บทที่ 8

การควบคุมการแสดงออกของยีน

(Regulation of gene expression)

คำนำ

การดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตนั้นต้องเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึม และปฏิกิริยาชีวเคมีต่างๆ ที่ถูกควบคุมโดยเอนไซม์อันเป็นผลผลิตจากยีน ซึ่งกลไกควบคุมแสดงออกยีน (regulation gene expression) เกี่ยวข้องการควบคุมการเปิด (turn on) และปิด (turn off) ยีนในระดับการลอกรหัสและการแปลรหัส เพื่อตอบสนองความต้องการของเซลล์และการอยู่รอดของสิ่งมีชีวิตเมื่อสภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไป การควบคุมการแสดงออกของยีนเพื่อสังเคราะห์เอนไซม์นั้นสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

1. Unregulated enzyme production (Constitutive หรือ Housekeeping gene)

คือโปรตีนหรือผลผลิตยีน ถูกควบคุมด้วยยีนที่มีการแสดงออกอย่างสม่ำเสมอในขณะที่ยังดำรงชีวิตอยู่ เรียกยีนเหล่านี้ว่า constitutive gene หรือ housekeeping gene ตัวอย่างของยีนเหล่านี้ คือ ยีนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์องค์ประกอบต่างๆ ของไรโบโซม และเอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์โปรตีน รวมทั้งเอนไซม์ที่จำเป็นต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของน้ำตาลกลูโคส (glucose) เป็นต้น

2. Regulated enzyme production

เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนหรือเอนไซม์เพื่อตอบสนองความต้องการของเซลล์ที่อยู่ในสภาพแวดล้อมหนึ่ง โดยเอนไซม์ดังกล่าวจะทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์ เช่น เอนไซม์ β–galactosidase จะถูกสังเคราะห์ขึ้นมาเมื่อภายในเซลล์แบคทีเรียมีน้ำตาลแลกโตส (lactose) เรียกยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์ regulated enzyme ว่า regulated gene โดยเอนไซม์ในกลุ่มนี้สามารถแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ

2.1 Inducible enzyme

เป็นยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายซับสเตรต (degradation pathway; catabolism) ซึ่งยีนในกลุ่มนี้จะแสดงออกก็ต่อเมื่อภายในเซลล์มีตัวเหนี่ยวนำ (inducer หรือ substrate) เช่น β–galactosidase จะถูกสังเคราะห์ขึ้นเพื่อย่อยน้ำตาล lactose ให้เป็นน้ำตาล glucose และกาแลกโตส (galactose) เป็นต้น

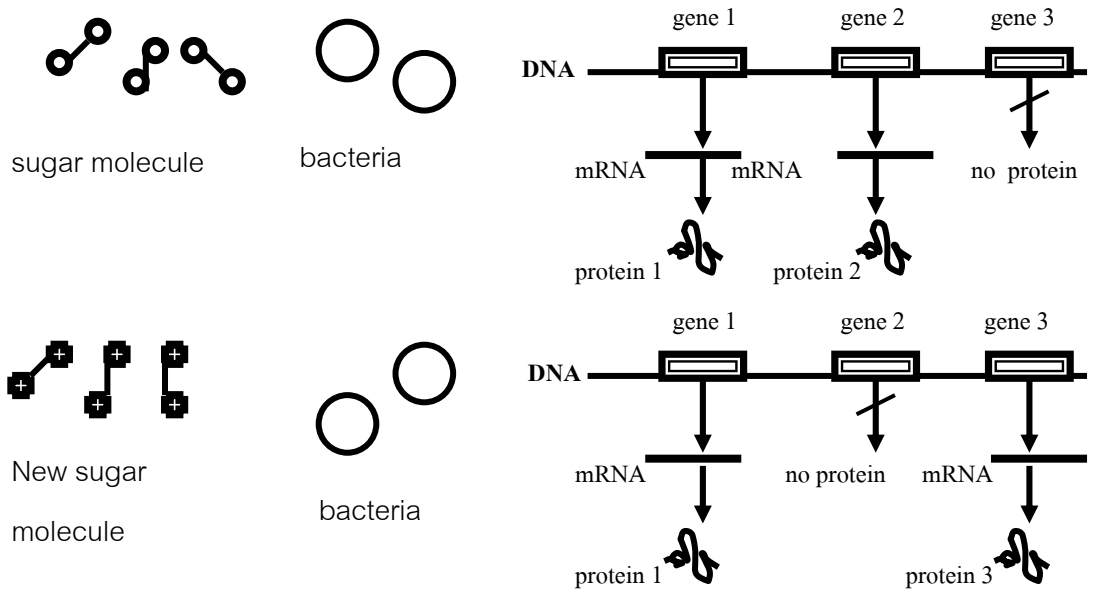
2.2 Repressible enzyme

เป็นยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์สารที่จำเป็นภายในเซลล์ (biosynthetic pathway; anabolism) เช่น เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฮีสติดีนและทรปโตเฟน เป็นต้น

อย่างไรก็ตามการแสดงออกของยีนสามารถถูกควบคุมได้หลายระดับที่แตกต่างกัน เช่น ในระดับ transcription, mRNA processing, translation และ enzyme function จากการศึกษาพบว่ากลไกควบคุมการแสดงออกของยีนในระดับ transcription มีความสำคัญมากที่สุดในสิ่งมีชีวิตพวกโปรคารีโอต ส่วนการควบคุมในระดับ translation เป็นการควบคุมกระบวนการเมตาบอลิซึมทั้งหมดภายในเซลล์ ซึ่งกลไกควบคุมการแสดงออกของยีนที่จะไปมีผลกระทบต่อฟีโนไทป์ของสิ่งมีชีวิตเป็นอย่างมาก

การควบคุมการแสดงออกของยีนในโปรคารีโอต (Gene regulation in prokaryote)

การควบคุมการแสดงของยีนภายในแบคทีเรีย เพื่อตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยน้ำตาลชนิดต่างๆ เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่ง พลังงาน ใน *E. coli* มียีนหลายชนิดโดยยีนแต่ละตัวทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ที่ต่างชนิดกัน ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดก็จะทำหน้าที่ย่อยน้ำตาลแต่ละชนิดเข้าสู่เซลล์โดยส่งผ่านเข้าสู่กระบวนการเมตาบอลิซึมของน้ำตาลแต่ละชนิด ดังนั้นแบคทีเรียจะกำหนดให้ยีนใดแสดงออกมานั้นขึ้นอยู่กับว่าสภาพแวดล้อมในขณะนั้นว่ามีน้ำตาลชนิดใดอยู่ เช่น มียีน 3 ตัวที่เกี่ยวข้องกับการย่อยน้ำตาล โดยยีนตัวที่ 1 เป็น housekeeping gene ส่วนยีนตัวที่ 2 และ 3 เกี่ยวข้องกับการย่อยน้ำตาลชนิดที่ 1 และ 2 ตามลำดับ **(รูปที่ 8.1)**



ภาพที่ 15.1 การควบคุมการเปิด-ปิดยีนของโปรคารีโอต

เมื่อเลี้ยง *E. coli* ในสภาวะปกติที่มีน้ำตาล glucoseอยู่ในสภาพแวดล้อม ต่อมาเมื่อน้ำตาล glucose ถูกใช้หมดไป ทำให้สภาพแวดล้อมเปลี่ยนไปโดยมีน้ำตาลชนิดที่ 1 เข้ามาแทนที่ก็จะมีการแสดงออกข้องยีนตัวที่ 2 เพื่อสังเคราะห์เอนไซม์ที่ต้องการใช้ในขณะนั้นอย่างรวดเร็ว และจะทำการปิดยีนอื่นที่ไม่ต้องการผลผลิตจากยีนนั้นๆ และเมื่อน้ำตาลชนิดที่ 2 เข้ามาแทนที่ก็จะมีการแสดงออกของยีนตัวที่ 3 ซึ่งการควบคุมการแสดงออกของยีนใน *E. coli* และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ จะตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมได้อย่างรวดเร็วโดยไม่สูญเสียพลังงาน

กลไกการควบคุมแสดงออกของยีนในโปรคารีโอตนั้นจะเกี่ยวข้องกับการทำงานของยีนที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ที่เรียกว่า operon โดย F. Jacob และ J. Monod (1961) ได้เสนอแบบจำลองของ operon (the operon model) เพื่ออธิบายกลไกการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ต่างๆ ซึ่ง operon ก็คือยีนสมบูรณ์หน่วยหนึ่ง ที่ประกอบด้วย

1. Regulator gene (*i*) เป็นยีนที่มีตำแหน่งอยู่ใกล้หรือห่างออกไปจากยีนโครงสร้าง ยีนโปรโมเตอร์ และยีนโอเปอเรเตอร์ โดยยีน ***i*** ทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีนที่เรียกว่า repressor protein ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของยีนโปรโมเตอร์ (1100 นิวคลีโอไทด์ , 360 กระอะมิโน)

2. Promoter gene (*p*) คือยีนที่มีตำแหน่งอยู่ใกล้หรืออาจมีตำแหน่งเหลื่อมซ้อน (overlapping) กับยีนโอเปอเรเตอร์ ซึ่งยีน ***p*** มีหน้าที่ควบคุมการทำงานของยีนโอเปอเรเตอร์ โดยลำดับเบสบนยีนโปรโมเตอร์จะเป็นตำแหน่งจดจำการเข้าเกาะของ RNA polymerase

3. Operator gene (*o*) เป็นยีนที่มีตำแหน่งอยู่ด้านหน้าติดกับยีนโครงสร้าง ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้าง โดยยีนโอเปอเรเตอร์จะมีตำแหน่งจดจำของ repressor protein เพื่อเข้าจับกับยีนโอเปอเรเตอร์จะมีผลทำให้ยีนโครงสร้างไม่สามารถลอกรหัสออกมาได้ เนื่องจากไปขัดขวางไม่ให้เอนไซม์ RNA polymerize เข้าจับกับตำแหน่งยีนโปรโมเตอร์ได้นั่นเอง

4. Structural gene หรือยีนโครงสร้าง เป็นยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนหรือเอนไซม์ชนิดต่างๆ ซึ่งยีนโครงสร้างนี้อาจมีเพียงยีนเดียว (monocistronic gene) หรืออาจมีหลายยีน (polycistronic gene) ก็ได้

มีการนำแบบจำลองของ operon มาอธิบายกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนเพื่อสังเคราะห์ inducible enzyme และ repressible enzyme ดังนี้

I. Inducible operon

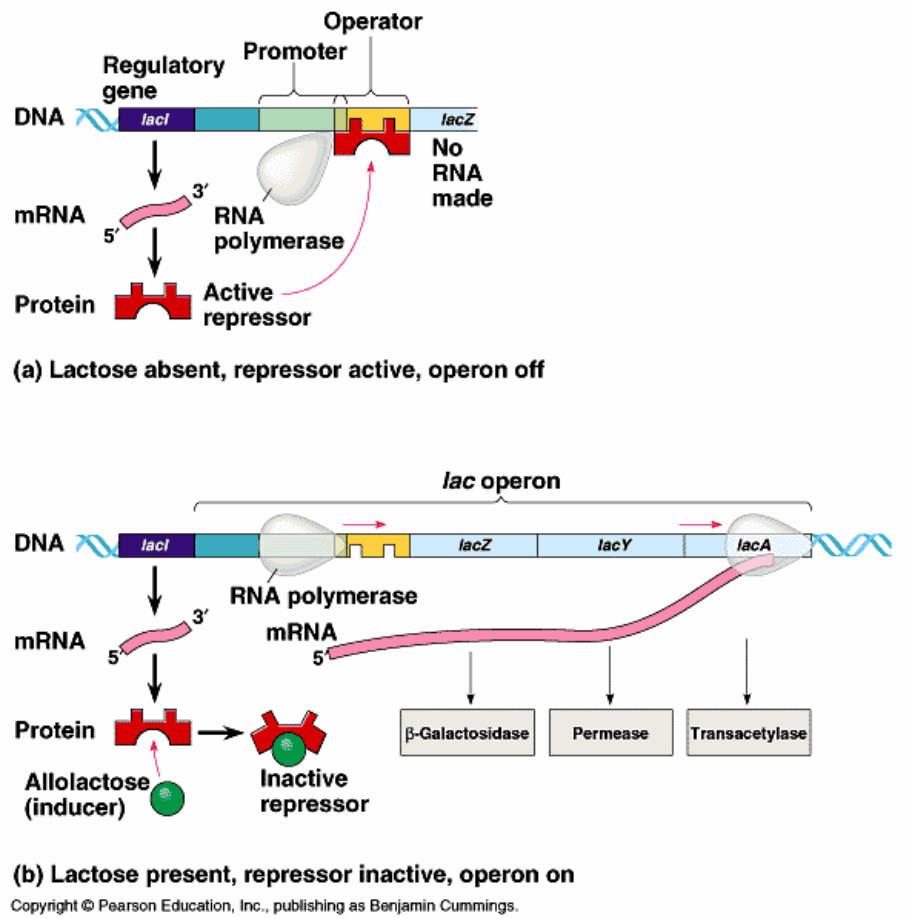
คือแบบจำลองการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์เพื่อใช้ในกระบวนการย่อยสลายซับสเตรต หรือหมายถึงการควบคุมกการแสดงออกของยีนโดยต้องมีซับสเตรตเป็นตัวกระตุ้นการแสดงออกของยีน โดยมีหลักการ คือ

1. กรณีที่ไม่มีซับสเตรต (no inducer) ในสภาวะแวดล้อม

พบว่า ยีน ***i*** จะสังเคราะห์ repressor protein อิสระที่อยู่ในสภาพ active ซึ่งสามารถเข้าจับกับยีน ***o*** ทำให้ตำแหน่งของยีน ***p*** ไม่ว่าง (เนื่องจากยีน ***p*** มีตำแหน่งเหลื่อมซ้อนกับยีน ***o***) ดังนั้น RNA polymeraase จึงไม่สามารถเข้าเกาะกับตำแหน่งจำเพาะ (-35 base sequence) ของยีน ***p*** ได้ จึงไม่เกิดกระบวนการลอกรหัส (transcription) ของยีนโครงสร้าง **(รูปที่ 8.2)**

2. กรณีที่ในสภาวะมีซับสเตรต หรือ effector molecule หรือตัวกระตุ้น (inducer)

ซับสเตรต (substrate) คือเป็นสารโมเลกุลขนาดเล็กของกรดอะมิโนหรือน้ำตาลที่มีอยู่ในสภาพแวดล้อม จะเป็นการกระตุ้นให้เกิดการลอกรหัสของยีนโครงสร้างใน operon ได้ โดย inducer จะผ่านเข้าไปภายในเซลล์ แล้วเข้ารวมกับ repressor protein ทำให้เกิดเป็นโครงสร้างสารประกอบเชิงซ้อนของ inducer-repressor complex ซึ่งทำให้ repressor protein ถูกปลดปล่อยออกจาก ***o*** หรือ inducer-repressor complex อยู่ในสภาพ inactive ไม่สามารถเข้าเกาะกับตำแหน่งยีน ***o*** ทำให้ตำแหน่งของยีน ***p*** ว่าง (เนื่องจากยีน ***p*** มีตำแหน่งเลื่อมซ้อนกับยีน ***o***) ดังนั้น RNA polymeraase จึงสามารถเข้าเกาะกับตำแหน่งจำเพาะ (-35 base sequence) ของยีน ***p*** ได้ จึงเกิดกระบวนการลอกรหัส (transcription) ของยีนโครงสร้าง **(รูปที่ 8.2)**



