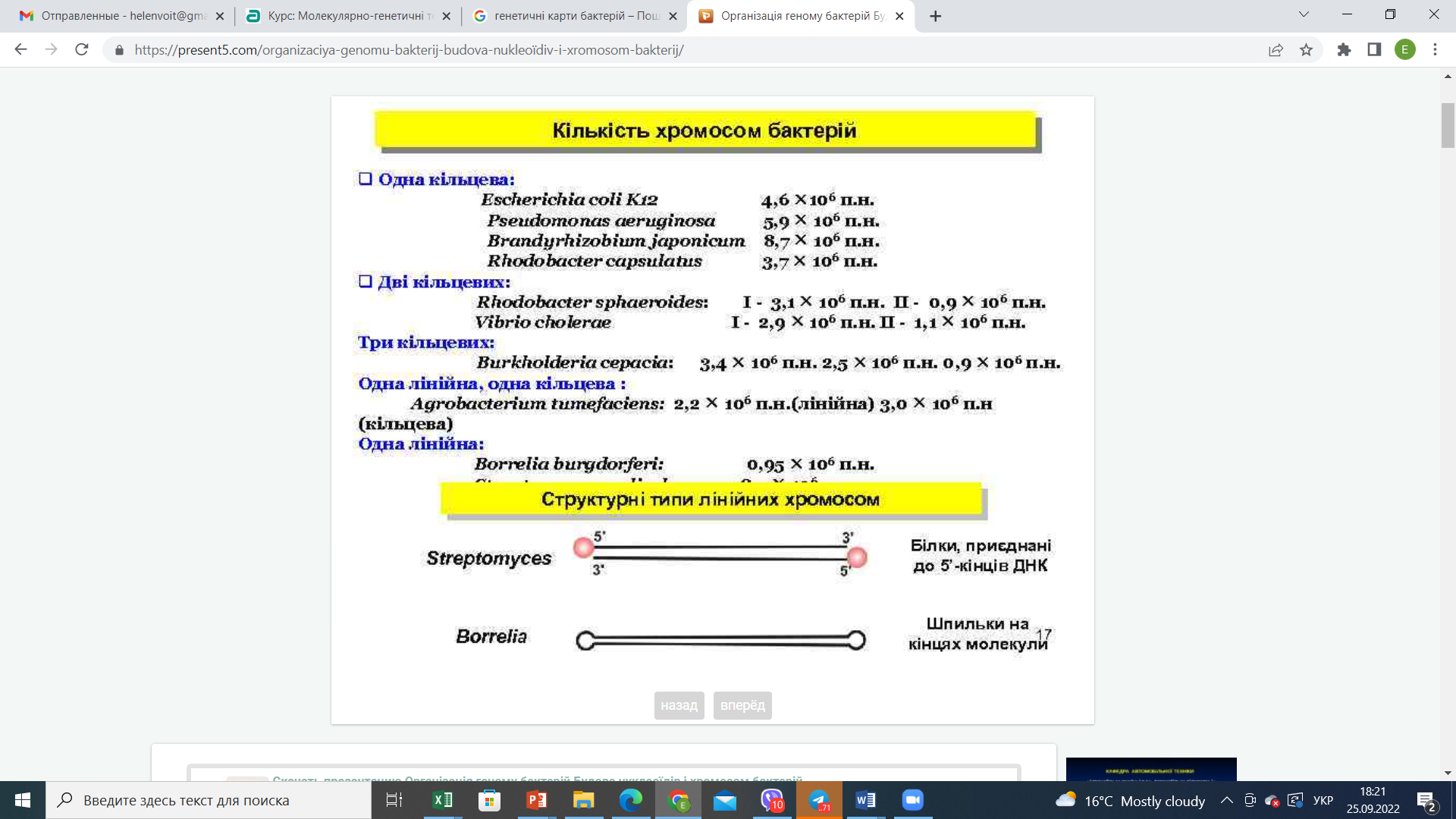
**Лекція 4**

**Зміст бактеріальної хромосоми. Регуляція транскрипції генів у прокаріот.**

**Зміст бактеріальної хромосоми.**

П'ятдесят років тому усі хромосоми прокаріот вважалися лінійними. В 1956 р. Ф.Жакоб і Е.Вільман запропонували кільцеву модель бактеріальної хромосоми. Ця модель вважалася загальноприйнятою до появи методу прямого аналізу фізичної структури хромосом. У 1989 р. уперше цим методом була ідентифікована лінійна бактеріальна хромосома у збудника кліщового спірохетозу *Borrelia burgdorferi*. Незабаром встановили, що лінійна і кільцеві хромосоми співіснують одночасно у *Agrobacterium tumefaciens*, а у грампозитивних бактерій роду *Streptomyces,* що мають один з найбільших бактерійних геномів (≈8000 тис. н.п.), є одна лінійна хромосома.



Розмір генома у різних бактерій коливається від 580 тис. н.п. у *Micoplasma genitalium* до 9 500 тис. н.п. у *Myxococcus xanthus.* Для кишкової палички *Е.coli* розмір генома складає 4600 тис. н. п. (мол. маса близько 3×109 Да, довжина ДНК ≈1,5 мм). У бактеріальних клітинах хромосома сильно компактизована. Так, кільцева молекула ДНК Е.coli довжиною - 1,5мм знаходиться в клітині у формі палички, що має діаметр 1 мкм і завдовжки 2 мкм.

Реплікація бактеріальної хромосоми починається в точці ***ori С*** (origine) і триває в обох напрямах до ділянки термінації реплікації ***ter С*** (terminus). У більшості бактерій ділянки *ori С* і *ter С* ділять кільцеву хромосому на два майже рівні реплікона. Область початку реплікації в багатьох бактеріальних геномах має консервативну структуру. Подібні структури знайдені майже в усіх секвенованих бактеріальних геномах. Для лінійних хромосом точка *ori С* визначається рівно посередині її. Напрям транскрипції більшості генів бактерій з високою швидкістю зростання співпадає з напрямом реплікації.

Важливою особливістю геномів прокаріот є їх висока інформативність: відношення інформативних ділянок до неінформативних складає 9:1. Тобто в середньому 90% нуклеотидних послідовностей геному припадають на кодуючі послідовності.

