

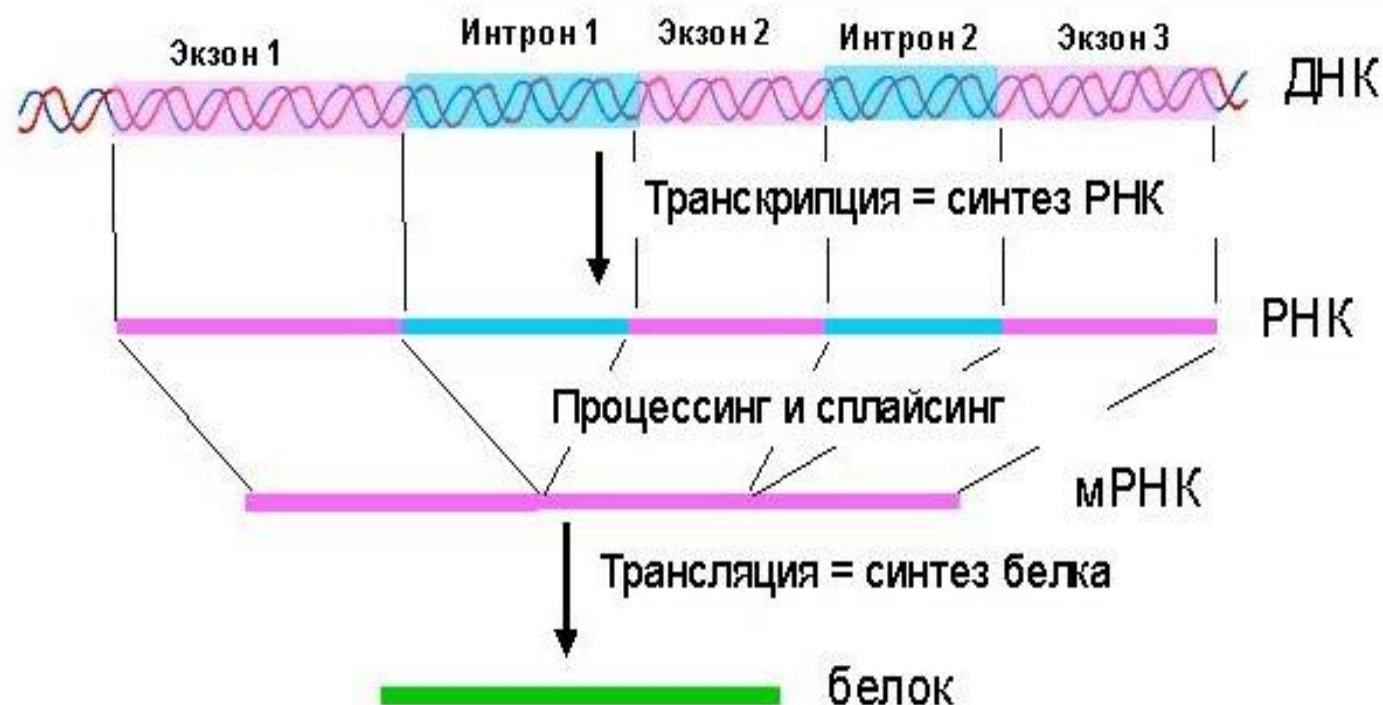


Технологии анализа экспрессии генов

Экспрессия генов



- фундаментальный процесс, лежащий в основе жизнедеятельности организма. Он включает в себя ряд последовательных молекулярных стадий: подготовка матрицы хроматина, транскрипция ДНК, созревание мРНК и формирование рибонуклеопротеиновых частиц, их внутриклеточный транспорт и трансляция на рибосомах. Каждая из указанных стадий контролируется определенным набором факторов - молекулярных машин, которые обычно представлены мультисубъединичными белковыми комплексами. Взаимодействие и согласованное привлечение различных факторов обеспечивает координацию отдельных этапов в единый процесс и точный контроль активности генов.



Экспрессия генов - последовательность реакций на пути от гена к белку = процесс передачи информации от ДНК к белку.

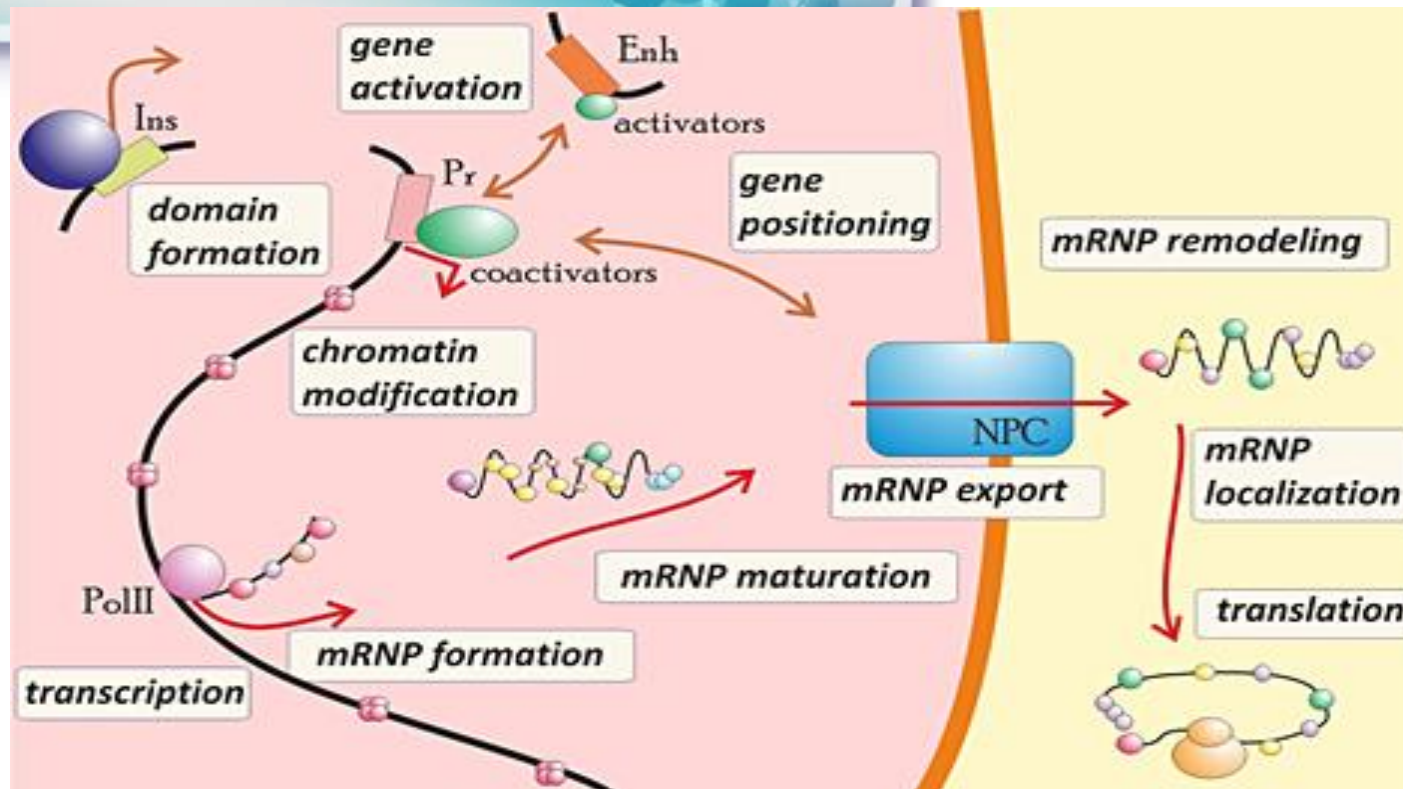
Транскрипция - синтез РНК. Образуется незрелая РНК, содержащая участки, соответствующие экзонам и интронам

Процессинг - вырезание участков, соответствующих интронам,

Сплайсинг - сшивание участков РНК, транскрибируемых с экзонов в результате чего образуется матричная РНК

Трансляция - синтез белка в цитоплазме клетки при участии рибосом

Основные этапы процесса экспрессии гена



Активность гена контролируется регуляторными элементами, энхансерами (Enh) и инсуляторами (Ins). Инсуляторы формируют домен активной транскрипции на хроматиновой фибрилле. Энхансер привлекает активаторы, которые обеспечивают последующее привлечение коактиваторов на промотор (Pr), модификацию и ремоделирование структуры хроматина и запуск активной транскрипции. Активность гена также определяет его локализацию внутри ядра. РНК-полимераза II синтезирует мРНК, которая формирует рибонуклеопротеиновые частицы (мРНП). мРНП созревают в нуклеоплазме и экспортируются в цитоплазму. Состав мРНП изменяется в цитоплазме, они транспортируются внутри клетки и транслируются.



- Известно, что гены определяют структуру всех молекул, из которых состоят клетки живых организмов, контролируют все метаболические процессы и содержат программу развития организма.
- В каждый момент времени любая клетка, от бактериальной до человеческой, использует лишь часть своих генов для синтеза определенных продуктов.
- Невозможна ситуация, когда все гены клетки работают одновременно. Мы говорим, что те гены, которые экспрессируются - *включены*, а те, которые не экспрессируются – *выключены*. Это означает, что экспрессия генов регулируется.



- В то же время известно, что в ходе индивидуального развития многоклеточного организма из оплодотворенной яйцеклетки образуются разнообразные типы клеток, входящих в состав определенных тканей. Но все клетки, как правило, несут *один и тот же набор генов*. В основе этого лежит *выборочное* использование генов, то есть *регуляция* генов.
- На разных стадиях дифференцировки клетки, руководствуясь лишь отчасти внешними сигналами, избирательно используют тот или иной набор генов, что определяет пути их развития.



- Экспрессия гена регулируется не только в ходе онтогенеза, но также и в течение жизни дифференцированной клетки. Например, клетки кожи под действием солнечного ультрафиолетового облучения вырабатывают пигмент меланин. Структура гена, отвечающего за синтез пигмента, не изменяется в ответ на облучение, просто внеклеточный сигнал – ультрафиолетовые лучи включает этот ген.

Регуляция работы генов у прокариот



Схема регуляции транскрипции у прокариот была предложена Ф. Жакобом и Ж. Моно в 1961 году на примере лактозного оперона.



