

## Základy biochemie KBC/BCH

# Kontrola genové exprese

**Inovace studia biochemie prostřednictvím e-learningu**

CZ.04.1.03/3.2.15.3/0407



Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky.



## Termíny zkoušek KBC/BCh, 2010/11

- Předtermín: Čtvrtek 16.12. , 8:30, posl. 501
- **Leden a únor 2011:**
- 10.1., 8:30 a 10:30, vždy posl. SE502
- 17.1., 8:30 a 10:30
- 24.1., 8:30 a 10:30
- 31. 1., 8:30 a 10:30
- 7. 2., 8:30 a 10:30
- 8. 2., 8:30 a 10:30

**Inovace studia biochemie prostřednictvím e-learningu**

CZ.04.1.03/3.2.15.3/0407



Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky.



## Osnova

- Úvod
- Prokaryota (*E. coli*) - Lac represor
- Represe katabolitem
- Atenuace - zeslabení
- Riboswitches - změna struktury mRNA
- Nástin genové regulace u eukaryot

## Úvod

- Genová exprese je kombinovaný proces transkripce genu na mRNA a translace mRNA do struktury proteinu.
- Jak je genová exprese kontrolována a řízena?
- V první řadě na úrovni transkripce, kdy je regulována proteiny, které se váží na určitá místa na DNA.
- Nejvíce poznaná je kontrola genové exprese u prokaryot, konkrétně u *E. coli*.

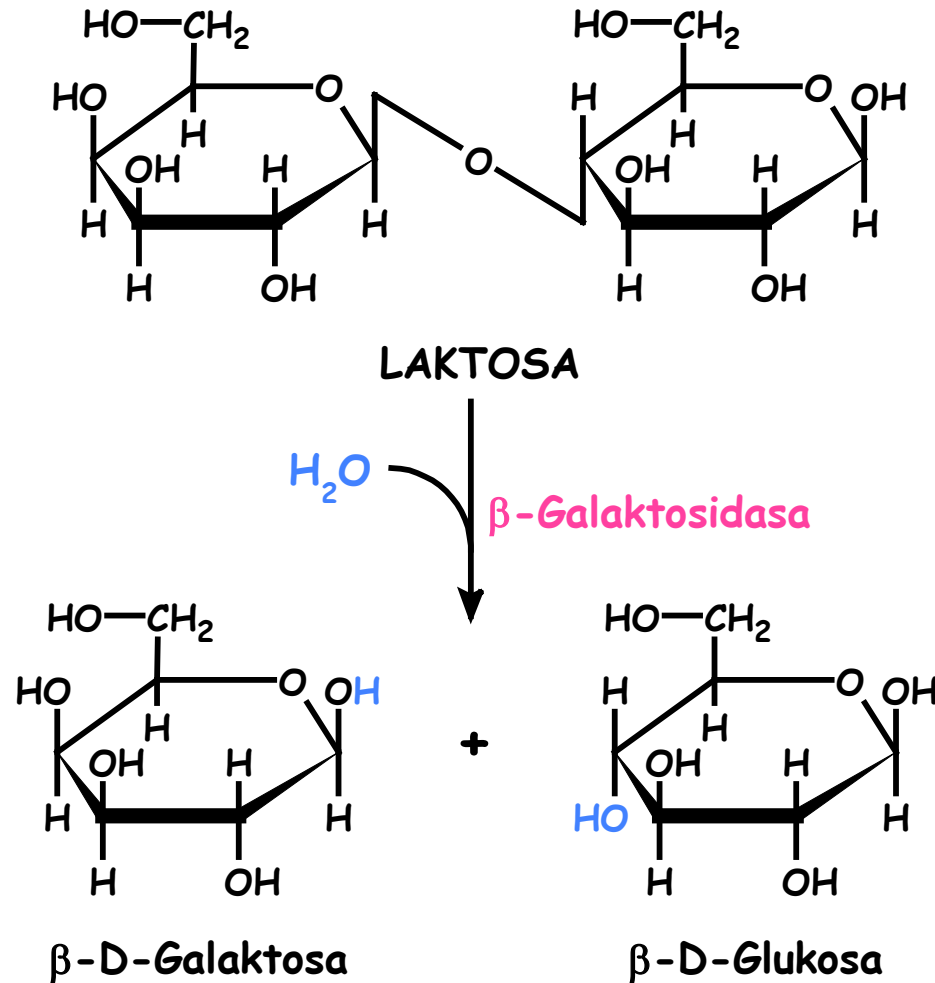
## Základní pojmy

- **Represor** je protein kódovaný regulačními geny, jehož vazbou na DNA dochází k zastavení transkripce operonu.
- **Operátor** je sekvence DNA mimo operon, na který se váže specifický represorový protein regulující funkčnost strukturního genu.
- **Operon** je jednotka koordinující a regulující aktivitu genu u prokaryot - kontrola syntézy proteinů. Obsahuje regulační prvky a geny kódující proteiny.
- **Induktor** je sloučenina, která vede v buňce ke tvorbě většího množství daného proteinu (enzymu), přímou vazbou na regulační sekvence jeho genu.
- **Promotor** je 5'-nekódující sekvence genu, na kterou se váže RNA polymerasa.

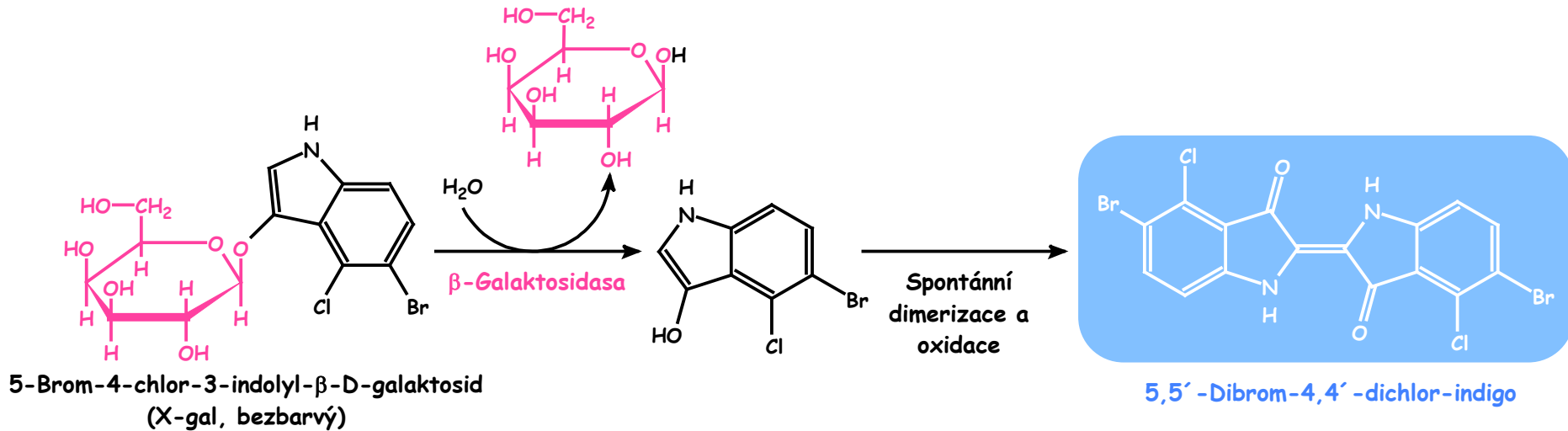
## *Lac* represor a *lac* operon *E. coli*

