

Når enzymer tøver – CTP-biosyntesen i mælkesyrebakterier

Regulering af CTP-syntesen i *Lactococcus lactis* er et elegant eksempel på, hvordan en organisme udnytter enzyms katalytiske egenskaber til at sikre en optimal tilpasning til de evigt skiftende fysiologiske udfordringer, cellen udsættes for

Af Jan Martinussen, Martin Willemoës*, Mogens Kilstrup, Peter Ruhdal Jensen og Karin Hammer, Mikrobiel Fysiologi og Genetik, BioCentrum, DTU

*Institut for Molekylær Biologi og Fysiologi, Københavns Universitet

Den hastighed, hvormed enzymer katalyserer de biokemiske processer i cellen, er afhængig af koncentrationen af både substrat og produkt. Så længe et enzym ikke er mættet, vil en øget substratmængde betyde, at processen forløber hurtigere. Et ganske særligt enzym er RNA-polymerasen, der med DNA som skabelon danner RNA-molekylerne, der igen fungerer som skabelon for proteinsyntesen.

De fleste af proteinerne fungerer som enzymer. Som substrat har RNA-polymerasen de fire nukleotider ATP, GTP, CTP og UTP (fi-

skal bruges i opbygning af alle cellekomponenter.

Kravet for nukleotider kan blive opfyldt på to måder: Ved nysyntese (de novo-syntese) fra intermediære forbindelser, der dannes i den generelle metabolisme, eller ved at udnytte allerede eksisterende forbindelser i omgivelserne, samt forbindelser der opstår intracellulært under nedbrydning af

RNA og DNA (figur 2). Endeprodukterne i nukleotidmetabolismen er purin- og pyrimidinnukleosidtrifosfaterne ATP, GTP, UTP, CTP (figur 1), der primært bruges i RNA-syntese, samt dATP, dGTP, dTTP og dCTP (figur 1), der er byggesten for DNA (figur 2).

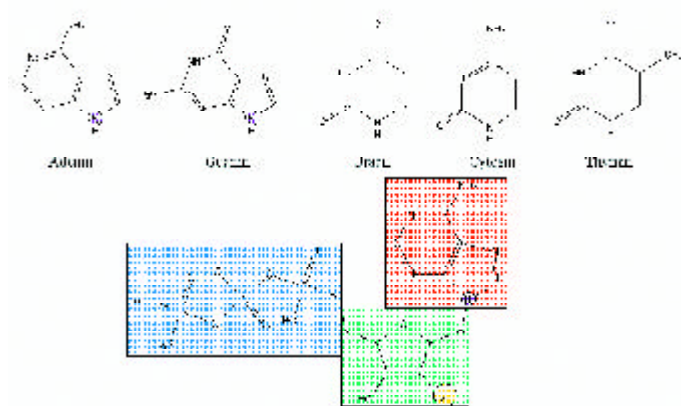
Bakteriers produktion af nukleotider

Mange bakterier kan producere nukleotiderne ved nysyntese, mens andre, heriblandt en række forskellige mælkesyrebakterier, kræver tilstedeværelse af enten puriner eller pyrimidiner til vækstmediet. Disse auxotrofe bakterier, der ikke selv kan syntetisere nukleotiderne, bruger de såkaldte »Salvage pathways«.

Prototrofe bakterier, der selv kan syntetisere nukleotider, har ud over metabolismevejene til de novo-syntese af nukleotider også Salvage pathways til transport og omdannelse af nukleobaser og nukleosider (figur 2). I disse bakterier er de novo-syntesevejene nedreguleret med en kombination af enzyminhibering og nedsat enzymproduktion (genetisk regulering) under tilstedeværelse af purin- eller pyrimidinkilder i vækstmediet.

