

# Regulace genové exprese u prokaryot a jejich virů

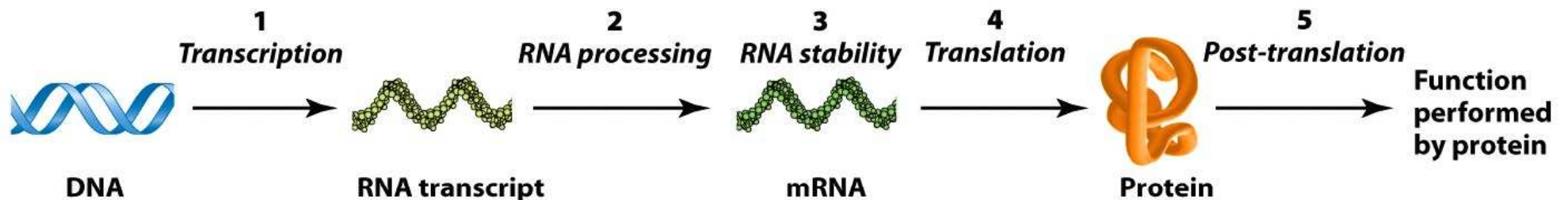
## Osnova přednášky:

- konstitutivní, inducibilní a represibilní genová exprese
- pozitivní a negativní regulace genové exprese
- operóny: koordinovaně regulované jednotky genové exprese
- laktózosý operón u *E. coli*
- tryptofanový operon u *E. coli*

# Regulace genové exprese u prokaryot

- základ jejich schopnosti adaptace na nejrůznější podmínky vnějšího okolí
- zapínání a vypínání různých sad genů podle toho, zda jsou jejich produkty potřebné nebo ne
- úspora energie buňky
- několik regulačních úrovní, u prokaryot hraje hlavní roli regulace transkripce

## Levels at which gene expression is regulated in prokaryotes



# Regulační mechanismy u prokaryot

- mechanismy, kterými dochází k rychlému zapnutí nebo vypnutí genové exprese v reakci na změny okolí
  - poskytují metabolismu plasticitu: dosažení maximálního růstu a reprodukce za nejrůznějších podmínek
- předprogramované okruhy nebo kaskády genové exprese
  - podnět ovlivní expresi určitého genu, jehož produkt ovlivní expresi sady dalších genů, jejich produkty zase další, atd.

# Konstitutivní, inducibilní a represibilní genová exprese

## Konstitutivní exprese

- stabilní (průběžná) exprese genů, které kódují složky buněk nutné pro udržování běžných- **provozních**- buněčných funkcí ("housekeeping functions")
- např. exprese genů pro rRNA, tRNA, ribozomové proteiny, RNA polymerázy, proteiny zapojené do proteosyntézy, enzymy katalyzující provozní funkce
- **konstitutivní geny** se takto exprimují ve většině buněk

# Konstitutivní, inducibilní a represibilní genová exprese

## Inducibilní/represibilní exprese

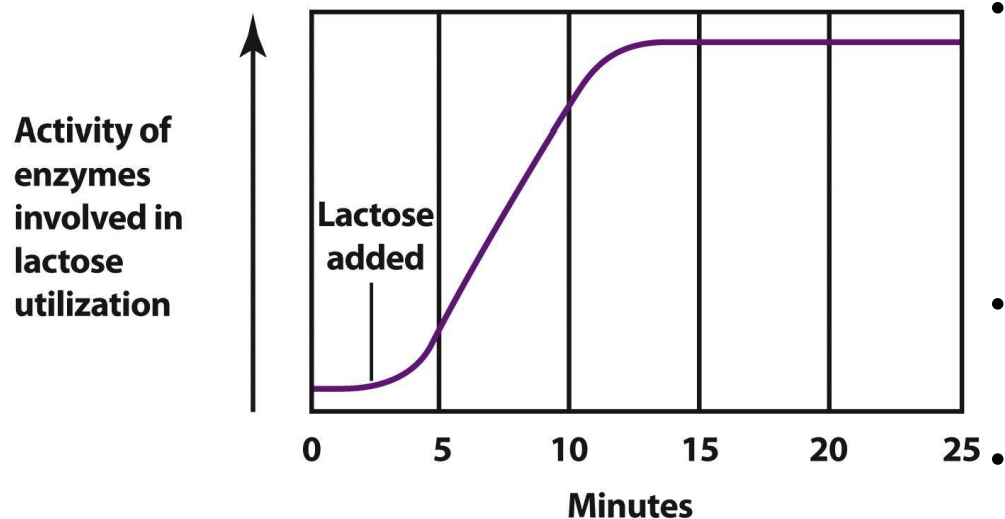
- genová exprese se zvyšuje nebo snižuje podle potřeby
- týká se (**inducibilních/represibilních**) genů, jejichž produkty jsou potřebné pouze za určitých podmínek
- syntéza těchto genů je pod kontrolou speciálních regulačních systémů
- konstitutivní exprese těchto genů by znamenala zbytečnou energetickou zátěž buňky (evoluční výhoda)

# Využití různých zdrojů energie u bakterií

- využitelných je několik uhlovodíků (např. glukóza, sacharóza, galaktóza, arabinóza, laktóza)
- je-li k dispozici, *E. coli* preferuje využití **glukózy**
- **za přítomnosti laktózy a nepřítomnosti glukózy** se buňky *E. coli* rychle přizpůsobí:
  - zahájí syntézu dvou enzymů:  **$\beta$ -galaktozidázy** a  **$\beta$ -galaktozidpermeázy**
  - $\beta$ -galaktozidpermeáza zajistí transport laktózy do buňky
  - $\beta$ -galaktozidáza laktózu štěpí na glukózu a galaktózu
  - za nepřítomnosti laktózy v okolí, buňky *E. coli* tyto enzymy nesyntetizují

# Indukce genů pro využití laktózy

## Induction of enzyme synthesis



- exprese obou genů je za nepřítomnosti glukózy a přítomnosti laktózy indukována rychle
- proces zapnutí genové exprese látkou dodanou do prostředí, ve které buňka roste, se nazývá **indukce**
- geny, jejichž exprese je takto regulována, se nazývají **inducibilní**
- indukce nastává na úrovni transkripce a mění počet molekul příslušných proteinů (nikoliv aktivitu proteinů již existujících)
- typickými **inducibilními enzymy** jsou enzymy zapojené do **katabolických** (rozkladných) drah

