

Глобальные регуляторные механизмы не являются ген-специфическими, а влияют на экспрессию многих генов.

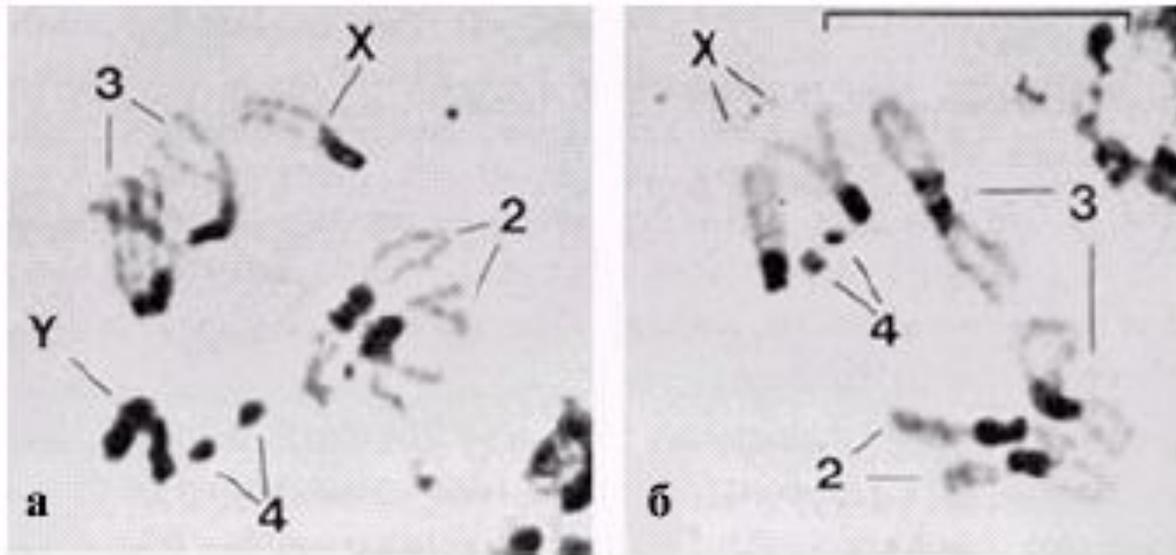
Регуляция может осуществляться путем изменения состояния хроматина, в частности изменения упаковки нуклеосом. Это создает еще один уровень регуляции экспрессии. Как правило, активация транскрипции коррелирует с переходом высококонденсированных форм хроматина в менее плотно упакованные «открытые» формы.

На экспрессию (транскрипцию) генов влияют обратимые изменения в структуре ДНК, в частности изменение степени свехспирализации (топологии) ДНК и, следовательно, изменение конформации (например, переход от В- к Z- или другим формам)

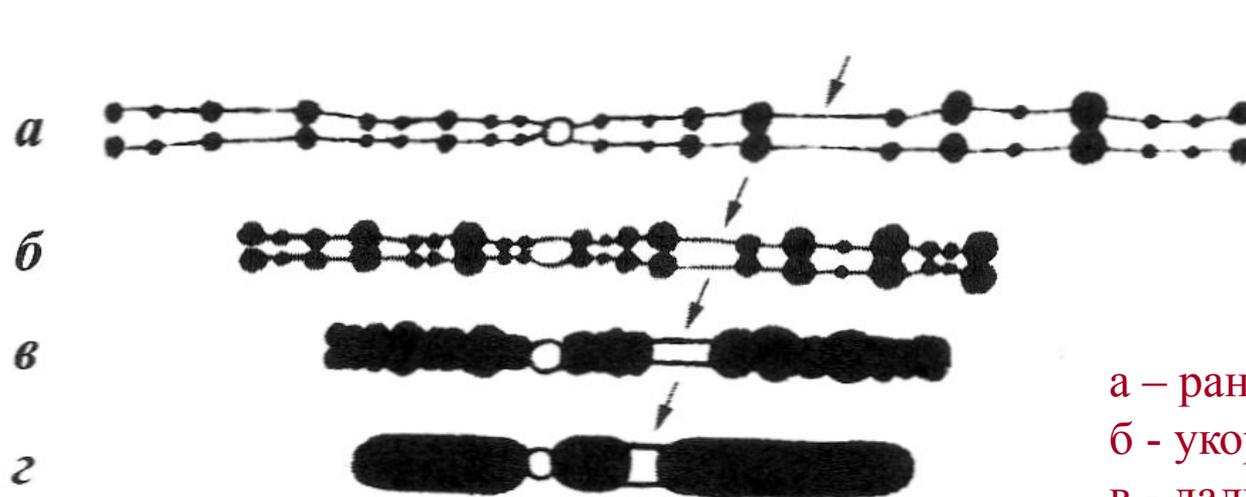
Активность транскрипции зависит от степени метилирования цитозина в динуклеотидных парах оснований $5'-CG-3'$.
 $3'-GC-5'$

Подавление экспрессии часто бывает связано с гиперметилированием, а активация - с гипометилированием.

Изменение состояния хроматина



Локализация эу-(светлые части хромосом) и гетерохроматина (интенсивно окрашенные участки) в кариотипе дрозофилы по результатам С-окрашивания. а - самец, б - самка. Цифры - номера хромосом. X и Y - половые хромосомы. Шкала 10 мкм.

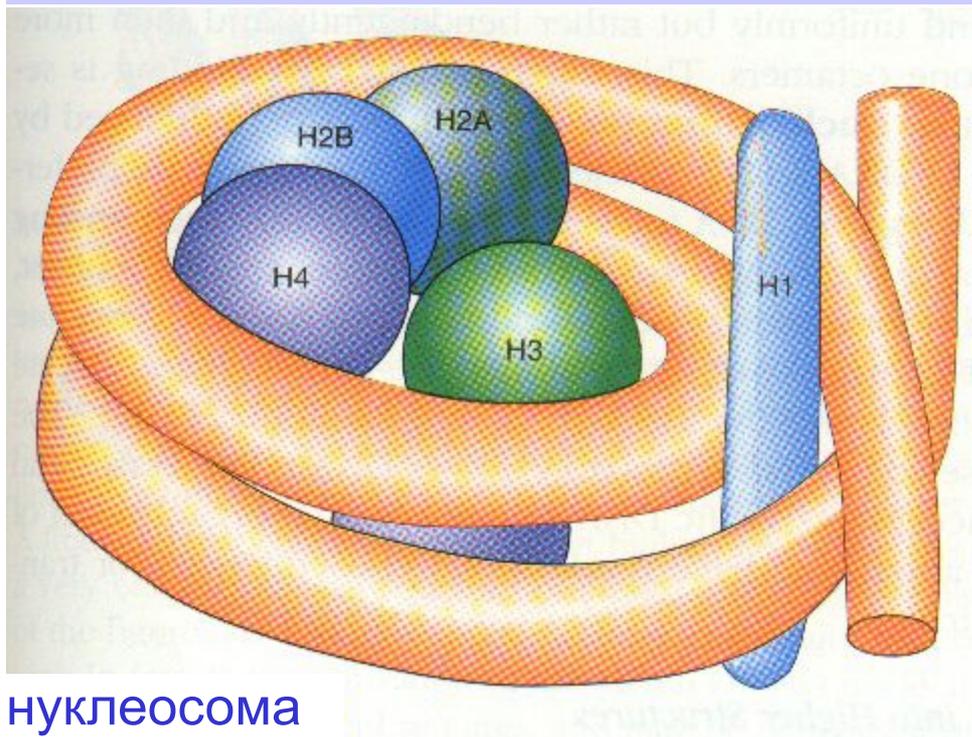


Изменение хромомерного рисунка в ядрышкообразующей хромосоме *Allium cepa* (лук обыкновенный) в прометафазе-метофазе мейоза

а – ранняя профаза;
 б - укорочение профазных хромосом;
 в - дальнейшее укорочение межхромомерных участков;
 г – метафазная хромосома.

Типичные характеристики гистонов млекопитающих

ТИП	Число АК	Мм, кДа основных АК	Число АК	Lys/Arg	Число
H1 (кролик)		213 23,0	65	21 12	
H2A (корова)		129 14,0	26	1,2 20	
H2B (корова)		125 13,8	28	2,5 16	
H3 (корова)		135 15,3	32	0,7 18	
H4 (корова)		102 11,3	26	0,8 10	



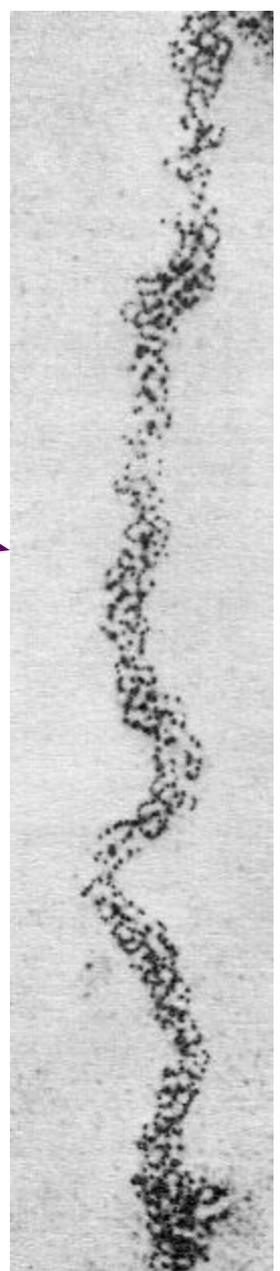
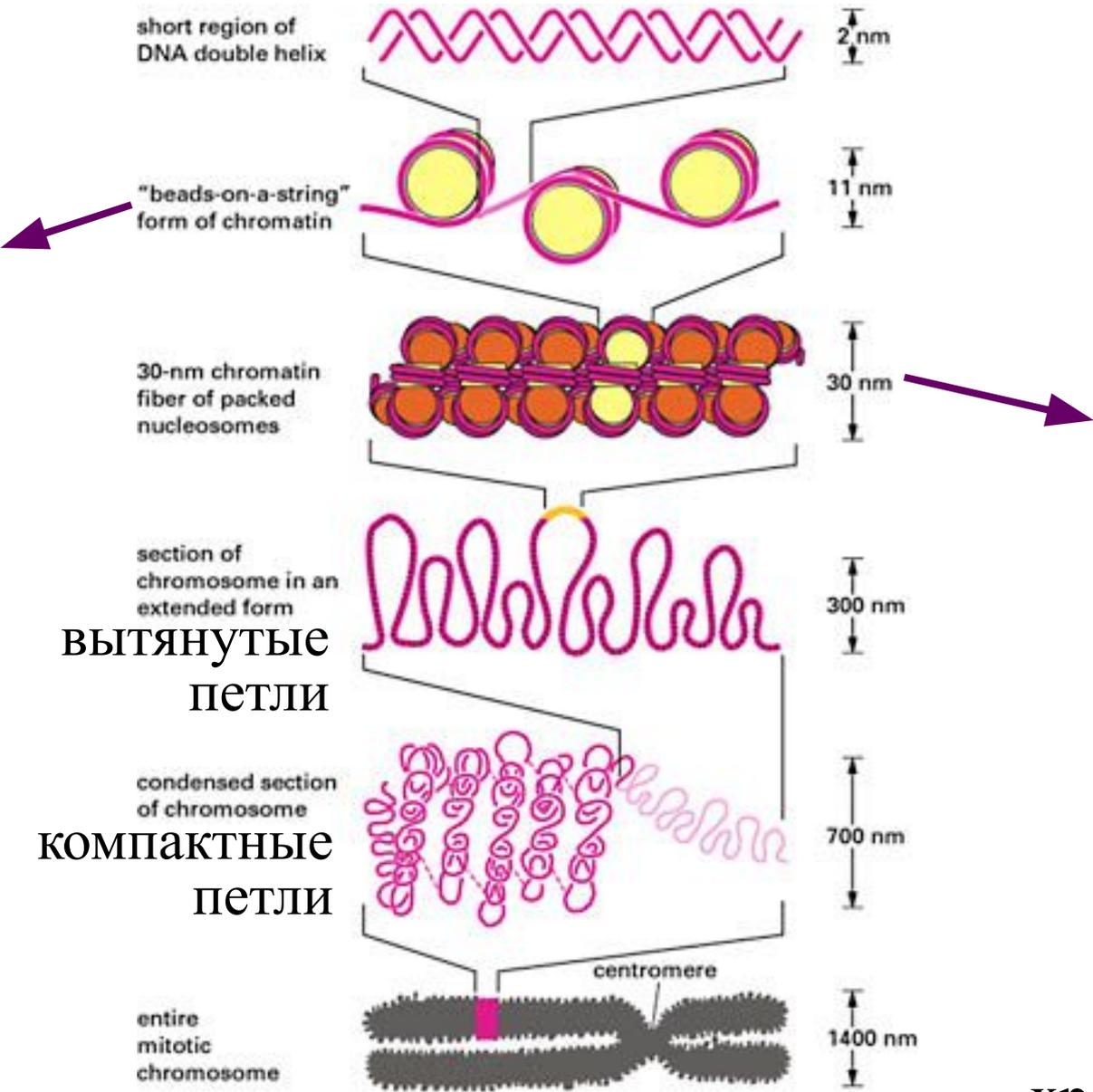
нуклеосома

В такой структуре с одним гистоновым октамером и молекулой гистона H1 ассоциированы 168 пар оснований спиральной ДНК

УПАКОВКА ДНК В ХРОСОМОМАХ

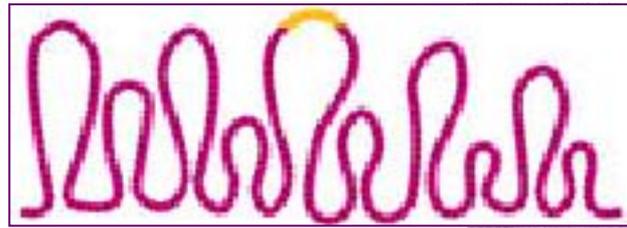


«бусы на нитке»

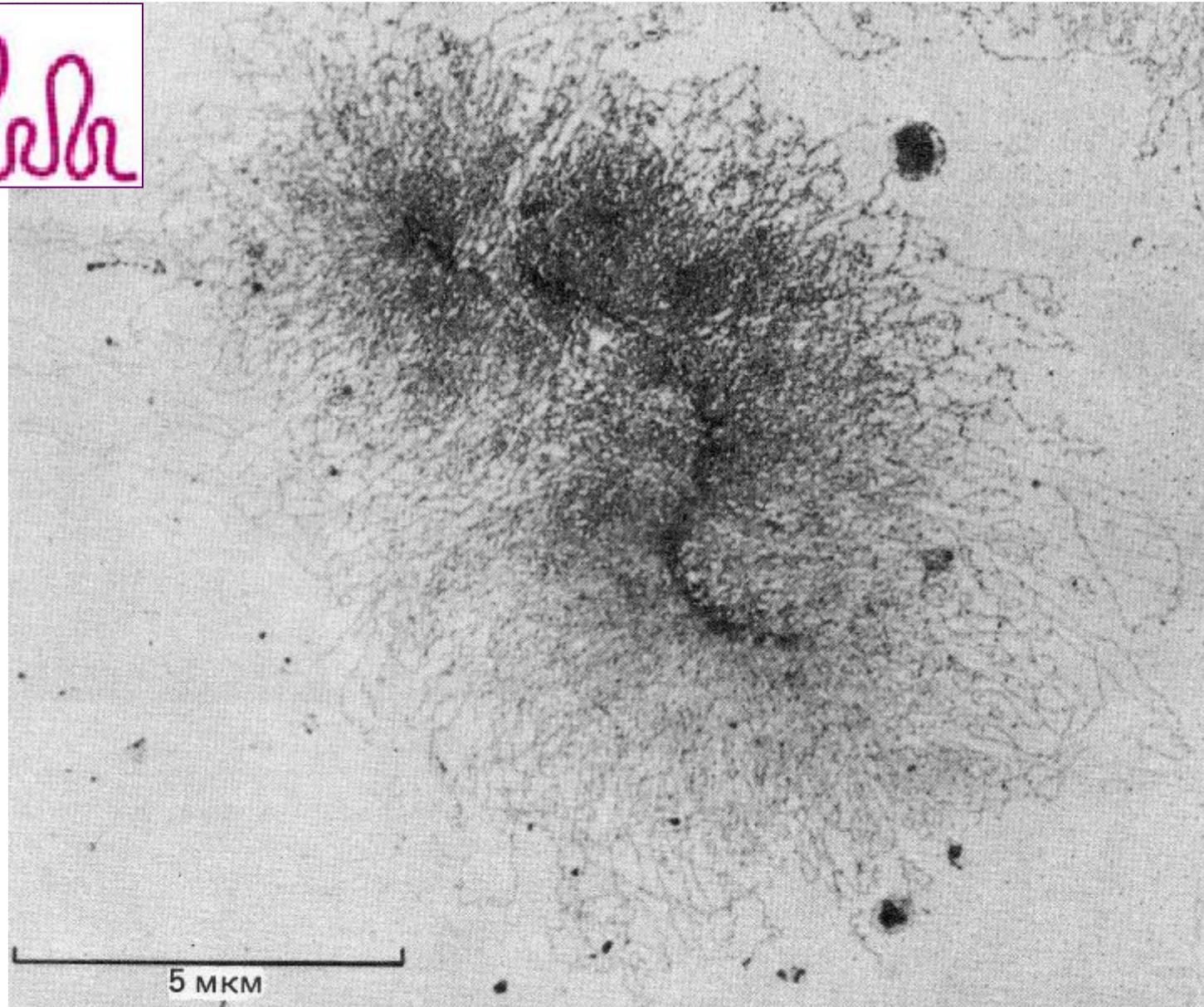


хроматиновые фибриллы

NET RESULT: EACH DNA MOLECULE HAS BEEN PACKAGED INTO A MITOTIC CHROMOSOME THAT IS 50,000x SHORTER THAN ITS EXTENDED LENGTH



Электронная
микрофотография
одиной
хроматиды
митотической
хромосомы
насекомого.
Специальная
обработка
позволяет
визуализировать
петли хроматина,
отходящие от
центральной
хроматиды.



