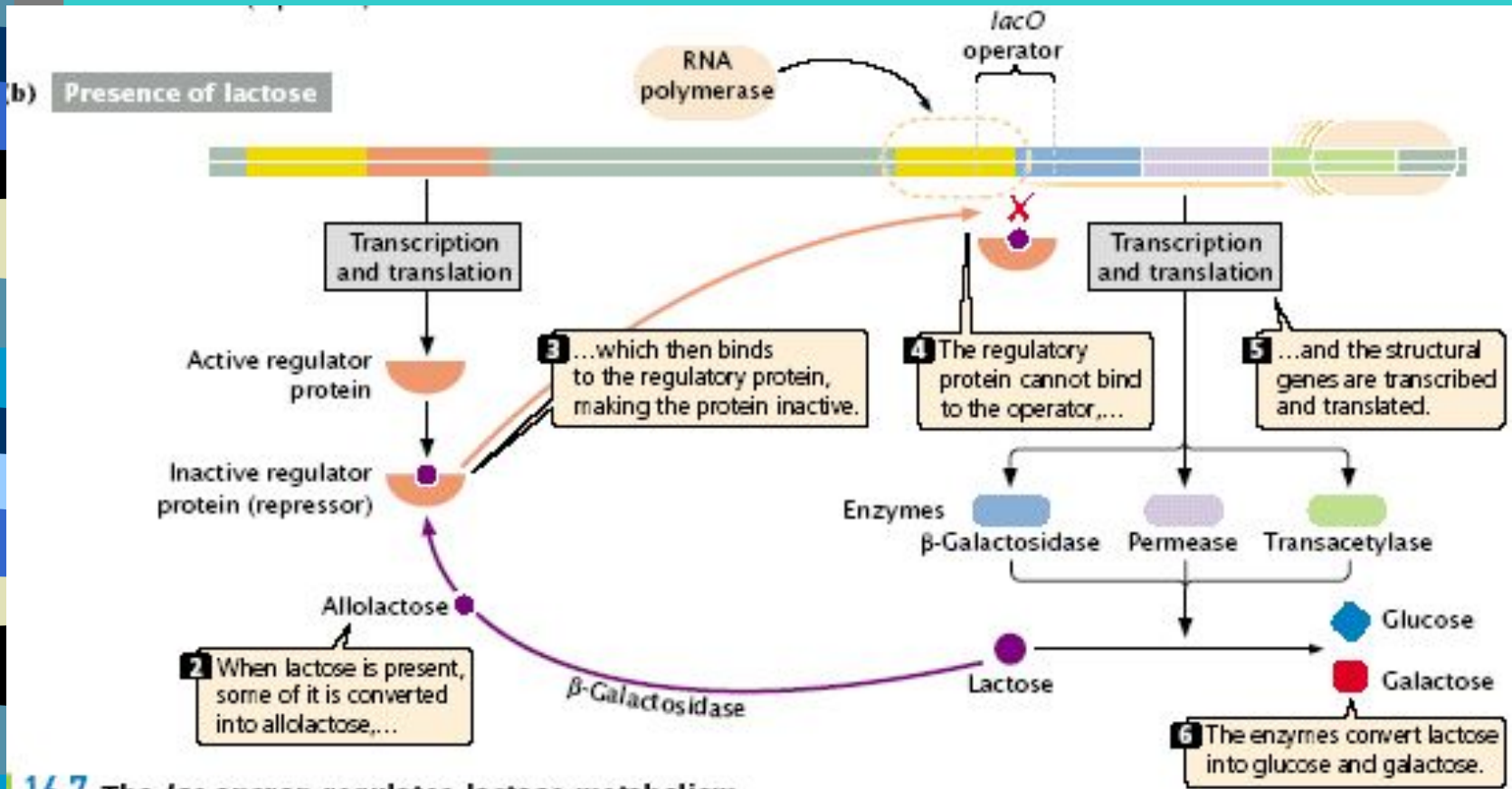
Метаболизм лактозы

The *lac* operon

(a) Absence of lactose

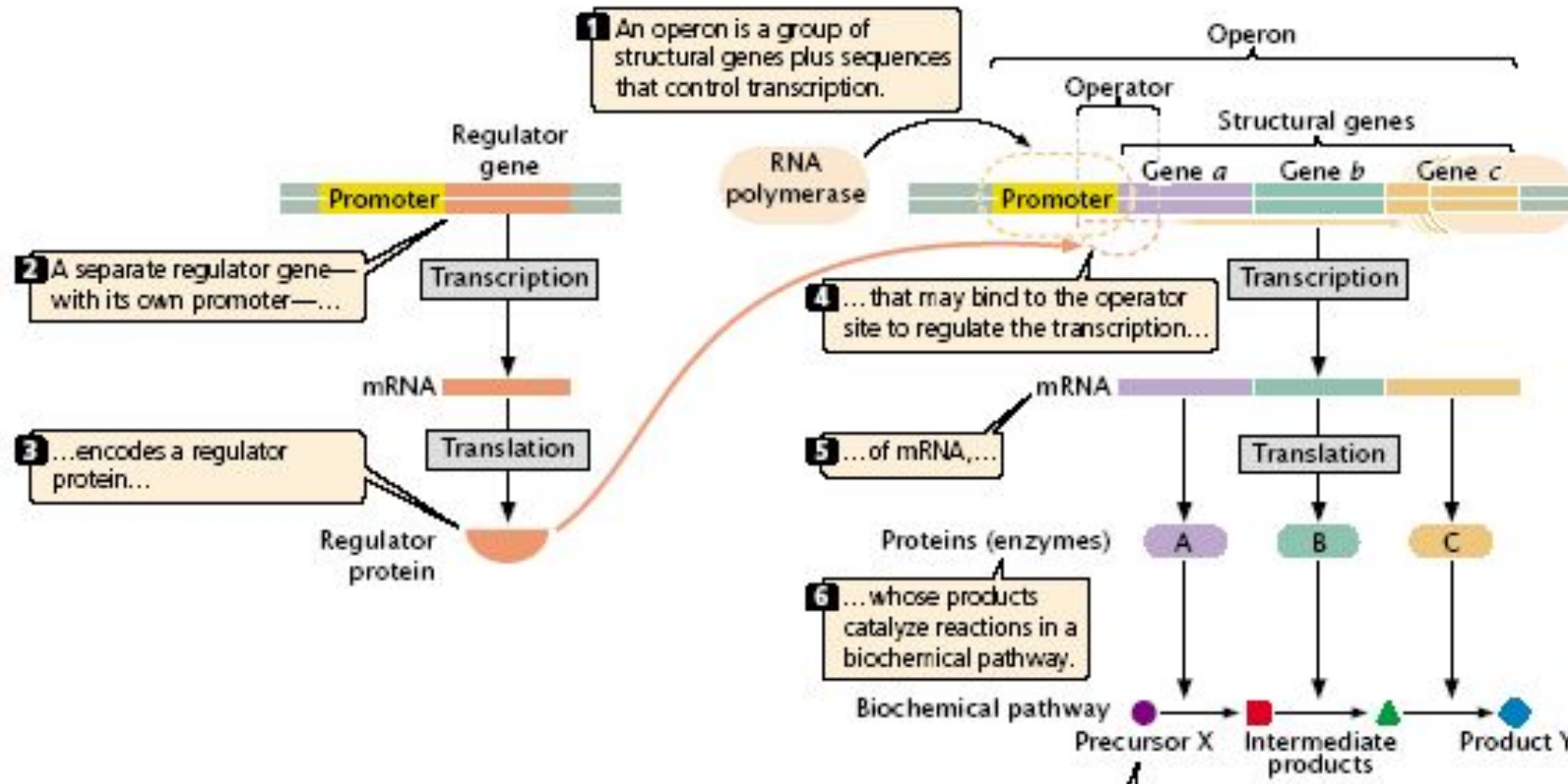


При отсутствии в среде лактозы белок-репрессор связывается с оператором и препятствует соединению