UMP's rolle

Lactococcus lactis kan selv syntetisere pyrimidinerne via en reaktionsvej, der er universel for alle organismer (figur 3A). UMP dannes gennem seks enzymatisk katalyserede reaktioner, idet der

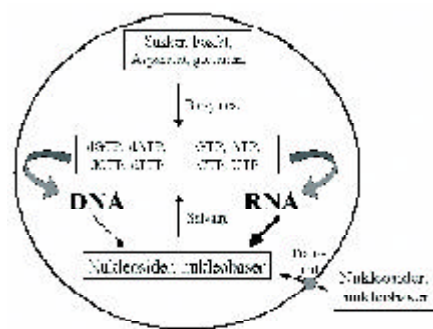


Figur 1. Struktur og nomenklatur af nukleotider og deres derivater. Øverst er vist fem nukleobaser. Guanin og Adenin er puriner, mens de tre øvrige er pyrimidiner. Nukleosider er en ribose eller deoxyribose, hvorpå der sidder en af de fem nukleobaser med en N-glycosidbinding i C1-positionen. Nitrogenatomet, der binder til sukkermolekylet, er angivet med en lille ring. Nederst er vist adenosin trifosfat (ATP). Deoxyadenosin trifosfat (dATP) er identisk med ATP, bortset fra at den med gult mærkede hydroxylgruppe er substitueret med et hydrogen.

gur 1). Når der er mangel på et af de fire nukleotider, vil RNA-polymerasen køre langsommere, når den skal indbygge det pågældende nukleotid i den voksende RNA-kæde. RNA-polymerasen tøver. Nedenfor skal vi se, hvordan cellen kan bruge denne egenskab ved enzymet til at regulere, hvor meget protein der skal laves.

En central rolle

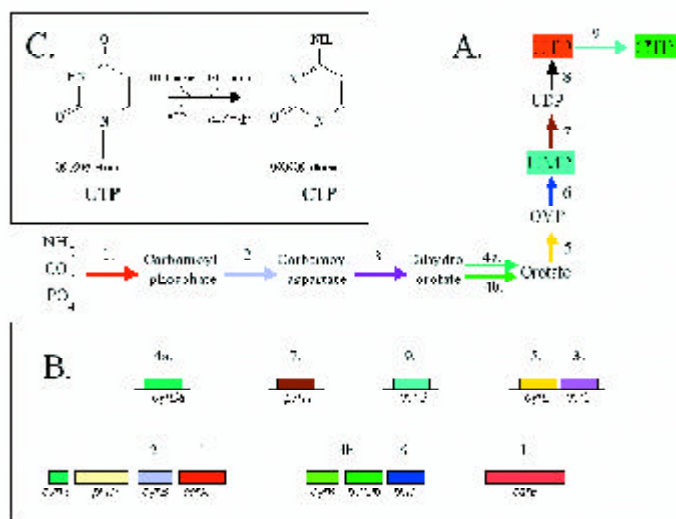
Ligesom alle andre organismer, har mælkesyrebakterier brug for nukleotider for at kunne syntetisere DNA, RNA og en række forskellige co-faktorer. Nukleosid trifosfater (NTP) – især ATP og GTP har en helt central rolle som intracellulær transportør af energi, der



Figur 2. Simplificeret billede af nukleotidmetabolismen i *Lactococcus lactis*. I biosyntesen bygges nukleotiderne op fra bunden, mens »Salvage« udnytter allerede dannede nukleotider, nukleosider og nukleobaser. Optagelse fra omgivelserne sikres af specielt dedikerede transportsystemer. Nukleotiderne anvendes i polymeriseringen af DNA og RNA. Efter nedbrydning af især RNA genbruges forbindelserne.

forbruges kuldioxid, ammoniak, aspartat og fosforibosylpyrofosfat, mens hydrolyse af ATP giver den energi, der kræves, for at syntesen kan foregå. UMP er også produkt i Salvage-reaktionerne.

UMP er udgangspunktet for dannelsen af alle pyrimidin-nukleotidtrifosfaterne: UTP, CTP, dCTP og dTTP. Genene, der koder for de seks biosyntetiske enzymer, er spredt på *L. lactis*-kromosomet.



