

Механизмы регуляции транскрипции

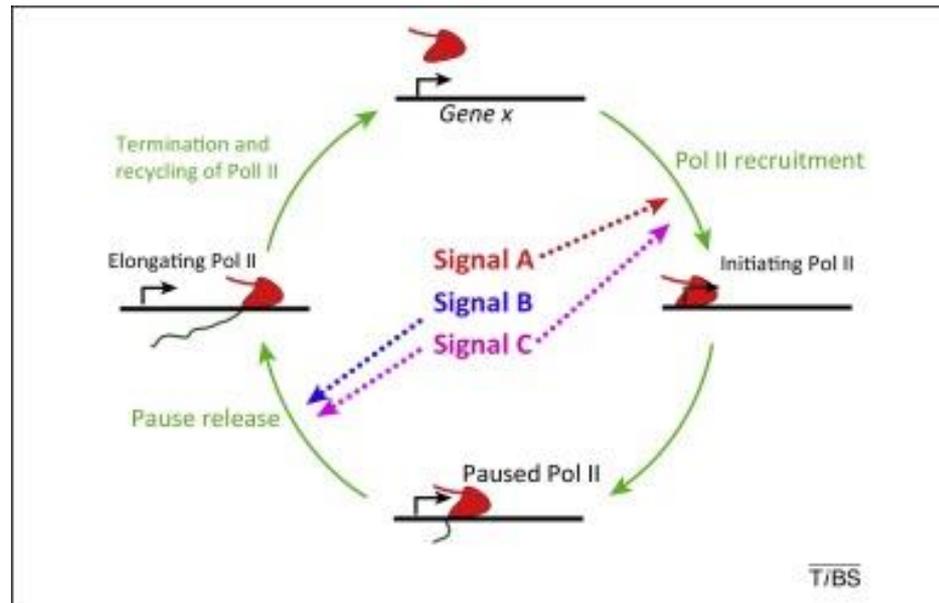
(Лекция 3)

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

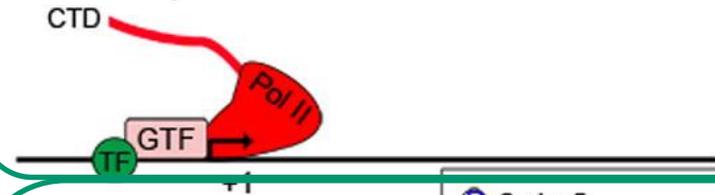


Этап регуляции транскрипции – остановка (pausing)
РНК-полимеразы на стадии начала элонгации



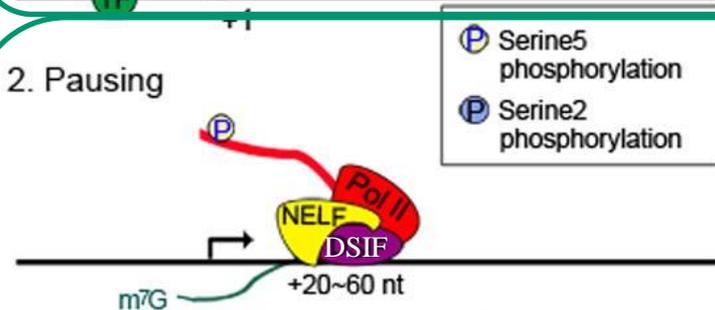
Дополнительный этап регуляции – остановка (pausing) РНК-полимеразы на стадии элонгации (начало)

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

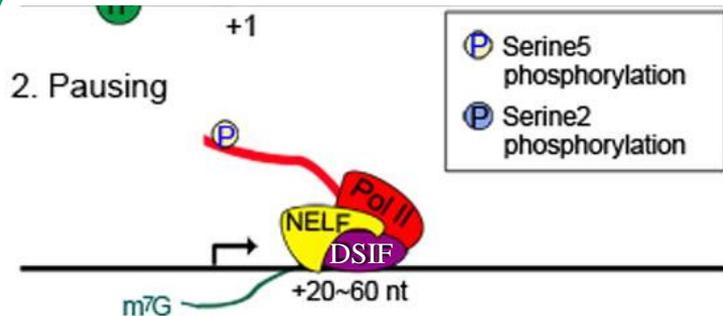


Этап 2: Pol II синтезирует РНК длиной 20-60 нуклеотидов и останавливается. Остановка происходит при участии факторов остановки (pausing factors):

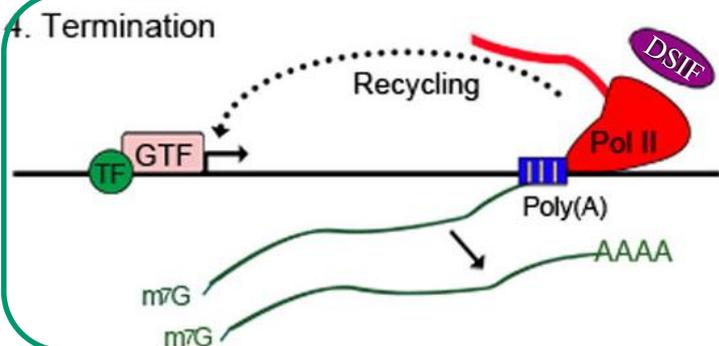
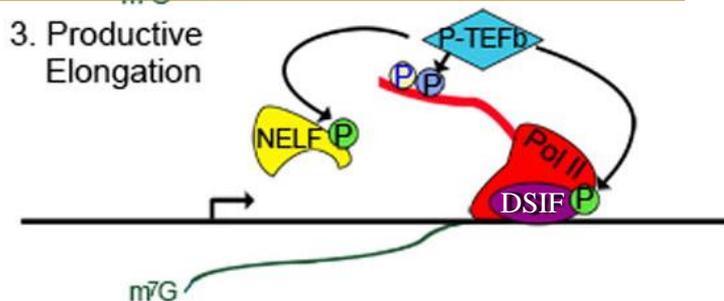
DSIF - the DRB sensitivity-inducing factor,
NELF - the negative elongation factor

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):

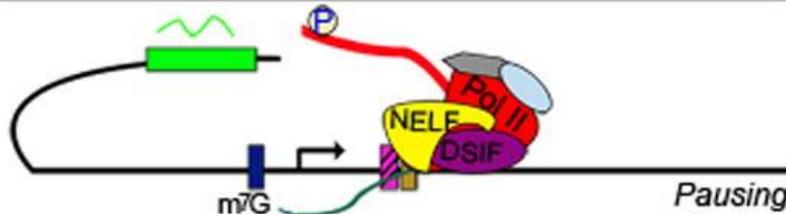
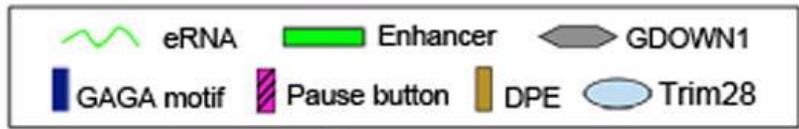
DSIF - the DRB sensitivity-inducing factor,
NELF - the negative elongation factor

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:

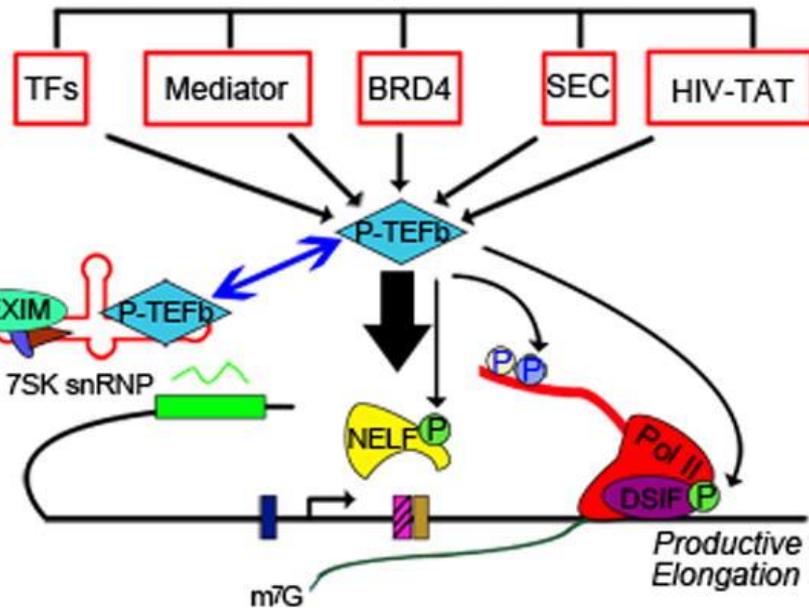
- Тепловом шоке (ТФ = HSF)

- Гипоксии (ТФ = HIF1 α)

- Воспалению (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;

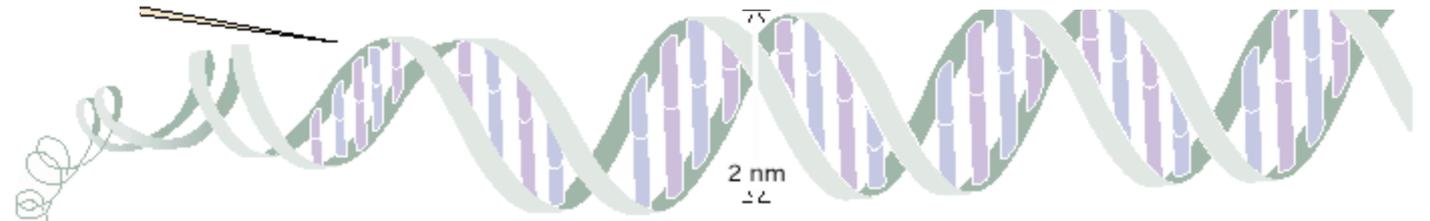
Г) Для достижения необходимого уровня транскрипции каждого гена, помимо базальных (общих) транскрипционных факторов, требуются другие белки (транскрипционные факторы, коактиваторы, корепрессоры, медиаторы и др.);

