



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ - ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

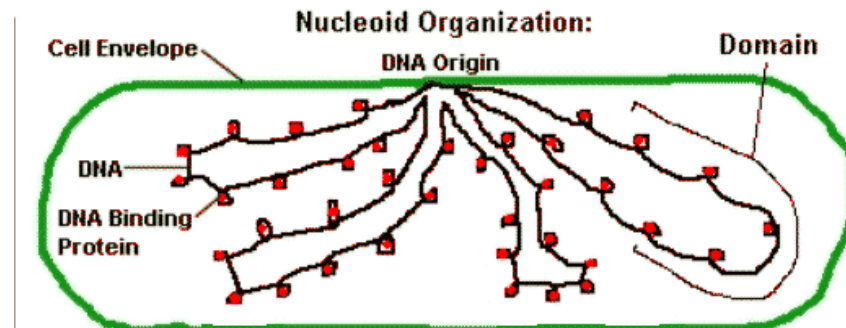
# ΓΕΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ

(Γενετικό υλικό των βακτηρίων - ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης)

Μαντώ Κυριακού

# ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

- Αποτελείται από ένα μόριο DNA σε υπερελιγμένη μορφή και τα άκρα του είναι ενωμένα (κυκλικό μόριο): βακτηριακό χρωμόσωμα
- Εκτός από το χρωμοσωμικό γενετικό υλικό πολύ σημαντικό ρόλο παίζει και το εξωχρωμοσωμικό: (μικρά μόρια DNA) τα πλασμίδια, τα μεταθετά γενετικά στοιχεία, οι προϊοί



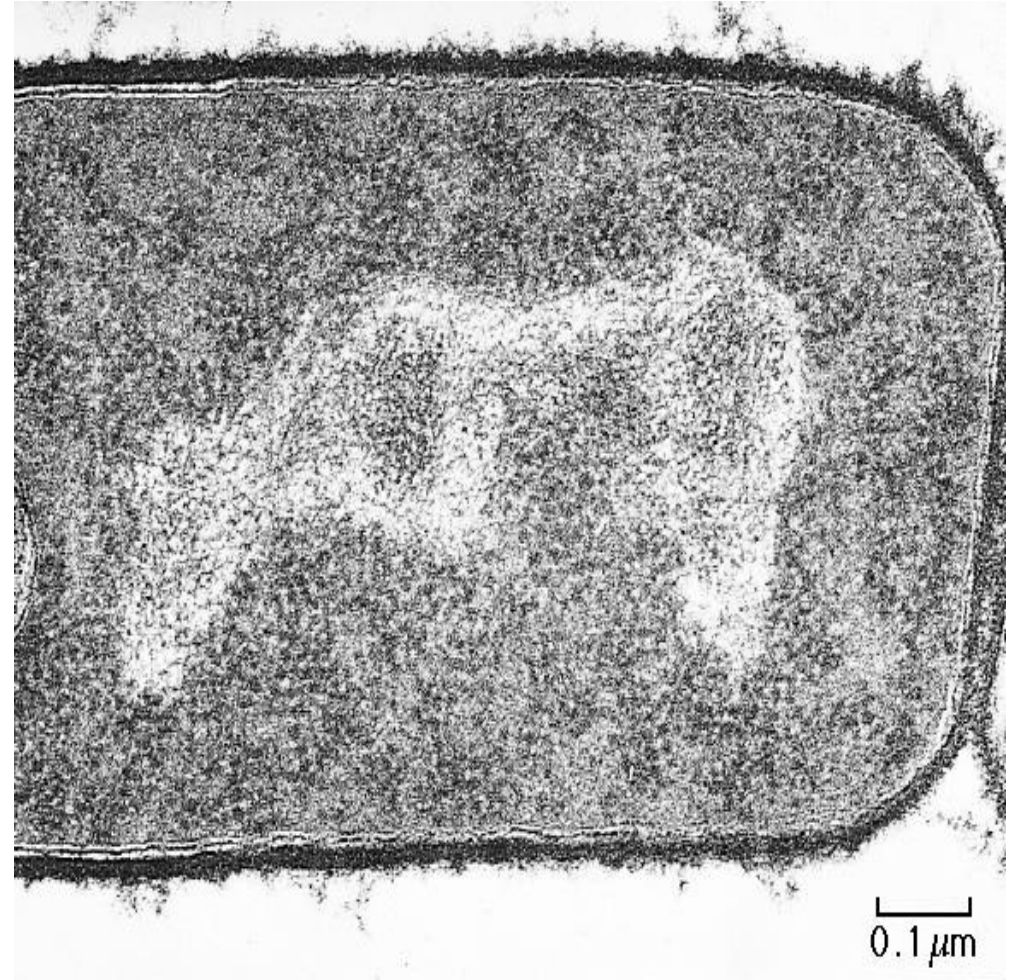
Plasmids are small circles of DNA found naturally in the cells of some organisms. A plasmid can replicate itself as well as any other DNA inserted into it. For this reason, plasmids make excellent cloning vectors—structures that carry DNA from cells of one species into the cells of another.

# Το μέγεθος ποικίλει...

Γενετικό στοιχείο	Διακύμανση του μεγέθους
Μεταθετά γενετικά στοιχεία (transposons)	800-30kbp
Πλασμίδια	1kbp-150kbp
Προ-ιοί	3kbp-300kbp
Φάγοι	4knt-170kbp
Βακτηριακό χρωμόσωμα	600kbp-9.45Mbp

# Βακτηριακό χρωμόσωμα

- ❖ Μύθος ότι είναι διάχυτο
- ❖ Εντοπίζεται σε συγκεκριμένη περιοχή, συνδεδεμένο με τη κυτταρική μεμβράνη: πυρηνοειδές
- ❖ Απλοειδές, αλλά σε κάποια βακτήρια απαντώνται περισσότερα από ένα αντίγραφα του χρωμοσώματος



# Το βακτηριακό χρωμόσωμα

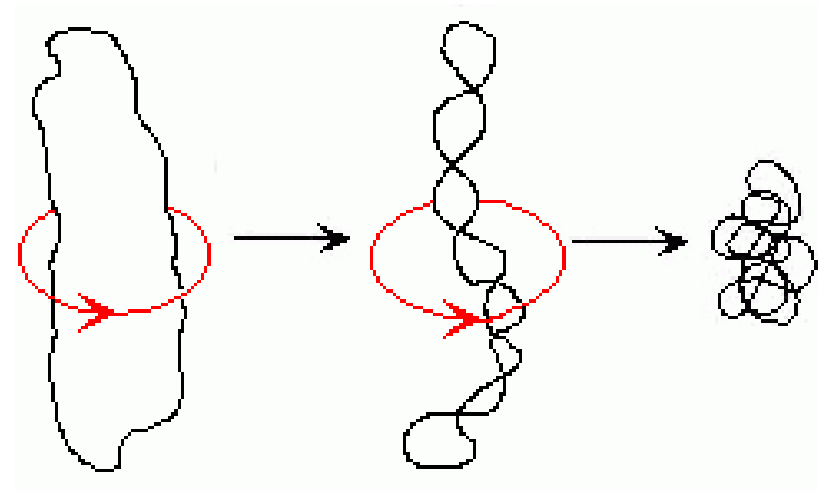
- Το μέγεθος του βακτηριακού χρωμοσώματος υποδεικνύει τη δομική πολυπλοκότητα του οργανισμού, όπως και του κύκλου της ζωής του
- *Mycoplasma genitalium*: 580kbp (υποχρεωτικό παράσιτο), ενώ το *Mycococcus xanthus*: 9,45Mbp
- Το χρωμόσωμα του *E.coli* :4,6Mbp και κωδικοποιεί περίπου 4400 πρωτεΐνες (Ευβακτήρια)

