

Geny eukariotyczne

Struktura i ekspresja I

Literatura

- Allison, rozdziały 11, 12
- Brown, rozdziały 7, 10, 11

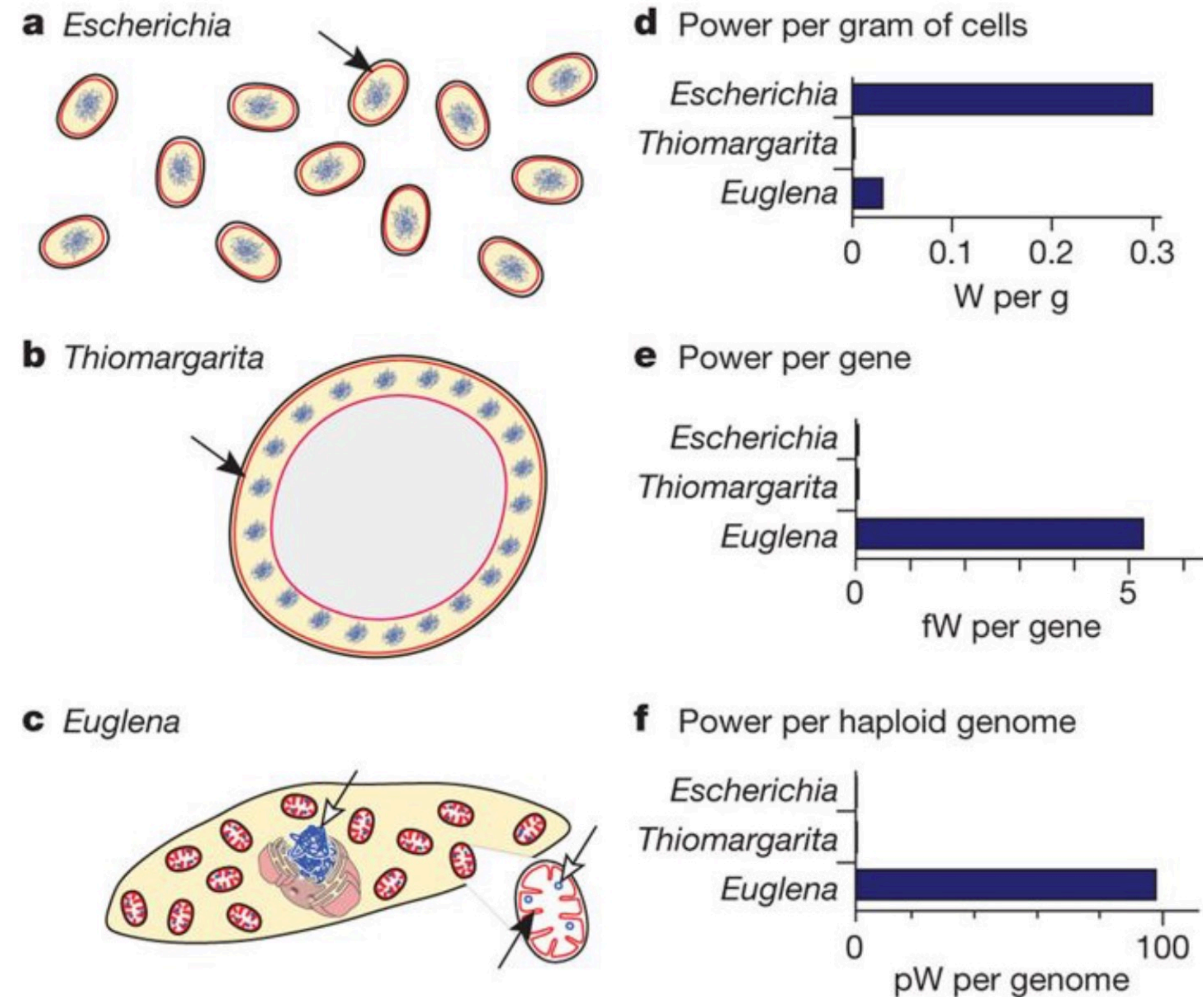
Eukarionty i złożoność

- prokarionty mają ogromne zróżnicowanie repertuaru genów i funkcji metabolicznych
- repertuar biochemiczny eukariontów jest mniej zmienny, ale wykazują wzrost złożoności
 - większe genomy
 - większa liczba genów
 - bardziej złożona regulacja, wielokomórkowość

Energetyka złożoności

- Budżet energetyczny komórki prokariotycznej: ~0,5 pW (1 pW = 10^{-12} W)
- Budżet energetyczny komórki eukariotycznej: ~2300 pW
- Udział w budżecie energetycznym:
 - replikacja: ~2%
 - ekspresja genów i synteza białek: ~75%
- Znacznie więcej energii/gen u eukariontów!!
- Jedyna droga zwiększania złożoności

Figure 2: The cellular power struggle.



a–c, Schematic representations of a medium sized prokaryote (*Escherichia*), a very large prokaryote (*Thiomargarita*), and a medium-sized eukaryote (*Euglena*). Bioenergetic

The energetics of genome complexity

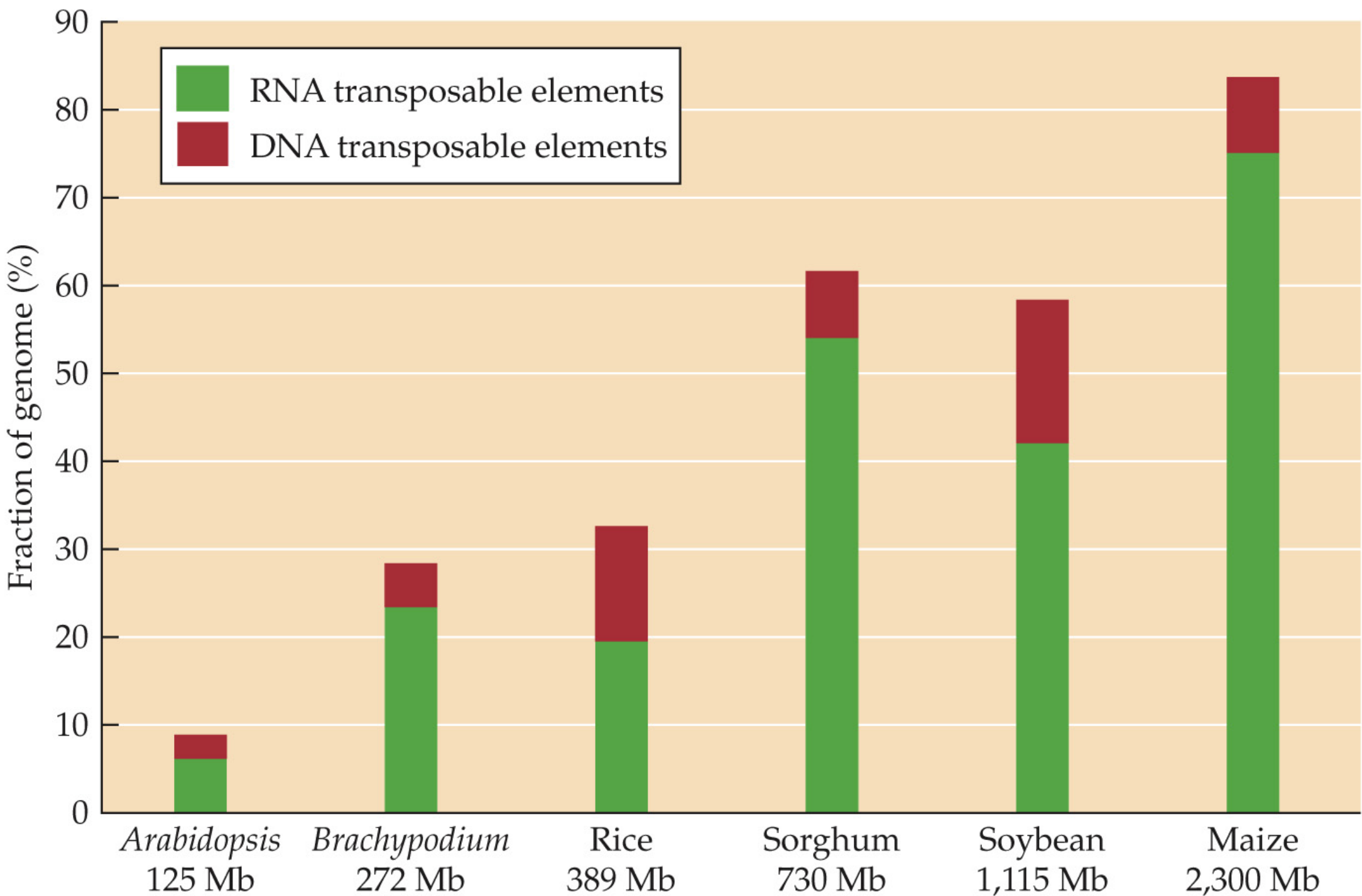
Nick Lane¹ & William Martin²

Genomy eukariotyczne

- Znaczna różnorodność
- Paradoks wartości C
 - brak korelacji między złożonością organizmu a wielkością genomu
- Paradoks wartości G
 - brak korelacji między złożonością organizmu a liczbą genów
- Często znaczna ilość obszarów niekodujących

Paradoks wartości C

- Bardzo duża zmienność w obrębie Eukaryota
- Najbardziej prawdopodobne wyjaśnienie - elementy repetytywne



MOLECULAR AND GENOME EVOLUTION 1e, Figure 11.6
© 2016 Sinauer Associates, Inc.

Range of C values in a sample of monophyletic eukaryotic higher taxa*

Taxon	Genome size range (Kb)	Ratio (highest/lowest)
Dinophyceae (dinoflagellates)	1,470,000–220,000,000	150
Fungi (fungi)	2,220–893,000	402
Metazoa (animals)	19,600–130,000,000	6,642
Porifera (sponges)	39,200–1,760,000	45
Cnidaria (cnidarians)	225,000–1,810,000	8
Rotifera (rotifers)	245,000–1,200,000	5
Tardigrada (water bears)	78,400–804,000	10
Nematoda (roundworms)	19,600–2,450,000	125
Platyhelminthes (flatworms)	58,000–20,100,000	342
Annelida (annelid worms)	58,800–7,490,000	127
Mollusca (mollusks)	421,000–7,690,000	18
Crustacea (crustaceans)	137,000–63,300,000	462
Chelicerata (chelicerates)	78,400–7,350,000	94
Hexapoda (insects)	88,200–16,600,000	188
Myriapoda (myriapods)	274,000–2,100,000	8
Echinodermata (echinoderms)	529,000–4,310,000	8
Bryozoa (bryozoans)	196,000–1,570,000	8
Onychophora (velvet worms)	4,340,000–19,500,000	4
Gastrotricha (gastrotrichs)	49,000–617,000	13
Cyclostomata (jawless fishes)	1,260,000–4,500,000	4
Chondrichthyes (cartilaginous fishes)	1,480,000–16,700,000	11
Osteichthyes (bony fishes)	343,000–130,000,000	380
Amphibia (amphibians)	931,000–118,000,000	127
Crocodylia (crocodiles)	2,440,000–3,380,000	1
Squamata (squamates)	1,030,000–3,850,000	4
Testudines (turtles)	1,750,000–5,330,000	3
Aves (birds)	891,000–2,120,000	2
Mammalia (mammals)	1,600,000–8,230,000	5
Viridiplantae (green plants)	9,800–149,000,000	15,204
Pteridophyta (pteridophytes)	88,200–71,200,000	807
Bryophyta (mosses)	167,000–7,810,000	47
Spermatophyta (seed plants)	63,400–149,000,000	2,350
Eukaryota (all eukaryotes)	373–149,000,000	399,000

Source: Data from www.genomesize.com, <http://data.kew.org/cvalues>, www.zbi.ee/fungal-genomesize, LaJeunesse et al. (2005), Hackett and Bhattacharya (2006), and Bennett and Leitch (2011).

*Only monophyletic taxa that contain multicellular organisms were included.

MOLECULAR AND GENOME EVOLUTION 1e, Table 11.2

Paradoks wartości G

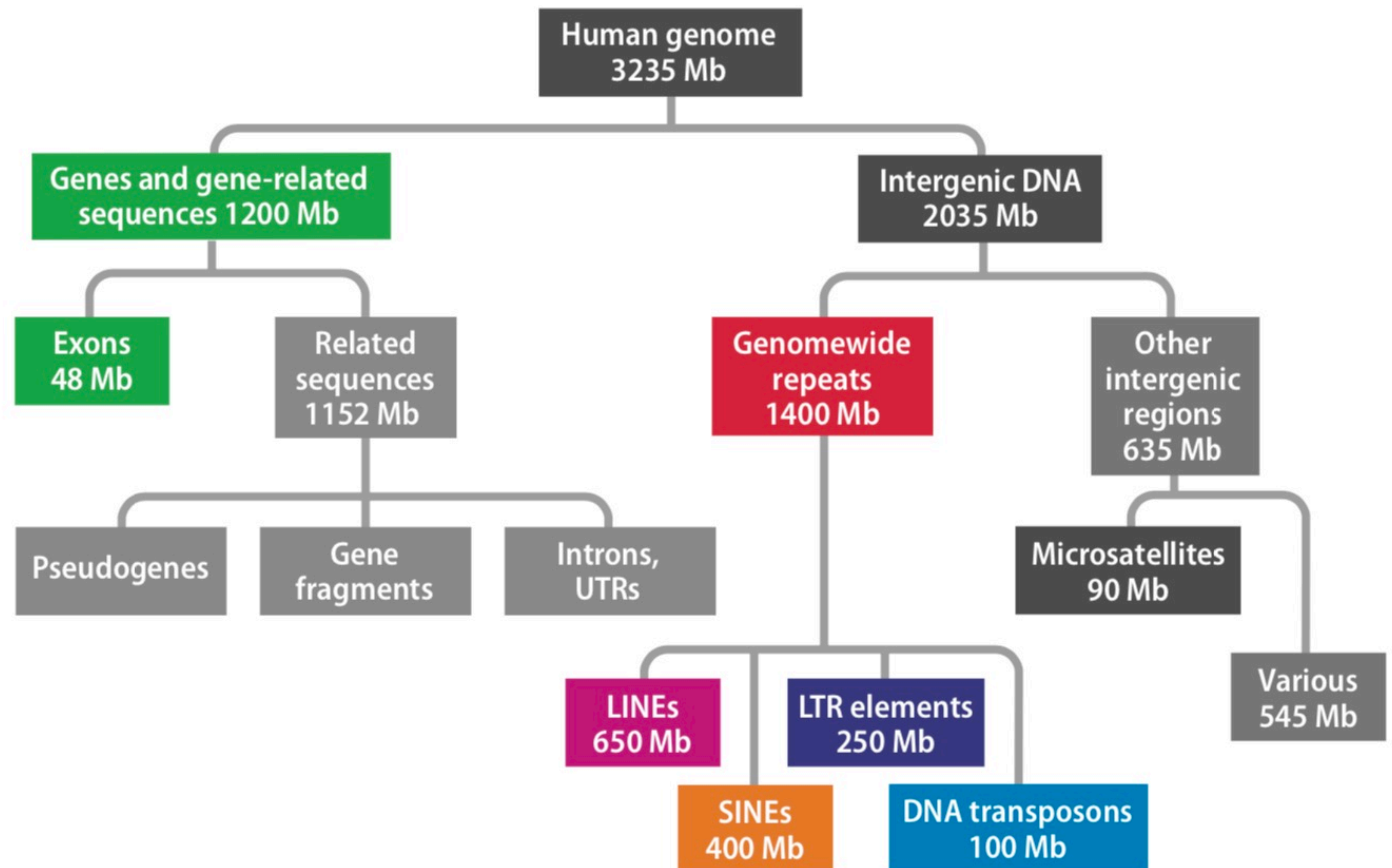
- Brak związku między liczbą genów a złożonością organizmu
- Tylko słaba (i nieliniowa) korelacja między liczbą genów a wielkością genomu
- Wyjaśnienia
 - generowanie różnorodności przez mechanizmy ekspresji
 - redundancja

