

# Механизмы регуляции транскрипции

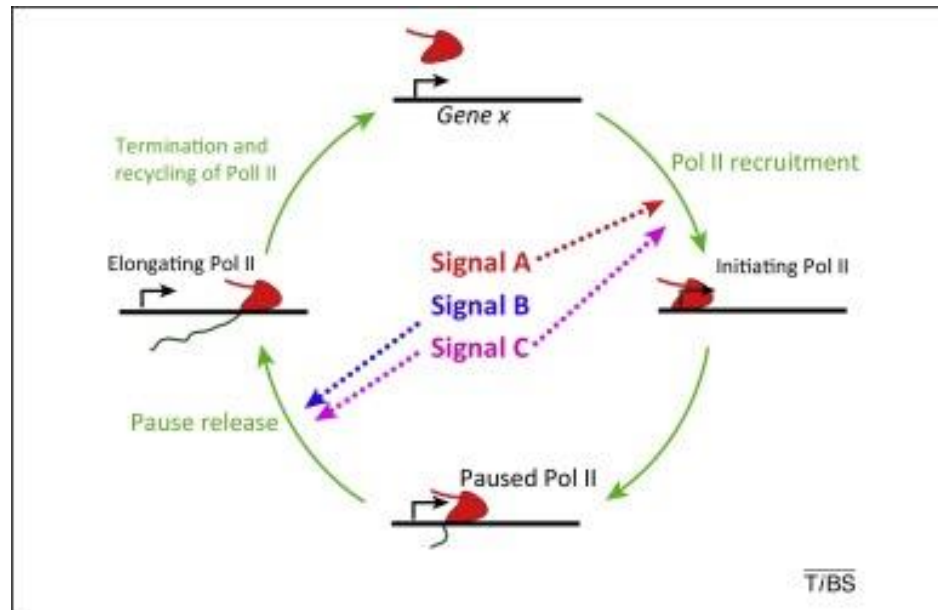
(Лекция 3)

с.н.с. лаб. эволюционной биоинформатики и  
теоретической генетики, к.б.н. Игнатьева Е.В.

# РЕГУЛЯТОРНЫЕ БЕЛКИ РЕГУЛИРУЮТ ТРАНСКРИПЦИЮ НЕ ТОЛЬКО НА СТАДИИ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ

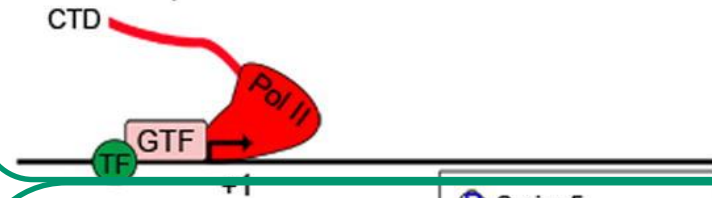


Этап регуляции транскрипции – остановка (pausing)  
РНК-полимеразы на стадии начала элонгации



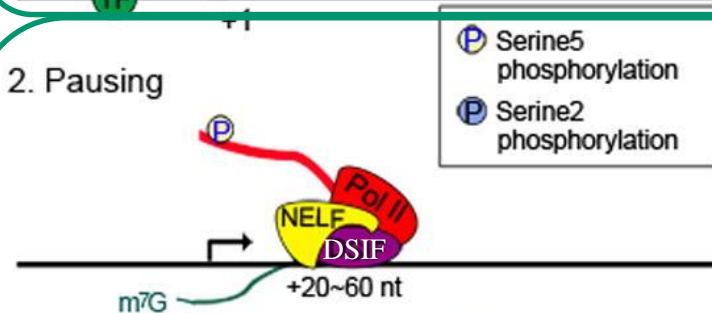
# Дополнительный этап регуляции – остановка (pausing) РНК-полимеразы на стадии элонгации (начало)

## 1. PIC complex and Initiation



**Этап 1:** Транскрипционные факторы (TF) рекрутируют базальные транскрипционные факторы (GTF) и РНК-полимеразу II (Pol II), после чего образуется прединициаторный комплекс (PIC) в районе промотора.

## 2. Pausing

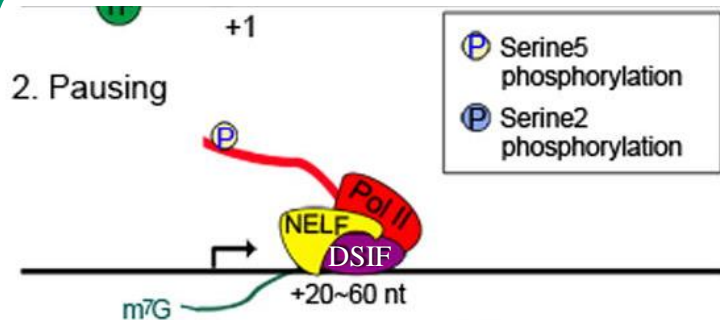


**Этап 2:** Pol II синтезирует РНК длиной 20-60 нуклеотидов и останавливается. Остановка происходит при участии факторов остановки (pausing factors):

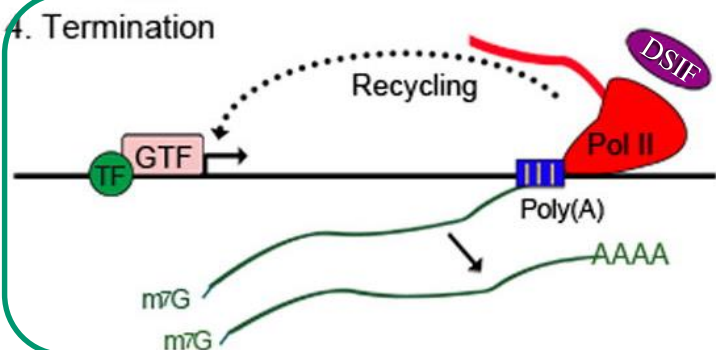
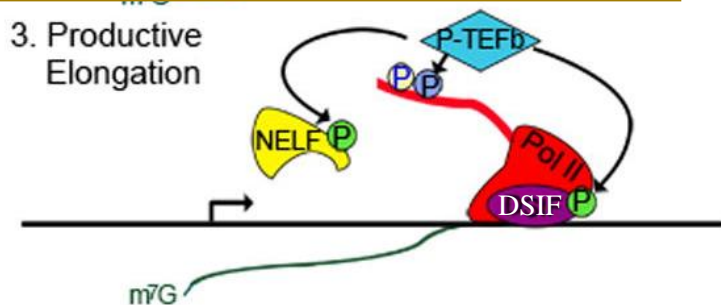
**DSIF - the DRB sensitivity-inducing factor,**  
**NELF - the negative elongation factor**

В этот момент карбокси-терминальный домен полимеразы II фосфорилирован по остаткам серина в 5-ой позиции. Цепь РНК связана с Pol II и имеет 5'кэп.

# Дополнительный этап регуляции – остановка (пауза) РНК-полимеразы на стадии элонгации (продолжение)



**P-TEFb** = positive transcription elongation factor



**Этап 2:** Pol II синтезирует РНК длиной 20-60 нуклеотидов и останавливается (пауза). Остановка происходит при участии факторов остановки (pausing factors):

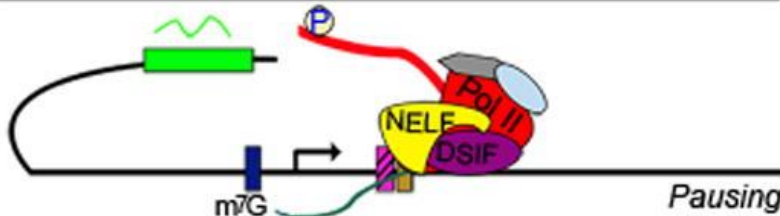
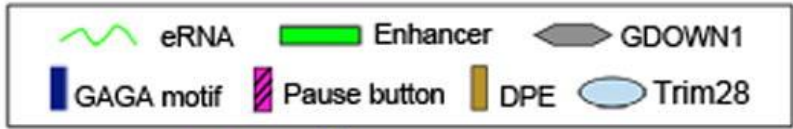
**DSIF - the DRB sensitivity-inducing factor,**  
**NELF - the negative elongation factor**

В этот момент карбокси-терминальный домен полимеразы II фосфорилирован по остаткам серина в 5-ой позиции. Цепь РНК связана с Pol II и имеет 5'кэп.

**Этап 3:** Пауза заканчивается под действием фактора **P-TEFb**. P-TEFb фосфорилирует карбокси-терминальный домен РНК-полимеразы (Pol II) по серину 2. Кроме того, P-TEFb фосфорилирует факторы DSIF и NELF, что приводит к диссоциации NELF. Фосфорилированный фактор DSIF становится активатором элонгации и движется вместе с Pol II вдоль гена.

**Этап 4:** Когда Pol II достигает точки терминации транскрипции, транскрипция прекращается. Pol II и РНК отсоединяются от ДНК.

# Остановка РНК-полимеразы на стадии элонгации и ее освобождение регулируется множеством сигнальных путей и многими факторами



У дрозофил пауза возникает особенно часто в генах, содержащих такие регуляторные элементы:

**DPE - downstream promoter element**

**pause button**

**GAGA – сайт связывания GAGA-фактора (ТФ)**

**P-TEFb - positive transcription elongation factor**

Может высвобождаться из 7SK-HEXIM inhibitory complex

**P-TEFb активируется при участии:**

BRD4 - Bromodomain-containing protein 4

SEC - super elongation complex

HIV-TAT - HIV-encoded transcriptional transactivator protein Tat

eRNAs – энхансерные транскрипты

**Окончание паузы происходит при:**

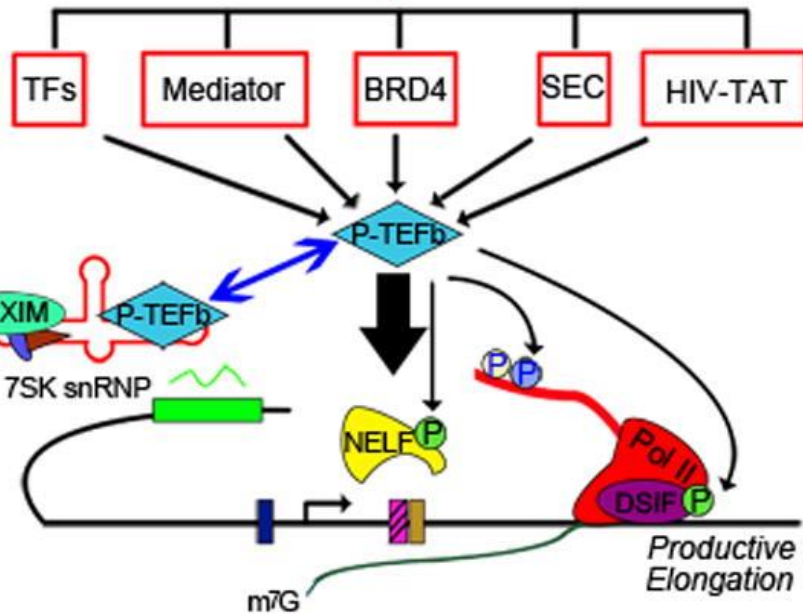
- Тепловом шоке (ТФ = HSF)