Το 90% του DNA: σύνθεση πρωτεϊνών και πολυπεπτιδίων

Υπόλοιπο 10%: έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης καθαρά δομική λειτουργία

# Το βακτηριακό χρωμόσωμα

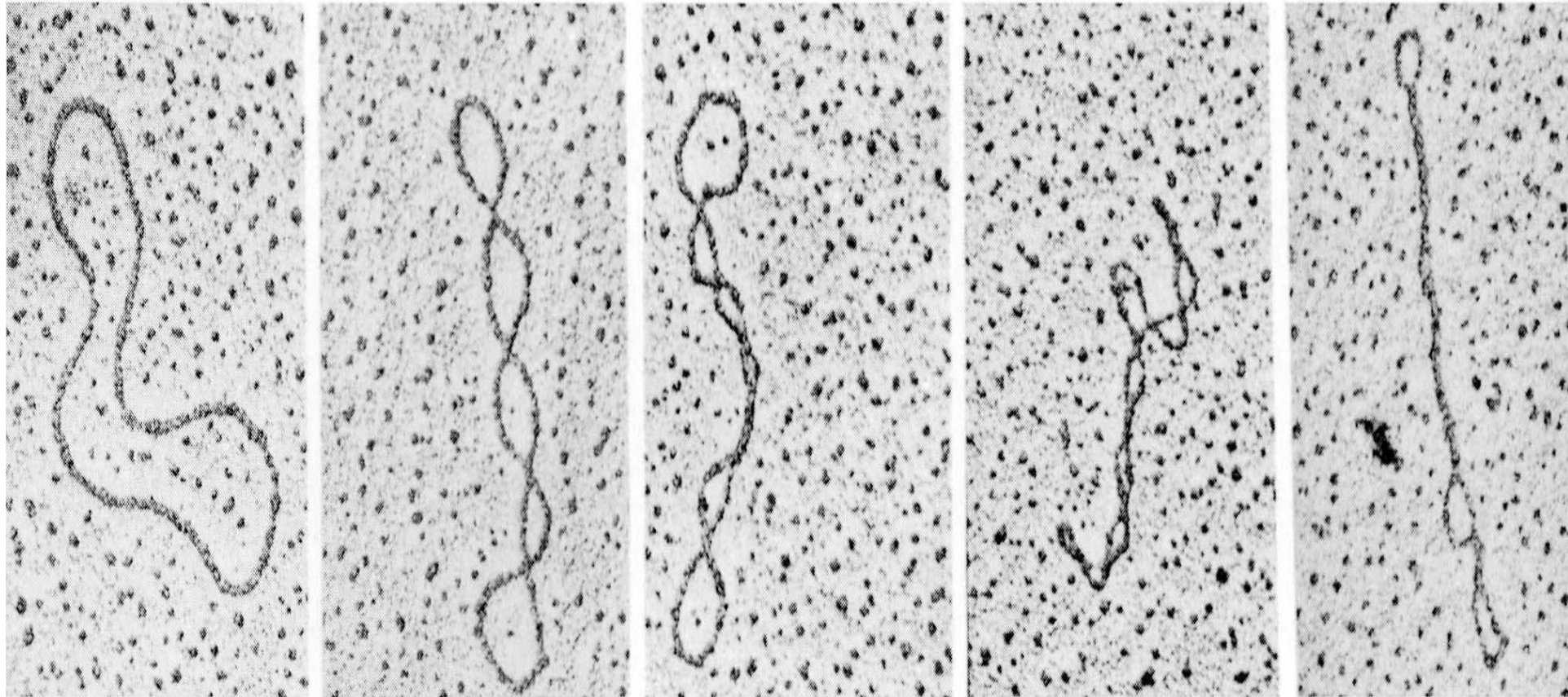
- ✓ DNA (κυκλικό, δίκλωνο μόριο)  
Εξαιρεση: γραμμικό χρωμόσωμα
- ✓ Πακετάρισμα του DNA:  
υπερελικοειδής δομή
- ✓ Αρνητική υπερέλιξη συνήθως
- ✓ Υπεύθυνο ένζυμο: DNA γυράση  
(τοποϊσομεράση II), εντοπίζεται  
σε βακτήρια και αρχαία



# Το στρίψιμο...του DNA

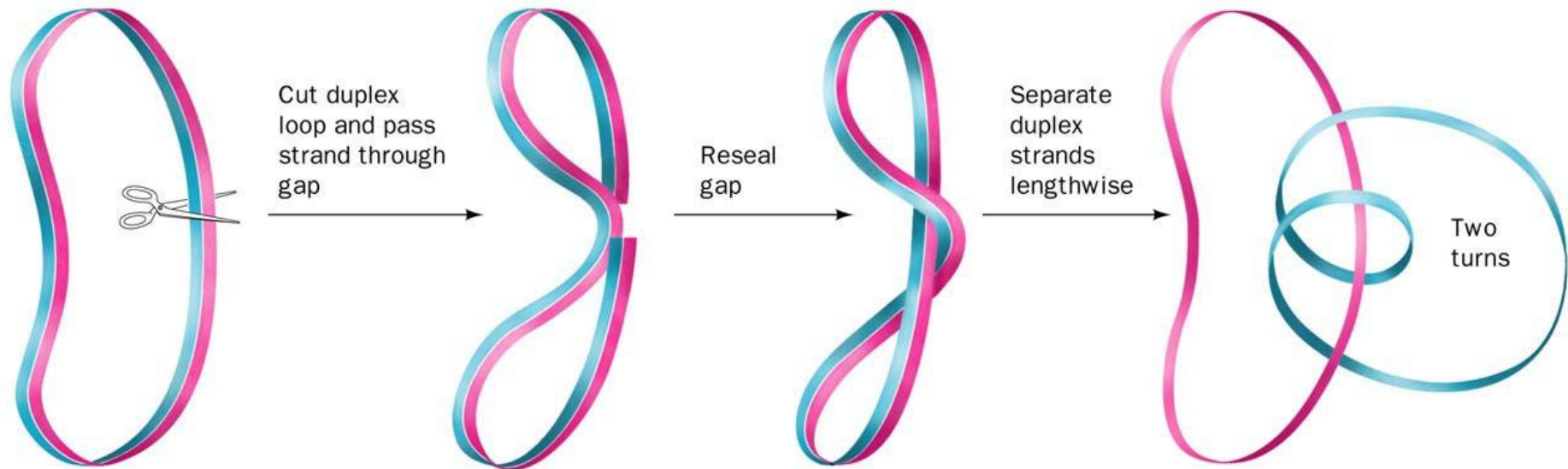
- ❖ Η υπερέλιξη επιτυγχάνεται μετά από σπάσιμο στη μία αλυσίδα του DNA και ένωση από την αντίθετη πλευρά (DNA γυράση)
- ❖ Συνύπαρξη με το ένζυμο τοποϊσομεράση I, που κάνει την αντίθετη διαδικασία: επαναφέρει περιοχές του DNA στη χαλαρή μορφή
- ❖ Το βακτηριακό χρωμόσωμα περιέχει περίπου 50 υπερελιγμένες περιοχές
- ❖ Η δομή του DNA διατηρείται μέσω της ισορροπίας της υπερέλιξης και του χαλαρώματος
- ❖ Δεν είναι απόλυτα γνωστοί οι λόγοι που απαιτούν αυτή τη διαδικασία: ο διπλασιασμός του DNA απαιτεί χαλάρωμα. Η έκφραση κάποιων γονιδίων απαιτεί υπερέλιξη, ενώ κάποιων άλλων αντίθετα χαλάρωμα!