รูปที่ 8.2 แบบจำลอง Inducible operon

(ที่มา : http://www.msu.edu/course/lbs/145/smith/s02/graphics/campbell_18.20.gif)

เนื่องจาก repressor protein เป็นผลผลิตของยีน ***i*** (regulator gene) ซึ่งทำหน้าที่ยับยั้งไม่ให้เกิดการลอกรหัสของยีนโครงสร้าง ถือว่าเป็นระบบควบคุมแบบ negative control ส่วนระบบควบคุมแบบ positive control หมายถึงผลผลิตของยีน ***i*** เป็นสิ่งจำเป็นที่ทำให้เกิดการลอกรหัส (เช่น cAMP-CAP complex)

ตัวอย่างการควบคุมการแสดงออกของยีนแบบ inducible operon คือ *lac* operon ซึ่งเป็นกลไกการควบคุม ดังนี้

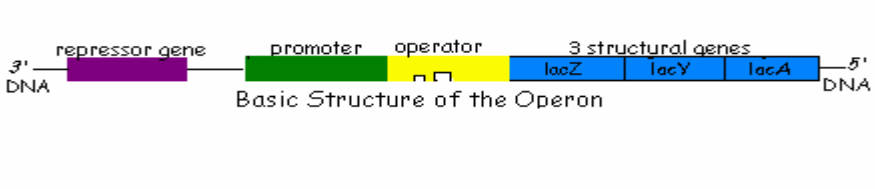
***lac* operon**

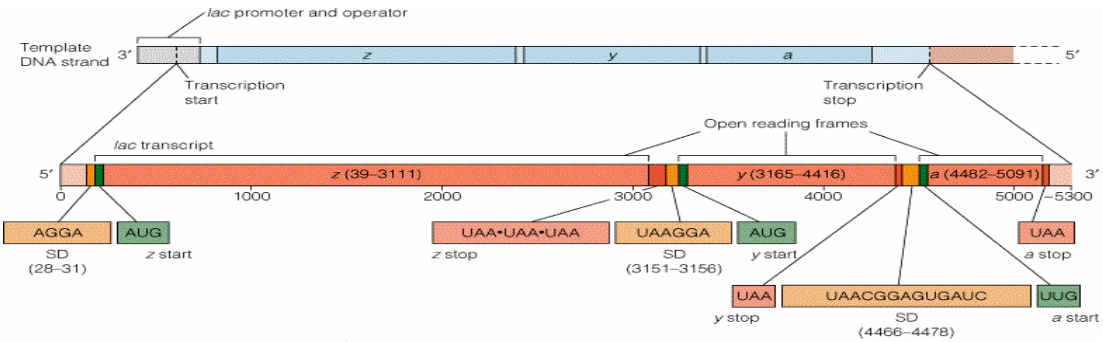
Jacop และ Monod เสนอแบบจำลอง *lac* operon ของ *E .coli* โดยพบว่าโครงสร้างของ *lac* operon ประกอบด้วยยีนหลายยีน ได้แก่ promoter gene, operator gene และ structural gene ที่เป็น polycistronic gene คือประกอบด้วยยีน 3 ยีน ได้แก่ ยีน *z* ยีน *y* และยีน *a* **(รูปที่ 8.3)** โดยยีนแต่ละยีนทำหน้าที่สังเคราะห์เอนไซม์ต่างชนิดกันคือ

ยีน *z* ทำหน้าที่สังเคราะห์เอนไซม์ β-galactosidase เพื่อย่อยสลายน้ำตาล lactose ให้เป็นน้ำตาล galactose และ glucose (3,000 นิวคลีโอไทด์ , 1,000 กระอะมิโน) **(รูปที่ 8.4)**

ยีน *y* ทำหน้าที่สังเคราะห์เอนไซม์ β-galactoside permease เป็นเอนไซม์ที่อยู่บนผนังเซลล์ (membrane-bond enzyme) ของ *E. coli* ทำหน้าที่ขนส่งน้ำตาล lactose และ galactoside ชนิดอื่น (800 นิวคลีโอไทด์ , 270 กระอะมิโน) **(รูปที่ 8.5)**

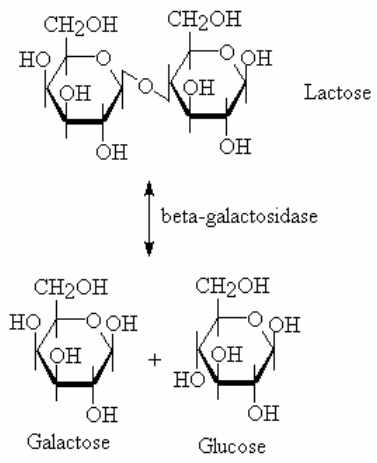
ยีน *a* ทำหน้าที่สังเคราะห์เอนไซม์ β-galactoside transacetylase หน้าที่ของเอนไซม์ชนิดนี้ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่คาดว่าน่าจะทำหน้าที่เติมหมู่ acetyl group ให้กับน้ำตาล lactose (800 นิวคลีโอไทด์ , 270 กระอะมิโน)

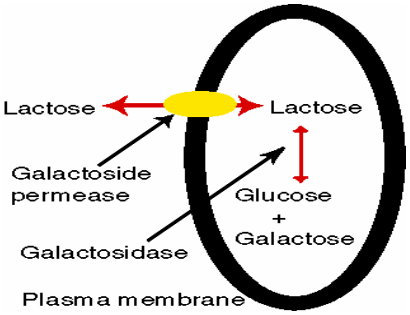




รูปที่ 8.3 โครงสร้างของยีนต่างๆ ใน *lac* operon

(ที่มา : http://science.nhmccd.edu/biol/operon/operon1d.gif)





รูปที่ 8.4 หน้าที่ของ beta-galactosidase **รูปที่ 8.5** หน้าที่ของ beta-galactoside permease

(ที่มา : http://bio.winona.msus.edu/berg/ChemStructures/Gsidase.gif)

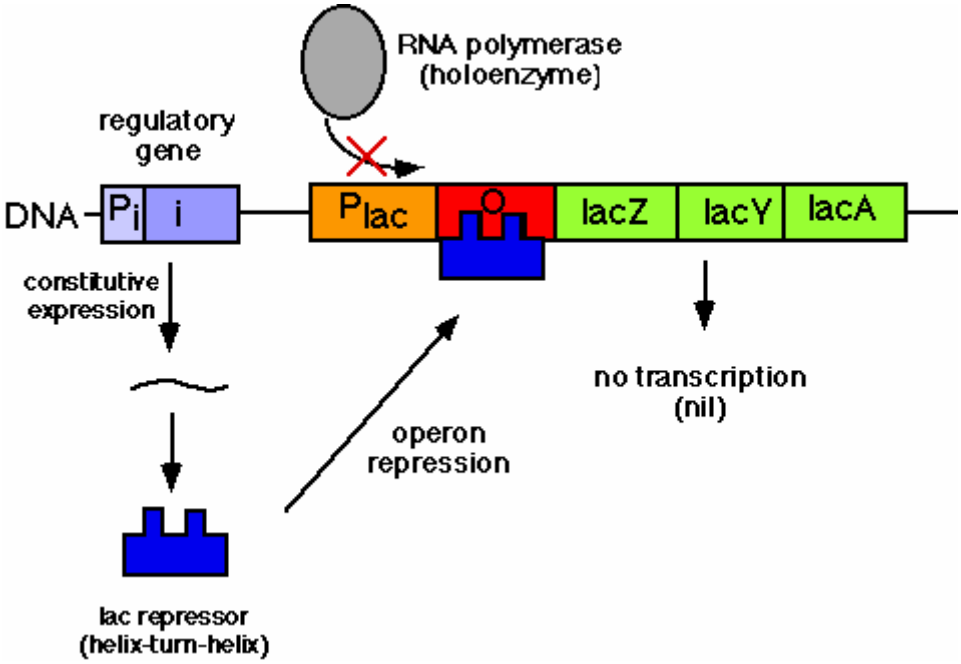
lac regulator gene (***i***) ทำหน้าที่สังเคราะห์ lac repressor protein ที่อยู่ในสภาพ active form มีกรดอะมิโนยาวประมาณ 360 โมเลกุล ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อย 4 หน่วยที่เหมือนกัน (tetamer) แต่ละหน่วยย่อยมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 38,000 ดาลตัน กลไกการทำงานของ lac repressor protein ในการควบคุมการแสดงออกของยีนนั้นขึ้นอยู่ว่ากับสภาวะนั้นมีหรือไม่มี inducer (หรือ lactose) สามารถแบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ (1) กลไกการควบคุมแบบ negative control ของ *lac* operon และ (2) การควบคุมแบบ positive control ของ *lac* poeron โดย CAP และ cyclic AMP

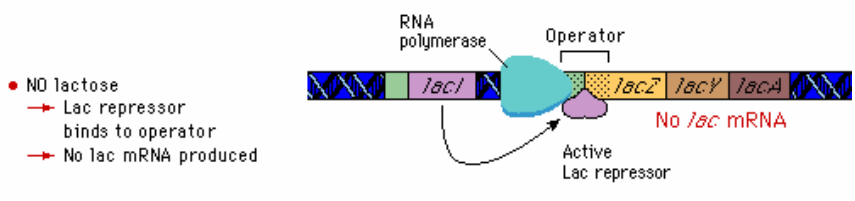
1. กลไกการควบคุมแบบ negative control ของ *lac* operon

หมายความว่า repressor protein ที่ผลิตจากยีน ***i*** อยู่ในสภาพ active สามารถเข้าเกาะกับตำแหน่ง ***o*** เพื่อกด (repression) ไม่ให้มีการแสดงออกของยีน โดยมีกลไกการควบคุม ดังนี้

1.1 สภาวะที่ไม่มี inducer (หรือ lactose)

โมเลกุลของ *lac* repressor protein จะเข้าจับกับ *lac* operator (***o***) เพื่อป้องกันไม่ให้เอนไซม์ RNA polymerase เข้าจับกับ promoter site (***p***) จึงทำให้ไม่ให้เกิดการลอกรหัสของยีนโครงสร้าง **(รูปที่ 8.6)** ซึ่งเป็นกลไกการควบคุมแบบ negative control





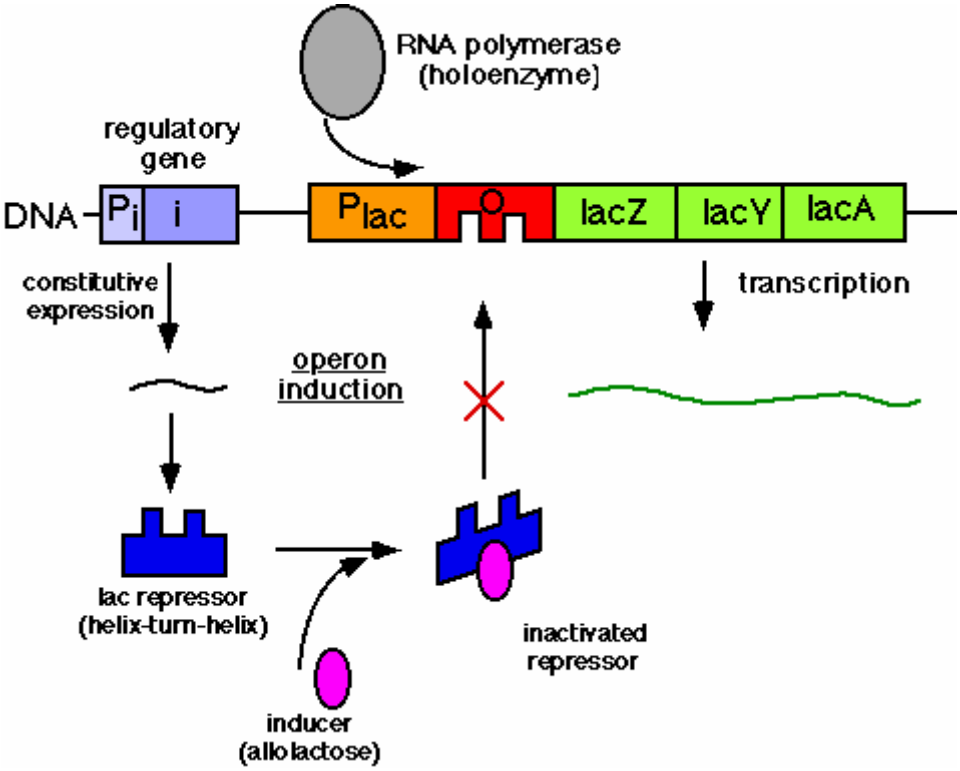
รูปที่ 8.6 กลไกการแสดงออกของ *lac* operon ในขณะที่ปราศจากน้ำตาล lactose

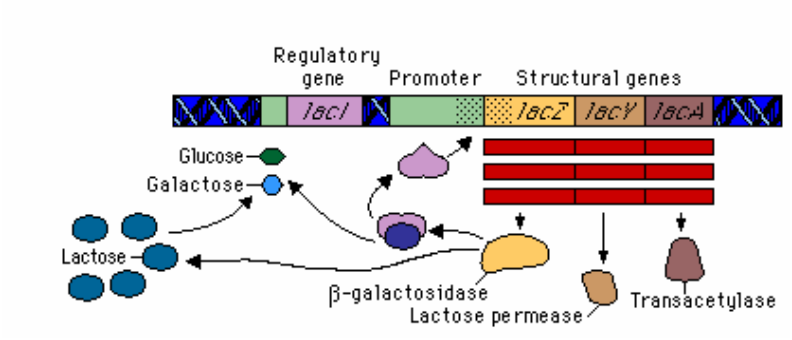
(ที่มา : http://www.life.uiuc.edu/bio100/lectures/s97lects/16GeneControl/lac_operon_rep.GIF)

อย่างไรก็ตามสภาวะที่ไม่มี inducer (หรือ lactose) พบว่ายีน *z*, *y* และ *a* จะมีการสังเคราะห์เอนไซม์อยู่บ้าง แต่มีการสังเคราะห์ผลผลิตของยีนออกมาในระดับที่ต่ำมาก คือ มีเอนไซม์ β-galactosidase น้อยกว่า 10 โมเลกุลต่อเซลล์ ซึ่งเป็นปริมาณที่เพียงพอที่จะกระตุ้นให้ *lac* operon มีการแสดงออกในระดับหนึ่ง โดย β-aglactosidase เข้าทำปฏิกิริยากับน้ำตาล lactose (ที่มีปริมาณเล็กน้อยภายในเซลล์) ได้เป็น allolactose ซึ่งเป็น inducer คล้ายกับสภาวะที่มีน้ำตาล lactose โดย inducer จะไปจับกับตำแหน่งยีน ***o*** ทำให้ RNA polymerase สังเคราะห์เอนไซม์ได้ นอกจากนั้นยังพบว่ามี galactoside บางชนิด เช่น isopropythiogalactoside (IPTG) เป็น strong inducer ของเอนไซม์ β-galactosidase (คือ ทำให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์อยู่ตลอดเวลา) แต่ไม่ได้ทำหน้าที่เป็น substrate ของเอนไซม์ β-galactosidase ดังนั้นจึงเรียกสารเหล่านี้ว่า gratuitous inducer หรือ non-metabolizable inducer

