

Přednáška kurzu Bi4010 Základy molekulární biologie, 2018/19



Regulace genové exprese

Jan Šmarda
Ústav experimentální biologie, PŘF MU



Proč regulovat expresi genů?

- produkty všech genů genomu nejsou v každém okamžiku života buňky nezbytné
- proměnlivost prostředí
- proměnlivost buňky během buněčného cyklu
- energetická náročnost procesu genové exprese

Konstitutivní genová exprese

- stabilní (průběžná) exprese genů, které kódují složky buněk nutné pro udržování základních - **provozních** - funkcí ("housekeeping functions")
- provozní geny kódují např. rRNA, tRNA, ribozomové proteiny, RNA-polymerázy, strukturní proteiny, proteiny zapojené do sestřihu a proteosyntézy, atd.
- **konstitutivní geny** se exprimují ve většině buněk





Inducibilní a represibilní 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)

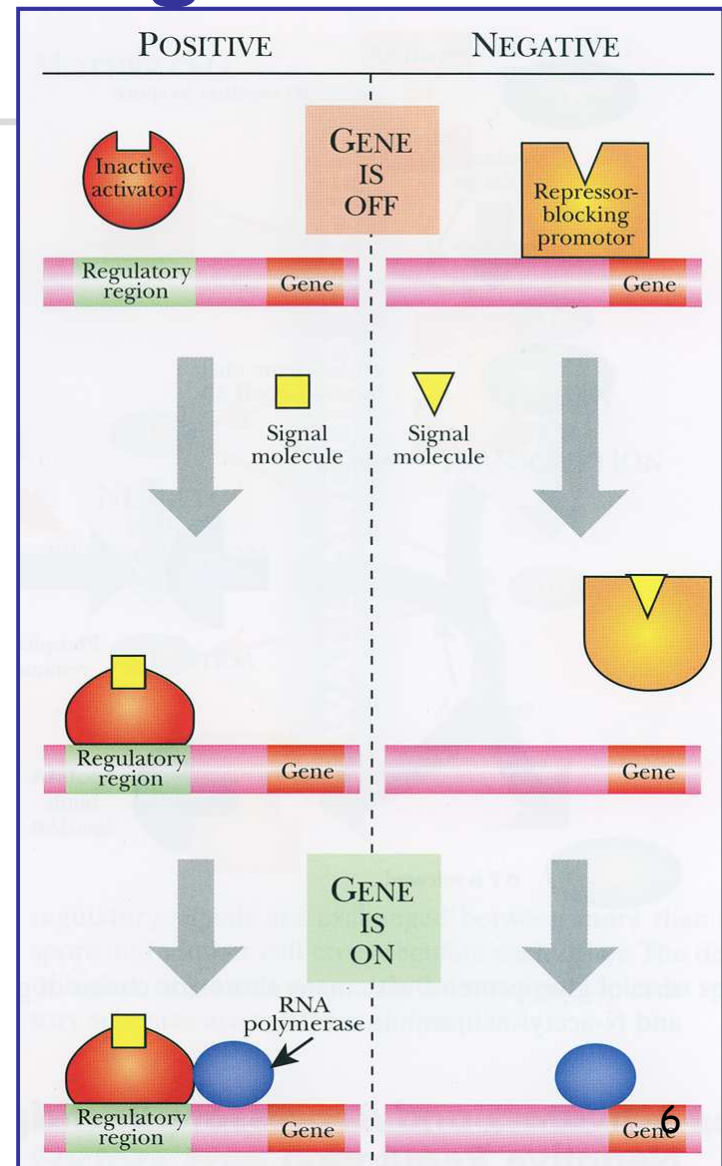


Pozitivní a negativní regulace genové exprese

- **pozitivní:** gen se exprimuje jen za přítomnosti aktivátoru, obvykle transkripčního faktoru, který napomáhá RNA-polymeráze ve vazbě na promotor – aktivita aktivátoru závisí na přijetí signálu
- **negativní:** gen se exprimuje jen za nepřítomnosti represoru – pokud je represor přítomen, váže se na operátor a znemožní expresi daného genu - uvolnění represoru závisí na přijetí signálu
- pozitivní i negativní regulace je tak závislá na malé molekule – induktoru, který se váže k regulačnímu proteinu
- signálů ovlivňujících expresi určitého genu může být větší počet

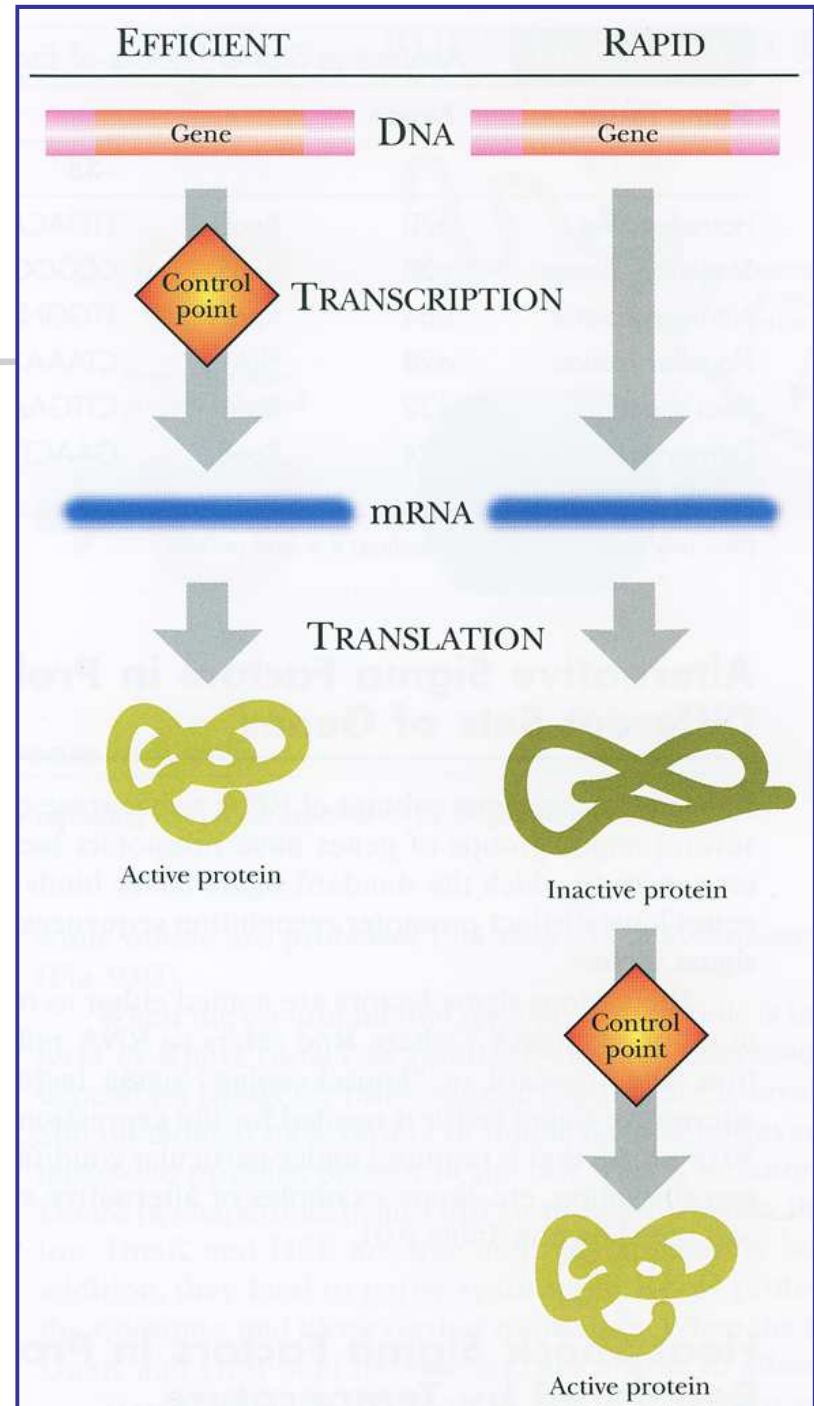
Pozitivní a negativní regulace genové exprese

- **pozitivní:** signál mění konformaci inaktivního regulátoru do aktivního stavu, který tak získá schopnost vazby do regulační oblasti genu, což usnadní funkci RNA-polymeráze
- **negativní:** regulátor blokuje promotor dokud nedojde vazbou signálu ke změně jeho konformace – čímž se uvolní z DNA a usnadní tak funkci RNA-polymeráze
- **aktivátory:** proteiny, které posilují expresi z určitých promotorů
- **represory:** proteiny, které tlumí expresi z určitých promotorů



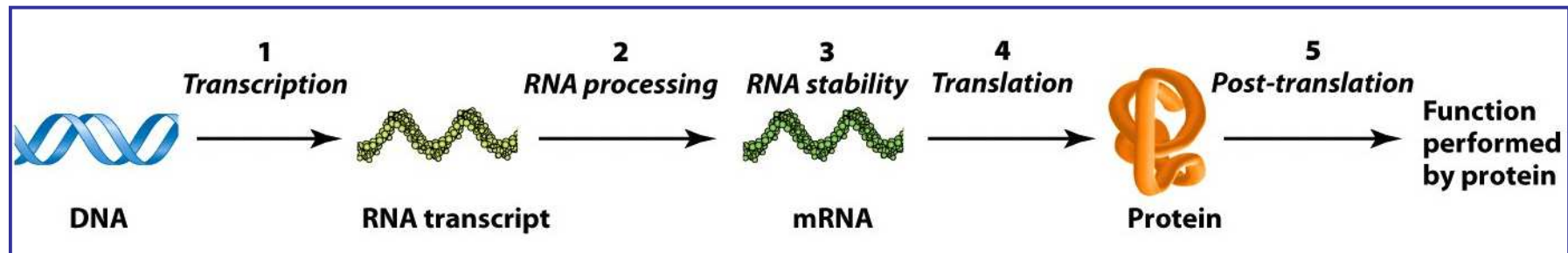
Ekonomičnost versus rychlost

- z hlediska ekonomičnosti je výhodná regulace na úrovni transkripce
- z hlediska zajištění rychlosti je výhodné zajistit produkci proteinu v inaktivní formě a možnosti jeho rychlého převedení do aktivního stavu



Regulační úrovně

- heterochromatizace/euchromatizace
- transkripce vedoucí ke vzniku primárního transkriptu
- úpravy primárního transkriptu vedoucí ke vzniku zralé mRNA
- stabilita mRNA, její náchylnost/odolnost k degradaci
- translace mRNA vedoucí k vzniku polypeptidových řetězců
- úpravy a sestavování polypeptidových řetězců
- regulace aktivity proteinu
- regulace degradace proteinu
- regulace translokace proteinu



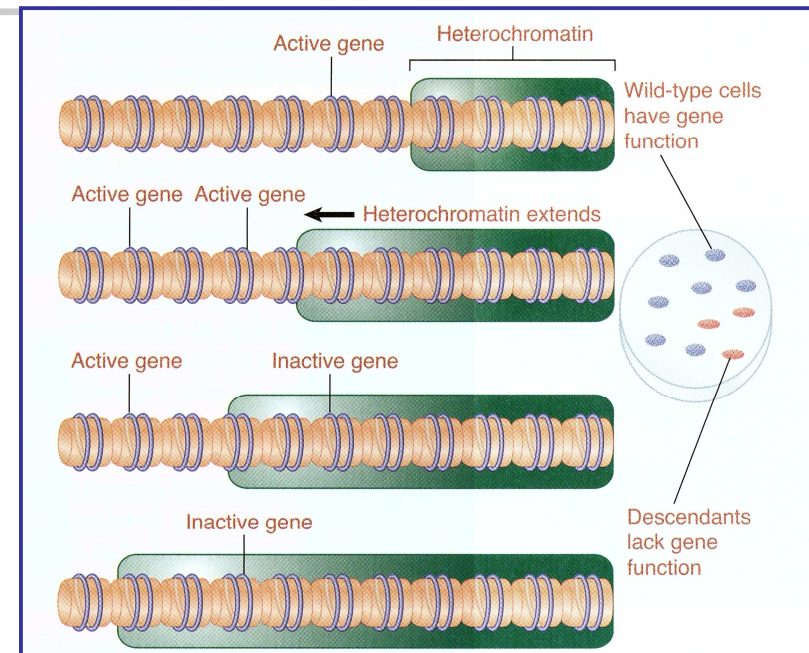
Typy heterochromatinu

konstitutivní

- vždy kondenzovaný
- lokalizace v blízkosti centromery a na koncích chromozomu
- nepřístupný genové expresi

fakultativní

- převoditelný na euchromatin modifikacemi histonů (acetylace, fosforylace, ADP-ribozylace, ubikvitinace) a tím zpřístupněn genové expresi
- hranici mezi heterochromatinem a euchromatinem může ovlivnit např. chromozomová translokace





Regulace u jednobuněčných a mnohobuněčných organismů

- u **jednobuněčných**: reakce na změny okolí (teplota, osmotický tlak, dostupnost živin, atd.)
- u **mnohobuněčných**: reakce na změny okolí + komunikace mezi buňkami téhož organismu + vývojové procesy v rámci organismu



Regulační mechanismy u prokaryot

- řídí genovou expresi 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.

