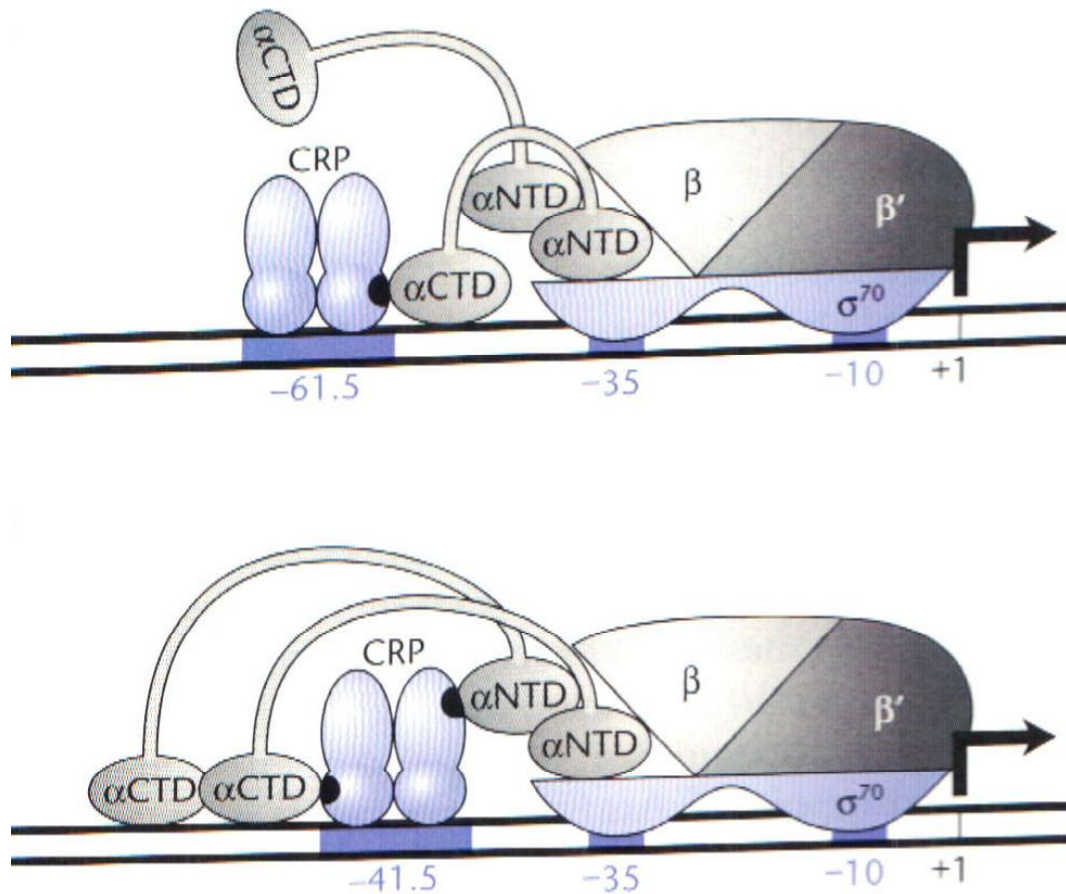


GLOBÁLNÍ REGULACE I

katabolická represe, nitrátový operon

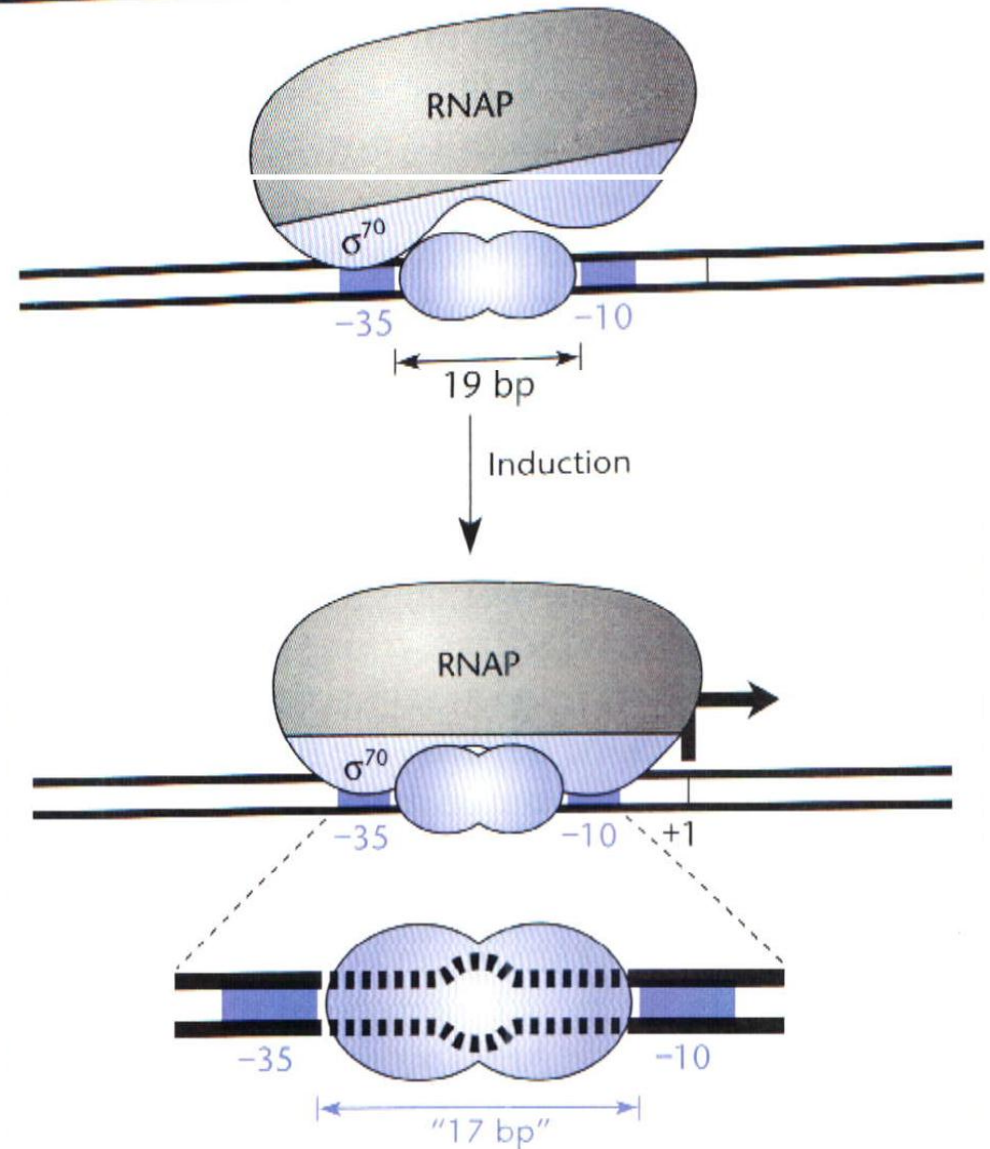
Komplexní promotory

- Příklady – CRP – protein – cAMP vazebný protein



Komplexní promotory

□ Příklady - NtrC



Globální regulační mechanismy

□ Bakterie

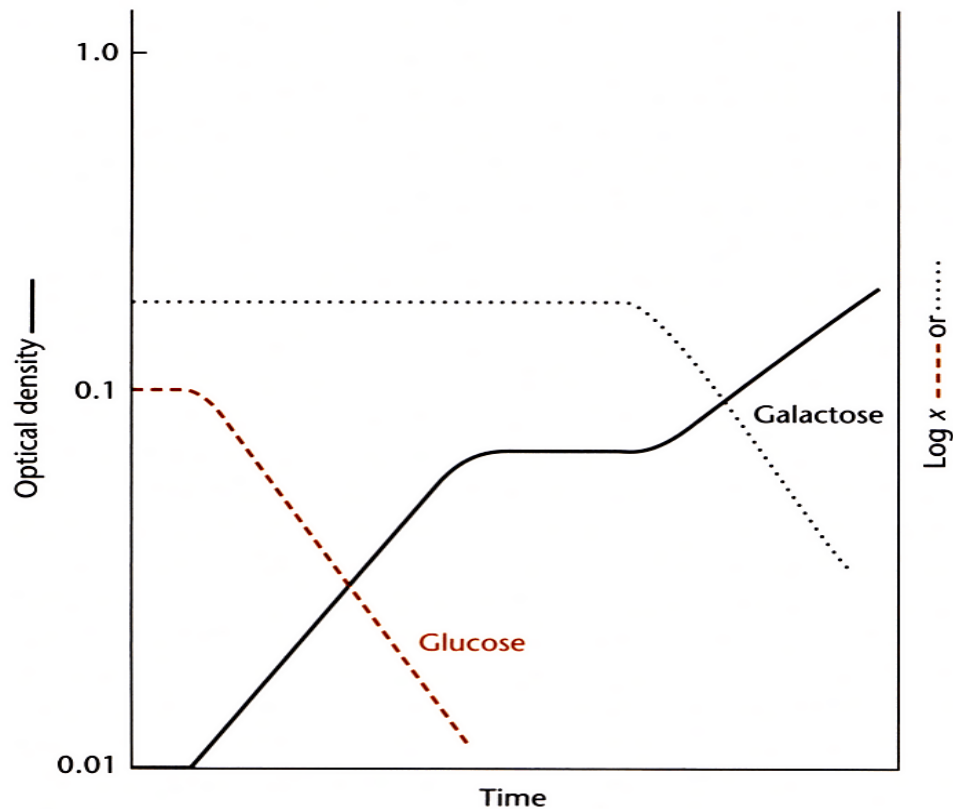
- v přirozeném prostředí musí být schopny přežívat v limitních a stresových situacích
- **musí být schopny kompetence s ostatními organismy v prostředí, které sdílejí**
 - schopnost živiny využívat efektivně
 - dosáhnout vysokého růstu a zvýšit tak poměr k ostatním organismům
 - musí být schopny využít různé zdroje energie
 - musí být schopny je využít co nejefektivněji
 - musí být schopny ignorovat ty ostatní neefektivní
- **musí rychle reagovat na změny v růstové rychlosti**
 - syntéza makromolekul – DNA, RNA, proteiny,
 - množství celulárních komponent – ribosomy, tRNA

Globální regulační mechanismy

- jeden regulační protein kontroluje řadu operonů
 - ▣ ty jsou součástí jednoho regulonu
- Katabolická represe – regulace utilizace zdroje C na výrobu energie, regulace katabolického metabolismu
- Asimilace dusíku – regulace syntézy aa x jejich využití jako zdroje energie

Katabolická represe

- růst buněk v mediu se směsí glukózy a galaktózy-



Katabolická represe

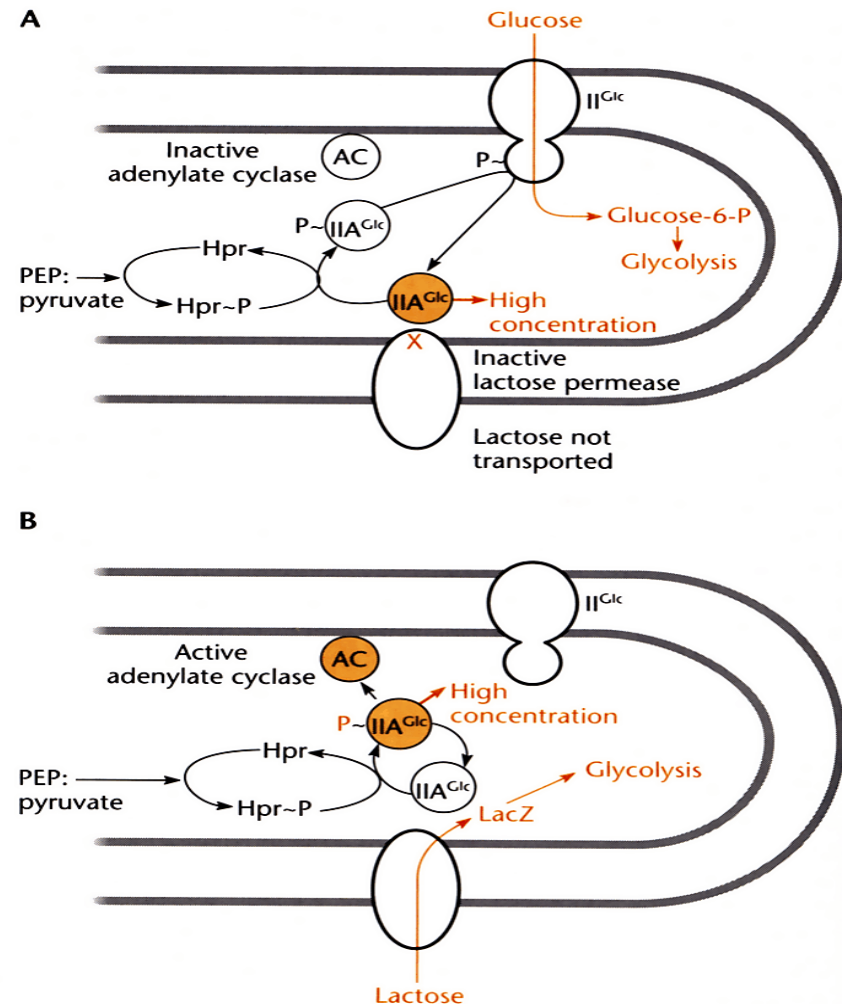
- **globální regulační systém ovlivňující utilizaci zdroje C a energie**
 - nejdříve se spotřebovává zdroj energie, který je nejefektivnější
 - nejlepší poměr vznik ATP x spotřeba energie na utilizaci
- katabolismus
 - – katabolická represe
 - – katabolicky sensitivní promotory
- *E. coli* -
 - cAMP a protein CAP (catabolit activator protein), (Cra)
 - kontrola fermentativního vs oxidativního metabolismu – protein Cra
 - cAMP nezávislé
 - též ostatní enterobakterie
- *B subtilis* a ostatní G⁺ - stejný fenotyp - odlišný regulační systém
 - CcpA protein
- Group Translocation – PEP:PTS. Maloney, P.C., Postma, P. ELSNET 2001