РНК-полимеразы с промотором и отменяет транскрипцию 3-х генов.



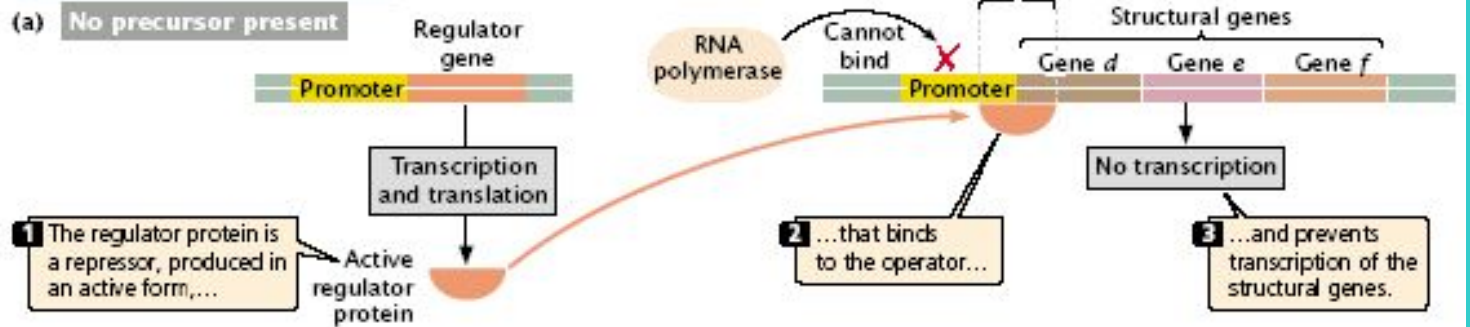
16.7 The *lac* operon regulates lactose metabolism.

При появлении лактозы репрессор связывается с ней, а не с оператором, транскрипция идет

