

NASTAVNI TEKST

OPERON

regulacija genske ekspresije u prokariota

doc. dr. sc. Nives Pećina-Šlaus, dipl. ing. Tamara Nikuševa-Martić, Krešimir Radić, prof. dr. sc. Floriana Bulić-Jakuš
Zavod za biologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Genska ekspresija može biti kontrolirana na različitim razinama; na razini transkripcije, obrade mRNA i translacije. Transkripcija je, svakako, jedan od osnovnih mehanizama regulacije ekspresije gena. Temeljni koncept za razumijevanje kontrole transkripcije predložili su još 1961 godine Francois Jacob i Jacques Monod, za koji su četiri godine kasnije dobili i Nobelovu nagradu. Radilo se o kontroli ekspresije u bakterije *E. coli*, danas već klasičnom modelu *lac*-operona (bakterijskog operona za metabolizam laktoze). No razjasnimo prvo što je to operon?

Bakterijski geni organizirani su u transkripcijske jedinice - **operone**, koji sadrže skupine gena čija je funkcija obično zajednička, a regulirani su kao jedna genetička jedinica.

Čuveni *lac*-operon sastoji se od tri strukturalna gena i predstavlja osnovni primjer genske regulacije. Možda najveći doprinos razumijevanju kontrole transkripcije, te posljedično i genske ekspresije je razlučivanje gena unutar jednog operona na strukturalne gene i tzv. regulatorne sekvence molekule DNA. Ova osnovna podjela koju su zorno predočili svojim modelom Jacob i Monod danas se stručno opisuje kao *cis*-djelujuće sekvence (*cis-acting sequences*) i sekvence koje kodiraju *trans*-djelujuće produkte.

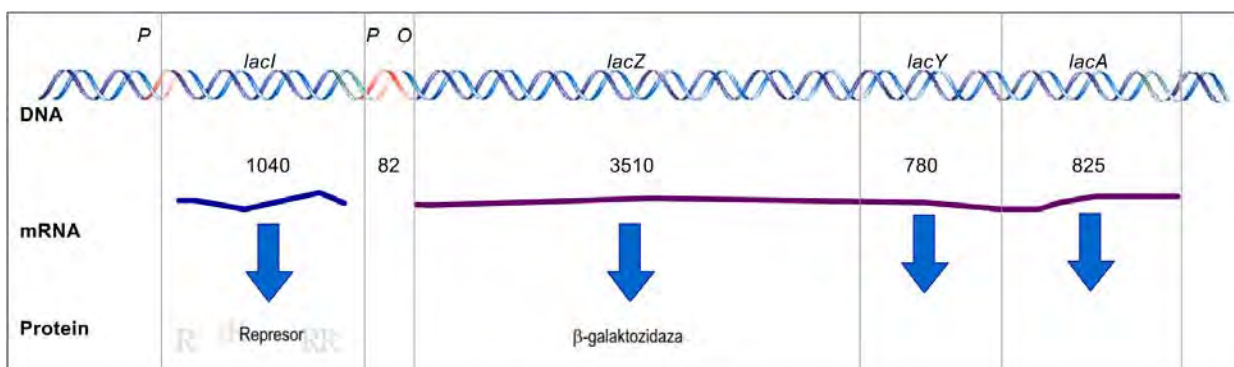
Razjasnimo malo ovu naizgled kompliciranu podjelu. Gen je sekvenca DNA molekule koja kodira difuzibilni produkt. Taj produkt je najčešće bjelančevina (protein), ali također može biti i RNA (kod gena koji kodiraju tRNA i rRNA). U oba slučaja

produkt odlazi s mjesta sinteze i djeluje negdje drugdje. To je *trans*-djelujući genski produkt.

Cis-djelujuće sekvence funkcioniraju unutar DNA. Najčešće su to mjesta u molekuli DNA, te možemo reći da funkcioniraju *in situ* djelujući samo na onu DNA s kojom su fizički povezane. Najbolji primjer za *cis*-djelujuće sekvence su sekvence koje obilježavaju početak i kraj transkripcijske jedinice, promotor i terminator. Tako možemo reći da je aktivnost jednog gena regulirana specifičnim interakcijama *trans*-djelujućih produkata (najčešće proteina) sa *cis*-djelujućim sekvencama (najčešće mjesta u DNA).

