

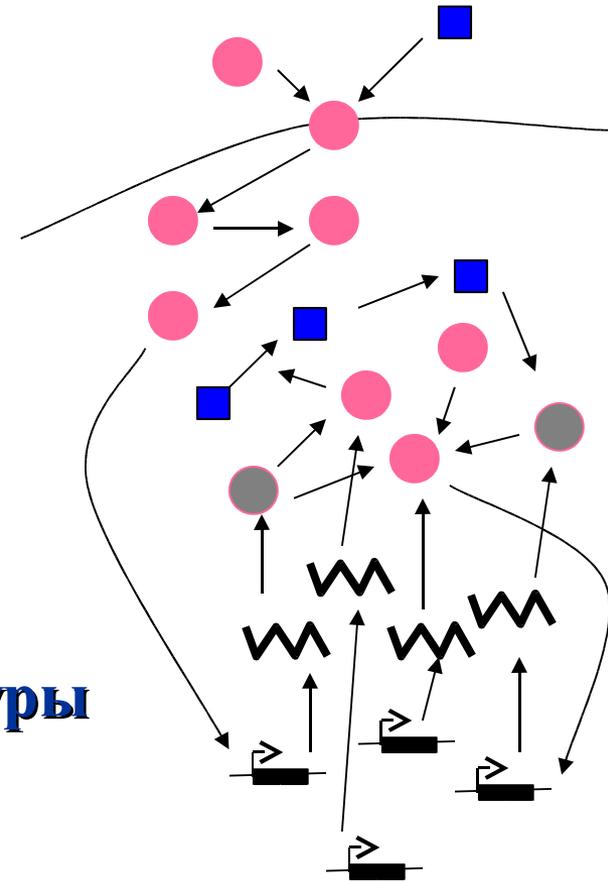
Генные сети и транскрипционные механизмы регуляции координированной экспрессии генов

(читала с.н.с. лаб. теоретической генетики, к.б.н.
Игнатьева Е.В.)

Генная сеть - группа координировано функционирующих генов, обеспечивающих формирование определенного фенотипического признака организма (молекулярного, биохимического, физиологического, морфологического, поведенческого и т.д.)

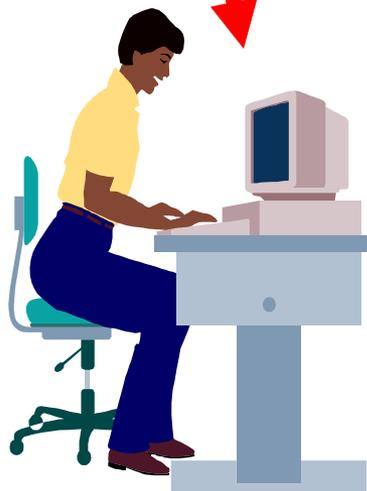
Обязательные компоненты генной сети:

гены, кодируемые ими РНК и белки, метаболиты, пути передачи сигналов, метаболические пути, регуляторные контуры с положительными и отрицательными обратными связями.

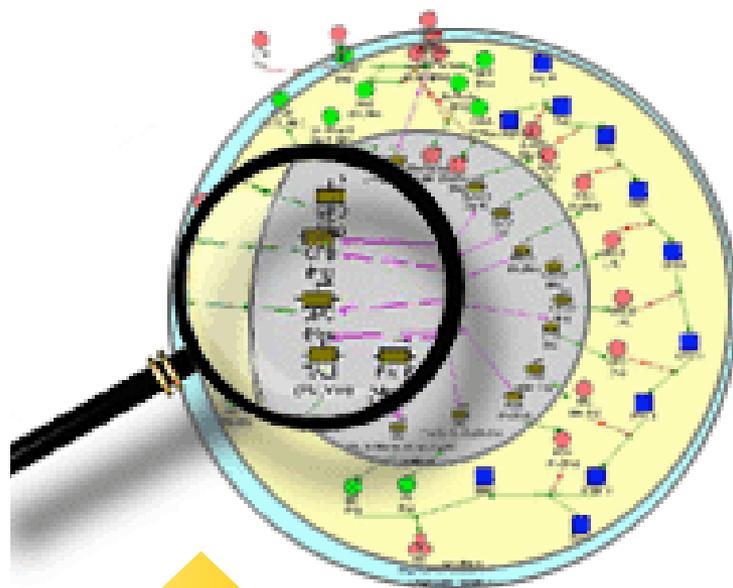
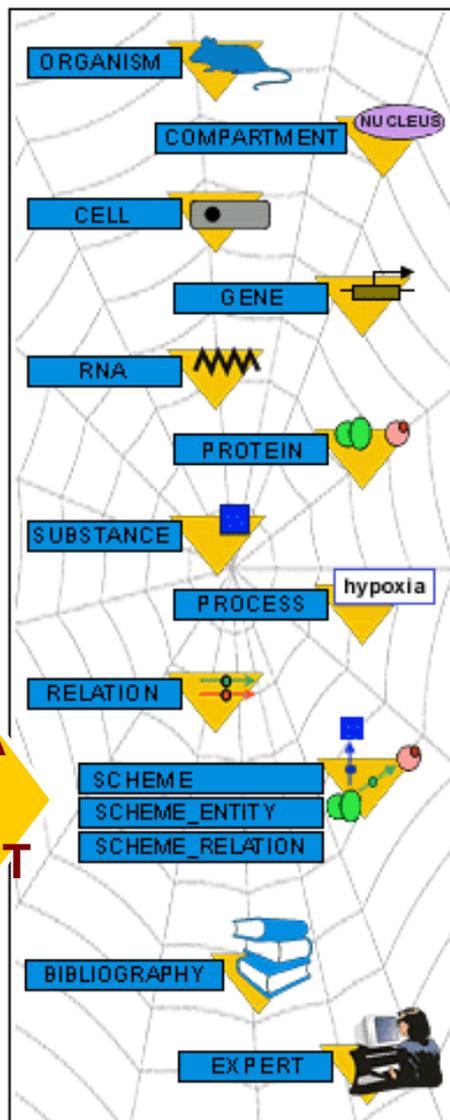


GeneNet - компьютерная технология формализованного описания, реконструкции и визуализации генных сетей

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬ-
НЫЕ СТАТЬИ



СИСТЕМА
ВВОДА
В GENE NET



GeneNet
вьюер

КОМПОНЕНТЫ ГЕННОЙ СЕТИ

ЭЛЕМЕНТАРНЫЕ СТРУКТУРЫ

ЭЛЕМЕНТАРНЫЕ СОБЫТИЯ

гены

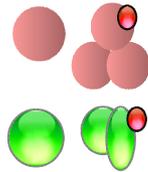
РНК

белки

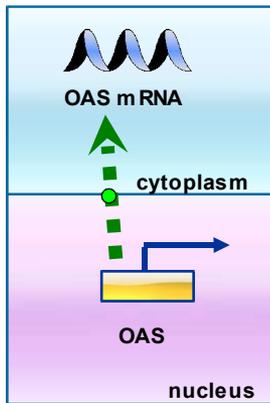
метаболиты

реакции

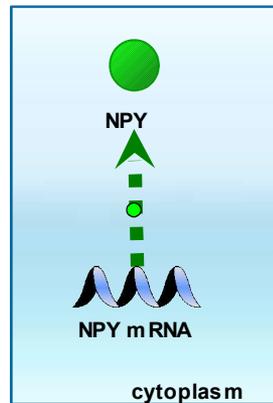
регуляторные
события



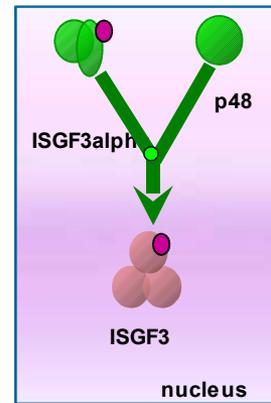
База данных GENENET: примеры графического представления элементарных структур и событий



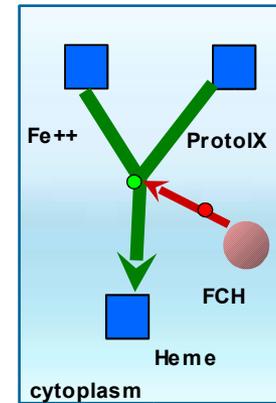
Транскрипция



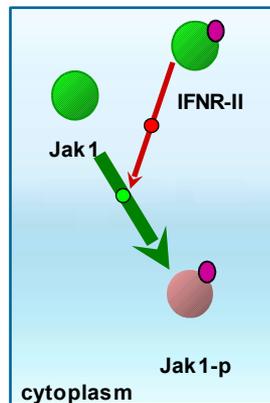
Трансляция



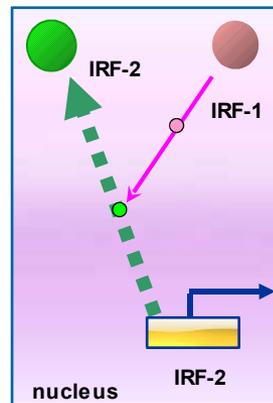
мультимеризация



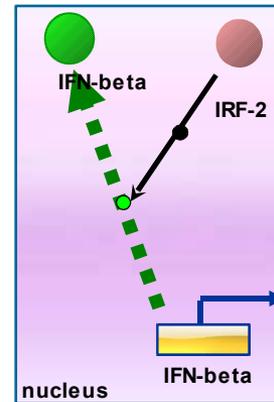
Ферментативная реакция



Фосфорилирование



Активация экспрессии

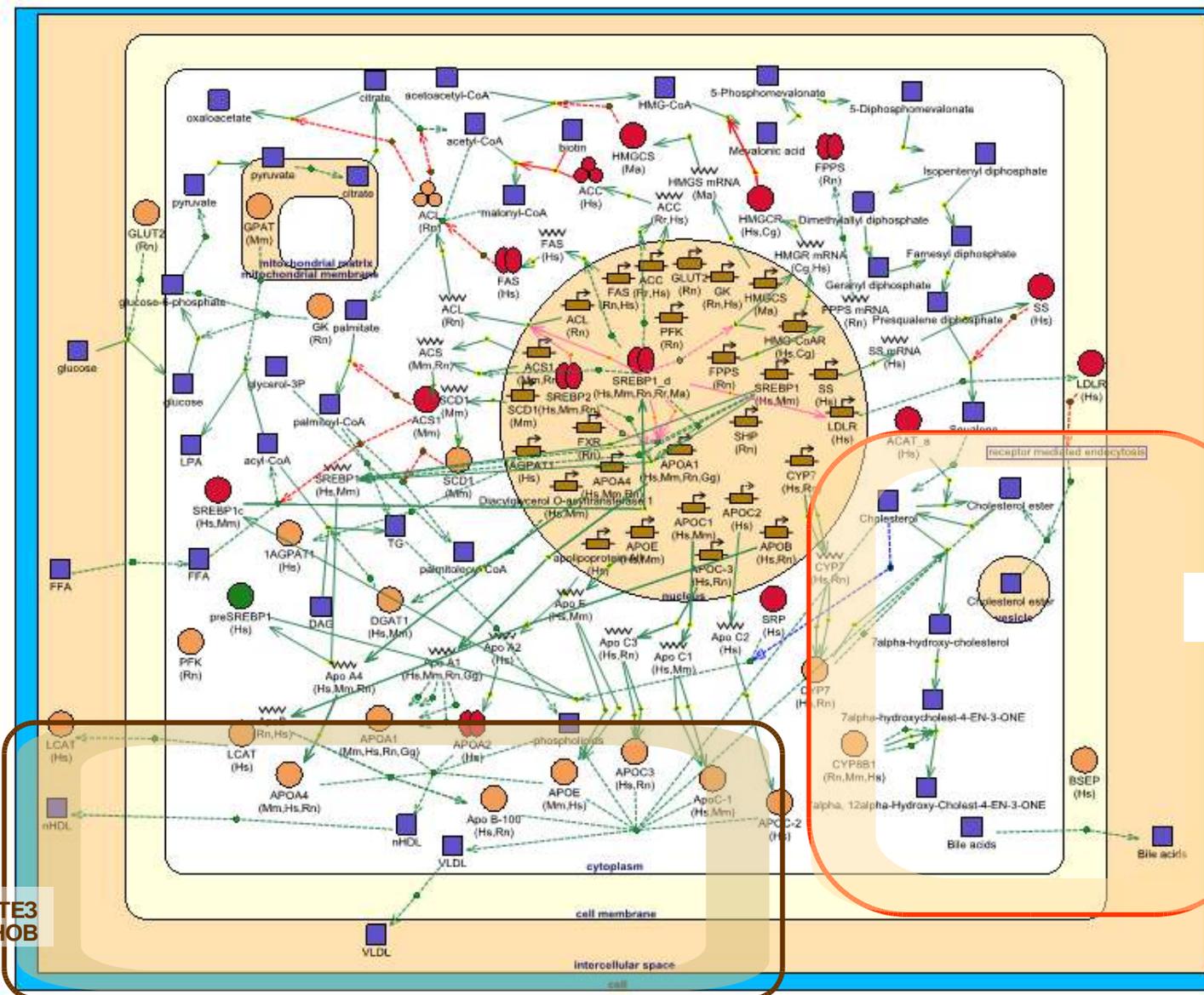


Подавление экспрессии

Обозначения:



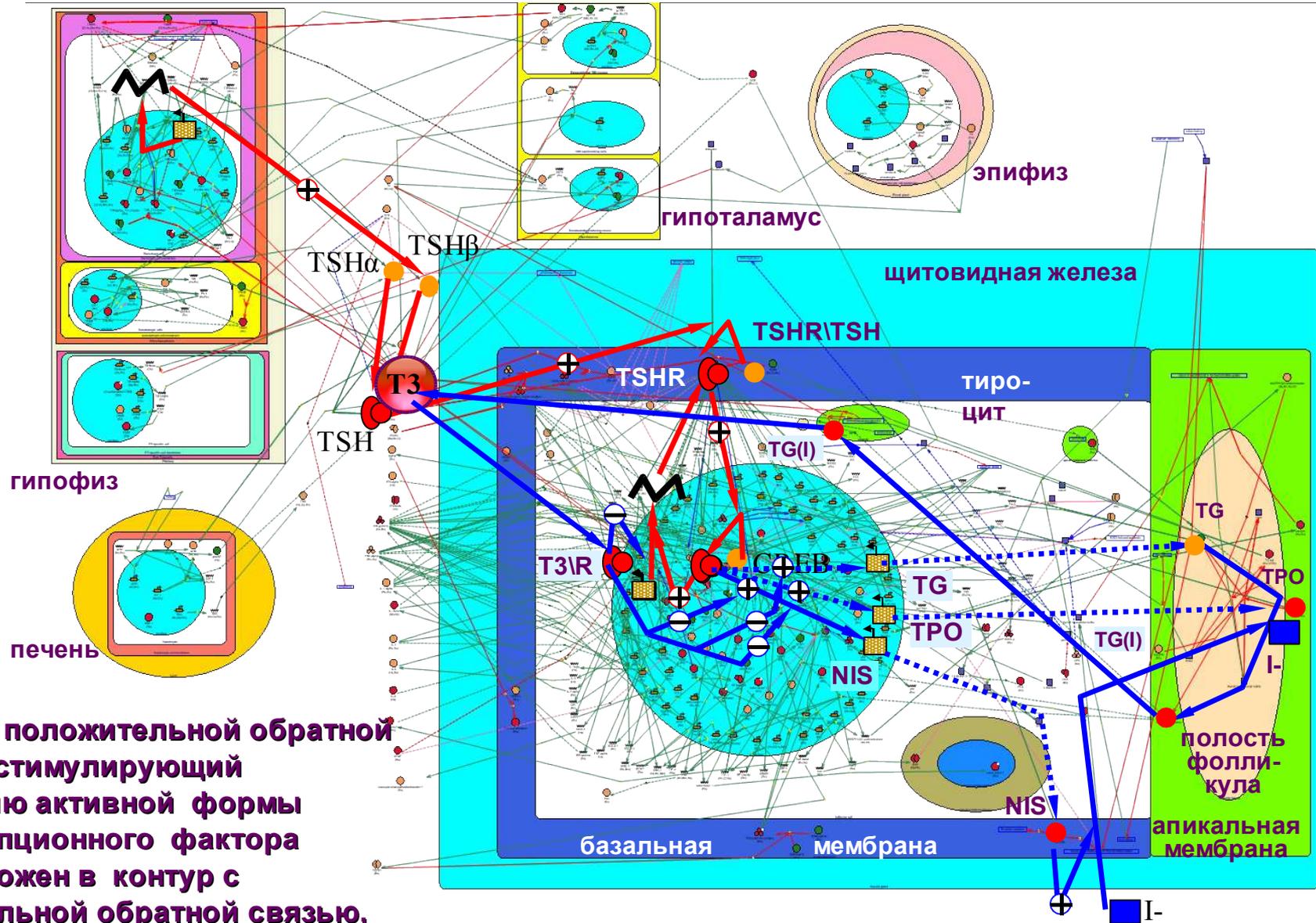
База данных GeneNet: компьютерная реконструкция геной сети печеночной клетки