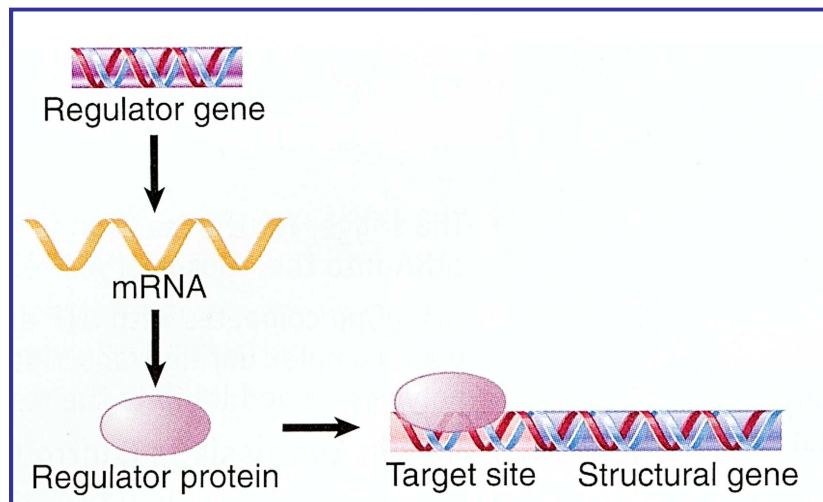


Trans- a cis-regulační elementy

- *trans*-aktivační molekuly (obvykle proteiny)
 - jsou schopny opustit místo své syntézy a volně se pohybovat, aby si našly svou cílovou molekulu
- *cis*-aktivační elementy (obvykle sekvence DNA)
 - fungují výlučně jako sekvence, které neopouštějí molekulu, jejíž jsou součástí (např. promotory, terminátory)
- genová exprese je řízena specifickými interakcemi *trans*-aktivačních molekul s *cis*-aktivačními sekvencemi

Regulátorové a strukturní geny

- strukturní gen kóduje jakýkoliv protein bez regulační funkce
- regulátorový gen kóduje takový protein (nebo RNA), který se zapojuje do procesu regulace genové exprese



Regulátorový protein může genovou expresi zapnout nebo vypnout

Regulace transkripce u prokaryot: alternativní sigma faktory

- sigma faktor umožňuje RNA-polymeráze specifickou vazbu na promotor
- několik skupin genů má promotory bez typických sekvencí -35 a -10: rozeznávány alternativními sigma faktory
- každý alternativní sigma faktor zajišťuje expresi celých skupin genů (50 a více), jejichž produkty jsou zapotřebí za určitých podmínek (např. stacionární fáze růstu, nedostatek dusíku, atd.)

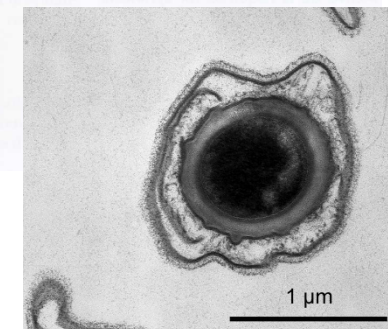
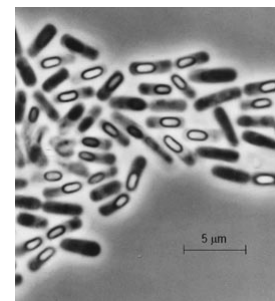
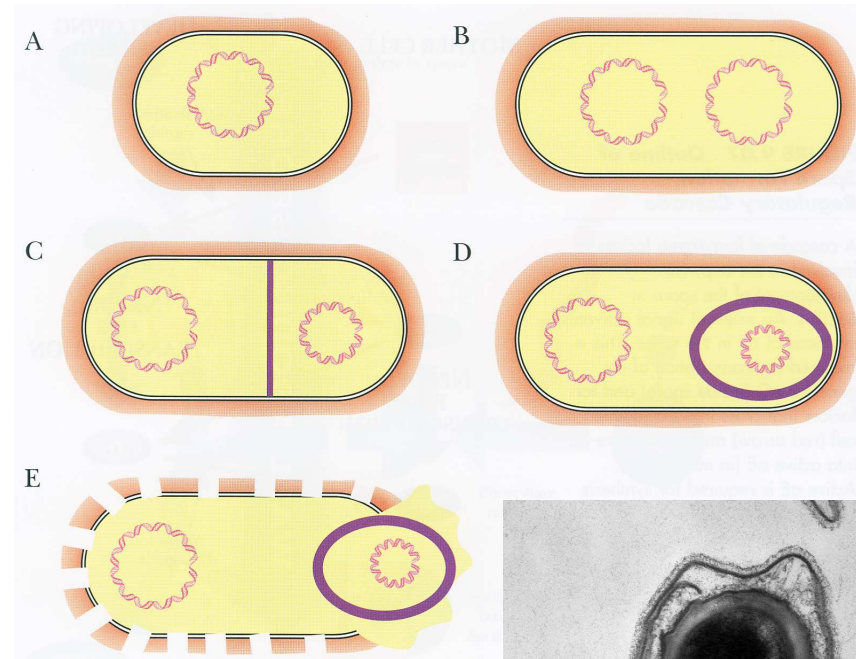
TABLE 9.01 Alternative Sigma Factors of *Escherichia coli*

Sigma factor	Name	CONSENSUS SEQUENCE			
		-35	Spacing	-10	
Housekeeping	σ_{70}	RpoD	TTGACA	16-18	TATAAT
Stationary phase	σ_{38}	RpoS	CCGGCG	16-18	CTATACT
Nitrogen control	σ_{54}	RpoN	TTGGNA	6	TTGCA
Flagellar motion	σ_{28}	FliA	CTAAA	15	GCCGATAA
Heat shock	σ_{32}	RpoH	CTTGAA	13-15	CCCCATNT
Extracytoplasmic heat shock	σ_{24}	RpoE	GAACTT	16	TCTGAT

(N = any base; Y = any pyrimidine; R = any purine)

Alternativní sigma faktory se uplatňují při sporulaci

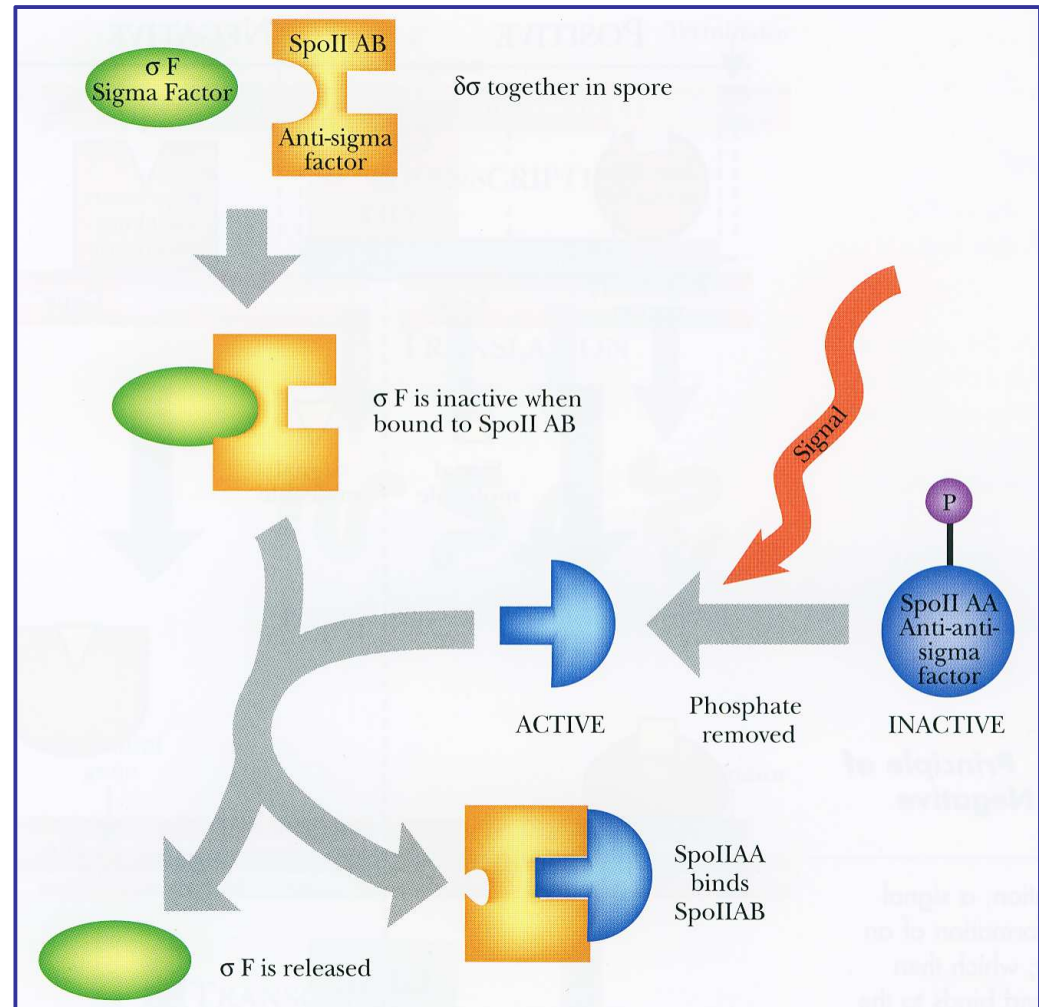
- spóry se tvoří asymetrickým dělením mateřské buňky za nepříznivých podmínek
- primitivní forma diferenciace prokaryotických buněk
- tvorba spór je řízena čtyřmi alternativními sigma faktory
- mezi geny rozeznávanými jedním sigma faktorem jsou i geny kódující jiné sigma faktory



Coupe de spore de *B. cereus* par microscopie électronique (C. Faille)

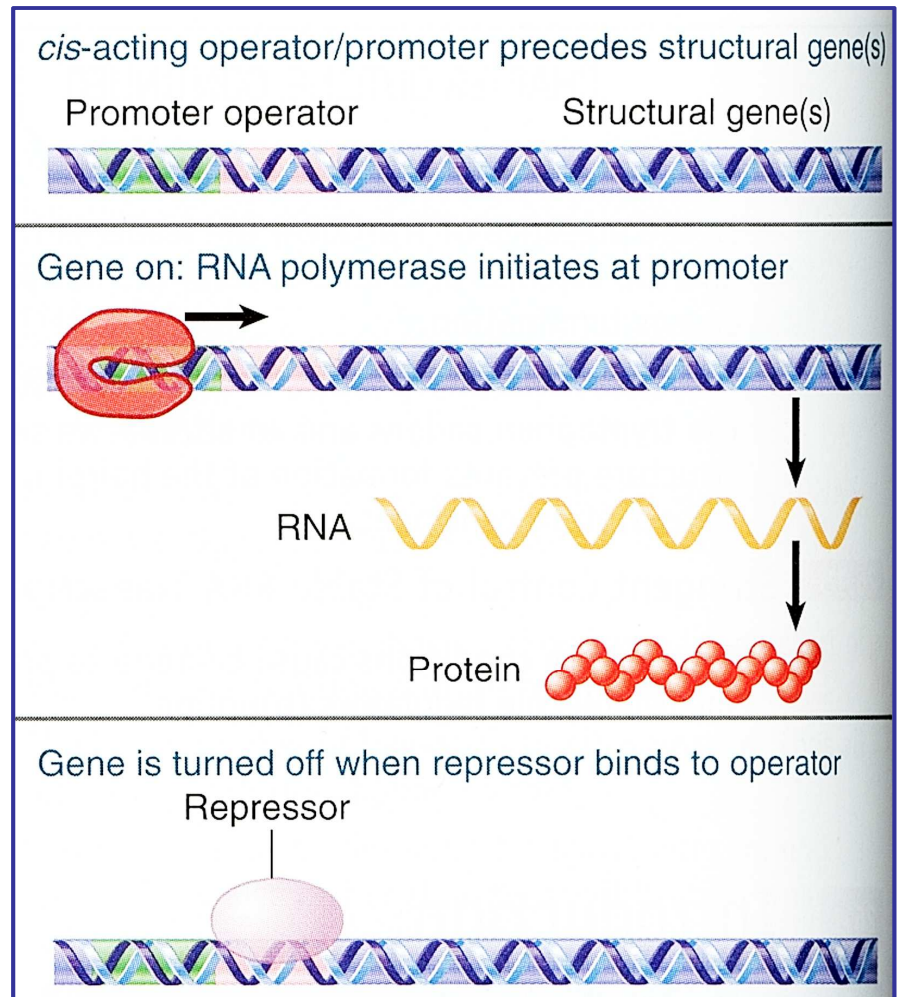
Anti-sigma faktory

- proteiny, které vážou sigma faktory a tím je inhibují: ztrácí schopnost vazby na RNA- polymerázu
- anti-anti sigma faktory se podílejí na regulační kaskádě