- Buňky *E. coli* pěstované za nepřítomnosti laktosy jsou původně neschopné metabolizovat tento disacharid. Schopnost metabolizovat laktosu závisí na přítomnosti a aktivitě dvou proteinů:  $\beta$ -galaktosidasy (katalyzuje hydrolýzu laktosy) a galaktosidpermeasy (transportuje laktosu do buněk).
- Několik minut po přidání laktosy do média těchto buněk se syntéza těchto proteinů zvýší 1 000 x.
- **Laktosa funguje jako induktor syntézy těchto proteinů!!!**
- Kromě laktosy existuje řada dalších derivátů laktosy, jako např. 1,6 - allolaktosa nebo syntetický induktor isopropylthiogalaktosid (IPTG). Přírodní a syntetické induktory indukují také syntézu thiogalaktosidtransacetylasy (detoxifikace látek transportovaných s laktosou galaktosidpermeasou).

# Funkce $\beta$ -galaktosidasy

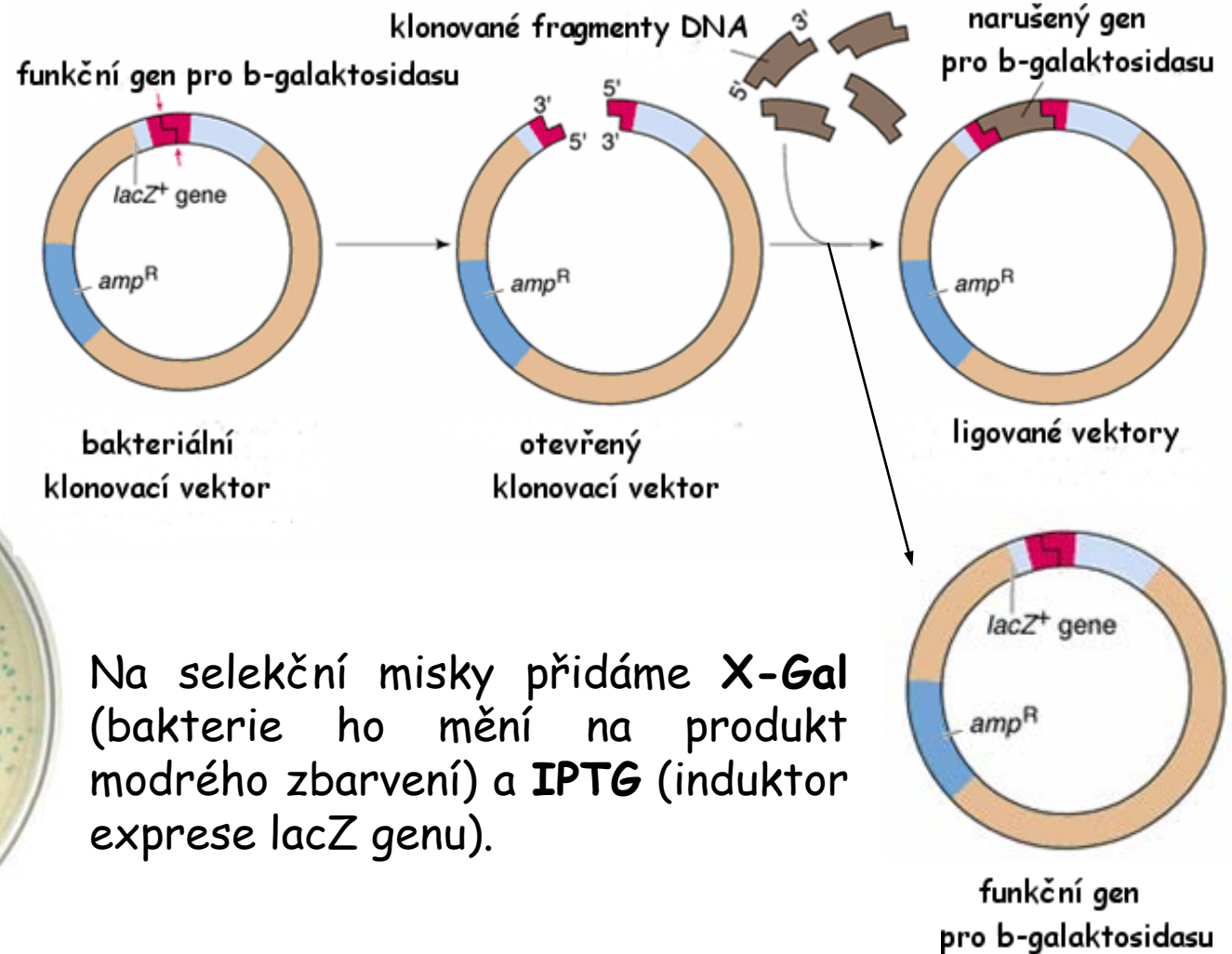


