

Лекция 6

Начало регуляции

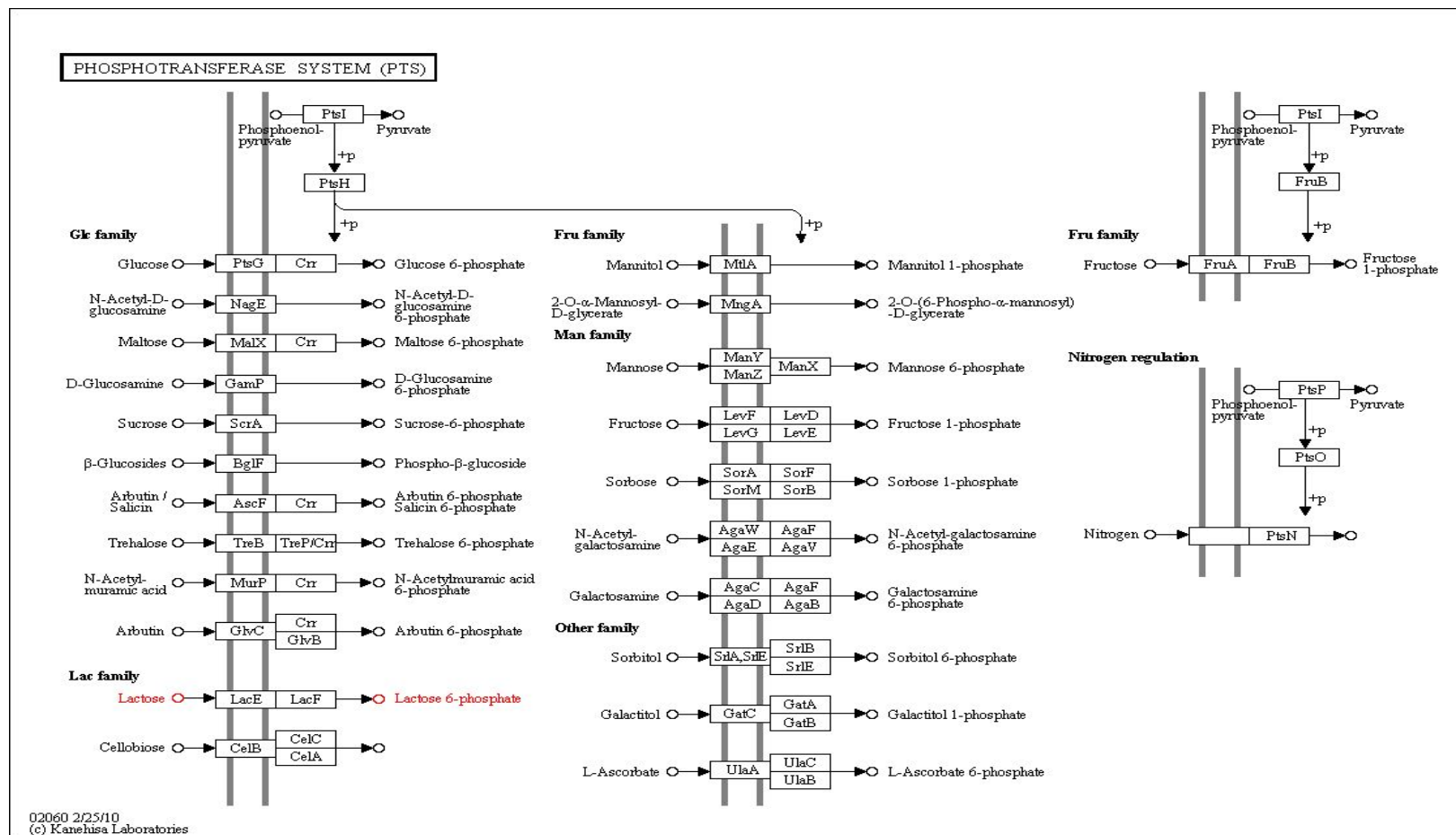
Основные регуляторные события (механизмы) регуляции

- Геном
- Транскриптом
- Протеом
- Метаболом
- Орган
- Организм
- Популяция
- Биосфера

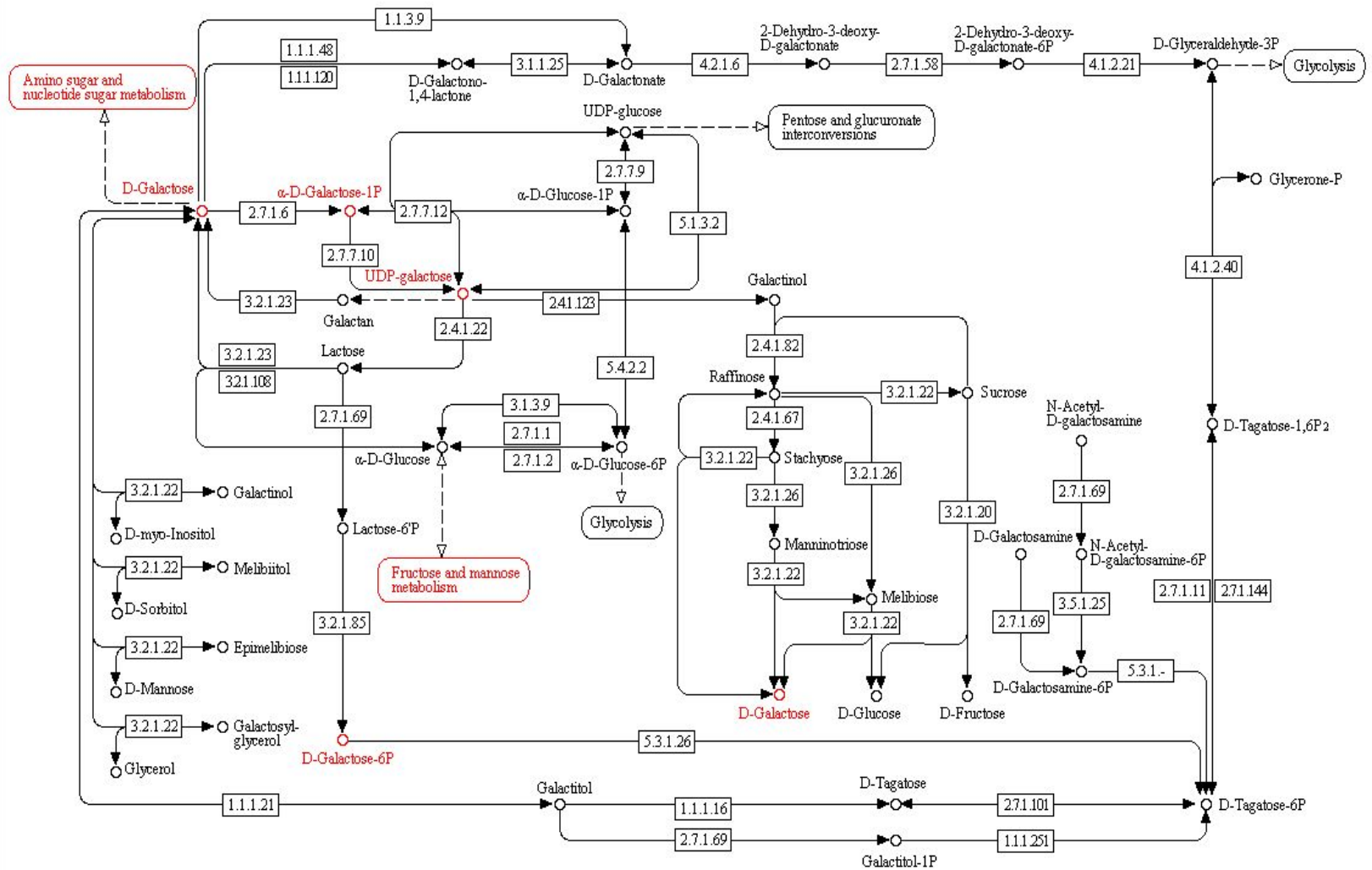
Геном (прокариоты)

