

# **Kontroll av genuttryck i prokaryoter**

**Claes Gustafsson**

# Ribonukleotidreduktas (RNR)

Deoxiribonukleotider (dNTP) bildas från ribonukleotider (NTP). Detta sker genom att NTP reduceras, d.v.s. förlorar sin OH-grupp i 2'-position.

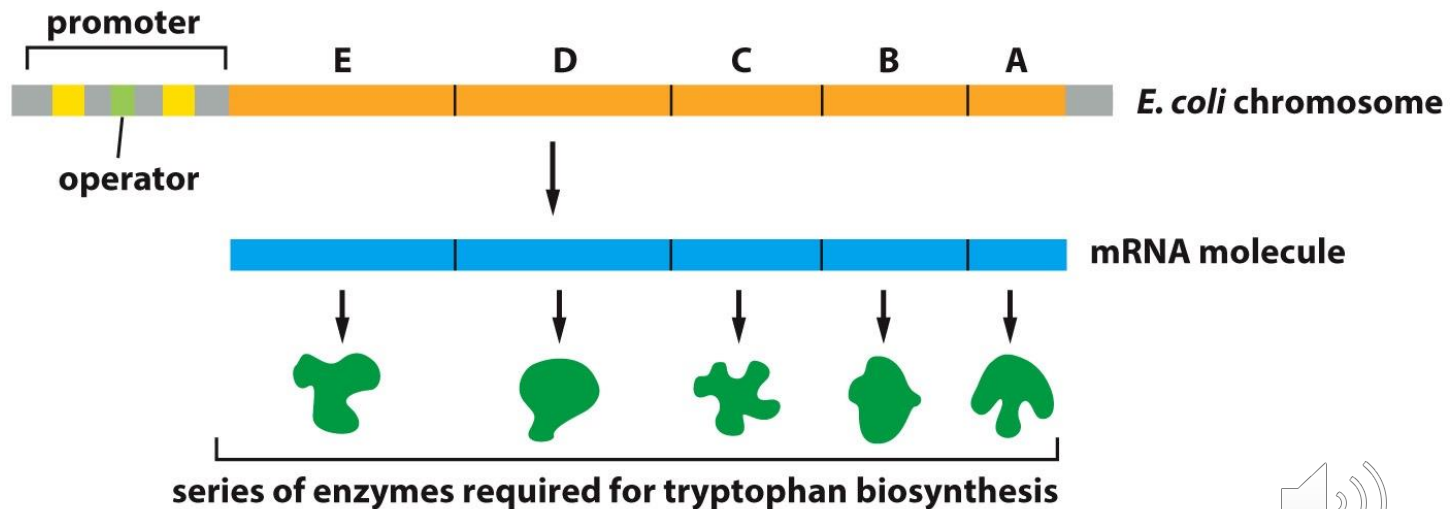
Denna reaktion katalyseras av enzymet ribonukleotidreduktas (RNR) – finns både hos prokaryoter och eukaryoter.



# VAD ÄR EN GEN?

En nukleotidsekvens i DNA, som krävs för syntesen av ett fungerande protein eller en RNA-molekyl (inkl. tRNA, rRNA etc.)

I genen ingår även de reglersekvenser som bestämmer när och hur mycket av genen som skall tillverkas.



# Olika gener uttrycks olika mycket

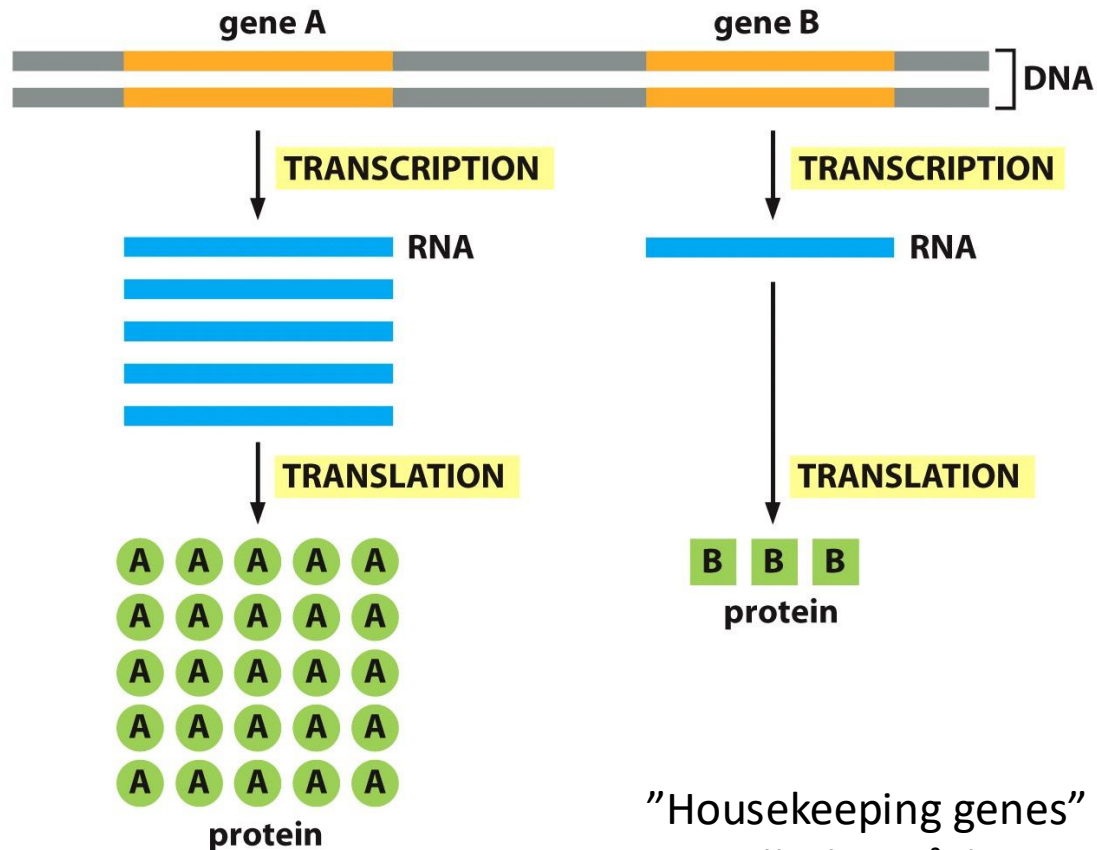
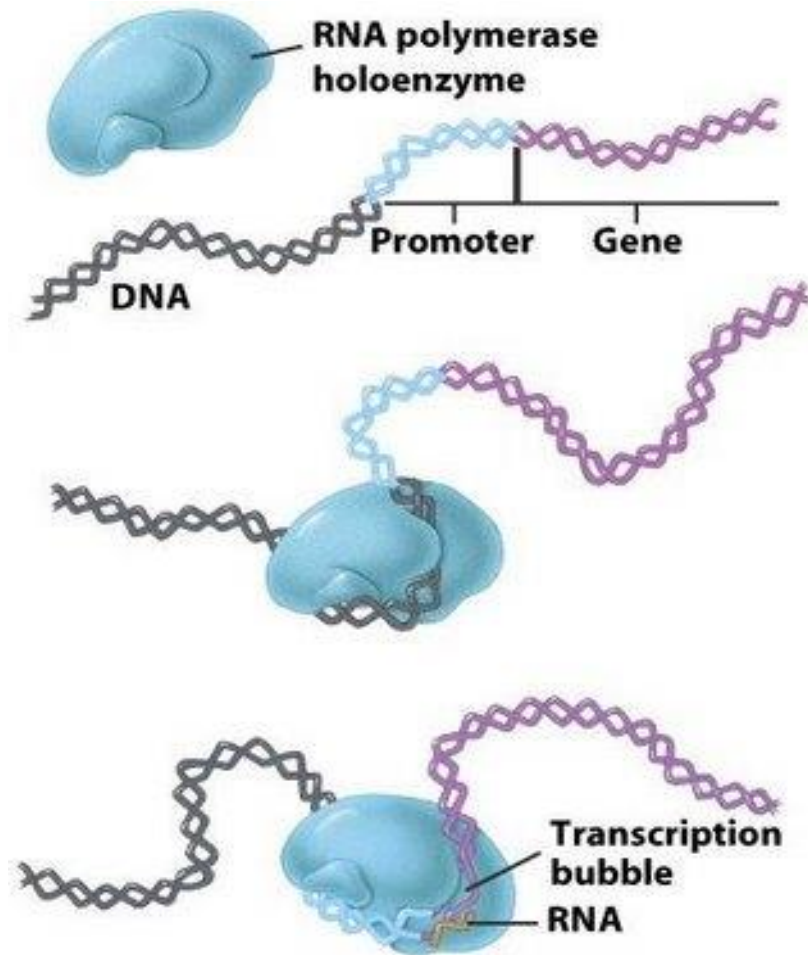


Figure 7-2 Essential Cell Biology, 4th ed. (© Garland Science 2014)

”Housekeeping genes” är gener som alltid är påslagna och som behövs för att en cell skall fungera normalt.

