

MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE PROKARYOT

Funkce a syntéza informačních
makromolekul
Regulace metabolické aktivity

Informační makromolekuly

- Nukleové kyseliny
- Proteiny
- Pořadí monomerních jednotek nese genetickou informaci

Nukleové kyseliny

- Deoxyribonukleová kyselina (DNA)
- Ribonukleová kyselina (RNA)
- Složeny z nukleotidů

Báze, nukleosidy a nukleotidy

Učebnice Madigan a kol., obr. 3.8, str. 57

Učebnice Madigan a kol., obr. 3.9, 3.10, str. 58

Učebnice Madigan a kol., obr. 3.11, str. 59a

Spojení dvou nukleotidů esterovou vazbou

DNA

- DNA je **dvouvláknová šroubovice**
 - Vlákna jsou držena pohromadě slabými vodíkovými vazbami mezi dusíkatými bazemi
 - Komplementární (doplňkové) báze G-C, A-T
 - Jedno vlákno DNA je komplementární k druhému
 - Velikost vyjádřena v párech bazí
 - *E.coli*: 4,64 Mbp
 - Sekundární struktura
 - Vlákna mohou být oddělena zahřátím
 - Struktura DNA vyřešena Jamesem Watsonem a Francisem Crickem 1953

Učebnice Madigan a kol., obr. 7.3, str. 177

Párování bazí

Důsledky komplementarity bazí

- Sekvence bazí jednoho vlákna určuje sekvenci vlákna druhého
- Při syntéze DNA je nově vzniklá šroubovice identická

Orientace DNA vláken

- Vlákna jsou antiparalelní
- Jedno vlákno uspořádáno shora dolů
 - 5' konec
 - Na konci vlákna je k uhlíku č. 5 sacharidu připojen fosfát
 - 3' konec
 - OH skupina připojena k uhlíku č. 3 sacharidu
- Druhé vlákno uspořádáno opačně

Učebnice Madigan a kol., obr. 7.4, str. 178

Učebnice Madigan a kol., obr. 7.5, str. 178

Uspořádání dvoušroubovice DNA

Učebnice Madigan a kol., obr. 7.6, str. 179

Obrácené repetice a tvorba sekundární struktury

Učebnice Madigan a kol., obr. 7.7, str. 179

Tepelná denaturace DNA

Supercoiling

- Nadšroubovicové vinutí
- Vyšší úroveň struktury
- Negativní supercoiling
 - DNA je stočena okolo své osy v opačném směru ke směru šroubovice
 - Převažující forma
 - DNA gyrasa (topoisomerasa II)
- Pozitivní supercoiling
 - Některá archea
 - Hypertermofilní
 - Stabilita DNA
 - Reverzní gyrasa
- Význam pro vměstnání DNA do buňky
 - DNA *E. coli* cca 1 mm vs. velikost buňky 2-3 μm

Učebnice Madigan a kol., obr. 7.8, str. 180

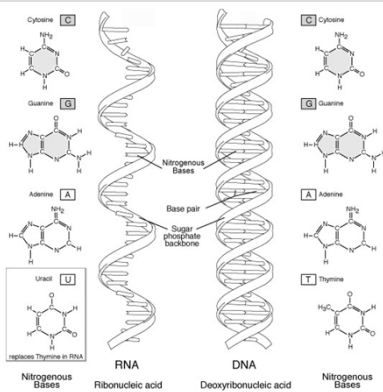
Supercoiling

Učebnice Madigan a kol., obr. 7.9, str. 181

Aktivita DNA gyrasy

RNA

- Jednovláčková
- Obsahuje uracil místo thyminu
- Sacharid je ribosa
- Kratší než DNA
- Řetězec ribonukleotidů
 - Příčný
 - Smyčky (sekundární struktura)



Struktura RNA a DNA

Typy RNA

- Mediátorová (mRNA)
 - Obsahuje genetickou informaci pro syntézu polypeptidů
 - Komplementární k sekvenci DNA
- Ribozomální (rRNA)
 - Součást ribozomů
 - Různé funkce při translaci (syntéze proteinů)
- Transferová (tRNA)
 - „Překlad“ genetické informace ve formě nukleotidů na aminokyseliny
 - Přenos aktivovaných aminokyselin do ribozomu
- Malé RNA
 - Regulace tvorby nebo aktivity ostatních RNA

