Глобальные регуляторные системы бактерий

System	Response	Regulatory gene(s) (protein[s])	Category of mechanism	Some genes, operons, regulons, and stimulons
Nutrient limitation				
Carbon	Catabolite regulation	*crp* (CAP, also called CRP)	DNA-binding activator or repressor	*lac*, *ara*, *gal*, *mal*, and numerous other C source operons
	Control of fermentative vs. oxidative metabolism	*cra* (Cra)	DNA-binding activator or repressor	Enzymes of glycolysis, Krebs cycle
Nitrogen	Response to ammonia limitation	*rpoN*	Sigma factor (σ^N)	*glnA* (GS) and operons for amino acid degradation
		ntrBC (NtrBC)	Two-component system	
Phosphorus	Starvation for inorganic orthophosphate (P_i)	*phoBR* (PhoBR)	Two-component system	>38 genes, including *phoA* (bacterial alkaline phosphatase) and *pst* operon (P_i uptake)
Growth limitation				
Stringent response	Response to lack of sufficient aminoacylated-tRNAs for protein synthesis	*relA* (RelA), *spoT* (SpoT)	(p)ppGpp metabolism	rRNA, tRNA, ribosomal proteins, amino acid biosynthesis operons
Stationary phase	Switch to maintenance metabolism and stress protection	*rpoS* (RpoS), sigma factor (σ^S)	Many genes with σ^S promoters; complex effects on many operons	
Oxygen	Response to anaerobic environment	*fnr* (Fnr)	CAP family of DNA-binding proteins	>31 transcripts, including *narGHJI* (nitrate reductase)
	Response to presence of oxygen	*arcAB* (ArcAB)	Two-component system	>20 genes, including *cob* (cobalamin synthesis)

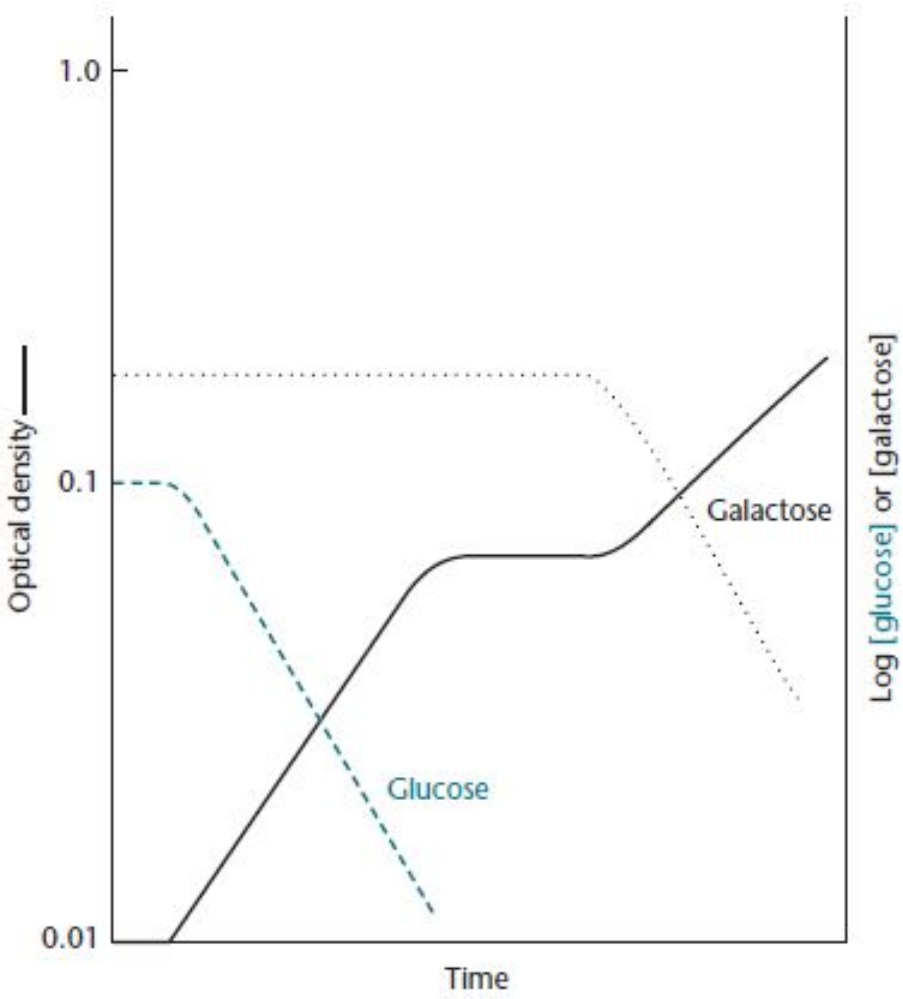
Глобальные регуляторные системы

System	Response	Regulatory gene(s) (protein[s])	Category of mechanism	Some genes, operons, regulons, and stimulons
Stress				
Osmoregulation	Response to abrupt osmotic upshift	*kdpDE* (KdpD, KdpE)	Two-component system	*kdpFABC* (K^+ uptake system)
	Adjustment to osmotic environment	*envZ/ompR* (EnvZ/OmpR)	Two-component system	OmpC and OmpF outer membrane proteins
		micF	sRNA	*ompF* (porin)
Oxygen stress	Protection against reactive oxygen species	*soxS* (SoxS)	AraC family of DNA-binding proteins	Regulon, including *sodA* (superoxide dismutase) and *micF* (sRNA regulator of *ompF*)
		oxyR (OxyR)	LysR family of DNA-binding proteins	Regulon, including *katG* (catalase)
Heat shock	Tolerance of abrupt temperature increase	*rpoH* (RpoH)	Sigma factor (σ^H)	Stimulon; Hsps (heat shock proteins), including *dnaK*, *dnaJ*, and *grpE* (chaperones), and *lon*, *clpP*, *clpX*, and *hflB* (proteases)
Envelope stress	Misfolded Omp proteins	*rpoE* (RpoE)	Sigma factor (σ^E)	>10 genes, including *rpoH* (σ^H) and *degP* (encoding a periplasmic protease)
	Misfolded pilus	*cpxAR* (CpxAR)	Two-component system	Overlap with RpoE regulon
pH shock	Tolerance of acidic environment	Many	Many	Complex stimulon

Совокупность генов и/или оперонов, подвергающихся глобальной регуляции при помощи одной и той же молекулы белка или РНК, называется **регулон**.
Совокупность регулонов, реагирующих на одни и те же условия окружающей среды, называется **стимулон**.
Сейчас мы немножко обо всем об этом поговорим.

Катаболитная регуляция

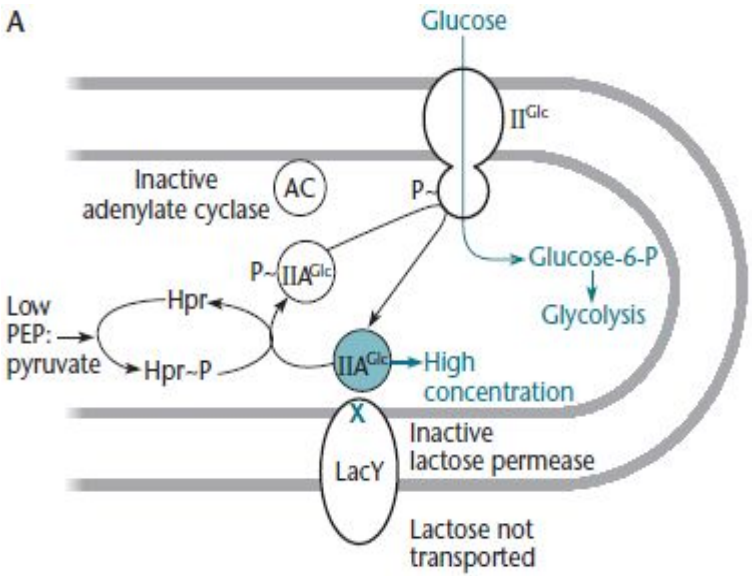
Это совокупность механизмов, позволяющих бактериальной клетке в каждый момент времени вовлекать в метаболизм тот источник углерода, от которого ей будет больше всего пользы (то есть энергии и катаболитов).

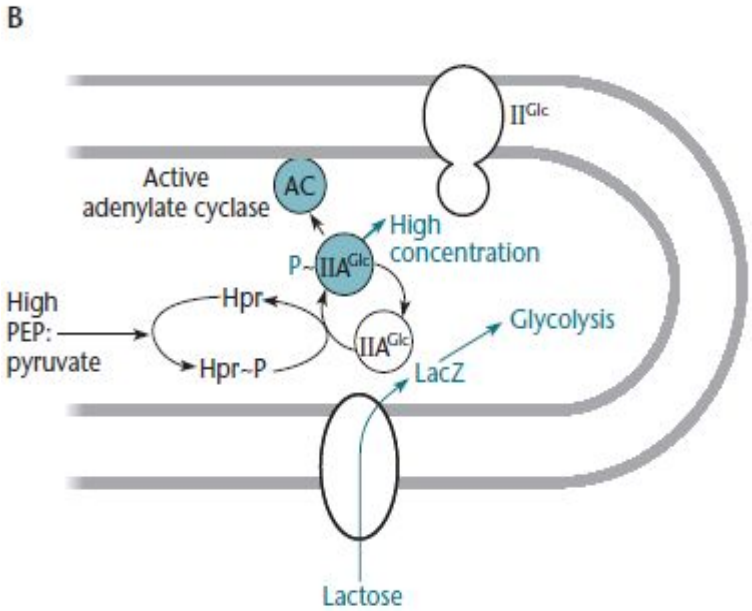


Хороший пример такой регуляции – так называемый диауксический рост клеток *E.coli* на среде с глюкозой и каким-либо другим источником углерода, например, галактозой. Хитрые бактерии сначала сожрут всю глюкозу, поскольку это самый энергетически выгодный для них субстрат, а уж когда глюкоза полностью закончится, переключатся на галактозу.