1.2. สภาวะที่มี inducer (หรือ lactose)

เมื่อมีการเติมน้ำตาล lactose เข้าไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะทำให้ปริมาณเอนไซม์ β-galactosidase สูงขึ้นถึง 5,000 โมเลกุลต่อเซลล์อย่างรวดเร็ว โดยเอนไซม์ □-galactosidase จะเปลี่ยนน้ำตาล lactose ให้เป็น inducer ของ operon คือ allolactose เพื่อเข้าจับกับ repressor protein ให้อยู่สภาพ inactive repressor ทำให้ไม่สามารถเข้าจับกับ operator gene จึงมีผลให้เอนไซม์ RNA polymerase เข้าจับกับ promoter site เพื่อทำการลอกรหัสของยีนโครงสร้างทั้ง 3 ยีน ภายใน *lac* operon **(รูปที่ 8.7)**





รูปที่ 8.7 กลไกการแสดงออกของ *lac* operon ในขณะที่มีน้ำตาล lactose อยู่ในสภาพแวดล้อม

(ที่มา : http://www.life.uiuc.edu/bio100/lectures/s97lects/16GeneControl/lac_operon_ind.GIF)

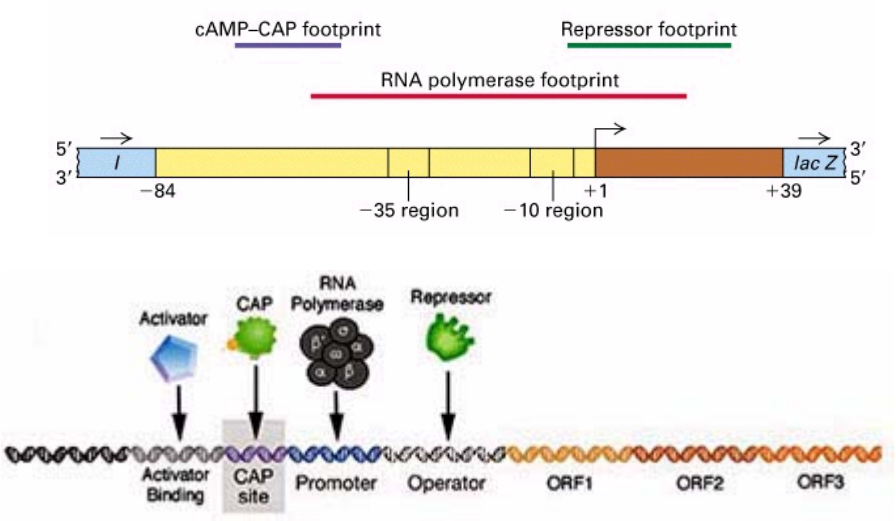
2. การควบคุมแบบ positive control ของ *lac* poeron โดย CAP และ cyclic AMP

จากการศึกษาเลี้ยงเซลล์ *E. coli* ในอาหารที่เติมน้ำตาล lactose และน้ำตาล glucose พบว่า glucose ที่มีปริมาณสูงจะมีการยับยั้งการเปิด *lac* operon รวมทั้ง operon อื่นๆ ที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต เช่น arabinose operon และ galactose operon เป็นต้น นั่นแสดงว่าน้ำตาล glucose เป็นน้ำตาลตัวแรกที่ถูกไปใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน จึงเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า catabolite repression (หรือ glucose effect) โดยปริมาณน้ำตาล glucose ภายในเซลล์จะไวต่อการตอบสนองการสังเคราะห์ cAMP คือถ้าระดับของน้ำตาล glucose สูงขึ้นจะทำให้ระดับของ cAMP ลดต่ำลง แต่ถ้าระดับของน้ำตาล glucose ลดต่ำลงจะมีผลทำให้ระดับ cAMP สูงขึ้น ซึ่งมีกลไกการควบคุม คือ (1) กรณีที่มีระดับน้ำตาล glucose ภายในเซลล์ต่ำ และ (2) กรณีที่มีระดับน้ำตาล glucose ภายในเซลล์สูง

2.1 กรณีที่มีระดับน้ำตาล glucose ภายในเซลล์ต่ำ

ถ้าภายในเซลล์มีระดับของน้ำตาล glucose ลดต่ำลง มีผลทำให้ระดับ cAMP สูง ซึ่ง cAMP จะไปรวมกับ CAP กลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ cAMP-CAP complex นั้นที่สามารถเข้าจับกับ *lac* promoter แล้วกระตุ้นให้ RNA polymerase เข้าเกาะกับ *lac* promoter เพื่อเปิดการทำงานของยีนต่อไป **(รูปที่ 8.8)** สารประกอบเชิงซ้อน cAMP-CAP complex เป็นตัวการทำให้เกิดการควบคุมแบบ positive control

catabolite repression ของ *lac* operon นั้นเกี่ยวข้องกับ regulatory protein หรือสารประกอบเชิงซ้อนของ cAMP-CAP complex ที่ประกอบด้วย (1) cyclic AMP receptor protein (หรือ catabolite activator protein; CAP) มีลักษณะเป็น dimer และ (2) effector molecule (หรือ cyclic AMP; cAMP หรือ adenosine-3$^{/}$, 5$^{/}$–phosphate) จากการศึกษาพบว่าโมเลกุล CAP เพียงอย่างเดียวไม่สามารถเข้าจับกับ *lac* promoter ได้ มีเพียงสารประกอบเชิงซ้อนของ cAMP-CAP complex เท่านั้นที่สามารถเข้าจับกับ *lac* promoter ได้



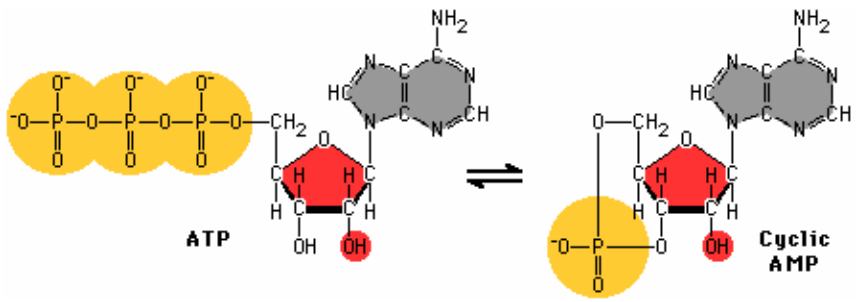
รูปที่ 8.8 cAMP-CAP binding site และ RNA polymerase binding ภายใน promoter

(ที่มา : http://bioweb.wku.edu/courses/biol22000/18TranscInitProk/images/F10-17.JPG)

2.2 กรณีที่มีระดับน้ำตาล glucose ภายในเซลล์สูง

ถ้าภายในเซลล์มีระดับของน้ำตาล glucose สูงขึ้น มีผลทำให้ระดับ cAMP ต่ำ ทำให้มี cAMP ไม่เพียงพอที่จะไปรวมกับ CAP ได้ จึงไม่เกิดสารประกอบเชิงซ้อน cAMP-CAP complex ขึ้นภายในเซลล์ ดังนั้น CAP เพียงอย่างเดียวจึงไม่สามารถเข้าจับกับ cAMP-CAP binding site ของ *lac* operator จึงทำให้เอนไซม์ RNA polymerase ไม่สามารถเข้าจับกับ RNA polymerase binding site ของ *lac* promoter ได้ จึงไม่เกิดกระบวนการลอกรหัส

ปัจจุบันยังไม่ที่เข้าใจว่าน้ำตาล glucose กลไกควบคุมปริมาณ cAMP อย่างไร แต่อาจเป็นไปได้ว่าในขณะที่ภายในเซลล์มีความเข้มข้นของน้ำตาล glucose สูง พบว่าโมเลกุลของน้ำตาล glucose หรือสารบางอย่างที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของน้ำตาล glucose จะมีผลไปยับยั้งการทำงานของของเอนไซม์ adenylcyclase ที่จะกระตุ้นให้ ATP เปลี่ยนไปเป็น cAMP **(รูปที่ 15.9)**



รูปที่ 15.9 กระบวนการเกิด cyclic AMP

(ที่มา : http://cwx.prenhall.com/bookbind/pubbooks/mcmurrygob/medialib/media_portfolio/text_images/FG20_04.JPG)

สรุปกลไกที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของ repressor protein, cAMP-CAP complex และ RNA polymerase ที่มีบทบาทต่อการสังเคราะห์ *lac* mRNA ใน *lac* opcron ได้ดังนี้

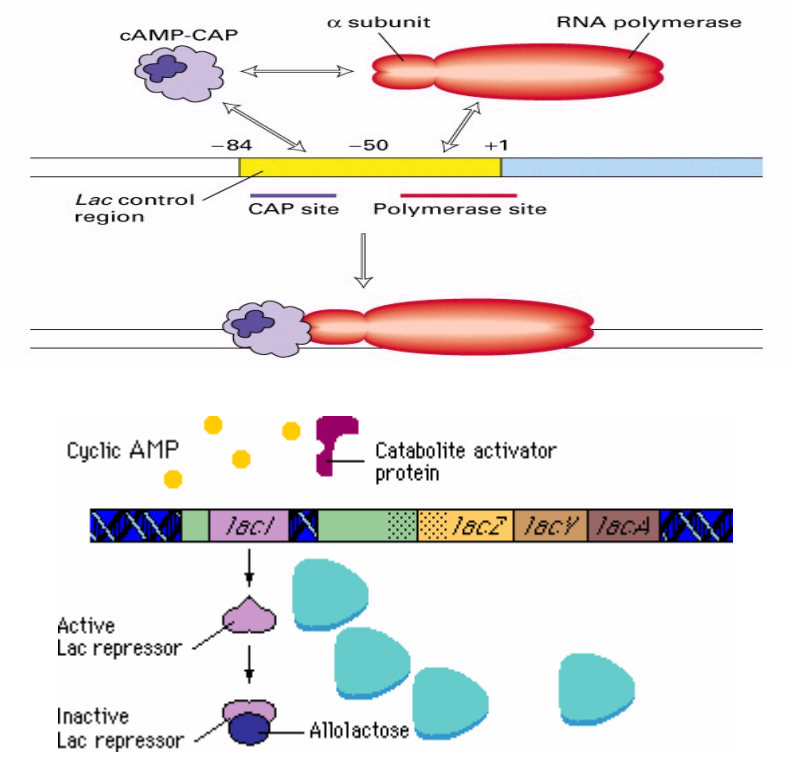
1. กรณีที่ไม่มีน้ำตาล lactose

ถ้ามี repressor protein จาก *lac* operon ที่เป็นกลไกการควบคุมแบบ negative control คือ เมื่อมี repressor protein จับอยู่กับ operator ก่อนแล้ว RNA polymerase ไม่สามารถเข้าจับกับ *lac* promoter ได้ ดังนั้น *lac* operon จึงปิดการทำงาน ทำให้ไม่เกิดกระบวนการถอดรหัสของยีน คือ repressor ทำหน้าที่เป็น antimelting protein ป้องกันการเกิด open promoter complex บนสายดีเอ็นเอ

2. กรณีที่ไม่มีน้ำตาล glucose

จะมีการสังเคราะห์ cAMP-CAP complex ซึ่งสามารถเข้าเกาะกับ *lac* operator ที่ตำแหน่ง CAP site แล้วกระตุ้นให้ RNA polymerase เข้าจับกับ *lac* promoter ของดีเอ็นเอ ดังนั้นจึงเกิดการเปิดการทำงานของยีน *lac* operon ซึ่งถือว่าเป็นกลไกการควบคุมแบบ positive control **(รูปที่ 8.10)**

cAMP-CAP ทำหน้าที่ให้ double helix อ่อนกำลังลง ทำให้เกิด open promoter complex ได้ง่าย ซึ่งส่งผลทำให้ RNA polymerase เข้าทำงานได้

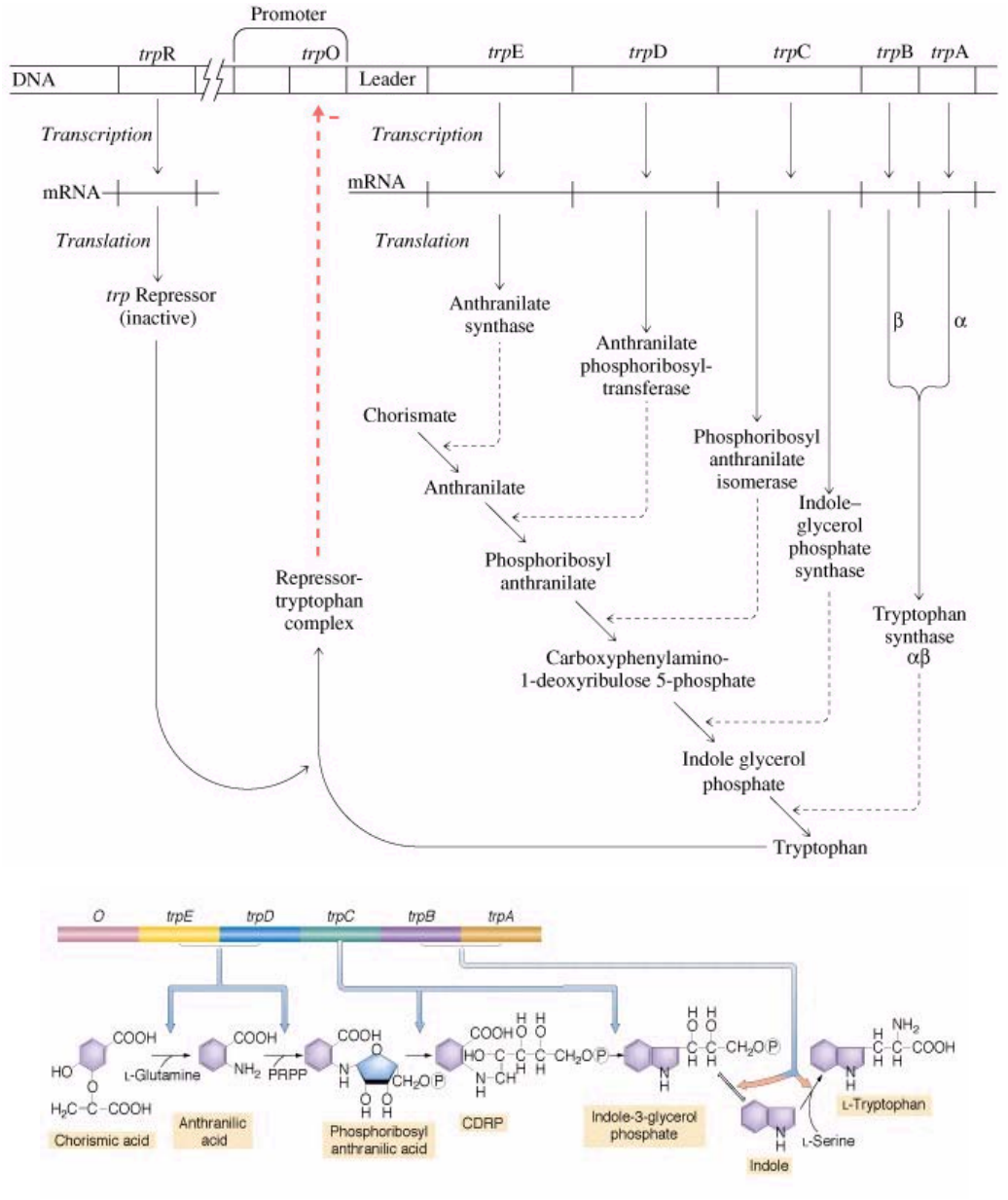


รูปที่ 8.10 การควบคุมการแสดงออกของยีน *lac* opeon โดย cAMP-CAP complex

(ที่มา : http://www.phschool.com/science/biology_place/biocoach/lacoperon/cyclic.html)