## $\beta$ -Galaktosidasová reakce sledovaná jako intenzita modrého zbarvení produktu

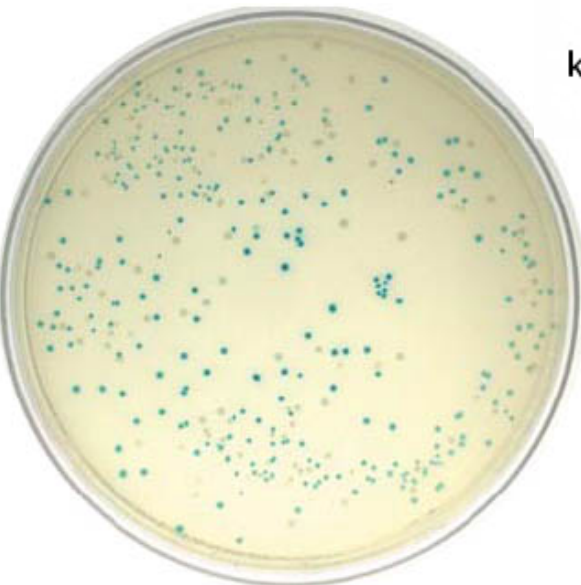




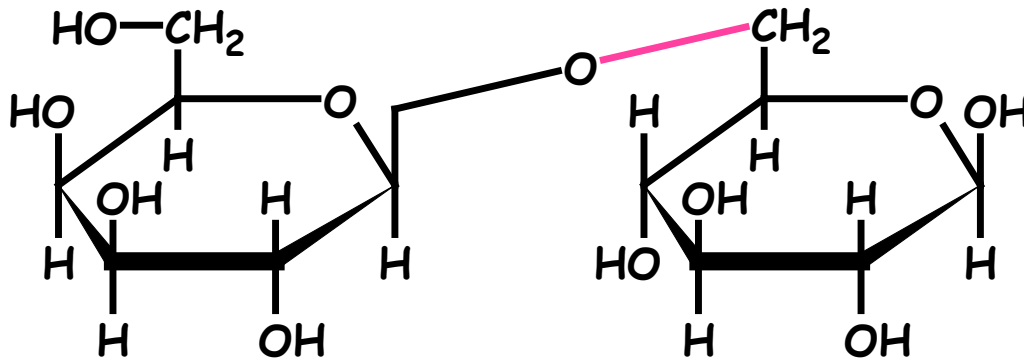
# Blue/white screening test usnadňuje selekci pozitivních klonů



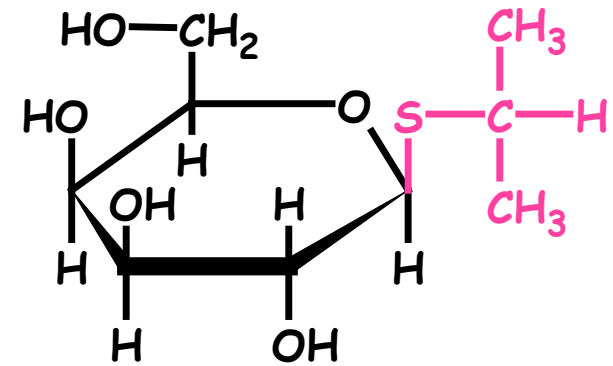
Na selekční misky přidáme **X-Gal** (bakterie ho mění na produkt modrého zbarvení) a **IPTG** (induktor exprese *lacZ* genu).



## Další induktory laktosového metabolismu



1,6-Allolaktosa

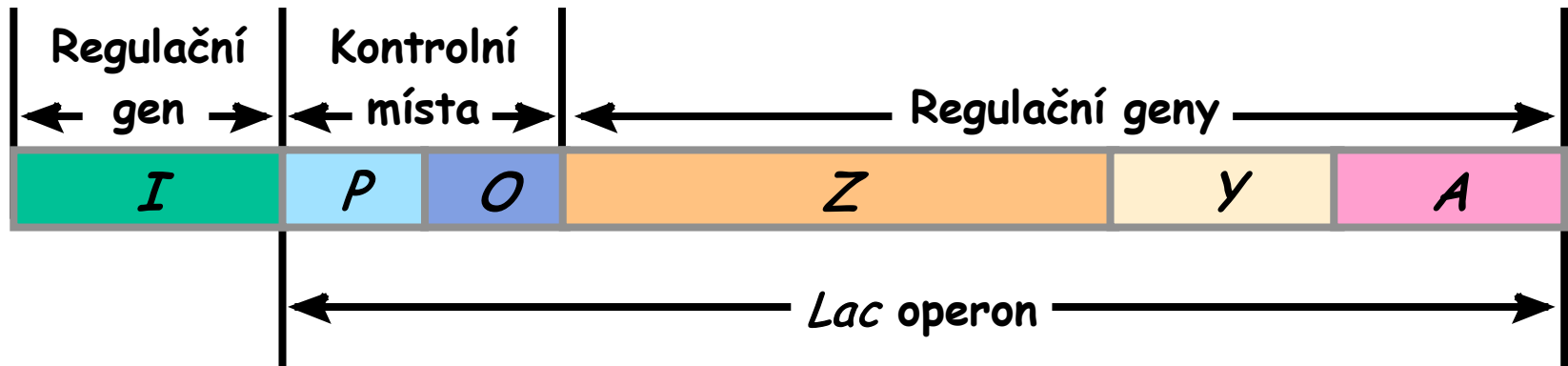


Isopropylthiogalaktosid  
(IPTG)

## *Lac operon E. coli*

Regulační gen (*I*) kóduje represor, který inhibuje transkripci *lac* operonu.

- Geny specifikující  $\beta$ -galaktosidasu, galaktosidpermeasu a thiogalaktosidtransacetylasu, označené jako *Z*, *Y* a *A* jsou kontinuálně seřazeny v tzv. *lac* operonu.
- *P* - promotor; *O* - operátor

