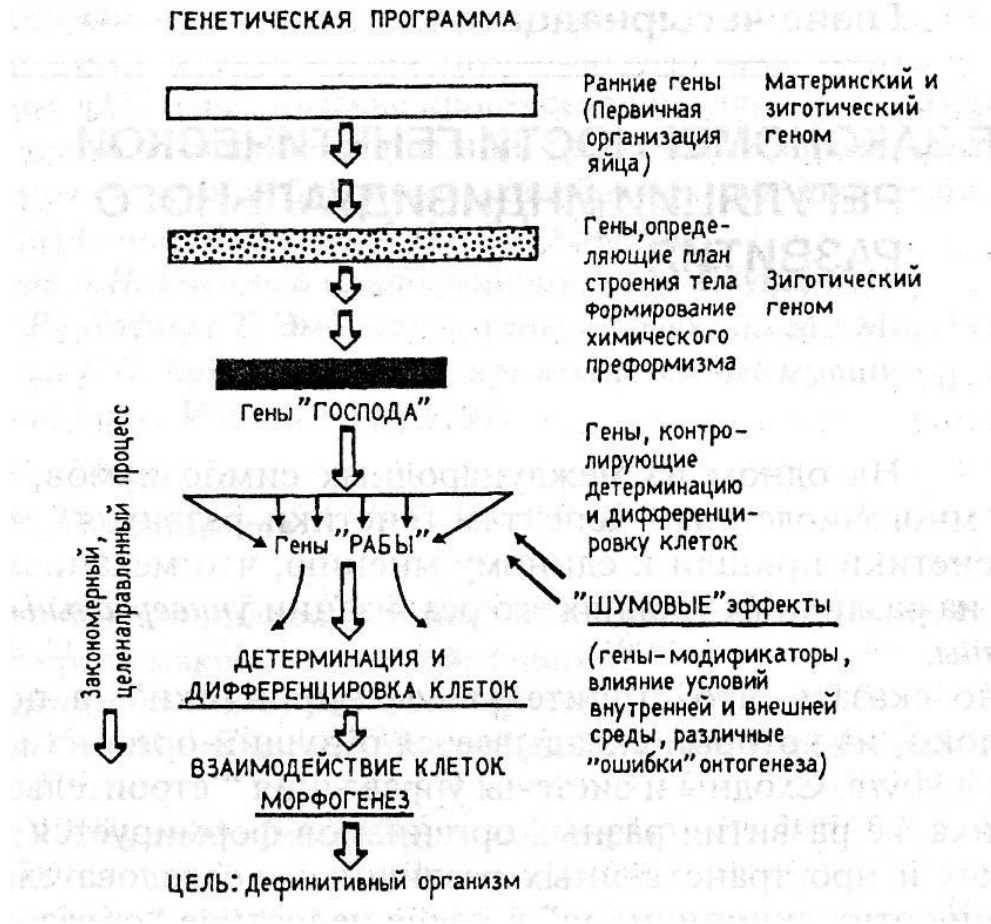


Молекулярно-генетический уровень

Схема генетического контроля индивидуального развития на разных этапах



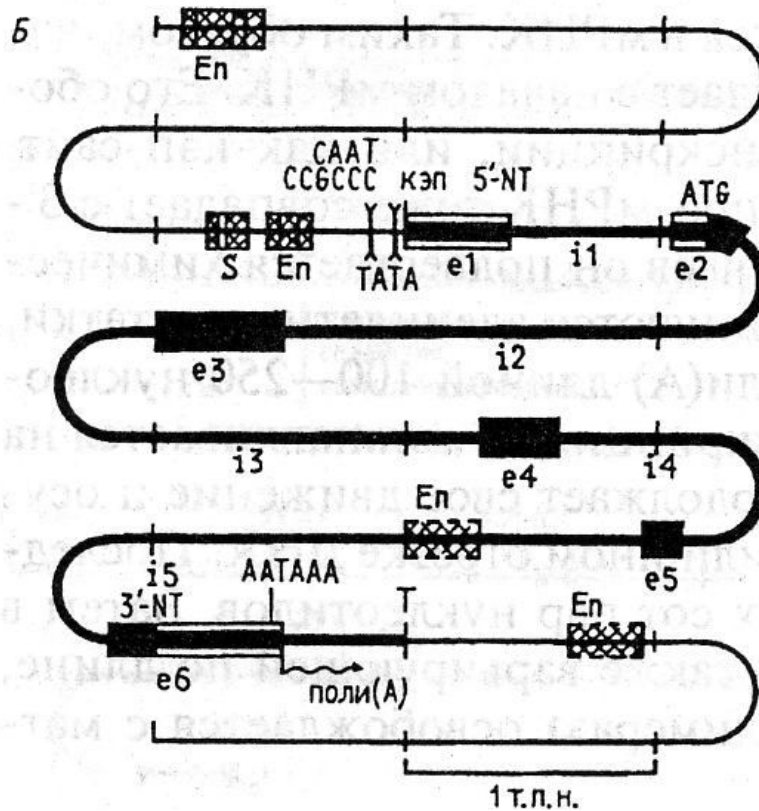
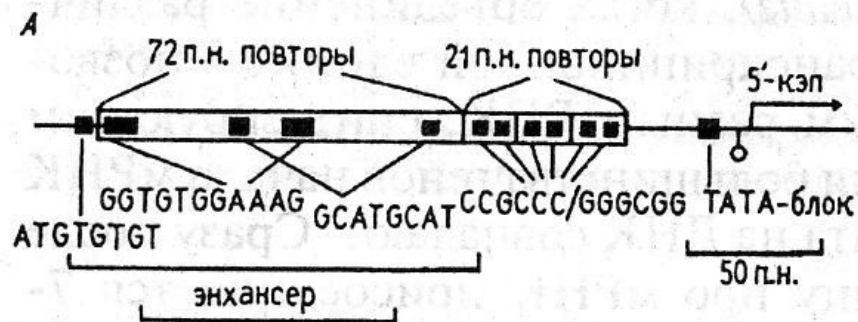
Как устроен ген?