# Transkriptionsinitierung



# Kodande sträng och mall-sträng

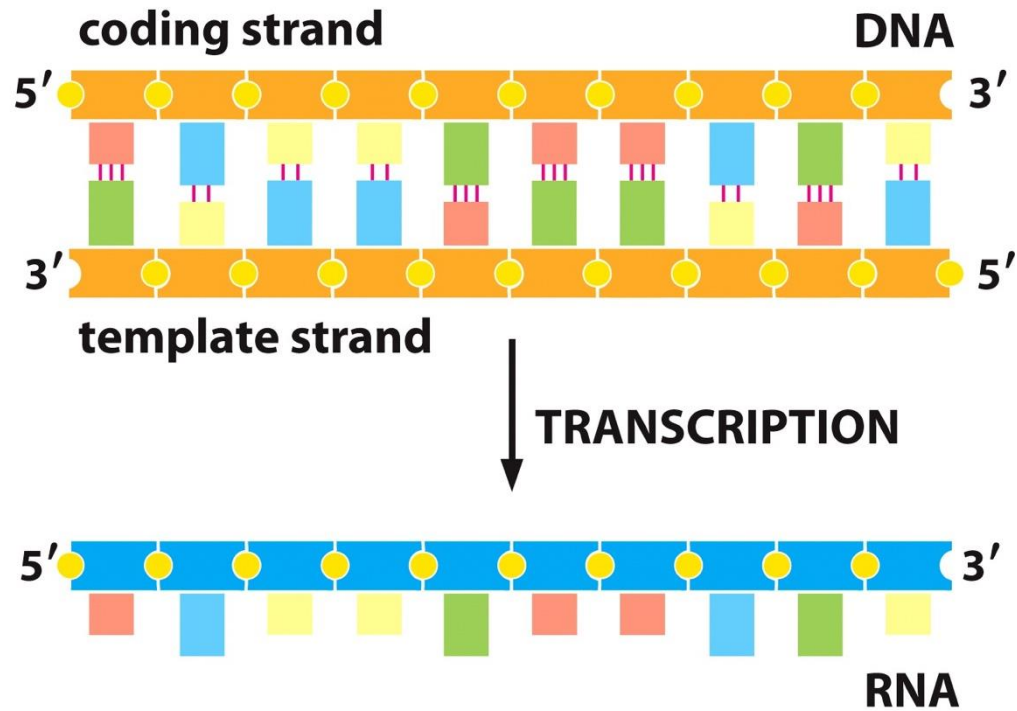


Figure 7-6 Essential Cell Biology, 4th ed. (© Garland Science 2014)

**Båda strängarna i DNA kan används som mall-sträng för RNA syntes.**

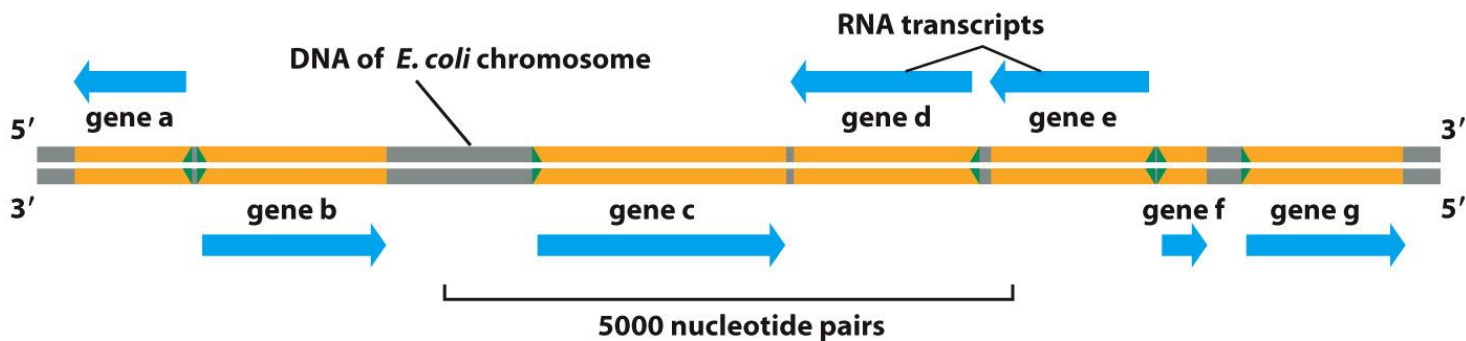
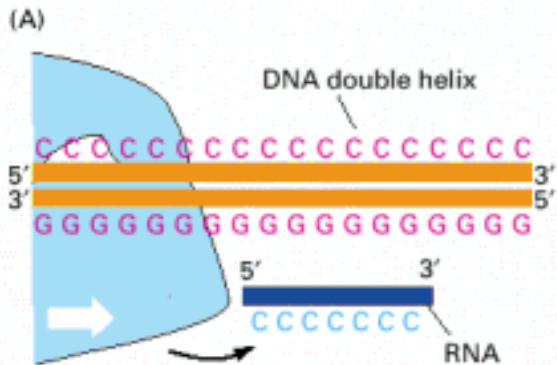
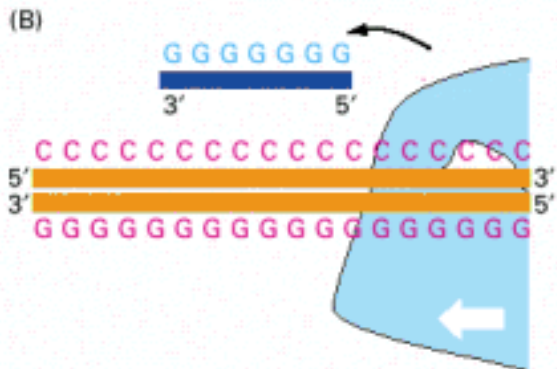


Figure 6-13 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

# Vilken sträng i DNA som skrivs av till RNA bestäms av den riktning som RNA-polymeraset rör sig



an RNA polymerase that moves from left to right makes RNA by using the bottom strand as a template



an RNA polymerase that moves from right to left makes RNA by using the top strand as a template

RNA syntetiseras alltid i 5' till 3' riktning.

Om man inte vet riktningen som RNA-polymeraset rör sig så kan man inte veta vilken sträng som är mall-sträng



# Promotorn bestämmer i vilken riktning RNA- polymeraset skall transkribera!

En transkriptionsenhet är  
den sekvens i DNA som  
transkriberas  
till RNA.

Startar vid promotorn och  
slutar vid terminatorn.

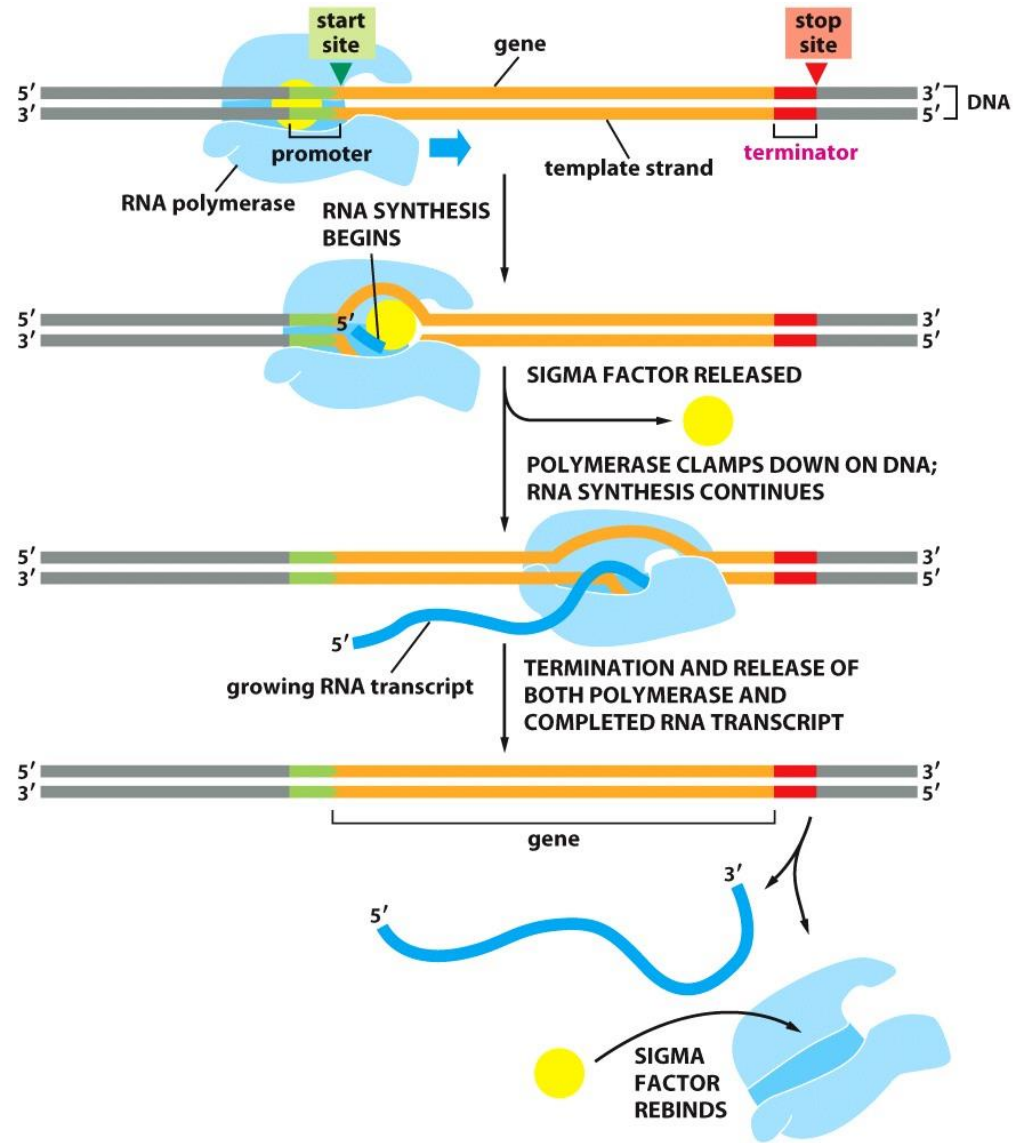


Figure 7-9 Essential Cell Biology, 4th ed. (© Garland Science 2014)

Hos bakterier kan en transkriptionsenhet bestå av flera gener  
Man brukar kalla en sådan enhet för ett "operon"