Katabolická represe – *E.coli*

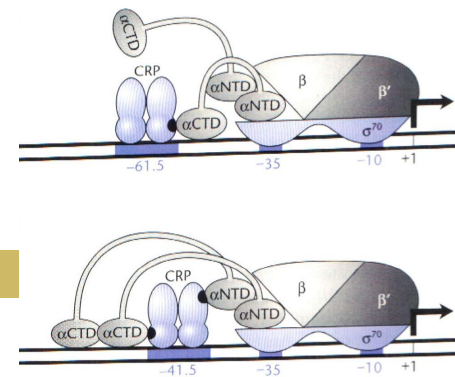
- **regulace katabolismu – současné znalosti**
 - regulace syntézy cAMP
 - nízká koncentrace katabolitů – vysoká koncentrace cAMP
 - regulace aktivity adenylát cyklázy – *cya gen*
 - regulace transportu glukózy -PEP dependentní PTS systém
- **Carbohydrate_{out} + PEP_{in} - (_PTS proteins_) → carbohydrate-P_{in} + pyruvate_{in}**
- transport PTS závislých cukrů do buněk (glukóza, fruktóza)
- IIA^{Glc} – P reguluje aktivitu adenylát cyklázy - pozitivně
 - nízká hladina IIA^{Glc} – P – nízká hladina cAMP
- poměr IIA^{Glc} – P : IIA^{Glc} je určen poměrem PEP : pyruvát
 - v přítomnosti rychle metabolizovatelného substrátu
 - PEP : pyruvát nízký – nízká hladina cAMP
 - spouští se kaskáda – HPr protein – kinasa -fosforyluje IIA^{Glc}
 - IIA^{Glc} – zároveň reprimuje transport ostatních cukrů (laktozy)
 - inducer exclusion

Katabolická represe

- exogenní glukóza inhibuje
 - ▣ syntézu cAMP
 - ▣ transport cukrů PTS nezávislých
- **A** – přítomnost glukózy
 - ▣ vysoká koncentrace IIA^{Glc}
- **B** – nepřítomnost glukózy
 - ▣ vysoká koncentrace $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$



Katabolická represe

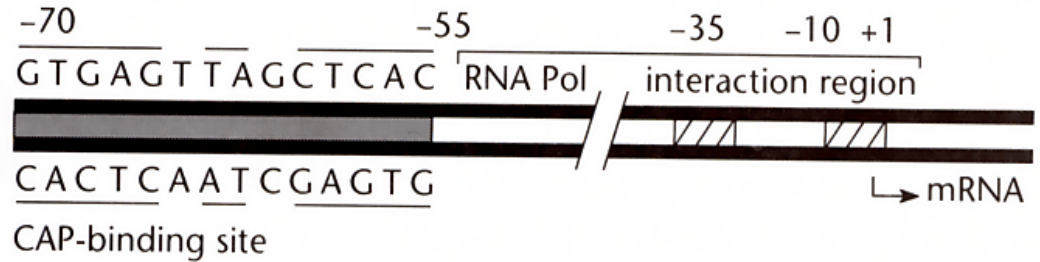


- dobře prostudovaný
- způsob jakým cAMP ovlivňuje katabolické operony
- vazba na CAP (catabolite activator protein)– transkripční regulátor
 - též CRP (cAMP receptor protein)
 - produkt *crp* genu
 - aktivátor i represor – záleží na vazebné pozici
 - *in vitro* experimenty a genetické studie
 - upstream od promotoru – CAP vazebné místo
 - podobné u všech katabolických operonů
 - váže se když je cAMP vysoká – není efektivní zdroj C
 - zesiluje *lac* promotor – místo upstream od -35
 - V ara operonu až za operátorovým místem I₁ a I₂
 - vazba I. typu – zavřený komplex
 - II. typu – otevřený komplex – gal operon
 - více jak jeden aktivátor
 - nepodléhá striktně katabolické represi – galaktosa též syntéza petidoglykanu

CAP

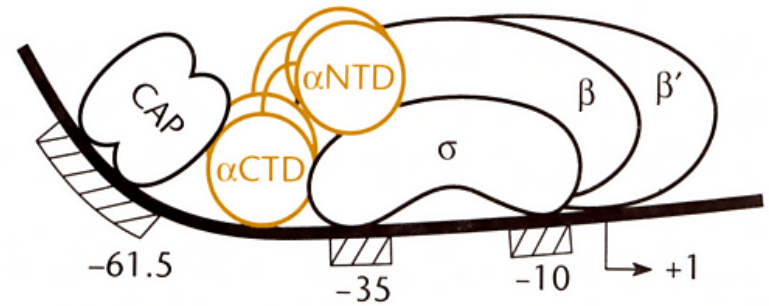
- model CAP aktivace
 - A - sekvence
 - B – model vazby

A

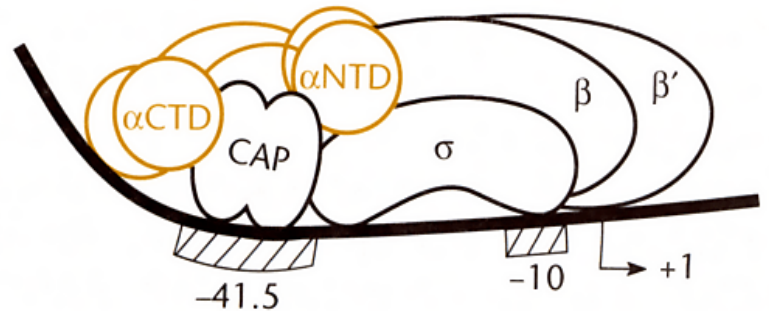


B

Class I promoter

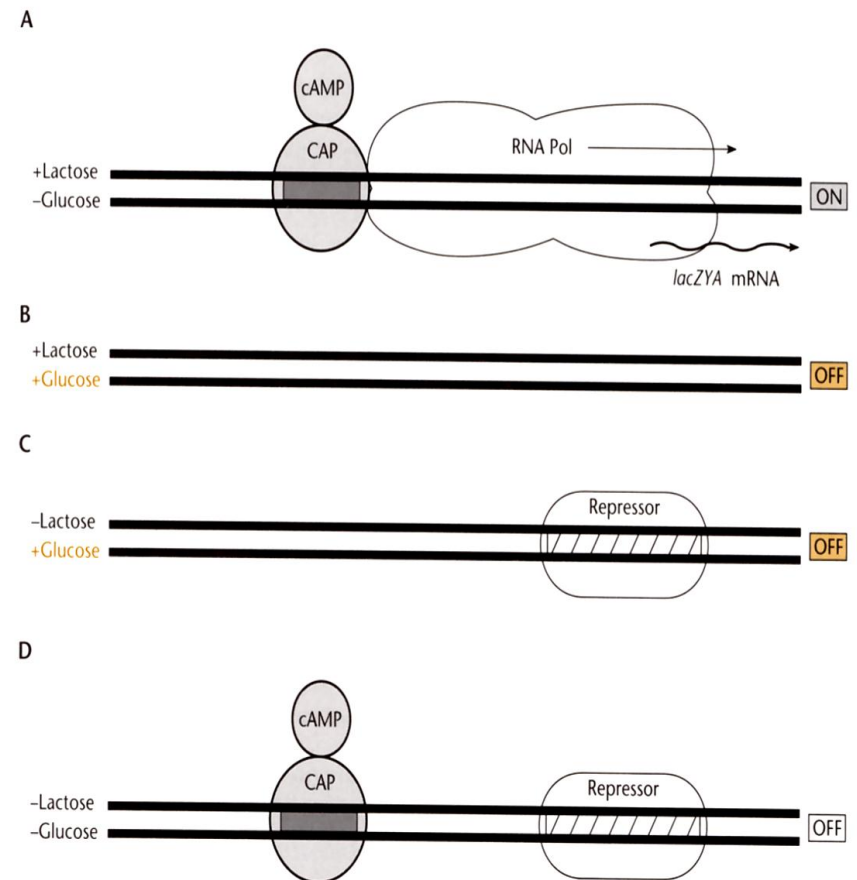
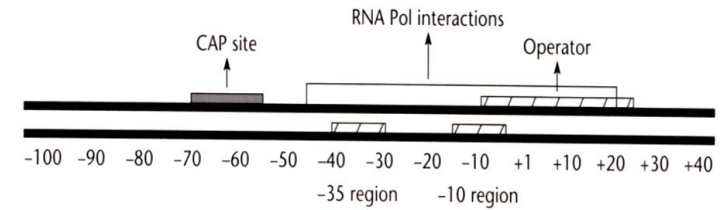


Class II promoter



CAP

- důležitá vlastnost CAP regulace
 - ▣ proběhne vždy s další regulací přináležící danému operonu
 - ▣ musí se setkat vždy dvoje podmínky
 - musí být vyčerpána glukosa a musí být přítomen induktor
 - ▣ glukosa → nízká hladina cAMP → málo CAP-cAMP
 - ▣ není vazba na operon
 - ▣ inhibice transportu laktozy - IIA^{Glc} protein
 - pokud je přítomna glukosa tak ani v přítomnosti laktozy se neaktivuje lac operon



Genetická analýza katabolické represe

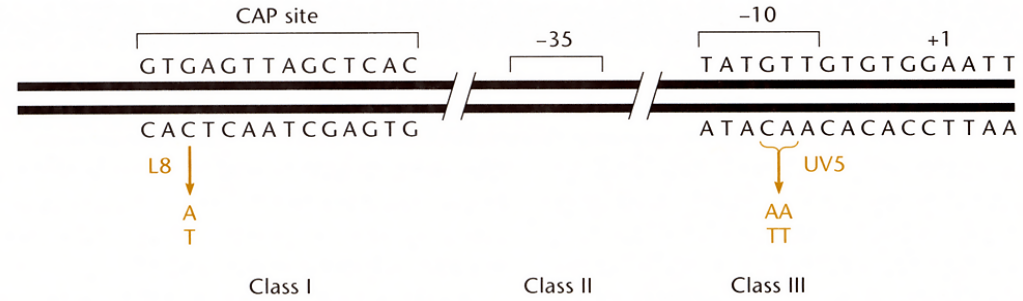
- Strategie studia
 - izolace mutant defektních v globální regulaci všech katabolicky citlivých operonů i jednotlivých specifických operonů
 - mnoho genetických i biochemických experimentů
- **1. izolace mutací v genech *crp* (CAP) a *cya* (adenylát cykláza)**
 - Předpoklad - brání transkripci ze všech katabolických operonů
 - nemají CAP-cAMP - není aktivace transkripce
 - Fenotyp - mutace v *crp* a *cya* mají pleiotropní charakter
 - vykazují různé fenotypy
 - neschopnost utilizace Lac, Gal, Ara, Mal

Genetická analýza katabolické represe

■ Princip izolace mutant

- založeno na tehdy známém faktu, že kolonie bakterií přeměňují soli tetrazolia do červena
 - pokud rostou - vysoké pH – červené zbarvení
- v přítomnosti fermentovatelného cukru –
 - vznikají org. kyseliny – snižují pH - nebarví se do červena
- mutantní bakterie v metabolismu pro alternativní cukry
 - využívají jiný zdroj C – vytvářejí červené kolonie –
 - Některé mohou být mutanty v *cya* nebo *crp*
- selekce na plotnách s tetrazoliem a dvěma cukry
 - při selekci na jednom cukru vznikají mutanty ve fermentativních drahách
 - jednoduchá mutace je častější než dvě nezávislé –
 - mutanty v *cya* nebo *cra* s vyšší frekvencí

Genetická analýza katabolické represe



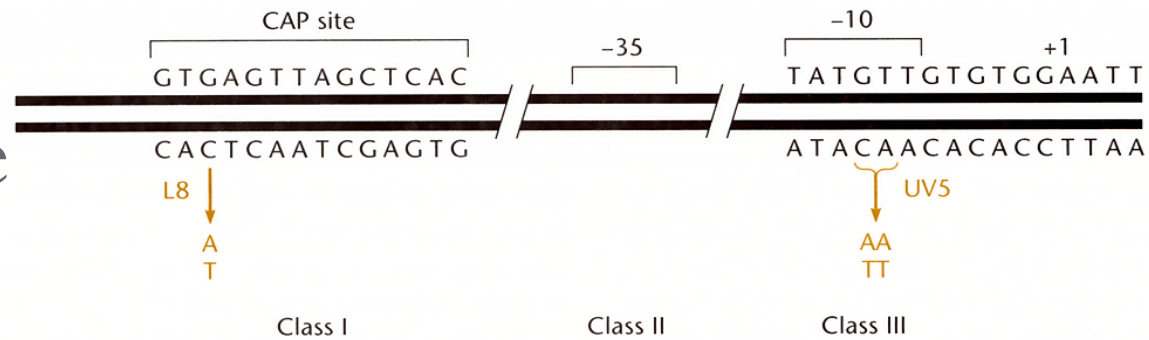
□ Charakterizace mutant

- testy na adenylát cyklázovou aktivitu -
- ztráta proteinu CAP –
 - Protein, který byl nezbytný k aktivaci *lac* operonu