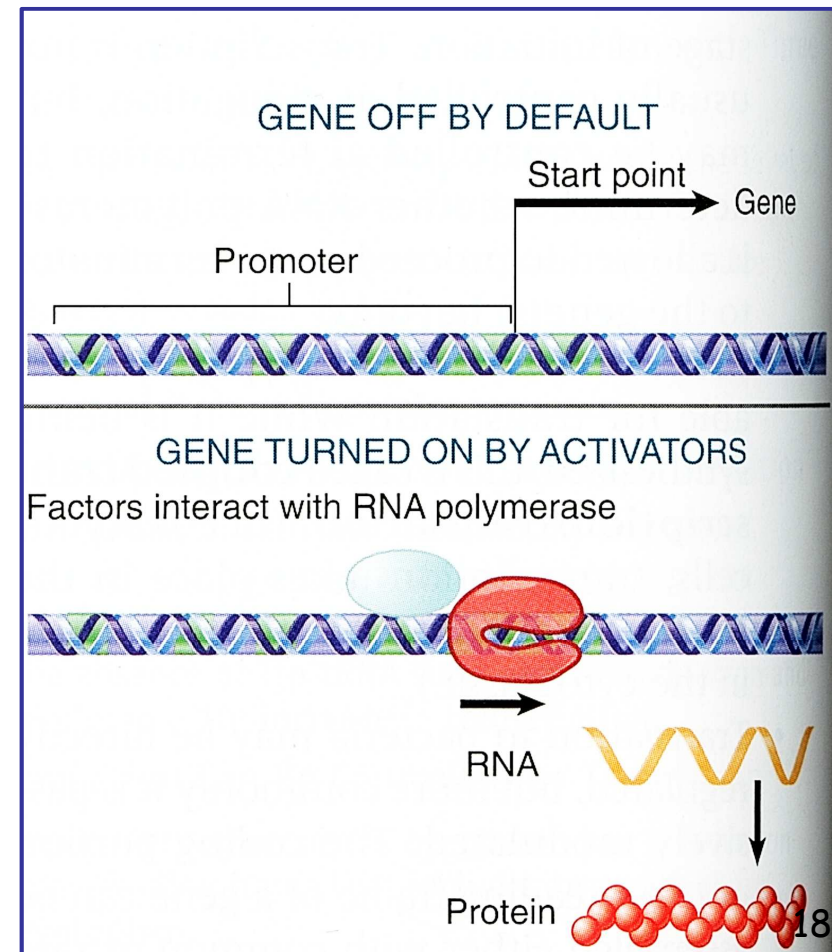
Negativní kontrola

- v blízkosti promotoru je další „cis-element“ - operátor
- operátor je místo vazby pro represor
- vazba represoru na operátor brání RNA-polymeráze iniciovat transkripci
- exprese genu vypnuta
- běžné u bakterií



Pozitivní kontrola

- pro iniciaci transkripce je nutný transkripční faktor, který asistuje RNA-polymeráze
- bez pozitivního signálu je gen inaktivní, RNA-polymeráza nemůže iniciovat transkripci
- běžná u bakterií i eukaryot

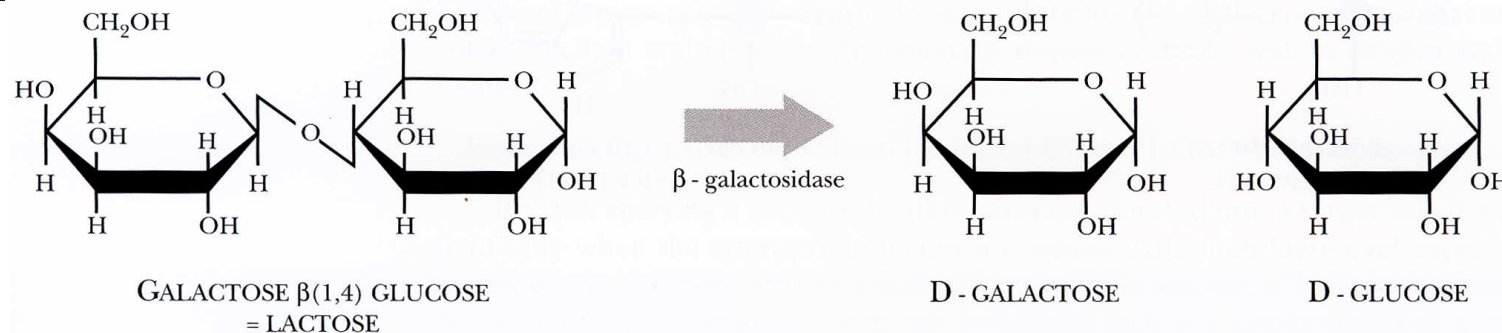




Regulace změnou koncentrace substrátu

- bakterie reagují rychle na změny svého okolí
- změny v dostupnosti klíčových živin mohou nastat kdykoliv, rychlé přepnutí metabolismu je podmínkou přežití
- produkce nepotřebného enzymu je zbytečná zátěž
- bakterie netvoří enzymy pro zpracování substrátu, pokud tento není k dispozici, ale jsou připraveny jejich produkci nastartovat, pokud se substrát objeví

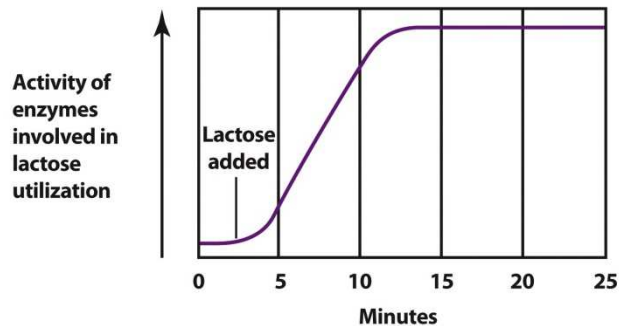
Využití různých zdrojů energie u bakterií



- využitelné jsou různé cukry, *E. coli* preferuje **glukózu**
- **za přítomnosti laktózy a nepřítomnosti glukózy** buňky *E. coli*:
 - zahájí syntézu dvou enzymů: **β -galaktozidázy** a **β -galaktozidpermeázy**
 - β -galaktozidpermeáza zajistí transport laktózy do buňky
 - β -galaktozidáza laktózu štěpí na glukózu a galaktózu
 - za nepřítomnosti laktózy v okolí, buňky *E. coli* tyto enzymy nesyntetizují

Indukce genů pro využití laktózy

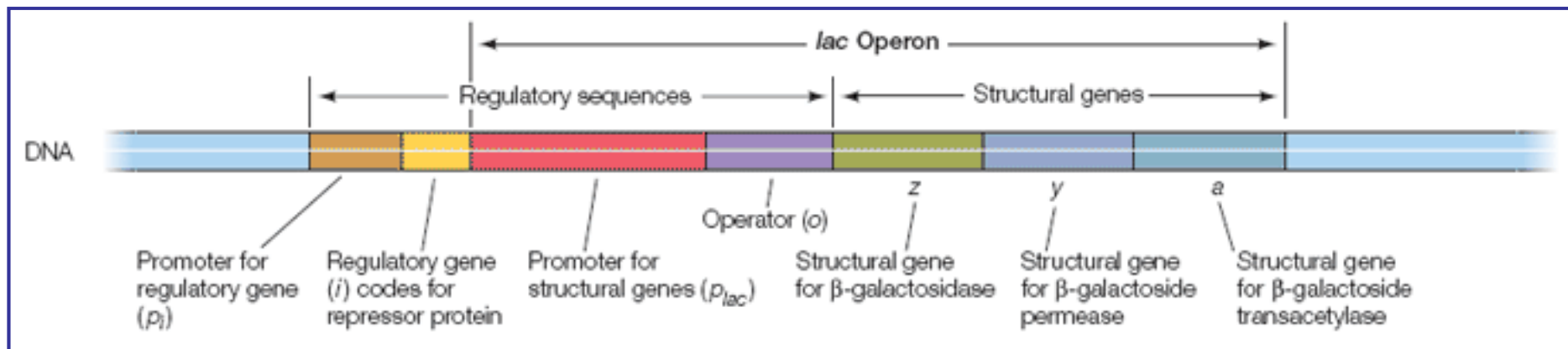
Induction of enzyme synthesis



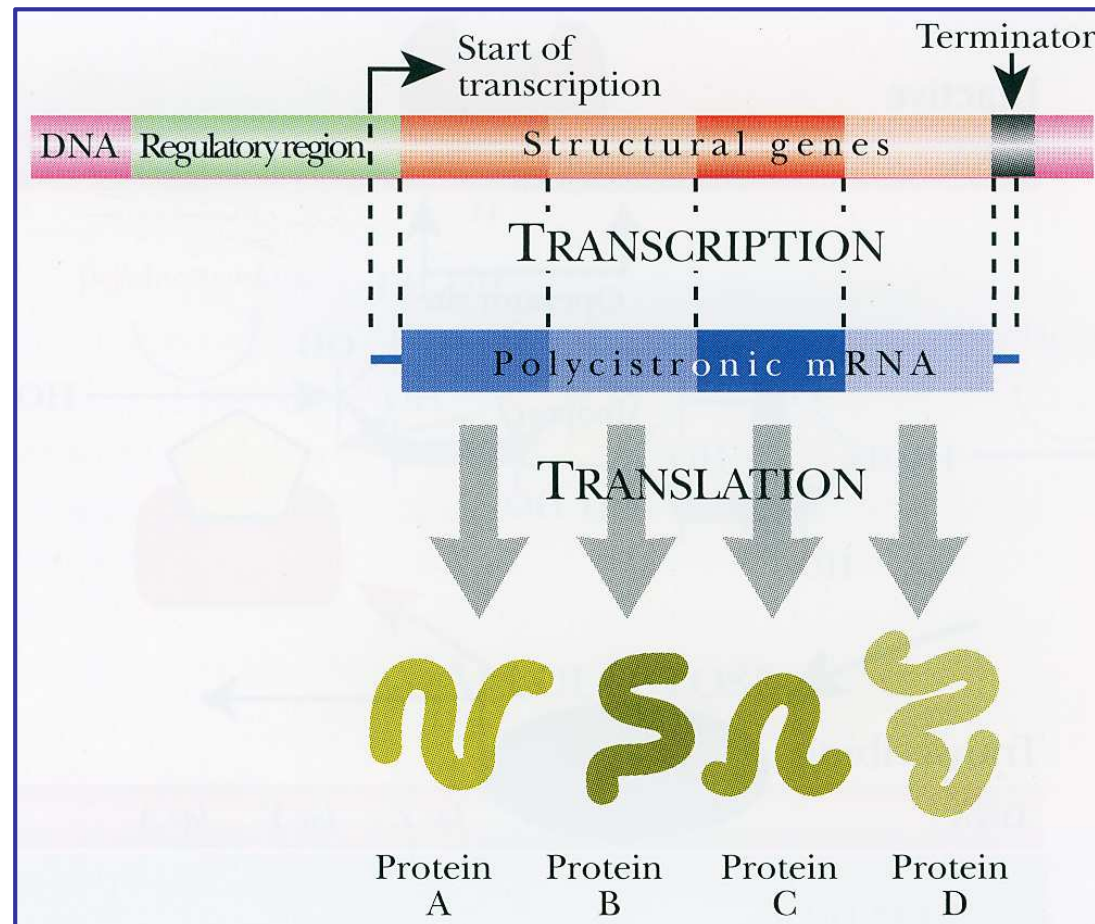
- exprese obou genů je za nepřítomnosti glukózy a přítomnosti laktózy indukována rychle
- proces zapnutí genové exprese látkou dodanou do prostředí, ve kterém buňka roste, se nazývá **indukce**
- geny, jejichž exprese je takto regulována, se nazývají **inducibilní**
- indukce nastává na úrovni transkripce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

Operón

- u prokaryot jsou geny s příbuznou funkcí často umístěny za sebou a jsou regulovány společně – tvoří operóny
- **operón**: soubor genů, které jsou společně přepisovány do jediné molekuly mRNA (polycistronové mRNA) a podléhají kontrole jediným regulátorem
- geny v operónu spolu funkčně souvisejí: např. kódují enzymy, které se účastní stejné biochemické dráhy
- u eukaryot se každý gen přepisuje samostatně



Transkripce operónu: polycistronová mRNA



Operóny - historie

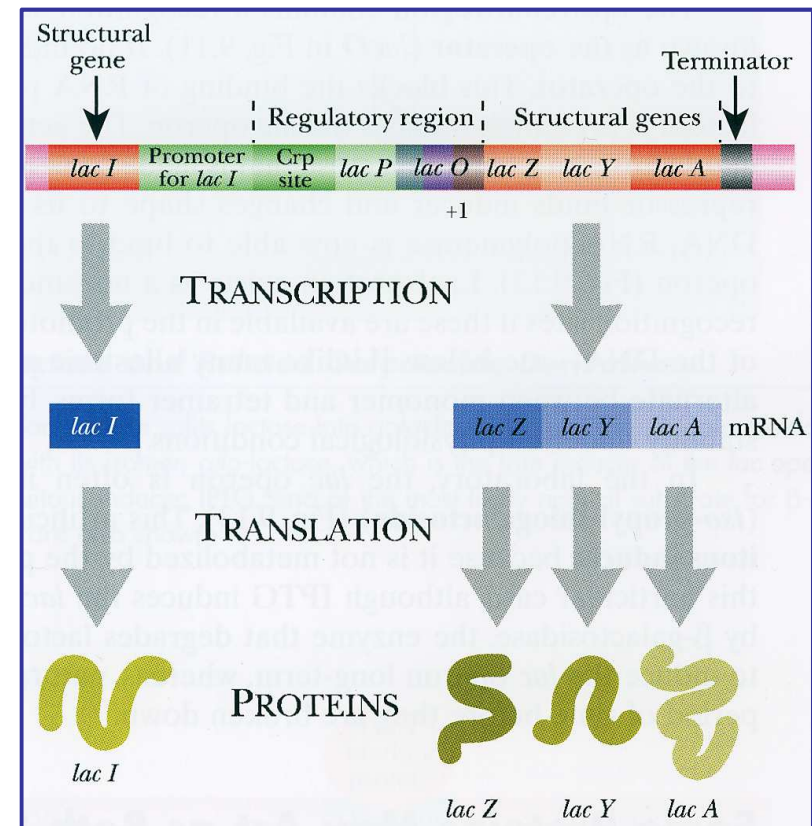
- objevitelé operónu: **Francois Jacob** a **Jacques Monod** (1961)



Nobelova cena za medicínu v roce 1965 (s André Lwoffem)

