

Urszula Błaszczyk\*

Katedra Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Technicznej, Wydział Technologii Żywności  
Akademia Rolnicza im. H. Kołłątaja w Krakowie, ul. Balicka 122, 30-149 Kraków;

Wpłynęło w listopadzie 2007 r.

1. Wstęp. 2. Struktura białka CRP. 3. Wiązanie cyklicznego AMP przez białko CRP. 4. Oddziaływanie białka CRP z DNA. 5. Mechanizmy regulacji inicjacji transkrypcji przez białko CRP. 6. Podsumowanie

### The *Escherichia coli* cAMP receptor protein – global transcriptional regulator

**Abstract:** The *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein (CRP) plays a key role in the transcription regulation for more than one hundred genes, mainly involved in the catabolism of carbon sources other than glucose. The protein is a homodimer and each monomer is folded into two distinct structural domains. CRP conformation and activity as a transcription factor are dependent upon cAMP. In response to cAMP binding the protein undergoes a conformational change that allows it to bind specific DNA sequences and interact with RNA polymerase. CRP in complex with cAMP regulates transcription initiation mainly as a sole activator or as a coactivator. Simple CRP-dependent promoters can be grouped into two classes according to the location of the target DNA site for CRP and the mechanism of transcription activation. At class I CRP-dependent promoters, the DNA site for CRP is located upstream of the core promoter. Transcription activation at class I CRP-dependent promoters involves a single protein-protein interaction between CRP and RNA polymerase. At class II CRP-dependent promoters, the DNA site for CRP overlaps the DNA site for RNAP and transcription activation involves three sets of protein-protein interactions between CRP and RNAP. At some CRP-dependent promoters the mechanism of transcription activation is more complex. Two or more CRP dimers or one CRP molecule and one or more molecules of other activators synergistically cooperate to activate transcription initiation.

1. Introduction. 2. CRP structure. 3. Binding of cAMP by CRP. 4. Interaction of CRP with DNA. 5. Mechanisms of regulation of transcription initiation by CRP. 6. Summary

---

**Słowa kluczowe:** aktywacja transkrypcji, białko aktywujące geny kataboliczne (CAP), białko wiążące cAMP (CRP), *Escherichia coli*, inicjacja transkrypcji

**Key words:** transcription activation, cAMP receptor protein (CRP), catabolite gene activator protein (CAP), *Escherichia coli*, transcription initiation

---

## 1. Wstęp

Kontrola ekspresji genów jest istotnym zagadnieniem, zarówno w odniesieniu do organizmów prokariotycznych, jak i eukariotycznych. Mechanizmy regulacji ekspresji genów, jakie wytworzyły się w trakcie ewolucji u *Eucaryota*, są znacznie bardziej skomplikowane niż u *Procaryota*, ponieważ ich genomy są znacznie większe i większa liczba genów musi podlegać skoordynowanej regulacji. Tym niemniej w przypadku obu grup najczęstszym i najlepiej poznanym sposobem kontroli ekspresji genów jest regulacja inicjacji transkrypcji z poszczególnych promotorów. Wśród wszystkich organizmów, zarówno prokariotycznych, jak i eukariotycznych, rozpoczęcie transkrypcji często uwarunkowane jest działaniem pozytywnego czynnika regulacyjnego – aktywatora [44]. Najczęściej białko aktywatorowe, po związaniu się ze specyficzną sekwencją DNA w pobliżu promotora, stymuluje inicjację

transkrypcji przez bezpośrednie oddziaływanie z polymerazą RNA [59]. U bakterii, znacznie częściej niż u wyższych organizmów, dochodzi także do negatywnej regulacji aktywności promotora przez działanie specyficznego represora, blokującego rozpoczęcie procesu transkrypcji [8, 46]. Jednym z najlepiej poznanych regulatorów transkrypcji jest bakteryjne białko CRP. Białko wiążące cAMP z *Escherichia coli* (CRP, ang. *Cyclic AMP Receptor Protein*) znane jest również pod nazwą CAP (*Catabolite Gene Activator Protein* – białko aktywujące geny kataboliczne). Nazwa ta nawiązuje do jego kluczowej roli w regulacji ekspresji ponad 100 genów należących do szeregu operonów, głównie zaangażowanych w katabolizm cukrów – laktozy, arabinozy, galaktozy i maltozy w komórkach *Escherichia coli* [10, 16, 39, 62].

Białko CRP jest czynnikiem transkrypcyjnym, który w komórkach *Escherichia coli* pełni funkcję aktywatora i koaktywatora, chociaż w odniesieniu do pewnych

---

\* Adres do korespondencji: Katedra Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Technicznej, Wydział Technologii Żywności, Akademia Rolnicza im. H. Kołłątaja w Krakowie, ul. Balicka 122, 30-149 Kraków; tel./fax: (12) 662 47 98; e-mail: ublaszczyk@ar.krakow.pl

genów może być również represorem. Te wielorakie funkcje białka CRP wiążą się z jego zróżnicowanymi możliwościami wiązania DNA oraz indukowania zmian w strukturze podwójnej helisy, a także zdolnością tworzenia specyficznych oddziaływań z innymi białkami.

## 2. Struktura białka CRP

Z powodu trudności w krystalizacji, wciąż nie jest znana struktura krystaliczna wolnego białka CRP. Znana natomiast jest jego struktura ze związanymi dwiema cząsteczkami cAMP [38], w kompleksie z DNA [37, 39] oraz w kompleksie z DNA i domeną C-terminalną podjednostki a polimerazy RNA [4].

Białko CRP jest dimerem o masie cząsteczkowej 47,2 kDa. Każda podjednostka (Rys. 1) zbudowana jest z 209 reszt aminokwasowych tworzących dwie odmienne pod względem wielkości i funkcji domeny strukturalne.

Większa z nich, domena N-końcowa, zawiera reszty aminokwasowe 1–133. Składa się na nią para krótkich  $\alpha$ -helis A i B, osiem fragmentów w formie struktury  $\beta$  oraz długa helisa C. Osiem antyrównoległych odcinków w konformacji  $\beta$  tworzy motyw strukturalny – baryłkę  $\beta$  ( $\beta$ -roll), który wraz z helisą C formuje kieszeń wiążącą cAMP. Cykliczny nukleotyd wiąże się w obrębie domeny N-końcowej w konformacji anty-periplanarnej (miejsce *anti*). W domenie tej znajdują się również regiony aktywatorowe AR2 i AR3, odpowiedzialne za oddziaływanie z podjednostkami odpowiednio  $\alpha$  i  $\sigma^{70}$  polimerazy RNA. Istnieje znaczna homologia sekwencji i struktury pomiędzy domeną N-terminalną CRP a domenami wiążącymi cAMP podjednostki regulacyjnej eukariotycznej kinazy białkowej zależnej od cAMP (*cAMP-dependent protein kinase*) [36]. Domena N-końcowa wykazuje również duże podobieństwo strukturalne do domeny wiążącej cykliczny nukleotyd (cAMP, cGMP) kanałów bramkowanych przez ten cykliczny nukleotyd [22]. Uważa się, że podjednostki oddziałują ze sobą głównie za pośrednictwem długich helis C, choć pewien udział w stabilizacji struktury dimerycznej ma również domena C-końcowa.