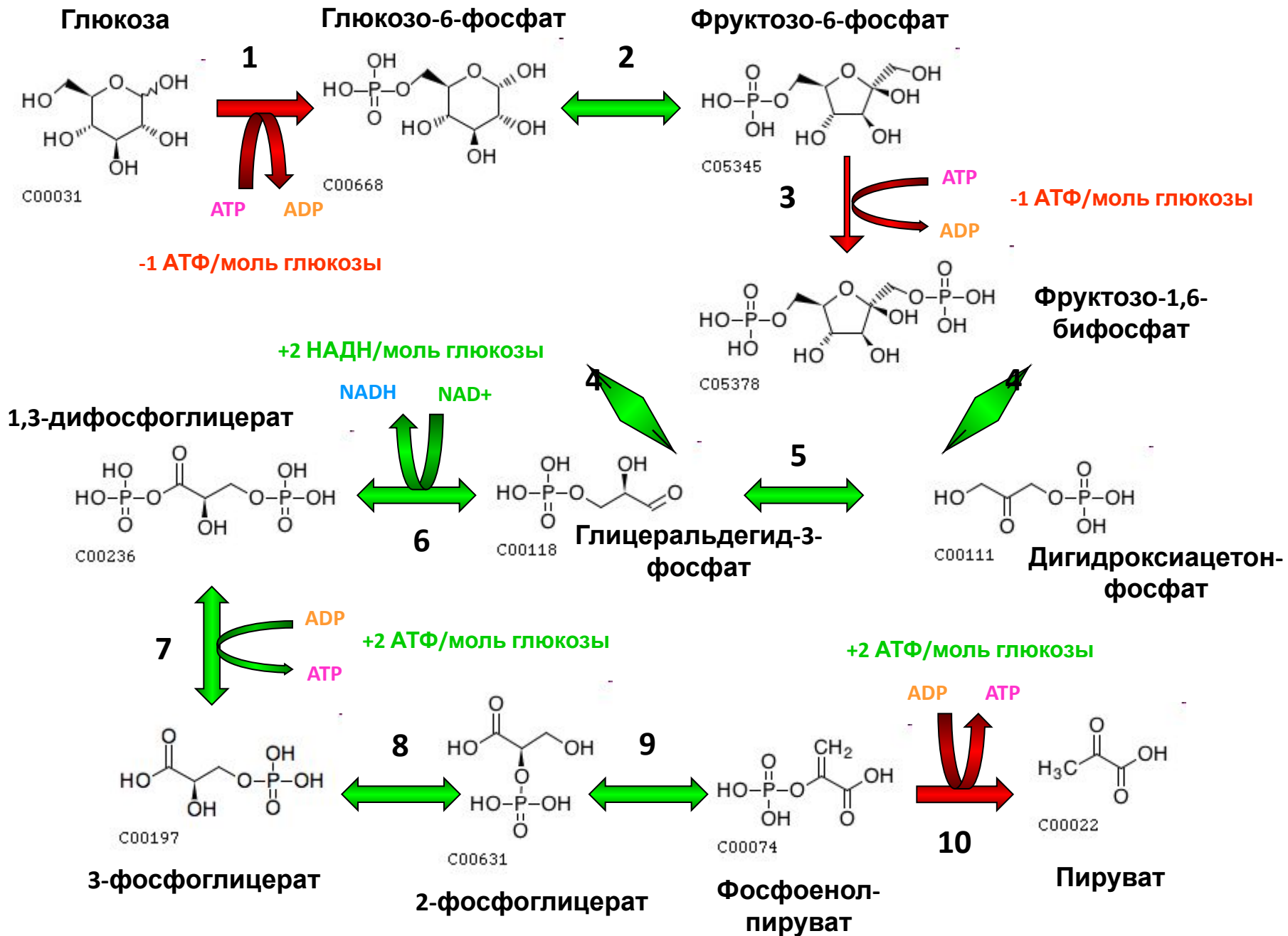
- Оперонная структура (Lac-оперон)
- Независимое расположение генов
- Наличие внутри оперона дополнительных регуляторных элементов
- Разнообразие структур – аттенюаторов, мест посадки репрессоров, шпилек-палиндромов, фрагментов генов, кодирующих антисмысловые молекулы РНК

Транспорт сахаров (лактозы)

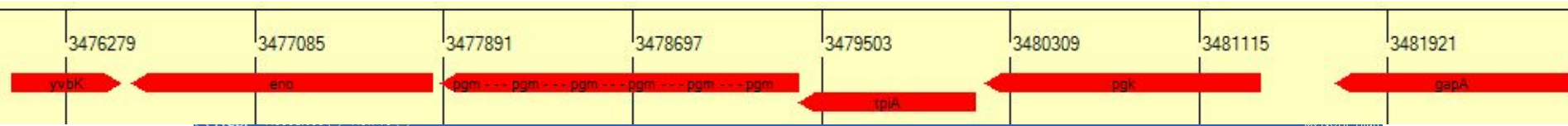


GALACTOSE METABOLISM





Расположение генов гликолиза (*gapA* и *eno*) у прокариот *Bacillus subtilis* (оперонное расположение)



Nucleotide
Alphabet of Life

Search: Nucleotide [v] Limits Advanced search Help

[Search] [Clear]

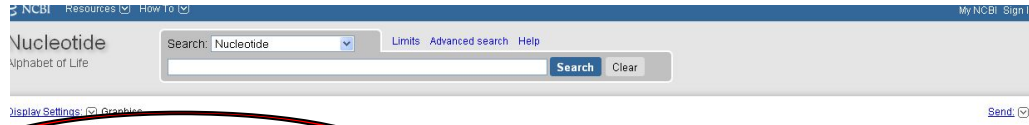
Display Settings: [v] Graphics [Send: v]

Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168 chromosome, complete genome

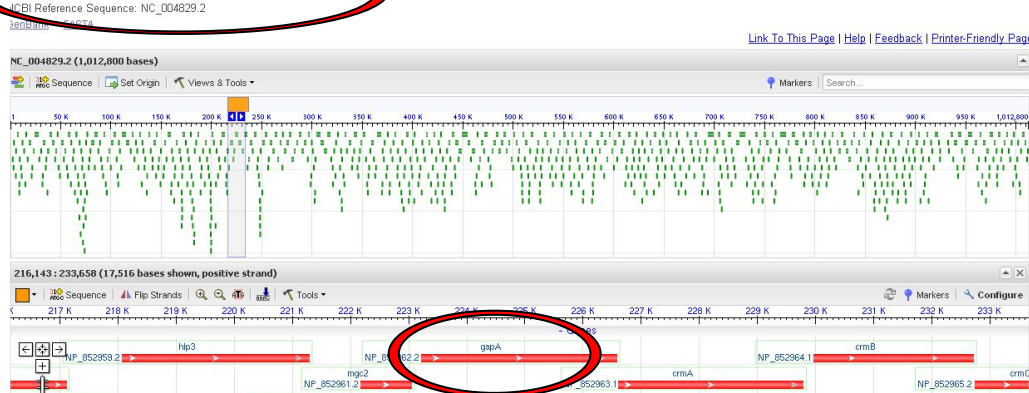
NCBI Reference Sequence: NC_000964.3
[GenBank](#) [FASTA](#) [Link To This Page](#) | [Help](#) | [Feedback](#) | [Printer-Friendly Page](#)



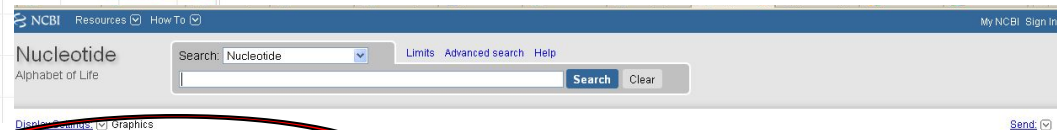
Расположение генов гликолиза (*gapA* и *eno*) у прокариот *Mycoplasma gallisepticum* (дискретное расположение)