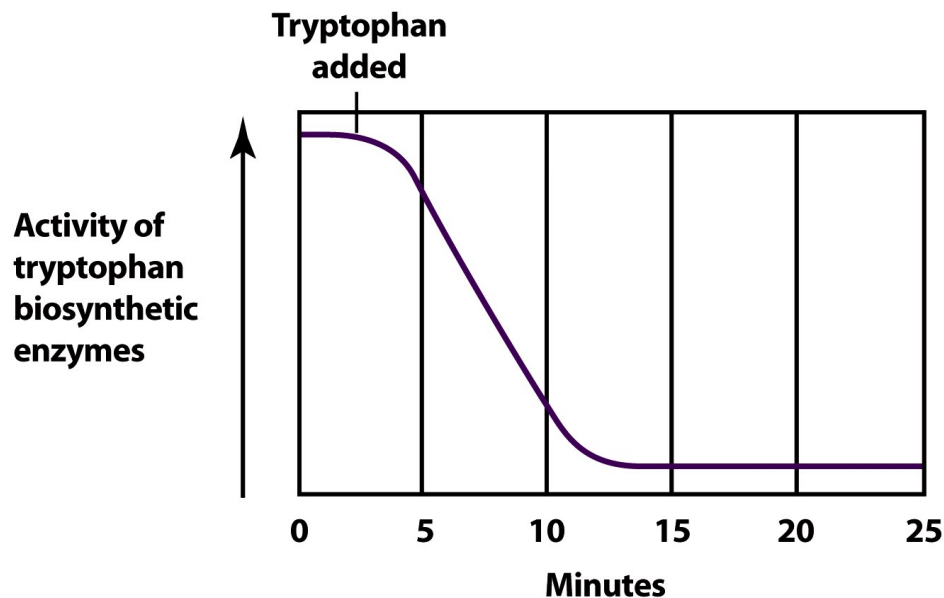
# Represe genů pro syntézu tryptofanu

- bakterie umí syntetizovat většinu organických molekul nutných pro svůj růst (aminokyseliny, puriny, pyrimidiny, atd.)
- např. v genomu *E. coli* je 5 genů kódujících enzymy zapojené do biosyntézy **tryptofanu**
- jejich exprese je nutná v prostředí postrádajícím tryptofan (pro zajištění proteosyntézy)
- v prostředí s tryptofanem je exprese těchto genů zbytečná, regulační mechanismy zajistí jejich **represi** (utlumení)
- za nepřítomnosti tryptofanu dojde k **derepresi** (zapnutí exprese příslušných genů)



# Represe genů pro syntézu tryptofanu

## Repression of enzyme synthesis



- **represe** nastává na úrovni transkripce
- enzymy zapojené do **anabolických** (syntetických) procesů jsou často **represibilní**
- represe není totéž, co negativní zpětná vazba (produkt biosyntetické dráhy inhibuje aktivitu prvního enzymu dráhy)

# Take home message

- u prokaryot se geny zajišťující provozní funkce (rRNA, tRNA, ribozomové proteiny) exprimují konstitutivně; ostatní geny se obvykle exprimují v závislosti na potřebnosti svých produktů
- geny, které kódují enzymy katabolických (rozkladných) drah se často exprimují inducibilně; pouze za přítomnosti příslušných substrátů
- exprese genů, které kódují enzymy anabolických (syntetických) drah se obvykle vypíná za přítomnosti koncového produktu této dráhy; jsou represibilní
- genová exprese může být regulována na mnoha úrovních, ale regulace transkripce je nejobvyklejší

# Pozitivní a negativní regulace genové exprese

- buňka disponuje **regulačními proteiny**, které dokážou indukovat nebo inhibovat expresi jednoho nebo více genů
- kódují je regulační geny
- **pozitivní regulační mechanismy** zapínají expresi strukturních genů
- **negativní regulační mechanismy** vypínají expresi strukturních genů
- v obou případech se mohou uplatňovat **inducibilní i represibilní** systémy

# Aktivátory a represory

- regulační proteiny se vážou na DNA do místa zvaného (RPBS, "regulator protein binding site") v sousedství promotoru strukturního genu
- u pozitivních regulačních systémů se regulační proteiny označují jako **aktivátory**, protože po vazbě na RPBS aktivují transkripci strukturních genů
- u negativních regulačních systémů se regulační proteiny nazývají **represory**, protože po vazbě na RPBS reprimují transkripci strukturních genů

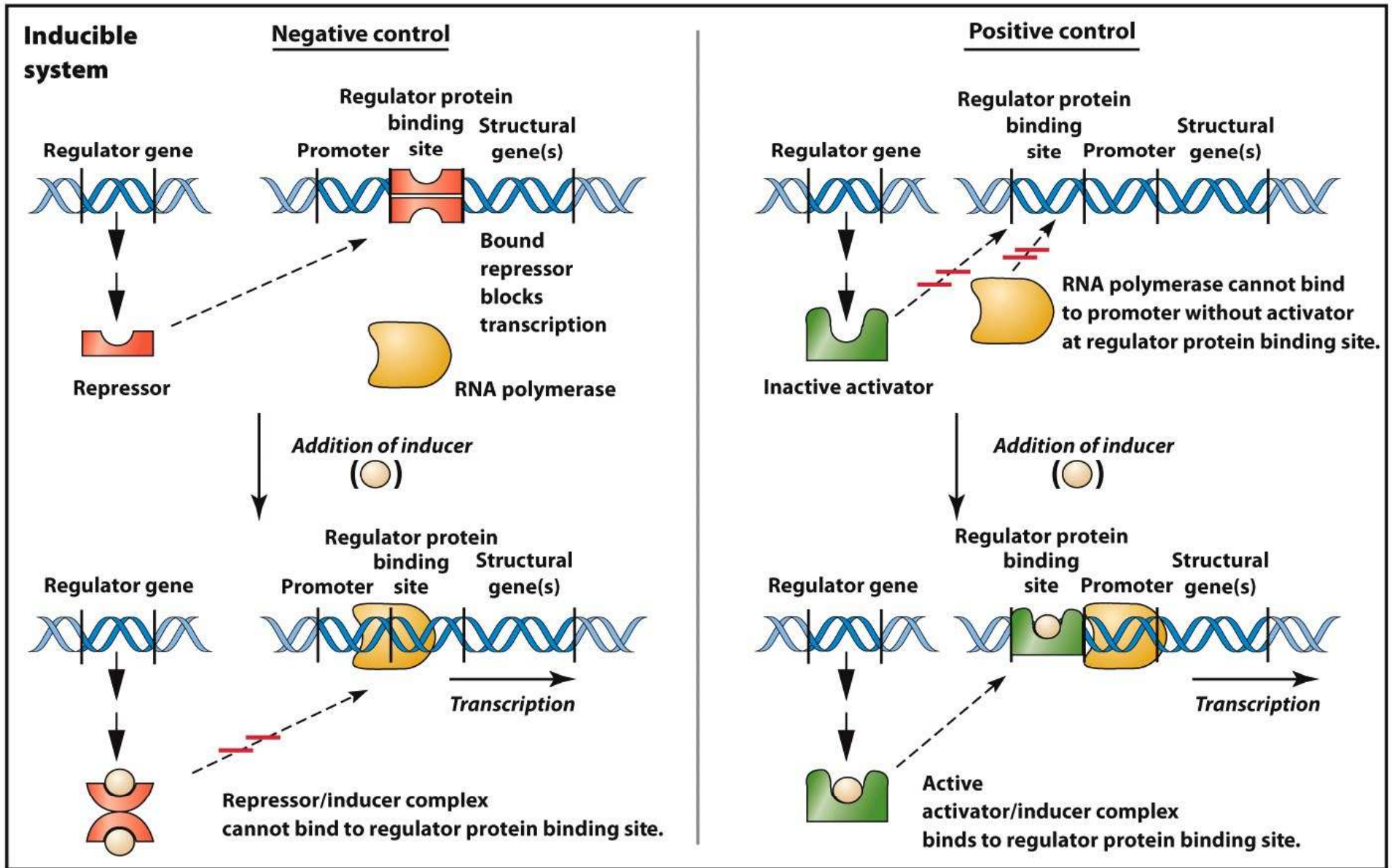
# Efektorové molekuly

- vazba regulačního proteinu do místa RPBS závisí na přítomnosti efektorových molekul
- efektorovými molekulami jsou obvykle malé molekuly (aminokyseliny, cukry, apod.)
- efektorové molekuly zapojené do indukce genové exprese se označují **induktory**
- efektorové molekuly zapojené do represe genové exprese se označují **korepresory**

