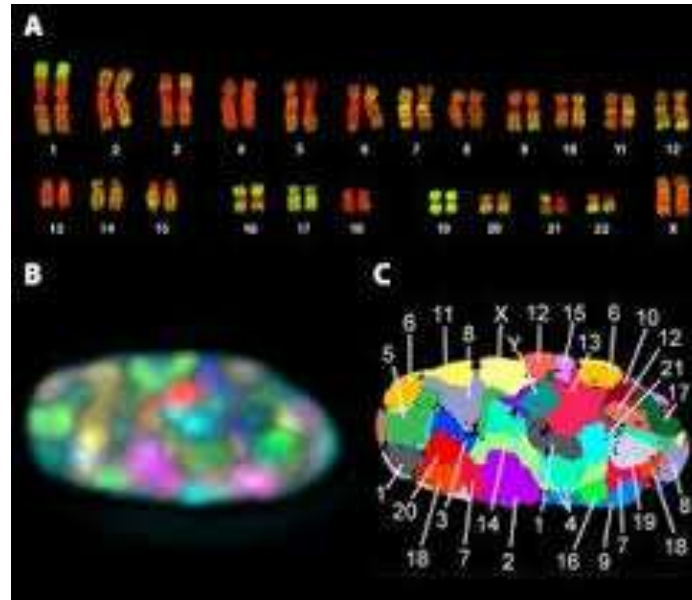


МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ПОЛТАВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Кафедра біохімії
Непорада К.С.

**Регуляція експресії генів.
Мутації. Репарація ДНК.**



Datei:PLoSBiol3.5.Fig1bNucleus46Chromosomes.jpg

План

- Експресія генів
- Регуляція експресії генів у прокариотів
- Особливості експресії генів у еукаріотів
- Генетичні рекомбінації (на прикладі імуноглобулінів)
- Мутації
- Репарація ДНК

ГЕНОМ ЛЮДИНИ

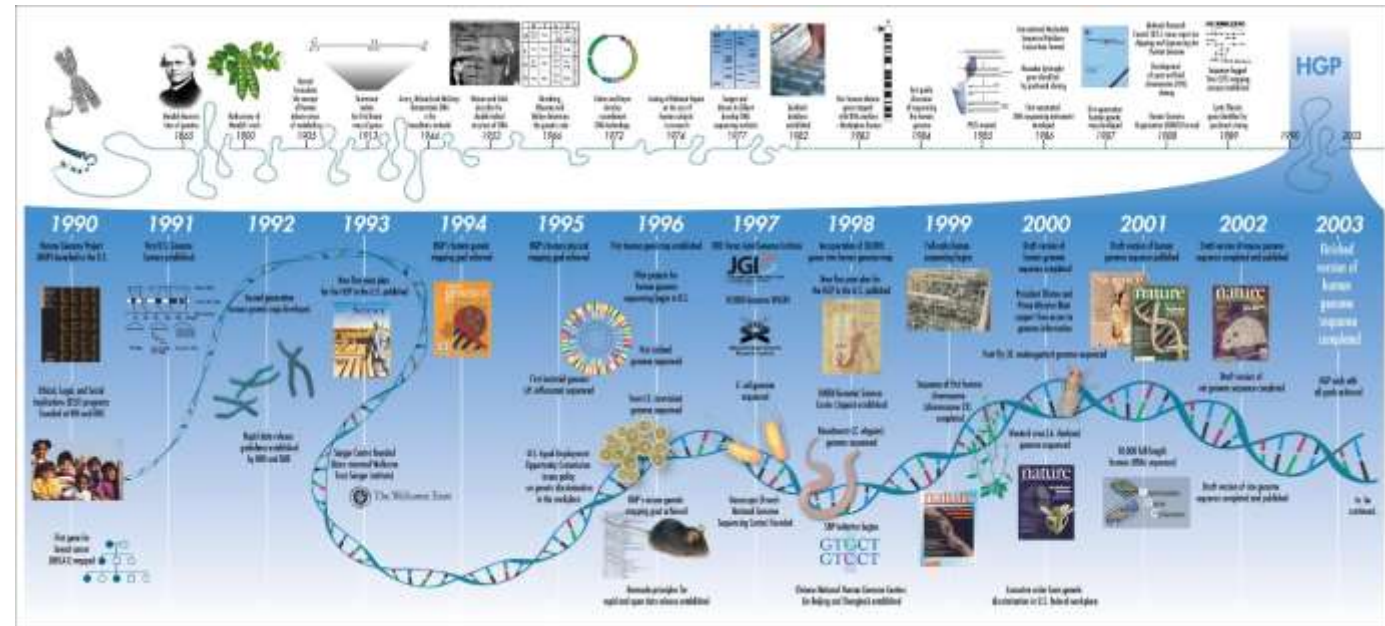
Проект розшифрування геному людини (**Human Genome Project**) був одним з найамбітніших наукових проектів ХХ століття, який тривав 13 років та закінчився у 2003 р.

У результаті виконання проекту побудована генетична карта геному та отримані послідовності 99,9% еухроматинових ділянок геному з точністю 99,99%, отримано 15 тис. повних кДНК (змістовних послідовностей білкових генів) та ідентифіковано близько 3 млн нуклеотидів.

Загальна довжина кодуючих ділянок генів дорівнює приблизно 34 млн. пар нуклеотидів, тобто становить **1,2 % геному**.

Ядерна геномна ДНК людини організована у хромосоми: 46 хромосом - 22 пари аутосом і пара статевих хромосом (XX у жінок та XY у чоловіків). Мітохондріальний геном людини представлений кільцевою молекулою ДНК розміром 16569 пар нуклеотидів і містить 37 генів: 13 гени білків, які беруть участь в окисному фосфорилуванні, 2 гени рРНК і 22 гени тРНК.

Результати аналізу геному людини свідчать про надзвичайно високу подібність послідовностей ДНК у різних індивідуумів: відповідно останнім оцінкам, **будь-які дві людини є ідентичними за нуклеотидними послідовностями на 99,5 %, тобто вся сукупність різноманітних фенотипів у людини зумовлюється варіаціями тільки 0,5 % геному.**