- Гипоксии (ТФ = HIF1 $\alpha$ )

- Воспалению (ТФ = Nf-kB)

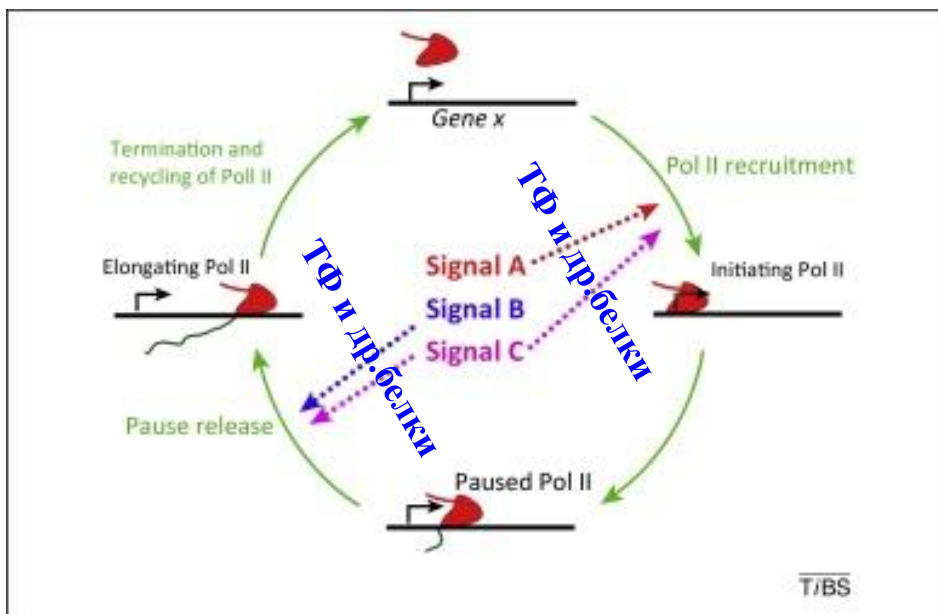
- Репрограммировании индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (BRD4, ТФ = KLF4)

- И т.д.



# Этап регуляции транскрипции – остановка (pausing) РНК-полимеразы на стадии начала элонгации

## Регуляция транскрипционными факторами и другими регуляторными белками



### Окончание паузы происходит при:

- Тепловом шоке (ТФ = HSF)
- Гипоксии (ТФ = HIF1 $\alpha$ )
- Воспалении (ТФ = Nf-kB)
- Репрограммировании индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (BRD4, ТФ = KLF4)
- И т.д.

# ОСОБЕННОСТИ ТРАНСКРИПЦИИ У ЭУКАРИОТ:

-А) У эукариот транскрипция осуществляется при участии РНК-полимераз трех типов, которые обозначаются как pol I, pol II, и pol III. Можно выделить три группы генов:

- pol I транскрибируемые: гены рРНК (18S, 5.8S и 28S )
- pol II транскрибируемые: все белок-кодирующие гены + гены многих мяРНК (U1, U2, U4, U5, U11, U12 и др.)
- pol III транскрибируемые : гены тРНК + гены низкомолекулярных РНК (5S рРНК, 7SL РНК, U6 РНК, 7SK РНК и др.)

Б) Каждая РНК-полимераза имеет сложное, многосубъединичное строение, например, pol II включает более 10 субъединиц;

В) Для точной посадки РНК-полимераз на участок, прилежащий к старту транскрипции, нужны вспомогательные белки – базальные (или общие) транскрипционные факторы;

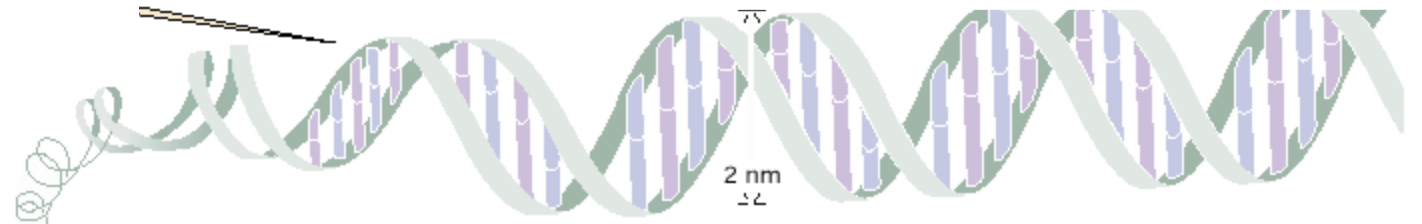
Г) Для достижения необходимого уровня транскрипции каждого гена, помимо базальных (общих) транскрипционных факторов, требуются другие белки (транскрипционные факторы, коактиваторы, корепрессоры, медиаторы и др.);

Д) Промоторы генов, транскрибируемых каждым типом полимераз, имеют характерное строение

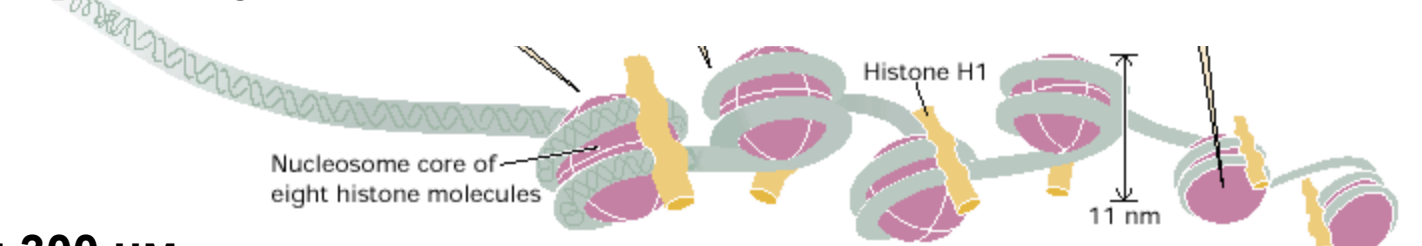
✓ **Е) Транскрипция генов эукариот зависит от состояния хроматина и плотности нуклеосомной упаковки.**

# Уровни организации хроматина

ДНК (двойная спираль)



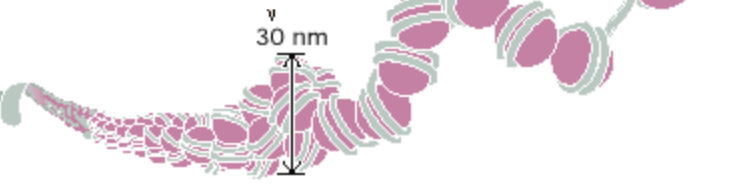
Нуклеосомы - комплекс ДНК с гистоновыми белками



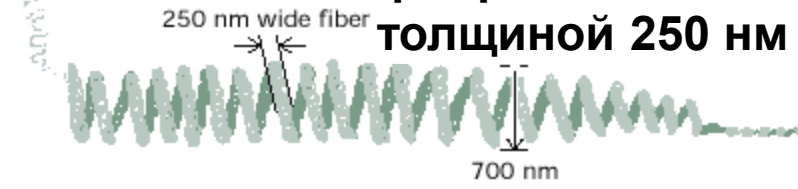
петли длиной 300 нм



30-нм фибриллы



фибриллы  
толщиной 250 нм



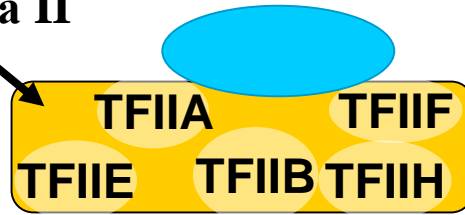
хроматиды в  
хромосоме



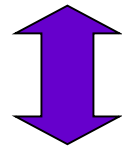


# КОНКУРЕНЦИЯ МЕЖДУ ГИСТОНЫМИ БЕЛКАМИ И ТРАНСКРИПЦИОННЫМИ ФАКТОРАМИ ЗА ДОСТУП К ДНК

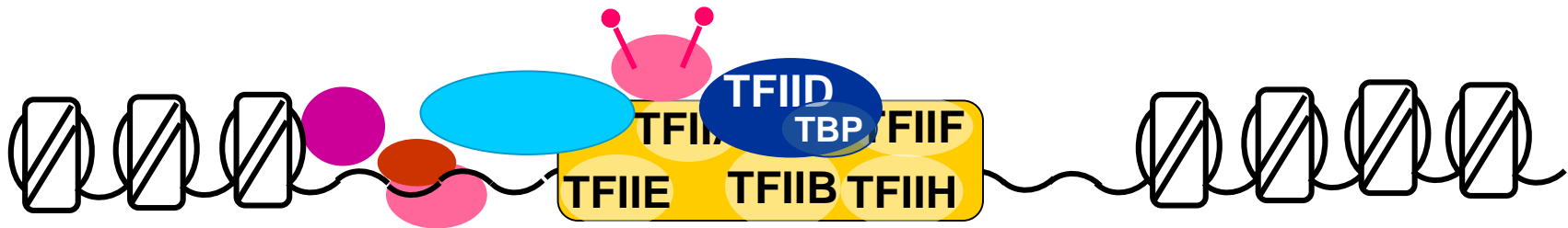
РНК полимераза II



Нуклеосомная упаковка ДНК препятствует взаимодействию ДНК с мультибелковым комплексом, включающим РНК-полимеразу и базальные транскрипционные факторы



Нуклеосомы

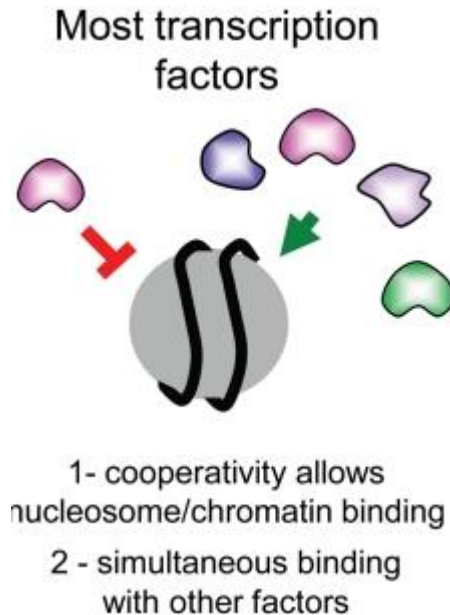


Отсутствие нуклеосомной упаковки в окрестностях старта транскрипции создает условия для контакта регуляторных белков с ДНК и формирования базального транскрипционного комплекса (ПБК)

# ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ ДЕЛЯТСЯ НА ДВЕ ГРУППЫ ПО СПОСОБНОСТИ СВЯЗЫВАТЬСЯ С САЙТАМИ НА ДНК В СОСТАВЕ НУКЛЕОСОМЫ:

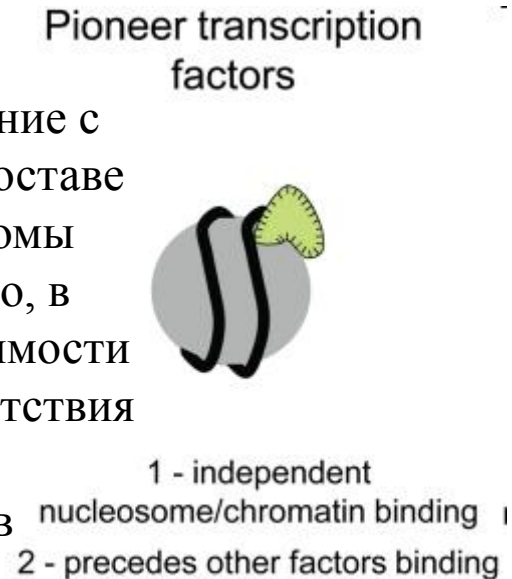
**- НЕ СПОСОБНЫЕ К СВЯЗЫВАНИЮ С ДНК В СОСТАВЕ НУКЛЕОСОМ**

Связывание с ДНК в составе нуклеосомы возможно, только если ТФ скооперируются с другими ТФ



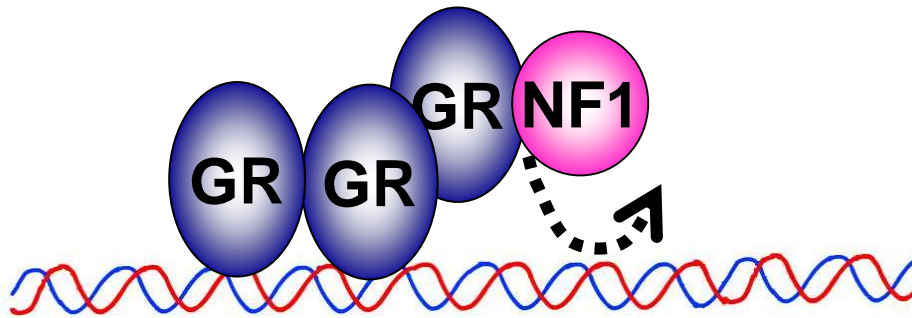
**- СПОСОБНЫЕ СВЯЗЫВАТЬСЯ С ДНК В СОСТАВЕ НУКЛЕОСОМ (ПИОНЕРНЫЕ ТФ);**

Связывание с ДНК в составе нуклеосомы возможно, в независимости от присутствия других факторов

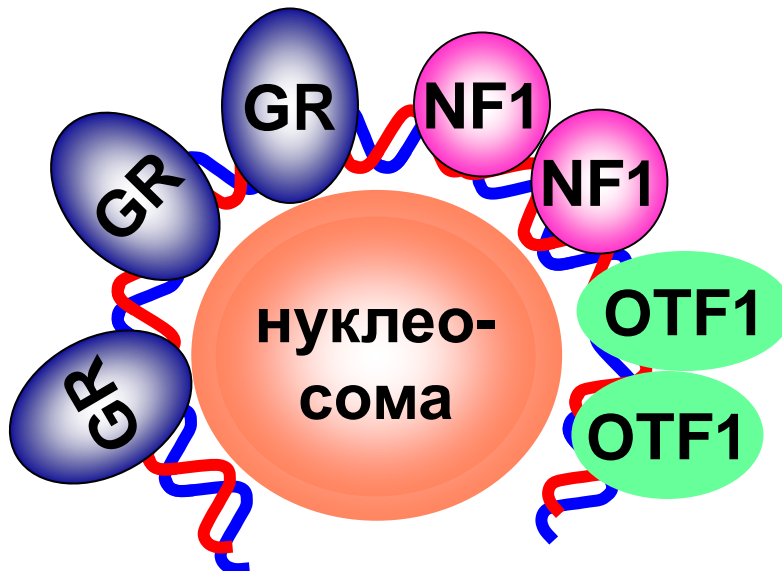


**ОБРАТНАЯ СИТУАЦИЯ: нуклеосомная укладка ДНК является необходимым условием для взаимодействия с белками.**

**Промотор MMTV (Mouse mammary tumor virus = вирус опухоли молочной железы мышей) - транскрипционные факторы взаимодействуют с сайтами на ДНК, только если ДНК имеет нуклеосомную укладку.**

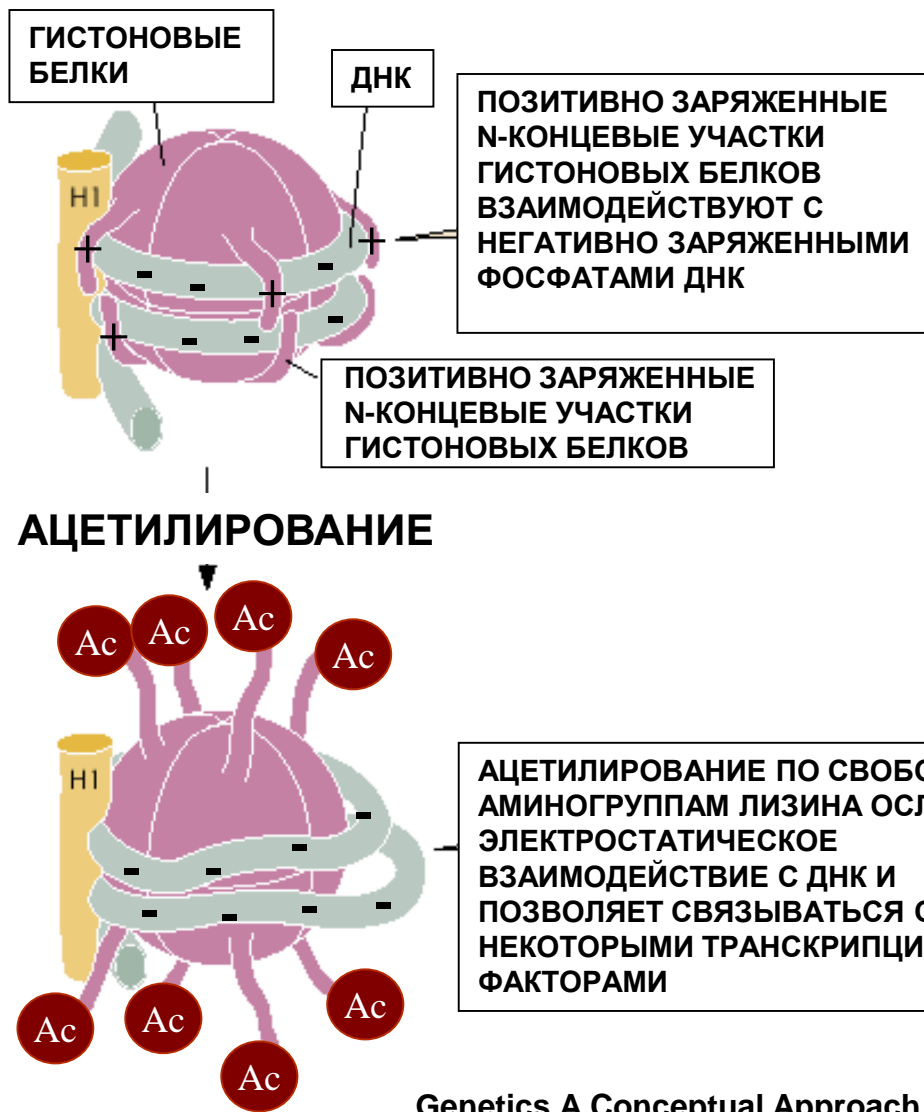


Свободная ДНК:  
Транскрипционные факторы GR и NF1 конкурируют друг с другом за связывание с близко расположенными сайтами их связывания на ДНК



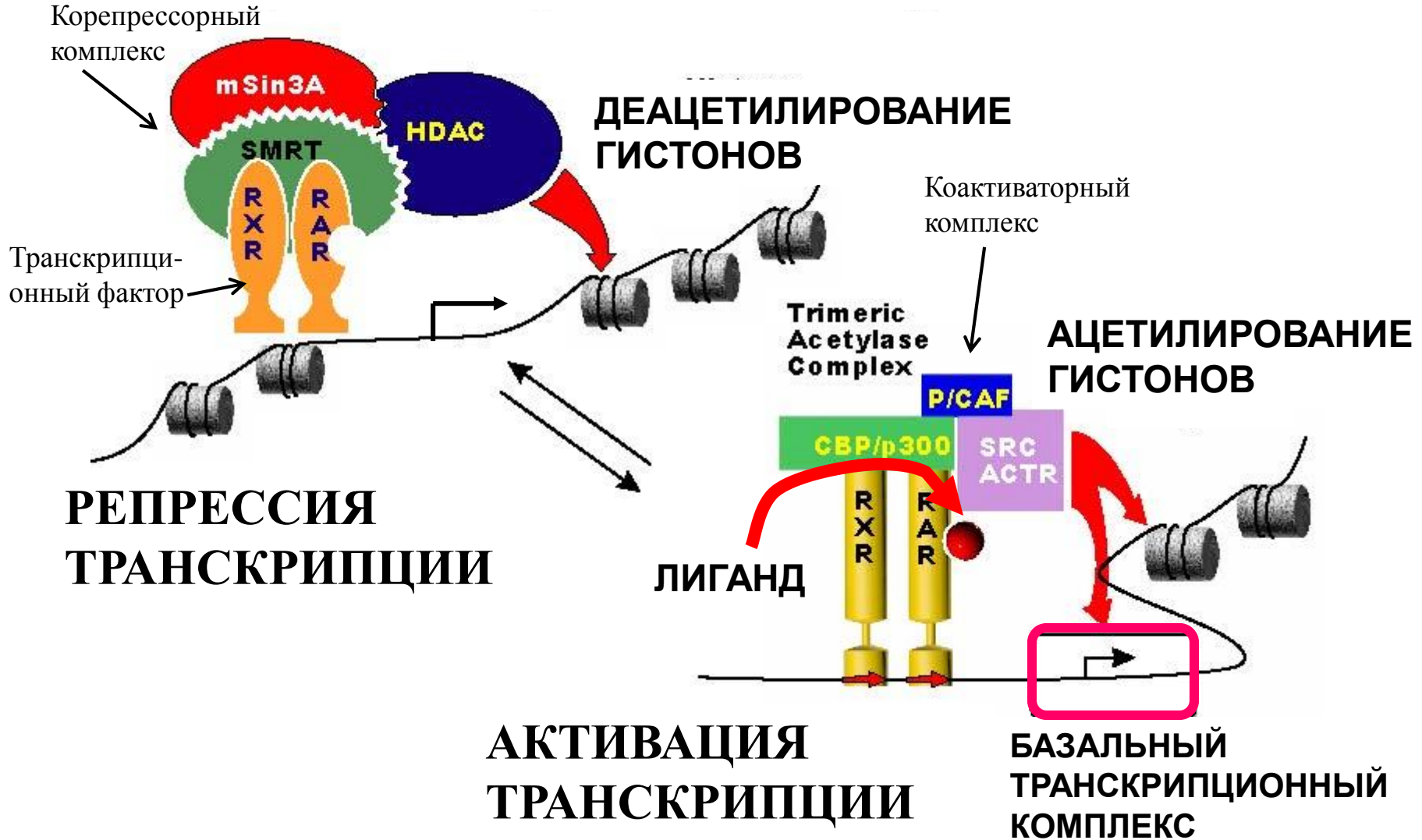
ДНК в составе нуклеосомы:  
GR и NF1 одновременно связываются с ДНК, только когда она изогнута на поверхности нуклеосомы