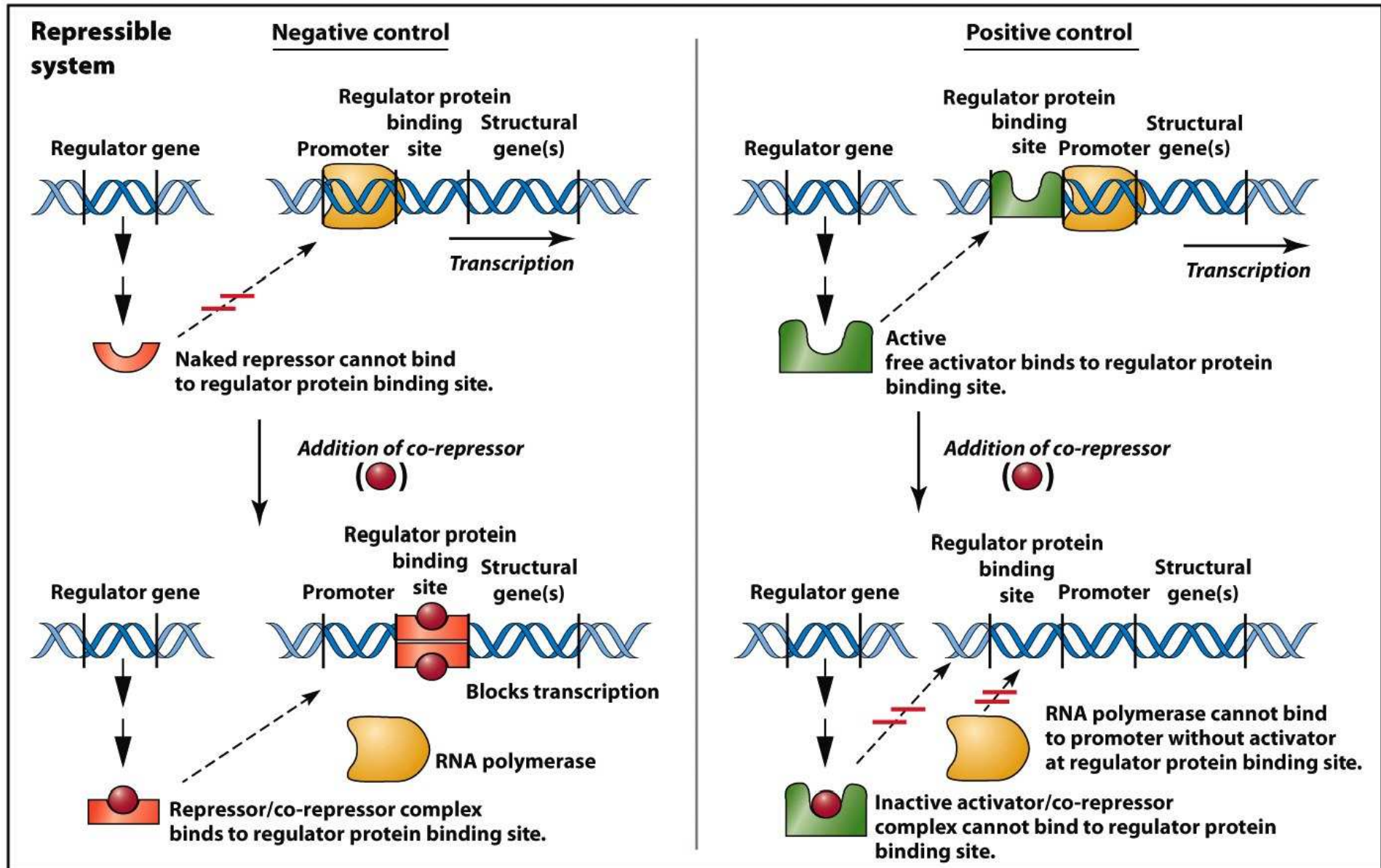
# Alosterické změny

- efektorové molekuly se vážou na regulační proteiny a způsobují změny jejich konformace, tzv. **alosterické změny**
- alosterické změny struktury regulačních proteinů vyvolané efektorů rozhodují o jejich schopnosti vazby na místa RPBS v DNA

# Inducibilní systémy



# Represibilní systémy





# Regulační mechanismy

- u pozitivních regulačních mechanismů se na aktivaci genové exprese podílí **aktivátor**
- aktivátor se nemůže vázat na RPBS za nepřítomnosti **induktoru**
- u negativních regulačních mechanismů se na vypnutí genové exprese podílí **represor**
- represor se nemůže vázat na RPBS za nepřítomnosti **korepresoru**

