**Експресія генів. Регуляція генної активності**

Першим етапом експресії генетичної інформації, записаної в послідовності нуклеотидів ДНК, є транскрипція – процес синтезу РНК з використанням одного з ланцюгів ДНК як матриці, тобто "переписування" послідовності нуклеотидів ДНК у послідовність нуклеотидів РНК. Молекула РНК, що синтезується на білковому гені, – мРНК – використовується далі як джерело інформації на другому етапі експресії гена – синтезі білка, або трансляції, – перекладі нуклеотидного тексту в амінокислотний. Відповідність між цими двома типами текстів – між комбінаціями нуклеотидів і амінокислотами – називається ***генетичним кодом*.**

Безпосереднім продуктом активності геному, яка регулюється спеціальними системами (за участю певних генів), є специфічна для даного типу клітин сукупність транскриптів (молекул РНК) – ***транскриптом***. Участь цих транскриптів у білковому синтезі зумовлює утворення набору білків – ***протеому***.

**Експресія генів у прокаріотів**

**Транскрипція.** Зростання ланцюга РНК при транскрипції відбувається в напрямі від 5’- до 3’-кінця. Принципова схема реакції ідентична схемі реакції синтезу ДНК **–** приєднання чергового нуклеотиду залежить від його комплементарних взаємодій з тим ланцюгом ДНК, котрий використовується як матриця. Фермент, який каталізує цю реакцію **–** *ДНК-залежна РНК-полімераза*. До складу бактеріальної РНК-полімерази входять кілька білкових субодиниць. Залежно від стадії транскрипції існує дві її форми:

1) кор-фермент у складі субодиниць, позначуваних як α (дві ко-

пії), β, β’ і ω;

2) голофермент – комплекс кор-ферменту із субодиницею σ.

Кор-фермент може працювати на різноманітних послідовностях, оскільки має досить високу неспецифічну спорідненість до ДНК. Поява субодиниці σ у складі голоферменту зумовлює зниження загальної неспецифічної спорідненості, однак при цьому виникає специфічна спорідненість до ***промоторів*** – особливих ділянок, із яких має розпочинатися транскрипція.

Промотор – регуляторна ділянка ДНК, розташована перед (у напрямку до 5' кінця молекули) відкритою рамкою зчитування гену або на початку оперону, що забезпечує контроль транскрипції цього гену або оперону. Промотор є необхідним для ініціації транскрипції.

Робочий цикл РНК-полімерази складається з таких стадій:

***Ініціація*** транскрипції, яка також є багатостадійним процесом: 1) зв’язування голоферменту з промотором; 2) локальне плавлення подвійної спіралі – розходження ланцюгів ДНК (на ділянці у 12-14 пар основ), яке дозволяє використовувати один із них як матрицю; 3) включення перших двох нуклеотидів у молекулу РНК (синтез першого фосфодіефірного зв’язку в активному центрі полімерази) є найповільнішою стадією процесу, яка може відбуватися тільки у присутності субодиниці σ;4) зростання первинного короткого транскрипту – приєднання 8-9 нуклеотидів; 5)очищення промотора – дисоціація σ-фактора, яка маркує перехід до елонгації транскрипції.

***Елонгація*** транскрипції, у кожному елементарному акті якої приєднується черговий нуклеотид до 3’-кінця РНК і кор-фермент пересувається на один нуклеотид уздовж матриці. При цьому разом із полімеразою переміщується також і розплавлена ділянка ДНК: одна пара основ руйнується попереду від полімерази, одна – відновлюється позаду. Синтез РНК відбувається із середньою швидкістю 40 нуклеотидів за секунду.

***Термінація*** транскрипції – визволення транскрипту, після чого кор-фермент знову взаємодіє з σ-субодиницею і здійснює новий пошук промотора. Сигнал термінації являє собою послідовність, транскрипція якої приводить до утворення у складі мРНК комплементарної дволанцюгової шпильки, безпосередньо фланкованої polyU послідовністю: цей елемент структури мРНК розпізнається полімеразою, унаслідок чого система руйнується. Іноді процес полегшується додатковими білковими факторами термінації.