Ж.Моно



Ф.Жакоб

Метаболизм лактозы в клетке *E.coli*

Lac Z: β -галактозидаза

расщепляет лактозу на глюкозу и галактозу.

Lac Y: β -галактозидпермеаза переносит лактозу через мембрану клетки.

Lac A: тиогалактозидтрансацилаза ацетилирует галактозу.

Lactose metabolism in *E. coli*

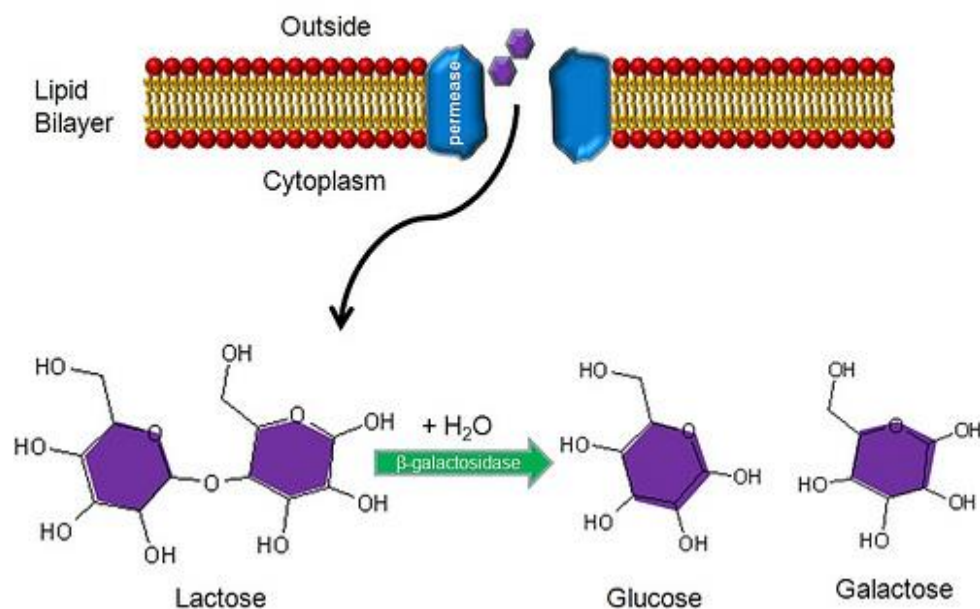
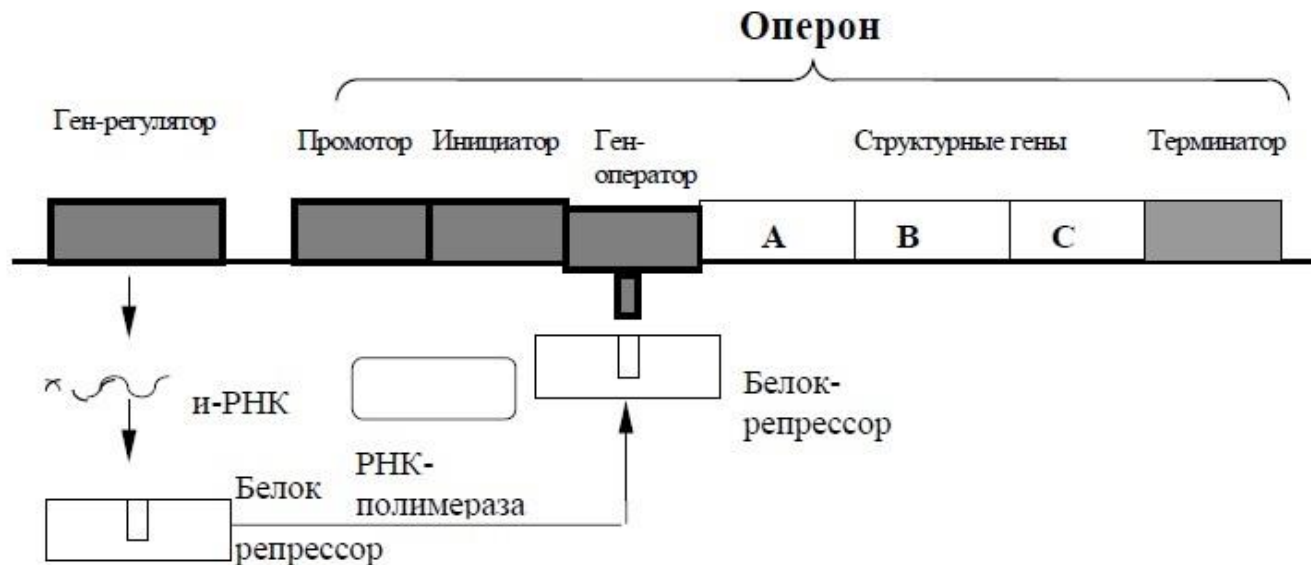


Схема регуляции транскрипции у прокариот (Оперон «не работает»)

Слайд 10



Оперон – группа тесно сцепленных генов, находящихся под контролем общего промотора и общего оператора и транскрибируемых как единая мРНК.

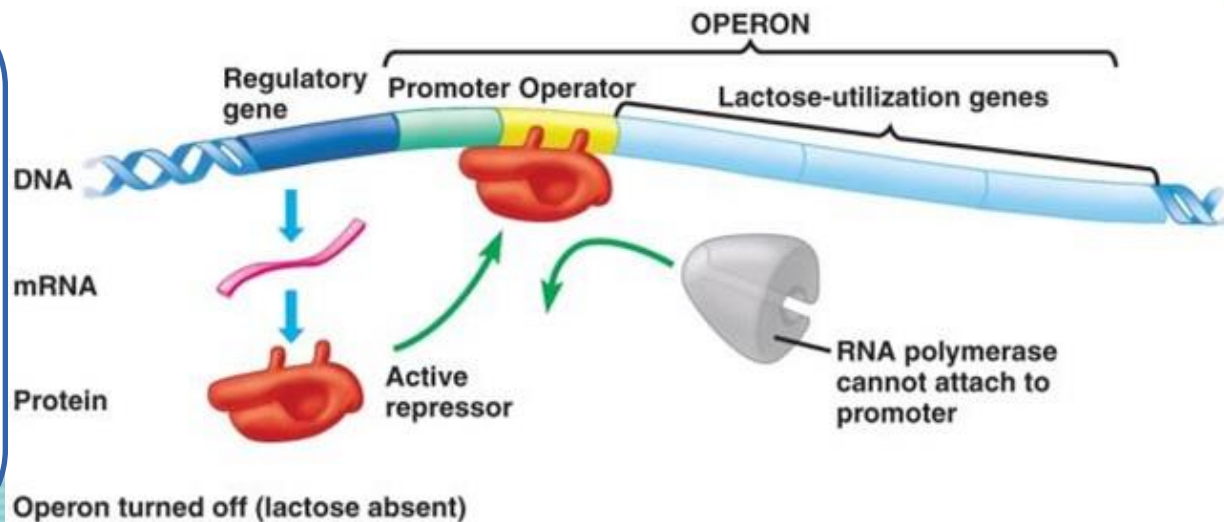
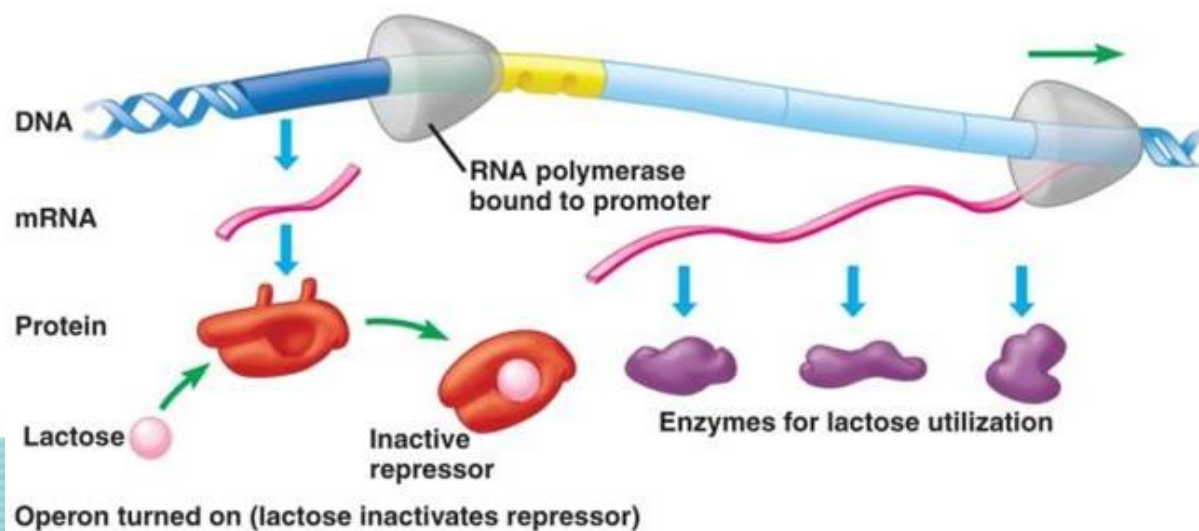
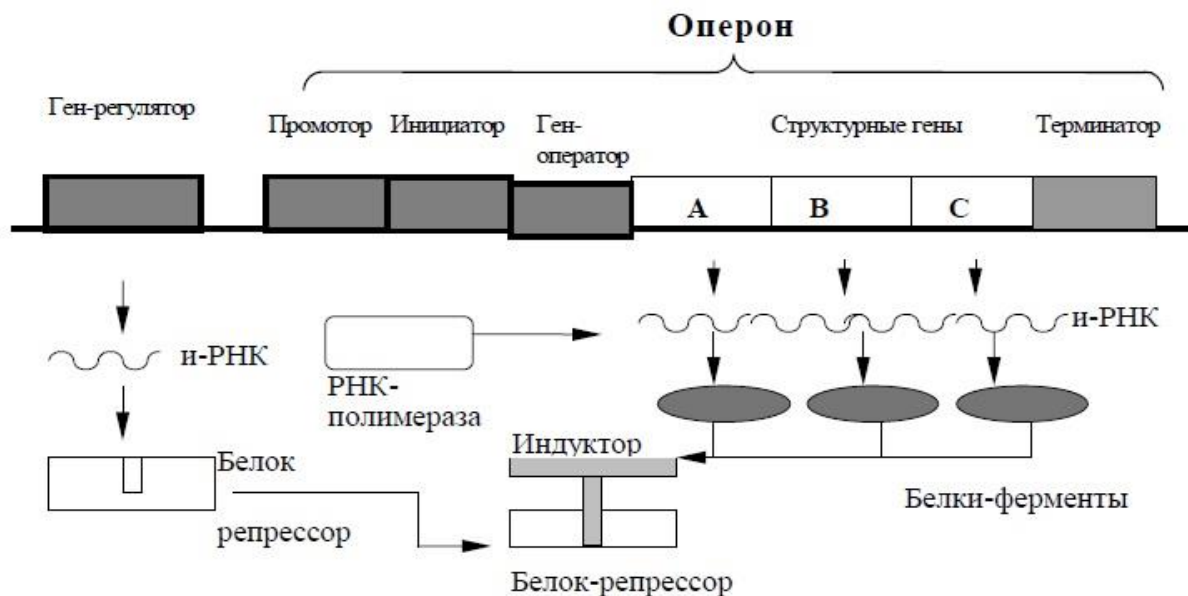