- Тонкая структура гена эукариот.
- Определение гена.
- В молекулярной биологии существует два подхода:
- Ген – это участок ДНК, соответствующий единице транскрипции. То есть – это участок ДНК, кодирующий информацию о каком-то продукте (белке).
- Ген – это участок ДНК, включающие сам структурный ген и окружающие его регуляторные зоны – промоторы, энхансеры, санлейсеры и др.
- Будем придерживаться второй точки зрения.

последовательности эукариотического гена (по Георгиеву, 1989).

А - регуляторные последовательности эукариотического вируса SV40; «Сердцевинные» последовательности энхансеров и важнейшие последовательности промотора;

Б - схема «усредненного» эукариотического гена, состоящего из 6 экзонов (Е) и 5 интронов (i) (в масштабе). Указаны энхансеры (En) и сайленсер (S) с их сердцевинными последовательностями (блоки внутри), возможные места положения энхансеров, элементы промотора, нетранслируемые области (5' - NT и 3' - NT) гена. Иницирующий кодон (AUG).



Структурный ген

- состоит из экзонов, кодирующих последовательности ДНК с информацией о первичной структуре белка и интронов – не кодирующих информацию о структуре белка. Интроны разделяют экзоны.
- Количество экзонов и интронов – варьирует.
- Например: рекордное число интронов (около 50) найдено в гене, кодирующем аминокислотную последовательность белка коллагена.
- Размеры интронов и экзонов – также колеблются в широких пределах – например в гене, кодирующем коллаген есть экзоны кодирующие последовательность в 15-18 аминокислот (45-54 пар оснований).
- Размер интронов иногда составляет несколько десятков пар нуклеотидов, но изредка, как у дрозофиллы могут достигать нескольких десятков тысяч пар.

Как работает ген?

- Во время транскрипции, когда к ДНК присоединяется РНК-полимераза, кодирующая часть гена начинается иницилирующим кодоном и заканчивается терминирующим.
- Кодирующая часть гена располагается в центральной части иРНК и подлежит трансляции.
- Кодирующей части предшествует 5' - нетранслируемая область, а за ней следует 3' - нетранслируемая область. Их размеры варьируют в разных типах иРНК.
- Эти области, вероятнее всего участвуют в регуляции процессов трансляции.
- Имеются данные, что 3' - нетранслируемая область определяет время жизни иРНК, а 5' - нетранслируемая область влияет на эффективность процесса трансляции.

Процесс созревания иРНК

- (превращение «юной» иРНК в «зрелую» иРНК) происходит в результате сплайсинга и процессинга.
- Особенностью этого процесса является то, что в процессе сплайсинга одной исходной иРНК могут образоваться разные по количеству экзонов иРНК (пример с белком кальцитонина – в клетках щитовидной железы иРНК строится из экзонов 1,2,3 и 4, а в клетках мозга – из экзонов 1,2,3,5 и 6).
- Это явление носит название альтернативный сплайсинг.

Точка инициации транскрипции

- Для большинства генов начало иРНК и начало первичного транскрипта на ДНК – совпадают.
- «Кэпирование» 5' - конца это процесс, при котором происходит присоединение к 5' - концу юной иРНК 7-метилгуанозинтрифосфатной группы.
- «Кэп» сохраняется в иРНК и получил название кэп-сайт.
- Этот участок сохраняется в иРНК и совпадает с началом молекулы уже зрелой иРНК.

Адениловый хвост прерывает транскрипцию

- 3' - конец первичного транскрипта («юной» иРНК) также совпадает с 3' - концом зрелой иРНК.
- Он не сохраняется в неприкосновенности, а в большинстве случаев к нему присоединяются аденилатные остатки.
- В результате этого процесса на конце молекулы зрелой иРНК формируется поли (А) хвост, содержащий 100-250 нуклеотидов.

