

KONTROLA EKSPRESJI GENU

WYKŁAD V

Komórki nie eksprymują swoich wszystkich genów przez cały cykl życiowy

Komórki ssaków

- **zachowują pełną informację genetyczną organizmu**
- **są zróżnicowane i wyspecjalizowane**
 - Np. komórki mózgu, skóry etc

Komórki bakterii

- **zwykle niezróżnicowane i niewyspecjalizowane**
- **poszczególne geny ulegają zróżnicowanej ekspresji w zależności od warunków środowiska**

Zróżnicowana regulacja genów bakteryjnych

Przykład

- Wiele bakterii ma zdolność wzrostu na podłożach zawierających różne cukry jak laktoza, maltoza lub glukoza
- Bakterie te syntetyzują jedynie enzymy niezbędne do wykorzystania cukru dostępnego w pożywce
- Enzymy potrzebne do wykorzystania innych cukrów nie ulegają ekspresji

Implikacje:

- Bakterie potrafią wykryć jaki cukier znajduje się w pożywce
- Bakterie potrafią intensyfikować ekspresję potrzebnych genów oraz hamować ekspresję genów mniej ważnych

Na jakim poziomie zachodzi regulacja ekspresji genów u bakterii?

Transkrypcja

Brak mRNA = Brak białka

- **Niski poziom mRNA = niska koncentracja określonego białka**

Regulacja na poziomie transkrypcji występuje najczęściej i jest najbardziej korzystna energetycznie

Translacja

- Regulacja na poziomie translacji kontroluje tempo syntezy białka przez rybosomy
- mRNA kodujące tak regulowane białka ulega ekspresji w sposób ciągły
- Synteza swoistego białka jest uruchamiana lub zatrzymywana

Strategie kontrolowania inicjacji transkrypcji u bakterii



Kontrola konstytutywna, zależna od struktury promotora

✧ Struktura promotora określa podstawowy poziom inicjacji transkrypcji.

✧ **Silne promotory** - 1000 x więcej efektywnych inicjacji niż w przypadku słabych promotorów

Regulacja inicjacji transkrypcji zależna od działania białek regulatorowych:

✧ represorów

✧ induktorów

✧ aktywatorów (białko CAP)

✧ wzmacniaczy i wyciszaczy (enhancers & silencers - rzadko)

SEKWENCJE PROMOTORÓW GENÓW *E. coli* odgrywają zasadniczą rolę w regulacji transkrypcji

TTGACA.....16-18 pz.....TATAAT.....5-8 pz.....C(G/A)T

Sekwencja –35

sekwencja -10

+1

Stanowi region wiązania czynnika sigma polimerazy RNA i oddziaływania z nią

- Obecność sekwencji zachowawczych w sekwencji promotora genu
 - BRAK - wymagane dodatkowe czynniki – aktywatory (np. CRP=CAP)
 - Konieczność obecności specyficznego czynnika sigma (promotory białek szoku cieplnego)
- Sekwencja pierwszych 30 zasad podlegających transkrypcji decyduje o szybkości opuszczenia promotora przez polimerazę, a to prowadzi do tworzenia się ponownego kompleksu inicjującego:
 - Stopień ujemnego zwinięcia sekwencji ulegającej transkrypcji (wiąże się z zdolnością rozplatania DNA przez polimerazę, im bardziej superzwinięte DNA, tym łatwiej ulega ropleceniu)
- Proces poronnej inicjacji

Inicjacja transkrypcji

Alternatywne czynniki sigma u *E. coli*

- . σ 70-wariant główny
- . σ 54-rozpoznaje geny metabolizmu azotu
- . σ 32-rozpoznaje geny aktywowane w wysokiej temperaturze
- . σ S-rozpoznaje geny stacjonarnej fazy wzrostu
- . σ F-rozpoznaje geny kodujące białka wici
- . σ E-rozpoznaje geny kodujące białka wydzielane na zewnątrz komórki
- . σ FecI-rozpoznaje geny kodujące białka transportu żelaza

Strategie kontrolowania inicjacji transkrypcji u bakterii



Kontrola konstytutywna, zależna od struktury promotora

* Struktura promotora określa podstawowy poziom inicjacji transkrypcji.

* **Silne promotory** - 1000 x więcej efektywnych inicjacji niż od słabych promotorów

Regulacja inicjacji transkrypcji zależna od działania białek regulatorowych:

❄ represorów

❄ induktorów

❄ aktywatorów (białko CAP=CRP)

❄ wzmacniaczy i wyciszaczy (enhancers & (silencers - rzadko)

Operon bakteryjny

- Operon obejmuje grupę genów kodujących białka uczestniczące w tym samym szlaku metabolicznym znajdujących się pod kontrolą wspólnego promotora

Elementy składowe operonu:

- **Geny strukturalne – kodują enzymy i inne białka**
- **Geny regulatorowe – kodują białka regulatorowe, które rozpoznają sekwencje operatora**
- **promotor = sekwencje do których przyłączają się polimeraza RNA, białka regulatorowe**
- **Sekwencja operatorowa = sekwencja z którą wiąże się produkty genów regulatorowych (represory)**
- **Promotor, operator i geny są w operonie ułożone liniowo**

OPERON *lac* – operon laktozowy



I: koduje monomer represora lac

P: promotor – miejsce wiązania polimerazy RNA

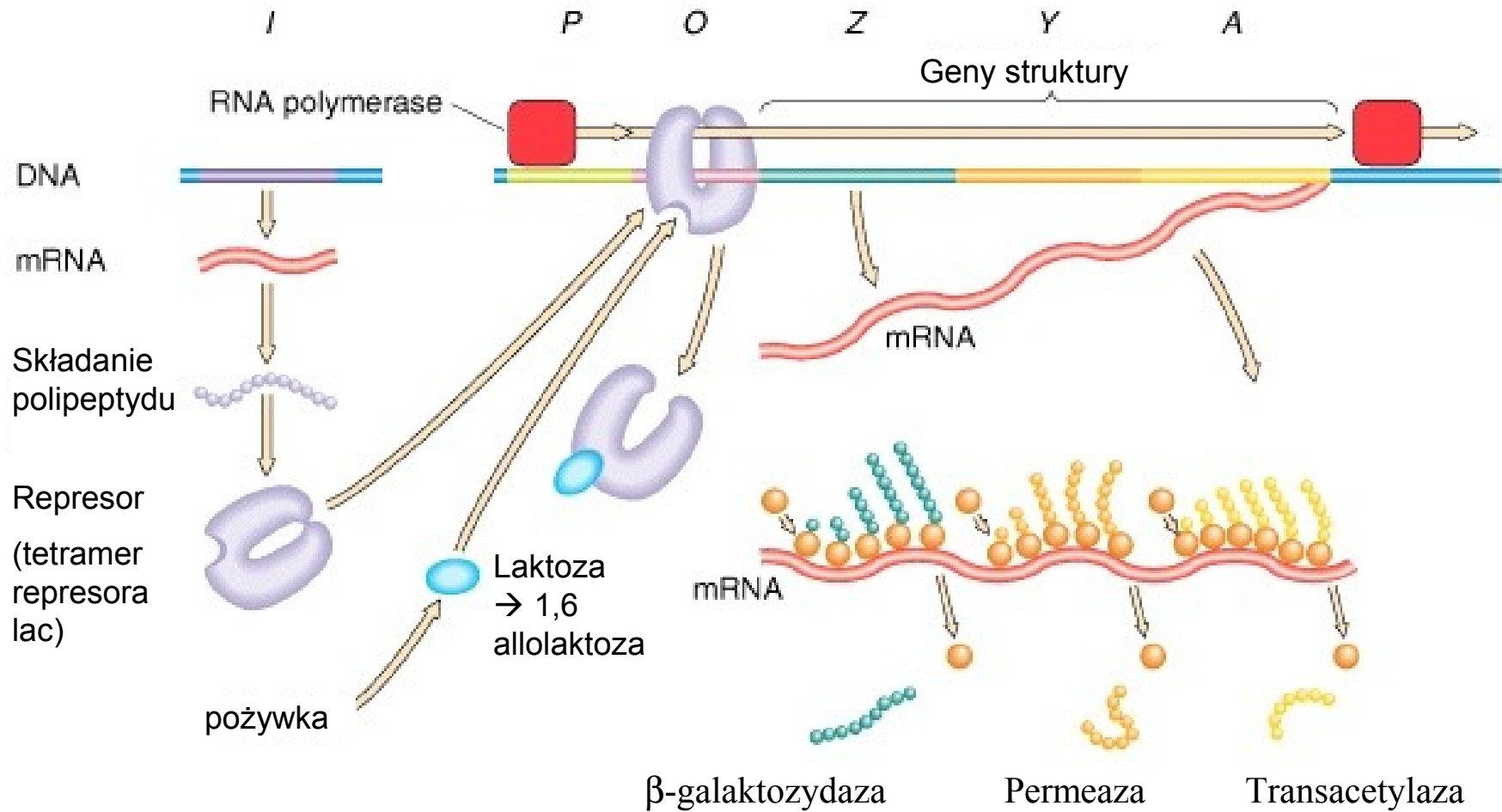
O: operator – miejsce wiązania represora Lac

lacZ: koduje β -galaktozydazę - hydrolizuje laktozę na glukozę i galaktozę

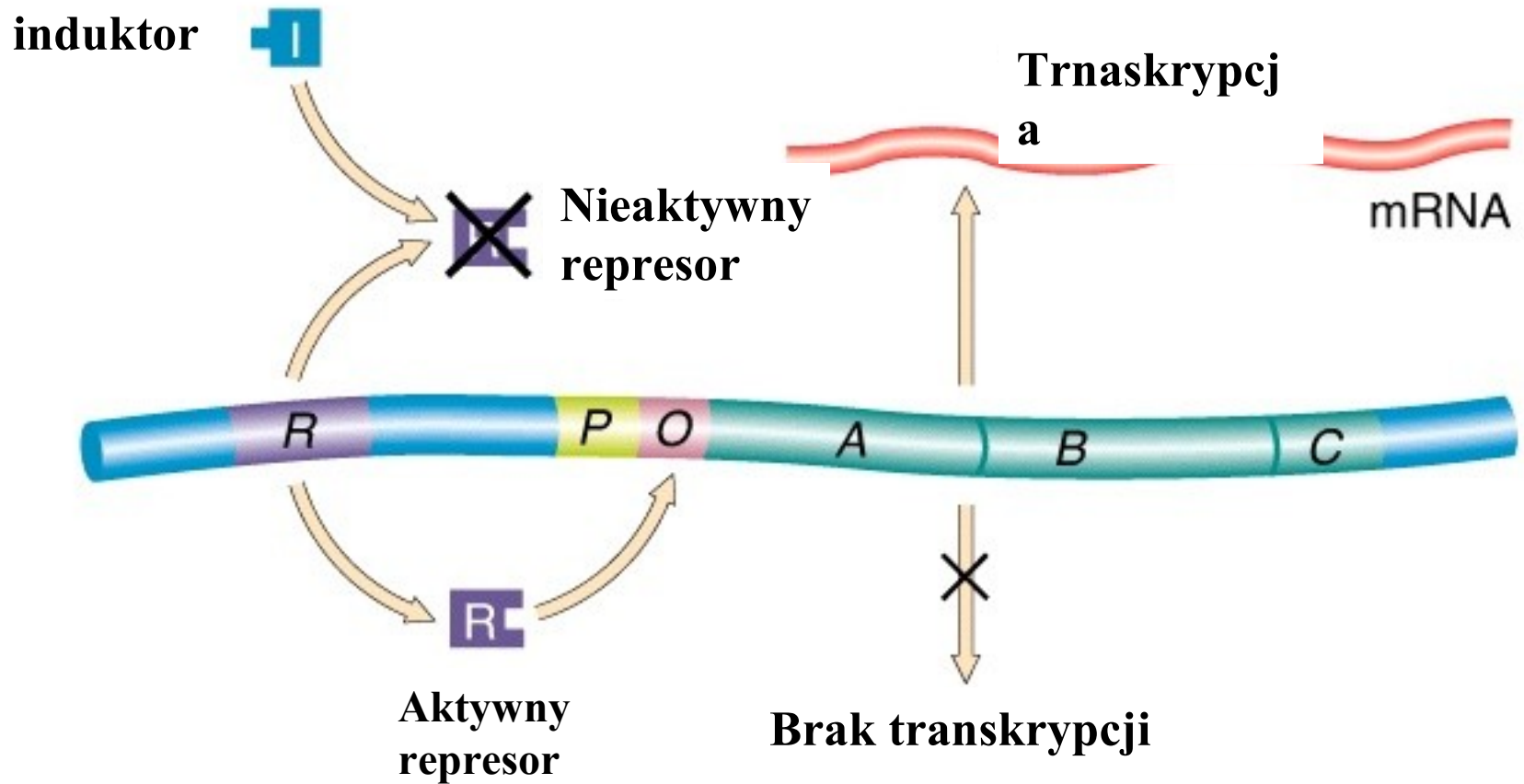
lacY: koduje permeazę laktozową - transportującą laktozę do komórki

lacA: koduje transacetylazę galaktozydu - rola biologiczna nieznana

OPERON *lac* : podsumowanie



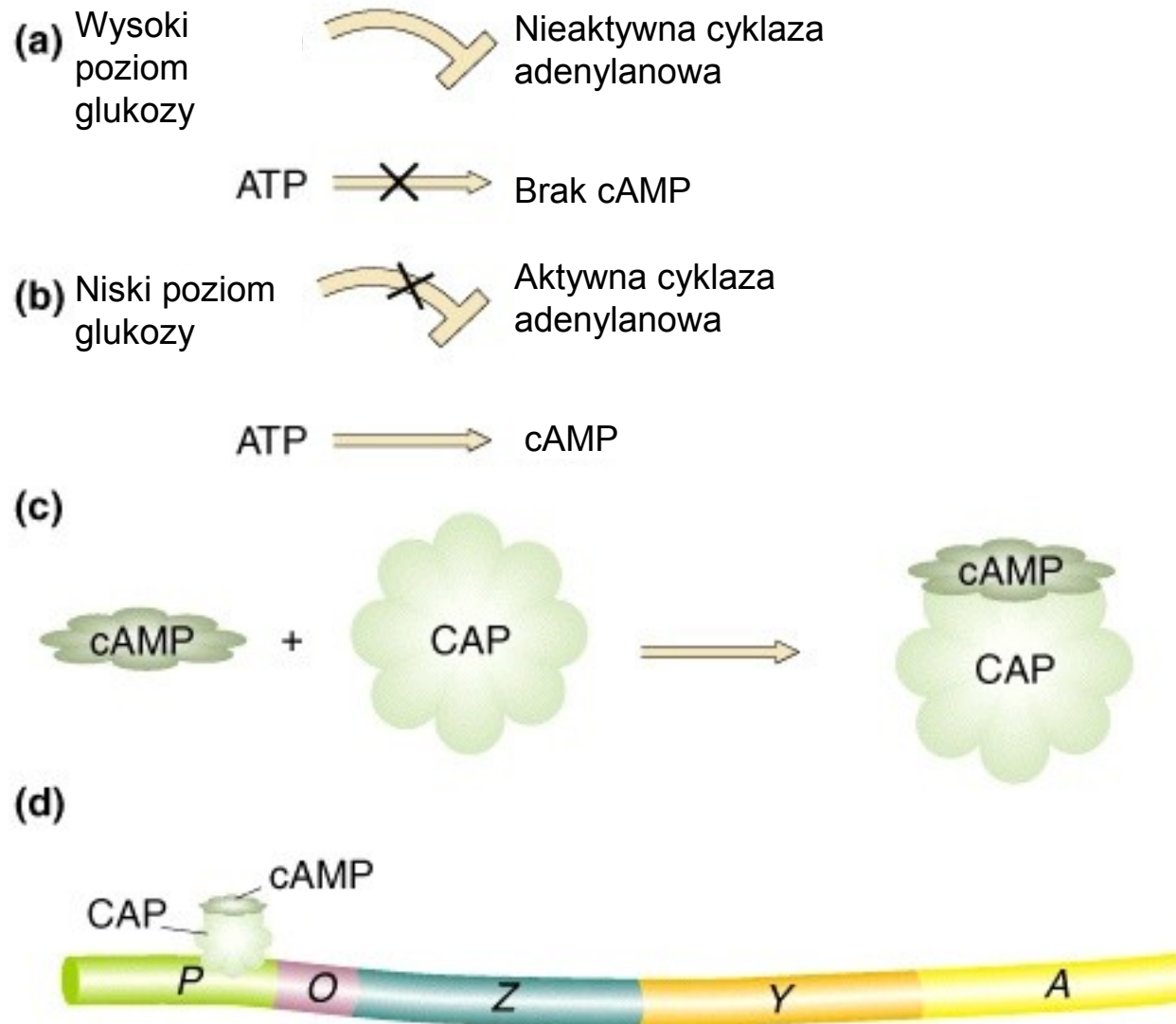
(a) Kontrola negatywna



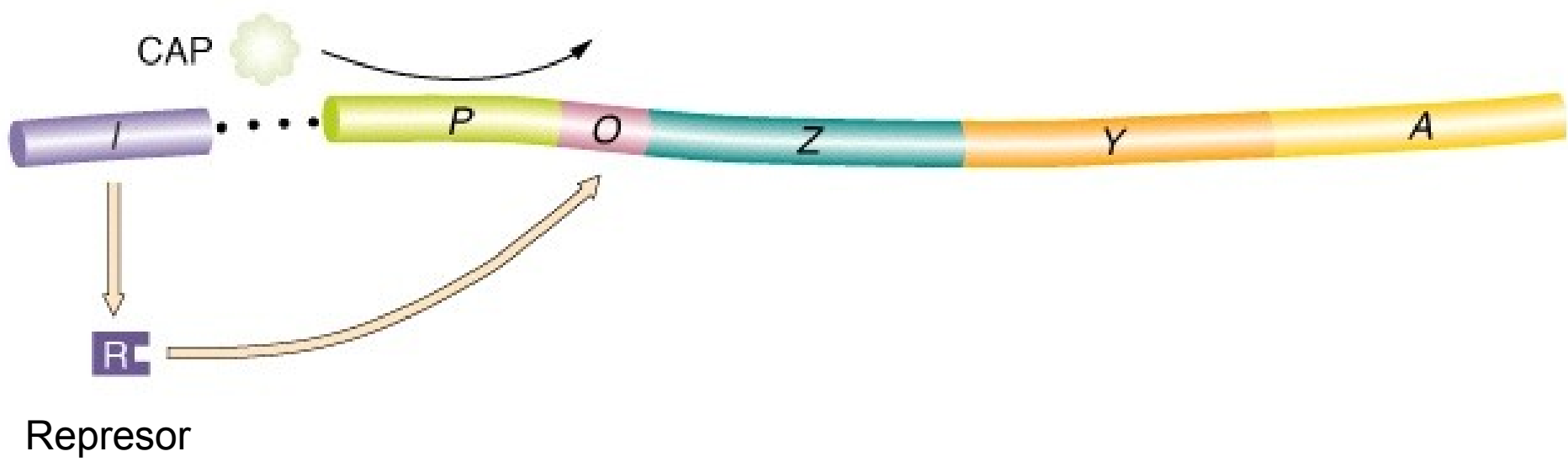
Represja kataboliczna operonu *lac*

- Regulacja operonu *lac* jest w rzeczywistości bardziej złożona
- Dodatkowy system pozytywnej kontroli uzupełnia pośredniczoną przez LacI represję
- Jeżeli zarówno glukoza jak i laktoza są obecne w pożywce to wykorzystywana jest najpierw glukoza
- Glukoza aktywnie hamuje ekspresję operonu *lac* pośredniczoną przez cAMP i białko aktywujące katabolit (catabolite activator protein – CAP = białko receptorowe cAMP = CRP) kodowane przez gen *crp*
- Proces ten jest nazywany **represją kataboliczną**

