

REGULACE TRANSKRIPCE I

Lac operon, Ara operon

□ **Regulace genové exprese**

- v popředí zájmu studia v postgenomické době
- proces při kterém je exprese genu zapínána/vypínána
- různé podmínky, různý fyziologický stav

□ **Důvody regulace exprese genů**

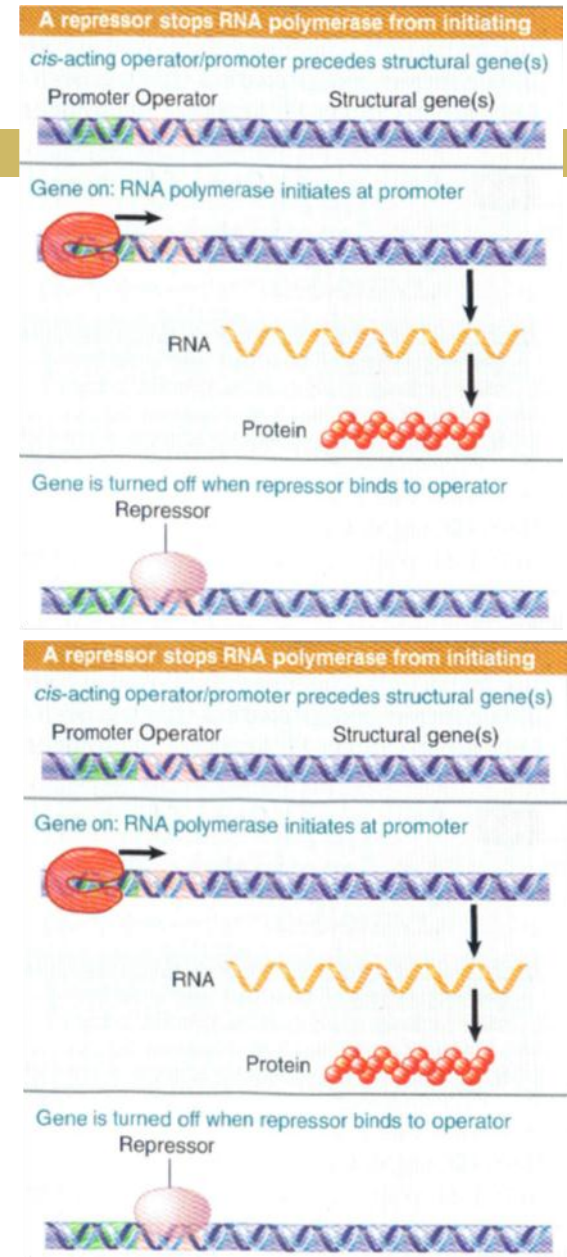
- exprese jen aktuálně potřebných genů
- reakce na změnu vnějšího prostředí
- součást procesu vývoje – (sporulace)

□ **Formy regulace**

- regulace na transkripční úrovni – regulace syntézy RNA – nejefektivnější
- postranskripční regulace - všechny regulace po transkripci RNA
- regulace na translační úrovni – RNA konstitutivně, za určitých podmínek není translatována – atenuace, interakce s asRNA, teplota

Regulace transkripce

- **Regulace na transkripční úrovni -**
 - iniciace transkripce na promotoru - RNA polymeráza
 - regulace prostřednictvím proteinů – regulační proteiny
 - usnadňují či brání vazbě RNA polymerázy na promotor
- **negativní**
 - transkripce regulována represorem – váže se na operátor (specifická sekvence)
 - brání vazbě RNA polymeráza – promotor
 - zabraňuje RNA polymeráze iniciovat transkripci
 - represor drží RNAP na začátku
- **pozitivní**
 - iniciace transkripce je kontrolována aktivátorem – nezbytný pro iniciaci transkripce
 - zvýšení vazby RNAP na promotor
 - umožňuje posunutí RNAP na začátek transkripce



Regulace transkripce

- Regulace elongace transkripce-
 - pomocí dostupnosti dNTPs – hladiny ATP x GTP

- Terminace transkripce –
 - Předčasná terminace –
 - atenuace
 - antiterminační proteiny – λ
 - Transkripce do sousedících genů –
 - Vznik asRNA

□ **Trans –acting –**

- difusibilní produkt genu – peptid, RNA
- struktury na dvou genetických elementech (chromosom, plazmid)

□ **Cis-acting -**

- úsek DNA specifické sekvence DNA
- Struktury na jednom genetickém elementu

Negativní regulace

- *E. coli lac* operon – první a klasický případ
 - Francois Jacob Jacques Monod – 1950 – krátce po objevení struktury DNA a objevení mRNA
 - 1965 – oceněno Nobelovou cenou
 - stále slouží jako srovnávací studie
 - tehdejší znalosti – enzym laktózového metabolismu je inducibilní v přítomnosti laktózy

Genetická analýza *lac* operonu

□ první krok –

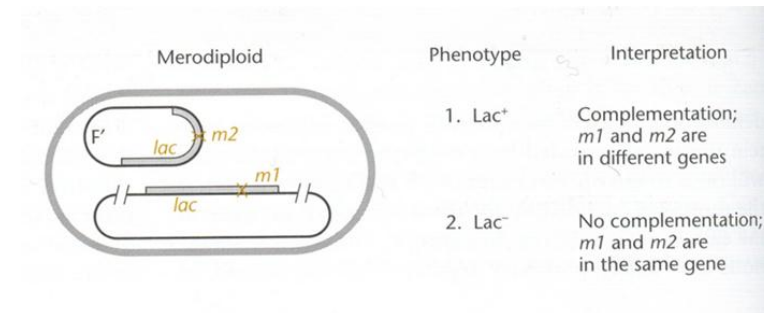
- izolace řady mutant defektních v metabolismu laktózy
- rozdělení do dvou skupin
- mutanty neschopné růst s laktózou jako jediným zdrojem C
 - Lac⁻
- mutanty produkující enzym na utilizaci laktózy i v její nepřítomnosti –
 - konstitutivní mutanty

□ druhý krok –

- komplementační studie
 - kolik genů tyto mutace reprezentují
 - které mutace ovlivňují trans a cis působící produkty genů

Genetická analýza *lac* operonu

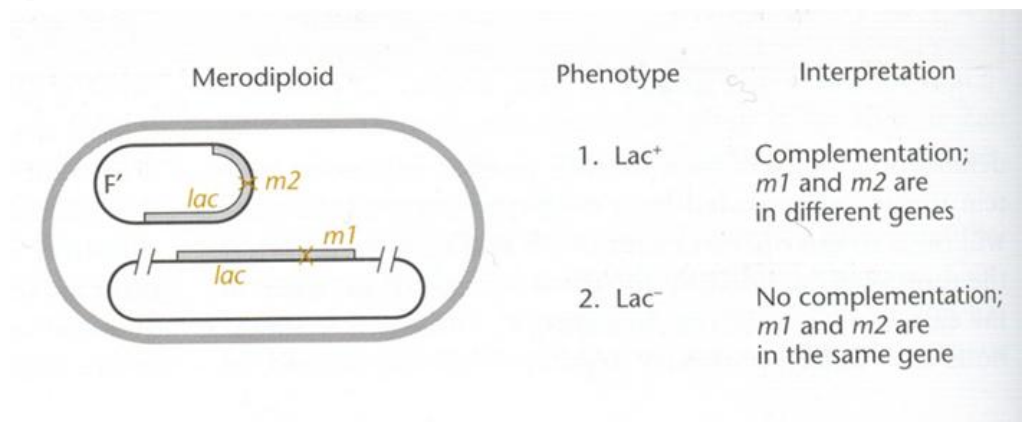
- Testování recesivity a dominance
 - komplementační pokusy s *lac*-mutanty –
 - F' s WT *lac* alelou vpravený do jednotlivých mutant
 - selekce podle typu použitých mutant
 - **dominance x recesivita** -
 - recesivní mutace -
 - parciální diploidi Lac – vytvářejí kolonie na laktóze – Lac+
 - dominantní mutace –
 - nevytvářejí kolonie za stejných podmínek – Lac-
 - většina mutací byla recesivních -
 - inaktivace genů potřebných k utilizaci laktózy
 - strukturní geny



Recesivní mutace v Lac operonu

□ počet strukturních genů v operonu

- komplementace dvou recesivních mutant – párová
- F' s alelou jednoho mutantu vpraven do druhého mutantu s mutací na chromosomu
 - Lac + – různé geny (komplementační skupiny)
 - Lac - - stejné geny
 - Jacob Monod – dvě skupiny – lacZ a lacY
- lac operon obsahuje ještě jeden gen lacA –
 - není potřebný k růstu na laktóze –
 - nemohl být v tomto typu experimentu objeven



Recesivní mutace v Lac operonu

- Konstitutivní - Lac^+ - bez i s induktorem
 - Recesivní, trans- acting
 - Komplementovatelné WT $lacI$ alelou
 - Mutace v $lacI^-$ zabraňující vazbě na operátor
 - Slouží k identifikaci aktivních míst na represorovém proteinu
 - DNA – vazebné místo