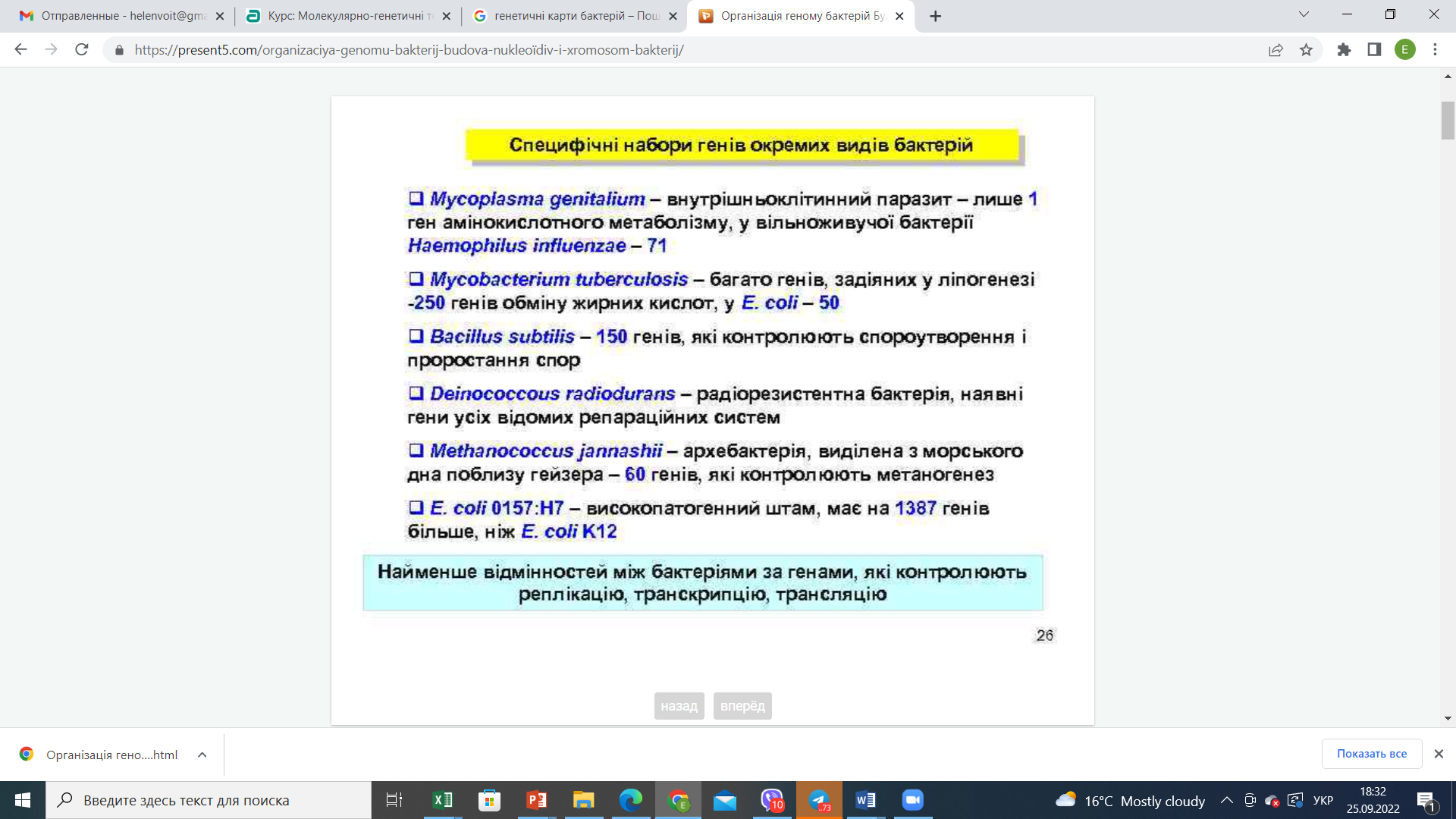
В структурі геному бактерії *Mycoplasma genitalium* (580 тис. н.п.) близько 90% складають кодуючі чергування нуклеотидів, які входять до складу 479 генів, локалізованих на, так званих, відкритих рамках зчитування. **Відкрита рамка зчитування** (*англ.* open reading frame, **ORF**) складається з ряду триплетів, що кодують амінокислоти; не містить термінальних кодонів, що потенційно може транслюватися в білок. У встановленій нуклеотидній послідовності генома прокаріот за допомогою комп'ютерних програм (біоінформатика) виявлені відкриті рамки зчитування. Середній розмір їх в прокаріотичних геномах відповідає приблизно **300 амінокислотним залишкам.** Співставлення складу ORF по функціям дозволяє ідентифікувати компоненти генома, загальні для всіх організмів, загальні для цієї групи видів і унікальні, специфічні тільки для цього організму. Функціональна класифікація генів і генних продуктів є основою для порівняння геномів і виявлення схожості і відмінності їх метаболізму. Усі білки і гени, що кодують їх, класифіковані на три функціональні групи: **енергообмін, інформація, комунікація** (зсередини- і зовні-клітинна). Серед **4 288 ORF** *Е. coli* не виявлені функції у 38 % ORF. Приблизно така ж частина генів з невідомою функцією відмічена і в інших прокаріотичних геномах.

1.В середньому 90% нуклеотидних послідовностей геному припадають на кодуючі послідовності- гени.

Середній розмір гена *E. coli* - **950 пар основ** (прокаріотичні гени не містять інтронів), середня довжина 2. міжгенних ділянок - **118 пар основ**. Однак міжгенні зони мають досить нерівномірний розподіл по довжині, варіюючи від 0 до 1730 пар основ.

