

Регулация на генната експресия

Цели

Глава 15: Регулация на генната експресия

Цели на преподавателя: Да се даде представа за възможностите за регулиране на генната експресия в прокариоти и в еукариоти.

След работа с този раздел студентите ще могат да постигнат следните учебни цели:

А. Знания

1. Да дадат определение и примери за значението на генната експресия;
2. Да охарактеризират оперона в прокариоти;
3. Да опишат съставните части и структурата на лактозния оперон в *E. coli*;
4. Да изброят възможностите за регулация в прокариоти;
5. Да дадат пример за стимулиране свързването на РНК полимеразата към промотора;
6. Да изброят възможностите за регулация в еукариоти на нивото на ДНК;
7. Да изброят възможностите за регулиране в еукариоти на ниво транскрипция;

Б. Разбирания

1. Да обяснят как чрез индукция в лактозния оперон и репресия в триптофановия оперон се инхибира свързването на РНК полимеразата към промотора;
2. Да обяснят механизма на катаболитната репресия;
3. Да обяснят механизма на регулацията на триптофановия оперон чрез атенюиране;
4. Да опишат основните характеристики на регулацията на генната експресия в еукариоти;
5. Да илюстрират с примери и обяснят регулирането на големи групи гени чрез пакетирание на хромозомите;
6. Да илюстрират с примери и обяснят регулирането чрез химически модификации на базите в гените или на хистонови белтъци;
7. Да илюстрират с примери и обяснят регулирането чрез отпадане и амплификация на гени;
8. Да обяснят как се извършва регулирането на ниво транскрипция посредством комплекс от хидрофобен хормон и неговия вътреклетъчен рецептор;
9. Да представят примери за посттранслационно регулиране;

В. Умения

1. Да приложат познанията си върху имуноглобулини и върху този раздел, за да илюстрират регулирането чрез генно пренареждане;
2. Да приложат познанията си върху сплайсинг и обяснят постранскрипционната регулация на това ниво;
3. Да демонстрират алтернативни места за полиаденилиране;
4. Да демонстрират посттранскрипционно редактиране на иРНК и обяснят разликите в аполипопротеини В100 в ЛПМНП и В48 в хиломикроните;
5. Да илюстрират регулирането на генната експресия чрез промени в стабилността на иРНК за трансфериновия рецептор;
6. Да илюстрират регулирането на ниво транслация - повлияване на биосинтезата на белтъка феритин от желязо-регулаторен белтък при ниски и високи концентрации на желязо в клетката;
7. Да приложат познанията си върху изучената теория и сравнят прокариотни и еукариотни гени;
8. Да приложат познанията си върху изучената теория и обяснят значението на тройноверижни участъци в ДНК за регулация на генната експресия.

15.1 Резюме

Реализирането на наследствената информация чрез транскрипция и транслация се означава като генна експресия. Генната експресия се регулира по различни сложни механизми.

В прокариоти регулацията става главно на транскрипционно ниво. Основна единица за регулация на генната експресия е оперонът. Оперонът съдържа набор от структурни гени и регулаторен участък (промотор), който координирано регулира тези гени. Обикновено структурните гени кодират белтъци от мултиензимен метаболитен път. Към промотора се свързват регулаторни белтъци, които улесняват или инхибират свързването на РНК полимеразата. Регулаторните белтъци са продукти на други гени, обикновено отдалечени от повлиявания оперон.

Еукариотните гени не са организирани в оперони. Обикновено всеки ген, кодиращ полипептидна верига, има свой промотор. Регулацията на генната експресия зависи от много фактори и може да се извършва на различни нива.

На нивото на ДНК това може да става чрез промяна в достъпността на ДНК, чрез химическа модификация на базите, чрез отпадане на гени, чрез умножаване (амплификация) на гени, чрез пренареждане на гени.

На нивото на транскрипцията генната експресия може да се регулира по време на сплайсинга на РНК, чрез възникване на различни места за полиаденилиране, при транспорта на РНК от ядрото към цитоплазмата чрез повлияване стабилността на иРНК, чрез посттранскрипционно редактиране на иРНК.

Допълнителни регулаторни механизми функционират в цитоплазмата на нивото на транслацията. Известна е и посттранслационна регулация чрез контролиране протеолитичното разграждане на белтъците.

Даден ген може да бъде едновременно регулиран на няколко нива.

15.2 Определение и значение на регулацията на генната експресия

Реализирането на наследствената информация чрез биосинтеза на РНК и белтъци се означава като генна експресия.

В ДНК на прокариота *E. coli*, живеещ в човешките черва, има 4×10^6 bp. Това съответства на около $1,3 \times 10^6$ кодона, които биха кодирани около 4 000 белтъци (съдържащи средно по 300 аминокиселинни остатъци). В действителност се експресират само около 700 белтъци, което показва, че много от гените не са активни. В човешкия геном се експресират около 100 000 гена, което е само 10 % от общия геном. Останалата ДНК (около 90 %) е транскрипционно неактивна.

Както клавишите на един роял не работят всички едновременно при свирене на мелодия, така само малка и различна част от гените в клетката се експресират в определен момент от растежа и диференциацията на клетката.

Организмите регулират генната експресия също и за адаптация към променящите се условия на външната среда, като спестяват излишни енергетични разходи, когато не е необходима синтеза на белтъци. Напр. клетките на *E. coli* използват глюкоза като източник на енергия, като я разграждат в гликолизата и цитратния цикъл до получаване на АТФ. Ензимите за разграждане на глюкоза са конститутивни. Глюкозата доставя и въглерод, който заедно с азот от средата, се използва за синтеза на 20-те аминокиселини, и чрез тях за синтеза на белтъци. Ако в растежната среда се добави лактоза вместо глюкоза, *E. coli* се адаптира и започва да синтезира ензими за разграждане на лактоза. Ако в средата се добавят готови аминокиселини, напр. триптофан, *E. coli* спира да синтезира ензимите, необходими за синтезата на триптофан.

15.3 Регулация на генната експресия в прокариоти

Регулацията на генната експресия в прокариоти, които са едноклетъчни организми без обособено ядро, е по-прост процес, отколкото в многоклетъчните еукариоти. В прокариоти ДНК не е свързана с хистонови и нехистонови белтъци. Получените първични иРНК-транскрипти не съдържат интрони, нямат "шапки" и полиА-"опашки". Транскрипцията и транслацията се извършват почти едновременно - още по време на синтезата на иРНК върху ДНК, към иРНК се присъединяват рибозоми и започва белтъчна биосинтеза.

15.3.1 Оперонът - основна единица за регулация на генната експресия

Опероновият модел за регулация на генната експресия е предложен от Jacob и Monod [1]. При създаване на този модел тези изследователи са взели предвид, че има два вида гени - конститутивни и индуцируеми. Експресията на конститутивните гени не се регулира. Кодираниите от тях белтъци се синтезират с постоянна, често ниска скорост. Индуцируемите гени се експресират само в присъствие на специфично вещество, наречено индуктор.

Оперонът съдържа група от координирано регулирани структурни гени и регулаторен участък (промотор). Промоторът е разположен в 5'-края на оперона, преди структурните гени (т. 13.4.2). Структурните гени кодират различни белтъци от мулти-ензимен метаболитен път.

Структурните гени се експресират координирано - т.е. те или се експресират всички, или нито един от тях не се експресира. При транскрипция на ДНК се получава една полицистронна иРНК, която носи информация за всички белтъци, кодирани от оперона. Тази иРНК има много стартови и стоп участъци, което позволява да се синтезират много белтъци при транслацията на една иРНК.

Към промотора или близо до него се свързват регулаторни белтъци, които повлияват (стимулират или инхибират) свързването на РНК полимеразата към промотора, т.е. действат на нивото на инициация на транскрипцията.

Опероните се повлияват и от различните \square субединици (или \square фактори), които се свързват към РНК полимеразата и улесняват тя да разпознае и се свърже към определени промотори (вж. т. 13.3.1).