II. Repressible operon

เป็น operon ที่อธิบายถึงกลไกการควบคุมการทำงานของกลุ่มยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์สารที่จำเป็นภายในเซลล์ (biosynthetic pathway; anabolism) ซึ่งตัวอย่างของยีนในกลุ่ม repressible operon คือ *trp* operon ซึ่งมีกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนตรงข้ามกับ *lac* operon โดยยีน ***i*** จะสร้าง aporepressor protein ที่อยู่ในสภาพ inactive form ไม่สามารถเข้าเกาะกับ ***o*** gene ทำให้ RNA polymerase เข้าเกาะกับ ***p*** gene แล้วเกิดกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนได้ ซึ่งถือว่าเป็นการควบคุมแบบ positive control **(รูปที่ 8.11)**



รูปที่ 8.11 แบบแสดงจำลอง repressible operon โครงสร้างของ *trp* operon และขั้นตอนการสังเคราะห์กรดอะมิโน trypophan

(ที่มา : http://www.indstate.edu/thcme/mwking/lacoperon.gif)

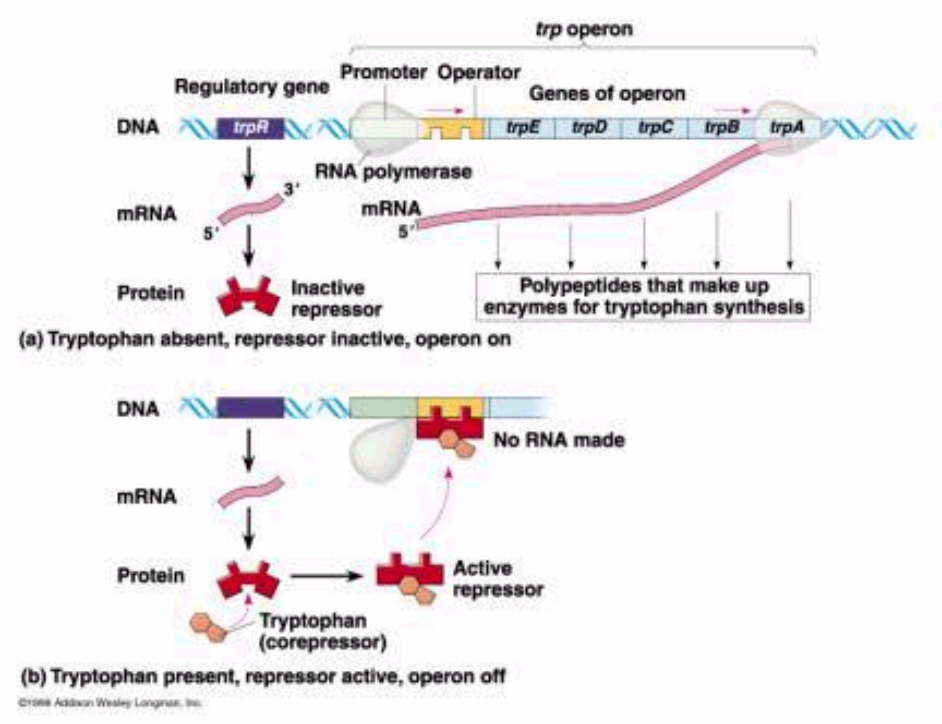
***trp* operon**

Charles Yanofsky และคณะ (1981) ได้เสนอโครงสร้างของ tryptophan operon (*trp* operon) ซึ่งประกอบด้วย regulator gene (*trpR*), promoter gene (***p***), operator gene (***o***) และ structural gene ที่ประกอบด้วยยีน 5 ตัว เรียงติดต่อกันคือ *trpE, trpD, trpC, trpB* และ *trpA* ยีนเหล่านี้ทำหน้าที่สังเคราะห์เอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดอะมิโน tryptophan จากการศึกษาพบว่า มีส่วนของ attenuator site (att) อยู่ระหว่างตำแหน่งของ operator region กับ *trpE* โดยตำแหน่ง att มีจำนวนคู่เบสประมาณ 140 คู่เบส ซึ่งเป็นบริเวณสำคัญสำหรับการควบคุมการแสดงออกของ *trp* operon **(รูปที่ 8.11)**

กลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนใน *trp* operon สามารถแบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ (1) กลไกการควบคุมโดย aporepressor และ (2) การควบคุมโดย attenuator site (att)

1. การควบคุมการทำงานของ *trp* operon โดยการทำงานของ aporepressor

กลไกการทำงานของ *trp* operon จะตรงข้ามกับ *lac* operon กล่าวคือ ในสภาวะที่เลี้ยง *E. coli* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีกรดอะมิโน tryptophan พบว่า *trpR* (regulater gene) จะสังเคราะห์ repressor protein เรียกว่า aporepressor protein ที่อยู่ในสภาพ inactive form ไม่สามารถเข้าจับกับ operator gene ได้ ทำให้เอนไซม์ RNA polymerase เข้าจับกับ promoter gene ทำให้ยีนโครงสร้างของ *trp* operon จะถูกเปิดออก แล้วมีการลอกรหัสออกมา **(รูปที่ 8.12a)** แต่เมื่อมีปริมาณกรดอะมิโน tryptophan ภายในเซลล์มากขึ้น พบว่ากรดอะมิโน tryptophan ทำหน้าที่เป็น corepressor เข้าจับกับ aporepressor protein กลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อนอยู่ในสภาพ active ที่สามารถเข้าจับกับ operator gene ซึ่งป้องกันไม่ให้เอนไซม์ RNA polymerase เข้าจับกับ promoter gene ทำให้ *trp* operon ถูกปิดไม่เกิดการลอกรหัสของยีนโครงสร้างทั้ง 5 ยีน **(รูปที่ 8.13b)** ซึ่งการควบคุมการทำงานของ *trp* operon โดยการทำงานของ aporepressor เป็นการควบคุมการแสดงออกของยีนแบบ negative control ในระดับลอกรหัส (transcription)



รูปที่ 8.12 การแสดงออกของ *trp* operon โดยการทำงานของ aporepressor

a) ในสภาวะที่เซลล์ปราศจาก corepressor

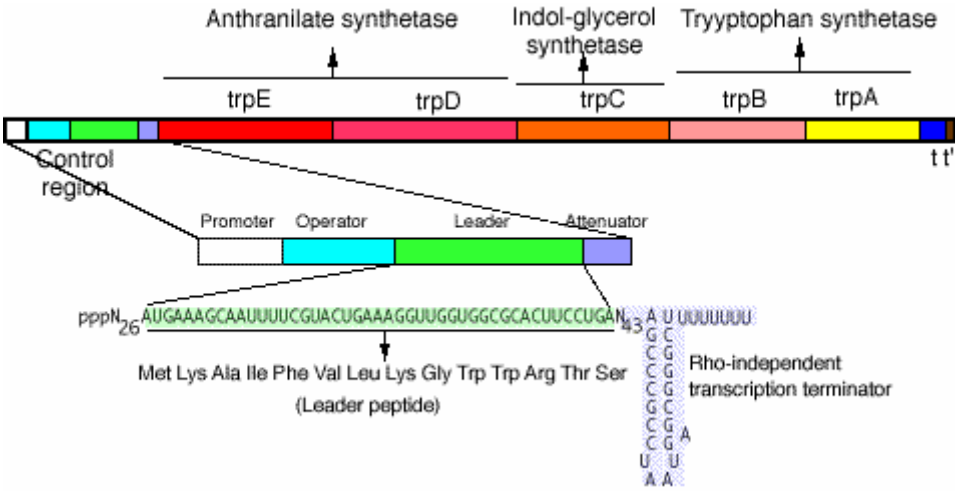
b) ในสภาวะที่เซลล์มี corepressor หรือ tryptophan

(ที่มา : http://departments.oxy.edu/biology/bio130/lectures_2000/11-17-00_lecture_files/image022.jpg)

2. การควบคุมการแสดงออกของ *trp* operon โดย attenuator site (att)

การควบคุม *trp* operon โดย attenuator site (att) ที่อยู่ระหว่างตำแหน่งของ operator region กับ *trpE* โดยตำแหน่ง att เป็นตำแหน่งสำคัญสำหรับการควบคุมการแสดงออกของ *trp* operon ดังนี้

1) ตำแหน่ง att บนดีเอ็นเอของ *trp* operon มีจำนวนคู่เบสประมาณ 140 คู่เบส โดยลำดับเบสส่วนใหญ่เป็น GC rich และมีลักษณะเป็น palindrom sequence ซึ่งแบ่งออกเป็น 4 ส่วน โดยส่วนที่ 1 เรียกว่า *trpL* (หรือ leader region) ที่มีตำแหน่งอยู่ที่ลำดับเบสที่ 27-68 ซึ่งตำแหน่ง *trpL* มีลำดับรหัสพันธุกรรม (coding sequence) ที่กำหนดกรดอะมิโนจำนวน 14 ตัว โดยมีลำดับของ tryptophan 2 ตัวอยู่ติดกัน **(รูปที่ 8.13)** ซึ่งเป็นบริเวณสำคัญสำหรับการควบคุมการแสดงออกของ *trp* operon



รูปที่ 8.13 องค์ประกอบของ *trp* operon และโครงสร้างของ attenuator site (att)

(ที่มา : http://www.andrew.cmu.edu/user/berget/Education/attenuation/atten1.gif)

2) การควบคุมโดย attenuation จะเกิดขึ้นได้จำเป็นต้องอาศัย termination of transcription โดยเกิดกระบวนการลอกรหัสขึ้นที่บริเวณตำแหน่ง attenuator site (att) ได้โมเลกุล mRNA สายเดี่ยว ซึ่งแบ่งออกเป็น 4 บริเวณ โดยบริเวณทั้ง 4 จะมีลำเบสที่เป็นคู่สมกัน (complrmrtary base) จึงทำให้โมเลกุล mRNA สายเดี่ยวสามารถที่จะมาเข้าคู่กันได้ แล้วเกิดเป็นโมเลกุล mRNA สายคู่ได้ ซึ่งการเข้าคู่กันของโมเลกุล mRNA สายเดี่ยวสามารถเข้าคู่กันได้ 3 แบบ คือ (1) ตรงบริเวณที่ 1 กับ 2 ทำให้เกิด pause signal ทำให้หยุดการลอกรหัสชั่วคราว (2) การเข้าคู่กันตรงบริเวณที่ 2 กับ 3 ทำให้เกิด antitermination signal เพื่อทำให้การแปลรหัสเป็นไปอย่างต่อเนื่อง และ (3) การเข้าคู่กันตรงบริเวณที่ 3 กับ 4 ทำให้เกิดเป็นรหัสหยุดเรียก termination of transcription signal ซึ่งมีหน้าที่คล้ายกับ rho-independent signal ของรหัสหยุดการสังเคราะห์โมเลกุล mRNA **(รูปที่ 8.14)** โดยบริเวณส่วนปลาย 3′mRNA ของส่วนที่ 4 จะมีเบส U ประมาณ 8 ตัว

3) การควบคุม *trp* operon โดย attenuation จะเกิดในโปรคารีโอตที่มีกระบวนการลอกรหัสเกิดก่อนแล้วขณะเดียวกันก็มีกระบวนการแปลรหัสเกิดขึ้นทันที (coupling transcription and translation) โดยขณะที่ RNA plymerase มีการสังเคราะห์ leader mRNA ผ่านบริเวณ att บริเวณที่ 1 กับ 2 ไรโบโซมเข้ามาจับกันโมเลกุล leader mRNA เพื่อเริ่มต้นแปลรหัสได้สายเปปไทด์สั้นๆ ที่เรียก leader peptide ในขณะที่กระบวนการลอกรหัสและการแปลรหัสกำลังดำเนินอยู่อย่างต่อเนื่อง ตำแหน่งของไรโบโซมที่เคลื่อนไปบน leader mRNA จะเกิดกลไกการควบคุมการเปิดและปิด *trp* operon โดย attenuation ขึ้น 2 แบบ คือ

3.1) เมื่อเซลล์แบคทีเรียอยู่ในสภาวะที่ขาดกรดอะมิโน tryptophan

ในสภาวะที่เซลล์ขาดกรดอะมิโน tryptophan จะมีผลทำให้ปริมาณของ $tRNA^{trp}$ ลดลง เพราะเมื่อโมเลกุลของกรดอะมิโน tryptophan น้อยมาก ทำให้การเกิดปฏิกิริยา aminoacylation

ของ $tRNA^{trp}$ ก็จะเกิดขึ้นน้อย จึงไปมีผลทำให้ไรโบโซมที่เคลื่อนตัวไปบน leader mRNA จะไปหยุดชั่วคราวที่ att บริเวณที่ 1 ซึ่งรหัส trp codon 2 รหัส (5′UGG UGG3′) เรียงติดต่อกัน (โดยจะไปหยุดชั่วคราวตรงรหัส trp codon รหัสแรกเท่านั้น) ทำให้มีเหตุการณ์ที่สำคัญ ดังนี้

