

Курс молекулярной биологии

Тема лекции

**Эпигенетическая регуляция
экспрессии генов у эукариот.
Регуляторные РНК**

**Захарова Ирина Борисовна,
к.б.н., доцент**

Регуляция экспрессии генов эукариот

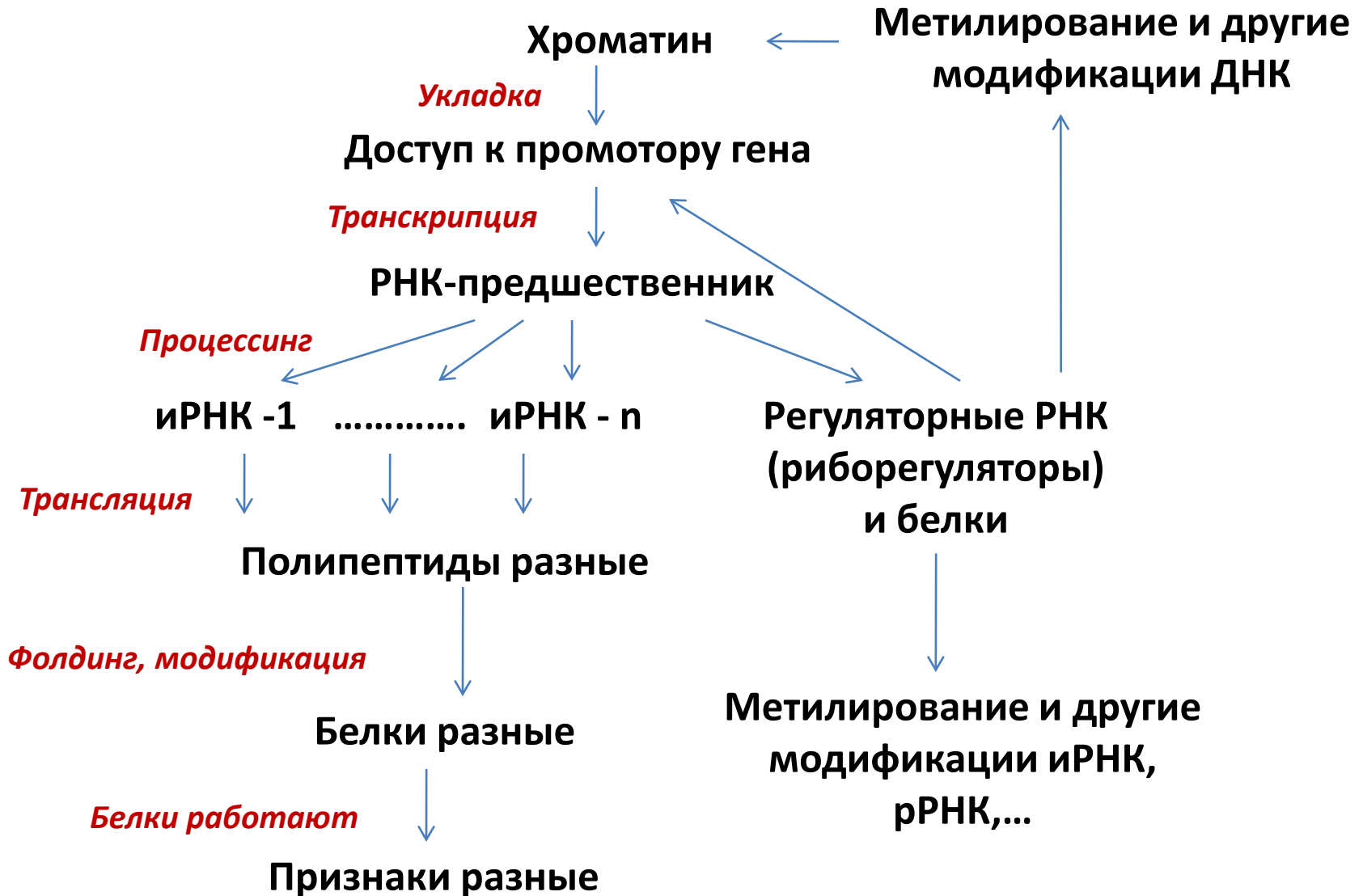
«В ходе эволюции, по-видимому, изменения активности генов в процессе развития, пускай даже очень небольшие, при сохранении общего набора генов могут приводить к удивительным эффектам, в частности - видообразованию»

Северинов

Именно это, видимо, произошло с нами и нашими ближайшими родственниками – шимпанзе.

- **Генетическая база шимпанзе совпадает с человеческой на 98,7 %.**
- **Это позволяет предполагать, что эволюционные пути человека и шимпанзе разошлись всего шесть миллионов лет назад.**
- **Гены у человека и шимпанзе, несмотря на схожесть, проявляют разную активность в разных органах тела.**

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ У ЭУКАРИОТ



Уровни регуляции экспрессии генов эукариот

- изменение плотности укладки хроматина
- изменение схемы метилирования ДНК – в результате меняется активность генов;
- блокирование промоторов, использование альтернативных промоторов;
- подавление экспрессии гена за счет синтеза антисенс-РНК на цепи, комплементарной кодирующей: ДНК – РНК-дуплекс не транслируется
- альтернативный сплайсинг
- использование транссплайсинга
- редактирование РНК – модификация нуклеотидов: превращение Ц в У или А в аналог гуанина – инозин, вставки нуклеотидов без ДНК-матрицы;
- уже после трансляции полипептид можно не активировать, можно отложить сплайсинг белка
- количество полипептидов, транслированных с одной иРНК, напрямую зависит от длины поли-А, а ее можно менять.

Эпигенетическая регуляция

Все клетки содержат одинаковую генетическую информацию, но при развитии организма эта информация в тканях или органах считывается избирательно, что и приводит к огромному разнообразию клеток в организме.

Каков же механизм процесса, позволяющего клетке стабильно включать и выключать определенные гены, не теряя при этом в ДНК информацию обо всех генах?

Контроль избирательного включения-выключения генов осуществляют, в том числе, особые *эпигенетические механизмы*, а процесс передачи этого контроля от клетки к клетке называют эпигенетическим наследованием.

"Эпи" в слове "эпигенетика" происходит от латинского "над", "сверх", и это означает, что записанная в ДНК информация не затрагивается, тут действуют другие, "надгенетические" механизмы.

