

Регуляция экспрессии генов у бактерий

На уровне транскрипции

На уровне трансляции

На уровне инициации
терминации

На уровне элонгации или

Позитивная (активация)

Негативная (репрессия)

Белки –
регуляторы:
- активаторы,
- репрессоры.

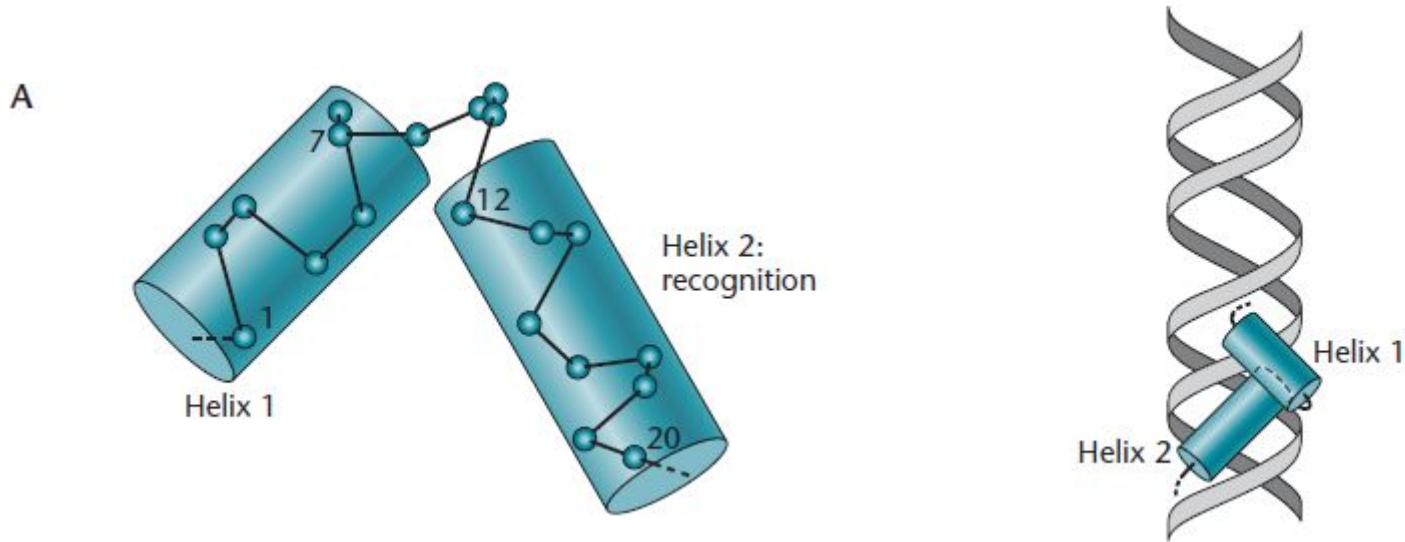
Сигналы, усиливающие
экспрессию
(активация активатора или
подавление репрессора):
индукторы

Сигналы, ослабляющие
экспрессию
(подавление активатора или
активация репрессора):
корепрессоры

Транскрипционная регуляция

В подавляющем большинстве случаев осуществляется белками, связывающимися с ДНК и что-то делающими с экспрессией гена/генов по соседству.

Самый часто встречающийся ДНК-связывающий мотив таких белков: спираль-поворот-спираль.



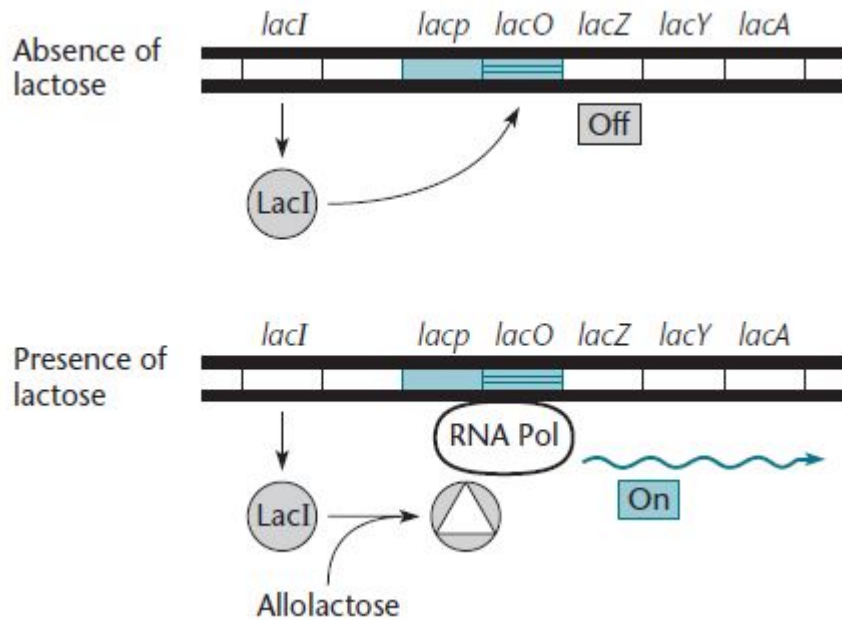
Аминокислоты спирали 2 располагаются в большой бороздке ДНК и связываются с нуклеотидами ДНК сиквенс-специфическим образом. Спираль 1 во взаимодействии с нуклеотидами участка обычно не принимает, но ее наличие является обязательным для связывания спирали 2.

Участок связывания транскрипционного фактора в ДНК называется **оператор**.

Негативная регуляция инициации транскрипции

Лас-оперон

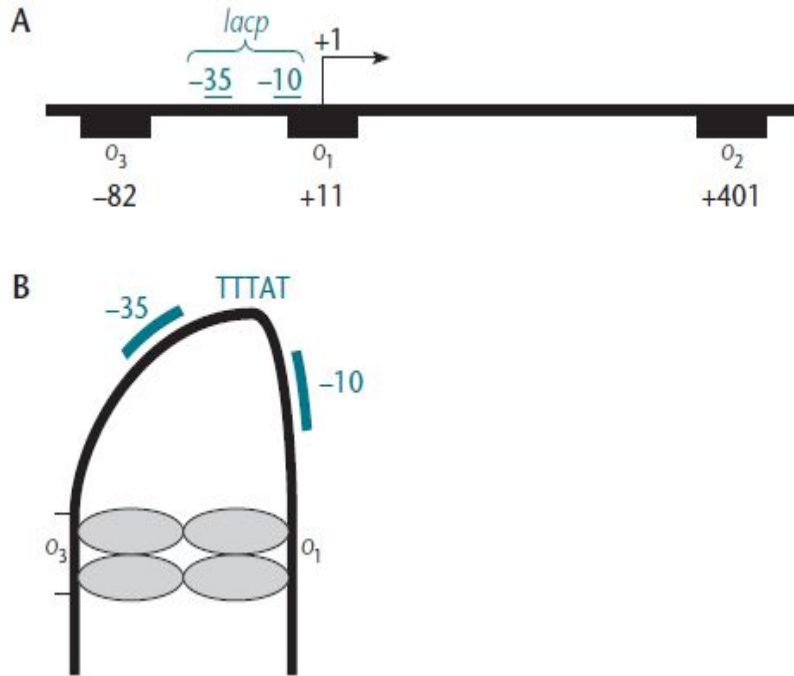
Сам термин «оперон» был впервые применен Жакобом и Мано именно к лактозному оперону. Оперон – совокупность генов, экспрессия которых на уровне транскрипции регулируется вместе и неразрывно.



Модель регуляции Лас-оперона Жакоба и Мано оказалась в принципе верной. Без лактозы ничто не мешает репрессору LacI связываться с оператором *lacO* и тем самым препятствовать связыванию РНК-полимеразы с промотором.

При наличии лактозы продукт ее метаболизма аллолактоза связывается с LacI и не дает ему связаться с *lacO*. РНК-полимераза начинает транскрипцию, синтезируются белки LacY, LacZ и LacA – ферменты, обеспечивающие метаболизм лактозы в полном объеме.

Операторы Лас-оперона



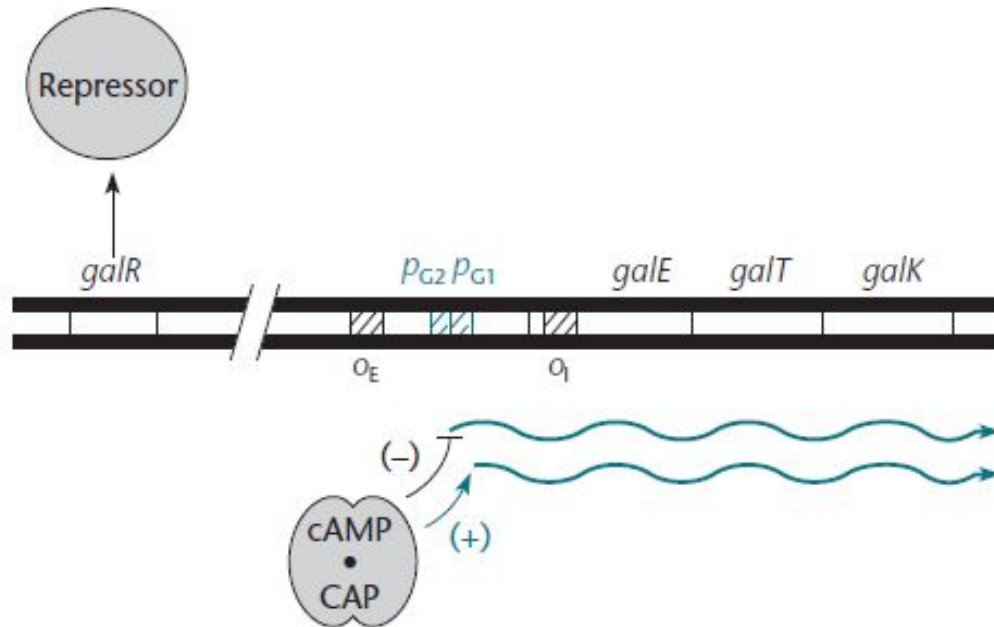
На самом деле операторов в лактозном опероне оказалось три штуки.

