

# Řízení genové exprese a proteosyntézy u prokaryot

Molekulární podstata bakteriální regulace genové exprese byla poznána dříve a podrobněji než eukaryotická regulace, protože bakteriální systémy jsou jednodušší a protože bakterie mají krátký buněčný cyklus, což genetické studie podstatně urychluje. U prokaryot **převažuje regulace na úrovni transkripce**.

## Regulace na úrovni transkripce

### Regulace $\sigma$ -faktory

**Promotor** je úsek DNA, na kterém RNA-polymerasa začíná syntetizovat řetězec RNA. Jedna z podjednotek bakteriální RNA-polymerasy je  **$\sigma$ -faktor**, bez kterého enzym nerozezná promotor. Různé typy  $\sigma$ -faktorů umožňují polymerase určit různé promotory. Faktory se označují podle molekulové hmotnosti. Za optimálních podmínek v bakterii působí  $\sigma^{70}$ . Při tepelném šoku se syntetizují jiné bílkoviny, vlivem faktoru  $\sigma^{32}$ . Při infekci fágem se v bakterii uplatní  $\sigma$ , který pomáhá zahájit transkripci tzv. pozdních genů.  $\sigma^{37}$  zahajuje transkripci sporulačních genů. Nemá-li bakterie v živné půdě dostatek dusíkatých látek,  $\sigma^{60}$  zajistí využití jiných zdrojů.

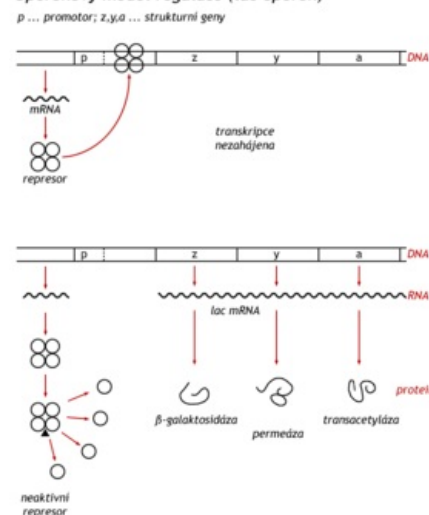
### Jacobův-Monodův operonový model

V r.1961 Francouzi Jacob a Monod zveřejnili teorii, vykládající mechanismus, jakým bakterie mění spektrum syntezovaných enzymů v závislosti na druhu živných látek, které má k dispozici. Tato teorie regulace transkripce se plně potvrdila. Základní regulovanou jednotkou na DNA je **operon**. Skládá se z operátoru a z tandemově uspořádaných strukturních genů. **Operátor** je sekvence DNA, na kterou se váže protein zvaný **represor**.

K využití laktózy jako zdroje energie bakterie potřebuje enzymy  $\beta$ -galaktosidasu, galaktosidpermeasu a  $\beta$ -galaktosidtransacetylasy, které jsou kódovány laktosovým operonem (**lac-operon**). *E. coli* pěstovaná na půdě s výhodnými energetickými zdroji, tj. glukózou nebo glycerolem, uvedené enzymy nepotřebuje. Za těchto okolností jsou v buňce zastoupeny jen několika molekulami. Jestliže je *E.coli* přenesena na živnou půdu, ve které bude místo zmíněných energetických zdrojů laktosa, indukuje se v bakterii syntéza enzymů potřebných k jejímu využití. Proto se nazývá **inducibilní enzymy**. Přírodním **induktorem** je 1,6-allolaktosa, která z laktosy vzniká transglykosylací, kterou katalyzuje oněch několik perzistujících molekul  $\beta$ -galaktosidasu.

Když byla objevena **konstitutivní mutanta**, která syntezovala všechny tři zmíněné enzymy bez ohledu na dostupné sacharidy, Jacob a Monod předpověděli, že syntézu všech tří enzymů řídí jediný **regulační gen**, jehož difuzibilní produkt (proteinový **represor**) se naváže na operátor a zabrání syntéze **polygenové (polycistronické) mRNA**. Dnes víme, že na tuto mRNA se ještě během transkripce navazují ribosomy a translační faktory a syntetizují se jednotlivé enzymy, nikoli proteinový prekursor odpovídající celému operonu. Syntéza dlouhých proteinových prekurzorů a jejich proteolytické štěpení ve funkční peptidy je jev pozorovaný v eukaryotických buňkách.