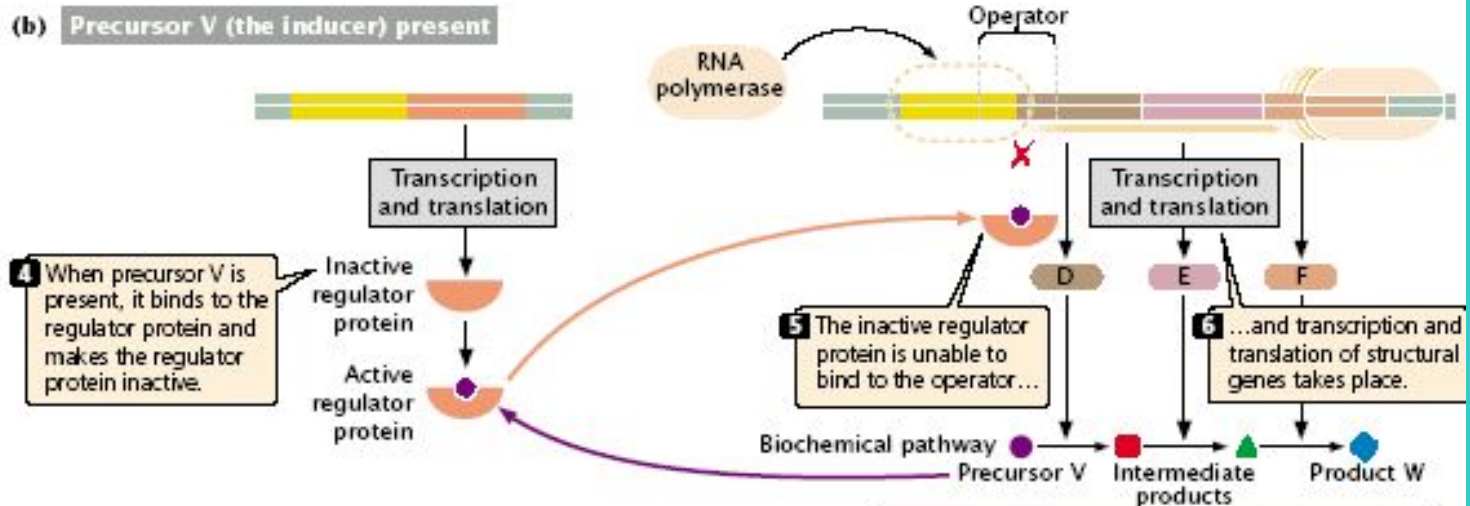


Negative inducible operon

(a) No precursor present

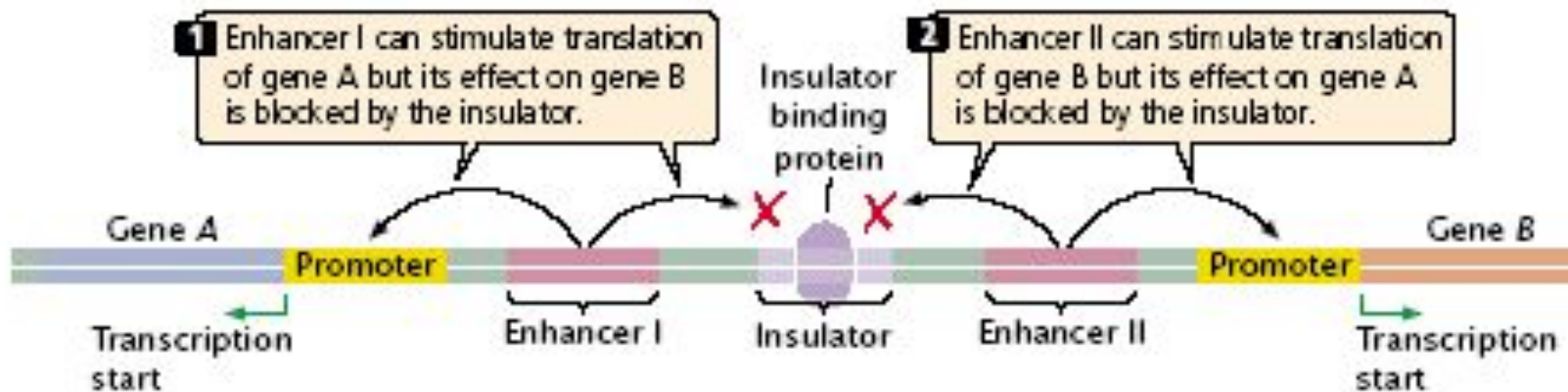


(b) Precursor V (the inducer) present



Conclusion: The operon is turned on (and produces product W) only when precursor, V, is available.

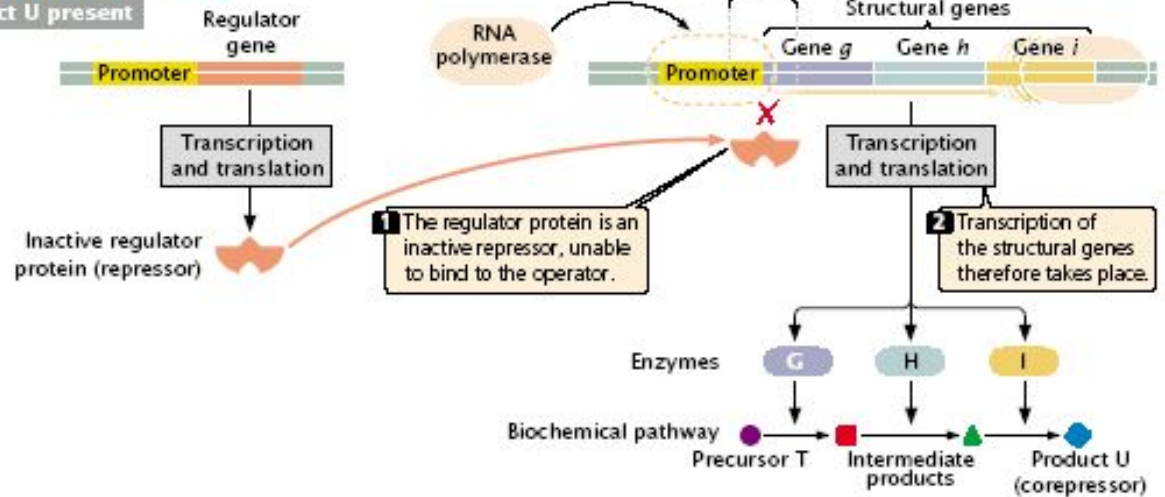
16.4 Some operons are inducible.



