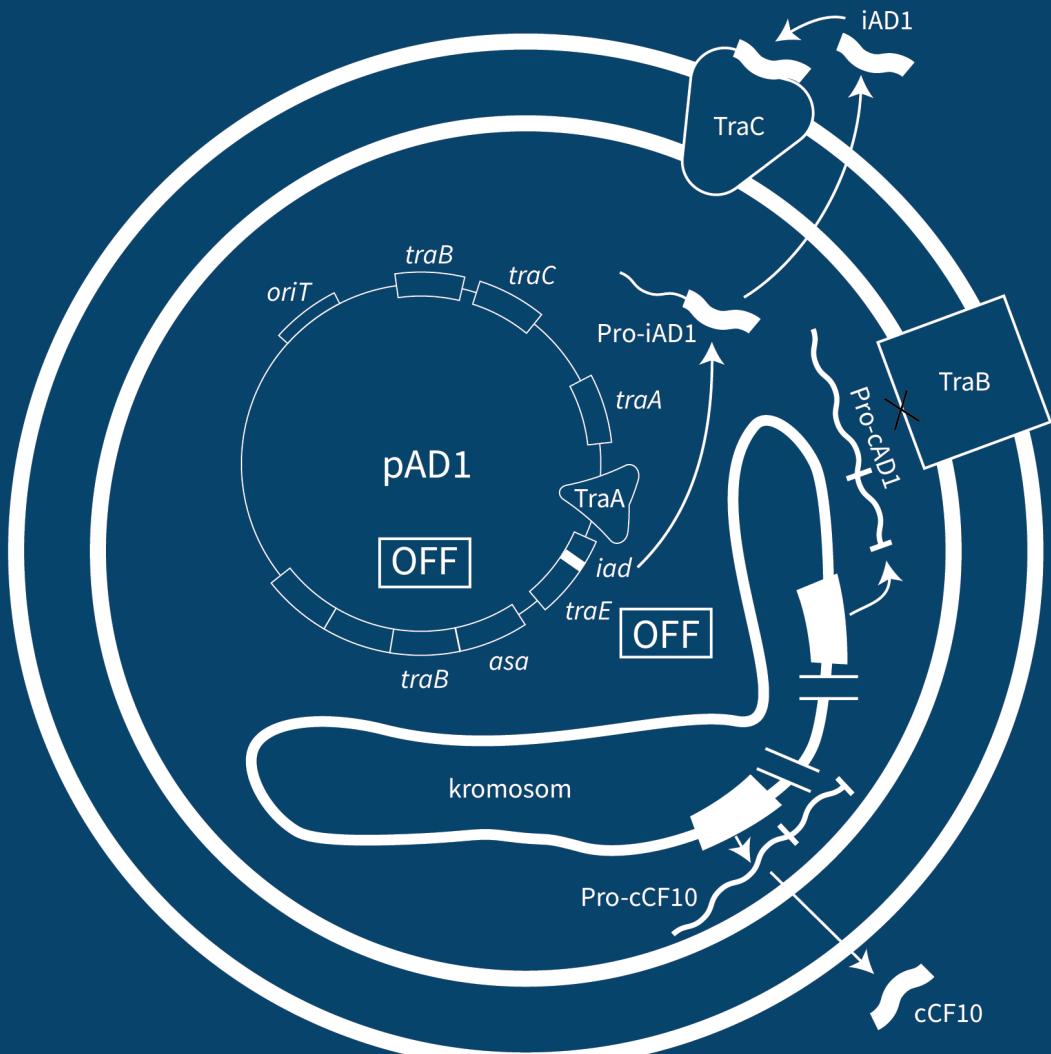


# MIKROBNA GENETIKA

## TEMELJNI KONCEPTI GENETIKE PROKARIOTOV

Uredili: Marjanca STARČIČ ERJAVEC in Jerneja AMBROŽIČ AVGUŠTIN





# MIKROBNA GENETIKA

TEMELJNI KONCEPTI GENETIKE PROKARIOTOV

Uredili: Marjanca STARČIČ ERJAVEC in Jerneja AMBROŽIČ AVGUŠTIN

Ljubljana, 2024

## KOLOFON

Mikrobnega genetika – Temeljni koncepti genetike prokariontov

Urednici: Marjanca Starčič Erjavec in Jerneja Ambrožič Avguštin

Recenzentki: Ines Mandić Mulec in Janja Trček

Lektor: Rok Dovjak

Ilustracije: Žan Zrimšek

Oblikovanje in prelom: Marjanca Starčič Erjavec



To delo je ponujeno pod licenco Creative Commons Priznanje avtorstva - Deljenje pod enakimi pogoji 4.0 Mednarodna licenca.

Založila: Založba Univerze v Ljubljani

Za založbo: Gregor Majdič, rektor Univerze v Ljubljani

Izdala: Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani

Za izdajatelja: Marina Pintar, dekanja Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani

Prva e-izdaja.

Ljubljana, 2024

Publikacija je brezplačna.

Publikacija je nastala v okviru razpisa RSF - interni poziv za projekte s področja uvajanja in razvoja odprtih izobraževalnih virov znotraj pedagoškega procesa.

Publikacija je v formatu pdf dostopna na: <https://ebooks.uni-lj.si>

DOI: 10.14720/9789612972943

Kataložni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v  
Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani

[COBISS.SI-ID 190101763](#)

ISBN 978-961-297-294-3 (PDF)

## PREDGOVOR IN ZAHVALA

Pričujoče učno gradivo za predmet Mikrobna genetika, ki je obvezni predmet v 2. letniku prvostopenjskega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti, je nastal kot rezultat projekta v okviru internega razpisa za projekte s področja uvajanja in razvoja odprtih izobraževalnih virov znotraj pedagoškega procesa (A.II.1). Ker je bil eden izmed pogojev tega razpisa, da so v izvedbo projekta vključeni tudi študentje 1. in/ali 2. stopnje, sva urednici k pisanju učbenika povabili študente, ki so predmet Mikrobna genetika poslušali v predhodnih študijskih letih. Učno gradivo je nastalo tako, da so študentje po svojih zapiskih s predavanj pri predmetu in po gradivu, dostopnem v spletni učilnici, napisali osnutek posameznih poglavij, ki so si jih izbrali. Osnutke poglavij sva urednici nato pregledali, popravili in uredili. Ker je z učnim načrtom predpisano študijsko gradivo učbenik Tine M. Henkin in Josepha E. Petersa *Snyder & Champness Molecular Genetics of Bacteria* iz leta 2020, ki je študentom na razpolago v knjižnici Biotehniške fakultete, sva se odločili, da za slikovno gradivo iz njega povzamemo in priredimo večino slik. Slike je avtorsko narisal prav tako študent mikrobiologije, ki je poslušal predavanja pri tem predmetu.

Urednici se vsem sodelujočim študentom iskreno zahvaljujeva za pogum pristopiti k tovrstnemu izzivu in za vse opravljeno delo. Izkreno se zahvaljujeva tudi obema recenzentkama in lektorju za hiter pregled in vse pripombe, popravke in napotke.

Vnaprej se opravičujeva za vse morebitne napake, ki jih boste – kljub skrbnemu pregledu, ki smo ga opravile urednici in obe recenzentki –, študentje prihodnjih generacij opazili ob uporabi tega učnega gradiva. Za vse vaše pripombe in predloge, ki bi prispevali k izboljšanju tega gradiva, se tako toplo priporočava.

doc. dr. Jerneja Ambrožič Avguštin

prof. dr. Marjanca Starčič Erjavec

V Ljubljani, 25. 3. 2024

# KAZALO VSEBINE

<b>PREDGOVOR IN ZAHVALA .....</b>	<b>1</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>2</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>8</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>12</b>
<b>1 KROMATIN.....</b>	<b>13</b>
UČNI CILJI.....	13
UVOD .....	13
Kromatin v bakterijski celici.....	13
NAP – z nukleoidom povezani proteini .....	14
Kromatin v celicah arhej.....	16
TEMELJNI POJMI .....	16
POVZETEK .....	16
<b>2 PODVOJEVANJE KROMOSOMSKE DNA .....</b>	<b>18</b>
UČNI CILJI.....	18
UVOD .....	18
Princip podvojevanja kromosomske DNA .....	18
Bakterijske polimeraze DNA.....	20
Odpravljanje napak, nastalih pri sintezi DNA .....	22
Problem podvojevanja koncev linearnih molekul DNA.....	24
Podvojevanje DNA pri arhejah .....	24
Podvojevanje bakterijskega kromosoma .....	25
Segregacija kromosomov .....	27
Razrešitev dimerov .....	27
Dekatenacija .....	28
Kondenzacija kromosoma .....	29
Particija kromosoma in citokineza .....	29
Uravnavanje začetka podvojevanja.....	30
TEMELJNI POJMI .....	31
POVZETEK .....	31
<b>3 PREPISOVANJE DNA V RNA – TRANSKRIPCIJA.....</b>	<b>32</b>
UČNI CILJI.....	32
UVOD .....	32
Geni so definirani odseki DNA, ki se prepišejo v RNA .....	32
RNA-polimeraza omogoča prepisovanje DNA v RNA .....	33
Potek prepisovanja pri bakterijah .....	35
Prepisovanje pri arhejah.....	36
Molekule RNA.....	36
Prenašalna RNA (tRNA) .....	36
Ribosomska RNA (rRNA).....	37
Druge molekule RNA .....	38
Razgradnja molekul RNA .....	38
TEMELJNI POJMI .....	39
POVZETEK .....	39
<b>4 PREVAJANJE mRNA V PROTEINE – TRANSLACIJA .....</b>	<b>40</b>
UČNI CILJI.....	40
UVOD .....	40

Aminoacilacija oz. vezava aminokisline na tRNA.....	40
Regija iniciacije translacije.....	41
Iniciacija prevajanja .....	42
Elongacija prevajanja.....	43
Terminacija prevajanja .....	44
Posebnosti izražanja genov prokariontov .....	45
Genetski kod in prevajanje genetske informacije .....	46
Regulacija sinteze ribosomov in tRNA.....	46
TEMELJNI POJMI .....	50
POVZETEK .....	50
<b>5 MUTACIJE IN REKOMBINACIJE.....</b>	<b>51</b>
UČNI CILJI.....	51
UVOD .....	51
Mutante.....	51
Zamenjave baznih parov (substitucije).....	52
Premiki bralnega okvira.....	52
Izbrisni (delecije).....	53
Tandemske podvojitve (duplicacije).....	54
Obrnitve (inverzije).....	54
Vstavitve (insercije) .....	55
Rekombinacija .....	55
TEMELJNI POJMI .....	60
POVZETEK .....	60
<b>6 PLAZMIDI .....</b>	<b>61</b>
UČNI CILJI.....	61
UVOD .....	61
Podvojevanje plazmidne DNA .....	61
Podvojevanje theta ( $\theta$ ) .....	61
Podvojevanje na način kotalečega se kroga – podvojevanje RC.....	61
Podvojevanje linearnih molekul DNA.....	62
Pomembne lastnosti plazmidov so odvisne od njihove regije <i>ori</i> .....	63
Gostiteljsko območje plazmida .....	63
Število kopij plazmida v celici .....	64
Inkompatibilnost .....	64
Sistemi za porazdelitev (particijo) plazmidov v hčerinski celici – sistemi Par .....	64
Uravnavanje podvojevanja plazmidne DNA .....	65
Uravnavanje podvojevanja plazmidne DNA s protismerno RNA .....	65
Uravnavanje podvojevanja plazmidne DNA z iteroni .....	68
Dejavniki gostiteljske bakterije, ki sodelujejo pri uravnavanju podvojevanja .....	69
Mehanizmi za preprečevanje izgube plazmidov .....	69
Mehanizmi za ločitev multimernih plazmidov .....	69
Sistemi toksin-antitoksin .....	71
TEMELJNI POJMI .....	72
POVZETEK .....	72
<b>7 KONJUGACIJA.....</b>	<b>73</b>
UČNI CILJI.....	73
UVOD .....	73
Zgodovina konjugacije .....	73

Konjugacija pri po Gramu negativnih bakterijah .....	74
Sistem Mpf .....	75
Sistem Dtr .....	75
Prenos sicer nekonjugativnih plazmidov z <i>oriT</i> .....	76
Bakteriofagi, specifični za celice F+ .....	76
Sekrecijski sistem tipa IV .....	76
Konjugacija v laboratoriju in naravi .....	77
Sevi Hfr .....	77
Sevi F' .....	77
Konjugacija pri sevih Hfr – Hfr-konjugacija .....	77
Kartiranje kromosomov s sevi Hfr .....	77
URAVNAVANJE KONJUGACIJE PRI PO GRAMU NEGATIVNIH BAKTERIJAH .....	78
Uravnavanje konjugacije plazmida F .....	78
KONJUGACIJA PRI PO GRAMU POZITIVNIH BAKTERIJAH .....	79
TEMELJNI POJMI .....	82
POVZETEK .....	82
<b>8 TRANSPOZICIJSKI ELEMENTI, INTEGRONI, GENOMSKI OTOKI IN KONJUGATIVNI TRANSPOZONI .....</b>	<b>83</b>
UČNI CILJI .....	83
UVOD .....	83
Splošno o transpoziciji .....	83
Delitev transpozicijskih elementov .....	83
Splošne lastnosti transpozicijskih elementov .....	84
Insercijska zaporedja .....	86
Sestavljeni transpozoni .....	86
Nesestavljeni transpozoni .....	86
Prenos transpozicijskega elementa – transpozicija .....	87
Nereplikativna transpozicija .....	87
Replikativna transpozicija .....	89
Integroni .....	90
Genske kasete in njihovo vstavljanje v integron .....	90
Delitev integronov .....	90
Integroni omogočajo adaptacijo bakterij na različna okolja .....	90
Mestnospecifične rekombinaze .....	91
Tirozinske (Y) in serinske (S) rekombinaze .....	91
Genomski otoki .....	92
Otoki patogenosti .....	92
Konjugativni transpozoni .....	92
TEMELJNI POJMI .....	93
POVZETEK .....	94
<b>9 TRANSFORMACIJA .....</b>	<b>95</b>
UČNI CILJI .....	95
UVOD .....	95
Oblike transformacije .....	95
Transformacija pri po Gramu pozitivnih bakterijah .....	95
Transformacija pri po Gramu negativnih bakterijah .....	96
Transformacija pri bakteriji <i>Neisseria gonorrhoeae</i> .....	97
Transformacija pri bakteriji <i>Haemophilus influenzae</i> .....	98
Transformacija pri bakteriji <i>Helicobacter pylori</i> .....	98

Uravnavanje kompetence bakterije <i>Bacillus subtilis</i> .....	99
Vzpostavitev in uravnavanje kompetence pri bakteriji <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	100
Pomen naravne transformacije .....	101
Prehrana – DNA kot nutrient.....	101
Popravljanje DNA.....	101
Vključitev novih genskih informacij – rekombinacija .....	101
Umetna transformacija .....	102
TEMELJNI POJMI .....	102
POVZETEK .....	103
<b>10 BAKTERIOFAGI IN TRANSDUKCIJA .....</b>	<b>104</b>
UČNI CILJI.....	104
UVOD .....	104
Razvrstitev v družine .....	104
Uravnavanje izražanja fagnih genov v litičnem ciklu pomnoževanja .....	105
Primeri regulatornih kaskad različnih fagov.....	106
Fag N4.....	106
Fag SPO1.....	106
Fag T7 .....	106
Fag T4 .....	107
Primeri pomnoževanja in pakiranja fagne DNA v kapsido .....	108
Fagi z enoverižno krožno DNA.....	108
Fagi z dvoverižno krožno DNA .....	110
Fagi z linearnim genomom .....	111
Fagi z enoverižno RNA .....	113
Drugi zanimivi fagi .....	113
Bakteriofag λ.....	114
Življenski cikel .....	114
Vzpostavitev lizogenije .....	116
Integracija faga λ v bakterijski kromosom.....	118
Imunost za superinfekcijo .....	119
Vzpostavitev litičnega cikla.....	119
Delovanje antiterminatorjev N in Q .....	120
TRANSDUKCIJA .....	122
Splošna transdukacija .....	122
Specializirana transdukacija .....	122
Lateralna transdukacija .....	123
Lizogena konverzija .....	123
<i>Escherichia coli</i> .....	123
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> .....	124
<i>Staphylococcus aureus</i> .....	124
TEMELJNI POJMI .....	124
POVZETEK .....	124
<b>11 OBRAMBA BAKTERIJ PRED BAKTERIOFAGI .....</b>	<b>126</b>
UČNI CILJI.....	126
UVOD .....	126
Restriktionsko-modifikacijski sistemi .....	126
Sistem Abi .....	126
Obrambne molekule.....	127

Sistemi CRISPR/Cas .....	127
Sistemi CRISPR/Cas razreda 1 .....	128
Sistemi CRISPR/Cas razreda 2 .....	129
TEMELJNI POJMI .....	130
POVZETEK .....	130
<b>12 URAVNAVANJE IZRAŽANJA GENOV PRI BAKTERIJAH.....</b>	<b>131</b>
UČNI CILJI.....	131
UVOD .....	131
Ravni uravnavanja izražanja genov .....	131
Uravnavanje izražanja genov na ravni strukture kromatina .....	131
Uravnavanje izražanja genov na ravni transkripcije.....	131
Pozitivno in negativno uravnavanje na ravni prepisovanja.....	131
Negativno uravnavanje izražanja genov.....	132
Pozitivno uravnavanje izražanja genov .....	137
Uravnavanje izražanja genov s transkripcijsko atenuacijo.....	140
RNA-stikala .....	143
Procesivna antiterminacija .....	144
Uravnavanje na ravni obstojnosti mRNA .....	145
Uravnavanje na ravni translacije .....	146
RNA-termosenzorji .....	146
Uravnavanje na ravni posttranslacijskih modifikacij .....	146
Uravnavanje aktivnosti RpoS z adapterji in antiadapterji .....	147
TEMELJNI POJMI .....	147
POVZETEK .....	148
<b>13 GLOBALNO URAVNAVANJE IZRAŽANJA GENOV .....</b>	<b>149</b>
UČNI CILJI.....	149
UVOD .....	149
Katabolna regulacija .....	150
Od cAMP odvisna katabolna regulacija – uravnavanje s CAP-cAMP .....	151
Katabolna regulacija s Cra .....	152
Katabolna regulacija pri <i>B. subtilis</i> .....	153
Uravnavanje asimilacije dušika .....	155
Sistem Ntr .....	155
Transkripcijski aktivator NtrC .....	156
Transkripcija operona <i>glnA-ntrB-ntrC</i> .....	158
Faktor $\sigma^N$ – gen <i>rpoN</i> .....	158
<i>Bacillus subtilis</i> – uravnavanje z GltC in CodY .....	159
Splošni odziv na stres pri po Gramu negativnih bakterijah.....	159
Splošni odziv na stres pri po Gramu pozitivnih bakterijah .....	160
Uravnavanje sporulacije .....	161
Fosforilacijska kaskada Spo0 .....	163
Povezava med kompetenco in sporulacijo .....	163
Časovno in prostorsko uravnavanje sporulacije.....	164
Toplotni šok .....	165
Toplotni šok pri drugih bakterijah .....	166
Odziv na stres ovojnice .....	167
Uravnavanje prevajanja <i>ompF</i> s protismerno RNA .....	167
Dvokomponentni sistem CpxA-CpxR .....	168
Zunajcitoplazemski faktor $\sigma^E$ .....	168

Uravnavanje, vezano na železo .....	169
Regulon Fur in uravnavanje z represorjem Fur .....	169
Regulon Fur in uravnavanje s sRNA RyhB.....	170
TEMELJNI POJMI .....	170
POVZETEK .....	171
<b>VIRI .....</b>	<b>172</b>

## KAZALO SLIK

Slika 1-1: Organizacija kromosoma <i>E. coli</i> med rastjo. Izražanje in koncentracija proteinov NAP vpliva na tesnost pakiranja DNA in različne celične procese, vključno z uravnavanjem izražanja genov.	14
Slika 1-2: Spremembe koncentracije proteinov NAP med bakterijsko rastjo.	15
Slika 2-1: DNA-polimeraza dodaja deoksiribonukleotide glede na matrično DNA.	18
Slika 2-2: Primaza sintetizira začetni RNA-oligonukleotid.	19
Slika 2-3: Shematski prikaz zgradbe holoencima DNA-polimeraze III pri bakteriji <i>E. coli</i> .	21
Slika 2-4: Vstavitev nukleotida z nepravilno tautomerno obliko dušikove baze vodi v nepravilno parjenje in končno spremenjen bazni par pri sintezi DNA.	22
Slika 2-5: Mehanizem kontrolnega branja DNA-polimeraze.	23
Slika 2-6: Sistem za popravljanje neujemanja.	23
Slika 2-7: Brez delovanja telomeraze je novonastala veriga krajsa od matrične verige.	24
Slika 2-8: Primerjava podvojevanja molekule DNA pri bakterijah, arhejah in prokariotih.	25
Slika 2-9: Mesto začetka podvojevanja na molekuli DNA arhej sestavlja mesta ORB, ki obdajajo mesto DUE.	25
Slika 2-10: Zgradba mesta začetka podvojevanja <i>oriC</i> . Označena so tudi zaporedja GATC.	26
Slika 2-11: Začetek podvojevanja bakterijskega kromosoma na <i>oriC</i> .	26
Slika 2-12: Zaključek podvojevanja bakterijskega kromosoma.	27
Slika 2-13: Razrešitev dimerov kromosoma s sistemom Xer med translokacijo kromosoma v novo celico.	28
Slika 2-14: Dekatenacija.	29
Slika 2-15: Podvojevalni čas (generacijski čas) <i>E. coli</i> je odvisen od sestave gojišča.	30
Slika 3-1: Prikaz transkripcijske enote in nastale prepisane molekule.	33
Slika 3-2: Značilna zgradba bakterijskega promotorja sigma 70 ( $\sigma^{70}$ )	34
Slika 3-3: Ob pridružitvi faktorja $\sigma$ osrednjemu delu encima dobimo holoencim, ki prepisuje DNA.	34
Slika 3-4: Funkcionalne regije bakterijske RNA-polimeraze.	35
Slika 3-5: Prikaz procesiranja prekurzorske (izhodiščne) tRNA.	37
Slika 3-6: Procesiranje izhodiščnega prepisa za ribosomske RNA.	38
Slika 4-1: Zgradba ribosoma.	40
Slika 4-2: Potek vezave aminokisline na tRNA.	41
Slika 4-3: Regija iniciacije translacije mRNA (RDS).	41
Slika 4-4: Potek začetka prevajanja.	42
Slika 4-5: Potek elongacije.	43
Slika 4-6: Terminacija prevajanja.	44
Slika 4-7: Terminacija prevajanja s tmRNA.	45
Slika 4-8: Nespecifično parjenje tretjega mesta kodona s prvim mestom antikodona.	46
Slika 4-9: Promotorsko-operatorska regija operona za rRNA.	47
Slika 4-10: Sinteza ribosomskih beljakovin in rRNA je usklajena – primer uravnavanja s proteinom L1.	47
Slika 4-11: Nastanek pppGpp.	48
Slika 4-12: Odziv na neugodne razmere.	48
Slika 4-13: Encimski aktivnosti proteinov RelA in SpoT.	49
Slika 4-14: Protein DksA na promotorskih regijah za gene biosinteze aminokislin ima stimulativen učinek (A), a na operonih za rRNA dodatno inhibira prepisovanje (B).	49
Slika 5-1: Mutante – revertante – supresorske mutante..	51
Slika 5-2: Zamenjave baznih parov lahko privedejo do tranzicije ali transverzije.	52
Slika 5-3: S premikom bralnega okvira, ki se pogosto dogodi zaradi zdrsa DNA-polimeraze na zaporedjih kratkih ponovitev (levo), se prevede popolnoma drugačno zaporedje aminokislin (desno).	53
Slika 5-4: Delecije nastanejo zaradi rekombinacije.	53
Slika 5-5: Tandemske duplikacije so posledice rekombinacije na istosmernih ponovitvah.	54
Slika 5-6: Rekombinacija dveh obrnjenih ponovitev je vzrok za nastanek obrnitve.....	54

Slika 5-7: Zaradi rekombinacije imata verigi DNA fizično izmenjane odseke. ....	55
Slika 5-8: Celica s homologno rekombinacijo reši zaplete zaradi prelomov pri podvojevanju DNA. ....	56
Slika 5-9: Delovanje sistema RecBCD (levo) in sistema RecF (desno) pri <i>E. coli</i> . ....	56
Slika 5-10: Dve molekuli DNA s homolognim zaporedjem si lahko izmenjata DNA. ....	57
Slika 5-11: Sistem RuvABC. ....	58
Slika 5-12: Odziv SOS. ....	59
Slika 5-13: Bakteriofag $\lambda$ se v kromosom gostiteljske celice vključi z mestnospecifično rekombinacijo <i>attP</i> in <i>attB</i> . ....	59
Slika 6-1: Podvojevanje plazmida na način kotalečega se kroga. ....	62
Slika 6-2: Podvojevanje lineranih molekul DNA pri bakteriji <i>Borellia burgdorferi</i> . ....	63
Slika 6-3: Sistem Par plazmida pR1 (levo) ter plazmidov F, RK2 in faga P1 (desno). ....	65
Slika 6-4: Mehanizem uravnavanja podvojevanja izpeljank plazmida ColE1. ....	66
Slika 6-5: Organizacija genov, zaporedja <i>oriV</i> , smer prepisovanja in genski produkti, povezani s podvojevanjem plazmida R1. ....	67
Slika 6-6: Prepis genov za protein RepA, ki omogoči podvojevanje plazmidne DNA, iz dveh promotorjev po vstopu v celico. ....	68
Slika 6-7: Prepisana CopA RNA uravnava podvojevanje plazmida R1 z inhibicijo translacije mRNA za RepA. ....	68
Slika 6-8: Regija <i>ori</i> plazmida pSC101, povezana z uravnavanjem podvojevanja. ....	69
Slika 6-9: Razdvojitev dimerov plazmida ColE1 s sistemom XerC/D gostiteljske bakterije <i>E. coli</i> . ....	70
Slika 7-1: Preprosta shema konjugacije, ko plazmid ni vključen v kromosom. ....	73
Slika 7-2: Konjugativni prenos plazmida. ....	75
Slika 7-3: Kartiranje kromosoma s sevom Hfr. ....	78
Slika 7-4: Uravnavanje konjugacijskega prenosa plazmida F. ....	79
Slika 7-5: Recipientska celica v okolje sprošča feromone (levo). ....	80
Slika 7-6: Neinducirana donorska celica (levo zgoraj). ....	81
Slika 8-1: Struktura DNA-transpozicijskega elementa. ....	84
Slika 8-2: Nastanek istosmernih ponovitev tarčnega zaporedja zaradi vstavitve transpozicijskega elementa. ....	85
Slika 8-3: Primer sestavljenega transpozona. ....	86
Slika 8-4: Nastanek sestavljenega transpozona. ....	86
Slika 8-5: Transpozon Tn3, ki ima poleg zapisov za transpozazo in resolvazo tudi zapis za odpornost proti betalaktamskim antibiotikom. ....	87
Slika 8-6: Nereplikativna transpozicija Tn5. ....	88
Slika 8-7: Proces homologne rekombinacije popravi prelom v donorski DNA, zaradi izreza transpozona pri nereplikativni transpoziciji. ....	88
Slika 8-8: Replikativna transpozicija Tn3. ....	89
Slika 8-9: Struktura integrona. ....	90
Slika 8-10: Integrativni konjugativni element Tn916, ki ima zapis za odpornost proti tetraciklinu (gen <i>tetM</i> ). ....	92
Slika 8-11: Medcelična konjugativna transpozicija Tn916. ....	93
Slika 9-1: Transformacija pri <i>B. subtilis</i> . ....	96
Slika 9-2: Transformacija pri <i>N. gonorrhoeae</i> . ....	97
Slika 9-3: Transformacija pri <i>H. influenzae</i> . ....	98
Slika 9-4: Transformacija pri <i>H. pylori</i> . ....	99
Slika 9-5: Uravnavanje kompetence z dvokomponentnim sistemom ComP-ComA. ....	99
Slika 9-6: Vzpostavitev in uravnavanje kompetence pri <i>S. pneumoniae</i> . ....	100
Slika 9-7: Prehod DNA skozi membrano ob električnem sunku. ....	102
Slika 10-1: Shema regulatorne kaskade fagnih genov. ....	105
Slika 10-2: Shema regulatorne kaskade pri fagu SPO1. ....	106
Slika 10-3: Filamentozni fag M13. ....	108

Slika 10-4: Podvojevanje genoma pri fagu M13.....	109
Slika 10-5: Primer okužbe bakterijske celice s fagom f1 in pakiranja njegovega genoma v kapsido.....	110
Slika 10-6: Podvojevanje genoma faga $\lambda$ .....	111
Slika 10-7: Podvojevanje genoma pri fagu T7.....	112
Slika 10-8: Značilni konci genomov faga T4.....	113
Slika 10-9: Bakteriofag $\lambda$ .....	114
Slika 10-10: Cirkularizacija linearnega genoma faga $\lambda$ .....	114
Slika 10-11: Življenjski cikel faga $\lambda$ .....	115
Slika 10-12: Linearni genom faga $\lambda$ .....	115
Slika 10-13: Takošnji zgodnji geni faga $\lambda$ .....	116
Slika 10-14: Zapozneli zgodnji geni faga $\lambda$ .....	116
Slika 10-15: Prepisovanje s promotorjev $p_{RE}$ (levo) in $p_{RM}$ (desno).....	117
Slika 10-16: Vezavna mesta na operatorjih OL in OR.....	117
Slika 10-17: Delovanje represorja glede na koncentracijo v celici.....	118
Slika 10-18: Regulator CII omogoči tudi transkripcijo s promotorja $P_i$ .....	118
Slika 10-19: Integracija faga $\lambda$ v bakterijski kromosom.....	119
Slika 10-20: Indukcija profaga $\lambda$ .....	120
Slika 10-21: Antiterminacijski kompleks s proteinom N (levo) in Q (desno).....	121
Slika 10-22: V fagno kapsido se lahko po naključju vnese del gostiteljskega kromosoma z zaporedjem psevdo-pac, ki ga prepozna fagna terminaza.....	122
Slika 10-23: Specializirana transdukcija.....	123
Slika 10-24: Lateralna transdukcija.....	123
Slika 11-1: Skupne značilnosti različnih sistemov CRISPR/Cas.....	127
Slika 11-2: Sistemi CRISPR/Cas.....	127
Slika 11-3: Vključitev novega vmesnika v zaporedje CRISPR.....	128
Slika 11-4: Vezava tracrRNA s tarčno DNA pri sistemu CRISPR/Cas tipa 2.....	129
Slika 12-1: Podrobnejši prikaz delovanja operona lac.....	133
Slika 12-2: Lega operatorjev $o_1$ , $o_2$ in $o_3$ (A) ter upogibanje DNA v promotorski regiji z vezavo tetramera LacI (B).....	134
Slika 12-3: Podrobnejši prikaz položaja obeh promotorjev in operatorjev operona gal (A) ter represosoma (B).....	135
Slika 12-4: Uravnavanje operona gal z vezavo represorja GalR na operatorja, utišanje prepisovanja s promotorja $p_{G2}$ s katabolno represijo.....	136
Slika 12-5: Zgradba in uravnava triptofanskega operona, glede na razpoložljivost triptofana.....	136
Slika 12-6: Zgradba operona ara.....	137
Slika 12-7: AraC je lahko v dveh oblikah, P1 in P2.....	138
Slika 12-8: Vloga AraC pri uravnavanju prepisovanja genov promotorjev $p_{BAD}$ in $p_c$ , če L-arabinoze ni na razpolago (A) in če je arabinoza na razpolago (B).....	138
Slika 12-9: Uravnavanje izražanja operona fab s FadR.....	139
Slika 12-10: Uravnavanje izražanja operona fad s FadR.....	140
Slika 12-11: Struktura 5' UTR-regije operona trp, v kateri je tudi zapis za vodilni peptid (A).....	141
Slika 12-12: Transkripcijska atenuacija operona trp pri <i>B. subtilis</i> z RNA-vezavnim proteinom TRAP.....	142
Slika 12-13: Transkripcijska atenuacija operona bgl pri <i>E. coli</i> z RNA-vezavnim proteinom BglG.....	142
Slika 12-14: Delovanje RNA-stikala.....	143
Slika 12-15: Kadar je aktivirani vitamin B <sub>12</sub> razpoložljiv, se veže v RNA-stikalo in stabilizira sekundarno strukturo, ki zakrije mesto za vezavo ribosoma.....	144
Slika 12-16: Če vitamina B <sub>12</sub> ni na razpolago, RNA-stikalo zavzame sekundarno strukturo, ki omogoča vezavo ribosoma in prevajanje mRNA steče.....	144
Slika 12-17: Uravnavanje razgradnje gena glmS na mRNA z RNA-stikalom, ki deluje kot ribocim.....	145

Slika 12-18: Uravnavanje gena <i>rpoH</i> pri <i>E. coli</i> ob pomoči RNA-termosenzorja. ....	146
Slika 12-19: Uravnavanje razgradnje RpoS z adapterji in antiadapterji.....	147
Slika 13-1: Aktivacija promotorjev tipov I in II sCAP.....	151
Slika 13-2: Pri katabolni regulaciji, ki ni odvisna od cAMP, sodeluje protein Cra.....	153
Slika 13-3: CcpA bakterije <i>B. subtilis</i> deluje kot transkripcijski represor, kadar je mesto <i>cre</i> navzdol od promotorjem ali pa se z njim prekriva (A), in kot transkripcijski aktivator, kadar je mesto <i>cre</i> navzgor od promotorja (B).....	153
Slika 13-4: Katabolna regulacija pri <i>B. subtilis</i> . ....	154
Slika 13-5: Sistem Ntr. ....	156
Slika 13-6: NtrC in njegovo delovanje.....	157
Slika 13-7: Operon <i>glnA-ntrB-ntrC</i> . ....	158
Slika 13-8: Domene $\sigma^N$ (A).. ....	158
Slika 13-9: Molekula sRNA DsrA v vlogi pozitivnega regulatorja izražanja gena <i>rpoS</i> in negativnega regulatorja izražanja gena <i>hns</i> : sRNA DsrA se z različnima predeloma veže na mRNA <i>rpoS</i> in mRNA <i>hns</i> . 160	160
Slika 13-10: RNAP s $\sigma^{70}$ , ki tvori odprti kompleks, in RNAP s $\sigma^{70}$ , vezana na 6 S RNA.....	160
Slika 13-11: Odziv na stres pri po Gramu pozitivnih bakterijah poteka preko proteinov stressosoma in signalne kaskade.....	161
Slika 13-12: Stopnje sporulacije in najpomembnejši geni. ....	162
Slika 13-13: Fosforilacijska kaskada Spo0 in njegov učinek. ....	163
Slika 13-14: Povezava med kompetenco in sporulacijo pri <i>B. subtilis</i> . ....	164
Slika 13-15: Aktivnost različnih faktorjev $\sigma$ in komunikacija med materinsko celico in predsporo poskrbita za usklajeno izražanje genov, ki sodelujejo pri sporulaciji. ....	165
Slika 13-16: Odziv na topotni šok pri <i>E. coli</i> .....	166
Slika 13-17: Uravnavanje prevajanja mRNA gena <i>ompF</i> s sRNA <i>micF</i> v okolju z nizko in visoko osmolarnostjo.....	167
Slika 13-18: Aktivacija dvokomponentnega sistema CpxA-CpxR.....	168
Slika 13-19: Nizka raven $Fe^{2+}$ pomeni izražanje genov za asimilacijo železa. ....	169
Slika 13-20: Mehанизem delovanja RyhB.....	170

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 2-1: Proteini, ki so vpleteni v podvojevanje DNA bakterije <i>E. coli</i> , geni, ki jih zapisujejo, ter njihove funkcije. ....	20
Preglednica 2-2: Katalitične sposobnosti in funkcije bakterijskih DNA-polimeraz. ....	21
Preglednica 7-1: Skupine genov in promotorjev, ki sodelujejo pri konjugaciji, in njihove naloge. ....	74
Preglednica 8-1: Lastnosti transpozicijskih elementov razredov I in II. ....	84
Preglednica 8-2: Primeri tirozinskih in serinskih rekombinaz. ....	91
Preglednica 10-1: Primeri družin fagov in njihove značilnosti. ....	104
Preglednica 13-1: Globalni regulatorni sistemi bakterije <i>E. coli</i> . ....	149
Preglednica 13-2: Geni, ki sodelujejo pri uravnavanju asimilacije dušika pri bakteriji <i>E. coli</i> . ....	155
Preglednica 13-3: Geni, povezani s sporulacijo. ....	162

## 1 KROMATIN

Nikolaj Mavrek, Jerneja Ambrožič Avguštin

### UČNI CILJI

- Razumeti razliko med molekulo DNA in kromatinom.
- Spoznati vlogo DNA-vezavnih proteinov pri tvorbi kromatina bakterij in arhej.
- Spoznati nekatere proteine NAP in jih glede na njihovo delovanje povezati z različnimi vlogami v celici.
- Povezati histonske proteine z evolucijskim/taksonomskim položajem arhej.

### UVOD

S pojmom kromatin označujemo bolj ali manj tesno pakiran kompleks nukleinskih kislin in z njimi povezanih proteinov v pro- in evkariontskih celicah. Izraz je prvi uporabil profesor anatomije Walter Flemming (1843–1901) v drugi polovici 19. stoletja, ko so raziskovalci ugotovili, da je v evkariontskem celičnem jedru dedni material, ki se z nekaterimi barvili specifično obarva. V evkariontskih celicah ločimo med evkromatinom, ki je v različnih fazah celičnega cikla različno zgoščen, in heterokromatinom, ki je tesno pakiran, tudi v interfazi. Osnovna zgradba evkariontskega kromatina je razmeroma dobro raziskana. 145–147 bp dolgi odseki molekule DNA so v stiku s proteini in se približno 1,65-krat ovijejo okoli histonskega oktamera, sestavljenega iz po dveh histonskih proteinov H2A, H2B, H3 in H4, in tako tvorijo nukleosom. Histonski protein H1 se veže na 20–22 bp dolgo zaporedje DNA, s čimer poveže v nukleosom vstopajočo in iz njega izstopajočo DNA. Nukleosom skupaj s histonskim proteinom H1 imenujemo kromatosom. Kromatin se nato čedalje tesneje pakira. Najprej nastane približno 30 nm debelo vlakno, ki na beljakovinskem ogrodju tvori zanke s povprečno dolžino 300 nm. Te zanke se stisnejo in organizirajo v 250 nm široko vlakno, ki se nato še dodatno zvije in zloži v kromatido kromosoma. Kromatide imajo premer približno 700 nm. Histonski proteini so sestavljeni iz globularnega dela in histonskih repov, ki so po večini zgrajeni iz pozitivno nabitih aminokislin. Te omogočajo povezavo z negativno nabito DNA, kar je pomembno pri uravnavanju izražanja genov (gl. epigenetika). Pri povezovanju DNA s histonskimi proteini sodelujejo tudi histonski šaperoni, med njimi skupina z nukleoidom povezanih proteinov (ang. nucleosome assembly protein, NAP), ki pa se po zgradbi in delovanju razlikujejo od prokariontskih proteinov NAP.

### Kromatin v bakterijski celici

Prokariontski kromatin, torej DNA, povezana z različnimi proteini, je v dinamičnem območju bakterijske celice, ki ga imenujemo nukleoid in zavzema okoli 20–25 % prostornine celice, odvisno od rastne faze in s tem procesov, povezanih z DNA (npr. podvojevanje, prepisovanje in rekombinacija DNA). Glavna razlika med evkariontskim jedrom in prokariontskim nukleoidom je, da slednji ni obdan z membrano. Običajno se srečujemo s poenostavljenou podobo bakterijskega kromosoma v obliki krožne dvoverižne molekule DNA, nekatere bakterije pa imajo linearne kromosome. DNA je v obeh primerih organizirana v različno velike makro- in mikrodomene, z različno stopnjo dodatnega zvitja (ang. supercoiling), kar omogočajo encimi topoizomeraze. Kromosom bakterije *Escherichia coli* (*E. coli*) je npr. organiziran v 4 makrodomene, Ori, Ter ter t. i. desno in levo nestrukturirano regijo, za slednji pa so značilne približno 10 kb dolge mikrodomene. Deli posameznih domen se med seboj lahko posredno povezujejo s proteini NAP, ki so opisani v nadaljevanju. Oblika in spremembe domen so torej odvisne od različnih dejavnikov, fizikalnih (dodatno zvitje), kemijskih (hidratacija DNA) in bioloških (protein NAP). DNA je v večini bakterijskih vrst običajno negativno dodatno zvita, kar omogoča lažje podvojevanje in transkripcijo; le redko je sproščena (ang. relaxed), to je brez dodatnega zvitja. Opisani sta dve

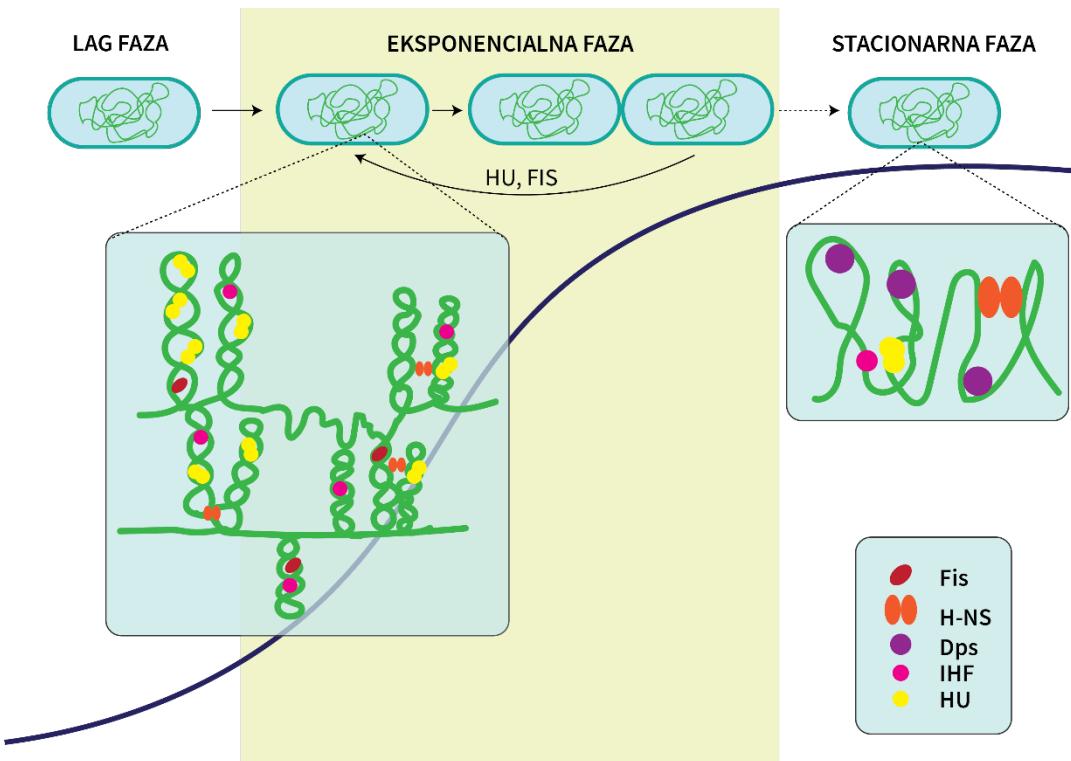
pogosti obliki dodatnega zvitja, in sicer plektonemska in solenoidna. Proteini NAP omogočajo, da obliki lahko prehajata druga v drugo. Solenoidna oblika je manj stabilna, a bolj kompaktna kot plektonemska, ki sama ne omogoča pakiranja DNA do prostornine, ki jo zavzema v nukleoidu. Zaradi negativnega dodatnega zvitja nastanejo drugačne lokalne oblike DNA, kot so npr. G-kvadrupleks, levosučna Z-oblika DNA, enoverižne molekule DNA, križne strukture itd.

### NAP – z nukleoidom povezani proteini

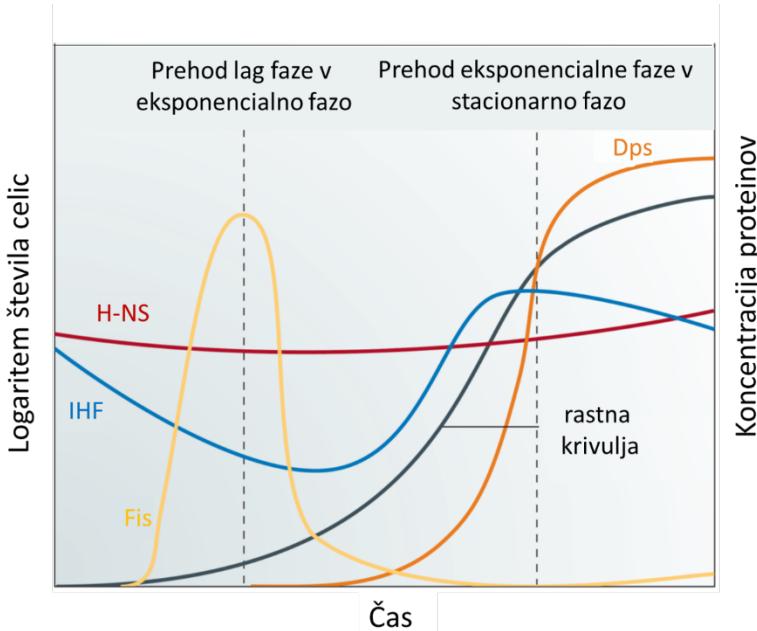
NAP ali z nukleoidom povezani proteini (ang. nucleoid associated proteins) so majhni in bazični, kar jim omogoča povezovanje z DNA. Vezava večine NAP na DNA je nespecifična, njihova naloga pa je povečanje togosti delov DNA, upogibanje ter povezovanje DNA. Posledično vplivajo na organizacijo DNA v domene, mestnospecifično rekombinacijo, podvojevanje DNA in horizontalni prenos ter uravnavanje izražanja genov. Število teh proteinov v prokariontski celici se giblje med nekaj tisoči in nekaj desettisoči, odvisno od rastne faze in vrste NAP. Groba ocena je, da se na približno 100–200 bp veže en NAP.

Genski zapisi za proteine NAP so lahko endogeni (na različnih mestih na kromosomih) ali ksenogeni, zapisani na mobilnih genetskih elementih (MGE). Endogeni med drugim vplivajo na vključitev MGE v kromosom, vplivi ksenogenih pa so še dokaj neznani. NAP-kodirajoče gene so našli v vseh bakterijskih genomih, se pa število za različne NAP razlikuje med vrstami. Nekateri proteini NAP se posttranslacijsko modificirajo, vendar vpliv modifikacij na funkcijo še ni dobro znan.

Med pomembnejše proteine NAP uvrščamo H-NS, HU, IHF, Fis, MukBEF, H1, Dps, ChpA ... (slika 1-1 in slika 1-2).



Slika 1-1: Organizacija kromosoma *E. coli* med rastjo. Izražanje in koncentracija proteinov NAP vpliva na tesnost pakiranja DNA in različne celične procese, vključno z uravnavanjem izražanja genov.



Slika 1-2: Spremembe koncentracije proteinov NAP med bakterijsko rastjo.

H-NS (ang. histone-like nucleoid structuring) je 15 kDa velik DNA-vezavni protein, zapisan v genu *hns*. Monomero sestavlja dve domeni, povezani z linkerjem, to sta DNA-vezavna domena in domena, ki omogoča povezovanje z drugimi proteini – oligomerizacijo (homo- in heteromerni kompleksi). *E. coli* ima v eksponencialni fazi okoli 20.000 monomernih H-NS. Z DNA se najprej poveže monomerna oblika, sledi oligomerizacija, kar posledično vodi v upogibanje DNA. Molekule H-NS se pogosteje vežejo na ukrivljeno DNA (promotorske regije, insercijska zaporedja (IS) in drugi MGE) in na z adenini in timini bogata zaporedja. H-NS je pri *E. coli* represor lastnega prepisovanja in prepisovanja še vsaj dvesto drugih genov, od katerih je večina povezana z odzivi na okoljske spremembe. Ob povišani koncentraciji natrijevih in kalijevih ionov disociira z DNA. S H-NS se lahko poveže njemu podoben protein StpA, ki je sicer bolj povezan z odzivom na visoko temperaturo in osmotski stres.

HU (ang. heat unstable) spada med najštevilnejše in najbolj ohranjene NAP. Pri *E. coli* ga je največ v eksponencialni fazi, tudi do 55.000 molekul na celico. Pri večini bakterijskih vrst je homodimer, pri nekaterih, npr. *E. coli*, pa je v heterodimerni obliki. Veže se lahko na dvoverižno ali enoverižno DNA in tudi na RNA ter je povezan z dodatnim zvitjem DNA s topoizomerazo I. Ne prepozna specifičnega zaporedja, a se pogosto veže na z adenini in timini bogata zaporedja. Pri *E. coli* uravnava približno 8 % vseh genov, povezanih s stresnim odzivom.

IHF (ang. integration host factor) lahko DNA upogne za 180°. Najprej so ga opazili kot kofaktor pri vstavljanju in izrezovanju faga  $\lambda$ , kasneje pa so spoznali njegovo vlogo pri transpoziciji, mestnospecifični rekombinaciji in podvojevanju plazmidov. Po aminokislinski sestavi je podoben HU, vendar na osnovi topologije prepozna vezavno mesto na DNA. V celici ga je največ ob koncu eksponencialne faze. Podenoti  $\alpha$  in  $\beta$  heterodimernega proteina IHF pri *E. coli* sta zapisani v genih *ihfA* in *ihfB*.

FIS (ang. factor of inversion stimulation) na začetku eksponencialne faze pospeši izražanje genov za dejavnike, ki sodelujejo pri prevajanju (tRNA, rRNA, ribosomski proteini ...). Prav tako je transkripcijski regulator topoizomeraze I in giraze. V rastoči kulturi ga je tudi 50.000

molekul/celico. Med eksponencialno fazo zavira svoje izražanje ter izražanje gena *rpoS* za faktor  $\sigma$ , značilen za stacionarno fazo –  $\sigma^{38}$ . FIS se veže na 17 bp dolgo spoznavno zaporedje. Aktiven je kot homodimer, ki upogne DNA na mestu vezave, posledično pa v pliva na strukturo genoma in njegovo remodeliranje.

DPS (ang. DNA protection during starvation) celica uporablja za proteomske odgovore na daljše obdobje stradanja. Njegov delež med kromatinskimi proteinimi v stacionarni fazi je 50 %. Je razmeroma nespecifičen za vezavna zaporedja. Z vezavo na DNA tvori t. i. kristalno strukturo, ki deluje pri zaščiti DNA. Pomaga pri tesnejšem zlaganju DNA v stacionarni fazi in ščiti pred oksidativnim stresom. Med eksponencialno fazo ga razgrajuje proteaza ClpXP; ko ga celica potrebuje, se proteoliza ustavi.

Pri stresnem odzivu imajo NAP različne vloge, nekateri se vežejo na DNA in jo tako zaščitijo, drugi inducirajo različne obrambne in prilagoditvene mehanizme, tretji pa delujejo kot transkripcijski faktorji in regulatorji, ki vplivajo na izražanje genov.

### Kromatin v celicah arhej

Proteinji NAP so pomembni tudi za strukturo kromatina pri arhejah. V različnih skupinah arhej je opisanih od ene do nekaj vrst proteinov NAP. Najbolj razširjen in obenem najbolj preučen je Alba (ang. acetylation lowers binding affinity), ki se lahko veže tako na enoverižno kot dvoverižno DNA. Najbolje opisan NAP iz termofilnih okolij pa je Sac10b.

Glede na to, da imajo nekateri temeljni celični procesi pri arhejah značilnosti tako prokariontov kot evkariontov, ni presenetljiva ugotovitev, da imajo nekatere skupine arhej poleg proteinov NAP tudi histonske proteine, a te po strukturi in funkciji niso povsem enaki kot pri evkariontih. Ker so raziskave arhejskih histonov pravzaprav še v začetni fazi, si nova odkritja sledijo zelo hitro. Za večino znanih arhej so ugotovili, da imajo zapis za enega ali nekaj histonskih proteinov, ki organizirajo podobno kot nukleosomi (npr. *Methanocaldococcus jannaschii*). Četudi histone imajo, pa ti niso nujno potrebni za preživetje pri vseh skupinah/vrstah. Pri vrsti *Methanosarcina mazei* delecija genov za histone sicer upočasni rast in poveča občutljivost za dejavnike, ki lahko poškodujejo DNA, zmanjšano in spremenjeno je tudi prepisovanje genov, vendar arheja preživi.

Histoni arhej imajo samo jedrni del in večinoma tudi nimajo N- in C-terminalnih repov. Posttranslacijske spremembe histonov so bolj izjema kot pravilo, kljub temu pa je struktura DNA, ki je navita okoli histona, zelo podobna evkarionski povezavi molekule DNA in histona. Arheje nimajo analoga histonskemu proteinu H1, modifikacije histonov so za zdaj redko opisane in običajno niso posttranslacijske.

### TEMELJNI POJMI

- Kromatin – bolj ali manj tesno pakiran kompleks nukleinskih kislin in z njimi povezanih proteinov. Izraz je pogosteje povezan z evkarionskimi celicami.
- Histoni – proteini, ki se pri evkariontih povežejo z DNA in tvorijo nukleosom. Potrdili so jih tudi pri nekaterih arhejah. Njihova primarna vloga je organizacija DNA v celici.
- NAP – DNA-vezavni proteini, značilni za bakterije in arheje. Njihova primarna naloga je organizacija DNA v celici.

### POVZETEK

Proteinji, ki se povezujejo z DNA, omogočijo, da se ta strukturno prilagodi velikosti celice. Bakterije imajo številne proteine NAP. Razlikujejo se po zgradbi, delovanju in koncentraciji v rastnih fazah. Med najpomembnejše bakterijske proteine NAP uvrščamo H-NS, HU, IHF in FIS. Ker med drugim

omogočajo povezovanje in upogibanje segmentov DNA, ne vplivajo samo na zgradbo kromatina, ampak posledično tudi na izražanje genov. Večina arhej ima poleg svojskih proteinov NAP tudi različne histonske proteine.

## 2 PODVOJEVANJE KROMOSOMSKE DNA

Nikolaj Mavrek, Marjanca Starčić Erjavec

## UČNI CILJI

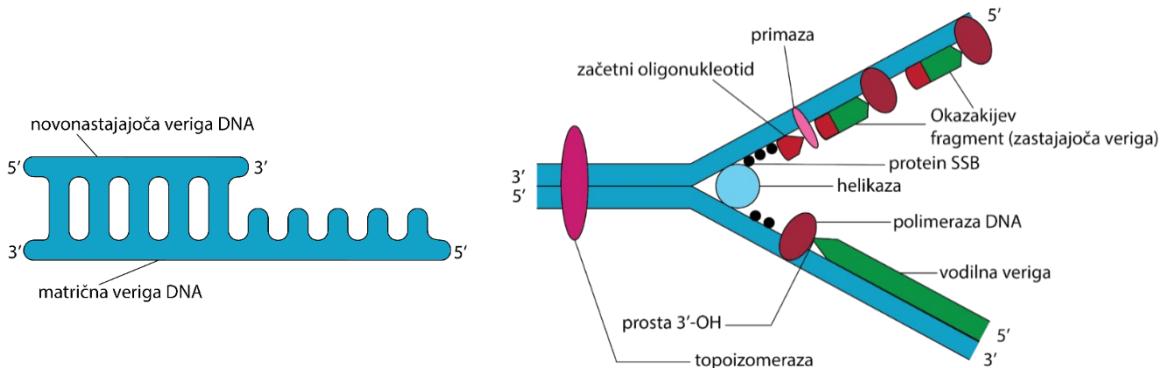
- Spoznati in razumeti zakonitosti podvojevanja kromosomske DNA.
  - Spoznati in razumeti vzroke napak v DNA, nastalih pri podvojevanju kromosomske DNA, in načine odpravljanja teh napak.
  - Spoznati in razumeti zakonitosti segregacije kromosomov.
  - Spoznati in razumeti uravnavanje začetka podvojevanja kromosomske DNA.

UVOD

Princip podvojevanja DNA je v vseh treh domenah življenja enak. Poteka v treh stopnjah: inicijacija (začetek), sinteza DNA in terminacija (zaključek). Vendar med tremi domenami življenja obstaja nekaj bistvenih razlik. Pri evkarijontih podvojevanje DNA poteka le v S-fazi celičnega cikla, in sicer z več tisoč mesti začetka podvojevanja, ki so razporejena približno po 20–300 kb narazen, pri prokarijontih pa vedno z enega mesta začetka podvojevanja. Razlika je tudi v velikosti Okazakijevih fragmentov. Ti so namreč pri evkarijontih dolgi 100–200 nukleotidov, pri prokarijontih pa 1000–2000 nukleotidov. Hitrost podvojevanja je pri prokarijontih veliko hitrejša kakor pri evkarijontih: pri *E. coli* je hitrost podvojevanja okoli 1000 nukleotidov na sekundo, pri evkarijontih pa med 500 in 5000 nukleotidi na minuto.

## Princip podvojevanja kromosomske DNA

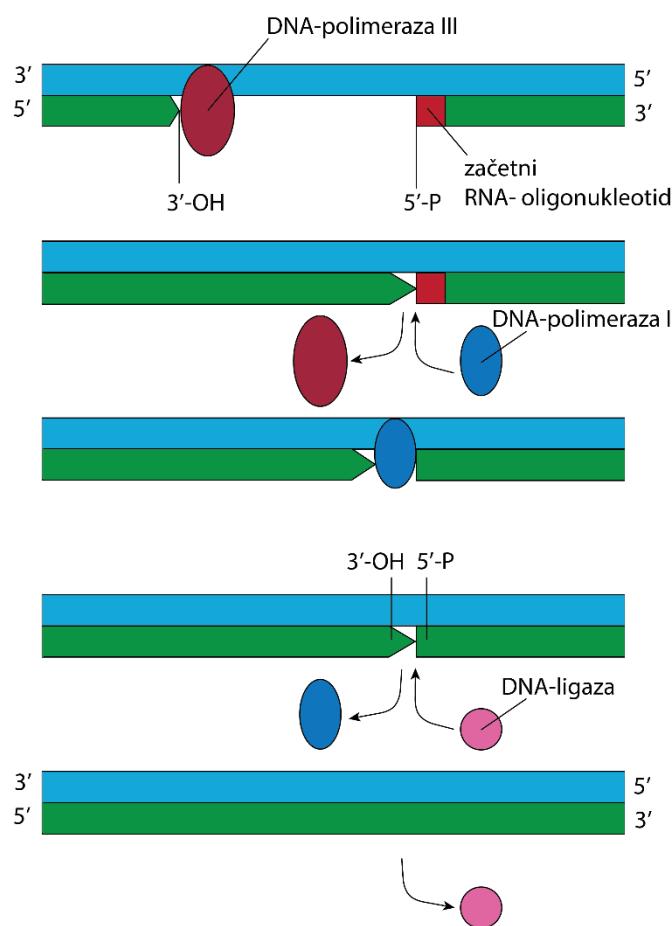
Podvojevanje DNA poteka od 5'-konca proti 3'-koncu in je semikonzervativno, kar pomeni, da je ena veriga stara oz. matrična, druga veriga pa nova. Na 3'-konec (na skupino -OH deoksiriboze) se dodajajo novi deoksiribonukleotidi, komplementarni s staro verigo, ki predstavlja matrico (slika 2-1 - levo).



Slika 2-1: DNA-polimeraza dodaja deoksiribonukleotide glede na matrično DNA. Dodaja jih na 3'-konec na prosto skupino -OH (levo). Replikacijske vilice (desno).

Pred podvojevanjem DNA je treba zrahljati dodatno zvitje DNA. To opravi encim topoizomeraza. Zatem encim helikaza razpre dvostransko DNA in tako nastaneta dve enojni verigi DNA, na katerih se vežejo beljakovine SSB (ang. single strand binding proteins). To strukturo imenujemo replikacijske vilice (slika 2-1- desno).

Na enoverižno DNA se nato veže primaza, ki ustvari začetni RNA-oligonukleotid, dolg 10–12 nukleotidov. Začetni oligonukleotid DNA-polimeraza III uporabi kot izhodišče, na katero dodaja deoksiribonukleotide. DNA-polimeraze za vgrajevanje uporabljajo deoksiribonukleozid trifosfate. Z odcepitvijo pirofosfata se nukleotid vgradi v verigo. Tako se sintetizira nova vodilna veriga. Zastajajoča veriga pa potrebuje več začetnih RNA-oligonukleotidov, ki nastajajo po približno 1000 bp narazen. DNA-polimeraza III od vsakega pomnoži del verige do naslednjega in tako nastanejo Okazakijevi fragmenti. Ko DNA-polimeraza III doseže naslednji začetni RNA-oligonukleotid, ki je že del prej sintetiziranega Okazakijevega fragmenta, se sprosti z DNA. Nadomesti jo DNA-polimeraza I, ki odstrani začetni RNA-oligonukleotid in na izpraznjeno mesto veže ustrezne deoksiribonukleotide. Manjkajoča fosfodiestrsko vez med delom DNA, ki ga je sintetizirala DNA-polimeraza III, in delom, ki ga je naredila DNA-polimeraza I, tako na vodilni kot na zastajajoči verigi ustvari DNA-ligaza (slika 2-2).



Slika 2-2: Primaza sintetizira začetni RNA-oligonukleotid. DNA-polimeraza III verigo DNA podvojuje proti 3'-koncu. Na zastajajoči verigi primaza sintetizira nov začetni RNA-oligonukleotid. Nanj se veže druga DNA-polimeraza III in pomnožuje proti 3'-koncu. DNA-polimerazo III zamenja DNA-polimeraza I, ki odstrani ribonukleotide začetnega RNA-oligonukleotida in namesto njih vstavi deoksiribonukleotide. DNA-ligaza ustvari manjkajočo fosfodiestrsko vez.

V podvojevanje DNA bakterije *E. coli* je vpletenih kar nekaj proteinov (preglednica 2-1).

## Poglavlje 2

Preglednica 2-1: Proteini, ki so vpleteni v podvojevanje DNA bakterije *E. coli*, geni, ki jih zapisujejo, ter njihove funkcije.

Protein	Gen	Funkcija
DnaA	<i>dnaA</i>	initiatorski protein
DnaB	<i>dnaB</i>	helikaza
DnaC	<i>dnaC</i>	privedba helikaze na mesto delovanja
SSB	<i>Ssb</i>	pripenjanje na enoverižno DNA
primaza	<i>dnaG</i>	sinteza začetnega RNA-oligonukleotida
DNA-ligaza	<i>lig</i>	lepljenje DNA (sinteza vezi med nukleotidi)
DNA-giraza	<i>gyrA, gyrB</i>	dodatno zvitje DNA
DNA-polimeraza I	<i>polA</i>	odstranitev in zamenjava začetnega RNA-oligonukleotida
podenota $\alpha$	<i>dnaE</i>	polimerizacija
DNA-polimeraze III		
podenota $\epsilon$	<i>dnaQ</i>	urejanje $3' \rightarrow 5'$
DNA-polimeraze III		
podenota $\theta$	<i>holE</i>	sestavina sredice
DNA-polimeraze III		
podenota $\beta$	<i>dnaN</i>	drseča objemka
DNA-polimeraze III		
podenota $\tau$	<i>dnaX</i> (produkt celega gena)	organizacija replikacijskega kompleksa
DNA-polimeraze III		
podenota $\gamma$	<i>dnaX</i> (produkt krajšega odseka gena)	vezava nalagalnega proteina drsne vponke in proteina SSB
DNA-polimeraze III		
podenoti $\delta$ in $\delta'$	<i>holA in holB</i>	nalaganje drsne vponke
DNA-polimeraze III		
Podenoti $\chi$ in $\psi$	<i>holC in holD</i>	vezava SSB
DNA-polimeraze III		

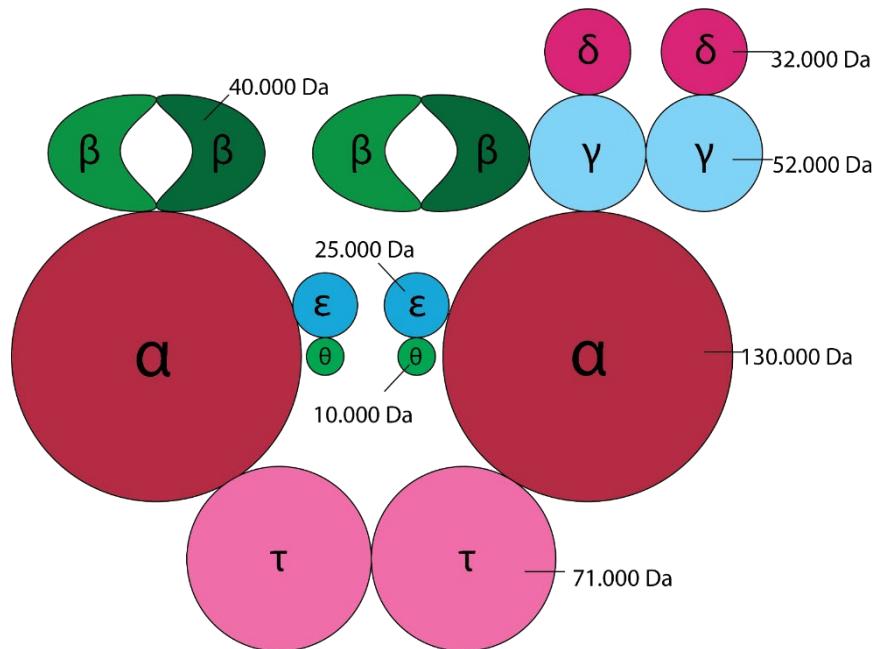
### Bakterijske polimeraze DNA

Bakterije imajo več tipov polimeraz, ki se med seboj razlikujejo po možnem katalitičnem delovanju in posledično funkcijah, ki jih lahko opravlja. Poleg sposobnosti polimerizacije oz. replikacije DNA ima polimeraza lahko še eksonukleazno funkcijo  $3' \rightarrow 5'$  in eksonukleazno funkcijo  $5' \rightarrow 3'$  (preglednica 2-2). Polimeraza z eksonukleazno funkcijo  $5' \rightarrow 3'$  lahko odstrani začetni RNA-oligonukleotid, ki je potreben, da DNA-polimeraza začne sintezo DNA (polimerazna funkcija  $5' \rightarrow 3'$ ).

Preglednica 2-2: Katalitične sposobnosti in funkcije bakterijskih DNA-polimeraz.

Polimeraza DNA	Polimeraza od 5' proti 3'	Eksonukleaza od 3' proti 5'	Eksonukleaza od 5' proti 3'	Funkcija
I	+	+	+	odstranitev nukleotidov in zamenjava začetnega RNA-oligonukleotida
II	+	+	-	popravljanje DNA; ponovna iniciacija replikacije po ustavitevi zaradi poškodb
III	+	+	-	podaljševanje verige DNA
IV	+	-	-	popravljanje DNA
V	+	-	-	popravljanje DNA

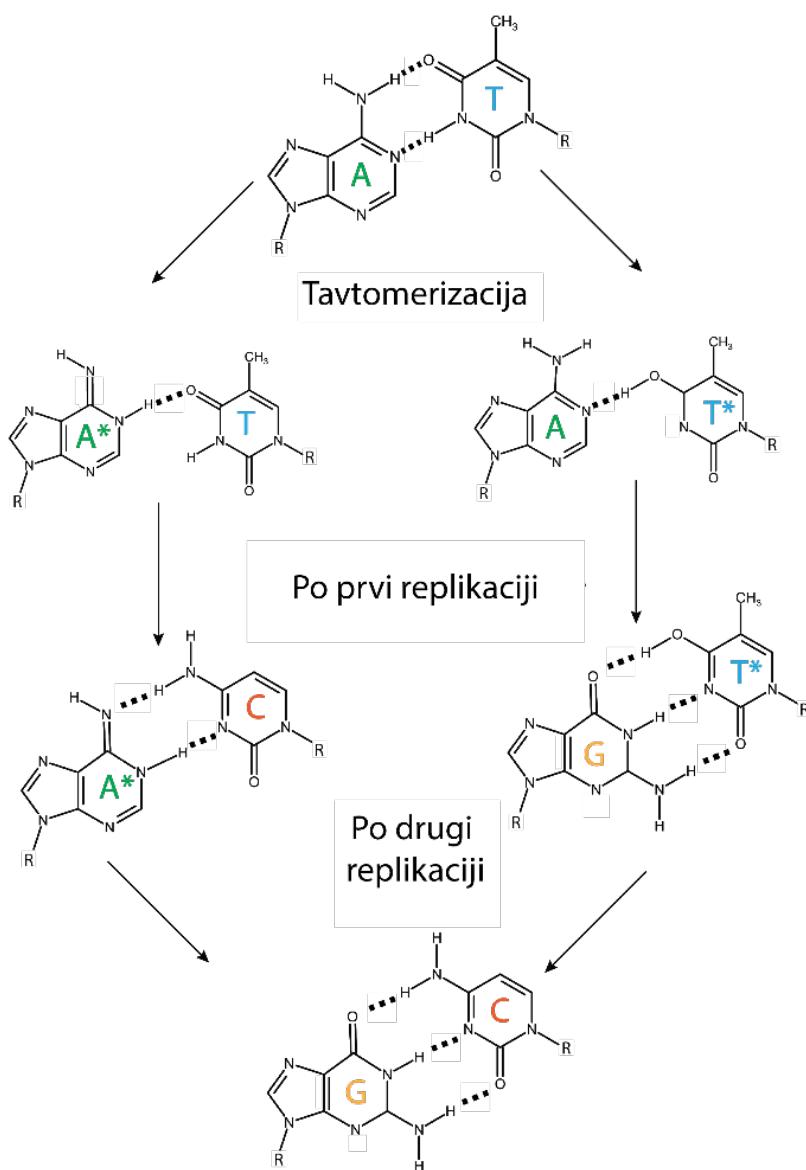
DNA-polimeraza III je holoencim, sestavljen iz več različnih podenot. Zgradba DNA-polimeraze pri bakteriji *E. coli* je shematsko prikazana na sliki 2-3. Podenote DNA-polimeraze III imajo različne funkcije (preglednica 2-2).

Slika 2-3: Shematski prikaz zgradbe holoencima DNA-polimeraze III pri bakteriji *E. coli*.

### Odpravljanje napak, nastalih pri sintezi DNA

Pri sintezi DNA se lahko ob vstavljanju nukleotidov dogodijo tudi napake. Nukleotidi so namreč v dveh različnih tautomernih oblikah (amino-imino oz. keto-enol).

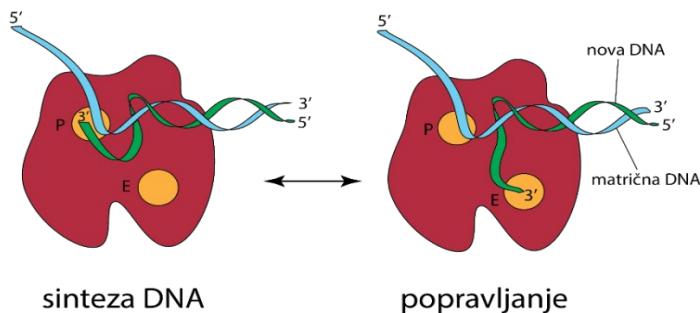
Če DNA-polimeraza vstavi nukleotid z nepravilno tautomerno obliko dušikove baze, je parjenje baz nepravilno in posledično nastane napaka v zaporedju DNA (slika 2-4).



Slika 2-4: Vstavitev nukleotida z nepravilno tautomerno obliko dušikove baze vodi v nepravilno parjenje in končno spremenjen bazni par pri sintezi DNA.

Zaradi vstavitve napačne tautomerne oblike pride do nepravilnega parjenja sosednjih nukleotidov, kar običajno vodi do spremembe v konformaciji DNA in posledično do spremembe v konformaciji DNA-polimeraze. Slednje povzroči zaustavitev polimerazne aktivnosti  $5' \rightarrow 3'$  in iniciira eksonukleazno aktivnost  $3' \rightarrow 5'$ , ki privede do odstranitve nepravilno parjenih nukleotidov. To

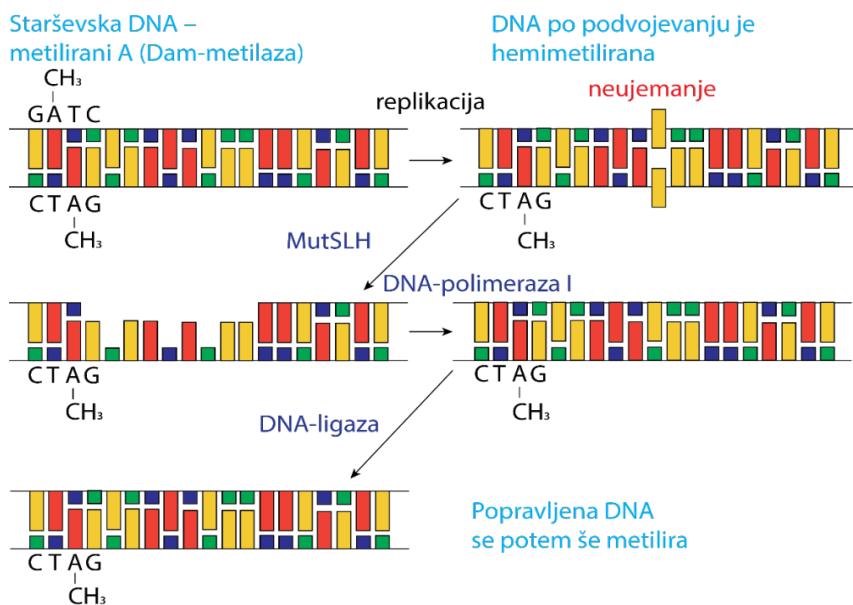
sposobnost DNA-polimeraze imenujemo kontrolno branje (ang. proof-reading), saj omogoča, da se DNA-polimeraza, ko vstavi napačen nukleotid, ustavi in popravi svojo napako (slika 2-5).



Slika 2-5: Mehanizem kontrolnega branja DNA-polimeraze.

Primaza zaradi pomanjkanja eksonukleazne aktivnosti  $3' \rightarrow 5'$  dela več napak, zato je večja tudi verjetnost, da se v začetni RNA-oligonukleotid vstavi kak napačen ribonukleotid. Ob zamenjavi ribonukleotidov začetnega RNA-olikognukleotida z deoksiribonukleotidi se ta napaka odpravi.

Če sami DNA-polimerazi III z mehanizmom kontrolnega branja ne uspe odstraniti napačnega nukleotida v novonastali DNA, ima bakterijska celica še drug mehanizem za odpravljanje napak, t. i. sistem za popravljanje neujemanja (ang. DNA mismatch repair) (slika 2-6).

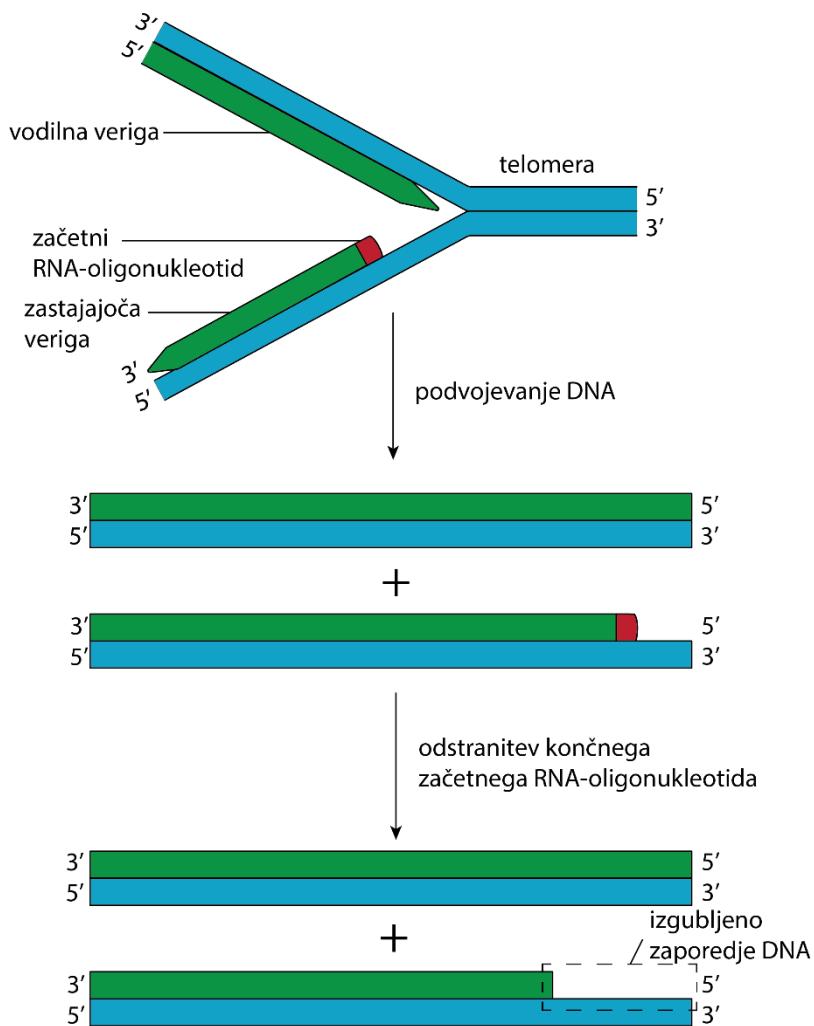


Slika 2-6: Sistem za popravljanje neujemanja. MutSLH izkazuje neujemanje, zaradi metilacije adeninov starševske verige zna določiti novonastalo verigo, iz nje izreže vse nukleotide do prvega metiliranega adenina, nato DNA-polimeraza I nastalo vrzel zapolni, DNA-ligaza pa ustvari še končno fosfodiestrsko vez. Nukleotidi so obarvani po Wernbergerjevi barvni shemi (A – rdeč, T – moder, G – rumen, C – zelen).

Pri bakteriji *E. coli* po replikaciji, kontrolnem branju in popravljanju neujemanja v povprečju ostane 1 napaka na  $10^{10}$  nukleotidov. Z drugimi besedami, 1 izmed 2000 potomk ima 1 napako v DNA.

### Problem podvojevanja koncev linearnih molekul DNA

Bakterije iz rodov *Streptomyces*, *Borrelia*, *Agrobacterium* in *Rhodococcus* imajo linearne molekule kromosomske DNA, pa tudi molekule plazmidne DNA. Ob sintezi zastajajoče verige DNA na 3'-koncu matrične verige ne more nastati nov začetni RNA-oligonukleotid in tako se sinteza nove verige ne more zaključiti (slika 2-7).



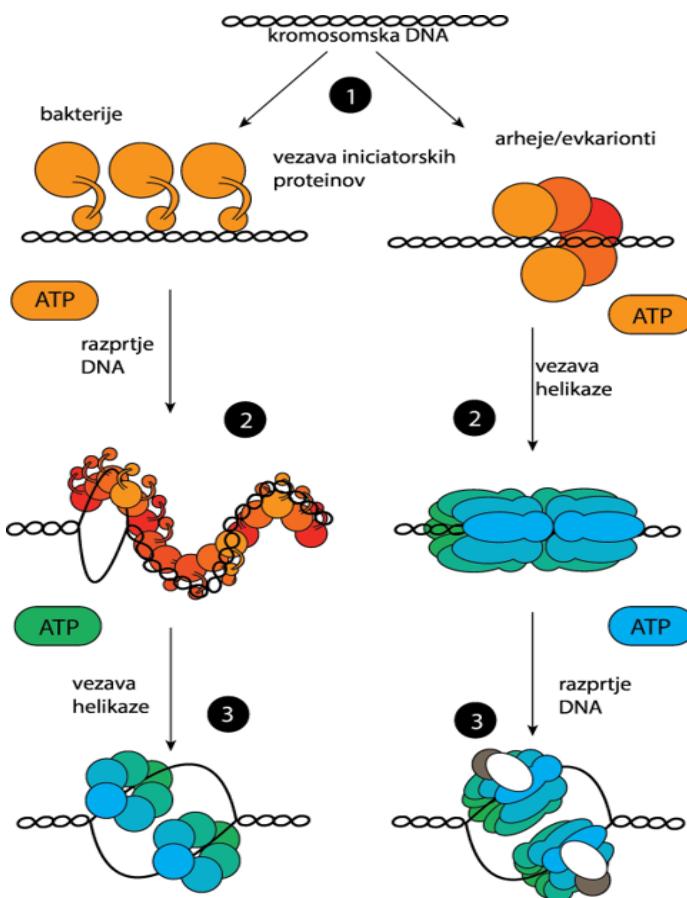
Slika 2-7: Brez delovanja telomeraze je novonastala veriga kraša od matrične verige.

Bakterije, ki imajo linearne molekule DNA, poznavajo specifične načine, kako preprečiti krašanje koncov molekul DNA.

### Podvojevanje DNA pri arhejah

Podvojevanje DNA so do sedaj preučevali pri treh različnih skupinah arhej.

Podvojevanje DNA pri arhejah je podobno podvojevanju evkariontske DNA. Sodelujoči encimi in initiatorski proteini so strukturno podobni evkarionskim (slika 2-8).



Slika 2-8: Primerjava podvojevanja molekule DNA pri bakterijah, arhejah in prokariotih.

Nekatere vrste arhej imajo eno mesto začetka podvojevanja, nekatere dve, nekatere tudi več. Mesta začetka podvojevanja pri arhejah nimajo zaporedij, ki bi jih prepoznali bakterijski initiatorski proteini, podobnejša so namreč evkarionskim zaporedjem. Mesto začetka podvojevanja je sestavljeno iz mesta DUE (ang. DNA unwinding element), bogatega z adeninskimi in timinskimi deoksiribonukleotidi, z obeh strani pa ga obdaja več mest ORB (ang. origin recognition box), slednja so ohranjene ponovitve, na katere se vežejo proteini, ki prepozna mesto začetka podvojevanja (slika 2-9).



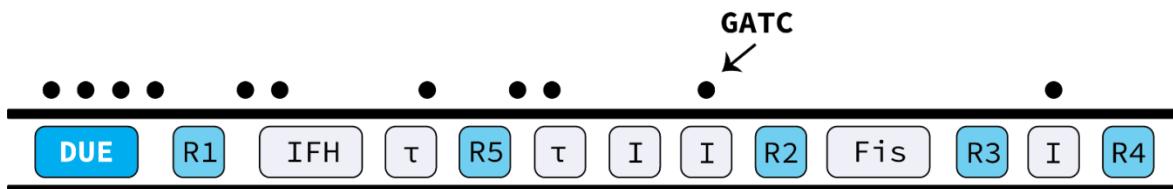
Slika 2-9: Mesto začetka podvojevanja na molekuli DNA arhej sestavlja mesta ORB, ki obdajajo mesto DUE.