Proteiny

- Složeny z aminokyselin
 - Různé chemické vlastnosti
 - Proteiny s různými vlastnostmi a funkcí
- Tvorba peptidové vazby mezi funkčními skupinami
- Polypeptidy o různé velikosti
- Dvě hlavní skupiny
 - Katalytické (enzymy)
 - Strukturální

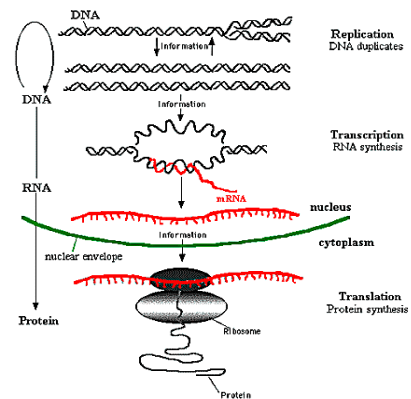
Učebnice Madigan a kol., obr. 3.13, str. 60

Struktura proteinu

- Primární struktura
 - Lineární uskupení aminokyselin
- Sekundární struktura
 - Důsledek interakce postranních řetězců aminokyselin
 - Skládání proteinu
 - α -helix
 - Flexibilní
 - β -struktura (skládaný list)
 - Rigidní
- Terciární struktura
 - Další skládání molekuly
 - Vodíkové vazby
 - Kovalentní disulfidová vazba (cystein)
 - Hydrofobní interakce
- Kvartérní struktura
 - Složení a počet podjednotek (polypeptidů)
- Pouze správné složení polypeptid má biologickou aktivitu

Uložení a přenos informací

- Základní jednotkou genetické informace je **gen**
 - Geny se skládají z DNA
- DNA ukládá informaci ve formě sekvence nukleotidů
- Přenos genetické informace v buňce
 - Replikace
 - Duplikace DNA před buněčným dělením
 - Transkripce a translace
 - Přenos nukleotidové sekvence DNA na sekvenci aminokyselin proteinu nebo sekvenci jiných RNA
- Centrální dogma molekulární biologie



Replikace

- Začíná na specifickém místě chromozomu (počátek replikace) - separace vláken - **helikasa**
- Pokračuje postupným přidáváním nukleotidů DNA polymerasou od 5' po 3' konec
 - 5'-fosfát přichozícího nukleotidu připojen k 3'-hydroxylu nukleotidu připojeného v předchozím cyklu
 - Prekurzorové nukleotidy = trifosfáty
- Jsou vytvořeny dvě dvouvláknové molekuly DNA
 - Semikonzervativní replikace
 - 1 vlákno původní, druhé nově syntetizované

Učebnice Madigan a kol., obr. 7.11, str. 183

Růst DNA řetězce

DNA polymerasa a primasa

- DNA polymerasa katalyzuje syntézu DNA od 5' konce k 3' konci (DNA polymerasa III)
 - Přidává nukleotidy pouze k již existující 3'-OH skupině
 - Je nutná přítomnost primeru
 - Úsek RNA komplementární k DNA templátu
 - Primasa
- Učebnice Madigan a kol., obr. 7.12, str. 183
- DNA polymerasa přidá první deoxyribonukleotid k 3'-OH skupině primeru

Replikační vidlička

- U prokaryot začíná DNA syntéza na místě zvaném počátek replikace
- Dvoušroubovice je rozvinuta pomocí helikasy
 - DNA gyrasa odstraňuje supercoiling před helikasou
- Stabilizace vlákna pomocí vazebného proteinu
- Kontinuální prodlužování na vedoucím vlákně
- Diskontinuálně na opožďujícím se vlákně
 - Opakovaná syntéza RNA primeru
 - Syntéza po menších částech (Okazakiho fragmenty)

Replikační vidlička

- Odštěpení primeru
 - DNA polymerasa I
 - 5' → 3' exonukleasová aktivita
- Vytvoření fosfodiesterové vazby
 - DNA ligasa

Učebnice Madigan a kol., obr. 7.13, str. 184

Učebnice Madigan a kol., obr. 7.15, str. 185

Schéma replikace DNA

Replikace kruhového chromozomu

- V obou směrech od počátku replikace
 - Dvě replikační vidličky
 - Tvorba theta struktury
 - Urychlení replikace
 - Chromozom *E. coli* cca 40 min

