

Regulácia génovej expresie

Prokaryota

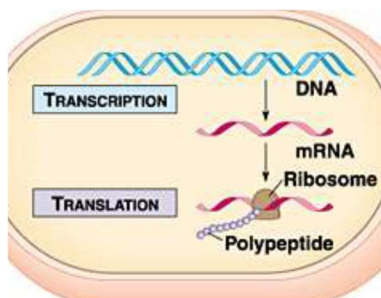
Prokaryotická vs. Eukaryotická génová regulácia

Prokaryota:

- Regulačné proteíny
- Základný stav = on
- Nemajú DNA/proteínové komplexy
- Gény sú usporiadané v operónoch

Eukaryota:

- Regulačné proteíny
- Základný stav = off
- Obsahujú DNA/proteínové komplexy = chromatín
- Nemajú operóny

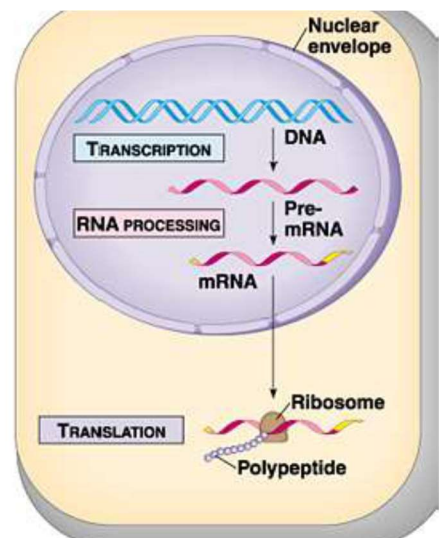


Prokaryotická bunka:

Prokaryota (baktérie) nemajú jadro

Eukaryota – segregácia počas transkripcie prebieha v jadre.

- mRNA je spracovaná pred transláciou



Eukaryotická bunka

Regulácia génovej expresie

DNA (zmena prostredia) \implies RNA (zapnutie/vypnutie génov) \implies proteín
(vysporiadanie sa proteínov s novým prostredím)

Veľmi dôležité pre:

- expresiu génov v prípade potreby
- utláčanie génov, keď nie sú potrebné
- šetrenie energetických zdrojov

Transkripčná kontrola

Veľa miest pre kontrolu:

DNA – Transkripcia (iniciácia, elongácia, terminácia)

RNA – Spracovanie (capping (obmedzenie), splicing, polyadenilácia, turnover)

Translácia

Proteíny – spracovanie proteínov

Expresia mnoho génov je regulovaná v bunkách:

Housekeeping (udržiavacie, regulátory deja) gény: sú vyjadrené konštitutívne, sú nevyhnutné pre základné procesy, napr. rast a replikáciu

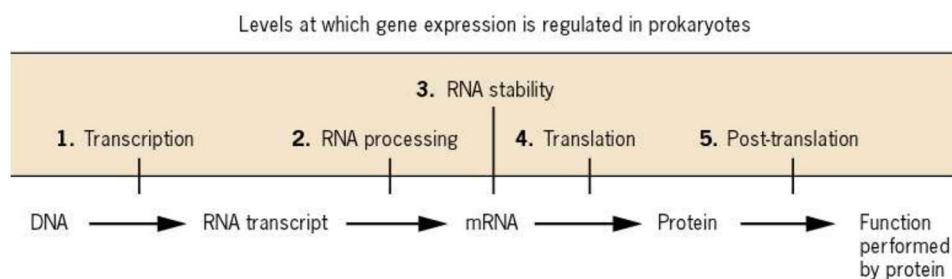
Indukovateľné gény: sú aktívne len vtedy, keď sú aktivované induktormi alebo bunkovými faktormi

Génová expresia je veľmi často kontrolovaná extracelulárnymi signálmi, ktoré komunikujú s génmi pomocou regulačných proteínov

Pozitívne regulátory (aktivátory) zvyšujú transkripciu

Negatívne regulátory (represory) znižujú transkripciu (alebo ju zrušia)

Úrovne regulácie:



Transkripčná regulácia má najdôležitejšiu úlohu

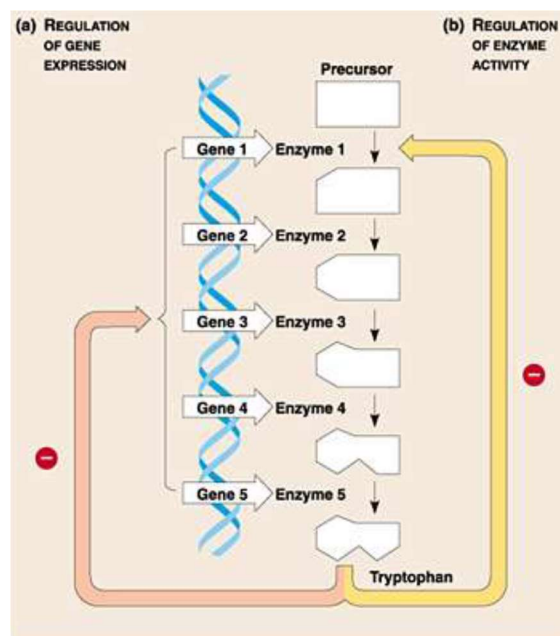
Typický polčas mRNA molekuly

BUNKA	GENERAČNÝ ČAS BUNKY	POLČAS mRNA molekuly	
		Priemerný:	Rozsah:
<i>E. coli</i>	20-60 min	3-5 min	2-10 min
<i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	3 hod	22 min	4-40 min
Bunky človeka	16-24 hod	10 hod	30 min(aj menej)

Kordinatívna regulácia – opreóny

- Expresia mnoho génov môže byť riadená súčasne
- Operón – súbor génov, ktoré sú prepísané z toho istého promótoru a sú riadené na rovnakých regulačných miestach
- Regulón – súbor génov, sú prepísané zo samostatných promótorových miest, sú kontrolované tou istou regulačnou molekulou. Globálne gény môžu koordinovať viac génov aj operónov, niektoré z nich môžu indukovať, niektoré ale môžu potláčať.

Operóny

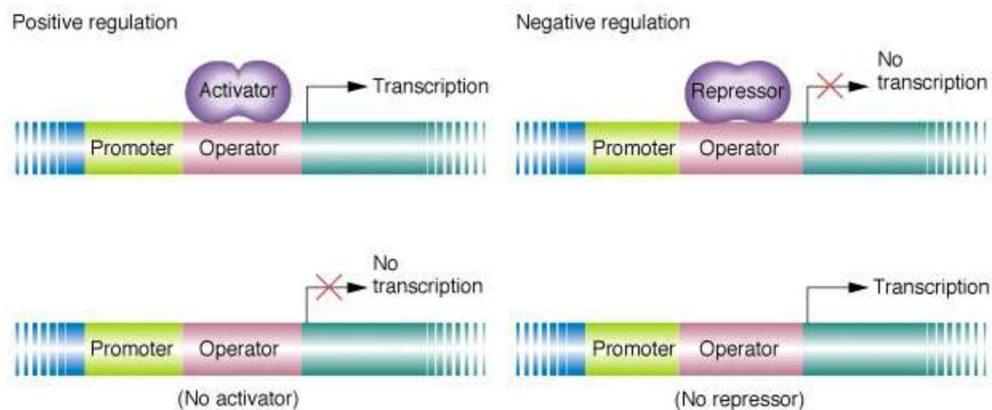


- Okrem regulačného enzýmu môžu regulovať produkciu jedného enzýmu
- Celá dráha je prepísaná pomocou operónov
- Operóny sú súbory génov, ktoré vykonávajú nejaké špecifické funkcie, všetky gény sú regulované sekvenciami oprátora, napr. trp operón a lac opreón

2 hlavné kroky pri regulácii génovej expresie pri Prokaryota:

1. Regulačné proteíny – zvyčajne DNA viažuce proteíny
 - Represory – inhibícia transkripcie
 - Aktivátory – elevácia transkripcie
 - Funkčné regulátory - môžu robiť aj
2. Výber sigma faktorov – určenie toho, ktoré promotory sú aktivované a ktoré nie

