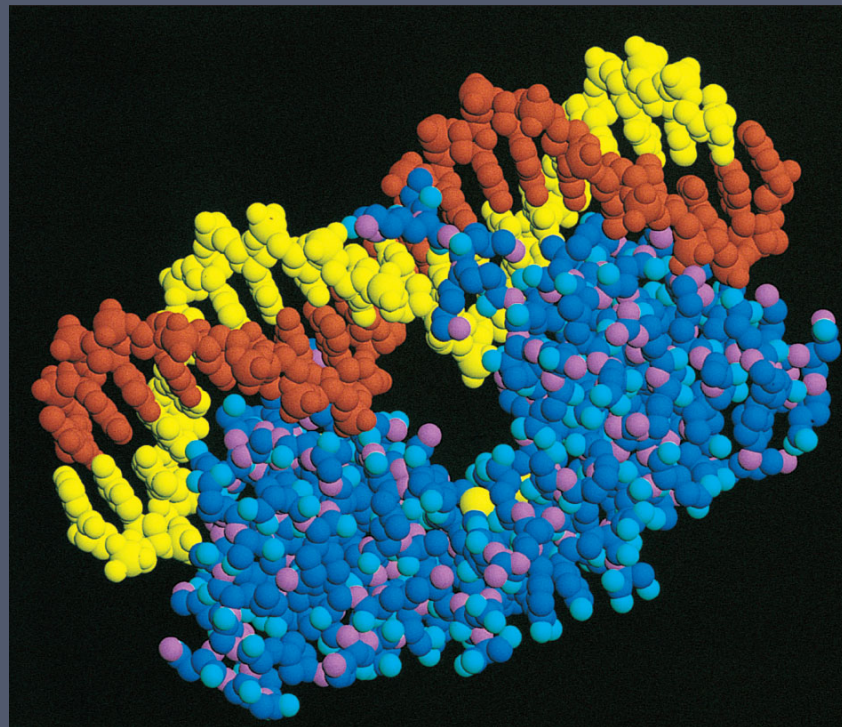


Κεφάλαιο 19 (+ κεφάλαιο 15 Hartwell) Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε βακτήρια και βακτηριοφάγους



Ο καταστολέας του οπερονίου *lac* προσδεδεμένος στο DNA.

Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε βακτήρια και βακτηριοφάγους

Κύρια σημεία:

Ρυθμιζόμενα γονίδια: τα γονίδια που εκφράζονται με ρυθμιζόμενο τρόπο.

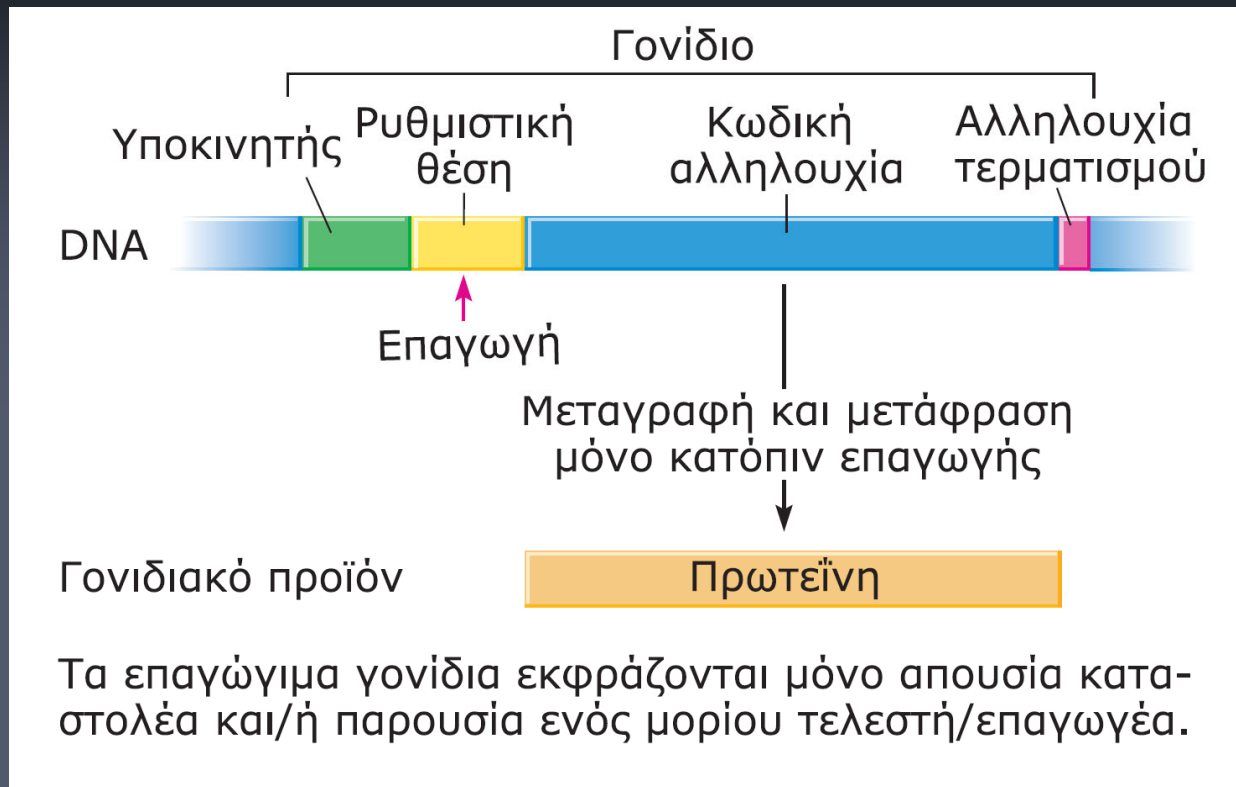
Ιδιοστατικά γονίδια: τα γονίδια που παραμένουν συνεχώς ενεργά (αν και σε κάποιο βαθμό ρυθμίζονται και αυτά).

Τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτείνες που συμμετέχουν στην ίδια κυτταρική λειτουργία οργανώνονται σε **οπερόνια**

Τα γονίδια αυτά βρίσκονται το ένα δίπλα στο άλλο, μεταγράφονται σε ένα **πολυκιστρονικό mRNA** και ρυθμίζονται από **ένα** υποκινητή και **μια** ρυθμιστική αλληλουχία, το **χειριστή**

Εικόνα 19.1

Γενική οργάνωση ενός επαγωγίμου γονιδίου.



Η **ρυθμιστική αλληλουχία** δεν κωδικοποιεί κανέναν προϊόν.

Επαγωγέας: η ρυθμιστική ουσία που επάγει την ενεργοποίηση αυτών των γονιδίων. **Επαγωγή:** η ενεργοποίηση ενός γονιδίου ως απόκριση στη παρουσία του επαγωγέα.

Ο επαγωγέας είναι ένα **μόριο-τελεστής**: συμβάλλει στον έλεγχο της έκφρασης ενός ή πολλών γονιδίων.

Γλυκόζη και λακτόζη ως πηγές άνθρακα στο E. Coli

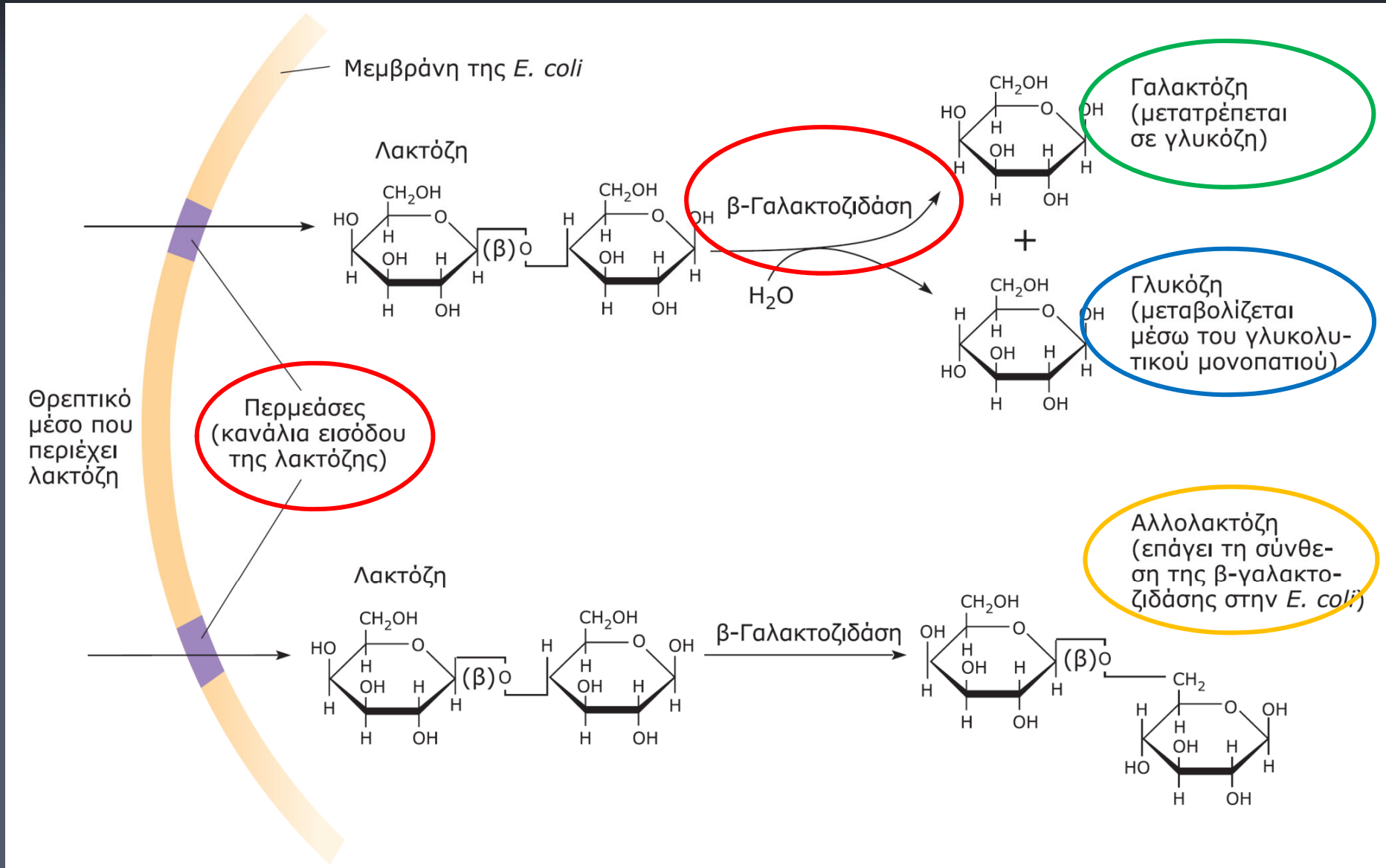
Γλυκόζη (σάκχαρο): τα ένζυμα που απαιτούνται για το μεταβολισμό της κωδικοποιούνται από **ιδιοστατικά** γονίδια.

ή

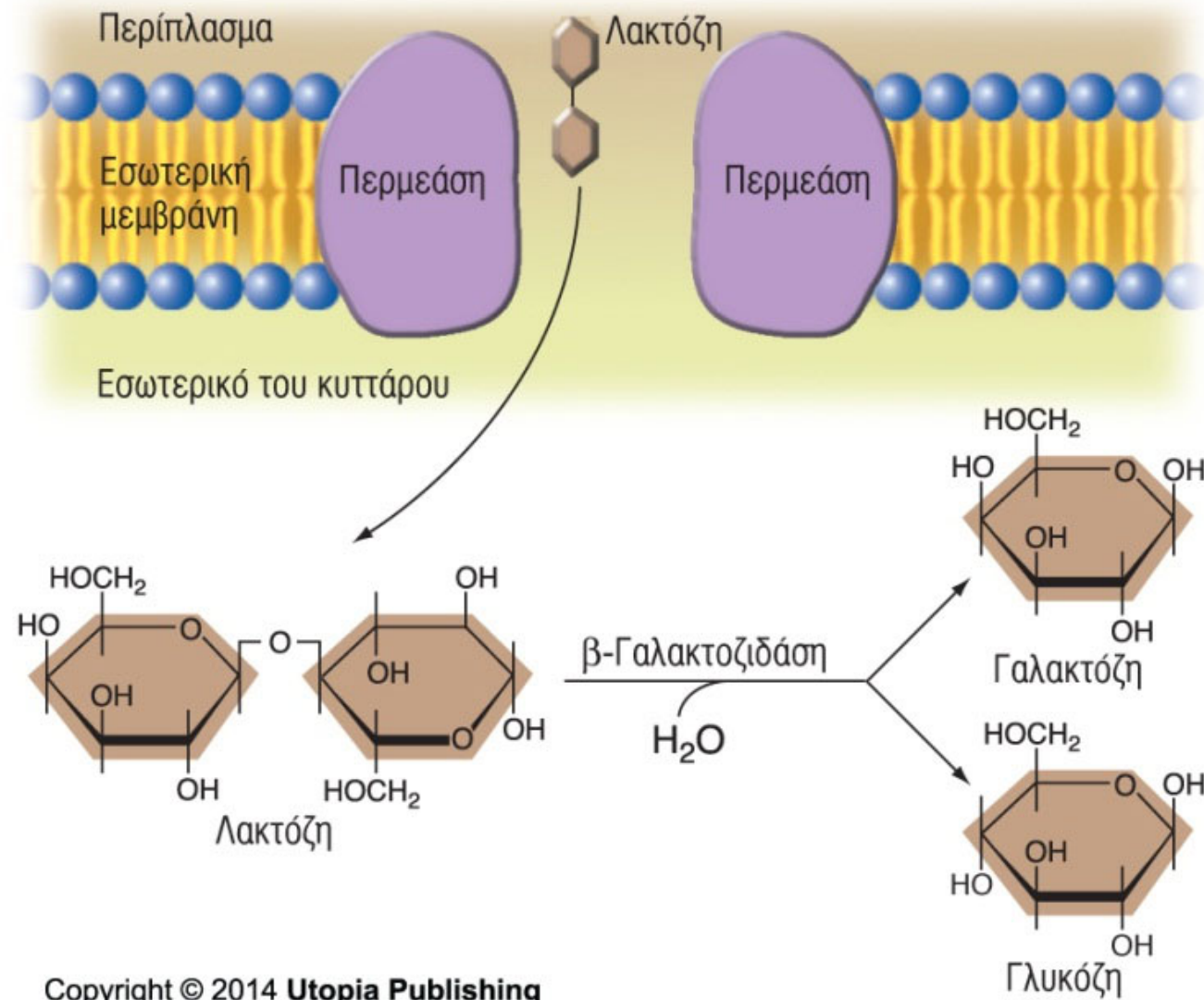
Λακτόζη (δισακχαρίτης: γαλακτόζη + γλυκόζη): απουσία γλυκόζης → **ενεργοποίηση ρυθμιζόμενων** γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που μεταβολίζουν τη λακτόζη.

Εικόνα 19.2

Αντιδράσεις που καταλύονται από το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση.