TABLE 11.5			
Number of protein-coding genes in some eukaryotic species			
Species ^a	Gene number	Species ^a	Gene number
* <i>Cyanidioschyzon merolae</i> (red alga)	5,009	* <i>Bigelowiella natans</i> (chlorarachniophyte alga)	21,706
* <i>Plasmodium falciparum</i> (malaria parasite)	5,429	<i>Mus musculus</i> (mouse)	22,606
* <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (yeast)	6,692	<i>Poecilia formosa</i> (Amazon molly)	23,615
* <i>Ostreococcus lucimarinus</i> (green alga)	7,603	<i>Hordeum vulgare</i> (barley)	24,287
* <i>Entamoeba histolytica</i> (parasitic amoeba)	8,283	* <i>Tetrahymena thermophila</i> (ciliate)	24,725
<i>Apis mellifera</i> (honeybee)	10,157	* <i>Guillardia theta</i> (cryptomonad alga)	24,945
<i>Petromyzon marinus</i> (lamprey)	10,415	<i>Danio rerio</i> (zebrafish)	26,459
<i>Ciona savignyi</i> (sea squirt)	11,616	<i>Amborella trichopoda</i> (plant)	27,313
* <i>Dictyostelium discoideum</i> (slime mold)	13,212	<i>Arabidopsis thaliana</i> (mustard weed)	27,416
<i>Drosophila melanogaster</i> (fruit fly)	13,937	<i>Theobroma cacao</i> (cacao)	29,188
<i>Gallus gallus</i> (chicken)	15,508	<i>Vitis vinifera</i> (grape)	29,971
<i>Ciona intestinalis</i> (sea squirt)	16,671	<i>Physcomitrella patens</i> (moss)	32,273
* <i>Phytophthora infestans</i> (potato blight)	17,785	<i>Solanum lycopersicum</i> (tomato)	34,675
<i>Xenopus tropicalis</i> (western clawed frog)	18,442	<i>Oryza sativa</i> (rice)	35,679
<i>Takifugu rubripes</i> (fugu)	18,523	<i>Solanum tuberosum</i> (potato)	39,021
<i>Pan troglodytes</i> (chimpanzee)	18,759	<i>Populus trichocarpa</i> (poplar)	41,377
<i>Latimeria chalumnae</i> (coelacanth)	19,569	<i>Manihot esculenta</i> (cassava)	30,666
<i>Tetraodon nigroviridis</i> (pufferfish)	19,602	<i>Selaginella moellendorffii</i> (lycophyte)	34,799
<i>Canis familiaris</i> (dog)	19,856	* <i>Emiliana huxleyi</i> (haplophyte)	38,544
<i>Bos taurus</i> (cow)	19,994	<i>Zea mays</i> (maize)	39,469
<i>Caenorhabditis elegans</i> (nematode)	20,447	<i>Brassica rapa</i> (rape)	41,018
<i>Monodelphis domestica</i> (opossum)	21,327	<i>Pinus taeda</i> (loblolly pine)	50,172
<i>Homo sapiens</i> (human)	20,364	<i>Malus × domestica</i> (hybrid apple)	57,386
<i>Oreochromis niloticus</i> (tilapia)	21,437	* <i>Trichomonas vaginalis</i> (flagellated protist)	60,815
<i>Ornithorhynchus anatinus</i> (platypus)	21,698	<i>Triticum aestivum</i> (bread wheat)	99,504

Source: Data from www.ensembl.org, fungi.ensembl.org, protists.ensembl.org, plants.ensembl.org, and www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse.
^aOrganisms marked with an asterisk (*) are unicellular.

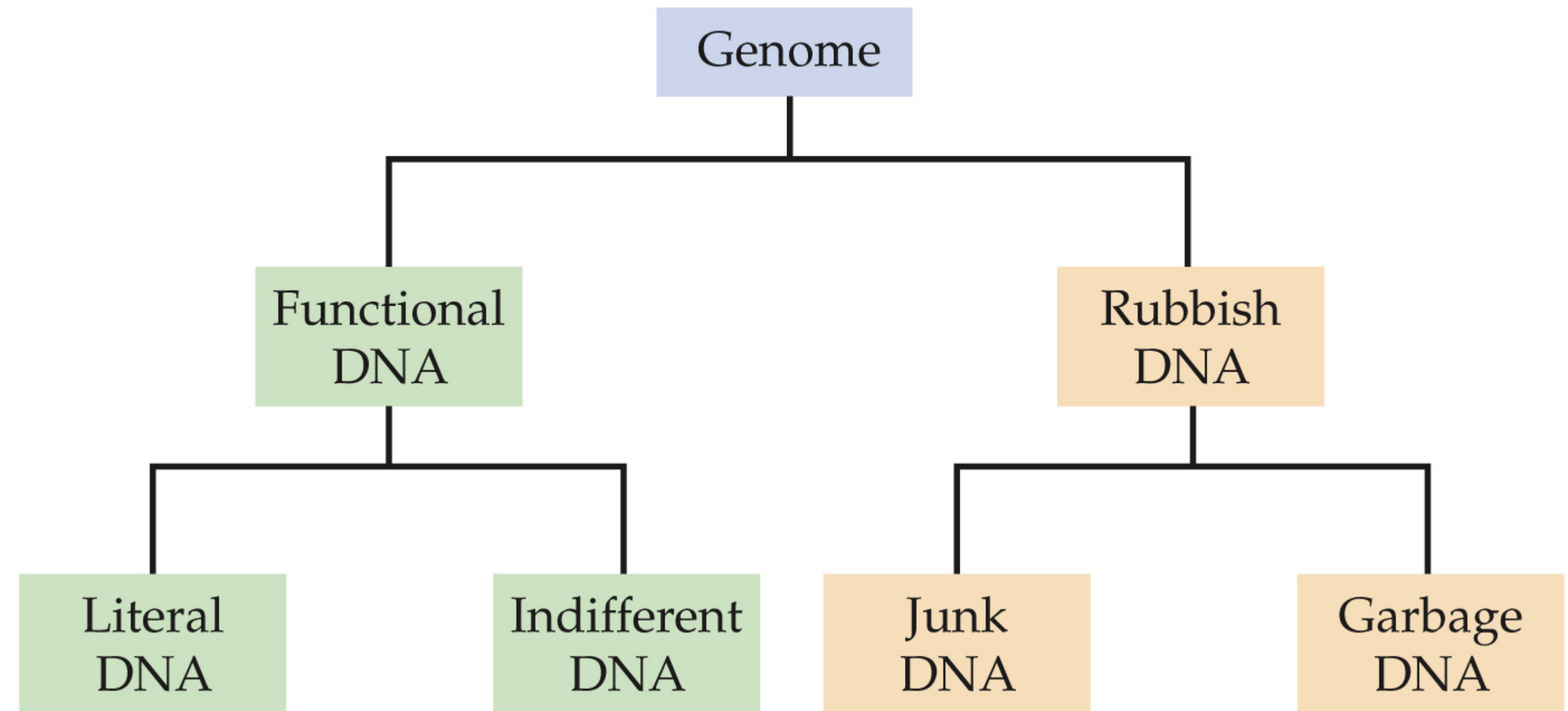
Co znajduje się w genomie eukariotycznym

- LINE - długie rozproszone elementy jądrowe
 - >5 kb, geny *pol* i *gag*, w większości nieaktywne
- SINE - krótkie rozproszone elementy jądrowe
 - nie kodują białek, np. Alu
- LTR - długie powtórzenia końcowe
- LINE, SINE i LTR to ruchome elementy genetyczne (często już nieaktywne)



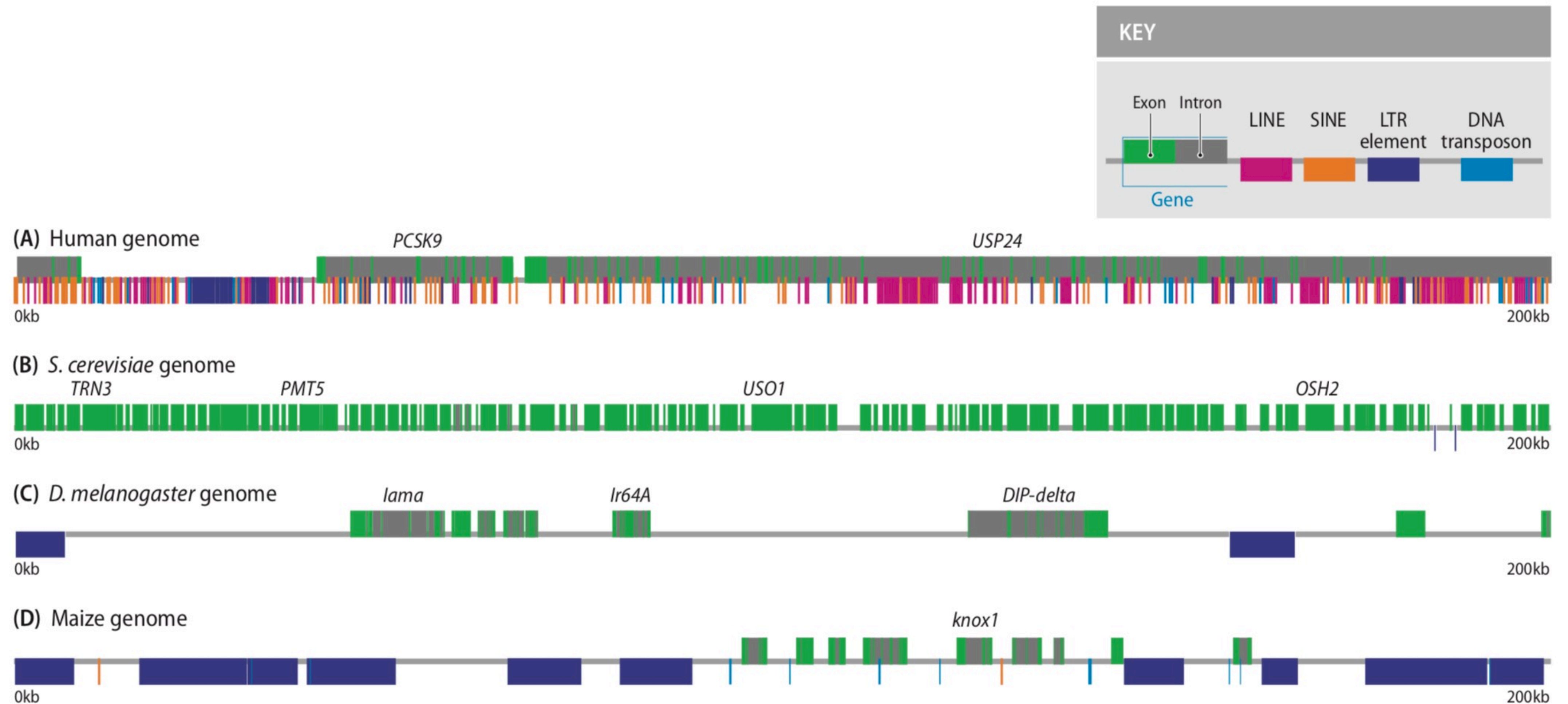
Elementy genomu - klasyfikacja ewolucyjna

- *Literal DNA* - selekcji podlega sekwencja nukleotydowa
- *Indifferent DNA* - fragmenty potrzebne, ale sekwencja nieistotna (np. strukturalne)
- *Junk DNA* - neutralne
- *Garbage DNA* - niekorzystne, ale utrzymują się mimo kontrselekcji, samolubne geny



MOLECULAR AND GENOME EVOLUTION 1e, Figure 11.1
© 2016 Sinauer Associates, Inc.

Różna zawartość obszarów niekodujących w genomach



“Definicja” genu

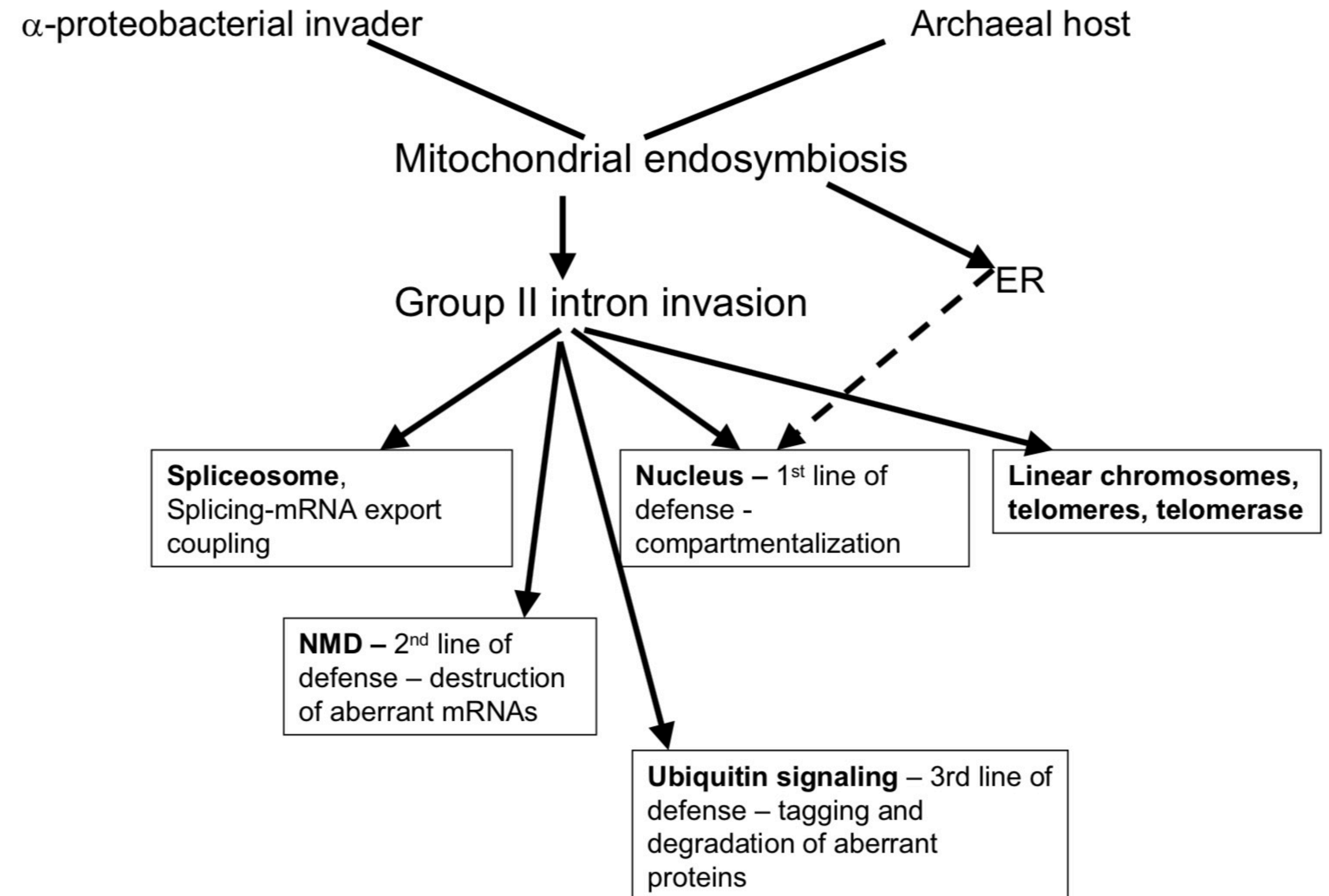
- Region DNA, który określa dziedziczną cechę organizmu; zwykle koduje pojedyncze białko lub RNA
- Zawiera całą funkcjonalną podjednostkę wraz z sekwencją kodującą, niekodującymi sekwencjami regulatorowymi DNA oraz z intronami
- Definicja niedoskonała, trudno jednoznacznie zdefiniować gen
- Współczesne definicje – centrum jest transkrypt

Geny eukariotyczne

- Procesy transkrypcji i translacji są rozdzielone w przestrzeni i czasie
- Każdy gen kodujący białko ma własny promotor, nie występują operony
- Jądro komórkowe, np. u człowieka:
 - średnica jądra $\sim 10\ \mu\text{m}$,
 - długość DNA $\sim 2\ \text{m}$,
 - podstawowe włókno chromatyny: grubość $10\ \text{nm}$

Po co powstało jądro?