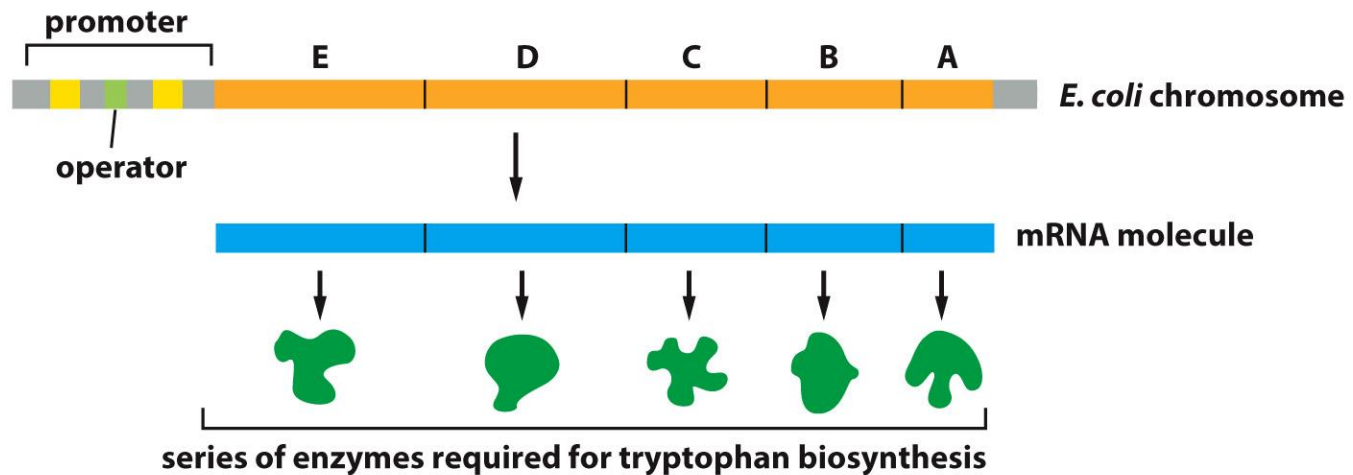


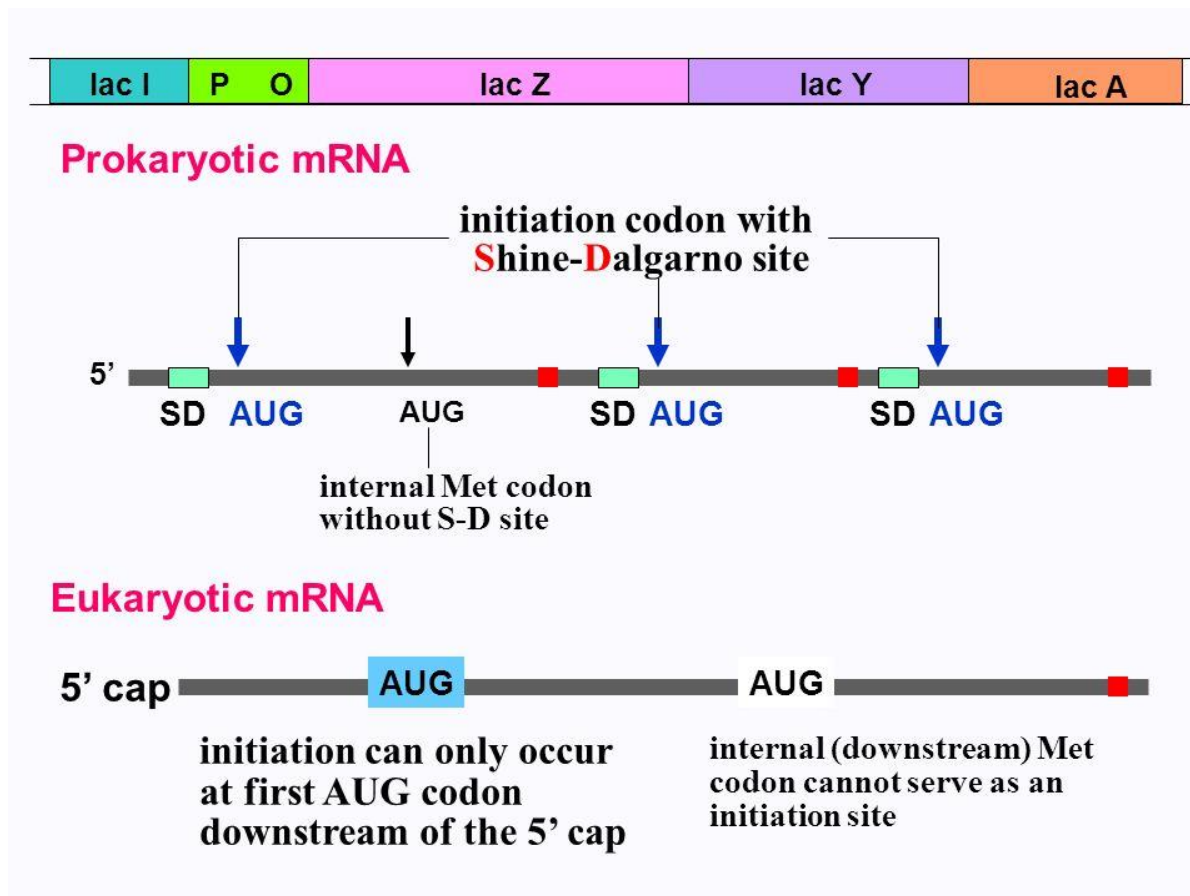
Figure 7-12 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Det bildas ett långt mRNA som kodar för flera olika proteiner.

Gener ger upphov till proteiner involverade i samma metabola "pathway" återfinns i samma operon!

I ett bakteriellt mRNA från ett operon finns många startplatser för translation!

Vid AUG som skall användas för initiering finns speciella sekvenser i mRNA – s.k. Shine-Dalgarno sekvenser, som hjälper ribosomen att hitta rätt.



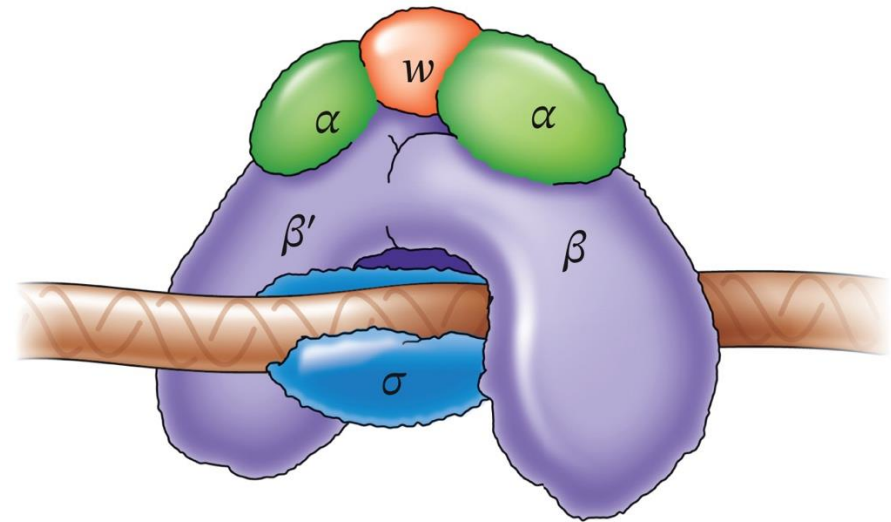
**Hur hittar bakteriellt RNA-  
polymeraset till promotorn?**

# *E. coli* RNA polymeras

**TABLE 30.1** Subunits of RNA polymerase from *E. coli*

Subunit	Gene	Number	Mass (kDa)
$\alpha$	<i>rpoA</i>	2	37
$\beta$	<i>rpoB</i>	1	151
$\beta'$	<i>rpoC</i>	1	155
$\omega$	<i>rpoZ</i>	1	10
$\sigma^{70}$	<i>rpoD</i>	1	70

Berg et al., *Biochemistry*, 9e, © 2019 W. H. Freeman and Company

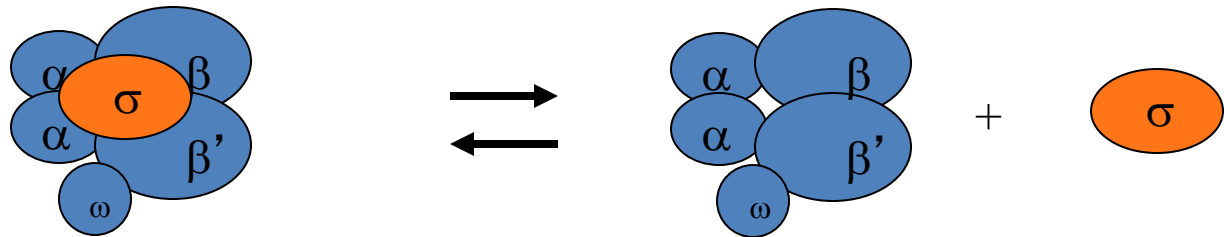


THE CELL: A MOLECULAR APPROACH 8e, Figure 8.1  
© 2019 Oxford University Press

$\beta$  (beta) är den **katalytiska subenheten** dvs. den som syntetiserar RNA i 5' till 3' riktning

$\sigma$  (sigma) styr enzymet till **promotorn (känner igen en särskild DNA-sekvens!)**

# Sigma subenheten hjälper RNA-polymeraset att hitta till promotorn och påverkar enzymets allmänna egenskaper



## Holoenzymet (innehåller sigma)

Kan hitta och specifikt binda till en promotor .

Binder svagt till icke-specifikt DNA – kräver promotor-sekvens för att “fastna”.

Hittar promotorn 10,000 gånger snabbare än kärnenzymet.