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

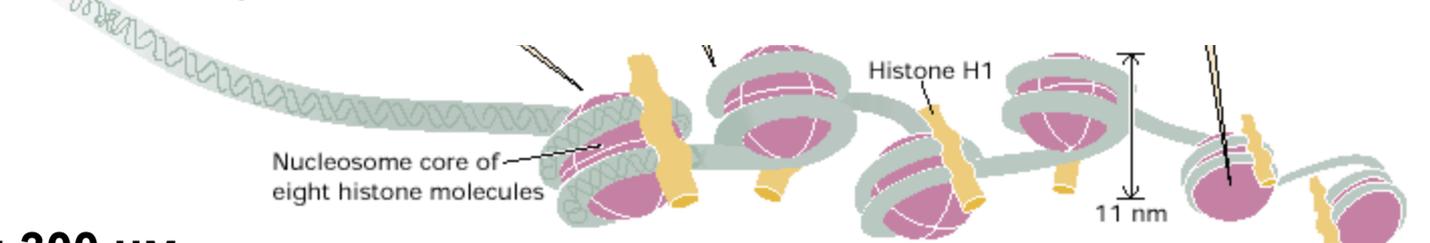
✓ **Е) Транскрипция генов эукариот зависит от состояния хроматина и плотности нуклеосомной упаковки.**

Уровни организации хроматина

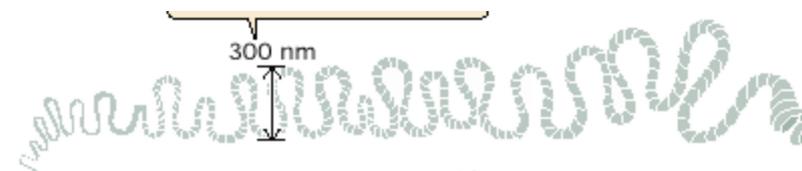
ДНК (двойная спираль)



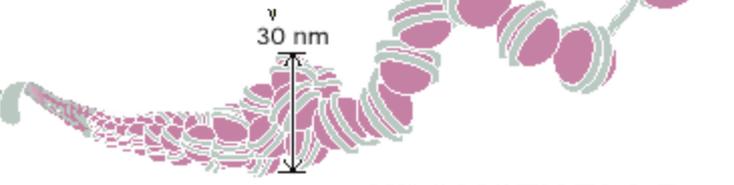
Нуклеосомы - комплекс ДНК с гистоновыми белками



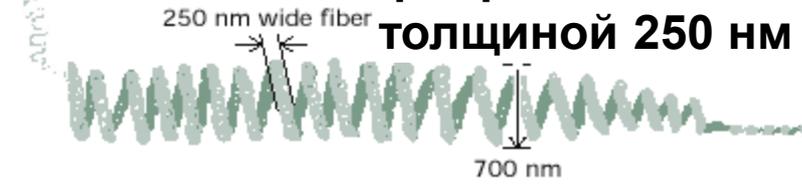
петли длиной 300 нм



30-нм фибриллы



фибриллы
толщиной 250 нм

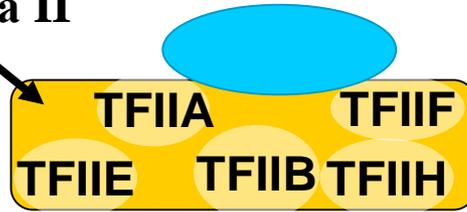


хроматиды в
хромосоме

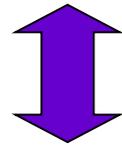


КОНКУРЕНЦИЯ МЕЖДУ ГИСТОНЫМИ БЕЛКАМИ И ТРАНСКРИПЦИОННЫМИ ФАКТОРАМИ ЗА ДОСТУП К ДНК

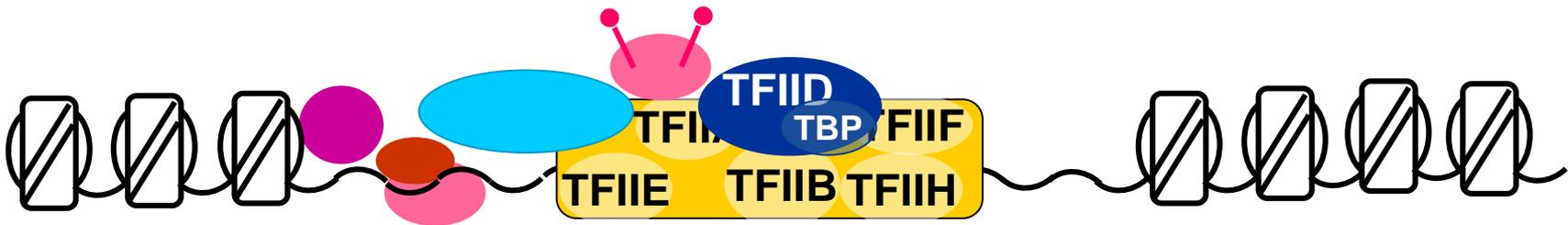
РНК полимераза II



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



Нуклеосомы

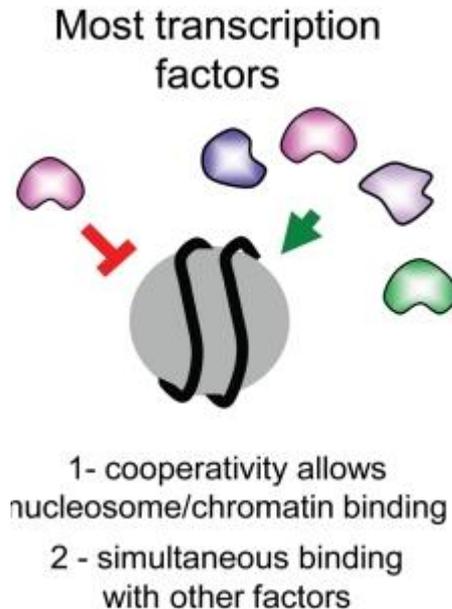


Отсутствие нуклеосомной упаковки в окрестностях старта транскрипции создает условия для контакта регуляторных белков с ДНК и формирования базального транскрипционного комплекса (ПБК)

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

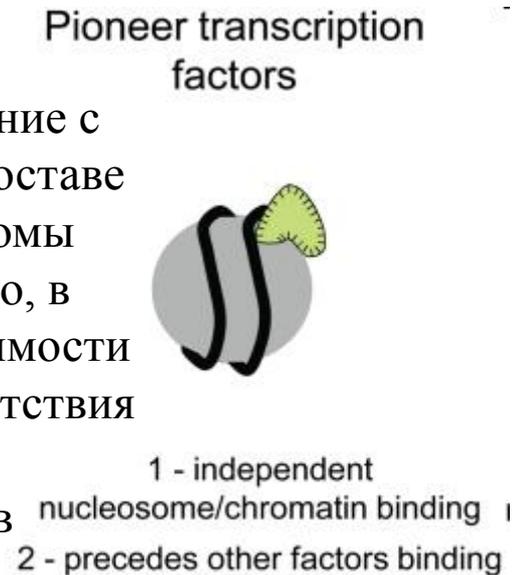
- НЕ СПОСОБНЫЕ К СВЯЗЫВАНИЮ С ДНК В СОСТАВЕ НУКЛЕОСОМ

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



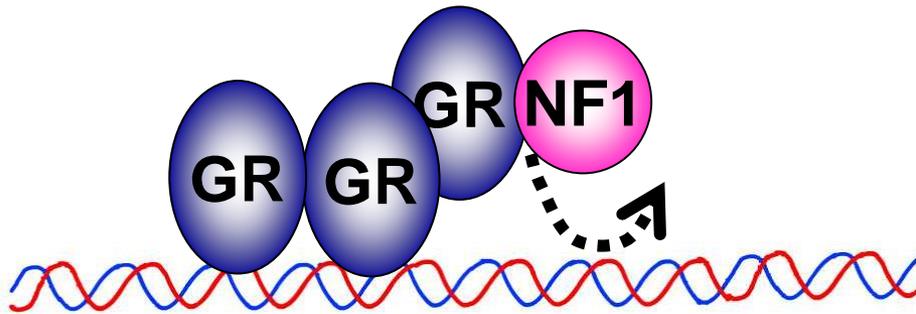
- СПОСОБНЫЕ СВЯЗЫВАТЬСЯ С ДНК В СОСТАВЕ НУКЛЕОСОМ (ПИОНЕРНЫЕ ТФ);

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

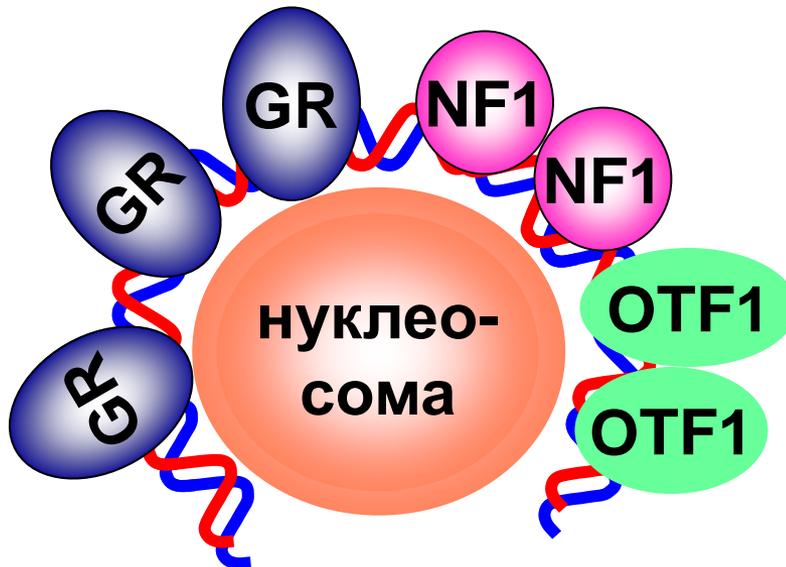


ОБРАТНАЯ СИТУАЦИЯ: нуклеосомная укладка ДНК является необходимым условием для взаимодействия с белками.