Регуляторная часть гена

- Перед кодирующим участком гена находится регуляторные единицы, иногда на расстоянии нескольких десятков тысяч единиц пар нуклеотидов.
- Первый участок – промотор.
- Он находится перед кэп-сайтом и определяет правильность инициации транскрипции.

В промоторе центральным элементом является ТАТА-бокс

- Эта последовательность в усредненном виде выглядит как ТАТААА и окружена короткими районами обогащенными GC – парами.
- ТАТА-бокс располагается на расстоянии 25 пар нуклеотидов перед кэп-сайтом.
- ТАТА-бокс вместе с промотором служат для связывания с ДНК факторов транскрипции, необходимых для образования комплекса РНК-полимеразы с ДНК и для запуска синтеза иРНК.

Основной контроль транскрипции

- Основной контроль транскрипции контролируется цис-регуляторными последовательностями нескольких видов:
- **Энхансеры** - усилители транскрипции;
- **Сайленсеры** - ослабители транскрипции;
- **Инсуляторы** – MAP/SAR последовательности, обеспечивающие относительную автономность функций гена и его регуляторных последовательностей, т.е. относительную независимость транскрипции от функционального состояния соседних генов.

Межмолекулярные взаимодействия на промоторе РНК – полимеразы II (Патрушев, 2000 г)

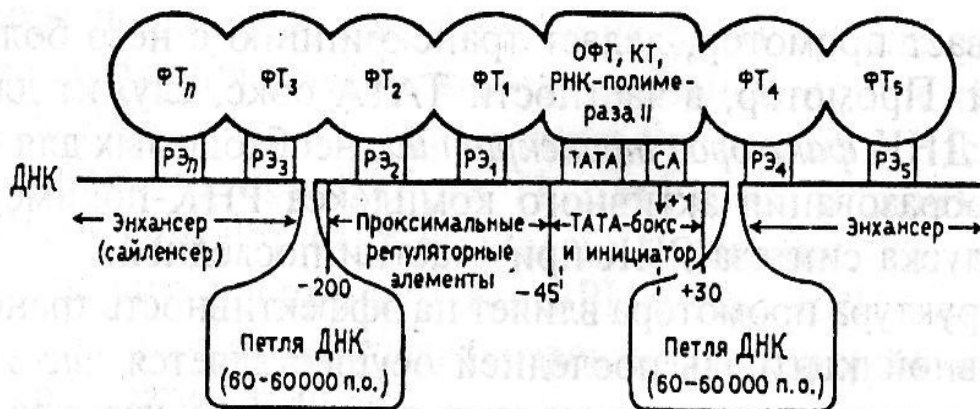


Рис. 3.4. Межмолекулярные взаимодействия на промоторе РНК-полимеразы II (по: Патрушев, 2000).

РЭ₁–РЭ_n — последовательности нуклеотидов регуляторных элементов промотора; ФТ₁–ФТ_n — взаимодействующие с ними регуляторные факторы транскрипции; ОФТ — основные факторы транскрипции; КТ — коактиваторы транскрипции; +1 — точка инициации транскрипции

Местоположение цис-регуляторных элементов

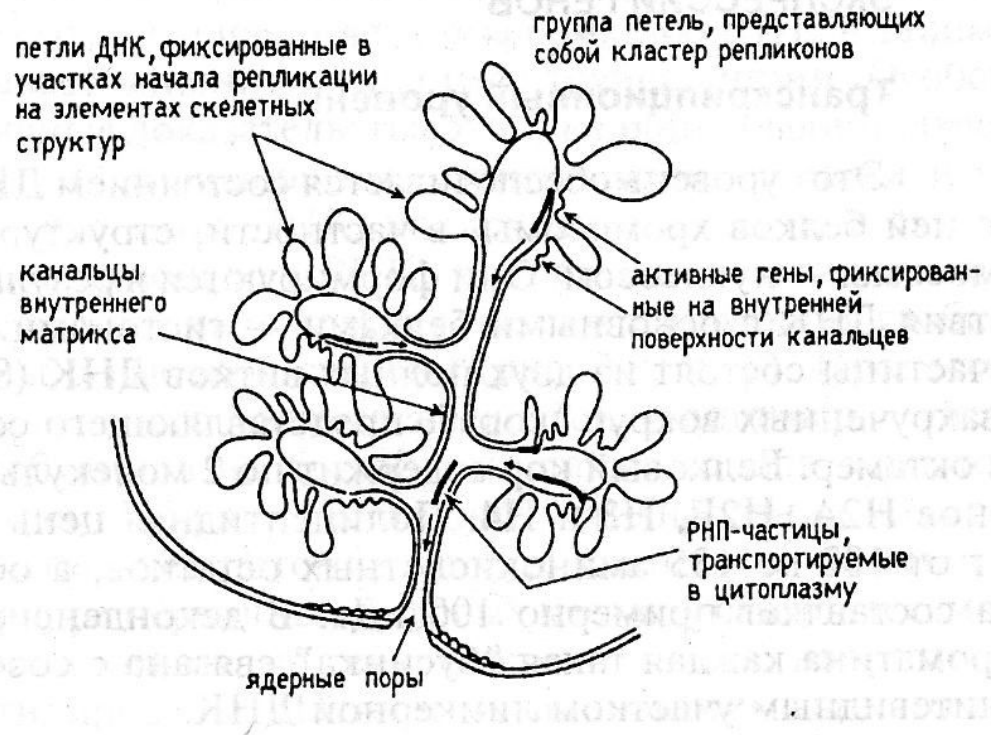
- Эnhансеры и сайленсеры могут находиться в самых разных местах структурного гена:
- А) перед кодирующей частью на расстоянии 3-10 и более тысяч п.н. от кэп-сайта.
- Б) непосредственно в интронах;
- В) за сайтом полиаденилирования
- Г) перекрываться с кодирующими последовательностями.