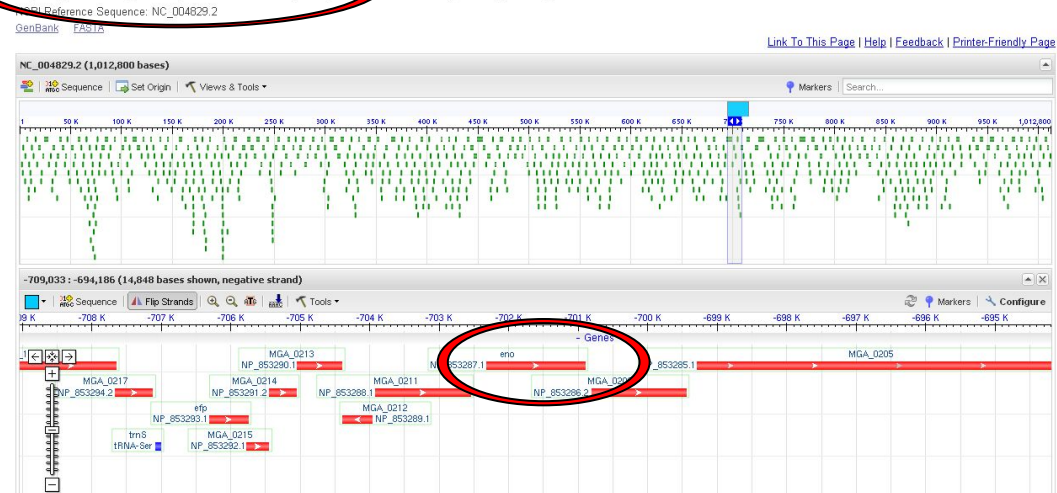
Mycoplasma gallisepticum str. R(low) chrom some, complete genome



gapA

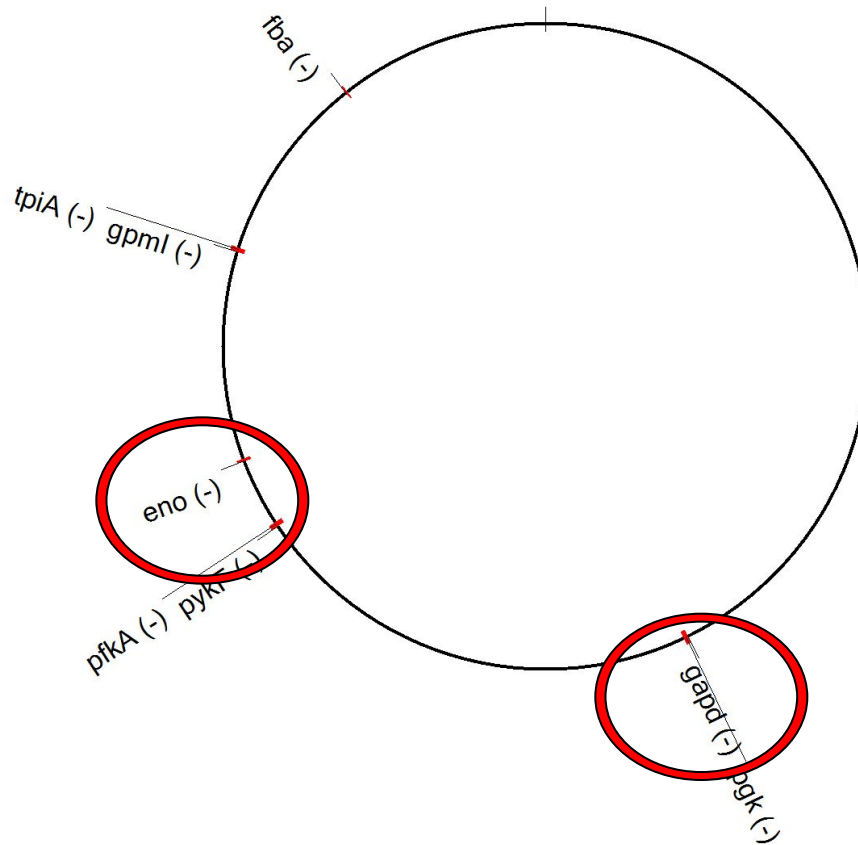


Mycoplasma gallisepticum str. R(low) chrom some, complete genome



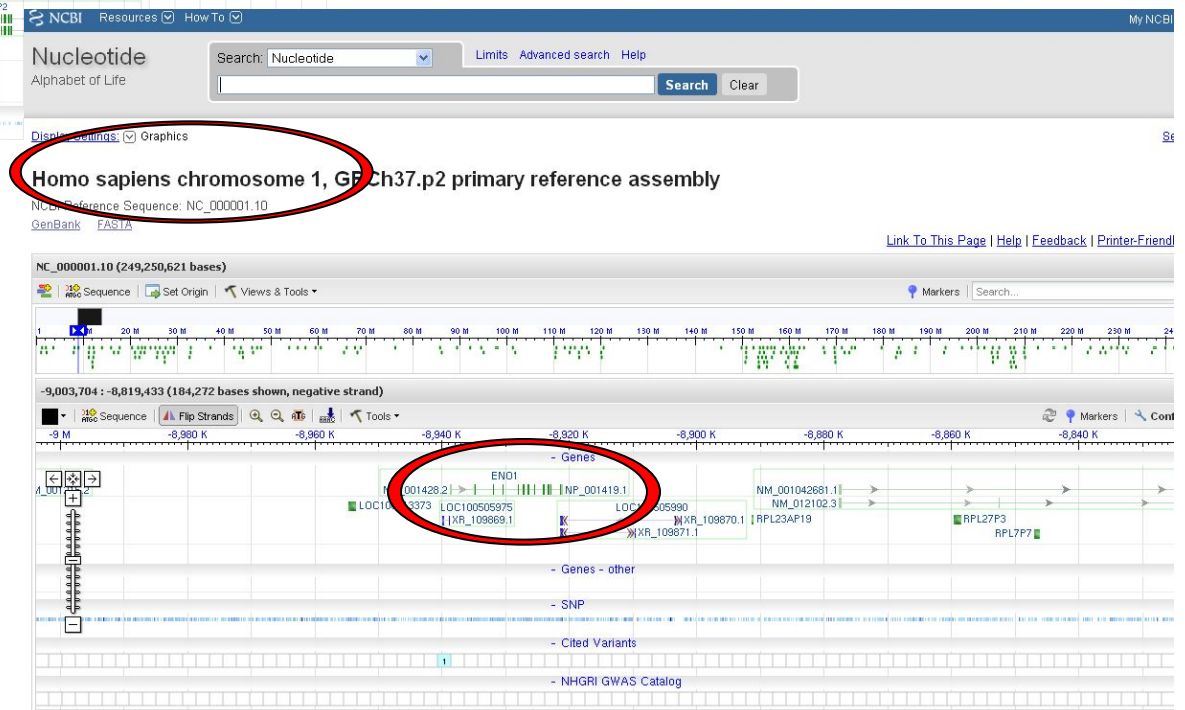
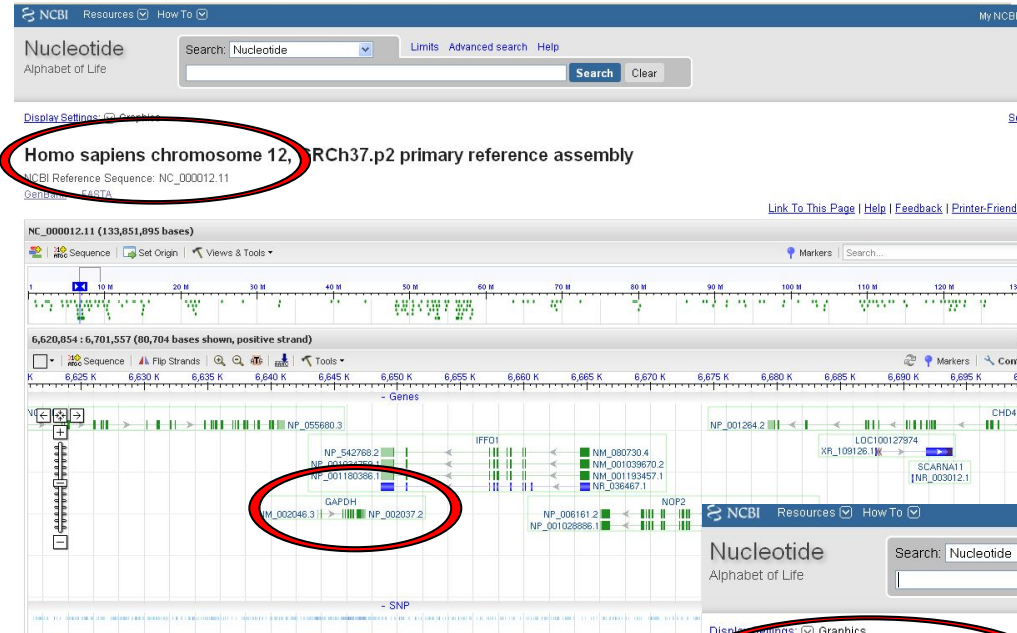
Enolase

