

МОЛЕКУЛЯРНОЕ СТРОЕНИЕ ОПЕРОНА

План

Генетическая система координат. Строение оператора и промотора

- 1. Структура транскрибируемой области оперона. Терминация транскрипции. Результат транскрипции.**
- 2. Регулоны и аттенюаторы**
- 3. Молекулярный механизм работы белка-репрессора**

1. Генетическая система координат. Строение оператора и промотора

Методами молекулярной биологии в 70 х годах была подтверждена оперонная гипотеза Ф. Жакоба и Ж. Моно (удостоенных Нобелевской премии в 1965 году) и установлено строение оперона (рис.1). Оказалось, что **оператор** – это участок ДНК, находящийся в самом начале транскрибируемой области оперона. Перед оператором (в нетранскрибируемой области) находится регуляторный участок - **промотор**. **Промотор** – это область ДНК, к которой прикрепляется молекула фермента РНК-полимеразы.

Строение оперона

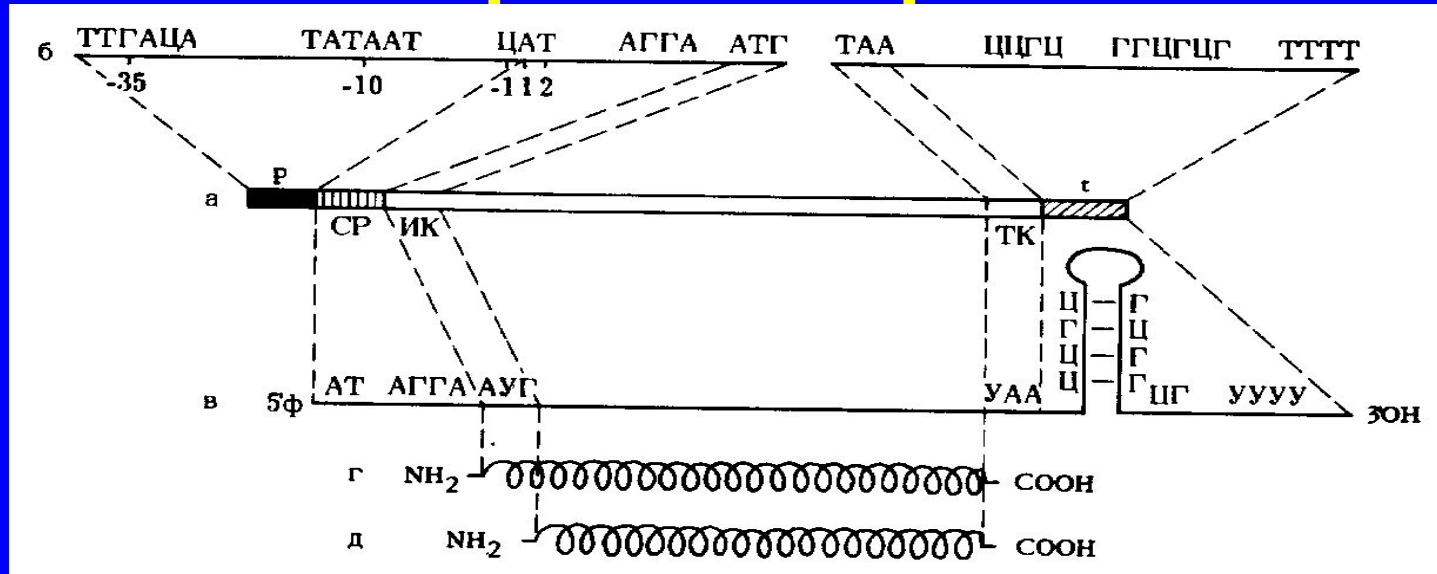


Рис. 1. Молекулярное строение и схема экспрессии оперона:
а — принципиальная структура гена (р — промотор; CP — сайт связывания рибосом; ИК и ТК — соответственно иницирующий и терминирующий кодоны; t — терминатор транскрипции) ;
б - идеализированная структура характерных сайтов на некодирующей нити ДНК; **в** - мРНК; **г** - белок-предшественник ; **д** — активный белок.