Mutace v promotoru ovlivňující aktivaci prostřednictvím CAP

- 3 třídy mutací v *lac* promotoru
- **1. třída** - mění CAP vazebné místo tak, že se na něj neváže CAP → L8 mutant
 - mutace v místě CAP vazebného míst
 - oslabuje *lac* promotor
 - stanovení měřením β – galaktozidázové aktivity
 - měření při laktóze – úroveň cAMP je vysoká – aktivita β – galaktozidázy nízká
 - přítomnost glukózy – úroveň cAMP nízká – aktivita β – galaktozidázy se příliš nesníží oproti předchozím podmínkám

Genetická analýza katabolické represe



- **2. třída** – změna -35 domény – neváže se RNA polymeráza
- v přítomnosti glukózy dochází k represí – nižší aktivita β – galaktozidázy
- slabý promotor i v přítomnosti laktózy

- **3. třída** – při izolaci revertant Lac^+ od mutant 1. třídy
 - ▣ změna v -10 regionu – TATAAT \rightarrow TATGTT
 - konsensus pro σ^{70} promotor
 - ▣ p lacUV5 – stejně silný jako WT – nepotřebuje aktivaci cAMP-CAP

Genetická analýza katabolické represe

- Interakce CAP a RNA polymerázy –
 - pokusy in vitro
 - mutovaná α podjednotka RNAP a
 - promotor fúzovaný s β – galaktozidázovou aktivitou
 - CAP dimer, ale na RNAP se váže jen jednou
 - Někdy dvě místa pro CAP v různé vzdálenosti, bližší je obsazováno jako první
 - Tebbutt et al., FEMS Microbiol Letters 210, 55, 2002

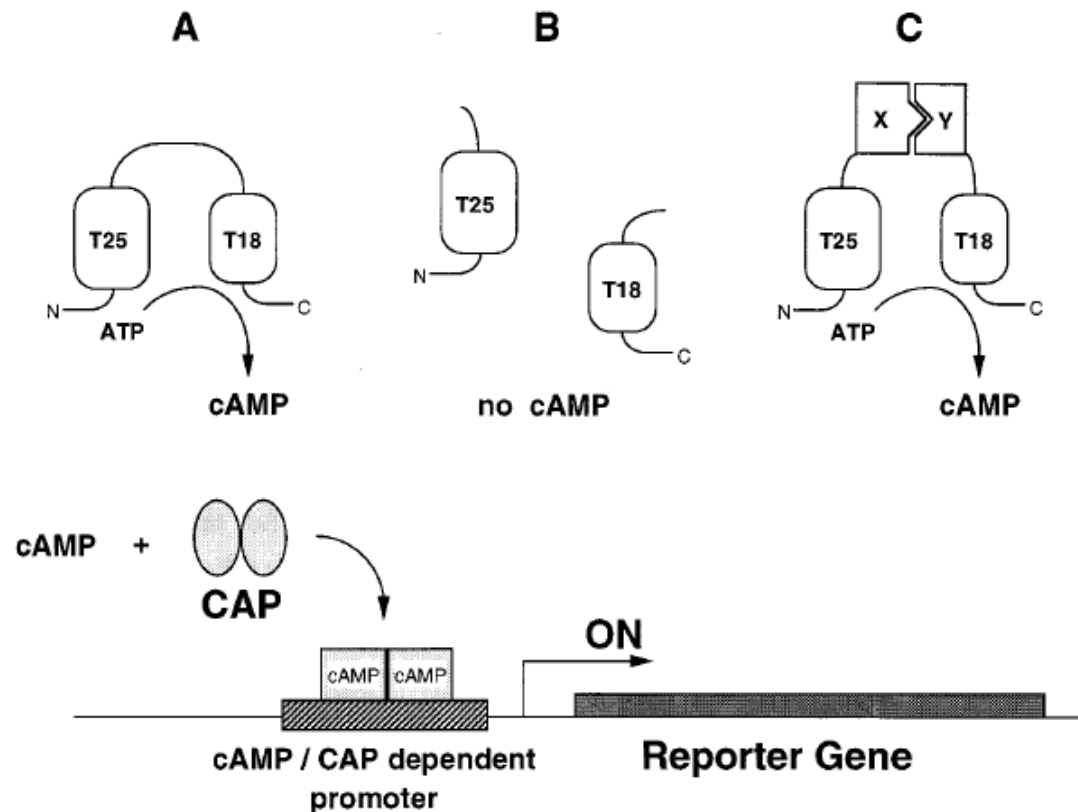
Expression from the *CCIQQ(-n)CCIQQ(-61.5)* promoters

Promoter	β -Galactosidase expression in M182 cells carrying pRW50 with different promoters (%)
No promoter	1.5
<i>CC(-61.5)</i>	100
<i>QQ(-61.5)</i>	3.5
<i>CC(-93.5)CC(-61.5)</i>	537
<i>QQ(-93.5)CC(-61.5)</i>	108
<i>CC(-93.5)QQ(-61.5)</i>	3.0
<i>CC(-103.5)CC(-61.5)</i>	496
<i>QQ(-103.5)CC(-61.5)</i>	104
<i>CC(-103.5)QQ(-61.5)</i>	2.5
<i>CC(-113.5)CC(-61.5)</i>	150
<i>QQ(-113.5)CC(-61.5)</i>	110
<i>CC(-113.5)QQ(-61.5)</i>	2.5

	DNA site for CRP at -n			DNA site for CRP at -61.5				
<i>CC(-91.5)CC(-61.5)</i>	..GGT	AAATGTGATG	TACATCACAT	GGATCTAGGT	AAATGTGATG	TACATCACAT	AGATCCAGAT..	
<i>CC(-92.5)CC(-61.5)</i>	..GGTA	AAATGTGATG	ACATCACATG	GATCCAGAGT	AAATGTGATG	TACATCACAT	AGATCCAGAT..	
<i>CC(-93.5)CC(-61.5)</i>	..GGTAA	ATGTGATGTA	CATCACATGG	ATCCGAAAGT	AAATGTGATG	TACATCACAT	AGATCCAGAT..	
<i>CC(-94.5)CC(-61.5)</i>	..GGTAAA	TGTGATGTAC	ATCACATGGA	TCTAGAAGGT	AAATGTGATG	TACATCACAT	AGATCCAGAT..	
<i>CC(-95.5)CC(-61.5)</i>	..GGTAAAT	GTGATGTACA	TCACATGGAT	CCTAGAAGGT	AAATGTGATG	TACATCACAT	AGATCCAGAT..	
<i>CC(-97.5)CC(-61.5)</i>	..GGTAAATGT	GATGTACATC	ACATGGATAC	AGGATCAGGT	AAATGTGATG	TACATCACAT	AGATCCAGAT..	
<i>CC(-99.5)CC(-61.5)</i>	..G	GTAATGTGA	TGTACATCAC	ATGGATCCAG	GGGATCAGGT	AAATGTGATG	AGATCCAGAT..	
<i>CC(-101.5)CC(-61.5)</i>	..GGT	AAATGTGATG	TACATCACAT	GGATCCAGGG	GGGATCAGGT	AAATGTGATG	AGATCCAGAT..	
<i>CC(-102.5)CC(-61.5)</i>	..GGTAA	AAATGTGATG	ACATCACATG	GATCCAGTGG	GGGATCAGGT	AAATGTGATG	AGATCCAGAT..	
<i>CC(-103.5)CC(-61.5)</i>	..GGTAA	ATGTGATGTA	CATCACATGG	ATCCAGATCA	GATTCGCAGT	AAATGTGATG	AGATCCAGAT..	
<i>CC(-104.5)CC(-61.5)</i>	..GGTAAA	TGTGATGTAC	ATCACATGGA	TCCAGATCTA	GATTCGCAGT	AAATGTGATG	AGATCCAGAT..	
<i>CC(-105.5)CC(-61.5)</i>	..GGTAAAT	GTGATGTACA	TCACATGGAT	CCAGATCAGG	GGGATCAGGT	AAATGTGATG	AGATCCAGAT..	
<i>CC(-109.5)CC(-61.5)</i>	..G	GTAATGTGA	TGTACATCAC	ATGGATCCAG	ATCGATCTGG	GGGATCAGGT	AGATCCAGAT..	
<i>CC(-110.5)CC(-61.5)</i>	..GGTAA	AAATGTGATG	ACATCACATG	TGGATCCAGA	TCAGATTCGG	GGGATCAGGT	AGATCCAGAT..	
<i>CC(-113.5)CC(-61.5)</i>	..GGTAA	ATGTGATGTA	CATCACATGG	ATCCAGATCA	GATTCGCAGG	GGGATCAGGT	AGATCCAGAT..	
<i>CC(-117.5)CC(-61.5)</i>	..GGTAAATGT	GATGTACATC	ACATGGATCC	AGATCAGATT	CGCAGATCCG	GGGATCAGGT	AGATCCAGAT..	
<i>CC(-122.5)CC(-61.5)</i>	..GGTAA	AAATGTGATG	ACATCACATG	GATCCAGATC	AGATTCGCAG	ATCGATCTGG	GGGATCAGGT	
<i>CC(-132.5)CC(-61.5)</i>	..GGTAAATGTGATGT	AAATGTGATG	ACATCACATG	GATCCAGATC	GTCGACCATG	GCTCGAGGTC	GACGATCTGG	GGGATCAGGT

Dvouhybridní systém BATCH

- Karimova et al. 1998 PNAS, 95: 5752.
- syntéza cAMP u Bordetella pertusis T25 a T18 a Δ cya mutant E. coli
- pokud interaguje X a Y, syntéze cAMP
- exprese mal nebo lac operonu
- vhodný pro studium membránových proteinů – nevyžaduje vytvoření transkripčního komplexu
- obr. 13.7 str. 557



cAMP nezávislá kat. represe

- *cra* mutanty
 - nejsou schopny syntetizovat glukózu z mnoha substrátů (acetat, pyruvat citrát,)
 - mají konstitutivní fruktózový operon
- aktivátor i represor
 - při metabolismu glukózy – vysoká hladina F-1-P a F-1,6-bP – váže se na Cra – to pak ztrácí DNA vazebnou schopnost
 - pokud represor – transkripce se zvýší v přítomnosti glukózy
 - pokud aktivátor - transkripce se sníží – inaktivace v přítomnosti glukózy
- Represor – katabolických drah pro alternativní cukry
 - Embden – Meyerhof
 - Entner- Doudoroff
- Aktivátor – operonů syntetizující glukózu z acetátu
 - glukoneogeneze

Enzyme	Gene or operon	Fold effect as determined by measuring ^a :	
		Enzyme activity	β-Galactosidase in gene-lacZ fusion
Positively regulated by Cra			
PEP synthase ^b	<i>ppsA</i>	20	10
PEP carboxykinase ^b	<i>pckA</i>	4	≥5
Malate synthase; isocitrate lyase ^b	<i>aceBA</i>	4	4
Isocitrate dehydrogenase ^b	<i>icd</i>	3	ND ^c
Fructose-1,6-bisphosphatase	<i>fbp</i>	2	ND
Cytochrome <i>d</i> oxidase	<i>cyd</i>	≥5	3
Negatively regulated by Cra			
Fructose catabolic enzymes ^b	<i>fruBKA</i>	~20	ND
HPt, Enzyme I ^b	<i>ptsHI</i>	3	ND
Entner-Doudoroff enzymes ^b	<i>edd-eda</i>	ND	3
Phosphofructokinase	<i>pfk</i>	2.5	ND
Mannitol catabolic enzymes ^b	<i>mtLADR</i>	6	2
Erythrose-4-phosphate dehydrogenase ^b	<i>gapB</i>	ND	3.5
Pyruvate kinase ^b	<i>pykF</i>	ND	3