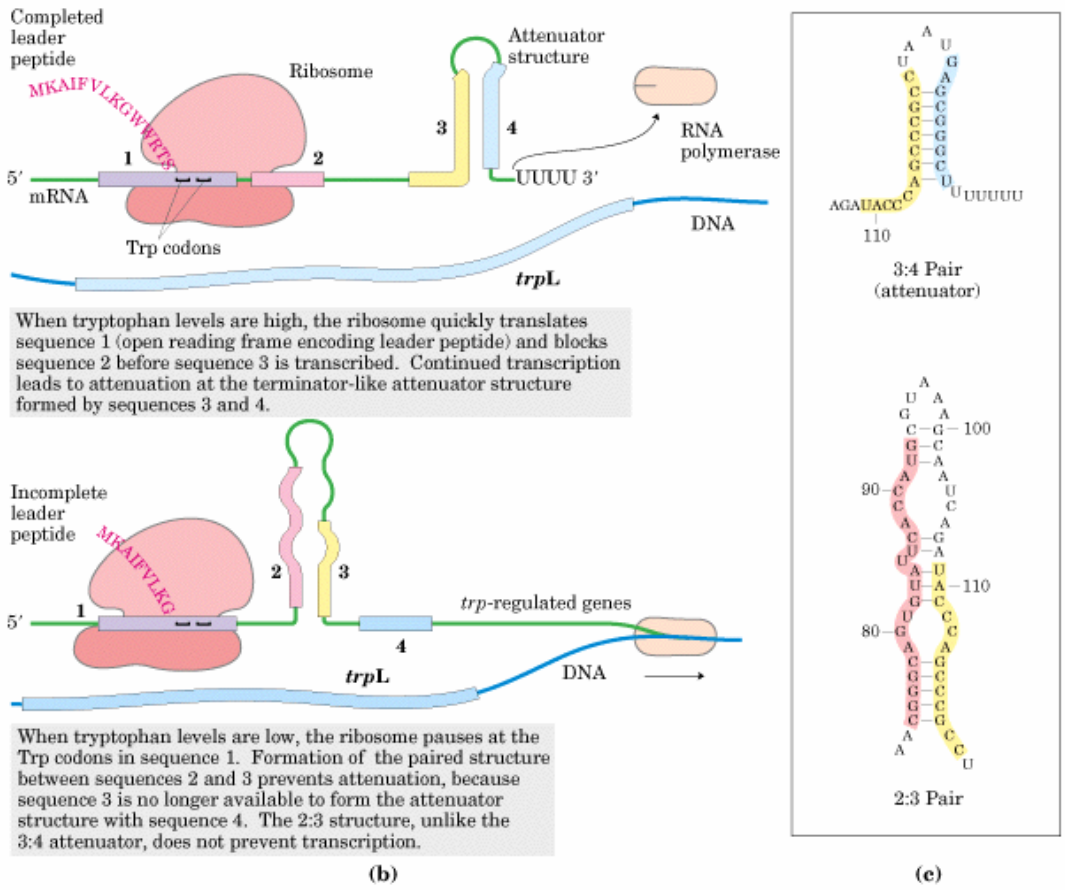
(1) ขณะนี้ไรโบโซมได้ครอบคุมบริเวณที่ 1 ของ attenuator ไว้ จึงทำให้บริเวณที่ 1 กับ 2 ไม่สามารถที่จะมารวมกันเป็นโครงสร้างของ stem and loop ได้ เพราะบริเวณที่ 1 ไม่ว่าง

(2) แต่ leader mRNA บริเวณที่ 2 สามารถที่จะเข้าคู่กับบริเวณที่ 3 ได้ เนื่องจาก RNA polymerase มีการลอกรหัสผ่านบริเวณที่ 2 และ 3 ไปแล้ว **(รูปที่ 8.14b)**

3) ซึ่งการเข้าคู่กับของบริเวณที่ 2 กับ 3 ทำให้เกิดเป็น antitermination signal เพราะว่าบริเวณที่ 3 กับ 4 ไม่สามารถมาเข้าคู่กันได้ ทำให้ไม่เกิด termination signal ขึ้น จึงทำให้เอนไซม์ RNA polymerase เคลื่อนที่ผ่าน attenuator ไปได้ มีผลให้ structural gene ทั้งหมดถูกแปลรหัสออกมา

3.2) กรณีที่ภายในเซลล์แบคทีเรียมีปริมาณกรดอะมิโน tryptophan อย่างเพียงพอ

เมื่อ RNA polymerase ทำการลอกรหัสผ่านบริเวณของ att ไปแล้วจะมีการควบคุมการแสดงออกของ *trp* operon กรณีที่มีปริมาณกรดอะมิโน tryptophan ภายในเซลล์แบคทีเรียอย่างเพียงพอ เมื่อไรโบโซมเคลื่อนที่มาถึงบริเวณที่ 1 ของ leader mRNA ซึ่งมี trp codon 2 รหัส สามารถแปลรหัสออกมาได้อย่างต่อเนื่องโดยไม่หยุด เพราะว่าในเซลล์มีปริมาณ $tRNA^{trp}$ อย่างเพียงพอ จากนั้นไรโบโซมจะเคลื่อนตัวแปลรหัสพันธุกรรมตำแหน่งต่อไปเรื่อยๆ จนเคลื่อนตัวมาถึงรหัสหยุด (UGA) ของ leader mRNA ในส่วนของบริเวณที่ 2 ซึ่งการควบคุมการแสดงออกของ *trp* operon กรณีที่มีปริมาณ กรดอะมิโน tryptophan ภายในเซลล์แบคทีเรียอย่างเพียงพอ ขณะที่มีการแปลรหัส พบว่าไรโบโซมได้ครอบคุมบริเวณที่ 2 ของ mRNA leader ไว้ทำให้บริเวณที่ 2 ไม่สามารถที่จะเข้าคู่กับบริเวณที่ 3 ได้ ส่งผลทำให้บริเวณที่ 3 เข้าไปเข้าคู่กับบริเวณที่ 4 ได้ เกิด termination signal **(รูปที่ 8.14a)** ทำให้ไรโบโซมไม่สามารถเข้าแปรหัสต่อไปได้ จึงสิ้นสุดกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน หรืออาจกล่าวได้ว่า เป็นการควบคุมในระดับการแปลรหัส นั่นเอง



รูปที่ 8.14 แบบจำลองการควบคุม *trp* poeron โดย attentration

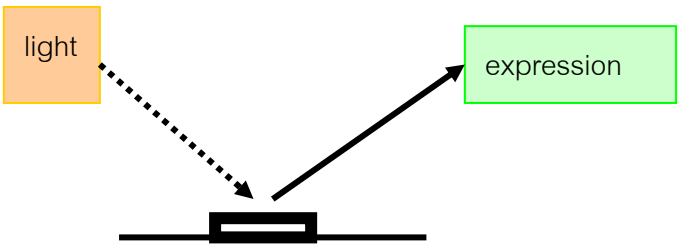
a) ในสภาวะที่ขาดกรดอะมิโน tryptophan

b) ในสภาวะที่มีกรดอะมิโน tryptophan อย่างเพียงพอ

(ที่มา : http://cats.med.uvm.edu/cats_teachingmod/microbiology/courses/gene_regulation/images/dij.trp-operon.gif)

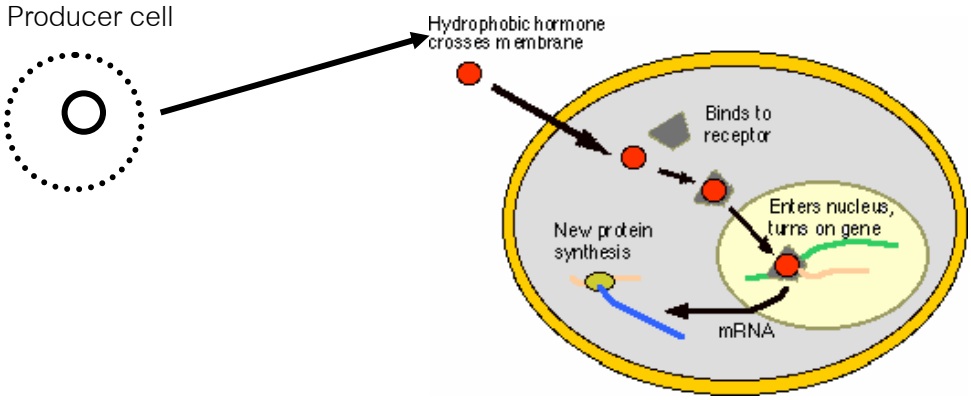
การควบคุมการแสดงออกของยีนในยูคารีโอต (Gene regulation in eukaryote)

กลไกควบคุมการแสดงออกของยีนในยูคารีโอตเพื่อตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมมีกลไกคล้ายกับโปรคารีโอต อาทิ ยีสต์มีกลไกการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการนำน้ำตาลไปใช้ประโยชน์ที่คล้ายคลึงกับของ *E. coli* ส่วนยีนในเซลล์พืชเมื่อได้รับแสงจากภายนอกเป็นตัวกระตุ้น จะทำให้เกิดการทำงานของยีนเพื่อสังเคราะห์ photosynthetic protein **(รูปที่ 8.15)** นอกจากนี้ยีนในเซลล์เดี่ยว (single cell) หรือกลุ่มของเซลล์ของสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ (multicellular oganism) จะมีการตอบสนองต่อสารกระตุ้น หรือสิ่งเร้าจากภายนอกเซลล์ เช่น hormone, growth factor และ regulatory molecule ที่สร้างออกมาจากเซลล์ชนิดใดชนิดหนึ่งแล้วไปมีผลกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนที่อยู่ภายในเซลล์อื่น **(รูปที่ 8.16)** ซึ่งทำให้กลุ่มของเซลล์เหล่านั้นมีการทำงานร่วมกัน ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากต่อสิ่งมีชีวิต



gene for a photosynthetic protein

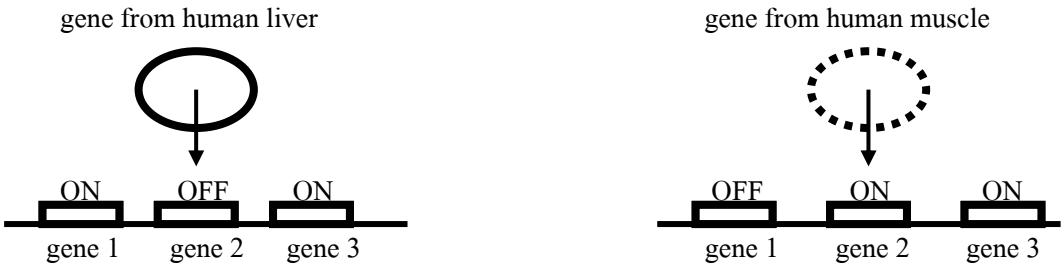
รูปที่ 8.15 การแสดงออกของยีนในพืชเมื่อได้รับแสงจากภายนอกเป็นตัวกระตุ้น



รูปที่ 8. 16 ผลผลิตยีนจากเซลล์หนึ่ง มีผลกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนที่อยู่ต่างเซลล์

(ที่มา : http://members.aol.com/Bio50/LecNotes/LNPics/ln21e.gif)

เซลล์แต่ละชนิดในยูคารีโอตมีรูปแบบการควบคุมการแสดงออกยีนแตกต่างกัน เพื่อดำรงสถานะภาพของเซลล์เอาไว้ อย่างเช่นภายในมนุษย์มีเซลล์อยู่ประมาณ 250 ชนิด แต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันทางสัณฐานวิทยา องค์ประกอบทางชีวเคมี และหน้าที่ เช่น เซลล์ของเซลล์ตับกับเซลล์กล้ามเนื้อมีความแตกต่างกันมาก สาเหตุเพราะกลุ่มเซลล์ดังกล่าวมีจำนวนชุดของยีน (set of gene) ที่แสดงออกไม่เหมือนกัน **(รูปที่ 8.17)** โดยการแสดงออกของเซลล์แต่ละชนิดนั้นมีรูปแบบการแสดงออกของยีนที่ถาวรและได้ถูกกำหนดไว้แล้วตั้งแต่ในระยะเริ่มต้นของพัฒนาการ ดังนั้นจึงทำให้เซลล์กล้ามเนื้อไม่สามารถเปลี่ยนไปเป็นเซลล์ตับได้ ในระยะเริ่มต้นของเอมบริโอ (embryo) เซลล์ทั้งหมดได้ถูกกำหนดเอาไว้แล้วว่าจะต้องพัฒนาไปเนื้อเยื่อหรืออวัยวะชนิดใด เพื่อพัฒนาไปเป็นทารก (fetus) ที่สมบูรณ์ ดังนั้นเซลล์ของเอมบริโอทั้งหมดจำเป็นต้องพัฒนาไปยังส่วนต่างๆ ของเอมบริโออย่างถูกต้อง นอกจากนี้ยังพบว่ายีนบางชนิดมีการแสดงออกในช่วงอายุที่แตกต่างกัน เช่น glubin gene ของมนุษย์



รูปที่ 8.17 การแสดงออกของยีนต่างกัน เมื่อต่างอวัยวะของสิ่งมีชีวิตเดียวกัน

การควบคุมการแสดงออกของยีนในยูคารีโอตมีความซับซ้อนมากกว่าของโปรคารีโอต ในด้านการเจริญเติบโต การแบ่งเซลล์ การเปลี่ยนแปลงรูปร่างและการพัฒนาจากเซลล์ไปเป็นอวัยวะและองค์ประกอบทางชีวเคมี นอกจากนี้การจัดระบบของยีนในยูคารีโอตแตกต่างจากโปรคารีโอตหลายประการเช่น

1. โมเลกุล mRNA ของยูคารีโอตมีลักษณะเป็น monocistronic ที่สามารถแปลรหัสออกมาเป็นโพลีเปปไทด์ได้เพียง 1 สาย หรือได้เป็นโปรตีน 1 ชนิด แต่ของโปรคารีโอตจะเป็น polycistronic mRNA ที่สามารถแปลรหัสเป็นโพลีเปปไทด์ได้มากกว่า 1 สาย หรืออาจกล่าวได้ว่าใน 1 operon มียีนโครงสร้างเพียง 1 ตัว ในยูคารีโอต operon นั่นเอง (ซึ่งจะไม่ใช้คำว่า operon ในยูคารีโอต)

2. ดีเอนเอของยูคารีโอตจะจับอยู่กับ histone และ non-histone protein และจะมีเป็นบางส่วนเท่านั้นที่ไม่มีโปรตีนเข้าจับ

3. ยีนที่บรรจุอยู่ภายในดีเอนเอทั้งหมดของยูคารีโอตมีเป็นจำนวนมากที่ไม่มีการแสดงออก โดยยีนของยูคารีโอตมีส่วนของ intron แทรกอยู่