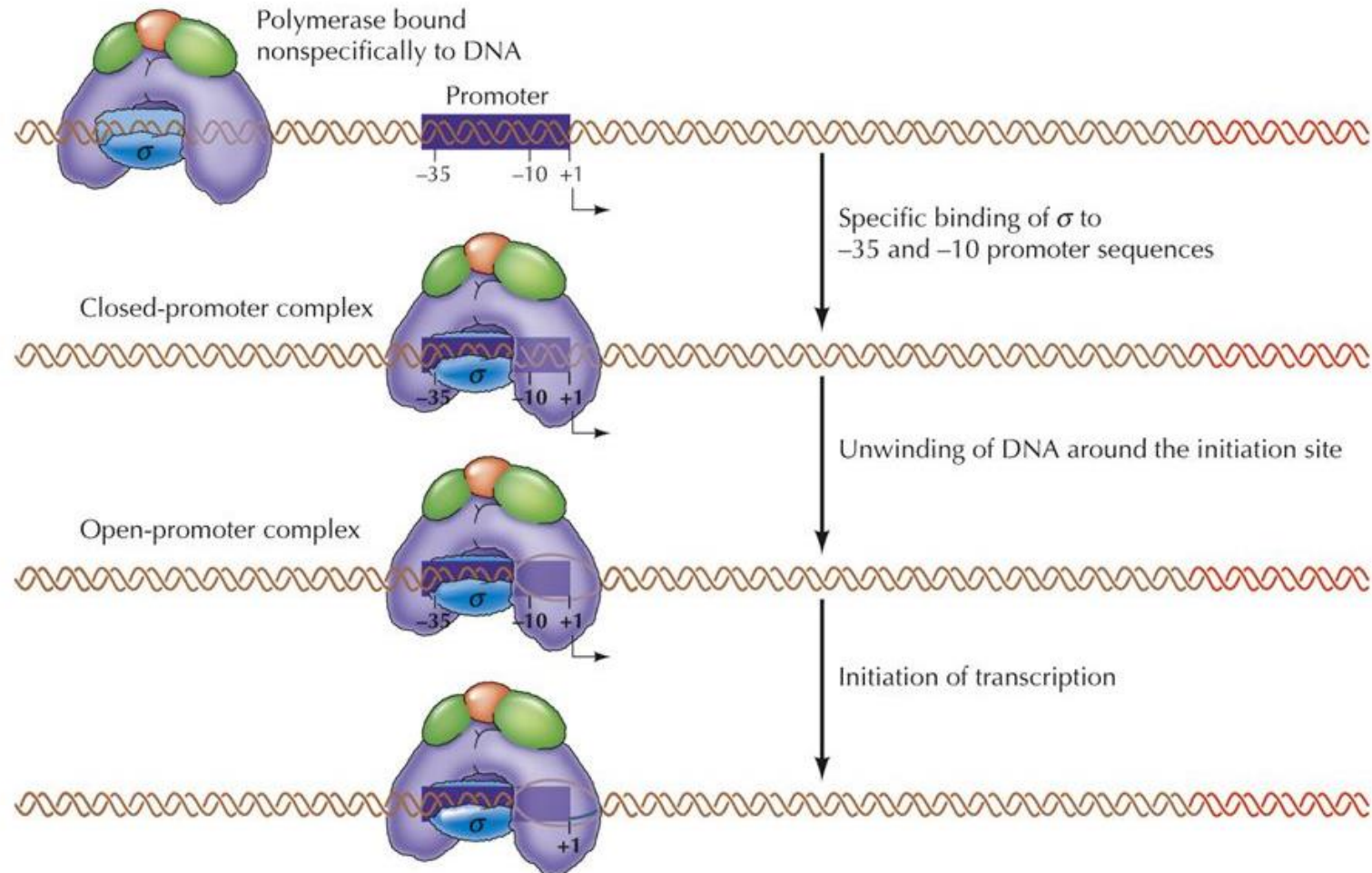
## Kärnenzymet (saknar sigma)

Innehåller alla de subenheter av RNA-polymeras om behövs för syntes av RNA.

Binder starkt till icke-specifikt DNA.

Har mycket svårt att hitta promotorer.

# Bakteriellt RNA-polymeras glider längs DNA och letar efter en promotor.



Efter initiering släpper sigma-faktorn och RNA-polymeraset fortsätter på egen hand.

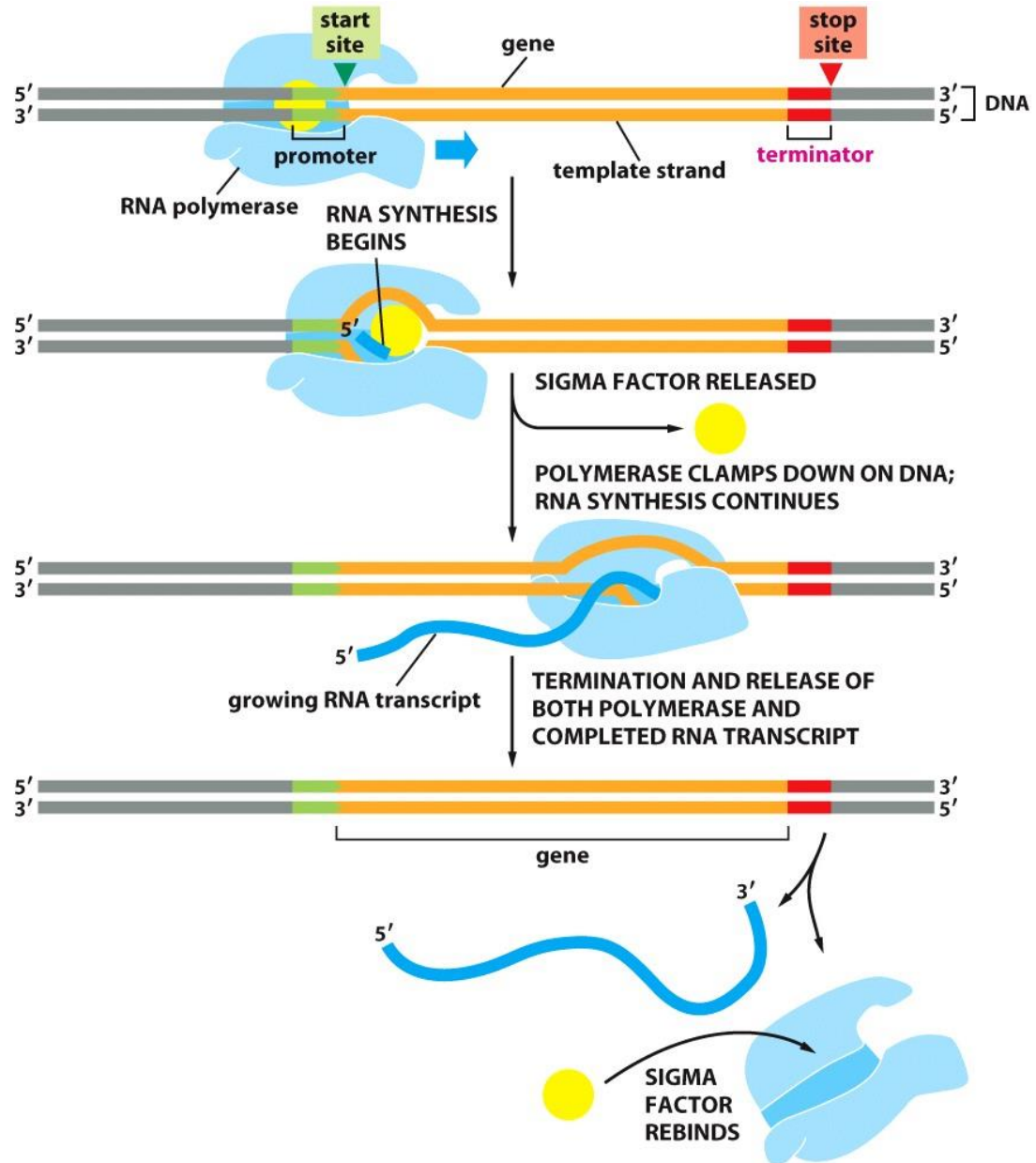


Figure 7-9 Essential Cell Biology, 4th ed. (© Garland Science 2014)



# Det finns sju olika sigma-subenheter som reglerar olika typer av gener

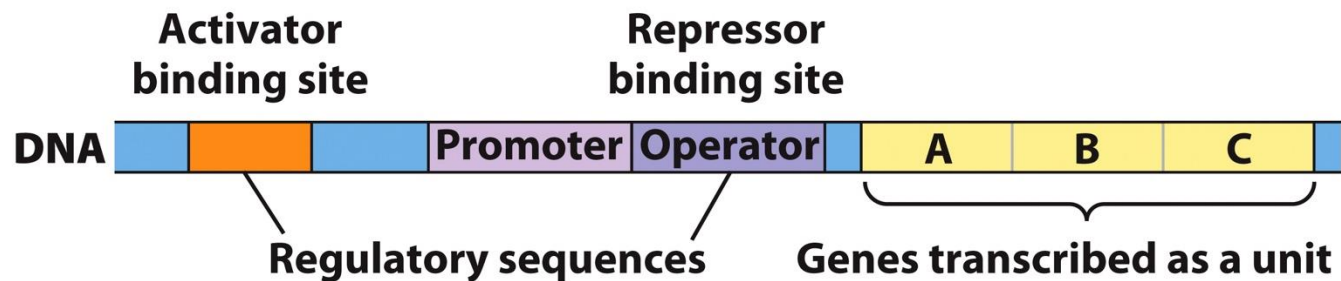
Gör det möjligt för bakterien att reglera uttryck av gener – kan välja att slå på eller av olika kombinationer av gener, beroende på situationen.

Det finns särskilda sigma faktorer för snabb tillväxt, för att skydda mot värme-shock, för att stimulera rörelse etc.

Sigma factor	Gene	Function
$\sigma^{70}$	<i>rpoD</i>	transcription of most genes during the exponential phase (19)
$\sigma^{54}$	<i>rpoN</i>	nitrogen-regulated gene transcription (22)
$\sigma^{38}$	<i>rpoS</i>	gene expression during the starvation and stationary phase (23)
$\sigma^{32}$	<i>rpoH</i>	heat-shock gene transcription (24)
$\sigma^{28}$	<i>rpoF</i>	expression of flagellar and chemotaxis genes (25)
$\sigma^{24}$	<i>rpoE</i>	response to the extracytoplasmic and extreme heat stress (1)
$\sigma^{19}$	<i>fecI</i>	regulation of the <i>fec</i> genes for iron dicitrate transport (26)