Mniejsza C-terminalna domena, zbudowana jest z reszt 139–209. Składają się na nią trzy  $\alpha$ -helisy D, E i F oraz cztery krótkie odcinki w postaci struktury  $\beta$ . Dwie z helis mniejszej domeny, helisy E i F, tworzą motyw strukturalny helisa-skret-helisa (*HTH, helix-turn-helix*). Jest on charakterystyczny dla szeregu białek – regulatorów transkrypcji, również eukariotycznych, wykazuje wysoką konserwatywność ewolucyjną i jest zdolny wiązać się swoiście do DNA [2]. Helisy F oddziałują z zasadami i szkieletem fosforanowym DNA, wiążąc się w dwóch kolejnych większych bruzdach

B-DNA. W obrębie domeny C-terminalnej zlokalizowane jest drugie miejsca wiązania cAMP, tym razem w konformacji synklijalnej (miejsce *syn*) [39], a także region aktywatorowy AR1 odpowiedzialny za oddziaływanie z podjednostką a polimerazy RNA. Reszty aminokwasowe 134–138 tworzą region zawiasowy (*hinge*) łączący obie domeny każdej podjednostki. Region ten charakteryzuje się dużą elastycznością i ma istotne znaczenie w przenoszeniu zmian strukturalnych wywołanych związaniem się cAMP do miejsca *anti* w obrębie domeny N-końcowej na helisę F wiążącą DNA, zlokalizowaną w domenie C-końcowej [62, 65].

Z danych krystalograficznych [38] wynika, że dimer CRP-(cAMP)<sub>2</sub> jest częściowo asymetryczny, co związane jest z odmiennym położeniem domen w stosunku do siebie w obu podjednostkach. Jedna z podjednostek występuje w konformacji otwartej i charakteryzuje ją szeroka szczelina między domenami, druga zaś występuje w konformacji zamkniętej, a budujące ją domeny są do siebie znacznie bardziej zbliżone. W przeciwieństwie do struktury CRP ze związanymi dwiema cząsteczkami cAMP, kompleks CRP-(cAMP)<sub>2</sub>-DNA jest symetryczny, a obie podjednostki CRP przyjmują konformację zamkniętą [37, 39]. Badania dynamiki molekularnej wskazują jednak, że przewidywana struktura kompleksu CRP-(cAMP)<sub>2</sub> w roztworze jest symetryczna, a obie podjednostki białka CRP występują w konformacji otwartej [6].

## 3. Wiązanie cyklicznego AMP przez białko CRP

Cykliczny AMP powstaje w wyniku reakcji cykliczacji ATP. U *Eucaryota* związek ten pełni funkcję wewnątrzkomórkowego przekaźnika drugiego rodzaju, pośredniczącego w fizjologicznym działaniu wielu hormonów i bodźców nerwowych. Większość efektów wywołanych w komórkach eukariotycznych przez cAMP zachodzi w wyniku aktywacji kinaz białkowych zależnych od cAMP, w szczególności kinazy białkowej A. Kinaza ta stymuluje ekspresję specyficznych genów przez fosforylowanie aktywatora transkrypcyjnego – białka wiążącego element wrażliwy na cAMP (*CREB, cAMP-response element binding protein*) [29]. Nieco inaczej funkcjonuje cAMP w komórkach bakteryjnych. Wiąże się on z białkiem CRP i w ten sposób reguluje transkrypcję ponad 100 genów w komórkach *E. coli*. Liczne badania biochemiczne, jak i biofizyczne wykazały, że wiązanie cAMP przez białko CRP wywołuje takie allosteryczne zmiany konformacyjne w jego strukturze, które umożliwiają mu wiązanie się do specyficznej sekwencji DNA, a następnie oddziaływanie z polimerazą RNA [13, 26, 40, 62].

Z danych uzyskanych w oparciu o strukturę krystaliczną białka CRP ze związanymi 2 cząsteczkami

cAMP [38] oraz strukturę białka związanego z 30-merowym fragmentem DNA [37] wynikało, że każda podjednostka CRP zawiera jedno miejsce wiązania cAMP. Badania z wykorzystaniem trawienia białka subtylizyną, chemicznej modyfikacji Cys178, badania fluorescencji reszt tryptofanowych, a także fluorescencji „zewnątrznej” sondy fluorescencyjnej – ANS, pokazały dwufazową zależność konformacji białka od stężenia cAMP [17]. W zakresie stężeń liganda do 200 mM szybkość proteolitycznego trawienia subtylizyną, jak również chemicznej modyfikacji Cys178, wzrastała w porównaniu do apo-CRP, intensywność fluorescencji kompleksu ANS-białko była gaszona, nie pojawiły się żadne zmiany w intensywności fluorescencji reszt tryptofanowych. Natomiast przy wyższych stężeniach cAMP szybkość trawienia jak i modyfikacji białka malała, intensywność fluorescencji kompleksu białko-ANS była jeszcze bardziej gaszona, również intensywność fluorescencji reszt tryptofanowych wyraźnie malała. W związku z tymi badaniami zaproponowano, że CRP może występować w trzech stanach konformacyjnych: apo-CRP, CRP ze związaną jedną cząsteczką cAMP w konformacji antyperiplanarnej i kompleks z dwiema cząsteczkami *anti*-cAMP przypadającymi na dimer. Za jedyną zdolną do specyficznego wiązania DNA i aktywacji transkrypcji formę CRP, uważano tę ze związaną jedną cząsteczką cAMP. Natomiast sądzono, że powstający w milimolowych, нефизiologicalznych stężeniach kompleks CRP-(cAMP)<sub>2</sub> wiąże się do DNA ze znacznie niższym powinowactwem i nie ma prawdopodobnie znaczenia w regulacji transkrypcji [17]. Istniały jednak znaczne rozbieżności pomiędzy danymi pochodzącymi z badań NMR [15] a danymi z dyfrakcji rentgenowskiej [38] dotyczące konformacji cAMP oraz zachowania się białka w zależności od stężenia liganda.