На рисунке 1 использована принятая в молекулярной генетике система координат, в которой нуклеотиды нумеруются от границы между транскрибируемой (справа) и нетранскрибируемой (слева) областями ДНК. Первый транскрибируемый нуклеотид и все нуклеотиды, находящиеся от него справа, имеют номера со знаком (+). Нетранскрибируемые нуклеотиды нумеруются влево со знаком (–).

Другая особенность схемы состоит в том, что состав нуклеотидов указывается не по смысловой, а по комплементарной ей цепи ДНК. Это облегчает отображение результатов транскрипции, так как синтезируемая РНК имеет такой же состав нуклеотидов, что и несмысловая цепь ДНК (за исключением замены тимина на урацил).

Оператор в этой системе координат находится на отрезке ДНК от +1 до +24, промотор – от –1 до –38. (Эти значения являются усреднёнными по большому числу (свыше 100) изученных промоторов *E. coli*).

В состав промоторов всех изученных оперонов входят два участка с относительно постоянным составом и последовательностью нуклеотидов (**консервативные последовательности**). Одна из них (последовательность **Хогнесса**) необходима для узнавания, а другая (последовательность **Прибноу**) — для тесного связывания РНК-полимеразы с промотором.

Последовательность Хогнесса имеет состав **5' ТТГАЦАЗ'**. Её центр находится около координаты — 35. Последовательность Прибноу (**5'ТАТААТЗ'**) расположена в участке с центральной координатой —10. В разных промоторах положение обоих последовательностей немного различается. Чаще всего они отстоят друг от друга на 16-18 пар нуклеотидов.

Последовательность нуклеотидов оператора (область ДНК от +1 до +24). лактозного оперона (*Lac*-оперона) образует симметричный **палиндром** (рис. 2) – последовательность пар нуклеотидов, которая в каждой из цепей ДНК считывается одинаково, но в противоположных направлениях (как справа налево, так и слева направо). Строение палиндрома таково, что молекула белка-репрессора, закодированного в регуляторном гене (I^*), прочно связывается с изолированной ДНК оператора (если нет индуктора). Если же в среде есть индуктор (аллолактоза), то репрессор соединяется с ним. При этом происходит аллостерическое изменение пространственной структуры молекулы репрессора, что влечёт к ослаблению его связи с операторной ДНК.