Възможно е наслагване на тези въздействия върху един и същи промотор за по-бърз отговор към променящите се условия.

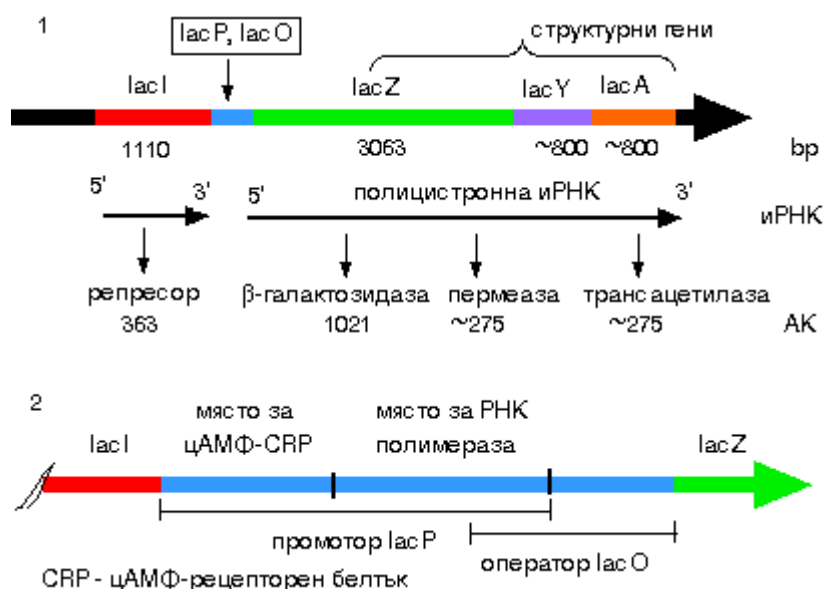
15.3.2 Структура на лактозния оперон в *E. coli*

Известни са много оперони в прокариоти, но лактозният оперон, изучен от Jacob и Monod, е класически пример за прокариотен оперон (фиг. 15-1). Той се състои от ген-регулатор *lacI*, промотор *lacP*, оператор *lacO* и структурни гени *lacZ*, *lacY* и *lacA*, които кодират ензимите \square -галактозидаза, пермеаза и транс ацетилаза. \square -галактозидазата разгражда лактозата до галактоза и глюкоза.

Пермеазата е необходима за транспорт на захари, вкл. лактоза през клетъчната мембрана. Транс ацетилазата прехвърля ацетилова група от ацетил-КоА върху \square -галактозид, като се предполага, че това може да е необходимо за детоксикация и екскреция на неметаболизирани продукти на галактозата.

Генът *lacI*, който има свой промотор, кодира репресорен белтък. Репресорът се синтезира като мономер. Активната му форма е тетрамер. Има висок афинитет към оператора. Генът *lacI* е разположен непосредствено преди промотора. При други оперони, обаче, регулаторният ген може да е отдалечен от структурните гени, които управлява.

Операторът припокрива част от промотора. Поради това присъствието на свързан репресор към оператора не позволява РНК полимеразата да се свърже към промотора и да започне транскрипцията. В промотора освен място за свързване на РНК полимеразата, има и друго място - за свързване на комплекс от цАМФ-CRP, чиято роля е разгледана в т. 15.3.5 и фиг. 15-4.



Фиг. 15-1.
Структура на лактозния оперон.

1 - Лактозният оперон съдържа ген-регулатор *lacI*, промотор *lacP*, оператор *lacO* и структурни гени *lacZ*, *lacY* и *lacA*, при експресията на които се синтезират три ензимни белтъци: β -галактозидаза, пермеаза и трансацетилаза. Генът *lacI* кодира репресорен белтък, който под форма на тетрамер се свързва към *lacO* (виж фиг. 15-2). Размерите на гените са дадени в нуклеотидни двойки (bp), а на ензимите в брой аминокиселини (АК).

2 - Увеличение на *lacP* и *lacO*. Промоторът съдържа място за свързване на РНК полимеразата и място за свързване на комплекс от цАМФ-CRP, чиято роля е разгледана в т. 15.3.5 и фиг. 15-4. Промоторът и операторът частично се припокриват.

15.3.3 Регулация чрез инхибиране свързването на РНК полимеразата към промотора

Регулаторни белтъци, наречени репресори, повлияват оперона, като инхибират свързването на РНК полимеразата към промотора.

Репресорът се свързва в участък, наречен "оператор". При прикрепване на репресор към оператора РНК полимеразата не може да се свърже и оперонът не работи.

Регулацията се осъществява чрез два механизма: индукция и репресия.

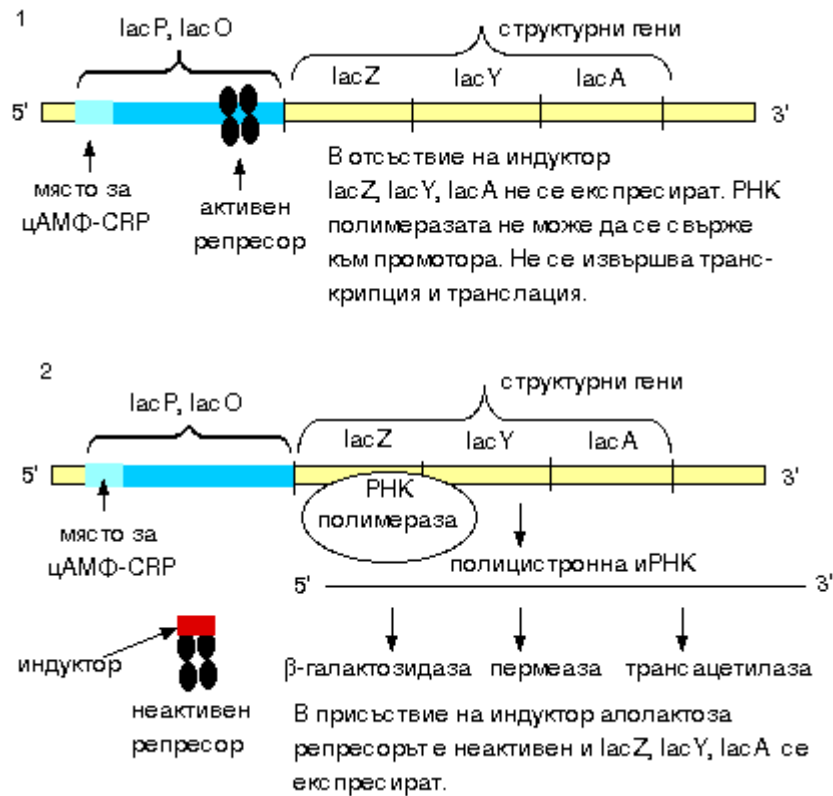
1) Индукция

Индукторът е нискомолекулно външно вещество, в присъствие на което се стимулира експресията на оперона.

В отсъствие на индуктор репресорът свързва промотора и оперонът не се експресира, т.е. е изключен. При наличие на индуктор, той свързва репресора, променя конформацията му и го инактивира. Промоторът се освобождава, РНК полимеразата се свързва към него и презаписва гените, последвано от транслация.

Лактозният оперон в *E. coli* е индуцируем оперон. В отсъствие на индуктор (фиг. 15-2-1) оперонът е изключен, тъй като репресорът под форма на тетрамер е активен, свързва се към *lacP* и пречи на свързването на РНК полимеразата към промотора. В присъствие на индуктор (фиг. 15-2-2) репресорът става неактивен, РНК полимеразата може да се свърже към промотора и структурните гени в оперона се експресират.

Фиг. 15-2.
Регулация на
лактозния оперон
чрез индукция.

