

P9. Význam regulací

Kontrola exprese genů u Escherichia coli

Východiskem pro pochopení vývojových procesů a jejich souvislosti s evolucí organických forem jsou mechanismy regulace exprese genů. Prokaryontní i eukaryontní buňky jsou nastaveny na optimální využití svých možností. I když část metabolických procesů probíhá díky trvalé přítomnosti příslušných enzymů (konstitutivních enzymů), o ekonomii buňky a realizaci konkrétního fenotypu rozhodují regulační procesy.

V případě prokaryontů se regulace uskutečňují

a) *Na úrovni kontroly aktivity enzymů*

Vzorem je negativní zpětnovazební regulace, kdy konečný produkt řetězu enzymových reakcí inhibuje aktivitu některého z prvních enzymů tohoto řetězu, nebo enzym, jehož aktivita rozhoduje o větvení reakcí. Tato inhibice je důsledkem změny konformace enzymu (dle F. Jacoba a J. Monoda změny jeho alosterických vlastností), vyvolané vazbou alosterického efektoru (konečného produktu nebo jeho analogů) na specifické místo proteinu. Například biosyntéza isoleucinu z threoninu je inhibována přebytkem isoleucinu tak, že isoleucin vazbou na threonin-deaminasu blokuje konverzi threoninu na α -ketobutyrát.

b) *Na úrovni genomu ovlivněním exprese genů, a/nebo na úrovni translace*

V r. 1961 byla F. Jacobem a J. Monodem publikována práce, která objasnila kontrolu metabolismu laktózy v buňkách *E. coli* v změnách exprese laktózoového (*lac*) operonu (Jacob and Monod 1961). Princip *lac* regulace se stal základním modelem genetických regulací (Miller 1978). Laktózoový operon je integrovanou transkripční jednotkou, složenou ze tří genů *lacZ*, *lacY*, *lacA*. Buňky *E. coli* nejsou schopny využít laktózu, pokud není rozštěpena na složky, galaktózu a glukózu, enzymem β -galaktosidasou jejíž aminokyselinové složení je kódováno genem *lacZ*; další dva geny *lacY*, *lacA*, kódují enzym permeasu pro β -galaktosidy a galaktosid acetylasu. Exprese *lac* operonu je negativně kontrolována (reprimována) přítomností bílkovinného represoru, produktu regulačního genu *lacI*. Kromě těchto čtyř strukturních genů jsou součástí operonu dvě regulační sekvence, vazebné místo pro represor (operátor *lacO*) a vazebné místo pro RNA polymerasu (promotor *lacP*). Represor je alosterickou bílkovinou, která vazbou vazbou β -galaktosidů ztrácí schopnost vázat se k operátoru. Tím se uvolňuje cesta pro RNA polymerasu a dochází k iniciaci transkripce. Funkcí promotoru je zajistit koordinovanou expresi „*in cis*“, tj.

koordinovanou expresi genů, které jsou součástí jednoho operonu a jejichž transkriptem je jedna společná mRNA.

Existují mutace, které ovlivňují funkci *lac* operonu. Některé vedou ke konstitutivní expresi, tj. činí expresi operonu nezávislou na přítomnosti efektoru, jiné ovlivňují strukturu a funkci enzymů, jiné ovlivňují rychlost a účinnost transkripce. Při růstu s laktózou jako jediným zdrojem energie a uhlíku se v buňce *E. coli* nachází několik tisíc molekul β -galaktosidasy. Některými mutacemi lze dosáhnout několikanásobné nadprodukce enzymu, ovšem na úkor syntézy ostatních enzymů a proliferační aktivity buňky.

☞ *Regulace lac operonu E. coli se stala učebnicovým prototypem genetických regulačních mechanismů. Vyplýval z něj i koncept mediátorové RNA, (mRNA).*

U *E. coli* a jiných mikroorganismů byly objeveny další genetické regulační obvody, jejichž společnou vlastností je negativní regulace působením represorů. Liší se však jen způsobem interakce represoru s efektozem: buď se jedná o indukci, tehdy je represor efektozem inaktivován (jako v případě *lac* operonu), nebo je represor efektozem aktivován a dochází k represí; typickým příkladem represibilního operonu je tryptofanový (*trp*) operon; v tomto případě tryptofan nacházející se v přebytku (jako korepresor) aktivuje alosterický represor. Výsledkem je koordinovaná represe pěti genů *trp* operonu a potlačení další syntézy tryptofanu.

Obecně, v syntéze enzymů katabolických reakcí zcela převažuje indukce, zatímco syntéza enzymů anabolických reakcí je represibilní. Negativní kontrola transkripce u bakterií je usnadněna skutečností, že bakteriální mRNA jsou většinou nestálé (rychlost jejich rozpadu je větší, než rychlost dělení buněk), takže celý systém může pohotově reagovat na změny regulačních vstupů. Jestliže nastavení regulačních parametrů rozhoduje o projevu genotypu, tj. o proměnách fenotypu, pak dědičné změny vazebných schopností bílkovin a změny struktury regulačních sekvencí DNA mohou být příčinou transformací vývojového potenciálu ve prospěch evoluce.

☞ *Logika regulací u prokaryot, optimalizovaná a fixovaná evolucí, je v souladu s vysokou rychlostí metabolismu a životních cyklů a nízkou úrovní strukturní complexity.*

Rozpojení genových sekvencí bakteriálních operonů do oddělených subjednotek se společným pozitivním regulačním členem (aktivátorem) poskytuje další možnosti ladění regulací koordinované

exprese. Příkladem může být evoluce uspořádání sekvence genů pro biosyntézu tryptofanu u různých druhů mikroorganismů (Crawford 1975; Campbell 1979): u Pseudomonád a Acineterobacterů geny tryptofanového klastru tvoří tři *subklastry*, u druhů *Bacillus*, *Micrococcus* a *Streptomyces* dva *subklastry*, *Staphylococcus*, *Escherichia* a *Serratia* jeden klastr, přičemž v obou posledních případech došlo k fúzi domén dvou párů genů (G,D a C,F) tak, že jejich produktem jsou bifunkční enzymy.