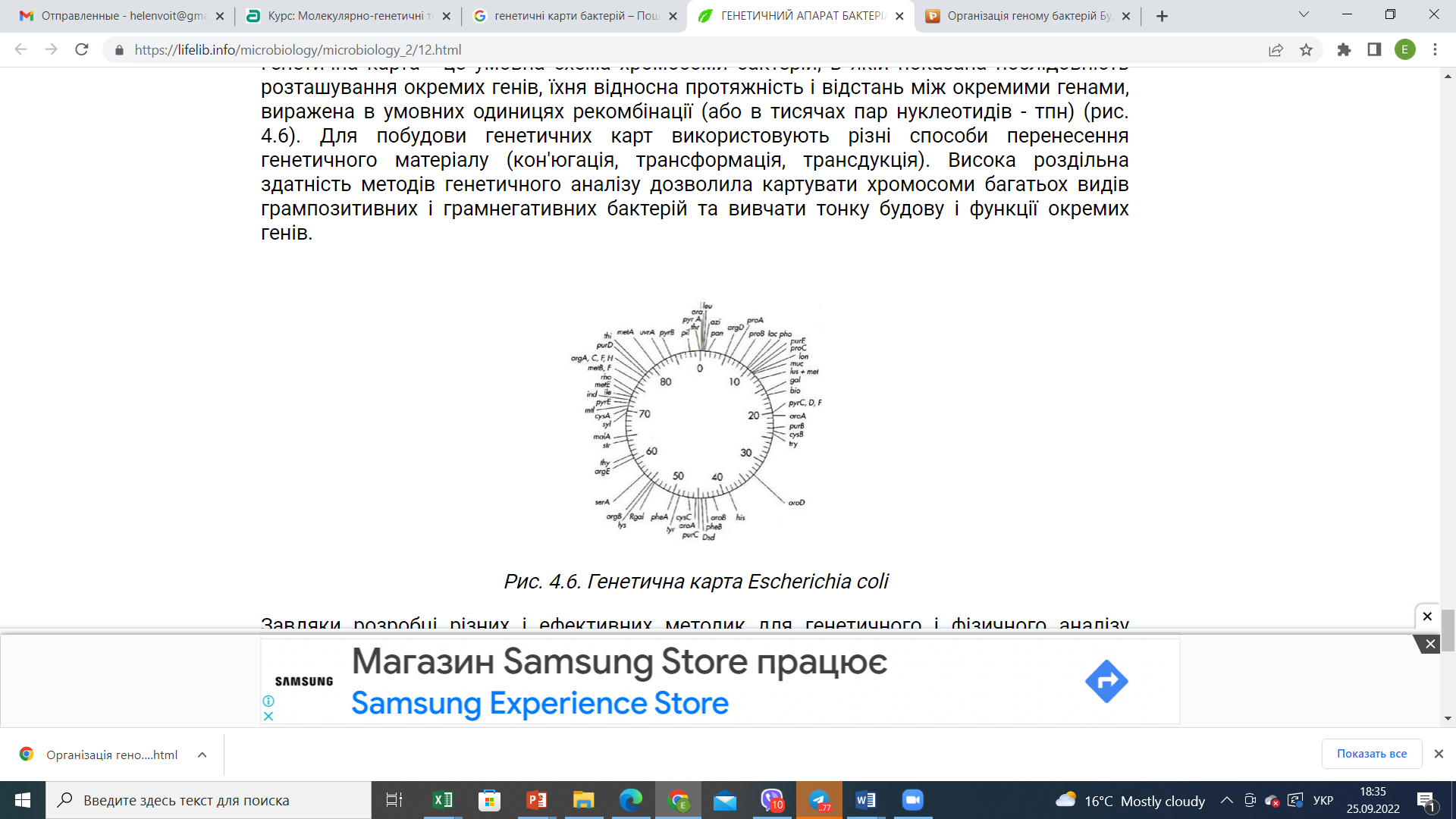
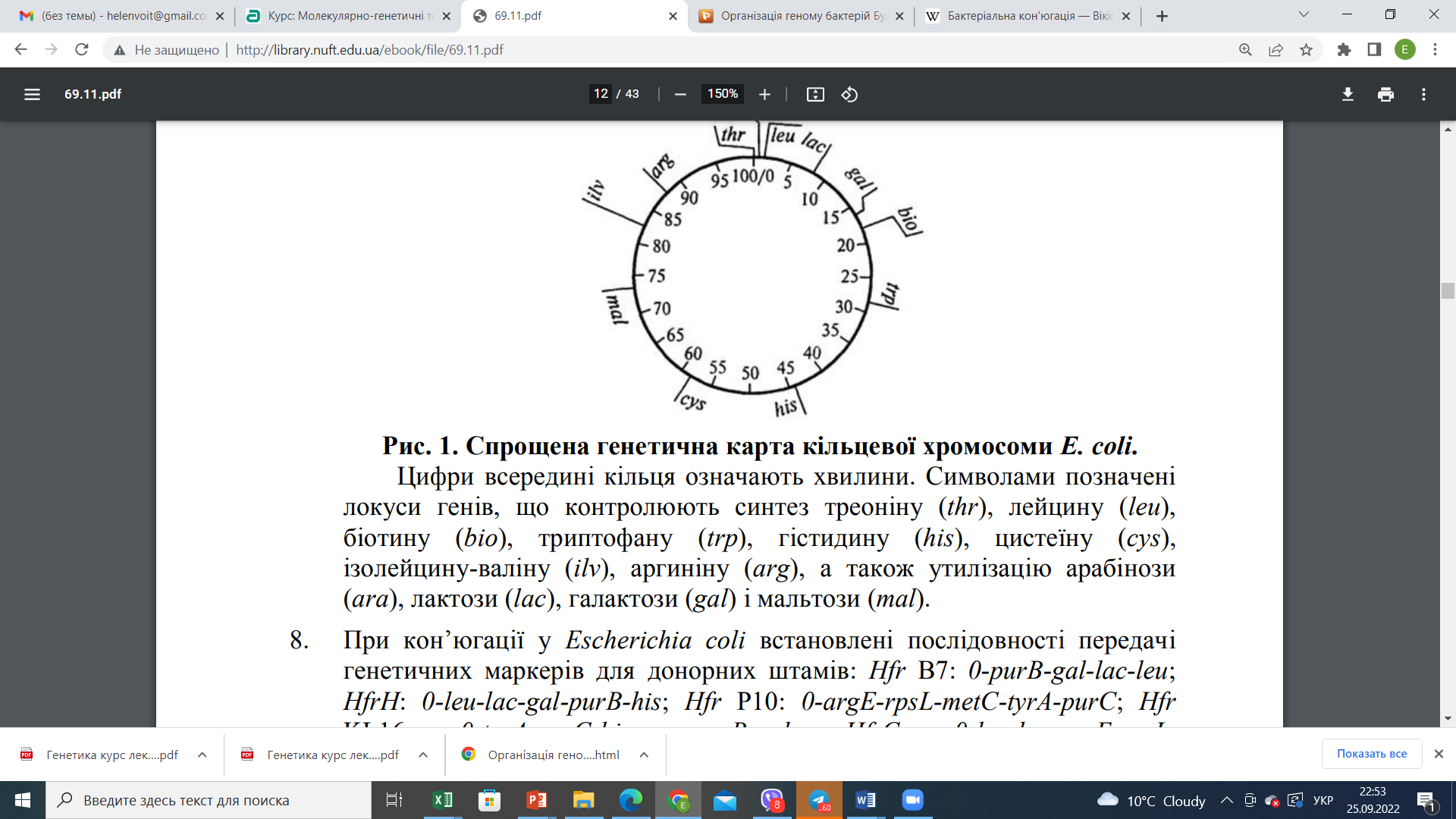
Одна бактеріальна хромосома містить до **1000** відомих генів. Зазвичай це гени **«домашнього господарства»**, необхідні для підтримки життєдіяльності клітини. Існує поняття про, так званий, **консервативний або мінімальний набір генів прокаріотичних клітин**, необхідних для забезпечення цих процесів. Він включає близько **256 генів**, серед яких більшу частину складають гени, необхідні для трансляції і транскрипції (відповідно 94 і 35), енергообміну (28), транспорту метаболітів (40), метаболічних перетворень різних сполук (6-8 ), секреції та адгезії (5), виконання структурних функцій (7 генів). Інші процеси життєдіяльності контролює менша кількість генів

Якщо ж з генома прокаріотичного організму вилучити консервативний мінімальний набір генів для мікроорганізмів то можна отримати ті гени, які визначають специфічні фенотипічні характеристики, що становлять унікальність організму– **гени «розкіші».** Показовий в цьому відношенні геном хелікобактерії, що мешкає в шлунку людини і викликає виразкову хворобу. Хелікобактерії здатні до життя у кислому середовищі, оскільки встановлюють позитивний внутрішньомембранний потенціал при низьких pH і модифікують мікросередовище за допомогою уреази. Білки *Н.pylori* містять удвічі більше основних амінокислотних залишків аргініну і лізину, чим білки *Е.coli*. З паразитизмом пов'язана наявність у *Н.pylori* не менше п'яти різних систем адгезії для прикріплення до епітеліальних клітин шлунку.



Гени зазвичай називаються абревіатурами з 4 літер, що походять від їхньої функції (коли вони відомі) та курсивом. Наприклад, ***recA*** названо на честь своєї ролі в [гомологічній рекомбінації](https://uk.upwiki.one/wiki/Homologous_recombination) плюс буква А. Названі функціонально пов’язані гени *recB*, *recC*, *recD* і т. д.

Всі гени пронумеровані у своєму порядку на геномі (**Фізичне картування бактеріальних генів методом перерваної кон’югації з Hfr штамами через плазміди**). **Так створюється карта хромосоми.**



У геномі бактерій можуть бути присутні гени, схожі за нуклеотидною послідовністю. Такі гени називаються гомологічними. Гомологічні гени можуть з'явитися в геномі в результаті подвоєння (дуплікації) одного гена.

