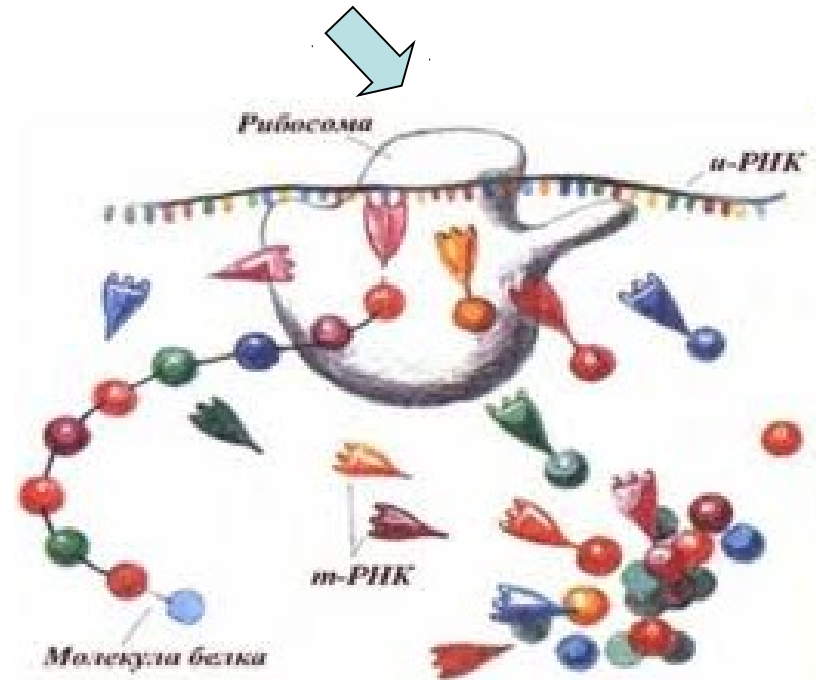
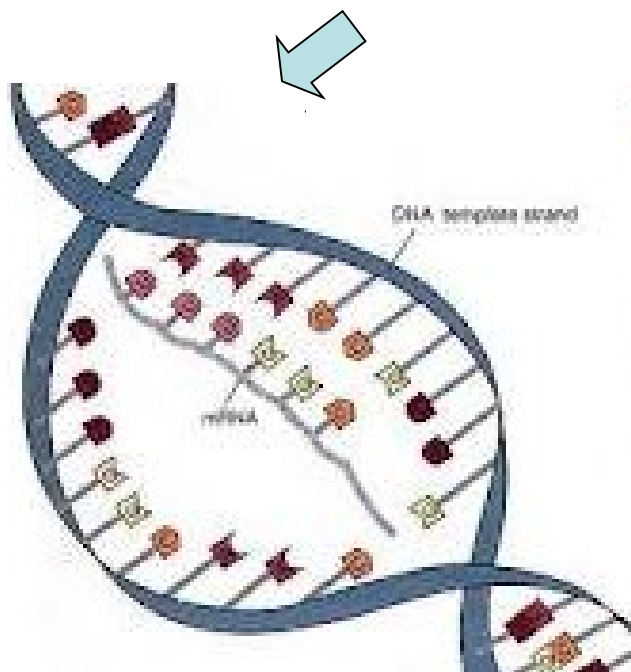


Лекція. Регуляція експресії генів. Репарація ДНК. Мутації. Генна інженерія



Експресія генів - процес реалізації інформації, закованої в генах, що складається з **транскрипції** та **трансляції**.



Напрямки регуляції протеосинтезу

- **Індукція** – активація синтезу білків
- **Репресія** – інгібування синтезу білків

Всі білки (ферменти) діляться на

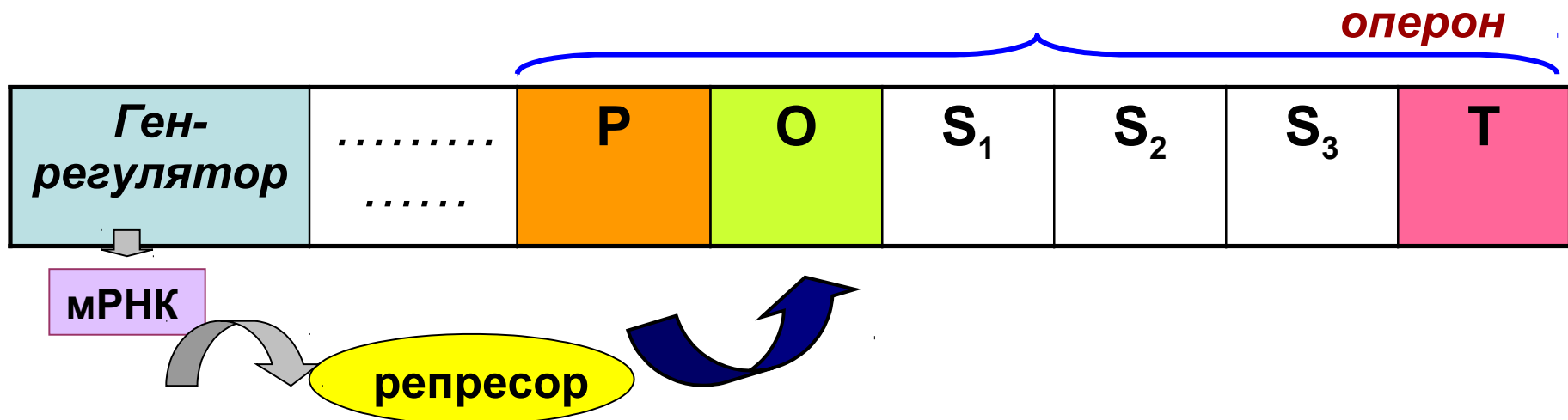
- **Конститутивні** – їх синтез йде постійно у сталій кількості
- **Адаптивні** – швидкість їх синтезу залежить від умов
 - *індуцибельні*
 - *репресибельні*

У прокариотів експресія генів регулюється на рівні транскрипції - теорія оперона Жакоба і Моно (1960)

Оперон – комплекс генетичних елементів ДНК, що контролюють синтез функціонально-пов'язаних ферментів

- Промотор (P)
- Оператор (O) – приєднує білок-репресор
- Структурні гени (S)
- Термінатор (T)

Ген-регулятор – кодує синтез репресора



Регуляція по типу індукції

Експресія генів та синтез ферментів активується **індуктором** (субстратом) = “ **індукція генів** ”

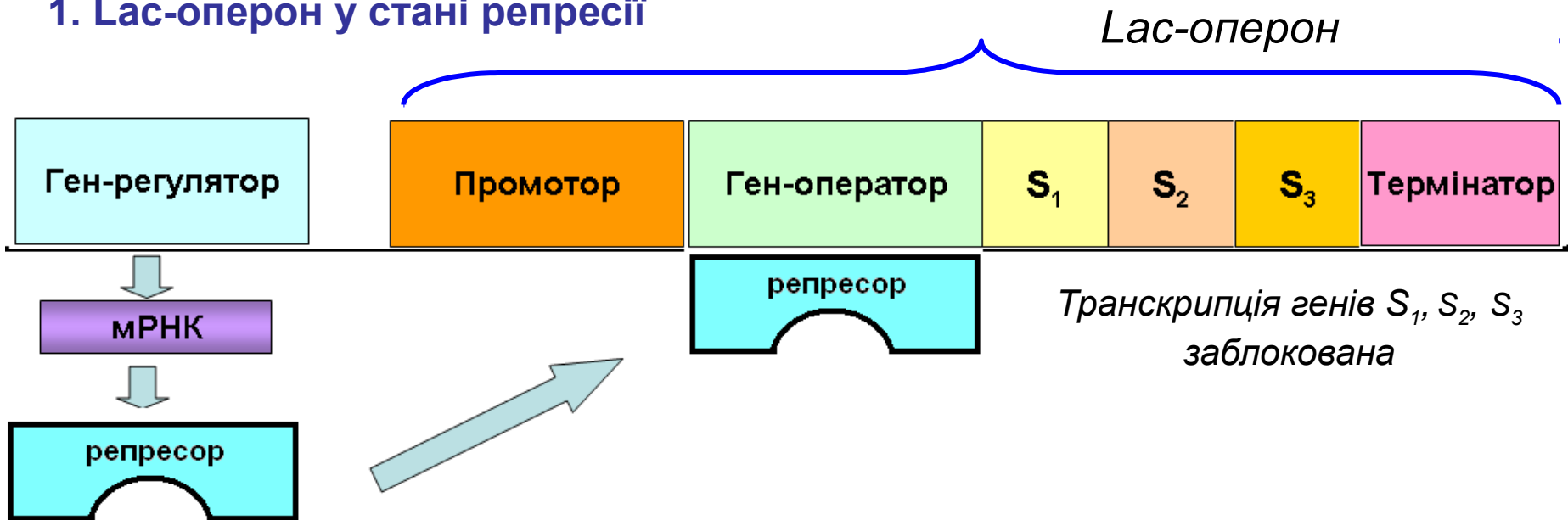
- **Індуктор** інактивує білок-репресор, що був зв'язаний з оператором
- РНК-полімераза транскрибує структурні гени з утворенням іРНК (для наступного синтезу білків)

Так регулюються катаболітні гени

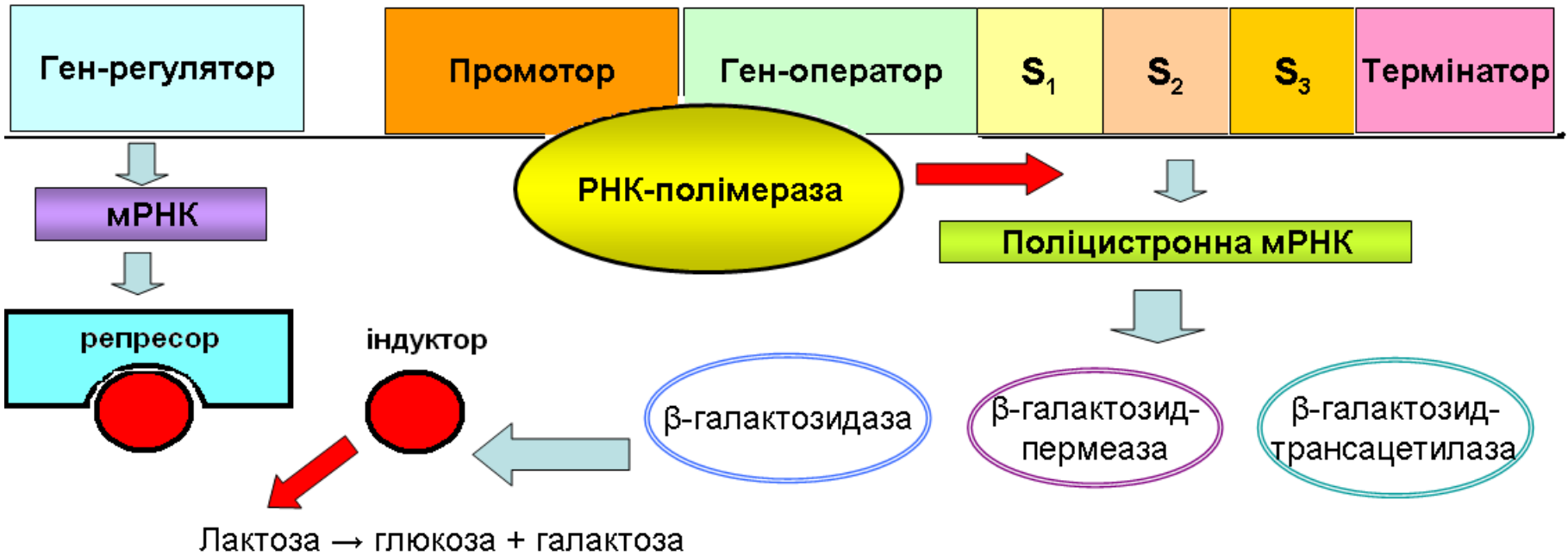
Приклад: **Lac-оперон E.coli**

- контролює синтез ферментів катаболізму лактози - **β -галактозидази, пермеази, трансацетилази**
- індуктором експресії генів є **лактоза**

