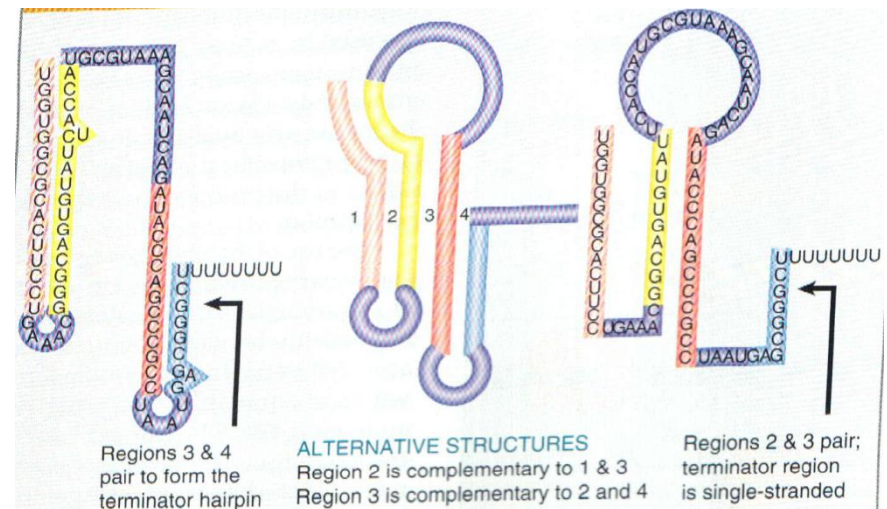
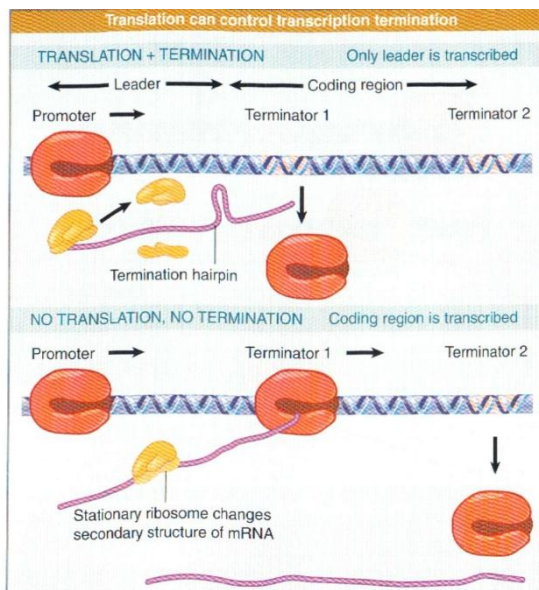


# GLOBÁLNÍ REGULACE III

Atenuace, RNA teploměry, riboswitch

# Atenuace transkripce

- Struktura RNA může být významným faktorem regulace exprese proteinů jak u prokaryot tak i eukaryot
  - Možnost zaujímat různé sekundární struktury –
    - různé možnosti intramolekulárního párování
      - Schopnost RNA střídati dvou konformací s regulačním charakterem - allosterické změny konformací nukleotidů a alterací v párování
    - vlastnosti alternativních konformací jsou rozdílné
      - Terminace transkripce
      - Inhibice translace



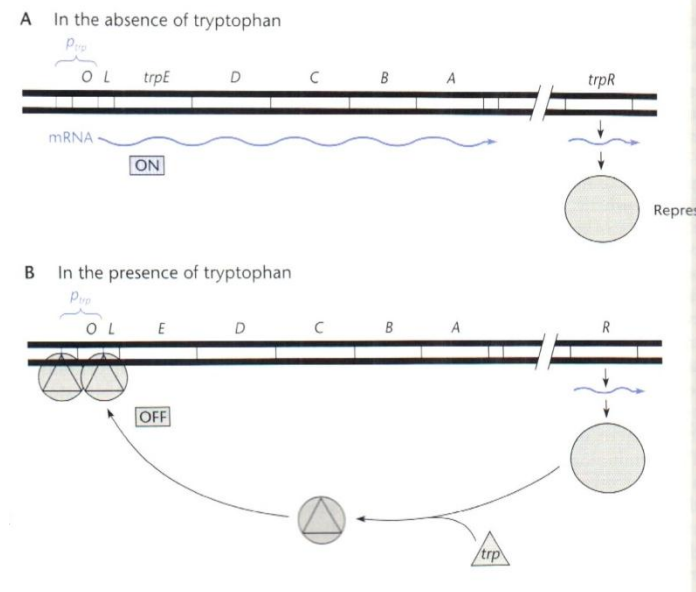
# Atenuace transkripce

- mechanismus atenuace - vedoucí sekvence obsahuje atenuátor
  - transkripce začne „normálně“, ale skončí dřív než dosáhne strukturního genu
  - Mechanismus, který kontroluje schopnost RNA polymerázy číst přes atenuátor
    - klasický případ – his a trp operon *E.coli*
    - ostatní aminokyseliny – leucin, fenylalanin, threonin, isoleucin, valin
    - tRNA syntéza *Bacillus subtilis*- regulace genů pro aminoacyl tRNA syntázu
- Vedoucí sekvence obsahuje terminátor
  - Vazba proteinů na mRNA
  - Vazba malých molekul - riboswitch

Regulatory RNA - ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES

# Genetická evidence atenuace

- *trp* operon *E. coli*
  - negativně regulován Trp represorem
  - pokud jediný způsob
    - u *trpR*<sup>-</sup> mutant
      - hladina enzymů operonu stejná bez i s tryptofanem  
X
    - u mutant (*i* null)
      - v nepřítomnosti tryptofanu transkripce těchto enzymů vyšší než v jeho přítomnosti
  - → *trp* operon je regulován dalším mechanismem



# Genetická evidence atenuace

- první evidence – tRNA<sup>Trp</sup> hraje roli v regulaci trp operonu v nepřítomnosti TrpR  
(Morse D.E. et al. 1976, J.Mol.Biol., **103**, 209.)
  - mutace snižující hladinu aminoacylované tRNA<sup>Trp</sup>
    - tryptophanyl-tRNA-synthetase
    - ve strukturním genu pro tRNA<sup>Trp</sup>
    - v genech odpovědných za modifikaci tRNA<sup>Trp</sup>

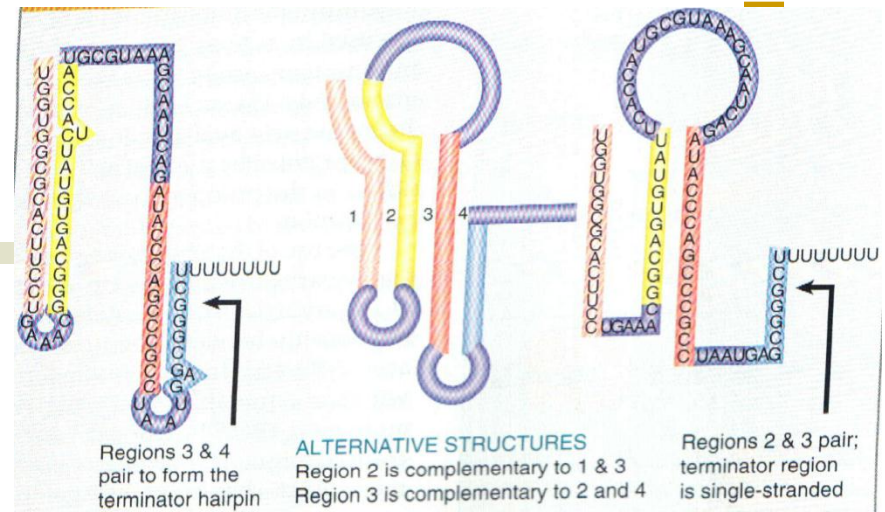
→ **zvyšují expresi operonu**
  - mutace v downstream oblasti od promotoru
    - delece ve vedoucí sekvenci (leader sequence, *trpL*) mezi promotorem a *trpE*
    - dvojité mutanty v TrpR a leader sekvenci

→ **konstitutivní mutanty**

# Genetická evidence atenuace

- delece sekvence v oblasti mezi operátorem a začátkem strukturního genu.
  - zvyšují expresi strukturních genů
    - efekt je nezávislý na represorovém proteinu
  - delece mají *cis* charakter –
    - jsou *cis* acting –
    - mutace ovlivňují transkripci *trp* operonu pouze na stejné DNA
- transkripce terminuje na vedoucí sekvenci v přítomnosti tryptofanu
  - transkripce *in vitro* se sadou mutant s deletovaným leader proteinem
  - změny v sekundární struktuře – jsou dané pozicí ribozomu na mRNA