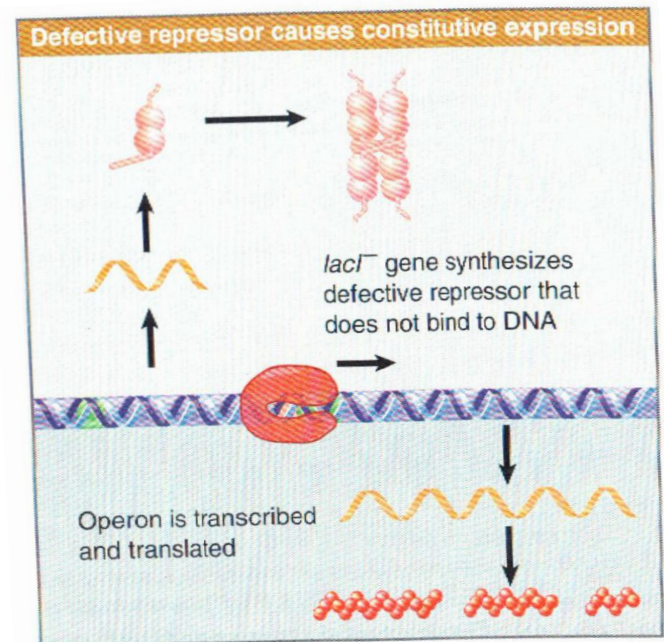
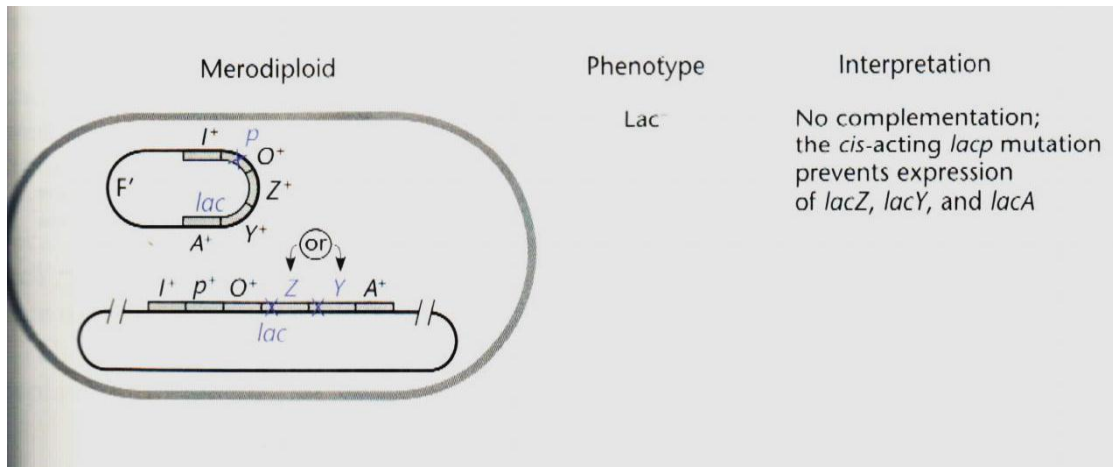


FIGURE 12.10 Mutations that inactivate the $lacI$ gene cause the operon to be constitutively expressed, because the mutant repressor protein cannot bind to the operator.

Dominantní mutace v Lac operonu

- Cis –acting mutace
- Lac⁻ nekomplementovatelné v pokusech s mutanty v obou genech (lacZ, lacY)
- Méně časté, polarizující efekt,
 - ▣ Mutace v operátorech – lacp
 - ▣ Zabraňují expresi z promotoru plac



Lac⁻ dominantní mutanty

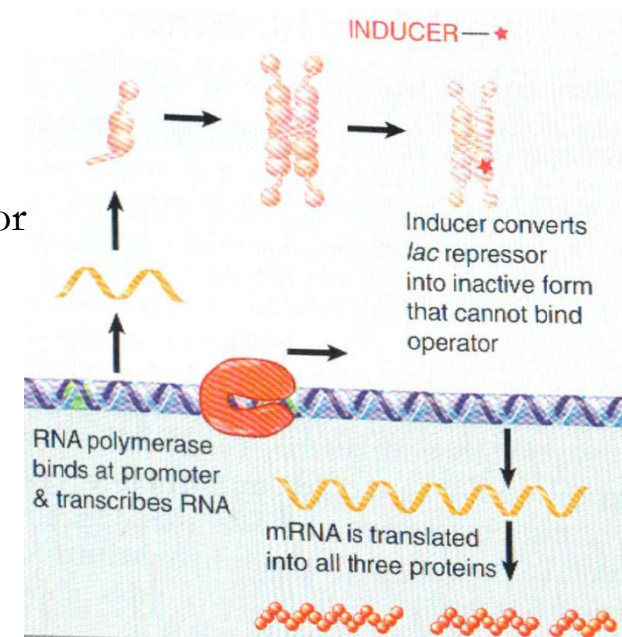
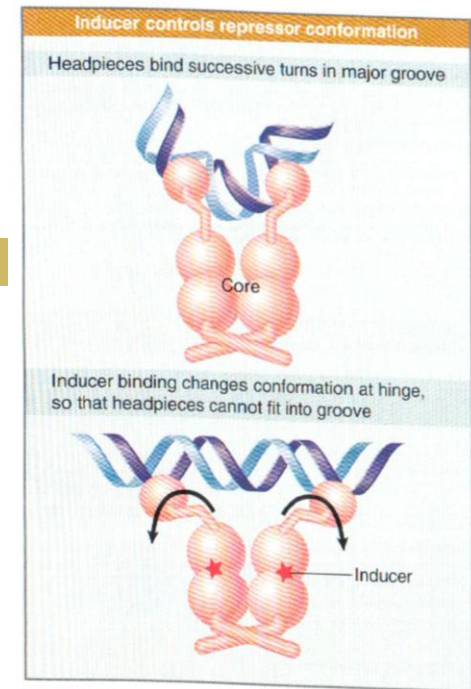
□ Mutace ovlivňující difusibilní produkt genu, ale dominantní

■ lacI^s – Lac⁻ mutace dominantní i v přítomnosti WT allely regulátoru

- „Superrepressor mutation“
- zabraňuje vazbu induktoru na represor –
- permanentní represe i v přítomnosti induktoru

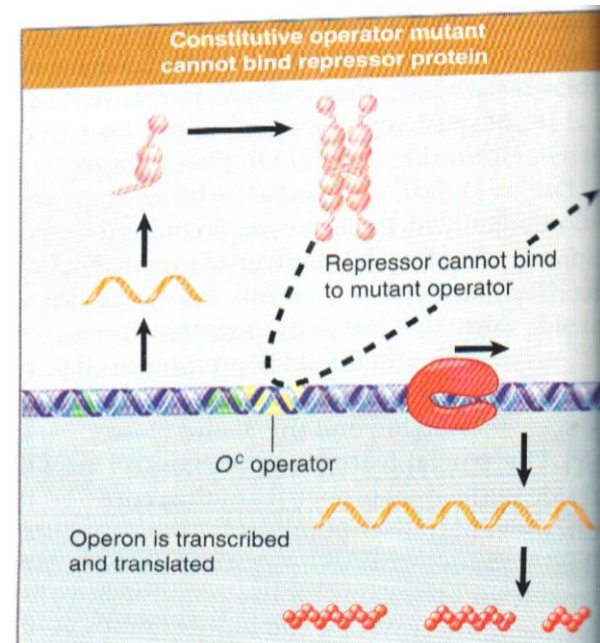
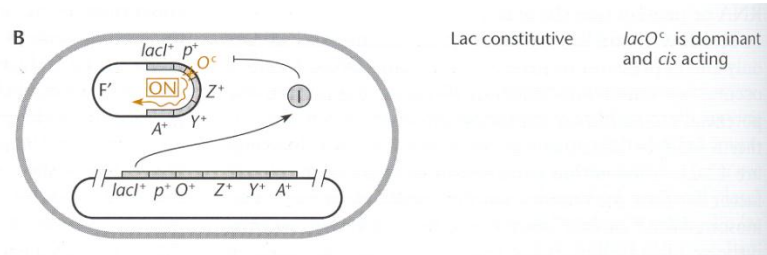
■ lacI^{rc} - konformační změny způsobující vazbu na operátor i/pouze v přítomnosti induktoru –

- represe v přítomnosti induktoru - reversní účinek
- dominantní



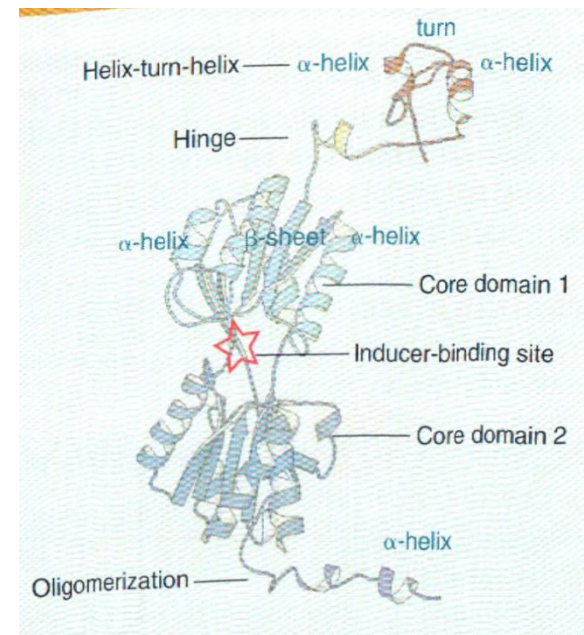
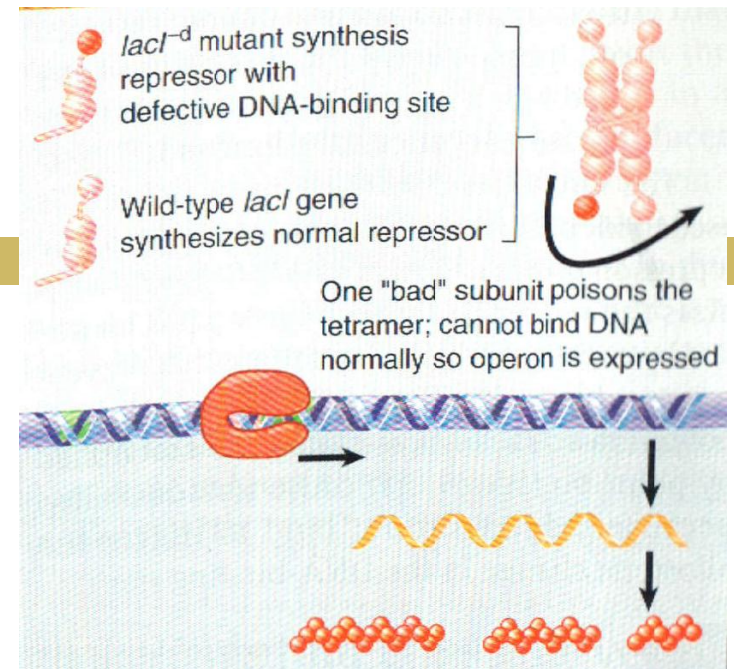
Konstitutivní mutanty – Lac+

- Cis-acting, dominantní mutace
 - vzácné konstitutivní mutanty
 - Lac⁺ i v přítomnosti WT alely celého operonu – bez induktoru
 - nazvané *lacO^c* - mutace bránící vazbu LacI na promotor –
 - Identifikují operátor
 - Mutace v regulátoru
 - Zrušení exprese
 - Neregulovaná exprese