### Podvojevanje bakterijskega kromosoma

Cis-delujuči element, potreben za iniciacijo podvojevanja DNA, je mesto *oriC*. Tu se podvojevanje bakterijskega kromosoma začne in mu zato rečemo tudi mesto začetka podvojevanja. To mesto je približno 260 bp dolgo zaporedje, ki je zelo dobro preučeno ter si je pri večini bakterij zelo podobno. Pri *E. coli* je na kromosому na približno 84,3 min. Na tem mestu so zaporedja z

## Poglavlje 2

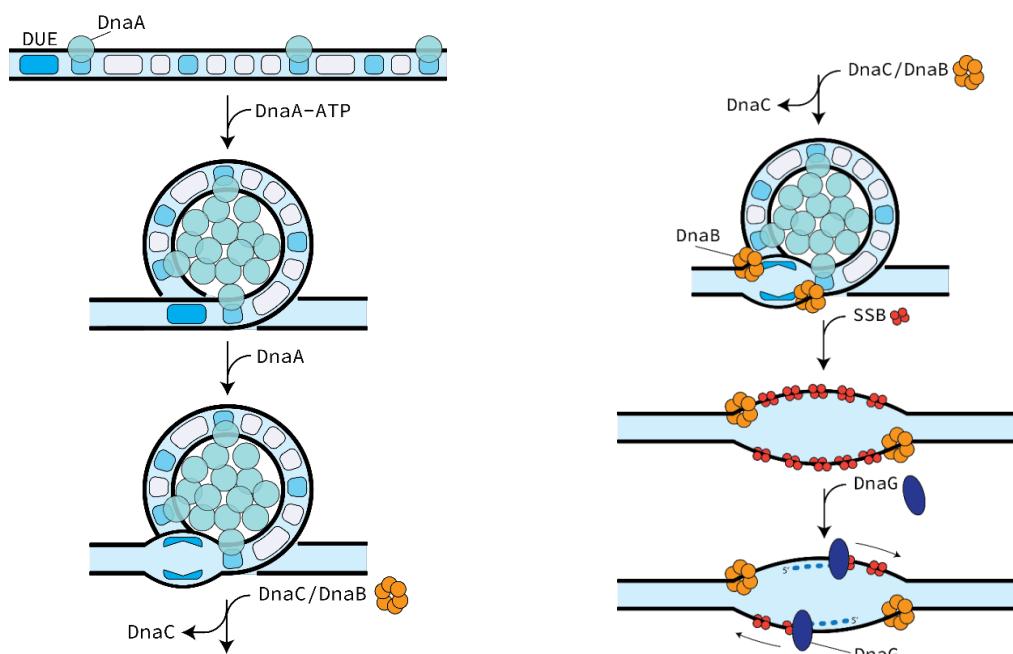
vezavnimi mesti za različne proteine, med katerimi je najpomembnejši initiatorski protein DnaA. Ta se veže na 5 vezavnih mest z označbami od R1 do R5, na kar tri (R1, R2 in R4) je vezan stalno. Mesti  $\tau$  in I imata vezan kompleks DnaA-ATP, isti kompleks je vezan tudi na treh mestih na mestu DUE, ki je z adenini in timini bogato zaporedje (slika 2-10).



Slika 2-10: Zgradba mesta začetka podvojevanja *oriC*. Označena so tudi zaporedja GATC.

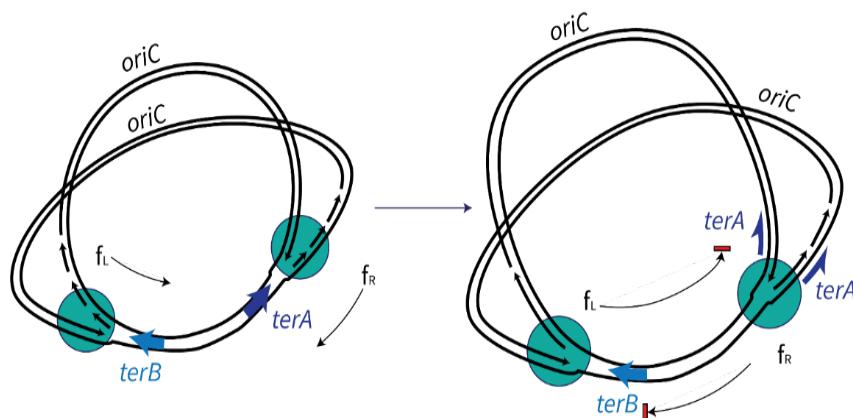
Trans-delujuči elementi, potrebni za iniciacijo podvojevanja bakterijskega genoma, so: DnaA, DnaB, DnaC, DnaG (= RNA-polimeraza), IHF in Fis.

Za pričetek podvojevanja je poleg že vezanih proteinov DnaA na mesto začetka podvojevanja potrebna vezava še približno 12 kompleksov DnaA-ATP. Tako lahko nastane velik, multimeren kompleks iz proteinov DnaA, zaradi katerega se DNA zvije, to pa omogoči razprtje verig na zaporedju DUE. Pri tem sodelujeta IHF in Fis, tudi samo dodatno zvitje je v pomoč. DnaA je potreben le na začetku podvojevanja, s svojim delovanjem namreč omogoči kompleksu DnaC/DnaB namestitev na zaporedju DUE. DnaC namesti protein DnaB, helikazo, na pravo mesto in kompleks nato zapusti, da se lahko vzpostavijo replikacijske vilice. Helikaza DnaB dodatno razpre obe verigi, na ti pa se vežejo proteini SSB, ki preprečijo ponovno hibridizacijo. Na mestu začetka podvojevanja lahko sedaj primaza DnaG sintetizira začetni RNA-oligonukleotid. Kompleks iz proteinov DnaB in DnaG imenujemo primosom, njegova naloga je potovanje po DNA ter sinteza začetnega RNA-oligonukleotida (slika 2-11).



Slika 2-11: Začetek podvojevanja bakterijskega kromosoma na *oriC*. Po vezavi proteinov DnaA na mesto začetka podvojevanja nastane zavoj DNA in DNA se razpre na zaporedju DUE. DnaB se veže na razprto zaporedje DUE. Proteini SSB se vežejo na enoverižno DNA. Primaza DnaG sintetizira začetni RNA-oligonukleotid.

Pri *E. coli* in *B. subtilis* poznamo sistem terminacije oz. zaključka podvojevanja DNA. Ta način je bolj preučen pri *E. coli*. Terminacija podvojevanja DNA poteka na zaporedjih *ter*. To so 23 bp dolga zaporedja, ki so prehodna le enosmerno, kar pomeni, da se čezne replikacijske vilice lahko pomikajo le v eni smeri. Zaporedji *terA* in *terB* zaokrožata terminacijsko območje. Zaporedje *terA* je prehodno le za replikacijske vilice, ki tečejo v smeri urnega kazalca. Zaporedje *terB* je prehodno le za replikacijske vilice, ki tečejo v nasprotni smeri urnega kazalca. Ko replikacijske vilice dosežejo zanje neprehodno zaporedje, se prve replikacijske vilice ustavijo in počakajo, da jih dosežejo tudi druge replikacijske vilice. Torej, če so desne vilice veliko hitrejše od levih (npr. zaradi nadpovprečnega števila napak DNA-polimeraze in posledičnega popravljanja na levi strani), se bodo ustavile na zaporedju *terA* in tam počakale druge replikacijske vilice. Ko se oboje replikacijske vilice srečajo, se podvojevanje preneha. Za terminacijo je potrebna posebna beljakovina, pri *E. coli* je to protein *Tus* (ang. terminus utilization substance), pri *B. subtilis* pa *RTP* (ang. replication terminator protein). Terminacijski proteini se vežejo na zaporedja *ter*, kjer ustavijo helikazo. Po zaključku podvojevanja se sprostita dve hčerinski molekuli DNA (slika 2-12).



Slika 2-12: Zaključek podvojevanja bakterijskega kromosoma. Replikacijske vilice  $f_R$  (ang. fork, right) se pomikajo v smeri urnega kazalca. Replikacijske vilice  $f_L$  (ang. fork, left) tečejo v nasprotni smeri urnega kazalca. Če so ene replikacijske vilice hitrejše od drugih, jih počakajo na zaporedju *terA* (replikacijske vilice  $f_L$ ) oz. *terB* (replikacijske vilice  $f_R$ ).

Replikacijske vilice na svoji poti lahko naletijo na poškodbe v verigi, npr. lezije in vrzeli. V takšnih primerih se ustavijo in pogosto tudi razpustijo. Obstajajo mehanizmi, ki pomagajo pri ponovni vzpostavitvi replikacijskih vilic, a ker ta ne poteka na mestu začetka podvojevanja, pri tem sodelujejo drugi proteini – to so primosomski proteini *PriA*, *PriB* in *PriC* ter *DnaT*, ki tvorijo zanko D in kot začetni oligonukleotid za ponovno sintezo DNA uporabijo 3'-konec enoverižne DNA. Če celica ne more zaključiti procesa replikacije, propade.

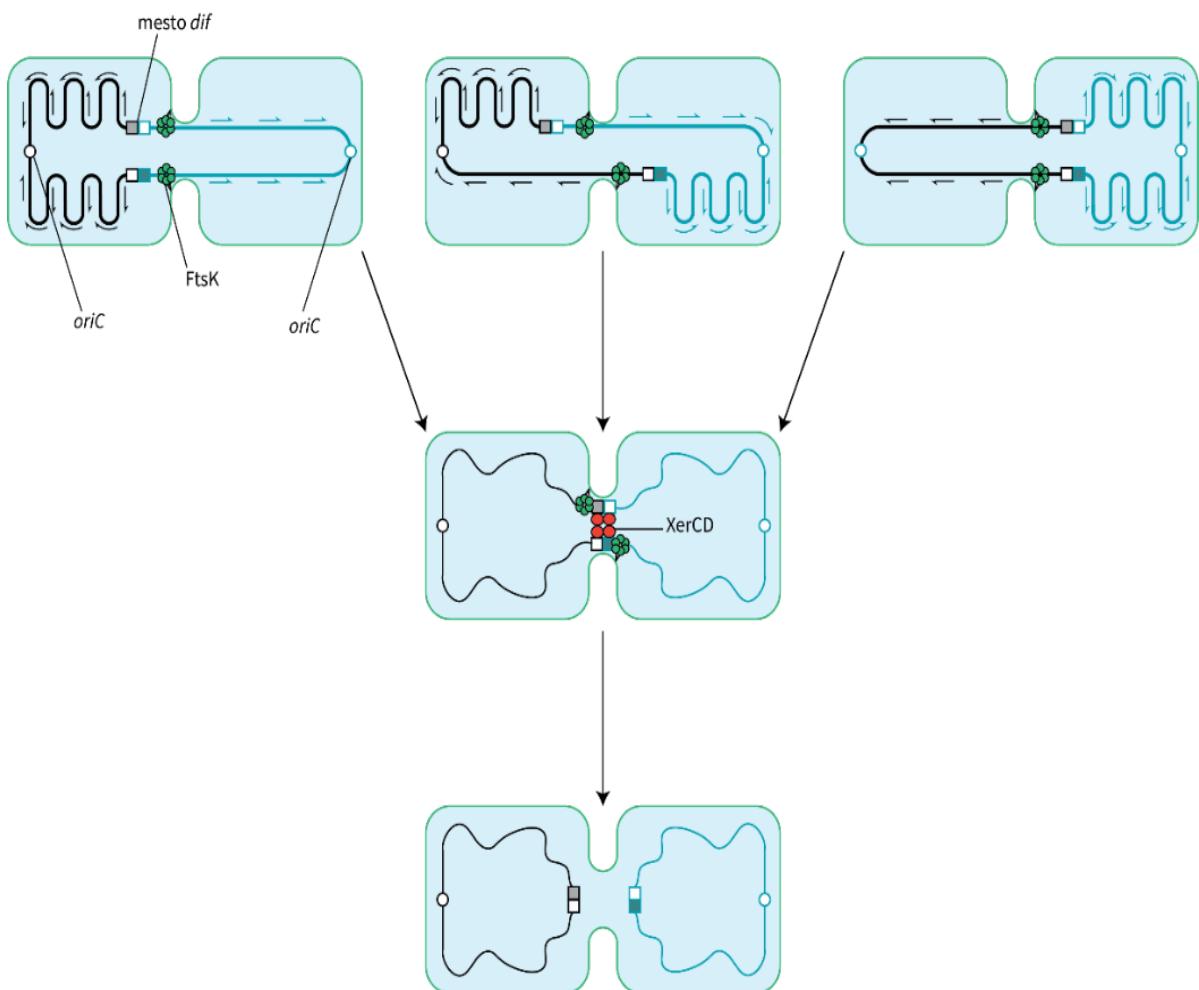
### Segregacija kromosomov

Segregacija kromosomov je proces porazdelitve hčerinskih molekul kromosoma v obe hčerinski celici. Pred tem morata biti obe hčerinski molekuli kromosoma ločeni. Za to obstajajo 3 mehanizmi:

#### Razrešitev dimerov

Sistem za razrešitev dimerov ločuje dimere kromosomov, ki so nastali zaradi dogodkov med replikacijo. Kromosomski dimer predstavlja hčerinski molekuli DNA, ki sta med seboj povezani v

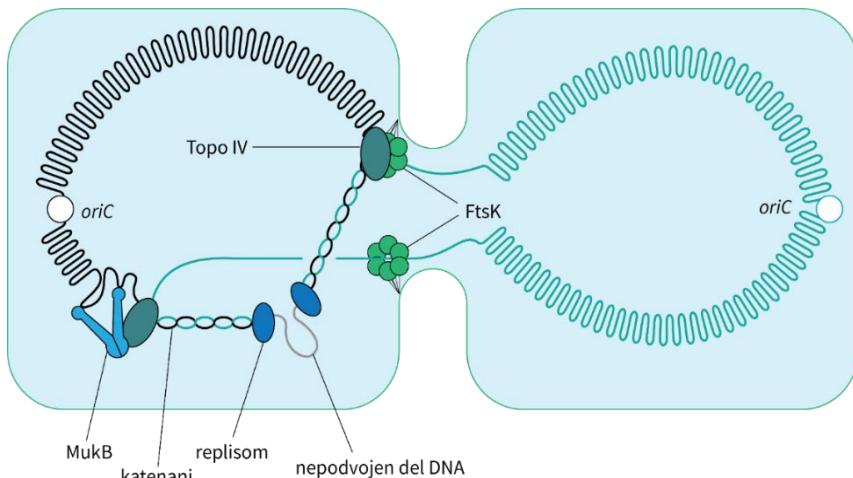
eno samo krožno molekulo DNA z dvojno dolžino. Sistem temelji na rekombinacijskem sistemu Xer, ki dimere razreši (slika 2-13). Xer je mestnospecifična rekombinaza. Sistem sestavlja dva proteina, XerC in XerD. V središču zaporedja *ter* je mesto *dif*. Dimerna kromosomska molekula ima dve mesti *dif*. XerCD sta v interakciji s translokazo FtsK, ki je locirana na zoženem delu med nastajajočima hčerinskima celicama, kjer bo delitveni septum preščipnil celico, in prepozna mesta KOPS (ang. FtsK-oriented polar sequence) ter tako v pravilni smeri translocira DNA. Ko prideta na zoženi del dve mesti *dif*, kompleks XerCD med njima naredi mestnospecifično rekombinacijo in tako razreši dimer. Interakcija XerCD-FtsK zagotavlja časovno in prostorsko usklajeno povezavo translokacije ene molekule hčerinske kromosomske DNA z delitvijo celice.



Slika 2-13: Razrešitev dimerov kromosoma s sistemom Xer med translokacijo kromosoma v novo celico. FtsK je translokaza, ki prepozna mesta KOPS za usmeritev DNA – ta DNA dajejo orientacijo – in s translociranjem DNA poskrbi, da sta po delitvi obe hčerinski molekuli DNA v svoji celici. Sistem XerCD razreši morebitni dimer kromosomske molekule z rekombinacijo med mestoma *dif*.

### Dekatenacija

Katenacija je posledica podvojevanja DNA. Vzvojni oz. torzijski stres pred replikacijskimi vilicami se lahko prenese v zavitje DNA med dvema hčerinskima molekulama za replikacijskimi vilicami, kar rezultira v nastanku katenanov, ki jih je treba odpraviti. Proses odpravljanja katenanov imenujemo dekatenacija. Večino dekatenacije opravi Topo IV, encim iz dveh podenot. Dekatenacija je zaradi interakcije s proteinom FtsK usklajena s translokacijo. Delovanje Topo IV je usklajeno tudi s kondenzacijo kromosoma, in sicer zaradi interakcije s proteinom MukB. Tako v primeru kondenzacije kot tudi translokacije je katenane namreč treba odstraniti (slika 2-14).



Slika 2-14: Dekatenacija. Topo IV, encim, ki opravlja dekatenacijo, reagira s FtsK, da odstrani katenane pred translokacijo kromosoma, reagira pa tudi z MukB, ki je odgovoren za kondenzacijo kromosoma, da se katenani odstranijo pred kondenzacijo.

### Kondenzacija kromosoma

Za nadzor nad kromosomsko DNA, za preprečevanje nastanka dimerov in katenanov celice uporabljajo kondenzacijo kromosoma. Izvršujejo jo proteini, imenovani kondenzini in kleisini. Kondenzine so odkrili najprej pri evkariontih ter jih poimenovali SMC (ang. structural maintainance of chromosome). Pri *E. coli* je kondenzin protein MukB, kleisina pa sta MukE in MukF. Pri *B. subtilis* je kondenzin protein SMC, kleisina pa sta ScpA in ScpB.

### Particija kromosoma in citokineza

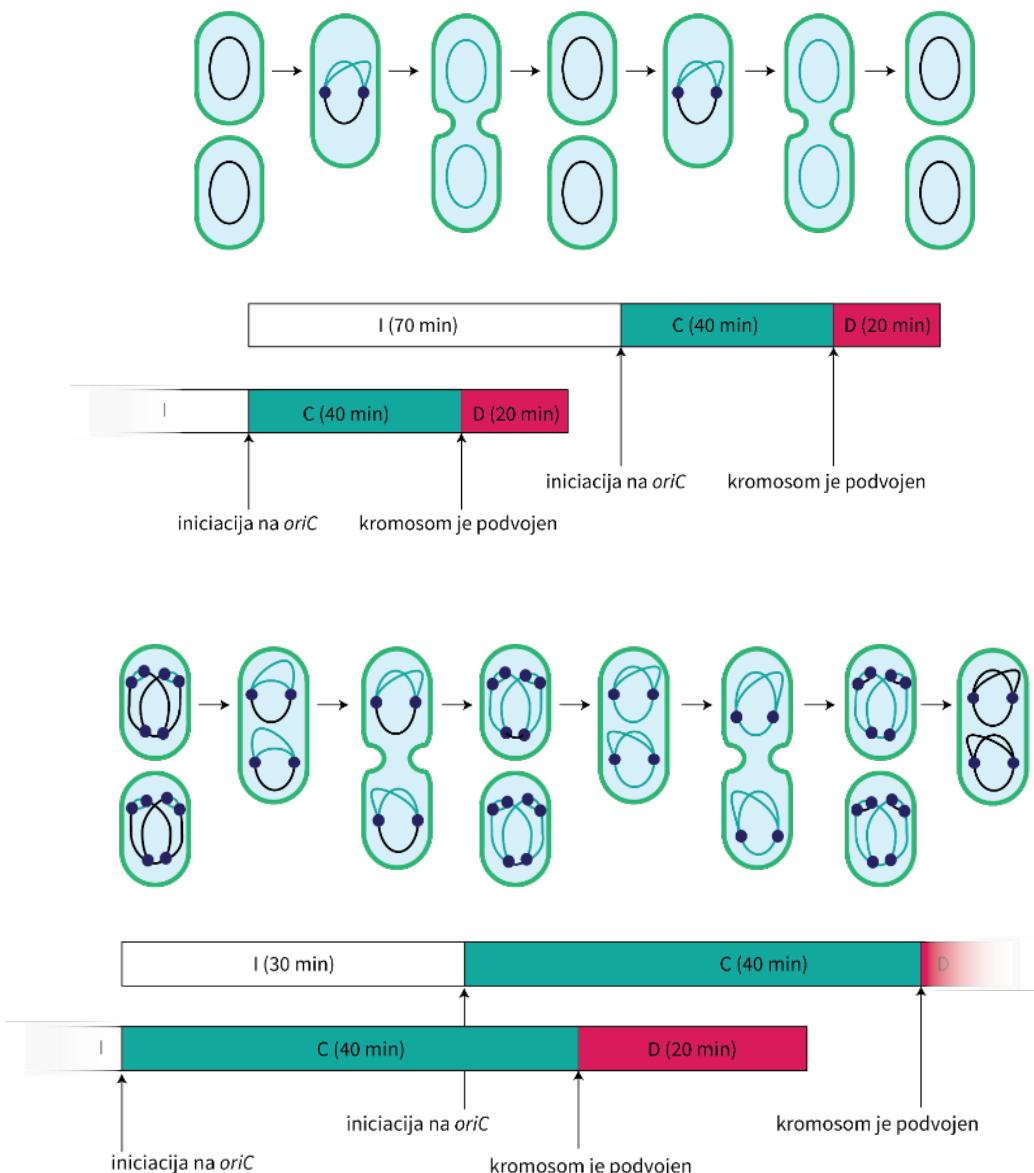
Particija zagotavlja enakomerno porazdelitev podvojenih kromosomskih molekul v obe hčerinski celici. Zapis za beljakovine, potrebne za particijo, vsebujejo geni *par*. To so najprej odkrili pri plazmidih. Med particijo se tvorijo različni filamenti, ki so podobni citoskeletalnim elementom oz. delitvenemu vretenu pri evkariontih. Njihova naloga je razporejanje kromosomskih molekul.

Pri citokinezi sta pomembni predvsem dva proteina, in sicer FtsZ, ki ga imenujemo tudi osrednja beljakovina citokineze, in MreB.

FtsZ je podoben tubulinu pri evkariontih, izoblikuje filamente, ki se zaradi dodajanja ali odvzemanja krajsih filamentov – protofilamentov – lahko podaljšujejo ali krajšajo. Za to potrebujemo energijo v obliki GTP. Pred celično delitvijo je FtsZ v obliki monomerov in protofilamentov porazdeljen po vsej celici, ko pa celica zraste do ustrezne velikosti, se monomeri in protofilamenti začnejo zbirati na sredini celice, kjer tvorijo protoprstan. Poleg FtsZ protoprstan tvorita še pomožna proteina FtsA in ZipA, ki FtsZ omogočita stabilnost in vezavo na membrano. Kasneje se v protoprstan veže še približno 25 drugih proteinov z različnimi nalogami, nekatere segajo v membrano ali skoznjo, druge sodelujejo pri sintezi celične stene septuma itn.

Protein MreB je podoben aktinu pri evkariontih, je prav tako iz protofilamentov, le da za gradnjo potrebuje ATP. Naloga MreB je usmerjanje sinteze peptidoglikana. Kokalne bakterije te beljakovine nimajo, zato niso zmožne tvorbe elipsastih ali podaljšanih celic.

Podvojevanje kromosoma je časovno usklajeno s citokinezo in je odvisno od rastnih razmer celice (slika 2-15). V bogatih gojiščih se tako nov cikel podvojevanja molekule kromosoma prične, še preden se je prejšnji v celoti končal.



Slika 2-15: Podvojevalni čas (generacijski čas) *E. coli* je odvisen od sestave gojišča. V revnem gojišču (zgoraj) se kromosomska molekula DNA najprej v celoti podvoji in potem sledi delitev celice. V bogatem gojišču (spodaj) se podvojevanje kromosomske molekule DNA z mesta *oriC* začne, še preden se je prejšnje podvojevanje končalo. Generacijski čas je tako krajši od časa, potrebnega za podvojitev kromosomske molekule.

### Uravnavanje začetka podvojevanja

Začetek podvojevanja je vezan na določeno celično maso, ki jo imenujemo iniciacijska celična masa. Začetek podvojevanja uravnavajo celične koncentracije in razmerja pomembnih beljakovin in beljakovinskih kompleksov, npr. razmerje DnaA-ATP ter DnaA-ADP. Več kot imamo v celici mest začetka podvojevanja *oriC*, več molekul DnaA celica potrebuje. DnaA niso vezani le na mestu začetka podvojevanja, temveč tudi drugod na molekuli DNA (titracija). Pomemben dejavnik pri začetku podvojevanja pa so metilirana zaporedja GATC. Metilacijo adeninov v zaporedjih GATC vrši encim deoksiadenozin metilaza oz. Dam. Znotraj mesta začetka podvojevanja je kar 11 zaporedij GATC, prav tako jih najdemo še drugod na kromosomu, npr. na promotorju gena *dnaA*. SeqA je trans-delujoči protein, ki se veže le na hemimetilirano DNA, najdemo pa ga le pri bakterijah

z encimom Dam. Njegova vezava na zaporedja GATC onemogoči njihovo metilacijo z encimom Dam, prav tako prepreči vezavo DnaA na vezavna mesta znotraj mesta začetka podvojevanja, zavre tudi izražanje gena *dnaA* in na ta način začasno prepreči ponoven začetek podvojevanja.

### TEMELJNI POJMI

- Semikonzervativno podvojevanje – podvojevanje, pri katerem nova veriga nastaja na stari verigi, ki deluje kot matrica.
- Okazakijev fragment – kratek fragment novosintetizirane DNA, ki nastane pri podvojevanju DNA na zastajajoči verigi.
- Iniciacijska celična masa – celična masa, ki je potrebna za začetek podvojevanja.

### POVZETEK

Podvojevanje DNA je semikonzervativno. Pred podvojevanjem DNA encim topoizomeraza razvije dodatno zvitje. Helikaza nato razpre dvoverižno DNA. Primaza ustvari začetni oligonukleotid iz ribonukleotidov, ki ga DNA-polimeraza III uporabi za začetek podvojevanja. Na koncu DNA-polimeraza I zamenja začetni RNA-oligonukleotid z deoksiribonukleotidi, zadnjo fosfodiestrsko vez pa sintetizira DNA-ligaza. Podvojevanje bakterijskega kromosoma se začne na mestu *oriC*, konča pa na mestih *ter*. Za segregacijo kromosomov poznamo tri mehanizme, in sicer razrešitev dimerov, dekatenacijo ter kondenzacijo kromosoma. Particija kromosoma in citokineza se zgodita na koncu. Pri tem imajo najpomembnejšo vlogo proteini Par ter FtsZ in MreB.

### 3 PREPISOVANJE DNA V RNA – TRANSKRIPCIJA

Nikolaj Mavrek, Jerneja Ambrožič Avguštin

#### UČNI CILJI

- Razumeti, da so geni zaporedja v DNA, ki se prepišejo v RNA, in da sta smer prepisovanja in matrična veriga določena z regulatornimi zaporedji, predvsem položajem promotorja.
- Spoznati, da so ključne podenote bakterijske RNA-polimeraze faktoji  $\sigma$ , ki prepozna promotorska zaporedja različnih skupin bakterijskih genov.
- Razumeti, da se poleg informacijske RNA iz DNA prepišejo tudi molekule RNA, ki imajo v celici strukturno, katalitično in regulatorno vlogo.

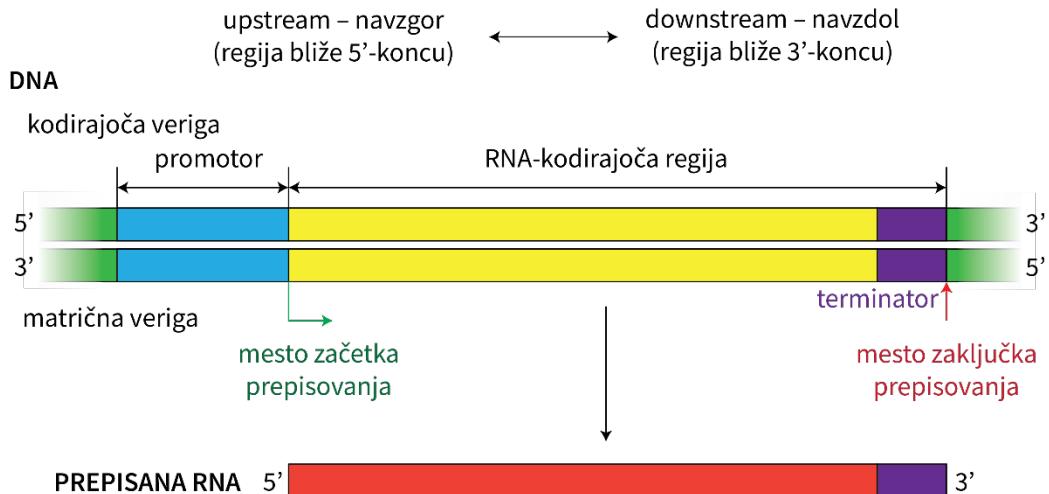
#### UVOD

S prepisovanjem ali transkripcijo se informacija, zapisana v genih na DNA, prenese v molekule RNA. DNA in RNA sta nukleinski kislini, prvo gradijo deoksiribonukleotidi, drugo pa ribonukleotidi. Različni imeni označujeta razliko v sestavi nukleotidov, sladkor v ribonukleotidih je riboza, v deoksiribonukleotidih pa deoksiriboza. Nukleinski kislini se razlikujeta tudi v bazni sestavi. Tako v DNA- kot v RNA-nukleotidih so baze adenin, gvanin in citozin, medtem ko je timin le v molekulah DNA, v RNA pa ga nadomešča uracil. Bazi se razlikujeta na petem mestu pirimidinskega obroča, kjer timin vsebuje metilno skupino, uracil pa ima vezan le vodikov atom. Primarno strukturo RNA predstavlja nukleotidno zaporedje. Čeprav so prepisane RNA enoverižne, se v celici po prepisu praviloma vzpostavijo znotrajmolekulske povezave z vodikovimi vezmi med komplementarnimi bazami, kar omogoči tvorbo sekundarnih struktur, kot so npr. debla, lasnice, zanke itd. Čeprav so sekundarne strukture posledica povezav med adeninom in uracilom ter gvaninom in citozinom, se izjemoma med seboj povežejo tudi druge baze, npr. gvanin in uracil. Poznamo tudi terciarne strukture RNA, imenovane psevdovozli. Nastanejo lahko kot posledica povezave enoverižne RNA z enoverižno regijo v lasnici iste molekule.

#### Geni so definirani odseki DNA, ki se prepišejo v RNA

Geni so zaporedja DNA, ki se prepišejo v RNA. Pri dvovertični DNA ločimo kodirajočo verigo (ang. sense), katere zaporedje je enako zaporedju v molekuli RNA, ter nekodirajoč ali matrično (ang. antisense) verigo. Slednja je matrica za prepis v RNA, z encimom RNA-polimeraza. Torej je matrična veriga osnova za nastanek enakega zapisa v RNA, kot je v kodirajoči verigi (z izjemo, da bodo timine nadomestili uracili). Sinteza RNA je komplementarna in antiparalelna glede na matrično verigo, novi nukleotidi pa se, tako kot pri podvojevanju DNA, dodajajo na 3'-koncu rastoče verige.

Del DNA, ki se prepiše v RNA in zaporedja, ki so pomembna za prepis, imenujemo transkripcijska enota (slika 3-1). Ključni regiji sta promotor in RNA-kodirajoča regija. Prvi nukleotid, ki se prepiše, ima oznako +1. Vse nadaljnje nukleotide v smeri proti 3'-koncu oz. navzdol (ang. downstream) označujemo s predznakom + in zaporedno številko. Nukleotidi v smeri proti 5'-koncu oz. navzgor (ang. upstream) od mesta začetka transkripcije, to je transkripcijske enote, imajo predznak – in zaporedno številko. S številko 0 ne označimo nobenega nukleotida. Prepisovanje se konča, ko RNA-polimeraza prepiše terminatorsko zaporedje, ki postane del RNA.



Slika 3-1: Prikaz transkripcijske enote in nastale prepisane molekule.

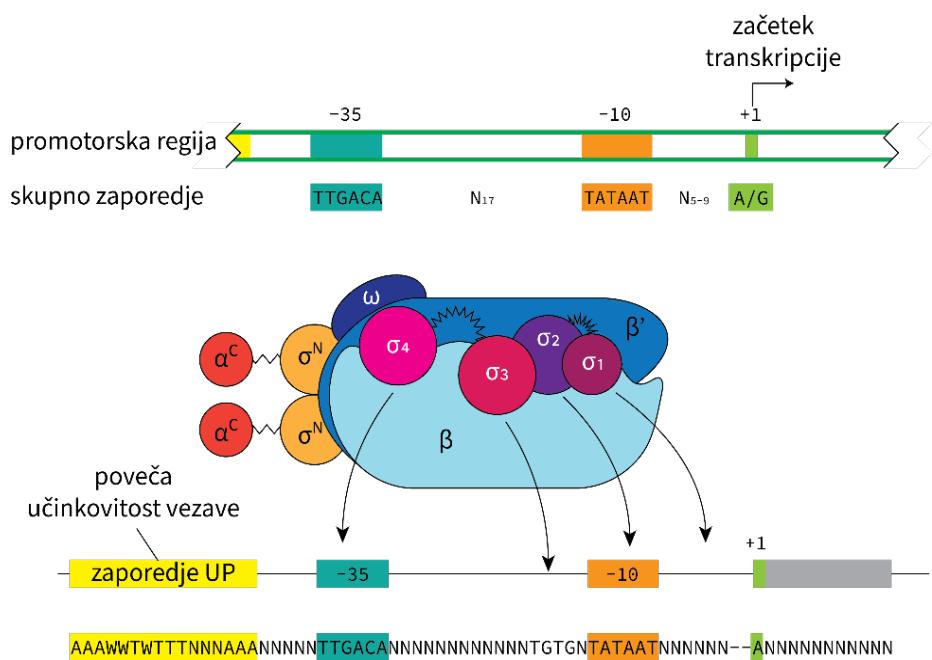
Proteine kodirajoči geni se prepišejo v informacijsko RNA oz. mRNA (ang. messenger RNA), ki jo sestavljajo tri pomembne regije: na začetku in na koncu sta neprevedeni regiji (ang. untranslated region, UTR), ki ju označimo kot 5' UTR in 3' UTR, vmes pa je del, ki se prevede na ribosomu in se začne s kodonom START (začetni kodon) in konča s kodonom STOP (zaključni kodon). V nekaterih primerih so tudi v regiji 5' UTR zaporedja, ki se prevedejo v sklopu uravnavanja prepisovanja genov (npr. atenuacija triptofanskega operona).

Pomembna razlika med prokarionskimi in evkarionskimi geni je v številu strukturnih genov v transkripcijski enoti. Pri evkariontih ima vsak strukturni gen, ki se prepiše v t. i. monocistronska mRNA, svojo regulatorno regijo, za prokarionte pa so značilni operoni. Operon sestavlja skupina (običajno funkcionalno povezanih) strukturnih genov, ki se prepiše skupaj v eno – policistronska mRNA, in pripadajoče zaporedje promotorja in drugih zaporedij, ki uravnava prepisovanje.

Pomembna skupina genov z zapisom za regulatorne ali strukture molekule RNA se ne prevede na ribosomih. Za funkcionalnost prepisa je običajno ključnega pomena sekundarna ali terciarna struktura.

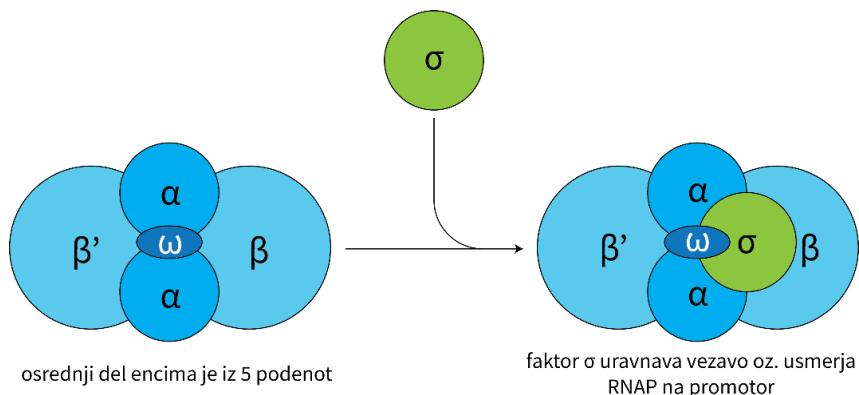
### RNA-polimeraza omogoča prepisovanje DNA v RNA

Za prepis DNA v RNA celice uporabljajo encim RNA-polimerazo (RNAP). Bakterije imajo običajno le eno vrsto RNA-polimeraze, v celici pa je med počasno rastjo povprečno približno 2000 kopij tega encima. Osrednji del encima (ang. core enzyme) je sestavljen iz petih podenot. To sta dve enaki podenoti alfa ( $\alpha$ ), dve podenoti beta ( $\beta$  in  $\beta'$ ) ter podenota omega ( $\omega$ ). Podenoti alfa sodelujeta pri sestavljanju encima in delno prepoznavanju promotorskega zaporedja, saj se s C-terminalnim delom vežeta na t. i. zaporedje UP (slika 3-2) ter s tem povečata učinkovitost vezave encima na DNA.



Slika 3-2: Značilna zgradba bakterijskega promotorja sigma 70 ( $\sigma^{70}$ )

Podenoti  $\beta$  imata katalitično aktivnost, podenota  $\omega$  pa sodeluje pri sestavljanju encima in njegovi stabilizaciji. Ko se osrednjemu delu encima pridruži za promotorsko zaporedje specifična podenota  $\sigma$ , dobimo t. i. holoencim RNA-polimerazo (slika 3-3). Faktor  $\sigma$  usmeri in uravnava vezavo RNAP na značilna promotorska zaporedja specifičnih skupin genov.



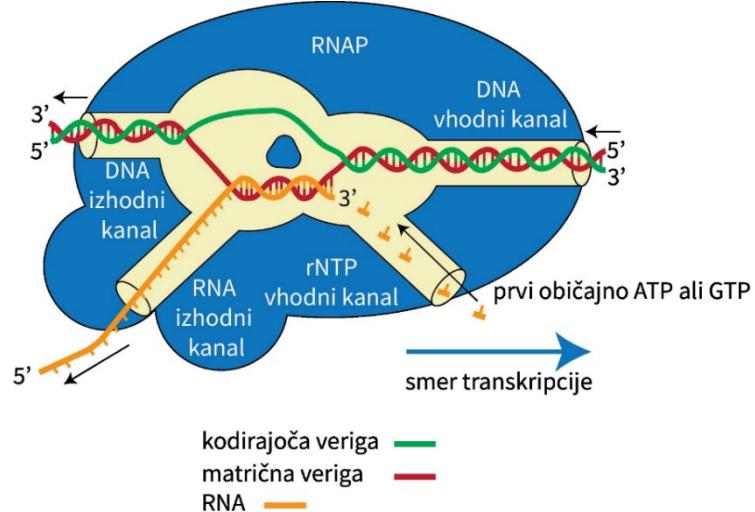
Slika 3-3: Ob pridružitvi faktorja  $\sigma$  osrednjemu delu encima dobimo holoencim, ki prepisuje DNA.

S primerjalno analizo zaporedij v promotorskih regijah je bilo ugotovljeno, da so nekatera zaporedja evolucijsko ohranjena, kar poudarja njihovo pomembnost za funkcionalnost. Takšna zaporedja, pri katerih so enaki nukleotidi na določenem položaju večine promotorjev, imenujemo skupna ali konsenzusna zaporedja. Med najbolj znanimi sta t. i. zaporedji -35 in -10, slednje pri bakterijah imenujemo tudi zaporedje Pribnowa (Pribnow box). Nekatere bakterijske promotorske regije imajo še tretje skupno zaporedje med -40 in -60, imenovano UP (ang. upstream element). Bakterije imajo različne faktorje  $\sigma$ . Naloga vsakega izmed njih je prepoznavanje skupnega zaporedja določene skupine promotorjev in vezava RNAP nanj (slika 3-2). V celicah je običajno največ faktorja

$\sigma^{70}$ , ki prepozna večino bakterijskih promotorjev. Preučeni so še drugi faktorji sigma, npr.  $\sigma^{32}$ ,  $\sigma^{54}$ ,  $\sigma^S$ ,  $\sigma^E$ . Vsak izmed njih prepozna drugačna skupna zaporedja različnih promotorjev, kar omogoča specifičnost začetka prepisovanja določenega gena oziroma skupine genov. Številka označuje velikost oz. maso faktorja sigma, npr. masa faktorja  $\sigma^{70}$  je 70 kDa. Označujemo jih lahko tudi s črkami, npr. faktor sigma S je pravzaprav faktor  $\sigma^{38}$ , sintetizira se kot odziv na stresne razmere in usmerja RNAP na promotorje genov, katerih produkti omogočajo ustrezni stresni odziv. Faktor sigma je običajno sestavljen iz štirih večjih regij oz. domen, označenih od  $\sigma_1$  do  $\sigma_4$ . Prva domena ( $\sigma_1$ ) interagira z regijo, ki leži med začetkom prepisovanja (+1) in skupnim zaporedjem –10, druga domena ( $\sigma_2$ ) se veže na skupno zaporedje –10, tretja ( $\sigma_3$ ) in četrta domena ( $\sigma_4$ ) faktorja sigma se povežeta z zaporedji navzgor od skupnega zaporedja –10, pri čemer je ključna interakcija domene  $\sigma_3$  z zaporedjem na mestu –35.

### Potek prepisovanja pri bakterijah

Prvi korak začetka prepisovanja je prepoznavanje promotorja in vezava RNAP z ustreznim faktorjem  $\sigma$  na promotorsko zaporedje. Od vezave je tako odvisna smer prepisovanja in to, katera veriga bo matrična oz. kodirajoča. Domena  $\sigma_4$  RNAP spozna dvoverižno promotorsko zaporedje –35. Ker je DNA dvoverižna, to stanje imenujemo zaprti kompleks. Nato domena  $\sigma_2$  dvoverižno DNA razpre na zaporedju –10, kar olajša dejstvo, da je tam več adeninov in timinov, in se poveže s kodirajočo verigo. Ta korak imenujemo izomerizacija, omogoči pa nastanek t. i. odprtrega kompleksa – prekinitev vodikovih vezi v zaporedju –10. RNAP je nameščena tako, da je položaj +1 matrične verige v katalitskem delu encima. Iniciacijo transkripcije ali začetek prepisovanja sproži vstop ATP ali GTP v t. i. vhodni kanal za ribonukleotide (ang. rNTP entry channel) (slika 3-4) in povezava z mestom +1 s timinom ali citozinom na matrični verigi (zato je prva baza pri prepisu v RNA pogosto purin) ter vstop in vezava drugih ribonukleozid trifosfatov, kar rezultira v sintezi kratkega začetnega RNA-oligonukleotida, ki je komplementaren DNA. Ta kompleks sedaj imenujemo iniciacijski transkripcijski kompleks.



Slika 3-4: Funkcionalne regije bakterijske RNA-polimeraze.

Ko je začetni RNA-oligonukleotid dolg do 10 nukleotidov, pride do dela domene  $\sigma_3$  (zanka  $\sigma_{3.2}$ ), ki RNAP ustavi v regiji, kjer izstopa RNA in ki jo imenujemo RNA-izhodni kanal (RNA exit channel). Na tej stopnji se transkripcija pogosto konča in znova začne. Proses imenujemo abortivna iniciacija. Če je začetni RNA-oligonukleotid dolg vsaj 10 nukleotidov, lahko prepisana RNA odmakne zanko  $\sigma_{3.2}$  in vstopi v izhodni kanal. Pogosto sledi odcepitev faktorja  $\sigma$ , ta se nato pridruži drugi molekuli

## Poglavlje 3

osrednjega dela RNAP. Sledi faza elongacije transkripcije ali podaljševanja prepisovanja, v kateri je hitrost sinteze RNA 30–100 nukleotidov na sekundo. V 17 bp dolgi regiji, kjer sta verigi DNA razprtji in ki jo imenujemo transkripcijski mehurček, sta DNA in RNA stalno povezani z 8–9 bp dolgim odsekom. RNAP se med prepisovanjem lahko ustavi zaradi sekundarnih struktur, kot so lasnice, ki se tvorijo, ko RNA izstopa skozi izhodni kanal encima RNAP. Včasih se zgodi, da se RNAP pomakne »nazaj« (ang. backtrack) proti 5'-koncu. Pri tem se 3'-konec novonastale RNA pomakne v kanal, v katerega vstopajo ribonukleotidi, in ga tako zapre. V takšnih primerih proteina GreA in GreB s svojim N-koncem vstopita v kanal in v njem odcepita 3'-konec novonastale RNA, da se prepisovanje lahko nadaljuje. Prepisovanje se konča, ko RNAP prepiše t. i. terminatorsko zaporedje – terminator. Ta je za geni, tako posamičnimi kot v operonih. Pri slednjih ni nujno, da so za vsakim genom. Za bakterije sta značilni dve vrsti terminatorjev:

- Intrinzični terminator je od drugih dejavnikov neodvisen terminator in predstavlja približno polovico vseh terminatorjev pri bakterijah. Zanj sta značilni obrnjeni ponovitvi, ki jima sledi zaporedje adeninov. Prepisovanje adeninov upočasni RNAP, zato se lahko v prepisanih obrnjениh ponovitvah komplementarne baze povežejo med seboj in nastane lasnica, ki ji sledi zaporedje uracilov. Oboje destabilizira RNA-polimerazo in med prepisovanjem adeninov se običajno sprosti z matrične verige. Po prekinitvi vezi med uracili in adenini se sprosti nova molekula RNA.
- Za končanje prepisovanja je potreben dodaten protein. Pogosto je to heksamerni protein Rho. Tak način terminacije je pogost, kadar ni sočasnega prevajanja na ribosomih. Rho je helikaza, ki za svoje delovanje potrebuje ATP. Veže se na zaporedje *rut* (približno 40 nukleotidov dolgo zaporedje brez sekundarnih struktur), nato pa potuje po RNA proti 3'-koncu. Ko dohití RNA-polimerazo, ki se je zaustavila (npr. zaradi sekundarnih struktur), s svojo helikazno aktivnostjo prekine hibrid RNA-DNA in tako sprosti novonastalo RNA.

### Prepisovanje pri arhejah

Prepisovanje pri arhejah vsebuje prvine tako prokariontskega kot evkariontskega prepisovanja. Sam mehanizem prepisovanja je podoben evkariontskemu. Arhejska RNA-polimeraza je podobna evkariontski RNA-polimerazi II, prav tako promotorska regija, s tremi pomembnimi spoznavnimi zaporedji za transkripcijske faktorje. Ti so prav tako podobni evkariontskim. Zaporedje TATA je približno 25 nukleotidov navzgor od mesta začetka prepisovanja. Prepozna ga protein TBP (ang. TATA-binding protein). Transkripcijski faktor B (TFB) je podoben evkariontskemu splošnemu transkripcijskemu faktorju TFIIB. TFB se poveže z zaporedjem BRE (B recognition element) in iniciacijskim elementom INIT, ki je ob mestu prepisovanja. Posledično se promotorska regija upogne, kar omogoči vezavo RNA-polimeraze. Sámo uravnavanje prepisovanja z aktivatorji in represorji pa je podobno kot pri bakterijah.

### Molekule RNA

Poleg molekul mRNA, ki se na ribosomih prevedejo v polipeptidno verigo, poznamo številne druge molekule RNA, ki so del številnih ribonukleoproteinov oziroma ribonukleoproteinskih kompleksov, v okviru katerih imajo lahko tudi encimsko-katalitično vlogo ali pa sodelujejo pri uravnavanju izražanja genov. Najštevilnejše med njimi so ribosomska RNA (rRNA) in prenašalna RNA (tRNA), njun delež v hitro rastočih celicah je kar 95 % celokupne celične RNA.

### Prenašalna RNA (tRNA)

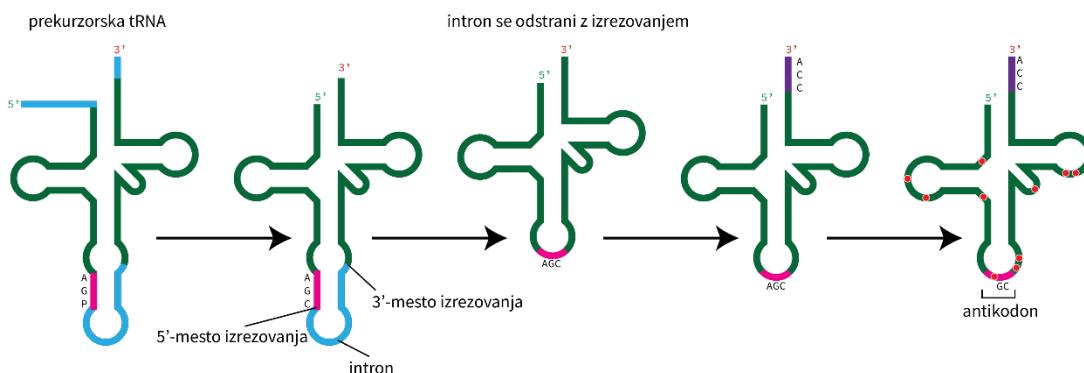
Molekule RNA, ki imajo pripeto specifično aminokislino in sodelujejo pri prevajanju, imenujemo prenašalne RNA oz. tRNA (ang. transfer RNA). V večini organizmov je od 30 do 40 različnih molekul tRNA, vsaka je zapisana s svojim genom. Po večini jih sestavlja od 75 do 95 nukleotidov, po zgradbi

so si med seboj zelo podobne. Znotraj molekule se komplementarne regije povežejo z vodikovimi vezmi in tako ustvarijo sekundarne strukture.

Prenašalna RNA je, tako kot ribosomska, stabilnejša kot mRNA. Za tRNA molekule so značilne redke, kemijsko spremenjene baze, kot npr. psevdouracil, dihidrouracil, ribotimidin itn. Modifikacije baz potečejo po prepisu tRNA iz DNA. Specifične aminokisline se pripnejo na A v zaporedju CCA na 3'-koncu. To zaporedje je del prvotnega prepisa iz DNA ali pa je dodano pozneje.

Geni za tRNA so lahko v skupkih ali pa razpršeni po genomu. Pri *E. coli* so geni za nekatere tRNA le v eni kopiji, za druge pa v več kopijah. Evkariotske celice imajo običajno veliko število kopij vsakega gena za tRNA. Pri *E. coli* se nekaj genov za tRNA običajno prepiše skupaj v eno prekurzorsko (izhodiščno) tRNA, ki se nato razcepi na posamezne tRNA. Sledi procesiranje izhodiščne tRNA, ki se začne na obeh koncih z odstranitvijo nukleotidov. Na sredinski zanki sledi izrez introna, po tem pa na 3'-koncu encim CCA-nukleotidiltransferaza doda tri nukleotide, in sicer dva citozinska in enega adeninskega, če zaporedje ni prisotno že v izhodiščnem prepisu. Temu sledi kemijska spremembra nekaterih baz v molekuli, ki poteče s tRNA modificirajočimi encimi. Po kemijskih spremembah nastane t. i. zrela tRNA (ang. mature tRNA) z značilno strukturo s tremi zankami, poimenovanimi glede na specifične modifikacije baz (slika 3-5). Zanka DHU (tudi D-zanka) je poimenovana po pogosti bazi dihidrouridin, sredinska zanka je antikodonska, desno zanko pa označujemo kot zanko TΨC oz. T-zanko zaradi zaporedja timin, pseudouridin, citozin. Aminokisline se vežejo na sprejemni oz. akceptorski del molekule tRNA. Majhno zanko, ki leži med sredinsko in desno, označujemo kot dodatno oz. raznoliko (variabilno) zanko, saj se njena velikost in zaporedje ribonukleotidov med tRNA lahko precej razlikujeta. Različne tRNA se lahko procesirajo na različne načine.

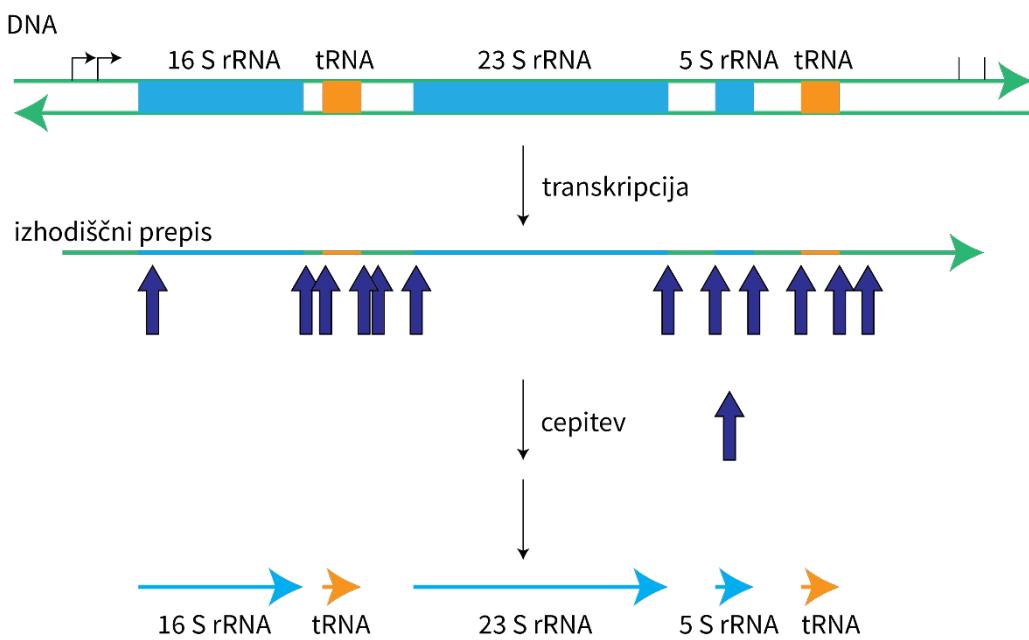
Antikodon se poveže s kodonom na mRNA, preostali deli tRNA pa z ribosomom.



Slika 3-5: Prikaz procesiranja prekurzorske (izhodiščne) tRNA.

## Ribosomska RNA (rRNA)

Geni za ribosomsko RNA so lahko v več kopijah, pri bakterijah je v povprečju ok. petnajst kopij na genom. Vse kopije rRNA so enake ali skoraj enake. Medtem ko so pri evkarijontih geni za rRNA nанизani drug za drugim, so pri bakterijah razpršeni. Evkarijonti imajo dva gena za rRNA; velikega, z zapisom za 5,8 S rRNA, 18 S rRNA in 28 S rRNA, in majhnega, z zapisom za 5 S rRNA. Pri bakterijah vse tri rRNA, to je 5 S rRNA, 16 S rRNA in 23 S rRNA, kodira en gen (slika 3-6).



Slika 3-6: Procesiranje izhodiščnega prepisa za ribosomske RNA.

Po prepisu gena za rRNA nastane izhodiščni prepis za 30 S rRNA, ki se nadalje procesira. Procesiranje te molekule se začne z metiliranjem nekaterih baz in riboz na drugem ogljikovem atomu. Potem mestnospecifične ribonukleaze oz. RNaze to RNA razcepijo na štiri kraje dele, in sicer izhodiščno 16 S rRNA, eno ali več tRNA, izhodiščno 23 S rRNA in izhodiščno 5 S rRNA. Ti izhodiščni prepisi se lahko še skrajšajo. *E. coli* ima 7 operonov za rRNA, ki so na različnih mestih v kromosomu in vsebujejo zapise za različne tRNA. V raziskavah so ugotovili, da vstavljeni geni za tRNA vzdržujejo selekcijo več rRNA operonov v bakterijski celici. Ker gene za rRNA uvrščamo med evolucijsko najbolj ohranjene, se primerjava njihovih zaporedij uporablja pri filogenetskih študijah.

16 S rRNA, ki je del manjše podenote ribosoma, ima pomembno vlogo pri začetku translacije: sodeluje pri pravilni povezavi mRNA z manjšo podenoto ribosoma, 23 S RNA pa deluje kot ribocim, to je peptidiltransferaza, ki združuje aminokisline s peptidno vezjo.

### Druge molekule RNA

Nekodirajoče RNA oz. ncRNA (ang. non-coding RNA) so majhne molekule RNA, ki imajo v celici običajno regulatorno vlogo. Vplivajo na začetek prepisovanja, začetek prevajanja, stanje membrane, različne spremembe po prepisovanju itn. V zadnjem času jih povezujejo z interakcijami med bakterijami in njihovimi evkarionskimi gostitelji. V bakterijah so odkrili tudi dolge nekodirajoče RNA oz. lncRNA (ang. long non-coding RNA). Čeprav so njihove funkcije še razmeroma neznane, se domneva, da sodelujejo pri uravnavanju izražanja tarčnih genov na ravni prepisovanja, prevajanja in/ali razgradnje RNA. Dolge so 200 nukleotidov ali več.

### Razgradnja molekul RNA

Najstabilnejši oblici RNA sta rRNA in tRNA. Funkcionalni lahko ostaneta tudi do nekaj generacij. Informacijska RNA je nestabilna, njen razpolovni čas je običajno krajev od treh minut. RNA razgradijo encimi – ribonukleaze. Poznamo endoribonukleaze, te vez prekinejo znotraj molekule, in eksoribonukleaze, te razgrajujejo RNA s 3'-konca. 5'-konec je zaradi treh fosfatov bolj zaščiten pred delovanjem eksoribonukleaz, čeprav poznamo tudi eksoribonukleaze, ki so zmožne

razgrajevanja s 5'-konca. S 3'-konca je razgradnja možna, če RNA ne vsebuje terminatorske zanke (intrinzičnega terminatorja), razen če je prišlo do poliadensilacije in je za terminatorsko zanko rep iz več adeninskih nukleotidov: takrat je kljub terminatorski zanki razgradnja mogoča (glej tudi poglavje o izražanju genov in uravnavanju na ravni stabilnosti mRNA).

## TEMELJNI POJMI

- Gen – del DNA, ki se prepiše v molekulo RNA.
- Operon – skupina (običajno bakterijskih) genov, s skupno regulatorno regijo.
- Faktor  $\sigma$  (sigma) – podenota holoencima RNA-polimeraza, ki se pridruži osrednjemu delu encima in omogoči specifično vezavo na promotorje različnih skupin genov.
- Zaporedje Pribnowa – z adenini in timini bogato zaporedje v promotorju na mestu -10 pri bakterijah.
- Kodon – zaporedje treh nukleotidov, ki določa aminokislino.
- Antikodon – zaporedje treh nukleotidov v tRNA, ki je komplementarno zaporedju posameznega kodona.
- Intrinzični terminator – zaporedje, ki zaradi strukturnih značilnosti, kot je tvorba lasnic, ki jim sledi zaporedje uracilov na prepisani RNA, povzroči pavziranje RNA-polimeraze, destabilizacijo hibrida RNA-DNA in posledično odcepitev RNAP iz matrične DNA.
- Ribocim – molekula RNA, ki lahko deluje kot encim.
- Ribonukleaze – encimi, ki razgrajujejo RNA.
- Policistronska RNA – RNA z zapisi za več polipeptidov/proteinov.
- Monocistronska RNA – RNA z zapisom za posamezni polipeptid/protein.

## POVZETEK

Prepisovanje ali transkripcija DNA je proces, pri katerem se sporočilo, zapisano v zaporedju nukleotidov v molekuli DNA, prenese v molekulu RNA. DNA in RNA sta nukleinski kislini, ki se razlikujeta po sestavi sladkorjev in pirimidinskih baz. Za prepis je pri bakterijah potreben encim RNA-polimeraza, ki se veže na promotorsko regijo gena oziroma operona. Ključna zaporedja v promotorski regiji, od katerih je odvisno, katera veriga se bo prepisala v kateri smeri, in jih spozna podenota  $\sigma$  RNA-polimeraze, so na mestih -35 in -10. Proses prepisovanja je razdeljen v faze začetka ali iniciacije, podaljševanja ali elongacije in zaključka ali terminacije. Slednja je odvisna od specifičnih zaporedij, ki jih imenujemo terminatorji. Protein kodirajoči geni se prepišejo v informacijsko RNA – mRNA, ki je kratkoživa in se včasih sočasno s prepisovanjem že začne prevajati na ribosomih. Poleg mRNA so v celici še druge molekule RNA. Pomembno vlogo pri prevajanju imata prenašalna RNA – tRNA in ribosomska RNA – rRNA. Geni za obe vrsti RNA se prepišejo v daljše izhodiščne prepise, ki se preoblikujejo – procesirajo, tako da nastanejo posamezne tRNA, za katere so značilni modificirani nukleotidi in struktura, ki je pomembna za njihovo funkcionalnost, ter tri različne rRNA (5 S, 16 S in 23 S) od vsakega rRNA-operona. Za uravnavanje izražanja genov in druge funkcije v bakterijski celici so pomembne še druge nekodirajoče molekule RNA, vključno z razmeroma malo zanimimi, ki so daljše od 200 nukleotidov.

## 4 PREVAJANJE mRNA V PROTEINE – TRANSLACIJA

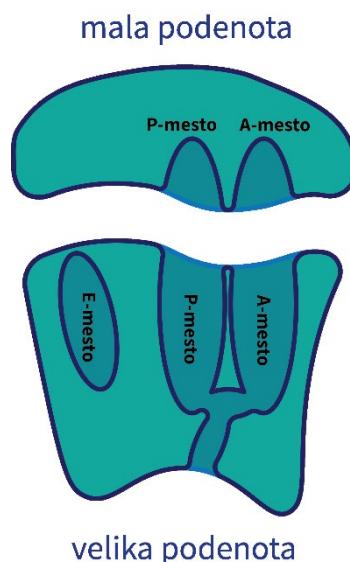
Nikolaj Mavrek, Marjanca Starčič Erjavec

### UČNI CILJI

- Spoznati in razumeti zakonitosti prevajanja mRNA v proteine.
- Spoznati in razumeti posebnosti izražanja genov prokariontov.
- Spoznati in razumeti zakonitosti uravnavanja ribosomov in tRNA.

### UVOD

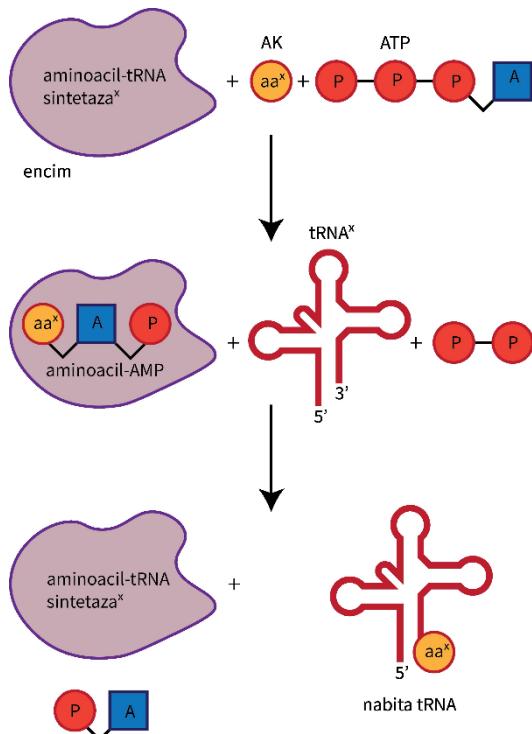
Ribosomi so največje, najkompleksnejše in evolucijsko izredno ohranjene strukture v bakterijski celici. Vsaka celica ima na tisoče ribosomov, so namreč med glavnimi sestavinami celice, njihovo število pa variira glede na rastne razmere. Ribosomi so pravzaprav veliki encimi, katerih naloga je polimerizacija aminokislin in tvorba polipeptidne verige. Sestavljeni so iz večike in male podenote. Na ribosomih lahko določimo tri pomembna mesta za prevajanje: mesto A, kjer se na mRNA veže naslednja aminoacilirana tRNA; mesto P, kjer nastane peptidna vez med zadnjim aminokislinskim ostankom v peptidni verigi in naslednjim aminokislinskim ostankom, ki je še na tRNA, vezani na A mestu, in mesto E, s katerega se sprosti tRNA brez aminokislinskega ostanka (slika 4-1).



Slika 4-1: Zgradba ribosoma.

### Aminoacilacija oz. vezava aminokisline na tRNA

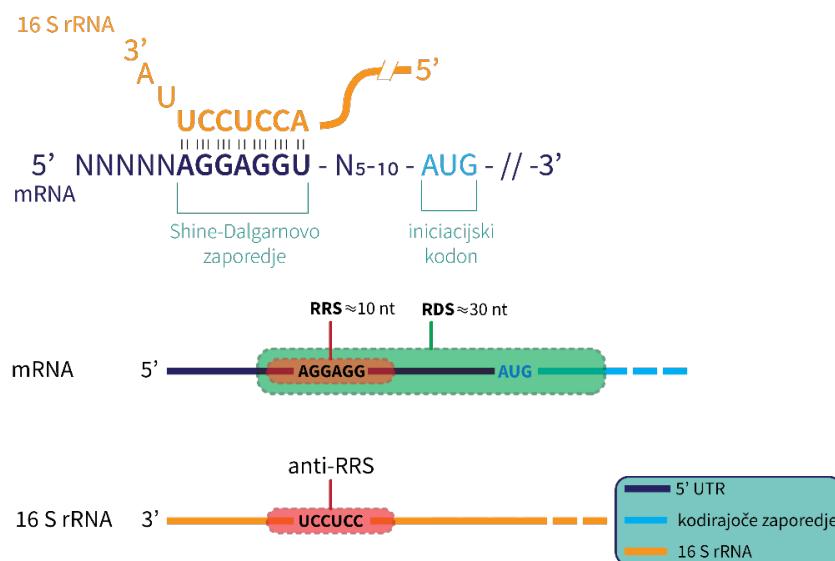
Aminoacil-tRNA sintetaze so encimi, ki povežejo tRNA z ustreznou aminokislino tako, da prepoznao antikodon, velikost dodatne (variabilne) zanke ter diskriminacijsko bazo tik pod tremi dodanimi nukleotidi na 3'-koncu. S hidrolizo molekule ATP in vezavo AMP na aminokislino dobimo aminoacil-AMP, v naslednjem koraku AMP nadomesti tRNA (slika 4-2).



Slika 4-2: Potek vezave aminokisline na tRNA. Z vezavo aminokisline na tRNA nastane aminoacilirana tRNA.

### Regija iniciacije translacije

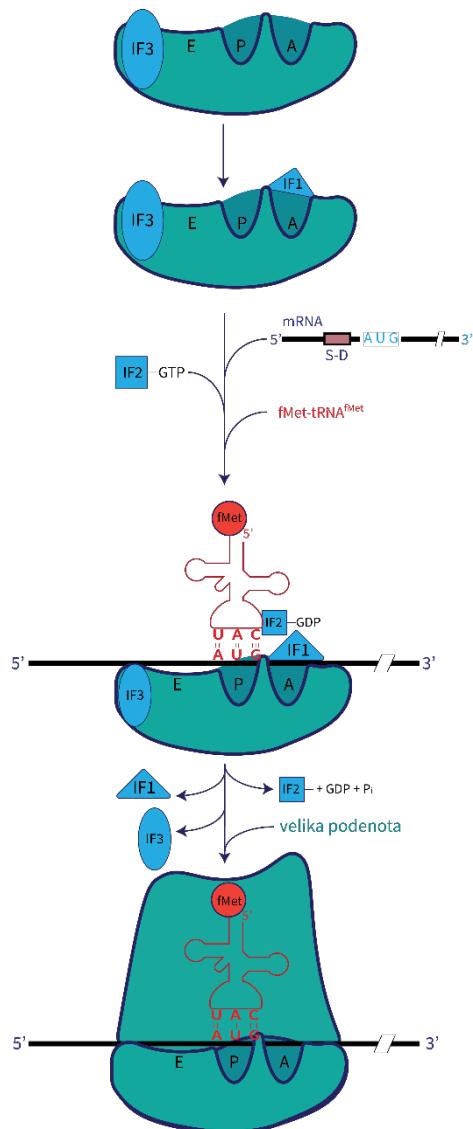
Na molekuli mRNA mora ribosom začeti prevajanje na pravem mestu na - regiji iniciacije translacije (ang. translation-initiation region, TIR) (slika 4-3). Poleg tega imena se je uveljavila tudi kratica RDS (ang. ribosome docking site). To regijo sestavlja Shine-Dalgarnovo zaporedje (S-D) ali ribosomske vezavne mesta (ang. ribosome binding site, RBS; lahko tudi RRS, ang. ribosome recognizing sequence) ter začetni kodon, najpogosteje AUG, ki zapisuje aminokislino formilmetyonin (fMet). Poleg AUG je lahko začetni kodon GUG, redkeje UUG ali CUG.



Slika 4-3: Regija iniciacije translacije mRNA (RDS). Znotraj te regije je značilno Shine-Dalgarnovo zaporedje AGGAGG (RRS).

### Iniciacija prevajanja

Prva stopnja prevajanja je začetek ali iniciacija. Na ribosomsko podenoto 30 S se najprej veže protein IF-3, nato protein IF-1, katerega naloga je stabilizacija ribosomske podenote 30 S. Začetni kodon se veže neposredno na mesto P, kar omogoči protein IF-2, povezan z GTP. Molekula tRNA s formilmetytoninom (fMet) je podobna peptidil-tRNA, ki je značilna za mesto P na ribosomu, zato se nanj lahko neposredno veže. IF-2 in IF-3 zagotovita natančno namestitev mRNA in začetne oz. initiatorske tRNA. IF-1 in IF-3 se odcepita, IF-2 pa s hidrolizo GTP omogoči povezavo ribosomskih podenot 30 S in 50 S (slika 4-4).

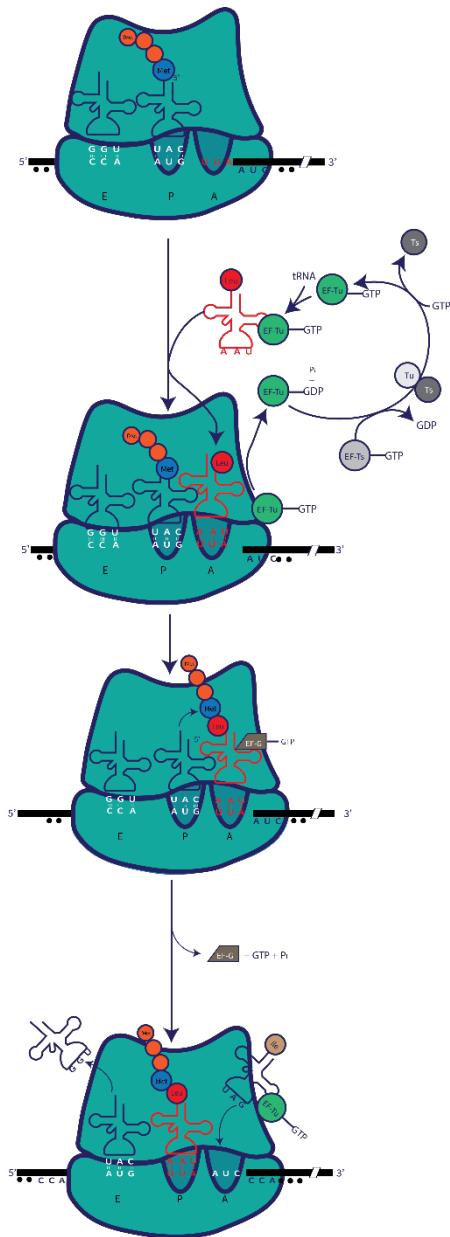


Slika 4-4: Potek začetka prevajanja. Za sam začetek prevajanja so potrebni iniciacijski faktorji IF1, IF2, IF3, začetna tRNA, mRNA ter mala ribosomska podenota (30 S). Nastane iniciacijski kompleks 30 S, ki se nato poveže z veliko ribosomsko podenoto (50 S) v iniciacijski kompleks 70 S.

Nekatere bakterije nimajo zaporedja TIR. Pri teh so odkrili, da je začetni kodon popolnoma na začetku ali v neposredni bližini 5'-konca. V teh primerih je mehanizem začetka prevajanja nekoliko drugačen; ali kar sestavljen ribosomski kompleks 70 S prepozna začetni kodon in se nanj ustrezno namesti ali pa začetni kompleks iz podenote 30 S, IF-2 in začetne tRNA prepozna začetni kodon na mRNA in se ustrežno veže nanj.

## Elongacija prevajanja

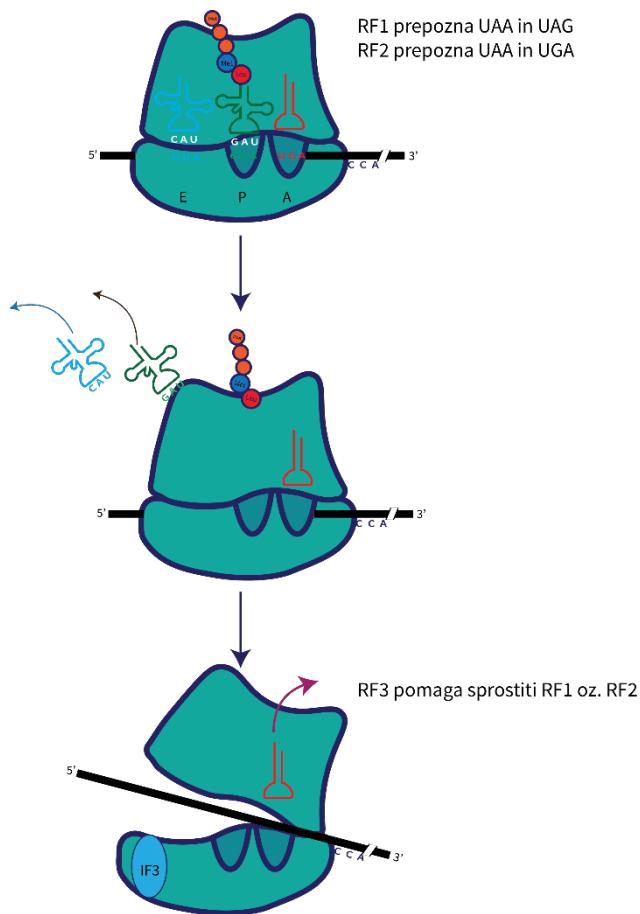
V drugi stopnji prevajanja, elongaciji oz. podaljševanju, se ribosom premika za 3 nukleotide proti 3'-koncu mRNA. Prihaja do vezave naslednjega 5'→3' kodona s 3'→5' antikodonom tRNA, pravilnost vezave pa zagotavlja specifičen del zaporedja na 16 S rRNA (ang. decoding site). Protein EF-Ts z vezanim GTP aktivira protein EF-Tu, da nastane EF-Tu-GTP, ki tRNA z aminokislinskim ostankom dostavi na mesto A. Akceptorski konec tRNA z aminokislinskim ostankom pride v stik s 23 S rRNA, ki s peptidiltransferazno funkcijo ustvari vez med zadnjim aminokislinskim ostankom že nastajajočega peptida in naslednjim aminokislinskim ostankom, ki ga je tRNA prinesla na mesto A. Po nastanku peptidne vezi v ribosom vstopi protein EF-G z vezanim GTP, ki se porabi za premik ribosoma za 3 nukleotide v smeri 5'→3' oz. premestitev tRNA z mesta A na mesto P in predhodne tRNA z mesta P na mesto E. Novo tRNA z aminokislinskim ostankom na izpraznjeno mesto A privede drug protein EF-Tu-GTP (slika 4-5).



Slika 4-5: Potek elongacije. V tej stopnji prevajanja sodelujejo elongacijski faktorji EF-Ts, EF-Tu in EF-G.

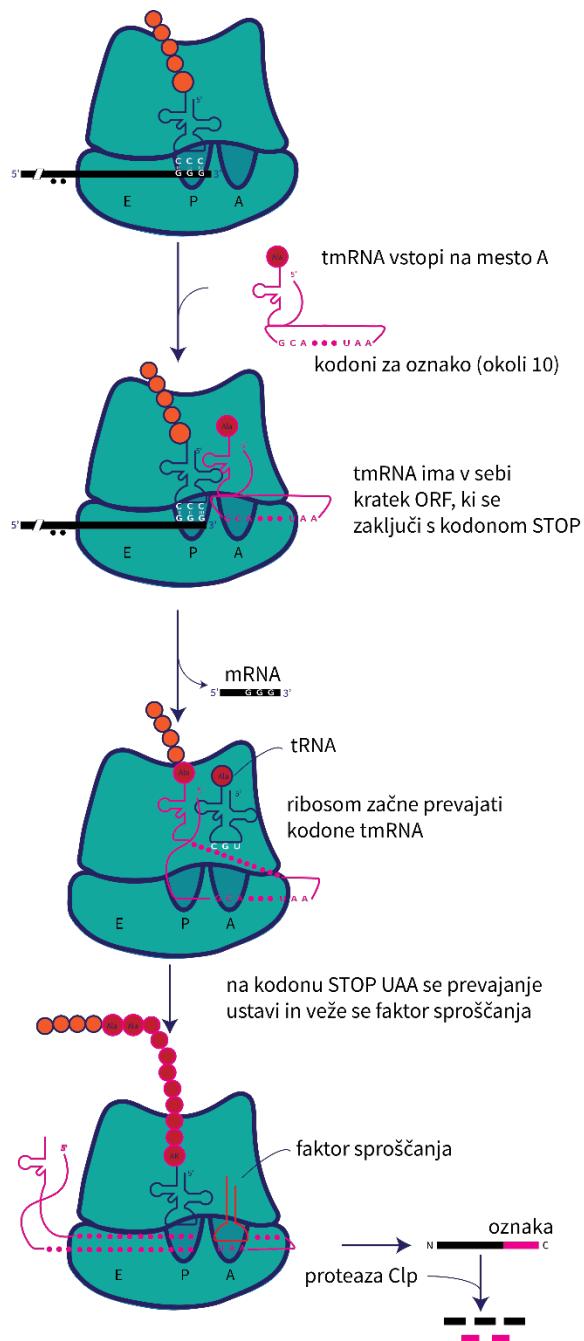
### Terminacija prevajanja

Zadnja stopnja prevajanja je terminacija oz. zaključek. Pri tem procesu sodelujejo faktorji sproščanja oz. proteini RF (ang. release factor), ki se vežejo na mesto A. RF1 prepozna zaključna kodona UAA in UAG, RF2 pa zaključna kodona UAA in UGA. Ribosom ob vezavi teh proteinov sprosti polipeptidno verigo, tRNA se ob pomoči kompleksa EF-G-GTP sprostijo z ribosoma, RF3 pa omogoči sprostitev RF1 in RF2 in disociacijo ribosoma (slika 4-6). Za disociacijo sta potrebna še EF-G in ribosomski sprostitveni faktor (ang. ribosome release factor, RRF). Oba privedeta do odcepitve polipeptidne verige s tRNA in mRNA z ribosoma.



Slika 4-6: Terminacija prevajanja. Faktor sproščanja (RF) se veže na zaključni kodon. Nastali polipeptid se sprosti in ribosom disociira.

Poznamo primere, ko na mRNA ni zaključnega kodona. Tedaj se na njen 3'-konec veže posebna tmRNA (ang. transfer-messenger RNA), ki združuje značilnosti tRNA in mRNA; na akceptorskem koncu namreč nosi alaninski aminokislinski ostank, njena antikodonska zanka pa je podaljšana v približno 10 kodonov dolg odprt bralni okvir (ang. open reading frame, ORF), ki se konča z zaključnim kodonom. Ribosom tako nadaljuje branje tega ORF, na N-konec polipeptida doda še nekaj aminokislinskih ostankov, kot so zapisani v ORF tmRNA. Ko na mesto A pride zaključni kodon iz tmRNA, sledi terminacija kot običajno. Proteaza Clp prepozna peptid, ki ima dodane v tmRNA zapisane aminokislinske ostanke, in ga v celoti razgradi (slika 4-7).



Slika 4-7: Terminacija prevajanja s tmRNA.

Aminokislinska zaporedja na N-koncu običajno nimajo formilne skupine. Po večini niti na začetku nimajo metionina, saj imajo celice dva encima, peptid deformilazo, ki odstrani formilno skupino, in metionin aminopeptidazo, ki odcepi metioninski aminokislinski ostanek z novonastalega peptida.

### Posebnosti izražanja genov prokariontov

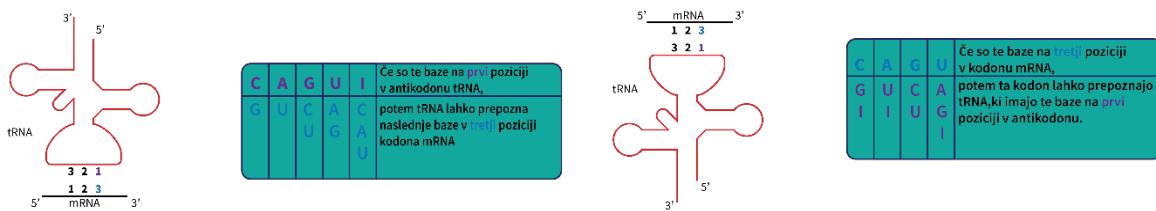
Pri prokariontih je večina mRNA policistranske, kar pomeni, da je na isti mRNA zapis za več genov. Med geni leži t. i. intercistronsko zaporedje, ki sega od konca zaključnega kodona predhodnega gena do začetnega kodona naslednjega gena (Shine-Dalgarnovo zaporedje je torej v intercistronskem zaporedju). Intercistronska zaporedja so različno dolga, od -1 (segajo v zaključni

kodon) do 40 nukleotidov. Ribosomi na zaključnem kodonu vsakega posameznega gena disociirajo, na Shine-Dalgarnovih zaporedjih pa se ponovno vzpostavijo. Na tak način lahko policistronska mRNA hkrati prevaja več ribosomov, vsak svoj gen, in pomikajo se proti 3'-koncu mRNA. Molekulo mRNA, ki jo prevaja več ribosomov, imenujemo poliribosom. S pojmom vezano prevajanje oz. vezana translacija pa označujemo pojav, ko na mRNA zaključni kodon kakega gena in Shine-Dalgarnovo zaporedje naslednjega gena sovpadata in tvorita lasnično zanko, kar onemogoči vezavo ribosoma na sredo molekule mRNA in prevajanje. Šele ko se zanka razpre, se translacija naslednjega gena lahko prične.

Prepisovanje in prevajanje pri bakterijah pogosto potekata hkrati, kar pomeni, da RNA-polimeraza prepisuje DNA v mRNA, na to mRNA pa se že vežejo ribosomi in izdelujejo polipeptid. Hitrost RNA-polimeraze in proteinske sinteze ribosoma sta približno enaki, tako da ne pride do naletavanja in interferenc med procesoma.

### Genetski kod in prevajanje genetske informacije

Genetski kod povzema zapis – kodiranje zaporedja aminokislina v zaporedju mRNA. Trije zaporedni nukleotidi (kodon) kodirajo eno aminokislino. Genetski kod je redundanten, ker lahko več različnih kodonov zapisuje isto aminokislino, in univerzalen, saj je pri večini živih bitij enak. Obstaja nekaj izjem, npr. pri bakterijah rodu *Mycoplasma* kodon UGA ne predstavlja zaključnega kodona, ampak informacijo za aminokislino triptofan. Tretje mesto kodona je tisto, ki omogoča degeneriranost genetskega koda. V praksi to pomeni, da lahko pride do zamenjave baze na tretjem mestu, ne da bi to vplivalo na nastajajoče aminokislinsko zaporedje. Na tretjem mestu kodona je parjenje nespecifično, kar rezultira v tem, da 49 različnih tRNA lahko prepozna vseh 64 kodonov – posamezna tRNA lahko prebere več različnih kodonov. Velja tudi, da različne tRNA lahko preberejo isti kodon. (slika 4-8).



Slika 4-8: Nespecifično parjenje tretjega mesta kodona s prvim mestom antikodona.

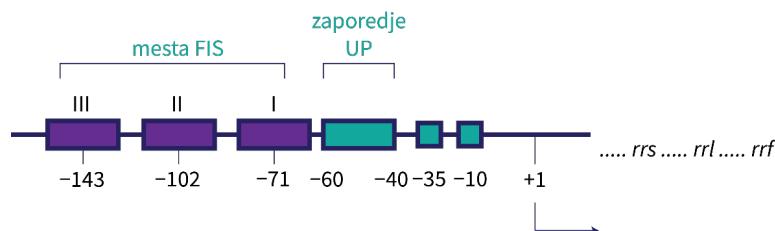
### Regulacija sinteze ribosomov in tRNA

Da lahko celice uspešno rastejo, morajo z energijo preudarno ravnavati. Med najučinkovitejše načine ravnanja z energijo spada uravnavanje sinteze ribosomov in tRNA. Vsaj 50 % sintetizirane RNA v celici je ali rRNA ali tRNA, a celice naredijo le toliko rRNA in tRNA, kolikor ju potrebujejo. To je odvisno od hitrosti rasti, npr. hitro rastoča *E. coli* potrebuje okoli 70.000 ribosomov na celico, počasi rastoča pa okoli 20.000 ali celo manj.

Med ribosomskimi geni so tudi geni za tRNA, RNA-polimerazo in proteine, potrebne pri podvojevanju DNA. Ribosomski geni niso naključno posejani po kromosому, ampak so zbrani v večjih skupkih okoli mesta začetka podvojevanja kromosoma (*oriC*). Dva največja skupka sta na kromosому okoli 73' in 90'.