Εικόνα 15.3 (Hartwell)

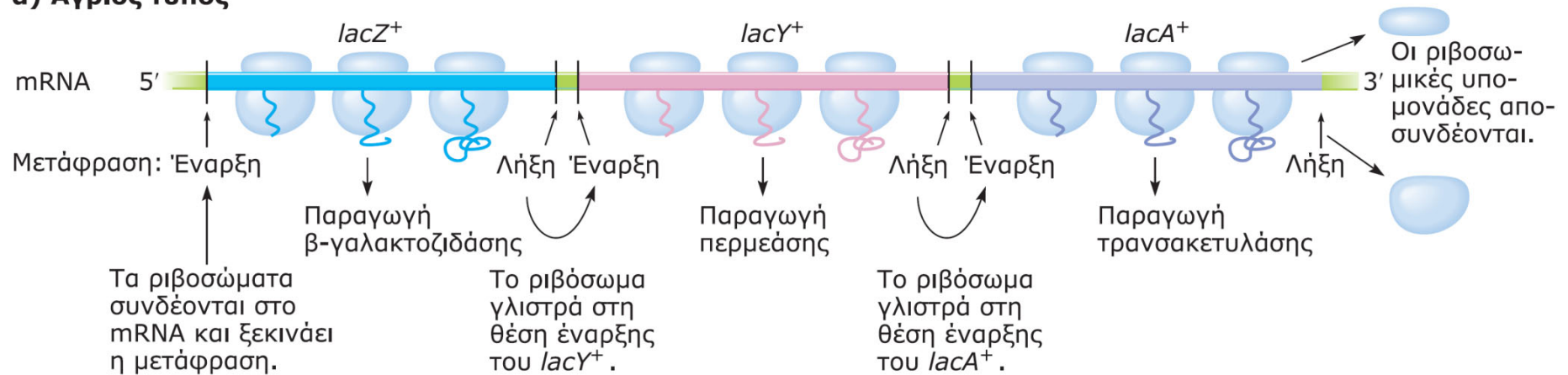


Copyright © 2014 Utopia Publishing

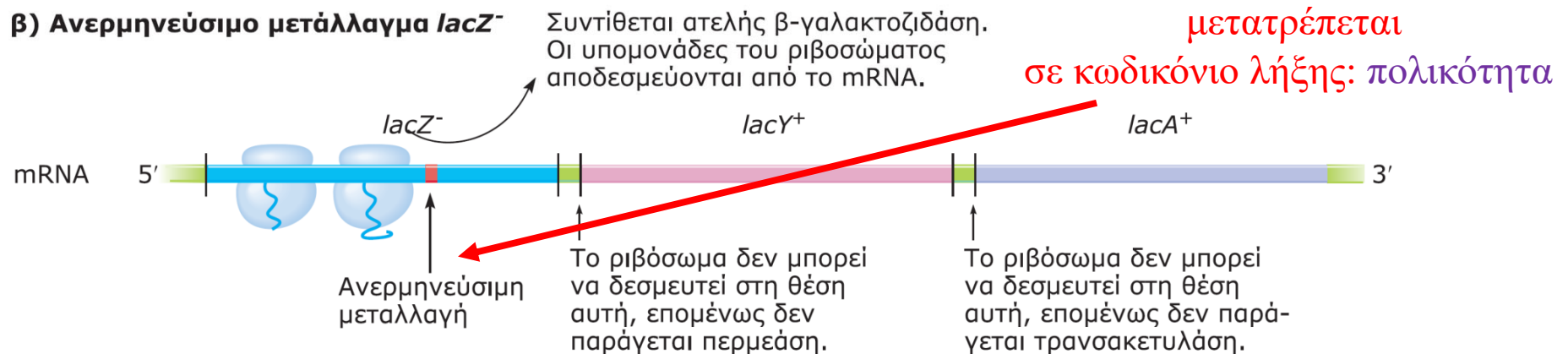
Εικόνα 19.3

Μετάφραση του πολυκιστρονικού mRNA *lac* που κωδικοποιεί τα ένζυμα τα οποία είναι απαραίτητα για την αξιοποίηση της λακτόζης (α) σε *E. coli* άγριου τύπου και (β) σε ένα μεταλλαγμένο στέλεχος που φέρει μια ανερμηνεύσιμη μεταλλαγή στο γονίδιο της β-γαλακτοζιδάσης (*lacZ*).

α) Άγριος τύπος

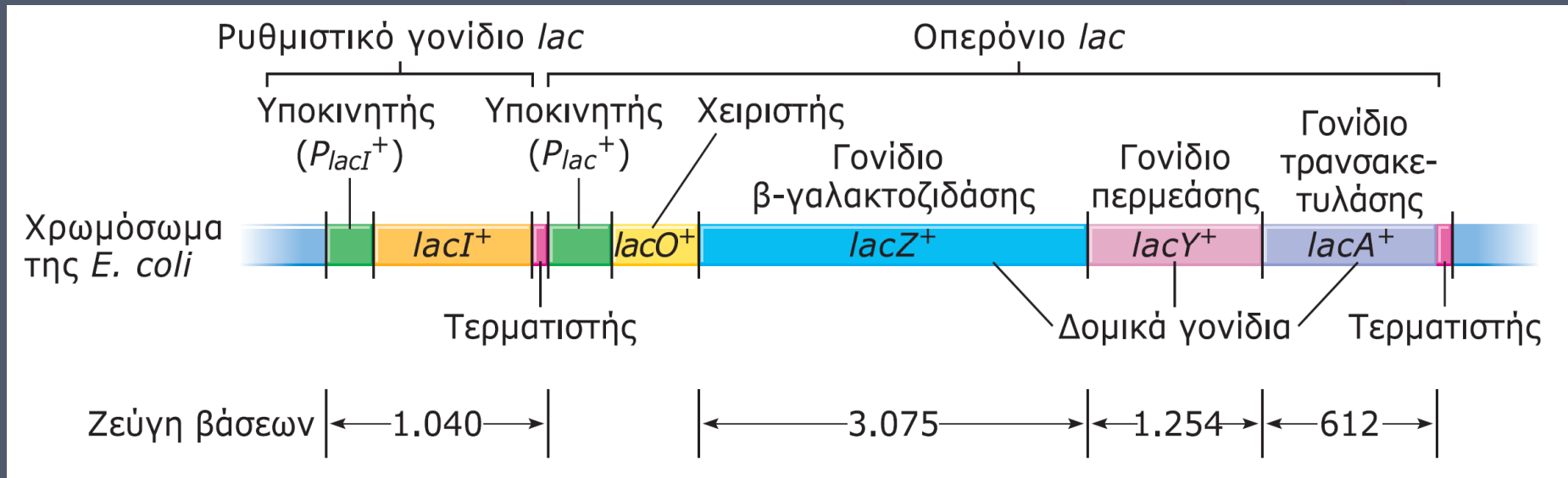


β) Ανερμηνεύσιμο μεταλλάγμα *lacZ*⁻



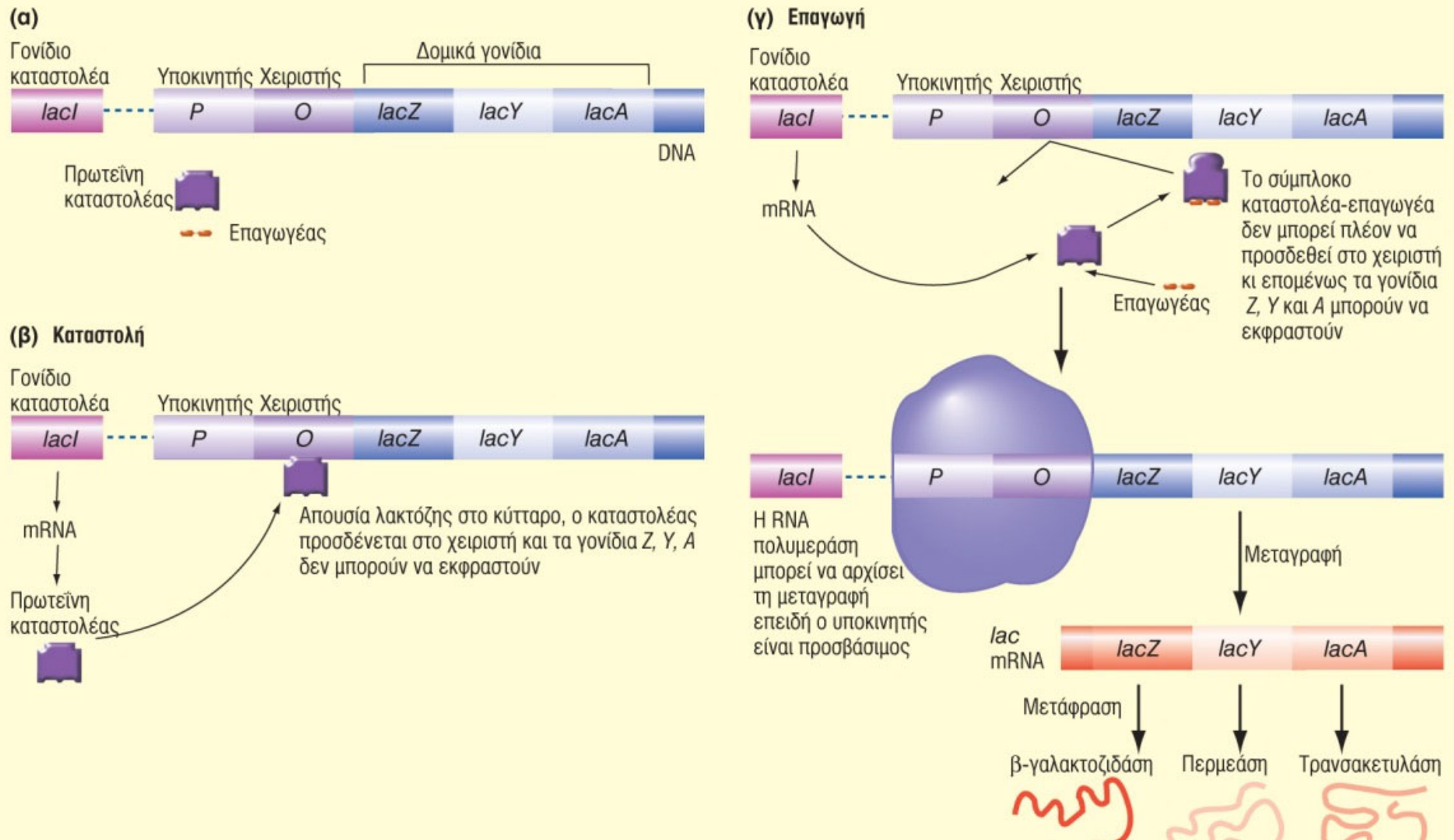
Εικόνα 19.4

Οργάνωση των γονιδίων *lac* της *E. coli* και των ρυθμιστικών τους στοιχείων: του χειριστή, του υποκινητή και του ρυθμιστικού γονιδίου *lacI*. Ο υποκινητής, ο χειριστής και τα γειτονικά γονίδια *lac* αποτελούν το οπερόνιο *lac*.



Εικόνα 15.5 (Hartwell)

Το οπερόνιο της λακτόζης στην *E. coli*



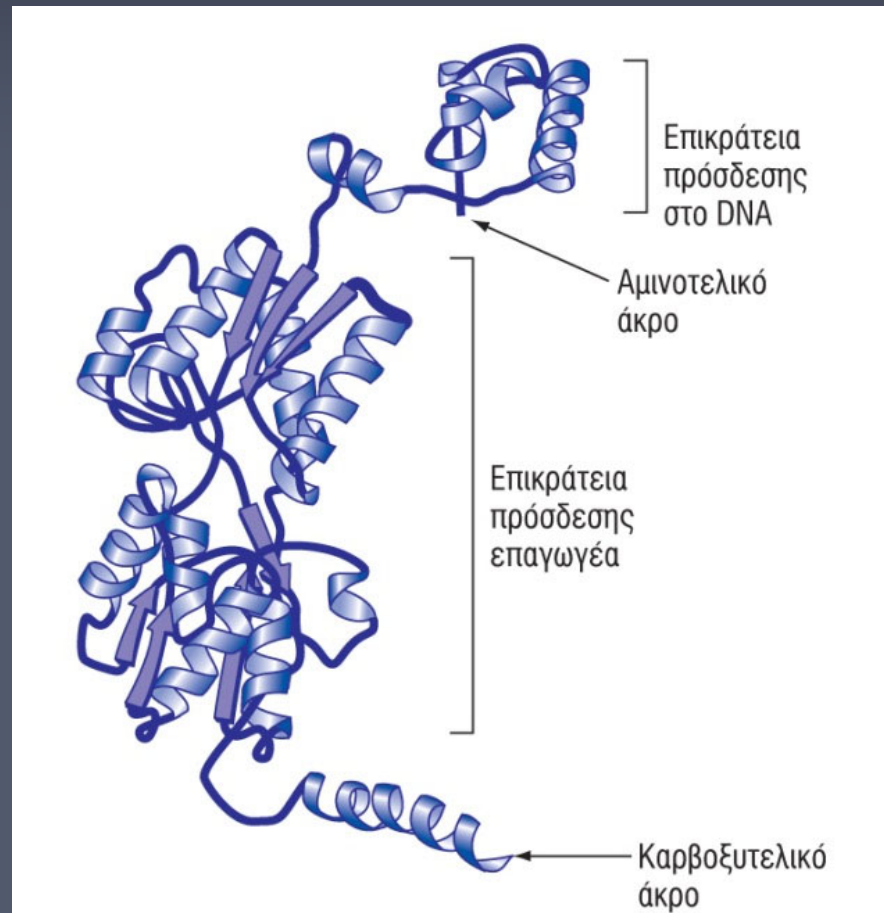
Απομόνωση ιδιοστατικών μεταλλάγμάτων

Jacob και Monod:

- Απομόνωσαν μεταλλάγματα που προκαλούν την **ιδιοστατική σύνθεση** και των **τριών** γονιδίων: η σύνθεση τους πλέον είναι **σταθερή** και **ανεξάρτητη** από τον επαγωγέα.
- Διέκριναν **2 κατηγορίες** ιδιοστατικών μεταλλαγών:
 - κατηγορία 1: χαρτογραφήθηκε **δίπλα στο γονίδιο lacZ**: χειριστής
 - κατηγορία 2: χαρτογραφήθηκε **ανοδικά του γονιδίου lacZ**: γονίδιο καταστολέα

Εικόνα 15.10 (Hartwell)

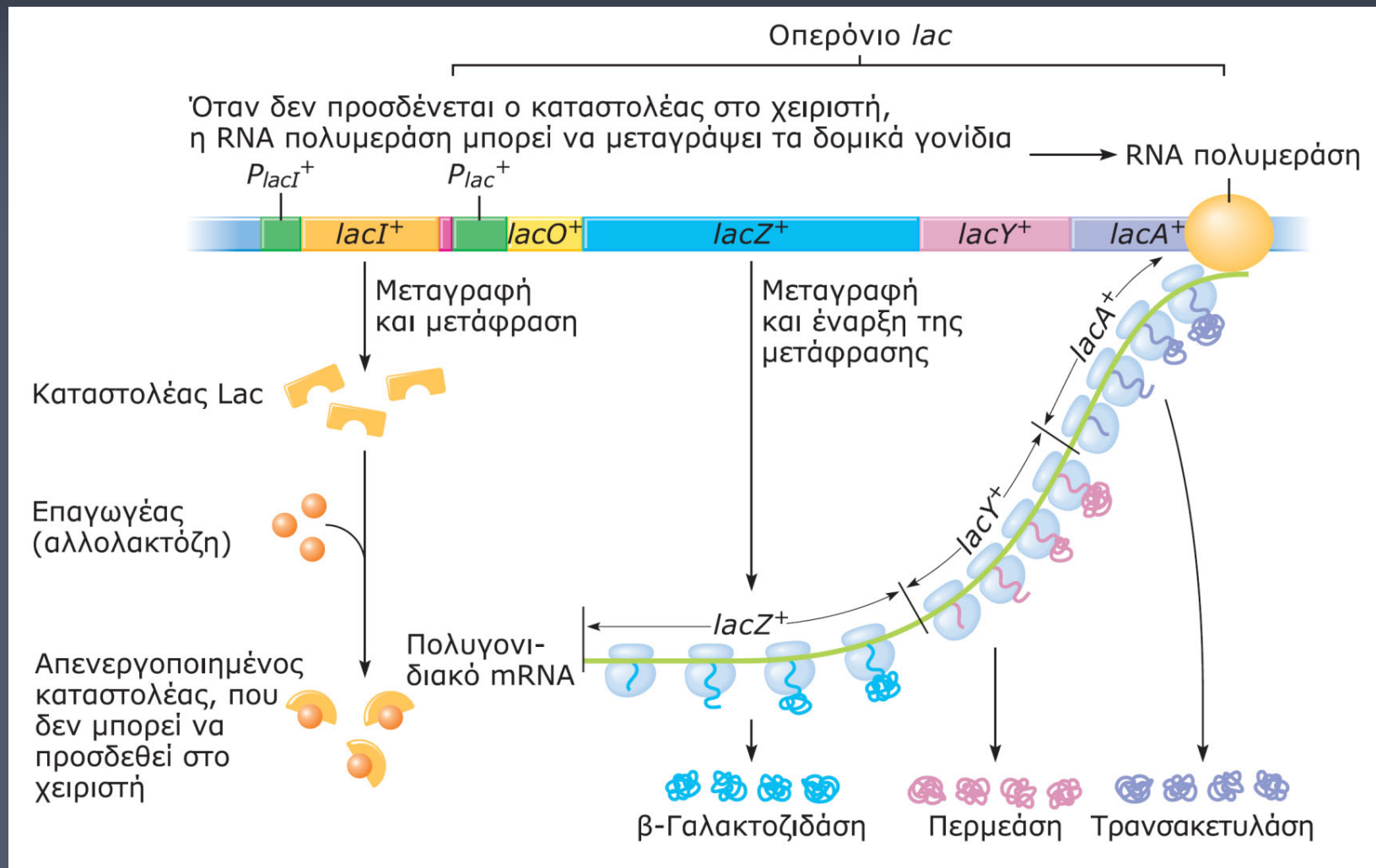
Ο καταστολέας έχει **δύο** επικράτειες πρόσδεσης



Copyright © 2014 Utopia Publishing

Εικόνα 19.7

Λειτουργία του οπερονίου *lac* σε στέλεχος *E. coli* άγριου τύπου που αναπτύσσεται με τη λακτόζη ως μοναδική πηγή άνθρακα.

