

Ekspresja genu

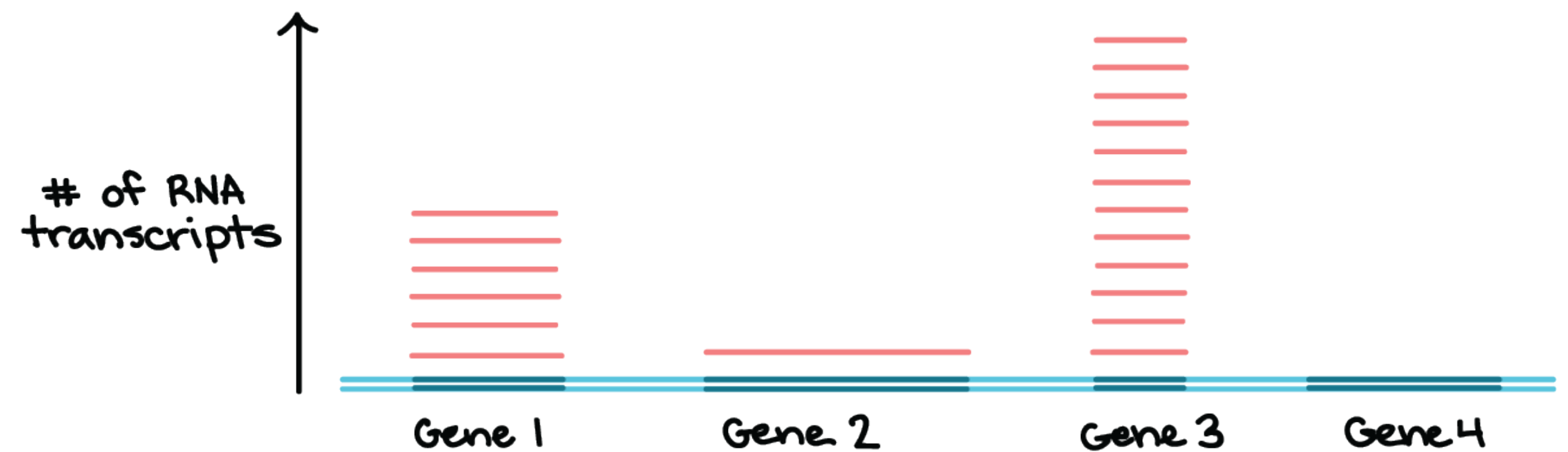
Podstawowe mechanizmy i pojęcia

Ekspresja

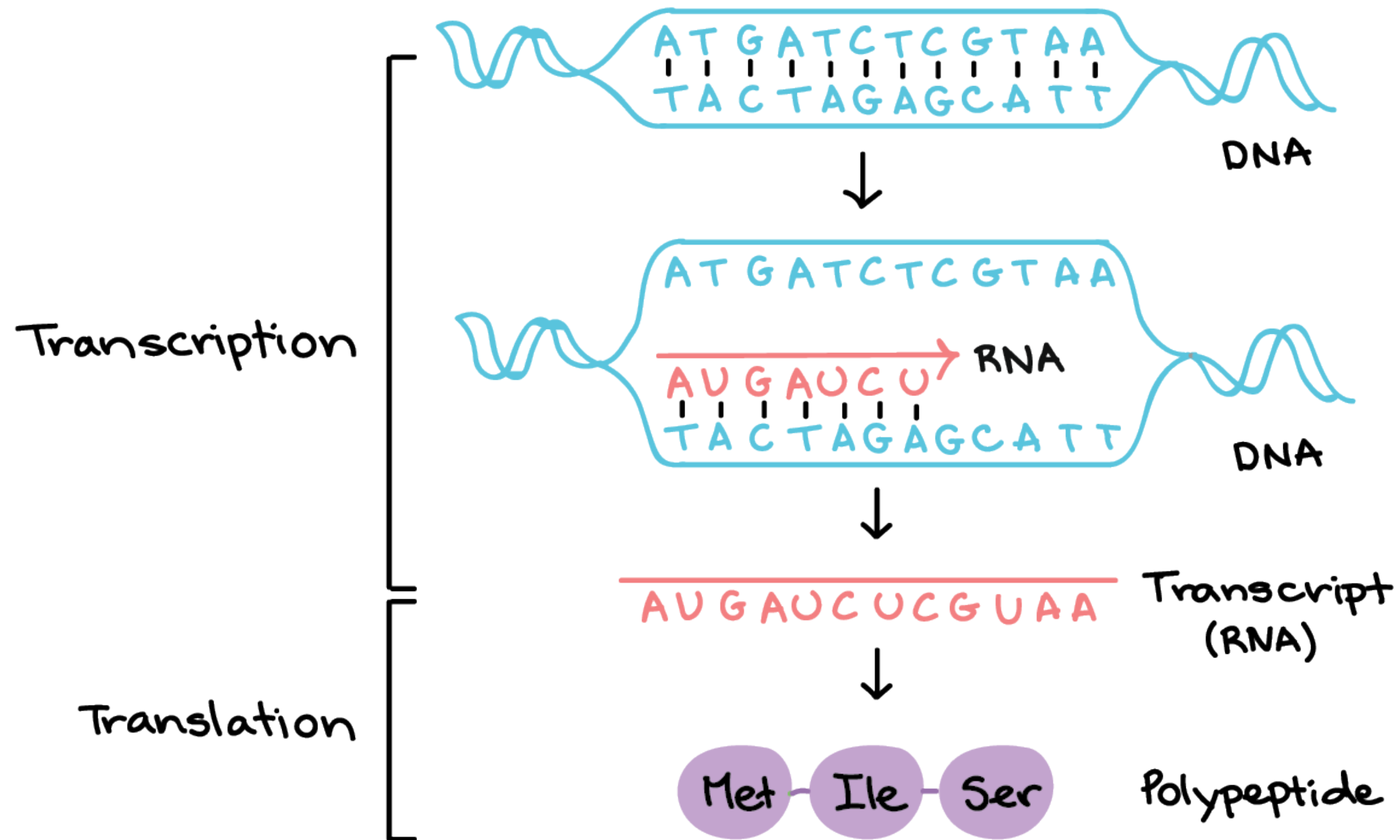
- Ekspresja (wyrażanie) genu jest regulowana na wielu etapach
- Regulacja ekspresji jest podstawowym mechanizmem dla:
 - adaptacji do zmiennych warunków
 - homeostazy
 - rozwoju i różnicowania
- Wzór regulacji ekspresji genów może być utrzymywany z kolejnymi podziałami komórki, a nawet z kolejnymi pokoleniami - epigenetyka

Regulacja działania genów

- Każdy gen ulega ekspresji na innym poziomie
- Komórki z tym samym DNA mogą wyrażać różne geny na różnym poziomie - podstawa procesów regulacyjnych



Ekspresja genu - obraz bardzo uproszczony



Centralna hipoteza ("dogmat")

Ideas on Protein Synthesis (Oct. 1956)

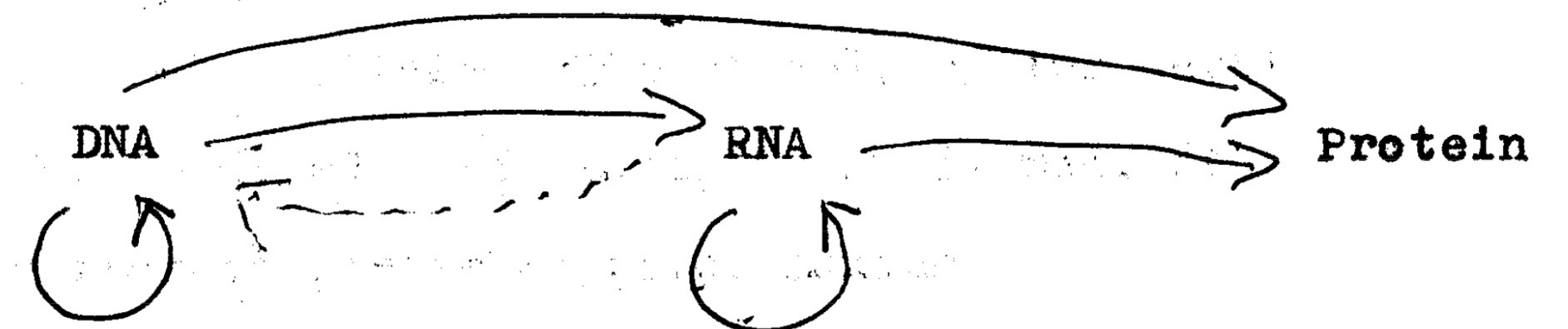
Francis Crick, 1956

The Doctrine of the Triad.

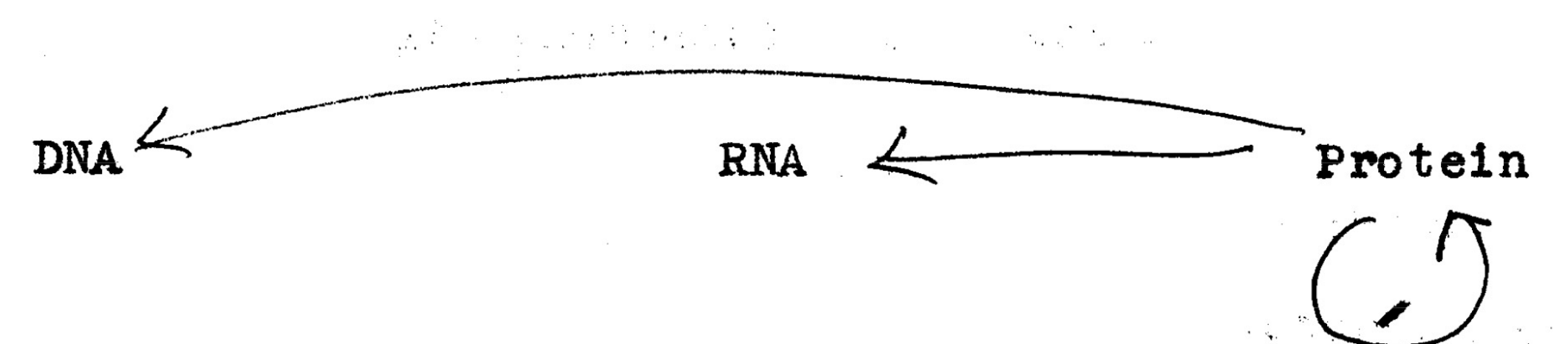
The Central Dogma: "Once information has got into a protein it can't get out again". Information here means the sequence of

the amino acid residues, or other sequences related to it.

That is, we may be able to have



but never



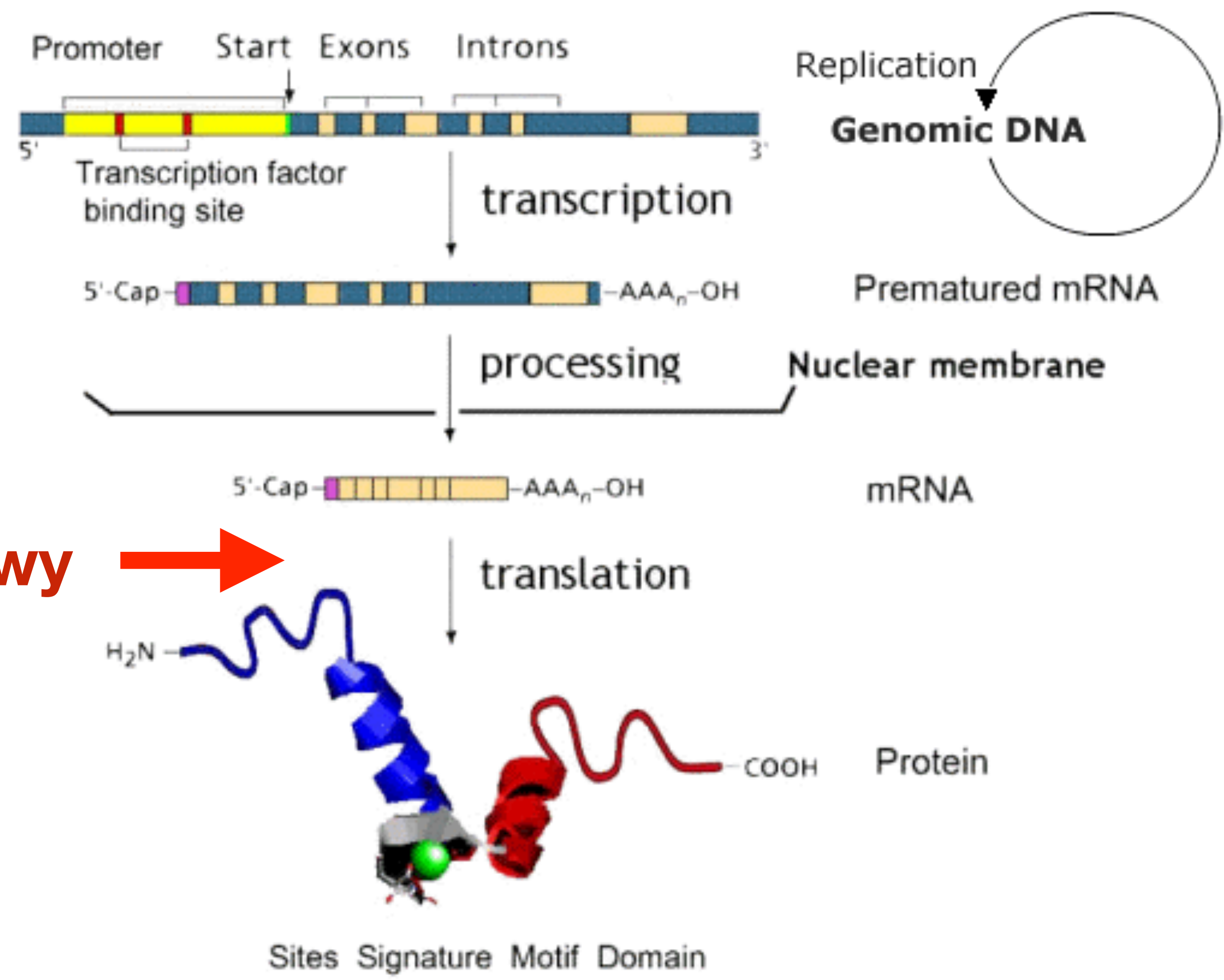
where the arrows show the transfer of information.

Centralna hipoteza („dogmat”)

DNA

RNA

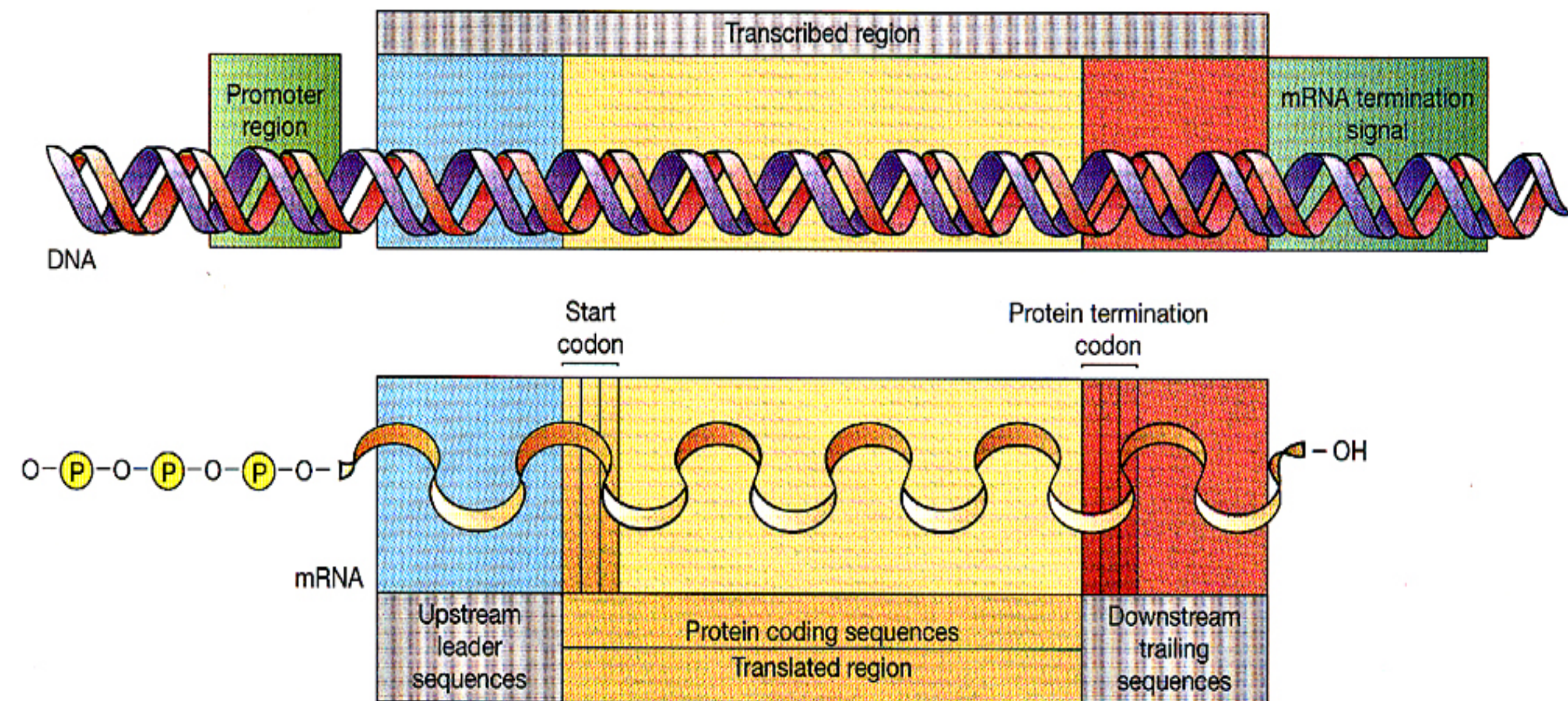
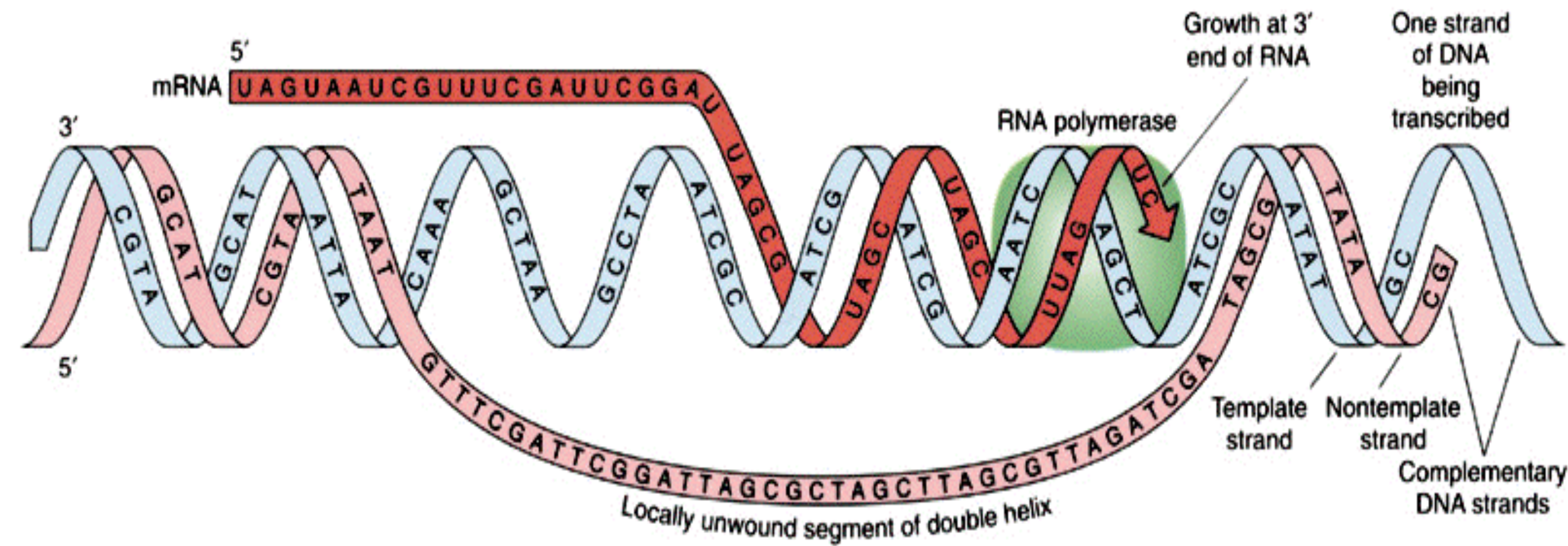
BIAŁKO



Ten etap jest jednokierunkowy →

Transkrypcja

- Konkretnie mechanizmy różne u Prokaryota i Eukaryota
- Inicjacja w miejscu **promotora**, związanie białek z DNA i rozplecenie podwójnej helisy
- Dla genów kodujących białka powstający transkrypt dłuższy, niż sekwencja kodująca
 - obszary **UTR** (*untranslated regions*)
 - nie mylić miejsca startu transkrypcji (+1) z miejscem startu translacji ani końca transkryptu z kodonem stop



Transkrypcja

- U Prokaryota polimeraza RNA wiąże się z DNA, u Eukaryota z DNA wiążą się ogólne czynniki transkrypcyjne, a z nimi dopiero polimeraza
- U Eukaryota kilka (3 główne) polimeraz RNA
 - I - rRNA
 - II - mRNA, niektóre małe RNA
 - III - tRNA, małe RNA
 - mitochondrialna

Ekspresja genów prokariotycznych

- dominuje regulacja na poziomie transkrypcji
- policistronowe jednostki transkrypcyjne o wspólnej regulacji transkrypcyjnej – operony
- mRNA są szybko degradowane, translacja zachodzi zasadniczo równocześnie z transkrypcją
- czas półtrwania mRNA: ~2'