Суттєвою особливістю прокаріотичної системи транскрипції білкових генів є те, що молекула мРНК зв’язується з рибосомами безпосередньо під час транскрипції – ***прокаріотична транскрипція і білковий синтез є єдиним процесом***. Ініціація трансляції відбувається окремо на кожному з них усередині мРНК, і розпізнання цих стартових кодонів не залежить від їхнього розташування щодо 5’-кінця матриці (так звана *внутрішня ініціація*).

Якщо рибосоми з тих чи інших причин не зв’язуються з мРНК, транскрипт швидко деградує під дією нуклеаз.

**Регуляція транскрипції.** Головними елементами, взаємодія між якими зумовлює активацію чи репресію транскрипції, є *цис*- і *транс-елементи*. *Цис*-елементи – це регуляторні елементи послідовності ДНК, які фізично зв’язані з даним геном; у прокаріотів часто називаються *операторами* і перебувають у безпосередній близькості до промоторів.

*Транс*-елементи – білкові фактори транскрипції, які вільно дифундують (*транс*портуються) у просторі клітини, шукаючи свій *цис*-елемент, до якого вони мають специфічну спорідненість. Якщо зв’язування *транс*-елемента з оператором приводить до активації транскрипції, кажуть, що фактор є *активатором* і здійснює *позитивну* регуляцію. Якщо фактор блокує зв’язування РНК-полімерази (часто за рахунок зниження доступності промотора), його називають *репресором* і йдеться про *негативну* регуляцію.

Для регуляції певних генів застосовується механізм *антитермінації*, коли активатори транскрипції запобігають упізнанню РНК-полімеразою сигналів термінації, що містяться всередині кодуючої частини гена.

***Оперон*** являє собою кластер так званих *структурних генів*, на яких синтезується одна молекула мРНК, що має кілька (одна на кожен структурний ген) послідовних відкритих рамок зчитування для трансляції відповідних білків. ***Лактозний оперон*** (*lac*-оперон) *E. coli* став свого часу, першою детально вивченою системою регуляції транскрипції. До складу оперона входять три структурні гени, що кодують ферменти, залучені до утилізації (катаболізму) лактози.

**Експресія генів в еукаріотів**

На відміну від прокаріотів, еукаріотична мРНК синтезується підчас транскрипції у клітинному ядрі, звідки транспортується до цитоплазми. Отже, ***білковий синтез, який відбувається в цитоплазмі, та* *транскрипція є окремими, розділеними у просторі й часі, етапами* *експресії гена***.

Дозрівання пре-мРНК з утворенням функціональної матриці називають *процесингом*. Усі операції процесингу відбуваються під час транскрипції на РНК-полімеразному комплексі, тобто *процесинг еукаріотичної мРНК* *є невід’ємною частиною транскрипції*.

**Ініціація транскрипції.** В еукаріотичних клітинах функціонують РНК-полімерази трьохтипів: *РНК-полімераза І* працює на кластерах генів рибосомної РНК ісинтезує рРНК 18S, 28S та 5,8S; *РНК-полімераза ІІ* транскрибує білкові гени, гени маленьких ядерних РНК і деяких інших РНК, котрі непіддаються трансляції; *РНК-полімераза ІІІ* здійснює синтез тРНК, рибосомної РНК 5S і кількох інших низькомолекулярних РНК. Кожна з цихполімераз містить від 12 до 16 субодиниць. Кожна полімераза має свій набір *базальних факторів транскрипції*, які забезпечують точну посадку ферменту на промотор, вибір стартової точки та одного з ланцюгів ДНК як матричного.