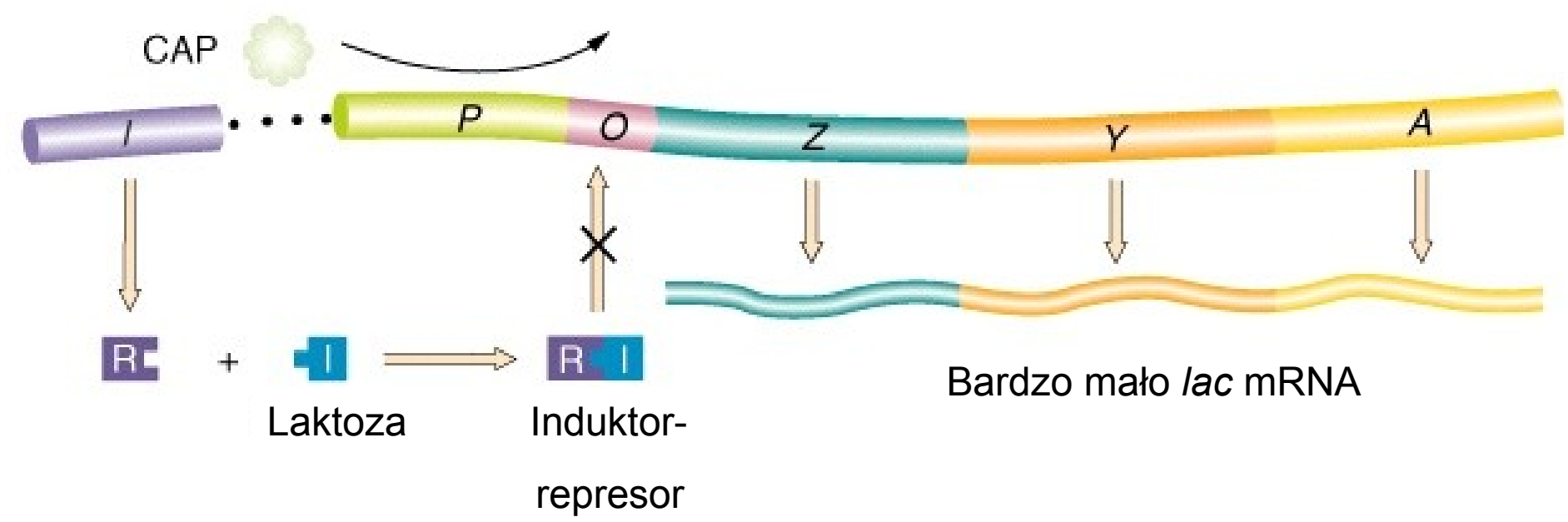
Kataboliczna represja operonu *lac*



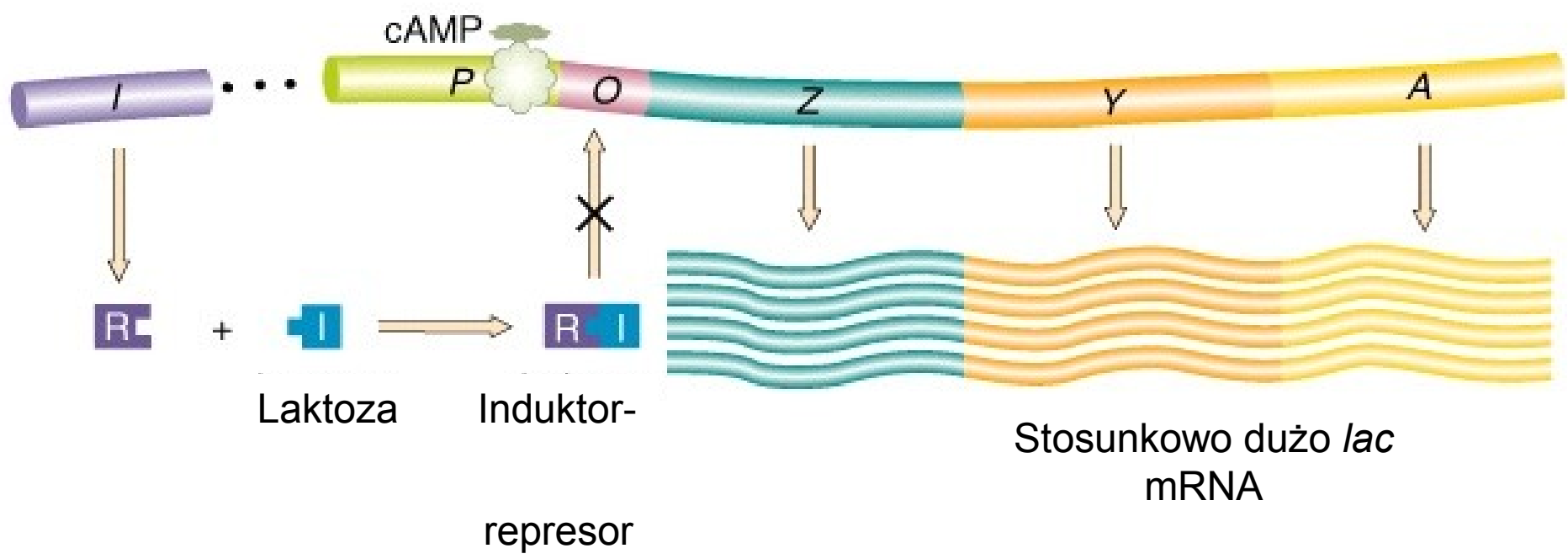
(a) Obecność glukozy (cAMP); brak laktozy, brak *lac* mRNA



(b) Obecność glukozy (niski poziom cAMP); obecność laktozy



(c) Brak glukozy (wysoki poziom cAMP); obecność laktozy



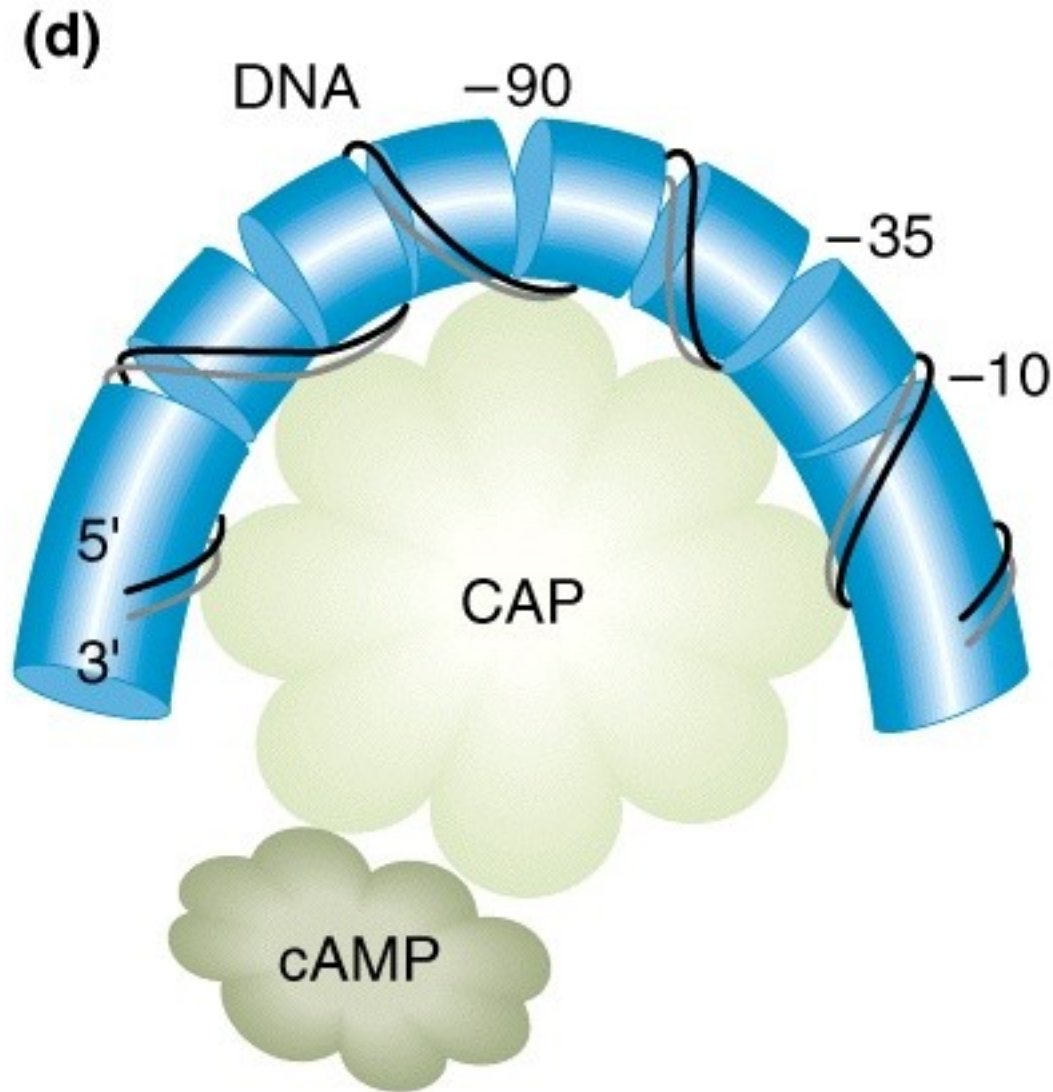
Białka allosteryczne

- **Represory i aktywatory transkrypcji należą do białek allosterycznych**
- **Białka takie przybierają co najmniej 2 stany konformacyjne**
- **Allosteryczne represory i aktywatory mają 2 różne miejsca:**
 - **Miejsce wiązania swoistego allosterycznego efektora.**
 - **miejsce wiązania DNA .**
- **Białka allosteryczne zmieniają konformację po związaniu z allosterycznym efektem**
- **Ta zmiana konformacji zmienia zdolność wiązania DNA przez represor lub aktywator.**

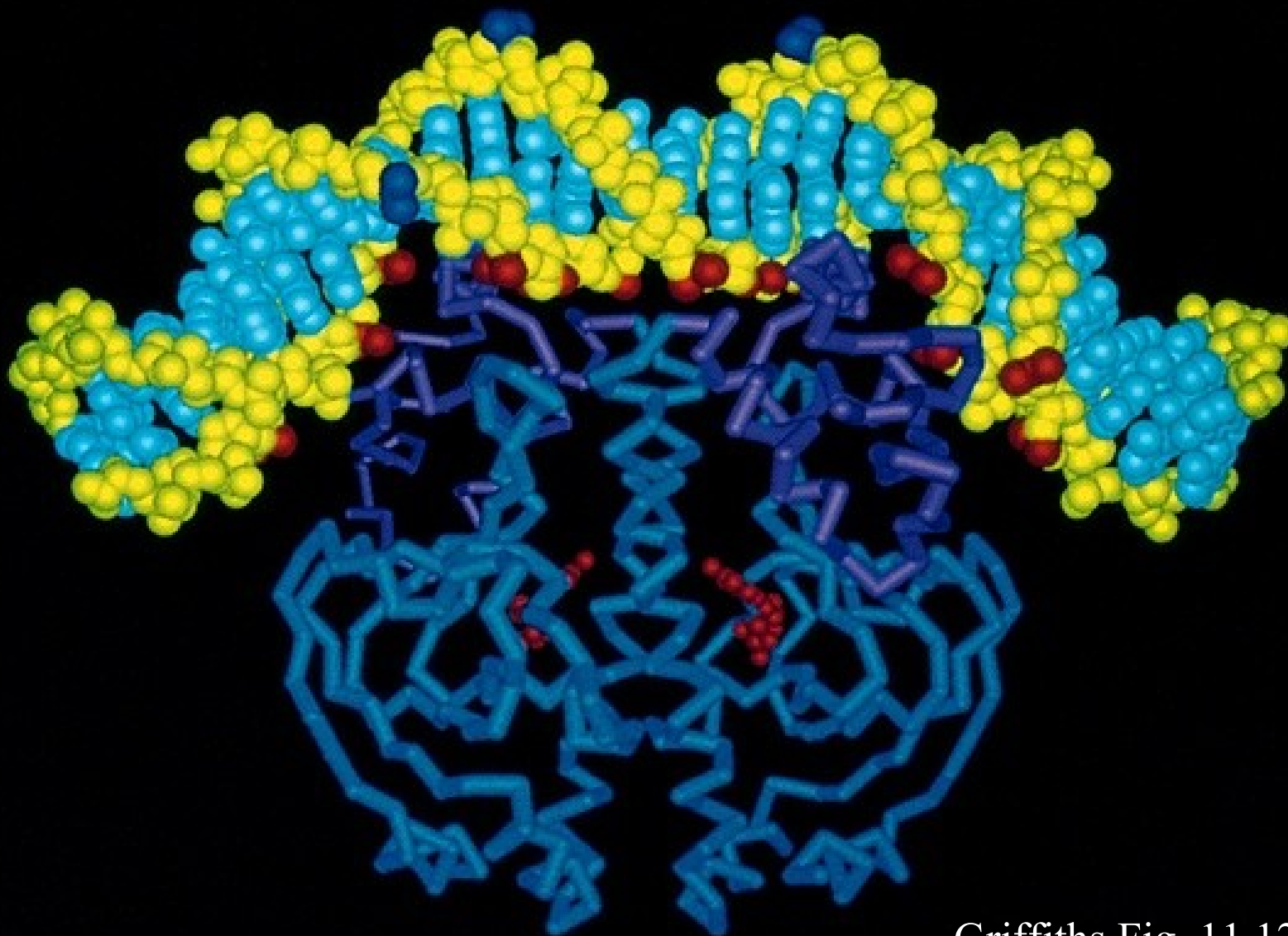
Mechanizm działania CAP

- Białko CAP ma właściwości allosteryczne, po związaniu z cAMP potrafi wiązać DNA tuż za promotorem (upstreame) operonu *lac*
- Po związaniu promotora CAP wprowadza lokalne zagięcie DNA
- Zagięcie to ułatwia przyłączenie polimerazy RNA do promotora.
- Końcowym wynikiem jest aktywacja **transkrypcji**
- Ten proces aktywacji jest hamowany jeżeli represor LacI jest związany z miejscem operatorowym