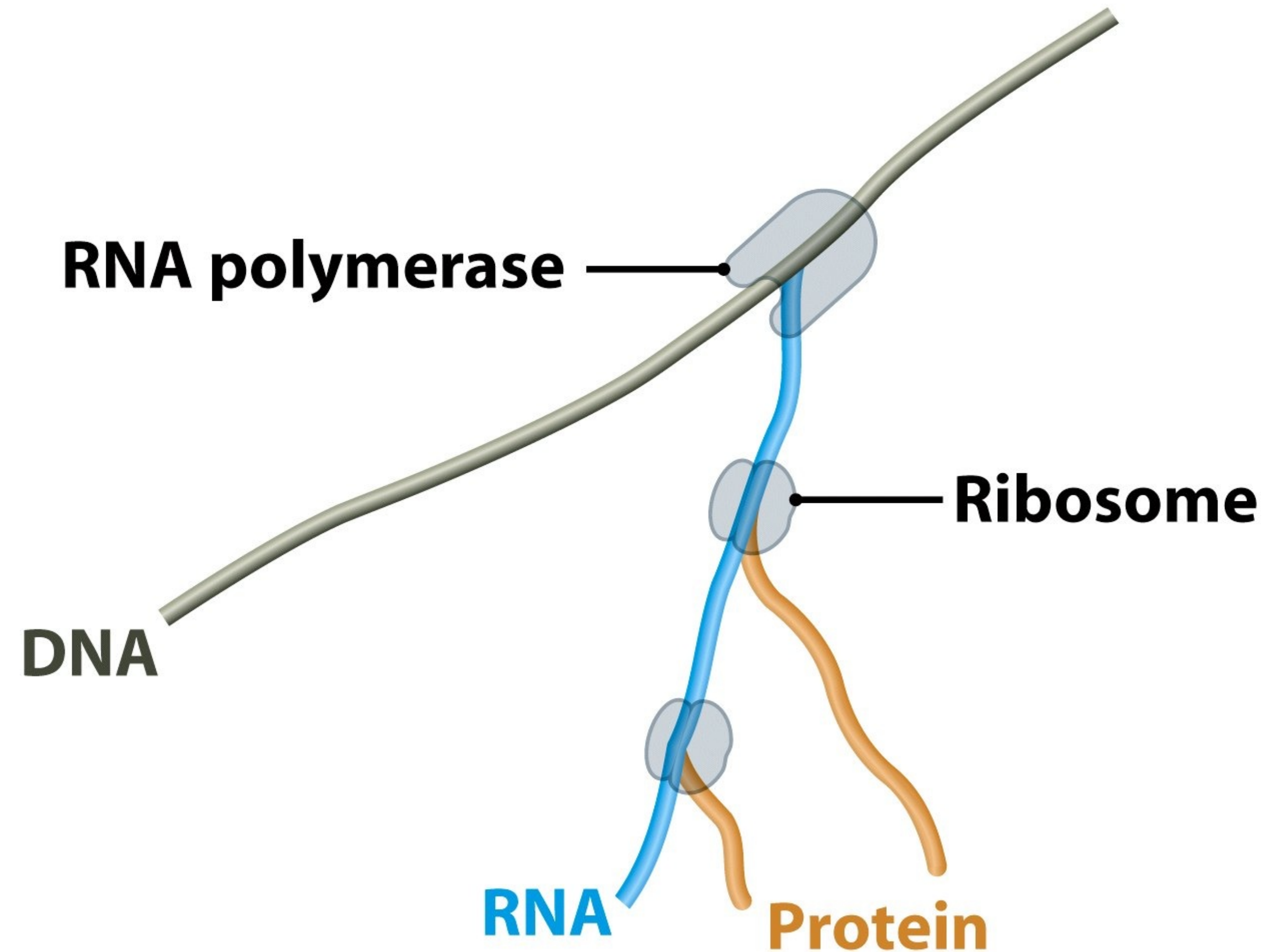


Figure 12-10 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Ekspresja genów eukariotycznych

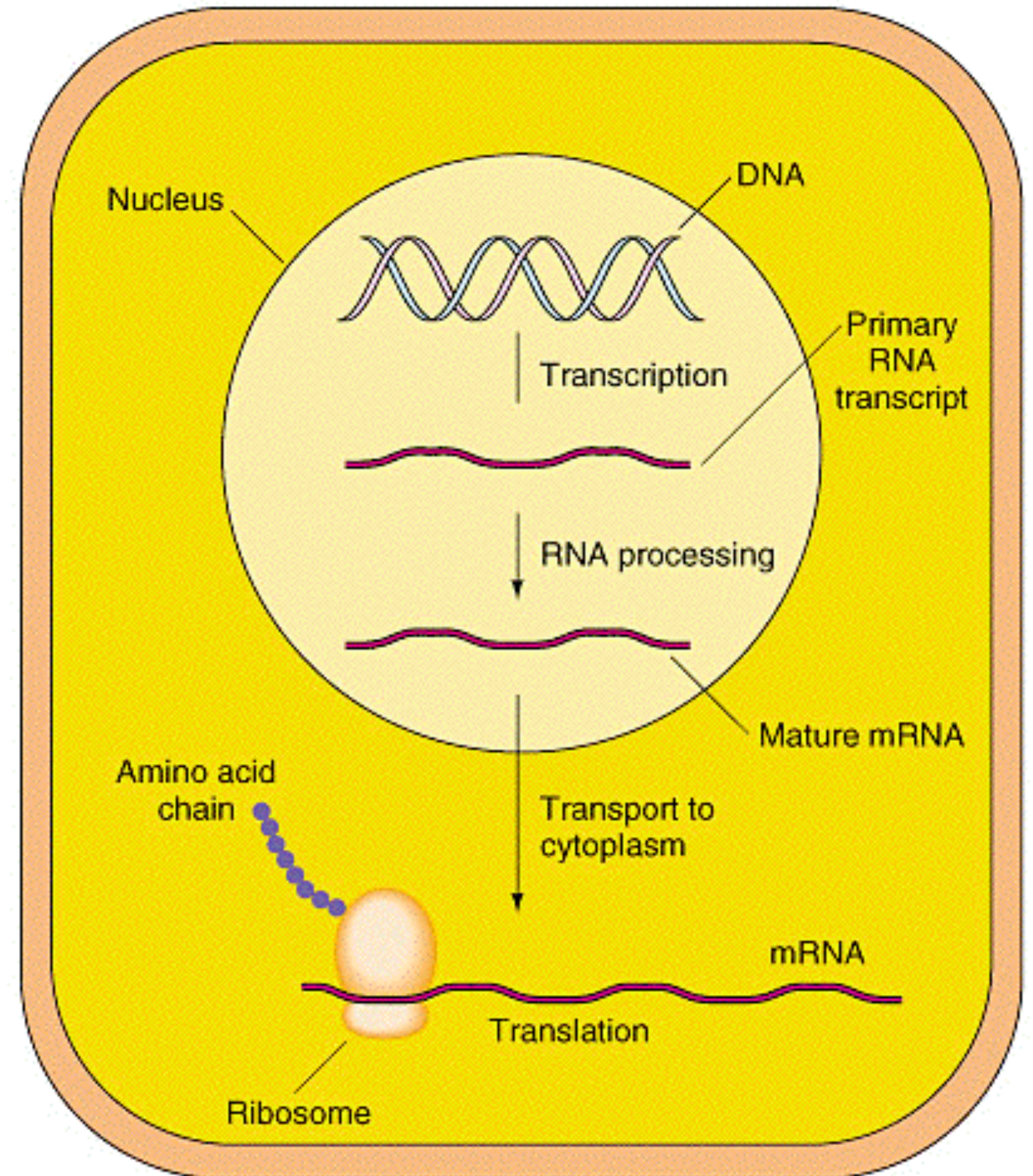
- Procesy transkrypcji i translacji są rozdzielone w przestrzeni i czasie
- mRNA są stabilniejsze: od kilkunastu minut do kilku godzin
- Każdy gen ma własny promotor, nie występują operony
- Proces ekspresji genu składa się z wielu etapów
- Na każdym z etapów możliwe działanie regulacyjne
- Informacja kierująca syntezą białka może być modyfikowana po transkrypcji (alternatywne składanie, redagowanie) – złożoność proteomu przekracza złożoność genomu

Etapy ekspresji/poziomy regulacji u Eukaryota

- struktura chromatyny
- transkrypcja
- obróbka i kontrola jakości RNA
- transport RNA
- degradacja RNA
- translacja
- modyfikacje post-translacyjne
- degradacja białka

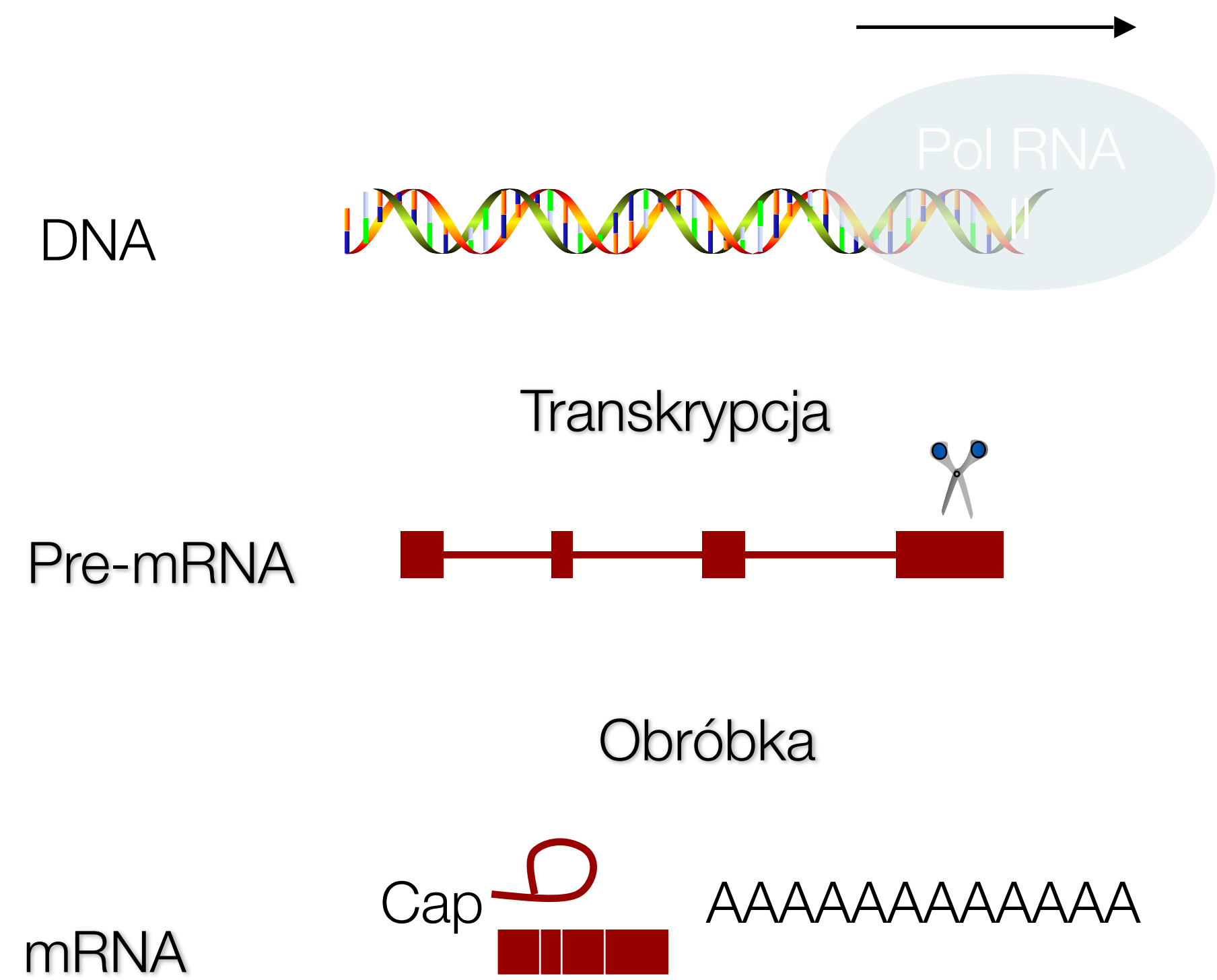
Losy mRNA w komórce eukariotycznej

- Transkrypcja
- Dodanie „czapeczki” na końcu 5’
- Składanie (splicing)
- Poliadenylacja na końcu 3’
- Transport do cytoplazmy
- Translacja
- Degradacja

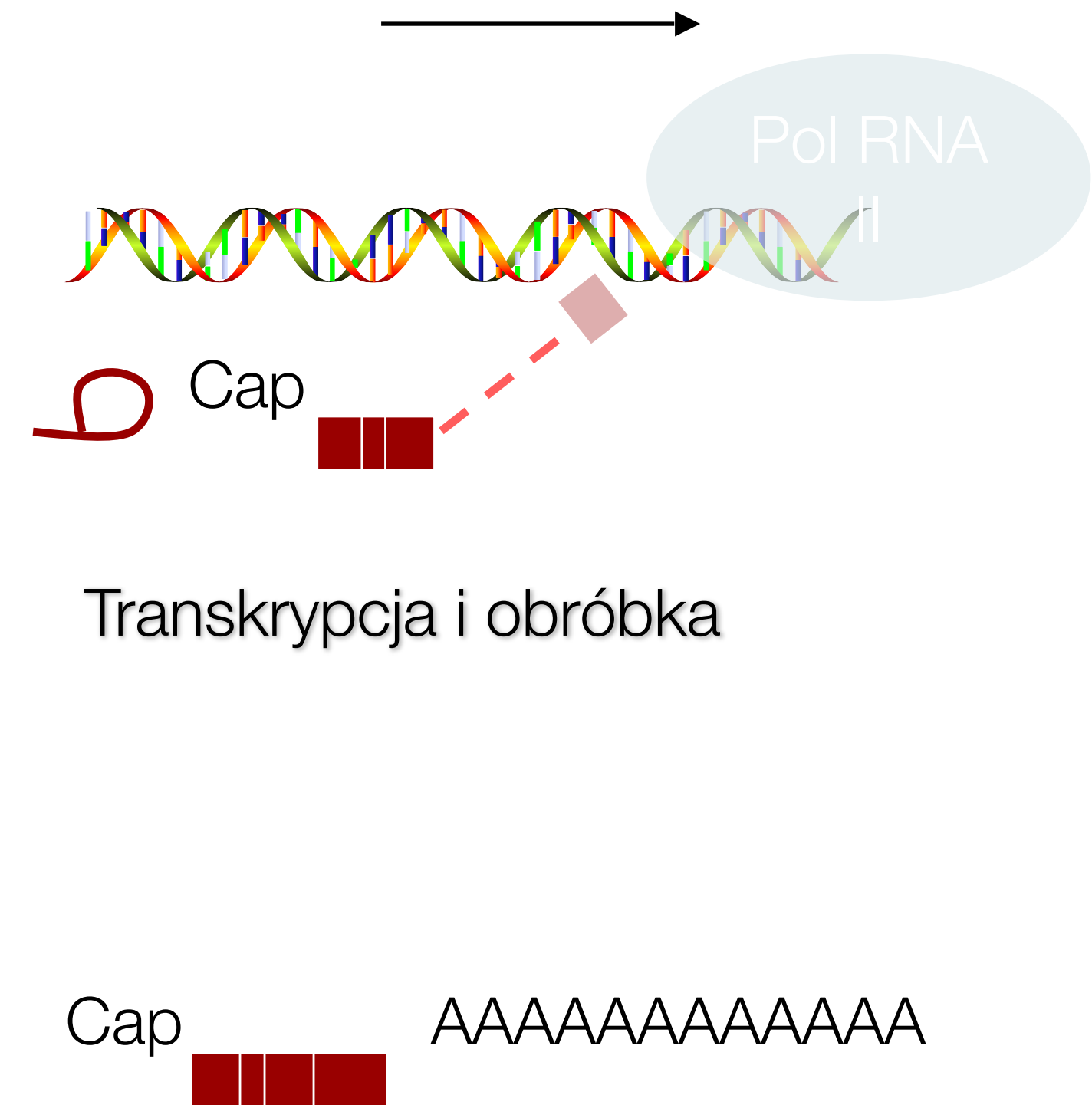


U Eukaryota transkrypcja i obróbka RNA są sprzężone

Tradycyjny obraz ekspresji genu



Współczesny obraz ekspresji genu



Bakterie i eukarionty

- Prosta w porównaniu z Eukariontami ekspresja genu bakterii może być ewolucyjnie wtórna, nie pierwotna
- przystosowanie do termofilii (termoredukcja)
 - RNA niestabilny w wysokich temperaturach
 - nie ma hipertermofilnych eukariontów
- najwcześniejsze gałęzie drzewa bakterii zawierają wiele gatunków ekstremofilnych

Elementy systemów regulacji

- Elementy *cis*
 - Znajdują się w obrębie tej samej cząsteczki, co element podlegający regulacji
 - Elementy *cis* w obrębie DNA
 - np. promotory, operatory, enhancery
 - Elementy *cis* w obrębie RNA
 - sekwencje wiążące białka regulujące translację, splicing, degradację itp.

Elementy systemów regulacji

- Elementy *trans*
 - Odrębne cząsteczki oddziałujące z elementami *cis* i modulujące ekspresję
 - Białka regulujące transkrypcję (czynniki transkrypcyjne), aktywatory, represory itp.
 - Białka regulujące inne etapy ekspresji (aktywatory/represory translacji, splicingu itp.)
 - RNA regulatorowe (siRNA, miRNA itp.)

Podstawy regulacji genu

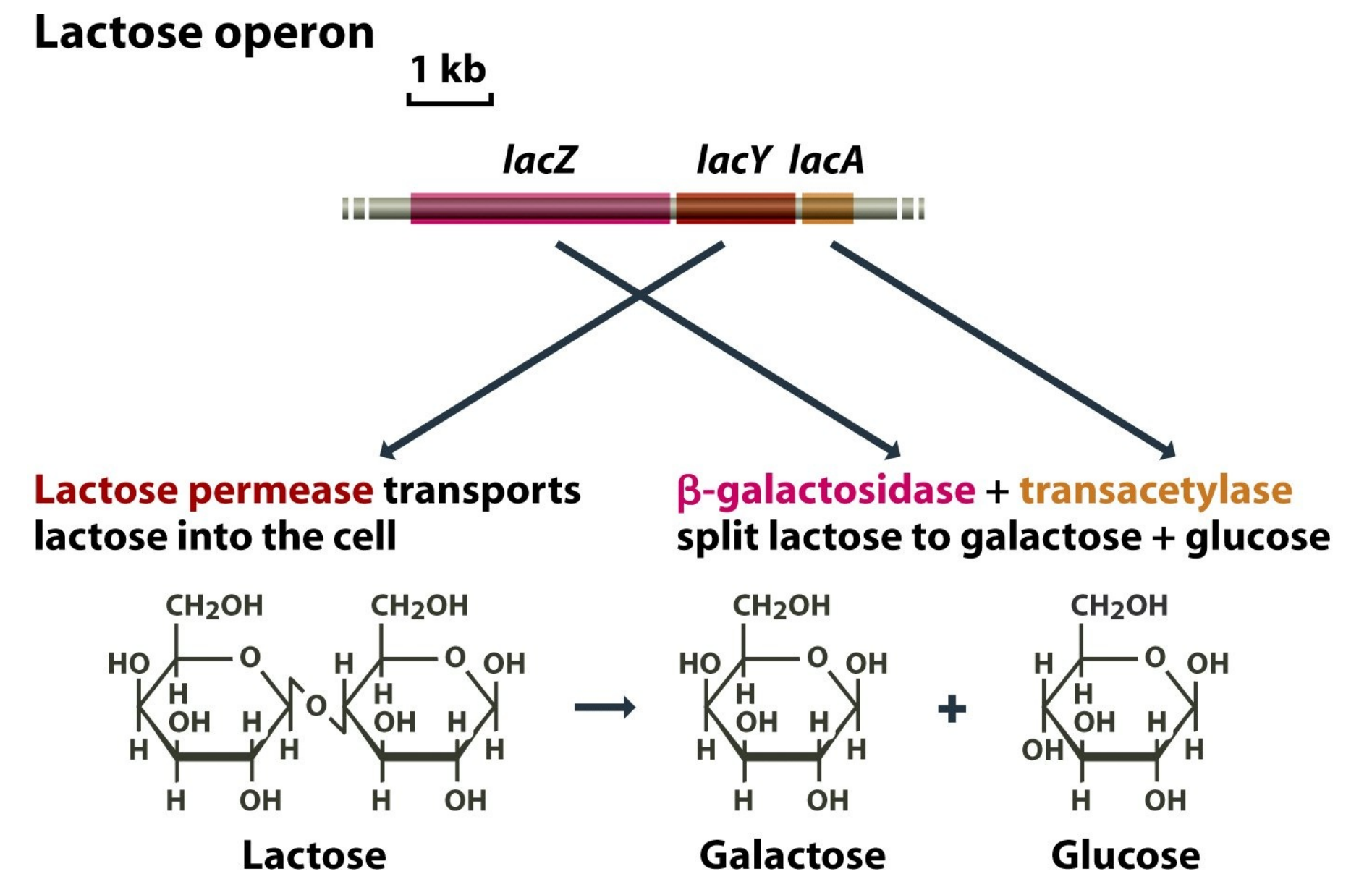
- Regulacja pozytywna
 - czynnik *trans* jest **aktywatorem** – zwiększa ekspresję
- Regulacja negatywna
 - czynnik *trans* jest **represorem** – osłabia ekspresję

Podstawy regulacji genu

- Regulacja indukowalna
 - Sygnał zwiększa (indukuje) ekspresję
- Regulacja reprimowalna
 - Sygnał zmniejsza (reprimuje) ekspresję
- Możliwe są różne układy, np. regulacja negatywna indukowalna
 - Nie należy mylić pojęć: pozytywna/negatywna dotyczy aktywności czynnika *trans* a indukowalna/reprimowalna – odpowiedzi na sygnał

Operony

- Typowy dla bakterii i archeonów system ekspresji
- Policistronowy transkrypt – wspólna ekspresja wielu genów z jednego promotora
- Przeważnie geny związane funkcją, ale są wyjątki