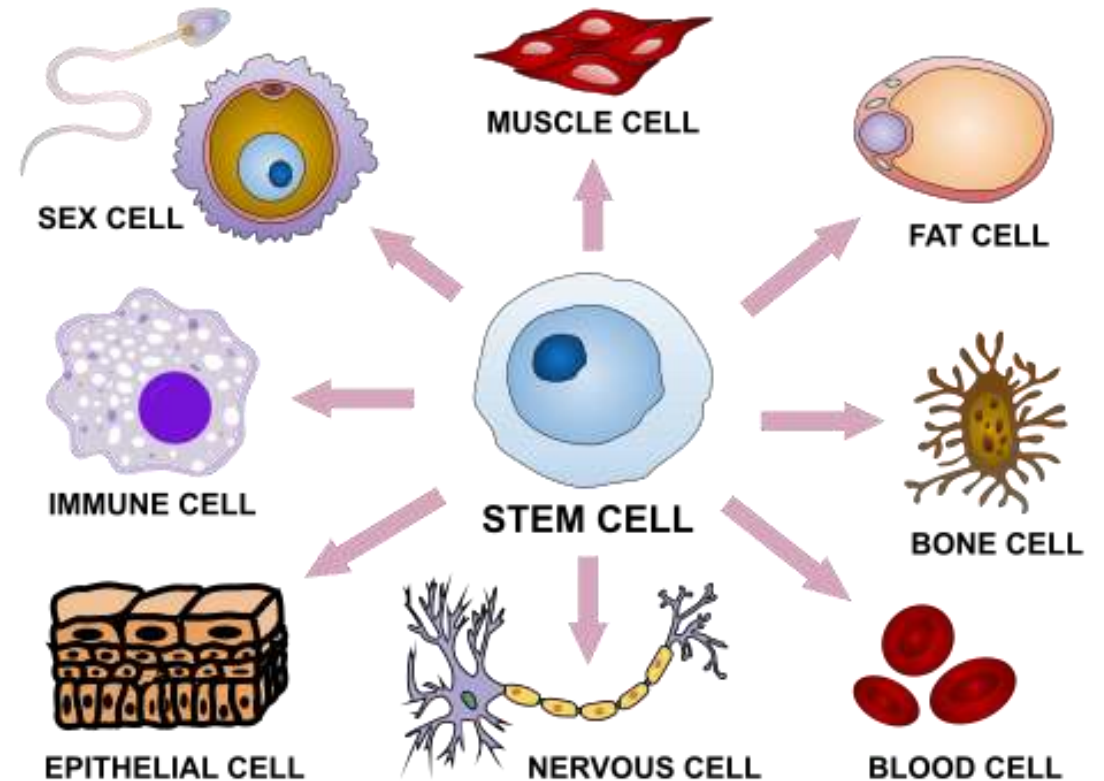


Механізми генної експресії

Хоча не **всі клітини** людини виглядають і функціонують однаково, вони мають **ідентичний геном**.

200 різних клітинних фенотипів в організмі людини відрізняються тим, які гени в них експресуються, а також сигналами, що визначають час експресії певного гена або набору генів.

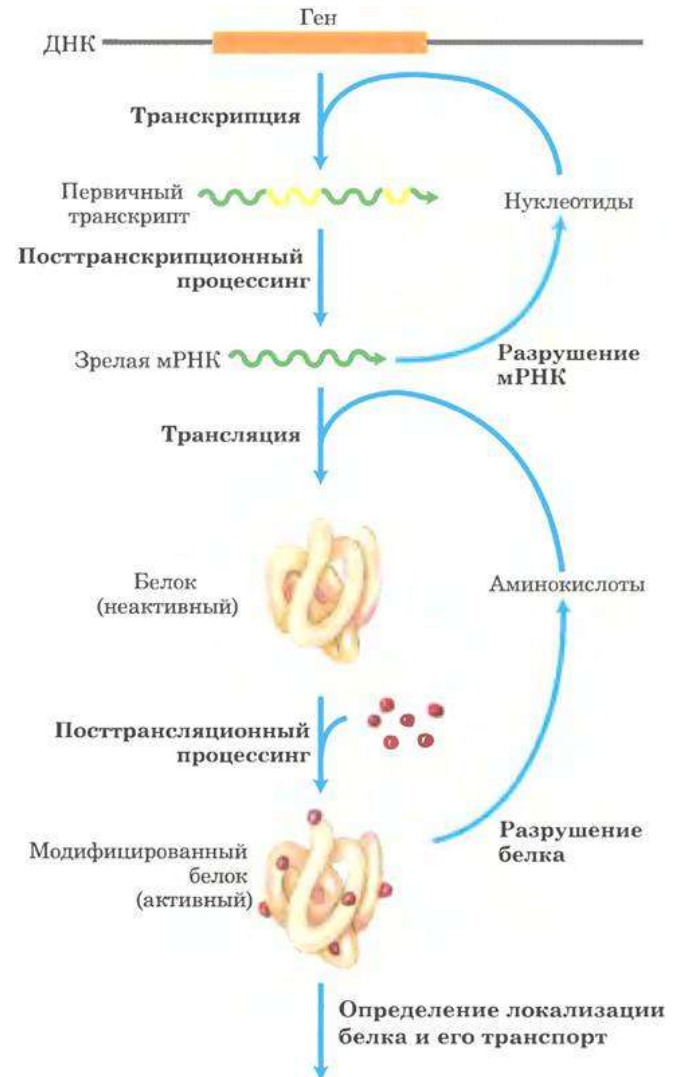
- **Генна експресія** - це сукупність молекулярних механізмів реалізації спадкової інформації, завдяки яким ген проявляє свій потенціал в конкретній фенотиповій ознаці організму.



Принципи регуляції генів

Гени тих продуктів, які необхідні клітині постійно, такі як гени ферментів основних метаболічних шляхів, експресуються на більш-менш постійному рівні в кожній клітині організму. Такі гени називають генами «домашнього господарства». **Постійна експресія гена називається конститутивною експресією.**

Концентрація продуктів інших генів збільшується і зменшується у відповідь на молекулярні сигнали; це регульована експресія гена. **Гени, концентрація продуктів яких збільшується при особливих обставинах, відносяться до індукцибельних; збільшення експресії називається індукцією.**



Рівні регуляції експресії генів

Контроль експресії генів здійснюється на наступних рівнях:

- на рівні транскрипції (контролюється час і характер транскрипції гена)
- на рівні процесингу первинного транскрипту
- при відборі зрілих мРНК для їх транспорту в цитоплазму
- на рівні трансляції - відбір в цитоплазмі мРНК для трансляції на рибосомах
- на рівні активності білка - селективна активація, інактивація або компартментація молекул білка після їх синтезу.



Рівні регуляції експресії генів

В.И. Павличенко, А.В. Абрамов Основы молекулярной биологии и генетики. Учебное пособие для студентов медицинских вузов. – Запорожье, 2007. – 293с.

Регуляції експресії генів у прокариотів

Модель оперону за Ф. Жакоб і Ж. Моно

В 1961р. французькі вчені Ф. Жакоб і Ж. Моно запропонували концепцію оперону, яка розкриває механізми індукції та репресії біосинтезу білку на етапі транскрипції.

Оперон — комплекс генетичних елементів, що відповідає за координований синтез групи функціонально зв'язаних ферментних білків.

Белок-регулятор кодується геном-регулятором.

Оператор — місце зв'язування білка-регулятора.

Структурні гени - ділянки ДНК, що кодують мРНК конкретних білків.

Ген-регулятор, який не входить до оперону, кодує синтез білка-регулятора.