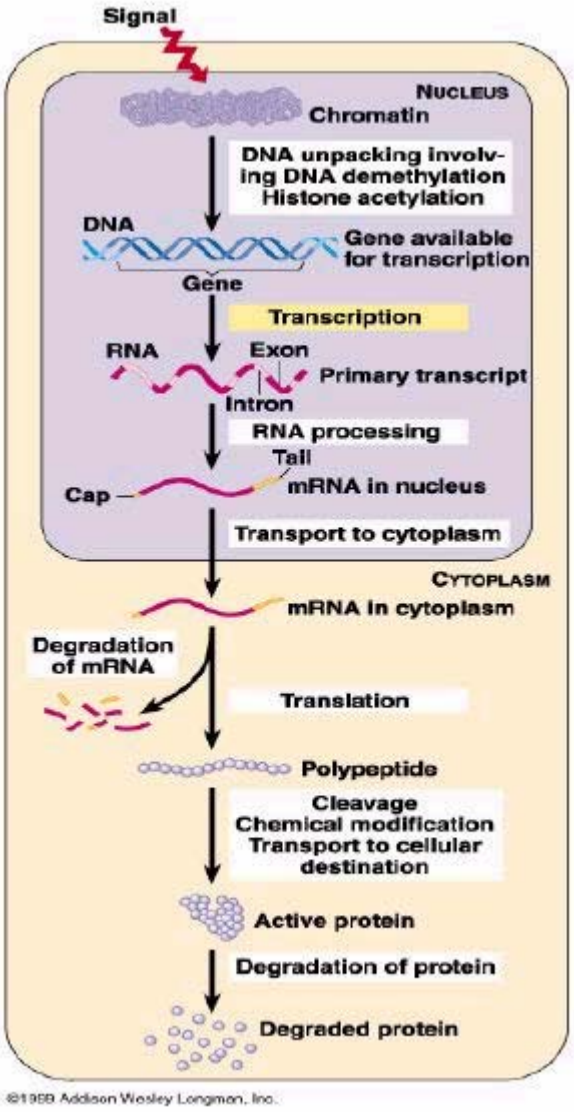
เนื่องจากความซับซ้อนของยีนภายในยูคารีโอต ทำให้ความเข้าใจเกี่ยวกับการควบคุมการแสดงออกและการทำงานของยีนภายในยูคารีโอตไม่มากนัก ดังนั้นจึงได้มีการเสนอแนวความคิดที่เป็นไปได้สำหรับการควบคุมการแสดงออกของยีน คือการควบคุมปริมาณอัตราการสังเคราะห์ผลผลิตของยีน อัตราการย่อยสลายผลผลิตของยีนต่อหนึ่งหน่วยเวลา และความสมดุลของผลผลิตที่สังเคราะห์จากยีนแต่ละยีนที่สะสมอยู่ภายในเซลล์ ซึ่งการควบคุมการแสดงออกของยีนในยูคารีโอตสามารถควบคุมได้ในขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่ง หรือมีการควบคุมร่วมกันหลายขั้นตอน **(รูปที่ 8.18)** ดังนี้

1. Transcription คือการควบคุมการแสดงออกของยีนในระดับการลอกรหัส เพื่อสังเคราะห์ mRNA ถ้าปริมาณโมเลกุลอาร์เอ็นเอที่สังเคราะห์ออกมาต่อหนึ่งหน่วยเวลาลดลงจะทำให้ปริมาณของผลผลิตของยีนภายในเซลล์ลดลงด้วย

2. mRNA turnover คือ ถ้าโมเลกุล mRNA ถูกย่อยสลายไปก่อนที่จะเกิดการแปลรหัสทำให้การสังเคราะห์ผลผลิตของยีนก็จะเกิดขึ้นในปริมาณที่จำกัด

3. mRNA processing เช่น การเติม cap ที่ปลาย 5′mRNA หรือการเกิดปฏิกิริยา polyadenylation ที่ปลาย 3′mRNA และการ splicing ของยูคารีโอต โดยปกติ mRNA processing จะเกิดขึ้นก่อนการแปลรหัส แต่ถ้ากระบวนการนี้เกิดขึ้นช้าจะส่งผลทำให้การสังเคราะห์ผลผลิตของยีนล้มเหลวได้

4. Translation คือการควบคุมการสังเคราะห์ผลผลิตยีน ซึ่งอาจเป็นการควบคุมจำนวนหรือปริมาณไรโบโซมที่เข้าจับกับโมเลกุล mRNA 1 โมเลกุล เพราะถ้าปริมาณไรโบโซมที่เข้าจับกับ mRNA มีจำนวนมากก็จะทำอัตราการสังเคราะห์ผลผลิตของยีนสูงมากกว่ามีไรโบโซมเข้าจับเพียง 1 โมเลกุล



รูปที่ 8.18 ระดับควบคุมการแสดงออกของยีนในยูคารีโอต

(ที่มา : http://www.niles-hs.k12.il.us/jacnau/chpt196.jpg)

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับกลไกการควบคุมการแสงดออกของยีนในยูคารีโอต มีดังนี้

1. ตำแหน่ง upstream site ของยีนยูคารีโอต
2. DNA binding protein ที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน
3. ฮอร์โมนควบคุมการแสดงออกของยีน

I. ตำแหน่ง upstream site ของยีนในยูคารีโอต

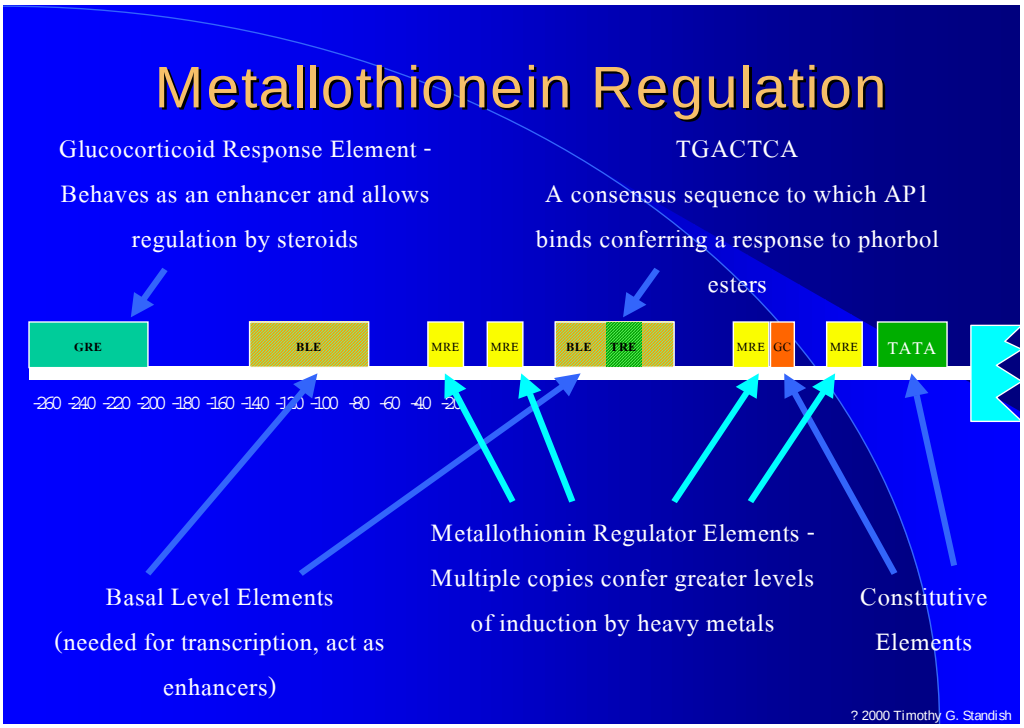
เป็นตำแหน่งที่อยู่ทางด้าน upstream site ของยีน หรืออยู่ทางด้านปลาย 5′OP_4 ของตำแหน่งเริ่มต้นการลอกรหัสของดีเอ็นเอ (ตำแหน่ง +1) ซึ่งตำแหน่ง upstream site มีความสำคัญคือ

เป็นตำแหน่งที่มีลำดับเบสจำเพาะต่อการเข้าจับของ DNA-binding protein ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนโดยอาจยับยั้งหรือกระตุ้นให้เกิดกระบวนการลอกรหัสของ structural gene (DNA-binding protein ทำหน้าที่คล้ายกับ repressor ใน *lac* operon นั่นเอง) ตัวอย่างกลไกควบคุมการแสดงออกของยีนยูคารีโอตที่เกี่ยวข้องกับความซับซ้อนของบริเวณ upstream site ของ Human metallothionin gene

Human metallothionin gene เป็นยีนที่เกี่ยวข้องการควบคุมการสังเคราะห์ metallothionin protein ซึ่งเป็นโปรตีนทำหน้าที่ป้องกันเซลล์จากความเป็นพิษของสารโลหะหนัก เช่น cadmium ซึ่ง metallothionin gene จะแสดงออกเมื่อได้รับการกระตุ้นจากปริมาณ cadmium ที่สะสมภายในเซลล์มีสูงขึ้น ทำให้เอนไซม์ RNA polymerase II เข้าเกาะกับตำแหน่ง promoter ที่อยู่บริเวณ upstream site เพื่อเริ่มกระบวนการลอกรหัสที่ตำแหน่ง +1 จากการศึกษา พบว่า ที่บริเวณตำแหน่ง upstream site ของ metallothionin gene ที่ควบคุมการแสดงออกของยีนนั้นประกอบด้วยตำแหน่งที่สำคัญ 9 ตำแหน่ง คือ (1) GRE (glucocorticoid response element), (2) มี 2 constitutive promoter elements ได้แก่ GC box และ TATA box โดยมีตำแหน่งอยู่ใกล้กับ startpoint of transcription (+1) (3) Enhancer หรือ basal level element (BLE) มี 2 ตำแหน่ง โดยมีหน้าที่ส่งเสริมการกระบวนการลอกรหัส และ (4) MRE (metal response element) มี 4 ตำแหน่ง **(รูปที่ 8.19)** โดยตำแหน่งต่างๆ ใน upstream site จะทำหน้าที่ร่วมกันเพื่อควบคุมการแสดงออกของยีน metallothionin gene ดังนี้

1. ตำแหน่ง TATA box เป็นตำแหน่งที่เอนไซม์ RNA polymerase II เข้าจับกับดีเอ็นเอ ซึ่งการเข้าจับ RNA polymerase II ต้องอาศัย transcript factors ชนิดต่างๆ เช่น TFIIA และ TFIIB เป็นต้น

2. Activation site คือตำแหน่ง GC box และ enhancer ที่มีบทบาทในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน โดยการทำงานของเอนไซม์ RNA polymerase II แต่ยังไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด

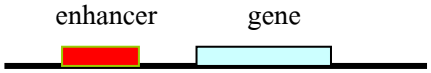


รูปที่ 8.19 บริเวณ upstream site ที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของ metallothionin gene (ที่มา : Benjamin, 2000)

จากการศึกษาการกลายพันธุ์ของ GC box หรือ enhancer อย่างใดอย่างหนึ่ง พบว่าจะทำให้อัตราการลอกรหัสลดลง ซึ่งชี้ให้เห็นว่าตำแหน่งดังกล่าวมีส่วนสำคัญที่จะกระตุ้นให้เกิดการออกรหัส อย่างไรก็ตามพบว่ามียีนหลายยีนที่มีเพียง GC box หรือ enhancer อย่างใดอย่างหนึ่งเท่านั้น หรือไม่มีเลย แต่จะมี activation site ชนิดอื่นเข้ามาแทน เช่น CAAT box โดย GC box และ CAAT box บางครั้งพบว่าตำแหน่งเหล่านี้จะรวมกันเป็นส่วนหนึ่งของ promoter แล้วมีโปรตีนเข้ามาเกาะทำให้เกิดเป็นโครงสร้างเชิงซ้อนของ RNA plymerase II initiation complex เพื่อเริ่มกระบวนการลอกรหัส

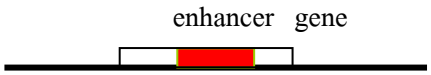
สำหรับตำแหน่งของ enhancer นั้นอาจอยู่ที่บริเวณ upstream site ของยีนเป้าหมาย (target gene) หรือ enhancer อาจจะอยู่ตรงบริเวณด้าน down stream ของยีนหรืออาจอยู่ห่างไกลออกไปจากยีน หรือบางกรณีอาจอยู่ในส่วนของ intron ก็ได้ **(รูปที่ 8.20)** ปัจจุบันเชื่อว่า enhancer ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อที่เฉพาะเจาะจง (specific tissue) เท่านั้น

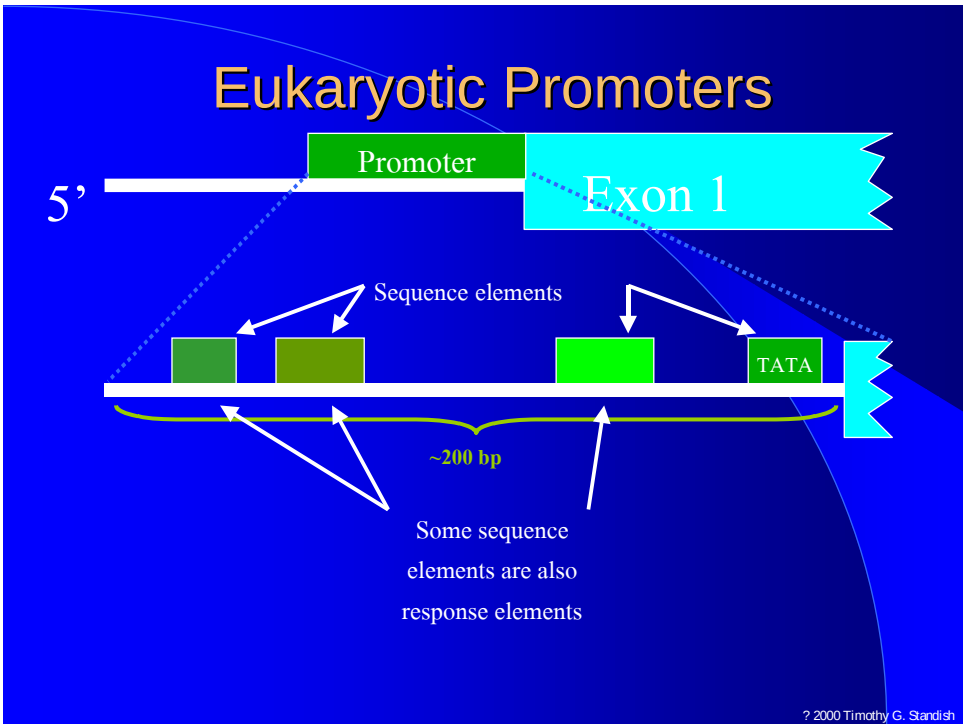
(a) Upstream



(b) Downstream

(c) Within intron of gene





รูปที่ 8.20 ตำแหน่งของ enhancer ที่พบได้ในดีเอนเอ

(ที่มา : http://www.grisda.org/tstandish/teachers/presentations/Molecular%20Genetics/Regulation%20of%20Transcription.ppt)

3. Transient response elements เป็นตำแหน่งที่จะกระตุ้นให้เกิดกระบวนการถอดรหัสของยีนเป้าหมายเป็นบางครั้งเท่านั้น เพื่อตอบสนองต่อสิ่งเร้าที่อยู่ภายในหรือภายนอกเซลล์ จากการศึกษาพบว่าตำแหน่ง transient response element ของ metallothieonin gene สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ (1) metal respopse element (MSE) เป็นตำแหน่งที่ตอบสนองต่อโลหะหนักเพื่อให้เกิดการทำงานของยีนในขณะที่มีหรือไม่มีสารโลหะหนักภายในเซลล์ และ (2)

glucocorticoid response element (GRE) ทำหน้าที่กระตุ้นให้เกิดการทำงานของยีน โดยเป็นตำแหน่งที่ตอบสนองต่อสารกระตุ้น หรือสัญญาณที่อยู่ภายนอกเซลล์ คือ ฮอร์โมน glucocorticoid