Tryptophan operon

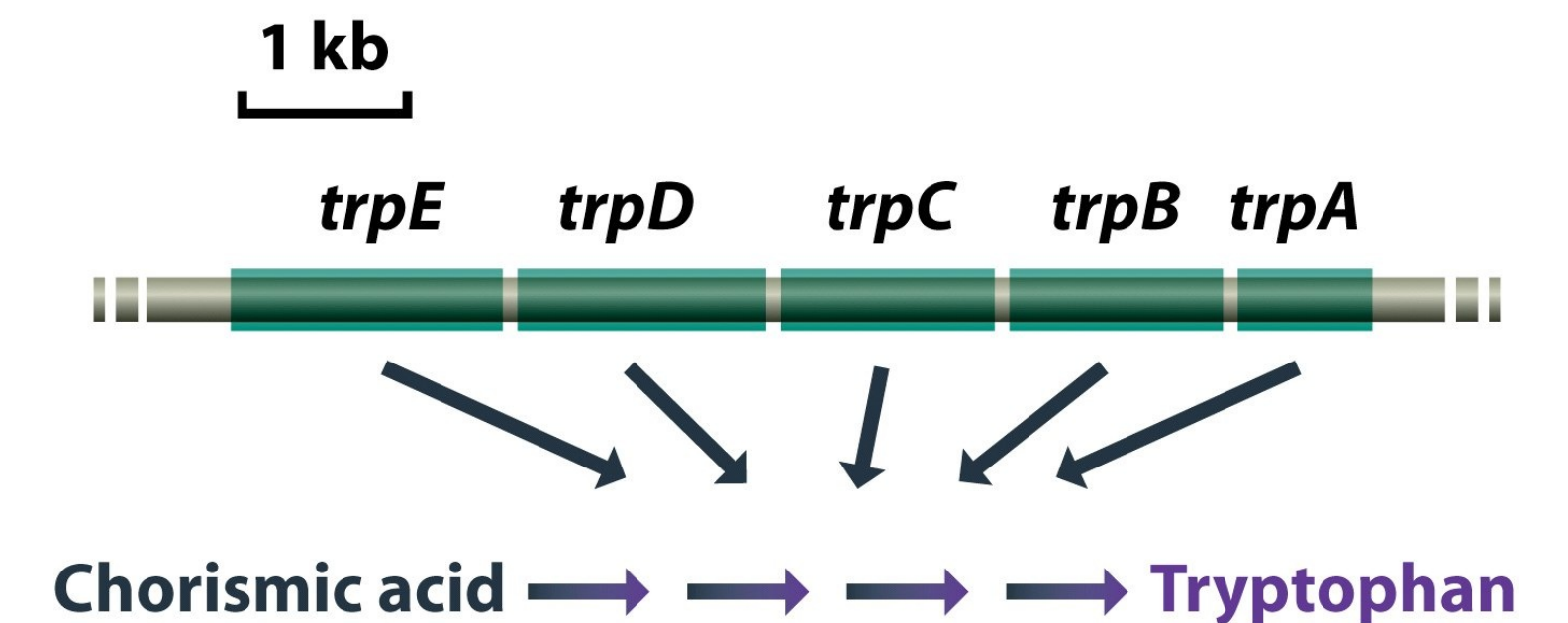
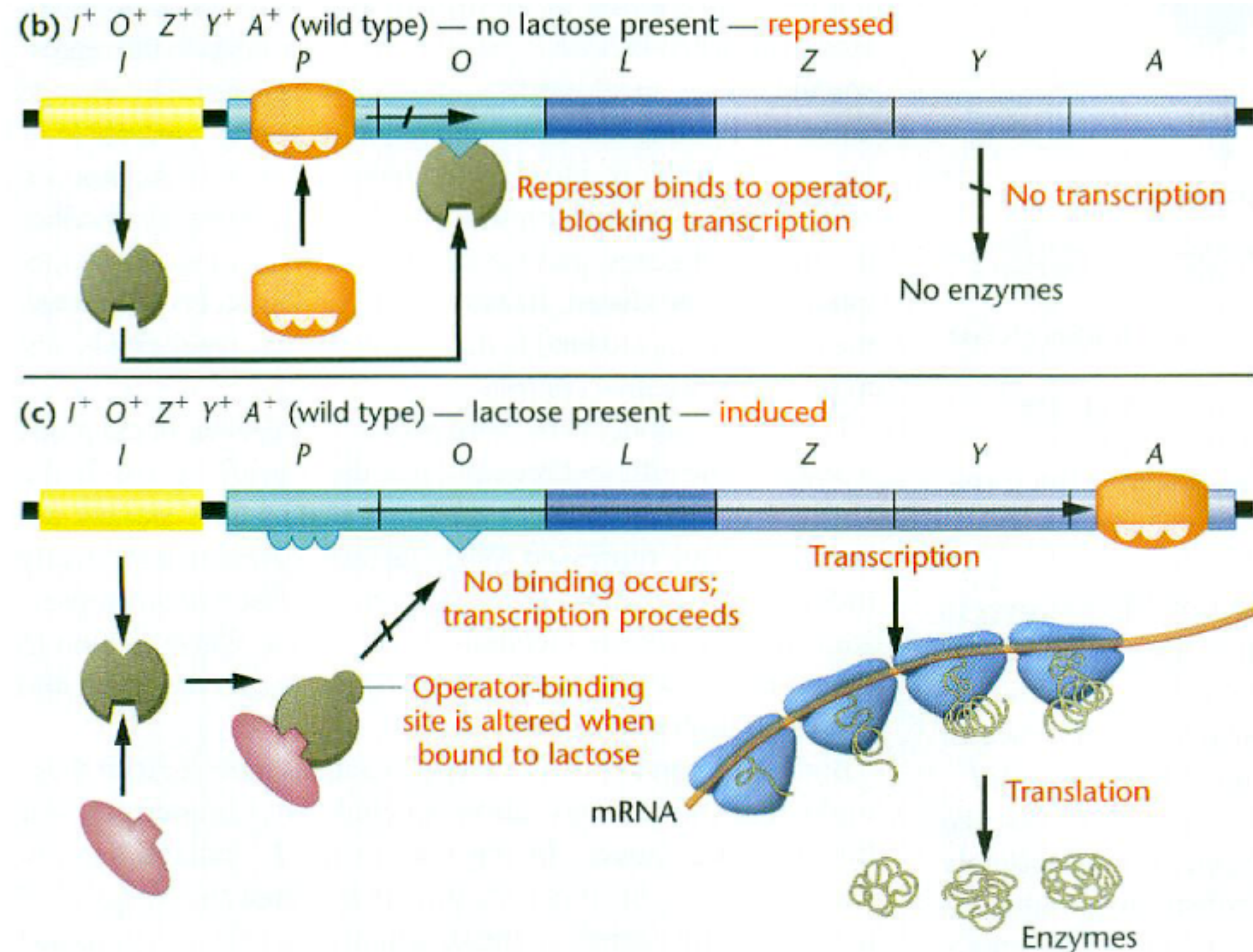


Figure 8.8 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Przykład – operon *lac*



Operon *lac*

- Regulacja na poziomie inicjacji transkrypcji
- Negatywna indukowalna – przez laktozę/represor *lacI*
- Pozytywna – przez glukozę i cAMP/białko CAP
 - Białko to reguluje szereg operonów związanych z wykorzystywaniem źródeł węgla - regulon

Kod genetyczny

- Trójkowy
 - 20 aminokwasów
 - kodony po 3 nukleotydy: $4^3=64$ możliwości
 - Dowody: badanie mutantów insercyjnych i delecyjnych

Kod genetyczny

- Nienakładający się
 - Dowody:
 - założmy sekwencję GTACA: jeden kodon: TAC, pozostałe: GTA i ACA (nakładanie 2 nukleotydów). Przy danym kodonie “centralnym”, możliwe tylko $4^2 = 16$ różnych kombinacji trzyaminokwasowych. W naturze natomiast występują wszystkie możliwe kombinacje (20^3).
 - Pojedyncza zmiana nukleotydowa w sekwencji kodującej zmienia tylko jeden aminokwas, a nie dwa sąsiednie

Kod genetyczny

- Bezprzecinkowy
- Zdegenerowany
 - 3 kodony STOP, pozostałe 61 kodonów koduje 20 aminokwasów
 - wiele (do 6) różnych kodonów może kodować ten sam aminokwas, ale...

Kod genetyczny

- Kod jest **jednoznaczny**
- Dany kodon zawsze koduje jeden i tylko jeden aminokwas
 - Degeneracja oznacza, że jeden aminokwas może być kodowany przez więcej kodonów

Kod genetyczny

		Second base of codon					
		U	C	A	G		
First base of codon	U	UUU Phenylalanine phe UUA Leucine leu	UCU Serine ser UCG	UAU Tyrosine tyr UAA STOP codon UAG	UGU Cysteine cys UGA STOP codon UGG Tryptophan trp	U	Third base of codon
	C	CUU Leucine leu CUC CUA CUG	CCU Proline pro CCC CCA CCG	CAU Histidine his CAA Glutamine gin CAG	CGU Arginine arg CGC CGA CGG	C	
	A	AUU Isoleucine ile AUC AUA AUG Methionine met (start codon)	ACU Threonine thr ACC ACA ACG	AAU Asparagine asn AAC AAA Lysine lys AAG	AGU Serine ser AGC AGA Arginine arg AGG	A	
	G	GUU Valine val GUC GUA GUG	GCU Alanine ala GCC GCA GCG	GAU Aspartic acid asp GAC GAA Glutamic acid glu GAG	GGU Glycine gly GGC GGA GGG	G	

Uniwersalność kodu

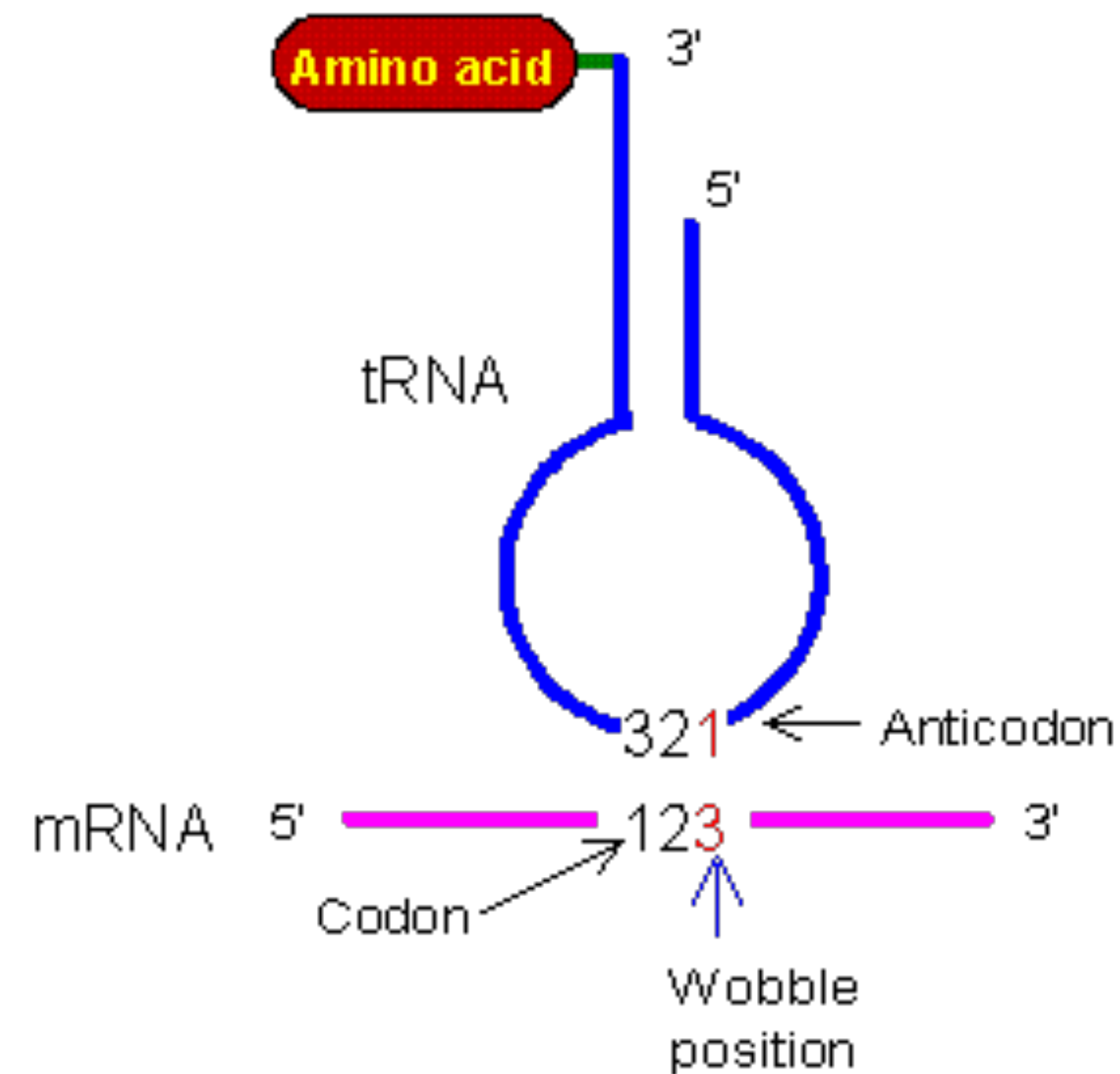
- Kod genetyczny jest zasadniczo **taki sam u wszystkich organizmów na Ziemi**
- Nieznaczne odstępstwa przez ewolucję pojedynczych tRNA
 - kody organellarne (np. UGA - Trp a nie stop w mitochondriach)
 - niektóre orzęski
 - nieliczne grzyby (CUG Ser a nie Leu u *Candida*)

Regularności w kodzie

- Trzecia pozycja kodonu najmniej znacząca
 - (np. UCx – Ser)
- Aminokwasy o podobnych właściwościach często z podobnymi kodonami
 - Np.
 - AAA, AAG: lizyna; AGA, AGG: arginina
 - UCx: seryna; ACx: treonina

Parowanie *wobble*

- W 3 pozycji kodonu (1 antykodonu) dozwolone parowanie:
- G-U
- I-U/A/C (I – inozyna)
- Tzw. zasada tolerancji Cricka

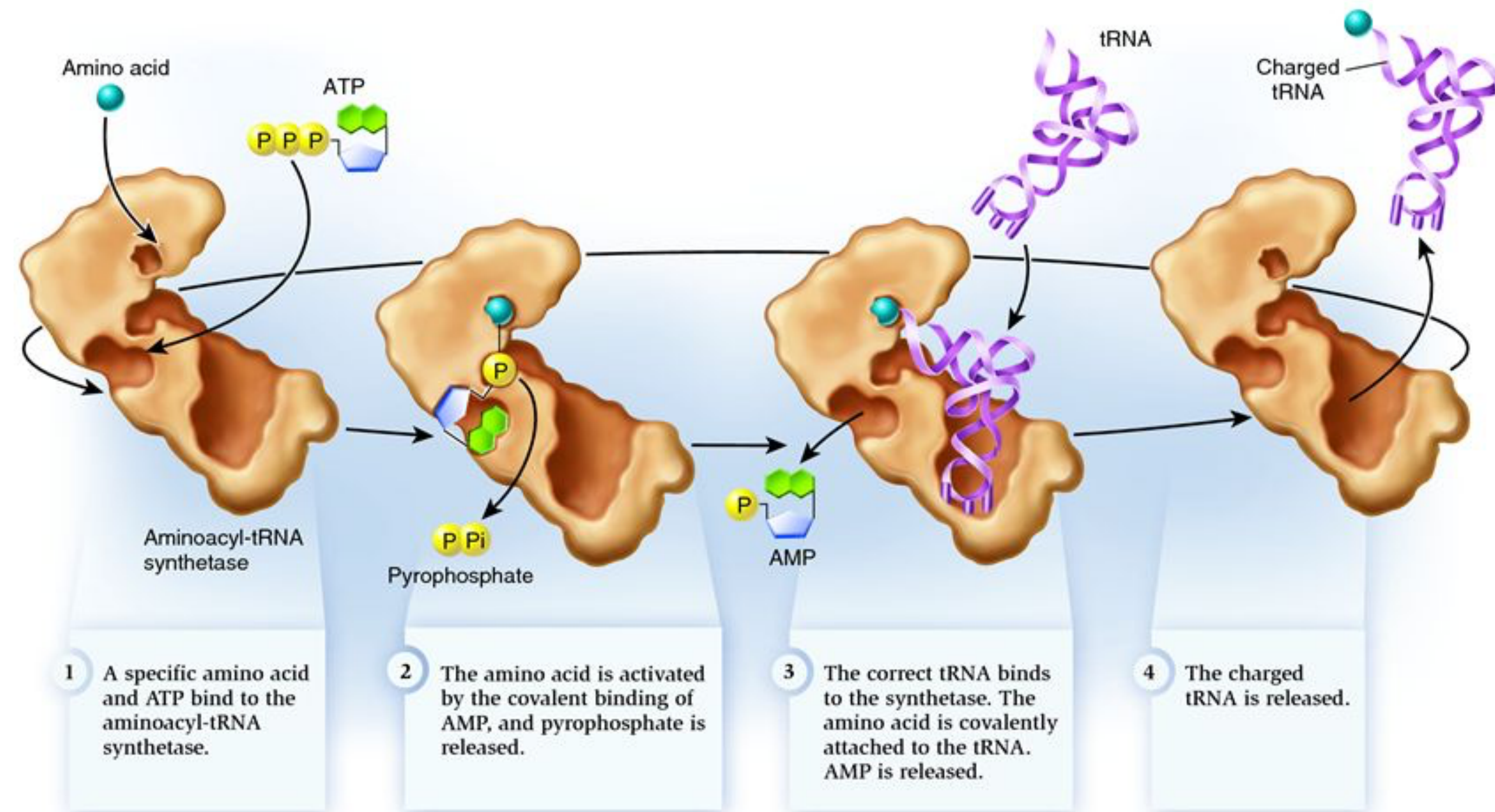


Wobble bases					
tRNA	C	A	G	U	I
mRNA	G	U	C	A	C
			U	G	A
					U

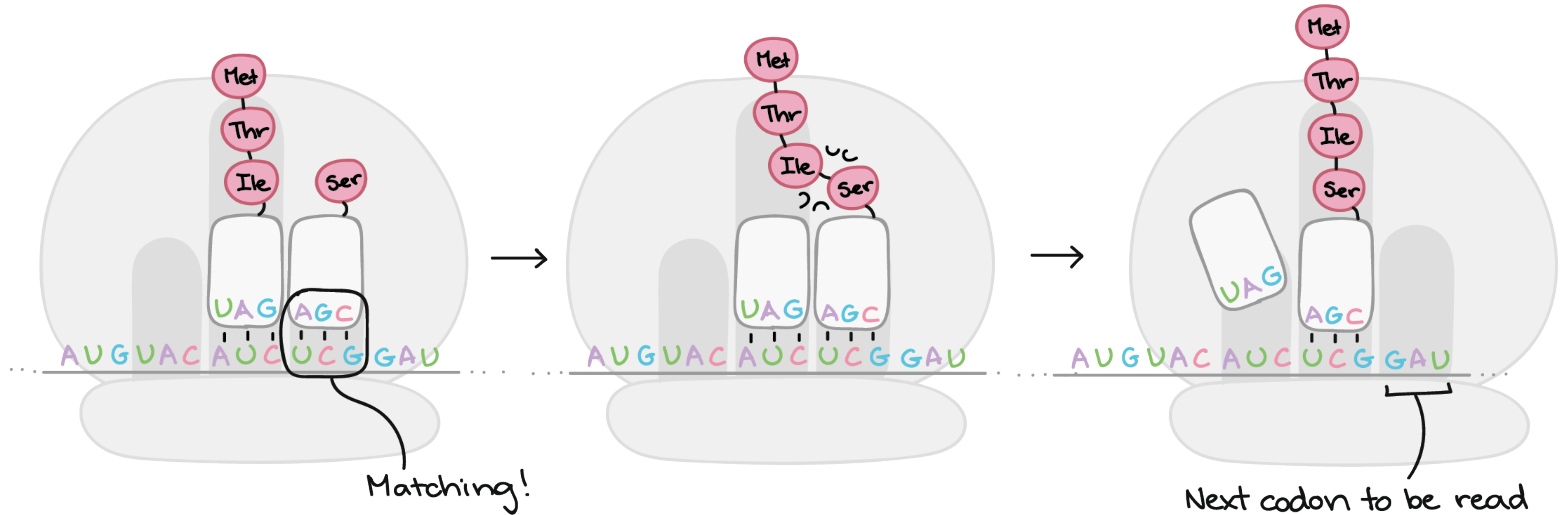
Wobble bases				
mRNA	C	A	G	U
tRNA	G	U	C	A
	I	I	U	G
				I

Aminoacylacja tRNA

- Przyłączanie aminokwasu do tRNA - aminoacylo-tRNA transferazy (syntetazy)
 - specyficzne dla aminokwasu
 - zwykle rozpoznawany nie jest antykodon, tylko elementy struktury tRNA
 - istnieje aktywność korekcyjna (usunięcie niewłaściwie przyłączonego aminokwasu przez transferazę) - wierność rzędu 10^{-4}



Translacja



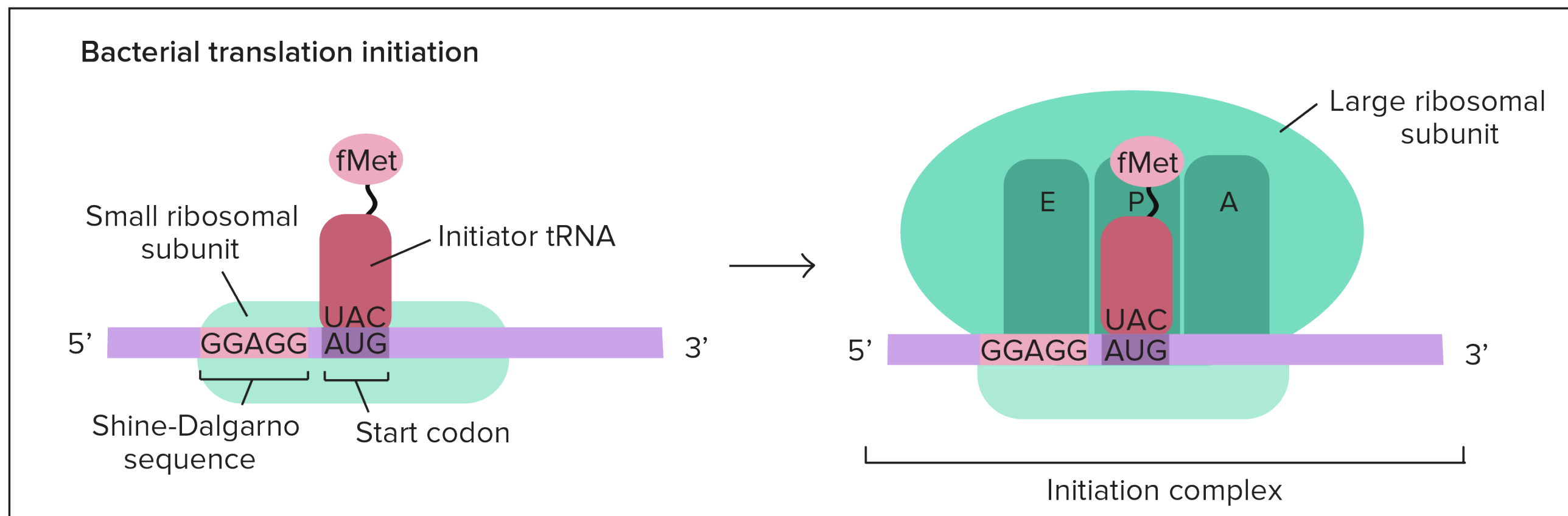
tRNA binds to exposed codon.

New amino acid attaches to polypeptide chain.