# Model regulace *trp* operonu

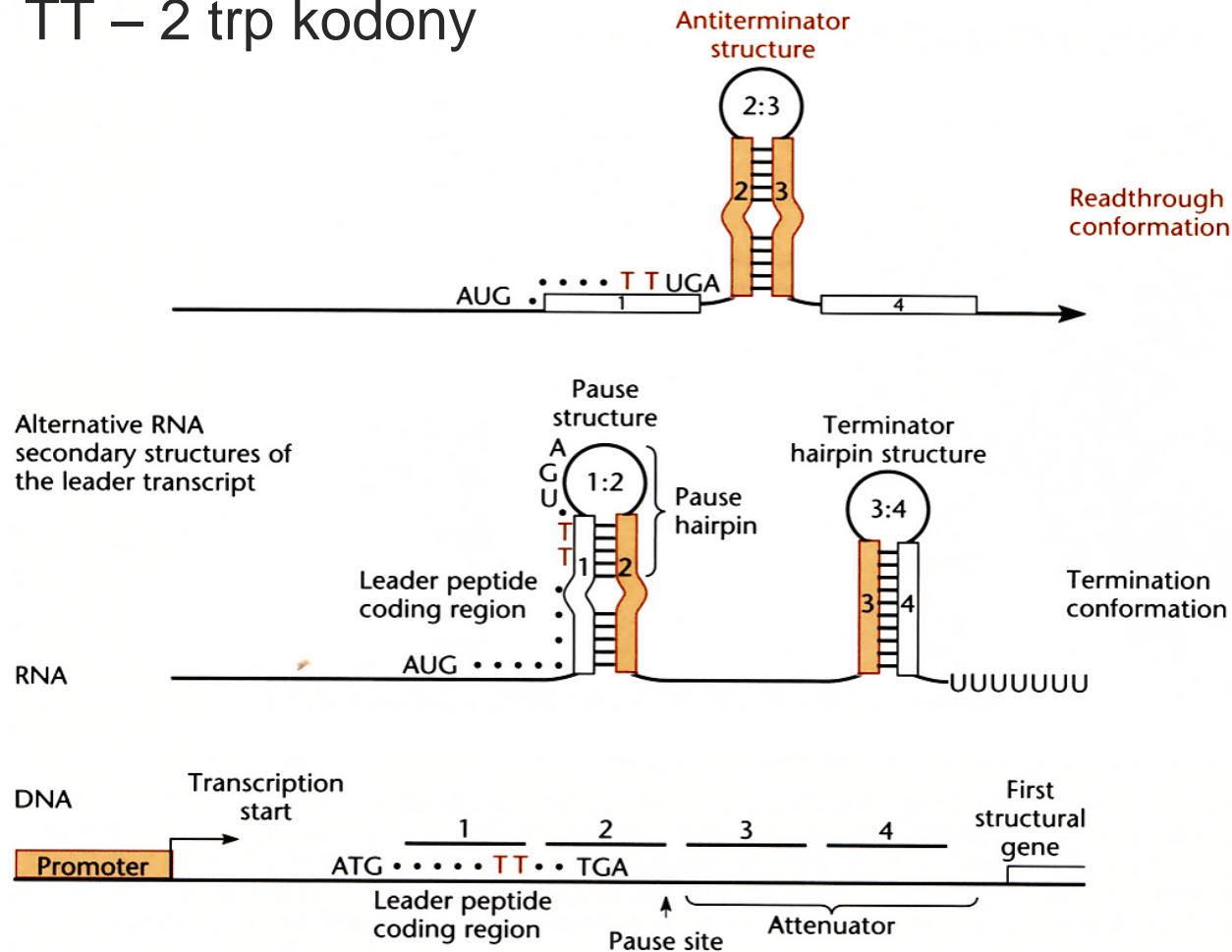


## ■ Současný model - vlastnosti

- procentuální zastoupení aminoacylované tRNA<sup>Trp</sup> determinuje sekundární strukturu mRNA v místě vedoucí sekvence
  - vedoucí sekvence obsahuje dva sousední *trp* kodony
  - čtyři RNA oblasti mohou zaujmout tři rozdílné vlásenky (hairpins)
  - vlásenka 3:4 je součástí faktor nezávislé transkripční terminace
- pokud je hladina tryptofanu → aminoacylované tRNA<sup>Trp</sup> nízká → dojde k dočasnému zastavení ribosomu na *trp* kodonech
  - ribosomy tak signalisují nedostatek tryptofanu
  - transkripce má pokračovat -

# Model regulace *trp* operonu

- struktura vedoucí sekvence *trp* operonu
  - TT – 2 *trp* kodony

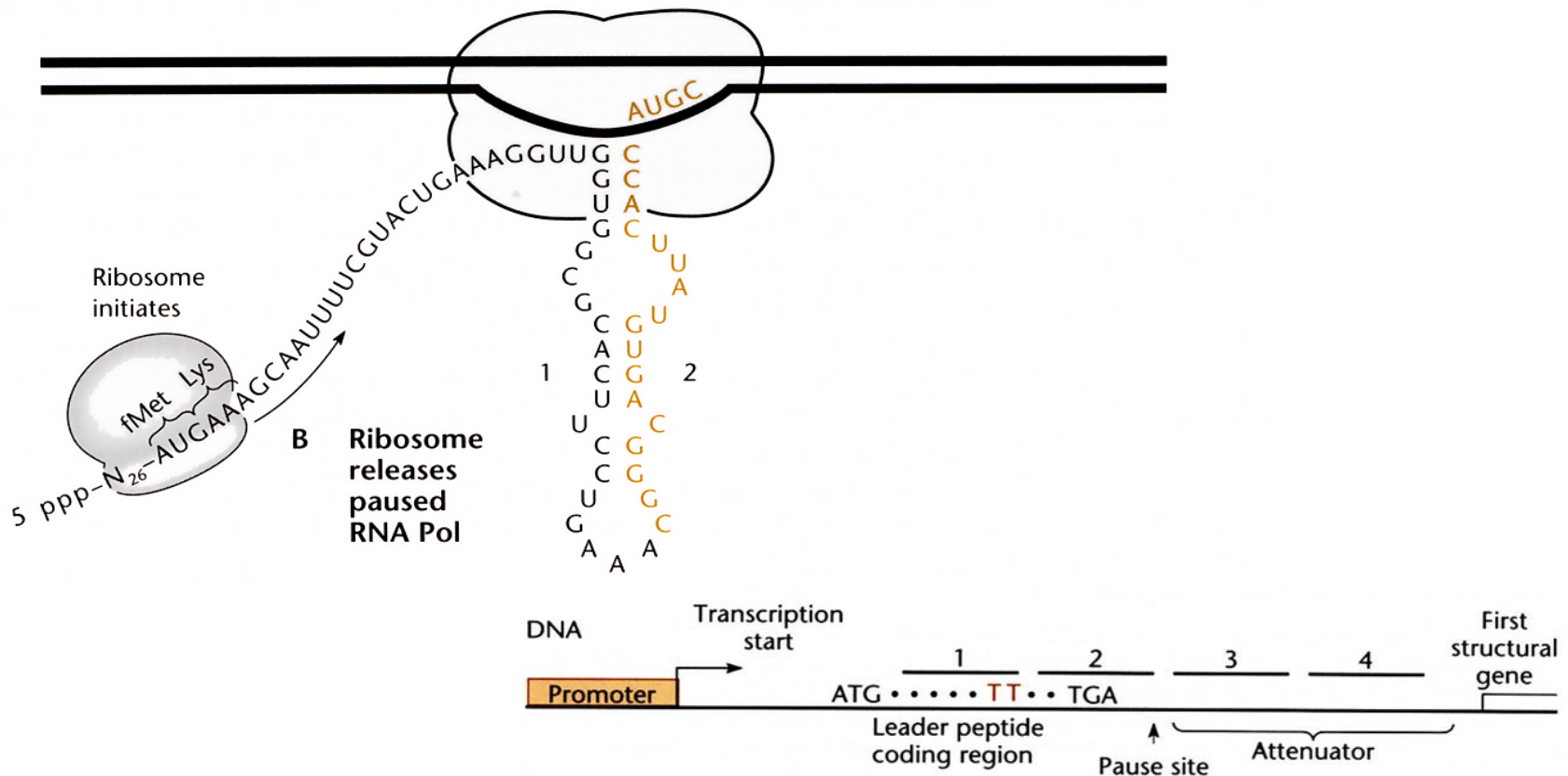




# Model regulace *trp* operonu

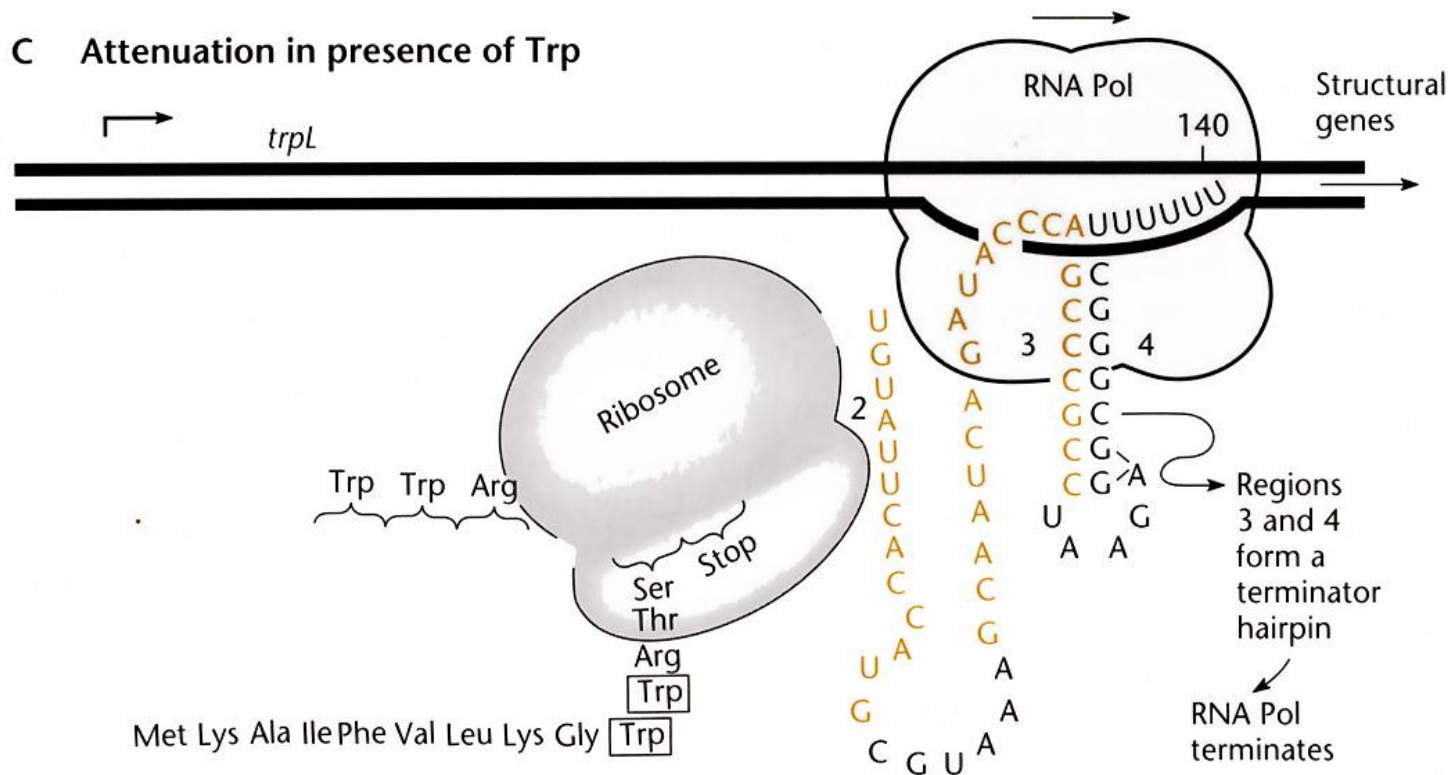
- A) RNA polymerasa se dočasně zastaví za úsekem 1:2
- B) Ribosom se naváže na RBS na mRNA, zahájí translaci

A RNA Pol pauses at 1:2 pause site



# Model regulace *trp* operonu

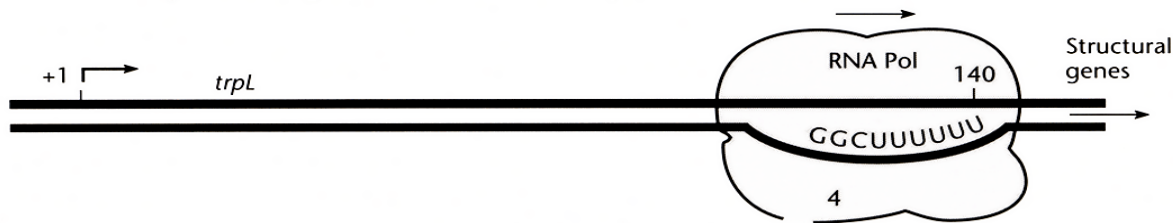
- C) Ribosom „vystrčí“ RNApolymerasu z místa 1:2 v přítomnosti tryptofanu tvorba vlásenky 3:4 – terminace transkripce