Белок LacI связывается с парой операторов (1 и 2 либо 1 и 3), формируя тетрамер. Это приводит к изгибу ДНК, который, в свою очередь, стабилизирует связывание LacI с ДНК.

В результате мы имеем крайне прочное связывание, разрушить которое, по сути, может только лактоза и ничто другое.

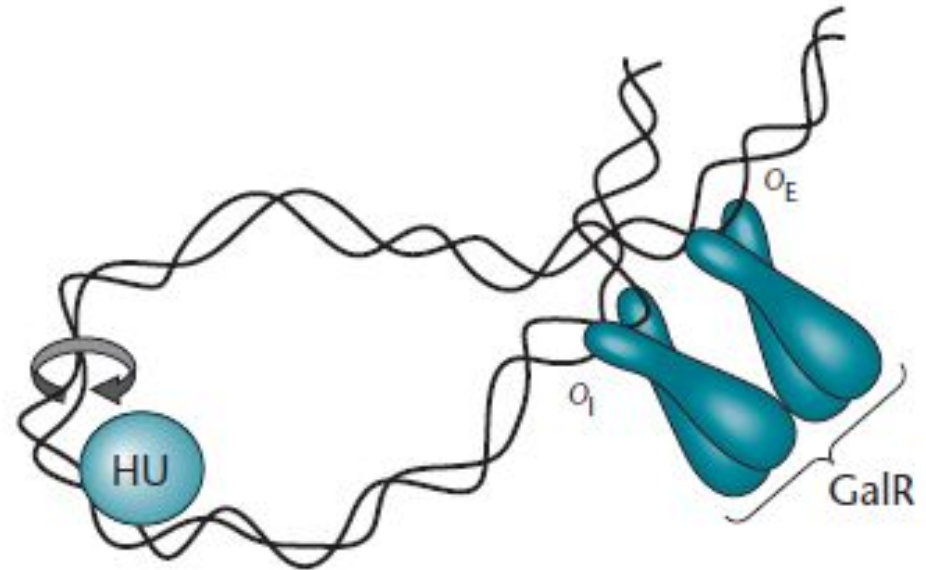
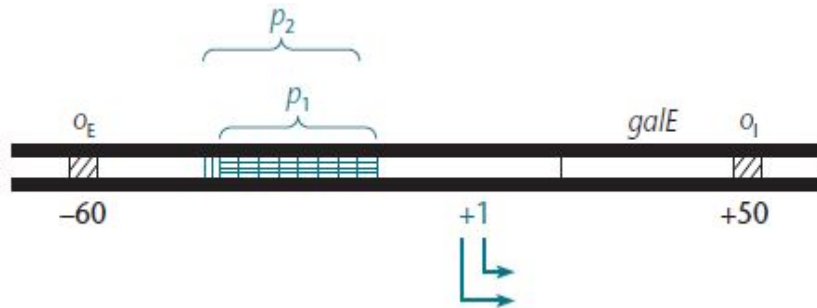
Негативная регуляция инициации транскрипции

Gal-оперон



Очень похожая история, но со специфическими чертами. Гены оперона могут транскрибироваться с двух промоторов, при этом белок CAP в комплексе с цАМФ подавляет один промотор и активирует второй (зачем?). Однако же в отсутствие галактозы репрессор GalR связывается с двумя операторами и полностью блокирует транскрипцию. Если же галактоза появляется, GalR уже не может связываться с операторами, и транскрипция идет успешно.

Операторы Gal-оперона

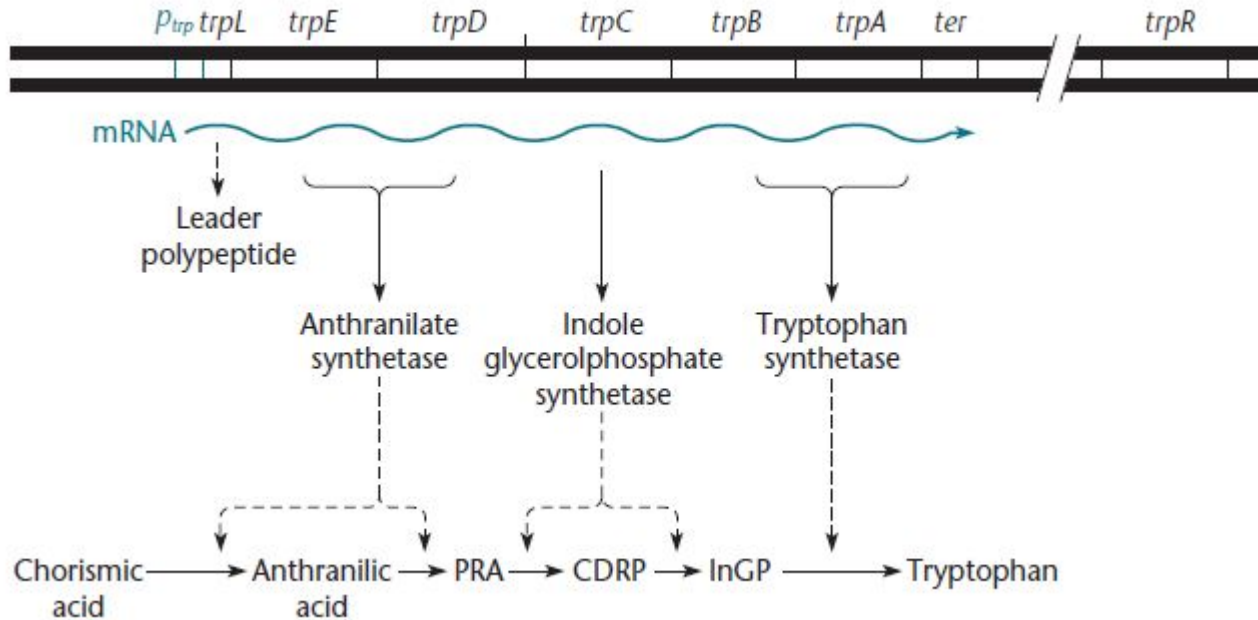


Расстояние между двумя операторами 110 нуклеотидов. GalR работает в виде двух димеров, каждый из которых связывает по одному оператору. Это приводит к изгибу ДНК. Любопытно, что гистоноподобный белок HU для нормальной работы этой системы должен связаться в центре петли и сделать один лишний виток двойной спирали. Из-за этого у димеров GalR появляется возможность связать два оператора в антипараллельной конфигурации, что является обязательным условием репрессии.

Gal- и Lac-опероны кодируют белки, необходимые для утилизации соответствующих сахаров. Такие опероны называются деградиционными. Логично, что они выключены в отсутствии этих сахаров.

Негативная регуляция инициации транскрипции

Trp-оперон

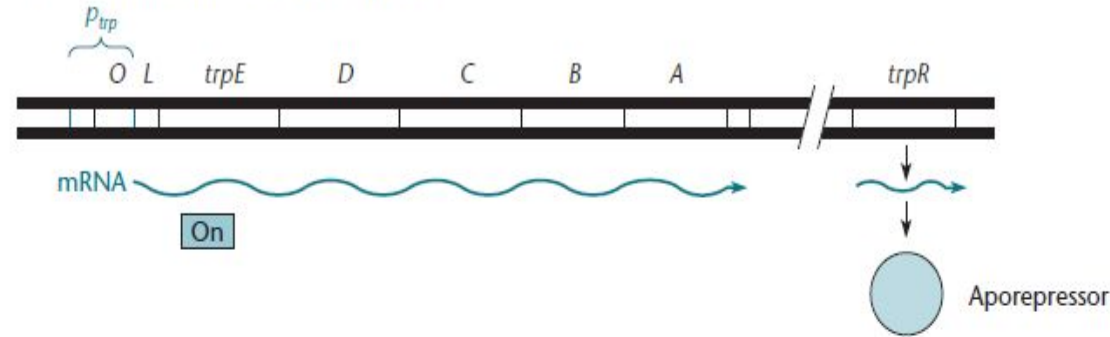


А здесь мы имеем дело с биосинтетическим опероном, кодирующим ферменты биосинтеза триптофана. При этом регуляция все равно негативная.