V vsakem ribosomu je po ena molekula vsake vrste rRNA (16 S, 23 S in 5 S), zato je nastanek vseh treh vrst iz ene izhodiščne molekule RNA (prekurzorska molekula RNA) pripraven, saj zagotavlja,

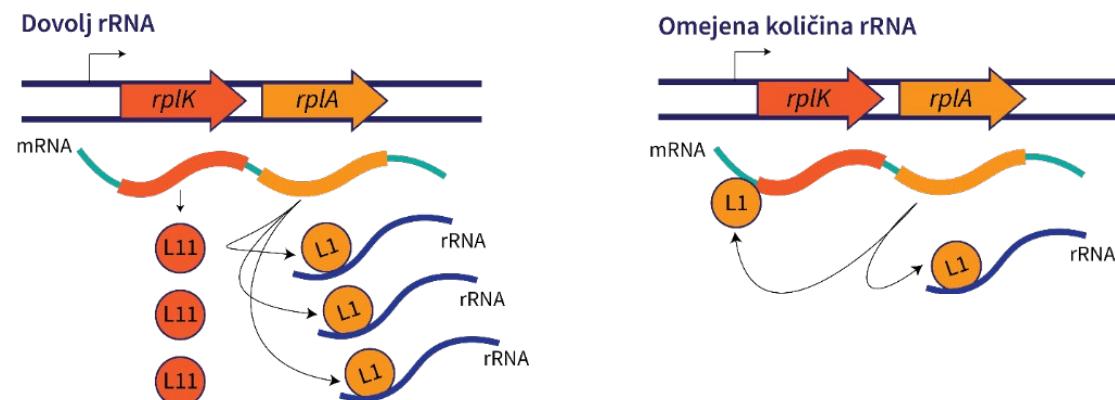
da so v celici v enaki količini. Bakterije imajo več kopij operona za rRNA, kar zagotavlja rRNA v zadostnih količinah, npr.: *E. coli* ima 7 operonov za gene rRNA, *B. subtilis* pa 10 kopij operona za rRNA. Promotorske regije operonov za gene rRNA so zelo močne, saj se zelo ujemajo s konsenzusnimi zaporedji promotorjev -10 in -35, ki jih prepoznavajo faktorji  $\sigma^{70}$ . Geni za rRNA imajo tudi zaporedje UP, ki izboljša vezavo C-terminalnih domen podenote  $\alpha$  RNA-polimeraze na promotor. Poleg tega imajo še vezavna mesta za proteine FIS, ki dodatno pospešijo prepisovanje. Obstajajo še antiterminatorski elementi, ki so tik za promotorjem ter med *rrs* in *rrl*; preprečujejo zaustavljanje RNA-polimeraze in predčasno terminacijo prepisovanja (slika 4-9).



Slika 4-9: Promotorsko-operatorska regija operona za rRNA.

Uravnavanje sinteze rRNA poteka preko koncentracije ATP oz. GTP. Promotorske regije operonov rRNA in tudi tRNA so občutljive za koncentracije ATP oz. GTP, saj sta to prva nukleotida, vstavljeni v nastajajočo molekulo RNA (začetni nukleotid). RNA-polimeraza se lahko veže na te promotorje in tako tvori zaprti kompleks, iz tega lahko nastane odprtji kompleks, vendar je ta ob nizki koncentraciji ATP oz. GTP odprt le kratek čas in se hitro vrne v stanje zaprtega kompleksa. Ob zadostni koncentraciji ATP oz. GTP nastane prekurzorska RNA, ki se nato procesira.

Sinteza ribosomskih beljakovin in rRNA je usklajena, čeprav potekata neodvisno druga od druge. Ribosomske beljakovine so zapisane na drugih operonih in se z rRNA združijo v funkcionalne ribosome kasneje. Hitrost sinteze ribosomskih beljakovin je translacijsko samouravnava (avtoregulirana) – en protein skrbi za posttranskripcijsko uravnavanje operona. Pri *E. coli* je tak npr. protein L1. Kadar je rRNA zadosti, se L1 veže nanjo, da nastane velika ribosomska podenota, kadar pa je rRNA malo, se L1 veže na TIR mRNA za ribosomske beljakovine ter tako prepreči prevajanje (slika 4-10).

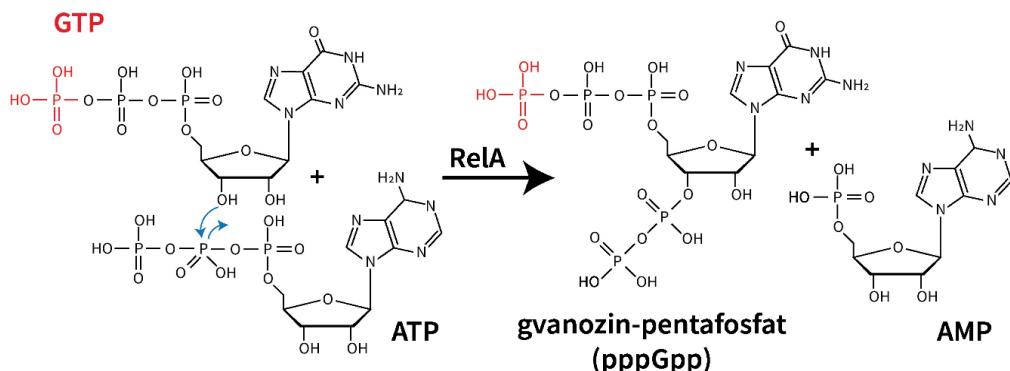


Slika 4-10: Sinteza ribosomskih beljakovin in rRNA je usklajena – primer uravnavanja s proteinom L1. To je strukturni protein ribosomske podenote, vendar je njegova naloga tudi uravnavanje operona ribosomskih beljakovin.

Ko celicam zmanjka hranil, zmanjka tudi na tRNA vezanih aminokislinskih ostankov, zato se ustavi prevajanje ter posledično tudi sinteza rRNA in tRNA, saj sta prevajanje ribosomskih beljakovin in sinteza rRNA povezani. Prenehanju sinteze rRNA in tRNA ob primanjkljaju hraniloziroma zaustavitvi sinteze beljakovin pravimo odziv na neugodne razmere (ang. stringent response). Na

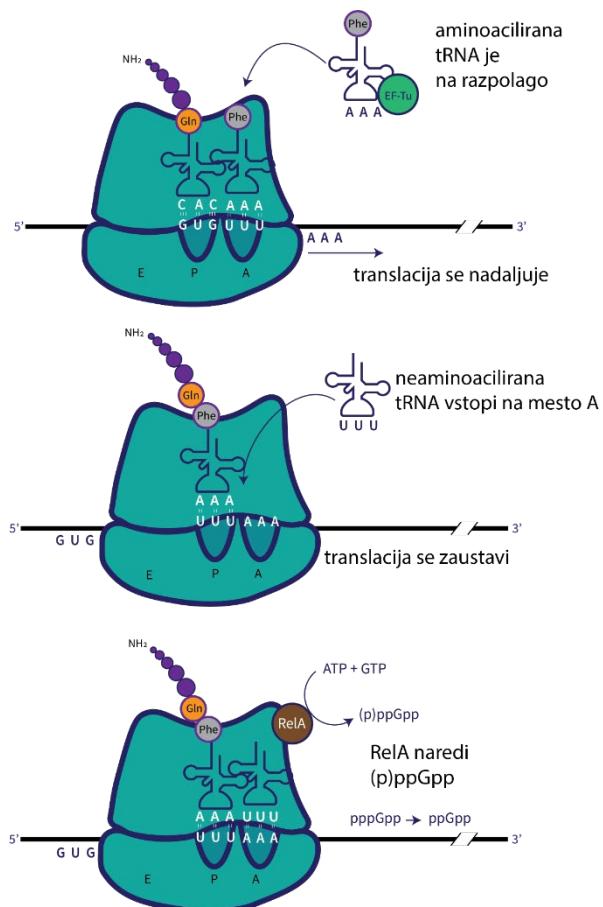
## Poglavlje 4

ta način celica prihrani energijo in vire. Odziv na neugodne razmere je povezan z nastankom molekule ppGpp (slika 4-11), ki jo sintetizira protein RelA. RelA s svojo encimsko aktivnostjo najprej omogoči nastanek pppGpp iz molekul ATP in GTP, nato pa nastali molekuli s svojo fosfatazno sposobnostjo na 5'-koncu odcepi en fosfat, da nastane ppGpp.



Slika 4-11: Nastanek pppGpp.

V odzivu na neugodne razmere (slika 4-12) se tako zazna razpoložljivost aminoaciliranih tRNA. Ko potrebne aminoacilirane tRNA namreč ni na voljo, ribosomi prenehajo translacijo, saj se na mesto A veže neaminoacilirana tRNA. Ob zaustavitvi ribosomske proteinske sinteze RelA sproži tvorbo ppGpp.



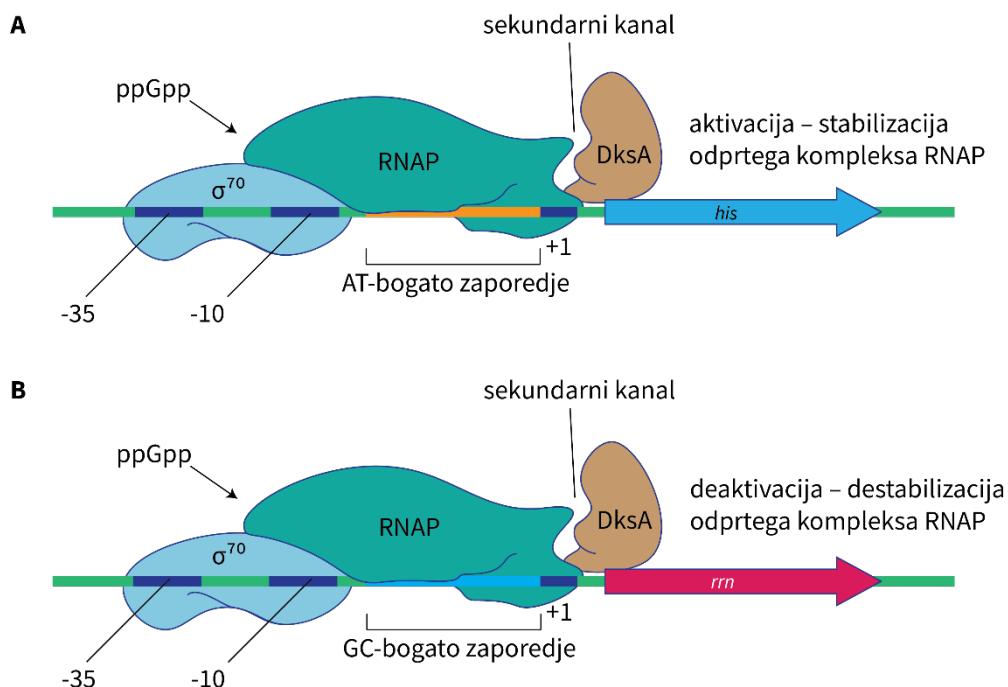
Slika 4-12: Odziv na neugodne razmere.

Na znotrajcelično koncentracijo ppGpp vpliva tudi protein SpoT. Podobno kot RelA lahko sintetizira (p)ppGpp, vendar ppGpp lahko pretvori tudi v GDP; ta pretvorba je ob pomanjkanju hranil sicer inhibirana (slika 4-13).



Slika 4-13: Encimski aktivnosti proteinov RelA in SpoT.

Ob pomanjkanju hranil koncentracija ppGpp naraste, enako se zgodi s prehodom v stacionarno fazo in tudi v drugih stresnih razmerah, zato mu pravimo splošni alarmon. Protein DksA pri *E. coli* še dodatno okrepi delovanje alarmona ppGpp, saj vstopi v kanal RNA-polimeraze, skozi katerega vstopajo nukleotidi (podobno kot proteina GreA in GreB), in tako še dodatno inhibira prepis operonov za rRNA. Na promotorskih regijah za gene biosinteze aminokislin pa ima na RNA-polimerazo ravno obraten učinek in stimulira prepis teh genov (slika 4-14).



Slika 4-14: Protein DksA na promotorskih regijah za gene biosinteze aminokislin ima stimulativen učinek (A), a na operonih za rRNA dodatno inhibira prepisovanje (B).

Homologe proteinov RelA in SpoT najdemo skoraj v vseh bakterijskih genomih. *B. subtilis* ima npr. encim Rsh, ki je homolog SpoT, nima pa homologa DksA, saj ti niso tako pogosti. Je pa pri *B. subtilis*

## Poglavlje 4

odziv na neugodne razmere nekoliko drugačen, saj na regulacijo operonov za rRNA bistveno bolj vpliva koncentracija GTP in ne alarmona ppGpp.

### TEMELJNI POJMI

- Aminoacil-tRNA sintetaza – encim, ki poveže tRNA z ustrezeno aminokislino.
- Regija iniciacije translacije – mesto začetka prevajanja mRNA.
- Genetski kod – univerzalni ključ za prevod informacije na mRNA v beljakovino.
- ppGpp – alarmon, ki celico obvesti o neugodnih razmerah.

### POVZETEK

Ribosomi so najkompleksnejše in evolucijsko izredno ohranjene strukture bakterijske celice. Njihova naloga je polimerizacija aminokislin v polipeptidne verige. Ribosomi so sestavljeni iz male in velike podenote. Prevajanje se začne na regiji iniciacije translacije, kjer ribosom prevede prvi kodon, najpogosteje AUG, v aminokislino formilmetionin. Prevajanje poteka do zaključnega kodona, ko se z ribosoma sprosti novonastala peptidna veriga in ribosom disociira. Genetski kod nam pove, katera aminokislina se bo vgradila v nastajajočo beljakovino. Za uspešno rast celic je potrebno preudarno ravnanje z energijo. Sinteza komponent ribosomov je zato zelo natančno uravnana.

## 5 MUTACIJE IN REKOMBINACIJE

Nikolaj Mavrek, Marjanca Starčič Erjavec

### UČNI CILJI

- Spoznati mutacije in razumeti različne načine nastanka mutacij.
- Spoznati in razumeti zakonitosti in vlogo rekombinacije.

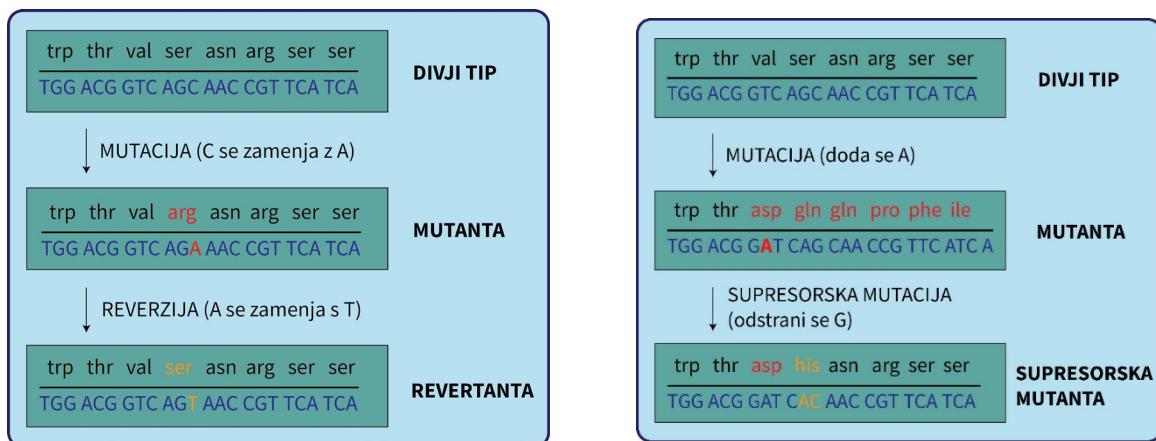
### UVOD

Mutacije označujejo vsako spremembo v zaporedju nukleotidov v DNA, ki se deduje. Sprememba se lahko pojavi v enem ali več baznih parih, dodane ali izrezane pa so lahko celo obsežne regije kromosoma.

Enojna mutacija (ang. single mutation) je posledica ene napake pri replikaciji, rekombinaciji ali popravljanju in ni vezana na število spremenjenih baz. Vroče točke (ang. hot spots) so deli kromosoma, lahko tudi posamezni nukleotidi, na katerih je pogostost mutacij večja.

### Mutante

Celicam, ki so pridobile vsaj eno mutacijo, pravimo mutante. Mutantam, ki se jim zaradi mutacije funkcija kakšnega gena spremeni, v naslednjih generacijah pa se zaradi novih mutacij v zaporedju DNA istega kodona funkcija spet povrne, pravimo povratnice ali revertante (ang. revertant) (slika 5-1 – levo). To se zgodi tako, da se prav na mestu spremembe v naslednjih generacijah ponovno zredi zamenjava v nukleotid, ki je bil prisoten pred prvo mutacijo, ali pa se zapis spremeni tako, da se zaradi degeneriranosti genetskega koda kodonu povrne pomen. Funkcija pa se mutantam lahko povrne tudi s t. i. supresijo mutacije (slika 5-1 – desno). O njej govorimo, kadar se nekje zunaj mutiranega kodona zgodi mutacija, ki izniči vpliv prve mutacije.



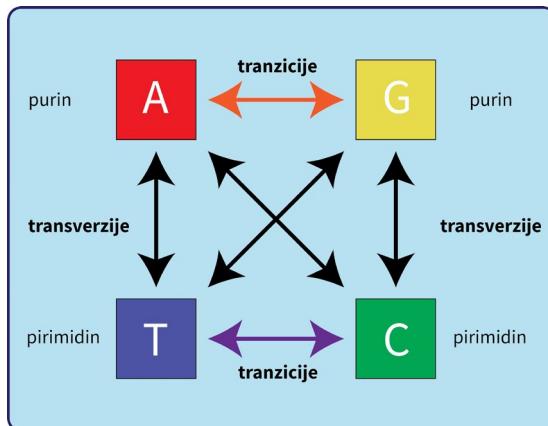
Slika 5-1: Mutante – revertante – supresorske mutante. Brez sekvenciranja oz. poznavanja aminokislinskega zaporedja ne moremo ločiti med revertanto in supresorsko mutantno.

Obstajata dve obliki supresije mutacij, intragenska ter intergenska. Pri prvi originalna mutacija, npr. zamenjava, inaktivira beljakovino, druga mutacija v istem genu pa povzroči spremembo, ki ponovno povrne izvorni fenotip – celica ima ponovno funkcionalno beljakovino. Ponoven premik bralnega okvira, ki izniči predhoden premik, je prav tako primer intragenske supresije. Če bi originalna mutacija spremenila funkcionalno beljakovino v nefunkcionalno, mutacija v drugem genu pa bi prvo beljakovino spremenila nazaj v funkcionalno (ali pa bi vplivala na pojavitev drugačne beljakovine, ki bi v celici nadomestila prvo), bi govorili o intergenski supresiji. Poznamo

pa tudi supresijo nesmiselnih mutacij – povezana je s t. i supresorsko tRNA. O tem govorimo takrat, ko zaradi mutacije v DNA nastanejo zaključni kodoni (kodoni STOP), s supresijsko mutacijo v genskem zaporedju za antikodon tRNA pa se ta spremeni tako, da zaključni kodon prebere kot kodon za aminokislino. Prevajanje mRNA se tako ne ustavi, temveč nadaljuje, kot bi se, če se mutacija v DNA ne bi zgodila.

### Zamenjave baznih parov (substitucije)

Pri zamenjavah baznih parov oz. substitucijah ločimo dve vrsti, in sicer tranzicije in transverzije. Tranzicija je zamenjava istovrstnih baz, torej purina s purinom ali pirimidina s pirimidinom, medtem ko je transverzija zamenjava purina s pirimidinom ali pirimidina s purinom (slika 5-2).



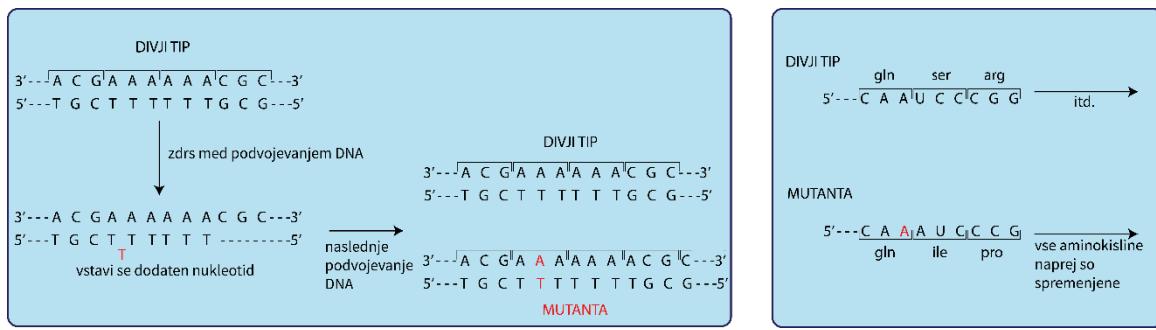
Slika 5-2: Zamenjave baznih parov lahko privedejo do tranzicije ali transverzije.

Zamenjave baznih parov nastanejo zaradi napačnega parjenja baz. Spadajo med točkovne mutacije. Vzroki za zamenjavo so številni, med najpogosteje spadajo tautomerne oblike dušikove baze, napake DNA-polimeraze, deaminacija citozina ter oksidacija baz. Z deaminacijo citozina dobimo uracil, ki v naslednji generaciji, če ostane nepopravljen, povzroči parjenje z adeninom. Do oksidacije baz pa pride zaradi reaktivnih kisikovih zvrst (ang. reactive oxygen species), ki lahko kemijsko spremenijo baze. Npr.: gvanin lahko oksidira v 8-oksogvanin, ki se pari z adeninom. Za substitucije pravimo, da puščajo (ang. leaky mutation).

Ena sama zamenjava baznega para ima lahko zelo močan učinek, npr. mutacija v promotorski regiji lahko vodi v oslabitev ali prenehanje izražanja gena; posledično sta gen ozziroma operon nefunkcionalna. Mutacija v predhodnem struktturnem genu, ki se prepisuje v policistronske mRNA, lahko vodi v predčasen konec prevajanja tudi drugih struktturnih genov. Za takšne mutacije rečemo, da imajo polarni učinek.

### Premiki bralnega okvira

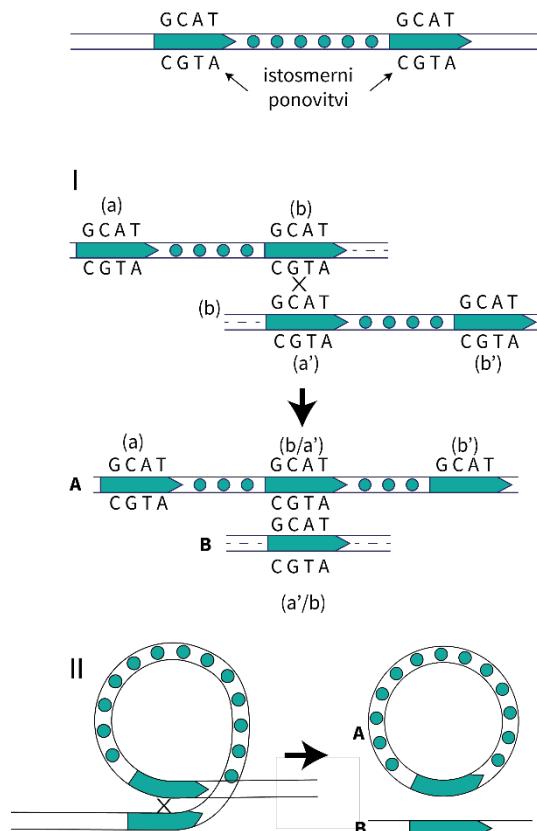
Vzrok za premik bralnega okvira je zdrs DNA-polimeraze, kar se običajno zgodi na zaporedju s kratkimi ponovitvami (slika 5-3 – levo). S premikom bralnega okvira pride do prevajanja popolnoma drugačnega zaporedja aminokislin (slika 5-3 – desno). Tovrstne mutacije rezultirajo v prekratkih in neuporabnih beljakovinah. Mutacije zaradi premikov bralnega okvira praviloma ne puščajo, lahko pa hitro revertirajo. Patogene bakterije premike bralnih okvirjev pogosto uporabljajo kot mehanizem za izogibanje imunskemu sistemu.



Slika 5-3: S premikom bralnega okvira, ki se pogosto dogodi zaradi zdrsa DNA-polimeraze na zaporedjih kratkih ponovitev (levo), se prevede popolnoma drugačno zaporedje aminokislin (desno).

### Izbrisni (deleciji)

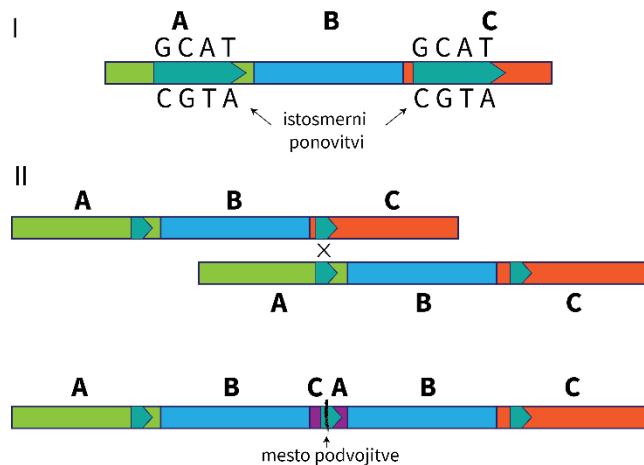
Izbrise oz. delecije označujemo z veliko grško črko delta ( $\Delta$ ). Vzrok so rekombinacije, ki lahko potečejo med istosmernima ponovitvama na isti molekuli ali na dveh različnih molekulah DNA (slika 5-4). Za potek rekombinacije ni nujno 100 % ujemanje obeh istosmernih ponovitev, vendar morajo biti istosmerne ponovitve dolge vsaj 50 baznih parov. Izbrisi rezultirajo v nastanku nefunkcionalnih genskih produktov in beljakovin. Tovrstne mutacije običajno ne puščajo, zmožnost revertiranja pa je odvisna od obsega izbrisca. Daljši izbrisi ne morejo nikoli revertirati. Pogosta posledica izbrisov so genske fuzije oz. spremembe v uravnavanju izražanja genov.



Slika 5-4: Delecije nastanejo zaradi rekombinacije. Ta lahko poteče na istosmernih ponovitvah, dolgih vsaj 50 baznih parov.

### Tandemske podvojite (duplicacije)

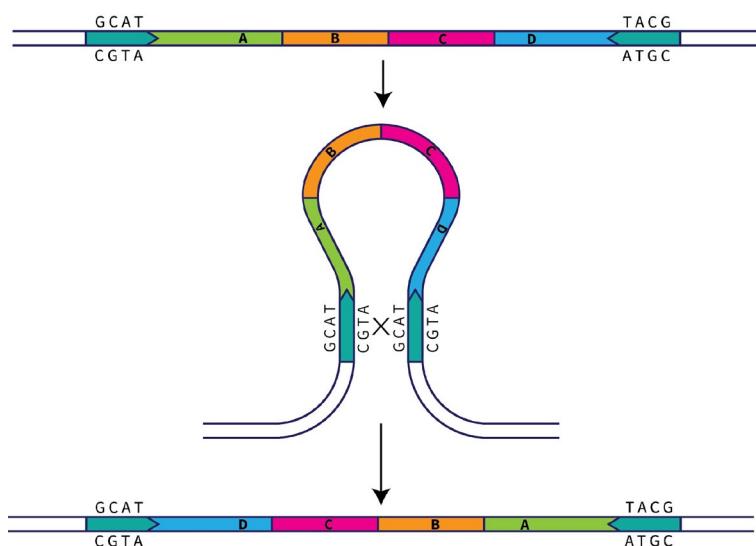
Vzrok tandemskih duplikacij je tako kot pri delecijah rekombinacija zaradi istosmernih ponovitev (slika 5-5). Nastanek tandemskih duplikacij v kakem genu običajno vodi v nastanek neuporabnega proteina. Če je podvojeno zaporedje dovolj dolgo, npr. če vsebuje več genov, pa to morda sploh nima fenotipskih posledic. Bakterije lahko dolge duplikacije preživijo popolnoma brez vpliva na fenotip. Tandemske duplikacije daljših regij lahko revertirajo, tandemse duplikacije v enem samem genu pa običajno ne puščajo.



Slika 5-5: Tandemske duplikacije so posledice rekombinacije na istosmernih ponovitvah.

### Obrnitve (inverzije)

Z rekombinacijo dveh obrnjenih ponovitev lahko nastane obrnitve (slika 5-6). Take mutacije, nastale z rekombinacijo dveh popolnoma enakih, a obrnjenih zaporedij, običajno hitro revertirajo in niso stabilne. Obrnitve, ki so nastale na ne popolnoma zrcalnih obrnjenih zaporedijh, pa običajno teže revertirajo in veljajo za stabilnejše. Posledica obrnitve je sprememba fenotipa, kar mnoge patogene bakterije izkoriščajo pri vklapljanju in izklapljanju genov za virulentne dejavnike in genov, ki zapisujejo površinske proteine. Zelo dolge obrnitve so lahko problematične ali vodijo celo v propad celice: obrnjenost zaporedij KOPS se npr. povezuje z napačno razporeditvijo DNA med hčerinski celici.



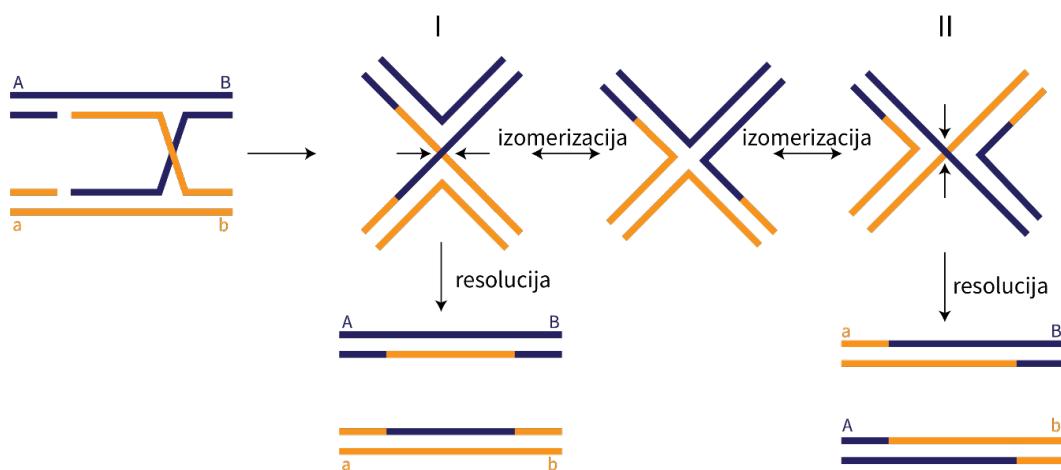
Slika 5-6: Rekombinacija dveh obrnjenih ponovitev je vzrok za nastanek obrnitve.

## Vstavitve (insercije)

Vzroki za nastanek kratke vstavitve so zdrsi DNA-polimeraze, vzroki za dolge vstavitve pa so transpozicije. Vstavitve inaktivirajo gen, običajno ne puščajo in le redko revertirajo, še posebej v primeru kratkih zaporedij, saj so prekratka za rekombinacijo. Zaradi vstavitev lahko pride do nastanka novih terminacijskih mest transkripcije, ki lahko motijo izražanje genov, ki jim sledijo.

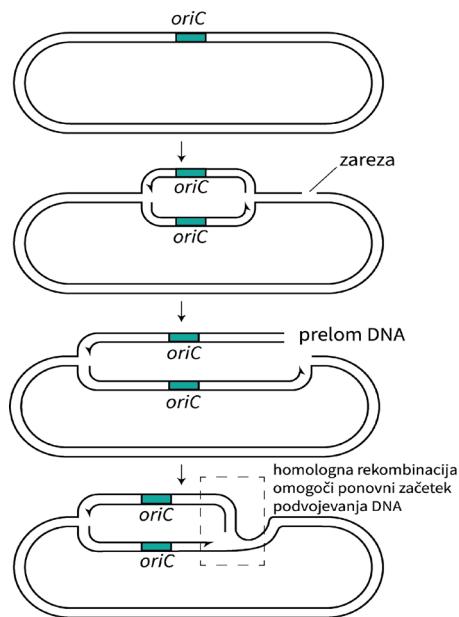
## Rekombinacija

Rekombinacija je proces fizične izmenjave odsekov med dvema molekulama DNA (slika 5-7). Neodvisno od mutacij omogoča nastanek novih genskih kombinacij, lahko se izmenja celo večji odsek genoma, npr. več genov, kar botruje prilagoditvam na spremembe okolja. Rekombinacija omogoča nastanek ene molekule DNA iz dveh oz. dveh molekul DNA iz ene.



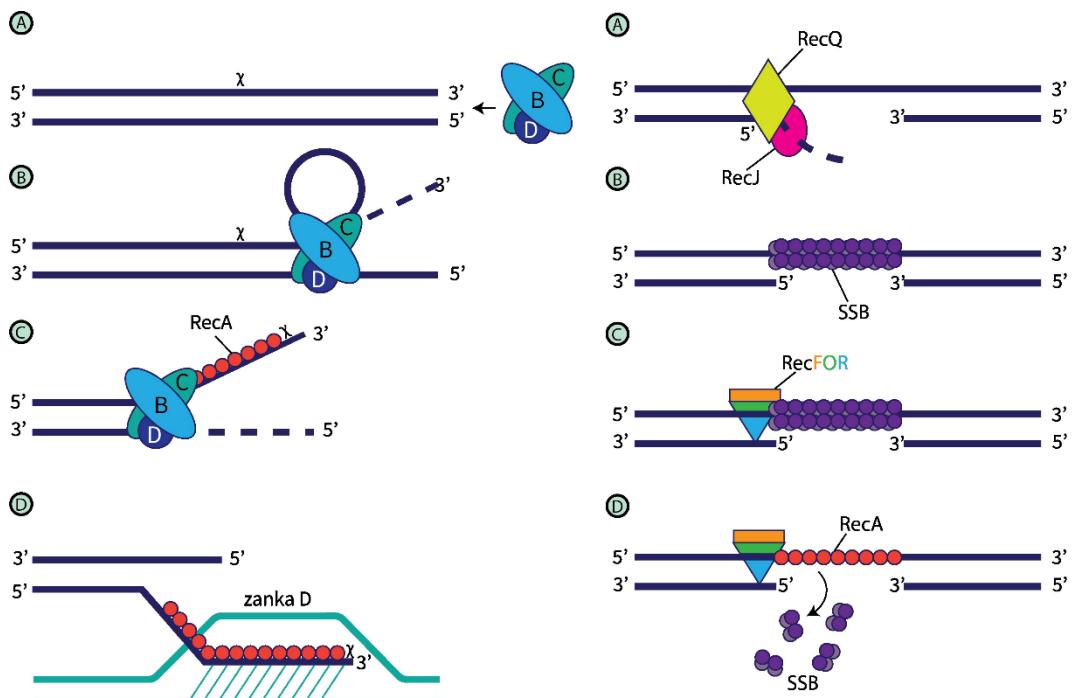
Slika 5-7: Zaradi rekombinacije imata verigi DNA fizično izmenjane odseke. Videti je, kot da ima nastala molekula »premešana« zaporedja. Način »premešanja« zaporedij je odvisen od načina izomerizacije.

Za celico je najpomembnejša splošna ali homologna rekombinacija. Ta se dogodi na zaporedjih DNA, ki sta si zelo podobni ali enaki. Za homologno rekombinacijo je potrebna določena dolžina homolognih odskov DNA, ki pa se med različnimi organizmi razlikuje. Za večino organizmov velja, da mora biti homologno zaporedje DNA daljše od 23 baznih parov. Daljša homologna zaporedja lahko vodijo v več dogodkov zamenjav nukleotidov. Homologna rekombinacija ima pomembno vlogo pri podvojevanju kromosoma. Replikacijske vilice, ki se začnejo na mestu začetka podvojevanja, se lahko sesedejo, če naletijo na prelome v verigi. V takem primeru v verigi DNA z zarezo nastane dvoverižni prelom (ang. double strand break). Rekombinacija s kopijo kromosoma v drugi verigi tvori strukturo (zanka D), ki omogoči nadaljevanje podvojevanja kromosoma (slika 5-8). Ponovno vzpostavitev replikacijskih vilic omogočijo proteini Pri, DnaT, DnaB in DnaC.



Slika 5-8: Celica s homologno rekombinacijo reši zaplete zaradi prelomov pri podvojevanju DNA.

Pri *E. coli* so za rekombinacijo najpomembnejši geni *rec*. Sistem RecABCD pri *E. coli* deluje na specifičnih mestih, ki pa so v genomu zelo pogosta. Imenujemo jih mesta  $\chi$  (ang. crossover hotspot instigator) in imajo zaporedje 5'-GCTGGTGG-3'. Heterotrimler RecBCD ima helikazno in nukleazno aktivnost. Veže se na mesto zareze in odvije ter razgradi obe verigi do mesta  $\chi$ . Na tem mestu se na 3'-verigo vežejo beljakovine RecA, ki tvorijo povezave s homolognim mestom in tako omogočijo nastanek heterodupleksa in D-zanke, RecBCD pa še nekoliko skrajša 5'-verigo (slika 5-9 – levo).



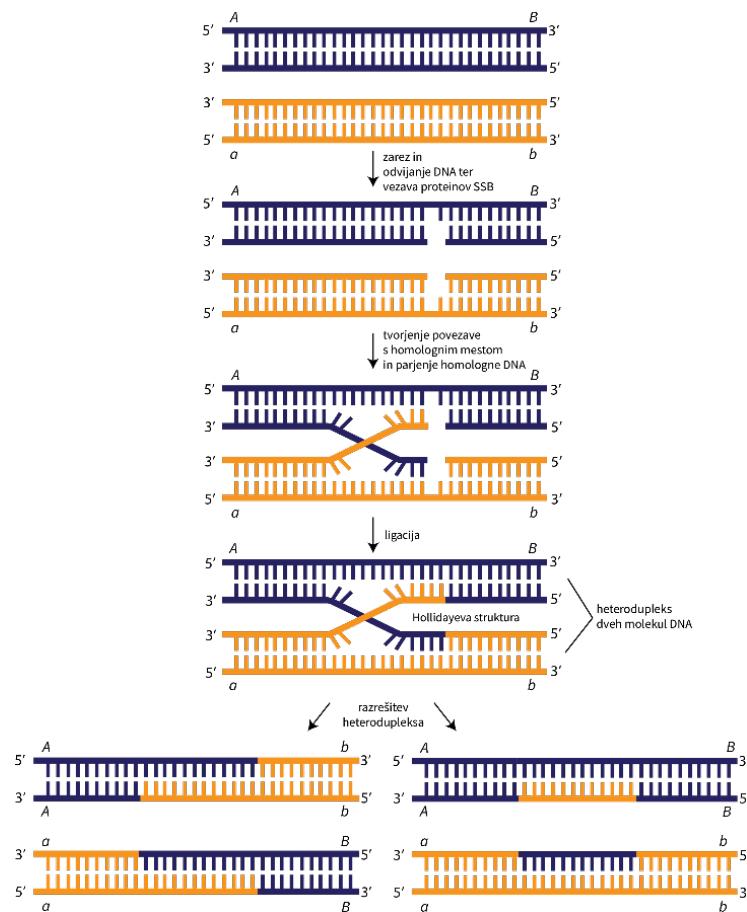
Slika 5-9: Delovanje sistema RecBCD (levo) in sistema RecF (desno) pri *E. coli*.

Mesta dvoverižnega preloma kromosoma se popravlja s sistemom RecBCD. Po vezavi na mesto preloma kompleks RecBCD potuje v obe smeri. V smeri, kjer so mesta  $\chi$  polarna in pravilno usmerjena, hitreje naleti na mesto  $\chi$  in nukleazna aktivnost RecBCD se ustavi, veže se RecA, kar

preko zanke D omogoči nastanek novih replikacijskih vilic. Homologna rekombinacija s sistemom RecBCD je pomembna tudi pri rekombinaciji linearnih fragmentov DNA (npr. s transdukциjo vneseni odseki DNA) in kromosoma. Na 3'-koncu linearnega fragmenta DNA se zaradi delovanja RecBCD vežejo RecA, poiščejo homologna zaporedja in sprožijo rekombinacijo s kromosomom. Po replikaciji takšnega kromosoma in po segregaciji vsake nastale kopije kromosoma v svojo celico ima tako vsaka hčerinska celico različno kopijo kromosoma.

RecF je sistem pri *E. coli*, ki pripravi enoverižno DNA za vstop v D-zanko. Na mesto vrzeli se na začetku vežeta helikaza RecQ ter eksonukleaza RecJ, sledi jima vezava proteinov SSB. V to vrzel s proteini se veže kompleks RecFOR in RecF povzroči zamenjavo proteinov SSB s proteini RecA, kompleks RecFOR pa nato tvori D-zanko (slika 5-9 – desno).

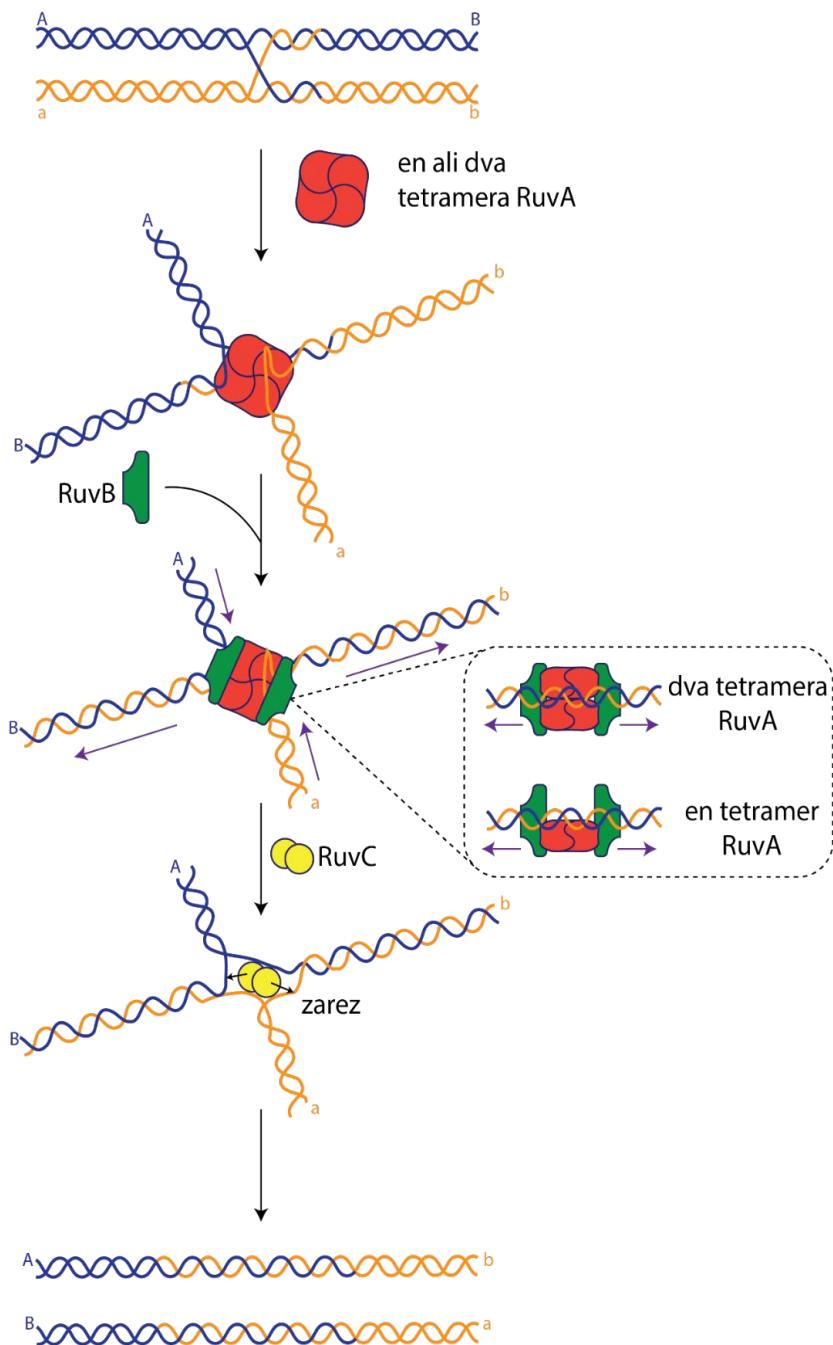
RecA sprva tvori nukleofilament samo na enoverižni DNA, ko najde homologno zaporedje, pa nastane struktura iz treh verig (iz enoverižne DNA in dvovertižne DNA), imenovana sinapsa. Polimerizacija RecA se lahko nadaljuje proti 3'-koncu in nukleofilament se razširi v sosednjo dvovertižno DNA. Na drugi strani poteka depolimerizacija RecA. Za potek rekombinacije je značilna t. i. Hollidayeva struktura. Ta nastane, ko se molekuli, med katerima se dogaja rekombinacija, med sabo parita (slika 5-10).



Slika 5-10: Dve molekuli DNA s homolognim zaporedjem si lahko izmenjata DNA. Po nastanku zareze v homolognih predelih sledi odvijanje DNA, vezava proteinov SSB in parjenje homologne DNA (nastanek heterodupleksa in D-zanke). Sledi ligacija vezi. Nastalo strukturo imenujemo Hollidayeva struktura. Le-ta lahko potuje po DNA, DNA se lahko zasuka za 180°. Hollidayeva struktura se lahko razreši na dva načina. Prvi način je vertikalni prerez (prikazan na sliki levo), pri katerem dobimo rekombinantni molekuli DNA, pri čemer imata obe molekuli zamenjano DNA na obeh verigah. Drug način je horizontalni rez (prikazan na sliki desno), pri katerem dobimo rekombinantni molekuli DNA, ki imata obe samo po eno verigo DNA z zamenjanimi odseki.

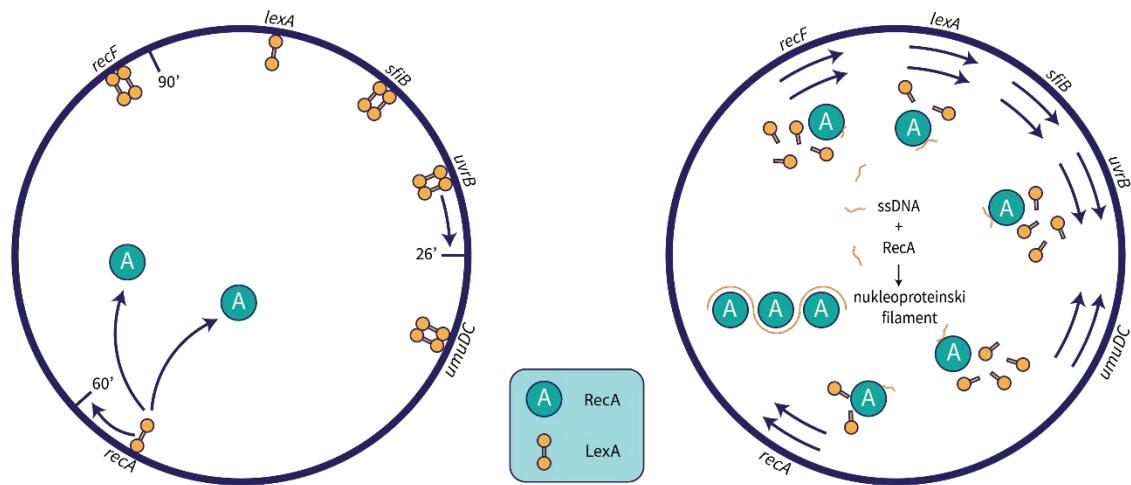
## Poglavlje 5

Sistem RuvABC je sistem pri *E. coli*, ki omogoči razrešitev Hollidayeve strukture (slika 5-11). En ali dva tetramera RuvA se vežeta na Hollidayeve strukture. Nauj se vežeta dva heksamerja RuvB, tako da tvorita prstan okoli verige DNA. Z vezavo RuvC na kompleks RuvAB lahko kompleks RuvABC naredi rez dveh verig DNA in razreši Hollidayeve strukture. Sistem RuvABC deluje proti 3'-koncu. S proteinom PriA, ki stabilizira replikacijske vilice, lahko premik Hollidayeve strukture v obratni smeri, proti 5'-koncu, naredi tudi sistem RecG.



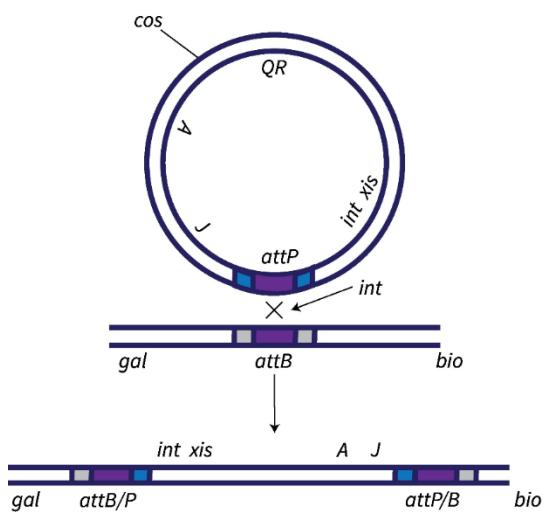
Slika 5-11: Sistem RuvABC.

RecA ima pomembno vlogo tudi v odzivu SOS (slika 5-12). Odziv SOS je celični odgovor na poškodbe DNA. Med znaki poškodovanja je tudi enoverižna DNA (ssDNA). Nanjo se veže RecA in tako tvori nukleoproteinski filament, zaradi katerega razpade dimerni represor, protein LexA, ki preprečuje izražanje kopice genov, katerih produkti soprospitvajo v odzivu SOS. Nastali nukleoproteinski filament odstrani represor odziva SOS, dimere proteina LexA, in tako sproži odziv SOS.



Slika 5-12: Odziv SOS. Izražanje genov, katerih produkti so del odziva SOS, je preprečeno zaradi vezave dimernega represorja LexA. RecA z vezavo na enoverižno DNA (ssDNA) tvori nukleoproteinski filament, ki povzroči razgradnjo dimerov LexA in tako sproži odziv SOS.

Poznamo tudi mestnospecifično rekombinacijo, v bakterijskem svetu je najbolj znana pri bakteriofagu  $\lambda$ . Bakteriofag  $\lambda$  ima v svojem genom zaporedje *attP*, v bakterijskem kromosому pa je zaporedje *attB*. Integraza omogoča mestnospecifično rekombinacijo med temi dvema zaporednjema (slika 5-13).



Slika 5-12: Bakteriofag  $\lambda$  se v kromosom gostiteljske celice vključi z mestnospecifično rekombinacijo *attP* in *attB*. Zaporedje *attB* je v kromosomu gostiteljske celice med operonoma za razgradnjo galaktoze in sintezo biotina.

## TEMELJNI POJMI

- Mutacija – vsaka sprememba v zaporedju verige DNA, ki je popravljalni mehanizmi niso zaznali.
- Rekombinacija – proces fizične izmenjave odsekov med dvema molekulama DNA.

## POVZETEK

Mutacije so spremembe v zaporedju nukleotidov v DNA, ki se dedujejo. Sprememba se lahko zgodi v le enem baznem paru, lahko v večjem številu baznih parov, lahko pa obsega celo večje regije kromosoma. Med mutacije prištevamo substitucije, premike bralnega okvira, izbrise, tandemske podvojitve, obrnitve in vstavitve. Homologna rekombinacija je eden izmed temeljnih dogodkov v celici, ki privede do izmenjave DNA med dvema homolognima zaporednjema. Pri njej sodeluje vsaj 25 različnih proteinov. Zanjo je značilna Hollidayeva struktura. Poznamo tudi mestnospecifično rekombinacijo.

## 6 PLAZMIDI

Nikolaj Mavrek, Lara Krampač, Jerneja Ambrožič Avguštin

### UČNI CILJI

- Spoznati osnovne značilnosti in pojme, povezane s plazmidimi.
- Spoznati, da obstajajo razlike med podvojevanjem plazmidne in kromosomske DNA in razumeti uravnavanje podvojevanja plazmidov.
- Spoznati in razumeti, kaj vpliva na možnost soobstoja dveh ali več različnih plazmidov v bakterijski celici.
- Spoznati mehanizme, ki preprečujejo izgubo plazmidov iz bakterijskih celic – tudi v neselekcijskih razmerah.

### UVOD

Plazmidi so molekule DNA s svojo replikacijsko regijo – replikoni, ki se podvojujejo neodvisno od kromosoma. So zunajkromosomski genetski elementi, ki pa se lahko vključijo v kromosom, običajno s homologno rekombinacijo. V kromosom vstavljeni plazmidi se podvojujejo skupaj s kromosomske DNA. Plazmidi so pomemben del genoma bakterij, še posebno kadar imajo zapise, ki bakterijam v selekcijskem okolju pomagajo preživeti (npr. v okolju z antibiotiki ali težkimi kovinami), se hitreje in bolje adaptirati (uporaba neobičajnih virov ogljika), zasesti ekološko nišo (sinteza antibiotikov) in povzročiti kolonizacijo in preživetje v gostiteljskem organizmu (sinteza toksinov, fimbrij). V tehnologiji rekombinantne DNA pa so plazmidi ključni vektorji za pripravo rekombinantnih molekul.

### Podvojevanje plazmidne DNA

Ključni del samostojnega replikona je (vsaj eno) mesto začetka podvojevanja (*ori*), s katerim se lahko povežejo proteini, ki sodelujejo pri tem procesu. Proteini, ki prepozna to regijo, so običajno zapisani v samem plazmidu, v nekaterih primerih pa, tako kot pri drugih encimih, ki sodelujejo pri podvojevanju (npr. DNA-polimeraza), tudi v kromosomski DNA. Podvojevanje plazmida se začne na mestu začetka podvojevanja, ki ga označujemo z *oriV* (ang. origin of replication – vegetative) – mesto začetka podvojevanja kromosoma je *oriC*. Nekateri plazmidi imajo več mest začetka podvajanja. Med najbolj raziskane mehanizme podvojevanja plazmidne DNA uvrščamo podvojevanje theta ( $\theta$ ), podvojevanje na način kotalečega se kroga (ang. rolling circle, RC) in podvojevanje linearnih plazmidov.

### Podvojevanje theta ( $\theta$ )

Ta način podvojevanja je podoben podvojevanju kromosoma. Začne se s prekinitvijo vodikovih vezi na mestu *oriV*. Po vezavi začetnega RNA-oligonukleotida se podvojevanje nadaljuje v eni ali obeh smereh. Tak način podvojevanja je med drugimi značilen za plazmide F, P1, ColE1, RK2 in temperatni fag P1, katerega genom se med lizogenim ciklom zunaj kromosoma zaokroži in pomnožuje kot plazmid.

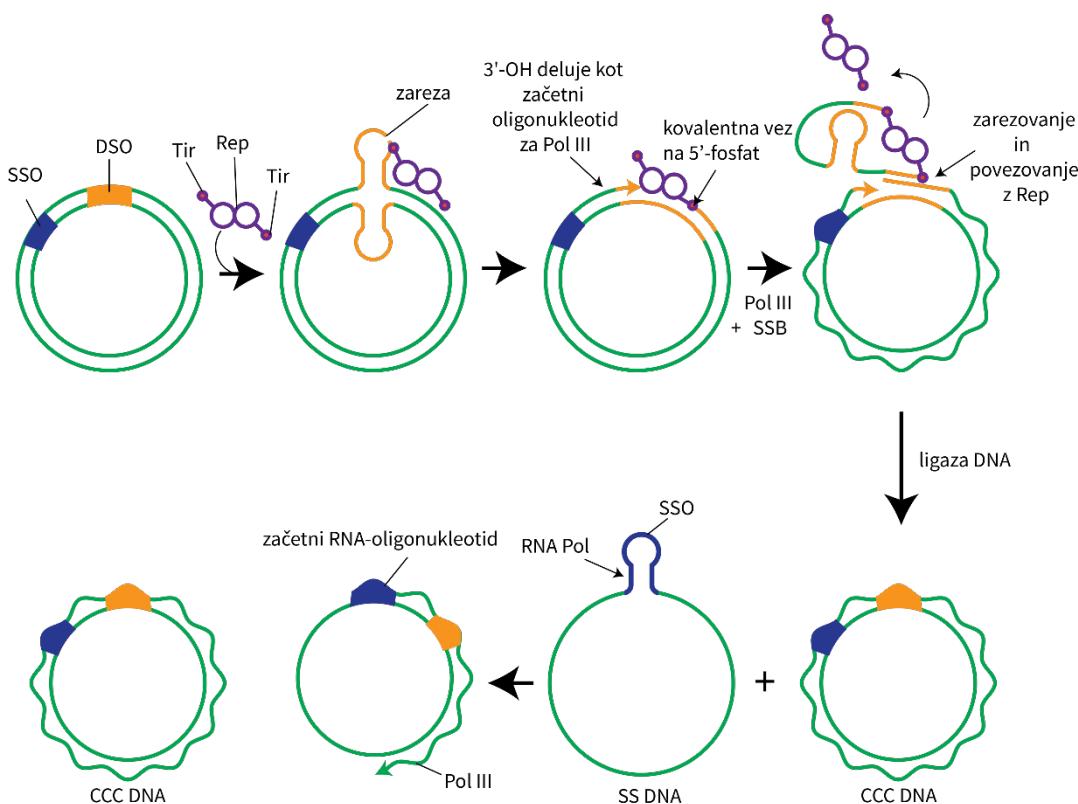
### Podvojevanje na način kotalečega se kroga – podvojevanje RC

Mehanizem podvojevanja na način kotalečega se kroga oz. RC (ang. rolling circle replication) je bil prvič opažen pri skupini fagov, značilen pa je tudi za plazmide in arheje.

Plazmidi, za katere je značilen mehanizem RC, imajo dve mesti začetka podvojevanja, DSO (ang. double strand origin) in SSO (ang. single strand origin). Potek podvojevanja je prikazan na sliki 6-1. Plazmidno zapisan protein Rep prepozna palindromsko zaporedje v DSO in se z njim poveže.

## Poglavlje 6

Posledično, zaradi povezave komplementarnih zaporedij v obrnjenih ponovitvah DSO, nastane struktura, podobna križu, kar proteinu Rep omogoči cepitev fosfodiestrsko vezi v eni verigi. Rep ostane s svojim tirozinskim ostankom ob cepitvenem mestu povezan s 5'-koncem plazmidne DNA. Nastali 3'-konec ima vlogo začetnega oligonukleotida, ki DNA-polimerazi III omogoči dodajanje novih nukleotidov in s tem sintezo verige, ki je komplementarna (prvotni) notranji verigi, ob tem pa se odmika (prvotna) zunanjega veriga z vezanim proteinom Rep. Vlogo helikaze lahko prevzame gostiteljska helikaza, pri nekaterih plazmidih pa kar protein Rep. Ko DNA-polimeraza konča sintezo komplementarne verige, se 5'-fosfat s tirozina v proteinu Rep s fosfotransferazno reakcijo prenese na 3'-konec odmaknjene verige, da nastane enoverižna krožna DNA, protein Rep pa se sprosti in razgradi. Količina razpoložljivega proteina Rep lahko tako uravnava število kopij plazmida. Sinteza komplementarne verige na odmaknjeni enoverižni krožni DNA je odvisna od gostiteljskih proteinov. RNA-polimeraza sintetizira začetni oligonukleotid na *ori* SSO, s katerega nato DNA-polimeraza III nadaljuje sintezo komplementarne verige. Ko je sinteza končana, DNA-polimeraza I odstrani začetni RNA-oligonukleotid, ligaza pa poveže konca DNA.

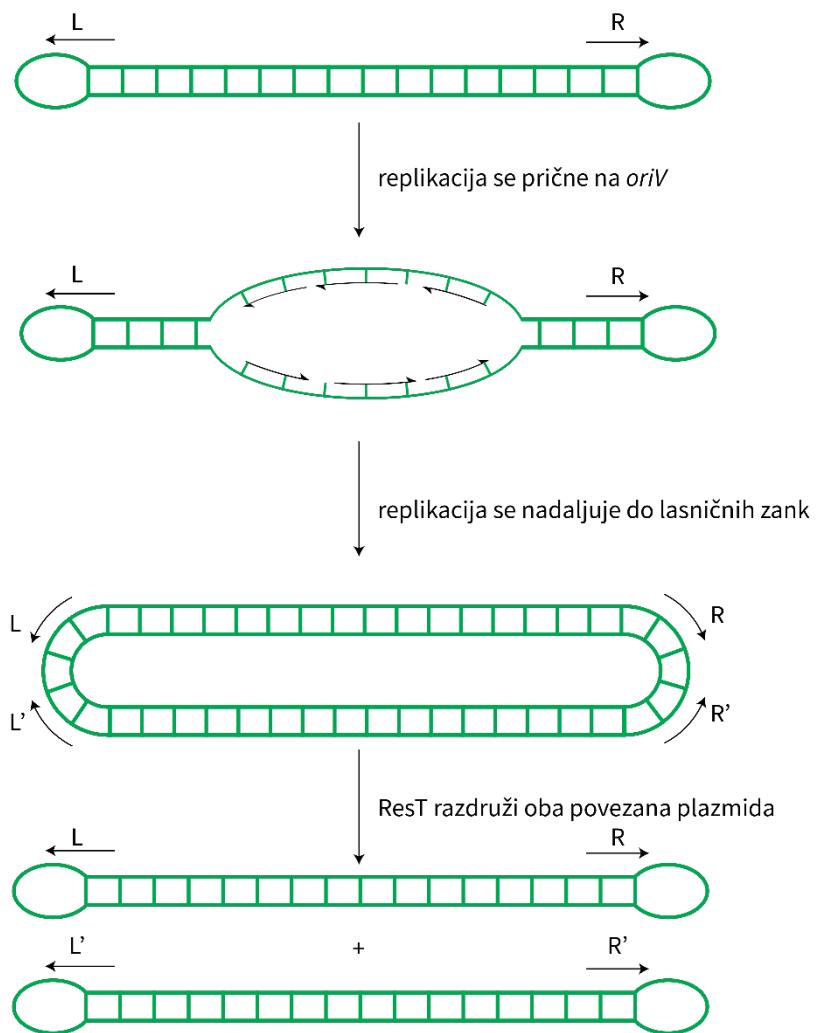


Slika 6-1: Podvojevanje plazmida na način kotalečega se kroga.

### Podvojevanje linearnih molekul DNA

Pri podvojevanju linearnih molekul DNA po odstranitvi začetnega RNA-oligonukleotida na sledilni verigi nastane vrzel, ker je DNA-polimeraza zaradi odsotnosti 3'-konca ne more nadomestiti. To lahko privede do krašanja molekule DNA. Evkarioti imajo encim telomerazo, ribonukleoprotein, ki s specifičnim mehanizmom prepreči krašanje kromosomov. Pri bakterijah, ki imajo linearne kromosome in plazmide, je mehanizem ohranjanja koncev na sledilni verigi nekoliko drugačen. Na sliki 6-2 je kot primer prikazano podvojevanje linearne DNA bakterije *Borrelia burgdorferi*, ki ima na koncih levo (L) in desno (D, ang. R) lasnično zanko, kjer sta združena 3'- in 5'-konca obeh verig.

Replikacija plazmidov poteka z mesta *oriV*, ki je znotraj molekule DNA. Rezultat podvajanja sta dva povezana plazmidna, ki se razdružita tako, da telomerna resolvaza (ResT) naredi zamknjen rez v območju koncov plazmidov. S tem lahko oboj plazmidov ponovno tvorita lasnične zanke. Bakterije rodu *Streptomyces* rešujejo problem linearne DNA z nekoliko drugačnim mehanizmom, pri katerem igrajo pomembno vlogo obrnjene ponovitve na koncih linearnih molekul in t. i. terminalni protein.



Slika 6-2: Podvojevanje lineranih molekul DNA pri bakteriji *Borellia burgdorferi*.

### Pomembne lastnosti plazmidov so odvisne od njihove regije *ori*

#### Gostiteljsko območje plazmidov

Gostiteljsko območje (ang. host range) plazmidova predstavljajo bakterije, v katerih se lahko plazmid pomnožuje. Običajno je odvisno od regije *ori*. Plazmidi, ki za podvojevanje potrebujejo več gostiteljskih proteinov, so omejeni na bolj ali manj ozko skupino gostiteljskih bakterij – imajo ozko gostiteljsko območje (ang. narrow host range). Med tovrstne plazmide uvrščamo npr. tip plazmidov ColE1, kot je pBR322, in skupino plazmidnih vektorjev pUC, ki se pogosto uporabljajo kot vektorji za kloniranje. Ker imajo v bližini mesta *ori* običajno zapis za ključni replikacijski protein, lahko to regijo uporabimo za pripravo novih vektorjev, z ozkim gostiteljskim območjem in običajno

## Poglavlje 6

velikim številom kopij. Plazmidi s širšim gostiteljskim območjem so večji, saj imajo lasten zapis za vse ali večino za podvojevanje potrebnih proteinov, ki se morejo izražati tudi v manj sorodnih gostiteljskih bakterijah, zato so manj odvisni od le-teh. V tehnologiji rekombinantne DNA se pogosto uporablja t. i. prenosne vektorje (ang. shuttle vector). To so plazmidni vektorji z dvema ali več različnimi replikacijskimi regijami, ki delujejo v različnih (lahko zelo nesorodnih) gostiteljih.

### Število kopij plazmida v celici

Število kopij plazmida (ang. copy number) v posamezni bakterijski celici je uravnavano in določeno. Uravnavanje števila kopij plazmida v celici se razlikuje med plazmidmi z večjim številom kopij (ang. high copy number plasmids) in plazmidmi, ki jih je v celici malo (ang. low copy number plasmids). Pri plazmidih, ki jih je zelo malo ali obstajajo celo samo v eni kopiji, je podvojevanje oziroma število kopij zelo natančno uravnano (ang. stringent plasmids), npr. plazmid F, pri plazmidih z večjim številom kopij pa se podvojevanje zaključi, ko jih je približno dovolj (ang. relaxed plasmids), tako da se prepreči ponovni začetek podvojevanja.

### Inkompatibilnost

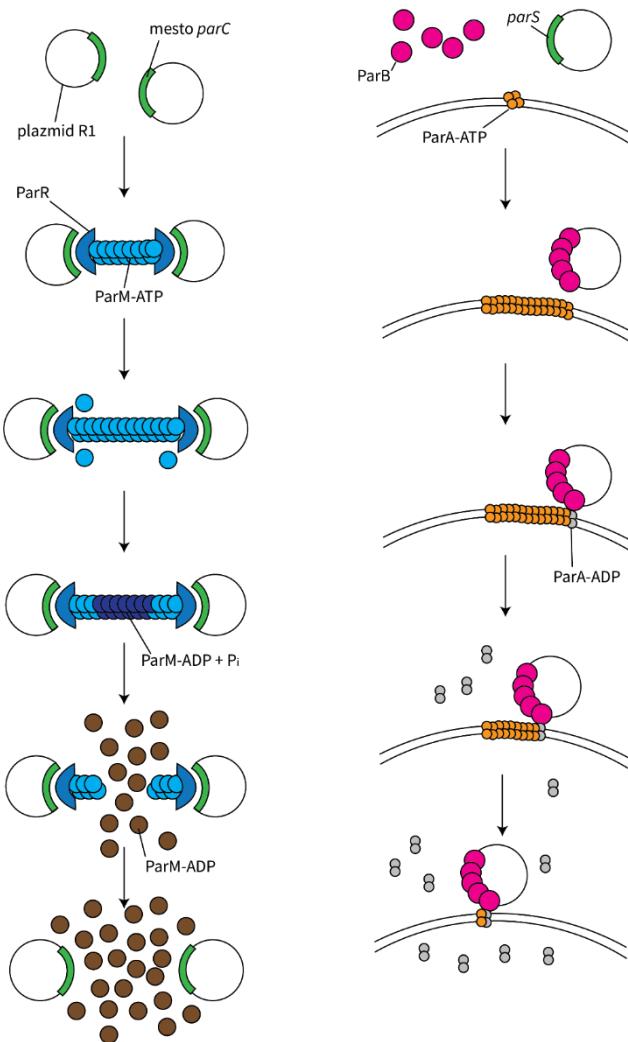
Inkompatibilnost je nezmožnost soobstoja dveh ali več vrst plazmidov brez seleksijskega pritiska v bakterijski celici skozi številne generacije. Glede na uravnavanje podvojevanja in mehanizem porazdelitve v hčerinski celici, plazmide uvrščamo v t. i. inkompatibilnostne skupine (Inc). Plazmida iz iste skupine Inc sta lahko inkompatibilna, ker imata enak način uravnavanja podvojevanja ali ker imata enak sistem Par (okrajšano za ang. partitioning), ki skrbi za porazdelitev v hčerinski celici. V prvem primeru proteini plazmidov z enako replikacijsko regijo ne prepoznajo kot različnih, zato je število kopij posamezne vrste plazmidov neenakomerno (npr., v celici sta dve vrsti plazmidov, obe v petih kopijah, vendar se prva pomnoži osemkrat, drugi pa dvakrat). Tudi v drugem primeru celica plazmidov z enako regijo Par ne prepozna kot različnih, zato ju v hčerinski celici porazdeli naključno (npr., v starševski celici sta 2 kopiji plazmida A in 8 kopij plazmida B; ob porazdelitvi v hčerinski celici lahko ena dobi 2 kopiji plazmida A in 3 kopije plazmida B, druga celica pa dobi 5 kopij plazmida B, a nobene kopije plazmida A, plazmid A se tako »izgubi«). Inkompatibilnostne skupine lahko ugotovimo s sekvenciranjem (*in silico*) ali z eksperimenti (*in vitro*).

### Sistemi za porazdelitev (particijo) plazmidov v hčerinski celici – sistemi Par

Sistemi Par zagotavljajo, da je v vsaki hčerinski celici vsaj ena kopija plazmida. Nekateri so podobni sistemu za porazdelitev podvojenega kromosoma v hčerinski celici. Proteini sistemov Par lahko tvorijo različne tipe filamentov. Poznamo 2 tipa sistema Par:

- Sistem Par, kot ga ima npr. plazmid pR1, je prikazan na levi strani slike 6-3. Na plazmidih, ki se morata porazdeliti vsak v svojo celico, je zaporedje *parC* (ang. centromere-like region *par*), na katerega se veže protein ParR. Tam se začne polimerizacija proteina ParM-ATP na obeh plazmidih v filament. Rastoča filimenta plazmida potiskata na nasprotna konca celice. Filament je stabilen, dokler ParM-ATP, ki je vezan na kompleks *parC*-ParR, ne hidrolizira. Ko ParM-ATP znotraj filimenta hidrolizira v ParM-ADP, se filament depolimerizira, ob tem ostaneta plazmida na nasprotnih koncih celice.
- Sistem Par, kot je značilen za plazmida F, RK2 in fag P1, je prikazan na desni strani slike 6-3. Ključna sta proteina ParA in ParB ter cis-zaporedje *parS* oziroma pri faktorju F: SopA, SopB in sopC. ParA-ATP se kot dimer veže na naključna mesta v nukleoidu in polimerizira v vse smeri, ParB pa se veže na mesto *parS* na plazmidu. Naključni interakcija kompleksa ParB-*parS* s ParA-ATP spodbudi hidrolizo slednjega v ParA-ADP, ta pa disociira z DNA, se lahko obnovi v ParA-ATP in veže nekje druge na nukleoidu. Kompleks ParB-*parS* pa se

lahko poveže z naslednjim ParA-ATP, kar omogoči pomikanje plazmida po nukleoidu. Na tak način lahko dva plazmida pristaneta vsak na svojem koncu celice.



Slika 6-3: Sistem Par plazmida pR1 (levo) ter plazmidov F, RK2 in faga P1 (desno).

### Uravnavanje podvojevanja plazmidne DNA

Podvojevanje plazmidne DNA je natančno uravnani proces. V grobem lahko mehanizme za uravnavanje razdelimo v dve skupini:

- uravnavanje s protismerno RNA (ang. antisense RNA),
- uravnavanje z iteroni.

### Uravnavanje podvojevanja plazmidne DNA s protismerno RNA

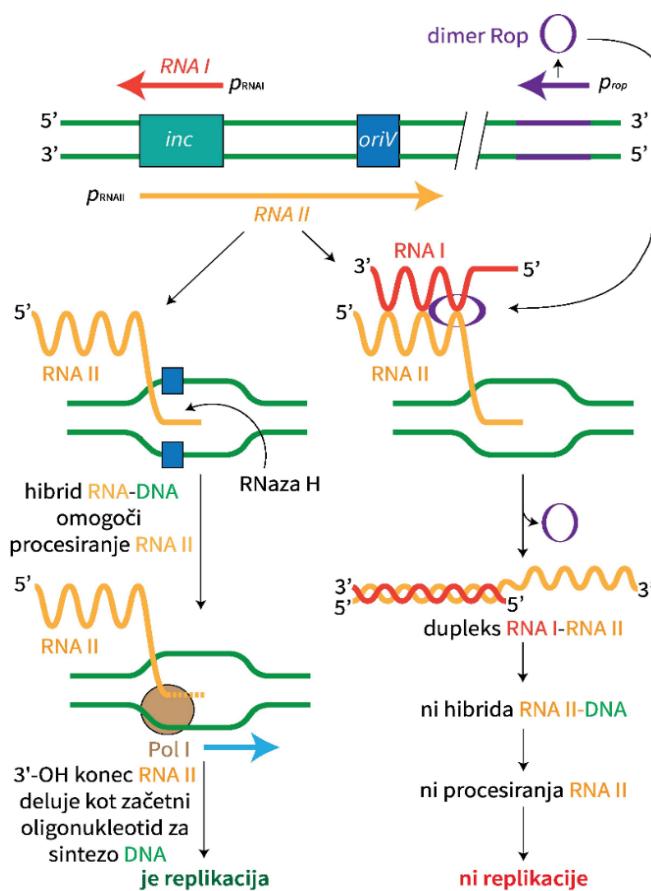
Uravnavanje podvojevanja plazmidne DNA s protismerno RNA deluje po principu negativne povratne zanke. Protismerna RNA je zapisana na plazmidu in se sintetizira neprestano ter je nestabilna. Če je torej v celici prisotnih veliko kopij plazmida, to vodi tudi v povečano število protismerne RNA. Ta deluje tako, da inhibira delovanje encimov, ki so nujno potrebni za podvojevanje plazmidne DNA (npr. iniciacijski protein ali primaza). Manjše število kopij plazmida vodi v manjše število molekul protismerne RNA, kar se posledično odraža v pohitrenem

podvojevanju plazmida. Protismerna RNA je torej regulatorna molekula, ki v visokih koncentracijah inhibira podvojevanje plazmida.

#### Plazmid pColE1 in izpeljanke plazmida ColE1

Mehanizem uravnavanja podvojevanja plazmida ColE1 je bil eden od prvih, ki so ga natančneje preučili. Iz tega plazmida, ali pa njegovega bližnjega sorodnika pMB1, so izpeljani številni vektorji za kloniranje. Mednje spadajo npr. plazmidi pBR322, pUC, pBAD in pET. Čeprav se našteti vektorji od izvornih plazmidov pMB1/pColE1 po zgradbi precej razlikujejo, imajo vsi ohranjeno prvotno replikacijsko regijo ColE1. To pomeni, da imajo vsi isti mehanizem uravnavanja podvojevanja. Pogosto je število kopij plazmida z načrtimi mutacijami povečano, kar je koristno za lažjo izolacijo velikih količin plazmidne DNA iz celic. Posebnost teh plazmidov je, da ne potrebujejo plazmidno zapisanega proteina Rep za začetek podvojevanja na mestu *oriV*, temveč samo regulatorno RNA.

Uravnavanje podvojevanja plazmida ColE1 je prikazano na sliki 6-4. Na plazmidu je v regiji *inc*, povezani z inkompatibilnostno skupino, zapisana molekula RNA I. Ta se prepiše s komplementarne verige v nasprotni smeri kot RNA II in vpliva na delovanje slednje. Če RNA I ni prisotna, RNA II tvori hibrid DNA-RNA II na mestu začetka podvojevanja. Ta hibrid omogoči procesiranje – cepitev z encimom RNA-endonukleaza (RNaza H). Zaradi njene aktivnosti na tem mestu nastane prosta 3'-OH. Ta lahko služi kot začetni oligonukleotid za podvojevanje plazmida, ki ga sprva katalizira DNA polimeraza I. Če RNA II ni pravilno cepljena, ne more delovati kot začetni oligonukleotid, kar onemogoči začetek podvojevanja.



Slika 6-4: Mehanizem uravnavanja podvojevanja izpeljank plazmida ColE1.

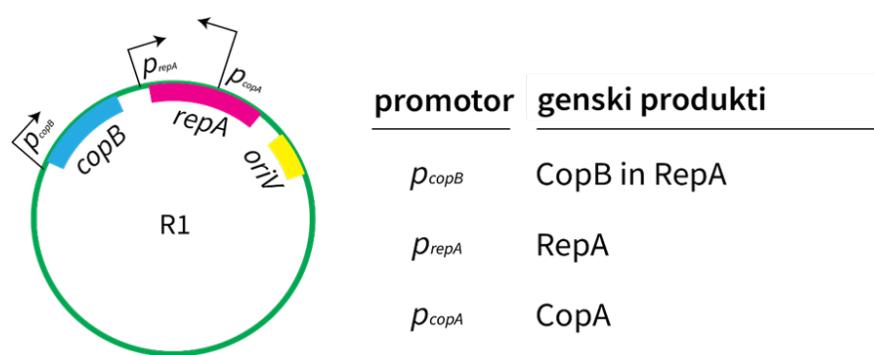
RNA I prepreči podvojevanje DNA tako, da se poveže z RNA II. To je mogoče, ker sta molekuli prepisa komplementarnih verig istega odseka DNA (slika 6-4). Najprej se povežejo kratki izpostavljeni odseki obeh molekul. Ta povezava je šibka, vendar jo stabilizira protein Rop, ki pa ni esencialen. Sledi nastanek stabilnega dupleksa RNA I-RNA II. Taka povezava RNA II onemogoči, da bi zavzela svojo običajno sekundarno strukturo, se vezala na DNA in z RNazo H izpostavila 3'-konc. Podvojevanje plazmida je popolnoma inhibirano, ko je v celici približno 16 kopij.

Mutacije, ki so v regiji, kjer nastane hibrid RNA I-RNA II, ne vplivajo na število kopij plazmida, pač pa na njegovo inkompatibilnostno skupino. Že ena sama spremenjena baza v RNA I lahko namreč prepreči njuno povezovanje. Ker pa se mutacija ob podvojitvi plazmida prenese tudi v RNA II, se lahko zamenja inkompatibilnostna skupina plazmida – dobimo novo. Plazmid ColE1 in njegov bližnji sorodnik p15A (iz njega so izpeljani vektorji za kloniranje, kot sta pACYC177 in pACYC184) sta člana dveh različnih inkompatibilnostnih skupin, čeprav se regiji protiprepisne RNA razlikujeta le v enem nukleotidu.

#### Plazmid R1

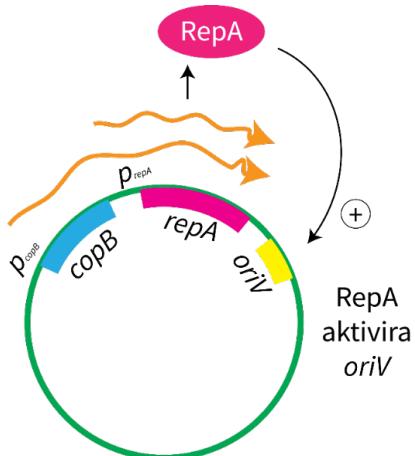
Večina plazmidov za začetek podvojevanja potrebuje plazmidno zapisan protein. Običajno je to protein Rep, ki pomaga razpreti verigo DNA v regiji *oriV*. Pri tem po navadi sodelujejo tudi gostiteljski proteini, kot je DnaA. Proteini Rep so zelo specifični. Vežejo se le na enaka mesta *oriV*. Količina razpoložljivega proteina Rep uravnava podvojevanje in s tem število plazmidov v celici.

Podvojevanje plazmida R1, ki ga uvrščamo v skupino IncFII, je prikazano na slikah od 6-5 do 6-7. Edini plazmidno zapisan protein, ki je potreben za začetek podvojevanja, je RepA. Geni in promotorji plazmida R1, povezani z uravnavanjem podvojevanja, so natančneje prikazani na sliki 6-7.



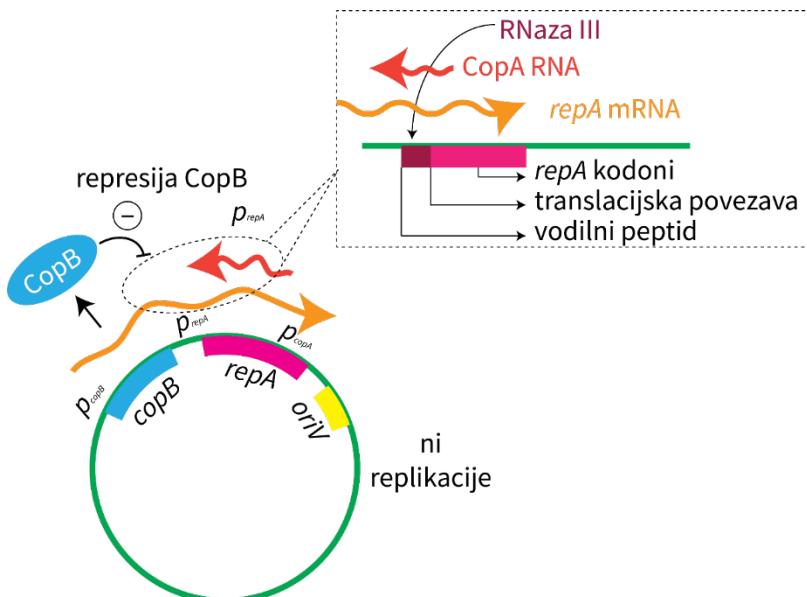
Slika 6-5: Organizacija genov, zaporedja *oriV*, smer prepisovanja in genski produkti, povezani s podvojevanjem plazmida R1.

Gen *repA* se lahko prepisuje iz dveh promotorjev. Eden od teh je  $p_{copB}$ , s katerega se prepišeta tako *repA* kot *copB*, njuna mRNA pa se prevede v proteina RepA in CopB. Drugi promotor,  $p_{repA}$ , je znotraj gena *copB*. Iz tega promotorja se prepiše in kasneje prevede samo protein RepA. Ta promotor je inhibiran s strani proteina CopB. To pomeni, da se ob vstopu plazmida v celico protein RepA sintetizira z obej promotorjev, ko pa v celici naraste količina CopB, ta inhibira nastanek RepA s tega promotorja, zato se lahko prepiše samo še s promotorja  $p_{copB}$ . Proses je prikazan na 6-6.



Slika 6-6: Prepis genov za protein RepA, ki omogoči podvojevanje plazmidne DNA, iz dveh promotorjev po vstopu v celico.

Ko plazmid doseže določeno število kopij, uravnavanje podvojevanja prevzame protismerna RNA CopA (slika 6-7). Ta se prepiše s promotorja  $p_{copA}$ , ki je na nasprotni verigi, kot je regija translacije iniciacije (TIR)  $repA$  na mRNA. Prepisi molekuli RNA,  $copA$  in  $repA$ , sta torej komplementarni in se povežeta v dvoverižno molekulo RNA. Ta kompleks nato cepi RNaza III, ki je zapisana na kromosому. Razlogi, da ta cepitev prepreči sintezo RepA, so sledeči: mRNA z zapisom za RepA ima v 5'-koncu zapis za kratek vodilni peptid. Prevajanje gena  $repA$  na mRNA je vezano na prevajanje tega vodilnega peptida (translacijska povezava). Cepitev dvoverižne hibridne RNA na tem mestu prepreči prevajanje vodilnega peptida, posledično pa tudi prevajanje gena za RepA. Zaradi opisanih mehanizmov večja količina RNA CopA negativno vpliva na tvorbo proteina RepA, zato se število kopij plazmida ne poveča (slika 6-7).



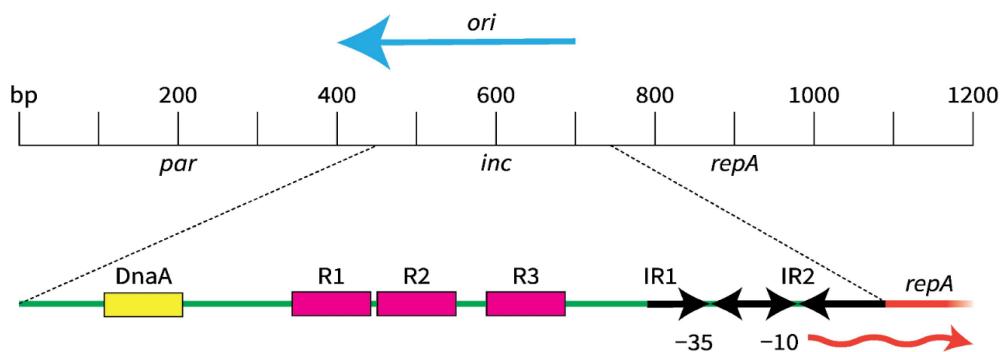
Slika 6-7: Prepisana CopA RNA uravnava podvojevanje plazmida R1 z inhibicijo translacije mRNA za RepA.