А если вы после этого дадите им опять глюкозы – они тут же плюнут на галактозу и опять примутся за свое любимое лакомство!

ЦиклоАМФ-зависимая катаболитная регуляция у E.coli





рования и метаболизм сахаров

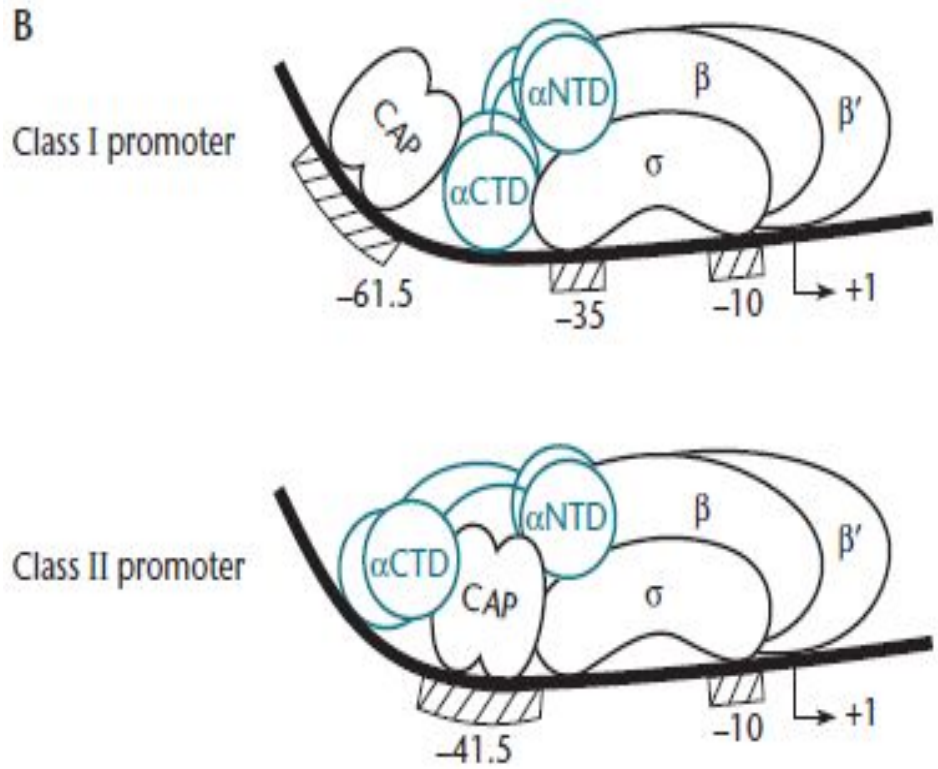
Глюкоза поступает в клетку с участием белка IIAGlc фосфотрансферазной системы сахаров. Если глюкозы много, то пирувата в клетке больше, чем фосфоенолпирувата. PEP конвертируется в пируват, отдавая лишний фосфат на белок Hpr, но этих лишних фосфатов совсем мало. А с белка Hpr фосфаты переходят как раз на белок IIAGlc. В фосфорилированной форме он не способен активировать фермент аденилатциклазу, и уровень цАМФ в клетке низок. Помимо этого, IIAGlc без фосфата еще и подавляет транспорт низкоэнергетических сахаров (лактозы) в клетку.

Если же глюкозы в клетке мало, то PEP становится больше пирувата. Он начинает активно конвертироваться в пируват, форфорилированного белка Hpr много, и все эти фосфаты передаются на IIAGlc. Фосфорилированный IIAGlc (1) активирует аденилатциклазу, и в клетке становится больше цАМФ, (2) перестает подавлять транспорт низкоэнергетических сахаров в клетку.

А цАМФ-то и нужен для глобального клеточного ответа на изменившийся источник углерода!

CAP-регулон

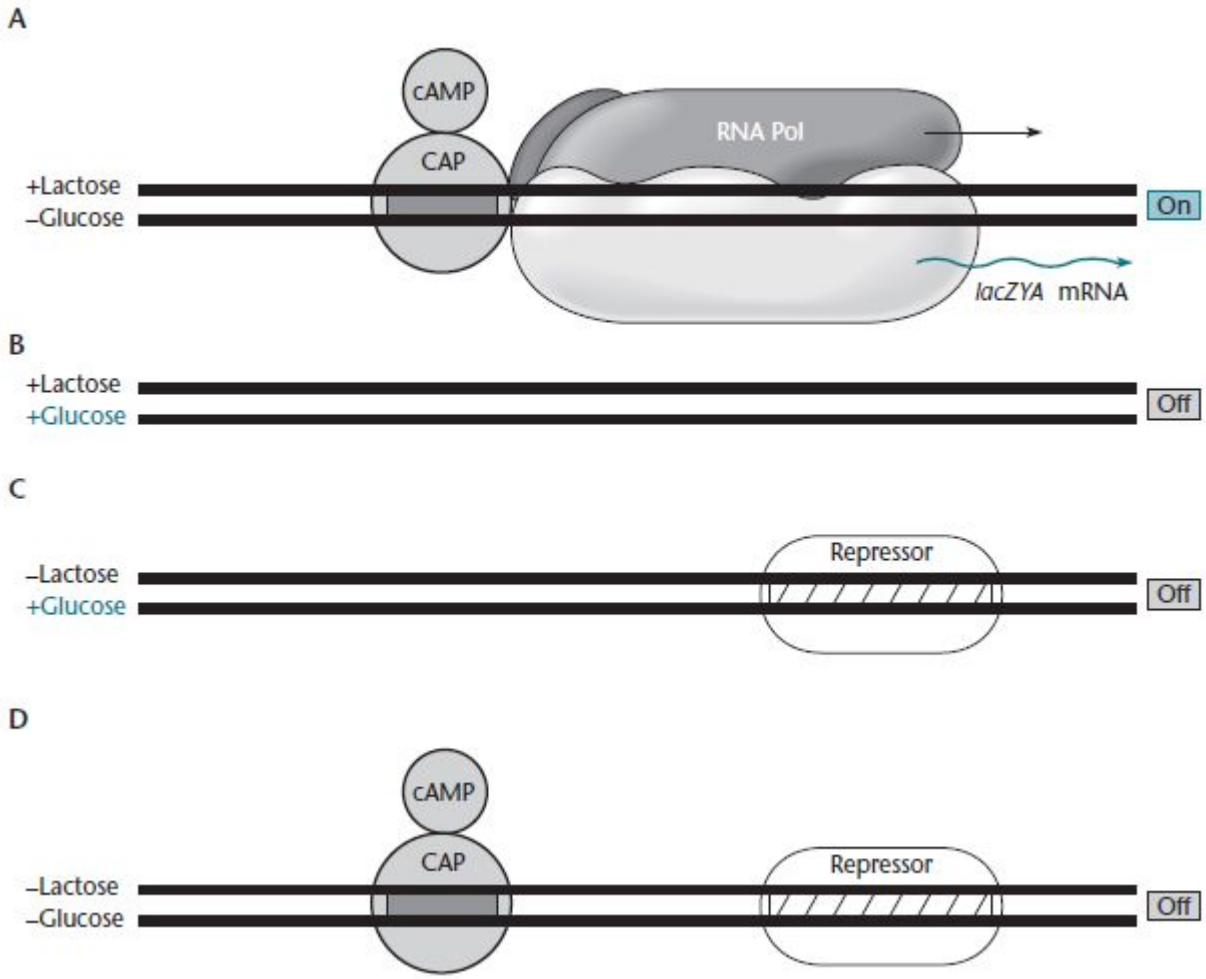
CAP – это cAMP-activated protein. Связавшись с цАМФ, этот белок становится активатором многих оперонов, связанных с метаболизмом сахаров (Lac, Gal, Ara и многие другие). Таким образом, все эти опероны подвергаются как специфической (как мы видели на прошлой лекции), так и глобальной регуляции. Механизмы CAP-регуляции разные на разных оперонах.



Вот два примера работы CAP на промоторах. В первом случае (Lac) он связывается с С-концевым доменом альфа-субъединицы РНК-полимеразы и стимулирует связывание фермента с -35 и -10.

Во втором случае (Gal) CAP взаимодействует с N-концевым доменом той же субъединицы, что приводит к локальному расплетанию ДНК в районе начала транскрипции.
Но в любом случае у CAP есть свой участок связывания ДНК, который всегда несколько выше промотора. И такое связывание возможно только для цАМФ-связанной формы белка!