Негативная регуляция инициации транскрипции

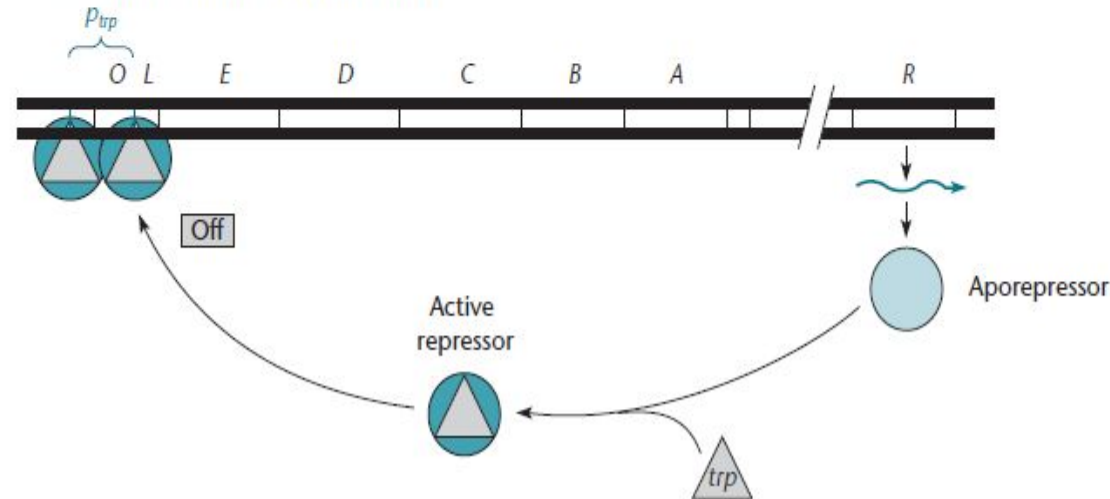
Trp-оперон

A In the absence of tryptophan



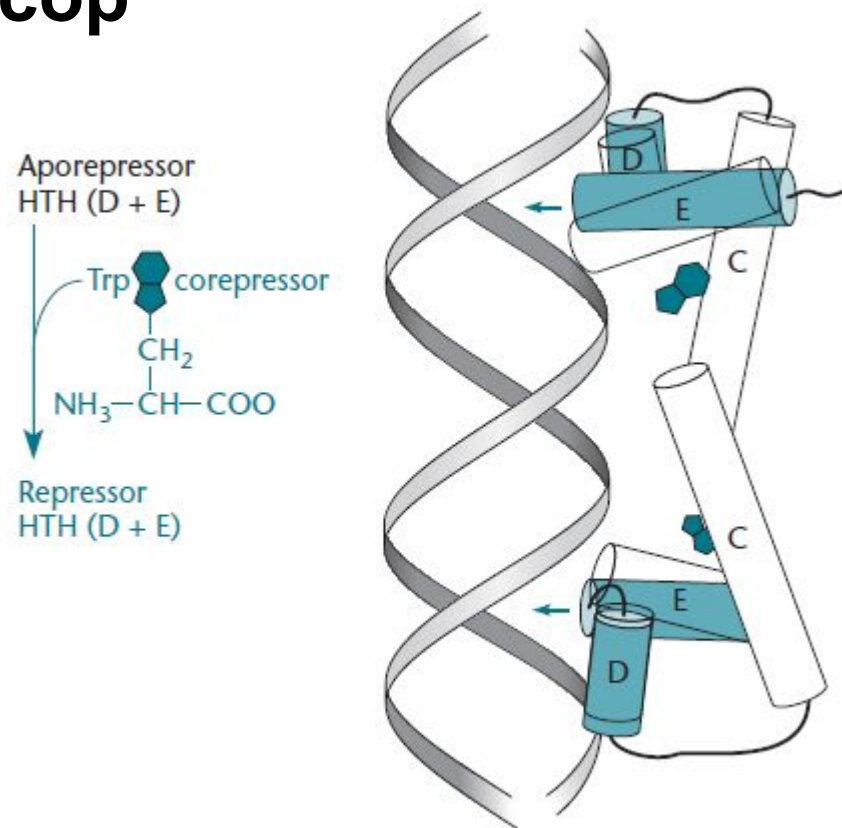
Если триптофана нет в среде, значит, его надо синтезировать самой клетке. В этих условиях репрессор TrpR неактивен (т.н. апопрессор), и идет транскрипция всех генов оперона, что приводит к синтезу триптофана.

B In the presence of tryptophan



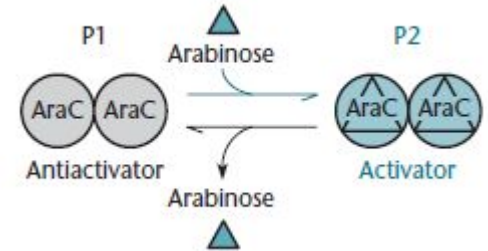
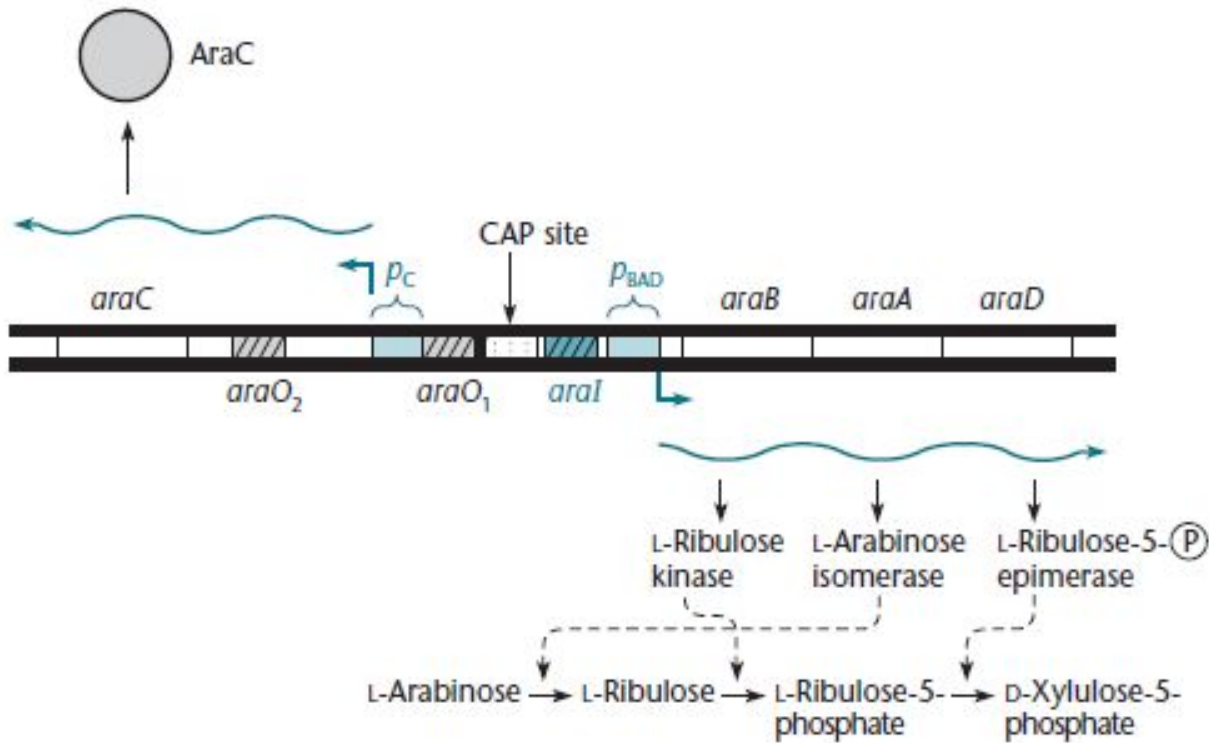
Как только в среде появился триптофан, надо заканчивать его синтезировать, ведь это довольно энергозатратный процесс. Триптофан связывается с апопрессором и активирует его, превращая уже в репрессор. Он связывается с оператором и блокирует ставшую ненужной транскрипцию.

Превращение апорепрессора в репрессор



Две молекулы триптофана связываются с димером TrpR и вызывают легкий поворот одной альфа-спирали относительно другой. Это приводит к формированию домена helix-turn-helix (НТН), компетентного в связывании большой бороздки ДНК в районе оператора.

Позитивная регуляция инициации транскрипции

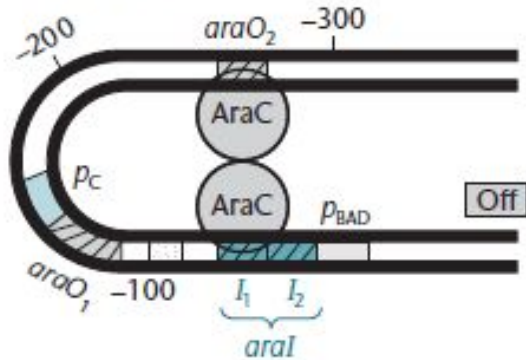


Три гена метаболизма арабинозы находятся под промотором *p*_{BAD}. Непосредственно перед промотором – оператор *araI*, с которым связывается белок AraC, чтобы активировать транскрипцию. Также имеются еще два оператора – *araO*₁ и *araO*₂, с которыми тот же белок AraC связывается, чтобы транскрипцию подавить. Ген *araC* транскрибируется в другую сторону, с промотора *p*_C.