# Take home message

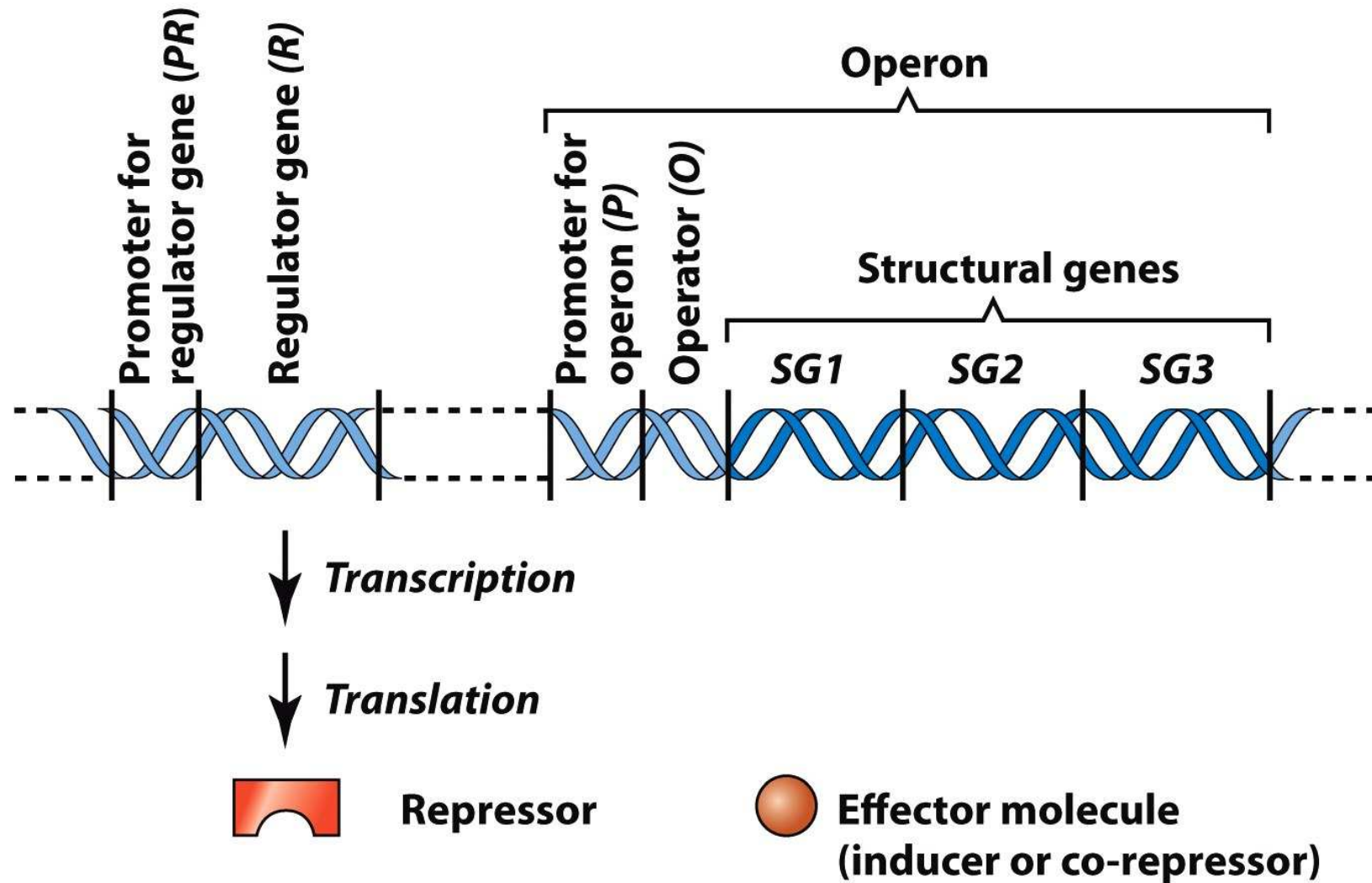
- genová exprese je řízena pozitivními a negativními regulačními mechanismy
- u **pozitivních** regulačních mechanismů je pro zapnutí exprese strukturních genů potřebný **aktivátor** (kódovaný regulačním genem)
- u **negativních** regulačních mechanismů je pro vypnutí exprese strukturních genů nutný **represor** (kódovaný regulačním genem)
- aktivátory a represory řídí genovou expresi tím, že se vážou do míst DNA v blízkosti promotorů strukturních genů
- o schopnosti vazby aktivátorů a represorů na DNA rozhodují malé **efektorové molekuly**, které s nimi vytvářejí komplexy
- efektorové molekuly se označují jako **induktory** u inducibilních systémů a **korepresory** u represibilních systémů

# Operóny: koordinovaná regulace genové exprese

- u prokaryot jsou geny s příbuznou funkcí často umístěny v jednotkách, které podléhají společné regulaci
- model **operónu** zavedli **Francois Jacob** a **Jacques Monod** v roce 1961
  - vysvětlení regulace genů nutných pro využívání laktózy u *E. coli*
  - transkripce sady strukturních genů je řízena dvěma kontrolními elementy: **represorovým genem a operátorem**
  - represorový gen kóduje represor, který se váže na sekvenci DNA, zvanou operátor
  - operátor je v blízkém sousedství sady genů, jejichž expresi řídí
  - vazbou represoru na operátor se vypíná transkripce celé sady genů
  - vazba je regulována přítomností nebo nepřítomností efektorové molekuly (induktoru nebo korepresoru)

# Model operónu

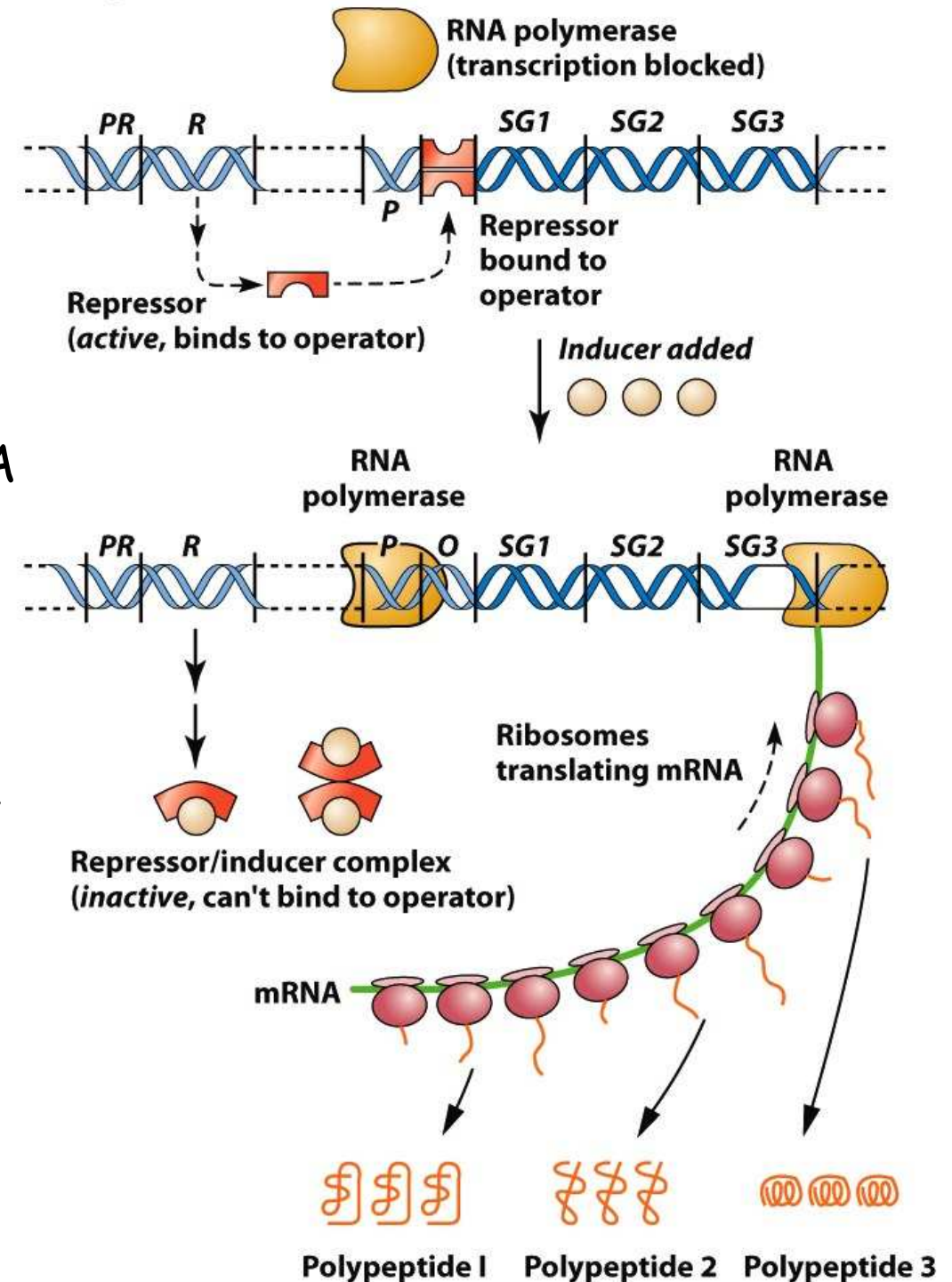
## The operon: components



# Inducibilní operón

- **volný represor se váže k operátoru** a tím stéricky brání RNA polymeráze iniciovat transkripci strukturálních genů - transkripce vypnuta
- **vazbou induktoru se represor inaktivuje** - ztratí schopnost vazby na operátor - transkripce zapnuta