# Влияние ацетилирования N-концевых фрагментов гистоновых белков на плотность нуклеосомной укладки



Концевые фрагменты гистоновых белков имеют высокое содержание положительно заряженных (основных) аминокислотных остатков (лизина и аргинина). Суммарный положительный заряд концевых фрагментов гистонов, экспонированных на поверхности белковой глобулы, обеспечивает их плотный контакт с отрицательно заряженными фосфатами сахарофосфатного остова ДНК. Это взаимодействие стабилизирует комплекс ДНК с белками

# Механизм регуляции плотности нуклеосомной укладки при активации транскрипционного фактора RXR/RAR под действием лиганда



# МОДИФИКАЦИИ ХРОМАТИНА :

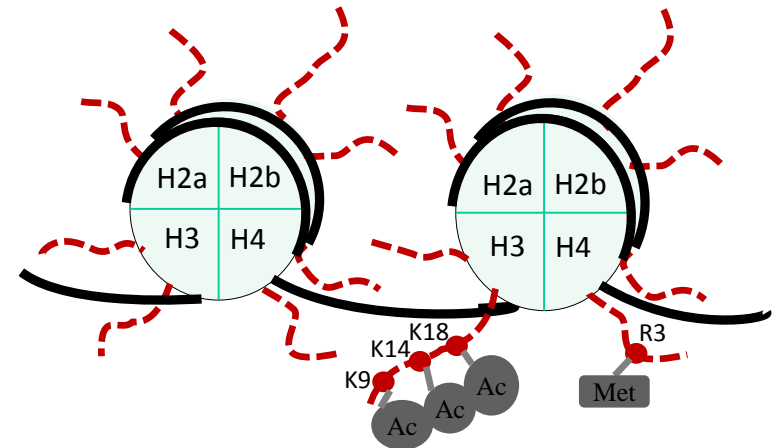
## ДНК

Метилирование (и другие модификации) цитозина в составе ДНК



## БЕЛКИ

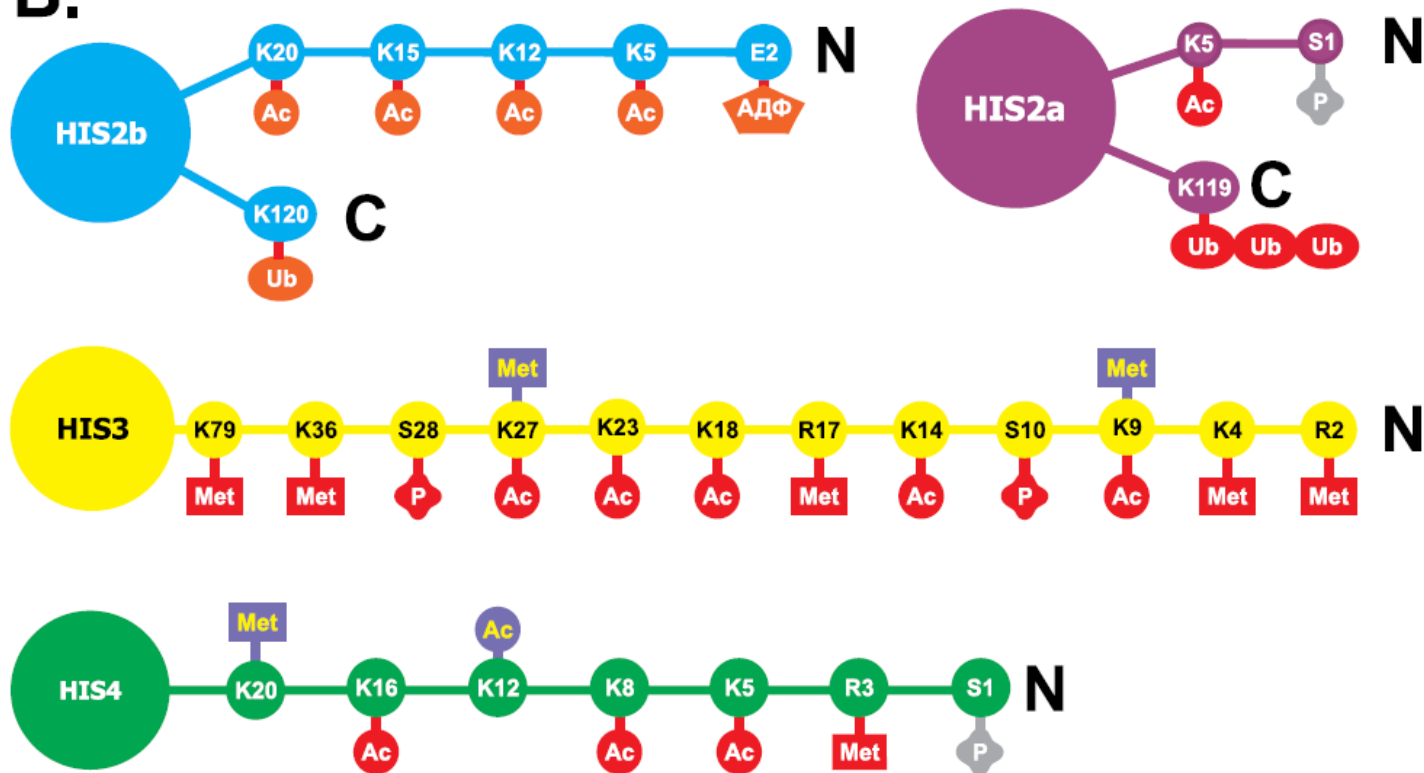
Посттрансляционные ковалентные модификации гистоновых белков.



Модификациям, как правило, подвергаются N-концевые участки гистонов, не входящие в состав нуклеосомной глобулы и остающиеся экспонированными на ее поверхности.

# ВАРИАНТЫ КОВАЛЕНТНЫХ МОДИФИКАЦИЙ ГИСТОНОВ

Б.



Подлежащие модификации аминокислоты в концевых фрагментах гистонов обозначены однобуквенным кодом и номером, соответствующим положению начиная с N-конца молекулы.

Ac – ацетилирование, Met – метилирование, P-фосфорилирование, Ub-убиквитинилирование, АДФ-рибозилирование.

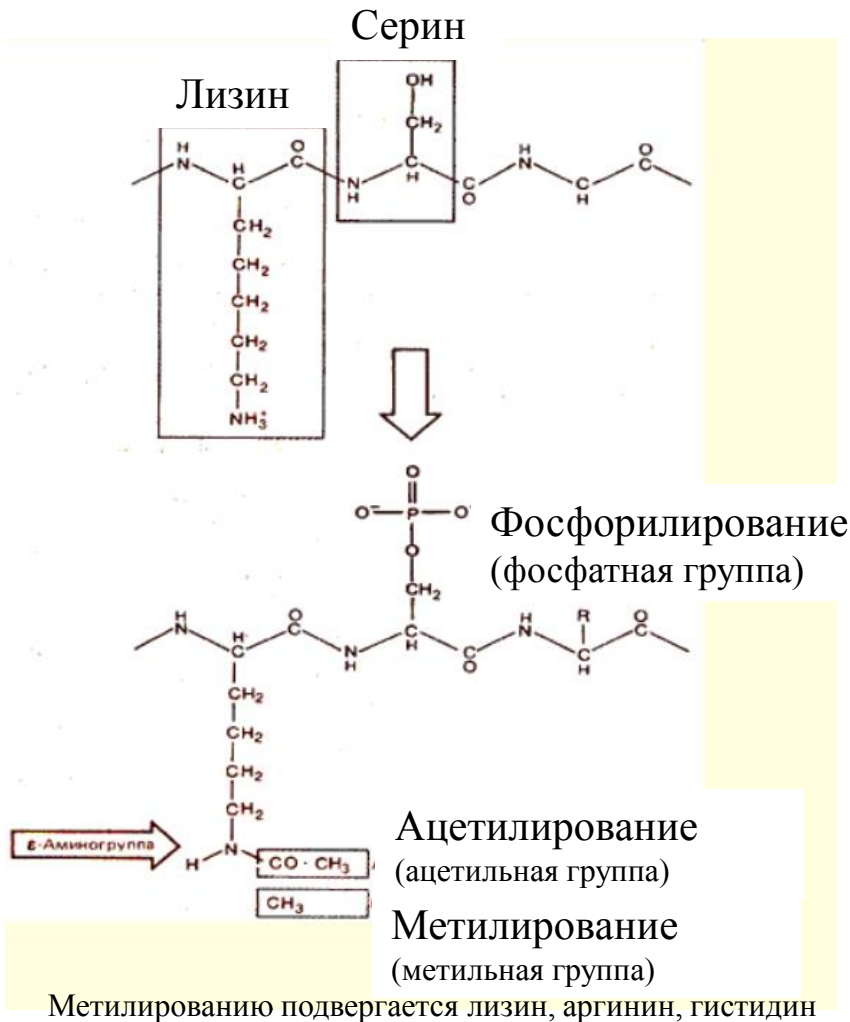
К – лизин, R – аргинин, E – глутамин, S-серин

Синим цветом обозначены модификации, характерные для репрессированного хроматина, красным – для активного.

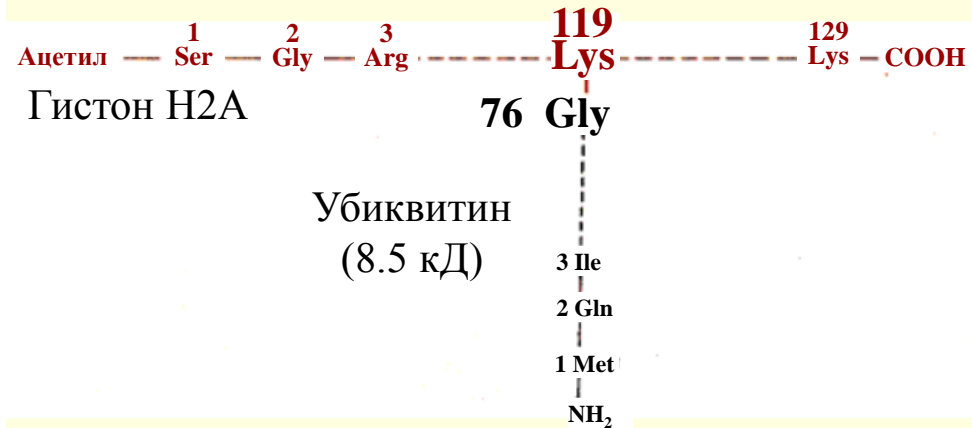
Серым цветом обозначены модификации, связанные с конденсацией хромосом при митозе либо гаметогенезе.