# Aktivatorer och repressorer

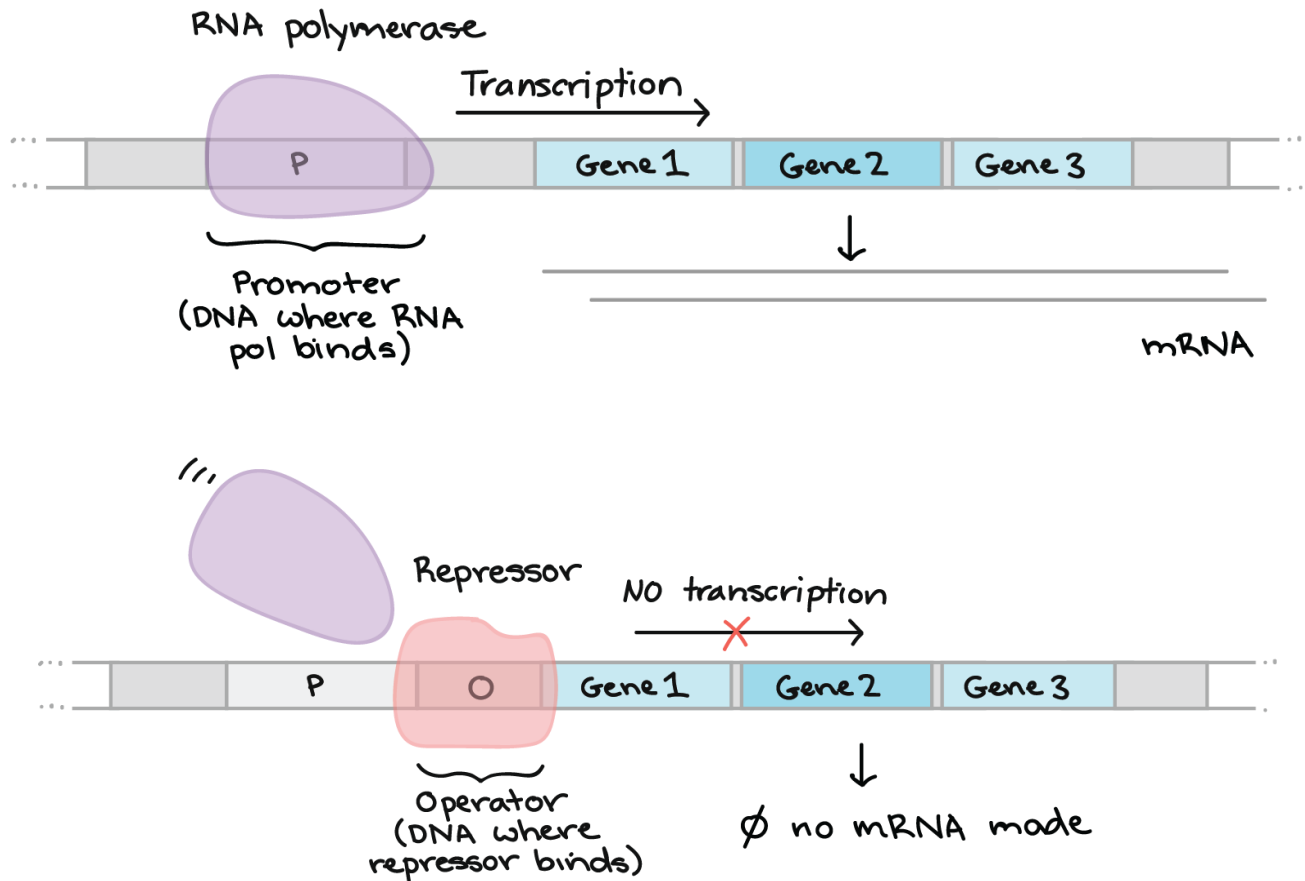
Nära promotorn finns bindningsplatser för proteiner som kan stimulera (aktivatorer) och stänga av (repressorer) transkription av alla dessa gener.



**Figure 28-6**  
*Lehninger Principles of Biochemistry, Sixth Edition*  
© 2013 W. H. Freeman and Company

I ett typiskt operon återfinns en "operator".

Detta är en DNA-sekvens till vilken en repressor kan binda för att blockera initiering av transkription.

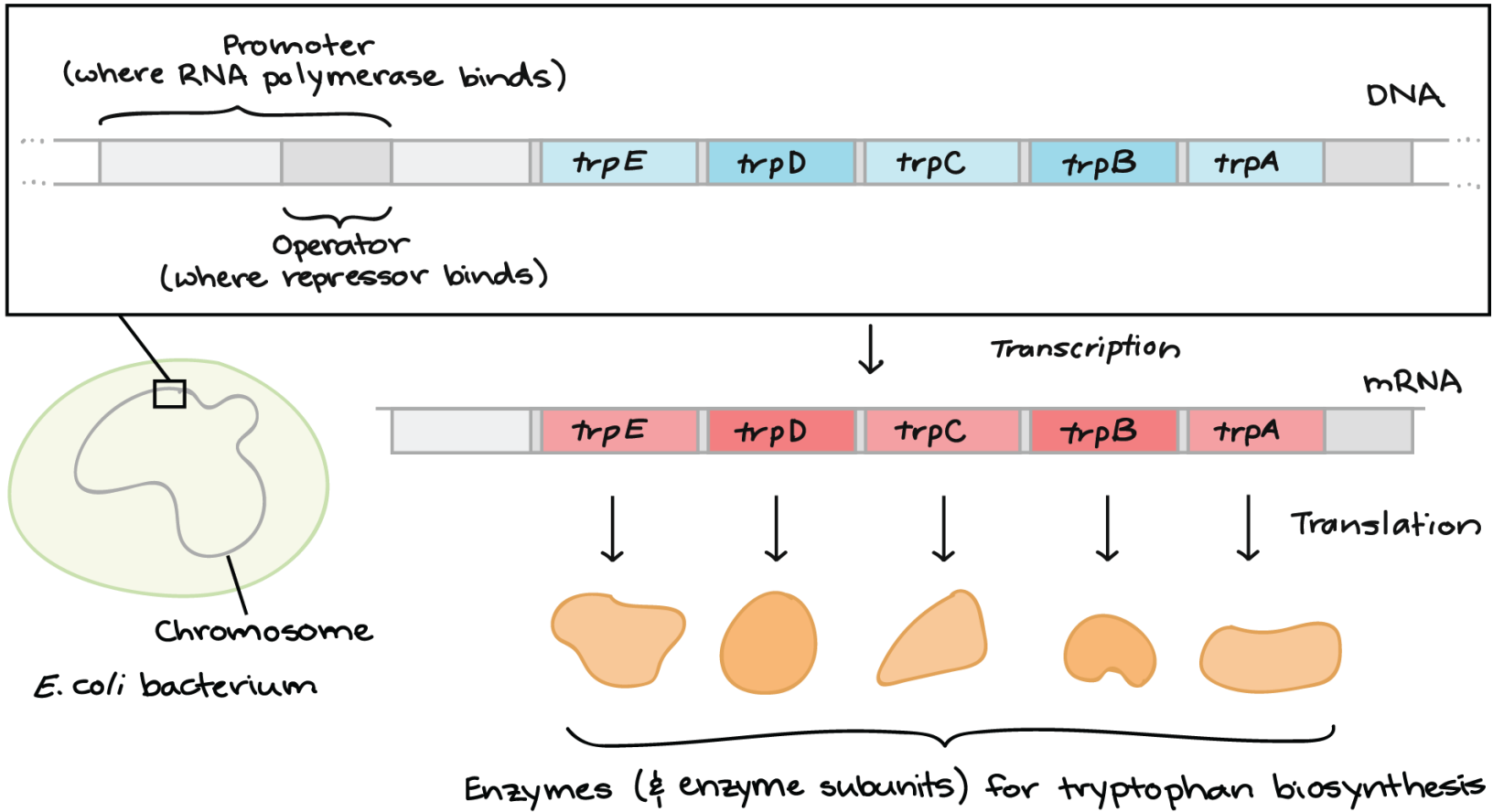


## **Tryptofan-operonet**

**- kodar för genprodukter som  
behövs för att bilda tryptofan**

# Tryptofan-operonet kodar för genprodukter (enzymer) som behövs för att bilda aminosyran tryptofan

Trp operon



# Finns det lite tryptofan i omgivningen så behöver operonet uttryckas.

Trp repressorn kan inte binda till operatorn och blockera transkription

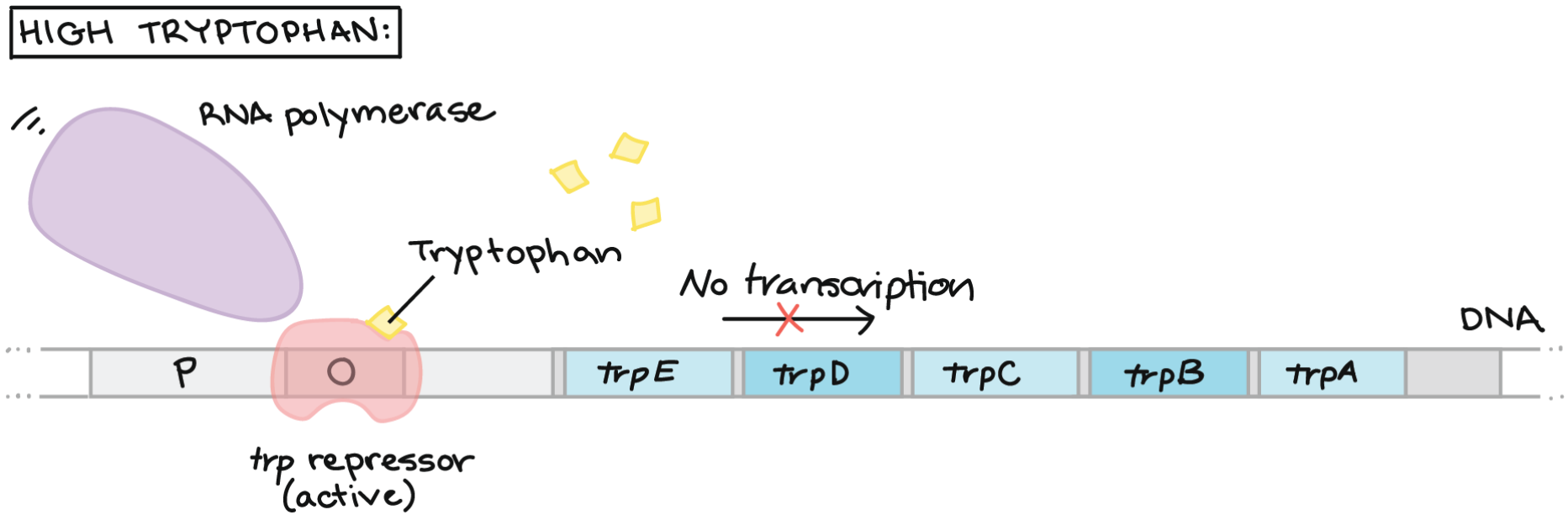
LOW TRYPTOPHAN:

trp repressor  
(inactive)