Dopiero badania krystalograficzne kompleksu CRP z 46-merowym fragmentem DNA wyjaśniły te wątpliwości. Wykazały bowiem obecność także drugiego miejsca wiązania cAMP, tym razem w konformacji synklinicznej [39]. Istnienie dodatkowego miejsca wiązania cyklicznego nukleotydu potwierdziły również kolejne badania NMR [61] oraz ITC [26]. W związku z tym zaproponowany został nowy model trzech stanów konformacyjnych w jakich występuje białko CRP: apo-CRP, kompleks CRP z dwiema cząsteczkami *anti*-cAMP, zdolny do swoistego wiązania sekwencji DNA i regulacji transkrypcji oraz kompleks z czterema cząsteczkami cAMP, dwiema cząsteczkami *anti*-cAMP i dwiema cząsteczkami *syn*-cAMP. Ten ostatni kompleks tworzy się dopiero przy milimolowych stężeniach cAMP.

Cząsteczka cAMP wiążąca się w konformacji antyperiplanarnej, lokalizuje się wewnątrz kieszeni utworzonej przez strukturę baryłki  $\beta$  oraz dwie helisy C w obrębie domeny N-końcowej. W wiązaniu cykliczne-

go nukleotydu biorą udział obie podjednostki białka CRP. W bliskim sąsiedztwie cząsteczki *anti*-cAMP znajduje się 17 reszt aminokwasowych: 15 reszt z jednej podjednostki i 2 reszty z drugiej. Spośród 17 reszt tworzących kieszeń wiążącą *anti*-cAMP 10 reszt jest hydrofobowych a 7 hydrofilowych. W wiązaniu cyklicznego nukleotydu jak i w pośredniczeniu zmian w strukturze białka CRP wywołanych związaniem cAMP, najistotniejszą rolę odgrywa 5 reszt aminokwasowych: Glu72, Arg82, Ser83, Thr127, Ser128 [26, 30, 63, 64].

Cząsteczka cAMP w konformacji synklinicznej umiejscowiona jest w domenie C-końcowej. Oddziałuje ona z motywem HTH, strukturą spinki do włosów ( $\beta$ -*hairpin*) utworzoną z dwóch antyrównoległych odcinków  $\beta$  (4 i 5) z domeny N-końcowej oraz pośrednio poprzez cząsteczki wody z DNA [39]. Taka lokalizacja drugiego miejsca wiązania cAMP może mieć pewne biologiczne znaczenie dla wiązania DNA oraz aktywacji transkrypcji przez białko CRP. Cząsteczka *syn*-cAMP znajduje się w bezpośrednim sąsiedztwie motywu HTH, odpowiedzialnego za wiązanie DNA, a poprzez cząsteczkę wody oddziałuje z Glu181, ta reszta z kolei, ze względu na interakcję z cytozyną w pozycji 5, ma również ważny udział w specyficznym wiązaniu podwójnej helisy. *syn*-cAMP oddziałuje także z obszarem białka, który prawdopodobnie uczestniczy w procesie aktywacji transkrypcji. Szczególne znaczenia może mieć tutaj sąsiedztwo Lys52, która odgrywa istotną rolę w aktywacji promotorów klasy II [42]. Drugie miejsce wiązania cAMP może tłumaczyć obniżenie powinowactwa CRP do specyficznego sekwencji DNA przy milimolowych stężeniach cAMP, ze względu na współzawodnictwo DNA i reszty fosforanowej cAMP o wiązanie Arg180. Reszta ta jest istotna dla specyficznego wiązania DNA poprzez oddziaływanie z guaniną w pozycji 7 w obrębie dużej bruzdy DNA [4]. Z drugiej jednak strony stężenie cAMP, jakie jest wymagane do tego by druga cząsteczka cyklicznego nukleotydu mogła ulec wiązaniu jest na tyle duża, że może występować niezwykle rzadko, jeśli w ogóle w warunkach *in vivo*. Jakkolwiek nie jest zupełnie wykluczone, że powinowactwo drugiego miejsca wiązania do cAMP może wzrastać w obecności polimerazy czy też innych białek, jeżeli w ten sposób doszłoby do większej stabilizacji powstałych kompleksów. Może także następować lokalny wzrost stężenia cAMP w pobliżu CRP np. na skutek bliskiego sąsiedztwa cyklazy adenylanowej [39].

#### 4. Oddziaływanie białka CRP z DNA

Dimeryczna struktura CRP predysponuje to białko do oddziaływania z palindromową sekwencją DNA. We wszystkich operonach indukownych katabolicznie

przez kompleks CRP-cAMP, rozpoznające helisy F dwóch podjednostek CRP penetrują oddalone od siebie o 34 Å dwie sąsiednie bruzdy DNA. Dzięki dopasowaniu się struktury białka i DNA dochodzi do utworzenia szeregu wiązań wodorowych, pomiędzy resztami aminokwasowymi łańcucha polipeptydowego helisy F, a grupami funkcyjnymi zasad azotowych operatora eksponowanymi do dużej bruzdy. Utworzenie się tych wiązań jest możliwe dzięki istnieniu ścisłej komplementarności w zakresie donorów i akceptorów wiązań wodorowych białka i DNA, która jest wynikiem istnienia charakterystycznej sekwencji, zarówno nukleotydowej operatora, jak i aminokwasowej helisy rozpoznających.

Z wielu badań wynika, że główne interakcje odpowiedzialne za specyficzność rozpoznania zachodzą między: G7 i Arg180, C5 i Glu181, T4 i Arg185 [25]. Wszelkie podstawienia nukleotydowe w tych pozycjach prowadzą do znacznego upośledzenia wiązania białka. CRP może się wiązać z DNA również w sposób nieswoisty, na skutek oddziaływań pomiędzy dodatnio naładowanymi resztami aminokwasowymi białka, którego punkt izoelektryczny wynosi 9,12, a ujemnie naładowanymi resztami fosforanowymi w DNA, a także poprzez wiązania wodorowe powstające pomiędzy atomami wodoru grup amidowych niektórych wiązań peptydowych oraz resztami kwasu fosforowego w podwójnej helisie. Oddziaływania te przyczyniają się do dodatkowej stabilizacji kompleksu CRP-DNA; z drugiej strony powodują, że nawet przy braku cAMP białko CRP odznacza się słabym powinowactwem do DNA o dowolnej sekwencji. W niespecyficznym wiązaniu DNA biorą udział obie domeny podjednostki białka CRP [21].