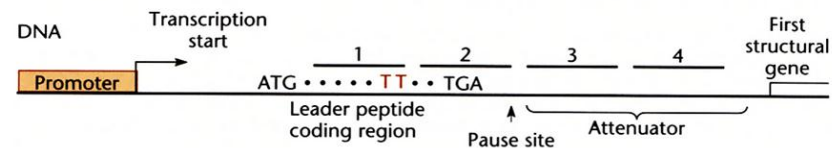
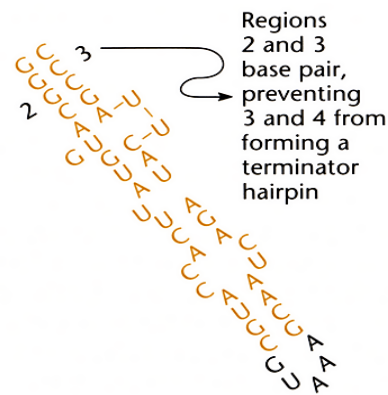
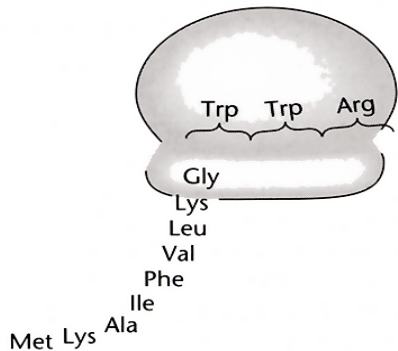
# Model regulace *trp* operonu

D) V nepřítomnosti tryptofanu – pozastvení na TT kodonech – vytvoření 2:3 vlásenky – pokračování transkripce přes strukturní geny

D Transcription elongation in absence of Trp

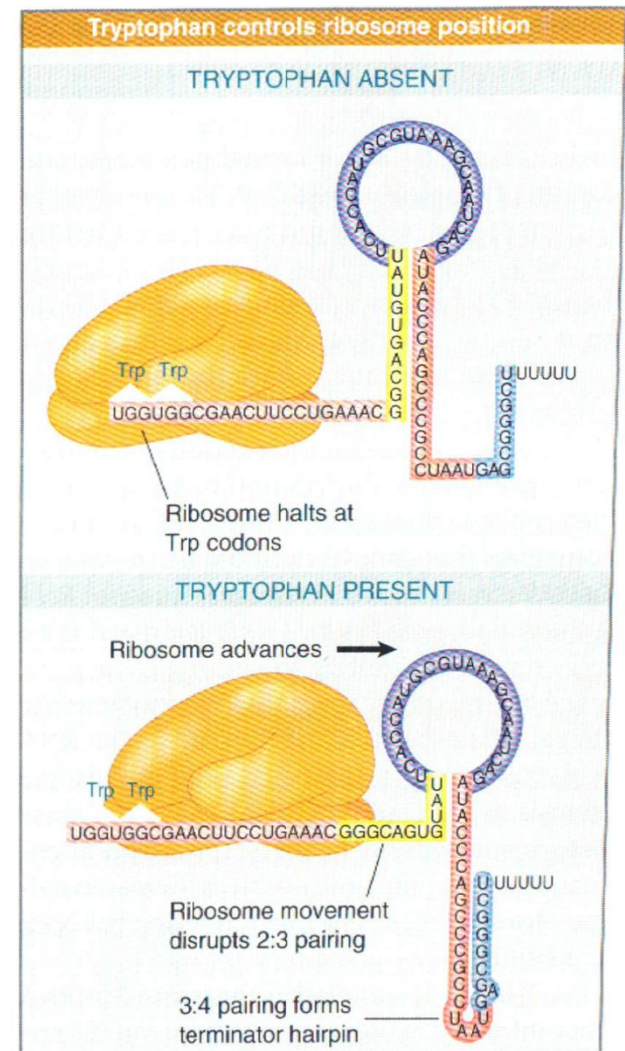


Lack of *trp* tRNA causes ribosome to stall



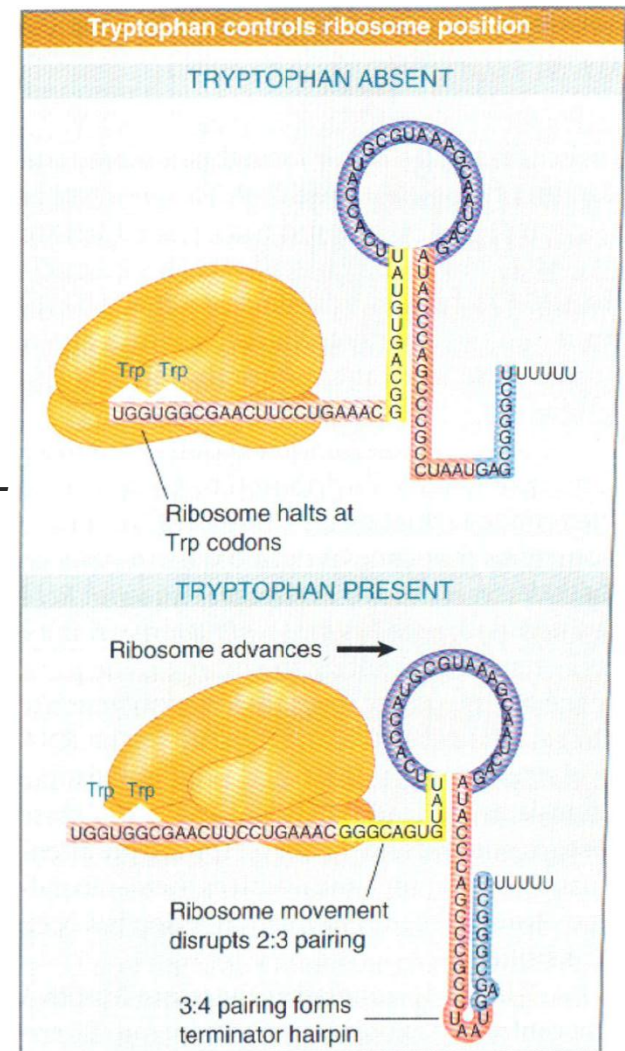
# Model regulace *trp* operonu

- Současný model – vlastnosti
  - vytváří se různé vlásenky
    - po iniciaci transkripce RNA polymerasa se pohybuje po *trpL* sekvenci do místa za oblast 2,
    - kde se zastaví,
    - vytvoří se vlásenka 1:2, (pause hairpin) důležitý signál k zastavení (1 s) -
    - dojde k nasednutí ribosomu dříve než polymerasa dojde do místa 3
    - nasednutý ribosom „posune“ RNA polymerasu do místa 3 dále –ribosom se dostane do *trp* oblasti
      - málo Trp – zastavení ribosomu – vytvoření 2:3 vlásenky – pokračování translace
      - Dostatek Trp – ribosom pokračuje - vytvoření 3:4 terminační vlásenky



# Genetická evidence modelu

- **mutace *trpL75*** – potvrzení funkce vlásenky *in vivo*
  - bodová mutace destabilizující vlásenku 2:3
  - terminace v *trpL* oblasti bez ohledu na výši hladiny tryptofanu
  - dokazující, že formování 2:3 vlásenky zabraňuje vytvoření 3:4
- **mutace *trpL29*** – translace vedoucího peptidu z *trpL* je nezbytný pro regulaci
  - změna start kodonu AUG na AUA zabraňuje iniciaci translace
  - terminace probíhá i v nepřítomnosti tryptofanu
  - model vysvětluje i předpoklad, že pozdržující se RNA polymerasa na 1:2 vlásence je posunuta ribosomem
  - nevytvoří se 2:3 ale 3:4 vlásenka



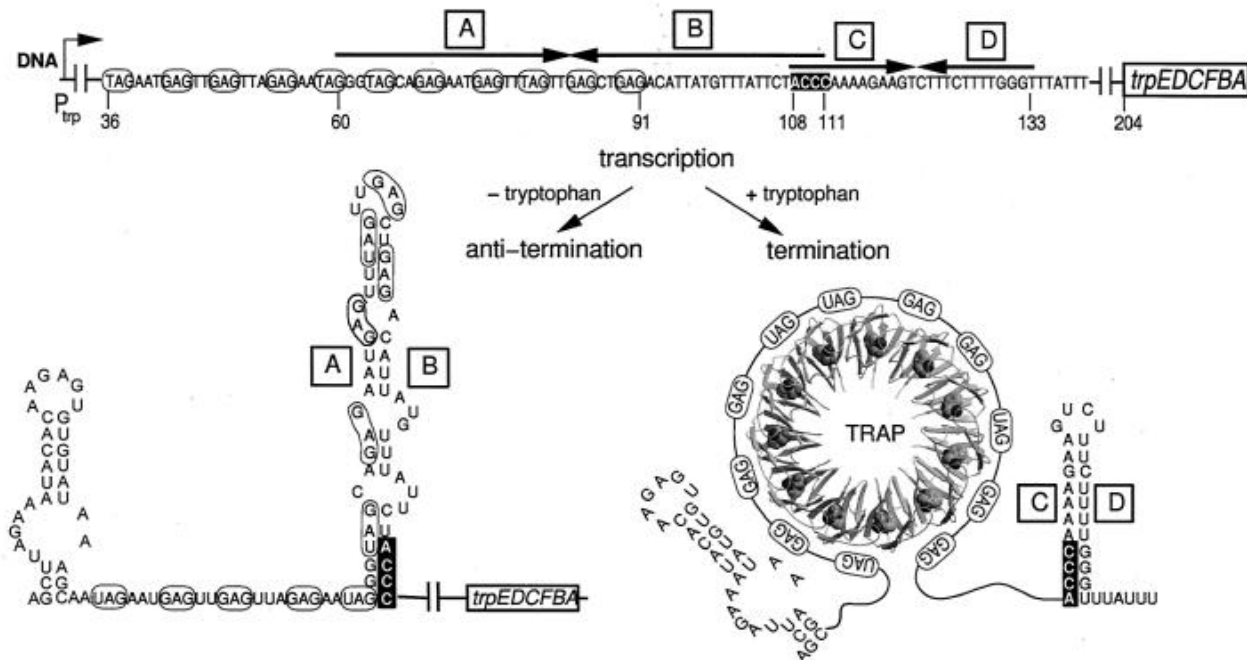
# *trp* operon u *Bacillus subtilis*

- některé typy atenuace odlišné –
  - kontrola prostřednictvím trans-acting proteinu
    - *bgl* operon *E. coli*
    - *trp* operon *Bacillus subtilis*
  - regulační protein se váže na vedoucí část RNA a zabraňuje tvorbě sekundární struktury
  - zvyšuje nebo snižuje terminaci transkripce
- *trp* operon není regulován represorem
  - pouze antiterminační mechanismus – odlišný od *E. coli*
    - protein TRAP (*trp* RNA-binding attenuation protein) modeluje sekundární strukturu mRNA
      - v přítomnosti tryptofanu se váže na antiterminační vlásenku a brání její vytvoření

# *trp* operon u *Bacillus subtilis*

model postranskripční regulace *trp* operonu *B.s.*–  
J.Bact. (2001), **183**, 5795

- antiterminační vlásenka je bezprostředně upstream od terminační
- inverzní sekvence, které je vytvářejí, se překrývají
- nemohou se vytvořit obě najednou
  - přerušením antiterminační se vytvoří terminační
  - nesyntetizují se strukturální geny operonu