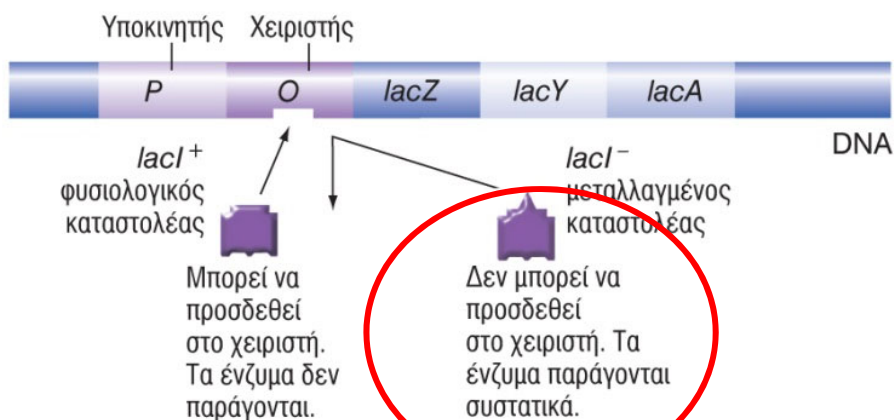


Εικόνα 15.8 (Hartwell)

Καταστολέας Lac

Μεταλλαγές καταστολέα: **δύο** επικράτειες πρόσδεσης

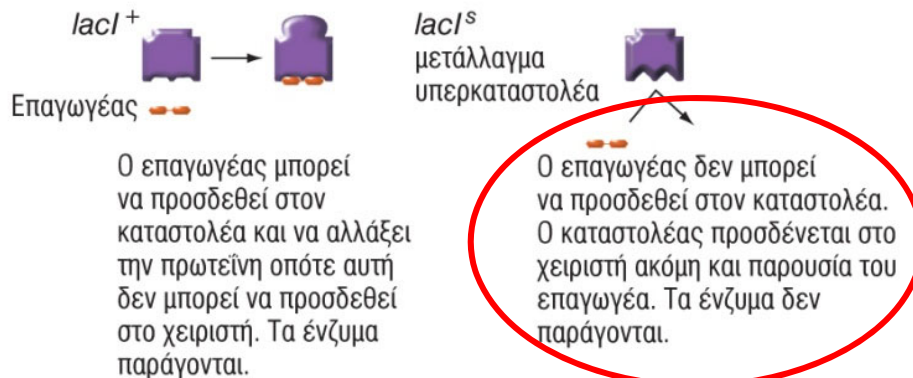
Μεταλλαγμένος καταστολέας



Copyright © 2014 Utopia Publishing

Utopia

Μεταλλαγμένος **υπερκαταστολέας**



Copyright © 2014 Utopia Publishing

Utopia

Εικόνα 15.11 (Hartwell) Χειριστής LacO

Μεταλλαγές χειριστή

Μεταλλαγμένος χειριστής (o^c)



Η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων έχει αλλάξει

Ο καταστολέας δεν μπορεί να αναγνωρίσει το χειριστή και να προσδεθεί πάνω του. Τα ένζυμα των γονιδίων *lac* συντίθενται συστατικά.

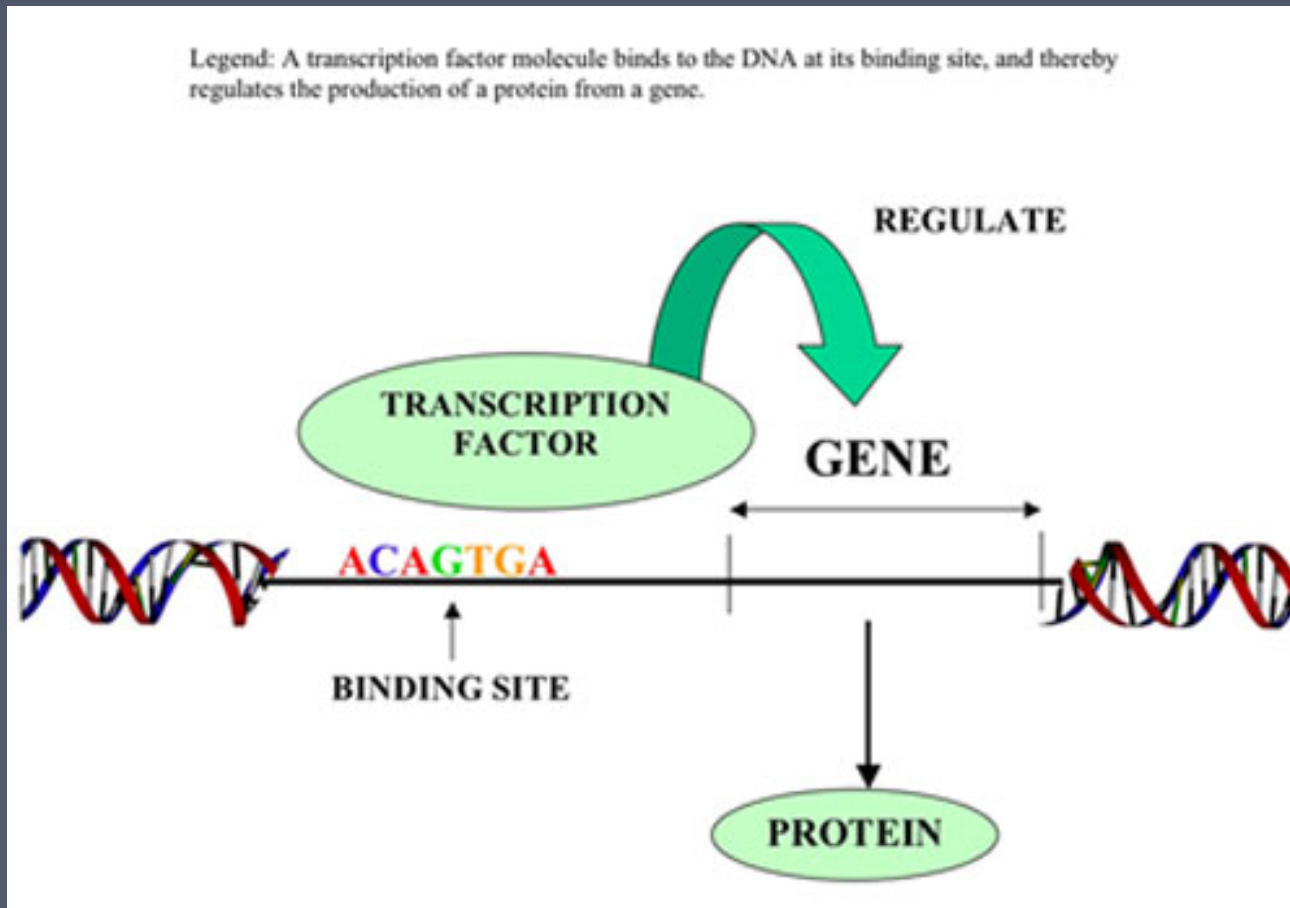
Copyright © 2014 Utopia Publishing

Πως μπορείς να ξεχωρίσεις τα μεταλλάγματα του χειριστή από τα μεταλλάγματα που αφορούν το καταστολέα;

Οι πρωτεΐνες δρουν *in trans*. Οι θέσεις DNA δρουν *in cis*.

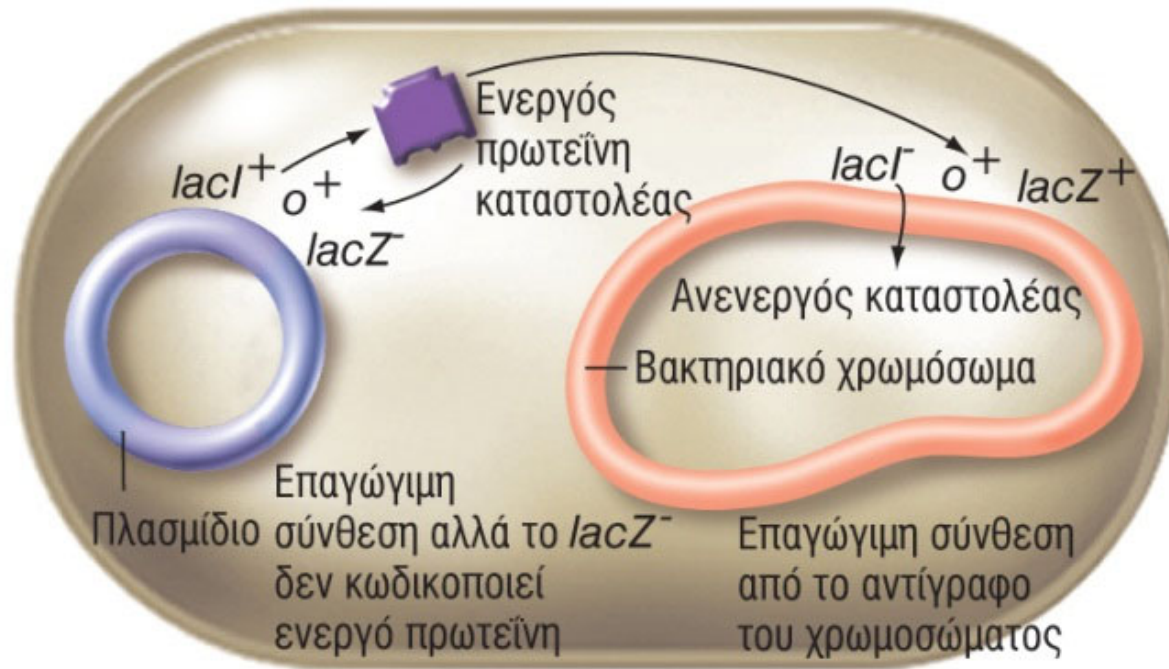
Trans στοιχεία: διαχέονται και δρουν σε πολλούς στόχους.

Cis στοιχεία: επηρεάζουν μόνο την έκφραση γειτονικών γονιδίων



Τι είναι ένα «μερικώς διπλοειδές» κύτταρο?