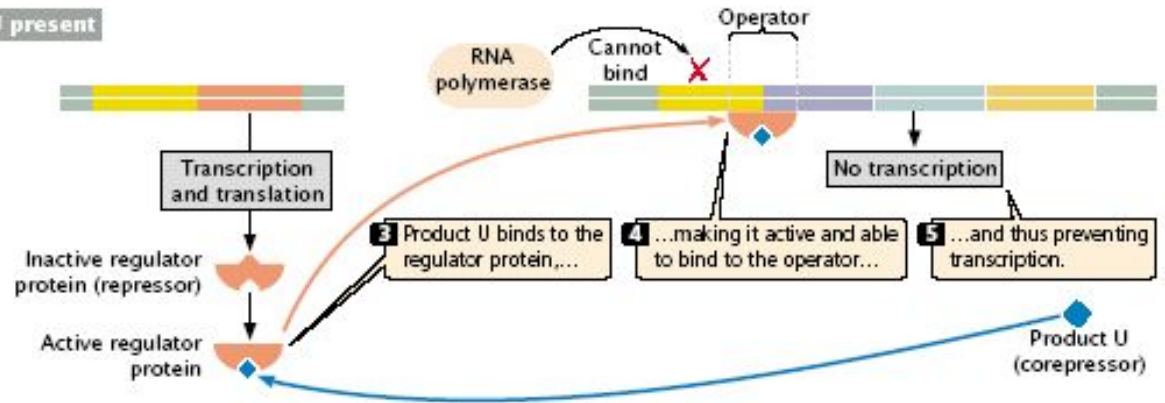
Инсулятор блокирует действие энхансера, если инсулятор находится между энхансером и промотором