# *trp* operon u *Bacillus subtilis*

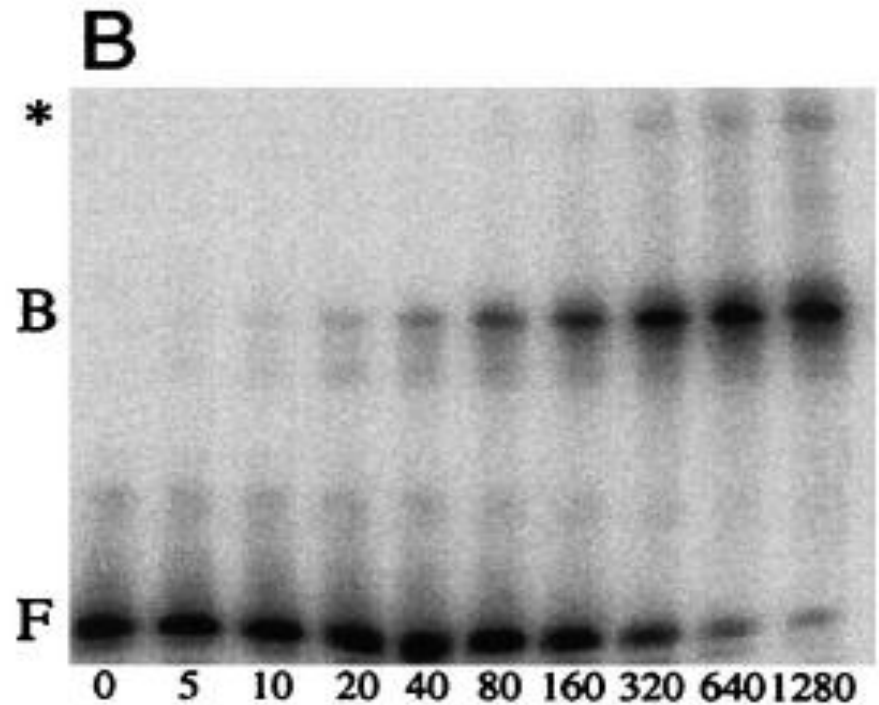
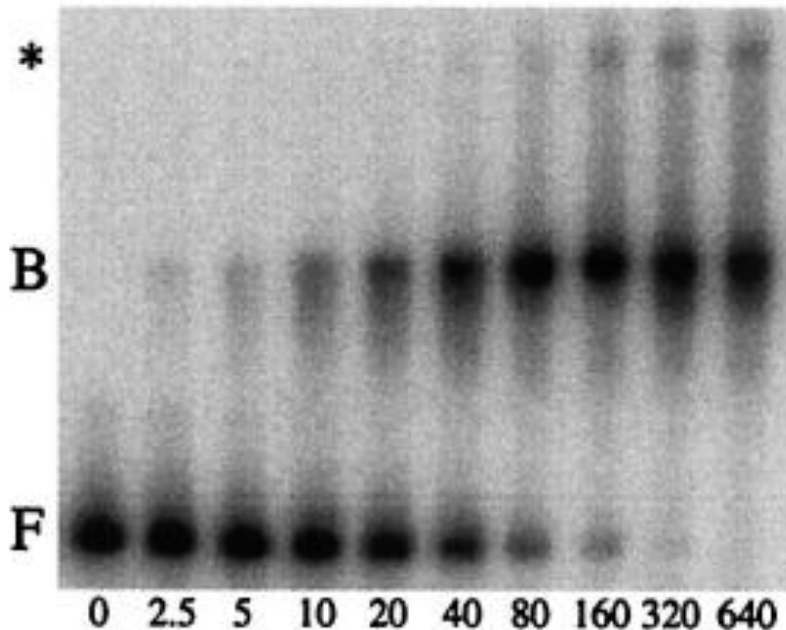
- další mechanismus reagující na „nenabitou“ tRNA<sup>Trp</sup>
- antiTRAP protein
  - v přítomnosti nenabité tRNA<sup>Trp</sup> se váže na TRAP a vyvazuje jej z vazby na RNA
  - zabraňuje terminaci transkripce
  - fenotypově ale podobné chování jako *trp* operon u *E. coli*
- (Babitzke P., and Gollnick P. 2001, J.Bact. 183, 5795)



# RNA- protein vazebná retardace

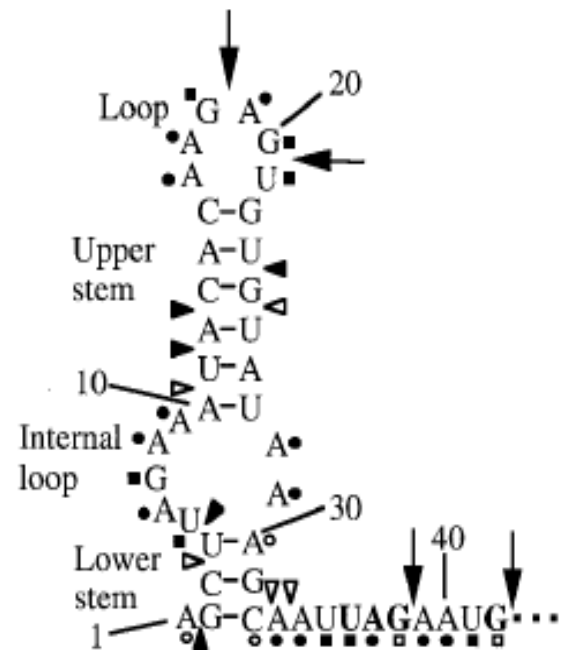
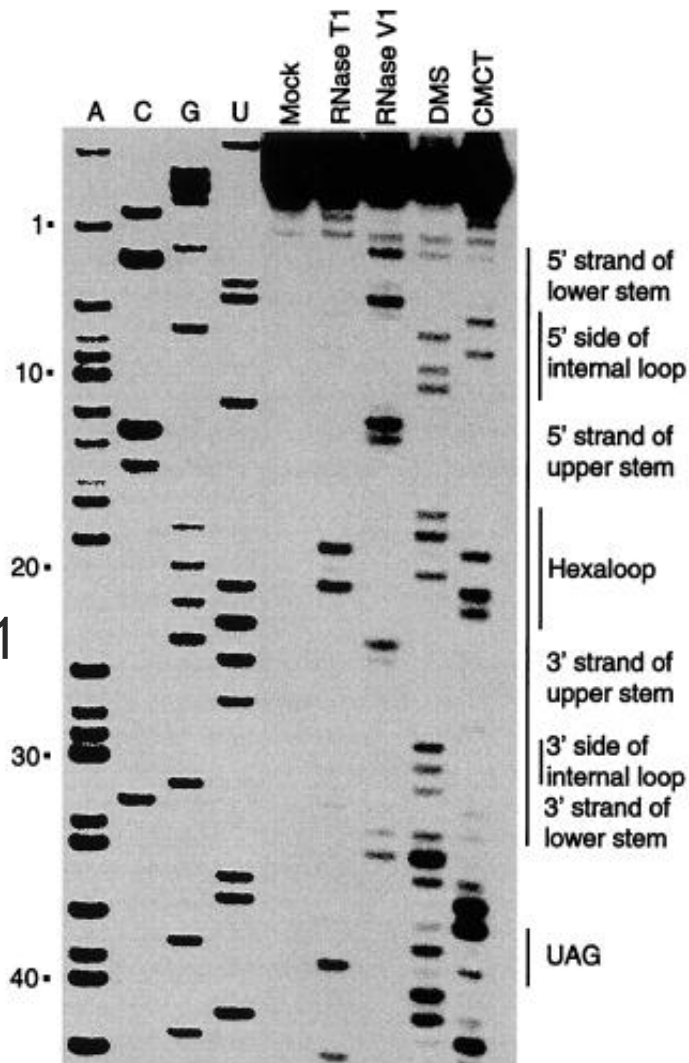
- studium vazby TRA na RNA – gelová retardace
  - značené RNA (WT A, delece ve vlásence B) generovaná z plasmidu a protein v různých koncentracích se inkubuje 20 min
  - deteguje se v nativním akrylamidovém gelu (F volná RNA, B vázaná na protein)

**A** ■ J.Bact. 182,1819, (2000)



# studium RNA struktury

- J.Bact. **182**,1819, (2000)
- Štěpení RNA různými RNAasami a detekce štěpů metodou primer extension
- štěpení RNaseT1 označeno ←



# RNA sensory

některé mRNA nejsou pouze substrát pro ribosomy

- obsahují kontrolní elementy,
  - moduluji vlastní exprese v závislosti na daných podmínkách
  - bez účasti další makromolekuly
  - cis – acting
  - lokalizovány v 5'UTR oblasti (untranslated region)
  - změna konformace v závislosti na fyzikální nebo chemický signál
- **Riboswitch** – regulace nízkomolekulárním metabolitem
  - monitorují metabolický stav
- **RNA teploměr** – reagují na intracelulární teplotu

Narberhaus, F. *et al.* RNA thermometers. *FEMS Microbiol. Rev.* (2006) **30**:3.

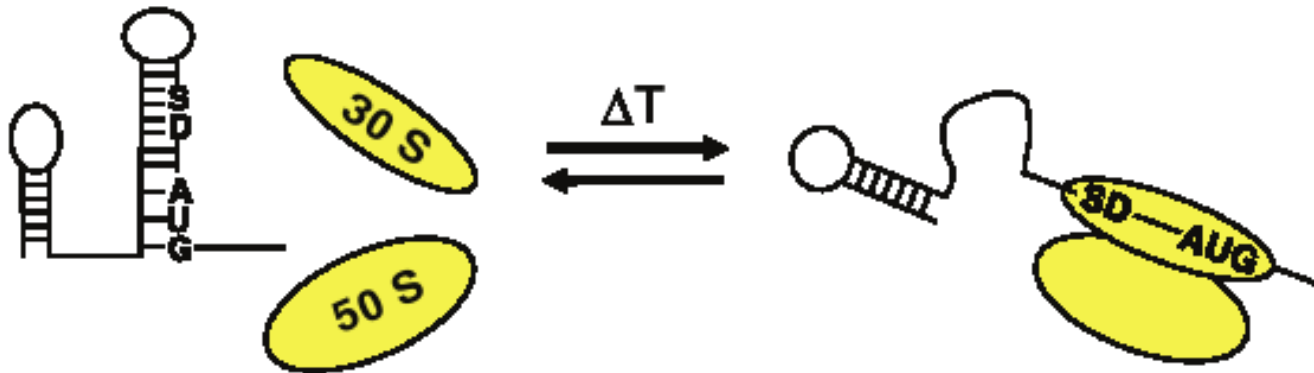
Nudler, E. *et al.* The riboswitch control of bacterial metabolism. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 11- 17, 2004.