Схема регуляции транскрипции у прокариот (Оперон «работает»)

Слайд 11



Регуляция транскрипции генов прокариот

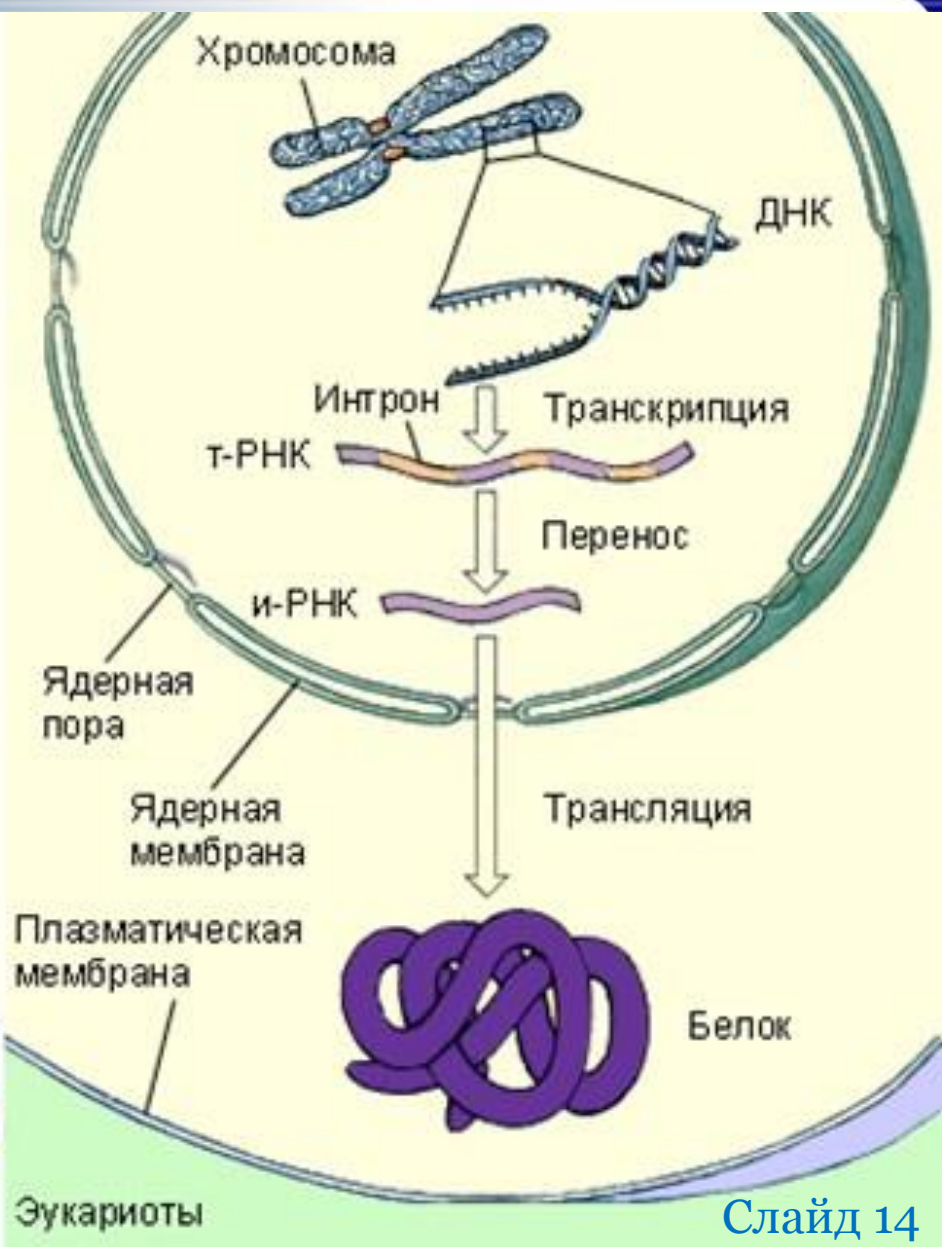
- Осуществляется с помощью регуляторных белков.
- Регулируемые гены содержат в лидерной части гена дополнительные элементы, с которыми связываются регуляторные белки.
- Регуляция может быть негативной (осуществляется белками-репрессорами) или позитивной (осуществляется белками-активаторами).



В регуляции могут принимать участие низкомолекулярные соединения

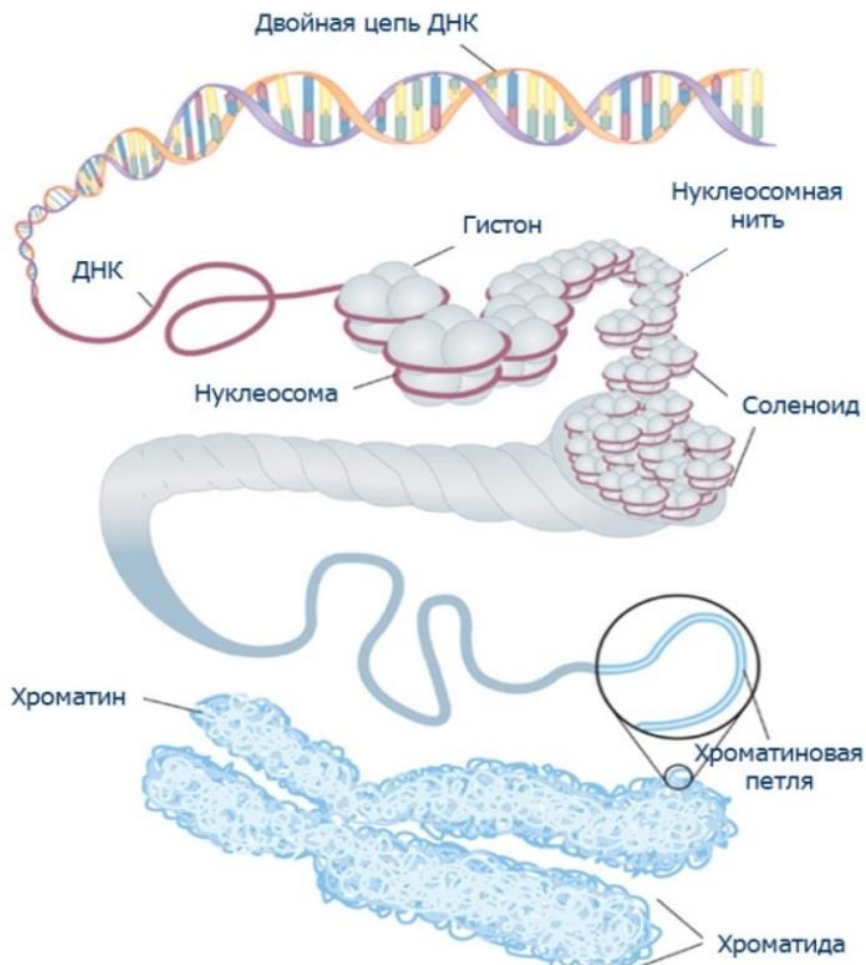
Индуктор – небольшая молекула, которая запускает транскрипцию в результате взаимодействия с регуляторным белком - репрессором. Такая система регуляции называется индуцибельной.

Корепрессор – небольшая молекула, которая запускает репрессию в результате взаимодействия с неактивным белком-репрессором, который переходит в активную форму. Такая система регуляции называется репрессибельной.



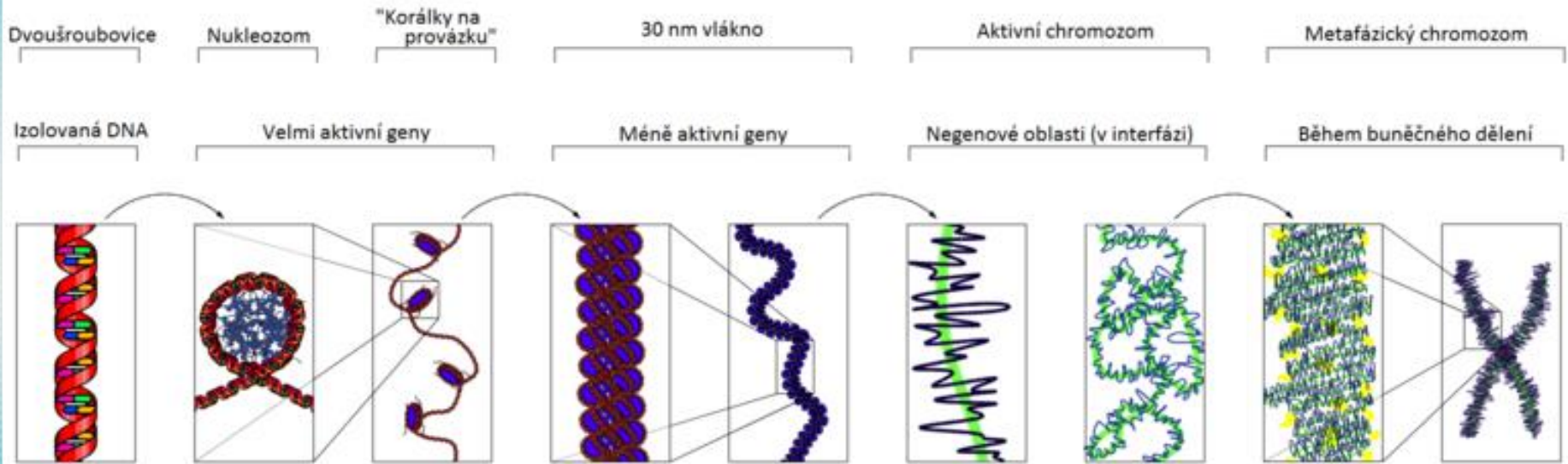
Экспрессия у прокариот и эукариот

Организация хроматина

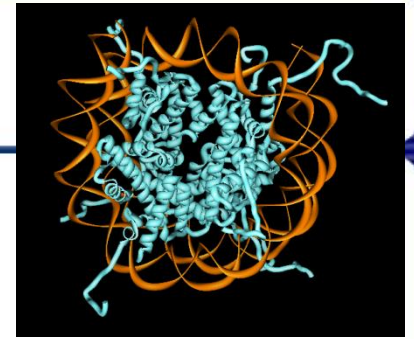


В ядрах дифференцированных клеток хроматин имеет такую укладку, что только небольшое число генов (часто менее 1%) доступно для транскрипции. Различают участки гетерохроматина, в которых ДНК упакована очень компактно и недоступна для транскрипции, и участки эухроматина, имеющие более рыхлую укладку и способные связывать РНК-полимеразу. В разных типах клеток в область эухроматина попадают разные гены, а это означает, что в разных тканях транскрибируются разные участки хроматина.