Расположение генов гликолиза (*gapA* и *eno*) у прокариот
Mycoplasma gallisepticum (дискретное расположение)



Расположение генов гликолиза (GAPDH и ENO) у эукариот *Homo sapiens*

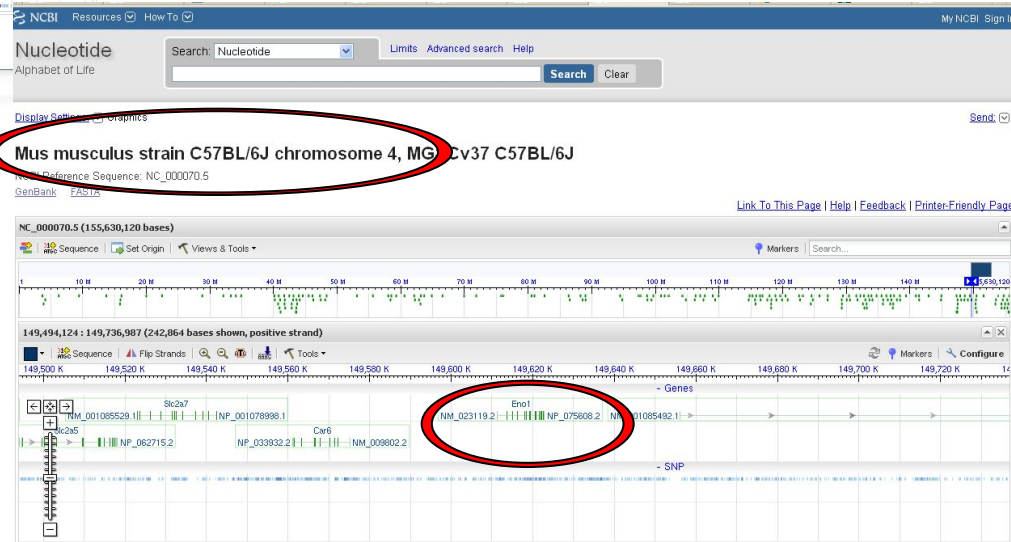
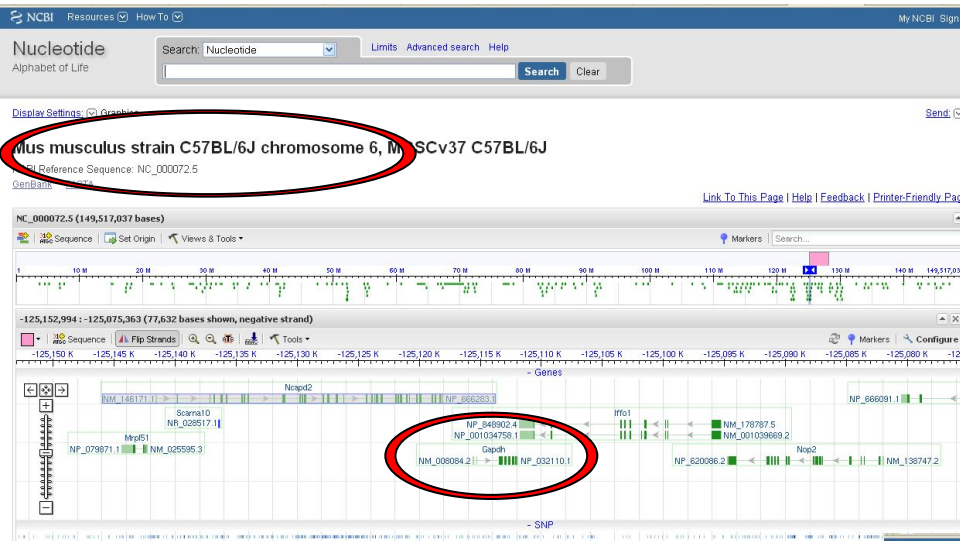
GAPDH



Enolase

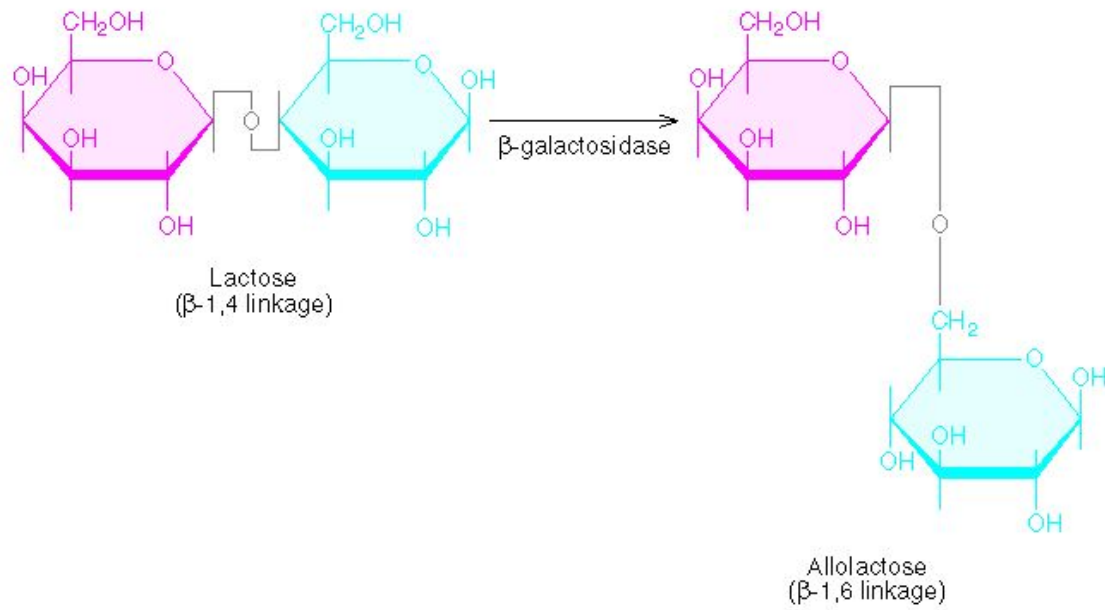
Расположение генов гликолиза (*GAPDH* и *ENO*) у эукариот *Mus musculus*

GAPDH



Enolase

индуктор



Структура промоторов E. Coli

Pribnow box
TATA box
-10 box

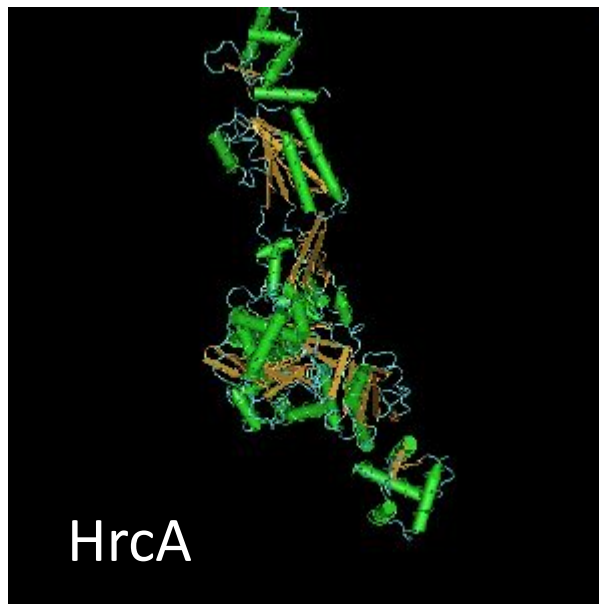
	UP element	-35 Region	Spacer	-10 Region	Spacer	RNA start
Consensus sequence	NNAAA ^{AA} _{TT} ^A _T TTTTNAAAANN	N TTGACA	N ₁₇	TATAAT	N ₆	+1
<i>rrnB</i> P1	AGAAAATTATTTTAAATTCCT	N GTGTCA	N ₁₆	TATAAT	N ₈	A
<i>trp</i>		TTGACA	N ₁₇	TTAACT	N ₇	A
<i>lac</i>		TTTACA	N ₁₇	TATGTT	N ₆	A
<i>recA</i>		TTGATA	N ₁₆	TATAAT	N ₇	A
<i>araBAD</i>		CTGACG	N ₁₈	TACTGT	N ₆	A