Нобелівська премія з фізіології та медицини 1965



Фото з архіву Нобелівського фонду.
Франсуа Якоб
Частка призу: 1/3



Фото з архіву Нобелівського фонду.
Андре Львофф
Частка призу: 1/3

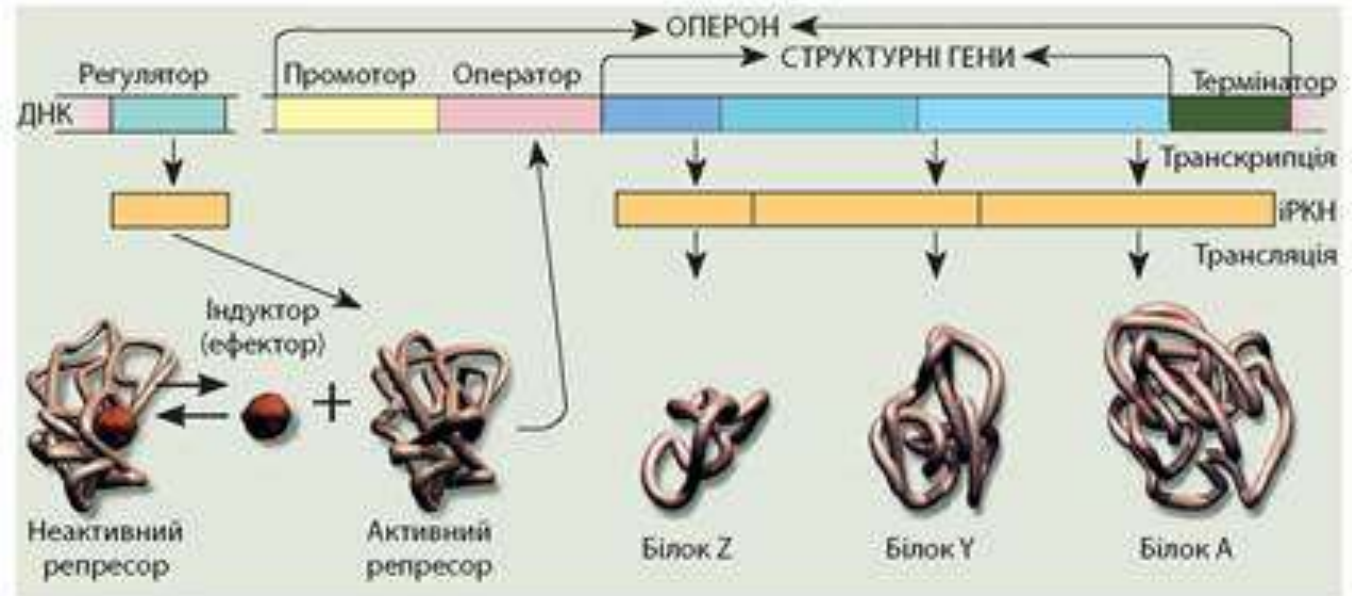


Фото з архіву Нобелівського фонду.
Жак Моно
Частка призу: 1/3

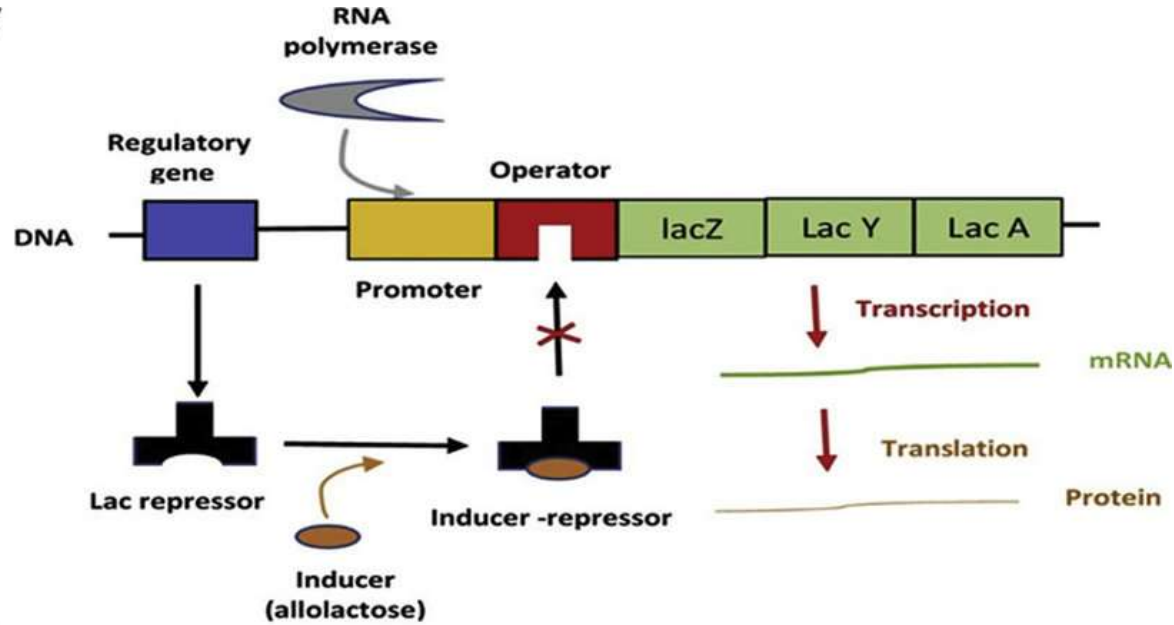
Нобелівську премію з фізіології та медицини 1965 р. Спільно отримали Франсуа Якоб, Андре Львофф і Жак Моно "за відкриття, що стосуються генетичного контролю синтезу ферментів і вірусів".

Концепція оперону на прикладі лактозного

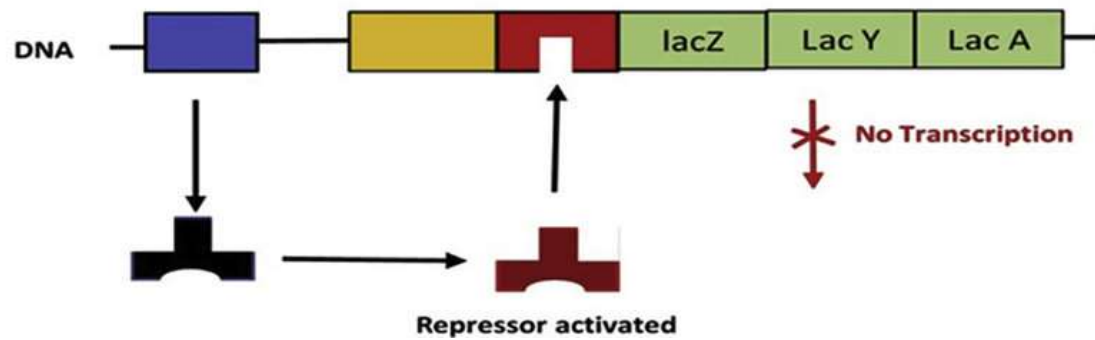
До складу Lac-оперона E. Coli входять **3 структурних гени**, що кодують ферменти: β -галактозидазу, β -галактозидпермеазу та β -галактозидтрансацилазу, які приймають участь в утилізації та метаболізмі лактози, **промотор**, **оператор**.