Энхансеры

- - короткие последовательности ДНК (100-200 пар оснований), состоят из нескольких модулей (коротких олигонуклеотидов – отвечающих за связывание определенного регуляторного белка);
- - могут действовать на больших расстояниях (независимо от того далеко ли они от точки инициализации синтеза иРНК или после точки терминации);
- - механизм действия – создание благоприятной конформационной ситуации в соответствующем участке ДНК.
- - каждый энхансер может взаимодействовать с целым рядом регуляторных белков, которые вырабатываются в определенных тканях
- - взаимодействие белкового фактора и энхансера может контролироваться гормонами, металлами, низкомолекулярными веществами и др.
- ИТОГ: Энхансеры включают и выключают некоторые гены.

- Между энхансерами и сайленсерами нет четкого разграничения.
- Одна и та же последовательность может выступать и в роли энхансера и в роли сайленсера.
- Активация (через энхансеры) или подавление транскрипции (через сайленсеры) происходит в зависимости от того, какие регуляторные белки вырабатываются в клетках данного типа

Модель организации интерфазной хромосомы, основанная на предположении о том, что ядерный матрикс представляет собой систему канальцев (Ярова, 1997 г.)



Второй уровень компактизации хроматина

- Образование хромомеров возможно за счет специфических последовательностей нуклеотидов, которые специфически взаимодействуют с ядерным матриксом (или ядерным скэффолдом – скелетом).
- Такие последовательности называются MAR (Matrix Associated Region) или SAR (Scaffold Associated Region) MAR/SAR.
- Возможно, именно MAR/SAR последовательности выполняют функции инсуляторов.
- Инсулятор – это цис-регуляторный элемент, который блокирует взаимодействие между энхансером и промотором, если он расположен между ними.

Многоуровневый принцип регуляции экспрессии генов

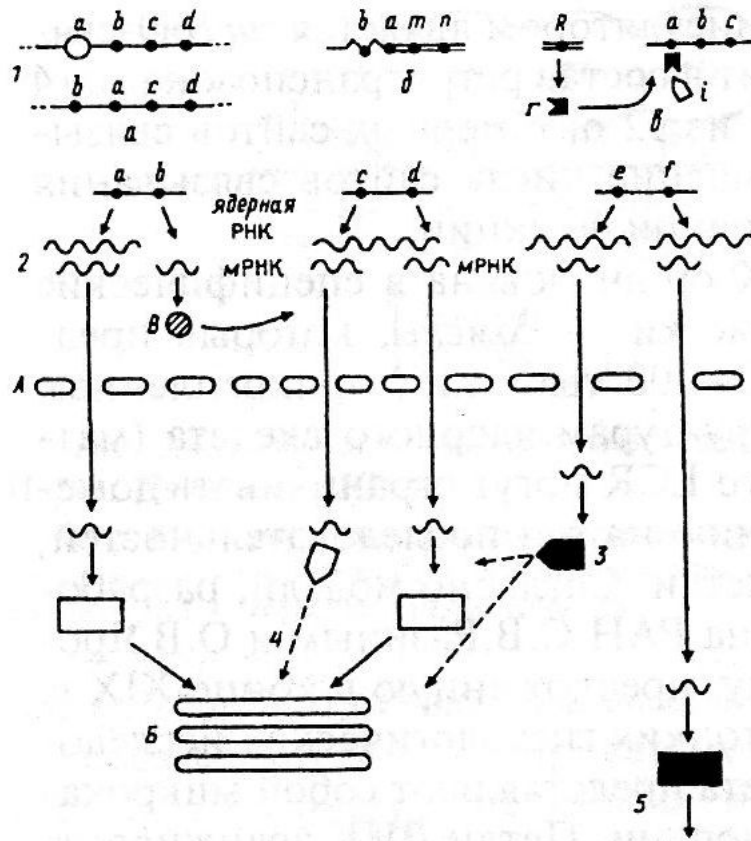


Рис. 3.6. Схема уровней регуляции экспрессии генов, проявляющихся в различных генных взаимодействиях (по: Корочкин, 1981).

1 — взаимодействие генов на транскрипционном уровне, включающее эффекты инверсии (а), транслокации (б) и индукции по типу Жакоба и Моно (в). а—d — структурные гены; R — ген-регулятор; r — репрессор, i — индуктор.

