

# GLOBÁLNÍ REGULACE II

Regulace porinů, regulátorové RNA

# Regulace syntézy porinů

- Většina bakterií je schopna přežít ve volné přírodě
- Nejzákladnější problém v přírodě – schopnost vyrovnat se s osmotickým tlakem
  - ▣ Uvnitř buněk vždy vyšší než vnější – zadržuje buněčná stěna – turgor
  - ▣ Schopnost buněk vnímat změny osmotického tlaku – vnímat různá prostředí
    - Patogenní bakterie – vstup do hostitele – v těle vždy vyšší osmolarita
  - ▣ Regulace turgoru – akumulace či uvolnění  $K^+$  a dalších osmolytů (prolin, glycin betain)
- základní mechanismus u G- bakterií – syntéza porinů vnější membrány
  - ▣ regulují průnik kompatibilních solutů přes vnější membránu
    - *E. coli* – OmpC malé a OmpF velké (uplatňuje se v řídkých roztocích)
    - při vysoké osmolaritě – více OmpC

# Regulace syntézy porinů

- 1. krok - izolace mutant defektních v expresi porinů
  - ▣ receptory slouží jako receptory pro některé fágy a bakteriocin
    - izolace mutant resistantních k těmto fágům – nesyntetizují OmpF
  - ▣ původně dva lokusy – ompF a ompB
    - ompF – mutant se ztrátou schopnosti syntetizovat porin OmpF
      - Absolutní – strukturní protein
    - ompB – dva geny – EnvZ a OmpR – komplementační testy
      - mutace v lokusu zabraňovali syntéze ompF jen částečně
      - dvoukomponentový systém, pouze částečná ztráta
      - přímá reakce na změny osmolarity
      - signál neznámý
    - OmpR – P – aktivuje transkripci OmpC
    - OmpR – aktivuje transkripci OmpF
      - potvrzení, že EnvZ a OmpR je nezbytný pro aktivaci transkripce OmpF – fúze s lacZ

# Regulace syntézy porinů

- Fenotypy mutant -
  - genetické studie nepotvrdily jednoduchý model
    - OmpR-P – složitější regulace transkripce OmpC
      - Je potřebný i k regulaci OmpF
  - *envZ* – null mutace –
    - podle modelu – kompletní inhibice fosforylace OmpR
      - žádná syntéza OmpC
      - konstitutivní vysoká hladina syntézy OmpF
    - nepotvrdilo se –
      - žádná syntéza OmpC
      - limitní transkripce OmpF

# Regulace syntézy porinů

- *Konstitutivní mutace v OmpR*
  - *ompR2 (con)* – i v kombinaci s envZ null – nelze fosforylovat
    - konstitutivní OmpF
    - zabraňuje expresi OmpC
  - *ompR3 (con)* – mutace mimující fosforylaci
    - konstitutivní exprese OmpC
    - zabraňuje expresi OmpF –
    - OmpC+ OmpF- konstitutivně
      - nekomplementovatelné EnvZ+ i OmpR+
      - in cis mutace
- snaha vysvětlit na ara operonu – ompR ve dvou formách

- Fenotypy *envZ* a *ompR* mutací

| <b>TABLE 13.3</b> Phenotypes of <i>envZ</i> and <i>ompR</i> mutations                          |   |
|--|---|
| <b>Genotype</b>  | <b>Phenotype</b>                                      |
| <i>envZ</i> <sup>+</sup> <i>ompR</i> <sup>+</sup>  | OmpC <sup>+</sup> OmpF <sup>+</sup>                   |
| <i>envZ</i> <sup>+</sup> <i>ompR1</i>  | OmpC <sup>-</sup> OmpF <sup>-</sup>                   |
| <i>envZ</i> (null) <i>ompR</i> <sup>+</sup>  | OmpC <sup>-</sup> OmpF <sup>+ -<sup>a</sup></sup>     |
| <i>envZ</i> <sup>+</sup> <i>ompR2</i> (Con)  | OmpC <sup>-</sup> OmpF <sup>+</sup> (low osmolarity)  |
|  | OmpC <sup>-</sup> OmpF <sup>+</sup> (high osmolarity) |
| <i>envZ</i> (null) <i>ompR2</i> (Con)  | OmpC <sup>-</sup> OmpF <sup>+</sup> (low osmolarity)  |
|  | OmpC <sup>-</sup> OmpF <sup>+</sup> (high osmolarity) |
| <i>envZ</i> <sup>+</sup> <i>ompR3</i> (Con)  | OmpC <sup>+</sup> OmpF <sup>-</sup> (low osmolarity)  |
|  | OmpC <sup>+</sup> OmpF <sup>-</sup> (high osmolarity) |
| <i>envZ</i> <sup>+</sup> <i>ompR3</i> (Con)/ <i>envZ</i> <sup>+</sup> <i>ompR</i> <sup>+</sup> | OmpC <sup>+</sup> OmpF <sup>-</sup> (low osmolarity)  |
|  | OmpC <sup>+</sup> OmpF <sup>-</sup> (high osmolarity) |

<sup>a</sup>+ - indicates that OmpF levels are reduced but not eliminated.

# Regulace syntézy porinů

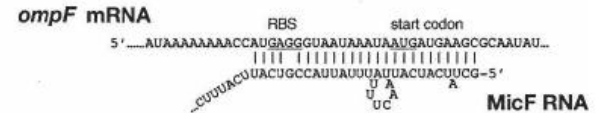
## **předpověditelné mutanty odpovídající jednoduchému modelu**

- analogie s AraC – u mutanta *ompR3* konformační změna odpovídající fosforylované formě
- komplementační testy nejdou vysvětlit jednoduchým modelem
  - *envZ+*, *ompR3* / *envZ+*, *ompR+*
    - předpoklad –
      - nízká osmolarita – *OmpC+* *OmpF+* - recesivní mutace
      - vysoká osmolarita - *OmpC+* *OmpF-* dominantní mutace
        - mutantní *ompR3* aktivuje *OmpC* –
        - WT *OmpR* aktivuje *OmpF* při nízké osmolaritě –
    - realita -
      - *OmpC* – konstitutivně – i při nízké osmolaritě
      - *OmpF* – vůbec ani při nízké osmolaritě
- další současný výzkum –
  - záleží na místě vazby na promotoru,
  - kinasa i fosfatázová aktivita