Da bismo lakše mogli objasniti mehanizam genske "sklopke" *lac*-operona, vratimo se ponovno na pojmove strukturalni gen i gen regulator. **Strukturalni gen** je bilo koji gen koji kodira proteinski produkt. Očito je da u ovu skupinu spadaju najrazličitiji proteini koji uključuju strukturalne proteine, enzime s katalitičkim djelovanjem, te regulatorne proteine. **Gen regulator** opisuje strukturalni gen koji kodira protein uključen u regulaciju ekspresije drugih gena. Bit same regulacije jest da gen regulator kodira protein koji kontrolira transkripciju vezujući sa na određeno mjesto(a) u DNA. Regulacije može biti pozitivna (interakcija pali gensku ekspresiju) ili negativna (dolazi do gašenja genske ekspresije).

Opišimo sada strukturu samog *lac*-operona, genskog clustera veličine oko 6000 pb (Slika 1).



Slika 1. Struktura *lac* operona. *Lac* operon zauzima oko 6.000 pb. S lijeve strane gen *lacI* ima vlastiti promotor i terminator. Kraj *lacI* regije dodan je promotoru P. Operator O zauzima prvih 26 pb dugog *lacZ* gena, zatim slijede *lacY* i *lacA* geni i na kraju terminator

Kada se RNA sintetizira na DNA kalupu (proces transkripcije), u DNA moraju postojati određena mjesta (sekvence) koje kažu da sinteza RNA (transkripcija) mora započeti, ali isto tako kontroliraju njenu brzinu. Te regulatorne sekvence u DNA molekuli nazivaju se PROMOTORI. Promotor lac-operona veličine je oko 25 nukleotida, postavljen je prije početne sekvence za transkripciju (5' kraj) i ne prepisuju se u mRNA.

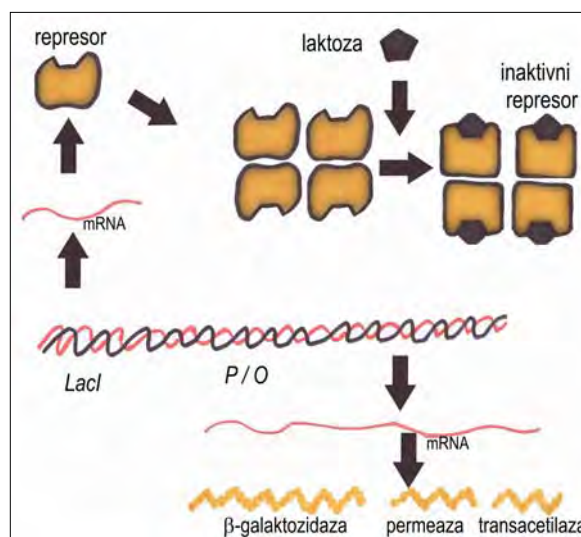
Između promotora i sekvenci koje kodiraju aminokiseline (strukturnih gena), smještene su druge regulatorne sekvence nazvane OPERATORI. Operator prepoznaju i na njega se vežu specifični proteini – regulatorni proteini, zvani REPRESORI. Kada je represor na operatoru, RNA polimeraza ne može se vezati na promotor i započeti transkripciju. Ovo je primjer klasične regulacije u bakterija koja je negativna: protein represor onemogućuje gensku ekspresiju.

Nakon operatora slijedi *cluster* strukturnih gena za razgradnju laktoze, a to su lacZYA. Isto tako kompleksna je i terminacija RNA sinteze, proces čija učestalost također može biti regulirana. Stop signali (UAA, UAG, UGA) smješteni su prije stvarnog završetka transkripcije, prije TERMINACIJSKE REGIJE.