Ε' $lacI^+ o^+ Z^-$ πλασμίδιο σε $lacI^- o^+ Z^+$ βακτήρια



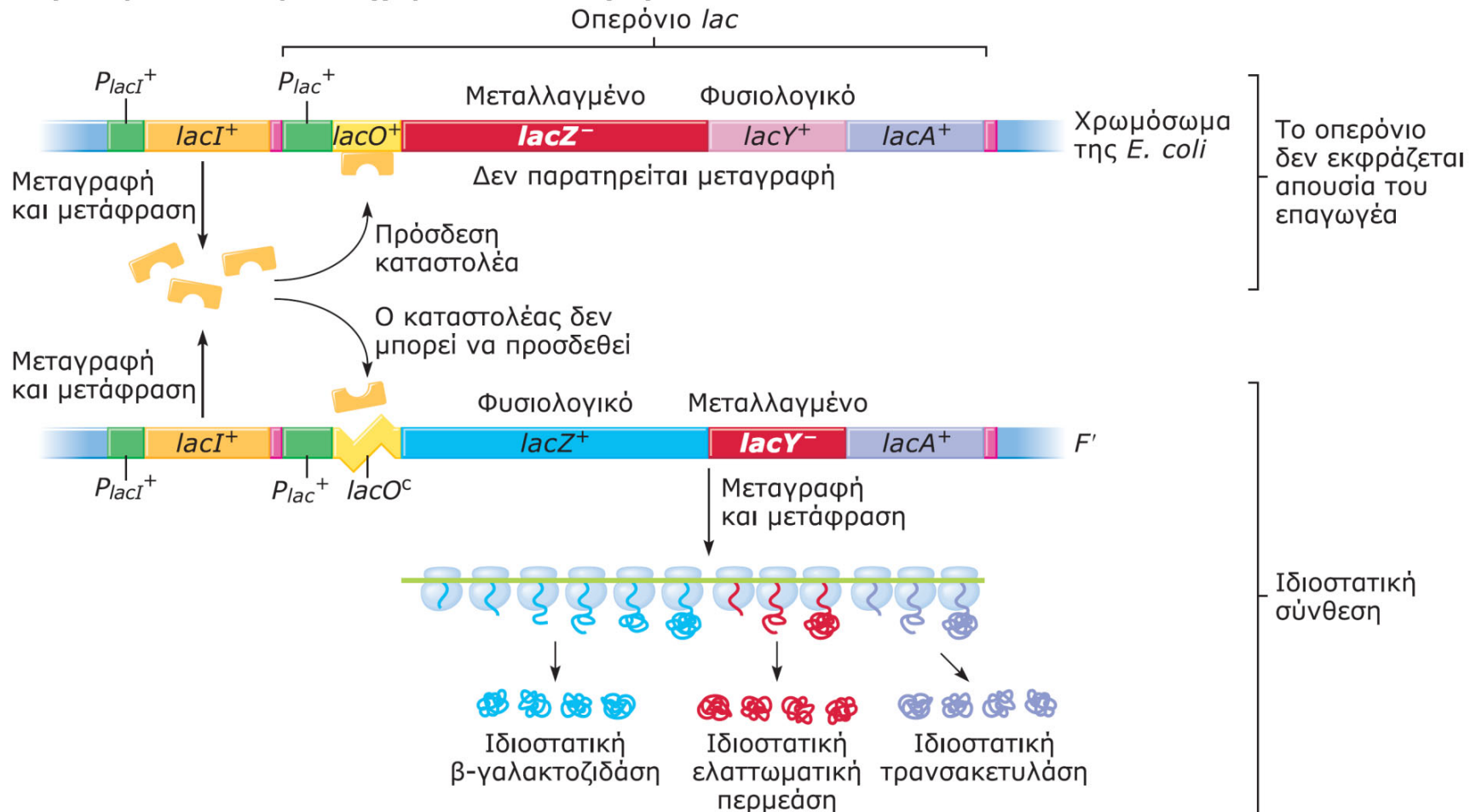
Copyright © 2014 Utopia Publishing

 **utopia**

Εικόνα 19.8

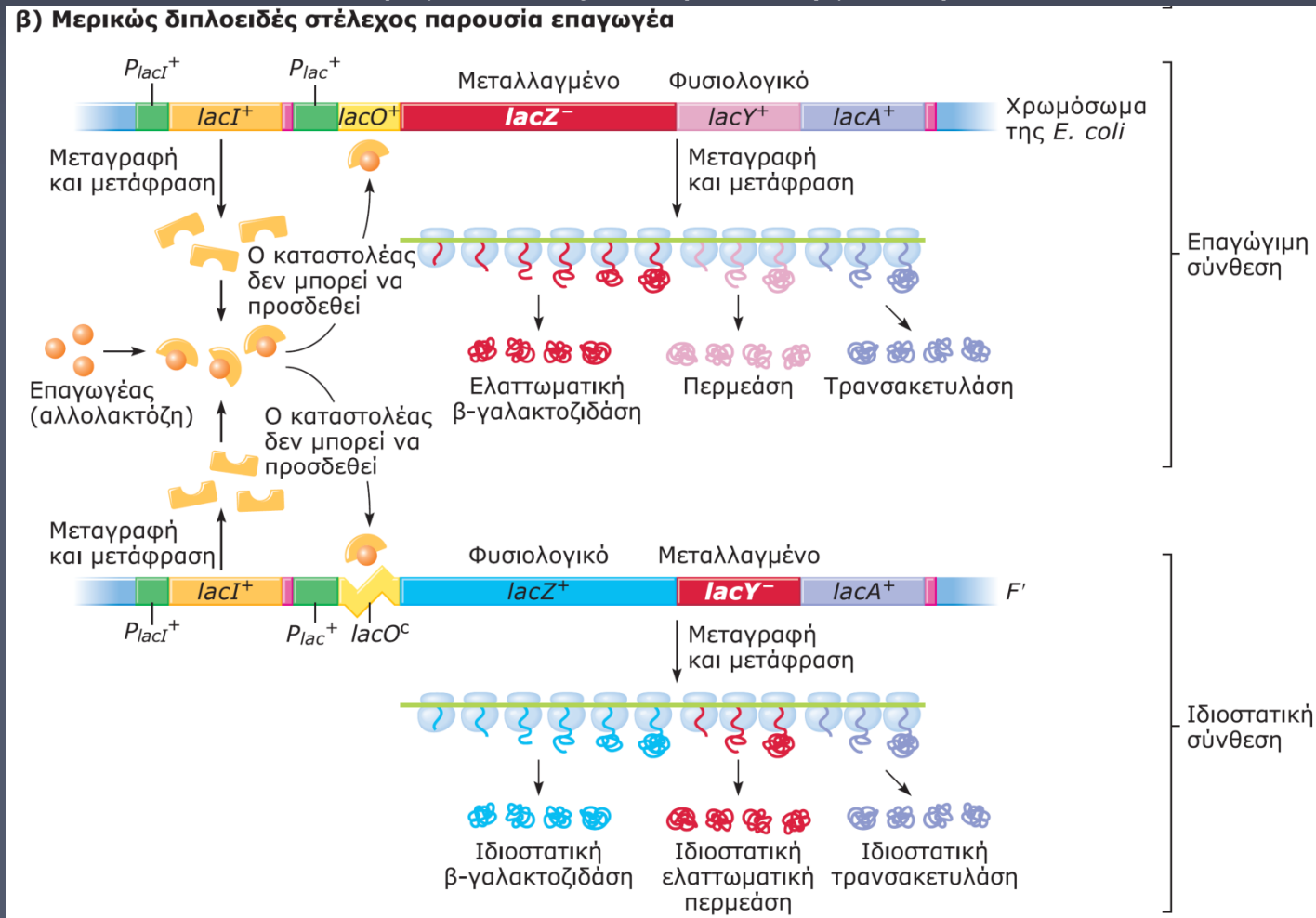
cis-Επικρατής επίδραση της μεταλλαγής $lacO^c$ σε ένα μερικώς διπλοειδές στέλεχος *E. coli*. (α) Απουσία επαγωγέα, το οπερόνιο $lacO^+$ απενεργοποιείται, ενώ το οπερόνιο $lacO^c$ παράγει λειτουργική β-γαλακτοζιδάση από το γονίδιο $lacZ^+$ και μη λειτουργικά μόρια περμεάσης από το γονίδιο $lacY^-$ που φέρει μια παρερμηνεύσιμη μεταλλαγή.

α) Μερικώς διπλοειδές στέλεχος απουσία επαγωγέα



Εικόνα 19.8

(β) Παρουσία του επαγωγέα, παράγεται λειτουργική β-γαλακτοζιδάση και ελαττωματική περμεάση από το οπερόνιο $lacO^c$, ενώ το οπερόνιο $lacO^+$ παράγει μη λειτουργική β-γαλακτοζιδάση από το γονίδιο $lacZ^-$ (παρερμηνεύσιμη μεταλλαγή) και λειτουργική περμεάση από το γονίδιο $lacY^+$. Συνολικά, από τα δύο οπερόνια που υπάρχουν στο κύτταρο παράγεται λειτουργική β-γαλακτοζιδάση και περμεάση.

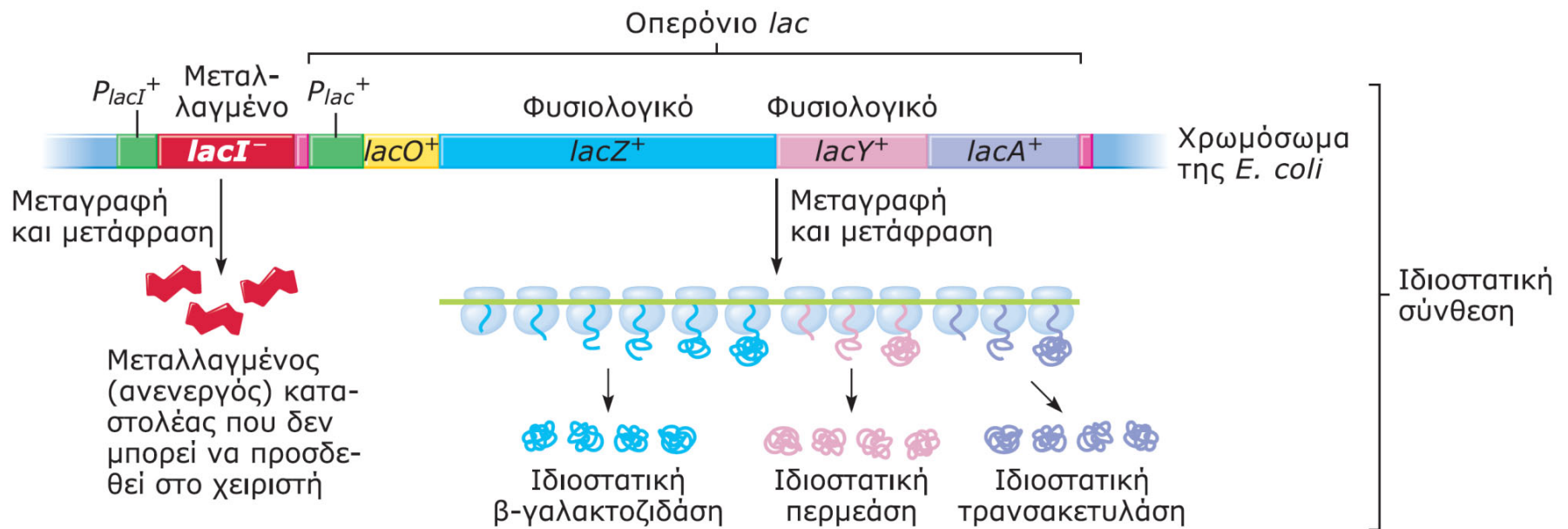


Εικόνα 19.9

Επιδράσεις της μεταλλαγής *lacI*.

(α) Επίδραση στην έκφραση του οπερονίου *lac* σε ένα απλοειδές κύτταρο, στο οποίο παράγονται μεταλλαγμένα, ανενεργά μόρια του καταστολέα Lac που δεν μπορούν να προσδεθούν στο χειριστή *lacO*⁺. Τα δομικά γονίδια του οπερονίου μεταγράφονται ιδιοστατικά. Επίδραση στο μερικώς διπλοειδές στέλεχος *lacI*⁺ *lacO*⁺ *lacZ*⁻ *lacY*⁺/*lacI*⁻ *lacO*⁺ *lacZ*⁺ *lacY*⁻

α) Απλοειδές στέλεχος παρουσία ή απουσία επαγωγέα

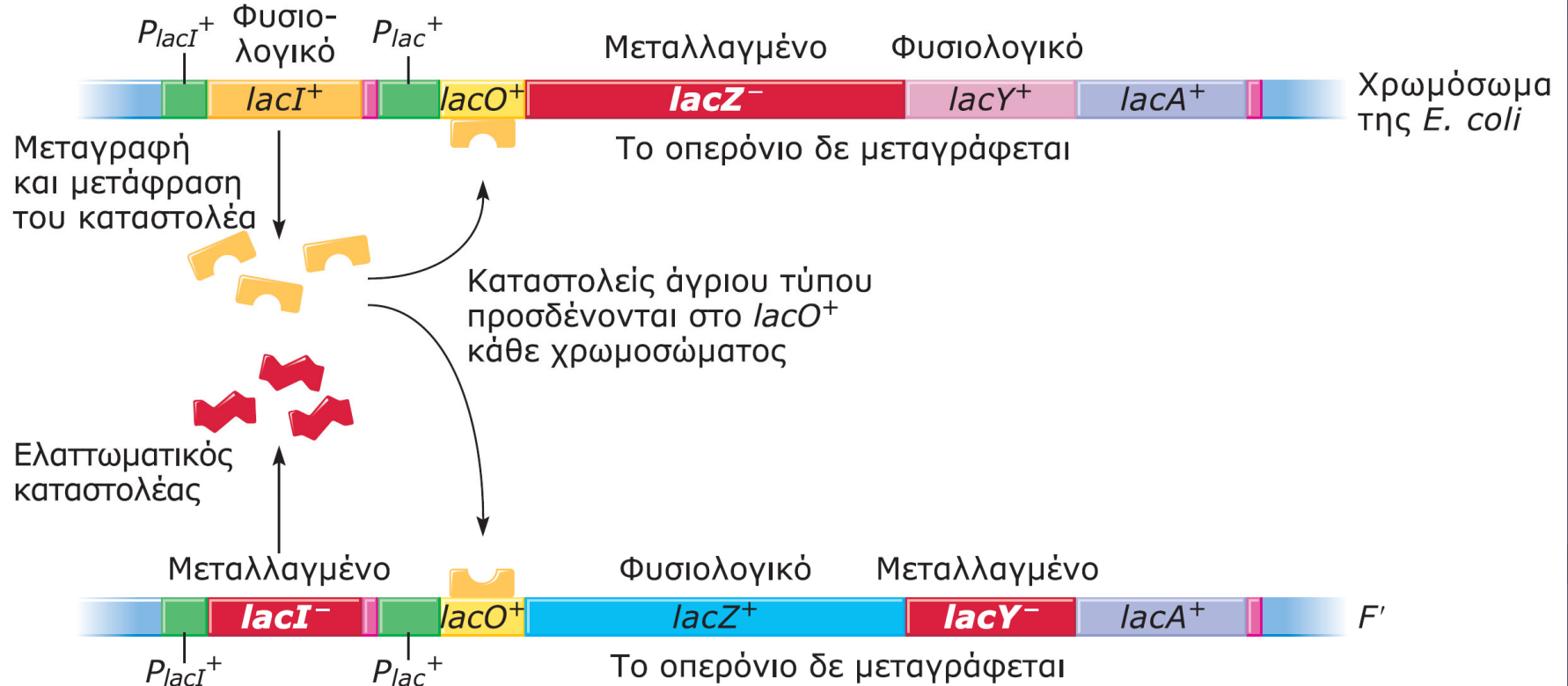


Εικόνα 19.9

Επιδράσεις της μεταλλαγής *lacI*⁻.

(β) απουσία ή (γ) παρουσία του επαγωγέα. (Οι μεταλλαγές *lacZ* και *lacY* είναι παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις.)

β) Μερικώς διπλοειδές στέλεχος απουσία επαγωγέα

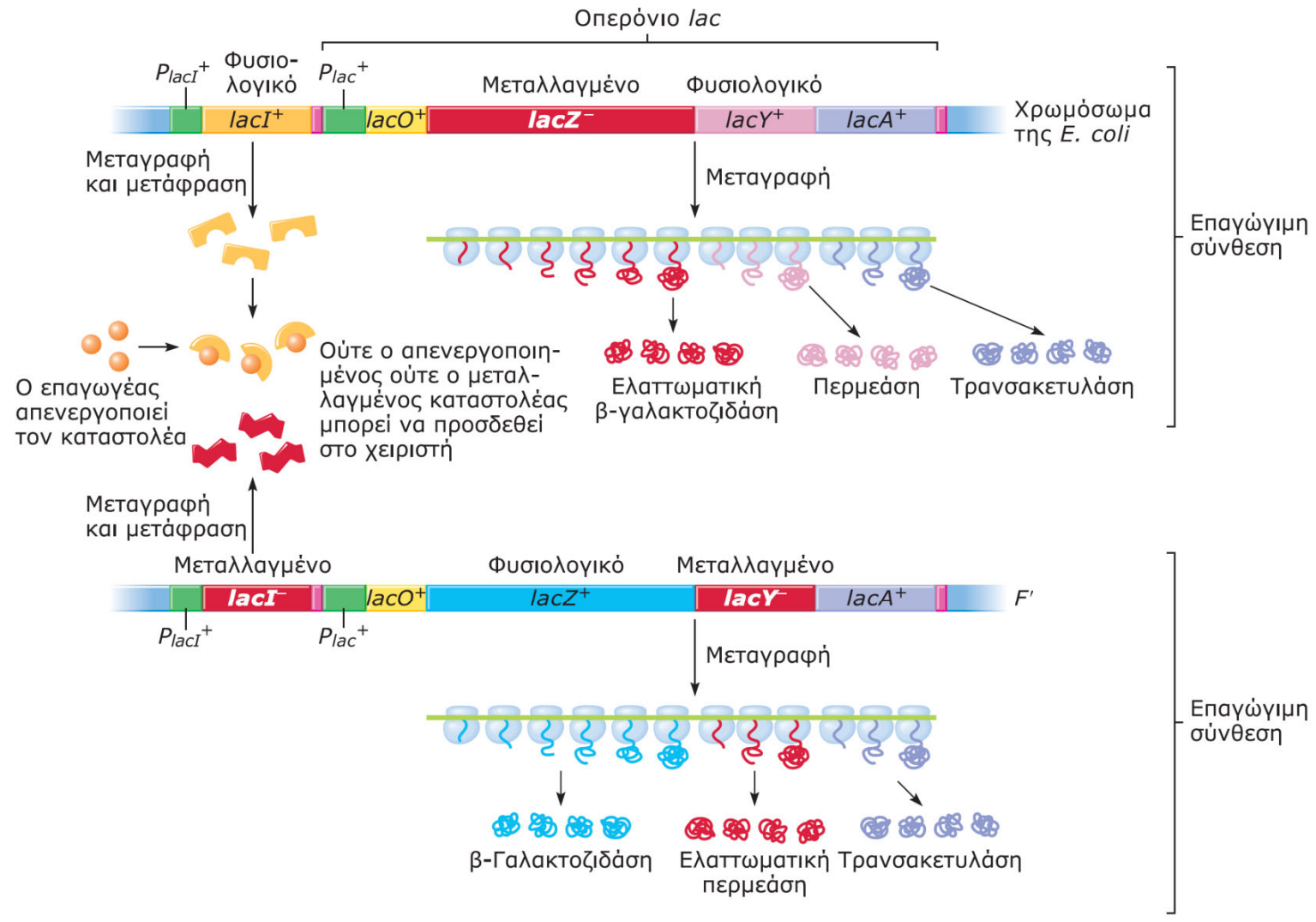


Εικόνα 19.9

Επιδράσεις της μεταλλαγής *lacI*.