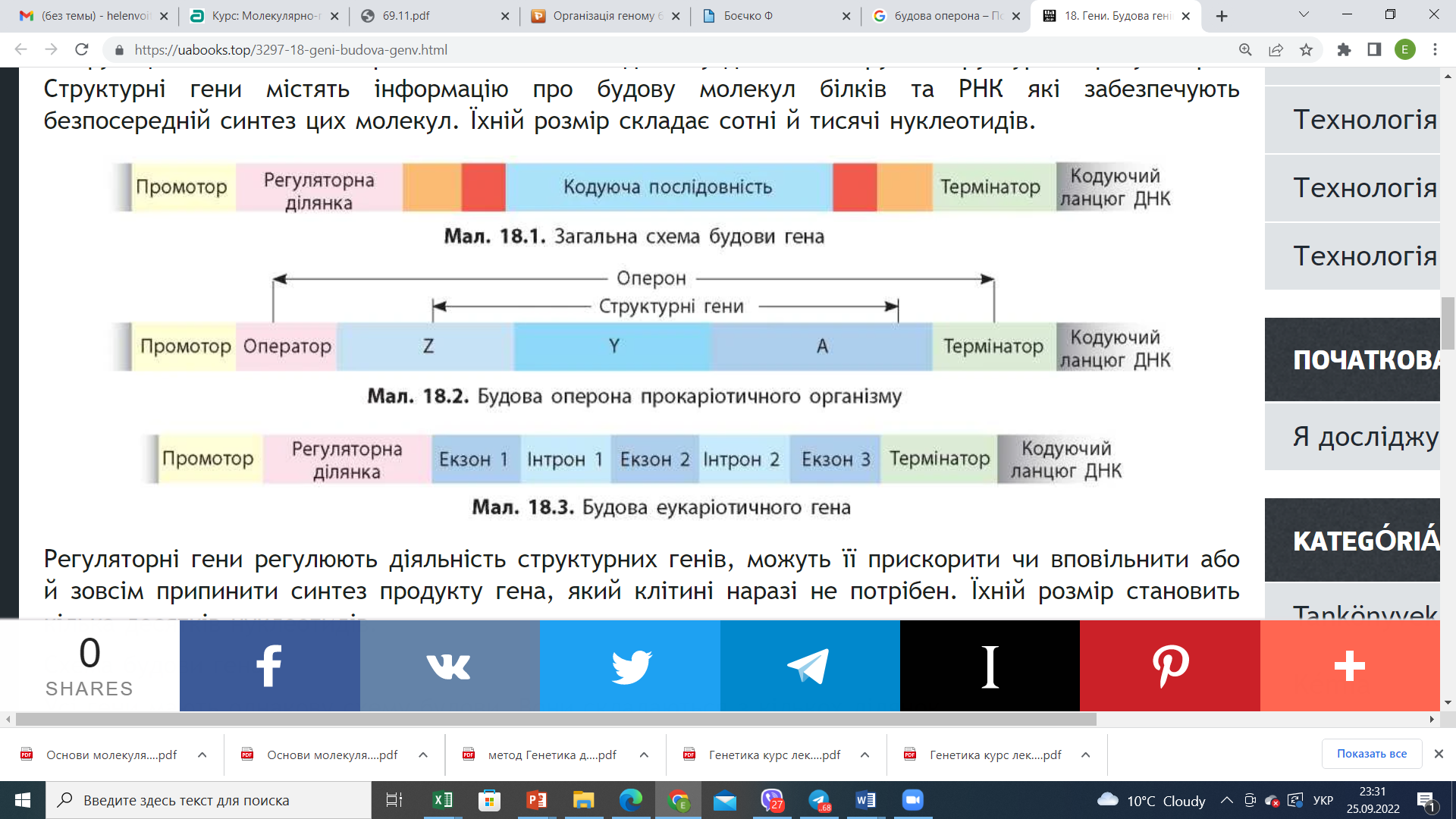
Деякі гени, подібні за будовою, але трохи відрізняються за функціями, мають велику копійність в геномі. На рис. представлено кількість копій різних генів в геномі вільноживучої бактерії *Bacillus subtilis*. *Копійність генів пов'язана зі способом життя бактерій.* Це ті гени, які обумовлюють **екологічну специфічність.**

Окрім білок-кодуючих генів, в геномах прокаріотів закодовані 3. **гени рРНК та тРНК**, які мають значну копійність і утворюють **кластери** (групи). Так у кишкової палички ідентифіковано 7 оперонів рРНК і 86 оперони тРНК. При цьому наприклад до оперону рРНК входять кластери генів 23S, 16S і 5S рРНК. Ці гени розташовані тандемно і транскрибуються як одне ціле з утворенням 30S-РНК-попередника.

4. В бактеріальному геномі присутні також **мобільні елементи класу ДНК-транспозонів**, абсолютно аналогічні транспозонам в геномах еукаріот.

Характерною рисою бактеріального геному є те, що лише поодинокі гени функціонують як самостійні одиниці транскрипції. Більшість структурних генів згруповані в **оперони,** отже мають спільну систему регуляції і функціонують як одне ціле. Як правило, оперон обєднує гени функціонально споріднених білків-ферментів, що каталізують послідовні реакції синтезу або розпаду певного продукту. Найкраще вивчені оперони, гени яких кодують ферменти синтезу амінокислот (анаболічні оперони) та використання цукрів як енергетичних сусбтратів (катаболічні оперони).

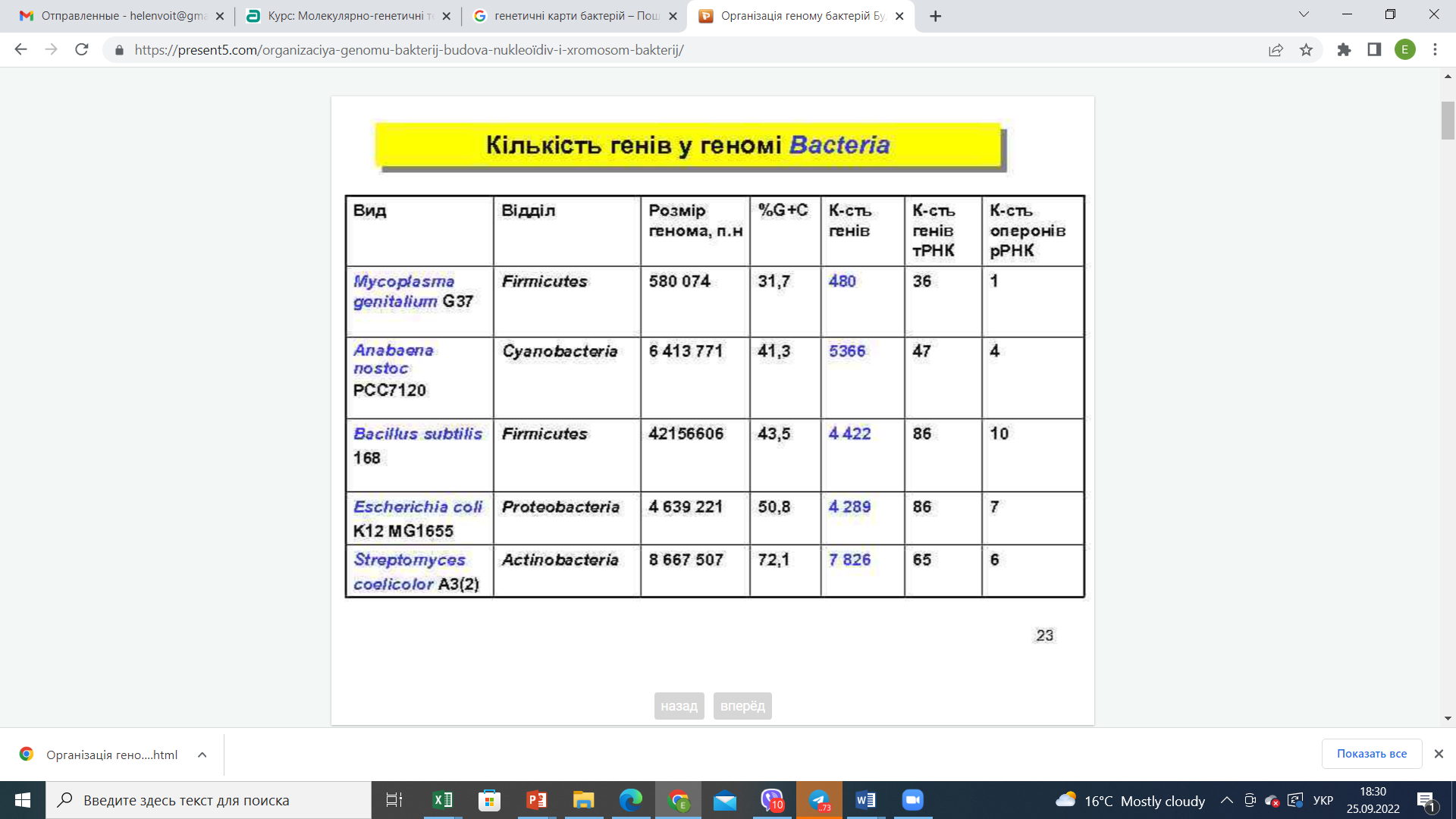
Тобто, під **опероном прокаріот** **слід розуміти ділянку ДНК, обмежовану промотором і термінатором, що містить цистрони, на структурі яких закодовано білки-ферменти одного метаболічного циклу, і регулюються геном-регулятором**. Оперон являє собою транскрипційну одиницю, тому його інколи називають **транскриптоном** або одиницею транскрипції. Група генів, що відноситься до одного оперона, транскрибується в одну іРНК, яка послідовно транслюється рибосомами з утворенням кожного з білків.