- Hipoteza - jądro powstało u eukariotów jako system obrony przed inwazją intronów od symbionta mitochondrialnego
- Introny gr. II - są u bakterii, brak u Archaea
- Składanie (splicing) jest wolniejsze od translacji
- Rozdzielenie translacji od składania - obrona przed zaburzeniem translacji przez sekwencje intronowe



Hypothesis

The origin of introns and their role in eukaryogenesis: a compromise solution to the introns-early versus introns-late debate?

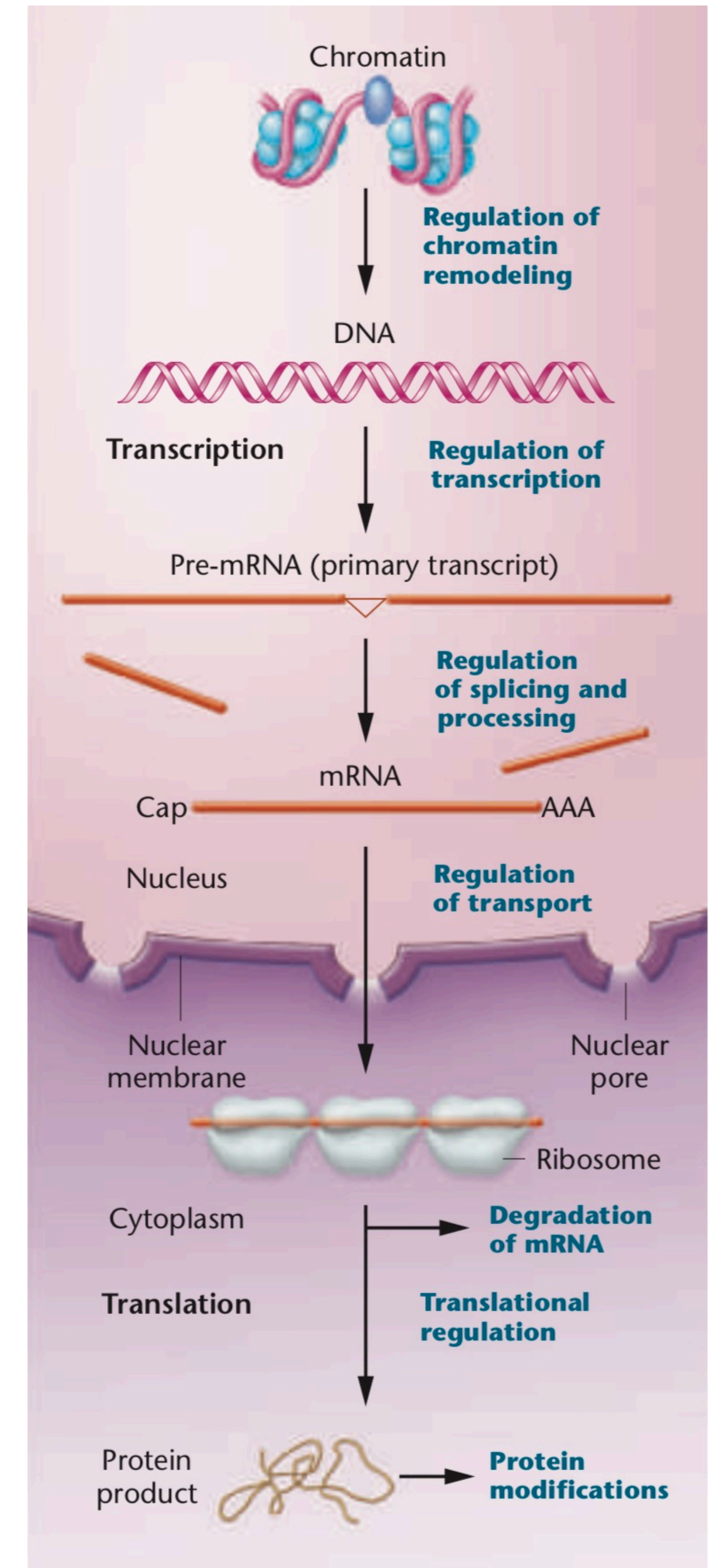
Eugene V Koonin*

Biology Direct 2006, 1:22 doi:10.1186/1745-6150-1-22

Open Access

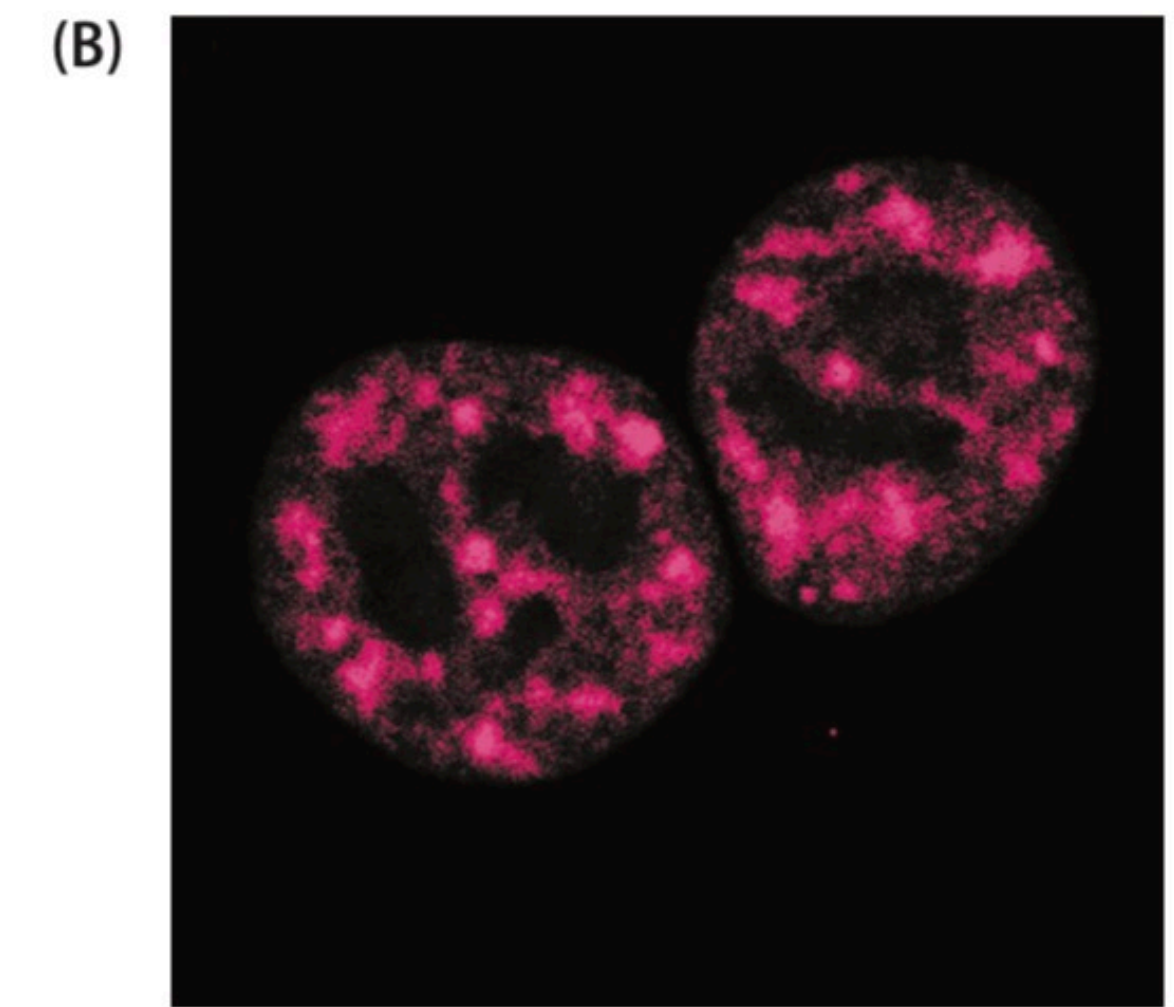
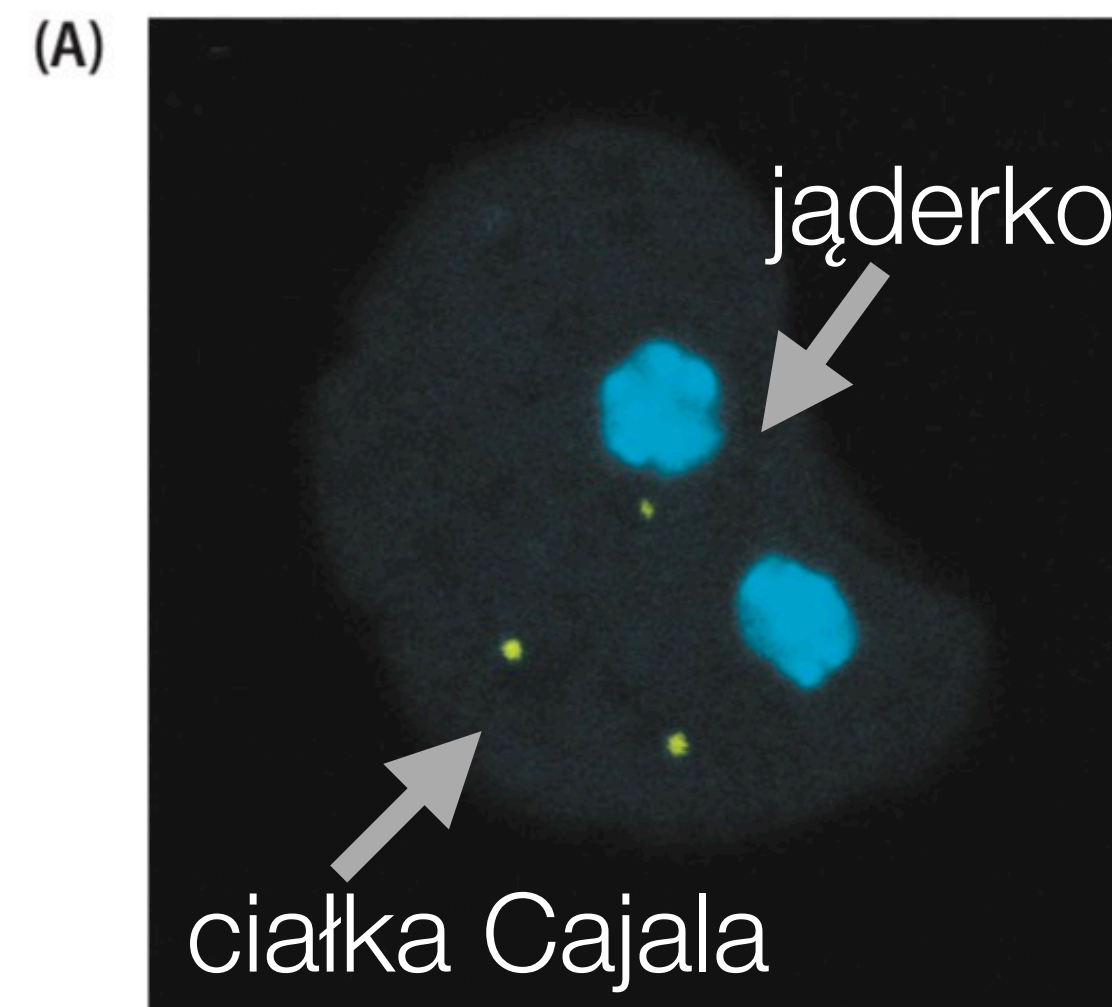
Ekspresja genów eukariotycznych

- Złożony, wieloetapowy proces
- Każdy z etapów może podlegać regulacji
- Mechanizmy zwiększające różnorodność produktów genów
 - alternatywne miejsca startu transkrypcji
 - alternatywne miejsca startu translacji
 - alternatywne składanie
 - modyfikacje białek
- Złożoność proteomu (u człowieka >500 tys. form) znacznie przekracza złożoność genomu (u człowieka ~20 tys. genów)