☞ *Amplifikace, translokace, rekombinace a fúze genů je běžným prostředkem evoluce genomů.*

Od regulačních obvodů k regulačním kaskádám

Lac operon *E. coli* není izolovaným regulačním obvodem, jeho exprese závisí na koncentraci glukózy v buňce. Jednoduchý cukr glukóza je produktem základního metabolismu a je bezprostředním zdrojem energie a uhlíku. Disacharid laktóza, pokud má plnit stejnou funkci, musí být nejdříve rozštěpena na složky, glukózu a galaktózu. Syntéza β -galaktosidasy by však v přítomnosti glukózy byla pro buňku zbytečnou zátěží. Proto vznikl kontrolní mechanismus, umožňující včlenění laktózového systému do celkového metabolismu. Tím je pozitivní regulace prostřednictvím alosterického proteinu CAP (catabolite activator protein). Konformace CAP a jeho afinita k příslušné regulační sekvenci v genomu závisí na jeho interakci s cyklickým adenosin-monofosfátem cAMP (cAMP je 3',5'-cyklický fosfodiester adenosinu, vznikající z ATP působením adenylát cyklasy). Tvorba cAMP z ATP však závisí na vnitrobuněčné koncentraci glukózy. V podmínkách hladovění na glukózu klesá koncentrace ATP a narůstá koncentrace cAMP. V těchto podmínkách vzniká komplex CAP-cAMP, který se váže do blízkosti promotoru *lacP* a tím posiluje jeho afinitu k RNA polymerase. Tento regulační systém je výsledkem selekce promotoru s oslabenou vazebnou schopností pro RNA polymerasu a vzniku nové kooperující vazebné sekvence pro CAP-cAMP. Je to příklad evoluce k adaptivnímu optimu.

Jako promotor operonů zajišťuje koordinovanou expresi genů „*in cis*“, tak mechanismus pozitivní regulace skrze CAP a akceptorové sekvence funguje jako epistatická kontrola „*in trans*“ - propojuje různé operony v integrovanou regulační jednotku - regulon. Učebnicovým příkladem takové integrace je koordinovaná regulace štěpení dalších potenciálních zdrojů uhlíku a energie, sacharidů arabinózy, maltózy a galaktózy, v závislosti na koncentraci glukózy v buňce. Aktivátorem transkripce jednotlivých operonů je opět komplex CAP-cAMP. Uvedené typy regulací jsou využívány v těch případech, kdy je nutná rychlá reakce na změnu prostředí. Genové regulace však mohou rozhodovat i o časovém sledu a návaznosti

různých procesů tak, že předchází regulační stupně postupně zapínají stupně následující.

☞ Integrací a propojením jednotlivých regulačních modulů vznikají *koordinované regulační sítě*; mapy takových regulačních sítí byly nedávno publikovány pro případ *E. coli* a *Saccharomyces cerevisiae*.

Regulační sítě by na určité úrovni komplexity mohly být základem samouspořádání regulačních procesů; S.A. Kauffman (Kauffman 1991; 1993) uvažuje i o *možnosti zpětnovazebního působení na genotyp*: nastavení podmínek pro *vnitřní selekci* (kanalizaci) množiny mutací, tedy nikoli o lamarckovské rozhodnutí o specifické genetické změně.

☞ Podle Kauffmanova není fenotyp součtem prepisů informací z jednotlivých genů, ale *emergentní vlastností* celého systému: fenotyp se vynořuje jako důsledek interakcí regulačních systémů. Byť genetický podmíněný, je *a priori* nepředpověditelný.

Příkladem regulačních sítí se sofistikovaným souborem regulačních prvků jsou sítě, které se uplatňují při *rozhodování o životních strategiích temperovaných bakteriofágů* a kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*.

Temperované bakteriofágy

Temperované (lysogenisující) fágy mohou existovat ve dvou alternativních stavech, buď jako virové částice využívající hostitele pro svou mnohonásobnou reprodukci, nebo v lysogenním stavu, jako virový genom integrovaný v genomu hostitele (provirus, profág). Lysogenní buňka obsahuje zpravidla jednu kopii fágového genomu, která se synchronně replikuje s genomem bakteriálním. Lysogenní buňka díky expresi fágového genomu jeví *lysogenní imunitu* – je odolná, „imunní“, proti infekci virovými částicemi stejného typu (jeví příslušnou *imunitní specifitu*). Virus jak v případě lytické, tak v případě lysogenní odpovědi vyžaduje metabolismus, RNA polymerasu a proteosyntetický aparát hostitele.

Dobře prostudovaným je fág λ , *E. coli* (Ptashne 1986a). Osud genomu λ (dle Waddingtona jeho „epigenetický prostor“) závisí na souhře šesti regulačních proteinů: cro, N, Q, P_{cI}, P_{cII}, P_{cIII}, ve vztahu k několika promotorům.

- *První etapou vývoje*, bezprostředně následující vstup genomu λ do hostitelské buňky, je transkripce genů *N* a *cro* ze dvou promotorů p_R a p_L (p_R - promotor pro pravostrannou transkripci, p_L - promotor pro levostrannou transkripci) a produkce regulačních proteinů N a P_{cro}.

Pcro má vlastnosti represoru, protein N je pozitivním regulátorem (s antiterminační funkcí)

☞ Fág má nyní *možnost rozhodnout o svém dalším osudu* (zde najdeme elementární analogii diferenciaci eukaryot). Volba závisí na povaze signálů z vnitřního i vnějšího prostředí; váže se na fyziologický stav hostitele.

Bud' a) ustaví cyklus množení fága s lysou buňky, nebo b) zvolí konservativní formu - lysogenii

Ad a) V podmínkách zajišťujících energeticky náročnou lytickou reprodukci (vznik několika set kopií genomu a odpovídající množství proteinových komponent virové částice) dojde především k mnohonásobné replikaci fágové DNA a následně k transkripci skupiny tzv. pozdních genů.