*Проксимальні* (приблизно в зоні .50 – 200 пар основ відносно старту транскрипції) і *дистальні* (будь-де відносно старту) регуляторні елементи мають спорідненість до специфічних факторів транскрипції, взаємодія з якими активує / блокує зв’язування РНК-полімерази. Якщо дистальний елемент підсилює ефективність ініціації, його називають *енхансером*, якщо навпаки – *сайленсером*. У зоні старту міститься так званий *базальний* *промотор*, на якому, власне, і відбувається ініціація. Для ініціації транскрипції є необхідним збирання на промоторі *преініціаторного комплексу* за участю РНК-полімерази ІІ й шести базальних (загальних) факторів транскрипції TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF, TFIIH.

**Елонгація транскрипції, процесинг і термінація синтезу мРНК.** Після синтезу перших 20.30 нуклеотидів до С-кінцевого доменуРНК-полімерази рекрутуються ферменти, які здійснюють певну хімічну модифікацію 5’-кінцевого нуклеотиду мРНК з утворенням *кепу.*

Далі під час елонгації транскрипції, негайно після синтезу чергового інтрона, на С-кінцевому домені відбувається збирання мультимолекулярної структури, яка називається *сплайсосомою*. Призначення сплайсосоми полягає у здійсненні ***сплайсингу* –** вирізання інтронів і зшивання екзонів, у результаті чого мРНК стає копією лише кодуючої частини гена або її фрагментів. Останньою подією процесингу, тісно узгодженою з термінацією транскрипції, є *поліаденілування* 3’-кінця мРНК – приєднання до 3’-кінцевого нуклеотиду polyA-послідовності.

**Регуляція транскрипції.** Відповіддю на необхідність регулювати окремо активність великої кількості генів лімітованим набором факторів транскрипції є принцип *модульності* будови еукаріотичних промоторів.

З принципом модульності тісно пов’язаний принцип *кооперативності* взаємодії транскрипційних факторів із *цис*-елементами, щознаходяться поряд.

Активація транскрипції потребує перебудов структури хроматину в напрямку деконденсації хроматинової фібрили та визволення *цис*-елементів від нуклеосом. Для реалізації таких перебудов є два основні інструменти, які діють у тісній координації один з одним: система *посттрансляційних модифікацій* гістонів і АТР-залежні *комплекси ремоделювання* хроматину, що проводять репозиціювання нуклеосом.

Ацетилювання залишків Lys (у певних консервативних позиціях) майже завжди корелює з активацією транскрипції – ацетильовані гістон-ацетилтрансферазами (НАТ) гістони акумулюються в активних промоторах, і навпаки, дія гістон-деацетилаз приводить до інактивації. Ацетилтрансферази та деацетилази постійно безадресно працюють у хроматині, підтримуючи певний базовий баланс ацетилювання / деацетилювання гістонів. При активації певного промотора ацетилтрансферази здійснюють адресне гіперацетилювання, а після зникнення активуючого сигналу деацетилази повертають промотор до базового неактивного стану. Ацетилювання гістонів сприяє деконденсації хроматинової фібрили за рахунок зниження позитивного заряду головних факторів конденсації, якими є гістонові хвости.

**РНК-інтерференція.** РНК-інтерференція є ще однією системою негативної регуляції експресії генів через використання мікро-РНК. Активація генів мікро-РНК (транскрибуються РНК-полімеразою ІІ) зумовлює синтез молекулРНК, які містять дволанцюгові шпильки. Шпильки вирізаються нуклеазою і стають субстратом для РНКази, яка отримала назву *дайсер*(*Dicer*).

**Синтез білків**

Молекулярні механізми білкового синтезу в основному є спільними для всіх живих організмів. Зчитування інформації, записаної в послідовності нуклеотидів мРНК, та її переклад у амінокислотний текст розпочинається зі стартового кодона, де при *ініціації трансляції* відбувається остаточне збирання головного пристрою трансляції – *рибосоми –* комплексу рибосомної РНК і білків. Вона сканує нуклеотидну послідовність мРНК, рухаючись уздовж неї кроками по три нуклеотиди від 5’- до 3’-кінця під час *елонгації трансляції* до стопкодона, де відбувається *термінація* процесу.