БИОСИНТЕЗ
ЛИПОПРОТЕИНОВ

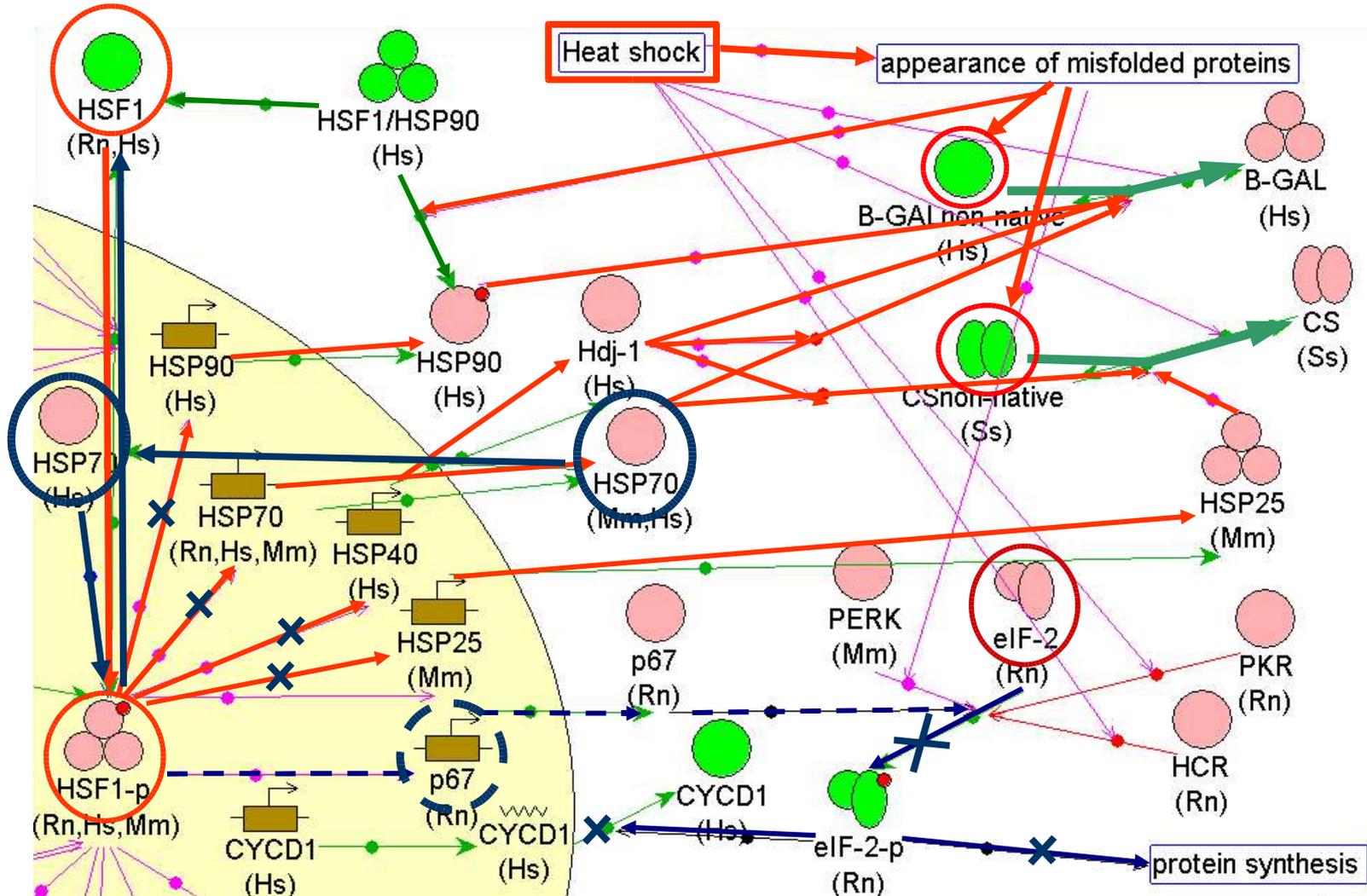
ПРОДУКЦИЯ
ЖЕЛЧНЫХ
КИСЛОТ

БАЗА ДАННЫХ GENENET: регуляция уровня тиреоидных гормонов (Т3, Т4)



Контур с положительной обратной связью, стимулирующий продукцию активной формы транскрипционного фактора CREB, вложен в контур с отрицательной обратной связью, гомеостатирующий продукцию тиреоидных гормонов на уровне тироцита

Генная сеть ответа на тепловой шок

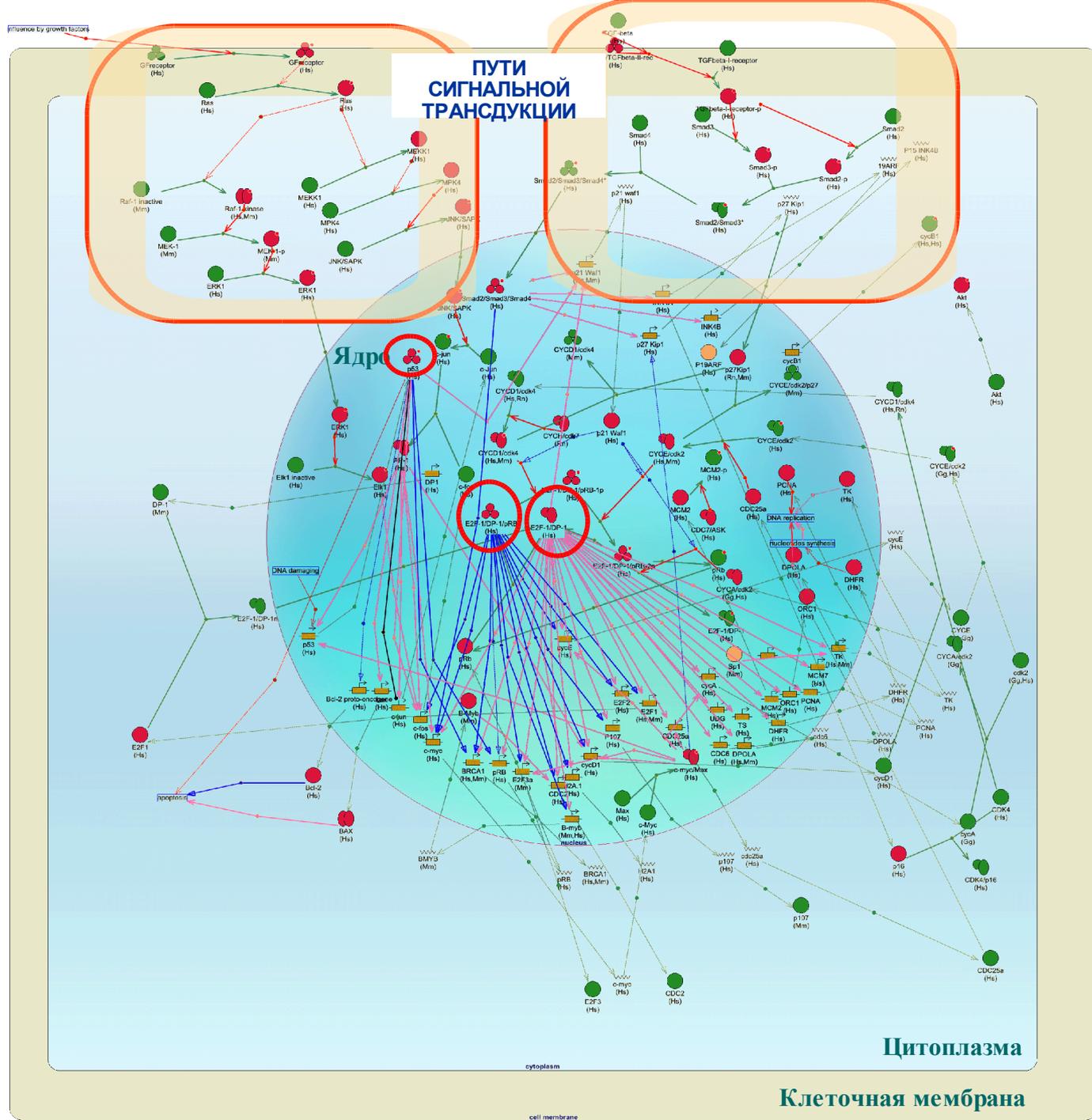


Степаненко И.Л., ИЦиГ СО РАН

Influence by growth factors

ПУТИ СИГНАЛЬНОЙ ТРАНСДУКЦИИ

База данных GeneNet: компьютерная реконструкция геной сети клеточного цикла млекопитающих (человек, мышь, крыса) – Go/G1-S переход



Цитоплазма

Клеточная мембрана

cytoplasm

cell membrane

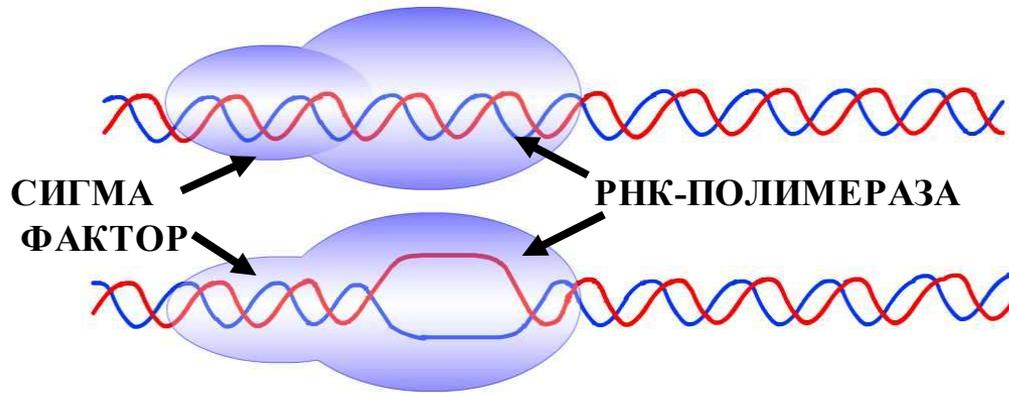
Что такое координированная экспрессия генов ?

Нужно, чтобы каждый ген экспрессировался в нужном количестве :

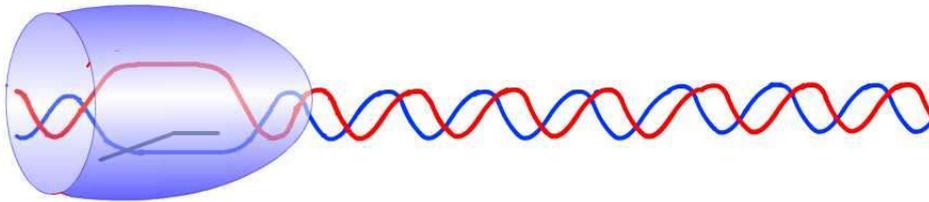
- в нужном месте (тканеспецифичность)
- в нужное время (индуцибельность, зависимость от этапа развития, стадии клеточного цикла или дифференцировки)

Транскрипционные механизмы регуляции координированной экспрессии генов у прокариот

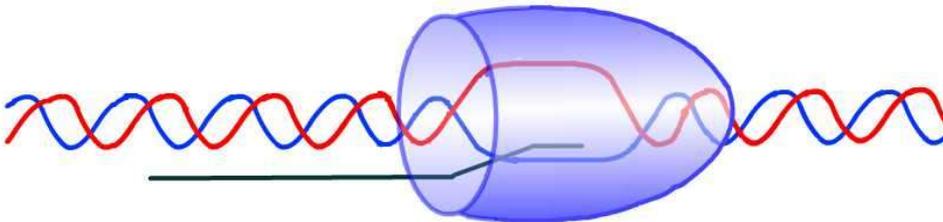
ПРОКАРИОТЫ - ЧЕТЫРЕ ЭТАПА ТРАНСКРИПЦИИ:



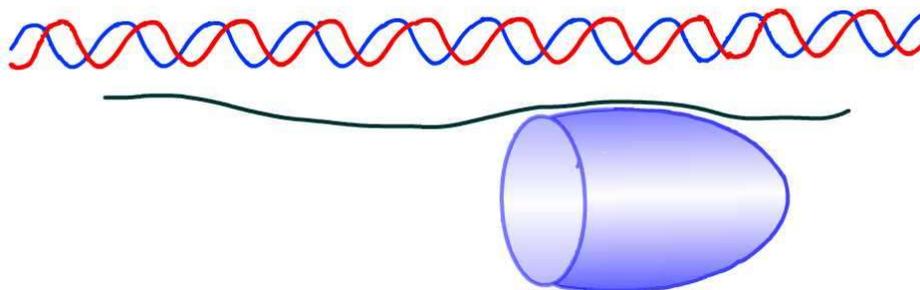
РАСПОЗНАВАНИЕ МАТРИЦЫ:
при участии сигма фактора (у *E.coli*) РНК полимераза связывается с ДНК и расплетает ДНК в точке инициации транскрипции



ИНИЦИАЦИЯ:
сигма фактор отсоединился и синтезирована цепь РНК (2-9 пар оснований)



ЭЛОНГАЦИЯ:
движение РНК полимеразы вдоль ДНК, расплетание ДНК, синтез РНК, заплетание ДНК

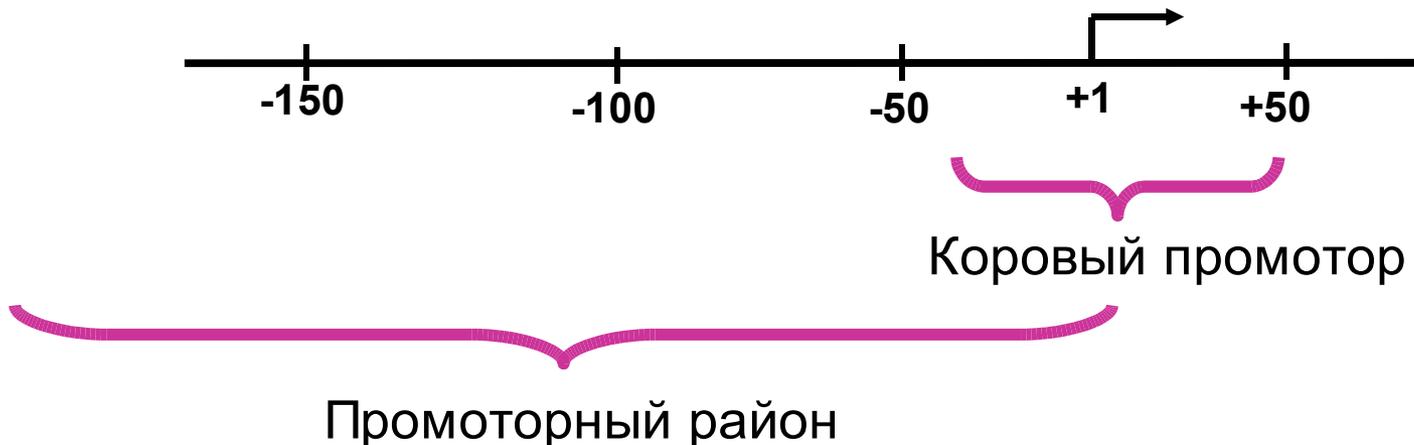


ТЕРМИНАЦИЯ: окончание транскрипции, распад комплекса ДНК-РНК-полимераза. Происходит после распознавания терминатора

ПРОМОТОР – участок, прилегающий к старту транскрипции. Содержит регуляторные элементы, которые опознаются с белками, обеспечивающими инициацию транскрипции