Negative repressible operon

(a) No product U present

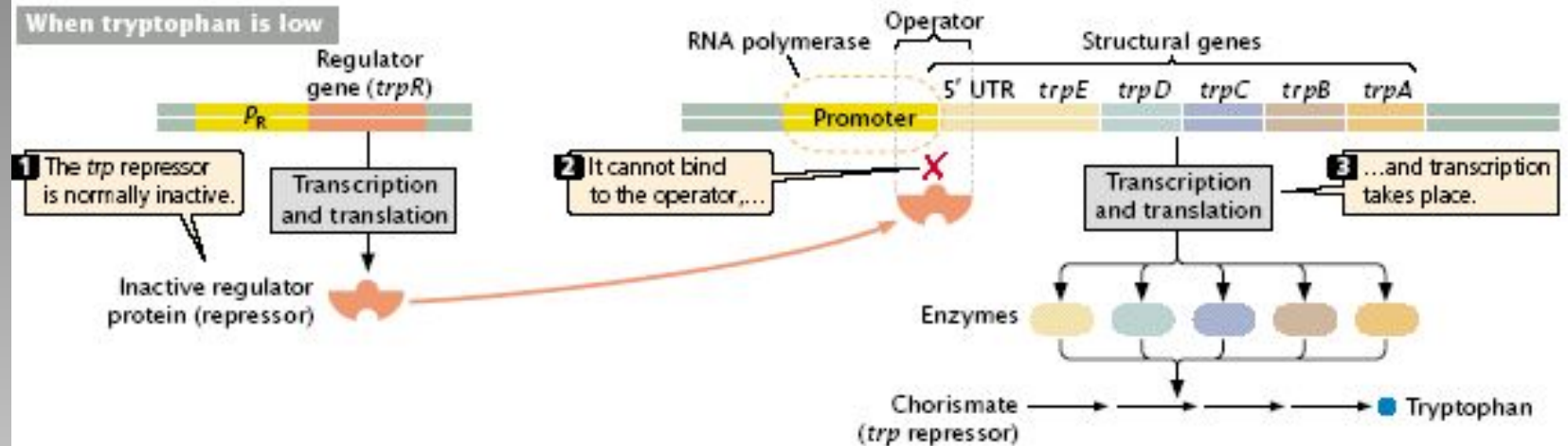


(b) Product U present

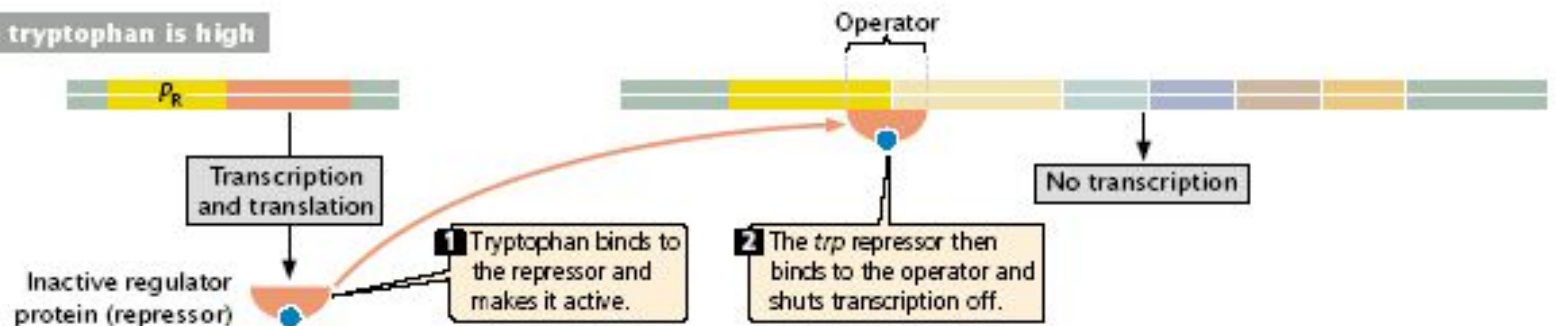


16.5 some operons are repressible.

When tryptophan is low

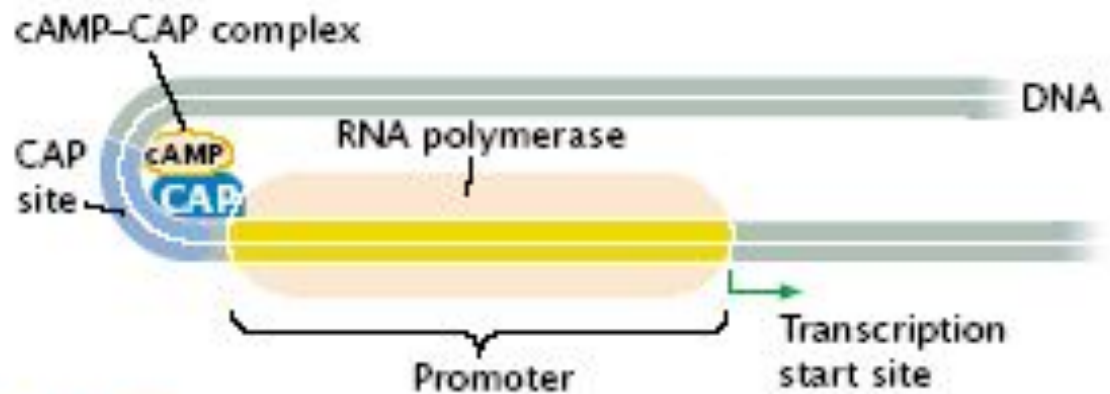
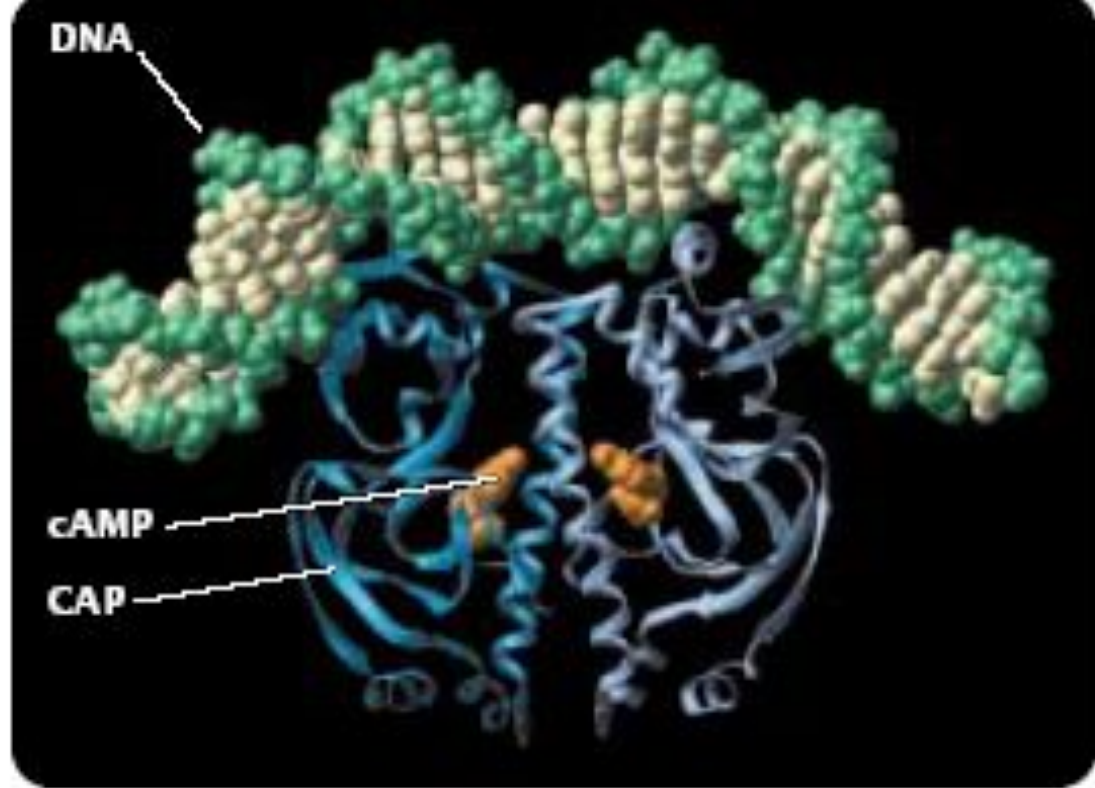