Figur 3. A) Pyrimidinbiosyntesen.

Følgende enzymer og korresponderende gener i parentes er nødvendige: 1. Carbamoylfosfat synthase (*carAB*), 2. Aspartat transcarbamoylase (*pyrB*), 3. Dihydroorotase (*pyrC*), 4a. Dihydroorotat dehydrogenase A. (*pyrDa*), 4b. Dihydroorotat dehydrogenase B (*pyrKDb*). 5. Orotat fosforibosyltransferase (*pyrE*), 6. OMP decarboxylase (*pyrF*), 7. UMP kinase (*pyrH*), 8. Pyruvate kinase (*pyk*), 9. CTP synthase (*pyrG*).

B) Organiseringen af de ovennævnte gener på kromosomet af *Lactococcus lactis*. Der findes tre operoner *pyrEC*, *pyrKDbF* og *pyrRPBcarA*. *pyrR* koder for det regulatoriske protein *PyrR*, mens *pyrP* koder for en uracil transportør, der er ansvarlig for aktiv transport af uracil fra omgivelserne ind i cellen.

C) UTPs omdannelse til CTP.

Den ene aminogruppe fra glutamin overføres til UTP under fraspaltning af vand. Der hydrolyseres et ATP-molekyle, der gør reaktionen energetisk favorabel.

De er organiseret i fem enheder: *carB*, *pyrRPBcarA*, *pyrEC*, *pyrKDbF* og *pyrDa* (figur 3B).

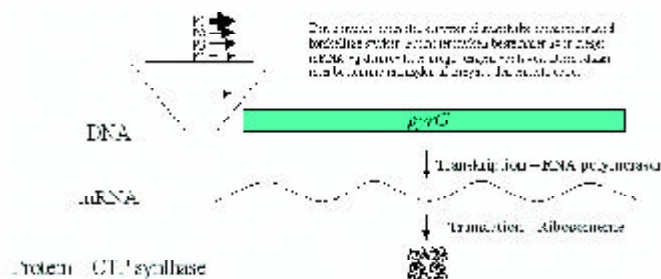
Det første gen i *pyrRPBcarA*-operonen er *pyrR*, der koder for et regulatorisk protein. Ødelægges *pyrR* ved en mutation, resulterer det i en kraftig stigning i syntesen af alle pyrimidin biosyntetiske enzymer.

PyrR-proteinet kan binde et UMP-molekyle. *PyrR*-molekylerne vil binde UMP, når den interne UMP-koncentration er høj, og ved lave UMP-koncentrationer er *PyrR*-proteinerne ubundne. *PyrR* måler derigennem cellens UMP-koncentration. Når UMP er bundet til *PyrR*, reducerer dette kompleks syntesen af de enzymer, der katalyserer UMP-dannelsen.

CTP synthase – et spændende enzym

CTP dannes ved, at en aminogruppe fra aminosyren glutamin overføres til UTP (figur 3C). Enzymet, der katalyserer reaktionen, er CTP synthase, der har vist sig at være et overordentligt spændende enzym. Enzymets egenskaber påvirkes nemlig af de forskellige nukleotider: ud over at selve reaktionen er afhængig af koncentrationen af substrat og produkt (UTP, ATP og CTP, ADP), påvirkes