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

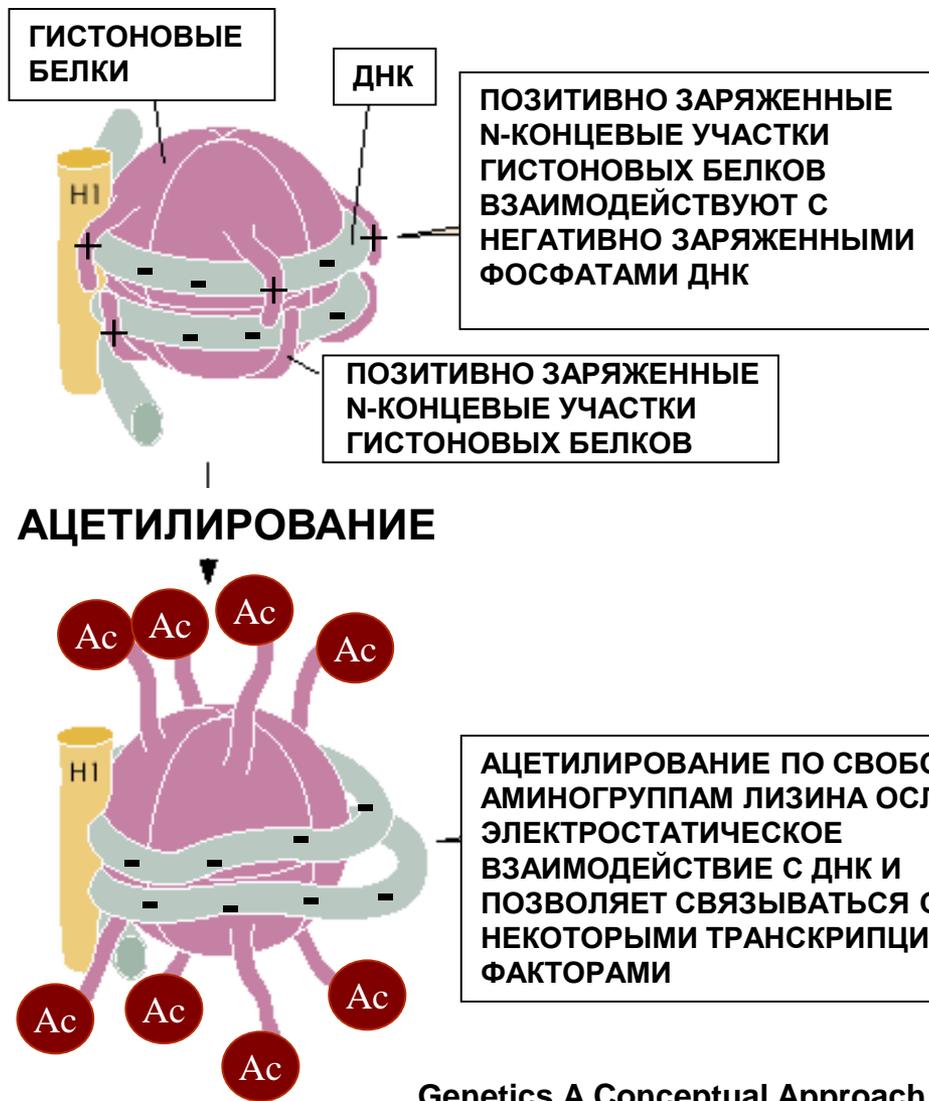


**Свободная ДНК:
Транскрипционные факторы GR и NF1 конкурируют друг с другом за связывание с близко расположенными сайтами их связывания на ДНК**



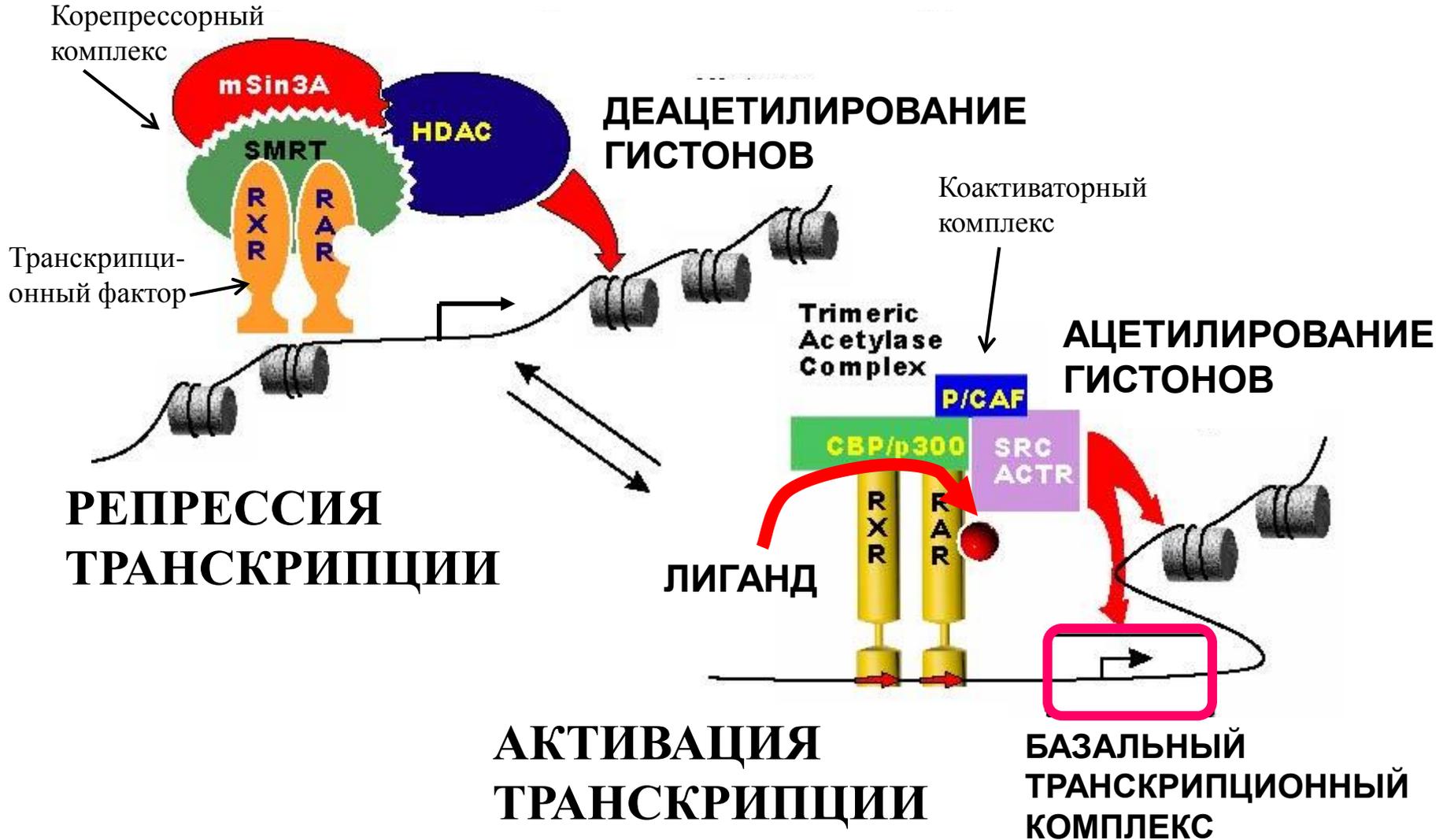
**ДНК в составе нуклеосомы:
GR и NF1 одновременно связываются с ДНК, только когда она изогнута на поверхности нуклеосомы**

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 :