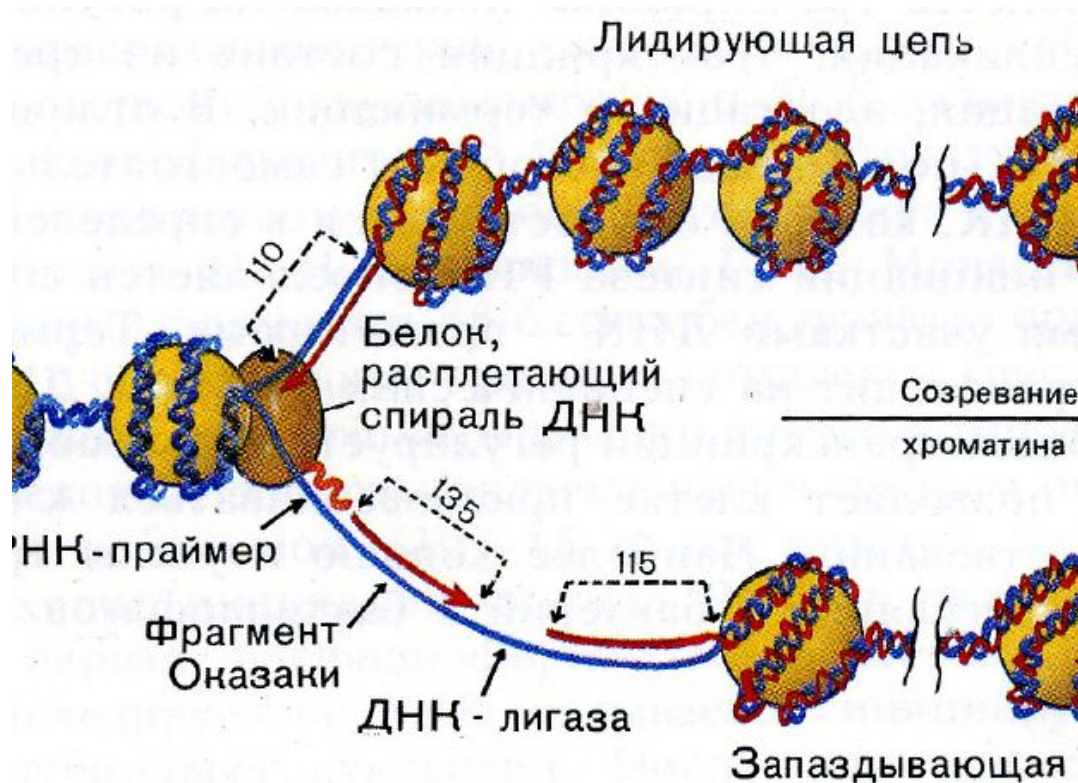
2 — посттранскрипционная регуляция на уровне процессинга или скорости транспорта мРНК из ядра в цитоплазму. B — комплекс, регулирующий процессинг; 3 — взаимодействие генов на уровне регуляции скорости синтеза и деградации продукта; 4 — действие генов, контролирующих связывание продукта трансляции с клеточными мембранами, ингибиторами или другими веществами; 5 — действие генов, контролирующих синтез продуктов, которые осуществляют различные межклеточные взаимодействия (морфогенетические движения, индукцию и т.д.). А — ядерная, Б — клеточная мембрана