Коровый промотор – участок приблизительно $-40 +50$

Промоторный район – 5' фланкирующий район вплоть до старта транскрипции

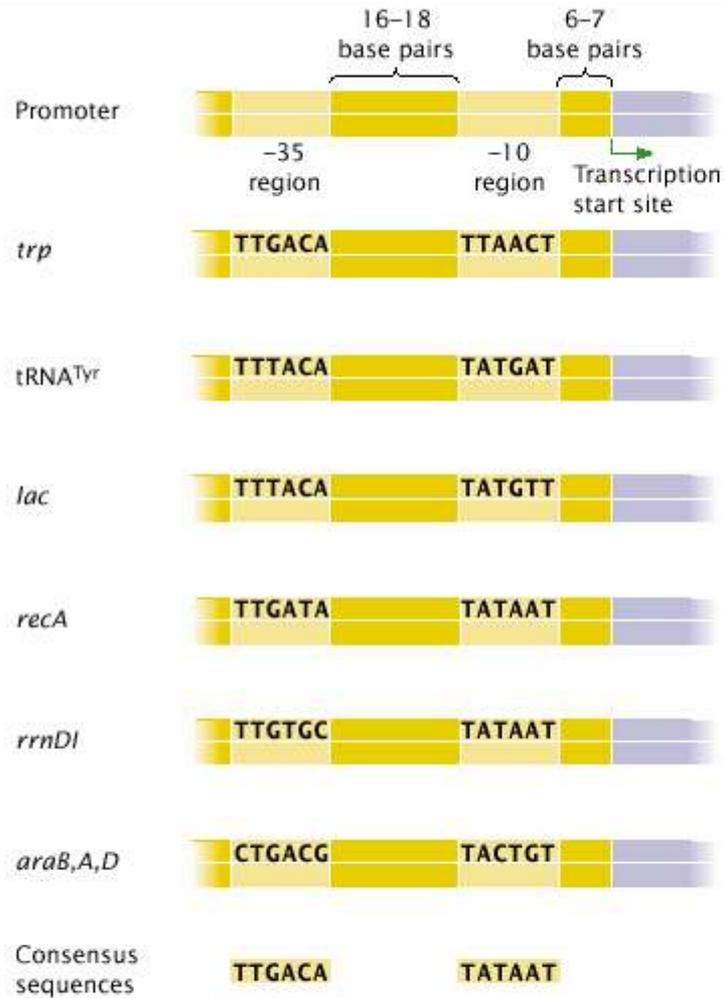


Анализ последовательностей более 100 промоторов, У *E.coli* выявил сходное строение:

- 1) в районе старта транскрипции – пурины, часто «CAT»
- 2) в позиции «-10» гексамер TATAAT (последовательность «-10»)
- 3) в позиции «-35» гексамер TTGACA (последовательность «-35»)
- 4) расстояние между последовательностями «-35» и «-10» ~16-18 нуклеотидов



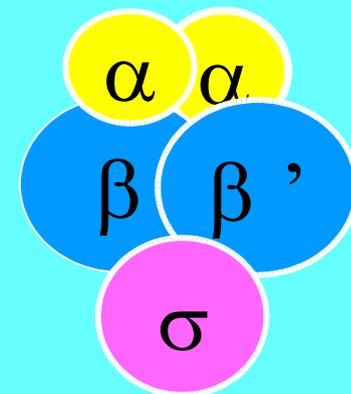
Изучение
функции
участка
с помощью
мутационного
анализа



13.12 In most prokaryotic promoters, the actual sequence is not TATAAT. The sequences shown are

СУБЪЕДИНИЧНЫЙ СОСТАВ КОМПЛЕКСА СИГМА ФАКТОР – РНК ПОЛИМЕРАЗА (E.coli)

| субъединица | Мол. масса | Количество | Локализация | Функция |
|-------------|------------|------------|----------------|-------------------------|
| альфа | 40.000 | 2 | РНК полимераза | Сборка фермента |
| бета | 155.000 | 1 | РНК полимераза | Связывание нуклеотидов |
| бета' | 160.000 | 1 | РНК полимераза | Связывание с матрицей |
| сигма | 32-92.000 | 1 | сигма фактор | Связывание с промотором |

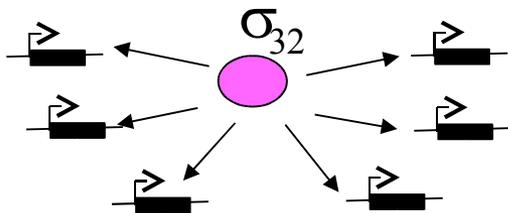


E.coli имеет несколько сигма факторов , специфичных для различных ситуаций, которые распознают промоторы разных групп генов

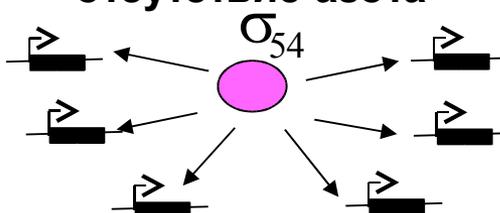
| ситуация | Мол. Масса сигма фактора | «-35» последовательность | спейсер | «-10» последовательность |
|------------------|--------------------------|--------------------------|------------|--------------------------|
| общая | 70.000 | TTGACA | 16-18 п.о. | TATAAT |
| тепловой шок | 32.000 | CCCTTGAA | 13-15 п.о. | CCCGATNT |
| отсутствие азота | 54.000 | CTGGNA | 6 п.о. | TTGCA |
| хемотаксис | 28.000 | СТААА | 15 п.о. | GCCGATAA |



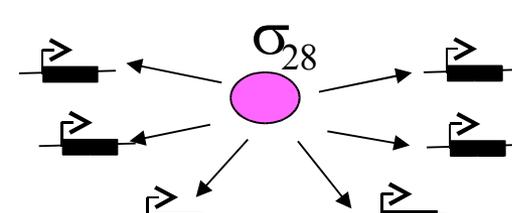
Ответ на тепловой шок



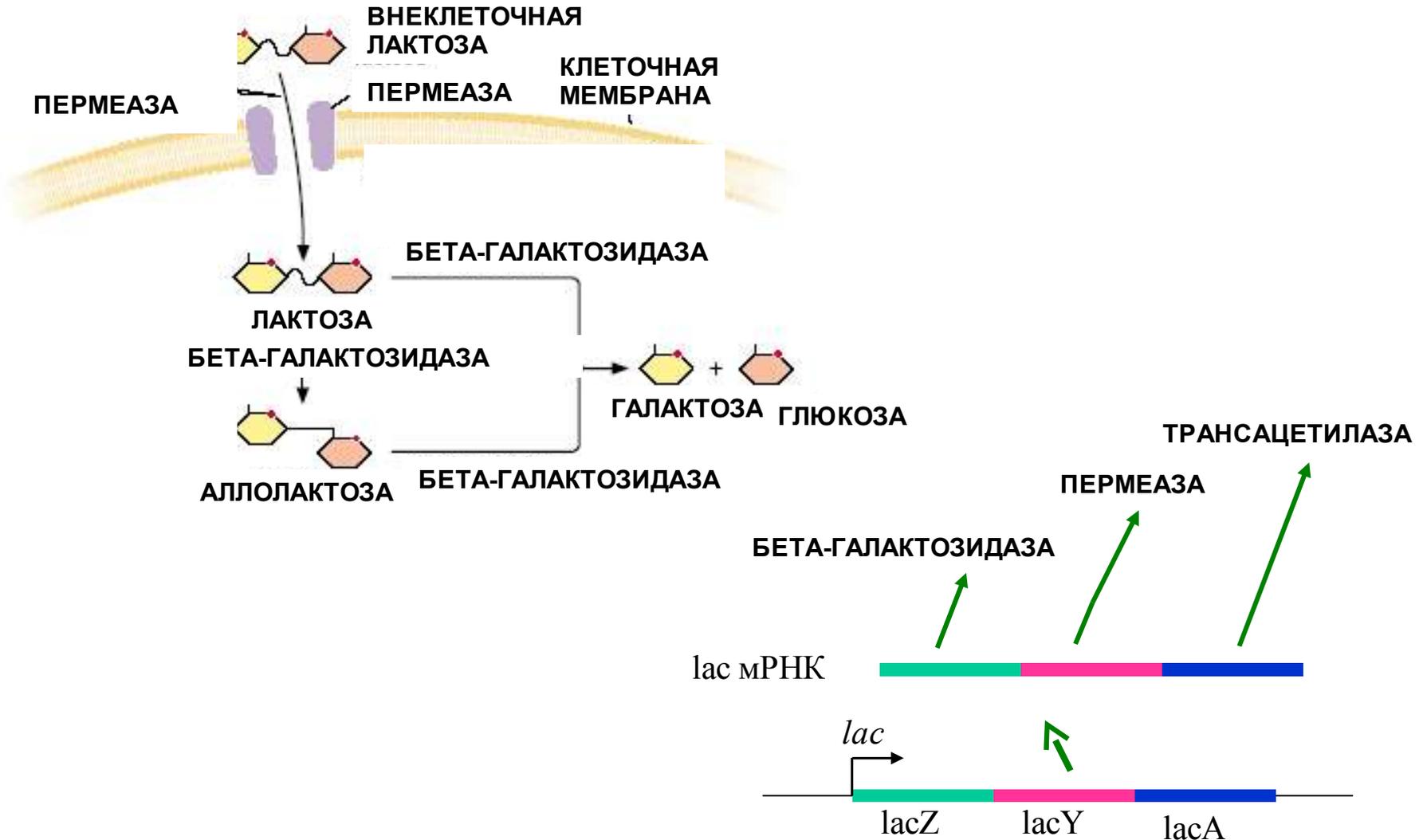
Реакция на отсутствие азота



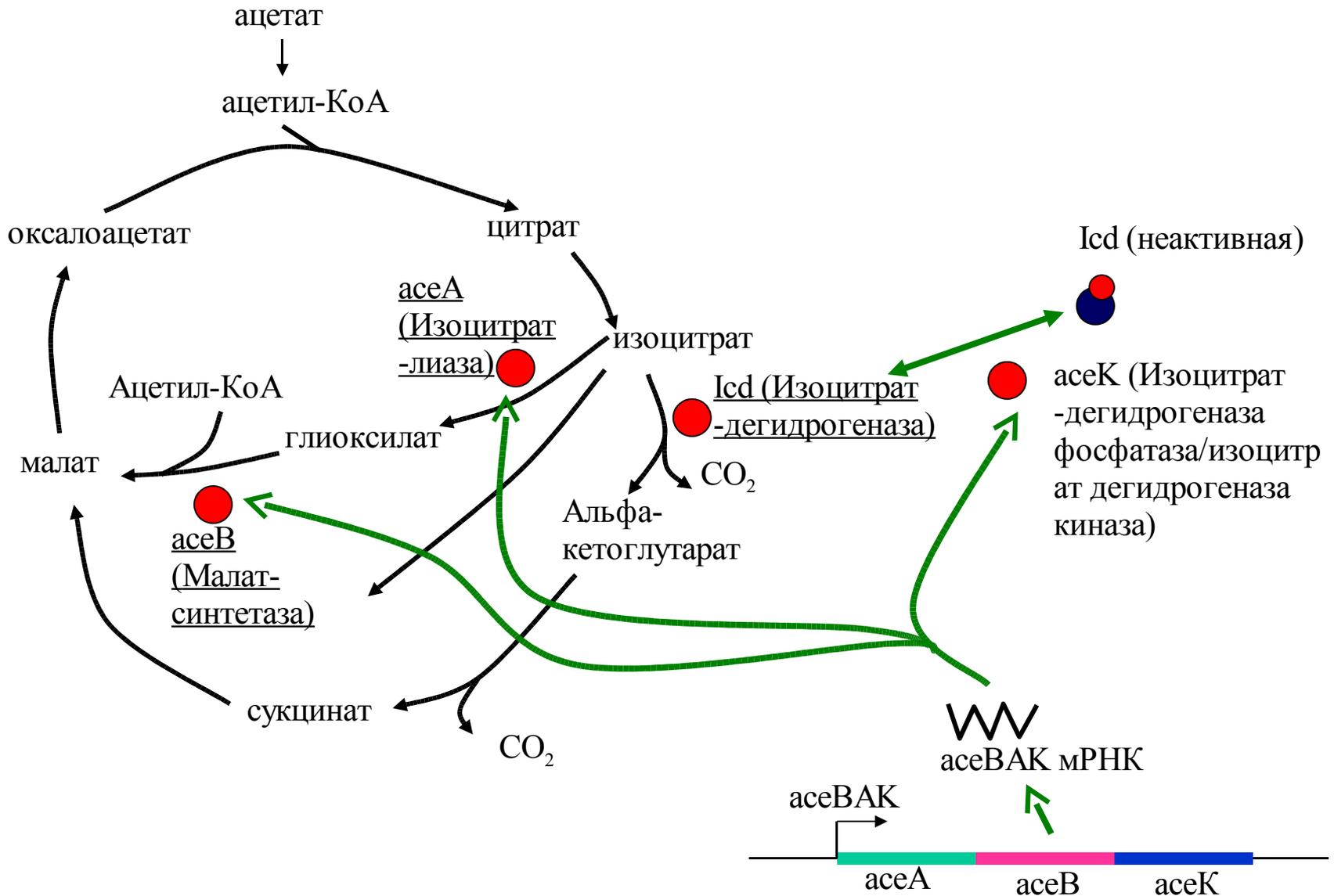
Хемотаксис



ПОСТУПЛЕНИЕ И ДЕГРАДАЦИЯ ЛАКТОЗЫ В КЛЕТКЕ контролируется лактозным опероном



Гены оперона aceBAK контролируют метаболизм изоцитрата у E.coli

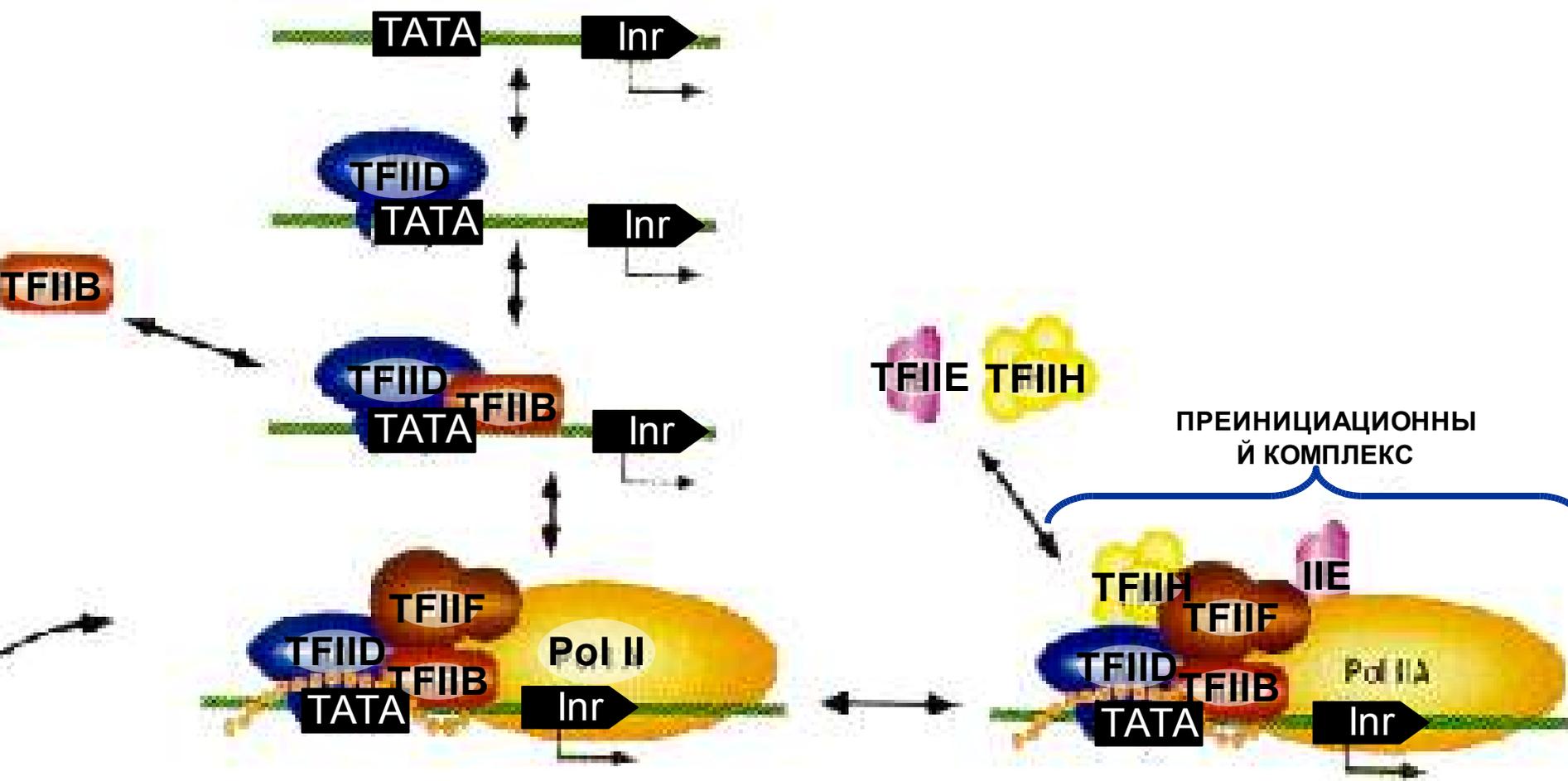


У прокариот координированная экспрессия генов обеспечивается на транскрипционном уровне за счет наличия