#### Uravnavanje podvojevanja plazmidne DNA z iteroni

Nekateri plazmidi svoje podvojevanje uravnavajo z iteroni. Iteroni so 17–22 bp dolga zaporedja baz v 3–7 ponovitvah v regiji  $oriV$ . V bližini so lahko tudi dodatne kopije iteronov, ki sodelujejo pri uravnavanju števila kopij plazmidov. Najbolje preučeni predstavniki teh plazmidov so pSC101, F, P1, R6K in sorodniki plazmidova RK2.

### Plazmid pSC101

Plazmid pSC101 je eden od najenostavnejših plazmidov, ki svoje podvojevanje uravnava z iteroni. Njegova regija *ori*, prikazana na sliki 6-8, vključuje regijo *par* (porazdelitev plazmidov), *inc* (zaporeda, ki sodelujejo pri uravnavanju podvojevanja in posledično uvrstitvi v inkompatibilnostno skupino) ter regulatorno (IR1 in IR2) in kodirajočo regijo za protein RepA (*repA*). RepA je edini plazmidno zapisan protein, ki je potreben za začetek podvojevanja. Poleg gena *repA* so v tej regiji tudi iteroni R1, R2 in R3, s katerimi se RepA poveže. Drugi proteini, ki sodelujejo pri podvojevanju, so zapisani kromosomsko (DnaA, DnaB, DnaC in DnaG).



Slika 6-8: Regija *ori* plazmida pSC101, povezana z uravnavanjem podvojevanja. RepA svoje prepisovanje uravnava z vezavo na IR1 in IR2. R1, R2 in R3 so iteroni, ki so vezavna mesta za RepA. Prikazano je tudi mesto vezave gostiteljskega proteina DnaA in mesto *par*.

Podvojevanje je uravnavano s količino proteina RepA in povezovanjem plazmidov z njim. Protein RepA uravnava prepisovanje lastne mRNA (transkripcijska avtoregulacija). Ko je v celici več kopij plazmida, je posledično tudi veliko plazmidno zapisanega proteina RepA. Ta se veže na obrnjene ponovitve (IR1 in IR2), v katerih sta zaporedji -10 in -35, ključni za vezavo RNA-polimeraze, in s tem prepreči lastno prepisovanje. Če ima plazmid majhno število kopij (ang. low copy number), se verjetno vključi dodatni mehanizem. Ko je v celici plazmidov dovolj, se med seboj povežejo z vezanimi proteini RepA. Ta proces prepreči nadaljnje podvojevanje obeh povezanih plazmidov. Tako je podvojevanje uravnavano ne samo s koncentracijo RepA, ampak tudi s številom plazmidov (natančneje s številom iteronov, ki so v mestu *ori*).

Dejavniki gostiteljske bakterije, ki sodelujejo pri uravnavanju podvojevanja

Mnogi plazmidi za začetek podvojevanja poleg proteina Rep potrebujejo tudi gostiteljske encime, kot npr. DnaA, ki običajno sodeluje pri podvojevanju bakterijskega kromosoma. Pri nekaterih plazmidih prihaja tudi do interakcij med proteini Rep in DnaA. RP4, ki ima široko gostiteljsko območje, sintetizira dve vrsti proteina Rep. Sklepamo lahko, da različni proteini laže interagirajo z DnaA posameznih bakterijskih vrst ali rodov.

### Mehanizmi za preprečevanje izgube plazmidov

Zunajkromosomski elementi, kot so plazmidi, se med celično delitvijo lahko hitro izgubijo. Poznamo nekaj vrst mehanizmov, ki jih pomagajo ohranjati v celicah. Primeri teh so mehanizmi za ločitev multimernih plazmidov in sistemi za porazdelitev plazmidov ter sistemi toksin-antitoxin.

### Mehanizmi za ločitev multimernih plazmidov

Verjetnost, da celica med delitvijo izgubi plazmid, se poveča, če so plazmidi med seboj povezani. Dimeri (povezava dveh plazmidov) in multimeri (povezava več plazmidov) se tvorijo zaradi

## Poglavlje 6

rekombinacij med monomeri, lahko pa so tudi posledica neuspešne terminacije podvojevanja RC. Dimeri in multimeri imajo obliko velikih krogov in so včasih pri podvojevanju uspešnejši od običajnih plazmidov (imajo več mest *ori*). To povzroči kopiranje multimernih plazmidov v celici, če ne pride do njihove razdružitve.

Multimeri so težavni tudi pri delitvi celice in porazdelitvi plazmidov med hčerinski celici. Zmanjšujejo število kopij plazmida v celici in lahko se zgodi, da gre celoten multimer le v eno hčerinsko celico, druga pa ostane brez plazmida.

Ker je frekvenca izgubljanja multimernih plazmidov visoka, imajo mnogi zapise za mestnospecifične rekombinacijske sisteme. Te so lahko zapisani na plazmidih samih ali pa na kromosomu gostiteljske bakterije.

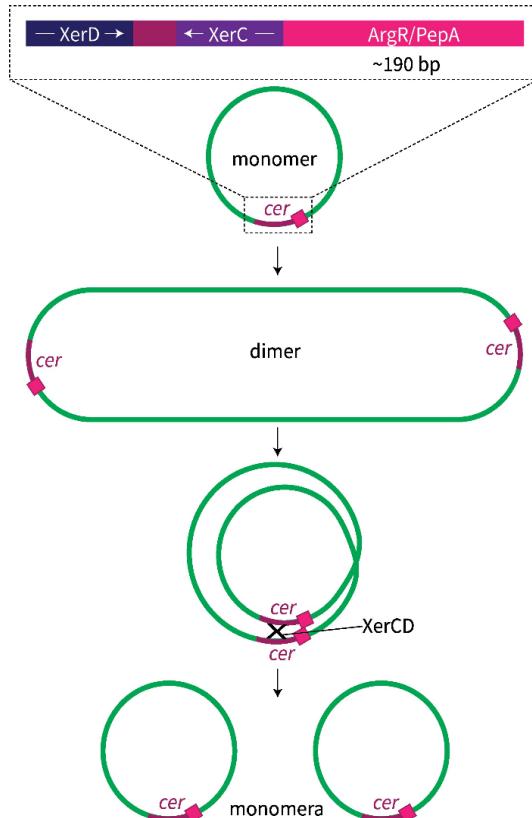
### Sistem Cre-*loxP*

To je plazmidno zapisan mestnospecifičen rekombinacijski sistem faga P1. Protein Cre je tirozinska rekombinaza, ki omogoči rekombinacijo dveh mest *loxP* dimera. Rezultat rekombinacije sta dva monomera.

### Sistema *cer*-XerC/D in *psi*-XerC/D

Plazmida ColE1 (uporablja sistem *cer*-XerC/D) in pSC101 (uporablja sistem *psi*-XerC/D) svoje multimere ločita z mestnospecifičnimi rekombinacijskimi sistemi svojih gostiteljev. Sistemi sicer omogočijo razdvojitev kromosomskih dimerov na mestih *dif* in z interakcijo med XerC/D in FtsK, plazmidi pa te sisteme z manjšimi dopolnitvami lahko izkoristijo tudi v lastne namene.

Plazmid ColE1 ima mesto *cer*, vendar je to prepoznamo samo, če sta blizu vezana tudi gostiteljska proteina PepA in ArgR, kot je prikazano na sliki 6-9. Proteina se vežeta z rekombinazo XerC/D na mestu *cer* ter sodelujeta pri pravilni rekombinaciji.



Slika 6-9: Razdvojitev dimerov plazmidita ColE1 s sistemom XerC/D gostiteljske bakterije *E. coli*.

## Sistemi toksin-antitoksin

Kadar bakterije niso pod selekcijskim pritiskom, je podvojevanje in ohranjanje plazmidov za celico nepotrebno metabolno in energetsko breme, ki jim upočasni rast. Nekateri plazmidi za svojo ohranitev v celicah skrbijo s sistemi toksin-antitoksin. Z njimi sprožijo propad celic, ki izgubijo plazmide. Te sisteme, ki jih v angleščini imenujemo tudi *plasmid addiction systems*, pogosto najdemo pri mobilnih plazmidih, zasledimo pa jih tudi pri integrativnih konjugativnih elementih.

Sistemi toksin-antitoksin imajo dva sestavna dela, ki sta proteina ali RNA. Ena od komponent deluje kot toksin, ki celici škoduje, druga pa kot antitoksin ali protistrup, ki škodo izniči. Ko je plazmid v celici, se sintetizirata oba. Antitoksin lahko učinek toksina izniči neposredno (npr. z vezavo nanj ali preprečitvijo sinteze toksina) ali pa nanj deluje posredno (preko drugih interakcij). Načeloma je toksin stabilen in v celici ostane tudi, ko se plazmid izgubi, kar vodi v propad celice. Nekaj sistemov je opisanih v nadaljevanju.

### Tip I

Protismerna RNA se poveže z mRNA za toksin in inhibira njegovo sintezo, ker celične RNaze kompleks razgradijo. Če se geni z zapisom za toksin in antitoksin, izgubijo, mRNA za toksin ni več nevtralizirana z nestabilno protismerno RNA in sinteza toksina je omogočena. Prvi znan primer tega mehanizma je sistem *hok-sok*.

### Tip II

Tako toksin kot antitoksin sta proteina. V običajnih razmerah antitoksin inhibira dejavnost toksina tako, da z njim tvori kompleks. V stresnih okoliščinah se lahko aktivirajo celične proteaze (Clp in Lon) in antitoksin razgradijo. Sproščeni toksin lahko inhibira translacijo ali podvojevanje bakterijske DNA.

### Tip III

Toksin je protein in antitoksin je molekula RNA. Z nastankom kompleksa iz antitoksinske RNA in toksina je toksin inaktiviran. Če se geni z zapisom za toksin in antitoksin izgubijo, se manj stabilna antitoksinska RNA razgradi, toksin kot stabilna molekula pa lahko še naprej inhibira procese prevajanja v celici.

### Tip IV

Proteinski antitoksin stabilizira filamentozne proteine citoskeleta (FtsZ in MreB). Kadar antitoksina ni, toksin onemogoča polimerizacijo citoskeletalnih proteinov in inhibira celično delitev.

### Tip V

Proteinski antitoksin deluje kot specifična RNaza za toksinsko mRNA. Brez antitoksina se toksinska mRNA ne razgradi in protein, ki se iz nje prevede, lahko poškoduje celično membrano.

### Tip VI

Toksin se veže na drsečo objemko DNA-polimeraze in prepreči podvojevanje DNA. Antitoksin pa toksin »dostavi« celični proteazi in s tem omogoči njegovo razgradnjo.

### Tip VII

Proteinski antitoksin deluje kot encim in inaktivira toksin s posttranslacijsko modifikacijo. Sistem *hha-tomB* (pri bakterijah *Yersinia enterocolitica* in *E. coli*) deluje tako, da antitoksin v okolju s kisikom toksin oksidira.

## TEMELJNI POJMI

- Replikon – molekula DNA, ki se lahko neodvisno podvaja z enega mesta začetka podvojevanja – *ori*.
- Mesto *ori* – mesto, kjer se začne podvojevanje DNA.
- Gostiteljsko območje (ang. host range) plazmida – bakterije, v katerih se plazmid lahko pomnožuje.
- Podvojevanje theta ( $\theta$ ) – način podvojevanja DNA, pri katerem nastane struktura, podobna grški črki  $\theta$ .
- *ori DSO* (ang. double strand origin) – mesto začetka podvojevanja na način kotalečega se kroga (RC) na izhodni dvostranski plazmidni DNA.
- *ori SSO* (ang. single strand origin) – mesto začetka sinteze komplementarne verige enoverižnega krožnega plazmida, nastalega pri podvojevanju na način kotalečega se kroga (RC).
- Inkompatibilnost – nezmožnost soobstoja dveh ali več vrst plazmidov v bakterijski celici.
- Telomeraza – encim, ki rešuje težavo linearnih koncov molekul DNA.
- Protismerna RNA – RNA, ki se prepiše glede na kodirajočo verigo v nasprotni smeri kot RNA, ki se sintetizira glede na matrično verigo.
- Endonukleaza – encim, ki cepi znotraj verige DNA.
- translacijsko-iniciacijska regija (TIR) – regija, pomembna za začetek translacije.
- Iteroni – ponovitve določenih zaporedij v bližini regije *oriV*; običajno so dolga 17–22 baznih parov in se ponovijo približno 3–7-krat.

## POVZETEK

Plazmidi so replikoni, ki se običajno podvajajo neodvisno od kromosoma. Plazmidi imajo zapise za različne dejavnike, ki bakterijam večinoma olajšajo preživetje in adaptacijo v različnih okoljih. Poleg tega imajo pogosto tudi zapise za dejavnike, ki so potrebni za podvojevanje in porazdelitev v hčerinski celici. Plazmidi se podvojujejo na različne načine, med bolj znanimi in preučenimi so način  $\theta$ , RC in podvojevanje linearnih plazmidov. Podvojevanje plazmidne DNA je natančno uravnavan proces, pri katerem lahko sodelujejo protismerna RNA in različni proteini Rep. Število kopij plazmida je uravnavano in določeno. Plazmidi iz različnih inkompatibilnostnih skupin v celici načeloma ostanejo več generacij, če pa so iz iste inkompatibilnostne skupine, iz celične linije sčasoma lahko izpadajo. Inkompatibilnostne skupine plazmidov so odvisne od regije *ori* in sistemov Par. Sistemi Par zagotavljajo ustrezno porazdelitev plazmidov med hčerinski celici. Ker se lahko plazmidi med celično delitvijo hitro izgubijo, so bakterije razvile mehanizme za njihovo ohranjanje v celici. Primeri teh so mehanizmi za ločitev multimernih plazmidov in sistemi za porazdelitev plazmidov ter sistemi toksin-antitoksin (TA).

## 7 KONJUGACIJA

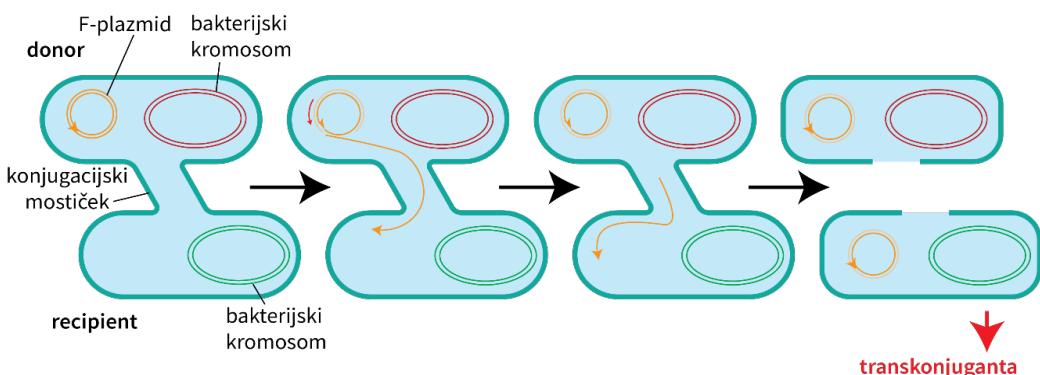
Nadja Spasovski, Jerneja Ambrožič Avguštin, Marjanca Starčič Erjavec

### UČNI CILJI

- Spoznati in razumeti konjugacijo po Gramu negativnih in pozitivnih bakterij.
- Spoznati in razumeti uravnavanje konjugacije po Gramu negativnih in pozitivnih bakterij

### UVOD

Konjugacija je proces, pri katerem se med dvema bakterijskima celicama, ki sta preko pila v neposrednem celičnem stiku, prenese plazmid ali integrativni konjugativni element (ICE), prav tako pa se lahko skupaj z njima prenesejo še drugi genski elementi, npr. integroni. Celico, ki plazmid daruje, imenujemo donorska celica ( $F^+$ ), celico, ki plazmid prejema pa recipientska celica ( $F^-$ ), recipientsko celico s prejetim plazmidom pa transkonjuganta (slika 7-1).



Slika 7-1: Preprosta shema konjugacije, ko plazmid ni vključen v kromosom. Po prenosu DNA iz donorske celice v recipientsko nastane transkonjuganta.

### Zgodovina konjugacije

Čeprav plazmidi še niso bili opisani, sta Joshua Lederberg in Edward Tatum leta 1947 analizirala posledice konjugativnega prenosa genetskih zapisov. Lederberg in Tatum sta za svoj poskus uporabila različne avksotrofne seve bakterije *E. coli*, ki sami niso bili sposobni sintetizirati nekaterih aminokislín. Za eno izmed kombinacij sta uporabila sev Y10, ki je bil avksotrofen za treonin, levcin in tiamin, in sev Y24, avksotrofen za biotin, fenilalanin in cistein; nobeden od njiju ni rasel na minimalnem gojišču. Če pa sta seva zmešala in ju po določenem času sprala in nato inkubirala na minimalnem gojišču, sta opazila rast – ugotovila sta, da je na vsakih  $10^7$  celic ena postala prototrofna. Take celice so bile rekombinantne in so imele tako gene seva Y10 kot gene seva Y24, saj je med genomoma prišlo do rekombinacije. Posledično so bile sposobne same sintetizirati vse potrebne aminokislíne. Lederberg in Tatum sta domnevala, da so se geni nekako prenesli med bakterijama, čeprav takrat še niso poznali plazmidov in niso vedeli za možnost njihove vključitve v bakterijski kromosom.

Leta 1950 je Bernard Davis ponovil nekoliko spremenjen poskus, da bi ugotovil, ali so prototrofi nastali zgolj s transformacijo ali pa je za prenos potreben neposredni celični stik. Uporabil je dva različno avksotrofna seva in z njima napolnil U-cevko, tako da sta bila seva na sredini med seboj ločena s porozno pregrado, ki je omogočala zgolj pretok gojišča, ne pa izmenjave bakterijskih celic. Želel je namreč preveriti, ali se lahko DNA prenese v gojišču, torej brez neposrednega celičnega stika. Po inkubaciji je oba seva nacepil na minimalno gojišče, vendar kolonije niso zrasle, saj je

pregrada preprečevala povezavo bakterij preko pila. Ko jo je odstranil, je konjugacija lahko potekla in na minimalnem gojišču so zrasle prototrofne rekombinantne bakterije.

Danes je znano, da se plazmidi in drugi genski elementi lahko med bakterijskimi celicami prenesejo na več načinov, med najbolje opisanimi so: konjugacija, transdukcija (prenos z bakteriofagi), transformacija (vnos zunajcelične DNA liziranih bakterij v celico) in vezidukcija (prenos z vezikli).

### Konjugacija pri po Gramu negativnih bakterijah

Prvi in najbolj preučen konjugativni plazmid je plazmid F (ang. fertility), imenovan tudi faktor F. Ker je za prenos plazmidov potrebnih veliko informacij in precej plazmida zasede že regija *tra* (ang. transfer), so konjugativni plazmidi razmeroma veliki. Pri plazmidu F (99 kb) geni *tra*, ki so del operona *tra*, zavzemajo približno eno tretjino plazmidne DNA. Poleg genov *tra* so na plazmidu F zapisani še drugi geni. Plazmid pa ima kar tri replikacijske regije, in sicer RepFIA, ki omogoča podvojevanje θ in je najpomembnejša, zato jo imenujemo tudi *oriV*, RepFIB oz. *oriS*, ki sama ni dovolj učinkovita za ohranitev plazmida v celici, in RepFIC::Tn1000, ki je inaktivirana zaradi vstavljenega Tn1000. Funkcije nekaterih genov plazmida F še vedno niso znane.

Po Gramu negativne bakterije imajo številne gene *tra* z različnimi funkcijami (preglednica 7-1), ki jih lahko delimo v dve skupini: geni za proteine sistema Dtr (ang. DNA transfer and conjugal replication), ki sodelujejo pri pripravi plazmidne DNA za prenos in samem prenosu, ter gene sistema MpF (ang. mating pair formation), z zapisi za sintezo in sestavo pila, stabilizacijo konjugacijskega para ter povezavo sistemov MpF in Dtr. Pomemben del operona *tra* so tudi geni za regulatorne molekule in regulatorna zaporedja.

Preglednica 7-1: Skupine genov in promotorjev, ki sodelujejo pri konjugaciji, in njihove naloge.

Naloge	Geni (proteini) oz. mesta v DNA
<b>Geni, ki se prevedejo</b>	
<b>1. Geni za prenos DNA</b>	
a) Sinteza pila	<i>traA</i> (prepropilin), <i>traQ</i> (prepropilinska hidrolaza), <i>traX</i> (pilinska N-acetilaza)
b) Sestavljanje pila	<i>traB</i> , <i>traC</i> , <i>traE</i> , <i>traF</i> , <i>traG</i> , <i>traH</i> , <i>traK</i> , <i>traL</i> , <i>traU</i> , <i>traV</i> , <i>traW</i> , <i>trbC</i>
c) Stabilizacija konjugacijskega para	<i>traG</i> , <i>traN</i>
d) Prenos DNA	<i>traD</i> (protein za prenos DNA), <i>traI</i> (relaksaza/helikaza), <i>traY</i> ( <i>oriT</i> -nukleaza)
<b>2. Geni, povezani s prenosom DNA</b>	
a) Zmanjšanje stabilnosti povezave, omejevanje vstopa DNA (ang. surface exclusion)	<i>traS</i> , <i>traT</i>
b) Uravnavanje prenosa	<i>finP</i> , <i>traJ</i> (glavni pozitivni regulator konjugacije), <i>traM</i> , <i>traY</i>
<b>Cis-mesta, ki se ne prepišejo</b>	
<b>1. Prenos DNA</b>	<i>oriT</i>
<b>2. Mesta, povezana s prenosom DNA</b>	
a) Transkripcijski promotorji	<i>p<sub>traI</sub></i> , <i>p<sub>traJ</sub></i> , <i>p<sub>traM</sub></i> , <i>p<sub>traT</sub></i> , <i>p<sub>traY</sub></i>
b) Mesto za vezavo represorja	<i>O<sub>traJ</sub></i>

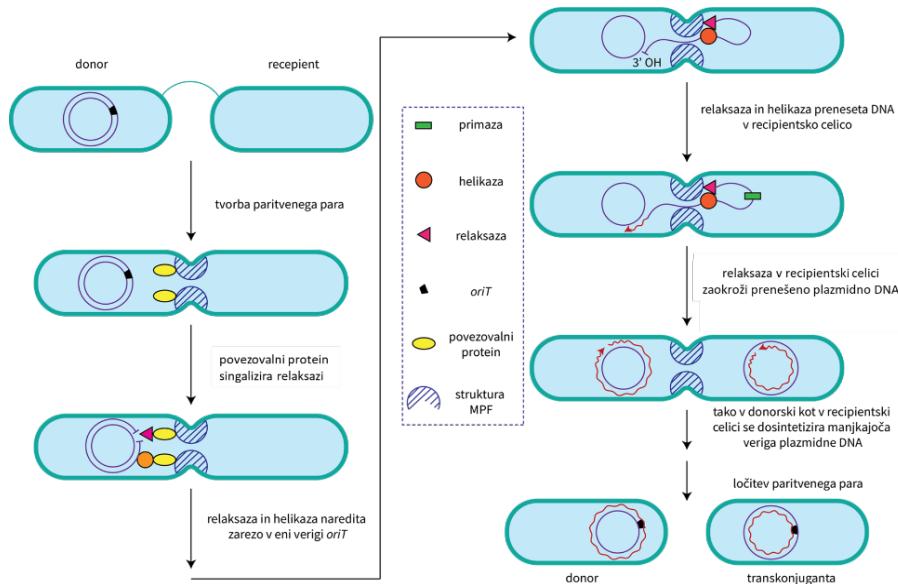
## Sistem Mpf

Glavna naloga proteinov sistema Mpf je, da donorski in recipientski celici omogočijo, da med konjugacijo ostaneta v stiku preko pila in da nastane kanalček, skozi katerega v recipientsko celico potujejo proteini in DNA. Sistem prav tako vsebuje obveščevalni dejavnik (povezovalni protein), ki sistem Dtr obvesti, da je sestavljen konjugacijski mostiček in se konjugacija lahko začne.

Proteini sistema Mpf sestavljajo pil – beljakovinsko strukturo premera 10 nm ali več, ki ima na sredini kanalček, skozi katerega lahko potujejo DNA in proteini. Glavni sestavni protein je pilin oz. TraA, ki je prisoten v mnogih kopijah in tvori osrednjo strukturo, ki povezuje celici. Sam pil pa je zgrajen iz številnih različnih proteinov, med katerimi ima vsak specifično nalogu. Konjugacija se začne s sintezo pila, ki se lahko razlikuje med različnimi konjugacijskimi sistemi. Lahko je različnega premera, kratek ali dolg, rigid ali upogljiv. Gre verjetno za evolucijsko prilagoditev na okolje, v katerem v naravi poteka konjugacija, kar je treba upoštevati pri konjugacijah, ki jih preučujemo v laboratorijskih razmerah. Pil omogoča povezovanje donorske in recipientske celice in prehod DNA iz ene v drugo celico. Ko je stik vzpostavljen, se t. i. povezovalni protein (ang. coupling protein), ki je del sistem Mpf in vezan na membranski del pila, poveže z ustrezno plazmidno DNA. Sledi hidroliza ATP, vezanega na povezovalni protein, s čimer se ta konformacijsko spremeni. To sproži prenos plazmida, ki ga omogočijo proteini sistema Dtr.

## Sistem Dtr

Proteini sistema Dtr sodelujejo predvsem pri pripravi DNA na prenos in pri samem prenosu. V sistem spadajo številni različni proteini, eden najpomembnejših pa je relaksaza oz. TraI (v plazmidu F). Relaksaza je mestnospecifična endonukleaza, ki naredi zarezo na mestu *nic* v *oriT*, ko iz sistema Mpf prejme signal, da sta celici povezani s pilom in pripravljeni na prenos DNA. Relaksaza prekine eno verigo plazmida tako, da cepi fosfodiestrsko vez med dvema nukleotidoma, pri čemer se s svojim tirozinom kovalentno veže na 5'-koncu prekinjene verige in jo skozi pil vodi v recipientsko celico. V recipientski celici se preneseni plazmid znova zaokroži, tako da prenese fosfatno skupino iz tirozina na 3'-koncu deoksinukleotida. Pri tem se relaksaza sprosti s plazmida in se razgradi (glej sliko 7-2).



Slika 7-2: Konjugativni prenos plazmida. Najprej se celici povežeta s pilom, nato pa relaksaza zareže eno izmed verig na mestu *nic* v *oriT* in jo prenese v recipientsko celico. Prenesena veriga se nato zaokroži in podvoji s primazo in gostiteljsko polimerazo. Prav tako se podvoji tudi enojna veriga, ki je ostala v donorski celici. Po končani konjugaciji se konjugacijska vez prekine.

## Poglavlje 7

Relaksaza plazmida F pa ima tudi helikazno aktivnost, kar ji omogoča, da v donorski celici loči verige DNA, prav tako pa naj bi v recipientski celici polimerazi III pomagala pri sintezi komplementarne verige prenesenega plazmida. Relaksaza je skupaj s pomožnimi proteini del večjega kompleksa, imenovanega relaksosom. V plazmidu F med pomožne proteine uvrščamo TraU, TraM in TraY, ki pomagajo pri prenosu DNA in uravnavanju delovanja relaksosoma s sistemom MpF. Proteina TraY in IHF (gostiteljski protein, kodiran je na kromosому in ne na plazmidu) sta predvsem pomembna pri rezu DNA na mestu *nic*, medtem ko TraM in TraD pomagata pri prenosu verige v drugo celico.

Prenos plazmidne DNA v recipientsko celico spominja na mehanizem RC za podvojevanje plazmidne DNA. Medtem ko se v donorski celici za začetek sinteze komplementarne verige lahko uporabi kar 3'-konec prekinjene verige, je za sintezo komplementarne verige prenesene DNA potrebna sinteza začetnega RNA-oligonukleotida. Tega izdela encim primaza, ki je pri večini konjugacijskih sistemov del sistema Dtr. Pri nekaterih plazmidih (RP4, ColIb-P9) primaza nastane v donorski celici in se nato prenese v recipientsko, skupaj s plazmidom, pri nekaterih pa se prepiše iz enoverižne DNA med prenosom. Prednost konjugativnega plazmida, ki ima zapis za lastno primazo, je ta, da se lahko prenese tudi v manj sorodne gostiteljske bakterije, katerih lastne primaze na plazmidu ne bi prepoznale ustreznegra zaporedja za sintezo začetnega oligonukleotida.

Ker se po prenosu enoverižne DNA tako v donorski kot recipientski celici sintetizira komplementarna veriga glede na preostalo oziroma preneseno enoverižno DNA, imata po konjugaciji tako donorska kot transkonjugantna celica dvoverižno plazmidno DNA.

### Prenos sicer nekonjugativnih plazmidov z *oriT*

Da se plazmid lahko samostojno prenese, potrebuje vse ustrezne gene za tvorbo konjugacijskega mostička, proteine za sam prenos DNA in mesto *oriT*. Tak plazmid je konjugativen. Če plazmid nima vseh potrebnih zapisov za proteine, ki bi to omogočili, se lahko prenese s proteini ustreznega konjugativnega plazmida, ki je hkrati v celici – takšni plazmidi se torej, čeprav so nekonjugativni, tudi lahko prenašajo s konjugacijo, pravimo, da se mobilizirajo (ang. mobilizable plasmids). Najpreprostejši vsebujejo samo mesto *oriT*, katerega zaporedje je enako mestu *oriT* konjugativnega plazmida, zaradi katerega se prenašajo. V tem primeru mesto prepozna relaksaza konjugativnega proteina, ki se lahko poveže s povezovalnim proteinom. Če ima tak plazmid tudi zapis za relaksazo, jo mora prepozнатi povezovalni protein konjugativnega plazmida. Zato imajo naravni sicer nekonjugativni plazmidi, ki pa se lahko prenesejo s konjugacijo, v regiji *mob* poleg *oriT* še zapis za relaksazo in povezovalni protein, kar jim omogoča, da se prenašajo s širšim naborom konjugativnih plazmidov, ne zgolj s tistimi, ki imajo enak *oriT*.

### Bakteriofagi, specifični za celice F+

Bakteriofagi se na gostiteljski celici vežejo na specifični receptor, vezavi pa sledi vnos fagne DNA. Fagi, ki so specifični za celice F+ (ang. male-specific phages), se pritrdijo na receptor, ki je na pilu teh celic, in tako lahko okužijo zgolj celice, ki so sposobne tvoriti pil. Npr., bakteriofaga M13 in R17 okužujeta zgolj bakterije, ki imajo pil, zapisan na plazmidu F, faga Pf3 in PRR1 pa samo tiste, ki imajo pil, zapisan na plazmidu RP4. Ker so receptorji za pritrditev faga na celico na pilu, lahko mutacije v zapisih za pil povzročijo, da se fag na celico ne more pritrditi.

### Sekrecijski sistem tipa IV

Konjugacijski aparat je soroden sekrecijskemu sistemu tipa IV, ki se sicer uporablja za transport proteinov, proteinskih kompleksov in kompleksov DNA-protein med celicami oziroma med celicami in okoljem. Patogene bakterije pa sistem pogosto uporabljajo za vnos toksinov v druge celice, npr. evkariotske. Takrat celici povezuje pil ali kak drug adhezin, pri prenosu pa prav tako

sodelujejo posebne membranske strukture, skozi katere potuje toksin. Primer takega sistema najdemo na plazmidu Ti bakterije *Agrobacterium tumefaciens*.

### Konjugacija v laboratoriju in naravi

Čeprav je konjugacija naraven proces, ključen za rekombinacijo genov med bolj ali manj sorodnimi bakterijami, je pogosto del laboratorijskih poskusov, s katerimi preučujemo in anticipiramo dogajanje v kompleksnejših, naravnih okoljih ali v okviru katerih pripravljamo nove seve. V laboratoriju je uspešnost konjugacije odvisna od številnih dejavnikov, med drugim moramo prilagoditi samo gojišče in razmere, v katerih konjugacija poteka, glede na konjugativni pil plazmida. Ker se pili razlikujejo po dolžini, rigidnosti in premeru, je pomembno ugotoviti, ali je primernejše trdno ali tekoče gojišče.

#### Sevi Hfr

Plazmid F ali katerikoli drug plazmid, ki ima s kromosomom mesta homologije, se lahko vanj vključi s homologno rekombinacijo. Takšnemu plazmidu rečemo episom, celico z vključenim plazmidom pa imenujemo celica Hfr. Mesta homologije plazmida in kromosoma so pogosto transpozicijski elementi – transpozoni (Tn) in še pogosteje insercijska zaporedja (IS).

#### Sevi F'

Vstavljen plazmid se včasih iz kromosoma tudi izreže, prav tako z rekombinacijo. Če se plazmid izreže natančno in v celoti, se kromosom in plazmid v celici vrneta v stanje, kakršno je bilo pred vključitvijo. Lahko pa se zgodi, da se skupaj s plazmidom izreže še del kromosoma, ki se tako preseli na plazmid – del lahko obsega enega ali več genov. Plazmid F z vključenim delom kromosoma imenujemo F' (ang. F prime). F' se lahko s konjugacijo prenese v celico F–, kar se odrazi tudi na njenem fenotipu.

### Konjugacija pri sevih Hfr – Hfr-konjugacija

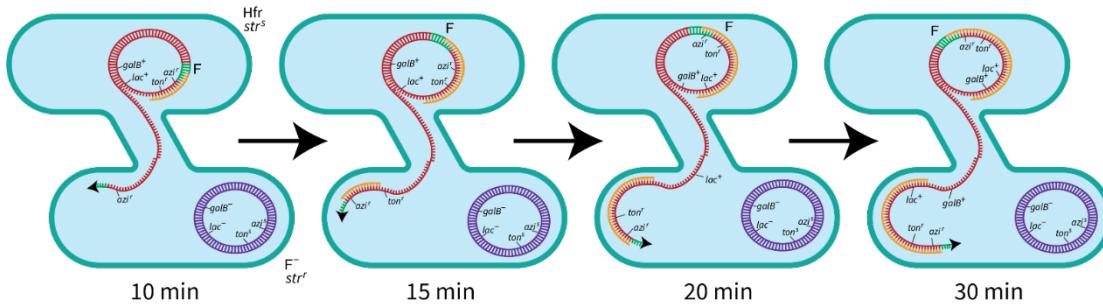
S konjugacijo se lahko prenese tudi v kromosom vstavljen plazmid. V razmerah, ko se začne konjugacija, se na mestu *nic* v *oriT* v kromosom vstavljenega plazmida prekine ena od verig. Proces je enak kot pri prenosu prostega plazmida. Najprej se prenese del plazmidne DNA za mestom *oriT*, nato pa še krajsi ali daljši del donorske kromosomske DNA. Kako velik fragment kromosomske DNA se bo prenesel v recipienta, je odvisno od stabilnosti konjugacijskega mostička. Načeloma se pri Hfr-konjugaciji nikoli ne prenese ves plazmid, saj bi se teoretično v tem primeru prenesel ves kromosom: konjugacijski mostiček se običajno namreč prekine mnogo prej.

Ker se v recipientski celici pojavi donorska kromosomska DNA, ki je homologna recipientski kromosomski DNA, lahko sledijo številne rekombinacije odsekov donorske DNA s kromosom recipiente celice. Donorske seve, pri katerih je konjugativni plazmid vključen v kromosom, zato imenujemo Hfr-sevi (ang. High-frequency of recombination).

### Kartiranje kromosomov s sevi Hfr

Frekvenco konjugativnega prenosa genov s sledljivimi fenotipi lahko uporabljamo za kartiranje lege genov na kromosому donorjev. Na podlagi izračunanih frekvenc prenosa in rekombinacij posameznih genov oz. genskih označevalcev lahko določimo njihov položaj na kromosому. Mestu *oriT* najbližji kromosomski geni donorja se prenesejo z najvišjo frekvenco, sledеči pa z vedno nižjo frekvenco. Za kartiranje običajno uporabimo seva z različnimi aleli istovrstnih genov. Primer je sev Hfr, ki ima na kromosому gene *azi<sup>R</sup>*, *ton<sup>+</sup>*, *lac<sup>+</sup>* in *galB<sup>+</sup>*, recipientski sev pa je *Azi<sup>S</sup>*, *ton<sup>-</sup>*, *lac<sup>-</sup>* in *galB<sup>-</sup>*. Izvedemo poskus z več vzporednimi konjugacijami, od katerih vsako prekinemo

po različnem času inkubacije (slika 7-3). Po vsaki prekinjeni konjugacijski operacijski fazi preverimo, kateri geni v recipientu so postali funkcionalni zaradi rekombinacije genov, prenesenih iz donorske v recipientsko DNA. Frekvenco konjugacij izračunamo na podlagi števila transkonjugant s funkcionalnim aleлом in je sorazmerno višja za gene, ki so bliže vstavljenemu plazmidu (v smeri, v kateri se prenaša), kot za gene, ki so bolj oddaljeni.



Slika 7-3: Kartiranje kromosoma s sevom Hfr. V recipientsko celico se bodo najprej prenesli geni, ki so bliže mestu *oriT*, oddaljeni geni se bodo prenesli zadnji.

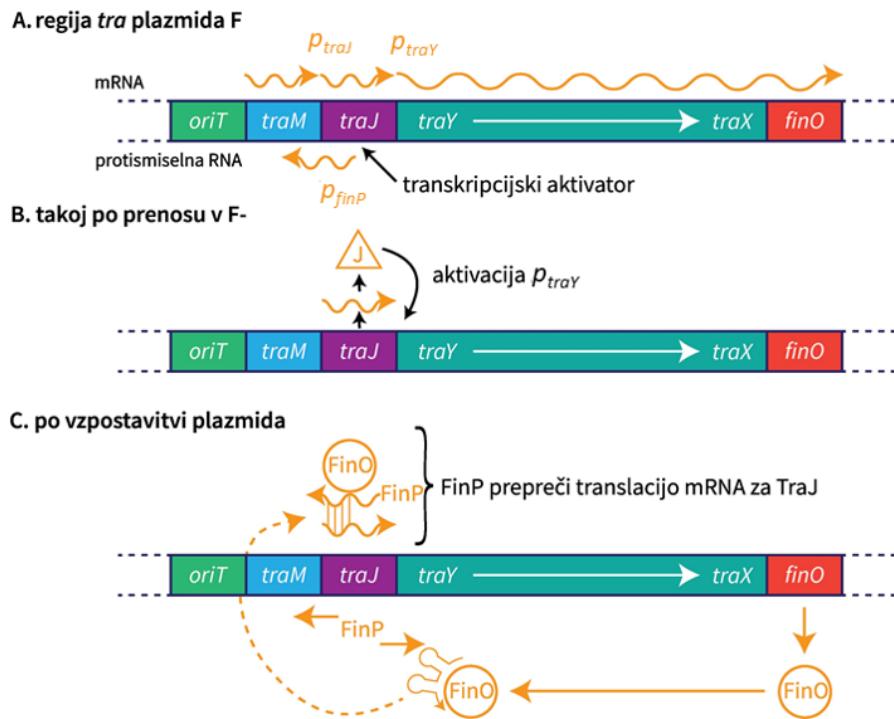
Frekvenca prenosa genov, ki se prenašajo zadnji in so precej oddaljeni od mesta *oriT*, je zelo nizka ali prenosa niti ne zaznamo in so zato podatki pogosto nezanesljivi. Za kartiranje celotnega kromosoma zato potrebujemo seve, ki imajo konjugativni plazmid vstavljen na različnih mestih kromosoma in gene prenašajo z različnimi frekvencami.

### URAVNAVANJE KONJUGACIJE PRI PO GRAMU NEGATIVNIH BAKTERIJAH

Konjugacija je precej natančno uravnavan proces. Večina plazmidov se uspešno in učinkovito prenaša zgolj kratek čas, in sicer takoj po vstopu konjugativnega plazmida v novo celico. Nato je izražanje genov zavro. Kljub temu pa se plazmid zlahka razširi po populaciji bakterij, če ta pride v stik s populacijo s kakim konjugativnim plazmidom. Ko se namreč ta prenese v novo celico, je izražanje genov *tra* največje in plazmid se hitro razširi med celicami.

### Uravnavanje konjugacije plazmida F

Uravnavanje konjugacije je najbolje preučeno pri plazmidu F, pri katerem je glavni transkripcijski aktivatorski protein TraJ. Če bi ta neprestano nastajal, bi se geni *tra* neprestano izražali in bakterija bi ves čas imela pil. Vendar pa je nastajanje TraJ uravnavano. Produkta dveh genov, *finP* in *finO*, tvorita mehanizem t. i. fertilnostne inhibicije, ki preprečuje konjugacijo zaradi delovanja na *traJ* mRNA (slika 7-4). Promotor  $P_{finP}$  je znotraj gena *traJ* in je usmerjen v obratni smeri kot promotor  $P_{traJ}$ . Iz gena *finP* tako nastaja *finP* RNA (FinP), ki je protismerna *traJ* mRNA. RNA FinP je dokaj nestabilna in sama po sebi ne more delovati. Za svojo stabilizacijo potrebuje protein FinO, ki je zapisan v zadnjem genu operona *tra*. S FinO stabilizirana RNA FinP se lahko veže na *traJ* mRNA. Zvezavo protismesilne RNA FinP na *traJ* mRNA se prekrije vezavno mesto za ribosom (RBS) na *traJ* mRNA, kar prepreči njeno prevajanje, saj se ribosom na *traJ* mRNA ne more vezati. Poleg tega pa nastalo dvoverižno strukturo RNA (*traJ* mRNA-RNA FinP) razgradi RNaza E, kar dodatno prispeva k preprečevanju nastanka TraJ. Ko se plazmid prenese v novo celico, se najprej tvori TraJ, nato FinO, saj je *finO* zadnji gen v operonu *tra*, in tako konjugacija lahko hitro poteče. Geni *tra* se izrazijo, na celici nastane pil in plazmid se lahko prenese v naslednjo bakterijo. Ko se plazmid v celici ustavi in se izrazi tudi *finO*, se zavre nastanek TraJ in posledično tudi konjugacija. Geni za produkte, potrebne za konjugacijo, se torej prenehajo izražati kmalu po prenosu plazmida v novo gostiteljsko celico.



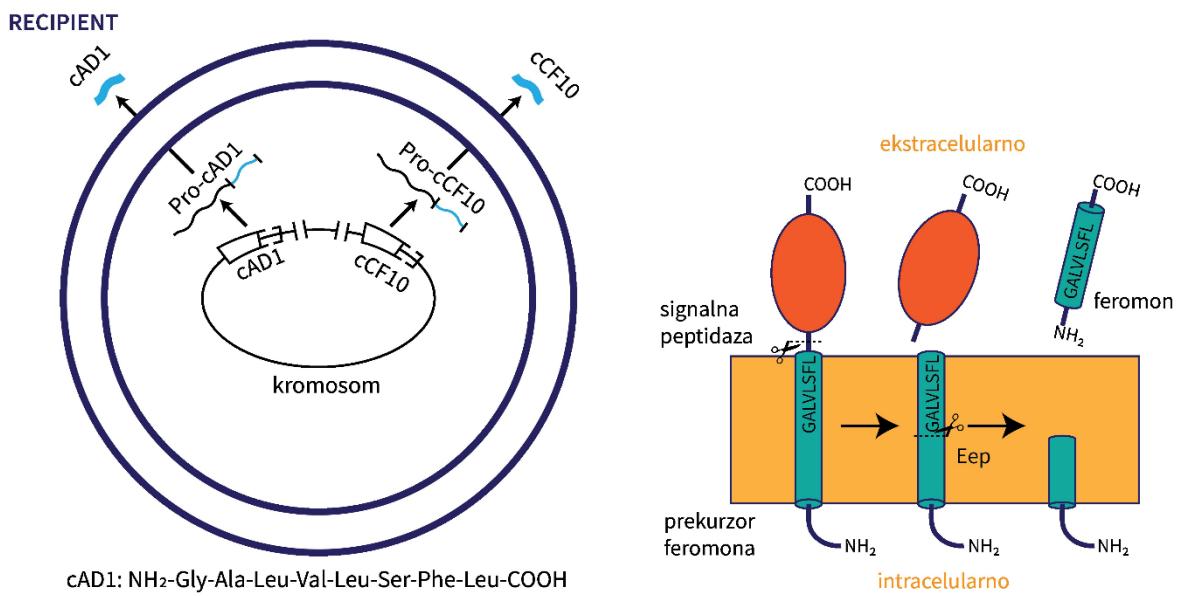
Slika 7-4: Uravnavanje konjugacijskega prenosa plazmida F. V njem imajo ključno vlogo transkripcijiški aktivator TraJ in sistem fertilitnosti inhibicije FinP-FinO. V plazmidu F in njegovih različicah, ki jih uporabljamo v laboratoriju, je v genu *finO* vstavljen transpozicijski element IS3 – ta mutacija gen inaktivira, zato se geni *tra* neprestano izražajo. Posledično imajo vse celice s takim plazmidom F na svoji površini pile in so pripravljene na konjugacijo.

Medtem ko FinP in FinO količino TraJ uravnavata posttranskripcijsko z razgradnjo TraJ-mRNA, pa na aktivnost samega promotorja *p<sub>traJ</sub>* vplivajo še drugi proteini. Njegovo aktivnost povečujejo globalni regulatorji H-NS, Lrp in cAMP-CRP.

### KONJUGACIJA PRI PO GRAMU POZITIVNIH BAKTERIJAH

Konjugacija ne poteka samo pri po Gramu negativnih bakterijah, temveč tudi pri po Gramu pozitivnih bakterijah, kot so *Bacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* in *Streptomyces*. Njihov sistem konjugacije (z izjemo *Streptomyces*) je podoben kot pri po Gramu negativnih bakterijah, npr., zaporedja *oriT* obeh skupin so si zelo podobna. Glavna razlika je v sistemu Mpf, saj je pri po Gramu pozitivnih bakterijah zaradi sestave celične stene lahko preprostejši. Konjugacija pri bakteriji *Enterococcus faecalis* je svojevrstna in bo v nadaljevanju podrobnejše prikazna.

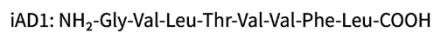
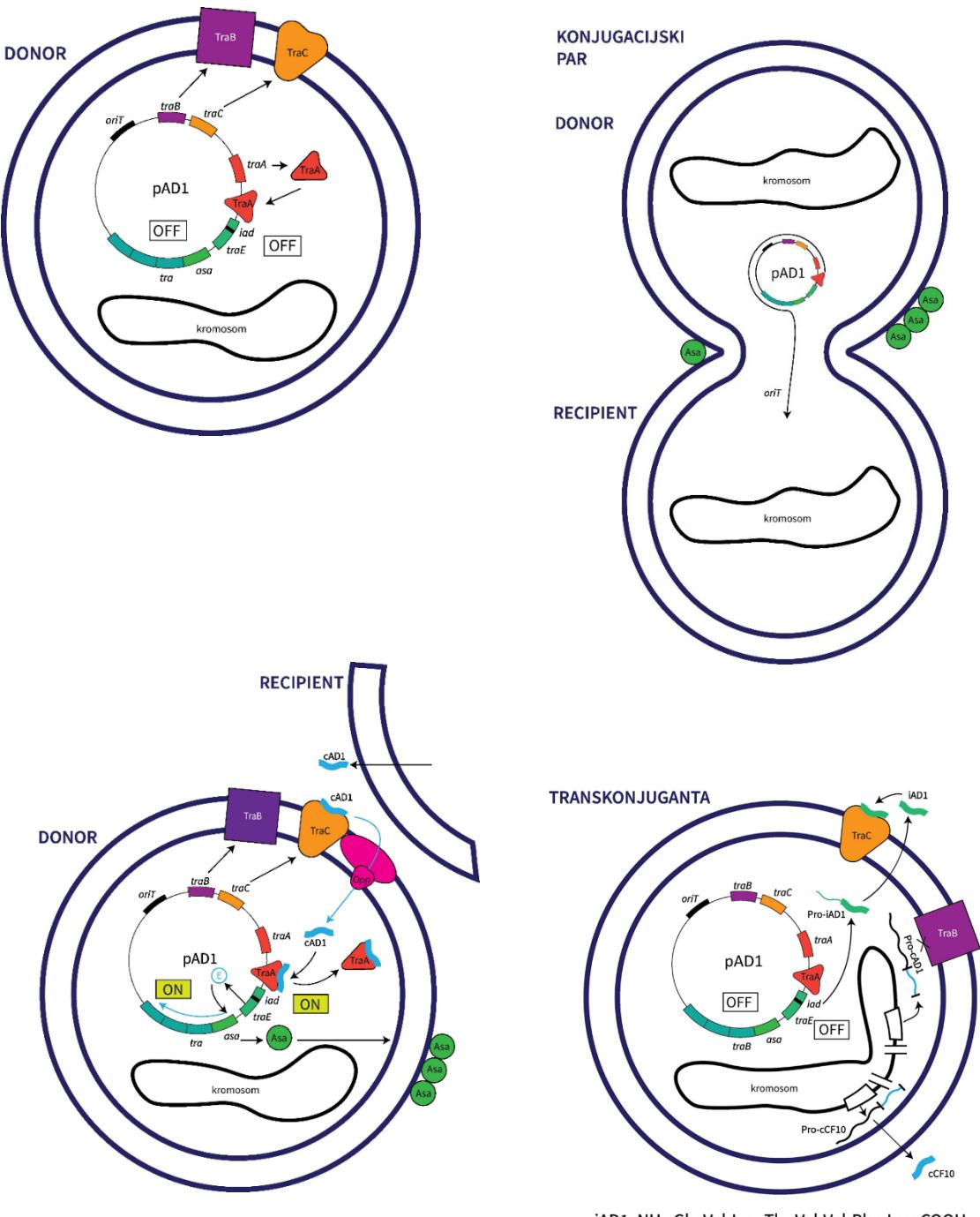
Recipientske celice bakterije *E. faecalis* v okolje sproščajo feromone, kratke oligopeptide, ki spodbujajo konjugacijo z donorskimi celicami *E. faecalis*, ki vsebujejo določen plazmid. Sproščeni oligopeptidi so specifični za posamezne plazmide in jih celica preneha sproščati, ko prejme želeni plazmid. Celica lahko v okolje sprošča več različnih feromonov za več različnih plazmidov naenkrat in preneha sintezo zgolj tistega feromona, ki je značilen za plazmid, ki ga je celica že prejela (slika 7-5 – levo).



Slika 7-5: Recipientska celica v okolje sprošča feromone (levo). Preden nastane aktivna oblika feromona, ki se sprosti v okolje, se mora prekurzor feromona še procesirati (desno).

V recipientski celici feromoni nastanejo kot prekurzorji (npr. Pro-cAD1) v obliki lipoproteina, kateremu se pri iznosu iz celice odreže signalno zaporedje. Iz preostalega dela po proteolizi z encimom Eep ostanejo 7–8 aminokislin dolga zaporedja s C-terminalnega dela, ki se sprostijo v okolje (slika 7-5 – desno). Tako recipientska celica v okolje sprosti zgolj aktivne oblike, ki delujejo kot feromoni za pritegnitev celic F+ z določenimi konjugativnimi plazmidi. Feromoni so poimenovani po plazmidu, ki jih pritegnejo, npr. cAD1 je feromon za plazmid pAD1.

Donorska celica vsebuje konjugativni plazmid, ki kodira vse genske produkte, potrebne za konjugacijo. Na površini donorske celice so proteini za zaznavo feromonov: feromonski receptorji TraC, zapisani v genu *traC*. Gen *traA* kodira represor TraA, ki v neinducirani donorski celici preprečuje transkripcijo genov za konjugacijo (slika 7-6 – levo zgoraj), vse dokler ne pride do indukcije donorja. Indukcija donorja se zgodi, ko se feromon veže na receptor TraC na površini donorske celice. TraC nato feromon prenese na oligopeptidni permeazni sistem (Opp), ki ga vnese v citoplazmo. V citoplazmi se feromon veže na TraA in mu tako prepreči represijo genov za konjugacijo, med drugim tudi gena *traE*. V induciranim donorjem tako lahko nastane TraE, ki aktivira preostale gene *tra* (slika 7-6 – levo spodaj). Nastane agregacijski protein Asa, ki pokrije površino donorske celice in sproži kontakt z recipientsko, čemur sledi konjugacijski prenos. Po vzpostavitvi celičnega stika med donorsko in recipientsko celico nastane konjugacijska pora, skozi katero se plazmidna DNA prenese podobno kot pri po Gramu negativnih bakterijah (slika 7-6 – desno zgoraj). Po prenosu konjugativnega plazmida v recipientsko celico, se delovanje transkonjugante spremeni: ne privlači več plazmidov istega tipa. Transkonjuganta ima tri mehanizme za preprečevanje ponovne konjugacije: i) izrazijo se površinski izključitveni proteini, ki preprečijo nastanek nove konjugacijske pore, ii) sintetizira se inhibitor iAD1, ki se izloči iz celice in veže na TraC ter s tem preprečuje ponovno aktivacijo konjugacije, ter iii) protein TraB veže še neaktivni feromon za ta plazmid (Pro-cAD1) in s tem preprečuje, da bi se izločal v okolje (slika 7-6 – desno spodaj). Celica, ki je postala transkonjuganta, v okolje sicer še vedno lahko sprošča feromone za druge plazmide, ki jih še nima. Kot pri po Gramu negativnih bakterijah se lahko tudi pri po Gramu pozitivnih bakterijah skupaj s konjugativnimi plazmidi prenesejo tudi nekonjugativni plazmidi, ki pa se jih lahko mobilizira.



Slika 7-6: Neinducirana donorska celica (levo zgoraj). Represor TraA preprečuje izražanje genov za konjugacijo. Inducirana donorska celice (levo spodaj). Na TraC, feromonski receptor na površini celice, se veže feromon, ki po transportu v citoplazmo z vezavo na TraA prepreči represijo genov za konjugacijo, nastane TraE, ki aktivira gene tra. Protein Asa prekrije donorsko celico in vzpostavi stik z recipientsko celico (desno zgoraj). Nastane konjugacijska pora, skozi katero se prenese plazmidna DNA, enako kot pri po Gramu negativnih bakterijah. Celica po konjugaciji preneha izločati feromon za prejeti plazmid v okolje in z vezavo inhibitorja na TraC prepreči ponovno konjugacijo (desno spodaj).

Tudi konjugacija pri streptomicetah je svojevrstna, saj so celice streptomicet sposobne tvoriti micelij, v katerem so povezane: tako je frekvenca konjugacije lahko tudi do 100-odstotna. Celice za konjugacijo potrebujejo zelo malo genetske informacije, zato so regije *tra* konjugativnih

## Poglavlje 7

plazmidov streptomicet precej kratke. Konjugacija ima dva koraka: intermicelijski prenos, ki je vezan na produkt genov *tra* – DNA se preko pore prenese med dvema sosednjima celicama. Drugi korak je intramicelijski prenos, v katerem se DNA prenese na sosednje predelke micelija in razširi po njem.

### TEMELJNI POJMI

- Konjugacija – proces prenosa plazmida ali ICE med dvema bakterijskima celicama, ki sta v neposrednem celičnem stiku preko pila.
- Donorska celica (F+) – bakterijska celica, ki daruje plazmid.
- Recipientska celica (F–) – bakterijska celica, ki sprejema plazmid.
- Transkonjuganta – recipientska celica, ki je s konjugacijo prejela DNA.
- Konjugativni plazmid – plazmid, ki se lahko samostojno prenaša, ima zapis za vse potrebne genske elemente za prenos.
- Relaksaza – encim, ki prereže in prenese eno od verig DNA v recipientsko celico.
- Sevi Hfr – donorski sevi, pri katerih je konjugativni plazmid vključen v kromosom.

### POVZETEK

Konjugacija je proces, pri katerem se med dvema bakterijskima celicama, ki sta preko pila v neposrednem celičnem stiku, prenese plazmid ali integrativni konjugativni element (ICE). Najdemo jo tako pri po Gramu pozitivnih kot pri po Gramu negativnih bakterijah. Med konjugacijo se v donorski celici verigi DNA ločita, nato pa se ena prenese v recipientsko celico. Tako nastane transkonjuganta. Da se plazmid lahko samostojno prenese, potrebuje vse ustrezne gene za tvorbo konjugacijskega mostička, proteine za sam prenos DNA in mesto *oriT*. Prvi odkrit in najbolj preučen konjugativni plazmid je plazmid F, imenovan tudi faktor F. Približno tretjino plazmida predstavljajo geni *tra*, ki so del operona *tra*. Mesto *oriT* označuje mesto, kjer encim relaksaza prekine eno od verig in jo začne prenašati v recipientsko celico. Relaksaza je skupaj s pomožnimi proteini del večjega kompleksa, imenovanega relaksosom. Plazmid F ali katerikoli drug plazmid, ki ima s kromosomom mesta homologije, se lahko vanj vključi s homologno rekombinacijo. Donorske seve, pri katerih je konjugativni plazmid vključen v kromosom, imenujemo sevi Hfr in jih lahko uporabimo za kartiranje bakterijskih kromosomov. Konjugacija je precej natančno uravnavan proces; večina plazmidov se uspešno prenaša zgolj kratek čas, in sicer takoj po vstopu konjugativnega plazmida v novo celico. Nato je izražanje genov zatrdo. Konjugacijo lahko spremljamo zgolj v laboratoriju, proces v naravi pa poteka v drugačnih razmerah in z drugačno frekvenco. Danes največji problem predstavlja prenos rezistenčnih plazmidov, s katerimi se širi odpornost proti različnim antibiotikom.

## 8 TRANSPOZICIJSKI ELEMENTI, INTEGRONI, GENOMSKI OTOKI IN KONJUGATIVNI TRANSPOZONI

Lara Krampač, Jerneja Ambrožič Avguštin, Marjanca Starčič Erjavec

### UČNI CILJI

- Spoznati osnovno zgradbo transpozicijskih elementov in mehanizme njihovega premikanja po genomu.
- Razumeti pomen transpozicijskih elementov za širjenje genov v bakterijski populaciji.
- Spoznati prednosti in slabosti integrонov za širjenje genov v populaciji v primerjavi s transpozoni.
- Spoznati genomske otoke, vključno z otoki patogenosti.
- Razumeti razliko med zgradbo in možnostjo horizontalnega prenosa transpozonov in integrativnih konjugativnih elementov.

### UVOD

Med mobilne genetske elemente, poleg že opisanih plazmidov, uvrščamo tudi transpozone in pogojno integrone. Ti elementi imajo pomembno vlogo pri bakterijski evoluciji, vključno s širjenjem genov, povezanih z odpornostjo proti protimikrobnim učinkovinam.

Za razumevanje prenosa transpozicijskih elementov (Tn-elementov) je pomembno poznavanje homologne in nehomologne rekombinacije. Nehomologna rekombinacija (mestnospecifična rekombinacija) je ključna ne samo pri integraciji in izrezovanju profagov, temveč tudi pri procesu transpozicije, ki je opisan v nadaljevanju.

### Splošno o transpoziciji

Transpozicija je prenos definiranih odsekov DNA – transpozonov, znotraj ene ali med različnimi molekulami DNA. Gre za nehomologno rekombinacijo, ki jo omogočajo encimi transpozaze, ki so zapisani na samem transpozicijskem elementu.

Čeprav je o transpozicijskih elementih pri koruzi poročala že Barbara McClintock leta 1951, so vlogo skupine teh elementov – insercijskih zaporedij (IS) – James Shapiro, Peter Starlinger in Heinz Saedle pri bakterijah prepoznali šele leta 1965.

Danes vemo, da transpozicijski elementi verjetno obstajajo pri vseh organizmih. Med drugim imajo pomembno vlogo v evoluciji bakterij in so v zadnjih desetletjih pripomogli k širjenju v transpozone vključenih zapisov za odpornost proti protimikrobnim učinkovinam. Čeprav se večina transpozicijskih elementov vstavlja v naključna mesta v genomu, je frekvenca transpozicije – prenosa elementa – uravnavan proces. V nasprotnem primeru bi lahko povečano število ponovitev postalo uničujoče za celico. Frekvence transpozicije so različne, od približno enega dogodka na  $10^3$  delitev celice do 1 transpozicije na  $10^8$  delitev celice. Torej sta verjetnosti, da inaktivacijo nekega gena povzroči vstavljen transpozicijski element ali pa naključna mutacija, podobni. Prav inaktivacijo genov z naključno vstavitvijo vanje pogosto izkoristimo v laboratoriju za insercijsko inaktivacijo oziroma pripravo t. i. »knockout mutant«.

### Delitev transpozicijskih elementov

Transpozicijske elemente delimo na retrotranspozone (razred I) in DNA-transpozicijske elemente (razred II). Značilnosti obeh skupin so povzete v preglednici 8-1.

## Poglavlje 8

Pri retrotranspozoni se transpozicijski element med transpozicijo najprej prepiše v RNA, nato pa z reverzno transkriptazo nazaj v DNA, posledično pa nastanejo značilne kratke ponovitve tarčnega zaporedja. Gre torej za transpozicijo preko RNA-intermediata. Za retrotranspozone so značilne dolge končne istosmerne ponovitve in zapis za reverzno transkriptazo. Retrotranspozoni so značilnejši za evkariontske organizme. Med znanimi so element Ty kvasovk, copia pri vinskih mušicah in *LINE-1* pri človeku.

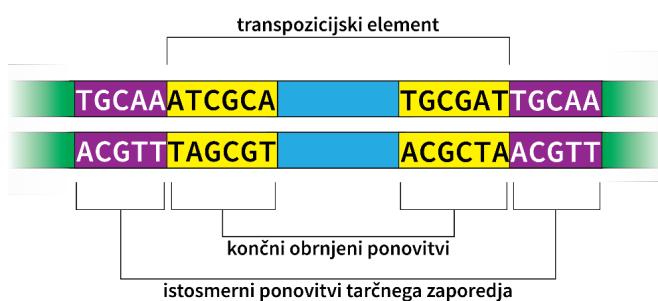
Pri DNA-elementih ni vmesnega prepisa v RNA, saj se lahko nespremenjeni prestavijo v tarčno zaporedje. V to skupino uvrščamo večino transpozicijskih elementov pri prokariotih, in tudi nekatere elemente evkariontov, kot npr. element P vinske mušice in elementa *Ac*, *Ds*, ki jih je opisala Barbara McClintock. DNA-transpozicijski elementi imajo na končeh značilni kratki obrnjeni ponovitvi ter vsaj en gen, to je zapis za transpozazo. Zaradi načina vstavitve v tarčno DNA, tako kot pri retrotranspozoni, povzročijo nastanek kratkih istosmernih ponovitev tarčnega zaporedja. DNA-transpozicijske elemente glede na zgradbo ter način transpozicije delimo na insercijska zaporedja (IS), transpozone (Tn) ter konjugativne transpozone.

Preglednica 8-1: Lastnosti transpozicijskih elementov razredov I in II.

	Zgradba	Geni	Transpozicija	Primeri
Razred I (retro- transpozoni)	dolge končne obrnjene ponovitve; kratke ponovitve tarčnega zaporedja	za reverzno transkriptazo (občasno tudi drugi)	preko RNA- -intermediata	<i>Ty</i> (kvasovka), <i>copia</i> (vinska mušica), <i>LINE-1</i> (človek)
Razred II (DNA- transpozoni)	kratke končne obrnjene ponovitve; kratke ponovitve tarčnega zaporedja	vsaj za transpozazo (občasno tudi drugi)	DNA-element; replikativna in nereplikativna	IS1 ( <i>E. coli</i> ), Tn3 ( <i>E. coli</i> ), <i>Ac</i> , <i>Ds</i> (koruza), element P (vinska mušica)

### Splošne lastnosti transpozicijskih elementov

Nekateri imajo samo gene, ki jim omogočajo transpozicijo, drugi pa imajo kompleksno zgradbo z dodatnimi geni (ang. cargo geni), ki niso povezani s transpozicijo. Večina bakterijskih transpozicijskih elementov ima nekatere skupne lastnosti, kot sta končni obrnjeni ponovitvi (IR), dolgi od 9 do 40 bp na koncih elementa, ki ju prepozna encim transpozaza (slika 8-1).

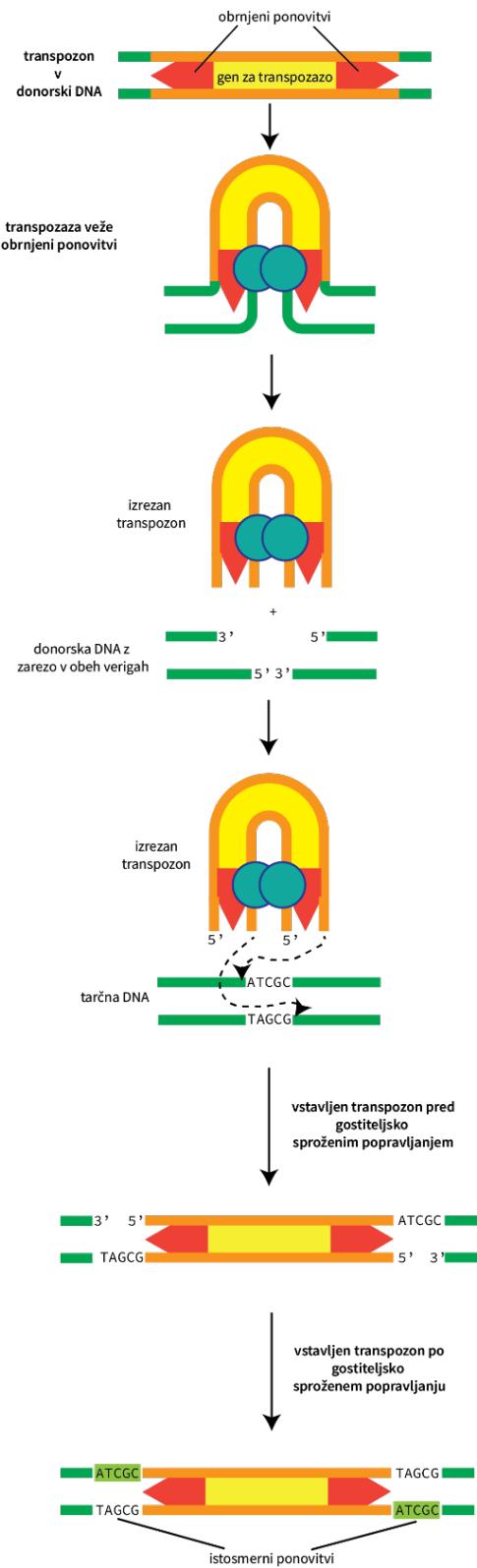


Slika 8-1: Struktura DNA-transpozicijskega elementa.

Transpozaza omogoči izrez iz prvotnega mesta, obenem pa cepi verigo v zaporedju, kamor se element vstavi. Ker je rez, ki ga transpozaza naredi v tarčnem zaporedju, zamaknjen, ostaneta po vstavitvi elementa na levi in desni strani kratka odseka enoveržne DNA, ki ju dopolni bakterijska

## Transpozicijski elementi, integroni, genomski otoki in konjugativni transpozoni

DNA-polimeraza (slika 8-2). Tako nastaneta kratki (3-12 bp dolgi) istosmerni ponovitvi tarčnega zaporedja, ki nista del elementa in se z njim ne prenašata.



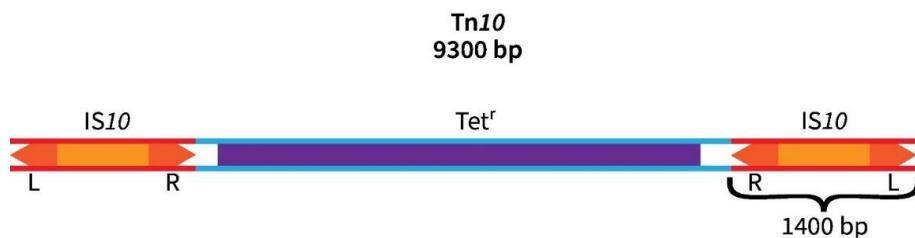
Slika 8-2: Nastanek istosmernih ponovitev tarčnega zaporedja zaradi vstavitve transpozicijskega elementa.

## Insercijska zaporedja

Insercijska zaporedja (ang. insertion sequence, IS) so najmanjši transpozicijski elementi pri bakterijah. Dolgi so 750–2000 bp in imajo zapis za encim transpozazo. Danes poznamo tisoče različnih insercijskih zaporedij, ki so razpršena po genomih različnih bakterijskih vrst. Ta zaporedja so zelo pomembna za rekombinacijo nehomolognih molekul DNA, saj lahko predstavljajo mesta homologije, ki omogočajo rekombinacijske dogodke, kot je npr. vstavitev plazmida v kromosom in rekombinacija odsekov z geni za odpornost med različnimi plazmidi. Prav tako so ključni za nastanek t. i. sestavljenih transpozonov.

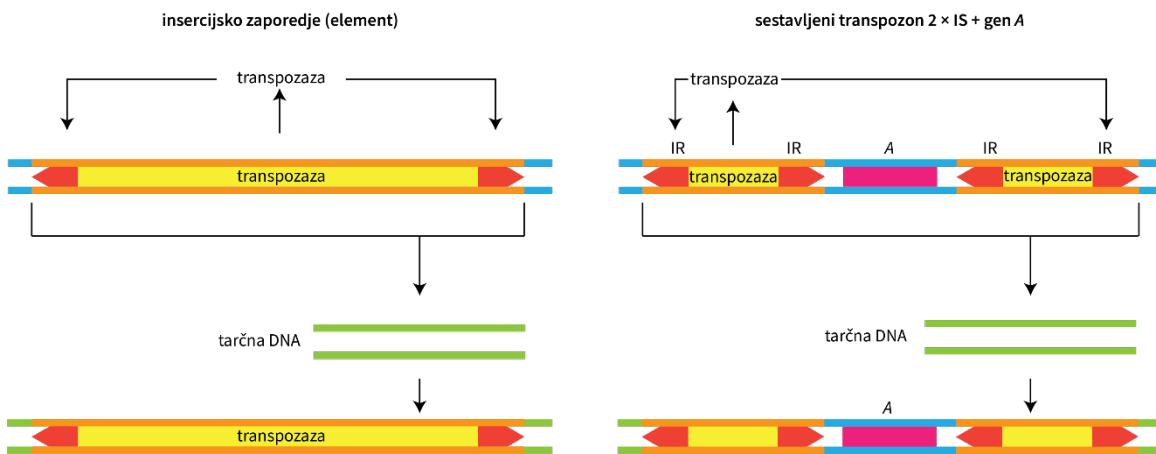
## Sestavljeni transpozoni

Primer sestavljenega transpozona Tn10 je prikazan na sliki 8-3. Kadar dve istovrstni insercijski zaporedji obdata gen ali odsek DNA, lahko nastane sestavljeni transpozon (ang. composite transposon).



Slika 8-3: Primer sestavljenega transpozona. Gen za odpornost proti tetraciklinu pri Tn10 obdajata insercijski zaporedji IS10. Na sliki je razvidno, da sta lahko insercijski zaporedji pri posameznem sestavljenem transpozonu obrnjeni v isto ali pa obratno smer (oznake L in R).

Na sliki 8-4 je prikazan primer, ko se insercijski sekvenci, ki se načeloma prenašata vsaka posebej, vstavita levo in desno od gena A. Ker ima vsaka od njiju zapis za enako transpozazo, lahko ta encim prepozna končne obrnjene ponovitve obeh. Kadar pride do mutacij notranjih zaporedij ene ali obeh IR, se lahko zgodi, da transpozaza prepozna le zunanjí IR obeh insercijskih zaporedij, ju prerezje in se posledično v tarčno DNA preneseta obe IS skupaj z zaporedjem med njima. Nastane nov sestavljen transpozicijski element. Razvoj novih sestavljenih transpozonov omogočajo tudi mutacije v genu za transpozazo v eni IS.

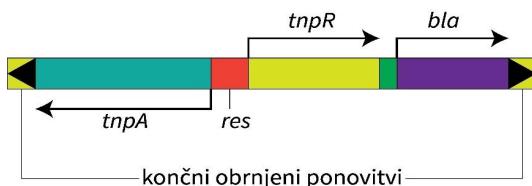


Slika 8-4: Nastanek sestavljenega transpozona. Dve insercijski zaporedji se vstavita levo in desno od gena A v tarčni DNA in se lahko nato v primeru mutacij notranjih obrnjenih ponovitev obe IS prenašata skupaj, vključujuč gen A.

## Nesestavljeni transpozoni

Mehanizem nastanka t. i. nesestavljenih – kompleksnih transpozonov ni tako jasen kot pri sestavljenih. Razlikujejo se v tem, da na končih nimajo insercijskih zaporedij, ampak samo obrnjeni ponovitvi (IR). Poleg IR imajo vsi tovrstni transpozoni še gena za transpozazo in encim

resolvazo ter *cis*-mesto *res*, mnogi pa še zapise za druge lastnosti (cargo geni). V 70. letih prejšnjega stoletja se je med enterobakterijami naglo začela širiti odpornost proti betalaktamskim antibiotikom. K temu je pripomogla vključitev gena za encim, ki inaktivira nekatere predstavnike betalaktamov TEM-1 v transpozon, poimenovan Tn3 (slika 8-5).



Slika 8-5: Transpozon Tn3, ki ima poleg zapisov za transpozazo in resolvazo tudi zapis za odpornost proti betalaktamskim antibiotikom.

Sledilo je mnogo takšnih evolucijskih dogodkov, zato so bili ti transpozoni v zadnjih 20 letih ključni za raznos genov, povezanih z odpornostjo proti antibiotikom in biocidom med različne bakterijske populacije v enakih ali različnih ekosistemih. V transpozone vključeni geni za odpornost so lahko tudi del drugih elementov, npr. integrinov. Zanimivo je, da lahko enake dodatne »cargo gene« zasledimo pri nesorodnih transpozoni iz te skupine.

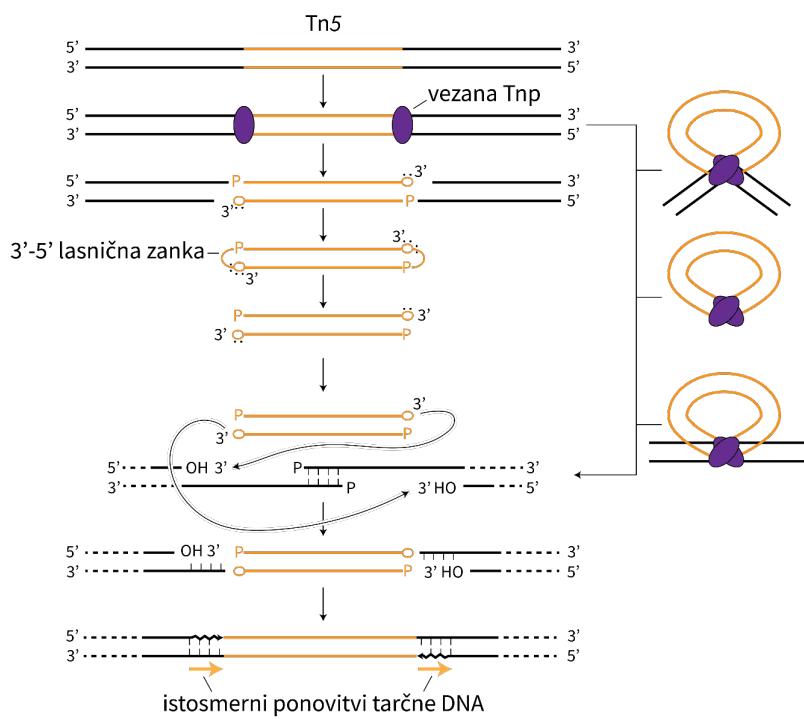
### Prenos transpozicijskega elementa – transpozicija

Pri bakterijah sta dobro opisana dva načina transpozicije, nereplikativna, ki je značilna za insercijska zaporedja in sestavljeni transpozoni, in replikativna, značilna za nesestavljeni in konjugativne transpozoni.

#### Nereplikativna transpozicija

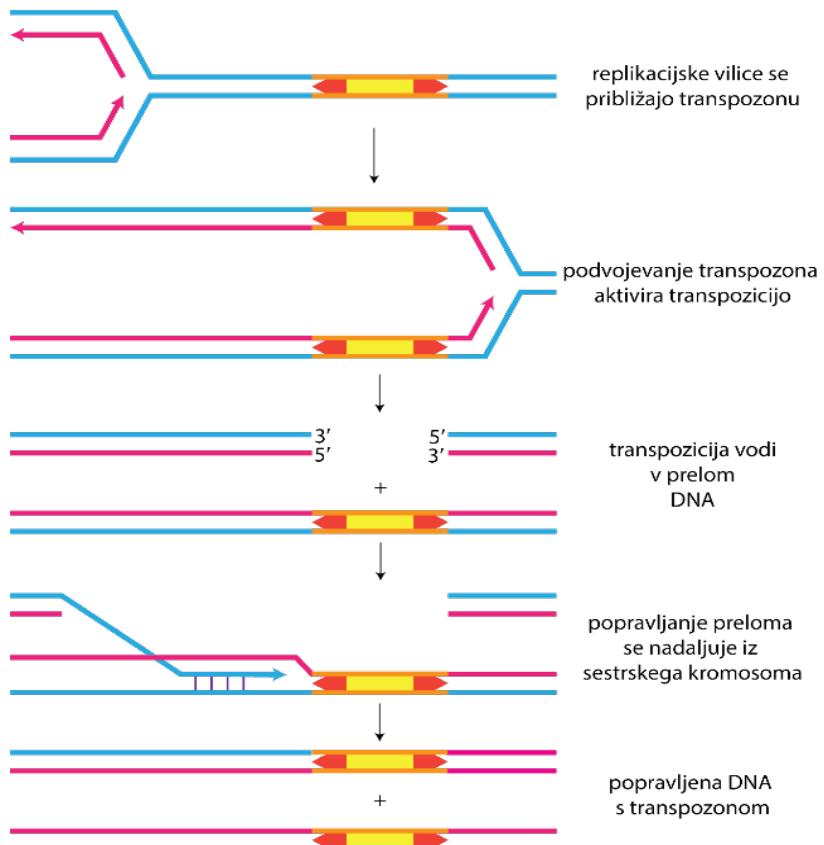
Nereplikativna ali konzervativna transpozicija je znana tudi pod imenom *cut and paste*. Pri tem načinu prenosa se transpozicijski element izreže z enega mesta v genomu (donorske DNA) in se prestavi na drugo mesto. Pri Tn5 se molekuli transpozazi vežeta na konca transpozona. Ob dimerizaciji tega encima se konca transpozona povežeta med seboj. V procesu hidrolize vsaka od transpozaz prekine eno od verig v donorski DNA, tako da na obeh koncih transpozona ostaneta reaktivni 3'-OH, ki »napadeta« fosfodiestrski vezi na druge verige, in tvorita se lasnični zanki. Posledično se transpozon izreže iz donorske DNA, čemur sledi vstavitev v tarčno DNA. S transpozazo se vezi v lasnični zanki prekineta. Prosti hidroksilni skupini »napadeta« fosfodiestrski vezi na obeh verigah tarčne DNA, in sicer z zamikom 9 bp. Konca transpozona se združita s tarčno DNA. Zaradi zamaknjenega reza tarčne DNA ostaneta na vsaki strani transpozona odseka enoverižne DNA, ki ju zapolni DNA-polimeraze, kar vodi v nastanek za Tn5 značilnih 9 bp dolgih direktnih ponovitev tarčne DNA (slika 8-6).

## Poglavlje 8



Slika 8-6: Nereplikativna transpozicija Tn5.

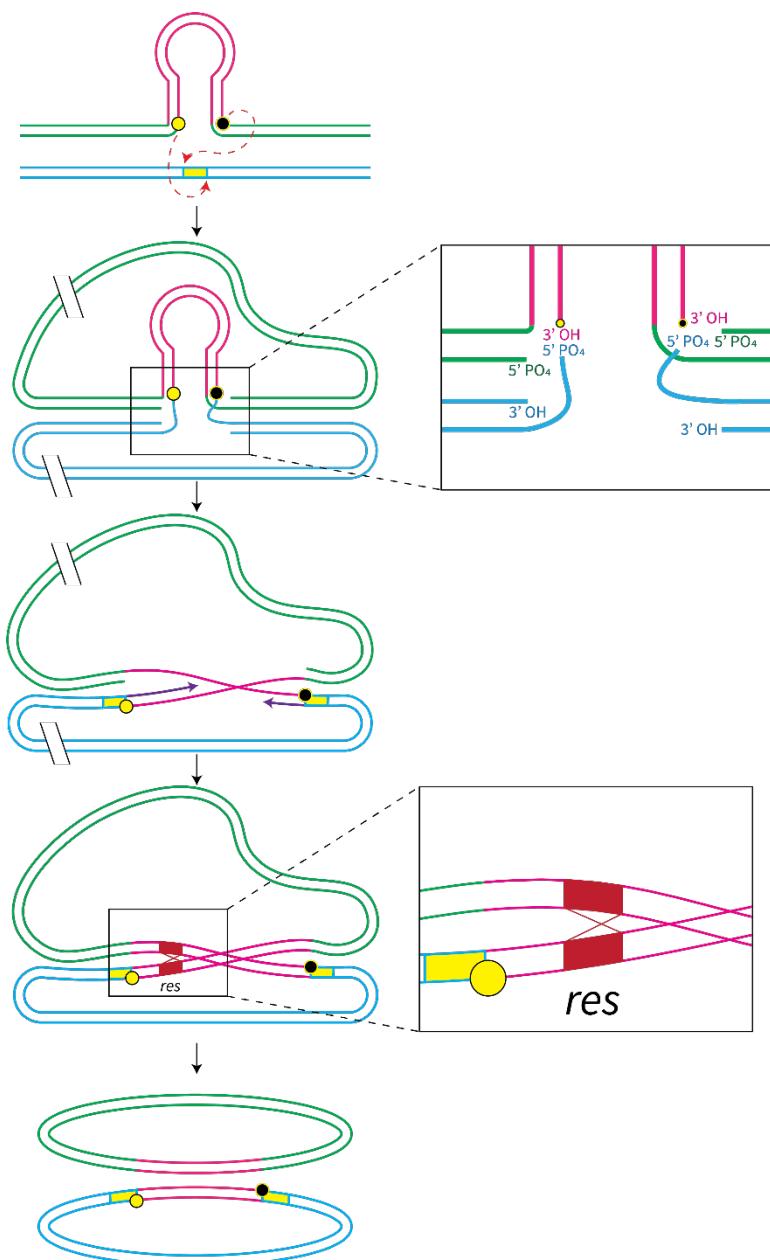
Nereplikativna transpozicija v donorski DNA za seboj pusti dvoverižni prelom. Ta se popravi s homologno rekombinacijo. Matrica je podvojen sestrski kromosom, zato je konzervativna transpozicija običajno uravnana tako, da se zgodi takoj po podvojitvi kromosoma (slika 8-7).



Slika 8-7: Proces homologne rekombinacije popravi prelom v donorski DNA, zaradi izreza transpozona pri nereplikativni transpoziciji.

### Replikativna transpozicija

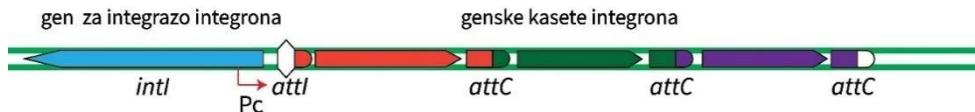
Replikativno transpozicijo imenujemo tudi *copy and paste*. Pri procesu transpozicije se element Tn podvoji, tako da dobimo kopiji transpozona v donorski in tarčni DNA. Tovrstna transpozicija je značilna za Tn3. V prvem koraku transpozaza razcepi verigi tarčne DNA z zamikom 5 bp. Obenem cepi donorsko DNA na obeh koncih transpozona tako, da nastaneta prosta 3'-konca. V naslednjem koraku se 5'-konca tarčne DNA povežeta s prostima 3'-koncema transpozona. DNA-verigi transpozona se ločita. S prostima 3'-koncema v tarčni DNA in gostiteljskimi encimi se sintetizirata komplementarni verigi transpozona in nastane kointegrat – donorska in tarčna molekula sta povezani s podvojenim transpozonom. Sledi razpad kointegrata z rekombinacijo med mestoma *res*. To katalizira resolvaza, ki je zapisana v Tn. Transpozon v tarčni DNA je zaradi zamaknjenega reza v prvem koraku obdan z 5 bp dolgima direktnima ponovitvama (slika 8-8).