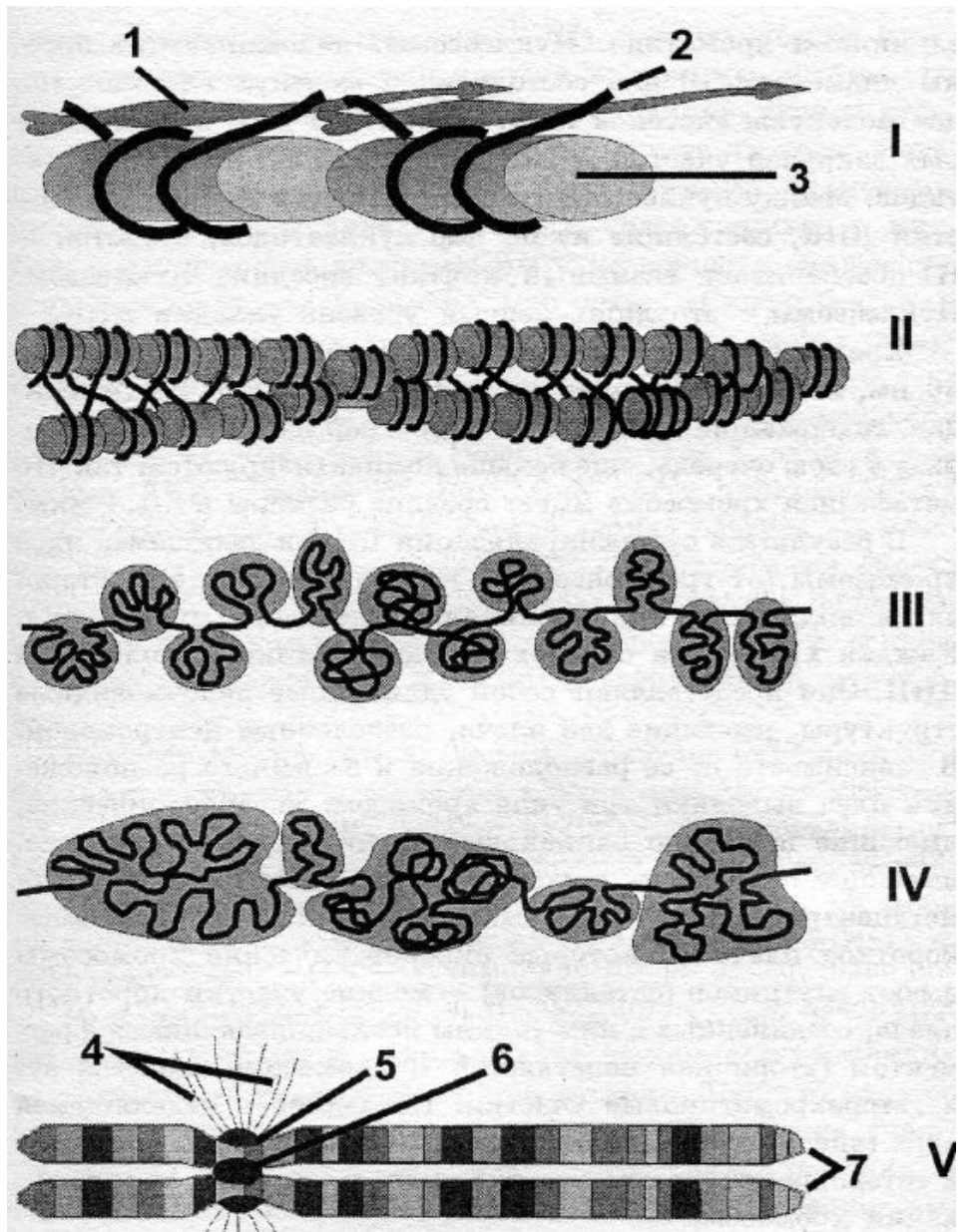
Транскрипционный уровень

- Этот уровень обеспечивается состоянием ДНК и связанных с ней гистонов в структуре нуклеосом. Нуклеосома состоит из двух полных витков ДНК (83 пары нуклеиновых оснований на один виток), закрученных вокруг «кора», представляющего собой белковый (гистоновый) октамер.
- В деконденсированной форме хроматина каждая такая «бусинка» связана с соседней частицей нитевидным участком линкерной ДНК.

Белковый «кор» содержит по две молекулы каждого из гистонов H2A, H2B, и H4.

Полипептидная цепь гистонов содержит от 102 до 135 аминокислотных остатков.





Процессы, влияющие на транскрипцию

- На транскрипцию влияют два химических процесса:
- метилирование, действующее непосредственно на ДНК;
- ацетилирование, действующее на белки хромосом.

- **Метилирование** происходит при действии фермента метилазы, который присоединяет метильную группу к цитозину.
- Этот процесс меняет конформацию ДНК, что действует на процесс транскрипции.

Факты:

- При исследовании процесса дифференциации куриных и человеческих эритроцитов было обнаружено, что в них ДНК, кодирующая глобины полностью не метилирована, в то время как ДНК, кодирующая гены глобинов в других клетках метилирована в высокой степени.

- При исследовании процессов связанных с переключением при синтезе иммуноглобулинов с одного типа на другой – обнаружено деметилирование соответствующих генов в ДНК.

- Состояние метилирования может передаваться от одной клетки к другим в ряду клеточных поколений. ДНК ядер ППК у самцов – метилированы слабо. Гены в ДНК яйцеклеток и сперматозоидов – метилированы интенсивно.
- Но степень метилирования в яйцеклетках и сперматозоидах может отличаться. Это отцовский и материнский импринтинг, который привносит дополнительную информацию в наследуемые геномы и она может регулировать поведение хромосом в пространстве и времени.

Итог по метилированию

- Метилирование не является универсальным способом репрессии генома.
- Оно широко распространено среди позвоночных, но его нет, например, у дрозофилы.

Ацетилирование гистонов

- Это открытие было сделано амер. Биохимиком Олфри (V.Ollfrei, 1964) с коллегами, который обнаружил, что неацетилированные гистоны тормозят транскрипцию ДНК на первом этапе экспрессии генов. А, ацетилирование гистонов, напротив, редуцирует это торможение.
- Олфри предположил, что ацетилирование гистонов делает их структуру более «рыхлой», открывая доступ к ДНК, делая ее гены доступными для белков-регуляторов транскрипции, а деацетилирование «уплотняет» структуру гистонов и закрывает доступ агентам активирующим транскрипцию.
- Впоследствии было доказано, что ацетилирование обратимый процесс и осуществляется по специфическим лизиновым остаткам, которые находятся в NH_2 – терминальном домене молекул гистонов.