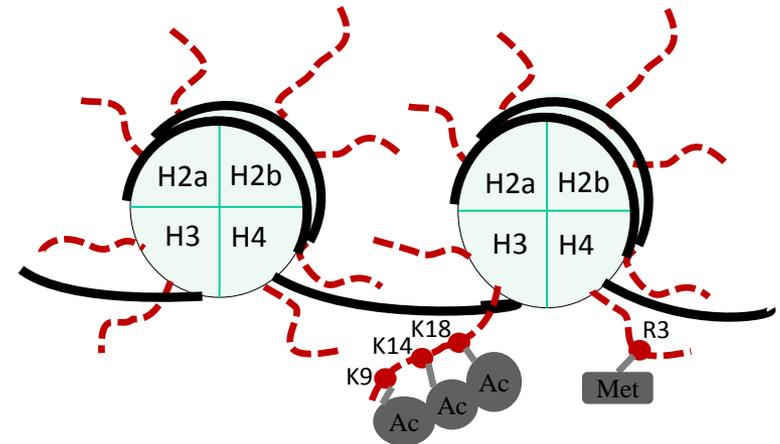
ДНК

Метилирование (и другие модификации) цитозина в составе ДНК



БЕЛКИ

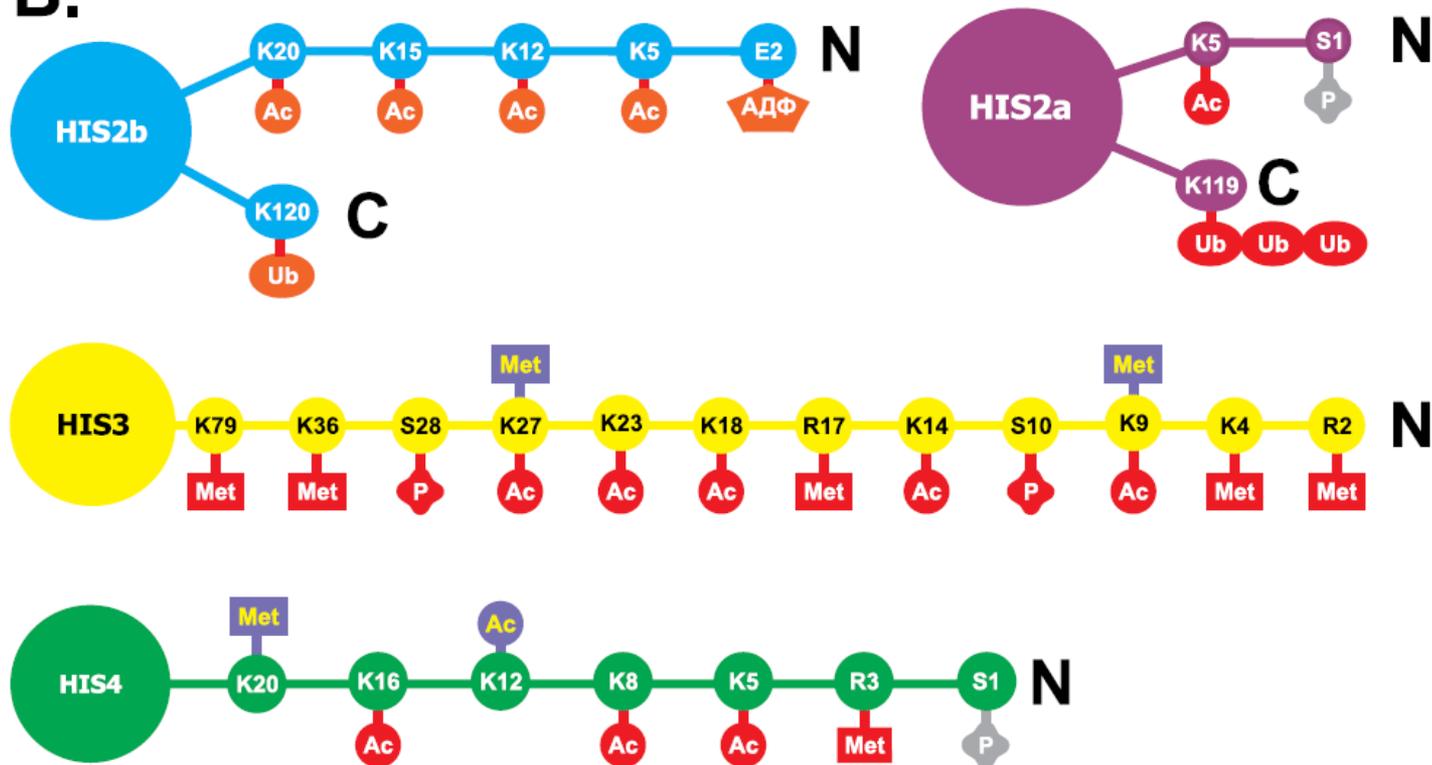
Посттрансляционные ковалентные модификации гистоновых белков.



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.

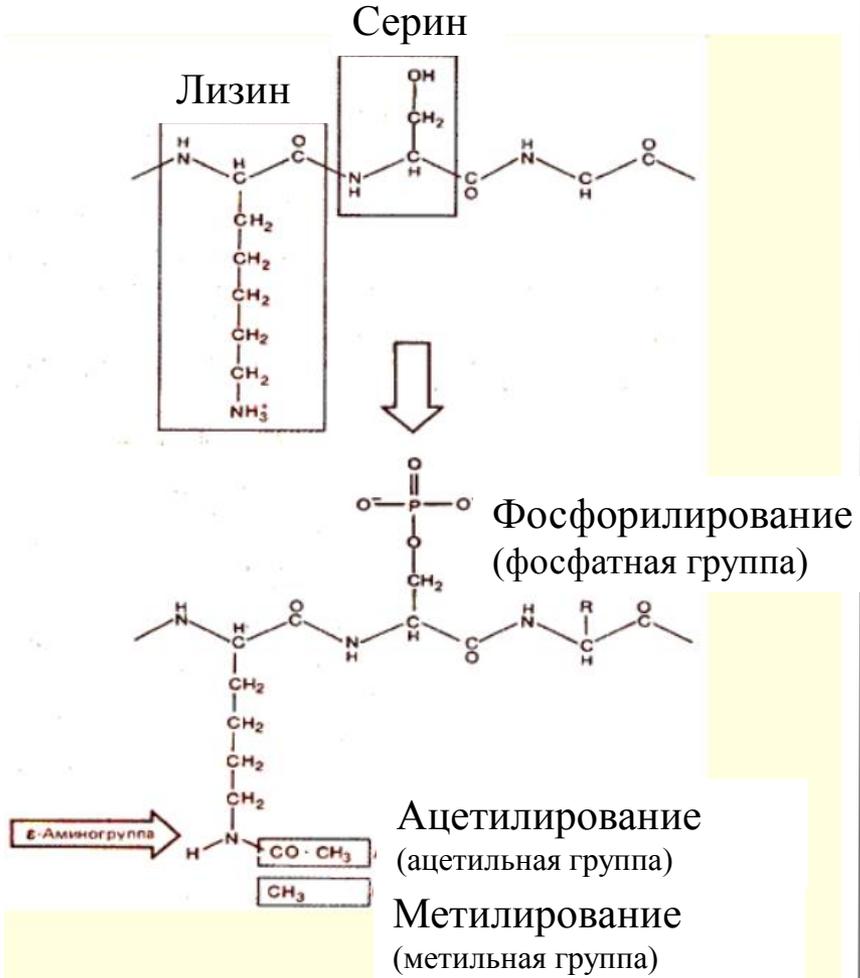
K – лизин, R – аргинин, E – глутамин, S-серин

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

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

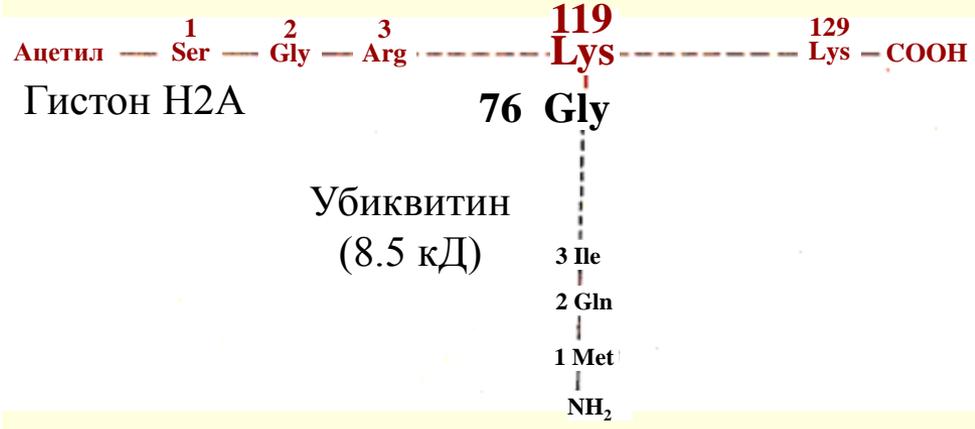
СУЩНОСТЬ НЕКОТОРЫХ МОДИФИКАЦИИ ГИСТОНОВЫХ БЕЛКОВ

Ацетилирование, метилирование, фосфорилирование:



Метилированию подвергается лизин, аргинин, гистидин

Убиквитинирование – присоединение белка убиквитина .