Operonový model regulace (lac-operon)



Operonový model regulace (lac-operon)

```
TGTTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTTCACACA
O
ACACACCTTAACACTCGCCTATTGTTAAAGTGTGT
```

Sekvence lac operátoru

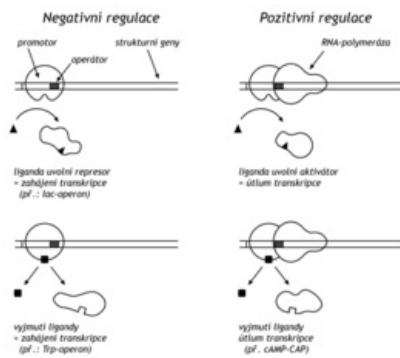
Lac represor ( $M_r=37000$ ) se skládá ze čtyř identických podjednotek. Tetramer má vysokou afinitu k operátoru, na který se naváže a zastaví transkripci operonu. Po navázání čtyř molekul induktoru se represor disociuje na podjednotky a uvolní se z DNA. Může být zahájena syntéza mRNA a enzymů. Pro represory je charakteristická vysoká afinita k operátorům. Disociační konstanta lac-represor-operátorového komplexu je 10 M. Represor se nejdříve naváže na nespecifické místo DNA a putuje po DNA. Vyhledává tedy operátor jednorozměrově, podél DNA. Navazování represoru třírozměrově, přímo z roztoku, by bylo zdoluhavé. Sekvence operátoru (27 pb) je centrálně symetrická, což je běžné v úsecích DNA určených pro specifické navázání proteinů.

### Regulační význam cAMP u bakterií

Regulace na laktosovém operonu je příkladem **negativní regulace** transkripce, což znamená, že geny jsou přepisovány, dokud transkripce není zastavena represorovým proteinem. Při **pozitivní regulaci** jsou geny aktivní pouze tehdy, je-li regulační protein navázán na DNA. Příkladem pozitivní regulace je **katabolická represe**. Pokud má *E.coli* k dispozici glukózu, je v bakterii nízká hladina nejen  $\beta$ -galaktosidasu, ale též dalších katabolických

enzymů (galaktokinázy, tryptofanasy, arabinoisomerasy). V nepřítomnosti glukózy stoupne v buňce koncentrace cAMP, který se naváže na **katabolicky aktivací protein** (CAP-protein, catabolite activating protein). Komplex CAP-cAMP má vysokou afinitu k části promotorů jednotlivých genů několika katabolických enzymů. Komplex se navazuje tak, že na rozdíl od represoru nepřesahuje vazebné místo pro RNA-polymerasu, spíše vytvoří další vazebná místa a tím stimuluje transkripci.

Přehled pozitivní a negativní regulace zahájení transkripce  
CAP - katabolický aktivací protein



Přehled pozitivní a negativní regulace zahájení transkripce

V místě zahájení transkripce laktosového operonu tedy působí dva regulační mechanismy. Represor se zahájením transkripce interferuje, CAP-cAMP ho usnadňuje. Pokud je v prostředí glukóza i laktosa, bakterie dá přednost glukóze, neboť vlivem glukózy poklesne hladina cAMP v buňce a dereprese laktosového operonu není stimulována pro nedostatek CAP-cAMP.

## Variace operonového řízení genů. Tryptofanový a arabinosový operon

**Tryptofanový operon** řídí syntézu pěti enzymů potřebných k tvorbě tryptofanu z chorismátu. Represor tryptofanového operonu se na rozdíl od laktosového represoru může navázat na operátor teprve v komplexu s **korepresorem**, což v tomto případě je tryptofan. Jen v tomto komplexu zaujímá represor konformaci s vysokou afinitou k operátoru. Je to účelné, neboť je-li v prostředí dostatek Trp, nemá bakterie důvod syntetizovat enzymy k jeho tvorbě. Při nedostatku tryptofanu se komplex Trp-represor-operátor disociuje a tím se odblokuje syntéza polycistronické mRNA.