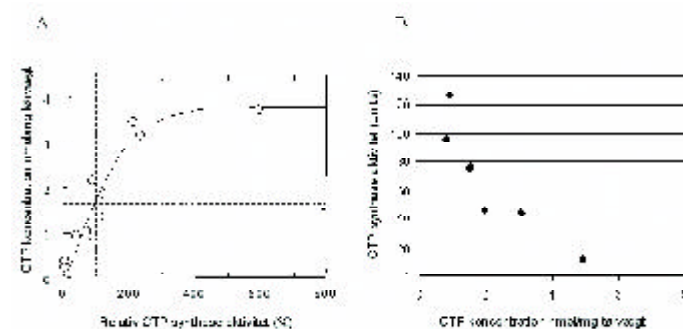
enzymets katalytiske egenskaber af purinnukleotidet GTP. GTP har en stærk positiv effekt på enzymaktiviteten. Ved lav GTP-koncentration i cellen nedsættes enzymets aktivitet, hvorved der dannes mindre CTP. På den måde er der kommunikation mellem de enkelte nukleotider, hvilket kan være med til at opretholde en konstant intracellulær koncentration af alle fire nukleotider (UTP, ATP, CTP og GTP).



Figur 4. Strategi for konstruktion af stammer med differentieret udtryk af *pyrG*. Den normale promotor erstattes af syntetiske promotorer med forskellige styrker. Det resulterer i forskellige RNA-mængder og dermed forskellige mængder af CTP synthase. RNA-polymerasen er ansvarlig for syntese af mRNA (budbringer RNA) i transskriptionsprocessen, mens ribosomerne oversætter budskabet i mRNA-molekylet til protein – i dette tilfælde enzymet CTP synthase.

For at undersøge om mængden af CTP synthase i *L. lactis* påvirker koncentrationen af CTP, blev der fremstillet en række bakteriestammer, der i forskellig grad producerer CTP synthase.

I bakterier er produktionen af et bestemt enzym oftest bestemt af promotoren, der sidder foran genet og styrer, hvor meget mRNA der produceres. Ved at konstruere DNA-molekyler, hvor den normale promotor var erstattet med forskellige syntetiske promotorer (figur 4), var det muligt at fremstille bakteriestammer, der producerede en



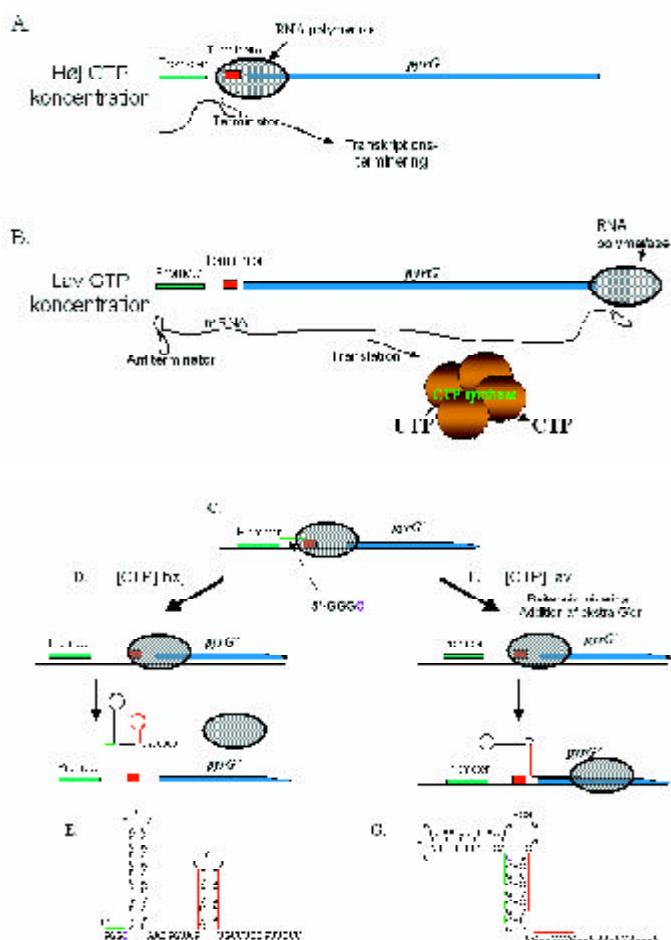
Figur 5. A) CTP-koncentrationen i cellen som en funktion af mængden af CTP synthase. Mængden af CTP synthase varieres som beskrevet i figur 4 og er angivet relativt til aktiviteten i den normale celle – her sat til 100%. B) CTP synthase-aktiviteten som funktion af den intracellulære CTP-koncentration. Mængden af CTP justeres ved tilsætninger til mediet. Se kilde 2 for metoden.