Крім генів ферментів, які безпосередньо приймають участь у синтезі чи розпаді певної сполуки, до оперона можуть входити гени, що мають споріднену функцію – наприклад, кодують білки, відповідальні за транспорт необхідних субстратів у клітину або за включення генів іншого оперона.

3 2584 оперонів кишкової палички 73% містять 1 ген, 17% - 2 гена, 5%- 3 гена, 5% - 4 і більше генів.

У хромосомі *B.subtilis* 1250 оперонів у середньому по 3 гени на оперон.



**Регуляція транскрипції генів у прокаріот**

Найбільш продуктивно можна впливати на експресію гена через його транскрипцію. При такому способі регуляції повинен змінюватися внутрішньоклітинний рівень відповідних мРНК, який може лімітувати (обмежувати) біосинтез білків рибосомами. Крім того, припинення синтезу мРНК для зменшення внутрішньоклітинного вмісту непотрібних у даний момент білків економічно і з енергетичної точки зору, оскільки з припиненням транскрипції перестає витрачатися енергія на біосинтез непотрібних макромолекул – мРНК.

Регуляція транскрипції в клітинах здійснюється на рівні індивідуальних генів, їх блоків і навіть цілих хромосом. Можливість управління багатьма генами, як правило, забезпечується наявністю у них спільних регуляторних послідовностей нуклеотидів, з якими взаємодіють однотипні фактори транскрипції. У відповідь на дію специфічних **ефекторів** (низькомолекулярних метаболітів, ксенобіотиків або фізичних факторів (температура, іонізуюче випромінювання тощо) такі фактори набувають здатність з високою точністю зв’язуватись з регуляторними послідовностями генів. Наслідком цього є ослаблення (**репресія**) або посилення (**активація**) транскрипції відповідних генів.

Активність багатьох генів прокаріот регулюється за допомогою білкових факторів, взаємодіючих з регуляторними ділянками **промоторів генів**. При цьому відбуваються як посилення транскрипції генів – **позитивна регуляція (активація)**, так і пригнічення зчитування генетичної інформації РНК-полімеразами – **негативна регуляція (репресія)**. У першому випадку регуляторні фактори називають **активаторами**, а в другому – **репресорами.**

Послідовності нуклеотидів промоторних ділянок генів, з якими взаємодіють молекули репресора, називаються **операторами.** У багатьох випадках репресор зв’язується з оператором тільки в присутності низькомолекулярного **ефектора**, який специфічно взаємодіє з репресором. Такі ефектори отримали назву **корепресорів**. Вони часто потрібні й для функціонування білків-активаторів транскрипції. *Найпростіший механізм репресії полягає у блокуванні зв’язування РНК-полімерази з промотором*. Це відбувається в тому випадку, якщо послідовності нуклеотидів місць посадки РНК-полімерази на промотор і репресора на оператор перекриваються.

*Деякі бактеріальні білки-репресори здатні негативно впливати на етапи ініціації транскрипції вже після зв’язування РНК-полімерази з промотором.* Такі білки-репресори викликають утворення петлі на ділянці ДНК, яка містить промотор. При цьому взаємодія РНК-полімерази з промотором не послаблюється. У такому випадку блокуються наступні за ініціацією транскрипції етапи, які передують утворенню першого фосфодиефірного зв’язку.

Поширеним **механізмом активації** транскрипції за допомогою білків-активаторів *є полегшення її ініціації РНК-полімеразою після контакту між ферментом і білком-активатором*, пов’язаними з регуляторною ділянкою промотора, що супроводжується конформаційними змінами РНК-полімерази.

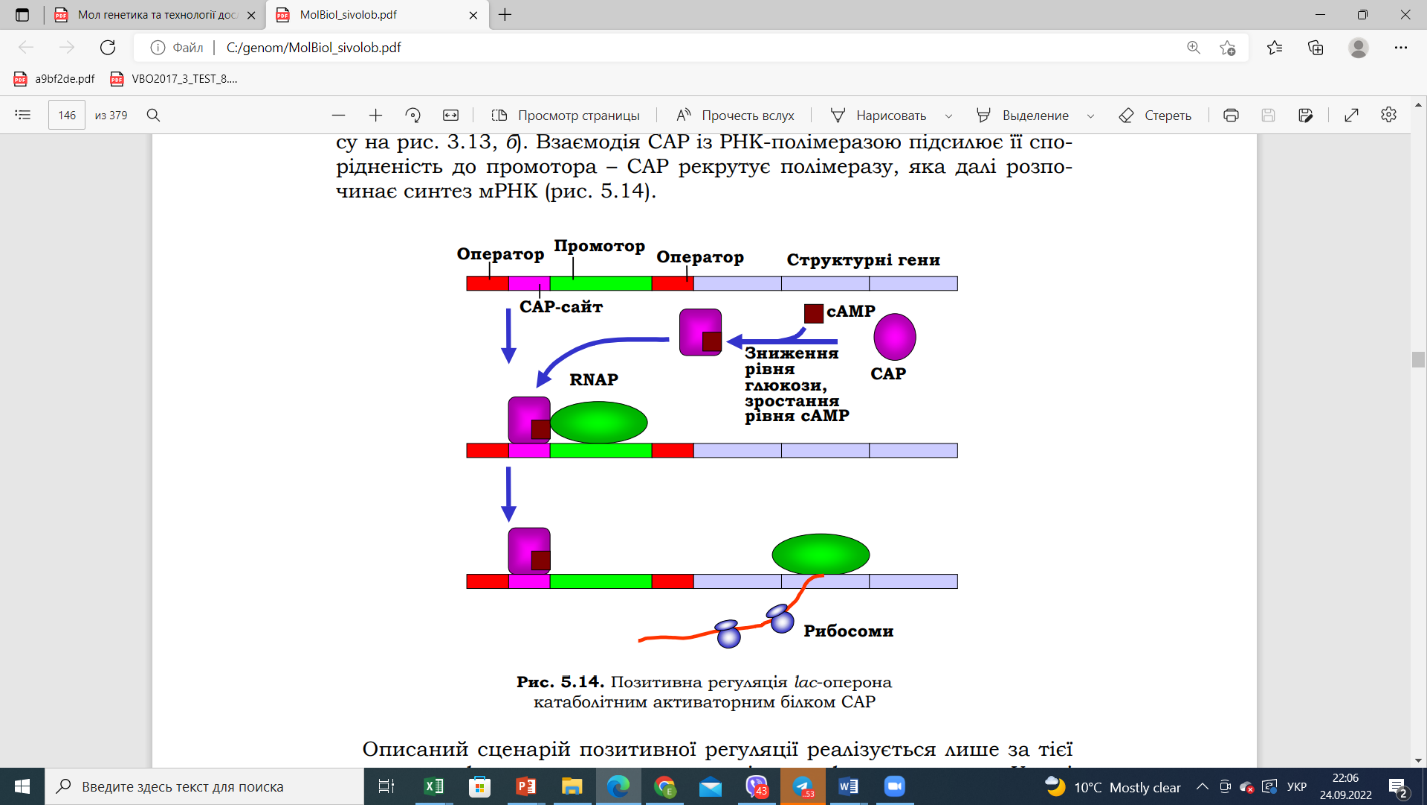
 Також, у бактерій виявлені білки-регулятори, які мають активність як репресора, так і активатора транскрипції. Такими **«амфотерними»** властивостями володіє, зокрема, **білок-активатор катаболічних оперонів** (англ. Catabolite Activator Protein, скорочено – **САР**, або CAMP Receptor Protein, скорочено – **CRP**). Він активує транскрипцію бактеріальних генів, продукти яких беруть участь у розщепленні (катаболізмі) різних органічних сполук (переважно цукрів), які використовуються бактеріальною клітиною в якості джерела вуглецю. Свої властивості активатора CRP-білок набуває лише в комплексі з циклічним **AMP (сAMP**). Внутрішньоклітинна концентрація сAMP зростає у бактерій, які ростуть на бідних поживних середовищах, і знижується в умовах надлишку легко засвоюваних джерел вуглецю, наприклад глюкози. Тому *система CRP-сAMP забезпечує активацію експресії катаболічних оперонів лише на бідних поживних середовищах*.