When tryptophan is high



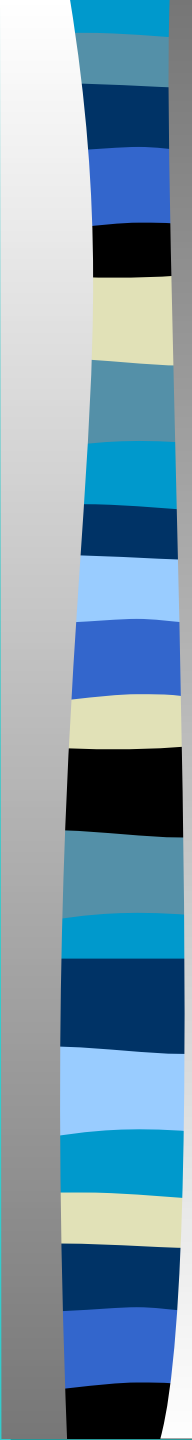
16.14 The *trp* operon controls the biosynthesis of the amino acid tryptophan in *E. coli*.

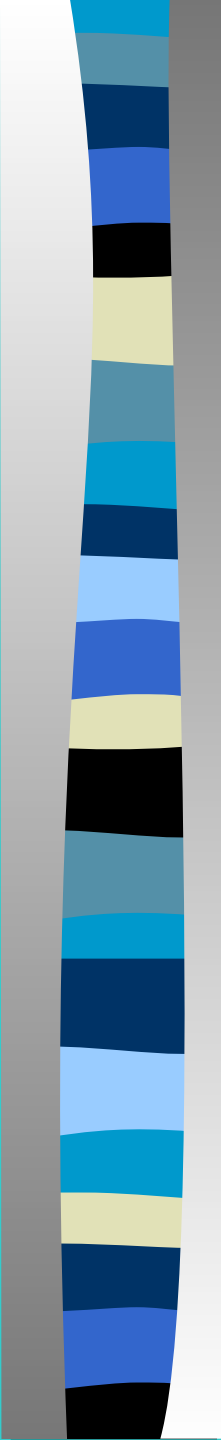
Активация
транскрипции
за счет
связывания
cap и cAMP



Регуляция транскрипции транспозонами (Т)

- Поскольку Т несут в своем составе регуляторные сигналы для Тр, (промоторы, энхансеры, сайленсеры, инсуляторы) то перемещение этих сигналов по хромосоме может изменять Тр смежных с ними генов
- После удаления Т его промотор может остаться на месте
- ретроТ внедряются чаще в регуляторные районы генов. При этом ген-хозяин не портится и терпит Т
- Брешь после удаления Т может залечиваться с ошибками, т. е. остается след после Т в виде мутации

- 
- T может изменить границы петель. Некоторые T могут нести последовательности инсулятора, с которым связываются белки. Например, у гурсу последовательность инсулятора повторена 12 раз
 - T могут участвовать в перестройках хромосом. Например, *mariner* обеспечивает неравный кроссинговер и делецию в 17 хромосоме, что проявляется в нейродегенеративных заболеваниях и повышении уровня холестерина