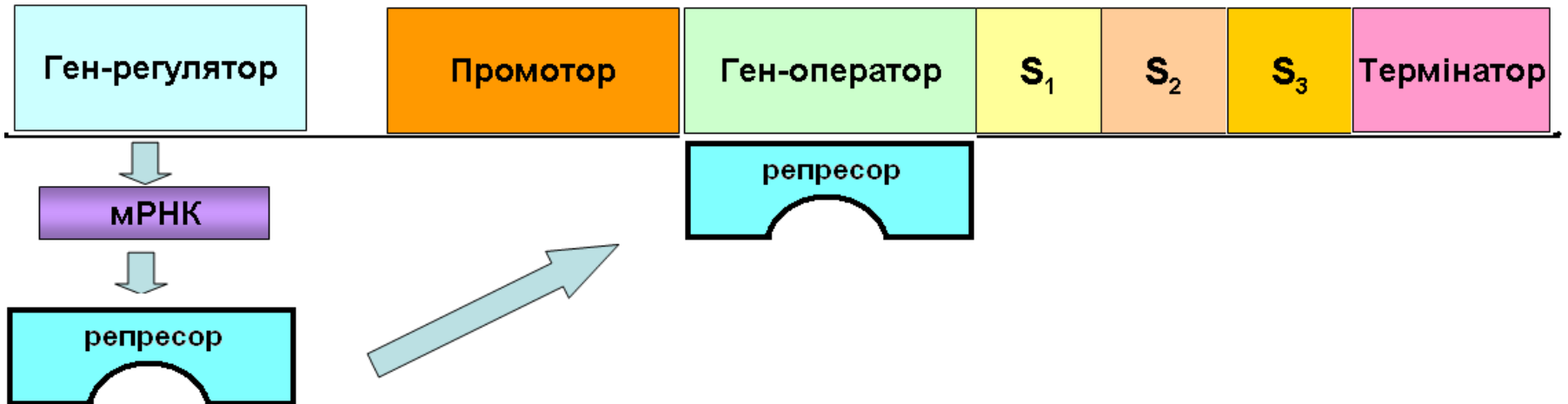
1. Lac-оперон у стані репресії



2. Лас-оперон у стані індукції



3. Лас-оперон повернувся у стан репресії



Регуляція по типу репресії

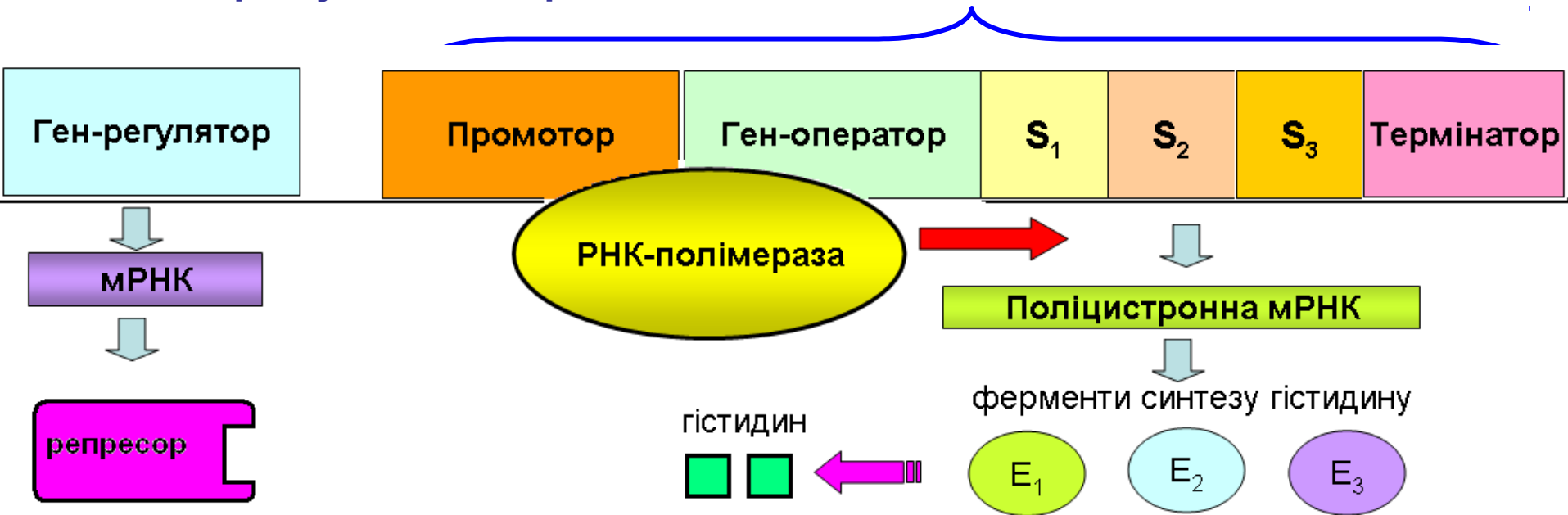
- Репресор блокує ген-оператор тільки в присутності **ко-репресора** - кінцевого продукту реакції – **“репресія генів”**
- Зниження рівня ко-репресора запускає експресію генів

Так регулюються анаболітні гени

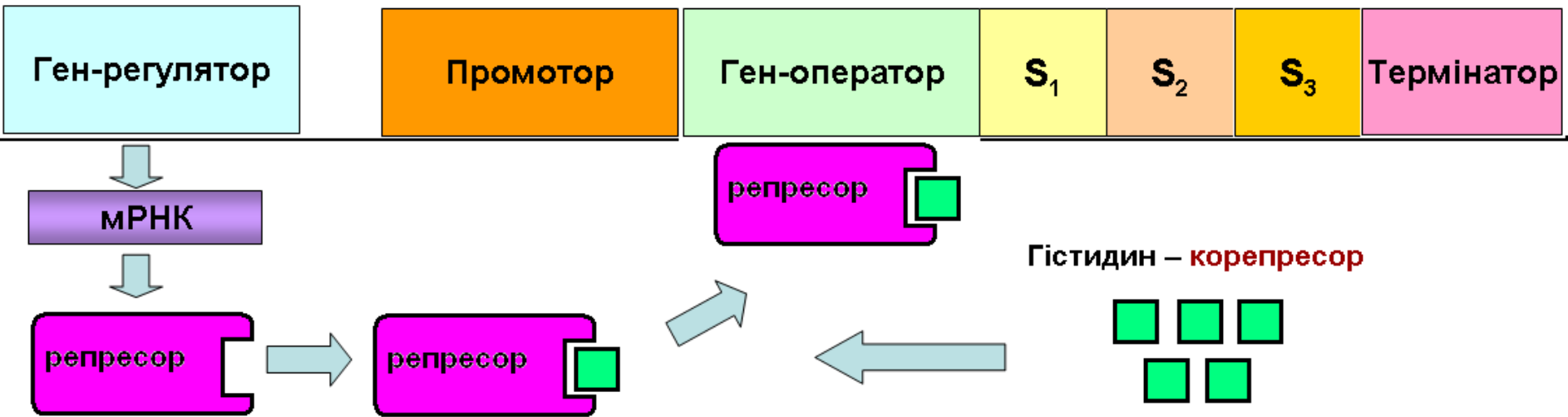
Приклад: His-оперон E.coli

- контролює синтез ферментів, що утворюють гістидин
- **Гістидин** є ко-репресором

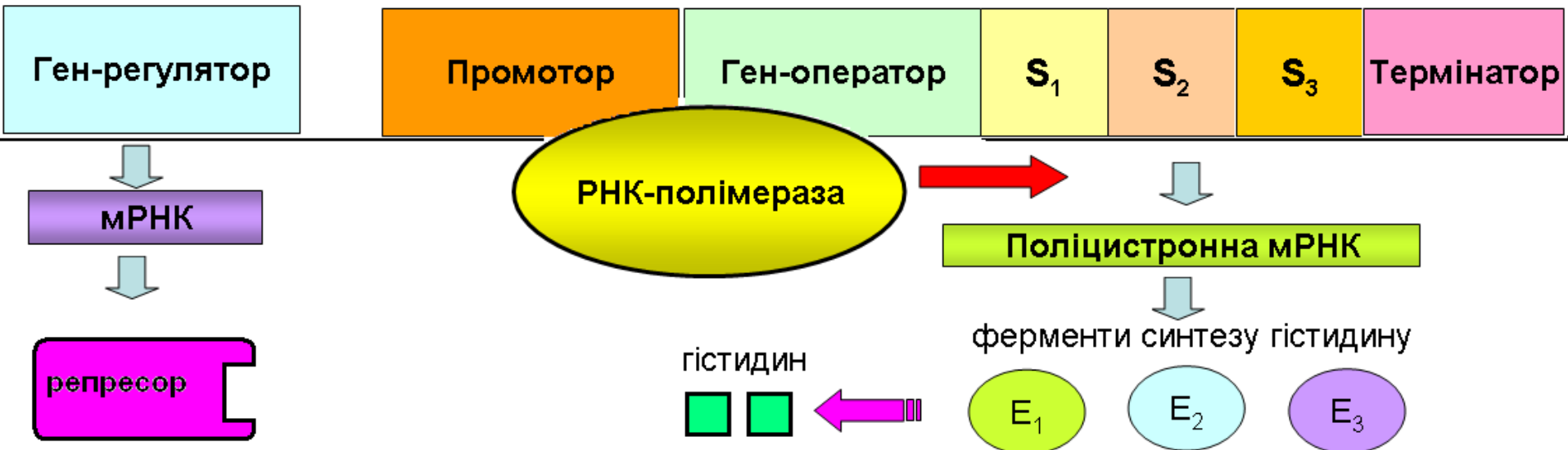
1. His-оперон у стані експресії



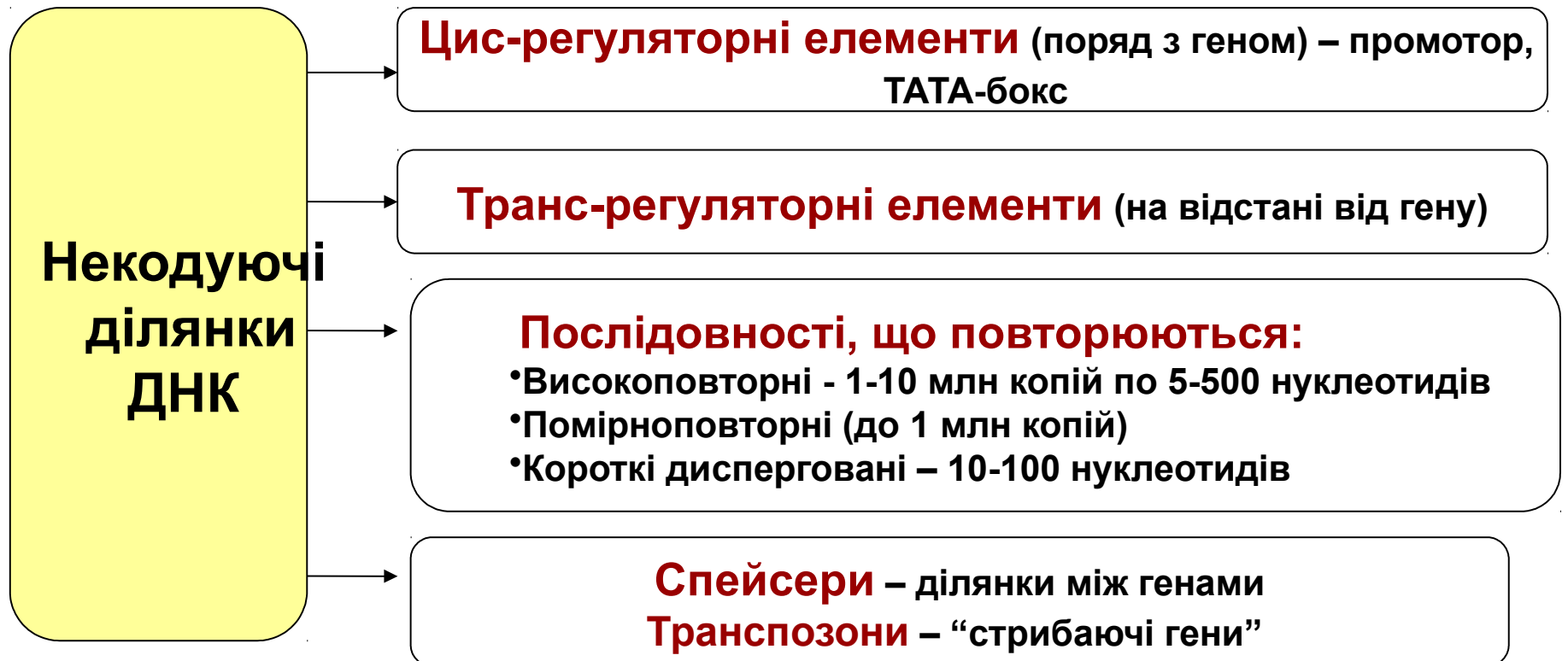
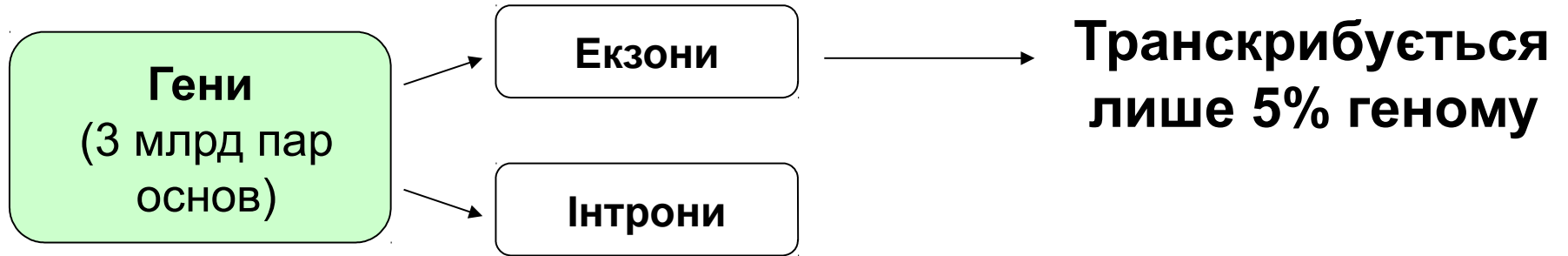
2. His-оперон у стані репресії