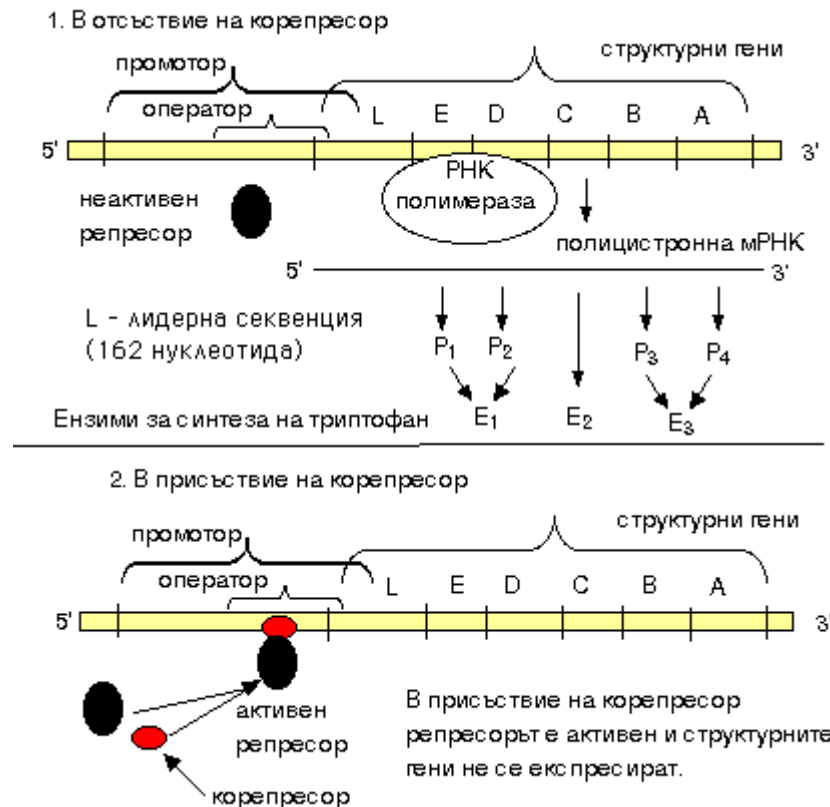


- 1- В отсъствие на индуктор репресорът блокира промотора и оперонът не се експресира;
 2 - В присъствие на индуктор репресорът е неактивен, промоторът е свободен и гените се експресират.

2) Репресия

На фиг. 15-3 е представен триптофановият оперон. Операторът се припокрива с промотора и частично с водещата секвенция L. Структурните гени A, B, C, D, E кодират пет полипептиди (P), които оформят три ензима, необходими за синтеза на триптофан. Този оперон обикновено е включен. Въпреки наличието на вътрешен репресор, гените в оперона се експресират, тъй като репресорът е неактивен. Ако в клетката навлезе външен нискомолекулен корепресор, той свързва репресора и го активира. Оперонът спира да действа, т.е. този оперон е репресируем.. Не се презаписват гените и не се синтезират белтъци.

Фиг. 15-3.
 Регулация на триптофановия оперон чрез репресия.



1 - В отсъствие на външен нискомолекулен корепресор вътрешният репресор е неактивен и структурните гени се експресират.

2 - В присъствие на корепресор репресорът става активен и гените не се експресират.

15.3.4 Регулация чрез стимулиране свързването на РНК полимеразата към промотора

Освен репресорните белтъци, в бактериите има и белтъци, които стимулират свързването на РНК полимеразата към определени промотори. Напр. арабинозният оперон (ага-оперон) се стимулира от белтък, наречен агаС. В отсъствие на глюкоза, но при наличие на арабиноза, арабинозата се свързва с този белтък агаС. Комплексът от арабиноза и агаС се свързва в специален участък близо до промотора. Това улеснява свързването на РНК полимеразата към промотора.

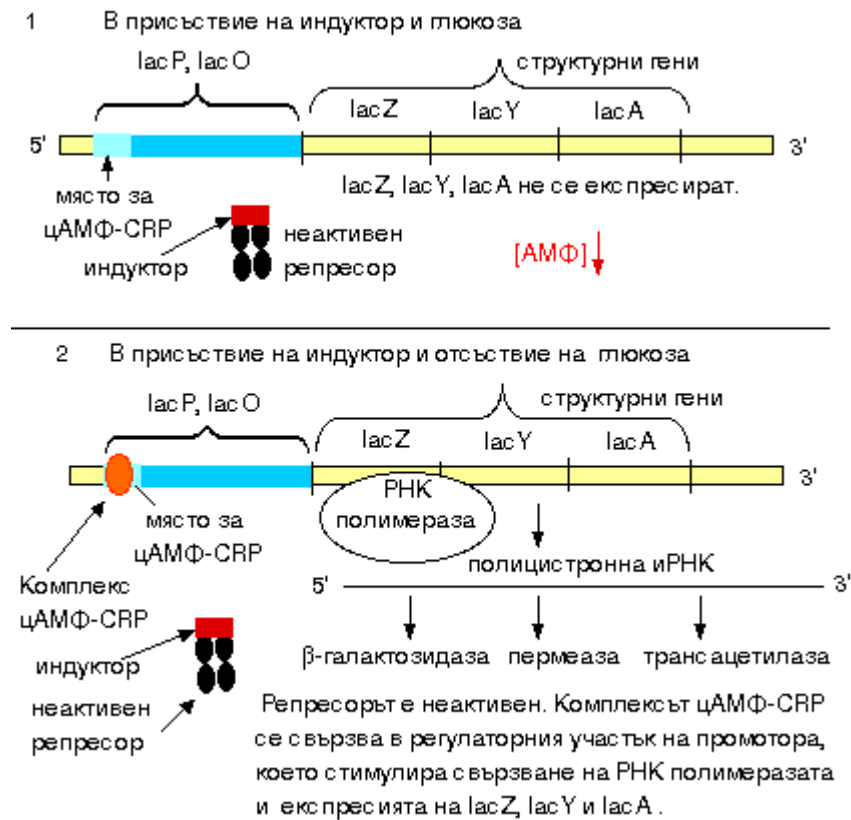
15.3.5 Регулация чрез катаболитна репресия

Този механизъм действа в лактозния, арабинозния и галактозния оперон.

Въпреки че индукторът (друга захар, различна от глюкоза) инактивира репресора, присъствието на глюкоза репресира експресията на оперони за други захари, независимо че те могат да присъстват в средата - фиг. 15-4-1. В присъствие на глюкоза концентрацията на цАМФ е ниска и не се проявява положителният му ефект за активиране на транскрипцията, описан по-долу.

Намалението на глюкозната концентрация води до повишаване концентрацията на цАМФ (фиг. 15-4-2) и свързването му към цАМФ-рецепторен белтък CRP (от английски

cyclic AMP receptor protein) . Среща се и означението CAP (от старото му название catabolic activator protein, т. е. катаболитно активаторен белтък). Свързването на цАМФ променя конформацията на белтъка, който става активен. Активният комплекс цАМФ-CRP се свързва към специфичен регулаторен участък на промотора и стимулира свързването на РНК полимеразата. Извършва се транскрипция и транслация. При снижаване концентрацията на цАМФ, CRP е в неактивна конформация.



Фиг. 15-4. Регулация чрез катаболитна репресия.

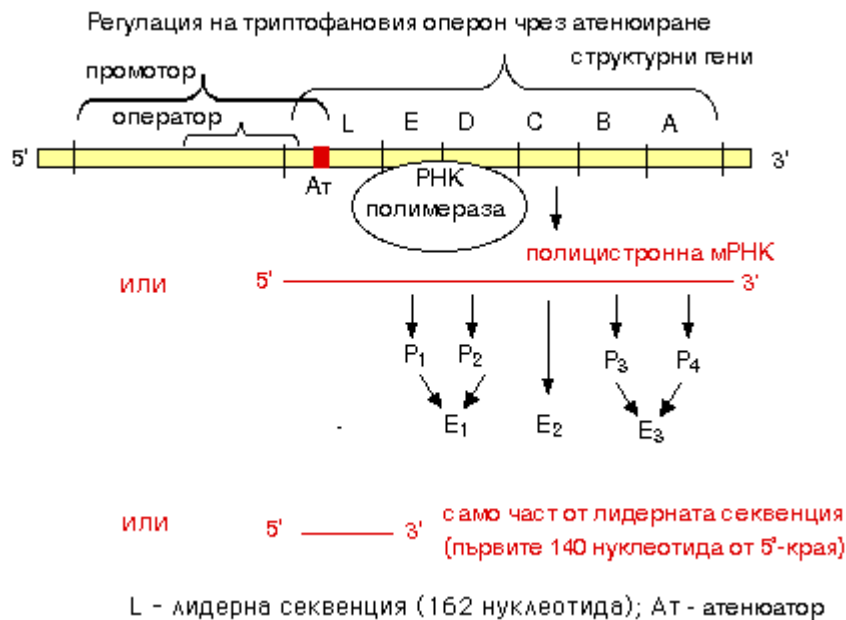
1 - В присъствие на индуктор и глюкоза структурните гени не се експресират, тъй като глюкозата снижава концентрацията на цАМФ и не се проявява положителният му ефект за активиране на транскрипцията.