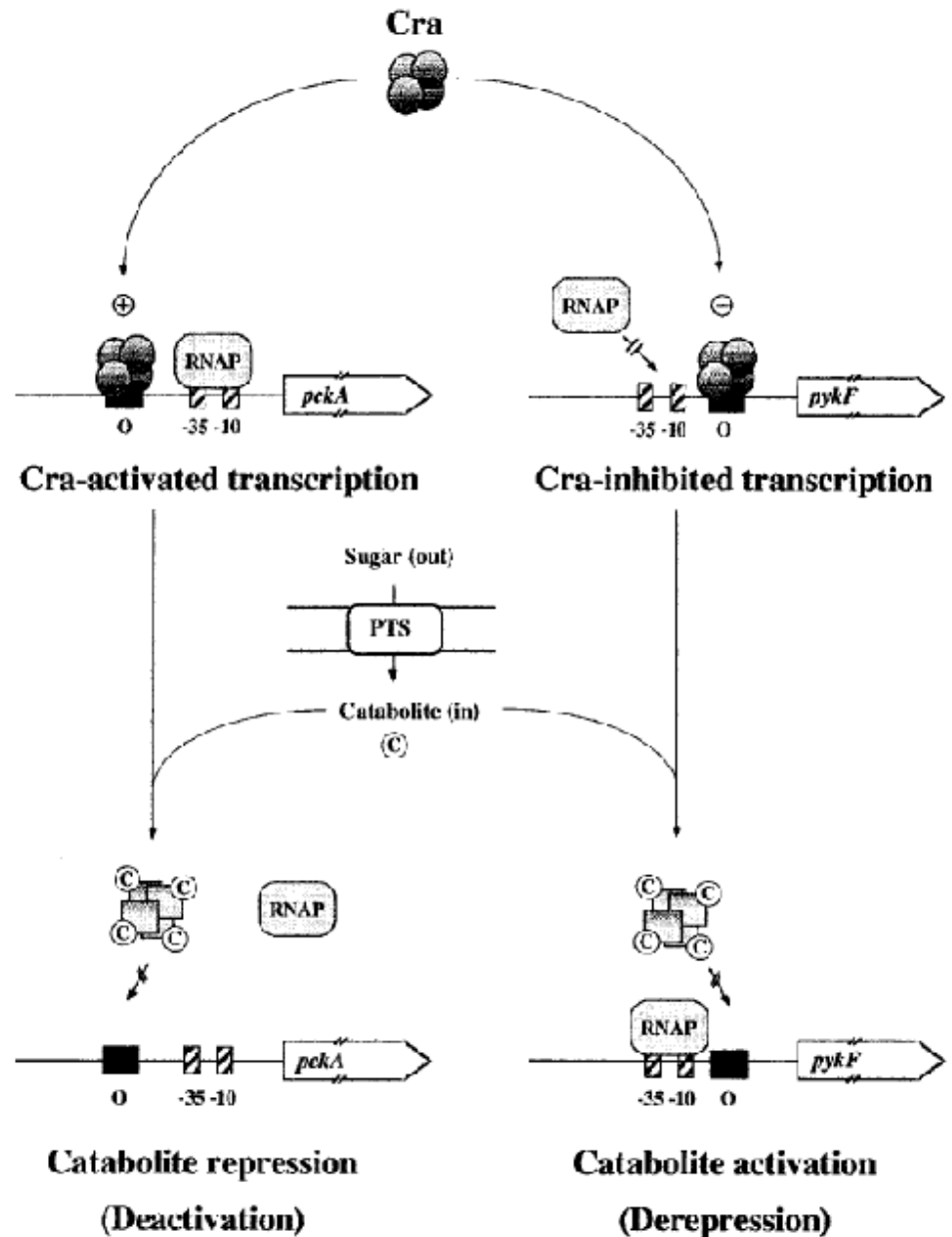
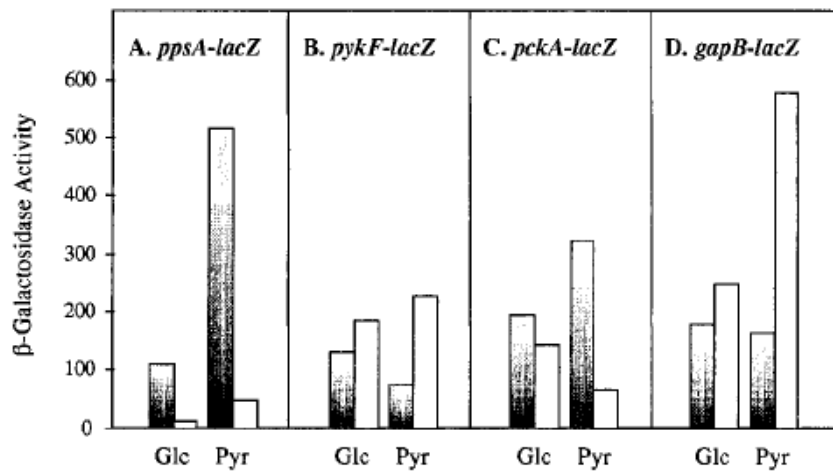
Model katabolické aktivace a represe Cra proteinu

pckA – PEP karboxy kináza

pozitivně regulována

pykF – pyruvát kináza

negativně regulována

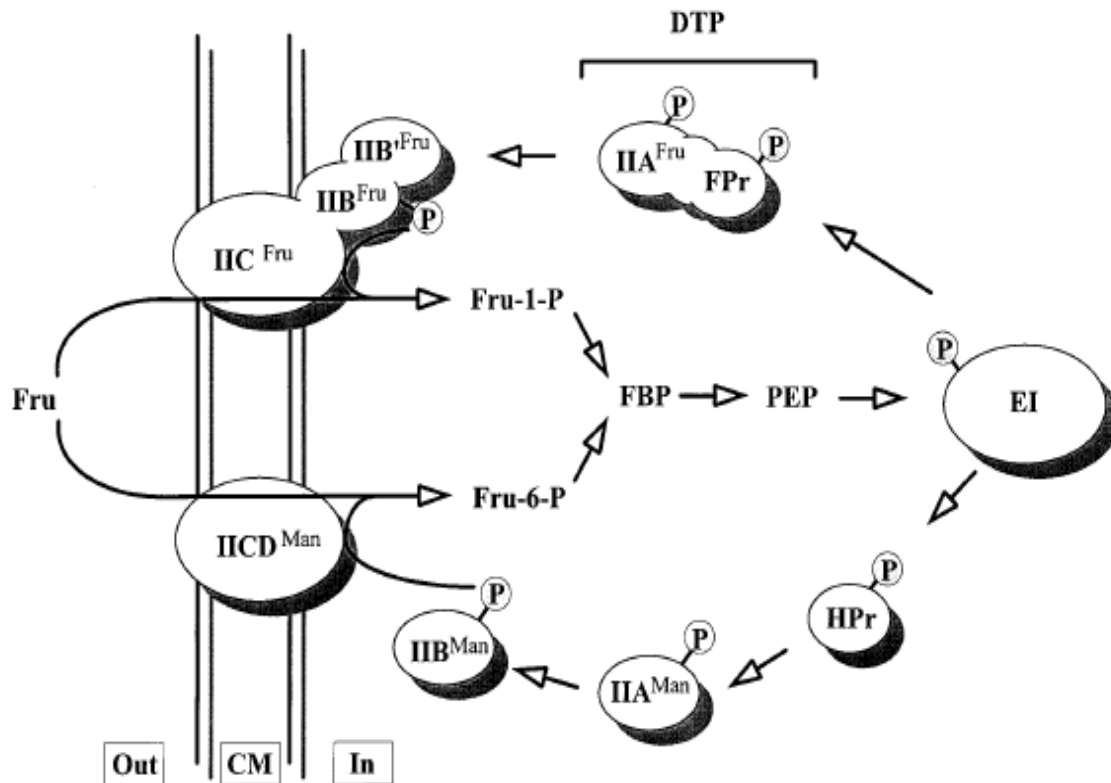


cAMP nezávislá kat. represe

- Některé promotory obě vazebná místa – *pckA* (PEP karboxykináza)
 - vzájemné působení Cra a CRP-cAMP komplexní regulace
 - cAMP-CPR – pozitivní efekt na *pckA* genovou expresi
 - WT
 - buňky rostoucí na glukóze – nižší PckA aktivita než na pyruvátu rostoucí buňky
 - Cra reprimuje a jeho efekt je přednostní před cAMP-CRP
 - Cra mutanty - opačný efekt
 - reagují pouze na přítomnost CRP-cAMP

cAMP nezávislá kat. represe

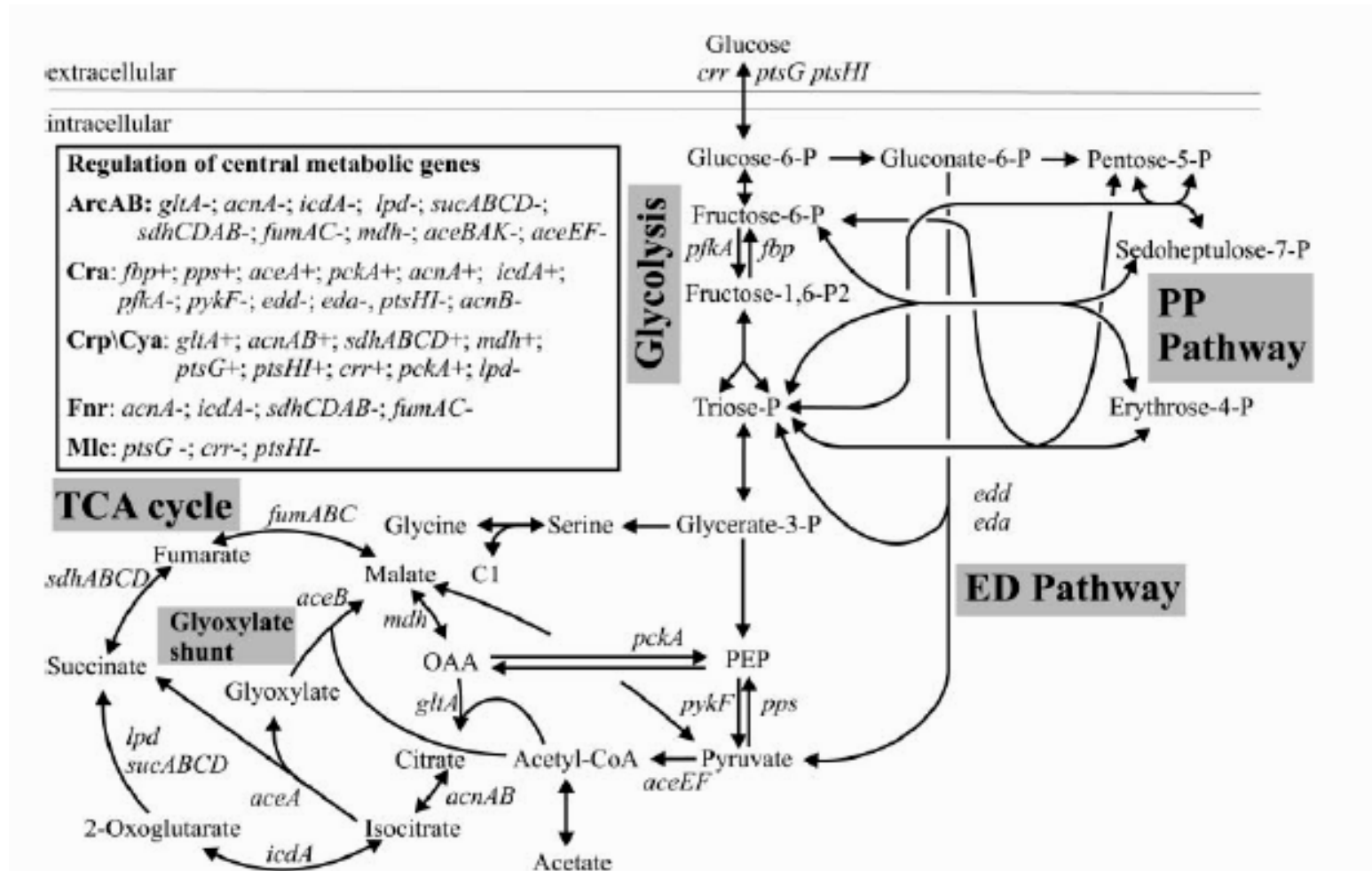
- Fosforylační dráha pro fruktózu v PTS systému.
- PEP je bezprostřední donor fosfátové skupiny pro PTS fosforylační dráhu.
 - ▣ Minireview: Saier J.Bact. ,178, 3411,1996.