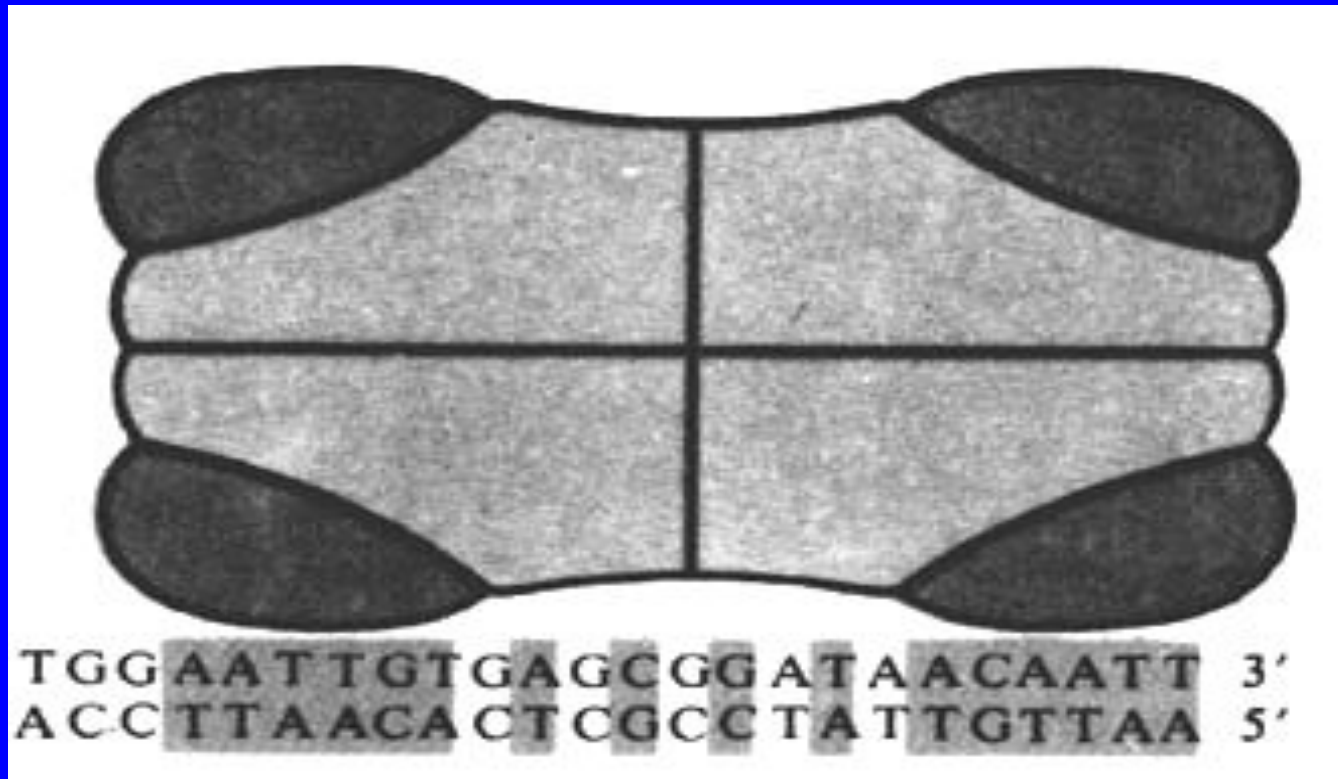


Рис. 2. Белок-репрессор и нуклеотидная последовательность ДНК (палиндром), с которой связывается *lac*-репрессор.

2. Структура транскрибируемой области оперона.

Терминация транскрипции. Результат транскрипции

Транскрибируемая область оперона включает не только оператор и структурные гены. Между оператором и первым структурным геном (координаты от +28 до +36) находится участок, кодирующий т.н. **сайт узнавания рибосом** (или последовательность **Шайна-Далгарно**) (СР на рис.1). В её состав входит участок **5'АГГА 3'**. В транскрибируемой мРНК к этой последовательности присоединяется рибосома. Сайты рибосом расположены перед каждым структурным геном оперона. Промотор, оператор и терминирующий участок являются общими для всех генов оперона. Поэтому, синтезирующаяся мРНК является **полицистронной**, т.е. содержит непрерывную последовательность нуклеотидов РНК, транскрибированную со всех структурных генов данного оперона — от оператора до терминатора включительно.

Примерно с 37-го нуклеотида начинается ДНК первого структурного гена. Первый триплет (кодон в мРНК) называется **инициирующим** (ИК на рис.1). В большинстве генов бактерий это триплет **АТГ** (реже – **ГТГ**). Триплет АТГ кодирует ами-нокислоту метионин, но в начале полипептидной цепи он оп-ределяет вставку аминокислоты – формилметионина. В гото-вом белке эта аминокислота модифицируется или отщепляется.

Белок-кодирующая часть заканчивается **терминирующим** триплетом (ТК на рис.1) (**ТАА, ТАГ или ТГА**).

Пройдя структурные гены и синтезировав полицистронную молекулу мРНК, РНК-полимераза вступает в область, называемую **терминатором**. В терминаторной последовательности содержатся участки, состоящие из повторяющихся ГЦ-пар, расположенных в противоположной ориентации относительно друг друга и взаимно комплементарных. В транскрибированной одноцепочной мРНК эти участки комплементарно соединяются друг с другом с помощью водородных связей, образуя т.н.

Предполагается, что образование шпилек в синтезированной молекуле мРНК способствует её отсоединению от ДНК-матрицы.

Движение РНК-полимеразы по двойной нити ДНК сопровождается перемещением расплавленного участка ДНК (длиной 16-18 н.п.), в котором 3'-концевая область синтезируемой мРНК связана водородными связями с ДНК-матрицей. После считывания терминального участка в соответствующем ему участке мРНК образуется шпилька. Это, каким то, пока не образом, ослабляет связь РНК с ДНК матрицей и приводит к разрыву