Zależne od CAP zagięcie DNA

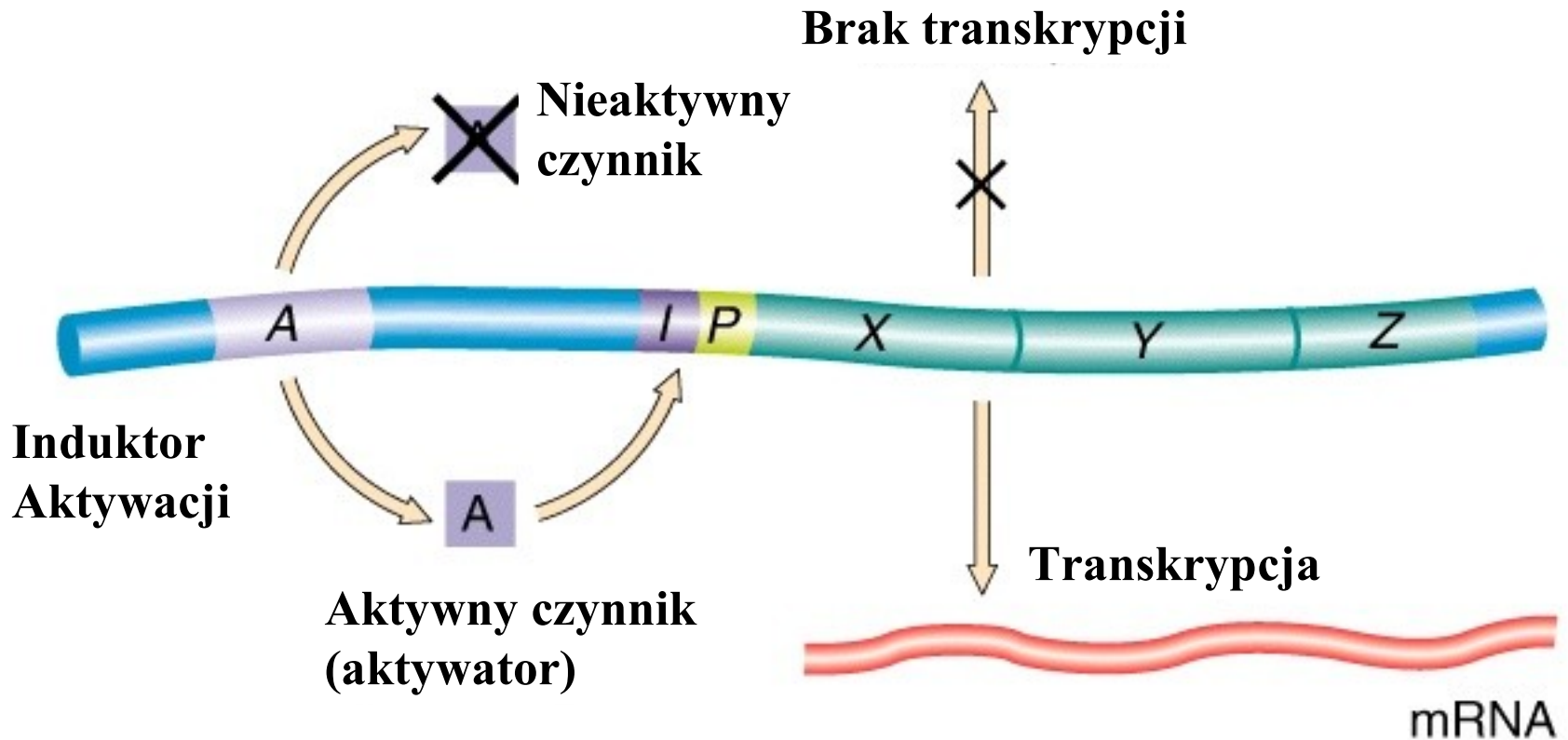


Model strukturalny CAP przyłączonego do DNA



Griffiths Fig. 11.12e

(b) Pozytywna kontrola

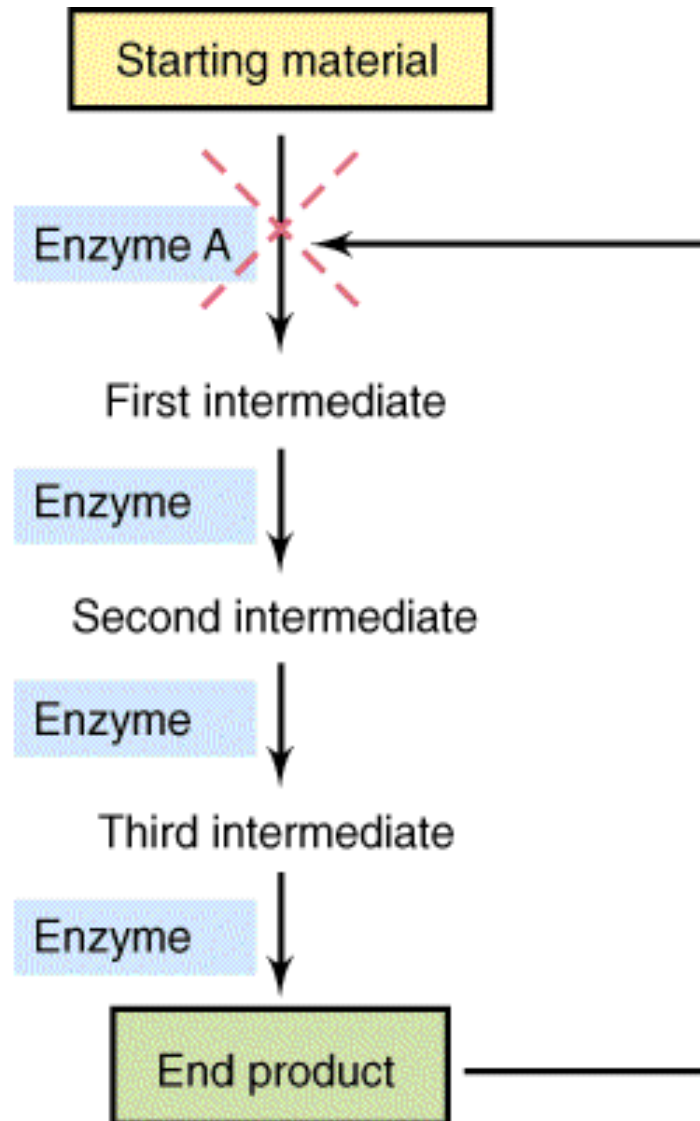


Regulacja szlaków metabolicznych

Represja

- Szlaki metaboliczne związane z biosyntezą aminokwasów są kluczowe dla przeżycia

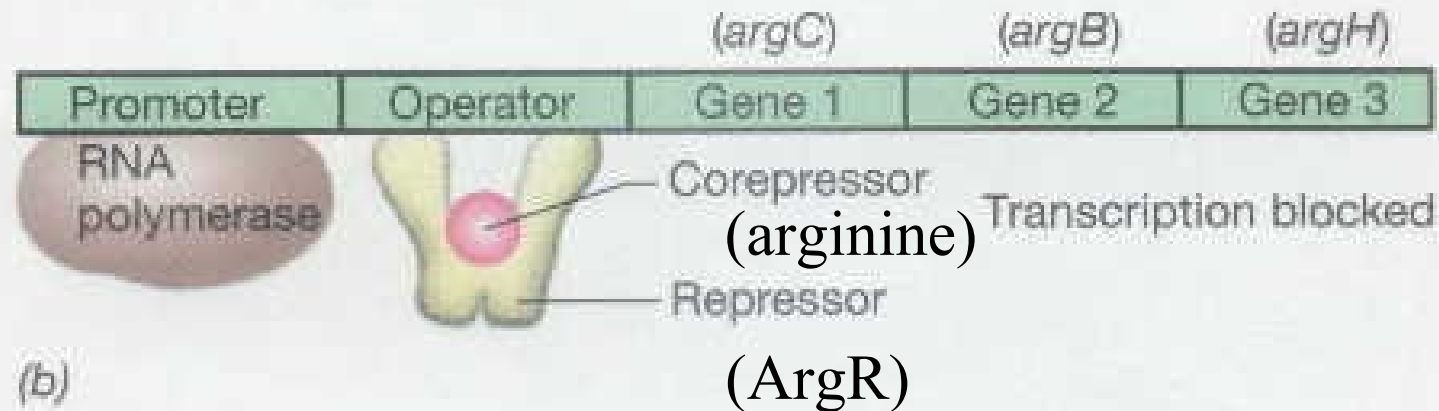
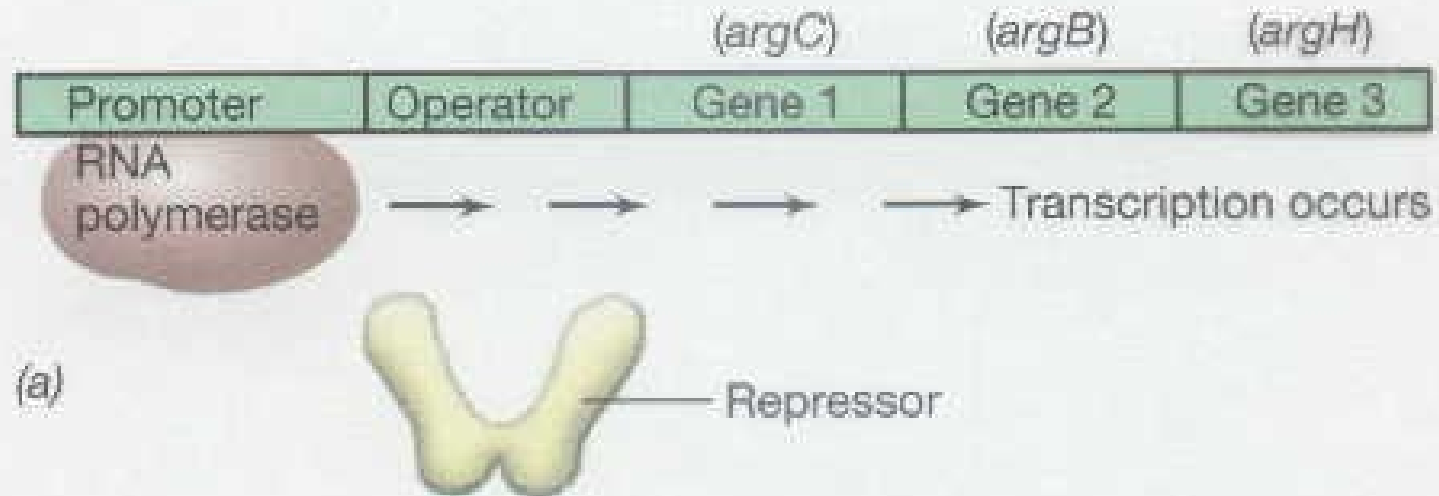
Inhibicja przez produkt końcowy



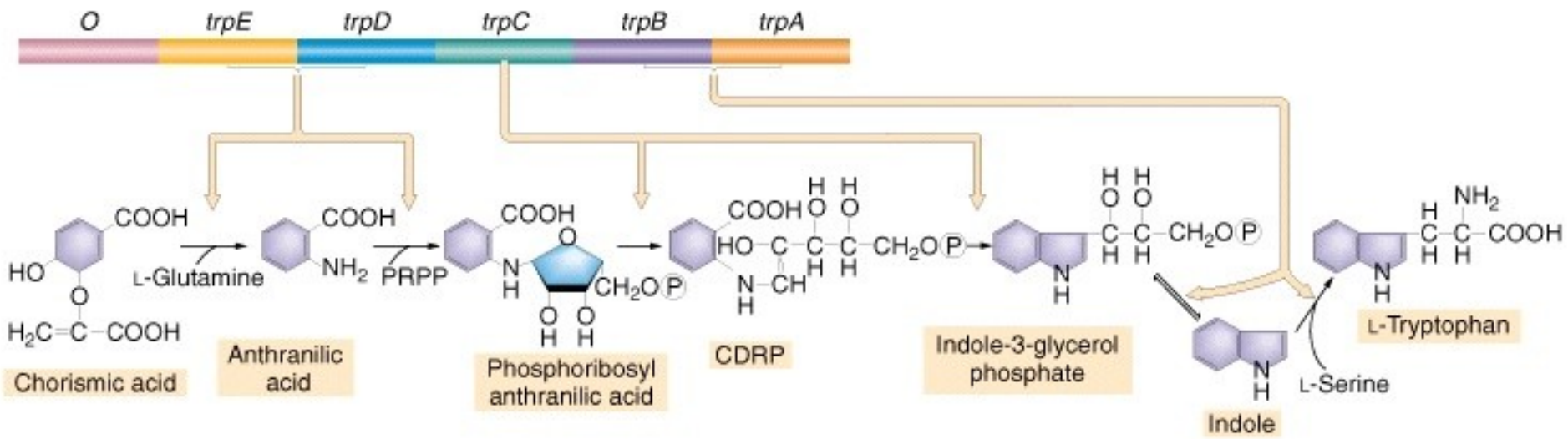
Represja przez produkt końcowy

- Wymaga produkcji allosterycznego białka represora
- Represor nie może bezpośrednio przyłączać się do miejsca operatorowego
- Represor wiąże się z produktem końcowym szlaku i:
 - zmienia swoją konformację
 - wiąże się z miejscem operatorowym
 - blokuje transkrypcję
- Przykład : biosynteza argininy u *E. coli*.

Represja operonu argininowego

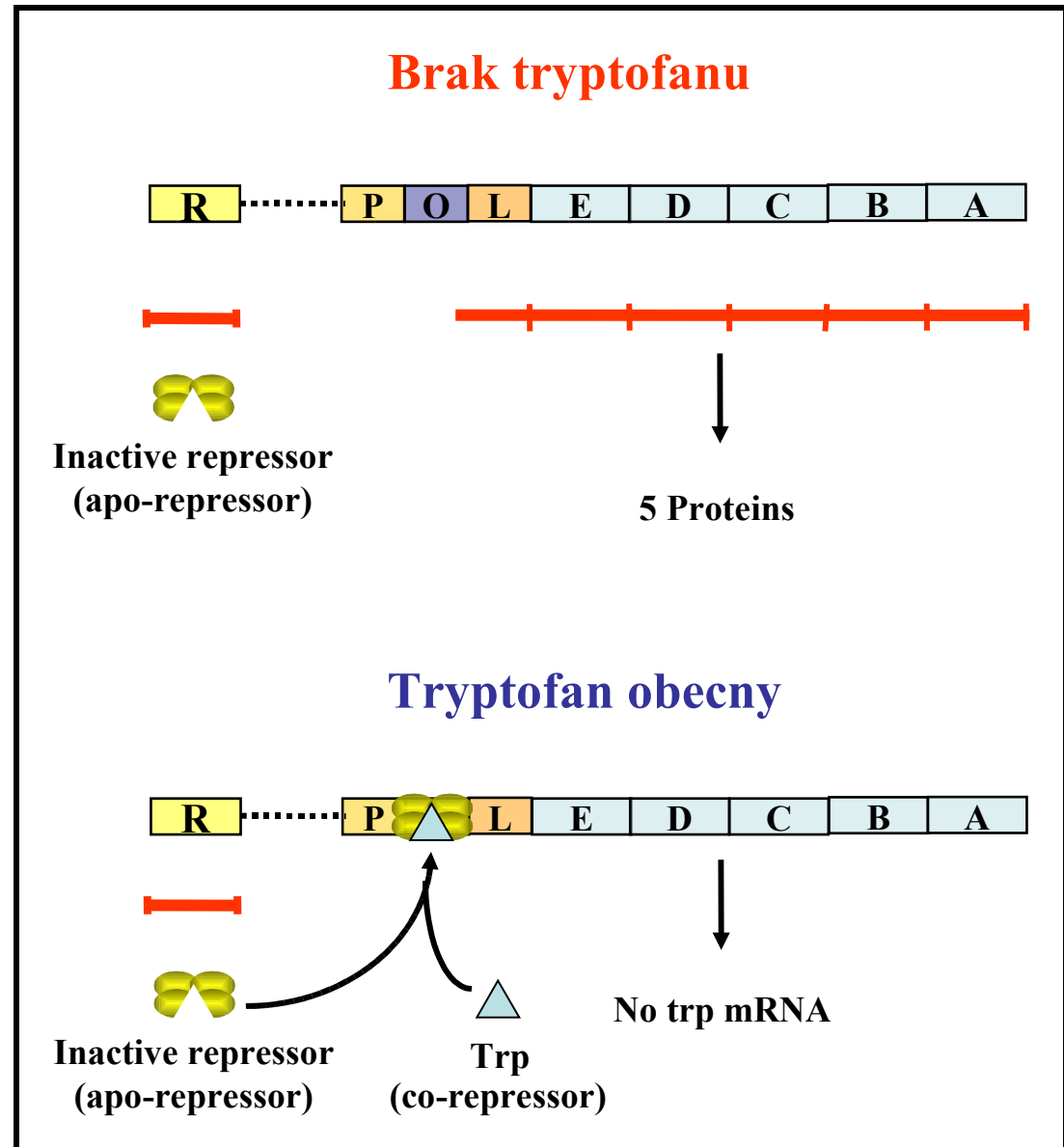


Szlak biosyntezy tryptofanu

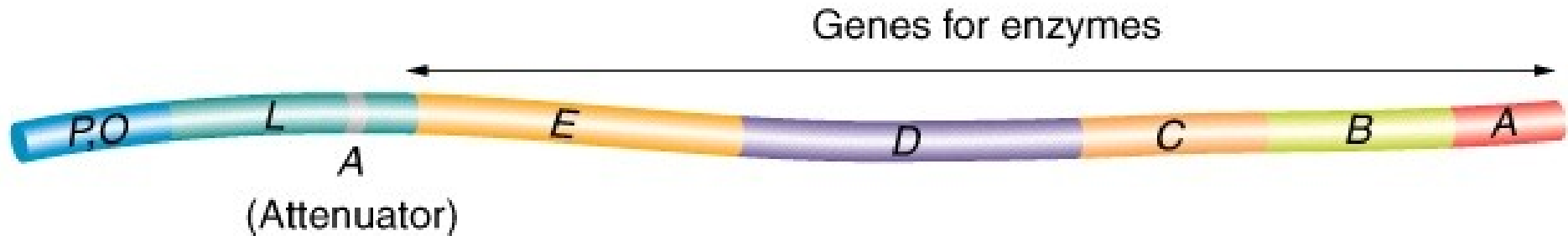


Operon Tryptofanu

- Ko-represor -- tryptofan
 - Brak
 - ekspresja genu
 - Tryptofan obecny
 - Aktywuje represor
 - ekspresja genu nie zachodzi
- Kontrola negatywna