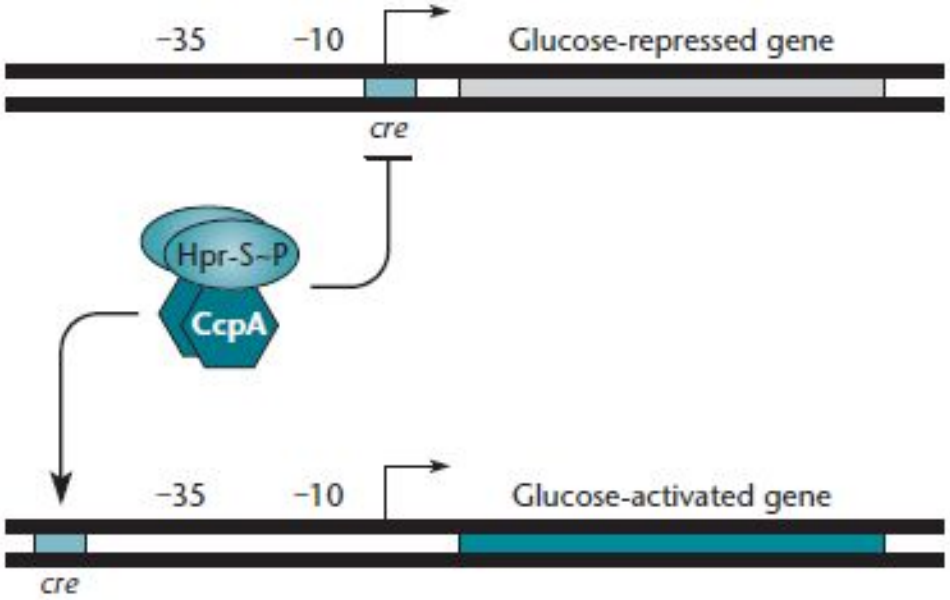
Регуляция Lac-оперона оперонного и регулонного уровн



Единственный вариант, когда оперон активен – присутствие лактозы и отсутствие глюкозы. Во всех остальных случаях либо не будет активного CAP (если есть глюкоза), либо будет специфический репрессор LacI (если нет лактозы).

Катаболитная регуляция у *B.subtilis*

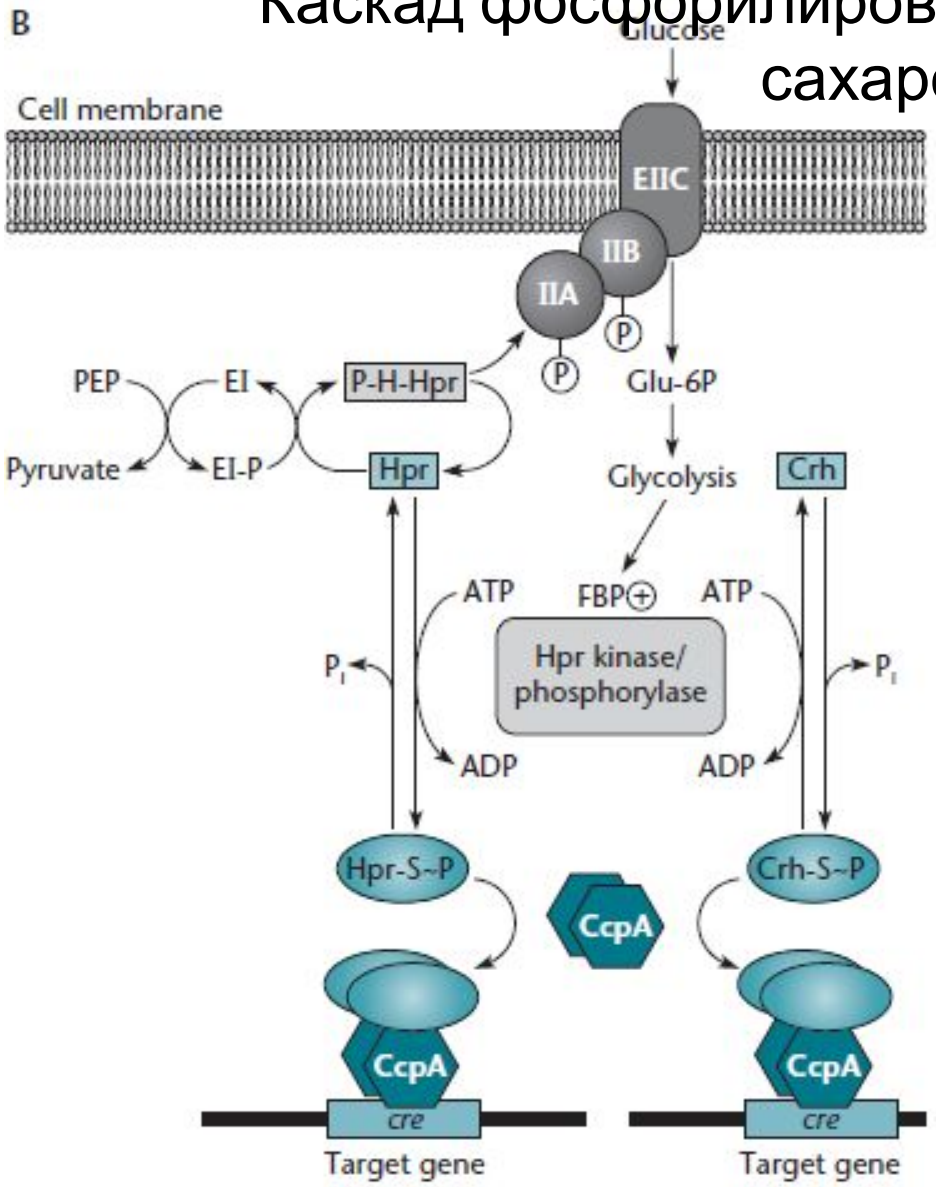
Регуляция, основанная на цАМФ, вообще ни разу не универсальная. Например, у *B.subtilis* цАМФ вообще не синтезируется. Вместо него они используют белок CcpA. Но фосфорилирование и здесь важно, причем бацильный белок Hpr тут также играет роль.



CcpA действует на несколько десятков оперонов, связанных с метаболизмом сахаров, связываясь с так называемым cre-участком. Любопытно, что если cre находится выше промотора, то CcpA выступает как активатор транскрипции, а если cre перекрывается с промотором – то как репрессор!

CcpA-зависимая катаболитная регуляция у *B.subtilis*

Каскад фосфорилирования и метаболизм сахаров



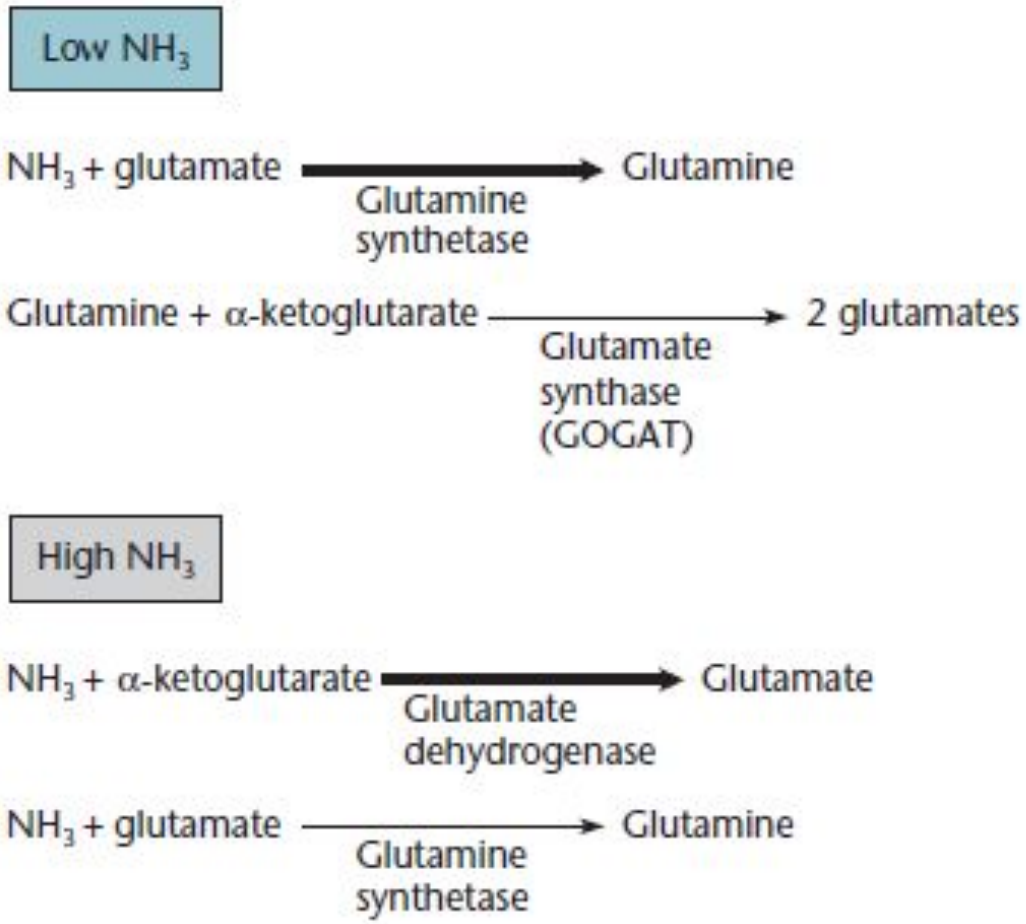
При поступлении глюкозы в клетку активно запускается гликолиз , становится много промежуточного продукта, фруктозо-1,6-бисфосфата (FPB). Он активирует белок Hpr-киназу, которая фосфорилирует Hpr по остатку СЕРИНА. Hpr-S-P связывается с CcpA и активирует его, теперь он может связаться с ДНК и активировать/репрессировать транскрипцию.