Učebnice Madigan a kol., obr. 7.16, str. 186

Učebnice Madigan a kol., obr. 7.17, str. 187

Replisom

- Jednotlivé proteiny nepracují nezávisle
- Tvoří replikační komplex (replisom)

Učebnice Madigan a kol., obr. 7.19, str. 188
(popisuje složení replisomu)

Opravy DNA (proofreading)

- Chyby v párování bazí
- Polymerasa I, III
- 3' → 5' exonukleasová aktivita
- Nesprávné párování způsobí, že se polymerasa na chvíli zastaví
- To je signálem pro exonukleosovou aktivitu polymerasy, aby vyštípla nesprávný nukleotid
- Po té je polymerasovou aktivitou polymerasy začleněn správný nukleotid

Učebnice Madigan a kol., obr. 7.20, str. 189

Terminace replikace

- Konec replikace
- Topoisomerasa IV rozpojí dvě cirkulární DNA molekuly

Expresse genu

- Bakteriální chromozom je rozdělen na **geny**
 - Sekvence nukleotidů DNA obsahující informaci o sekvenci AMK jednoho polypeptidového řetězce nebo sekvenci RNA řetězce (*t*, *r*)
- Každý obsahuje dvě hlavní oblasti
 - Kódující oblast - oblast kódující sekvenci aminokyselin jednoho polypeptidového nebo RNA řetězce
 - Regulační oblast, která stanoví, zda kódující oblast bude fungovat při syntéze proteinu
 - Promotor
 - Sekvence nukleotidů, ke které se musí navázat RNA polymerasa, aby mohla fungovat
 - Operátor
 - Sekvence nukleotidů, ke které se váží jiné proteiny a ovlivňují tak funkci RNA polymerasy

Expresse genu

- Schopnost genu fungovat v buňce tak, aby se tvořil produkt genu
 - Produktem genu je polypeptidový nebo RNA řetězec
- Transkripce a translace

Kódování aminokyselin

- Kodón
 - Trojice nukleotidů v mRNA, která kóduje některou z 20 standardních AMK nebo dává signál k zahájení či ukončení syntézy polypeptidového řetězce
- Genetický kód
 - Složení a sekvence všech kodonů

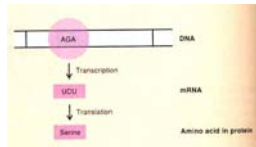
Vlastnosti genetického kódu

- Je degenerovaný
 - Stejná AMK je kódována několika kodóny
- Degenerace genetického kódu není stejná
 - Každá AMK je kódována různým počtem kodonů
- Jeden kodón kóduje pouze jednu AMK
- Nesmyslné (terminační) kodóny (UAA, UAG, UGA)
- Startovací kodón (AUG)
- Preference různých kodonů různými organismy

Genetický kód

		SECOND POSITION				
		U	C	A	G	
FIRST POSITION	U	phe ^{yl} -ala ^{na} leu ^{ce}	ser ⁱⁿ	tyr ^{osin} *stop *stop	try ^{ptin} *stop	U C A G
	C	leu ^{ce}	pro ^{lin}	his ^{tidin} *stop	arg ⁱⁿ gly ^{cin}	U C A G
A	iso ^{leu} *met ^{ionin}	thr ^{onin}	asp ^{aragin} lys ⁱⁿ	ser ⁱⁿ arg ⁱⁿ	U C A G	
G	val ⁱⁿ	ala ^{na}	asp ^{aragin} gly ^{cin} *stop	gly ^{cin}	U C A G	

* cod stop
Celkem 64 možných kombinací



Kodón AGA kóduje serin

Syntéza proteinů

- **Transkripce**
 - Tvorba komplementárního vlákna RNA = mediátorová RNA (mRNA)
 - DNA slouží jako matrice
 - Začlenění nukleotidů pomocí RNA polymerasy (katalyzuje tvorbu kovalentní vazby mezi sousedními nukleotidy)
- **Translace**
 - Přepis mRNA na sekvenci aminokyselin
 - mRNA určuje sekvenci aminokyselin proteinu

Transkripce genu

- DNA přepsána na mRNA
- Tři kroky
 - Začátek syntézy RNA
 - Prodlužování řetězce mRNA
 - Ukončení syntézy mRNA

Začátek transkripce

- RNA polymerasa
 - U bakterií jedna
 - U *E. coli* složena ze 4 podjednotek ($\alpha_2\beta\beta'$)
- RNA polymerasa se váže na specifické sekvence nukleotidů v DNA
 - Promotor
- Promotory jsou rozpoznány pomocí σ faktorů
- Slabé vazebné síly
- Po zahájení syntézy se oddělí