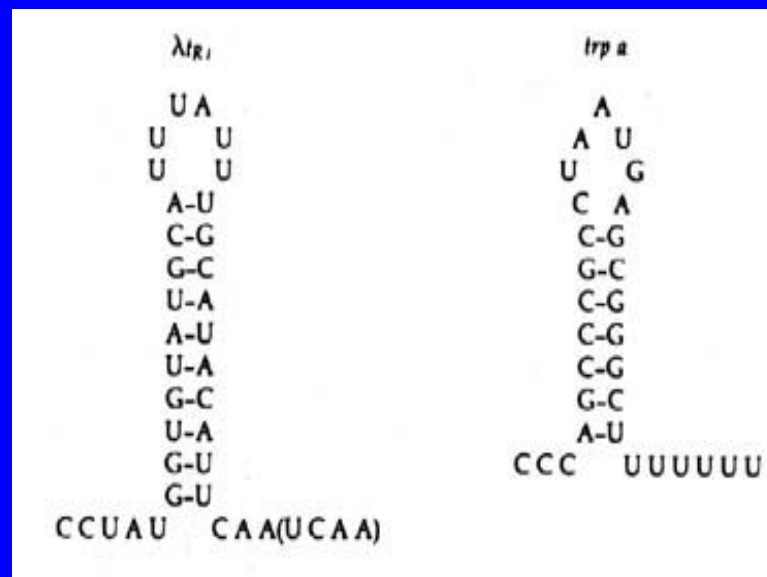


Рис. 3. Шпильки в терминальных последовательностях двух мРНК, образующиеся при транскрипции:

1 - гена фага λ ;

2 - триптофанового оперона *E.coli*

За терминатором, на расстоянии около 20 нуклеотидов от оси шпильки, расположен участок ДНК, состоящий из остатков тимидина (ТТТ...) (в мРНК, соответственно, УУУ...). На РНК-транскрипте образуется полиуридиновый «хвост» (рис. 1, 4). Так как поли-У последовательность соединена с комплементарной ей последовательностью поли-А (в ДНК) меньшим числом водородных связей, чем участки, состоящие из Г-Ц пар, то это способствует отсоединению РНК-транскрипта от ДНК-матрицы

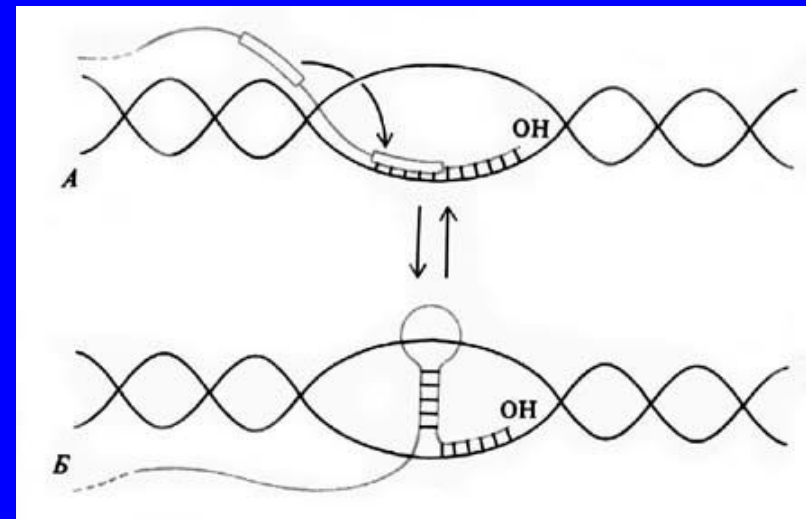


Рис. 4. Возможный механизм терминации транскрипции
(объяснение в тексте).

На рис. 5 показана схема экспрессии лактозного оперона *E.coli*.

Образовавшаяся в ходе транскрипции полигенная (полицистронная) молекула мРНК, состоит из лидерной (5'), белок-кодирующей и концевой (3') частей.

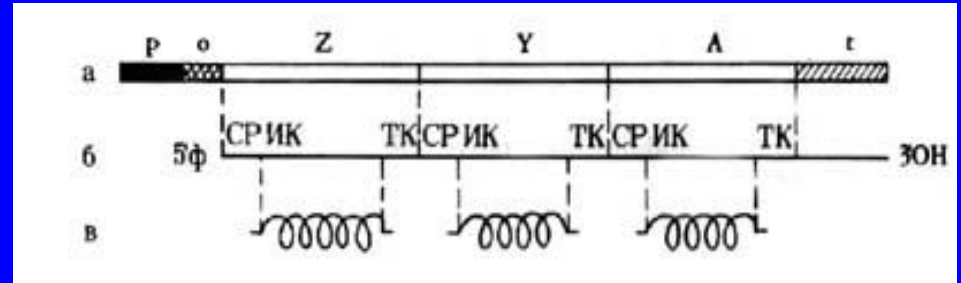


Рис. 5. Схема экспрессии лактозного оперона *E.coli*: а – строение оперона (р – промотор; о – оператор; Z, Y, A – структурные гены; t – терминатор); б – полигенная мРНК (СР- сайт связывания рибосом, ИК и ТК – иницирующий и терминирующий кодоны); в – белки.