Slika 8-8: Replikativna transpozicija Tn3.

## Integroni

Integroni so genetski elementi, ki so med bakterijami zelo razširjeni. Domneva se, da so vključeni v 15 % bakterijskih genomov. Osnovna zgradba integrona je prikazana na sliki 8-9. Ključni deli so gen za **integrazo** (*intI*), promotor ( $P_c$ ) za prepis genov genskih kaset in **rekombinacijsko mesto** (*attI*), kjer se v integron zaporedno vključi ena ali več genskih kaset.



Slika 8-9: Struktura integrona. Z različnimi barvami so označene zaporedno vstavljeni genske kasete, ki imajo običajno genski zapis brez lastnega promotorja in rekombinacijsko mesto za vključitev v integron (*attC*).

## Genske kasete in njihovo vstavljanje v integron

Genske kasete imajo pogosto zapise za odpornost proti antibiotikom. Zaokrožen fragment DNA z gensko kaseto, sestavljeno iz gena za odpornost (*ant1<sup>r</sup>*) in rekombinacijskega mesta *attC*, integronska integraza z mestnospecifično rekombinacijo med mestoma *attI* in *attC* vključi v integron, geni pa se prepišejo s promotorja integrona ( $P_c$ ). Naslednja kaseto (*ant2<sup>r</sup>*) se z rekombinacijo ponovno vključi na mestu *attI*, njeni geni pa se prav tako prepišejo s  $P_c$ .

## Delitev integrонov

Včasih so integrone uvrščali v dve skupini: mobilne integrone in superintegrone.

Mobilni integrone so sestavljeni iz nekaj kaset, ki imajo največkrat zapise za odpornost proti protimikrobnim učinkovinam. Njihova mesta *attC* so različna, posebni pa so zato, ker se lahko med različnimi gostitelji prenašajo s pomočjo transpozonov in plazmidov. So torej mobilni. Superintegroni so na kromosому in so pomembni za genomsko in fenotipsko plastičnost. Vsebujejo lahko več sto različnih genskih kaset, njihova mesta *attC* pa so enaka.

Danes integrone načeloma ne delimo več na ti dve skupini, saj poznamo mnoge, ki imajo lastnosti obeh. Številne družine razdelimo v tri skupine na podlagi homologije gena za integrizo, ki je običajno gen, na podlagi katerega z metodo PCR potrdimo integron v celici:

1. skupina integronev, ki jih najdemo pri proteobakterijah iz vode in zemlje (v to skupino štejemo tudi klinično pomembne integrone razreda 1 in 3);
2. skupina integronev razreda 2 in integrone na integrativnih konjugativnih elementih SXT/R391, ki so pomembni za adaptacijo in evolucijo gamaproteobakterij;
3. skupina integronev, ki imajo zapis za integrizo v obratni smeri kot prejšnji dve skupini (inverzni integrone). Te integrone zasledimo pri spirohetah, planktomicetah, cianobakterijah in klorobijih iz različnih okolij.

## Integroni omogočajo adaptacijo bakterij na različna okolja

Integroni sami niso mobilni, so pa pogosto vključeni v transpozone in/ali plazmide ter se posledično lahko prenašajo med bakterijami znotraj okoljske niše. Dejstvo, da so geni na integronu bolj vezani na okolje kot pa na gostitelja, v katerem integron obstaja, jih povezuje z adaptacijo na specifično okolje. Vstavitev genov v integron ne povzroči inaktivacije obstoječih genov kot vstavitev transpozičijskega elementa. Geni se lahko takoj prepišejo iz v bakteriji delujočega promotorja.

## Mestnospecifične rekombinaze

Mestnospecifične rekombinaze so encimi, ki prepoznajo dve specifični mesti na DNA in omogočijo rekombinacijo med njima. Mednje spadajo npr. integraze integronov in integrativnih konjugativnih elementov, ki omogočijo rekombinacijo dveh različnih molekul DNA. V dosedanjih poglavjih smo spoznali fagne integraze, kot je encim Int faga  $\lambda$ , ki omogoči vstavitev krožne fagne DNA v kromosom z rekombinacijo med mestoma *attP* in *attB*. Fagne integraze so zelo specifične, bolj kot integraze elementov ICE in integronov. Integraze se uporabljajo tudi pri vstavitvi otokov patogenosti v kromosom.

K mestnospecifičnim rekombinazam uvrščamo še resolvaze, ki so bile omenjene pri transpozonih in plazmidih. Prve omogočijo rekombinacijo med mestoma *res* in razdružijo kointegrat, ki nastane med replikativno transpozicijo. Resolvaze pri plazmidih pomagajo pri razdružitvi dimerov in multimerov (sistemi Cre-*loxP* in cer-XerC/D ter psi-XerC/D). Resolvazam so podobne DNA-invertaze, saj obe skupini encimov omogočita mestnospecifično rekombinacijo med dvema mestoma na isti molekuli DNA. Razlikujejo se v tem, da resolvaze delujejo na istosmerni rekombinacijski zaporedji, invertaze pa na obrnjeni (nasprotno usmerjeni).

## Tirozinske (Y) in serinske (S) rekombinaze

Različne vrste mestnospecifičnih integratz načeloma katalizirajo enake reakcije in so si med seboj tesno sorodne. Razdelimo jih v dve veliki družini, in sicer Y oz. tirozinske rekombinaze ter S oz. serinske rekombinaze. Razlikujejo se glede na vrsto katalitične aminokisline, ki ima ključno vlogo v njihovem aktivnem centru. Primeri obeh vrst rekombinaz so v preglednici 8-2.

Preglednica 8-2: Primeri tirozinskih in serinskih rekombinaz.

Izvor	Encim
<i>Tirozinske rekombinaze</i>	
<b>Resolvaze</b>	
<i>E. coli</i>	plazmidni/fagni P1 Cre
	plazmidni F ResD
<i>Borrelia</i> spp.	fagna N15 telomerna resolvaza
<i>S. sonnei</i>	telomerna resolvaza
Bakterije	plazmidni šaflon ColIb-P9
	XerCD
<b>Integraz</b>	
<i>E. coli</i>	integraza faga $\lambda$
Bakterije	integroni
<i>Serinske rekombinaze</i>	
<b>Resolvaze</b>	
<i>E. coli</i>	resolvaza (TnpR) transpozona Tn3
	resolvaza transpozona $\gamma\delta$
	ParA plazmida RP4/RK2
<i>Enterococcus</i> spp.	resolvaza transpozona Tn917
<b>Invertaze</b>	
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium	invertaza Hin

## Genomski otoki

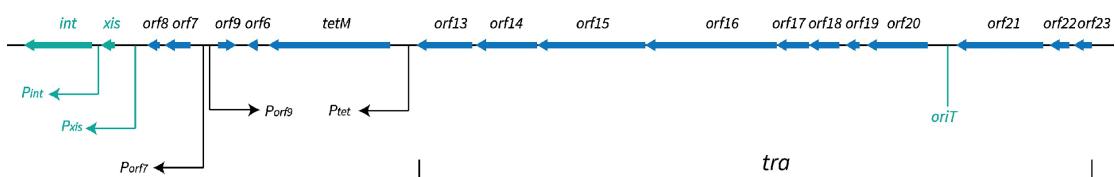
Genomski otoki (ang. genomic islands, GIs) so skupki bakterijskih genov, za katere vemo oziroma domnevamo, da so nastali s horizontalnim prenosom. Pri evoluciji genomov imajo pomembno vlogo, saj omogočijo hitro adaptacijo in preživetje bakterij v specifičnih okoljskih nišah. Ker so v genomskih otokih pogosto geni, povezani z odpornostjo, virulenco in metabolizmom, so pomembni za klinične in industrijske seve. Njihovo mobilizacijo in prenos po bakterijski populaciji omogočajo npr. integroni, transpozoni ... Genomske otoke z geni za virulenco imenujemo otoki patogenosti.

## Otoki patogenosti

Otoki patogenosti (ang. pathogenicity islands, PAIs) so 10–200 kb veliki odseki genoma z geni za dejavnike virulence. Od preostalega bakterijskega genoma se razlikujejo po deležu GC-parov ter uporabi kodonov (ang. codon usage). Obdajajo jih kratke direktne ponovitve tarčnega zaporedja, ki so posledica rekombinacije pri vnosu v genom. Otoki patogenosti se pogosto vstavljajo v gene za tRNA. Poleg genov za transpozaze, integraze ter insercijskih zaporedij vsebujejo tudi nekatere kriptične gene.

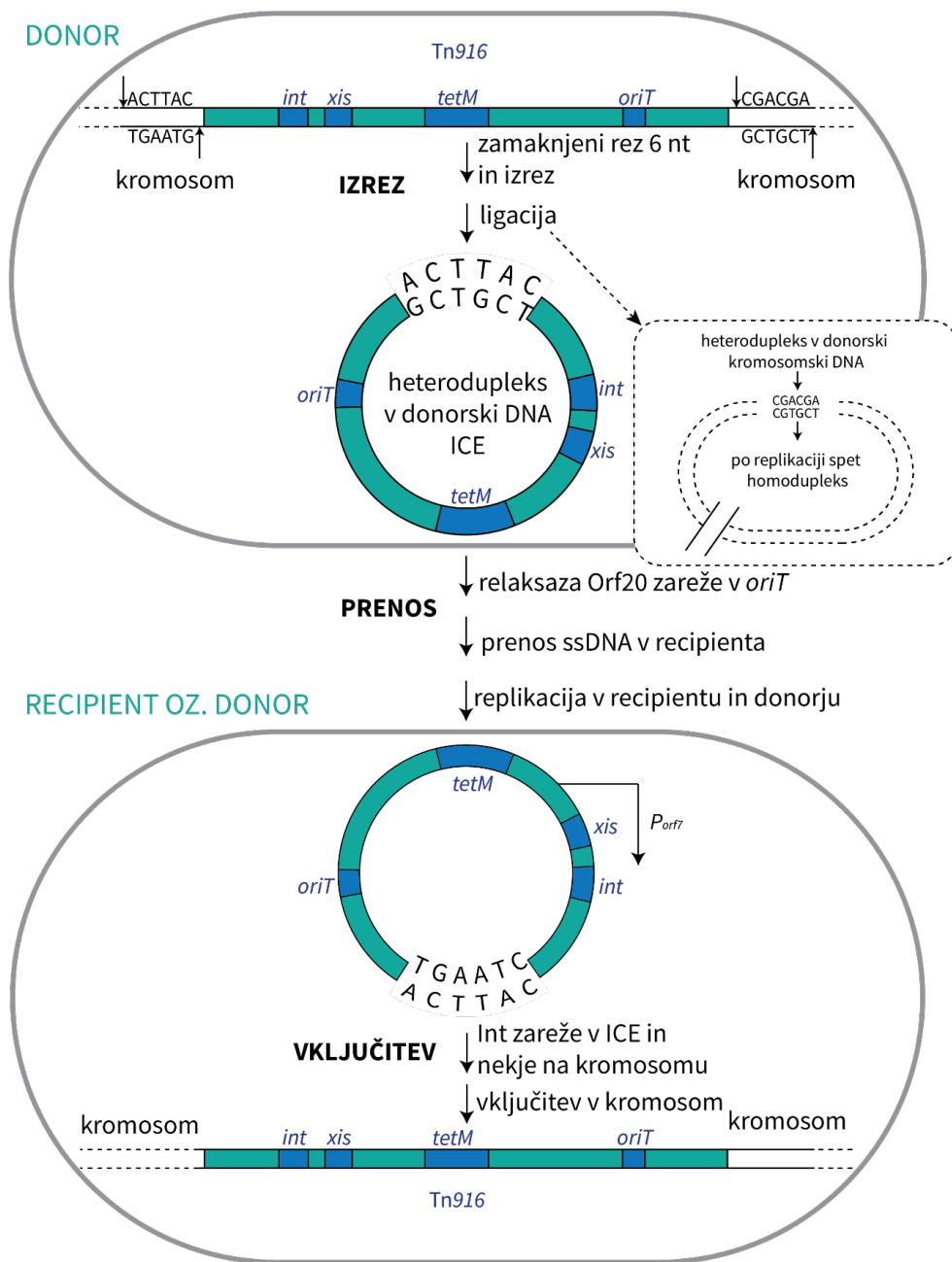
## Konjugativni transpozoni

**Konjugativni transpozoni** oz. **integrativni konjugativni elementi** (ICE) so posebna skupina mobilnih genetskih elementov. Integrativni konjugativni elementi se od konjugativnih plazmidov, ki se lahko podvojujejo neodvisno od kromosoma, razlikujejo po tem, da so ICE običajno vključeni v kromosom in v celici ne obstajajo v avtonomni obliki. Tako kot konjugativni plazmidi imajo ICE zapise za proteine Tra in se lahko prenesejo v recipientske celice. Njihov najprepoznavnejši predstavnik je Tn916 (slika 8-10), ki je bil odkrit pri *E. faecalis* in je prvi najden ICE. Tn916 in njemu sorodni ICE so promiskuitetni. Prenašajo se v mnoge po Gramu pozitivne in celo v nekatere po Gramu negativne bakterije (gen *tetM* je bil najden v mnogo bakterijskih vrstah).



Slika 8-10: Integrativni konjugativni element Tn916, ki ima zapis za odpornost proti tetraciklinu (gen *tetM*). Velik je 18.032 baznih parov.

Potek medcelične konjugativne transpozicije ICE Tn916 iz donorske celice se prične s zamknjenim rezom iz kromosoma. Sledi ligacija nekomplementarnih koncev izrezanega elementa, zaradi česar govorimo o nastanku heterodupleksa. Zgodi se tudi ligacija v donorski kromosomski DNA, kjer tudi nastane heterodupleks (ta po replikaciji zopet postane homodupleks, a se hčerinski celici v svojem kromosому na tem mestu razlikujeta). Relaksaza Orf20 zareže v *oriT* ICE in začne se prenos enoverižne DNA v recipienta. V naslednjem koraku se v donorju in recipientu sintetizira manjkajoča veriga DNA. V tem procesu se heterodupleks integrativnega konjugativnega elementa pretvori v homodupleks. ICE se nato s proteinom Int vključi v kromosom recipienta (slika 8-11).



Slika 8-11: Medcelična konjugativna transpozicija Tn916.

### TEMELJNI POJMI

- Transpozon – mobilni genetski element, ki se z encimom transpozazo lahko premika po genomu.
- Genomski otok – skupek bakterijskih genov, za katerega vemo oz. domnevamo, da je nastal s horizontalnim prenosom.
- Genska kaseta – mobilni genetski element, ki vsebuje gen in mesto za rekombinacijo.
- Integron – genetski element, ki z rekombinacijo vase vključuje gene iz okoljskega metagenoma (genske kasete) in jih nato izraža ob pomoči svojega promotorja. Vsebuje gen za integrizo, rekombinacijsko mesto in lasten promotor.
- Otok patogenosti – vrsta genomskega otoka, ki vsebuje zapise za dejavnike virulence.

## POVZETEK

Transpozicija je prenos določnih fragmentov DNA, transpozonov, znotraj ene ali med različnimi molekulami DNA. Transpozicijske elemente delimo na retrotranspozone (razred I) in DNA-transpozone (razred II), med slednje pa uvrščamo tudi krajša insercijska zaporedja. Poznamo tudi sestavljene in nesestavljene transpozone. Premikanje transpozicijskih elementov po genomu lahko poteka na dva različna načina – z replikativno ali nereplikativno transpozicijo. Eksperimentalno jih lahko uporabljamo za insercijsko mutagenezo. Integroni so genetski elementi, ki vase z rekombinacijo vključujejo gene iz okoljskega metagenoma (genske kasete) in jih izražajo ob pomoči svojega promotorja. V preteklosti so jih delili na mobilne integrone in superintegron, danes pa poznamo številne primere, ki imajo lastnosti obeh skupin. Integroni sami po sebi niso mobilni, zato so za prenašanje med kromosomi potrebne transpozaze in rekombinaze. Mestnospecifične rekombinaze so encimi, ki prepoznajo dve specifični mesti v DNA in omogočijo rekombinacijo med njima. Poznamo tirozinske in serinske rekombinaze. Genomski otoki so skupine bakterijskih genov, ki so nastale s horizontalnim prenosom. Mednje spadajo otoki patogenosti, ki imajo zapise za dejavnike virulence. Posebna skupina mobilnih genetskih elementov so konjugativni transpozoni, ki so običajno vključeni v kromosom in v celici ne obstajajo v avtonomni obliki.

## 9 TRANSFORMACIJA

Nadja Spasovski, Marjanca Starčič Erjavec

### UČNI CILJI

- Spoznati in razumeti transformacijo po Gramu negativnih in pozitvnih bakterij.
- Spoznati in razumeti uravnavanje transformacije po Gramu negativnih in pozitvnih bakterij.
- Spoznati in razumeti umetno transformacijo.

### UVOD

Po propadu celice v okolje sproščena DNA običajno razpade na fragmente, velike okoli 15 kb. Takšna prosta DNA v okolju je na razpolago za horizontalni genski prenos, ki ga imenujemo transformacija. O njej govorimo, ko se prosta DNA iz okolice sprejme v celico in vključi v bakterijski genom. Celico, ki je na tak način prejela genetsko informacijo, imenujemo transformanta. S transformacijo prenesena DNA se v celični genom lahko vključi na dva načina: lahko je sama replikon ali pa se, običajno s homologno rekombinacijo, vključi v replikon, ki je že v celici.

### Oblike transformacije

Ločimo dve obliki transformacije, in sicer naravno oz. fiziološko in umetno. Večina bakterij ni sposobna naravne transformacije. Bakterije, ki pa so naravno sposobne sprejeti DNA iz okolja, to lahko storijo le v nekaterih razmerah – npr. v določenih fazah življenjskega cikla ali specifičnih rastnih razmerah. Celice, ki so v stanju, da iz okolja lahko sprejmejo prosto DNA, imenujemo kompetentne celice. V številnih bakterijah, ki po našem poznavanju niso naravno kompetentne, so bili najdeni homologi znanih genov za kompetenco, kar nakazuje možnost, da so tudi te sposobne naravne kompetence in transformacije, le da jih še ne znamo gojiti na tak način, da bi jih k temu pripravili.

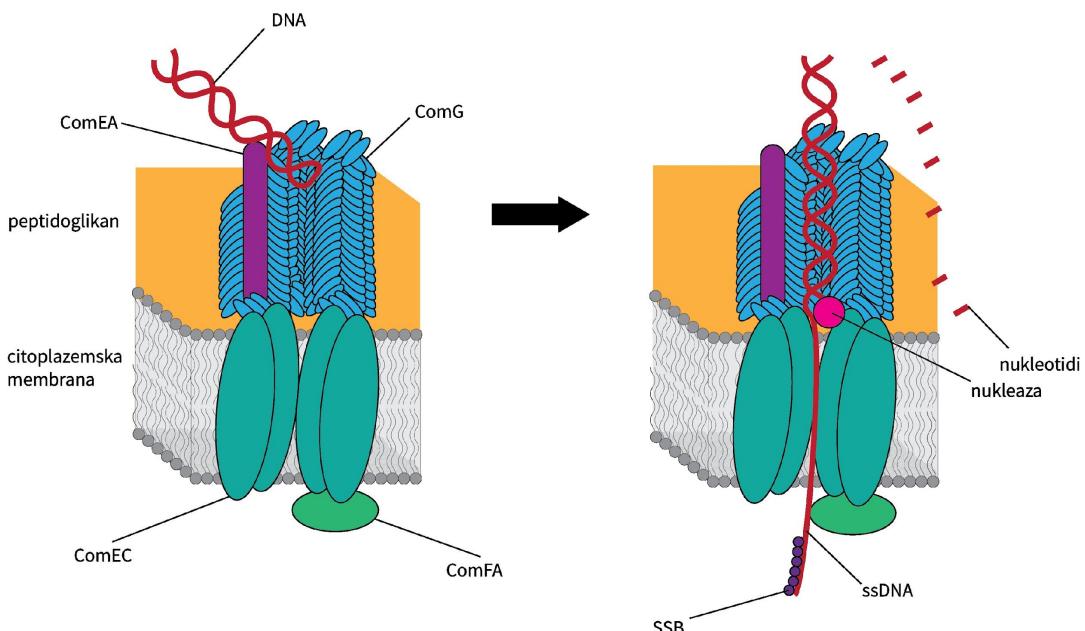
Naravno kompetentne bakterije so našli tako med po Gramu pozitivnimi kot po Gramu negativnimi bakterijami, in sicer v naslednjih rodovih: *Acinetobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Helicobacter*, *Neisseria*, *Thermus*, *Synechococcus* in *Deinococcus radiodurans*. Med najbolj preučene bakterije z naravno sposobnostjo transformacije sodijo med po Gramu negativnimi bakterijami *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* in *Helicobacter pylori*, med po Gramu pozitivnimi pa *Bacillus subtilis* in *Streptococcus pneumoniae*. To so modelni organizmi, na podlagi katerih lahko opazujemo razlike med transformacijo po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterij.

### Transformacija pri po Gramu pozitivnih bakterijah

V splošnem transformacijo po Gramu pozitivnih bakterij delimo v štiri stopnje: 1) vezava dsDNA na zunanjou površino celice, 2) razgradnja ene verige DNA, 3) prenos ssDNA skozi celično steno in citoplazemske membrano v citoplazmo in 4) vključitev prenesene DNA v genom recipientske celice.

V bakteriji *B. subtilis* so geni za kompetenco (*com*) v več različnih operonih, in sicer jih v grobem lahko razdelimo na operone za uravnavanje kompetence (*comA*, *comK*) in operone za transport DNA v bakterijo (*comE*, *comF* in *comG*). Treba je poudariti, da je pri genih *com* uporabljen nekanonski način poimenovanja operonov, genov in proteinov – *comEA* je npr. oznaka za prvi strukturni gen (A) v operonu *comE*, *comEC* pa za tretjega (C) v istem operonu. Njuna produkta sta proteina ComEA in ComEC.

Za bakterijo *B. subtilis* je značilno, da s transformacijo sprejema vsako DNA iz okolja in ne zgolj DNA lastne vrste. Psevdopil sestavljajo proteini operona *comG*, med katerimi je glavni pilinski protein ComGC. Prosta dvostranska DNA se zaradi nespecifičnih elektrostatičnih interakcij med negativno nabito DNA in pozitivno nabitimi aminokislinami psevdopila lahko veže neposredno na psevdopil. Nato vezano dvostransko DNA endonukleaza NucA razreže na fragmente, velike 15 kilobaznih parov. S postopno razgradnjijo psevdopila se fragmenti približajo celični membrani, kjer jih veže protein ComEA – receptor za dvostransko DNA na celični površini. Tam nukleaza razgradi eno verigo DNA, druga pa se prenese skozi kanalček, ki ga tvorijo proteini ComEC. Pri tem pomaga ComFA, od ATP odvisna translokaza, ki skozi kanalček v citoplazmo vleče enoverižno DNA. DNA se v celico prenaša s hitrostjo 80–100 nukleotidov na sekundo. Po vstopu enoverižne DNA v citoplazmo, se nanjo vežejo proteini SSB (ang. single-stranded-DNA-binding protein) in jo tako zaščitijo pred razpadom (slika 10-1).



Slika 9-1: Transformacija pri *B. subtilis*. Dvostranska DNA se veže neposredno na proteine psevdopila, nato pa jo endonukleaza NucA razreže na krajše fragmente. Fragmenti se približajo celični membrani s postopno razgradnjijo psevdopila, tam pa jih veže receptor za dvostransko DNA ComEA. Pred vstopom v celico se ena veriga razgradi, druga pa se s translokazo ComFA prenese v citoplazmo skozi kanalček iz proteinov ComEC.

Čeprav sta *B. subtilis* in *S. pneumoniae* obe po Gramu pozitivni bakteriji in sta si njuna sistema za transformacijo precej podobna, pa med njima obstaja tudi nekaj razlik. Dvostransko DNA na površini celice pri *B. subtilis* endonukleaza NucA razreže na 15 kb dolge fragmente, pri *S. pneumoniae* pa endonukleaza EndA na zgolj 6 kb. Tudi sicer se imena genov med obema bakterijama razlikujejo. Bakteriji se razlikujeta tudi po tem, kdaj celice postanejo kompetentne. Medtem ko so celice *S. pneumoniae* najbolj kompetentne v zgodnji logaritemski fazi, postanejo celice *B. subtilis* kompetentne šele, ko začne primanjkovati hrani.

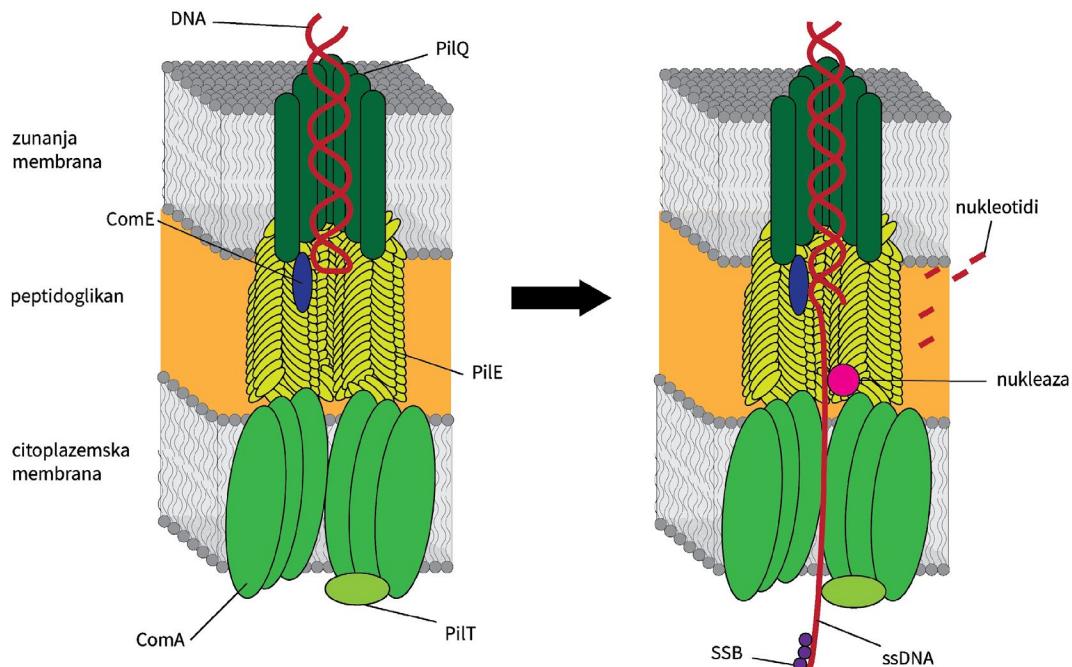
### Transformacija pri po Gramu negativnih bakterijah

V splošnem lahko transformacijo po Gramu negativnih bakterij razdelimo na pet stopenj: 1) dsDNA se veže na zunanjou membrano celice, 2) dsDNA se prenese skozi zunanjou membrano in celično steno, 3) ena veriga DNA se razgradi, 4) ssDNA se prenese skozi citoplazemske membrene v citoplazmo celice in 5) prenesena DNA se vključi v genom recipientske celice.

Sistemi transformacije se pri po Gramu negativnih bakterijah med seboj precej razlikujejo. Bakterija *Neisseria gonorrhoeae* ima transformacijski sistem, ki temelji na sekrecijskem sistemu tipa II (SSTII), bakterija *Haemophilus influenzae* ima transformasome, bakterija *Helicobacter pylori* pa ima transformacijski sistem, ki je podoben sekrecijskemu sistemu tipa IV (SSTIV) oz. konjugacijskemu sistemu *vir* bakterije *Agrobacterium tumefaciens*.

#### Transformacija pri bakteriji *Neisseria gonorrhoeae*

Sistem transformacije, ki temelji na sekrecijskem sistemu tipa II in ga najdemo pri bakteriji *N. gonorrhoeae*, je precej podoben sistemu pri po Gramu pozitivnih bakterijah. Najopaznejša razlika med njima je ta, da mora biti prehod proste DNA v celico prilagojen tako, da hidrofilna nukleinska kislina lahko prehaja skozi dve membrani – najprej skozi zunanjou, šele nato skozi citoplazemske. Da se dvoverižna DNA prenese skozi zunanjo membrano, 12–14 kopij sekretina PilQ tvori poro, ki ima hidrofilni vodni kanal, skozi katerega se prenaša DNA. Pri tem pomaga protein PilE, saj tvori psevdopil, ki s krčenjem vleče DNA skozi poro. Tako se DNA približa notranji membrani celice, kjer jo veže protein ComE. Pred prehodom skozi citoplazemsko membrano nukleaza razgradi eno verigo, druga pa potuje skozi poro v membrani, ki jo tvorijo proteini ComA. Enoverižno DNA skozi poro vleče PilT – od ATP odvisna translokaza. Po vstopu enoverižne DNA v citoplazmo, se nanjo vežejo proteini SSB, ki jo zaščitijo pred razpadom (slika 10-2).

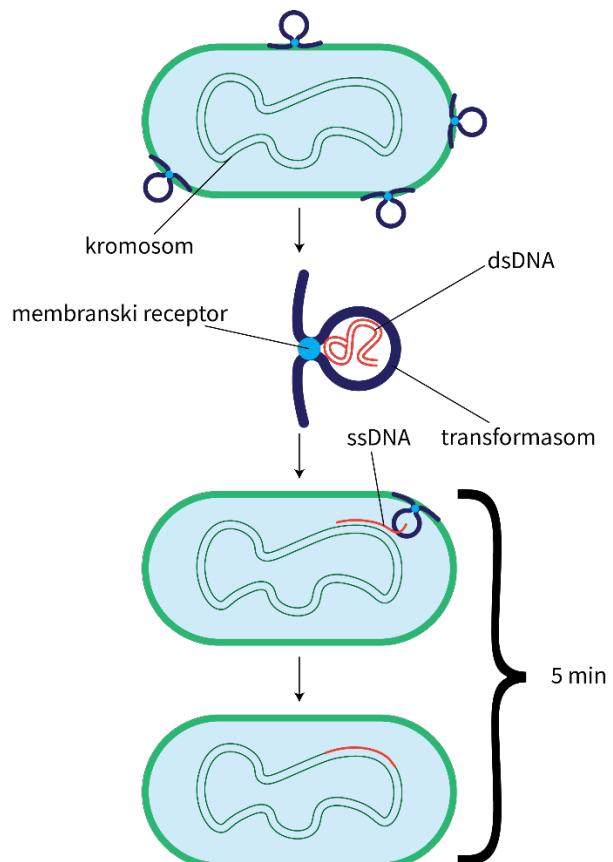


Slika 9-2: Transformacija pri *N. gonorrhoeae*. Transformacija temelji na sekrecijskem sistemu tipa II in je precej podobna transformaciji pri po Gramu pozitivnih bakterijah. DNA najprej preide skozi hidrofilni kanalček v zunanji membrani, nato pa jo na površini peptidoglikanskega sloja veže protein ComE. Pred prehodom skozi citoplazemsko membrano nukleaza razgradi eno verigo, druga pa se skozi citoplazemske membrano prenese skozi poro iz proteinov ComA. Skozi to poro enoverižno DNA v celico vleče proteinska translokaza PilT.

Za *N. gonorrhoeae* je značilno, da prosto DNA sprejme zgolj iz bakterij iste vrste ali pa zelo sorodnih, saj je za vezavo DNA na površino celice potrebno specifično zaporedje. Geni za kompetenco so pri tej bakteriji stalno izraženi.

### Transformacija pri bakteriji *Haemophilus influenzae*

Bakterija *H. influenzae* za transformacijo uporablja sistem s transformasomi – posebnimi izvihki citoplazemske membrane, v katere vstopi dvooverižna DNA. Prosto DNA, velikosti 30–50 kb, najprej vežejo membranski receptorji na površini celice. Podobno kot *N. gonorrhoeae* lahko tudi *H. influenzae* sprejme zgolj prosto DNA s specifičnim zaporedjem, ki ga prepozna receptorji. Dvooverižna DNA nato vstopi v transformasom, kjer se preoblikuje v enoverižno DNA, ki se prenese v citoplazmo. Enoverižna DNA se v celici z rekombinacijo vključi v kromosom (slika 10-3).



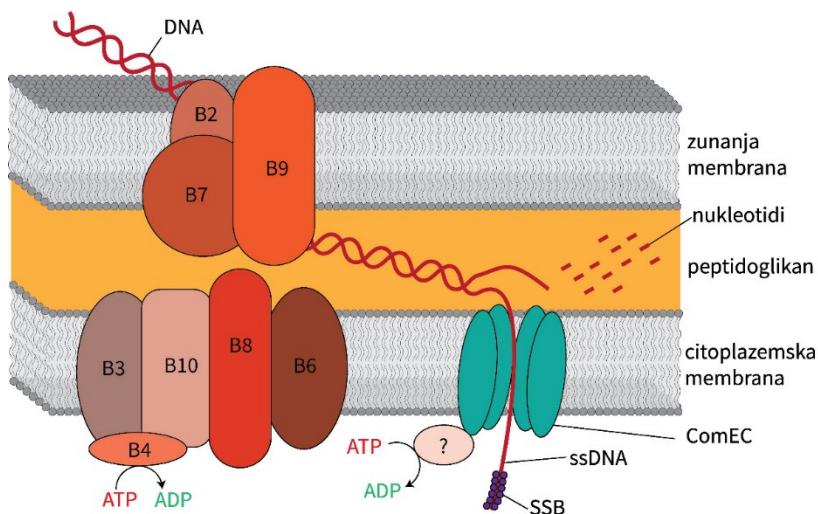
Slika 9-3: Transformacija pri *H. influenzae*. Bakterija uporablja sistem z membranskimi izvihki – transformasomi. Prosto DNA najprej vežejo receptorji na površini celice, nato pa vstopi v transformasom, kjer se pretvori v enoverižno DNA. Ta se prenese v celico, kjer se z rekombinacijo vključi v kromosom.

Za bakterijo je značilno, da celice postanejo kompetentne, ko začne primanjkovati hrani.

### Transformacija pri bakteriji *Helicobacter pylori*

Transformacijski sistem *H. pylori* je podoben konjugacijskemu sistemu *vir* rastlinskega patogena *A. tumefaciens*, ki prenese T-DNA plazmida *Ti* iz bakterijske v rastlinsko celico. Proteini Com sistema *H. pylori* so namreč ortologni proteinom Vir *A. tumefaciens*. Za vnos v celico prosta DNA ne potrebuje specifičnih zaporedij. Transformacija bakterije je edinstvena in temelji na sekrecijsko-konjugacijskem sistemu tipa IV.

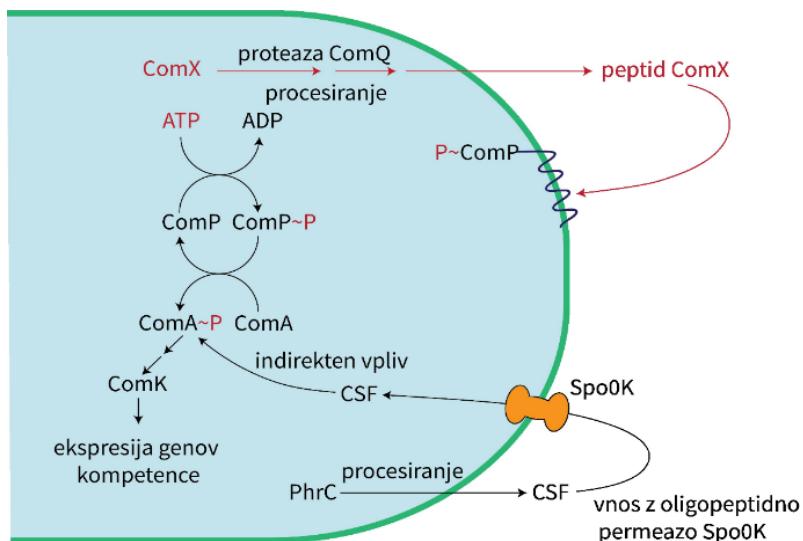
Proteini B2 tvorijo psevdopil, na katerega se veže prosta DNA, nato pa se ta prenese skozi kanal v zunanji membrani, ki ga tvorijo proteini B7 in B9. Pred prehodom skozi citoplazemsko membrano eno verigo razgradi nukleaza, druga pa se v celico prenese skozi poro iz proteinov ComEC. Ko enoverižna DNA vstopi v citoplazmo, se nanjo vežejo proteini SSB, ki jo zaščitijo pred razpadom (slika 10-5).



Slika 9-4: Transformacija pri *H. pylori*. Sistem temelji na sekrecijsko-konjugacijskem sistemu tipa IV in je edinstven. Prosta dvooveržna DNA se veže na psevdopil na površini celice, nato pa se skozi kanalček prenese v periplazmo. Tam nukleaza razgradi eno izmed verig, druga pa se skozi poro iz proteinov ComEC prenese v notranjost celice.

### Uravnavanje kompetence bakterije *Bacillus subtilis*

Gene kompetence *B. subtilis* uravnava transkripcijski faktor ComK, ki je uravnovan z dvokomponentnim sistemom ComP-ComA, pri čemer je ComP senzorska kinaza, ComA pa odzivni regulator. Ko senzorski membranski protein ComP zazna, da zmanjkuje hranil, se fosforilira – fosfatna skupina z ATP se prenese na histidinski ostanek v ComP. Nato se fosfatna skupina s ComP prenese na aspartatni ostanek v odzivnem regulatornem proteinu v citoplazmi ComA. ComA~P kot transkripcijski aktivator deluje na več genov, med njimi tudi na ComK in ComS (slika 10-6).



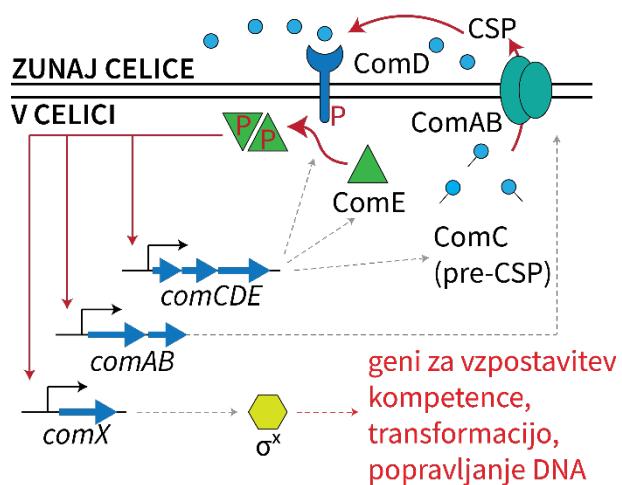
Slika 9-5: Uravnavanje kompetence z dvokomponentnim sistemom ComP-ComA. Ob pomanjkanju hranil se ComP fosforilira z ATP, nato pa se fosfatna skupina prenese na odzivni regulator ComA, ki fosforiliran deluje kot transkripcijski aktivator več genov. Kot produkta nastaneta tudi ComK, ki aktivira transkripcijo genov com, in ComS, ki ComK ščiti pred razgradnjo.

ComK je uravnavan tudi s ComS, ki prepreči nastanek kompleksa ComK s proteazama ClpC in MecA, ki bi ga razgradili. Tako se lahko ComK akumulira do dovolj visoke koncentracije, da aktivira transkripcijo genov *com*.

Pri uravnavanju kompetence pa ima pomembno vlogo tudi zaznavanje kvoruma s proteinom ComX, ki ga imenujemo tudi feromon kompetence. Ta nastaja iz daljšega polipeptida, ki je zapisan v genu *comX*. Pri procesiranju ComX je pomembna proteaza ComQ, ki cepi daljši polipeptid, da nastane feromon kompetence. Nastali feromon se izloči iz celice in se veže na membransko senzorsko kinazo ComP, ki se posledično autofosforilira. ComX deluje tako na lastno celico kot na druge celice *B. subtilis* (slika 10-6). Obstajata vsaj dva proteina Phr, ki posredno vplivata na ComA, saj inhibirata proteine Rap, ki defosforilirajo ComA~P, s čimer ga kot transkripcijskega aktivatorja naredijo neaktivnega. Protein PhrC se obdela in izloči iz celice kot CSF – kompetenčni in sporulacijski faktor. CSF se nato preko oligopeptidne permeaze SpoOK ponovno prenese v celico, kjer inhibira proteine Rap (slika 10-6). Ne glede na vse uravnavanje pa postane v populaciji *B. subtilis* kompetentnih največ 10 % celic.

### Vzpostavitev in uravnavanje kompetence pri bakteriji *Streptococcus pneumoniae*

Ključni proteini za vzpostavitev kompetence bakterije *S. pneumoniae* so zapisani v genih operona *com*. Proteina ComA in ComB tvorita membranski transporter, ki iz celice prenese protein ComC (pre-CSP), iz katerega nato nastane kompetenčno stimulirajoči peptid oz. CSP (ang. Competence-Stimulating Peptide). Ta igra pomembno vlogo pri uravnavanju kompetence, še posebej pri medcelični signalizaciji, saj se lahko veže tudi na sosednje celice. CSP se na zunanjosti celice veže na senzorski receptorski protein ComD in sproži njegovo fosforilizacijo. Nato ComD fosforilira odzivni regulatorni protein v citoplazmi ComE – ComE~P deluje kot transkripcijski aktivator 20 genov, med njimi tudi *comCDE*, *comAB* in *comX*. Kot produkt gena *comX* nastane protein ComX oz.  $\sigma^X$ , faktor  $\sigma$  za RNA-polimerazo. RNA-polimeraza, na katero je vezan  $\sigma^X$ , je sposobna prepoznati promotorje genov kompetence in tako se prepiše še dodatnih 60 genov – imenujemo jih geni pozne kompetence. Ti geni imajo zapise za večino proteinov transformacijskega sistema bakterije, prav tako pa sodelujejo celo pri popravljanju DNA (slika 10-7).



Slika 9-6: Vzpostavitev in uravnavanje kompetence pri *S. pneumoniae*. Pomembno vlogo ima kompetenčno stimulirajoči peptid (CSP), ki deluje tako na celico, ki ga izloča, kot na sosednje celice. Celica izloča protein CSP, ta pa preko dvokomponentnega sistema ComD-ComE aktivira gene za kompetenčno. Fosforiliran ComE namreč aktivira prepis nekaterih genov *com*, med produkti teh pa nastane tudi ComX oz.  $\sigma^X$ , ki vpliva na prepis številnih genov, potrebnih za kompetenčno in transformacijo.

## Pomen naravne transformacije

Obstaja več hipotez, zakaj imajo bakterije sposobnost privzema proste DNA in kakšno prednost jim transformacija sploh prinese.

### Prehrana – DNA kot nutrient

Ena izmed hipotez, zakaj bakterije uporabljajo transformacijo, je ta, da je transformacija zanje način privzema hrani, saj so nukleinske kisline lahko vir ogljika in dušika. Protiargument tej hipotezi je, da mnoge bakterije privzemajo zgolj lastno DNA – če bi bakterije transformacijo res izkoristile za prehranjevanje, bi najbrž sprejele vsako DNA, ki je v okolju na razpolago. Prav tako kompetentne postanejo samo maloštevilne celice v populaciji, čeprav hraniila potrebujejo vse. A mehanizem privzema zgolj lastne DNA je morda oblika zaštite pred tujo DNA, ki bi lahko pripadala bakteriofagom ali vsebovala transpozone in druge potencialno nevarne elemente. Tako naj bi bil privzem lastne DNA del razvoja kolonije – večina celic se »žrtvuje«, da jih lahko del kolonije uporabi za preživetje. Kanibalska presnova mrtvih bakterij znotraj kolonije naj bi bila tako normalen proces, ki določenemu deležu celic omogoči preživetje.

Drugi argument proti omenjeni hipotezi pa je dejstvo, da sta privzem dvoverižne DNA in razgradnja te v citoplazmi bolj zakomplificirana kot razgradnja DNA v okolju in privzem prostih nukleotidov. Nekompetentne celice *B. subtilis*, npr., izločajo DNazo, ki razgradi DNA zunaj celice, da bakterija nukleotide laže sprejme.

### Popravljanje DNA

Druga hipoteza predpostavlja možnost, da celice DNA iz okolja privzamejo, da bi popravile lastno poškodovano DNA. Zaradi mutagenih dejavnikov se v populaciji bakterij zgodijo poškodbe DNA. V nekaterih celicah so poškodbe tako hude, da celice propadejo in se njihova DNA sprosti v okolje. Druge, še živeče celice, jo privzamejo in uporabijo za popravljanje lastne DNA – to je mogoče le, če je bila prevzeta DNA poškodovana na drugih mestih kot lastna. To hipotezo podpira dejstvo, da mnoge bakterije privzamejo zgolj DNA iste vrste, čeprav je v okolju na voljo tudi DNA drugih vrst, propadlih zaradi mutagenega dejavnika. Samo lastna DNA je namreč dovolj podobna, da se lahko uporabi za popravljanje.

Če bi bakterije s transformacijo popravljale genom, bi pričakovali, da bi se ob prepisovanju genov za kompetenco prepisali tudi geni za popravljanje DNA in da bi se kompetenca pojavila kot odziv na delovanje mutagenega dejavnika. To se pri nekaterih bakterijah dejansko tudi zgodi – pri *B. subtilis* in *S. pneumoniae* se ob razvoju kompetence inducira gen *recA*, potreben za popravljanje DNA z rekombinacijo. Pri drugih bakterijah, kot je *H. influenzae*, pa se pri razvoju kompetence *recA* ne inducira, prav tako se pri njej kompetenca ne pojavi kot odziv na mutageni dejavnik in poškodbo DNA, kar hipotezi nasprotuje.

### Vključitev novih genskih informacij – rekombinacija

Tretja hipoteza pravi, da bakterije uporabljajo transformacijo, da si lahko med seboj izmenjajo genski material, kar vodi v nastanek novih genskih kombinacij, večjo gensko pestrost in pospešeno evolucijo. Ker se bakterije razmnožujejo nespolno, medsebojno izmenjavo genskega materiala omogoča zgolj horizontalni prenos – po tej hipotezi je transformacija nadomestek za spolno razmnoževanje. To podpira dejstvo, da nekatere naravno kompetentne celice med svojo rastjo v okolje sproščajo DNA. To počnejo nekatere vrste rodu *Neisseria*, ki s sekrecijskim sistemom tipa IV aktivno izločajo DNA v okolje. Vendar pa DNA, izločena v okolje, ni nujno namenjena transformaciji, temveč lahko tudi pripomore k tvorbi biofilma.

Nekatere bakterije (npr. *N. gonorrhiae*) pa si lahko s privzemom DNA iz okolja povečajo antigensko variabilnost in se s tem laže izognejo imunskemu sistemu gostitelja, kar podpira omenjeno hipotezo. Vendar pa lahko celica antigensko variabilnost doseže tudi z znotrajcelično rekombinacijo odsekov genov (primer – fimbrije) in zanjo transformacija ni nujno potrebna.

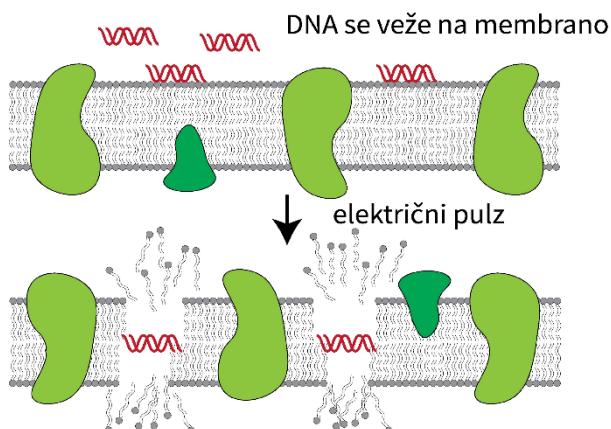
### Umetna transformacija

Večina bakterij ni naravno kompetentnih, kljub temu pa lahko umetno vzbudimo stanje celic, v katerem so iz okolja sposobne sprejeti prosto DNA. Kompetentnost celic vzbudimo na različne načine – tako s kemijskimi kot fizikalnimi sredstvi ali pa s kombinacijo obojih.

Na klasičen način kompetentne celice pripravimo s  $\text{CaCl}_2$  ob nizki temperaturi. Kalcijevi ioni namreč nevtralizirajo negativni naboj na površini bakterijske celice, da se ji negativno nabita DNA lahko približa, in povzročijo spremembe v razporeditvi polisaharidov. Tako se v membrani izpostavijo proteini, ki lahko vežejo DNA. Ko želimo v celico vnesti prosto DNA, izvedemo topotni šok. Pripravljene kompetentne celice, ki smo jim dodali DMSO ali glicerol, lahko zamrznemo.

DNA pa lahko v celice vnesemo tudi z elektroporacijo oz. elektrotransformacijo, postopkom, pri katerem DNA prenesemo ob pomoči električnega sunka.

Če želimo DNA vnesti z elektroporacijo, kompetente celice pripravimo podobno kot za klasično transformacijo, ampak pri tem uporabimo le sterilno destilirano  $\text{H}_2\text{O}$  in led. V elektroporacijski zmesi namreč ne sme biti preveč soli, saj bi bila elektroporacija sicer manj uspešna ali celo neuspešna. DNA se veže na površino celice, nato pa zaradi električnega sunka v membrani nastanejo pore, skozi katere nukleinska kislina vstopi v bakterijo (slika 10-7).



Slika 9-7: Prehod DNA skozi membrano ob električnem sunku. V membrani nastanejo pore, da lahko DNA pride v celico.

Transformiramo pa lahko tudi evkariotske celice – takrat jo imenujemo transfekcija. Poudarimo, da z izrazom transfekcija poimenujemo tudi transformacijo s prosto virusno DNA.

### TEMELJNI POJMI

- Transformacija – sprejem in vključitev proste DNA iz okolja v bakterijsko celico.
- Transformanta – recipientska celica, ki je uspešno sprejela in vključila DNA iz okolice.
- Prosta DNA – DNA, sproščena v okolje, ki običajno razpade na približno 15 kilobaznih parov velike fragmente.
- Kompetentne celice – celice, ki so v stanju, da iz okolja lahko sprejmejo prosto DNA in si jo vključijo v genom.

## POVZETEK

Transformacija je eden izmed načinov horizontalnega prenosa genskega materiala in označuje sprejem in vključitev proste DNA iz okolja v celico. Ločimo dve obliki transformacije, in sicer naravno oz. fiziološko in umetno. Večina bakterij ni sposobna naravne transformacije. Celice, ki iz okolja lahko sprejmejo prosto DNA in jo vključijo v svoj genom, so kompetentne celice. Umetno lahko celice naredimo kompetentne z različnimi kemijskimi sredstvi in fizikalnimi postopki. Bakterije, ki so naravno sposobne sprejeti prosto DNA (naravno kompetentne), najdemo tako med po Gramu pozitivnimi kot po Gramu negativnimi bakterijami. Obstajajo tri hipoteze, zakaj bakterije izvajajo transformacijo: kot način privzema hrane, da bi popravile lastno poškodovano DNA in da bi si izmenjale genski material.

## 10 BAKTERIOFAGI IN TRANSDUKCIJA

Nadja Spasovski, Jerneja Ambrožič Avguštin, Marjanca Starčič Erjavec

### UČNI CILJI

- Spoznati zgradbo nekaterih pomembnih bakteriofagov.
- Razumeti smisel in način zaporednega vklapljanja fagnih genov v litičnem ciklu pomnoževanja.
- Spoznati, da so načini podvojevanja fagne DNA odvisni od zgradbe fagne nukleinske kisline.
- Spoznati in razumeti življenski cikel bakteriofaga in njegovo uravnavanje.
- Razumeti način horizontalnega prenosa genov in pomen fagov pri tem.

### UVOD

Bakteriofagi oz. fagi so virusi, ki okužujejo bakterijske celice. Kot vsi virusi tudi fagi niso živi organizmi, temveč zgolj nukleinska kislina, ki jo obdaja proteinska ovojnica. Ocenjuje se, da je na svetu približno  $10^{31}$  fagov, največ jih najdemo v oceanih ( $4 \times 10^{30}$ ), kjer imajo pomembno ekološko vlogo. Po nekaterih ocenah naj bi bilo v 1 ml morske vode približno  $10^6$  fagom podobnih delcev (ang. phage-like particles). Ker se fagi pritrđijo na točno določene receptorje na celicah, so precej specifični pri izbiri gostiteljske bakterije in običajno niso sposobni okužbe nesorodnih bakterij. Nabor bakterij, ki jih neki fag lahko okuži, imenujemo gostiteljsko območje faga.

Zgradba in kompleksnost faga sta običajno odvisna od njegove velikosti, ta pa se giblje med 24 in 200 nm. Povprečna velikost genoma je 40 000 baznih parov, vendar obstajajo tudi precej manjši oziroma večji. Fagni genom je iz DNA ali RNA, obdaja pa ga proteinska kapsida. Nekateri manjši fagi, npr. MS2, ki lahko okuži bakterijo *E. coli*, nimajo značilnih struktur, kot sta fagna glava in rep, sama kapsida pa je sestavljena iz zgolj dveh proteinov. Nekoliko večji fag T4, pri katerem lahko ločimo glavo in rep, lahko vsebuje tudi do 10 različnih vrst proteinov z različnim številom molekul. Najmanjši do sedaj znan genom, velik 2435 bp, pripada fagu *Leucomotor*, medtem ko lahko genomi megafagov iz rodu *Prevotella* presegajo velikost 540 kb. Fage z genomi, ki so večji od 200 kb, imenujemo *jumbo fagi*.

Fagna RNA ali DNA je lahko enoverižena ali dvoverižena. Genom je lahko sestavljen iz ene nukleinske kisline ali pa je razdeljen na več delov (multipartiten). Velikost in kompleksnost faga sta običajno sorazmerni z velikostjo njegovega genoma.

### Razvrstitev v družine

Fage lahko razvrstimo glede na genom, morfologijo in gostiteljsko območje. Uvrščeni so v razmeroma malo družin. Primeri fagov iz nekaterih družin in njihove značilnosti so navedeni v preglednici 10-1.

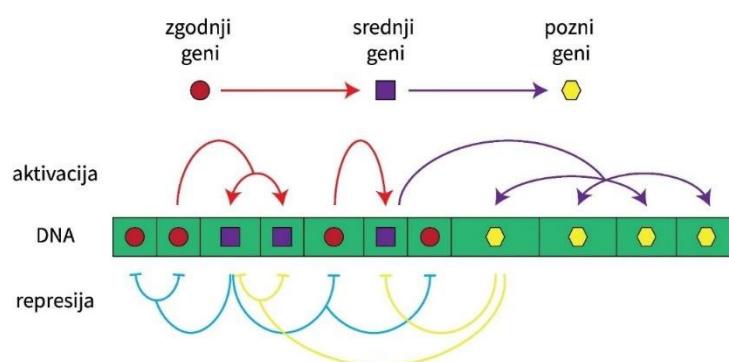
Preglednica 10-1: Primeri družin fagov in njihove značilnosti.

Družina	Primer(i)	Značilnosti
<i>Siphoviridae</i>	$\lambda$ , N15, T1, T5	linearna dvoverižna DNA, dolg rep
<i>Podoviridae</i>	T3, T7, P22, N4, $\Phi 29$	linearna dvoverižna DNA, kratek rep
<i>Myoviridae</i>	T4, P1, P2, Mu, SPO1	linearna dvoverižna DNA, velik fag, krčljiv rep
<i>Microviridae</i>	$\Phi X174$	krožna enoverižna DNA, sferična kapsida
<i>Inoviridae</i>	M13, f2, CTX $\phi$	krožna enoverižna DNA, filamentozni

Genomi fagov iz iste družine so si podobni in se precej razlikujejo od fagnih genomov drugih družin oziroma gostiteljskih bakterij, kar nakazuje evolucijski razvoj, neodvisen od gostitelja. Glede na zgradbo/obliko fagov ločimo različne morfotipe. Lahko so poliedrični (*Microviridae*, *Corticoviridae*, *Tectiviridae*, *leviviridae*, *Cistoviridae*), filamentozni (*Inoviridae*), pleomorfni (*Plasmaviridae*) ... Najbolj preučena skupina fagov je red *Caudovirales*, ki ga delimo v pet družin: *Siphoviridae*, *Podoviridae*, *Myoviridae*, *Ackermannviridae* in *Herelleviridae*. Glede na zgradbo repa se najbolj razlikujejo prve tri družine. Za *Siphoviridae* je značilen dolg nekrčljivi rep, za *Podoviridae* kratek krčljivi rep, za *Myoviridae* pa kompleksen krčljivi rep.

### Uravnavanje izražanja fagnih genov v litičnem ciklu pomnoževanja

Kot vsi virusi so tudi bakteriofagi pri razmnoževanju odvisni od gostiteljske celice. Fag se najprej pritrdi na specifični receptor na površini bakterije, nato pa vanjo vbrizga svoj genom. Zgodnje gene (ang. early genes), tj. gene, ki se prepišejo prvi, običajno prepisuje gostiteljska RNA-polimeraza. Običajno so to geni za encime, ki so povezani s sintezo fagne DNA, npr. DNA-polimeraza, DNA-ligaza, helikaza itd. Ti encimi nato omogočijo podvojevanje fagnega genoma. Temu sledi še prepis poznih genov. Njihovih promotorjev ne more prepoznati gostiteljska RNA-polimeraza, temveč zgolj fagna RNA-polimeraza. Tako je zagotovljeno, da se pozni geni prepišejo šele po nastanku produktov zgodnjih genov. Prav tako fagna RNA-polimeraza prepozna samo fagne promotorje, zato bo prepisala zgolj fagne gene in ne tudi gostiteljskih. Večina poznih genov kodira proteine kapside in repa ter tiste, ki sodelujejo pri pakiranju genoma v glave fagov. Ko je kapsida pripravljena, se vanjo vnese DNA oziroma RNA, nato pa se, odvisno od faga, doda še rep. Nekateri fagi imajo zgodnje, srednje in pozne gene. Načelo zaporedne uravnave je enako. Produkti zgodnjih genov omogočajo izražanje srednjih genov, produkti srednjih genov omogočajo izražanje poznih genov in utišanje zgodnjih genov, produkti poznih genov pa utišanje srednjih genov. Poteka izražanja posameznih fagnih genov fagi ne uravnavajo zgolj z lastno RNA-polimerazo, temveč tudi z zapisi za specifične faktorje  $\sigma$ , ki omogočajo prepoznavo samo določenih promotorjev, in s številnimi regulatornimi proteinimi. Takšno zaporedno uravnavanje izražanja fagnih genov imenujemo regulatorna kaskada (shematsko je prikazana na sliki 10-1). Za prepis določenih genov v določenih stopnjah razvoja delujejo posamezni mehanizmi uravnavanja, ki so specifični za vrsto faga. Fazi sestavljanja fagov sledi izločanje iz bakterijske celice. Za večino fagov velja, da se sprostijo ob lizi celice, nekateri pa se izločijo s procesom, ki spominja na eksocitozo. V tem primeru bakterije ne lizirajo, le njihova rast se upočasni.



Slika 10-1: Shema regulatorne kaskade fagnih genov.

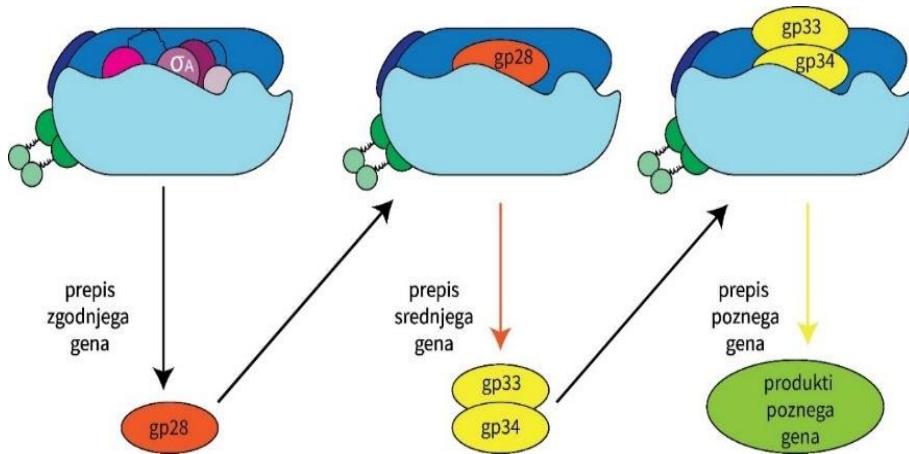
## Primeri regulatornih kaskad različnih fagov

### Fag N4

Fag N4 je specifičen za *E. coli* in ima gene za dve lastni RNA-polimerazi. Prva je t. i. virusna RNA-polimeraza oz. vRNAP, ki je skupaj z genomom pakirana v kapsidi, in sicer v štirih kopijah. V celico vstopi skupaj z DNA in omogoči prepisovanje »lasničnih« promotorjev zgodnjih genov. Dodatno zvita DNA lahko namreč tvori sekundarne strukture v obliki lasnic, ki jih v *E. coli* stabilizirajo proteini SSB, prav tako pa k njihovemu nastanku pripomore aktivnost gostiteljske giraze. Med produkti zgodnjih genov so tudi fagna RNA-polimeraza II, ki je heterodimeren encim s podenotama gp15 in gp16, ter njena kofaktorja, ki se prepišeta iz genov *gp1* in *gp2*. Gp1 je transkripcijski faktor, potreben za odvitje DNA promotorja, gp2 pa privede RNAP na enoverižno DNA. RNA-polimeraza II prepiše srednje gene, tudi za protein SSB N4. Primeri tega se vežejo na gostiteljsko RNA-polimerazo s  $\sigma$  70 in jo usmerijo na promotorje fagnih poznih genov. Tako fag N4 gostiteljsko polimerazo uporabi zgolj za pozne gene, vse druge pa prepišejo njegove lastne RNA-polimeraze. Produkt poznih genov je tudi vRNAP, ki se pakira v kapsido. Na primeru vidimo, da lahko fag lastno polimerazo uporabi za prepis zgodnjih genov le, če ta skupaj z genomom vstopi v celico, sicer mora zanje uporabiti gostiteljsko.

### Fag SPO1

Fag SPO1 je specifičen za bakterijo *B. subtilis*, njegove gene pa lahko razdelimo na zgodnje, srednje in pozne. Po vstopu fagne DNA v celico bakterijska RNA-polimeraza prepiše zgodnje gene s promotorjev, ki so podobni gostiteljskim in jih prepozna RNAP s faktorjem sigma –  $\sigma^{A/55}$ . Produkt zgodnjega gena *gp28* je nov faktor sigma –  $\sigma^{gp28}$ , ki gostiteljski polimerazi omogoči prepis s promotorjev srednjih genov. Med njimi se prepišeta tudi gena *gp33* in *gp34*, nastala proteina pa skupaj nadomestita  $\sigma^{gp28}$  in omogočita prepis poznih genov (slika 10-2).



Slika 10-2: Shema regulatorne kaskade pri fagu SPO1. Gene prepisuje gostiteljska RNA-polimeraza, vendar jo k ustreznim promotorjem usmerjajo različni faktorji  $\sigma$ . Ti nastanejo kot produkti zgodnjih in srednjih genov.

### Fag T7

Fag T7 je specifičen za *E. coli* in ima približno 50 genov, ki jih uvrščamo v dva razreda: zgodnje in pozne. Po okužbi celice s fagom bakterijska RNA-polimeraza prepiše zgodnje gene, med katerimi je tudi gen *gp1* za fagna RNA-polimerazo. Fagna RNA-polimeraza specifično prepozna promotorje poznih genov. Zanimivo je, da se ob vstopu fagnega genoma sprva vnese le del fagne DNA z zgodnjimi in nekaj poznimi geni. Prepis prvih poznih genov s fagno RNAP omogoči vnos preostalega dela DNA s poznimi geni. Specifičnost fagne polimeraze T7 in drugih fagnih polimeraz

za lastne promotorje se izkorišča za pripravo ekspresijskih vektorjev, saj lahko z uravnavanjem sinteze polimeraze nadzorujemo izražanje poljubnega gena, uravnawanega s promotorji poznih genov T7. Primer je promotor gp10 faga T7, ki je eden izmed »najmočnejših«, kar pomeni, da bodo geni, uravnavani s tem promotorjem, zelo pogosto prepisani. Primer tovrstnih vektorjev so plazmidi pET (plasmid expression T7), ki imajo za promotorjem T7 številna restrikcijska mesta, kamor lahko vstavimo poljubne gene. Promotor T7 lahko posredno naredimo tudi inducibilen, tako da nadzorujemo izražanje gena za RNA-polimerazo T7, kar je še posebej uporabno pri sintezi toksičnih proteinskih produktov.

### Predstavitev na fagu

Ker so fagi zelo preprosti (sestavljeni zgolj iz nukleinske kisline in proteinske kapside), lahko pripravimo translacijske fuzije poljubnega gena z genom za izbrani kapsidni protein. Tako bo po nastanku viriona protein našega gena postal del kapside – bo predstavljen na fagni kapsidi. Metodo imenujemo predstavitev na fagu (ang. phage display).

Metoda je še posebej uporabna pri preučevanju interakcij med proteini in za protein specifičnimi ligandi. Če je ligand znan in iščemo protein, s katerim se lahko veže, pripravimo knjižnico fagov, ki imajo na površini predstavljene različne proteine. To pomeni, da s tehnologijo rekombinantne DNA v ustreznih vektorjih pripravimo zbirko translacijskih genskih fuzij (npr. s kapsidnim proteinom gp10 faga T7). Na površini različnih rekombinantnih fagov tako dobimo predstavljene različne proteine. Med njimi lahko identificiramo fage in posledično vse fuzijske proteine, ki se z visoko afiniteto vežejo z znanim ligandom (npr. hormonom, peptidom, protitelesom ...). Lahko pa, obratno, ugotavljamo, kateri ligandi se vežejo na znani protein: pripravimo translacijsko fuzijo s točno določenim proteinom in iščemo različne ligande, ki se vežejo s proteinom, predstavljenim na fagu.

### Fag T4

Z več kot 200 geni je T4 je eden izmed večjih do sedaj dobro raziskanih fagov. Uvrščamo ga v družino *Myoviridae*, za katero so značilni fagi z velikim genomom in velikim deležem adeninov in timinov (AT). Je zgodovinsko zelo pomemben modelni fag, saj so poskusi z njim pomembno prispevali k razvoju molekularne genetike. Ima številne gene, med njimi tudi takšne, ki nadomeščajo gostiteljske, kar mu omogoča razmnoževanje v različnih gostiteljih in v različnih razmerah. Fag ima npr. gene za dejavnike, ki pospešijo njegovo pomnoževanje, ko gostiteljska celica (*E. coli*) živi v anaerobnih razmerah. Prav tako ima zapise za lastne tRNA, kar mu omogoči hitrejšo translacijo, saj fag, zaradi velikega deleža AT v genomu, preferenčno uporablja druge kodone kot njegova gostiteljska celica. V genomu ima tudi zapise za encime, ki sodelujejo pri podvojevanju DNA, npr. za ligazo. Tako predstavlja dober vir genov za encime, ki jih uporabljamo v laboratoriju – rekombinantno ligazo T4. Zaradi velikega genoma je uravnavanje izražanja fagnih genov zelo kompleksno, pogosto so pri tem uporabljeni novi faktorji  $\sigma$  in številni drugi mehanizmi regulatorne kaskade. Kljub temu pa fag nima zapisa za lastno RNA-polimerazo, temveč uporablja gostiteljsko.

Njegove gene lahko glede na čas izražanja razdelimo v štiri skupine: takojšnji zgodnji geni, zapozneli zgodnji geni, srednji geni in pozni geni. Ko fagna DNA vstopi v celico, gostiteljska RNA-polimeraza s fagnih promotorjev, ki jih prepozna s  $\sigma^{70}$ , prepiše takojšnje zgodnje gene (ang. immediate early). Med produkti teh so tudi antiterminatorji, ki preprečijo, da bi RNA-polimeraza zdrsnila z DNA in po prepisu takojšnjih zgodnjih genov prenehala prepisovanje. Tako gostiteljska

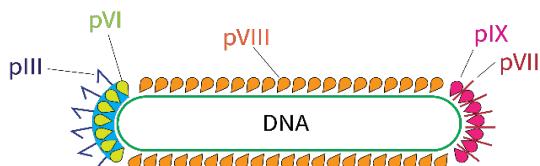
RNA-polimeraza nadaljuje transkripcijo zapoznelyih zgodnjih genov (ang. delayed early genes), ki se prepišejo iz istih promotorjev  $\sigma^{70}$  kot takojšnji zgodjni geni. Srednji geni (ang. middle genes) se prepišejo s promotorjev, ki se nekoliko razlikujejo od promotorjev, ki jih RNAP prepozna s  $\sigma^{70}$ , saj imajo prepoznavno (konsenzusno) zaporedje na mestih  $-10$  in  $-30$  in ne na  $-10$  in  $-35$ . Prepoznavno zaporedje na mestu  $-30$  imenujemo *Mot box*. Da lahko bakterijska RNA-polimeraza s  $\sigma^{70}$  prepozna takšne promotorje, se nanjo vežeta proteina MotA in AsiA. Proteina sta produkta zapoznelyih zgodnjih genov in delujeta kot koaktivatorja, ki preoblikujeta faktor  $\sigma$  tako, da polimeraza lahko prepozna promotorje srednjih genov. Ker tako spremenjena polimeraza ne prepozna več promotorjev  $\sigma^{70}$ , so protein AsiA poimenovali protein antisigma. V nasprotju z drugimi faktorji antisigma se AsiA ne veže na  $\sigma^{70}$  in jo inaktivira, temveč prepisovanje s promotorjev  $\sigma^{70}$  preprečuje zgolj posredno. Pravi pozni geni (ang. true late genes) imajo zapise za proteine glave in repa, prepisovanje teh genov pa je povezano s podvojevanjem fagne DNA. Podobno kot srednji geni se tudi pravi pozni geni prepišejo s promotorjev, ki se nekoliko razlikuje od promotorjev, prepoznanih s  $\sigma^{70}$ . V tem primeru je prepoznavno zaporedje zgolj na mestu  $-10$ , ki pa je daljše kot pri običajnem promotorju  $\sigma^{70}$ . Na mestu  $-35$  ali kjerkoli drugje za mestom  $-10$  ni drugih prepoznavnih zaporedij. Da lahko RNA-polimeraza prepozna tovrstne promotorje,  $\sigma^{70}$  nadomestita alternativna faktorja  $\sigma$  gp55 in gp33. Vendar pa proteina sama ne moreta tvoriti učinkovitega odprtrega kompleksa, temveč je za to potreben še gp45, ki poveže gp33 in gp55 z RNA-polimerazo. Protein gp45, je sicer dodatni protein, ki pri podvojevanju fagne DNA deluje podobno kot drseča objemka (ang. sliding clamp). Premika se skupaj z DNA-polimerazo ter skrbi, da ta ne zdrsne z DNA. Občasno se gp45 loči od drugih replikacijskih proteinov in sam drsi po DNA. Tako se lahko poveže z gp33 in gp55. Ker je protein gp45 povezan s podvojevanjem fagne DNA, tak način uravnavanja omogoča izražanje pravih poznih genov šele po začetku podvojevanja fagne DNA.

### Primeri pomnoževanja in pakiranja fagne DNA v kapsido

#### Fagi z enoverižno krožno DNA

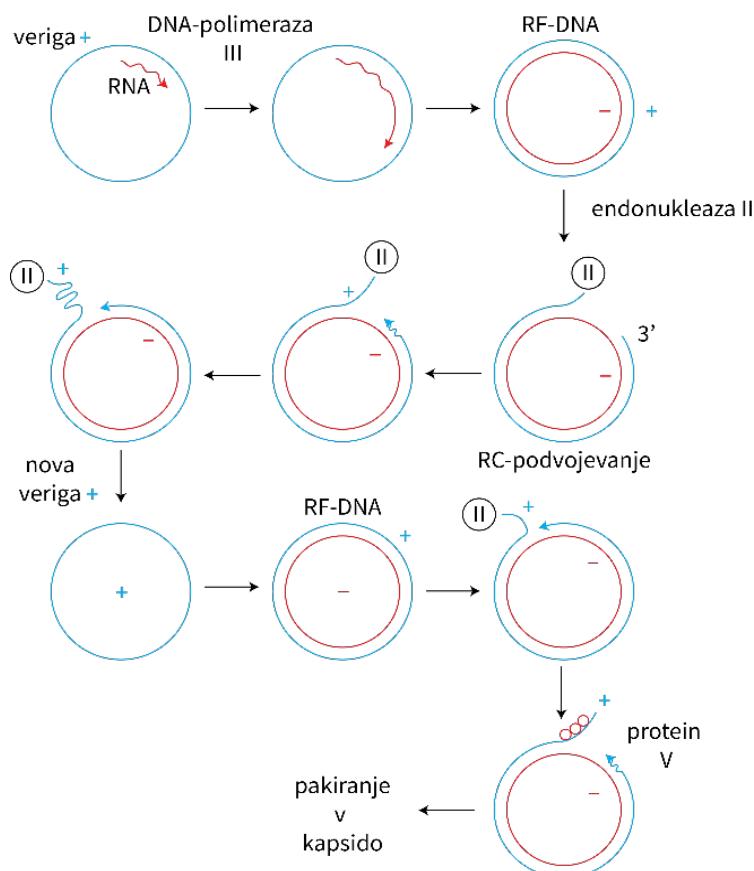
Številni manjši fagi imajo genom iz enoverižne krožne DNA. Na splošno jih lahko razdelimo v dve skupini. Predstavnik prve skupine je ikozaedrični fag  $\phi$ X174. Celice okuži podobno kot drugi fagi – DNA vstopi v bakterijo, in ko se fag namnoži, celica lizira. Predstavnika druge skupine sta filamentozna faga M13 in f1. Zanj je značilno, da lahko okužita zgolj celice, ki vsebujejo konjugativne plazmide – vežeta se namreč na konjugacijski pil. V nasprotju s fagom  $\phi$ X174 in večino drugih v celico ne vstopi zgolj fagni genom, temveč celoten fag. Ob prenosu faga skozi notranjo membrano se mu proteinski plašč odstrani, ob izstopu iz celice pa se fagna DNA ponovno obda z ovojnico. Celica ob tem ne lizira, zato je okužba s takim fagom kronična. Ker okužene celice rastejo počasneje od preostalih, so plaki motni. Samo podvojevanje je najbolje preučeno pri fagu M13.

Genom faga M13 je iz enoverižne krožne DNA, ki jo označimo kot verigo + in je obdana s slojem proteinov (slika 10-3).



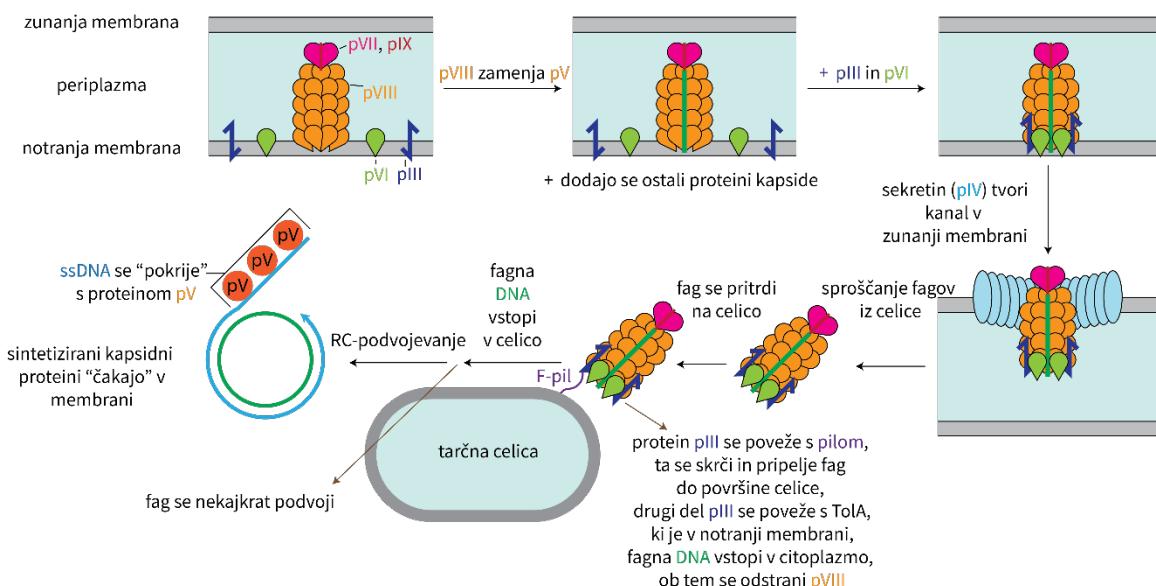
Slika 10-3: Filamentozni fag M13. M13 okuži zgolj celice, ki izražajo konjugacijske pile. Zanj je značilno, da v celico vstopi v celoti, pri prehodu skozi notranjo membrano pa se odstrani njegov proteinski plašč. Ko nastanejo novi fagi in se sprostijo iz celice, ta ne lizira.

Takojo po vstopu DNA v celico, se sintetizira komplementarna veriga –, kar omogočijo gostiteljski proteini. Tako nastane dvojnična veriga – t. i. oblika RF (ang. replicative form) DNA. Predpogoj za sintezo komplementarne verige je sinteza začetnega oligonukleotida. Ker gostiteljski proteini običajno potrebujejo dvojnično DNA, RNA-polimeraza izkoristi kratek odsek lasnice, ki nastane v enoverižni DNA na mestu *ori*. Po tvorbi začetnega oligonukleotida DNA-polimeraza III ob pomoči drugih gostiteljskih proteinov zgradi komplementarno verigo. Za nadaljnje podvojevanje so potrebni tudi proteini, zapisani v prvi RF DNA. Veriga + se podvojuje na način kotalečega se kroga – RC (ang. rolling circle replication). V mestu *ori* veriga + specifična endonukleaza, ki je produkt gena II (protein II) prekine verigo. Gostiteljska helikaza sodeluje pri odvituju DNA ob prekinitvi. Protein II ostane vezan na 5'-koncu prekinjene DNA (veriga +), gostiteljska DNA-polimeraza III, s pomoženimi proteinimi, pa dodaja nukleotide na 3'- konec in s tem sintetizira novo verigo +, ob tem pa izpodriva staro verigo +. Protein II, vezan na 5'-koncu stare, izpodrivenje verige, konca te verige poveže tako, da se fosfat na tirozinu prenese nazaj na prosti 3'-konec stare verige. Tako lahko stara veriga + ponovno postane matrica za sintezo verige – in nove molekule RF (slika 10-4). Podvojevanje se nadaljuje, dokler se ne začne akumulirati protein fagnegata gena V, ki prekrije enoverižno verigo + in s tem prepreči nadaljnjo sintezo oblike RF. Enoverižna DNA + se v membrani obda s kapsido in virioni se sprostijo iz celice, pri čemer bakterija ne lizira.



Slika 10-4: Podvojevanje genoma pri fagu M13. Najprej gostiteljska polimeraza enoverižni DNA sintetizira komplementarno verigo, da nastane oblika RF. Ta se nato pomnožuje na način kotalečega se kroga, dokler se ne akumulira dovolj proteina V, ki se veže na verigo + in prepreči nastanek nove komplementarne verige. Enoverižna DNA (veriga +) se nato pakira v fagne glave.

Na sliki 10-5 je prikazan cikel okužbe s fagom f1 z natančneje opisanim mehanizmom pakiranja v kapsido. Fag f1 ima 5 proteinov, med katerimi prevladuje poglaviti protein glave pVIII s približno 2700 kopijami. Preostali štirje so zastopani v le nekaj kopijah. Del fagnega proteina pIII, ki je lociran na enemu koncu faga, se ob okužbi celice poveže s pilom. Ta se nato skrči in privede fag do površine celice. Drugi del pIII se poveže s TolA, ki je v notranji membrani bakterijske celice, del njega pa se izteza v periplazemski prostor. Fagna DNA nato vstopi v celico, ob tem pa se prenese protein pVIII iz fagne kapside v notranjo membrano. Sledi podvojevanje fagne DNA s podobnim mehanizmom, kot je bil opisan za fag M13. Nastala enoverižna DNA se »prekrije« s proteinom pV. Kapsidni proteini, ki so se sintetizirali *de novo*, so nameščeni v notranji celični membrani. Ko DNA vstopi v membrano, proteini pVIII zamenjajo pV. V fagne delce se lahko pakira samo DNA, ki ima zaporedja *pac*. K nastajajočemu fagu se dodajo preostali proteini (pIII in pVI), protein pIV, ki je sekretin, pa nato tvori poro v zunanjji membrani, skozi katero se izloči sestavljeni fag.



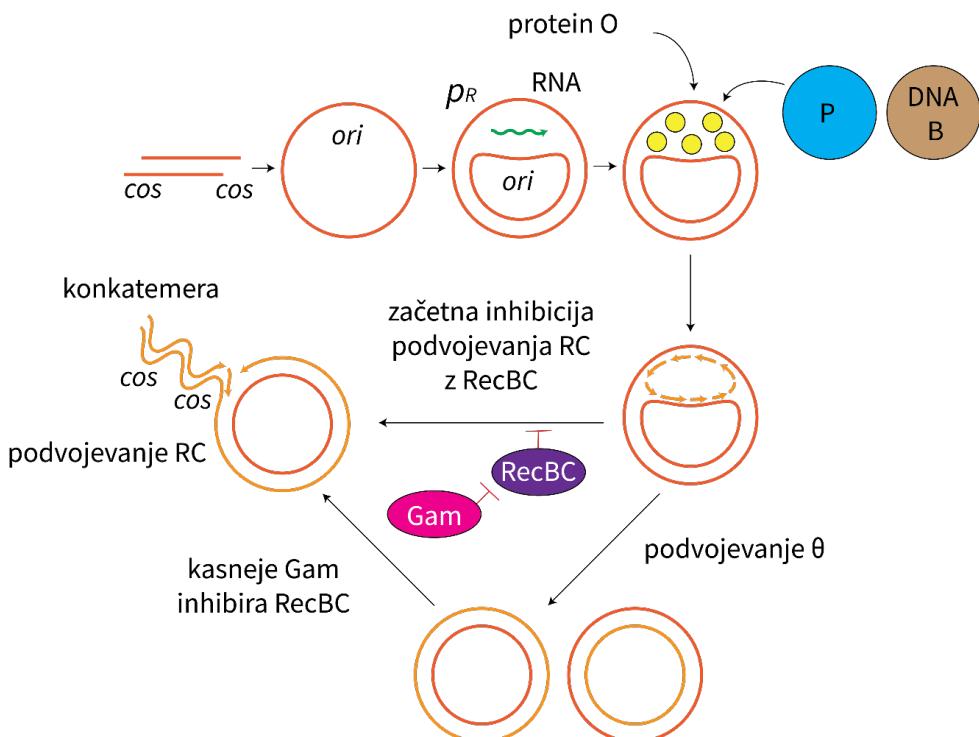
Slika 10-5: Primer okužbe bakterijske celice s fagom f1 in pakiranja njegovega genoma v kapsido.

Podvojevanje DNA faga  $\phi$ X174 poteka podobno, z uporabo gostiteljskih encimov, ki sicer sodelujejo pri podvojevanju kromosomske DNA, in nekaterih dodatnih proteinov, kot so PriA, PriB, PriC in DnaT. Enoverižna DNA te skupine fagov se v bakterijski celici obda s kapsido, fagi pa se sprostijo iz celice ob njeni lizi.