Сильные промоторы: хорошее соответствие консенсусу и правильный спейсинг

Слабые промоторы: существенные отличия от консенсуса в -35 and -10 районах

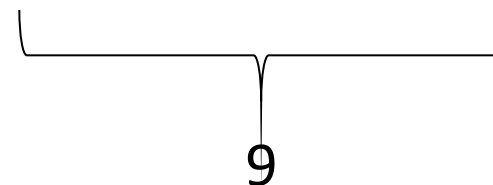
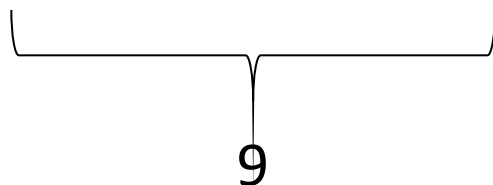
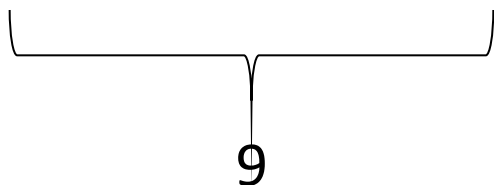
CIRCE

N
 N N
 N N
 N N
 C-G
 T-A
 C-G
 A-T
 C-G
 G-C
 A-T
 T-A
 T-A
 NNNNN NNNNN



N
 N N
 N N
 N N
 C-G
 T-A
 C-G
 A-T
 C-G
 G-C
 A-T
 T-A
 T-A
 NNNNN NNNNN
 NNNNN NNNNN
 A-T
 A-T
 T-A
 C-G
 G-C
 T-A
 G-C
 A-T
 G-C
 N N
 N N
 N N
 N

TTAGCACTC---NNNNNNNNNN---GAGTGCTAA



сигма фактор определяет специфичность связывания РНК полимеразы с промоторами

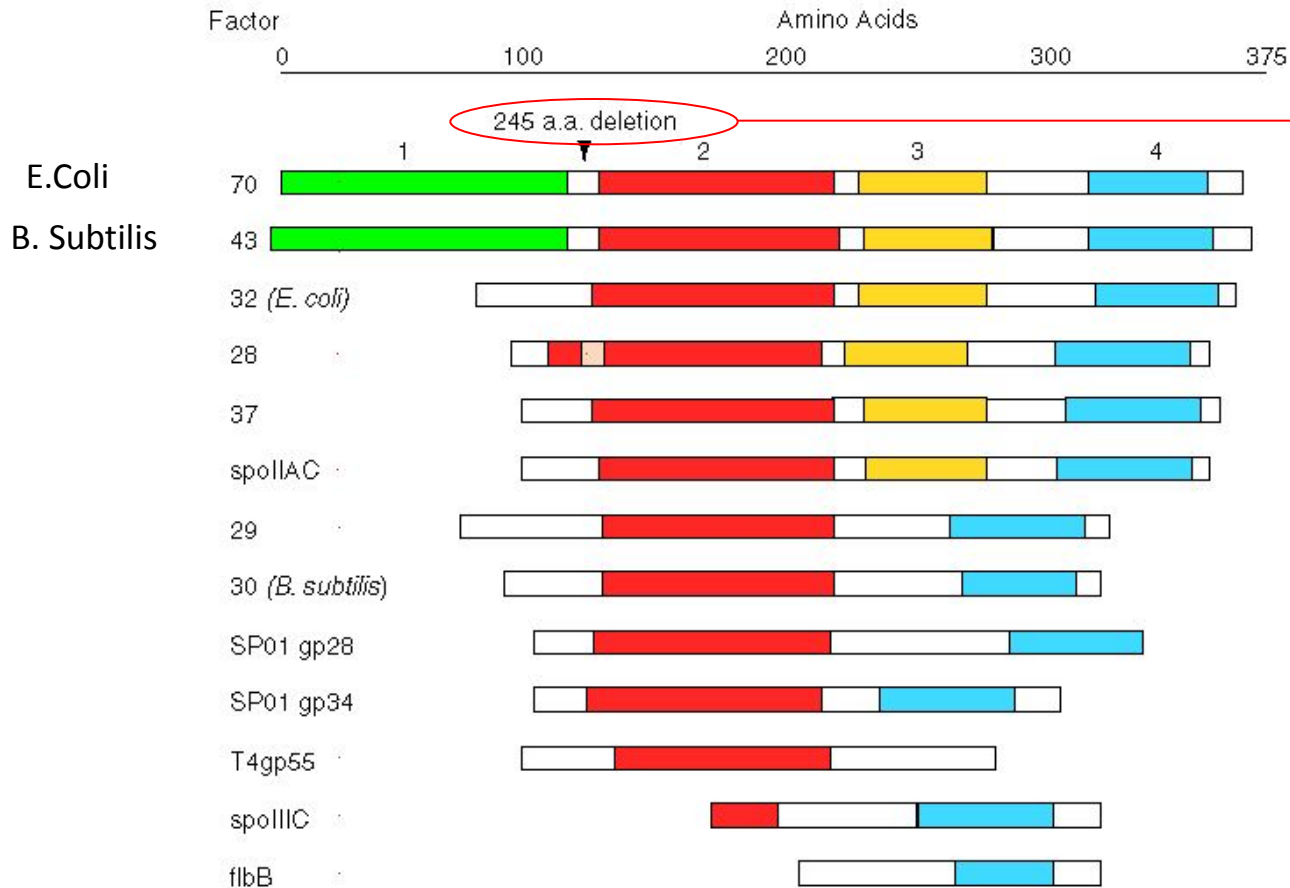
Сравнение аминокислотных последовательностей ряда сигма факторов выявило наличие четырех консервативных участков

участок 1 – подавление неспецифического связывания свободного сигма фактора с ДНК

участок 2 (наиболее консервативный) – связывание с -10 боксом промотора

участок 3 - (факультативный) связывание с -10 боксом промотора

участок 4 – связывание с -35 боксом промотора



подавление неспецифического связывания РНК пол с ДНК

У Subtilis эту функцию выполняет другой белок

сигма

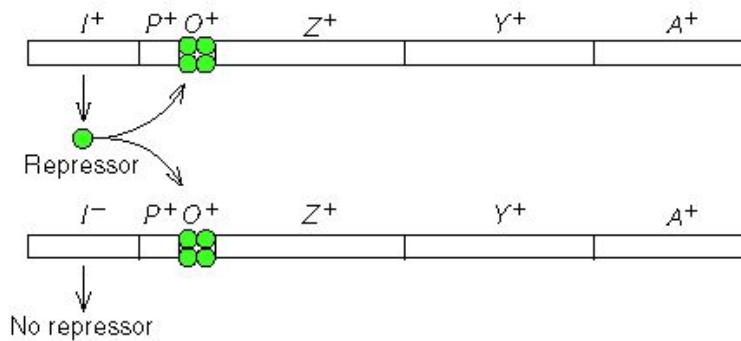
фактор узнаваемые промоторы

структура промотора

	<u>-35 бокс</u>	<u>-10 бокс</u>	
$\sigma 70$ Большинство генов	TTGACAT	TATAAT	
$\sigma 32$ Гены, активирующиеся при тепловом шоке		TCTCNCCCTTGAA	CCCCATNTA
$\sigma 28$ Гены подвижности и хемотаксиса		CTAAA	CCGATAT
$\sigma 38$ Гены стационарной фазы и ответа на стрессы		?	?
	<u>-24 Region</u>	<u>-12 Region</u>	
$\sigma 54$ Гены метаболизма азота		CTGGNA	TTGCA

Работа *lac*-оперона в клетках, содержащих нормальный геном и частичную копию генома с мутациями в *lac*-опероне и регуляторных генах (merodiploids)

(a) Mutant repressor gene (I^-)