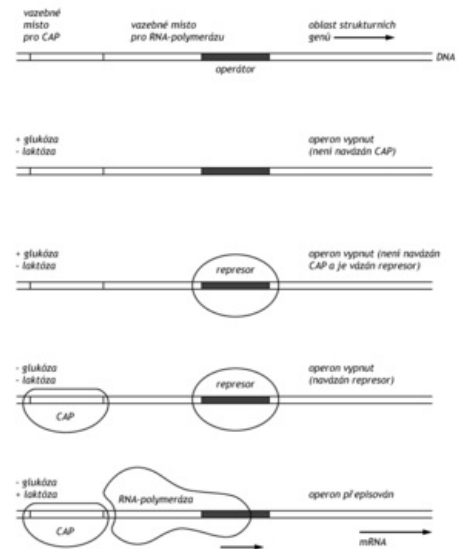
Laktosový represor řídí expresi jediného operonu, zatímco tryptofanový represor ovládá funkci tří operonů. Řídí zmíněný Trp-operon (5 enzymů), další operon pro tři enzymy biosyntézy aromatických aminokyselin a kromě toho reguluje svou vlastní tvorbu na regulačním genu. Při studiu Trp-operonu byla objevena ještě další hladina regulace transkripce, atenuace (angl. attenuate = zmírnit). Regulační signál v tomto případě pochází z translační úrovně proteosyntézy. V bakterii je to umožněno tím, že transkripce a translace jsou zde svázány místně i časově.

**Atenuátor** je úsek DNA mezi operátorem a genem pro první ze skupiny enzymů. Kóduje vedoucí sekvenci mRNA na jejím 5'-konci. Tato sekvence je ribosomem překládána v peptid na jehož 10. a 11. pozici jsou tryptofany. Čtrnáctým kodonem vedoucí sekvence je kodon-terminátor. Je-li v prostředí dostatek Trp, ribosomy se „pročítají“ k terminačnímu kodonu a začátek mRNA se konformuje do tvaru signalizujícího ukončení syntézy překládané (a ještě nedokončené) mRNA. Na konci atenuátoru se totiž vytvoří vlásenka mRNA, která je terminátorem pro RNA-polymerasu. Za **nedostatkem Trp** se ribosom zastaví u kodonů pro Trp a 5'-konec mRNA s ribosomem vytvoří takovou konformaci, která znemožňuje tvorbu terminátoru pro RNA-polymerasu. Transkripce pokračuje. Je to logické, bakterie potřebuje enzymy k syntéze Trp. Atenuace je známa u řady dalších operonů (pro enzymy syntézy Phe, His aj.)

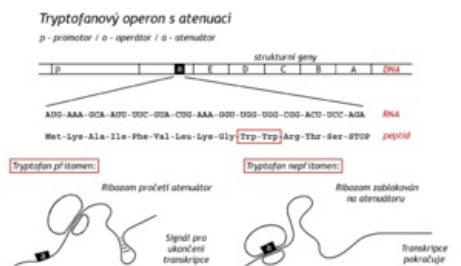
Některé proteiny mohou být pozitivními i negativními regulátory. Takový represor ovládá např. **arabinosový operon**, který řídí syntézu tří enzymů, přeměňujících arabinosu na xyluloso-5-fosfát (araB, araA, araD). V tomto případě regulační gen C sousedí s operonem, a ten má dva operátory (ara O<sub>1</sub> a ara O<sub>2</sub>) a jeden promotor (ara I). Jako katabolický operon je arabinosový operon řízen též komplexem cAMP-CAP, usnadňujícím zahájení transkripce. **Mohou nastat tři situace:**

