

# **МОЛЕКУЛЯРНОЕ СТРОЕНИЕ ОПЕРОНА**

## **План**

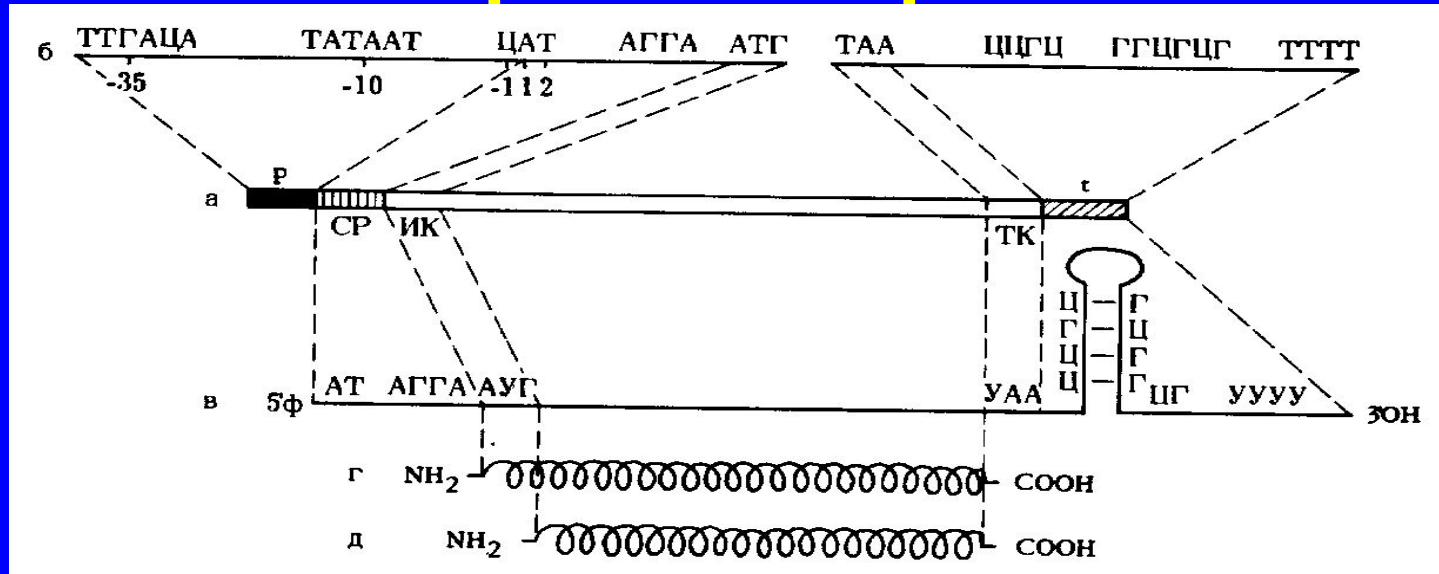
**Генетическая система координат. Строение оператора и промотора**

- 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 (p — промотор; CP — сайт связывания рибосом; ИК и ТК — соответственно инициирующий 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 (–).