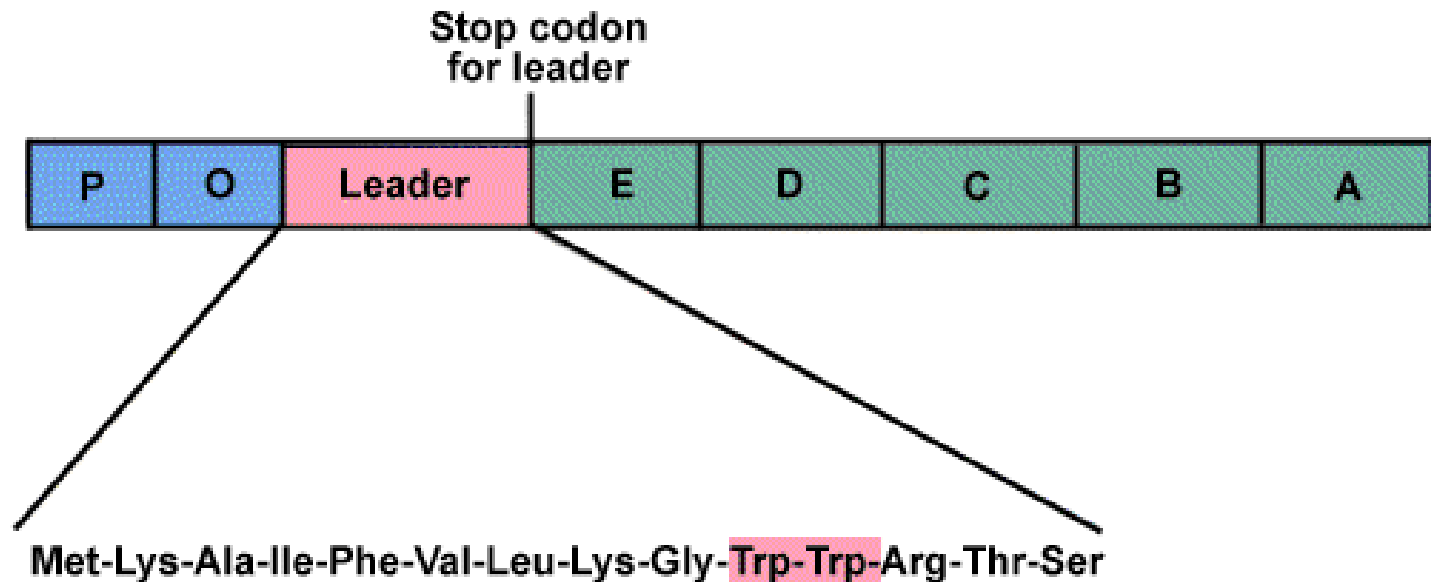
Operon *trp*



- operon *trp* jest regulowany przez represor TrpR (produkt oddzielnego operonu, wpływ 10 krotnie mniejsza ekspresja)
- ale jest jeszcze inny poziom kontroli (70 x mniejsza ekspresja)
 - znany jako atenuacja transkrypcji (**transcriptional attenuation**)
 - występuje bogata w tryptofan sekwencja liderowa (*L*)

W sumie oba mechanizmy pozwalają zmniejszać ekspresję 700 razy w zależności od stężenia tryptofanu

Region liderowy *trp*



Threonine

Met-Lys-Arg-Ile-Ser-Thr-Trh-Ile-Thr-Thr-Thr-Ile-Thr-Ile-Thr-Thr-Gly-Asn-Gly-Ala-Gly

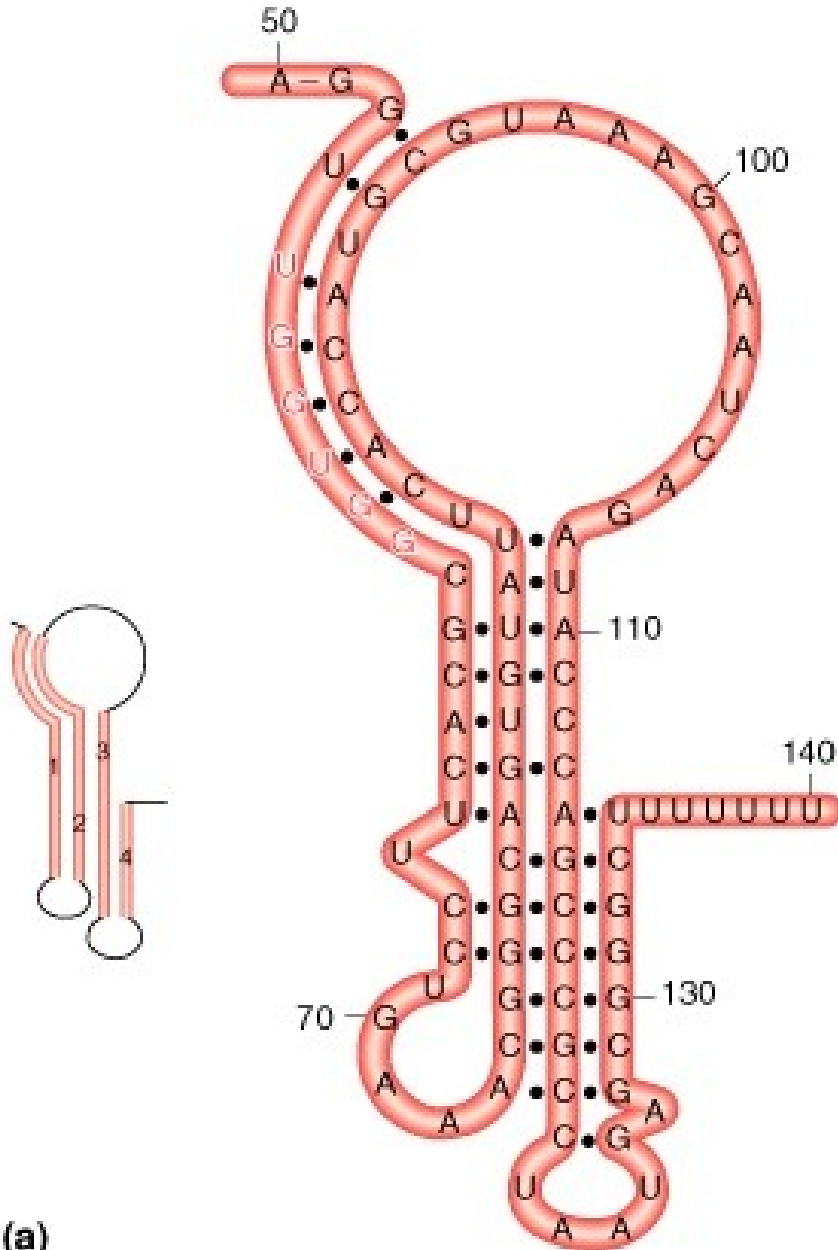
Histidine

Met-Thr-Arg-Val-Gin-Phe-Lys-His-His-His-His-His-His-His-Pro-Asp

Phenylalanine

Met-Lys-His-Ile-Pro-Phe-Phe-Phe-Ala-Phe-Phe-Phe-Thr-Phe-Pro

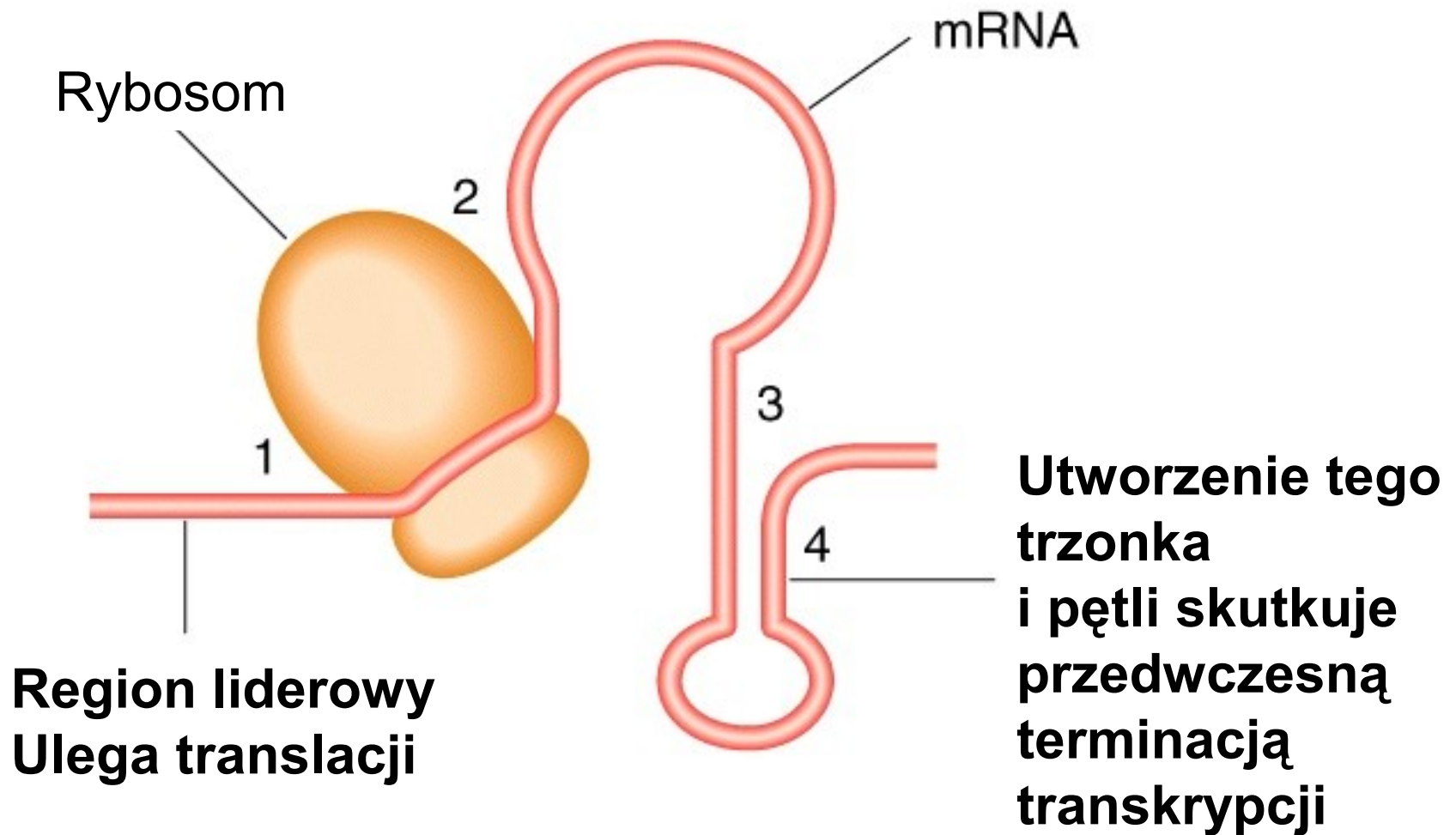
Struktura drugorzędowa mRNA lidera *trp*



- 4 regiony mogące tworzyć pętle i fragmenty dwuniciowe przez wiązania wodorowe
- segmenty 1, 2, 3 & 4
- mogą tworzyć 1:2, 2:3 i **3:4** struktury trzonka i pętli

Atenuacja operonu *trp*

- W obecności lub przy braku tryptofanu DNA kodujący peptyd regionu liderowego ulega transkrypcji do mRNA
- Przy braku tryptofanu mRNA całego operonu powstaje
- ALE .. Gdy tryptofan jest w pożywce transkrypcja zatrzymuje się (ulega atenuacji) przed genem *trpE*
- Ten proces atenuacji zależy od:
 - Cech strukturalnych liderowego regionu mRNA
 - Jednoczesnej translacji liderowego mRNA

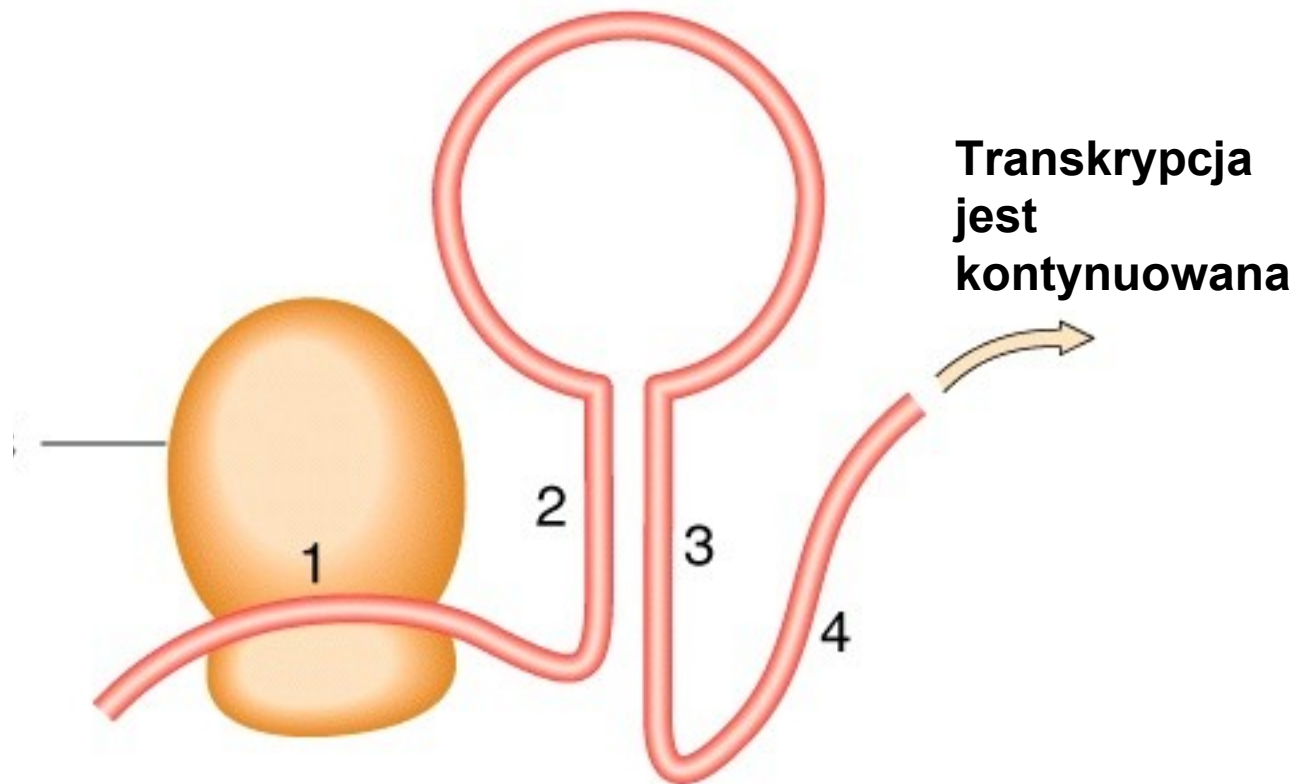


(b) **Wysoki poziom tryptofanu**

Atenuacja transkrypcji

Rybosom jest
zatrzymany na
kodonach trp

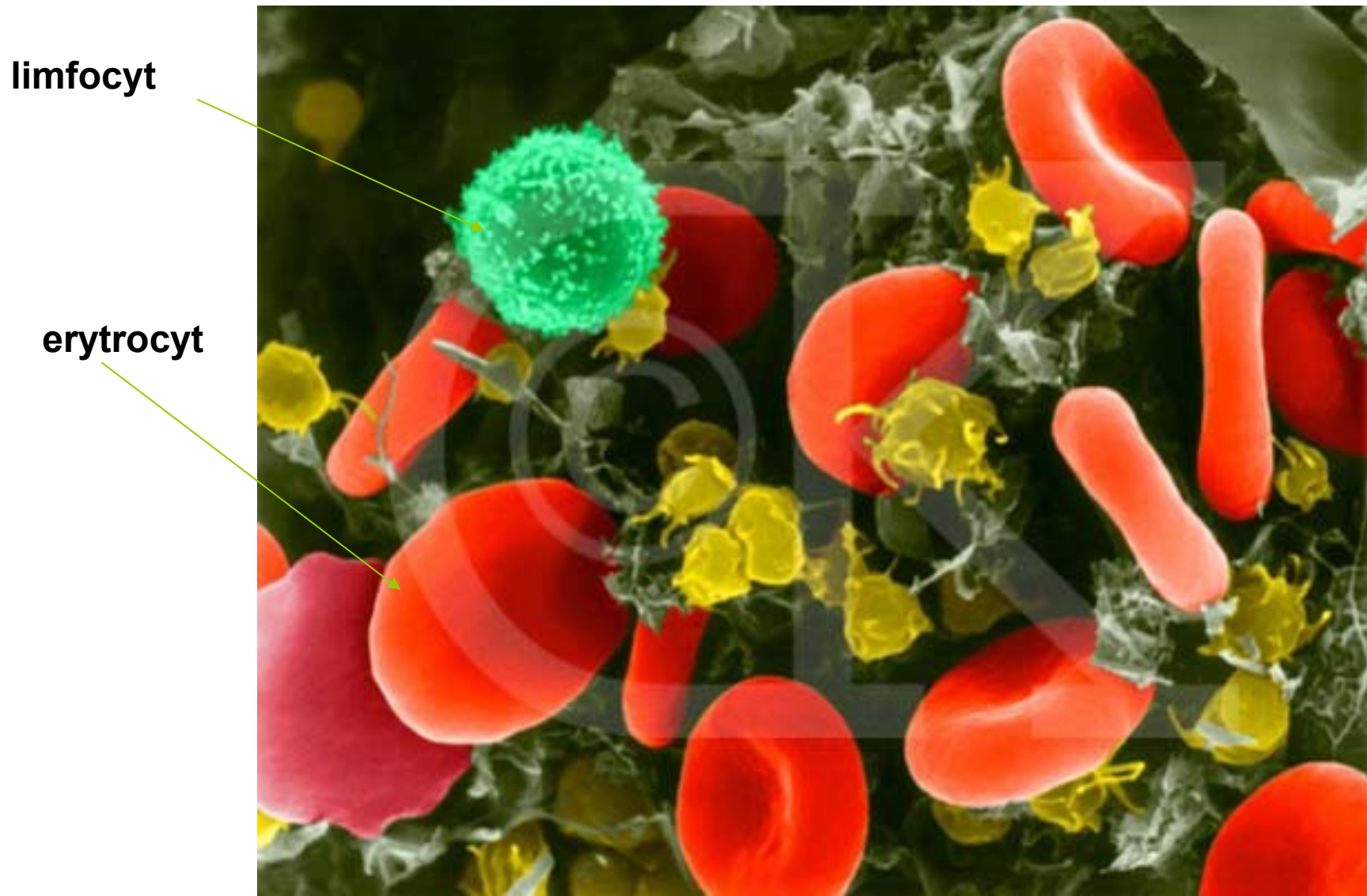
(brak Trp-tRNA)