# Το στρίψιμο...του DNA



Electron micrographs by Laurien Polder. From Kornberg, A. and Baker, T.A., DNA Replication (2nd ed.), p. 36, W.H. Freeman (1992). Used with permission

# Το στρίψιμο...του DNA

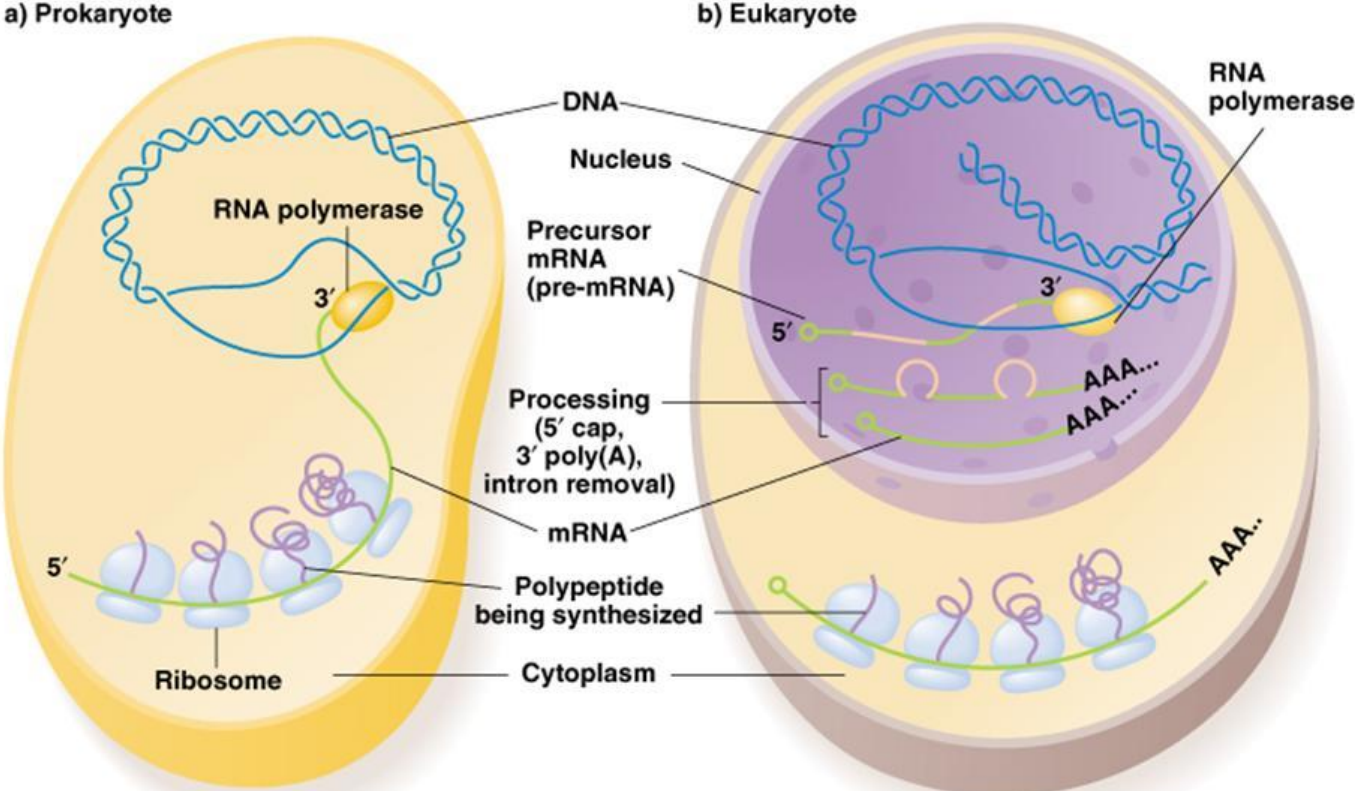


# Γονιδιακή έκφραση στα βακτήρια

Η γονιδιακή έκφραση περιλαμβάνει δύο διαφορετικές πολύ σημαντικές λειτουργίες:

- Το DNA πρώτα μεταγράφεται σε mRNA από το ένζυμο RNA-πολυμεράση. Τα μόρια του mRNA είναι αρκετά ασταθή και έχουν χρόνο ημιζωής κάποια λεπτά
- Πριν την ολοκλήρωση της μεταγραφής, ξεκινά η μετάφραση. Τα ριβοσώματα προσδένονται σε ειδικές θέσεις του mRNA και ξεκινούν την σύνθεση του πολυπεπτιδίου

# Γονιδιακή έκφραση στα βακτήρια



# Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης

Σημαντικότεροι τρόποι ρύθμισης:

- ⌘ Ρύθμιση της ενεργότητας του ενζύμου > μετα-μεταφραστική τροποποίηση
- ⌘ Ρύθμιση της ποσότητας (παρουσία ή απουσία του ενζύμου) > μεταγραφή ή μετάφραση του ενζύμου

Ρύθμιση της ενεργότητας του ενζύμου

# Μετα-μεταφραστική ρύθμιση

- Σύνθεση ως τμήμα μεγαλύτερης ανενεργού πρωτεΐνης
- Αποδόμηση ενζυμικών μορίων (μείωση της ενεργότητας)

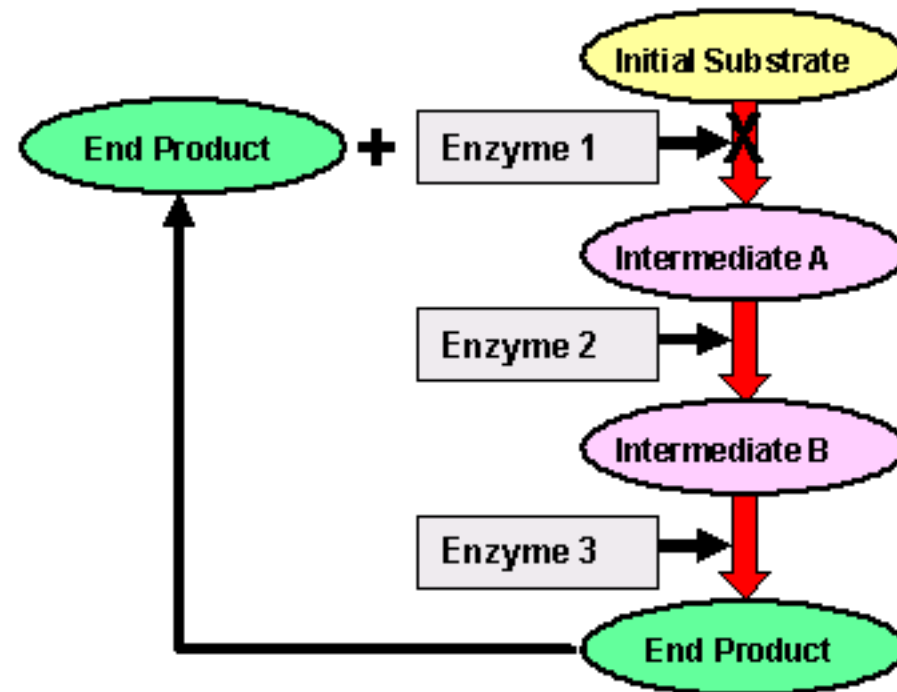
Αντιστρεπτές και προσωρινές μορφές ρύθμισης:

- Αναδραστική αναστολή
- Ομοιοπολική τροποποίηση ενζύμου

# Αναδραστική (ανατροφοδοτική ) αναστολή (feedback inhibition)

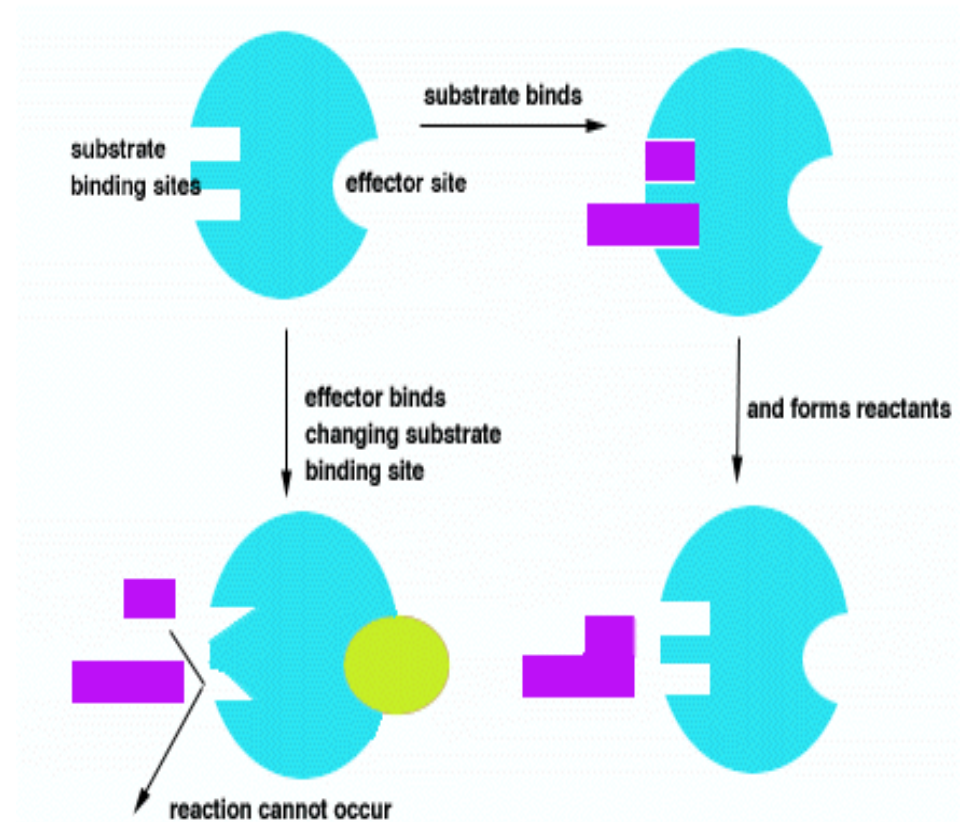
- Σύνθεση του ενζύμου και στη συνέχεια μείωση ή αναστολή της ενεργότητας από ειδικές ενώσεις του κυττάρου
- Εμφανίζεται κατά τη ρύθμιση βιοσυνθετικών οδών
- Τελικό προϊόν αναστέλλει την ενεργότητα του πρώτου ενζύμου της οδού

# Αναδραστική (ανατροφοδοτική) αναστολή (feedback inhibition)



# Αλλοστερισμός

- ❖ Αλλοστερικό ένζυμο διαθέτει 2 θέσεις: ενεργό κέντρο & αλλοστερική θέση
- ❖ Αλλοστερική θέση δεσμεύεται ο αναστολέας μη ομοιοπολικά και αλλάζει τη διαμόρφωση του ενζύμου, έτσι ώστε να μην μπορεί να δεσμευτεί στο ενεργό κέντρο το υπόστρωμα
- ❖ Εφαρμογή σε πολλές αναβολικές και καταβολικές οδούς



# Ισοένζυμα (ισολειτουργικά ένζυμα)

- Ένζυμα που καταλύουν την ίδια αντίδραση αλλά υπόκεινται σε διαφορετικό ρυθμιστικό έλεγχο
- Βιοσύνθεση των αρωματικών αμινοξέων
- Η πρώτη αντίδραση καταλύεται από 3 διαφορετικά ισοένζυμα και κάθε ένζυμο ρυθμίζεται από κάποιο από τα 3 διαφορετικά αμινοξικά προϊόντα (τυροσίνη, φαινυλαλανίνη, τρυπτοφάνη)
- Διαφορά με τις προηγούμενες περιπτώσεις αναδραστικής αναστολής: συνολική ποσότητα της αρχικής ενζυμικής ενεργότητας ελαττώνεται βαθμιαία και μηδενίζεται αφού έχουν παραχθεί και τα 3 προϊόντα

# Χρήση και κατάχρηση της αναδραστικής αναστολής

- 📄 Μελέτη και γνώση του φαινομένου
- 📄 Δημιουργία μεταλλάξεων που έχουν χάσει την ικανότητα ρύθμισης με αα, στις οδούς σύνθεσης αμινοξέων
- 📄 Παραγωγή αμινοξέων από μεταλλαγμένα βακτήρια συνεχώς
- 📄 Διατροφικά συμπληρώματα

# Ομοιοπολική τροποποίηση των ενζύμων

- ✂ Ομοιοπολική πρόσδεση ή αφαίρεση κάποιου οργανικού μορίου
- ✂ Μεταβάλλεται η διαμόρφωση της πρωτεΐνης → μεταβάλλεται η δραστηρότητά της
- ✂ Γνωστά παραδείγματα: σύνδεση νουκλεοτιδίων AMP ή ADP, ανόργανου φωσφορικού, μεθυλίωση

# Γονιδιακή ρύθμιση στα βακτήρια Οπερόνια!!!!

- Χαρακτηριστικό της κατασκευής του βακτηριακού DNA: τα γονίδια που παρουσιάζουν σχετική λειτουργία βρίσκονται τοποθετημένα μαζί στο χρωμόσωμα → εξυπηρετεί την οικονομία της γονιδιακής ρύθμισης στους οργανισμούς αυτούς
- Η γονιδιακή ρύθμιση στα βακτήρια διευκολύνεται κατά πολύ λόγω της οργάνωσης που παρουσιάζει το DNA σε μεταγραφικές ενότητες που ονομάζονται οπερόνια (operons)
- Αλληλουχίες ρύθμισης και σημεία έναρξης και λήξης της μεταγραφής: κοινά για όλα τα γονίδια της ομάδας αυτής → η ρύθμιση δεν γίνεται για κάθε ένα χωριστά, αλλά για όλη την ομάδα των γονιδίων του οπερόνιου

Ρύθμιση της ποσότητας του ενζύμου :  
ρυθμιστικές πρωτεΐνες που δεσμεύονται  
στο DNA

# Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε μεταγραφικό επίπεδο: αρνητικός έλεγχος

## Καταστολή της ενζυμικής σύνθεσης:

δεν επιτρέπεται η σύνθεση των ενζύμων που σχετίζονται με την παραγωγή κάποιας ένωσης, εάν η ένωση αυτή βρίσκεται στο θρεπτικό υλικό → σύνθεση αργινίνης και πολλών αμινοξέων, πουρινών και πυριμιδινών