V případě rozhodnutí k lýze

-protein Pcro funguje jako represor genu *cI* a znemožňuje syntézu hlavního represoru Pcl a tedy i lysogenizaci

-pozitivní (antiterminační) funkce proteinu Q umožňuje vznik strukturních bílkovinných složek virionu

-samouspořádáním fágové DNA se strukturními bílkovinami virionu probíhá morfogeneze fágových částic. Konečnou fází je lýza hostitelské buňky.

Ad b) Fyziologické podmínky nevyhovující účinné reprodukci vedou k lysogenisaci a vzniku profága (províru).

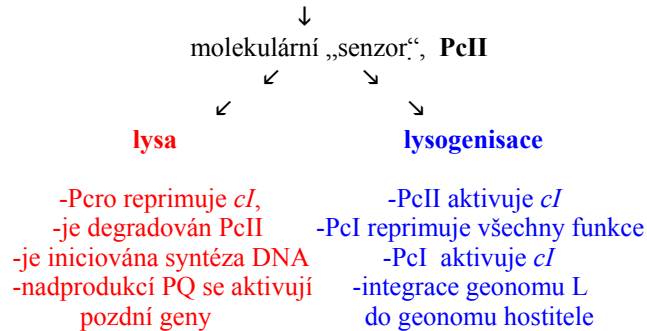
-Lysogenisace je spuštěna proteinem *PcII*, který umožní transkripci rekombinačních genů (*xis*, *int*) a *aktivuje transkripci cI*, tj. tvorbu hlavního fágového represoru Pcl z promotoru p_{RE} (produkt genu *cIII* přitom stabilizuje protein PcII).

Represor Pcl vystupuje ve dvou funkcích: *jako aktivátor transkripce genu cI* (jako faktor pozitivní regulace své vlastní syntézy ze zvláštního promotoru p_{RM}) a současně *jako negativní regulátor všech ostatních fágových funkcí* (včetně funkce cro blokováním promotorů p_R a p_L).

Rekombinační proteiny umožňují integraci fágového genomu do genomu hostitele. Hostitel přežívá infekci, autoregulací je *trvale produkován represor Pcl*, získává imunitu proti geneticky homologním virům.

Bifurkace, podmíněná fyziologickým stavem hostitele, je závislá na přítomnosti bakteriálních proteas: v bohatém prorůstovém prostředí jsou tyto proteasy aktivovány a degradují protein PcII, což znemožňuje zahájení syntézy imunitního represoru Pcl z promotoru p_{RE}.


λ infekce \Rightarrow transkripce velmi ranných genů [*N, cro*] \Rightarrow
 \Rightarrow aktivace ranných genů [PcIII, PcII, Q] proteinem N



Existuje řada mutací ve vazebných sekvencích regulačních genů λ , i v regulačních a strukturních genech, které mění vlastnosti jednotlivých regulačních obvodů a tudíž i osud bakteriofága λ a jeho hostitele. Rozšířování molekulárního mechanismu vývoje tohoto inspirativního objektu molekulární genetiky je výsledkem spolupráce mnoha laboratoří; úvodní práce opět pocházejí z pařížského Pasteurova ústavu, z laboratoře A. Lwoffa, F. Jacoba a J. Monoda, z 50.-60. let minulého století, s významným podílem M. Ptashne (Harvardská universita). Záslouhou M. Ptashne je vysvětlení struktury a funkce represorů. K vysvětlení mechanismu antireprese a vysvětlení funkce λ *cro* významně přispěla neapolská škola E. Calefa a český vědec Z. Neubauer (Oppenheim, Neubauer et al. 1970).

Porovnání strategií rozhodování v epigenetickém prostoru fága λ a homologního fága 434 (*E. coli*) a fágů L a P22 (*Salmonella typhimurium*, Bezdek and Amati 1967), poskytuje představu o evoluční diferenciaci genetických regulačních elementů. Uvedené druhy temperovaných fágů mají stejnou strukturu základního regulačního modulu pro syntézu lysogenního represoru (v případě fágů L a P22 nazvaného *ImmC* (*ImmC* obsahuje gen pro imunitní represor, gen *cro* pro antirepresor, a gen aktivující ustavení represe). Evolučně komplexnější genom P22 obsahuje navíc další, velmi sofistikovaný modul *ImmI*, kooperující s *ImmC* (*ImmI* zahrnuje gen *ant* pro druhý antirepresor, gen *mnt* gen kódující represor genu *ant* a gen *arc* kódující represor genu *mnt*).

O evolučních vztazích λ , L a P22 viz dále P10., Evoluce biologické complexity.

 Genomy eukaryot obsahují skupiny homeotických genů, které v určitém místě a čase rozhodují o expresi podřízených genů.

Názorným příkladem je genetická kontrola vývoje drozofily (*Drosophila melanogaster*). Tento organismus prochází stadiem embrya, larvy a dospělého organismu. Larva i dospělý organismus mají tělo rozdělené v 15 navazujících segmentů.

O identitě a specifickém vývoji skupin buněk v jednotlivých segmentech rozhodují exprese různých kombinací homeotických genů. Jsou to geny, které obsahují evolučně konzervativní sekvenci, tzv. *homeobox*. Jeho přepisem je část proteinu, zvaná *homeodoména* (typicky 60 aminokyselin).

☞ Obecně, homeotické proteiny fungují jako transkripční faktory. Struktura homeodomény je uzpůsobena k vazbě na regulační sekvence DNA.