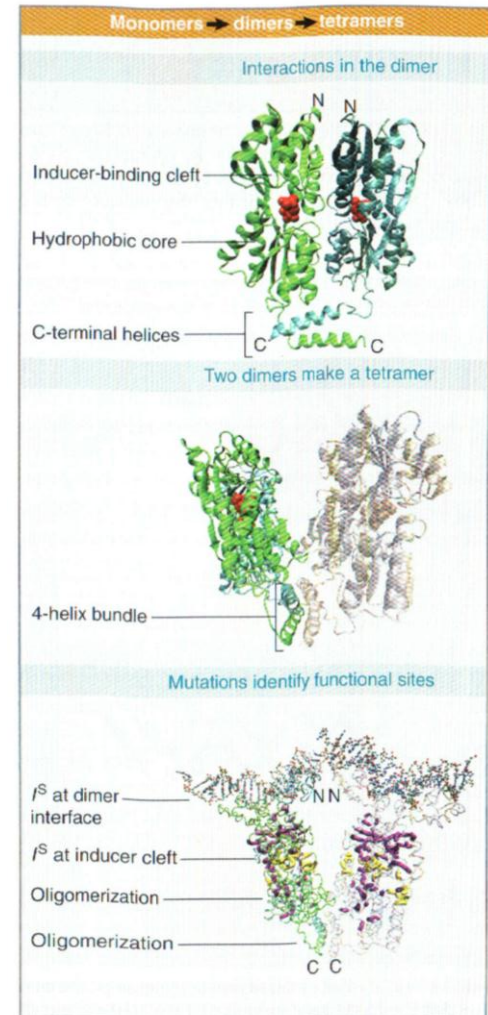
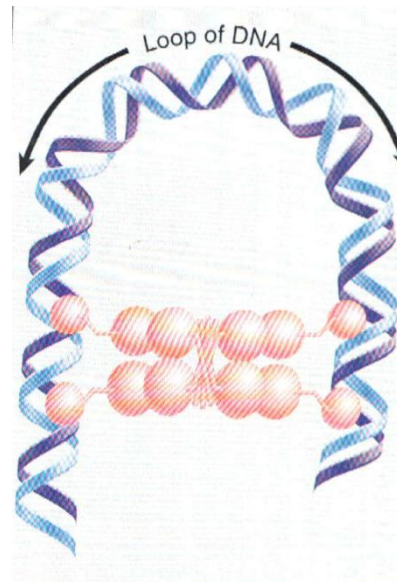
Dominantní mutace v Lac operonu

- konstitutivní mutace v *lac* operonu – Lac⁺
 - trans dominantní mutace –
 - *lacI^d* konstitutivní v expresi i v přítomnosti WT alely *lacI* –
 - mutace v samotném proteinu zabraňující vytvoření tetrameru



Model Lac operonu

- Jacob a Monod
 - vytvořen model – platný dodnes
 - induktor – allolaktosa, analog IPTG,
- Pozdější studie –
 - tři vazebná místa LacI
 - LacI tvoří tetramer
 - struktura LacI

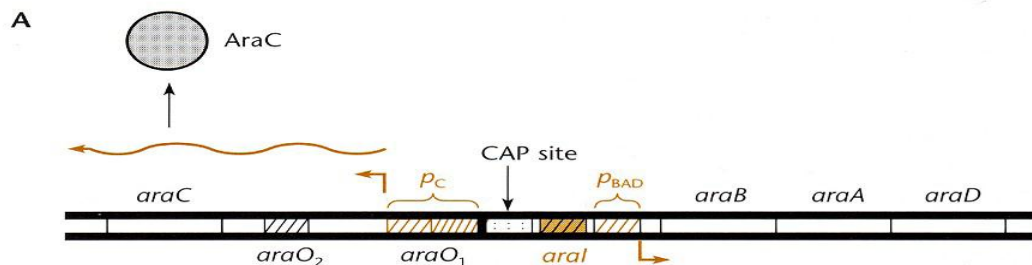


Vlastnosti lac operonu

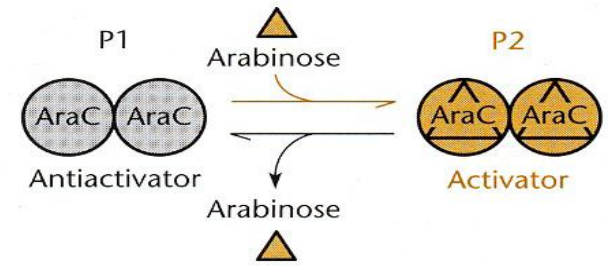
- LacI se váže na tři místa operátoru o1, o2, o3
 - ▣ o1 – nejdůležitější
 - ▣ delece o2 a o3 snižuje efektivitu regulace transkripce 50 x
 - ▣ represor se váže zároveň na dva operátory ve formě homotetrameru
- zároveň regulován katabolickou represí – reprimace v přítomnosti glukosy –
 - ▣ CAP protein (catabolite activator protein) a cAMP- vazebné místo v blízkosti o1
- LacI represor – používán jako represor i v jiných bakteriích
 - ▣ je velmi stabilní
- LacP – používán v mnoha expresních vektorech – řízená exprese
 - ▣ mutace UV5 ztráta sensitivity ke glukóze
- *lacZ* – reportérový gen

ara operon - pozitivní regulace

- *ara* operon – první objevený jako pozitivně regulovaný
 - ▣ konverze L-arabiny na D-xlulose-5-fosfát – vstup do metabolismu
 - ▣ 3 strukturální geny (*araBAD*)
 - ▣ jeden promotor – *pBAD*
 - ▣ aktivátorové místo – *araI* – vazba *araC* aktivace transkripce v přítomnosti arabinosy
- genetická evidence pozitivní regulace -
 - ▣ ztráta regulačního proteinu – jiný fenotyp
 - delece v *araC* – superreprese fenotypu –
 - geny operonu nejsou transkribovány ani v přítomnosti induktoru
 - X u *lacI* – konstitutivní exprese
 - rozdíly ve frekvenci konstitutivních mutant - u pozitivní regulace velmi řídké



Ara- operon



- mutace v *araC*, které způsobují konstitutivní utilizaci arabinózy
 - nízká frekvence - trik na jejich izolaci -
 - použití anti-induktoru – D-fukóza
 - brání vazbě arabinózy na AraC - neváže se na promotor
 - selekce v přítomnosti D-fukózy
 - WT netvoří kolonie na arabinóze
 - konstitutivní mutanty ano - ($AraC^C$)

Původní model – pozitivní regulace:

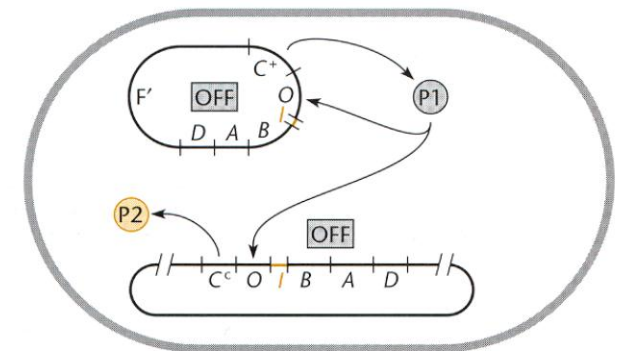
Předpoklad:

- AraC ve dvou stavech
 - P1 (v nepřítomnosti ara)
 - P2 (v přítomnosti ara)
- vazba AraC na promotor v P2 formě
- ($AraC^C$) v P2 formě i v nepřítomnosti arabinosy
 - podle modelu pozitivní regulace – dominantní k WT

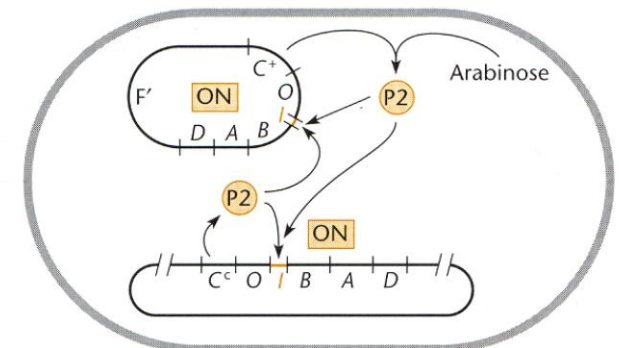
Výsledek:

- aktivace P2 i v přítomnosti WT P1 formy
- komplementační studie s WT na F' - recesivní
- jiný model regulace

A Absence of arabinose



B Presence of arabinose

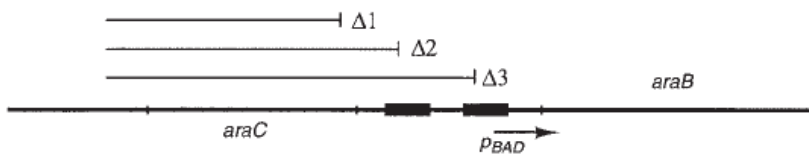
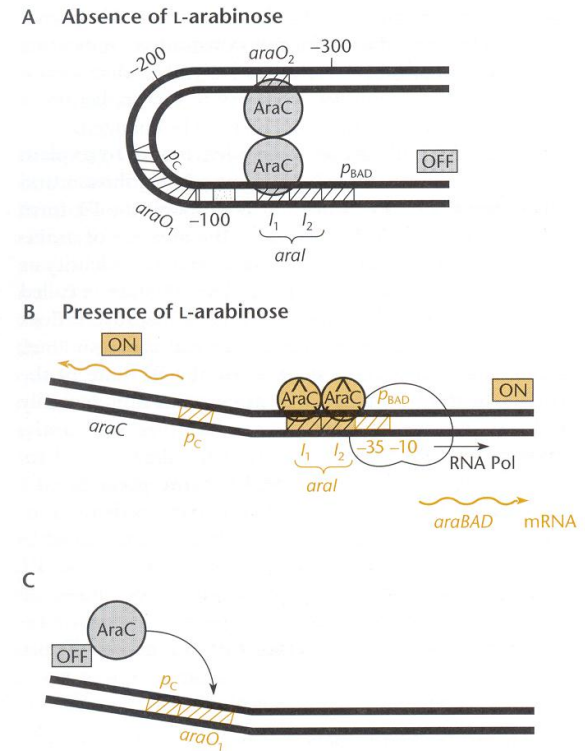


ara operon

- negativní regulace

- negativní regulace ara operonu
 - araC v P1 formě se váže na jiné místo operátoru a zabraňuje transkripci

- Robert Schleif: AraC protein: a love-hate Relationship.
BioEssays 25:274–282, 2003