Интересно, что тот же белок Hpr, фосфорилированный по остатку ГИСТИДИНА, активирует транспорт в клетку низкоэнергетических сахаров, как в случае *E.coli*. А фосфорилирование этого белка по СЕРИНУ ингибирует фосфорилирование по ГИСТИДИНУ. Соответственно, транспорт низкоэнергетических сахаров получается подавленным, если имеется большое количество глюкозы.

Регуляция ассимиляции азота

Азот входит в состав многих биологических молекул, поэтому его наличие является обязательным для жизни.

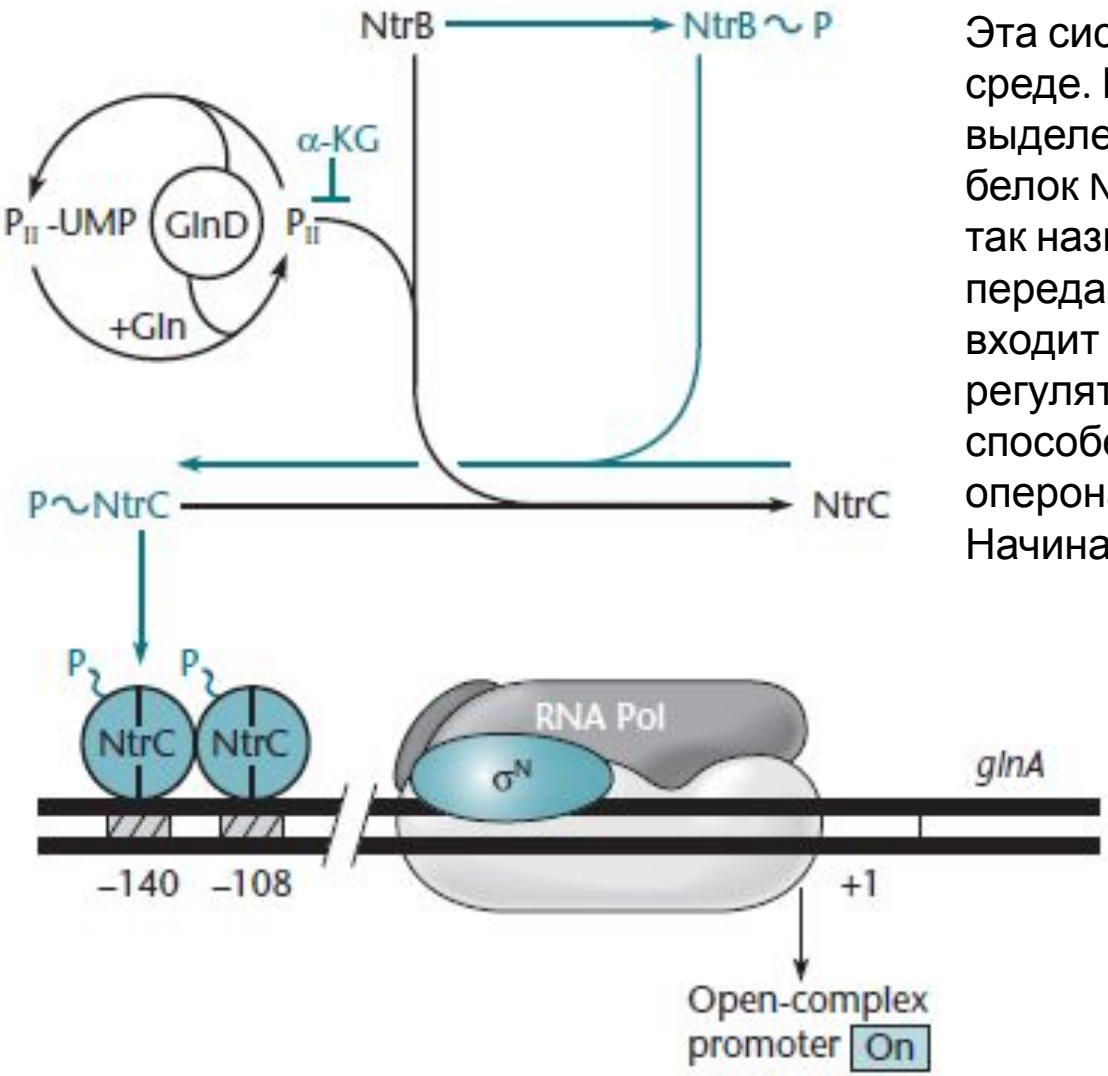
В большинстве случаев азот встраивается в биомолекулы в виде NH3. Поэтому все формы азота должны быть восстановлены клеткой до NH3 и потом уже использоваться в различных реакциях. Это называется ассимиляционное восстановление азота. А потом уже начинается собственно ассимиляция, то есть включение NH3 в биосинтез.



В зависимости от количества NH3, клетка может использовать разные пути его включения в биомолекулы. Соответственно, все это надо регулировать!

glnA-регулон и система передачи сигнала

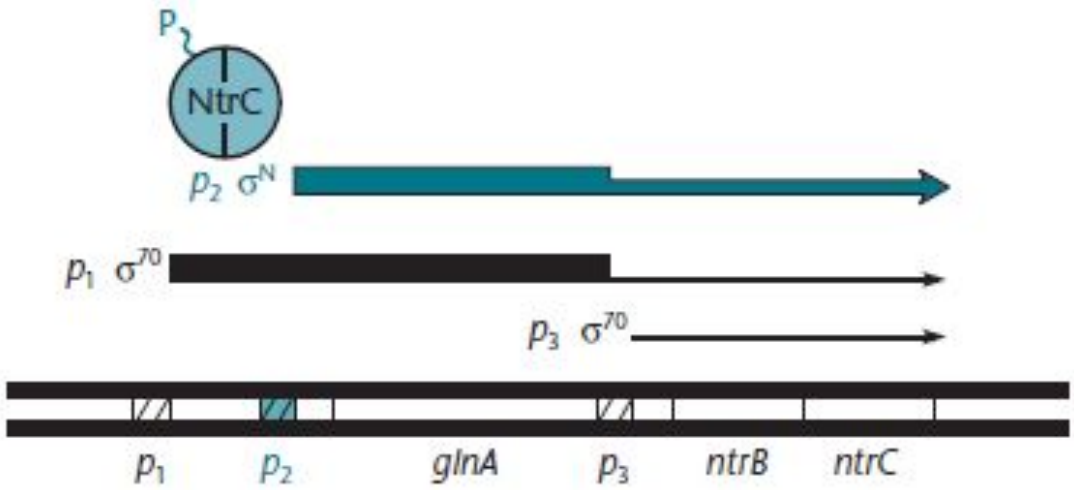
Это как раз совокупность оперонов, регулирующихся в ответ на изменение концентрации NH3. Рассмотрим регуляцию оперона, содержащего glnA – ген глютаминсинтазы.



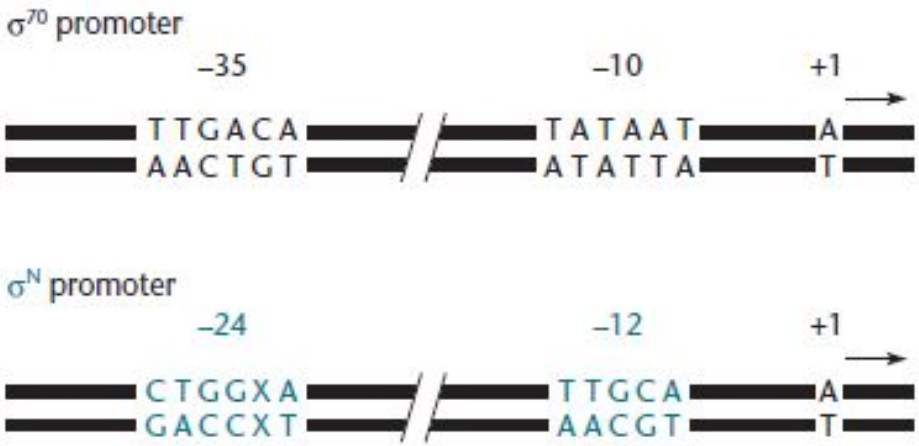
Эта система завязана на количестве азота в среде. Если NH3 мало, происходят реакции, выделенные синим: автофосфорилируется белок NtrB (ген входит в оперон). Этот белок – так называемая сенсорная киназа, он передает фосфат на белок NtrC (ген также входит в состав оперона) – так называемый регулятор ответа. Фосфорилированный NtrC способен активировать транскрипцию glnA-оперона и других оперонов данного регулона. Начинает синтезироваться глютаминсинтаза.