Laktoza je beta-galaktozid koji E. coli, nakon razgradnje na glukozu i galaktozu, koristi kao izvor energije i izvor ugljikovih atoma. Enzim koji razgrađuje laktozu na ove dvije komponente je beta-galaktozidaza, kodirana strukturnim genom lac-operona lacZ. Ukoliko bakterija divljeg tipa raste u mediju bez prisustva laktoze vrlo je malo molekula ovoga enzima u stanici. Nakon dodavanja laktoze u medij, beta-galaktozidaza pojavljuje se u velikim količinama u bakterijskoj stanici. Kažemo da je došlo do INDUKCIJE njene sinteze. Uz ovaj enzim dolazi do sinteze još dvaju enzima lac-operona: beta-galaktozid permeaze kodirane lacY genom, te beta-galaktozid transacetilaze, kodirane lacA genom. Permeaza je 30 kD velik protein vezan uz membranu koji transportira beta-galaktozide u stanicu E. coli, a transferaza acetiliranjem štiti ostale galaktozide koje beta-galaktozidaza ne smije pocijepati (transferira acetilnu skupinu s acetil-CoA na beta-galaktozide koji nisu laktoza).

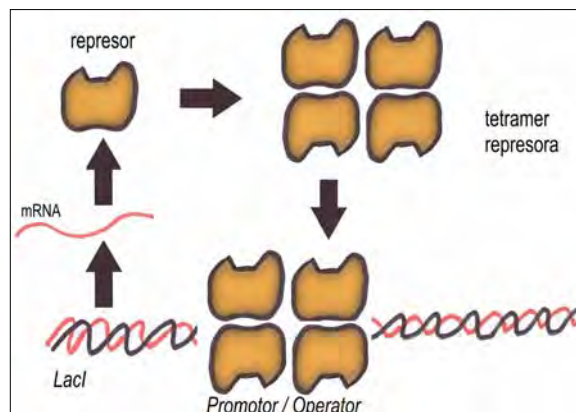
Sva tri gena transkribiraju se zajedno, a indukcija njihove transkripcije te posljedično i sinteze proteinskih produkata regulirana je pomoću represora, produkta regulatornog gena *i*. Gen *i* smješten je uzvodno od promotora za lac-gene, i potpuno je neovisna transkripcijska jedinica sa vlastitim promotorom i terminatorskom regijom. U stanju

represije, odnosno u životnim uvjetima bez laktoze, protein represor vezan je na operatorsku sekvencu, te tako smeta (onemogućuje) RNA polimerazi vezanje na promotor lac-operona i nema sinteze strukturnih proteina. Sustav je isključen jer enzimi nisu niti potrebni s obzirom na nedostatak laktoze. Ukoliko E. coli treba svoja tri enzima za metabolizam laktoze očito je da se represor na određeni način mora maknuti s operatora. Represor, čija je struktura nedavno u potpunosti određena, alosterički je protein, koji kada se veže sa specifičnom molekulom mijenja svoj oblik, te tako promijenjen nije sposoban vezati se na ciljnu molekulu (u našem slučaju operatorsku sekvencu DNA). Represor ima dva vezna mjesta: jedno za malu molekulu induktora i drugo mjesto za vezanja s DNA. Molekula koja alosteričkom proteinu – represoru, mijenja konformaciju upravo je laktoza. Ona se specifično veže na ovaj protein, mijenjajući njegov oblik. Kada je laktoza vezana na represor sposobnost represora da se veže na operator smanjuje



Slika 2. A Kad u mediju nema laktoze, tetramer represora vezan je za operatorsku regiju DNA pa ne dolazi do transkripcije strukturnih gena.

Slika 2. B Laktoza se veže na represor, čini ga inaktivnim pa dolazi do transkripcije gena za enzime za razgradnju laktoze