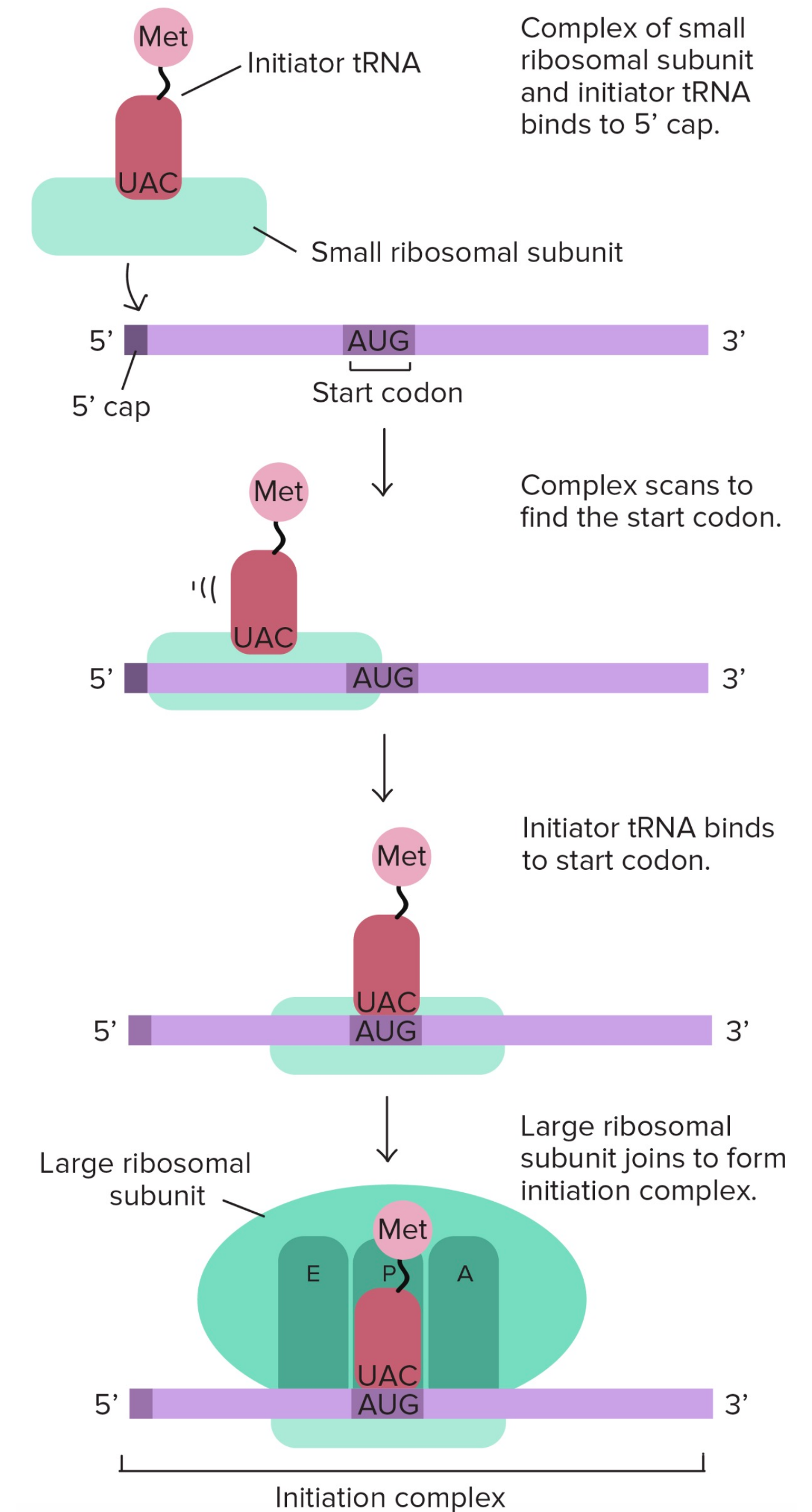
Ribosome shifts one codon over on the mRNA.

Inicjacja translacji

- Mała podjednostka rybosomu wiąże się z mRNA, następnie przyłącza się duża podjednostka
- u bakterii decyduje interakcja rRNA z sekwencją Shine-Dalgarno w mRNA
- u Eukaryota - czapeczka (kap) mRNA
- Kodon start - zwykle AUG (Met, u bakterii fMet)

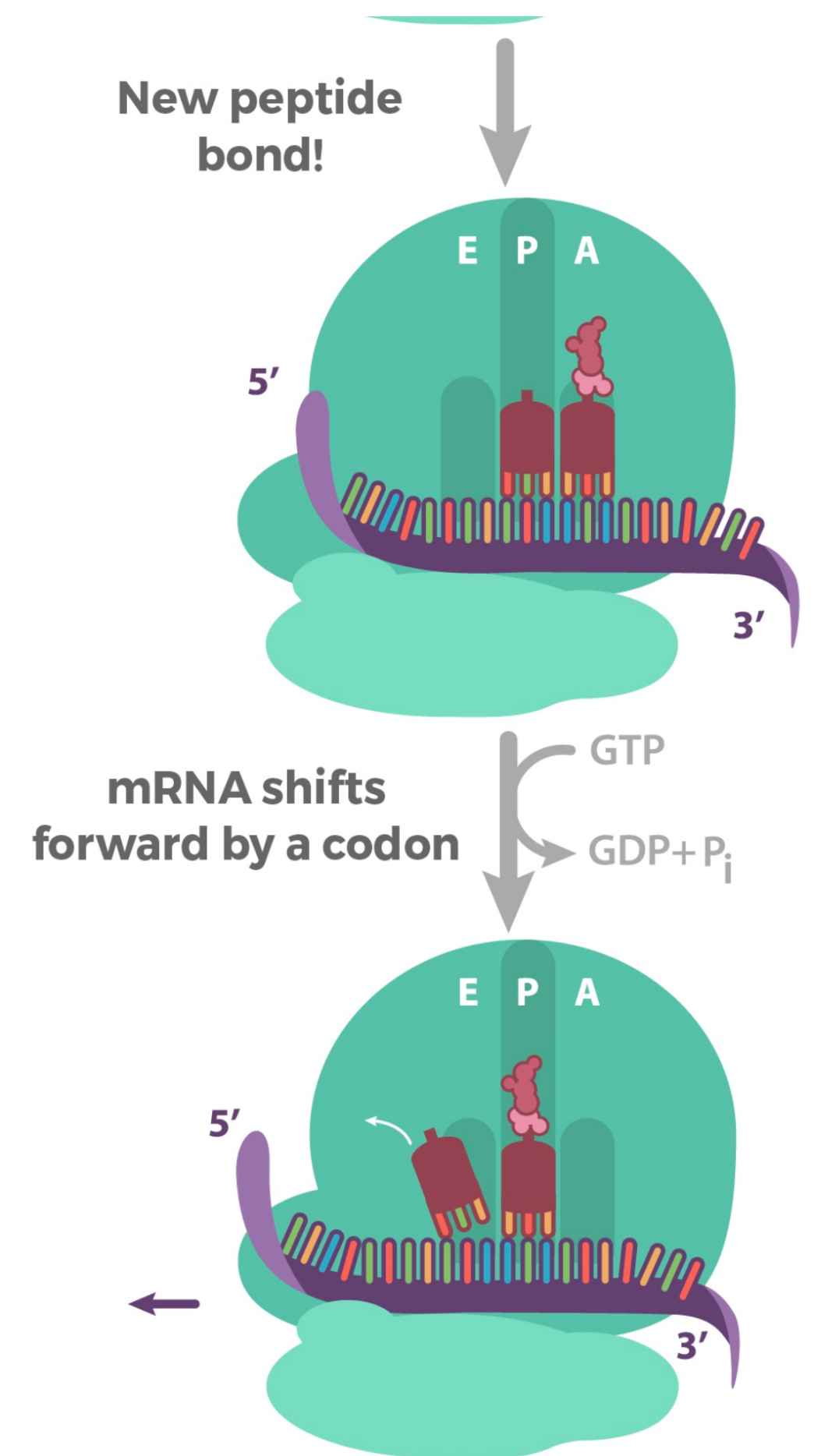
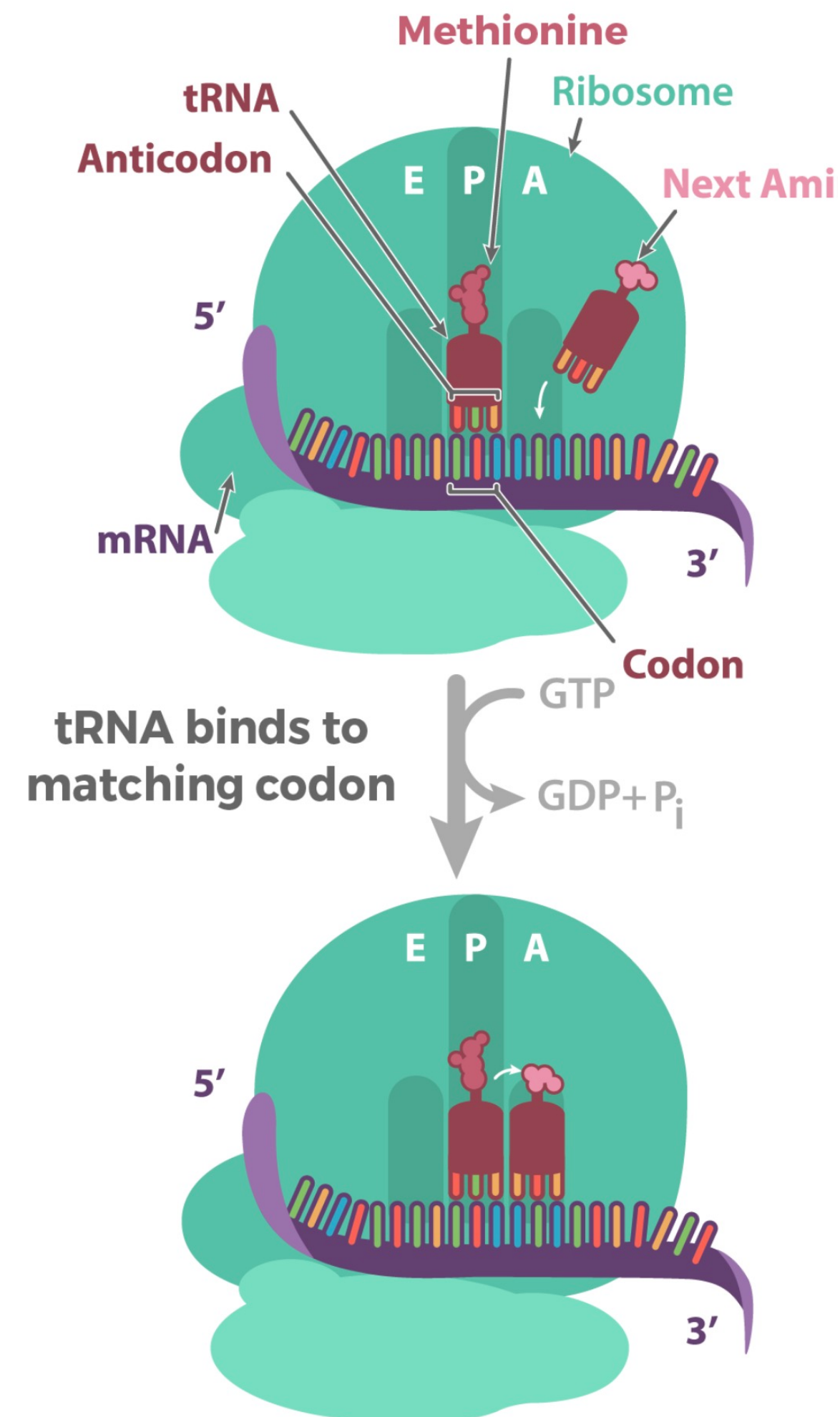


Eukaryotic translation initiation



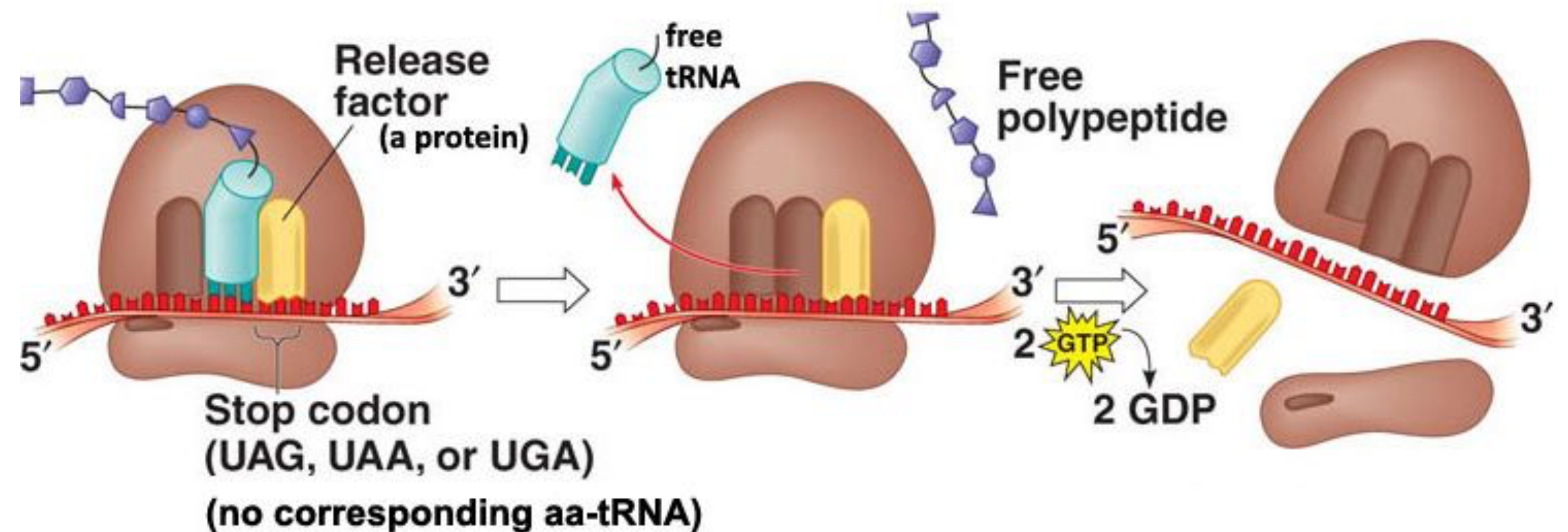
Elongacja

- Energię zapewnia hydroliza GTP przez czynnik elongacyjny
- u bakterii EF-G
- u Eukariontów eEF-2
- Tworzenie wiązania peptydowego - aktywność peptydylotransferazy (rybosom)



Terminacja

- Kodon stop - nie ma tRNA
- Konkurencja o wiązanie między tRNA a czynnikiem uwalniającym RF
- RRF - *ribosome recycling factor* - rozdziela podjednostki



Nobel 2009 - chemia

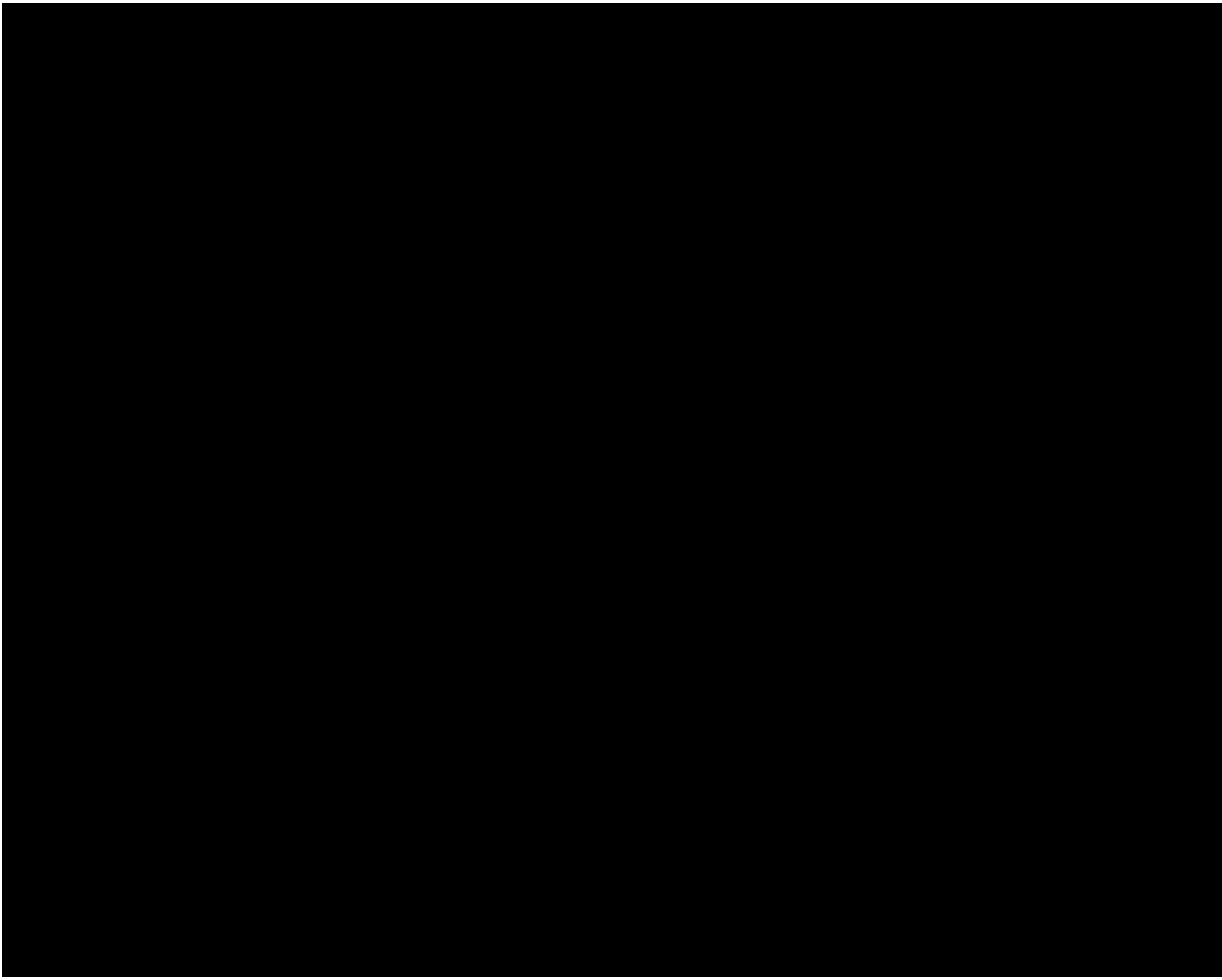


The Nobel Prize in Chemistry 2009

"for studies of the structure and function of the ribosome"

 Photo: MRC Laboratory of Molecular Biology Venkatraman Ramakrishnan 🏆 1/3 of the prize United Kingdom MRC Laboratory of Molecular Biology Cambridge, United Kingdom	 Credits: Michael Marsland/Yale University Thomas A. Steitz 🏆 1/3 of the prize USA Yale University New Haven, CT, USA; Howard Hughes Medical Institute	 Credits: Micheline Pelletier/Corbis Ada E. Yonath 🏆 1/3 of the prize Israel Weizmann Institute of Science Rehovot, Israel
--	---	--

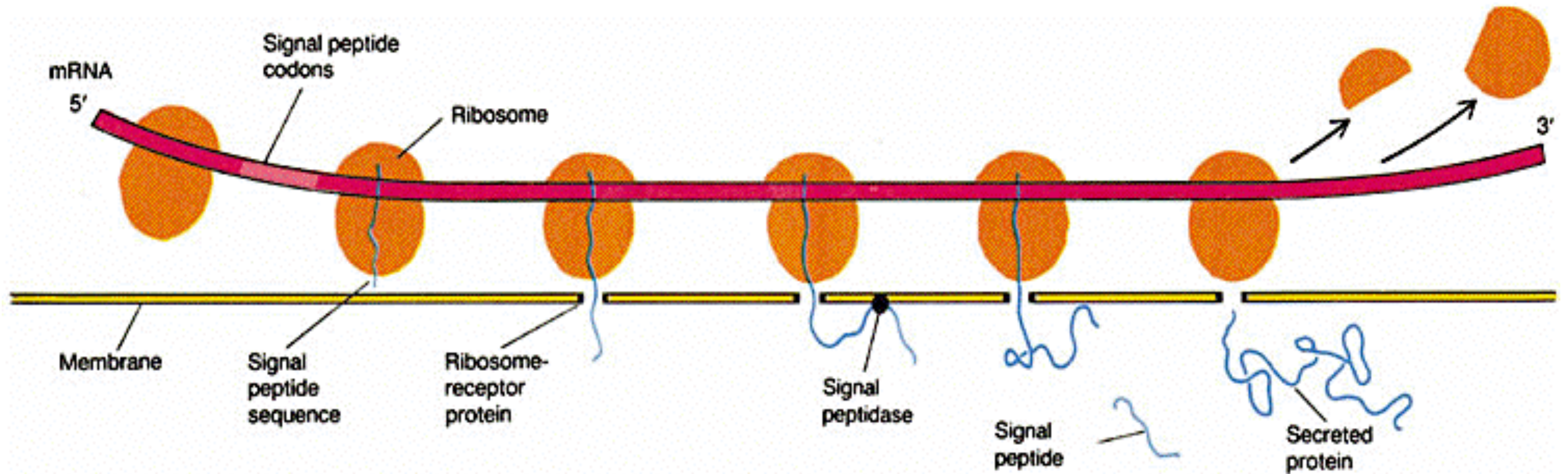




Animacje i struktury

<http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/groups/ribo/>

Sekwencja białka zawiera sygnały sortowania do przedziałów komórki



Kierowanie do ER i szlaku wydzielniczego zachodzi równocześnie z translacją
Kierowanie do mitochondrium zachodzi po translacji