helt bestemt mængde CTP synthase. Ved at måle CTP-koncentrationen i de forskellige stammer var det muligt at afgøre, om der er en sammenhæng mellem mængden af enzym og koncentrationen af CTP. Det viste sig, at der var proportionalitet mellem mængden af

AAS · ICP/MS
UV-VIS · LC/MS
GC/MS · FT-IR/NIR

Ny FT-IR?
- Så er det også os!

Thermo
FISHER SCIENTIFIC CORPORATION
48 16 62 00 · Gydevang 17-19 · 3450 Allerød



Figur 6. Model for pyrG-regulering.

- A) Ved høj CTP-koncentration vil transskriptionen stoppe ved terminatoren, før der kan laves pyrG mRNA.
- B) Ved lav CTP-koncentration vil terminatoren ikke dannes, hvorfor transskriptionen fortsætter så der laves pyrG mRNA, der kan translateres til CTP synthase. Der vil derfor produceres CTP.
- C) Udsnit af starten af pyrG-genet. Transskriptionen initieres med en 5'-GGGC sekvens (grøn linje).
- D) Ved høj CTP-koncentration fortsætter transskriptionen og en terminator, der involverer baseparring i regionen, er vist med rødt og dannes preferentielt.
- E) Den sekundære struktur af pyrG mRNA'et i terminatorkonfigurationen.
- F) Ved CTP-mangel vil RNA-polymerasen pause umiddelbart foran det lille C i position fire i 5'-GGGC-sekvensen. Pga. reiterativ transskription eller »Stuttering« vil ekstra G'er blive inkorporeret i 5' enden af RNA'et, indikeret med en stiplede grøn linje. G'erne (den grønne linje) baseparrer med den venstre side af terminatoren (rød linje), hvorved dannelsen af terminatoren forhindres. Transskriptionen fortsætter, hvilket resulterer i ekspression af pyrG.
- G) Den sekundære struktur af pyrG mRNA i anti-terminatorkonfigurationen.

CTP synthase og CTP-koncentrationen (figur 5A). Sagt på en anden måde: Mængden af CTP synthase bestemmer hvor meget CTP, der er i cellen.

Spørgsmålet var så, hvad der i normale celler bestemmer, hvor meget CTP synthase, der skal laves? For at undersøge om CTP-koncentrationen havde nogen betydning for mængden af CTP synthase, blev mængden af enzym bestemt ved forskellige CTP-koncentrationer (figur 5B). Det fremgår, at CTP-koncentrationen bestemmer mængden af CTP synthase. Når CTP-koncentrationen er helt i bund, producerer cellen op til 40 gange den normale mængde enzym. Situationen er altså den, at CTP-koncentrationen bestemmer mængden af CTP synthase, og mængden af CTP synthase bestemmer CTP-koncentrationen. Det forklarer, hvordan bakterier bærer sig ad med at opretholde en konstant intracellulær CTP-koncentration – CTP homeostase.

Hvordan styres mængden af enzym?

Tilbage står at finde ud af, hvordan CTP-koncentrationen styrer mængden af enzym. Ved at sammenligne DNA-sekvenserne af genet, der koder for CTP synthase – pyrG – fra forskellige organismer, og inddrage resultater fra undersøgelser af *L. lactis* og *Bacillus subtilis* var det muligt at opstille en model for, hvordan den CTP-afhængige regulering virker (figur 6).