A/



B/



(A) Активація транскрипції шляхом зв'язування РНК-полімерази з промотором. (B) Інгібування транскрипції шляхом зв'язування активованого репресора з оператором.

Atitey, Komlan & Loskot, Pavel & Rees, Paul. (2018). Elucidating effects of reaction rates on dynamics of the lac circuit in Escherichia coli. Biosystems. 10.1016/j.biosystems.2018.11.003.

Клітини *E. coli* зазвичай ростуть на середовищі, використовуючи як джерело вуглецю глюкозу. Якщо в середовищі культивування глюкозу замінити на лактозу, то клітини адаптуються до нових умов, почавши синтез трьох ферментів, що забезпечують утилізацію та метаболізм лактози.

За відсутності індуктора (лактози) білок-репресор пов'язаний з оператором. РНК-полімераза не може приєднатися до промотору, транскрипція структурних генів оперону не йде.

У присутності лактози білок-репресор приєднує її, змінює свою конформацію і втрачає спорідненість до оператора. РНК-полімераза зв'язується з промотором і транскрибує структурні гени.

Особливості експресії генів у еукаріотів

- У клітинах еукаріотів ядерна оболонка просторово розділяє процеси транскрипції і трансляції (прокаріотична транскрипція і білковий синтез є єдиним процесом).
- На експресію еукаріотичних генів впливає ампліфікація генів - багатократне збільшення числа копій однакових генів з метою інтенсифікації синтезу молекул, необхідних на певний момент часу та рекомбінації ДНК.
- У еукаріотів не встановлено повної оперонної організації генетичного матеріалу. Гени ферментів певного метаболічного ланцюга можуть бути розташовані в різних хромосомах. Вони зазвичай не мають системи регуляції у вигляді гена-регулятора, оператора і промотора, тому синтезовані в ядрах еукаріотів мРНК моноцистронні. Регуляція активності генів в еукаріотів складніша. В цьому процесі беруть участь відразу декілька генів-регуляторів, тобто регуляція транскрипції еукаріотів є комбінативною.
- Ще одна особливість геному еукаріотів - наявність спеціальних «підсилювальних» сайтів ДНК - енхансерів. Вони можуть розташовуватися на великій відстані від промотора. Їх функція - участь в регуляції активності структурних генів.
- Геном еукаріотів зазнає регуляторного впливу з боку ендокринної системи організму. Багато гормонів є індукторами транскрипції. Зокрема, це стосується стероїдних гормонів, які зворотно зв'язуються з білками-рецепторами, які транслюють їх у ядро.
- Відомо, що регуляція активності генів еукаріотів пов'язана з утворенням комплексу ДНК з білками хроматину. У такому вигляді гени нуклеосом не здатні до транскрипції. Тому необхідною умовою є часткова декомпактизація хроматину і ослаблення зв'язків з гістоновими білками (система посттрансляційної модифікації гістонів: ацетилювання, метилювання специфічних залишків Lys).
- Контроль експресії генів в еукаріотів здійснюється також на стадії трансляції (вплив ковалентної модифікації на білкові фактори ініціації).
- Деякі гени еукаріотів декілька раз повторюються, а певні ділянки ДНК взагалі не відіграють генетичної ролі, наприклад, сателітна ДНК. Геном еукаріотів «надлишковий». Крім цього, у геномах еукаріотів містяться послідовності, що повторюються кілька десятків, сотень і навіть мільйонів раз. Вони знаходяться серед унікальної ДНК. До таких послідовностей належать елементи з непостійною локалізацією. Їх називають транспозонами, або мобільними елементами. Гени, що повторюються, виконують різноманітну біологічну роль: регуляція відтворення ДНК, участь у кросинговері, позначення межі між екзонами й інтронами тощо.
- Регуляція експресії генів еукаріотів може здійснюватися на стадії посттрансляційних змін.

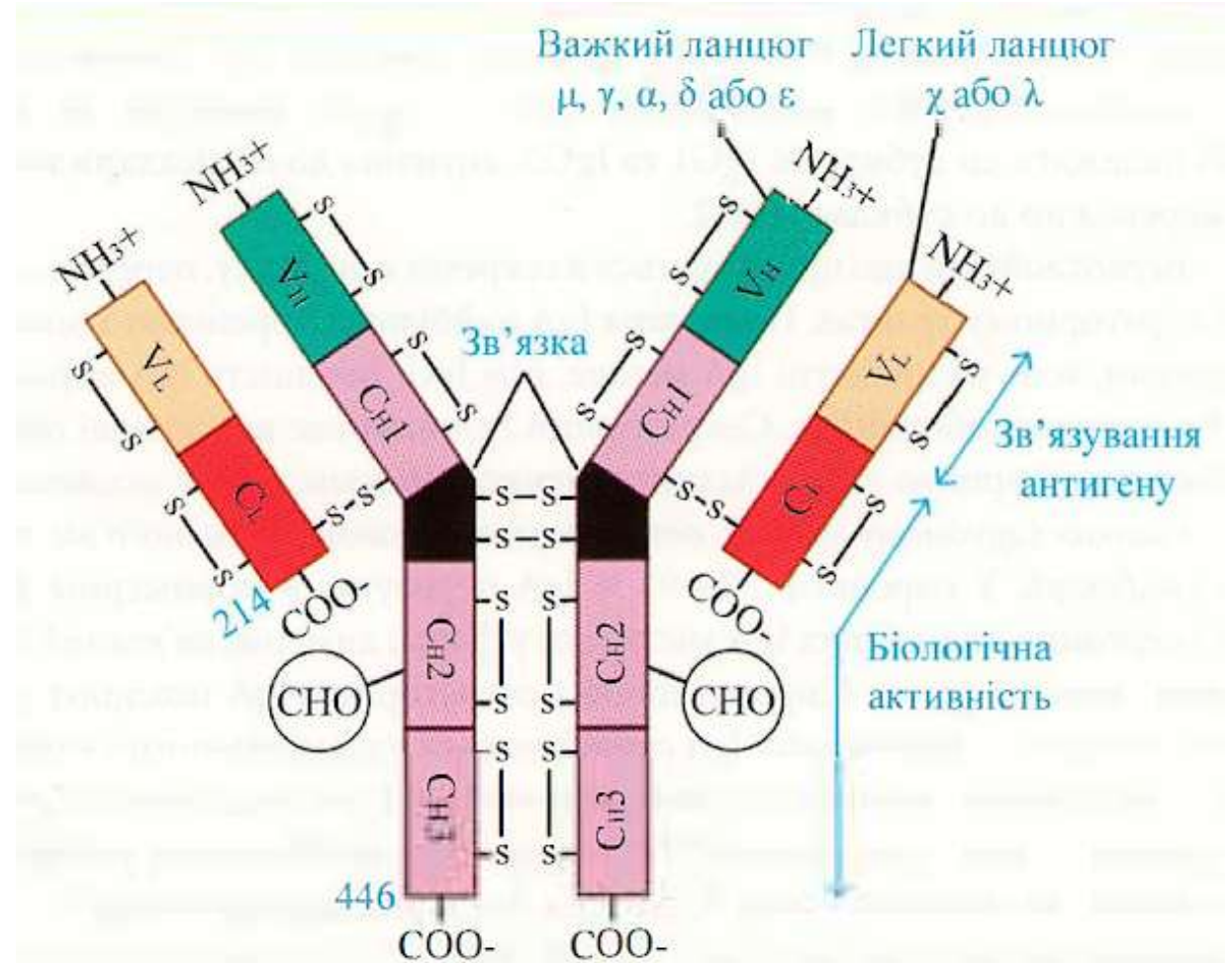
Рекомбінація ДНК на прикладі імуноглобулінів