Убиквитин содержит 76 остатков (сравним с гистоном H2A, содержащим примерно 130 остатков). Изопептидная связь образуется между C-концевым глицином убиквитина и свободной ε-NH₂-группой лизина в положении 119 гистона H2A. (Названием *изопептидная связь* подчеркивается, что данная εNH₂-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 ¹

Тип модификации	Позиция(и) ²	Влияние на транскрипцию
Метилирование ДНК		
Метилирование цитозина	СрG острова	Репрессия
Ковалентные модификации гистонов		
Ацетилирование лизина	H3 (9, 14, 18, 56), H4 (5, 8, 13, 16), H2A, H2B	Активация
Фосфорилирование серина или треонина	H3 (3, 10, 28), H2A, H2B	Активация
Метилирование аргинина	H3 (17, 23), H4 (3)	Активация
Метилирование лизина	H3 (4, 36, 79) H3 (9, 27), H4 (20)	Активация Репрессия
Убиквитинирование лизина	H2B (123³/120⁴) H2A (119⁴)	Активация Репрессия
Сумоилирование лизина	H2B (6/7), H2A (126)	Репрессия
Изомеризация пролина	H3 (30–38)	Активация /Репрессия

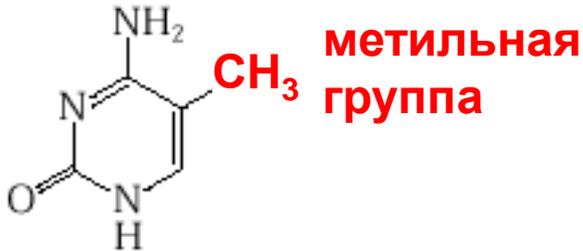
¹ - представлено по данным (Berger S.L. 2007)

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

³ - дрожжи

⁴ - млекопитающие

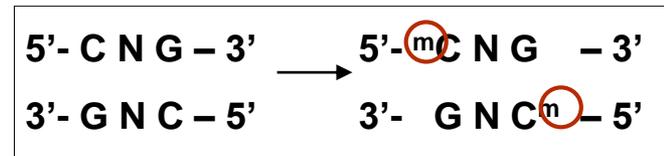
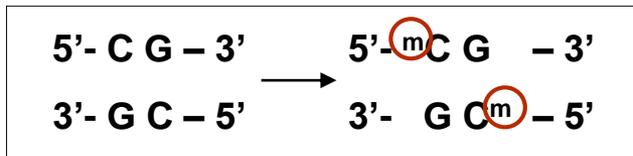
В ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ УРОВЕНЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК ЧАСТО КОРРЕЛИРУЕТ С УРОВНЕМ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА. МЕТИЛИРОВАННЫЕ УЧАСТКИ ДНК ТРАНСКРИБИРУЮТСЯ МЕНЕЕ АКТИВНО, ЧЕМ НЕМЕТИЛИРОВАННЫЕ УЧАСТКИ



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)

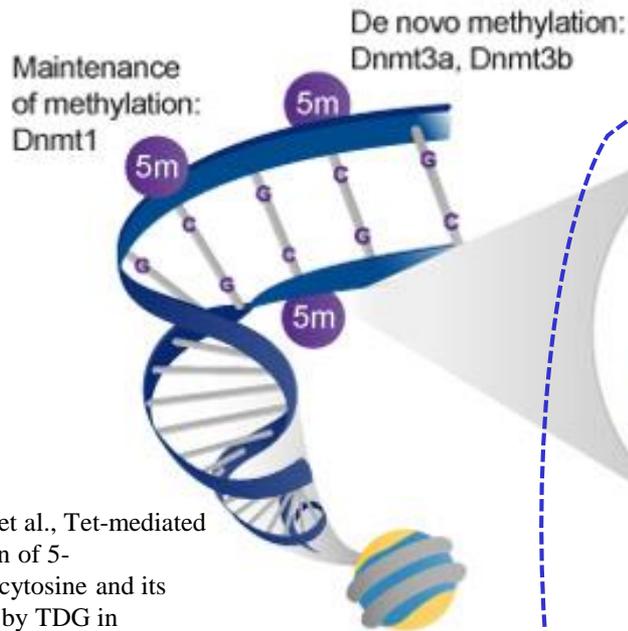
Цикл модификаций цитозина

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

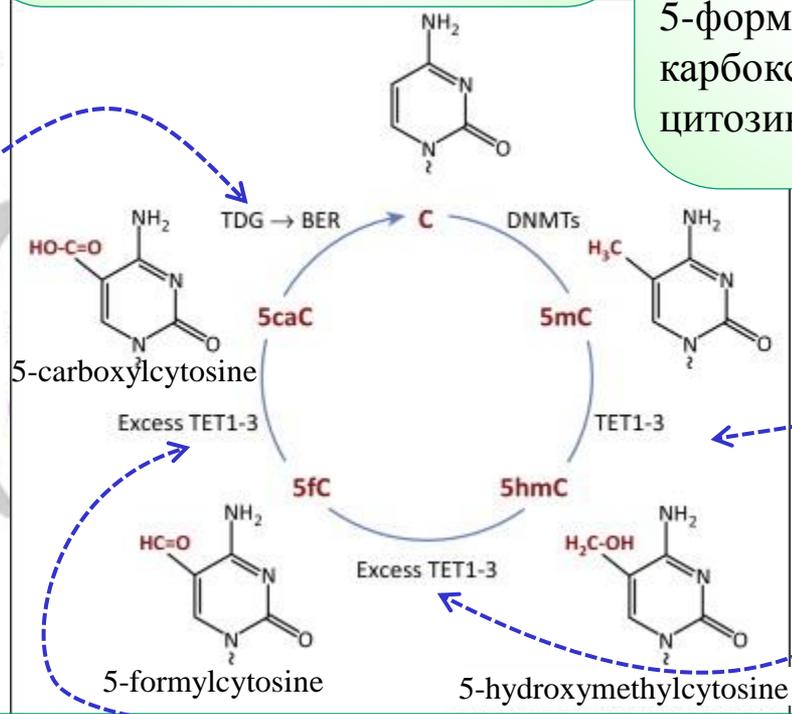
Фермент **DNMT1** – способен метилировать цитозин в составе CpG динуклеотида, только если цитозин в комплементарном CpG динуклеотиде тоже метилирован. Это механизм поддержания метилированного статуса ДНК во время репликации

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.



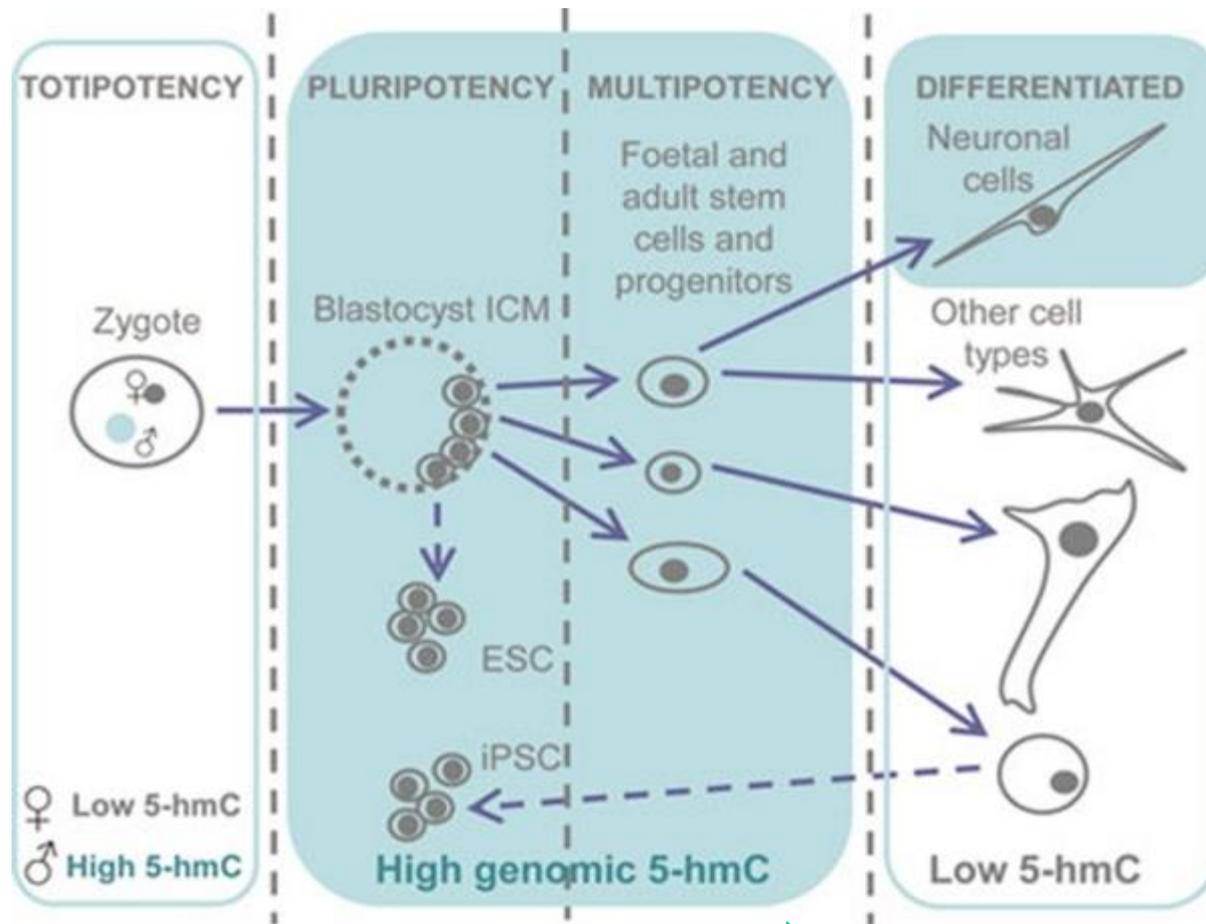
He YF, et al., Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA.. Science 333 (6047): 1303–7.