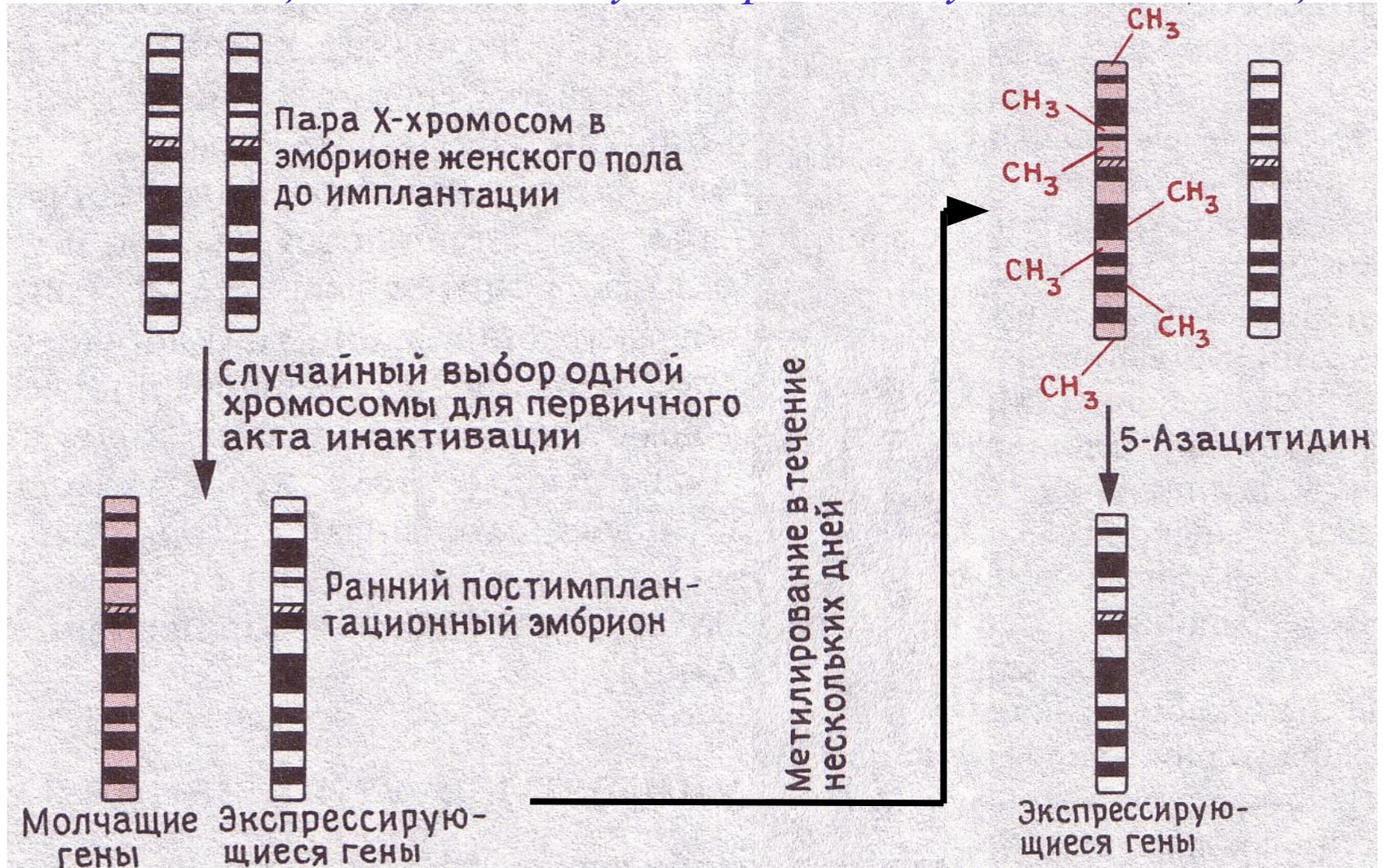
Активность транскрипции зависит от степени метилирования цитозина в динуклеотидных парах оснований:



Метилирование как правило происходит по положению 5 остатков цитозина (5-meC).

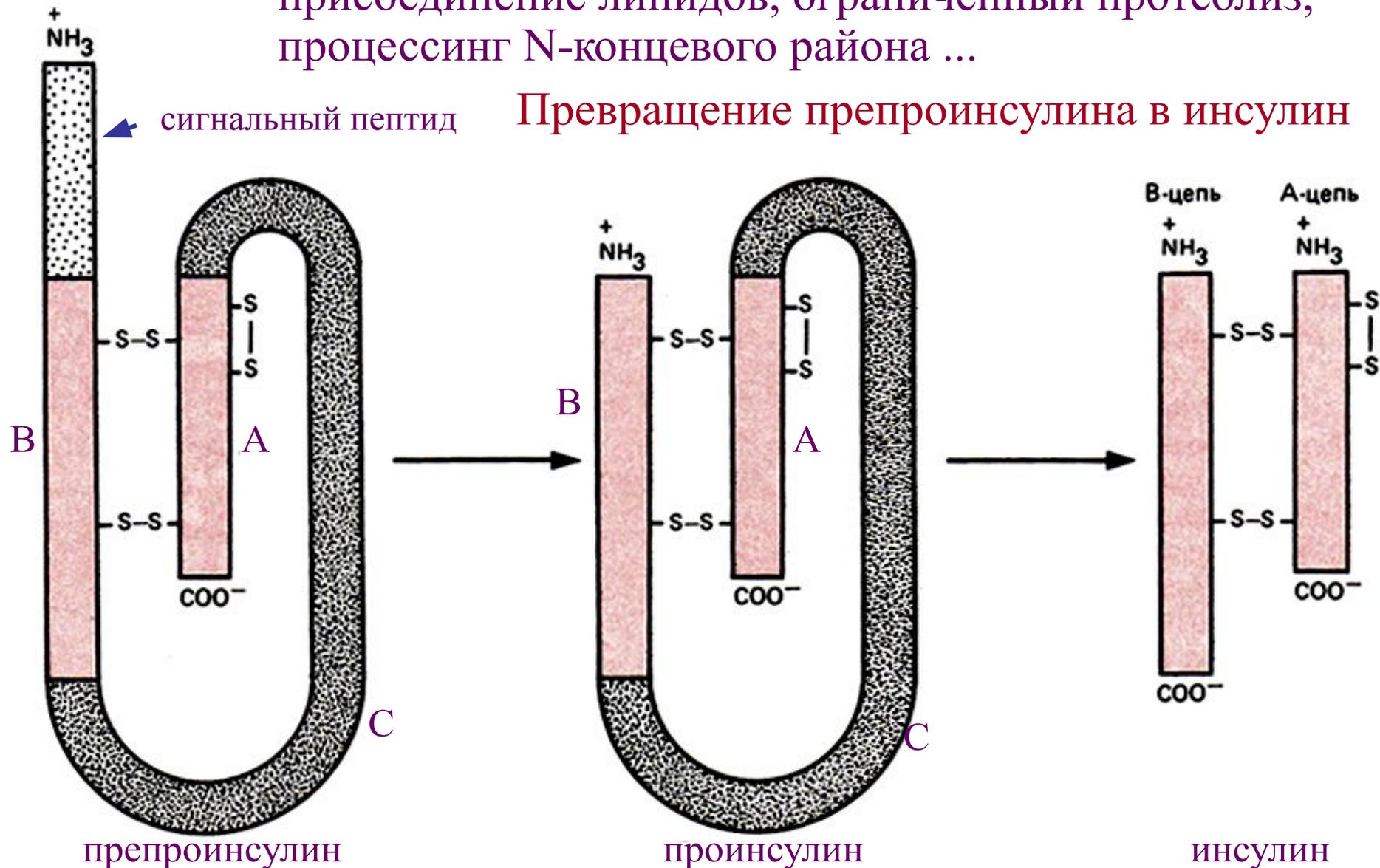
За исключением нескольких случаев, при наличии метилированных групп остатков цитозина внутри регуляторных областей гена и вокруг них (**гиперметилирование**) **эффективность генной экспрессии уменьшается**, часто полностью подавляется. И наоборот **активное состояние генов** обычно сочетается с отсутствием метилирования или понижением степени метилирования (**гипометилирование**).

GR2 Инактивация одной из двух X-хромосом у млекопитающих



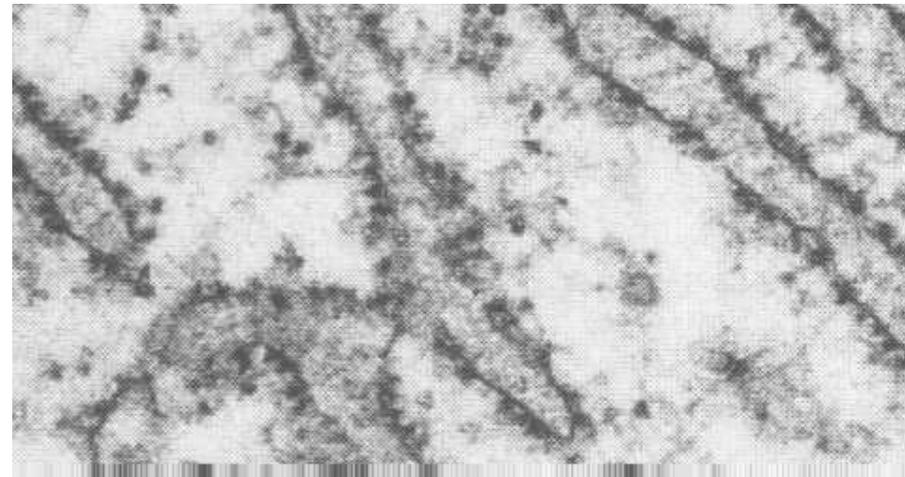
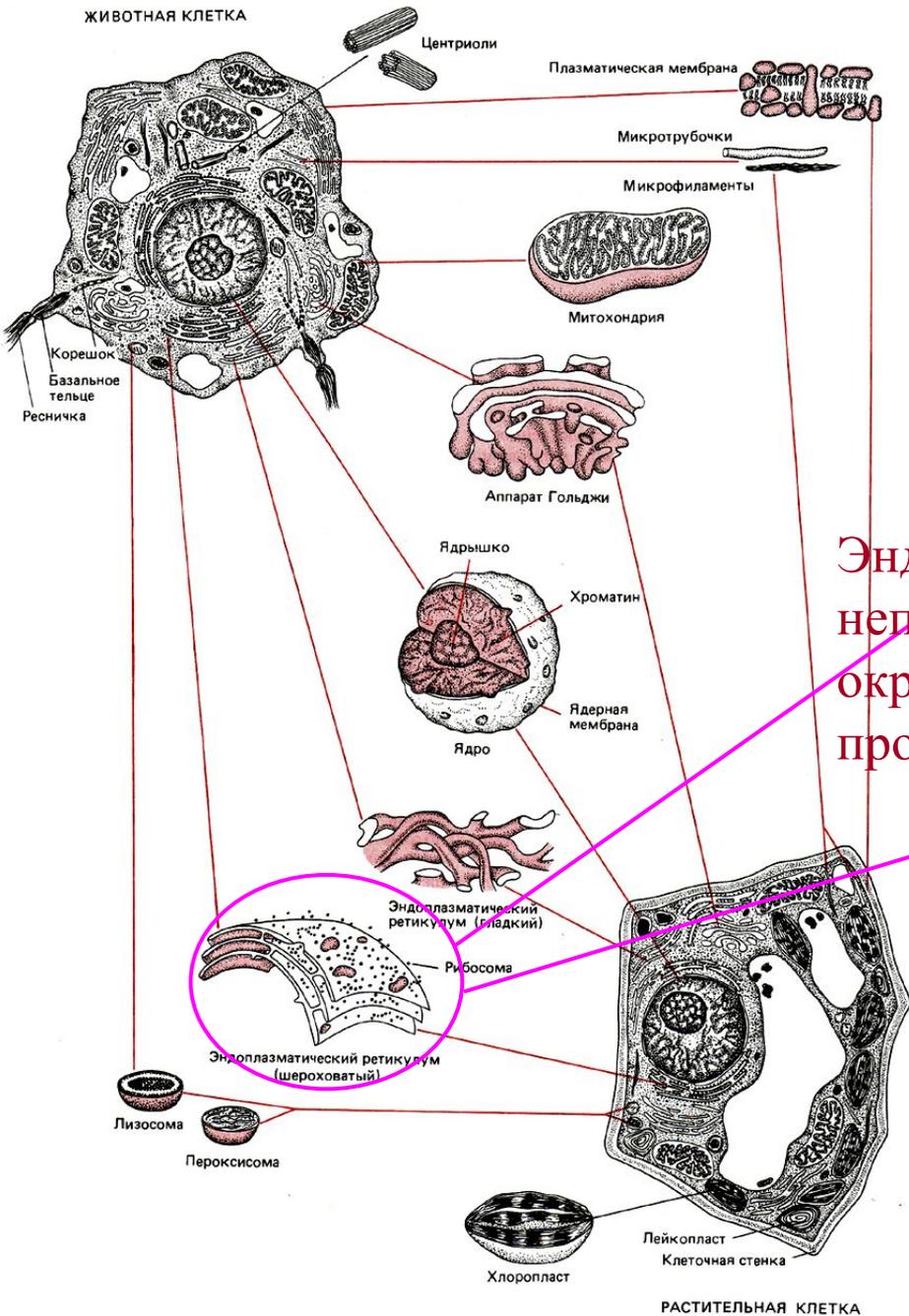
В тканях эмбриона до его имплантации обе хромосомы активны и не метилированы. После имплантации экспрессия генов одной из двух хромосом прекращается, в то время как другая хромосома остается транскрипционно активной. По-видимому, инактивация предшествует интенсивному метилированию, которое происходит несколько позже. Обработка клеток, содержащих активную и неактивную хромосомы, азацитидином (5-azaC) приводит к интенсивной элиминации остатков 5-meC из неактивной хромосомы и к активации экспрессии ее генов.

Примеры: гликозилирование; фосфорилирование, присоединение липидов, ограниченный протеолиз, процессинг N-концевого района ...

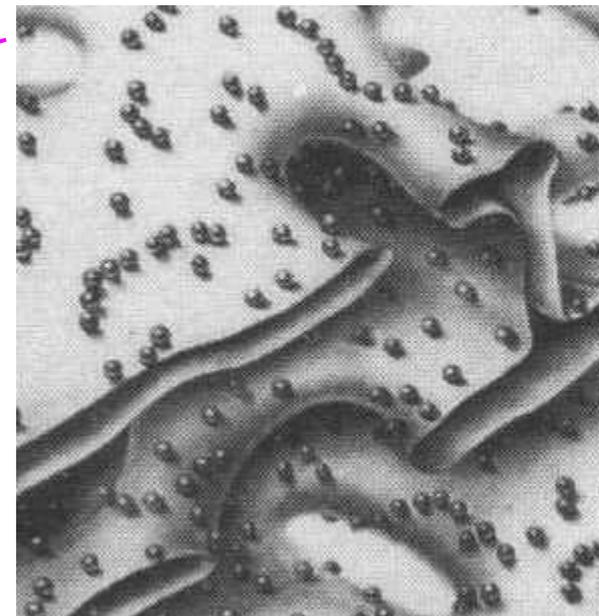


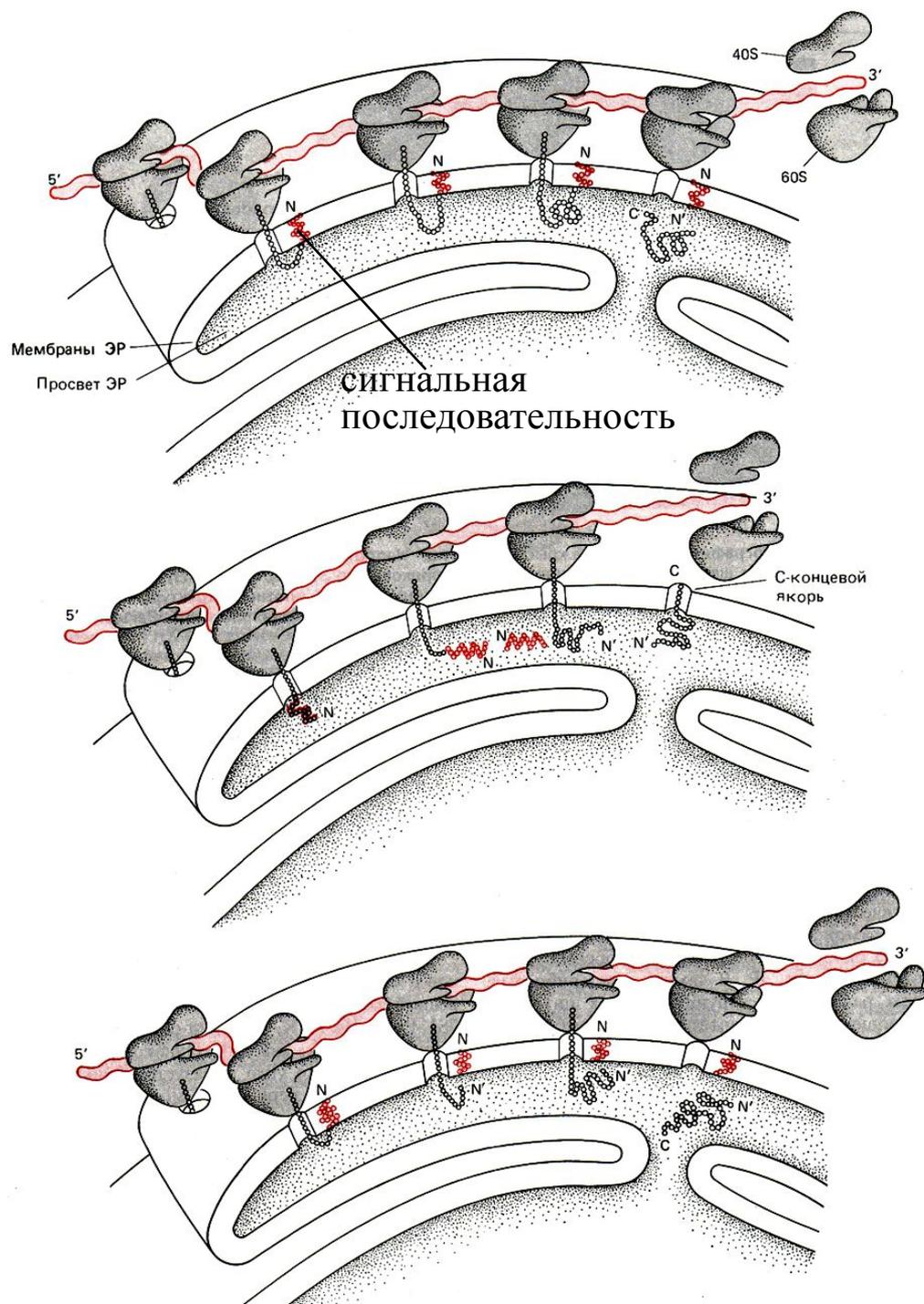
Доставка эукариотических белков к клеточным мембранам и проникновение через них