Badania dichroizmu kołowego różnych odcinków DNA w kompleksie z CRP wykazały, że w roztworze wiązaniu białka do DNA może towarzyszyć częściowe, lokalne przejście struktury B-DNA w strukturę A-DNA [19]. Związanie się CRP do operatora prowadzi także do szeregu deformacji w strukturze podwójnej helisy. Na podstawie struktury krystalograficznej CRP związanego do 30-merowego fragmentu DNA stwierdzono, że dwa odkształcenia mają charakter skokowy i występują w regionie operatora, pomiędzy 6 a 7 parą nukleotydów, licząc od osi symetrii operatora. Zlokalizowane są one po obu stronach osi symetrii, kąt jednego wynosi w przybliżeniu 40°, a drugiego 50°, w sumie łączne wygięcie DNA wynosi około 90° [4, 25, 33]. Potwierdziły to również badania przeniesienia energii pomiędzy znakowanymi końcami fragmentu *lac*-DNA związanego do białka CRP, w których stwierdzono, że w badanym kompleksie następuje wygięcie DNA o około 80 do 100° [18], a także badania przeniesienia energii w kompleksie z symetrycznym fragmentem DNA (sekwencja *ICAP*), które wskazały średni kąt wygięcia DNA – 77 (±3)° [20]. Pozostałe zmiany

w strukturze DNA są znacznie łagodniejsze, występują również po obu stronach środka symetrii [33, 37].

Wygięcie podwójnej helisy ma istotne znaczenie dla aktywacji transkrypcji ze względu na m.in.: utworzenie właściwej orientacji względem siebie CRP i polimerazy RNA, umożliwiające bezpośrednie oddziaływanie białko-białko [14, 18], stabilizację wiązania polimerazy RNA do DNA, kontakt polimerazy RNA z sekwencjami aktywującymi położonymi na lewo od promotora [12, 14], ułatwienie rozplatania DNA w obrębie startu transkrypcji [38].

## 5. Mechanizmy regulacji procesu transkrypcji przez białko CRP

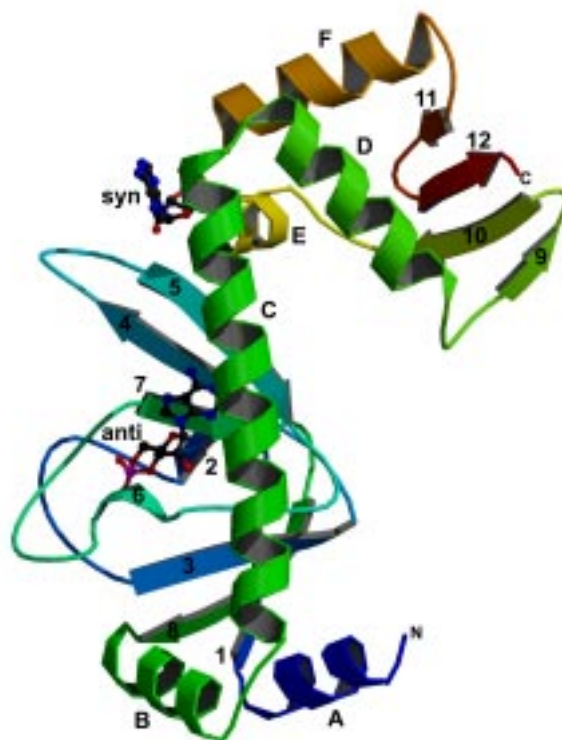
Białko CRP jest przede wszystkim aktywatorem transkrypcji. Istnieją znaczne różnice w mechanizmie aktywacji promotorów przez kompleks CRP-cAMP w zależności od miejsca wiązania się tego aktywatora do DNA jak i sposobu oddziaływania z polimerazą RNA. W związku z tym promotory aktywowane przez CRP zostały podzielone zasadniczo na trzy klasy [10, 25].

Promotory klasy I i II wymagają do aktywacji transkrypcji tylko jednej cząsteczki aktywatora CRP. W przypadku promotorów klasy I białko CRP wiąże się do DNA przed miejscem wiązania polimerazy. Promotor *lac* oraz syntetyczny promotor *CC* (–61.5) należą do najlepiej poznanych promotorów tej klasy. W przypadku obu promotorów aktywator wiąże się przed sekwencją –35 w okolicach regionu –62. Miejsce wiązania kompleksu CRP-(cAMP)<sub>2</sub> może być również zlokalizowane w pobliżu regionu: –72, –83 czy też –93. Dla aktywacji transkrypcji tej klasy promotorów istotne jest oddziaływanie białka CRP z C-terminalną domeną podjednostki a polimerazy RNA (w skrócie aCTD). Miejscem kontaktu białka z polimerazą są reszty aminokwasowe 156–164 zlokalizowane w obrębie domeny C-terminalnej białka CRP. Reszty te stanowią region aktywatorowy 1 (w skrócie AR1) [35, 47, 69]. Pojedyncza mutacja w obrębie obszaru AR1 istotnie zmniejsza bądź całkiem eliminuje możliwość aktywacji transkrypcji promotorów klasy I, natomiast nie wpływa na wiązanie oraz wygięcie DNA przez białko CRP [68, 69]. Badania z wykorzystaniem techniki skaningu alaninowego wskazują, że szczególnie istotny dla właściwego funkcjonowania regionu AR1 jest łańcuch boczny Thr158 [35]. Wykonano również badania heterodimerów, które pokazały, że aCTD oddziałuje tylko z jednym obszarem AR1, zlokalizowanym na podjednostce CRP sąsiadującej z polimerazą [67]. Ten sam sposób oddziaływania białka aktywatorowego z polimerazą RNA, mimo różnych miejsc wiązania DNA przez CRP możliwy jest dzięki istnieniu elastycznego, zbudowanego z 13–20 reszt aminokwa-

sowych łańcucha polipeptydowego, łączącego aCTD z aNTD (N-terminalną domeną podjednostki a polimerazy RNA) [7, 27]. W wyniku oddziaływania aktywatora z polimerazą RNA wzrasta powinowactwo RNAP do promotora, wyrażające się wzrostem stałej wiązania  $K_B$  (czyli stałej tworzenia kompleksu zamkniętego) i stąd też obserwowany wzrost częstości inicjacji transkrypcji [9, 10, 25].

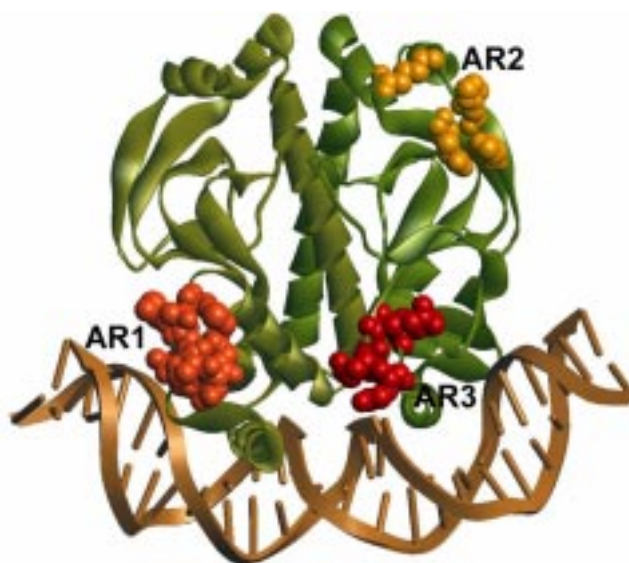
Szczególnym przypadkiem promotora klasy I jest promotor *malt* z centrum wiązania CRP położonym 71 nukleotydów przed miejscem startu transkrypcji. Promotor ten zawiera również charakteryzujące się wysokim powinowactwem, inhibitorowe miejsce wiązania aCTD w pobliżu rejonu -47. W nieobecności aktywatora, związana do miejsca inhibitorowego C-końcowa domena podjednostki a polimerazy RNA tworzy nieaktywny otwarty kompleks transkrypcyjny. Dopiero oddziaływanie CRP z aCTD, przeciwdziałające silnemu wiązaniu aCTD do rejonu -47, pozwala na przejście nieaktywnego kompleksu w pełni funkcjonalny kompleks elongacyjny [51, 52].