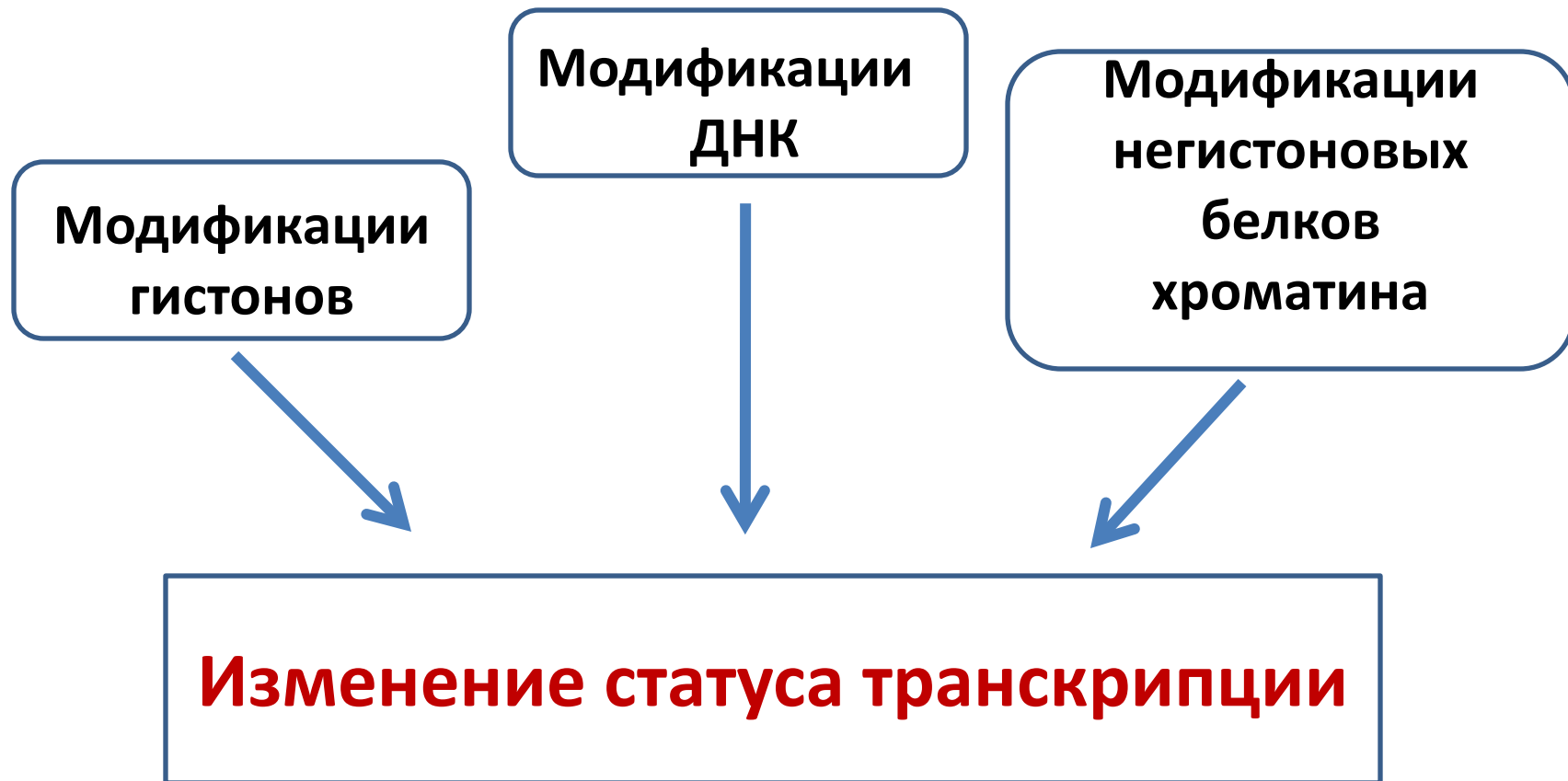
Эпигенетическая регуляция

*наследственные и ненаследственные **изменения в экспрессии конкретного гена** без каких-либо соответствующих структурных изменений в его нуклеотидной последовательности*

Эпигенетические явления

- импринтинг,
- эффект положения,
- особенности структурно-функциональной организации хроматина хромосомных локусов, влияющие на экспрессию генов,
- интерференция РНК

Эпигенетические модификации



Хромосомы должны удовлетворять двум противоположным потребностям клетки: топологическая организация гигантской молекулы ДНК - против необходимости доступа к геному факторов, осуществляющих репликацию, транскрипцию, рекомбинацию, репарацию и другие хромосомные процессы.

Преобразования хроматина осуществляется с помощью трех основных взаимосвязанных механизмов:

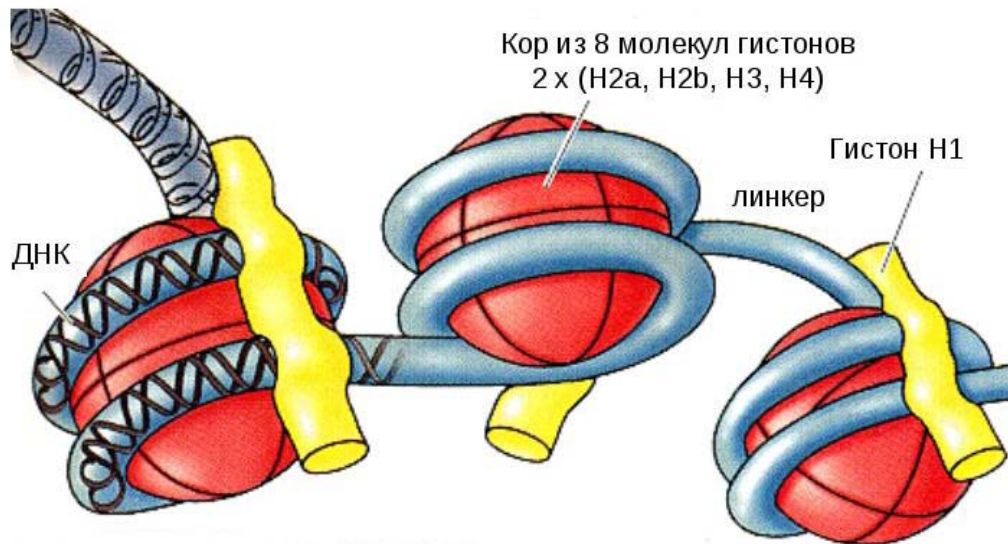
- 1. ковалентной модификации гистонов**
- 2. АТФ-зависимого ремоделирования хроматина**
- 3. включение вариантных гистонов в хроматин**

- Транскрипция в значительной степени **контролируется вариациями структуры хроматина,**
- существует тщательная инструкция для факторов транскрипции

Функциональное состояние определяет число, качественный состав и специфический набор модификаций гистоновых белков –