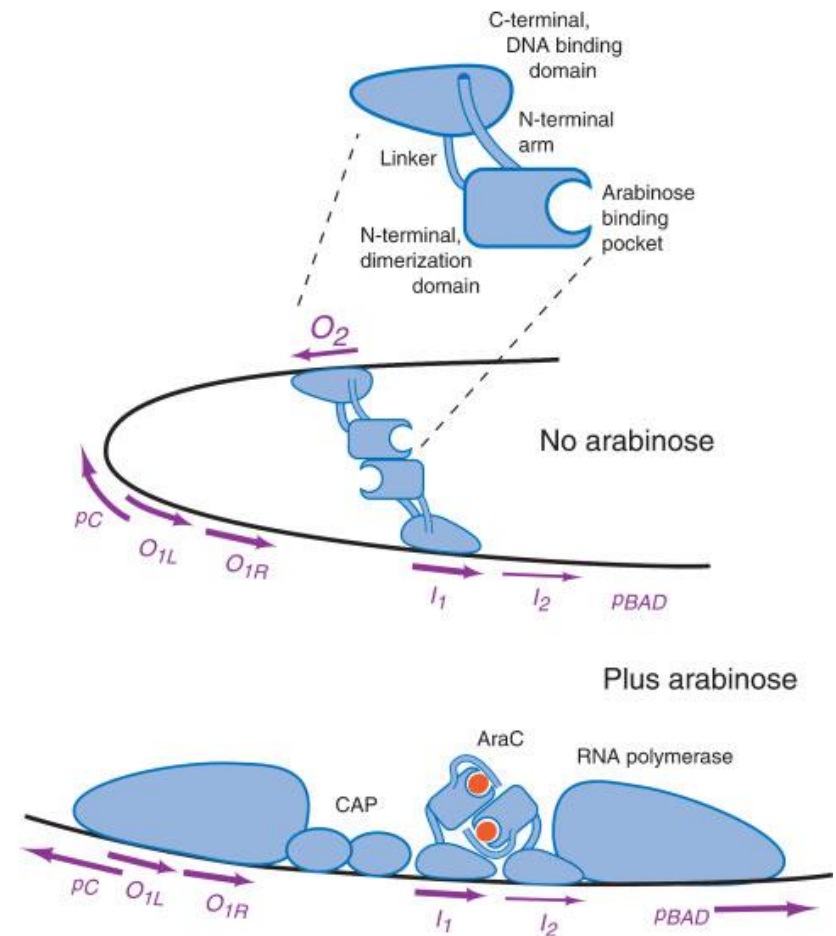
Level of *ara* expression

	$\Delta 1$	$\Delta 2$	$\Delta 3$
No AraC present	<1	<1	<1
AraC provided <i>in trans</i>	1	20	<1
AraC provided <i>in trans</i> + arabinose	200	200	<1

Figure 3. The deletions that suggested the existence of repression of *p_{BAD}* that is dependent on an upstream DNA site. When a strain containing deletion two is provided with AraC *in trans*, the *p_{BAD}* promoter is normally inducible by arabinose but, surprisingly, in the absence of arabinose, the promoter possesses the elevated basal level of 20. The behaviors of the deletions one and two demonstrate the presence of an element lying between their endpoints whose absence leads to the elevated basal level.

Model ara - operonu

- Robert Schleif: AraC protein: a love–hate Relationship. *BioEssays* 25:274–282, 2003
- Ara operon – použití v biotechnologiích
 - para v expresních vektorech místo plac
 - lépe regulován
 - lepší regulace též katabolickou represí



Kombinovaná regulace

- Dvě funkce regulátorů

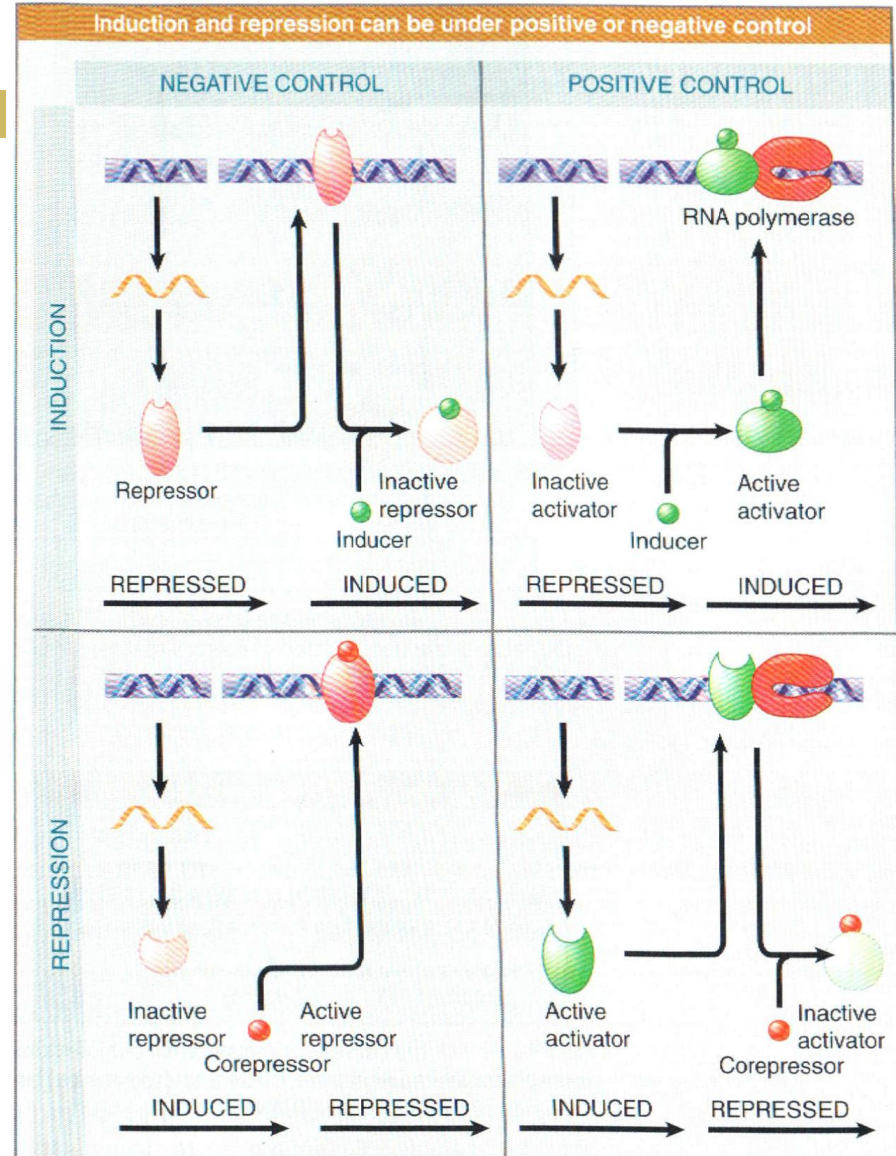
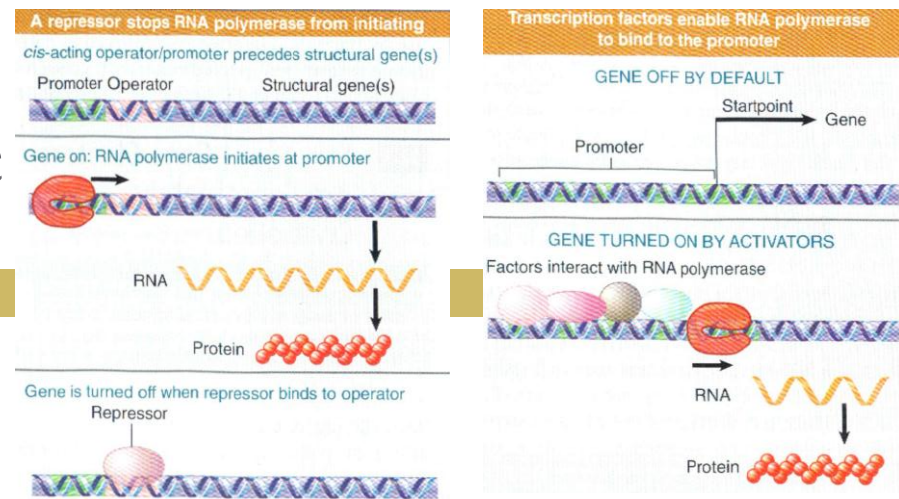


FIGURE 12.27 Control circuits are versatile and can be designed to allow positive or negative control of induction or repression.

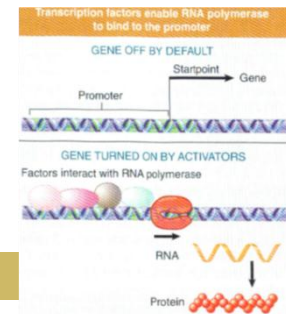
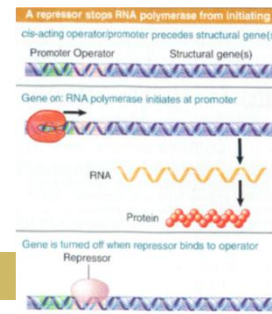
Regulace transkripce



Genetická evidence negativní a pozitivní regulace

- deleční mutanty v regulačních genech operonů se chovají rozdílně
- **negativní regulace** –
 - ▣ konstitutivní transkripce
 - transkripce operonu i v nepřítomnosti induktoru
- **pozitivní regulace** –
 - ▣ konstitutivní deprivace
 - inhibice transkripce genů operonu i v přítomnosti induktoru

Regulace transkripce



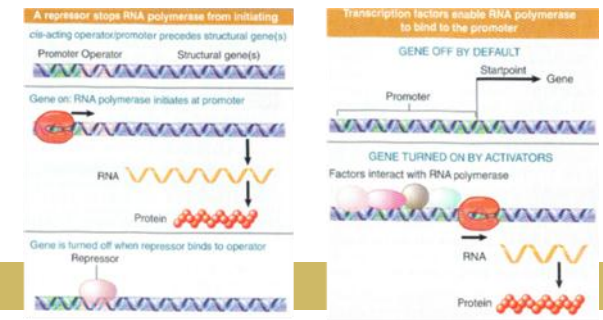
□ Genetická evidence negativní a pozitivní regulace

- Bodové mutace – mutanty s různými vlastnostmi
- Chování v komplementačních testech