1. Při nedostatku regulačního proteinu C je syntézována mRNA pro jeho syntézu.
2. Syntéza proteinu C je autoregulována. Při nadbytku proteinu C v nepřítomnosti arabinosu se protein C naváže současně na operátor O<sub>2</sub> a další molekula proteinu C na operátor O<sub>1</sub> a úsek araI, což je promotor strukturálních genů. Vytvoří se klička DNA a syntéza enzymů je blokována.
3. Jestliže při nedostatku glukózy stoupne hladina cAMP v buňce a v prostředí je arabinosa, naváže se arabinosa na protein C. Tím ho

Kombinovaná negativní (represor) a pozitivní (CAP-protein) regulace lac-operonu

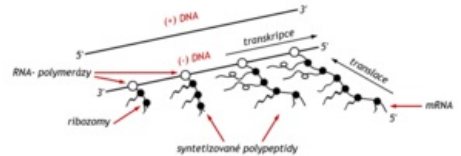


Kombinovaná regulace lac operonu



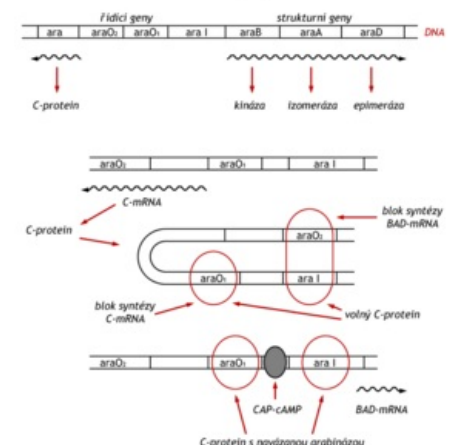
Tryptofanový operon s atenuací

Prostorové a časové spřažení bakteriální transkripce a translace



Prostorové a časové spřažení bakteriální transkripce a translace

Arabinosový operon



Arabinosový operon

konformačně změni v pozitivní regulační faktor, který spolu s komplexem cAMP-CAP umožní zahájit syntézu mRNA pro syntézu enzymů. Syntéza proteinu C je při tom stále blokována komplexem arabinosa-protein C navázaným na operátor O<sub>1</sub>.

Jsou známy ještě složitější regulační systémy, ve kterých je programově postupně aktivován jeden gen za druhým v určitém sledu a po dosažení určitých podmínek. Tak tomu je např. po infekci buňky virem (fágem). V první fázi infekce hostitelská buňka syntetizuje faktory a enzymy pro syntézu virových složek, a v pozdní fázi infekce se program změni ve prospěch syntézy vlastních komponent virionu. Podrobně byl takový program prostudován např. u fága λ. Program je to nadmíru účelný, vždyť virus „smí“ svého hostitele zabít až po využití jeho proteosyntetických mechanismů.

## Řízení terminace transkripce

Při transkripci se RNA-polymerasa pohybuje po DNA až k **terminátorové sekvenci**. Po jejím přepisu se syntezovaná RNA stočí do vlásenky, která napomáhá disociaci RNA od matrice a uvolnění enzymu. Za vlásenkou bývá úsek oligo(U), který se k matici váže slaběji než sekvence obsahující G a C. Existují proteiny zvané antiterminační faktory, které umožní, aby se enzym „pročetl“ přes terminátorovou sekvenci a pokračoval v syntéze delší RNA.

Terminace transkripce by mohla být řízena také hladinou **p-faktoru** (rhó-faktoru). Je to protein, určitá jehož koncentrace je třeba k zakončení transkripce na některých terminátorech. Tato pozorování zatím nebyla potvrzena *in vivo*.

## Regulace bakteriální proteosyntézy na úrovni translace

U bakterií je známa **translační represe**. Příkladem je syntéza ribosomálních proteinů. Syntéza padesáti těchto bílkovin je přesně koordinována na 20 operonech. Na každém operonu je syntezována polycistronická mRNA kódující určitou skupinu ribosomálních proteinů a někdy i dalších bílkovin (EF-G, EF-Tu, podj. RNA-polymerasy). Ve skupině bývá vždy jeden z proteinů **represorem translace**. Navazuje se na mRNA (nikoli DNA!) a potlačuje syntézu celé skupiny proteinů, zakódovaných na molekule mRNA. Této regulaci je nadřazena syntéza rRNA. Afinita ribosomálních proteinů k rRNA je vyšší než k vazebnému místu na mRNA. Dokud je tedy dostatek rRNA, syntetizují se další ribosomální proteiny. Jestliže je syntéza rRNA zastavena nebo zpomalena, nadbytek ribosomálních proteinů – represorů se začne navazovat na odpovídající mRNA a zastaví translaci (svou i ostatních ribosomálních proteinů).