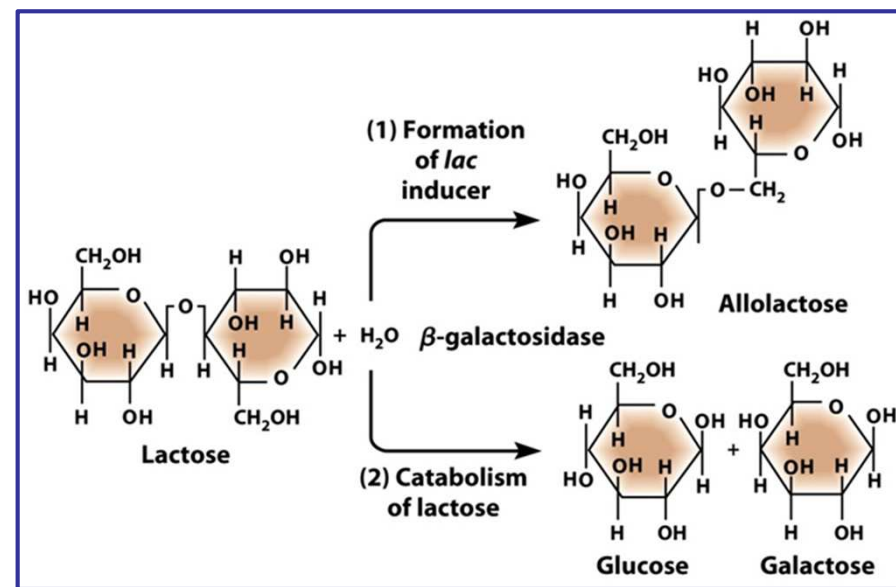
Laktóзовý (*lac*) operón

- tři strukturní geny: *lacZ*, *lacY* a *lacA* + regulační oblast proti směru transkripce
- *lacZ* kóduje β -galaktozidázu (rozklad laktózy)
- *lacY* kóduje β -galaktozidpermeázu (membránový protein, zajišťující transport laktózy do buňky)
- *lacA* kóduje β -galaktozidacetylázu (přenos acetylové skupiny z acetylkoenzymu A na laktózu)
- *lacI* kóduje represor *lac* operónu (přepisuje se v opačném směru)



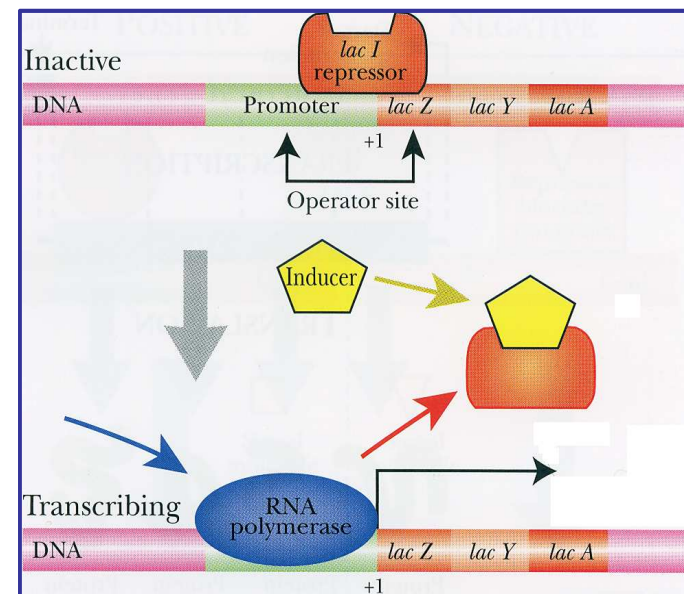
Lac operón

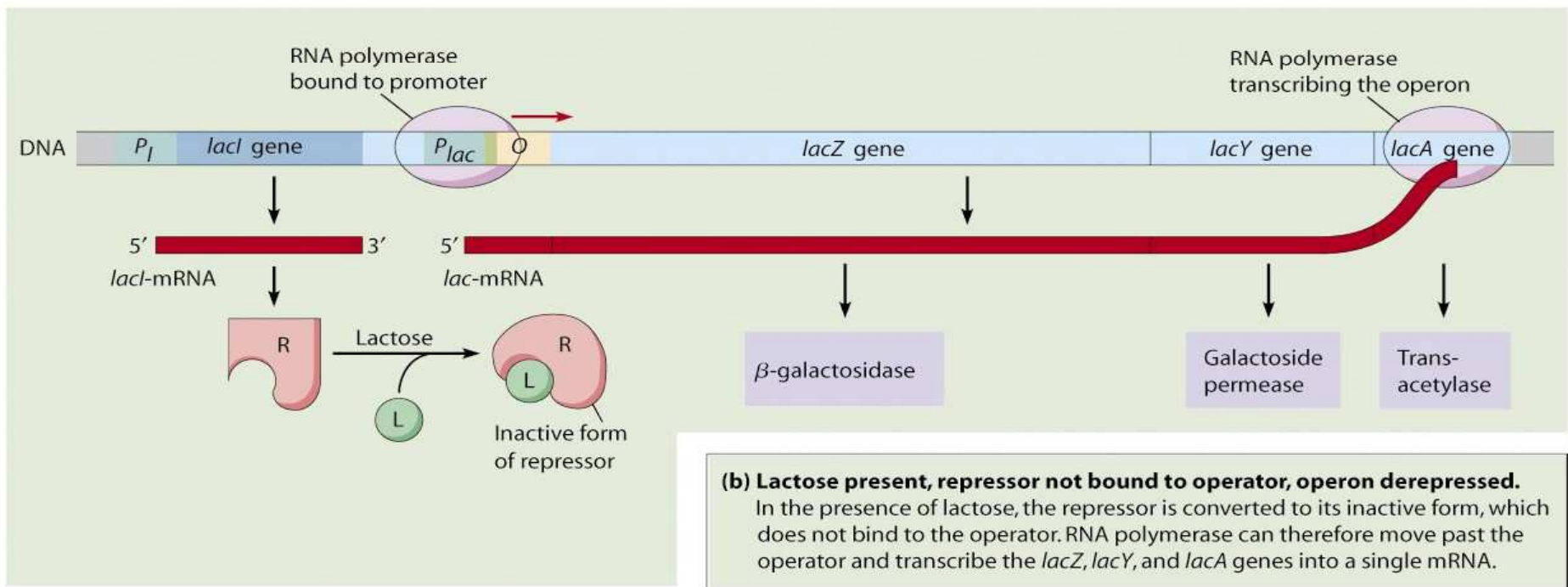
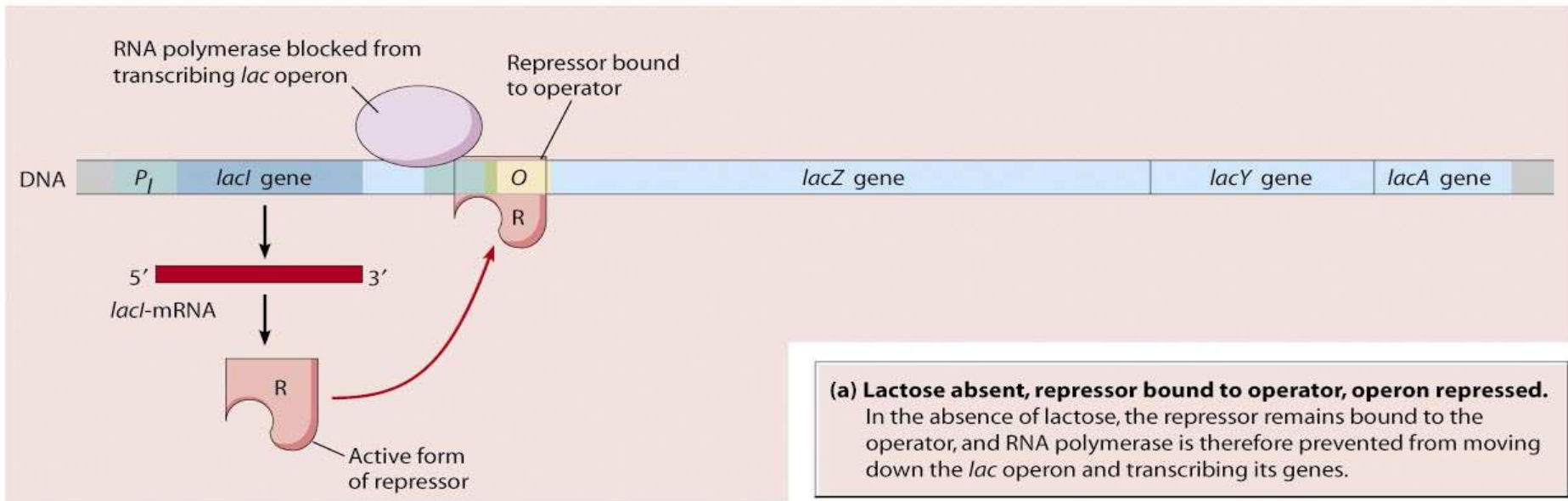
- β -galaktozidáza je potřeba jen za přítomnosti laktózy a nedostatku glukózy
- v opačném případě je transkripce *lac* operonu utlumena Lac represorem
- když se objeví laktóza, postačuje i malé množství rozkladných enzymů k jejímu rozštěpení na glukózu a galaktózu
- glukóza a galaktóza se spojují za vzniku alolaktózy, která inaktivuje Lac represor (induktor *lac* operónu)



Operátor: vazebné místo pro represor

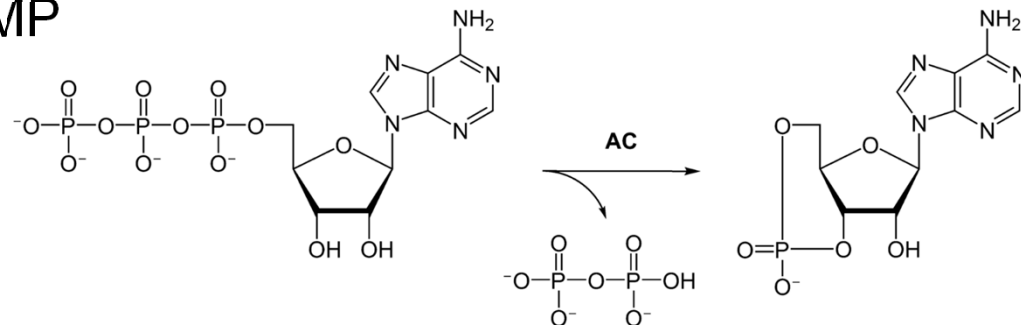
- vazebné místo pro represor LacI v promotoru *lac* operónu
- za nepřítomnosti induktoru se LacI váže na operátor a blokuje vazbu RNA-polymerázy na promotor
- za přítomnosti laktózy (vlastním induktorem je izomer laktózy – alolaktóza) dojde k uvolnění represoru (změna konformace, ztráta schopnosti vazby na DNA)





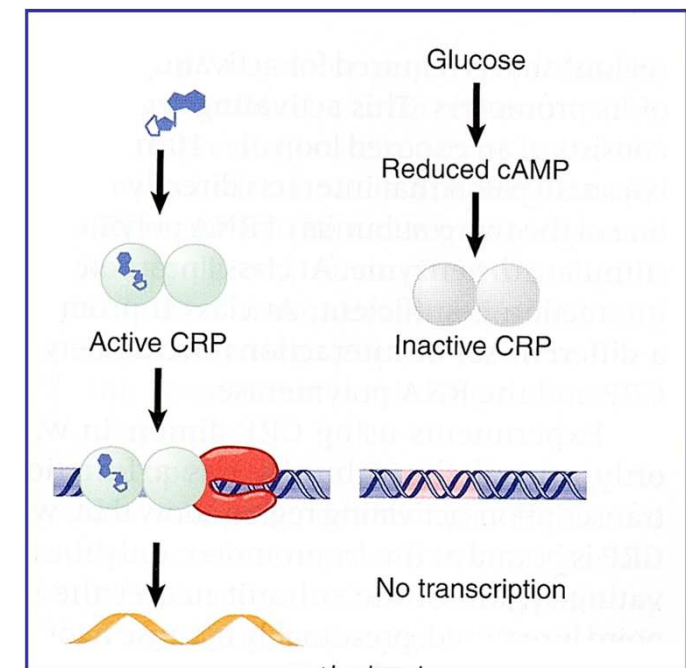
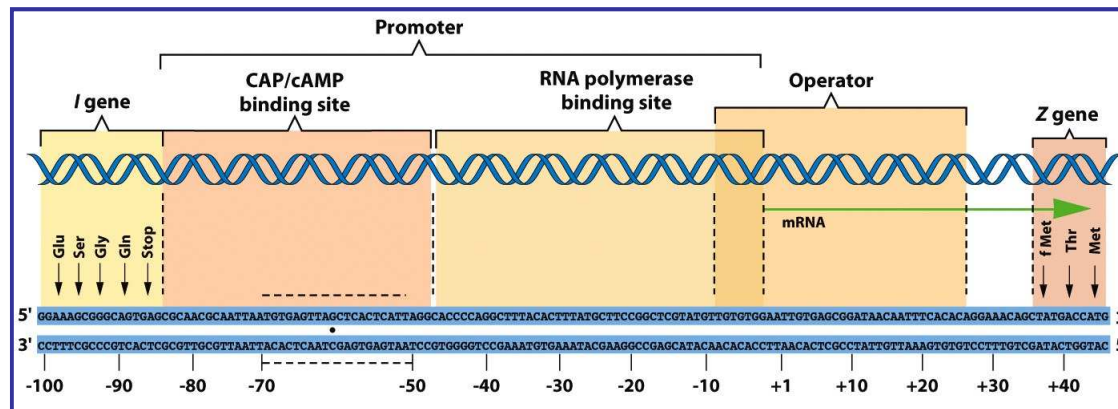
Katabolická represe