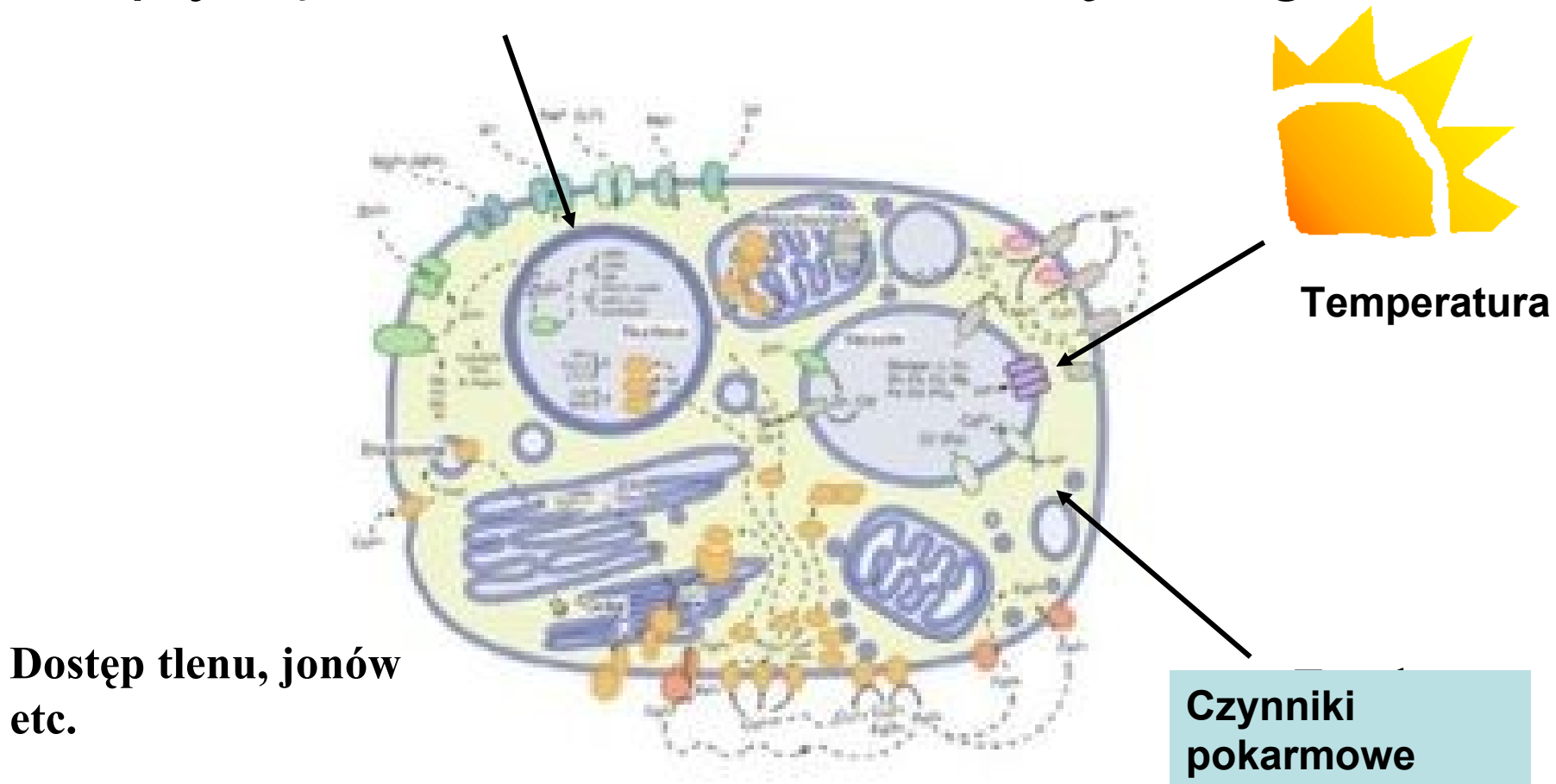
(c) **Niski poziom tryptofanu**

KONTROLA EKSPRESJI GENU EUKARIONTÓW

Komórki poszczególnych tkanek i narządów eukariontów wykorzystują zróżnicowane zestawy genów związane z pełnioną przez nie funkcją



Każda komórka odpowiada na bodźce płynące ze środowiska zewnętrznego



Regulacja ekspresji genów:

Znaczenie regulacji ekspresji genów

- rozwój i różnicowanie
- odpowiedź na warunki środowiska
- procesy chorobowe
- wydajność organizmów użytkowych

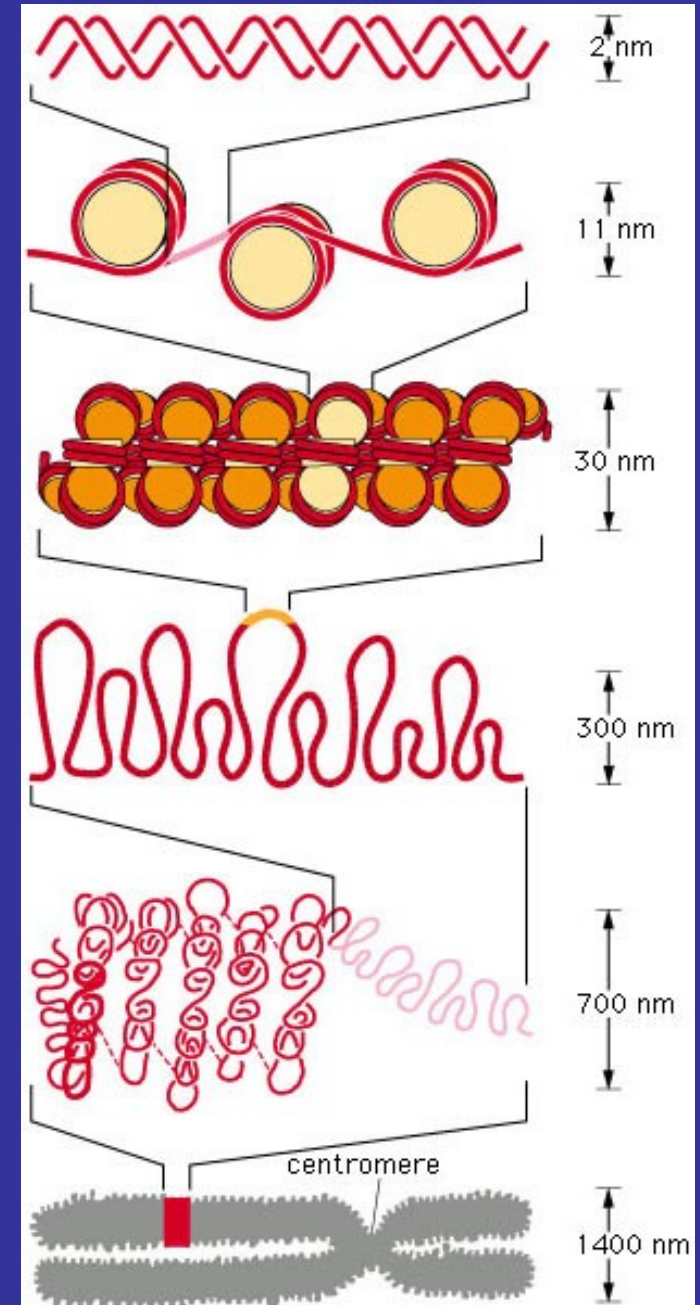
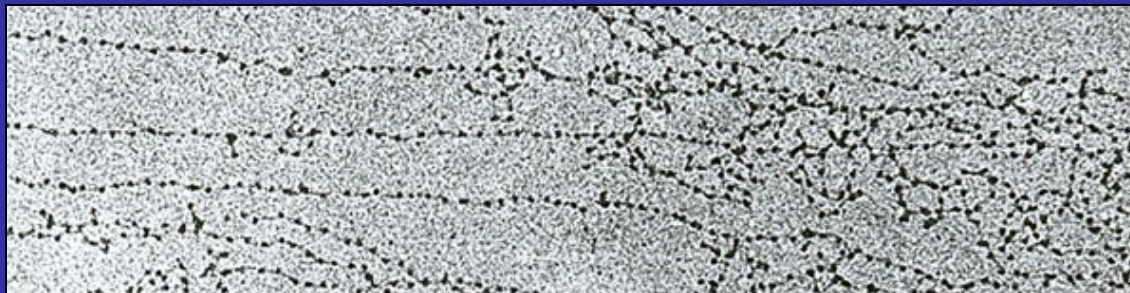
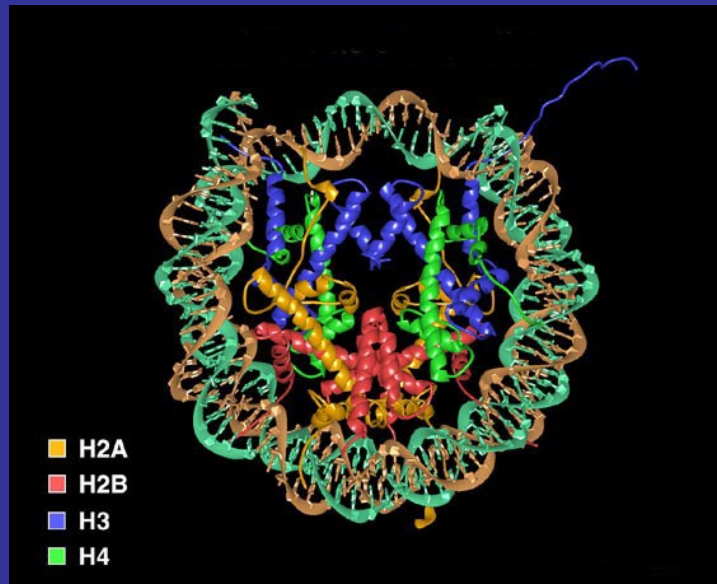
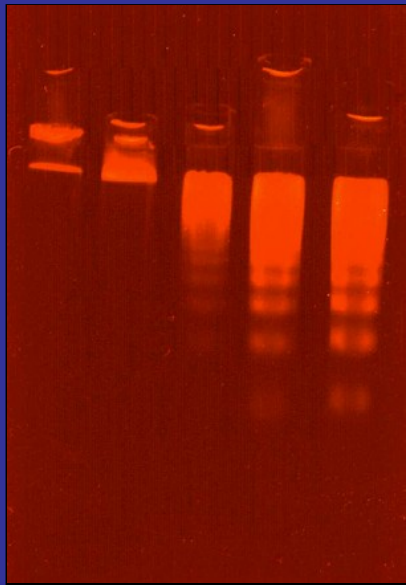
Regulacja ekspresji genów eukariontów

Poziomy na których ekspresja genów jest regulowana:

- dostęp do DNA
- inicjacja transkrypcji
- terminacja transkrypcji
- splajsing
- stabilność RNA
- inicjacja translacji
- transport białka
- cięcie białka
- modyfikacje posttranslacyjne białka
- degradacja białka

Struktura nukleosomowa chromatyny

- DNA jest nawinięty na rdzenie z histonów H2A, H2B, H3 i H4
- struktury wyższego rzędu

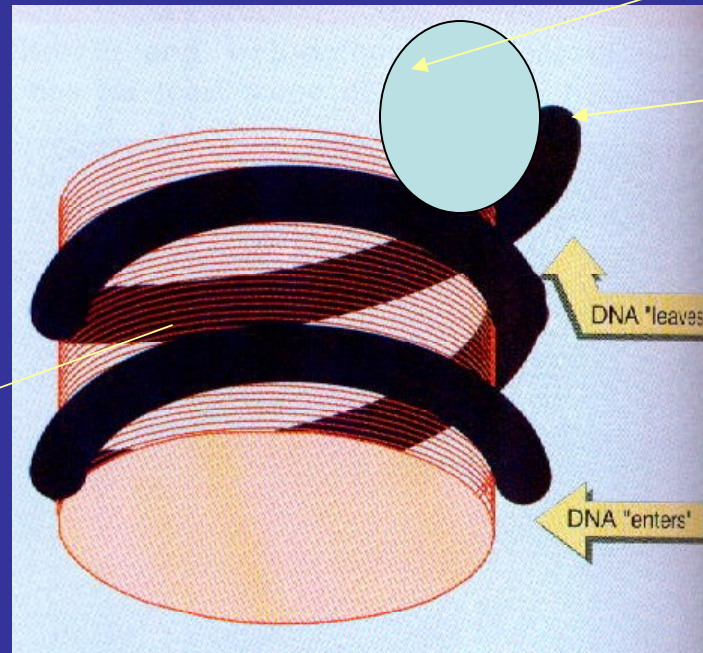


Nukleosom 300 kD, 6x11 nm

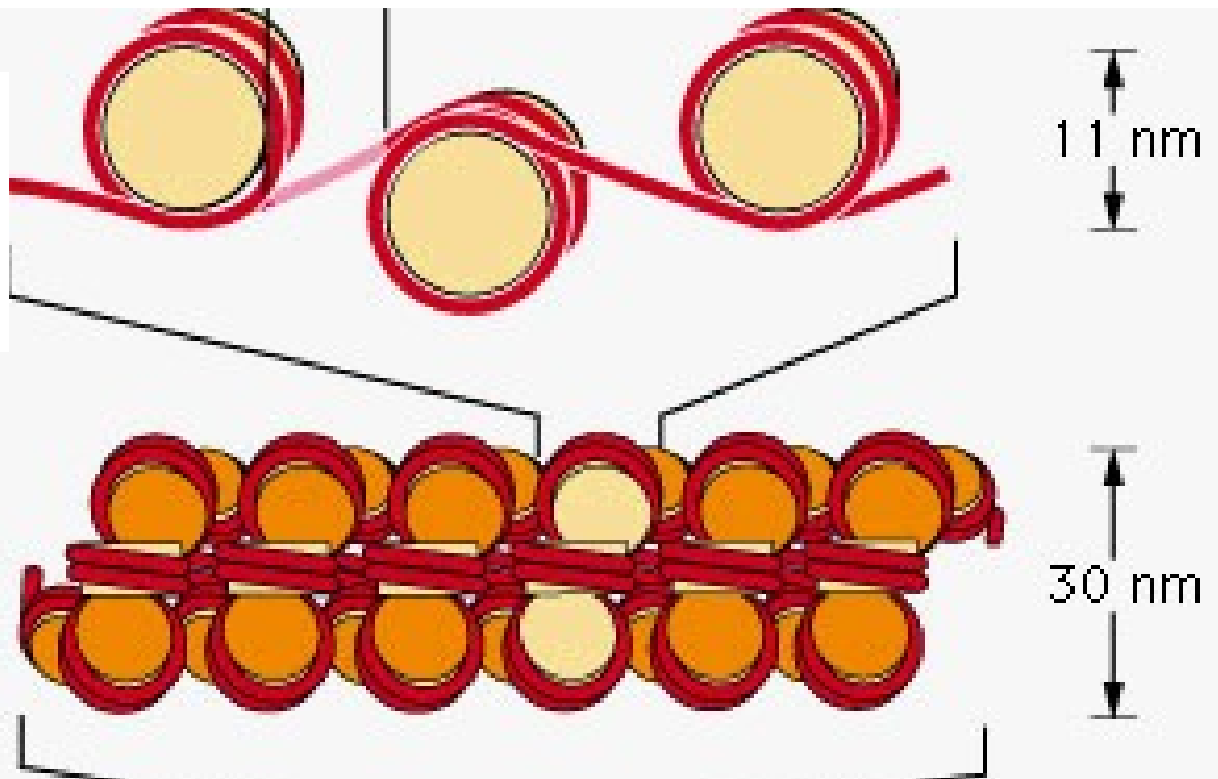
H1

**łącznikowy
DNA
(0-80 bp)**

**DNA rdzenia
140 bp**



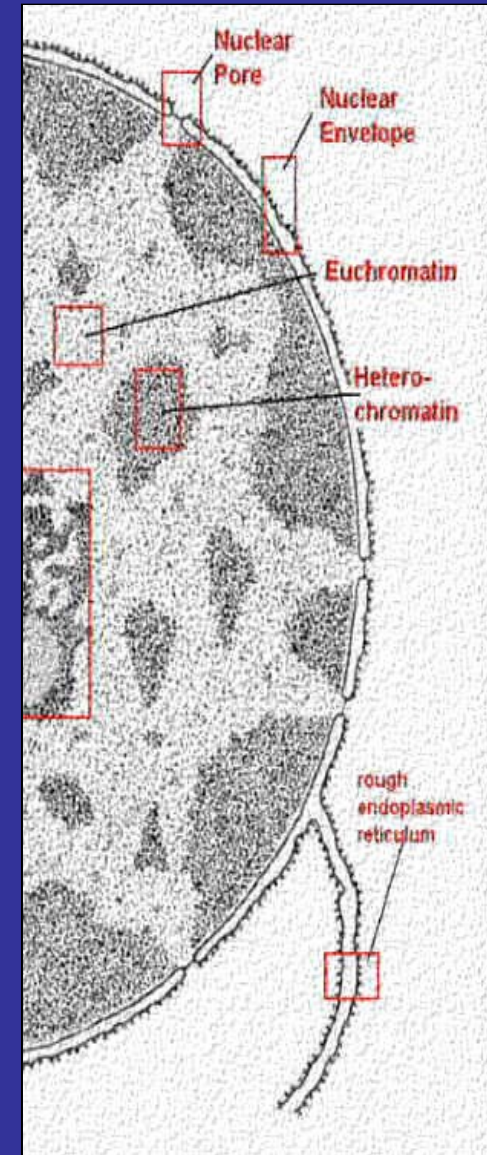
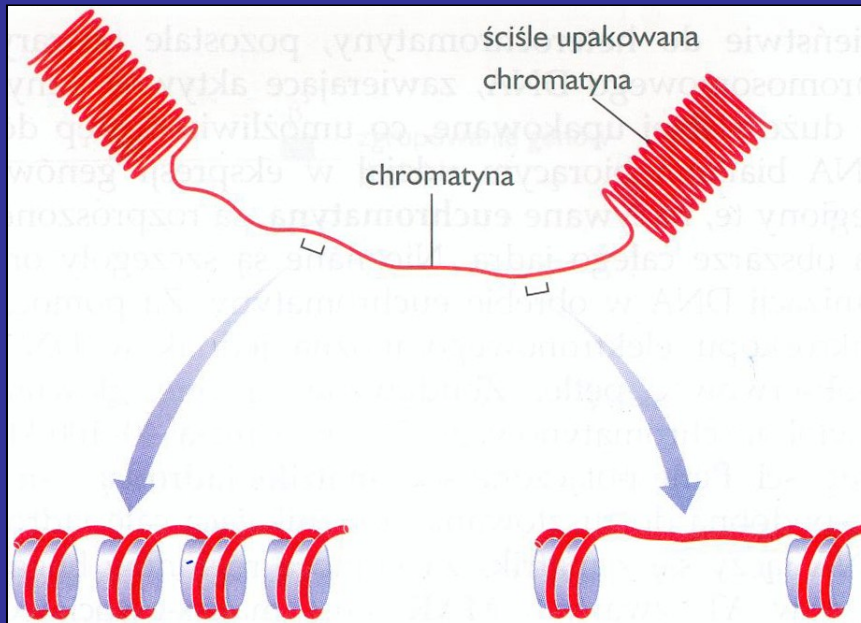
Połączenia
nukleosomów, „sznur
koralików”