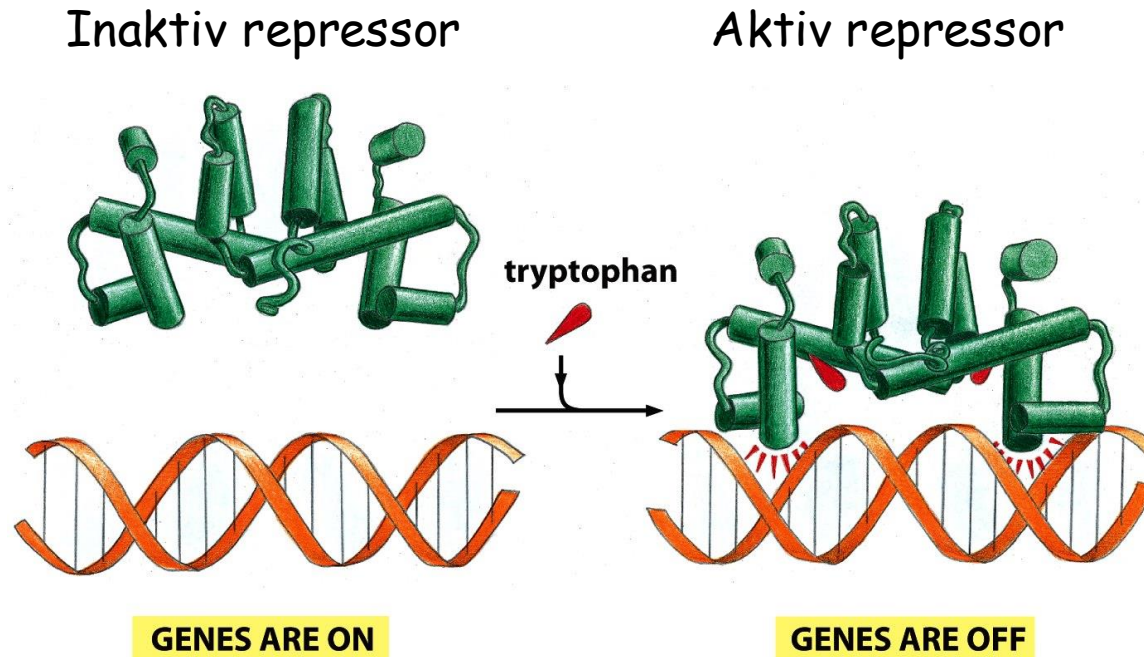


Finns det mycket tryptofan i omgivningen så behöver inte dessa enzymer uttryckas.

Trp repressorn binder till operator-sekensen och blockerar transkription



# Tillgången på tryptofan reglerar tryptofanrepressorns aktivitet!



När *E coli* har god tillgång på tryptofan i mediet, binder det till repressorn och orsakar en konformationsförändring så att repressorn kan binda till operatorn.

Tryptofan fungerar som behövs för att repressorn skall vara aktiv!



## **Lac-operonet**

**- kodar för genprodukter som  
behövs för att bryta ner laktos**

## **Glukos är förstahandsvalet som energikälla i bakterier.**

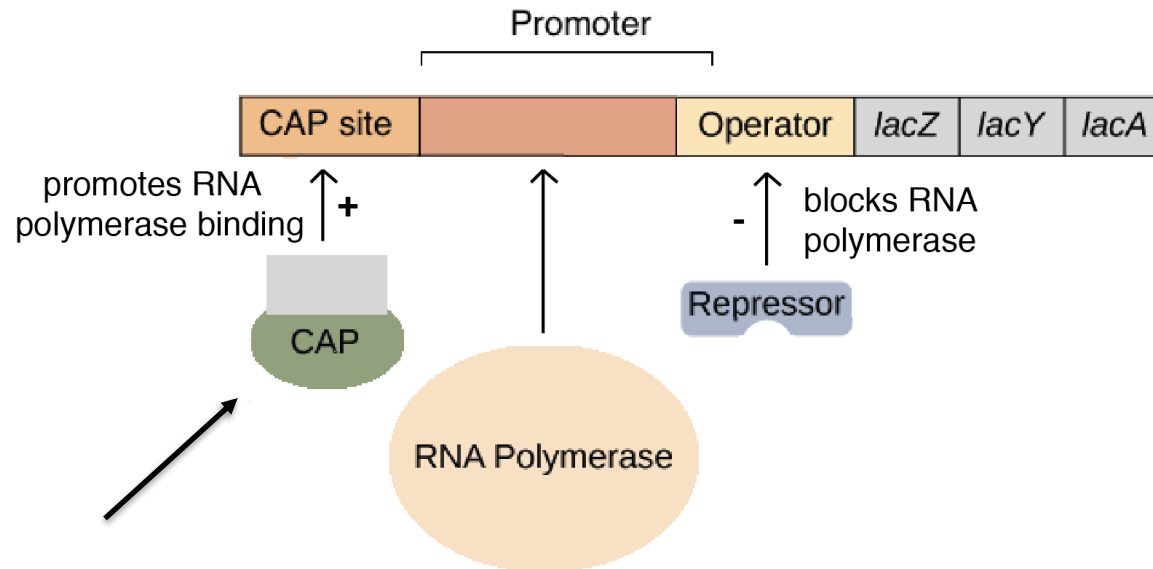
När det finns mycket glukos i cellerna är alternativa sockerkällor avstängda så att cellen huvudsakligen förbränner glukos.

När det finns lite glukos i cellen kan arabinos, laktos eller andra sockermolekyler användas som energikällor.

Förklarar varför Lac-operonet i normalfallet är avstängt! Vill endast slås på när glukos saknas! Och endast i de fall det finns laktos att tillgå!

# Vid reglering av Lac-operonet samverkar en aktivator och en repressor

The *lac* operon:



**CAP är en aktivator**

Två krav för transkription av Lac-operonet!

1. Ingen repressor bunden till operatorn!
2. Ett aktivatorprotein (CAP) som stimulerar initiering av transkription!

# Aktivatorer stimulerar transkription

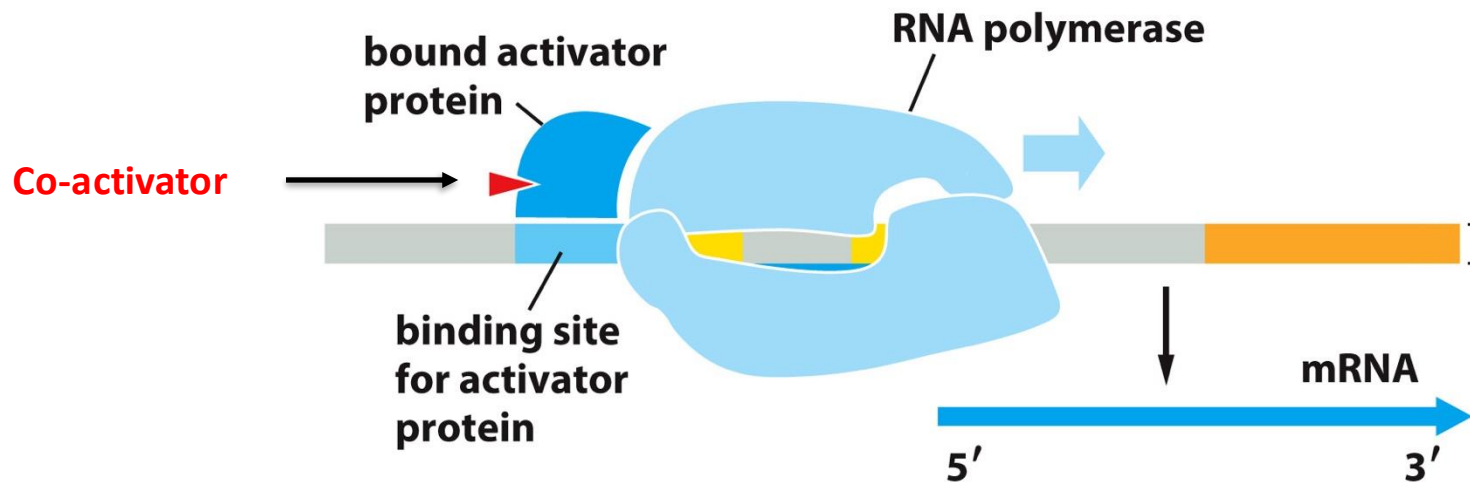


Figure 7-14 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Underlättar inbindning av RNA-polymeras.

Kan öka transkriptionsnivån mer än 1000 gånger.

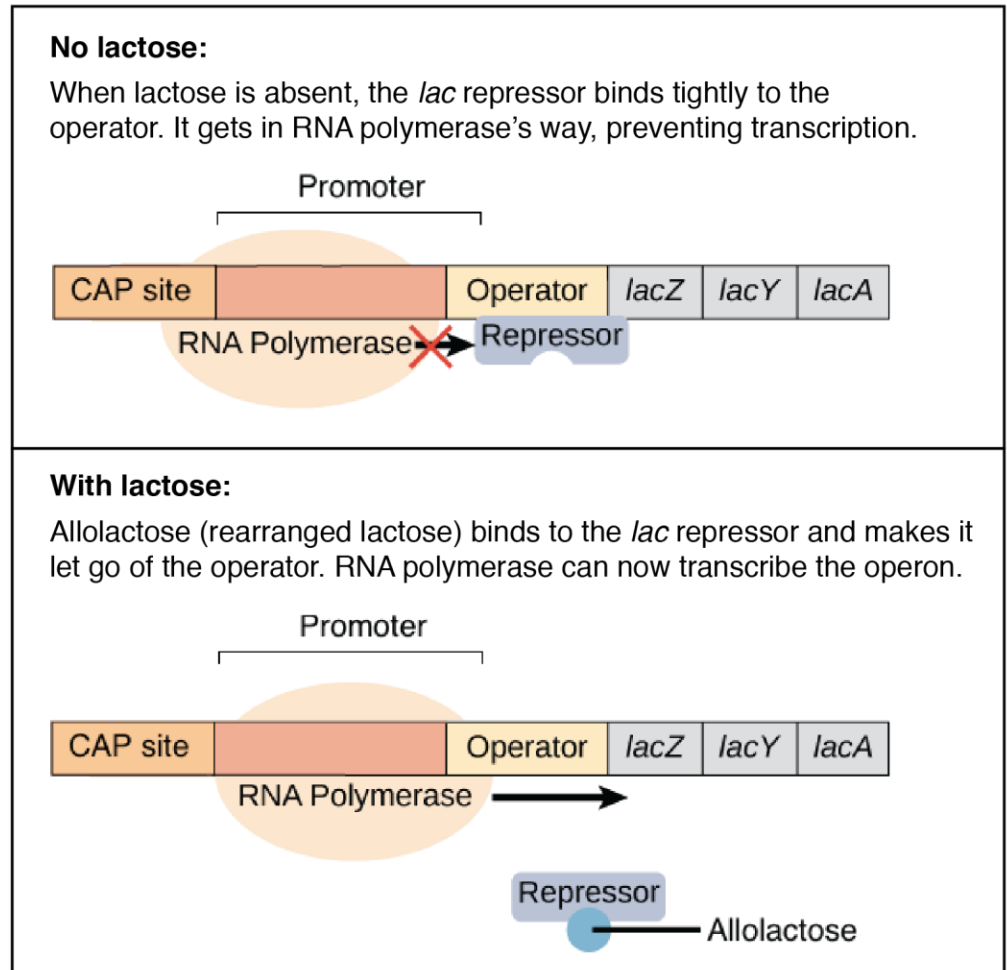
Vissa aktivatorer behöver en mindre molekyl, en så kallad **co-aktivator** som binder till aktivatorn för att den skall vara aktiv.