- jiný mechanismus kontroly *lac* operónu, zprostředkován cAMP a pozitivním regulačním proteinem CRP („cAMP-receptor protein“), někdy rovněž zvaným CAP („catabolite-activator protein“)
- cAMP se váže na CRP/CAP, čímž se mění jeho konformace do podoby umožňující pevnou vazbu na DNA v místě promotoru a díky interakci s RNA-polymerázou aktivuje transkripci *lac* operónu
- glukóza je lepší zdroj energie než laktóza, proto za současné přítomnosti laktózy a glukózy se inaktivuje adenylátcykláza a snižuje se produkce cAMP



Katabolická represe

- *lac* promotor obsahuje kromě operátoru také vazebné místo pro CAP/CRP
- vazbou CAP/CRP na promotor se aktivuje transkripce *lac* operónu
- glukóza brání indukci *lac* operónu inaktivací adenylátcyklázy: bez cAMP se CRP/CAP inaktivuje, čímž se redukuje transkripce *lac* operónu
- tím je zajištěno přednostní využití glukózy místo méně účinných energetických zdrojů





Katabolická represe

- CAP se na promotor váže pouze za přítomnosti cAMP
- hladina cAMP je pod kontrolou glukózy (glukóza brání aktivaci adenylátcyklázy, tj. enzymu, který katalyzuje tvorbu cAMP)

Za přítomnosti glukózy

- adenylátcykláza je inaktivní
- hladina cAMP je nízká
- CAP/CRP 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

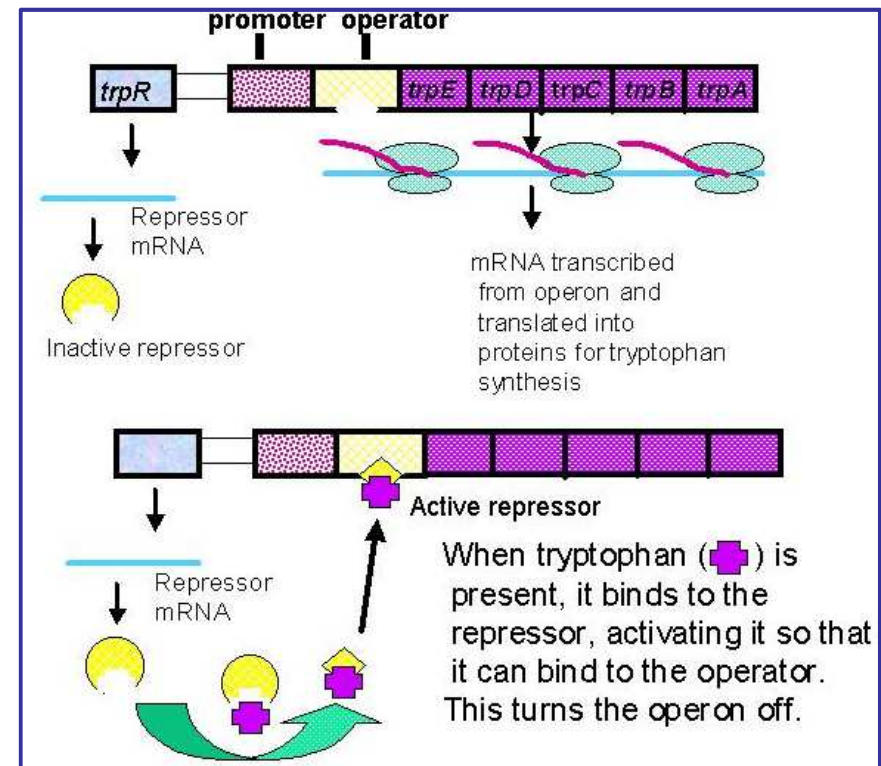


Operón trp

- je negativně regulován hladinou svého produktu, tj. aminokyseliny tryptofanu (přidání trp do růstového média zastaví jeho biosyntézu)
- tryptofan aktivuje represor trpR
- represor trp se váže na několik operátorů
- nejdůležitější je operátor trpEDCBA řídící tvorbu enzymů, kterými se syntetizuje tryptofan
- mechanismus represe je ve všech případech založen na zabrání iniciace transkripce operónu

Operón trp

- trp represor se syntetizuje v inaktivní formě
- při represi se uplatní tryptofan: dvě molekuly tryptofanu se vážou k dimeru trp represoru a změní jeho konformaci do stavu, kdy je schopen aktivní vazby na operátor
- vazba represoru znemožní vazbu RNA-polymerázy k promotoru a iniciaci transkripce





Take home message

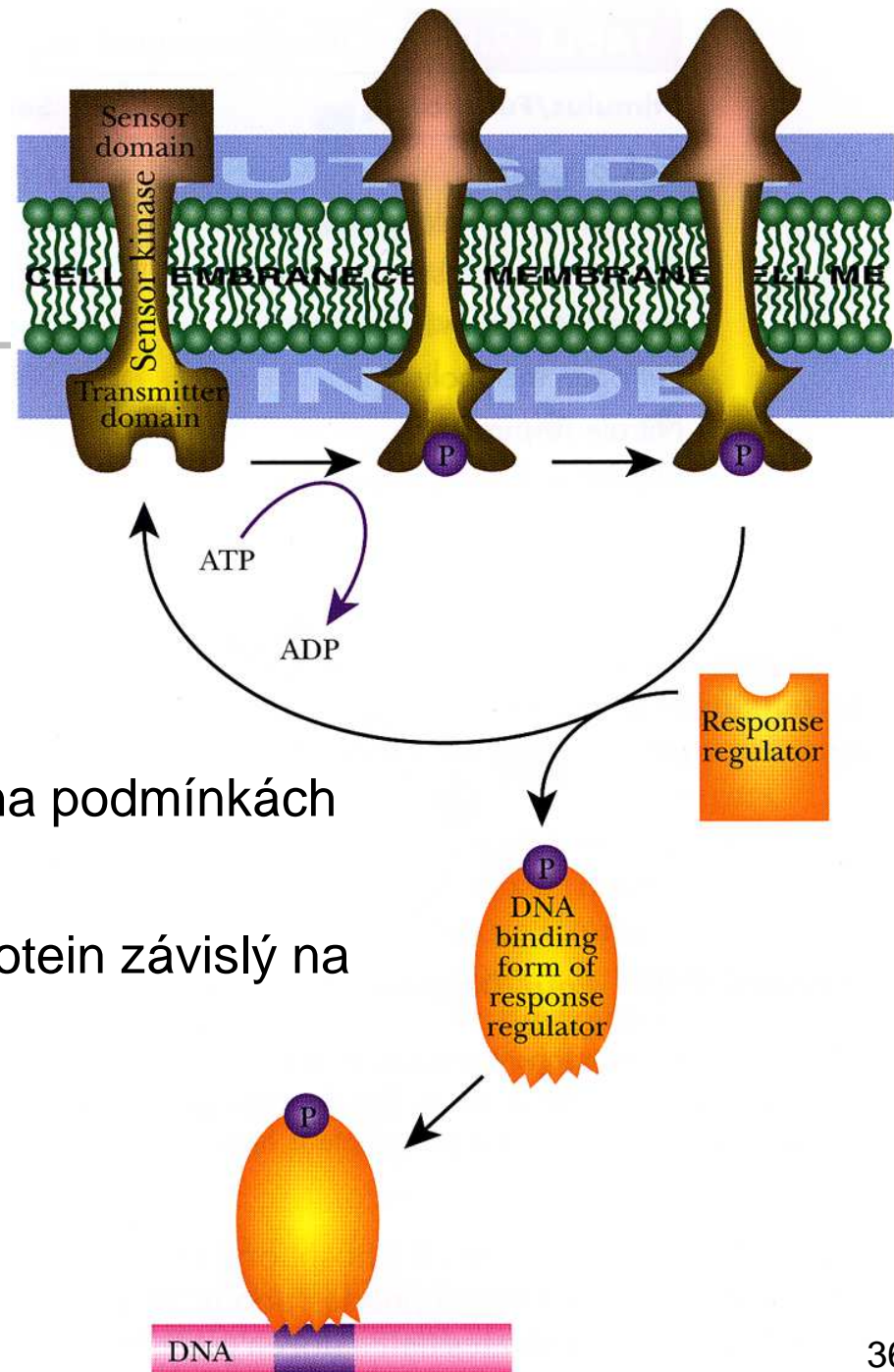
- *lac* operón *E. coli* je regulační systém obsahující tři strukturní geny, které se účinně přepisují pouze za přítomnosti laktózy a nepřítomnosti glukózy
- za nepřítomnosti laktózy se Lac represor váže na *lac* operátor a brání RNA-polymeráze v iniciaci transkripce operónu
- *trp* operón využívá represoru pro zastavení transkripce genů pro biosyntézu tryptofanu



Dvousložkové regulační systémy

- regulaci aktivity enzymů nebo transkripčních faktorů často zajišťují signální molekuly nebo chemické skupiny (fosfát, metyl, acetyl, AMP, atd.)
- dvousložkové systémy využívají připojení **fosfátu**:
 - první složkou je **regulační protein** se schopností vazby k DNA pouze ve fosforylovaném stavu
 - druhou složkou je **transmembránová kináza**, která podle změn okolí přechází do aktivního stavu, fosforyluje napřed sebe samu, následně i regulační protein

Dvousložkový systém



membránová složka: kináza závislá na podmínkách vnějšího okolí

cytoplasmatická složka: regulační protein závislý na fosforylaci



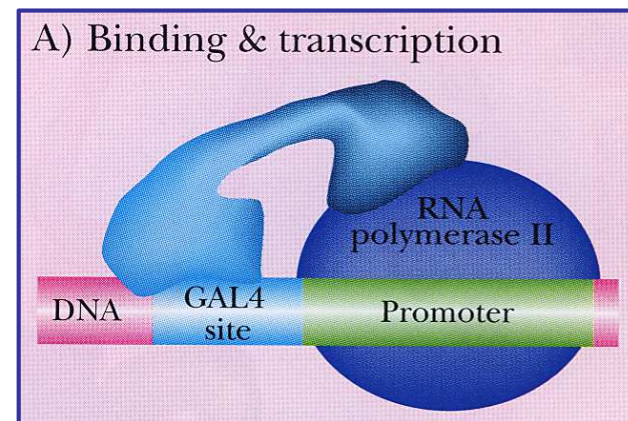
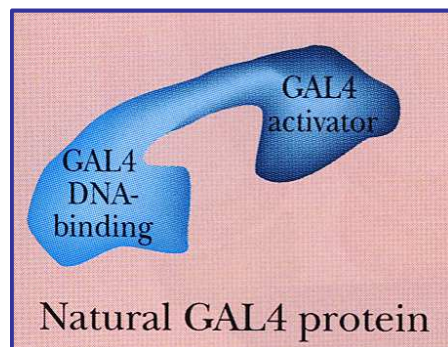
Regulace transkripce u eukaryot

složitější než u prokaryot

- vysoký počet genů, které jsou různě exprimovány v různých tkáních
- chromatin
- kompartmentalizace buňky (DNA v jádře, regulátory tvořené v cytoplazmě)

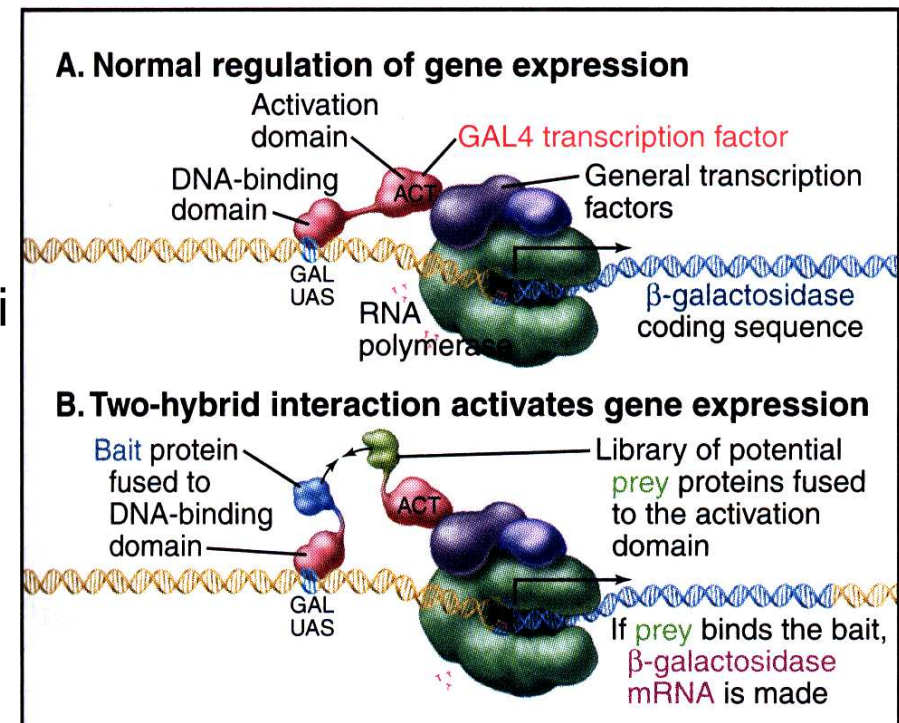
Vlastnosti transkripčních faktorů

- cíleně ovlivňují expresi genů
- reagují na specifické signály
- jsou schopny přechodu z cytoplazmy do jádra
- rozeznávají a vážou specifické sekvence DNA
- zprostředkovávají kontakt s transkripčním aparátem
- mají doménovou strukturu: jedna zajišťuje vazbu na DNA, druhá interaguje s transkripčním aparátem (např. protein GAL4 kvasinek)