ГИСТОНОВЫЙ КОД

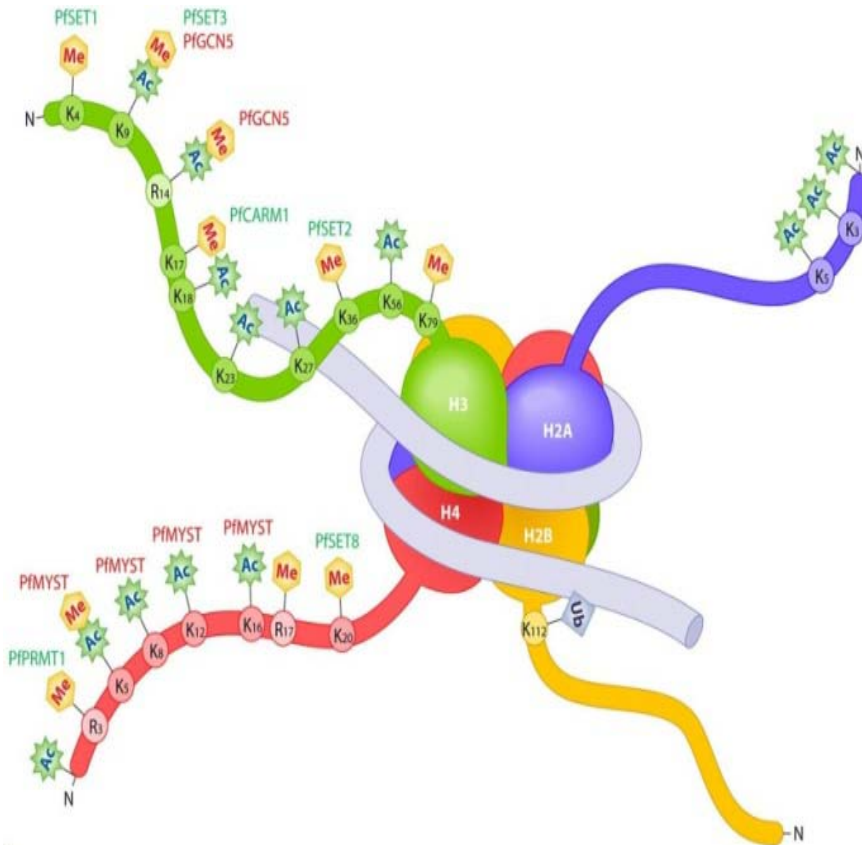
- Центральную роль в упаковке ДНК на всех уровнях играет **нуклеосома**
- Именно межнуклеосомные взаимодействия определяют степень компактизации ДНК.



Кор-нуклеосома -
минимальная нуклеосома -
гистоны **H2A, H2B, H3, H4** -
«коровые» гистоны

+ H1 – линкерный гистон
– **полная нуклеосома**

Молекула каждого гистона состоит из центрального структурированного трехспирального домена и двух неструктурированных N- и С-"хвостов"



"Хвосты" гистонов выходят на поверхность хроматиновой фибриллы, участвуют в межнуклеосомном взаимодействии и **подвергаются многочисленным модификациям**

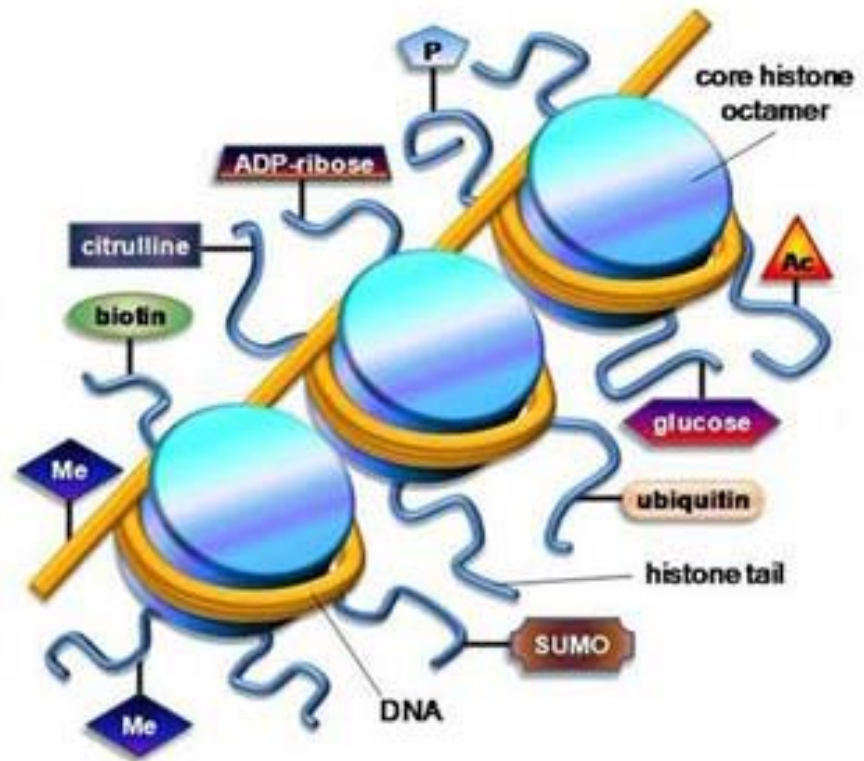
Ферменты модификации гистоновых "хвостов"

- гистоновая **ацетилтрансфераза** - присоединяет ацетильную группу к определенным лизинам
- гистоновая **метилтрансфераза** - присоединяет метильную группу к лизиновым и/или аргининовым остаткам гистонового "хвоста"
- гистоновые **киназы** – переносят фосфатную группу на серины и гистидины

Обнаружены многочисленные ферменты, удаляющие эти группы с гистоновых "хвостов"

Ковалентные модификации гистонов

Аминокислота	Модификация
Лизин (K)	Метилирование (Me) Ацетилирование (Ac) Убиквитинирование (Ub) Сумоимирование (Su) Рибозилирование (Rib)
Аргинин (R)	Метилирование (Me)
Серин (S) Треонин (T) Цистеин (C)	Фосфорилирование (P)



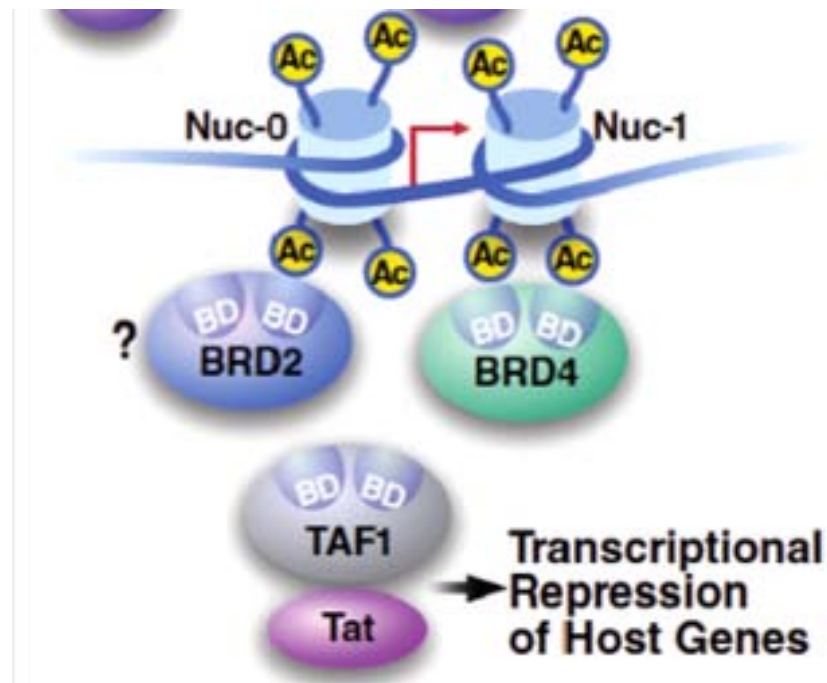
<http://biod.pnpi.spb.ru/~konev/chromatin.html>

Белки, узнающие модификации гистонов

Бромодомен - специфически узнает ацетилированные лизины на гистоновых "хвостах"

Бромодомен обнаружен более чем в 75 белках человека.