# СУЩНОСТЬ НЕКОТОРЫХ МОДИФИКАЦИИ ГИСТОНОВЫХ БЕЛКОВ

## Ацетилирование, метилирование, фосфорилирование:



## Убиквитинирование – присоединение белка убиквитина .



Убиквитин содержит 76 остатков (сравним с гистоном H2A, содержащим примерно 130 остатков). Изопептидная связь образуется между С-концевым глицином убиквитина и свободной ε-NH<sub>2</sub>-группой лизина в положении 119 гистона H2A. (Названием *изопептидная связь* подчеркивается, что данная εNH<sub>2</sub>-группа - это не обычная аминогруппа, участвующая в образовании пептидной связи.) Убиквитин - кислый белок, в котором содержание глутаминовой и аспарагиновой кислот таково, что общее отношение основные/кислые аминокислоты во вновь образованном конъюгированном белке оказывается пониженным.

**Сумоилирование** – присоединение небольших (молекулярная масса 12 кД) белков семейства SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier). Сумоилированию подвергается лизин.



# МОДИФИКАЦИИ ХРОМАТИНА И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ТРАНСКРИПЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ ГЕНОВ <sup>1</sup>

Тип модификации	Позиция(и) <sup>2</sup>	Влияние на транскрипцию
<b>Метилирование ДНК</b>		
<b>Метилирование цитозина</b>	<b>СрG острова</b>	<b>Репрессия</b>
<b>Ковалентные модификации гистонов</b>		
<b>Ацетилирование лизина</b>	<b>H3 (9, 14, 18, 56), H4 (5, 8, 13, 16), H2A, H2B</b>	<b>Активация</b>
<b>Фосфорилирование серина или треонина</b>	<b>H3 (3, 10, 28), H2A, H2B</b>	<b>Активация</b>
<b>Метилирование аргинина</b>	<b>H3 (17, 23), H4 (3)</b>	<b>Активация</b>
<b>Метилирование лизина</b>	<b>H3 (4, 36, 79) H3 (9, 27), H4 (20)</b>	<b>Активация Репрессия</b>
<b>Убиквитинирование лизина</b>	<b>H2B (123<sup>3</sup>/120<sup>4</sup>) H2A (119<sup>4</sup>)</b>	<b>Активация Репрессия</b>
<b>Сумоилирование лизина</b>	<b>H2B (6/7), H2A (126)</b>	<b>Репрессия</b>
<b>Изомеризация пролина</b>	<b>H3 (30–38)</b>	<b>Активация /Репрессия</b>

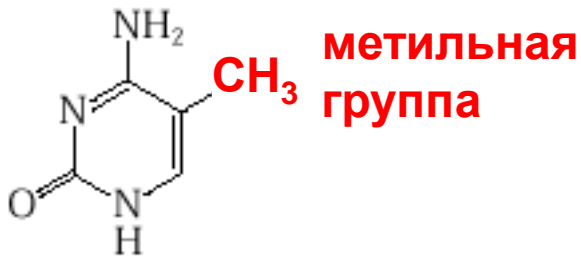
<sup>1</sup> - представлено по данным (Berger S.L. 2007)

<sup>2</sup> - позиции хорошо исследованных сайтов с указанием геномной локализации метилированной ДНК или локализации аминокислотных остатков, подвергшихся посттрансляционным модификациям.

<sup>3</sup> - дрожжи

<sup>4</sup> - млекопитающие

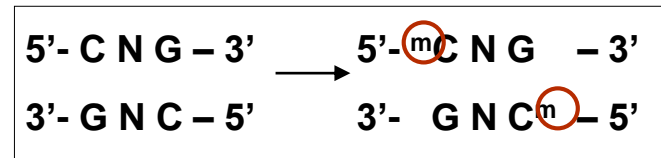
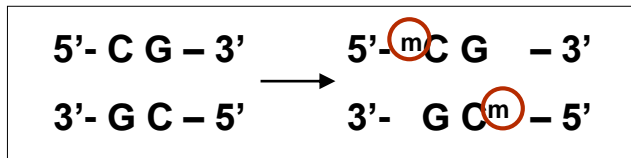
**В ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ УРОВЕНЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК ЧАСТО КОРРЕЛИРУЕТ С УРОВНЕМ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА. МЕТИЛИРОВАННЫЕ УЧАСТКИ ДНК ТРАНСКРИБИРУЮТСЯ МЕНЕЕ АКТИВНО, ЧЕМ НЕМЕТИЛИРОВАННЫЕ УЧАСТКИ**



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

**5-метилцитозин**

**НАИБОЛЕЕ ЧАСТО МЕТИЛИРОВАНИЮ ПОДВЕРГАЮТСЯ ЦИТОЗИНОВЫЕ НУКЛЕОТИДЫ, В СОСТАВЕ CG-ДИНУКЛЕОТИДОВ ЛИБО CNG-ТРИНУКЛЕОТИДОВ**



У млекопитающих метилирование по цитозину в позиции C5 осуществляется, преимущественно, в динуклеотидах CpG. Метилирование осуществляется ферментами DNMT (DNA methyltransferase).

# Код модификаций хроматина (сложность)

**Код модификаций хроматина** - разнообразный набор **модификаций** гистоновых белков и цитозина в составе ДНК. Характеризует различные состояния хроматина (активный, неактивный и т.п.)

1) **Возможные модификации гистоновых белков (11):**

ацетилирование, метилирование, фосфорилирование, АДФ-рибозилирование, деиминирование, убиквитинирование, сумоилирование, присоединение N-ацетилглюкозамина, удаление концевых участков гистоновых белков (*Histone tail clipping*), изомеризация пролина

2) **Варианты модификаций гистоновых белков:**

- модификациям могут подвергаться аминокислотные остатки как на N- так и на C-концевых участках гистонов;
- каждый гистон может иметь модификации по нескольким позициям;
- боковая цепь остатка лизина может метилироваться несколько раз (моно-, ди-, триметилирование)

3) **Возможны** следующие модификации **цитозина в составе ДНК (4):**

- метилирование;
- 5'-гидроксиметилирование;
- карбоксилирование;
- формилирование (присоединение формильной группы)

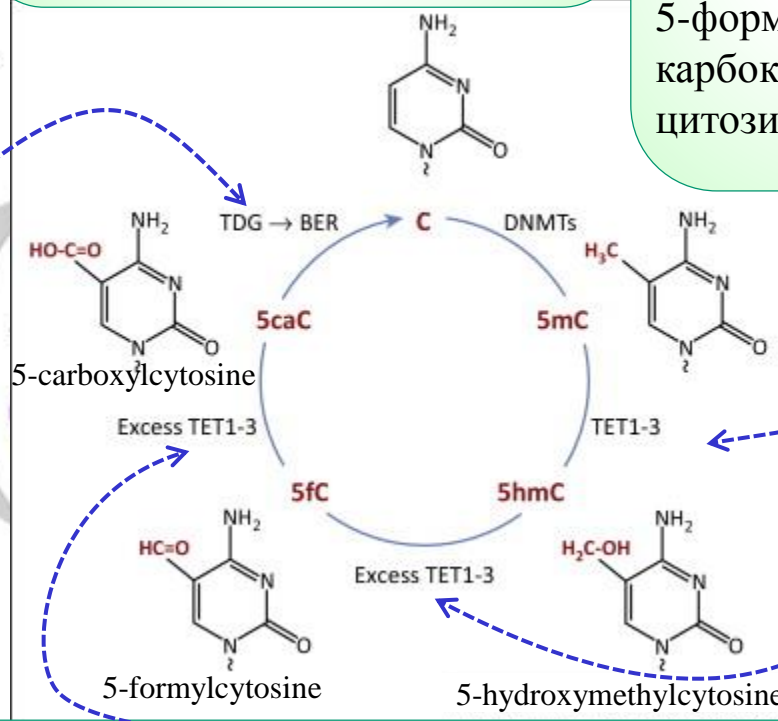
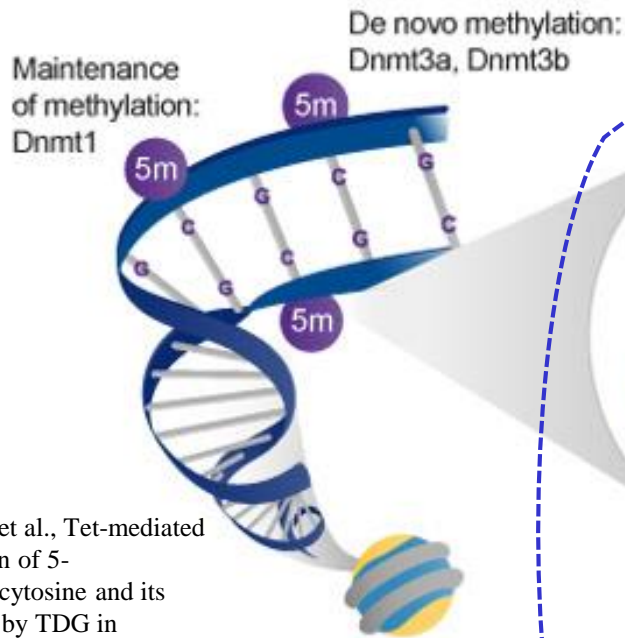
# Цикл модификаций цитозина

Метилирование осуществляется ферментами **DNMT** (DNA methyltransferase)

Фермент **DNMT1** – способен метилировать цитозин в составе CpG динуклеотида, только если цитозин в комплементарном CpG динуклеотиде тоже метилирован. Это механизм поддержания метилированного статуса ДНК во время репликации

**Шаг 1.** Ферменты **DNMT3a** и **DNMT3b** способны метилировать ДНК *de novo*, то есть CpG динуклеотиды, которые не имеют в комплементарной позиции метилированного цитозина.

**Шаг 2.** 5-метилцитозин подвергается воздействию ферментами семейства ТЕТ (ten–eleven translocation family of dioxygenases) с образованием 5-гидрокси-метилцитозина (5-hmC), 5-формил- (5-fC) и 5-карбокси- (5-caC) цитозина.