## Odkazy

### Související články

- Řízení genové exprese a proteosyntézy
- Řízení genové exprese a proteosyntézy u eukaryot
- Gen
- Transkripce
- Translace
- 

*Další kapitoly z knihy **ŠTÍPEK, S.: Stručná biochemie uchování a exprese genetické informace**:*

**Struktura nukleových kyselin:** Základní složky nukleových kyselin • Primární struktura nukleových kyselin • Řetězec nukleové kyseliny lze štěpit neenzymovou nebo enzymovou hydrolýzou • Metody sekvencování •

**Sekundární a vyšší struktura nukleových kyselin:** Sekundární struktura DNA • Denaturace a reasociace řetězců nukleových kyselin, molekulární hybridizace • Sekundární struktura RNA • Topologie DNA; • Interakce DNA s proteiny, struktura chromosomu • Bakteriální chromosom • Eukaryotické chromosomy • DNA mitochondrií

**Biosyntéza nukleových kyselin:** Replikace DNA • Transkripce

**Biosyntéza polypeptidového řetězce - translace:** Transferové RNA (tRNA) • Aktivace aminokyselin, syntéza aminoacyl-tRNA • Funkce ribozómů v translaci • Translace u prokaryotů • Struktura ribozómů • Iniciace translace • Elongace peptidů • Terminace translace • Inhibitory bakteriální translace • Translace u eukaryotů • Struktura ribozómů • Iniciace eukaryotické translace • Elongace eukaryotické translace • Terminace eukaryotické translace • Inhibitory eukaryotické translace

### Genetický kód

**Biosyntéza nukleových kyselin a proteosyntéza v mitochondriích:** Replikace mitochondriální DNA • Mitochondriální transkripce • Mitochondriální translace

**Řízení genové exprese a proteosyntézy:** Řízení genové exprese a proteosyntézy u prokaryot • Regulace na úrovni transkripce • Regulace sigma-faktory • Jacobův-Monodův operonový model • Regulační význam cAMP u bakterií • Variace operonového řízení genů • Tryptofanový a arabinosový operon • Řízení terminace transkripce • Regulace bakteriální proteosyntézy na úrovni translace • Řízení genové exprese a proteosyntézy u eukaryot • Regulace na úrovni uspořádání genů • Regulace na úrovni transkripce • Regulace posttranskripčních úprav pre-mRNA • Regulace na úrovni translace • Řízení rychlosti degradace mRNA • Regulace funkce proteinu kotranslačními a posttranslačními úpravami

**Posttranslační úpravy a targeting proteinů:** Signální sekvence polypeptidu, volné a vázané ribozomy • Posttranslační glykosylace proteinů • Targeting nezávislý na glykosylaci proteinů • Targeting mitochondriálních proteinů • Targeting jaderných proteinů • Rozhodovací mechanismus k destrukci nefunkčních proteinů • Receptorem zprostředkovaná endocytóza

**Biochemie virů:** Reprodukce DNA virů • Reprodukce RNA virů • Interferony

**Biochemie genového inženýrství:** Štěpení DNA na definovaném místě řetězce • Účinné dělení fragmentů DNA elektroforézou • Identifikace restrikčních fragmentů • Syntéza umělé DNA • Pomnožení a exprese izolovaného nebo umělého genu v hostitelské buňce

## Zdroje

- ŠTÍPEK, Stanislav. *Stručná biochemie : Uchování a exprese genetické informace*. 1. vydání. Medprint, 1998. 92 s. s. 54–62. ISBN 80-902036-2-0.