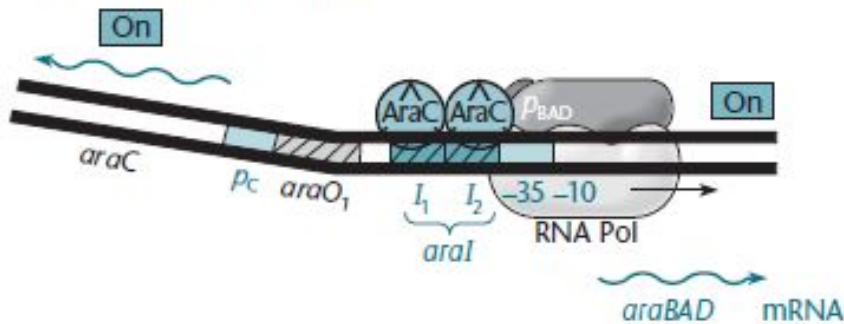
Репрессорная или активаторная активность белка AraC зависит от арабинозы. В ее присутствии димер AraC – это активатор (форма P2), а в ее отсутствие – репрессор (форма P1).

Позитивная регуляция инициации транскрипции

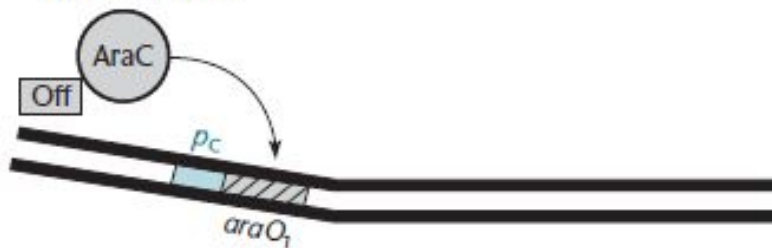
A Absence of L-arabinose



B Presence of L-arabinose



C Excess of AraC



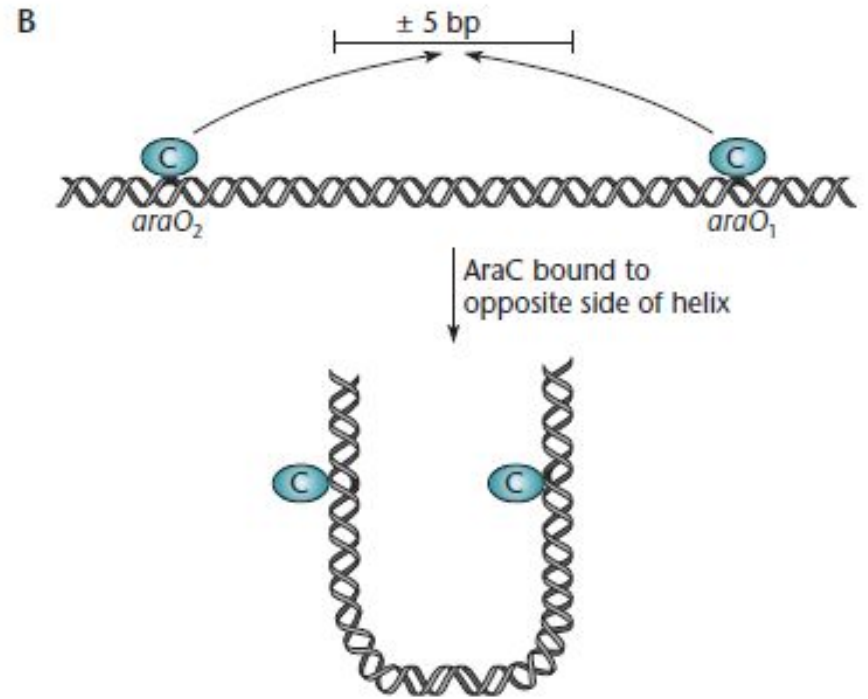
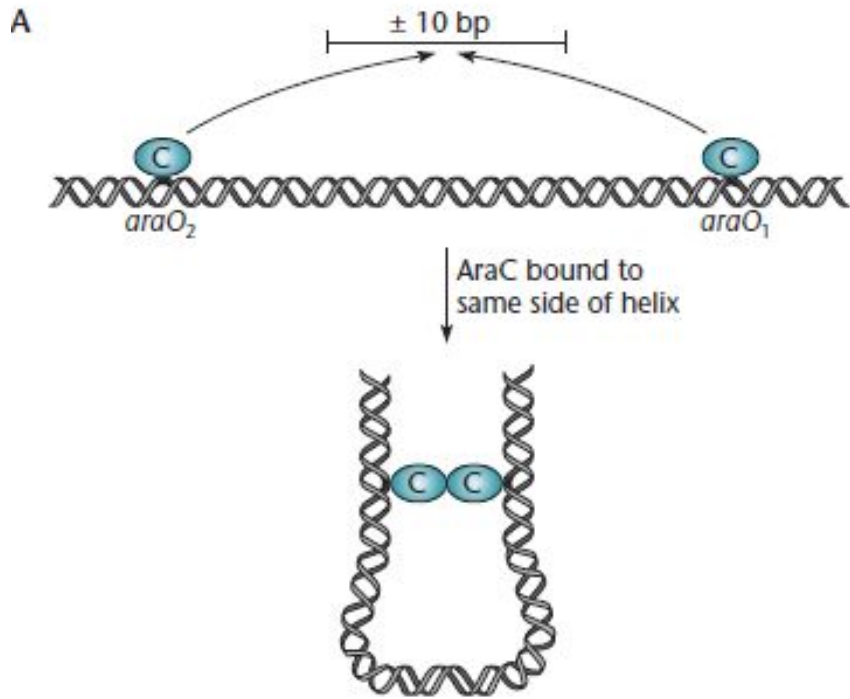
терон

В отсутствие арабинозы Р1-форма AraC предпочитительно связывается с I1 – частью оператора *araI* и с оператором *araO2*. Оператор *araI* становится недоступен для Р2-формы *araC*, даже если она вдруг откуда-то возьмется. А без этого транскрипция с p_{BAD} невозможна.

При появлении арабинозы Р1 превращается в Р2, а у этой формы AraC предпочтительная аффинность к двум частям оператора *araI*. Это позволяет начаться транскрипции, синтезируются ферменты метаболизма арабинозы.

Ситуация, в которой наличествует избыток AraC – плохая ситуация, его может стать больше арабинозы, и начнется подавление транскрипции. В этом случае AraC начинает связываться с оператором *araO1*, что блокирует транскрипцию его собственного гена.

Регуляция ara-оперона зависит от поверхности

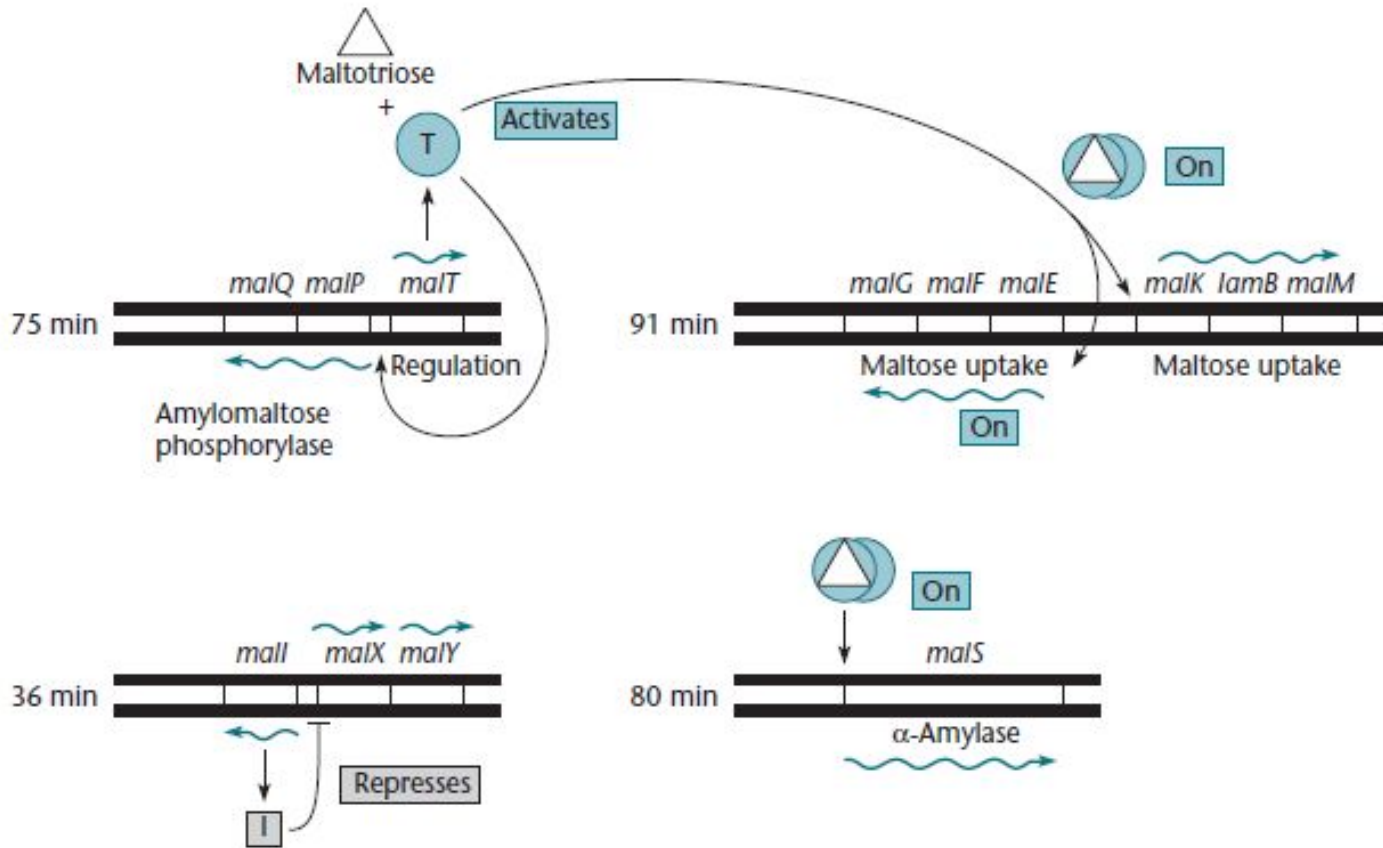


Две молекулы AraC связываются с участками O₂ и I₁ с одной и той же стороны двойной спирали ДНК. Именно поэтому они способны изогнуть ДНК и провзаимодействовать друг с другом, а это является необходимым условием репрессии транскрипции, ибо стабилизирует ДНК-белковые комплексы.