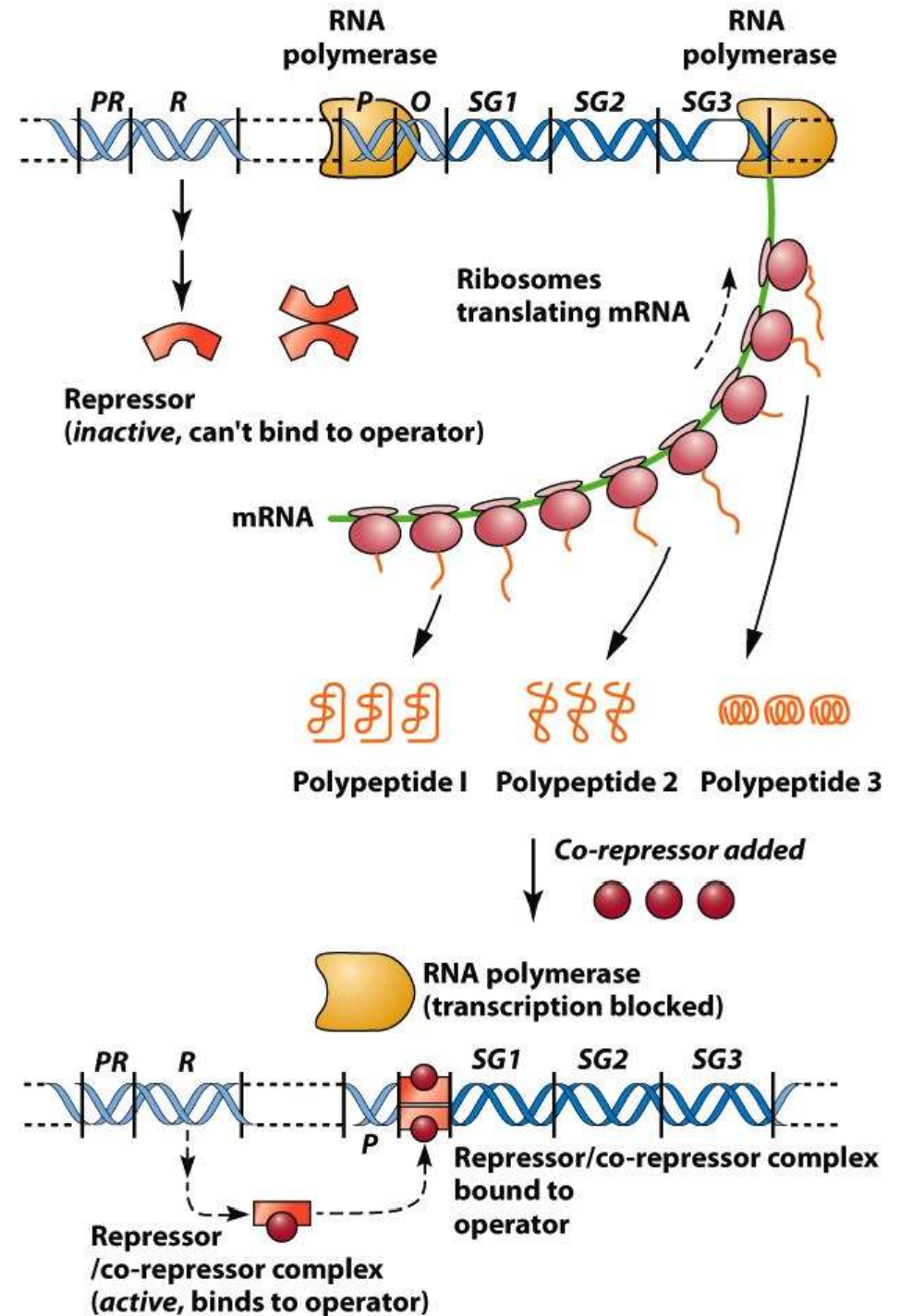
## The operon: induction



# Represibilní operón

- volný represor se nemůže vázat na operátor - transkripce zapnuta
- vazbou korepresoru na represor se obnoví schopnost vazby represoru na operátor - transkripce vypnuta

## The operon: repression



# Strukturní geny operónu: koordinovaná exprese

- operóny obsahující více než jeden strukturní gen jsou **multigenní**
- všechny strukturní geny operónu se transkribují jako jedna transkripční jednotka (koordinovaná exprese)
- produktem je molekula mRNA nesoucí transkripty všech genů operónu