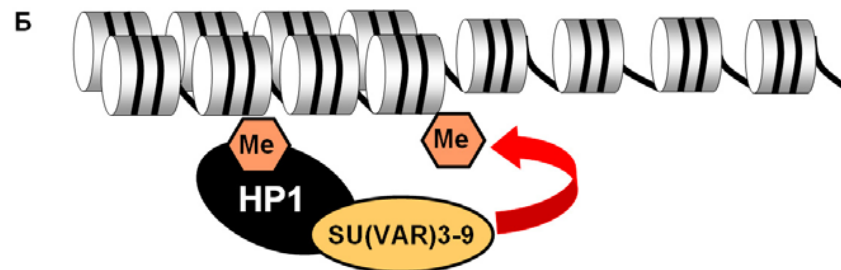
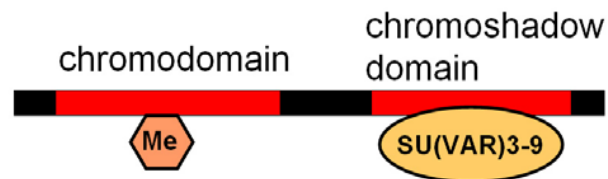
Бромодомен часто, хотя и не всегда, является частью фермента ацетилтрансферазы гистонов (НАТ), функция которого - ацетилирование гистонов-мишеней и который существует как часть более крупного комплекса, осуществляющего ремоделирование хроматина



Хромодомен - узнает метильные маркировки на гистонах.

Из несущих хромодомен белков лучше всего изучен HP1 (от английского "heterochromatin protein"). Этот белок **принимает участие в структурной организации гетерохроматина** - области хроматина, находящейся в высоко-конденсированном состоянии, где все гены репрессированы.

А Структура белка HP1



Модификации гистонов могут:

1. Прямо влиять на свойство октамера гистонов (например посредством снижения заряда)
2. Выполнять сигнальную функцию (ГИСТОНОВЫЙ КОД) , способствуя привлечению различных белков

Важно не только **тип модификации** и **позиция**, по которой осуществляется модификация, но и **количественные характеристики модификаций**

монометилирование и триметилирование лизина могут иметь прямо противоположные последствия

Роль модификаций в регуляции транскрипции

Модификации	Роль в транскрипции	Сайты модифицирования
ацетилирование	активация	H3 (K9, K14, K18, K56)
		H4 (K5, K8, K12, K16)
		H2A (?)
		H2B (K6, K7, K16, K17)
фосфорилирование	активация	H3 (S10)
	репрессия	H3 (S10 +S28)
метилование	активация	H3 (K4, K36, K79)
	репрессия	H3 (K9, K27)
		H4 (K20)

Ремоделирование хроматина

- Хроматин влияет на экспрессию генов на нескольких уровнях структурной организации.
- Оборачивание ДНК вокруг гистонового октамера в нуклеосоме препятствует доступу других белковых факторов к информации о последовательности ДНК.
- Доступность генов и регуляторных элементов можно настроить с помощью дифференциальной упаковки ДНК.

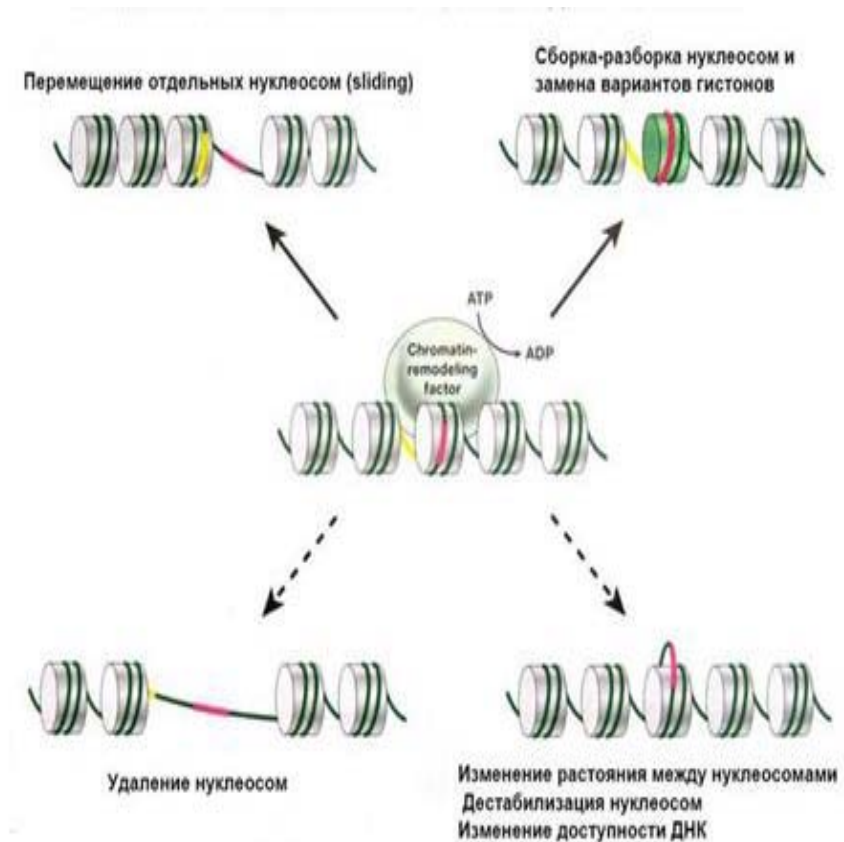


Клетки имеют набор специализированных комплексов ремоделирования хроматина (ремоделеры), обеспечивающих транслокацию, удаление или сборку нуклеосом

Ремоделирование хроматина

Механизмы ремоделирования

- нуклеосомы могут быть собраны в состав хроматина или удалены,
- коровые гистоны могут быть заменены на варианты,
- может быть изменена позиция нуклеосом по отношению к последовательности ДНК



**Метилирование ДНК
и связанные с ним
процессы**

У эукариот метилирование ДНК – один из ключевых механизмов регуляции

- **онтогенеза и клеточной дифференцировки**
- **подавления экспрессии чужеродных последовательностей и мобильных элементов**

- **Метилирование в основном происходит пострепликативно**
- **Статус метилирования ДНК эукариот обратим, существует равновесие между метилированием и деметилированием**
- **Деметилирование может быть активным (катализируется ферментами) и пассивным (отсутствие метилирования в очередном цикле репликации)**

- Участки генома, содержащие большое количество метилированных цитозинов, как правило, не транскрибируются.
- **Отсутствие метилирования является необходимым условием для транскрипционной активности.**
- Так как метилирование ДНК является обратимой модификацией и не находится в прямой зависимости от последовательности ДНК, его принято считать **эпигенетическим механизмом регуляции экспрессии**

Нормальное метилирование ДНК у позвоночных

С в мотиве **СрG** обычно метилированы (50-90%, в клетках взрослых людей приблизительно 70%)

метилирование С вне мотива СрG (выявлено в эмбриональных стволовых клетках) составляет незначительную долю

Определение СрG островка:

СрG островок - последовательность, содержащая более 60% оснований С и G, в которой соотношение числа СрG динуклеотидов к числу GrC динуклеотидов составляет не менее 0.6