Fra promotoren initieres mRNA-syntesen (transskriptionen), der udføres af RNA-polymerasen. Det syntetiserede mRNA oversættes dernæst til protein (enzymet CTP synthase) af ribosomerne i den proces, der kaldes translation. Længere nede i mRNA'et, men inden det stykke, der koder for CTP synthasen, kan man finde et område, hvor mRNA'et kan folde op i en sekundær struktur – en terminator, der er kendt for at stoppe transskriptionen (figur 6). Der vil altså ikke blive lavet mRNA med koden for CTP synthase, når RNA'et kan folde op i terminatorstrukturen.

For at få lavet CTP synthase, når CTP-koncentrationen er lav, er det nødvendigt, at transskriptionen kan fortsætte forbi terminatoren. Det opnås, hvis RNA'et ikke folder op i terminatorstrukturen, men folder op i en alternativ struktur kaldet anti-terminatoren (figur 6). Hvad bestemmer, hvilken af de to strukturer, der dannes?

Når der er overskud af CTP, vil den første del af mRNA'et have sekvensen GGGCACUGG. Ved CTP-mangel vil sekvensen af mRNA'et i stedet være GGGGGGGGCACUGG. Der sker det, at RNA-polymerasen ved lav CTP-koncentration mangler CTP til RNA-syntesen. Når den når til den fjerde base, hvor den skal indsætte et C, vil den ikke umiddelbart have CTP til rådighed, men i stedet lave reiterativ transskribering, hvor den samme DNA-sekvens transskriberes flere gange – man siger, at RNA-polymerasen »stammer«. Tilstedeværelsen af de ekstra G'er favoriserer dannelsen af anti-terminatoren, og hele genet transskriberes. Når RNA-polymerasen tøver pga. manglen på CTP, laves der ekstra RNA og dermed mere CTP synthase, der sørger for, at cellen producerer mere CTP.

Regulering af CTP-syntesen

Vi startede med at fastslå, at hastigheden, hvormed enzymer katalyserer de biokemiske processer, stiger, når koncentrationen af substratet i cellen stiger. Da RNA-polymerasen har CTP som substrat og mRNA som produkt, er det umiddelbart logisk at antage, at en nedsat CTP-mængde betyder nedsat RNA-syntese. Derfor kan det virke forbløffende, at en lav CTP-koncentration medfører en øget mængde pyrG mRNA.

Det er vigtigt at fremhæve, at den øgede mængde mRNA ikke skyldes, at RNA-polymerasen kører hurtigere, men kører langsommere og derved forhindrer, at syntesen af pyrG mRNA stopper ved terminatoren. Regulering af CTP-syntesen i *L. lactis* er således et elegant eksempel på, hvordan en organisme udnytter enzyms katalytiske egenskaber til at sikre en optimal tilpasning til de evigt skiftende fysiologiske udfordringer cellen udsættes for.

Kilder:

1. Wadskov-Hansen S., M. Willemoes, J. Martinussen, K. Hammer, J. Neuhard, and S. Larsen. Cloning and verification of the *Lactococcus lactis* pyrG gene and characterization of the gene product, CTP synthase. *J Biol Chem.* 2001. 12:38002-38009.
2. Jørgensen C., K. Hammer and J. Martinussen. CTP limitation increases expression of CTP synthase in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol.* 2003. 185:6562-6574.
3. Jørgensen C, K. Hammer, P. Ruhdal-Jensen and J. Martinussen. Expression of the pyrG gene determines the pool sizes of CTP and dCTP in *Lactococcus lactis*. *Eur J Biochem.* 2004. 271:2438-2445.
4. Meng Q, C. Turnbough and R. Switzer. Attenuation control of pyrG expression in *Bacillus subtilis* is mediated by CTP-sensitive reiterative transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004 27:10943-10948.
5. Willemoes M, B. Sigurskjold. Steady-state kinetics of the glutaminase reaction of CTP synthase from *Lactococcus lactis*. The role of the allosteric activator GTP incoupling between glutamine hydrolysis and CTP synthesis. *Eur J Biochem.* 2002. 269:4772-4779.