Структура хроматина

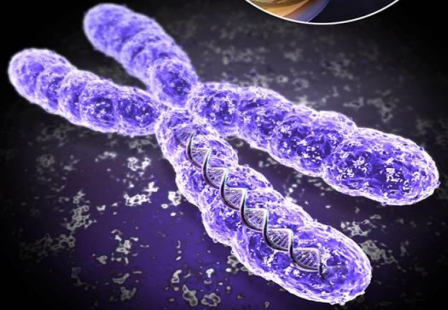
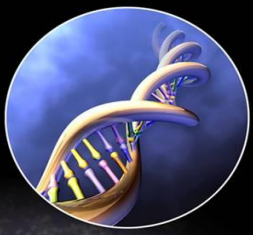


Стойкая репрессия генов гетерохроматина



обеспечивается:

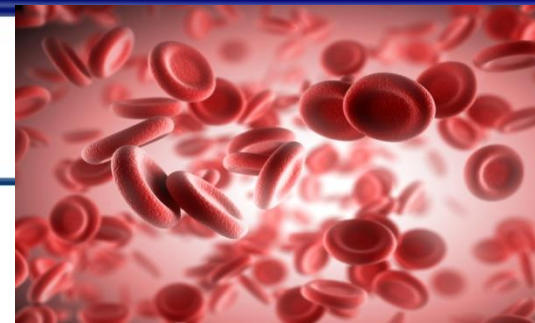
- пространственной укладкой ДНК, при которой гетерохроматин находится в высококонденсированном состоянии;
- метилированием дезоксицитидина ДНК-метилазами в 5'-CG-3' последовательностях ДНК. Эта модификация сильно меняет конформацию хроматина и препятствует активной транскрипции;
- связыванием с гистонами и образованием нуклеосом, которые также снижают транскрипционную активность ДНК.



Разный набор и количество белков в эукариотических клетках может регулироваться:

- изменением количества структурных генов;
- перестройкой генов в хромосомах;
- эффективностью транскрипции разных участков генома;
- характером посттранскрипционных модификаций первичных транскриптов;
- на уровне трансляции;
- с помощью посттрансляционных превращений вновь синтезированных полипептидных цепей.

Изменение количества генов



Амплификация (или увеличение числа) генов используется организмом в том случае, когда возникает необходимость увеличить синтез определённого генного продукта.

Утрата генетического материала - довольно редкий способ регуляции. Наиболее яркий пример потери всех генов за счёт разрушения ядра - процесс созревания эритроцитов.

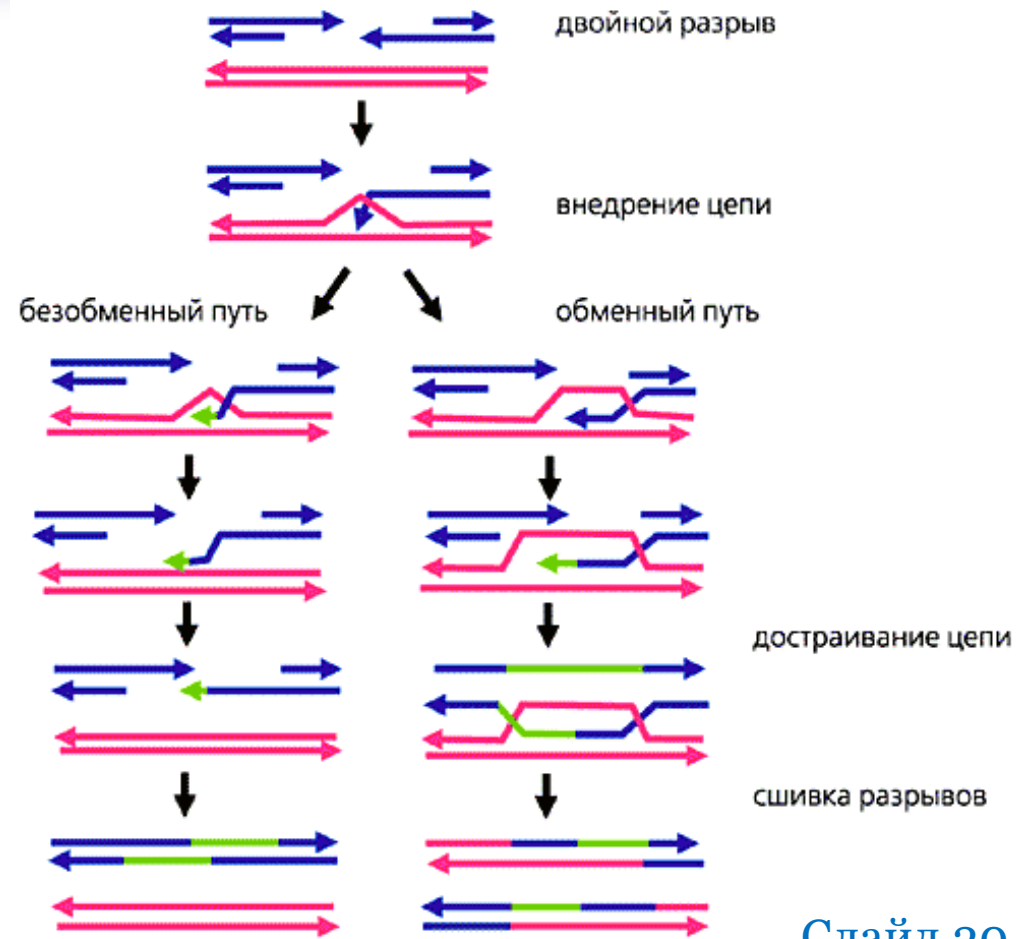


Перестройка генов. У высших организмов, так же как и у прокариотов, отмечают процесс обмена, перемещения генов между хромосомами или внутри хромосомы, объединение генов с образованием изменённой хромосомы, которая после таких структурных изменений способна к репликации и транскрипции. Этот процесс получил название "**генетическая рекомбинация**".

Генетическая рекомбинация

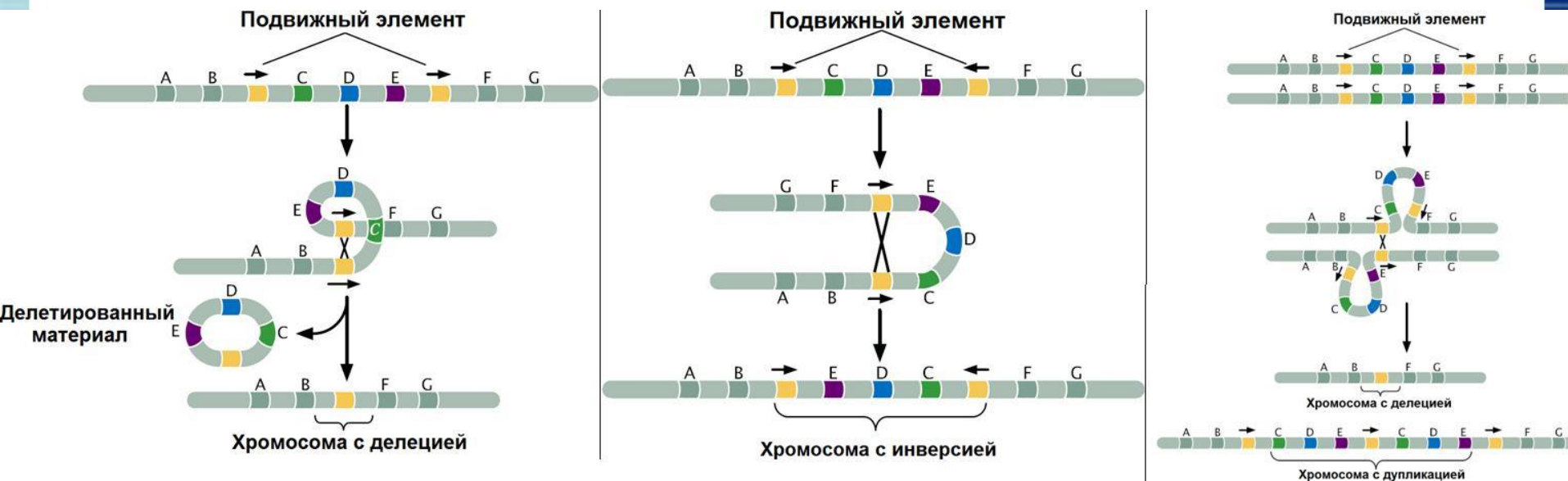
У эукариотов рекомбинации наблюдают:

- при половом слиянии яйцеклетки и сперматозоида;
- при перемещении подвижных генетических элементов - транспозонов, в состав которых входят отдельные гены или группа генов, с исходной позиции в какое-либо другое место той же или другой хромосомы;
- при формировании в лимфоцитах "библиотеки" генов, кодирующих антитела или иммуноглобулины.