2 - В присъствие на индуктор и отсъствие на глюкоза се увеличава концентрацията на цАМФ, който се свързва към цАМФ-рецепторен белтък (CRP). Комплексът цАМФ-CRP се свързва към специфичен регулаторен участък на промотора и стимулира свързването на РНК полимеразата, транскрипцията и транслацията.

15.3.6 Регулация чрез атенюиране

Триптофановият оперон, освен чрез репресия (т. 15.3.3), се регулира и чрез атенюиране (затихване). Този механизъм е характерен само за прокариоти, тъй като при тях транскрипцията и транслацията не са пространствено разделени и транслацията започва още преди да е завършила транскрипцията. Определяща е концентрацията на аминокиселината в средата.

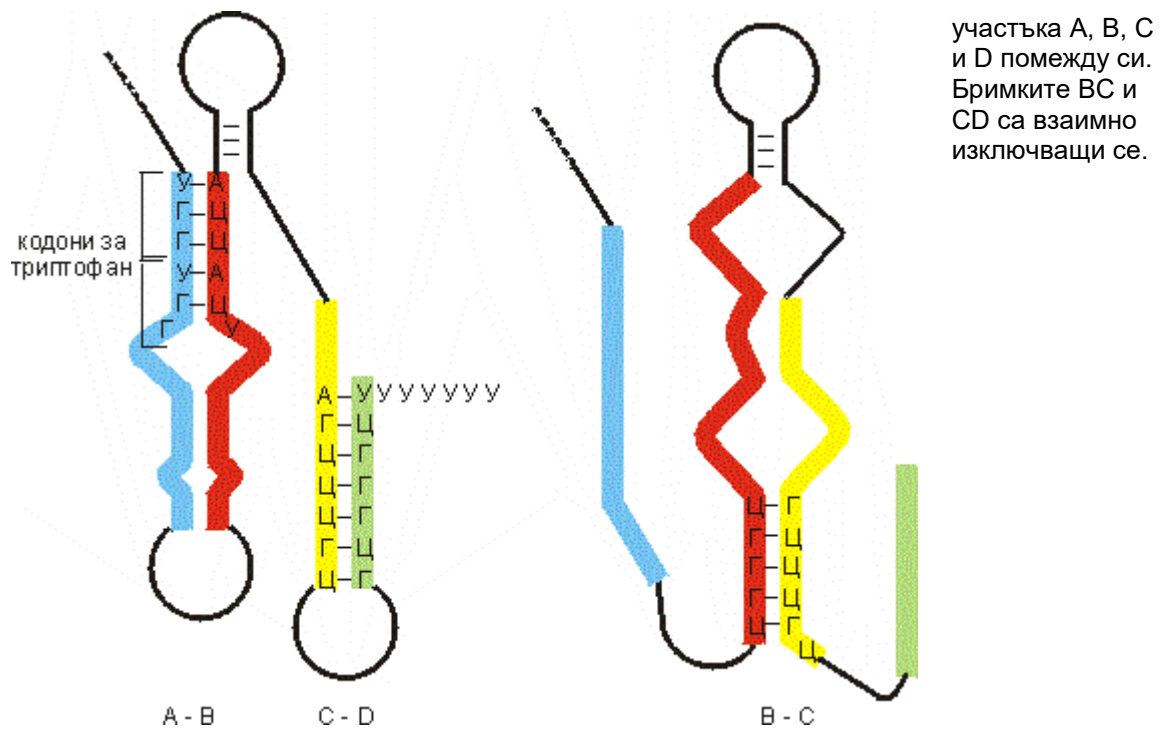
Допълнителният контролиращ елемент, наречен атенюатор, е разположен в лидерната секвенция от 162 нуклеотида, която е преди структурните гени (фиг. 15-5). При ниска концентрация на триптофан се синтезира цялата иРНК (6720 нуклеотиди, вкл. и лидерната секвенция) и ензимите за синтеза на триптофан. При увеличаване на неговата концентрация, той започва да действа като корепресор и скоростта на транскрипция намалява. При това се синтезира не цялата иРНК, а само част от лидерната секвенция (140 нуклеотиди).



Фиг. 15-5. Допълнителен регулаторен елемент (атенюатор) в лидерната секвенция на триптофановия оперон. При различни нива на триптофан структурата на атенюатора е различна (виж фиг. 15-6 и 15-7) и определя дали да се получи иРНК с пълна дължина на веригата, или само част от лидерния пептид

На фиг. 15-6 е показана по-детайлна структура на лидерната секвенция в триптофановия оперон, където е и атенюаторът. Показани са четири участъка А, В, С и D, които могат да взаимодействат помежду си комплементарно и да образуват различни бримки АВ, ВС или CD. Бримките ВС и CD са взаимно изключващи се. Ако се образува бримката ВС, не могат да се образуват нито бримка АВ, нито бримка CD. Както е обяснено по-долу, бримка CD действа като терминатор, а бримка ВС е нетерминираща. В началото на участък А има два съседни кодони за триптофан.

Фиг. 15-6. Различни вторични структури на лидерната секвенция в триптофановия оперон, които може да се получават при различни комплементарни взаимодействия на четирите

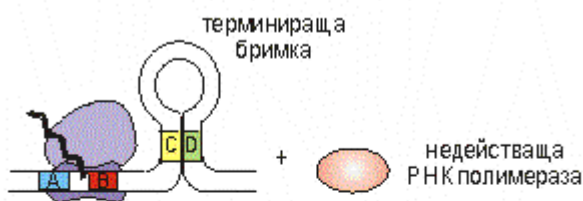


При ниска концентрация на триптофан в средата, не се образува Три-тРНК и рибозомата спира в кодоните за триптофан, т. в участък А (фиг. 15-7). Това позволява да се образува нетерминиращата бримка BC и да се транскрибира иРНК с пълна дължина на веригата.

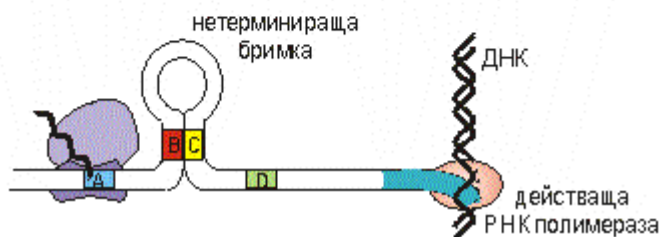
При висока концентрация на триптофан, има достатъчно Три-тРНК и рибозомата бързо преминава през кодоните за триптофан и участък А и заема участък В. Това прави невъзможно образуването на бримка BC, а позволява образуването на бримка CD. Бримка CD е богата на Г-Ц двойки, последвани от олиго-У сегмент. Подобно съчетание, както е разгледано в т. 13.6, дава възможност за терминиране поради два важни фактора: 1) по-здраво свързване между Г и Ц в бримката CD и 2) по-слабо взаимодействие между олиго-У сегмента и ДНК-матрицата. При образуване на бримката CD транскрипцията спира преждевременно.

Фиг. 15-7. Регулиране на триптофановия оперон чрез атенюиране.

1. При висока концентрация на триптофан



2. При ниска концентрация на триптофан



1 - при ниска концентрация на триптофан в средата;

2 - при висока концентрация на триптофан в средата.