Механізм утворення різноманітності спектра імуноглобулінів (антитіл) і рецепторів Т-клітин полягає у змінах геномної ДНК під час розвитку лімфоцитів. Такі зміни ДНК характерні лише для клітин імунної системи і не спостерігаються в інших соматичних клітинах.

Синтез імуноглобулінів кодують певні генетичні сегменти, які об'єднуються разом ще в геномі під час розвитку лімфоциту й утворюють функціональний ген. Процес перерозподілу генних сегментів у геномній ДНК називають **рекомбінація генів** імуноглобулінів.

Ці генетичні рекомбінації є механізмом, завдяки якому в організмі людини забезпечується синтез мільйонів різних антитіл у відповідь на антиген.

За хімічною будовою імуноглобуліни – це тетрамерні білки, що складаються з 4 ланцюгів: 2 Н – важких та 2 L – легких. Саме, за типом Н-ланцюга розрізняють клас імуноглобуліну: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE



Рекомбінація ДНК на прикладі імуноглобулінів

Із застосуванням методів молекулярної біології та генної інженерії було доведено, що важкі і легкі ланцюги імуноглобулінів кодуються трьома локусами генів: двома локусами - κ і λ - легких ланцюгів і локусом H важких ланцюгів.

Локус генів важких ланцюгів утворений із чотирьох груп генетичних сегментів: V, D, J і C.

Локуси генів легких ланцюгів побудовані трьома групами генетичних сегментів: V, J і C кожний.

Гени ланцюгів κ та λ розміщені відповідно на 2-й і 22-й хромосомах, а ланцюга H – на 14-й.

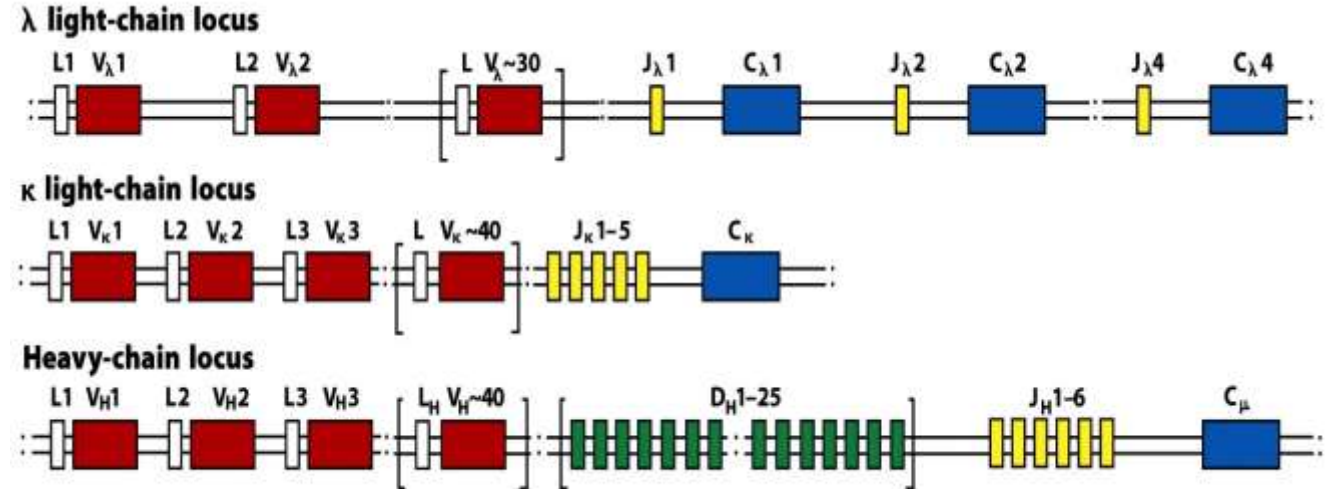
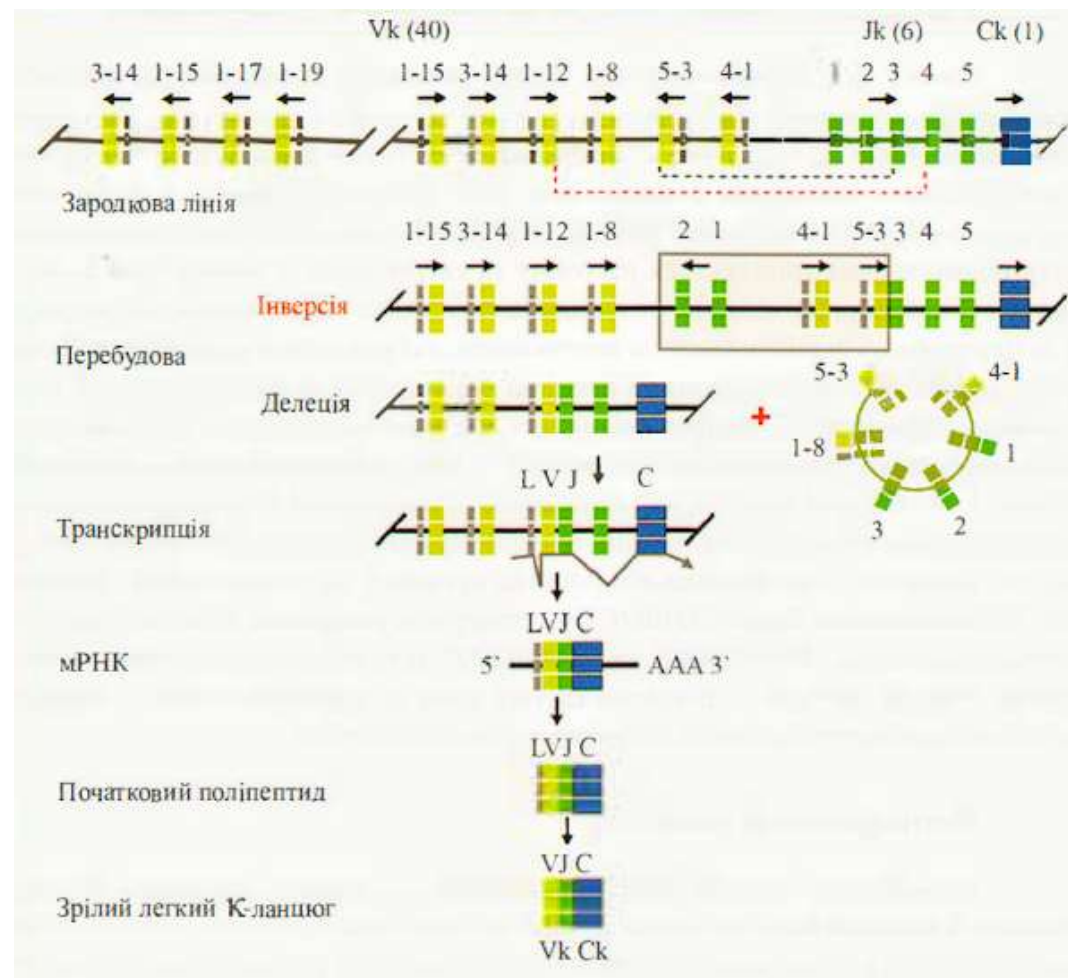