Рекомбинация в результате МГЭ (мобильных генетических элементов)

Слайд 21



Идентифицировано более 100 различных белков, способных взаимодействовать со специфическими регуляторными последовательностями ДНК, влияя главным образом на процесс сборки транскрипционного комплекса и скорость транскрипции.

Слайд 22

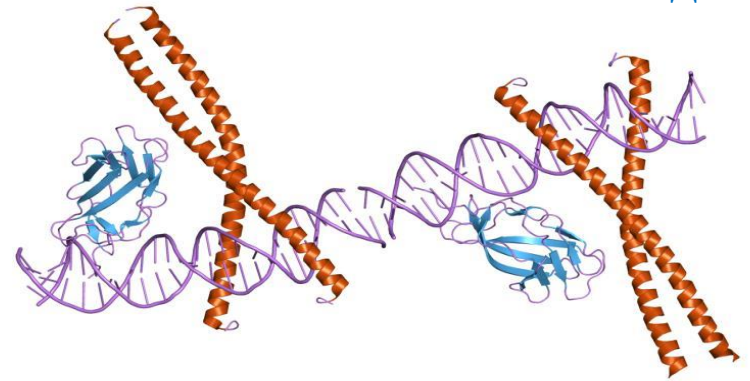
Эти белки имеют один или несколько доменов, обеспечивающих выполнение регуляторных функций.

ДНК-связывающие домены, ответственные за узнавание и связывание регуляторных факторов со специфическими участками на молекуле ДНК;

Домены, активирующие транскрипцию за счёт связывания с белками основного инициаторного комплекса: транскрипционными факторами, коактиваторами и РНК-полимеразой;

Антирепрессорные домены, благодаря которым белки способны взаимодействовать с гистонами нуклеосом и освободить транскрибируемые участки ДНК от связи с этими ингибиторными структурами;

Домены, связывающие лиганды, присоединение которых к белку изменяет его конформацию и обеспечивает связывание с молекулой ДНК.





Георгиев Георгий Павлович

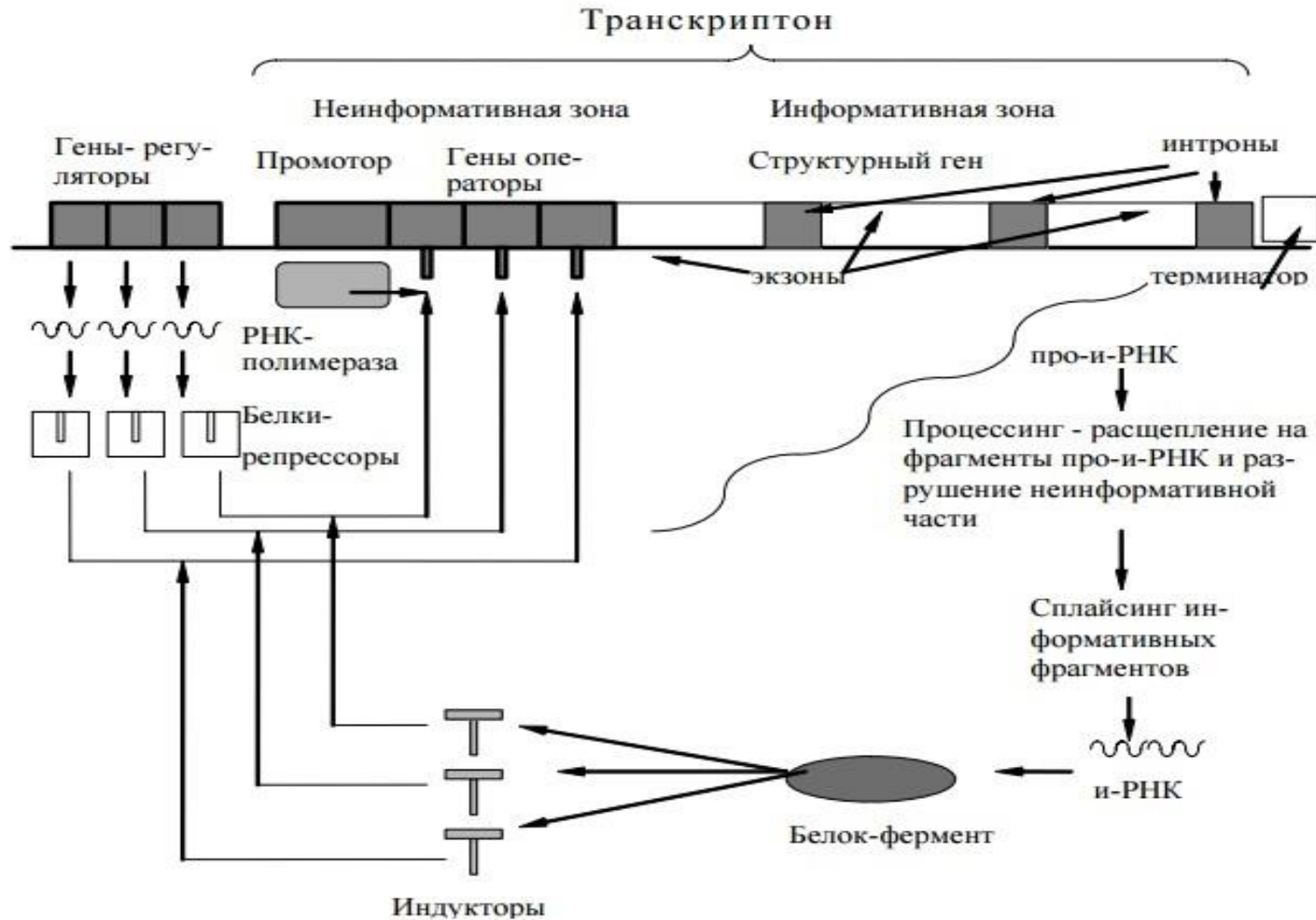
(род. 1933)

— советский и российский ученый биохимик и молекулярный биолог , академик РАН. Основатель и директор Института биологии гена РАН. Открыл мобильные генетические элементы у животных.

Схема регуляции транскрипции у эукариот разработана Георгием Павловичем Георгиевым в **1972** году.

Схема регуляции транскрипции у эукариот

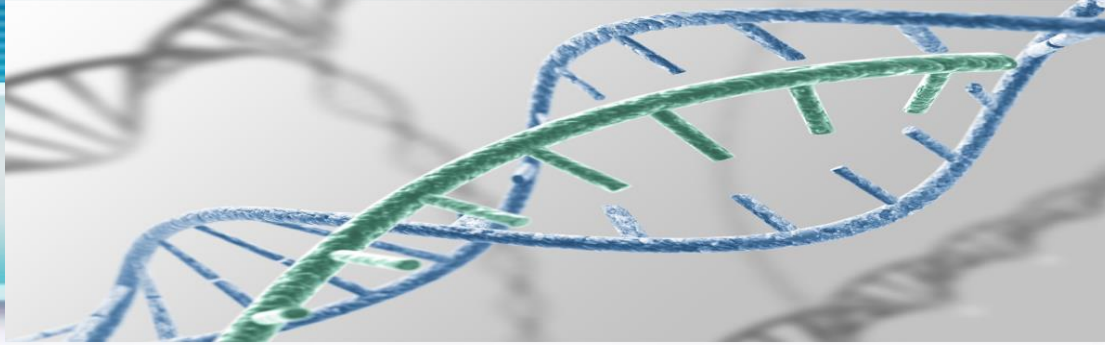
Слайд 24



Принцип регуляции (обратная связь) сохраняется, но механизмы ее более сложные. Единица транскрипции у эукариот называется **транскриптоном**. Он состоит из неинформативной (акцепторной) и информативной (структурной) зон. **Неинформативная зона** начинается **промотором с инициатором**. Далее следуют группа **генов-операторов**, за которыми расположена информативная зона. **Информативная зона** образована структурным геном, разделенным на экзоны (информативные участки) и интроны (неинформативные участки). Заканчивается транскриптон **терминатором**.

Регуляция экспрессии генов на посттрансляционном уровне многообразна

1. Стабильность полипептидов в клетках зависит от протеаз, играющих важную регуляторную роль. Они осуществляют процессинг при их секреции и транспорте через мембраны, превращают неактивные пре-белки в активные белки, отщепляют N-концевой формилметионин и т.д.
2. Протеазы гидролизуют нефункциональные, денатурированные, испорченные в процессе работы белки и мультиферментные комплексы.
3. Специальные белки-шапероны обеспечивают правильную третичную структуру белков.
4. Специальные ферментные системы осуществляют модификацию белков, добавляя или удаляя химические группы. Эти изменения в структуре и функции белков являются чувствительным методом клеточной регуляции. Реакции модификации включают фосфорилирование, ацетилирование, метилирование, аденилирование, рибозилирование, убиквитинирование и т.д. В большинстве случаев модификация белков является обратимой.



Эукариотические клетки содержат три различные РНК-полимеразы

РНК-полимераза I – синтез рибосомных РНК (рРНК).

РНК-полимераза II – синтез матричной РНК (мРНК) и большую часть небольших ядерных РНК (snРНК).

РНК-полимераза III – синтез транспортных РНК (тРНК) и 5S-рибосомной РНК (5SRНК).

Энхансеры и сайленсеры

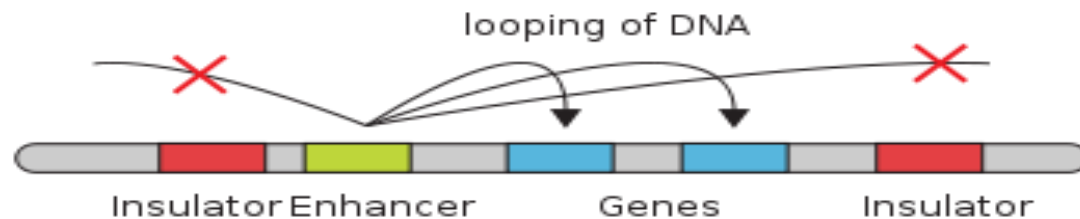
Энхансеры - участки ДНК вне промотора.

Связываются с различными факторами транскрипции и усиливают транскрипцию определенных генов.

Энхансеры могут располагаться на расстоянии до 10 тпн от промотора, а также после него.