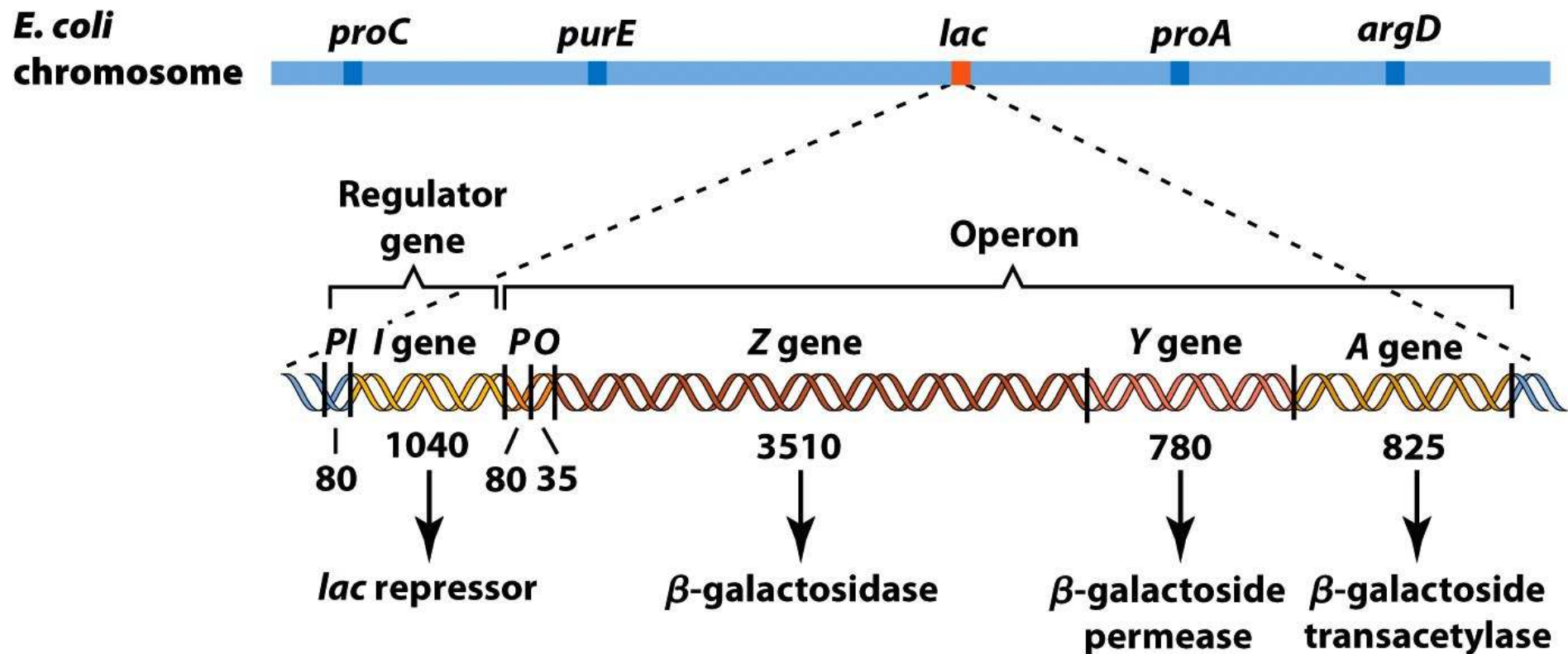
# Take home message

- u bakterií se geny s podobnou funkcí objevují v koordinovaně regulovaných jednotkách zvaných operóny
- každý operón obsahuje sadu sousedících strukturních genů, promotor (vazebné místo RNA polymerázy) a operátor (vazebné místo pro regulační protein zvaný represor)
- vazba represoru na operátor brání RNA polymeráze v transkripci strukturních genů operónu
- operátor zbavený represoru RNA polymeráze umožňuje transkripci operónových genů



# Laktóзовý operón v *E. coli*: indukce a katabolická represe

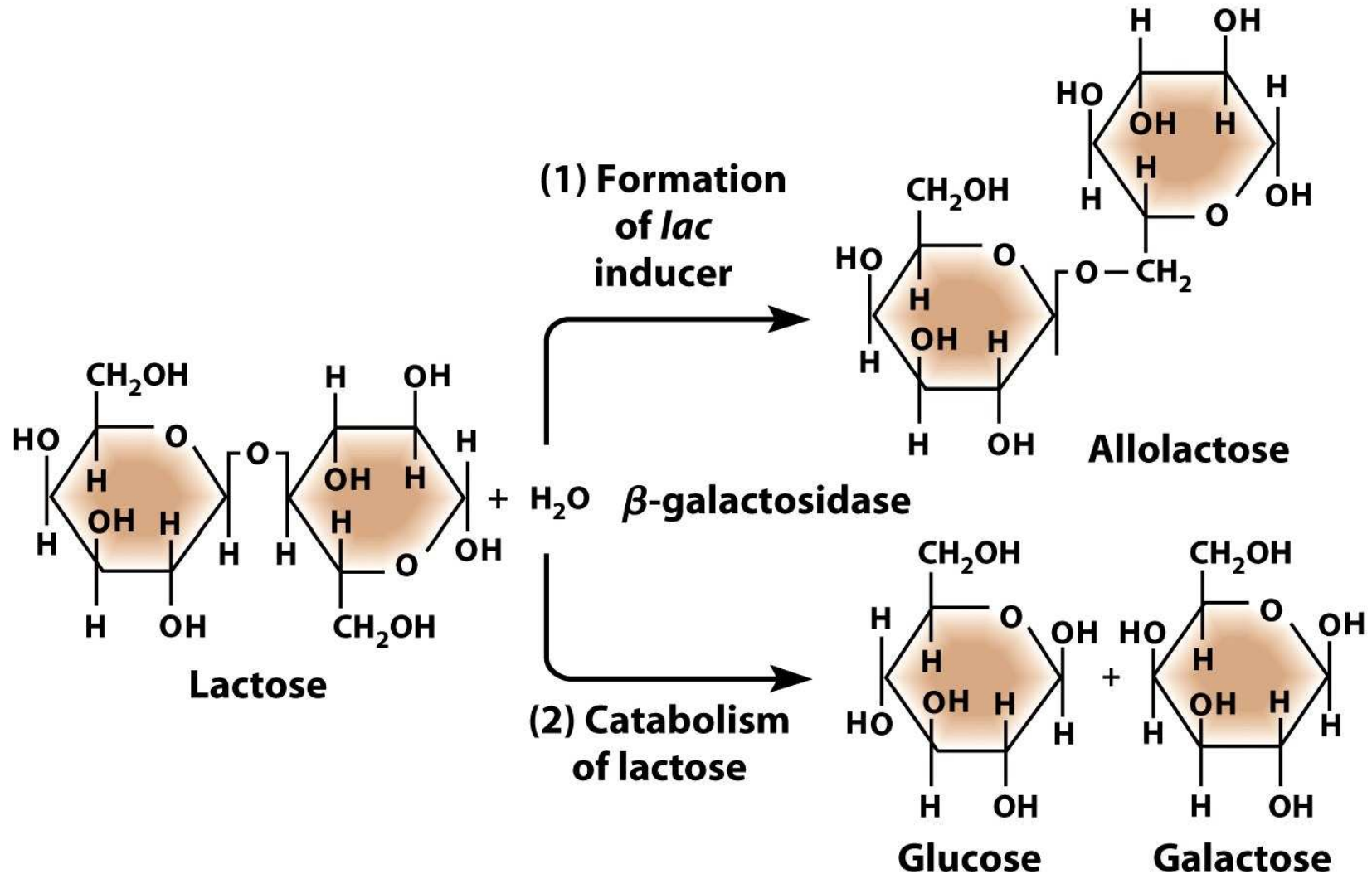
Strukturní geny *lac* operónu se transkribují pouze za přítomnosti laktózy a nepřítomnosti glukózy



# Indukce *lac* operónu

- gen *lac I* kóduje represor
- za nepřítomnosti induktoru se represor váže na *lac* operátor a blokuje transkripci strukturních genů
- **induktorem je alolaktóza**, která vzniká z laktózy reakcí katalyzovanou  $\beta$ -galaktozidázou
- vazbou alolaktózy na represor se represor uvolňuje z operátoru, transkripce strukturních genů se tím zapne