Włókno 30 nm (solenoid)

Regulacja struktury nukleosomowej chromatyny

- euchromatyna i heterochromatyna - obszary o strukturze rozluźnionej lub zagęszczonej
- przesuwanie nukleosomów - zwalnianie dostępu do miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych
- Euchromatyna – niehomogenna, około 10% - geny aktywnie transkrybowane, w tych rejonach włókna 30 nm są zdysocjowane do „sznura koralików”. Część z nich, głównie sekwencje promotorowe, mogą być odwinięte z nukleosomów, w celu umożliwienia przyłączenia czynników transkrypcyjnych i innych białek



elementy jądra komórkowego

TRANSKRYPCJA A HISTONY RDZENIOWE

- * Połączenie matrycowego DNA z histonami ogranicza dostęp białkowych regulatorów transkrypcji do promotorów
- * Represja spowodowana istnieniem chromatyny różni się w zależności od pozycji jaką zajmują nukleosomy w stosunku do promotorów oraz od właściwości aktywatorów
- * W komórkach eukariotycznych występują białka zdolne do zmiany struktury nukleosomów i ułatwiania transkrypcji na matrycach chromatynowych np. kompleks białek kodowanych przez geny rodziny SWI/SNF; NURF (Nucleosome remodelling factors)

TRANSKRYPCJA A HISTONY RDZENIOWE (2)

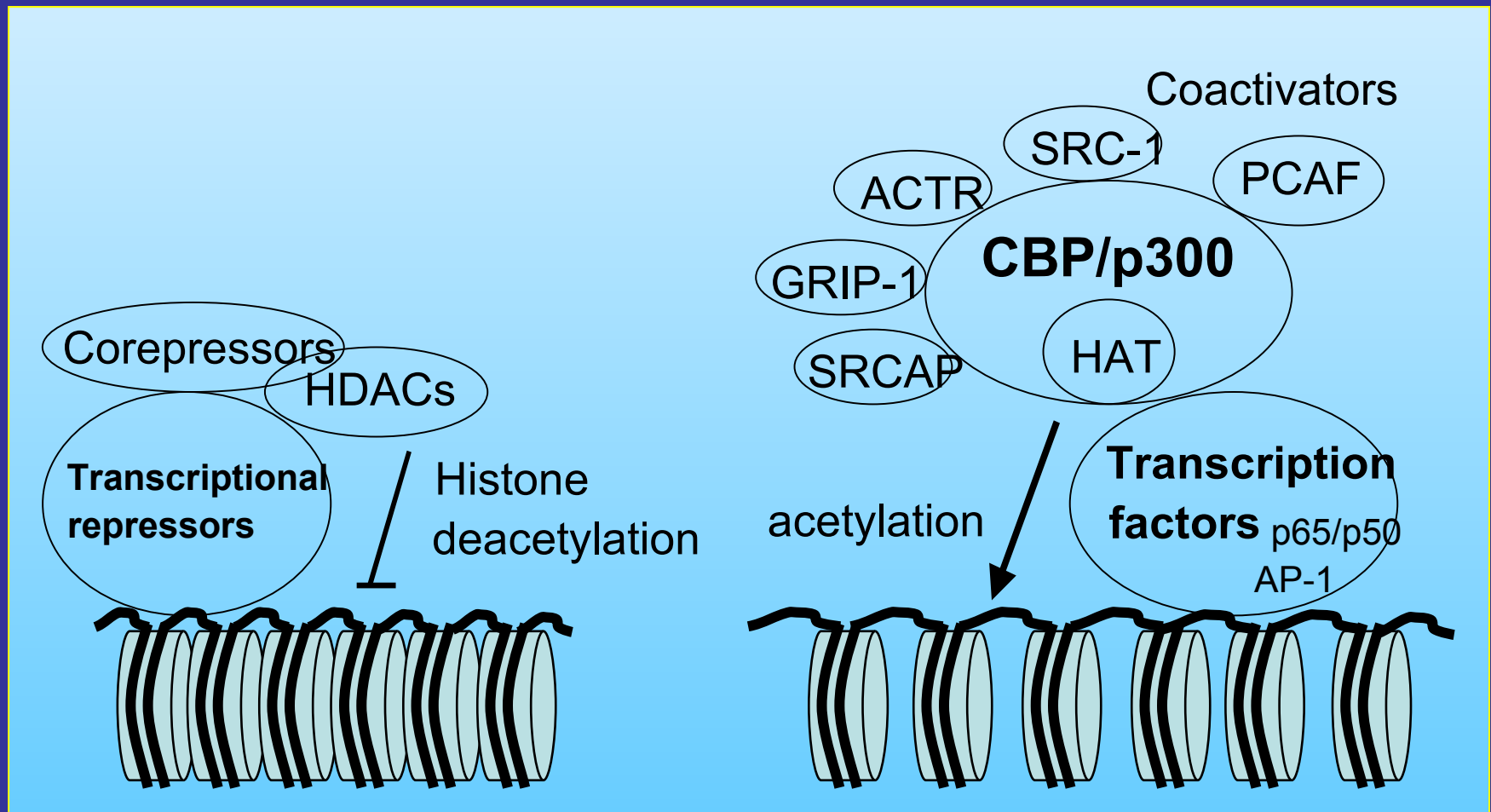
★ Produkty genów SWI/SNF (= kilkanaście białek) wykazują aktywność zależną od DNA ATP-azy i w obecności ATP reorganizują struktury nukleosomów ułatwiając wiązanie aktywatorów transkrypcji i TBP do odpowiednich sekwencji DNA znajdujących się w obrębie nukleosomu

★ H1 jest generalnym represorem transkrypcji, transkrypcja niektórych genów jest w wysoce specyficzny sposób regulowana przez H1 – Różnicowanie niektórych tkanek skorelowane jest w czasie z wymianą wariantów H1

Regulacja transkrypcji a nukleosomy

- * **Modulacja ekspresji genu zależy od ułożenia nukleosomów**
- * **Gen jest wyłączony gdy nukleosomy pokrywają miejsca przyłączania polimerazy RNA**
- * **Przesunięcie nukleosomów otwiera polimerazie dostęp do promotora i ekspresję genu**
- * **Pozycja nukleosomów może odgrywać rolę w precyzyjnej kontroli ekspresji genu regulując szybkość jego transkrypcji przez ciągłą modulację dostępu polimerazy**
- * **Na umiejscowienie nukleosomów ma wpływ acetylacja histonów zmniejszająca powinowactwo histonów do DNA**

Udział histonów w regulacji transkrypcji

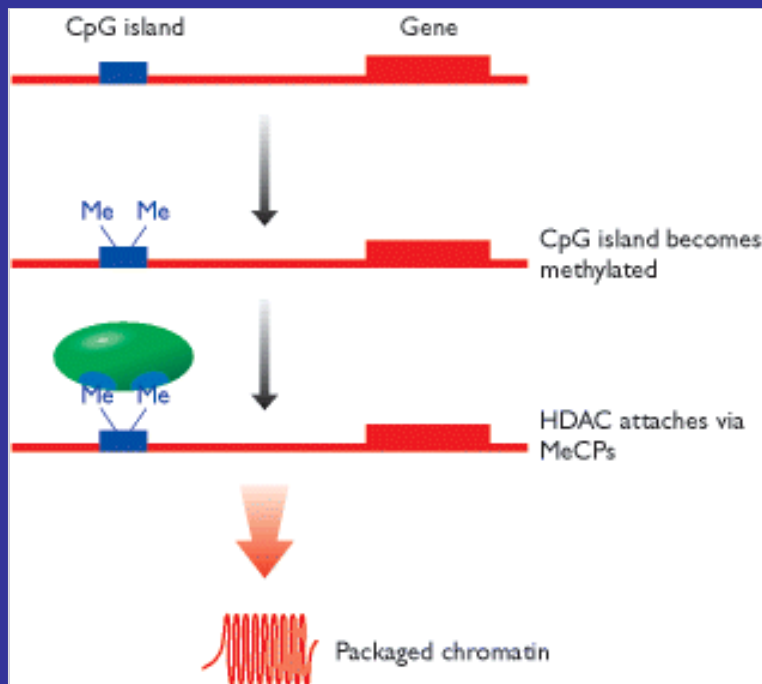


Gene silencing

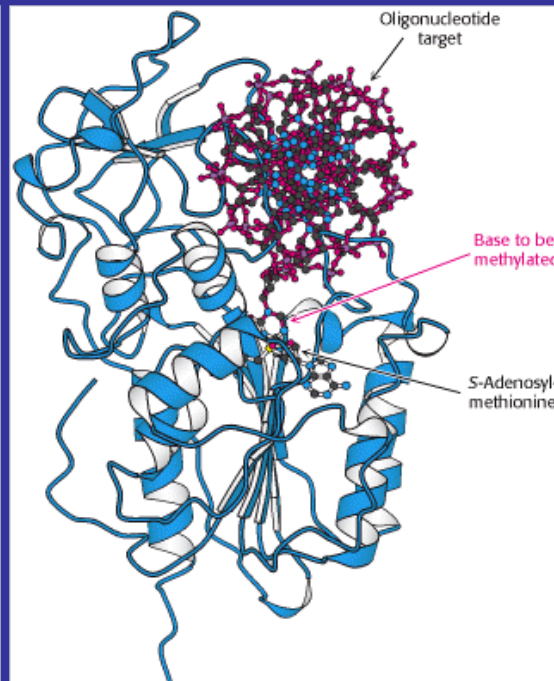
Gene activation

Metylacja DNA

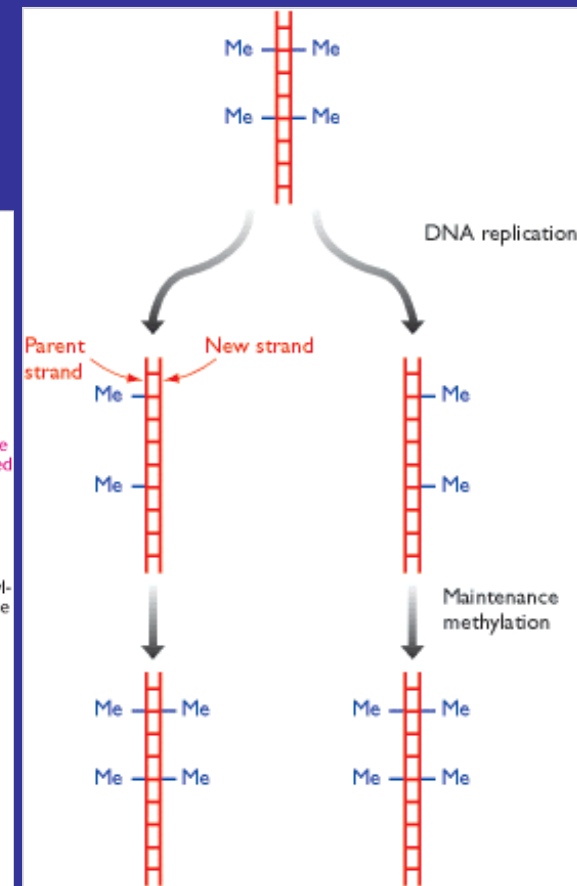
- przyłączenie grupy metylowej do cytozyny
- powoduje zamknięcie danego obszaru chromatyny
- może być podtrzymywana podczas podziałów komórkowych



metylacja DNA a struktura chromatyny



metylotransferaza DNA



podtrzymywanie metylacji DNA

UDZIAŁ METYLACJI DNA W REGULOWANIU TRANSKRYPCJI U EUKARIONTÓW

👉 5-metylocytozyna stanowi około 5% całości cytozyny w DNA kręgowców oraz od 6% do 40% cytozyny w DNA roślin

👉 Geny nieaktywne transkrypcyjnie są silniej zmetylowane

Główne mechanizmy wpływu metylacji DNA na transkrypcję:

👉 bezpośrednie blokowanie oddziaływań czynników transkrypcyjnych z DNA

👉 niektóre białka preferencyjnie wiążą zmetylowany DNA co uniemożliwia wiązanie czynników transkrypcyjnych

👉 przyjmowanie przez zmetylowany DNA zwartej struktury chromatynowej

Znaczenie metylacji DNA:

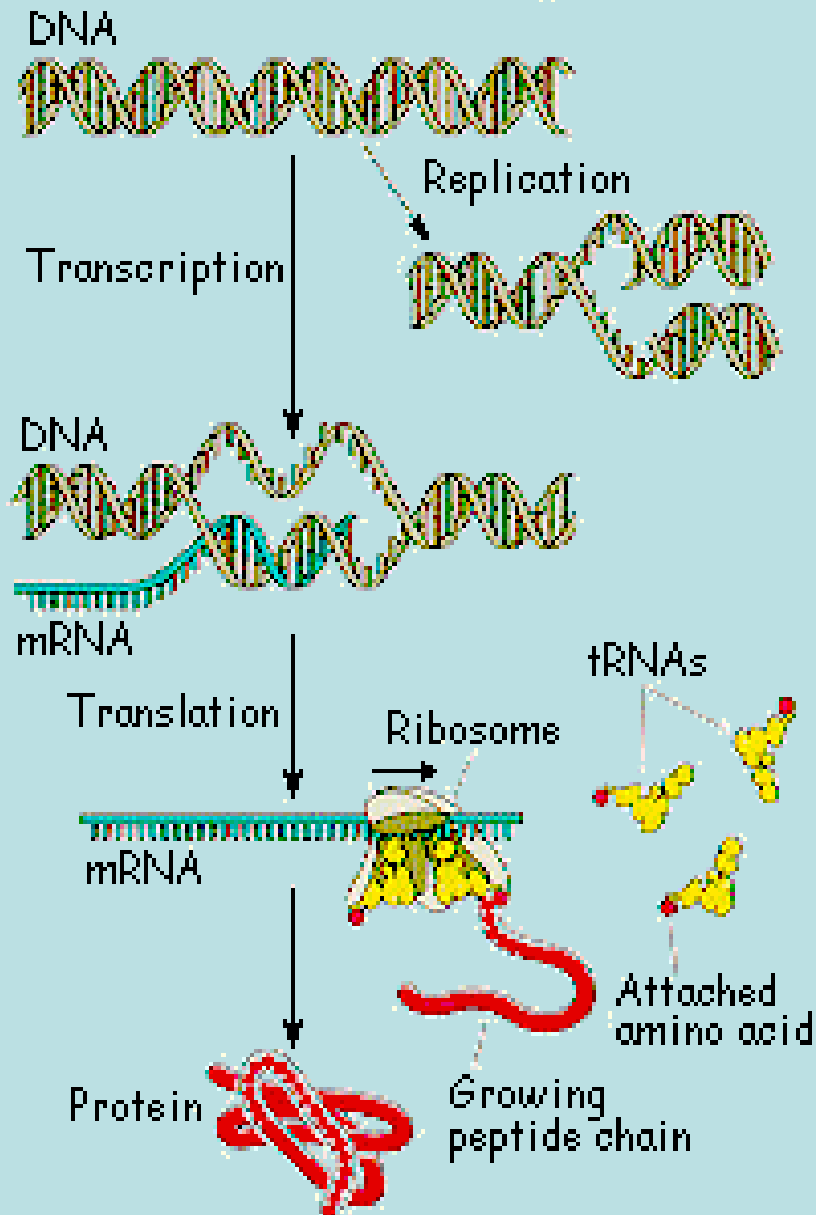
*** Metylacja DNA odpowiedzialna jest za zachowanie i dziedziczenie tkankowej specyficzności ekspresji genów**

*** Hypermetylacja transpozonów i innych sekwencji powtarzających się zmniejsza prawdopodobieństwo powstania w genomie uszkodzeń na skutek niepotrzebnych rearanżacji (hamowanie transpozazy)**

*** U ssaków metylacja DNA związana jest z piętnowaniem genomowym (w komórce diploidalnej tylko jeden gen z pary alleli jest aktywny, ekspresja drugiego jest hamowana przez metylację)**

*** Metylacja odgrywa główną rolę w inaktywacji jednego z pary chromosomów X u samicy**

Kiedy i gdzie zachodzi regulacja ekspresji genu?