Свойства CpG островков

- имеются в 60% генов, в том числе во всех генах “домашнего хозяйства”
- >200 пн, длина большинства - 0.5-3 т.п.н.
- относительно высокий GC-состав (обычно >60%), плотное расположение мотива CpG (один на 10 пн, в 10-20 раз выше, чем в среднем по геному)
- как правило, содержат мотивы CCGCC (сайты связывания транскрипционного фактора SP1)

Особенности метилирования CpG-островков

- большинство либо гипер-, либо гипометилированы
- внутригенные – чаще гиперметилированы,
- расположенные в промоторах – чаще гипометилированы

СрG островки в промоторах позвоночных

- ✓ СрG островки перекрываются с 60% промоторов РНК-полимеразы II млекопитающих и с абсолютным большинством промоторов генов «домашнего хозяйства».
- ✓ *В случае такого перекрывания практически все сайты связывания ТФ находятся в островках*
- ✓ СрG в промоторах обычно неметилированы, что необходимо для транскрипции (метилирование обычно блокирует транскрипцию)

СpG-богатые промоторы:

- активность гена зависит от плотности метилирования нуклеотидов (1 на 300 – заметное подавление, 1 на 100 – репрессия)
- островки, как правило, неметилированы (исключения – импринтированные гены, неактивная X-хромосома)
- **инактивация, как правило, необратима**

СpG- бедные промоторы:

- регулируются частично метилированием, частично другими механизмами
- **инактивация обратима!**

Репрессия транскрипции посредством метилирования ДНК

В целом CpG-островки - маркеры потенциальной транскрибируемости последовательности (но не обязательной транскрипции)

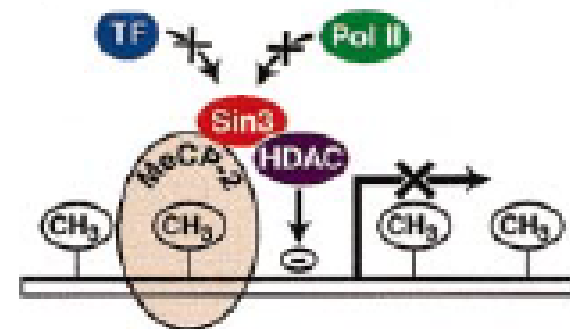
В промоторах как содержащих, так и не содержащих CpG островки

- ✓ отсутствие метилирования, как правило, - активно транскрибируемые гены
- ✓ наличие метилирования – не экспрессирующиеся гены

активная транскрипция

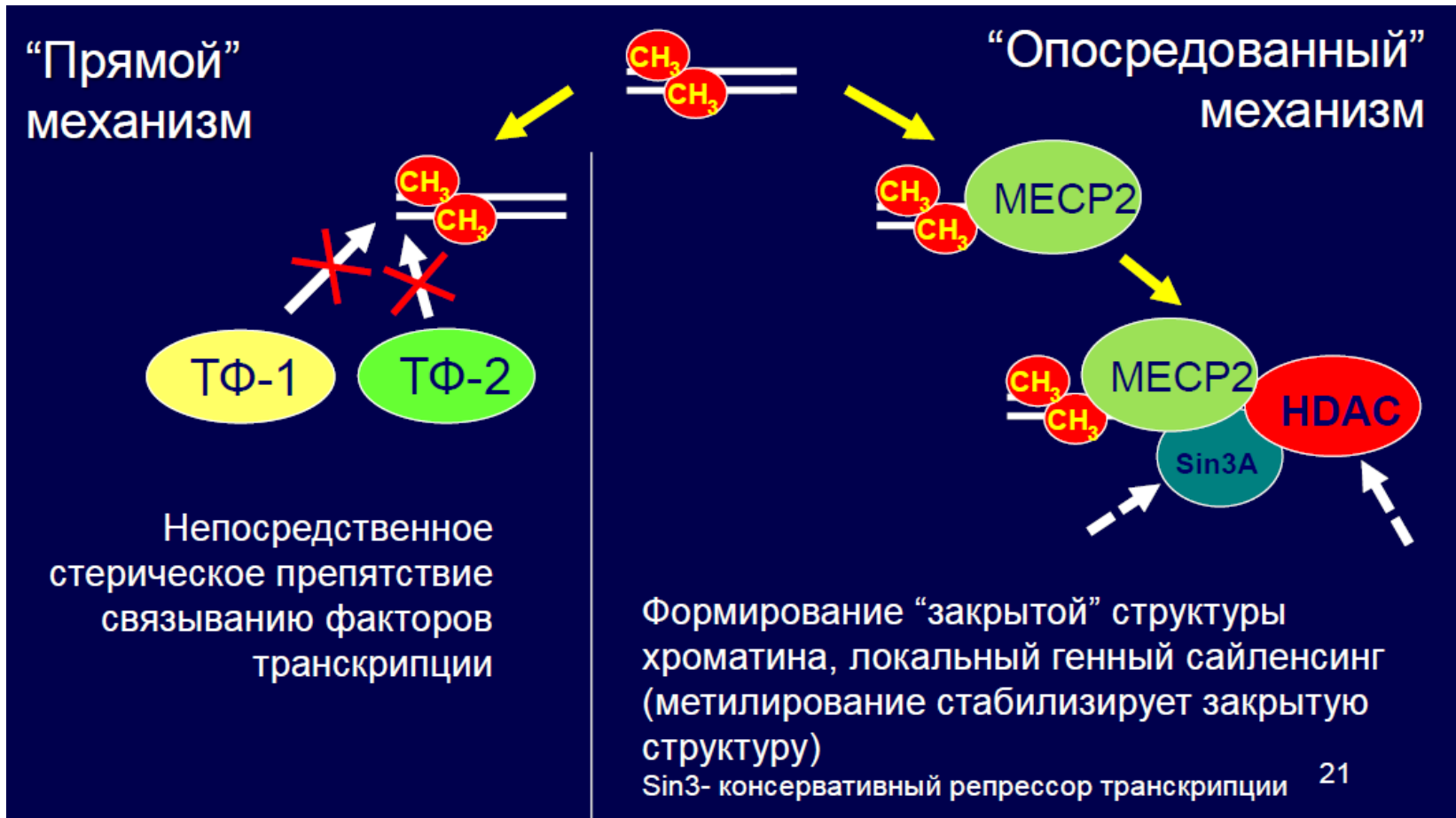


репрессия транскрипции



Эффекты метилирования CpG на регуляцию экспрессии проявляются **на уровне транскрипции**

Метилирование ДНК ингибирует экспрессию генов с помощью двух (относительно) независимых механизмов



Механизмы инактивации гена в результате метилирования промоторной области

- 1. Метильные группы нарушают ДНК-белковые взаимодействия, выступая в большую бороздку ДНК и препятствуя связыванию специфических транскрипционных факторов.**
- 2. Метилированные районы ДНК специфически связывают транскрипционные репрессоры.**
- 3. Метилирование ДНК влияет на структуру хроматина.**

**Метилирование ДНК в клетке контролирует все (!)
генетические процессы:**

- **Транскрипция**
- **Репликация**
- **Рекомбинация**
- **Репарация**
- **Транспозиция генов**
- **Инактивация X-хромосомы**

Включение вариантных гистонов в хроматин

Для всех гистонов, кроме H4, показано существование альтернативных вариантных (замещающих) гистонов которые могут заменять канонические гистоны в составе нуклеосом

- кодируются отдельными генами**
- выполняют специальные функции**

Как правило, вариантные формы отличаются от основных несколькими аминокислотными заменами.