W przypadku promotorów klasy II miejsce wiązania się aktywatora pokrywa się częściowo z rejonem -35 odpowiedzialnym za wiązanie polimerazy RNA. Modelowymi przedstawicielami tej klasy promotorów są *galP1* oraz syntetyczny promotor *CC* (-41.5), z miejscem wiązania w pobliżu rejonu -42. Mechanizm aktywacji transkrypcji w przypadku tej grupy promotorów aktywowanych przez kompleks  $CRP-(cAMP)_2$  jest bardziej skomplikowany niż dla promotorów klasy I. Aktywator oddziałuje zarówno z domeną C- jak i N-terminalną podjednostki  $\alpha$  polimerazy RNA [10, 25, 34, 43]. Oddziaływanie regionu aktywatorowego 1 z  $\alpha$ CTD powoduje wzrost stałej wiązania  $K_B$ , natomiast w wyniku oddziaływania aktywatora z N-terminalną domeną podjednostki  $\alpha$  polimerazy RNA stymulowany jest proces izomeryzacji kompleksu transkrypcyjnego zamkniętego do otwartego. Obszary odpowiedzialne za tą drugą interakcję to region aktywatorowy 2 (AR2), zbudowany z reszt His19, His21, Glu96 i Lys101, zlokalizowany w obrębie domeny N-końcowej białka CRP oraz reszty 162–165 domeny N-końcowej podjednostki  $\alpha$  polimerazy RNA [10, 25]. W przypadku promotorów klasy II miejscem kontaktu białka CRP z polimerazą RNA jest również podjednostka  $\sigma^{70}$  [41]. Z resztami aminokwasowymi podjednostki  $\sigma^{70}$  oddziałuje region CRP, zwany regionem aktywatorowym 3 (AR3). Zbudowany jest on z reszt Lys52, Asp53, Glu54, Glu55 i Glu58 [42]. Reszty Asp53, Glu54, Glu55 i Glu58 tworzą ujemnie naładowany obszar na powierzchni białka zlokalizowany w obrębie zwrotu  $\beta$  zawartego w domenie N-końcowej. Oddziaływania z dodatnio naładowanym obszarem podjednostki  $\sigma^{70}$  RNAP mają charakter elektrostatyczny. Reszta Lys52 nosząca ładunek dodatni wpływa hamująco na proces



Rys. 1. Schemat struktury przestrzennej podjednostki białka CRP w kompleksie z dwiema cząsteczkami cAMP

Sześć fragmentów w postaci  $\alpha$ -helisy oznaczono literami, natomiast dwanaście fragmentów w formie struktury  $\beta$  oznaczono cyframi. Schemat wykonano za pomocą programu graficznego MolScript oraz Raster 3D na podstawie współrzędnych atomów z Brookhaven Protein Data Bank (kod: 2CGP).



Rys. 2. Schemat struktury kompleksu CRP-DNA z zaznaczonymi rejonami oddziaływania z polimerazą RNA.

Schemat sporządzono przy pomocy programu graficznego WebLabViewerPro 3.7 na podstawie współrzędnych atomów z Brookhaven Protein Data Bank (kod: 1CGP).

aktywacji, jej podstawienie resztami Glu, Asp, Gln, Asn czy Val wzmacnia aktywność promotorów klasy II [58]. W cząsteczce CRP typu dzikiego, hamujący wpływ lizyny 52 oraz aktywujący wpływ pozostałych reszt aminokwasowych regionu AR3 równoważą się wzajemnie. Cząsteczka cAMP w konformacji synklynalnej lokalizuje się pomiędzy domenę wiążącą DNA i zwrot  $\beta$  regionu AR3, oddziałując z tą strukturą poprzez wiązanie wodorowe z grupą amidową reszty 58 oraz poprzez oddziaływanie hydrofobowe z łańcuchem bocznym Lys57 [42]. Obszary CRP istotne dla oddziaływania tego aktywatora z polimerazą RNA w przypadku aktywacji promotorów klasy I i II zostały przedstawione na rysunku 2.

W przeciwieństwie do powyższych klas, promotory klasy III wymagają dla pełnej aktywacji transkrypcji kilku cząsteczek aktywatora np. dwu lub więcej cząsteczek CRP lub też jednej bądź kilku cząsteczek białka CRP i dodatkowo jednej lub więcej cząsteczek aktywatora specyficznego dla danego operonu. Przykładami tego typu promotorów są promotory *ansB* [48], *araBAD* [66], *rhaSR* [60], *acsP2* [3], *malKp* [45], *melAB* [56] i *uhpT* [28].

W przypadku synergistycznego oddziaływania dwu lub więcej cząsteczek CRP bez udziału innych aktywatorów, mechanizm regulacji inicjacji transkrypcji jest względnie prosty, tzn. jest on kombinacją pewnych elementów charakterystycznych dla mechanizmów aktywacji transkrypcji z promotorów klasy I i/lub II [10]. Przykładowo dimer CRP związany w pozycji -103 lub -93 może współaktywować transkrypcję razem z dimerem CRP zlokalizowanym w pobliżu miejsca -62 [24]. W tym przypadku obie cząsteczki CRP aktywują transkrypcję zgodnie z mechanizmem klasy I poprzez obszar AR1. Podobnie, dimer CRP związany w pozycji -103, -93 czy -83 może współdziałać z dimerem CRP zlokalizowanym w pobliżu regionu -42 [11, 32]. W tym przypadku położona dalej od miejsca transkrypcji cząsteczka CRP działa poprzez mechanizm klasy I w wyniku oddziaływania obszaru AR1, a leżąca bliżej startu transkrypcji cząsteczka aktywatora funkcjonuje zgodnie z mechanizmem klasy II w wyniku oddziaływania obszarów AR1, AR2 i AR3 z polimerazą RNA.