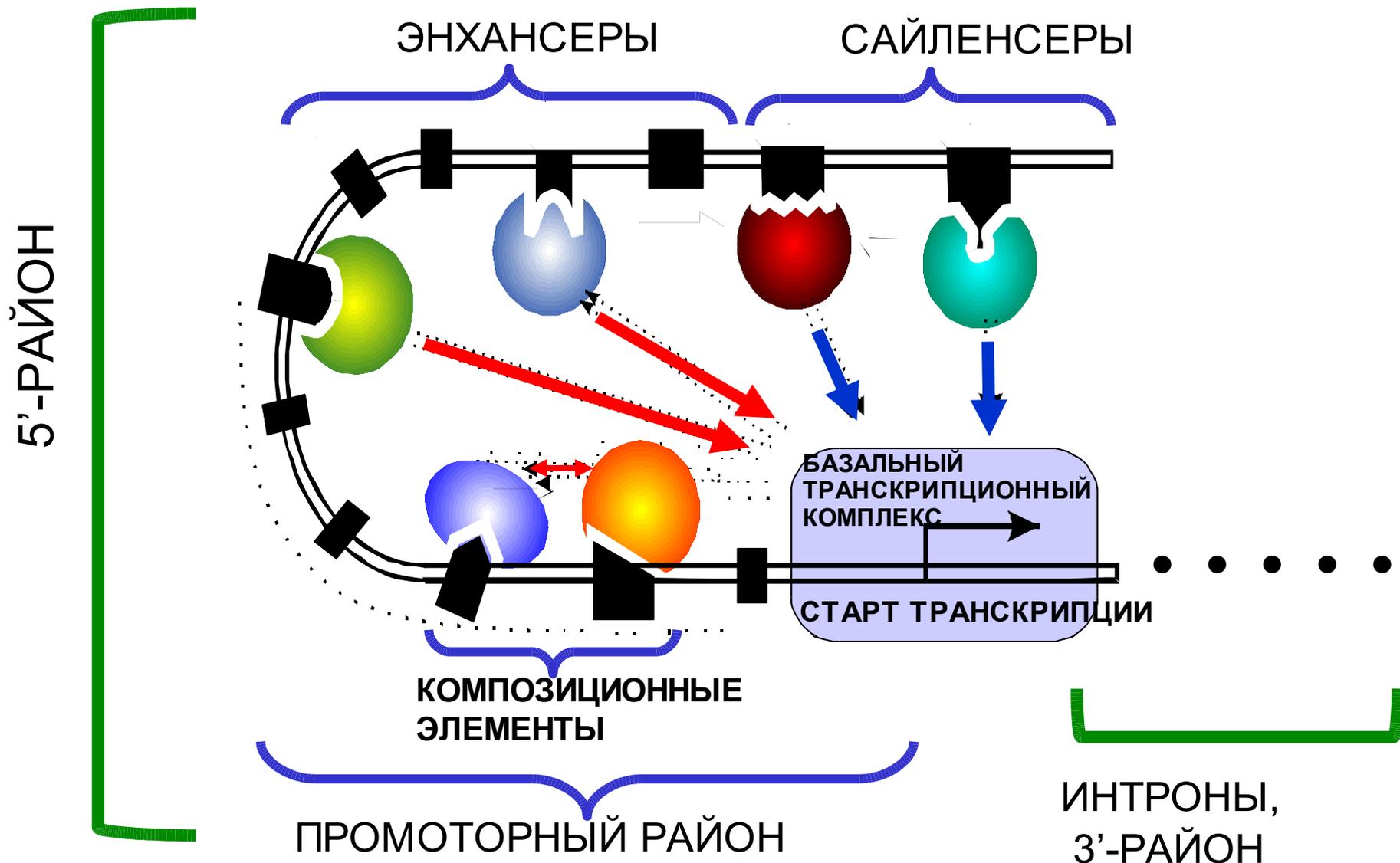
- оперонов
- нескольких типов сигма факторов

Транскрипционные механизмы регуляции координированной экспрессии генов у эукариот

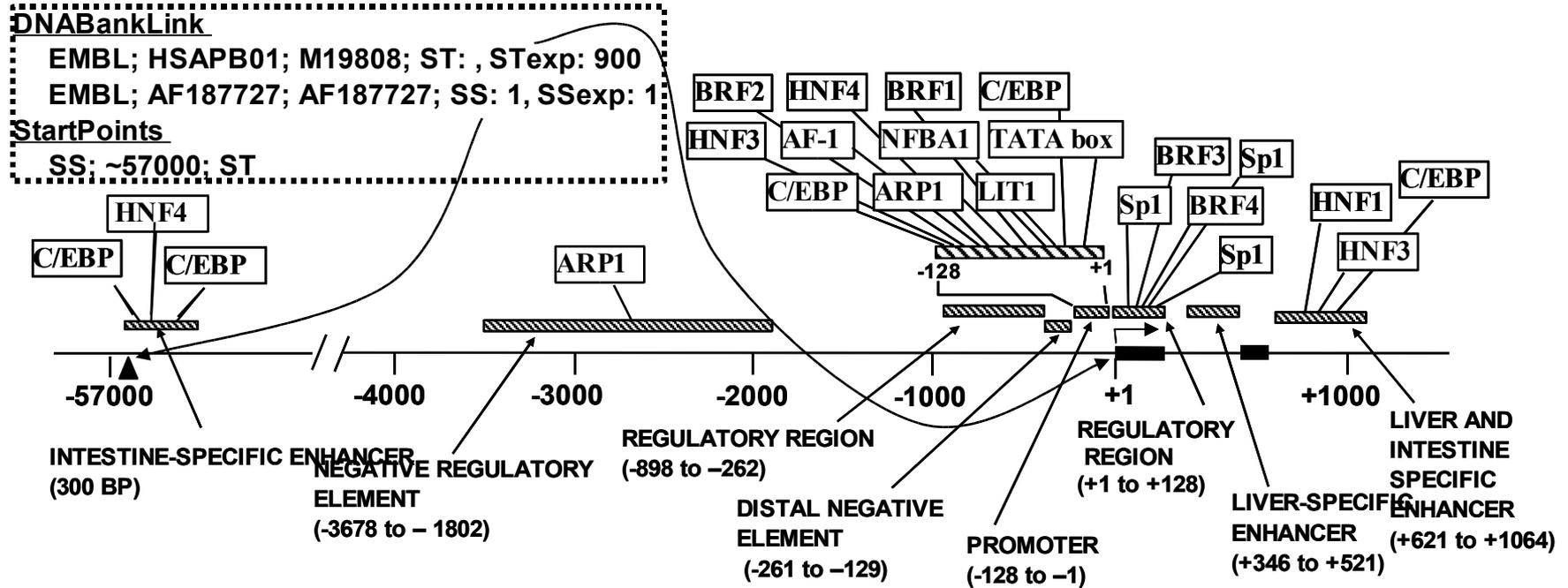
Схема пошаговой сборки преинициационного комплекса в районе старта транскрипции гена, транскрибируемого РНК полимеразой II



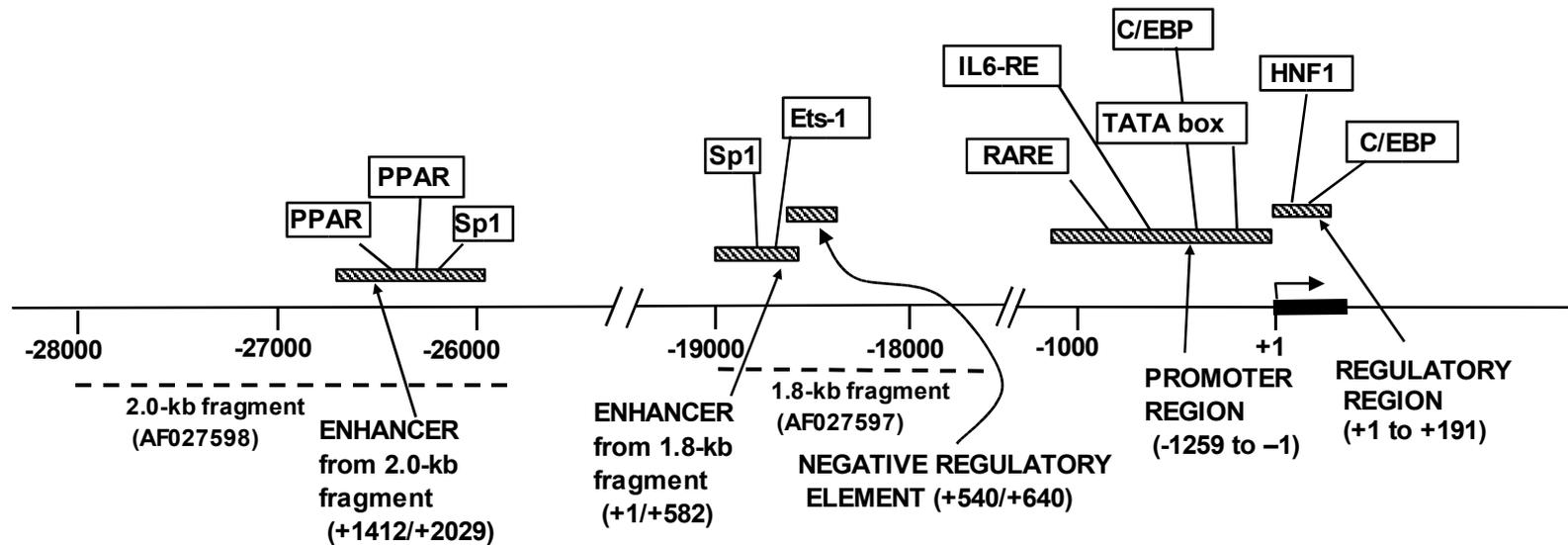
МОДЕЛЬ РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ ЭУКАРИОТИЧЕСКОГО ГЕНА



РЕГУЛЯТОРНЫЕ РАЙОНЫ, КОНТРОЛИРУЮЩИЕ ТРАНСКРИПЦИЮ ГЕНА АПОЛИПОПРОТЕИНА В ЧЕЛОВЕКА



РЕГУЛЯТОРНЫЕ РАЙОНЫ , КОНТРОЛИРУЮЩИЕ ТРАНСКРИПЦИЮ ГЕНА АПОЛИПОПРОТЕИНА (А) ЧЕЛОВЕКА



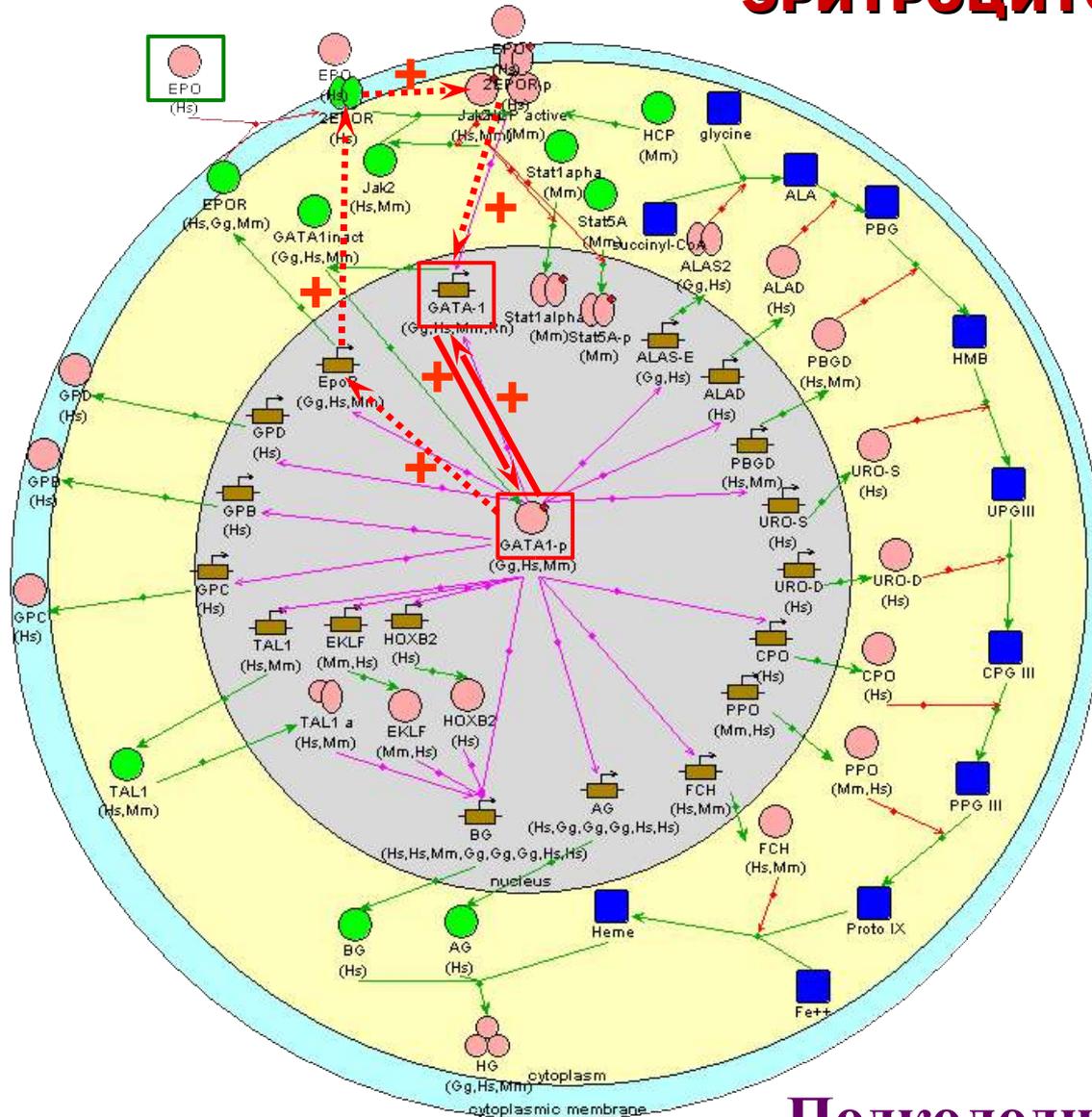
Тканеспецифичность – одна из форм координированной экспрессии генов

Был проведен анализ экспрессии 36182 транскриптов мыши в 61 ткани

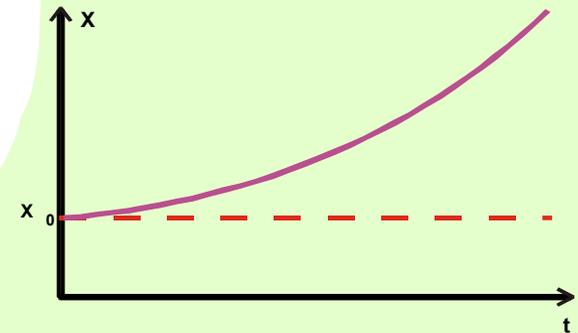
Выявлено, что среднее количество транскриптов, приходящихся на одну ткань составляет 8200

ВЫВОД: в каждом типе клеток экспрессируется только часть генов генома.