Results

No *lac* products in absence of lactose

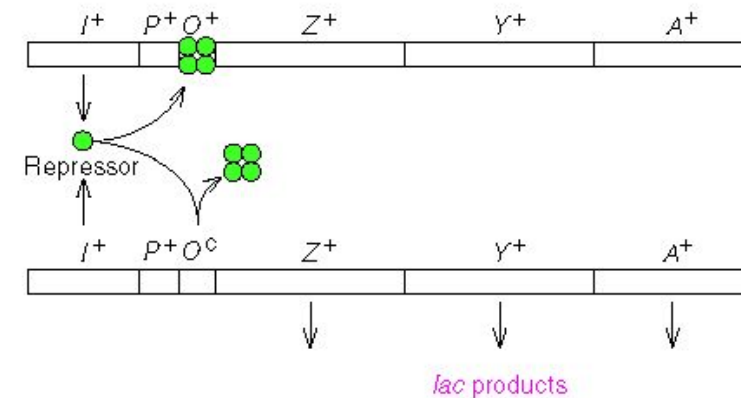
No *lac* products in absence of lactose

Conclusion

Both *lac* operons repressible; mutation is recessive

есть репрессор, работающий in trans

(b) Mutant operator (O^c)

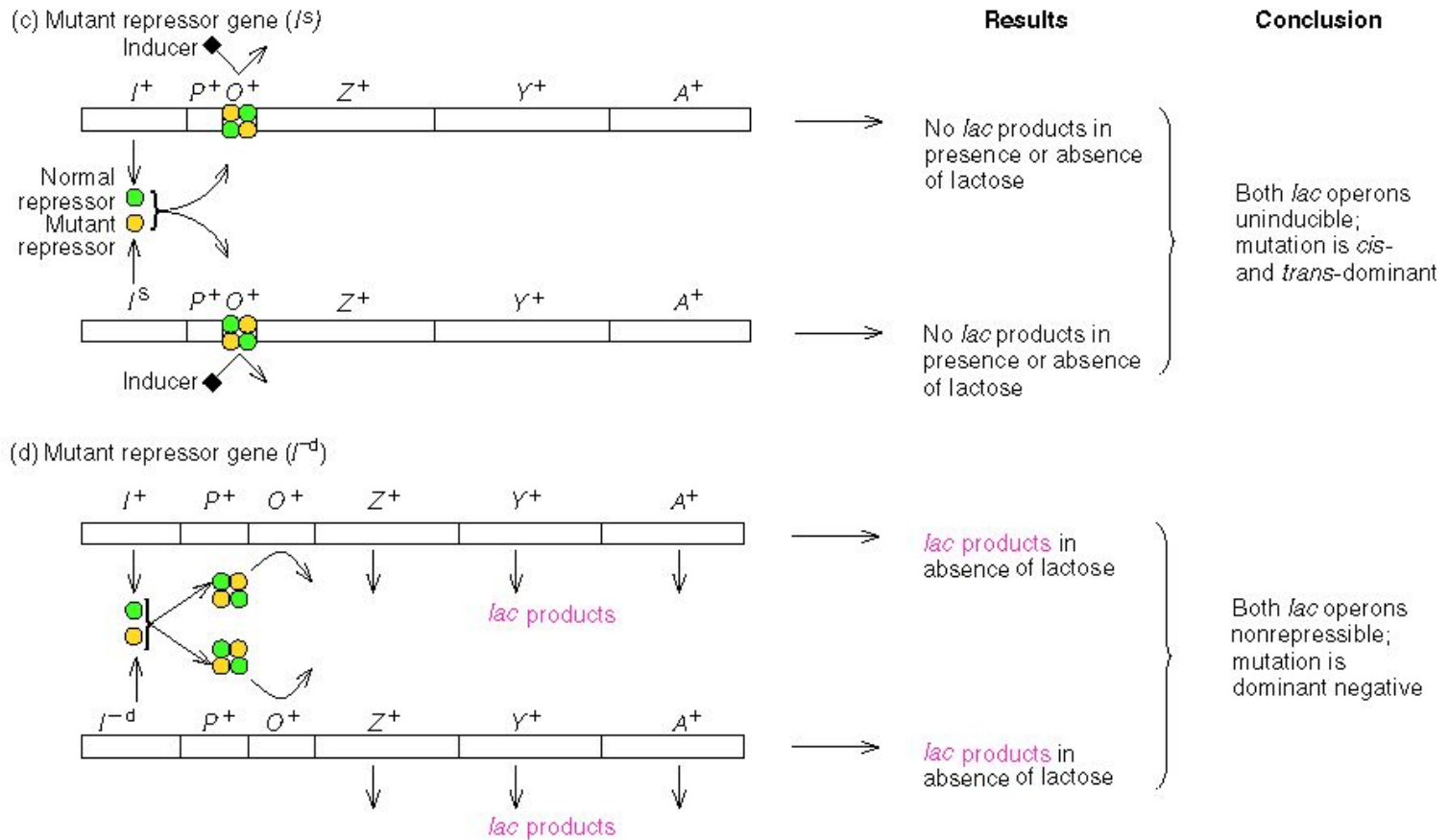


No *lac* products in absence of lactose

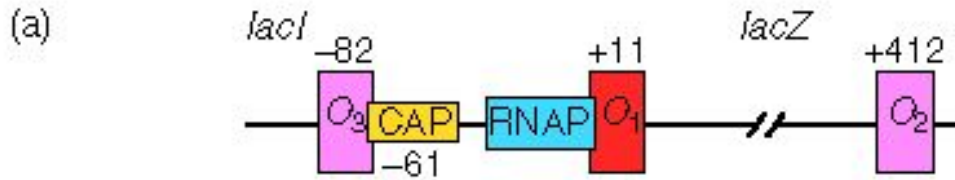
lac products in absence of lactose

One *lac* operon nonrepressible; mutation is *cis*-dominant

есть cis-регуляторный элемент, мутации в котором препятствуют связыванию trans-репрессора



Репрессор состоит из нескольких субъединиц. Мутации, затрагивающие одну субъединицу, влияют на способность всего репрессора связываться с индуктором, либо с оператором

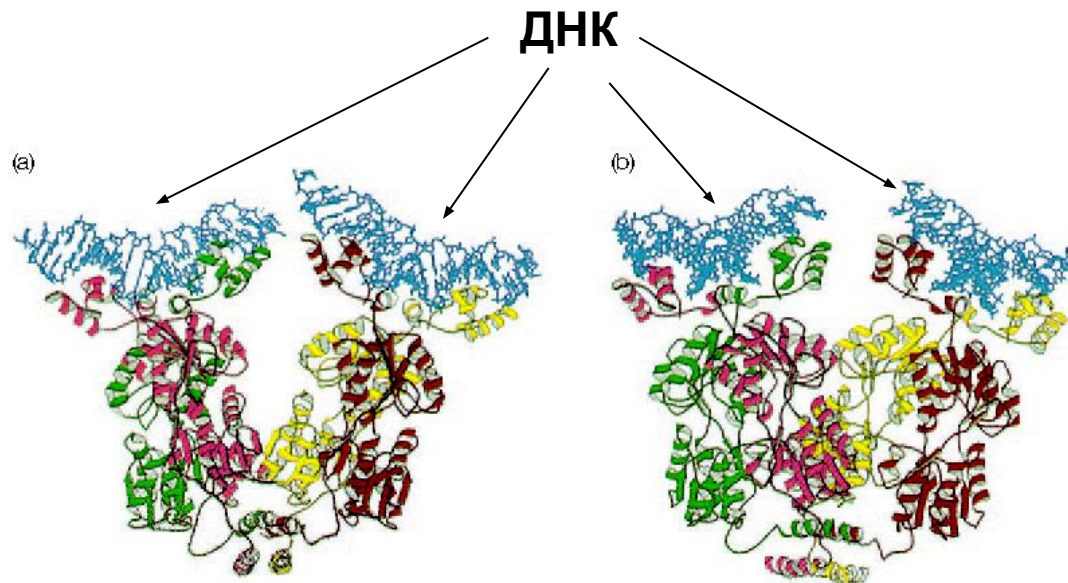


Наряду с главным оператором (O1) в лактозном опероне есть два «вспомогательных» оператора (O2 и O3). Уровень репрессии значительно снижается, если делетировать одновременно O2 и O3

(b)

O ₁	5'	AATTGTGAGCGGATAACAATT	3'
O ₂	5'	AAaTGTGAGCGagTAACAacc	3'
O ₃	5'	ggcaGTGAGCGcAaccCAATT	3'

тетрамер репрессора связывается одновременно с двумя участками узнавания на молекуле ДНК



Репресор не препятствует связыванию РНК полимеразы с промотором

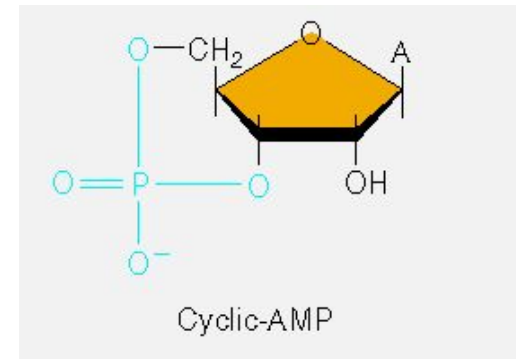
Репрессия осуществляется на этапе перехода от открытого комплекса к элонгации

Почему lac-оперон не работает, когда в среде есть и глюкоза и лактоза?