# RNA teploměr

- zvyšující se teplota mění konformační změny NK
  - mRNA – cis acting
    - Chladový i tepelný šok, faktory virulence

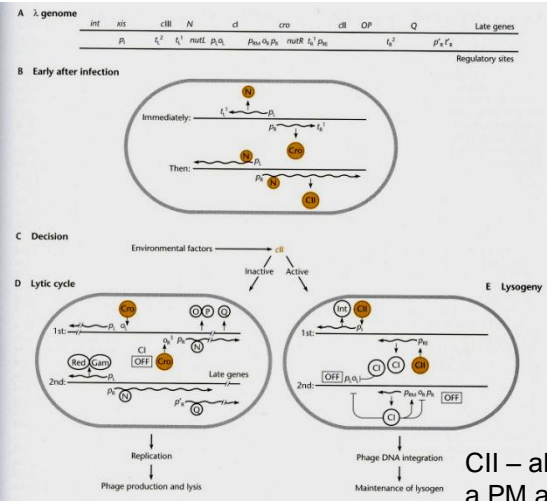
## (b) RNA thermometers

### I. Translation initiation (*cis*-acting)





- 1. objevený u cIII genu λ fága (15 let)
  - při 37 °C se posune rovnováha ve prospěch struktur mRNA cIII proteinu umožňující vazbu ribosomu
  - proběhne produkce cIII proteinu – stabilizace cII - lysogenní fáze
  - při 45 °C naopak
    - navíc cII degradovaný FtsH proteázou



CII – aktivuje transkripci z promotorů PRE a PM a PI  
 PRE a PM – transkripce CI – represor  
 transkripce z promotorů P a L  
 PI - transkripce integrasy  
 CIII – inhibuje buněčnou proteasu, která degraduje CII  
 CI – regulace repress transkripce v lysogenním stavu

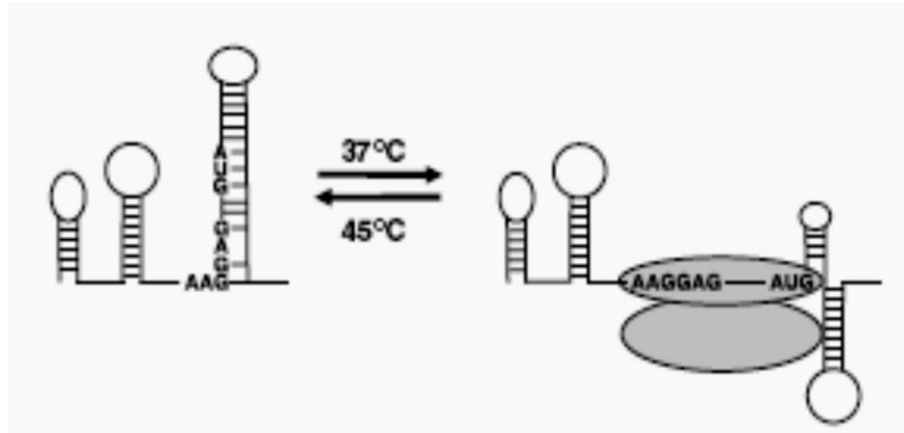


Fig. 2. Temperature-dependent sequestration of the λ cIII ribosome-binding site. Grey ovals, ribosome; AAGGAG, Shine-Dalgarno (SD) sequence; AUG, start codon.

# [ Regulon teplotního šoku ]

- po vzrůstu teploty -
  - rychlý nárůst asi 30-ti proteinů (Hsps – heat shock proteins)
  - pomalá degradace
  - indukce též dalšími stimuly- ethanol, degradace DNA
  - konzervované od bakterií až po vyšší eukaryota
  - spíše proteiny obecného stresu
    - Craig E. a Gross (1997), Trends. Biochem. Sci. 16,135.
- **původní objevení** – kolekce teplotně sensitivních mutant
  - neschopné indukovat Hsps po teplotním šoku
  - geny nalezeny komplementací s genomovou knihovnou WT
  - klony schopné přežít po tepelném šoku

# Regulon teplotního šoku

- *E. coli*
  - Nejlépe prostudovaný
    - Hsps ve dvou operonech
      1.  $\sigma^{32}$  regulon – 30 genů
      2.  $\sigma^{24}$  regulon – 3 proteiny – aktivita při vyšších teplotách
  - stálá nízká koncentrace – funkce za normálních podmínek
  - po šoku rychlý několikanásobný nárůst
  - **chaperony** – za normálních podmínek sbalují nově vzniklé proteiny – GroEL, DnaK, DnaJ, GrpE
  - **proteázy** – degradace nevratně denaturovaných proteinů- Lon, Clp
  - **aminoacyltransferázy**- neznámá funkce, spojení se syntézou proteinů

# [ Regulon teplotního šoku ]

- $\sigma^{32}$  → *rpoH* gen - po šoku stoupne exprese 15 x a ihned
  - promotor *rpoH* není rozpoznáván samotným  $\sigma^{32}$
  - otázka → jak může vzniknout tak velký nárůst ?
    - není autoregulace – nerozpoznává vlastní promotor
      - 4 promotory – 3  $\sigma^{70}$  a jeden  $\sigma^{24}$
    - silná transkripční regulace x transkripce *rpoH* vzrůstá málo
    - musí být postranskripční regulace
      - po tepelném šoku zvýšení stability mRNA
      - zvýšení translace z *rpoH* mRNA
      - účast DnaK a DnaJ



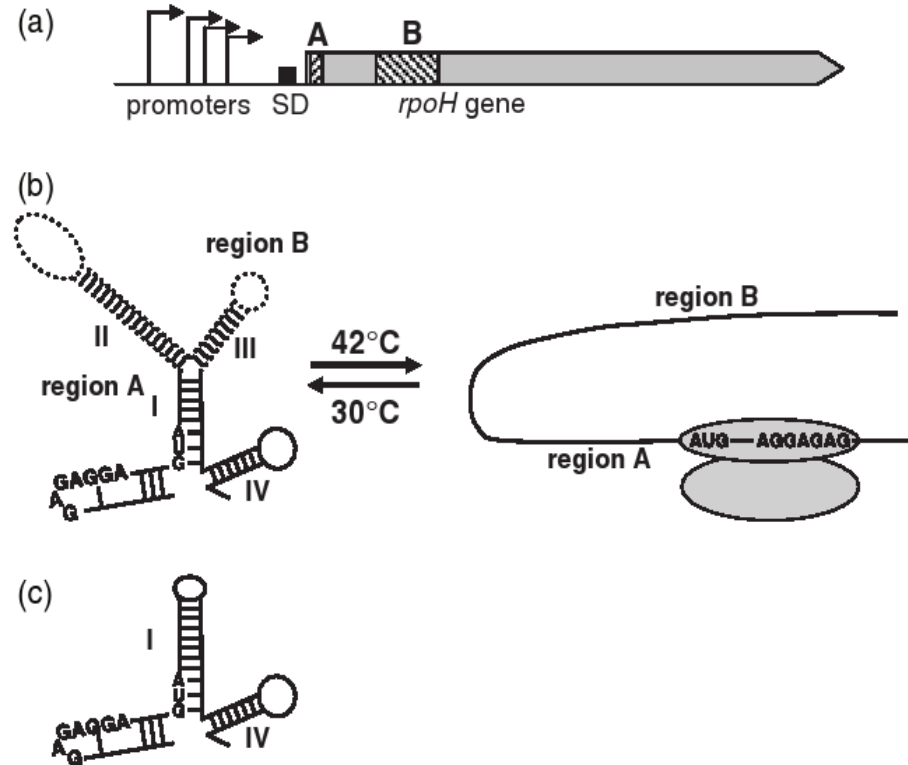
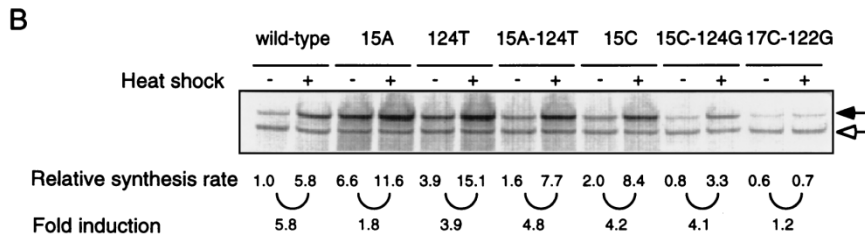
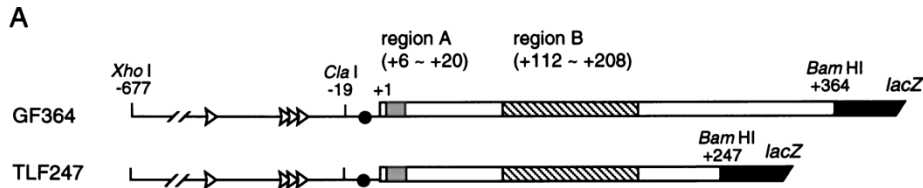
# [ RNA teploměr ]

- mRNA *rpoH* – RNA teploměr –
  - zajištěna translační efektivita hlavního regulátoru
  - korelace s teplotou
  - dva intragenové segmenty A a B –
    - v 5'proximální části v kodující sekvenci
    - *rpoH-lacZ* fúze a deleční mutanty
  - sekundární struktury mezi těmito oblastmi inhibují translaci při nízkých teplotách
  - při vyšší teplotě – rozvolnění struktury – nasednutí ribosomu
  - deleční analýza, bodové mutace, analýza struktury
    - Morita et al. 1999: J.Bact. 181:401.

# RNA teploměr

## Schéma regulace *rpoH* mRNA

- A) schema regulonu
- B) struktura *rpoH* mRNA
- C) minimální funkční sekvence



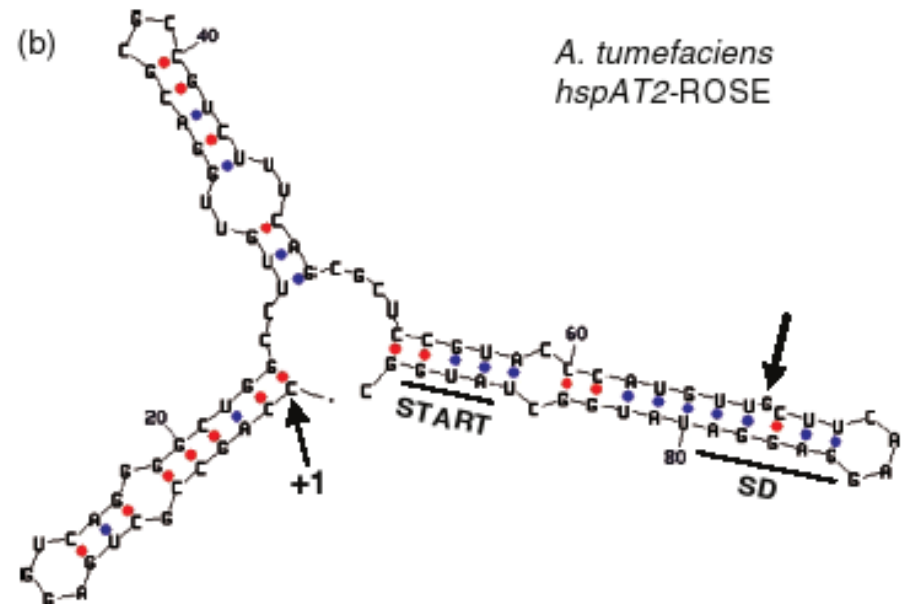
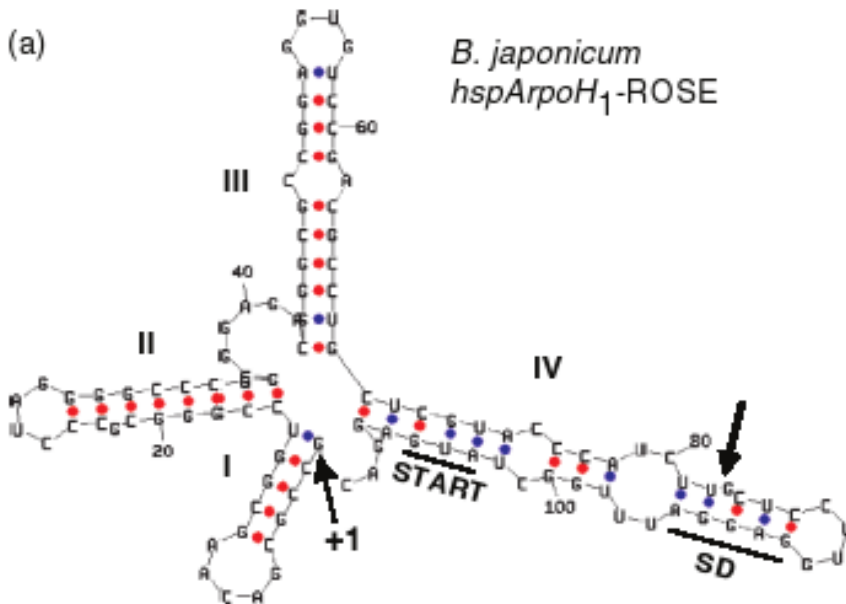
# ROSE