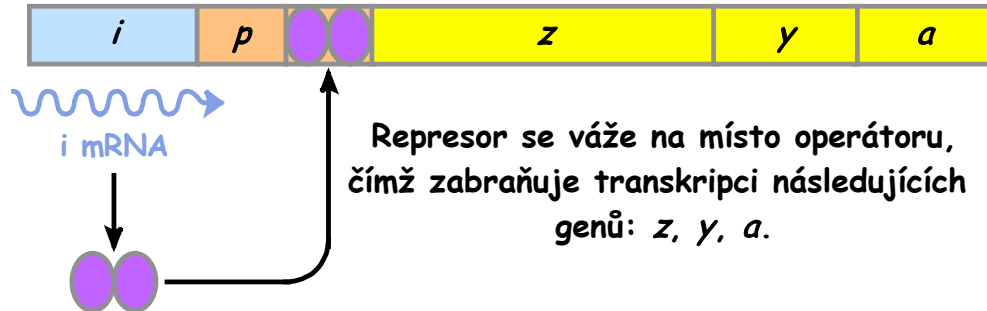


## *lac* represor rozpoznává operátorovou sekvenci

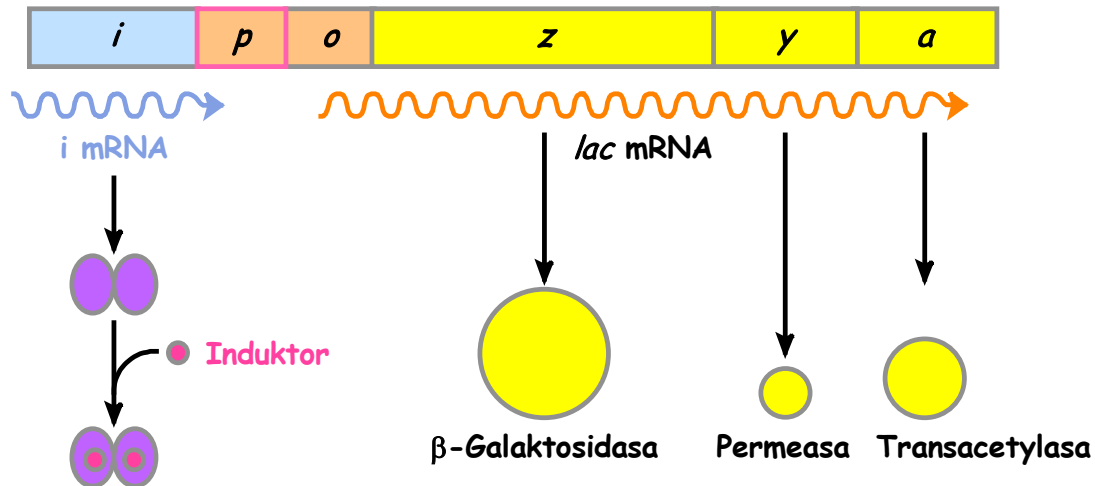
- Cílem *lac* represoru je region *lac* operonu znám jako **operátor**, ležící v blízkosti  $\beta$ -galaktosidasového genu.
- Za nepřítomnosti induktoru se *lac* represor váže na operátor a brání tak transkripci mRNA. Po vazbě induktoru represor oddisociuje a transkripce a následná translace může proběhnout.
- Rychlostní konstanta této změny je  $\sim 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  !!!
- *lac* represor byl izolován v roce 1966, B. Müller-Hillem a W. Gilbertem. *lac* represor je přítomen v *E. coli* v množství 0,002 %. Molekulární klonovací techniky dovolily připravit množství, které umožnilo studovat kompletní třírozměrnou strukturu (Ponzy Lu a Mitchell Lewis, 1996).
- *lac* represor je homotetramer, každý obsahující 360 aminokyselin, čtyři funkční jednotky.

# Expres *lac* operonu

## A) BEZ INDUKTORU



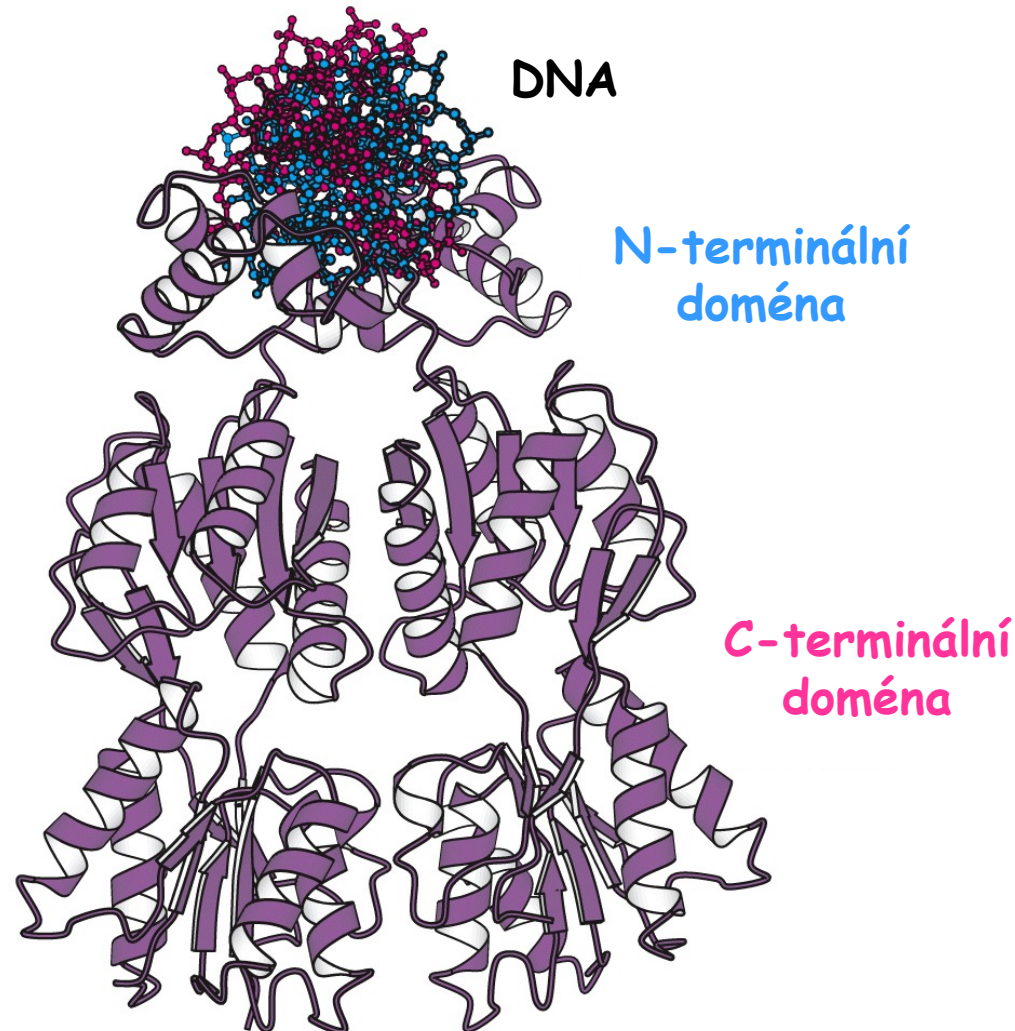
## B) S INDUKTOREM



Komplex represor-induktor nemá schopnost vázat se na DNA.