А если NH3 много, в дело вступает белок PII, который теряет УДФ-модификацию , потому что глютамин стимулирует белок GlnD, который ее и отщепляет. PII без модификации подавляет автофосфорилирующую активность NtrB, и дело кончается невозможностью активировать glnA-оперон и остальные опероны регулона. А оно и не надо – NH3 и так полно!

glnA-оперон устроен любопытным образом



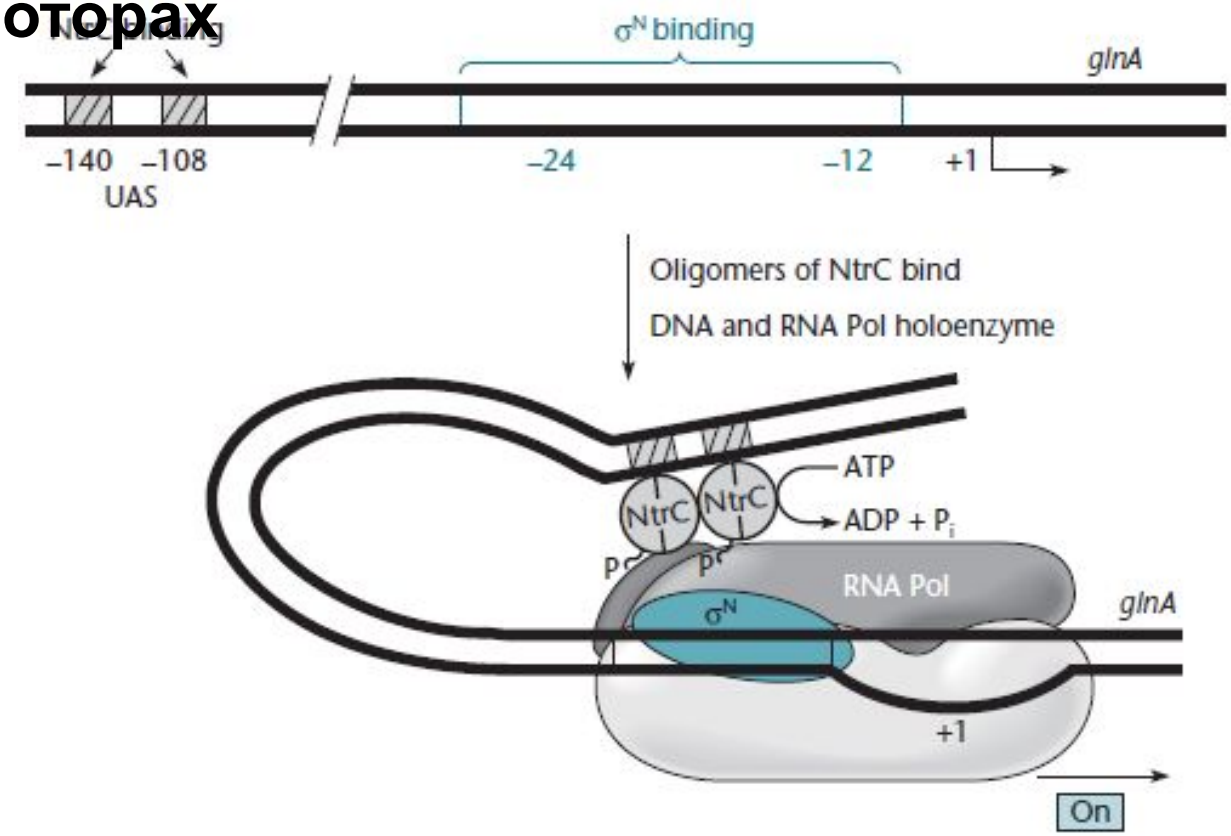
В этом опероне три промотора, но только один (p2) подвержен NtrC-зависимой регуляции. Это потому, что остальные промоторы могут узнаваться обычной РНК-полимеразой с сигма70-субъединицей. А вот p2 подходит только для фермента с нестандартной сигма54-субъединицей.



Никаких -35 и -10 элементов в промоторах для сигмы54 (она же сигмаN) нет, вместо этого есть совсем другие элементы, -24 и -12.

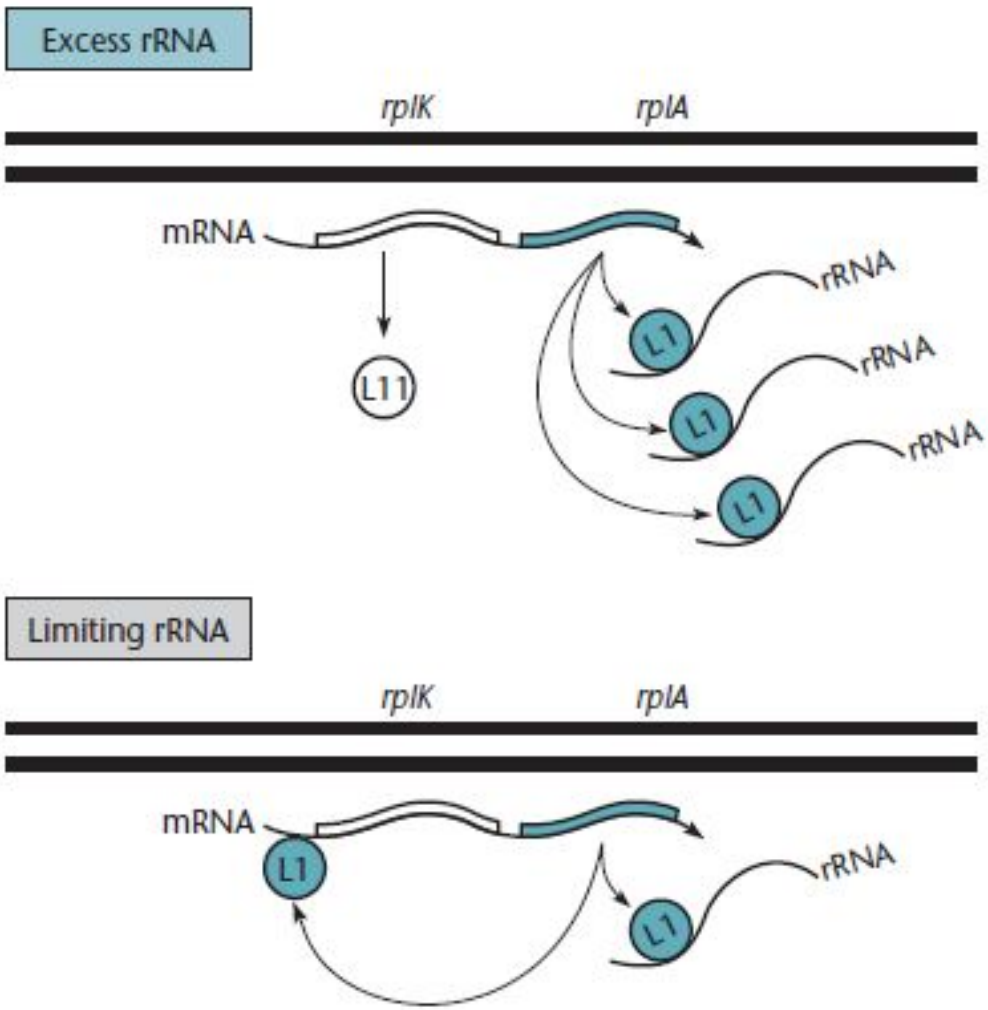
Промоторы p1 и p3 нужны для того, чтобы в клетке даже в случае большого количества NH3 в среде имелись малые количества глютаминсинтазы, она же все равно нужна.

Механизм работы NtrC на сигма54-зависимых промоторах



Две молекулы NtrC должны сначала связаться с двумя участками UAS (upstream activated sequence). После этого NtrC может связаться с сигма54-содержащей РНК полимеразой (изгибая при этом ДНК). АТФазная активность NtrC приводит к началу расплетания ДНК и формирования «открытого комплекса», необходимого для нормальной инициации транскрипции.

Регуляция синтеза рибосомных белков



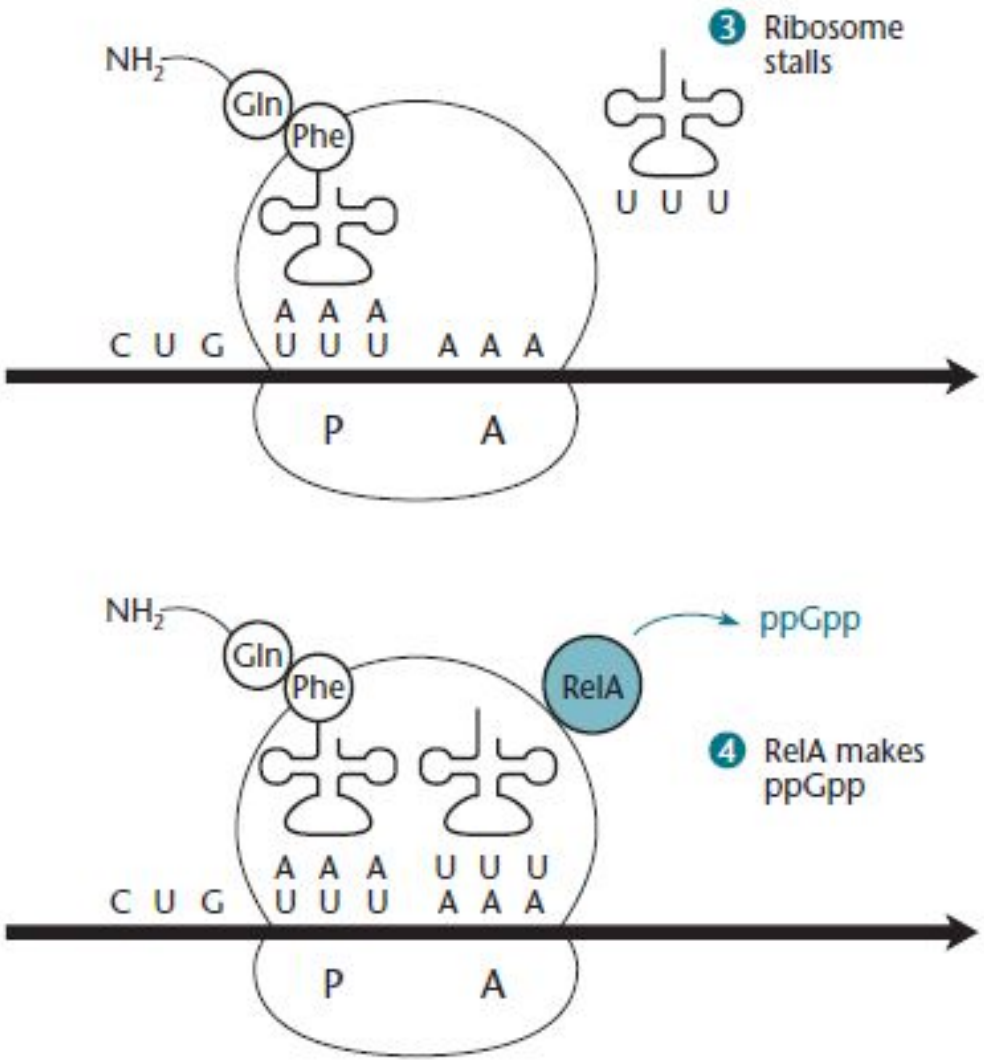
В геноме *E.coli* имеется несколько оперонов, состоящих из генов рибосомных белков. Все они регулируются схожим образом, формируя тем самым регулон рибосомных белков.