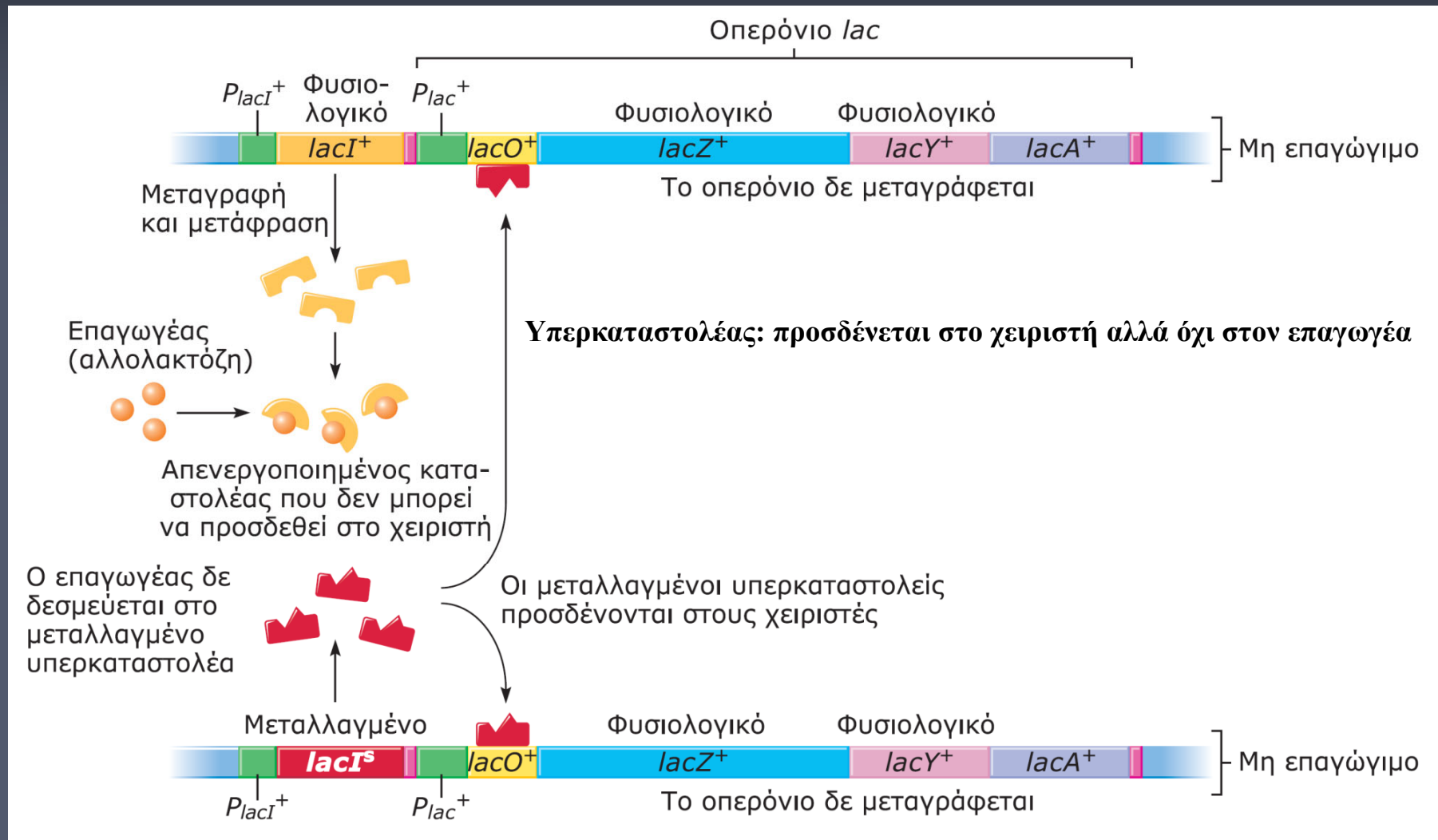
(γ) παρουσία του επαγωγέα. (Οι μεταλλαγές *lacZ* και *lacY* είναι παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις.)

γ) Μερικώς διπλοειδές στέλεχος παρουσία επαγωγέα

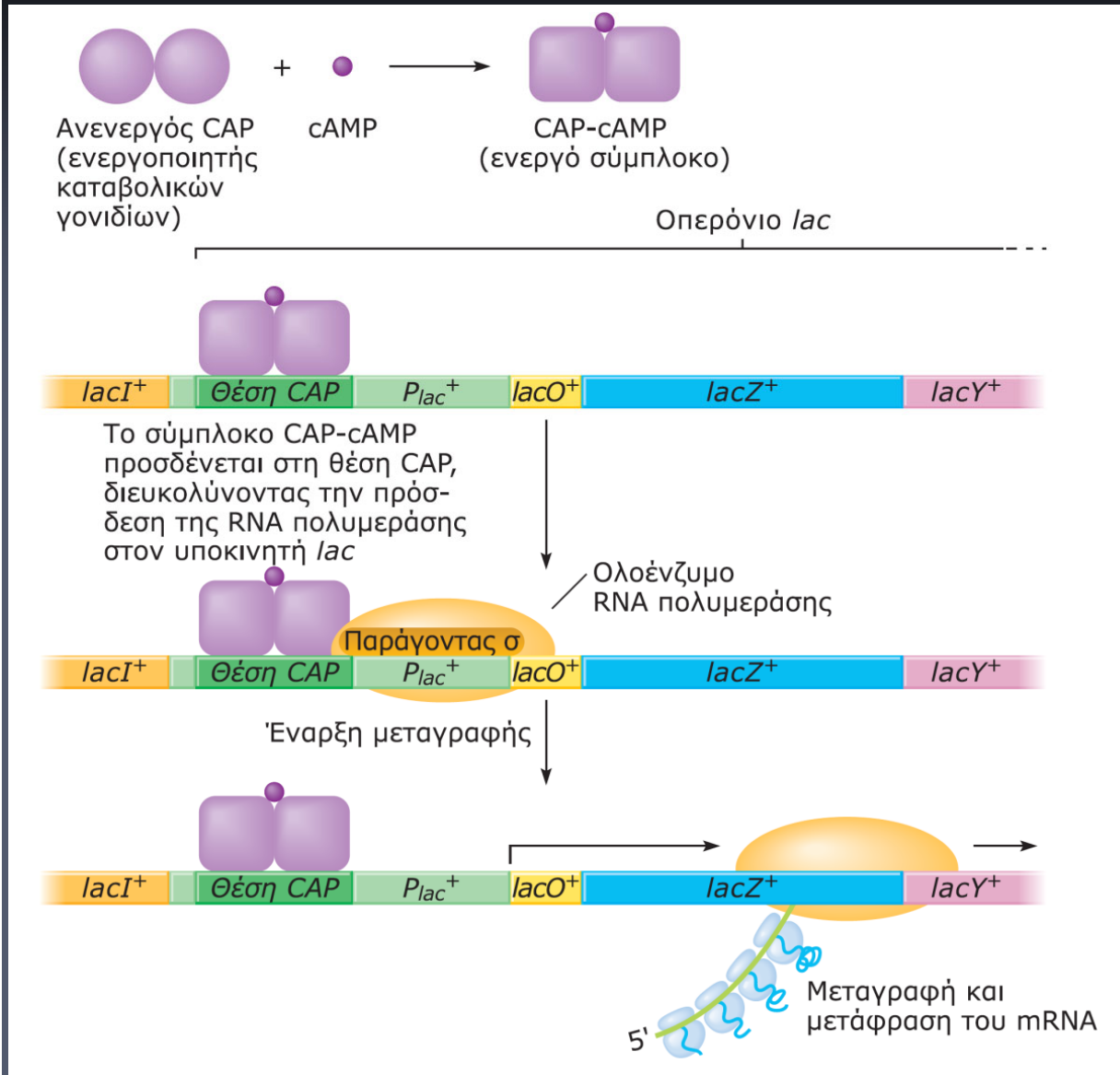


Εικόνα 19.10

Επικράτηση της μεταλλαγής *lacI^S* επί του άγριου τύπου *lacI⁺* σε ένα μερικώς διπλοειδές κύτταρο *lacI⁺ lacO⁺ lacZ⁺ lacY⁺ lacA⁺ / lacI^S lacO⁺ lacZ⁺ lacY⁺ lacA⁺* που αναπτύσσεται παρουσία λακτόζης.



Θετική ρύθμιση του οπερονίου Lac



Εικόνα 19.11

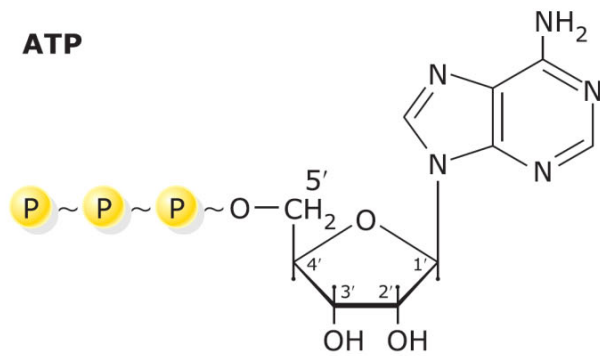
Ο ρόλος του κυκλικού AMP (cAMP) στη ρύθμιση των οπερονίων που είναι ευαίσθητα στην παρουσία γλυκόζης, όπως το οπερόνιο *lac* της *E. coli*.

Παρουσιάζεται η συμπεριφορά του οπερονίου *lac* στην περίπτωση που υπάρχει διαθέσιμη λακτόζη αλλά όχι γλυκόζη.

CAP: catabolite gene Activator Protein

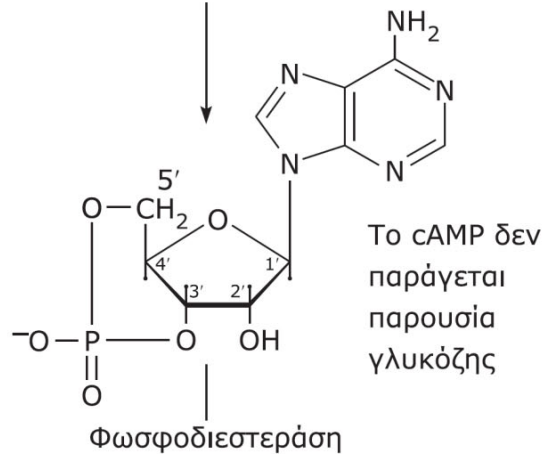
Τα επίπεδα cAMP μειώνονται ραγδαία παρουσία γλυκόζης (καταβολική καταστολή)

ATP



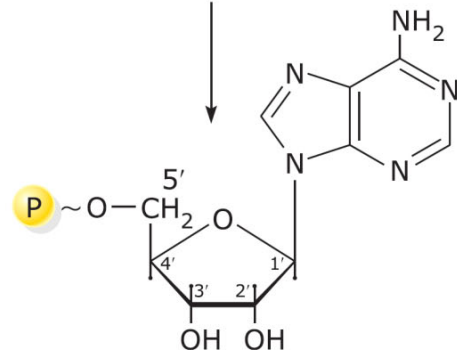
Αδενυλική κυκλάση

cAMP



Φωσφοδιεστεράση

5'-AMP



Εικόνα 19.12

Δομή του κυκλικού AMP (cAMP ή κυκλική 3',5'-μονοφωσφορική αδενοσίνη).

Το cAMP συντίθεται από ATP μέσω μιας αντίδρασης που καταλύεται από την αδενυλική κυκλάση και διασπάται από τη φωσφοδιεστεράση.

Κατά την μεταφορά της γλυκόζης στο εσωτερικό του κυττάρου, η αδενυλική κυκλάση απενεργοποιείται.

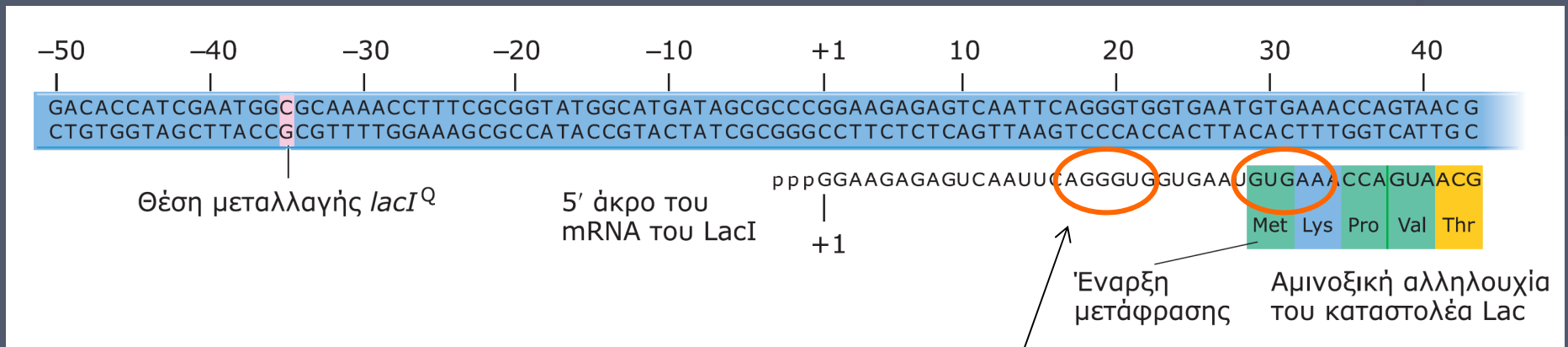
cAMP δεν συντίθεται ενώ όσο απομένει διασπάται από την φωσφοδιεστεράση.

Εικόνα 19.13

Νουκλεοτιδική αλληλουχία του υποκινητή του γονιδίου *lacI*⁺ και της περιοχής του 5' άκρου του mRNA του καταστολέα του οπερονίου *lac*.

Φαίνεται επίσης η αμινοξική αλληλουχία του αμινοτελικού άκρου του καταστολέα. Προσέξτε ότι ως κωδικόνιο έναρξης χρησιμοποιείται το GUG, το οποίο σε αυτή την περίπτωση κωδικοποιεί το αμινοξύ μεθειονίνη.