Существуют, однако, вариантные формы гистонов, имеющие серьезные отличия от основных форм.

Роль гистоновых вариантов состоит в том, чтобы сохраняя нуклеосомную укладку хроматина, увеличивать или уменьшать её устойчивость в каждом конкретном участке хроматина и, тем самым, управлять процессами транскрипции, репликации и репарации

Вариантные формы гистонов

H1

H5 в эритроцитах птиц
варианты **H1₁-H1₈** в мышечных клетках

H2A

масро H2A (в неактивной X хромосоме)
H2A-Bbd (в активном хроматине)
H2A.Z (в активном хроматине)
H2A.X (маркирует мишени для репарации)

H3

CENP-A (центромерный белок)
Cid (центромерный белок)
H.3.3 (активный хроматин)

«Основные» и «вариантные» формы гистонов кодируются разными генами

Регуляторные РНК

ncRNA – некодирующие РНК

ncRNA	Описание
miRNA	<p>MicroRNAs (miRNAs) маленькие (21–23 п.н.) <u>одноцепочечные</u> РНК, регулируют экспрессию генов за счет частичной комплементарности пар оснований со специфическими мРНК . Это ингибирует трансляцию и в некоторых случаях приводит к деградации мРНК</p>
siRNA	<p>Small interfering or silencing RNAs (siRNAs) маленькие <u>двуцепочечные</u> РНК, которые посредством РНК-интерференции (RNAi) осуществляют down-регуляцию специфического гена, содержащего комплементарную последовательность.</p>

ncRNA – некодирующие РНК

snoRNA	Small nucleolar RNAs (snoRNAs) маленькие (70–240 н.) РНК, управляющие метилированием и псевдоуридилацией РНК. SnoRNAs содержат антисенс-последовательность (10–20 н.), комплементарную последовательности мишени рядом с основанием для модификации
piRNAs	Piwi-interacting RNA (piRNA) маленькие (27–30 nt) РНК, половых клеток дрозофилы и позвоночных. Осуществляют модификацию хроматина и подавление экспрессии транспозонов.

РНК-интерференция



The Nobel Prize in Physiology or
Medicine 2006

"for their discovery of RNA interference - gene silencing by
double-stranded RNA"



Photo: L. Cicero/Stanford

Andrew Z. Fire

1/2 of the prize



Photo: R. Carlin/UMMAS

Craig C. Mello

1/2 of the prize

В 2006 году Эндрю Файер и Крейг Мелло получают Нобелевскую премию по физиологии и медицине «За открытие явления РНК-интерференции — механизма сайленсинга генов при участии дцРНК».

Хотя сам феномен РНК-интерференции был описан задолго до того (ещё в начале 80-х), именно работы Файера и Мелло в общих чертах определили регуляторный механизм малых РНК .

История открытия РНК-интерференции

- ✓ В 1990 году для того, чтобы изменить окраску цветков петунии (*Petunia hybrida*), в растения были введены дополнительные копии гена **халконсинтазы** — фермента, **необходимого для синтеза розового и фиолетового пигментов**.
- ✓ Однако, повышение экспрессии гена синтазы не привело к проявлению более тёмной окраски околоцветника, напротив, цветки стали более светлыми и даже частично белыми. Полученные результаты свидетельствовали о том, что активность фермента не растёт, а снижается.
- ✓ Гены халконсинтазы экспрессировались на более низком уровне, чем до введения трансгена.



Дальнейшие исследования показали, что у растений деградация мРНК приводит к снижению активности гена по механизму посттранскрипционного ингибирования.

Данное явление получило название **«косупрессии экспрессии гена»**, однако, механизм данного процесса не был известен.

РНК-интерференция



- ✓ Явление **РНК-интерференции (RNA interference)** было открыто в ходе экспериментов по подавлению экспрессии генов при помощи **антисмысловой РНК** у *C. elegans*. Предполагалось, что антисмысловая РНК после комплементарного узнавания мРНК препятствует ее трансляции.

антисмыслРНК + мРНК ✗ трансляция

- ✓ Однако в некоторых экспериментах было обнаружено, что инъекции контрольной смысловой РНК вызывают такой же эффект подавления экспрессии гена, как и инъекция антисмысловой РНК.

смыслРНК + мРНК ✗ трансляция

- ✓ Более тщательный анализ показал, что агентом, нарушающим экспрессию, является не смысловая или антисмысловая РНК, а **двухцепочечная РНК**, содержащаяся в качестве примеси в обоих препаратах.

Основные тезисы Э. Файер и К. Мелло :

1. При РНК-интерференции расщепляется именно мРНК и никакая другая;
2. Дц РНК действует (вызывает расщепление) значительно эффективнее одноцепочечной.
3. дцРНК, комплементарная участку зрелой мРНК, вызывает расщепление последней. *Это указывало на цитоплазматическую локализацию процесса и наличие специфической эндонуклеазы;*
4. Небольшого количества дцРНК (нескольких молекул на клетку) достаточно для полного «выключения» целевого гена, *что указывает на существование каскадного механизма катализа и/или амплификации.*

РНК-интерференция

– механизм подавления экспрессии гена в результате комплементарного соединения малой интерферирующей РНК (miRNA и/или siRNA) с мРНК, подлежащей трансляции, и разрушение последней рибонуклеазами