Figure 4-4 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Рекомбінація легких ланцюгів імуноглобулінів

У людини є близько 30 V λ -генних сегментів, 7 J λ - і 7 C λ -сегментів. Функціональний ген легкого λ -ланцюга формується шляхом приєднання певного V-сегмента до J-сегмента.

Кількість J κ -сегментів у геномі людини - 6, C κ -генний сегмент представлений тільки однією копією та приблизно 76-80 V κ -генних сегментів.



Рекомбінація важких ланцюгів імуноглобулінів

У створенні функціонального гена, який кодує варіабельний домен важких ланцюгів імуноглобулінів, беруть участь три генних сегменти: V_H (100 генів), D_H (30 генів) і J_H (6 гена). Константний C_H -генний сегмент представлений 10 генами.

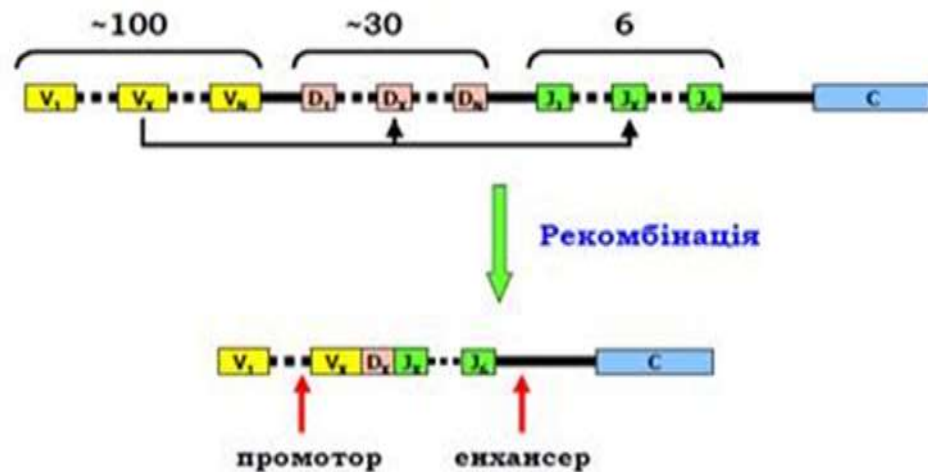


Схема перебудови генів імуноглобулінів: гени, що кодують варіабельні домени, утворюються в результаті сайт-специфічної рекомбінації

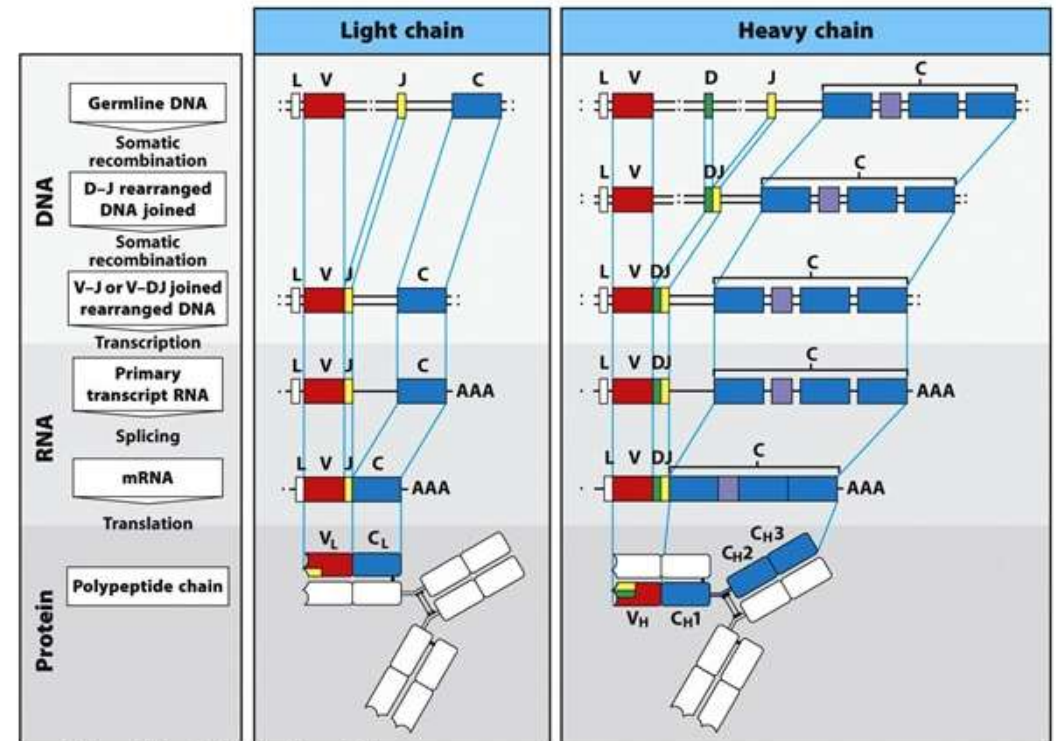


Figure 4-2 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

МУТАЦІЇ

Мутації - це незапрограмовані, випадкові та стабільні зміни в структурі ДНК, які з'являються або в результаті дії мутагенних чинників, або як результат помилок систем реплікації, репарації чи рекомбінації.