### Fagi z dvooverižno krožno DNA

Primer faga z dvooverižno krožno DNA je fag  $\lambda$ . V kapsidi je DNA faga  $\lambda$  linearna, po vstopu v celico pa se zaokroži, zaradi povezave dveh 12 bp dolgih komplementarnih zaporedij (*cos*), ki sta na obeh koncih linerane fagne DNA. Na sliki 10-6 je prikazano podvojevanje DNA faga  $\lambda$ . Za podvojevanje fagne DNA, ki s se začne na mestu *ori*, sta potrebna zgolj produkta genov *o* in *p*. Protein O se veže na ponovljena zaporedja na mestu *ori*, in upogne DNA, s tem pa odpre dvojno vijačnico, podobno kot DnaA na mestu *oriC* v bakterijskem kromosomu. Nato se protein P poveže s proteinom O in gostiteljsko helikazo DnaB. Ob začetku podvojevanja se sintetizira še RNA v regiji *ori* (pri promotorju  $P_R$ ), ki sodeluje pri ločitvi verig in deluje kot začetni oligonukleotid pri podvojevanju. Podvojevanje poteka v obeh smereh, podobno kot podvojevanje  $\theta$  pri plazmidih. Ko je

podvojevanje končano (oboje replikacijske vilice se srečajo), se nastali molekuli ločita. Ko nastane nekaj kopij DNA s podvojevanjem  $\theta$ , se mehanizem podvojevanja preklopi v način kotalečega se kroga (RC). Glavno vlogo pri tem preklopu se pripisuje produktu fagnega gena *gam*, ki inhibira RecBCD. Slednji sprva onemogoča prehod v podvojevanje RC, ko pa je produkta *gam* dovolj, se sprosti inhibicija prehoda v RC. Podvojevanje RC je podobno kot pri fagu M13, le da se na novo sintetizirane kopije DNA med seboj ne ločijo. Tako nastaja dolga linearna molekula DNA z zaporednimi ponovitvami genoma faga  $\lambda$ , konkatemera.



Slika 10-6: Podvojevanje genoma faga  $\lambda$ . Za podvojevanje sta potrebna samo dva proteina – O in P. Fag se sprva podvojuje podobno kot plazmidi s podvojevanjem  $\theta$ , nato pa preklopi na podvojevanje RC, vendar se podvojena DNA med seboj ne ločuje. Tako nastanejo dolge konkatemere, ki se jih razreže šele pri pakiranju v kapside.

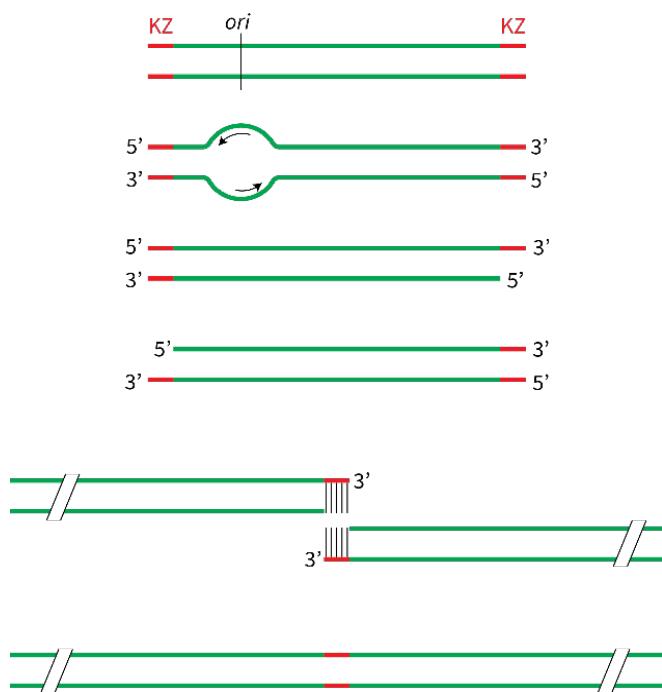
Fag lahko DNA pakira v kapside zgolj iz konkatemer, in sicer mora biti ta sestavljen iz vsaj dveh kopij genoma. Za pakiranje genoma faga  $\lambda$  v kapsido je zelo pomembno 12 bp dolgo zaporedje *cos*, ki je na obeh koncih njegovega linearnega genoma. DNA se namreč začne pakirati prav na mestu *cos*, ki ga prepozna mehanizem v kapsidi, in se ustavi, ko naleti na naslednje mesto *cos*. Tam se DNA prereže, posledično se v fagno glavo pakira natanko en linearni genom faga  $\lambda$ . Z zamaknjenim rezom na mestih *cos* ob pakiranju v kapsido nastaneta 12 bp dolga komplementarna enoverižna konca DNA, kar fagu omogoči zaokrožitev genoma po vstopu v naslednjo gostiteljsko celico. Za fage z dvoverižno DNA je značilno, da imajo sisteme za časovno uskladitev sinteze fagov in lize celice.

#### Fagi z linearnim genomom

Večji fagi imajo pogosto linearni genom, zato imajo pri podvojevanju, prav tako kot linearni plazmidi in kromosomi, težavo, kako podvojiti konec sledilne verige. Po odstranitvi začetnega

RNA-oligonukleotida DNA-polimeraza namreč nima na razpolago prostega 3'-konca za dodajanje DNA-nukleotidov. Nekateri fagi zato po vstopu v celico svoj genom zaokrožijo (fag  $\lambda$ ), drugi pa imajo specifične mehanizme za podvojitev celotne DNA, nekateri so podobni opisanim pri linearnih plazmidih.

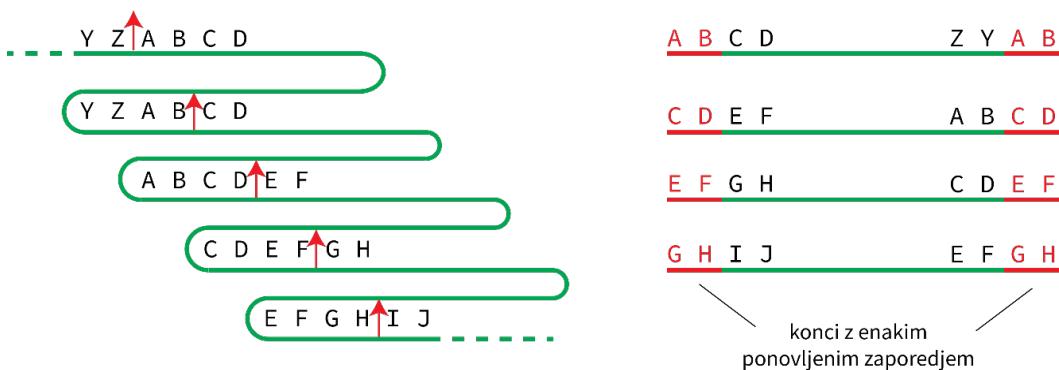
Zanimiv je fag T7, ki ima linearni genom in zapise za kar nekaj encimov: RNA-polimerazo, DNA-polimerazo, helikazo, ligazo, primazo, DNA-endonukleazo in DNA-eksonukleazo. S slednjima lahko razgrajuje gostiteljsko DNA, da pridobi nukleotide za gradnjo lastnega genoma. Podvojevanje faga se začne s sestavo začetnega RNA-oligonukleotida na mestu *ori* in nadaljuje v obe smeri s fagno DNA-polimerazo. Po odstranitvi začetnega RNA-oligonukleotida ostane vrzel na 5'-koncu novonastalih verig DNA. Ker pa ima fag na obeh koncih svojega genoma enaka ponovljena končna zaporedja (KZ), se lahko enoverižni lepljivi konci dveh molekul med seboj povežejo in nastane konkatemera, ki se ob pakiranju v kapsido razreže (slika 10-7).



Slika 10-7: Podvojevanje genoma pri fagu T7. Fag ima na obeh koncih linearnega genoma enako končno zaporedje, zato se lahko lepljivi konci novonastalih verig med seboj povežejo. Nastanejo konkatemere, ki se pred pakiranjem v kapside razdelijo na posamezne genome.

Tudi modelni fag T4 ima linearni genom, ki tvori konkatemere, vendar ne s povezovanjem posameznih podvojenih molekul DNA, ampak z rekombinacijo. T4 ima izjemno velik genom, v katerem ima zapise za številne proteine – tudi takšne, ki bi jih lahko uporabljali od gostiteljske celice. Pri podvojevanju sodeluje več kot 30 fagnih produktov, začne pa se na več mestih *ori* vzdolž genoma. Podobno je podvojevanju bakterijskega kromosoma. Pri tem nastane več kopij fagne DNA, ki imajo enoverižne 3'-konci. Kot T7 ima tudi T4 na obeh koncih genoma enako ponovljeno zaporedje – tako se lahko enoverižni 3'-konci vrnejo v drugo molekulo dvoverižne DNA in z njim tvoriti triverižno zanko D. S 3'-konca vrinjene enoverižne DNA se sintetizira komplementarna veriga s posebnim mehanizmom, ki je odvisen od rekombinacije (ang. recombination dependent DNA replication) in ki hkrati omogoči povezavo kopij genoma v konkatemere. Pri fagih T7 in T4 se kapside sestavijo pred pakiranjem DNA. Proteini kapside se sprva povežejo s proteini ogrodja in t. i. portalnim proteinom v prokapsido. Ko se proteini ogrodja odstranijo, v kapsido vstopi DNA, dodajo se preostali proteini in rep, pri T4 že sestavljen, pri T7 pa se sestavi na kapsidi. Pri pakiranju

fagnega genoma sodeluje pentameren proteinski obroč na vhodu kapside, ki vanjo »sesa« DNA, dokler ni polna. Protein terminaza, ki sodeluje pri pakiranju, ne prepozna natančnega začetka in konca fagnega genoma, tako kot pri fagu  $\lambda$ , pač pa na začetku mesto *pac* (ang. packaging) in tako omogoči vnašanje DNA v kapsido, dokler ta ni polna, četudi se vanjo prenese več kot en genom. Takrat se pakiranje prekine. Zato tak način pakiranja imenujemo *headful*. Posledično imajo linearni genomi faga značilne konce z enakim ponovljenim zaporedjem (redundantni konci – ang. terminal redundant ends). Prav tako so ti konci pri vsakem novonstalem fagu malo drugačni, saj je začetek in konec pakirane DNA na drugem mestu (ciklično permutirani genomi – ang. cyclically permuted genomes). Kljub temu pa imajo vsi sintetizirani fagi z različnimi konci vso potrebno, enako genetsko informacijo (slika 10-8).



Slika 10-8: Značilni konci genomov faga T4. Konci z enakim zaporedje na obeh straneh so posledica pakiranja v kapsido, ki lahko sprejme malo več kot celoten genom faga.

### Fagi z enoverižno RNA

Po vstopu RNA v celico je ta funkcionalno mRNA, ki se prevede v replikazo, tj. od RNA odvisno RNA-polimerazo. Nastanek replikaze je potreben, saj nekatere bakterije, npr. *E. coli*, nimajo tega encima. Replikaza nato sintetizira komplementarno (–) verigo, ki jo uporablja kot matrico za sintezo novih (+) verig mRNA. Te se prevedejo, da se sestavi genom novih fagov.

### Drugi zanimivi fagi

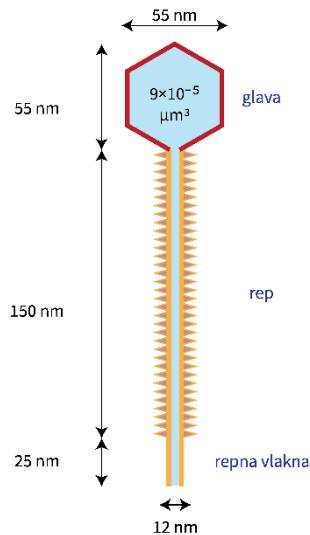
Če imajo fagi poleg litičnega tudi lizogeni cikel pomnoževanja, ki je v nadaljevanju opisan pri fagu  $\lambda$ , se običajno vstavijo v specifična mesta *att* gostiteljevega kromosoma z rekombinacijo in običajno ne povzročijo inaktivacije genov – mutacije. Nekateri fagi pa se ne integrirajo v kromosom, temveč obstajajo kot profagi v citoplazmi. Nekateri fagi imajo tudi lastnosti plazmidov. Primer je fag P1, ki se podvojuje kot krožni plazmid, prav tako ima tudi gene za proteine, povezane s porazdelitvijo genoma med dve hčerinski celici ter z uravnavanjem števila kopij, ima sistem toksin-antitoksin ter mestnospecifičen rekombinacijski sistem za ločitev multimer Cre-lox, ki prepreči izgubo faga pri delitvi celice. Zanj je značilno, da se lahko regija z zapisom za proteine repa obraža, kar se odraža v spremenjenem gostiteljskem območju.

Nekateri fagi spominjajo na transpozicijske elemente (fag Mu). Fag Mu se lahko vključi v kromosom, vendar ne na specifična, ampak naključna mesta. Posledično v genomu bakterij pogosto povzroča mutacije, kar je bilo ključno pri njegovem poimenovanju (ang. mutator phage).

Nekateri fagi se niso sposobni samostojno podvojevati, temveč za to potrebujejo druge fage. Imenujemo jih satelitni virusi. Eden takih je fag P4, ki se razmnožuje zgolj v prisotnosti faga P2.

## Bakteriofag $\lambda$

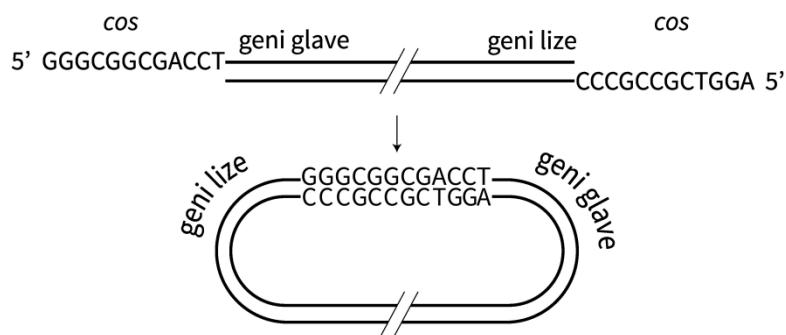
Bakteriofag  $\lambda$  (lambda) oz. fag  $\lambda$  je eden najbolje raziskanih virusov. Njegov gostitelj je bakterija *E. coli*. Ima ikozaedrično glavo in fleksibilen rep (slika 10-9). Njegov genom je linearna dvostranska DNA, dolga 48.502 bp. Genski produkti nastajajo iz približno 50 odprtih bralnih okvirjev. Je temperirani fag; ima lizogeni in litični način razmnoževanja. Zaradi svojih značilnosti je fag  $\lambda$  zelo uporaben tudi kot vektor v tehnologiji rekombinantne DNA.



Slika 10-9: Bakteriofag  $\lambda$ . Fag je sestavljen iz ikozaedrične glave in fleksibilnega repa. Njegov genom je 48,5 kb dolga dvostranska DNA.

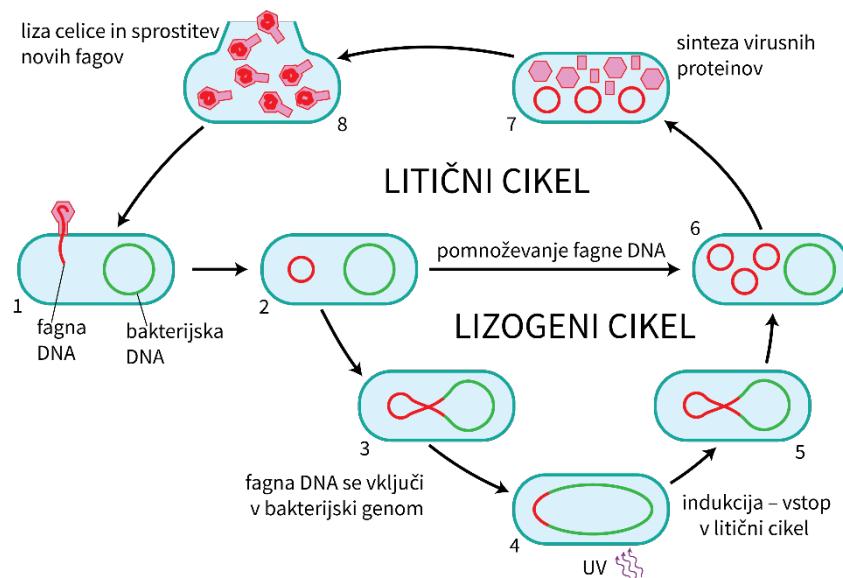
## Življenski cikel

Da lahko fag  $\lambda$  okuži celico, se mora vezati na receptor LamB v zunanjem membranu celice. LamB je sicer membranski transportni protein za maltozo in ga kot receptor uporabljajo tudi nekateri drugi fagi. V notranjost celice fagna DNA potuje skozi citoplazemskega porina preko prenašalnih proteinov maltognaza permeaznega kompleksa. Linearni genom faga  $\lambda$  se takoj po vstopu v citoplazmo gostiteljske celice zaokroži, in sicer se povežeta mesti *cos* na obeh enoverižnih 5'-koncih genoma (slika 10-10), nato pa bakterijska ligaza zareže vrzeli v fosfodiesterne verige krožne DNA faga  $\lambda$ .



Slika 10-10: Cirkularizacija linearne genomske DNe faga  $\lambda$ . Takoj po vstopu faga v celico se fagni genom zaokroži, tako da se povežeta mesti *cos*.

Zaokrožen fagni genom se lahko vključi v kromosom (profag) in se skupaj z njim podvojuje ter prenaša na naslednje generacije bakterij – lizogeni cikel. Lahko pa se zaokroženi fagni genom takoj prične podvojevati, čemur sledi pakiranje namnožene fagne DNA v kapside in po lizi celice sprostitev nove generacije fagov v okolje – litični cikel. Tudi v bakterijski genom vključen profag po indukciji preide v litični cikel; izreže se iz kromosoma in prične podvojevati (slika 10-11). Kakšna bo usoda faga  $\lambda$  v celici, je odvisno od razmer v okolju in celici, npr., bogato gojišče običajno vodi v litični cikel.



Slika 10-11: Življenjski cikel faga  $\lambda$ . Po vstopu v celico se fagna DNA lahko vključi v kromosom (lizogeni cikel) ali se takoj začne podvojevati in pakirati ter se z lizo celice sprosti v okolje (litični cikel).

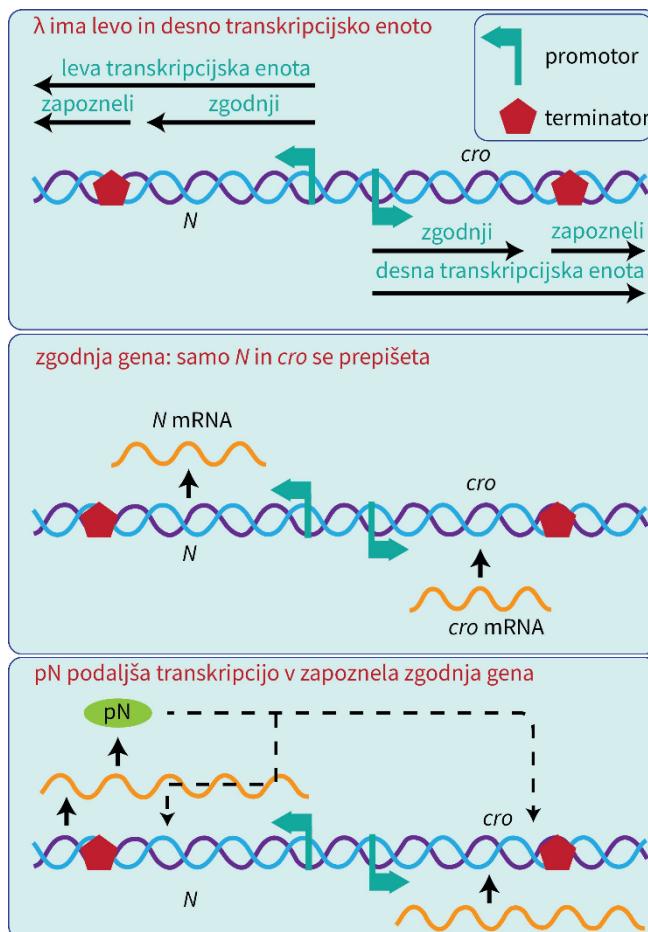
Uravnavanje izražanja genoma faga  $\lambda$  je precej kompleksno. 48,5 kb velik fagni genom lahko v grobem razdelimo na gene glave, repa, rekombinacije, podvojevanja in lize ter gene za regulatorne dejavnike (slika 10-12).



Slika 10-12: Linearni genom faga  $\lambda$ . V zaokroženem genomu tvorijo pozni geni (geni za lizo, glavo in rep) eno samo transkripcijsko enoto, ki se prepisuje s promotorja  $P_{R'}$ .

Glede na čas izražanja lahko gene faga  $\lambda$  razdelimo v tri skupine: takojšnji zgodnji, zapozneli zgodnji in pozni geni. Zgodnji in zapozneli zgodnji geni so potrebni tako za lizogeni kot litični cikel, medtem ko so produkti poznih genov potrebni zgolj pri litičnem ciklu. V skupino takojšnjih zgodnjih genov (ang. immediate early) spadata zgolj dva gena, in sicer *N* in *cro*. Gostiteljska RNA-polimeraza ju prepiše iz promotorjev  $p_L(N)$  in  $p_R(cro)$ , nastala produkta pa sta regulatorna proteina. Protein Cro je pomemben predvsem pri litičnem ciklu, protein N pa deluje kot antiterminator, ki prepreči, da bi se po takojšnjih zgodnjih genih prepisovanje končalo. Tako lahko RNA-polimeraza nadaljuje transkripcijo zapoznelyih zgodnjih genov (ang. delayed early) (slika 10-13). Med produkti teh so tudi štirje regulatorni proteini, ki se prepišejo iz genov *cl*, *cII*, *cIII* in *Q*. Proteini *Cl*, *CII* in *CIII* uravnavajo lizogenijo, medtem ko *Q* uravnava litični cikel. V zapozneli zgodnji fazni se izražajo tako geni litične kot lizogene poti (*cro* in *cl*) – katero pot bo fag izbral, je odvisno od razmer v celici, prav tako pa tudi od tega, ali *CII* uspe omogočiti dovolj sinteze *Cl*, da preseže delovanje Cro. Med zapoznele

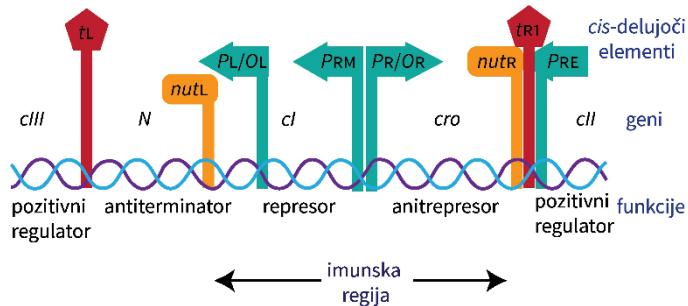
zgodnje gene sicer spada še sedem genov za rekombinacijo oziroma integracijo, če je fag prešel v lizogeni cikel, oziroma dva gena za podvojevanje fagne DNA, če je fag prešel v litični cikel.



Slika 10-13: Takožnji zgodnji geni faga  $\lambda$ . Produkta zgodnjih genov sta zgolj dva regulatorna proteina, ki se prepišeta iz genov  $N$  in  $cro$ . Protein  $N$  deluje kot antiterminator in omogoči, da se prepišejo še zapozneli zgodnji geni.

### Vzpostavitev lizogenije

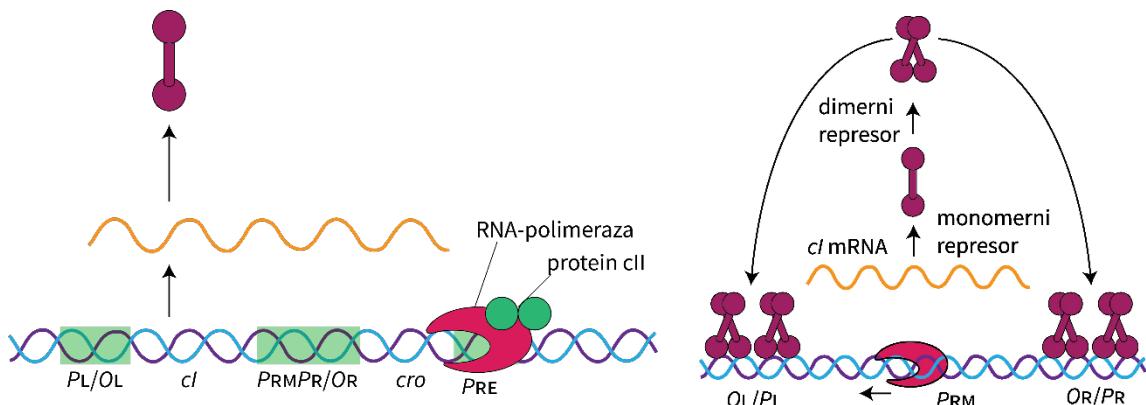
Proteina CII in CIII omogočita RNA-polimerazi, da začne prepisovanje s promotorja  $p_{RE}$  (ang. repressor establishment) (slika 10-14).



Slika 10-14: Zapozneli zgodnji geni faga  $\lambda$ . Produkta genov  $cII$  in  $cIII$  omogočita, da RNA-polimeraza začne prepisovanje s promotorja  $p_{RE}$ .

Promotor  $p_{RE}$  namreč nima tipičnega konsenzusnega zaporedja, ki bi ga prepoznala RNA-polimeraza s  $\sigma^{70}$ , zato se CII kot tetramer veže na zaporedje DNA v bližini  $-35$  in tako omogoči prepisovanje (slika 10-15, levo). Tako CII deluje kot transkripcijski aktivator. Vendar pa je sam

protein CII podvržen razgradnji z gostiteljsko proteazo HflA in posledično zelo nestabilen, zato je za uspešen prepis genov s promotorja  $p_{RE}$  potreben tudi CIII. Ta zaščiti CII pred razgradnjo, da se lahko akumulira do dovolj visoke koncentracije za aktivacijo prepisovanja. Transkripcija s promotorja  $p_{RE}$  vodi v sintezo  $\lambda$ -represorja CI, ki je nujen za vzpostavitev lizogenije. Promotor  $p_{RE}$  se prepisuje v obratni smeri kot  $p_R$ , s katerega se prepisuje gen *cro*, zato s  $p_{RE}$  nastaja protismerna mRNA, ki preprečuje translacijo mRNA z zapisom za *cro*.



Slika 10-15: Prepisovanje s promotorjem  $p_{RE}$  (levo) in  $p_{RM}$  (desno). CII se veže na gostiteljsko RNA-polimerazo, da lahko ta prepozna promotor  $p_{RE}$ . CII preprečuje, da proteaza razgradi CII in s tem omogoči, da je v celici dovoljšnja koncentracija CII, da deluje kot transkripcijski aktivator. S promotorjem  $p_{RE}$  se prepisuje gen za  $\lambda$ -represor CI;  $\lambda$ -represor s svojo vezavo na  $O_R$  deluje kot aktivator transkripcije samega sebe, saj omogoča vezavo RNA-polimeraze na promotor  $p_{RM}$ .

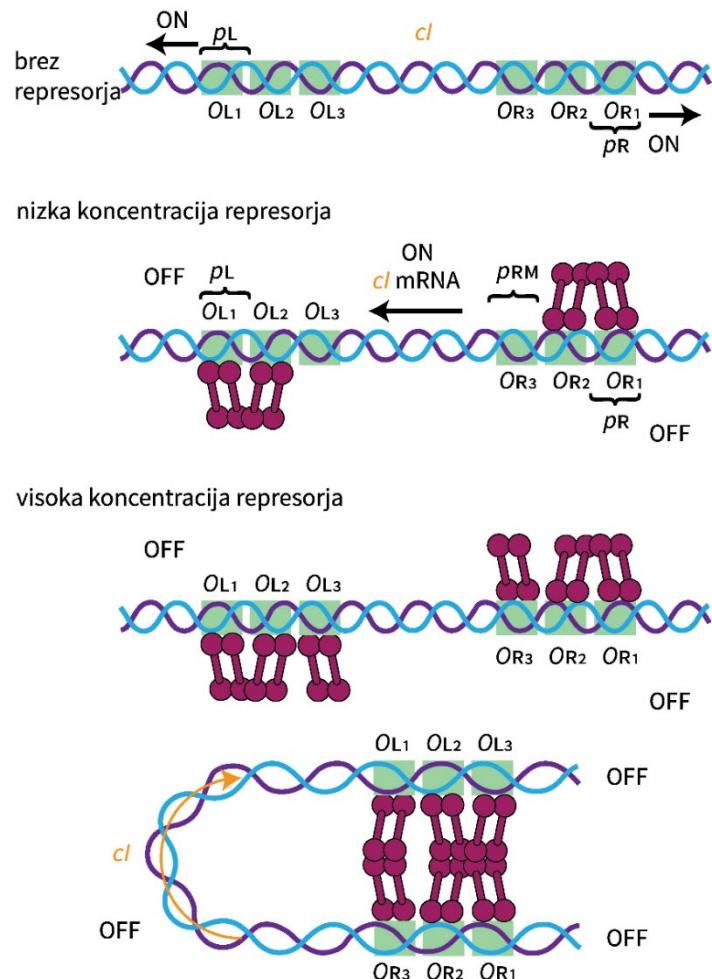
Proteinski monomer CI ( $\lambda$ -represor) je sestavljen iz dveh domen. C-terminalna domena omogoča dimerizacijo monomerov; represor je aktiven kot dimer, saj se le ta oblika lahko veže na DNA. N-terminalna domena omogoča vezavo na DNA, in sicer ima protein na DNA-vezavnem mestu motiv viačnica-zavoj-viačnica (ang. helix-turn-helix, HTH). Dve kratki regiji proteina CI z motivom  $\alpha$ -viačnice se vezeta v veliki žleb dvojne viačnice DNA. Molekula  $\lambda$ -represorja deluje na operatorja  $O_L$  in  $O_R$ , vsak od njiju pa ima tri vezavna mesta ( $O_{L1}$ ,  $O_{L2}$ ,  $O_{L3}$  in  $O_{R1}$ ,  $O_{R2}$ ,  $O_{R3}$ ) (slika 10-16). Prav tako se oba operatorja,  $O_L$  in  $O_R$ , prekrivata s promotorjem  $p_L$  ozziroma  $p_R$ . Represor se na vezavna mesta v operatorju veže kooperativno, in sicer je največja afiniteta za vezavo na mestih  $O_{L1}$  in  $O_{R1}$ . Vezava dimera na prvi dve mesti poveča afiniteto za vezavo na naslednji dve itd.



Slika 10-16: Vzavna mesta na operatorjih OL in OR. Vsak operator ima tri vezavna mesta, na katera se  $\lambda$ -represor veže kooperativno. Z največjo afiniteto se veže na mesti  $O_{L1}$  in  $O_{R1}$ , kar poveča afiniteto za vezavo na naslednji dve.

Vendar pa se mesto  $O_{R3}$  prekriva tudi s promotorjem  $p_{RM}$ , zato je učinek represorja odvisen od njegove koncentracije in mesta, kamor se veže. Če je namreč koncentracija  $\lambda$ -represorja nizka, se bo ta vezal zgolj na prvo mesto operatorja ( $O_{L1}$  in  $O_{R1}$ ) oz. na prvi dve, če se koncentracija poveča ( $O_{L1}$ ,  $O_{L2}$  in  $O_{R1}$ ,  $O_{R2}$ ). To preprečuje vezavo RNA-polimeraze na promotorja  $p_L$  in  $p_R$ , vendar pa omogoča njeno vezavo na promotor  $p_{RM}$  (ang. repressor maintenance). Tako CI deluje kot aktivator transkripcije s promotorja  $p_{RM}$ , s katerega začne RNA-polimeraza prepisovati gen *cl* (slika 10-15, desno). Ko je koncentracija  $\lambda$ -represorja dovolj visoka, da se veže še na mesti  $O_{L3}$  in  $O_{R3}$ , je prepisovanje s promotorja  $p_{RM}$  zmanjšano, saj CI, vezan na mesto  $O_{R3}$ , preprečuje vezavo RNA-polimeraze. Prav tako se dimeri, vezani na  $O_L$ , povežejo z dimeri, vezanimi na  $O_R$ . Tako upognejo DNA in dodatno ovirajo transkripcijo s  $p_{RM}$ . S tem je zagotovljena avtoregulacija CI, ko njegova

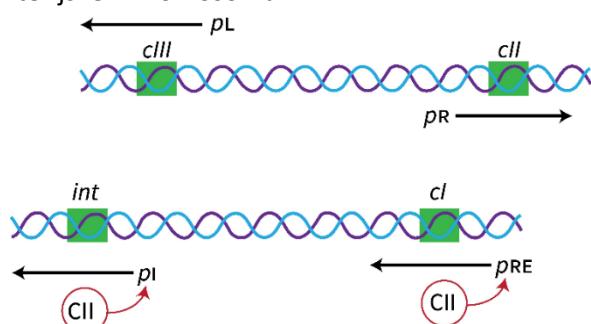
koncentracija preveč naraste. Kljub temu pa je dovoljšnja koncentracija  $\lambda$ -represorja v celici nujna za vzdrževanje lizogenije (slika 10-17).



Slika 10-17: Delovanje represorja glede na koncentracijo v celici. Pri visoki koncentraciji je  $\lambda$ -represor vezan še na mesto O<sub>R3</sub>, kar onemogoča transkripcijo s promotorjem p<sub>RM</sub>. Prav tako se dimeri represorja med seboj povežejo in upognejo DNA. Nastajanje represorja je avtoregulirano z represorjem samim.

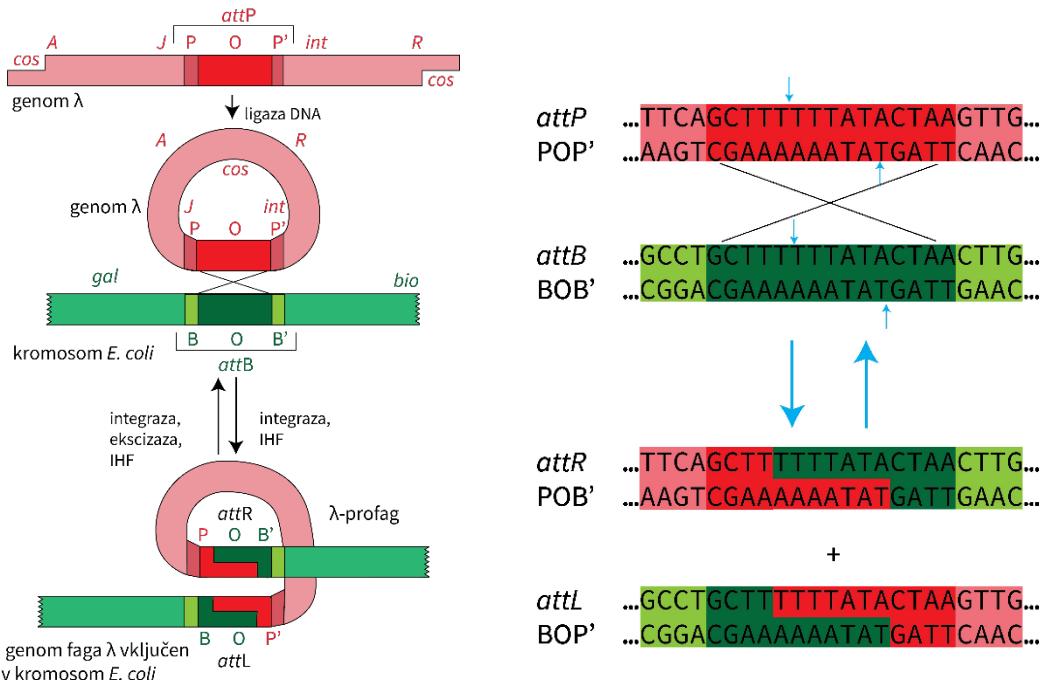
#### Integracija faga $\lambda$ v bakterijski kromosom

Regulator CII omogoči prepisovanje tudi s promotorja p<sub>I</sub> in tako se izrazi gen za integrazo int (slika 10-18). Integrazom omogoči mestnospecifično rekombinacijo med mestoma attP na fagnem genomu in attB na bakterijskem kromosomu.



Slika 10-18: Regulator CII omogoči tudi transkripcijo s promotorja p<sub>I</sub>. Tako se izrazi gen za integrizo, ki omogoči vključitev DNA faga  $\lambda$  v kromosom bakterije.

Mestnospecifična rekombinacija ni enaka običajni homologni rekombinaciji, saj je nekaj nukleotidov z obeh zunanjih strani mest *attP* in *attB*, med katerima se dogaja mestnospecifična rekombinacija, različnih, medtem ko je 15 bp dolgo osrednje zaporedje mest *attP* in *attB* iz enakih nukleotidov (slika 10-19, desno). Rekombinacija se zgodi med kratkima homolognima deloma osrednjega zaporedja, dolgima 7 bp (TTTATAC). Ker je mesto homologije tako kratko, integracija faga ni mogoča brez encima integraze, ki prepozna mesti *attP* in *attB* ter ju rekombinira (slika 10-19, levo).



Slika 10-19: Integracija faga  $\lambda$  v bakterijski kromosom. Ker je mesto homologije zelo kratko (desno), je za vključitev faga potreben poseben fagni encim – integraza. Potrebuje pa se tudi gostiteljski protein IHF (levo).

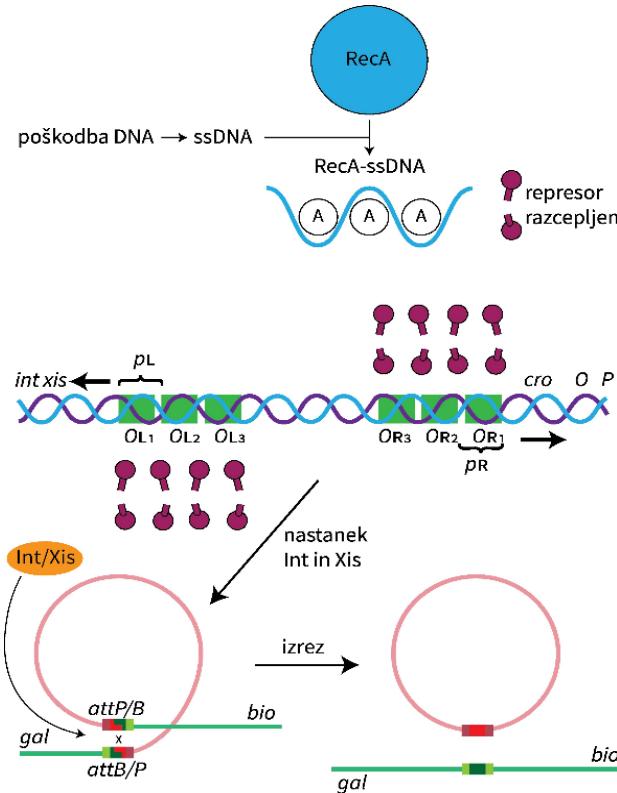
### Imunost za superinfekcijo

$\lambda$ -represor se ne veže zgolj na operatorje lastnega genoma, temveč tudi na genome drugih fagov, ki okužujejo celico in so njihova operatorska zaporedja dovolj podobna, da se nanje lahko veže. Z vezavo na njihove operatorje preprečuje izražanje njihovih genov in celico varuje pred superinfekcijo, tj. dodatno okužbo, ki se pridruži prvotni. Če  $\lambda$ -represor ne prepozna operatorjev na genomu faga, ki okuži celico, celica proti njemu ni imuna.

### Vzpostavitev litičnega cikla

Za prehod iz lizogenega v litični cikel je potrebna razgradnja  $\lambda$ -represorja, to pa sprožijo stresni dejavniki, kot so UV-sevanje, prosti radikali, različne kemikalije itd. UV-svetloba tako neposredno deluje na  $\lambda$ -represor in ga inaktivira. Dejavniki, ki poškodujejo bakterijski genom, pa delujejo preko sistema SOS (slika 10-20). Ob poškodbah DNA se namreč sproži sistem SOS, in sicer se na proteine RecA vežejo kratki odseki enoverižne DNA, kar v proteinu sproži koproteazno aktivnost. Tak RecA se nato veže na CI in povzroči, da molekula sama razcepi vezi med domenama. TS tem se prekine vez med DNA-vezavno domeno in domeno, ki je potrebna za dimerizacijo monomerov. Brez tega se  $\lambda$ -represor ne more dimerizirati in posledično se ne more vezati na operatorje. Če represorja ni, se RNA-polimeraza lahko veže na promotorja  $p_L$  in  $p_R$  in začne prepisovanje. S promotorja  $p_R$  se med drugim prepiše tudi gen *cro*, katerega produkt prav tako zavira sintezo  $\lambda$ -represorja. Cro se namreč veže na ista operatorska mesta kot CI ( $O_{L1}$ ,  $O_{L2}$ ,  $O_{L3}$  in  $O_{R1}$ ,  $O_{R2}$ ,  $O_{R3}$ ), vendar z obratno

afiniteto. To pomeni, da se najprej veže na mesti  $O_L3$  in  $O_R3$ , nato na  $O_L2$  in  $O_R2$  itn. Z vezavo na mesto  $O_R3$  prepreči prepisovanje s promotorja  $p_{RM}$  – tako s tega promotorja Cl ne nastaja več.



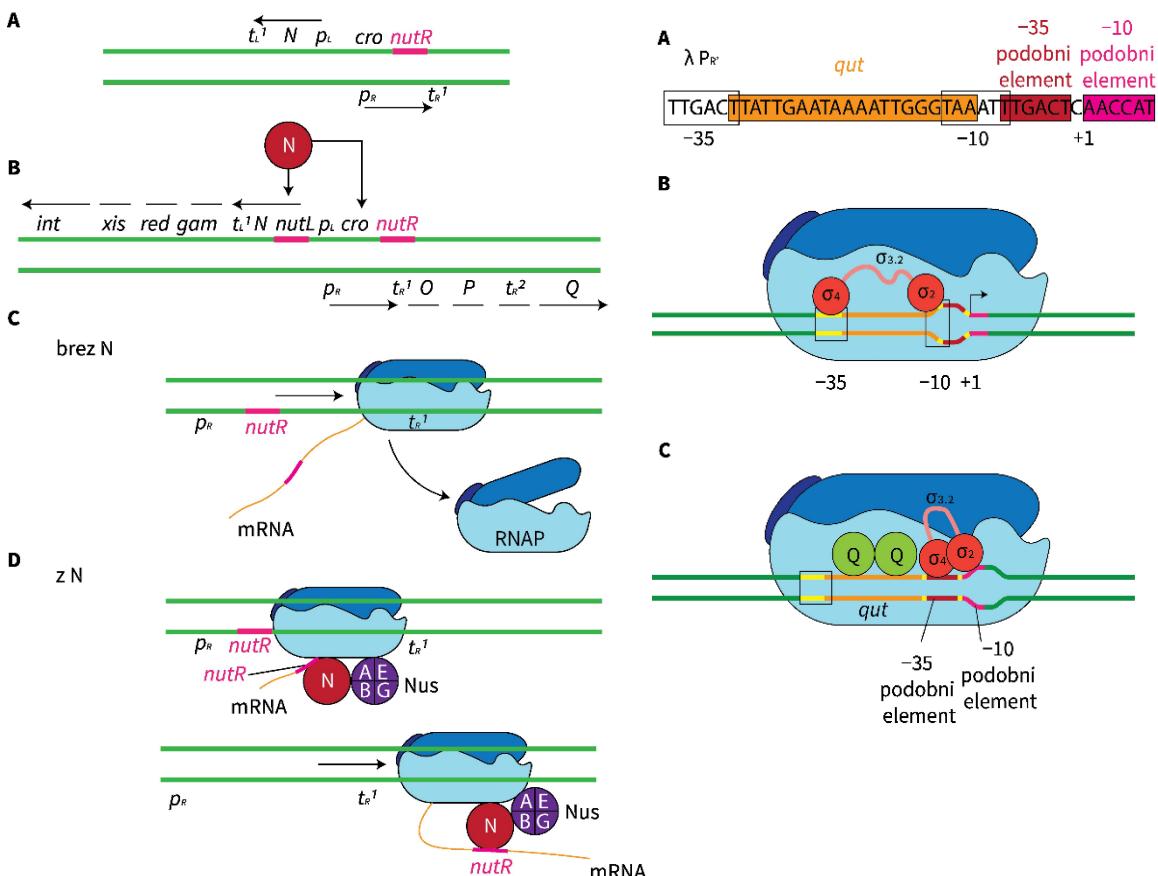
Slika 10-20: Indukcija profaga  $\lambda$ . Poškodbe DNA sprožijo, da se na RecA vežejo kratki odseki enoverižne DNA. Vezava aktivira koproteazno aktivnost RecA, ki sproži razcep vezi v molekuli Cl. Razgradnja  $\lambda$ -repressorja vodi v aktivacijo litičnega cikla in prepis genov, ki so potrebni za indukcijo profaga (npr. *int* in *xis*).

S promotorja  $p_R$  se poleg gena *cro* prepiše še *Q*. *Q* je antiterminatorski protein, ki RNA-polimerazi omogoči, da nadaljuje s transkripcijo poznih genov. Prav tako je za vzpostavitev litičnega cikla pomemben tudi antiterminatorski protein *N*, ki omogoči transkripcijo zapoznelyh zgodnjih genov. S promotorja  $p_L$  se prepišeta tudi gena *int* in *xis*, katerih produkta sta integraza in ekscizaza. Čeprav je za vključitev faga v kromosom dovolj zgolj integraza, ki prepozna mesti *attP* in *attB*, je za izrez profaga potrebna še ekscizaza. Ko je profag vključen v kromosom, sta namreč mesti *att*, ki obdajata njegov genom, hibridni – delno sestavljeni iz *attB* in delno iz *attP*. Integraza sama ni sposobna prepoznati takih hibridnih zaporedij *att*, zato mora biti poleg še ekscizaza. Vendar pa je pomembno, da se ta sintetizira šele pri indukciji profaga in ne ob njegovi vključitvi v kromosom, saj bi se sicer fag izrezal že takoj po integraciji. Ko je fagni genom izrezan iz kromosoma, se začne podvojevati in pakirati v kapside.

#### Delovanje antiterminatorjev *N* in *Q*

Proteina *N* in *Q* sta oba antiterminatorja. Čeprav delujeta po različnih mehanizmih, oba omogočita, da se transkripcija lahko nadaljuje preko mesta terminacije, in sicer *N* omogoča prepisovanje zapoznelyh zgodnjih genov, *Q* pa poznih genov. RNA-polimeraza prepisuje DNA s promotorji  $p_L$  in  $p_R$  zgodnjih genov faga  $\lambda$ , vendar se transkripcija konča, ko naleti na terminatorska mesta. Če se polimeraza tam ustavi, faktor Rho namreč prekine prepisovanje. Pred terminatorskim mestom promotorja  $p_R$  je zaporedje *nutR* (ang. N utilisation rightward), ki skupaj z *N* in proteini *Nus* omogoči nadaljevanje prepisovanja. Ko se *nutR* prepiše v mRNA, se ta veže na RNA-polimerazo, medtem pa se protein *N* prepiše iz gena *N*, ki je pod promotorjem  $p_L$ . Vezava

*nutR* RNA na polimerazo omogoči, da se nanjo veže protein N, pri čemer pomagajo tudi gostiteljski proteini Nus. Kompleks vezanih proteinov in *nutR*-RNA potuje skupaj z RNA-polimerazo in omogoči nadaljevanje transkripcije preko terminacijskih mest. Tak kompleks imenujemo antiterminacijski kompleks (slika 10-21, levo).



Slika 10-21: Antiterminacijski kompleksi s proteinom N (levo) in Q (desno). Brez proteina N se transkripcija iz promotorjev *p<sub>L</sub>* in *p<sub>R</sub>* konča na terminacijskih mestih (A-levo, C-levo). Protein N z antiterminacijskim delovanjem omogoči nadaljevanje transkripcije preko terminatorjev (B-levo). Da se N lahko veže na RNA-polimerazo, se mora nanjo najprej vezati v mRNA prepisano mesto *nut*, pri vezavi pa pomagajo tudi gostiteljski proteini Nus (D-levo). Za vezavo proteina Q na RNA-polimerizo je potrebno zaporedje *qut*, ki je med mestoma -35 in -10 promotorja *P<sub>R'</sub>* (A-desno). Če na DNA na mestu *qut* ni vezanega proteina Q, se RNA-polimeraza ustavi na mestoma -35 in -10 podobnih zaporedijh in transkripcija se konča (B-desno). Če je na DNA na mestu *qut* vezan protein Q, se le-ta veže na RNA-polimerazo in nastane antiterminacijski kompleks (C-desno). Ob proteinu Q se na RNA-polimerizo veže tudi protein NusA; oba Q in NusA se naprej premikata skupaj z RNA-polimerazo.

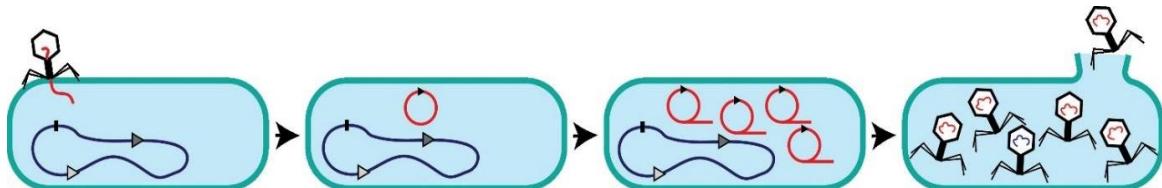
Kot N tudi Q za vezavo na RNA-polimerazo potrebuje specifično zaporedje – mesto *qut* (ang. Q utilisation site). Zaporedje *qut* delno prekriva promotor *P<sub>R'</sub>* in se prepis mRNA s tega promotorja lahko zgodi, samo če je na zaporedje *qut* vezan protein Q. Ko RNA-polimeraza začne prepisovati s promotorja *P<sub>R'</sub>*, se po 16–17 nukleotidih ustavi. Če je na mesto *qut* vezan protein Q, se ta poveže s polimerazo in jo stabilizira. Proteinu Q se pridruži še gostiteljski protein NusA in oba potujeta skupaj z RNA-polimerazo ter preprečujejo terminacijo transkripcije (slika 10-21, desno).

## TRANSDUKCIJA

Transdukcia je horizontalni prenos DNA med bakterijami, ki ga posredujejo bakteriofagi. Fage, ki lahko s transdukcijsko prenašajo DNA, imenujemo transducirajoči fagi. Poznamo splošno, specializirano in lateralno transdukcijsko.

### Splošna transdukcia

Z izrazom splošna transdukcia poenostavljeno označujemo prenos katerekoli regije kromosoma iz ene bakterije v drugo, s fagom. Ko fag okuži celico in vstopi v litični cikel pomnoževanja DNA, se bakterijski kromosom pogosto razgradi. Pri tem se lahko zgodi, da se v kapsido namesto fagnega genoma pakira fragment bakterijske kromosomske DNA ali njen plazmid. Tak transducirajoči delec lahko okuži novo celico. Vezava na za fag občutljivo celico je namreč odvisna le od interakcije med receptorjem na površini bakterijske celice in fagno kapsido. Ker se običajno prenese le del genomske DNA celice, v kateri se je fag prej namnožil, se v transducirani celici ne bodo sintetizirali infektivni fagi. Celico, ki s fagom prejme DNA druge bakterije in v kateri se prenesena DNA obdrži, imenujemo transdiktanta. Po transdukcijski se lahko npr. z rekombinacijo vključi v bakterijski kromosom, če obstajajo mesta homologije. Frekvenca transdukcijske je običajno nizka, saj je pakiranje napačne DNA v kapsido redek dogodek, pri čemer je treba upoštevati, da morajo imeti fragmenti za pakiranje t. i. mesta psevdo-*pac*, to so mestom *pac* podobna zaporedja, ki jih pri pakiranju v kapsido prepozna terminaza (slika 10-22). Prav tako je za nastanek stabilne transdiktante pomembno, da se prenesena DNA v recipientski celici ne razgradi.



Slika 10-22: V fagno kapsido se lahko po naključju vnese del gostiteljskega kromosoma z zaporedjem psevdo-*pac*, ki ga prepozna faga terminaza.

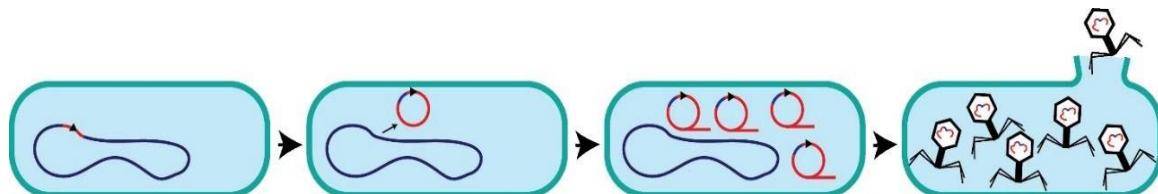
Bakterijski kromosom ali plazmid lahko ob mestih psevdo-*pac* vsebuje tudi mesto psevdo-*cos*; to so mesta, ki so podobna fagnim zaporedjem *cos*. Pri fagu, ki genom pakira po mehanizmu *headful*, je eno mesto psevdo-*pac* dovolj, da bo v fagno glavo pakiran tudi delček bakterijske DNA. Takšni fagi so dobri splošni transducenti. Manjša verjetnost pa je, da bo gostiteljska DNA pakirana zaradi zaporedja psevdo-*cos*, saj bi potrebovala dve taki mesti na razdalji, ki ustreza velikosti genoma faga. Fagi, kot npr.  $\lambda$ , ki imajo tak način pakiranja, zato niso dobri splošni transducenti.

Splošna transdukcia je zaradi prenosov/izmenjave genov pomembna za evolucijo. DNA je v kapsidi bolj zasčitena od gole pri transformaciji, vendar lahko težavo pri prenosu predstavlja specifičnost faga za gostitelja.

### Specializirana transdukcia

Specializirana transdukcia je prenos točno določenih odsekov kromosomske DNA iz ene bakterijske celice v drugo s fagi. Odkrita je bila pri kolifagu  $\lambda$ , saj je zanj značilno, da se lahko vstavi v gostiteljski kromosom. Fag, ki je vstavljen v gostiteljski kromosom in se skupaj z njim razmnožuje, imenujemo profag. Specializirana transdukcia je namreč posledica napačnega izrezanja vstavljenega faga: v kapsido se tako poleg fagnega, običajno okrnjenega genoma pakira še delček bakterijskega kromosoma. Na sliki 10-23 je prikazan potek specializirane transdukcijske. Fagi se vstavijo v kromosom z rekombinacijo med mestoma *att* (ang. attachment site) na bakterijski in

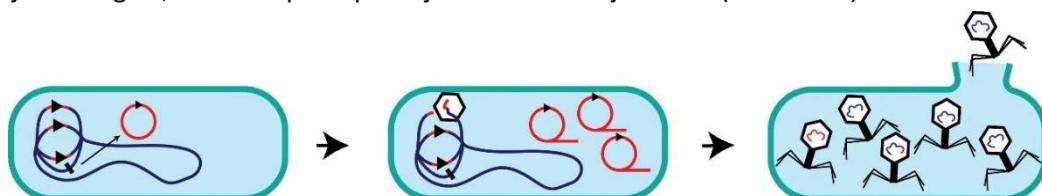
fagni DNA. Pri izrezovanju se lahko zgodi rekombinacija med drugima dvema mestoma, na drugi poziciji. Tako se lahko poleg fagnega genoma izreže del bakterijskega kromosoma, ki leži levo ali desno od mesta vstavitve faga – mesta lizogenizacije. Ker se s takšno transdukcijo pri posmeznem fagu, ki ima lahko eno ali več mest vstavitve v bakterijski kromosom, prenesejo vedno le določeni deli kromosoma – tisti, ki so levo ali desno od mesta lizogenizacije, govorimo o specializirani transdukciji. Frekvenca tovrstnih dogodkov je nizka, ker mora biti razdalja med mesti rekombinacije ustrezna za pakiranje v kapsido.



Slika 10-23: Specializirana transdukcija. Fag se vstavi v kromosom, nato pa se iz njega napočno izreže – posledično se v kapsido pakira okrnjena fagna DNA z delom bakterijskega kromosoma.

### Lateralna transdukcija

Lateralna transdukcija je bila prvič opisana pri bakteriji *Staphylococcus aureus* leta 2018. Ta način horizontalnega prenosa omogoča prenos daljših odsekov bakterijskega kromosoma v recipientsko celico ob pomoči fagov. Fagni genom se začne podvojevati, ko je še integriran v kromosom, običajno s podvojevanjem  $\theta$ . Pomnoženi genom se nato pakira v kapside neposredno iz kromosoma. Pri tem se skoraj vedno zgodi, da se v kapsido pakirajo še deli bakterijske DNA (slika 10-24).



Slika 10-24: Lateralna transdukcija. Poseben mehanizem transdukcije je bil odkrit pri fagu bakterije *S. auerus*.

### Lizogena konverzija

Lizogena konverzija je pojav, pri katerem lizogeni fag spremeni nepatogeno bakterijo v patogeno. Številni fagi imajo v svojem genomu t. i. morone. To so geni, ki sicer niso potrebni za fagne funkcije, ampak so povezani z virulenco ali izboljšanim fitnesom gostiteljske bakterije. Če lizogeni fag v bakterijo prinese morone, ti lahko vplivajo na njen fenotip. Geni, ki bakteriji omogočajo virulenco, imajo običajno svoje regulatorne regije, ki pa so pod nadzorom gostiteljskih regulatornih molekul. Taki geni se v bakteriji izrazijo, ko je ta v evkarionskem gostitelju. Nekaj primerov je opisanih v nadaljevanju.

#### *Escherichia coli*

Primer toksina, ki je zapisan v fagni DNA in spremeni nepatogene seve v patogene, je šigatoksin/verotoksin (Stx/Vtx), značilen predvsem za seve *E. coli* iz seroloških skupin O157:H7 in O26:H11. Ti sevi so povezani s številnimi hudimi črevesnimi obolenji. Sam toksin je sestavljen iz dveh podenot – A in B. Podenota B se veže na specifične celične receptorje in pomaga podenoti A vstopiti v endotelijalne celice gostitelja. Podenota A je po funkciji N-glikozilaza, ki iz evkarionske 28 S rRNA odstrani specifični adenin. To prepreči vezavo elongacijskega faktorja 1 (EF-1 $\alpha$ ) na ribosom in s tem onemogoči translacijo. Izražanje gena za toksin lahko pri bolniku vodi v HUS (hemolitični uremični sindrom), posledica katerega je lahko celo odpoved ledvic.

### *Corynebacterium diphtheriae*

Patogeni sevi bakterije *C. diphtheriae* imajo v kromosom vstavljen profag  $\beta$ , ki ima v svojem genomu gen *tox*. Produkt tega je davični toksin (ang. diphtheria toxin), ki je sestavljen iz dveh podenot (A in B). Podenota B omogoča vnos toksina v evkariotske celice, podenota A pa preprečuje translacijo, in sicer veže ADP na elongacijski faktor 2, kar ga inaktivira. Gen *tox* se izraža samo, ko je *C. diphtheriae* v evkariotskem gostitelju, ali pri nizkih koncentracijah železa. Izražanje namreč nadzorujejo regulatorni dejavniki, katerih geni so na bakterijskem kromosому in ki sicer sodelujejo tudi pri uravnavanju železa v celici.

### *Staphylococcus aureus*

Pri bakteriji *S. aureus* so številni geni za dejavnike virulence del otokov patogenosti (PAI). To so genetski otoki v kromosomu, ki imajo zapise, povezane z virulenco. *S. aureus* je sicer običajni predstavnik človeške kožne mikrobiote, vendar lahko nekateri sevi povzročijo sindrom toksičnega šoka (TSS). Eden izmed toksinov, ki povzročijo ta sindrom, je TSST-1 – superantigen, ki se veže na nevariabilno domeno protiteles in sproži močan imunski odziv. Gen za TSST-1 pogosto najdemo na otoku patogenosti SaPI (ang. *Staphylococcus aureus* pathogenicity island). Bakterija za prenos otoka v sosednje celice izkoristi fage, in sicer se SaPI prenese kot satelitni virus, ki pri podvojevanju in pakiranju potrebuje pomoč drugega faga, ki je okužil celico. Geni na otoku patogenosti zavrejo izražanje genov za podvojevanje fagnega genoma in zmanjšajo velikost kapside, da je primernejša za prenos SaPI kot fagne DNA. Po prenosu se SaPI vstavi v kromosom recipientske celice z integrazo, ki je zapisana na otoku patogenosti. Mehanizem, ki omogoči učinkovitejši prenos otokov patogenosti s fagi, je verjetno predhodno omenjena lateralna transdukacija.

## TEMELJNI POJMI

- Gostiteljsko območje faga – nabor bakterij, ki jih fag lahko okuži.
- Litični cikel – cikel pomnoževanja bakteriofagov, med katerim se v bakterijski celici izgrajujejo novi bakteriofagi, ki se iz celice običajno izločijo ob njeni lizi.
- Lizogeni cikel – cikel pomnoževanja bakteriofagov, med katerim ne nastanejo novi fagi, ampak se podvojuje samo njegova nukleinska kislina.
- Transdukacija – prenos DNA med bakterijskimi celicami ob pomoči bakteriofagov.

## POVZETEK

Bakteriofagi oz. fagi so virusi, ki okužujejo bakterijske celice. Njihov genom je zelo raznovrsten, običajno iz ene ali nekaj molekul nukleinskih kislin, ki jih obdaja proteinska kapsida. Ker se pritrди na točno določene receptorje na površini bakterijskih celic, so precej specifični glede gostitelja. Kot vsi virusi se tudi bakteriofagi razmnožujejo le v bakterijski celici in so bolj ali manj odvisni od gostiteljskih proteinov. Njihov življenjski cikel je lahko litični ali lizogeni. Izražanje fagnih genov je običajno precej uravnavano, in sicer se po okužbi ne izrazijo vsi naenkrat, temveč zaporedno – v kaskadah. Mehanizem podvojevanja fagnega genoma je odvisen od oblike nukleinske kisline in števila verig v vijačnici. Bakteriofag  $\lambda$  je eden najbolj raziskanih kompleksnih virusov. Je temperirani fag, ki se lahko podvojuje na dva načina (kot samostojen fag ali kot profag, torej z dednino, vstavljen v kromosom). V lizogenem ciklu je vključen v bakterijski kromosom, s katerim se tudi podvojuje, v litičnem ciklu pa nastajajo novi fagni delci, ki se iz celice izločijo ob njeni lizi. Glede na čas izražanja lahko gene faga  $\lambda$  razdelimo v tri skupine: takojšnji zgodnji, zapozneli zgodnji in pozni geni. Zaradi svojih značilnosti je fag  $\lambda$  zelo uporaben kot vektor v DNA-tehnologiji. Transdukacija je horizontalni prenos DNA med bakterijami ob pomoči bakteriofagov. Poznamo splošno, specializirano in lateralno transdukциjo. Pri splošni se lahko prenesejo številni deli gostiteljskega kromosoma iz ene bakterije v drugo, pri specializirani pa le deli, ki so levo ali desno

od mesta lizogenizacije. Podobno velja za lateralno transdukcijo, le da je mehanizem te drugačen. S transdukcijo preneseni geni so pogosto povezani z adaptacijo na specifični habitat, evolucijsko pomembni pa so tudi fagi z geni za virulenco, ki so povezani z lizogeno konverzijo.

## 11 OBRAMBA BAKTERIJ PRED BAKTERIOFAGI

Nadja Spasovski, Jerneja Ambrožič Avguštin

### UČNI CILJI

- Spoznati načine, s katerimi se bakterije branijo pred tujo DNA/RNA.
- Razumeti pomen in delovanje sistema CRISPR/Cas.

### UVOD

Bakterije imajo številne mehanizme, s katerimi se branijo pred bakteriofagi. Geni za obrambne sisteme so lahko na kromosomu, tudi npr. na otokih patogenosti ali drugih genetskih otokih, oziroma na mobilnih elementih, kot so fagi in plazmidi.

### Restriktionsko-modifikacijski sistemi

Restriktionsko-modifikacijski sistemi bakteriji omogočajo, da razlikuje med lastno in tujo DNA na podlagi modifikacij dušikovih baz v DNA. Bakterije svojo DNA pred cepitvijo z lastnimi restriktionskimi encimi zaščitijo z modifikacijo DNA (npr. metilacijo baz). Če DNA, ki se vnese v celico, ni spremenjena/zaščitenega (modificirana) na enak način, jo restriktionski encimi razgradijo. Poznamo tudi restriktionske encime, ki cepijo le ob specifično modificiranih bazah. Pogosto jih zasledimo v fagnih genomih, npr. pri fagu T4. Ta ima namesto običajnega citozina hidroksimetil citozin in njegova DNA je odporna proti restriktionskim encimom, ki ob tako modificiranih bazah ne morejo prekiniti vezi, hkrati pa občutljiva za encime, ki cepijo zgolj ob modificiranih bazah.

### Sistem Abi

Sistem Abi (ang. abortive infection) celico po okužbi s fagom ubije in s tem prepreči, da bi se v njej fag namnožil in okužil še sosednje celice. Sistem spominja na apoptozo z virusom okužene celice pri večceličnih evkariontskih organizmih.

Primer sistema Abi je odziv na okužbo s fagom T4 ali njemu sorodnim fagom, pri katerem celica načrtno okvari translacijski sistem. Primer je proteaza Lit, zapisana na nefunkcionalnem fagu e14 v večini sevov *E. coli* K12. Aktivira jo vezava peptida Gol v glavnem kapsidnem proteinu T4, ki se tvori po okužbi s fagi, tako da cepi ribosomski elongacijski faktor EF-Tu, s čimer ustavi translacijo tako fagne kot tudi gostiteljske RNA. Proteaza v neokuženih celicah ni aktivna.

Drugi primer je sistem Rex. Sestavljata ga proteina RexA in RexB, geni zanju pa so na profagu  $\lambda$ . V celici, ki ima v kromosom vstavljen profag  $\lambda$ , se gena *rexA* in *rexB* neprestano izražata, vendar sta njuna proteinska produkta aktivirana šele, ko se celica okuži s številnimi različnimi fagi. Takrat proteina uničita celični membranski potencial, kar vodi v obrnjeno delovanje ATP-sintaze – celica izgublja ATP, dokler zaradi pomanjkanja energije ne propade.

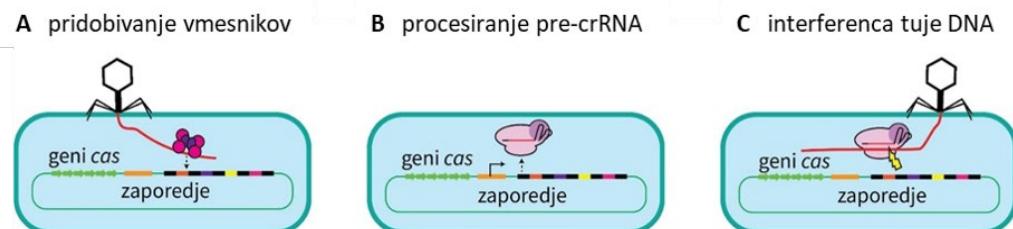
Tretji primer sistema Abi je sistem Prr. Ta za uničenje celice uporablja ribonukleazo (RNazo) PrrC, specifično za lizinsko tRNA ( $tRNA^{Lys}$ ). Zapis za encim je na profagu, ki je soroden fagu P1. RNaza PrrC je večino časa neaktivna, saj je večina molekul vezana na komponento gostiteljskega restriktionsko-modifikacijskega sistema Ecoprrl, preostale pa inaktivira nizka raven deoksitimidin trifofata (dTTP). Po okužbi količina dTTP naraste, saj je potreben za podvojevanje fagnega genoma. Sistem Prr aktivira okužba s fagom T4, saj ima ta v svojem genomu zapis za antirestriktionski peptid Stp, ki inaktivira tudi Ecoprrl. Tako se sprosti RNaza PrrC, ki cepi  $tRNA^{Lys}$  in v celici ustavi translacijo ter s tem prepreči sestavo novih fagov T4. Da bi fag znova mogočil sintezo produktov poznih genov, lahko popravi napako in dobimo ponovno funkcionalno  $tRNA^{Lys}$ .

## Obrambne molekule

Nekatere vrste bakterij iz rodu *Streptomyces* sintetizirajo veliko sekundarnih metabolitov, tudi antibiotikov. Nekateri med njimi v nizkih koncentracijah zavirajo pomnoževanje fagov z dvoverižnim genomom, ne pa tudi gostiteljskih bakterij.

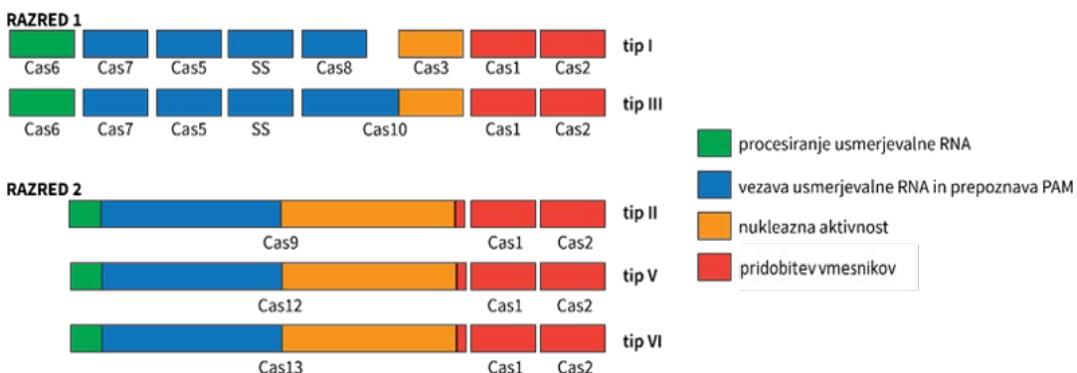
### Sistemi CRISPR/Cas

CRISPR/Cas je pridobljen imunski sistem, ki številne bakterije ščiti pred tujo plazmidno ali fago DNA, v nekaterih primerih tudi RNA. To pomeni, da po preživelji okužbi z npr. fagom bakterija prepozna vdirajočo tujo DNA in jo razgradi. S kratico CRISPR (ang. cluster of regularly interspaced short palindromic repeats) označujemo kromosomski lokus, sestavljen iz vodilnega zaporedja s promotorjem, ki mu sledijo ponovitve enakih, med 25 in 65 bp dolgih palindromskih zaporedij, ki so med seboj ločena s t. i. vmesniki (ang. spacer), dolžine okoli 30 baznih parov. Število ponovitev med sistemi zelo variira (5–500), imajo pa jih skoraj vse arheje in številne bakterije. V neposredni bližini lokusa CRISPR so s sistemom CRISPR povezani geni *cas* (ang. CRISPR associated). Produkti teh omogočijo, da bakterija pridobi vmesnike iz tuje fagne in/ali plazmidne DNA, procesira z lokusa CRISPR prepisano pre-CRISPR-RNA (pre-crRNA) v usmerjevalno crRNA in opravi interferenco, to je prepoznavanje in cepitev tuje DNA (slika 11-1).



Slika 11-1: Skupne značilnosti različnih sistemov CRISPR/Cas. Vsi sistemi CRISPR/Cas vsebujejo naslednje korake: pridobivanje vmesnikov, procesiranje pre-crRNA in interferenca – prepoznavanje in cepitev tuje DNA.

Na podlagi različne zgradbe in mehanizma delovanja lahko sisteme CRISPR/Cas v grobem razdelimo v dva razreda (slika 11-2). Sistemi razreda 1 so kompleksnejši in za cepitev tarčne nukleinske kisline potrebujejo kompleks več efektorskih proteinov, medtem ko so sistemi razreda 2 enostavnnejši – običajno je za cepitev tarčne nukleinske kisline potreben le en efektorski protein (npr. endonukleaza Cas9).

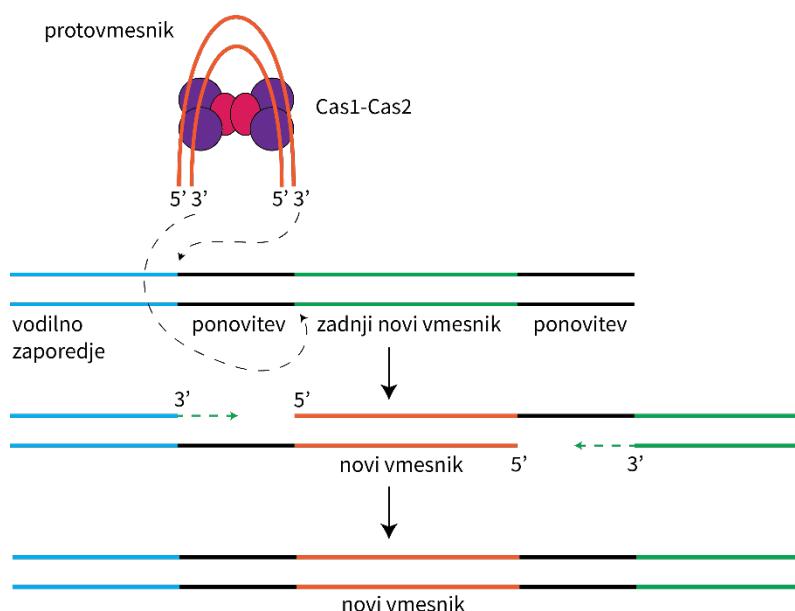


Slika 11-2: Sistemi CRISPR/Cas. V grobem jih lahko razdelimo v dva razreda, pri čemer je sestava sistemov razreda 1 zapletenejša, sestava sistemov razreda 2 pa preprostejša – pogosto en protein oziroma proteinski kompleks opravlja več funkcij.

Vsem sistemom je skupno pridobivanje vmesnikov, procesiranje pre-crRNA in interferenca. Prav tako imajo vsi sistemi proteina Cas1 in Cas2, s katerima pridobivajo vmesnike.

### Sistemi CRISPR/Cas razreda 1

V razred 1 uvrščamo sisteme CRISPR/Cas tipov I, III in IV. Delovanje različnih sistemov razreda 1 običajno poteka po podobnih korakih. Za pridobitev imunosti je nujno, da celica najprej preživi vdor tuje DNA. Pred fagno DNA se lahko brani z restriktijskimi endonukleazami. Nato v fazi adaptacije iz npr. fagnega genoma s proteini pridobi vmesnike Cas, ki se vstavijo med ponovitve v zaporedju CRISPR. Novi vmesniki se v zaporedje CRISPR vključijo v ponovitev, ki je najbližja vodilni regiji, ob genih *cas*, v kateri je promotor (slika 11-3). Vmesnik se v CRISPR vključi tako, da se na obeh koncih ponovitve razcepi ena veriga, tako da nastane zamknjeni rez. Med prekinjeni verigi se nato vstavi novopridobljeni vmesnik, sam mehanizem je podoben transpoziciji. Polimeraza zapolni vrzeli, ki sta nastali zaradi zamknjenega reza, in tako na obeh straneh novega vmesnika nastane nova ponovitev.



Slika 11-3: Vključitev novega vmesnika v zaporedje CRISPR. Na obeh koncih ponovitve, ki je najbližja vodilni regiji, nastane zamknjeni rez, kamor se vstavi nov vmesnik. Ko polimeraza zapolni vrzeli, nastane nova ponovitev.

V naslednji stopnji sledi prepis celotnega zaporedja CRISPR z istega promotorja v vodilni regiji v dolgo pre-crRNA. To eden ali več proteinov Cas procesira v več krajših usmerjevalnih crRNA – vsaka od njih ima zapis za enega od vmesnikov. Nato se crRNA z drugimi proteini Cas poveže v efektorski kompleks, ki prepozna dele fagnega genoma, če se tovrstna DNA znova pojavi v celici. Deli fagne DNA, ki jih prepozna, so namreč enaki vmesnikom, ki jih je pridobila ob prvi okužbi s fagom. Proteini efektorskega kompleksa nato z nukleazno aktivnostjo razgradijo fagno DNA, kar imenujemo interferenca. Pri nekaterih sistemih pa lahko efektorski kompleks aktivira od kompleksa ločeno nukleazo Cas, ki razreže vdirajočo DNA.

Ker je zaporedje vmesnikov CRISPR homologno določenim delom fagnega genoma, se pojavi vprašanje, kako efektorski kompleks loči med vdirajočo in lastno CRISPR-DNA. Predstopno vmesnika, ki je v fagnem genomu, imenujemo protovmesnik (ang. protospacer). Ob protovmesniku je še specifično kratko zaporedje, imenovano PAM (ang. protospacer-adjacent motif). Zaporedje PAM se pri različnih sistemih CRISPR razlikuje, vendar je običajno kratko in ga je zato možno najti na več mestih v različnih fagnih genomih. Pri pridobivanju vmesnikov proteina

Cas1 in Cas2 izbereta zgolj tiste odseke fagne DNA, ki vsebujejo zaporedje PAM, in jih izrežeta iz genoma. Pred vključitvijo v zaporedje CRISPR se zaporedja PAM odstranijo. Ob ponovni okužbi s fagom efektorski kompleks deluje zgolj na DNA, ki vsebuje zaporedja PAM – to je na vstopajočo DNA.

### Sistemi CRISPR/Cas tipa 1

Najpogosteje najdeni sistemi CRISPR/Cas pri bakterijah in arhejah so sistemi tipa 1. Efektorski sistem deluje neodvisno od sistema pridobivanja vmesnikov, ki ga vodita proteini Cas1 in Cas2. Pri procesiranju pre-crRNA v crRNA, ki je del efektorskega kompleksa, sodelujejo številni proteini z različnimi funkcijami. Protein Cas6 cepi pre-crRNA v crRNA, nato pa slednjo prekrije več kopij podenot Cas7. 5'-konec crRNA prepozna Cas5, ki se nato veže še s Cas8. Cas8 prepozna tarčno zaporedje PAM na vstopajoči DNA. Ob vezavi efektorskega kompleksa na DNA se nanjo vežejo še t. i. proteini SS, ki pomagajo pri stabilizaciji kompleksa.

### Sistemi CRISPR/Cas tipa 3

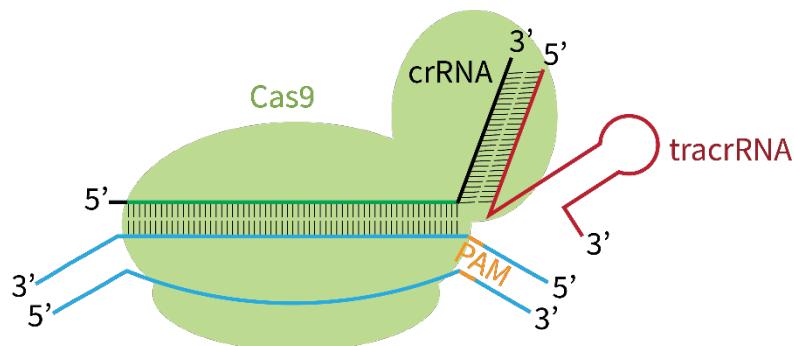
Drugi najpogosteje najdeni sistemi CRISPR/Cas pri bakterijah in arhejah so sistemi tipa 3. Zanje je značilna nukleaza Cas10. Prav tako pa je protein Cas1 povezan z reverzno transkriptazo, kar omogoči prepis RNA v DNA in nato vključitev DNA-vmesnika v zaporedje CRISPR. To je uporabno predvsem pri okužbi s fagi z RNA-genomom.

### Sistemi CRISPR/Cas razreda 2

Za sisteme CRISPR/Cas razreda 2 je značilna enostavnejša sestava – pogosto en protein opravlja več funkcij. Zaradi svoje vloge v genetskem inženirstvu je najbolj znan sistem CRISPR/Cas tipa 2 z efektorskim proteinom Cas9. Pridobivanje vmesnikov s proteini Cas1 in Cas2 je usklajeno z efektorskim proteinom Cas9, ki je odgovoren za procesiranje pre-crRNA in interferenco. Poleg crRNA je potrebna še dodatna transaktivacijska crRNA – tracrRNA (trans-activating CRISPR RNA), ki je del efektorskega kompleksa. Pri uporabi v genetskem inženirstvu se zaradi lažjega dela veže crRNA in tracrRNA v skupno tracrRNA-crRNA oziroma usmerjevalno RNA (sgRNA).

### Sistemi CRISPR/Cas tipa 2

Sistemi tipa 2 so pri bakterijah tretji najpogostejši sistemi CRISPR/Cas, medtem ko pri arheah še niso odkriti. Zanje je značilno, da je pridobivanje vmesnikov s Cas1 in Cas2 usklajeno z efektorskim proteinom Cas9, ki je odgovoren za procesiranje pre-crRNA in samo interferenco ter nadomešča efektorski kompleks. Prav tako je za delovanje efektorskega kompleksa poleg crRNA potrebna še tracrRNA, ki se pari z delom ponovitve na crRNA (slika 11-4).



Slika 11-4: Vezava tracrRNA s tarčno DNA pri sistemu CRISPR/Cas tipa 2.

Sistemi tipa 2 so znani predvsem zaradi svoje vloge pri genetskem inženirstvu. Sistem se namreč uporablja za urejanje genomov, saj omogoča, da DNA prerežemo na točno določenem mestu in tam uvedemo mutacijo. Če želimo DNA prerezati v specifičnem zaporedju, ustvarimo sintetično usmerjevalno crRNA – sgRNA (ang. synthetic guide RNA). V sgRNA sta crRNA z izbranim zaporedjem in tracrRNA zaradi lažjega dela povezani. Protein Cas9 naredi zarezo na mestu, ki je homologno crRNA. Prerezano DNA celica skuša popraviti, pri čemer prihaja do napak, zato bodo na tistem mestu nastale mutacije.

#### Sistemi CRISPR/Cas tipa 5 in 6

Sistemi CRISPR/Cas tipa 5 in 6 so za zdaj precej redko najdeni. Tudi pri njih je efektorski kompleks nadomeščen z enim efektorskim proteinom – Cas12 (sistem tipa 5), ki v tarčni DNA naredi zamaknjeni rez, in Cas13, ki cepi enoverižno tujo RNA (sistem tip 6). Nukleaza Cas12 najverjetneje izhaja z insercijskega zaporedja, ribonukleaza Cas13 pa iz toksinskega dela sistema TA (toksin-antitoksin).

#### TEMELJNI POJMI

- Restriktionsko-modifikacijski sistemi – bakterijski sistemi za prepoznavanje tuje DNA na podlagi modifikacij dušikovih baz in cepitve le-te ob mestu modifikacije za zaščito lastne DNA.
- Sistem Abi – bakterijski sistem za obrambo pred bakteriofagi, ki okuženo celico ubije.
- Sistemi CRISPR/Cas – adaptivni imunski sistemi bakterij, s katerimi te na podlagi vstavljenih fragmentov tuje DNA v lastni genom ob ponovem stiku razgradijo enako vstopajočo DNA.

#### POVZETEK

Bakterije imajo številne sisteme, s katerimi se branijo pred tujo, npr. fagno in plazmidno DNA. Restriktionsko-modifikacijski sistemi bakteriji omogočajo, da razlikuje med lastno in tujo DNA na podlagi modifikacij dušikovih baz v DNA. Sistem Abi celico po okužbi s fagom ubije in s tem prepreči, da bi se v njej fag namnožil in okužil druge celice. Sistemi CRISPR/Cas pri bakterijah in arhejah predstavljajo adaptivni imunski sistem, ki jim omogoča zaščito pred tujo DNA. Sisteme CRISPR/Cas lahko v grobem razdelimo v dva razreda, vsem pa je skupno to, da iz tuje (npr. fagne) DNA pridobivajo fragmente – vmesnike, ki jih vstavijo med ponavljajoča se kratka palindromska zaporedja lokusa CRISPR v bakterijski genom. Na podlagi vmesnikov prepisane in procesirane crRNA prepoznajo vstopajočo DNA, s katero so že bile v stiku, in jo razgradijo. Zaradi svoje vloge pri preurejanju genomov v genskem inženirstvu je najbolj znan sistem CRISPR/Cas tipa 2 iz razreda II z efektorskim proteinom Cas9.

## 12 URAVNAVANJE IZRAŽANJA GENOV PRI BAKTERIJAH

Lara Krampač, Jerneja Ambrožič Avguštin

### UČNI CILJI

- Spoznati razliko med stalnim – konstitutivnim izražanjem in uravnavanim izražanjem genov.
- Razumeti pomen uravnavanja izražanja genov za bakterije.
- Spoznati različne ravni izražanja genov pri bakterijah.
- Razumeti koncept operona.
- Razumeti koncept pozitivnega in negativnega uravnavanja.
- Spoznati in razumeti primere uravnavanja na ravni iniciacije in elongacije prepisovanja.
- Spoznati in razumeti primere uravnavanja izražanja genov na ravni stabilnosti mRNA in translacije.
- Razumeti, zakaj je aktivnost nekaterih genskih produktov smiselno uravnavati s posttranslacijskimi modifikacijami.