Если из последовательности ДНК между двумя операторами удалить участок в 10 нуклеотидов (ровно 1 оборот спирали) – бактерия этого не почувствует.

А если удалить участок 5 нуклеотидов – никакой репрессии уже не будет, поскольку две молекулы репрессора окажутся на разных сторонах потенциального изгиба и не будут стабилизированы.

Позитивная регуляция инициации транскрипции

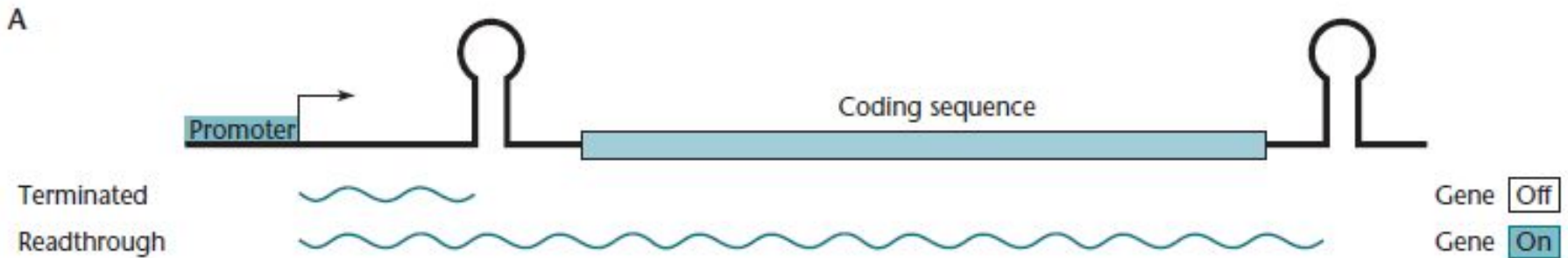


Активатор MalT, связываясь с мальтозой, начинает активировать сразу аж три оперона (4-й, 36-минутный, от этого белка независим, но тоже регулируется мальтозой).

Аттенюация

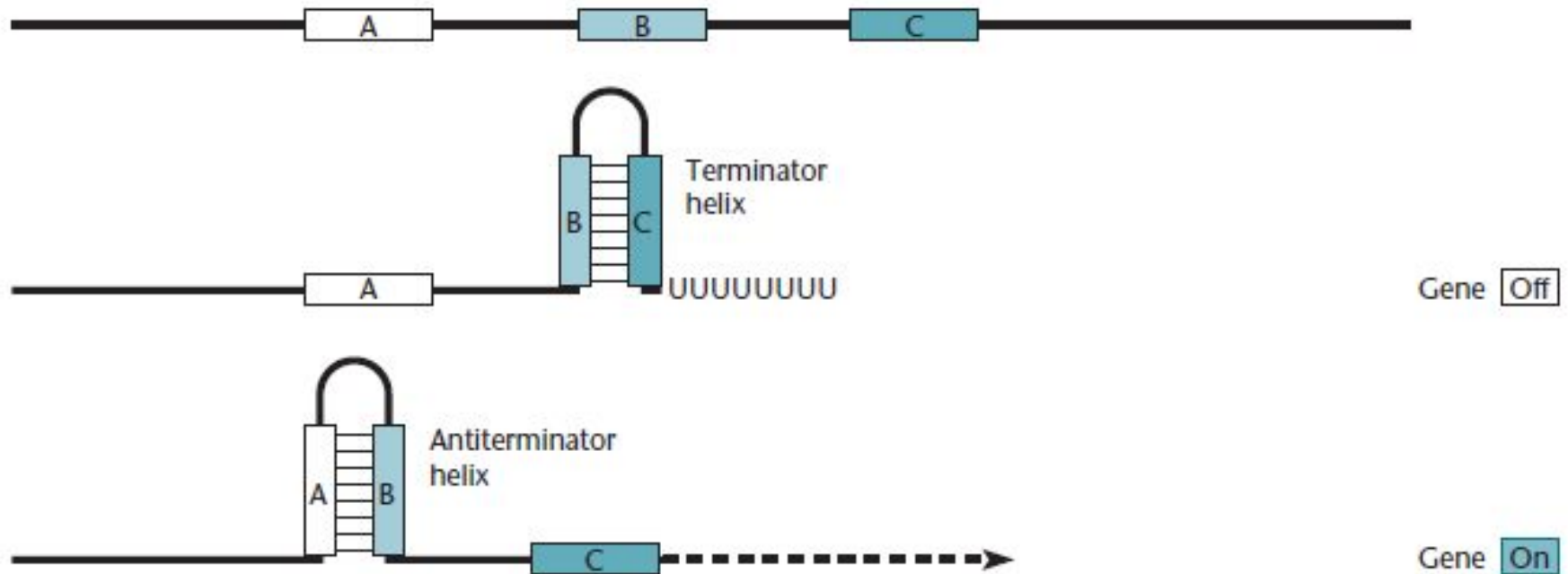
транскрипции

Это такой способ регуляций, когда РНК-полимераза успешно инициирует транскрипцию, и этот этап регуляции не подвергается. А вот дальше РНК-полимераза может терминировать, даже не доехав до первого гена оперона. Часто это достигается модуляцией вторичной структуры синтезируемой РНК.



При аттенюации транскрипции часто бывает, что новосинтезируемая РНК в самом начале содержит последовательность, способную сложиться в шпильку. Если вы помните, то шпильки – это сигналы терминации транскрипции, каковая и происходит с образованием короткой РНК, ничего не кодирующей. Но если не дать сложиться такой терминационной шпильке, то все будет хорошо, и весь оперон нормально оттранскрибируется.

Аттенюация транскрипции

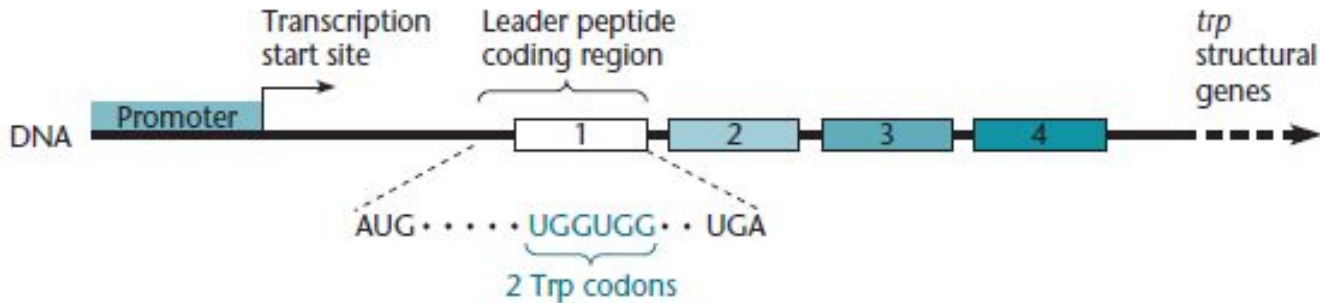


Часто аттенюация происходит с участием олигоU-участка в лидерной последовательности РНК. Полимераза проходит такие участки медленно, что позволяет сформироваться терминационной шпильке В-С. И все кончается преждевременной терминацией.

Однако же если что-то случилось, и формирование шпильки В-С запрещено, будет формироваться другая шпилька, А-В, не являющаяся терминационной, поскольку после нее нет олигоU-участка. И тогда транскрипция пойдет дальше и счастливо завершится в конце оперона.