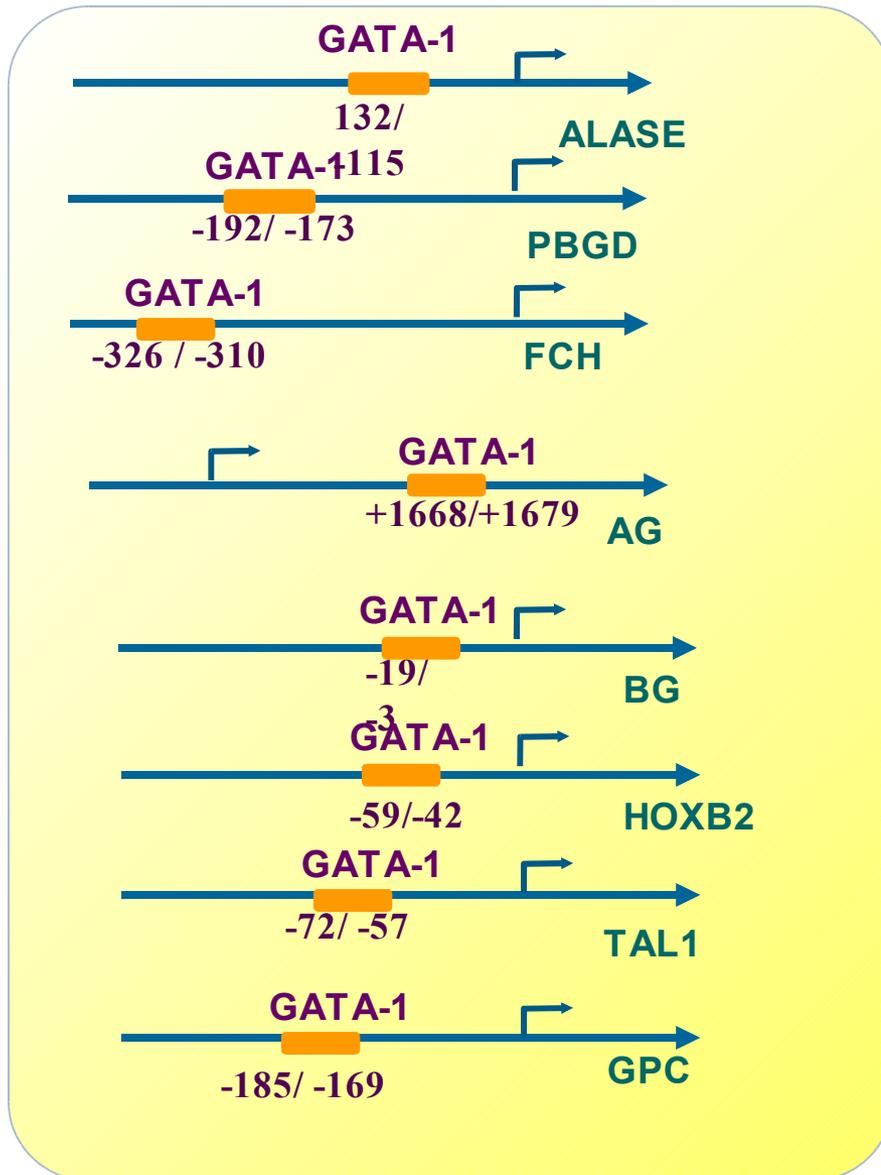
БАЗА ДАННЫХ GENENET: ФРАГМЕНТ ГЕННОЙ СЕТИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И СОЗРЕВАНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ



Принципиальная схема регуляторного контура с положительной обратной связью



Сайты связывания транскрипционного фактора GATA-1 в генах человека из генной сети дифференцировки и созревания эритроцитов

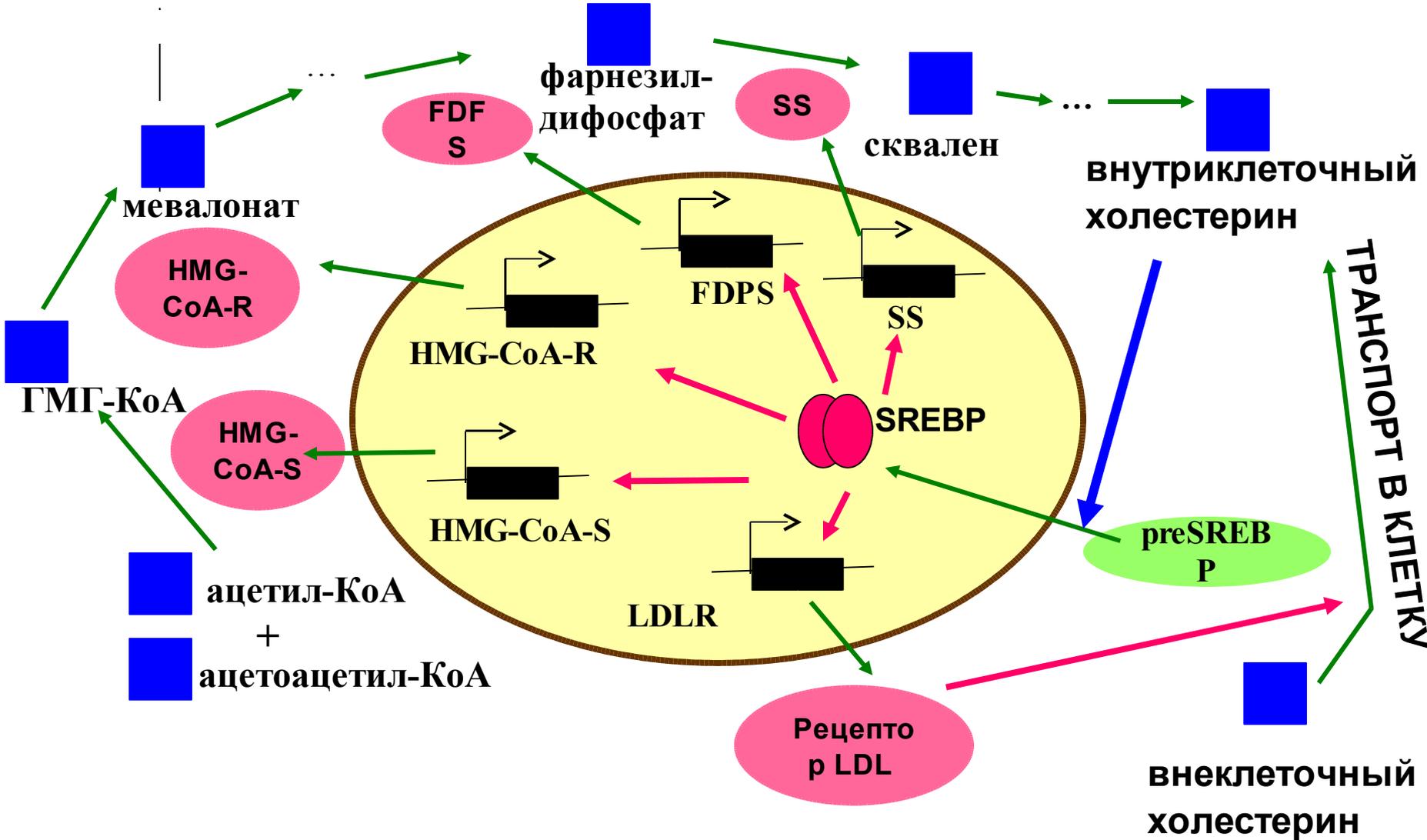


```

ctgttcgctcgAGATAAaagctgag
gcacacatgctGATAAcatccccg
gggtggccccAGATAAacttttta
gaagggactgAGATACctttgggg
ggttgtaaacAGATAAacaaacct
ctggcagtgaAGATAAaacgtgtc
cgccccgccccCGATAAagcgcctcg
tgcgcccgcgAGATAAaggagccgc
tgggcctggaAGATAAcagctagt
tccttgctagAGATAAaacccaaa
agaggagaagGGATAAATgccagg
tgcaatgactAGATAGgcagtagc
tgctgctttgAGATAGgactttca
gtcttccatcAGATAGcatttgga
gcggggcgggAGATAAcaatccga
gcgggagtggAGATAAaggctcagg
tctgcgtcagAGATAGgaggtctc
    
```

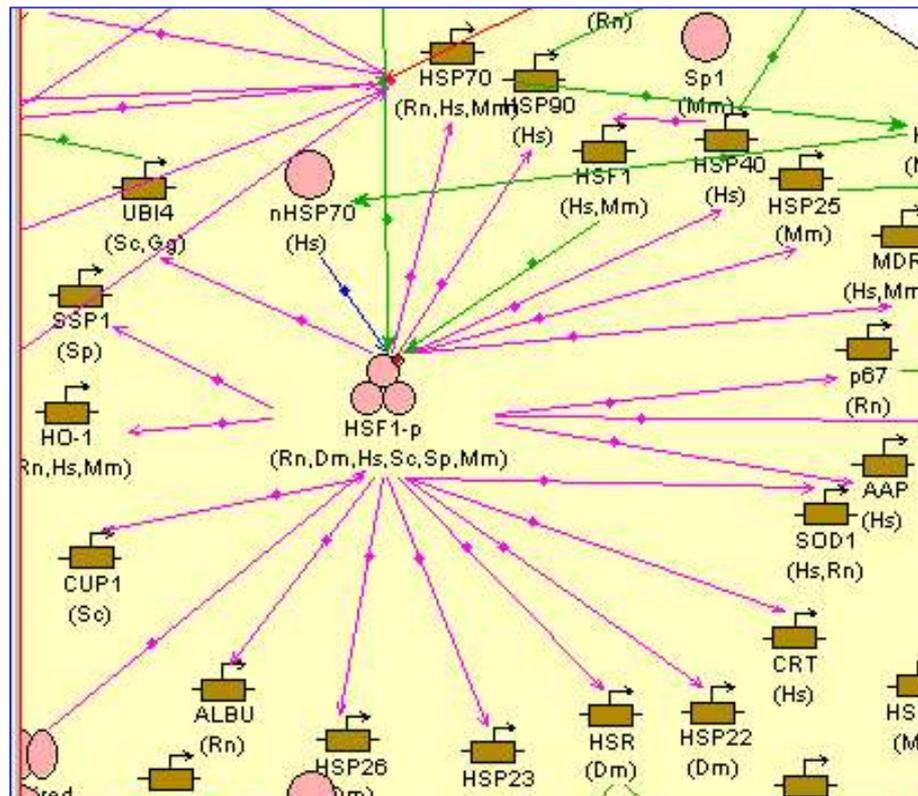
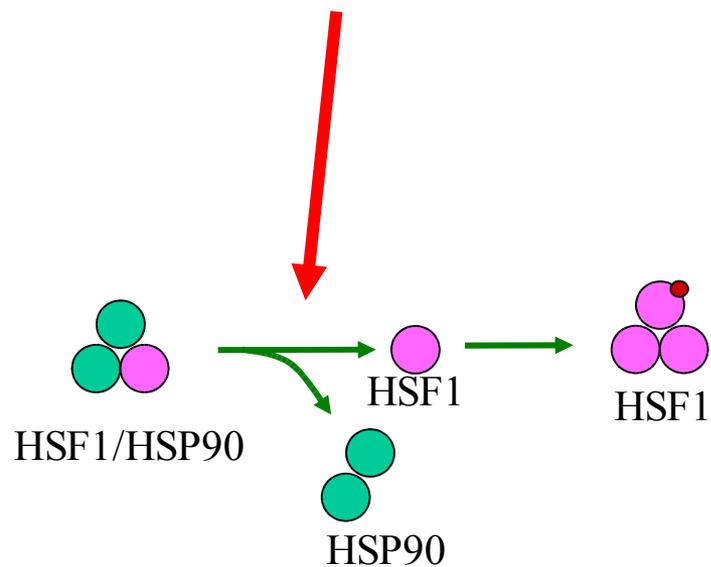
Координированное включение или
выключение кассеты генов в ответ на
индуктор или репрессор

РЕГУЛЯЦИЯ УРОВНЯ ХОЛЕСТЕРИНА (эукариоты):



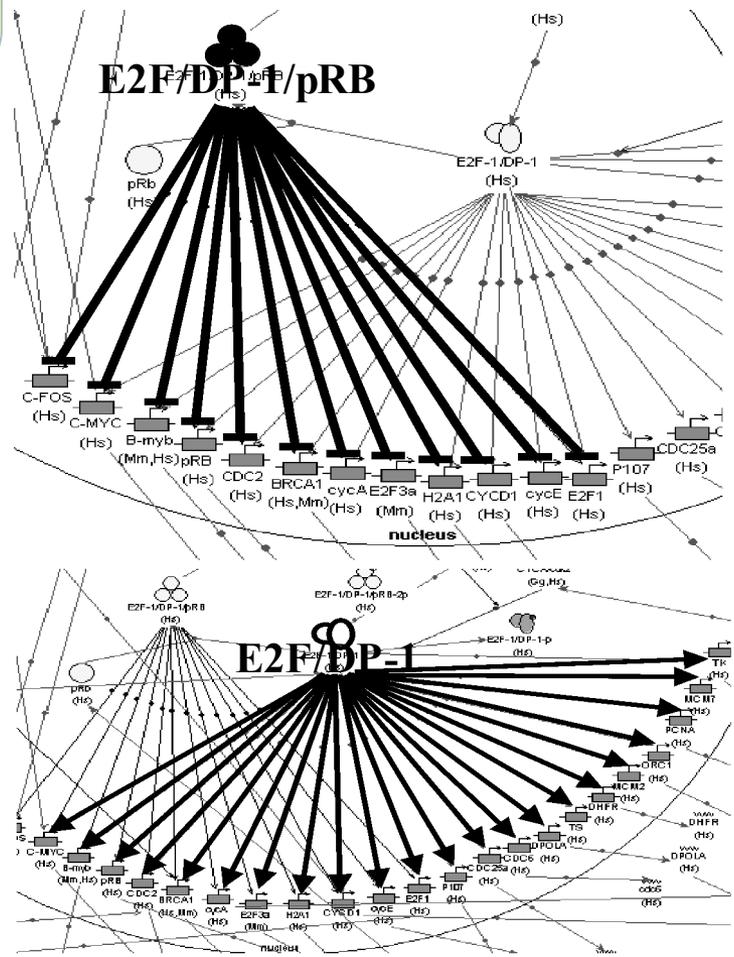
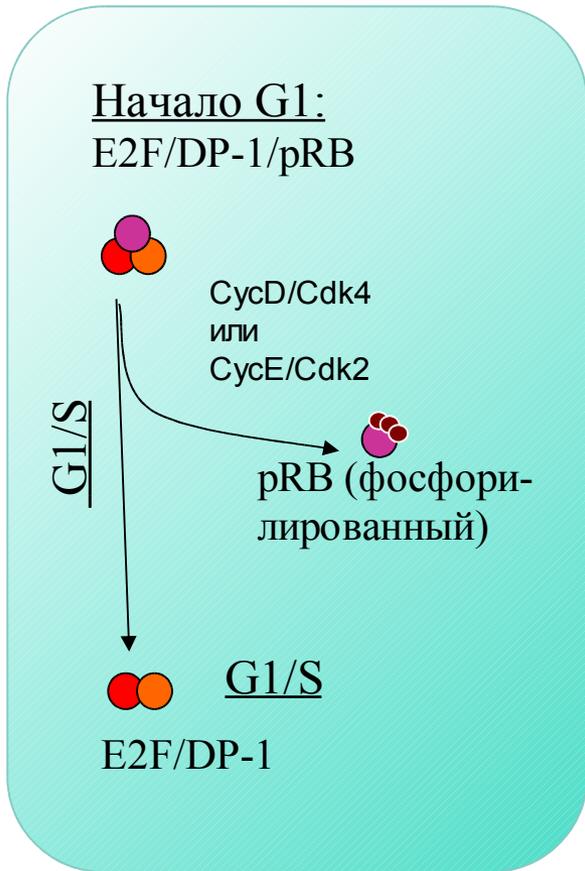
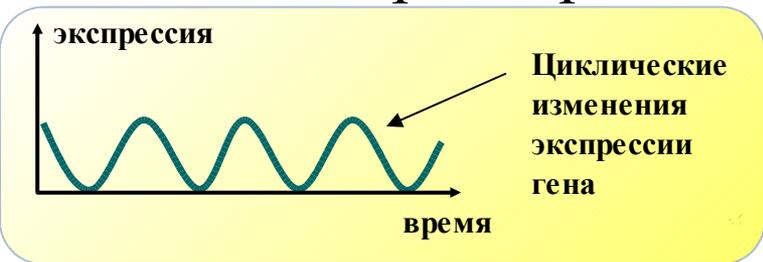
Активация генов теплового шока

Тепловой шок



Изменение уровня экспрессии генов в
циклических процессах

Координированная экспрессия генов клеточного цикла на стадиях G1 и G1/S



G1:
Подавление транскрипции комплексом E2F-1/DP-1/pRB

G1/S: Активация транскрипции комплексом E2F-1/DP-1

I.I. Turnaev, D.Yu. Oshchepkov, O.A. Podkolodnaya Extension of cell cycle gene network description based on prediction of potential binding sites for E2F transcription factor. In: Bioinformatics of Genome Regulation and Structure. Ed. By N.Kolchanov and R. Hofstaedt, Kluwer Academic Publishers, Boston/Dordrecht/London, 2004, pp.273-282.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ:

