

# **ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНОМА ПРОКАРИОТ И РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНОВ**

## **План**

- 1. Принципы изучения работы генов бактерий.**
- 2. Регуляция транскрипции гена галактозидазы у *E.coli*. Оперон.**

# 1. Принципы изучения работы генов бактерий

Исследования главного структурного и функционального элемента генома – отдельного гена начались в 60-х гг. XX века. В те годы не существовало методов определения нуклеотидной последовательности ДНК. Поэтому учёные строили гипотезы о строении гена на основе экспериментального изучения особенностей его функционирования. В 70-80-гг. эти гипотезы были проверены и уточнены с помощью молекулярной генетики.

Прямым критерием активности гена является наличие или отсутствие в клетке закодированного в нём белка. Так как большинство генов кодируют строение ферментов, можно судить о работе гена по активности соответствующего фермента. Искусственно вводя или убирая из питательной среды субстрат для данного фермента можно получить сведения относительно особенностей регуляции работы гена. Для проведения подобных исследований лучше всего подходят микроорганизмы, в частности – бактериальные

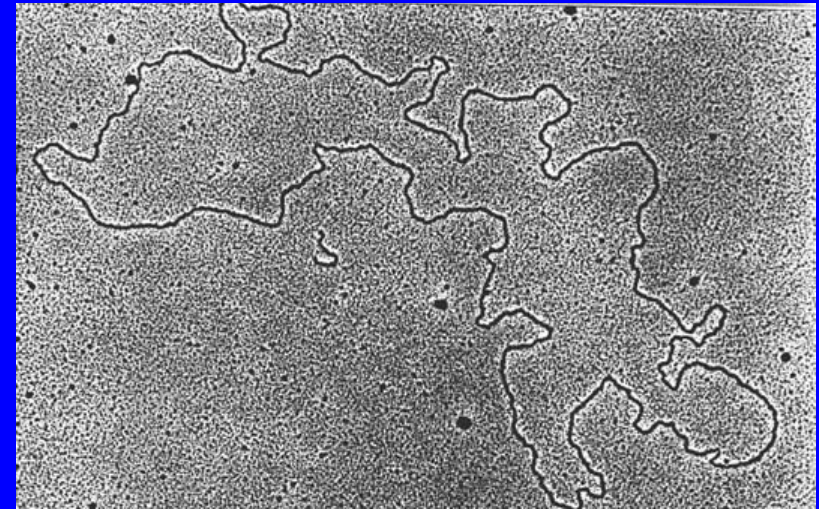
## *1.1. Бактерии как объекты генетики*

Генетический аппарат бактерий не организован в хромосомы и не отделён от цитоплазмы ядерной мембраной. Большинство генов находятся в большой кольцевой молекуле ДНК. Кроме того, имеются кольца меньших размеров, в которых также есть гены. Эти кольца ДНК называются **плазмидами** (рис.1).

Плазмиды могут реплицироваться автономно от бактериальной «хромосомы». Некоторые плазмиды могут интегрироваться в неё в определённых участках – **сайтах**. Такие плазмиды называются **эписомами**.

Плазмиды могут переходить из одной клетки в другие, перенося имеющиеся в них гены. Наличие в плазмидах генов устойчивости ко многим

Одним из преимуществ бактерий как объектов гене-тики является то, что в бак-териальном геноме каждый ген представлен единствен-ным аллелем. На его актив-ность не могут влиять дру-гие аллели этого же гена (их попросту нет). Поэтому чтобы узнать, какой аллель, нормальный или «дефект-ный», имеется у данного бактериального штамма, «включён» или «выключен» ген в данный момент, дос-таточно определить качест-во и количество



**Рис. 1. Бактериальная плазмида. Электронная микрофотография (x 40000). Плазмида представляет собой кольцевую молекулу ДНК**

Фенотип бактериального штамма – это, прежде всего, совокупность вырабатываемых химических соединений. «Дистанция» между генотипом и фенотипом у бактерий гораздо короче, чем между генотипом и морфологическими признаками высших организмов (такими, например, как форма гребня у кур, форма и вес плодов у растений, размеры организма и т.д.). Именно потому, что у бактерий (и некоторых других микроорганизмов) можно непосредственно изучать различные биохимические мутации, они стали главными объектами молекулярной и биохимической генетики. Самой изученной бактерией является кишечная палочка – *Escherichia coli* (сокращённо *E. coli*), обитающая в кишечнике всех млекопитающих и не являющаяся болезнетворным организмом.

## 2. Регуляция транскрипции гена галактозидазы у *E.coli*. Оперон

Культуру *Escherichia coli* можно поддерживать искусственно в виде жидкой суспензии клеток, или на агаризованной питательной среде. Для своего существования *E. coli* требует поступления извне органических соединений. Из углеводов лучше всего она усваивает глюкозу. Ферменты для утилизации глюкозы вырабатываются бактериальными клетками постоянно, а, следовательно, постоянно должны транскрибироваться гены, в которых закодированы эти ферменты. Такие ферменты, вырабатываемые клеткой постоянно, были названы **конститутивными**.