3. His-оперон повернувся у стан експресії

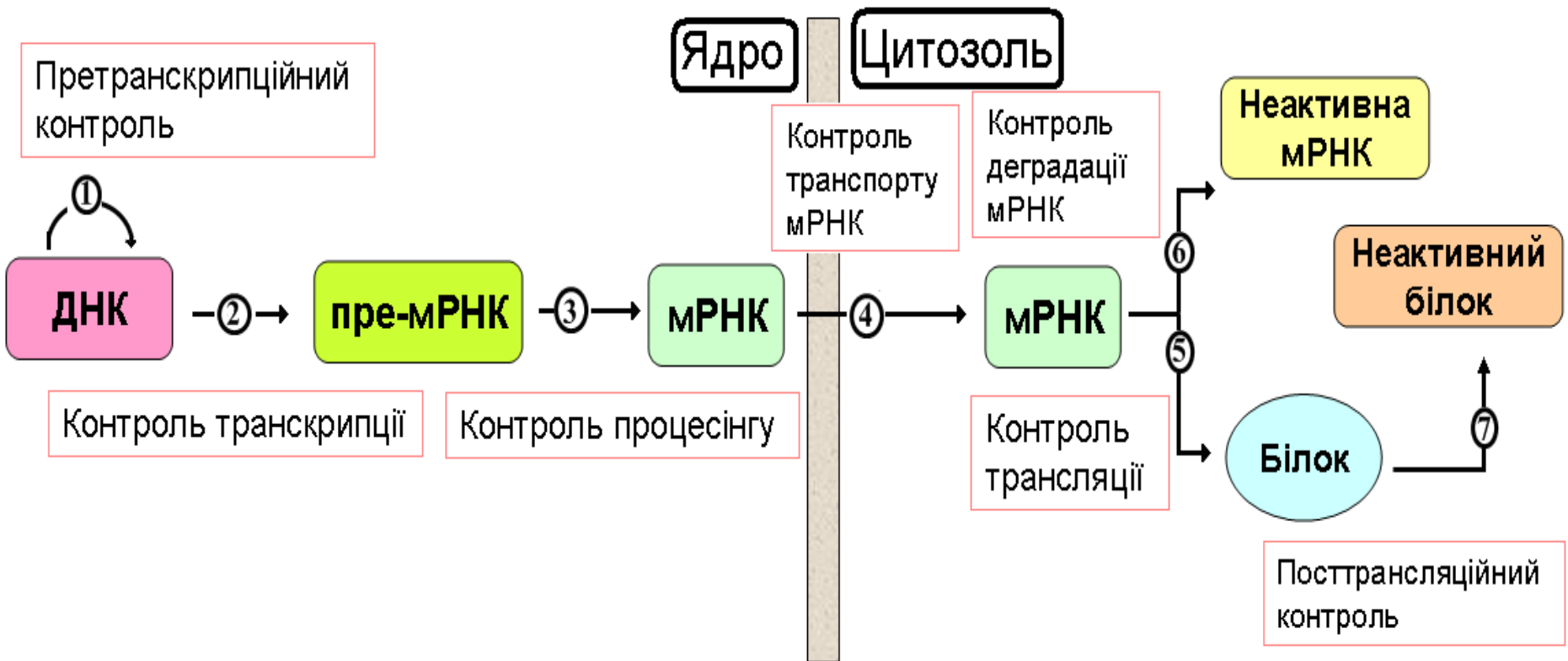


Особливості геному еукаріот



У еукаріот регуляція експресії генів – багаторівнева!!!

- на рівні структурної організації геному
- на рівні транскрипції
- на рівні трансляції

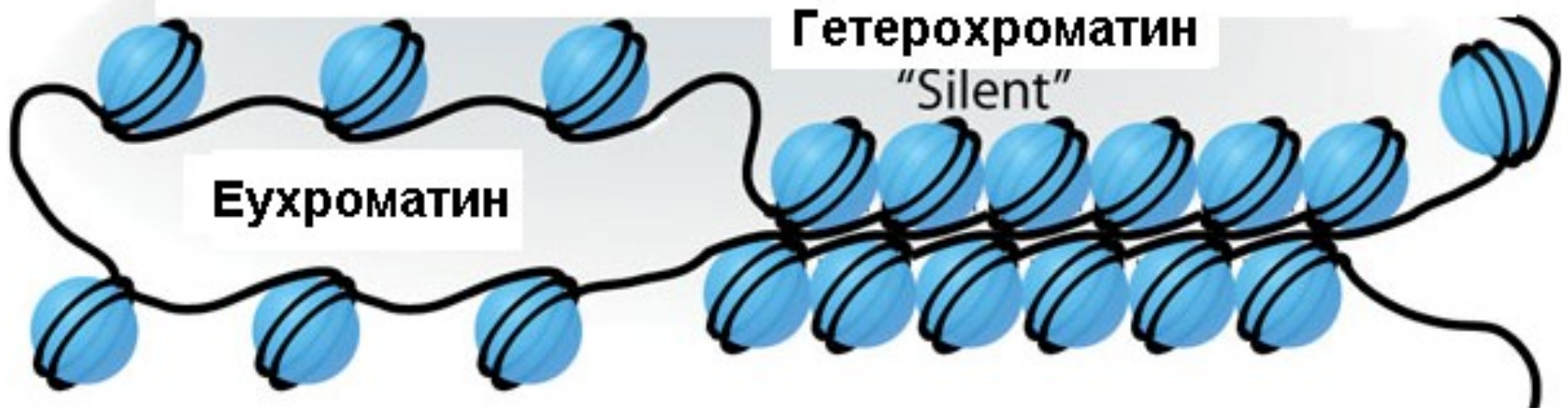


Претранскрипційний контроль

1. Структурна та хімічна модифікація геному

Упаковка хроматину:

- Еухроматин - активний
- Гетерохроматин - неактивний



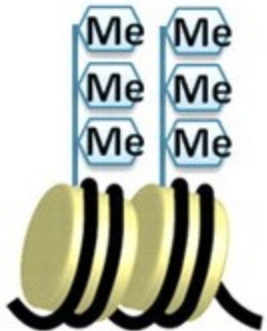
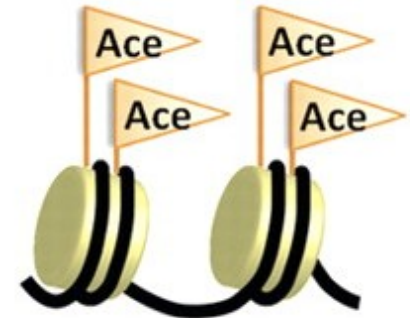
Хімічна модифікація гістонів – метилування, ацетилювання, фосфорилування, SUMO



Гістонацетилтрансфераза



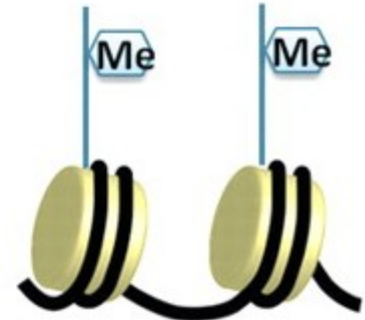
Деацетилаза



Деметилаза

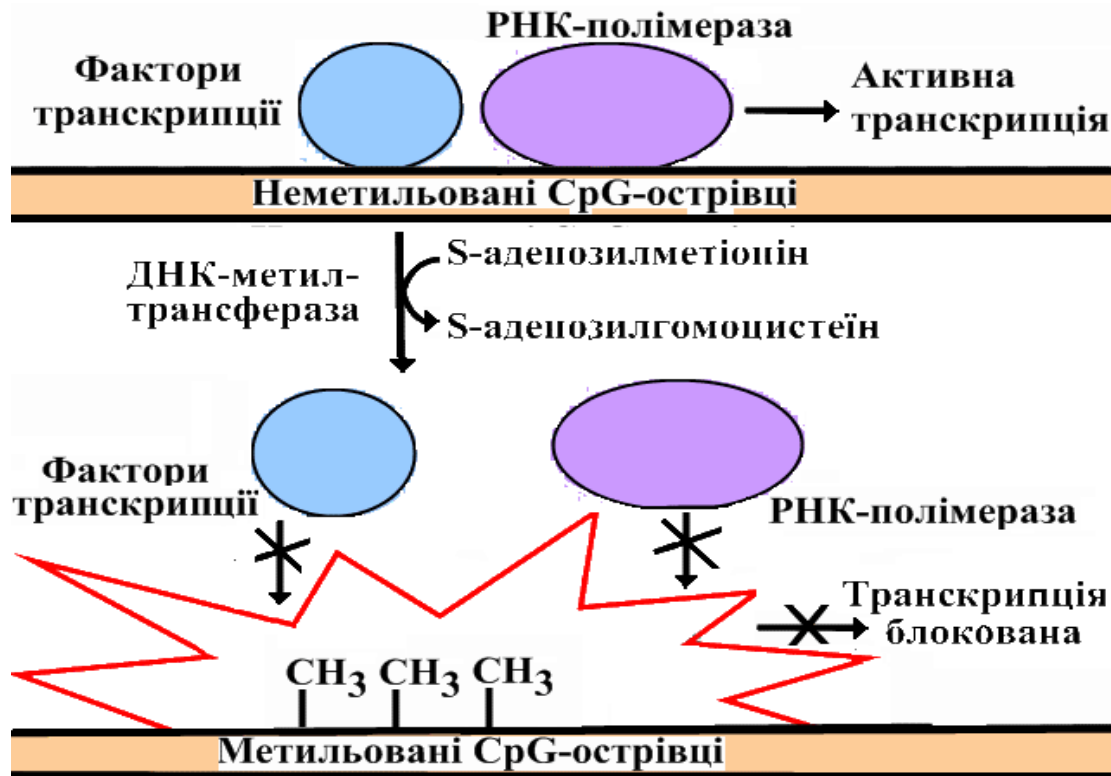


Лізинметилтрансфераза



Метилування ДНК

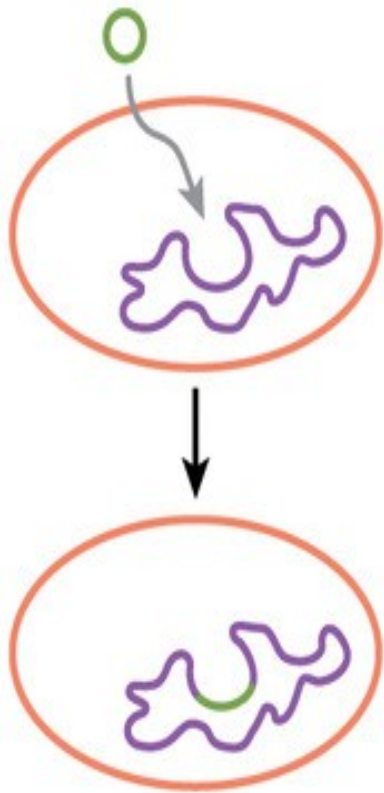
- йде по залишкам цитозину (5%) у промоторах (*CpG-острівці*)
- не змінює нуклеотидну послідовність
- тимчасово інактивує ген і блокує його транскрипцію



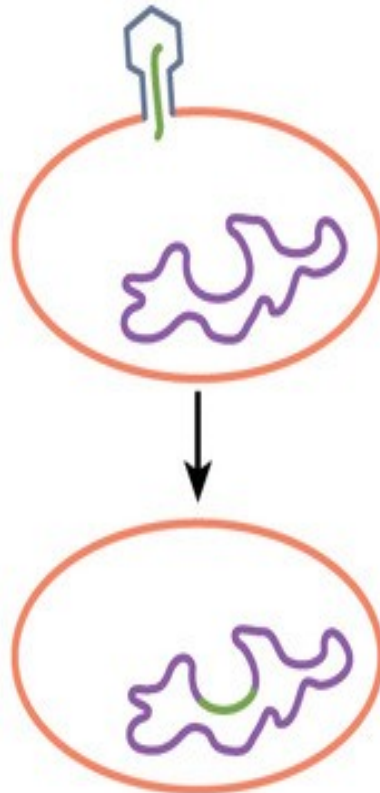
Метилування гена білка-супресора пухлинного росту (білка p53)
сприяє розвитку пухлин

2. Рекомбінація генів - обмін фрагментів ДНК між генами або об'єднання генів з різних біологічних джерел

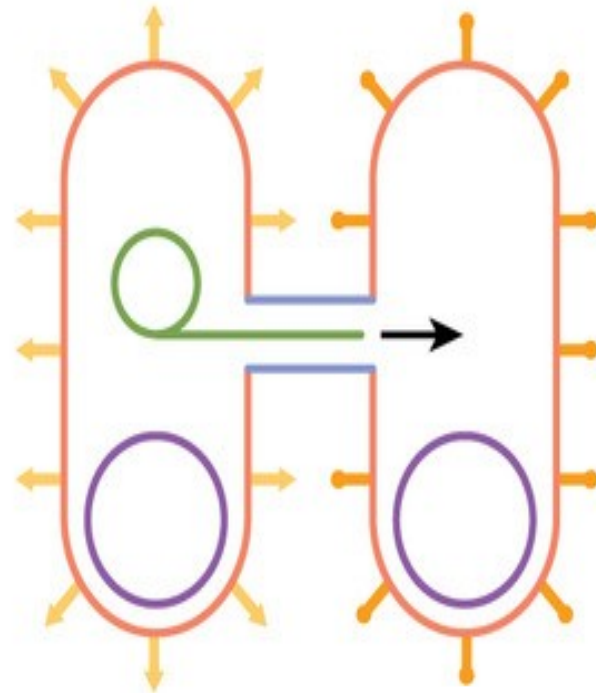
Рекомбінації у прокаріот



Трансформація



Трансдукція



« Кон'югація

Рекомбінації у еукаріот

- Кросинговер – обмін **ідентичними ділянками між гомологічними хромосомами** під час мейозу
- Транспозиції / транслокації **переміщення генів** в межах однієї хромосоми /або в іншу хромосому

Значення:

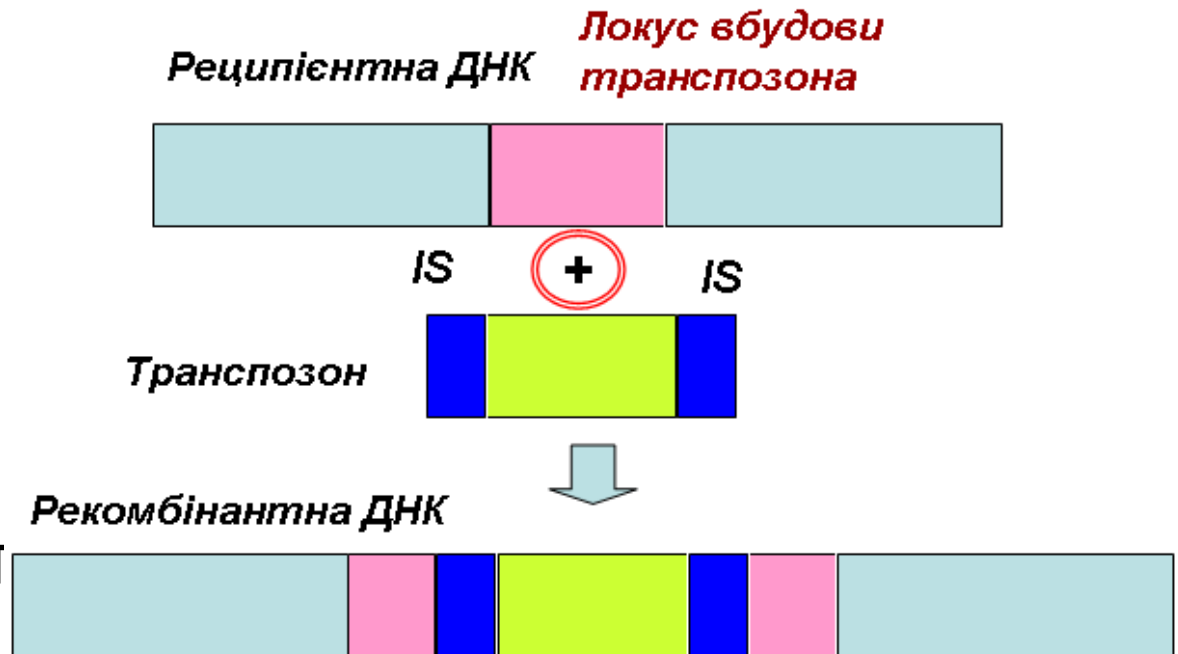
- виникнення більш корисних генних комбінацій в процесі еволюції
- формування різноманітності антитіл (імуноглобулінів)
- диференціація Т- та В-лімфоцитів



Транспозони – “стрибаючі гени”

Містять на кінцях інсерційні послідовності (англ. - *insert* *включати*).

Кодують фермент що їх вбудовує - *транспозаза*



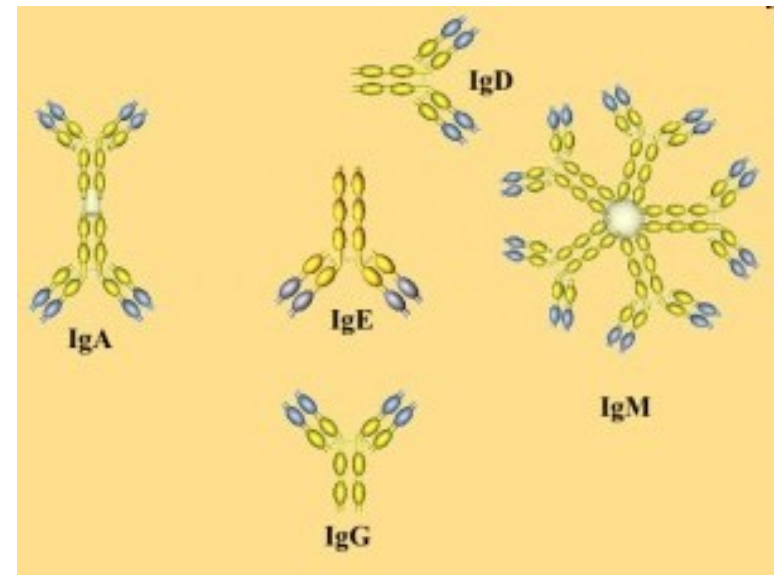
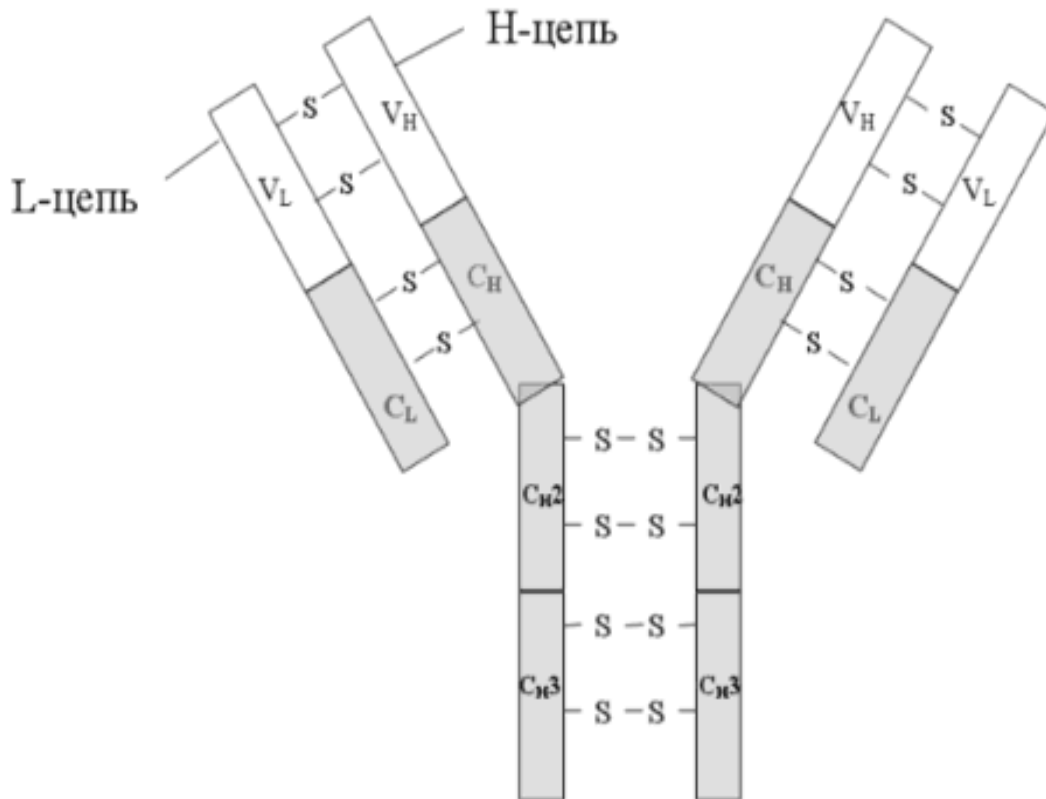
Механізм:

- ДНК-аза розрізає реципієнтну ДНК
- Вбудовується транспозон
- ДНК-лігаза зшиває фрагменти

Імуноглобуліни

2 L-ланцюги - легкі
2 H-ланцюги - важкі
V -варіабельні ділянки (800 генів)
C-константні ділянки (60 генів)

5 видів: IgA, IgG
IgE, IgM, IgD



Ампліфікація – збільшення копій певних генів
(або їх фрагментів) внаслідок вибухоподібної
багаторазової реплікації

Металотіонеїн

**Дигідрофолат-
редуктаза**

**Полімеразна
ланцюгова
реакція
(ПЛР)**

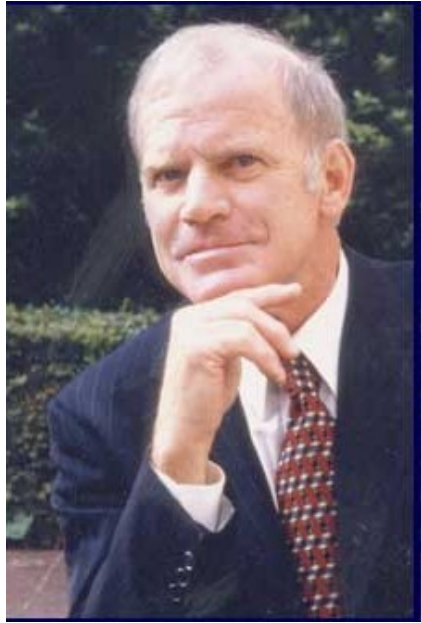
**Детоксикація
важких металів
Pb, Cu, Hg, Cd**

**Резистентність до
цитостатику
метотрексату**

**ДНК-
діагностика**



Нобелівська премія по хімії - 1993



Керри Малліс
Каліфорнійський
університет,
США

**Пошук голки у
копиці сіна!**

**ПЛР – фундаментальна
технологія ХХ сторіччя**

**ДНК-діагностика:
батьківство, інфекційні
хвороби,
генетичні – молекулярні
хвороби**

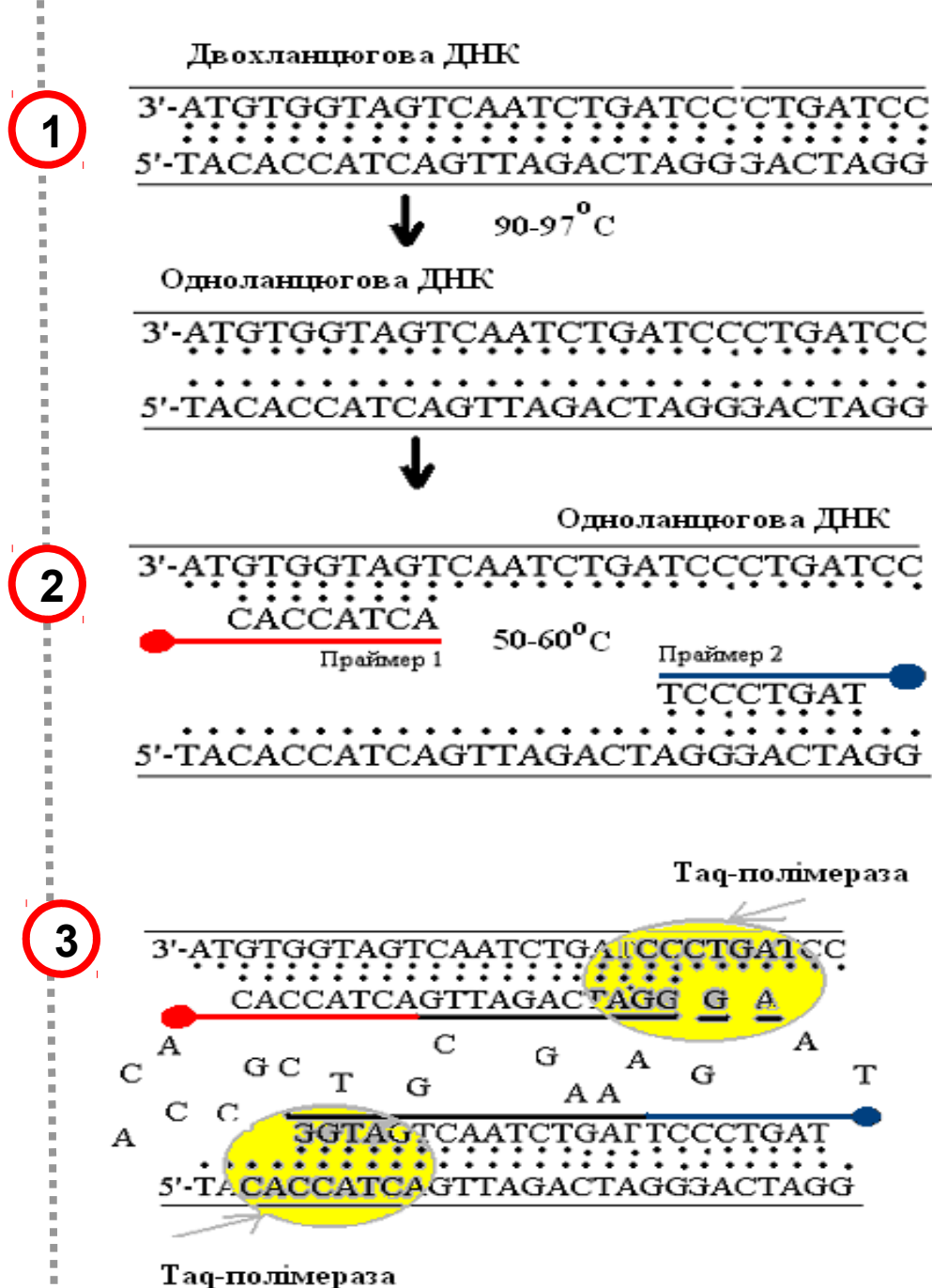
Метод ПЛР

Фактори ПЛР:

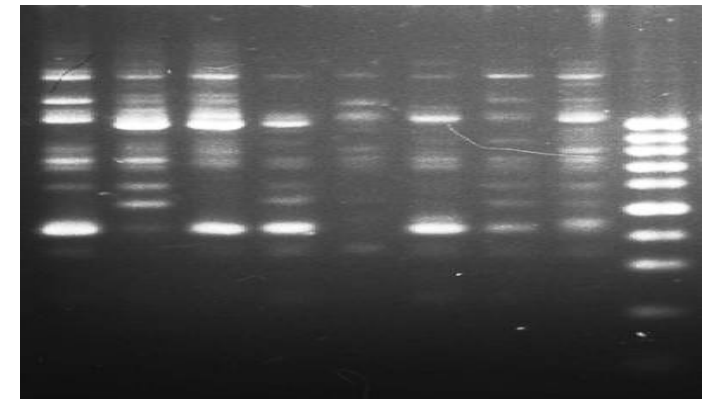
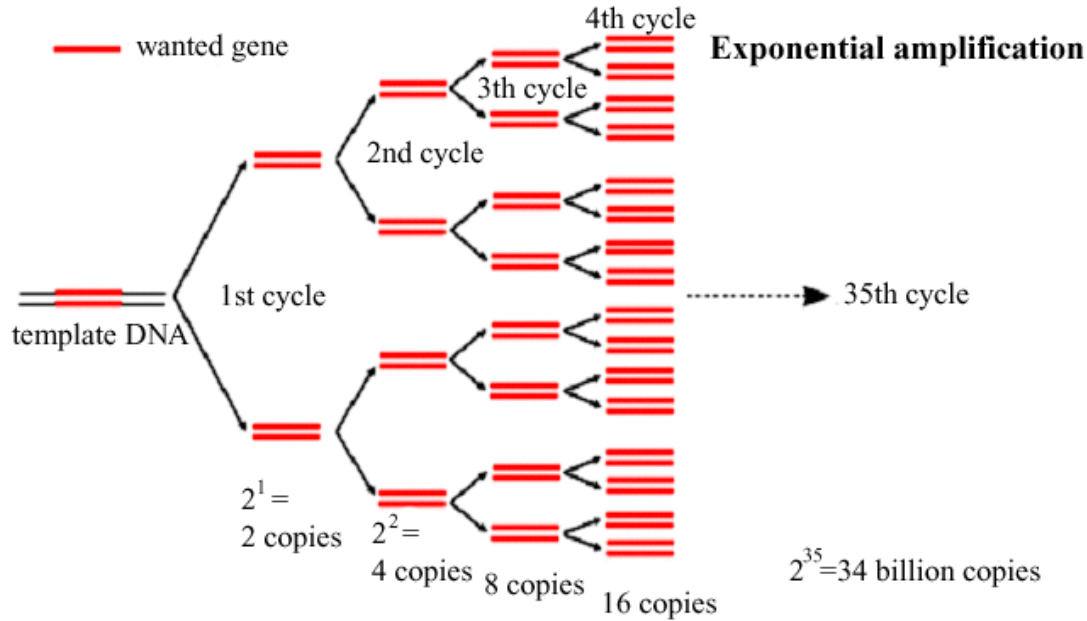
- ДНК-матриця
- 2 праймера
- дАТФ, дГТФ, дЦТФ, ТТФ
- **ДНК-полімераза** (Тaq-полімераза)
- Mg^{2+}

Етапи ПЛР:

1. **Плавлення** (90-100°C) :
розплітання (денатурація) ДНК
2. **Віджиг** (50-60°C) :
гібридизація одноланцюгової ДНК з праймерами
3. **Елонгація**: синтез дочірніх ланцюгів Тaq-полімеразою



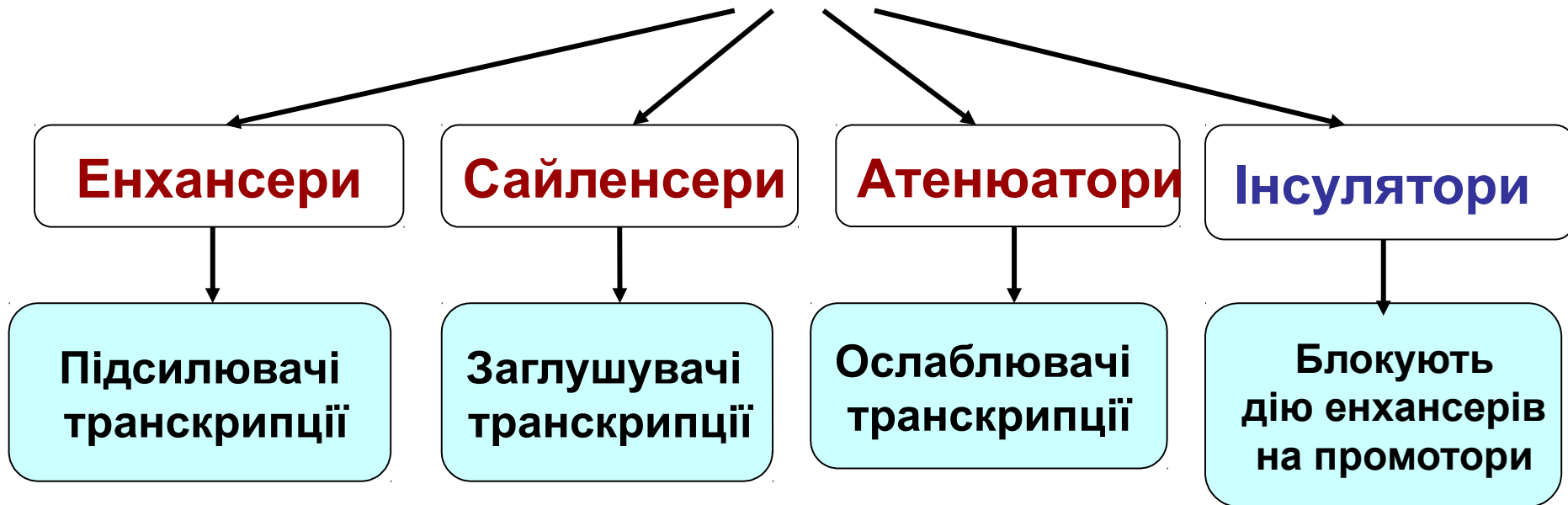
Ампліфікатори (термоциклери)



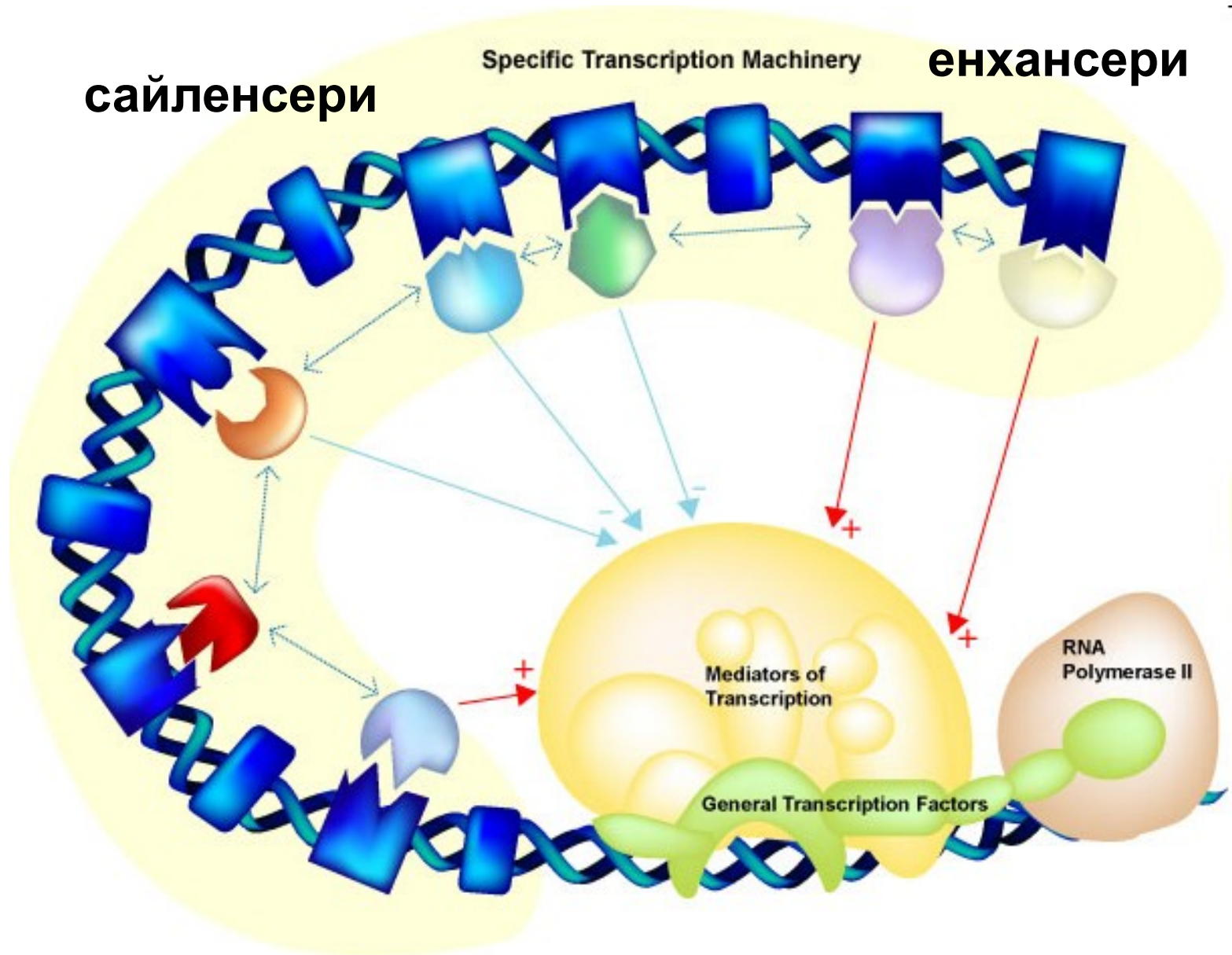
Візуалізація продуктів ампліфікації (ампліконів) шляхом електрофорезу

Транскрипційний контроль

1. Регуляторні елементи геному - специфічні сайти ДНК, які впливають на активність транскрипції

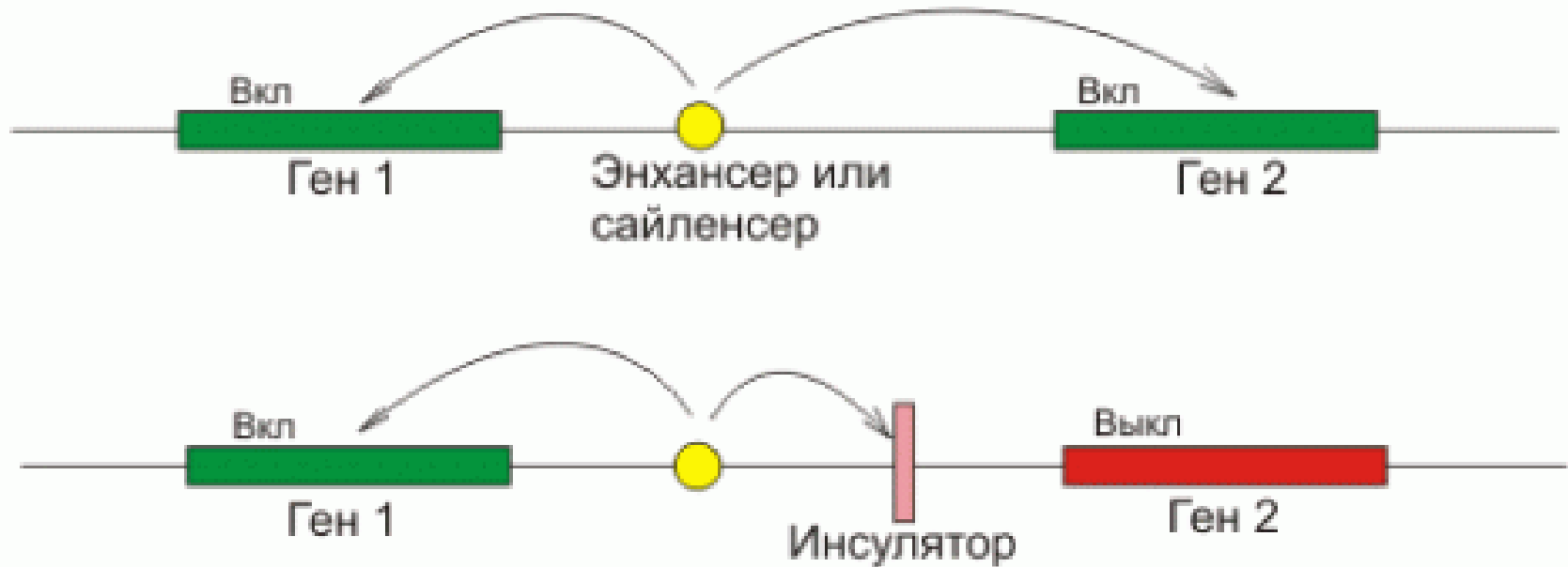


Транскрипційний контроль



Інсулятори

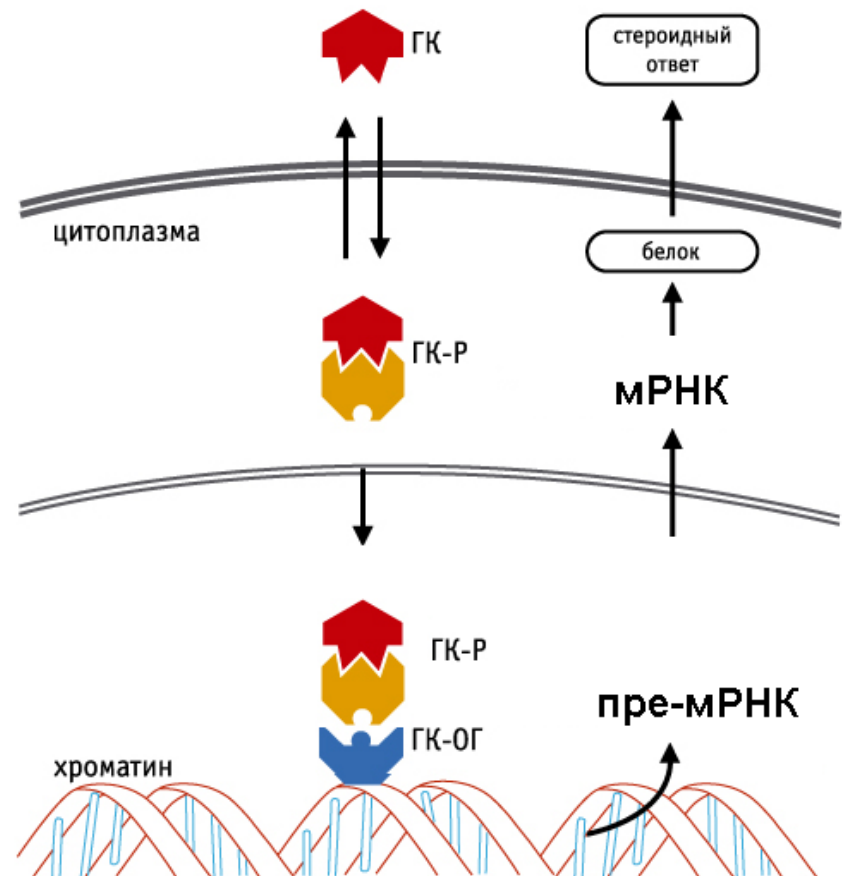
- Пригнічують вплив енхансерів та сайленсерів на промотор