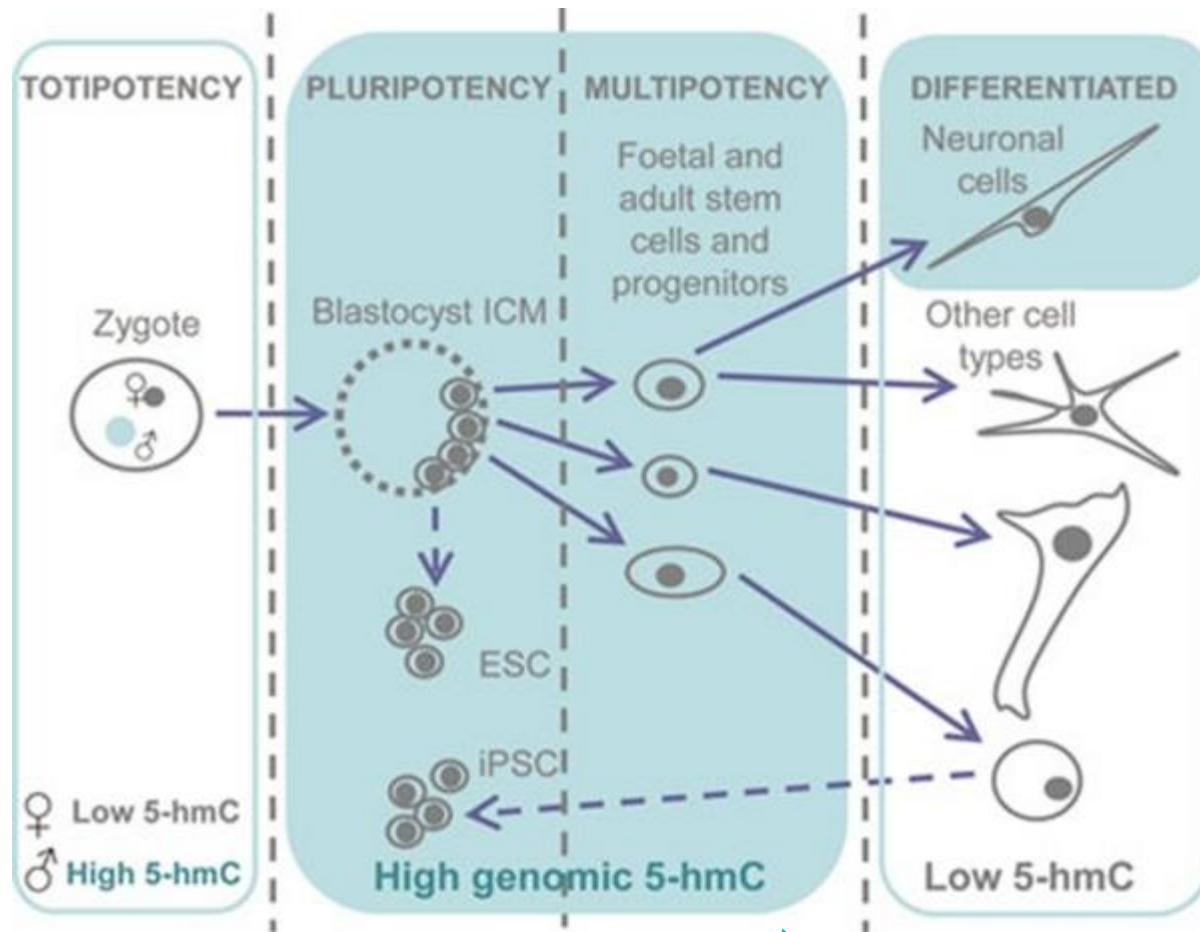


Epigenetic mechanisms of importance for drug treatment. Trends in Pharmacological Sciences, 2014, 35, (8):384–396

He YF, et al., Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA.. Science 333 (6047): 1303–7.

**Шаг 3.** Карбоксильная группа опознается и удаляется тимин-ДНК-гликозилазой (TDG). В дальнейшем сайт подвергается эксцизионной репарации (BER= base excision repair), и образуется цитозин.

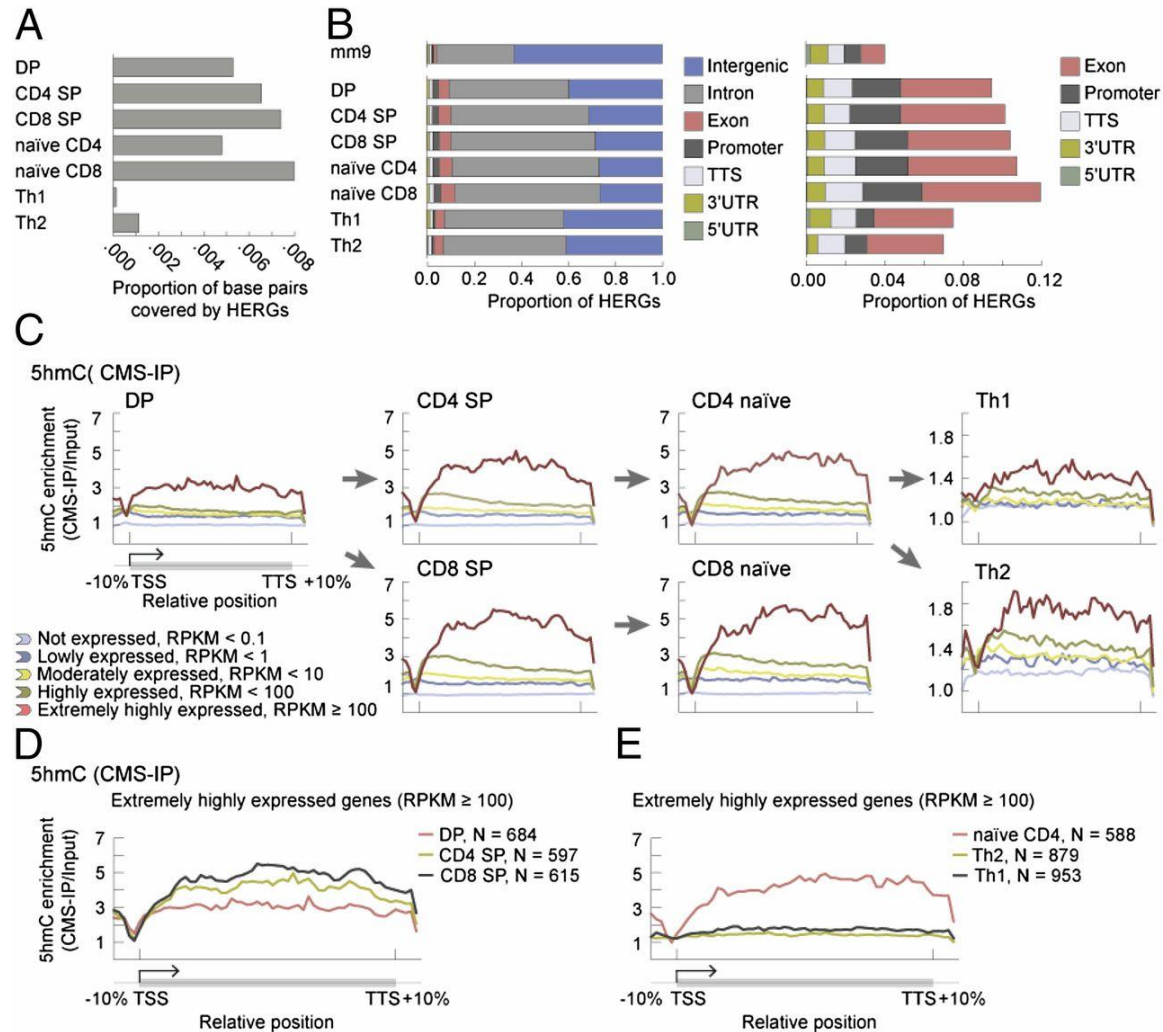
# Содержание 5-гидрокси-метилцитозина (5-hmC) в клетках в ходе развития млекопитающих



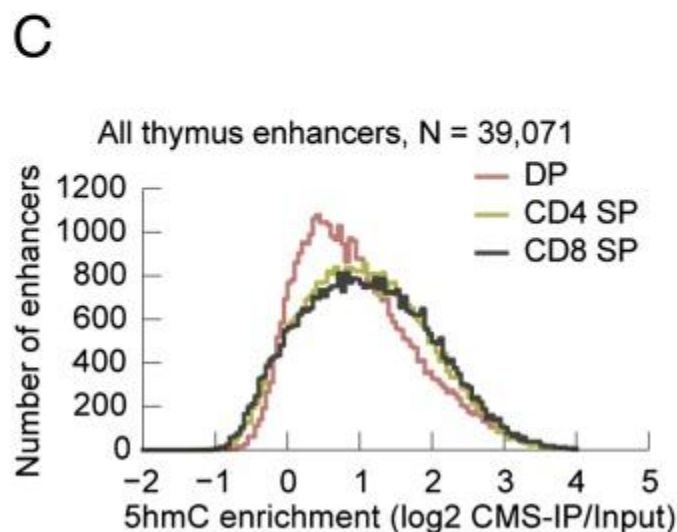
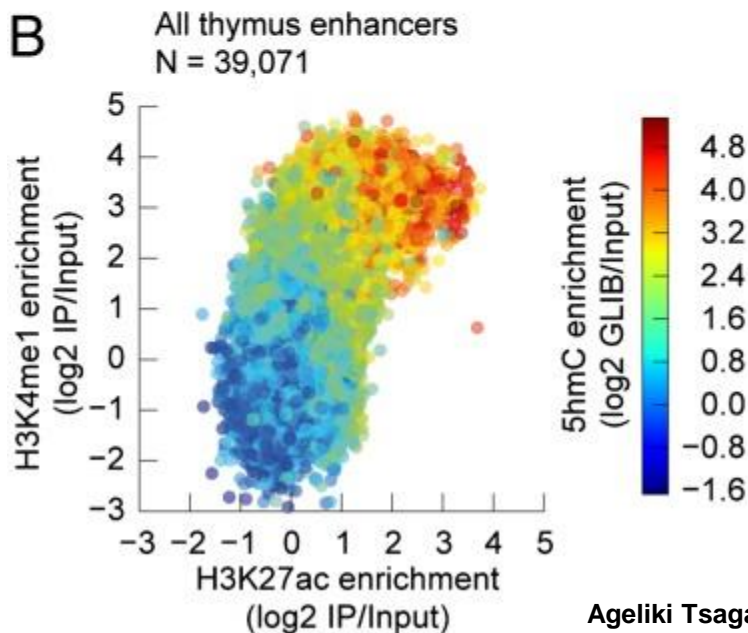
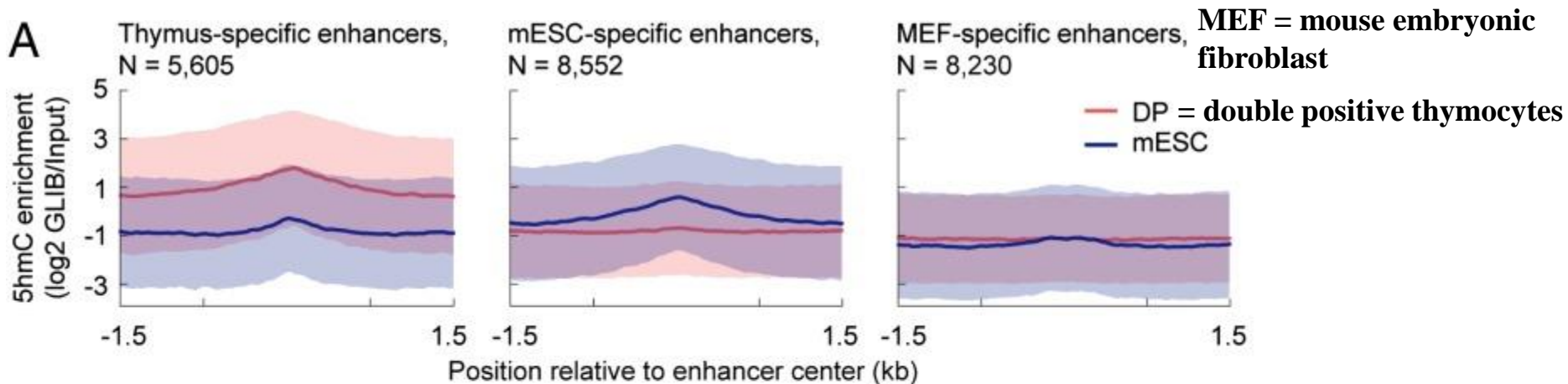
Высокое содержание 5-hmC