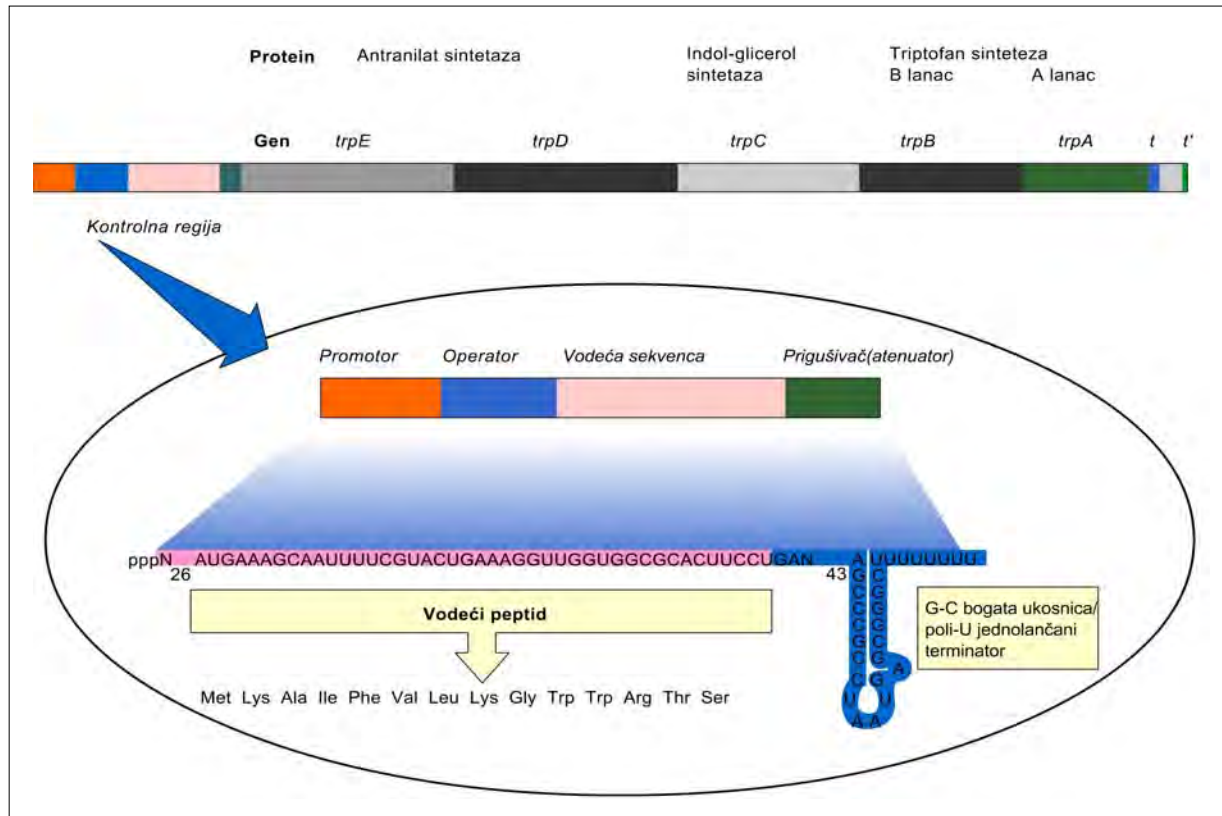


se za faktor 10^3 . Tako represor jednostavno disocira s operatora oslobađajući mjesto za RNA polimerazu. Tek sada RNA polimeraza vezanjem na promotor može započeti transkripciju tri strukturalna gena čiji su produkti neophodni E. coli za metabolizam laktoze. Stoga je laktoza u ovom slučaju induktor, a ovaj sustav negativne regulacije nazivamo i INDUCIBILNIM. Sustav kontrole lac-operona vrlo je učinkovit. Prisustvo molekule laktoze omogućuje transkripciju strukturalnih gena lac-operona. Nakon što je sva laktoza izmetabolizirana, represor poprima prvotni oblik, te se ponovo može vezati na operatorsko mjesto i blokirati RNA polimerazu (Slika 2 A i B).

Zanimljiva je regulacija još jednog operona E. coli. Radi se o primjeru genske regulacije koju možemo razjasniti pomoću, triptofanskog ili *trp*-operona. Ovaj operon obrnuto radi od inducibilnog sustava regulacije, i nazivamo ga REPRESIBILNI sustav. Trp-operon genski je *cluster* od pet gena koji ekspirira 7 kb mRNA transkript koji kodira za sintezu 5 enzima potrebnih da sintetiziraju aminokiselinu triptofan iz korismata. Tih 5 enzima sintetizira se uzastopce koordinirano, a sam operon ima svoju promotorsko-operatorsku regulatornu sekvencu kao i regulatorni gen *trpR* (Slika 3).