## ROSE – Repression Of heat- Shock gene Expression

- regulační element mRNA reagující na teplotu upstream od strukturního genu
  - *Bradyrhizobium japonicum* – heat shock protein
    - 100 nukleotidů v 5'UTR
    - konservované
    - delece této části – zvýšení translace bez zvýšení teploty
      - původní vysvětlení regulace na transkripční úrovni - negativní
      - selhali experimenty nalézt regulační protein
      - analýza pomocí počítačových výpočtů z primární sekvence
      - mfold program – Zuker et al. 2003, NAR,31:3406
  - Nalezeno u dalších – Rhizobiaceae: *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*
    - společný znak – nepárový G naproti SD sekvenci

# ROSE

- struktura ROSE u *B. japonicum* a *A. tumefaciens*
  - při delecii G – ztráta sensitivity k vyšší teplotě

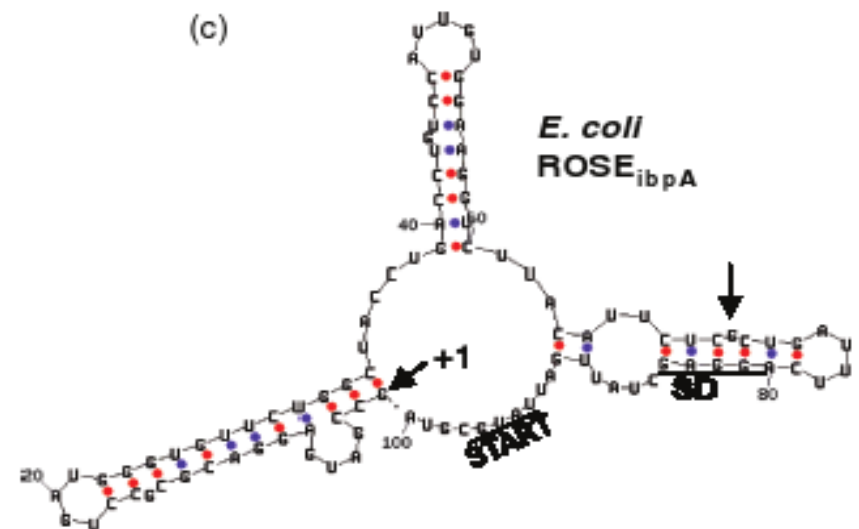
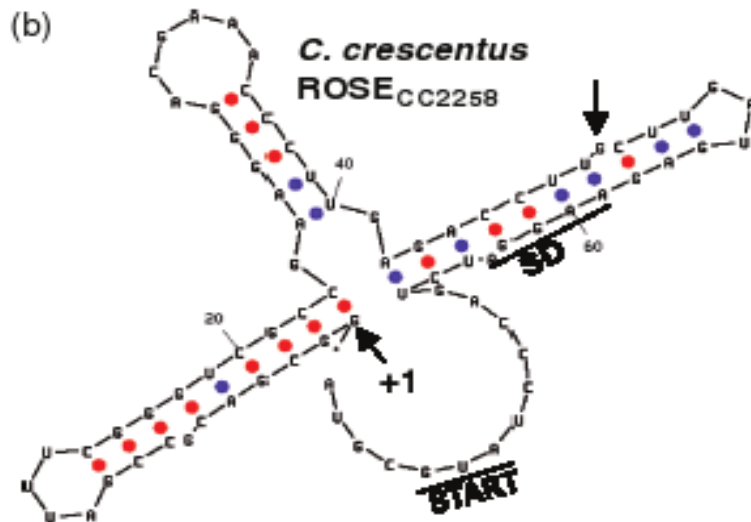


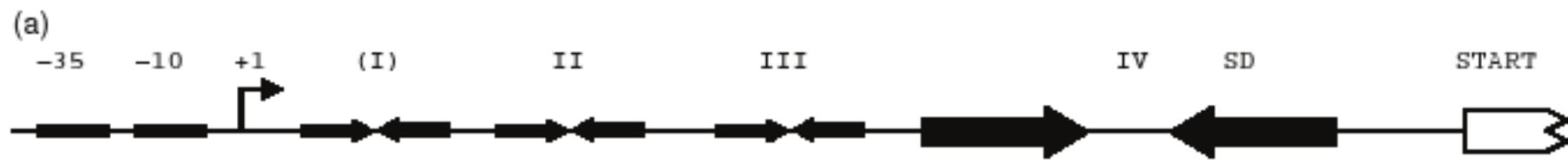
# [ ROSE ]

- Spekulace co stačí na zahájení translace
  - úplné rozvolnění vlásenky
  - perturbace v místě SD
  - Experimentální metody
    - NMR
      - potvrzení perturbací a funkce nepárového G
      - stabilizační funkce ostatních smyček

# ROSE

- kandidáti též u gamaproteobacteria –
  - *E.coli*, *Salmonella*, *Vibrio*
  - malé heat-shockové proteiny ze skupiny A a B
  - pouze predikce - BLAST nestačí
  - zatím neobjevené struktury u ostatních rodů





**Alpha-Proteobacteria**

<i>Bradyrhizobium japonicum (hspA)</i>	AUCUUGCUCUCU---UGGAGGAUUUGGC---UAUG
<i>Bradyrhizobium japonicum (hspB)</i>	AUCUUGCUCAG---UGGAGGAUUUGGC---UAUG
<i>Bradyrhizobium japonicum (hspD)</i>	AUUUUGCUCG---UGGAGGAUCUGGC---UAUG
<i>Bradyrhizobium japonicum (hspE)</i>	AUAUUGCUCAG---AGGAGGAUGUGGU---UAUG
<i>Bradyrhizobium japonicum (hspH)</i>	AUUUUGCUCUCU---UGGAGGAUUUGGC---UAUG
<i>Bradyrhizobium sp. Parasponia (hspA)</i>	AUCUUGCUCUC---AGGAGGAUUUGGC---UAUG
<i>Bradyrhizobium sp. Parasponia (hspC)</i>	AUCUUGCUCUC---UGGAGGACUUGGC---UAUG
<i>Bradyrhizobium sp. Parasponia (hspD)</i>	AUCUUGCUCUU---UGGAGGAUUUGGC---UAUG
<i>Bradyrhizobium sp. Parasponia (hspE)</i>	AUGUUGCUCUCA---AAAAGGAUUUGGA---UAUG
<i>Rhizobium sp. strain NGR234 (hspA)</i>	AUGUUGCUCUA---CGGAGGAUGUAGC---UAUG
<i>Rhizobium sp. strain NGR234 (hspC)</i>	AUGUUGCUCAA---AGGAGGAUGUGGC---UAUG
<i>Mesorhizobium loti (m112387)</i>	AUGUUGCUCUCA---AGGAGGAUGUAGU---UAUG
<i>Mesorhizobium loti (m113033)</i>	AUGUUGCUC-----AACAGGAGAACACCU-CAUG
<i>Mesorhizobium loti (m1r3192)</i>	AUGUCGCUCUU---GAGAGGACAGUGUAA-CAUG
<i>Mesorhizobium loti (m119627)</i>	AUGUUGCUCUUA---CGGAGGAUAUGGC---UAUG
<i>Rhodopseudomonas palustris (RPA0054)</i>	AAGUCGCUUC---GAGAGGACUUUGU---GAUG
<i>Rhodopseudomonas palustris (hspD)</i>	UAGUCGCUUCU---AGGAGGACUUUGAC---CAUG
<i>Brucella suis (ibpA)</i>	AUGUCGCUC-----UGAAGGAGGGCUAAC-CAUG
<i>Agrobacterium tumefaciens (hspA1/hspA2)</i>	AUGUUGCUCUCA---AGGAGGAUAUGGC---UAUG
<i>Sinorhizobium meliloti (ibpA)</i>	CCGUUGCUCUUA---UGGAGGACGACAU---CAUG
<i>Sinorhizobium meliloti (b21295)</i>	AUGUUGCUCUCA---AGGAGGAUAUGGC---UAUG
<i>Bartonella henselae (ibpA2)</i>	UAGUCGCUC-----UAAAGGAGGGCAAUAUUAUG
<i>Caulobacter crescentus (CC2258)</i>	ACCUUGCUCUGAUG-AGAAGGAUCUGACCC-UAUG
<i>Caulobacter crescentus (CC3592)</i>	AAGUCGCUUCA---GCGAGGACUUCGC---GAUG

## Gamma-Proteobacteria

*Pseudomonas aeruginosa* (ibpA)  
*Pseudomonas putida* (ibpA)  
*Pseudomonas syringae* (PSPT02170)  
*Erwinia carotovora* (ibpA)  
*Erwinia carotovora* (ibpB)  
*Escherichia coli* (ibpA)  
*Escherichia coli* (ibpB)  
*Salmonella enterica* (ibpA)  
*Salmonella enterica* (ibpB)  
*Yersinia pestis* (ibpA)  
*Yersinia pestis* (ibpB)  
*Shewanella oneidensis* (ibpA)  
*Vibrio cholerae* (hspA)  
*Vibrio parahaemolyticus* (hspA)  
*Vibrio vulnificus* (hspA)  
**Consensus**