# Гены, экспрессирующиеся на высоком уровне, имеют высокое содержание 5-гидрокси-метилцитозина (Т-клетки мыши)

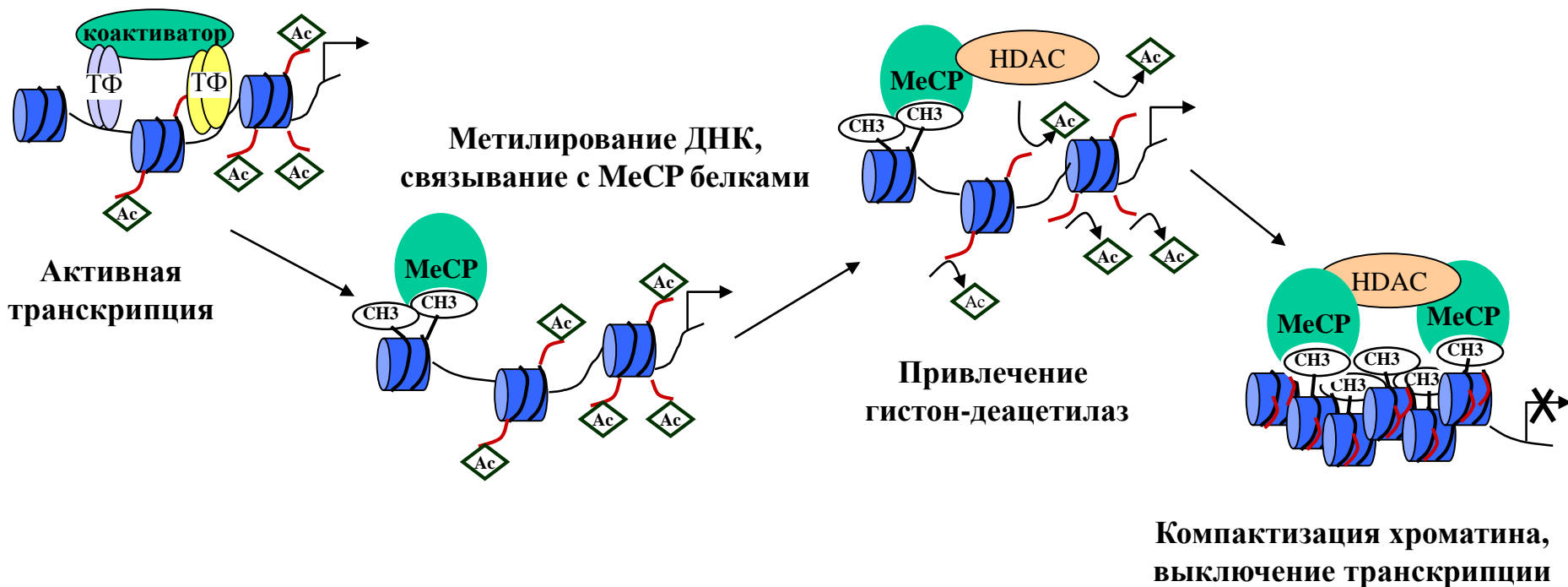
## HERGs = 5hmC-enriched regions of the genome



# Энхансеры , обеспечивающие высокую ткане-специфическую экспрессию генов, имеют высокое содержание 5-гидрокси-метилцитозина



# Схематическое представление механизма подавления транскрипции генов, инициированного метилированием ДНК и последующим привлечением гистон-деацетилаз.

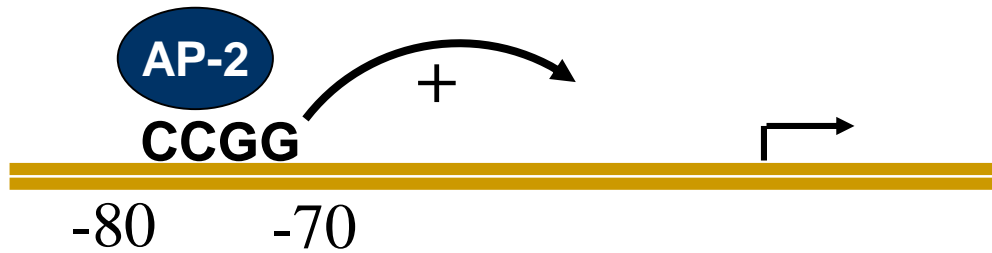


MeCP - метил-CpG-связывающие белки ,  
HDAC – гистон-деацетилаза.

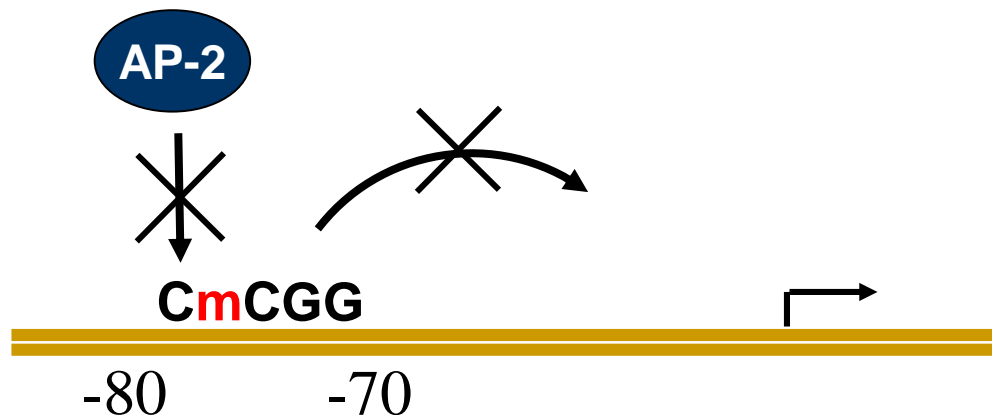


Метилирование нуклеотидов в пределах сайтов связывания транскрипционных факторов затрудняет их специфическое взаимодействие с факторами.

ПРИМЕР: ген проэнкефалина человека содержит сайт связывания транскрипционного фактора AP-2 районе -80/-70 от старта транскрипции.



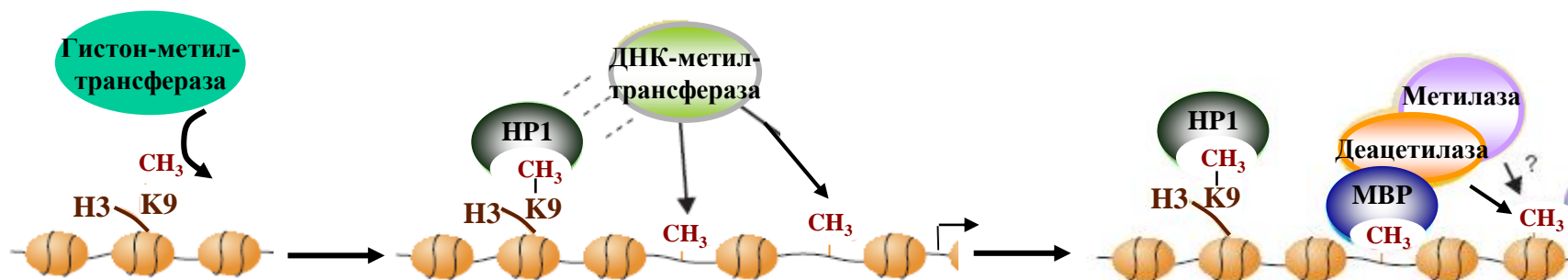
Если сайт связывания AP-2 находится в деметилированном состоянии, AP-2 эффективно взаимодействует с этим сайтом, что приводит к активации транскрипции гена



Метилирование нарушает связывание белка AP-2 с ДНК и транскрипция снижается

# МЕХАНИЗМ, СОПРЯГАЮЩИЙ ПРОЦЕССЫ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГИСТОНОВ И МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК

предложен по результатам исследования на модельном организме *Neurospora crassa*  
(Нейроспора густая из рода «Красная хлебная плесень»)



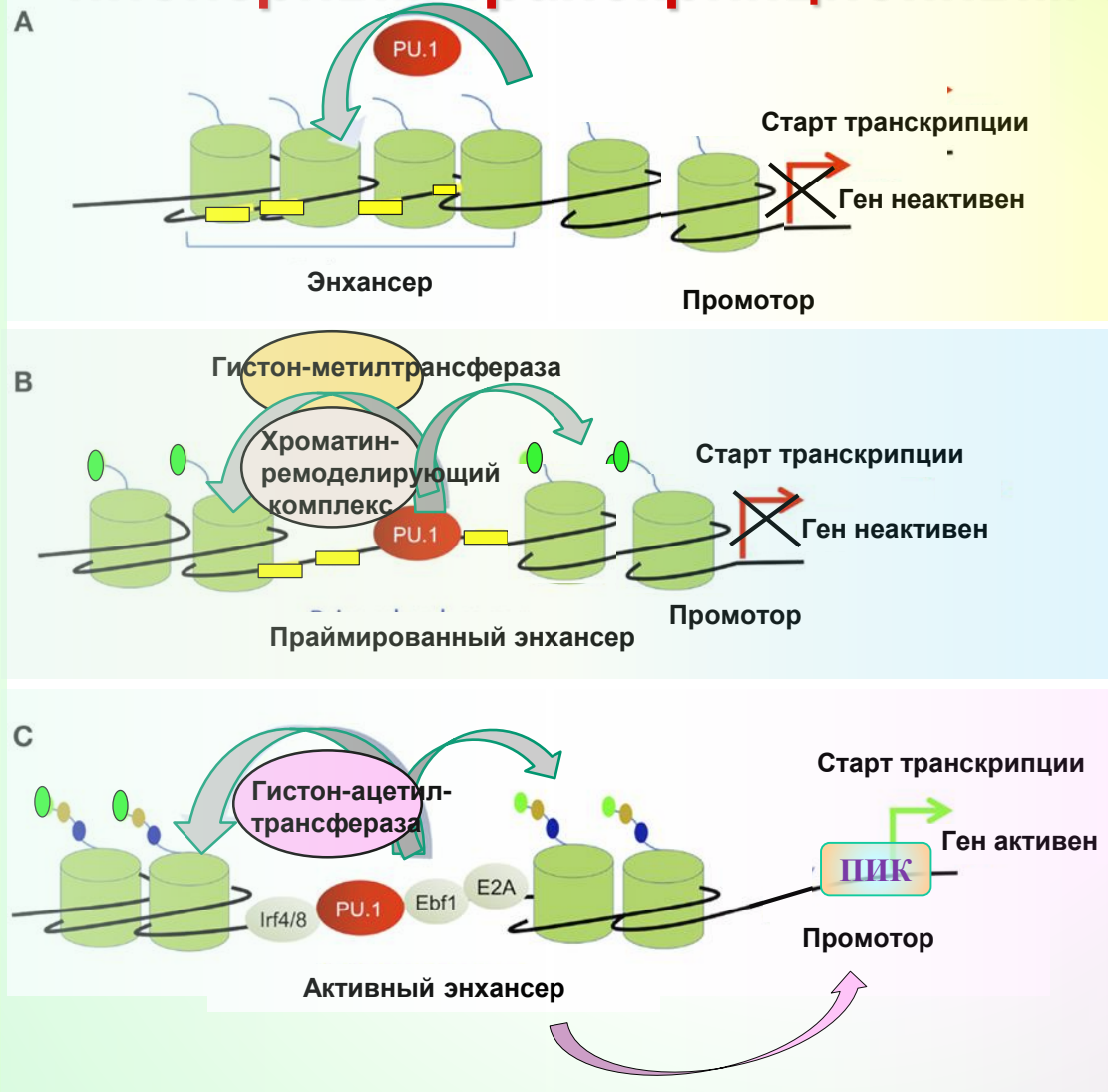
## Основные этапы:

- 1) Метилирование лизина H3-K9 при участии гистон-метилтрансфераз (например, Suvar39h).
- 2) Возникновение высокоаффинного участка связывания структурного белка гетерохроматина HP1.
- 3) Белок HP1 привлекает ДНК-метилтрансферазу, осуществляющую метилирование ДНК.
- 4) Метилированные участки ДНК взаимодействуют с MBR-белками, содержащими метил-связывающие домены (MBD).
- 5) MBR-белки оказывают дальнейшее инактивирующее влияние на хроматин, поскольку способны привлекать белки с деацетилазными активностями, и, весьма вероятно, с гистон-метилтрансферазными активностями.