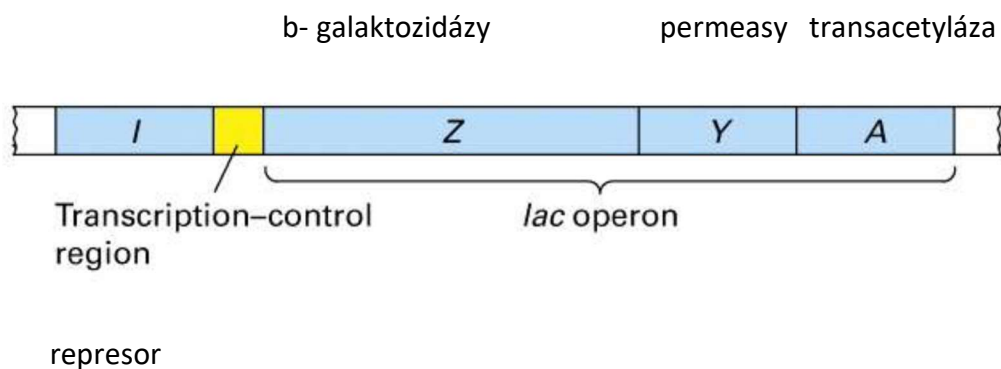
Regulačné komponenty



- Cis regulačné prvky ovplyvňujú len tú istú DNA molekulu (promotory, opreóny a „zlepšovateľa“ (enhancers))
- Trans regulačné prvky môžu ovplyvňovať hociktorú molekulu DNA (aktivátory, represory, transkripčné faktory)

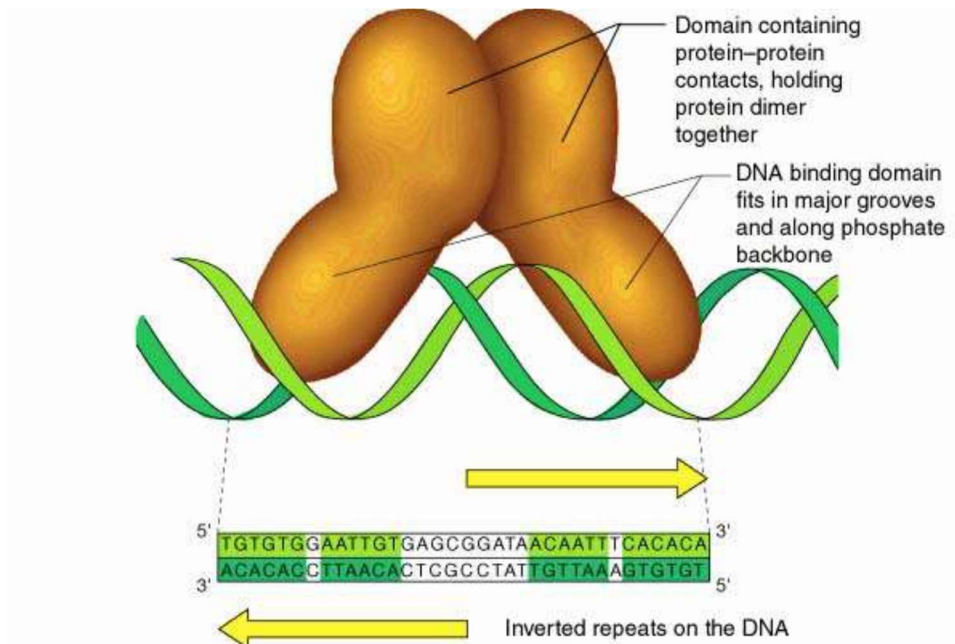
Kde sa regulačné proteíny viažu na promotory?

Aktivátory skoro vždy viažu proti prúdu na pozícii -30, zatiaľ čo veľa represorov viaže na po prúde, tiež v pozícii -30.



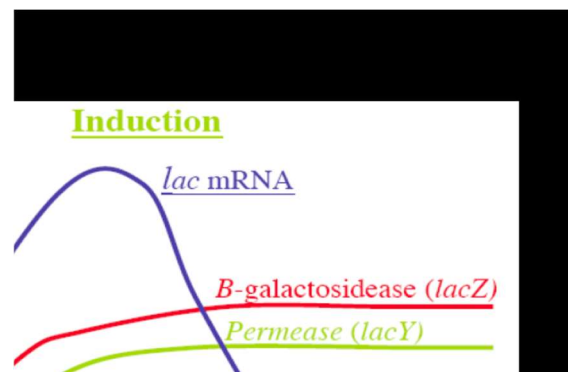
Regulačné proteíny

Typicky DNA viažuce proteíny sú spojené s regulovanými promótermi a môžu znížiť alebo zvýšiť účinnosť transkripcie, represorov a aktivátorov, ale aj významný počet regulátorov.



Adaptácia a indukcia

Prítomnosť substrátu a laktózy ovplyvňuje vzhľad enzýmu – beta- galaktozidázy.



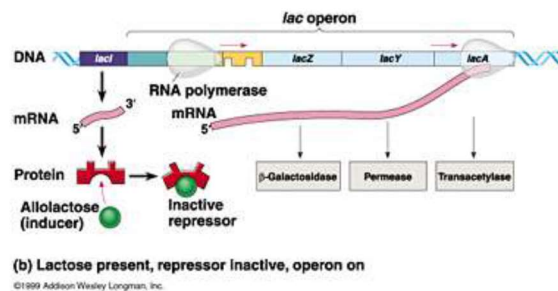
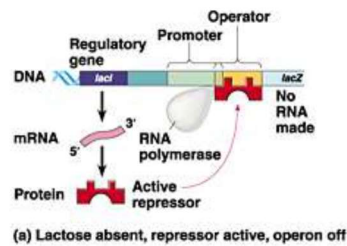
Beta-galaktozidáza (a permeáza) sú indukovateľné

1. Neprítomnosť laktózy 1-2 molekúl / bunka
2. V prítomnosti laktózy 100000 molekúl / bunka

Lak – indukcia

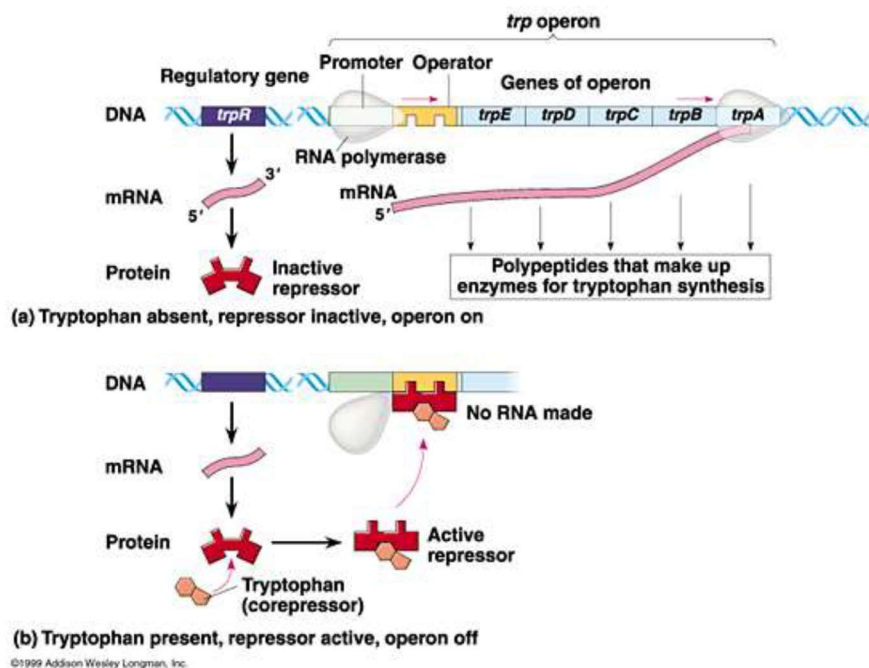
Metabolizmus laktózy je regulovaný tromi génmi. V normálnych podmienkach bunka rastie v glukóze, ale pri prítomnosti nízkej glukózy a vysokej laktózy, bunka vyvoláva výrobu enzýmov, ktoré sú špecifické pre laktózu.