CRP może również pełnić funkcję koaktywatora, współdziałając z jednym lub więcej aktywatorów. Mechanizm działania jest bardzo różny. Podobnie jak wcześniej, białko CRP może się wiązać niedaleko pozycji -103 czy -93 i aktywować transkrypcję z innym aktywatorem zdolnym do oddziaływania z  $\alpha$ CTD,  $\alpha$ NTD czy  $\sigma^{70}$ , np. cząsteczką FNR zlokalizowaną w pozycji -42 [48]. Białko CRP działa wtedy zgodnie z mechanizmem aktywacji promotorów klasy I a FNR – analogicznie do mechanizmu klasy II. Podobnie CRP związany w pozycji -42 może współaktywować

transkrypcję z cząsteczką FNR związaną w pozycji -103, -93 czy -83 [11].

We wszystkich powyższych przypadkach CRP i drugi dodatkowy aktywator oddziałują z różnymi obszarami RNAP oddzielnie, tzn. nie jest potrzebny bezpośredni kontakt pomiędzy CRP a koaktywatorem. Są jednak również takie promotory, gdzie dochodzi do bezpośredniego oddziaływania CRP z drugą cząsteczką aktywatora, a mechanizm aktywacji jest znacznie bardziej skomplikowany. W przypadku niektórych promotorów bezpośredni kontakt białka CRP z dodatkowym aktywatorem pozwala na większą stabilizację wiązania tego aktywatora do DNA lub też wywołane związaniem się CRP zagięcie DNA ułatwia koaktywatorowi oddziaływanie z RNAP. Możliwe jest także, że indukowana związaniem CRP zmiana struktury DNA przeciwdziała silnym oddziaływaniom białko-białko lub białko-DNA blokującym rozpoczęcie transkrypcji [28, 45].

Białko CRP może pełnić funkcję nie tylko aktywatora czy koaktywatora procesu transkrypcji, w niektórych przypadkach jest ono również represorem (funkcjonuje w ten sposób w odniesieniu do takich genów jak *cya* – gen ten koduje cyklazę adenylanową, katalizującą syntezę cAMP z ATP i *crp* – gen kodujący białko CRP) bądź korepresorem [1, 23, 31, 53]. Przykładem tego drugiego wariantu może być jego współdziałanie z represorem CytR, którego powinowactwo do operatora wzrasta około 1000-krotnie w obecności białka CRP. W nieobecności allosterycznego efektora – cytydyny, białko CytR hamuje inicjację transkrypcji poprzez bezpośrednie oddziaływanie z 2 cząsteczkami CRP związanymi do DNA oraz poprzez blokowanie fragmentu DNA zawartego pomiędzy cząsteczkami CRP [49, 55]. Interakcje CytR-CRP i CytR-DNA całkowicie uniemożliwiają aktywację transkrypcji, gdyż z jednej strony sterycznie blokują funkcjonalne regiony AR1 obu dimerów CRP a z drugiej strony również nie pozwalają na oddziaływanie  $\alpha$ CTD z segmentem DNA sąsiadującym z każdym dimerem CRP. Białko CytR oddziałuje z resztami Glu12, Trp13, His17, Leu105, Val108 i Pro110 zlokalizowanymi w obrębie domeny N-końcowej CRP [50].

## 6. Podsumowanie

Białko wiążące cAMP z *Escherichia coli* jest modelowym regulatorem transkrypcji intensywnie badanym przy okazji poznawania mechanizmów kontroli inicjacji transkrypcji w organizmach prokariotycznych. Białko CRP jest pierwszym aktywatorem, który został wyizolowany i oczyszczony oraz pierwszym, którego trójwymiarowa struktura została poznana. Mechanizmy regulacji transkrypcji z udziałem białka CRP mogą z powodzeniem odnosić się do mechanizmów działa-

nia innych białek regulatorowych. Za przykład może posłużyć tutaj czynnik FNR – białko regulujące redukcję fumaranu i azotanu z *E. coli* (*Fumarate and Nitrate Reduction Regulator of Escherichia coli*). Białko to aktywuje transkrypcję w sposób analogiczny do mechanizmu występującego w przypadku promotorów zależnych od CRP klasy I, II i III. Białko FNR zawiera w swojej strukturze funkcjonalne odpowiedniki obszarów AR1 i AR3 białka CRP, a dla aktywacji transkrypcji szczególnie istotny jest kontakt rejonu AR1 białka FNR z domeną C-terminalną podjednostki a polimerazy RNA oraz rejonu AR3 z podjednostką  $\sigma^{70}$  polimerazy RNA [5, 57]. Wyżej wymienione interakcje w znacznym stopniu sposób odpowiadają oddziaływaniom, które występują pomiędzy dimerem CRP a polimerazą RNA.

Mechanizmy aktywacji transkrypcji z udziałem białka CRP, choć w wielu aspektach dobrze wyjaśnione, ciągle wymagają pełniejszego strukturalnego opisu. Poznana została już struktura krystaliczna białka CRP w kompleksie z symetryczną, syntetyczną sekwencją DNA oraz domeną C-terminalną podjednostki a polimerazy RNA, a kolejnym istotnym krokiem w zrozumieniu mechanizmów regulacji transkrypcji byłoby poznanie struktury pełnego kompleksu CRP-RNAP-promotor i to w odniesieniu do zarówno promotorów klasy I jak również promotorów klasy II.