и проникновение через них



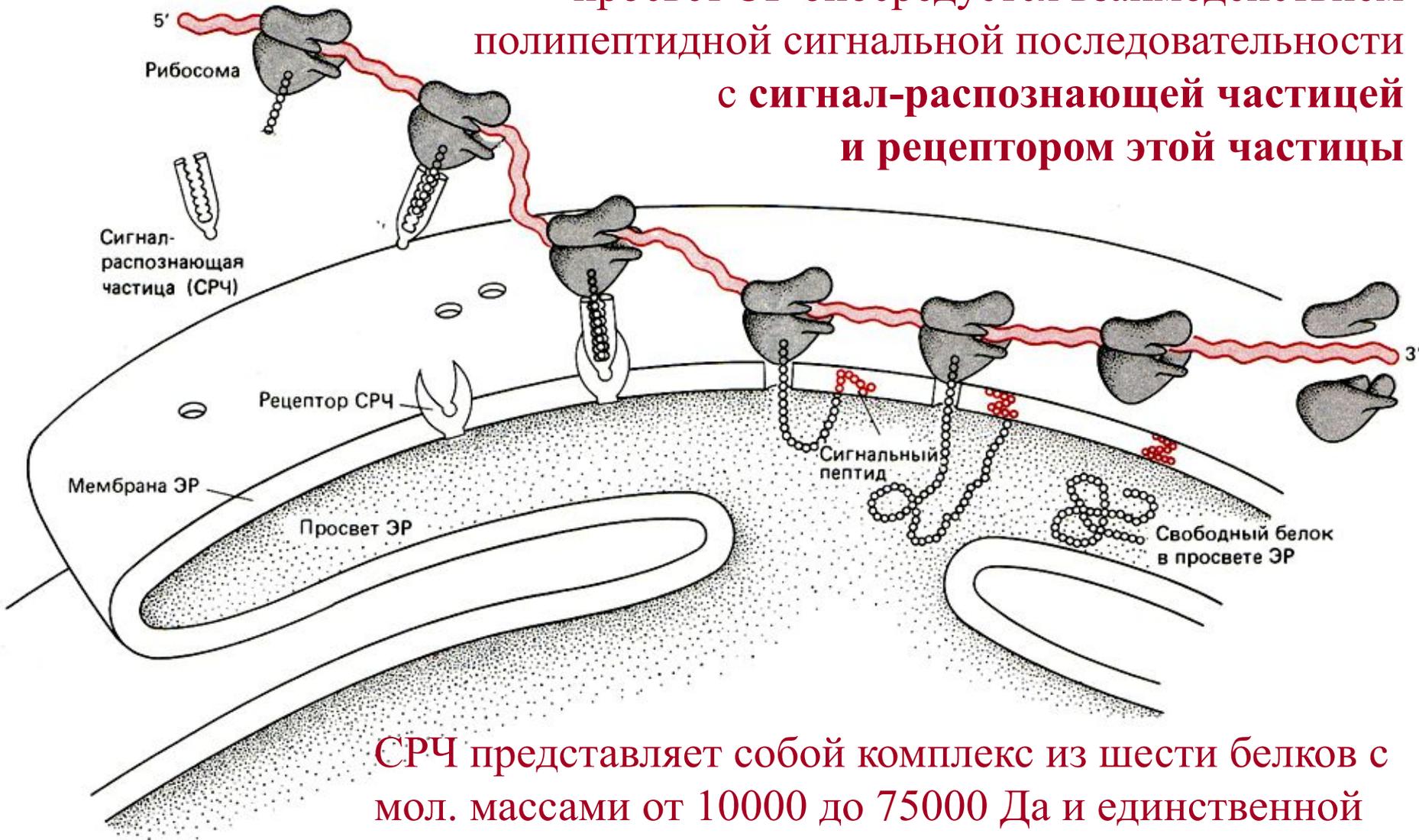
Эндоплазматический ретикулум (ЭР) - непрерывная сеть внутриклеточных мембран, окружающих пространство, называемое просветом ЭР





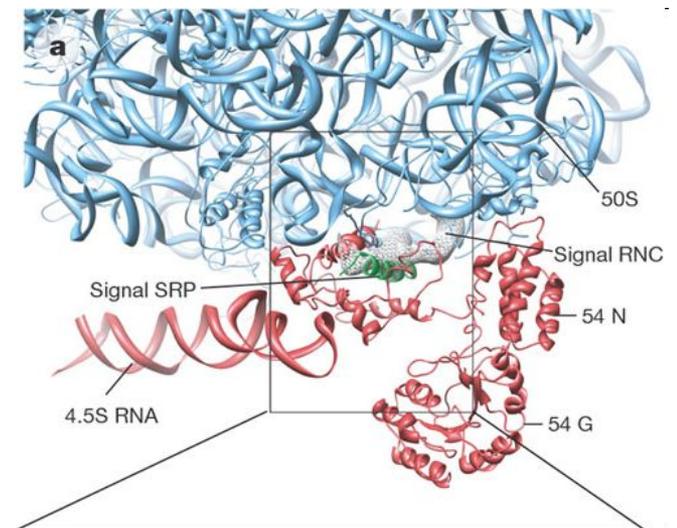
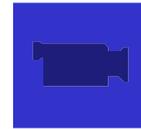
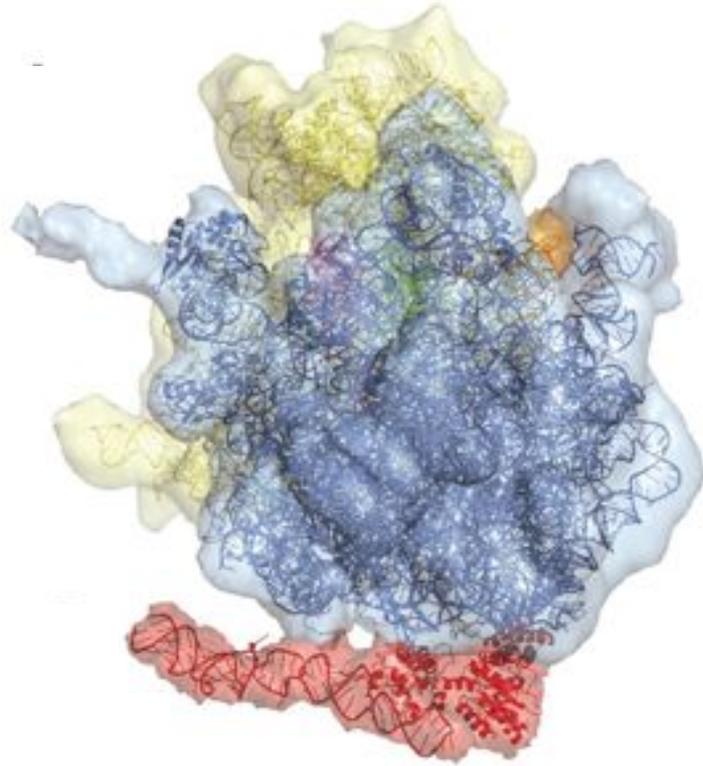
*Котрансляционный
транспорт
полипептидных
цепей*

Транспорт мембранных и секретируемых белков в просвет ЭР опосредуется взаимодействием полипептидной сигнальной последовательности с сигнал-распознающей частицей и рецептором этой частицы

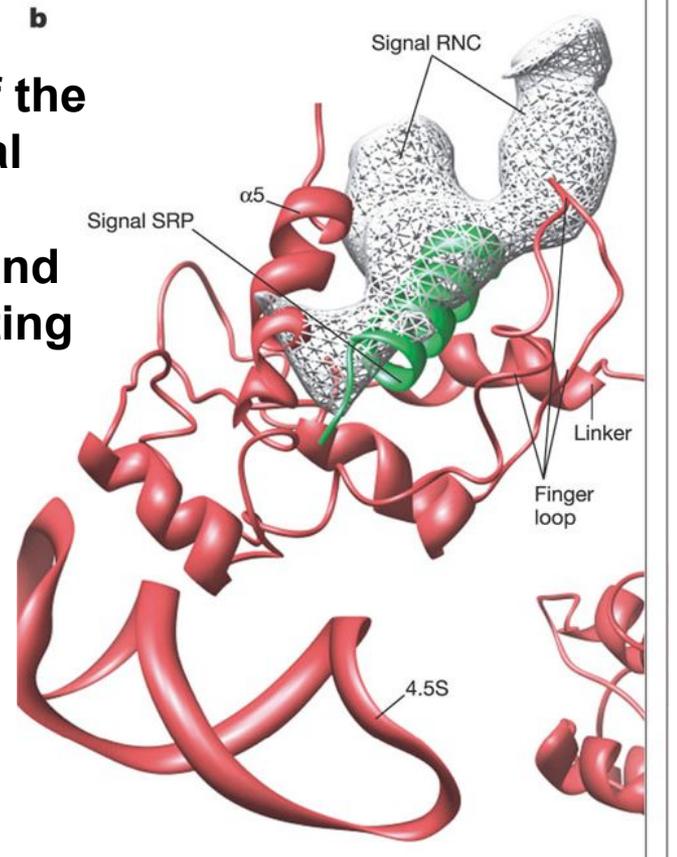


СРЧ представляет собой комплекс из шести белков с мол. массами от 10000 до 75000 Да и единственной молекулы РНК длиной 300 нуклеотидов - 7SL-РНК

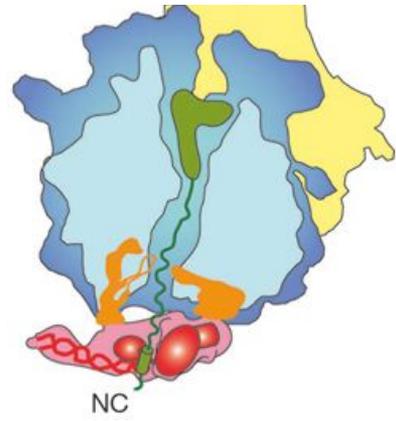
108.5 Cryo-EM structure of the eubacteria ribosome-SRP complex



Structure of the *E. coli* signal recognition particle bound to a translating ribosome



Scheme of the eubacterial complex

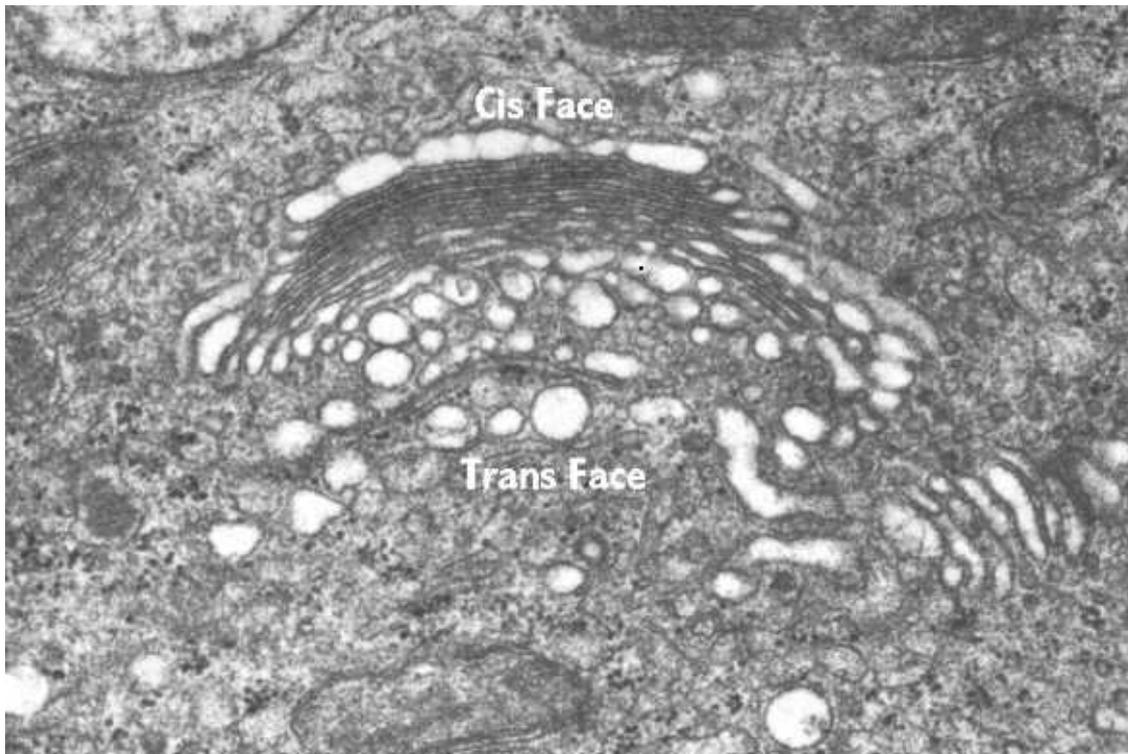


Характерные N-концевые сигнальные последовательности эукариотических и прокариотических белков

Белок	Заряженный участок							Гидрофобный участок																						
Липопротеин		Met	Lys	Ala	Thr	Lys		Leu	Val	Leu	Gly	Ala	Val	Ile	Leu	Gly	Ser	Thr	Leu	Leu	Ala	Gly	Cys	Ser	Ser					
β-Лактамаза pBR322	Met	Ser	Ile	Gln	His	Phe	Arg	Val	Ala	Leu	Ile	Pro	Phe	Phe	Ala	Ala	Phe	Cys	Leu	Pro	Val	Phe	Ala	His	Pro	Glu				
Основной белок оболочки фага fd	Met	Lys	Lys	Ser	Leu	Val	Leu	Lys	Ala	Ser	Val	Ala	Val	Ala	Thr	Leu	Val	Pro	Met	Leu	Ser	Phe	Ala	Ala	Glu	Gly				
Щелочная фосфатаза							Met	Lys	Gln	Ser	Thr	Ile	Ala	Leu	Ala	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Phe	Thr	Pro	Val	Thr	Lys	Ala	Arg	Thr	Pro
Мальтозосвязывающий белок	Met	Lys	Ile	Lys	Thr	Gly	Ala	Arg	Ile	Leu	Ala	Leu	Ser	Ala	Leu	Thr	Thr	Met	Met	Phe	Ser	Ala	Ser	Ala	Leu	Ala	Lys	Ile	Glu	
Лейцинсвязывающий белок		Met	Lys	Ala	Asn	Ala	Lys	Thr	Ile	Ile	Ala	Gly	Met	Ile	Ala	Leu	Ala	Ile	Ser	His	Thr	Ala	Met	Ala	Asp	Asp	Ile			
Проальбумин	Met	Lys	Trp	Val	Thr	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Phe	Ile	Ser	Gly	Ser	Ala	Phe	Ser	Arg											
Легкая цепь IgG	Met	Asp	Met	Arg	Ala	Pro	Ala	Gln	Ile	Phe	Gly	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Phe	Pro	Gly	Thr	Arg	Cys								
Лизоцим	Met	Arg	Ser	Leu	Leu	Ile	Leu	Val	Leu	Cys	Phe	Leu	Pro	Leu	Ala	Ala	Leu	Gly	Lys											
Пролактин	Met	Asn	Ser	Gln	Val	Ser	Ala	Arg	Lys	Ala	Gly	Thr	Leu	Leu	Leu	Leu	Met	Met	Ser	Asn	Leu	Leu								
Гликопротеин вируса везикулярного стоматита	Met	Lys	Cys	Leu	Leu	Tyr	Leu	Ala	Phe	Leu	Phe	Ile	His	Val	Asn	Cys	Lys													

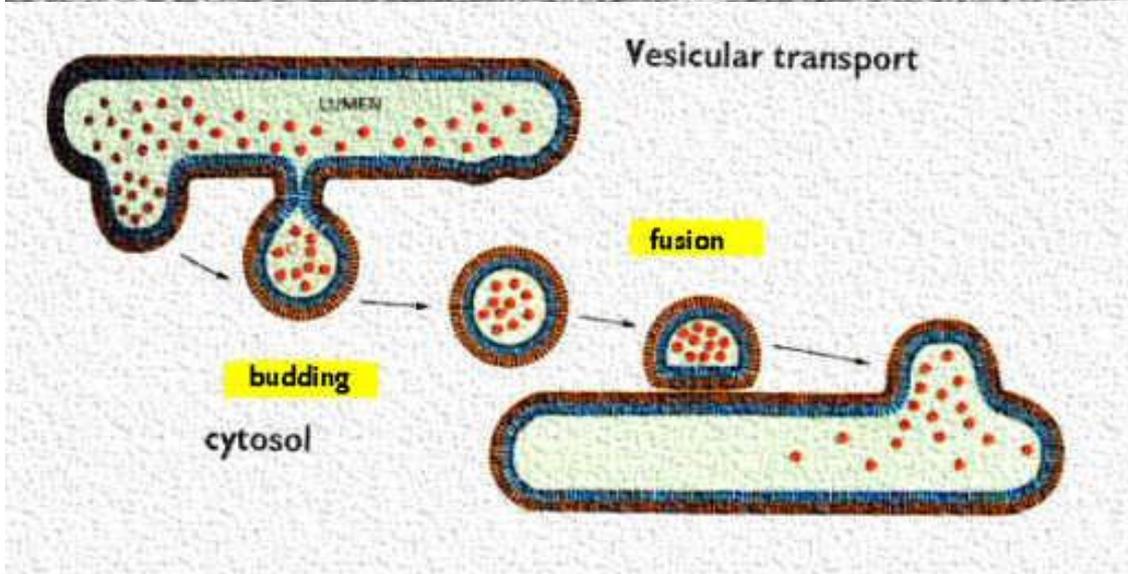
Длина сигнальной последовательности составляет от 15 до 35 аминокислотных остатков.