Катаболитная репрессия ?

В действительности - активация

CAP – Catabolite Activator Protein
(активатор катаболитных оперонов)
Работает в комплексе с цикло-АМФ,
уровень которого существенно
повышается при недостатке глюкозы



CAP активирует целый ряд оперонов, обеспечивающих синтез ферментов, необходимых для использования альтернативных продуктов питания (*gal*, галактозный оперон; *ara*, арабинозный оперон)

CAP стимулирует образование открытого комплекса

Участок связывания CAP находится перед промотором и содержит TGTGA последовательность

lac промотор и многие другие катаболитные промоторы являются очень слабыми. -35 бокс в этих промоторах сильно отличается от консенсуса

Существуют мутанты *lac* промотора, которые обеспечивают транскрипцию без CAP активатора

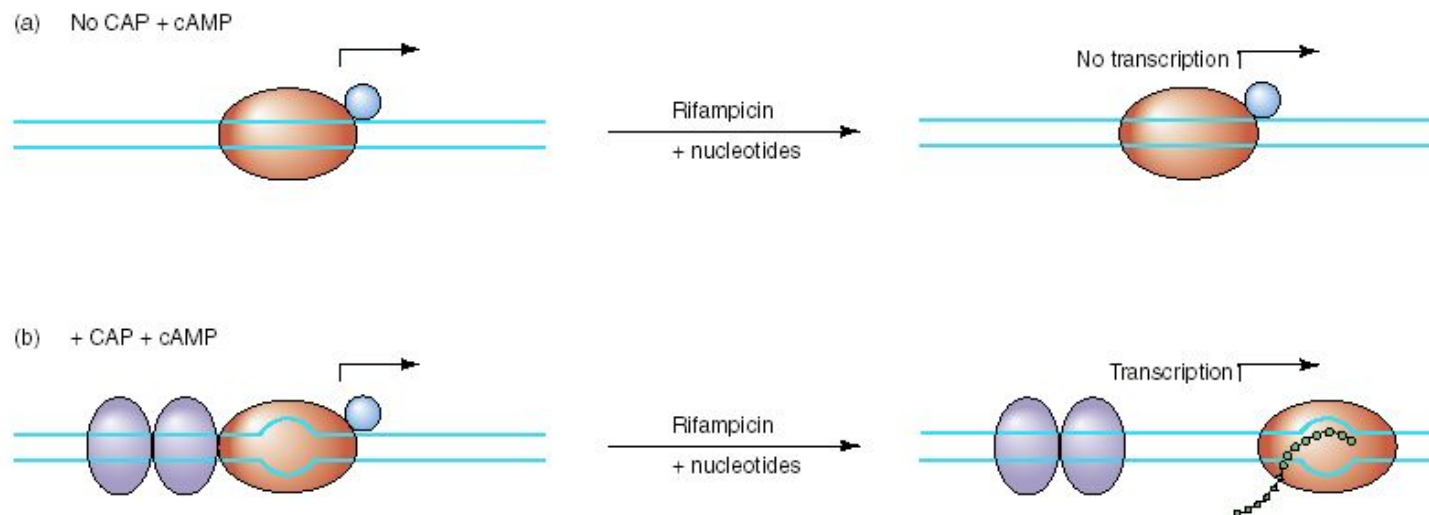
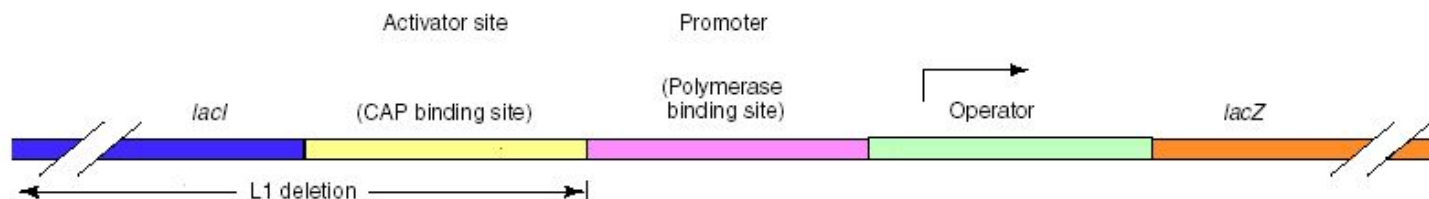
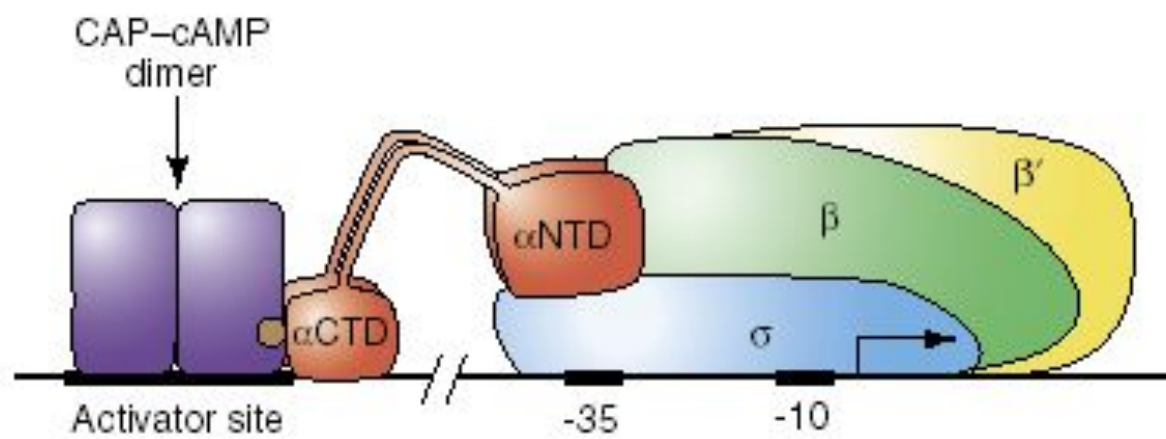


Figure 7.15 CAP plus cAMP allow formation of an open promoter complex. (a) When RNA polymerase binds to the *lac* promoter without CAP, it forms a closed promoter complex. This is susceptible to inhibition when rifampicin is added along with nucleotides, so no transcription occurs. (b) When RNA polymerase binds to the *lac* promoter in the presence of CAP and cAMP (purple), it forms an open promoter complex. This is not susceptible to inhibition when rifampicin and nucleotides are added at the same time because the open promoter complex is ready to polymerize the nucleotides, which reach the polymerase active site before the antibiotic. Once the first phosphodiester bond forms, the polymerase is resistant to rifampicin inhibition until it reinitiates. Thus, transcription occurs under these conditions, demonstrating that CAP and cAMP facilitate formation of an open promoter complex. The RNA is shown in green.