Если имеется свободная рРНК, то регуляторный белок (здесь – L1) будет с ней связываться и начинать сборку рибосом.

А вот если свободной рРНК мало, то избыток L1 начнет связываться с регуляторной областью первого гена оперона (здесь – rplK, кодирующий белок L11) и полностью подавлять транскрипцию. Таким образом, выходит, что количество молекул рРНК всегда равно количеству молекул каждого из рибосомных белков.

Stringent response (строгий ответ)

Этот тип регуляции приводит к тому, что синтез рРНК и тРНК подавляется в условиях голодания по одной или более аминокислоте.



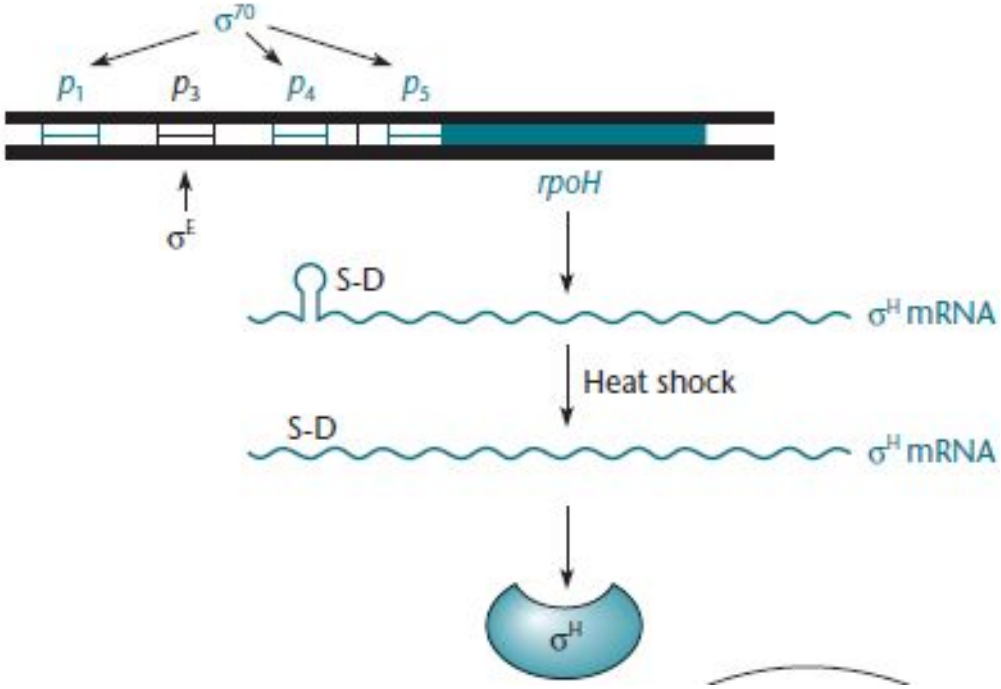
Основной компонент stringent response – гуанозинтетрафосфат (ppGpp). Он синтезируется в ответ на ситуацию, когда в клетке нет аминокислоты (на рисунке – лизина). Когда рибосома доходит до лизинового кодона AAA, она останавливается, потому что нет аминоацилированной тРНК-Лиз с антикодоном UUU, которую мог бы доставить в А-участок рибосомы фактор EF-Tu. Однако есть деацилированная лизиновая тРНК, которая при достаточно долгой паузе (а она вообще будет бесконечной, раз лизина нет) может случайно войти в А-участок рибосомы даже без помощи EF-Tu.

Деацилированная тРНК в А-участке – сигнал для белка RelA, который мгновенно начинает синтез ppGpp, перенося фосфаты на 3’-конец ГТФ с молекулы АТФ.

Молекулярный механизм работы ppGpp до конца не известен, но он подавляет транскрипцию генов рРНК и тРНК. А раз нет рРНК, то нет и рибосомных белков! Это

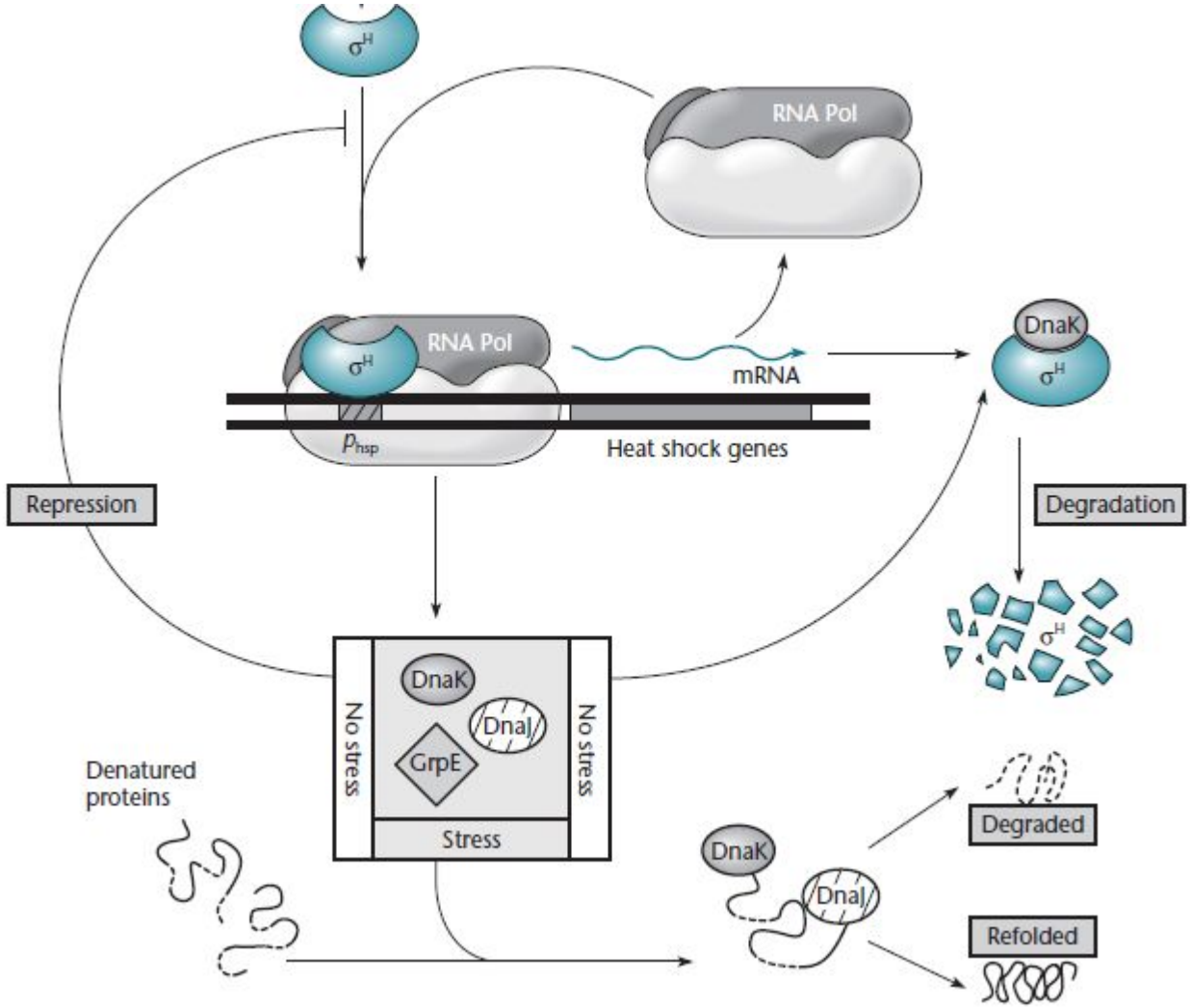
Heat shock response (ответ на тепловой шок)

При повышении температуры бактериальная клетка начинает синтезировать целый ряд так называемых белков теплового шока – в основном это шапероны и протеазы, щепящие неправильно сложившиеся белки. Но начинается все опять с необычной сигмы!



В норме синтез такой сигмыН выключен из-за шпильки, включающей в себя SD этой мРНК. Но она расплетается само по себе при повышении температуры, это термосенсор! И уж тогда сигмаН начинает синтезироваться в больших количествах, что, в свою очередь, разрешает синтез белков теплового шока со специальных сигмаН-промоторов.