# Regulace syntézy porinů

- Kinázová / fosfatázová aktivita EnvZ
- Vysoká osmolarita –
  - fosfotransferázová aktivita – vysoká hladina OmpR-F
- Nízká osmolarita
  - Fosfatázová aktivita – vysoká hladina OmpR
- vytvoření bodových mutant ovlivňující amino terminální fosforylační doménu – T831
  - fenotyp – OmpF-, OmpC-
- Nutnost OmpR-P pro regulaci obou genů
- změna vazebných vlastností - DNAaseI protekční test
  - 3 vazebná místa u OmpF promotoru
    - mutant stejné jako WT
  - 3 vazebná místa u OmpC promotoru
    - změna oproti WT – neváže se
    - místa promotoru musí být zaplňována postupně



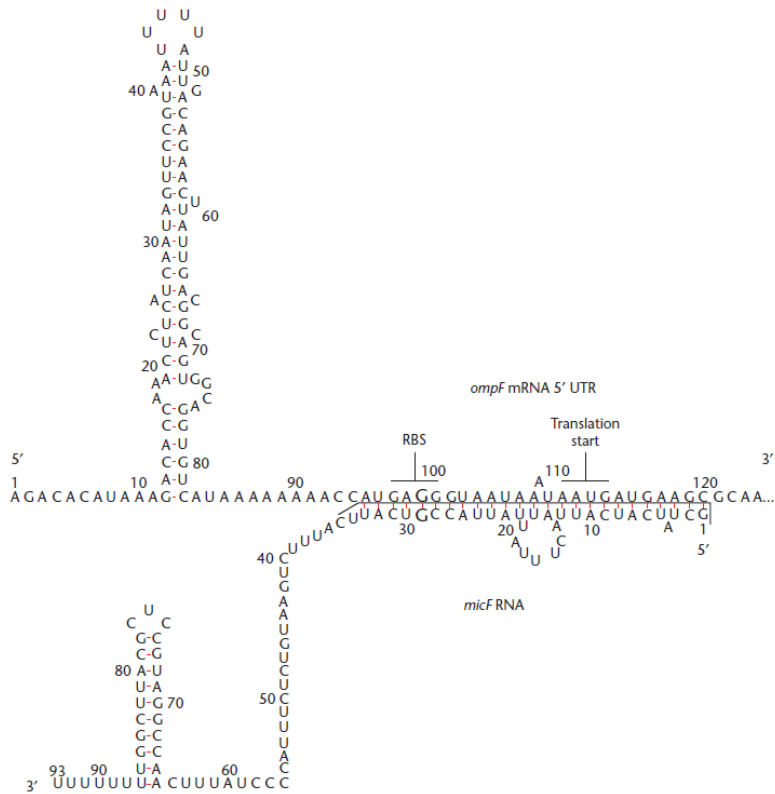


# Regulace syntézy porinů

- Regulace při dalších stresech – teplotní šok, ethanol atd,
  - MicF – regulační RNA –(messenger inhibitory complementary)
    - Objevení - overexprese z multikopiového plazmidu oblastí upstream od ompC (Mizuno et al. 1984)
    - 93 nt transkript,
      - na 5' konci – 3P – na 3' konci Rho nezávislá terminace
    - Ovlivnění exprese ompF
    - transkribována z opačného vlákna – v opačném směru
    - antisense k OmpF mRNA v sekvenci iniciace translace (TIR)
      - - S-D, AUG kodon
      - zabraňuje nasednutí ribosomu
    - vyšší koncentrace MicF při stresech
    - zastavení exprese OmpF – vyšší poměr OmpC
  - promotor MicF – komplexní - aktivován různými aktivátory
    - SoxS – oxidativní stres
    - MacA – slabé kyseliny- antibiotika
    - OmpR – další úroveň regulace OmpF - osmolarita

# MicF

## □ Interakce MicF s oblastí v ompF



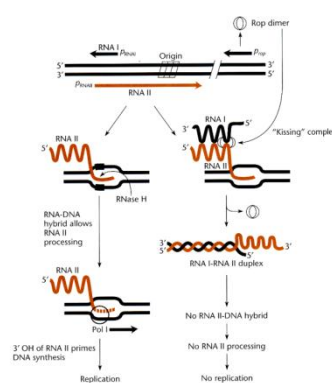
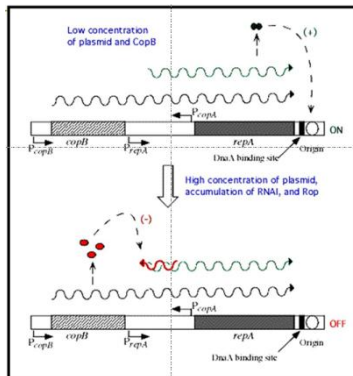
# Regulační RNA

- ssRNA – riboregulace
  - ▣ na mnoha úrovních
    - regulace transkripce –
      - feromon-responsiv transport plazmidu u *Enterococcus faecalis* – 200 mD RNA – zvýšení transkripční terminace *in trans*
    - vazba na proteiny – RNA polymerasu 6S RNA
    - postranskripční úroveň – vazba na mRNA - změna sekundární struktury
      - změny v párování basí
      - mění se schopnost být translatovatelná
      - mění se stabilita
        - antisense RNA - působící *in cis*
        - globálně regulační malé RNA – působící *in trans*

# Regulační RNA

## ■ antisens RNA –

- fágy, transposony, regulace transkripce plazmidů (Tomizava et al. 1981)
  - ctRNA – transkribovány z druhého vlákna – cca 100 bp
  - regulace jen jednoho genu
  - Cis působení
  - rozdílná regulace transkripce od cílové mRNA
  - rozdílná stabilita x degradace s cílovou mRNA
  - změna vazby cílového proteinu (RNAs)
- též v chromosomu - Crp Tic RNA – přesahuje *crp* gen