- **Relaksacja chromatyny**
- **Transkrypcja**
- **Translacja**
- **Stabilność białek**
- **Modyfikacje białek**

Regulacja na poziomie transkrypcji

- **Jest najsilniejsza na etapie inicjacji transkrypcji**
- **Korzyść:** Energia komórki nie jest marnowana na powstawanie produktów przejściowych

Ale:

Ten sposób regulacji wydłuża czas reakcji na bodziec gdyż po przejęciu bodźca przez receptor komórkowy :

1. Wiadomość musi dotrzeć do jądra
2. Odpowiedni fragment chromatyny musi ulec relaksacji i związać się z białkami regulatorowymi
3. Musi zostać przyłączona polimeraza RNA i zająć transkrypcja
4. Pre mRNA musi być poddany składaniu i wyeksportowany do cytoplazmy
5. Musi zająć translacja i dojrzewanie białek

Kontrola inicjacji transkrypcji u eukariontów



Geny transkrybowane przez polimerazę RNA I

- * W większości komórek zachodzi ciągła transkrypcja wielokrotnie powtórzonej kopii jednostki transkrypcyjnej zawierającej sekwencje 28 S; 5,8S; 18S rRNA
- * Poziom transkrypcji zależy od etapu cyklu komórkowego i tkanki.
- * Kluczowa rola białka **UBF**
- * Szczegółowy mechanizm nie jest znany.

Geny transkrybowane przez pol RNA II i pol RNA III

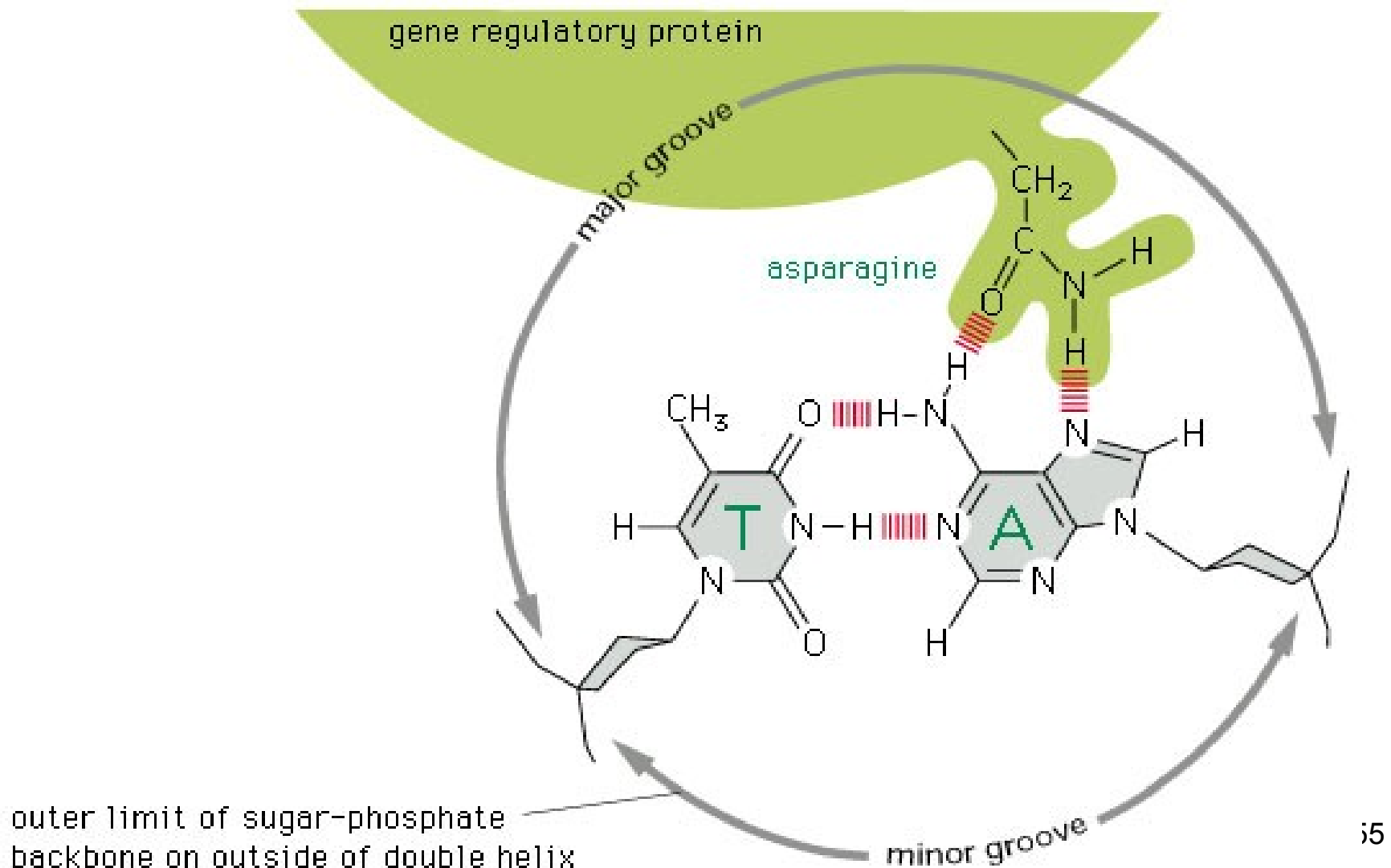
- * Składanie kompleksów preinicjacyjnych nie jest procesem wydajnym.
- * Podstawowe tempo inicjacji transkrypcji jest bardzo małe, niezależnie od tego jak silny jest promotor. Konieczne są dodatkowe białka aktywujące:
- * **Aktywatory konstytutywne** (oddziałują na wiele genów, nie reagują na sygnały zewnętrzne)
- * **Aktywatory regulacyjne**

Regulacja ekspresji genu

Czym jest czynnik transkrypcyjny?

Czynnik transkrypcyjny to białko, które po translokacji do jądra bierze udział w regulacji transkrypcji poprzez specyficzną interakcję z helisą DNA lub też poprzez interakcję z białkiem wchodzącym w skład kompleksu rozpoznającego swoistą sekwencje DNA

Gene Regulatory Proteins Bind to DNA



Aktywatory inicjacji transkrypcji u eukariontów

Czynniki transkrypcyjne (CT) **inne!!!** niż podstawowe czynniki transkrypcyjne uczestniczące w składaniu kompleksu preinicjacyjnego

→ na inicjację

CT to **białka** wiążące się -specyficznie z określonymi sekwencjami:

→ w obrębie obszaru promotorowego - wpływają na transkrypcję tylko 1 genu

→ w obrębie wzmacniaczy - mogą jednocześnie oddziaływać na transkrypcję wielu genów

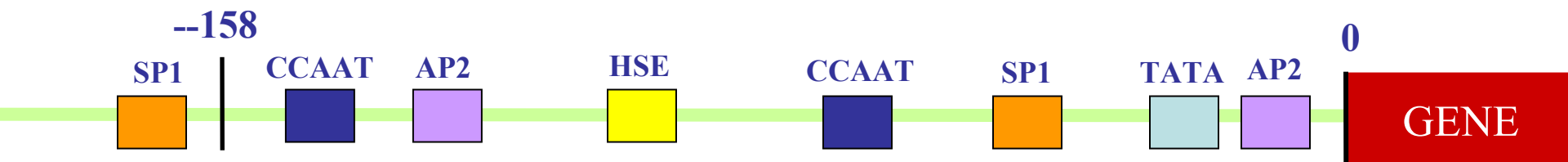
→ Przykłady CT

Konstitutywne: CTF/NF1 (rozpoznaje blok CAAT, powszechny)

Sp1 (rozpoznaje blok GC, powszechny)

Czynniki odpowiedzi: CT szoku cieplnego (rozpoznaje HSE, odpowiada na szok cieplny)

Czynniki komórkowo specyficzne: GATA-1 specyficzny dla komórek erytroidalnych



- Sekwencja TATA : wyznacza start transkrypcji
- TATA, CCAAT, SP1: transkrypcja konstitutywna
- HSE odpowiedź na zmiany temperatury

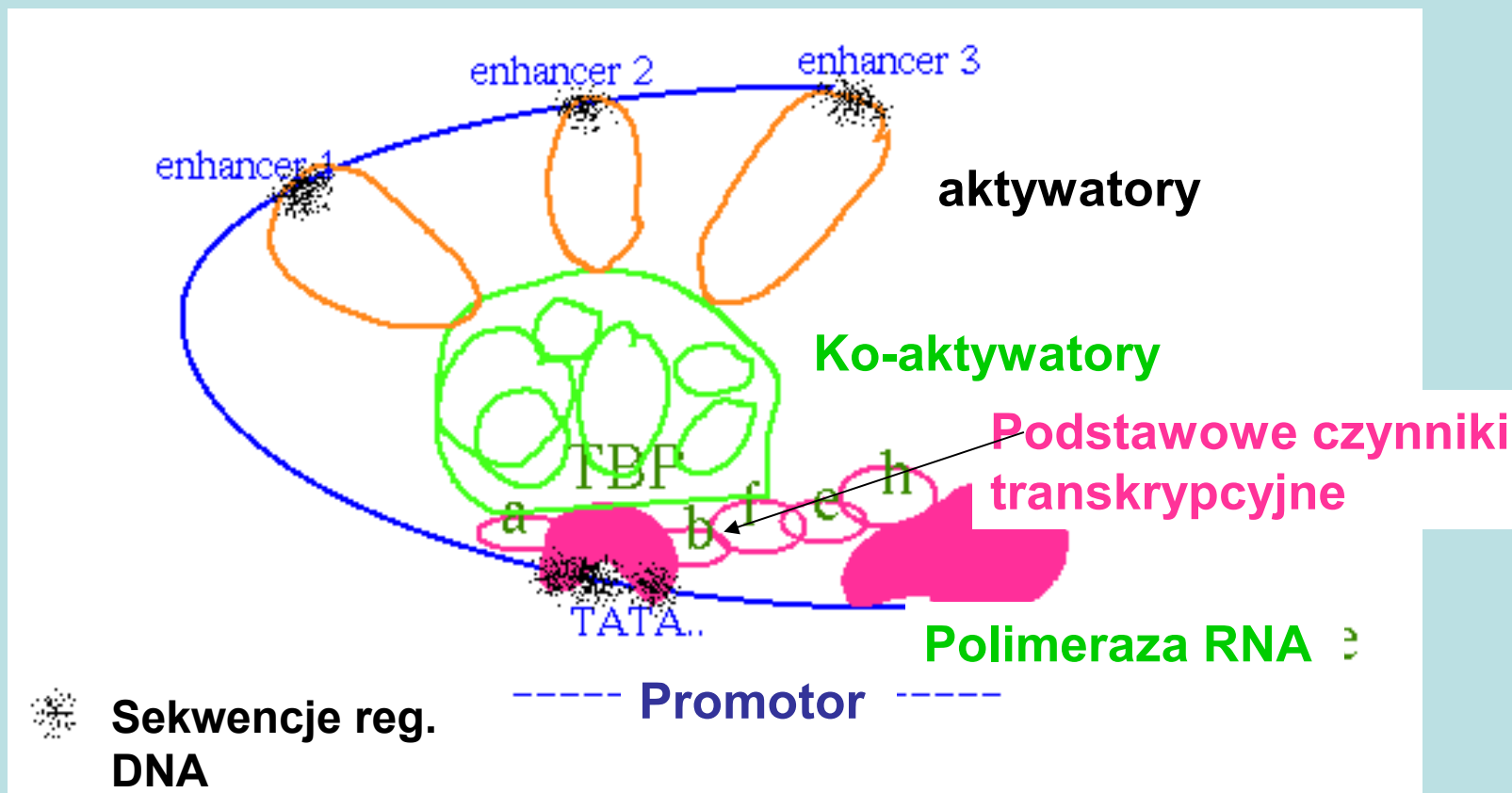
promotor hsp70

Sekwencje regulatorowe białka szoku cieplnego ludzkiego

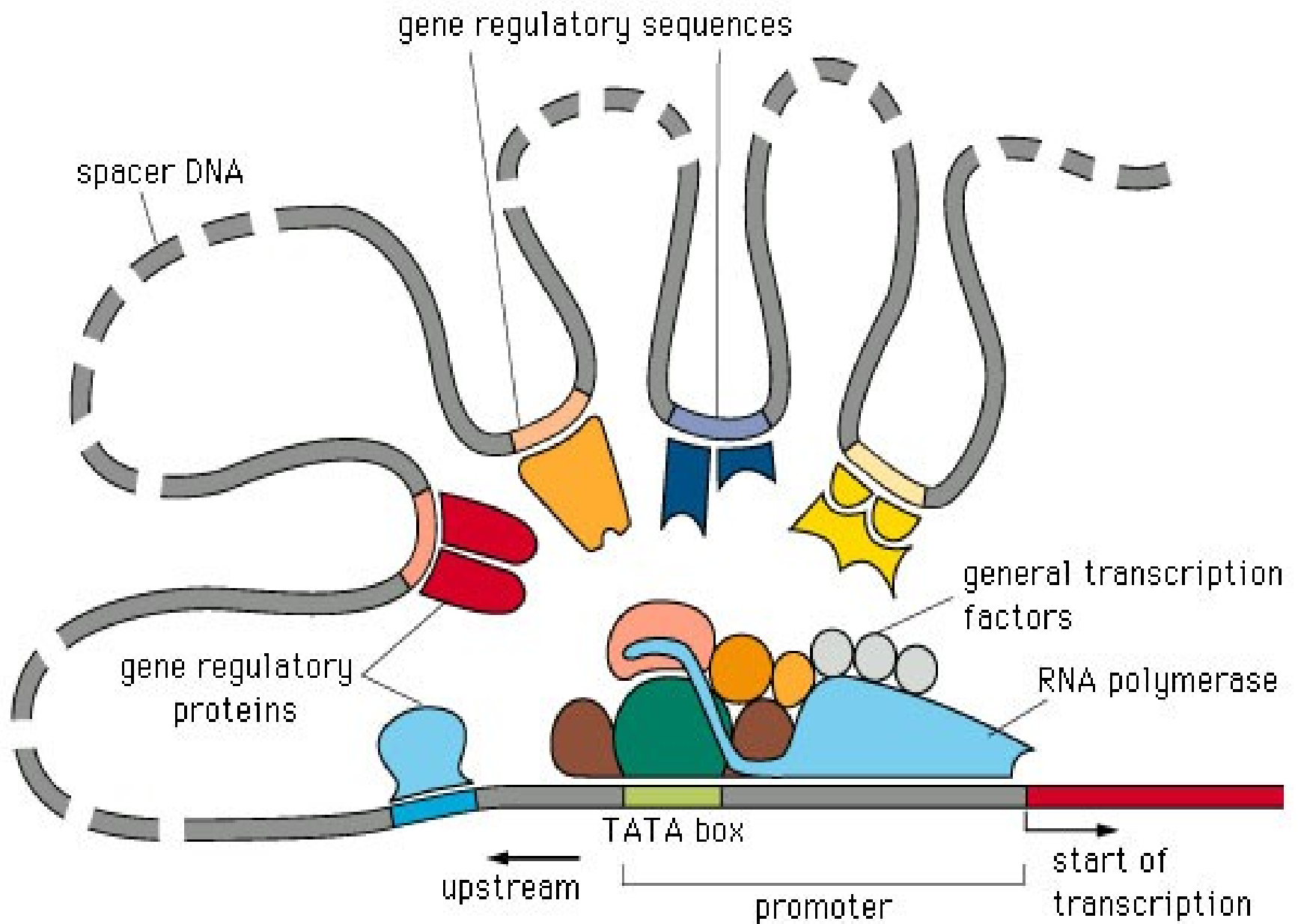
Aktywatory inicjacji transkrypcji u eukariontów..