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

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

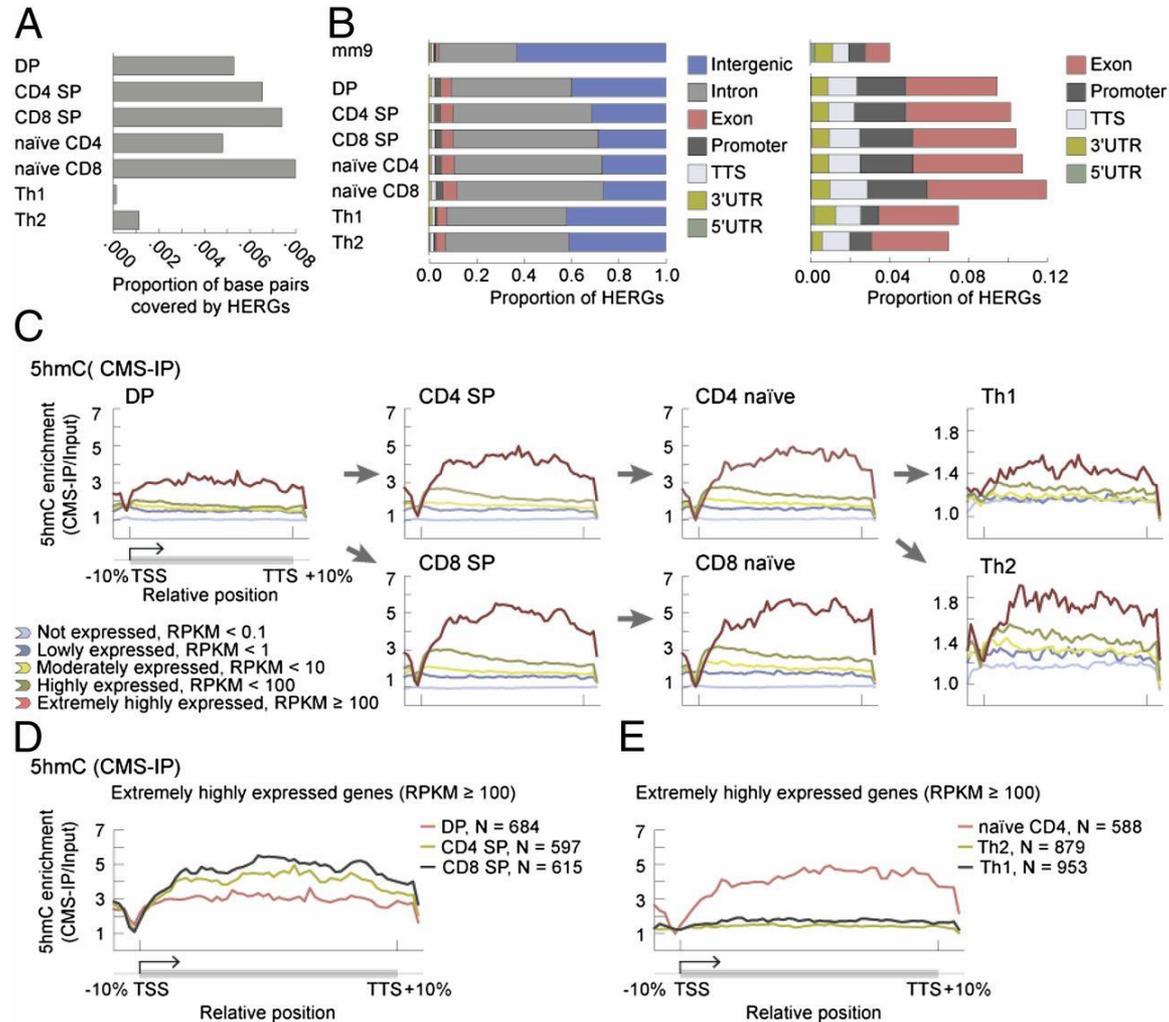
Содержание 5-гидрокси-метилцитозина (5-hmC) в клетках в ходе развития млекопитающих



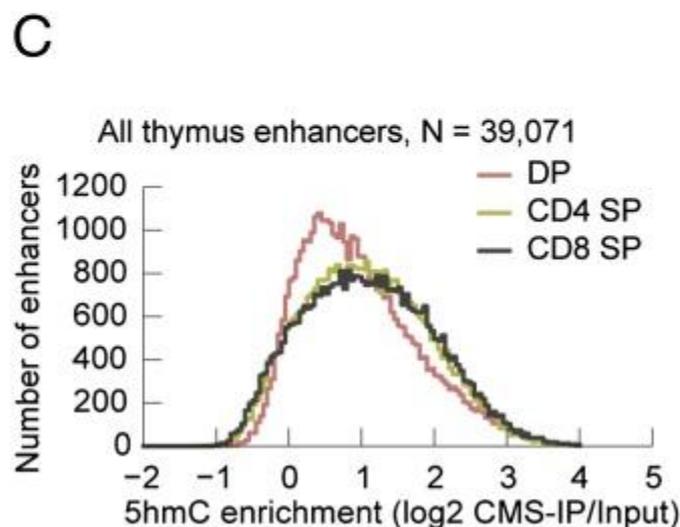
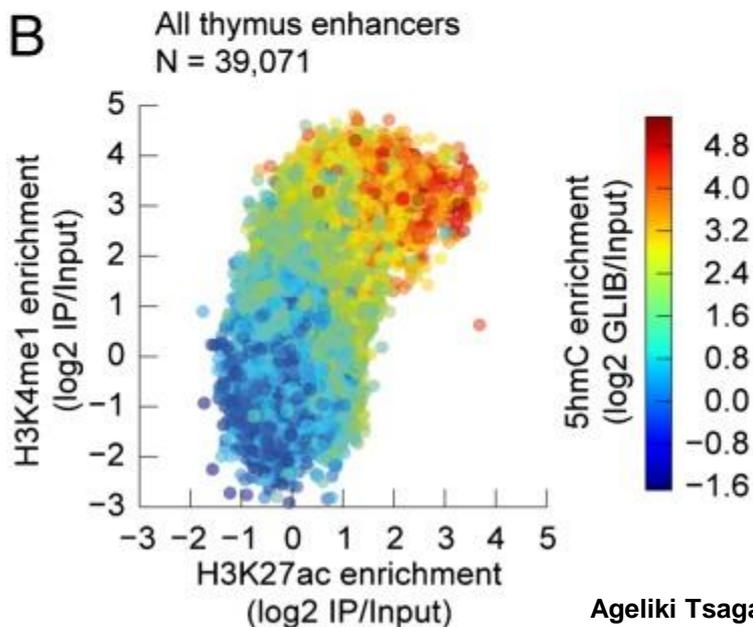
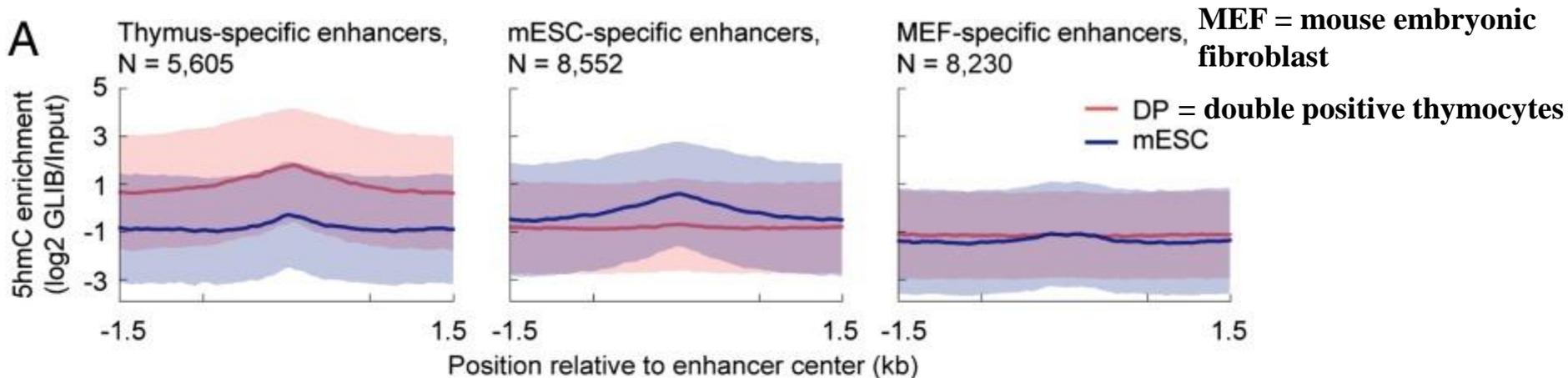
Высокое содержание 5-hmC