Laktóza=glukóza + galaktóza



Trp operón – represia

Vo forme spätnej väzby inhibície, produkt určuje väzbu s represorovým proteínom, ktorý blokuje transkripciu.

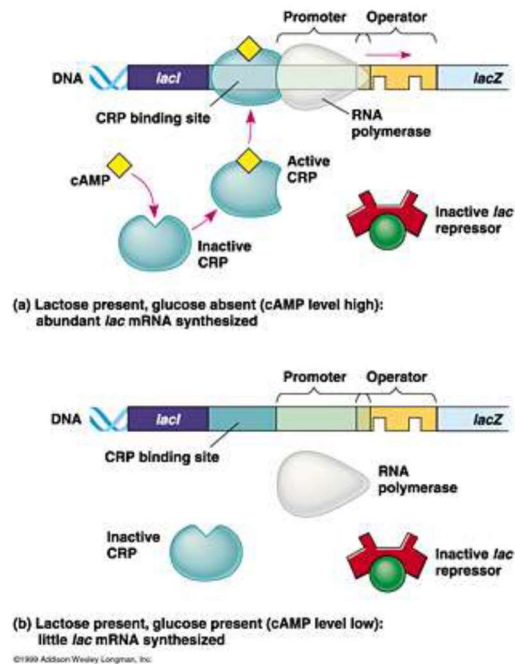


Laktabolicá represia

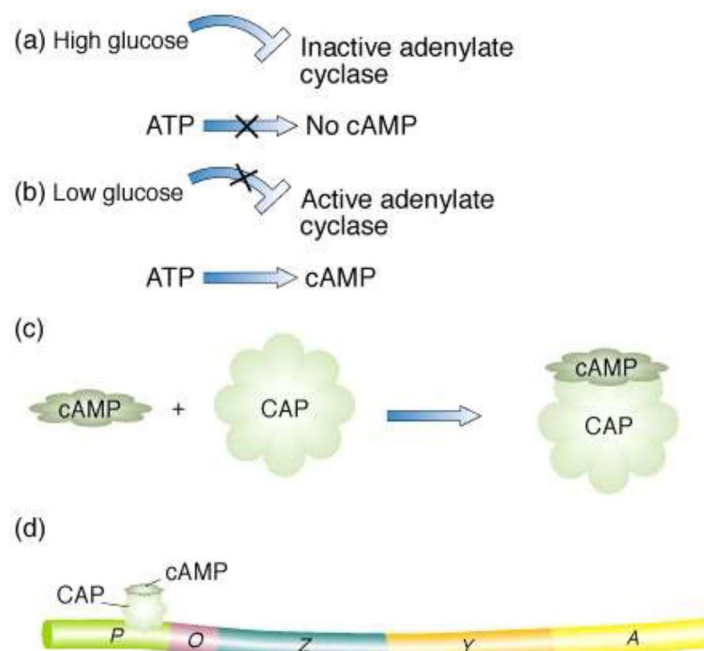
Metabolizmus laktózy je riadený tromi génmi. Za prítomnosti nízkej glukózy a vysokej bunka indukuje produkciu špecifické enzýmy pre laktózu.

Laktóza = glukóza + galaktóza

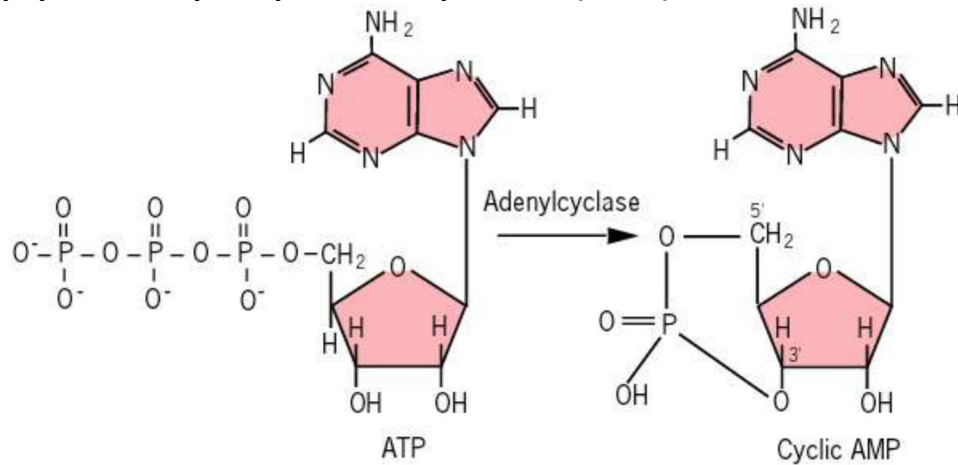
Bunka uprednostňuje glukózu – sekundárny mechanizmus, ktorý zabezpečuje metabolizmus laktózy, vyskytuje sa len vtedy, keď je nízka koncentrácia glukózy.



Aktivátor Cap a operon lac



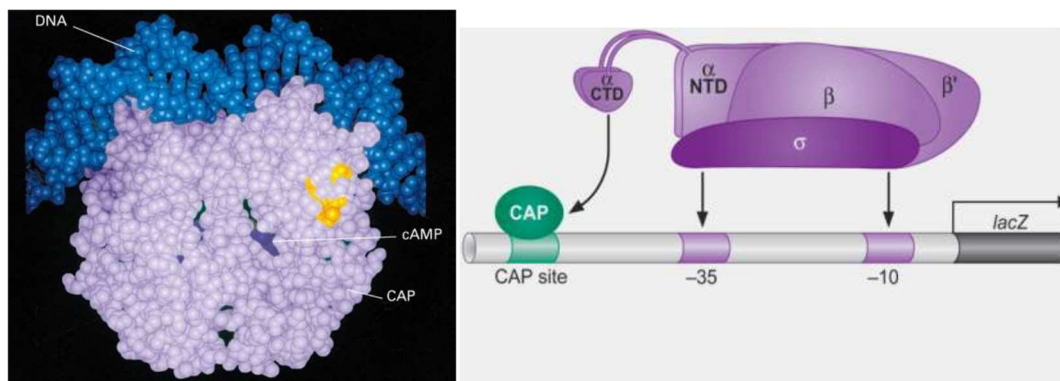
The adenylylase-catalyzed synthesis of cyclic AMP (cAMP) from ATP



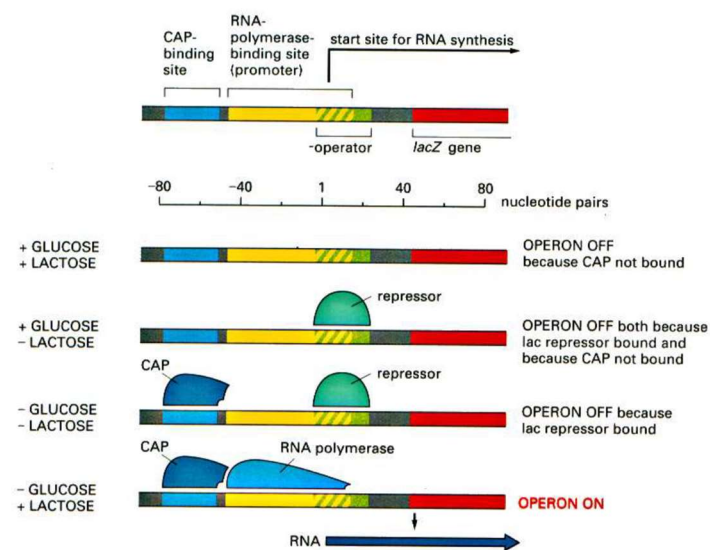
Vázba Cap zmení sekundárnu štruktúru DNA

Ohyb Dna spôsobuje, že promótor je prístupnejší pre RNA polymerázu.