**Транспортні РНК.** Молекули тРНК містять 74-95 (найчастіше 76) нуклеотидів.У складі молекули формуються комплементарні дволанцюгові стеблата шпильки з петлями на кінцях за єдиною для всіх тРНК схемою. Кінцеві фрагменти ланцюга об’єднуються у дволанцюгове стебло, причому чотири нуклеотиди на 3’-кінці залишаються неспареними. 3’-Кінцевий триплет ССА є стандартним для всіх тРНК, до рибози кінцевого аденозину ковалентно приєднується амінокислота – відповідно, стебло називають *акцепторним.*

тРНК конкретного типу, яка відповідає певній амінокислоті, позначають, індексами, наприклад, тРНКAla. Загальна кількість типів тРНК, які обслуговують процес білкового синтезу, становить близько 40. Оскільки типів тРНК *більше, ніж амінокислот*, одній амінокислоті може відповідати кілька тРНК – такі тРНК називають *ізоакцепторними*. Типів тРНК *менше, ніж кодонів*, тому одна тРНК здатна розпізнавати кілька синонімічних кодонів, що забезпечується неоднозначністю спарювання між першою позицією антикодона і третьою.

**Рибосома й механізм трансляції.** Рибосома – рибонуклеопротеїновий комплекс, який складається з двох субодиниць. Маленька субодиниця прокаріотичної рибосоми містить одну молекулу рРНК 16S (компоненти рибосоми прийнято позначати їхніми коефіцієнтами седиментації у сведбергах – S) і 21 молекулурибосомних білків. Велика субодиниця містить дві молекули рРНК (23Sі 5S) і білки 36 типів. Еукаріотична рибосома містить трохи більшу рРНК18S замість 16S, дві рРНК (28S і 5,8S), замість 23S, рРНК 5S і більшу кількість білків. Структура обох рибосом і принципи їхньої роботи подібні.

Синтез еукаріотичних рРНК 18S, 5,8S і 28S здійснюється в ядерці, яке формується на тандемних повторах кластера відповідних генів рРНК (кластер повторюється від 100 до 1000 разів у різних видів).

Первинний продукт транскрипції містить три фрагменти майбутніх рРНК, розділені спейсерами, – кластер транскрибується як одне ціле.

*Процесинг* рРНК – деградація спейсерів, а також певні хімічні модифікації – здійснюється за участю близько 150 типів *маленьких ядерцевих* *РНК.* Первинний продукт транскрипції прокаріотичних генів рРНК містить ділянки, які відповідають усім трьом прокаріотичним рРНК, а також кілька майбутніх тРНК. Часткова деградація транскрипту приводить до утворення зрілих молекул, які взаємодіють із рибосомними білками, формуючи дві субодиниці рибосоми. Остаточне збирання рибосоми з двох субодиниць, як у про-, так і в еукаріотів, відбувається під час ініціації трансляції.

Під час роботи рибосоми її маленька субодиниця взаємодіє з мРНК. Сумісно двома субодиницями утворюються сайти зв’язування для трьох молекул тРНК. Зчитування інформації з мРНК здійснюється рибосомою в напрямку від 5’- до 3’-кінця, поліпептидний ланцюг синтезується від N- до С-кінця. Процес трансляції розпочинається зі стадії ініціації, коли рибосомою впізнається стартовий кодон, що задає початок і рамку зчитування інформації.

Стартовим кодоном є здебільшого метіоніновий кодон AUG, відповідно, ініціаторною є завжди Met-тРНКіMet. Отже, першою амінокислотою завжди виступає метіонін.

Далі робота рибосоми під час елонгації трансляції полягає в послідовному (потриплетно) зчитуванні інформації з мРНК і відповідному приєднанні амінокислот до поліпептидного ланцюга. Кожен такий крок складається з трьох операцій, що циклічно повторюються (*елонгаційний цикл*).