## Piśmiennictwo

- Aiba H.: Autoregulation of the *Escherichia coli* *crp* gene: CRP is a transcriptional repressor for its own gene. *Cell*, **32**, 141–149 (1983)
- Aravind L., Anantharaman V., Balaji S., Babu M.M., Iyer L.M.: The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 231–262 (2005)
- Beatty C.M., Browning D.F., Busby S.J., Wolfe A.J.: Cyclic AMP receptor protein-dependent activation of the *Escherichia coli* *acsP2* promoter by a synergistic class III mechanism. *J. Bacteriol.* **185**, 5148–5157 (2003)
- Benoff B., Yang H., Lawson C.L., Parkinson G., Liu J., Blatter E., Ebright Y.W., Berman H.M., Ebright R.H.: Structural basis of transcription activation: the CAP- $\alpha$  CTD-DNA complex. *Science*, **297**, 1562–1566 (2002)
- Bernard A.M., Lloyd G.S., Green J., Busby S.J., Lee D.J.: Location of the *Escherichia coli* RNA polymerase  $\alpha$  subunit C-terminal domain at an FNR-dependent promoter: analysis using an artificial nuclease. *FEBS Lett.* **30**, 13–18 (2004)
- Berrera M., Pantano S., Carloni P.: Catabolite activator protein in aqueous solution: a molecular simulation study. *J. Phys. Chem.* **111**, 1496–1501 (2007)
- Blatter E., Ross W., Tang H., Gourse R., Ebright R.: Domain organization of RNA polymerase  $\alpha$  subunit: C-terminal 85 amino acids constitute a domain capable of dimerization and DNA binding. *Cell*, **78**, 889–896 (1994)
- Browning D., Busby S.: The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 1–9 (2004)
- Busby S., Ebright R.H.: Transcription activation at class II CAP-dependent promoters. *Mol. Microbiol.* **23**, 853–859 (1997)
- Busby S., Ebright R.S.: Transcriptional activation by catabolite activator protein (CAP). *J. Mol. Biol.* **293**, 199–213 (1999)
- Busby S., West D., Lawes M., Webster Ch., Ishihama A., Kolb A.: Transcription activation by the *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein. Receptors bound in tandem at promoters can interact synergistically. *J. Mol. Biol.* **241**, 341–352 (1994)
- Déthiollaz S., Eichenberger P., Geiselmann J.: Influence of DNA geometry on transcriptional activation in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **15**, 5449–5458 (1996)
- Fic E., Górecki A., Wasylewski Z.: Fluorescence quenching studies of conformational changes induced by cAMP and DNA binding to heterodimer of cyclic AMP receptor protein from *Escherichia coli*. *Protein J.* **26**, 457–466 (2007)
- Geiselmann J.: The role of DNA conformation in transcriptional initiation and activation in *Escherichia coli*. *Biol. Chem.* **378**, 599–607 (1997)
- Gronenborn A.M., Clore G.M., Blazy B., Baudras A.: Conformational selection of the syn-cAMP upon binding to the cAMP receptor protein. *FEBS Lett.* **136**, 160–164 (1981)
- Harman J.G.: Allosteric regulation of the cAMP receptor protein. *Biochem. Biophys. Acta*, **1547**, 1–17 (2001)
- Heyduk T., Lee J.C.: *Escherichia coli* cAMP receptor protein: evidence for three protein conformational states with different promoter binding affinities. *Biochemistry*, **28**, 6914–6924 (1989)
- Heyduk T., Lee J.C.: Solution studies on the structure of bent DNA in the cAMP receptor-*lac* DNA complex. *Biochemistry*, **31**, 5165–5171 (1992)
- Ivanov V.I., Minchenkova L.E., Chernov B.K., McPhie P., Ryu S., Garges S., Barber A.M., Zhurkin V.B., Adhya S.: CRP-DNA complexes: inducing the A-like form in the binding sites with an extended central spacer. *J. Mol. Biol.* **245**, 228–240 (1995)
- Kapanidis A.N., Ebright Y.W., Ludescher R.D., Chan S., Ebright R.H.: Mean DNA bend angle and distribution of DNA bend angles in the CAP-DNA complex in solution. *J. Mol. Biol.* **312**, 453–468 (2001)
- Katouzian-Safadi M., Blazy B., Cremet J.Y., Le Cear J.P., Rossier J., Charlier M.: Photo-cross-linking of CRP to non-specific DNA in the absence of cAMP. DNA interacts with both the N- and C-terminal parts of the protein. *Biochemistry*, **32**, 1770–1773 (1993)
- Kaupp U.B., Seifert R.: Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol. Rev.* **83**, 769–824 (2002)
- Kolb A., Busby S., Buc H., Garges S., Adhya S.: Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 749–795 (1993)
- Langdon R.C., Hochschild A.: A genetic method for dissecting the mechanism of transcriptional activator synergy by identical activators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 12673–12678 (1999)
- Lawson C.L., Swigon D., Murakami K.S., Darst S.A., Berman H.M., Ebright R.H.: Catabolite activator protein: DNA binding and activation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**, 10–20 (2004)
- Lin S.H., Lee J.C.: Communications between the high-affinity cyclic nucleotide binding sites in *E. coli* cyclic AMP receptor protein: effect of single site mutations. *Biochemistry*, **41**, 11857–11867 (2002)