Dvouhybridní systém

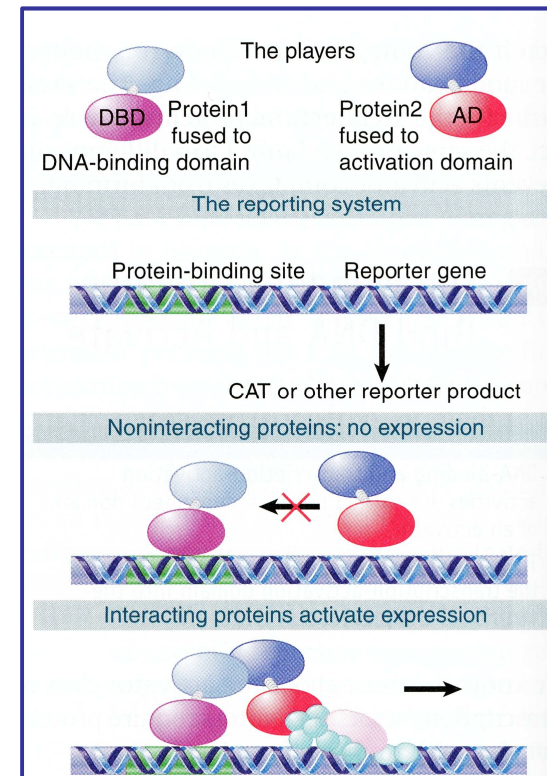
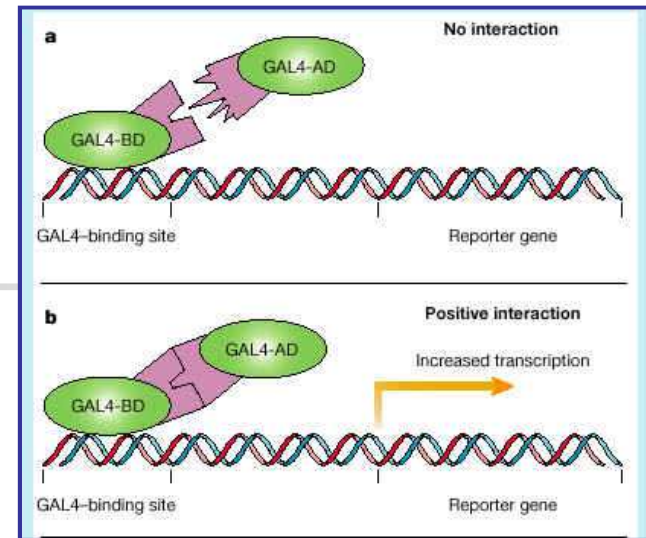
- metoda analýzy meziproteinových interakcí
- využívá umělého spojení testovaných proteinů s oddělenými doménami transkripčního aktivátoru GAL4
- GAL4 má modulární strukturu: doménu pro vazbu na DNA (DBD) a aktivační doménu (AD)
- interakce obou domén vede k aktivaci transkripce reportérového genu (kovalentní propojení domén není nutné)



Dvouhybridní systém - princip

Testování interakce proteinu 1 s proteinem 2

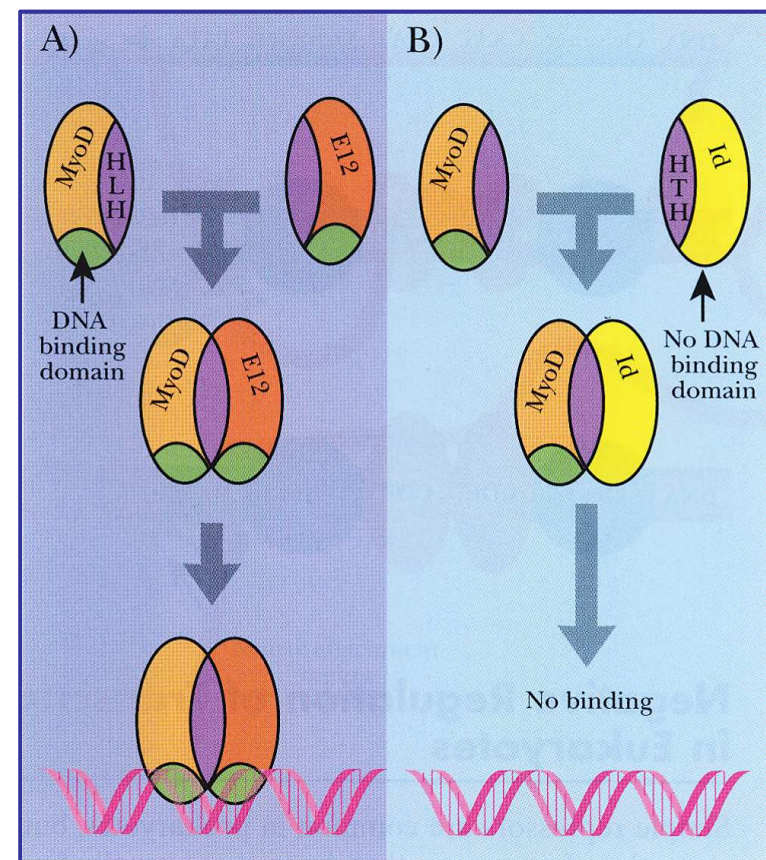
- doména pro vazbu na DNA (**DBD**) transkripčního faktoru GAL4 se spojí s **proteinem 1**
- aktivační doména (**AD**) transkripčního faktoru GAL4 se spojí s **proteinem 2**
- oba fúzované geny se exprimují v kvasinkových buňkách obsahujících příslušný reportérský gen stabilně začleněný do genomu
- interakce testovaných proteinů se projeví aktivací reportérského genu



Negativní regulace interakcí s inhibítorem

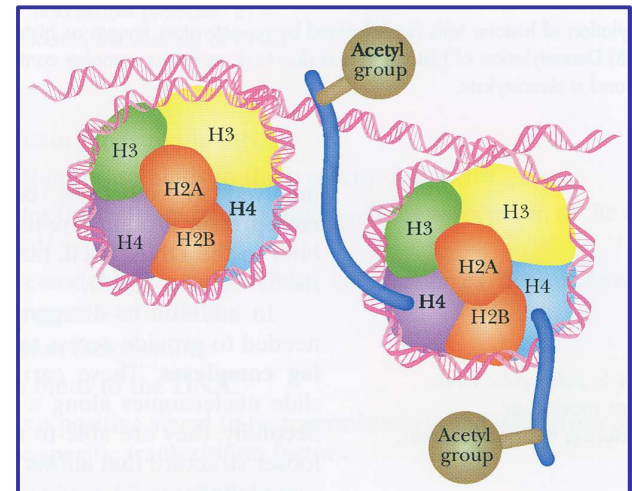
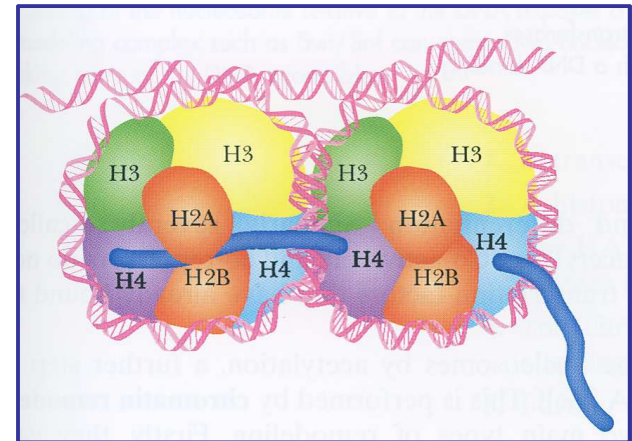
transkripční faktor **MyoD**

- indukuje expresi genů potřebných pro svalové buňky
- obsahuje doménu šroubovice-smyčka-šroubovice (HLH) pro dimerizaci a doménu pro vazbu na DNA
- funguje jako heterodimer složený z tkáňově specifického proteinu HLH (**MyoD**) a obecného proteinu HLH (**proteinu E**)
- heterodimerizace s inhibítorem postrádajícím DNA-vazebnou doménu (**Id**) blokuje vazbu komplexu na DNA (**inhibice svalové diferenciace**)



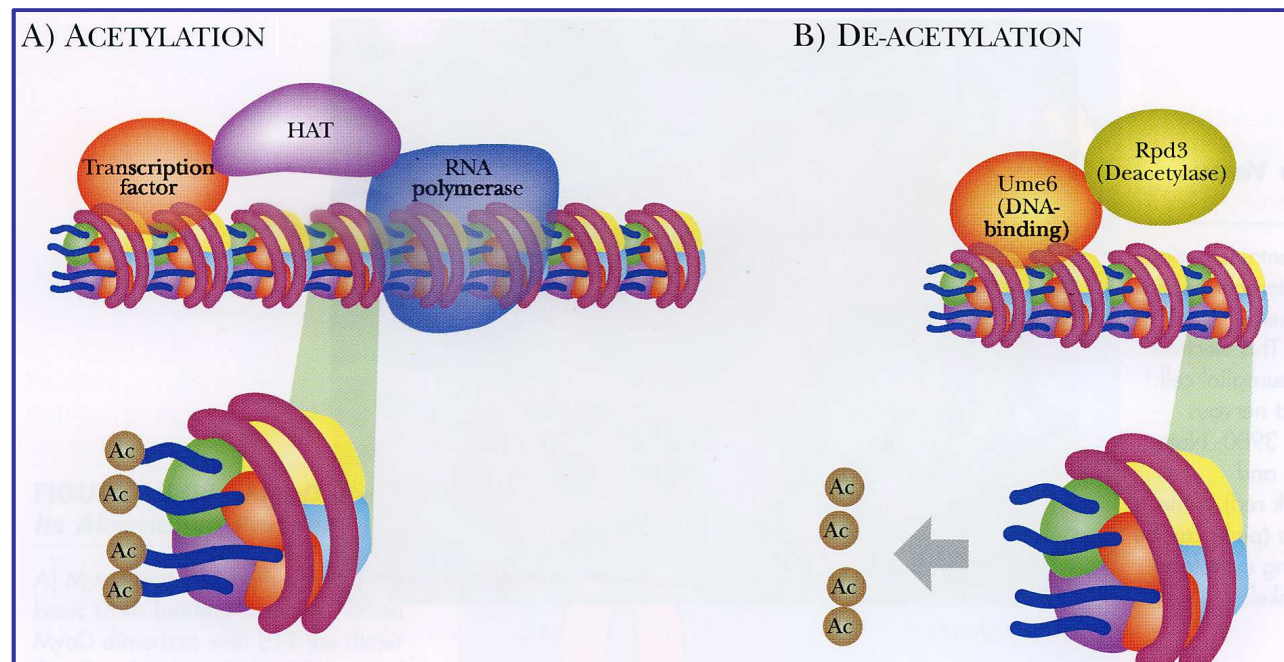
Přístupnost DNA v chromatinu

- hustě složená DNA v chromatinu zabraňuje RNA-polymeráze v přístupu k promotoru
- acetylace histonů ovlivňuje kompaktnost chromatinu: neacetylované histony tvoří velmi kondenzovaný chromatin, acetylované histony méně kondenzovaný chromatin
- strupeň acetylace určují enzymy: **histonacetyltransferázy (HAT)** a **histonové deacetylázy (HDAC)**



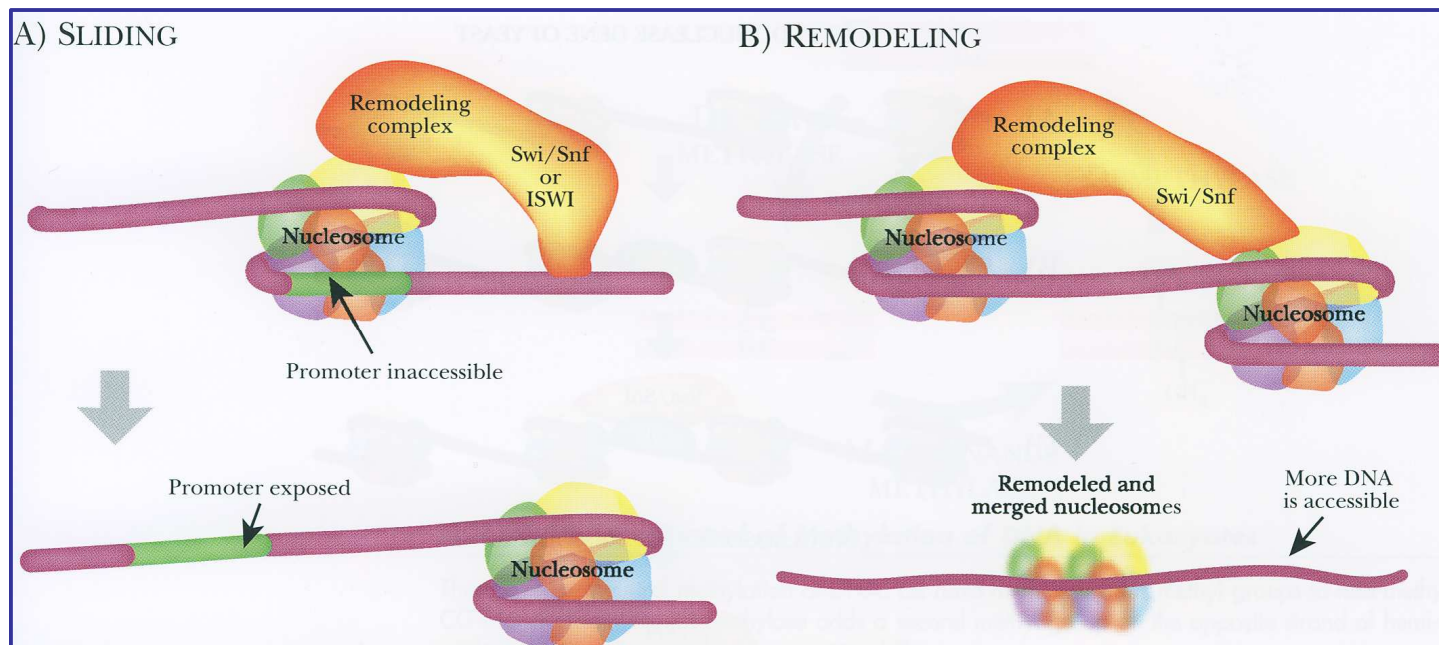
Regulátory mění acetylaci histonů

- koaktivátory transkripce mají aktivitu HAT např. proteiny CBP/p300
- korepresory transkripce mají aktivitu HDAC
- koaktivátory a korepresory se nevážou na DNA přímo, ale interagují s transkripčními faktory