Represorové geny fága λ *cI*, *cro* a gen λ *Q* můžeme brát, z hlediska funkce jejich produktů, jako analogie homeotických genů eukaryot (Ptashne 1986a; Harrison 1991): jejich produkty jsou rozhodující pro realizaci vždy jen jedné ze dvou možných alternativních vývojových drah (v této analogii pátý regulační gen N nepatří do této kategorie, protože jeho produkt nerozlišuje lytickou a lysogenisující dráhu). Pokud jde o způsob vazby k DNA, P*cI* a P*cro* se chovají jako typické homeotickými proteiny:

-P*cI* (236 ak) se skládá ze dvou částí tvořených krátkými α -helixy; obě části, N-doména (92 ak), a C-doména (104 ak), jsou spojeny lineárním polypeptidem (40 ak). N-doménu tvoří 5 α -helixů, z nichž dva interagují s velkým žlábkem DNA. Rozpoznávání specifické sekvence bází operátoru náleží 3. helixu. Protein P*cI* (*cI*-represor λ) funguje pouze ve formě dimeru.

-P*cro* tvoří jen jedna doména (66 ak), rovněž obsahující 5 α -helixů. P*cro*, podobně jako P*cI*, funguje jako dimer.

Gen *cro* je patrně paralogem *cI* a vznikl duplikací *cI*; mutační diferenciací obou vede ke specifitě rozlišení vazebných sekvencí dvou různých operátorů.

(Podobně se k DNA vážou i dalších prokaryotické kontrolní proteiny: *lac*, *trp* represory a cAMP receptorový protein (CRP)).

Na příkladu fága λ porozumíme zásadnímu významu různých molekulárních přepínačů, které rozhodují

- o nastavení vývojových cest, produkty genů *c*, *Q*,
- o časové posloupnosti vývojových kroků, produkty genů *N*, *cro*, *Q*, *cIII*, *cII*, *cI*,
- opakování regulace v jiných vývojových etapách a jiných kontextech (P*cI* jako represor vs. P*cI* jako faktor autoregulace vlastní syntézy; P*cro* jako „antirepresor“ tj. represor *cI* a, v tzv. „neimunní“ fázi

lysogenů λ (Neubauer), jako represor exprese ostatních ranných funkcí).

U lysogenů můžeme vyčlenit *dva stavy, charakteristické pro diferenciaci buněčných linií*, podobně, jako ve vývoji mnohobuněčných organismů: latentní stadium „*předurčení*“ (commitment) a stadium „*rozhodnutí*“ (determination) k některé z možných vývojových cest.

Stav lysogenie se klonálně udržuje tak, že při dělení buněk dochází k symetrické distribuci represoru P_{CI} do obou dceřinných buněk. Lysogenní buňka je však *předurčena* k lyse; k lytickému *rozhodnutí* dojde

- jesliže je degradován represor P_{CI} (např. proteinem RecA při poškození genomu hostitele),
- nebo v důsledku konjugativního přenosu profága do buňky nelysogenního recipienta (zygotickou indukci profága).

Souběžně s evolučními změnami uspořádání regulovaných domén probíhá diferenciacie regulačních sekvencí, promotorů a operátorů. Mění se jejich poloha vzhledem k transkripčním jednotkám, mění se i směry transkripce.

Například operony *lac* a *trp* obsahují promotory zajišťující jednosměrnou transkripci, biotinový klastr *E. coli* a geny kontrolující zahájení transkripce ranných funkcí fága λ jsou transkribovány divergentní transkripcí vlevo a vpravo ze dvou promotorů se dvěma operátory. Exprese operonu *trp* zahrnuje navíc ještě kontrolu mechanismem tzv. atenuace, který se formálně podobá antiterminaci u fága λ ; atenuace (neznámá u eukaryot) v případě *trp* operonu umožňuje kontrolu transkripce zpětnovazebním propojením s celkovou úrovní translace: v podmínkách nízké koncentrace tryptofanyl-tRNA, tj. při hladovění na tryptofan, se atenuace (signál pro předčasnou terminaci transkripce) uvolňuje. Kontrola represorem a atenuací zahrnuje dvě různé kontrolní sekvence, operátor a atenuator, liší se mechanismem i strukturou kontrolních elementů; umožňuje jemné ladění exprese a je dalším příkladem integrace regulačních systémů.

Poučení získané v mikrosvětě fága λ nyní doplníme o poznatky získané studiem *přepínání typu pohlaví u kvasinky (S.cerevisiae)*;

☞ objevíme další regulační možnosti,

- buněčně-specifické regulace kombinací různých proteinových faktorů do nadmolekulárních komplexů,
- regulační roli chromatinu.

Pohlavní diferenciace S. cerevisiae (Nasmyth 1982; Heskowitz 1989; Haber 1998). Existují dvě alternativní rozmnožovací strategie tohoto jednobuněčného eukaryota:

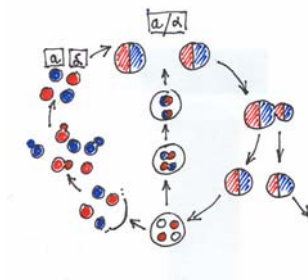
- množení v mitotických cyklech diploidních buněk,
- množení v mitotických cyklech haploidních buněk.

V obojím případě se buňky dělí asymetrickým pučením, z *mateřské buňky* se odděluje *buňka dcerinná*.

Buňky jsou ve výchozím stavu diploidní ale v podmínkách hladovění mohou podstoupit meiosu za vzniku tetrády haploidních buněk (spor) uzavřených v asku.

V asku jsou dvě dvojice buněk, lišící se typem pohlaví, znovu schopných fúze za vzniku diploidních buněk.

Jeden pohlavní typ (*mating type*) je α , druhý **a**. Tetráda má tedy konstituci $[2\alpha, 2a]$.



Diploidní buňky mohou vznikat

- a) fúzí haploidů opačného pohlaví přímo v asku (ale bez možnosti šířit genotypovou variabilitu rekombinacemi), nebo
- b) po otevření asku, ve volném prostředí. V tomto případě existuje pozoruhodný molekulární mechanismus, který zajišťuje fáze střídání pohlaví v jednotlivých generacích.