Результат: стабилизация инактивированного состояния хроматина и его распространение вдоль хромосомы.

Tamaru H., Selker E.U. A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa* // *Nature*. 2001. V.414. N6861. P.277-283.

# Пошаговая упрощенная схема ремоделинга энхансерного хроматина, индуцированного пионерным транскрипционным фактором PU.1



- Пионерный транскрипционный фактор = фактор - «первопроходец»
- Другие транскрипционные факторы

Модификации хроматина

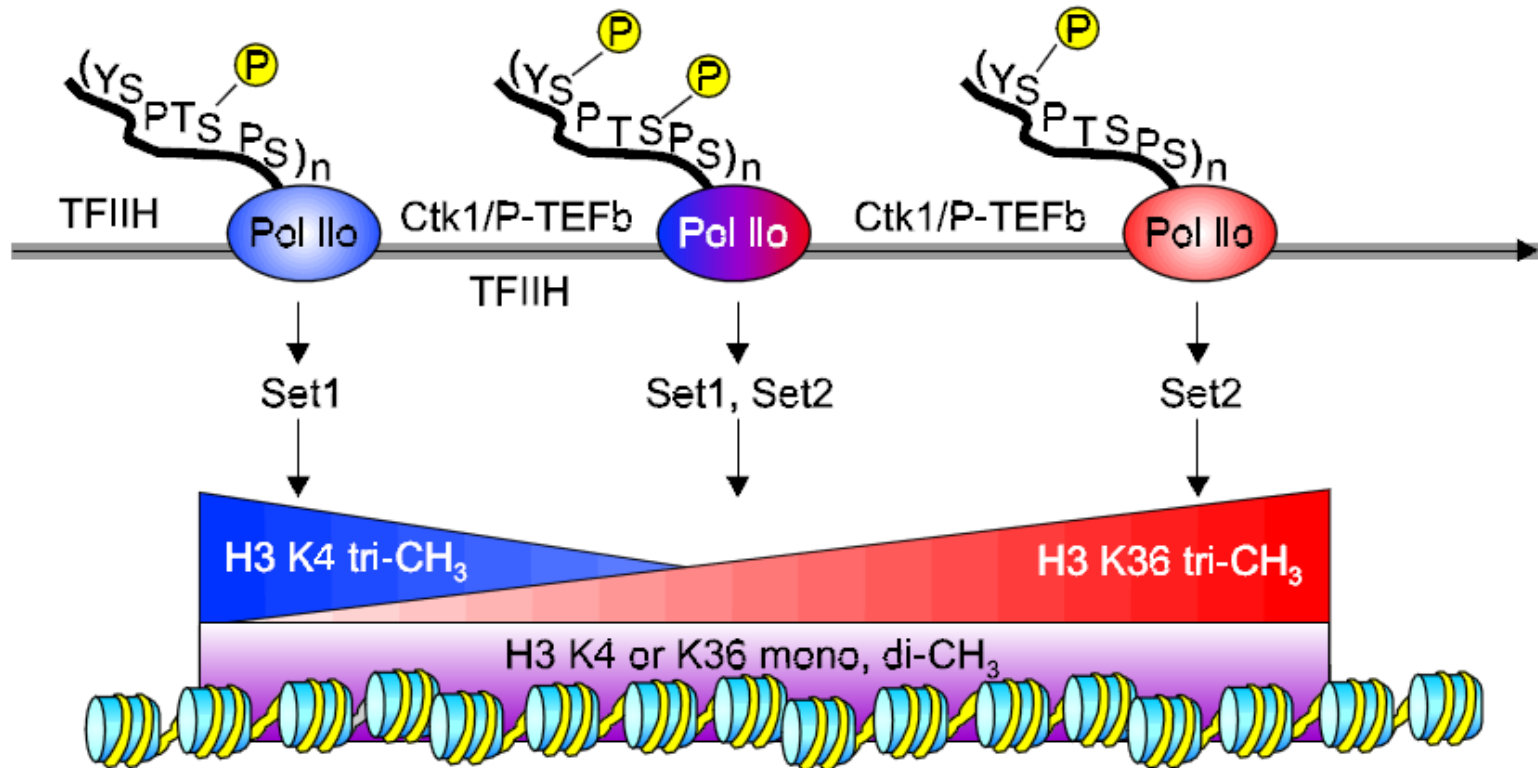
- H3K4me1
- H3K9ac
- H3K27ac

Сайты связывания транскрипционных факторов

ПИК Прединициационный комплекс

# МОДИФИКАЦИИ ХРОМАТИНА НА РАЗЛИЧНЫХ ЭТАПАХ ТРАНСКРИПЦИИ

Ранняя элонгация → Поздняя элонгация

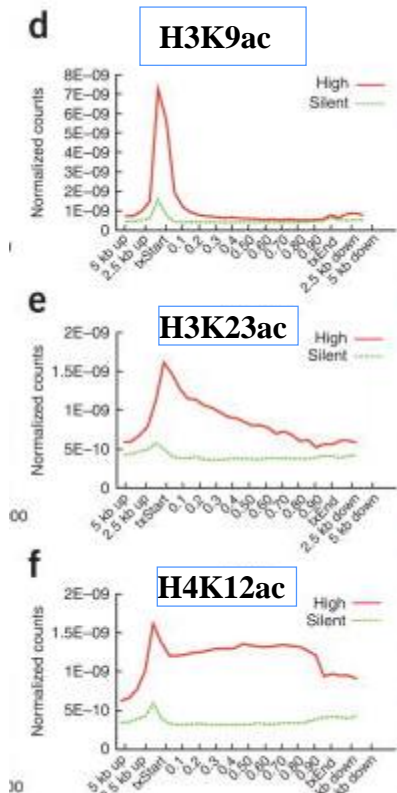


5'-район гена обогащен модификацией H3K4-triCH<sub>3</sub>, а 3'-район гена имеет маркер H3K36-triCH<sub>3</sub>. Метилирование лизина в позиции H3K4 осуществляется белками семейства Set1, а в позиции H3K36 - белками семейства Set2. Комплекс белков Set1 взаимодействует с транскрипционной машиной через S5 фосфорилированный CTD. Белки Set2 привлекаются по мере появления S2 фосфорилирования CTD.

# Типичные модификации хроматина на участке ДНК перед стартом транскрипции (CD4+ Т клетки человека)

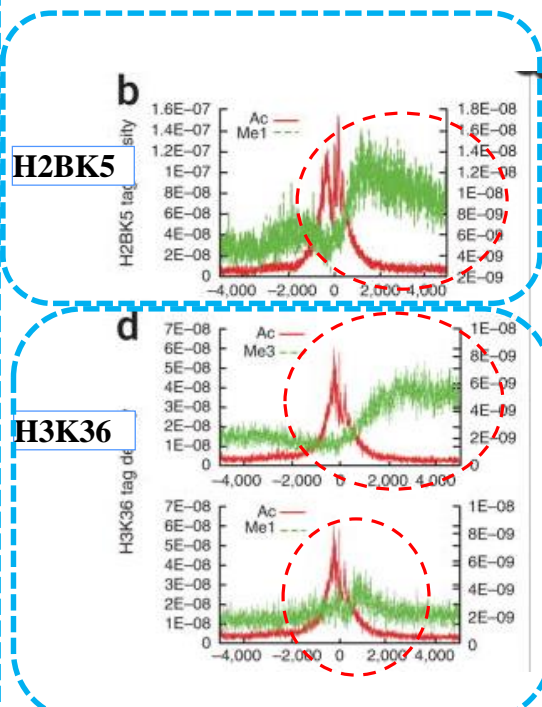
Паттерн ацетилирования гистонов перед стартом транскрипции и в теле гена

1000 высоко экспрессирующихся генов  
1000 «молчащих» генов

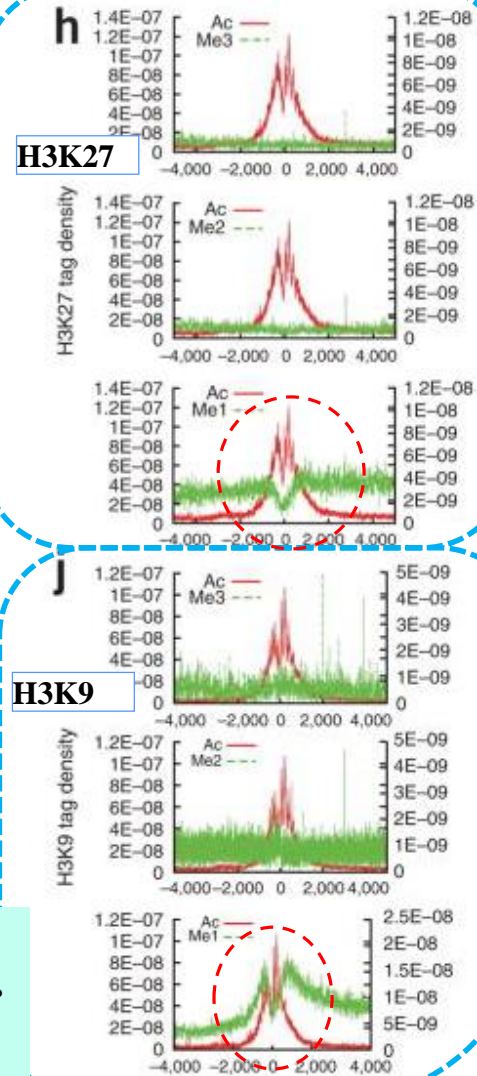


Ацетилирование гистонов положительно коррелирует с экспрессией генов

Пространственное распределение взаимно антагонистических маркеров хроматина вдоль участков активных генов (1000 генов)



Модификации H2BK5me1, H3K36me3, H3K27me1 встречались существенно чаще в центральной части транскрипта



Старт транскрипции  
Точка терминации транскрипции

Конец 3-ей лекции