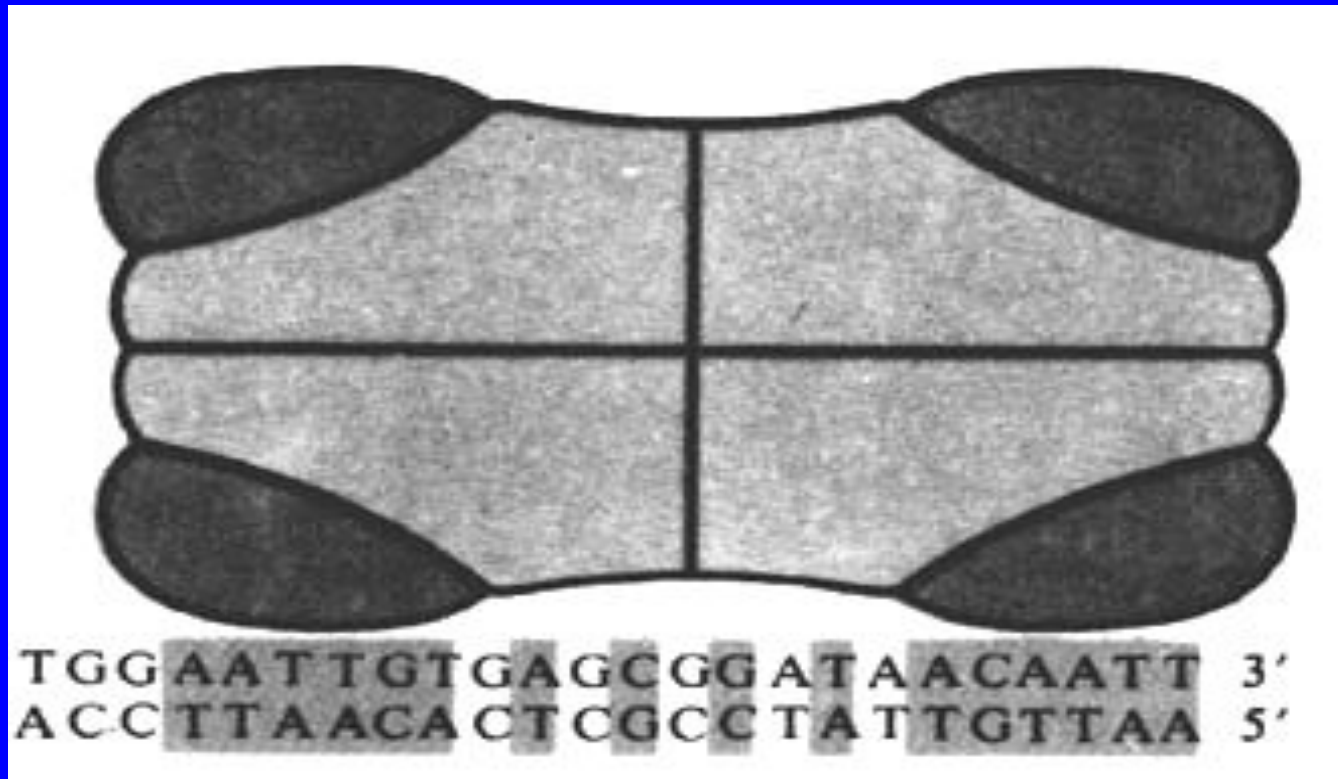
Другая особенность схемы состоит в том, что состав нуклеотидов указывается не по смысловой, а по комплементарной ей цепи ДНК. Это облегчает отображение результатов транскрипции, так как синтезируемая РНК имеет такой же состав нуклеотидов, что и несмысловая цепь ДНК (за исключением замены тимина на урацил).

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.



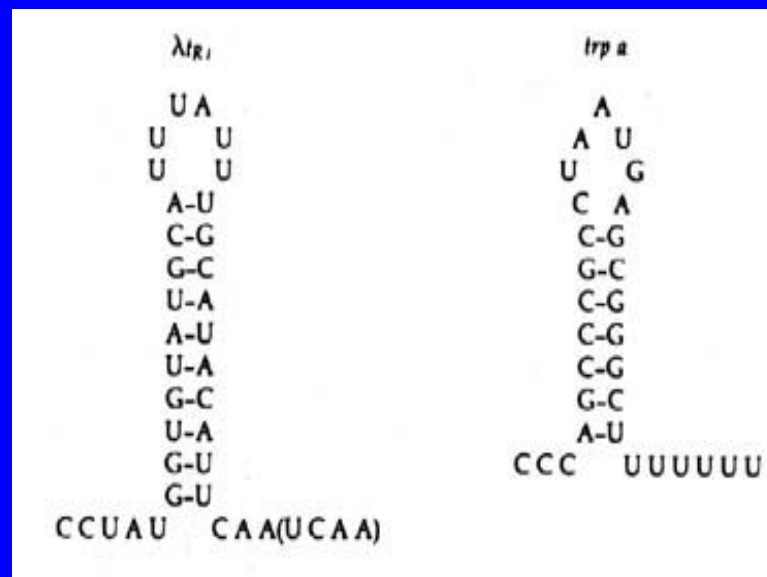
Примерно с 37-го нуклеотида начинается ДНК первого структурного гена. Первый триплет (кодон в мРНК) называется **инициирующим** (ИК на рис.1). В большинстве генов бактерий это триплет **АТГ** (реже – **ГТГ**). Триплет АТГ кодирует ами-нокислоту метионин, но в начале полипептидной цепи он оп-ределяет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

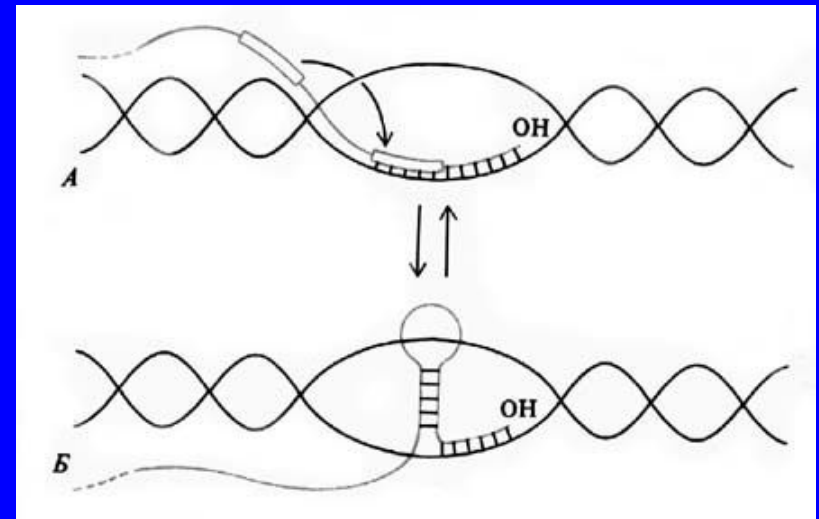
Предполагается, что образование шпилек в синтезированной молекуле мРНК способствует её отсоединению от ДНК-матрицы.