2. Регуляторні білки – взаємодіють з енхансерами, реалізують дію гормонів

Мають 3 домени для зв'язування з

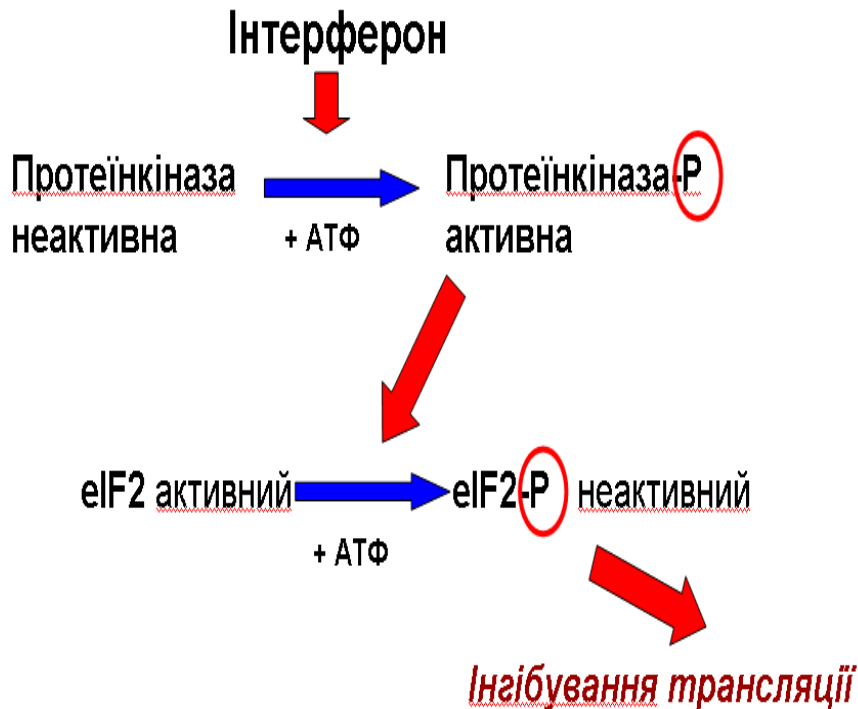
- ДНК
- РНК-полімеразою
- Гормонами
 - стероїдні гормони
 - ретиноєва кислота
 - кальцитріол
 - тироксин



Трансляційний контроль

1. Фосфорилування /дефосфорилування фактору ініціації трансляції eIF2 (при фосфорилуванні інактивується)

Дія інтерферонів



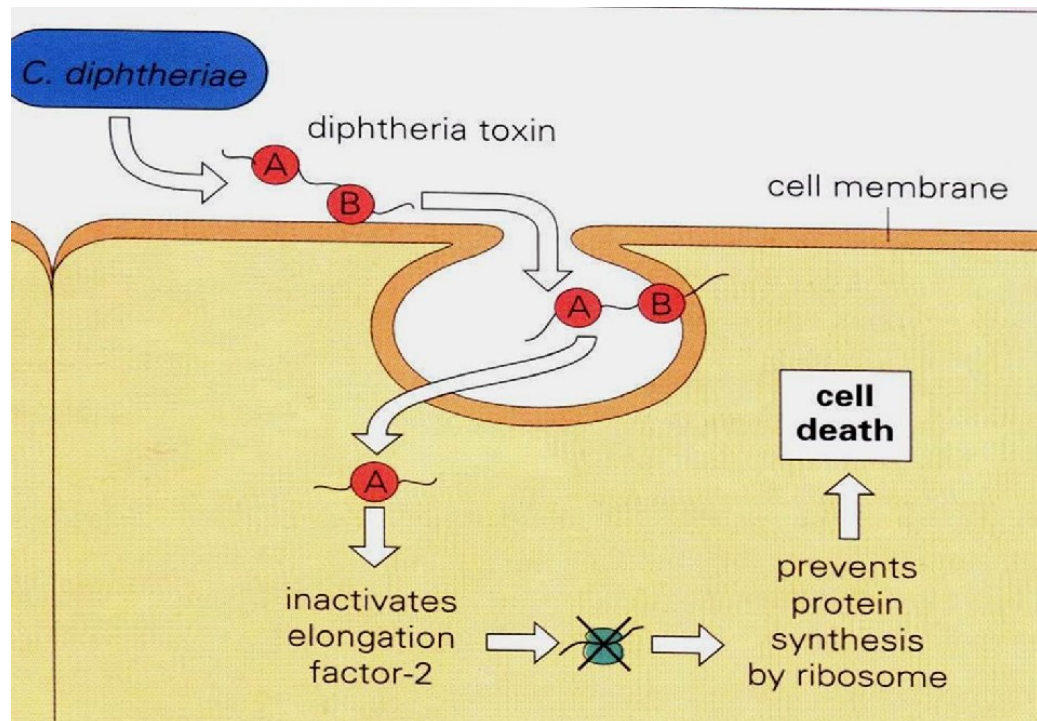
Контроль синтезу глобіну



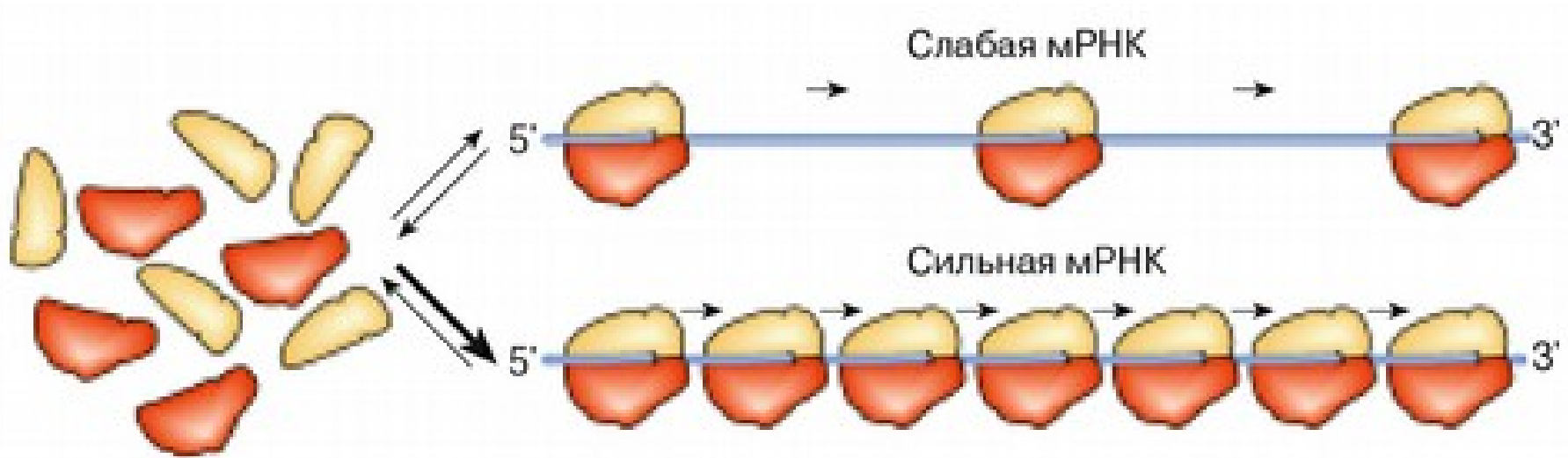
Дифтерійний токсин:

- АДФ-рибозилування фактору елонгації **eEF-2** → інгібування транслокації рибосом
- руйнує НАД в епітелії дихальних шляхів

НАД + eEF-2 → eEF-2-АДФ-рибоза + Нікотинамід



2. Дискримінація РНК



“Сильні” РНК – висока спорідненість з рибосомою та факторами ініціації

“Слабкі” РНК

Особливості регуляції експресії генів у людини



- Вкл / викл генів – повільне (години, дні, тижні)
- Регулюється гормонами (інсулін, тиреоїдні та стероїдні гормони), факторами росту, цитокінами
- В різних клітинах експресуються різні гени
- Більшість генів знаходиться в зарепресованому стані
- Біосинтез білків найбільш активно відбувається в печінці

Мутації – кількісні або якісні зміни генотипу організму

Класифікація:

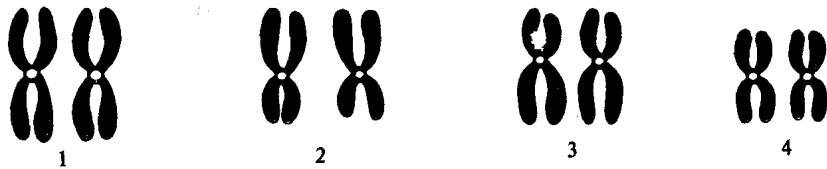
За причиною: спонтанні та індуковані

За характером:

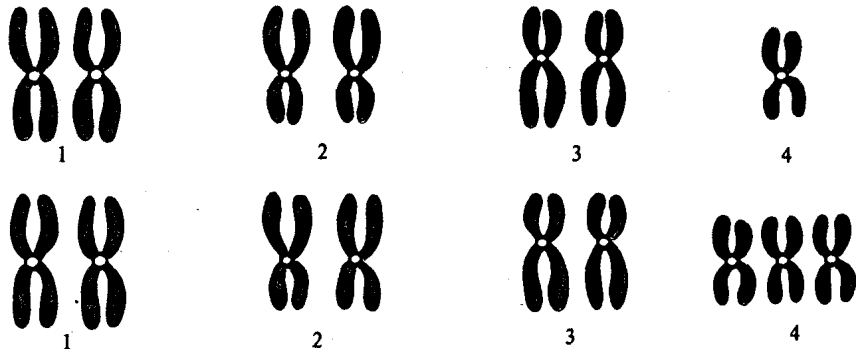
1. Геномні – зміна кількості хромосом

• поліплоїдії, гетероплоїдії (анеуплоїдії)

Норма



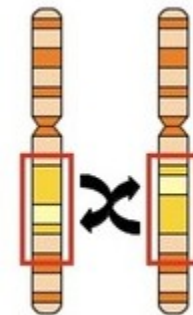
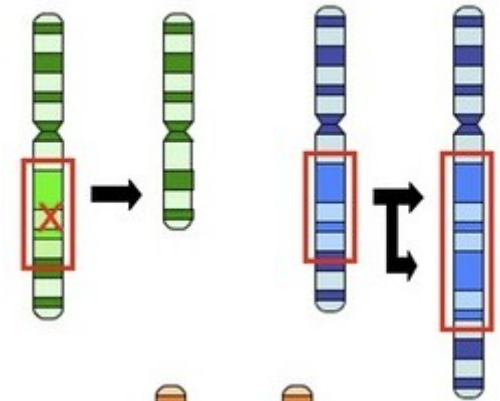
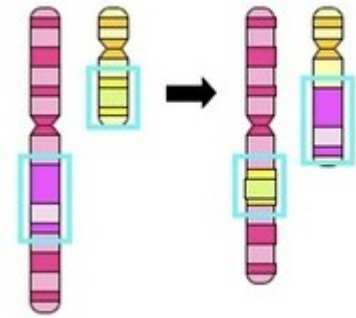
Анеуплоидія



Трисомія по 21 хромосомі

2. Хромосомні аберації

- **транспозиція** – перенесення генів в межах одної хромосоми
- **транслокація** – перенесення гену в іншу хромосому
- **делеція** - втрата ділянки хромосоми
- **дуплікація** - подвоєння ділянки хромосоми
- **інверсія** - поворот ділянки хромосоми на 180°

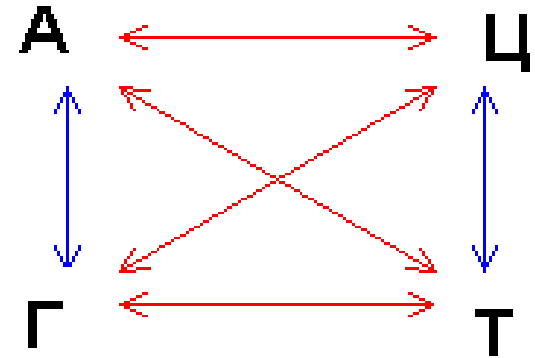


3. Генні (точкові мутації) – кількісні або якісні зміни нуклеотидів в межах одного гена.

1. Заміни :

• **Транзиції:** $T \leftrightarrow C$ або $A \leftrightarrow G$.