Białka podlegają złożonym modyfikacjom

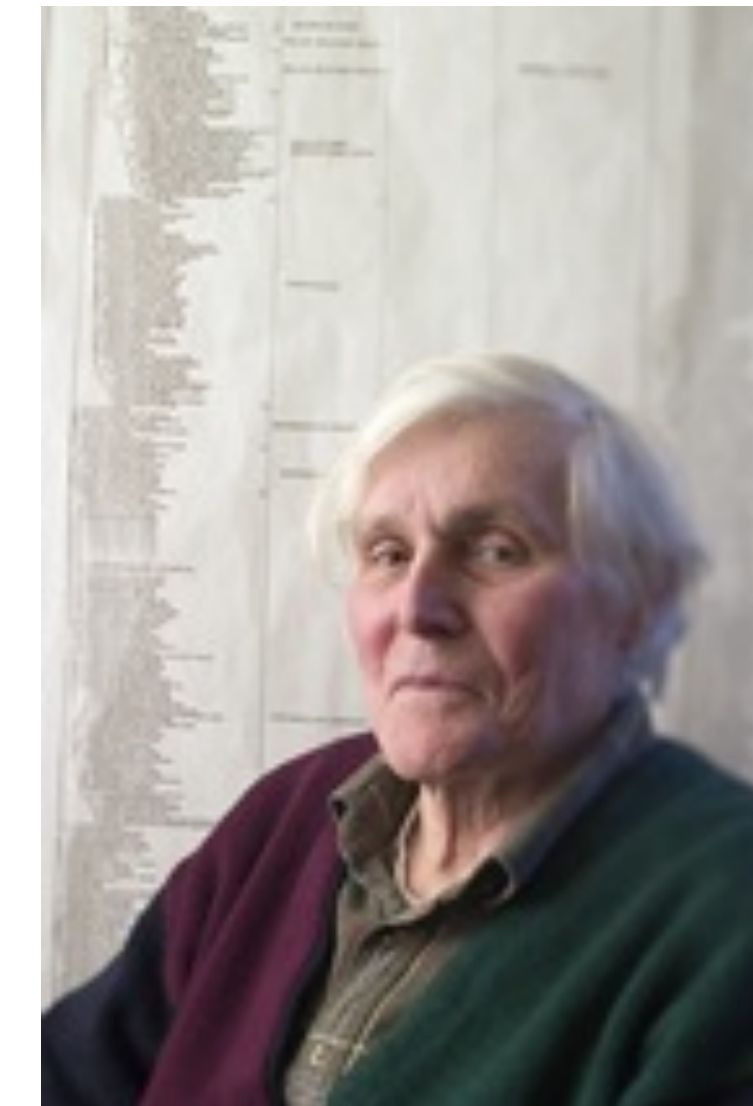
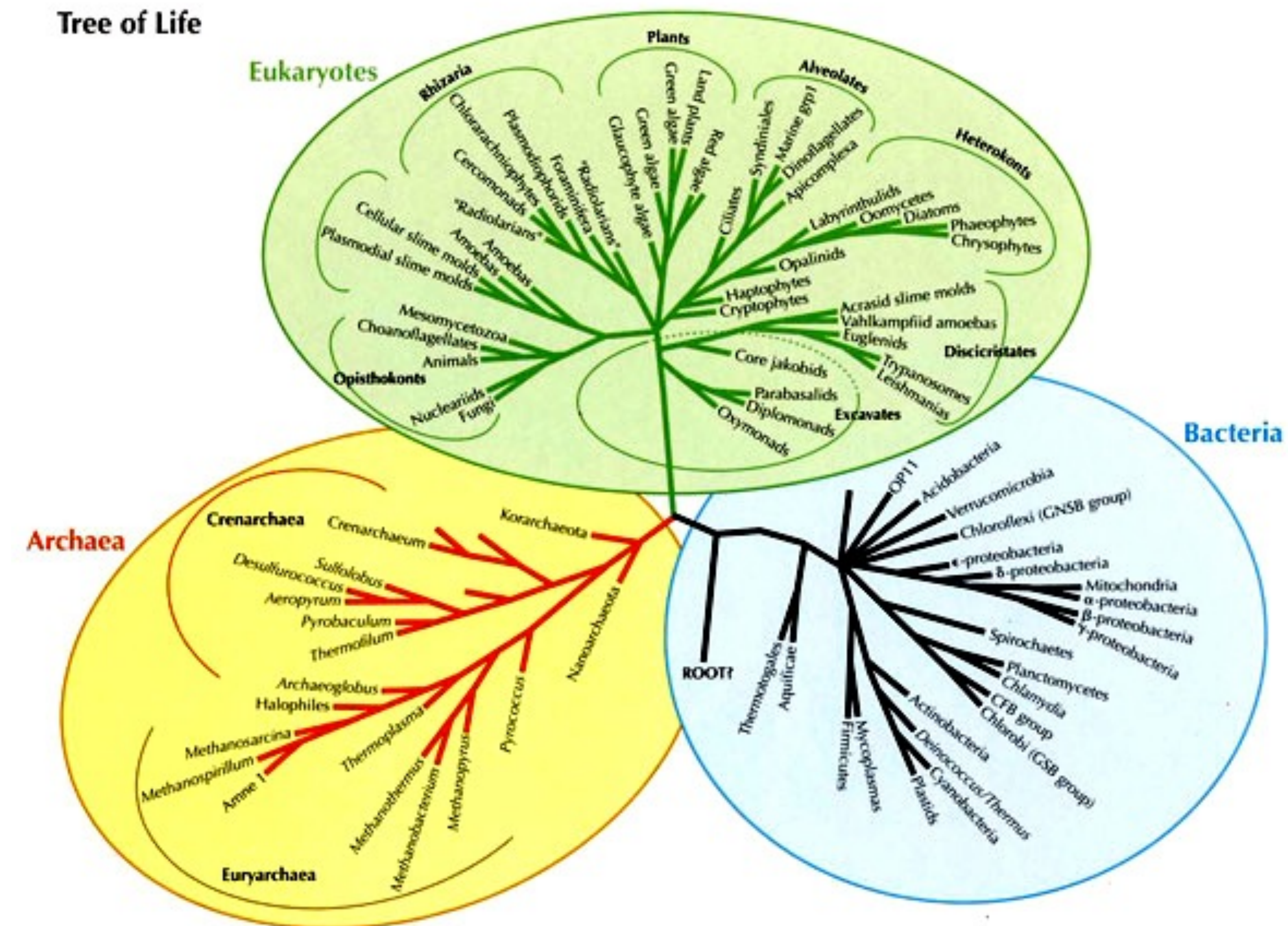
- Fałdowanie – wspomagane przez białka opiekuńcze
 - Białka opiekuńcze odgrywają ważną rolę w patogenezie wielu chorób (nowotwory, choroba Huntingtona i inne choroby agregacyjne, choroba Parkinsona i Alzheimerera, mukowiscydoza)
- Modyfikacje chemiczne (fosforylacja, glikozylacja itp.)
- Ubikwitynacja i degradacja

Prokaryota

Genetyka molekularna i genomika

Literatura

- Allison, rozdziały 5.3, 10
- Brown, rozdział 8, 12 (fragmenty dotyczące bakterii)



Carl Woese
(1928-2012)

Genomy bakterii i archeonów

- Od 0,5 (mykoplazmy) do ~ 5 Mb
 - Wyjątkowo 9 Mb (*Bradyrhizobium japonicum*) – 13 Mb (*Sorangium cellulosum*)
 - archeony z reguły 1,5-2,5 Mb
- Gęste upakowanie genów (~1 gen/kb)
 - Krótkie obszary międzygenowe i regulatorowe
 - Tylko sporadycznie występują introny
 - Kodowane białka krótsze, niż u Eukaryota
- Tworzy z białkami upakowaną strukturę nukleoidu

Gęste upakowanie genomu *E. coli*

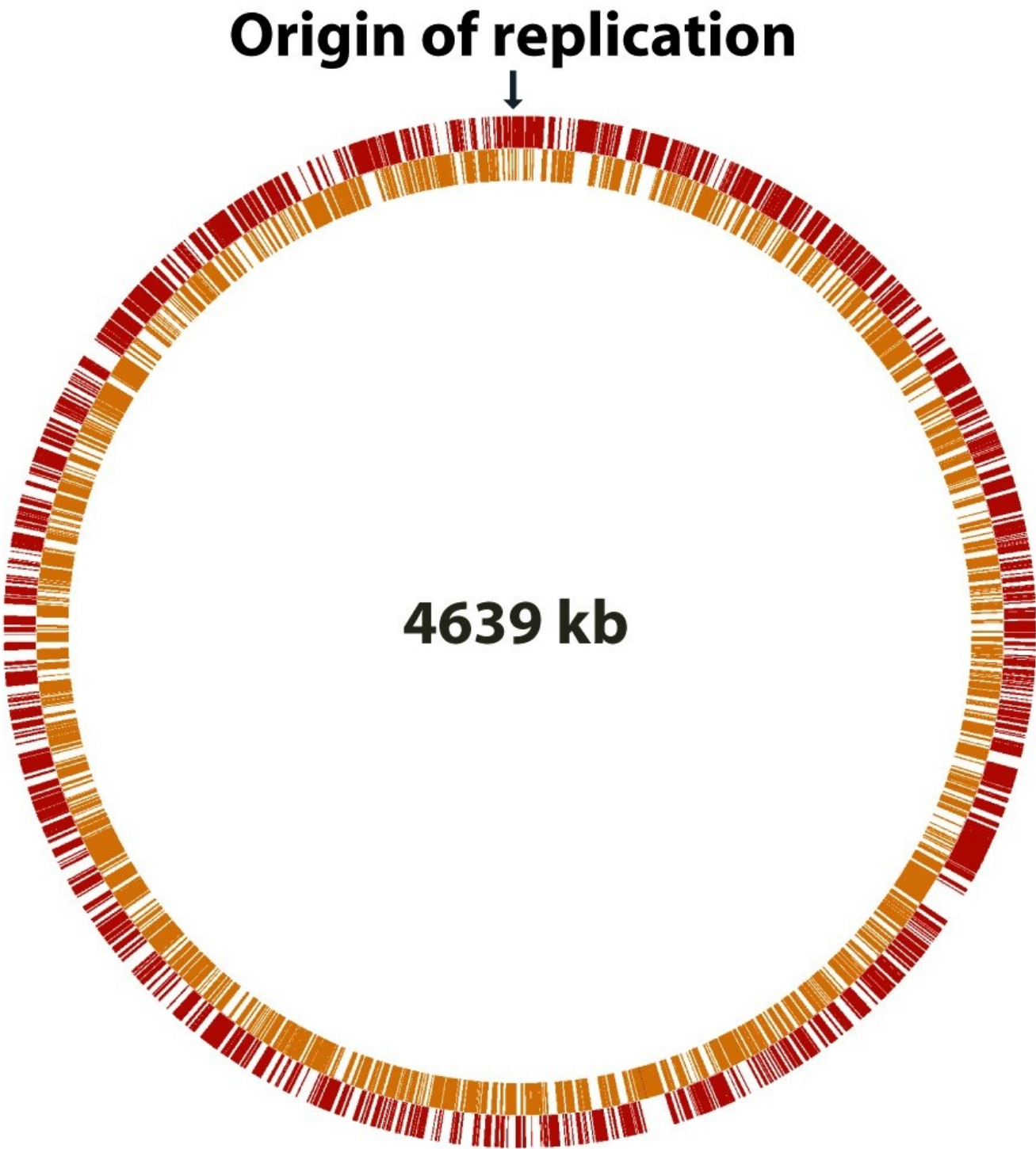


Figure 8.6 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

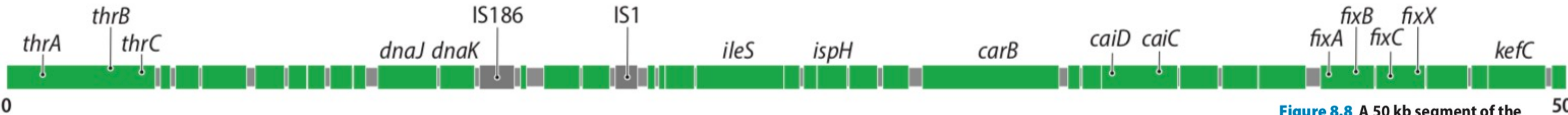


Figure 8.8 A 50 kb segment of the *Escherichia coli* genome. The segment

Upakowanie DNA

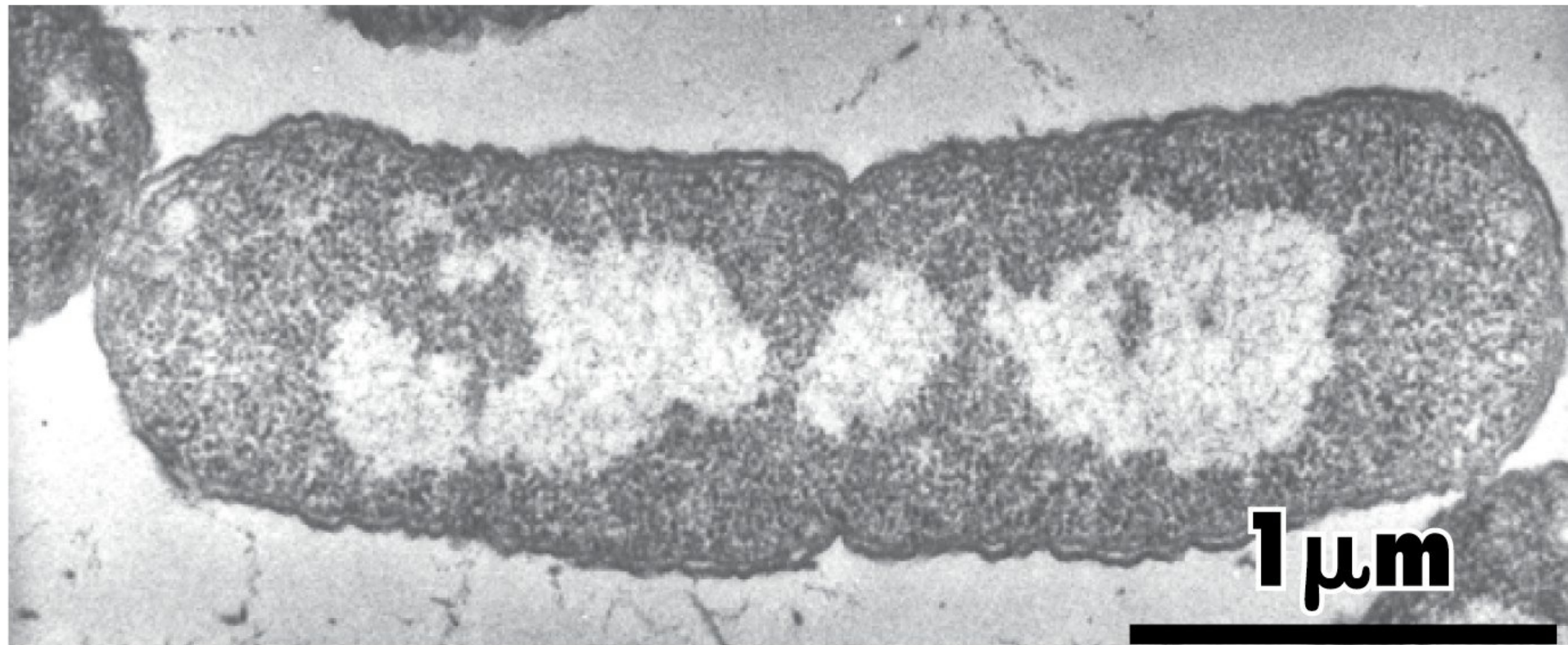


Figure 8.1 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

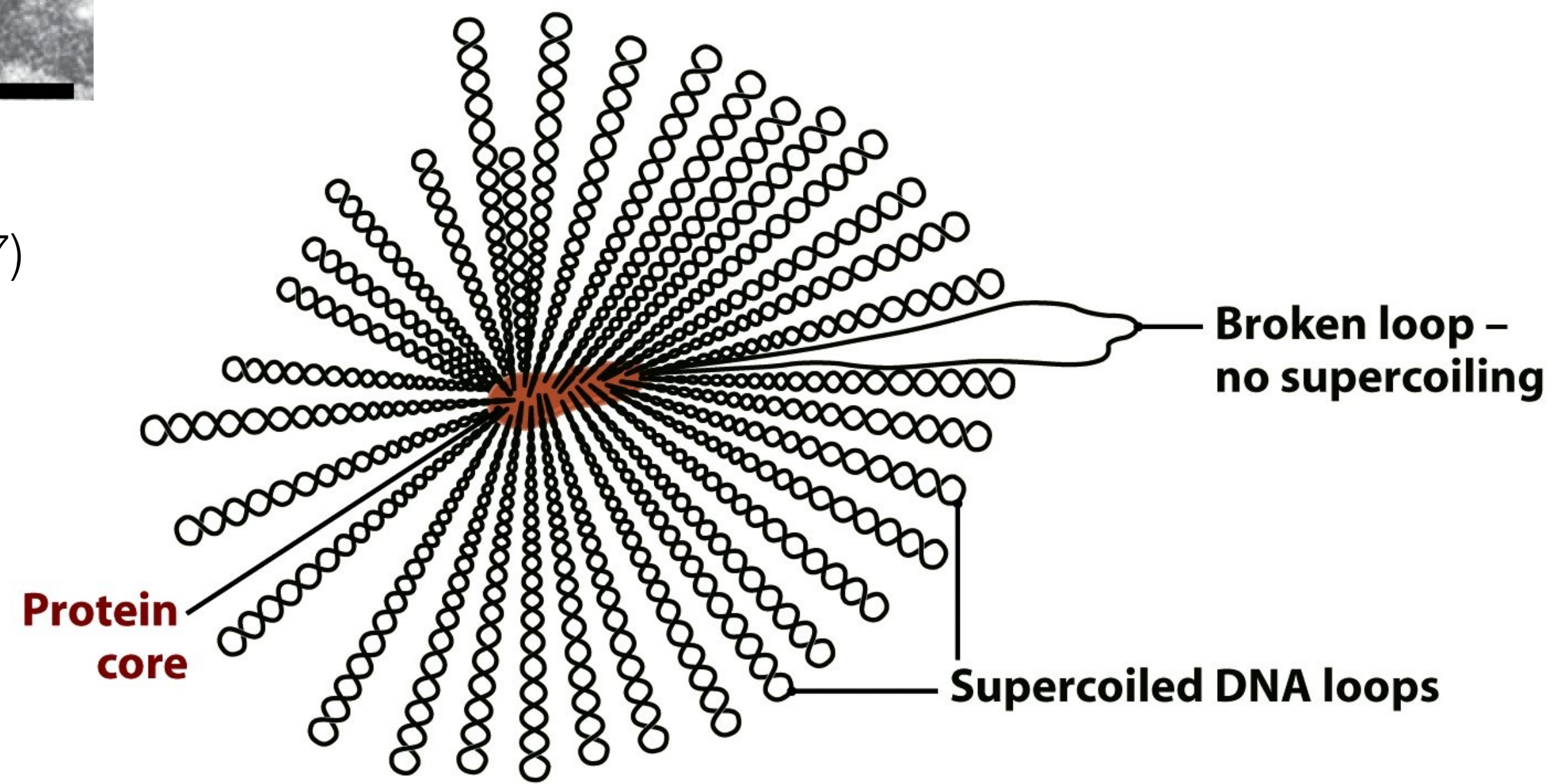


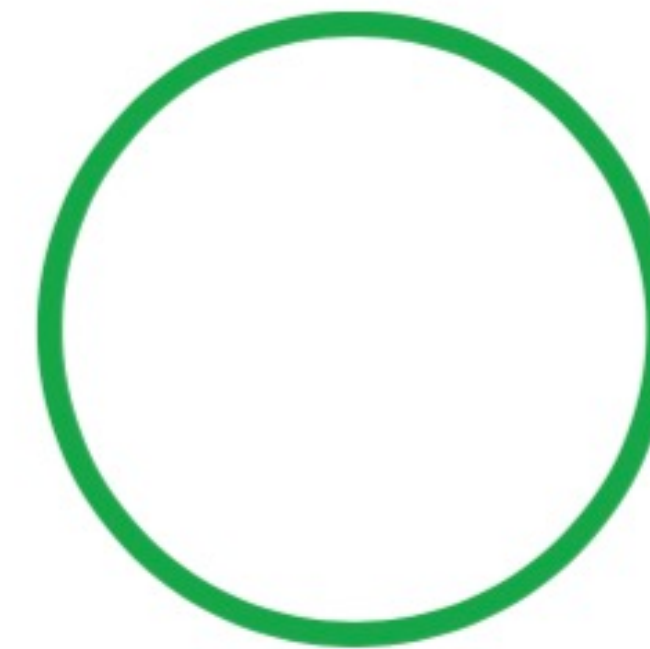
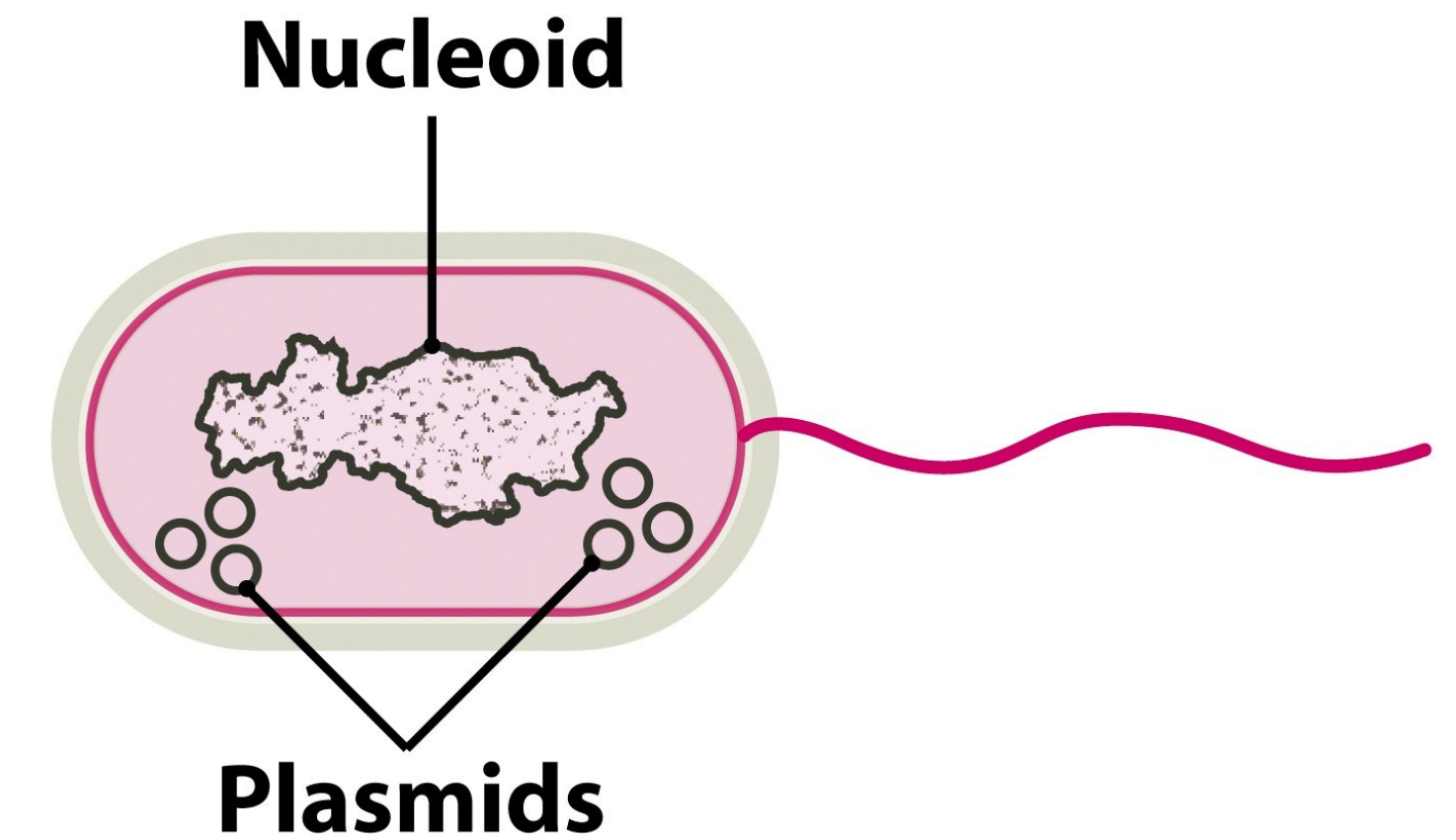
Figure 8.3 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Gen prokariotyczny