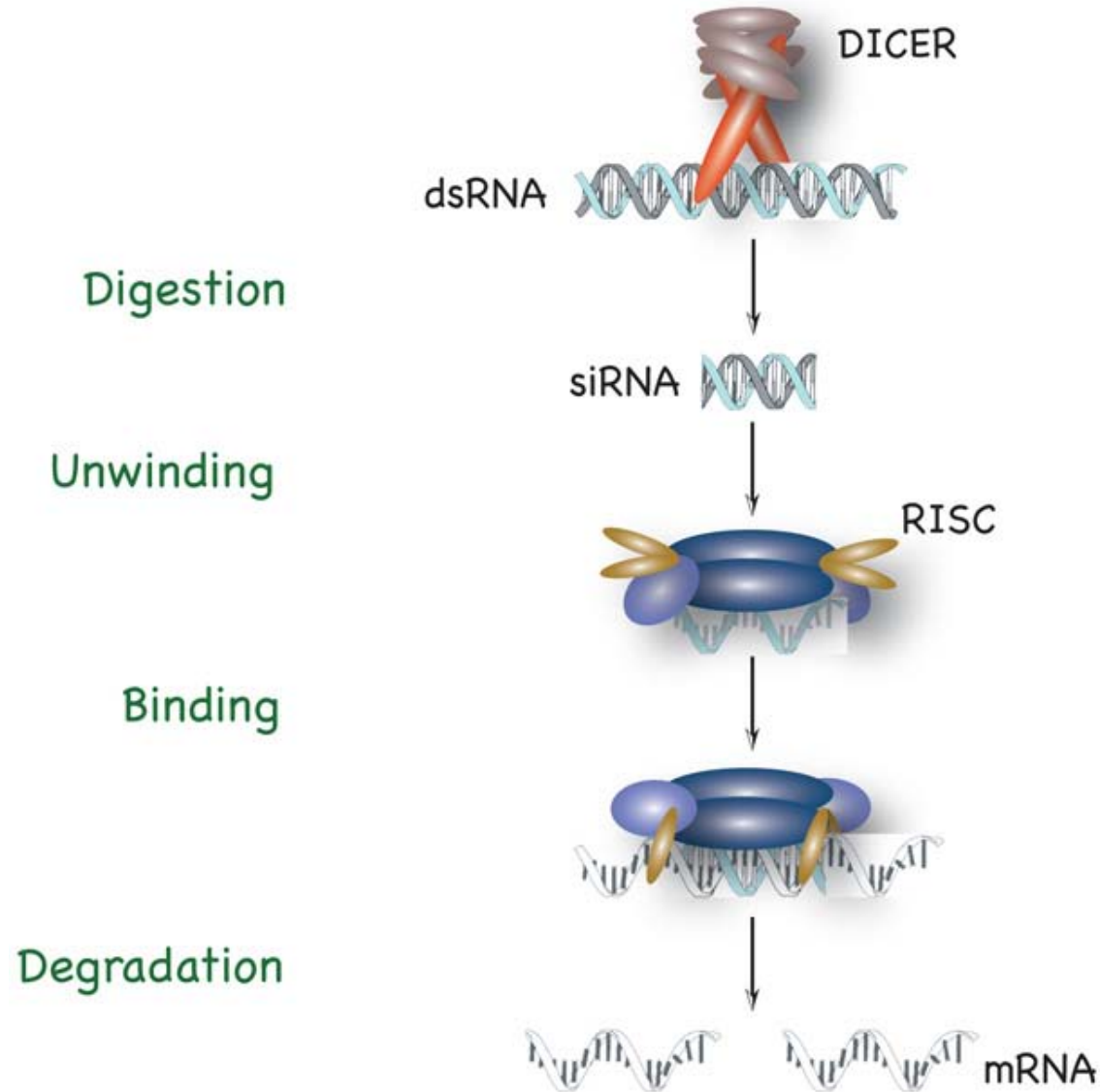
РНК-сайленсинг – древнейшая “иммунная система”!

Существует не менее 1.5 миллиардов лет, многие элементы есть уже у бактерий. Наиболее распространенное мнение – возникновение РНК-сайленсинга было вызвано необходимостью **защиты генома от РНК-вирусов и мобильных элементов**

Функции

- Поддержание стабильности генома – эта функция сохранилась почти повсеместно (постепенно замещается “чисто белковыми” механизмами)
- Защита от РНК-вирусов – в чистом виде сохранилась у растений, элементы обнаружены у *C.elegans*, *D.melanogaster* и позвоночных
- Время-разрешенная и тканеспецифичная регуляция экспрессии генов у организмов с билатеральной симметрией

Механизм РНК интерференции (цитоплазматический этап)



Drosha - РНКаза III – ядерный фермент

Dicer – цитоплазматический комплекс

Содержит:

1. каталитические домены **РНКазы III** — фермента, специфично разрезающие двуспиральные РНК
2. **РНК-геликазный** домен
3. PAZ-домен - модуль, который **связывает конец dsРНК**

DICER узнает и нарезает dsРНК на фрагменты размером около 21–23 п.н.

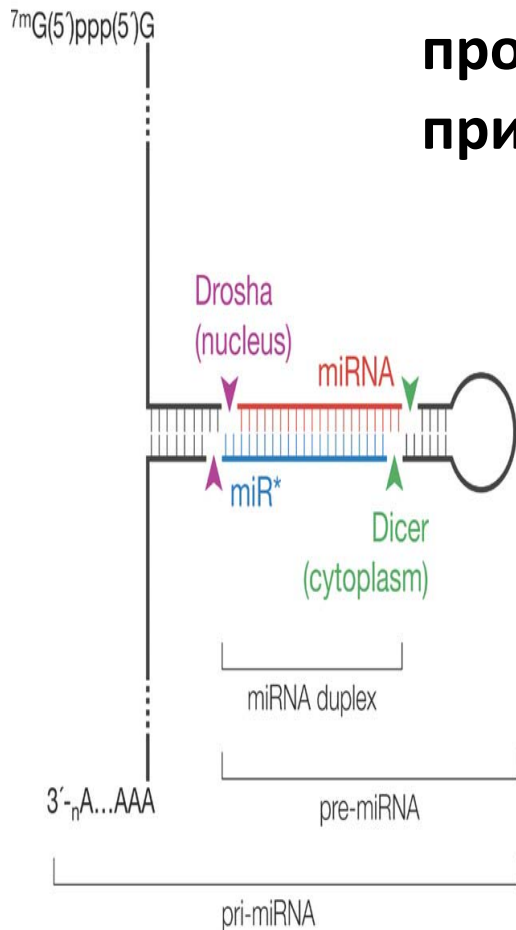
guide strand – направляющая (антисенс по отношению к мРНК) цепь

Комплекс RISC (RNA Induced Silencing Complex)— это одноцепочечная siРНК и белки семейства ARGONAUTE (Ago) – хеликаза и нуклеаза

Биогенез MicroRNA

A miRNA biogenesis

Предшественник микроРНК транскрибируется с геномной ДНК, в результате чего появляется промежуточная форма **при-микроРНК**, несущая признаки обычной мРНК: кэп и полиА-хвост.



Петля с двумя одноцепочечными «хвостами» подвергается двухстадийному процессингу:

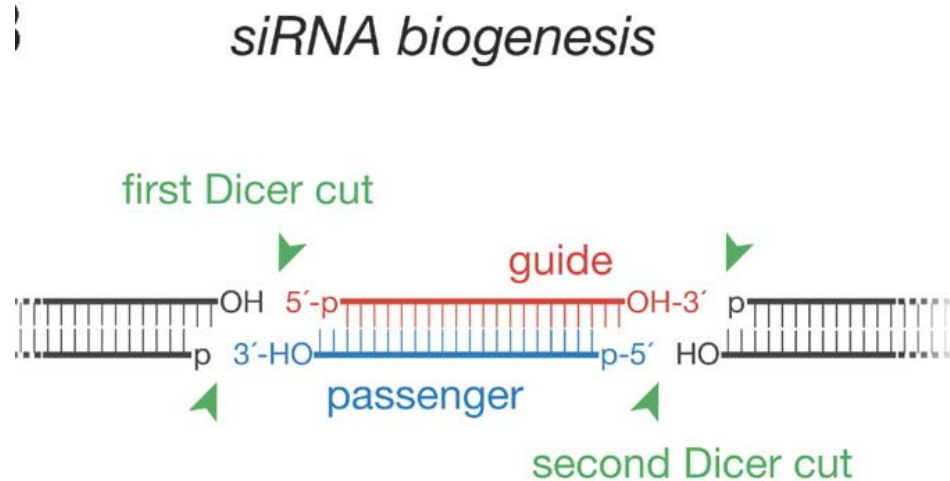
1. Эндонуклеаза Drossha отрезает от шпильки одноцепочечные «хвосты», после чего вырезанная шпилька (**пре-микроРНК**) экспортируется в цитоплазму

2. где узнается Dicer'ом, вносящим ещё два разреза. В таком виде зрелая микроРНК включается в состав комплекса RISC.