Сайленсеры - регуляторные элементы ДНК, ингибирующие транскрипцию с использованием белков-репрессоров. При этом происходит прямое подавление инициации транскрипции путем разрушения транскрипционного комплекса на промоторе

Инсуляторы



— последовательности ДНК, особые регуляторные элементы, которые обладают способностью блокировать сигналы, исходящие от окружения. Эта функция инсуляторов включает две активности.

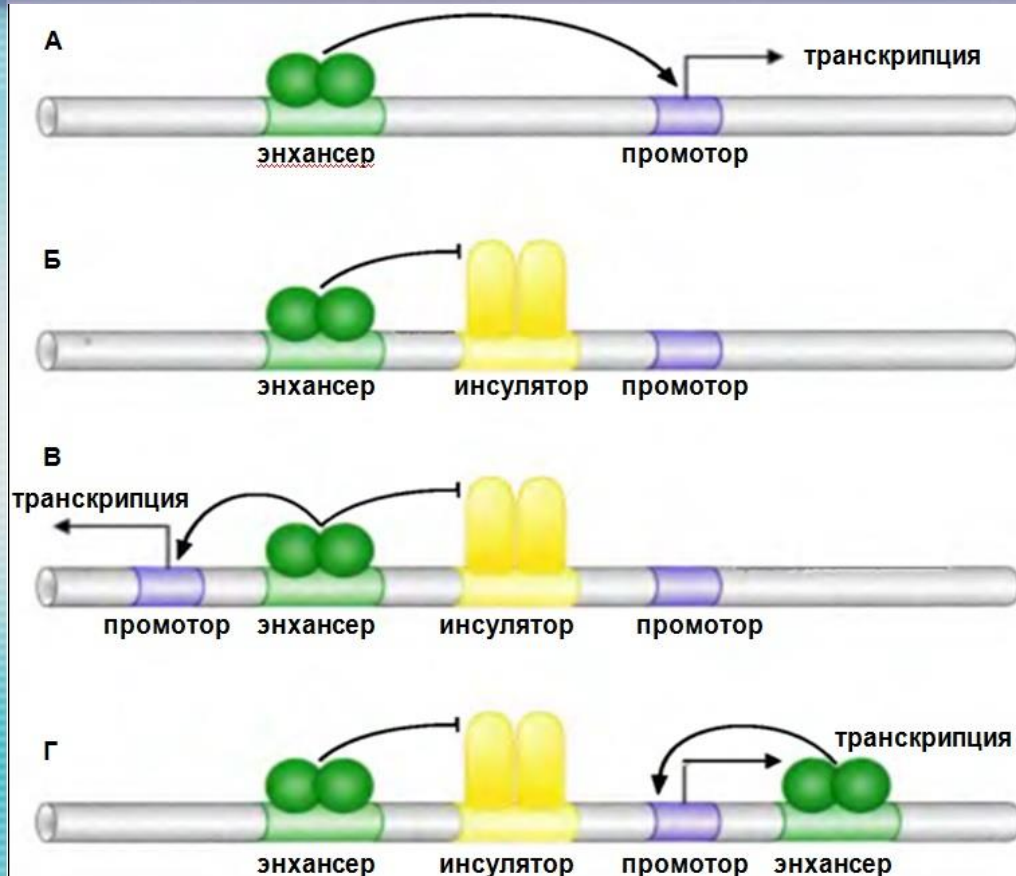
Во-первых, они блокируют взаимодействие между энхансером и промотором, если находятся между ними. Введение инсулятора между При этом инсулятор выполняет только разделительную функцию и не влияет на активность энхансера и промотора по отдельности.

Во-вторых, инсулятор выполняет барьерную функцию для распространения конденсации Х. Показано, что инсуляторы могут разделять два участка Х, различающиеся по степени компактизации.

Энхансеры не обладают специфичностью действия, следовательно, у эукариот существуют механизмы, обеспечивающие невозможность активации генов в ненужном месте или в неправильное время энхансерами соседнего гена.

Инсуляторы представляют собой сайты связывания специфических инсуляторных, белков.

Инсуляторы блокируют активность энхансеров



А – показан промотор, регулируемый активаторами, связанными с энхансером.

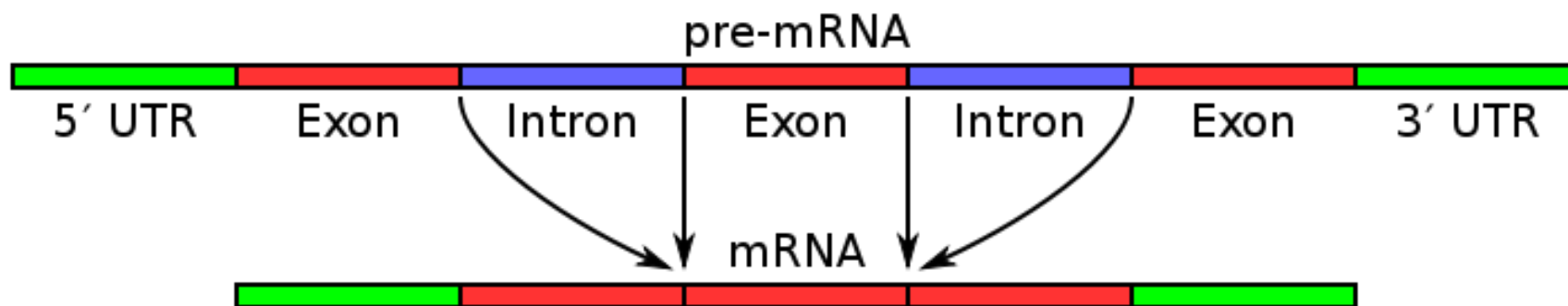
Б – между промотором и энхансером расположен инсулятор, который блокирует действие активаторов.

В – энхансер может активировать другой промотор в близлежащей области.

Г – промотор может активироваться за счет действия энхансера, расположенного в нижележащей последовательности.

Сложные взаимодействия регуляторных элементов с участием инсуляторов обеспечивают многообразие нюансов экспрессии генов.

СПЛАЙСИНГ



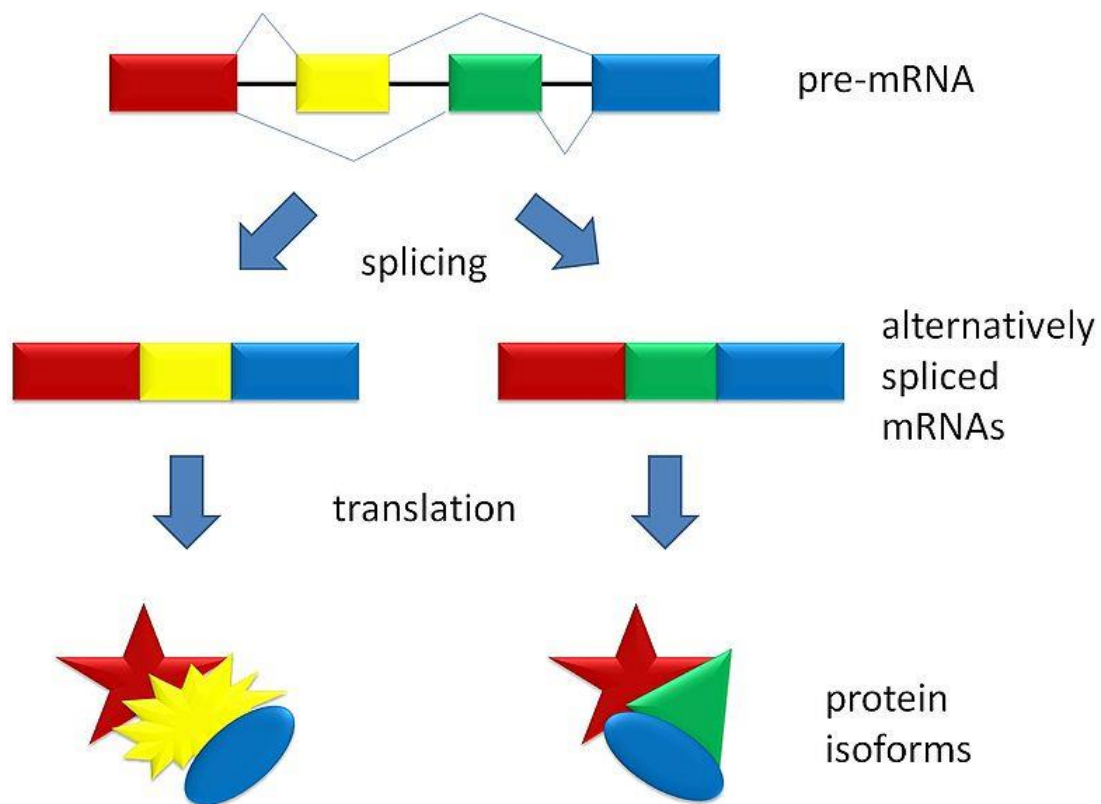
Большинство генов эукариот состоят из **ЭКЗОНОВ** и **ИНТРОНОВ**. В процессе сплайсинга интроны вырезаются, а экзоны сшиваются, образуя зрелую РНК.

Процесс удаления из пре-РНК интронов и соединение в одну последовательность экзонов называется **сплайсингом**

Альтернативный сплайсинг

Процесс, позволяющий индивидуальным генам продуцировать множество различных активных белковых изоформ.

Процесс, в котором из одной пре-матричной РНК могут образовываться различные зрелые транскрипты, благодаря включению разных экзонов.





Регуляция активности генов у эукариот изучена менее полно, чем у вирусов и прокариот, что обусловлено наличием у них ядра, сложно устроенных хромосом и дифференциацией клеток. Допускается, что в основе регуляции действия генов у эукариот лежат механизмы, в принципе сходные с таковыми у вирусов и прокариот. Однако, есть и существенные отличия.

1. Почти всегда оперон эукариот содержит только один структурный ген в то время как у вирусов и прокариот в большинстве оперонов их бывает несколько, иногда более десятка.
2. У эукариот структурные гены, ответственные за разные звенья той или иной цепи биохимических реакций, как правило, разбросаны по геному, а не сосредоточены в одном опероне, как это часто имеет место у прокариотов.



3. У эукариот существует одновременное групповое подавление активности генов во всем ядре, в целой хромосоме, или в большом ее участке. Такая групповая репрессия генов осуществляется в значительной мере гистонами-белками, входящими в состав эукариотических хромосом. Примером групповой регуляции активности генов - это полное прекращение транскрипции всех генов при сперматогенезе.