## Struktura *lac* represoru - dimer vázaný na DNA

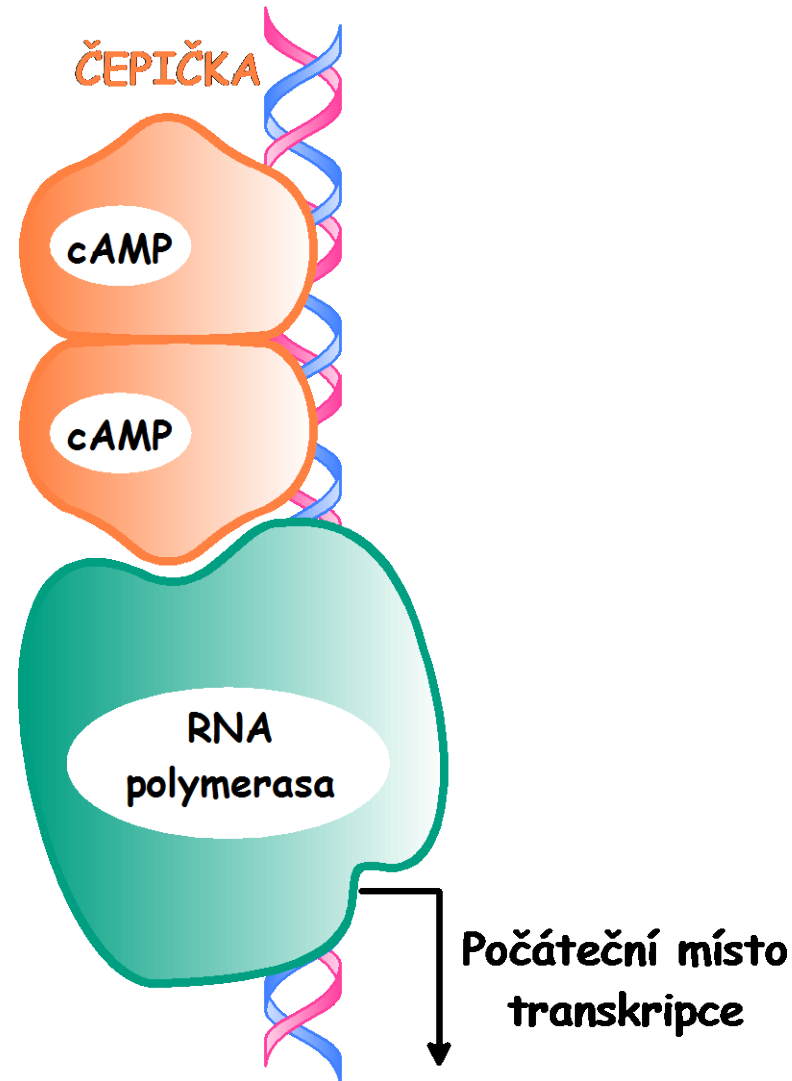
*Lac* represor (tetramer) se chová jako allosterický protein. Váže současně dva operátory a vytváří na DNA smyčku.



**Represe katabolitem.** Transkripce může být stimulována proteiny, které reagují s RNA polymerasou.

- Adekvátní množství glukosy zabraňuje plné expresi genů specifikujících proteiny nutné k fermentaci řady dalších katabolitů včetně laktosy, arabinosy a galaktosy, dokonce i v případě, že jsou přítomny ve vysokých koncentracích. Zamezuje se tak duplikaci tvorby enzymů katalyzujících tvorbu energie.
- **Inhibiční efekt glukosy zvaný katabolická represe spočívá ve snížené hladině cAMP!!**
- **Za přítomnosti glukosy je hladina cAMP nízká, zvýšená je za situace, kdy je glukosy nedostatek (viz metabolické regulace).**
- Pro tento typ represe je nutný cAMP vazebný protein zvaný cAMP receptorový protein CRP nebo také CAP (catabolite gene activator protein).
- CAP-cAMP komplex se váže na promotorový region *lac* operonu a stimuluje transkripci za nepřítomnosti represoru. CAP je pozitivní regulátor, na rozdíl od *lac* represoru, který je negativní regulátor.
- Zvýšená hladina cAMP uvnitř *E. coli* vede k tvorbě CAP-cAMP komplexů (homodimer), které se váží na promotory za stimulace transkripce mnoha genů.