Присутствуют в клетке
постоянно:
Sp1, NF1

Экспрессируются при
определенных условиях

Экспрессируются в
развитии в определенных
клетках:
GATA, HNF, Pit1, MyoD

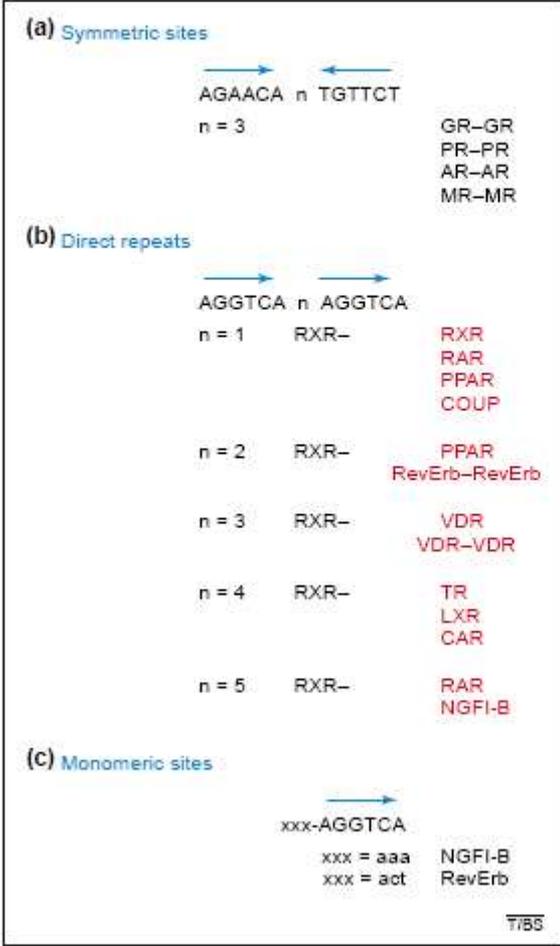
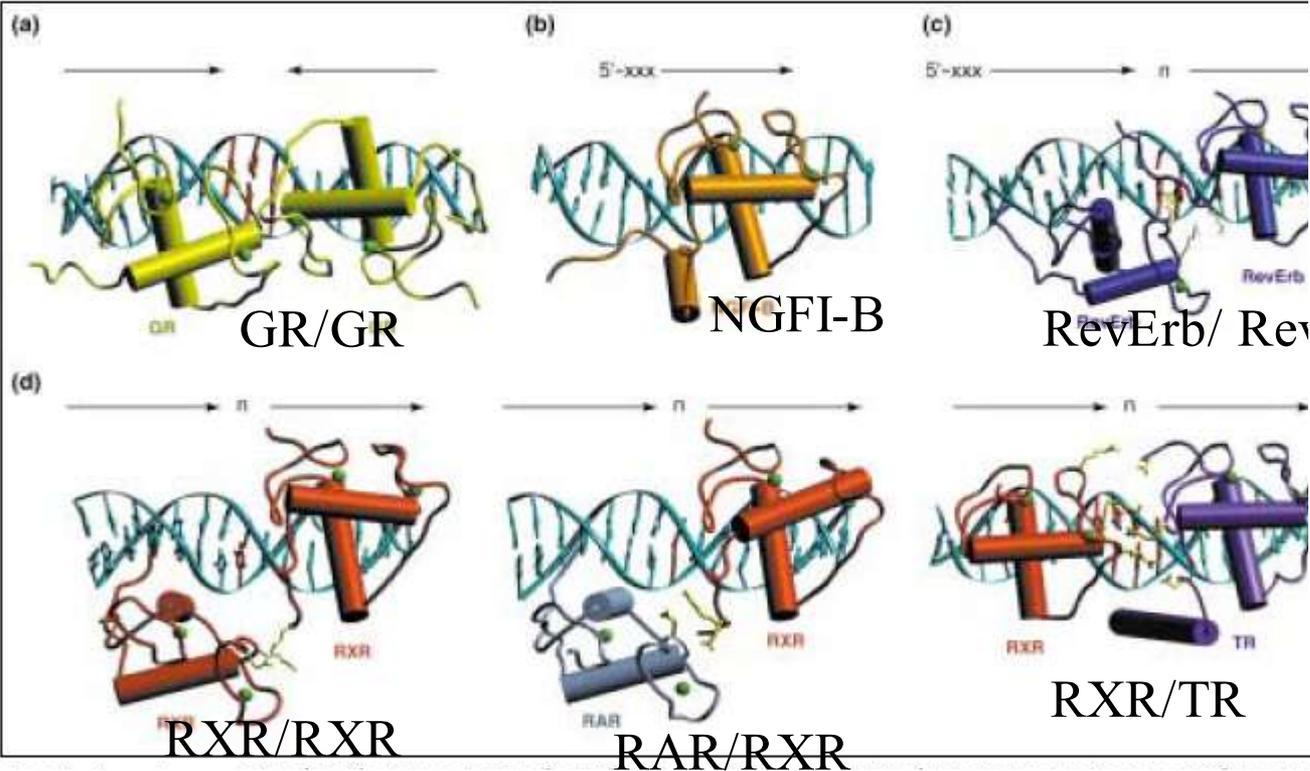
Экспрессия зависит от
сигнала

Стероидные
рецепторы
GR, ER, PR,
TR, RARs,
RXR, PPAR

Активируются
внутренними
сигналами:
SREBP, p53 ...

Активируются
сигналами,
передаваемыми
от мембраны
клетки:
SRF, CREB,
FOS-JUN, STAT,
NF-kB, NFAT

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ С ДНК



TRENDS in Biochemical Sciences 2001, 26, 6, 384-390, Khorasanizadeh S. and Rastinejad F.

САЙТЫ СВЯЗЫВАНИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ

SF1

ggagtTCAAGGTAAtaagggc
 ccagctCAAGGCTAagtgaga
 gaggggggAGGTCAacactcc
 ctagctcaAGGCTAagagagg
 gtctcCCAAGGTCAtccttgt
 ggtcaCCAAGGCTGCTgactg
 agtgGTCAAGGCAAtttagaa
 tgттаTCAAGGTCaagcaag
 caaagTAGAGGTCAggaggaa
 gctagtCAAGGTTActtcaa
 ttatTCAAGGTAatgataac
 ccggcCCAAGGTCcacttgct
 agcttTCGAGGTCAatggccac
 cttggACAAGGGCGcagaggg
 gacagACAAGGTCAgaaagga
 gggtgCAAGGCCActaagca
 ggcggaCAAGGTCAgggaggt
 gggaggCAAGGCCActgggca

SREBP1

GgcgcgctcggctcccctCCACCCCTGctgagatgatgcact
 AccagggcagcagagaagACACCCCAcccccactcaccaca
 AcacccccacccccaacTCACCCCAgTgcagcatcattaa
 aacggTcgccttaacaaccgcCCACTgctcgcacccgggc
 AgcttctagagtgttaTCACGCCAGtctccttccgcgact
 GtgccagttgggatctCCAAGCCACgcccaccaagagttt
 CagttccttctgggtGACACTCCACagtctcccaccgaac
 GcactggtcatttgaTCACCTTATcagttctagggcagtg
 AaccatggaataccaTCAACCCATcataccaatggaaagc
 CtgtacccccctgcctcTCACCCCATcaccatgagctctcc
 CcatccatagtccttgTCACCTGACaggggggtgggtaaac
 GgccaatccccgcgcggCCACGCCACatgggctgacagctt
 TgattgcgtgaccctGTCACTCCAGagttagatagccaag
 CtctggagtgacaggGTCACGCAATcagaccacggtaatt
 TgacaggggtcacgcaATCAGACCACggtaattgcacaacg
 CgtaacccaacccttGTCACTCCAAGaccctaacttggtc
 CaagaccctaacttgGTCACTCCACagccttgcctcctct
 CacatccagccgggcTACACCCCATcactccacgggcccg

GTCAAGGTC

TCACCCCAT

| | | | | | | | | | | | | |
|---|------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| A | 0.25 | 0.12 | 0.17 | 0.05 | <u>0.86</u> | <u>0.98</u> | 0.00 | 0.00 | 0.05 | 0.07 | <u>0.79</u> | 0.24 |
| T | 0.15 | 0.17 | <u>0.48</u> | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | <u>0.69</u> | 0.17 | 0.05 | 0.17 |
| G | 0.35 | <u>0.46</u> | 0.09 | 0.14 | 0.14 | 0.00 | <u>1.00</u> | <u>1.00</u> | 0.02 | 0.02 | 0.07 | 0.35 |
| C | 0.25 | 0.25 | 0.26 | <u>0.81</u> | 0.00 | 0.02 | 0.00 | 0.00 | 0.24 | <u>0.74</u> | 0.09 | 0.24 |
| N | G* | T* | C** | A** | A** | G** | G** | T** | C** | A** | N | |

SITECON – Интернет-доступный ресурс для выявления конформационных свойств ДНК и распознавания сайтов связывания ТФ

<http://www.mgs.bionet.nsc.ru/mgs/programs/sitecon/>

SITECON

Standart settings for recognition [Example](#)

Paste alignment here in FASTA format (from screen or from file):

Paste sequence here in FASTA format (from screen or from file):

```
>Sequence for analysis
ggactcctgcctgtccctgcccgcacatgacagccctcgat
gtctggcgcccatgacggagaccatgcctgcctctgcct
tcatgcactggtggccgcccctcctcgagcctgacctact
```

Window size Apply weight
Minimal threshold, % Cut threshold, %

[Error Table](#) [Error Plot](#) [Significance Matrix](#) [Full Result Table](#)

Window size Apply weight
Minimal threshold, % Cut threshold

Cuttet result table

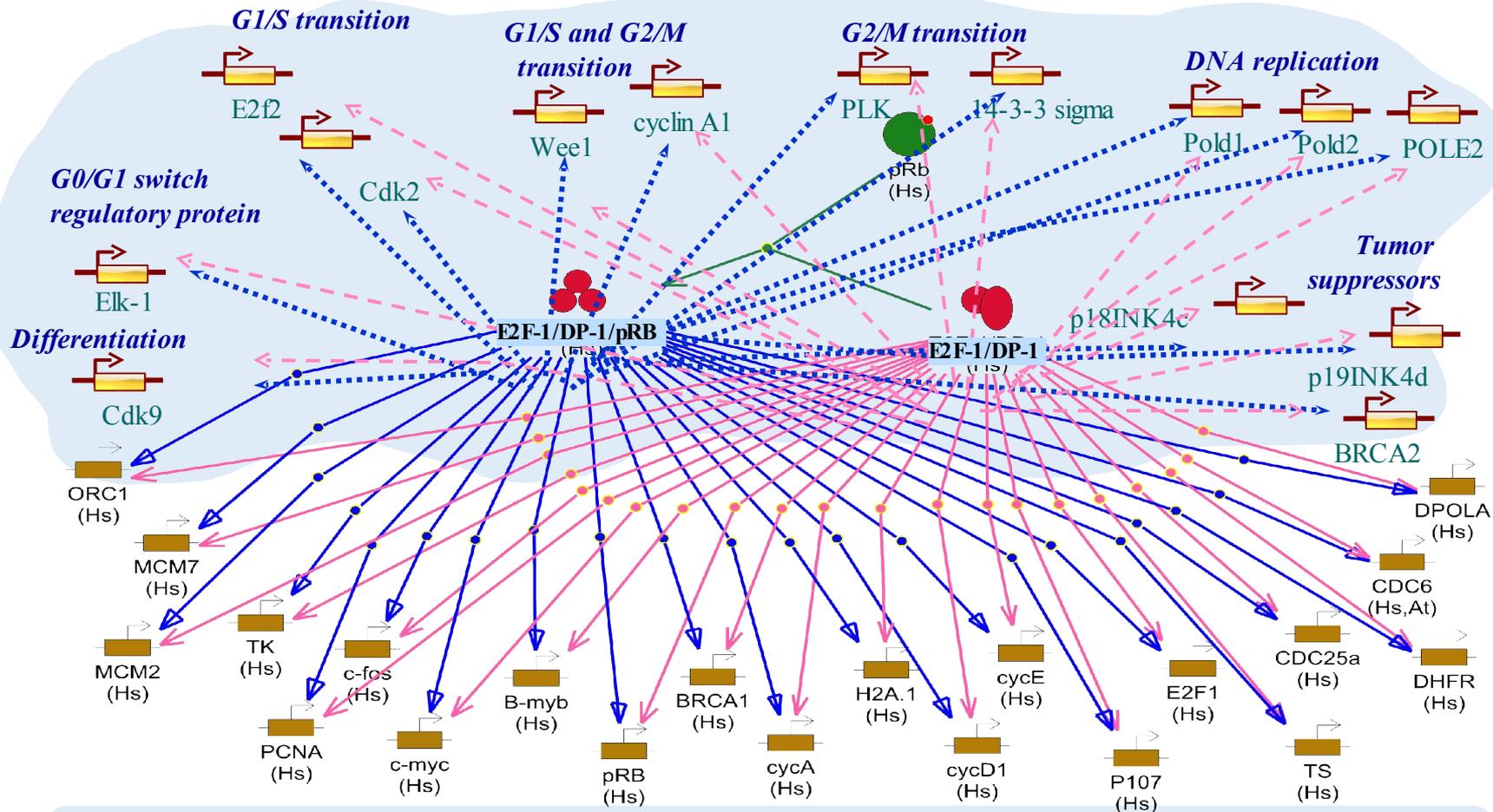
```
>1: Test
Pos 521, 0.830, direct, TTTCGCGGCAAAAAGGATTTGGCGCGTAAAAGCCGACCCCTGCCG
Pos 784, 0.850, direct, TTTCGCGGCAAAAAGGATTTGGCGCGTAAAAGTGGCCGGGACTT
Pos 768, 0.818, indirect, TTACGCGCCAAATCCTTTTGGCCGAAAAGAGTGTGTACACAGG
Pos 505, 0.830, indirect, TTACGCGCCAAATCCTTTTGGCCGAAAAGGCCACGAGCCCGCC
Summarized length of all tested sequences = 3919
Sum = 4
```

Распознавание 45 типов сайтов связывания производится на основе выборок сайтов из базы TRRD

Распознавание 179 типов сайтов связывания производится на основе выборок искусственных сайтов из базы ARTSITE

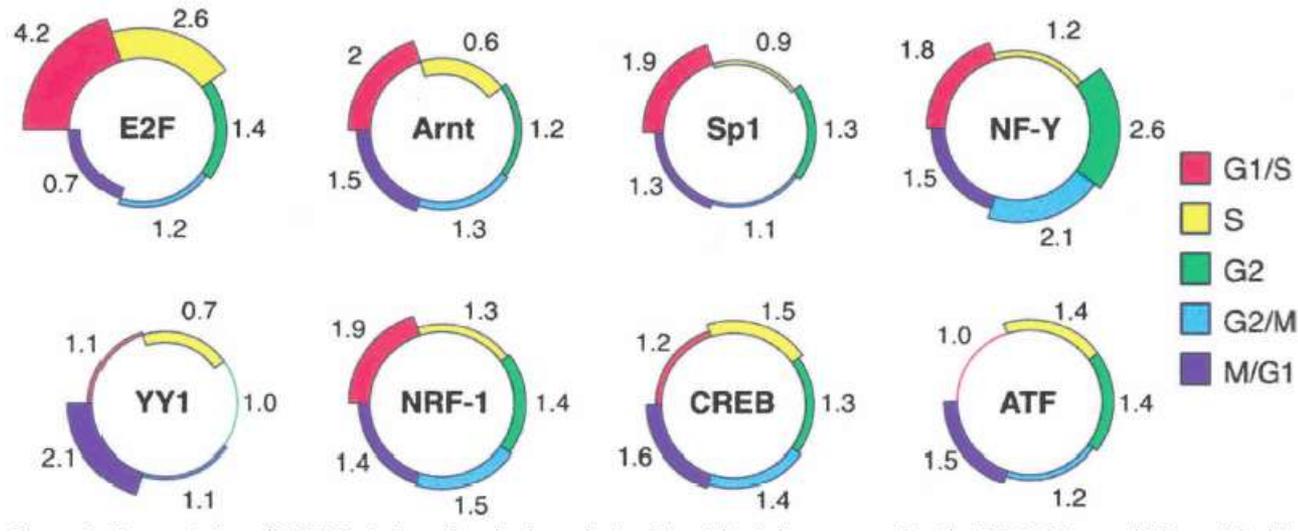


Реконструкция генных сетей *in silico*: дополнение генной сети регуляции клеточного цикла потенциальными генами-мишенями транскрипционного фактора E2F-1/DP-1 на основе данных по предсказанию сайтов его связывания

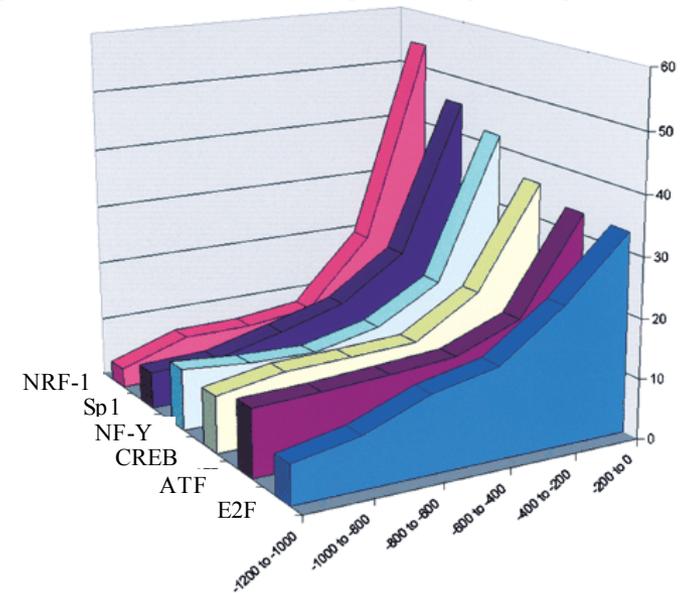


Предсказаны ранее не исследованные сайты связывания транскрипционного фактора E2F-1 в 14 генах человека