Enzyme	Gene or operon	Fold effect as determined by measuring ^a :	
		Enzyme activity	β -Galactosidase in gene-lacZ fusion
Positively regulated by Cra			
PEP synthase ^b	<i>ppsA</i>	20	10
PEP carboxykinase ^b	<i>pckA</i>	4	≥ 5
Malate synthase; isocitrate lyase ^b	<i>aceBA</i>	4	4
Isocitrate dehydrogenase ^b	<i>icd</i>	3	ND ^c
Fructose-1,6-bisphosphatase	<i>fdp</i>	2	ND
Cytochrome <i>d</i> oxidase	<i>cyd</i>	≥ 5	3
Negatively regulated by Cra			
Fructose catabolic enzymes ^b	<i>fruBKA</i>	~ 20	ND
HPr, Enzyme I ^b	<i>ptsHI</i>	3	ND
Entner-Doudoroff enzymes ^b	<i>edd-eda</i>	ND	3
Phosphofruktokinase	<i>pfk</i>	2.5	ND
Mannitol catabolic enzymes ^b	<i>malADR</i>	6	2
Erythrose-4-phosphate dehydrogenase ^b	<i>gapB</i>	ND	3.5
Pyruvate kinase ^b	<i>pykF</i>	ND	3

Katabolická represe - *E. coli*

- Schéma metabolických drah regulovaných dvojicí CRA a CRP



Katabolická represe u *B. subtilis*

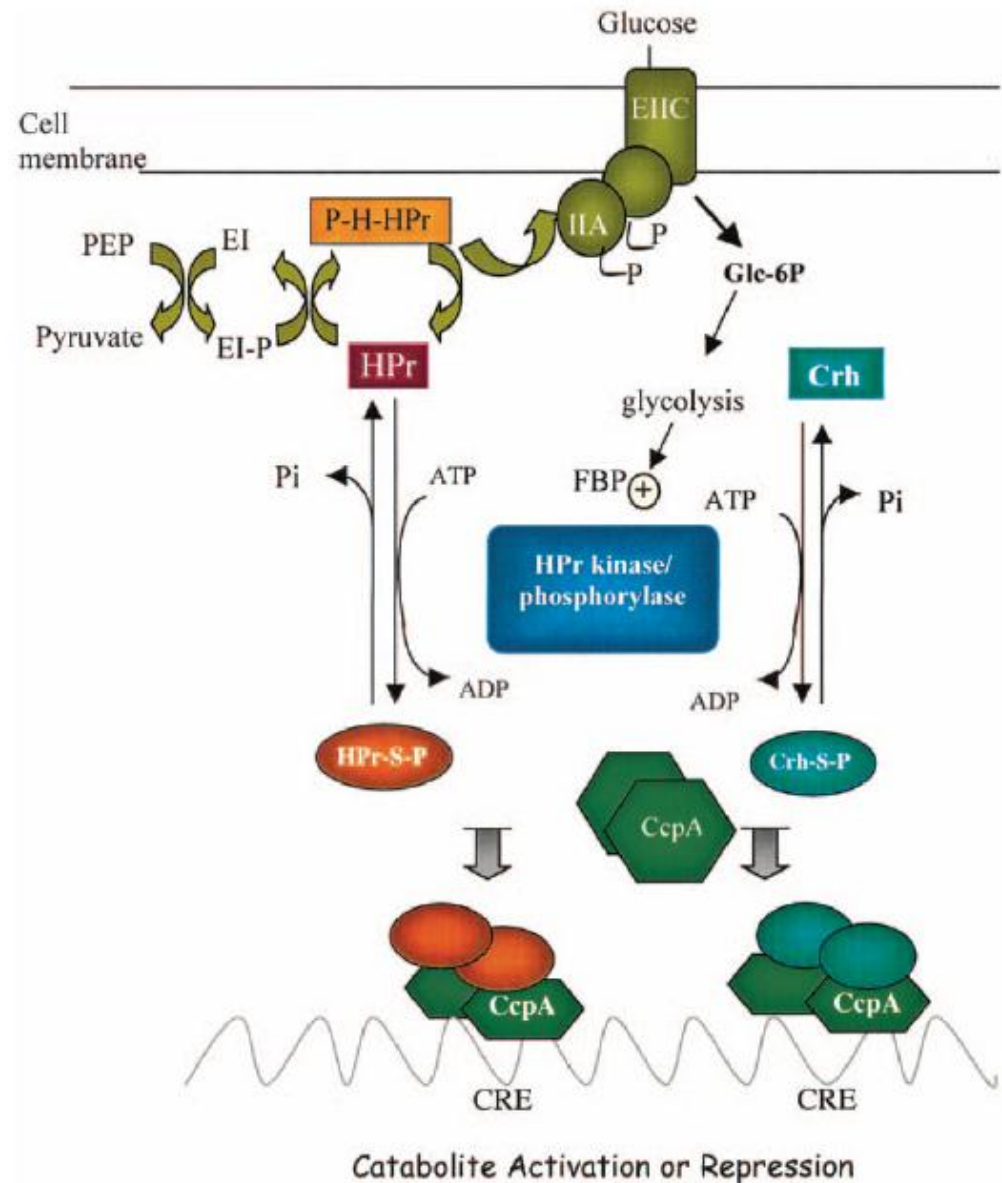
- vůbec nemá cAMP – alternativní regulace
- CcpA represor (catabolit control protein A)
 - člen rodiny LacI, GalR proteinů
 - váže se na *cre* místo v promotoru katabolicky sensitivních operonů
 - represe jejich transkripce
 - kontroluje 100 genů
 - záleží na stupni fosforylace HPr proteinu
 - vysoká koncentrace F-1-P a F-1,6-bP –
 - stimulace fosforylace HPr na serinu
 - tím jej konvertuje na korepresor a váže se na CcpA
 - tehdy vazba na *cre* místo promotoru
 - reprimace transkripce

Katabolická represe u *B. subtilis*

- HPr zároveň slouží jako donor fosfátu v PTS systému
 - musí být fosforylován na histidinu
 - fosforylace na serinu inhibuje fosforylaci na histidinu
 - inhibice transportu cukru, který tento systém využívá
 - úzká koordinace transportu cukrů a regulace katabolicky závislých operonů
- Saier M.H. 1996, J. Bact. 178: 3411
- Deutcher J.A. 2002, Bacillus and its closest Relatives, 129, ASM Press, Washington D.C.
- Lorca G. L. 2005, J. Bact. 187: 7826

Katabolická represe u *B. subtilis*

- Schéma transdukční dráhy aktivující CcpA
 - ▣ Lorca et al. J.Bact. 187, 7826, 2005



Asimilace dusíku

Dusík – nukleotidy, vitaminy, aminokyseliny

Zdroj dusíku – NH_3 a NO_3^- (vyjímečně N_2)

Ntr operon – asimilační redukce – aerobní metabolismus - NH_3

□ zaručuje metabolismus dusíku a optimalizaci spotřeby energie při syntéze sloučenin obsahující N → aa

□ aktivace dusíku z alternativních zdrojů – aa – glutamine synthetasa

■ prozkoumán u G^- → konservovaný

■ G^+ → málo prozkoumaný a jiný

□ G^-

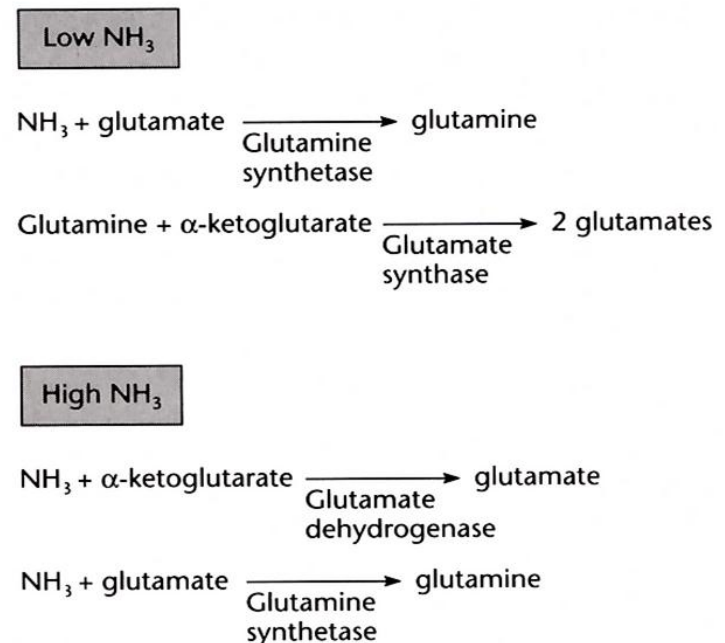
■ probíhají dvě metabolické reakce závislé na vnější koncentraci NH_3

■ nízká - vysoká hladina glutamin synthetasy (GlnA)

■ aktivace signální kaskády

■ vysoká – nízká hladina glutamin synthetasy

■ pouze na syntézu proteinů



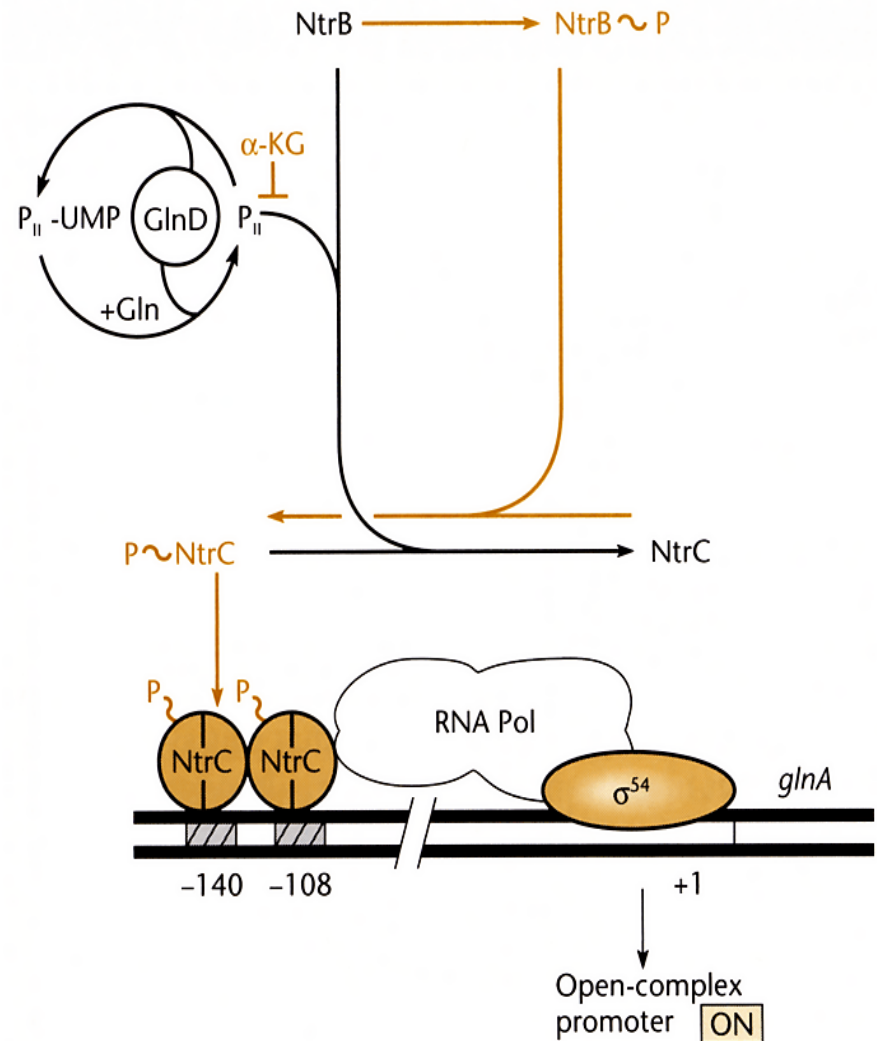
Asimilace dusíku

- dostupnost dusíku je cítěna (monitorována) skrz hladiny glutaminu v buňkách
- odráží potřebu aktivizovat alternativní zdroje dusíku v buňce
- regulace operonu *glnA-ntrB-ntrC* prostřednictvím regulační dráhy
- Signální regulační dráha - dále též *glnD* a PII
 - NtrC – transkripční regulátor –
 - fosforylovaný – pozitivní regulace pro alternativní zdroje N
 - (různá podle organismu)
 - NtrB – sensorová kinasa –
 - autofosforylace při nízké koncentraci N
 - s NtrC – dvouhybridní systém
 - PII – sensorový protein - hladina glutaminu
 - Nízký N - nízký glutamin – PII- UMP
 - Vysoký N – vysoký glutamin – stimulace *GlnD* – deurynilace PII
 - Nemodifikovaný PII – vazba na NtrB – inhibice autofosforylace

Ntr operon

Regulace Ntr operonu

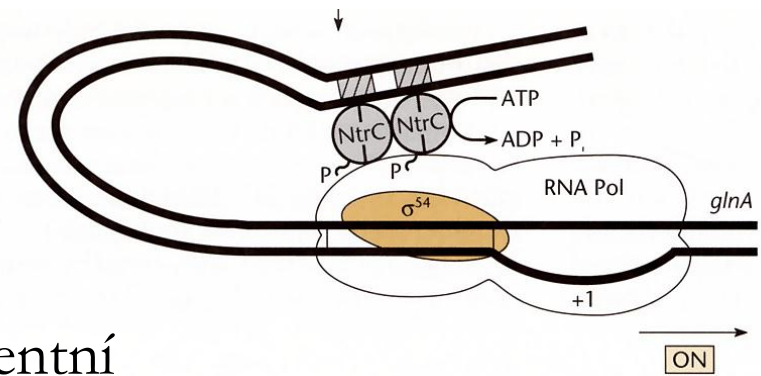
- zlatě – nízké koncentrace NH_3
 - $\text{P}_{\text{II}}\text{-UMP}$ vysoké
 - nízký glutamin
- černě – vysoká koncentrace NH_3
 - P_{II} vysoké, váže se na NtrB
 - vysoký glutamin



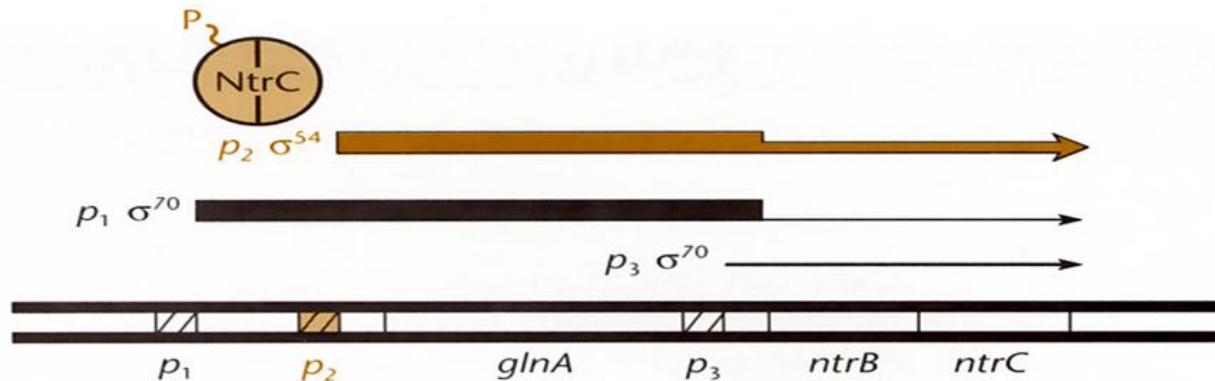
Ntr operony

- pod kontrolou NtrC -P
 - geny pro transport aminokyselin -
 - *E. coli* může jako zdroj C jen některé (glutamin, histidin, arginin)
 - geny pro utilizaci nitrátu -
 - *Klebsiella pneumoniae*
 - geny pod kontrolou jiného regulačního proteinu
 - ten je regulován NtrC-P
 - geny pro degradaci aminokyselin - Nac – *Klebsiella*
 - dusík fixující proteiny – NifA - *Klebsiella*