การทำงานของ transient response element จะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อมีสารโลหะหนักเข้าไปภายในเซลล์ ทำให้ตำแหน่ง metal response site ถูกเข้าจับโดย reguratory protein (อาจเป็น cadmium หรือ glucocorticoid) ซึ่งเป็นการกระตุ้นให้เอนไซม์ RNA polymerase II ทำการลอกรหัส metallothionin gene และสังเคราะห์ matallothionin protein ออกมา เพื่อเข้าจับกับสารโลหะหนักที่อยู่ภายในเซลล์ จากนั้น regulatory protein จะหลุดออกจากตำแหน่ง metal response site เพื่อเป็นการหยุดการทำงานของยีน **(รูปที่ 8.21a)** เหตุการณ์ทำนองเดียวกันนี้จะเกิดขึ้นที่ตำแหน่ง glucocorticoid site ด้วยเช่นกัน เพื่อตอบสนองต่อสัญญาณที่เกิดจากฮอร์โมน glucocorticoid **(รูปที่ 8.21b)** มีข้อสันนิษฐานว่า metallothionin gene ประกอบด้วยตำแหน่ง metal response site 4 ตำแหน่ง เพื่อเพิ่มปฏิกิริยาการทำงานของยีนให้มีความถูกต้องแม่นยำมากที่สุด

รูปที่ 8.21 a-b) การตอบสนองของ transient response element ที่ควบคุมการแสดงออกของ metallothionin gene (ที่มา : Brown, 1992)

II. DNA binding protein ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีน

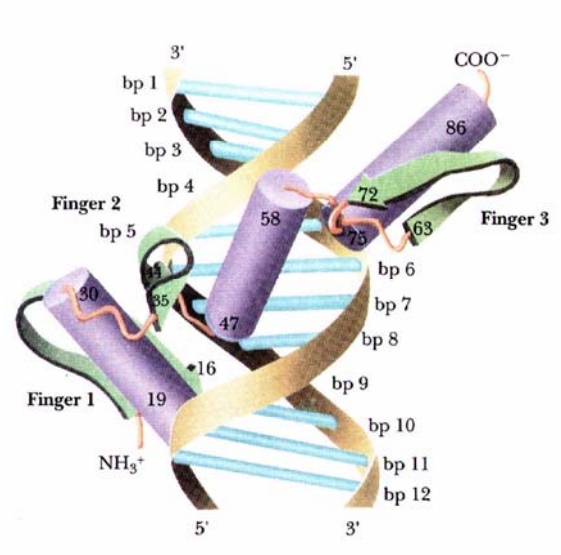
DNA-binding protein คือ transcription factor และ regulatory protein ที่จะเข้าทำปฏิกิริยากับลำดับเบสเฉพาะที่อยู่ภายในดีเอนเอ เพื่อทำให้เกิดกระบวนการเริ่มต้นการสังเคราะห์โมเลกุล

mRNA ทั้งในยูคารีโอตและโปรคารีโอต โดย DNA binding protein ที่พบในยูคารีโอตในขณะนี้มี 3 ชนิด ได้แก่ helix-turn-helix, zinc finger และ leucine zipper

1. Helix-turn-helix motif

Helix-turn-helix เป็นโครงสร้างอีกแบบหนึ่งของ regulatory protein ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีการจัดเรียงตัวกันเกิดเป็นโครงสร้าง α-helix อยู่ภายใน cro-protein โดยประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย (subunit) เชื่อมต่อกันเป็น dimer ซึ่งในแต่ละหน่วยย่อยของ dimer ประกอบด้วย α-helix 3 ส่วน คือ α_1-helix, α_2-helix และ α_3-helix **(รูปที่ 8.22)** และแต่ละ α-helix จะเชื่อมต่อกันด้วยสายกรดอะมิโน (amino acid chain) โดยเฉพาะ α_2-helix และ α_3-helix จะเชื่อมต่อกันด้วยกรดอะมิโนยาว 4 ตัว ซึ่ง α_3-helix มีชื่อเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า recognition helix คือเป็นสายของกรดอะมิโนที่สามารถเข้าจับกับโครงสร้างดีเอ็นเอสายคู่ที่ตำแหน่งร่องลึก (major groove) หรือร่องแคบ (minor groove) ส่วน α_2-helix มีชื่อเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า stabilization helix ทำหน้าที่ส่งเสริมการเข้าจับของ recognition helix กับดีเอนเอให้มีความคงตัวยิ่งขึ้นโดยการเข้าทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่อยู่ภายในดีเอนเอ

helix-turn-helix หรือ regulatory protein ที่พบได้ในแบคทีเรียคือ aporepressor protein ที่ควบคุมการแสดงออกของ *trp* operon นอกจากนี้ยังพบว่า helix-turn-helix เป็น regulatory protein ควบคุมการแสดงออกของยีนที่สังเคราะห์เอนไซม์ชนิดต่างๆ ในกระบวนการเมตาบอลิซึมของน้ำตาล galactose ภายในยีสต์ ส่วนในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงพบว่า helix-turn-helix มากกว่า 80 ชนิด ที่สามารถจดจำลำดับเฉพาะที่เรียกว่า hemeodomain sequence ที่อยู่ในดีเอนเอของสัตว์ซึ่ง hemeodomain sequence คือกลุ่มของลำดับเบสที่มีความจำเพาะต่างๆ ที่ทำหน้างานร่วมกันเพื่อควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับพัฒนาการของเอมบริโอ จึงทำให้เชื่อว่าโปรตีน helix-turn-helix เป็นกลุ่มของ DNA-binding protein ที่สำคัญมากในเซลล์ยูคารีโอต

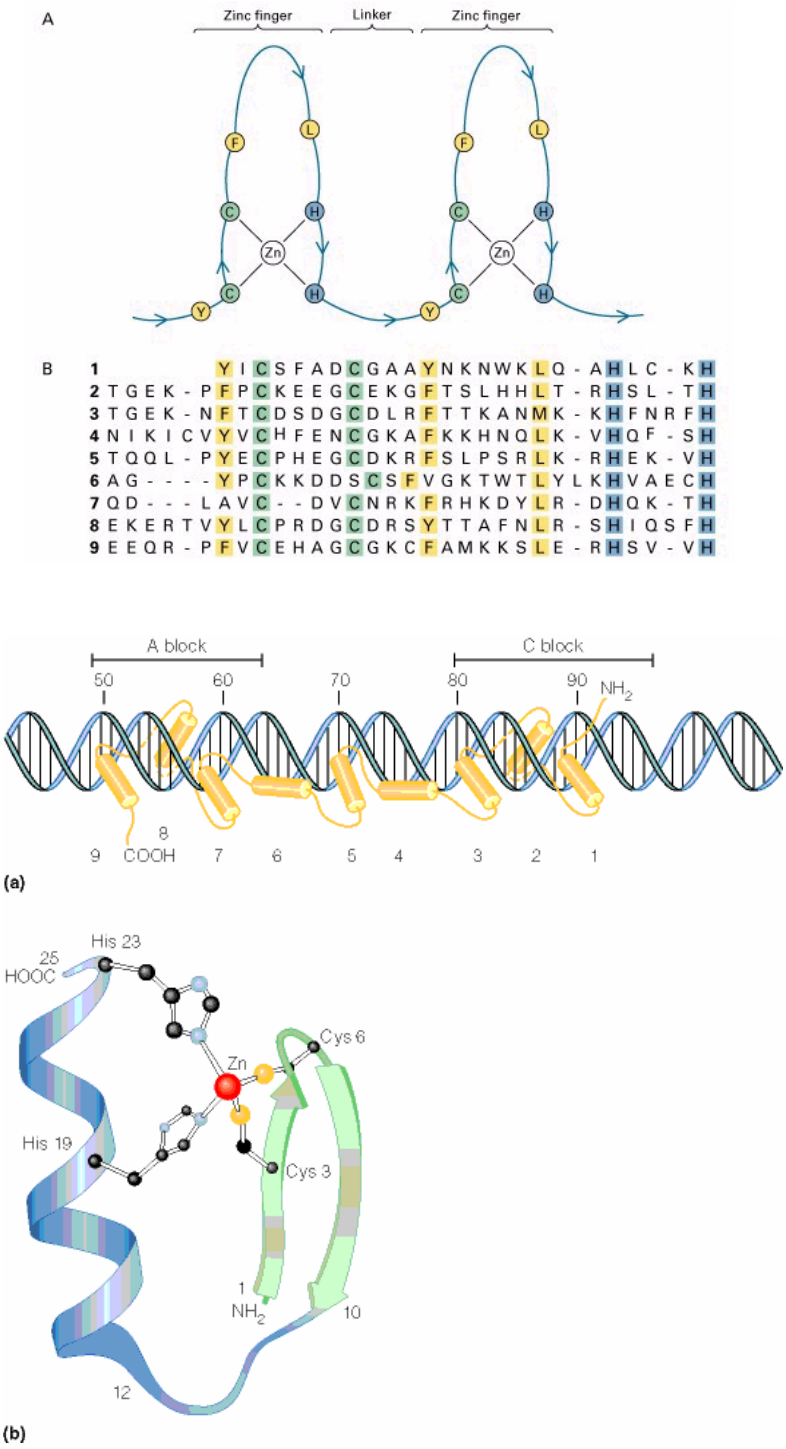


รูปที่ 8.22 การเข้าจับของ helix ทั้ง 3 ที่ตำแหน่ง major groove ของโมเลกุลดีเอน
(ที่มา : www.udel.edu/.../ pages/chem527/DNAbind.html)

2. Zinc-finger เป็น DNA-binding protein หรือ regulatory protein ที่ประกอบด้วย 2 domain โดยที่ domain แรกประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 70 โมเลกุล อยู่บริเวณด้านปลายคาร์บอกซิล (C-terminal end) ของโปรตีน ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับการเข้าเกาะกับดีเอ็นเอ แต่เป็นตัวกระตุ้น (activating region) ของการเกิดปฏิกิริยาต่างๆ ในกลไกการลอกรหัส ส่วน domain ที่สองจะเกี่ยวข้องกับการเข้าเกาะกับโปรโมเตอร์ โดย domain นี้ประกอบด้วย 2-10 หน่วยซ้ำ (repeating unit) เรียงเชื่อมต่อกัน ซึ่งแต่ละหน่วยซ้ำประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 30 โมเลกุล อยู่บริเวณด้านปลายอะมิโน (N-terminal end) ของโปรตีน โดยแต่ละหน่วยมีโครงสร้างภายในเป็น zinc-finger คือภายในสายโพลีเปปไทด์มีตำแหน่งที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน cysteine 2 โมเลกุล และ histidine 2 โมเลกุล เข้ามาจับกับอะตอมของ Zn 4 พันธะทำให้เกิดเป็นโครงสร้างที่คงตัวเรียก finger loop โดยมี hydrophobic core region ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน phenylanine และ leucine และมีกรดอะมิโนที่มีประจุบวกอยู่บริเวณด้านนอกทำให้สามารถเข้าจับกับดีเอนเอและทำปฏิกิริยากับลำดับเบสที่อยู่ด้านนอกบริเวณ major groove ด้วยพันธะไอออนนิก **(รูปที่ 8.23)** เพื่อควบคุมการแสดงออกของยีน

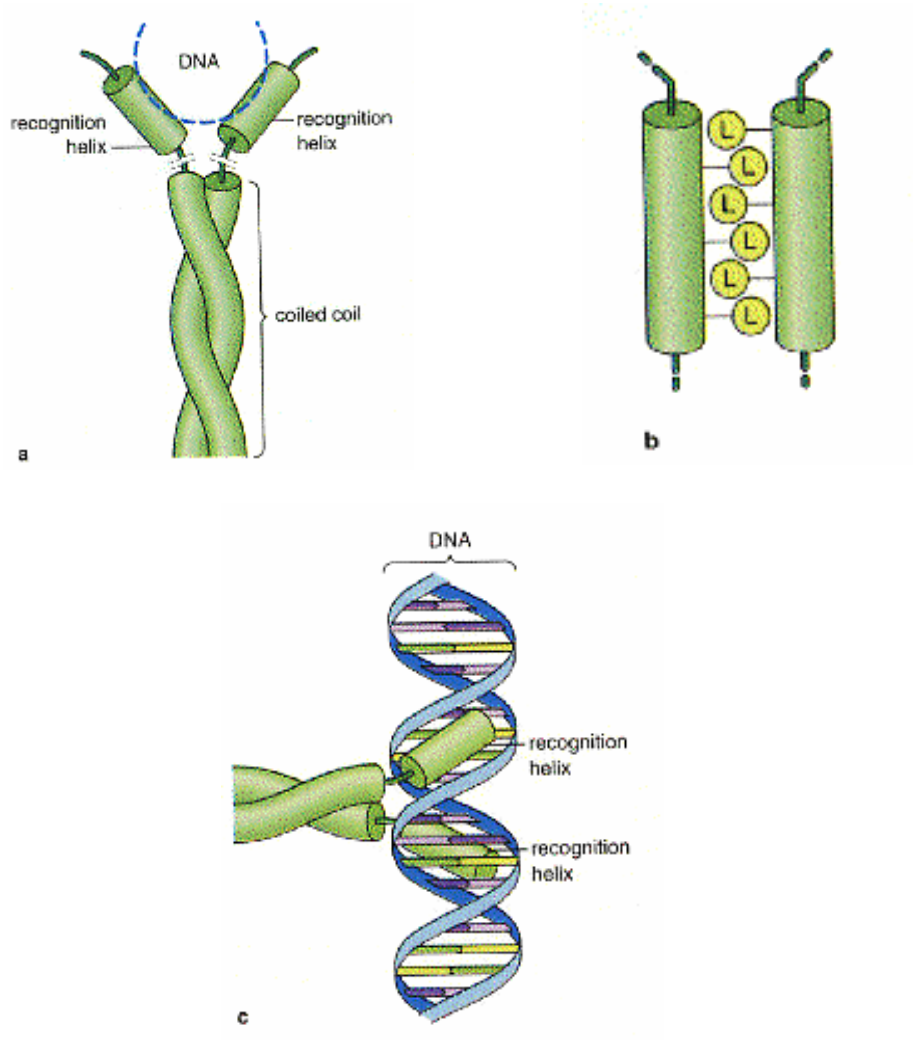
จากการศึกษาพบว่า zinc finger เป็น DNA-binding protein ที่พบได้ทั่วไปใน regulatory protein ของยีสต์ และยังเป็น regulatory protein ที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงของยีนหลายยีนที่ทำหน้าที่ร่วมกันในการสังเคราะห์ steroid hormone นอกจากนี้ปัจจัยที่ทำให้เกิดการลอกรหัส เช่น TFIIA ที่กระตุ้นให้เกิดการลอกรหัสของ 5S rRNA gene