• **Трансверзії:** $T (C) \leftrightarrow A (G)$



2. Зміна кількості нуклеотидів:

• **вставки:** (+) нуклеотиди

• **делеції (випадіння):** (-) нуклеотиди

3. По відношенню до рамки зчитування

• **із “зсувом рамки”** : +/- нуклеотиди, $n \neq 3$ (некратно 3)

• **без “зсуву рамки”** : +/- нуклеотиди, $n = 3$ (кратно 3)

Мовчазні мутації - сенс кодону не змінюється
(відсутність змін в білку)

Міссенс-мутації: заміна однієї АК на іншу в білку

Нонсенс-мутація: заміна змістовного кодону на стоп-кодон, передчасна термінація синтезу білку

ТГТ → **ТГЦ**
Цис → **Цис**

Мовчазна мутація

ТГТ → **ТГГ**
Цис → **Три**

Міссенс-мутація

ТГТ → **ТГА**
Цис → **Стоп**

Нонсенс-мутація

Наслідки точкових мутацій:

- без наслідків
- поліморфізм білків
- молекулярні хвороби
- летальні мутації

CAC	GTG	GAC	TGA	GGA	CTC	CTC
GTG	CAC	CTG	ACT	CCT	GAG	GAG



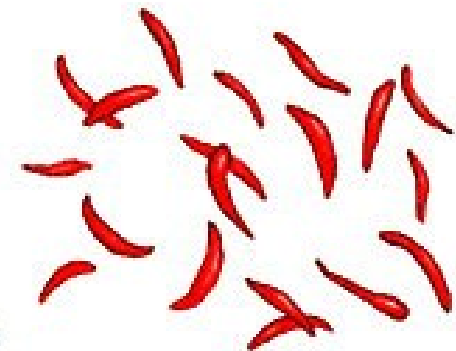
Глутаминовая
кислота



CAC	GTG	GAC	TGA	GGA	CAC	CTC
GTG	CAC	CTG	ACT	CCT	GUG	GAG



Валин Серповидно-клеточная анемия



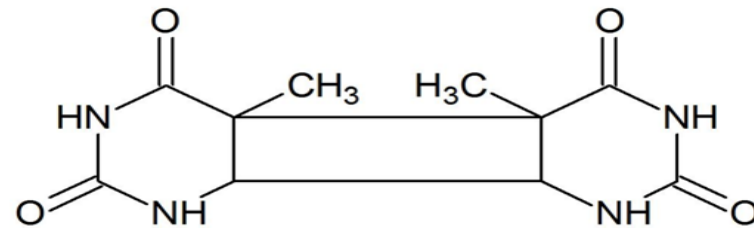
Мутагени – фактори, що індукують мутації

1. Фізичні:

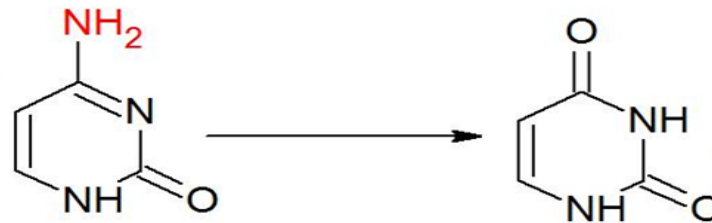
- **УФО:** димеризація тиміну
- **Іонізуюча радіація:** фрагментація ДНК



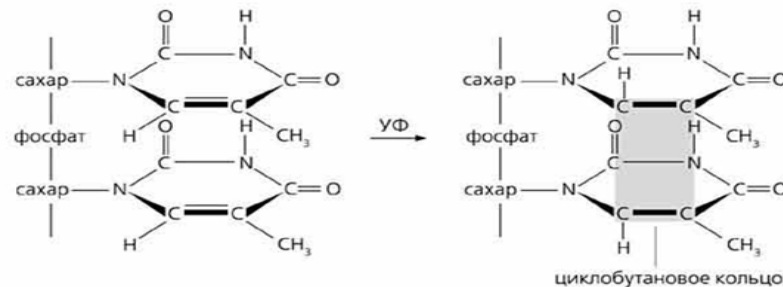
❖ Тиміновий димер



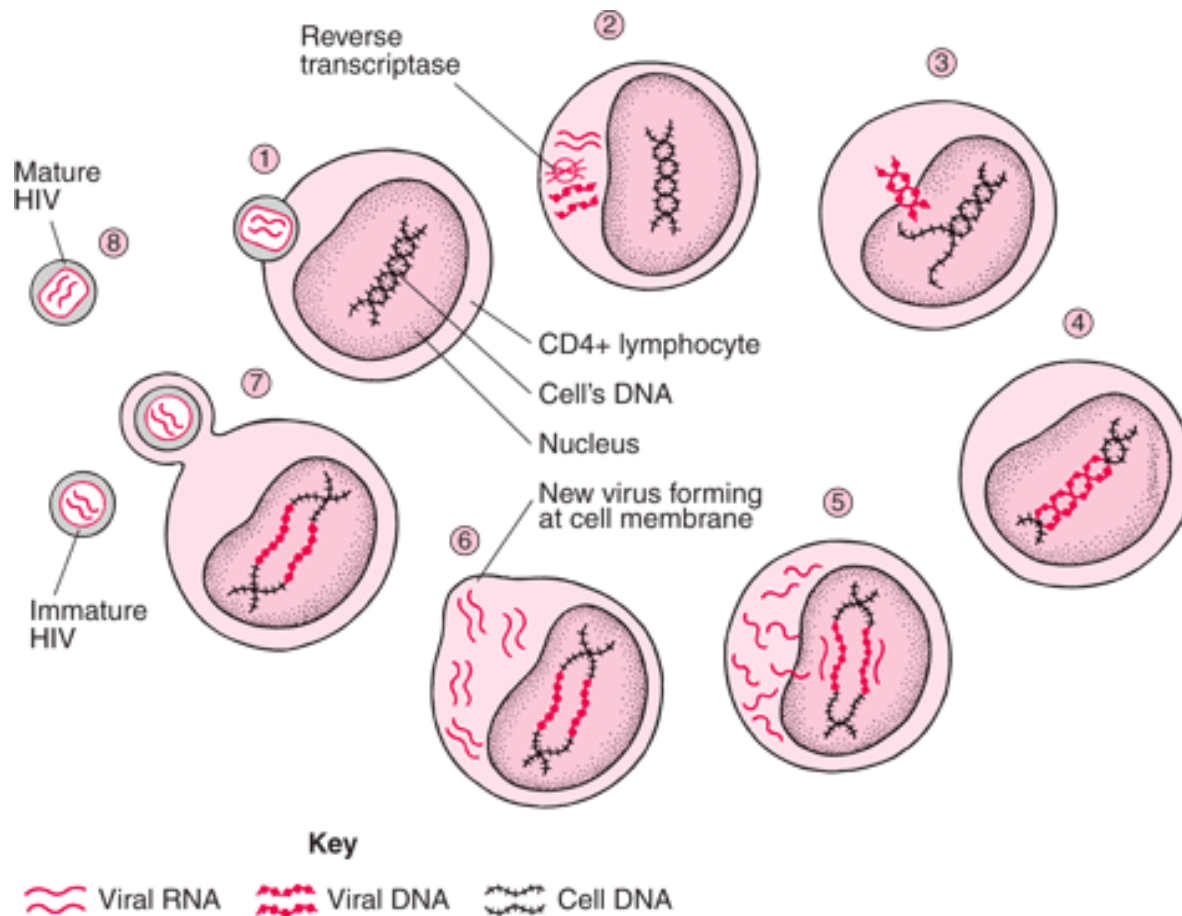
❖ Дезамінування цитозину в урацил



• конденсація дезоксирибоз у циклобутанове кільце



2. Біологічні: віруси, бактерії (вбудова своєї ДНК в геном клітини-реципієнта)



3. Хімічні:

• **аналоги азотистих основ:** заміщення нуклеотидів ДНК

2-амінопурин, 5-фторурацил

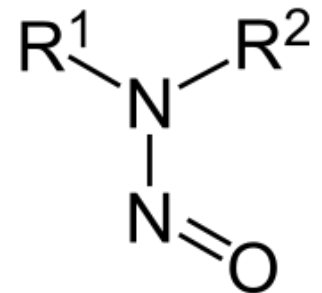
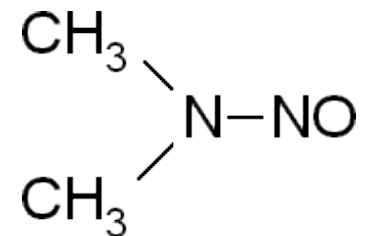
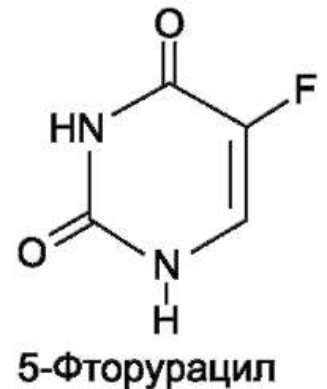
• **алкілюючі агенти:** хімічна модифікація азотистих основ - (+) CH_3 , C_2H_5 та ін.

нітрозодиметиламін, йодацетамід іприт

• **дезамінуючі агенти:** дезамінування

$\text{Ц} \rightarrow \text{У}$, $\text{А} \rightarrow$ гіпоксантин, $\text{Г} \rightarrow$ ксантин.

HNO_2 , NH_2OH (гідроксиламін), нітрозаміни, NO_3^-



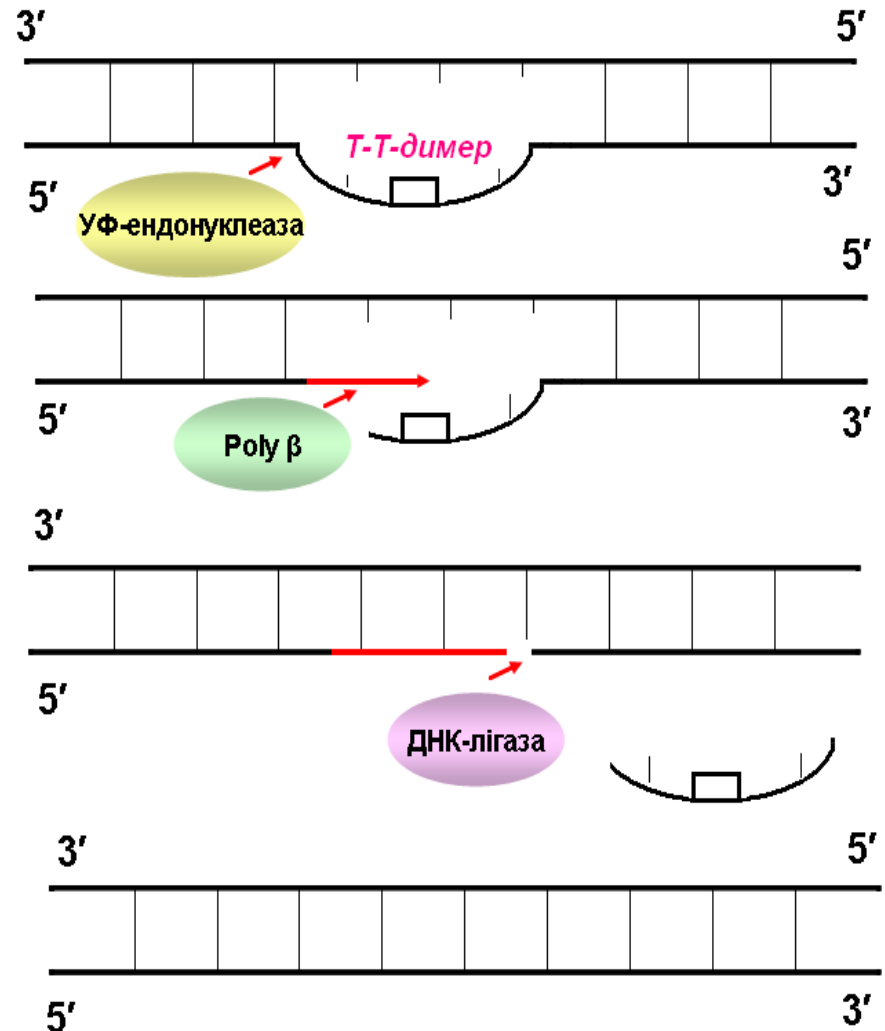
Репарація ДНК –
відновлення первинної
структури ДНК за участі
ферментних систем

Головна умова репарації –
один із ланцюгів ДНК має
бути неушкодженим !!!