# I närvaro av laktos så bildas allolaktos. Binder till repressorn och får den att släppa operatorn.

Observera skillnaden till trp-operonet!

Lac-repressorn släpper operatorn när laktos finns närvarande i mediet. På det viset blockerar den inte längre transkription.

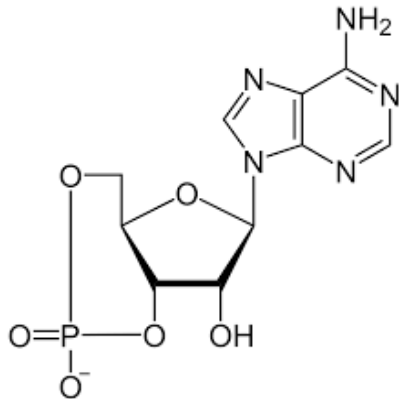
(vid trp-operonet fick tryptofan repressorn att binda!).



# Hur regleras aktiviteten hos aktivatorn, d.v.s. proteinet CAP?

I frånvaro av glukos så bildas molekylen cAMP.

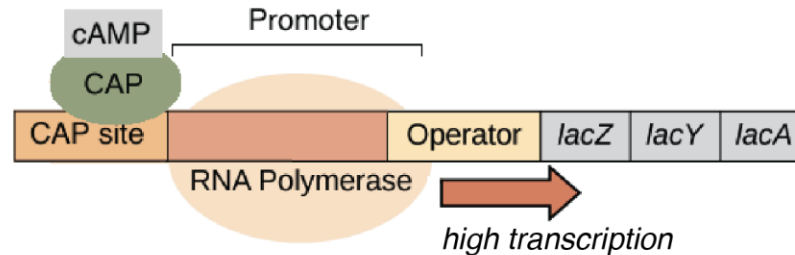
Binder till CAP, vilket får proteinet att fungera som en aktivator.



Cykliskt adenosinmonofosfat "cAMP" – signalmolekyl med många funktioner!

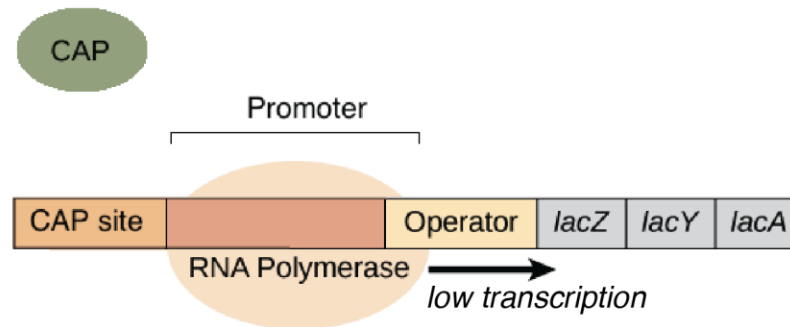
## Low glucose:

When glucose levels are low, cAMP is produced. The cAMP attaches to CAP, allowing it to bind DNA. CAP helps RNA polymerase bind to the promoter, resulting in high levels of transcription.



## High glucose:

When glucose levels are high, no cAMP is made. CAP cannot bind DNA without cAMP, so transcription occurs only at a low level.



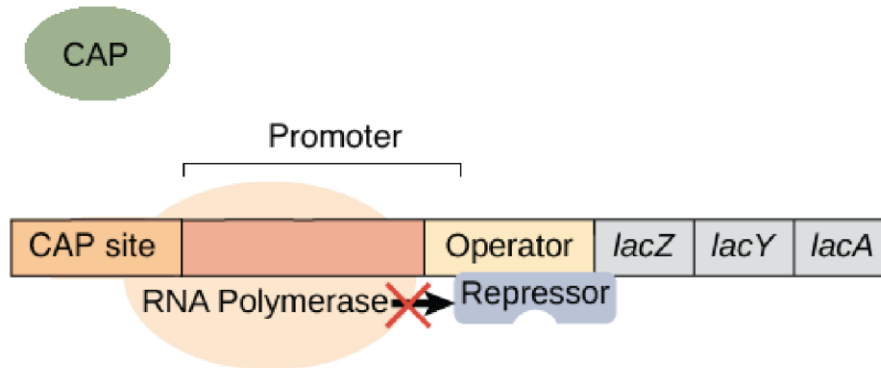
**Aktivatorer och repressorer samverkar för att få reglerat genuttryck!**

**Hur kan aktivatorn (CAP) samverka med repressorn för att få reglerat genuttryck från lac-operonet?**

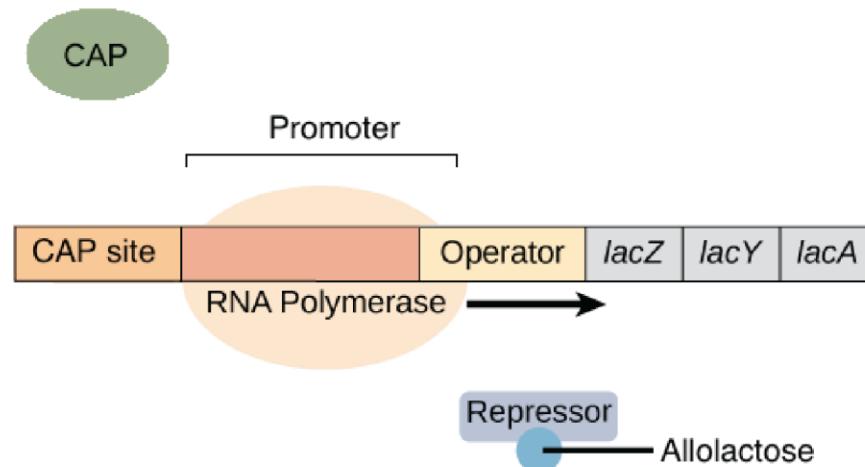
# I närvaro av glukos används inte lac-operonet. Även om laktos finns i omgivningen!

Glukos är alltid bakteriens förstahandsval!!

Glucose present, lactose absent:



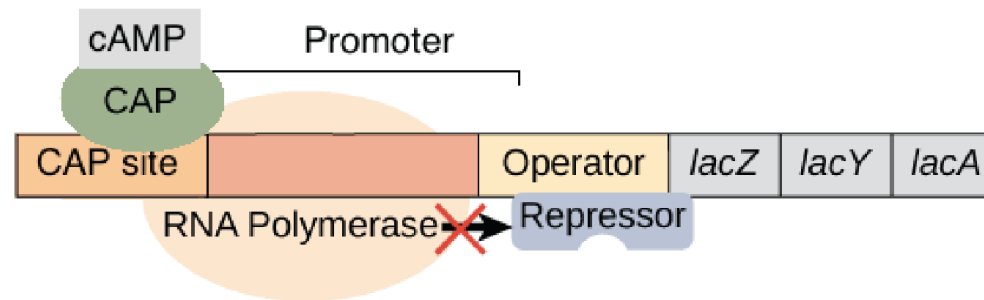
Glucose present, lactose present:



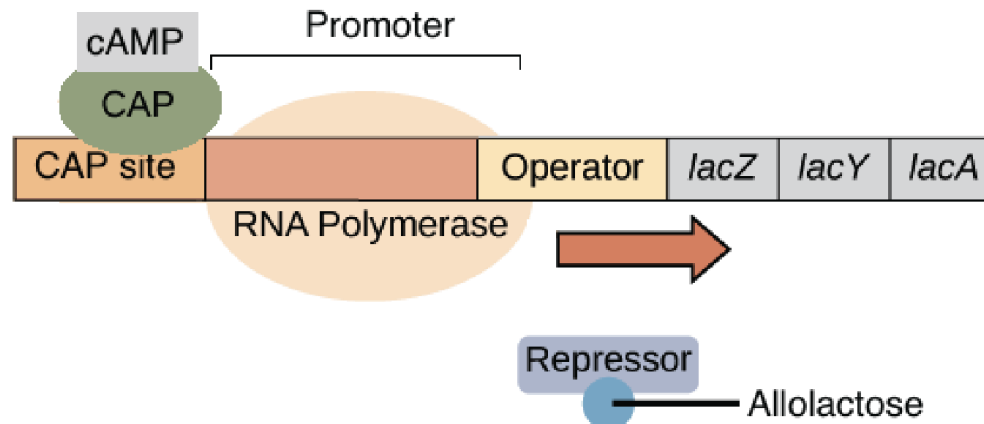


# I frånvaro av glukos slås lac-operonet på! Men bara om det finns laktos i omgivningen!

Glucose absent, lactose absent:



Glucose absent, lactose present:

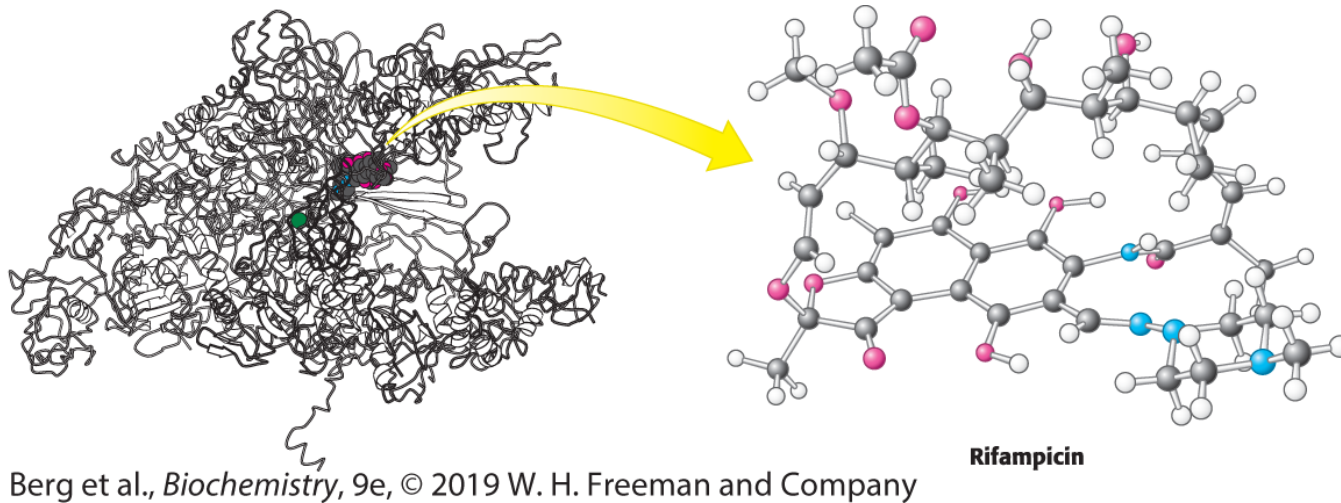


# Antibiotika

- För biologer är det ämnen som producerats av levande organismer i syfte att hålla andra organismer borta.
- Inom medicinen kan dessa medel användas för att behandla infektioner, men också vid cancersjukdom.

# Principer för antibiotikas effekt – två exempel

## 1. Blockera initiering av transkription



Rifampicin binder till beta-subenheten i det bakteriella RNA polymeraset och blockerar elongering.

Används t.ex. vid behandling av tuberkulos

# Principer för antibiotikas effekt – två exempel

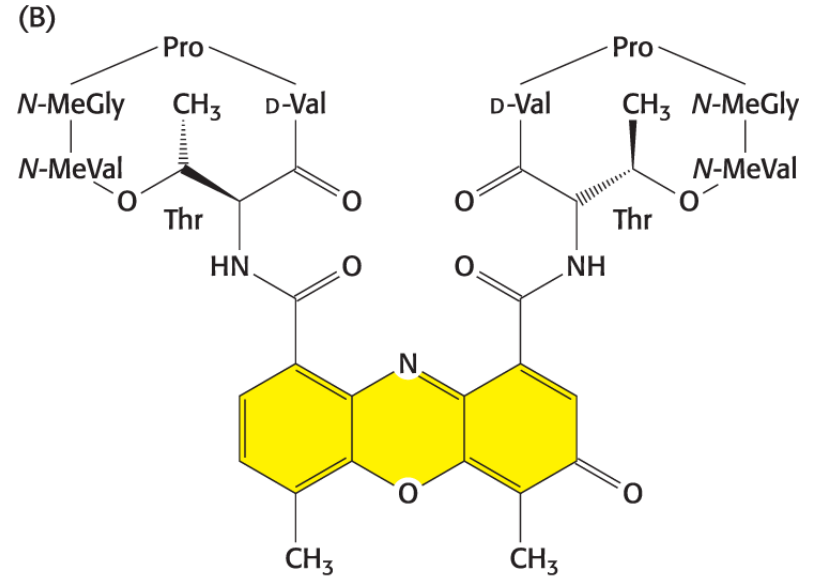
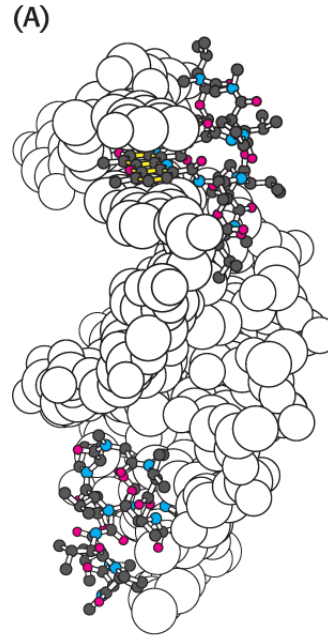
## 2. Interkalation

Actinomycin lägger sig mellan basparen i DNA.

“interkalation”

Stör t.ex. Transkription och DNA replikation

Används vid cancerbehandling t.ex. ovarialcancer

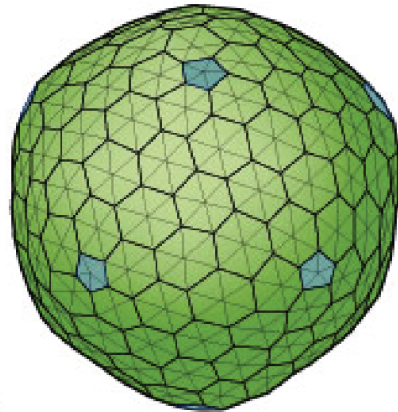


**Phenoxazone**

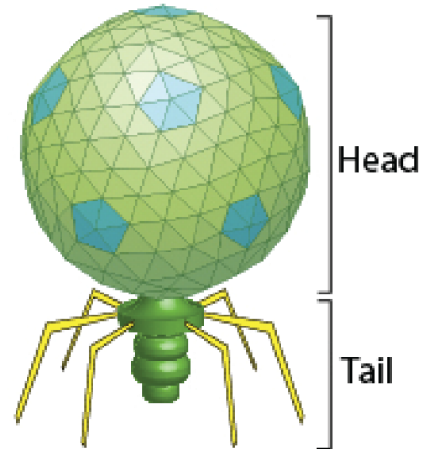
Berg et al., *Biochemistry*, 9e, © 2019 W. H. Freeman and Company



# Det finns speciella virus som bara infekterar bakterier – Bakteriofager



Icosahedral phage  
(Corticovirus)



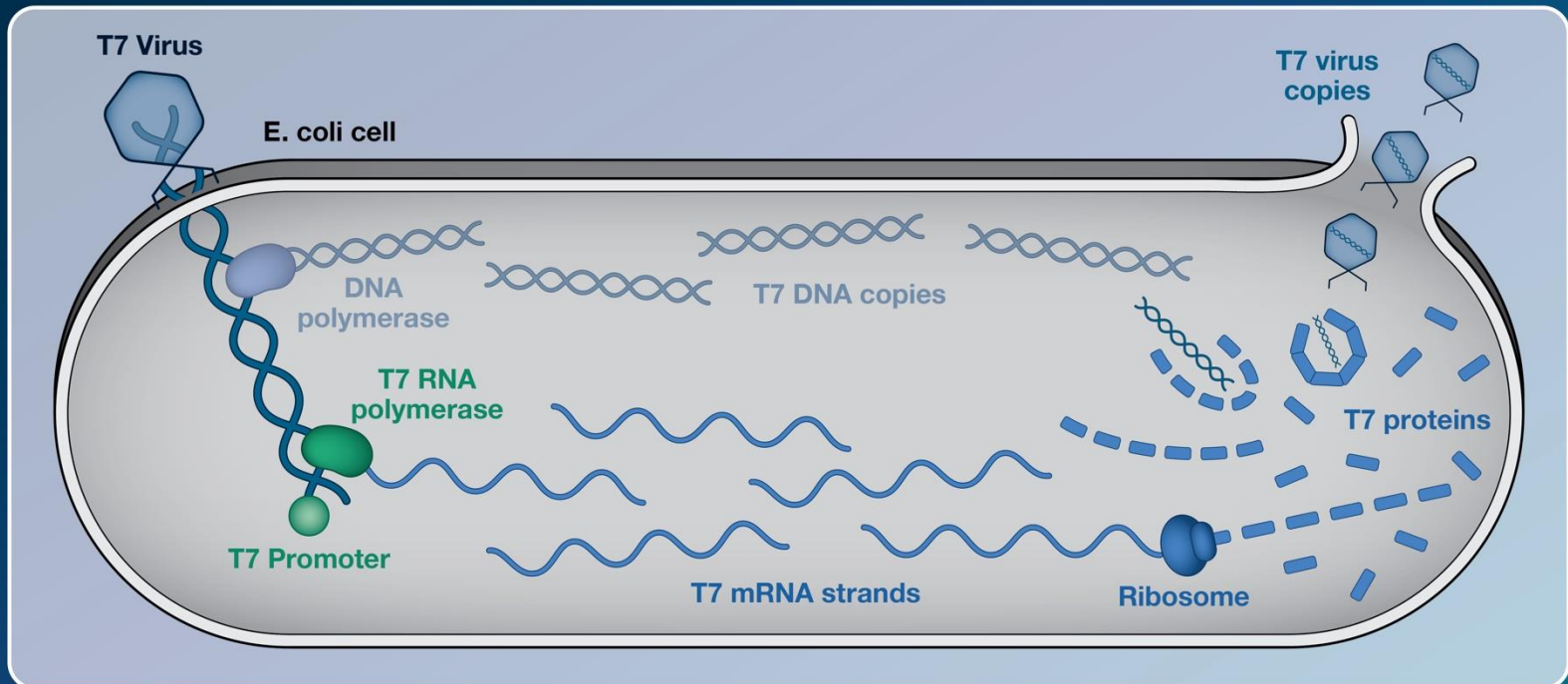
Head-tail phage  
(T7)



Filamentous phage  
(Inovirus)

**Bakteriofager infekterar bakterien och utnyttjar cellen för att skapa många nya kopior – bakterien dödas i en s.k. lytisk cykel**

## T7 BACTERIOPHAGE INFECTION



# Bakteriofag T7 RNA-polymeras används i ren form för att producera mRNA-vacciner mot t.ex. COVID.

## mRNA COVID VACCINES