В начале сигнальных последовательностей обычно располагаются короткий участок, включающий одну или несколько заряженных аминокислотных остатков, а за ним следует гидрофобный сегмент



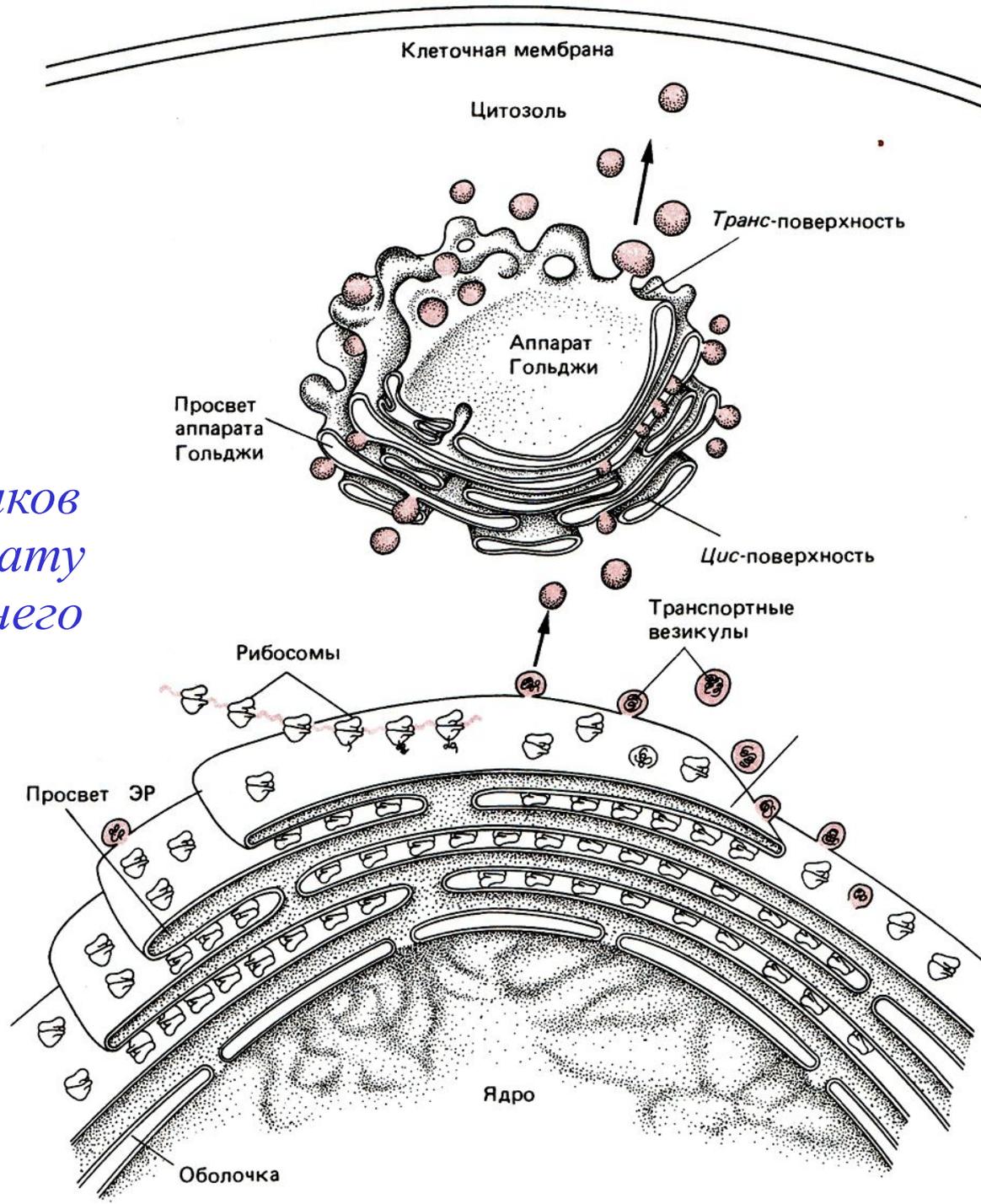
Белки направляются к лизосомам, плазматическим мембранам или секретируются с помощью аппарата Гольджи - набора тесно упакованных, взаимопроникающих, окруженных мембранами цистерн.

Перенос белков к аппарату Гольджи осуществляется с помощью так называемых окаймленных пузырьков (везикул), отпочковывающихся от ЭР и сливающихся с цистернами Гольджи.

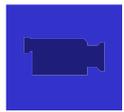


Белки, предназначенные для секреции, сначала попадают в секреторные везикулы, которые в конце концов сливаются с плазматическими мембранами и высвобождают свое содержимое наружу

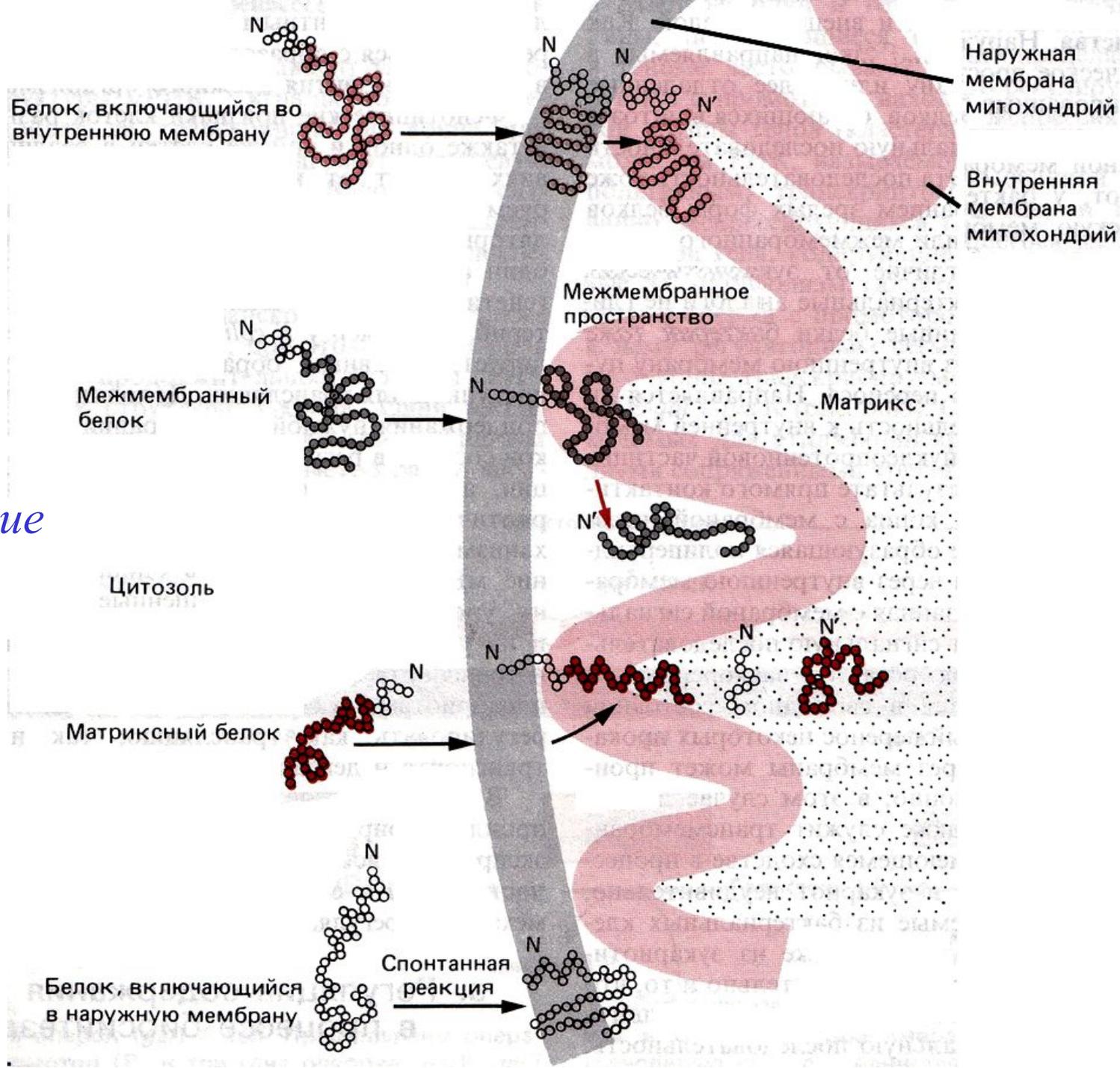
*Транспорт белков
от ЭР к аппарату
Гольджи и из него*



транспорт



модификация



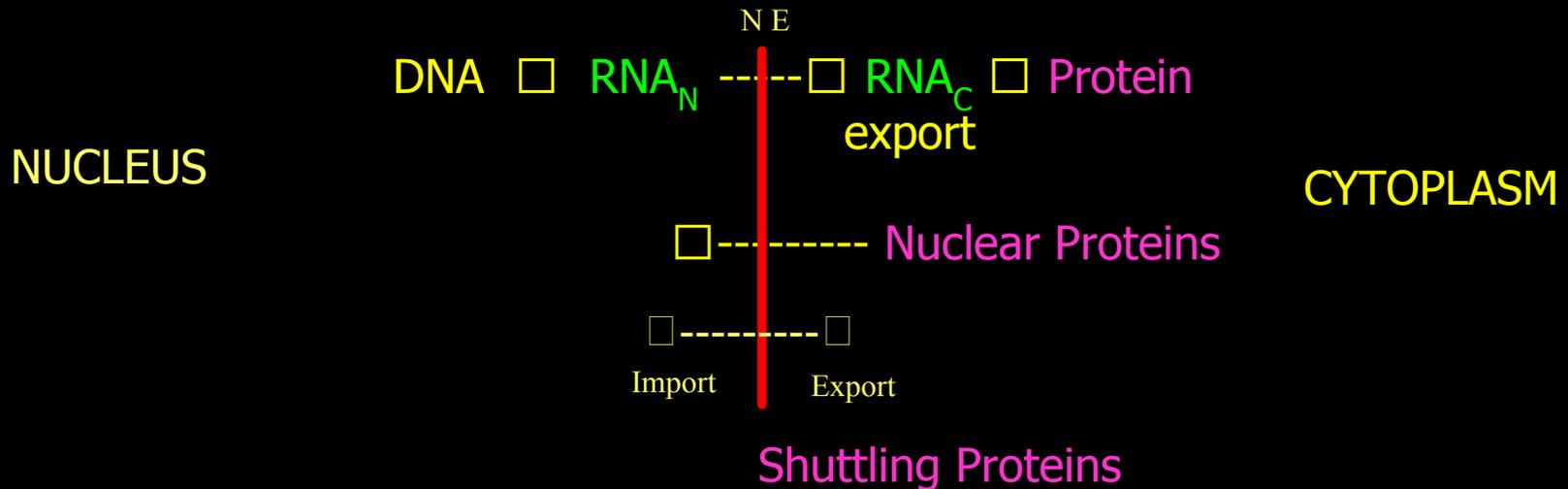
*Транспорт
белков в
эукариотические
клеточные
органеллы*

Mechanisms of Nuclear Import and Export

Gene Expression in Prokaryotes:

DNA □ RNA □ Protein

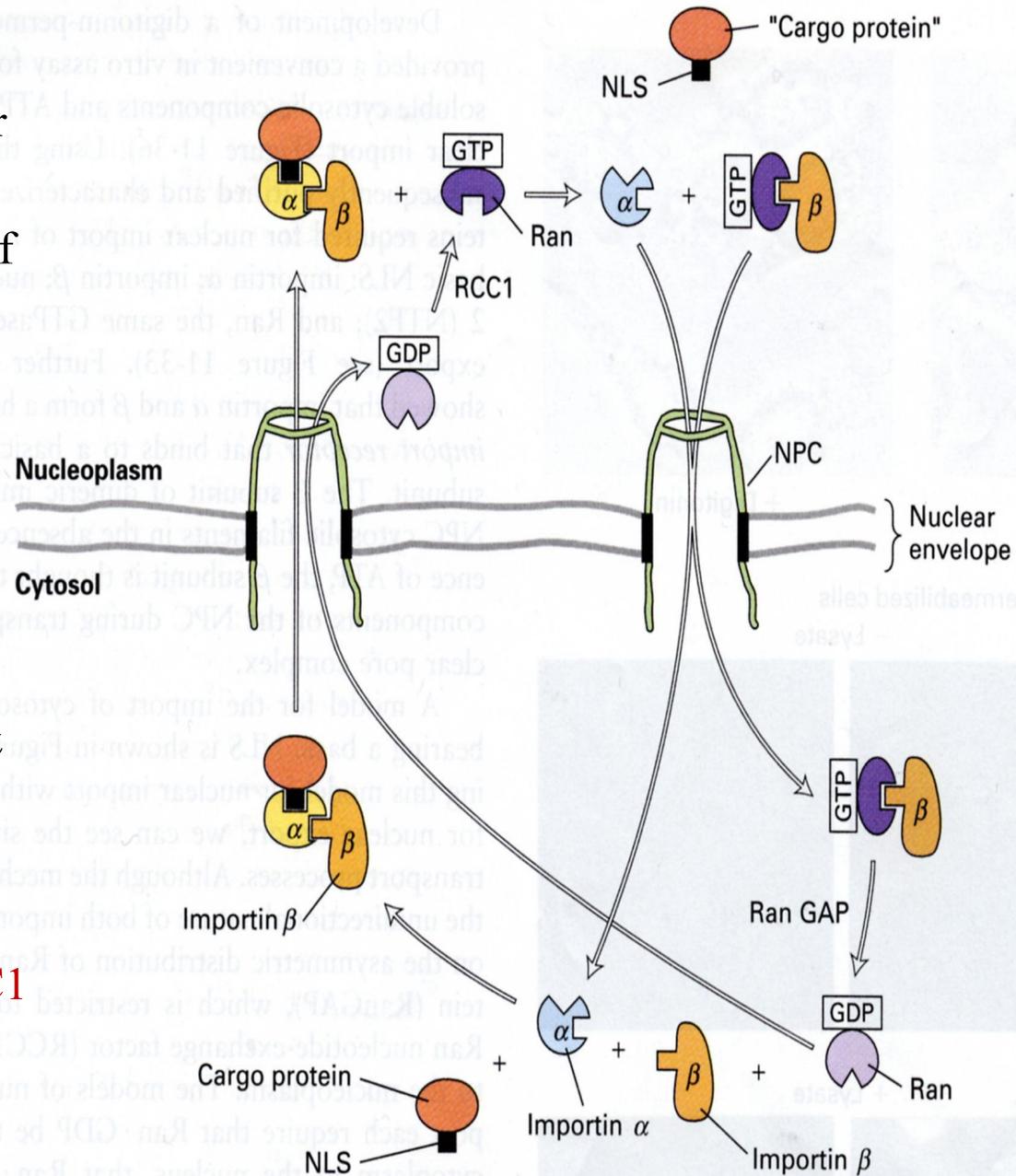
Gene Expression in Eukaryotes:



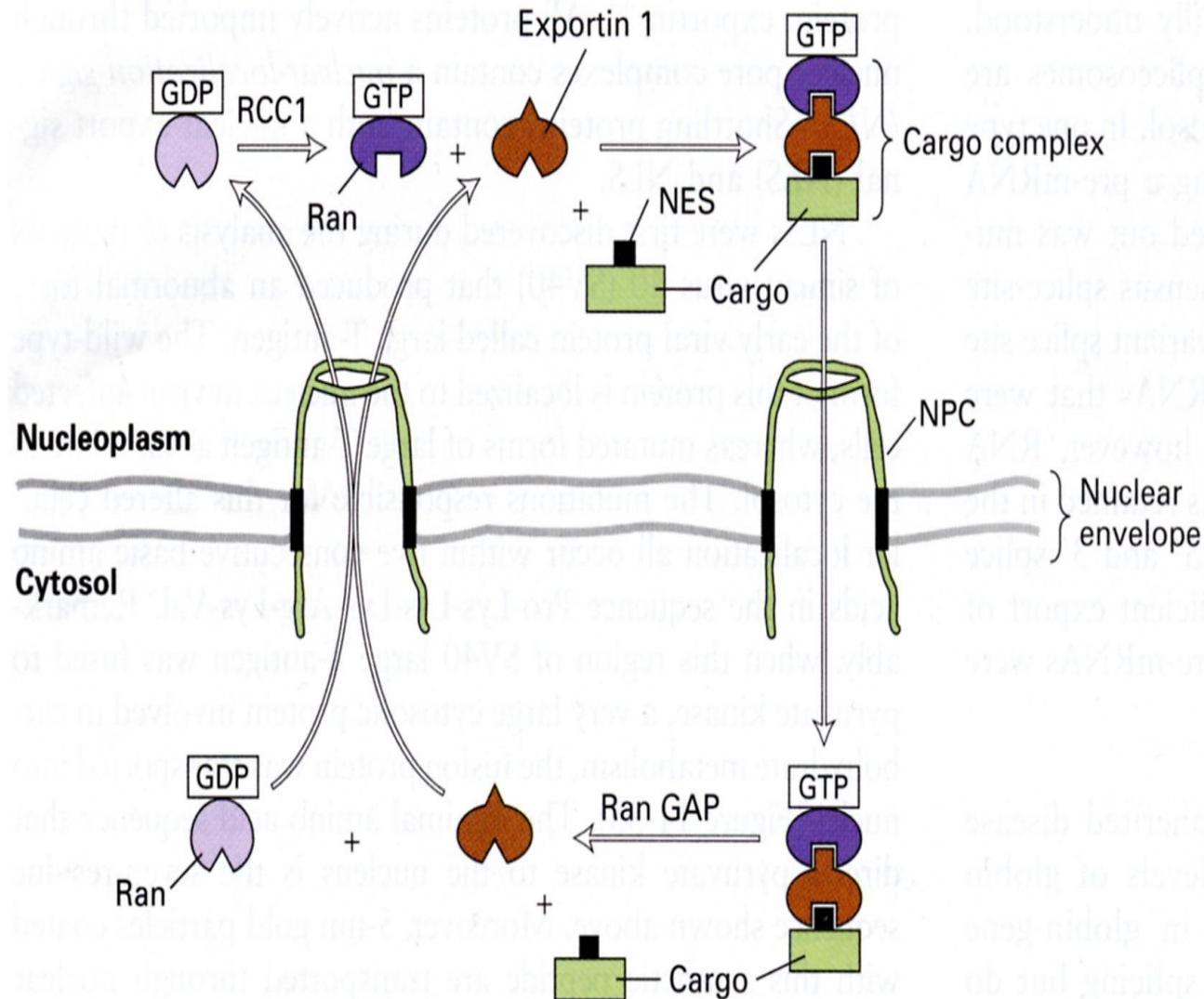
NUCLEAR IMPORT/EXPORT ARE ESSENTIAL PROCESSES FOR GENE REGULATION IN EUKARYOTES AND ARE HIGHLY REGULATED PROCESSES

Транспорт белков в ядро (*nuclear import*)

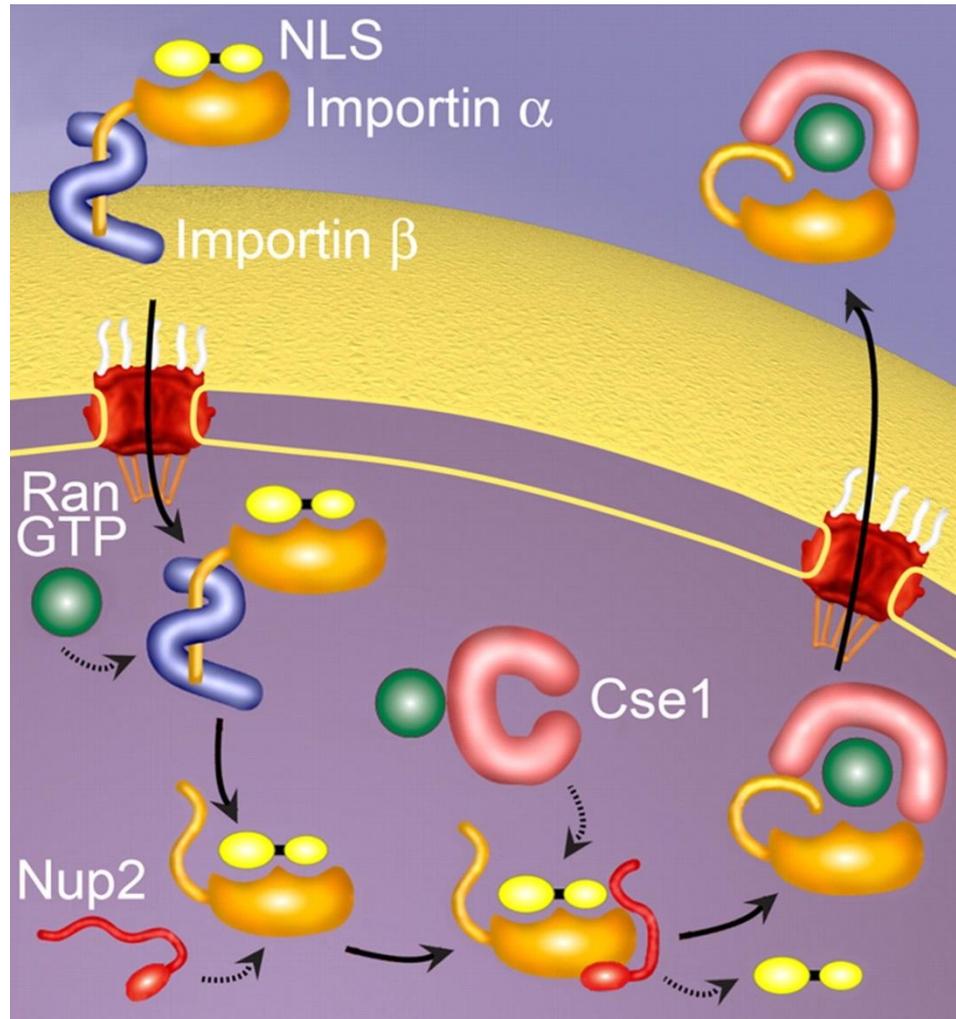
- Proteins to be imported into the nucleus have **Nuclear Localization Signals** (NLS's) that enable nuclear import.
- NLS's bind to **importin α** subunit of an importin α - β complex.
- Transport through the NPC is mediated by interaction of degenerative sequences in the NPC proteins with the **importin β** subunit.
- Key to function and regulation are **Ran-GTP** [high in **nucleus** by RCC1 (Ran nucleotide exchange factor)] & **Ran-GDP** [high in **cytoplasm** by RAN GAP (RAN GTP activating protein)]. Ran - GTFase.
- The asymmetric distribution of **RCC1** in the nucleus and **Ran GAP** in the cytoplasm drives the nuclear import process.



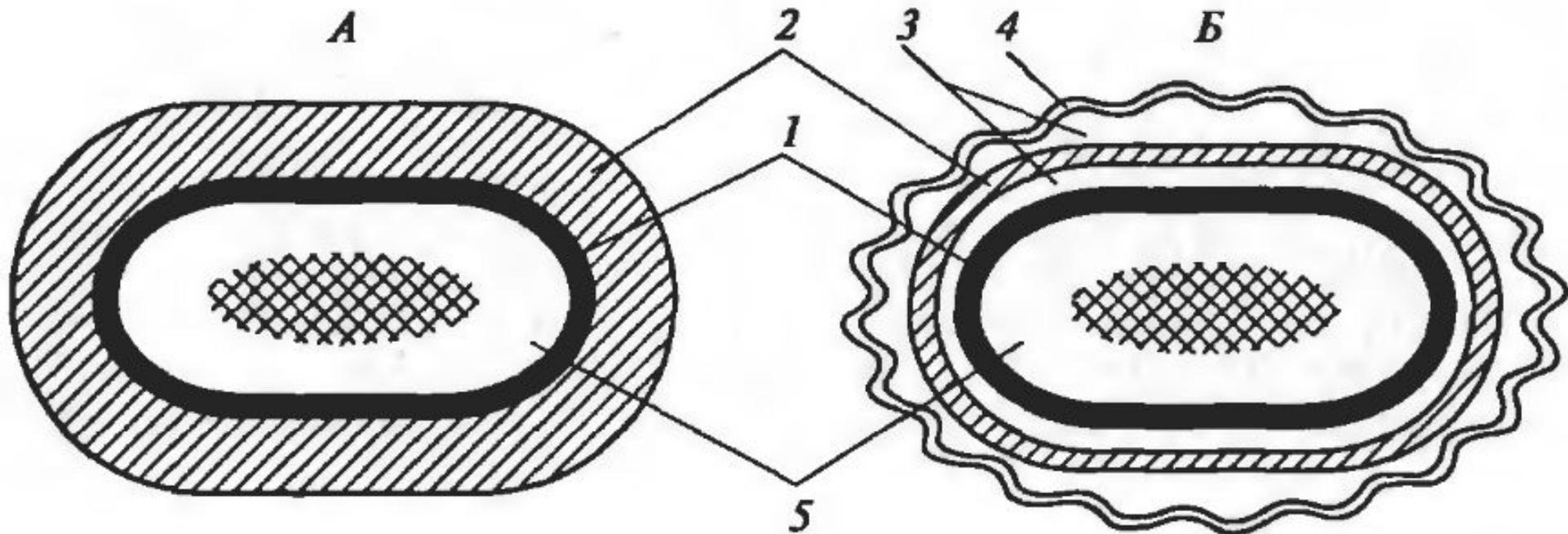
- The exporting proteins have special sequences called **Nuclear Export Signals** (NES's) that mediate export through binding to a class of proteins that function in export called exportins.
- **Exportins** are typically monomeric and function in a reverse manner to importin under the control of RAN.
- Thus the cargo complex requires **Ran-GTP** which is found only in the nucleus.
- Disassociation of the 'cargo' from the exportin requires **Ran-GDP** which occurs only in the cytoplasm.
- Because of its small size **Ran** is capable of fast diffusion through the NPC.



The classical nuclear import cycle.



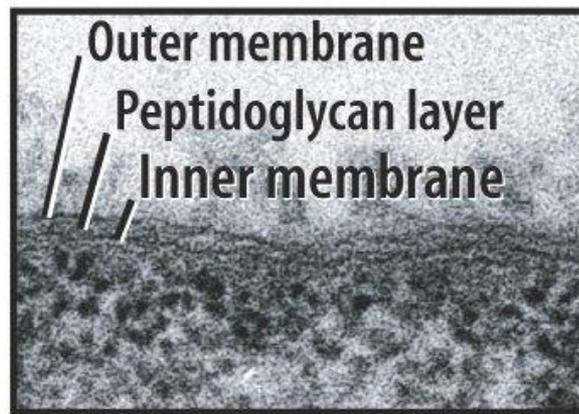
Allison Lange et al. J. Biol. Chem. 2007;282:5101-5105

Строение клеточных стенок

Клеточная стенка *грамположительных* (А) и *грамотрицательных* (Б) эубактерий:

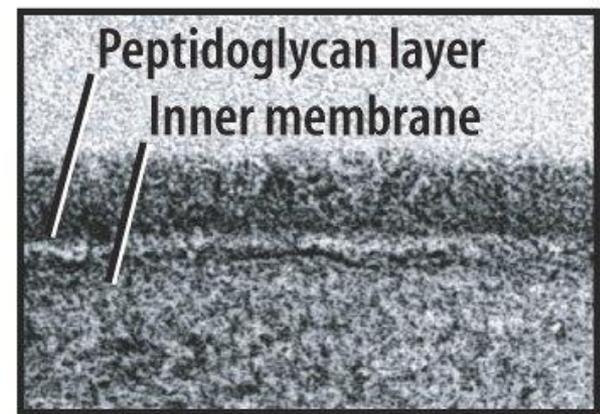
- 1 — цитоплазматическая мембрана;
- 2 — пептидогликан;
- 3 — периплазматическое пространство;
- 4 — наружная мембрана;
- 5 — цитоплазма

*Строение
клеточных
стенок*



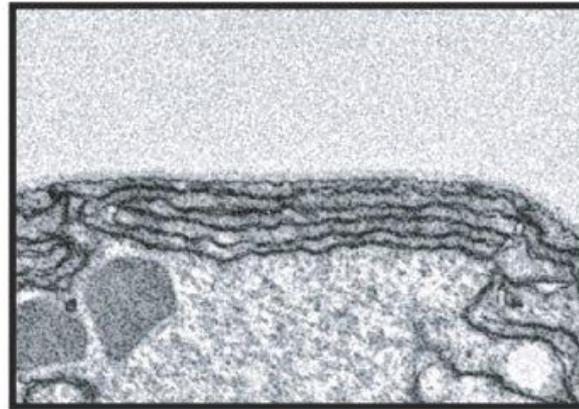
Gram-negative bacteria

Outer membrane;
peptidoglycan layer



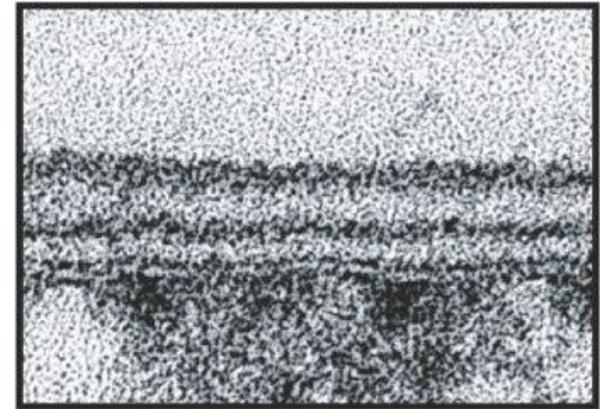
Gram-positive bacteria

No outer membrane;
thicker peptidoglycan layer



Cyanobacteria

Gram-negative; tougher peptidoglycan layer; extensive internal membrane system with photosynthetic pigments



Archaeobacteria

No outer membrane;
peptidoglycan layer outside
plasma membrane

113.3 *Строение клеточной стенки грам-положительных бактерий*

Характерные N-концевые сигнальные последовательности эукариотических и прокариотических белков

Белок	Заряженный участок							Гидрофобный участок																						
Липопротейн		Met	Lys	Ala	Thr	Lys		Leu	Val	Leu	Gly	Ala	Val	Ile	Leu	Gly	Ser	Thr	Leu	Leu	Ala	Gly	Cys	Ser	Ser					
β-Лактамаза pBR322	Met	Ser	Ile	Gln	His	Phe	Arg	Val	Ala	Leu	Ile	Pro	Phe	Phe	Ala	Ala	Phe	Cys	Leu	Pro	Val	Phe	Ala	His	Pro	Glu				
Основной белок оболочки фага fd	Met	Lys	Lys	Ser	Leu	Val	Leu	Lys	Ala	Ser	Val	Ala	Val	Ala	Thr	Leu	Val	Pro	Met	Leu	Ser	Phe	Ala	Ala	Glu	Gly				
Щелочная фосфатаза							Met	Lys	Gln	Ser	Thr	Ile	Ala	Leu	Ala	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Phe	Thr	Pro	Val	Thr	Lys	Ala	Arg	Thr	Pro
Мальтозосвязывающий белок	Met	Lys	Ile	Lys	Thr	Gly	Ala	Arg	Ile	Leu	Ala	Leu	Ser	Ala	Leu	Thr	Thr	Met	Met	Phe	Ser	Ala	Ser	Ala	Leu	Ala	Lys	Ile	Glu	
Лейцинсвязывающий белок		Met	Lys	Ala	Asn	Ala	Lys	Thr	Ile	Ile	Ala	Gly	Met	Ile	Ala	Leu	Ala	Ile	Ser	His	Thr	Ala	Met	Ala	Asp	Asp	Ile			
Проальбумин	Met	Lys	Trp	Val	Thr	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Phe	Ile	Ser	Gly	Ser	Ala	Phe	Ser	Arg											
Легкая цепь IgG	Met	Asp	Met	Arg	Ala	Pro	Ala	Gln	Ile	Phe	Gly	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Phe	Pro	Gly	Thr	Arg	Cys								
Лизоцим	Met	Arg	Ser	Leu	Leu	Ile	Leu	Val	Leu	Cys	Phe	Leu	Pro	Leu	Ala	Ala	Leu	Gly	Lys											
Пролактин	Met	Asn	Ser	Gln	Val	Ser	Ala	Arg	Lys	Ala	Gly	Thr	Leu	Leu	Leu	Leu	Met	Met	Ser	Asn	Leu	Leu								
Гликопротеин вируса везикулярного стоматита	Met	Lys	Cys	Leu	Leu	Tyr	Leu	Ala	Phe	Leu	Phe	Ile	His	Val	Asn	Cys	Lys													

Длина сигнальной последовательности составляет от 15 до 35 аминокислотных остатков.

В начале сигнальных последовательностей обычно располагаются короткий участок, включающий одну или несколько заряженных аминокислотных остатков, а за ним следует гидрофобный сегмент

СТРУКТУРА ГЕНОМОВ

Геном - суммарная ДНК одного набора хромосом и внехромосомных генетических элементов организма.