Vzhledem k tomu, že kvasinky nemají pohlaví determinované specializovanými pohlavními chromosomy, pak existují dvě možnosti určení pohlavního typu:

- *segregace* „pohlavních alel“ v meiose,
- nebo regulované střídání (přepínání) pohlaví mechanismem alternativní transkripce alel, nacházejících se ve dvou vzájemně *vázaných* „kasetách“.

V prvním případě by mohlo docházet nerovnoměrnému zastoupení obou pohlavních typů v populaci a k extinkci jednoho z nich.

„Informační centrum“ tvoří dvě netranskribované „kasety“ *HML α* , *HMRa*. „Exekutivním“ lokusem, v němž se uskutečňuje jejich alternativní transkripce, je lokus *MAT*. Kasety *HMRa* obsahuje alelu *Mata1*; kasety *HML α* obsahuje dvě kooperující alely *Mata α 1 α 2*;

Změny závisejí na expresi regulačních faktorů v regulačních kaskádách. Z tohoto schématu lze vyzorovat, že neustále vzniká, a dále zůstává zachována, nepřetržitá linie buněk s potenciálem diference.

Mat lokus odpovídá za produkci tří typů proteinů: **Pa1**, **Pa2**, nebo **Pa1**: Alely **Mata1α2** kódují proteiny **Pa1**, **Pa2**; alela **Mata1** kóduje protein **Pa1**; Tyto proteiny spolupracují s proteinem **MCM1**, který je *konstitutivně přítomen v buňkách všech typů a je vlastním transkripčním faktorem*. Kontrola pohlaví se děje vazbou těchto proteinů na promotory **a**-specifických genů (**pa**), **α**-specifických genů (**pa1**, **pa2**), **haploid-specifických genů (ph)**, promotor genu pro represor meiosis (**pRme**) a promotory genů pro sporulaci.

Uvedené regulační proteiny, skrze pořízené geny, kontrolují fenotypy dvou typů haploidních pohlavních buněk a fenotyp bezpohlavní diploidní buňky.

- *Diploidní buňka* má genetickou konstituci lokusů *MAT* [**Mat¹α1α2/Mat^ha1**];

není exprimován **Pa1**; jsou exprimovány **Pa2**, **Pa1**, a **MCM1**

Pa2 se účastní represe **a**-specifických genů;

heterodimer 2(Pa1)/2(Pa2) blokuje **pa1** (→nemožnost indukce **α**-specifických genů),

heterodimer 2(Pa1)/2(Pa2) blokuje **ph** (→nemožnost indukce haploid-specifických genů),

současně je navozena kompetence k meiose a sporulaci které se uskuteční v podmínkách hladovění.

-*Haploidní buňka α* má genetickou konstituci lokusu *MAT* [**Matα1α2**]; produkuje **Pa1**, **Pa2**; jsou aktivovány **α**-pohlavně specifické geny, haploid-specifické geny, reprimovány geny pro aktivaci meiosis; indukci transkripce vyvolává komplex {MCM1-Pa1}; **a**-fenotyp je reprimován komplexem {2(Pa2)-MCM1-2(Pa2)}.

Výsledně je navozena kompetence buněk pro pohlavní typ-**α**.

- *Haploidní buňka a* má genetickou konstituci lokusu *MAT* [**Mata1**]; produkuje pouze **Pa1**; Pa1 však zde není využit, uplatňuje se pouze v diploidní buňce. Pro vyjádření fenotypu-**a** stačí přítomnost konstitutivního proteinu MCM1 ve funkci TF. Jím jsou aktivovány **a**-specifické geny. **α**-specifické geny a geny pro indukci meiosis nejsou aktivovány - není přítomen příslušný TF.

Výsledně je navozena kompetence buněk pro pohlavní typ-**a**.

Kopie alel v lokusu MAT	Expres v lokusu MAT	Expres Sex specifických Genů	Fenotyp buněk
a1	(Pa1)	[a -SG], [α -SG], [h -SG]	a , haploid
α1,α2	Pa1, Pa2	(Pa2) ⇨ a -SG, (Pa1) ⇨ α -SG; [h -SG]	α , haploid
a/α1,α2 (diploid)	(Pa2+Pa1) ⇨ Pa1	(Pa2) ⇨ a -SG; (Pa2+ Pa1) ⇨ ⇨ α -SG & h -SG	a/α , diploid

[**a**-SG], [**h**-SG], konstitutivní exprese; indukce ⇨; represe ⇨;

[**α**-SG], geny konstitutivně ne-exprimované v **a** buňkách;

komplex (**α2+a1**), represor;

Plně vyjádření α -specifického nebo α -specifického fenotypu pro konjugativní splynutí buněk ještě vyžaduje indukci kompetentních buněk k pohlavní diferenciaci. Děje se to působením signálních peptidů (pohlavních feromonů). Ty jsou slabě produkovány konstitutivně, podobně přítomnost odpovídajících povrchových buněčných receptorů je konstitutivní. Při přiblížení buněk opačného pohlaví signální peptidy indukují zmnožení receptorů a posílení tvorby feromonů pozitivní zpětnou vazbou.

Rozhodování bakteriofágů mezi lysou a lysogenisací lze chápat jako problém vývojové biologie v miniatuře. Obdivuhodný systém kontroly pohlaví u kvasinek zahrnuje všechny základní prvky (vzory) ontogenetických regulací, plně rozvinutých až u živočichů a rostlin.

V mikrosvětě jednobuněčných organismů tedy nacházíme zjednodušené analogie vývojových programů vyšších eukaryot; můžeme je chápat jako odraz archetypů, které předcházely evoluci mnohobuněčných organismů (Scott 2000).

- *Homeodomény* Pa1, Pa2, byly prokázány krystalografickou analýzou komplexu heterodimeru Pa1-Pa2 s DNA (Li, Stark et al. 1995); váží se k DNA stejným způsobem jako represorové proteiny temperovaných bakteriofágů λ , P22, a podobně jako transkripční faktor MCM1.