Prodlužovací fáze

- RNA polymerasa se pohybuje podél DNA řetězce a syntetizuje mRNA
- Syntetizovaná RNA molekula má u prokaryot obvykle velikost několika genů
 - Polycistronní mRNA
 - Operon
 - Skupina genů, jejichž exprese je kontrolována jedním operátorem
 - Přepisovány ze stejného promotoru
 - Důležitá funkce při regulaci genů
 - Často jsou na jednom operonu geny kódující související enzymy

Terminační fáze

- RNA polymerasa ukončí transkripci na specifickém místě DNA
 - Transkripční terminátor
- Běžné terminátory jsou DNA sekvence obsahující obrácené repetice následované řetězci A nebo sekvenci bohatou na GC následovanou sekvencí bohatou na AT
- V některých případech jsou potřebné specifické proteinové faktory (např. Rho faktor u *E. coli*)
 - Vazba na RNA
- Terminátory jsou kódovány DNA, ale fungují na úrovni RNA
- RNA opouští DNA matici

Učebnice Madigan a kol., obr. 7.23, str. 193

Učebnice Madigan a kol., obr. 7.21, str. 190

Transkripce

Translace

- Přepis mRNA na protein
- 90% vydané energie
- V ribozomech
- Transferová RNA (tRNA)
 - Přenos aminokyselin do ribozomů
 - Antikodón – 3 nukleotidy komplementární k určitému kodónu v mRNA
 - Kovalentně vázaná aminokyselina na druhém konci
 - Aminoacyl-tRNA syntetasa
 - Pro každý kodón by měla existovat alespoň jedna specifická tRNA
 - Některé tRNA rozeznávají více kodónů
 - Tolerují nepravdivé párování u báze na třetí pozici
 - Obsahuje modifikované báze

Učebnice Madigan a kol., obr. 7.27, str. 197

Transferová RNA

Zahájení translace

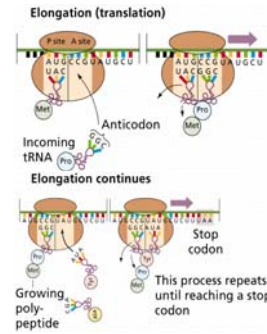
- Volná malá podjednotka ribozomu se váže na krátkou nukleotidovou sekvenci na mRNA
 - Vazebné místo ribozomu
 - Shine-Dalgarnova sekvence
 - Blízko před místem kde začne translace
 - Komplementární k oblasti 16S rRNA ribozomu
 - Uspadňuje vazbu mRNA k ribozomu
- Startovací signál – 3 nukleotidy (AUG) kódující formylmethionin (u bakterií)

Prodlužování

- tRNA obsahující aminokyselinu (nabitá tRNA) se může vázat k mRNA na dvou místech 50S podjednotky ribozómu
 - Peptidové místo (P)
 - Váže se první nabitá tRNA obsahující Met
 - Pomocí vodíkových vazeb s mRNA kodónem
 - Akceptorové místo (A)
 - Váže se další nabitá tRNA, jejíž antikodón je komplementární s druhým kodónem
- tRNA v P místě přeneše AMK na vedlejší AMK v A místě a vytvoří se peptidová vazba
 - Katalyzováno 23S rRNA

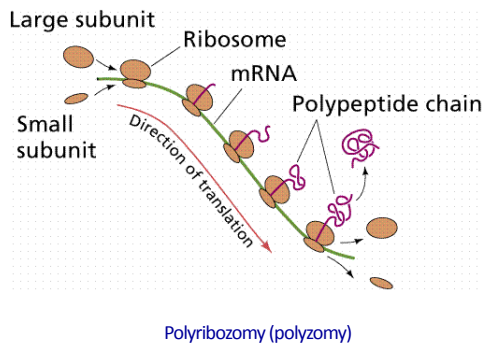
Prodlužování

- Ribozom se posune o jeden kodón podél mRNA, takže tRNA obsahující nyní 2 AMK se posune na P místo; tím se uvolní A místo
- tRNA je vytlačena z P místa do E místa (E = exit) a uvolněna z ribozomu
- Na A místo se váže další nabitá tRNA
- Peptidový řetězec roste postupným přidáváním AMK
- Několik ribozomů naráz připojeno k mRNA a syntetizují stejný protein
 - Urychlení syntézy
 - Polyribozomy (polyzomy)
- Proteinový řetězec roste od N-konce po C-konec