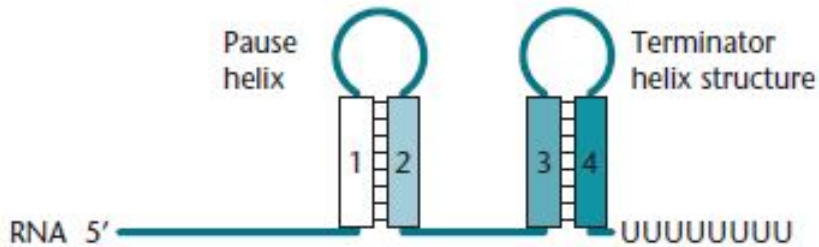
Аттенюация транскрипции

A The *trpL* leader region

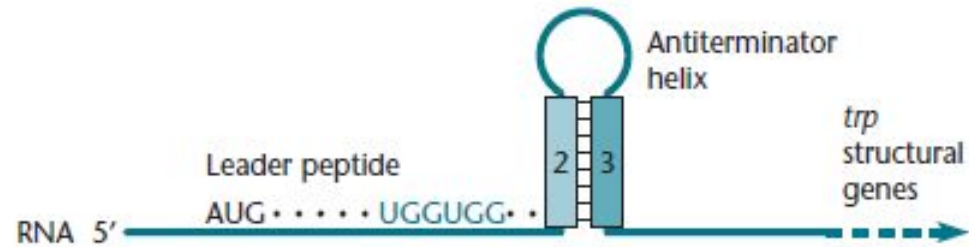


B Alternative pairing structures for *trpL* RNA

1 Structure that terminates transcription



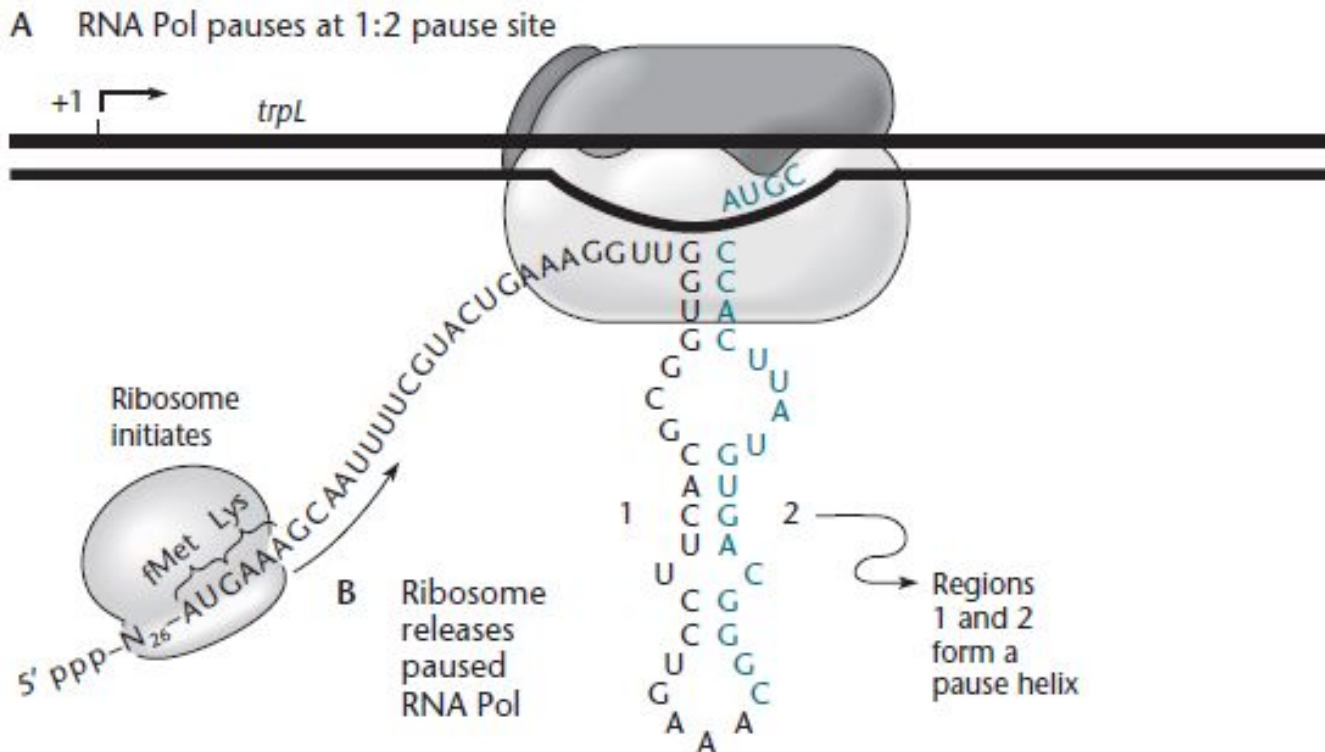
2 Structure that allows *trp* gene transcription



Лидерный участок этого оперона содержит 4 важных участка. Первый из них – короткая открытая рамка считывания, содержащая, помимо прочих, два триптофановых кодона. Участки могут формировать шпильки 1-2, 3-4 и 2-3. Последний вариант – единственный, при котором возможна нормальная транскрипция генов биосинтеза триптофана.

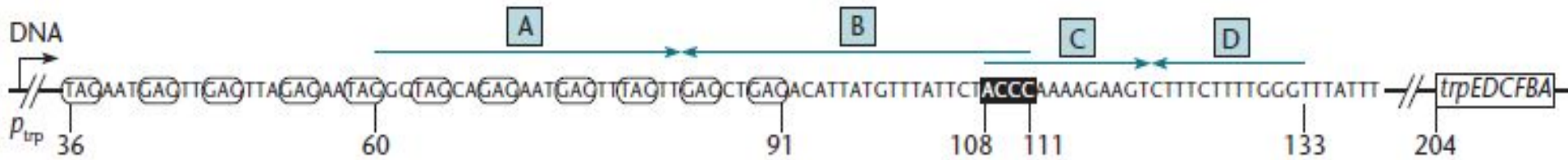
Аттенюация транскрипции

Trp-оперон *E.coli*: сопряжение транскрипции с трансляцией



РНК-полимераза застревает на шпильке 1-2 (так называемая шпилька паузы). Но тут ее догоняет рибосома, успешно инициировавшая на участке 1, и подталкивает ее. Неповоротливая РНК-полимераза сдвигается с места и едет транскрибировать дальше.

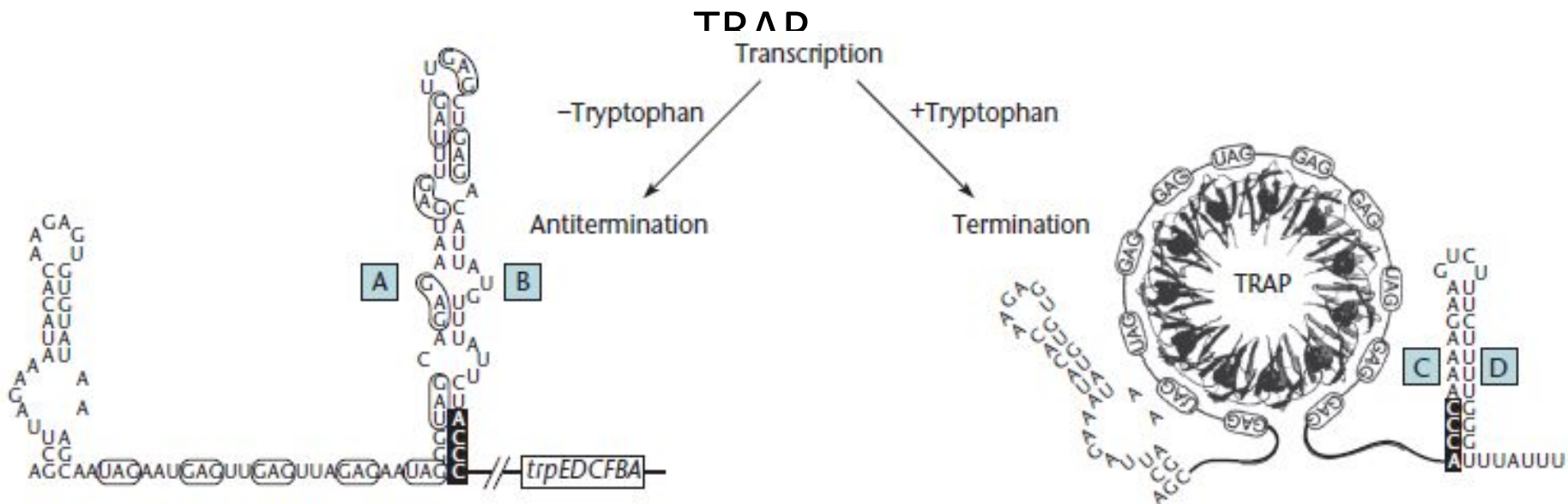
Аттенюация транскрипции Trp-оперон *B.subtilis*



У этой бактерии аттенюация триптофанового оперона происходит совсем не так, но с тем же результатом. В лидерном участке оперона имеются 4 последовательности, способные формировать две шпильки (A-B, антiterминационная, и C-D, терминационная, поскольку после участка D идет олигоU). Помимо этого, лидерный участок богат триплетами GAG, на которых все и завязано.