Трансляция мРНК начинается с посадки рибосом на мРНК, которая осуществляется благодаря комплементарности 3'-конца 16S рибосомной РНК и лидерной части мРНК (в сайте связывания рибосом). Рибосомы считывают информацию со всех генов полигенной мРНК. Но благодаря тому, что перед каждым геном имеется свой сайт связывания рибосом и иницирующий кодон, а в конце каждого гена – свой терминирующий кодон, на каждом гене мРНК синтезируется своя отдельная полипептидная цепь (рис.5).

3. Регулоны и аттенюаторы

В ДНК бактерий существует и другой тип организации генов. Некоторые группы структурных генов объединены в **регулоны** – совокупности координированно экспрессирующихся генов, контролирующих одну определенную функцию (этапы расщепления или синтеза какого-либо вещества). Гены в регулоне пространственно отдалены друг от друга. Каждый ген имеет собственные промотор, оператор и терминатор транскрипции. В некоторых регулонах часть генов объединена в опероны (например аргининовый регулон состоит из шести отдельных генов и двух оперонов).

Некоторые опероны (и регулоны), контролирующие синтез аминокислот, содержат ещё один тип регуляторных элементов – **аттенюаторы**.

Аттенюатор – это нуклеотидная последовательность с инвертированными повторами, расположенная между промотором и первым геном оперона. Вторичная структура аттенюатора изменяется в зависимости от наличия или отсутствия в клетке аминокислоты, синтез которой контролируется данным опероном (или регулоном). В аттенюаторе закодирован пептид, содержащий несколько, расположенных друг за другом, аминокислотных остатков данной аминокислоты. Когда концентрация аминокислоты в клетке в результате её синтеза (или поступления извне) достаточно высокая, происходит синтез аттенюаторного пептида. В результате изменяется вторичная структура ДНК в аттенюаторе таким образом, что транскрипция оперона прекращается. (Аттенюатор, таким образом, приобретает характер терминатора). При низкой концентрации аминокислоты в клетке пептид не синтезируется и структура аттенюатора не мешает транскрипции.

4. Молекулярный механизм работы белка-репрессора

Молекула активного *Lac*-репрессора это тетрамер, построенный из четырёх одинаковых полипептидных цепей (рис.2) первичная структура которых закодирована в генерегуляторе (I^*). Каждая цепь состоит из 360 аминокислотных остатков. Репрессор способен соединяться как с операторной ДНК, так и с индуктором. Связывание с этими двумя агентами осуществляется двумя различными участками белковых цепей молекулы репрессора. К ДНК репрессор прикрепляется N-концевой последовательностью, длиной около 50 аминокислотных остатков. Соединение с индуктором так изменяет конфигурацию молекулы репрессора, что она теряет химическое сродство к операторному участку ДНК. Для репрессии транскрипции *Lac*-оперона достаточно 10 молекул репрессора на клетку.

Удивительна точность, с которой молекула репрессора «опознаёт» операторный участок. Длина молекулы ДНК *E. coli* составляет 3,2 млн. пар нуклеотидов, а длина оператора *Lac*-оператора – всего 24 п.н. (рис.2). Если использовать иной масштаб, и принять длину оператора равной 1 см, то длине всей ДНК будет соответствовать величина 1,33 км. **Каким образом нескольким молекулам репрессора удаётся «отыскать» на огромной молекуле ДНК свою крошечную операторную последовательность?** Успешность столь точного поиска определяется его механизмом.

Молекулы репрессора имеют достаточно сильное химическое сродство и к неоператорной ДНК. По-видимому, все они после своего синтеза прикрепляются к ДНК в любом месте. Но эта связь, примерно, в 100000 раз слабее связи со своим оператором.