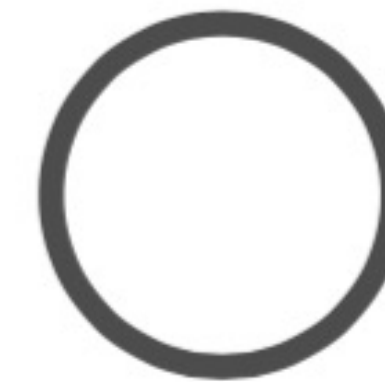
- Introny nieliczne, w mRNA praktycznie niespotykane
- Łatwo zidentyfikować gen w sekwencji DNA - **otwarta ramka odczytu** (ORF) od ATG do pierwszego STOP

Organizacja genomu

- Typowa – pojedynczy “chromosom” kolisty
- Możliwe liczne warianty
 - Więcej cząsteczek kolistych
 - Cząsteczki liniowe
- Plazmidy mogą być koliste lub liniowe
- Plazmidy zwykle są opcjonalne, mogą też występować u wielu gatunków
- Rozróżnienie – chromosomy zawierają geny metabolizmu podstawowego, niezbędne do życia, plazmidy – nie
- Chromidy - właściwości pośrednie



chromosome –
located in nucleoid,
carries essential genes



chromid – uses plasmid
partitioning system, carries
essential genes



plasmid – uses plasmid
partitioning system, carries
nonessential genes

Ewolucyjna zmienność Prokaryota

- Przy podobnej liczbie genów ogromna różnorodność zestawu genów
- Duże różnice między szczepami
 - np. *E. coli* O157:H7 vs. *E. coli* K12 - ~1300 genów w O nie w K i ~500 w K nie w O(!)
- Częsty poziomy transfer genów (do kilkunastu procent genomu), nawet między odległymi gatunkami
- Problem definicji gatunku

Genomy bakterii są dynamiczne

- Szczepy bakterii zaliczane do tego samego gatunku znacząco różnią się zawartością genów
- Genom rdzeniowy (*core genome*) – wspólny dla wszystkich szczepów
- Pangenom – zbiór wszystkich genów (nie występują jednocześnie)

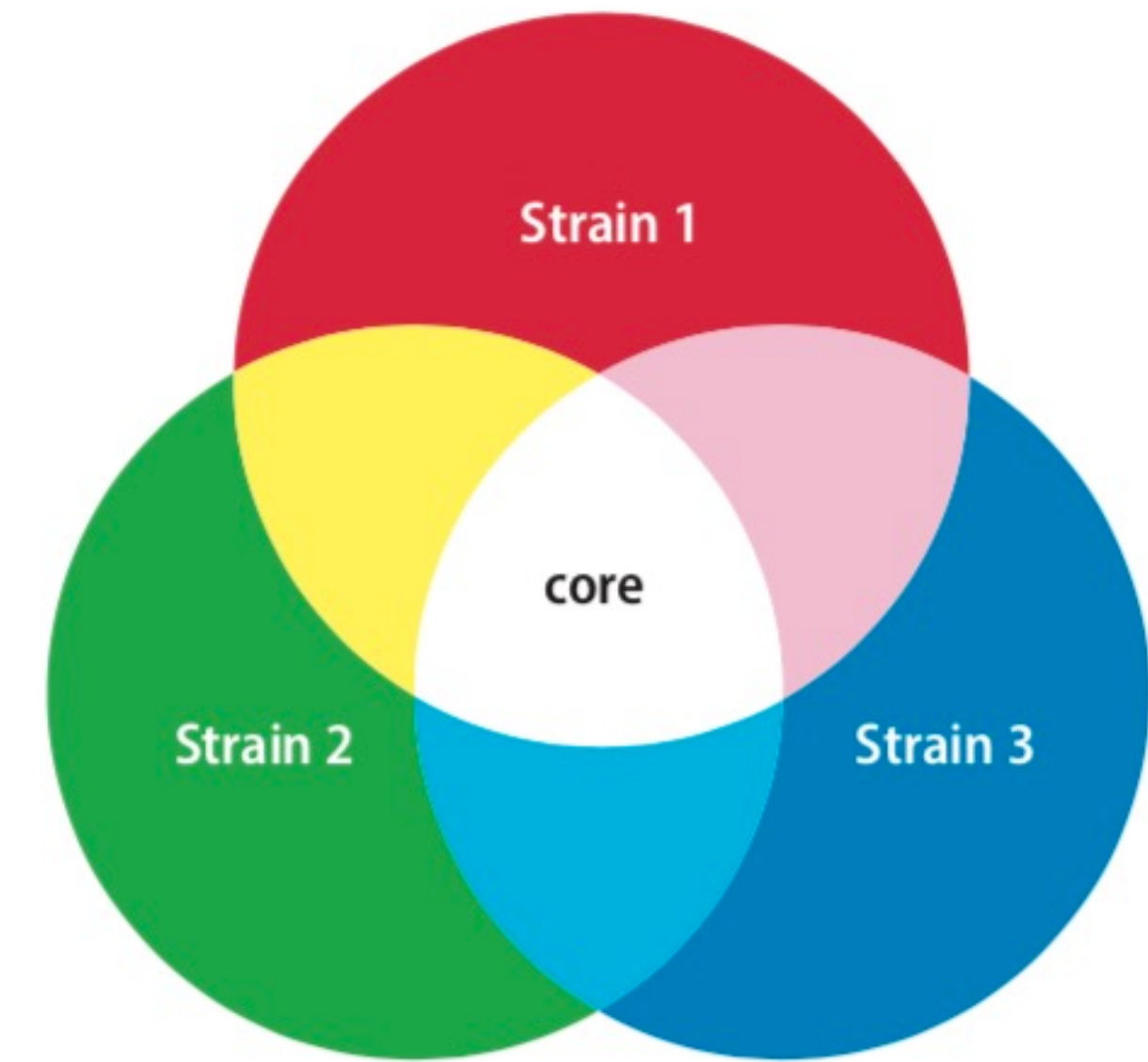
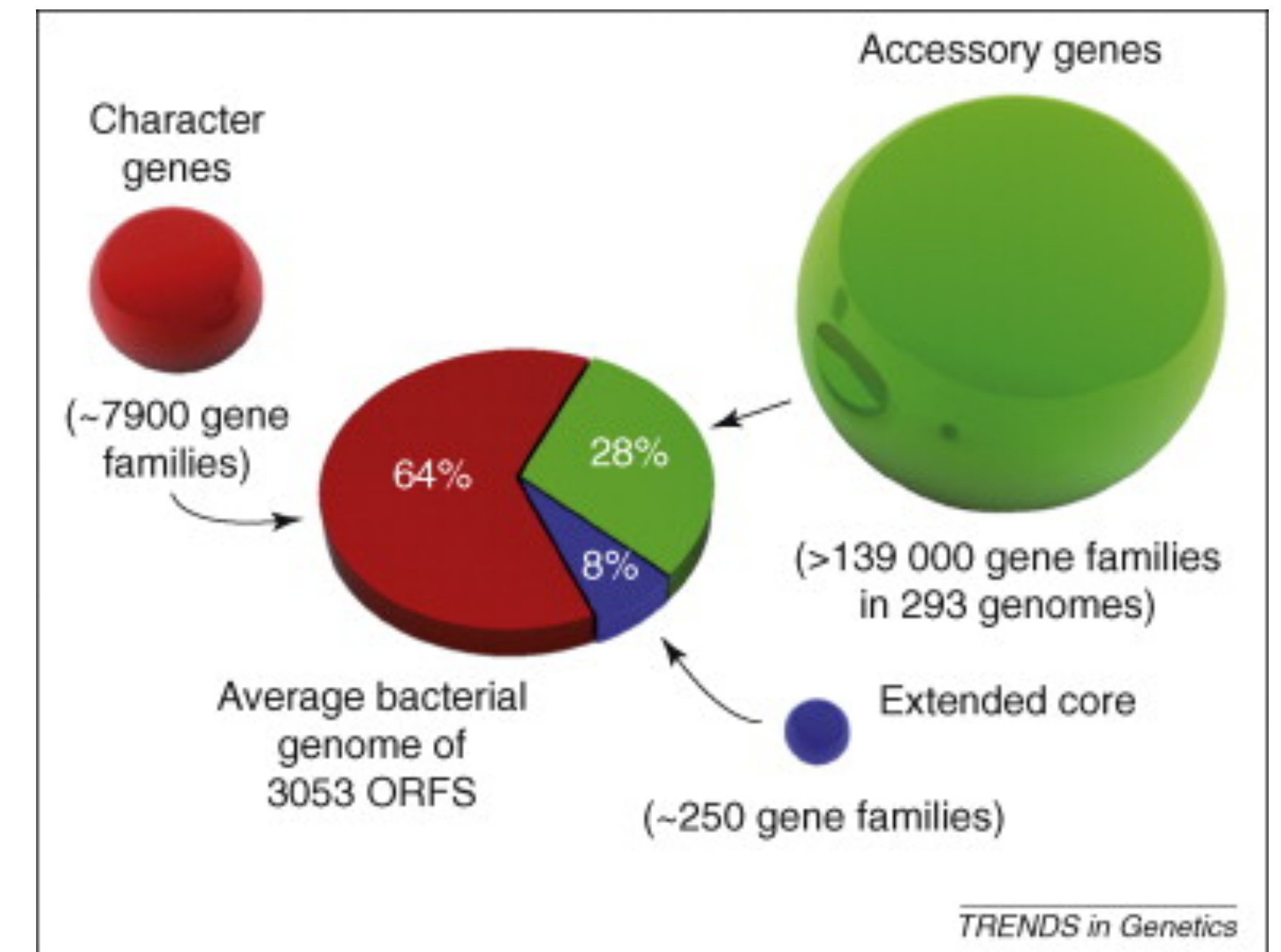


Figure 8.10 The pan-genome concept.



Co to jest *Escherichia coli* ?

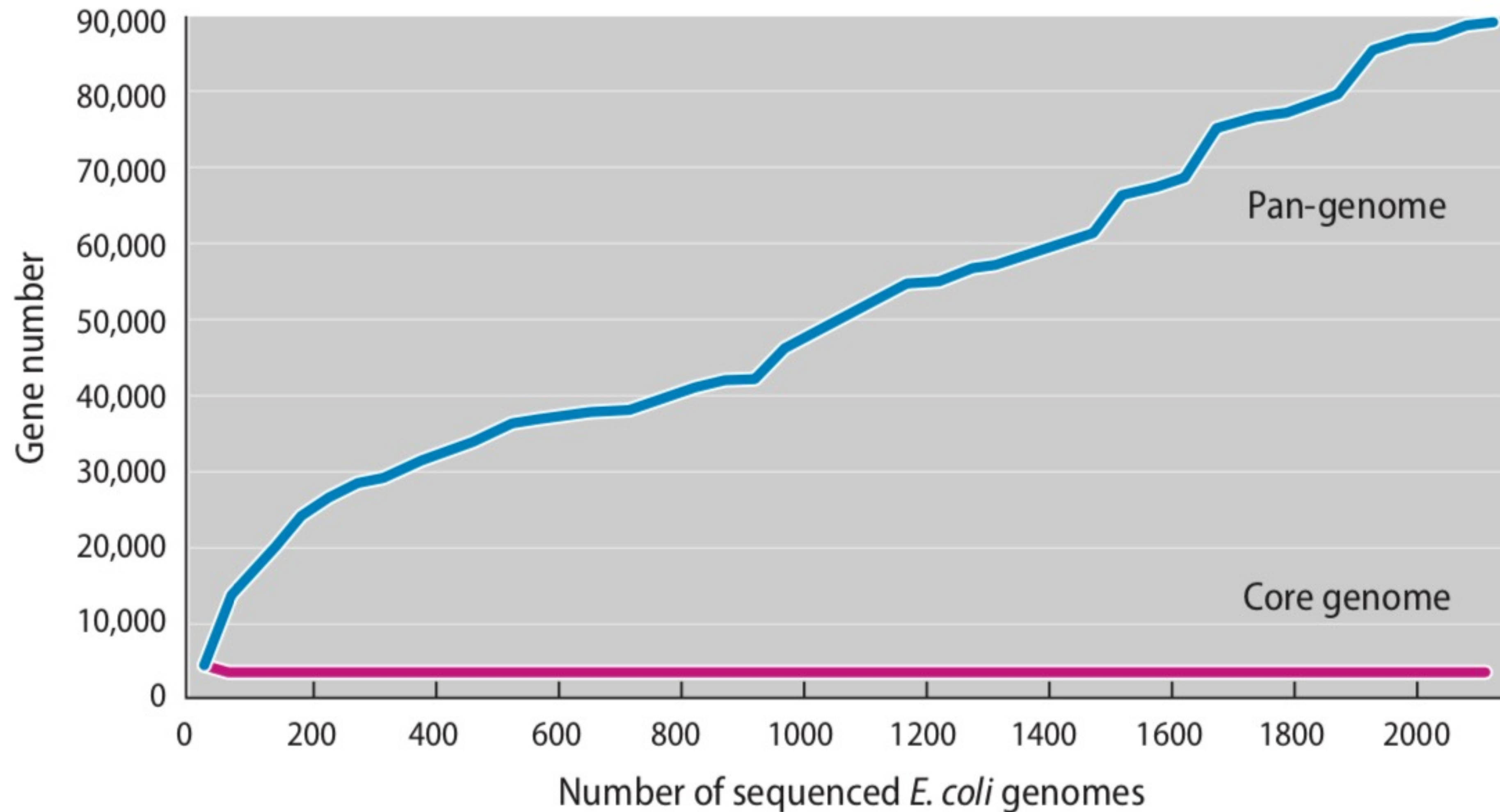
Dla 61 zsekwencjonowanych szczepów:

- W sumie 4157 do 5315 genów w genomie szczepu
- Genom rdzeniowy – 933 geny
- Reszta – geny “pomocnicze” wybrane spośród ~15 000 genów
- Cały pangenom: ~ 16 000 genów

Zhaxybayeva & Doolittle (2011) Curr Biology 21(7): R242-R246



Wielkość pangenu rośnie z liczbą poznanych genomów



Poziomy przepływ genów - bakterie

- U Bacteria i Archaea poziomy przepływ informacji genetycznej jest powszechny
 - plazmidy i ruchome elementy genetyczne
 - inne fragmenty DNA
- Równowaga pomiędzy naturalnymi barierami (np. system restrykcji-modyfikacji) a systemami ułatwiającymi wymianę DNA
- Utrudnia analizy filogenetyczne (różne drzewa różnych genów)

Adaptacje dzięki HGT

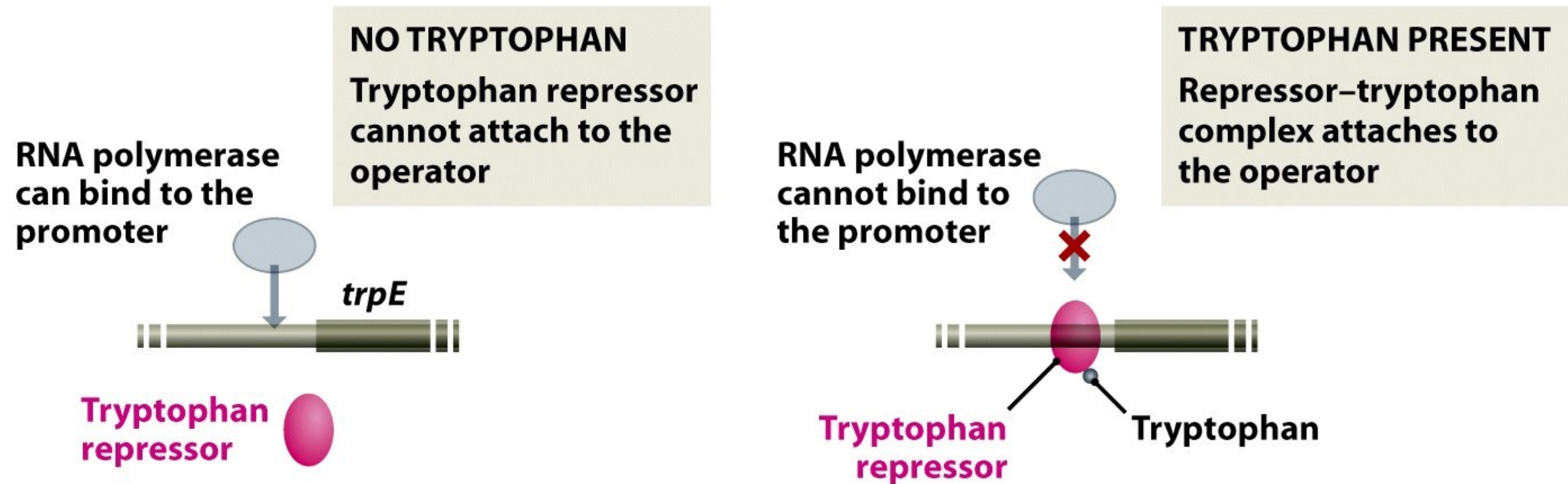
- *Salinibacter* (Bacteria) – geny umożliwiające przeżycie w warunkach wysokiego stężenia soli:
- wyspa genomowa: transpozazy + geny transporterów jonów i aminokwasów
- rodopsyny – wykorzystanie światła do transportu protonów i jonów
- Uzyskane w HGT od Archaea i innych Bacteria



Regulacja transkrypcji u bakterii

- Polimeraza stosunkowo prosta, proste sekwencje promotorowe
 - Rdzeń katalityczny wspólny, kilka **podjednostek sigma** o różnej specyficzności odpowiadających za rozpoznanie promotorów
 - $\sigma 70$ (RpoD) – główny czynnik sigma ("housekeeping") – większość genów
 - $\sigma 54$ (RpoN) – głód azotowy
 - $\sigma 38$ (RpoS) – głód/faza stacjonarna
 - $\sigma 32$ (RpoH) – szok cieplny
 - $\sigma 28$ (RpoF) – wici
- Aktywatory i represory wpływają na wiązanie polimerazy z DNA

Represor operonu *Trp*

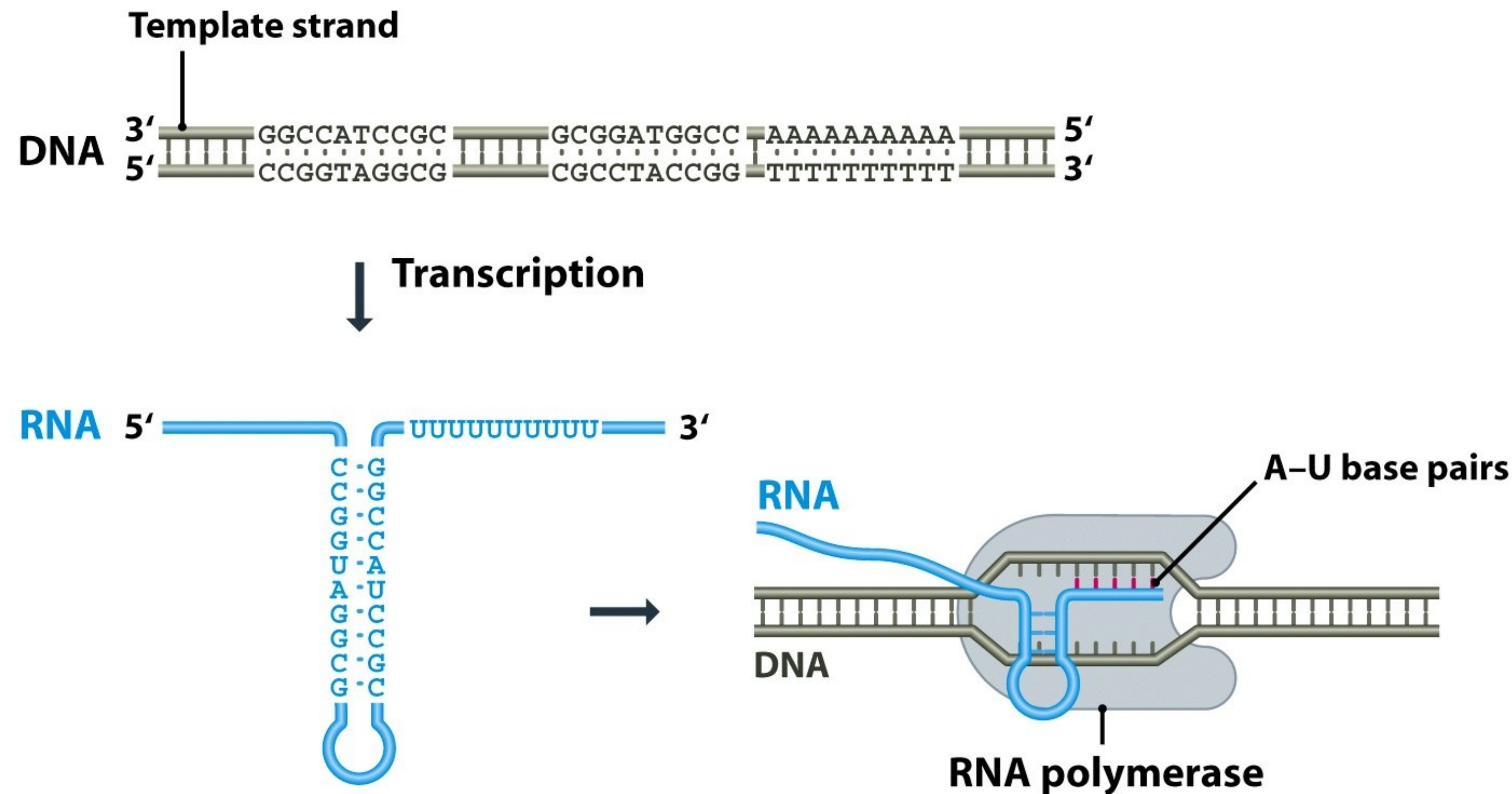


Regulacja negatywna reprimowalna

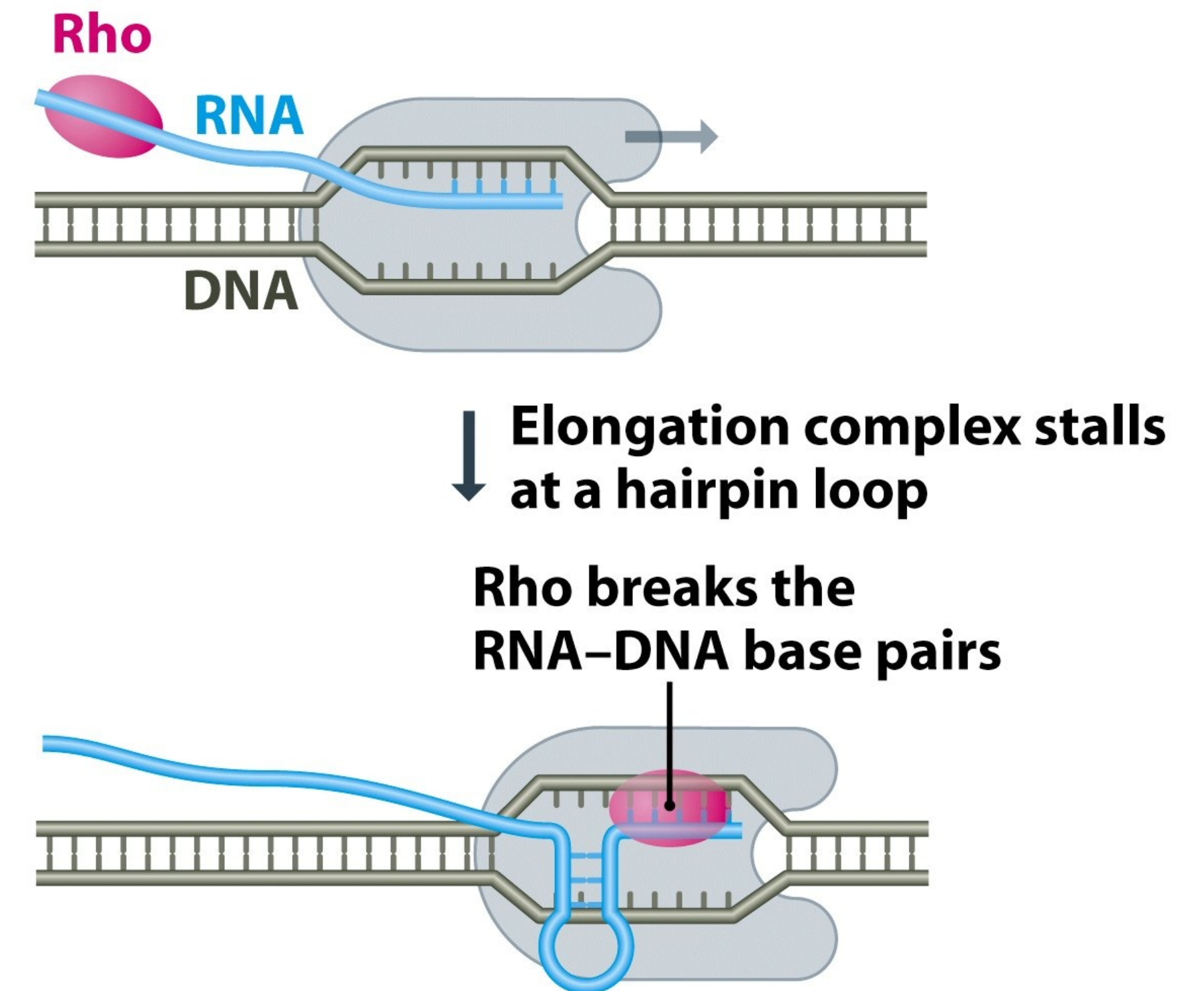
Terminacja transkrypcji

- Podczas transkrypcji cały czas konkurencja między kontynuowaniem a dysocjacją polimerazy
- Zależy od związanych białek, struktury transkryptu
- Terminatory
 - samodzielne
 - Rho zależne