MCM1 patří do archaické, velmi různorodé, konservativní, skupinky MADS-box genů (Coen and Meyerowitz 1991); „box“ je tvořen sekvencí ~180 pb; jméno „MADS“ je odvozeno od MCM1 (kvasinka), *Agamous* (*Arabidopsis*; diferenciaci květních orgánů), *Deficiens* (*Antirrhinum*; diferenciaci květních orgánů), *SRF* (*Serum Response Factor*; kontroluje lidský gen *fos*).

- *Regulace vývojové chronologie* u mnohobuněčných organismů rozhoduje o topografii diferencovaných buněk; v případě kvasinky je konverze pohlaví vázána na úzký interval v G1 fázi buněčného cyklu a buněčný cyklus slouží jako časová osa diferenciaci.

- Určení vývojových drah v důsledku *asymetrické distribuce buněčných složek*, poziční regulace; její typické vyjádření nacházíme ve vajíčcích drosofil: v každém z obou protilehlých pólů vajíčka drosofil je deponována specifická mRNA mateřského původu; na počátku embryonálního vývoje jedna z nich produkuje bílkovinu *nanos*, druhá bílkovinu *bicoid*. Jejich protiběžné gradienty pak vytvářejí regulační pole, určující předozadní polaritu embrya.

V případě kvasinky jde o asymetrické rozložení mRNA-SWI5, které diferencuje dvě dělicí se buňky v buňku mateřskou a dceřinnou a rozhoduje o expresi funkce HO.

- Represe/indukce často souvisejí se změnami *struktury chromatinu v okolí transkribovaného genu*. V případě kvasinky tyto změny indukují proteinové faktory, které působí v komplexu s RNAPol II („*chromatin remodelling*“ faktory).

- *Působení signálních molekul* na indukci kompetentních buněk k diferenciaci. V případě kvasinky signální peptidy (feromony α ,a) vazbou na receptory indukují *in trans* superexpresi pohlavních fenotypů a konjugaci.

- Fúze haploidních buněk s odlišeným pohlavím připomíná *počátky evoluce pohlavního dimorfismu vyšších organismů*. Střídání pohlaví mechanismem genové konverze zajišťuje v populaci rovnováhu mezi oběma typy pohlaví a předznamenává mechanismus založený na segregaci dvojic pohlavních chromosomů.

- Pohlavní diferenciaci kvasinky, předurčená pouze pro mateřskou buňku, *zachovává linii mateřských buněk, jeví se jako analogie systému kmenových buněk vyšších organismů*.

Transkripce a evoluce transkripčních faktorů

Transkripce je proces kterým je kopírována genetická informace uložená v sekvencích DNA do sekvence nukleotidů RNA. Informace potřebná k syntéze bílkovinných molekul je zprostředkována mediátorovou RNA, mRNA.

Základní mechanismus transkripce je u prokaryot i eukaryot stejný, kondenzace ribonukleotidů podle předlohy DNA je katalyzována komplexy proteinů, DNA-dependentními RNA polymerasami. V každém aktu transkripce je kopírován vždy jen jeden z obou řetězců DNA ve směru 3'-5' (templátový řetězec), přičemž kondenzace ribonukleotidů probíhá ve směru 5'-3' (aniž je vyžadován iniciační primer jako v případě replikace DNA).

Prokaryota vystačí s jedním typem RNA polymerasy pro všechny typy RNA transkriptů, eukaryota využívají tři typy RNA polymeras pro tři typy RNA: *RNA polymerasu I* pro transkripci ribosomálních genů (s výjimkou 5S RNA), *RNA polymerasu II* pro transkripci genů kódujících složení bílkovin (tvorbu primárních transkriptů, z nichž sestříhem vzniká mRNA) a některé typy malých RNA; *polymerasu III* pro transkripci genů 5S RNA, tRNA a řady malých RNA.

RNA polymerasa prokaryot má dvě základní strukturní komponenty: jádro složené ze subjednotek **a, b, b'**: **a₂bb'** a různé σ -faktory, které určují vazebnou specifitu celého polymerasového komplexu (holoenzymu) k různým promotorům. Např. vzniku spór *Bacillus subtilis* se účastní sada σ -faktorů, díky nimž různé varianty holoenzymu postupně rozpoznává různé sporulační promotory.

Regulace transkripce u prokaryot se uskutečňuje působením alosterických proteinů, které vazbou na operátory, specifické sekvence v oblasti promotorů, aktivují nebo blokují promotory. Jednotlivé geny prokaryot bývají sdruženy do transkripčních jednotek oddělených terminačními sekvencemi. Proteinové *antiterminační faktory*, změnou konformace DNA v okolí terminačních sekvencí, umožňují kontrolu délky transkriptu (tj. kontrolu počtu souvisle transkribovaných genů). Tato strategie umožňuje vytvářet regulační kaskády, jak bylo na různých místech uvedeno v předchozím textu.

Transkripce genomů eukaryot, díky větší složitosti genomu zahrnuje podstatně větší počet proteinových složek; vždy vyžaduje aktivaci specifickými transkripčními faktory, které reagují s DNA v bezprostředním okolí promotorů a, mimoto, působení i dalších sekvencně specifických vazebných proteinů. Uspořádání vazebných regulačních sekvencí vzhledem k vlastnímu promotoru se liší pro různé typy genů a různé typy RNA polymeras. V případě genů transkribovaných RNA polymerasou II se jedná o *promotorové sekvence* („TATA-boxy“), sekvence přilehlé k promotoru proti směru transkripce, *URS* (upstream regulatory sequences) a *vzdálené*

regulační sekvence před a/nebo za genem, enhancery a silencery (Ptashne 1986). Transkripční faktory zajišťují *specifitu* transkripce, další přídatné proteiny transkripčního komplexu modulují (zesilují či oslabují) *účinnost* transkripce. *Transkripční faktory eukaryot (TF)* hrají klíčovou regulační úlohu v ontogeneze; fungují jako přepínače vývojových drah při diferenciaci buněk embrya (příklady takového rozhodování jsme již uvedli v souvislosti s reprodukcí fága λ a kontrolou pohlaví u kvasinky (*S. cerevisiae*). TF působí díky schopnosti zaujímat specifické prostorové konformace pro interakce se sekvencemi a konformacemi DNA.