# Regulační RNA

## □ Způsoby studia

### □ Objevení –

#### ■ vytipování ze sekvencí –

- promotory na antisense vlákně

#### ■ Microarrays –

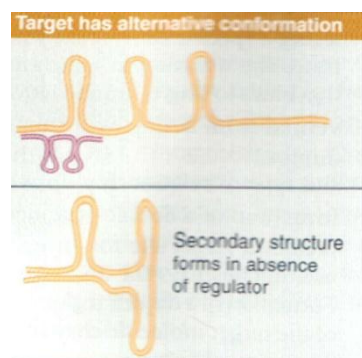
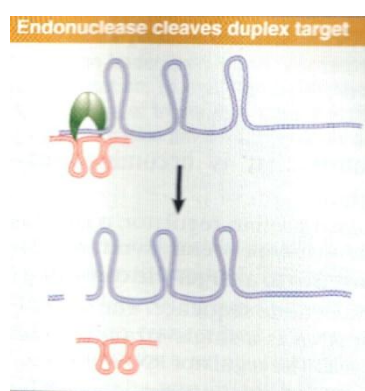
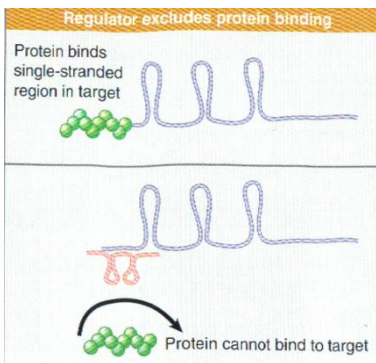
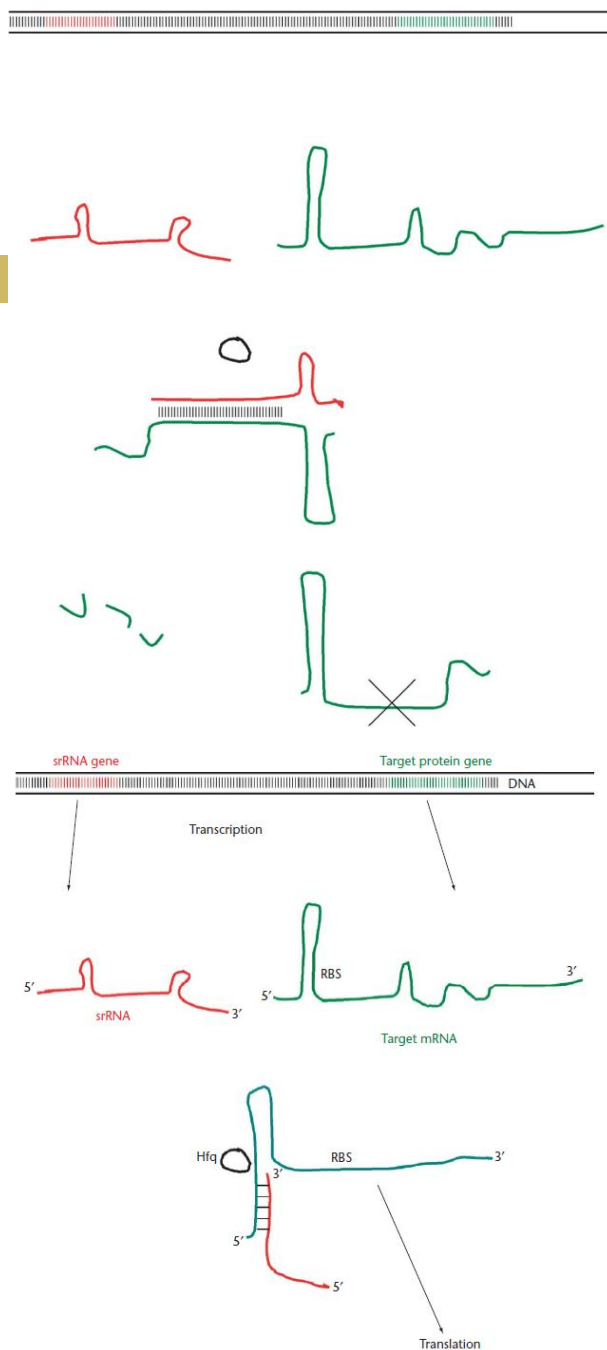
- nové metody umožňují rozlišit z kterého vlákna se transkript tvoří

#### ■ Následné důkazy

- reportérové geny
- hybridizace
- RT PCR
- specifické štěpení RNAsami
- hybridní systémy

# Regulační RNA

- bez překryvu cílové RNA – kdekoliv v chromosomu – 12bp
  - několik cílových genů – globální regulace
    - Regulace stability nebo funkce mRNA
  - kódované v intergenových oblastech
  - v *E. coli* 17 různých –



# Regulační RNA

- Způsoby objevování
  - dříve těžká analýza regulačních mechanismů
  - nyní nástroje bioinformatiky srovnávání genomu příbuzných kmenů
  - nástroje genomiky – microarrays
  - Nástroje bioinformatiky
    - sekvence intragenových úseků jsou konzervované, pokud obsahují regulační sRNA
  - vyhledávání kandidátů –
    - rozpoznatelný promotor,
    - $\rho$  nezávislý terminátor
  - testování pomocí
    - Northern blotting
    - RT PCR
    - Detekce protilátkou cílového proteinu