## Vazebné místo pro katabolitem aktivovaný protein (CAP, čepička)

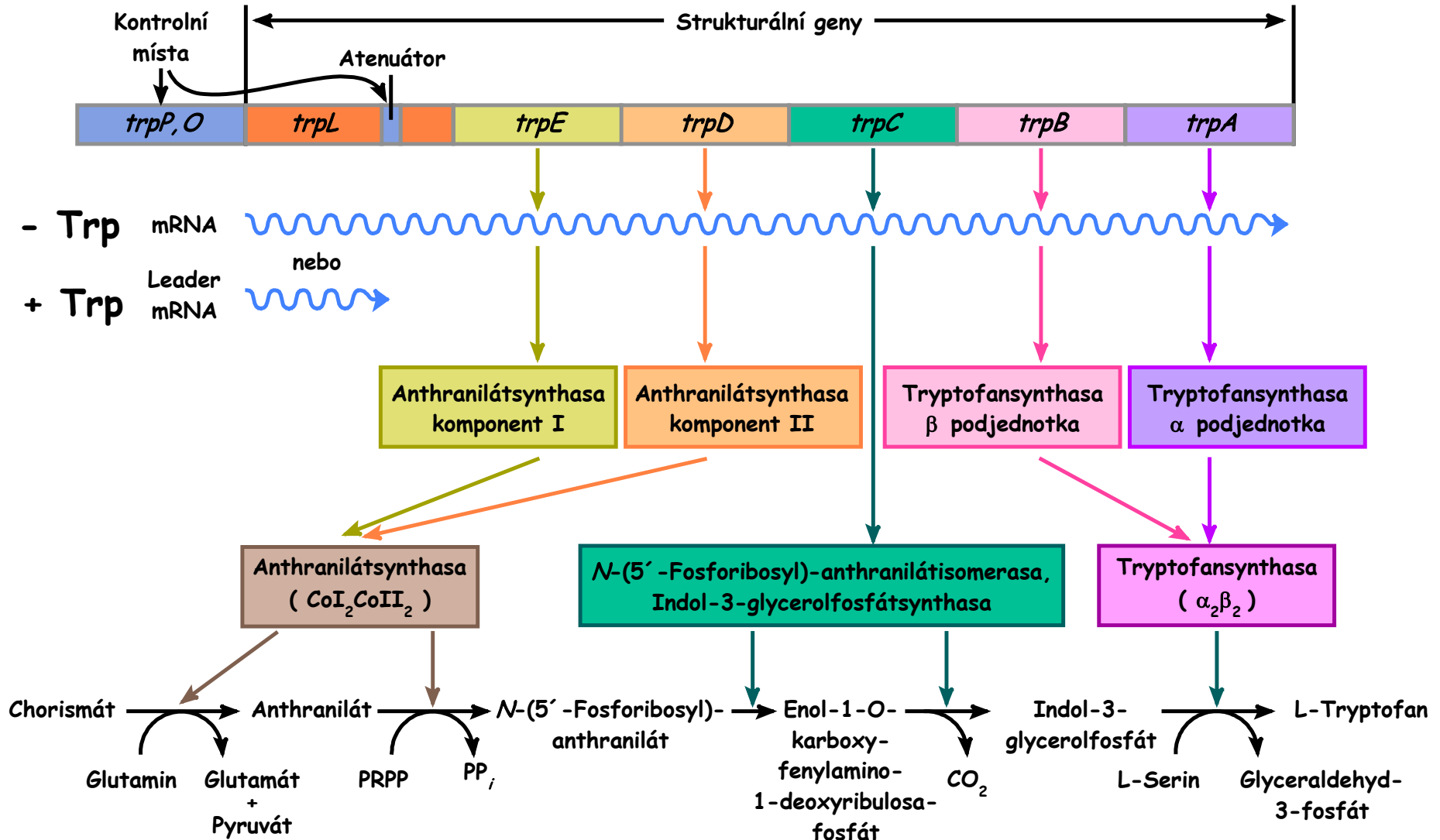




## Atenuace - zeslabení

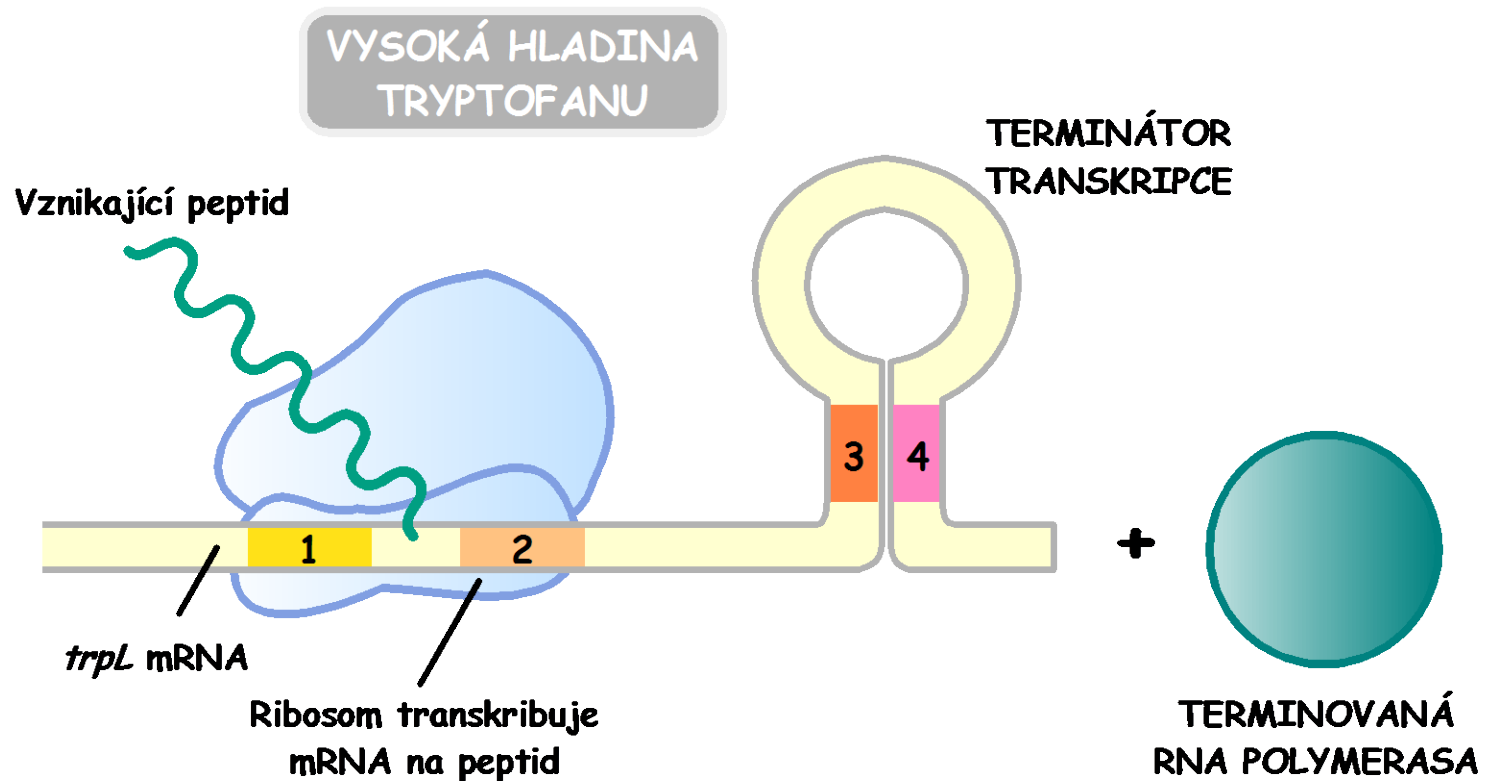
- *E. coli trp operon* kóduje pět polypeptidů, které se podílí na tvorbě tří enzymů, které zprostředkovávají syntézu Trp z chorismátu.
- Těchto pět *trp* operon genů je koordinovaně exprimováno pod kontrolou *trp* represoru, který váže L-Trp za tvorby komplexu vázajícího se specificky na *trp* operátor a redukuje tak 70 x rychlost transkripce *trp* operonu. Trp se tak stává korepresorem - jeho přítomnost zabraňuje další produkci Trp.
- Takový kontrolní prvek se nazývá atenuátor - zeslabovač - sekvence DNA v operátorové oblasti bohatá na kodony pro Trp (UGG)
- Při nedostatku Trp je *trp* atenuátor maskován.