4. Существует система регуляции с помощью стероидных гормонов. Последние связываются со специальными белками - рецепторами, расположенными в мембранах клеток - мишеней. Синтез белков - рецепторов контролируется геном тестикулярной феминизации X - хромосомы. Такой комплекс обеспечивает активацию определенного гена.

5. Транскрипция и трансляция у эукариот разобщены (у прокариот - сопряжены). Синтез и-РНК происходит в ядре, а белков - на рибосоме. Без гормонального сигнала, которые и-РНК остаются не транслированными.

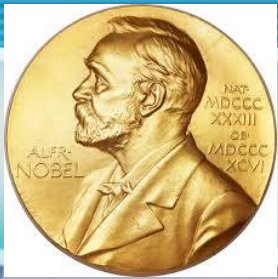
РНК-интерференция (RNA silencing)

РНК-интерференция (RNA silencing) – это подавление экспрессии генов у эукариот (замалчивание генов) на посттранскрипционном уровне, индуцированное короткими интерферирующими РНК (small interfering RNA, siРНК).

Малые РНК

- разрезание матричной РНК (mРНК)
- репрессия трансляции
- ремоделирование хроматина

**регуляция экспрессии генов на
транскрипционном и
посттранскрипционном уровнях**



Крэйг Меллоу



Эндрю Файер

Нобелевская премия по физиологии и медицине
в **2006** г.

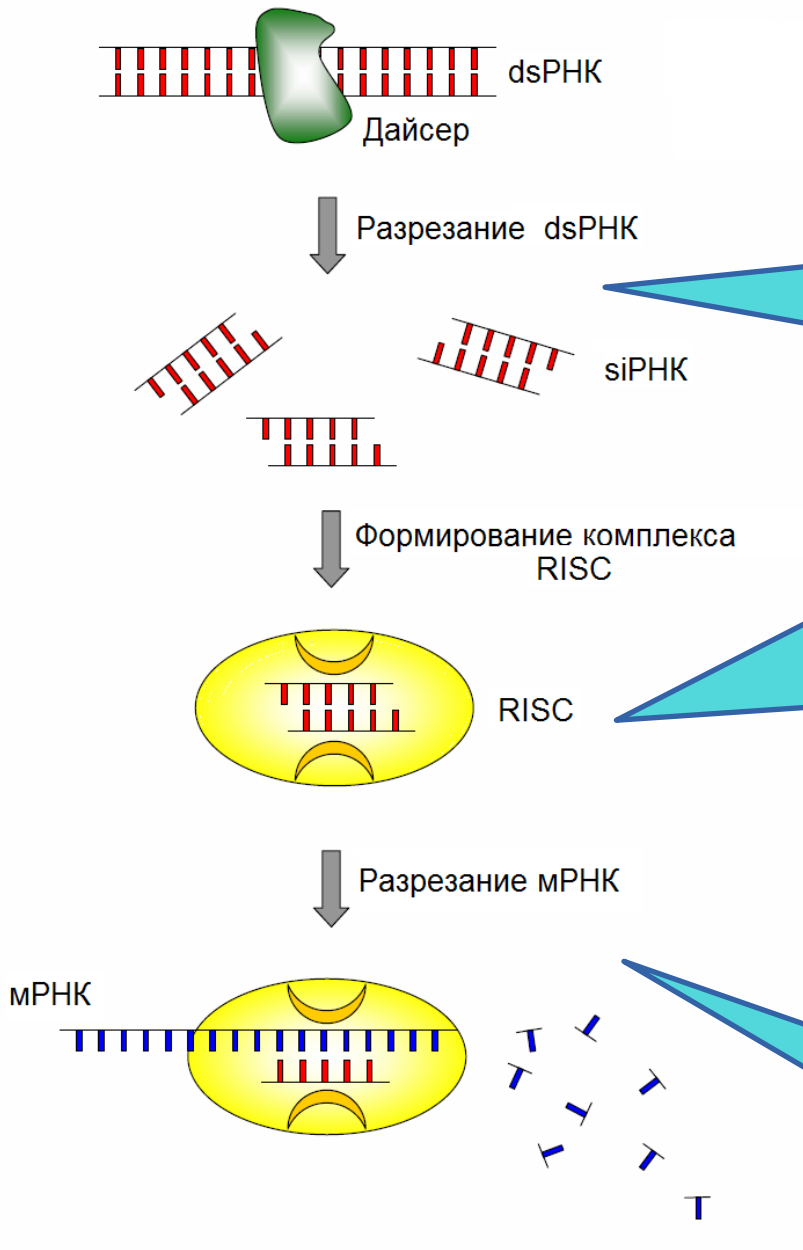
за открытие РНК-интерференции –
замалчивание генов двунитовой ДНК
(gene silencing)

Появление в клетке dsРНК вызывает каскад событий, известный как РНК-интерференция.

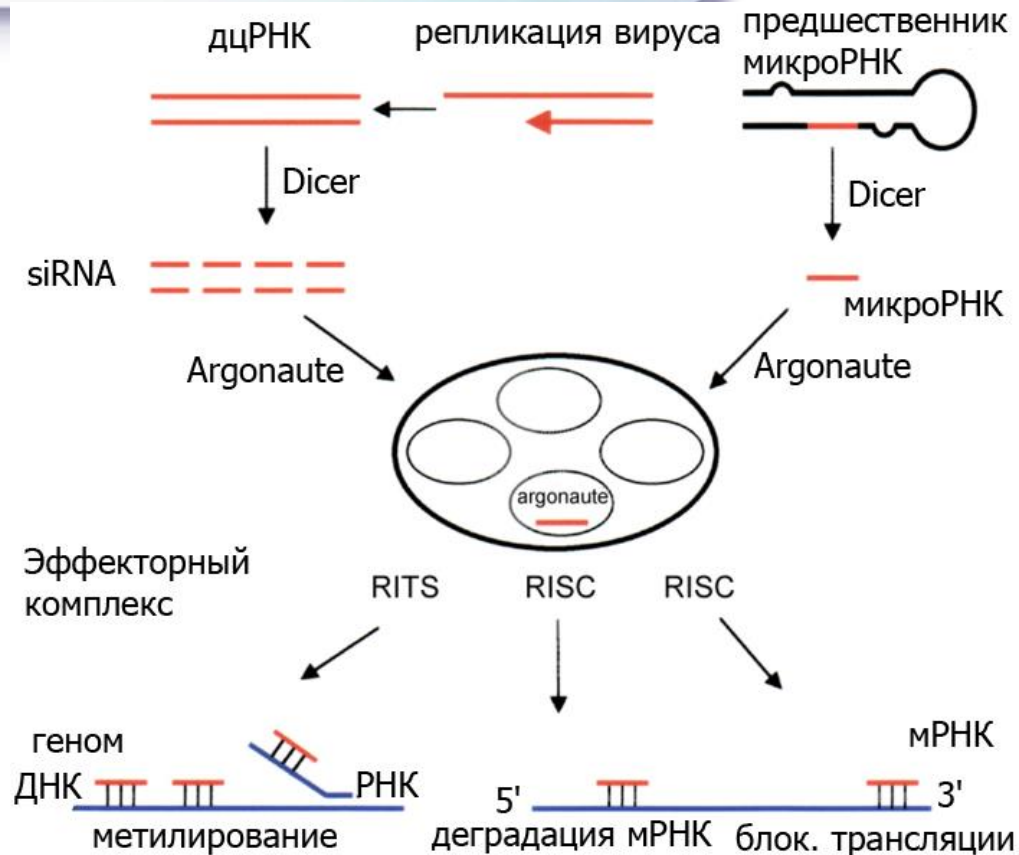
1. Фермент Дайсер связывается с dsРНК и разрезает её на короткие фрагменты в 21-23 п.н. – siРНК (short interfering RNA).

2. siРНК связываются с ферментативным комплексом RISC (RNA-induced silencing complex), который использует одну её нить (комплементарную мРНК) для связывания с мРНК.

3. Нуклеазная активность комплекса RISC деградирует мРНК.



Механизм RNAi



- 1) Фермент Dicer разрезает двуцепочечную РНК.
- 2) Образованные при этом siРНК или микроРНК попадают в RNA-induced silencing complex (RISC)
- 3) RISC разрушает мРНК и предотвращает трансляцию

Основные свойства РНК-интерференции

- Специфичность (подавляется экспрессия только того гена, нуклеотидная последовательность которого полностью соответствует нуклеотидной последовательности вводимой dsРНК).
- РНК-интерференция реализуется на посттранскрипционном уровне (фрагменты dsРНК, соответствующие последовательностям промотора или интрона не вызывали РНК-интерференцию).
- Эффект РНК-интерференции, возникший в каком-либо участке тела *C. elegans* может распространяться по всему организму и передаваться по наследству потомкам.