Ферменти репарації ДНК

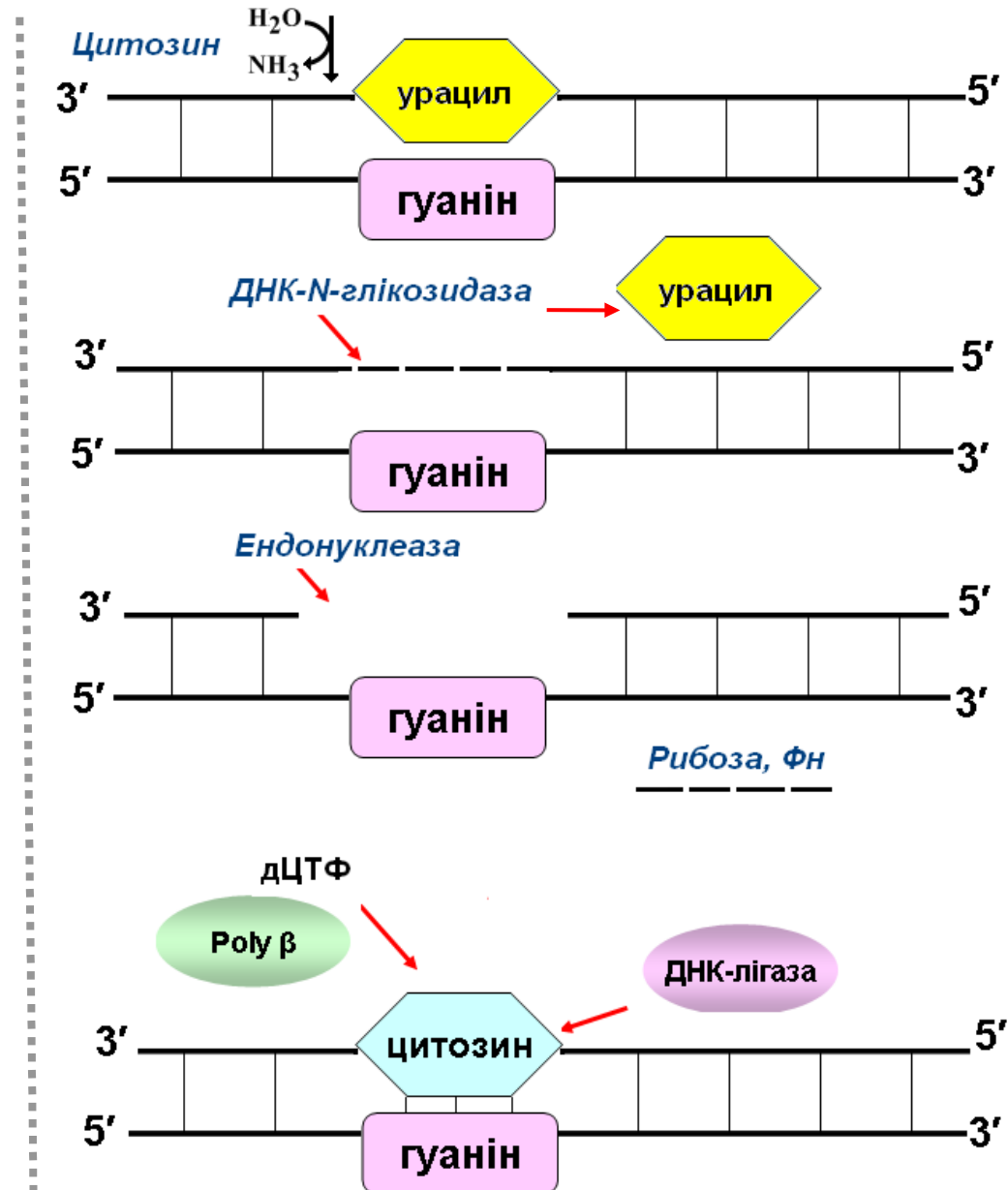
- ✓ **Ендонуклеаза** – видаляє «помилки»
- ✓ **β -ДНК-полімераза** синтезує «латку»
- ✓ **ДНК-лігаза** зшиває ланцюг ДНК

УФ-специфічна ендонуклеаза видаляє тимінові димери (ТТ)!!!



Репарація дезамінування цитозину

1. Видалення урацилу:
урацил-ДНК-глікозидаза розщеплює N-глікозидний зв'язок між урацилом та дезоксирибозою
2. Ендонуклеаза розщеплює ланцюг ДНК зліва від апіримідинової ділянки.
3. ДНК-полімераза β вбудовує правильний нуклеотид
4. ДНК-лігаза зшиває розрив в ланцюгу ДНК



Патологія репарації

Вроджений дефект УФ-ендонуклеази

Пігментна ксеродерма

- ☠ підвищена чутливість до УФО
- ☠ поява червоних плям на шкірі
- ☠ виразки на шкірі, папули, ущільнення, невуси, рак шкіри



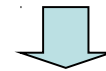
Генна інженерія (технологія рекомбінантних ДНК) – сукупність технологій виділення та перенесення генетичного матеріалу від одного організму в інший, забезпечення спадковості та експресії нових генів

Молекулярні химери – мікроорганізми, що містять гени людини



Синтез інсуліну, гормону росту, соматостатину, інтерферону, еритропоетину, факторів гемостазу

Трансплантація генів – вбудова генів в геном людини



В майбутньому - лікування спадкових хвороб цукрового діабету та ін.

Принципи генної інженерії

1. Отримання гену - конструювання **ДНК-копії (кДНК)** на мРНК за допомогою **зворотної транскриптази вірусів**
2. Конструювання **рекомбінантної ДНК** (вектор + кДНК) за допомогою **рестриктаз бактерій**
3. Клонування гену в клітинах-реципієнтах

Конструювання рекомбінантної ДНК:

қДНК + вектор

Вектор - плазміда або ДНК вірусу, що здатні до самореплікації та переходу з клітини до клітини

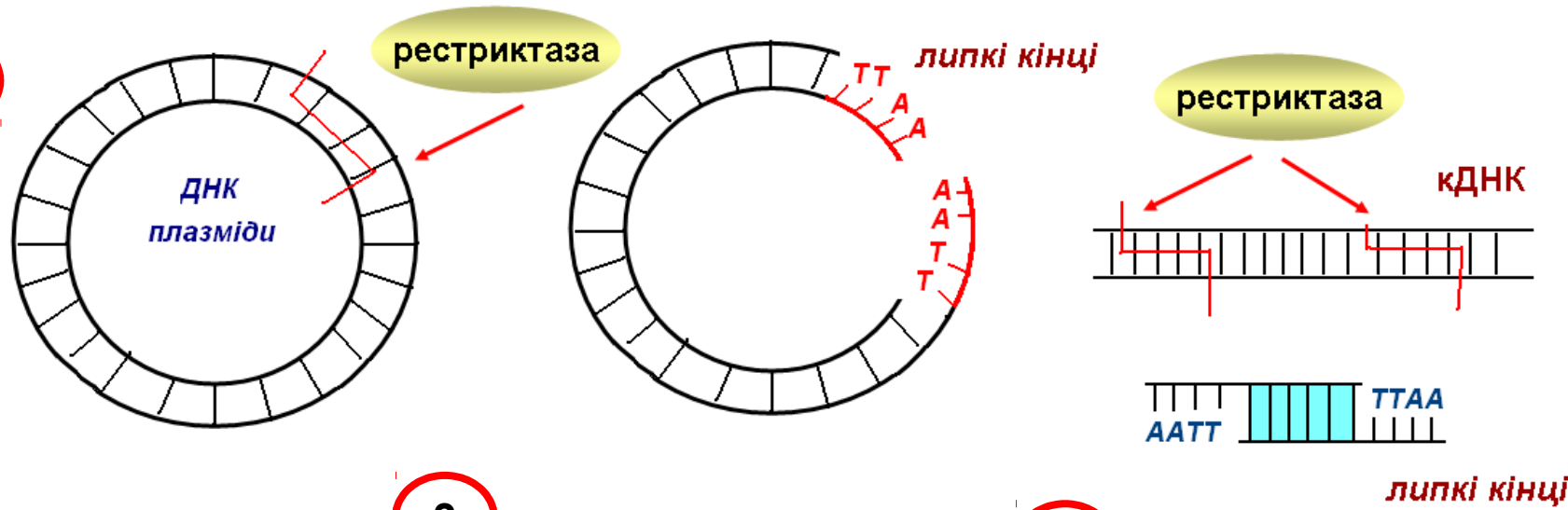
Етапи:

1. Обробка плазміди та қДНК **рестриктазами**
2. З'єднання “липків кінців” плазміди та қДНК
3. Зшивання қДНК та плазміди ДНК-лігазою

Рестриктази - високоспецифічні ферменти бактерій, що розрізають молекули ДНК тільки у певних сайтах (паліндромах)

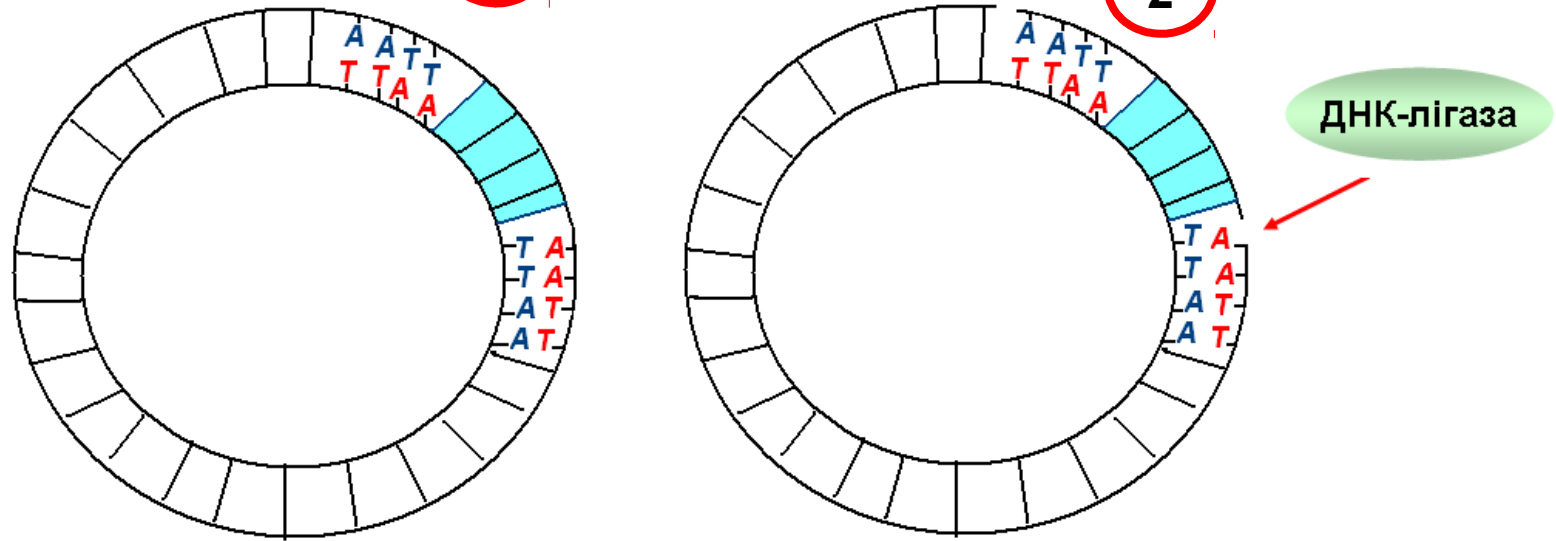
Конструювання рекомбінантної ДНК: κДНК + вектор

1



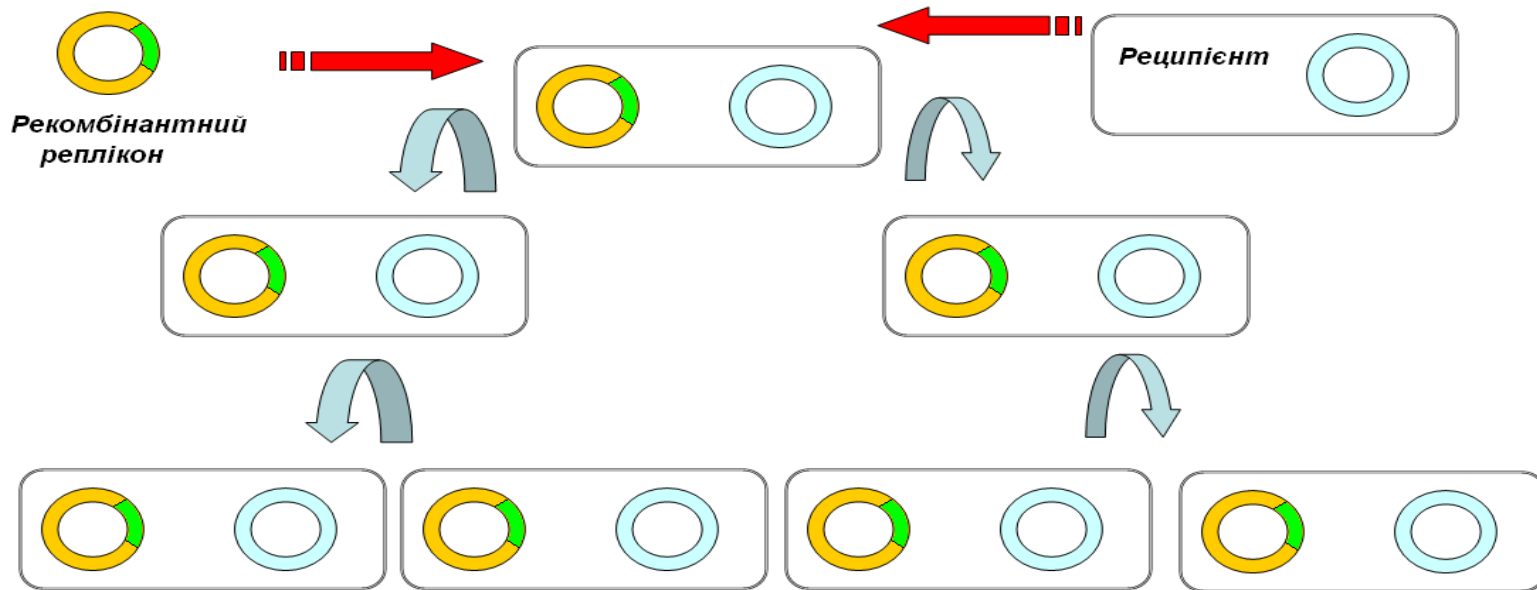
3

2



Рекомбінантна ДНК

Введення рекомбінантної ДНК в клітину-реципієнт та клонування гену.



Синтез білків