Чрез атенюиране се регулират и опероните за ензими, необходими за синтеза и на други аминокиселини като хистидин, фенилаланин, изолевцин, треонин.

15.4 Регулация на генната експресия в еукариоти

Човек започва своето съществуване от оплодената яйцеклетка, която претърпява много цикли на делене, водещо до сложен организъм с различни тъкани и органи. Промените в процеса на индивидуалното развитие от детството до старостта са резултат от програмираното включване и изключване на различни гени. Дори в старческа възраст някои клетки продължават да се диференцират, като напр. еритроцити, клетки за производство на антитела в отговор на инфекции, клетки на чревната лигавица.

Многоклетъчните организми са много по-сложни от едноклетъчните прокариоти. Въпреки че в соматичните клетки на организма има еднакъв набор от гени, в клетките с различна морфология и функции (напр. мускулни, чернодробни, нервни и пр.) се експресира малка и различна част от общите гени. Механизмите за регулация на генната активност в еукариоти са много по-сложни. В тях има много повече места за регулация, увреждането на които може да доведе до заболяване.

Въпреки по-сложните механизми на регулация в еукариоти, общите принципи, които управляват генната експресия в прокариоти, са валидни и при еукариоти. Експресията на гените може да бъде активно стимулирана или инхибирана чрез свързване на белтъци към ДНК или РНК.

15.4.1 Регулация на генната експресия на нивото на ДНК

Понастоящем е известно, че геномът в ДНК не е постоянно фиксирана статична структура, а има висока степен на пластичност. Части от гени могат да се придвижват, да се губят, да се умножават и това може да има значение за регулацията на някои гени, за увеличаване на генетичното разнообразие, а също и за развитие на някои видове рак и резистентност срещу лекарства.

15.4.1.1 Регулиране на големи групи гени чрез пакетиране на хромозомите

Еукариотите могат да регулират едновременно големи групи от гени чрез промяна в хромозомното пакетиране. Цели хромозоми или части от хромозоми са недостъпни за транскрипция в т.н. неактивен кондензиран хетерохроматин. Гените в дифузния еухроматин са потенциално активни и достъпни за транскрипция. Напр. при зреене на еритроцити, изходните кръвни клетки хематобласти, които се делят активно и синтезират РНК, съдържат дифузен еухроматин. В получаващите се еритробласти преобладава хетерохроматин.

В клетките на женски организми едната X хромозома е транскрипционно неактивна чрез хетерохроматинизация съгласно хипотезата на Lyon. Неактивните X хромозоми се наричат телца на Barr.

15.4.1.2 Регулиране чрез химическа модификация

Цитозиновите бази в глобиновите гени са метилирани до 5-метилцитозин в клетки, където не се експресират, а в еритроидни клетки не са метилирани.

Ацетилирането и деацетилирането на хистоновите белтъци също е важен фактор за промяна структурата на хроматина и регулиране на генната експресия.

Под действие на цитоплазмни ацетилази се ацетилират ϵ -амино групи в лизинови остатъци близо до аминокраищата на хистони H3 и H4. Това се смята, че е необходимо за образуване на хистоновия октамер. Други ядрени ацетилази модифицират специфични лизинови остатъци в четирите хистони H1A, H2A, H3 и H4.

Ацетилирането неутрализира положително заредени лизинови остатъци, подаващи се от нуклеозомната сърцевина, като по този начин отслабва афинитета им към съседни нуклеозоми и към отрицателно заредени групи в свързващата ДНК. Смята се, че това отваря нуклеозомите за транскрипция.

Връзката между хистоновото ацетилиране и повлияването на транскрипцията се вижда от факта, че единият от TAF-компонентите на TFIID е хистонова ацетилаза. Ядрените хистонови ацетилази са свързани с транскрипционни фактори.

Семейство от хистонови деацетилази имат обратно действие на ацетилазите. Те отстраняват ацетиловите групи от хистоните. Репресирани гени чрез деацетилиране може да улеснява свързването на РНК полимеразата към други гени, като намалява количеството на хроматина, който трябва да се сканира от транскрипционните фактори.

15.4.1.3 Отпадане на гени

Пример за отпадане на гени има при развитието на еритроцитите. Незрелите клетки еритробласти имат ядро и синтезират РНК за глобиновите вериги на хемоглобин. При съзряване на клетките, ядрата се изхвърлят. В зрелите еритроцити няма ядра, няма гени и не се синтезира РНК.

15.4.1.4 Амплификация (умножаване на гени)

Някои гени, чиито продукти са необходими в големи количества, имат много копия. Напр. гените за хистоните и за рРНК нормално са под форма на много копия. В някои видове силно мутиращи ракови клетки може да се получи хилядократна амплификация на гени, които нормално са в малък брой.

При амплифицирането може да се получат фрагменти от ДНК извън хромозомите или в самите хромозоми да се получи тандемно умножаване на гените.

Амплифицирането на някои гени обяснява развиването на резистентност към някои лекарства. Генът за дихидрофолат редуктаза се амплифицира при по-дълго лечение с метотрексат на тумори и левкемия. (Метотрексат инхибира дихидрофолат редуктазата, тъй като е структурен аналог на фолат - гл. 8 и 9).

Амплифицират се и гените за множествена лекарствена резистентност. Тези гени кодират мембранно свързани гликопротеини, които предизвикват резистентност към голям брой антитуморни препарати - изпомпват ги извън клетките като АТФ-зависими помпи. По този начин резистентност може да се прояви дори към препарат, даван за първи път.

Генът за металотионеин също се амплифицира. Този белтък предпазва клетките, като свързва различни тежки метали (цинк, мед, живак и др.). При увеличаване на тежките метали в средата, гените за този белтък се умножават.

15.4.1.5 Генно пренареждане

Части от ДНК могат да се преместват от едно място на друго в генома, свързвайки се едни с други по различни начини, което води до производство на различни белтъци.

Пример за това са гените за имуноглобулините. За осигуряване на действена имунна защита са необходими огромен брой антитела с различна антигенна специфичност. Броят на наличните гени е недостатъчен за огромния брой произвеждани антитела от В-лимфоцитите. Организмът се справя с този проблем, като използва генно пренареждане.

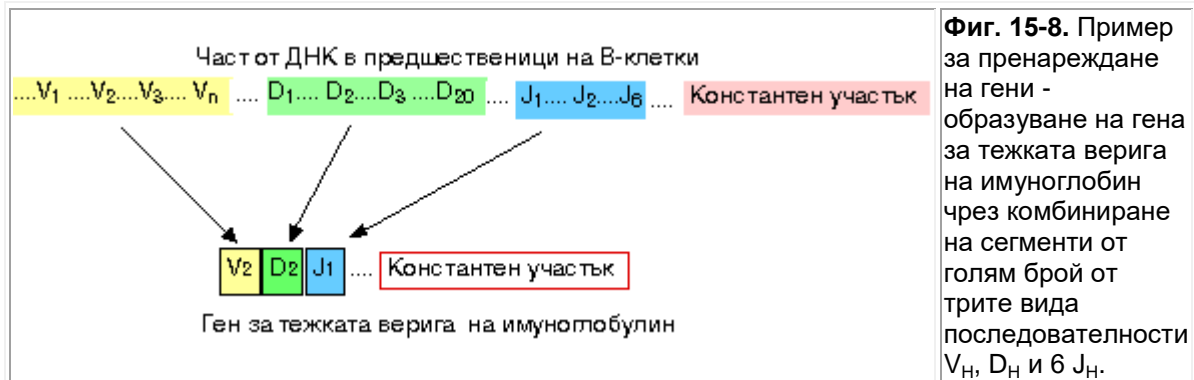
Антителата съдържат две леки и две тежки вериги (фиг. 2-19), всяка от които съдържа вариабилни и константни участъци.

Гените за имуноглобулините принадлежат към три генни семейства, всяко от които е разположено на различно място (локус) в различна хромозома (табл. 15-1). В действителност гените във всеки локус са частични гени, които се пренареждат, за да образуват цялостен ген.