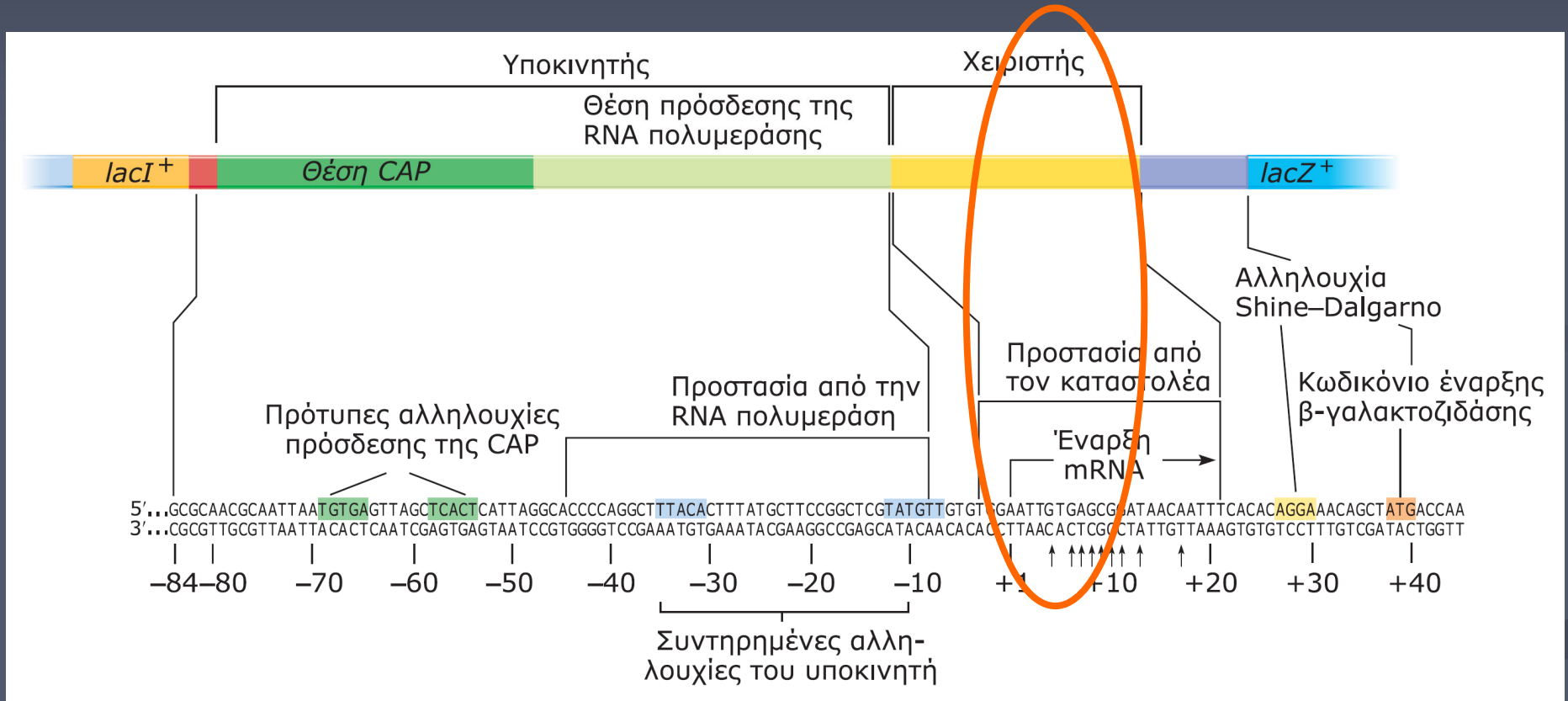
Ασυνήθιστο GUG αντί για AUG



AGGG: Shine-Dalgarno: θέση πρόσδεσης του ριβοσώματος (συνήθως 9-12 βάσεις ανοδικά του κωδικόνιου έναρξης)

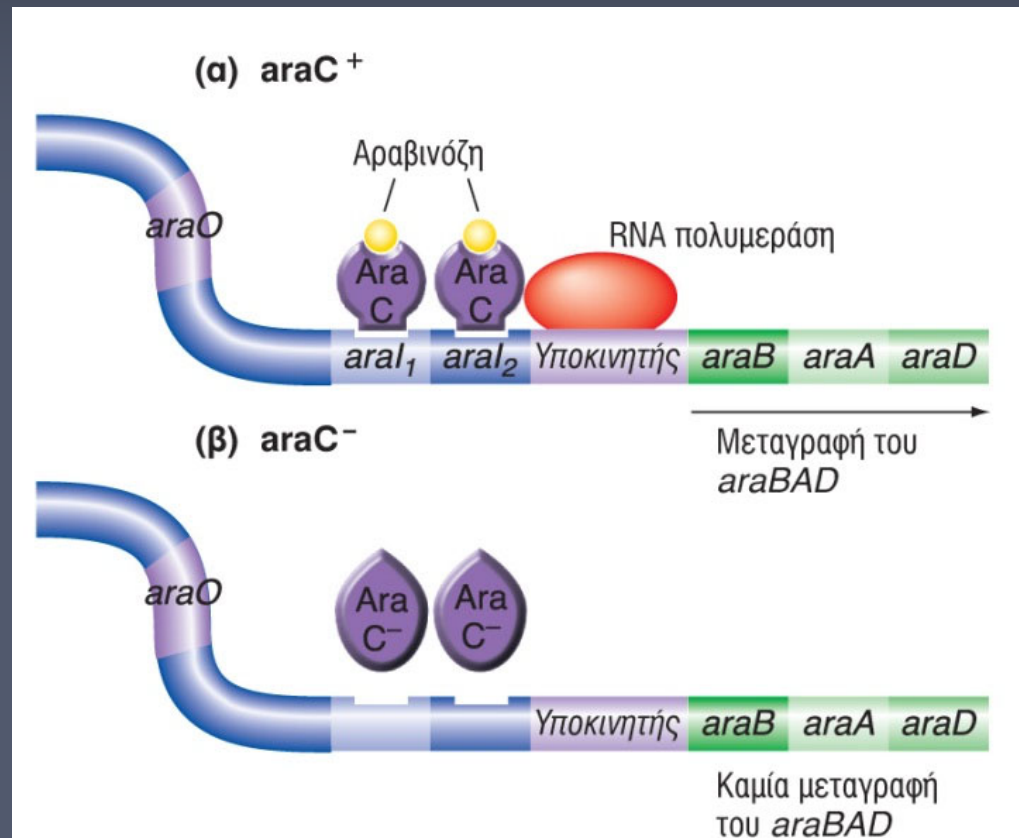
Εικόνα 19.14

Αλληλουχία του υποκινητή και του χειριστή του οπερονίου της λακτόζης στην *E. coli*. Παρουσιάζονται επίσης οι θέσεις ορισμένων γνωστών μεταλλάγων *lacO^c* (υποδεικνύονται με βέλη).



Θετική ρύθμιση του οπερονίου *araBAD* από την *AraC*

AraC: ρυθμιστική πρωτεΐνη των γονιδίων που εμπλέκονται στη διάσπαση του σακχάρου Αραβινόζη



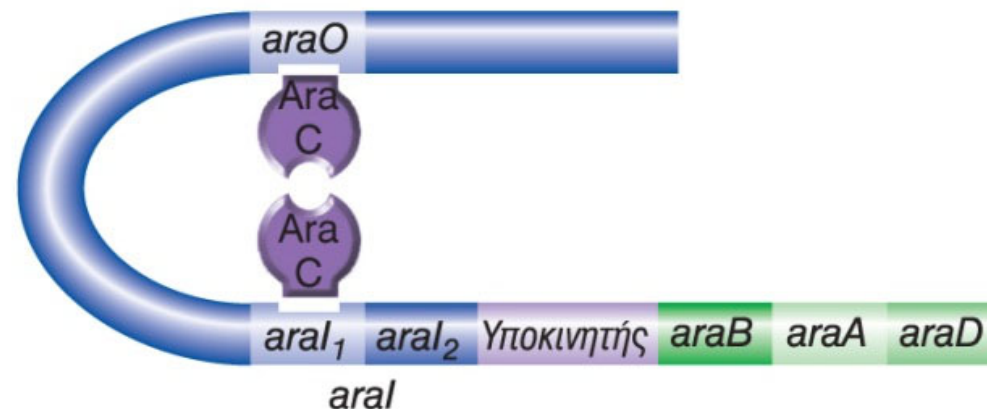
Copyright © 2014 Utopia Publishing

Θετική ρύθμιση του οπερονίου *araBAD* από την *AraC*

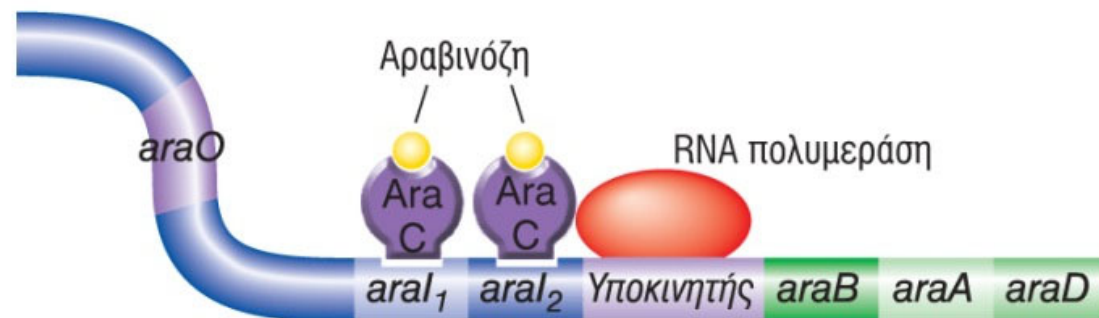
AraC: ρυθμιστική πρωτεΐνη των γονιδίων που εμπλέκονται στη διάσπαση του σακχάρου Αραβινόζη

(α) Αραβινόζη απύουσα

Διμερές *AraC* δεσμευμένο και στις δύο θέσεις *araO* και *araI*.
Τα γονίδια *araBAD* δεν μεταγράφονται.



(β) Αραβινόζη παρούσα

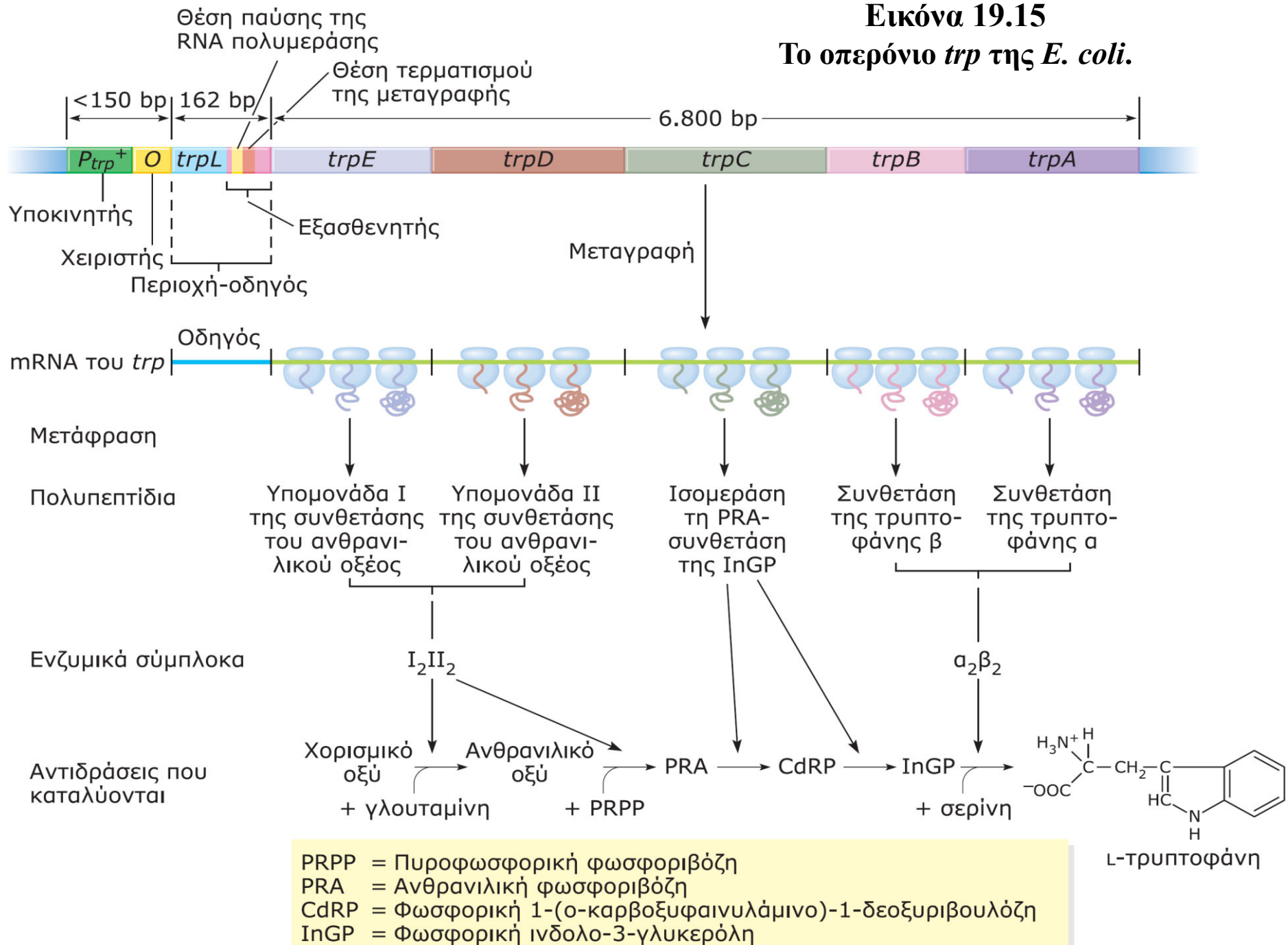


Κατασταλτά οπερόνια

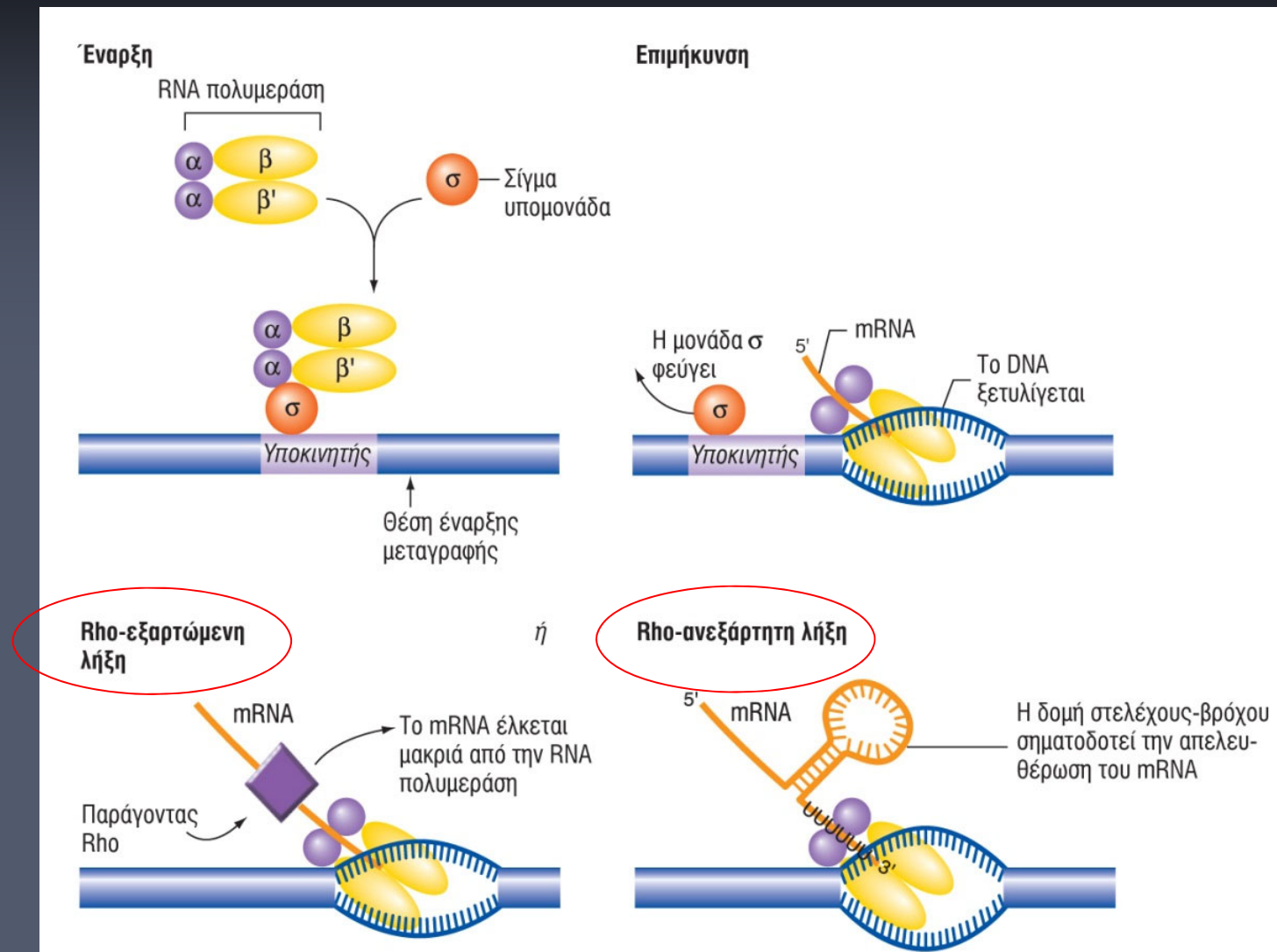
Η προσθήκη ενός αμινοξέος δεν επάγει αλλά **καταστέλλει** το οπερόνιο βιοσύνθεσης αυτού του αμινοξέος.