**Table 1** List of *E. coli* small regulatory RNAs and target molecules

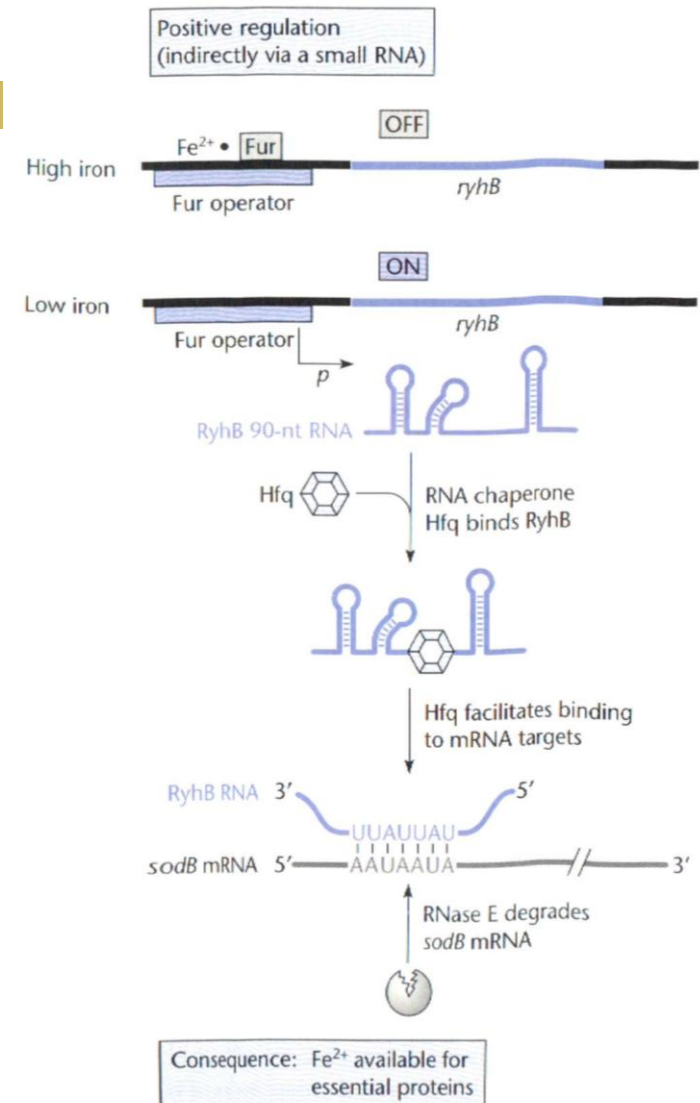
| RNA             | Target  | Effect of target function |
|-----------------|---|---------------------------|
| <i>csrB</i> RNA | CsrA protein  | Suppression               |
| <i>csrC</i> RNA | CsrA protein  | Suppression               |
| <i>cyaR</i> RNA | <i>ompX</i> mRNA  | Suppression               |
| <i>dicF</i> RNA | <i>ftsZ</i> mRNA  | Suppression               |
| <i>dsrA</i> RNA | <i>rpoS</i> mRNA; <i>hns</i> mRNA   | Activation                |
| <i>gadY</i> RNA | <i>gadX</i> mRNA  | Activation                |
| <i>gcvB</i> RNA | <i>oppA</i> and <i>dppA</i> mRNAs   | Suppression               |
| <i>invR</i> RNA | <i>ompD</i> mRNA  | Suppression               |
| <i>micA</i> RNA | <i>ompA</i> mRNA  | Suppression               |
| <i>micC</i> RNA | <i>ompC</i> mRNA  | Suppression               |
| <i>micF</i> RNA | <i>ompF</i> mRNA  | Suppression               |
| <i>omrA</i> RNA | <i>ompT</i> mRNA, <i>cirA</i> mRNA, <i>fecA</i> mRNA, <i>fepA</i> mRNA + 32 other mRNAs | Suppression               |
| <i>omrB</i> RNA | <i>ompT</i> mRNA, <i>cirA</i> mRNA, <i>fecA</i> mRNA, <i>fepA</i> mRNA + 14 other mRNAs | Suppression               |
| <i>oxyS</i> RNA | <i>fhlA</i> mRNA + > 40 genes indirectly  | Suppression               |
| <i>rprA</i> RNA | <i>rpoS</i> mRNA  | Activation                |
| <i>RseX</i> RNA | <i>ompA</i> mRNA, <i>ompC</i> mRNA  | Suppression               |
| <i>rybB</i> RNA | <sup>a</sup> <i>ompC</i> mRNA, <i>ompD</i> mRNA + other <i>omp</i> mRNAs                | Suppression               |
| <i>ryhB</i> RNA | <i>sodB</i> mRNA + several other mRNAs  | Suppression               |
| <i>rydC</i> RNA | <i>yejABEF</i> mRNA   | Suppression               |
| <i>ryeB</i> RNA | Unknown   | –                         |
| <i>srgS</i> RNA | <i>ptsG</i> mRNA  | Suppression               |
| Spot42 RNA      | <i>galK</i> mRNA of <i>galETKM</i> mRNA   | Suppression               |
| <i>sraC</i> RNA | Unknown   | –                         |
| <i>sraG</i> RNA | Unknown   | –                         |
| <i>sraH</i> RNA | Unknown   | –                         |
| <i>sraJ</i> RNA | Unknown   | –                         |
| <i>sroB</i> RNA | Unknown   | –                         |
| <i>sroC</i> RNA | Unknown   | –                         |
| <i>sroD</i> RNA | Unknown   | –                         |
| <i>sroE</i> RNA | Unknown   | –                         |
| <i>sroH</i> RNA | Unknown   | –                         |
| 6S RNA          | RNA polymerase/ $\sigma^{70}$ complex   | Suppression               |

<sup>a</sup>mRNA binding shown in *Salmonella*.

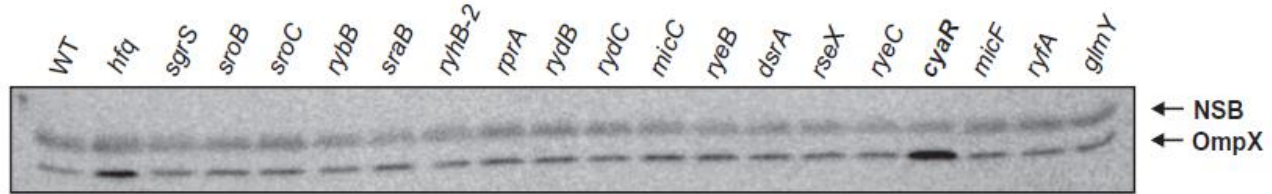


# Regulační RNA

- **RyhB** –
- kontroluje 6 mRNA –
  - proteiny z Fur operonu – pozitivně i negativně
- metabolismus železa
- páruje s mRNA –
  - dsRNA region – RNasa E degraduje ssRNA přesahy
  - destrukce cílové mRNA i regulátoru