■ konstitutivní mutant – mutant u něhož jsou geny operonu transkribovány vždy

- negativní regulace – častější –
 - **jakákoliv mutace, která inaktivuje represor nebo jeho vazbu na operátor**
 - recesivní k WT – regulační WT protein se váže na operátor mutantu – trans acting
- pozitivní regulace – málo časté -
 - **mutace, která mění pouze vazbu induktoru, vazba na operátor musí být zachována**
 - dominantní k WT – u mutantního aktivátoru je zachována vazba na promotor -

Regulace transkripce



□ Genetická evidence negativní a pozitivní regulace

□ **Deprivační mutant** – mutant u něhož nejsou geny operonu transkribovány bez ohledu na přítomnost aktivátoru

□ Negativní regulace

□ méně časté – mutace v místě vazby aktivátoru (laktoza) –

□ dominantní k WT

□ Pozitivní regulace

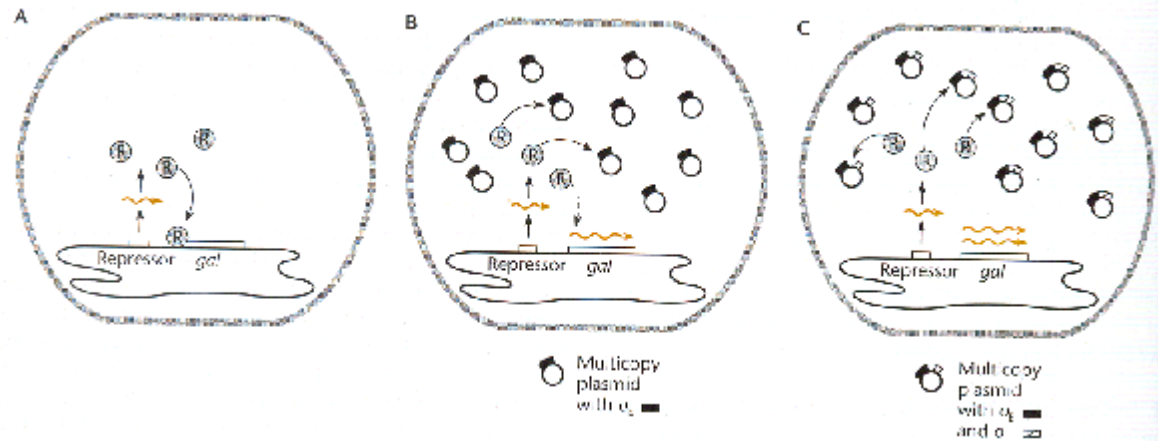
■ jakákoliv mutace bránící vazbě na operátor - časté

■ recesivní k WT -

Genetický důkaz gal operonu

- izolace mutant v operátoru
- Mutace v o1 - kolekce konstitutivních mutant gal operonu
 - izolace z kmenů se super represorovou mutací galRS analogie lacI^S
 - mutace-dominantní trans - mění represor tak že nemůže vázat induktor
 - pokud mutanty v operátoru -zabraňují vazbu represoru na operátor
 - konstitutivní mutanty transkribující i v nepřítomnosti gal
- pokud galR^S mutanty rostou na galaktóze jako jediném zdroji C
 - většina v galR represoru - další mutace znemožňující vazbu na operátor
 - některé v operátoru zabraňující vazbu na operátorové místo
- redukce počtu mutací v galR
 - použití diploidních buněk v galRS-
 - pouze dvě nezávislé mutace v galR změní buňku v konstitutivní
 - dvě nezávislé mutace jsou méně časté než mutace v operátoru
 - identifikace mutací v operátoru
 - komplementace a důkaz cis-acting

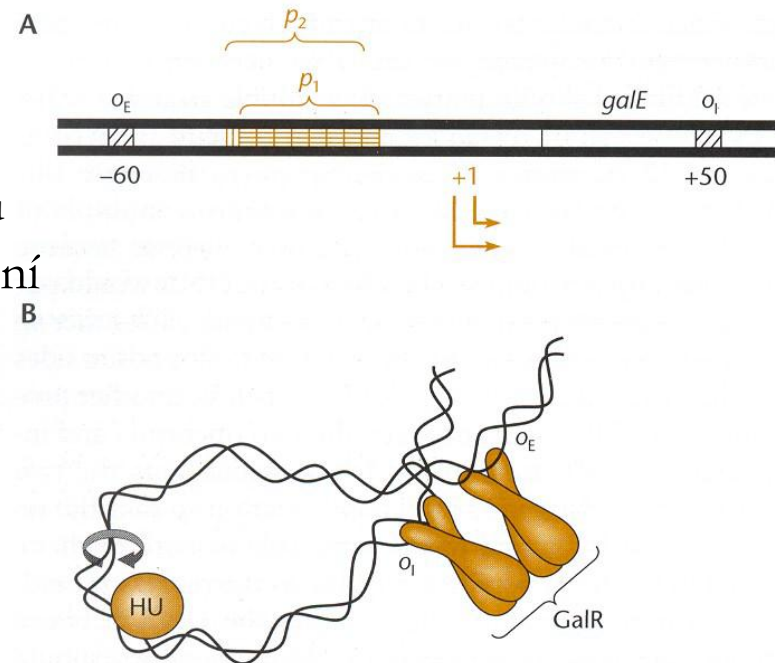
Genetický důkaz gal operonu



- důkaz, že mutace v o_1 (uvnitř strukturního genu $galE$) je mutace v operátoru
 - průkaz schopnosti vázat GalR
 - DNA obsahující $galE$ je naklonována do multikopiového plazmidu
 - transformována do buněk pak tyto buňky obsahují mnoho kopií $galE$ genu
 - pokud je operátorové místo – vyváží se všechny molekuly galR – nereprimuje se transkripce – konstitutivní transkripce
 - titrace – metoda, kdy se syntetizuje operon neboť je operon „osvobozen“, od vlivu represoru (escaping synthesis)
 - v gal operonu pouze částečně konstitutivní mutanty
 - ještě jeden operátor – obě oblasti na jednom plazmidu
 - záleží na vzdálenosti

Geneticky důkaz gal operonu

- důkaz dvou operátorových míst
 - stejná sekvence – stejný protein
 - rozeznává stejnou strukturu na DNA
 - 10 bp vzdáleny – stočení DNA – aby se represor nevázal na opačné strany operátoru
- HU protein – vazba mezi operátory a stáčení DNA – histon like protein
 - experimentálně se dokazuje vkládáním extra DNA mezi operátory
- represosome –
 - struktura DNA, HU proteinu a homotetrameru represoru navázaného na operátory
- □ (Geanakopulos et al. Nat.Struct.Biol. 8, 432, 2001)

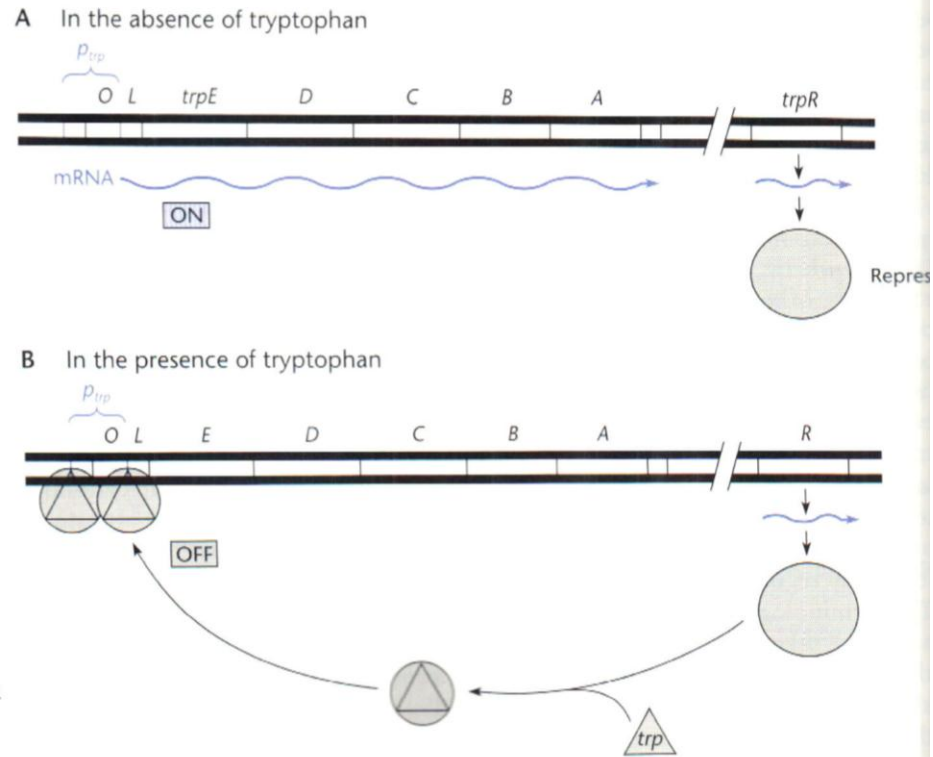


Biosyntetické operony

- regulace opačná než u degradativních operonů (lac, gal,)
 - enzymy biosyntetické dráhy nejsou syntetizovány v přítomnosti koncového produktu biosyntetické dráhy
 - konstitutivní mutanty takové, které syntetizují produkt i v jeho přítomnosti
 - represor – regulační protein
 - korepresor – efektor vážící se na represor a usnadňující vazbu na operátor
 - konečný produkt syntetické dráhy
 - aporepresor – v nepřítomnosti korepresoru je represor neaktivní
 - represor bez korepresoru

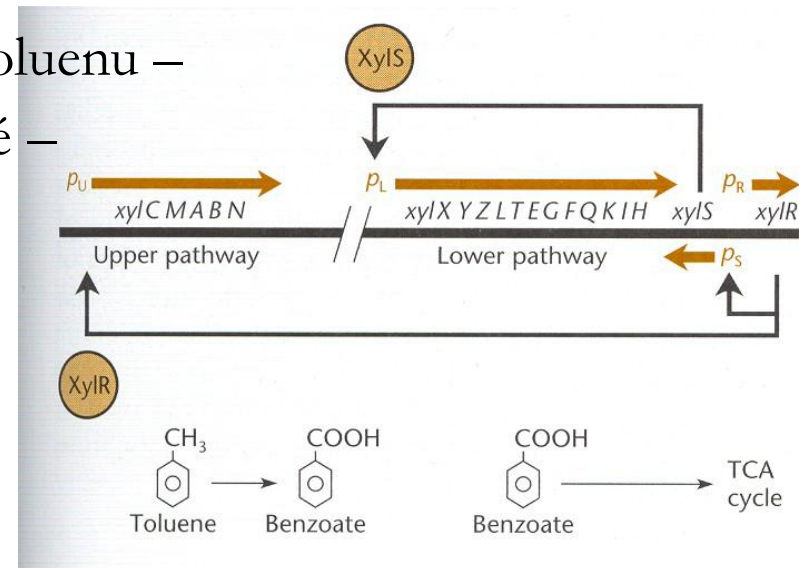
Tryptofanový operon

- 5 strukturních genů –
 - syntéza tryptofanu z chorismové kyseliny
 - jeden promotor – p_{trp} –
 - negativně regulovaný represorem TrpR
 - v nepřítomnosti tryptofanu – aporepresor –
 - probíhá transkripce
 - v přítomnosti tryptofanu – korepresor
 - – vazba na operátor
- izolace mutant v operátoru stejná jako u lac, gal operonu