Γενική αρχή: τα μονοπάτια των αναβολικών (δηλ. βιοσυνθετικών μονοπατιών) καταστέλλονται όταν το τελικό προϊόν είναι διαθέσιμο.

Εικόνα 19.15
Το οπερόνιο *trp* της *E. coli*.



Εικόνα 15.2 (Hartwell) Η μεταγραφή στα προκαρυωτικά κύτταρα

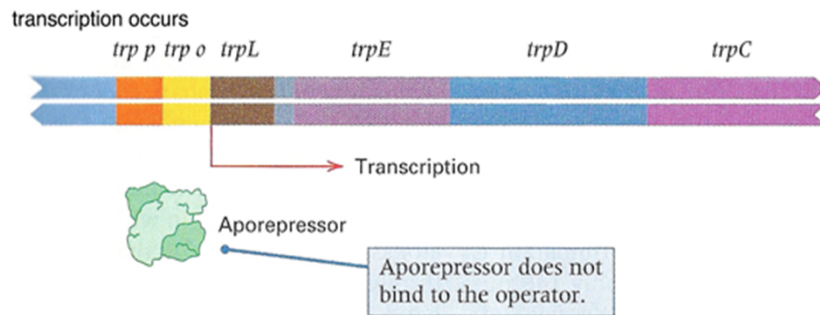


Copyright © 2014 Utopia Publishing

Καταστολή οπερονίου Trp:

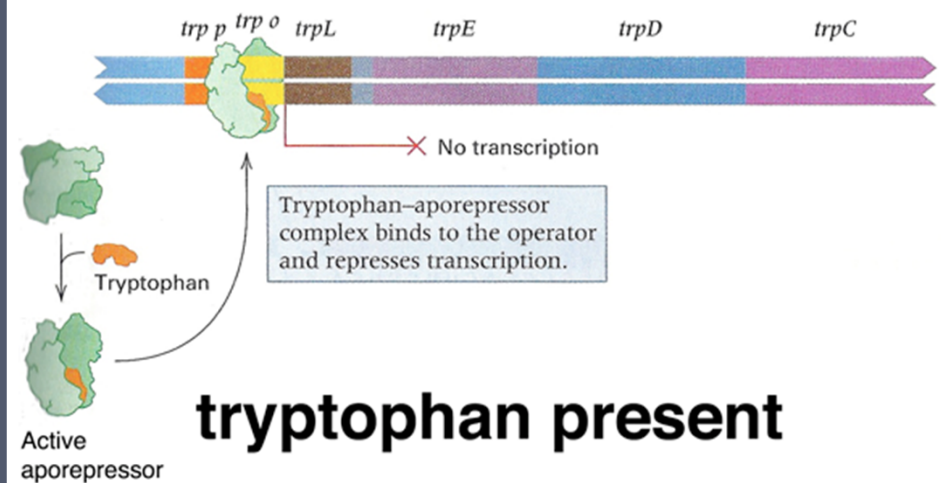
το ρυθμιστικό γονίδιο Trp κωδικοποιεί τον αποκαταστολέα (aporepressor protein) ο οποίος παραμένει ανενεργός. Παρουσία τρυπτοφάνης, η τελευταία προσδένεται στον αποκαταστολέα και τον ενεργοποιεί. Ο αποκαταστολέας προσδένεται στο χειριστή και καταστέλλει τη μεταγραφή.

E. coli trp operon



low tryptophan

E. coli trp operon

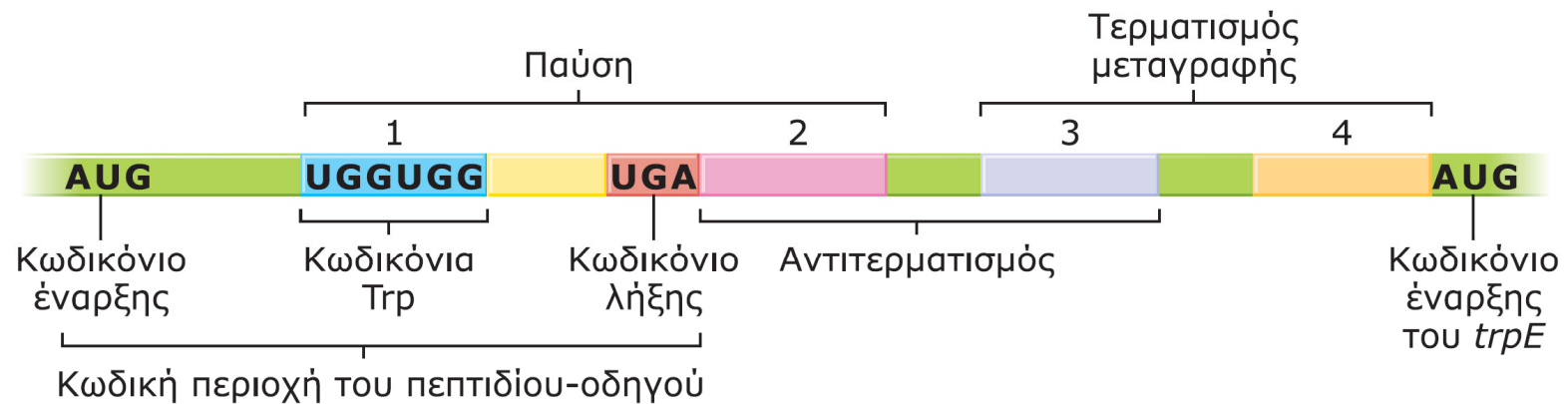


tryptophan present

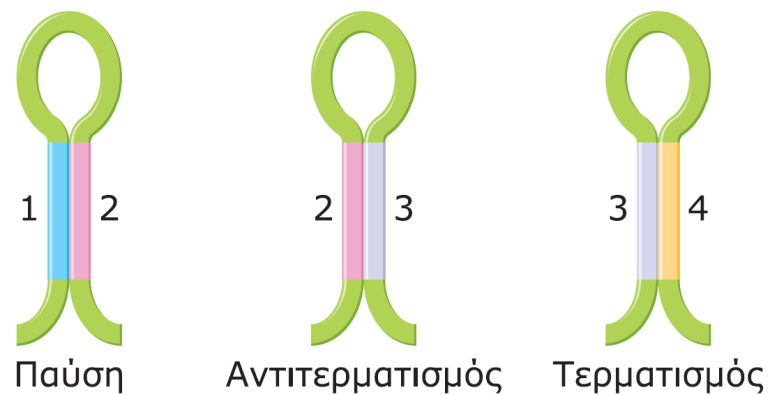
Εικόνα 19.16. Οι τέσσερις περιοχές του οδηγού του mRNA του οπερονίου *trp* και οι εναλλακτικές δευτεροταγείς δομές.

Παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης τρυπτοφάνης

Οργάνωση της περιοχής:



Εναλλακτικές δομές RNA:



Εικόνα 19.17

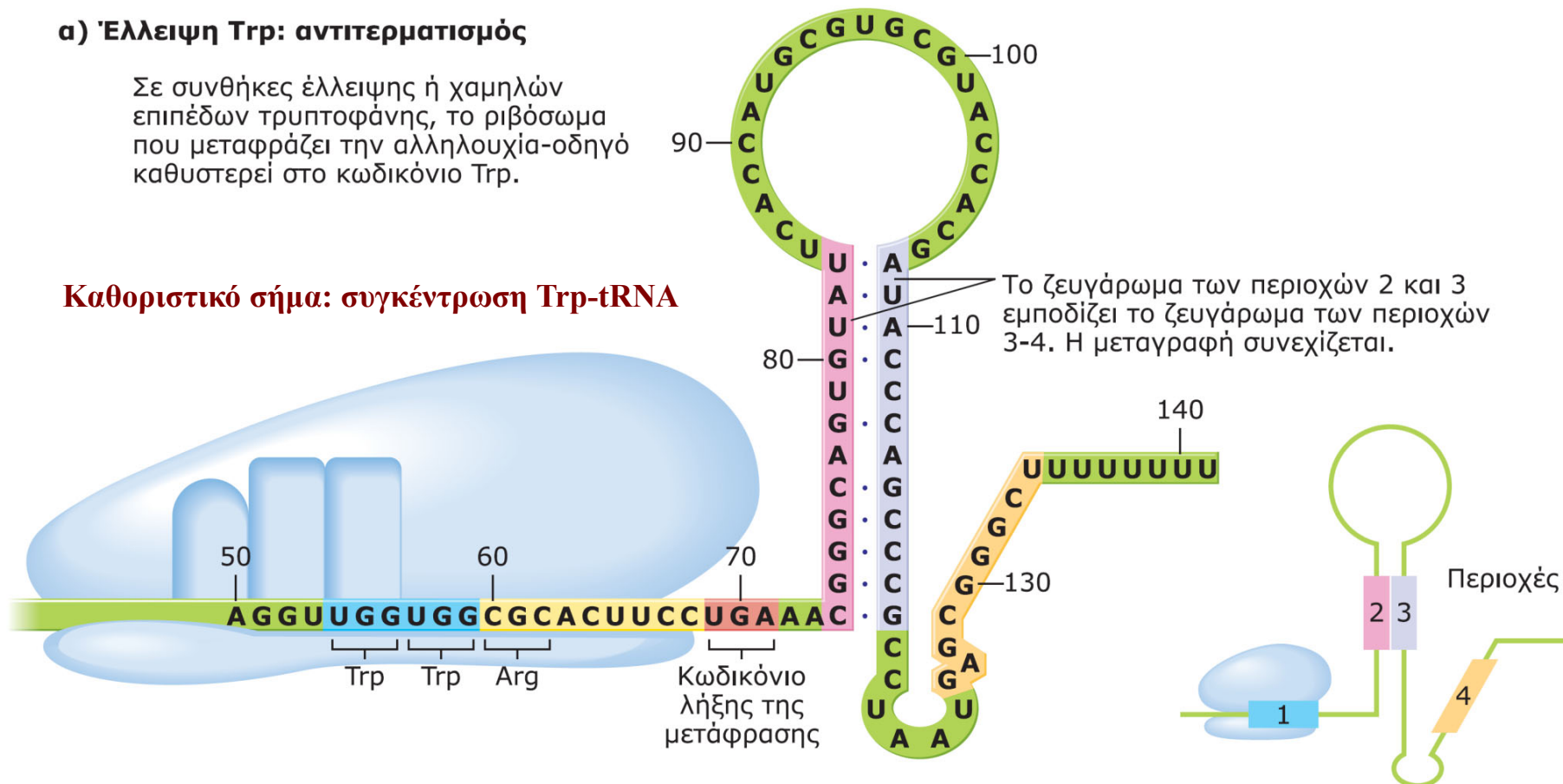
Μοντέλα του μηχανισμού εξασθένησης στο οπερόνιο *trp* της *E. coli*.

Οι δομές με γαλάζιο χρώμα είναι ριβοσώματα που μεταφράζουν την περιοχή-οδηγό του mRNA. (α) Κύτταρα με έλλειψη τρυπτοφάνης. (β) Κύτταρα με υψηλά επίπεδα τρυπτοφάνης.

α) Έλλειψη Trp: αντιτερματισμός

Σε συνθήκες έλλειψης ή χαμηλών επιπέδων τρυπτοφάνης, το ριβόσωμα που μεταφράζει την αλληλουχία-οδηγό καθυστερεί στο κωδικόνιο Trp.