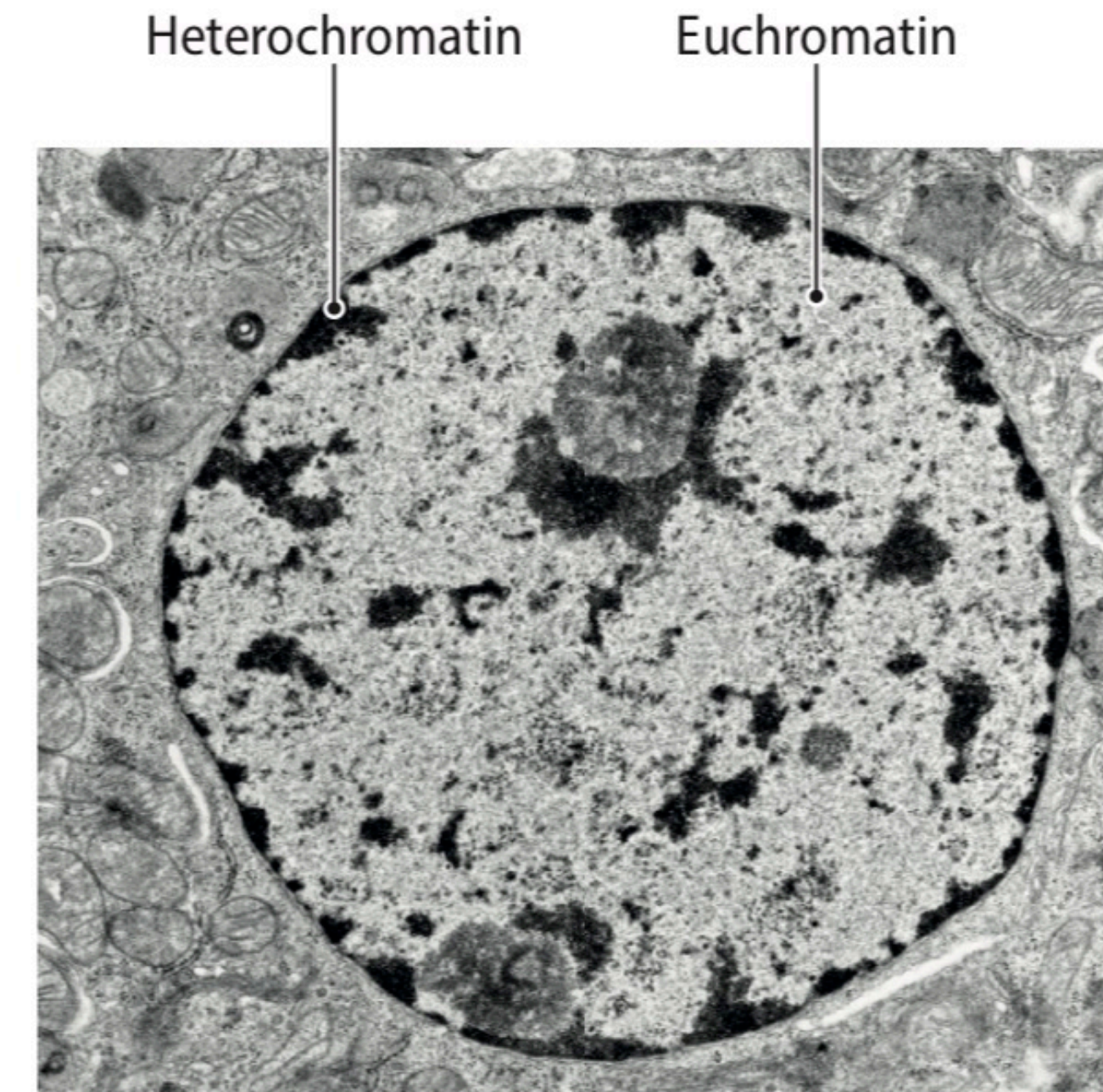


Architektura jądra a ekspresja genów

- Organizacja DNA i białek w kompleks - chromatynę jest kluczowa dla regulacji ekspresji genów
- Jądro ma złożoną i wysoce uorganizowaną strukturę
 - jąderko - synteza rRNA
 - ciałka Cajala - synteza snRNA i snoRNA (?)
 - plamki (ciałka) jądrowe (*nuclear speckles*) - składanie mRNA
- Euchromatyna
- Heterochromatyna
 - konstytutywna (centromery, telomery, obszary repetytywne)
 - fakultatywna (regulowana)

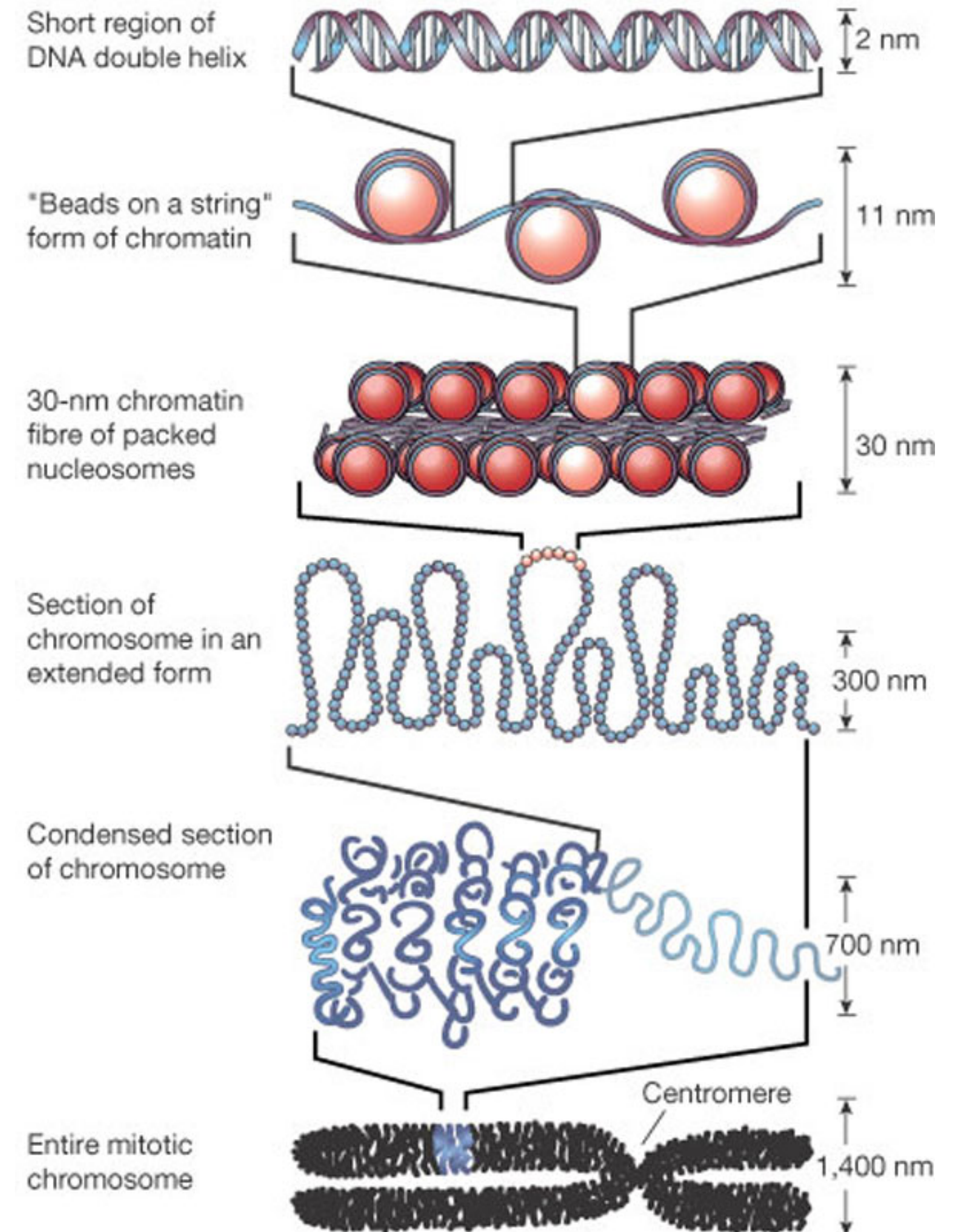
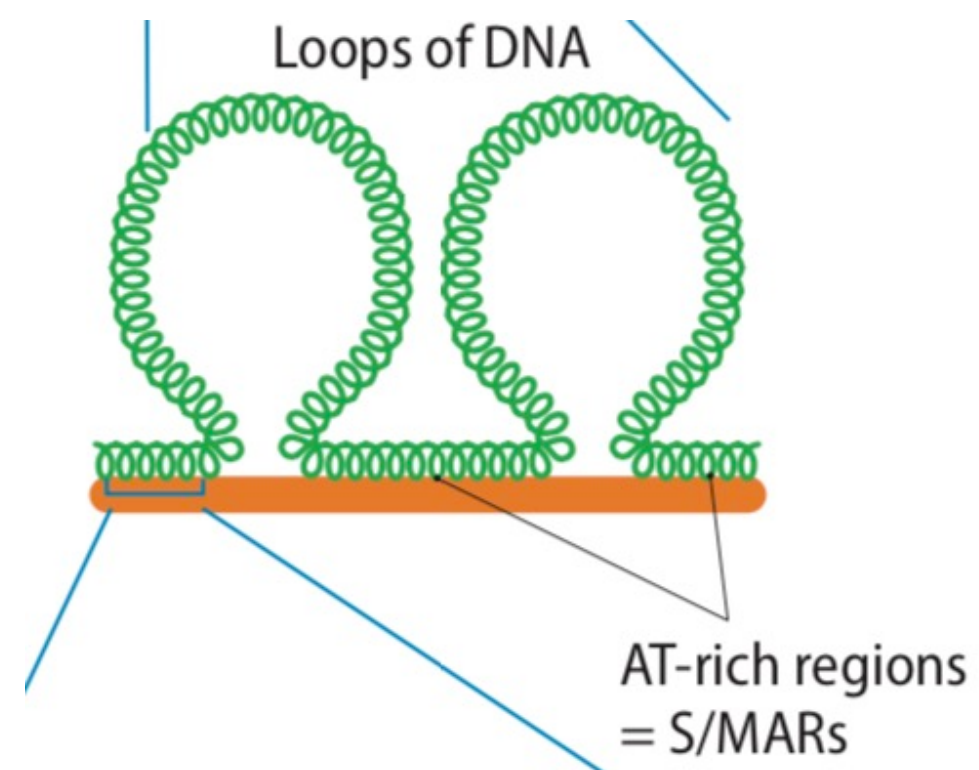


plamki (ciałka) jądrowe



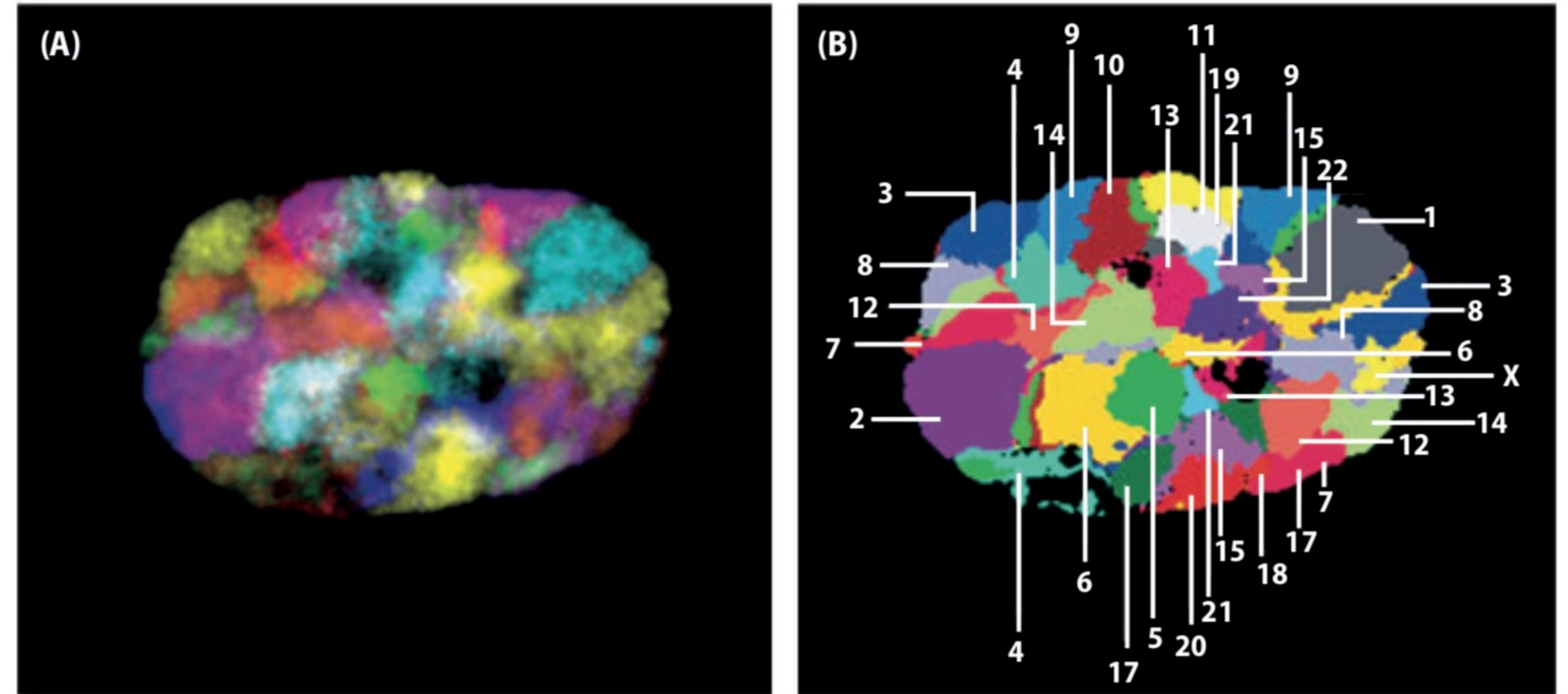
Kondensacja chromatyny

- Obraz “klasyczny”, związany z kondensacją podczas podziału komórki
- W interfazie inne mechanizmy
 - potwierdzono istnienie *in vivo* włókna 10 nm (DNA + nukleosomy)
 - niepewne istnienie włókna 30 nm. (solenoidu)
- organizacja w pętle i domeny