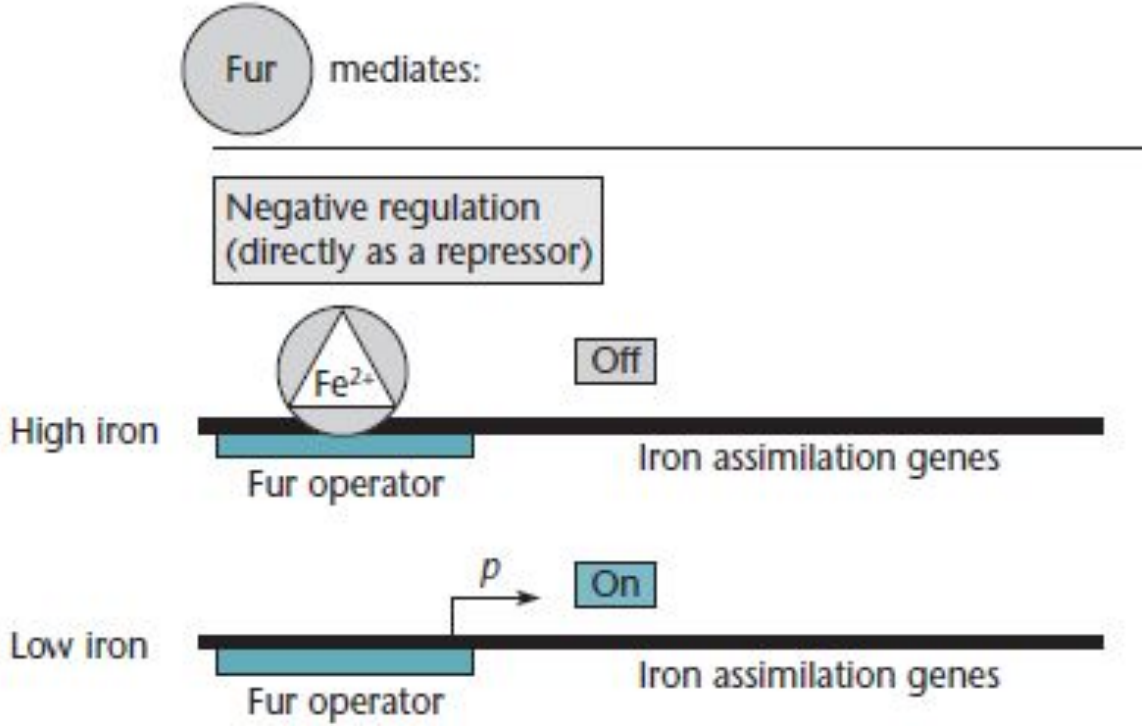
Heat shock response (ответ на тепловой



Белок DnaK в нормальных условиях связывается с новосинтезированными белками и помогает им правильно складываться. Связывается он и с сигмойН (если температура уже понизилась, а этой сигмы еще полно), и это приводит к деградации сигмыН. А при повышенной температуре DnaK связывается только с неправильно сложенными белками и помогает им свернуться правильно, а заодно и оставляет в покое сигмуН, которая спокойно запускает экспрессию всего Hsr-регулона

Регуляция метаболизма железа

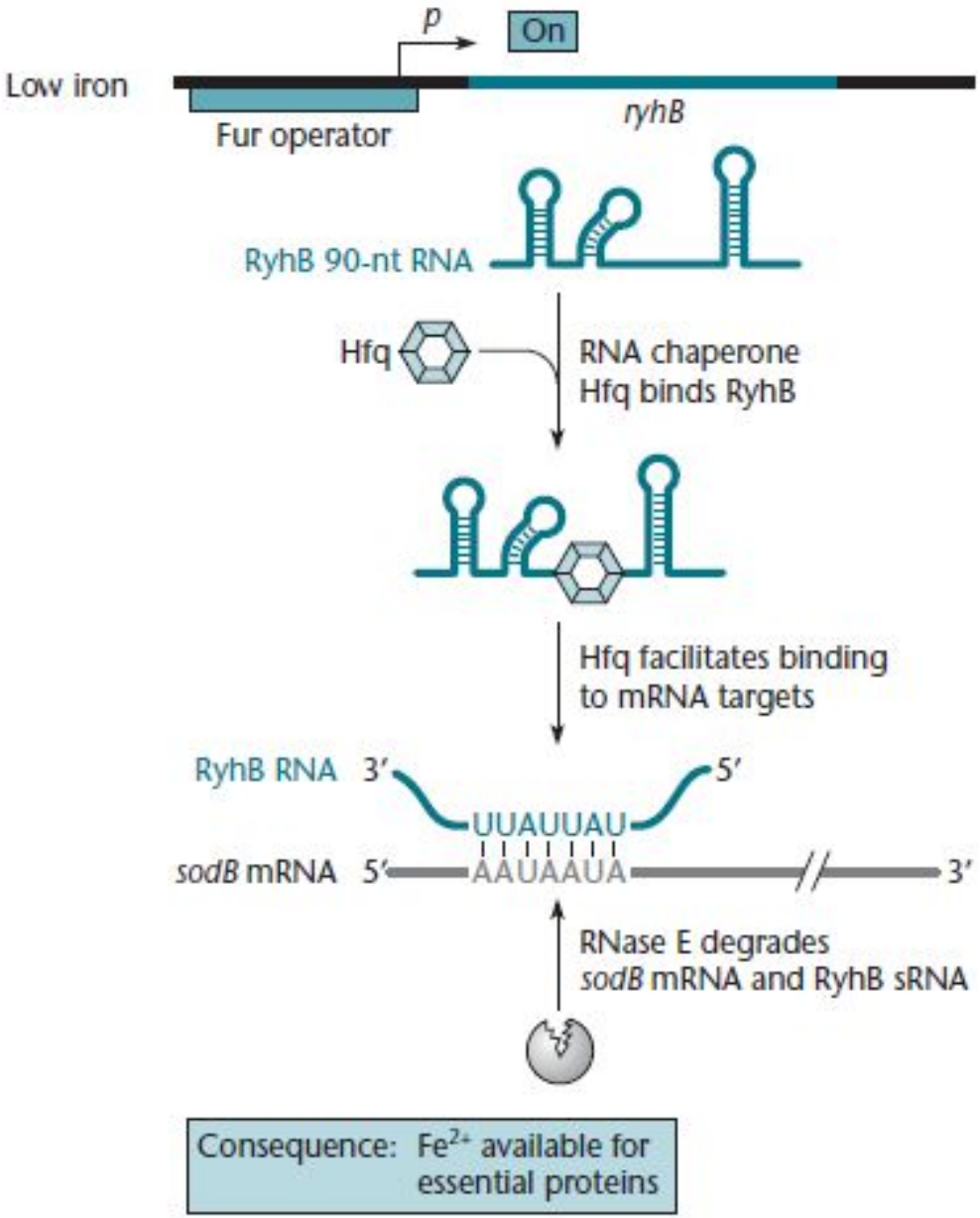
Железо – важная штука для любого живого организма, и бактерии – не исключение. Однако с железом надо быть аккуратным – его избыток приводит к формированию супероксид-ионов из перекиси водорода, а это самый жуткий мутаген для клетки. Гены, вовлеченные в метаболизм железа, организованы в Fur-регулон.



Когда железа в клетке много, ионы Fe2+ связываются с белком Fur и превращают его в репрессор, действующий по классическому механизму на опероны генов ассимсиляции железа (мембранные транспортеры и т.д.).

Когда железа мало, Fur находится в состоянии апорепрессора, и транскрипция ассимиляторов железа идет вполне активно.

Регуляция метаболизма

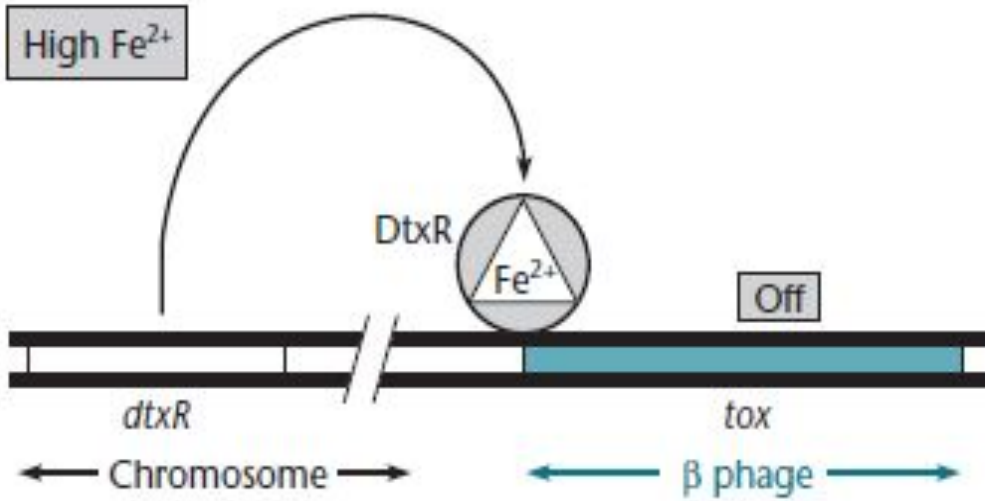


В частности, при малом количестве железа активируется транскрипция гена ryhB. Этот ген кодирует короткую РНК, которая при помощи РНК-шаперона Hfq связывается с 5’-участками мРНК белков, которые, наоборот, начинают активно синтезироваться при высоком содержании железа (по другим механизмам; здесь – мРНК Sod1, кодирующая супероксиддисмутазу, фермент конвертации перекиси водорода в супероксид-радикалы). Получается дцРНК, которая есть субстрат для деградации клеточными системам и РНК-интерференции.