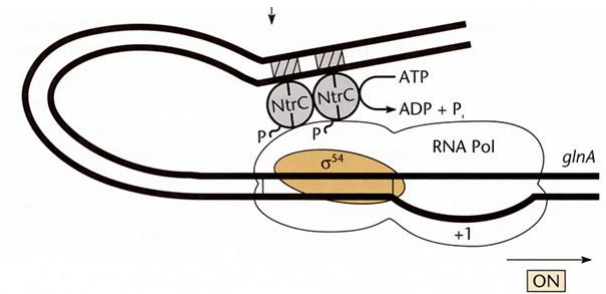
Operon glutamin synthetasy



- tři promotory -P2 je NtrC – P dependentní
 - zvýšení transkripce při limitaci N
 - transkripce všech tří genů – může docházet k terminaci za gln
 - σ^{54} RNAP dependentní promotor
 - odlišný od σ^{70} - pozice -12 a -24
 - samotný NtrC-P se váže na -108 – 110 místo upstream
 - UAS místo – upstream activated site
 - častější u eukaryot
 - silná vazba oligomeru – kontakt NtrC-P – RNAP- P₂
 - bez kontaktu σ^{54} s NtrC-P se nezačíná transkripce
 - NtrC se podílí na separaci vláken DNA -ATPasová aktivita



Operon glutamin synthetasy



□ P1 –

□ σ^{70} promotor

- většina terminuje za glnA
- zajišťuje nízkou hladinu glutamin synthetasy i při nadbytku N
- inhibován NtrC-P

□ P3 -

□ slabý σ^{70} promotor za gln –

- zajišťuje konstitutivní transkripci NtrB, NtrC

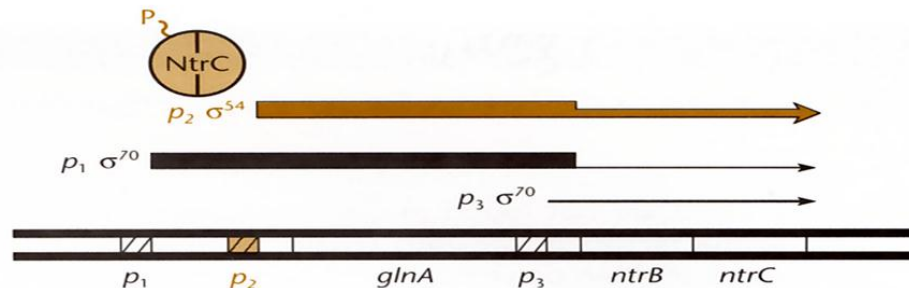
σ^{70} promotor



σ^{54} promotor



σ^{32} promotor



Adenylace glutamin syntetázy

- další regulace na úrovni adenylace glutamin syntetázy
 - ▣ adenylyltransferáza (ATasa) – AMP na tyrosin a opačně
 - ▣ inaktivace – vysoká koncentrace NH_3 – regulace množství glutaminu
 - ▣ regulace GlnD a PII proteinu – PII reguluje aktivitu ATasy
 - volný PII – stimuluje adenylační reakci – inaktivace GlnA
- funkce
 - ▣ koordinace katabolické represe, Ntr systému a aa degradativní regulon
 - aa jako zdroj C a energie - druhově různé –
 - ▣ *E. coli* – všechny aa (mimo tryptofan, histidin, valin) jako zdroj N, jako zdroj C pouze – alanin, tryptofan, aspartat, asparagin, prolin, serin)
- operon pro degradaci aa – vlastní regulace
 - ▣ též pod regulací Ntr a CAT
 - není spouštěno v přítomnosti lepšího zdroje N a C – (NH_3 a glukosa)
 - ▣ může být nevýhoda
 - Salmonella – zdroj C - glukosa, zdroj N – histidin
 - ▣ hladovění na N
- aa potřebné i pro další užití – syntéza proteinů, osmoregulace

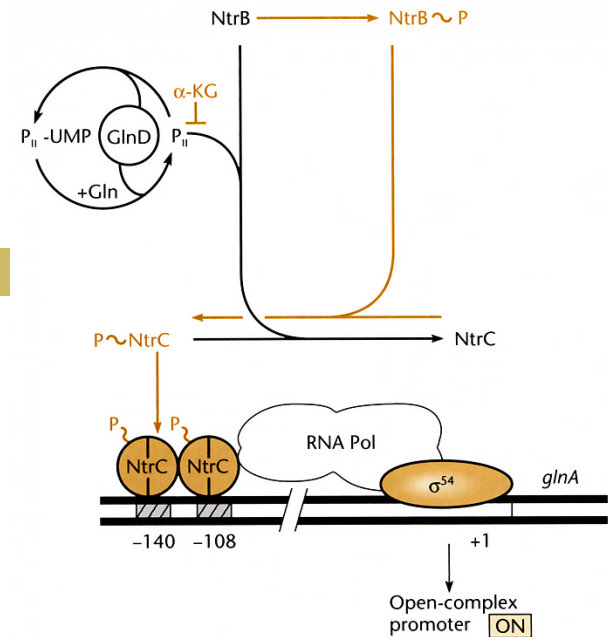
Genetická analýza

- provedena na *E. coli*, *Klebsiella* a *Salmonella*
- nejdříve odhalena role glutamin syntetázy
 - ▣ mnoho mutant
 - v genech které ovlivňovaly regulaci glutamin syntetázy
 - nebo byly gln^-
 - ▣ Magasanik 1982, Annu.Rev.Genet. **16**, 135
 - ▣ mnoho let, mnoho práce, mnoho lidí

TABLE 13.2 Genes for nitrogen regulation

Gene	Alternate name	Product	Function
<i>glnA</i>		Glutamine synthetase	Synthesize glutamine
<i>glnB</i>		P_{II} , P_{II} -UMP	Inhibit phosphatase of NtrB, activate adenylyltransferase
<i>glnD</i>		Uridylyltransferase (UTase)/Uridylyl-removing enzyme (UR)	Transfer UMP to and from P_{II}
<i>glnE</i>		Adenylyltransferase (ATase)	Transfer AMP to glutamine synthetase
<i>glnF</i>	<i>rpoN</i>	σ^{54}	RNA polymerase recognition of promoters of Ntr operons
<i>ntrC</i>	<i>glnG</i>	NtrC, NtrC- PO_4	Activator of promoters of Ntr operons
<i>ntrB</i>	<i>glnL</i>	NtrB, NtrB- PO_4	Autokinase, phosphatase; phosphate transferred to NtrC

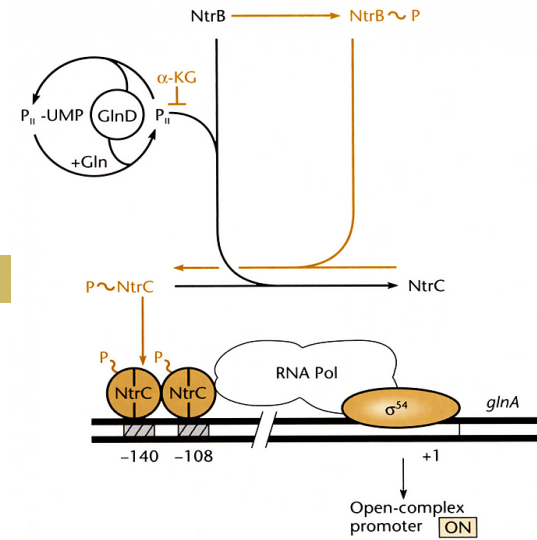
Genetická analýza



□ *glnB* – P_{II} – původně *gln*- mutant

- null mutanty projevovaly *gln*+
- u *gln*- mutant - změna vazebného místa pro UMP
 - 2 efekty
 - P_{II} se váže na NtrB – zabraňuje fosforylaci NtrC
 - i při nízké koncentraci NH₃ se syntetizuje málo glutaminu z P1
 - nevede k *gln*- fenotypu –
 - *gln*- fenotyp způsoben 2. funkcí P_{II} - adenylace glutamin syntetázy (*GlnA*)
 - bez UMP silně adenyluje *GlnA* – deaktivace – netvoří se glutamin
- null mutanty – není P_{II} vůbec
 - není stimulace adenyltransferázy – mnoho glutaminu vždy
 - není vazba na NtrB - fosforyluje se NtrB -NtrC – i při vysoké hladině N

Genetická analýza



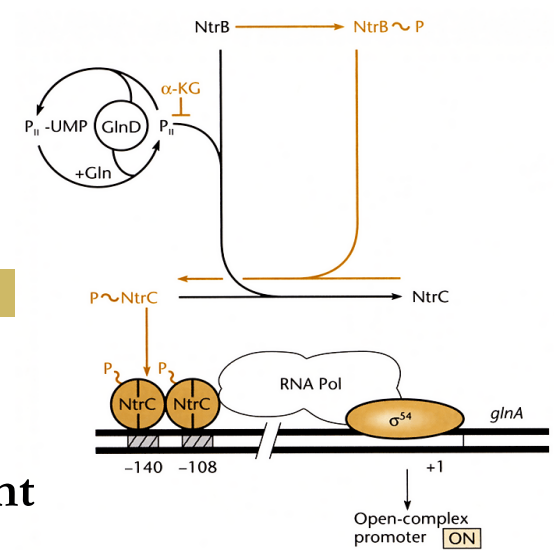
□ **gln D** – uridynyl transfersa – gln^- mutanty

- transfer UMP na P_{II} → u mutant pouze ve formě P_{II}
 - i null mutanty mají gln^- fenotyp – PII deaktivace GlnA
 - null mutace v glnB (PII) suprimují gln^- fenotyp glnD mutant
 - absence glnD nevadí pokud buňky neobsahují žádný P_{II} protein
 - neovlivňuje ani adenyltransferázu ani autofosforylaci NtrB
 - glutamin syntetáza je stále aktivní – i v nadbytku N

□ **glnL** – ntrB – kinasa

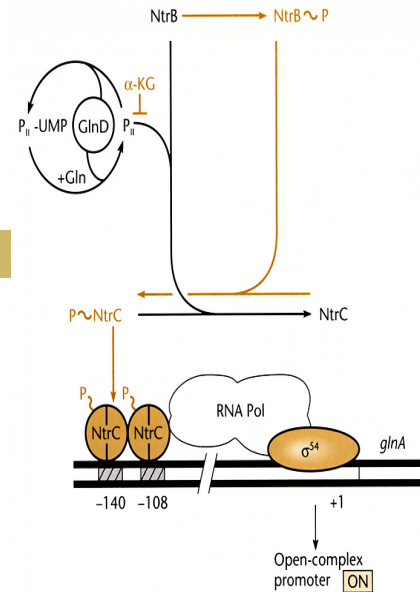
- objevena mezi mutanty, kteří extragenově suprimovali mutace v glnD a glnB
 - mutace zabraňující vazbě P_{II} na kinázu – není blokáde autofosforylační reakce –
 - Ntr regulon spuštěný i při nadbytku N
- null mutace – residuální stupeň regulace – NtrC je fosforylován jinou kinázou – další N závislá regulační dráha

Genetická analýza



- ***glnF* – *rpoN* - σ^{54} - null mutace patří do *gln⁻* mutant**
 - ▣ bez něho neprobíhá transkripce z P2 - *gln-ntrB-ntrC*
 - ▣ při nízkém N ale NtrC-P inaktivuje P1
 - ▣ při vysokém N malé množství GlnA je inaktivováno adenylací
 - ▣ P3 funguje – tvoří se *ntrB-ntrC*
 - ▣ null mutace v *ntrC* - suprese *gln⁻* fenotypu
- ***glnG* – *ntrC* – mutanty suprimující *gln⁻* fenotyp *glnF* (σ^{54})**
 - ▣ null mutace
 - sama nezpůsobuje *gln⁻* fenotyp – GlnA i z P1 promotoru
 - není reprimován fosforylovaným NtrC
 - ▣ mutace způsobující *gln⁻* fenotyp -
 - NtrC ztrácí schopnost aktivace z P2 promotoru
 - je ale fosforylován – reprimuje P1 promotor