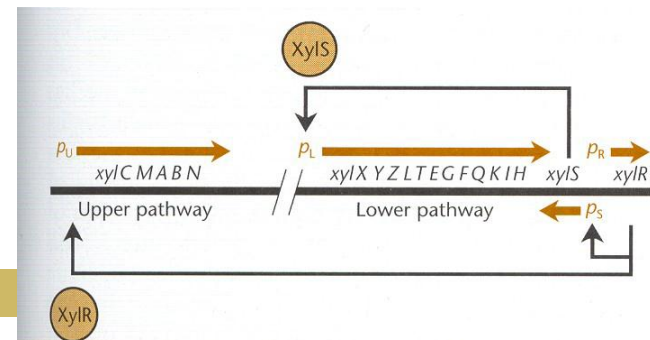


Pozitivní regulace

- ***tol* operon** – degradace cyklických uhlovodíků
 - ▣ na plazmidu pWWO *Pseudomonas putida*
 - ▣ degradace toluenu, xylenů a chlorovaných derivátů (katecholy)
 - ▣ dva operony -
 - „upper“ dráha – toluen na benzoát
 - „lower“ dráha – štípe benzoátový
 - ▣ regulace – pozitivní v přítomnosti toluenu –
 - ▣ Obě dráhy koordinované a nezávislé –
 - ▣ dva aktivátory
 - XylR – NtrC rodina aktivátorů
 - XylS – LysR rodina aktivátorů



tol operon – genetické studie



- přenesení plazmidu do *E. coli*
- mutagenese plazmidu Tn5 a přeneseno zpět do *P. putida*
- stanovení fenotypu – inaktivace genů umožňující růst na toluenu
- lokalizace mutace a sekvenace
- analýza regulace
 - klony které nemají xylS nemohou exprimovat geny dolní dráhy i v přítomnosti benzoátu
 - xylS – pozitivní regulátor dolního operonu
 - klony nemající xylR – neexprimují horní operon a xylS je transkribován s nižší rychlostí
 - xylR je pozitivní aktivátor horního operonu a xylS
 - pokud xylS nadprodukován –
 - aktivace dolní dráhy i v nepřítomnosti benzoátu
 - XylS – aktivuje transkripci dolní dráhy v nepřítomnosti benzoátu pokud je přítomen v nadbytku

tol operon – genetické studie

- rozšíření substrátové specifity tol operonu
 - metodami genetické selekce
 - zvýšení rozsahu induktorů
 - technikou genové fúze
 - prováděno v *E. coli* – XylS protein může aktivovat dolní dráhu i v *E. coli*
 - pL promotor byl fúzován s tetracyklinovou resistencí na plazmidu
 - transformace do *E. coli* s plazmidem exprimující XylS protein
 - v přítomnosti benzoátu – tetracyklin rezistentní
 - mutageneze *E. coli* s oběma plazmidy
 - selekce na tetracyklin v přítomnosti alternativních substrátů
 - 4-ethyl benzoát
 - většinou konstitutivní mutanty – exprese i v nepřítomnosti induktoru
 - některé reagující na pozměněný aktivátor
 - sekvenace – **mutanty v *xylS* použity k vytvoření mutanta**

Komplexní promotory

- globální regulační mechanismy
- regulační systémy regulující současně několik operonů
- **nutriční limitace** –
 - katabolická represe (crp – lac, ara, gal, mal)
 - limitace dusíku – (rpoN – glnA, degradace aa)
 - limitace fosforu – (phoBR – 38 genů – phoA, pst system)
- **limitace růstu** -
 - stringentní odpověď (nedostatek aminoacyl-tRNA – relA, spoT – rRNA, tRNA)
 - stacionární fáze – rpoS – 40 genů -
 - limitace kyslíku – fnr – 31 genů – nitrát reduktáza
- **stres** -
 - osmoregulace kdpDE – transport draslíku
 - atd

Komplexní promotory

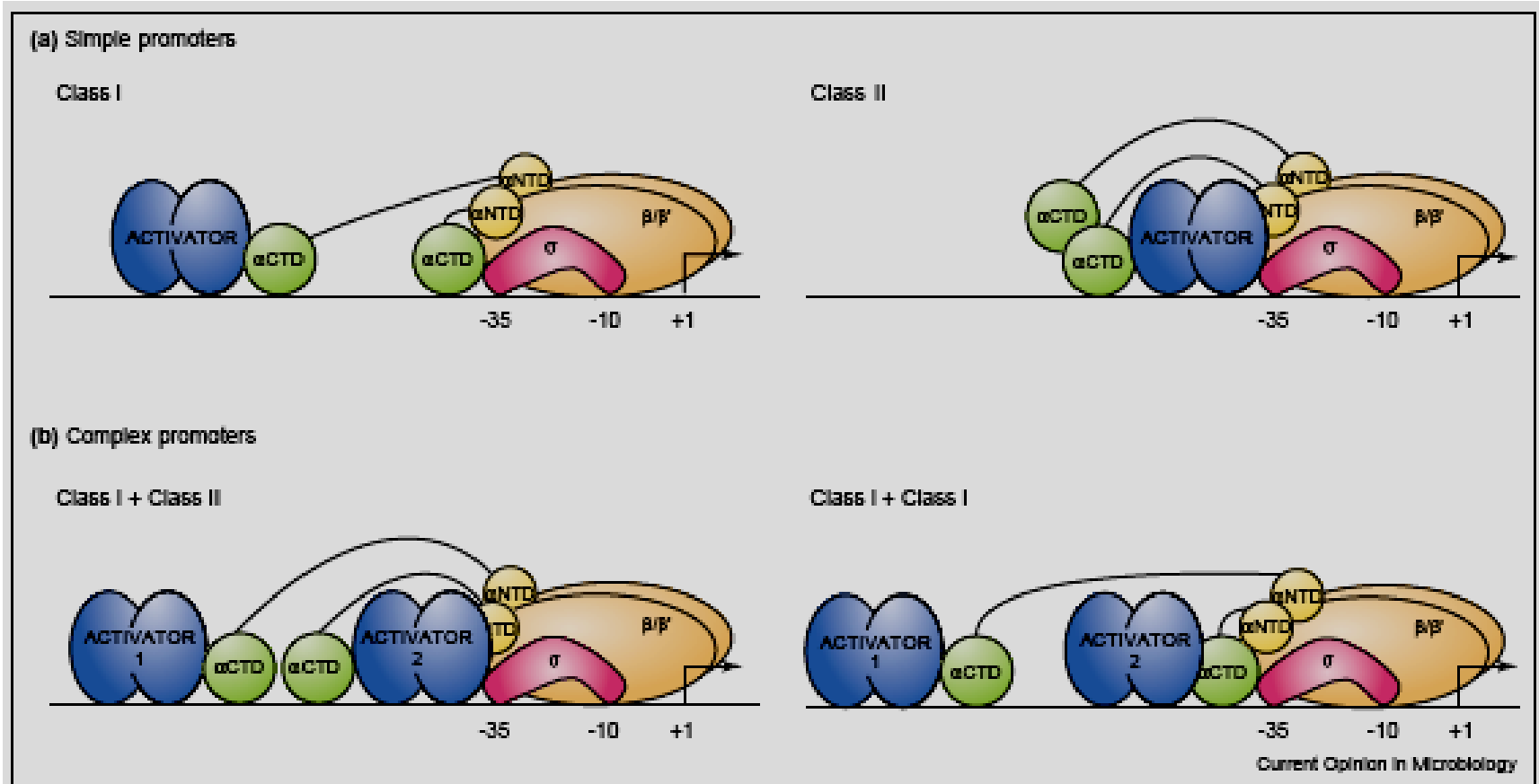
- Současný přístup – komparativní genomika –
 - Identifikace represorů a aktivátorů ve všech bakteriích
 - Patří do limitního počtu rodin
 - Na základě sekvenční a strukturní podobnosti
 - Stejné motivy vazby k DNA – helix-turn-helix, winged HTH, looped-hinge helix, zinc finger motif
 - 15 rodin aktivátorů a represorů – název podle 1. objevený
 - LacI – represory z utilizace cukrů
 - TetR – tet R v Tn10 – 100 druhů – ATB rezistence a syntéza, osmo regulace , efluxní pumpy, virulentní geny, moduluje DNA
 - AraC – 100 druhů – utilizace cukrů, tol operon (XylS), stresové odpovědi (SoxS)
 - NtrC – aktivace pouze se sigma 54, Tol operon (XylR), aktivace ATP

Komplexní promotory

- několik typů interakcí aktivátoru s operátorem a RNAP
 - aktivátor přímo interaguje s RNAP – posílení vazby na promotor přímou protein-protein interakcí s C koncem α podjednotky RNAP
- dva typy interakce I. třída a II. třída
 - λ cI, CRP (cyclic AMP binding protein),
 - MerR rodina aktivátorů (Tn21)
 - Nir operon (nitrite reductase) – IHF a Fis protein
 - alternativní mechanismus – změna konformace promotoru – lepší rozeznání RNAP
- I. třída – interakce aktivátoru s upstream lokalizací DNA (-61, -71, -81, nebo -91) a C-terminální doménou α podjednotky RNAP
- II. třída – aktivátor se váže na promotorové -35 místo
- komplexní promotory
 - kombinace obou typů
 - současná regulace aktivátorem s druhým aktivátorem (*E.coli* proP)
 - současná regulace aktivátorem a represorem (*E. coli* ara operon)