Рис. Позитивна регуляція Lac-оперона катаболітним активатором САР.

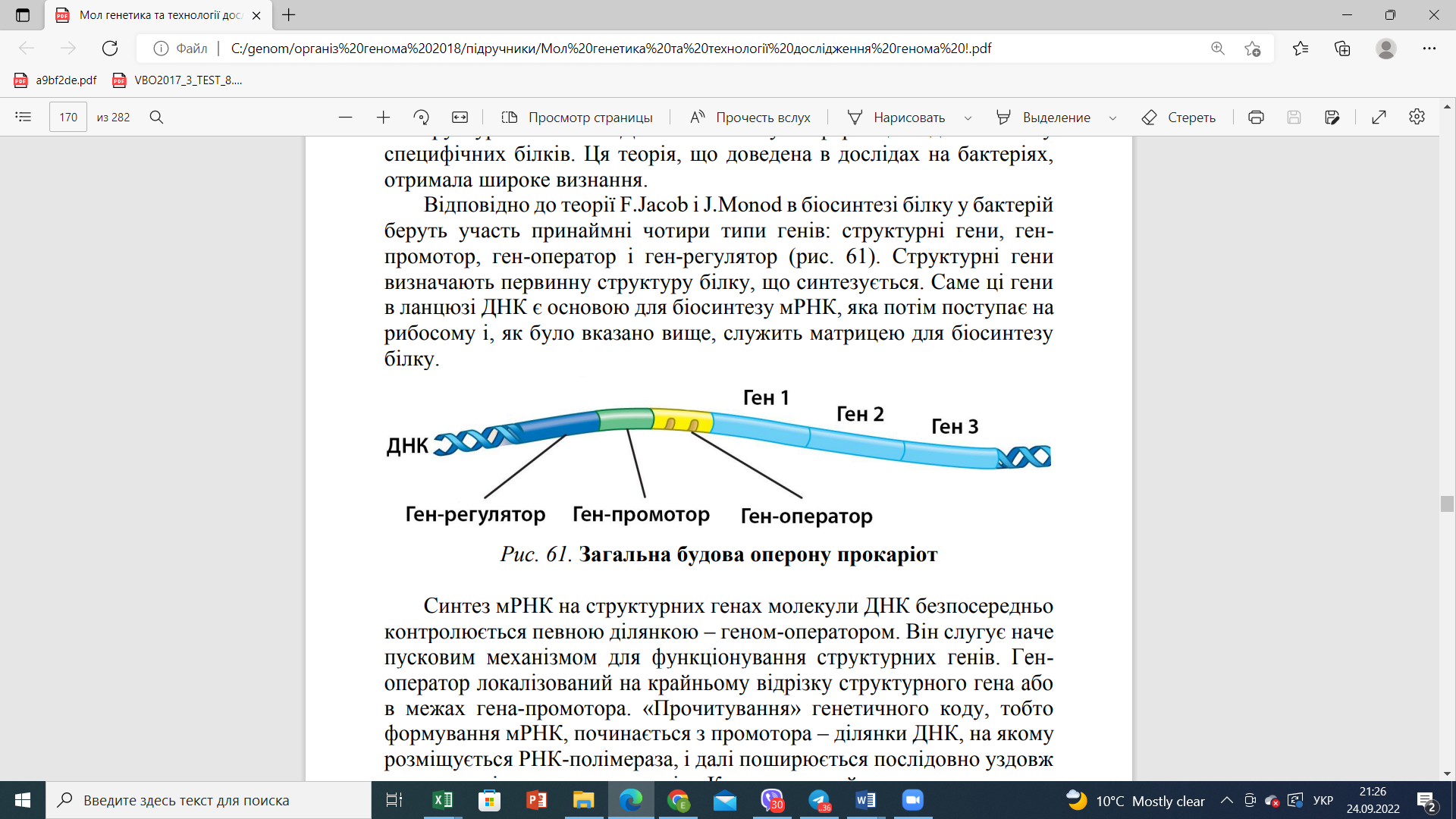
CRP-білок може виступати, також, у ролі репресора транскрипції генів, зокрема галактозного оперону *E.coli*. Якщо всі гени катаболічних оперонов активуються CRP-білком у присутності сAMP, то негативна регуляція їх транскрипції відбувається індивідуально. Добре відомими прикладами такого роду регуляції є механізм регуляція транскрипції Lac-оперона *E.coli* під дією Lac-репресора, а також галактозного і арабінозного оперонів з їх специфічними білками-репресорами.

Деякі регуляторні елементи бактерій, які беруть участь в активації транскрипції можуть розташовуватись на великій відстані (кількох сотень нуклеотидів) від промоторів, на які вони впливають. У цьому випадку контакт активатора з РНК-полімеразою забезпечується завдяки формуванню петлі з ділянки ДНК, розташованої між даними регуляторними елементами, що призводить до просторового зближення двох білків.