### UVOD

Informacije za sintezo proteinov in molekul RNA, ki so zapisane v DNA, omogočajo razvoj in delovanje organizmov. Nekatere proteine oziroma molekule RNA celice potrebujejo ves čas, zato se geni za njihovo sintezo izražajo stalno ali konstitutivno, produkte drugih pa celica potrebuje občasno. Zato so za celico ključni mehanizmi uravnavanja izražanja genov, ki omogočajo časovno primerno in usklajeno izražanje genov, odvisno od dejavnikov v okolju in sami celici. Posamezni geni so lahko uravnavani samostojno (monocistronske enote) ali pa skupaj z enim ali več drugimi geni v operonu (polycistronske enote). Za skupno uravnavanje skupine genov ali operonov skrbijo globalni regulatorni mehanizmi. Uravnavanje izražanja genov pri bakterijah omogoča predvsem fleksibilnost odgovora celice na spremembe v zunanjem okolju. Pri večceličnih organizmih pa je uravnavanje ključno predvsem za celično diferenciacijo.

### Ravni uravnavanja izražanja genov

Uravnavanje izražanja genov pri bakterijah poteka na sledečih ravneh:

1. struktura kromatina,
2. transkripcija,
3. procesiranje RNA (vpliva tako na stabilnost mRNA kot tudi na učinkovitost in hitrost translacije),
4. translacija,
5. posttranslacijske modifikacije.

### Uravnavanje izražanja genov na ravni strukture kromatina

O vplivu strukture kromatina je že zelo veliko znanega pri evkariontih, pri katerih je povezana z epigenetskim uravnavanjem izražanja genov. Raziskovalci čedalje pogosteje ugotavljajo, da predvsem remodeliranje kromatina, ki ga omogočajo proteini NAP, tudi pri bakterijah pomembno vpliva na izražanje genov.

### Uravnavanje izražanja genov na ravni transkripcije

Pozitivno in negativno uravnavanje na ravni prepisovanja

Kadar lahko z določenimi regulatornimi molekulami spodbudimo izražanje genov, govorimo o pozitivnem uravnavanju. Regulatorni protein, ki spodbudi prepisovanje, imenujemo aktivator.

## Poglavlje 12

Kadar lahko z regulatornimi molekulami izražanje genov inhibiramo, temu pravimo negativno uravnavanje. Regulatorni protein, ki prepisovanje utiša, je represor.

Delovanje aktivatorjev in represorjev lahko dodatno spremeni vezava nekaterih molekul. Molekula, ki z aktivacijo aktivatorja ali inaktivacijo represorja spodbudi izražanje genov, je induktor. Nasprotno je molekula, ki z aktivacijo neaktivnega represorja (aporesorja) ali inaktivacijo aktivatorja izražanje genov utiša, imenovana koresor.

Regulatorni proteini, ki se povežejo z določenim nukleotidnim zaporedjem v DNA, pogosto vsebujejo motiv HTH (ang. helix-turn-helix, HTH). Prva 7–9 nukleotidov dolga vijačnica je od druge, enako dolge, ločena z okoli štirimi aminokislinami. Ko se protein veže na DNA, druga vijačnica leži v velikem žlebu in lahko tvori vodikove vezi s specifičnimi bazami.

### Operon

Skupine bakterijskih strukturnih genov, ki se prepisujejo skupaj, in pripadajoče zaporedje promotorja in drugih zaporedij, ki uravnavajo prepisovanje, imenujemo operon. Ne spada pa vanj regulatorni gen, ki ima lastno regulatorno regijo.

Operoni so lahko inducibilni ali represibilni. Pri inducibilnih v izhodiščnem stanju prepisovanja ni. Določene spremembe lahko prepisovanje spodbudijo/inducirajo. Pri represibilnih operonih v izhodiščnem stanju prepisovanje običajno poteka, ob določenih spremembah pa se ustavi.

### Prvi podatki o uravnavanju izražanja genov – laktozni operon (*operon lac*)

Model operona sta leta 1961 opisala Francois Jacob in Jaques Monod s sodelavci. Z njim sta razložila genetsko ozadje uravnavanja razgradnje lakteze pri *E. coli*. Ob začetku raziskav jima je bilo znano, da bakterija sintetizira encime za razgradnjo lakteze le, če je ta prisotna v njenem okolju. Analizirala sta dve vrsti mutant. Mutante *lac* niso bile zmožne rasti v gojišču z laktezo kot edinim virom energije, konstitutivne mutante pa so sintetizirale encime za razgradnjo lakteze, tudi če je gojišče ni vsebovalo. Obstoj konstitutivnih mutant je bil prvi namig, da je uravnavanje operona *lac* negativno.

Jacoba in Monoda je zanimalo tudi, ali mutacije prizadenejo *trans*-delujuče genske produkte ali *cis*-delujuča zaporedja. Da bi to izvedela, sta morala ugotoviti, ali je posamezna mutacija dominantna ali recesivna. Ker so bakterije haploidni organizmi, sta »delno diploidnost« za nekatere gene dosegla z vstavitvijo plazmida F' z ustreznimi geni in pripravila vrsto komplementacijskih poskusov, na podlagi katerih sta prišla do svojih zaključkov. Načeloma velja, da se mutaciji lahko komplementirata, če sta v različnih *trans*-delujučih genih (vplivata na različni regulatorni molekuli), ne pa, če sta v istem genu ali pa je ena v *cis*-delujučem regulatornem zaporedju. Glede na učinek mutacije v regulatornem genu lahko sklepamo, ali je uravnavanje negativno ali pozitivno. Npr., mutacija v genu za regulatorno molekulo, zaradi katere se ta ne more več vezati na regulatorno zaporedje, običajno vodi v konstitutivno izražanje, če je uravnavanje negativno (mutacija v genu za represor), oziroma utišanje, če je uravnavanje pozitivno (mutacija v genu za aktivator). Če je uravnavanje negativno, lahko tudi mutacije v operatorski *cis*-regulatorni regiji vodijo v konstitutivno izražanje strukturnih genov, saj je onemogočena vezava represorja.

### Negativno uravnavanje izražanja genov

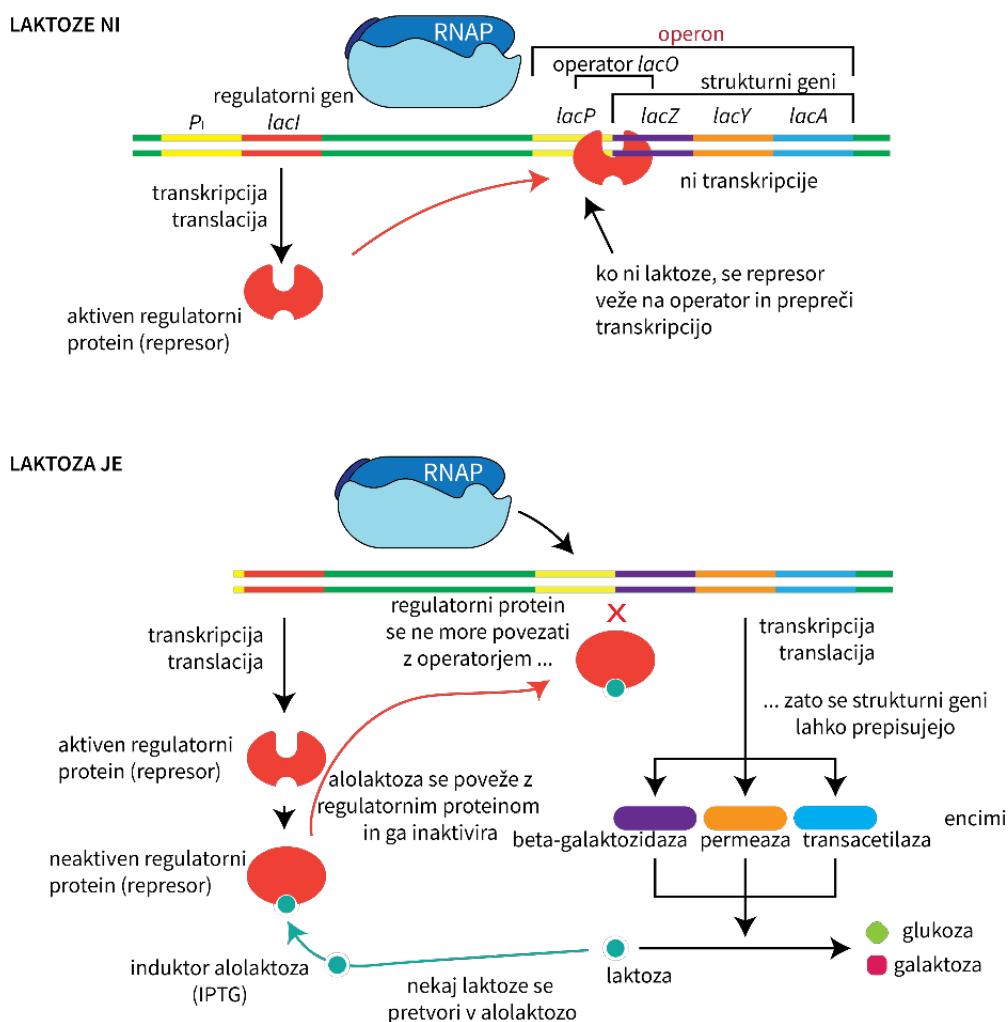
Negativno uravnavanje je pogosteje povezano z izražanjem genov za encime, ki sodelujejo pri katabolnih reakcijah – reakcijah razgradnje substratov. Regulatorna molekula je represor, ki lahko deluje na različne načine.

### Mehanizmi delovanja represorjev:

1. Najpogosteje se operatorsko zaporedje prekriva s promotorskim, tako da vezava represorja onemogoči vezavo RNA-polimeraze.
2. Vezava represorja povzroči upogibanje DNA v promotorski regiji, kar prepreči vezavo RNA-polimeraze.
3. Represor zadrži RNA-polimerazo na promotorju in prepreči elongacijo prepisovanja.

### Zgradba in uravnavanje operona *lac*

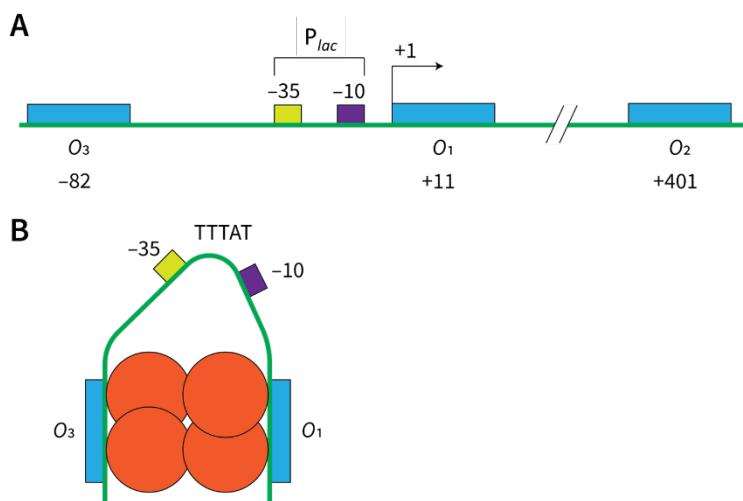
Poenostavljena zgradba operona *lac* je prikazana na sliki 12-1. Promotorski in operatorski regiji sledijo trije strukturni geni – *lacZ*, *lacY* in *lacA*. Gen *lacZ* kodira encim  $\beta$ -galaktoizidazo, ki omogoča razgradnjo laktoze v glukozo in galakozo ali induktor alolaktoze. V tehnologiji rekombinantne DNA se kot induktor namesto laktoze uporablja IPTG (izopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktoperiranozid). Gen *lacY* ima zapis za encim permeazo, ki omogoča vnos laktoze v celico, *lacA* pa za encim acetiltransferazo. Regulatorni gen za represor ni del operona in se prepisuje iz lastne regulatorne regije s svojo uravnavo.



Slika 12-1: Podrobnejši prikaz delovanja operona *lac*.

Operon *lac* je primer negativno uravnavanega inducibilnega operona. Uravnavanje izražanja genov operona *lac* je odvisno od razpoložljivosti laktoze in je prikazano na sliki 12-1. Kadar bakterija laktoze nima na razpolago oziroma v celici ni induktorja alolaktoze, je regulatorni protein – represor LacI – aktiven in se veže na operatorsko regijo. Ker se zaporedje operatorja prekriva s 3'-koncem promotorja in 5'-koncem prvega strukturnega gena, vezava represorja onemogoči vezavo RNA-polimeraze (RNAP) in s tem transkripcijo strukturnih genov operona. Ker je represor alosterični protein, v prisotnosti laktoze oziroma vezave alolaktoze spremeni obliko in posledično sposobnost vezave na operatorsko regijo. Zato se lahko RNAP veže na promotor in začne se transkripcija strukturnih genov *lacZ*, *lacY* in *lacA*.

Dolga leta so raziskovalci mislili, da je v operonu *lac* samo eno operatorsko mesto. Kasnejše raziskave so pokazale, da so operatorska mesta tri, in sicer  $o_1$ ,  $o_2$  in  $o_3$  (slika 12-2, A). Operator  $o_1$ , ki leži najbliže promotorju, je bil opisan najprej. Kot že omenjeno, vezava represorja na  $o_1$  onemogoči vezavo RNAP. Danes se domneva, da operator  $o_1$  deluje v kombinaciji z  $o_2$  in/ali  $o_3$ . Represor LacI namreč lahko tvori tetramer, ki se poveže z dvema operatorjema hkrati. Na sliki 12-2, B, je prikazana povezava med  $o_1$  in  $o_3$ , tvorba tertramera in posledičen upogib promotorske regije, kar onemogoči vezavo RNAP (pravilna lega faktorja  $\sigma$  – glej transkripcijo), hkrati pa se stabilizira tudi vezava represorja na DNA.



Slika 12-2: Lega operatorjev  $o_1$ ,  $o_2$  in  $o_3$  (A) ter upogibanje DNA v promotorski regiji z vezavo tetramera LacI (B).

#### Odziv na druge vire ogljika – katabolna represija

Operon *lac* ni uravnavan samo z razpoložljivostjo laktoze, temveč tudi drugih virov ogljika, čemur pravimo katabolna represija. Ta proces preprečuje izražanje genov za razgradnjo sekundarnih virov ogljika (laktoze), kadar je na razpolago boljši vir (glukoza). Katabolna represija, kljub imenu, temelji na transkripcijskem aktivatorju CAP (ang. catabolite activator protein), ki je znan tudi pod imenom Crp (ang. cyclic AMP receptor protein) ter majhni efektorski molekuli cAMP (pri *E. coli* in sorodnih enterobakterijah).

Encim adenilat ciklaza pretvori molekulo ATP v ciklični AMP (cAMP) in difosfat; cAMP se nato poveže s proteinom CAP, ki se je na DNA tako sposoden vezati navzgor (ang. upstream) od promotorja in spodbuditi iniciacijo prepisovanja. Ker glukoza inhibira delovanje tega encima, v njeni prisotnosti koncentracija cAMP pada. Ker se cAMP ne poveže s CAP, ni dodatne aktivacije prepisovanja genov operona *lac*.

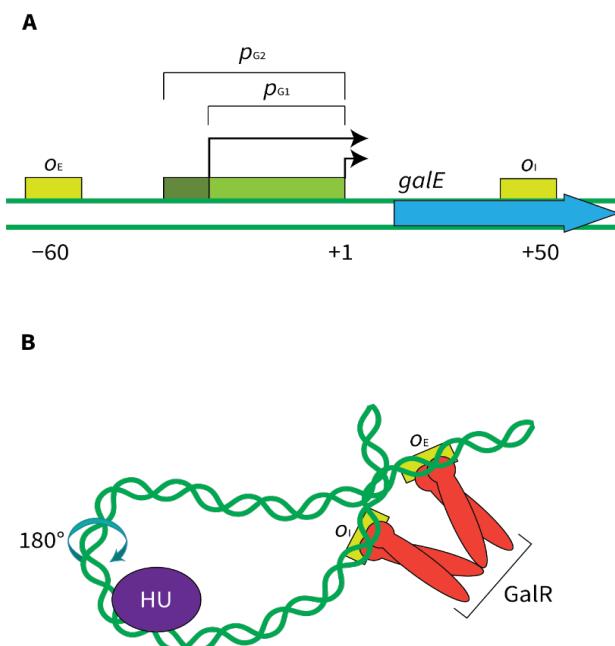
### Zgradba in uravnavanje galaktoznega operona (operona *gal*)

Primer negativno uravnavanega inducibilnega operona je tudi operon *gal* pri *E. coli*. Produkti njegovih strukturnih genov sodelujejo pri pretvorbi/razgradnji galaktoze v glukozo, ki jo bakterija nato metabolizira z glikolizo. Geni so inducirani le, če je v gojišču/okolju galaktoza, saj je vezava represorja v tem primeru onemogočena.

Operon *gal* ima dva promotorja  $p_{G1}$  in  $p_{G2}$ , operatorja  $o_E$  (notranji) in  $o_E$  (zunanji) ter strukturni geni *galE* (encim UDP-galaktozna 4-epimeraza), *galT* (galaktoza-1-fosfat-uridiltransferaza) in *galK* (galaktokinaza).

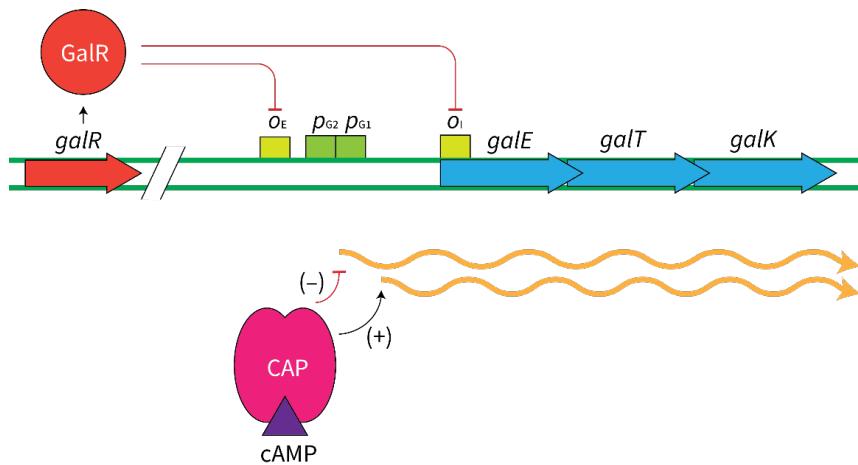
Prepisovanje strukturnih genov *galE*, *galT* in *galK* se začne s promotorjem  $p_{G1}$  in  $p_{G2}$ . Za metabolizem galaktoze sta pomembna še gen *galU* in permeazni gen, ki pa sta dislocirana in nista del operona. Od operona sta odmaknjena tudi oba represorska gena *galR* in *galS*. Za represorja GalR in GalS velja, da sta se oba zmožna povezati z galaktozo, za represijo večine genov pa je pomembnejši prvi. GalS je pomemben predvsem pri genih, katerih produkti skrbijo za transport galaktoze v celico.

Za uspešno uravnavanje sta potrebna oba operatorja,  $o_E$  in  $o_E$ . Do represije pride, ko se dva dimera represorja GalR vežeta na operatorski zaporedji in hkrati povežeta med seboj, kar vodi v upogib DNA v promotorski regiji. 180-stopinjsko zanko stabilizira DNA-vezavni protein HU in nastane kompleks, imenovan represosom. Če je na operatorsko zaporedje vezan samo eden od represorjev, lahko to še vedno do neke mere omeji prepisovanje, vendar brez upogibanja promotorske regije represija ni tako učinkovita (slika 12-3).



Slika 12-3: Podrobnejši prikaz položaja obeh promotorjev in operatorjev operona *gal* (A) ter represosoma (B).

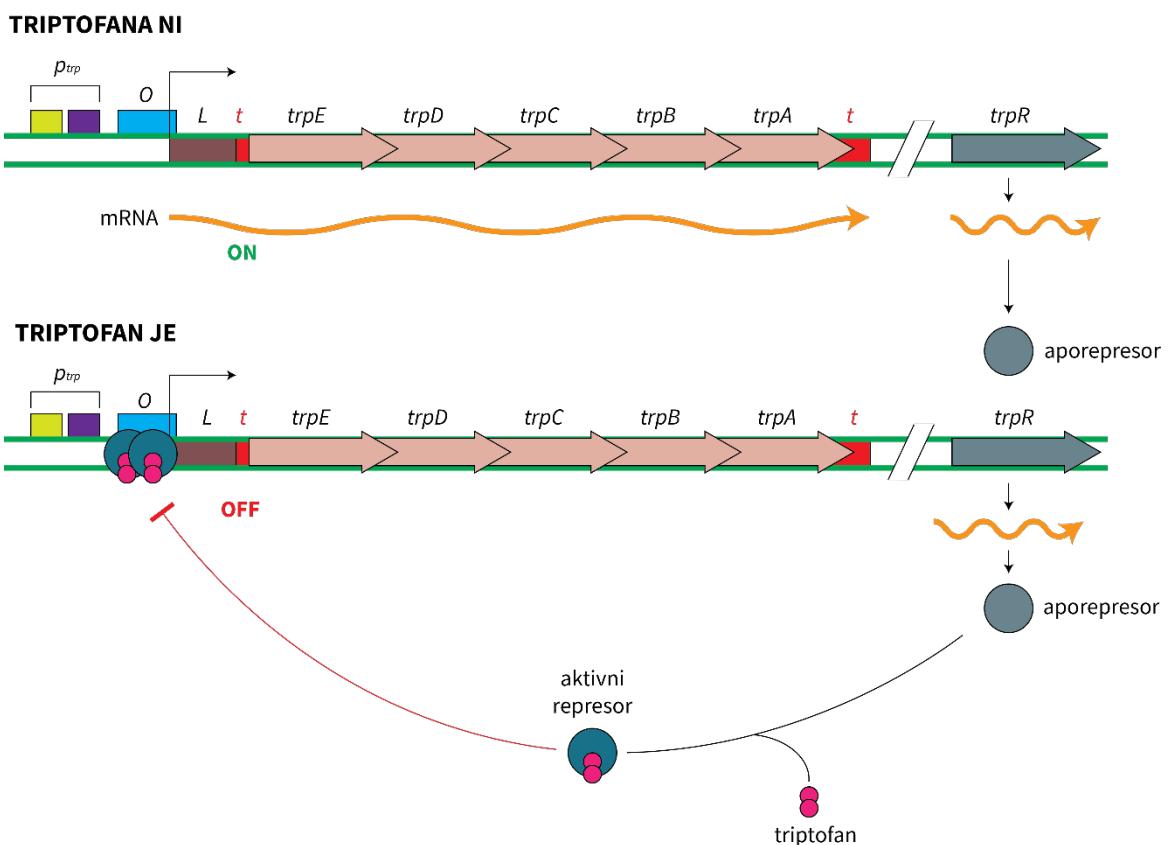
Operon *gal* je uravnavan tudi s katabolno represijo (glej operon *lac*), vendar glukoza ne vpliva na oba promotorja (slika 12-4). Aktivira transkripcijo s  $p_{G1}$  (označeno s + na sliki 12-4) in zavira transkripcijo s  $p_{G2}$  (označeno z - na sliki 12-4). Prepisovanje s tega promotorja je v prisotnosti glukoze šibko, drugi promotor pa je aktivен v vsakem primeru. Čeprav je s katabolno regulacijo uravnavan le eden od promotorjev, pa sta v odsotnosti galaktoze oba reprimirana.



Slika 12-4: Uravnavanje operona *gal* z vezavo represorja GalR na operatorja, utišanje prepisovanja s promotorja  $p_{G2}$  s katabolno represijo.

#### Zgradba in negativno uravnavanje triptofanskega operona (operon *trp*)

Leta 1953 so Monod in sodelavci prvič odkrili primer represibilnega operona. Gre za operon *trp* z geni, katerih produkti sodelujejo pri biosintezi aminokisline triptofana, kadar ga bakterija nima na voljo. Njegova zgradba je prikazana na sliki 12-5.



Slika 12-5: Zgradba in uravnava triptofanskega operona, glede na razpoložljivost triptofana.

Operon *trp* sestavljača promotor  $p_{trp}$ , operator ter regija, ki se prepiše. V slednji je zapis za vodilni peptid ter strukturni geni *trpE*, *trpD*, *trpC*, *trpB* in *trpA*. Vseh pet strukturnih genov se prepisuje s

promotorja  $p_{trp}$ . Kadar triptofana ni na razpolago, je aporepresor TrpR neaktivnen. Ker se njegovi  $\alpha$ -vijačnici ne moreta uspešno pozicionirati za vezavo na DNA, se ne more vezati na operator. Vezava triptofana spremeni njuno konformacijo tako, da je interakcija med aporepresorjem in DNA operatorja mogoča. Ker se posledično RNAP ne more vezati na promotor, je prepisovanje genov operona  $trp$  preprečeno. Gen za represor,  $trpR$ , je nekoliko oddaljen od operona.

### Pozitivno uravnavanje izražanja genov

Prepisovanje strukturnih genov s pozitivno uravnavanih operonov poteka le, kadar je prisoten aktivzen aktuator.

#### Mehanizmi delovanja aktivatorjev:

1. Aktuatorji pogosto delujejo tako, da povečajo jakost vezave RNA-polimeraze na promotor.

RNA-polimeraze imajo lahko nizko afiniteto do promotorjev zaradi:

a. odsotnosti ali spremenjenega skupnega zaporedja v promotorju na mestu  $-35$ , kar vodi v slabši stik med faktorjem  $\sigma$  in RNAP in promotorjem; ta stik izboljša vezava in interakcija aktuatorja z RNAP;

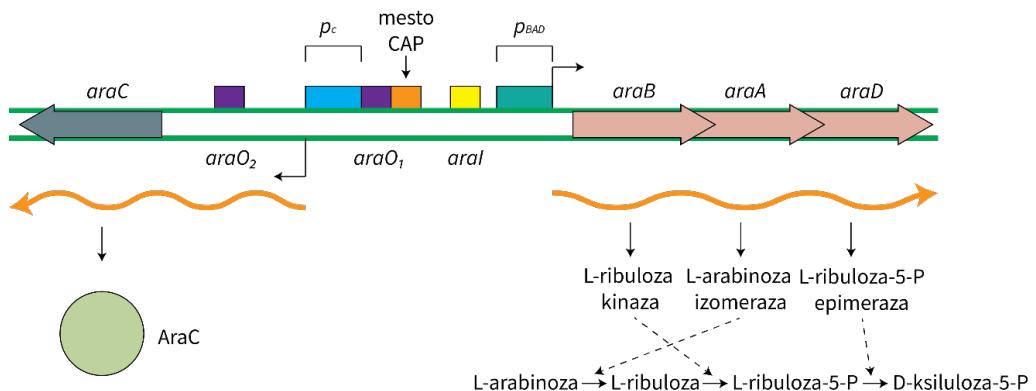
b. aktuator lahko deluje preko neposredne interakcije s faktorjem  $\sigma$ ;

2. Če je interakcija med promotorjem in RNAP premočna, tako da je onemogočen prehod v fazo elongacije transkripcije, pa lahko aktuatorji prevzamejo vlogo represorja.

### Zgradba in uravnavanje arabinoznega operona (operon *ara*)

Arabinozni operon spada med pozitivne inducibilne sisteme. Odgovoren je za pretvorbo L-arabinoze v D-ksilulozo-5-fosfat, ki se kasneje vključi v druge metabolne poti. Encimi za razgradnjo D-arabinoze so v drugem operonu.

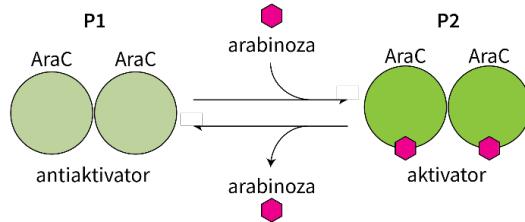
Slike 12-6 je razvidno, da je operon *ara* sestavljen iz treh strukturnih genov *araB*, *araA* in *araD*, ki se prepišejo s promotorja  $p_{BAD}$ . Pred njimi leži aktivatorska regija *araI*, sestavljena iz dveh cis-regulatornih zaporedij: *araI<sub>1</sub>* in *araI<sub>2</sub>*. Navzgor od *araI* je CAP-vezavno mesto, ki ima pomembno vlogo pri katabolni regulaciji. Sledita operatorski mesti *araO<sub>1</sub>* in *araO<sub>2</sub>*, ki ju loči promotorska regija gena za regulatorni protein AraC,  $p_c$ . AraC se prepisuje s promotorja  $p_c$  v obratni smeri kot *araB*, *araA* in *araD* s promotorja  $p_{BAD}$ .



Slika 12-6: Zgradba operona *ara*.

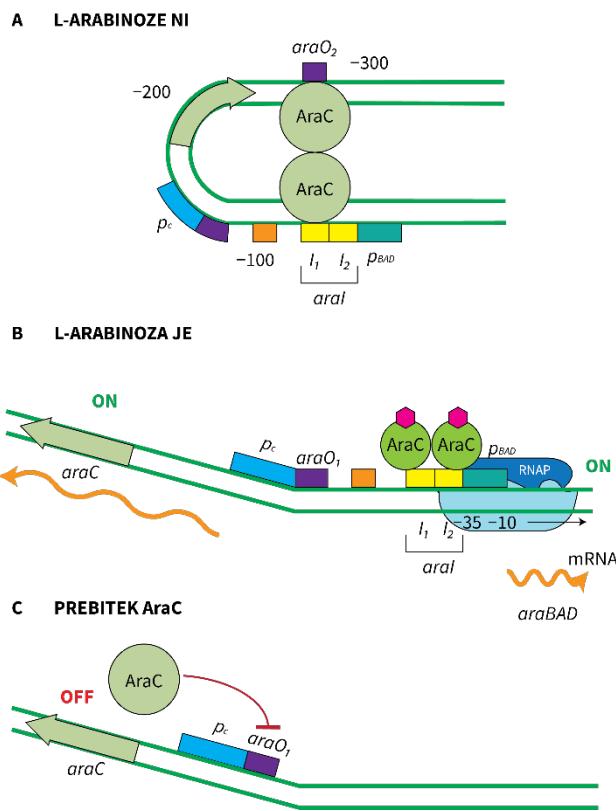
## Poglavlje 12

Regulatorni protein AraC se pojavlja v dveh oblikah, P1 in P2 (slika 12-7), odvisno od razpoložljivosti arabinoze.



Slika 12-7: AraC je lahko v dveh oblikah, P1 in P2.

Uravnavanje operona *ara* je prikazano na sliki 12-8. Obliki AraC imata pri uravnavanju operona različni vlogi. Kadar v gojišču ni arabinoze, je AraC v obliki P1 in ima vlogo antiaktivatorja. Oblika AraC P1 se prednostno veže na *araO<sub>1</sub>* in *araI<sub>1</sub>*. Ta interakcija priomore k upogibanju DNA in represiji prepisovanja. Izzankanje DNA poleg prepisovanja strukturnih genov inhibira tudi prepisovanje gena za AraC s promotorja *p<sub>C</sub>*. Kadar je L-arabinoza razpoložljiva, je regulatorni protein v obliki P2 in deluje kot aktivator, saj se prednostno veže na *araI<sub>1</sub>* in *araI<sub>2</sub>* (za aktivacijo je obvezna vezava AraC na *araI<sub>2</sub>*). Če je protein AraC v prebitku, je ta uravnovan s transkripcijsko avtoregulacijo. Prepisovanje gena *araC* je v odsotnosti arabinoze zvrsto zaradi upogibanja DNA. Ko je arabinoza zopet na voljo, promotor *p<sub>C</sub>* ni več upognjen in prepisovanje lahko poteka. Če koncentracija AraC postane previsoka, se veže na *araO<sub>1</sub>* in ustavi prepisovanje lastnega gena s *p<sub>C</sub>*.



Slika 12-8: Vloga AraC pri uravnavanju prepisovanja genov promotorjev *p<sub>BAD</sub>* in *p<sub>C</sub>*, če L-arabinoze ni na razpolago (A) in če je arabinoza na razpolago (B). Na sliki C je prikazana inhibicija prepisovanja *araC* s promotorja *p<sub>C</sub>* ob presežku AraC.

### Katabolno uravnavanje arabinoznega operona

Razpoložljivost drugih virov ogljika (npr. glukoze) vpliva tudi na uravnavanje operona *ara*. Protein CAP se v odsotnosti glukoze veže na CAP-vezavno mesto. Njegova vezava pripomore k odprtju zanke, ki je nastala kot posledica vezave AraC na *araO<sub>2</sub>* in *araI<sub>1</sub>*. Odprtje zanke lahko prepreči vezavo AraC na *araO<sub>2</sub>* in *araI<sub>1</sub>* ter spodbudi njegovo vezavo na *araI<sub>1</sub>* in *araI<sub>2</sub>*. Odsotnost glukoze oz. boljšega vira ogljika od arabinoze torej spodbudi izražanje genov operona *ara*.

Regulatorna regija operona *ara*, vključno s promotorjem  $p_{BAD}$ , je pogosto del ekspresijskih vektorjev. Ker brez arabinoze skoraj ni transkripcije na promotor vezanih genov, je primeren za proizvodnjo problematičnih/toksičnih proteinov.

### Uravnavanje operonov za sintezo (operon *fab*) in razgradnjo (operon *fad*) maščobnih kislin

V operonu *fab* bakterije *E. coli* so geni, katerih produkti sodelujejo pri sintezi maščobnih kislin, v operonu *fad* pa geni, katerih produkti sodelujejo pri njihovi razgradnji. Oba operona za uravnavanje uporablja regulatorni protein FadR, vendar v dveh različnih vlogah.

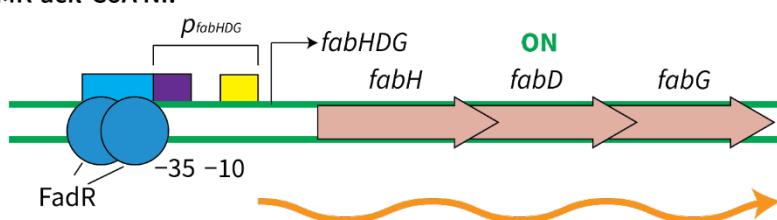
Pri operonu *fab* je FadR transkripcijski aktivator, ki se kot tak veže navzgor, pred promotor, in spodbuja prepisovanje (slika 12-9). Končni produkt gena tega operona so maščobne kisline (MK). Pri njihovi sintezi je ključen MK-acil-CoA. Ta ima vlogo korepresorja, saj se veže na aktivator FadR in ga inaktivira, prepreči namreč njegovo vezavo na DNA. To pomeni, da kadar je končnega produkta te metabolne poti dovolj, sinteza encimov, ki pri njej sodelujejo, ne bo potekala. Operon *fab* je torej primer pozitivnega uravnavanja represibilnega operona.

### POZITIVNO URAVNAVANJE REPRESIBILNEGA OPERONA GENI, POVEZANI S SINTEZO MAŠČOBNIH KISLIN

MK-acil-CoA JE:



MK-acil-CoA NI:

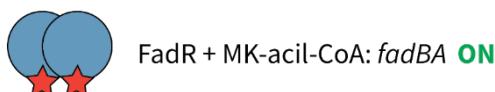


Slika 12-9: Uravnavanje izražanja operona *fab* s FadR.

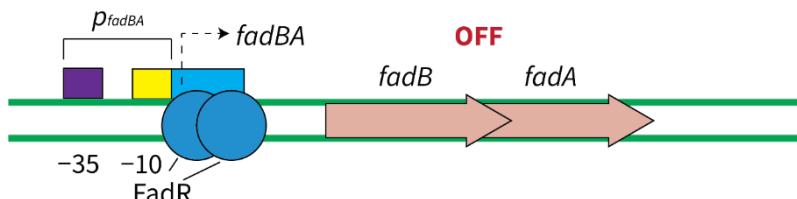
Pri operonu *fad* protein FadR prevzame vlogo represorja (slika 12-10). Ob nizki koncentraciji MK se veže na DNA tako, da onemogoči vezavo RNA-polimeraze in s tem preprečuje prepisovanje. Kadar je prisoten induktor MK-acil-CoA, represor postane neaktivni in geni, katerih produkti so odgovorni za razgradnjo maščobnih kislin, se lahko zopet prepisujejo. Operon *fad* je primer negativne inducibilne uravnave.

## NEGATIVNO URAVNAVANJE INDUCIBILNEGA OPERONA GENI, POVEZANI Z RAZGRADNJO MAŠČOBNIH KISLIN

MK-acil-CoA JE:



MK-acil-CoA NI:



Slika 12-10: Uravnavanje izražanja operona *fad* s FadR.

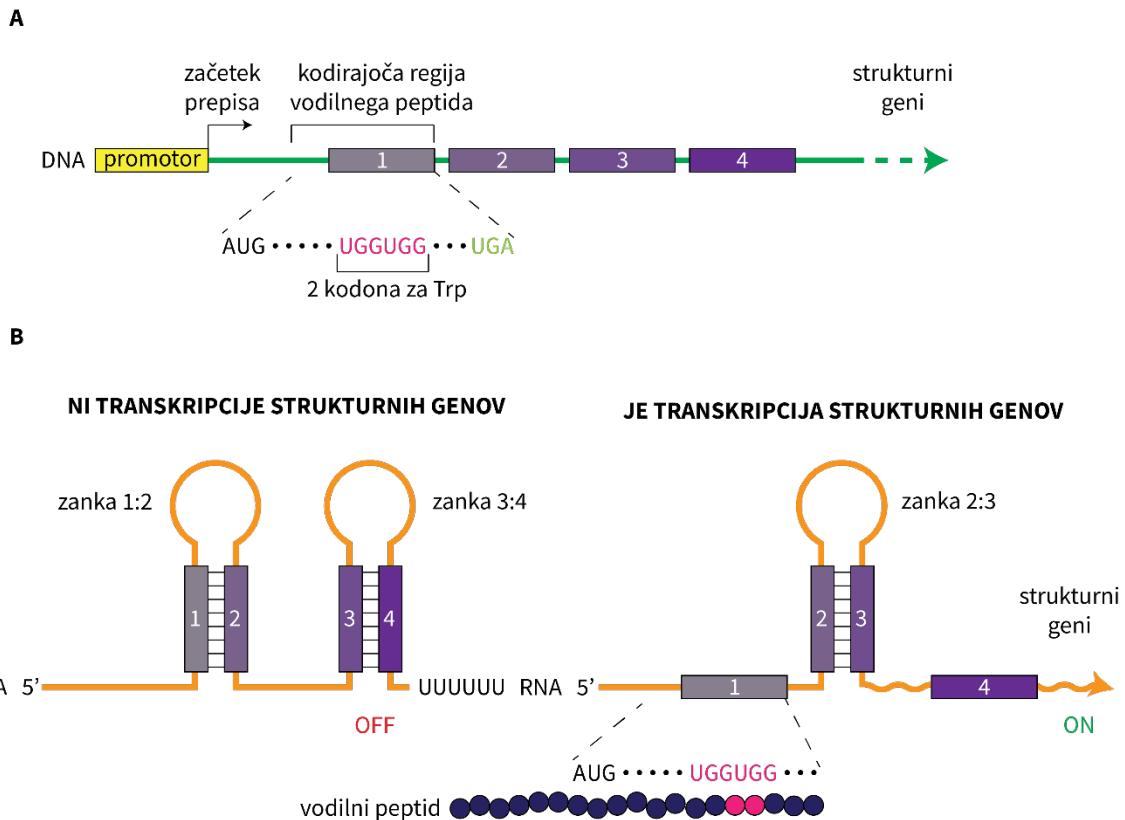
### Uravnavanje izražanja genov s transkripcijsko atenuacijo

Do sedaj je bilo opisanih nekaj primerov uravnavanja izražanja genov, ki poteka na samem začetku prepisovanja, pri iniciaciji. Prepisovanje je lahko uravnavano tudi kasneje, ko RNA-polimeraza že zapusti promotor, in sicer s transkripcijsko atenuacijo. V tem procesu se RNA-polimeraza veže na promotor in prične prepisovanje, postopek pa se nato običajno zaključi že po prepisu vodilnega peptida s 5'-regije (leader region), pred prvim strukturnim genom, če produkti genov niso potrebni. Do predčasne terminacije prepisovanja pride zaradi sprememb v strukturi prepisane RNA vodilne regije ali zaradi proteinov, ki vplivajo na procesivnost RNA-polimeraze.

Terminacijo pogosto povzroči tvorba intrinzičnih terminatorjev, to je lasnične zanke v prepisani RNA, ki ji sledi zaporedje uracilov. Ta proces pa se lahko prepreči, če se zaradi delovanja različnih dejavnikov v prepisani RNA ustvarijo drugačne strukture, ki preprečijo tvorbo terminatorja. Te alternativne strukture imenujemo antiterminatorji.

### Uravnavanje operona *trp* pri *E. coli* s transkripcijsko atenuacijo

Začetek prepisovanja operona *trp* je uravnavan z inaktivacijo represorja s prostim triptofanom. Ker so biosinteze poti za bakterijo pogosto metabolno breme, encimov, ki pri njih sodelujejo, ne sintetizirajo, če to ni res potrebno. Zato uravnavajo izražanje genov pogosto na več ravneh ali po zaporednih korakih iste ravni. Poleg negativnega uravnavanja operona *trp* z represorjem je za *E. coli* značilno tudi uravnavanje s transkripcijsko atenuacijo. Slika 12-11 (A) prikazuje podrobno strukturo kodirajoče regije z zapisom za vodilni peptid. Iz te regije prepisana RNA lahko tvori 3 različne zanke (slika 12-11, B). Dve zanki nastaneta, če se povežejo komplementarne regije 1 in 2 ter hkrati 3 in 4, lahko pa se povežeta samo komplementarni regiji 2 in 3. Kadar zanka nastane iz regij 3 in 4 (zanki sledi zaporedje uracilov), nastane značilen intrinzični terminator, zato se prepisovanje konča predčasno, to je pred prvim strukturnim genom. Mehanizem omogoča kratek časovni zamik med prepisovanjem in translacijo mRNA pri bakterijah.



Slika 12-11: Struktura 5' UTR-regije operona *trp*, v kateri je tudi zapis za vodilni peptid (A). S transkripcijsko atenuacijo se v prisotnosti oz. odsotnosti triptofana uravnava prepis genov za njegovo sintezo (B).

Pri transkripcijski atenuaciji operona *trp* pri *E. coli* začne RNA-polimeraza prepisovanje pri promotorju in nadaljuje z regijo 1. Ta vsebuje dva triptofanska kodona. Po prepisu prvih dveh regij se RNA-polimeraza ustavi in na prepisano mRNA se veže ribosom in začne njeno translacijo. Če v celici ni dovolj aminoacilirane tRNA<sup>Trp</sup>, se ribosom v regiji 1 ustavi, kar daje priložnost za povezavo regij 2 in 3 v zanko. Nastalo strukturo imenujemo **antiterminator**, saj onemogoči povezavo regij 3 in 4, ki bi omogočila tvorbo **terminatorja**. Tvorba antiterminatorja omogoča nadaljevanje prepisovanja strukturnih genov, katerih produkti sodelujejo pri sintezi triptofana.

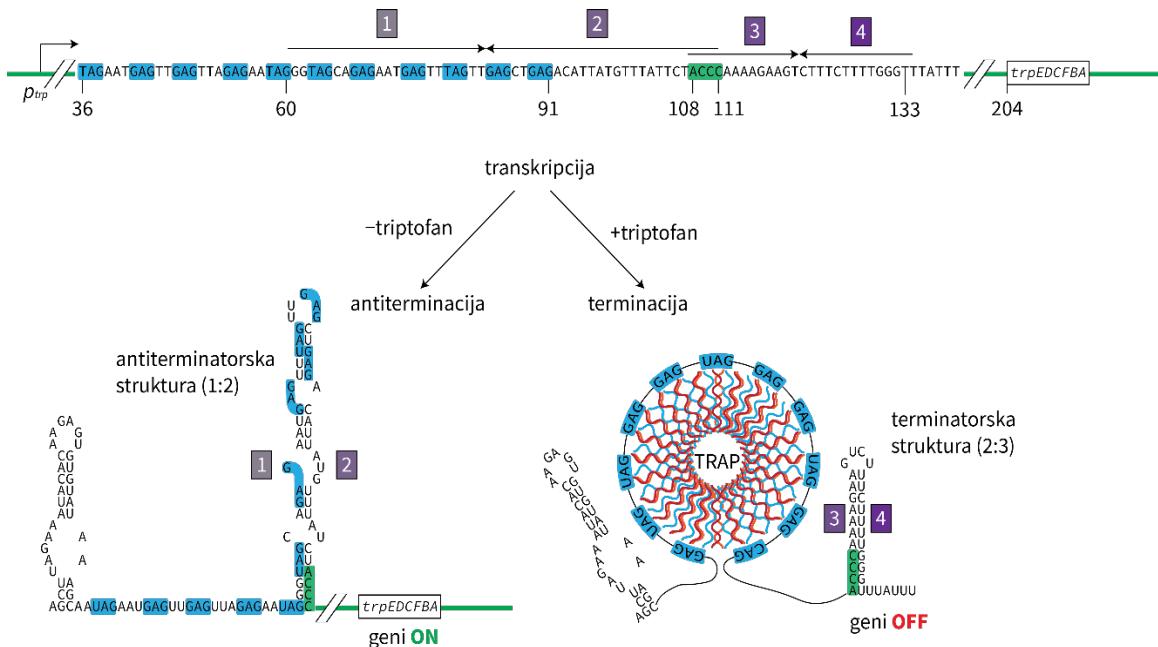
Če pa je v celici na razpolago še dovolj aminoacilirane tRNA<sup>Trp</sup>, se ribosom na triptofanskih kodonih ne ustavi. Regija 2 se zaradi bližine ribosoma, ki se je ustavil zaradi zaključnega kodona, ne more povezati z regijo 3, pač pa se ta poveže z regijo 4. Nastane terminator in prepisovanje se konča pred prvim strukturnim genom.

#### Uravnavanje operona *trp* pri *B. subtilis* s transkripcijsko atenuacijo

Uravnavanje operona *trp* pri *B. subtilis* je prav tako odvisno od količine dostopnega triptofana. Na sliki 12-12 je prikazana transkripcijska atenuacija z RNA-vezavnim proteinom. Prepisovanje se začne z vodilno – 5' UTR-regijo, z značilnimi ponovitvami 3 bp in zaporedjem, ki omogoča nastanek terminatorja. Regulatorni protein, ki sodeluje pri uravnavanju, je sestavljen iz 11 podenot in se imenuje TRAP (ang. *trp* RNA-binding attenuation protein). S ponovitvami 3 bp na mRNA se poveže le, kadar je v celici dovolj triptofana, tako da ima vsaka od podenot vezano po eno molekulo. Interakcija vezanega proteina TRAP onemogoči tvorbo antiterminatorja in nastane terminator, ki prekine prepisovanje. Strukturni geni operona *trp* se v prisotnosti triptofana torej ne prepisujejo,

## Poglavlje 12

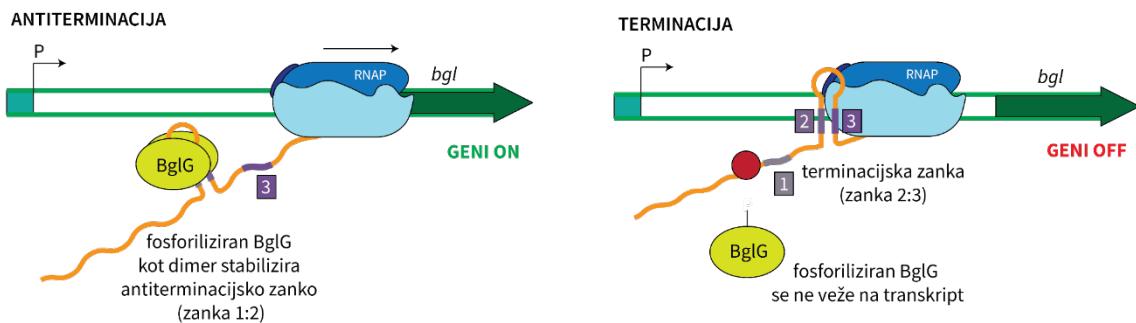
saj TRAP z vezanim triptofanom destabilizira antiterminator. TRAP z vezanim triptofanom lahko uravnava tudi prevajanje že prepisane mRNA. Veže se namreč na ponovitve navzgor od zaporedja S-D (Shine-Dalgarno) in s tem prepreči vezavo ribosoma in posledično prevajanje prvega strukturnega gena.



Slika 12-12: Transkripcijska atenuacija operona *trp* pri *B. subtilis* z RNA-vezavnim proteinom TRAP.

### Uravnavanje $\beta$ -glukozidnega operona (operon *bgl*) pri *E. coli*

Bakterije lahko s končanjem elongacije uravnava tudi gene, povezane z razgradnjo sladkorjev. V vodilni regiji 5' UTR operona *bgl* je transkripcijski terminator, strukturni geni, ki sledijo, pa so povezani z razgradnjo  $\beta$ -glukozidov. Na sliki 12-13 je prikazano, kako fosforilacija BglG vpliva na možnost povezave z mRNA in terminacijo prepisovanja. Tvorbo terminatorja lahko prepreči vezava dimernega nefosforiliranega proteina BglG (slika 12-13, levo). Če je BglG fosforiliran, ne more dimerizirati in se povezati z mRNA (slika 12-13, desno).



Slika 12-13: Transkripcijska atenuacija operona *bgl* pri *E. coli* z RNA-vezavnim proteinom BglG.

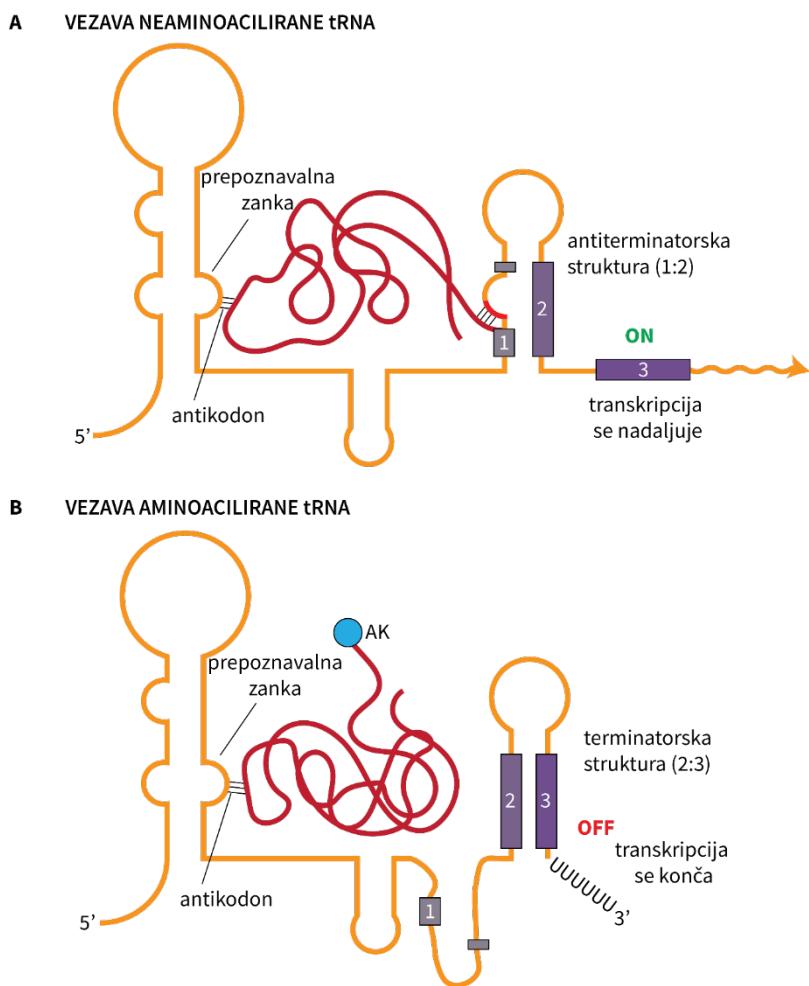
Fosforilacija proteina BglG pa je povezana z vnosom  $\beta$ -glukozidov v celico. Če se transportirajo v celico, lahko protein BglF prenese fosfatno skupino na  $\beta$ -glukozid in ne fosforilira aktivatorja BglG. Dimerni BglG omogoči tvorbo antiterminatorja in nadaljnje prepisovanje genov operona. V primeru operona *bgl* pri *E. coli* RNA-vezavni protein deluje kot transkripcijski aktivator, saj stabilizira strukturo antiterminatorja.

### RNA-stikala

RNA-stikala (ang. riboswitches) so RNA-elementi, ki so pogosto v vodilni regiji 5' UTR- mRNA. Zložijo se lahko v kompleksno trodimenzionalno strukturo, v katero se vežejo ligandi kot tRNA, nukleotidi, kofaktorji, aminokisline ali kovinski ioni. Vezava liganda povzroči konformacijsko spremembo RNA, ki nato vpliva na izražanje genov. Do vpliva lahko pride na ravni transkripcijske atenuacije ali translacije.

#### Uravnavanje prepisovanja genov za aminoacil-tRNA sintetaze pri *B. subtilis* z RNA-stikalom T-box

Pomanjkanje aminokislin v celici onemogoča njihovo pripenjanje na ustrezne tRNA. Bakterije pomanjkanje aminoaciliranih tRNA pskušajo kompenzirati tudi s povečano sintezo aminoacil-tRNA sintetaz. Uravnavna poteka s transkripcijsko atenuacijo z RNA-stikalom, ki zaznava prisotnost neaciliranih tRNA, to je t. i. T box (slika 12-14). Vodilna regija 5' UTR mRNA za aminoacil sintetazo lahko zavzame dve različni strukturi. Kadar tRNA ni aminoacilirana, se z antikodonom poveže s specifično regijo, komplementarno antikodonu, na t. i. prepoznavalni zanki (ang. specifier loop) s 3'-koncem z antiterminatorjem in ga stabilizira, kar omogoči izražanje gena za to aminoacil-tRNA sintetazo. Če je tRNA aminoacilirana, ne more interagirati z antiterminatorjem in ga stabilizirati, zato se izoblikuje terminator, ki prekine prepisovanje.



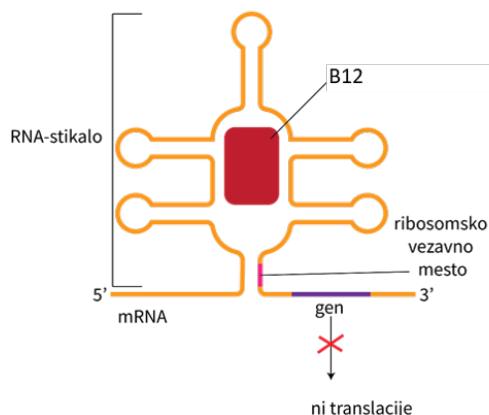
Slika 12-14: Delovanje RNA-stikala. Uravnavanje genov za aminoacil sintetaze z molekulami tRNA.

## Poglavlje 12

Mnoga tRNA-stikala vežejo končne produkte biosintežnih poti (npr. lizin, glicin, B<sub>12</sub>, B<sub>1</sub>, gvanin, adenin, SAM ...) in uravnavajo gene, ki so vključeni v njihov metabolizem ali vnos v celico. Ker vezava liganda prepreči izražanje genov, so ti sistemi represibilni.

RNA-stikala lahko delujejo tudi na ravni translacije mRNA. Primer tega mehanizma je uravnava translacije genov mRNA, povezanih z vitaminom B<sub>12</sub> (koencim B<sub>12</sub>). B<sub>12</sub> se v aktivirani obliki veže na RNA-stikalo (slika 12-15). Posledično mRNA tvori sekundarno strukturo, ki ne omogoča translacije, saj je mesto za vezavo ribosoma zakrito.

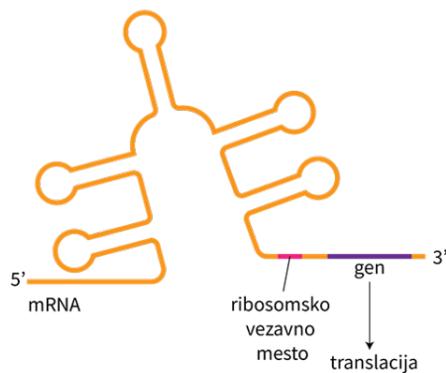
PRISOTNOST REGULATORNE MOLEKULE



Slika 12-15: Kadar je aktivirani vitamin B<sub>12</sub> razpoložljiv, se veže v RNA-stikalo in stabilizira sekundarno strukturo, ki zakrije mesto za vezavo ribosoma. Prevajanje v tem primeru ne poteka.

Če koencima B<sub>12</sub> ni (slika 12-16), mesto za vezavo ribosoma ostane odkrito in translacija steče. Regulatorna molekula lahko v nekaterih primerih deluje tudi kot aktivator.

ODSOTNOST REGULATORNE MOLEKULE



Slika 12-16: Če vitamina B<sub>12</sub> ni na razpolago, RNA-stikalo zavzame sekundarno strukturo, ki omogoča vezavo ribosoma in prevajanje mRNA steče.

### Procesivna antiterminacija

Na terminacijo prepisovanja (intrinzični terminatorji in od faktorjev odvisni terminatorji) lahko vplivajo tudi proteini, ki se povežejo z RNA-polimerazo in vplivajo na njen procesivnost. Ti pogosto ostanejo povezani s transkripcijsko elongacijskim kompleksom (TEC) in omogočajo prepisovanje »preko« terminatorskih zaporedij, kar imenujemo procesivna antiterminacija. Pomembna je pri prepisovanju daljših operonov in pri operonih, ki imajo od proteina Rho odvisno terminacijo oziroma se RNA ne prevaja (npr. rRNA). V teh primerih obstaja velika verjetnost, da se protein Rho veže predčasno in se prepisovanje zaključi že pred koncem operona. Celice imajo zato

razvite sisteme, ki modificirajo TEC in zagotovijo večjo procesivnost. Primer procesivne antiterminacije je sistem RfaH pri *E. coli*.

### Uravnavanje na ravni obstojnosti mRNA

Na količino razpoložljive mRNA v celici vpliva njena sinteza in razgradnja oz. razpolovni čas. To je časovno obdobje, v katerem koncentracija mRNA pade na polovico izhodiščne (za večino bakterijske mRNA je razpolovni čas 1–5 min). Daljši razpolovni čas praviloma pomeni več nastalih produktov. Nanj vpliva prisotnost ribonukleaz (endonukleaz in eksonukleaz) in dostopnost mest za njihovo delovanje.

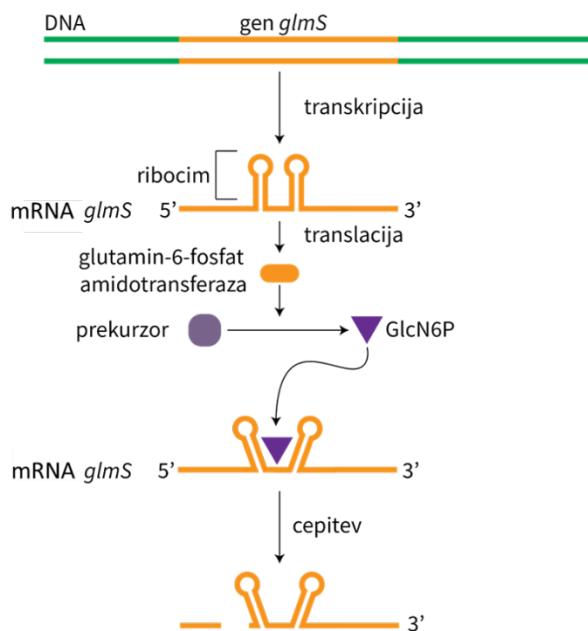
### Od proteinov odvisna razgradnja

Preprost primer uravnavanja razgradnje mRNA z RNA-vezavnim proteinom je gen, ki kodira RNazo E pri *E. coli*. Gen *rne* ima na 5'-koncu v vodilni regiji vezavno mesto za RNazo E. Kadar je encima malo, je mRNA stabilna in prevajanje poteka nemoteno. Ob povečani količini endoribonukleaze pa se mRNA cepi in posledično ne prevede. Ta sistem je primer avtoregulacije, saj je izražanje gena neposredno uravnavano s produkтом tega gena.

### Od RNA odvisna razgradnja

Na stabilnost mRNA lahko vplivajo tudi regulatorne RNA-molekule. Najpogosteje so to *trans*-delujoče male molekule sRNA (ang. small RNA), ki se vežejo na tarčno mRNA in spremeni njenu stabilnost. Mnoge sRNA so del globalnih regulatornih sistemov.

Na sliki 12-17 je prikazan primer uravnavanja razgradnje mRNA pri bakteriji *B. subtilis* z genom *glmS*. Uravnavanje poteka z RNA-stikalom, ki deluje kot ribocim. Gen *glmS* za encim, ki sodeluje pri sintezi sladkorja glukozamin-6-fosfat (GlcN6P), ima v vodilni regiji 5' UTR mRNA 75 nukleotidov, ki delujejo kot ribocim. Aktiven postane, ko se v to regijo gena veže sladkor GlcN6P. Pri visoki koncentraciji tega sladkorja se cepi mRNA z zapisom za encim.



Slika 12-17: Uravnavanje razgradnje gena *glmS* na mRNA z RNA-stikalom, ki deluje kot ribocim.

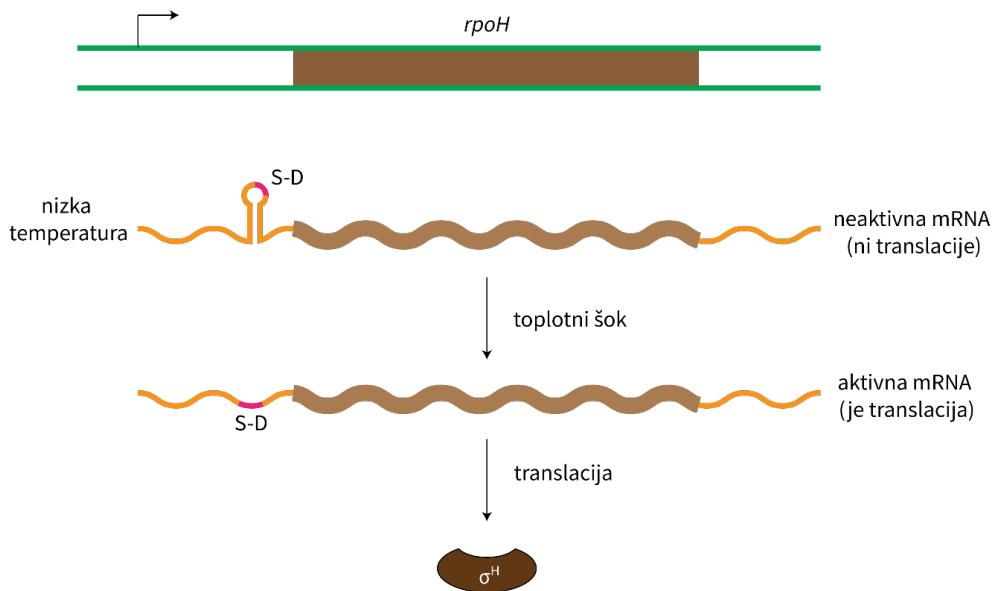
## Uravnavanje na ravni translacije

Uravnavanje izražanja genov na ravni translacije najpogosteje poteka že na stopnji iniciacije translacije ob vezavi podenote 30 S ribosoma na TIR (translacijsko-iniciacijsko regijo). Vezava je namreč odvisna tudi od strukture mRNA. Vse, kar vpliva na dostop iniciacijskega kompleksa k TIR, potencialno vpliva tudi na prevajanje. Manj pogosto je uravnavanje na stopnji elongacije translacije.

### RNA-termosenzorji

Za uravnavanje translacije s termosenzorji je značilno, da se lahko sekundarna struktura vodilne regije v mRNA spreminja v odvisnosti od temperature. Sekundarne strukture, kot so zanke, ki nastanejo zaradi komplementarnega parjenja baz, so pri višji temperaturi praviloma manj stabilne oziroma neobstojne, kar omogoča iniciacijo translacije. Pri nižjih temperaturah pa lahko preprečijo vezavo ribosoma na TIR in s tem inhibirajo iniciacijo translacije.

RNA-termosenzorji uravnavajo izražanje gena *rpoH* bakterije *E. coli*, ki kodira faktor  $\sigma$  za topotni stres –  $\sigma^{H/32}$  (slika 12-18). To je alternativni faktor  $\sigma$ , ki prepozna promotorje, odgovorne za prepisovanje genov, ki se v celici odzovejo na povišano temperaturo (ang. heat shock). V celici je *rpoH* na mRNA vedno prisotna v nizki koncentraciji, vendar se ne prevaja, saj tvori sekundarne strukture, ki zakrijejo TIR. Ko se temperatura v okolju bakterije poviša, se sekundarne strukture razpustijo in prevajanje steče.



Slika 12-18: Uravnavanje gena *rpoH* pri *E. coli* ob pomoči RNA-termosenzorja.

Sistem RNA-termosenzorjev je znan tudi pri uravnavanju genov za dejavnike virulence, za katere je smiselno, da se prevajajo pri temperaturi gostiteljskega organizma.

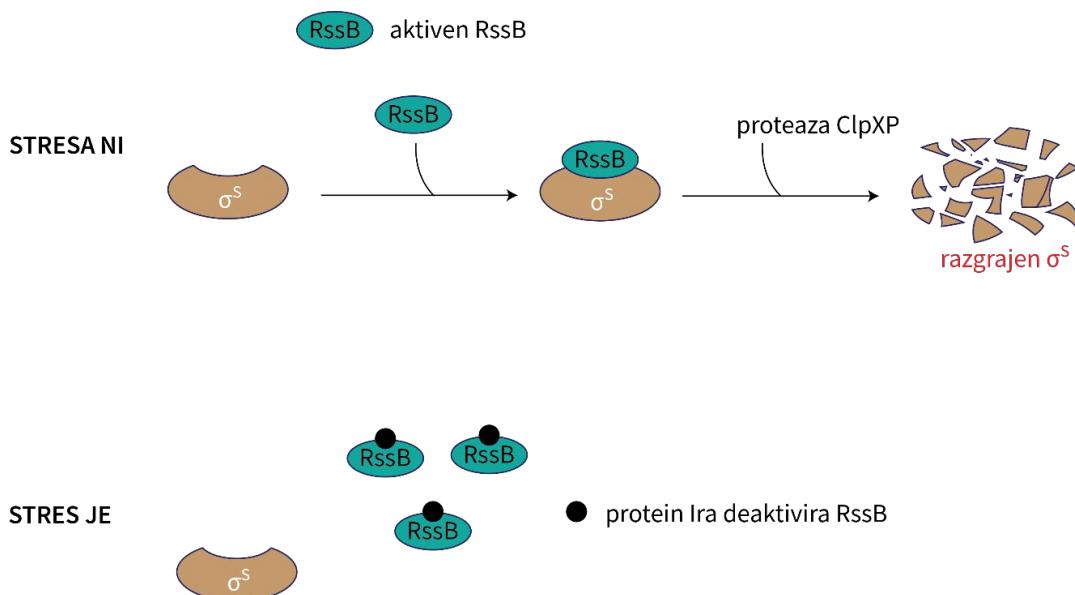
## Uravnavanje na ravni posttranslacijskih modifikacij

Na količino aktivnega proteinskega produkta v celici poleg uravnavanja na ravni prepisovanja in prevajanja vplivajo tudi drugi dejavniki. Izmed teh so pomembne posttranslacijske modifikacije proteinov (fosforilacija, acetilacija, metilacija ...). Ključna je tudi stabilnost proteina, na katero vplivajo zunanjí dejavniki, uravnavana proteoliza in odpornost proteina proti proteazam. Vsak od teh korakov predstavlja možnost posttranslacijskega uravnavanja.

### Uravnavanje aktivnosti RpoS z adapterji in antiadapterji

Posttranslacijske modifikacije lahko vplivajo na aktivnost proteinov oziroma so zanj celo ključne. Hkrati pa vplivajo tudi na stabilnost proteinov. Pri procesu uravnavane proteolize sodelujejo molekule, ki jih imenujemo adapterji in antiadapterji. Prvi označujejo proteine, ki jih želi celica razgraditi. Aktivnost adapterjev preprečujejo antiadapterji in s tem povečajo stabilnost proteina. Obe vrsti molekul sta zelo specifični.

Sistem uravnavane proteolize poznamo pri proteinu RpoS bakterije *E. coli* (slika 12-19). RpoS je še eden od alternativnih faktorjev  $\sigma$ , imenujemo ga tudi  $\sigma^{S/38}$ . Odgovoren je za prepis genov, ki sodelujejo pri odzivu na stres oziroma pri adaptaciji na suboptimalne rastne razmere (npr. stacionarna faza). Nekaj molekul se ga sintetizira tudi, kadar celica ni v stresnih razmerah. V tem primeru ga označi adapter RssB in posledično razgradi proteaza ClpXP. Ob vstopu v stacionarno fazo ali v drugih stresnih razmerah se sintetizira antiadapterski protein Ira (ang. Inhibitor of RssB activity): poveže se z RssB in ga s tem inaktivira. Rezultat je preprečena razgradnja faktorja  $\sigma^{S/38}$ , posledično pa omogočena povezava z RNAP in prepis genov, povezanih s stresnim odzivom.



Slika 12-19: Uravnavanje razgradnje RpoS z adapterji in antiadapterji.

### TEMELJNI POJMI

- Gen – zaporedje v molekuli DNA, ki se prepiše v RNA.
- Strukturni gen – zapis za protein, ki sodeluje pri metabolizmu oz. je pomemben za zgradbo celice.
- Regulatorni gen – zapis za RNA ali protein, ki se poveže z določenim zaporedjem v molekuli DNA ali RNA in vpliva na izražanje genov.
- Regulatorni element – zaporedje v molekuli DNA, ki se ne prepiše. Z njimi se povežejo produkti regulatornih genov.
- Aktivator – regulatorni protein, ki z vezavo na DNA spodbudi prepisovanje.
- Induktor – molekula, ki z aktivacijo aktivatorja ali inaktivacijo represorja spodbudi izražanje genov.
- Represor – regulatorni protein, ki z vezavo na DNA zavre prepisovanje.

## Poglavlje 12

- Korepresor – molekula, ki z aktivacijo neaktivnega represorja (aporesorja) ali inaktivacijo aktivatorja utiša izražanje genov.
- Inducibilni operon – operon, pri katerem se geni običajno ne prepisujejo. Uravnavan je lahko pozitivno z aktivatorjem ali negativno z represorjem.
- Represibilni operon – operon, pri katerem se geni običajno prepisujejo. Uravnavan je lahko pozitivno z aktivatorjem ali negativno z represorjem.
- Katabolna represija – proces, ki preprečuje izražanje genov za razgradnjo sekundarnih virov ogljika (npr. laktaze), kadar je na razpolago boljši vir ogljika (npr. glukoza).
- Terminator – lasnična zanka, ki se tvori po prepisu DNA in ji sledi zaporedje uracilov. Ta struktura oslabi vezavo RNA-polimeraze, kar običajno vodi v terminacijo prepisovanja.
- Antiterminator – struktura v mRNA, ki izniči učinek terminatorja.
- Procesivna antiterminacija – sposobnost RNA-polimeraze, da kljub terminatorju nadaljuje prepisovanje DNA.

### POVZETEK

Uravnavanje izražanja genov pri bakterijah poteka na več ravneh, od strukture kromatina in transkripcije ter stabilnosti mRNA do translacije ter posttranslacijskih modifikacij. Na ravni prepisovanja ločimo pozitivno in negativno uravnavo inducibilnih in represibilnih operonov. Dobro raziskani so učbeniški primeri operonov *lac*, *gal*, *trp*, *ara* ter *fab* in *fad*. Prepisovanje je lahko uravnavano na stopnji iniciacije in elongacije, ko RNA-polimeraza že zapusti promotor in na nadaljnje prepisovanje vplivajo regulatorne molekule, ki omogočijo/onemogočijo tvorbo antiterminatorjev v vodilni regiji (5'UTR) mRNA. Primer je transkripcijska atenuacija operona *trp* in *bgl* pri bakteriji *E. coli*. Na terminacijo prepisovanja lahko vplivajo proteini, ki se povežejo z RNA-polimerazo in vplivajo na njeno procesivnost ter s tem omogočajo prepisovanje vzdolž terminatorskih zaporedij. RNA-stikala so regulatorne regije v vodilni regiji mRNA, ki vplivajo na prepisovanje, translacijo ali razgradnjo mRNA. Na prevajanje mRNA lahko vplivajo RNA-termosenzorji. Zasledimo jih pri uravnavanju gena *rpoH* ( $\sigma^H$ ) pri bakteriji *E. coli*. Nekateri proteini postanejo funkcionalni šele s posttranslacijsko modifikacijo. Primer je uravnavanje nadzorovane proteolize RpoS ( $\sigma^S$ ) z adapterji in antiadapterji.

## 13 GLOBALNO URAVNAVANJE IZRAŽANJA GENOV

Lara Krampač, Marjanca Starčič Erjavec

### UČNI CILJI

- Spoznati in razumeti zakonitosti globalnega uravnavanja izražanja genov na izbranih primerih celičnega odziva na pomanjkanje hranil.
- Spoznati in razumeti zakonitosti globalnega uravnavanja izražanja genov na izbranih primerih celičnega odziva na omejitve rasti.
- Spoznati in razumeti zakonitosti globalnega uravnavanja izražanja genov na izbranih primerih celičnega odziva na stres.

### UVOD

Bakterije se morajo znati hitro in učinkovito prilagoditi na najrazličnejša okolja in razmere, v katerih se znajdejo. Različni viri energije in ogljika, spremembe v pH, omejena dostopnost hranil, temperaturna nihanja in drugi stresni dejavniki vplivajo na gensko izražanje. Za učinkovito izražanje genov so potrebni kompleksni regulatorni sistemi, ki nadzorujejo izražanje mnogih genov in operonov. Tem sistemom pravimo globalni regulatorni mehanizmi. Kadar en sam regulatorni protein (ali RNA) nadzira veliko število različnih genov in operonov, pravimo, da so vsi ti geni in operoni združeni v regulon. Skupino regulonov, ki se odzovejo na isti okoljski dejavnik, imenujemo stimulon. V preglednici 13-1 so povzeti najpomembnejši globalni regulatorni mehanizmi, ki uravnavajo odziv *E. coli* na različne omejitve (pomanjkanje hranil, ovirana rast in različne stresne razmere).

Preglednica 13-1: Globalni regulatorni sistemi bakterije *E. coli*.

Sistem	Regulatorni geni (proteini)	Mehanizem	Tarča
<b>Omejitve hranil</b>			
Zaznava ogljika	<i>crp</i> (CRP) <i>cra</i> (CRA)	DNA-vezavni aktivator oz. represor	<i>lac, ara, gal, mal ...</i> encimi glikolize in Krebsovega cikla
Zaznava dušika	<i>rpoN</i> ( $\sigma^N$ ) <i>ntrBC</i> (NtrBC)	faktor $\sigma$ dvokomponentni sistem	<i>glnA</i> in operoni za razgradnjo aminokislin
Zaznava fosforja	<i>phoBR</i> (PhoBR)	dvokomponentni sistem	> 38 genov, med njimi <i>phoA</i> in <i>pst</i>
<b>Omejitve rasti</b>			
Odziv na neugodne razmere (ang. stringent response)	<i>relA</i> (RelA), <i>spoT</i> (SpoT)	metabolizem (p)ppGpp	rRNA, tRNA, ribosomski proteini, operoni za biosintezo aminokislin

Se nadaljuje

## Poglavlje 13

Nadaljevanje preglednice 13-1: Globalni regulatorni sistemi bakterije *E. coli*.

Sistem	Regulatorni geni (proteini)	Mehanizem	Tarča
Odziv na stacionarno fazo	<i>rpoS</i> ( $\sigma^S$ )	faktor $\sigma$	gene s promotorjem za faktor $\sigma$
Odziv na kisik	<i>fnr</i> (Fnr)	DNA-vezavni aktivator oz. represor	> 31 genov, med njimi <i>narGHJI</i>
	<i>arcAB</i> (ArcAB)	dvokomponentni sistem	> 20 genov, med njimi <i>cob</i>
<b>Stres</b>			
Osmoregulacija	<i>kpdDE</i> (KpdD, KpdE)	dvokomponentni sistem	<i>kpdFABC</i>
	<i>envZ/ompR</i> (EnvZ/OmpR)	dvokomponentni sistem	OmpC in OmpF
	<i>micF</i>	sRNA	<i>ompF</i>
Kisikov stres	<i>soxS</i> (SoxS)	družina regulatorjev AraC	regulon <i>sox</i> , vključno s <i>sodA</i> in <i>micF</i>
	<i>oxyR</i> (OxyR)	družina DNA-vezavnih proteinov LysR	regulon <i>oxyR</i> , vključno s <i>katG</i>
	<i>rph</i> ( $\sigma^H$ )	faktor $\sigma$	stimulon Hsps, vključno z <i>dnaK</i> , <i>dnaJ</i> , <i>grpE</i> , <i>lon</i> , <i>cipPX</i> , <i>hflB</i>
Stres ovojnice	<i>rpoE</i> ( $\sigma^E$ )	faktor $\sigma$	> 10 genov, med njimi <i>rpoH</i> in <i>degP</i>
	<i>cpxAR</i> (CpxAR)	dvokomponentni sistem	prekriva z regulonom RpoE
pH-šok	mnogo	mnogo	kompleksen vpliv

### Katabolna regulacija

Z metabolizmom različnih virov ogljika bakterije pridobijo različno količino energije. Od tega izkoristka je odvisna hitrost njihove rasti, ki se ji mora prilagoditi sinteza celičnih makromolekul. Smiselno je, da celica energijo porablja le za sintezo tistih encimov, ki metabolizirajo substrat z najvišjim izkoristkom energije. Mehanizem, ki zagotavlja, da celica uporablja le najugodnejši vir energije in ogljika, se imenuje katabolna regulacija (starejši izraz je katabolna represija). Temu mehanizmu pravimo tudi efekt glukoze, saj prisotnost glukoze praviloma močno zavre izražanje operonov za uporabo drugih virov ogljika; glukoza je namreč prednostni vir ogljika za veliko večino bakterij. Zaradi prisotnosti glukoze, ki je najugodnejši vir energije, se prepreči tudi transport manj ugodnih virov energije skozi membrano v citoplazmo celice. Temu rečemo izključitev induktorja, saj se zaradi tega v celici zmanjša količina induktorja, ki bi induciral izražanje operonov za razgradnjo manj ugodnih virov ogljika (npr. *lac* in *gal*).

Katabolna regulacija se lahko dogaja po posredovanju cAMP (od cAMP odvisna katabolna regulacija) ali brez njega (od cAMP neodvisna katabolna regulacija). Od cAMP odvisna katabolna regulacija je vezana na aktivnost adenilat ciklaze, na katero vpliva fosfotransferazni sistem. Protein

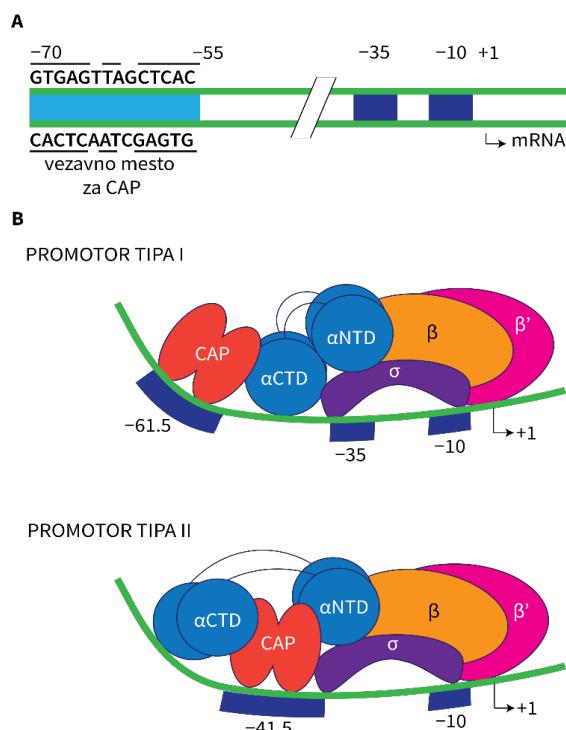
IIA, eden izmed proteinov fosfotransferaznega sistema, namreč v fosforilirani obliki aktivira adenilat ciklazo, ki nato ATP pretvori v cAMP. Protein IIA je v fosforilirani obliki, ko je v celici nizka koncentracija glukoze. Za cAMP tako pravimo, da signalizira količino glukoze, ki je celici na voljo. Ko je v celici glukoza, je adenilat ciklaza neaktivirana in koncentracija cAMP je nizka. Ko v celici glukoze ni, je adenilat ciklaza aktivirana in posledično je v citoplazmi visoka koncentracija cAMP. Od cAMP neodvisna katabolna regulacija pa vključuje protein Cra, ki signalizira znotrajcelično koncentracijo sladkornih kabolitov fruktoza-1-fosfat in fruktoza-1,6-bisfosfat, ki sta v celici v visoki koncentraciji, ko ima celica na voljo glukozo ali njej podoben sladkor.

### Od cAMP odvisna katabolna regulacija – uravnavanje s CAP-cAMP

Koncentracija cAMP vpliva na izražanje klasičnih katabolnih operonov *lac*, *gal*, *ara* in *mal*. Vsi ti operoni so del t. i. regulona CAP, saj njihovo uravnavanje poteka s proteinom CAP (ang. catabolite activator protein). Protein CAP ima tudi drugo ime, in sicer CRP (ang. cAMP receptor protein). Kadar je na CAP vezan cAMP (kompleks CAP-cAMP), ima vlogo transkripcijskega aktivatorja regulona CAP. Veže se kot dimer na vezavno mesto za CAP, ki se nahaja navzgor od promotorja operonov v regulonu CAP.

Glede na način vezave dimera CAP-cAMP (pozicioniranje) na DNA, razlikujemo dva tipa promotorjev (slika 13-1).

- Tip I (promotor  $p_{lac}$  operona *lac*): vezavno mesto za CAP je na mestu -61,5; dimer CAP-cAMP veže  $\alpha$ -CTD del RNAP in poveča jakost njene vezave na promotor, kar pospeši nastanek zaprtega kompleksa promotorja.
- Tip II (promotor  $p_{G1}$  operona *gal*): vezavno mesto za CAP je na mestu -41,5; dimer CAP-cAMP veže tako  $\alpha$ -CTD kot tudi  $\alpha$ -NTD del RNAP in s tem pospeši nastanek odprtrega kompleksa promotorja.



Slika 13-1: Aktivacija promotorjev tipov I in II sCAP. Pomembno je, kje leži vezavno mesto za CAP. Vezavno mesto za CAP (A). Položaj vezavnega mesta za CAP in vezava CAP na RNAP (B).

Obstajajo tudi promotorji, pri katerih se veže več kot en dimer CAP-cAMP, kar vpliva tako na vezavo RNAP oziroma nastanek zaprtega kompleksa kot tudi na nastanek odprtrega kompleksa. Eden od mehanizmov delovanja CAP je tudi ta, da upogne DNA, kar vpliva na njeno dostopnost za druge regulatorne proteine in RNAP.

### Katabolna regulacija s Cra

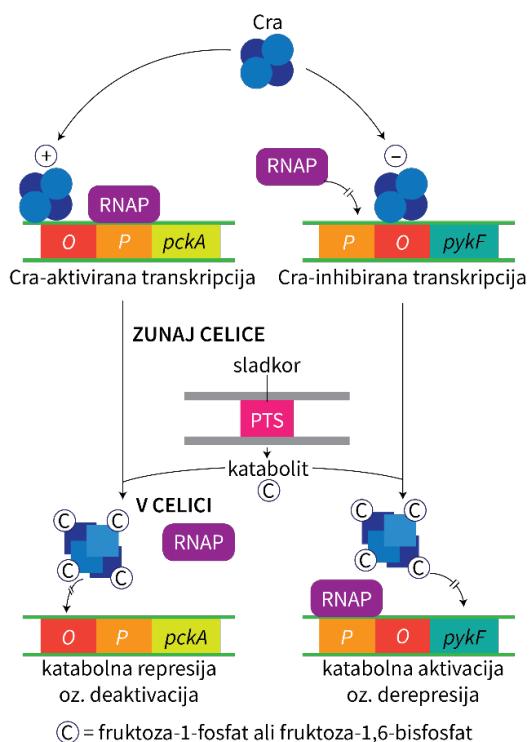
Katabolna regulacija pri *E. coli* poteka tudi na način, ki ni odvisen od cAMP. Protein Cra (ang. catabolite repressor/activator), izvorno poimenovan FruR (ang. fructose repressor), je zapisan v genu *cra* in je DNA-vezavni protein, podoben LacI in GalR.