☞ *Vznik a rozrůznění TF je příkladem molekulární evoluční homologie - důsledkem reutilizace a modifikace evolučně starších strukturních modulů, nejčastěji α -spirál a β -listů (Kornberg 1993).*

Rozeznáváme tyto *základní typy TF* (Sruhl 1989; Latchman 1990; Harrison 1991; McKnight 1991):

- a) „*helix-turn-helix*“,
- b) „*helix-loop-helix*“
- c) „*zinc finger*“,
- d) TF obsahující „*leucine zipper*“.

a,b) první a druhý typ TF jsou nazvány podle toho, že jejich peptidové α -spirály, které s dvouvláknovou DNA interagují v jejím velkém žlábků, jsou navzájem spojeny peptidovými smyčkami, často β -listy. Hlavní represor Pcl a antirepresor Pcro fága λ (Ptashne 1986a), dále produkty alel *MAT α* , *MAT α* *Saccharomyces cerevisiae*“ Pa α 2, Pa1 (Li, Stark et al. 1995), protein MCM1, i většina TF kódovaných homeotickými geny vyšších eukaryot mají právě tyto charakteristické konformační prvky (Yanofsky, Ma et al. 1990; Gehring, Quian et al. 1994).

Pravzor dnešních homeotických genů a vznik TF s homeodomény se patrně objevil, jako klíčová inovace, ještě na úrovni prebiotické chemie a hypercyklů: prvních genů s informací pro peptidy dostatečné délky nemohly být výsledkem náhodného uspořádání bází. Vznikly nejspíš jako polymery, obsahující tandemově-opakující se kratší sekvence, s lichým počtem bází, například polymery typu $j \times [N]_k$; j =počet opakování; k =liché číslo, nejčastěji 5 nebo 7; $[N]_k$ jsou n -tice bází, nejčastěji penta- nebo hepta-mery. Pokud polymer tohoto složení, primitivní gen, *a priori* neobsahoval stop kodony, mohl být translatován ve všech třech čtecích fázích v oligopeptid o stejné periodicitě (Ohno 1984; Ohno 1987). Velmi snadno takto mohly vzniknout oligopeptidy s α -helixovou konformací; jednoduchou mutací někde v řetězci se tato konformace automaticky mohla transformovat v β -list (Doskočil 1986). Stopy po takové plastické primordiální pentanukleotidové či heptanukleotidové periodicitě dosud nacházíme v dnešních bílkovinách starého původu (Ohno 1987); α -helixy jsou přímo ideálně předurčeny ke vstupu do velkého

žlábků DNA a k rozpoznávání posloupností bází v místě vazby (a nejen to, proteiny se stírajícími se spiralizovanými a nespiralizovanými úseky byly ideálně disponovány pro úlohu membránových receptorů (Ohno 1987).

c) „zinkové prsty“ jsou peptidové smyčky, které vznikají díky komplexně vázaným atomům zinku; jako α -helixy zasahují do velkého žlábků DNA.

d) TF většinou reagují s DNA jako dimery; přítomnost α -helixů s určitou periodicitou *leu* zbytků umožňuje *homo* i *heterodimerizaci* TF: dva hřebínky leucinových zbytků ve dvou protilehlých α -helixech se mohou spojit do struktury připomínající uzavřený zip. Takovým spojením může dojít k radikální změně specifity TF.

☞ *Transkripce genů prokaryot a eukaryot se liší ve využití možností regulačních mechanismů.* Regulace transkripce u prokaryot jsou flexibilní, obsahují pozitivní i negativní prvky (aktivaci, represí), a díky operonovému uspořádání genů i možnosti diferenciální transkripce terminací/antiterminací. U eukaryot zcela převažuje pozitivní regulace aktivací genů. Represe/indukce transkripce je u eukaryot využívána vzácně.

Antiterminace transkripce není u eukaryot využívána, protože zde neexistuje polycistronické (operonové) uspořádání transkripčních jednotek. Terminační sekvence jsou (zejména pro RNA polII) definovány nejednotně; terminace se neodehrává na úrovni DNA, souvisí s odštěpením 3'-konců primárních transkriptů a s polyadenylací mRNA.

V současnosti seznam TF přesahuje stovku členů a většina z nich má některou z výše uvedených charakteristických vlastností.

Můžeme si představit jak asi evolvovaly buněčně-specifické regulace působením TF: v prvním stadiu se vytvořila schopnost proteinu vázat se na DNA. Tuto fázi jsme popsali výše. Dále, vlivem postupně akumulovaných mutací, docházelo jednak ke změně sekvenčně-specifických interakcí, jednak k oslabení vazby k DNA. V této fázi se mohly uplatnit další vazebné kofaktory, které mohly dále zeslabit, nebo naopak posílit vazbu TF k DNA. Mohlo přitom současně docházet i k další diferenciaci vazebné specifity. Příkladem může sloužit diferenciální působení proteinu MCM1 při specifikaci pohlavního typu kvasinek (MCM1 jako TF v α -buňkách; nebo v α -buňkách: MCM1- α 1 v roli indukujícího TF; MCM1- α 2 v roli represoru).