Если глюкозу заменить другим сахаром – дисахаридом лактозой, то бактерии начинают вырабатывать  **$\beta$ -галактозидазу** - фермент расщепляющий лактозу на моносахара – глюкозу и галактозу. Если подачу лакто-зы прекратить и вновь заменить её глюкозой, то выра-ботка  $\beta$ -галактозидазы прекращается. Таким образом,  $\beta$ -галактозидаза вырабатывается клеткой только тогда, когда она необходима. Белки, вырабатываемые клеткой не постоянно, а только при наличии соответствующего субстрата, называются **факультативными**.

**Вывод: ген галактозидазы способен «включаться» и «выключаться» в зависимости от наличия в суб-страта для данного фермента.** Гены, способные индуцироваться в необходимый момент, называются **индуцибельными**, а вещества, вызывающие включение гена, – **индукторами**.

Французские биохимики Ф. Жакоб и Ж. Моно в 1961 г. провели опыты с мутантными штаммами *E.coli*, различающимися по способности утилизировать лактозу. Использовались, также гибридные штаммы (мерозиготы), у которых были объединены мутации, связанные с нарушением индукции синтеза галактозы. Были получены следующие результаты:

1. **Одновременно** с синтезом галактозидазы всегда начинается синтез ещё двух ферментов – пермеазы (необходима для переноса лактозы внутрь клетки) и трансацетилазы (непосредственно не участвующей в утилизации лактозы). Абсолютное количество этих ферментов в клетке может быть разным, но относительное соотношение (10 : 5 : 2) всегда остаётся постоянным.

2. Кроме мутаций структурных генов ферментов **обнаруживаются мутации ещё в двух участках ДНК**, нарушающие индукцию. Мутация одного из этих участков делает синтез всех трёх ферментов конститутивным (ферменты вырабатываются постоянно, даже тогда, когда в среде нет



3. Конститутивная мутация находится в ДНК на некотором удалении от структурных генов ферментов.
4. Мутация блокировки синтеза расположена непосредственно перед структурными генами ферментов.

**Жакоб и Моно предложили следующие объяснения полученных данных.**

1. Структурные гены  $\beta$ -галактозидазы, пермеазы и трансацетилазы расположены рядом друг с другом и включаются одновременно при наличии в клетке индуктора (именно поэтому вырабатываются сразу три фермента).
2. Перед генами находится участок ДНК, мутация которого приводит к блокировке синтеза ферментов. Этот участок был назван оператором.

3. Ещё один ген, определяющий включение и выключение структурных генов, расположен на некотором удалении от них. В нём закодирован особый белок, имеющий химическое сродство и к оператору, и к индуктору. Этот белок был назван **белком-репрессором**, а его структурный ген — **геном-регулятором**.
4. Регуляция синтеза всех трёх ферментов происходит с помощью единого механизма следующим образом (рис.2).