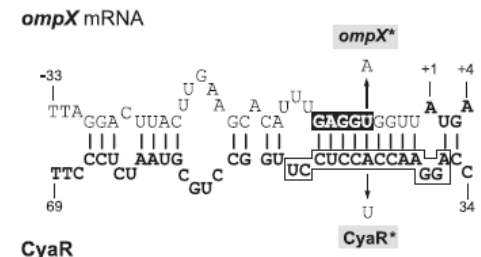
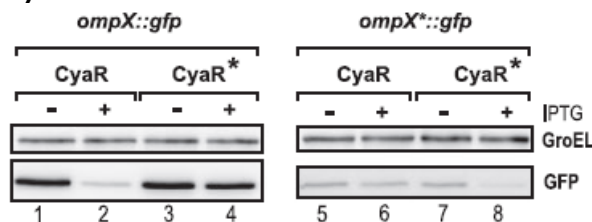
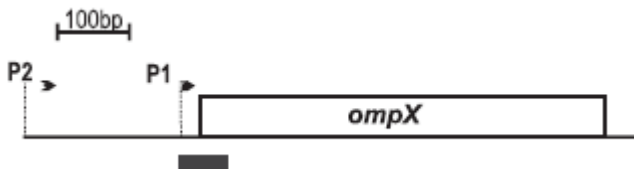
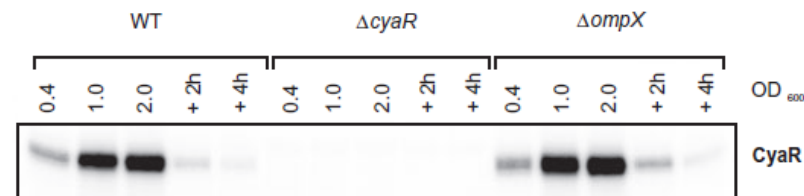


# Regulační RNA



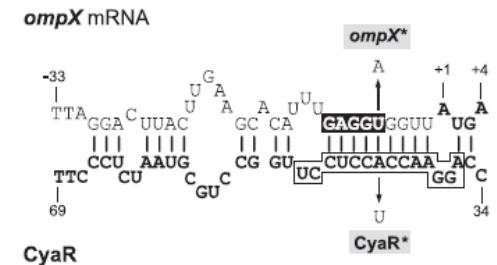
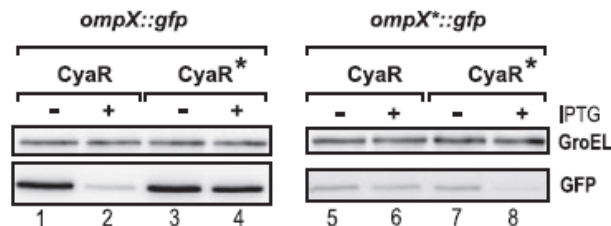
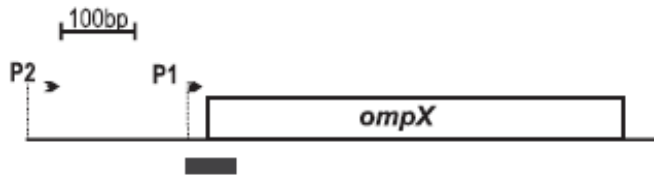
## □ cyaR RNA

- Reguluje malý Omp – OmpX
- ‘reverse target search’ - systematickou delecí genů pro sRNA v *Salmonella typhimurium*
  - spekulativní role v transportu glukózy
  - environmentální stresy
  - v intergenové oblasti genů *yegQ* a *orgK*
  - sekvence konzervovaná v G- bakteriích (*Salmonella*, *Erwinie*, *Pseudomonas*)
  - regulován cAMP (Papenfert et al. 2008)
    - Nízká transkripce v exponenciální fázi
- reprimuje expresy *ompX* vazbou na RBS –
  - Hfq asi ano – OmpX akumulace v Hfq delečních mutantách
  - mutační experimenty konstiu



# Regulační RNA

- Mutační experiment na zjištění interakce *cya* s oblastí *ompX*
- *OmpX* fúzané s GFP na plazmidu – konstitutivně transkribuje *ompX* GFPmRNA
- Dále pPL-CyaR (pKP-39-3) or mutantní plazmid, pPL-CyaR\* (pKP-75-1)
- GFP detekováno protilátkou
- GrOEL jako marker.