Terminacja transkrypcji



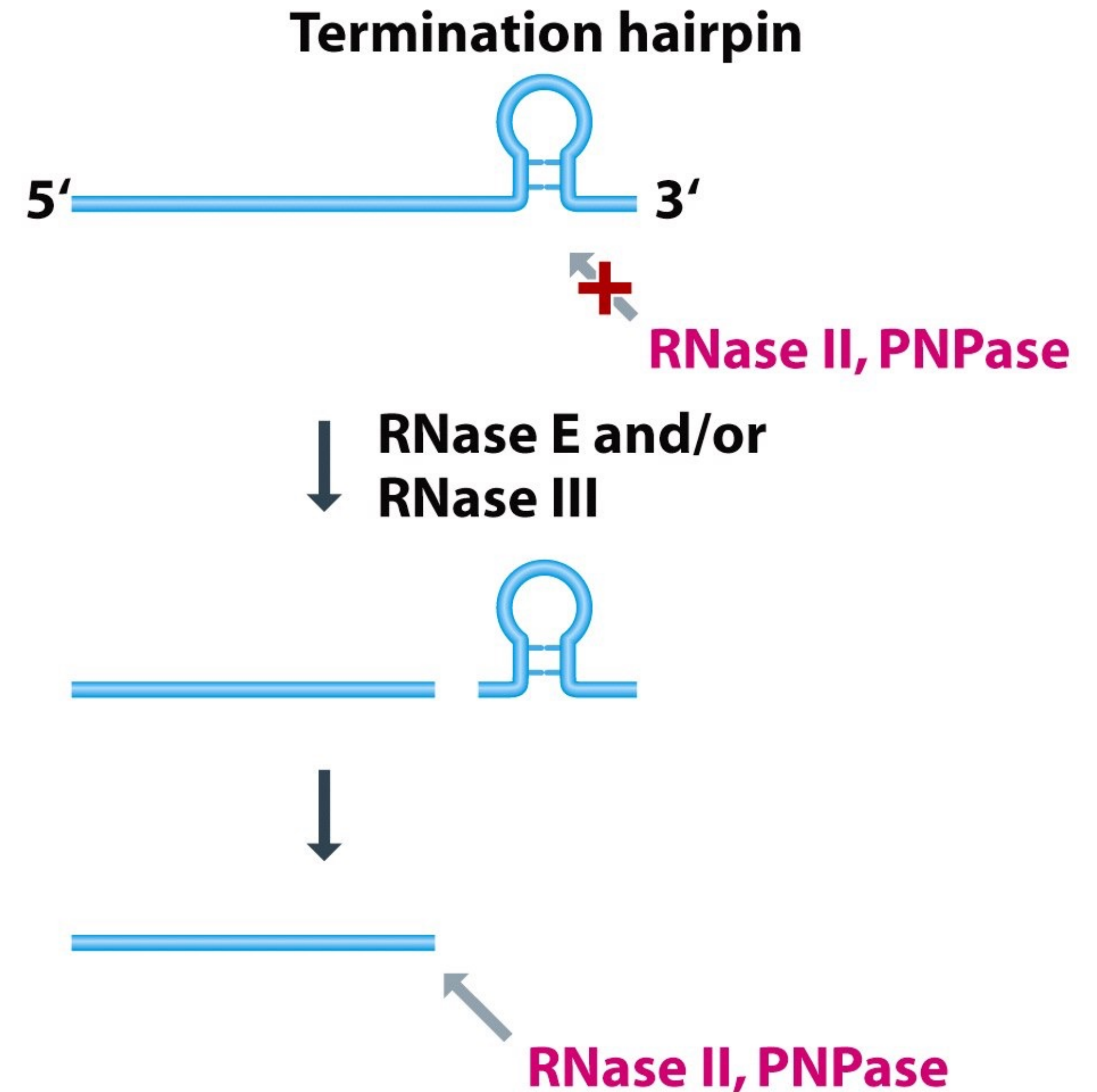
samodzielne (rho-niezależne)



rho-zależne

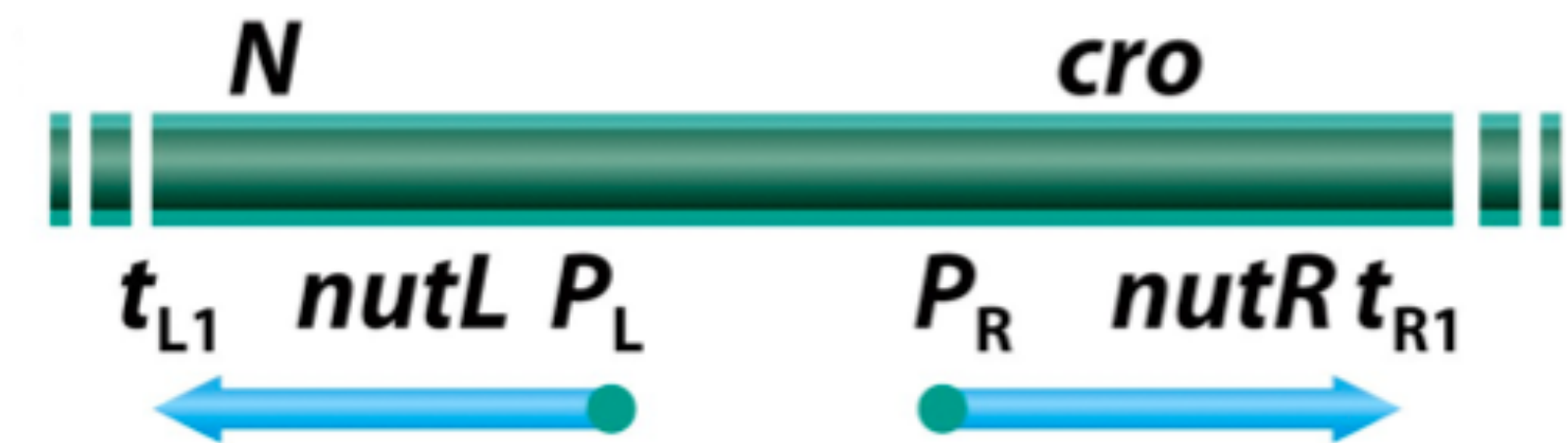
Degradacja RNA u bakterii

- Degradosom - kompleks o aktywności egzorybonukleazy (RNaza II, PNPaza) od końca 3'
- Ochrona przez strukturę pętli
- Endonukleaza (RNaza E, RNaza III)

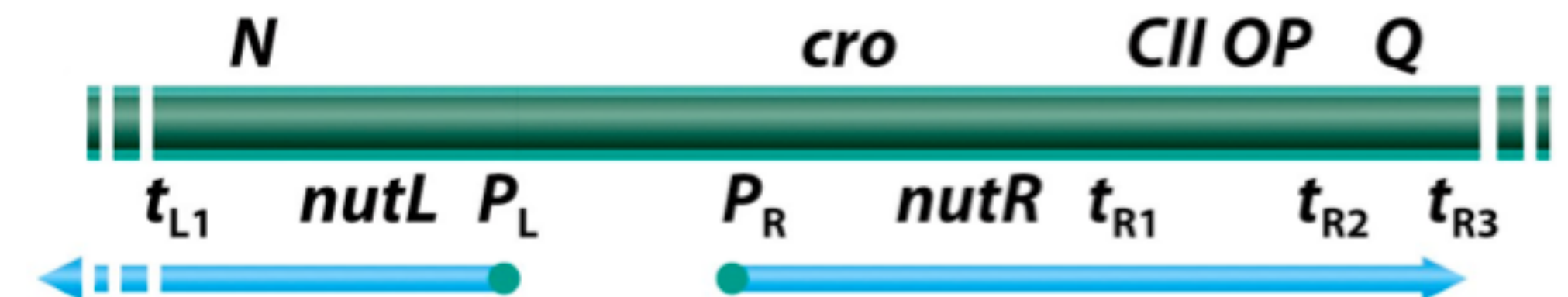


Regulacja na poziomie terminacji - antyterminacja

- Antyterminacja
 - Regulacja pozytywna, czynnik trans wiążąc się z DNA znosi działanie terminatora
 - Typowy przykład – geny kaskady litycznej faga λ



Najwcześniejsze



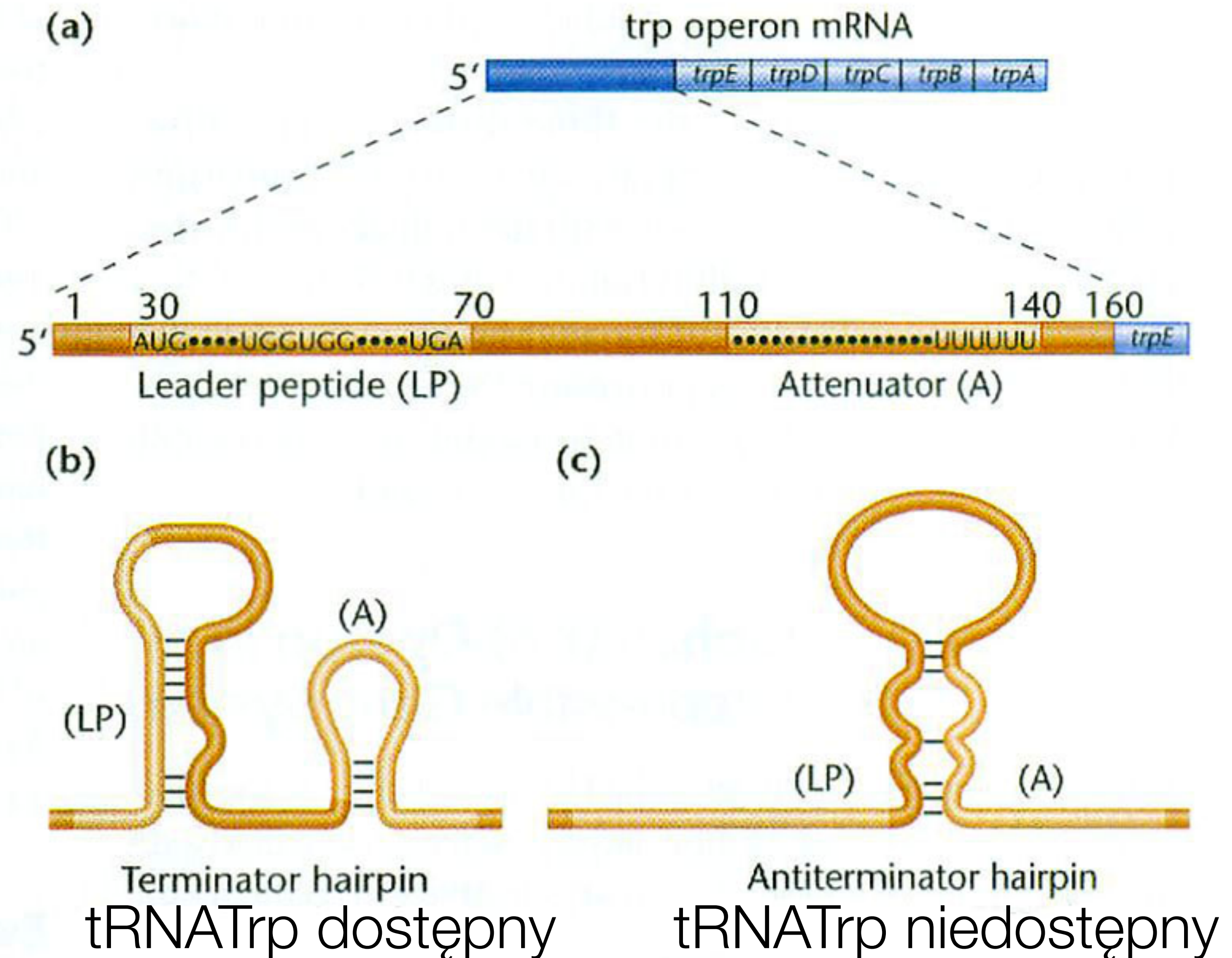
Wczesne-opóźnione

Regulacja na poziomie terminacji - atenuacja

- Fakultatywna sekwencja terminatora na początku transkryptu, zależnie od warunków
 - Kinetyka translacji – dostępność naładowanego tRNA
 - Wiązanie specyficznych białek
 - Wiązanie ligandów drobnocząsteczkowych – ryboprzełączniki (niektóre)

Atenuacja – operon *trp* *E. coli*

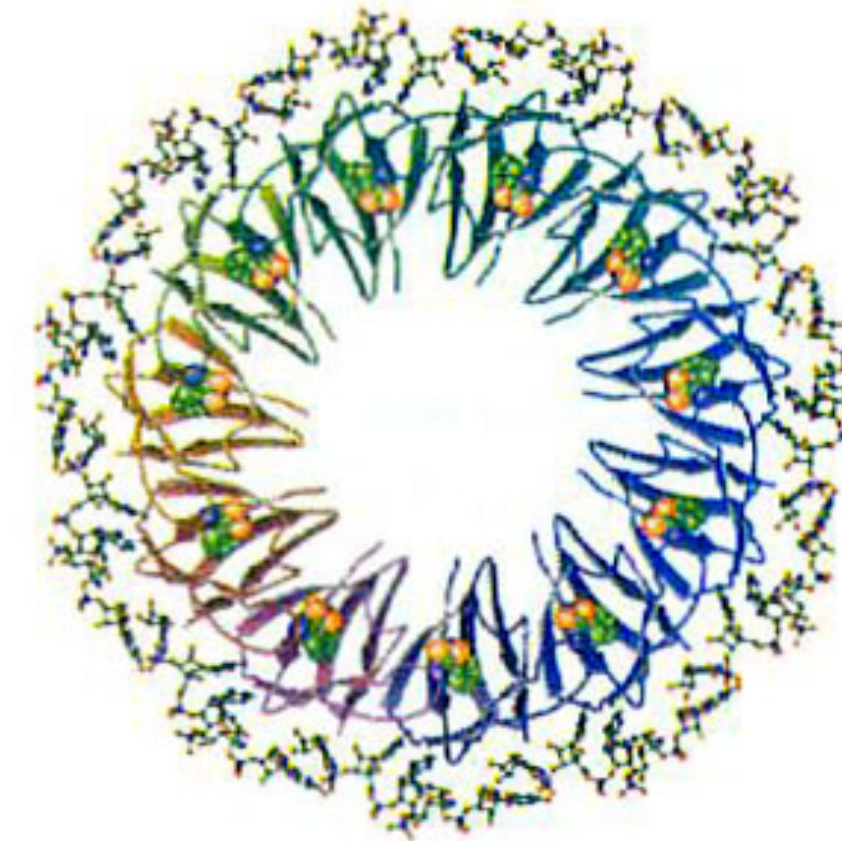
- Zależnie od dostępności załadowanego tRNA^{Trp} sekwencja lidera mRNA przyjmuje różne konformacje
- Mechanizm: pauzowanie translacji przy małej dostępności tRNA^{Trp}



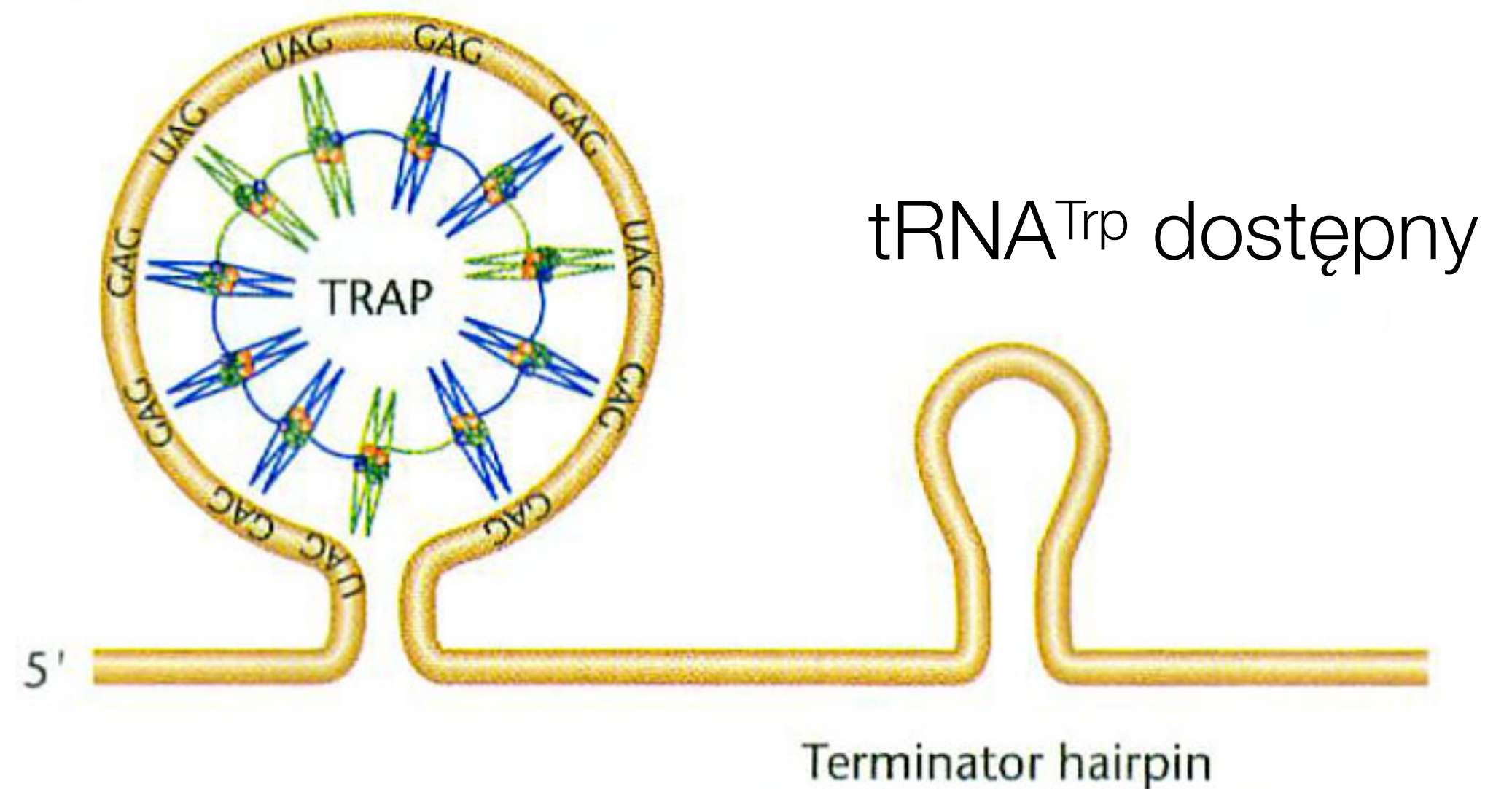
Operon trp u *Bacillus subtilis*

- Białko TRAP wiąże naładowany tRNA^{Trp}
- Kompleks TRAP z tRNA^{Trp} wiąże mRNA
- Dodatkowo białko AT (anty-TRAP) wiąże TRAP gdy bardzo mało naładowanego tRNA^{Trp}

(a)



(b)