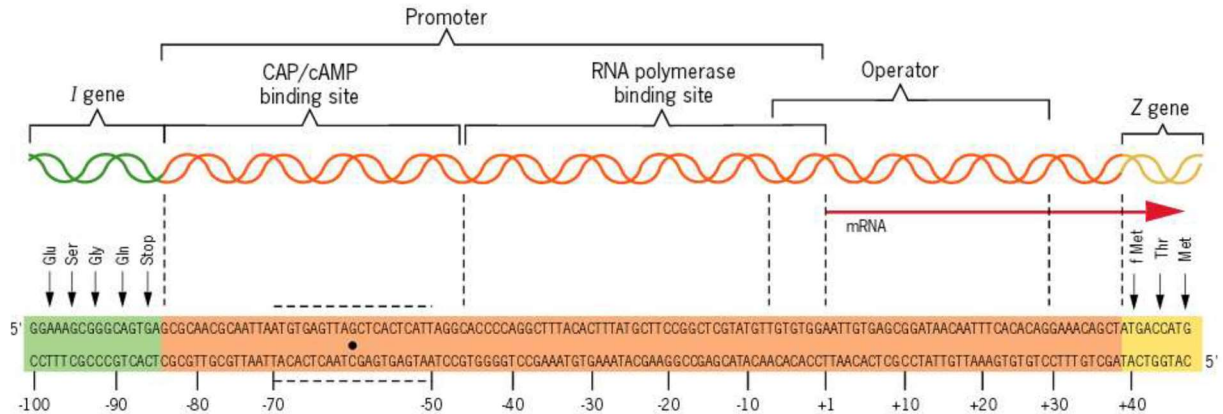
- Zvýšená frekvencia iníciácie



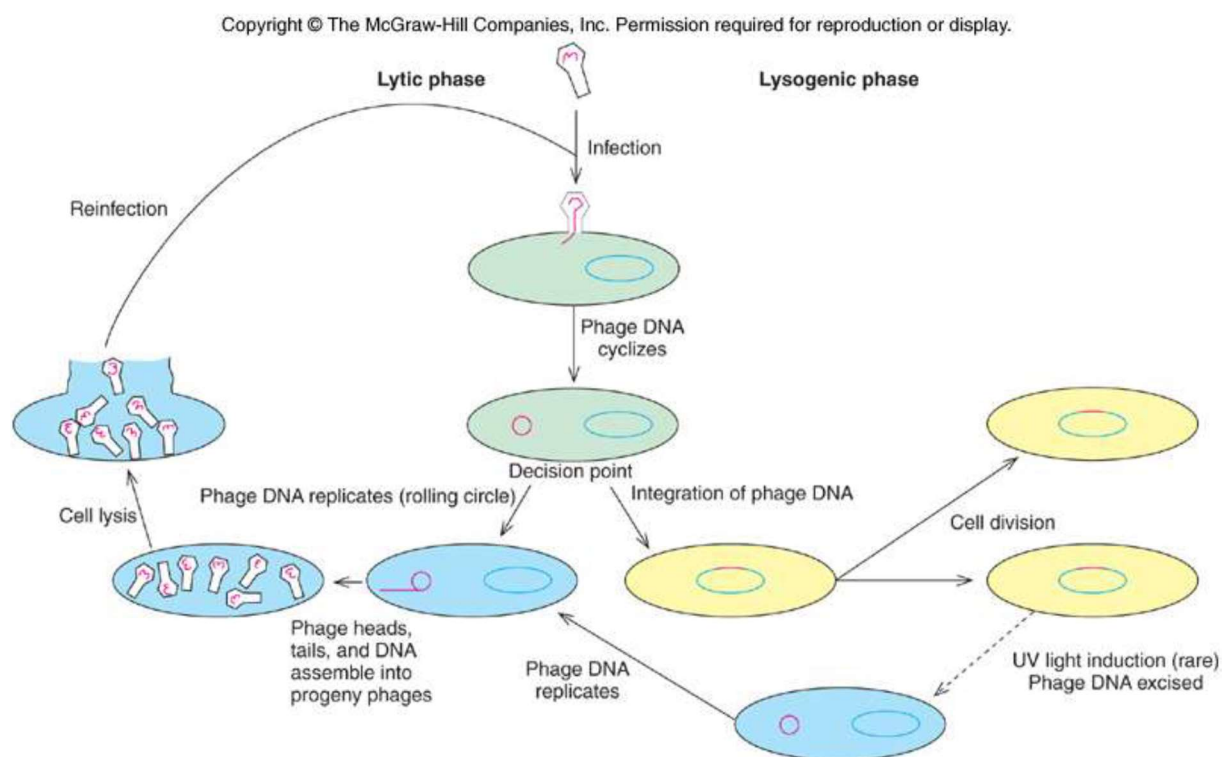
Dvojitá kontrola laktózového proteínu



CAP, RNA POLYMERASE AND REPRESSOR - BINDING SITES



Dva spôsoby reprodukcie fágů

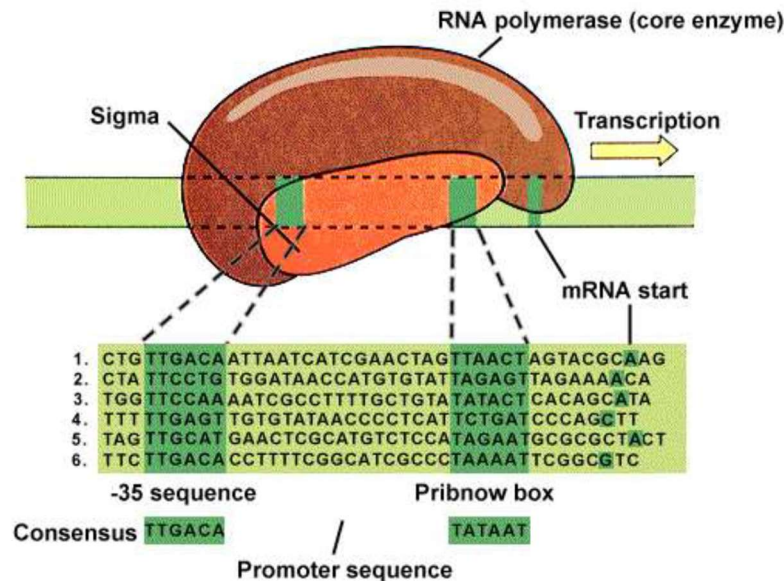


Kontrola týchto dvoch spôsobov rastu fágů λ E. coli

Je to príklad genetického „prepínača“, stabilná situácia, ktorá je prenesená na potomstvo buniek. Tento typ prepínača sa zúčastní na diferenciácii v eukaryotických bunkách.