***Модель регуляції експресії Lac-оперона E.coli за Жакобом- Моно.***

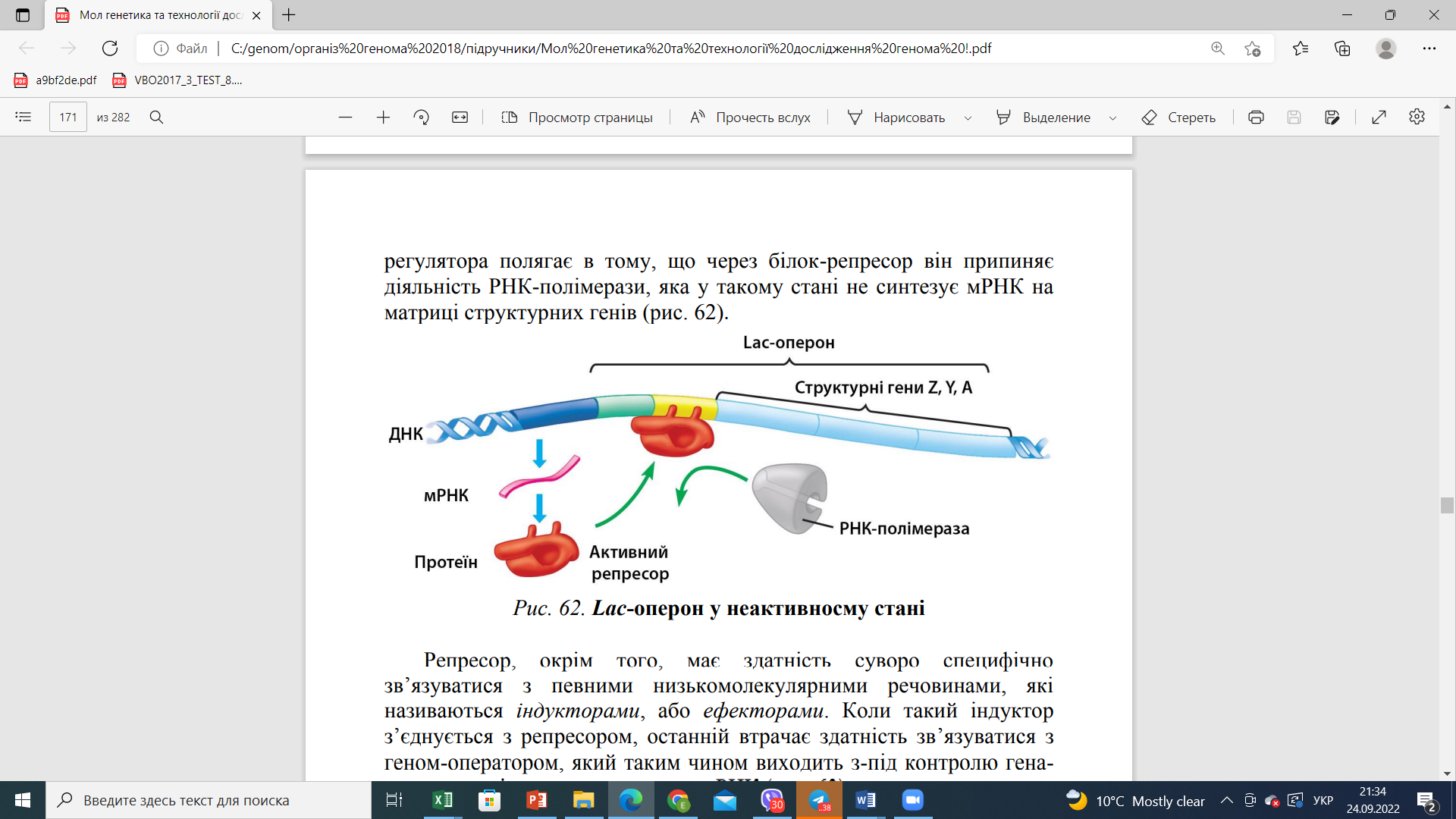
Загальну теорію регуляції синтезу білку розробили François Jacob (1920-2013) і Jacques Lucien Monod (1910-1976). Ця теорія, що доведена в дослідах на бактеріях, отримала широке визнання.

Відповідно до теорії F.Jacob і J.Monod в біосинтезі білку у бактерій беруть участь принаймні чотири типи генів: **структурні гени, ген-промотор, ген-оператор і ген-регулятор.** Структурні гени визначають первинну структуру білку, що синтезується. Саме ці гени в ланцюзі ДНК є основою для біосинтезу мРНК.



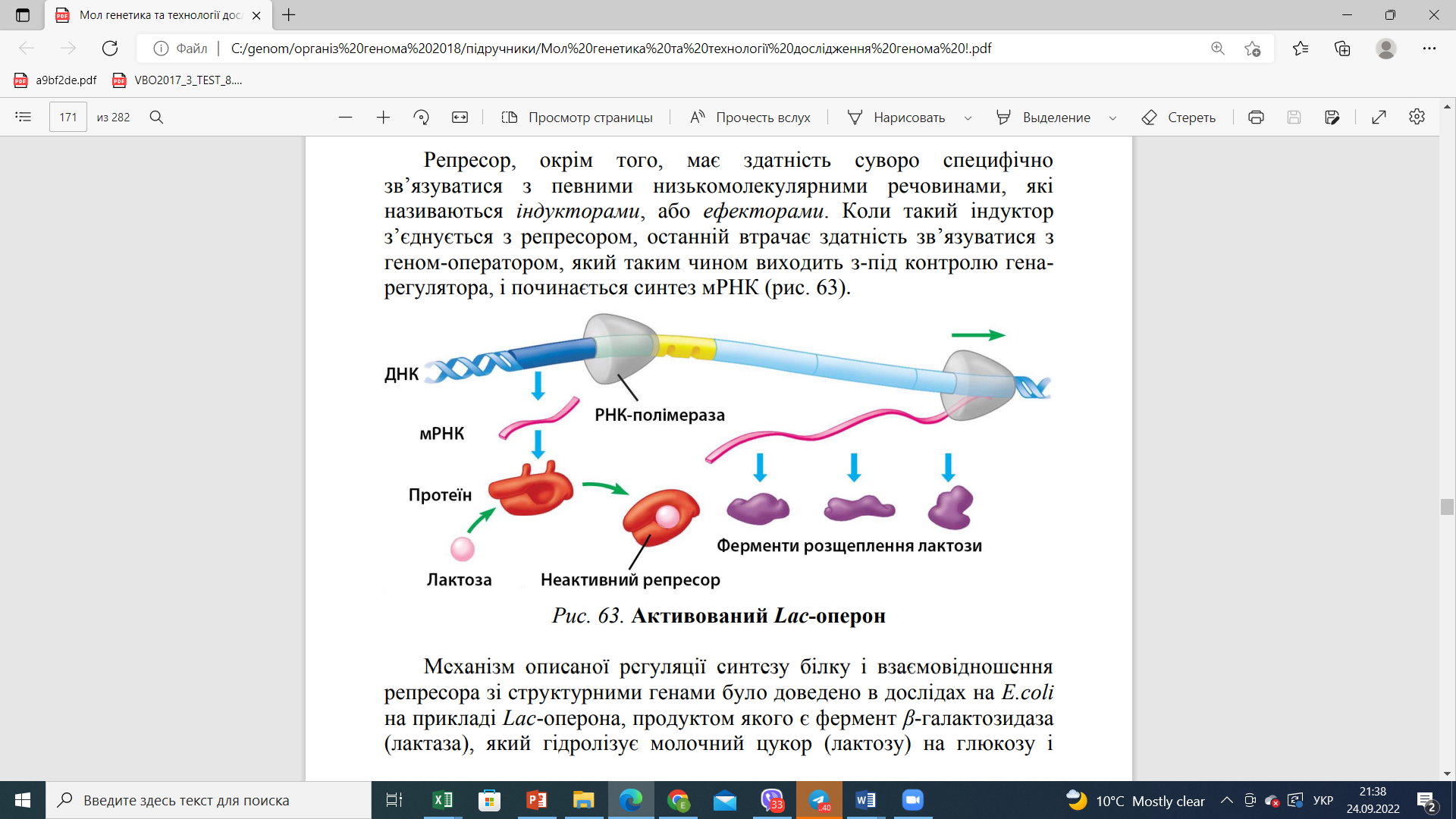
Синтез мРНК на структурних генах молекули ДНК безпосередньо контролюється певною ділянкою – геном-оператором. Він слугує наче пусковим механізмом для функціонування структурних генів. Ген-оператор локалізований на крайньому відрізку структурного гена або в межах гена-промотора. «Прочитування» генетичного коду, тобто формування мРНК, починається з промотора – ділянки ДНК, на якому розміщується РНК-полімераза, і далі поширюється послідовно уздовж оператора і структурних генів. **Координований одним оператором поодинокий ген або група структурних генів утворює оперон.**

У свою чергу діяльність оперону перебуває під контролюючим впливом іншої ділянки ланцюга ДНК – гена-регулятора. Оскільки структурні гени і ген-регулятор знаходяться в різних ділянках ланцюга ДНК, зв’язок між ними здійснюється за допомогою речовини-посередника, яким виявився білок, що названий **репресором.** Утворення репресора відбувається в рибосомах на матриці специфічної мРНК, синтезованої на гені-регуляторі. *Репресор має спорідненість з геном-оператором* і, відповідно, здатний з’єднуватись з ним. Утворення такого комплексу призводить до блокування синтезу мРНК і, отже, синтезу білку. Тобто функція гена- регулятора полягає в тому, що через білок-репресор він припиняє діяльність РНК-полімерази, яка у такому стані не синтезує мРНК на матриці структурних генів.