Ανενεργός καταστολέας, προσδένεται ο συγκαταστολέας και ενεργοποιείται: καταστολή της μεταγραφής

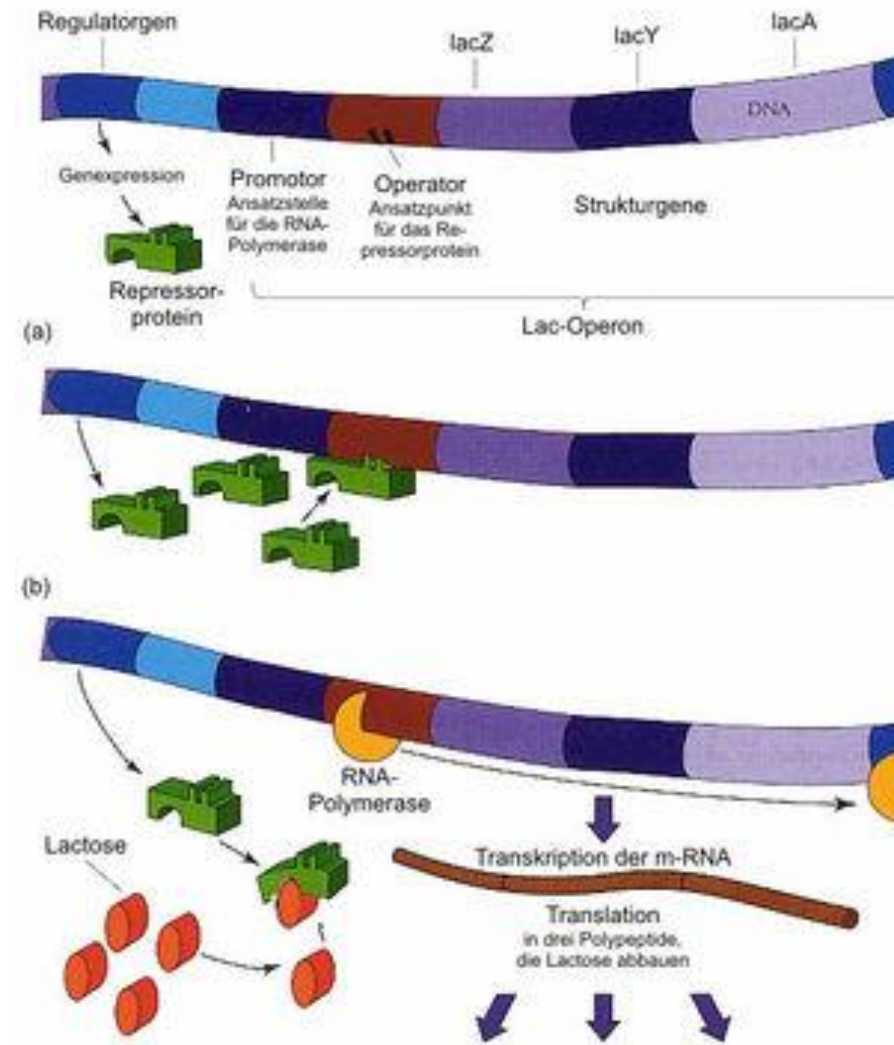
Όφελος για το βακτήριο: δεν σπαταλά ενέργεια για τη σύνθεση ενζύμων που δεν χρειάζονται

# Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε μεταγραφικό επίπεδο: αρνητικός έλεγχος

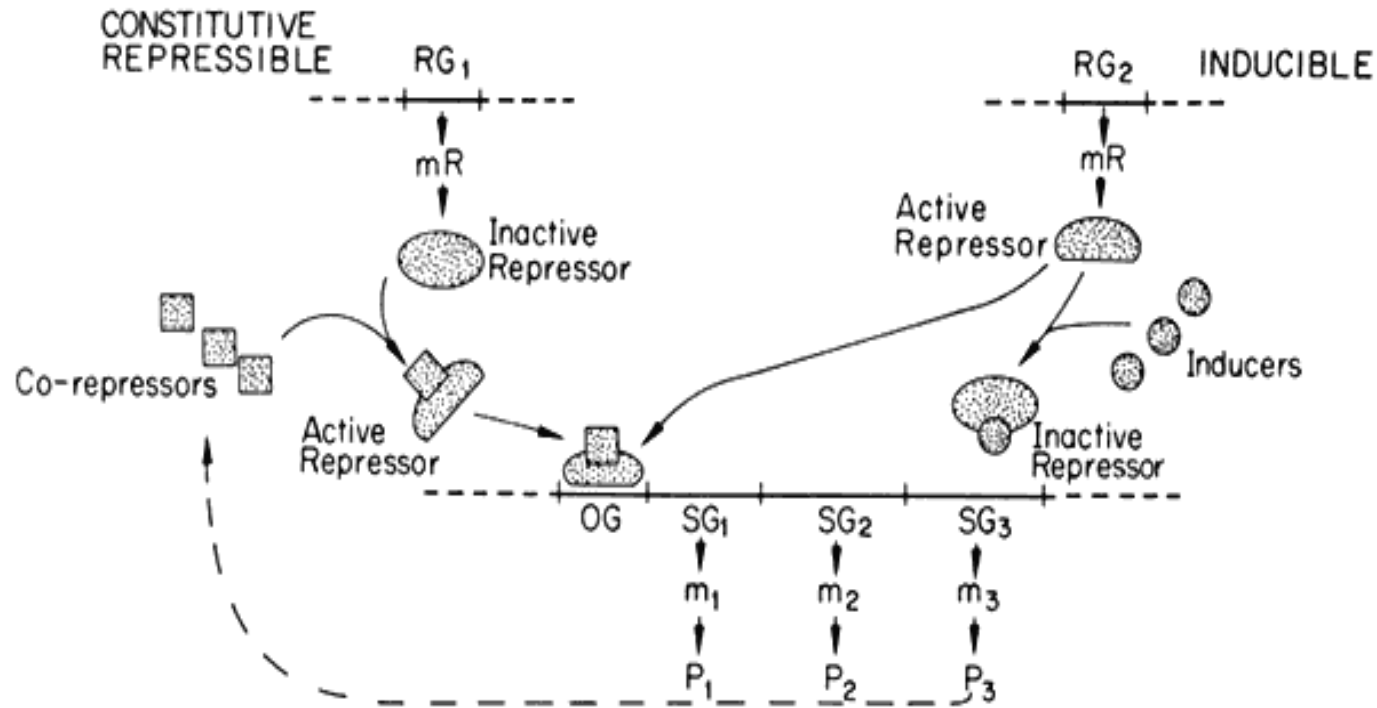
- Επαγωγή της ενζυμικής σύνθεσης: μόνο όταν είναι παρόν το υπόστρωμα το οποίο θα χρησιμοποιήσει → οπερόνιο της λακτόζης, γενικότερα ένζυμα που εμπλέκονται σε καταβολικές βιοχ. Οδούς
- Καταστολέας συνδέεται με χειριστή → RNA πολυμεράση δεν μεταγράφει
- Καταστολέας+επαγωγέα, δεν μπορεί να συνδεθεί με τον χειριστή → RNA πολυμεράση μεταγράφει