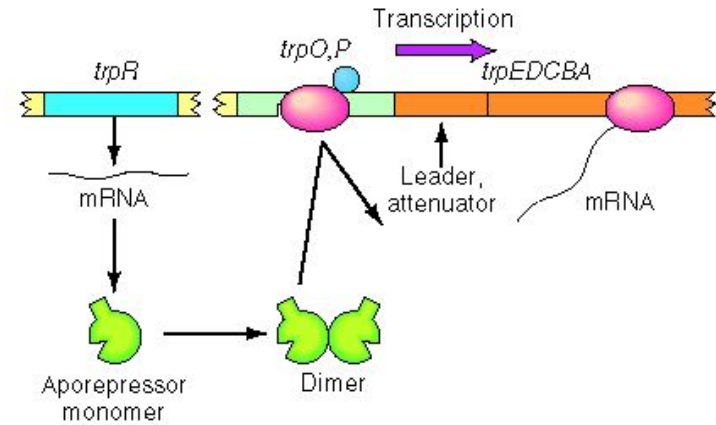


Анаболитные опероны

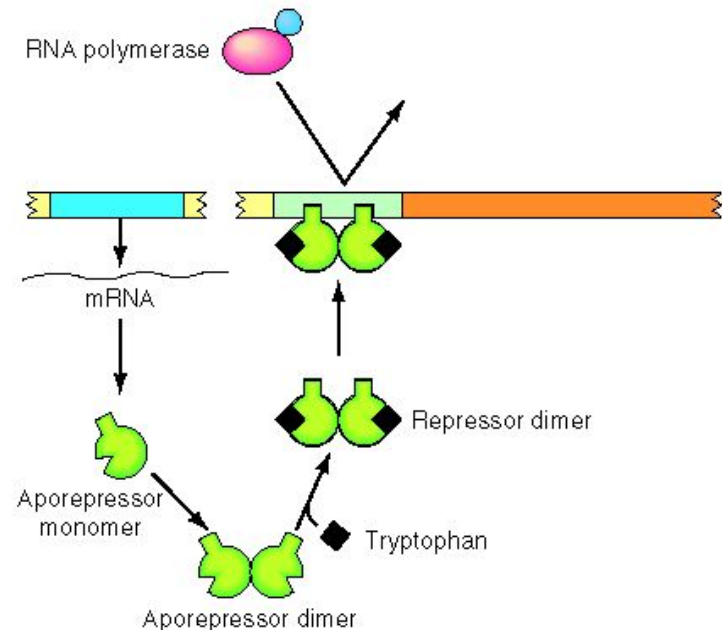
Должны активироваться в условиях недостатка тех веществ, в синтезе которых участвуют кодируемые опероном ферменты

триптофановый оперон:

триптофан (**корепрессор**) связывается с неактивной формой репрессора, превращая ее в активную



(b) High tryptophan: repression



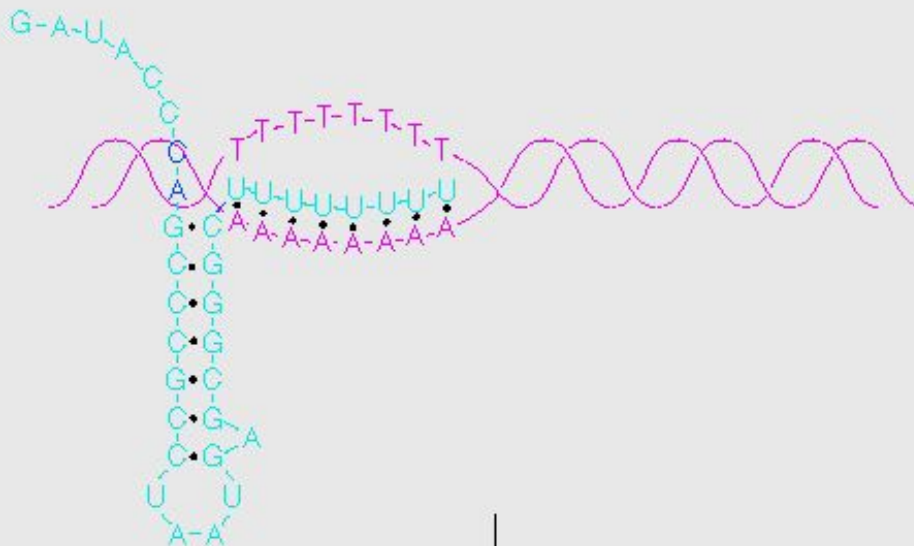
Преждевремя
дополнительн

В начале опе
лидерный пе
После этой р

trpO, P



mRNA:

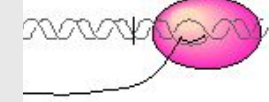


еспечивает

ываемый

анскрипции

trpE

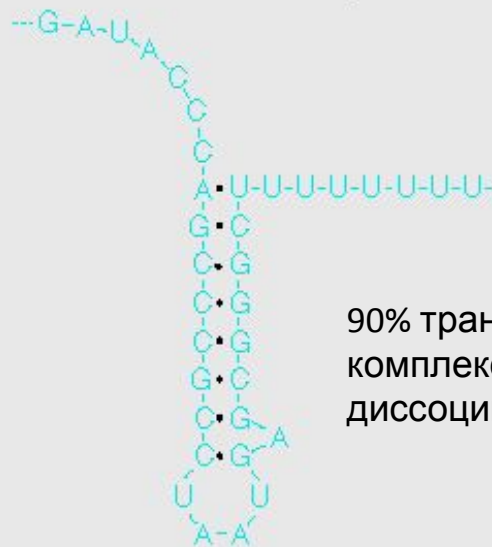


High tryptophan: at

trpO, P



mRNA:



90% транскрипционных
комплексов
диссоциируют

trpE



(Leader termination)

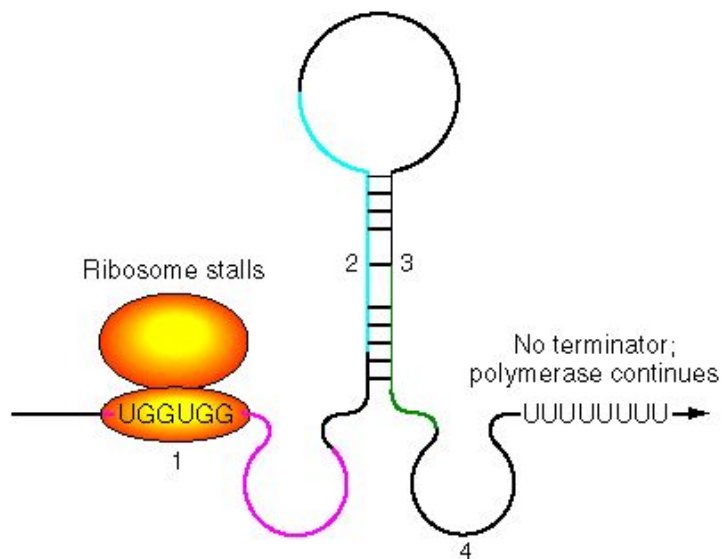


У прокариот транскрипция и трансляция могут происходить одновременно

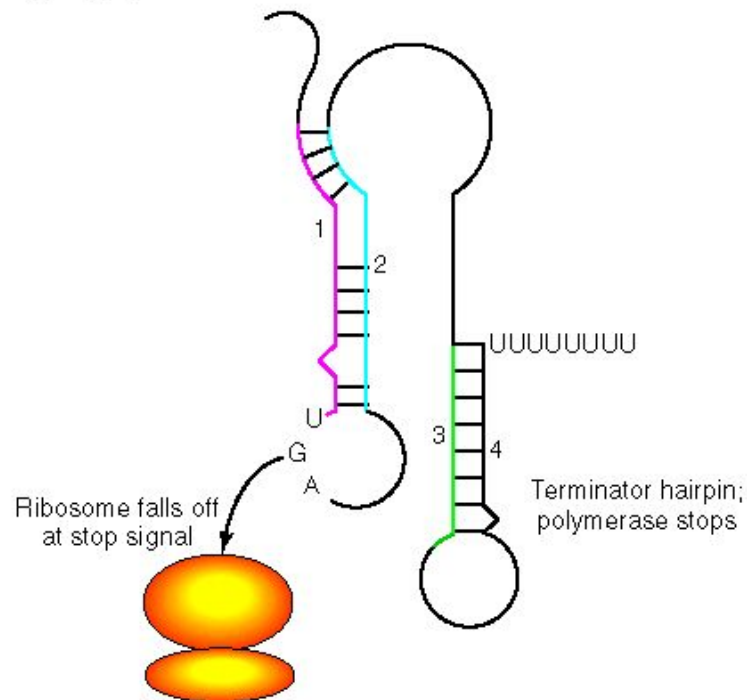
При отсутствии триптофана рибосома задерживается на лидерной последовательности. Это смещает равновесие в сторону большой шпильки

Met Lys Ala Ile Phe Val Leu Lys Gly Trp Trp Arg Thr Ser Stop
pppA--AUGAAAGCAAUUUUUCGUACUGAAAGGUUGGUGGCGCACUCCUGA

(a) Tryptophan starvation



(b) Tryptophan abundance



Регулируемые терминаторы транскрипции есть и в других анаболитных оперонах
В гистидиновом опероне лидер содержит 7 кодонов гистидина