Iniciácia transkripcie v prokaryotách

Holoenzým = RNAP jadro + Sigma



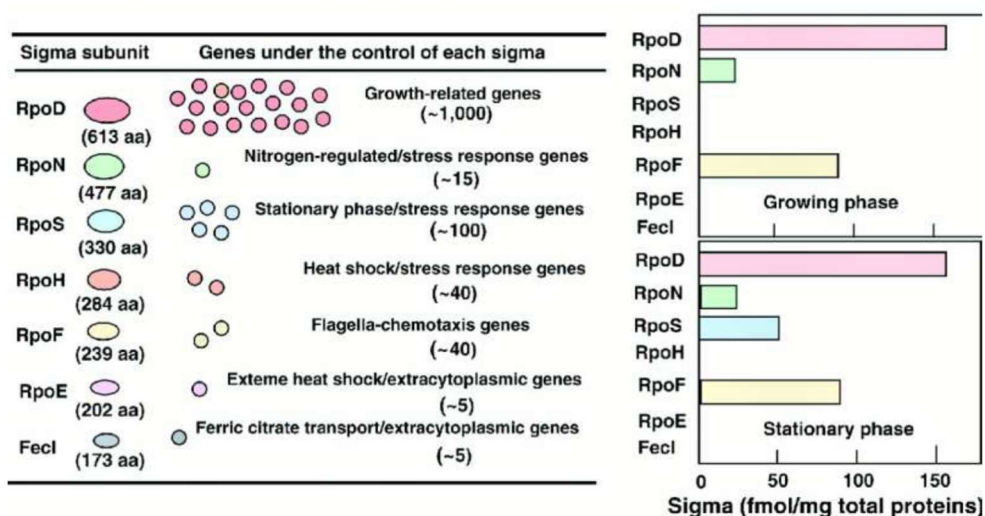
Bakteriálne sigma faktory

- Sú transkripčné faktory
- Rozdielne sigma faktory viažu na RNP a rozpoznávajú špecifické -10, -35 sekvencie
- Pomáhajú rozkladať DNA na vystavenie transkripčného štartovacieho miesta
- Väčšina baktérií má významné sigma faktory
- Podporujú zmeny v expresii génov
- E. coli 7 sigma faktorov
- B. subtilis 18 sigma faktorov
- Všeobecne platí, že baktérie majú viac sigma faktorov

Alternatívne sigma faktory

- rozpoznávajú regulátory – rôzne regulóny génov
- E. coli si môže vybrať medzi sigma 7 a asi 350 transkripčnými faktormi

Intracellular Concentrations of RNA Polymerase Sigma Subunits in *Escherichia coli* W3110



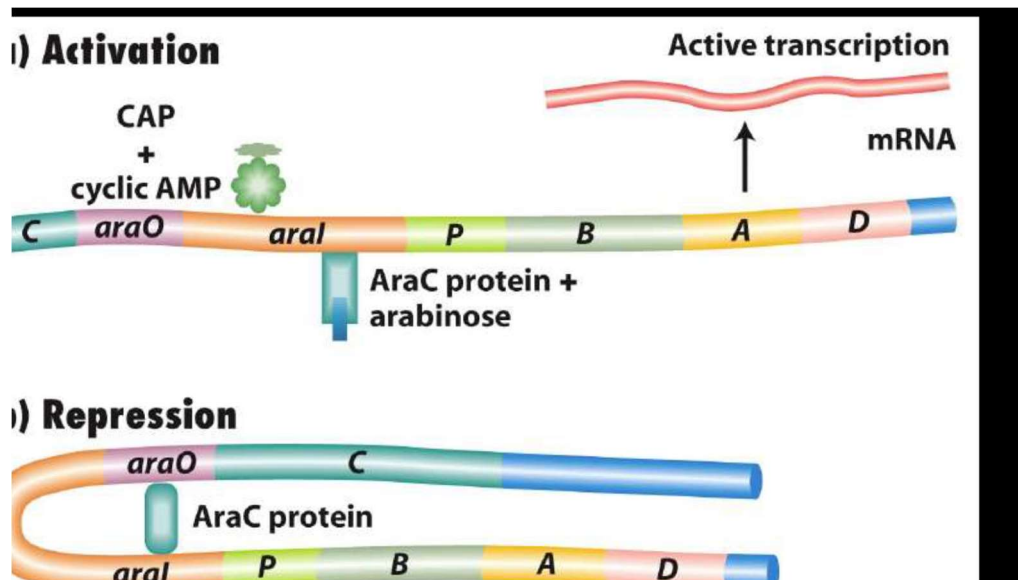
Promótory regulované alternatívnymi sigma faktormi majú úplne odlišné konsenzuálne sekvencie

s70 TTGACA – 17 bp – TATAATN3-6-A
-35 -10

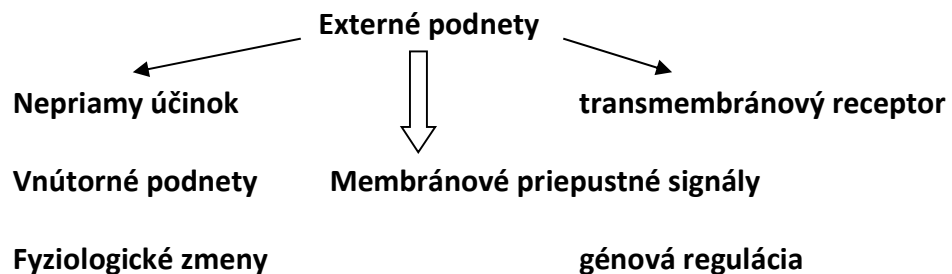
s32 CTTGAAA – 16 bp – CCCCATNTN3-10-T/A
-35 -10

s54 GG – N12 – GC/T – 12bp – A
-24 -12

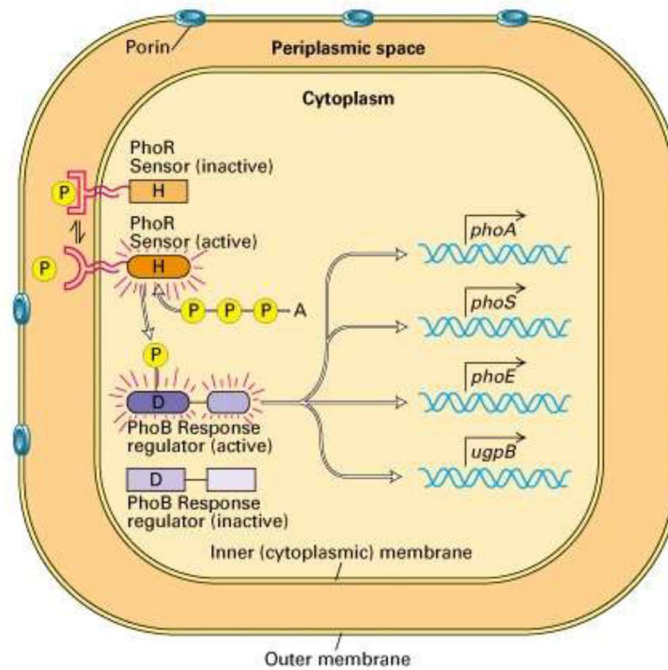
- Regulátor degradácie arabinózy (cukru), AraC je vynikajúci príklad
- Mnohé gény sa podieľajú na vychytávaní a katabolizme