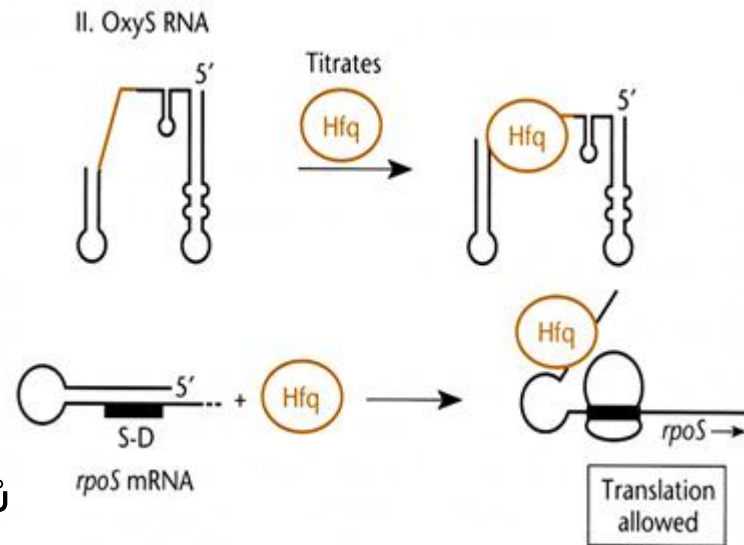


# Regulační RNA

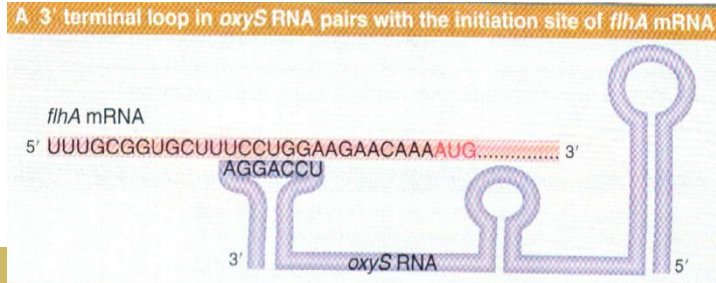
## □ OxyS –

### ▣ indukce při oxidativním stresu

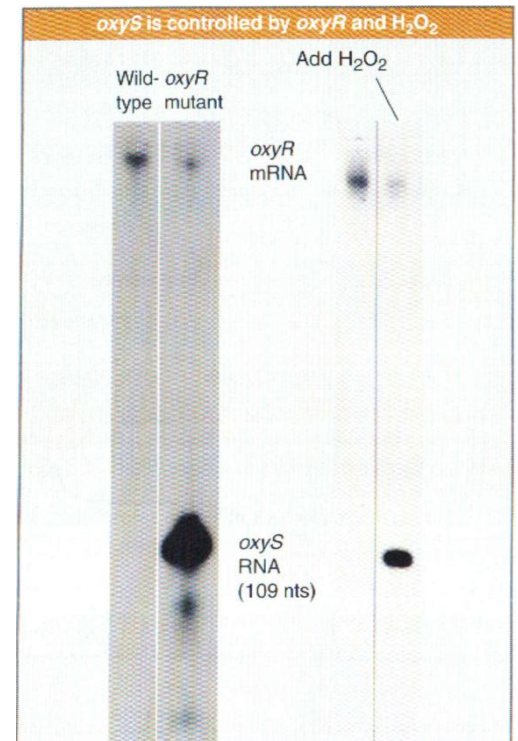
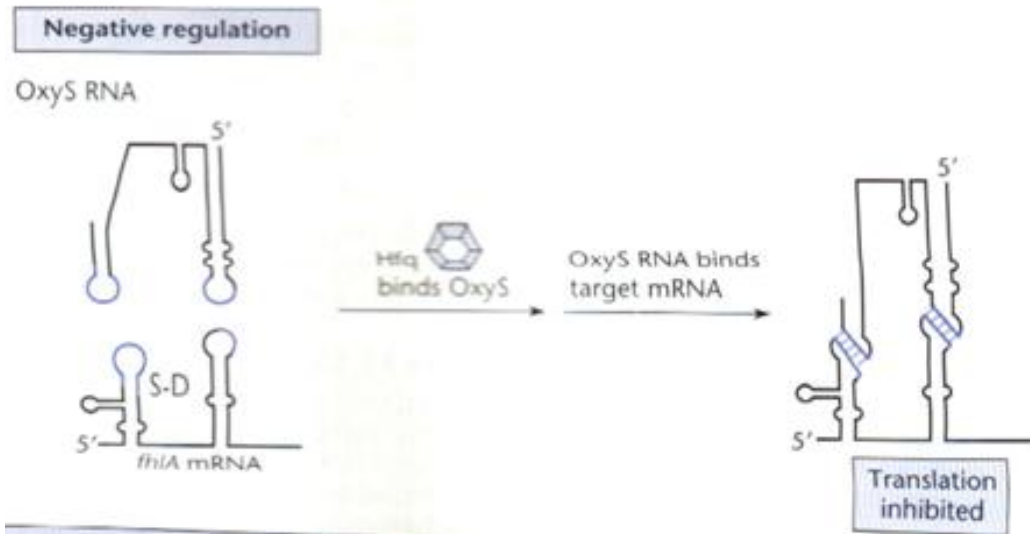
- po působení  $H_2O_2$  – indukce adaptačních genů
- indukce OxyR – transkripční regulátor
  - Indukce oxyS – malá regulační RNA – 109 bp
- translace z *rpoS* – sigma faktor stacionární fáze
  - působí nepřímo – vyřadí pozitivní regulátor – Hfq
    - Hfq - váže se na vedoucí sekvenci mRNA *rpoS* – odkrývá S-D sekvenci
    - Hfq i na další sRNA – DsrA – RNA chaperon
    - může též destabilizovat



# Regulační RNA



- FhIA – transkripční aktivátor metabolismu kys. mravenčí
  - OxyS se váže na translační začátek a inhibuje navázání ribosomu



*oxyS* –  
transkribován v *oxyR* konstitutivním mutantu,  
indukce po přidání H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