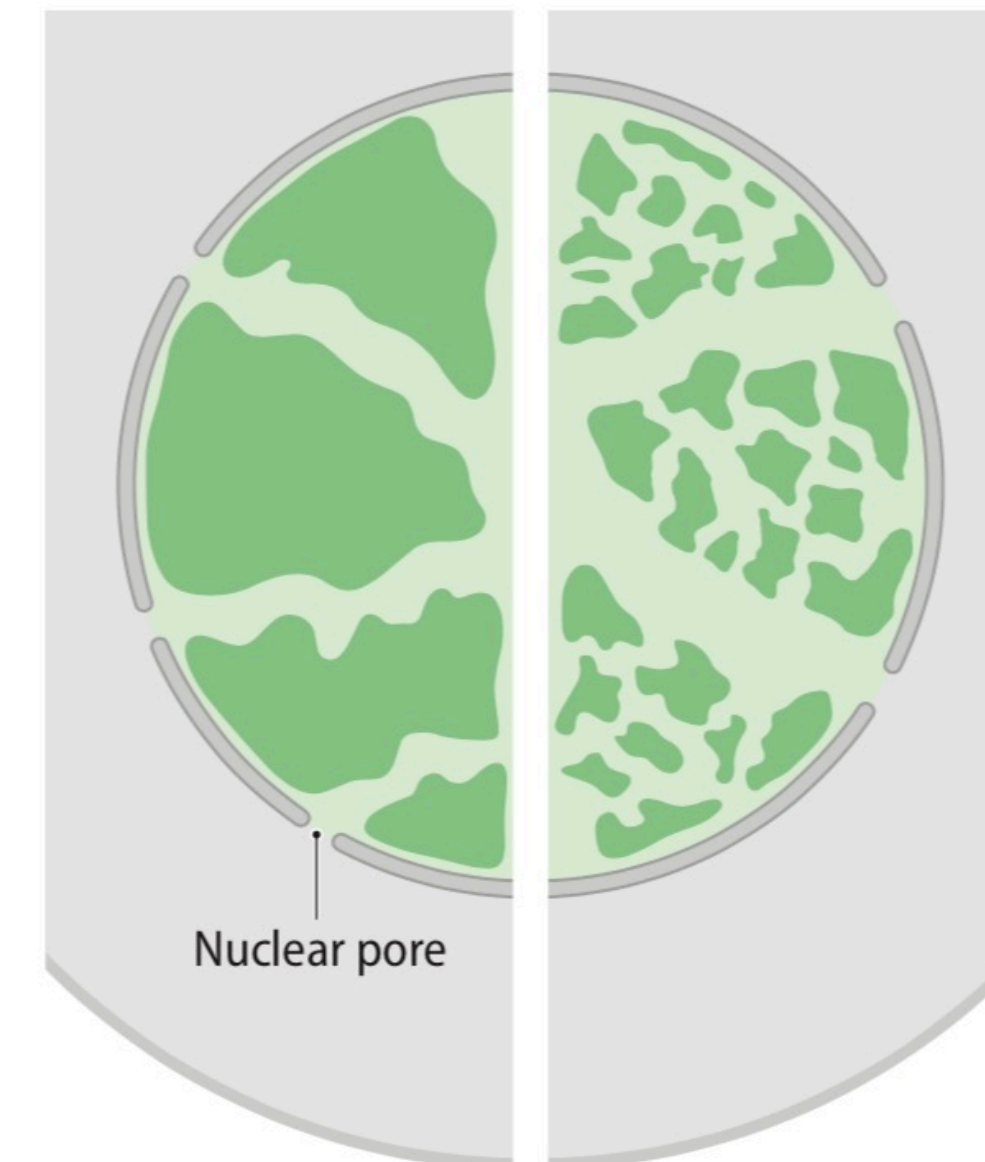


Terytoria chromosomowe

- Każdy chromosom w jądrze interfazowym zajmuje określoną przestrzeń - terytorium
- Kanały prowadzące do porów jądrowych - transkrypcja aktywna w pobliżu kanału



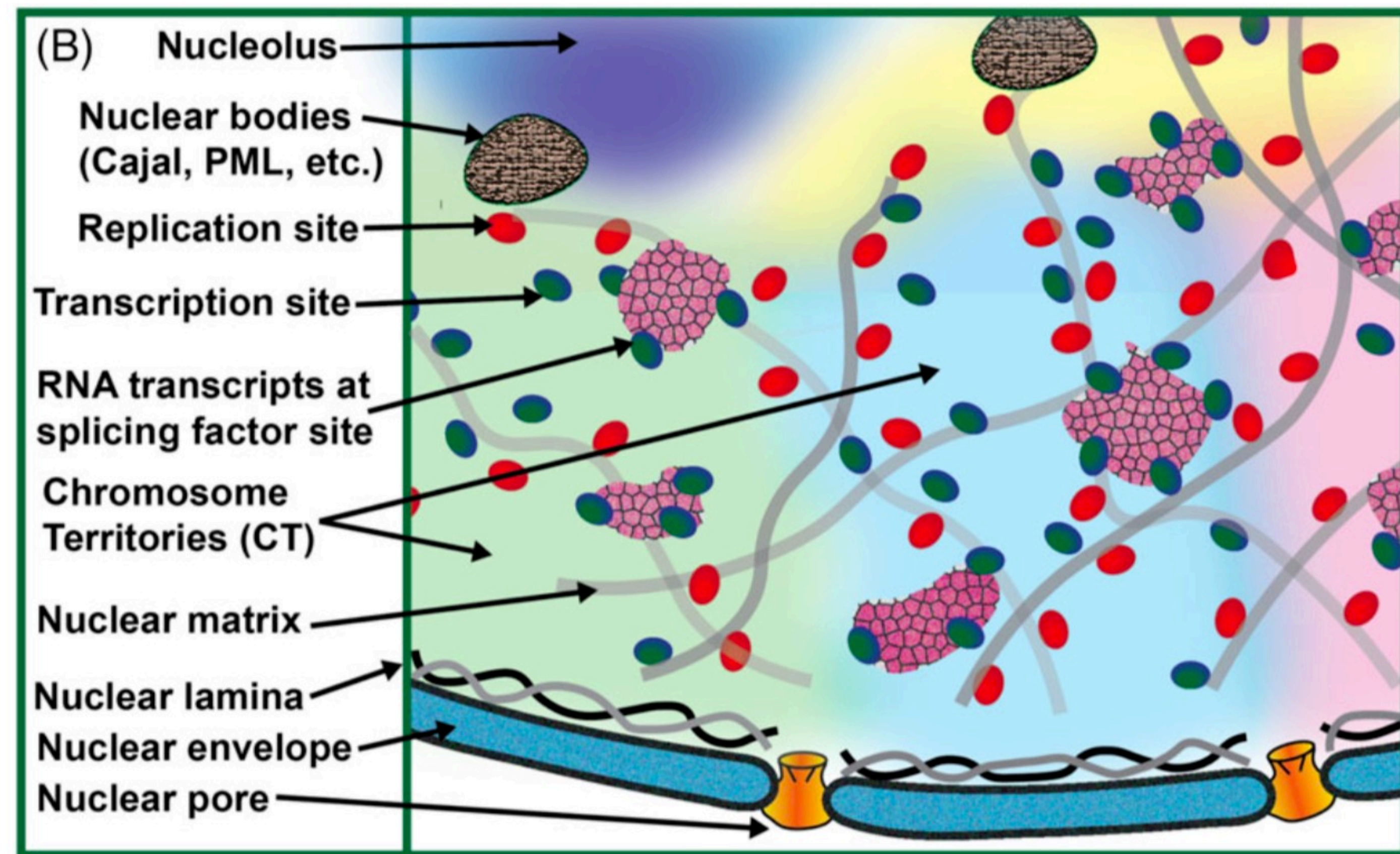
Terytoria chromosomów w jądrze komórki człowieka



TA Brown, *Genomes*, 4th ed

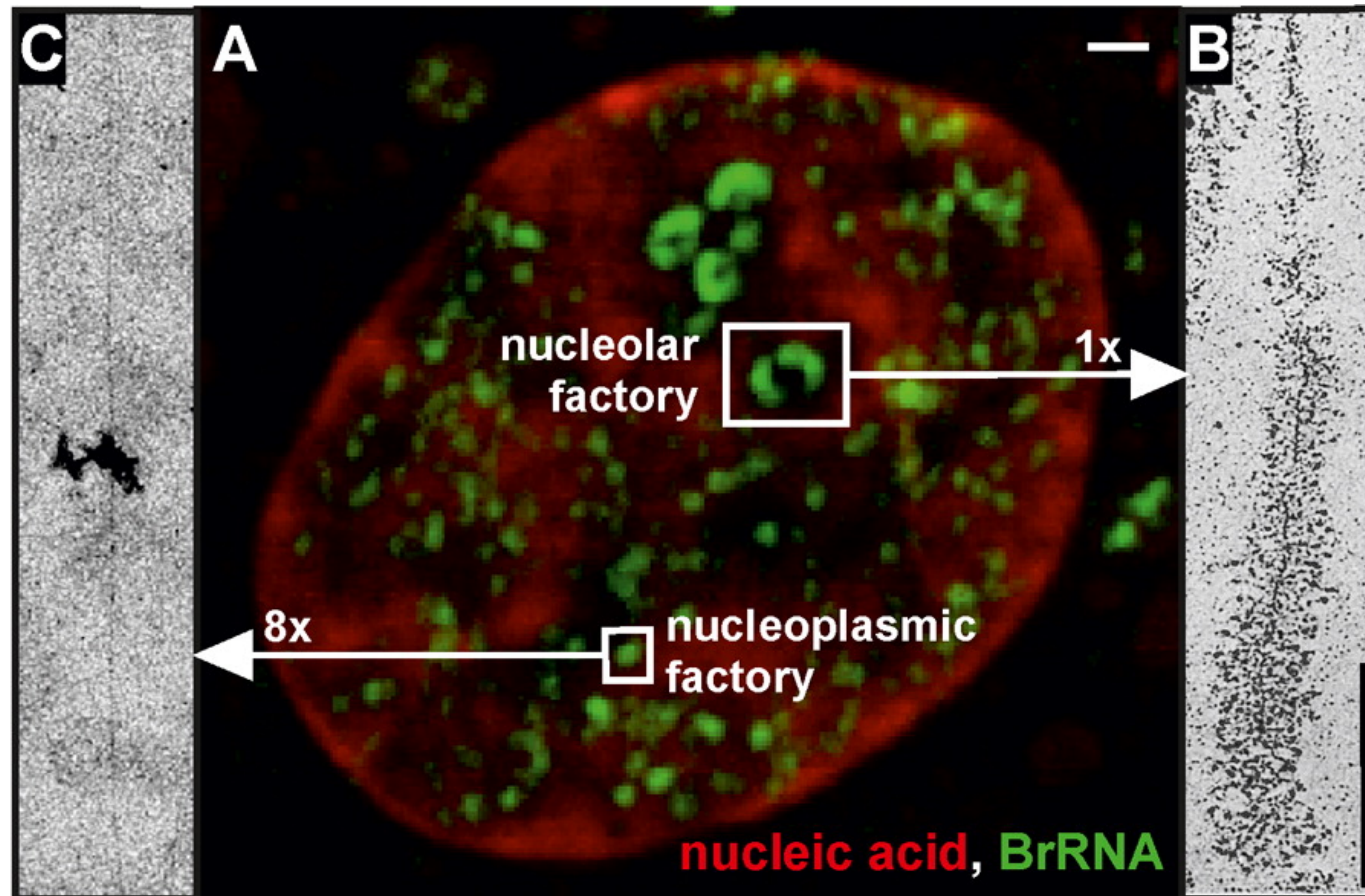
Funkcjonalna architektura jądra

- Miejsca aktywnej transkrypcji tworzą skupiska - tzw. fabryki transkrypcyjne
- Białka zaangażowane w składanie tworzą ciała jądrowe w sąsiedztwie fabryk transkrypcyjnych
- Tradycyjny model: czynniki transkrypcyjne i polimeraza przyłączają się do DNA
- Współczesny model: DNA przemieszcza się do nieruchomej fabryki transkrypcyjnej



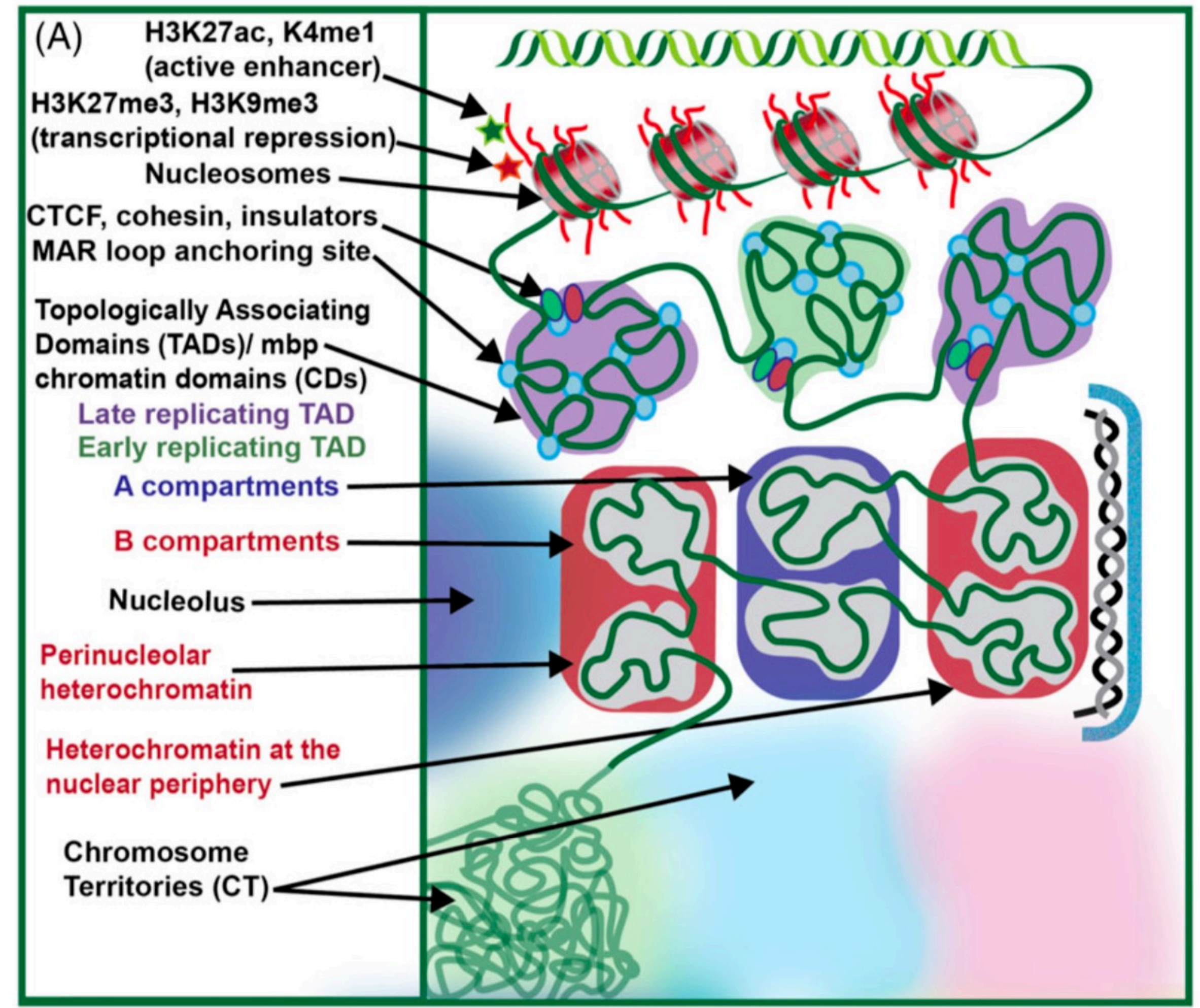
Fritz. *et al. Genes Chromosomes Cancer*. 2019;1–20