Brzina sinteze mRNA za triptofan iznosi oko 4 minute nakon čega se brzo razgrađuje. Kratki vijek

mRNA za *trp* omogućava bakteriji brzi odgovor na promjenjene potrebe za triptofanom. U stvari E. coli može mijenjati proizvodnju svojih biosintetskih enzima za triptofan 700-struko. Ekspresija gena triptofanskog operona regulirana je na dva posve različita i jedan o drugom neovisna načina. Prvi mehanizam regulacije slijedi osnovni princip regulacije operona s tom izmjenom da je protein represor sam po sebi inaktivan i ne može ostvariti vezanje na operatorsku sekvencu. Tek kada se veže s molekulom korepresora dobiva svoju aktivnu konformaciju. Trp represor je 58 kdal velik protein kojeg kodira *trpR* gen, smješten podalje od *trp*-operona. Kompleks tog represora i triptofana čvrsto se veže na operatorsku sekvencu, dok se sam represor (bez triptofana) ne može vezati. Drugim riječima triptofan je u represibilnom sustavu KOREPRESOR. Operatorsko mjesto u *trp*-operonu (slično kao i kod lac-operona) preklapa se s promotorskim mjestom. Stoga vezanje represora/korepresora onemogućava RNA polimerazi pristup promotoru i enzimi za biosintezu triptofana neće se ekspimirati. Kada bakterijska stanica potroši sav triptofan i kada se posljednja molekula ove aminokiseline otpusti s represora, represor odlazi s *trp* operatora, transkripcija više nije blokirana i dolazi do sinteze dovoljno enzima za



Slika 3. Trp operon sastoji se od pet strukturalnih gena kojima upravlja kontrolna regija koja uključuje promotor, operator, kodirajuću regiju za vodeći peptid i sekvencu prigušivača (atenuatora)

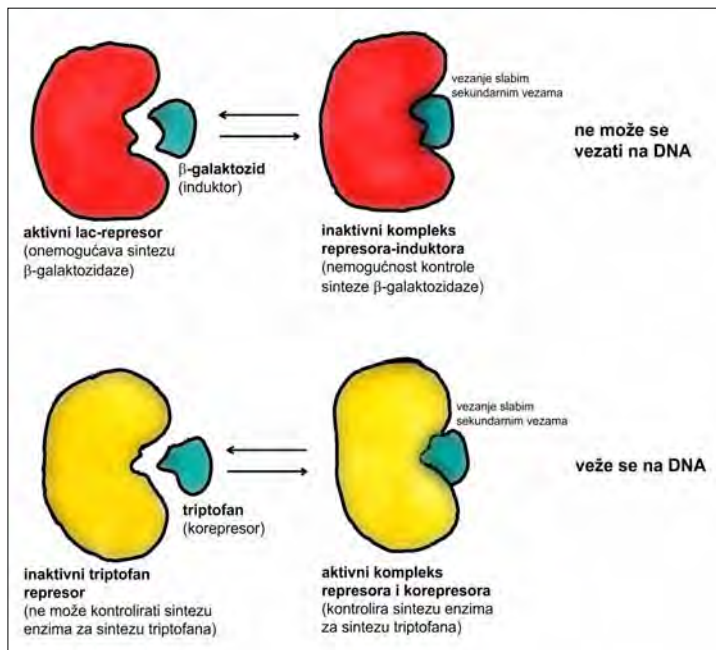
ponovnu sintezu triptofana. Na Slici 4 shematski su opisani inducibilni i represibilni mehanizmi regulacije genske ekspresije.

Drugi mehanizam kojim *E. coli* regulira razinu proteina za sintezu triptofana, uključuje formiranje sekundarne strukture u molekuli mRNA. Da bi mRNA mogla poprimiti ovu strukturu postoje specifične regulatorne atenuatorske (prigušivačke) regije *trp*-operona. Brojni su operoni regulirani ATENUACIJOM. Sekundarna struktura o kojoj govorimo i koja je uzrok atenuacije tzv. je Struktura ukosnice (hairpin) u mRNA. Ukoliko se ukosnica formirala dolazi do terminacije transkripcije prije negoli se prepisu strukturalni geni. Kada ukosnica nema, RNA polimeraza elongira sintezu mRNA preko atenuatorske regije i dolazi do transkripcije strukturalnih gena. Mogli bismo reći da je regulacija genske ekspresije putem atenuacije predstavlja tzv. *fine tuning* ekspresije strukturalnih gena represibilnih operona (Slika 3).

Još je jedan operon *E.coli* i *Salmonelle typhimurium* reguliran atenuacijom. To je Histidinski operon (*his*-operon), skupina bakterijskih gena za biosintezu histidina.