Genetická analýza signálních kaskád



- v signálních drahách proteiny modulující aktivitu regulačních proteinů aniž by se sami vázaly na DNA.
 - PII v signalizaci zdroje dusíku
 - regulace prostřednictvím postranlační modifikace
 - mutace dvojího typu
 - bodové mutace - změna způsobu vazby
 - null mutanty – fenotyp stejný jako když se neváže.
 - PII – v nemodifikované vazbě – neváže se na NtrB i při nízkých koncentracích NH_3 . Fenotyp gln^+ ale buňka hladová na N.
 - delece enzymu, který jej modifikuje –
 - stejný efekt pokud působí pouze na tento protein
 - glnD ovlivňuje též glutamin syntetasu – gln^- fenotyp
 - suprese mutace – delece obou -
 - suprese gln^- fenotypu u PII vyřazením též glnD - konstitutivní syntéza glutamin syntetasy i v nadbytku NH_3

Genetická analýza signálních kaskád

□ Mutace v protein kináze

□ mutace ve vazebném místě modifikujícího proteinu

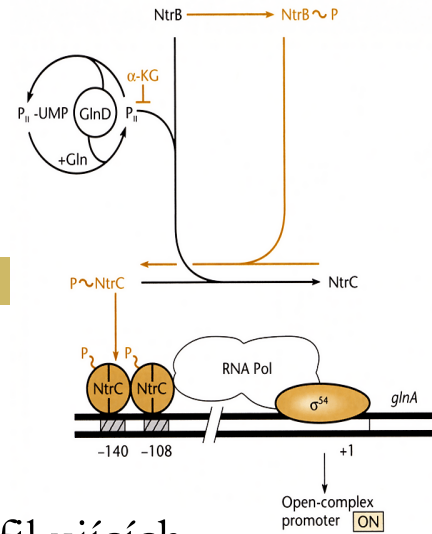
- suprimuje případné mutace v proteinech vazebných i modifikujících
- fenotyp – regulace ve formě kdy se modifikující protein neváže.
 - v případě NtrB se fosforyluje bez ohledu na hladinu NH_3 i stav modifikujících proteinů

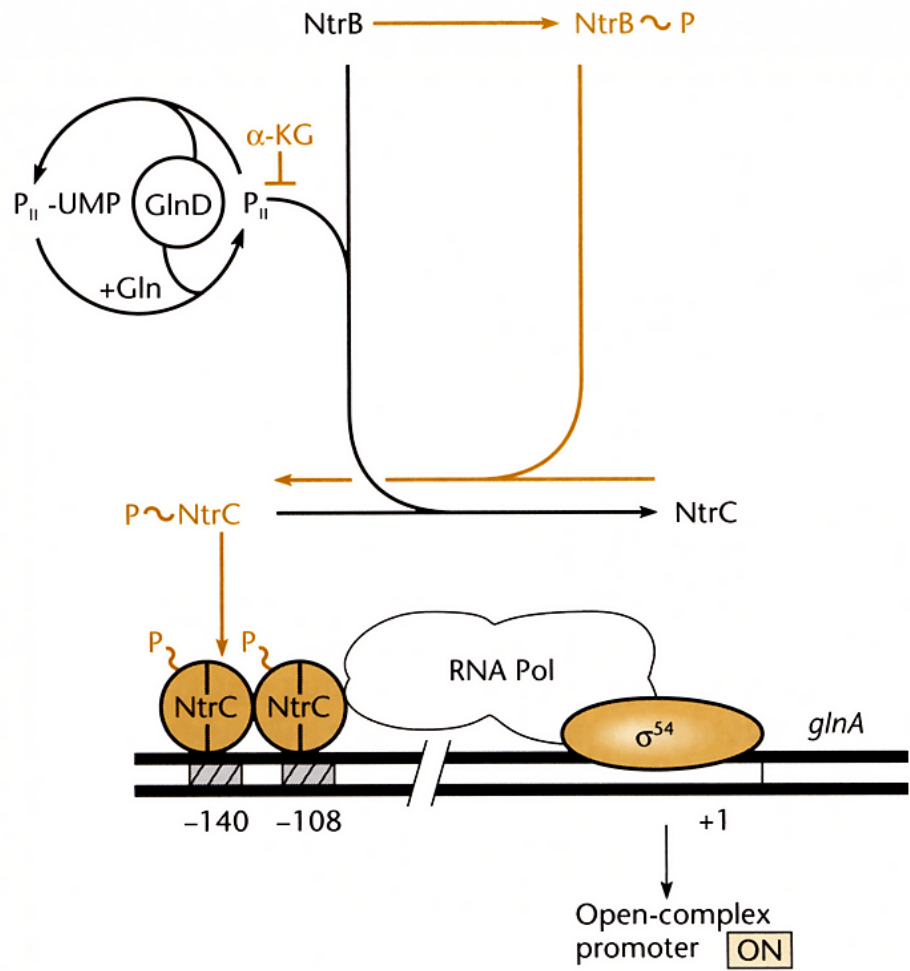
□ null mutace –

- zůstává určitý stupeň regulace
 - zástupnost kináz
 - další regulační dráha

□ mutace response regulátoru

- mutace bodové i deleční – různé efekty – závisí na promotoru a typu regulace

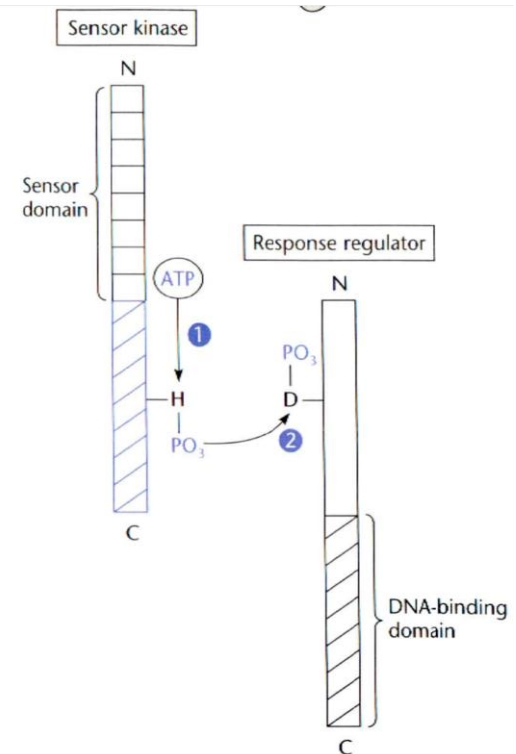
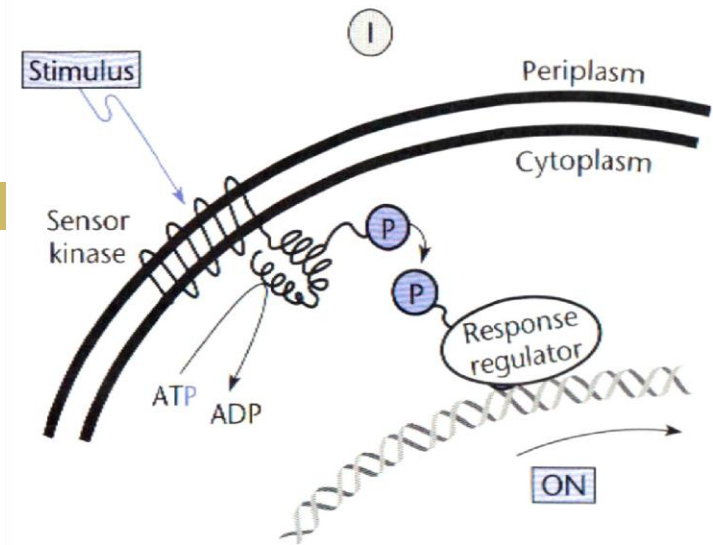




Signální kaskády

- Adaptace na stres –
 - teplotní stres
 - obecně stresová odpověď
 - extracelulární stres –
 - poškození buněčné stěny
 - nutriční stres
 - přirozená kompetence
 - sporulace
 - virulence
 - motilita
- Sensor response regulace
 - Většinou histidinové kinasy (His Kin)
 - Těž threonin serin kinasy fosfatázy (STYK)
 - Adenylát cyklázy (Acyc)
 - Diguanylát cyklázy (GGDEF) – phosphodiesterasy (EAL)
 - c-diGMP – forma biofilmů, motilita
 - Methylované chemotaktické proteiny (MCP)

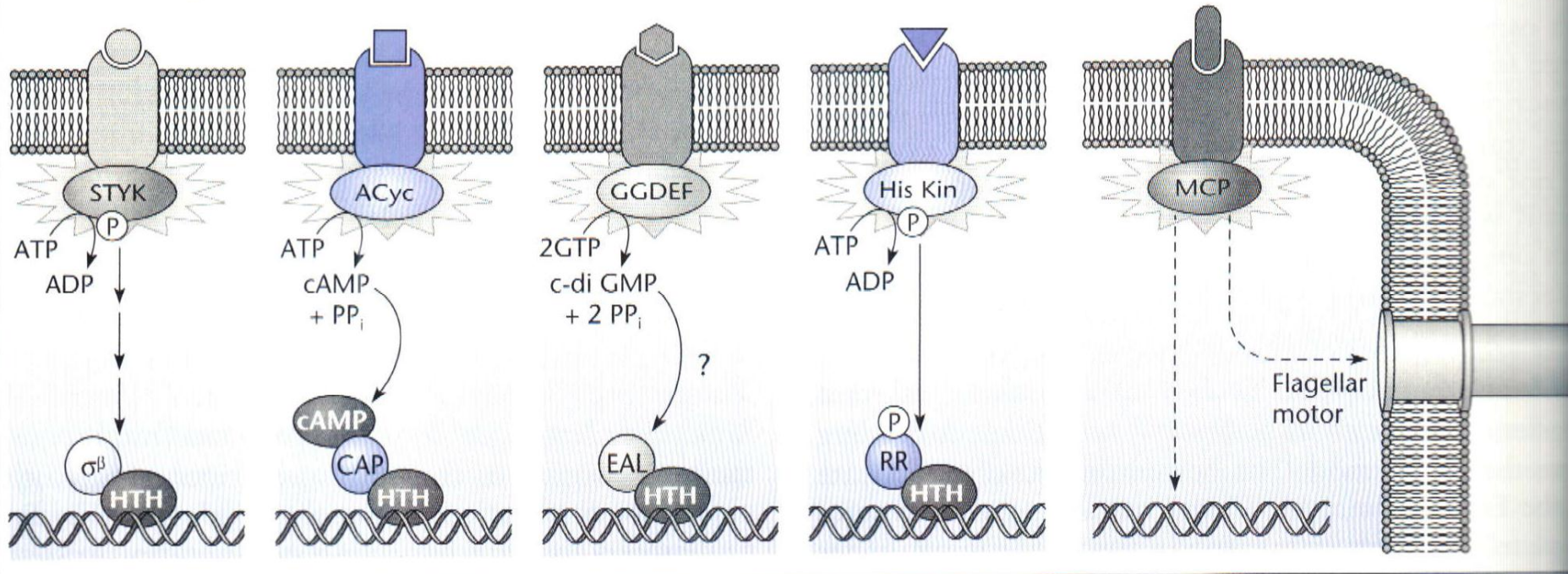
B Two-component system



Signální kaskády

□ příklady

A Various signal transduction systems



Regulace syntézy porinů

- Většina bakterií je schopna přežít ve volné přírodě
- Nejzákladnější problém v přírodě – schopnost vyrovnat se s osmotickým tlakem
 - Uvnitř buněk vždy vyšší než vnější – zadržuje buněčná stěna – turgor
 - Schopnost buněk vnímat změny osmotické tlaku – vnímat různá prostředí
 - Patogenní bakterie – vstup do hostitele – v těle vždy vyšší osmolarita
 - Regulace turgoru – akumulace či uvolnění K^+ a dalších osmolytů (prolin, glycin betain)
- základní mechanismus u G- bakterií – syntéza porinů vnější membrány
 - regulují průnik kompatibilních solutů přes vnější membránu
 - *E. coli* – OmpC malé a OmpF velké (uplatňuje se v řídkých roztocích)
 - při vysoké osmolaritě – více OmpC

Regulace syntézy porinů

- 1. krok - izolace mutant defektních v expresi porinů
 - receptory slouží jako receptory pro některé fagy a bakteriocin
 - izolace mutant resistantních k těmto fágům – nesyntetizují OmpF
 - původně dva lokusy – ompF a ompB
 - ompF – mutant se ztrátou schopnosti syntetizovat porin OmpF
 - Absolutní – strukturní protein
 - ompB – dva geny – EnvZ a OmpR – komplementační testy
 - mutace v lokusu zabraňovali syntéze ompF jen částečně
 - dvoukomponentový systém, pouze částečná ztráta
 - přímá reakce na změny osmolarity
 - signál neznámý
 - OmpR – P – aktivuje transkripci OmpC
 - OmpR – aktivuje transkripci OmpF
 - potvrzení, že EnvZ a OmpR je nezbytný pro aktivaci transkripce OmpF – fúze s lacZ

Regulace syntézy porinů

- Fenotypy mutant -
 - genetické studie nepotvrdily jednoduchý model
 - OmpR-P – složitější regulace transkripce OmpC
 - Je potřebný i k regulaci OmpF
 - *envZ* – null mutace –
 - podle modelu – kompletní inhibice fosforylace OmpR
 - žádná syntéza OmpC
 - konstitutivní vysoká hladina syntézy OmpF
 - nepotvrdilo se –
 - žádná syntéza OmpC
 - limitní transkripce OmpF

Regulace syntézy porinů

- *Konstitutivní mutace v OmpR*
 - *ompR2* (con) – i v kombinaci s envZ null – nelze fosforylovat
 - konstitutivní OmpF
 - zabraňuje expresi OmpC
 - *ompR3* (con) – mutace minující fosforylaci
 - konstitutivní exprese OmpC
 - zabraňuje expresi OmpF –
 - OmpC+ OmpF- konstitutivně
 - nekomplementovatelné EnvZ+ i OmpR+
 - in cis mutace
 - snaha vysvětlit na ara operonu – ompR ve dvou formách

- Fenotypy *envZ* a *ompR* mutací

TABLE 13.3 Phenotypes of <i>envZ</i> and <i>ompR</i> mutations	
Genotype	Phenotype
<i>envZ</i> ⁺ <i>ompR</i> ⁺	OmpC ⁺ OmpF ⁺
<i>envZ</i> ⁺ <i>ompR1</i>	OmpC ⁻ OmpF ⁻
<i>envZ</i> (null) <i>ompR</i> ⁺	OmpC ⁻ OmpF ^{+ -^a}
<i>envZ</i> ⁺ <i>ompR2</i> (Con)	OmpC ⁻ OmpF ⁺ (low osmolarity)
	OmpC ⁻ OmpF ⁺ (high osmolarity)
<i>envZ</i> (null) <i>ompR2</i> (Con)	OmpC ⁻ OmpF ⁺ (low osmolarity)
	OmpC ⁻ OmpF ⁺ (high osmolarity)
<i>envZ</i> ⁺ <i>ompR3</i> (Con)	OmpC ⁺ OmpF ⁻ (low osmolarity)
	OmpC ⁺ OmpF ⁻ (high osmolarity)
<i>envZ</i> ⁺ <i>ompR3</i> (Con)/ <i>envZ</i> ⁺ <i>ompR</i> ⁺	OmpC ⁺ OmpF ⁻ (low osmolarity)
	OmpC ⁺ OmpF ⁻ (high osmolarity)

^a+ - indicates that OmpF levels are reduced but not eliminated.