Fabryki transkrypcyjne jądra i jąderka



Domeny i przedziały chromatyny

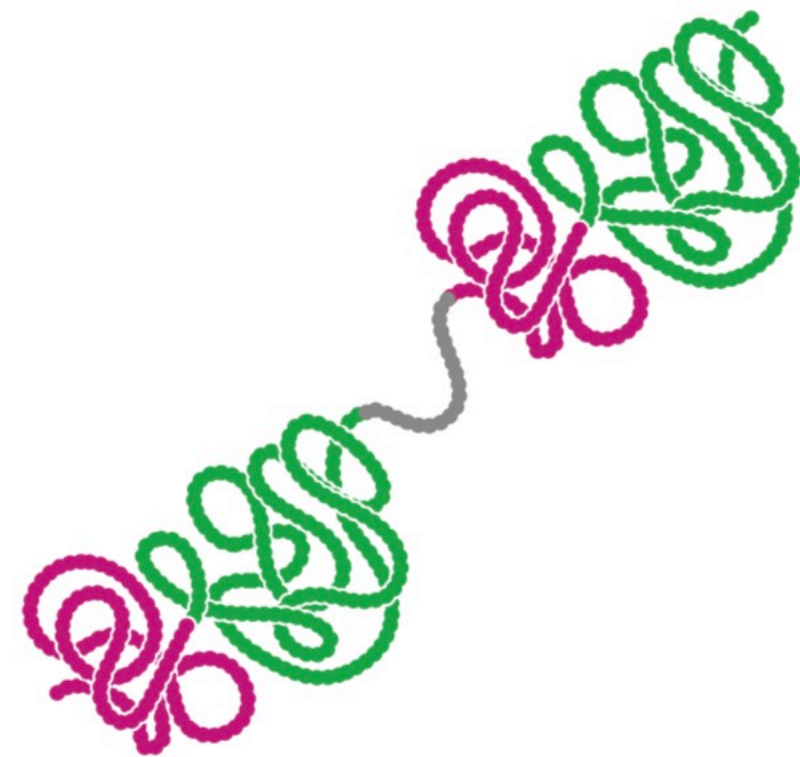
- Przedziały typu A: euchromatyna, aktywne
- Przedziały typu B: heterochromatyna, ekspresja wyciszona
- Domeny chromatynowe (domeny powiązane topologicznie - TAD)



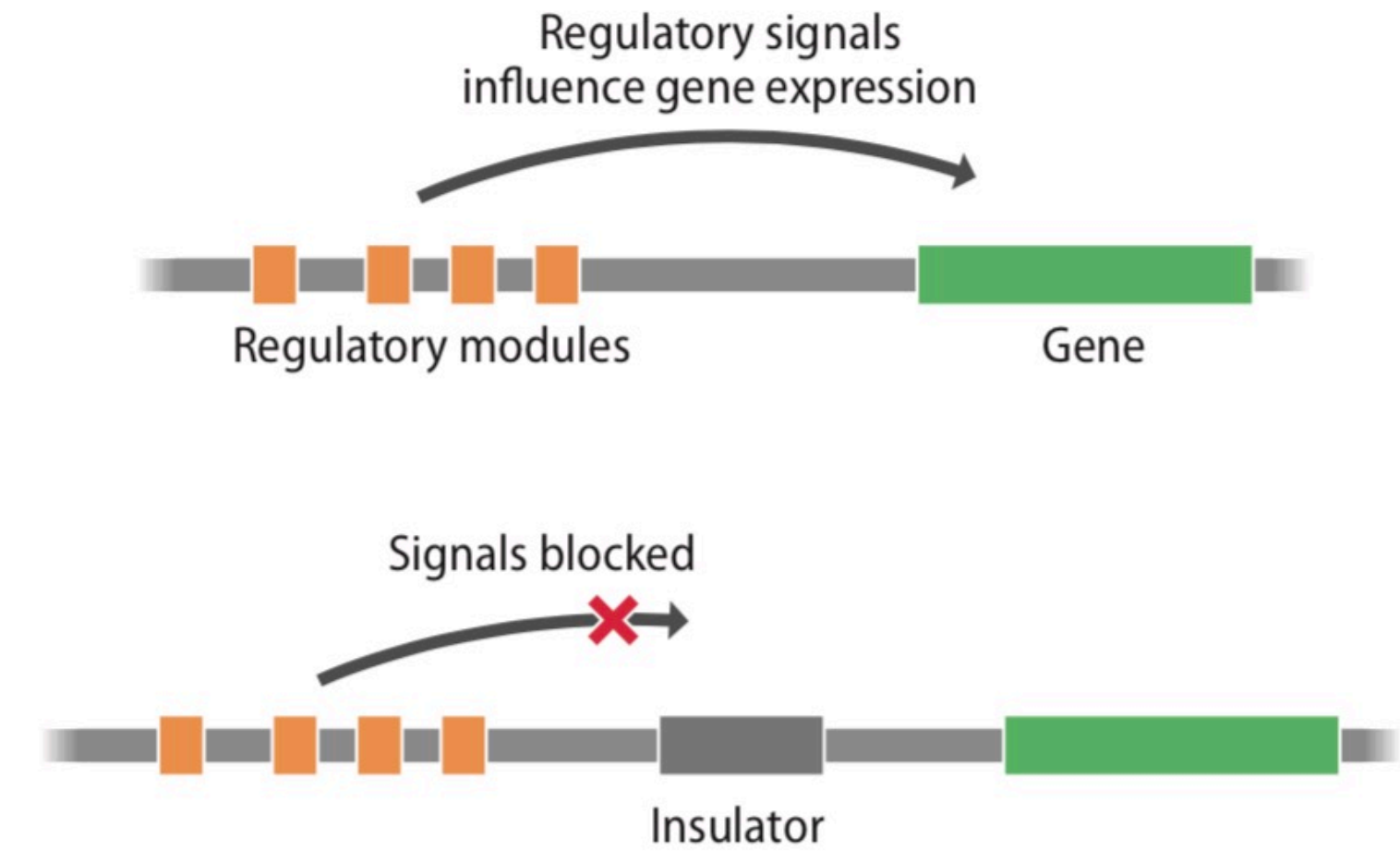
Fritz. *et al. Genes Chromosomes Cancer*. 2019;1–20

Domeny chromatyny

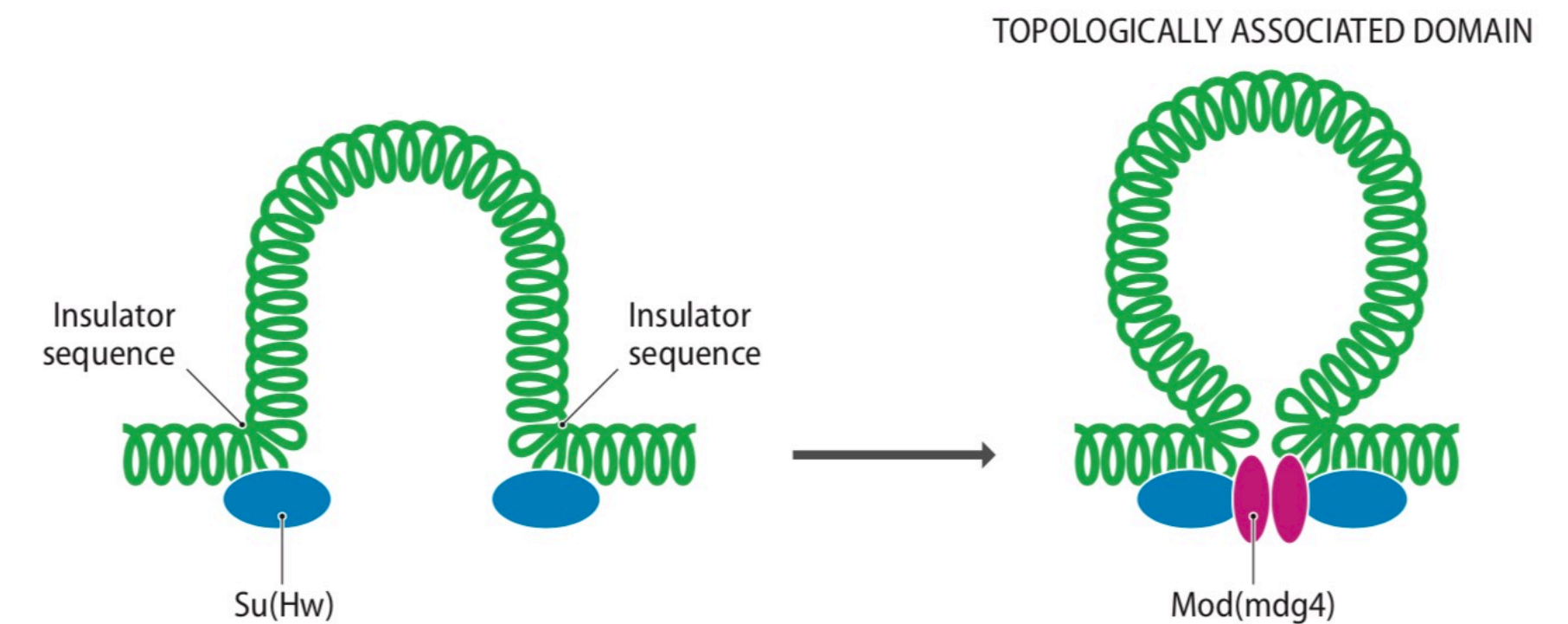
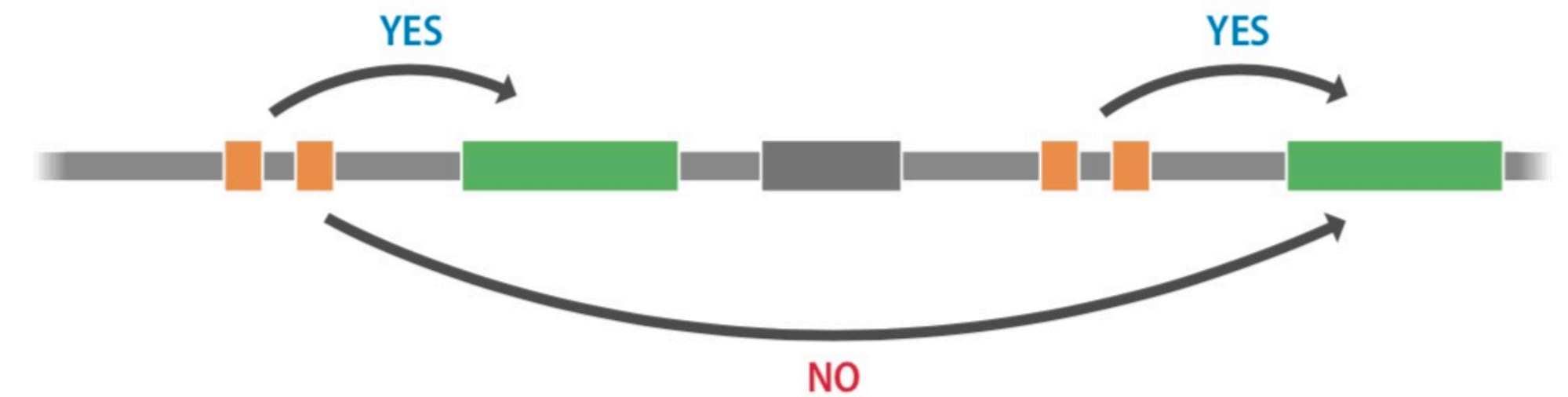
- Domeny przedzielone są sekwencjami izolatorów
- Izolatory uniemożliwiają oddziaływanie elementów regulatorowych (enhancerów) poza obrębem domeny



(A) Insulators block the regulatory signals that control gene expression

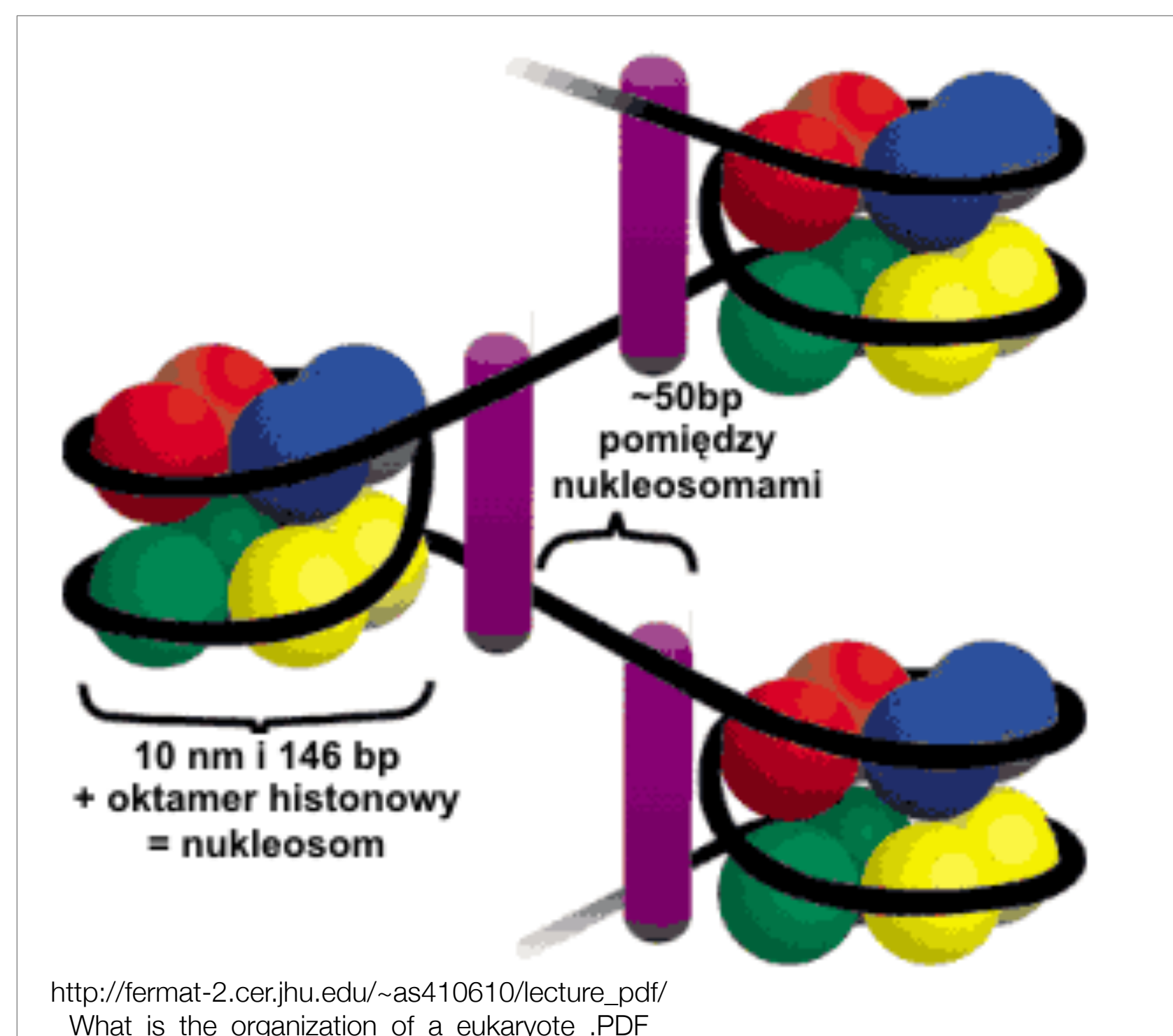


(B) Insulators prevent cross-talk between domains



Nukleosomy

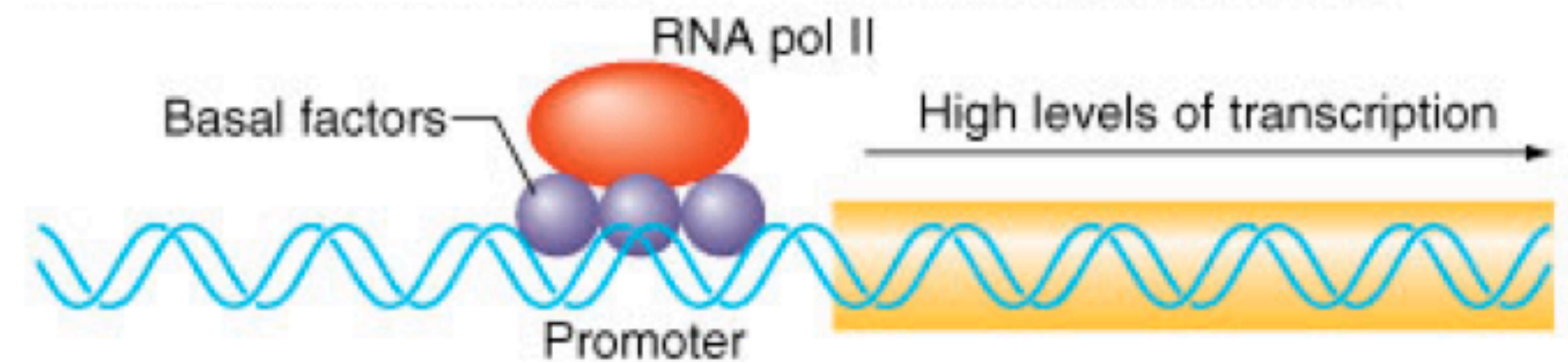
- Oktamer rdzeniowy 2x (H2A, H2B, H3, H4), owinięty ok. 147 bp DNA
- Histon łącznikowy H1 związany z ok. 50 bp DNA
- H3 i H4 - bogate w argininy, należą do najbardziej konserwowanych ewolucyjnie sekwencji
- H2A i H2B - bogate w lizyny, konserwowane ewolucyjnie
- H1 - bardzo bogaty w lizyny, słabo konserwowany, duża różnorodność