27. Meng W., Savery N., Busby S., Thomas M.: The *Escherichia coli* RNA polymerase subunit linker: length requirements for transcription activation at CRP-dependent promoters. *EMBO J.* **19**, 1555–1566 (2000)
28. Merkel T., Dahl J., Ebright R., Kadner R.: Transcription activation at the *Escherichia coli* *uhpT* promoter by the catabolite gene activator protein. *J. Bacteriol.* **177**, 1712–1718 (1995)
29. Montminy M.: Transcription regulation by cyclic AMP. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 807–822 (1997)
30. Moore J.L., Gorshkova I., Brown J.W., McKenney K.H., Schwarz F.P.: Effect of cAMP binding site mutations on the interaction of cAMP receptor protein with cyclic nucleoside monophosphate ligands and DNA. *J. Biol. Chem.* **271**, 21273–21278 (1996)
31. Mori K., Aiba H.: Evidence for negative control of *cya* transcription by cAMP and cAMP receptor protein in intact *Escherichia coli* cells. *J. Biol. Chem.* **260**, 14838–14843 (1985)
32. Murakami K., Owens J., Belyaeva T., Meares C., Busby S., Ishihama A.: Positioning of two alpha subunit carboxy-terminal domains of RNA polymerase along promoter DNA by two transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 11274–11278 (1997)
33. Napoli A.A., Lawson C.L., Ebright R.H., Berman H.M.: Indirect readout of DNA sequence at the primary-kink site in the CAP-DNA complex: recognition of pyrimidine-purine and purine-purine steps. *J. Mol. Biol.* **357**, 173–183 (2006)
34. Niu W., Kim Y., Tau G., Heyduk T., Ebright R.H.: Transcription activation at class II CAP-dependent promoters: two interactions between CAP and RNA polymerase. *Cell*, **87**, 1123–1134 (1996)
35. Niu W., Zhou Y., Dong Q., Ebright Y., Ebright R.: Characterization of the activating region of *Escherichia coli* catabolite gene activator protein (CAP). I. Saturation and alanine scanning mutagenesis. *J. Mol. Biol.* **243**, 595–602 (1994)
36. Pantano S., Zaccolo M., Carloni P.: Molecular basis of the allosteric mechanism of cAMP in the regulatory PKA subunit. *FEBS Lett.* **579**, 2679–2685 (2005)
37. Parkinson G., Wilson Ch., Gunasekera A., Ebright Y.W., Ebright R.E., Berman H.M.: Structure of the CAP-DNA complex at 2.5 Å resolution: a complete picture of the protein-DNA interface. *J. Mol. Biol.* **260**, 395–408 (1996)
38. Passner J.M., Schultz S.C., Steitz T.A.: Modeling the cAMP-induced allosteric transition using the crystal structure of CAP-cAMP at 2.1 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **304**, 847–859 (2000)
39. Passner J.M., Steitz T.A.: The structure of a CAP-DNA complex having two cAMP molecules bound to each monomer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 2843–2847 (1997)
40. Popovych N., Sun S., Ebright R.H., Kalodimos C.G.: Dynamically driven protein allostery. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 831–838 (2006)
41. Rhodius V., Busby S.: Interactions between activating region 3 of the *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein and region 4 of the RNA polymerase  $\sigma^{70}$  subunit: application of suppression genetics. *J. Mol. Biol.* **299**, 311–324 (2000)
42. Rhodius V., Busby S.: Transcription activation by the *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein: determinants within activating region 3. *J. Mol. Biol.* **299**, 295–310 (2000)
43. Rhodius V., West D.M., Webster C.L., Busby S.J., Savery N.J.: Transcription activation at class II CRP-dependent promoters: the role of different activating regions. *Nucl. Acids Res.* **25**, 326–333 (1997)
44. Rhodius V.A., Busby S.J.: Positive activation of gene expression. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**, 152–159 (1998)
45. Richet E., Vidal-Ingigliardi D., Raibaud O.: A new mechanism for coactivation of transcription initiation: repositioning of an activator triggered by the binding of a second activator. *Cell*, **66**, 1185–1195 (1991)
46. Rojo F.: Mechanisms of transcriptional repression. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**, 145–151 (2001)
47. Savery N.J., Lloyd G.S., Busby S.J., Thomas M.S., Ebright R.H., Gourse R.L.: Determinants of the C-terminal domain of the *Escherichia coli* RNA polymerase alpha subunit important for transcription at class I cyclic AMP receptor protein-dependent promoters. *J. Bacteriol.* **184**, 2273–2280 (2002)
48. Scott S., Busby S., Beacham I.: Transcriptional coactivation at the *ansB* promoters: involvement of the activating regions of CRP and FNR when bound in tandem. *Mol. Microbiol.* **18**, 521–532 (1995)
49. Shin M., Kang S., Hyun S.J., Fujita N., Ishihama A., Valentin-Hansen P., Choy H.E.: Repression of deoP2 in *Escherichia coli* by CytR: conversion of a transcription activator into a repressor. *EMBO J.* **20**, 5392–5399 (2001)
50. Sogaard-Andersen L., Mirnov A.S., Pedersen H., Sukhodelts V.V., Valentin-Hansen P. Single amino acid substitutions in the cAMP receptor protein specifically abolish regulation by the CytR repressor in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 4921–4925 (1991)
51. Tagami H., Aiba H.: A common role of CRP in transcriptional activation: CRP acts transiently to stimulate events leading to open complex formation at a diverse set of promoters. *EMBO J.* **17**, 1759–1767 (1998)
52. Tagami H., Aiba H.: An inactive open complex mediated by an UP element at *Escherichia coli* promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 7202–7207 (1999)
53. Takahashi H., Inada T., Postma P., Aiba H.: CRP down-regulates adenylate cyclase activity by reducing the level of phosphorylated IIA(Glc), the glucose-specific phosphotransferase protein, in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **259**, 317–326 (1998)
54. Travers A., Muskhelishvili G.: A common topology for bacterial and eukaryotic transcription initiation? *EMBO Rep.* **8**, 147–151 (2007)
55. Valentin-Hansen P., Sogaard-Andersen L., Pedersen H.: A flexible partnership: the CytR anti-activator and the cAMP-CRP activator protein, comrades in transcriptional control. *Mol. Microbiol.* **20**, 461–466 (1996)
56. Wade J.T., Belyaeva T.A., Hyde E.I., Busby S.J.: A simple mechanism for co-dependence on two activators at an *Escherichia coli* promoter. *EMBO J.* **20**, 7160–7167 (2001)
57. Weber K.D., Vincent O.D., Kiley P.J.: Additional determinants within *Escherichia coli* FNR activating region 1 and RNA polymerase alpha subunit required for transcription activation. *J. Bacteriol.* **187**, 1724–1731 (2005)
58. West D., Williams R., Rhodius V., Bell A., Sharma N., Zou Ch., Fujita N., Ishihama A., Busby S.: Interactions between the *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein and RNA polymerase at class II promoters. *Mol. Microbiol.* **10**, 789–797 (1993)
59. Węgrzyn G., Węgrzyn A.: Aktywacja transkrypcji w komórkach *Escherichia coli*. *Post. Biologii Komórki*, **24**, 53–68 (1997)
60. Wickstrum J.R., Santangelo T.J., Egan S.M.: Cyclic AMP receptor protein and RhaR synergistically activate transcription from the L-rhamnose-responsive *rhaSR* promoter in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **187**, 6708–6718 (2006)



61. Won H.S., Lee T.W., Park S.H., Lee B.J.: Stoichiometry and structural effect of the cyclic nucleotide binding to cyclic AMP receptor protein. *J. Biol. Chem.* **277**, 11450–11455 (2002)
62. Won H.S., Yamazaki T., Lee T.W., Yoon M.K., Park S.H., Kyogoku Y., Lee B.J.: Structural understanding of the allosteric conformational change of cyclic AMP receptor protein by cyclic AMP binding. *Biochemistry*, **39**, 13953–13962 (2000)
63. Youn H., Kerby R.L., Conrad M., Roberts G.P.: Study of highly constitutively active mutants suggests how cAMP activates cAMP receptor protein. *J. Biol. Chem.* **281**, 1119–1127 (2006)
64. Youn H., Kerby R.L., Koh J., Roberts G.P.: A C-helix residue, Arg-123, has important roles in both the active and inactive forms of the cAMP receptor protein. *J. Biol. Chem.* **282**, 3632–3639 (2007)
65. Yu S., Lee J.C.: Role of residue 138 in the interdomain hinge region in transmitting allosteric signals for DNA binding in *Escherichia coli* cAMP receptor protein. *Biochemistry*, **43**, 4662–4669 (2004)
66. Zhang X., Schleif R.: Catabolite gene activator protein mutations affecting activity of the *araBAD* promoter. *J. Bacteriol.* **180**, 195–200 (1998)
67. Zhou Y., Busby S., Ebright R.H.: Identification of the functional subunit of a dimeric transcription activator protein by use of oriented heterodimers. *Cell*, **73**, 375–379 (1993)
68. Zhou Y., Merkel T., Ebright R.H.: Characterization of the activating region of *Escherichia coli* catabolite gene activator protein (CAP). II. Role at class I and II CAP-dependent promoters. *J. Mol. Biol.* **243**, 603–610 (1994)
69. Zhou Y., Zhang X., Ebright R.H.: Identification of the activating region of catabolite gene activator protein (CAP): Isolation and characterization of mutants of CAP specifically defective in transcription activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 6081–6085 (1993)