Όφελος για το βακτήριο: δεν συνθέτει ένζυμα εάν δεν χρησιμοποιούνται

# Οπερόνιο της λακτόζης: επαγωγή της ενζυμικής σύνθεσης



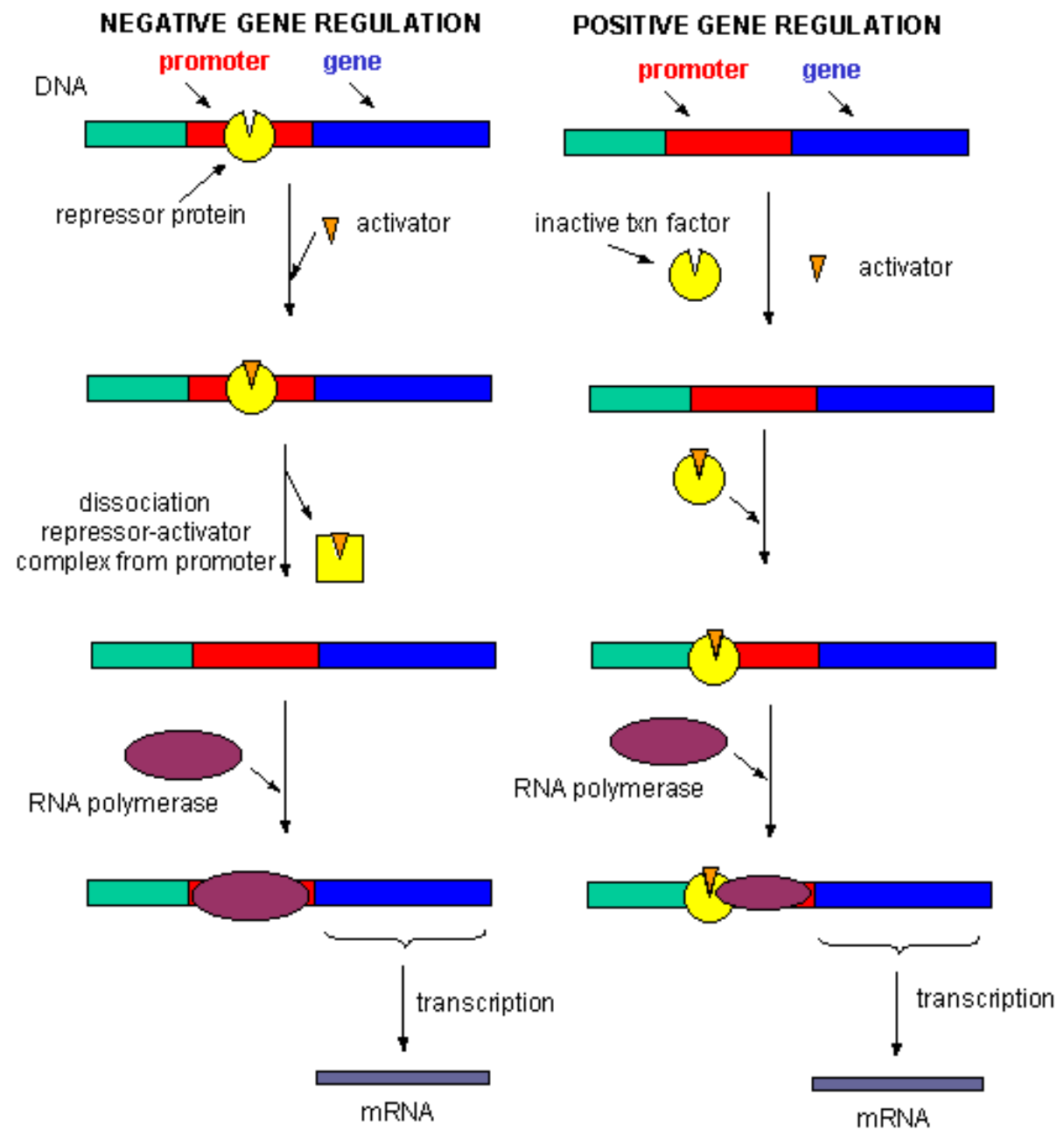
# Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε μεταγραφικό επίπεδο: αρνητικός έλεγχος



Η πρωτεΐνη όταν είναι ενεργή καταστέλλει την μεταγραφή

# Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε μεταγραφικό επίπεδο: Θετικός έλεγχος

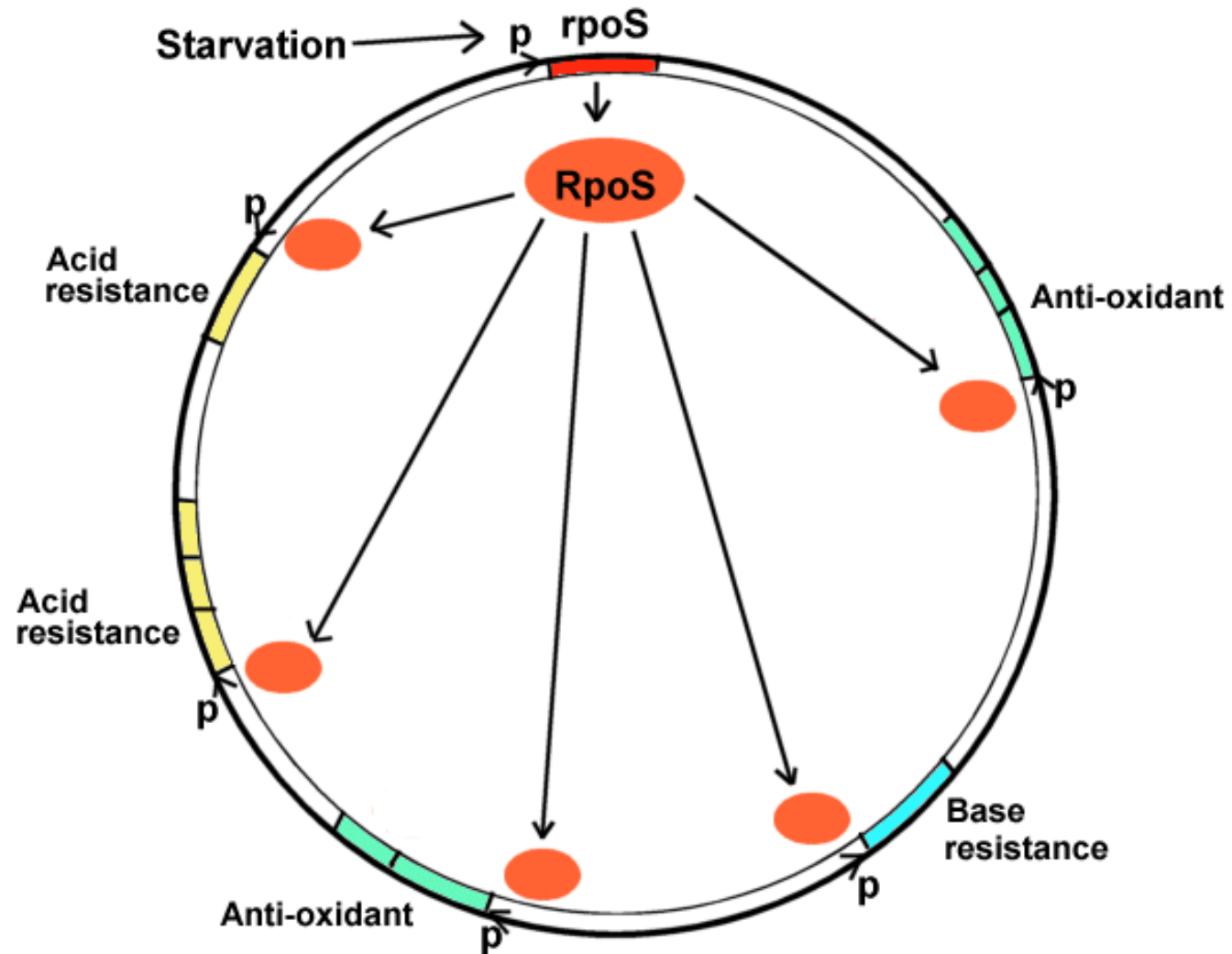
- Ρυθμιστική πρωτεΐνη διευκολύνει τη δέσμευση της RNA πολυμεράσης στο DNA, γεγονός που αυξάνει τη σύνθεση του mRNA → καταβολισμός της μαλτόζης στο *E.coli*
- Η σύνθεση των ενζύμων γίνεται μόνο παρουσία της μαλτόζης στο περιβάλλον
- Η μαλτόζη ως επαγωγέας συνδέεται με την ρυθμιστική πρωτεΐνη και μόνο τότε αυτή μπορεί να συνδεθεί με το DNA (την προωθεί)
- Η σύνδεση της ρυθμιστικής πρωτεΐνης με το DNA επιτρέπει την έναρξη της μεταγραφής από την RNA πολυμεράση