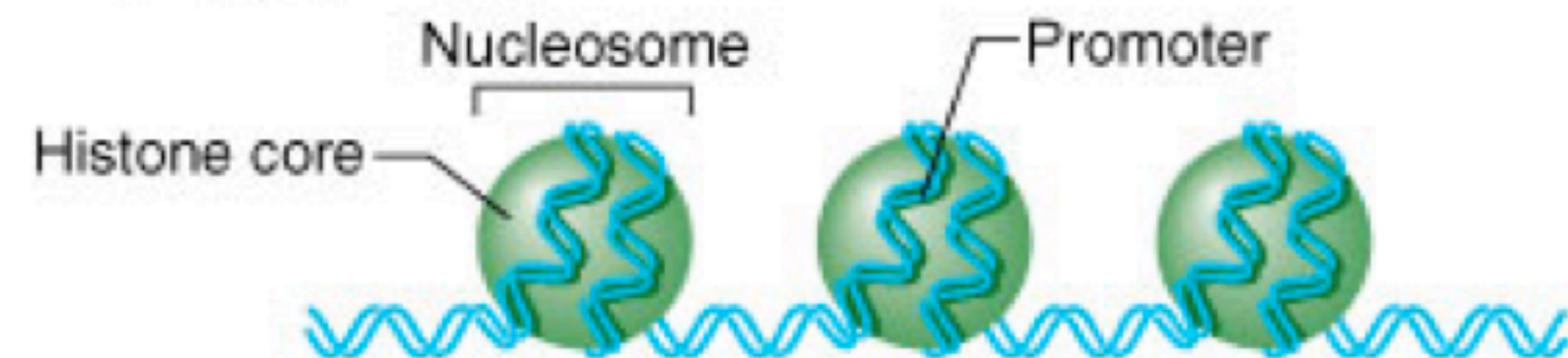
Struktura chromatyny reguluje aktywność genów

- Na poziomie domen i kompartmentów: przejścia między fakultatywną heterochromatyną a euchromatyną
- Na poziomie genów: rozmieszczenie nukleosomów w obrębie sekwencji promotora
- Regulacja przez strukturę chromatyny może być trwała - mechanizmy epigenetyczne
- regulacja genów utrzymująca się po podziale komórki, a nawet w kolejnych pokoleniach

odsłonięty promotor dostępny dla czynników transkrypcyjnych



struktura chromatyny ogranicza wiązanie czynników transkrypcyjnych

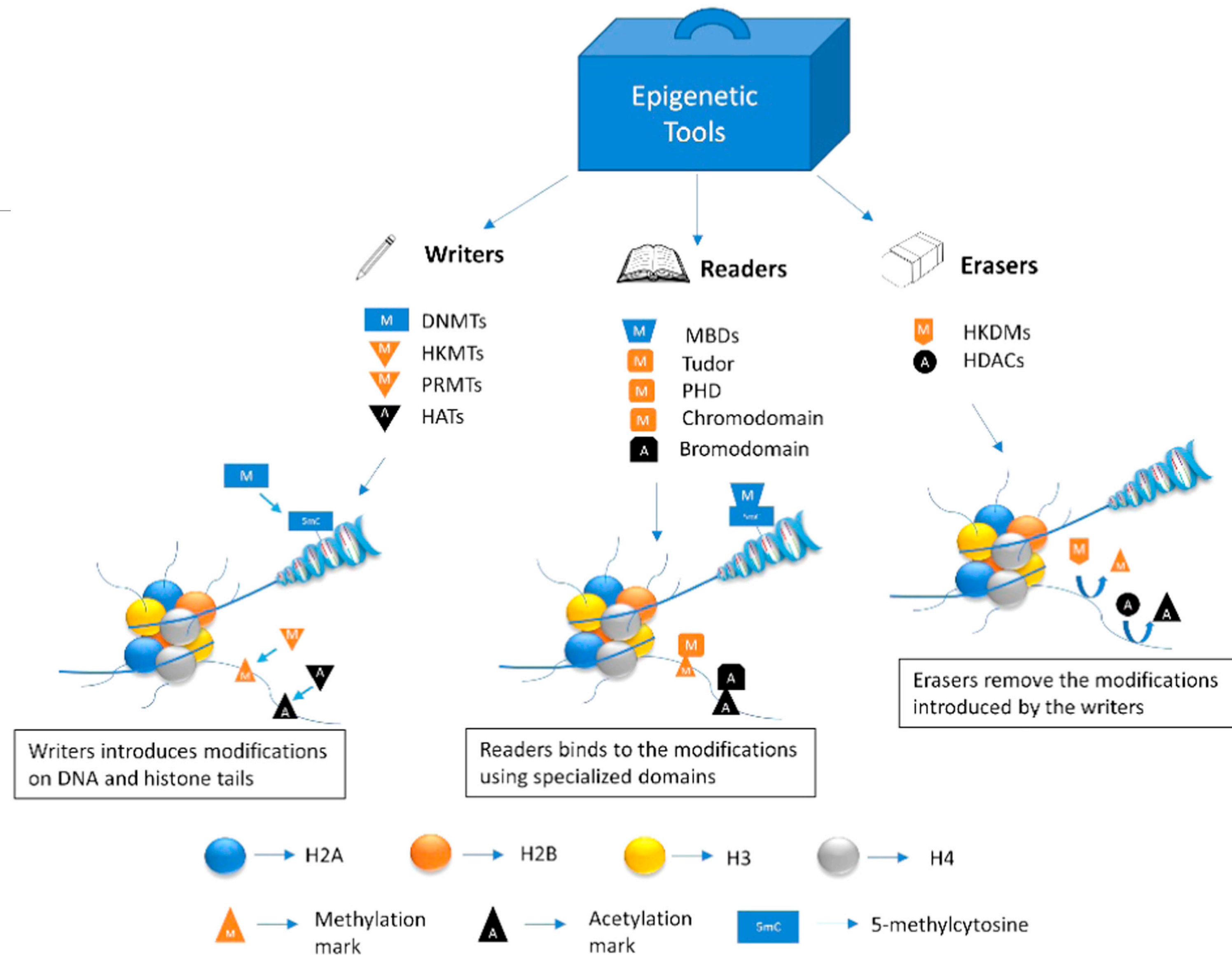


Mechanizmy regulacji chromatyny

- Trwalsze:
 - **Metylacja DNA** (najczęściej 5-metylocytozyna)
 - **Modyfikacje kowalencyjne białek histonowych** (najczęściej metylacja, acetylacja, fosforylacja)
- **Remodelowanie chromatyny** (zmiana ułożenia nukleosomów na DNA) - bardziej dynamiczne
 - może zależeć od modyfikacji histonów

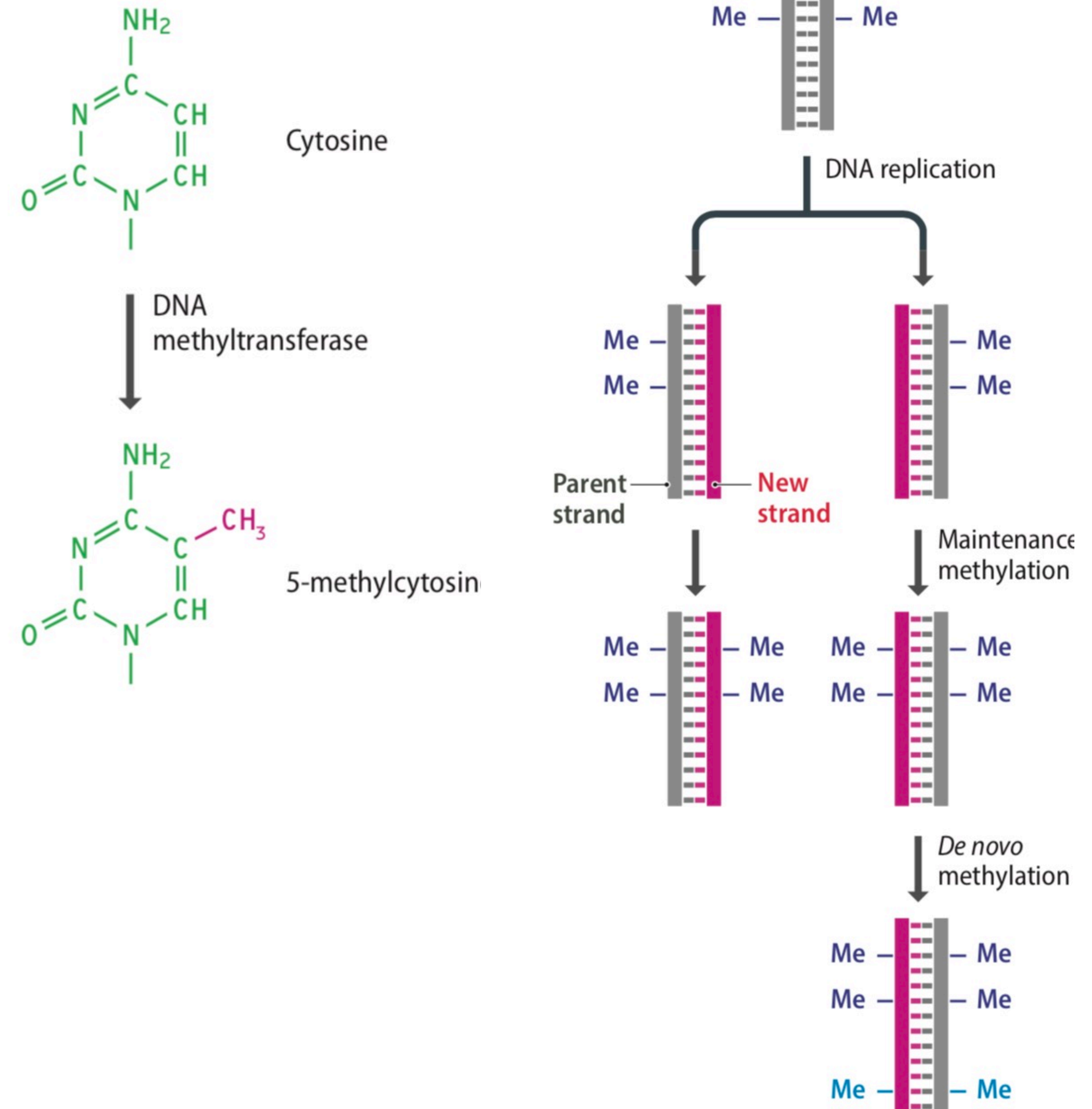
Elementy regulacji epigenetycznej

- Białka zapisujące (*writers*): modyfikują DNA lub histony
 - np. metylotransferazy DNA, metylotransferazy i acetylazy histonów
- Białka odczytujące (*readers*): wiążą się ze zmodyfikowanym DNA lub histonami
 - np. białka wiążące metylo CpG, białka z chromodomeną i bromodomeną
- Białka wymazujące (*erasers*): usuwają modyfikacje
 - np. demetylazy DNA, demetylazy i deacetylazy histonów



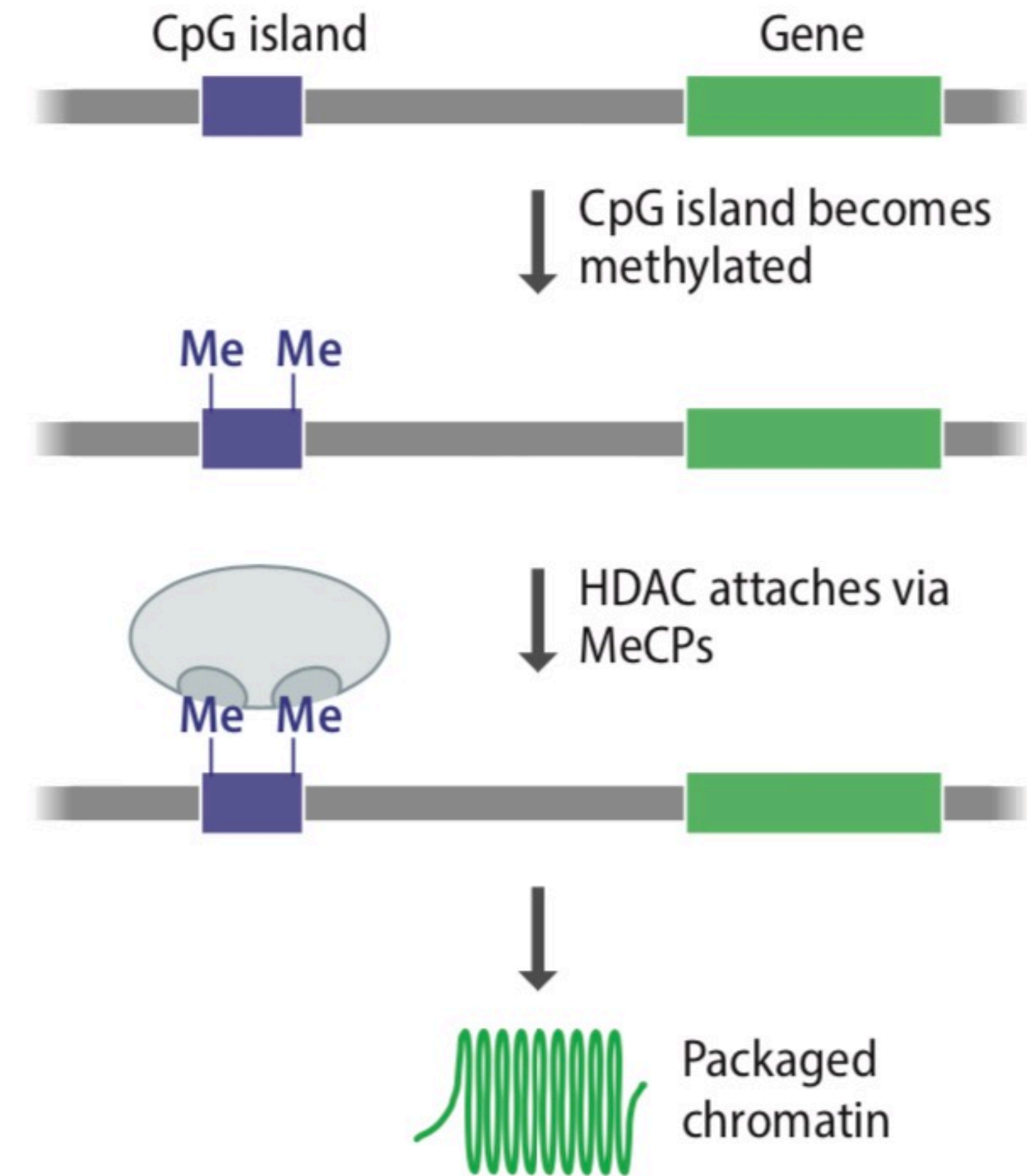
Metylacja DNA

- Najczęściej metylowana cytozyna w pozycji 5 przez metylotransferazy DNA (DNMT)
- Rzadka u niższych eukariotów, u kręgowców do 10% cytozyn (u roślin do 30%)
- Najczęściej w sekwencjach CG (u roślin też CNG)
- Wzór metylacji odtwarzany po replikacji podczas mitozy
- Podczas mejozy zwykle (nie zawsze) “reset” do wzoru domyślnego