Мутація, яка виникла в соматичних клітинах (соматична мутація), спадкується тільки в ряду клітинних поколінь, а та, що в статевих клітинах (генеративна мутація) - передається наступним поколінням нащадків. Крім мутацій, котрі виникають у ядерному геномі (ядерні мутації), зміни можуть відбуватися також у ДНК мітохондрій.

Типи мутацій:

- Геномні
- Хромосомні
- Генні (точкові)

Мутагени

Пошкодження ДНК можуть виникати внаслідок як впливу продуктів нормальної життєдіяльності клітини, так і дії зовнішніх факторів середовища.

Ендогенні та екзогенні фактори, здатні пошкоджувати ДНК, називають мутагенами, а процес утворення мутацій - мутагенезом.

Мутагенез, який відбувається у природних умовах, конкретні причини якого, як правило, важко ідентифікувати, - це **спонтанний мутагенез**.

Якщо мутації викликаються штучно - **індукований мутагенез**.

Кількість спонтанних пошкоджень ДНК, що виникають у одній клітині людини за добу, оцінюється в **10^4-10^6** . Переважна частина цих пошкоджень у нормі видаляється системами репарації, і тільки невелика кількість залишається у вигляді мутації.

Основною причиною помилкового приєднання нуклеотидів під час реплікації є таутомерія азотистих основ (аміно- чи іміноформи для А, Ц; енольної чи кетоформи для Г, Т).

Майже всі мутагени є одночасно й канцерогенами.

Мутагени:

- Хімічні (аутомутагени, ксенобіотики)
- Фізичні (іонізуюче випромінювання (рентгенівські та γ -промені, α - і β -частинки; ультрафіолетові промені короткохвильового діапазону (100-280 нм))
- Біологічні (віруси, бактерії, паразити) - інфекційний мутагенез.

Точкові мутації

Заміна, в результаті якої замість пурину (А, Г) включається піримідин (Т, Ц) або навпаки називається **трансверсією**. Заміна пурину на пурин (А↔Г) і, відповідно, піримідину на піримідин (Т↔Ц), називається **транзицією**.

Транзиції та трансверсії, які відбулися в кодуючій частині гена, можуть зумовити заміну амінокислоти в складі білка - у такому випадку мутацію називають **міссенс-мутацією**.

Унаслідок виродженості генетичного коду заміна нуклеотиду може не змінити змісту кодона. Така нуклеотидна заміна називається **сеймсенс-мутацією**. При утворенні в результаті трансверсії чи транзиції стоп-кодона нуклеотидну заміну називають **нонсенс-мутацією**.

Вставка (**інсерція**) або випадіння (**делеція**) одного чи декількох нуклеотидів. Інсерція або делеція у кодуючій частині гена, що не кратні трьом нуклеотидам, призводять до зсуву рамки зчитування.

Прикладом точкової мутації є захворювання серповидноклітинна анемія (HbS) викликане мутацією одного нуклеотиду в гені β-глобіну у гемоглобіні. Це призводить до того, що у 6 позиції глутамат замінюється валіном. Тобто, зміною послідовності кодону з Г**А**Г (кодує глутамат) на Г**Т**Г (кодує валін) - трансверсія (заміна пурин на піримідин).



Геномні мутації

Три типи геномних мутацій - гаплоїдія, поліплоїдія та анеуплоїдія.

Гаплоїдія - це зменшення вдвічі диплоїдного набору хромосом.

Зворотним явищем є **поліплоїдія** - кратне гаплоїдному збільшення кількості хромосом. Клітина з трьома гаплоїдними наборами хромосом називається триплоїдною, чотирма - тетраплоїдною і т. д.

Анеуплоїдія - це не кратна гаплоїдному набору зміна кількості хромосом. (Усі типи анеуплоїдій є результатом нерозходження окремих хромосом (чи хроматид) при поділі клітини - мітозі чи мейозі).

Найчастіше вона виявляється у збільшенні або зменшенні кількості копій однієї хромосоми, рідше - декількох. Анеуплоїдна клітина (чи організм), яка містить одну додаткову хромосому, має назву трисомік. Утрата однієї хромосоми приводить до **моносомії**, двох гомологічних хромосом - до **нулісомії**.

Анеуплоїдії

хромосомні синдроми людини

Тип відхилення	Частота
<i>Статеві хромосоми у чоловіків</i> 47,XXY с. Кляйнфельтера 47,XYY	1/750 1/1050
<i>Статеві хромосоми у жінок</i> 45,X с. Тернера-Шерешевського 47,XXX Трипло X	1/3500 1/960
<i>Аутосомні трисомії</i> 47,21+ с. Дауна 47,18+ с. Патау 47,13+ с. Едвардса	1/800 1/12 000 1/10 000

Репарація ДНК

Репарація ДНК - один із загальних біологічних процесів, спрямований на виправлення помилок синтезу ДНК при реплікації, а також численних пошкоджень, що виникають у ДНК унаслідок дії мутагенних факторів.

Захворювання у людини, які викликаються генетичними порушеннями системи ексцизійної репарації:

- 1) Пігментна ксеродерма,
- 2) Синдром Кокейна,
- 3) Тріхотіодістрофія,
- 4) Синдром передчасного старіння.

За механізмами здійснення репарація підрозділяється на: **неексцизійну** репарацію (фоторепарація) і **ексцизійну** (англ. Excision, вирізати) репарацію.

Ферменти репараційної системи клітини:

Фотоліаза, яка індукується ультрафіолетовим світлом (фоторепарація);

УФ-специфічна ендонуклеаза, яка розщеплює ланцюг ДНК біля піримідинового димеру

Специфічні глікозилази – які відщеплюють модифіковану азотисту основу від дезоксирибози (своє для кожної з модифікованих азотистих основ);

ДНК-ендонуклеази здійснюють одноланцюговий розрив ДНК;

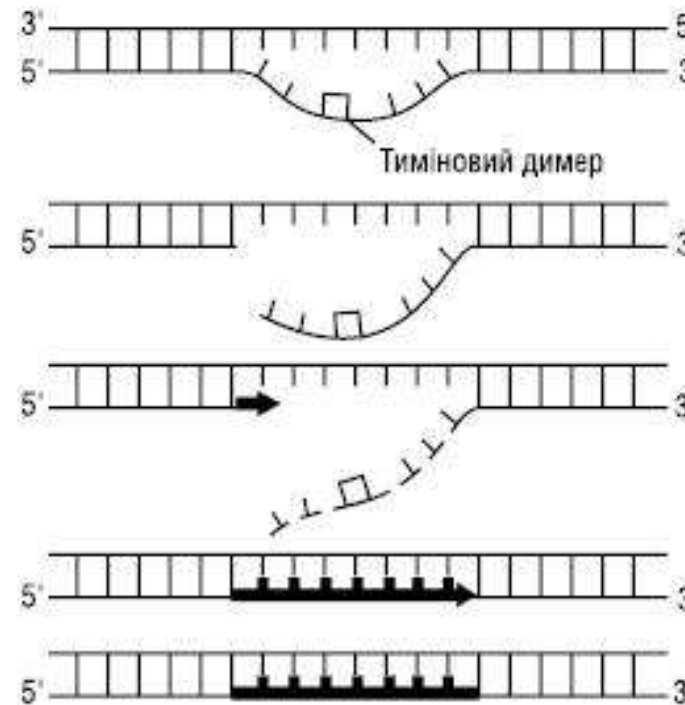
ДНК-полімераза β - фермент, що синтезує відповідну ділянку ланцюга ДНК замість вилученого;

ДНК-лігаза - зшивання одноланцюгового розриву ДНК.