# Regulon

- ❖ Τα γονίδια για τον καταβολισμό της μαλτόζης είναι διασπαρμένα σε διάφορα οπερόνια, κάθε ένα από τα οποία διαθέτει μία θέση πρόσδεσης της ρυθμιστικής πρωτεΐνης. Έτσι η πρωτεΐνη αυτή ρυθμίζει πάνω από ένα οπερόνια. Τα οπερόνια αυτά ονομάζονται: regulon
- ❖ Στον ίδιο οργανισμό μπορεί να συνυπάρχουν θετικός και αρνητικός έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης για διαφορετικά γονίδια

# Regulon



# Γονιδιακής ρύθμισης συνέχεια...

- ❖ Άλλοι τρόποι γονιδιακής ρύθμισης που εμπλέκουν απλά μείωση (**εξασθένιση**) της παραγόμενης ποσότητας ενζύμου (οπερόνιο τρυπτοφάνης στο *E.coli*)
- ❖ Στους προηγούμενους τρόπους ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης, ο έλεγχος γίνεται στην αρχή της μεταγραφής: ξεκινά ή δεν ξεκινά
- ❖ Με τον συγκεκριμένο τρόπο ξεκινά η μεταγραφή και στη συνέχεια μειώνεται η παραγωγή των ολοκληρωμένων αντιγράφων του mRNA (επίδραση πριν από την ολοκλήρωσή της)

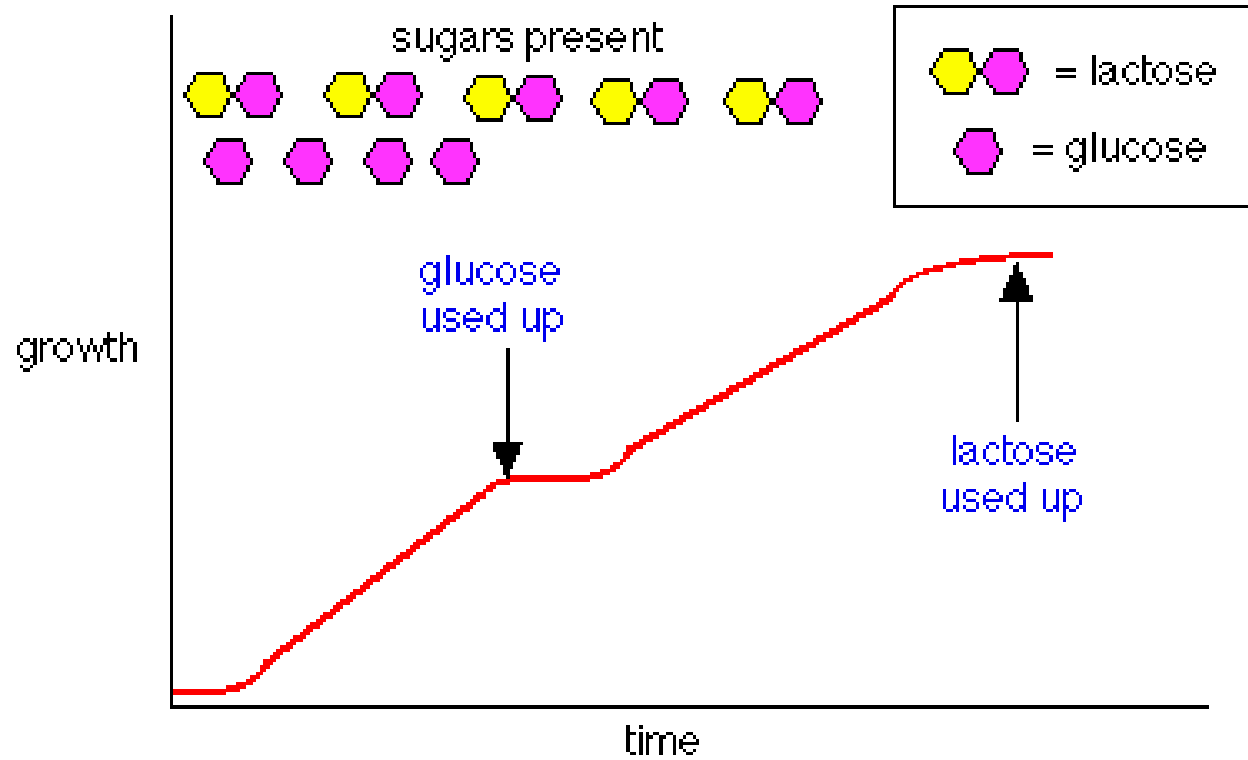
# Ολικός έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης

- ⌘ Συχνά ο μ.ο χρειάζεται να ρυθμίσει πολλά γονίδια ταυτόχρονα για να ανταποκριθεί σε κάποια αλλαγή του περιβάλλοντος π.χ. όταν εμφανιστεί έλλειψη P, το *E.coli* πρέπει να ρυθμίσει τη σύνθεση > 80 πρωτεϊνών για να προσαρμοστεί (περισσότερα από ένα regulons)
- ⌘ Αντίστοιχα εκτός από την ενεργοποίηση κάποιων γονιδίων, ο ολικός έλεγχος χρησιμοποιείται για τη παρεμπόδιση κάποιων ενζύμων να εκφραστούν όταν δεν υπάρχει λόγος π.χ. δεν υπάρχει λόγος να καταβολίσουν τη μαλτόζη ή τη λακτόζη εάν υπάρχει κάποια άλλη πηγή C πιο «εύκολη», όπως η γλυκόζη στο περιβάλλον

# Παράδειγμα ολικής ρύθμισης: Αναστολή της καταβολικής δραστηριότητας

- Αναστέλλεται η σύνθεση διαφόρων μη σχετιζομένων μεταξύ τους ενζύμων που εμπλέκονται σε καταβολικούς μηχανισμούς, παρουσία π.χ. της γλυκόζης
- Φαινόμενο διαυξίας: παρουσία δύο πηγών ενέργειας →
  - αύξηση στη πρώτη πηγή,
  - μείωση προσωρινή της αύξησης,
  - αύξηση στη δεύτερη πηγή