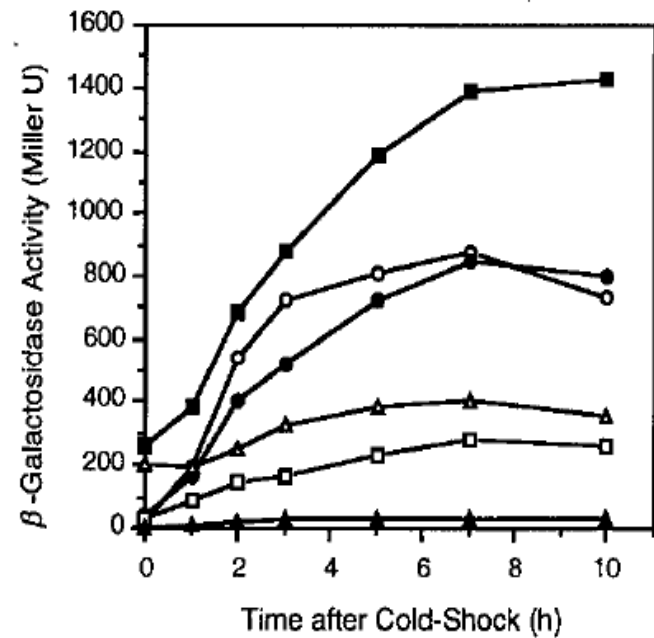
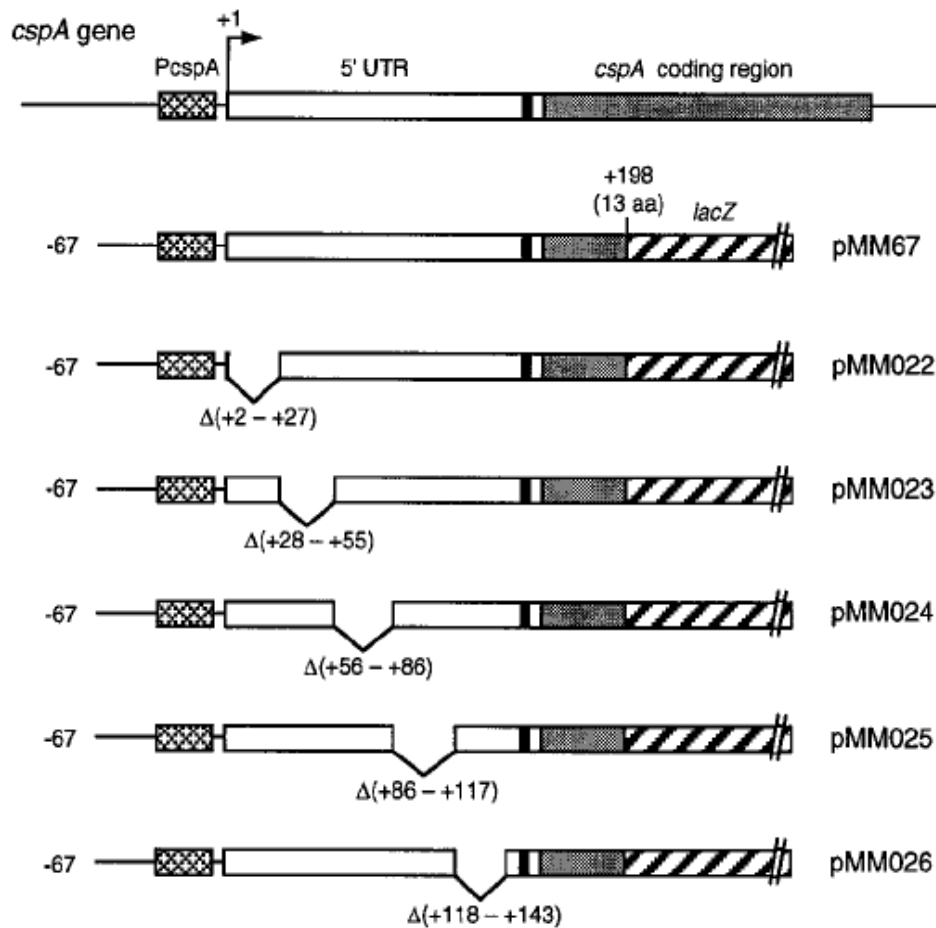
```
UACUUGCUGAUAA-UUCAGGAGAUUCGC--AAUG
UACUUGCUGAAU--CUCAGGAGUU-----UAUG
CACUCGCGACA-AACAGGAGAAUUAU-CAUG
UCCUCGCGCAUG-UUUAGGAGGCUGUUU-UAUG
CUCUCGCUUCUU--AGAAGGAGUCAU-AU-UAUG
UUCUCGCGAU---UUCAGGAGCUAUGAUUAUG
UACUCGCUUCUU--AGAAGGAGAAUGAC-UAUG
UUCUCGCGAU---UUCAGGAGUUUAUGAUUAUG
AACUCGCUUCUU--AGAAGGAGAAUGAU-UAUG
CCCUGCUAAUCUAUUUAGGAGGCAGUUUGUAUG
AUCUCGCUUCA--AGAAGGAGUUAACGUAUAUG
AUAUUGCUUAAG--ACAAGGAUAUGAA---UAUG
CUAUUGCUUAAUCAAGAGGAUAGGAA---UAUG
CUAUUGCUUAAU--AAGAGGAUAGAU---UAUG
CUAUUGCUUAA--AAGAGGAUAGGAU---UAUG
UYGCUy [3-6]rrAGGak [2-8] uAUG
```



# Chladový šok

- změna membránové fluidity
- konformační změny NK a proteinů
- CSPs – cold shock proteins
  - rozdílné a zatím málo prozkoumané funkce (oproti HSPS)
  - regulace na postranskripční úrovni
    - tvorba rozdílné struktury transkriptu při 37 a 15 °C
    - nízká stabilita CSPs mRNA při normální teplotě
    - konformační změny při rozdílných teplotách modulují dostupnost SD sekvence
  - *cspA* mRNA *E. coli* -
    - dlouhý 5'UTR oblast – 159 nukleotidů
    - Yamaka et al. J.Bact., 1999 181:6284
      - deleční pokusy – leader sekvence kontroluje efektivnost translace
      - stabilita mRNA – nízká při vyšších teplotách

# Chladový šok



# virulentní geny

- exprese genů zodpovědných za virulenci
  - transkripční úroveň – regulační protein
  - exprese závisí na vnějších faktorech
    - **extracelulární koncentrace železa**
      - *Corynebacterium diphtheriae* – DtrX
    - **osmotický tlak**
      - *Vibrio cholerae* – ToxR-ToxS dvoukomponentový systém –
      - ToxR funguje jako dimer
      - regulace 20 genů
    - **teplota**

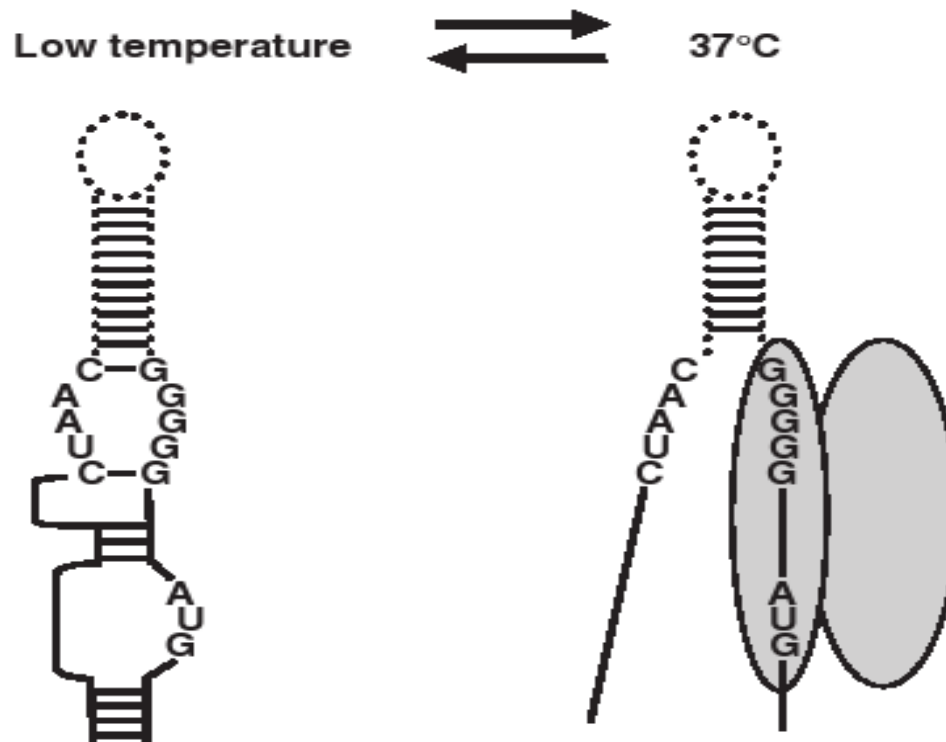
# virulentní geny

## ■ teplotní kontrola

- teplotně indukované změny v DNA
- proteinové teploměry
- RNA teploměry
- *Yersenia pestis* – regulace aktivátoru LcrF
  - hladina proteinu vyšší při 37 °C x transkripce k teplotě citlivá není
  - termální destabilizace vlásenky umožňující translaci byla vypočtena
- *Listeria monocytogenes* – aktivátor PrfA
  - teplotně sensorová část jednodušší – jedna vlásenka
  - párování s SD je slabší
  - AUG kodon není maskován
  - vyšší citlivost a fungování při menších změnách teploty

# virulentní geny

- *Listeria monocytogenes* – aktivátor PrfA
  - Jednoduchá smyčka – citlivější reakce při nižších teplotách

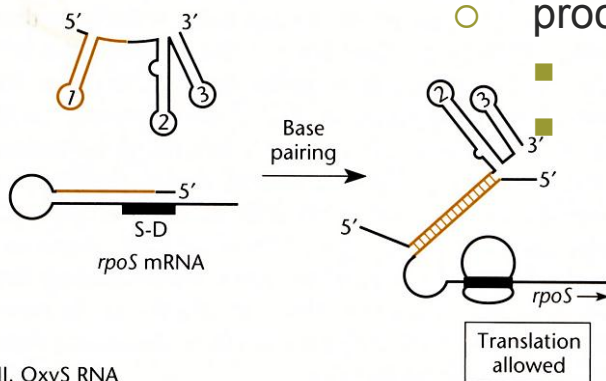


# Malé nekodující RNA - DsrA

- RpoS je více zastoupen při 25 °C
  - RpoS dependentní promotory jsou efektivně transkribovány při nízkých teplotách
    - Regulace prostřednictvím DsrA – teplota okolí jeden z faktorů ovlivňující množství DsrA v buňce.
      - iniciace transkripce
      - stabilita samotné antisense RNA – vyšší při nižších teplotách
    - Vlastnosti DsrA
      - 85 nukleotidů primární transkript – forma F
        - Stabilnější při 25 °C
      - procesován na 60-61 nukleotidů – forma T
        - RNAsa E – mechanismus neznámý
        - odštěpována 5' oblast – interakce s mRNA RpoS

## Positive regulation

### I. DsrA RNA



### II. OxyS RNA

# RNA teploměry

- Nezodpovězené otázky
  - Struktury RNA teploměrů – NMR, X-ray
  - Rozvolňovací proces
    - Nejsou známy všechny interakce sekundárních a hlavně terciálních struktur
    - Dynamika folding a unfolding procesu RNA
  - Stabilita transkriptů
    - Neznámý mechanismus degradace a důvod proč buňky produkují transkripty které jsou degradovány
  - Existence i u jiných genů
    - Zda pouze geny pro teplotní šoky a virulenci
  - Důvod nízké sekvenční a strukturní konzervovanosti
  - Jiné mechanismy regulace než iniciace translace
    - Terminace transkripce, ribozymová aktivita jako u riboswitch

# Riboswitch

- monitorují metabolický stav
  - The riboswitch control of bacterial metabolism Trends Biochem. Sci., 29, 11 (2004)
- váží se na metabolity - aptamery
  - vysoká afinita a specifita
  - zpětnovazebná kontrola metabolických drah
- regulace genů pro biosyntézu, transport nebo degradaci malých metabolitů
  - metabolismus vitaminů
    - Flavin mononukleotid sensing riboswitch – rfn-box
    - thiamin pyrophosphate sensing riboswitch – thi-box
    - Adenosylcobalamin - B12
  - metabolismus purinů
    - hypoxanthin
    - Guanin
  - di-GMP – „second messenger“