Učebnice Madigan a kol., obr. 7.29, str. 199

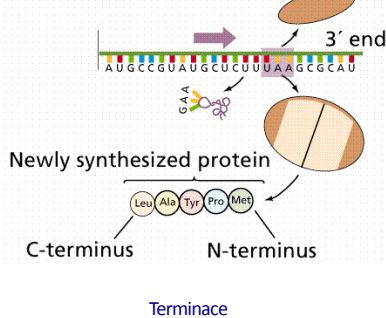
Schematické znázornění prodlužování



Terminační fáze

- Syntéza proteinu končí, je-li dosažen nesmyslný kodón
- Protein disociuje z tRNA
 - Pomocí specifického proteinu, který se váže ke stop kodónu
- Podjednotky ribozomu disociují a uvolňují se z mRNA (znovu se spojí při vazbě na mRNA)

Termination



Skládání proteinů

- Nutné pro správnou funkci proteinu
- Spontánně nebo
- Pomocí molekulárních chaperonů a chaperoninů
- Chaperony *E.coli*
 - DnaK, DnaJ, GroEL, GroES
 - Energie: ATP
- Některé chaperony přenášejí nesložený protein k jiným chaperonům
- Chaperony také mohou znovu skládat proteiny, které částečně zdenaturovaly
 - Heat shock proteiny

Sekrece proteinů

- Některé proteiny se využívají mimo buňku nebo v různých organelách (eukaryota)
- Přesun z ribozomů přes membránu
- Signální sekvence
 - N-terminální sekvence 15-20 AMK
 - Převažují hydrofobní AMK – protein se protáhne přes hydrofobní membránu
 - Po sekreci je signální sekvence odštěpena peptidasou – posttranslační modifikace

Sekrece proteinů

- Obvykle sekrece nesloženého proteinu **Sec systémem**
 - SecA protein
 - Částice rozpoznávající signál
- Sekrece již složeného proteinu **Tat systémem**
 - Proteiny obsahující kofaktory, které musí být vloženy při skládání

Učebnice Madigan a kol., obr. 7.33, str. 204

Export proteinů

Posttranslační modifikace proteinu

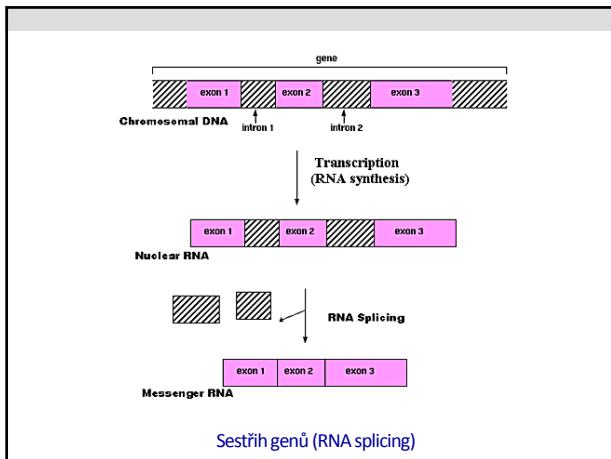
- Proteolýza
 - Odstranění startovacího methioninu
 - Odštěpení signálního peptidu
 - Aktivace proteinu částečnou proteolýzou
- Přeměna některých aminokyselin (např. fosforylace tyrosinu)
- Glykosylace
- Acylace na N-konci
- Tvorba disulfidových můstků
- Začlenění kofaktoru u enzymů

Transkripce a translace u prokaryot

- Prokaryotické buňky nemají jádro
- Transkripce a translace probíhají téměř současně
 - V cytoplasmě

Transkripce a translace u eukaryot

- mRNA musí být transportována z jádra
- Translace probíhá v cytoplasmě
- Transkripce a translace neprobíhají současně na stejné molekule mRNA
- mRNA molekuly jsou v jádře po transkripci značně modifikovány
 - DNA sekvence obsahuje introny, které nekódují AMK proteinů
 - Introny se přepisují do mRNA, ale ne na proteiny
 - Introny jsou odstraněny před přenosem mRNA do cytoplasmy (sestřih genů)