Enviromentálne prispôsobenie

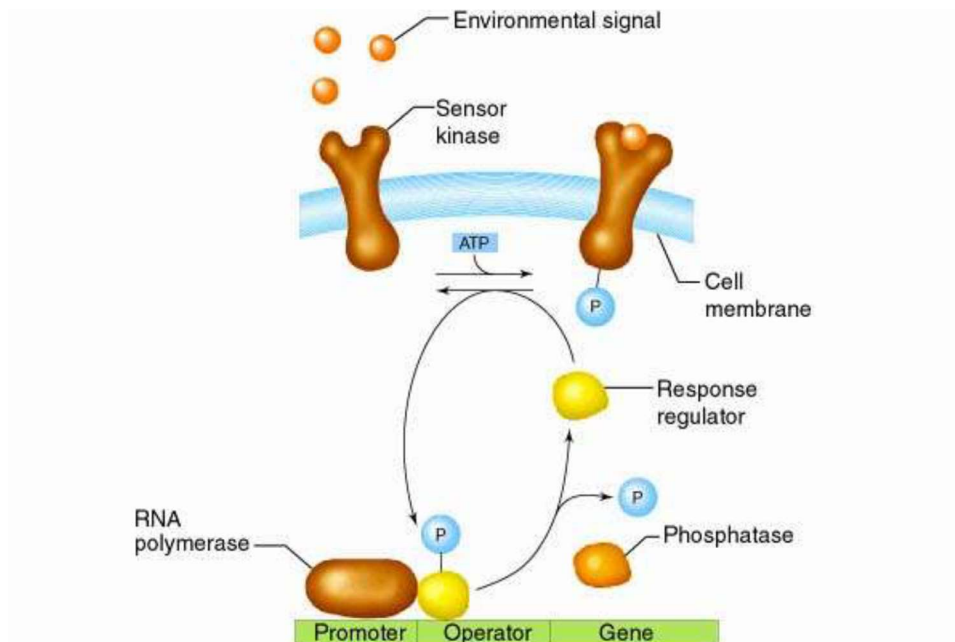


Dva komponentné systémy



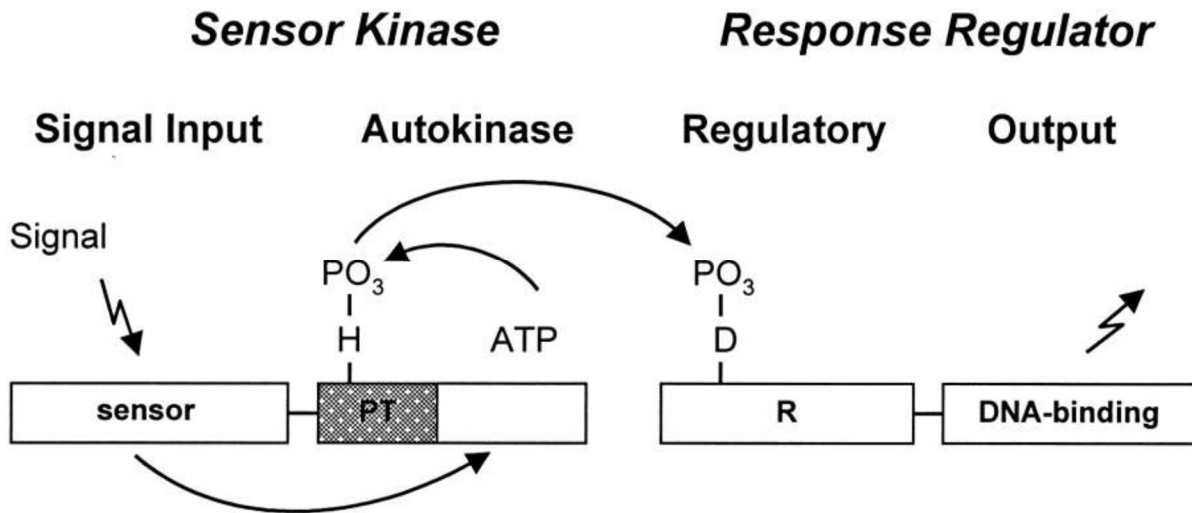
Jednoduchá paradigma pre signalizáciu životného prostredia - dvojzložkový systém

- > 30 takých systémov v *E. coli* - tiež nájdené v rastlinách a hubách



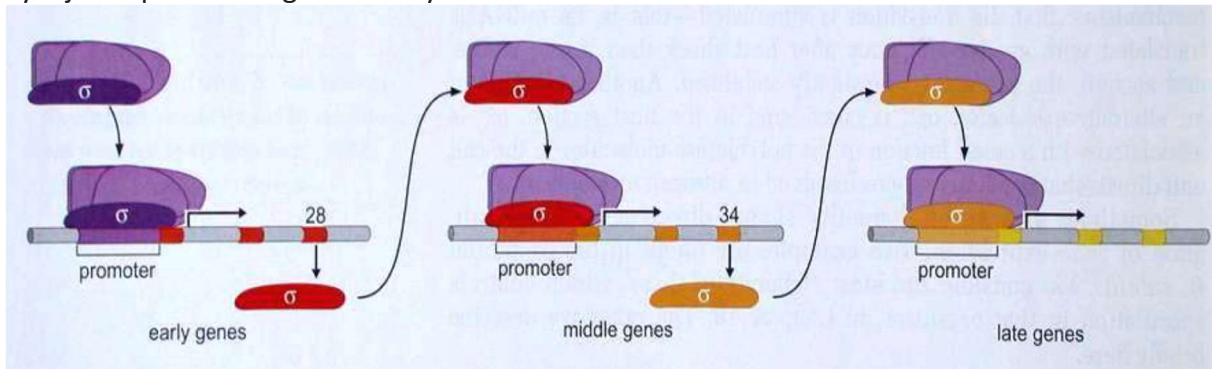
Základný model pre dvojzložkový regulačný systém

- Senzor histidinkinázy (HK) - môže alebo nemusí byť transmembránový - fosforyluje sám
- Regulátor reakcie (RR) - často, ale nie vždy ovplyvňuje expresiu génov - fosforylovaný HK



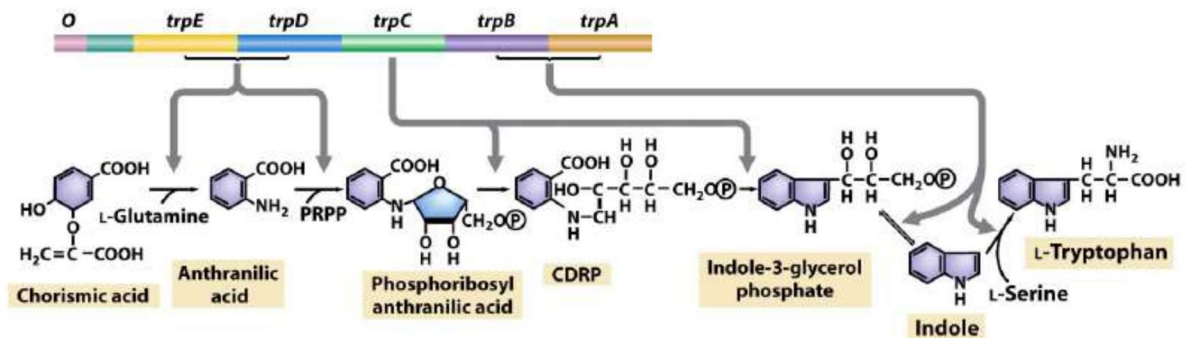
B. subtilis rozhoduje o sporulovaní - založené na mnohých rôznych faktoroch

Vývojové špecifické sigma faktory

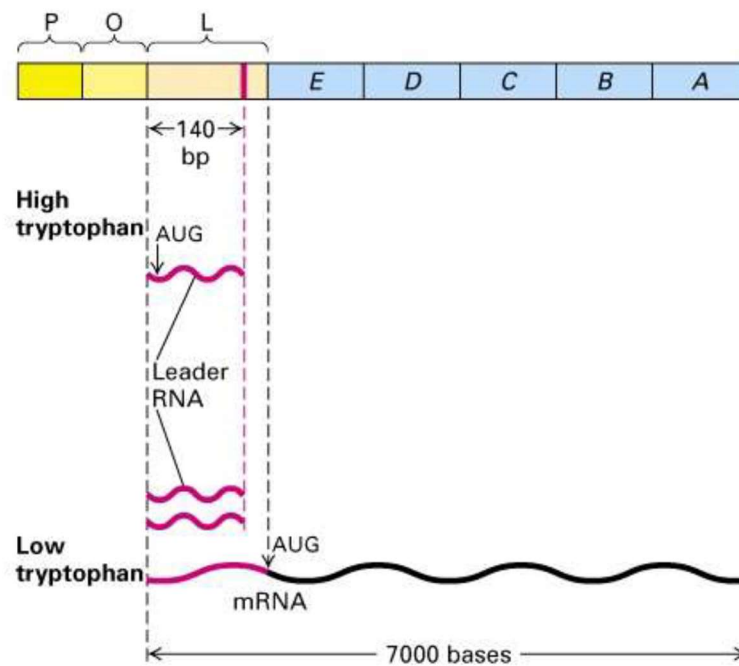


Attenuation – Útlm

- Charakteristická pre RNA je regulácia útlmom - niekoľko regiónov internej komplementariy (invertované opakovania) v rámci vedúcej sekvencie
- „Vodca“ je ďalej charakterizovaný prítomnosťou viacerých kodónov pre aminokyseliny (napríklad G. Trp)
- Vysoké Trp vedie k predčasnému ukončeniu transkripcie - nízke Trp umožňuje transkripciu