Табл.15-1. Разположение на генните семейства за леките и тежките вериги на имуноглобулините.

Генни семейства	Локализация
Гени за леката κ -верига	хромозома 2
Гени за леката λ -верига	хромозома 22
Гени за тежката верига	хромозома 14

В дългото рамо на хромозомите в предшествениците на В-лимфоцити има над 200 V_H последователности, 20 D_H последователности и 6 J_H последователности. Те са разположени на групи в съответната хромозома (фиг. 15-8).



15.4.2 Регулация на експресията на отделни гени на ниво транскрипция

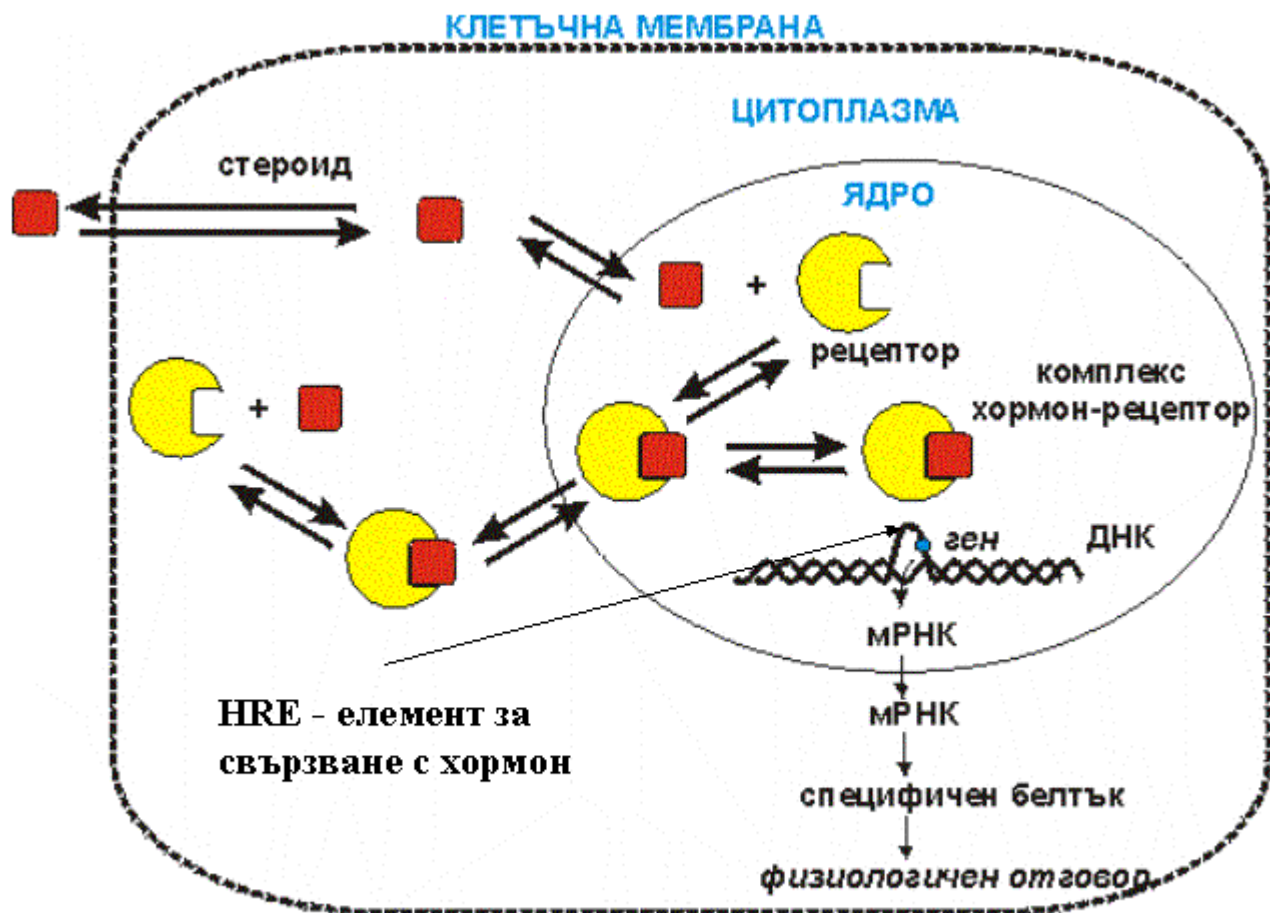
Различни фактори на външната среда (топлинен шок, тежки метали, различни токсични химикали), извънклетъчни и вътреклетъчни сигнали повлияват генната експресия на ниво транскрипция.

Както бе показано в гл. 13, в ДНК на еукариоти има регулаторни последователности с различна ориентация и отдалечени на различно разстояние преди или след стартовата точка, които могат да усилват или намаляват скоростта на експресия (енхансери и силансери, съответно). Поради отдалечеността си те не контактуват директно с основния транскрипционен комплекс. Те биват разпознавани и упражняват своя ефект чрез свързване на белтъци (транскрипционни трансактиватори), които пък се свързват с коактиваторите от основния комплекс и така променят скоростта на транскрипция.

Специфични регулаторни последователности, отговорни за опосредяване ефекта на различни хормони, растежни фактори и др., действат като енхансери или силансери или са в тясна връзка с тях. Такива характерни регулаторни последователности, наричани още "места за отговор към хормони" (hormone response elements) могат да бъдат повлиявани по три механизма:

1) Чрез директно свързване към тях на комплекс от хидрофобен хормон и неговия вътреклетъчен рецептор :

Хидрофобни хормони, като напр. стероидните хормони, тироксин и др. (фиг. 15-9, виж също глава 17) минават лесно през хидрофобната клетъчна мембрана. Някои от тях се свързват към специфични рецептори в цитоплазмата. За други рецепторите се намират в ядрото. Всеки рецептор, освен място за свързване на хормона, има и участък за свързване към специфична регулаторна последователност в ДНК. Комплексът хормон-рецептор действа като индуктор или репресор. При свързване на този комплекс в специфичния регулаторен участък на гена, генът се активира или инактивира.



Фиг. 15-9. Пример за повлияване на генната експресия на ниво транскрипция от комплекса между стероиден хормон и неговия рецептор.

За едни стероидни хормони рецепторът се намира в цитоплазмата, а за други в ядрото. Комплексът хормон-рецептор се свързва със специфична регулаторна последователност и повлиява експресията на определени гени.

2) Чрез RAS-медирана сигнална киназна каскада при свързване на различни извънклетъчни растежни фактори към мембранен рецептор с тирозин-киназна активност - виж глава 17.

3) Чрез цитоплазмени STAT-белтъци, наречени така от английското им название: signal transducers and activators of transcription, т. е. предаващи сигнала и активиращи транскрипцията - виж глава 17.

Един индуктор може да повлияе различни гени, ако те съдържат еднакви регулаторни елементи. Напр. инсулин индуцира координираната експресия на скорост-определящите ензими от гликолиза, цитратен цикъл, пентозофосфатен път, синтеза на мастни киселини и триацилглицероли.

За даден ген може да има различни енхансери и силансери. Регулацията на даден ген се осъществява не от един единствен белтък, а от комбинация на различни регулаторни белтъци, които се свързват към енхансерите и силансерите в отговор на разнообразни сигнали.

15.4.3 Посттранскрипционна регулация

15.4.3.1 Регулация на генната експресия на ниво снаждане (сплайсинг)

В различни тъкани или в различни периоди на развитието снаждането на една прекурсорна иРНК може да се извърши по различен начин (алтернативно снаждане) и да се получат различни зрели иРНК. Това е един от начините за регулация на генната експресия в клетката. Участието на голям брой белтъци и мяРНК в този процес и неговата многостъпалност дават възможност за съответни промени в първичната структура на РНК.

От друга страна, с грешки в снаждането се обяснява заболяването β -таласемия, при което не се образува нормална β -верига в хемоглобин. Промяна в нуклеотид на границата между екзон и интрон не позволява отстраняването на интрона и обръква рамката на четене на иРНК при белтъчната синтеза.