Аттенюация транскрипции

Trp-оперон *B.subtilis*: РНК-связывающий белок

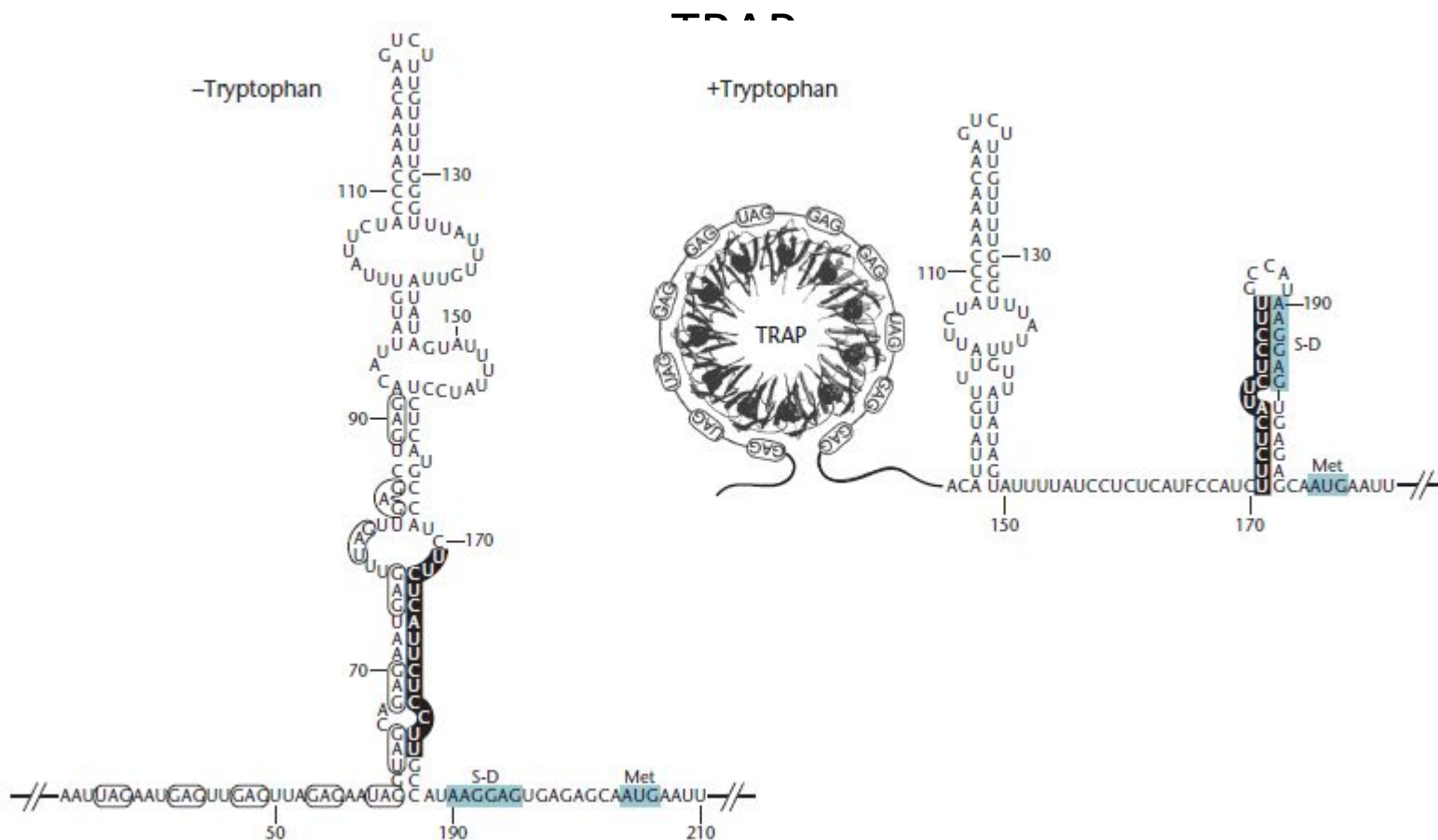


В триптофан-связанной форме белок TRAP приобретает способность сильно связывать те самые триплеты. А поскольку сам белок склонен к формированию олигомеров шарообразной формы, то выходит так, что лидерная РНК «наматывается» на такие олигомеры и крепко-накрепко закрепляется триплетами. Однако в участках С и D таких триплетов нет, они свободны и могут сформировать шпильку, которая, как уже говорилось, является терминационной. Транскрипция оперона не идет, триптофан не синтезируется.

А если триптофана нет, TRAP не способен намотать на себя лидерную РНК. Тогда образуется более стабильная антитерминационная шпилька А-В, запрещающая формирование терминационной шпильки. Транскрипция оперона идет, триптофан синтезируется!

Аттенюация транскрипции

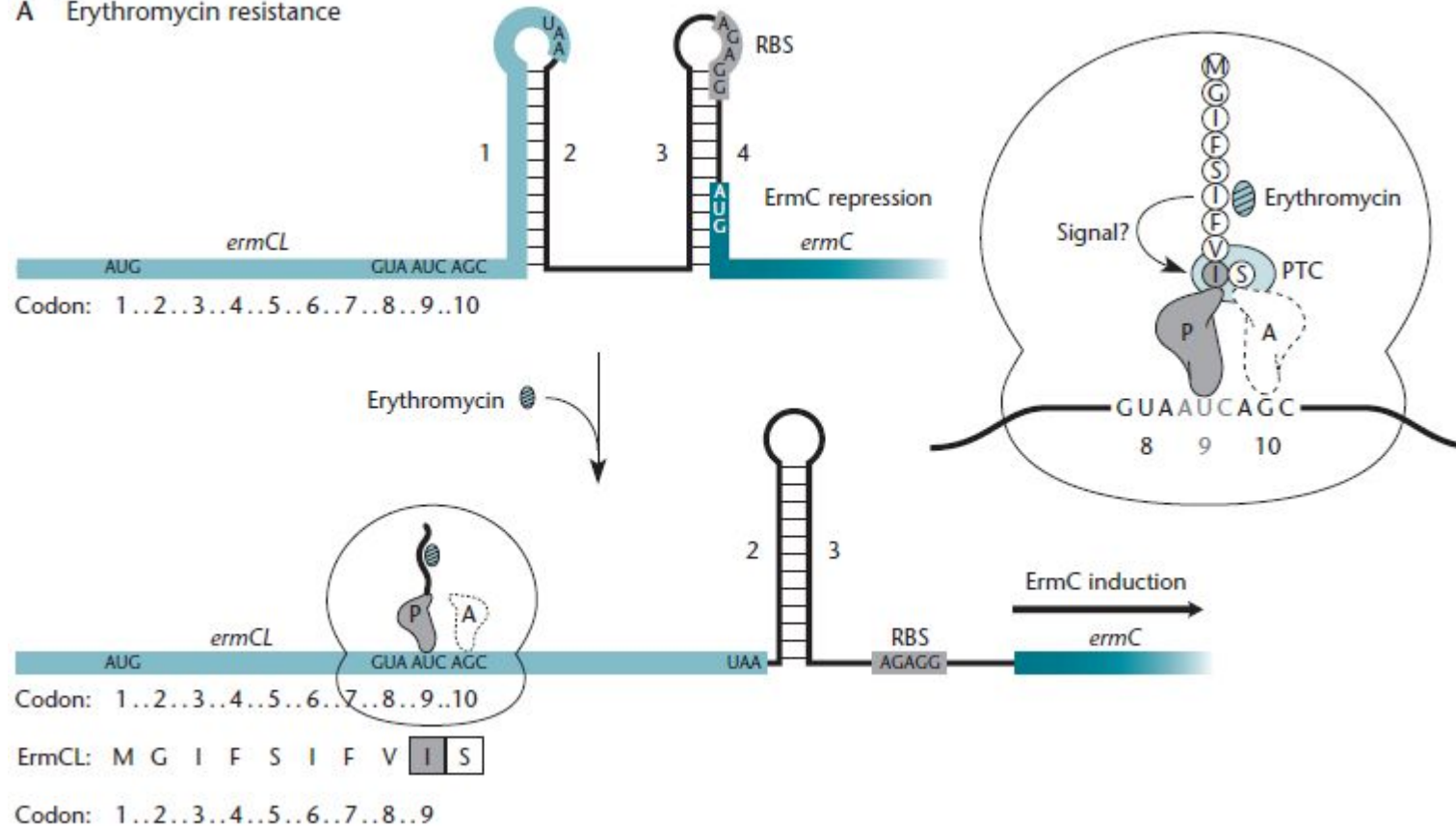
Trp-оперон *B.subtilis*: РНК-связывающий белок



На всякий случай TRAP в связанной с триптофаном форме еще и подавляет трансляцию РНК *trpE*, первой в опероне. Без этого белка в части РНК сразу перед SD *trpE* формируется большая шпилька, и при этом сам SD находится в оц виде, что делает возможной посадку рибосомы и трансляцию. Однако когда приходит Trp-TRAP, связывание с ним делает невозможным формирование такой шпильки, и формируется другая (менее стабильная), захватывающая SD. Трансляция в таких условиях невозможна!

«Аттенюация трансляции» Бактериальная устойчивость к

A Erythromycin resistance



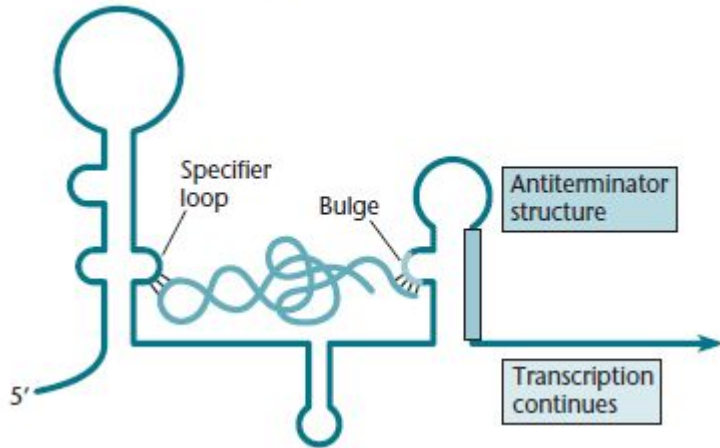
Эритромицин подавляет бактериальную трансляцию, связываясь с рибосомами и вызывая застревание в них полипептидов. Еще в сублетальных концентрациях он может сделать это в одном случае и вызывать застревание синтезируемого белка ErmCL. Это приводит к переорганизации шпилек в нижележащей части мРНК, в результате чего высвобождается SD следующей мРНК, *ermC*. Идет ее трансляция с образованием белка ErmC, метилтрансферазы, метилирующей один конкретный нуклеотид в рибосомной РНК, в результате чего эритромицин уже не может связаться с рибосомой!