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 терминаторного 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 терминаторных последовательностях двух мРНК, образующиеся при транскрипции:**  
**1 - гена фага  $\lambda$ ;**  
**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.

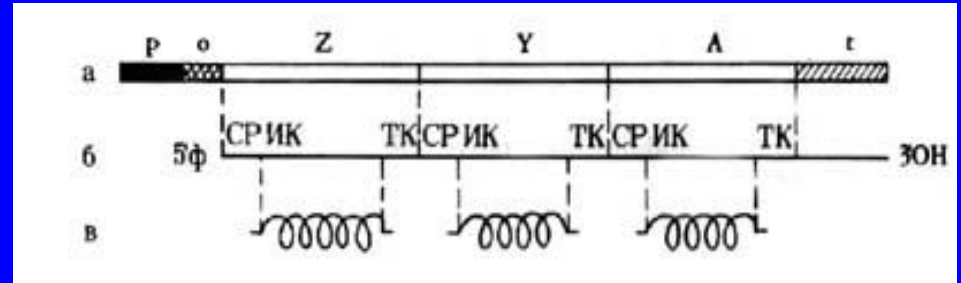


Рис. 5. Схема экспрессии лактозного оперона *E.coli*: а – строение оперона (р – промотор; о – оператор; Z, Y, A – структурные гены; t – терминатор); б – полигенная мРНК (СР- сайт связывания рибосом, ИК и ТК – иницирующий и терминирующий кодоны); в – белки.

**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.

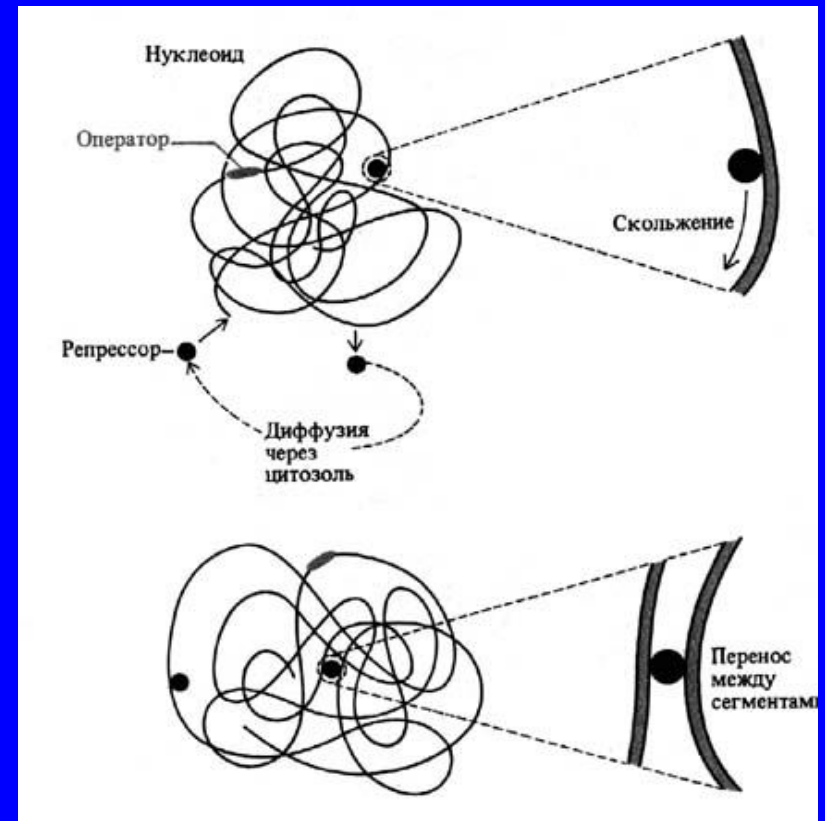


Удивительна точность, с которой молекула репрессора «опознаёт» операторный участок. Длина молекулы ДНК *E. coli* составляет 3,2 млн. пар нуклеотидов, а длина оператора *Lac*-оператора – всего 24 п.н. (рис.2). Если использовать иной масштаб, и принять длину оператора равной 1 см, то длине всей ДНК будет 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?