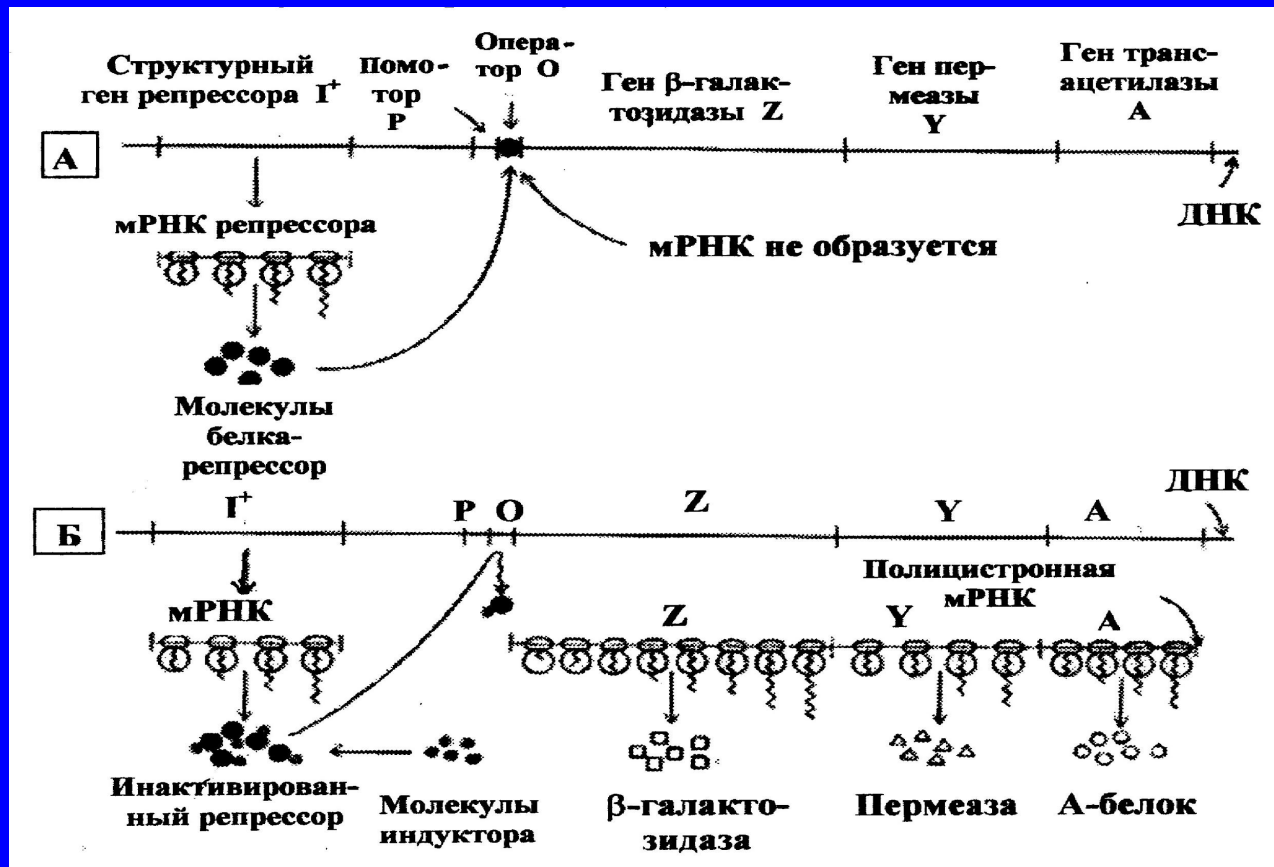


Рис. 2. Взаимодействие репрессора, индуктора и оператора при регуляции транскрипции генов лактозного оперона *E.coli*

А. В отсутствии индуктора репрессор связан с оператором, препятствуя связыванию РНК-полимеразы с промотором, который прилегает к оператору.

Б. Индуктор связывается с репрессором, инактивируя его. РНК-полимераза связывается с промотором и начинает транскрипцию

В клетке всегда имеется небольшое число молекул белка-репрессора, который стремится связаться с оператором, расположенным перед структурными генами. «Заблокированный» оператор становится недоступным для прохождения молекул фермента РНК-полимеразы в область структурных генов. Поэтому транскрипция структурных генов не происходит.

Если в питательной среде появляется индуктор, то имеющий к нему сродство белок-репрессор, соединяются с молекулами индуктора. Это изменяет структуру молекул белка-репрессора так, что они теряют сродство к оператору и отсоединяются от него. РНК-полимераза получает доступ на структурные гены ферментов. Начинается их транскрипция (синтез мРНК) и синтез ферментов. Ферменты расщепляют лактозу.

Если поступление лактозы в среду прекращается, то концентрация её, по мере утилизации ферментами, падает, происходит диссоциация комплекса субстрат-репрессор и высвобождение молекул белка-репрессора. Высвободившиеся молекулы репрессора вновь присоединяются к оператору. Оператор вновь блокируется. Синтез ферментов прекращается.

Участок ДНК, включающий оператор и следующие за ним структурные гены, был назван **опероном**.

**Таким образом, включение и выключение генов утилизации лактозы происходит по принципу обратной связи.** Поступление в среду лактозы является сигналом для включения структурных генов, в которых закодированы ферменты утилизации лактозы. Полное исчезновение лактозы является сигналом для выключения этих генов.

Рассмотренный характер регуляции транскрипции является общим для генов, определяющих ферментативное расщепление (катаболизм) различных органических веществ. Поэтому такая регуляция транскрипции была названа **катаболической**.

Включение генов, в которых закодированы ферменты синтеза (**реакции анаболизма**), например, аминокислот, регулируется тоже по принципу обратной связи. Регуляторами в этом случае являются конечные продукты. Молекулы свободного белка-репрессора химически инертны по отношению к оператору. При отсутствии в клетке конечного продукта (например, аминокислоты) оператор не заблокирован для РНК-полимеразы. Происходит транскрипция генов и синтез ферментов анаболизма данной аминокислоты. Когда концентрация молекул аминокислоты достигает необходимого уровня, небольшая их часть соединяется с репрессором (происходит активация репрессора). Активированный репрессор приобретает химическое сродство к оператору и блокирует его. Синтез ферментов анаболизма (и соответствующей аминокислоты) прек-

Характерной особенностью большинства факультативных ферментов, определяющих последовательную цепь биохимических превращений, является то, что они появляются и исчезают одновременно. По-видимому, соответствующие структурные гены расположены последовательно друг за другом и имеют общие оператор и регулятор.

Оперонная организация генома оказалась свойственной всем изученным бактериям.

Ещё одними обязательными функциональными элементами генома должны быть участки ДНК, на которых прекращается транскрипция (**терминаторы**). Они действительно были обнаружены в положении за структурными генами, как оперонов бактерий, так и генов эукариот.

# *Вопросы и задания*

1. Почему бактерии – более удобный объект для изучения работы генов, чем высшие организмы? Какие признаки бактерий используются для изучения работы генов?
2. Какие данные свидетельствуют о наличии механизма включения и выключения генов в бактериальной клетке? Какие гены называются факультативными, какие – конститутивными?
3. Какие данные свидетельствуют о том, что структурные гены ферментов, выполняющие сопряжённые функции, объединены в один оперон?
4. Опишите значение всех компонентов оперона?
5. Чем отличается регуляция работы оперонов, обеспечивающих катаболические и анаболические реакции.