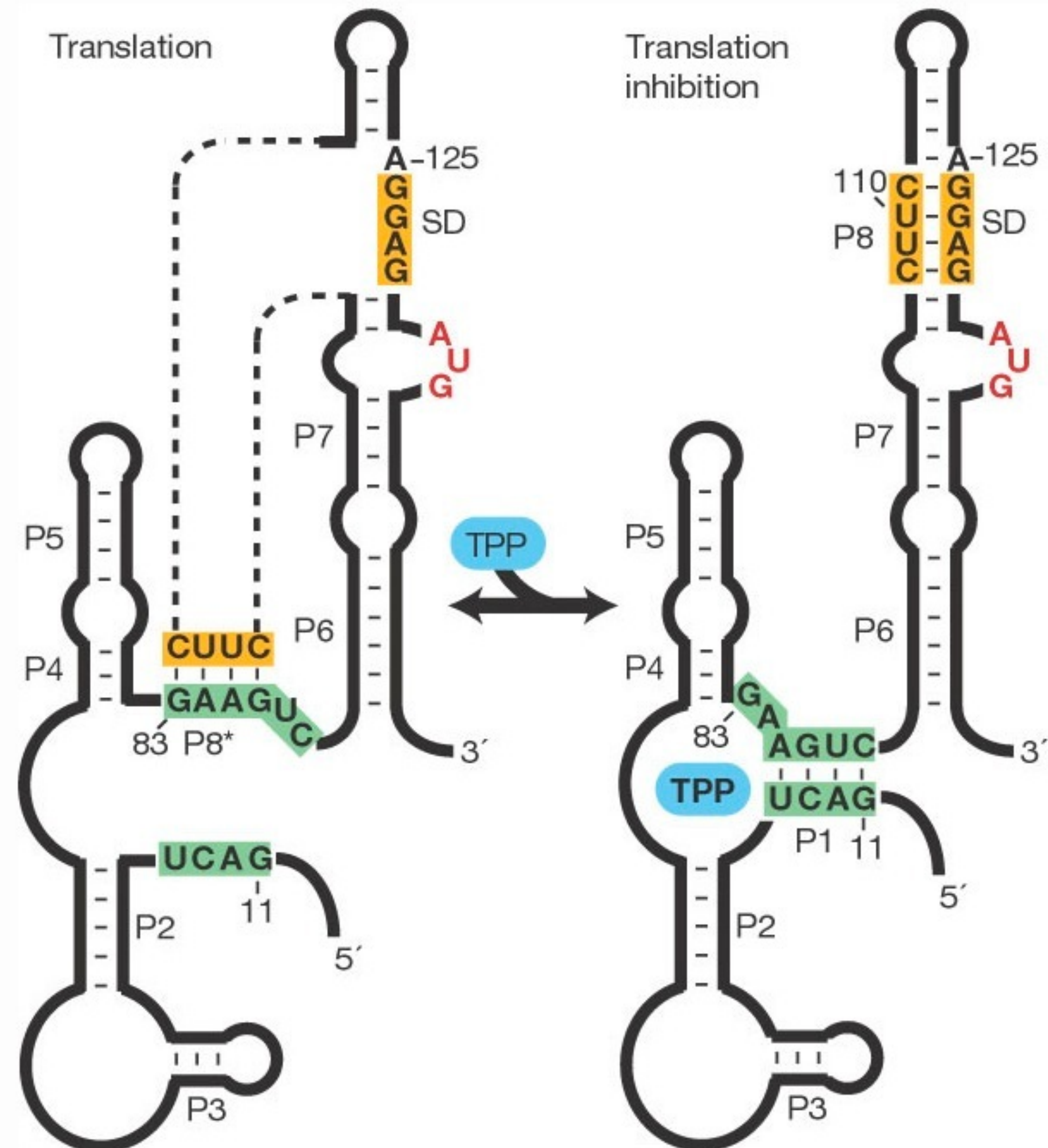
Ryboprzełączniki

- Wiązanie związków drobnocząsteczkowych bezpośrednio z mRNA (element *cis*) zmienia konformację RNA, wpływając na ekspresję
 - Atenuacja
 - Dostępność miejsca wiązania rybosomu
 - Częste u bakterii, sporadycznie u Eukaryota (grzyby)

Ryboprzełącznik TPP – operon *thi E. coli*

Odpowiada za biosyntezę tiaminy

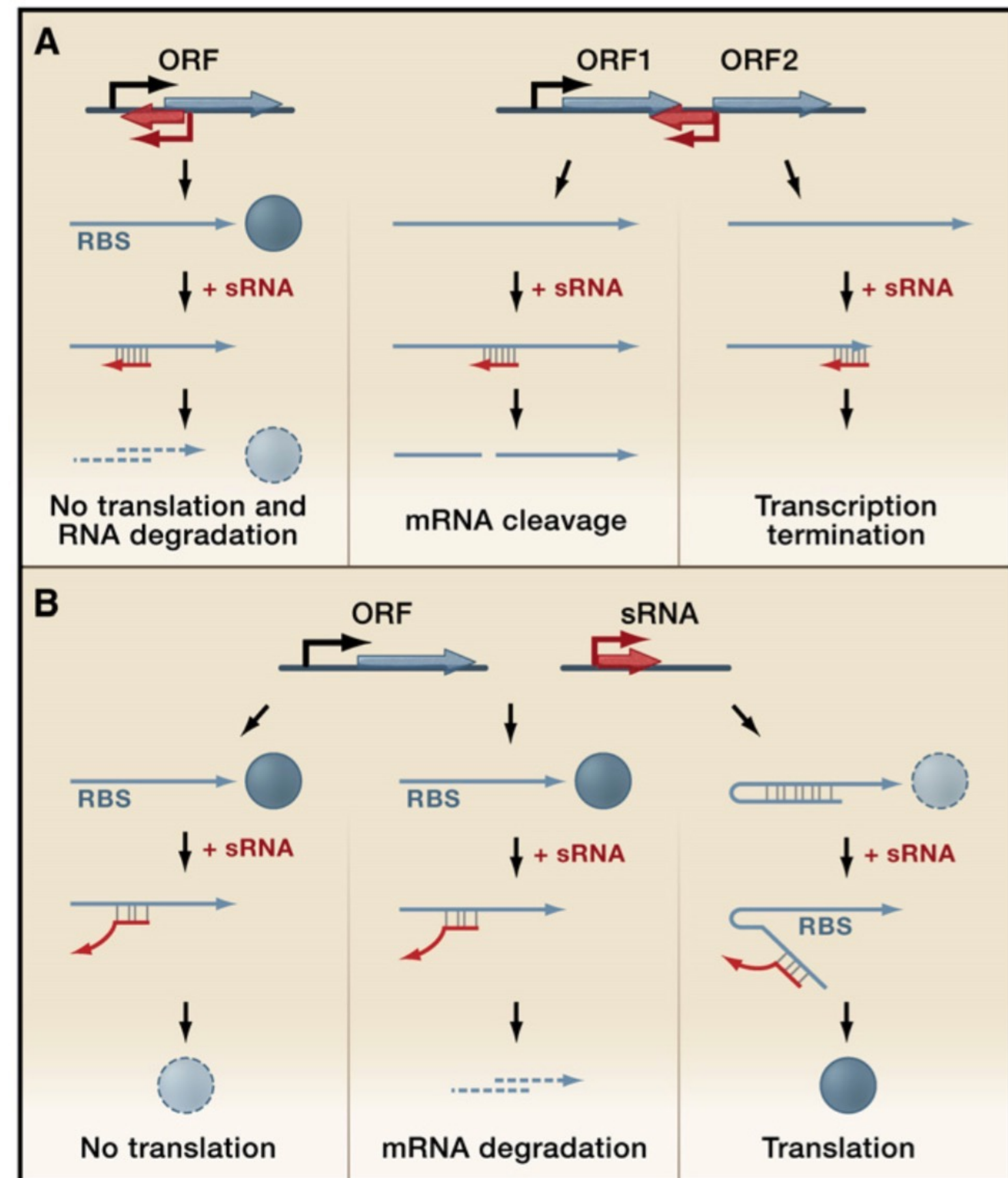
SD- Shine-Dalgarno
TPP- pirofosforan tiaminy



RNA jako elementy *trans*

- Niekodujące RNA regulatorowe
- Działają na różnych poziomach
 - hamowanie replikacji plazmidu (RNA I/ Col E1)
 - hamowanie transkrypcji (*MicF* RNA/ *OmpF*)
 - oddziaływanie z białkami regulatorowymi (sekwestracja)
 - oddziaływanie z mRNA (inhibicja translacji, degradacja)

Waters & Storz, *Cell* 136:615-28, 2009



Globalne systemy regulujące - regulony

- Skoordynowana regulacja działania wielu operonów
 - Regulacja przez podjednostki σ (np. szok cieplny, głód itp.)
 - Odpowiedź ścisła: brak składników odżywczych, alarmon ppGpp, interakcja z polimerazą RNA, wybór podjednostki σ_{38} (RpoS)
 - Represja kataboliczna (aktywator CAP)
 - zależny od poziomu glukozy poziom cAMP
- Odpowiedź SOS
 - uszkodzenia genomu, białko RecA – indukowana aktywność proteazy, tnie m. in. represor LexA

Genomy organelle

- Mitochondria i plastydy pochodzą od przedstawicieli Bacteria
 - Gospodarz symbiozy należał do Archaea
- Genomy organellarne mają cechy genomów prokariotycznych
- Ogromna różnorodność struktury i organizacji ekspresji
- Kodują zwykle od kilku do kilkunastu (u człowieka - 13) białek, przeważnie składniki kompleksów łańcucha oddechowego/fotosyntezy oraz rRNA i tRNA
- Często dziedziczone tylko od jednego z rodziców (wyjątek: grzyby)

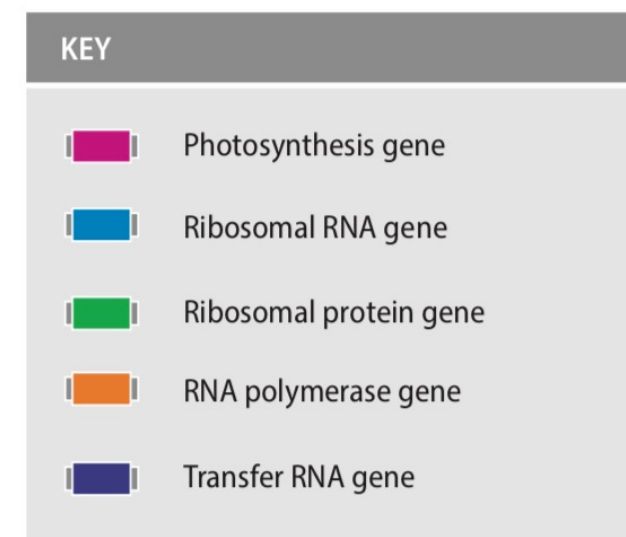
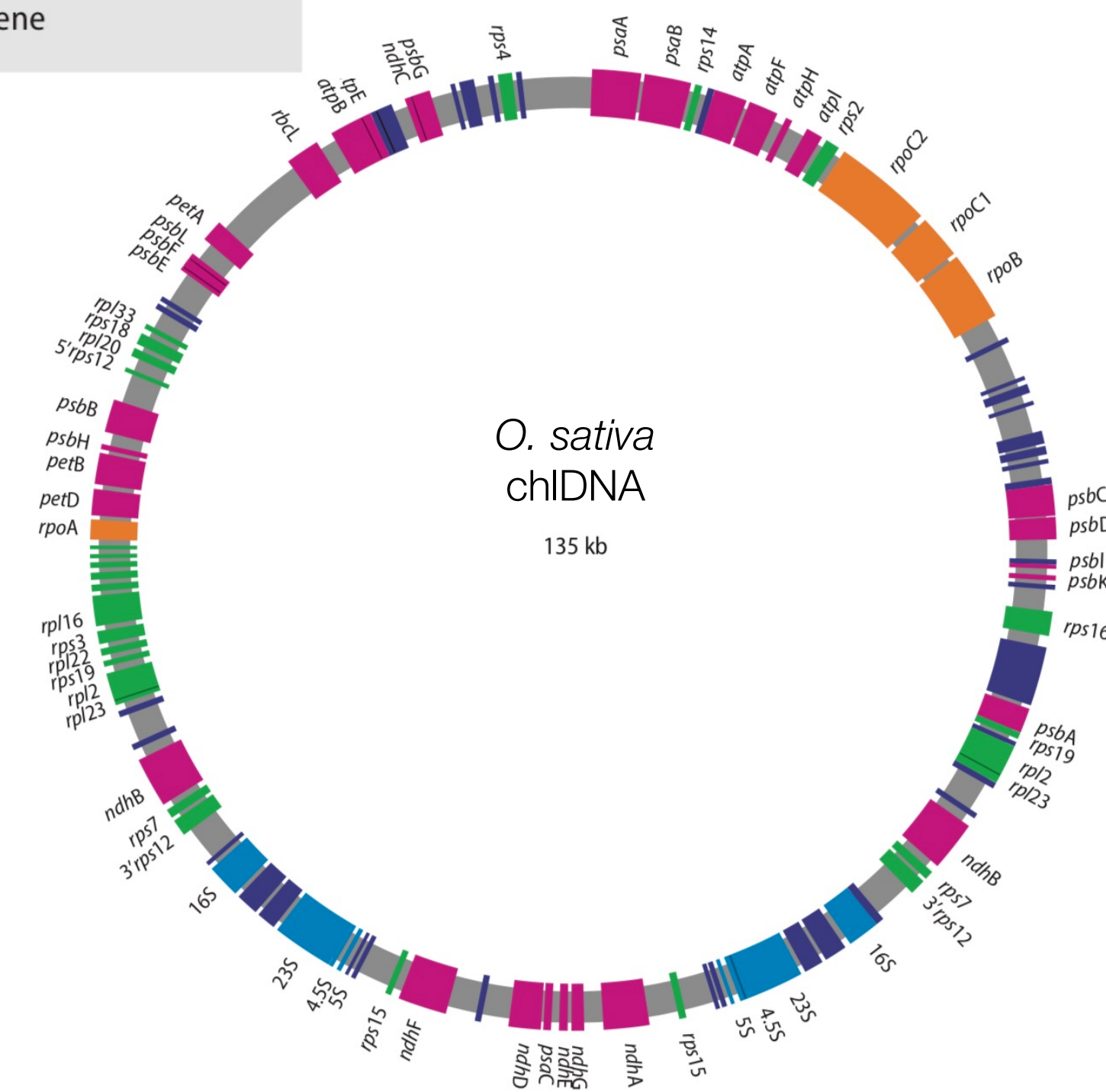
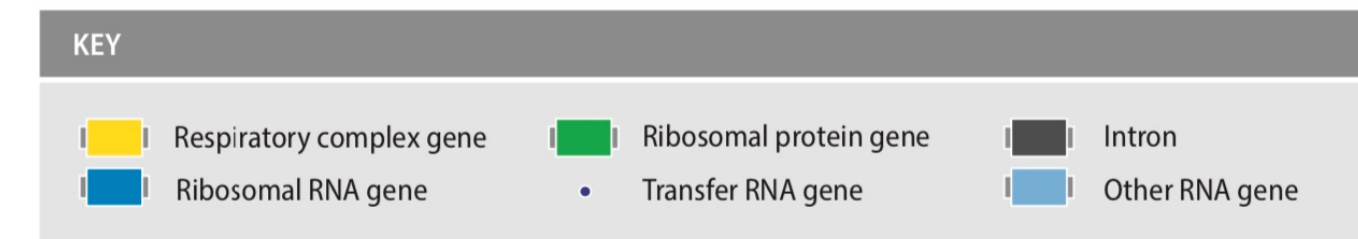
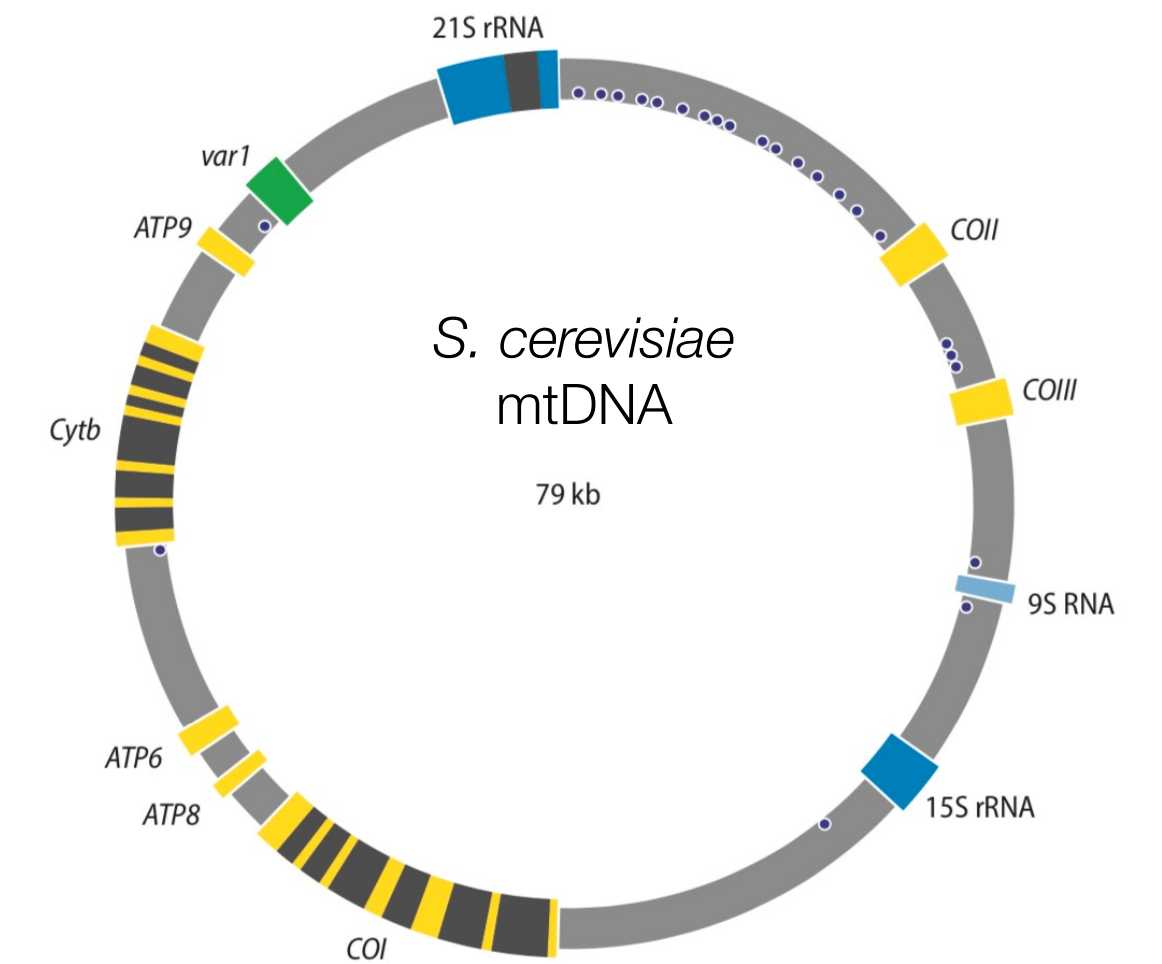
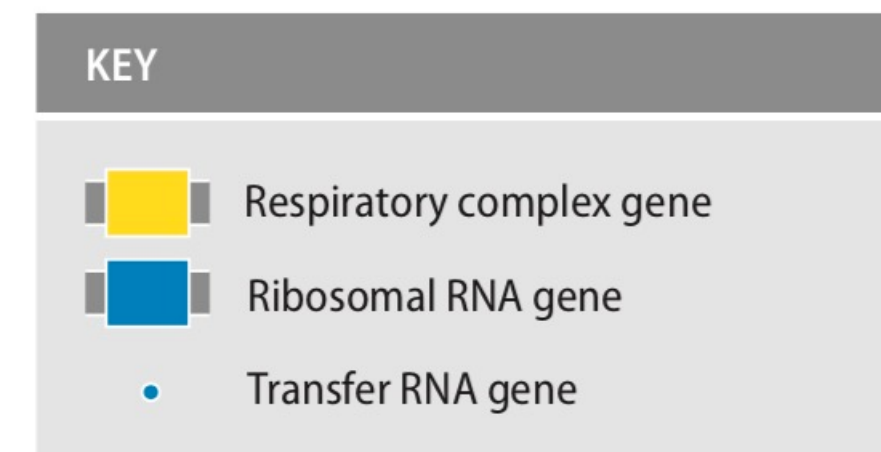
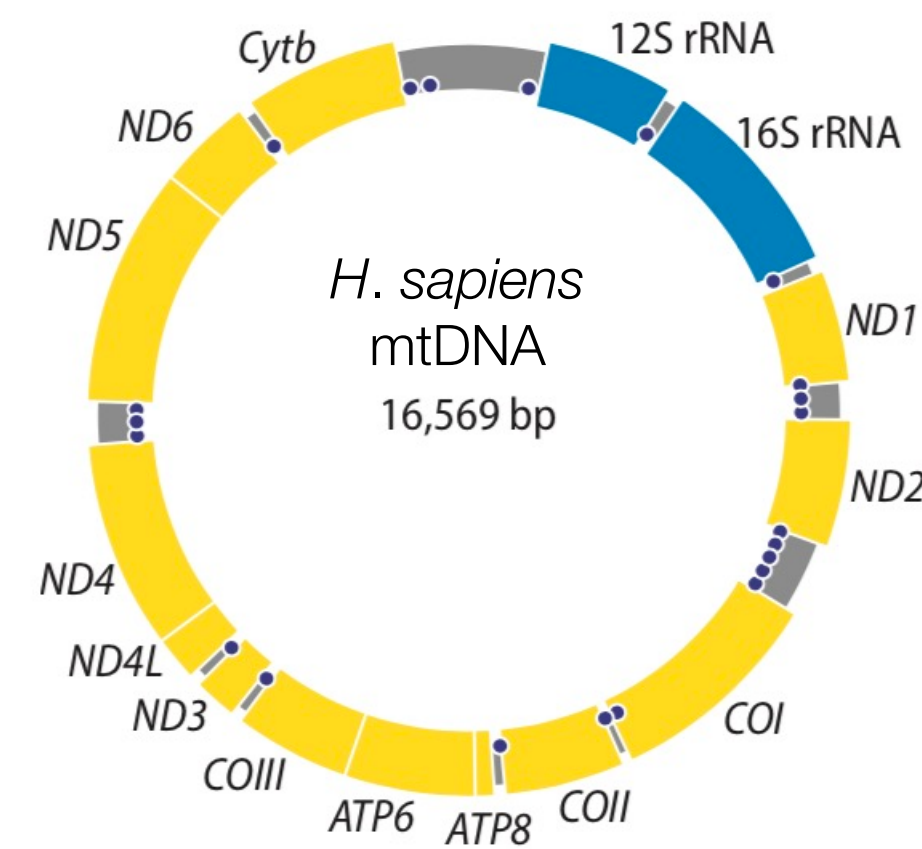


Figure 8.17 The rice chloroplast genome. Only those genes with known functions are shown. A number of the genes contain introns, which are not indicated on this map. These discontinuous genes include several for tRNAs, which is why the tRNA genes are of different lengths even though the tRNAs that they specify are all of similar size.