Komplexy remodelující chromatin

- doplňují změny nukleozomů plynoucí z acetylace histonů
- posunují nukleozomy po molekule DNA a obnažují její sekvence pro transkripci
- mění uspořádání histonů do volnější podoby, která DNA zpřístupňuje



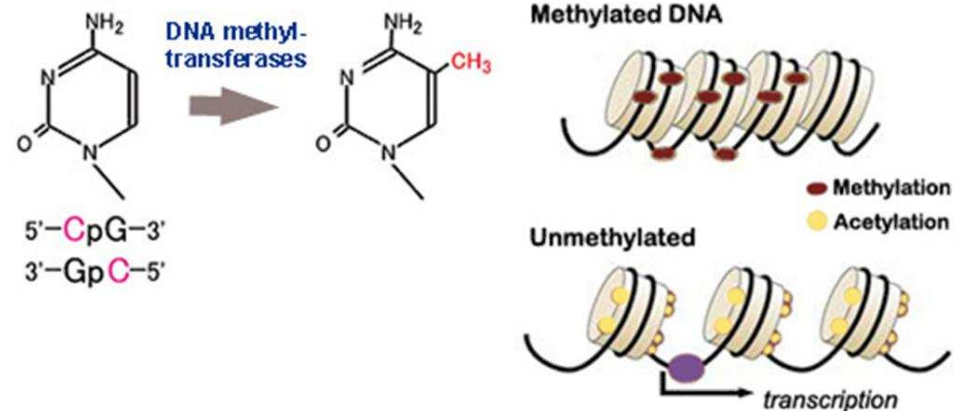


Aktivace transkripce eukaryotického genu

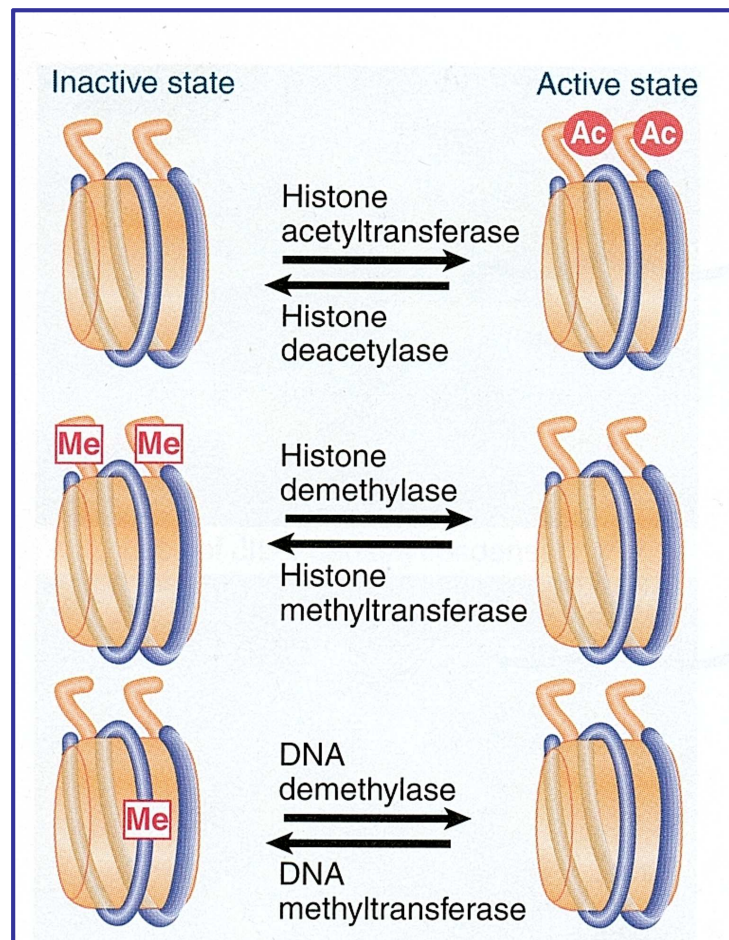
- vazba transkripčního faktoru k DNA
- vazba HAT k transkripčnímu faktoru
- HAT acetyluje histony v okolí a uvolňuje vazbu nukleozomů k DNA
- komplexy remodelující chromatin mění uspořádání nukleozomů – přístupnost DNA je zvýšena
- vazba dalších transkripčních faktorů
- vazba RNA-polymerázy k DNA

Genovou expresi u eukaryot ovlivňuje i metylace DNA

- metylace cytozinu u vyšších eukaryot: 10-30%
- katalyzována metyltransferázou
- rozeznávací sekvence krátké: GC u živočichů a GNC u rostlin
- **methylace DNA zeslabuje genovou expresi**
- provozní geny nemají ostrovy GC metylované
- metylové skupiny vyčnívají do velkého žlábků DNA a tak brání řádné vazbě transkripčních faktorů



Epigenetické změny a genová exprese





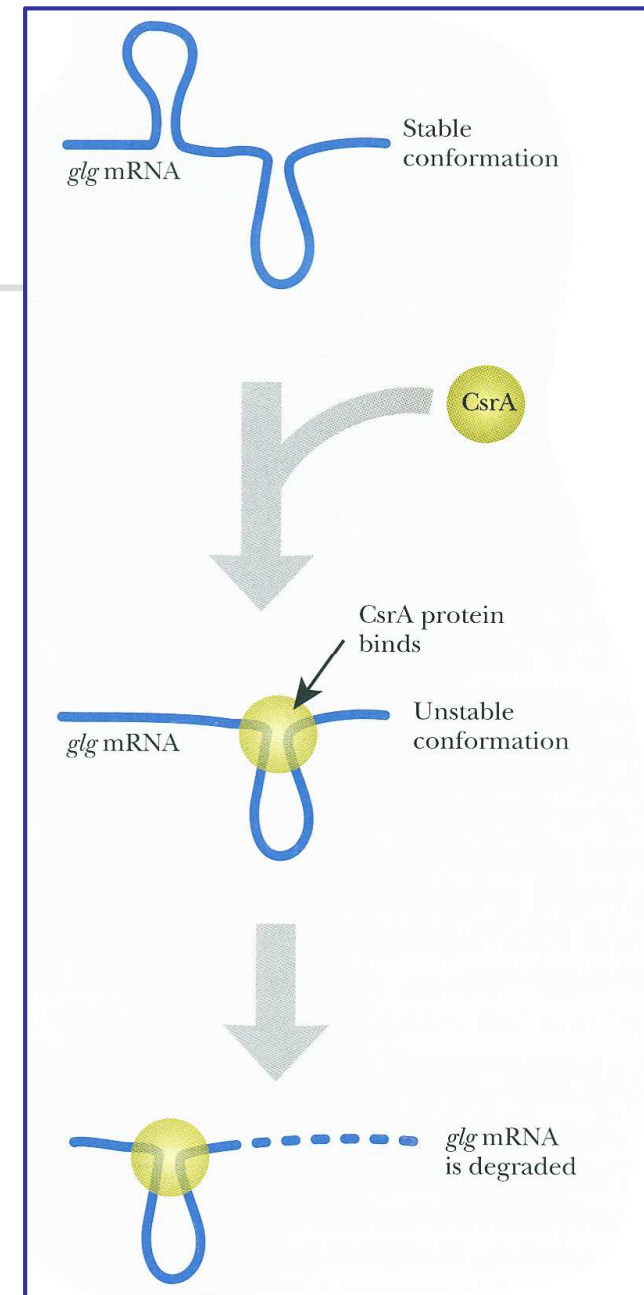
Regulace na úrovni translace

- vzácná u bakterií, běžná u vyšších organismů
- založena na vazbě regulátoru k RNA
- regulátorem je obvykle malá molekula RNA, která se může párovat s komplementární oblastí cílové mRNA

- regulační možnosti:
 - řízení stability mRNA
 - přeměna mRNA do netranslatovatelné formy
 - řízení translace regulačními proteiny nebo prostismyslnou RNA

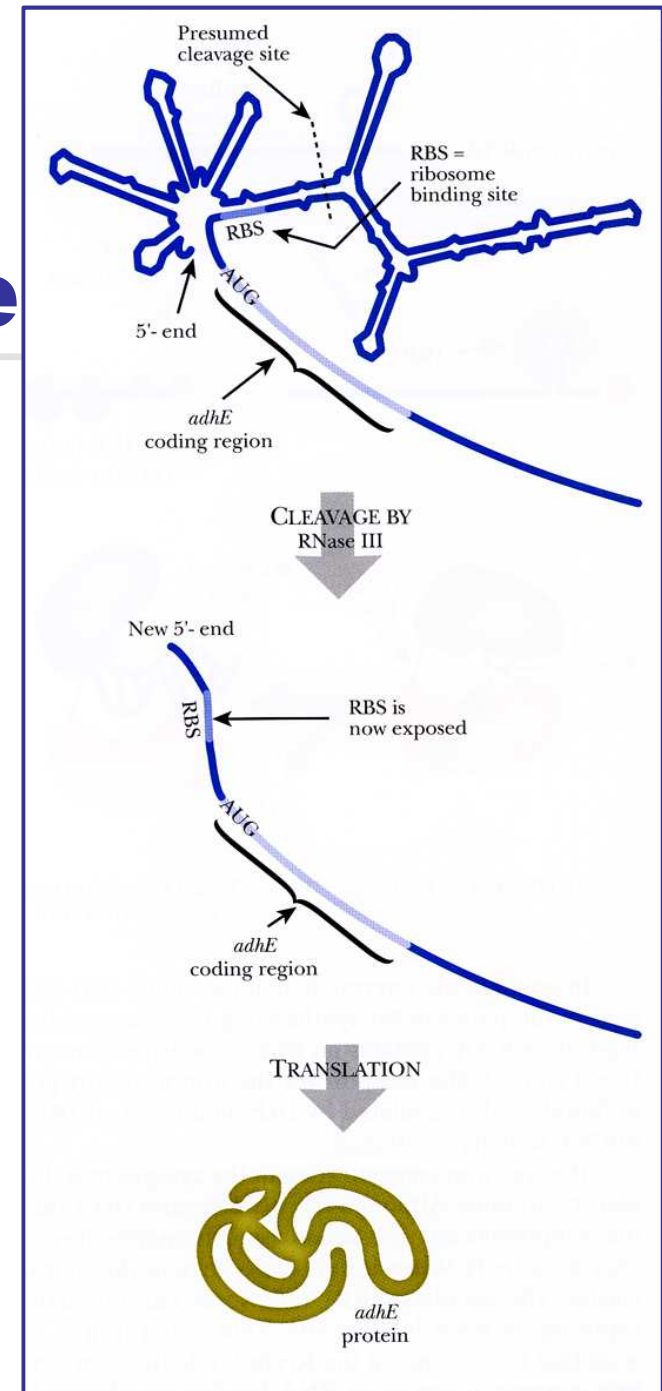
Stabilita RNA

- mRNA má krátký poločas rozpadu, po splnění své funkce podléhá rozkladu ribonukleázami
- citlivost k RNázám závisí na sekundární struktuře
- ta může být ovlivněna regulačními signály, které indukují vazbu regulačních proteinů na RNA



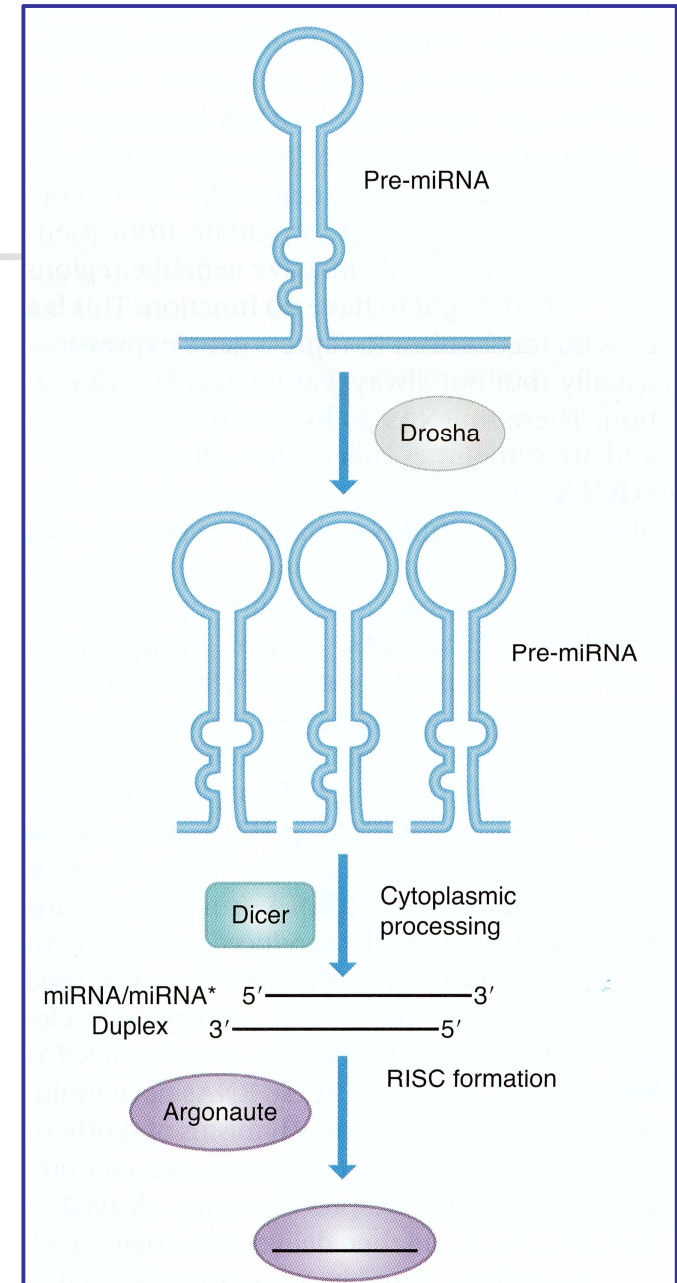
Regulace translace

- místo pro vazbu ribozomů (RBS) na mRNA může být skryto sekundární strukturou
- odštěpením části mRNA RNázou se přístupnost RBS obnoví