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПРОКАРИОТИЧЕСКИХ И ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ ГЕНОВ

Прокариотические гены

А. Ген, кодирующий один белок



Сегменты ДНК, которые транскрибируются с образованием одной молекулы РНК называются **единицами транскрипции**

Б. Гены, кодирующие белки, организованы в оперон



В. Единицы транскрипции, кодирующие рРНК и тРНК



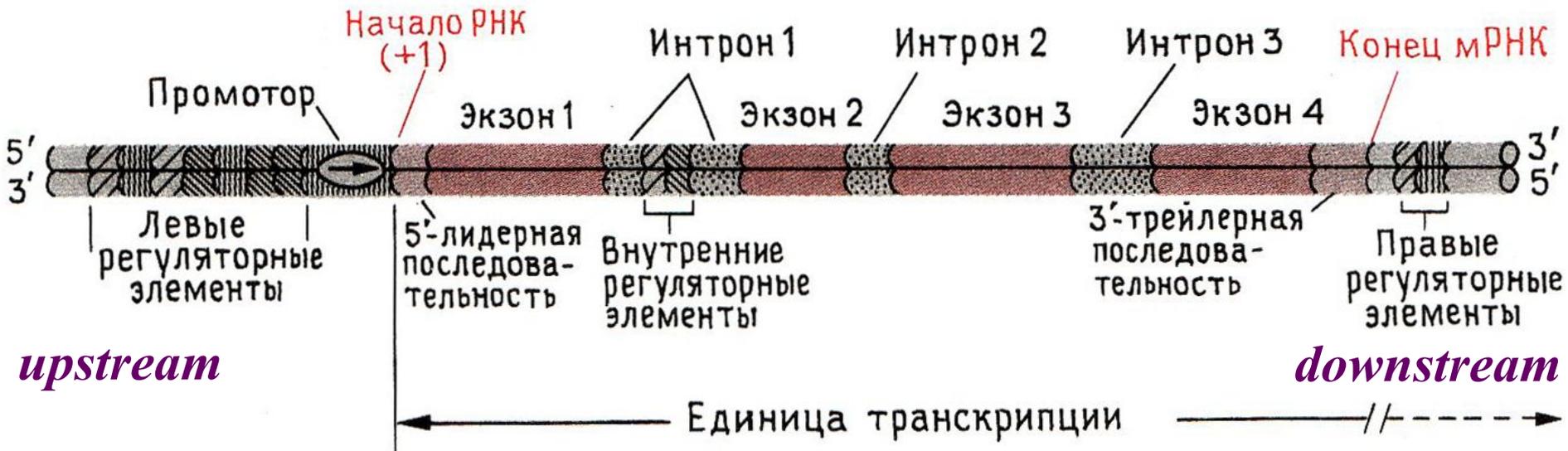
ЭУКАРИОТИЧЕСКИЕ ГЕНЫ

Гены класса I кодируют 5,8S-, 18S- и 28S-рРНК, транскрибируются РНК-полимеразой I (Pol I).

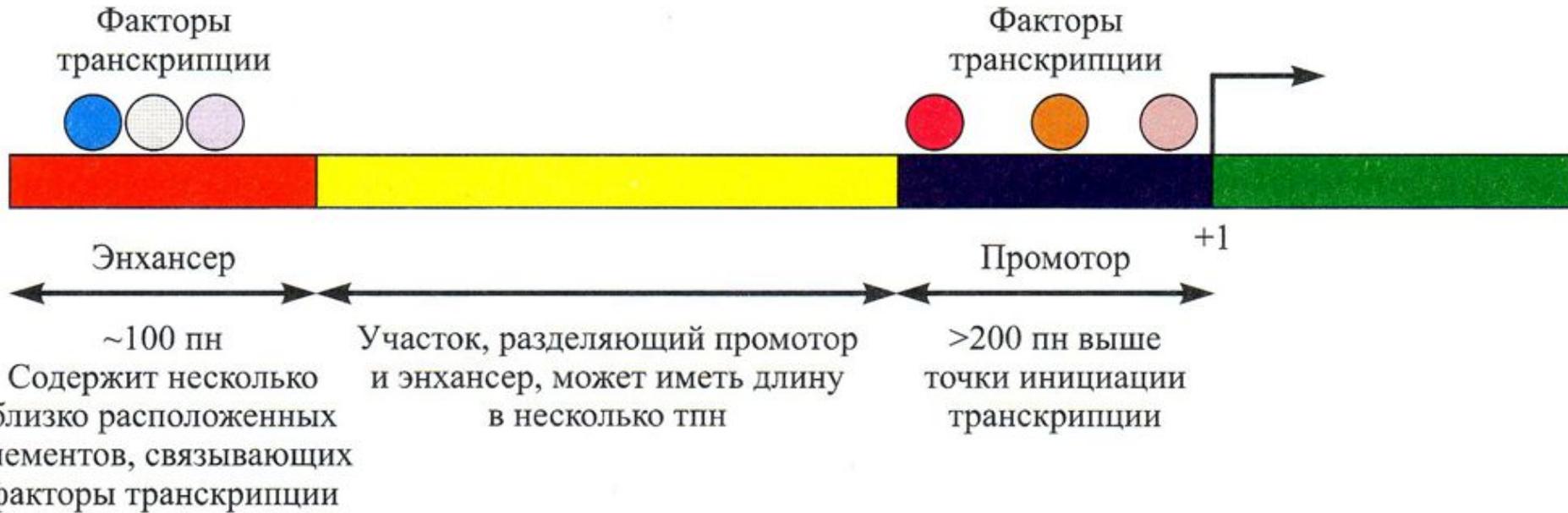
Гены класса II кодируют все мРНК и ряд мяРНК транскрибируются РНК-полимеразой II (Pol II).

Гены класса III кодируют тРНК, 5S-рРНК и некоторые мцРНК транскрибируются РНК-полимеразой III (Pol III).

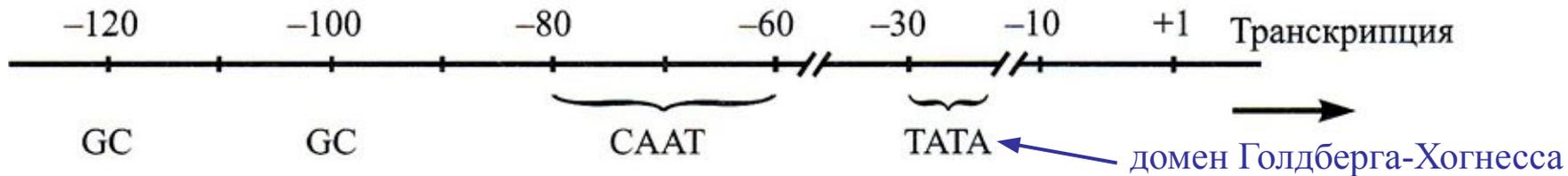
Структурные особенности типичного эукариотического гена, кодирующего белок



Единица транскрипции сегмент от точки инициации транскрипции до области ее окончания

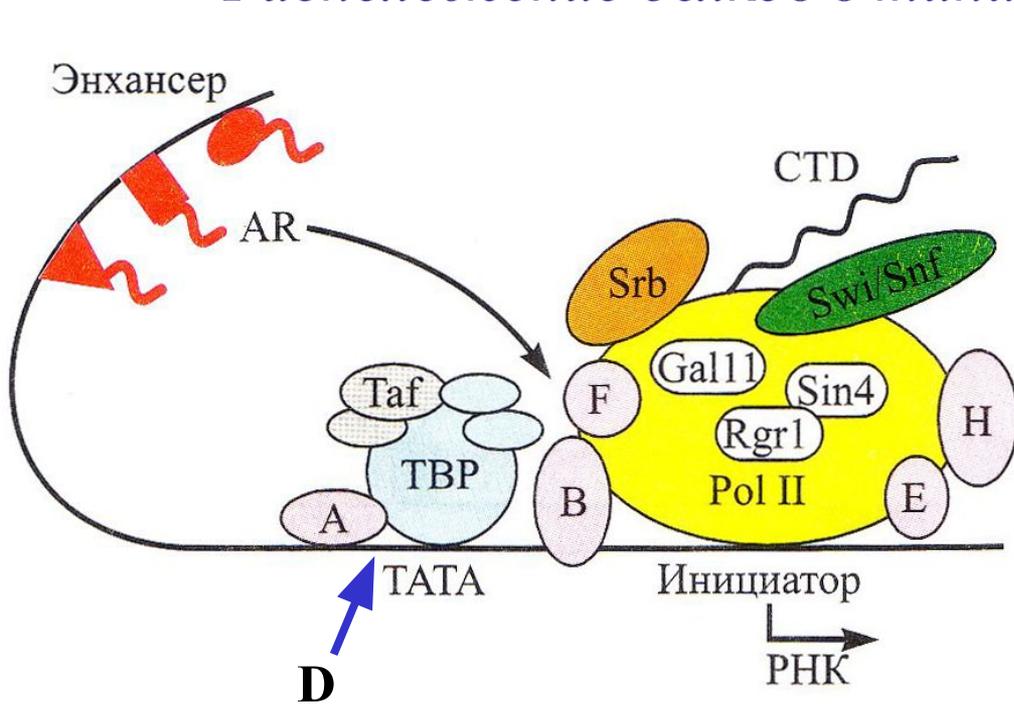


Фактор транскрипции - любой белок необходимый для инициации транскрипции, но не являющийся собственно РНК-полимеразой

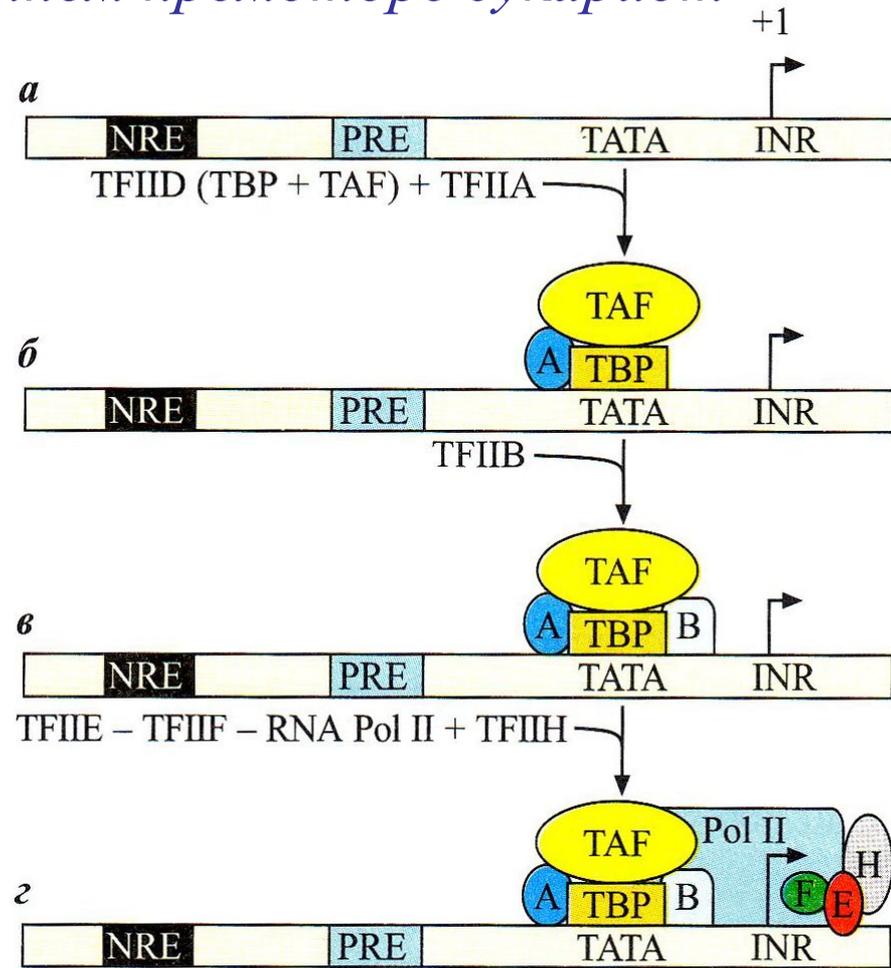


Структура промотора у эукариот [Russell, 1998. P. 390].

+1 — точка начала транскрипции. Последовательность ТАТА, вероятно, контролирует выбор стартовой точки транскрипции; последовательность СААТ, по-видимому, контролирует первоначальное связывание РНК-полимеразы с промотором. С помощью GC-домена, очевидно, происходит связывание РНК-полимеразы с окрестностями стартовой точки транскрипции



Общие факторы транскрипции Pol II к настоящему времени выделены и очищены. Их шесть: TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF и TFIIH (или, по другим данным, семь: +TFIIJ).



Сборка общего транскрипционного комплекса
a — типичный промотор гена эукариот, содержащий элемент инициации транскрипции (INR) и TATA-домен, а также некоторое число позитивных (PRE) и негативных регуляторных элементов (NRE);
b–c — порядок сборки общих факторов транскрипции и РНК-полимеразы II на промоторе
 Одна из субъединиц TFIIH обладает протеинкиназной активностью

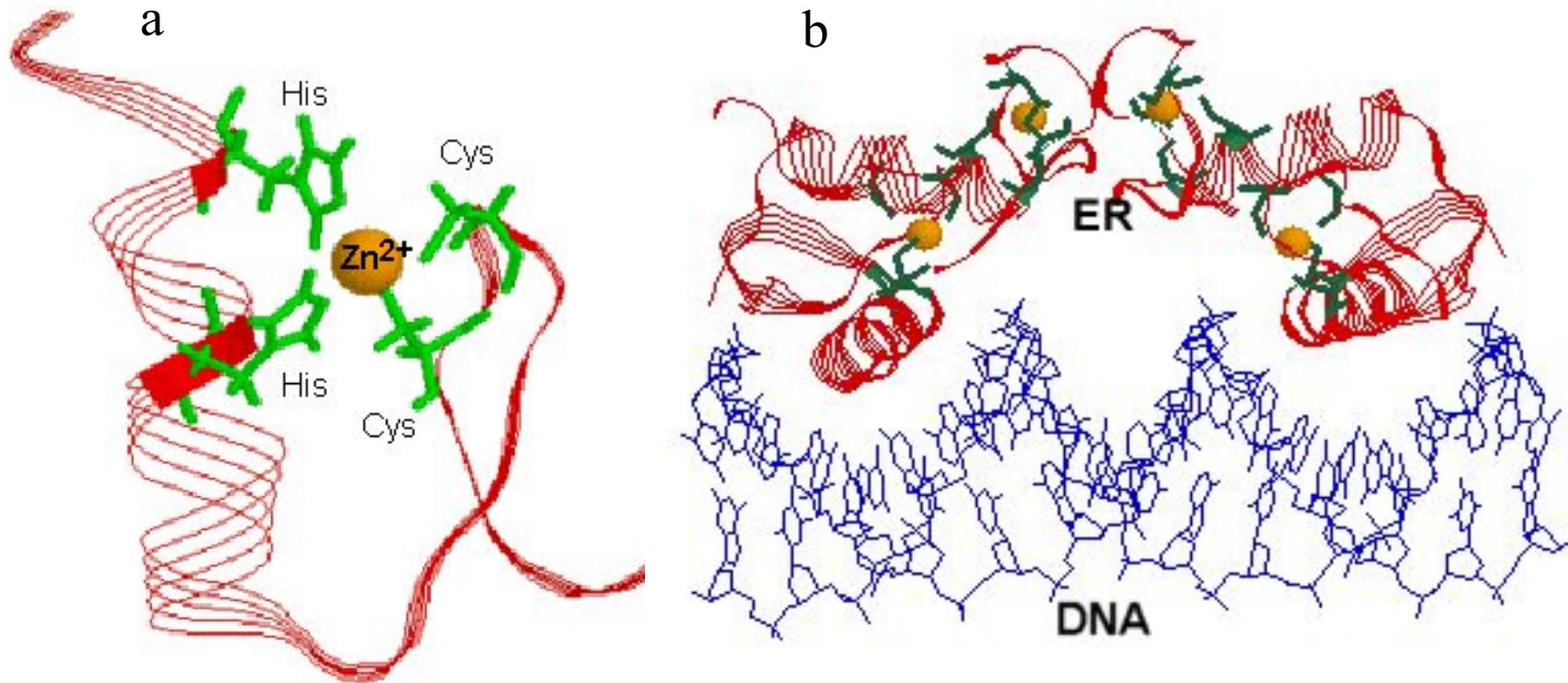


Структура белка-активатора GAL4 у дрожжей

Специфические факторы транскрипции должны обладать двумя важнейшими свойствами:

- 1) опознавать специфические последовательности-мишени, расположенные в энхансерах, промоторах и других регуляторных элементах данного гена;
- 2) связываться с другими компонентами транскрипционного аппарата после присоединения к ДНК.