РНК-интерференцию обнаружили у большинства эукариотических организмов

в частности у
простейших, кишечнополостных, насекомых, грибов,
растений, млекопитающих

Биологическая роль РНК-интерференции

защита от ДНК- и РНК-содержащих вирусов (растения)

подавление активности мобильных генетических элементов

Посттранскрипционное замолкание генов (PTSG; мишень РНК)

контроль развития организма

участие в детерминации клеток

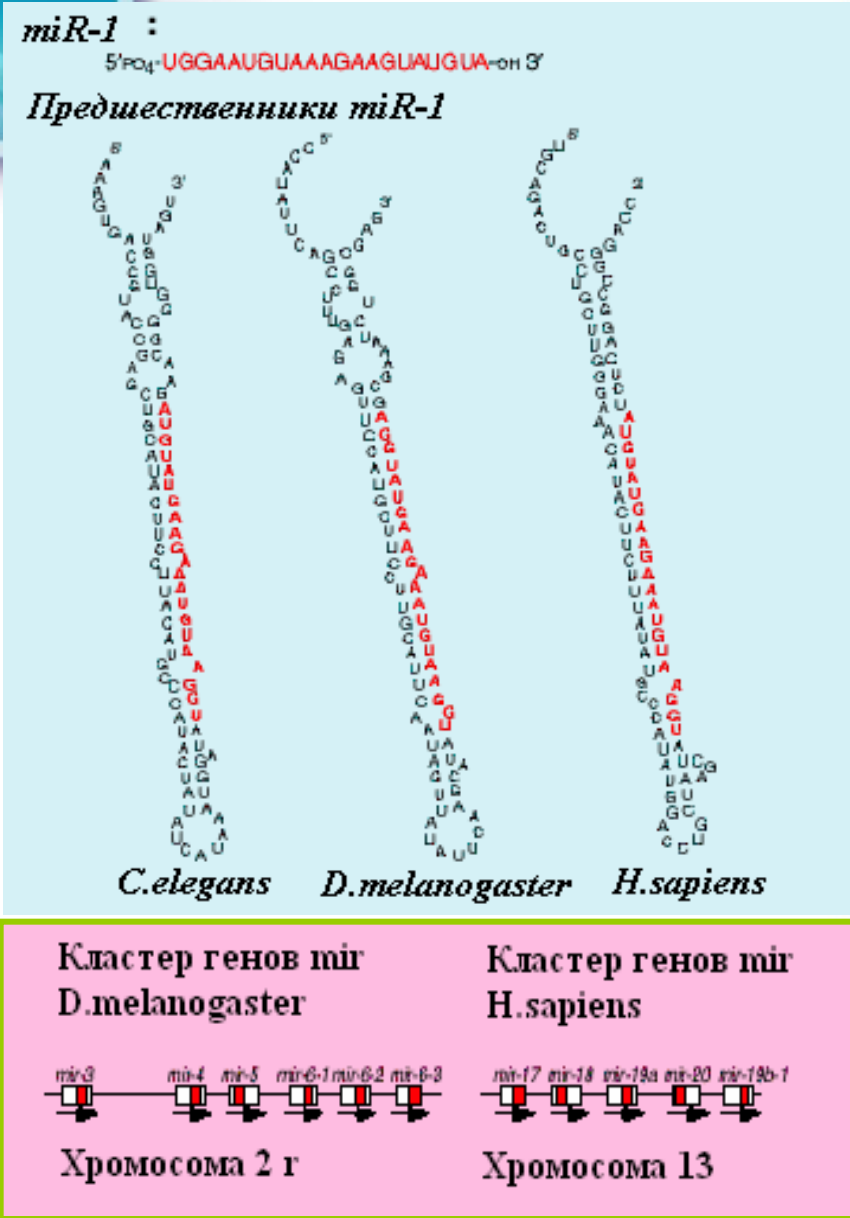
Транскрипционное замолкание генов (TSG; мишень ДНК)

изменение структуры гетерохроматина (РНК-зависимое метилирование)

МикроРНК : регуляция экспрессии генов

микроРНК (miRNA)

- Консервативны у отдаленных видов.
- В процессированной форме представляют собой одноцепочечные РНК длиной около 22 нуклеотидов.
- Комплементарно (или частично комплементарно) связываются с мРНК, что приводит к ее разрушению или к ингибированию трансляции.



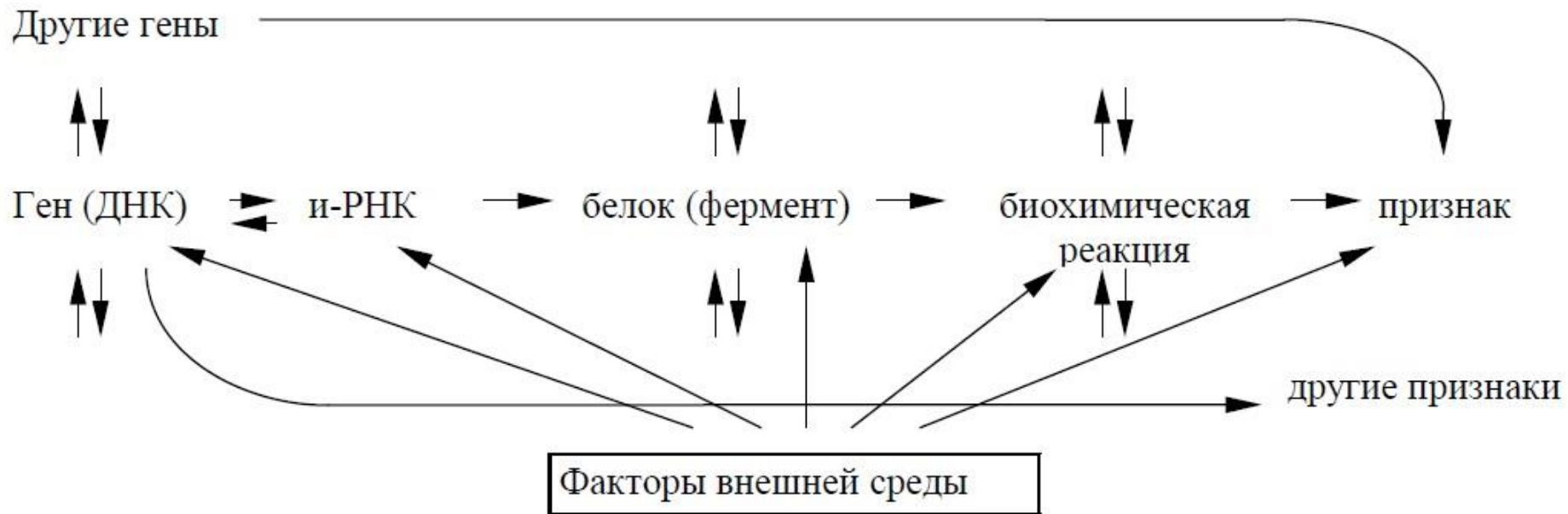
микроРНК:

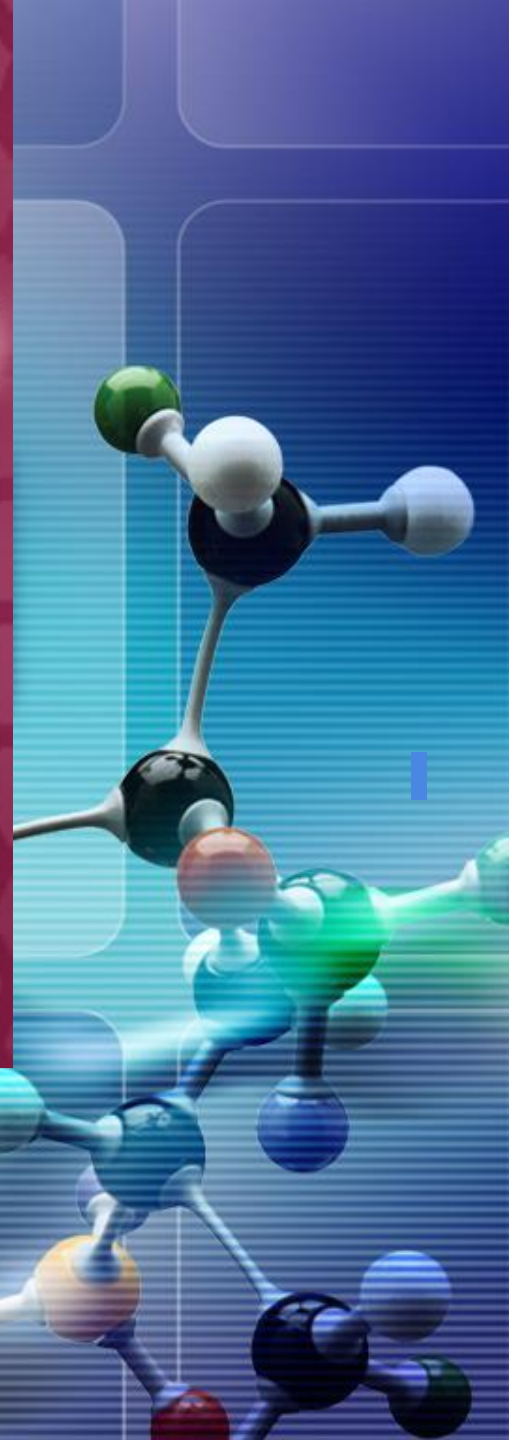
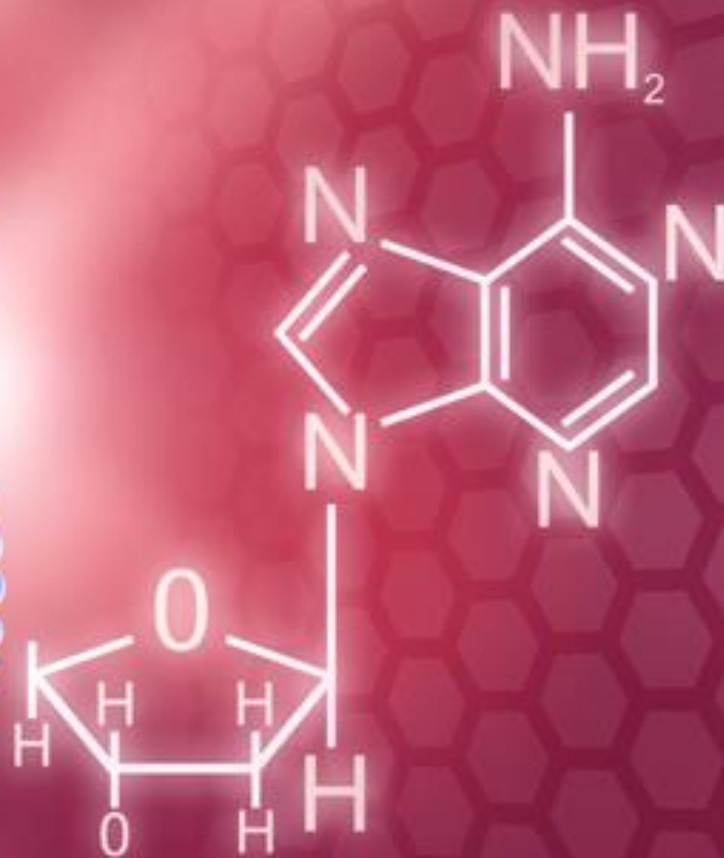


особенности структурной и геномной организации

- Одинаковая последовательность может кодироваться разными генами.
- Гены миРНК чаще всего располагаются между белок-кодирующими генами.
- Могут располагаться в интронах белок-кодирующих генов. Транскрипция происходит параллельно с транскрипцией пре-мРНК данного гена.
- Гены миРНК организованны в кластеры, транскрибируемые как мультицистронные РНК-продукты.

Схема реализации генетической информации





Спасибо за внимание!