Učinek vezave proteina Cra na DNA je odvisen od položaja vezavnega mesta. Kadar je njegovo vezavno mesto (operator) navzgor od promotorja gena, ki ga Cra uravnava, vezava Cra vodi v aktivacijo transkripcije tega gena. Kadar je njegovo vezavno mesto (operator) navzdol od promotorja gena, ki ga uravnava, ali se s tem promotorjem prekriva, pa s svojo vezavo prepreči transkripcijo tega gena.

Vezava Cra na DNA pa je odvisna od signalnih molekul – katabolitov fruktoza-1-fosfat (F1P) ali fruktoza-1,6-bisfosfat (FBP). Z vezavo katerega od teh katabolitov je Cra namreč inaktiviran in se ne more več vezati na DNA. Ti signalni molekuli sta v celici v visoki koncentraciji, kadar bakterija raste na sladkorjih, kot je glukoza. Vpliv onemogočene vezave Cra na prepisovanje operona pa je odvisen od tega, ali je Cra represor (njegovo vezavno mesto je navzdol od promotorja oz. se s promotorjem prekriva) ali aktivator posameznega operona (njegovo vezavno mesto je navzgor od promotorja).

Če Cra deluje kot represor, se transkripcija operona poveča, kadar bakterija raste v prisotnosti glukoze, saj je takrat tudi veliko omenjenih signalnih molekul, ki se vežejo na proteine Cra, in je tako onemogočena vezava Cra na DNA. Če Cra deluje kot aktivator, se transkripcija operona zmanjša, kadar bakterija raste na glukozi, saj se takrat zaradi vezave signalnih molekul Cra ne more vezati na DNA in tako aktivirati transkripcije.

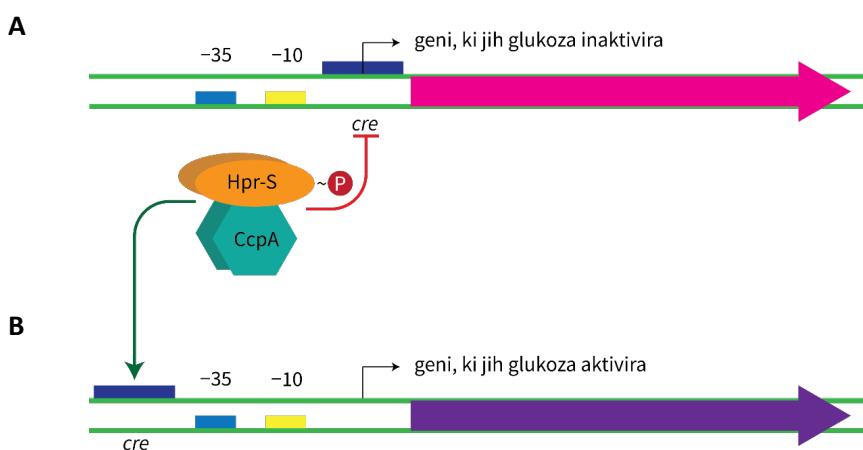
V splošnem velja, da Cra deluje kot represor in zavira operone, katerih produkti sodelujejo v centralnih biokemijskih poteh sladkornega katabolizma, kot sta Embden-Meyerhofova in Entner-Doudoroffova pot. Če je prisotna glukoza ali drug sladkor, katerega katabolit se lahko veže na Cra, represije ni, saj Cra zaradi vezave signalne molekule ni aktiven. Cra deluje kot aktivator in aktivira operone, katerih produkti sodelujejo v sintezi glukoze iz piruvata in drugih metabolitov. Kadar je glukoza prisotna in Cra ni aktiven, se ti operoni ne izražajo (slika 13-2).



Slika 13-2: Pri katabolni regulaciji, ki ni odvisna od cAMP, sodeluje protein Cra. Ta lahko deluje kot transkripcijski aktivator ali represor, odvisno od mesta vezave.

### Katabolna regulacija pri *B. subtilis*

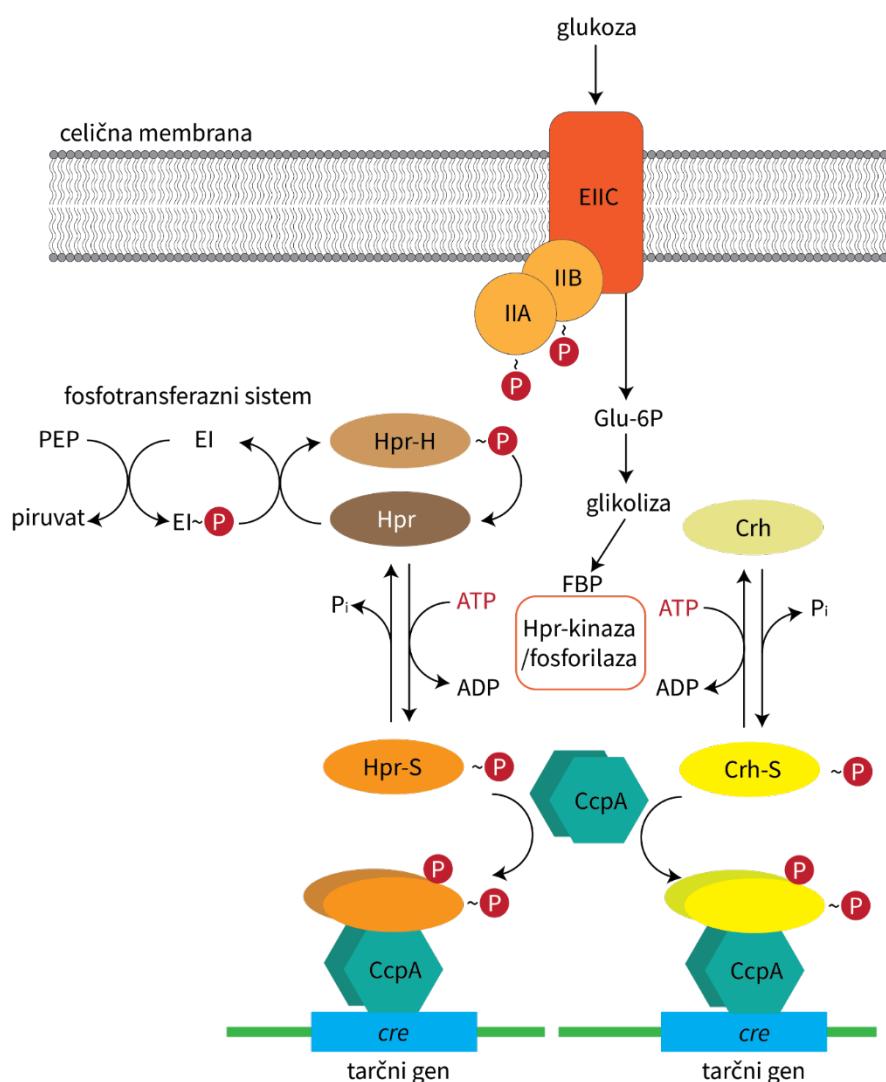
*B. subtilis* pri katabolni regulaciji ne uporablja molekule cAMP, saj je sploh ne sintetizira. Glavno vlogo v katabolni regulaciji ima protein CcpA (ang. catabolite control protein A), ki deluje kot represor. Je DNA-vezavni protein iz družine regulatorjev LacI/GalR. Veže se na mesta cre (ang. catabolite repressor) in uravnava približno 100 genov. Inaktivira gene, katerih izražanje mora biti zaradi prisotnosti glukoze zatrženo, in aktivira gene, ki se morajo zaradi prisotnosti glukoze izražati. Njegovo delovanje je odvisno od položaja mesta cre glede na promotor (slika 13-3). Kadar je mesto cre navzdol od promotorja oz. se z njim delno prekriva, CcpA s svojo vezavo prepreči izražanje gena (CcpA deluje kot represor). Kadar je mesto cre navzgor od promotorja, CcpA z vezavo omogoči transkripcijo tega gena (CcpA deluje kot aktivator).



Slika 13-3: CcpA bakterije *B. subtilis* deluje kot transkripcijski represor, kadar je mesto cre navzdol od promotorjem ali pa se z njim prekriva (A), in kot transkriacijski aktivator, kadar je mesto cre navzgor od promotorja (B).

Aktivnost CcpA (zmožnost vezave na DNA) je uravnavana preko proteina Hpr, ki je del fosfotransferaznega sistema. CcpA se lahko na DNA namreč veže samo, kadar je nanj vezan protein Hpr v fosforilirani obliki (fosfat je vezan na specifični serinski aminokislinski ostank). Rast na gojišču z visoko koncentracijo glukoze vodi v nastanek fruktoza-1,6-bisfosfata, ki nato povzroči fosforilacijo specifičnega serinskega ostanka v Hpr ( $Hpr-S\sim P$ ), zaradi vpliva fruktoza-1,6-bisfosfata na Hpr-kinazo.  $Hpr-S\sim P$  se veže na CcpA, nastali kompleks pa na mesto *cre*. Kadar je koncentracija glukoze in torej tudi koncentracija fruktoza-1,6-bisfosfata v gojišču nizka, Hpr-kinaza defosforilira  $Hpr-S\sim P$  (slika 13-4).

Hpr v celici v osnovi služi kot eden izmed prenašalcev fosfata v fosfotransferaznem sistemu, potrebnem za transport glukoze v celico. Fosfat se s proteina EI prenese na Hpr (fosforilacija se zgodi na histidinskem ostanku Hpr) in nato na transportni protein IIA<sup>Glc</sup>. Fosforilacija Hpr na serinskem ostanku prepreči fosforilacijo na histidinskem ostanku in s tem tudi inhibira fosfotransferazni sistem PTS. Vlogo Hpr v katabolni regulaciji lahko nadomesti protein Crh, ki sicer ni del fosfotransferaznega sistema, a se prav tako fosforilira na specifičnem serinskem ostanku, veže na CcpA in mu tako omogoči vezavo na mesta *cre*.



Slika 13-4: Katabolna regulacija pri *B. subtilis*. Vlogo proteina Hpr, ki je del fosfotransferaznega sistema, lahko nadomesti protein Crh, ki pa ni del fosfotransferaznega sistema. Glu-6P: glukoza-6-fosfat. FBP: fruktoza-1,6-bisfosfat.

## Uravnavanje asimilacije dušika

Bakterije potrebujejo dušik za sintezo številnih bioloških molekul (nukleotidi, aminokisline, vitamini). Pridobijo ga v obliki amonijaka ( $\text{NH}_3$ ), nitrata ( $\text{NO}_3^-$ ) ali iz organskih molekul. Nekatere bakterije zaradi zmožnosti biološke fiksacije dušika lahko uporabijo celo atmosferski dušik ( $\text{N}_2$ ). Ne glede na vir pa mora dušik v vse biosinteze reakcije vstopati v obliki  $\text{NH}_3$  ali kot  $\text{NH}_2$  iz glutamata ali glutamina.

Enterobakterije uporabljajo različne poti asimilacije dušika, odvisno od koncentracije  $\text{NH}_3$ . Ko je koncentracija  $\text{NH}_3$  nizka, bakterije kot vir dušika uporabljajo aminokisline: encim glutamin sintetaza  $\text{NH}_3$  veže na glutamat, da nastane glutamin, nakar encim glutamat sintaza iz molekule glutamina in  $\alpha$ -ketoglutarata naredi dve molekuli glutamata. Pri takšni asimilaciji dušika se encim glutamin sintetaza potrebuje v velikih količinah, kar je energijsko precej potratno. Kadar je koncentracija  $\text{NH}_3$  visoka (npr. ko je v gojšču  $\text{NH}_4\text{OH}$ ), encim glutamat dehidrogenaza  $\text{NH}_3$  veže na  $\alpha$ -ketoglutarat, da nastane glutamat. Na glutamat nato encim glutamin sintetaza veže  $\text{NH}_3$ , da nastane glutamin. Glutamin sintetaza je pri takšni asimilaciji potrebna v majhnih količinah in tako se porabi manj energije.

Preglednica 13-2: Geni, ki sodelujejo pri uravnavanju asimilacije dušika pri bakteriji *E. coli*.

Gen	Alternativno ime gena	Produkt	Funkcija
<i>glnA</i>		glutamin sintetaza	sinteza glutamina
<i>glnB</i>		protein PII	inhibira NtrB, aktivira adenilil transferazo
<i>glnD</i>		uridilil transferaza	prenos UMP na in z PII
<i>glnE</i>		adenilil transferaza	prenos AMP na glutamin sintetazo
<i>glnF</i>	<i>rpoN</i>	$\sigma^N$	RNAP prepozna promotorje operonov Ntr
<i>ntrC</i>	<i>glnG</i>	NtrC	aktivacija promotorjev operonov Ntr
<i>ntrB</i>	<i>glnL</i>	NtrB	prenos fosfata na in z NtrC
<i>glnK</i>		GlnK	regulacija aktivnosti adenilil transferaze

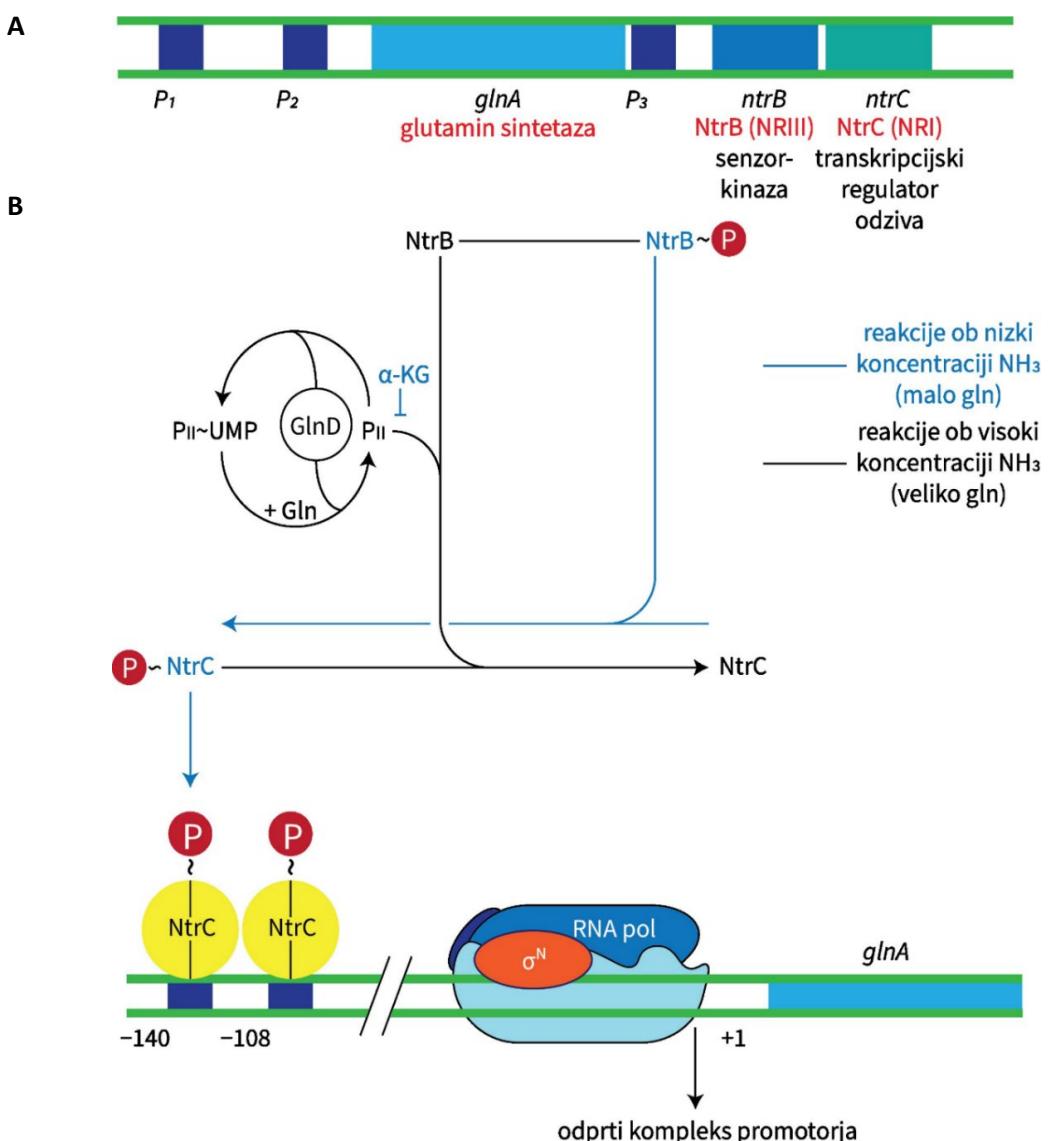
## Sistem Ntr

Operoni, ki sodelujejo pri uporabi dušika, so pri *E. coli* del sistema Ntr (ang. nitrogen regulated). Uravnavanje sistema Ntr zagotavlja, da bakterija ne sintetizira encimov za pridobitev dušika iz aminokislin ali nitrata, medtem ko je na razpolago  $\text{NH}_3$ . Del regulona so tudi transportni sistemi za alternativne vire dušika.

Operon *glnA-ntrB-ntrC* in drugi geni sistema Ntr so uravnavani s signalno transduksijsko potjo, ki jo tvori dvokomponentni sistem NtrB in NtrC. Sodelujeta tudi GlnD in PII (slika 13-5). NtrB je senzorska kinaza, ki se pri nizki koncentraciji dušika avtofosforilira in nato fosfat pred transkripcijskemu regulatorju NtrC, ta pa aktivira prepisovanje genov regulona Ntr. Količina dušika (koncentracija  $\text{NH}_3$ ), ki je na voljo, se zaznava preko količine glutamina v celici. Ob nizki

koncentraciji  $\text{NH}_3$ , ko je v celici torej malo glutamina, morajo biti vsi produkti operona *glnA-ntrB-ntrC* sintetizirani v večji količini.

Kadar je v celici koncentracija glutamina nizka, je protein  $\text{P}_{\text{II}}$  modificiran in se nahaja v stanju  $\text{P}_{\text{II}}\sim\text{UMP}$ . V nasprotnem primeru (v celici je dušika dovolj) protein GlnD odstrani UMP s  $\text{P}_{\text{II}}$ . Nemodificirani  $\text{P}_{\text{II}}$  se veže na NtrB, s čimer prepreči njegovo avtofosforilacijo. NtrB tako ne more prenesti fosfata na NtrC, kar pomeni, da NtrC ne aktivira prepisovanja genov sistema Ntr, ki sodelujejo pri uporabi alternativnih virov dušika (slika 13-5).



Slika 13-5: Sistem Ntr. Zgradba operona *glnA-ntrB-ntrC* (A). Gen *ntrB* kodira senzorsko kinazo, *ntrC* pa transkripcijski regulator odziva. Regulacija z NtrBC (B). Reakcije, ki potekajo ob nizki koncentraciji  $\text{NH}_3$  (malo glutamina), so označene z modro barvo, reakcije, ki potekajo ob visoki koncentraciji  $\text{NH}_3$  (veliko glutamina), so označene s črno.

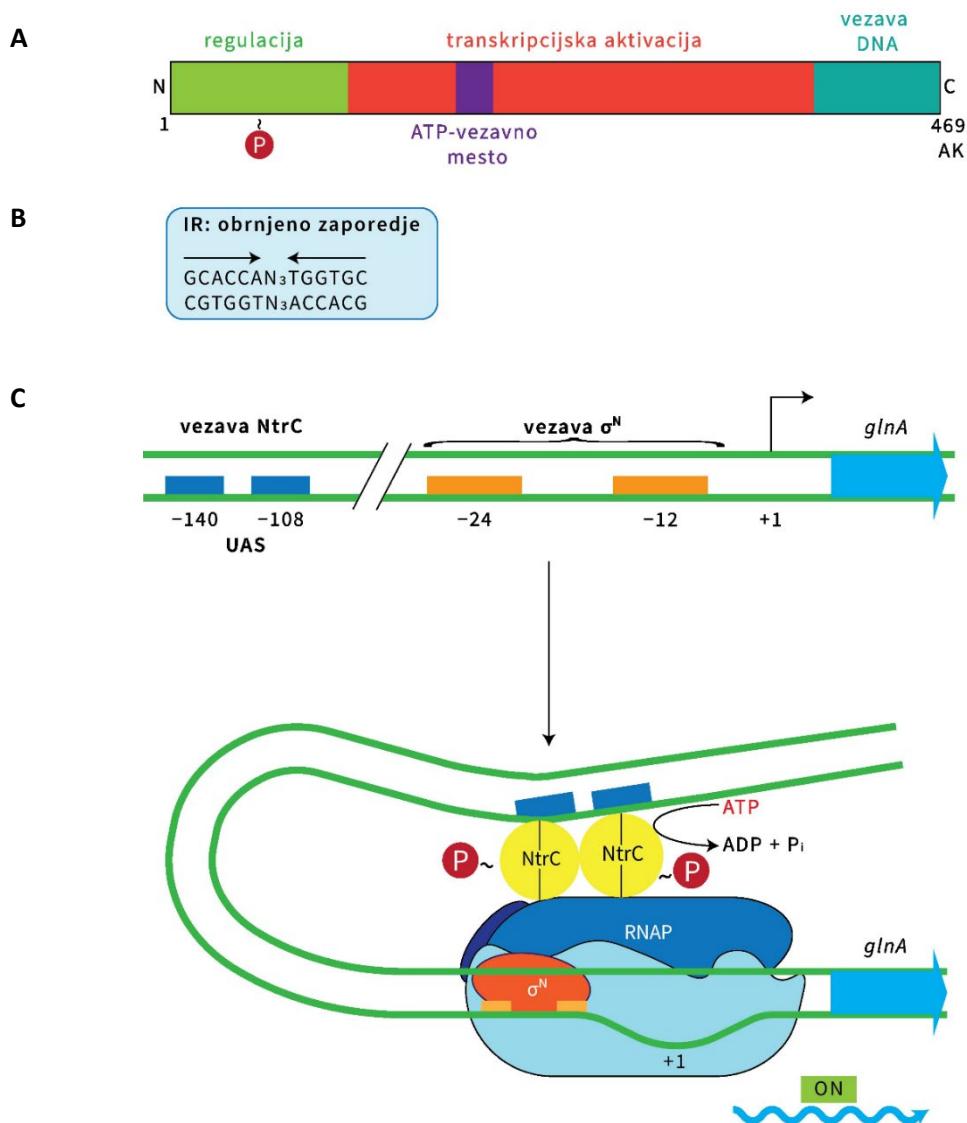
### Transkripcijski aktivator NtrC

Transkripcijski regulator odziva NtrC deluje kot aktivator regulona Ntr. Ima tri domene: N-terminalna domena je regulatorna domena, katere aspartatni aminokislinski ostanek se fosforilira; osrednja domena, ki poskrbi za transkripcijsko aktivacijo, ima ATP-vezavno mesto; C-terminalna domena pa omogoči vezavo na DNA (slika 13-6, A). V nefosforiliranem stanju N-terminalna

domena prekriva osrednjo domeno, zato se ATP ne more vezati na osrednjo domeno in tako ne more priti do aktivacije.

Aktivacija z NtrC~P poteka tako, da se ta veže (veže se kot oligomer) na mesto UAS (ang. upstream activator sequence) (slika 13-6, B), ki je 100 bp navzgor od promotorja. Na UAS se lahko veže tudi NtrC, ki ni fosforiliran, vendar v tem primeru do aktivacije ne pride. Da lahko NtrC~P deluje na RNAP, se mora DNA upogniti, pri čemer pomagajo proteini kot npr. IHF.

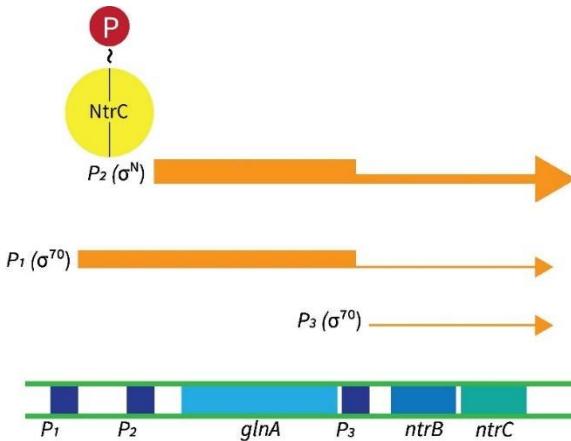
Za nastanek odprtega kompleksa je obvezna razgradnja molekule ATP, ki je vezana na osrednjo domeno NtrC~P.



Slika 13-6: NtrC in njegovo delovanje. NtrC ima več domen (A). Njegovo vezavno mesto (UAS) ima obrnjeno zaporedje (B). Potek aktivacije prepisovanja od NtrC odvisnega promotorja – primer promotorja  $P_2$  *glnA* (C).

### Transkripcija operona *glnA-ntrB-ntrC*

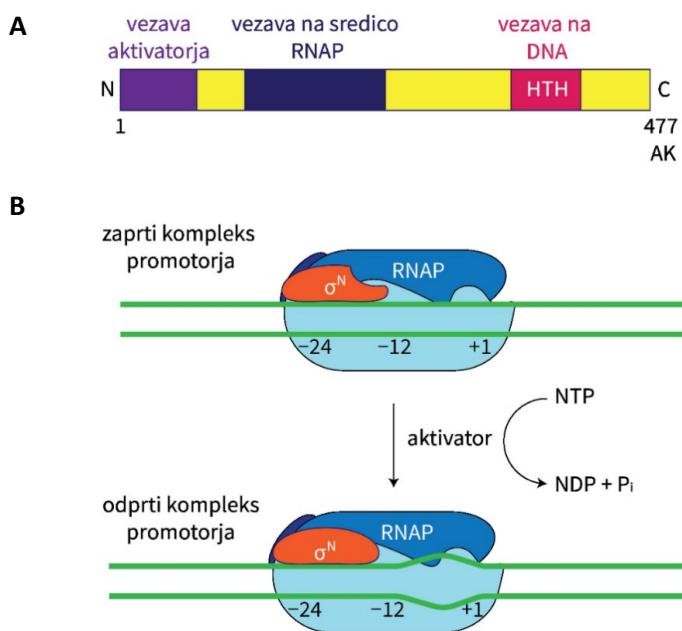
Prepisovanje operona *glnA-ntrB-ntrC* poteka s treh promotorjev, in sicer  $P_1$ ,  $P_2$  in  $P_3$  (slika 13-7). Na promotor  $P_2$ , ki je odziven na NtrC~P, se veže RNAP, ki vsebuje  $\sigma^N$ . Promotorja  $P_1$  in  $P_3$  prepozna  $\sigma^{70}$ , transkripcijsko iniciacijo pa represira NtrC~P.



Slika 13-7: Operon *glnA-ntrB-ntrC*. Debelina črt na sliki nakazuje količino nastale mRNA. Na to vplivajo transkripcijski terminatorji.

### Faktor $\sigma^N$ – gen *rpoN*

Faktor sigma N ( $\sigma^N$ ) imenujemo tudi  $\sigma^{54}$ . Ima tri domene: aktivacijsko domeno (domena za vezavo aktivatorja), ki je N-terminalna; osrednjo domeno, ki je domena za vezavo v sredico encima RNAP; ter domeno proti C-terminalnemu koncu, s katero se veže na DNA (ima motiv HTH) (slika 13-8, A). Za aktivacijo promotorjev Ntr, ki jih prepozna  $\sigma^N$ , je potrebna predhodna vezava aktivatorskega proteina NtrC na mesto UAS. RNAP z vezano  $\sigma^N$  za nastanek odprtrega kompleksa nujno potrebuje ATP. Šele ob razgradnji ATP se spremeni konformacija RNAP, kar omogoči nastanek odprtrega kompleksa promotorja (slika 13-8, B).



Slika 13-8: Domene  $\sigma^N$  (A). Aktivacija promotorjev, ki jih prepozna  $\sigma^N$  (B). Za nastanek odprtrega kompleksa promotorja je potreben aktivatorski protein, ki hidrolizira NTP.

Faktor  $\sigma^N$  najdemo tako pri po Gramu pozitivnih kot tudi pri po Gramu negativnih bakterijah, vendar ni univerzalen. Promotorji, ki jih prepozna, pa so lahko tudi povsem nepovezani z zaznavo dušika. Tako  $\sigma^N$  prepozna npr. promotorje flagelarnih genov bakterij iz rodu *Caulobacter*. Tudi takšni promotorji za aktivacijo potrebujejo aktivatorske proteine, ki hidrolizirajo ATP in se vežejo na svoja tudi več kot 100 bp oddaljena prepoznavna zaporedja.

### *Bacillus subtilis* – uravnavanje z GltC in CodY

Regulacija asimilacije dušika pri *B. subtilis* temelji na interakcijah med proteini. Kadar je koncentracija  $\alpha$ -ketoglutarata visoka, deluje GltC kot transkripcijski aktivator gena za glutamat sintazo (GOGAT). Ko je visoka koncentracija glutamata, pa je aktivacija z GltC zmanjšana.

CodY je DNA-vezavni globalni regulatorni protein, ki je ohranjen pri mnogih po Gramu pozitivnih bakterijah. Je splošni senzor za fiziološko stanje celice. Običajno deluje kot represor genov, katerih produkti sodelujejo pri odzivu bakterije na pomanjkanje hranil. To so npr. gen za glutamat sintazo, geni za privzem in uporabo drugih aminokislín, ki se jih lahko uporabi za sintezo glutamata in glutamina. DNA-vezavna aktivnost CodY je aktivirana z visoko koncentracijo GTP ali razvejenih aminokislín (levcin, izolevcin, valin). Visoka koncentracija molekule GTP pomeni, da ima celica dovolj energije. Razvejene aminokislíne so dober kazalnik metabolne aktivnosti, saj je njihova sinteza odvisna od dostopnosti ogljika, dušika in fosforja. Visoka koncentracija teh aminokislín torej pomeni, da celica ne strada.

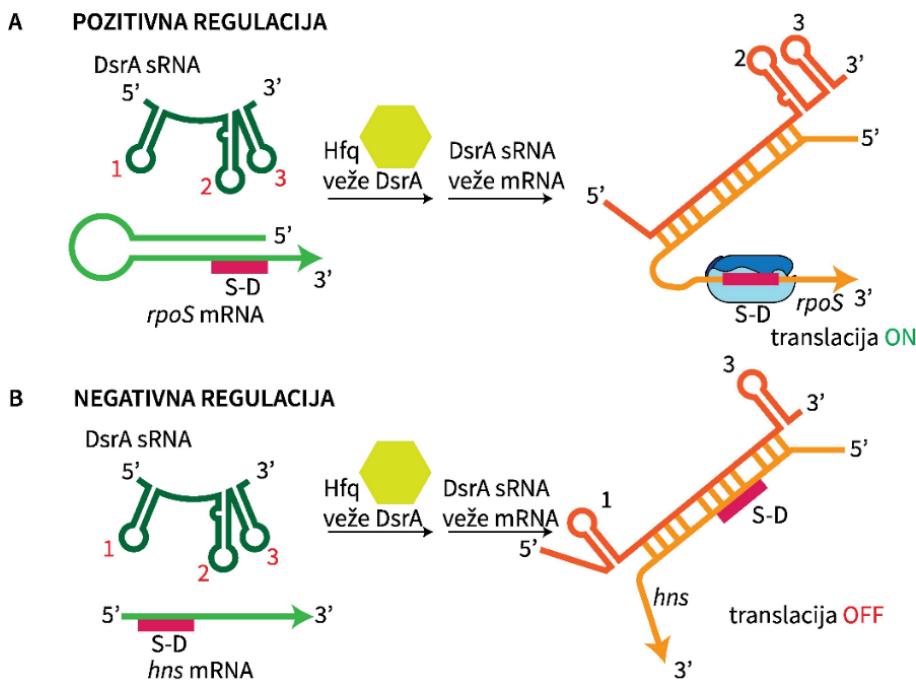
### Splošni odziv na stres pri po Gramu negativnih bakterijah

Za prepisovanje genov, katerih izražanje se mora ob splošnem stresu (npr. stacionarna faza, pomanjkanje hranil, oksidativne poškodbe, nizek pH ...) okrepliti, *E. coli* uporablja poseben faktor  $\sigma$ , sigmo S oz.  $\sigma^S$ , znan tudi pod imenom  $\sigma^{38}$ , ki je podoben  $\sigma^{70}$  (zato vsaka izmed njiju lahko prepozna promotorje genov, ki jih uravnava drugi).

Bakterija mora biti sposobna hitrega odziva na zaznan stres, zato je raven mRNA *rpoS* (gen za  $\sigma^S$ ) vseskozi visoka že v logaritemski fazi rasti, uravnavanje izražanja tega gena oz. količine proteina  $\sigma^S$  pa večinoma poteka posttranskripcijsko. Eden od načinov uravnavanja poteka z regulatorno sRNA, imenovano DsrA, katere sinteza se poveča ob nizki temperaturi.

DsrA pri splošnem odzivu na stres deluje kot pozitivni regulator, saj ob pomoči proteina Hfq z vezavo na regijo 5' UTR mRNA gena *rpoS* pospeši njeno prevajanje. Z vezavo DsrA na mRNA gena *rpoS* se namreč razvije sekundarna struktura, ki v normalnih razmerah zakrije mesto za iniciacijo translacije in tako preprečuje translacijo mRNA za  $\sigma^S$ , v razklenjenjem stanju pa prevajanje lahko steče (slika 13-9, A). V določenih razmerah DsrA lahko nadomesti druga sRNA, po imenu RprA.

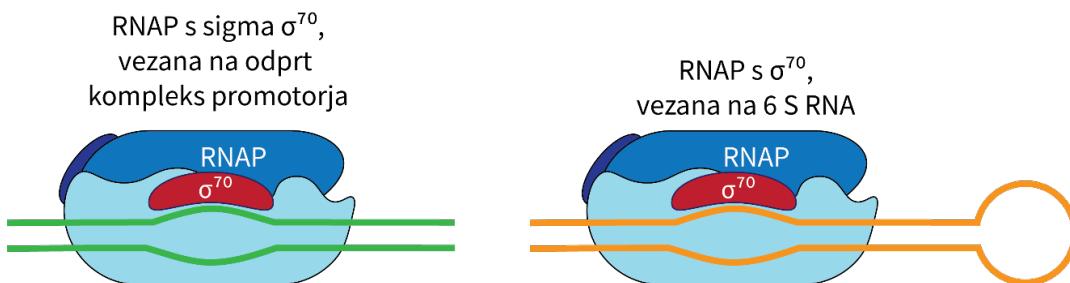
DsrA igra vlogo tudi pri uravnavanju gena *hns*, ki kodira globalni regulatorni protein H-NS. Ta zaradi vezave na DNA, ki povzroči njeno upogibanje, zavira prepisovanje mnogih genov, povezanih z rastjo in metabolizmom. DsrA, ki je v tem primeru negativni regulator, se veže na mRNA *hns* in zakrije zaporedje S-D, s čimer prepreči prevajanje tega gena (slika 13-9, B).



Slika 13-9: Molekula sRNA DsrA v vlogi pozitivnega regulatorja izražanja gena *rpoS* in negativnega regulatorja izražanja gena *hns*: sRNA DsrA se z različnima predeloma veže na mRNA *rpoS* in mRNA *hns*.

Količina  $\sigma^S$  je uravnavana tudi s stabilnostjo proteina, in sicer z RssB in Ira.

Še ena oblika posttranslacijske regulacije poteka z regulatorno RNA: 6 S RNA je regulatorna RNA, ki je strukturno podobna promotorju za  $\sigma^{70}$ . Povzroči, da se RNAP, ki ima vezano  $\sigma^{70}$ , namesto na promotor veže na 6 S RNA in tako ni več na voljo za prepisovanje genov s promotorji, ki jih prepozna  $\sigma^{70}$  (slika 13-10). RNAP, ki ima vezano  $\sigma^S$ , se na 6 S RNA ne veže. Ob vstopu v stacionarno fazo se tako količina regulatorne 6 S RNA poveča, kar vodi v učinkovitejše prepisovanje promotorjev, ki jih prepozna RNAP s  $\sigma^S$ .



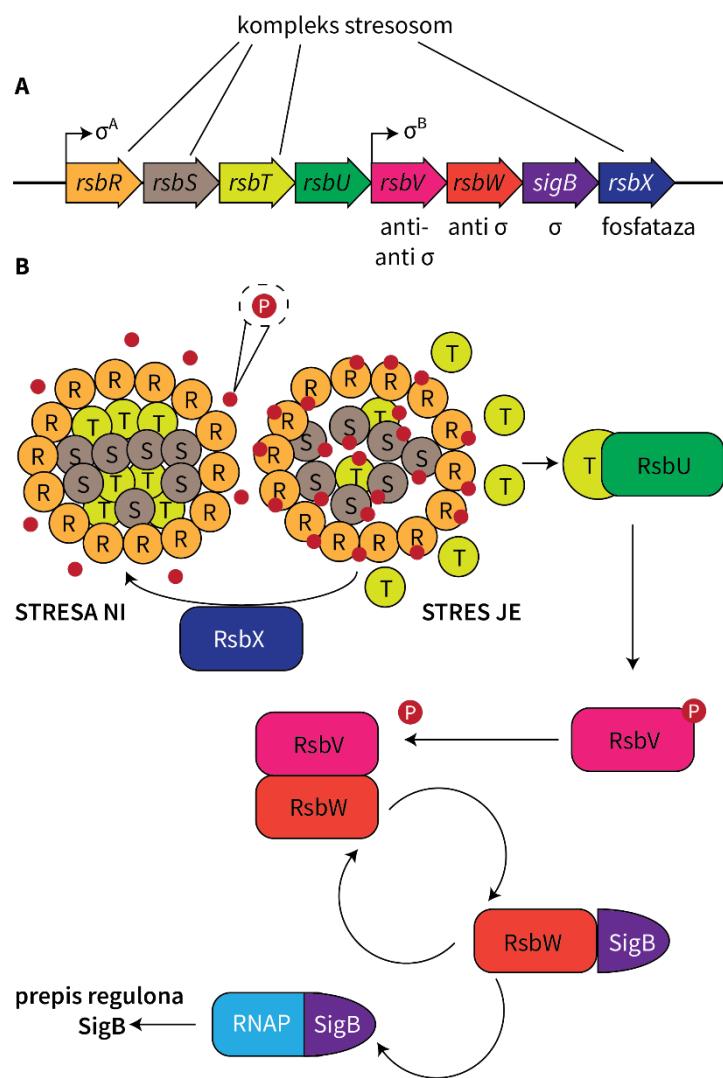
Slika 13-10: RNAP s  $\sigma^{70}$ , ki tvori odprti kompleks, in RNAP s  $\sigma^{70}$ , vezana na 6 S RNA.

### Splošni odziv na stres pri po Gramu pozitivnih bakterijah

Po Gramu pozitivne bakterije, vključno z *B. subtilis*, za splošni odziv na stres, za izražanje genov, ki se v takšnih razmerah morajo inducirati (preko 150 genov), tudi uporabljajo poseben faktor sigma,  $\sigma^B$ . Ta se od  $\sigma^S$  razlikuje v aminokislinski sestavi in prepozna promotorsko zaporedje z drugačnim konsenzusnim zaporedjem. Uravnavanje  $\sigma^B$  temelji na inaktivaciji faktorja antisigma, ki se navadno

veže na  $\sigma^B$  in ji prepreči vezavo na RNAP ter tako v normalnih razmerah ne dovoli izražanja genov, ki so namenjeni za odgovor na splošni stres.

Signalna pot za aktivacijo  $\sigma^B$  poteka preko proteinov Rsb. RsbR, RsbS, RsbT in RsbX tvorijo periplazemski kompleks, ki se imenuje stresosom. Ta zazna zunanjji stres in preko RsbS inducira signalno kaskado s fosforilacijo/defosforilacijo. Vsi proteini Rsb so namreč serinske ali treoninske kinaze, ki se v za celico stresnih razmerah fosforilirajo. V zadnjem koraku kaskade se RsbW (faktor antisigma) sprosti s  $\sigma^B$  in ta se lahko veže na RNAP. Ko stres mine, fosfataza RsbX odstrani fosfatne skupine na proteinih Rsb v stresosomu (slika 13-11).



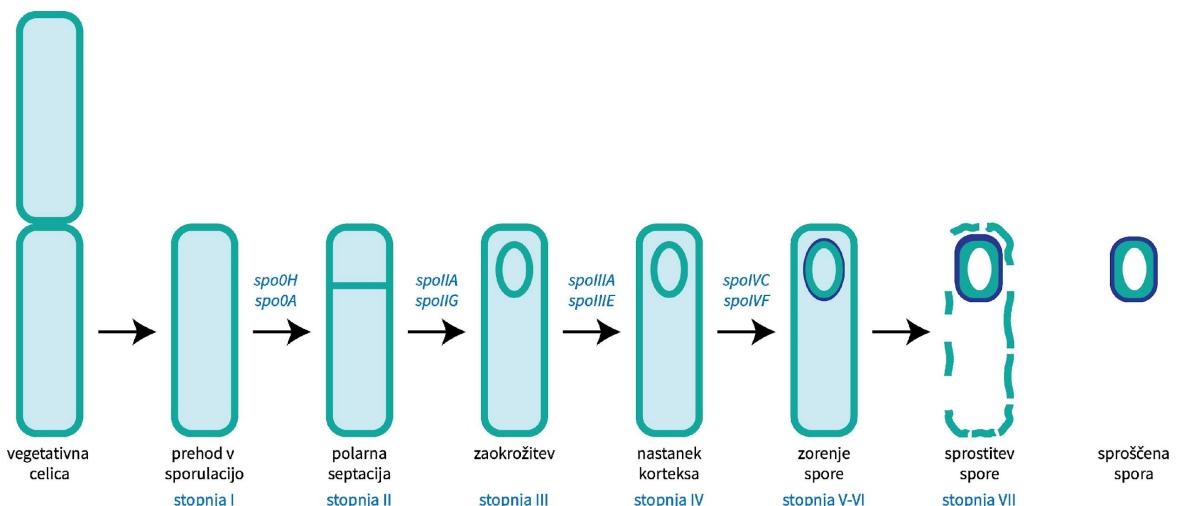
Slika 13-11: Odziv na stres pri po Gramu pozitivnih bakterijah poteka preko proteinov stresosoma in signalne kaskade. RsbW je faktor antisigma. RsbV je faktor anti-antisigma.

### Uravnavanje sporulacije

Sporulacija je najbolje raziskana pri bakteriji *B. subtilis*. Ta genetsko natančno uravnavani proces poteče, kadar bakterija strada. Sporulacija je zadna možnost, ki jo bakterija izbere le, če potrebnih nutrientov ne more pridobiti niti s kanibalizmom.

## Poglavlje 13

V procesu sporulacije nastane celica, imenovana endospora (slika 13-12), ki ni metabolno aktivna in je zelo odporna proti UV-žarkom, visoki temperaturi, kislinam in organskim topilom. Ko bakterija zopet pride v stik s hranili, poteče proces germinacije in metabolizem celice se ponovno aktivira.



Slika 13-12: Stopnje sporulacije in najpomembnejši geni.

V spodnji preglednici in slikah so prikazani nekateri najpomembnejši geni, povezani s sporulacijo.

Preglednica 13-3: Geni, povezani s sporulacijo.

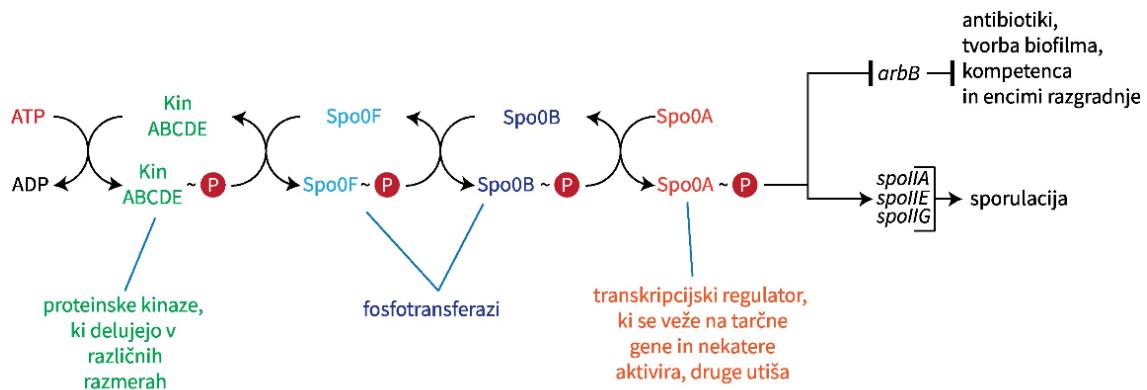
Stopnja sporulacije	Gen	Funkcija
0	<i>spo0A</i>	transkripcijski regulator
	<i>spo0B</i>	protein fosforilacijske kaskade
	<i>spo0F</i>	protein fosforilacijske kaskade
	<i>spo0E</i>	fosfataza
	<i>spo0L</i>	fosfataza
	<i>spo0H</i>	sigma H
	<i>spolIIA</i>	anti-antisigma
II	<i>spolIAB</i>	antisigma
	<i>spolIAC</i>	sigma F
	<i>spolIE</i>	fosfataza
	<i>spolIGA</i>	proteaza
	<i>spolIGB</i>	pro-sigma E
	<i>spolIIG</i>	sigma G
	<i>spolVCB-spolIIC*</i>	pro-sigma K
III	<i>spolVFA</i> in <i>spolVFB</i>	regulator sigma K

\* Produkta dveh genov se morata rekombinirati, da nastane celoten pro-sigma K.

## Fosforilacijska kaskada Spo0

Gen *spo0A* kodira transkripcijski regulator Spo0A, ki se, ko je fosforiliran, veže na tarčne gene in jih aktivira ali pa utiša. Fosforilira se s fosforilacijsko kaskado (slika 13-13), v kateri sodeluje vsaj pet različnih histidinskih kinaz Kin, ki se avtofosforilirajo, ter fosfotransferazna proteina Spo0F in Spo0B.

Kinazi KinA in KinB v odziv na podaljšano stradanje in poškodbe DNA fosforilirata Spo0F, od koder se fosfat preko Spo0B prenese na Spo0A. Na ta način nastane visoka koncentracija Spo0A~P. Kinaze KinC, KinD in KinE se odzovejo na manj izrazito stradanje in vodijo v nastanek nižje koncentracije Spo0F~P. Posledično nastane manj Spo0A~P. Obstajajo tudi fosfataze (RapA in RapB), ki v odziv na okoljske signale defosforilirajo Spo0F~P in s tem znižujejo koncentracijo Spo0A~P. Spo0E je fosfataza, ki defosforilira Spo0A~P.

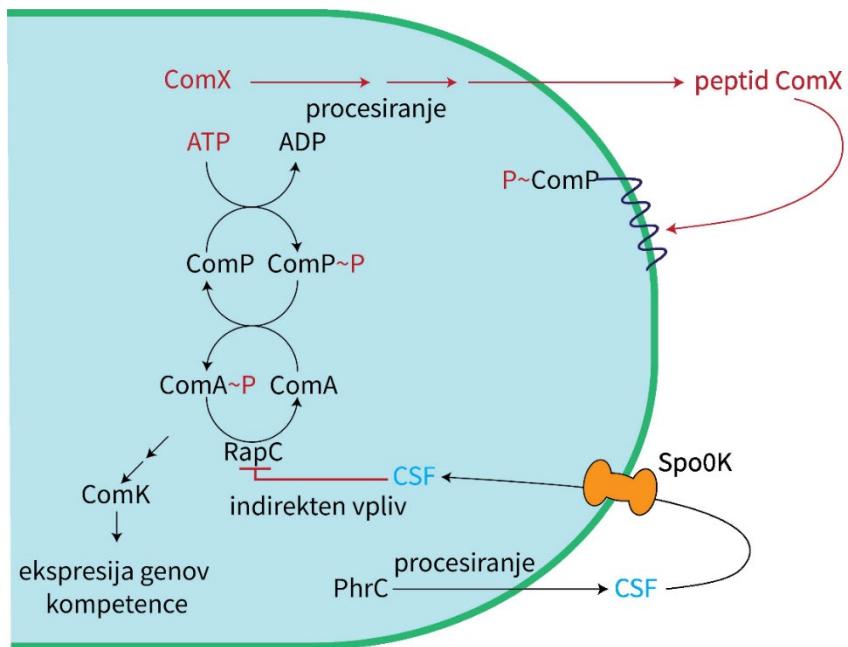


Slika 13-13: Fosforilacijska kaskada Spo0 in njegov učinek.

Od koncentracije fosforiliranega Spo0A je odvisno, kako se celica odzove na stradanje. Kadar je koncentracija Spo0A~P nizka (aktivirane KinC, KinD in KinE), le-ta pozitivno deluje na gene za sintezo antibiotikov, razgradnih encimov, na razvoj kompetence in tvorbo biofilma. Vse to poteka posredno preko *arbb*. V genu *arbb* je namreč zapisan represor, ki zavira izražanje genov za antibiotike, tvorbo biofilma, kompetenco in encime razgradnje. Nizka koncentracija Spo0A~P pa zavre izražanje *arbb* in tako lahko pride do aktivacije prej utišanih genov. Visoka koncentracija Spo0A~P (aktivirani kinazi KinA in KinB) pa neposredno vpliva na gene, katerih produkti sodelujejo pri sporulaciji.

### Povezava med kompetenco in sporulacijo

Kompetenca in sporulacija sta pri *B. subtilis* med seboj povezana odziva na stradanje. Za namene uravnavanja teh dveh procesov bakterije proizvajajo posebne regulatorne peptide Phr (PhrA in PhrC). Ti regulirajo ComA posredno tako, da proteinom Rap, ki defosforilirajo ComA, preprečijo defosforilacijo ComA~P, s čimer se raven ComA~P v celici zvišuje. Proteini Phr so sestavljeni iz signalnih zaporedij daljših polipeptidov, ki so produkti genov *phr*. Sprostijo se v okolje in za ponoven vstop v celico potrebujejo Spo0K, ki se uporablja tako pri kompetenci kot sporulaciji. CSF oz. PhrC negativno deluje na RapB, PhrA pa na RapA. Ta dva proteina Rap sodelujeta pri defosforilaciji Spo0F~P. Povezava med kompetenco in sporulacijo pri *B. subtilis* je prikazana na sliki 13-14.



Slika 13-14: Povezava med kompetenco in sporulacijo pri *B. subtilis*.

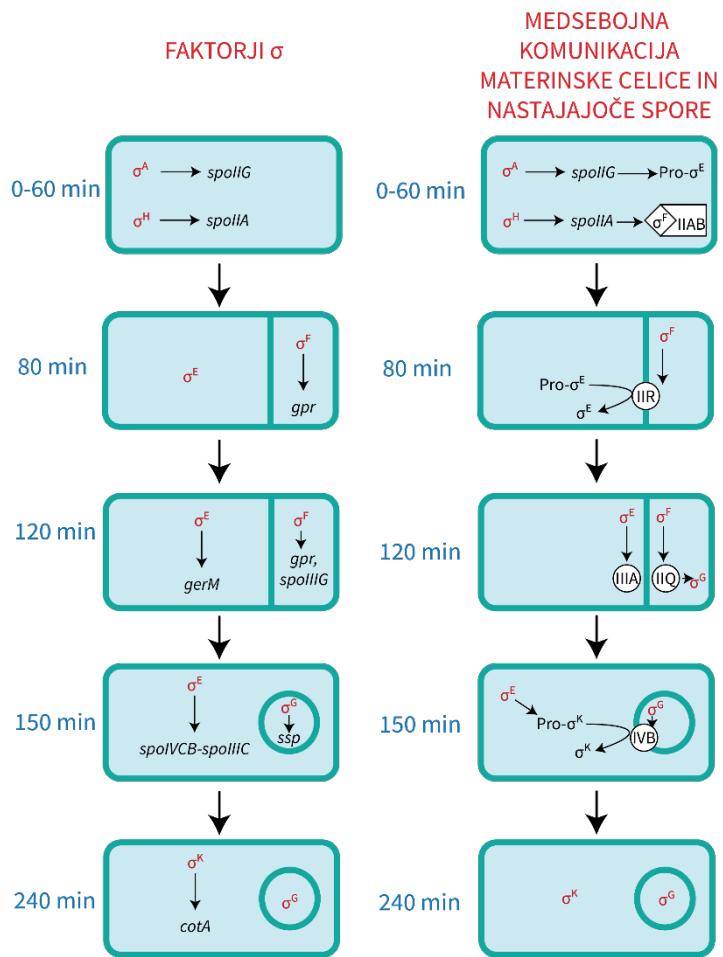
### Časovno in prostorsko uravnavanje sporulacije

Sporulacija pri *B. subtilis* se začne z veliko količino Spo0A~P, ki nadzoruje mnoge gene, povezane z asimetrično delitvijo in aktivacijo faktorjev  $\sigma$ , ti pa so specifični za proces sporulacije. Z asimetrično delitvijo celice nastane večja materinska celica in manjša predspora, iz katere se na koncu razvije spora. V naslednji stopnji procesa materinska celica objame predsporo, čemur sledi izoblikovanje korteksa in plašča spore. Nazadnje materinska celica lizira in v okolje sprosti zrelo sporo. Pri prepisovanju posameznih genov, povezanih s sporulacijo, sodelujejo različni faktorji  $\sigma$ , ki nadomestijo  $\sigma^A$ .  $\sigma^H$  je aktivna pred delitvijo celice,  $\sigma^E$  in  $\sigma^K$  sta aktivni v materinski celici,  $\sigma^F$  in  $\sigma^G$  pa v predspori (slika 13-15).

Po asimetrični delitvi je izražanje genov v predspori najprej odvisno od  $\sigma^F$  in nato od  $\sigma^G$ . Zapis za  $\sigma^F$  najdemo na lokusu *spoIIA*, prepiše pa ga RNAP, ki vsebuje  $\sigma^H$  (to poteka pred delitvijo). RNAP s  $\sigma^F$  prepiše gen *gpr*, ta kodira proteazo, ki ima pomembno vlogo pri germinaciji spore.  $\sigma^F$  sodeluje tudi pri prepisu operona *spoIIIIG*, ki kodira kasneje sintetiziranoo $G$ . Prepisovanje *spoIIIIG* je, kljub različni lokaciji, odvisno od  $\sigma^E$  (gen *spoIIIG*), ki jev materinski celici.  $\sigma^G$  v predspori omogoča prepis genov *ssp*.

V materinski celici  $\sigma^E$  prepiše gen *gerM*, ki je kasneje pomemben pri germinaciji. Z enakim faktorjem  $\sigma$  se prepišejo tudi geni, potrebni za nastanek  $\sigma^K$  (*spoIVCB-spoIIIC*). RNAP s  $\sigma^K$  nato poskrbi za prepis *cotA*, za kar je potrebna tudi aktivnost  $\sigma^G$  v predspori. Geni *cot* kodirajo proteine, ki se vključijo v plašč spore.

Materinska celica in nastajajoča spora med razvojem komunicirata. To zagotovi usklajeno izražanje genov.  $\sigma^E$  in  $\sigma^F$ , kljub prepisu pred delitvijo, postaneta aktivni šele vsaka v svojem delu deleče se celice.  $\sigma^F$  je predhodno inaktivirana s faktorjem antisigma SpolIAB,  $\sigma^E$  pa je pred aktivacijo v obliki Pro- $\sigma^E$ . Aktivnost  $\sigma^G$  je prav tako uravnavana s faktorjem antisigma, aktivnost  $\sigma^K$  pa s proteolizo.

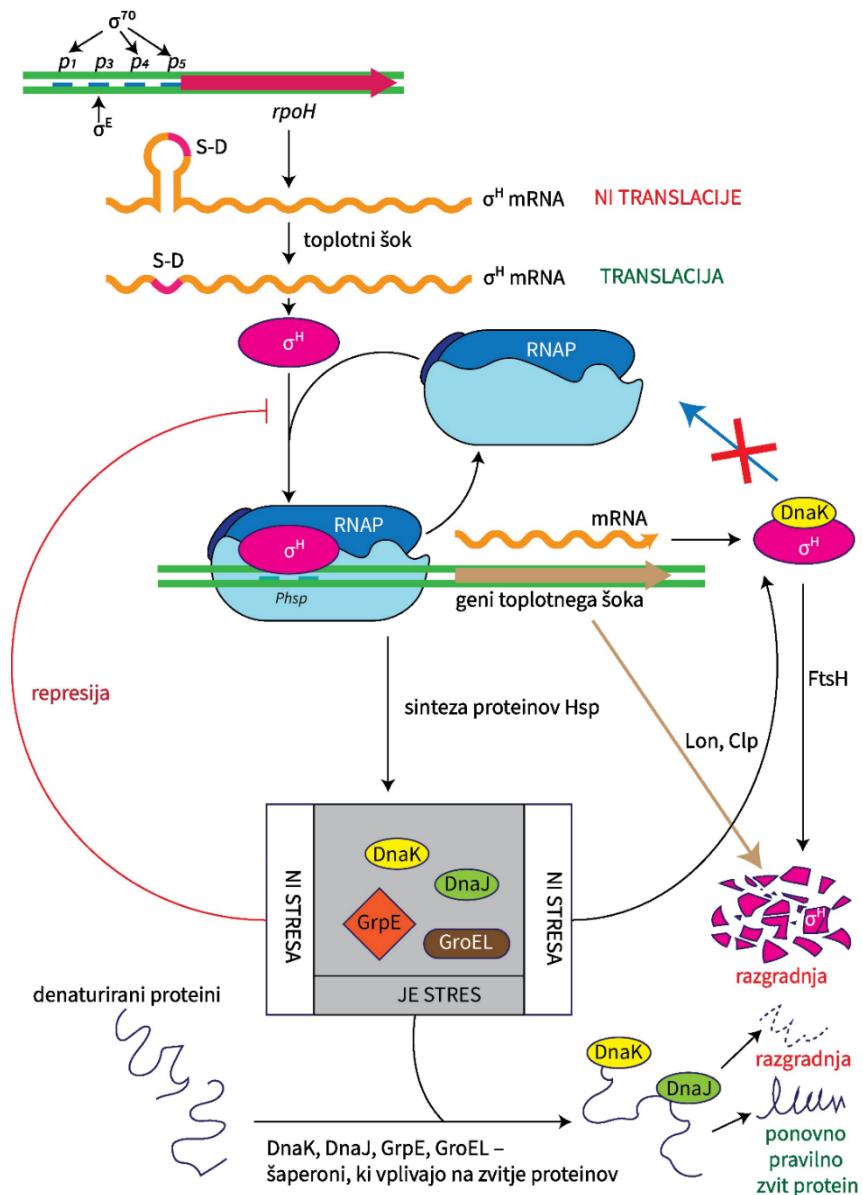


Slika 13-15: Aktivnost različnih faktorjev  $\sigma$  in komunikacija med materinsko celico in predsporo poskrbita za usklajeno izražanje genov, ki sodelujejo pri sporulaciji.

### Toplotni šok

Uravnavanje izražanja genov pri toplotnem šoku je med najbolj preučenimi globalnimi odzivi. Ob dvigu temperature *E. coli* vklopi vsaj 30 različnih genov, ki imajo zapise za proteine Hsps (ang. heat shock proteins). Večinoma se ti geni izražajo tudi pri normalni temperaturi, a se njihovo izražanje ob dvigu temperature bistveno poveča. Geni toplotnega šoka se vklopijo tudi ob izpostavitvi bakterije etanolu ali drugim organskim topilom, ki denaturirajo proteine. Odziv je torej precej splošen. V nasprotju z večino procesov je bil najprej odkrit pri evkariontih, šele kasneje pa je bil opažen tudi pri bakterijah.

Odziv na toplotni šok pri *E. coli* se začne s povečanjem koncentracije faktorja sigma H,  $\sigma^H$ , katerega količina se pri porastu temperature s 30°C na 42°C poveča petnajstkrat. Ta nato prepozna promotorje genov, ki sodelujejo pri odzivu na toplotni šok. Količina aktivne  $\sigma^H$  je regulirana tudi posttranslacijsko. Kadar celica ni v okolju s povišano temperaturo, je  $\sigma^H$  zaradi vezave na DnaK inaktivirana, označena za razgradnjo in nato tudi razgrajena. Ko pa se temperatura dvigne, pride do denaturacije mnogih proteinov, na katere se veže DnaK (ob pomoči GrpE in DnaJ) in pomaga pri njihovem zvitju oz. pri razgradnji, če ponovno zvitje ni mogoče. Na ta način je na voljo manj DnaK za vezavo na  $\sigma^H$ . Posledično se  $\sigma^H$  lahko veže na RNAP in geni toplotnega šoka se lahko izražajo (slika 13-16).



Slika 13-16: Odziv na topotni šok pri *E. coli*. DnaK, DnaJ, GrpE in GroEL so šaperoni, ki pomagajo zviti zaradi povišane temperature denaturirane proteine. Lon in Clp sta proteaze, ki denaturirane proteine razgradita.

### Topotni šok pri drugih bakterijah

Večina drugih bakterij, vključno z *B. subtilis*, se na topotni šok odzove drugače, uporabljajo namreč običajen faktor  $\sigma$  in represor HrcA. Ta prepreči izražanje genov topotnega šoka pri normalni temperaturi. Veže se na mesto CIRCE, ki je med bakterijami zelo ohranjeno (zasledimo ga tudi pri cianobakterijah).

Te bakterije temperature ne zaznavajo preko DnaK, temveč preko šaperona GroEL, ki je potreben za zvite HrcA. Ob povišani temperaturi ga titrirajo napačno zviti proteini, kar pomeni, da ne more več poskrbeti za pravilno zvite represorja HrcA. Represor HrcA tako ni aktiven in geni topotnega šoka niso več utišani.

## Odziv na stres ovojnice

Celična membrana bakterije je prva zaščita pred zunanjim stresom. Zaradi njene občutljivosti za spremembe v osmolarnosti, toksične spojine, topotni šok in spremembe pH so se razvili številni odzivi na stres. Vloga odzivov na stres ovojnice (zunajcitoplazemski stres) je ohranjanje integritete membran.

V normalnih razmerah je osmotski pritisk v celici višji od tistega v okolju. Celica integriteto ohranja s celično steno. Ker je to možno samo do neke mere, mora bakterija na spremembo v osmolarnosti reagirati. Taka sprememba lahko nakazuje tudi to, da je bakterija v gostitelju. Stresni odziv, ki skrbi za ohranitev integritete membrane, vključuje naslednje mehanizme:

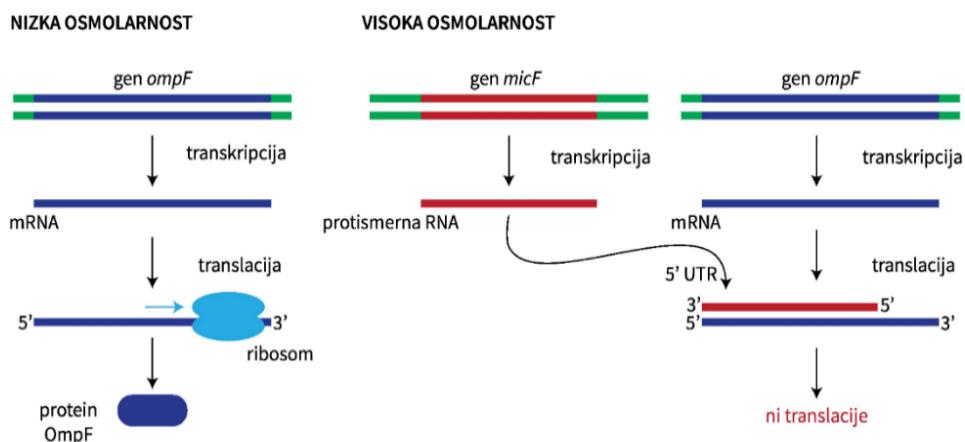
- izločanje ali akumulacija ionov K<sup>+</sup> in drugih spojin (npr. prolin ali glicin betain);
- sinteza oligosaharidov v periplazmi (*E. coli* in druge po Gramu negativne bakterije, ki morajo skrbeti za osmotski pritisk tako v citoplazmi kot periplazmi);
- regulacija sinteze porinov zunanje membrane, kot sta OmpF in OmpC.

Pore, ki sestojijo iz proteinov OmpF, so večje. Omogočajo hitrejši prehod snovi in omogočajo prednost v vodnih okoljih. Pore iz proteinov OmpC so v primerjavi s prejšnjimi manjše in ne dopuščajo prehoda večjih toksinov (npr. soli žolčnih kislin). *E. coli* ima v okolju z višjo osmolarnostjo na površini izraženih več por iz proteinov OmpC in manj tistih iz OmpF. Nasprotno ima v okolju z nižjo osmolarnostjo manj por OmpC, več pa OmpF.

Več por OmpC in manj por OmpF ima bakterija tudi pri višji temperaturi, višjem pH, oksidativnem stresu ter v prisotnosti organskih topil (etanol), nekaterih antibiotikov in toksinov. Razlog za to je, da manjša pora OmpC omejuje vstop mnogih toksičnih snovi v celico. Gena *ompF* in *ompC* sta tako del več različnih regulonov, ki se odzivajo na različne stresne dejavnike.

## Uravnavanje prevajanja *ompF* s protismerno RNA

OmpF v zunani membrani deluje kot kanal za pasivno difuzijo majhnih polarnih molekul. Izražanje njegovega gena *ompF* je na ravni prevajanja uravnavano s protismerno sRNA MicF. Ta se poveže s 5'-koncem mRNA za *ompF* in s tem zasede ribosomsko vezavno mesto mRNA *ompF*. Protein OmpF ne nastaja, saj je prevajanje njegove mRNA onemogočeno. Gen za MicF je aktiviran, kadar je celica v okolju z visoko osmolarnostjo (slika 13-17).

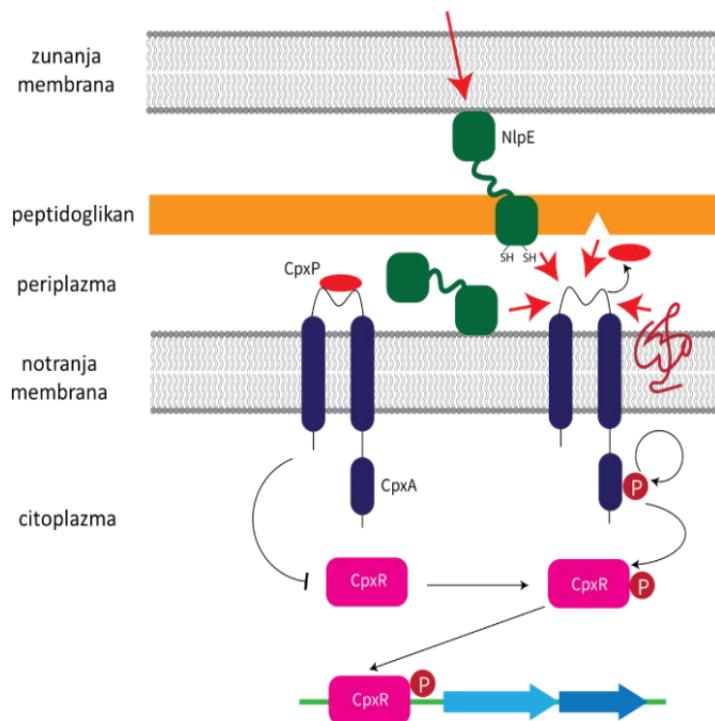


Slika 13-17: Uravnavanje prevajanja mRNA gena *ompF* s sRNA *micF* v okolju z nizko in visoko osmolarnostjo.

Izražanje gena *micF* pa se sproži tudi ob drugih vrstah stresa, saj se na promotorsko regijo gena *micF* lahko pri različnih stresnih dejavnikih vežejo različni aktivatorji, kot so SoxS (oksidativni stres), MarA (prisotnost šibkih kislin in nekaterih antibiotikov), Rob (prisotnost peptidnih antibiotikov) in OmpR~P. OmpR je del dvokomponentnega sistema EnvZ-OmpR, ki tudi vpliva na razmerje OmpC in OmpF. EnvZ je senzorska kinaza v notranji membrani, ki se ob stresu ovojnice fosforilira in nato preda fosfatno skupino proteinu OmpR, transkripcijskemu regulatorju, ki uravnava sintezo porinov. Ob visoki osmolarnosti je protein EnvZ pogosteje fosforiliran, kar vodi do višje ravni OmpR~P in transkripcije gena *ompC*. Ob nizki osmolarnosti prevlada fosfatazna funkcija EnvZ in zato je raven OmpR~P nižja, izvede se transkripcija *ompF*.

### Dvokomponentni sistem CpxA-CpxR

Eden od mehanizmov, s katerim *E. coli* zaznava stres ovojnice, je tudi dvokomponentni sistem CpxA-CpxR. CpxA je senzorska kinaza, ki se v odziv na signal fosforilira in nato fosfat prenese na CpxR, ki je odzivni regulator in transkripcijski aktivator. Signali za fosforilacijo CpxA so lahko različni: od kopičenja napačno zvitih proteinov, poškodb peptidoglikanskega sloja, različnih površinskih signalov do redoks stanja v periplazmi in zastojev v transportu lipoproteinov zunanje membrane. Fosforiliran CpxR aktivira več kot 100 različnih genov, med njimi tudi proteaze in šaperone, ki pomagajo zviti in odstraniti v periplazmi nakopičene proteine. CpxP je periplazemski protein, ki zavira aktivacijo CpxA-CpxR (slika 13-18).



Slika 13-18: Aktivacija dvokomponentnega sistema CpxA-CpxR.

### Zunajcitoplazemski faktor $\sigma^E$

Še en mehanizem, ki ga ima *E. coli* za odziv na zunajcitoplazemski stres, je faktor sigma E,  $\sigma^E$ . Ta omogoča prepis genov, katerih produkti delujejo v periplazmi kot proteaze (razgradijo poškodovane periplazemske proteine) in šaperoni (pomagajo zviti proteine, ki preidejo periplazmo). Uravnavanje aktivnosti  $\sigma^E$  poteka preko faktorja antisigma RseA. To je protein v notranji membrani, ki sega tako v periplazmo kot citoplazmo. Citoplazemska domena veže  $\sigma^E$  in jo inaktivira. Ob zunajcitoplazemskem stresu se periplazemska domena RseA zaradi delovanja

proteaze DegS odcepi, nakar proteaza RseP odcepi citoplazmesko domeno RseA z vezanim  $\sigma^E$ . Proteaza ClpXP zatem razgradi preostali del RseA in tako se  $\sigma^E$  sprosti in lahko sodeluje pri prepisovanju genov, povezanih s tem stresom.

### Uravnavanje, vezano na železo

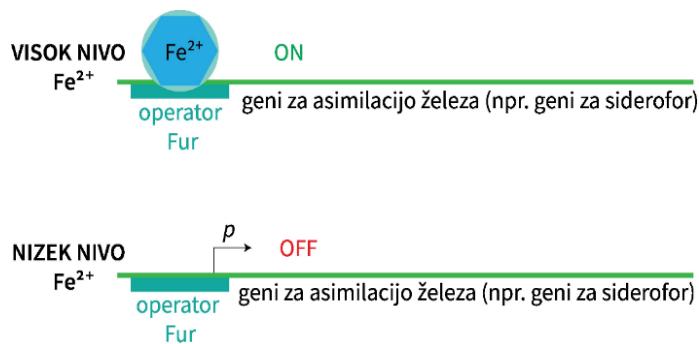
Železo je za bakterije pomemben nutrient. Mnogi encimi (npr. železova superoksid dismutaza) ga vsebujejo v aktivnem centru, kjer ima vlogo katalizatorja. Železo je tudi del mnogih transkripcijskih faktorjev. Eden od teh je FNR, ki uravnava gene za anaerobni metabolizem in z železom zaznava raven kisika. Bakterija mora zato imeti vedno zadostno količino železa, obenem pa se to ne sme nakopičiti do toksične koncentracije.

Železo v naravi obstaja v dveh oblikah.  $Fe^{3+}$  je netopna oblika, ki jo bakterije stežka uporabljajo.  $Fe^{2+}$  je topno železo, ki pa se ob prisotnosti kisika kmalu oksidira do  $Fe^{3+}$ . V naravi je tako v aerobnih okoljih železo večinoma v tej obliki. Bakterije ga pridobijo ob pomoči proteinov sideroforov, ki jih izločajo v okolje. Siderofori nato vežejo  $Fe^{3+}$  in ga transportirajo v celico, kjer se v citoplazmi zaradi reducirajočega okolja pretvori v  $Fe^{2+}$ . Bakterije siderofore sintetizirajo samo takrat, kadar jim železa primanjkuje.

### Regulon Fur in uravnavanje z represorjem Fur

Fur je DNA-vezavni represorski protein, ki uravnava prepisovanje genov svojega regulona. Na N-terminalnem koncu ima motiv HTH, s katerim se veže na DNA, na C-terminalnem koncu dimerizacijsko domeno in v sredini vezavno mesto za železo. Pojavlja se v obliki aporepresorja (nima vezanega  $Fe^{2+}$ ) ali represorja (ima vezano  $Fe^{2+}$ ).

Kadar je v celici velika količina  $Fe^{2+}$ , ta ion deluje kot korepresor. Veže se na aporepresor Fur in povzroči njegovo konformacijsko spremembo, s čimer ta postane aktiven represor. Fur- $Fe^{2+}$  se veže na operatorska zaporedja Fur, delno prekrivna z zaporedji -10 v promotorju, ki ga prepozna  $\sigma^70$ . RNAP se na te promotorje ne more več vezati in posledično se ustavi prepisovanje vseh genov in operonov regulona Fur. Če celici  $Fe^{2+}$  začne primanjkovati, Fur ostane v obliki aporepresorja. V tem primeru se ne more vezati na operatorska zaporedja in geni za asimilacijo železa (npr. geni za sintezo sideroforov) se izrazijo (slika 13-19).



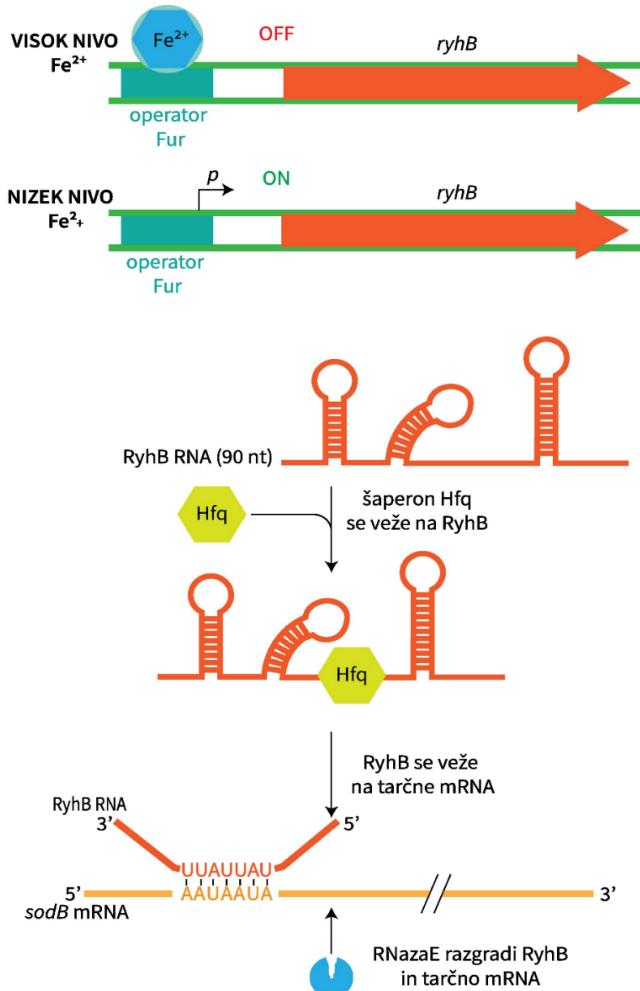
Slika 13-19: Nizka raven  $Fe^{2+}$  pomeni izražanje genov za asimilacijo železa. Kadar ima bakterija železa dovolj, Fur- $Fe^{2+}$  represira izražanje genov za njegovo asimilacijo.

Regulatorni sistem Fur je med po Gramu negativnimi bakterijami močno ohranjen. Podoben represorski sistem imajo tudi po Gramu pozitivne bakterije, vendar ne vse.

### Regulon Fur in uravnavanje s sRNA RyhB

Številni geni so ob prebitku železa utišani, izražanje nekaterih pa se v teh razmerah poveča. Železo se takrat porablja za različne proteine, ki ga vsebujejo (npr. akonitaza A in železova superoksid dismutaza), in proteine, ki so namenjeni njegovi hrambi (npr. feritinu podoben protein). Aktivacija teh genov ne poteka neposredno s Fur, temveč posredno s sRNA RyhB.

Ta molekula sRNA se sintetizira, kadar je bakterija v okolju z nizko ravnjo  $\text{Fe}^{2+}$ , in zavira izražanje genov, katerih produkti so potrebni ob visoki koncentraciji  $\text{Fe}^{2+}$ . Tako zagotavlja, da se železo porablja le za esencialne proteine, ki ga vsebujejo. S šaperonom Hfq se RyhB komplementarno poveže s tarčnimi molekulami mRNA. Nastala dvostranska molekula RNA predstavlja substrat za RNazo E, ki jo razgradi in s tem onemogoči prevajanje teh tarčnih molekul mRNA. V okolju s prebitkom železa izražanje RyhB preprečuje represor Fur (slika 13-20).



Slika 13-20: Mehanizem delovanja RyhB.

### TEMELJNI POJMI

- Regulon – geni in operoni, ki jih nadzira en regulatorni protein (ali RNA), so del enega regulona.
- Stimulon – skupina regulonov, ki se odzove na isti okoljski dejavnik.
- Siderofor – protein, ki ga bakterije izločajo v okolje za pridobivanje železa.

## POVZETEK

Bakterije se na različne vire energije in ogljika, spremenljiv pH, omejen dostop do hrani, temperaturna nihanja in druge stresne dejavnike prilagodijo z globalnimi regulatornimi mehanizmi. Na metabolizem različnih virov ogljika se bakterija prilagaja s katabolno regulacijo. Ta pri bakterijah *E. coli* in *B. subtilis* poteka različno. Asimilacijo dušika uravnavajo s sistemom Ntr. Za prepisovanje genov, katerih izražanje se mora okrepliti, ob splošnem stresu po Gramu negativne bakterije (*E. coli*) uporabljajo  $\sigma^S$ , po Gramu pozitivne (*B. subtilis*) pa  $\sigma^B$ . Kadar bakterije stradajo, lahko vstopijo tudi v proces sporulacije in tvorilo endospore. Proses je zelo natančno uravnavan, saj se uporablja le kot zadnja možnost. Uravnavanje izražanja genov pri toplotnem šoku je med najbolj preučenimi globalnimi odzivi. *E. coli* za prepisovanje ustreznih genov uporablja  $\sigma^H$ . Za bakterije je nevaren tudi stres ovojnice, na katerega pa se lahko odzivajo na več načinov. Uravnavanje, vezano na železo, poteka z represorjem Fur in sRNA RyhB.

## VIRI

Amemiya, H. M., Schroeder, J., Freddolino, P. L. 2021. Nucleoid-associated proteins shape chromatin structure and transcriptional regulation across the bacterial kingdom. *Transcription*, 12(4): 182–218. doi: 10.1080/21541264.2021.1973865.

Baker, T. A., Howe, M. M., Gross, C. A. 1983. Mu dX, a derivative of Mu d1 (*lac Apr*) which makes stable *lacZ* fusions at high temperature. *Journal of Bacteriology*, 156(2): 970–974, <https://doi.org/10.1128/jb.156.2.970-974.1983>.

Bingham, R., Ekunwe, S. I., Falk, S., Snyder, L., Kleanthous, C. 2000. The major head protein of bacteriophage T4 binds specifically to elongation factor Tu. *Journal of Biological Chemistry*, 275(30): 23219-26. doi: 10.1074/jbc.M002546200.

Brovedan, M. A., Cameranesi, M. M., Limansky, A. S., Morán-Barrio, J., Marchiaro, P., Repizo, G. D. 2020. What do we know about plasmids carried by members of the *Acinetobacter* genus? *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36, 109, <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02890-z>.

Chen, J., Quiles-Puchalt, N., Chiang, Y. N., Bacigalupe, R., Fillol-Salom, A., Chee, M. S. J., Fitzgerald, J. R., Penadés, J. R. 2018. Genome hypermobility by lateral transduction. *Science*, 362(6411): 207–212. doi: 10.1126/science.aat5867.

Chiang, Y. N., Penadés, J. R., Chen, J. 2019. Genetic transduction by phages and chromosomal islands: The new and noncanonical. *PLoS Pathogens*, 15(8): e1007878. doi: 10.1371/journal.ppat.1007878.

Diallo, I., Provost, P. 2020. RNA-Sequencing analyses of small bacterial RNAs and their emergence as virulence factors in host-pathogen interactions. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5): 1627. doi: 10.3390/ijms21051627.

Dillon, S., Dorman, C. 2010. Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nature Reviews Microbiology*, 8: 185–195, <https://doi.org/10.1038/nrmicro2261>.

Gillings, M. R. 2014. Integrins: past, present, and future. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78, 2: 257–277, <https://doi.org/10.1128/MMBR.00056-13>.

Guio, L., González, J. 2019. New insights on the evolution of genome content: Population dynamics of transposable elements in flies and humans. *Methods in Molecular Biology*, 1910: 505–530, [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9074-0\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9074-0_16).

Hacker, J., Carniel, E. 2001. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO reports*, 2, 5: 376–381, <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve097>.

Helinski, D. R. 2022. A brief history of plasmids. *EcoSal Plus*, 10, 1: eESP00282021, <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0028-2021>.

Henkin, T. M., Peters, J. E. 2020. Snyder & Champness Molecular genetics of bacteria. 5th ed. Washington DC, American Society for Microbiology, John Wiley & Sons, <https://doi.org/10.3201/eid2801.211628>.

- Hews, C. L., Cho, T., Rowley, G., Raivio, T. L. 2019. Maintaining integrity under stress: Envelope stress response regulation of pathogenesis in Gram-negative bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9: 313. doi: 10.3389/fcimb.2019.00313.
- Jacoby, G. A. 2009. AmpC beta-lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 22, 1: 161–182, <https://doi.org/10.1128/CMR.00036-08>.
- Klaiman, D., Kaufmann, G. 2011. Phage T4-induced dTTP accretion bolsters a tRNase-based host defense. *Virology*, 414(1): 97–101. doi: 10.1016/j.virol.2011.03.022.
- Koonin, E. V., Makarova, K. S. 2019. Origins and evolution of CRISPR-Cas systems. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 374(1772): 20180087. doi: 10.1098/rstb.2018.0087.
- Liebert, C. A., Hall, R. M., Summers, A. O. 1999. Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63, 3: 507–522, <https://doi.org/10.1128/MMBR.63.3.507-522.1999>.
- Lee, K. Y., Lee, B. J. 2016. Structure, biology, and therapeutic application of toxin-antitoxin systems in pathogenic bacteria. *Toxins (Basel)*, 8(10): 305. doi: 10.3390/toxins8100305.
- Maeda, M., Shimada, T., Ishihama, A. 2015. Strength and regulation of seven rRNA promoters in *Escherichia coli*. *PLoS One*, 10(12): e0144697. doi: 10.1371/journal.pone.0144697.
- McKenney, P. T., Driks, A., Eichenberger, P. 2013. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews in Microbiology*, 11(1): 33–44. doi: 10.1038/nrmicro2921.
- Molodtsov, V., Murakami, K. S. 2018. Minimalism and functionality: Structural lessons from the heterodimeric N4 bacteriophage RNA polymerase II. *Journal of Biological Chemistry*, 293(35): 13616–13625. doi: 10.1074/jbc.RA118.003447.
- Rashid, F.-Z. M., Crémazy, F. G. E., Hofmann, A., Forrest, D., Grainger, D. C., Heermann, D. W., Dame, R. T. 2023. The environmentally-regulated interplay between local three-dimensional chromatin organisation and transcription of *proVWX* in *E. coli*. *Nature Communications* 14, 7478. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-43322-y>.
- Richard, E., Darracq, B., Loot, C., Mazel, D. 2022. Unbridled integrons: A matter of host factors. *Cells*, 11, 6: 925, <https://doi.org/10.3390/cells11060925>.
- Singh, G., Yadav, M., Ghosh, C., Rathore, J. S. 2021. Bacterial toxin-antitoxin modules: classification, functions, and association with persistence. *Current Research in Microbial Sciences*, 7, 2: 100047, <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100047>.