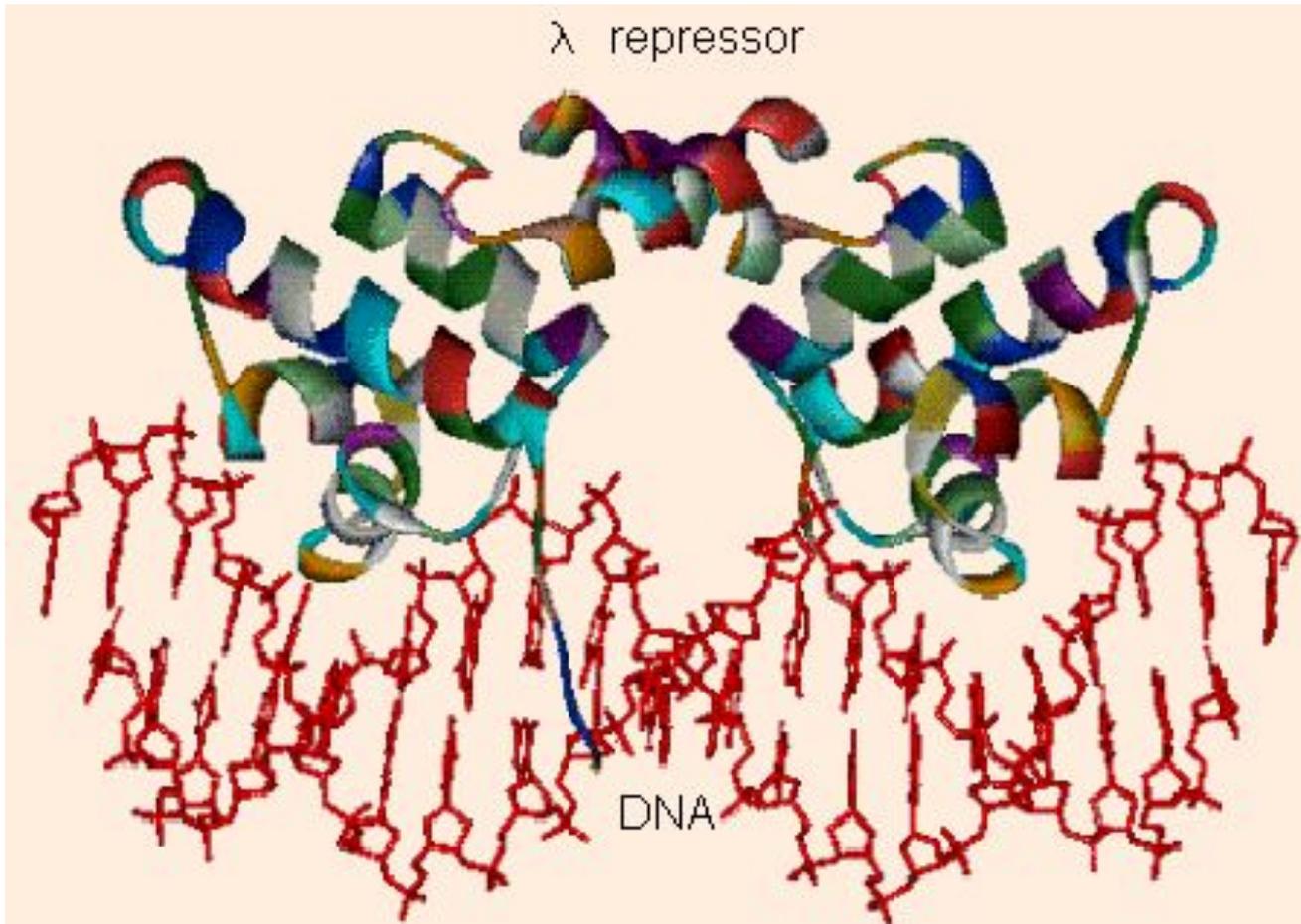
Очень часто молекула фактора транскрипции имеет разобщенные домены связывания с ДНК и активаторами транскрипции. Иногда возникает третий домен, связующий два предыдущих (соединяющий домен).

«Цинковые пальцы» - zinc finger domain

(a) Организация домена эстрогенового рецептора (ER).

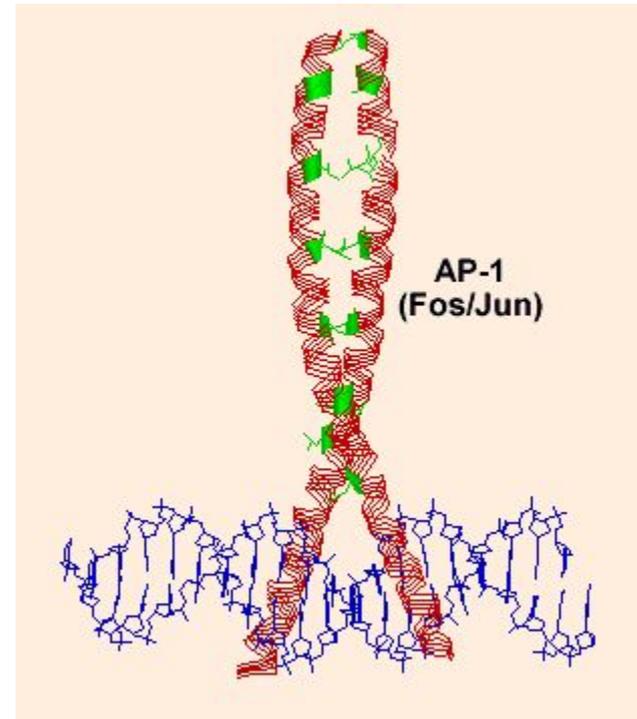
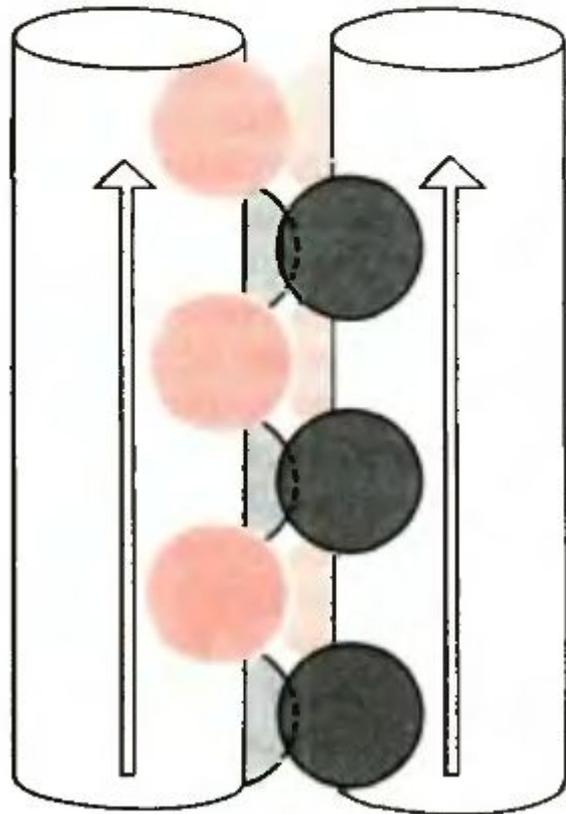
(b) Комплекс доменов цинковых пальцев ER и ДНК. Две молекулы ER формируют димер. (Большинство рецепторов стероидных гормонов содержат такой мотив.) PDB ID: 1HCQ

Специфические мотивы связывания с ДНК
Спираль-поворот-спираль - helix-turn-helix



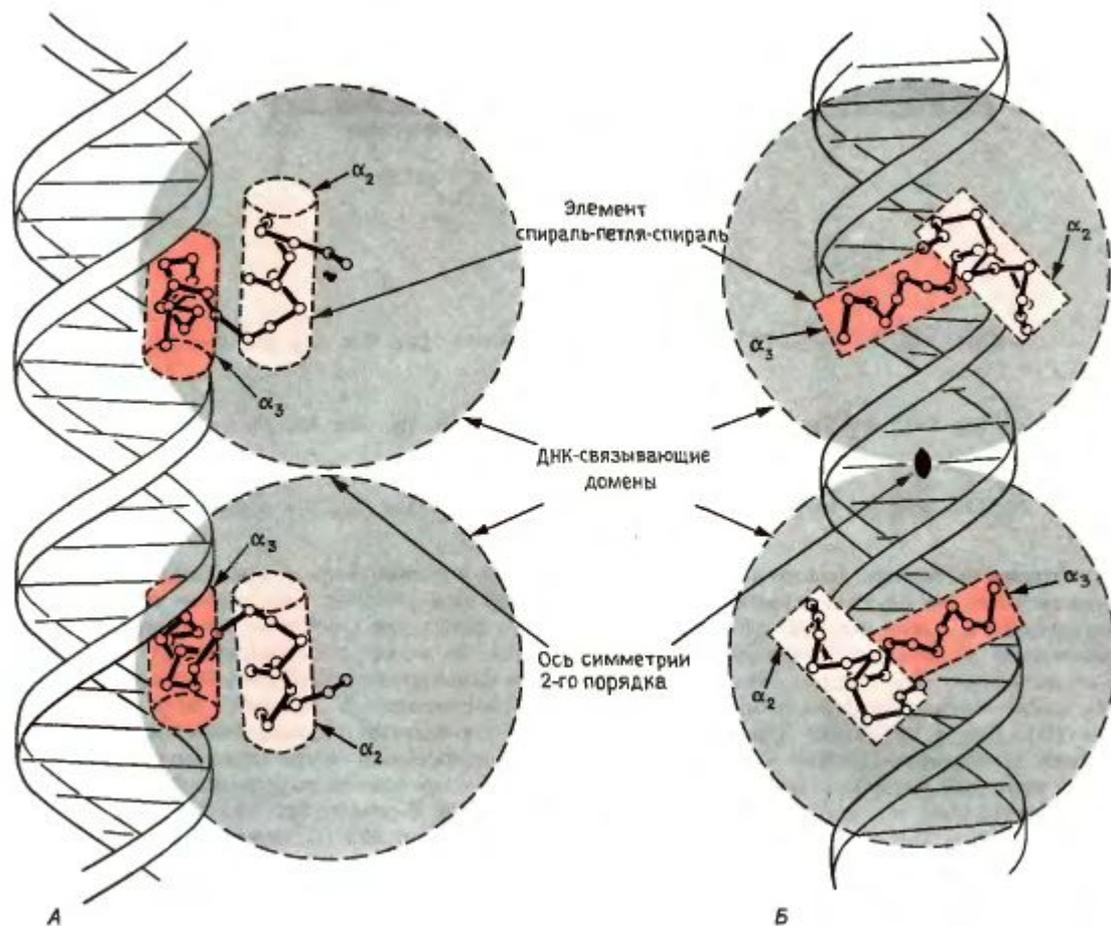
Взаимодействие димера репрессора λ с ДНК. Каждый λ репрессор включает мотив «helix-turn-helix». Одна из спиралей расположено в большой бороздке ДНК-спирали. PDB ID: 1LMB

Лейциновая молния - leucine zipper

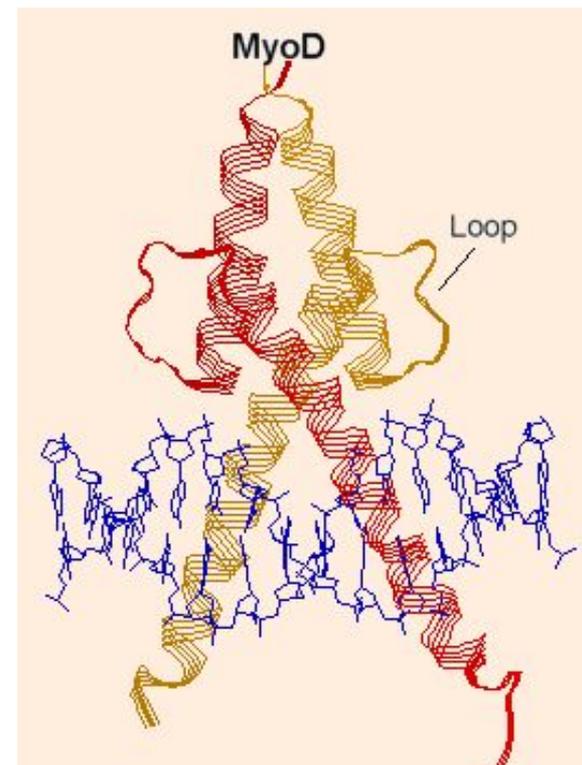


Структура AP-1/DNA комплекса. AP-1 – димер, сформированный транскрипционным фактором Jun и гомологичным ему белком Fos. Этот комплекс содержит мотив «лейциновая молния», который сформирован двумя альфа-спиралями. PDB ID: 1FOS

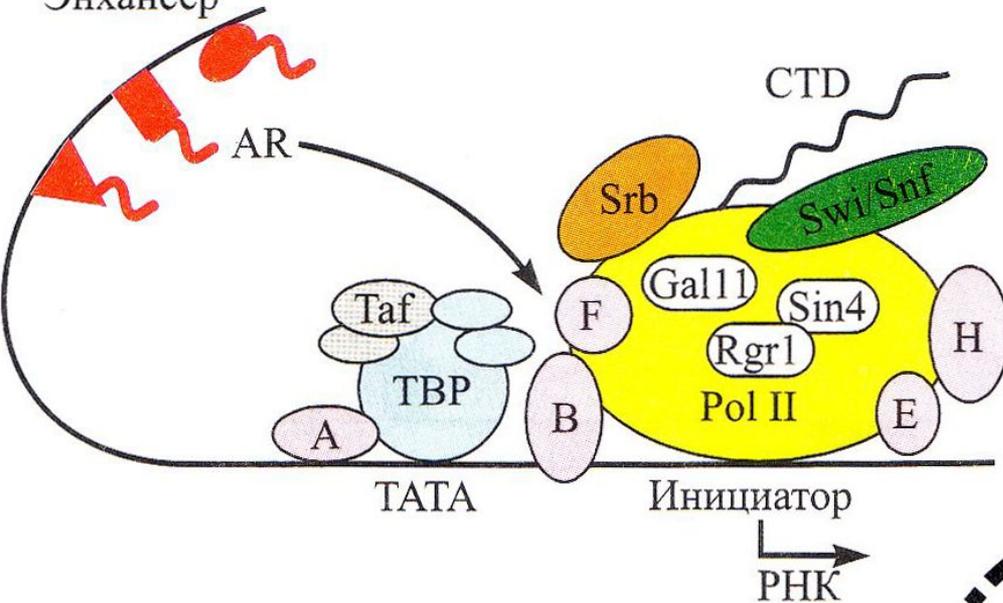
Спираль-петля-спираль - helix-loop-helix



Фактор транскрипции MyoD.
Структура мотива «helix-loop-helix».
PDB ID: 1MDY

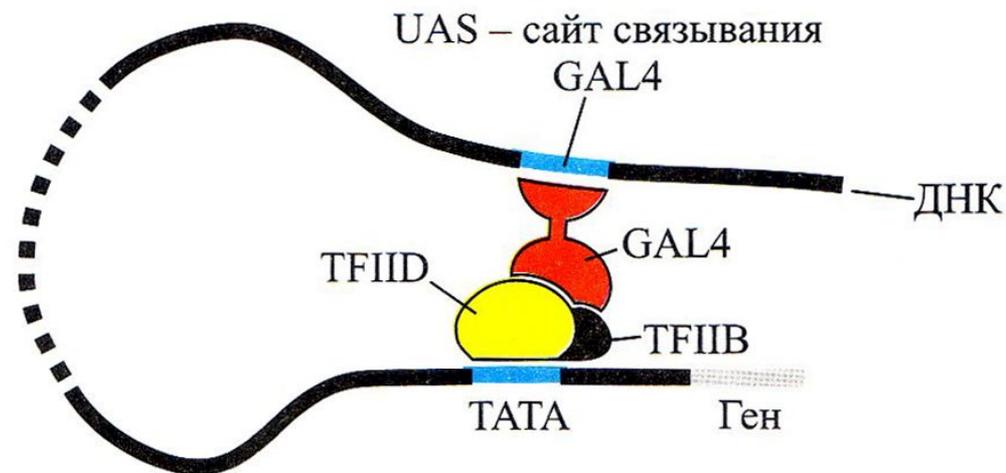


Энхансер

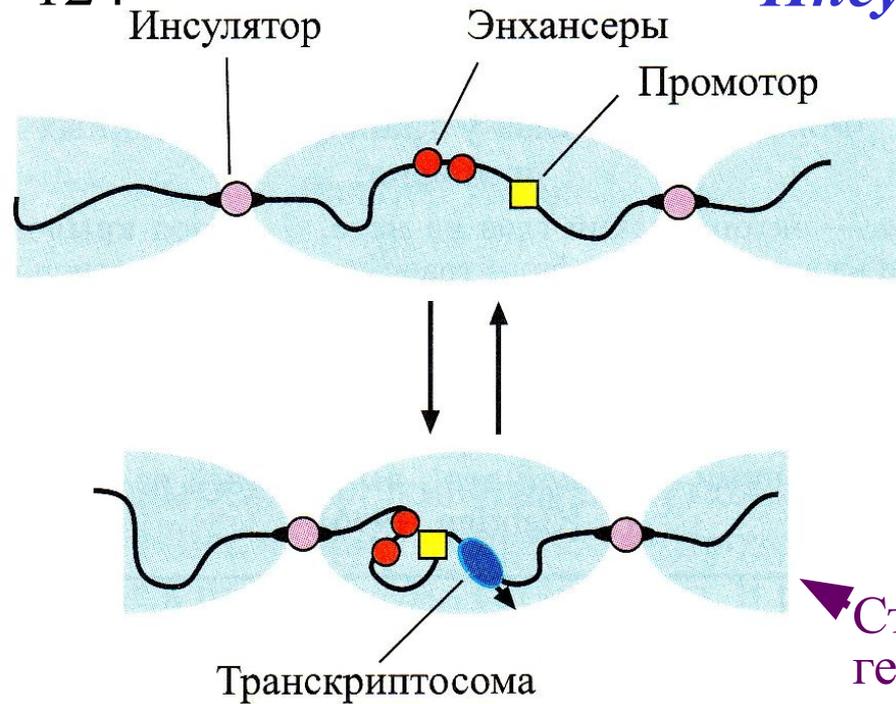


Энхансерные последовательности служат в качестве специфических участков связывания особых регуляторных белков, активирующих процесс транскрипции

Существуют также зоны ДНК, ответственные за репрессию активности генов — сайленсеры. Они связываются с белками-репрессорами.