# Genetická mapa *trp* operonu *E. coli* s vyznačenými enzymy katalyzujícími jednotlivé reakce.



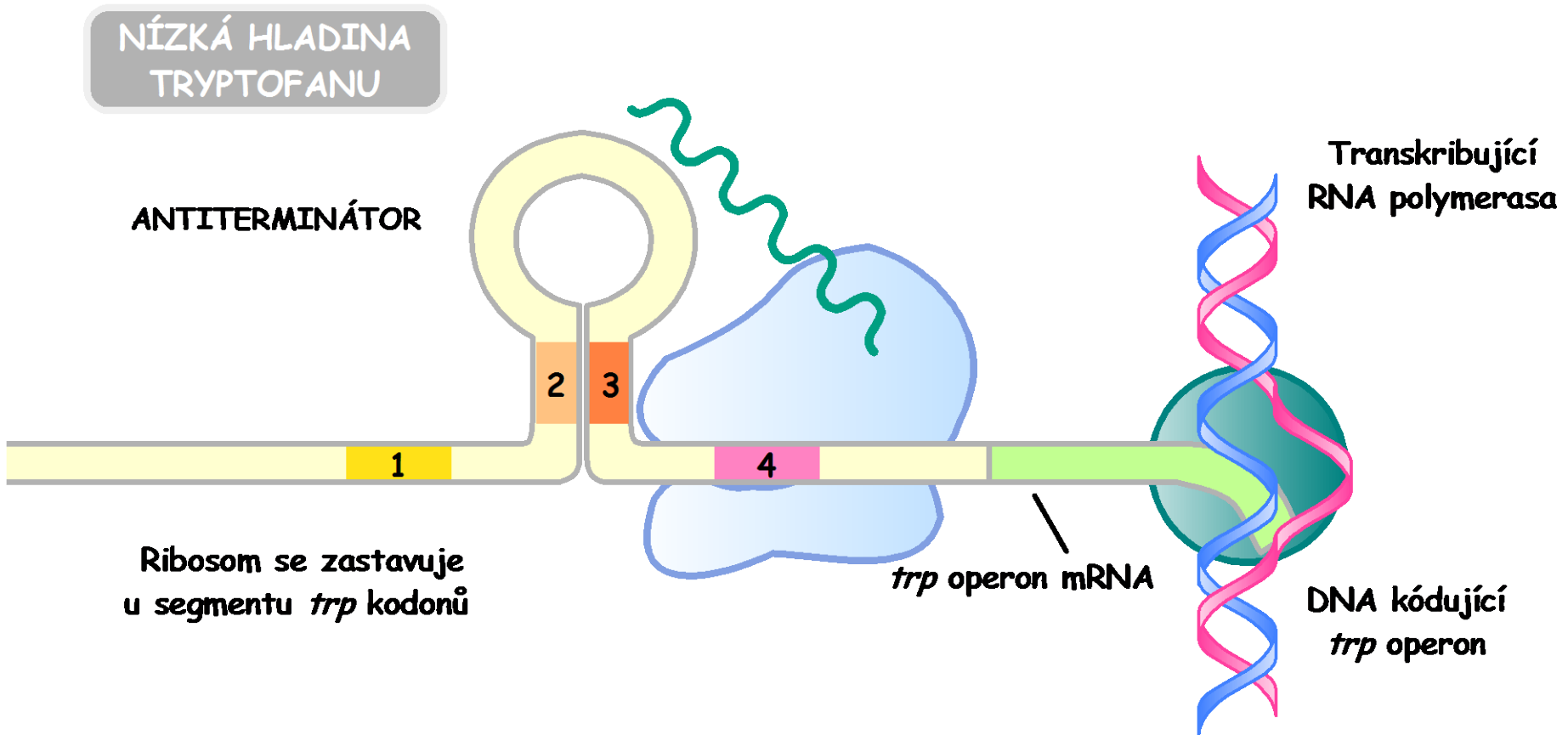
## Vysoká hladina L-Trp<sup>Trp</sup>

Když je dostatek Trp-tRNA<sup>Trp</sup>, přítomnost ribosomu na segmentu 2 zabraňuje tvorbě vlásenky 2 - 3. Vytváří se vlásenka 3 - 4 (terminátor transkripce) - dochází k ukončení transkripce.



## Nízká hladina Trp-tRNA<sup>Trp</sup>

Ribosom se zastaví na pozici 1 segmentu Trp kodonu. Stav dovoluje tvorbu vlásenky 2 - 3 a zamezuje tvorbě vlásenky 3 - 4.



## Riboswitches - změněná sekundární struktura mRNA

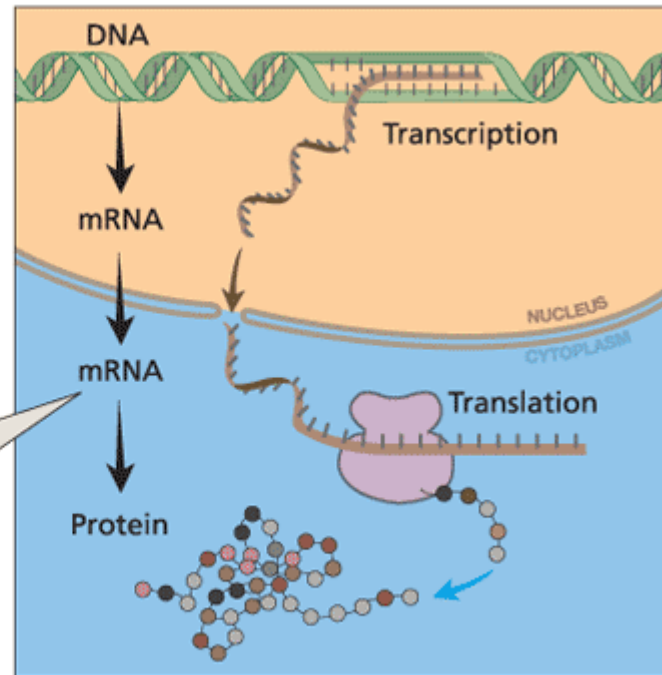
- Při syntéze thiaminpyrofosfátu (TPP) u *E. coli* je nutná přítomnost řady proteinů, jejichž hladina se mění spolu s potřebou TPP pro buňku.
- Na 5' konci mRNA je tzv. *thi* box (vysoce konzervativní sekvence) lišící se za přítomnosti a nepřítomnosti TPP. Struktura mRNA se tak mění spolu s hladinou TPP:
- Za nepřítomnosti TPP umožňuje konformace mRNA ribosomu připojení a translaci.
- Za přítomnosti TPP maskuje alternativní sekundární struktura Shine-Delgranovu sekvenci a ribosomy nemohou iniciovat translaci mRNA.
- Shine-Delgranova sekvence (TATA box) - párování bází mezi touto sekvencí a 16S rRNA (purinová) umožňuje ribosomu vybrat správný iniciační kodon.

Umlčení genu dvouvláknovou RNA. Dvouvláknová RNA štěpí mRNA specifického genu - zastavuje se produkce proteinu.

**The central dogma**  
The genetic information in double-stranded DNA is transcribed into single-stranded messenger RNA (mRNA) in the cell nucleus and subsequently translated into protein in the cytoplasm.