Komplexní promotory

- Current opinion in Microbiology 2004, 7, 102

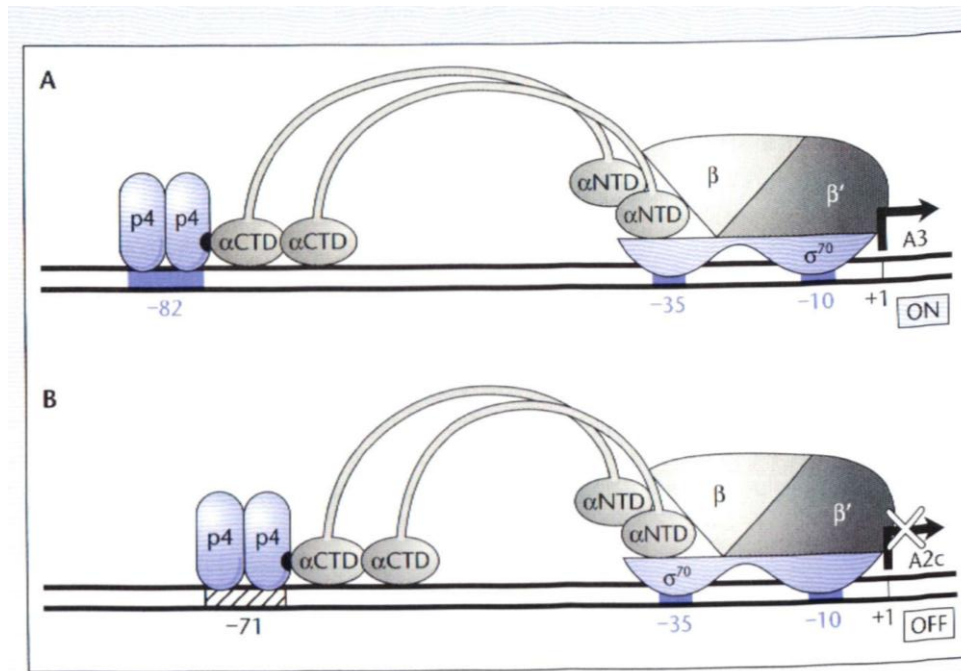


Komplexní promotory

- Represory – působí na iniciaci transkripce
 - Zabraňují vazbě RNAP na promotor
 - Sterické bránění
 - Ohyb DNA
 - Zabraňují RNAP separaci vláken DNA – vytváření otevřeného komplexu
 - Zabraňují pohybu RNAP z promotoru – promoter escape

Komplexní promotory

- Příklady - promoter escape
 - P4 – *Bacillus subtilis* bakteriofág – vytváří tak silný promotor, že RNAP jej nemůže opustit

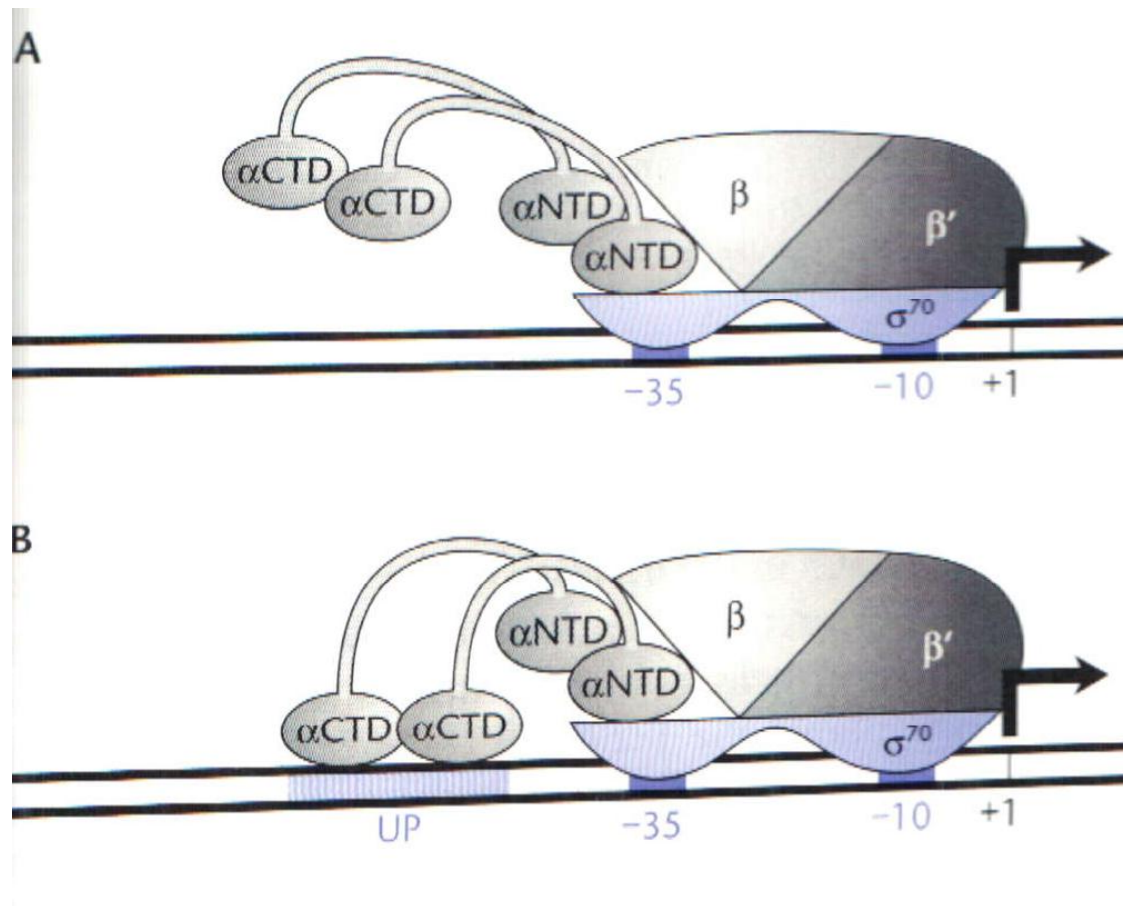


Komplexní promotory

- Aktivátory – iniciace transkripce
 - ▣ Zesílení promotoru
 - ▣ Stabilizace RNAP komplexu
 - ▣ Některé vazba na RNAP před vazbou na DNA – SoxS,
 - ▣ Umožňují RNAP vazbě na promotor – NtrC
 - ▣ Remodelace promotoru – vytvořením denaturační smyčky – „zkrácení“ promotoru