# Riboswitch

- Tabulka možných mechanismů riboswitch

Table 1. Riboswitches and their role in regulation of bacterial metabolism<sup>a,b</sup>

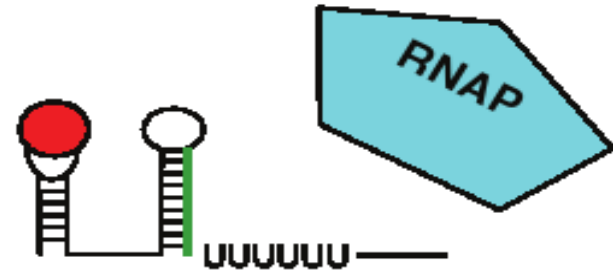
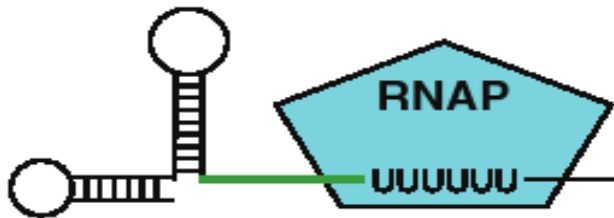
Metabolite (ligand)	Precursor	RNA sensor	Target process	Target genes	Where found	Refs
FMN	B2	<i>rfn</i> -box	Transcription termination or translation initiation	B2 synthesis and transport	Gram(+) and Gram(-) bacteria	[14–16]
TPP	B1	<i>thi</i> -box	Transcription termination or translation initiation	B1 synthesis and transport	Gram(+) and Gram(-) bacteria, some archaea, fungi and plants	[14,20,21,23]
Ado-Cbl	B12	B <sub>12</sub> -box	Transcription termination and/or translation initiation	B12 synthesis and transport	Gram(+) and Gram(-) bacteria	[32,33]
SAM	Met	S-box	Transcription termination	Sulfur metabolism	Gram(+) bacteria	[40–42]
Lysine	N/A	L-box	Transcription termination	<i>lysC</i>	Gram(+) and Gram(-) bacteria	[44,46,47]
Guanine, HX	N/A	G-box	Transcription termination and antitermination	Purine metabolism and transport	Gram(+) bacteria	[44] <sup>c</sup>

# Riboswitch

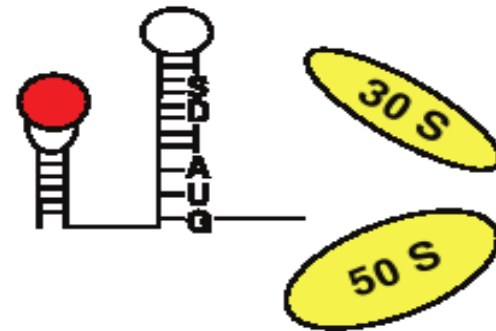
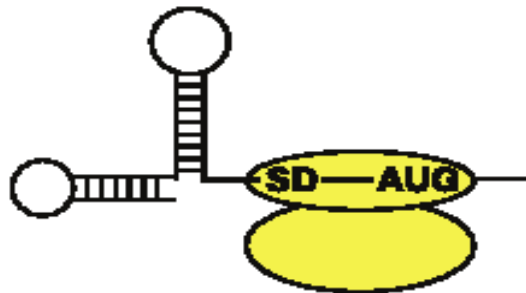
- lokalizace v 5'UTR oblasti
  - receptorová oblast – váže se metabolit a vytvoří konformační změnu – switch
  - konsensuální sekvence –
    - konservované u většiny bakterií
    - 100 – 200 bp
  - tři mechanismy
    - předčasná terminace
    - iniciace translace
    - mRNA processing
    - „off-switches“ i „on-switches“
  - Metody studia
    - RNase H probing, thermodynamická a kinetická měření vazby aptameru na RNA, krystalografie

# Riboswitch – negativní regulace

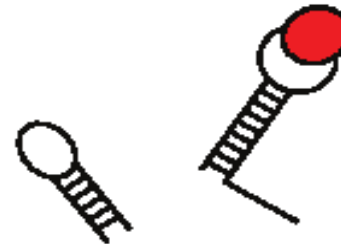
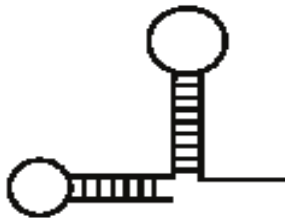
## I. Transcription termination



## II. Translation initiation

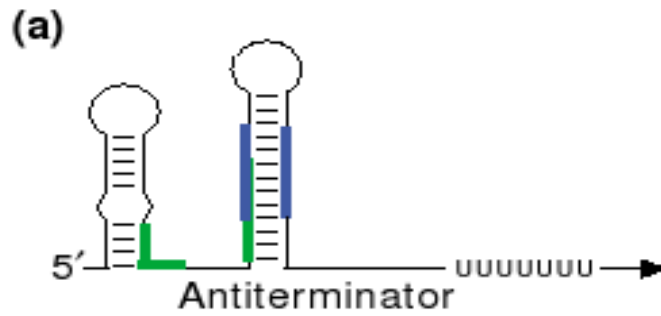


## III. Ribozyme activity



# Riboswitch – repress genú

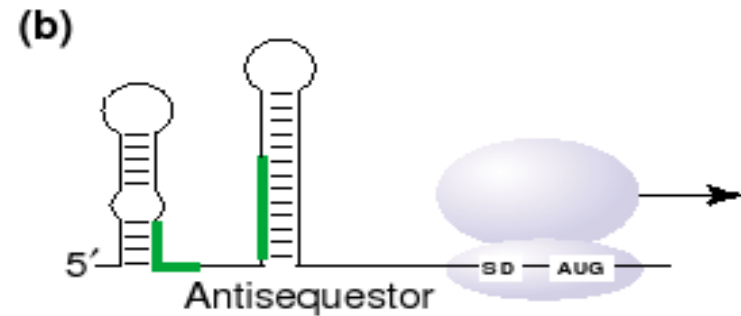
Transcription termination



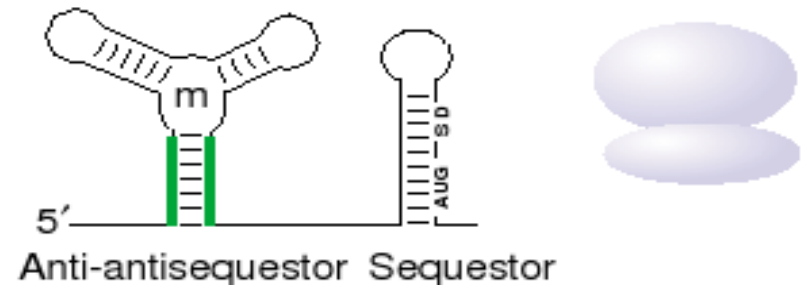
Metabolite



Translation initiation



Metabolite

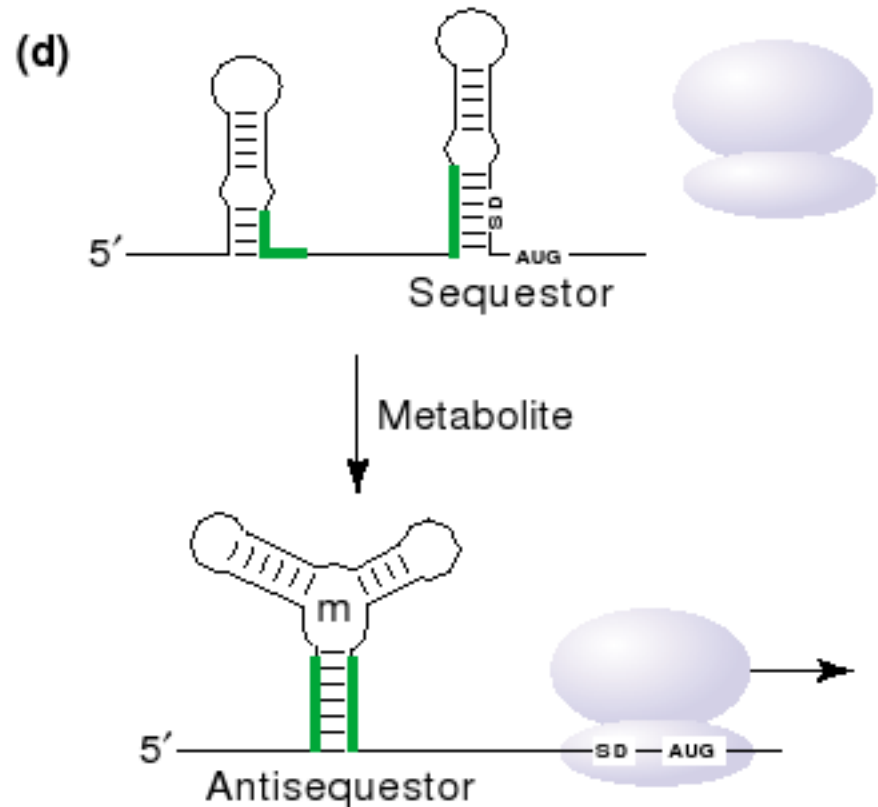
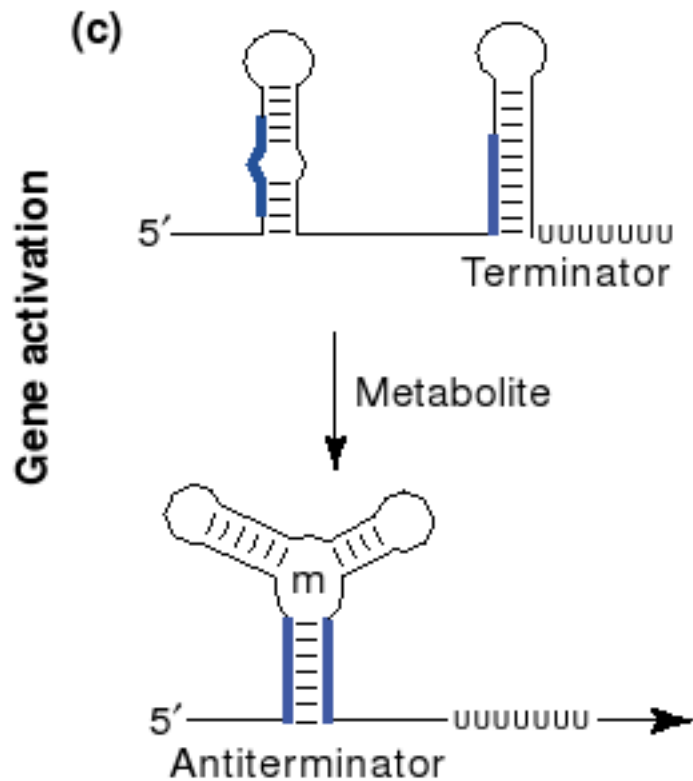


Gene repression

# Riboswitch – aktivace genů

## Transcription termination

## Translation initiation



# [ RNA regulace ]

## ■ Hlavní třídy bakteriálních atenuátorů

### RNA thermometer

- A. Riboswitch
- B. T- box
- C. Peptide leader
- D. Ribosomal protein leader
- E. Vazba terminátor/antiterminátor na RNA

Transcription attenuation in bacteria: theme and variations.  
Neville, M. and Gautheret, D.  
Brief. Funct. Genomic proteomic  
2009, **8**: 482