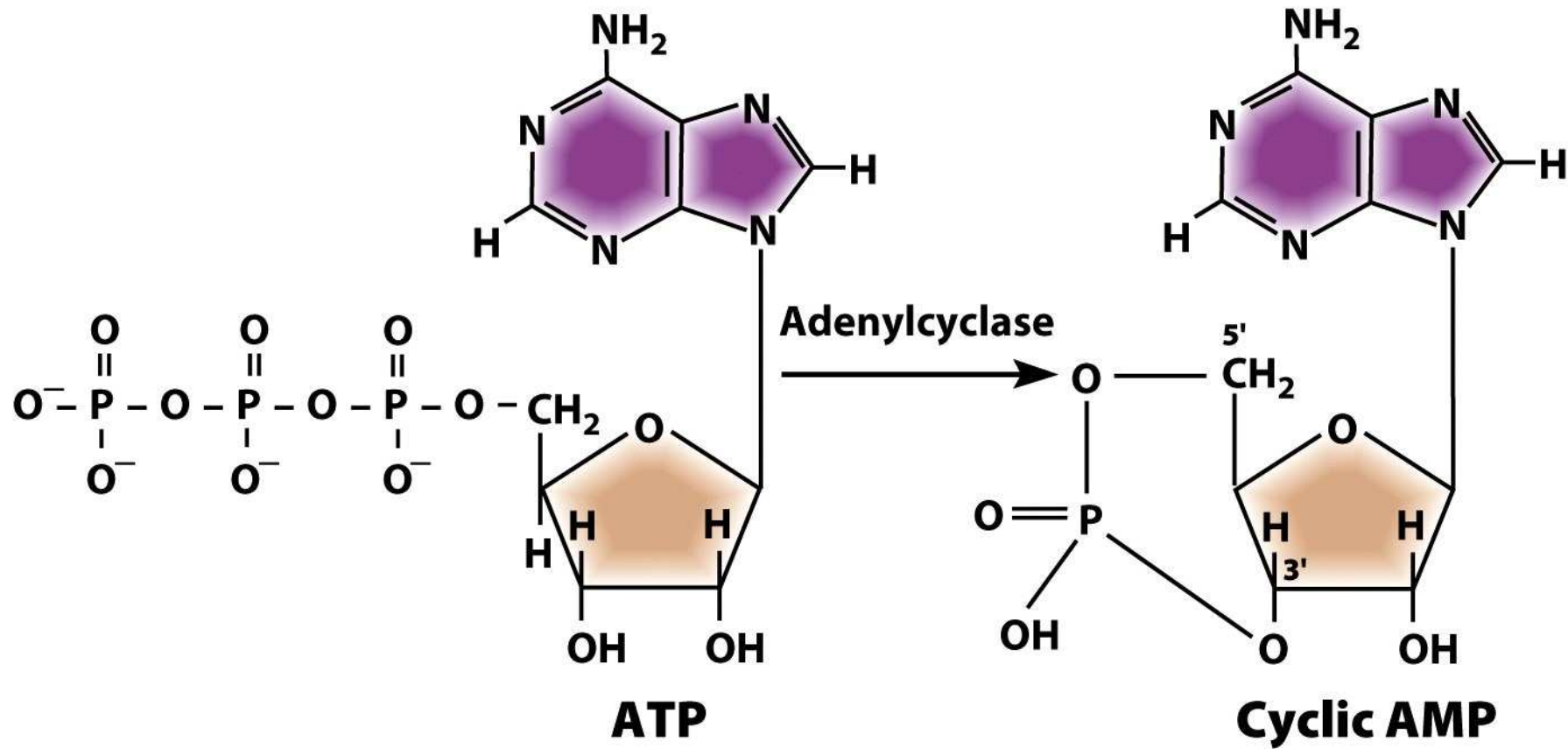
# Reakce katalyzované $\beta$ -galaktozidázou



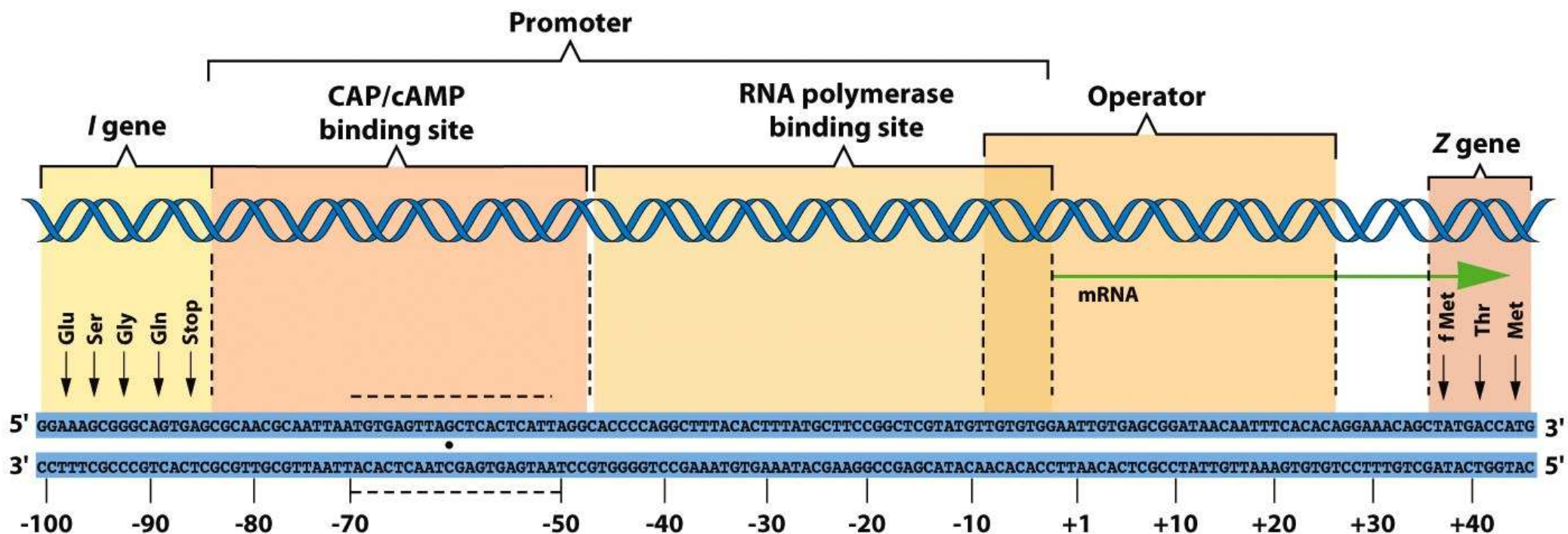
# Katabolická represe

- glukóza brání indukci laktózového operónu: tím je zajištěno přednostní využití glukózy místo méně účinných energetických zdrojů
- *lac* promotor má dvě složky
  - vazebné místo pro RNA polymerázu
  - vazebné místo pro katabolický aktivační protein (catabolite activator protein, CAP)
- vazbou CAP na promotor se aktivuje transkripce *lac* operónu
- CAP se na promotor váže pouze za přítomnosti dostatečné hladiny cyklického AMP (cAMP) - cAMP funguje jako efektorová molekula
- hladina cAMP je pod kontrolou glukózy (glukóza brání aktivaci adenylátcyklázy, tj. enzymu, který katalyzuje tvorbu cAMP)