3. Leucine-zipper เป็น DNA-binding protein หรือ regulatory protein ของยีนที่พบภายในพืชชั้นสูง มนุษย์ และสัตว์มีกระดูกสันหลัง โดยบริเวณปลาย C-terminus end ของ DNA-binding protein จะมีโครงสร้างที่เรียกว่า leucine-zipper ที่เกิดจากการม้วนตัวรวมกันของสายโพลีเปปไทด์ที่มีลักษณะเป็น α-helix 2 สายที่เหมือนกัน (homodimer) หรือแตกต่างกัน (heterodimer) มาเข้าคู่กันทำให้มีโครงสร้างคล้ายกับซิบ (zipper) ซึ่งฟันแต่ละซีกของซิบก็คือลำดับของโดยกรดอะมิโนทุกๆ 7 ตัว จะเป็นตำแหน่งของกรดอะมิโน leucine ที่เป็น hydrophobic และเรียงตัวอยู่ด้านนอกของสายโพลีเปปไทด์เสมอ **(รูปที่ 8.24)** บริเวณปลาย N-terminus end ของโครงสร้างของ leucine-zipper จะเชื่อมต่อกับ DNA-binding domain ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน lysine และ arginine เป็นจำนวนมาก ซึ่งทำหน้าที่ในการเข้าเกาะกับดีเอ็นในตำแหน่ง operator gene



รูปที่ 8.23 โครงสร้างของ zinc finger ที่เข้าจับกับดีเอ็นเอ โดยใช้ส่วน N-terminus end

(ที่มา : http://www.mun.ca/biochem/courses/3107/images/MVH/MVH_fi28p23.gif)

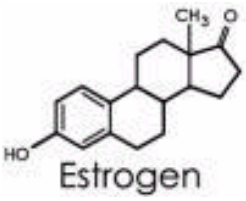


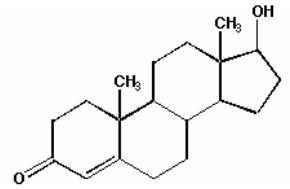
รูปที่ 8.24 **a)** โครงสร้างของ Leucine-zipper **b)** แสดงการ Zipper ของ x-helix 2 สาย **c)** การเข้าจับกันระหว่าง Leucine-zipper กับ major groove ของโมเลกุลดีเอ็นเอ (ที่มา : http://ntri.tamuk.edu/cell/chapter27/f17-6c.gif)

III. ฮอร์โมนควบคุมการแสดงออกของยีน

ยูคารีโอตเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีหลายเซลล์ ดังนั้นการติดต่อสื่อสารกันระหว่างเซลล์จึงเป็นกระบวนการที่สำคัญมาก ในพืชและสัตว์มีสารชีวเคมีที่ทำหน้าที่เป็นสัญญาณ (signal) หรือสารเคมีสื่อสาร (chemical messenger) ที่สร้างมาจากเซลล์ที่เรียกว่า secretary cell เพื่อทำหน้าที่สื่อสารระหว่างเซลล์โดยไปกระตุ้นให้เนื้อเยื่อเป้าหมาย (target tissues) หรือเซลล์เป้าหมาย (target cell) ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกระบวนการเมตาบอลิซึม และในบางกรณีทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการแสดงออกของยีน โมเลกุลของสารที่ทำหน้าที่เป็นสัญญาณ คือฮอร์โมน 2 ชนิด ได้แก่

(1) เปปไทด์ฮอร์โมน (peptide hormone) อาทิ อินซูลิน (insulin) และ growth hormone เป็นต้น และ (2) สเตียรอยด์ฮอร์โมน (steroid hormone) อาทิ estrogen และ testosterone เป็นต้น **(รูปที่ 15.25)**



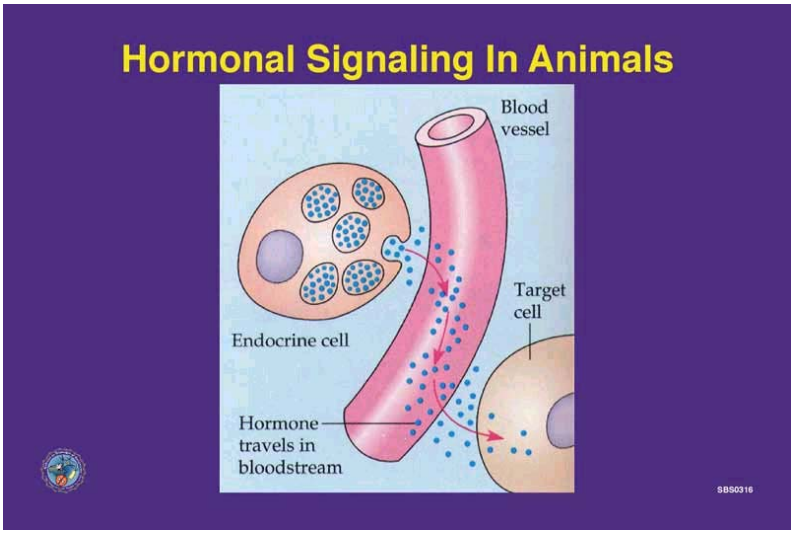


Estrogen Testosterone

รูปที่ 8.25 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ estrogen และ testosterone
(ที่มา : Gardner และคณะ, 1991)

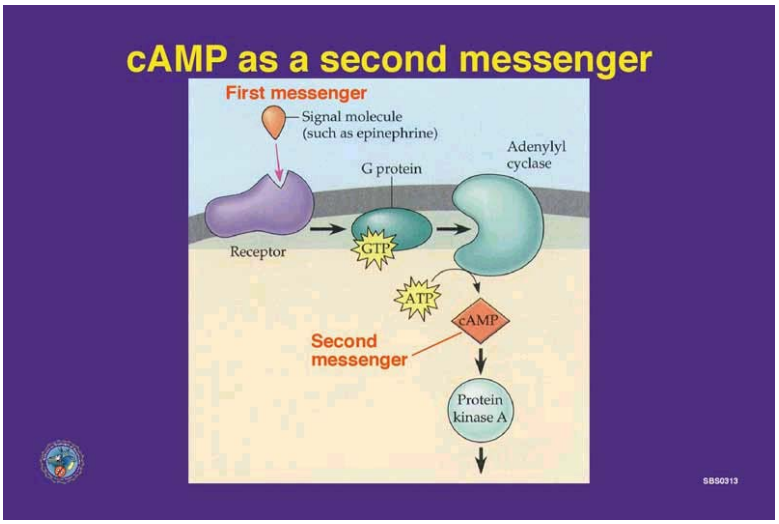
เปปไทด์ฮอร์โมน และสเตียรอยด์ฮอร์โมนเป็นตัวอย่างของสารเคมีที่ใช้เป็นสัญญาณในการติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์ในสัตว์ชั้นสูง โดยฮอร์โมนดังกล่าวที่ถูกสังเคราะห์ออกมาจาก secretory cell แล้วถูกปล่อยเข้าสู่กระแสโลหิต **(รูปที่ 8.26)** โดยเปปไทด์ฮอร์โมนไม่สามารถผ่านผนังเซลล์เข้าสู่ภายเซลล์ได้เพราะว่ามีโมเลกุลขนาดใหญ่และไม่สามารถละลายน้ำได้ แต่เปปไทด์ฮอร์โมนจะเข้าจับกับผนังเซลล์ด้านนอกของเซลล์เป้าหมายได้โดยเข้าจับกับ receptor ที่อยู่บริเวณผิว plasma membrane แล้วกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์ที่อยู่บนผนังเซลล์ด้านนอกของเซลล์เป้าหมาย เช่นเอนไซม์ adenyl cyclase เพื่อนำไปใช้สังเคราะห์ cyclic AMP (cAMP) จาก ATP และโมเลกุล cAMP ซึ่ง cyclic AMP (cAMP) หรือ kinase ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นสัญญาณภายในเซลล์ หรือเรียกว่า second messenger **(รูปที่ 8.27)** แล้วเข้าไปจับกับโมเลกุลของดีเอนเอที่ตำแหน่ง enhancer (ที่อยู่ในบริเวณ upstream region) จากนั้นจึงเกิดการแสดงออกของยีน เพื่อตอบสนองอะไรบางอย่างที่เกี่ยวข้องกับฮอร์โมน **(รูปที่ 8.28)**

ส่วนสเตียรอยด์ฮอร์โมนเป็นของสารเคมีที่ใช้เป็นสัญญาณในการติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์เช่นกันโดยสเตียรอยด์ฮอร์โมนมีโมเลกุลขนาดเล็กและไม่ละลายน้ำ จึงสามารถผ่านผนังเซลล์ของเซลล์เป้าหมายเข้าไปได้ แล้วเข้าจับ receptor protein ที่อยู่ภายในไซโตพลาซึ่มหรือในนิวเคลียสของเซลล์เป้าหมาย เกิดเป็น protein complex แล้วเข้าไปจับกับโมเลกุลของดีเอนเอที่ตำแหน่ง enhancer (ที่อยู่ในบริเวณ upstream region) จากนั้นจึงเกิดการแสดงออกของยีน เพื่อตอบสนองอะไรบางอย่างที่เกี่ยวข้องกับฮอร์โมน **(รูปที่ 8.29)**



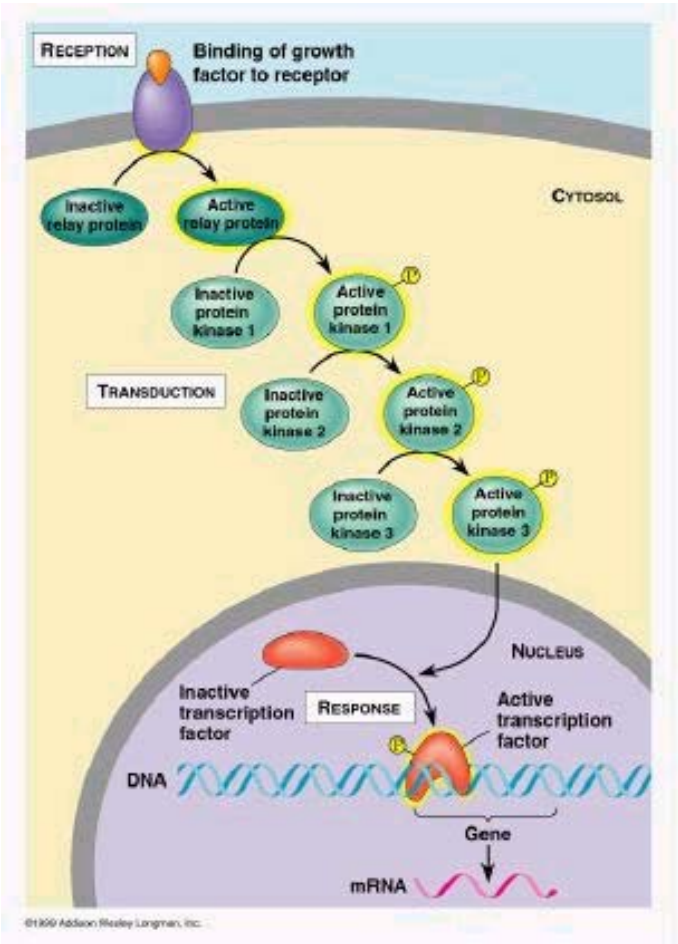
รูปที่ 8.26 การส่งถ่ายฮอร์โมนทางกระแสโลหิต

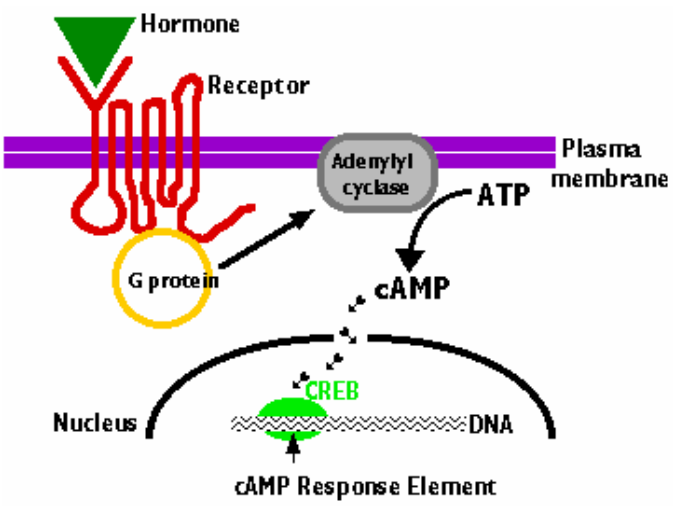
(ที่มา : http://www.esb.utexas.edu/mabrybio211/chapter11/6-SBS0316.jpg)



รูปที่ 8.27 การเกิด cAMP seconary messenger

(ที่มา : http://www.esb.utexas.edu/mabrybio211/chapter11/20-SBS0313.jpg)

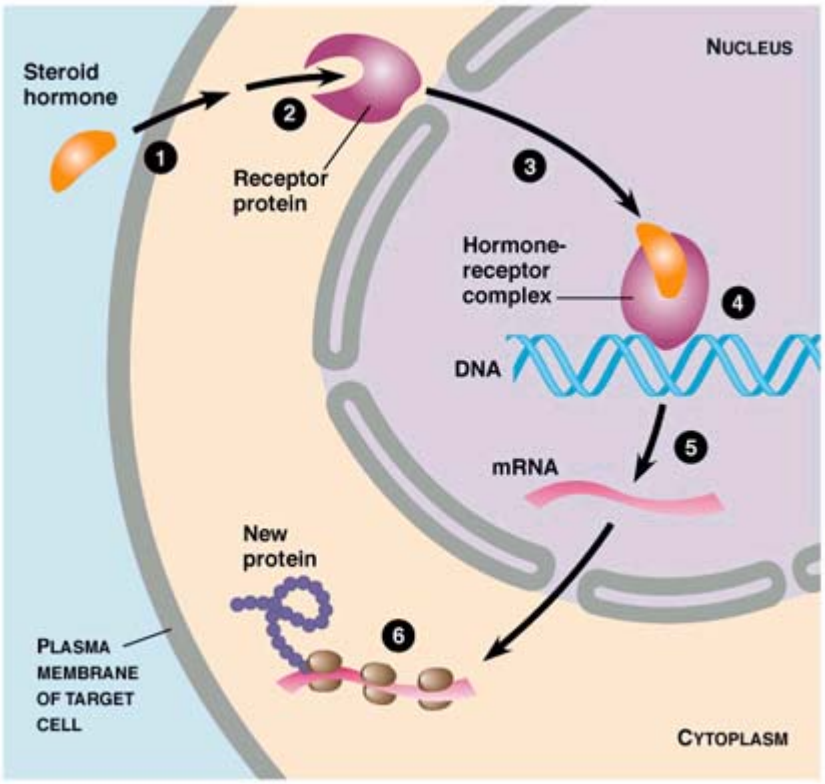




รูปที่ 8.28 กลไกการทำงานของ polypeptide hormone ในการควบคุมการทำงานของยีน

(ที่มา : http://www.niles-hs.k12.il.us/jacnau/chpt118.jpg และ

: http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/P/ProteinHormoneR.gif)



©1999 Addison Wesley Longman, Inc.

รูปที่ 8.29 กลไกการทำงานของ steroid hormone ในการควบคุมการทำงานของยีน

(ที่มา : http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/memb/c11x10hormone-receptors2.jpg)