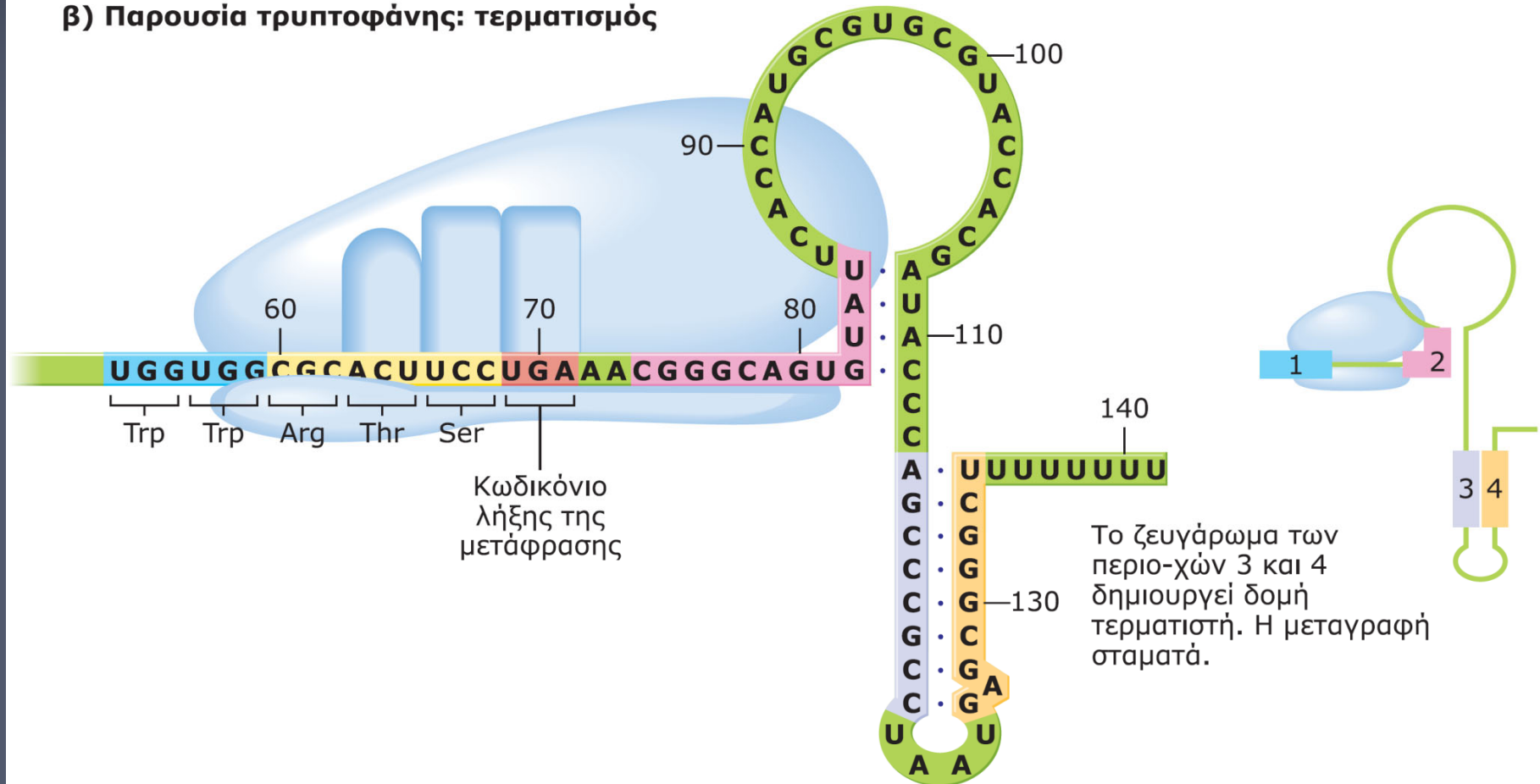
Καθοριστικό σήμα: συγκέντρωση Trp-tRNA



Εικόνα 19.17

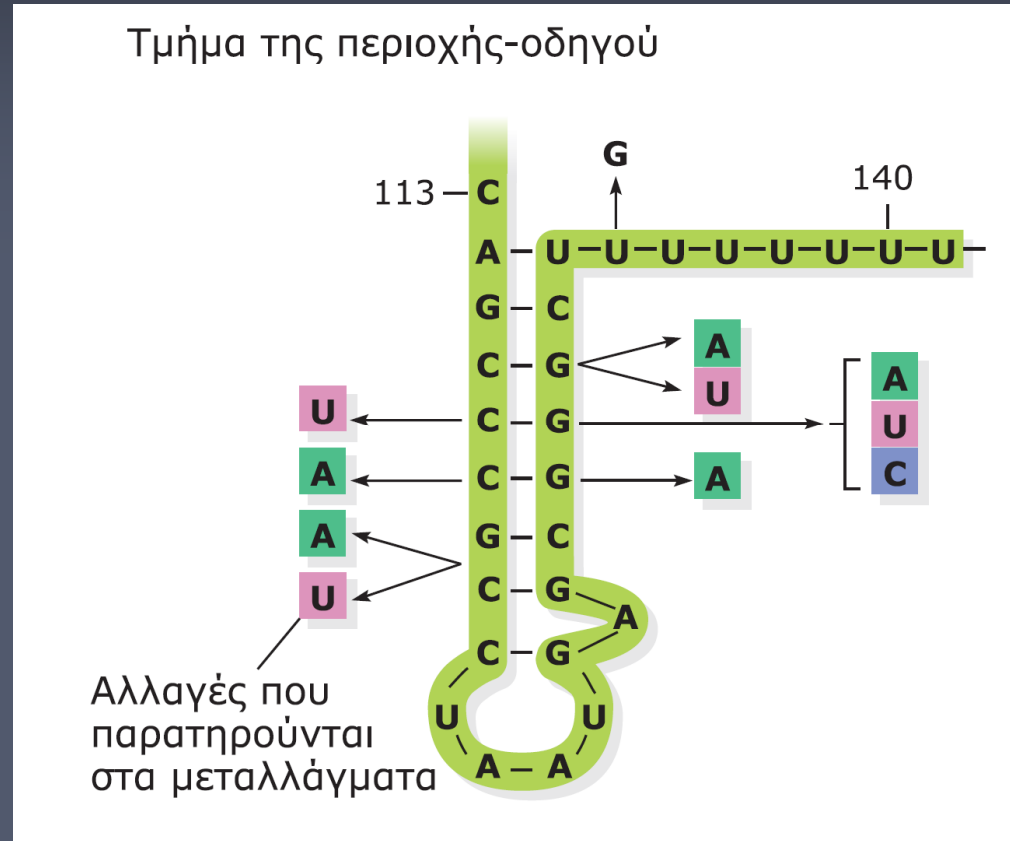
Μοντέλα του μηχανισμού εξασθένησης στο οπερόνιο *trp* της *E. coli*. Οι δομές με γαλάζιο χρώμα είναι ριβοσώματα που μεταφράζουν την περιοχή-οδηγό του mRNA. (β) Κύτταρα με υψηλά επίπεδα τρυπτοφάνης.

β) Παρουσία τρυπτοφάνης: τερματισμός



Εικόνα 19.18

Μεταλλαγές της περιοχής *trpL* που μειώνουν την αποτελεσματικότητα του τερματισμού της μεταγραφής στη θέση του εξασθενητή.
Οι μεταλλαγές χαρτογραφούνται σε περιοχές του DNA που αντιστοιχούν στις περιοχές 3 και 4 του mRNA.



Αν οι μεταλλαγές που αφορούν τις θέσεις των 2 κωδικονίων Trp αλλάξουν για κάποιο άλλο αμινοξύ τότε ο μηχανισμός εξασθένισης ανταποκρίνεται στη συγκέντρωση εκείνου του αμινοξέος.

Εικόνα 19.19

Αμινοξικές αλληλουχίες των πεπτιδίων-οδηγών διαφόρων βακτηριακών οπερονίων που ελέγχονται από το μηχανισμό της εξασθένησης.

Παρουσιάζονται τα πεπτίδια-οδηγοί των οπερονίων *pheA*, *his*, *leu*, *thr* και *ilv* (ισολευκίνη και βαλίνη) της *E. coli* ή της *Salmonella typhimurium*. Τα αμινοξέα των οποίων η συγκέντρωση ρυθμίζει τα αντίστοιχα οπερόνια έχουν σημειωθεί με κίτρινο χρώμα.

pheA: Met – Lys – His – Ile – Pro – **Phe – Phe – Phe** – Ala – **Phe – Phe – Phe** – Thr – Phe – Pro – –
his: Met – Thr – Arg – Val – Gln – Phe – Lys – **His – His – His – His – His – His – His** – Pro – Asp – –
leu: Met – Ser – His – Ile – Val – Arg – Phe – Thr – Gly – **Leu – Leu – Leu – Leu** – Asn – Ala – Phe – Ile –
Val – Arg – Gly – Arg – Pro – Val – Gly – Ile – Gln – His – –
thr: Met – Lys – Arg – Ile – Ser – Thr – Thr – Ile – **Thr – Thr – Thr – Ile – Thr – Ile – Thr – Thr** – Gly –
Asn – Gly – Ala – Gly – –
ilv: Met – Thr – Ala – **Leu – Leu** – Arg – **Val – Ile** – Ser – **Leu – Val – Val – Ile** – Ser – **Val – Val – Val** –
Ile – Ile – Ile – Pro – Pro – Cys – Gly – Ala – Ala – Leu – Gly – Arg – Gly – Lys – Ala – –

Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης στο φάγο λ

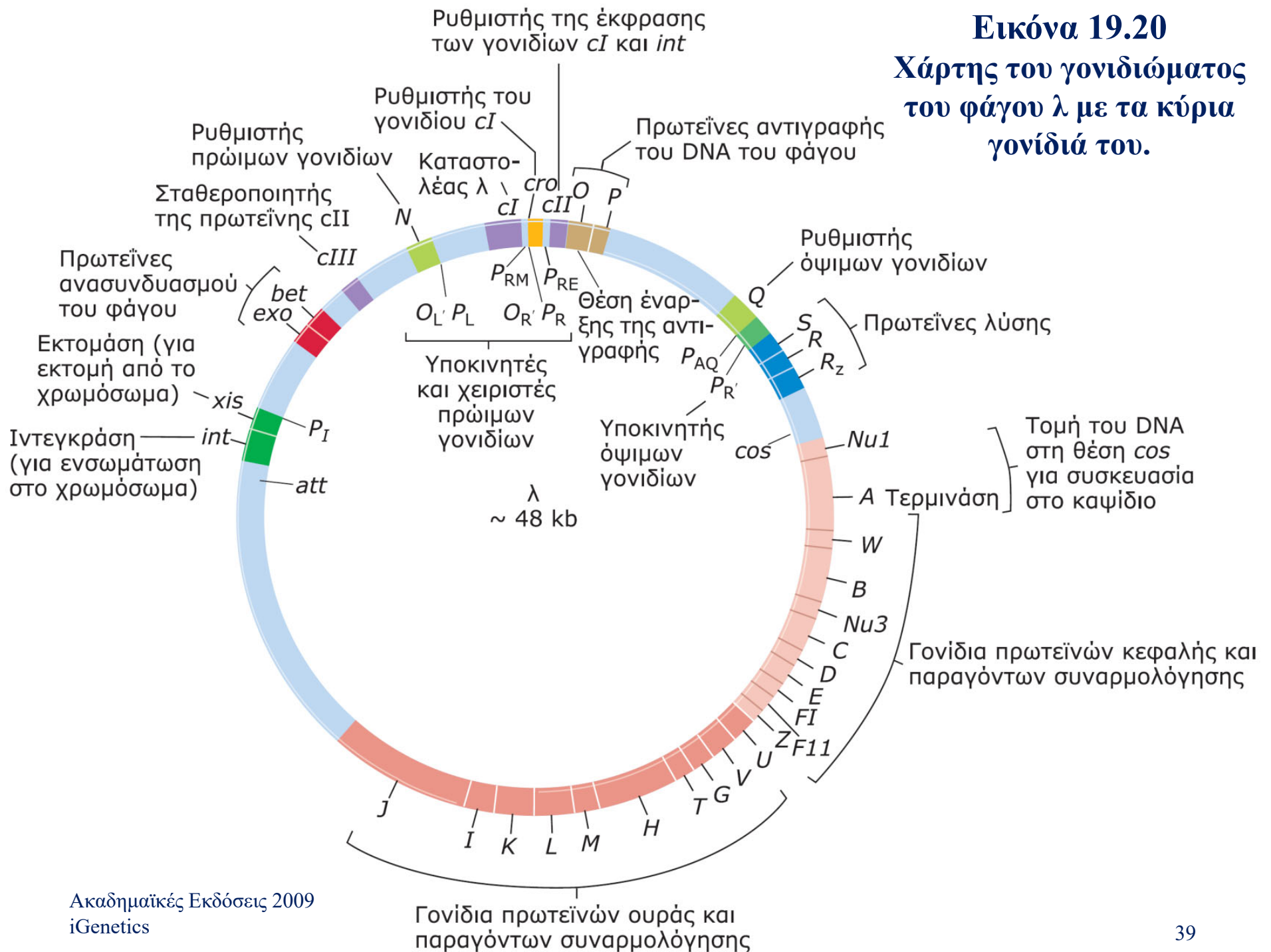
Λυτικός κύκλος: ο φάγος καταλαμβάνει τον έλεγχο του βακτηριακού κυττάρου, συνθέτει τα γονίδια του και παράγει νέους φάγους.

Λυσιγονία: ο φάγος ενσωματώνεται στο βακτηριακό χρωμόσωμα μέχρι να ενεργοποιηθεί.

Μέσα στο μολυσματικό σωματίο, το χρωμόσωμα λ είναι **γραμμικό**. Μόλις βρεθεί μέσα στο κύτταρο-ξενιστή, το χρωμόσωμα λ **κυκλοποιείται**.

Εικόνα 19.20

Χάρτης του γονιδιώματος του φάγου λ με τα κύρια γονίδια του.



Η έκφραση των γονιδίων του φάγου λ μετά τη μόλυνση της *E. coli* και τα στάδια της γονιδιακής έκφρασης στο λυσιγονικό ή στο λυτικό μονοπάτι.

-
- 5' 3' 3' 5'
- int* ... *N* ... *cI* ... *cro* ... *cII* ... *O* ... *P* ... *Q*
- Πρώιμα γονίδια
- P_I
- P_L, O_L
- P_{RM}
- P_R, O_R
- P_{RE}
- $P_{R'}$
- Όψιμα γονίδια
- mRNA
- mRNA

-
- Πρώιμα γονίδια
- Όψιμα γονίδια

- 40

Εικόνα 19.21

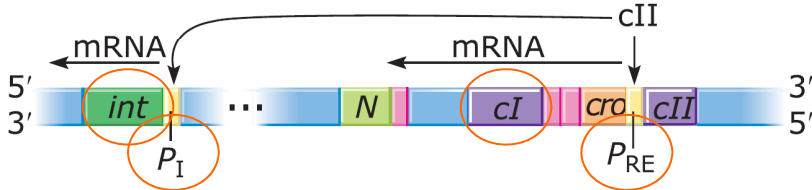
Η έκφραση των γονιδίων του φάγου λ μετά τη μόλυνση της *E. coli* και τα στάδια της γονιδιακής έκφρασης στο λυσιγονικό ή στο λυτικό μονοπάτι.

3 Εναλλακτικά μονοπάτια:

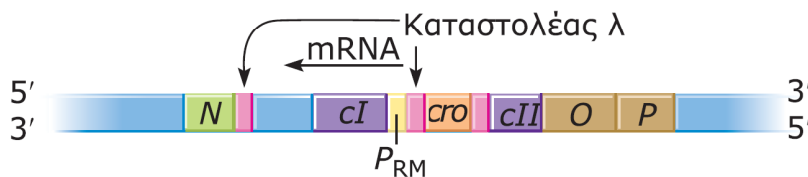
Λυσιγονία: επικρατεί ο καταστολέας λ

Λυτικός κύκλος: επικρατεί ο καταστολέας Cro

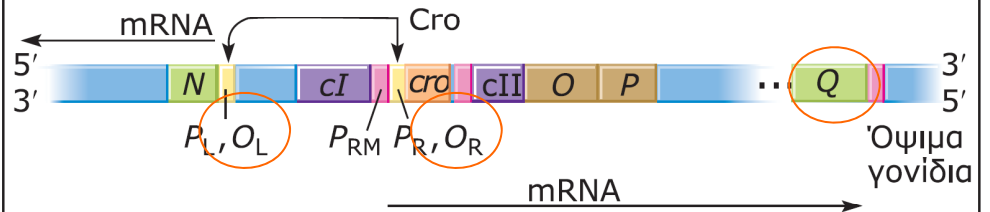
- 4α** Η πρωτεΐνη cII διεγείρει τη μεταγραφή του καταστολέα (γονίδιο *cI*) από τον P_{RE} και της ιντεγκράσης (γονίδιο *int*) από τον P_I .



- 5α** Επαρκής ποσότητα καταστολέα προσδένεται στις περιοχές O_R και O_L , παρεμποδίζοντας τη μεταγραφή. Η πρόσδεση του καταστολέα στην περιοχή O_R διεγείρει τη σύνθεση περισσότερου καταστολέα. Η ιντεγκράση καταλύει την ενσωμάτωση του DNA του φάγου στο βακτηριακό γονιδίωμα. Εγκαθιδρύεται η λυσιγονία.



- 4β** Η πρωτεΐνη Cro καταλαμβάνει τους χειριστές O_R and O_L , παρεμποδίζοντας τη σύνθεση του mRNA του καταστολέα αλλά επιτρέποντας επαρκή μεταγραφή προς τα δεξιά, ώστε να συσσωρευθεί πρωτεΐνη pQ.



- 5β** Η πρωτεΐνη pQ διεγείρει τη μεταγραφή των όψιμων γονιδίων. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν δομικές πρωτεΐνες για τη συσκευασία του DNA σχηματίζοντας νέους φάγους. Ακολουθεί λύση του βακτηρίου.