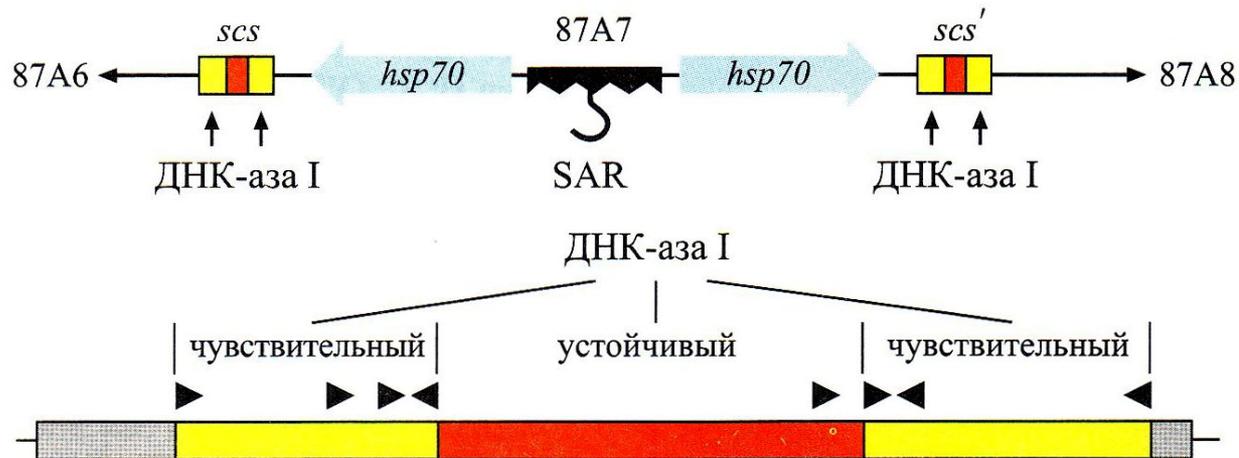


Взаимодействие белка GAL4 с участком UAS и транскрипционным комплексом, в результате чего облегчается присоединение к комплексу фактора транскрипции TFIIB. Это увеличивает скорость транскрипции примерно в 1000 раз



Только в пределах участка между двумя инсуляторами энхансерные последовательности, связавшись с белками-активаторами, могут образовать петлю и осуществить взаимодействие с промотором

Строение домена активирования гена между двумя инсуляторами



Структура инсуляторов в пуфе 87A7

hsp70 — ген, кодирующий белки теплового шока; *scs* и *scs'* — инсуляторные элементы. Внизу в более крупном масштабе показано строение *scs*-элемента: ДНК-аза I-чувствительные участки и последовательности CGATA

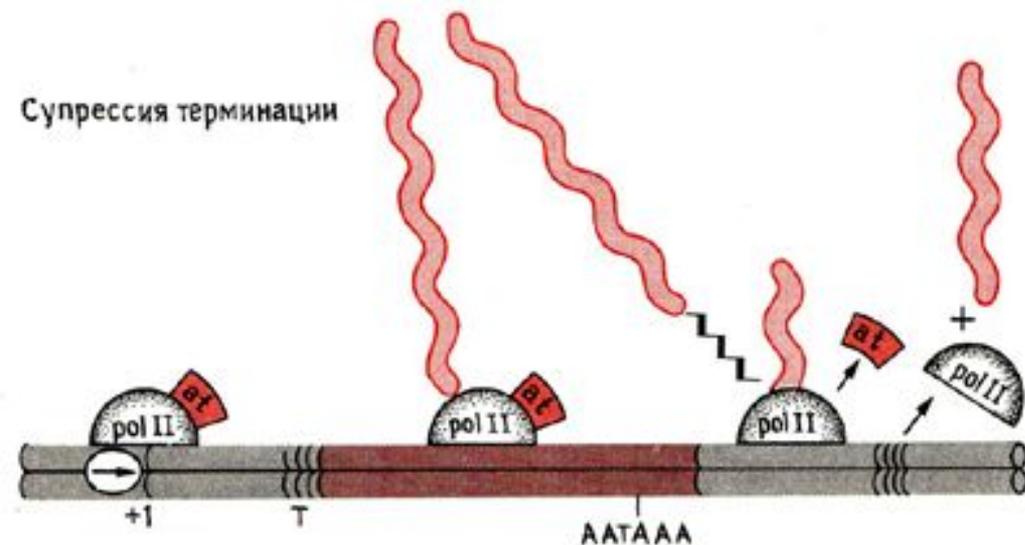
Механизмы, которые определяют 3'-конец соответствующих функциональных РНК-продуктов, уникальны для каждой полимеразной системы

Сигналом к терминации транскрипции с участием **Pol I** служат высококонсервативные последовательности значащей цепи (у мышей длиной 18 п.н. 5'-AGGTCTGACCCAG(TA/AT)NTCCG-3', так называемый SalI-бокс), которой обычно предшествует один или несколько пиримидиновых кластеров. Терминация в этих сайтах происходит при связывании специфических белков с последовательностями ДНК

3'-концы РНК, синтезированных при помощи **РНК-полимеразы III**, как правило, соответствуют сайтам, в которых заканчивается транскрипция. Для терминации транскрипции нужен только сам фермент и кластер дезоксиаденилатных остатков на матричной цепи и определенные фланкирующие его последовательности.

Транскрипция **Pol II** многих генов белков эукариот осуществляется во множественных сайтах последовательности ДНК протяженностью в сотни, а иногда и тысячи пар нуклеотидов.

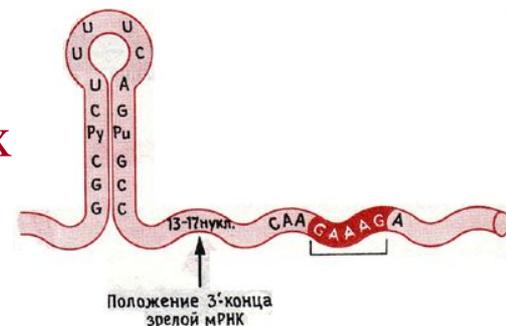
Некоторые гены белков, напротив, имеют четко определенные сигналы терминации транскрипции. Транскрипция заканчивается перед сигнальной последовательностью, в каком бы месте ДНК она ни находилась. Этот сигнал напоминают р-зависимые сигналы терминации у *E. coli*.

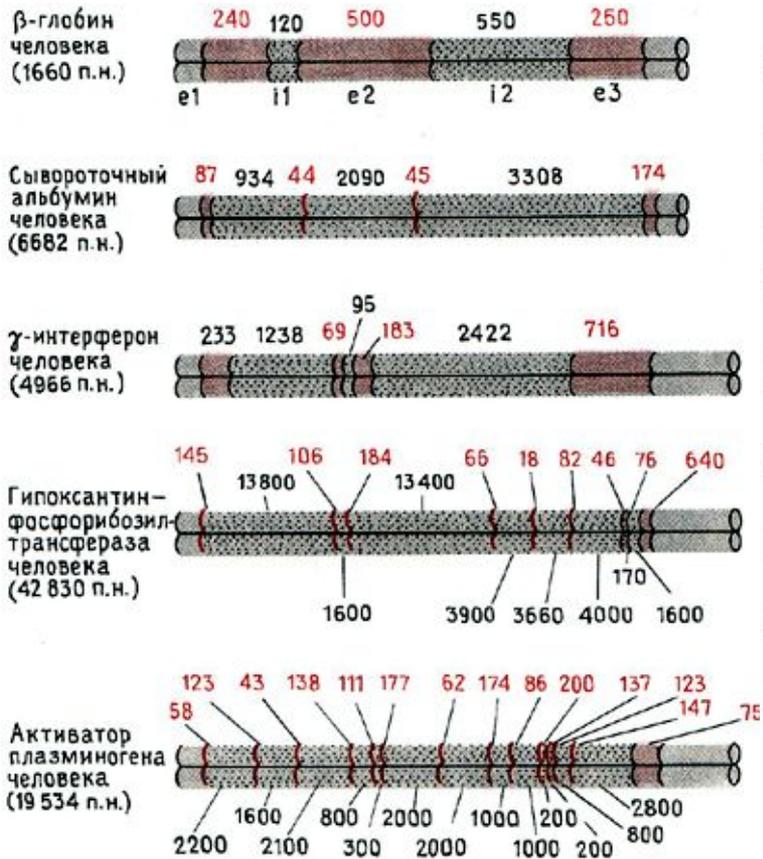


Терминация транскрипции связана с полиаденилированием.

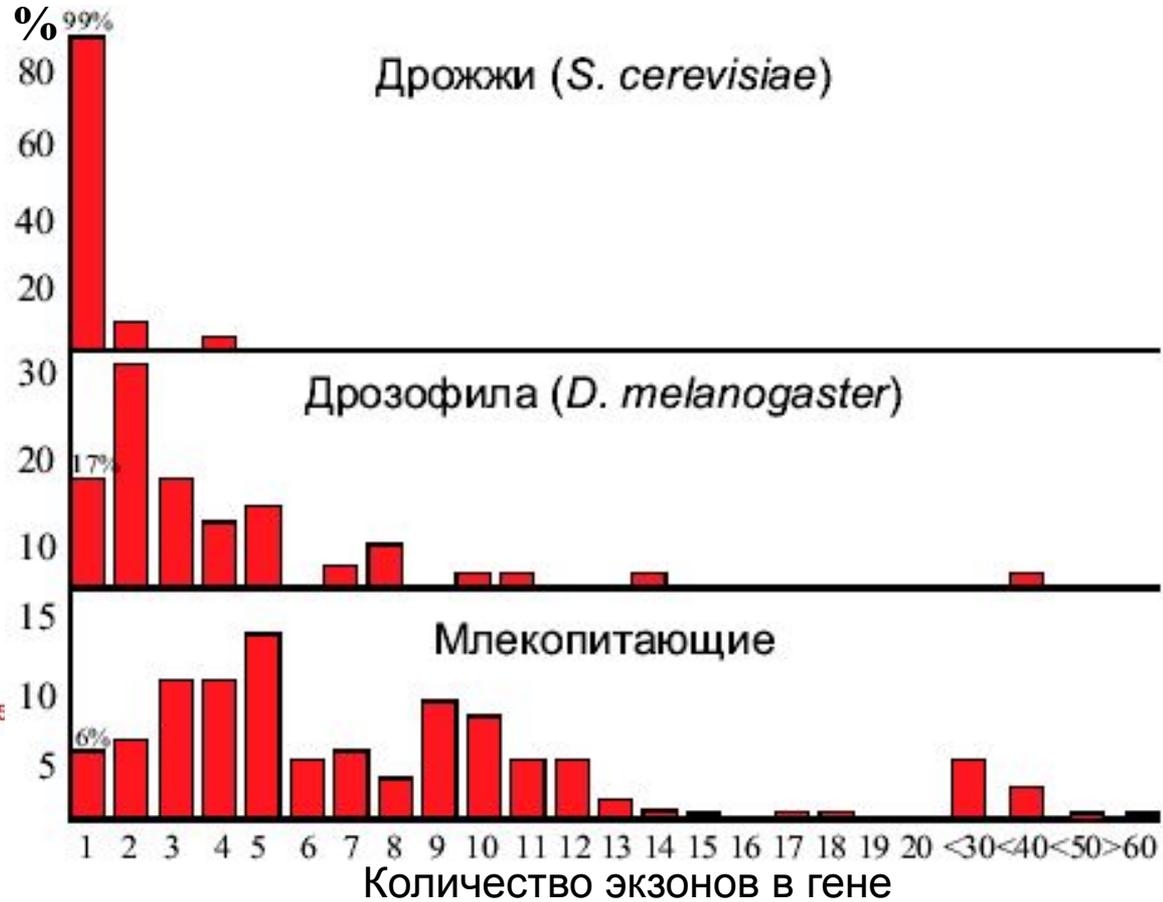
Последовательность ААТААА - обязательный элемент сигнала полиаденилирования, участвует также в терминации транскрипции

Все неполиаденилированные гистоновые мРНК любых организмов имеют зрелый 3'-конец с характерной структурой, служащей терминатором транскрипции





Экзон-интронное строение некоторых генов человека

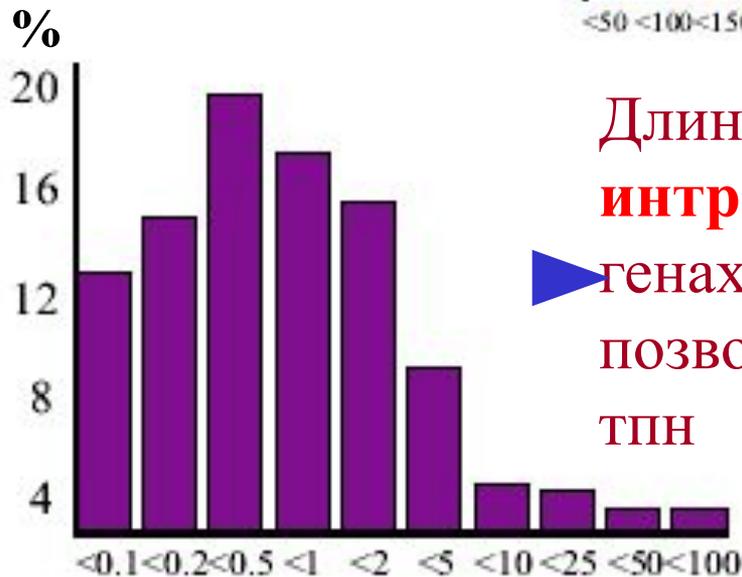
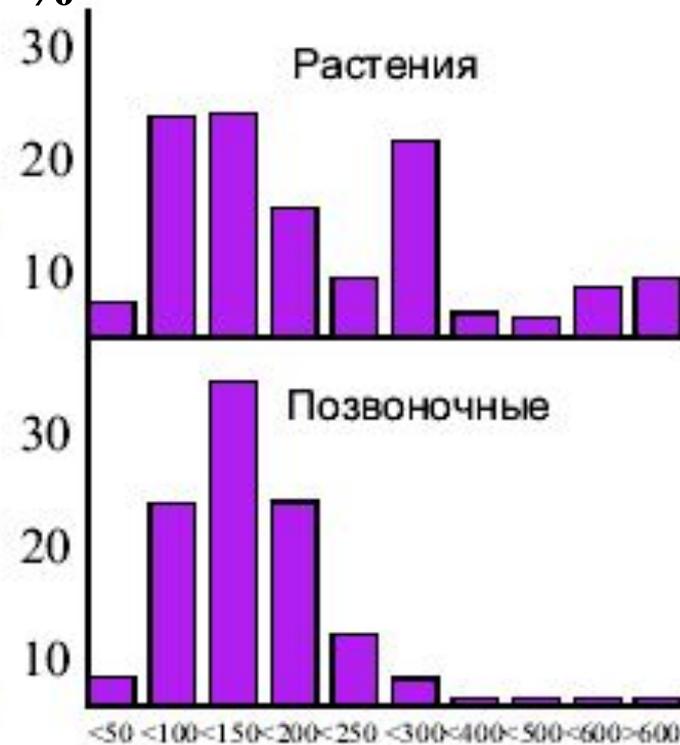
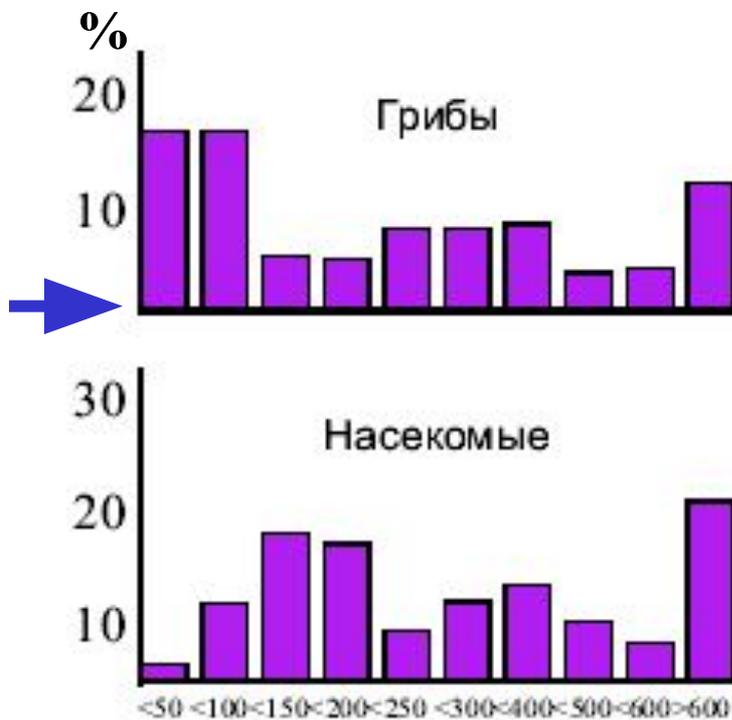


Распределение частот встречаемости генов с различным числом экзонов

ИНТРОН – часть гена, которая «переписывается» в пре-мРНК, но при образовании зрелой мРНК из нее удаляется

Экзоны и интроны %

Длина **ЭКЗОНОВ**
у разных
представителей
животного и
растительного
мира, пн



Только 1 % ДНК генома человека приходится на экзоны и 24 % — на интроны, при этом размер гена (экзоны + интроны) составляет около 28 тпн