Učebnice Madigan a kol., obr. 7.2, str. 177

Učebnice Madigan a kol., obr. 8.5, str. 213

Rozdíly v přenosu informací u prokaryot a eukaryot

Molekulární biologie archeí

- Archea sdílejí řadu vlastností jak s bakteriemi, tak eukaryoty
- Geneticky příbuznější eukaryotům

Chromosomy a replikace DNA

- Archea mají DNA gyrasu i histony
 - DNA je vměstnána do buňky díky nadšroubovicovému vinutí zprostředkovanému buď DNA gyrasou nebo vazbou k histonům
- Replikační aparát podobnější eukaryotům

Transkripce u archeí

- Sekvence promotorů, struktura a aktivita RNA polymerasy podobná eukaryotům
 - 1 RNA polymerasa (bakterie), ale podobnost s eukaryotní RNA polymerasou II
- Transkripční terminátory podobné bakteriím
- Většina genů neobsahuje introny (bakterie)
 - Některé geny kódující tRNA a rRNA ano
- Regulace transkripce podobná bakteriím

Syntéza proteinů u archeí

- Součástí translačního aparátu jsou příbuzné eukaryotům
- mRNA je rozeznávána ribozomy pomocí Shine-Dalgarnovy sekvence (bakterie)
- První aminokyselina vložená při translaci je methionin (eukaryota)

Metabolické regulace

- Bakterie jsou vystaveny rychle se měnícímu obsahu živin v prostředí
- Mohou aktivovat nebo zastavit biosyntetické a degradační dráhy
- Syntetizují pouze materiál, který není přímo dostupný z prostředí
- Většina genů kóduje proteiny
- Většina proteinů jsou enzymy

Hlavní mechanismy regulace

- Kontrola aktivity enzymu
 - Posttranslační
 - Sekundy
- Kontrola množství (exprese) proteinu
 - Na úrovni transkripce nebo translace
 - Regulační proteiny
 - Regulace pomocí RNA
 - Minuty

Učebnice Madigan a kol., obr. 9.1, str. 225

Regulace enzymové aktivity

- Přechodná inaktivace enzymu
- Nekovalentní modifikace enzymové struktury
 - Alosterická inhibice
 - Izoenzymy
- Kovalentní modifikace

Alosterická (zpětnovazební) inhibice

- Koncový produkt metabolické dráhy se váže na první enzym dráhy
 - Obvykle nekovalentně
 - Vazba do alosterického místa enzymu
 - Odlišné od aktivního místa enzymu
- Změní jeho tvar, takže už nemůže katalyzovat reakci (substrát se nemůže vázat do aktivního místa)
- Celá biosyntetická dráha je zastavena
- Reverzibilní proces

Koordinovaná zpětnovazební inhibice a izoenzymy

- Odlišné enzymy katalyzující stejnou reakci, podléhající různé regulaci
- Syntéza Tyr, Trp a Phe u *E. coli*
- DAHP synthasa
 - 3 izoenzymy, katalyzující první reakci syntézy aromatických aminokyselin
 - Nezávisle regulovány pouze jednou z AMK
 - Enzymová aktivita je zcela inhibována pouze v přítomnosti nadbytku všech 3 AMK

Kovalentní modifikace

- Regulace aktivity vazbou malých molekul k proteinu
- Vazba vede k inhibici enzymové aktivity změnou konformace
- AMP, ADP, anorganický fosfát, methylová skupina

Regulace transkripce pomocí regulačních proteinů

- Regulace transkripce vyžaduje proteiny vázající se k DNA (DNA vazebné proteiny)
- Většina vazebných proteinů je sekvenčně specifická
 - Interakce mezi postranními řetězci AMK proteinu a chemickými skupinami DNA
 - Zejména ve velkém žlábků DNA
- DNA vazebné proteiny
 - Enzym katalyzující specifickou reakci na DNA
 - Regulační protein ovlivňující expresi genu

Negativní kontrola transkripce

- Mechanismus zastavující transkripci pomocí regulačních proteinů
- Represe
 - Enzymy syntetizující určitý produkt jsou tvořeny pouze pokud daný produkt není přítomen v prostředí
 - Nadbytek produktu potlačuje syntézu enzymů
 - Obvykle represe koncovým produktem
 - Nesyntetizuje se žádný enzym dráhy
 - Nemá vliv na syntézu enzymů jiné metabolické dráhy
 - Obvykle ovlivňuje biosyntetické procesy
- Indukce enzymů
 - Enzym je vytvářen pouze pokud je přítomen jeho substrát
 - Obvykle ovlivňuje katabolické procesy