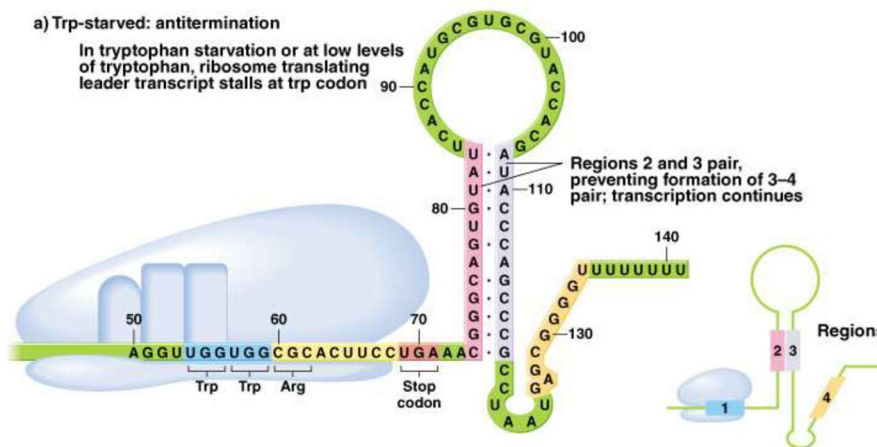
Attenuácia – Trp operón



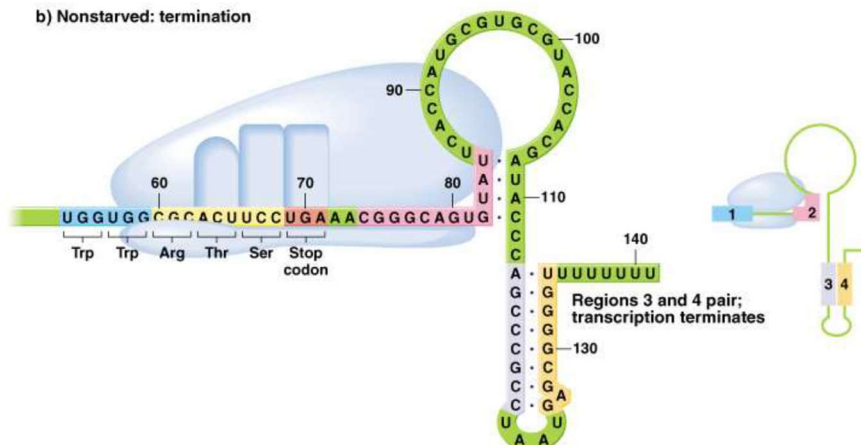
Zoslabenie rôznou štruktúrou sekundárnej RNA

a) Trp-starved: antitermination

In tryptophan starvation or at low levels of tryptophan, ribosome translating leader transcript stalls at trp codon



b) Nonstarved: termination



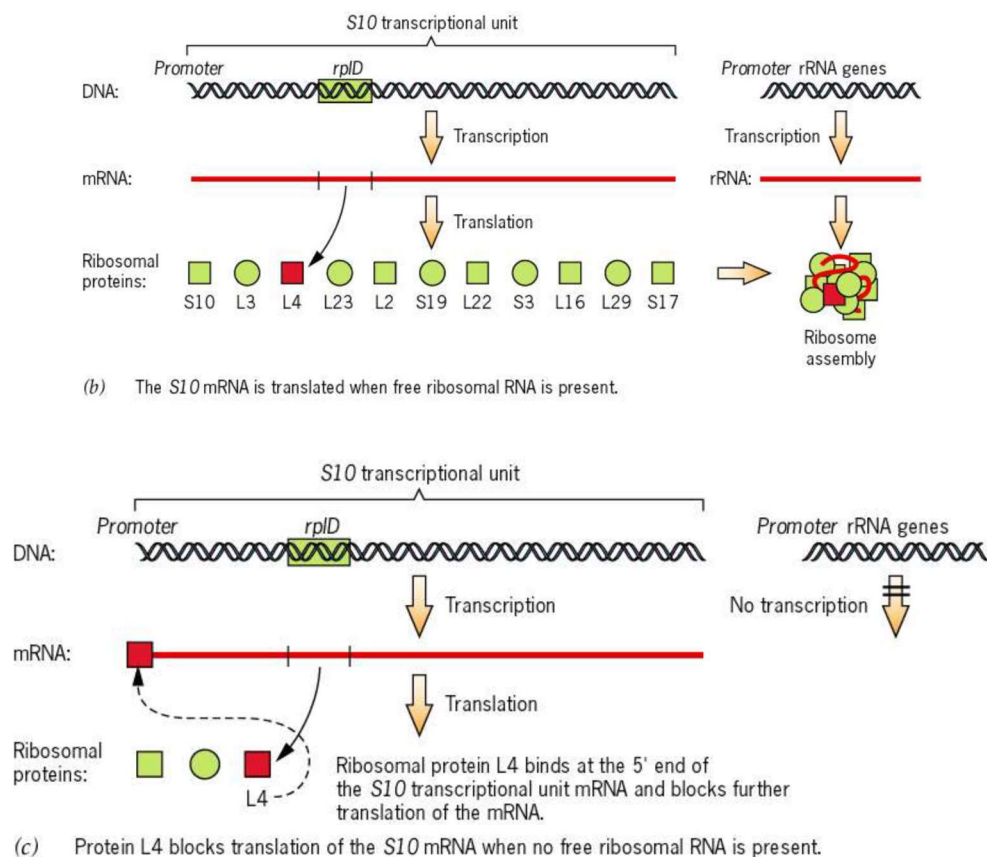
Sequencie „leader“

- (A) Met - Lys - Arg - Ile - Ser - Thr - Thr - Ile - Thr - Thr - Thr - Ile - Thr - Ile - Thr - Thr -
 5' AUG AAA CGC AUU AGC ACC ACC AUU ACC ACC ACC AUC ACC AUU ACC ACA 3'
- (B) Met - Lys - His - Ile - Pro - Phe - Phe - Phe - Ala - Phe - Phe - Phe - Thr - Phe - Pro - Stop
 5' AUG AAA CAC AUA CCG UUU UUC UUC GCA UUC UUU UUU ACC UUC CCC UGA 3'
- (C) Met - Thr - Arg - Val - Gln - Phe - Lys - His - His - His - His - His - His - His - Pro - Asp -
 5' AUG ACA CGC GUU CAA UUU AAA CAC CAC CAU CAU CAC CAU CAU CCU GAC 3'

Translačná kontrola génovej expresie

- Prokaryoti sú regulovaní počas transkripcie
- Translačná kontrola je používaná na jemné ladenie
- Transkripcia, preklad, mRNA degradácia
- Tri všeobecné mechanizmy:
 1. nerovná účinnosť iniciácie translácie
 2. zmenená účinnosť pohybu ribozómov
 3. diferenciálne rýchlosti degradácie mRNA

Translačné riadenie E. coli ribozomálnych proteínových génov



Regulácia malými RNA molekulami

- transakčné regulačné orgány
- regulačné RNA molekuly
- antisenčné RNA molekuly

Riboswitches

- malé molekuly môžu priamo pôsobiť na 5' - UTRs na mRNA, aby kontrolovali ich expresiu
- regióny 5' - UTRs schopné zmeniť ich štruktúry na kontrolu génovej expresie ako odpoveď na väzbu ligandu sa nazýva riboswitches
 - operuje stlačením génovej expresie
 - niektoré pracujú na úrovni transkripcie
 - iné môžu fungovať na úrovni translácie