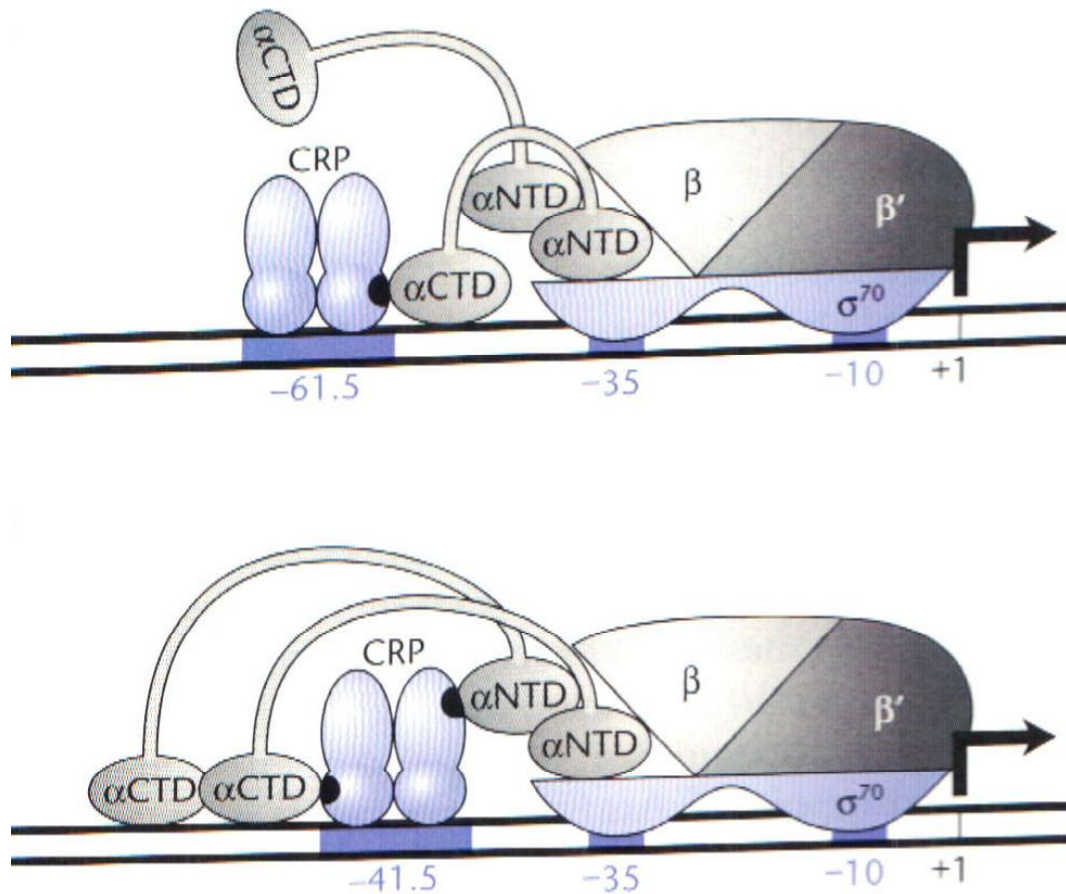
Komplexní promotory

- Příklady – sigma 70 bez aktivátoru



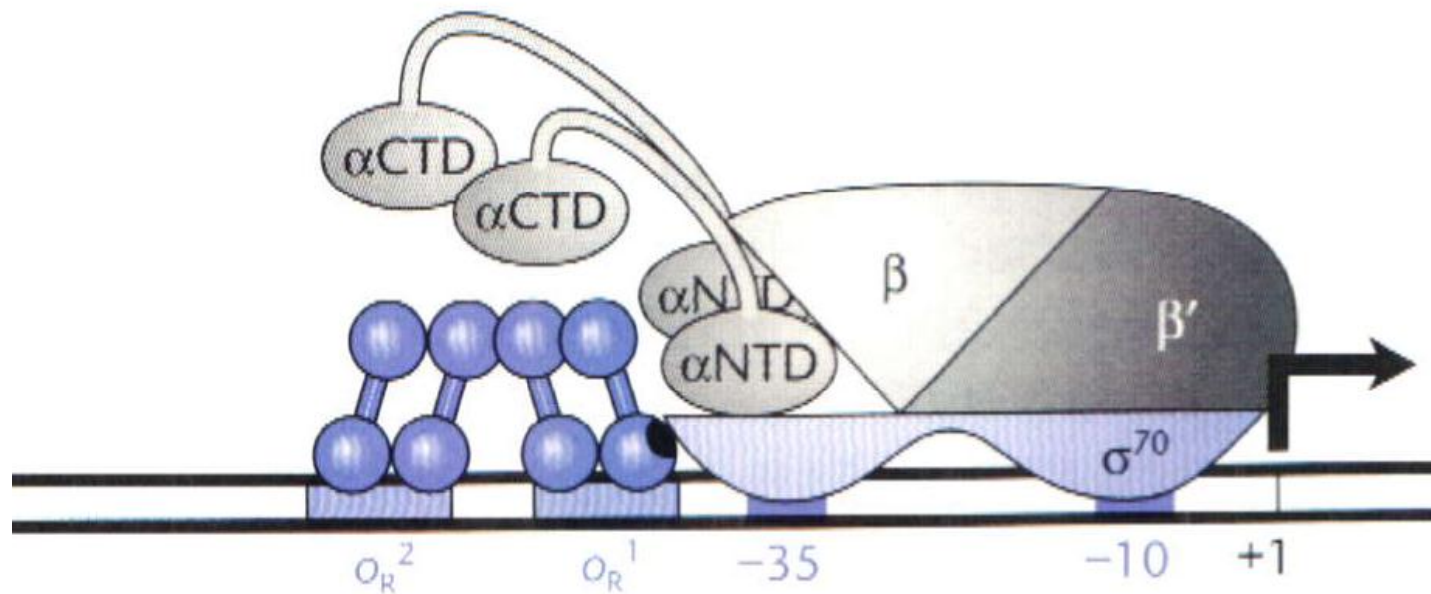
Komplexní promotory

- Příklady – CRP – protein – cAMP vazebný protein



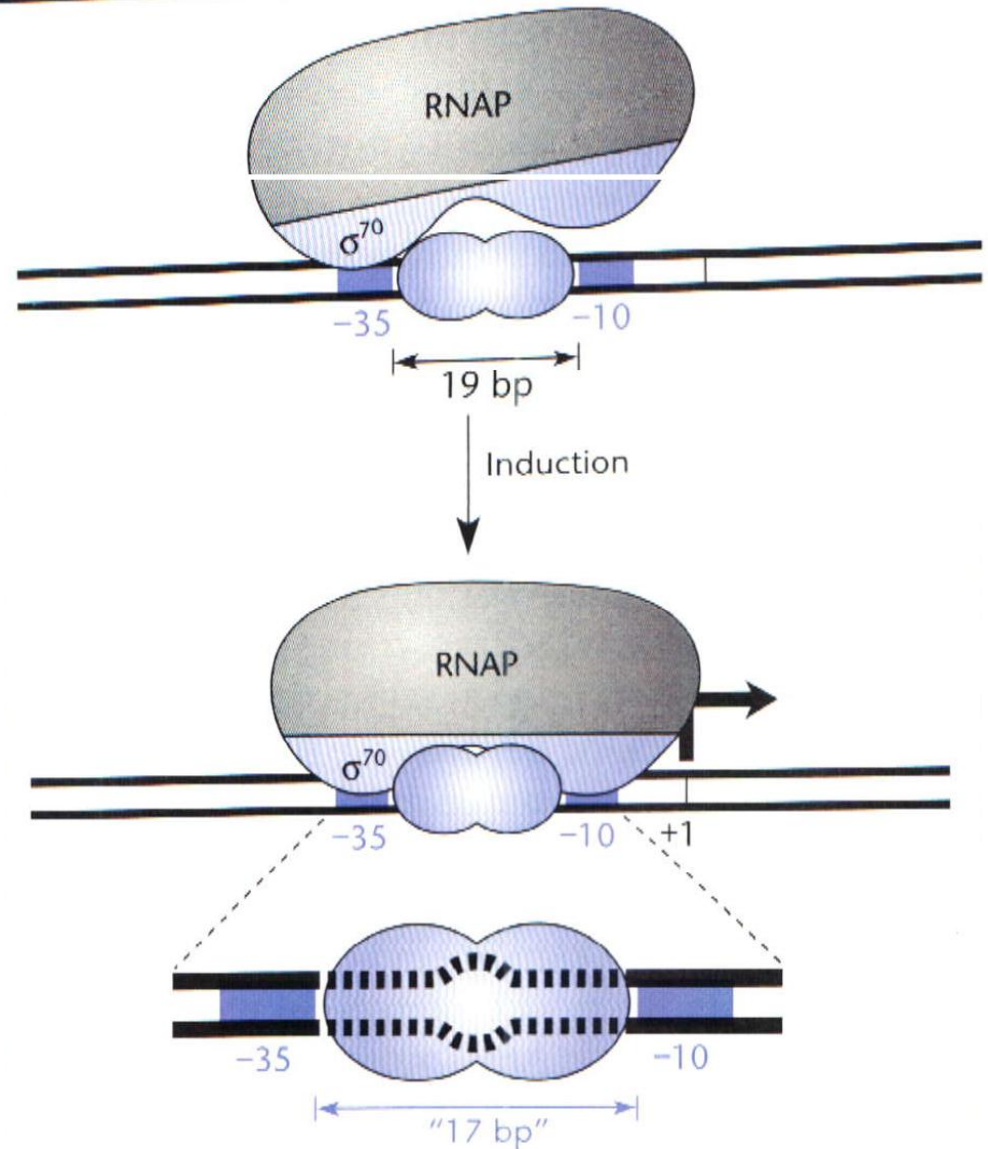
Komplexní promotory

- Příklady – c1 z lambda fága – aktivace z pRM promotoru



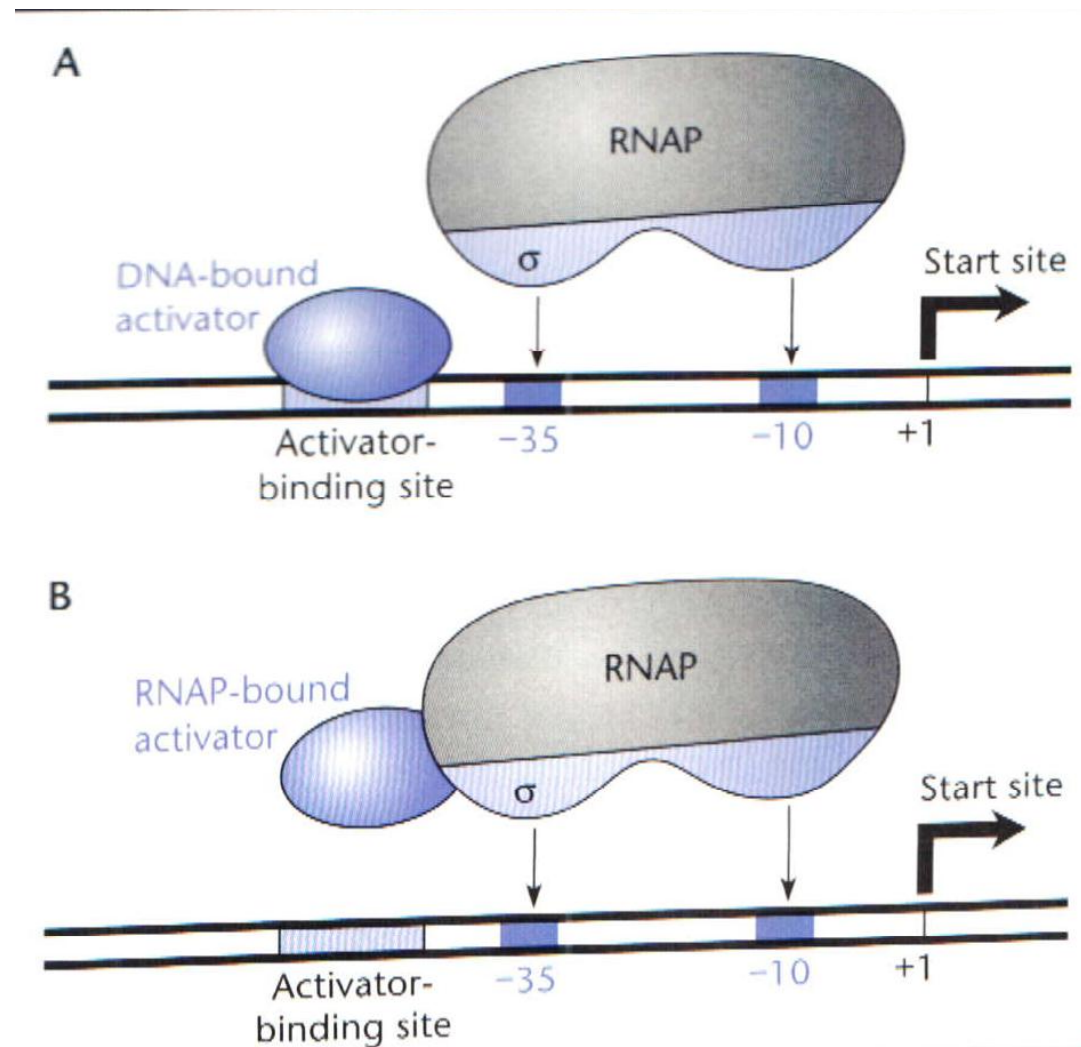
Komplexní promotory

□ Příklady - NtrC



Komplexní promotory

- Příklady – „zkrácení“ promotoru



Komplexní promotory

- Fis dependentní aktivace proP P2 promotoru (J.Mol.Biol.(2002) 316, 517-529)
 - transportér pro prolin, glycin-betain
 - dependentní na Fis proteinu a rpoS (sigma faktor pro stacionární fázi)
 - Fis – transkripční faktor exponenciální fáze – participuje na regulaci rekombinace a replikace
 - na proP P2 se váže na -41 místo (mechanismus II. typu)
- důkaz interakce s α CTD a identifikace místa interakce *in vivo*
 - kolekce mutant v α podjednotce RNAP
 - testována schopnost exprese proP z P2 promotoru
 - mutanty obsahující plasmid s bodově mutovanou (alanin) α podjednotkou RNAP a profága obsahující proP P2 fúzi s lacZ
 - stanovení β -galalktozidázové aktivity v jednotlivých mutantech - graf

□ Alanine α CTD mutanty