Negativní kontrola transkripce

- Efektory
 - Sloučeniny, které ovlivňují syntézu enzymů
 - Indukovatel
 - Indukuje syntézu enzymu
 - Korepresor
 - Potlačuje syntézu enzymu
- Nemusí být substráty nebo produkty enzymů
 - Strukturní analoga

Represe koncovým metabolitem

- Koncový produkt (korepresor) se váže na specifický represorový protein (represor)
- Změní jeho tvar, takže se může vázat na operátorovou oblast genu (součást regulační oblasti)
- Zabraňuje navázání RNA polymerázy k promotoru
- Operon
 - Set genů, které jsou spolu spojeny a jsou transkribovány jako jedna jednotka
 - Pod kontrolou jednoho operátoru
 - Geny jedné dráhy jsou často na jednom operonu
 - Jeden represor kontroluje transkripci všech genů dráhy
 - Každá biosyntetická dráha má svůj represor

Učebnice Madigan a kol., obr. 9.7, str. 229

Enzymová represe (argininový operon)

Indukce enzymu

- Represorový protein je aktivní v nepřítomnosti indukovatele
 - Váže se k operátorové oblasti
 - Zabraňuje transkripci
- Indukovatel se váže na represorový protein, inaktivuje ho a RNA polymerasa může začít transkripci

Učebnice Madigan a kol., obr. 9.8, str. 229

Indukce enzymu (*lac* operon)

Pozitivní kontrola transkripce

- Regulační proteiny aktivují vazbu RNA polymerasy k DNA
 - Aktivační protein (aktivátor)
- Katabolismus maltosy u *E. coli*
- Maltosa se váže na aktivační protein, který se poté naváže na vazebné místo aktivátoru na DNA
- Stimuluje transkripci
- Regulon
 - Soubor operonů kontrovaných jedním regulačním proteinem
 - Geny pro využití maltosy lokalizovány na několika operonech
 - Známý i pro operony s negativní kontrolou

Učebnice Madigan a kol., obr. 9.9, str. 230

Pozitivní kontrola enzymové indukce (*mal* operon)

Signální transdukcce

- V mnoha případech není externí signál (např. přítomnost substrátu) přenesen na regulační protein přímo, ale pomocí receptoru
- Dvoukomponentní regulační systém
 - Histidinkinasa
 - V cytoplasmatické membráně
 - Autofosforylace na specifickém His při vazbě substrátu
 - Přenos signálu (fosfát) na
 - Regulator odpovědi
 - V cytoplasmě
 - Obvykle DNA vazebný protein regulující transkripci

Učebnice Madigan a kol., obr. 9.12, str. 232

Kontrola exprese genu pomocí dvoukomponentního regulačního systému

Globální regulační mechanismy

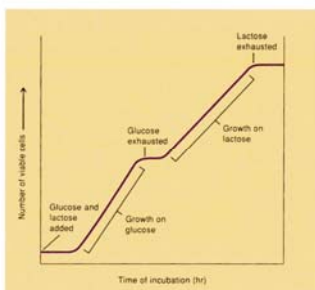
- Regulace exprese různých genů současně
- Laktosový operon i maltosový regulon podléhají globální regulaci (kromě specifických regulací)
- Katabolická represe
- Stringentní odpověď
- Odezva na teplotní šok

Katabolická represe

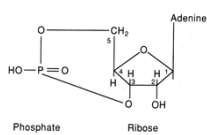
- Proces, kdy určitá sloučenina potlačí syntézu indukovatelných enzymů
- Substrát, který potlačuje využití ostatních substrátů, je lepším zdrojem uhlíku
- Efektivní využití přítomných substrátů

Katabolická represe

- Růst *E. coli* v přítomnosti glukosy a laktosy
 - Glukosa je rozkládána **konstitutivními enzymy**
 - Laktosa **indukuje** enzymy pro svůj rozklad
 - Glukosa zabraňuje růstu na laktose represí syntézy enzymů pro degradaci laktosy
 - Inhibuje syntézu cAMP a snižuje jeho hladinu nutnou pro indukci určitých metabolických drah
 - cAMP je nutný k iniciaci transkripce řady indukovatelných enzymů
 - Vazba na regulační protein umožňuje transkripci
 - Buňka metabolizuje nejlépe využitelný zdroj energie