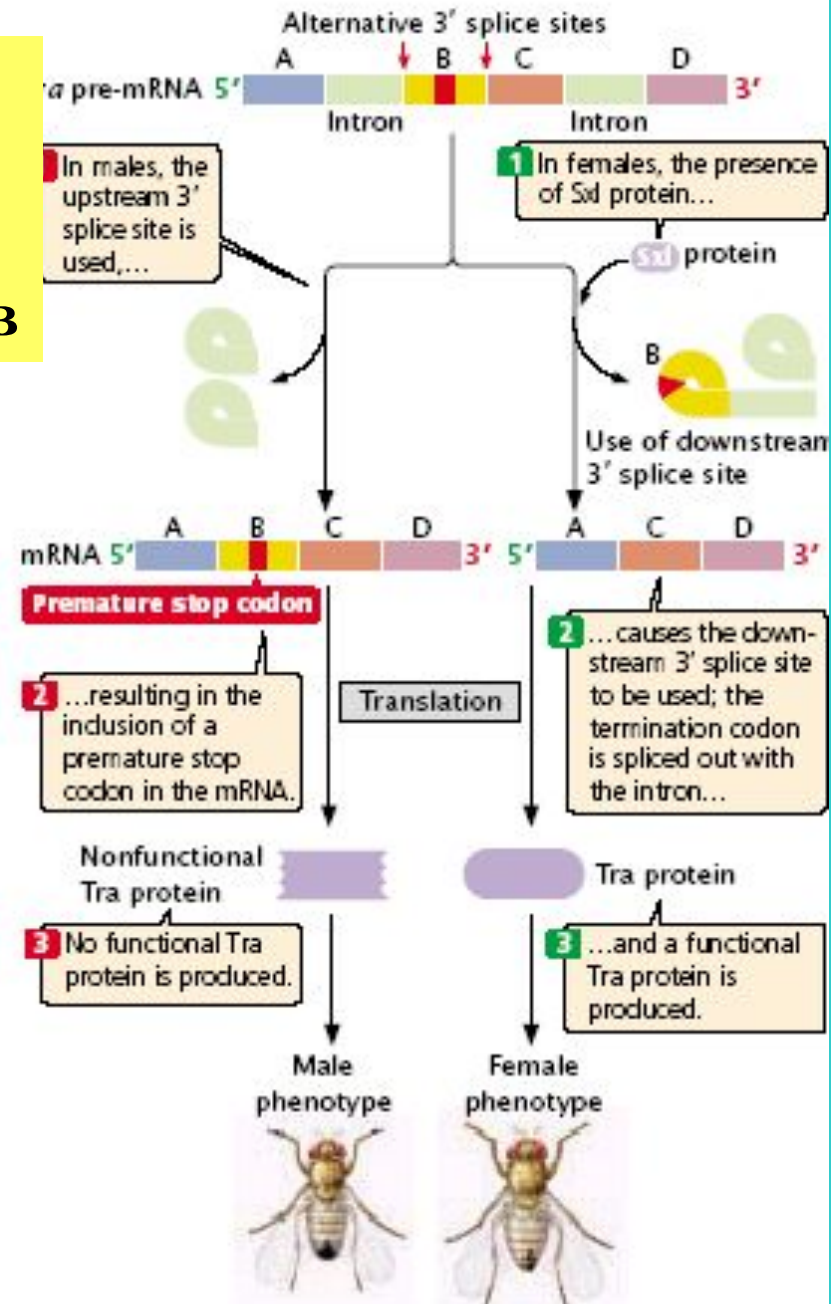


Эукариотические мРНК довольно стабильны (часы и сутки) До выхода в цитоплазму они проходят процессинг. Поэтому часто регуляция на уровне транскрипции не возможна. Возрастает важность следующего уровня

Посттранскрипционный уровень регуляции генной активности

- **Транспорт мРНК из ядра**
- **Процессинг мРНК**
- **Альтернативный сплайсинг**
- **Редактирование мРНК (Aро-В в печени 4563 АМК, в кишечнике – В-48- 2152 АМК, за счет изменения в 2153 САА на UAA т.е. образование стоп-кодона**
- **Альтернативные сайты полиаденилирования обеспечивают разную силу матрицы**

Альтернативный сплайсинг как регулятор активности генов



Редактирование РНК – термин предложен Р. Бенни для феномена встраивания 4 У .

В митохондриальный транскрипт одной из субъединиц цитохромоксидазы трипаносомы *brucei*. Это исправляет закодированный в ДНК сдвиг рамки

Считывания и приводит к синтезу функц. белка
Процесс осущ-ся гидовой РНК. Редактируемый комплекс наз. Эдитосома

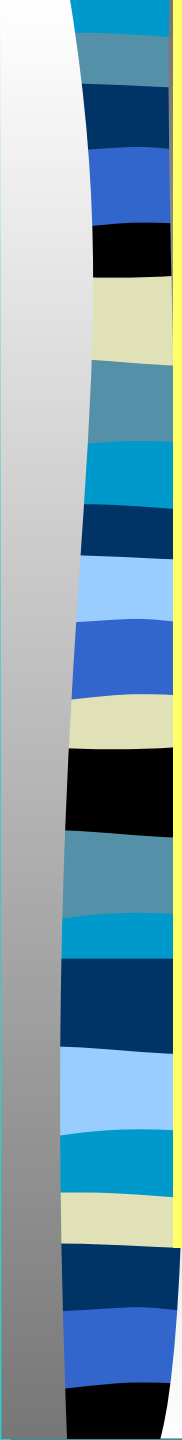
У млекопит. обнаружено тканеспец.

Редактирование мРНК аполипопротеина В путем дезаминирования С –U и модификацию А-Т в гене рецептора глутамата

Биологические последствия редактирования РНК

- Образование пригодной для трансляции РНК
- И редактированная и неотредактированная РНК могут быть матрицами для трансляции белков, различающихся по функции
- Позволяет синтезировать 2 тРНК с одного гена (в митохондриях животных)
- Может сделать мРНК более стабильной
- Т.О. – это механизм регуляции генной активности

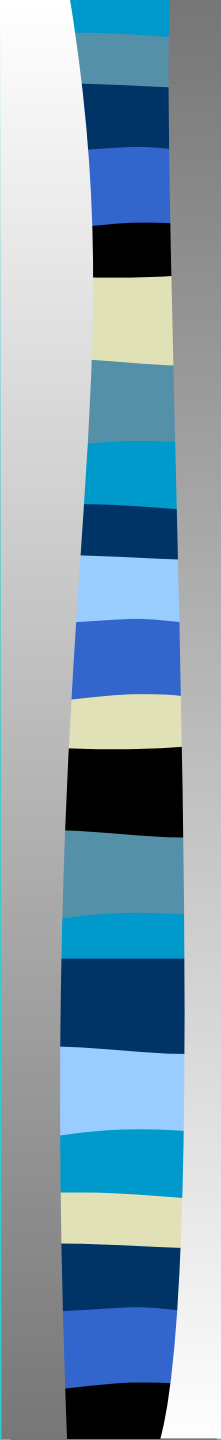
- Инициация трансляции с альтернативных сайтов
- Регуляция активности матрицы. Очень активные мРНК у вирусов и фагов, у мажорных белков
- Регуляция полужизни матрицы (ген глобина 10 часов. гены факторов роста менее 1 часа, гены гистонов в S-периоде – несколько часов, в G2 –периоде – 10-15 минут)
- Изменение стабильности мРНК
- Роль 5 и 3 НТО в регуляции трансляции (регуляция синтеза ферритина)
- Изменение скорости трансляции
- Альтернативные сайты терминации трансляции
- Зависимость от контекста. Так, селеноцистеин кодируется стоп-кодоном UGA если за ним определенны контекст. Контекст называют вторым генетическим кодом