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

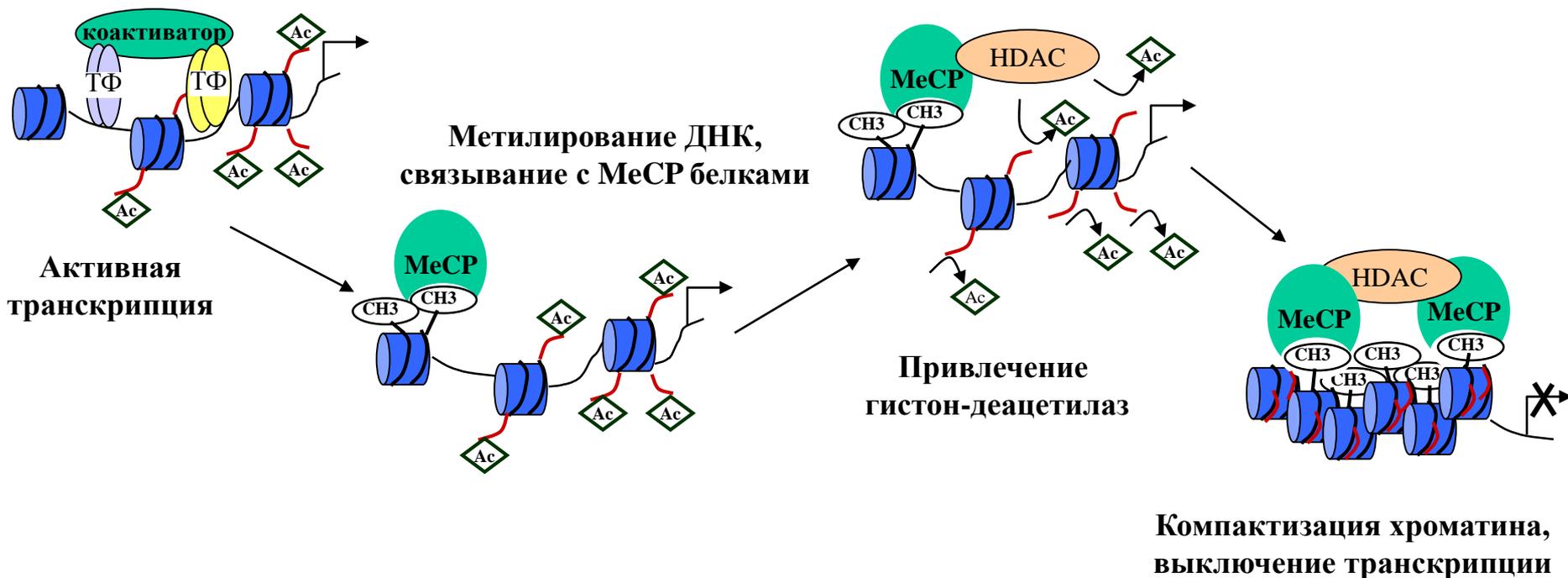
HERGs = 5hmC-enriched regions of the genome



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



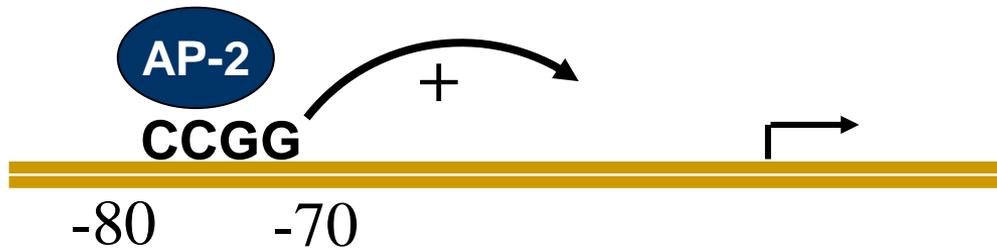
Схематическое представление механизма подавления транскрипции генов, инициированного метилированием ДНК и последующим привлечением гистон-деацетилаз.



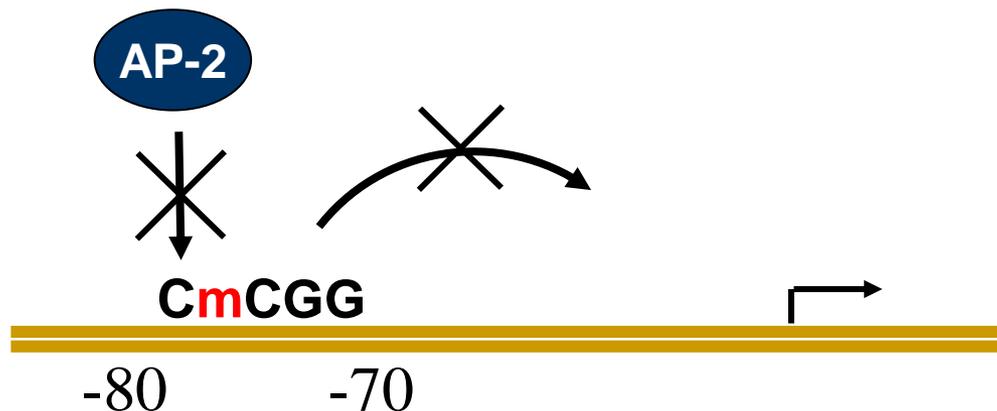
MeCP - метил-CpG-связывающие белки ,
HDAC – гистон-деацетилаза.

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.



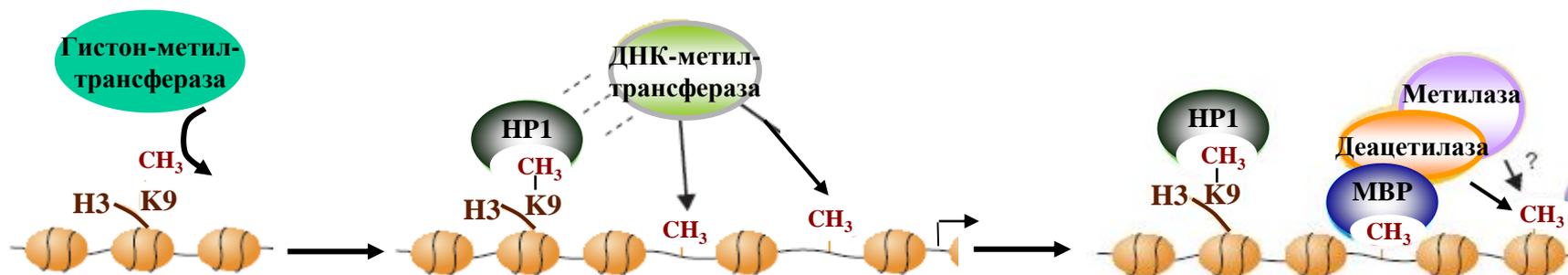
Если сайт связывания AP-2 находится в деметилированном состоянии, AP-2 эффективно взаимодействует с этим сайтом, что приводит к активации транскрипции гена



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»)



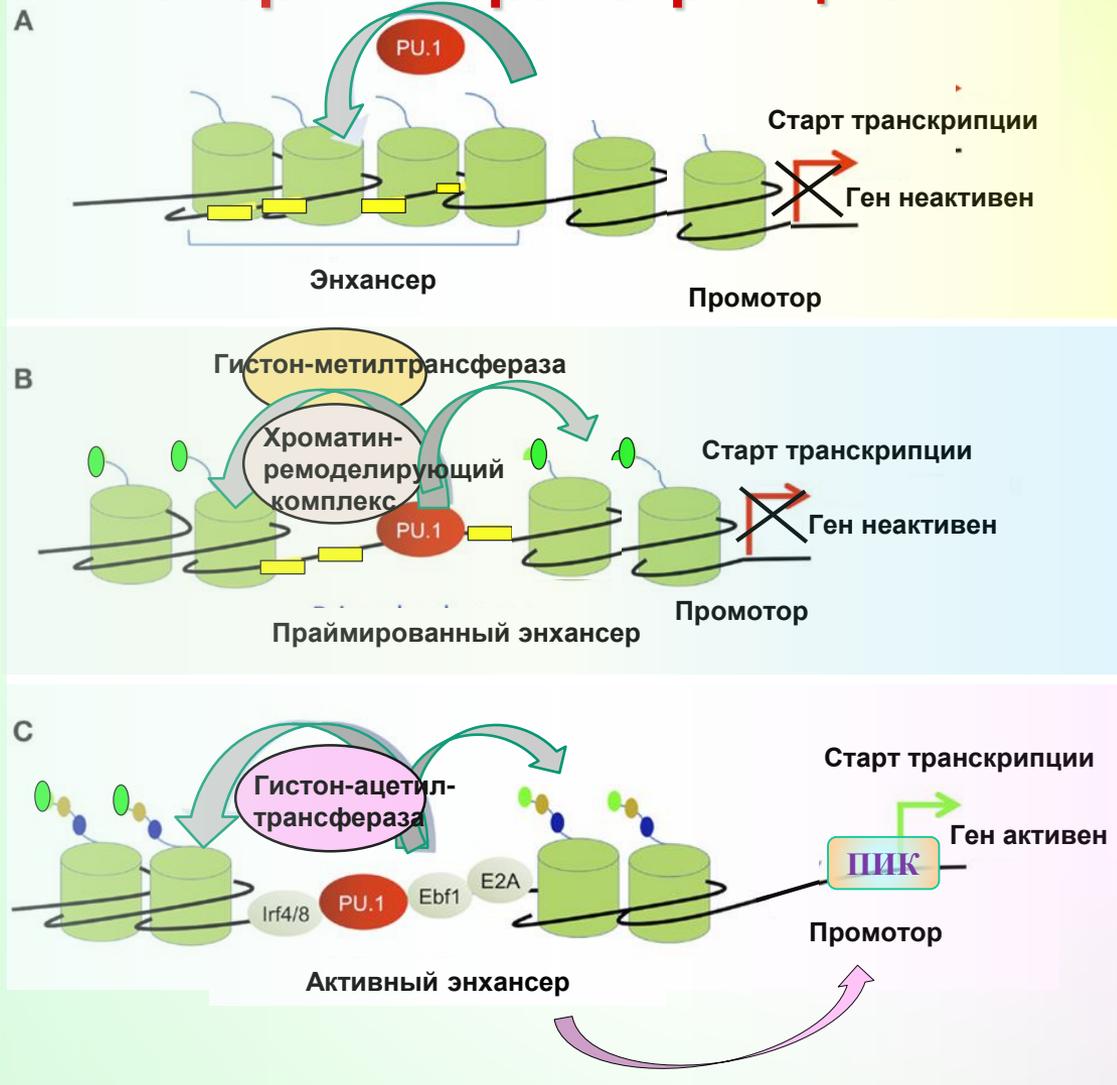
Основные этапы:

- 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 МВР-белками, содержащими метил-связывающие домены (МВД).
- 5) МВР-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

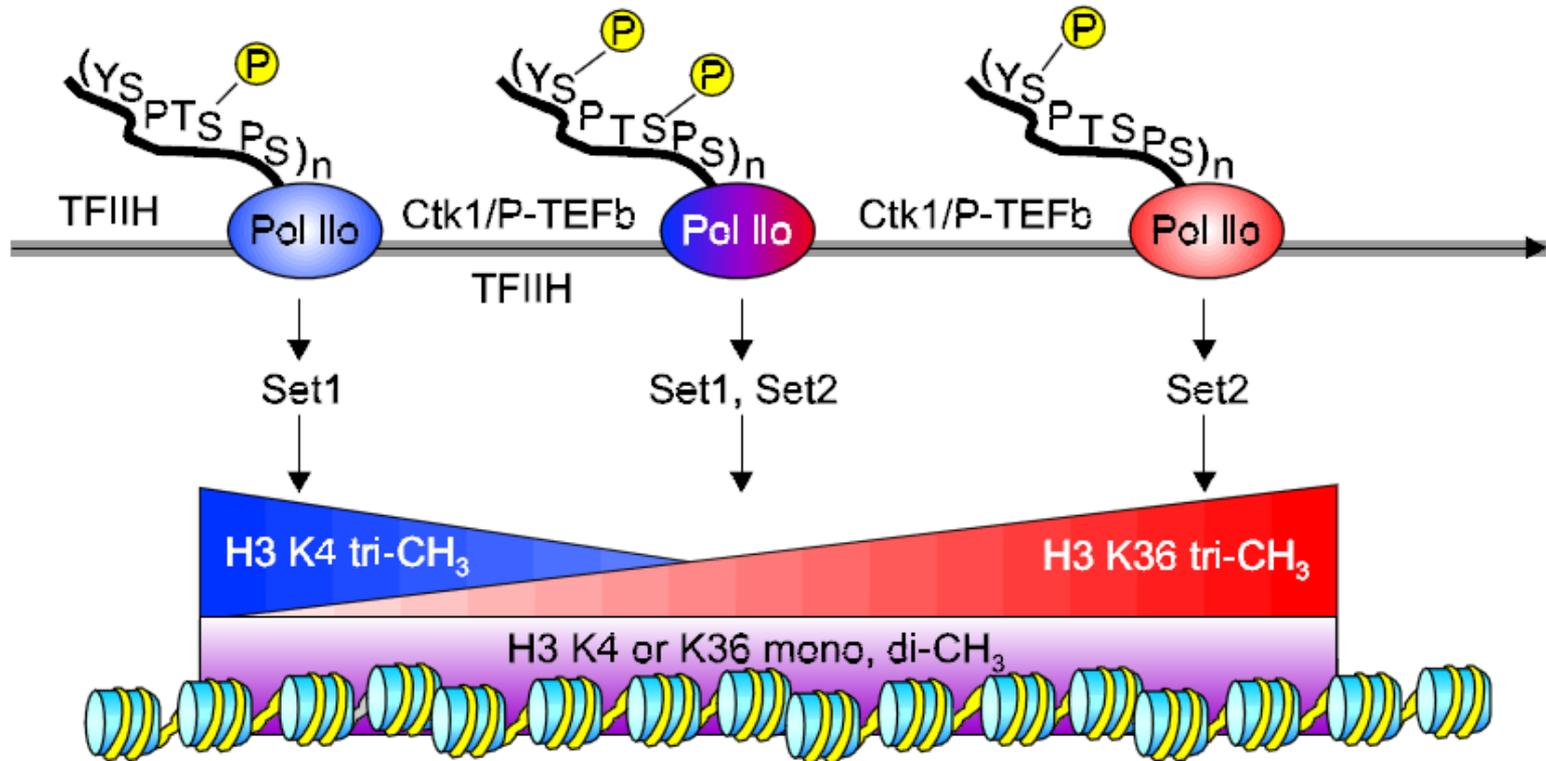
- H3K4me1
- H3K9ac
- H3K27ac

Сайты связывания транскрипционных факторов

ПИК Прединициационный комплекс

МОДИФИКАЦИИ ХРОМАТИНА НА РАЗЛИЧНЫХ ЭТАПАХ ТРАНСКРИПЦИИ

Ранняя элонгация → Поздняя элонгация

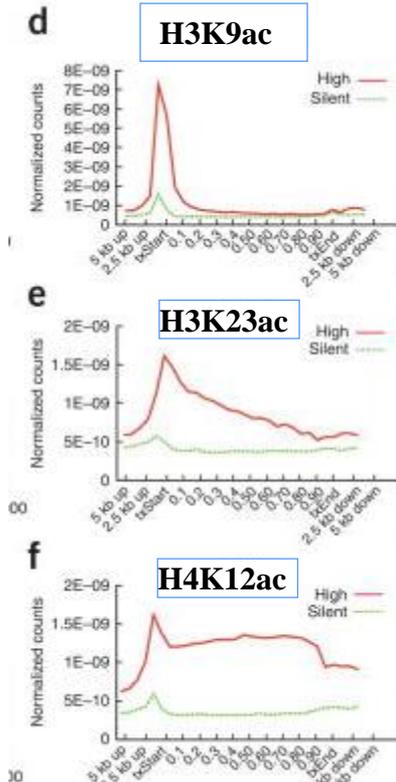


5'-район гена обогащен модификацией H3K4-triCH₃, а 3'-район гена имеет маркер H3K36-triCH₃. Метилирование лизина в позиции H3K4 осуществляется белками семейства Set1, а в позиции H3K36 - белками семейства Set2. Комплекс белков Set1 взаимодействует с транскрипционной машиной через S5 фосфорилированный CTD. Белки Set2 привлекаются по мере появления S2 фосфорилирования CTD.

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

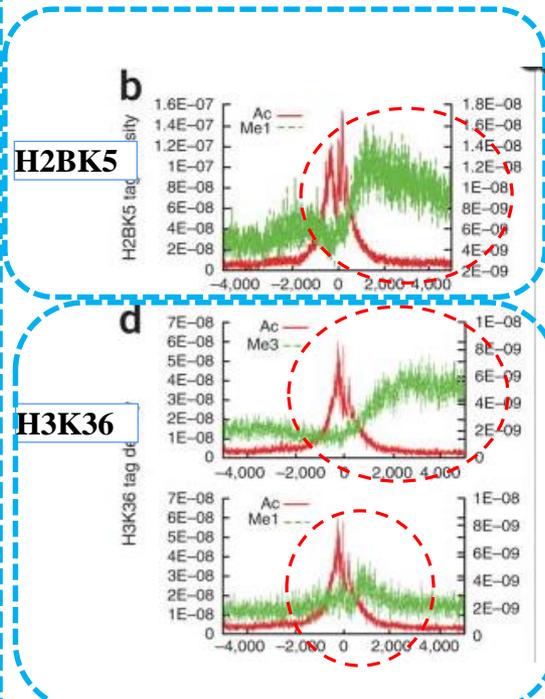
Паттерн ацетилирования гистонов перед стартом транскрипции и в теле гена

1000 высоко экспрессирующихся генов
1000 «молчащих» генов

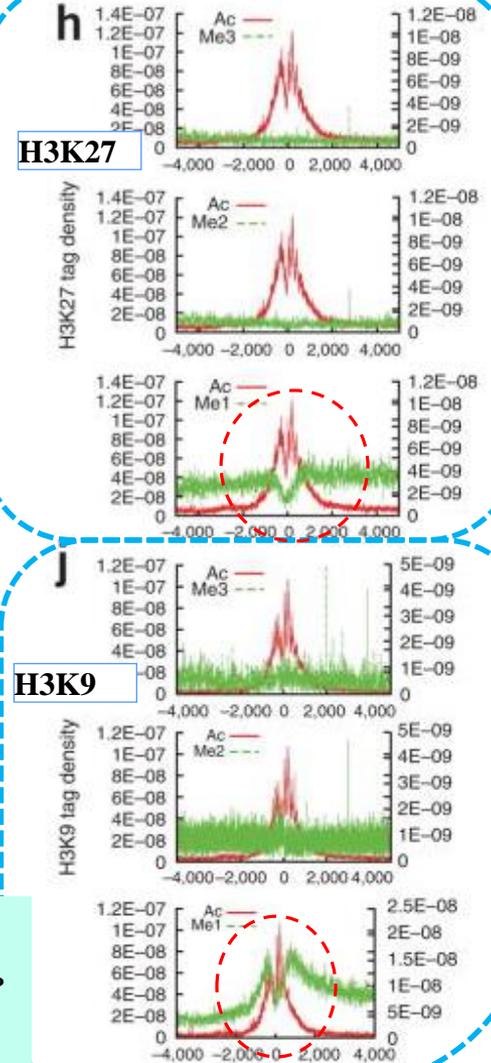


Ацетилирование гистонов положительно коррелирует с экспрессией генов

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