Белки, регулирующие транскрипцию

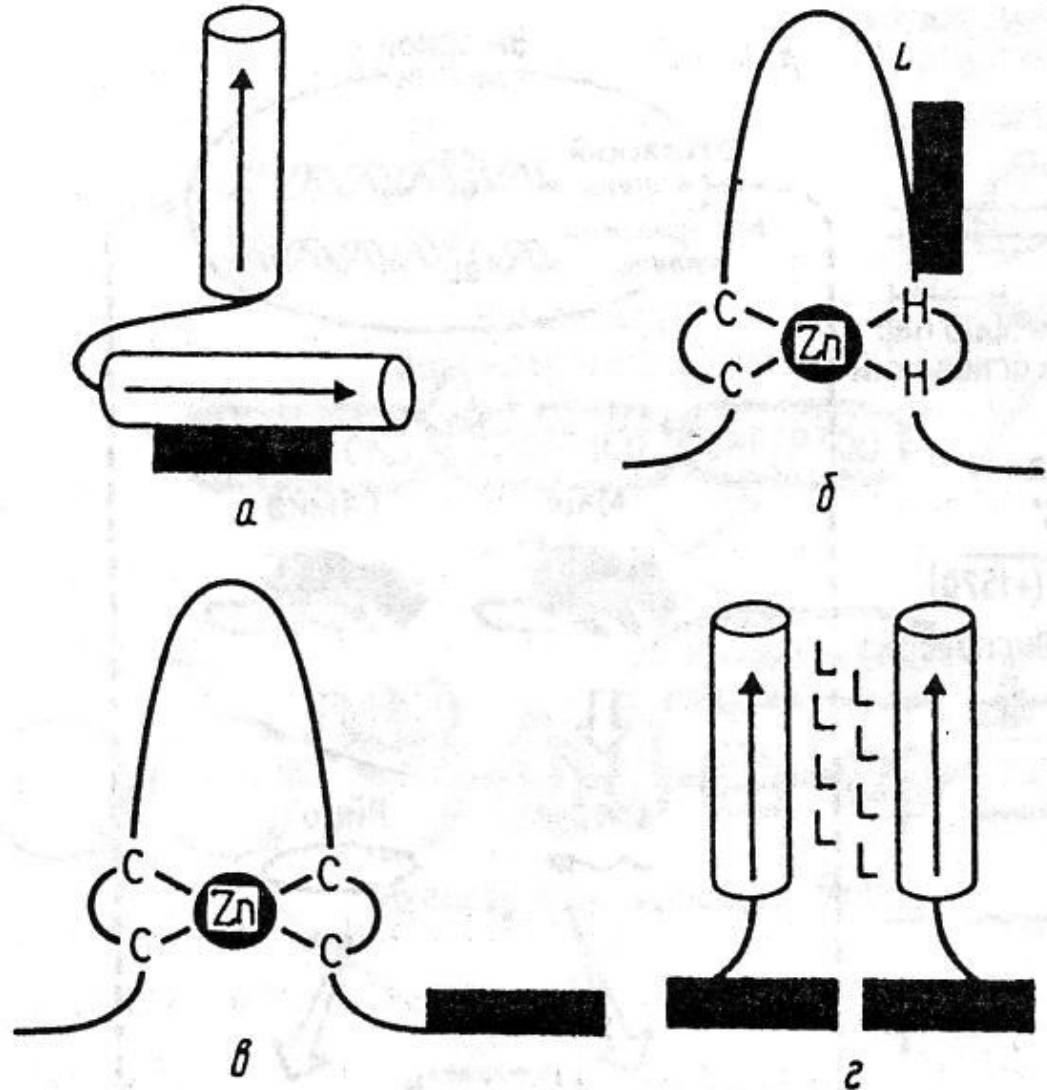
- В молекулярной биологии описаны многочисленные негистоновые белки, способные связываться с ДНК и регулировать экспрессию генов на транскрипционном уровне.
- За связывание с ДНК ответственны небольшие участки (домены) белковых молекул, содержащие до 100 аминокислот, отвечающих за конформацию белка, необходимую для связывания с ДНК.

3 домена белков, регулирующих транскрипцию

А-Спираль-поворот-спираль (helix-turn-helix, НТН). Этот домен белковой молекулы продуцируется гомеозисными генами и построена из α -спиралей (спираль узнавания), которая ложится в большую бороздку молекулы ДНК, а другая располагается в малой бороздке молекулы ДНК.

Б- «Цинковые пальцы». Это активаторы транскрипции важные в развитии и определении пола. Эта часть домена белковой молекулы содержит от 2 до 10 повторяющихся единиц, которые состоят из около 30 аминокислотных остатков и 7-11 атомов цинка.

Г- «Лейциновая застежка». Молекула этого белка содержит 4-5 остатков лейцина, которые отделены друг от друга 7 молекулами других аминокислот. Присутствие другой такой же структуры рядом позволяет им замыкаться наподобие застежки-молнии.