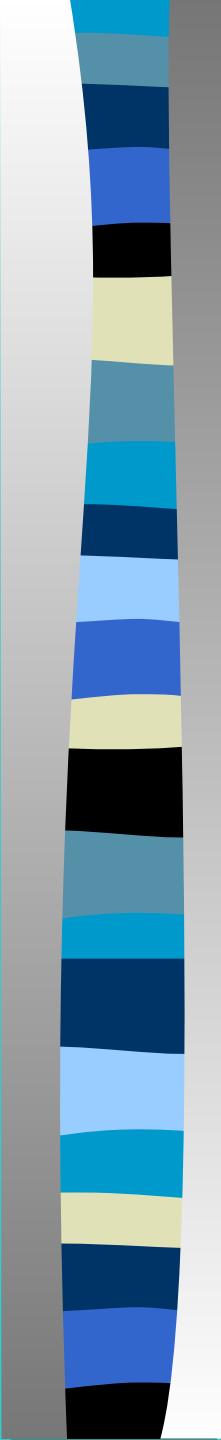
Регуляция синтеза ферритина если железа в среде мало, то соответствующая мРНК не транслируется. Ингибирование происходит на стадии инициации белком, который имеет сродство к ионам железа и связываясь с ним отваливается от ферритиновой мРНК. Вновь синтезированный ферритин отнимает железо от репрессора, который опять приобретает сродство к ферритиновой мРНК и останавливает синтез ферритина. Сюрприз в том, что репрессор – это известный фермент цикла Кребса- аконитаза

Дискриминация мРНК- инициирующие участки РНК имеют разное сродство к рибосомам и поэтому с разной эффективностью связывают их. Поэтому существуют сильные и слабые матрицы. Это определяется факторами инициации, которые локализуются на инициирующих субъединицах рибосом, зависит от контекста в районе AUG, шпилек и удлинения 5'НТО, декепирования мРНК

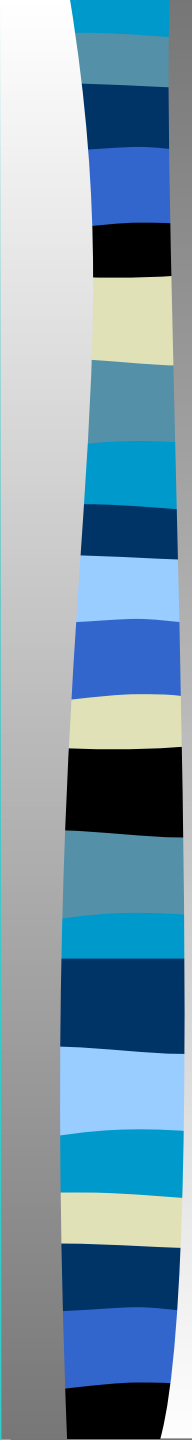
Нормальная трансляция зависит от положения мРНК в клетке. Так, в ооцитах D_r мРНК генов *oskar* и *nanos* для трансляции должна занять место на переднем конце яйца, а для гена *bicoid* –на заднем. Это обеспечивается связыванием с



Трансляционная репрессия – белок репрессор связывается с участком инициации трансляции и препятствует связыванию иницирующей рибосомы. Часто репрессором служит продукт данной РНК (ферритин)



Маскирование мРНК – осуществляется белком связывающимся с 3' НТО. Как связывание с хвостом затыкает рот всей мРНК? Очевидно за счет изменения конформации молекулы. Маскирование и демаскирование мРНК – это прием быстрого регулирования синтеза РНК у эукариот



Рнк не выходит из ядра, пока не закончится ее процессинг.

У ВИЧ есть регулируемый ядерный транспорт. Он заключается в том, что после транскрипции его РНК, клеточный механизм не может их выпустить из ядра, но у вируса на этот случай имеется ген Rev, облегчающий выход непроцессированных вирусных РНК в цитоплазму для дальнейшей трансляции

6. Белки, связываясь с 3'НТО и 5'НТО подавляют трансляцию

7. Фосфорилирование иницирующих факторов регулирует синтез белка

7. Подавление трансляции ми РНК

Посттрансляционный уровень регуляции

- Фолдинг белка
- Роль гликозилирования, фосфорилирование,
- ацетилирование и др и др. модификации белка
- Удаление частей полипептида (интеинов, сигнальной последовательности)
- Феномен прионизации белка

Гипотеза гистонового кода – ковалентные модификации ДНК и гистонов

- гипoaцетилирование, убиквитирование и фосфорилирование гистонов
- Метилирование гистонов и ДНК В результате образуются участки компактизации хроматина, не способные к транскрипции
- На цитологическом уровне сайленсеры – это участки гетерохроматина

Особенности регуляции генной активности у эукариот

- Отсутствие единой рег. системы
- Моноцистронный
- Комбинационный характер регуляции – у одного гена – регуляторов. У разных генов – перекрывающиеся наборы генов

- Плейотропный эффект генов-регуляторов
- Преобладание позитивной, а не негативной

Регуляции

- Специфическая регуляция гормонами
- Участие компактизации хроматина
- Регуляция на всех уровнях от ДНК до продукта и после