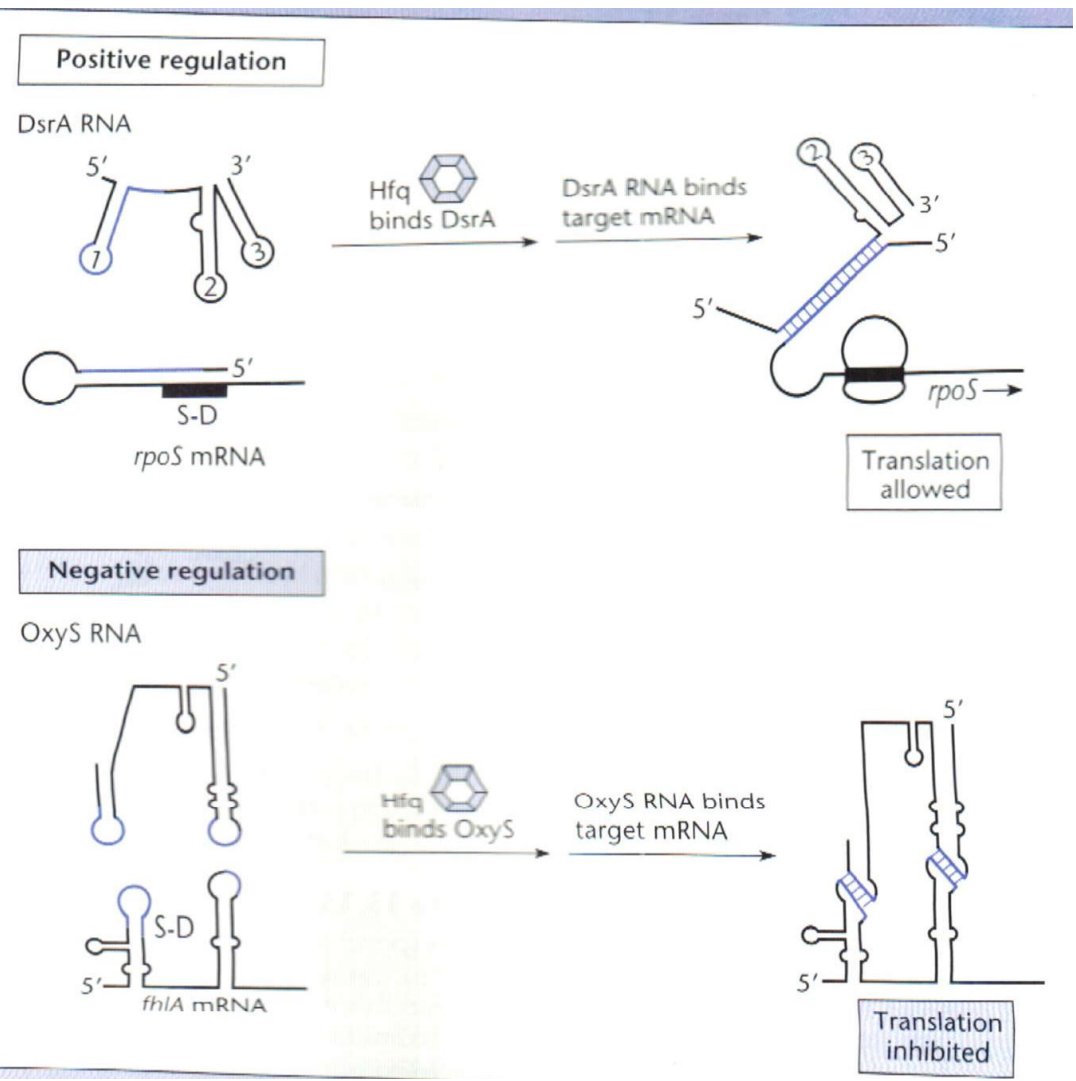
# Regulační RNA

## □ **DsrA -**

- působí *in trans* na více genů pozitivně i negativně
- hns – histon silencer gene
  
- *rpoS* – sigma faktor stacionární fáze
  - interakce na základě similarity v Shine-Dalgarno
    - inhibuje nebo umožňuje translaci
    - destabilizace mRNA
    - Opačné působení než oxyS