Diauxní růst *E. coli* na glukose a laktose



Cyklický AMP

Stringentní odezva

- Nastává při nedostatku aminokyselin
 - Při změně podmínek z nutričně bohatého prostředí do limitujícího
 - Syntéza rRNA, tRNA a proteinů přechodně ustává
 - Netvoří se nové ribosomy
 - Po čase se růst obnovuje, sníženou rychlostí
 - Aktivuje se biosyntéza nových aminokyselin
 - Nutná syntéza nových proteinů
 - Pomocí existujících ribosomů
- Stringentní odpověď je spouštěna regulačními nukleotidy
 - Guanosintetrafosfát (ppGpp)
 - Guanosinpentaosfát (pppGpp)
 - Syntetizovány specifickým proteinem při vazbě nenabitě tRNA do ribosomu
 - Inhibují syntézu tRNA a rRNA a aktivují operony pro syntézu aminokyselin

Odezva na teplotní šok

- Rozvolnění struktury a denaturace proteinů proteasami
- Indukce heat shock proteinů
 - Ochranná funkce
 - Indukovány i jinými typy stresu
- Tři hlavní třídy
 - Hsp70 (DnaK)
 - Hsp60 (GroEL)
 - Hsp10 (GroES)
- Dále proteasy
 - Degradace nevratně poškozených proteinů
- Regulace pomocí alternativních sigma faktorů
 - Rozpoznávají specifické promotory
 - Množství kontrolováno pomocí DnaK (inaktivace σ faktorů)

Regulace exprese genů pomocí RNA

- sRNA (malé RNA)
- 40-400 nukleotidů
- Vazba k jiným RNA nebo malým molekulám

Antisense RNA

- Vazba k jiným RNA (obvykle mRNA) na základě párování bazí
- Komplementární sekvence k úseku kódující sekvence mRNA
- Tvorba dvouvláknové RNA
 - Nedochozí k translaci
 - Degradace
 - Protein, který již není potřeba, není syntetizován (z již existující mRNA)

Riboswitche

- Specifické trojrozměrné struktury na 5'-konci mRNA, které jsou schopny rozpoznávat (vázat) malé molekuly
 - Vazba metabolitu na RNA mění strukturu
 - Zabraňuje translaci
- Některé kontrolují transkripci
 - Konformační změna způsobuje předčasnou terminaci syntézy mRNA, která nese riboswitch
- Kontrola syntézy enzymových kofaktorů, některých aminokyselin, adeninu, guaninu

Učebnice Madigan a kol., obr. 9.25, str. 246

Regulace pomocí riboswitche

Atenuace

- Předčasná terminace syntézy mRNA
- Kontrola exprese genu po iniciaci transkripce, ale před jejím dokončením
- Mechanismus umožněn díky téměř současné transkripci a translaci u prokaryot
- Kontrola biosyntézy aminokyselin u gramnegativních bakterií (např. Trp operon *E. coli*)
- První syntetizovaná část mRNA („leader“ sekvence) může tvořit dvě alternativní sekundární struktury (smyčky)
 - Jedna ze struktur umožňuje pokračování transkripce, druhá způsobuje předčasnou terminaci

Učebnice Madigan a kol., obr. 9.27, str. 248

Atenuace

- Leader sekvence kóduje leader peptid, který je bohatý na danou aminokyselinu
- Při dostatku aminokyseliny je leader peptid syntetizován celý
 - Vytvoří se smyčka, která působí jako transkripční terminátor
 - Zastavení transkripce zbytku operonu
- Při nedostatku aminokyseliny se ribozom zastaví u kodónu pro danou aminokyselinu (nedostatek nabitě tRNA)
 - Přítomnost pozastaveného ribozomu umožní vytvoření alternativní smyčky, která zabraňuje tvorbě transkripčního terminátoru a RNA polymerasa může pokračovat v transkripci operonu
- Atenuační mechanismus není přítomen u eukaryot
 - Prostorová separace transkripce a translace

Učebnice Madigan a kol., obr. 9.27, str. 248

Mechanismus atenuace

Atenuace nezávislá na translaci

- Vyžaduje RNA-vazebný protein
- U gram pozitivních bakterií
 - Trp operon *Bacillus subtilis*
- Vazba regulačního proteinu k RNA ovlivňuje tvorbu smyček, které buď zastavují nebo umožňují další transkripci