Můžeme uzavřít, že regulace v eukaryotických buňkách, zejména v buňkách mnohobuněčných organismů, zahrnují různé hierarchické úrovně. Základní úroveň je úroveň sekvencí DNA s lineárním uspořádáním regulačních a regulovaných genů. Na této úrovni pozorujeme, že vývojově specifické geny mají často tendenci sdružovat se do funkčních jednotek, ko-regulovaných klastrů. Další regulační úroveň je dána existencí chromatinu. Na této úrovni

zapínání a vypínání genových funkcí podléhá strukturním změnám chromatinu působením různých proteinových faktorů často v kooperaci s epigenetickými modifikacemi složek chromatinu (modifikací histonů a metylací DNA); lokální vlastnosti chromatinu rozhodují i o jeho topologickém a topografickém uspořádání v buněčném jádře.

Poznatky z nedávných výzkumů významu repetitivních sekvencí v eukaryotických geomech ukazují, že četné rodiny těchto sekvencí mohou být transkribovány a poskytují mnohočetné formy RNA, která vystupuje bezprostředně v regulačních funkcích (podrobněji viz P9.)

Snadno si představíme, že evoluce biologických forem měla v tomto strukturně i funkčně plastickém prostoru genetických regulací nepřeborné množství příležitostí.

Doporučená četba:

Povšechné informace o genetických regulacích viz (Alberts, Bray et al. 1998). Podstatně podrobnější informace najdeme v některém z vydání Lewinových „Genů“ (např. „Genes“, vydání z r.1994). Výtečný zdroj informací o základních principech genetických i ontogenetických regulací viz (Twyman 2001; Turner, McLennan et al. 2005); obě knihy jsou ze serie „Instant Notes“.

Časopisecké články jsou vybrány tak, aby poskytovaly informaci, „z první ruky“ a současně odpovídaly současnému stavu poznání.

Alberts, B., D. Bray, et al. (1998). Základy buněčné biologie. Úvod do molekulární biologie buňky. Ústí n. Labem, Espero.

Bezdek, M. and P. Amati (1967). "Properties of P22 and a related *Salmonella typhimurium* phage: I.General features and host specificity." Virology **31**: 272-278.

Bezdek, M. and P. Amati (1968). "Evidence for two immunity regulator systems in temperate bacteriophages P22 and L." Virology **36**: 701-703.

Campbell, A. (1979). Structure of complex operons, Plenum.

Coen, E., S. and E. Meyerowitz, M. (1991). "The war of the whorls: Genetic interactions controlling flower development in plants." Nature **353**(31-37).

Crawford, I. P. (1975). "Gene rearrangements in the evolution of the tryptophan synthetic pathway." Bacteriol. Rev. **39**: 87-120.

Davis, A. W., J. Roote, et al. (1996). "Rescue of hybrid sterility in crosses between *D. melanogaster* and *D. simulans*." Nature **380**: 157-159.

- Doskočil, J. (1986). "Přeměny genů v evoluci." Biologické listy **51**: 26-60.
- Gehring, W., J., Q. Quian, Y., et al. (1994). "Homeodomain-DNA recognition." Cell **78**: 211-223.
- Haber, J., E. (1998). "Mating-type gene switching in *Saccharomyces cerevisiae*." Ann. Rev. Genet. **32**: 561-599.
- Harrison, S., C. (1991). "A structural taxonomy of DNA-binding domains." Nature **353**: 715-719.
- Heskowitz, I. (1989). "A regulatory hierarchy for cell specialization in yeast." Nature: 749-757.
- Jacob, F. and J. Monod (1961). "Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins." J. Mol. Biol. **3**: 318-356.
- Kauffman, S. A. (1991). "Antichaos and adaptation." Scientific American **August 1991**(64-70).
- Kauffman, S. A. (1993). The Origins of Order. Self-Organization and Selection in Evolution. Oxford, Oxford Univ. Press.
- Kornberg, T., B. (1993). "Understanding the homeodomain." J. Biol. Chem. **268**: 26813-26816.
- Latchman, D., S. (1990). "Eukaryotic transcription factors." Biochem. J. **270**: 281-289.
- Li, T., M. Stark, R., et al. (1995). "Crystal structure of the *MATa1/MATa2* homeodomain heteromer bound to DNA." Science **270**: 262-269.
- McKnight, S., L. (1991). "Molecular zippers in gene regulation." Scientific American(April 1991): 32-39.
- Miller, J. H. (1978). The lacI gene: its role in lac operon control and its use as a genetic system. New York,, Cold Sprong Harbor.
- Nasmyth, K., A. (1982). "Molecular genetics of yeast mating type." Ann. Rev. Genet. **16**: 439-500.
- Neubauer, Z. and E. Calef (1970). "Immunity phase-shift in defective lysogens: non-mutational hereditary change of early regulation of λ prophage." J. Mol. Biol. **51**: 1-13.
- Ohno, S. (1984). "Birth of a unique enzyme from an alternative reading frame of the preexisted, internally repetitious coding sequence." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**: 2421-2425.
- Ohno, S. (1987). "Early genes that were oligomeric repeats generated a number of divergent domains on their own." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**: 6486-6490.
- Ohno, S. (1987). "Evolution from primordial oligomeric repeats to modern coding sequences." J. Mol. Evol. **25**: 325-329.

Oppenheim, A. B., Z. Neubauer, et al. (1970). "The antirepressor: a new element in the regulation of protein synthesis." Nature **226**: 31-32.

Ptashne, M. (1986). "Gene regulation by proteins acting nearby and at a distance." Nature **322**: 697-701.

Ptashne, M. (1986a). A Genetic Switch. Gene Control and Phage λ . Cambridge, Mass., Cell Press and Blackwell Sci. Publ.

Scott, M. (2000). "Development: The natural history of genes." Cell **100**: 27-40.

Sruhl, K. (1989). "Helix-turn-helix, zinc finger, and leucine-zipper motifs for eukaryotic transcriptional regulatory proteins." TIBS(April 1989): 137-140.

Turner, P., , A. McLennan, et al. (2005). Molecular Biology. New York, USA; Abingdon, UK, Taylor & Francis.

Twyman, R. M. (2001). Developmental Biology. Oxford, BIOS.

Yanofsky, M., F., H. Ma, et al. (1990). "The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors." Nature **346**: 35-39.