Биогенез siRNA

siRNA в цитоплазме нарезается DICER из более длинной dsRNA

Источником длинных дцРНК могут быть вирусные РНК, генетические конструкции, длинные шпильки в составе транскриптов и двунаправленная транскрипция мобильных элементов



Превращение массы dsРНК в 21–23 п.н. малые фрагменты с помощью ферментов **DICER**

siRNA имеют «особую примету»: по 2 неспаренных нуклеотида на 3'-концах и фосфорилированные 5'-концы

siРНК отличает от miРНК источник возникновения

- **miРНК кодируются собственными генами** и вырезаются из шпильки, образованной предшественником.
- **siРНК собственных генов не имеют** и представляют собой фрагменты более длинных РНК.

miRNA

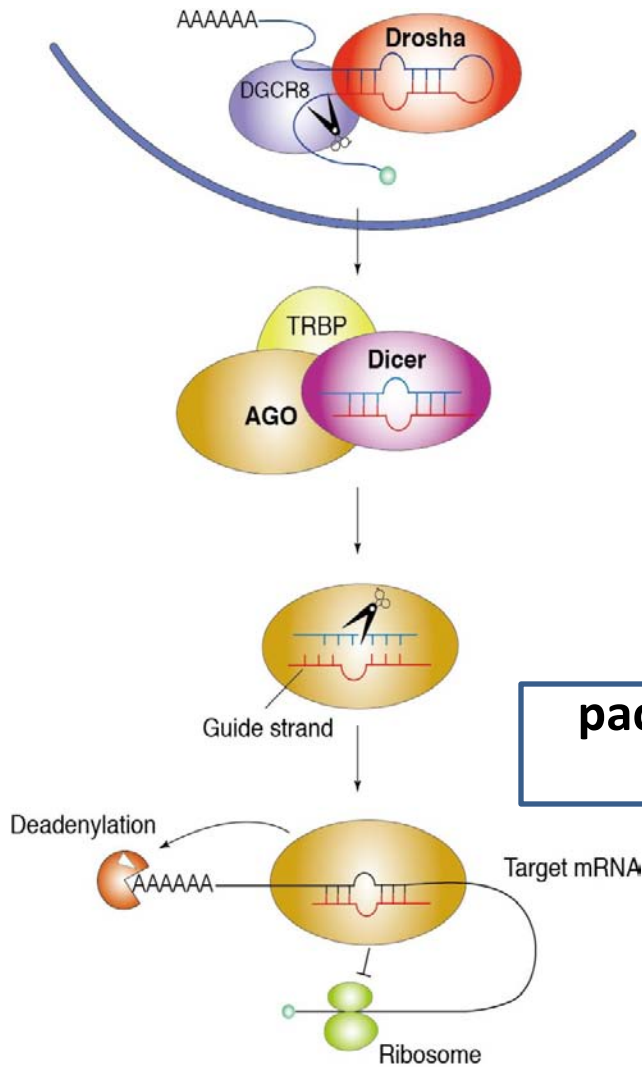
miRNA-miRNA дуплекс 21-25 н.
расплетается DICER и **guide strand**
взаимодействует с белком **Argonaute**
(AGO) = комплекс **RISC**

RISC с высокой специфичностью
связывается с комплементарным участком
в 3'-нетранслируемой области мРНК-
мишени.

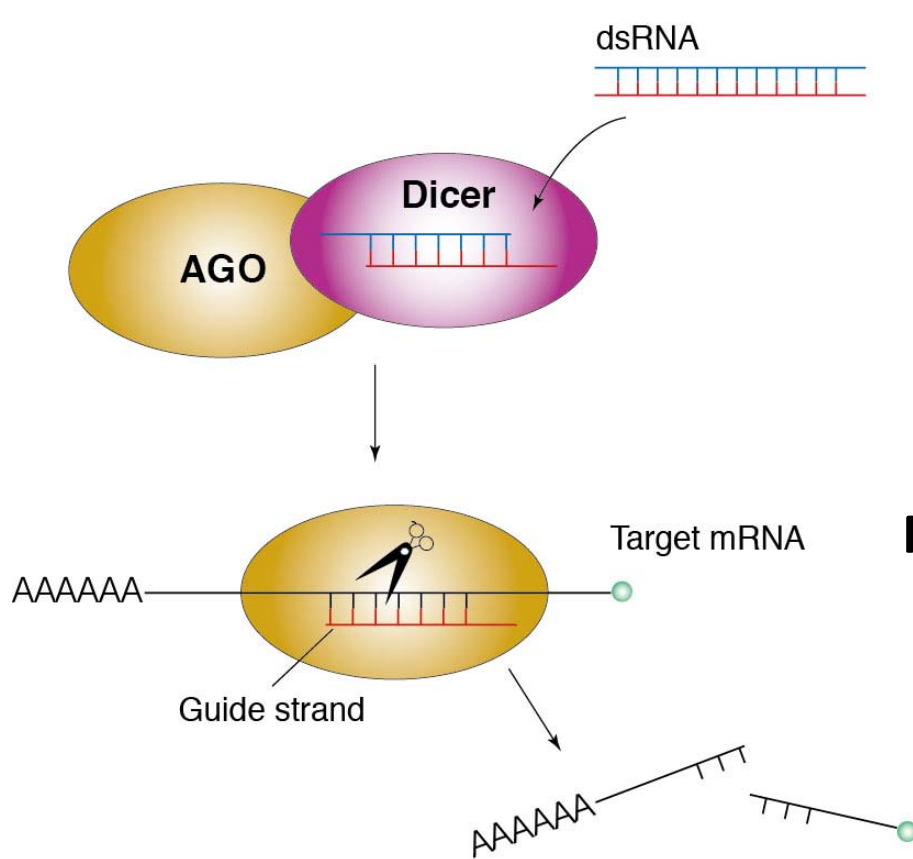
расщепление мРНК
белком Ago

если комплементарность не абсолютная,
целевая мРНК может не деградировать,
а только обратимо блокироваться

трансляции не будет



siRNA pathway



Помещение малых siРНК в мультибелковый комплекс RISC (RNA Induced Silencing Complex).

Разрезание дуплекса мРНК- siРНК

Трансляции нет

siРНК регулируют экспрессию генов двумя способами

1. Разрезание РНК-мишеней - «РНК-интерференция» у животных

2. Транскрипционный сайленсинг генов (transcriptional gene silencing, TGS)

siРНК направляют модификации гистонов и метилирование ДНК, что приводит к образованию гетерохроматина и репрессии транскрипции

TGS обнаружен у

- **дрожжей *Schizosaccharomyces pombe***
- **животных**
- **растений**

Функции miRNA.

Изученные miRNA

1. регулируют экспрессию генов на уровне трансляции
2. могут вызывать подавление транскрипции гена-мишени

У человека число miRNA

- экспериментально обнаруженных превышает 300,
- с учетом предсказанных - 800–1000.
- до 30% всех генов белков регулируется miRNA