Она достаточно сильна, чтобы удерживать молекулы репрессора в постоянном контакте с нитью ДНК, но позволяет им перемещаться (скользить) вдоль ДНК (рис.6).

Встретившись при таком скольжении со своим оператором, белок-репрессор прочно фиксируется на нём. Моделью данного процесса может служить бусина, нанизанная на длинную нить. Она может свободно перемещаться по нити, пока не наткнётся на крупный узелок.

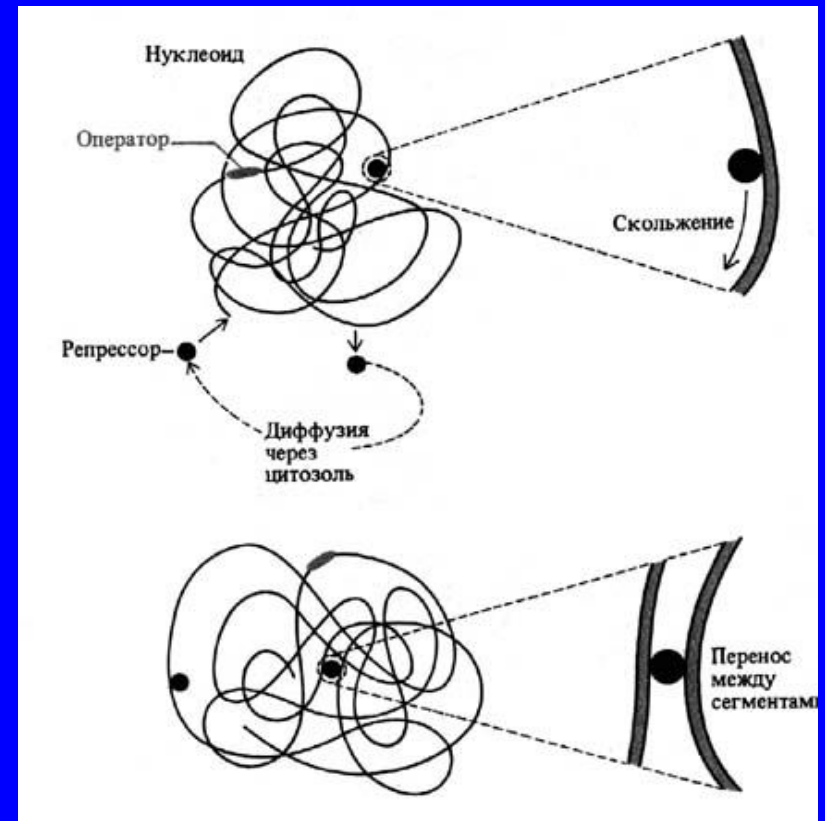


Рис.6. Схема поиска белком-репрессором области оператора на ДНК бактерии, сплетённой в клубок – нуклеоид. (Объяснение в тексте)

Поиск оператора молекулами репрессора облегчается благодаря особенностям строения как самого репрессора, так и операторного участка ДНК. Оператор имеет структуру палиндрома (рис.2), поэтому он может одинаково хорошо «распознаваться» молекулой репрессора при подходе к нему как слева, так и справа.

Молекула репрессора также симметрична, её противоположные концы одинаковы по строению, а, следовательно, обладают одинаковыми способностями к «распознаванию» оператора. Поэтому молекула репрессора может перемещаться по кольцевой «хромосоме» бактерии в любом направлении. В любом случае, она «обнаружит» свой оператор и прочно соединится с ним.

Вопросы и задания

1. Нарисуйте в тетради схему строения оперона (рис.1). Выделите и подпишите названия всех его функциональных участков.
2. Какие последовательности называются консервативными? Каковы функции последовательностей Прибноу, Хогнесса и Шайна-Долгарно?
3. Какой белок закодирован в гене регуляторе? Каковы функциональные и структурные особенности этого белка?
4. Что такое палиндром? Какова его функция в промоторном участке оперона?
5. Каким образом молекула белка-репрессора «узнаёт» операторный участок в опероне?
6. Каким образом образуются «шпильки» в терминаторном участке иРНК? Какова их возможная функция?
7. Что такое аттенюатор? Какова его функция?