Таким образом, то небольшое количество железа, которое имеется в клетке, становится доступно для белков, для которых оно и должно быть доступно в таких условиях, а белки, оперирующие с железом в больших количествах, исчезают – деградируют их мРНК.

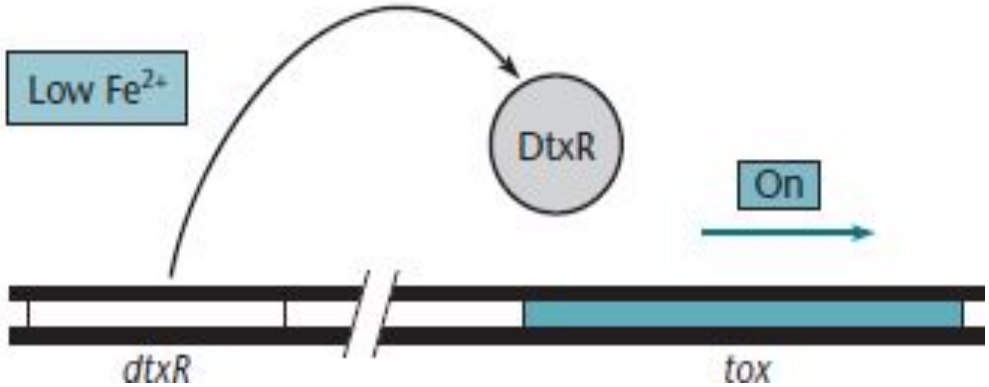
Железозависимая регуляция у дифтерийных коринебактерий

В клетках эукариот свободного железа практически не бывает – все оно связано с гемом или другими белками. Для любого внутриклеточного паразита снижение концентрации железа – сигнал того, что он попал в хозяйскую клетку. А значит, пора проявлять патогенность!



Пока железа много, оно связано с репрессором DtxR, подавляющим экспрессию гена дифтерийного токсина.

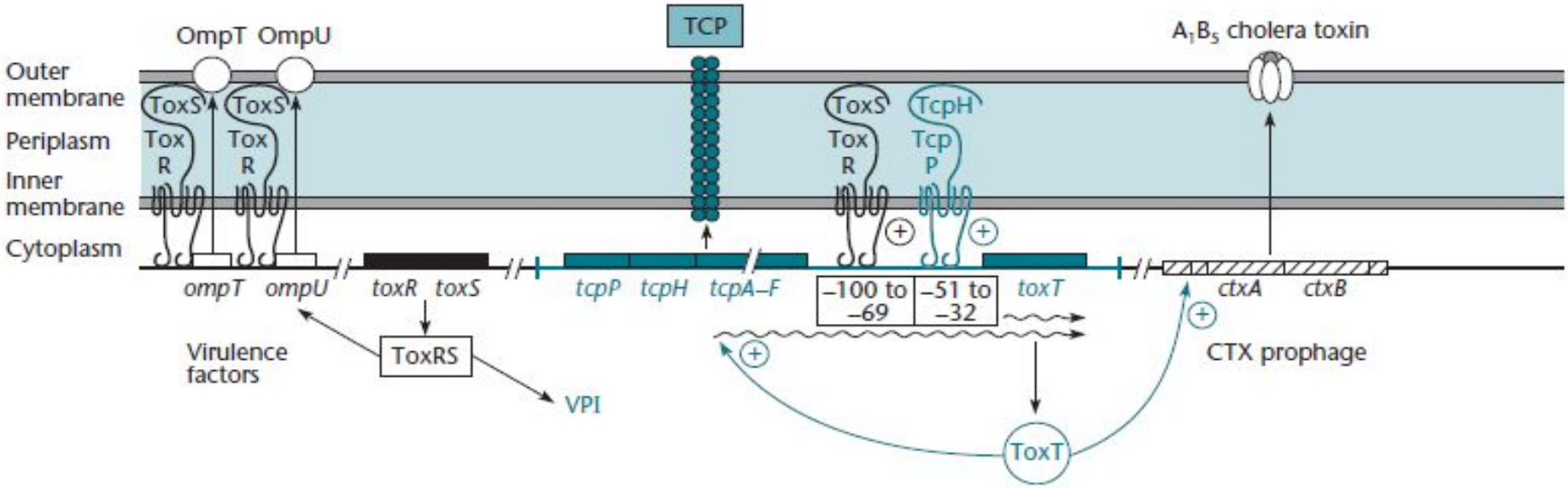
Когда железа становится мало, DtxR переходит в состояние апорепрессора, транскрипция начинается, токсин синтезируется, наступает адская дифтерия!



Любопытно, что ген токсина вообще-то принадлежит лизогенному профагу бета, а ген dtxR – из генома самой бактерии, которая без профага совершенно безобидна!

Регуляция патогенности холерного вибриона

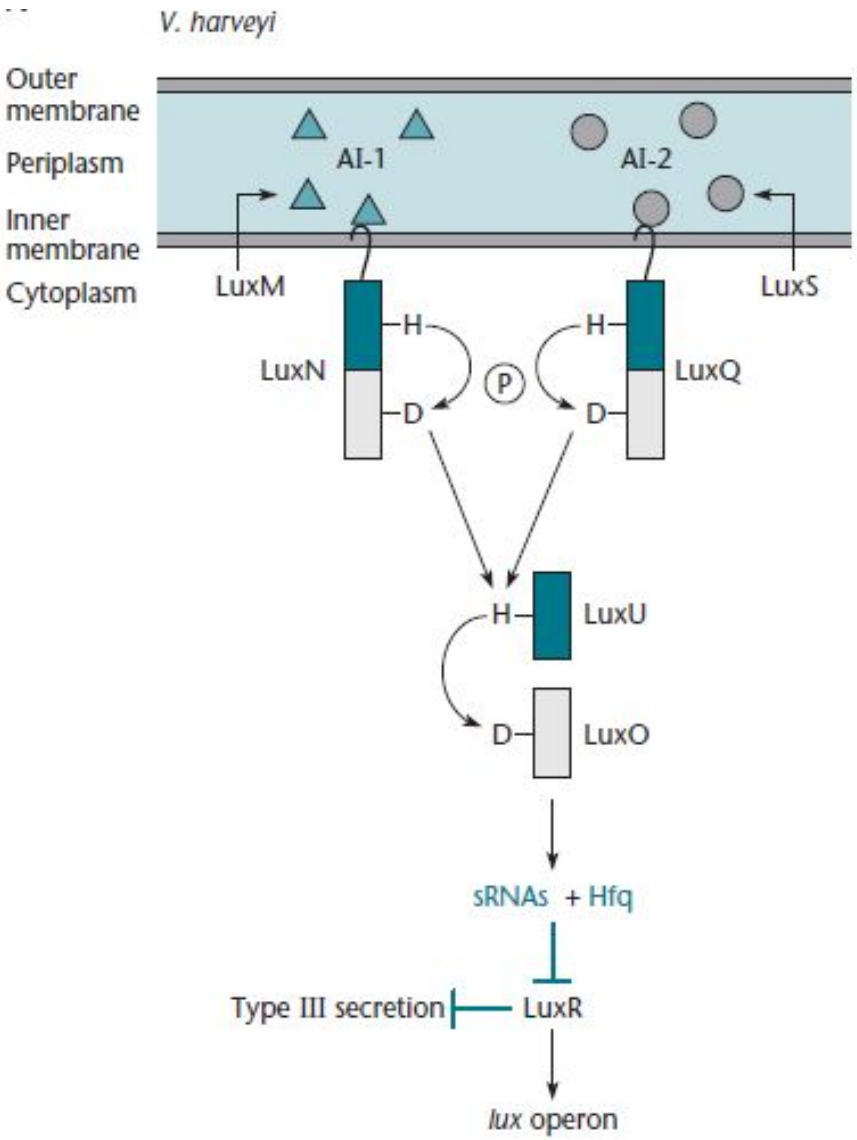
Холерный вибрион так устроен, что его патогенность проявляется в тонкой кишке человека, вызывая сильнейшую диарею вплоть до летального исхода. В тонкой кишке (1) высокая осмолярность, (2) высокие количества некоторых аминокислот, которые в других местах, наоборот, редки. Совокупность этих факторов вызывает активацию патогенности.



Регуляцией занимаются белки ToxS и ToxR. Они не только активируют синтез факторов вирулентности (OmpT, OmpU) и собственно токсинов (CtxA, CtxB), но и помогают им встроиться во внешнюю мембрану, чтобы можно было успешно заражать несчастных хозяев.

Чувство кворума

Бактерии могут узнавать о том, какое количество клеток того же вида их окружает, при помощи секреции в среду специальных малых молекул.



Хорошо изученнный случай – морской вибрион, кстати, близкий родственник холерного (у которого тоже есть чувство кворума). Эти вибрионы начинают светиться, когда их накапливается определенное количество в небольшом пространстве. Скорее всего, эти вибрионы – симбионты глубоководных рыб с органами освещения, но это еще не доказано. Они синтезируют и выпускают в среду две малых молекулы – гомосериновый лактон и фуранозилборатдиэфир (AI1 и AI2, соответственно). При их накоплении в периплазме (что может случиться только если они попали туда снаружи) запускается очень сложный и пока не очень хорошо изученный регуляторный каскад, который в конце концов приводит к активации lux-оперона и синтезу молекул, испускающих свет видимого диапазона.