15.4.3.2 Алтернативни места за полиадениране

Освен чрез генно пренареждане, гените за антителата се регулират и чрез промени в полиаденирането. Пре-В-лимфоцитите произвеждат IgM, чиито молекули са свързани към мембраната чрез хидрофобен участък в карбоксилния край. След диференцировката на тези клетки се използва алтернативно полиадениращо място, при което се образува друг IgD с по-къса верига и хидрофилен край, който не се прикрепва към мембраната, а се секретира извън клетката.

15.4.3.3 Посттранскрипционно редактиране на иРНК

Пример за промяна в секвенцията на иРНК след приключване на транскрипцията дават аполипопротеини В100 (интегрален белтък в ЛПМНП) и В48 в хиломикроните. АпоВ100 (4536 аминокиселинни остатъка) се синтезира в черния дроб, като генът се експресира 100 %. Същата иРНК се използва в червата, но под действие на цитидин дезаминаза в триплета ЦАА (кодиращ Глн) цитозин се дезаминира и ЦАА се превръща в УАА. УАА е стоп сигнал и се получава верига, дълга 48 % от тази в черния дроб.

15.4.3.4 Регулация чрез промени в транспорта и стабилността на иРНК

В еукариоти иРНК се придвижва от ядрото до рибозомите, свързана към белтъци, които я предпазват от разрушаване. При прокариоти полуживотът на иРНК е много къс (минути). В еукариоти полуживотът на иРНК се измерва с часове до дни.

В 3'-края на иРНК има участъци, образуващи вътрешни бримки, за които се предполага, че имат значение за определяне полуживота на иРНК.

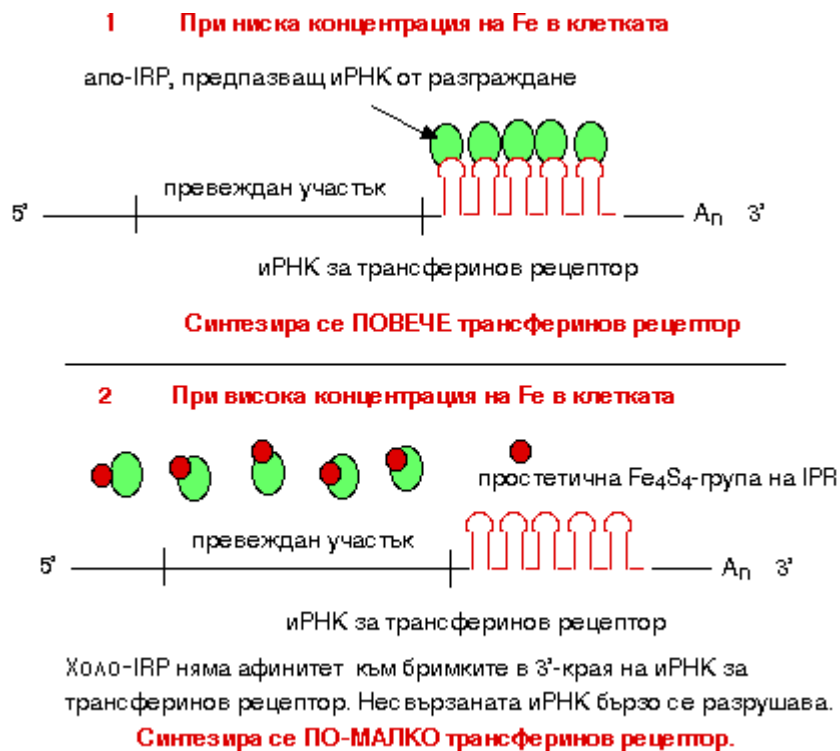
ПолиА-опашката също може да предпазва иРНК от разграждане. Известно е, че полуживотът на иРНК за хистони, които единствено нямат полиА-опашка, е < 30 мин.

Към полиА-опашката се свързват стехеометрично много молекули на РABP (полиА-свързващ протеин). Когато остатъчната полиА-опашка съдържа по-малко от 10 нуклеотиди и не може да взаимодейства с този белтък, иРНК бързо се разгражда от ендо- и екзо-нуклеази.

Интересен е примерът с рецептора за трансферин (фиг. 15-10 и фиг. 15-11). Трансферин пренася Fe в кръвта и за него по повърхността на клетките има рецептори.

Синтезата на трансфериния рецептор се регулира от свързването на специален Fe-регулаторен белтък (IRP) към бримки в 3'-края на иРНК. При ниска концентрация на Fe в клетката не се формира простетичната Fe₄S₄-група на IRP и той е под форма на апо-IRP. Апо-белтъкът има висок афинитет към бримките в 3'-края на иРНК, свързва се към тях и предпазва иРНК за трансфериния рецептор от разрушаване. Синтезира се **ПОВЕЧЕ** трансфериния рецептор.

Обратно, при високо съдържание на Fe, IRP свързва желязото под форма на Fe₄S₄-простетична група и има нисък афинитет към бримките в 3'-края на иРНК, не се свързва с нея и тя бързо се разгражда. Вследствие на това не се синтезира трансфериния рецептор.



Фиг. 15-10. Регулация на синтезата за трансфериния рецептор чрез повлияване стабилността на иРНК

Бримките в 3'-края на иРНК за трансфериния рецептор са място за свързване на Fe-регулаторен белтък (IRP).

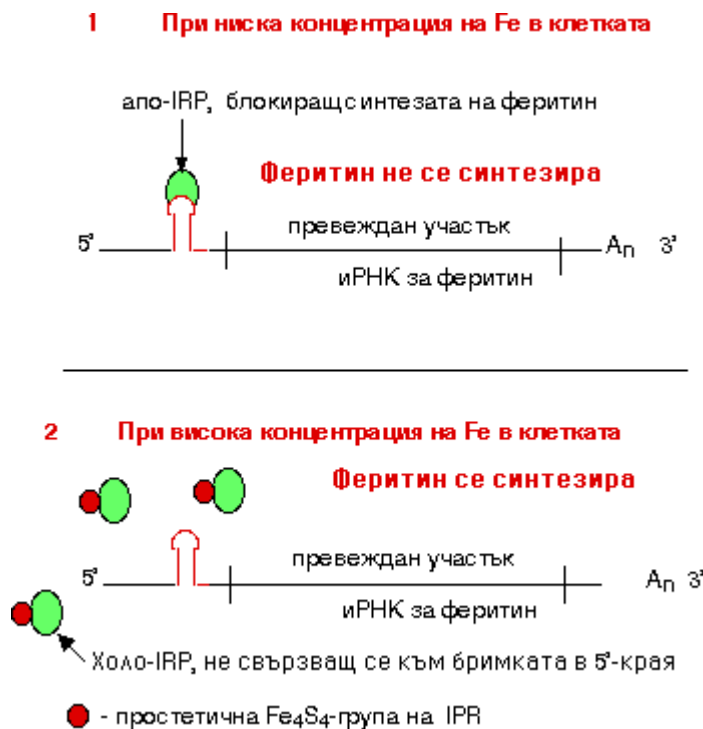
15.4.4 Регулация на ниво транслация

Разгледан бе ефектът на инсулин върху инициацията на транслацията (гл. 14).

Друг пример има при феритин. Това е белтък, който свързва и съхранява Fe в клетките. В 5'-края на иРНК за феритин (фиг. 15-11) има една бримка, свързваща Fe-регулаторния белтък IRP. Свързването повлиява инициацията на белтъчната синтеза на феритин.

Когато Fe е малко, към бримката в 5'-края на иРНК за феритин се свързва регулаторният белтък IRP и не се синтезира феритин, тъй като той не е необходим. Ако

Fe се увеличи, то свързва този белтък, променя конформацията му и той не се свързва към иРНК. Тогава се извършва транслация, т.е. синтеза на феритин.



Фиг. 15-11. Регуляция синтеза на феритин на ниво транслация.