Lac-оперон у неактивному стані

Репресор, окрім того, має здатність суворо специфічно зв’язуватися з певними низькомолекулярними речовинами, які називаються **індукторами,** або **ефекторами.** Коли такий індуктор з’єднується з репресором, останній втрачає здатність зв’язуватися з геном-оператором, який таким чином виходить з-під контролю гена-регулятора, і починається синтез мРНК.

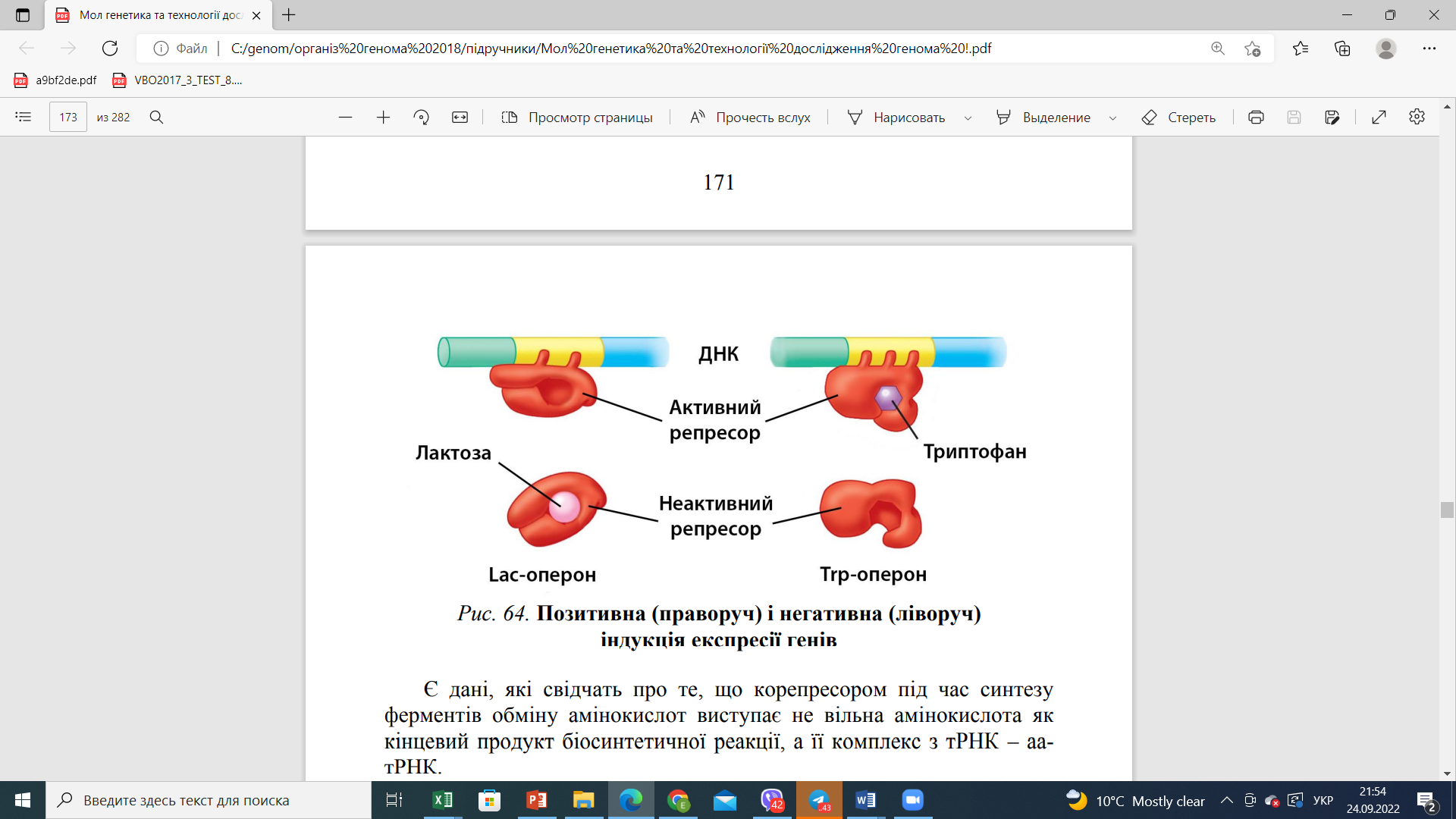


Активований Lac-оперон

Механізм описаної регуляції синтезу білку і взаємовідношення репресора зі структурними генами було доведено в дослідах на *Е.coli* на прикладі Lac-оперона, продуктом якого є фермент β-галактозидаза (лактаза), який гідролізує молочний цукор (лактозу) на глюкозу і галактозу. Дикий штам *Е.coli*, який зазвичай росте на глюкозі, не може розмножуватися, якщо замість глюкози в поживне середовище додати лактозу (нове джерело енергії і вуглецю) до тих пір, поки не будуть синтезовані відповідні ферменти. При потраплянні до клітини лактози (**індуктора**), її молекули зв’язуються з білком-репресором і блокують контакт між репресором і геном-оператором. При цьому ген-оператор і структурні гени починають знову функціонувати і синтезувати необхідну мРНК, яка транслюється на рибосомах з утворенням трьох ферментів, залучених до розщеплення лактози. Одночасно, ген-регулятор продовжує виробляти репресор, але він блокується молекулами лактози, тому синтез ферментів триває. Як тільки молекули лактози будуть повністю розщеплені, репресор звільняється і, потрапивши на ДНК, зв’язує ген-оператор і блокує синтез мРНК, а отже, і синтез ферментів, які руйнують лактозу.

Таким чином, біосинтез мРНК, який контролює синтез білку на рибосомах, залежить від функціонального стану репресора. Якщо репресор знаходиться в активному стані, не пов’язаний з індуктором, то він, розміщується на гені-операторі і блокує синтез мРНК. При потраплянні метаболіта-індуктора до клітини його молекули зв’язують репресор, перетворюючи його на неактивну форму. Структурні гени виходять з-під блокуючого контролю і починають синтезувати потрібну мРНК. *Такий механізм форми контролю називається* ***позитивною індукцією****.*

В інших випадках концентрація ряду ферментів у клітинах різко знижується при збільшенні концентрації кінцевих продуктів, які утворюються в ланцюзі послідовних ферментативних реакцій. Такий варіант негативної регуляції, що називається **негативною індукцією**, часто спостерігається в реакціях біосинтезу. У цих випадках молекули репресора, які також утворюються в рибосомах за «командою» гена-регулятора є неактивними і самі по собі не мають здатності пригнічувати діяльність гена-оператора, а отже і усього оперону. У даному випадку репресори набувають такої здатності після утворення комплексу з кінцевим продуктом біосинтетичного процесу. *Кінцевий продукт виступає, таким чином, як корепресор.*



Позитивна і негативна індукція експресії генів

Є дані, які свідчать про те, що корепресором під час синтезу ферментів обміну амінокислот виступає не вільна амінокислота як кінцевий продукт біосинтетичної реакції, а її комплекс з тРНК – аатРНК.

**Приклад** негативної індукції - **Триптофановий оперон** (trp-оперон) *E. coli.* Оперон містить 5 структурних генів, що відповідають за синтез амінокислоти Trp, перед ними знаходяться промотор, оператор. trp-Оперон перебуває також під контролем trp-репресора. Алостеричним регулятором репресора є сам Trp: у комплексі з ним репресор набуває конформаційної форми, що має високу спорідненість до оператора. При зниженні концентрації Trp репресор дисоціює й ефективність ініціації транскрипції підвищується в ~70 разів.