~~mRNA~~

**RNA interference**  
The mRNA is destroyed before it is translated into protein.



## Dicer a RISC

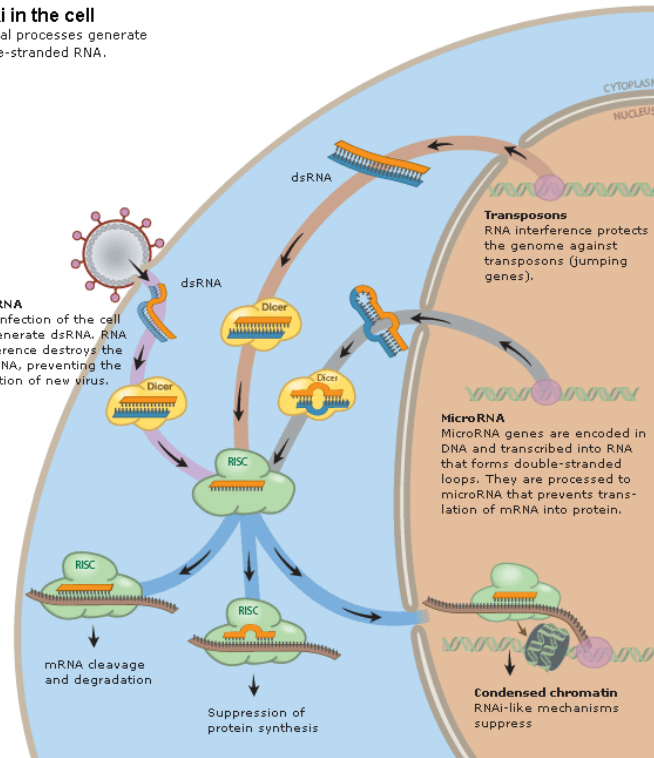
- **Dicer** je ribonukleasa ze skupiny **RNAas III**, štěpí dvouvláknovou **double-stranded RNA** (dsRNA) a **pre-microRNA** (miRNA) na krátké dvouvláknové RNA fragmenty nazvané **small interacting RNA** (siRNA), asi 20-25 nukleotidů dlouhé. Podle „**dicing**“ krájet na kostky.
- **RNA-induced silencing complex**, neboli **RISC**, je multiproteinový **siRNA** komplex štěpící (vstupující virální) **dsRNA**. RISC váže krátké **antisense** RNA vlákna, která jsou schopna vázat komplementární vlákna. Když dojde k vazbě komplementárního vlákna, je aktivována RNAasa štěpící RNA.
- Tento pochod je důležitý jak pro regulaci genu mikro-RNAsami (**micro-RNAasy**), tak také při obraně proti virovým infekcím, které často používají dvouvláknovou RNA jako infekční vektor.

# Umlčení genu dvouvláknovou RNA

## RNAi in the cell

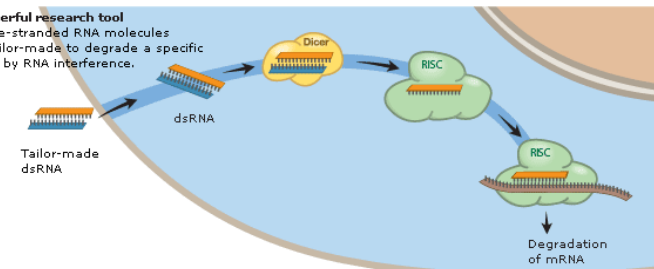
Several processes generate double-stranded RNA.

**Viral RNA**  
Virus infection of the cell can generate dsRNA. RNA interference destroys the viral RNA, preventing the formation of new virus.



## A powerful research tool

Double-stranded RNA molecules are tailor-made to degrade a specific mRNA by RNA interference.





# Terapie na bázi RNAi

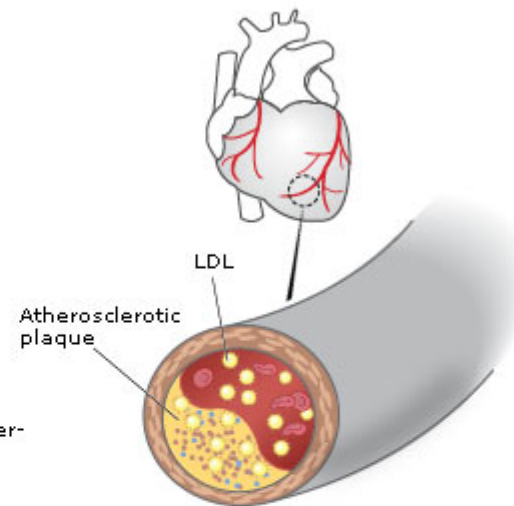
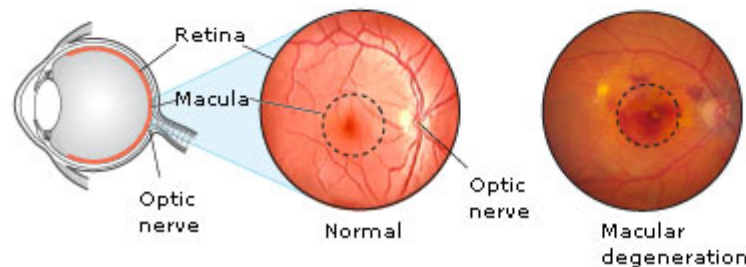
## RNAi based therapy – future opportunities

RNAi may become an important principle underlying medical therapy in the future. Clinical trials are already underway for RNAi treatment of RS virus infection and macular degeneration (an eye disease).

Promising results have also been obtained in preclinical studies of influenza, HIV, hypercholesterolemia and several other medical conditions.

## Age-related macular degeneration

Small blood vessels grow into the macular area and interfere with vision. RNAi is used to block production of the vascular endothelial growth factor, VEGF, which causes blood vessel growth.



## Hypercholesterolemia

An excess of cholesterol-containing LDL particles leads to accumulation of cholesterol in blood vessel walls and causes atherosclerosis. RNAi is used to block production of the LDL particles.

## Regulace genové exprese eukaryot

- Platí zde obecné principy známé u prokaryot.
- Exprese specifických genů může být aktivně inhibována nebo stimulována prostřednictvím proteinů vázajících se na DNA nebo RNA.
- Stejně jako u prokaryot působí hlavní známé regulační mechanismy na úrovni genové transkripce, ale zde je regulace komplikována větším množstvím a velikostí DNA (na rozdíl od prokaryot).