Эффект положения

- Происходит за счет того, что какой либо ген в результате инверсии или транслокации может попасть в гетерохроматиновую зону конститутивного хроматина и потерять способность к транскрибции.
- Важную роль в гетерохроматизации играют белки, содержащие «цинковые пальцы». Иногда гетерохроматизации могут подвергаться значительные области хромосомы

Дифференциальная активность генов

- Этот фактор регуляции транскрипции связан с дифференциальной активностью родительских генов.
- Пример: гетерохроматинизация одной из X-хромосом, которая превращается в тельце Барра. Причем эта X-хромосома может быть и отцовского и материнского происхождения.
- Процесс гетерохроматинизация одной из X-хромосом происходит на очень ранних этапах развития (у человека и макаки тельца Барра появляются на стадии 11-дневной бластоцисты в клетках трофобласта и на 16-19 день в клетках тела эмбриона, то есть на стадии 2000-5000 клеток).
- Образование телец Барра происходит не во всех клетках эмбриона (в клетках oogonий и ооцитов гетеропикноз не происходит).

Амплификация генов

- Амплификация генов – это способ многократного усиления транскрипции за счет умножения групп определенных генов.
- Факт: амплификация рибосомных генов в оогенезе ооцитов амфибий, рыб, а также у некоторых насекомых.
- Избыточная рДНК имеет внехромосомную локализацию в виде многочисленных ядрышек внутри ядра ооцита. Большинство таких рДНК имеет вид колец. Амплификация ядрышковых организаторов происходит во время мейоза на стадии пахитены. Иногда количество добавочных ядрышек достигает 1 000, а количество копий рДНК достигает в них 2500-5000.
- Напротив, умножение количества одного гена в гигантских полиплоидных клетках шелкоотделительной железы тутового шелкопряда достигается за счет высокой степени полиплоидизации. Если на один гаплоидный геном приходится 1-3 гена фиброиновой ДНК, то при полиплоидизации – их количество возрастает до тысячи.

Диминуция хроматина

- Это явление связано с уменьшением количества генетического материала.
- Явление диминуции было открыто Бовери в 1887 г. при развитии аскариды. Он описал различия в поведении хромосом соматических и половых клеток аскариды на ранних этапах развития.
- В соматических клетках Бовери наблюдал отрыв утолщенных концов хромосом.
- Оторвавшиеся фрагменты – не имея центромер, остаются в районе экватора веретена и впоследствии дегенерируют. А в клетках «зародышевого пути развития хромосомы сохраняют свою целостность, обеспечивая преемственность полноценной передачи наследственной информации потомкам.

- Как же можно выжить потеряв часть хромосомы?
- Оказалось, что у аскариды – на концах хромосом находятся не структурные гены, а часто повторяющиеся последовательности, которые составляют около 10% от всего хроматина. Кроме того после диминуции происходит восстановление теломерных участков хромосом – повтор TTAGGC.

Влияние подвижных элементов

- Иногда при мутации вставки в середину нормального гена встает подвижный генетический элемент (ПГЭ) и тогда происходит нарушение работы энхансеров, работа которых тормозится присутствующим ПГЭ.

Посттранскрибционный уровень

- Первым этапом этого уровня является созревание иРНК – процессинг, осуществляемый путем сплайсинга.
- На втором этапе – «зрелая» иРНК стабилизируется.
- К ней присоединяются адениниловые концы (polyA) от которых зависит время ее жизни в цитоплазме. Определяется время ее участия в трансляции.
- На третьем этапе иРНК транспортируется из ядра в цитоплазму. Это происходит с разной скоростью, например гистоновая иРНК выходит быстрее всех. То есть на этапе выхода – имеет место селекция по скорости выхода из ядра. Часть иРНК деградирует прямо в ядре.
- Итог: дифференциальная стабильность иРНК – один из механизмов, который может определять дифференциацию клеток, так как время ее жизни и скорость попадания в цитоплазму отражаются на интенсивности синтеза соответствующих белков.

Скорость трансляции

- Скорость трансляции определяется набором тРНК и активностью аминоацил-тРНК-синтетаз.
- Обнаружено, что в дифференцирующихся клетках амфибий набор тРНК различен, а в недифференцирующихся клетках – сходен.

- **Посттрансляционный уровень**
- Важную роль в поддержании определенной концентрации белка в клетке играет его концентрация, которая определяется скоростью его синтеза и распада.
- Обнаружены специальные гены, которые контролируют это соотношение.

- Итог: Комплексное влияние различий в скорости трансляции, формировании мультиферментных комплексов, связывание белков с мембранами или ингибиторами – является важным фактором в обеспечении биохимического признака в клеточном фенотипе.
- Следствие: на многочисленных этапах регуляции этого процесса может быть значительный разрыв между моментом реализации генетической программы и временем появления кодируемого белка в клетке.

БЛАГОДАРЮ ЗА ВНИМАНИЕ!