# cyklický AMP



# Organizace *lac* operónu v oblasti promotor-operátor



# CAP pozitivně reguluje *lac* operón, cAMP je efektozem

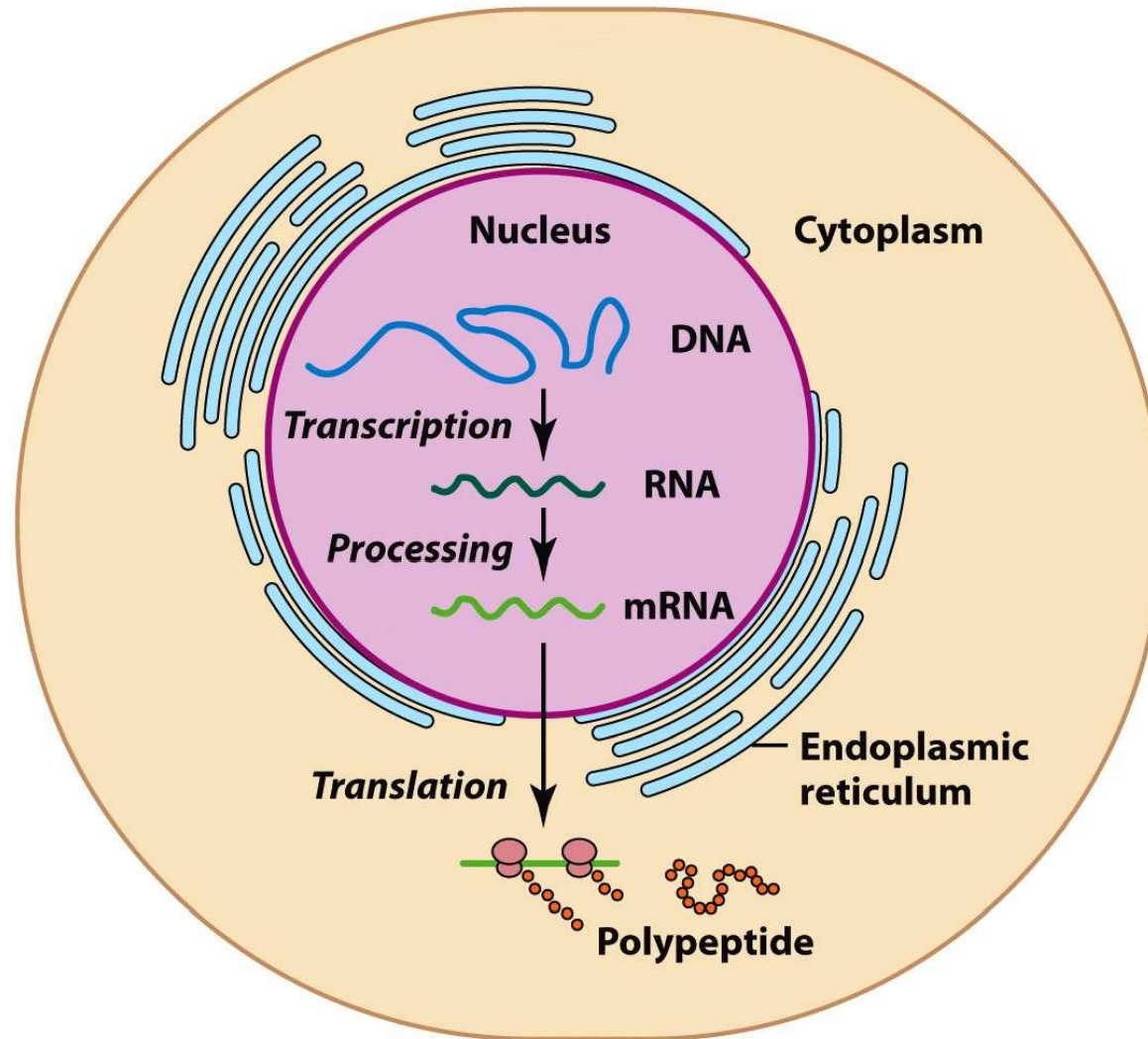
- Za přítomnosti glukózy
  - adenylátcykláza je inaktivní
  - hladina cAMP je nízká
  - CAP se nemůže vázat na *lac* operón
  - strukturní geny *lac* operónu se neexprimují
- Za nepřítomnosti glukózy
  - adenylátcykláza je aktivní
  - hladina cAMP je vysoká
  - CAP/cAMP se váže na *lac* operón
  - strukturní geny *lac* operónu se exprimují

# Take home message

- *lac* operón *E. coli* je regulační systém obsahující tři strukturní geny, které se účinně transkribují pouze za přítomnosti laktózy a nepřítomnosti glukózy
- za nepřítomnosti laktózy se *lac* represor váže na *lac* operátor a brání RNA polymeráze v iniciaci transkripce operónu
- katabolická represe brání indukci operónů typu *lac* glukózou, tj. přednostním zdrojem energie



# Genová exprese u eukaryot



regulace na úrovni transkripce, úprav RNA a translace

# Regulace transkripce

- pro regulaci transkripce u eukaryot jsou důležité nitrobuněčné signály i mezibuněčné komunikace
- pozitivní a negativní regulátorové proteiny zvané **transkripční faktory** se vážou do specifických oblastí DNA, aby zde stimulovaly nebo inhibovaly transkripci

# Alternativní sestřih RNA

- umožňuje tvorbu několika polypeptidů z genetické informace jediného genu

# Alternativní sestřih transkriptu krysího genu pro Troponin T

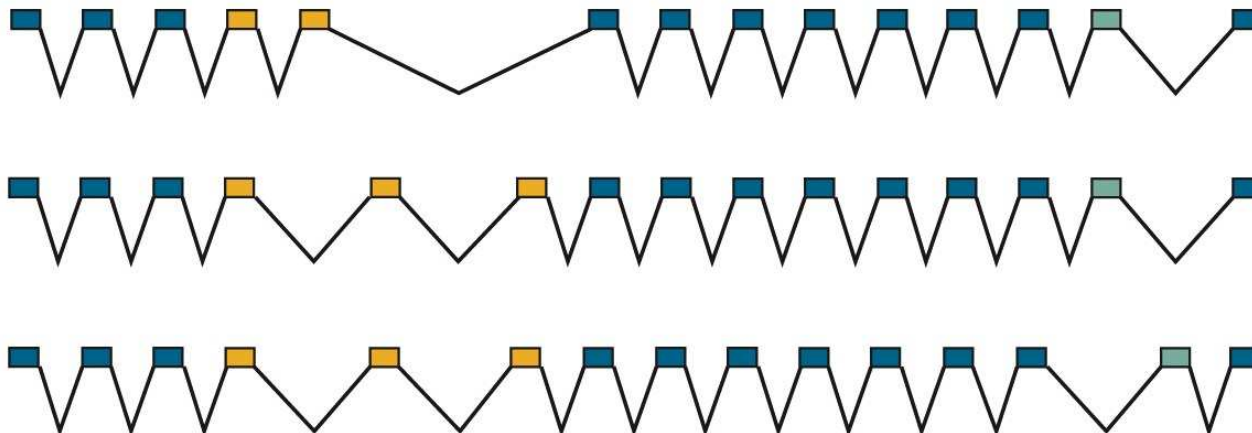
**Exons in rat troponin T gene**



**Alternate splicing of exons produces 64 different mRNAs.**

- Exons 1–3, 9–15, and 18 are present in all mRNAs.
- Exons 4–8 are present in various combinations in mRNAs.
- Exons 16 or 17, but not both, are present in all mRNAs.

**Examples of mRNAs**



# Cytoplazmatická kontrola stability mRNA

- stabilitu mRNA ovlivňuje několik faktorů
  - koncový úsek poly(A)
  - sekvence 3' UTR
  - chemické faktory (např. hormony)
  - malé RNA (siRNA) nebo microRNA (miRNA)

# Take home message

- transkripční faktory jsou schopné vazby na DNA a ovlivňují transkripci eukaryotických genů
- transkripty eukaryotických genů mohou podléhat alternativnímu sestřihu za vzniku mRNA kódující příbuzné, ale nestejně polypeptidy
- účinnost proteosyntézy závisí na stabilitě eukaryotických mRNA