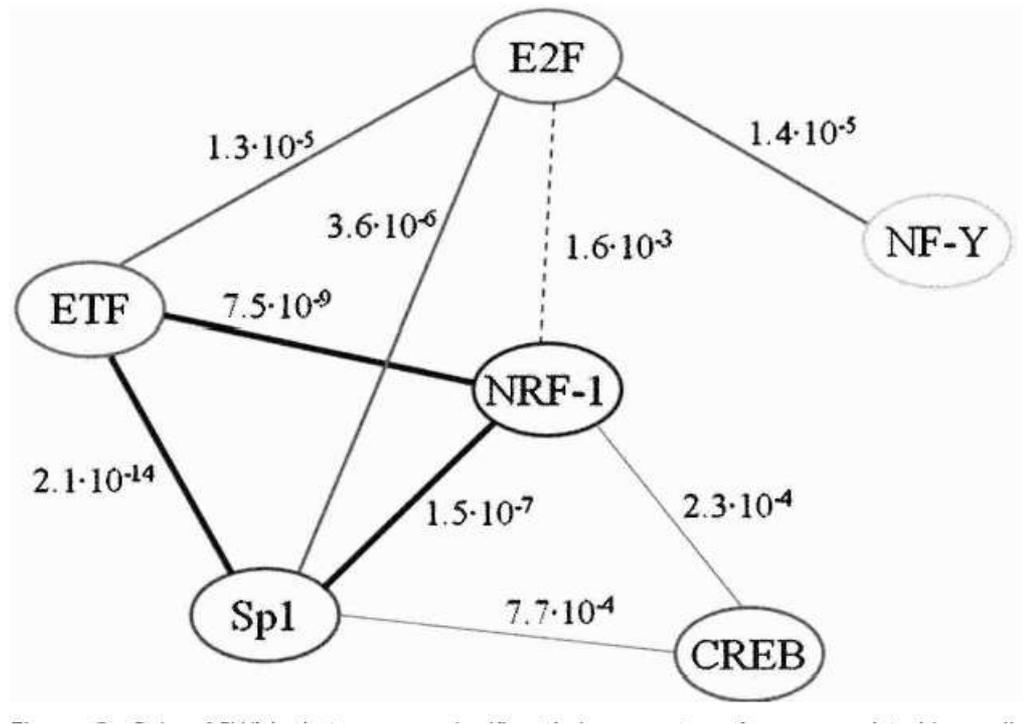
Содержание сайтов связывания транскрипционных факторов в генах клеточного цикла



Распределение сайтов в промоторных районах



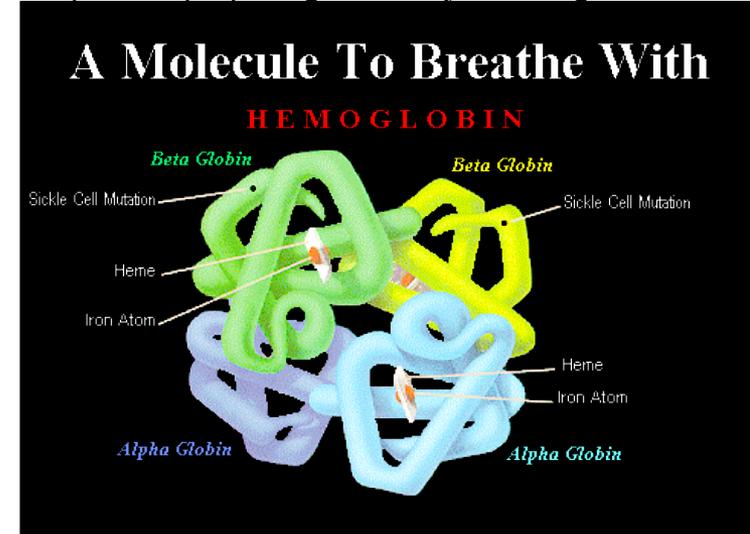
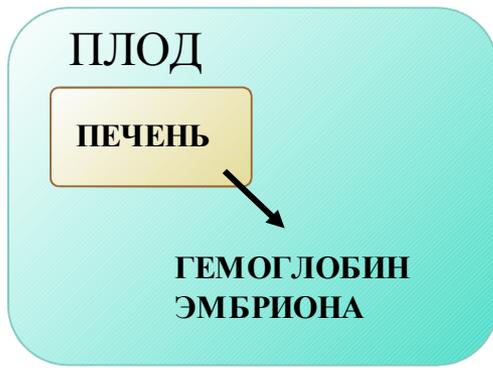
Встречаемость пар сайтов связывания транскрипционных факторов в генах клеточного цикла



568 промоторов

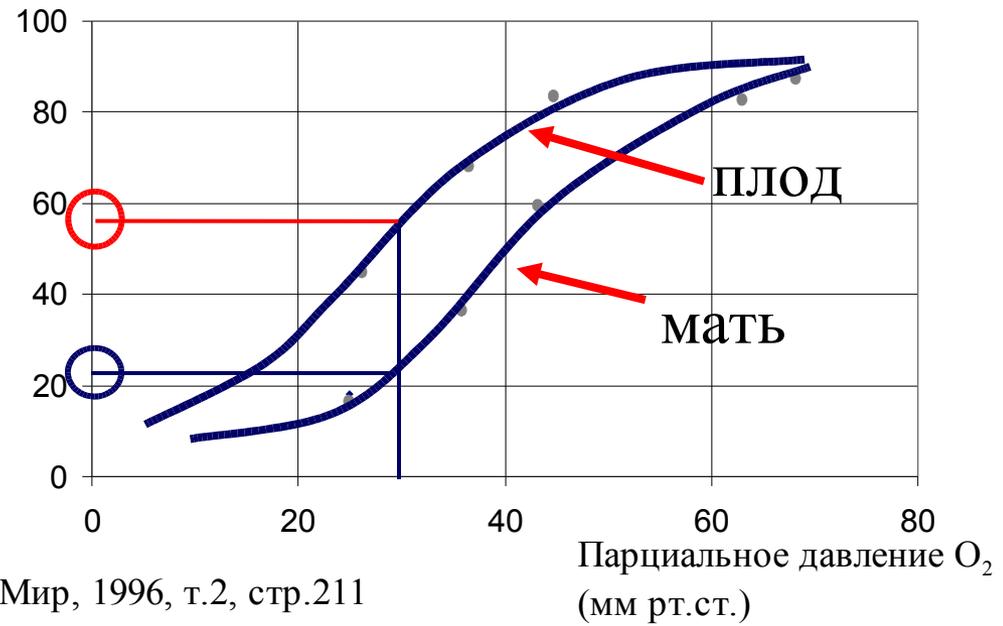
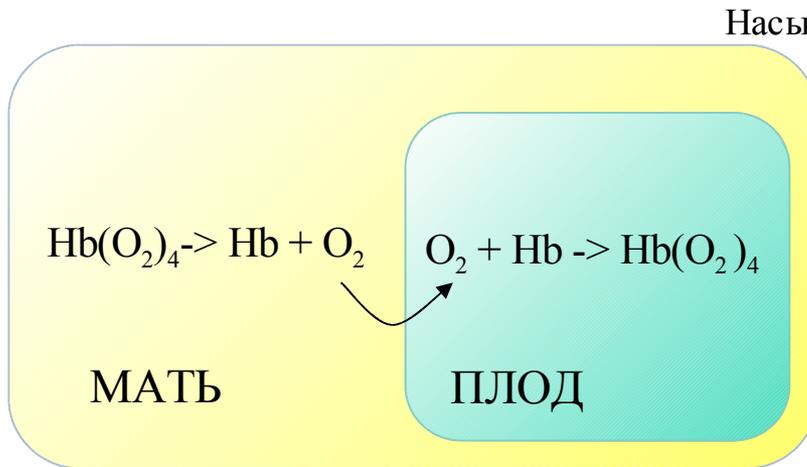
ФОРМЫ ГЕМОГЛОБИНА ВЗРОСЛОГО ОРГАНИЗМА И ПЛОДА

<http://www.people.virginia.edu/~rjh9u/hemoglob.html>

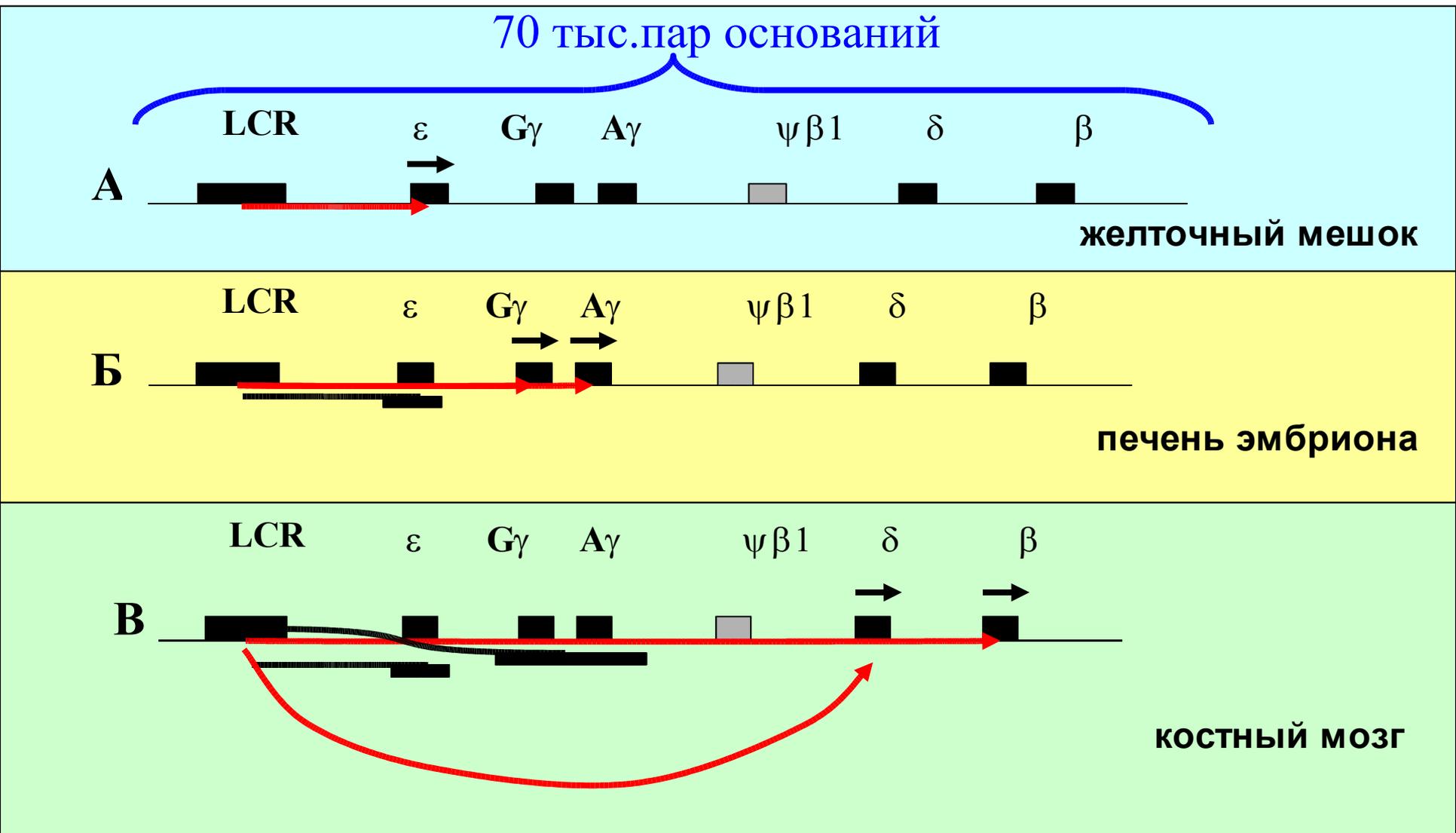


Гемоглобин – элемент генной сети, который меняется с возрастом

Характеристики гемоглобинов у плода и взрослого животного (овцы)

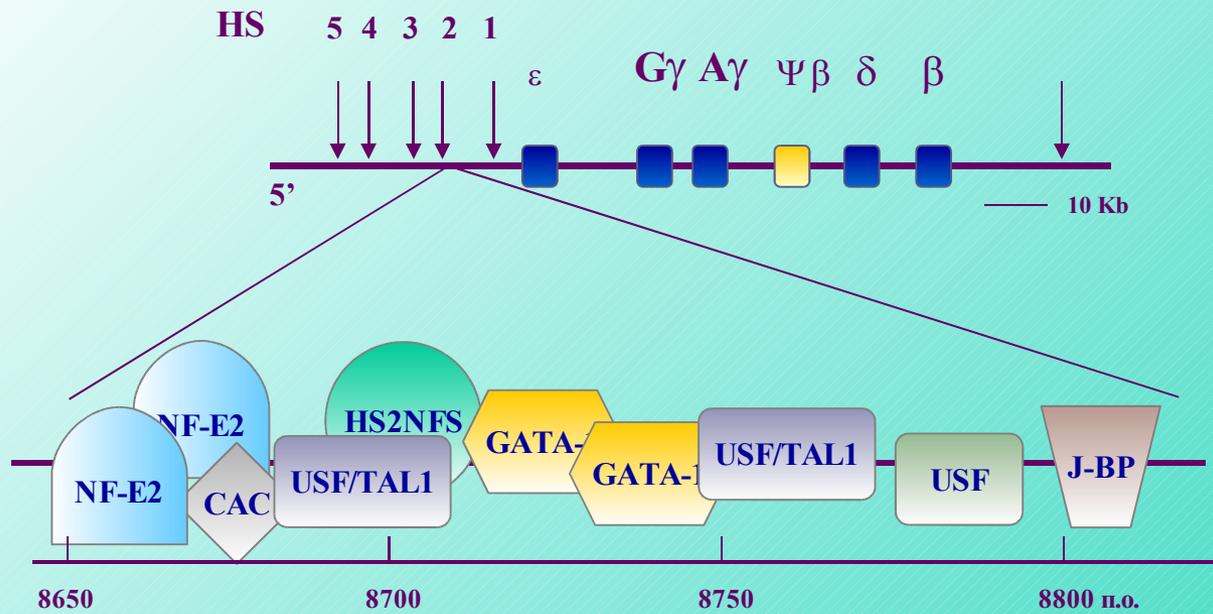


ЛОКУС-КОНТРОЛИРУЮЩИЙ РАЙОН КЛАСТЕРА ГЕМОГЛОБИНОВЫХ ГЕНОВ ЧЕЛОВЕКА



ϵ , $G\gamma$, $A\gamma$, δ , β - гены гемоглобинов; $\psi\beta 1$ - псевдоген

LCR глобинового локуса человека

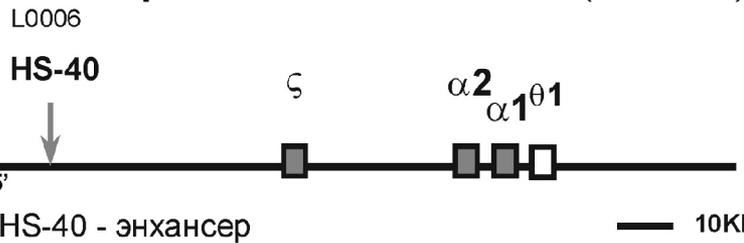


TCR α/δ (мышь)



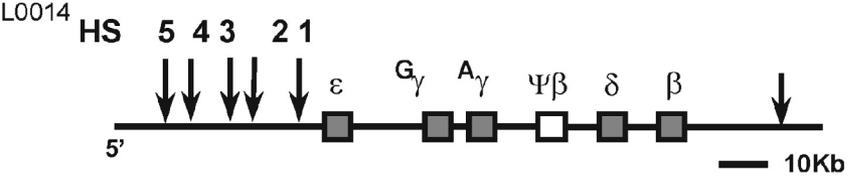
HS1 - энхансер
 HS1, HS1' район определяющий распространенность в тканях
 HS2 - HS6 район открывающий хроматин
 Цифрами обозначены экзоны гена *Dad1*

Кластер α -глобиновых генов (человек)