# Regulační RNA

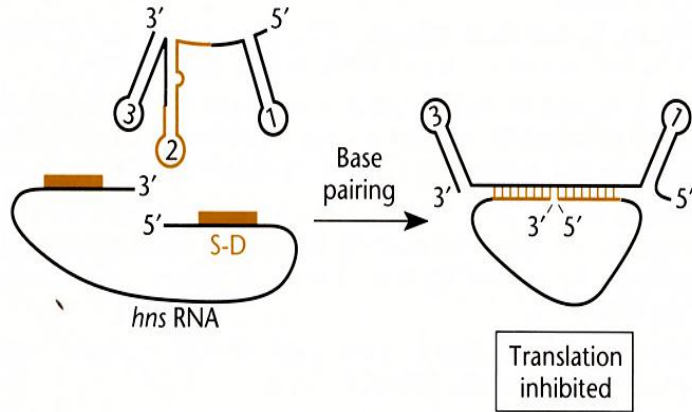
## □ OxyS a DsrA



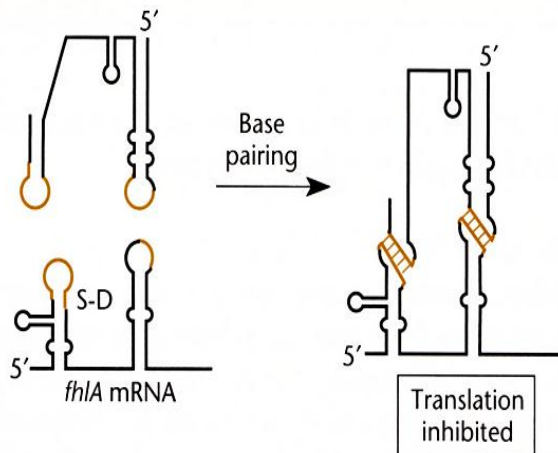
# Regulační RNA

## A Negative regulation

### I. DsrA RNA

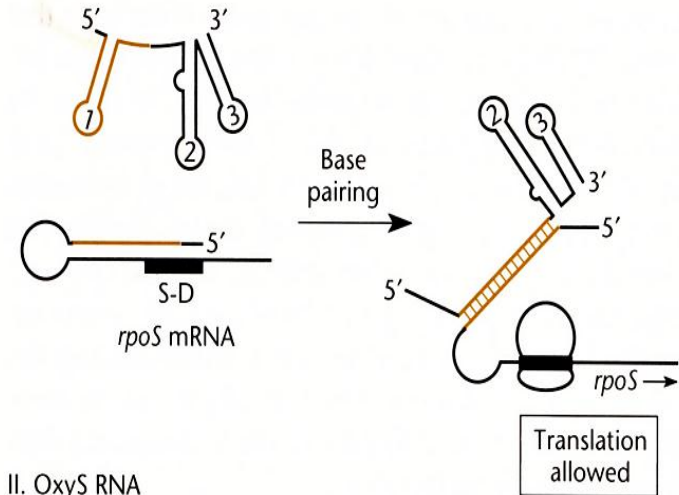


### II. OxyS RNA

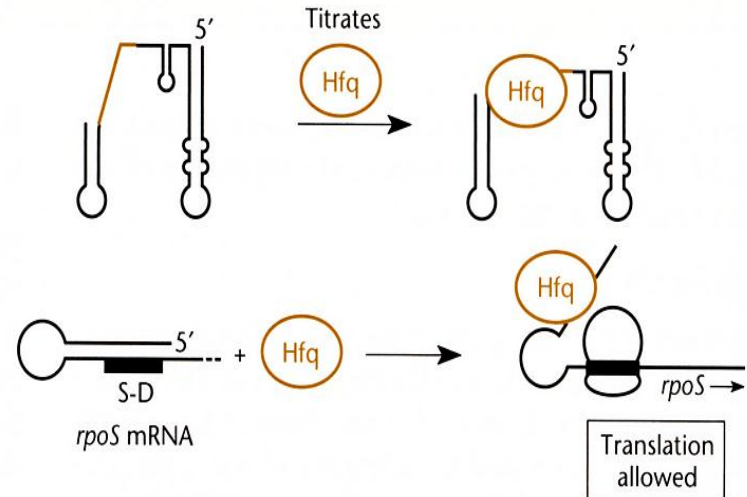


## B Positive regulation

### I. DsrA RNA



### II. OxyS RNA

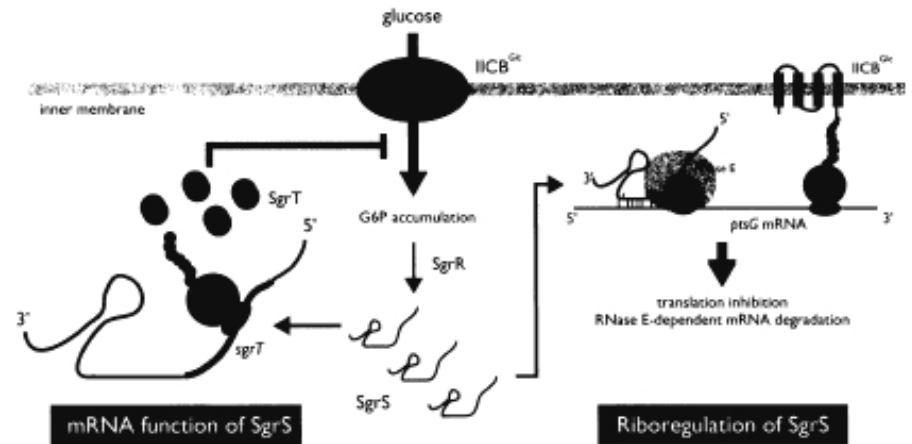




## □ *srgS* RNA

### ■ Transkript – duální funkce

- Regulační RNA
- Malý regulační protein – 220 bp
- 3' konec páruje a inhibuje translaci z *ptsG* RNA – transport glukózy
- 43 aa polypeptid –SgrT – interferuje s akumulací glukoso- 6 – fosfátu – zabraňuje akumulaci glukózy – buněčný stres
- Morita and Aiba. 2007
  - Many „noncoding“ RNAs await characterization for potential hidden function



# Regulační RNA

## MITES – miniature inverted-repeat transposable elements

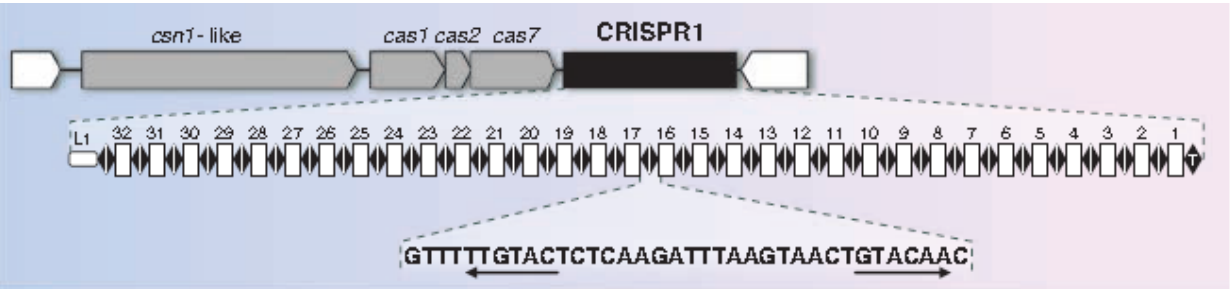
- poprvé u eukaryot –
  - 50 až 300 bp repetitivní sekvence
  - sbsence Tn ani dalšího ORFs
- pohyb – neautonomní IS element – málo prozkoumáno – pravděpodobně in trans Tn z jiné části genomu – Y2 nebo Y,S
- Vznik malých transkriptů
- Regulují upstream geny
- (Delihias 2008)

# Unikátní repetitivní elementy

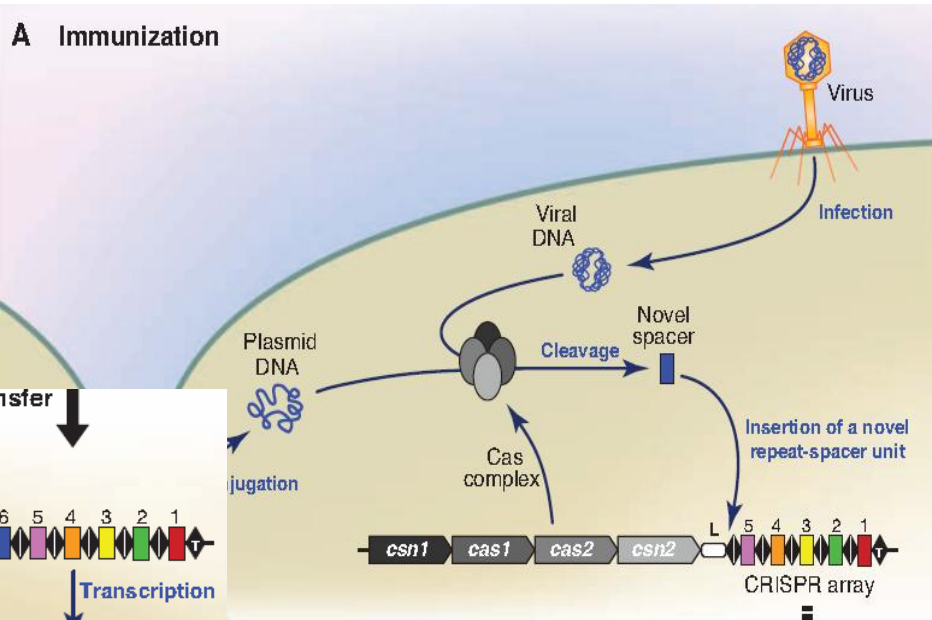


- CRISPR – regularly interspaced short palindromic repeats
  - nalezeny ve všech studovaných archaea i jejich plazmidech
  - posléze i v některých bakteriích
  - přímé repetice – 4 až 100 kopií oddělené nerepetitivními nekodujícími úseky DNA o stejné sekvenci - 25 až 40 bp (spacery)
  - opakování vytváří klastr
  - sekvence spacerů odvozená od virů a plazmidů –
    - určitá forma „paměti“ po předchozí expozici fágem
  - někdy asociované z proteiny – vytvářejí imunitní ochranu proti virům
    - mechanismus neznámý - informace elsnat 2008- mechanismus znám 2011
  - podobné v různých druzích – přenesené HGT

# CRISPR



## A Immunization



## B Immunity