Бримката в 5'-края е място за свързване на Fe-регулаторен белтък.

15.4.5 Посттранслационна регулация

Продължителността на живота на синтезираните белтъци се регулира и от протеолитично разграждане. Полуживотът им е от часове до дни, месеци, години. Някои белтъци се разграждат от лизозомални ензими, други от протеази в цитоплазмата. Някои от белтъците се бележат за разграждане чрез свързване с убиквитин, силно консервативен протеин, идентичен в *Drosophila* и човек.

15.5 Кратко сравнение на прокариотни и еукариотни гени

1) Локализация

В прокариоти няма ядро и ДНК е в цитоплазмата. Поради това транскрипцията и транслацията протичат едновременно.

В еукариотните клетки ДНК е локализирана основно в ядрото, а малка част - в митохондриите. Ядрото е отделено от цитоплазмата с ядрена мембрана. Транскрипцията на ДНК, т.е. синтеза на РНК протича в ядрото, а транслацията (белтъчната биосинтеза) протича в цитоплазмата.

2) Организация на гените в хромозоми

В прокариоти най-често има само една хромозома за хаплоидна клетка. ДНК е кръгова,

двойно-верижна, суперспирализирана и не е свързана с хистони, а с хистоноподобни белтъци HU, H-NS, които допринасят за нейното пакетиране. Освен ДНК и тези белтъци, бактериалните хромозоми съдържат различни йони, полиамини (спермин, спермидин, кадаверин, путресцин), РНК и нехистонови белтъци. Компактните структури на хромозомите се наричат нуклеоиди. Суперспирализираната ДНК образува около 40-50 бримки, всяка съдържаща около 100 двойки бази. Бримките са прикрепени към скелет, изграден от РНК и белтъци.

Човек има 23 хромозоми за хаплоидна клетка и 46 за диплоидна клетка. В диплоидните клетки има по две копия от всяка хромозома, наричани хомоложни хромозоми. Едната хомоложна хромозома е наследена от майката, а другата от бащата. Гените от едната хромозома са алели на гените от другата хромозома. Алелите може да са идентични или да се различават.

ДНК в еукариоти е линейна и свързана с хистонови белтъци и нехистонови белтъци, както е разгледано в глава 3.

3) Размери на генома

В прокариоти всички клетки са полови, хаплоидни. Геномът напр. на *E. coli* съдържа 4×10^6 bp за хаплоидна клетка. Няма диплоидни соматични клетки.

Геномът в еукариоти е диплоиден в соматични клетки и хаплоиден в половите клетки. В хаплоидна клетка на човек има 3×10^9 bp. Любопитно е, че геномът на жаба съдържа 4×10^9 bp, а този на грах - 2×10^{10} bp [2]. Т.е. сложността на организма не се определя само от големината на генома.

4) Уникалност и повтораемост на гените

В прокариоти всички гени са уникални, няма повтарящи се гени.

В еукариоти около 75 % от гените са уникални. Останалите около 25 % са повтарящи се.

5) Екзони и интрони

Гените на прокариоти не съдържат междинни некодиращи последователности (интрони).

Гените на еукариоти съдържат екзони (кодиращи последователности) и интрони.

6) Продукти на транскрипцията на гените - иРНК

В прокариоти иРНК е полицистронна, т.е. носи информация за няколко белтъка. В 5'-края няма шапка, в 3'-края няма полиаденилова опашка.

В еукариоти иРНК е моноцистронна. Поради наличие на интрони първичните транскрипти на гените, т.е. предшествениците на зрелите иРНК са много по-високомолекулни (средно около 10 пъти) от зрелите иРНК.

7) Оперони и регулация на генната експресия

В прокариотите структурните гени са организирани в оперони. Оперонът се състои от набор структурни гени, кодиращи функционално свързани белтъци, под контрол на един промотор или регулаторен участък. Генната експресия се контролира главно чрез повлияване транскрипцията на опероните. Регулаторни белтъци се свързват към промотора и инхибират или улесняват свързването на РНК полимеразата.

В еукариоти оперони няма. Всеки ген за полипептидна верига се контролира от собствен промотор. Регулацията на генната експресия зависи от много фактори и може да се извършва:

- на нивото на ДНК
- чрез промяна в достъпността на ДНК
- чрез химическа модификация на базите
- отпадане на гени
- умножаване (амплификация) на гени
- чрез пренареждане на гени

- на нивото на транскрипцията
- по време на зреенето на РНК
- при транспорта на РНК от ядрото към цитоплазмата
- в цитоплазмата, на нивото на трансляцията.

Даден ген може да бъде едновременно регулиран на няколко нива.

15.6. Пример за приложение на познанията в клиничната практика.
Роля на тройноверижни участъци в ДНК за регулацията на генната експресия

Наличието на полипуринови и полипиримидинови участъци в ДНК позволява образуване на тройноверижни участъци в ДНК, което може да пречи на свързването на регулаторни белтъци като транскрипционни фактори или да променя нивото на ДНК суперспирализация в този участък и така да пречи на генната експресия.

Пример за полипуринов-полипиримидинов участък има в промотора на човешкия *c-myc* онкоген [3]. Този участък, който взаимодейства с транскрипционни фактори, може да образува тройна верига със синтетичен специфичен комплементарен олигонуклеотид. Това води до инхибиране на транскрипцията на *c-myc in vitro*.

Този пример показва, че е възможно чрез образуване на вътрешно-молекулни тройноверижни участъци да се регулира експресията на специфични гени в норма и патология. Много перспективно е чрез синтетични специфични олигонуклеотиди, свързващи се като трета верига в определени участъци на ДНК, да се включват или изключват определени гени.

Такива специфични олигонуклеотиди могат да бъдат свързани и със специфични ензими, които могат да изрязват или модифицират ДНК в определени участъци. Това е друг интересен подход за контрол на генната експресия в туморни клетки, или в клетки, инфектирани с вирус [4].

15.7. Насоки за самостоятелна работа

1. При синдрома на чупливата хромозома има многократно увеличение на повтора ЦГЦ в 5'-нетранскрибиращия се край на гена FMR1. Това индуцира метилиране на ДНК в целия промотор на гена.

Изберете верния отговор от предложените по-долу:

Метилирането на ДНК в промотора

1. улеснява транскрипцията на ДНК
2. улеснява свързването на транскрипционни фактори към ДНК
3. превръща ДНК в транскрипционно неактивна
4. активира енхансерите за този ген
5. пречи на разтварянето на хроматина

Верен отговор: 3. Метилирането на целия промотор на гена FMR1 прави невъзможна транскрипцията.

1, 2, 4 - улеснена транскрипция, улеснено свързване на транскрипционни фактори и активиране на енхансерите е невъзможно при метилиране на промотора.

5 - Разгъването на хроматин в този район е необходимо, но метилирането на ДНК не повлиява директно разгъването.

Виж също т. 13.8.3.

2. Какво представлява енхансерът? Посочете верните отговори:

1. участък от ДНК, който е част от основния транскрипционен комплекс в еукариоти
2. вид транскрипционен фактор
3. участък, който осигурява базалната експресия
4. участък, който осигурява регулираната експресия
5. участък, различно отдалечен преди или след стартовата точка
6. участък, който медира ефекта на различни сигнали (хормони, топлинен шок, тежки метали и др.)

Верни отговори: 4, 5, 6.

Виж т. 13.4.3.

15.8. Литература

1. Jacob, F., Monod, J., J. Mol. Biol. 3, 1961, 318-356. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins.
2. 3. Marks, D. B., A. D. Marks, C. M. Smith (1996) Basical Medical Biochemisrty. A Clinical Approach. Williams and Wilkins, Baltimore, 806 pages, p. 223.
3. Kinniburg, A. J. Nucleic Acids Res. 17, 1989, 7771. A cis-acting transcription element of the *c-myc* gene can assume a H-DNA conformation
4. Pei, D., Corey, D. R. and Schulz, P. G. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1990, 9858. Site specific cleavage of duplex DNA by a semisynthetic nuclease via triple-helix formation.