- ☞ **CT oddziałują z kompleksem preinicjacyjnym poprzez 1 z 3 rodzajów domen aktywujących:**
- ☞ **domena kwasowa, bogata w kwas asparaginowy i kwas glutaminowy, występuje najczęściej**
- ☞ **domena poliglutaminowa**
- ☞ **domena poliprolinowa**
- ☞ **W regulacji inicjacji transkrypcji u eukarionów uczestniczą również represory (słabo poznane)**
- ☞ **Dużą rolę odgrywa precyzyjna kontrola aktywności czynników transkrypcyjnych**

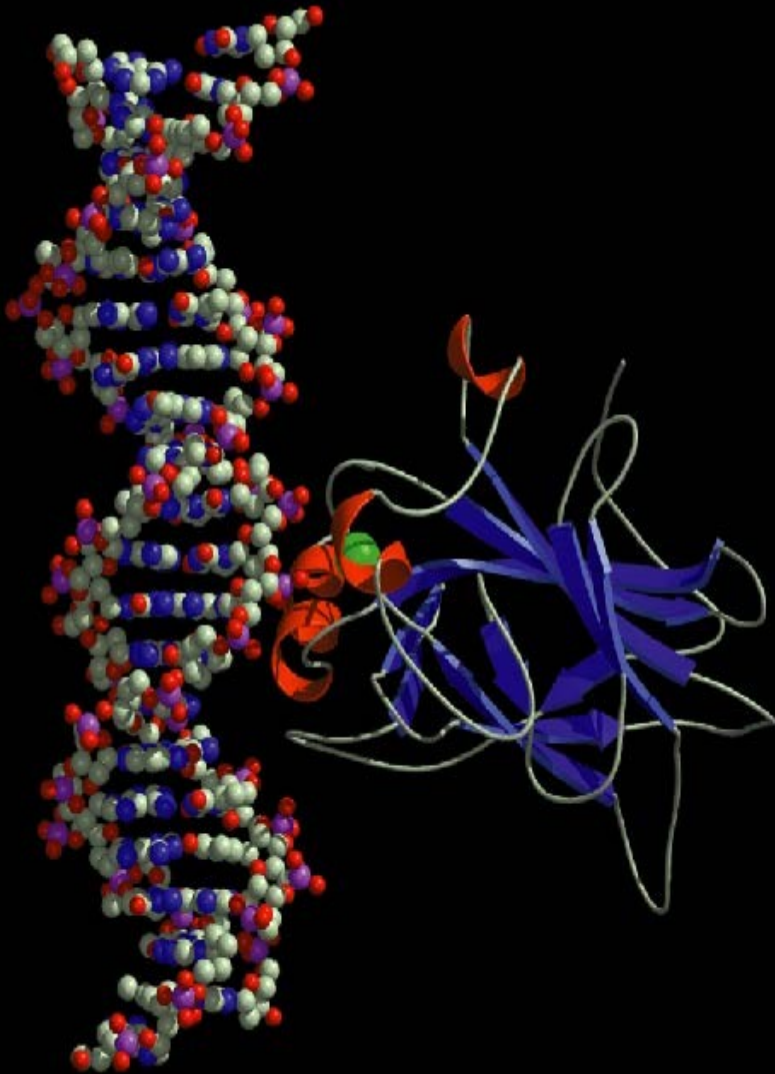
Promotor i wzmacniacze



- **Promotor** jest niezbędny do inicjacji transkrypcji
- Sekwencje regulatorowe (wzmacniacze) leżą w dużej odległości od promotora



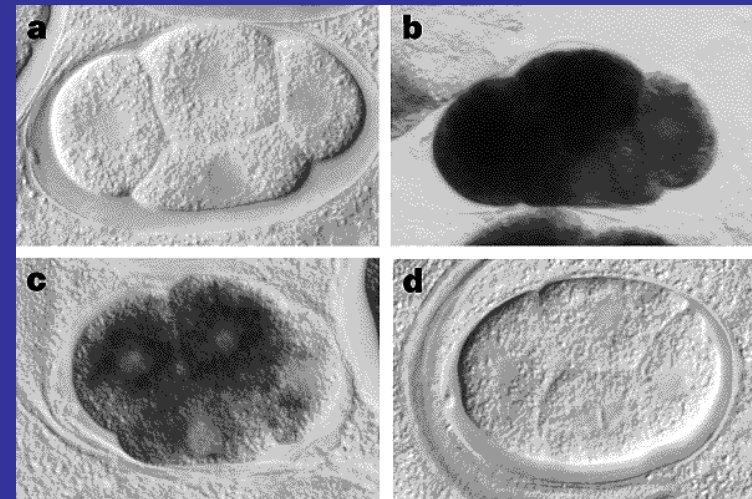
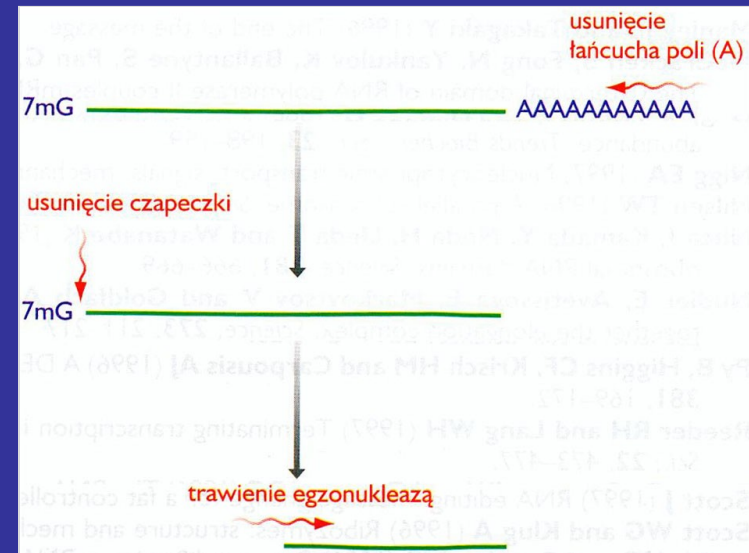
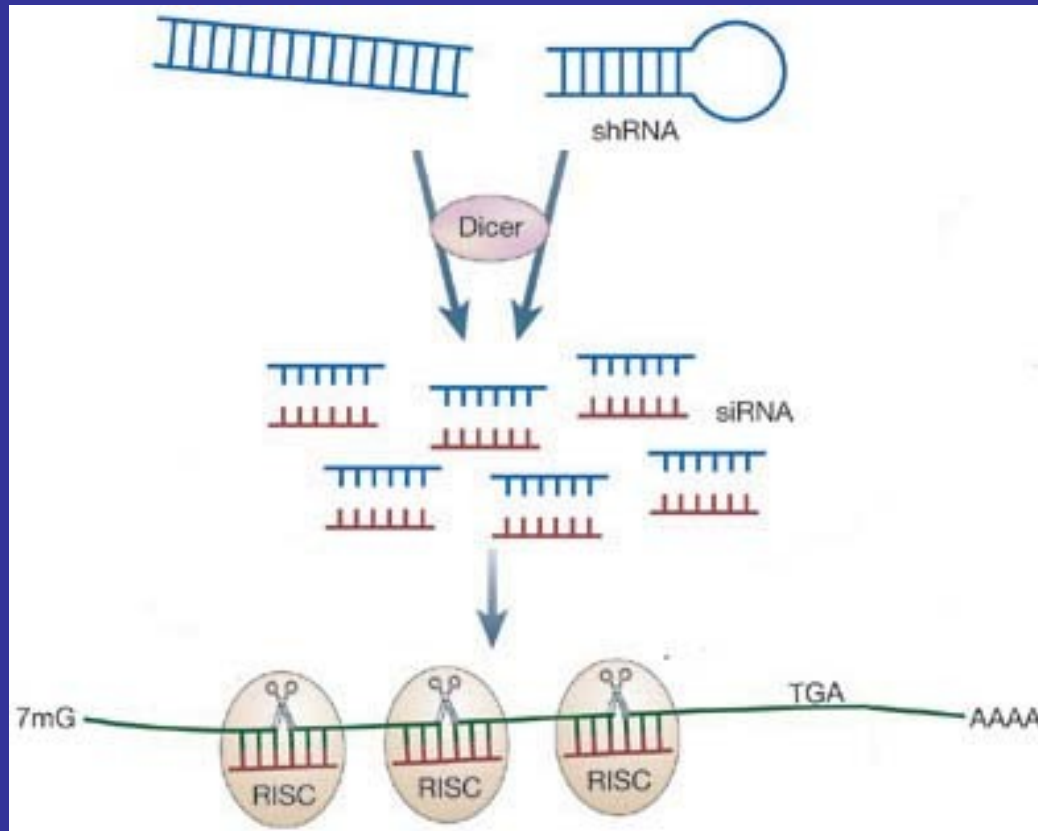
Czynniki transkrypcyjne wiążą się z DNA



**Czynniki
transkrypcyjne
wiążą się z
regulatorowymi
sekwencjami DNA**

Regulacja stabilności mRNA

- mechanizm zależny od deadenyacji
- sekwencje przyspieszające degradację
- interferencja RNA



Interferencja RNA....

mikroRNA: wyciszanie genu typu: “hetero-silencing”

kodowany w genomie jako prekursorowe “spinki do włosów”

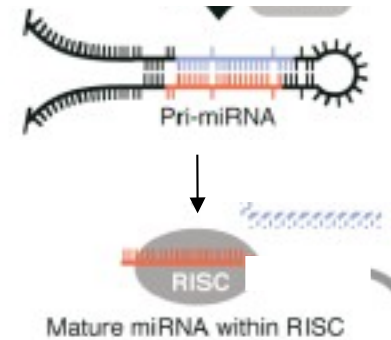
Przetwarzany (przycinany) przez endonukleazy

DICER do 21-25nt odcinków RNAs

Odzwiaływuje na mRNA kodowany w innym miejscu niż on sam

Degraduje perfekcyjnie komplementarny do siebie mRNA

Blokuje translację niezupełnie komplementarnych mRNA



siRNA: autowyciszanie (“auto-silencing”)

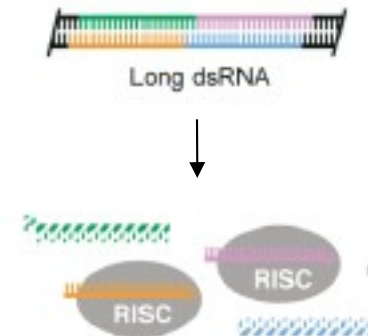
21-25nt RNAs tworzone przez DICER

z egzo oraz endogennych dwuniciowych fragmentów

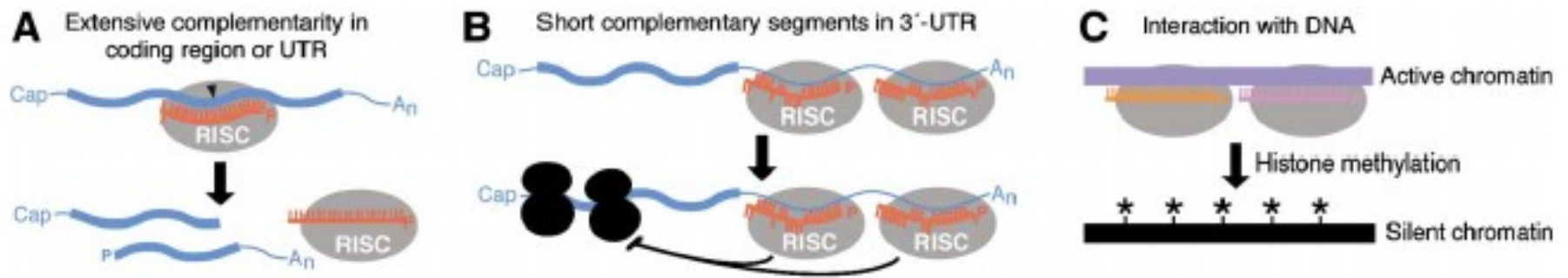
RNA (dsRNA)

Degraduje mRNA powstałe z tego samego lub blisko położonego genu

Degraduje RNA wysoce komplementarny



Mały wyciszający RNA (small silencing RNA) spełnia
co najmniej
3 różne funkcje

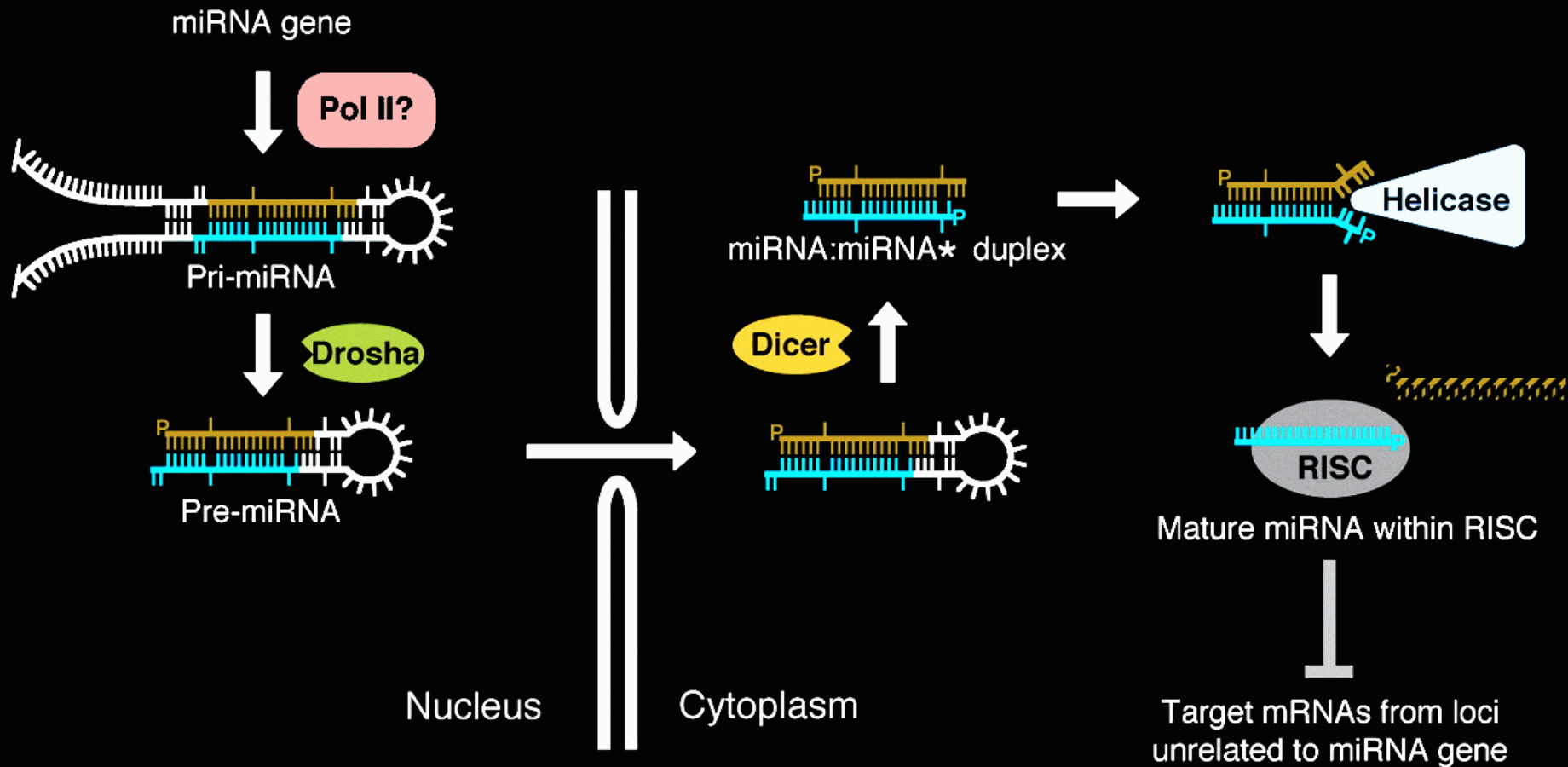


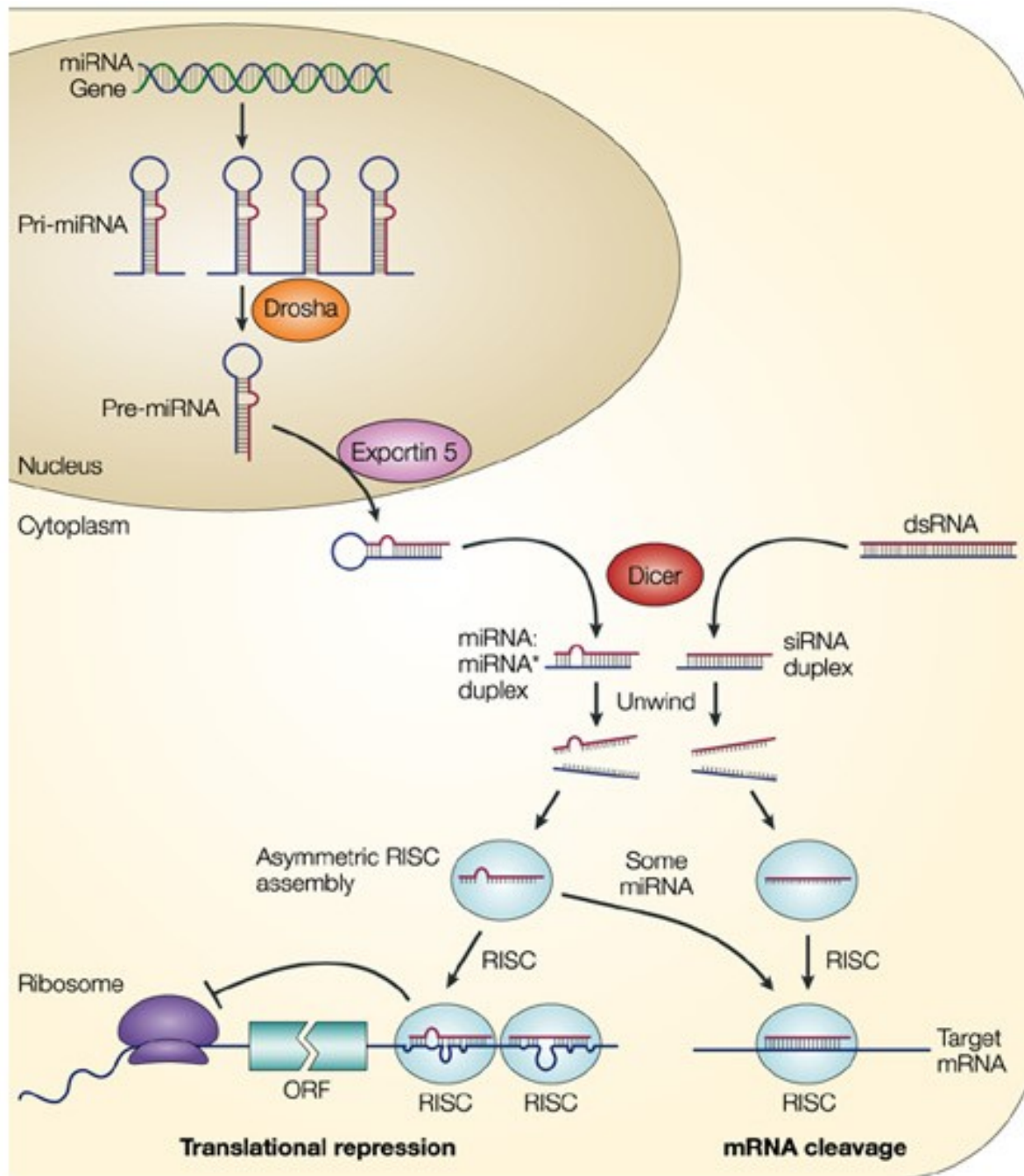
A. Rozcinanie mRNA (miRNA lub siRNA)

B. Zahamowanie translacji (miRNA)

C. Blokowanie transkrypcji (heterochromatynowy siRNA)

Biogeneza miRNA





Tylko 1 nić siRNA jest włączana do kompleksu RISC (RNA induced silencing complex)