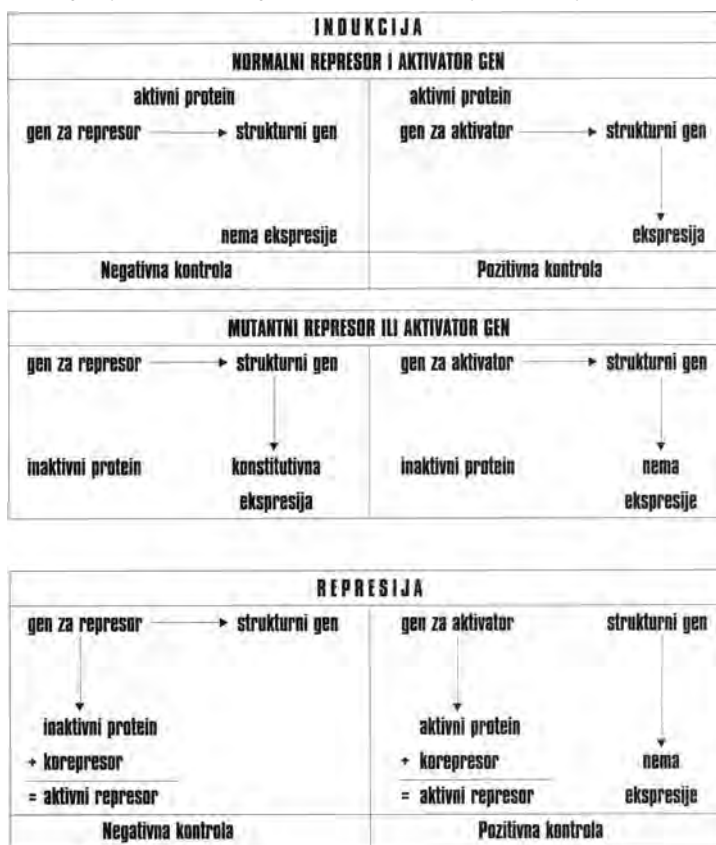
Kontrolne sklopke genske ekspresije raznolike su, te omogućuju pozitivnu ili negativnu kontrolu indukcije ili represije. Na Slici 5 shematski su prikazana četiri moguća scenarija pozitivne i negativne kontrole. Za gene regulirane pozitivnom kontrolom, ekspresija strukturalnih gena moguća je jedino uz prisustvo aktivnog regulatornog proteina. Mehanizam kontrole operona u ovom slučaju sušta je suprotnost negativnoj kontroli, jer umjesto onemogućavanja transkripcije, regulatorni protein neophodan je za njeno provođenje. On se veže s DNA molekulom ali i sa RNA polimerazom, te pomaže ovom enzimu u inicijaciji transkripcije. Pozitivni protein regulator zove se **AKTIVATOR**.

Kad shvatimo regulaciju genske ekspresije u prokariota, prvenstveno u induktivnom modelu *lac*-operona, s lakoćom možemo razumjeti složenije modele regulacije genske ekspresije i brojne varijacije ovog modela u prokariota i eukariota.



Slika 4. Inducibilni i represibilni mehanizmi genske ekspresije

Slika 5. Kontrolne sklopke regulacije ekspresije gena raznolike su i omogućuju pozitivnu i negativnu kontrolu indukcije ili represije



Dodatna literatura

1. Friedman AM, Fischman TO, Steitz TA. Crystal structure of lac repressor core tetramer and its implications for DNA looping. *Science* 1995;268:1721-7
2. Hartman PE, Hartman Z, Šerman D. Complementation Mapping by Abortive Transduction of Histidine-requiring *Salmonella* Mutants. *J gen Microbiol* 1960;22:354-68
3. Hartman PE, Loper JC, Šerman D. Fine Structure Mapping by Complete Transduction Between Histidine-requiring *Salmonella* Mutants. *J gen Microbiol* 1960;22:323-53
4. Jacob F, Monod J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* 1961;3:318-56
5. Lee F, Yanofsky C. Transcription termination at the *trp* operon attenuators of *E. coli* and *S. typhimurium*. *Proc Nat Acad Sci USA* 1997;74:4365-8
6. Levin B. The Operon U: Levin B. *Genes VII*, Oxford University Press, New York 2000; str. 273-312