Regulace syntézy porinů

předpověditelné mutanty odpovídající jednoduchému modelu

- analogie s AraC – u mutanta *ompR3* konformační změna odpovídající fosforylované formě
- komplementační testy nejdou vysvětlit jednoduchým modelem
 - *envZ+*, *ompR3* / *envZ+*, *ompR+*
 - předpoklad –
 - nízká osmolarita – *OmpC+* *OmpF+* - recesivní mutace
 - vysoká osmolarita - *OmpC+* *OmpF-* dominantní mutace
 - mutantní *ompR3* aktivuje *OmpC* –
 - WT *ompR* aktivuje *OmpF* při nízké osmolaritě –
 - realita -
 - *OmpC* – konstitutivně – i při nízké osmolaritě
 - *OmpF* – vůbec ani při nízké osmolaritě
- další současný výzkum –
 - záleží na místě vazby na promotoru,
 - kinaza i fosfatázová aktivita

Regulace syntézy porinů

- Kinázová / fosfatázová aktivita EnvZ
- Vysoká osmolarita –
 - fosfotransferázová aktivita – vysoká hladina OmpR-F
- Nízká osmolarita
 - Fosfatázová aktivita – vysoká hladina OmpR
- vytvoření bodových mutant ovlivňující amino terminální fosforylační doménu – T831
 - fenotyp – OmpF-, OmpC-
- Nutnost OmpR-P pro regulaci obou genů
- změna vazebných vlastností - DNAaseI protekční test
 - 3 vazebná místa u OmpF promotoru
 - mutant stejné jako WT
 - 3 vazebná místa u OmpC promotoru
 - změna oproti WT – neváže se
 - místa promotoru musí být zaplňována postupně

Regulace syntézy porinů

- Regulace při dalších stresech – teplotní šok, ethanol atd,
 - MicF – regulační RNA
 - bezprostředně upstream od OmpC,
 - transkribována z opačného vlákna – v opačném směru
 - antisense k OmpF mRNA v sekvenci iniciace translace (TIR)
 - - S-D, AUG kodon
 - zabraňuje nasednutí ribosomu
 - vyšší koncentrace MicF při stresech
 - zastavení exprese OmpF – vyšší poměr OmpC
 - promotor MicF – aktivován různými aktivátory
 - SoxS – oxidativní stres
 - MacA – slabé kyseliny- antibiotika
 - OmpR – další úroveň regulace OmpF - osmolarita

Regulační RNA

- ssRNA – riboregulace
 - ▣ na mnoha úrovních
 - regulace transkripce –
 - feromon-responsiv transport plazmidu u *Enterococcus faecalis* – 200 mD RNA – zvýšení transkripční terminace *in trans*
 - vazba na proteiny – RNA polymerasu
 - postranskripčně jako antisens RNA –
 - fágy, transposony, regulace transkripce plazmidů
 - ctRNA – transkribovány z druhého vlákna – 100 bp
 - regulace jen jednoho genu
 - též v chromosomu - Crp Tic RNA – přesahuje *crp* gen
 - bez překryvu cílové RNA – kdekoliv v chromosomu – 12bp
 - několik cílových genů – globální regulace

Regulační RNA

□ **DsrA** -

- působí *in trans* na více genů pozitivně i negativně
- hns – histon silencer gene

- *rpoS* – sigma faktor stacionární fáze
 - interakce na základě similarity v Shine-Dalgarno
 - inhibuje nebo umožňuje translaci
 - destabilizace mRNA

Regulační RNA

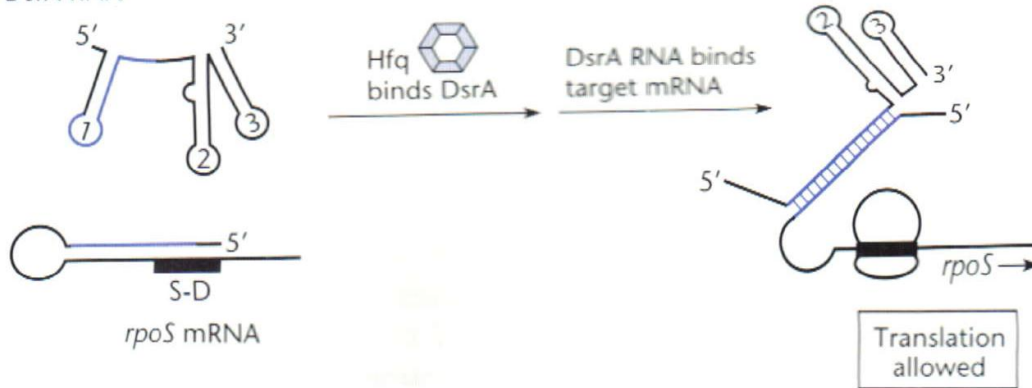
- ***OxyS*** –
 - indukce při oxidativním stresu
 - translace z *rpoS*
 - působí nepřímo – vyřadí pozitivní regulátor – Hfq
 - Hfq - váže se na vedoucí sekvenci mRNA *rpoS* – odkrývá S-D sekvenci
 - Hfq i na další sRNA – DsrA – RNA chaperon
 - může též destabilizovat
 - *fhfA* – transkripční aktivátor metabolismu kys. mravenčí
 - *OxyS* se váže na translační začátek a inhibuje navázání ribosomu

Regulační RNA

Positive regulation

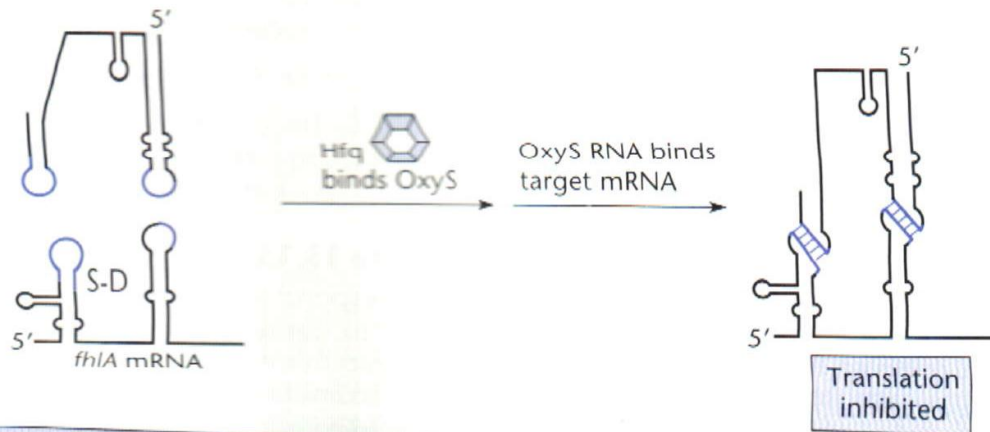
□ O:

DsrA RNA



Negative regulation

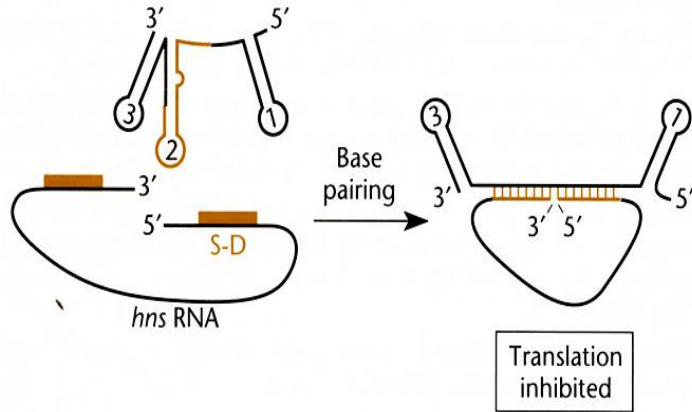
OxyS RNA



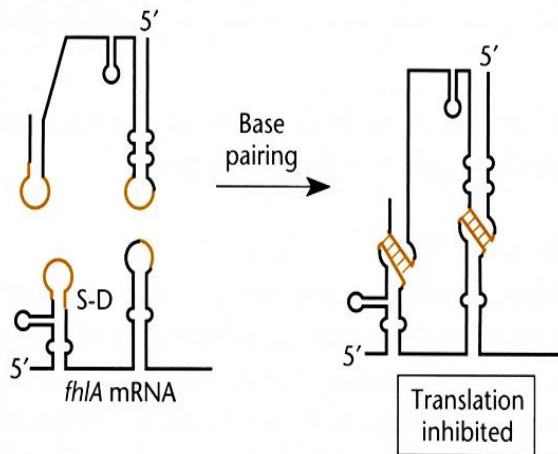
Regulační RNA

A Negative regulation

I. DsrA RNA

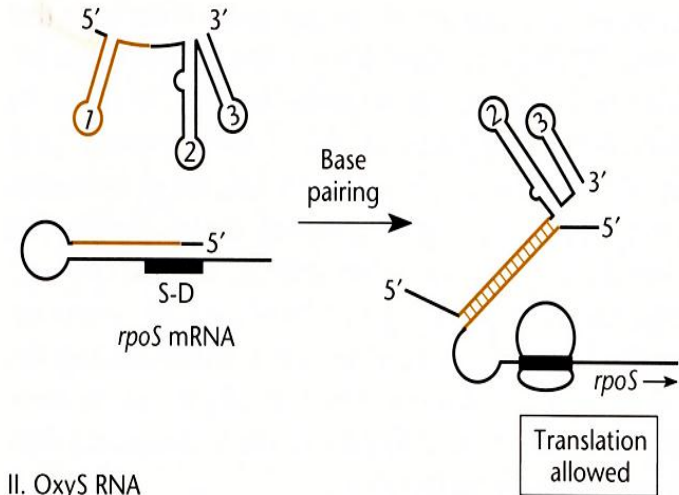


II. OxyS RNA

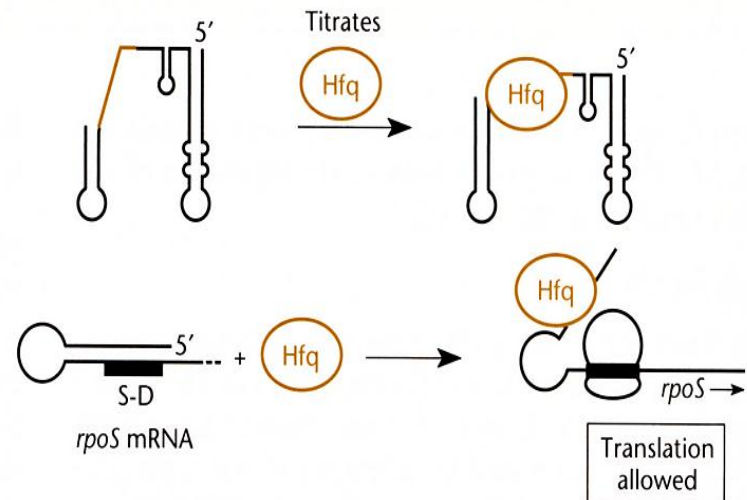


B Positive regulation

I. DsrA RNA



II. OxyS RNA



Regulační RNA

- Způsoby objevování
 - dříve těžká analýza regulačních mechanismů
 - nyní nástroje bioinformatiky srovnávání genomu příbuzných kmenů
 - nástroje genomiky – microarrays
 - sekvence intragenových úseků jsou konzervované, pokud obsahují regulační sRNA
 - jinak jsou různé
 - vyhledávání kandidátů –
 - rozpoznatelný promotor,
 - ρ nezávislý terminátor
 - testování pomocí Northern blotting