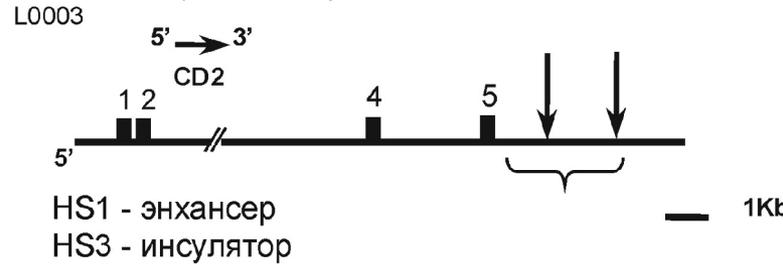
HS-40 - энхансер

Кластер β глобиновых генов (человек)



HS5 - инсулятор
 HS4 - HS1 - энхансер

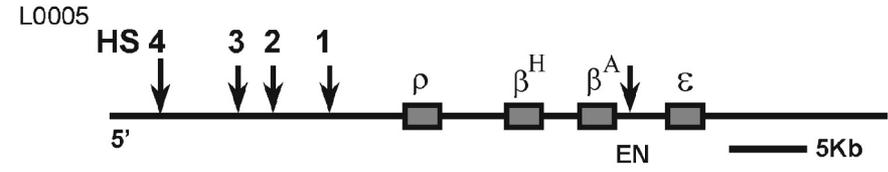
Ген *CD2* (человек)



HS1 - энхансер
 HS3 - инсулятор

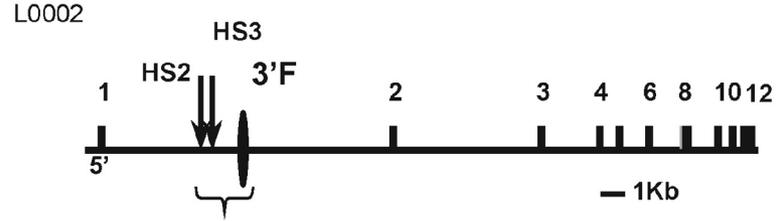
Цифрами обозначены экзоны гена *CD2*

Кластер β глобиновых генов (цыпленок)



HS4 - инсулятор
 HS3, HS2 - энхансер
 EN - межгенный энхансер

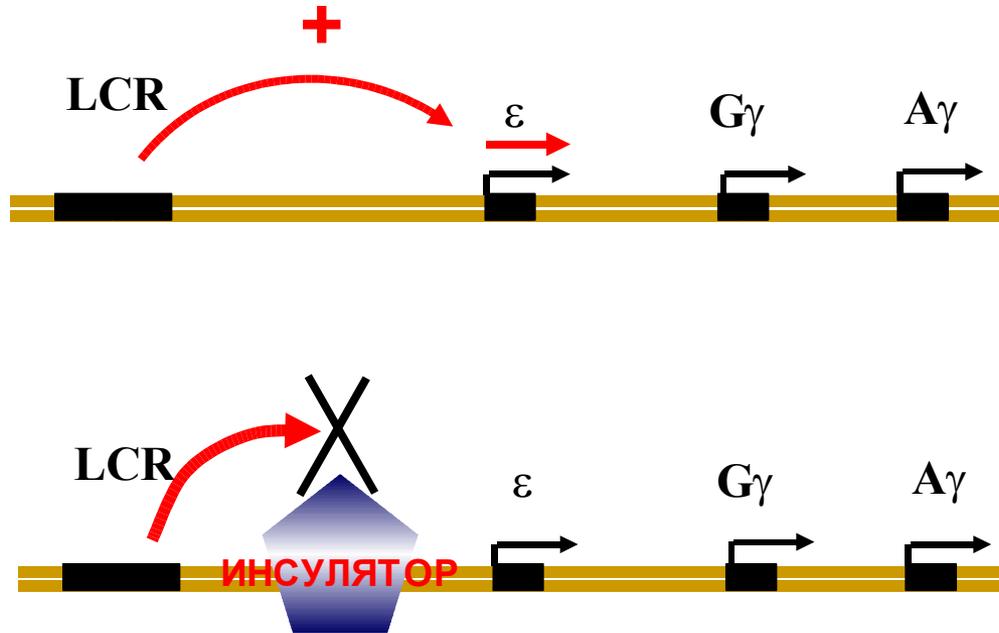
Ген *ADA* (человек)



HS2 - 5' вспомогательный элемент
 HS3 - энхансер;
 3'F - 3' вспомогательный элемент

Цифрами обозначены экзоны гена *ADA*

ИНСУЛЯТОР

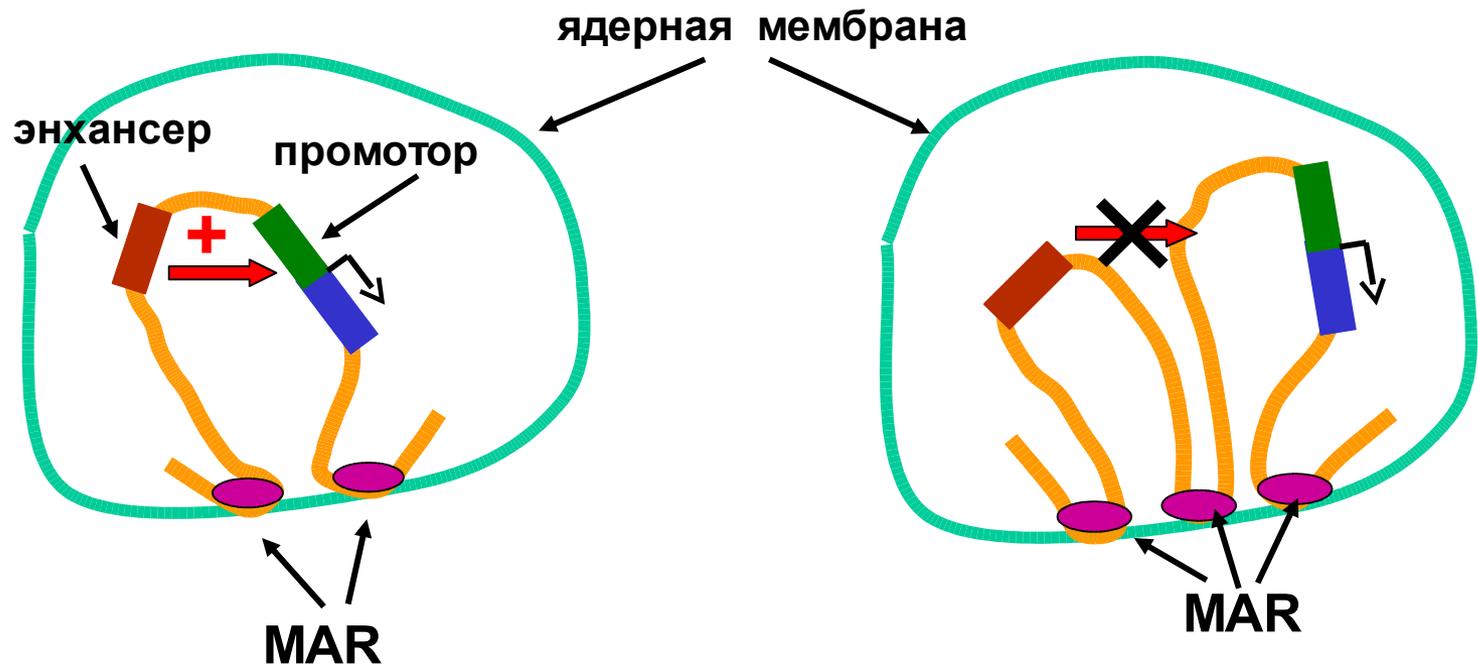


ИНСУЛЯТОР – участок ДНК, который, будучи помещенным между двумя регуляторными элементами может препятствовать активирующему либо подавляющему действию одного элемента на другой

При включении инсультора два регуляторных района оказываются в различных доменах, и не способны взаимодействовать

Роль инсультатора может выполнять участок прикрепления к ядерному матриксу (MAR). При включении такого инсультатора два регуляторных района оказываются в различных доменах, и не способны взаимодействовать

MARs =matrix attachment regions



энхансер активирует транскрипцию гена

энхансер не влияет на транскрипцию гена

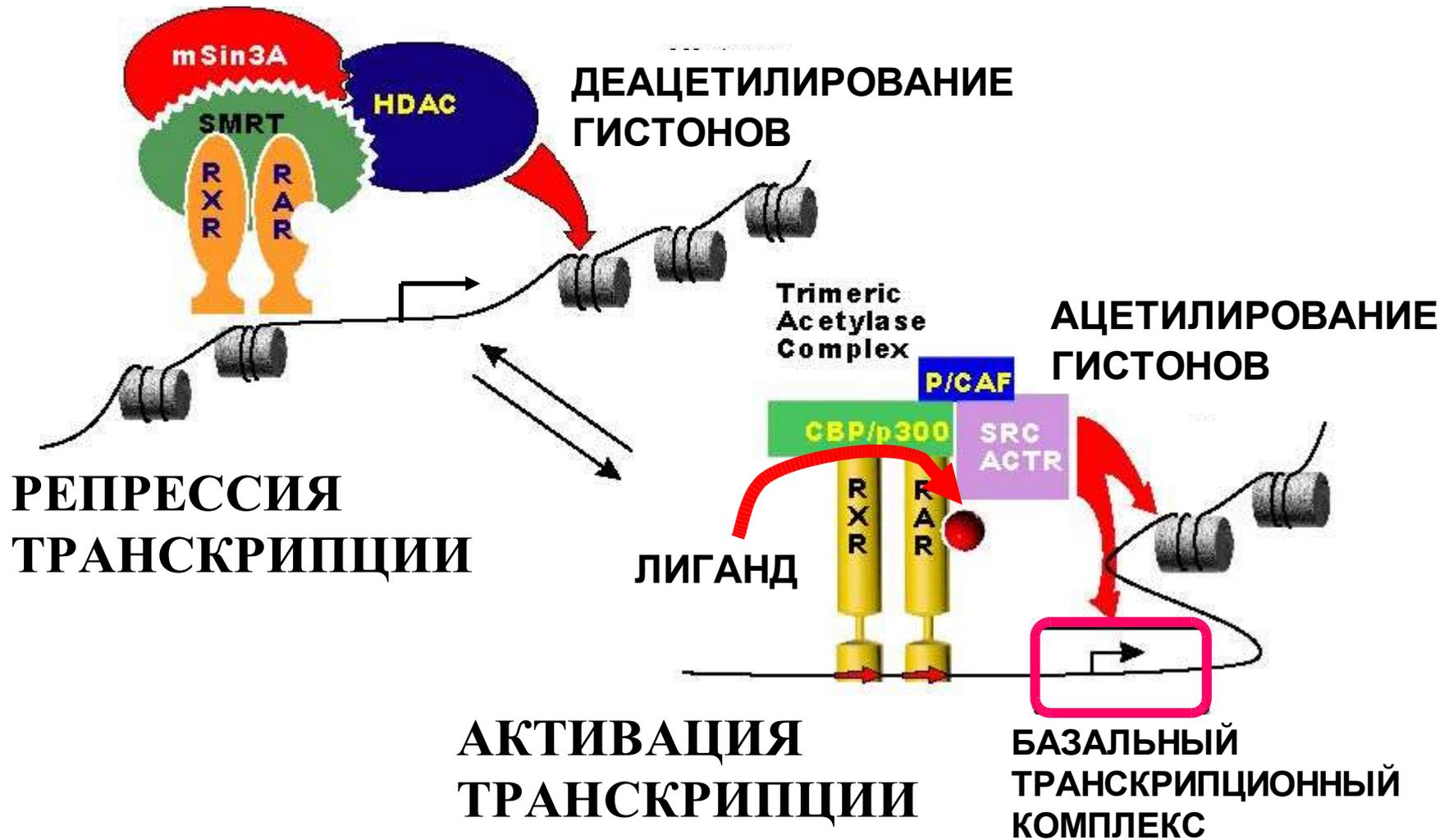
АЦЕТИЛИРОВАНИЕ ГИСТОНОВЫХ БЕЛКОВ ДЕСТАБИЛИЗИРУЕТ НУКЛЕОСОМЫ



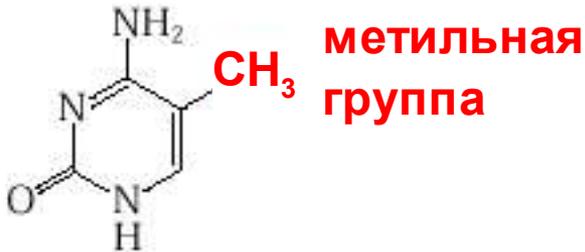
АЦЕТИЛИРОВАНИЕ



СВЯЗЫВАНИЕ РЕЦЕПТОРА С ЛИГАНДОМ ИЗМЕНЯЕТ СТРУКТУРУ ХРОМАТИНА



В ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ УРОВЕНЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК ЧАСТО КОРРЕЛИРУЕТ С УРОВНЕМ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА. МЕТИЛИРОВАННЫЕ УЧАСТКИ ДНК ТРАНСКРИБИРУЮТСЯ МЕНЕЕ АКТИВНО, ЧЕМ НЕМЕТИЛИРОВАННЫЕ УЧАСТКИ

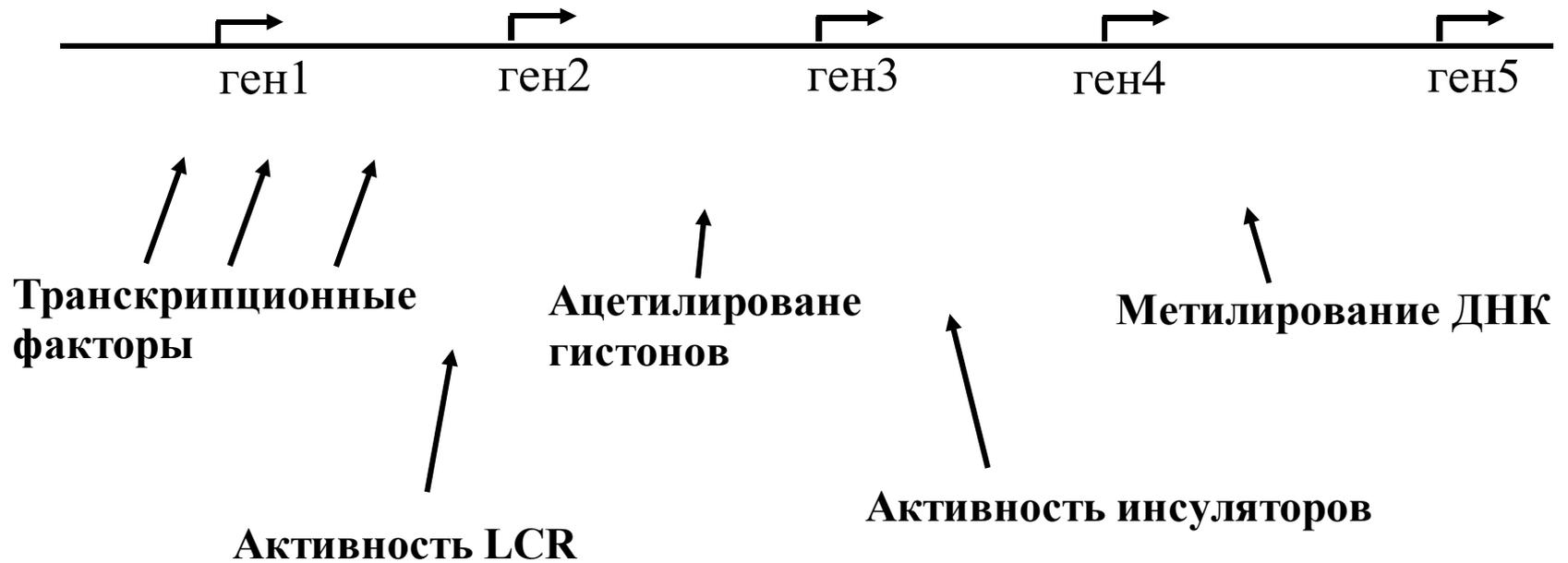


5-метилцитозин

**МЕТИЛИРОВАНИЕ
ЦИТОЗИНА
ПРИВОДИТ К
ОБРАЗОВАНИЮ 5-
МЕТИЛЦИТОЗИНА**

**НАИБОЛЕЕ ЧАСТО МЕТИЛИРОВАНИЮ
ПОДВЕРГАЮТСЯ ЦИТОЗИНОВЫЕ НУКЛЕОТИДЫ,
СТОЯЩИЕ ПОСЛЕ ГУАНИНОВЫХ
...GC...
...CG...**

СОВОКУПНОСТЬ ФАКТОРОВ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ КООРДИНИРОВАННУЮ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ





Спасибо за внимание !