Regulácia na úrovni bielkovín

Spracovanie – vyjadrené skoro v neaktívnej forme

- spracované na poskytnutie aktívnej formy
- spracovanie periplazmickej alebo vonkajšej membrány proteínov na uvoľnenie

aktívnej formy hlavnou peptidázou

Stabilitnosť – degradácia proteázami

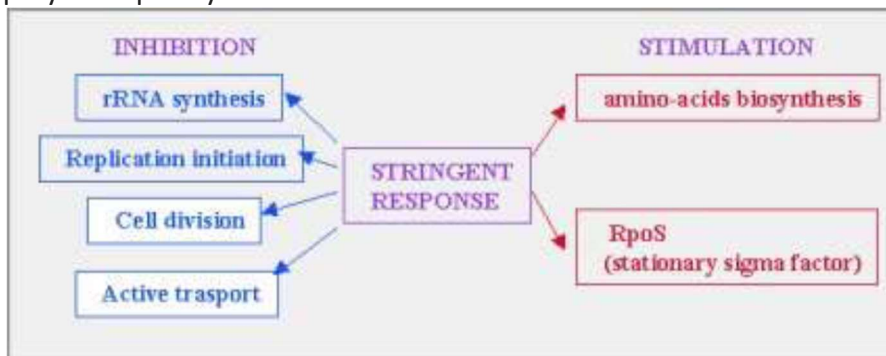
- krátky polčas rozpadu

Postavenie, funkcia – aktívny alebo neaktívny vyžaduje úpravu – konformačná zmena

- uvoľnenie z neaktívneho komplexu

Prísna odpoveď

- prvýkrát opísaný v *E. coli* v roku 1962



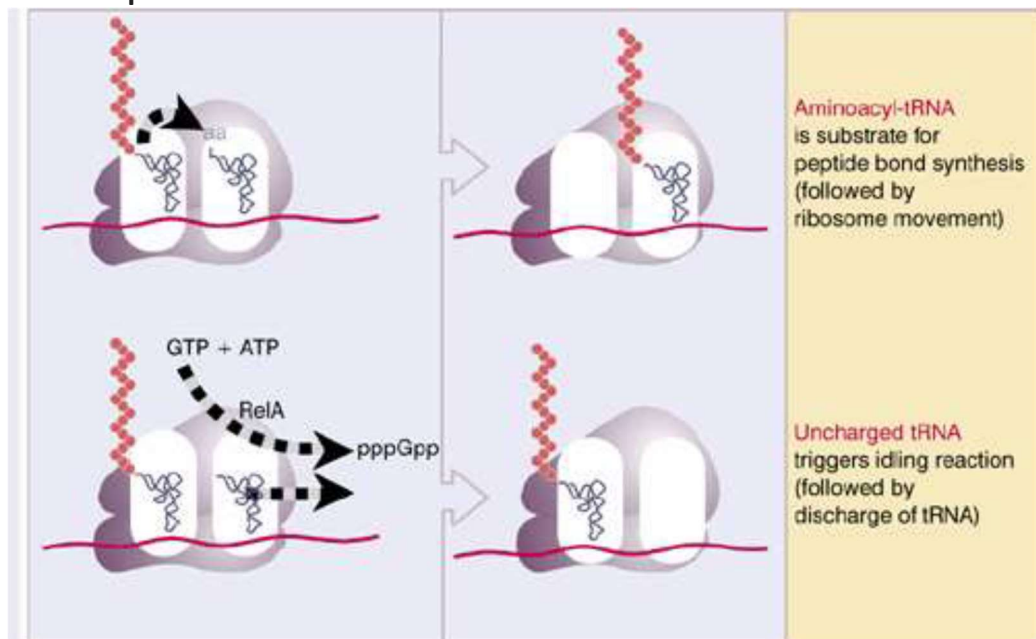
- po vyhladovaní aminokyselín sa bunky zmenšia na minimálnu jednotku, dostatočnú na to, aby prežila hladové obdobie. Takto sú schopné sa rýchlo zotaviť, keď sa znova sprístupnia živiny. (p)ppGpp
- ostrá odpoveď je sprostredkovaná dvoma nezvyčajnými fosforylovanými derivátmi GTP a GDP, spoločne nazývané (p)ppGpp, ktoré sa akumuluju na vysoké hladiny v priebehu pár sekúnd po hladovaní aminokyselín

Prísna odpoveď

- vyhladovanie aminokyselín
- 1. koncentrácia nabitých tRNA klesá

2. veľká prechodná akumulácia dvoch nových malých molekúl je indukovaná, dve molekuly pôvodné nazývané „magické škvry“ sú teraz známe ako vysokofosforylované nukleotidy guanozín tetrafosfát (5'-ppGpp-3') a guanozín pentafosfát (5'- pppGpp-3').
3. Celková syntéza proteínov sa spomaľuje a vzorka nasyntetizovaných proteínov sa dramaticky posúva. Ribozomálna syntéza proteínov klesá až blízko nuly, syntéza biosyntetických enzýmov aminokyselín je indukovaná
4. Syntéza tRNA a rRNA sa takmer zastaví.
5. Iniciácia nových kruhov DNA replikácii sa zastaví.
6. Syntéza fosfolipidu, uhľovodíkov a mureínu sa spomaľuje.

Prísna odpoveď



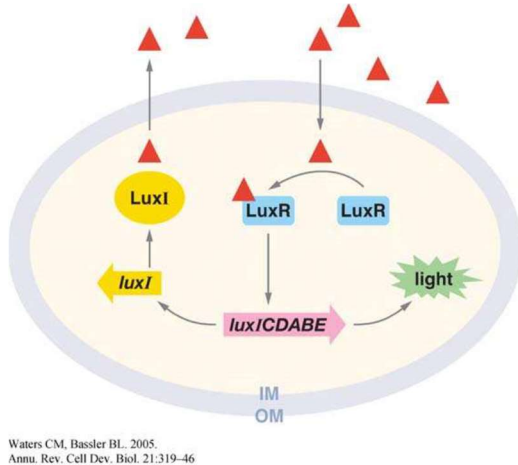
Snímanie kvóra

- Baktérie produkujú a vylučujú chemický signál molekuly (autoinduktory)
- Koncentrácia molekúl sa zvyšuje s rastúcou hustotou baktérií
- Keď kritická prahová koncentrácia molekuly je dosiahnutá, baktéria mení génovú expresiu
- Spôsob pre spoločenstvo baktérií na vzájomné „rozprávanie“

Snímanie kvóra vo *Vibrio fischeri*

- pri vysokej hustote buniek, *V. fischeri* exprimujú gény na bioluminiscenciu
- LuxI produkuje autoinduktor acyl-homoserín-laktón
- AHL vysiela mimo bunky
- Keď AHL dosiahne kritickú koncentráciu, viaže LuxR

- Aktivovaná funkcia LuxR viaže AHL a aktivuje transkripciu luminiscenčných génov



AHL molekuly a ich funkcia

Bioluminiscencia - *Vibrio anguillarum*, *V. fischeri*, *V. harveyi*

Rastlina-mikrób interakcia - *Rhizobium leguminosarum*, *R. meliloti* – rhizosféra – špecifické gény

Virulentné determinanty

- *Pseudomonas aeruginosa* – elastáza, pyokyanín atď.
- *Ralstonia solanacearum* – fytopatogén
- *Aeromonas hydrophila* – serínové proteázy
- *Vibrio cholerae* - HA/proteáza
- *Bordetella pertussis* – toxín pertussis (čierny kašeľ)
- *Erwinia carotovora* – fytopatogén
- *Staphylococcus aureus*

Produkcia polysacharidov

- *Rhodobacter sphaeroides*
- *Erwinia stewartii* – Stewartovo vädnutie kukuričného patogénu
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Escherichia coli* – kyselina guanová

Manželský prenos ???

- *Agrobacterium tumefaciens* Ti plazmid

Prúdenie pohyblivosti

- *Serratia liquefaciens*

Bunkové delenie

- *Escherichia coli*

Syntéza extracelulárnej lipázy

- *Streptomyces lividans* 66

Produkcia pigmentu

- *Chromobacterium violaceum* – violacein

Výroba antibiotík

- *Erwinia carotovora* – karbapén, antibiotikum β – laktám
- *Pseudomonas aureofaciens* – 3 fenazínové antibiotiká
- Gram + vektory baktérií mliečneho kvasenia – antimikrobiálny peptid

Genetická kompetencia

- *Streptococcus pneumoniae*
- *Bacillus subtilis*