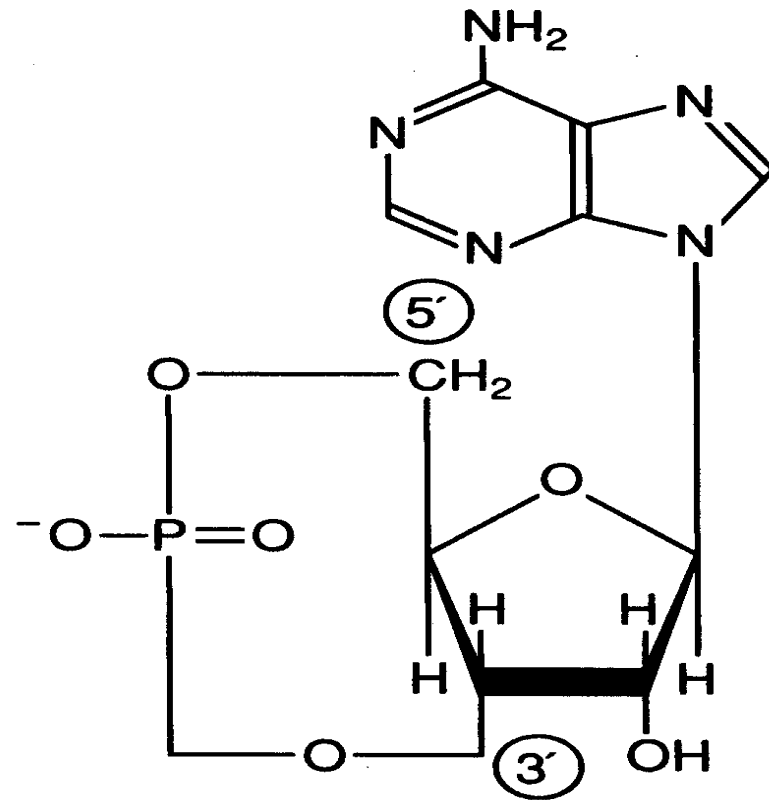
# Φαινόμενο διαυξίας



# cAMP: το κλειδί της ρύθμισης

- ☒ Η ρυθμιστική πρωτεΐνη που είναι απαραίτητη για τη δέσμευση της RNA πολυμεράσης στο DNA (Catabolite Activator Protein: ενεργοποιός πρωτεΐνη των καταβολικών γονιδίων), προσδένεται πρώτα η ίδια στο DNA, μόνο εάν συνδεθεί με το cAMP
- ☒ cAMP: κλειδί ρύθμισης πολλών αντιδράσεων στο κύτταρο, προέρχεται από το ATP
- ☒ Η παρουσία της γλυκόζης αναστέλλει τη σύνθεσή του και επάγει την έξοδό του από το κύτταρο → αναστολή της ολικής καταβολικής δραστηριότητας γίνεται με τη μείωση της συγκέντρωσης του cAMP

# CAMP



# cAMP

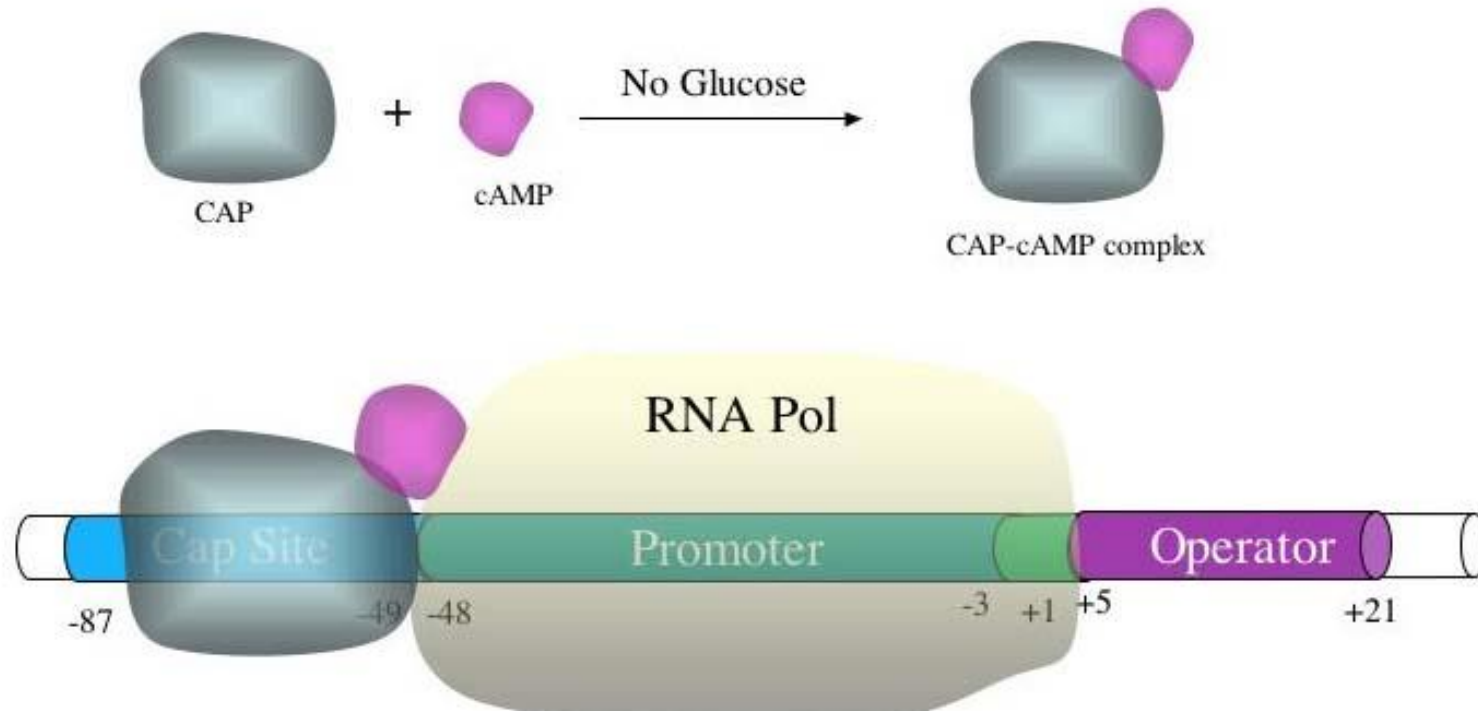
- Το cAMP προσδένεται με τις διαφορετικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες που επιτρέπουν την πρόσδεση της RNA πολυμεράσης των διαφορετικών οπερονίων που δεν σχετίζονται μεταξύ τους → ολικός έλεγχος της γονιδιακής ρύθμισης
- ...δεν είναι ο μοναδικός τρόπος συνολικού ταυτόχρονου ελέγχου της γονιδιακής ρύθμισης!!!

# cAMP

## *Catabolite repression*

In presence of glucose, adenylate cyclase activity is low, leading to low cAMP.  
No CAP-cAMP complex forms

When glucose levels are low, **adenylate cyclase** activity is high. CAP-cAMP complex forms and increases binding of RNA polymerase to promoter.



# Παράδειγμα: οπερόνιο της λακτόζης

Για να προχωρήσει η μεταγραφή του πρέπει:

1. cAMP σε υψηλή συγκέντρωση → CAP προσδένεται στη θέση δέσμευσής της (θετικός έλεγχος)
2. παρουσία του επαγωγέα (λακτόζη) → η κατασταλτική πρωτεΐνη να μην εμποδίζει τη μεταγραφή μέσω της δέσμευσής της στον χειριστή (αρνητικός έλεγχος)

Ευχαριστώ!!