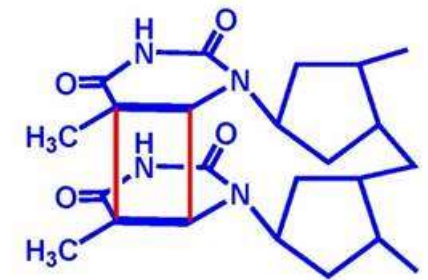
Ексцизійна репарація нуклеотидів (Nucleotide Excision Repair - NER)

Алгоритм ексцизійної репарації нуклеотидів, до якої залучено близько 17 білків, на прикладі тимінового димеру:

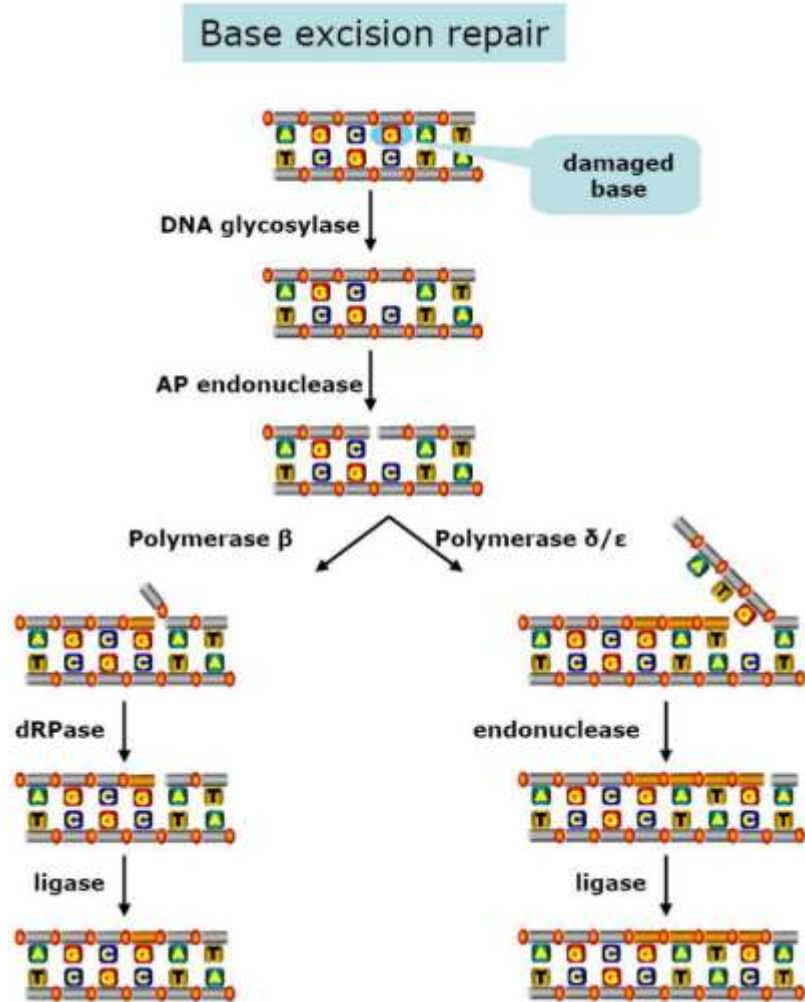
- 1) Детекція зміненого сайту ДНК
- 2) Ексцизія - «розрізання» ланцюга у сайті тимінового димеру УФ-специфічною ендонуклеазою
- 3) Заповнення утвореного проміжку нуклеотидами з використанням комплементарного ланцюга у якості матриці за допомогою ДНК-полімерази β
- 4) Відщеплення ділянки ДНК з сайтом, що містить тиміновий димер
- 5) Полімеризація розриву в ланцюзі специфічними ДНК-лігазами.



Тиміновий димер



Ексицизійна репарація азотистих основ (Base Excision Repair - BER)



Загальний алгоритм ексицизійної репарації азотистих основ :

- 1) Детекція зміненого сайту ДНК
- 2) Вилучення зміненої основи, якщо вона присутня, за допомогою глікозилаз
- 3) Ексицизія – «розрізання» ланцюга у безосновному сайті
- 4) Вилученні ділянки ДНК безосновного сайту
- 5) Заповненні утвореного проміжку нуклеотидами з використанням комплементарного ланцюга у якості матриці за участю ДНК-полімерази β
- 6) Полімеризація розриву в ланцюзі специфічними ДНК-лігазами.

Література

1. Біологічна і біоорганічна хімія: у 2 кн.: підручник. Кн. 1 Біоорганічна хімія / [Зіменковський Б.С., Музиченко В.А., Ніженковська І.В. та ін.]; за ред. Б.С. Зіменковського – К.: ВСВ «Медицина», 2014. – 272 с.
2. Біологічна і біоорганічна хімія: у 2 кн.: підручник. Кн. 2 Біологічна хімія / [Губський Ю.І., Ніженковська І.В., Корда М.М. та ін.]; за ред. Ю.І. Губського. – К.: ВСВ «Медицина», 2016. – 544 с.
3. Біохімія: підручник / за загальною редакцією професора А.Л. Загайка, проф. К.В. Александрової – Х.: Вид-во «Форт», 2014. – 728 с.
4. Губський Ю.І. Біологічна хімія / Губський Ю.І. - Київ-Тернопіль, Укрмедкнига, 2000. – 508 с.
5. Сиволоб, А.В. Молекулярна біологія : підручник / А.В. Сиволоб. - К. : Видавничополіграфічний центр «Київський університет», 2008. - 384 с.
6. Гонський Я.І. Біохімія людини / Гонський Я.І., Максимчук Т.П., Калинський М.І Підручник. Тернопіль: Укрмедкнига, 2002.- 744 с.
7. Уотсон, Дж. Д. Двойная спираль. Воспоминания об открытии структуры ДНК. - М. : Регулярная и хаотическая динамика, 2001.
8. В.И. Павличенко, А.В. Абрамов Основы молекулярной биологии и генетики. Учебное пособие для студентов медицинских вузов. – Запорожье, 2007. – 293с.
9. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome // Nature. - 2004. - Vol. 431. -P. 931-945.