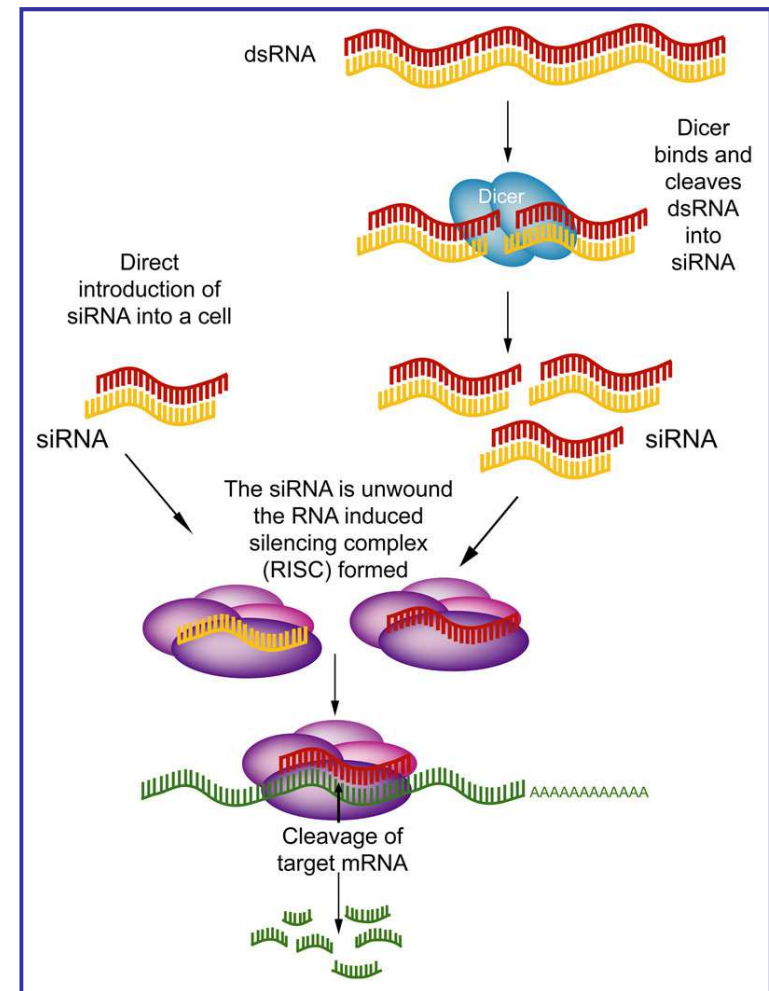
RNA interference (RNAi)

- sekvenčně specifický mechanismus umlčování genů vyvolaný dvouřetězcovou RNA na posttranskripční úrovni
- inhibičními elementy jsou malé molekuly RNA (**miRNA**, **siRNA**), které vznikají štěpením větších molekul **pre-miRNA** ribonukleázami **Drosha** (v jádře) a **DICER** (v cytoplasmě)
- DICER se spolu s RNA a proteiny **Argonaut** stává součástí multiproteinového komplexu **RISC** (RNA-induced silencing complex)



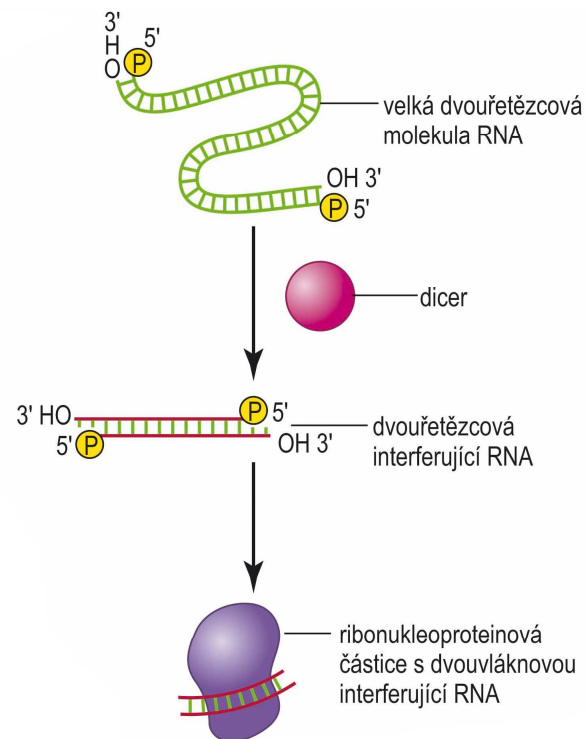
RNA interference (RNAi)

- po úpravách zůstává s komplexem RISC spojena ssRNA
- ta umožní sekvenčně specifickou vazbu celého komplexu na cílovou – komplementární mRNA
- nukleázová aktivita komplexu RISC tuto **mRNA rozštěpí**
- původně ochrana buňky proti virům
- běžná v eukaryotických buňkách
- využitelná pro cílenou inaktivaci genů: výzkum genových funkcí



Dráhy RNAi

- nukleáza **DICER** katalyzuje vznik malých molekul RNA (**siRNA** nebo **miRNA**) o délce 21 – 28 pb z větších ds molekul pre-miRNA
- siRNA a miRNA jsou spárovány po celé délce s výjimkou 3'-konců, kde zůstávají 2 nukleotidy nespárovány
- v cytoplasmě se siRNA a miRNA začleňují do komplexů RISC

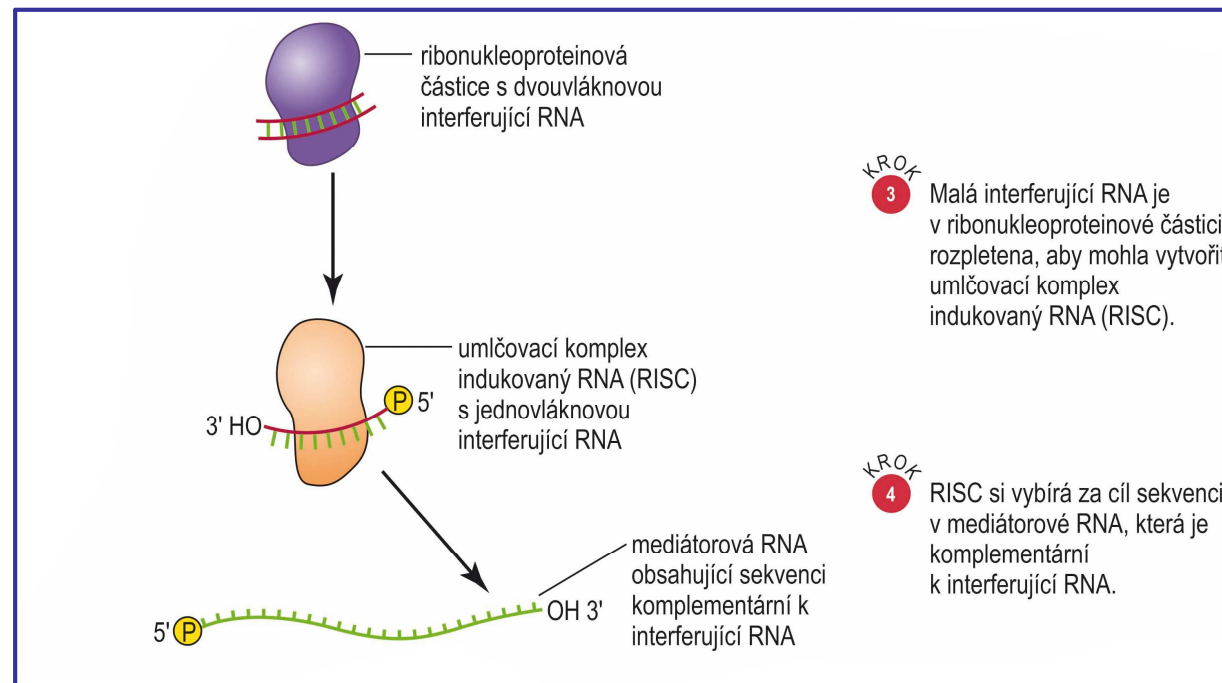


KROK 1 Velká dvouvláknová molekula RNA je rozkrájena na malé, dvouvláknové interferující RNA dlouhé 21–28 párů bází.

KROK 2 Malé interferující RNA a proteiny se spojují do ribonukleoproteinových částic.

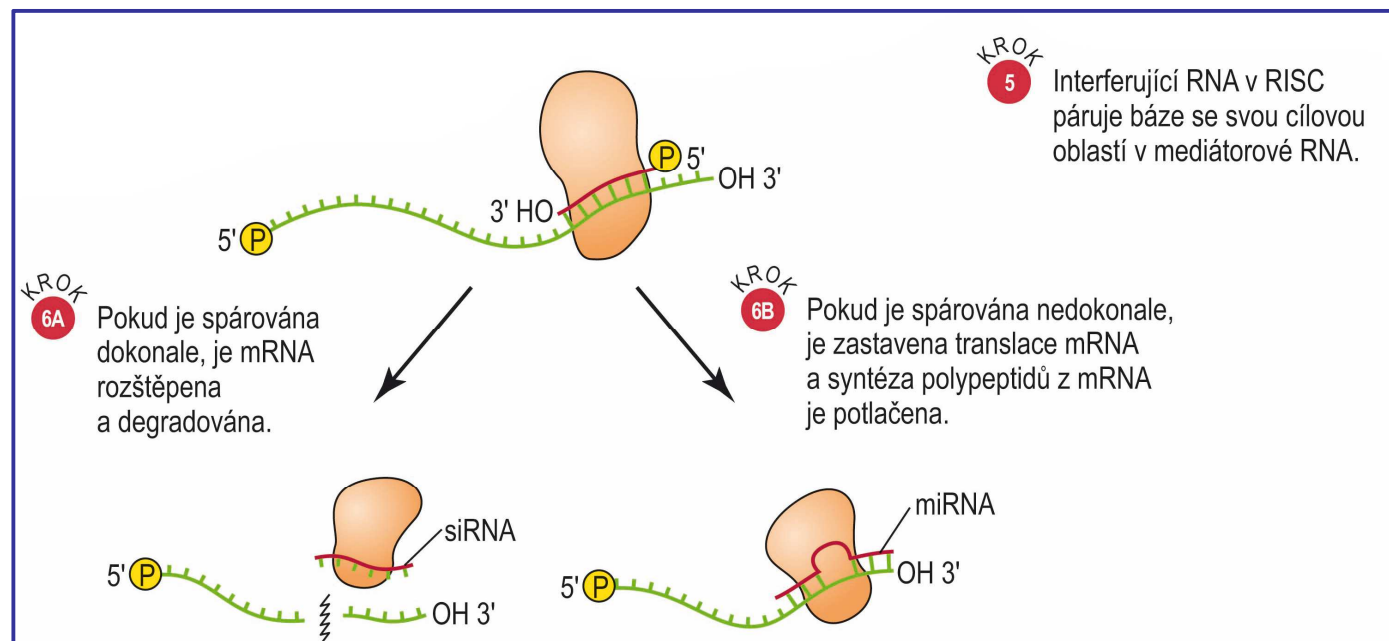
Dráhy RNAi

- dsRNA je v RISC rozpletena helikázovou aktivitou a jedno z jejích vláken je přednostně odstraněno
- zbývající řetězec RNA interaguje se specifickými molekulami mRNA
- interakce plyne z párování obou molekul



Dráhy RNAi

- mRNA se tak nemůže podrobit translaci
- mRNA vázaná v RISC se buď rozštěpí a degraduje nebo zůstane v ds komplexu
- její translace znemožněna





miRNA versus siRNA

- obě RNA negativně regulují translaci
- miRNA je endogenní, siRNA je exogenní (např. virového původu)
- miRNA může, ale nemusí být úplně komplementární určitému transkriptu, proto jedna miRNA může blokovat translaci několika/mnoha transkriptů (desítky až stovky)
- při úplné komplementaritě dochází k RNA interferenci vedoucí k degradaci mRNA
- při neúplné komplementaritě k degradaci nedochází, ale translace je blokována

Objev RNA interference: Nobelova cena

Andrew Fire a **Craig C. Mello** získali za objasnění RNA interference u hlístice Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství v roce 2006