Рибопереключате

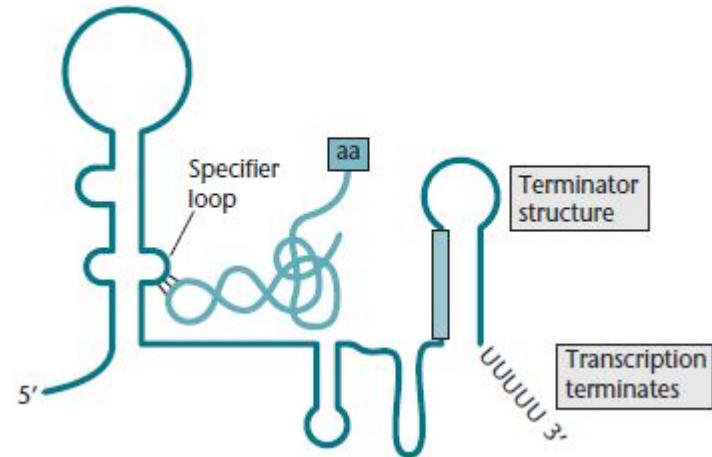
ли

Структурные элементы РНК (чаще всего – в лидерном участке), способные разрешать или запрещать экспрессию нижележащих генов путем прямой реакции на какой-либо сигнал (наличие разнообразных химических молекул или даже просто изменение температуры), без дополнительных участников процесса (белковых факторов, рибосом...). И это тоже вариант аттенуации.

A Low tRNA aminoacylation



B High tRNA aminoacylation

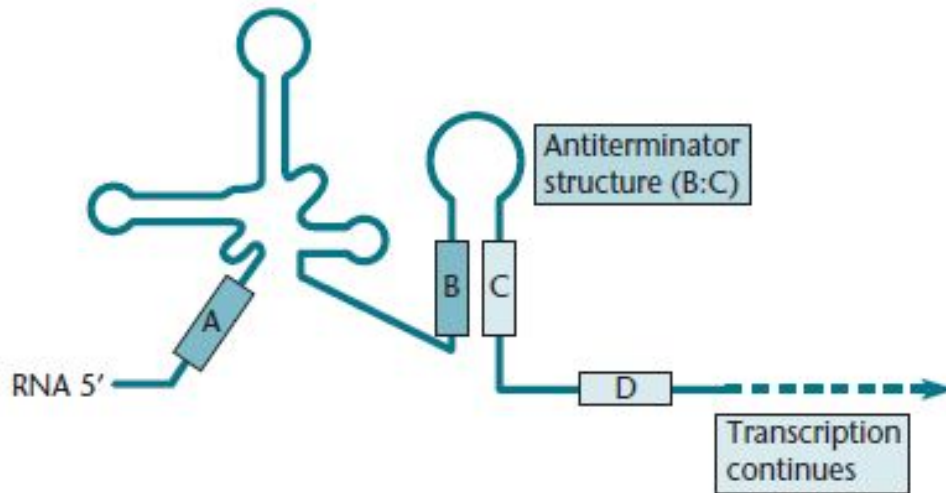


Вот, к примеру, регуляция транскрипции генов аминокил-тРНК-синтетаз у *B. subtilis*. Лидерные участки РНК содержат шпильку, с которой очень хочется связаться соответствующей тРНК своим антикодоном. Если тРНК деацилирована, ее 3'-конец связывается с другой частью лидерной РНК, и такое взаимодействие приводит к формированию антитерминаторной шпильки. Транскрипция идет, фермент синтезируется. А если тРНК аминокилирована, ее 3'-конец не может связаться с лидером, и формируется терминационная шпилька, что запрещает транскрипцию гена фермента.

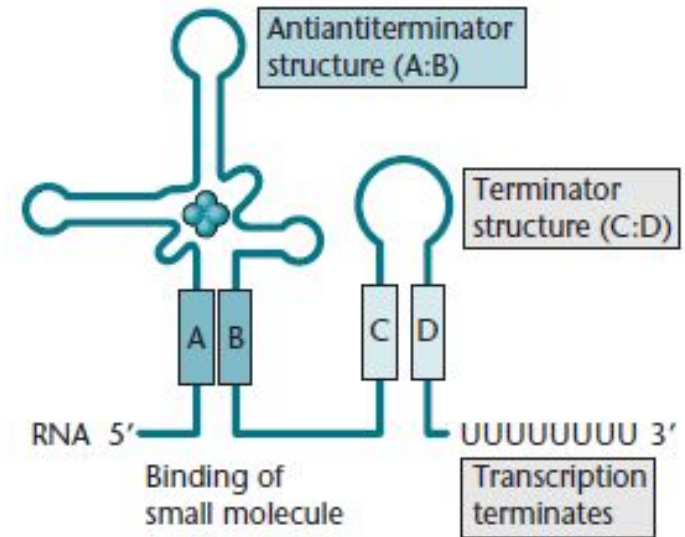
Рибопереключатели

Метаболиты, влияющие на вторичную структуру лидера

A Limiting effector



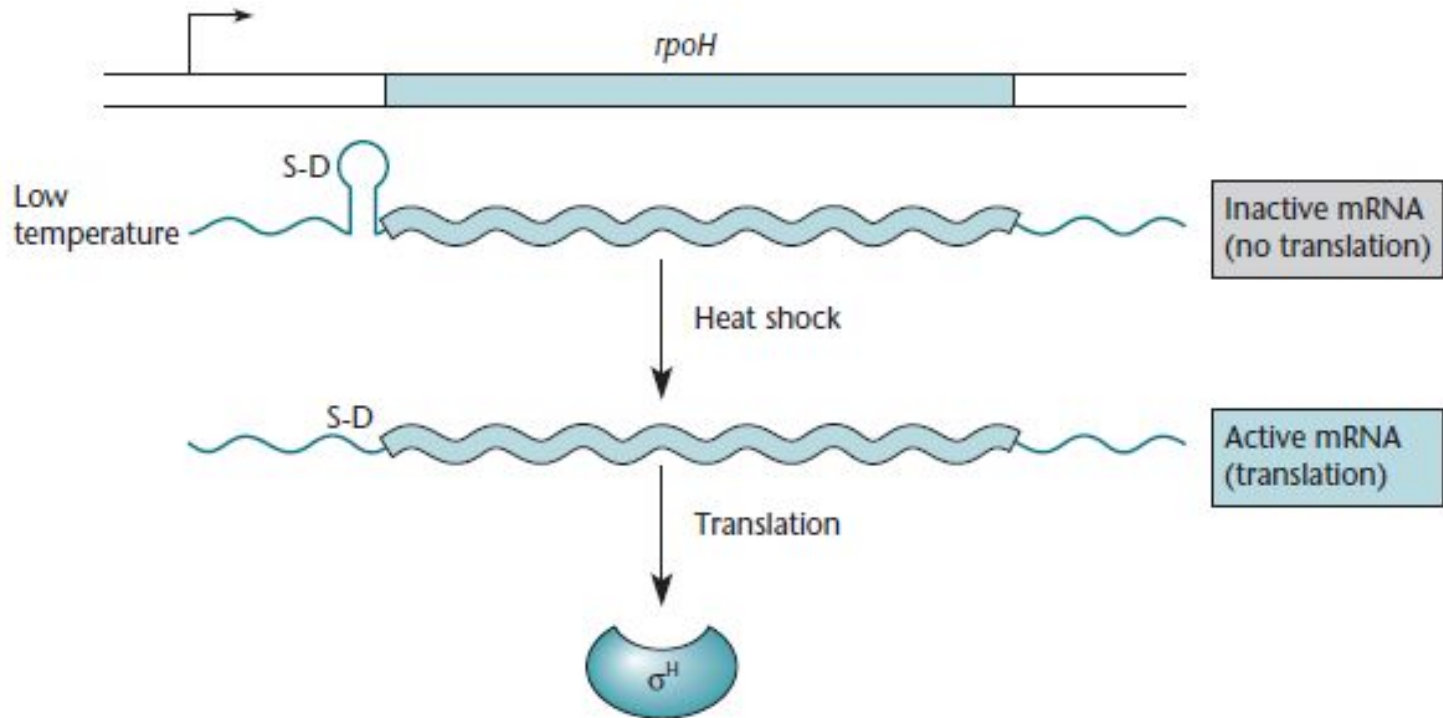
B Excess effector



Метаболитом может служить ион металла, аминокислота, витамин и много чего еще. Принцип нам уже знаком: в отсутствие метаболита формируется антитерминаторная шпилька, а в его присутствии – терминаторная. Это если метаболит надо синтезировать, а если его нужно, наоборот, запустить в метаболизм – роль метаболита в такой регуляции будет строго обратной.

Рибопереключатели

Регуляция инициации трансляции при помощи



Ген *groH* кодирует альтернативный сигма-фактор РНК полимеразы. Если он встраивается в холофермент вместо обычной сигмы, полимераза начинает узнавать другой набор промоторов и транскрибировать гены, кодирующие белки, критически важные для существования клетки при повышенной температуре.

Трансляция мРНК *groH* возможна как раз только при повышенной температуре, когда из-за этого расплетается шпилька, в состав которой входил SD этой мРНК.

Такие шпильки называются термосенсорами.