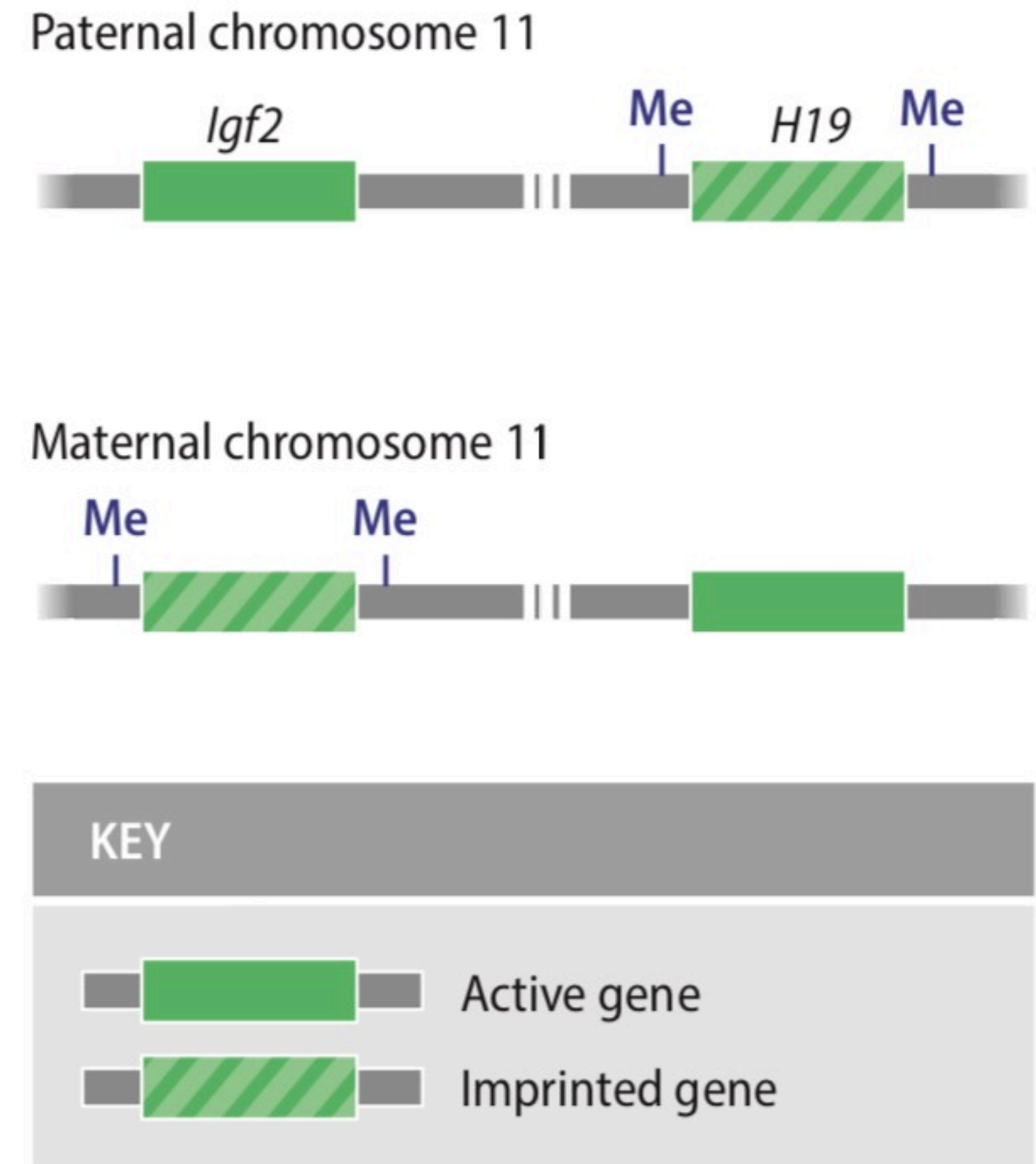
Metylacja DNA

- Metylacja DNA prowadzi do **kondensacji chromatyny** i **wyciszenia aktywności transkrypcyjnej**
- Odczytywanie: białka MeCP wiążą się ze zmetylowanymi sekwencjami CG
- Związanie białek MeCP rekrutuje kompleksy deacetylaz histonów (HDAC) Sin3 i NuRD
- Deacetylacja histonów powoduje kondensację chromatyny



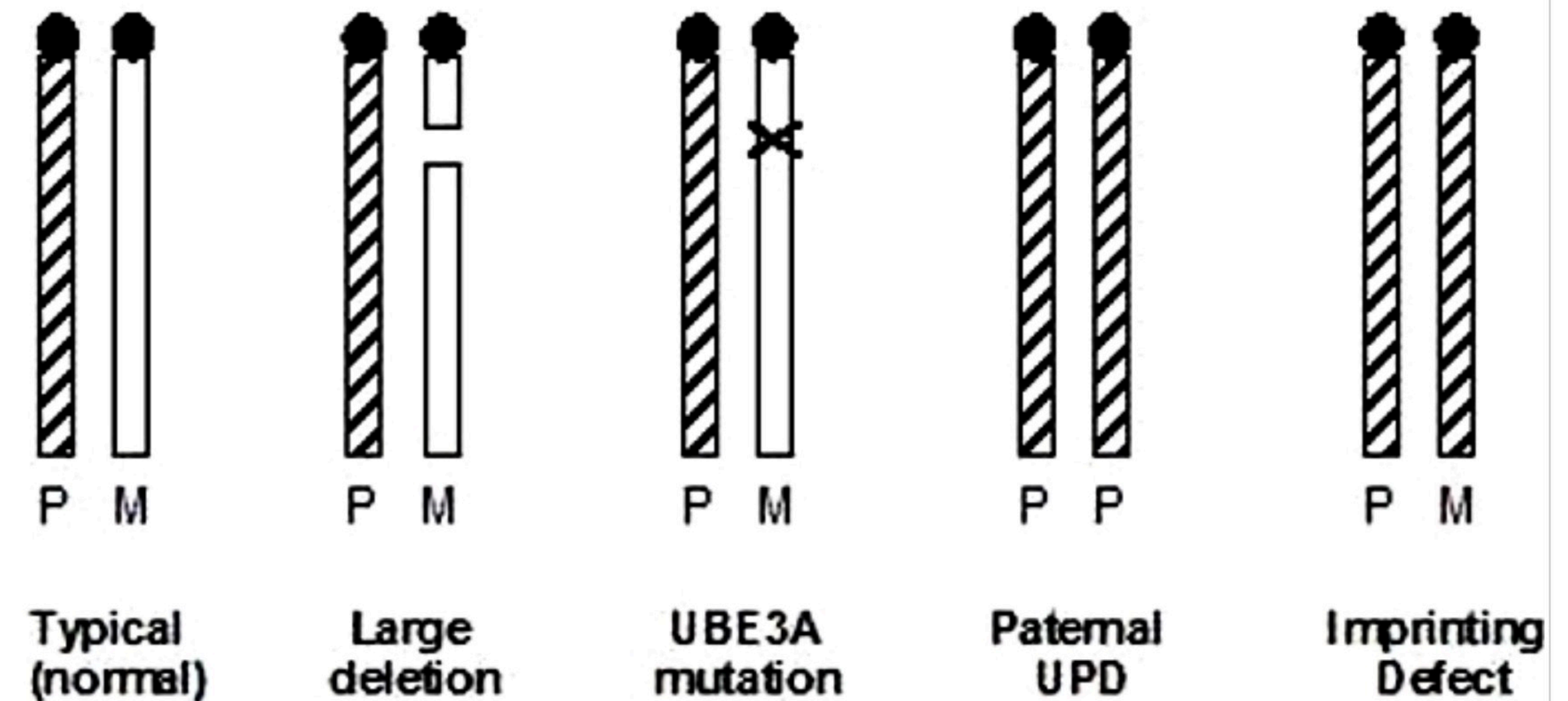
Niektóre funkcje metylacji DNA

- Inaktywacja jednego z dwóch chromosomów X
- Piętno genomowe (*imprinting*)
 - z dwóch alleli genu aktywny jest tylko jeden, pochodzący od określonego rodzica
 - dotyczy ok. 200 genów u ssaków
 - np. *IGF2* - aktywny ojcowski, wyciszony matczyny
 - *H19* - aktywny matczyny, wyciszony ojcowski
 - niezbędne do prawidłowego rozwoju zarodka



Piętno genomowe i choroby - zespół Angelmana

- Delecje lub mutacje punktowe na **matczynej kopii** chr. 15 (obszar 15q11-q13)
- Gen *UBE3A* koduje białko zaangażowane w szlak ubiquityny
- Allel ojcowski jest wyciszony przez imprinting, nie może zapewnić funkcji genu
- Gdy występują dwie kopie chromosomu ojcowskiego (disomia jednorodzicielska) też brak funkcji
- Defekty rozwoju intelektualnego i motorycznego, normalna długość życia

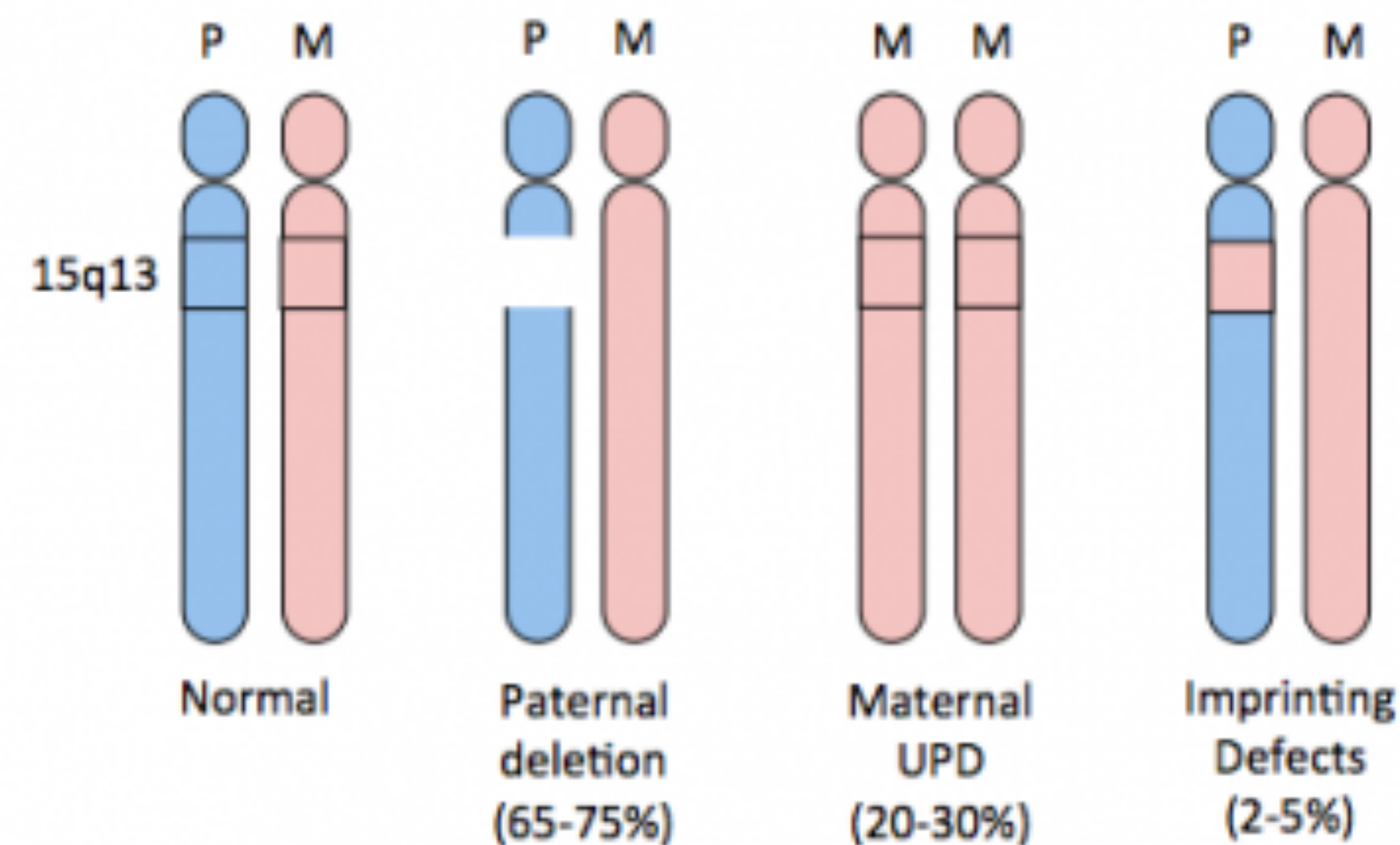


Piętno genomowe i choroby - zespół Prader-Willi

- Delecje na **ojcowskiej kopii** chr. 15 (też w obszarze 15q11-q13)
- Kilka genów, w tym kodujące snoRNA
- Allel matczyny jest wyciszony przez imprinting, nie może zapewnić funkcji genu
- Gdy występują dwie kopie chromosomu matczynego (disomia jednorodzicielska) też brak funkcji
- Defekty rozwoju intelektualnego i motorycznego, ciężkie zaburzenia odżywiania



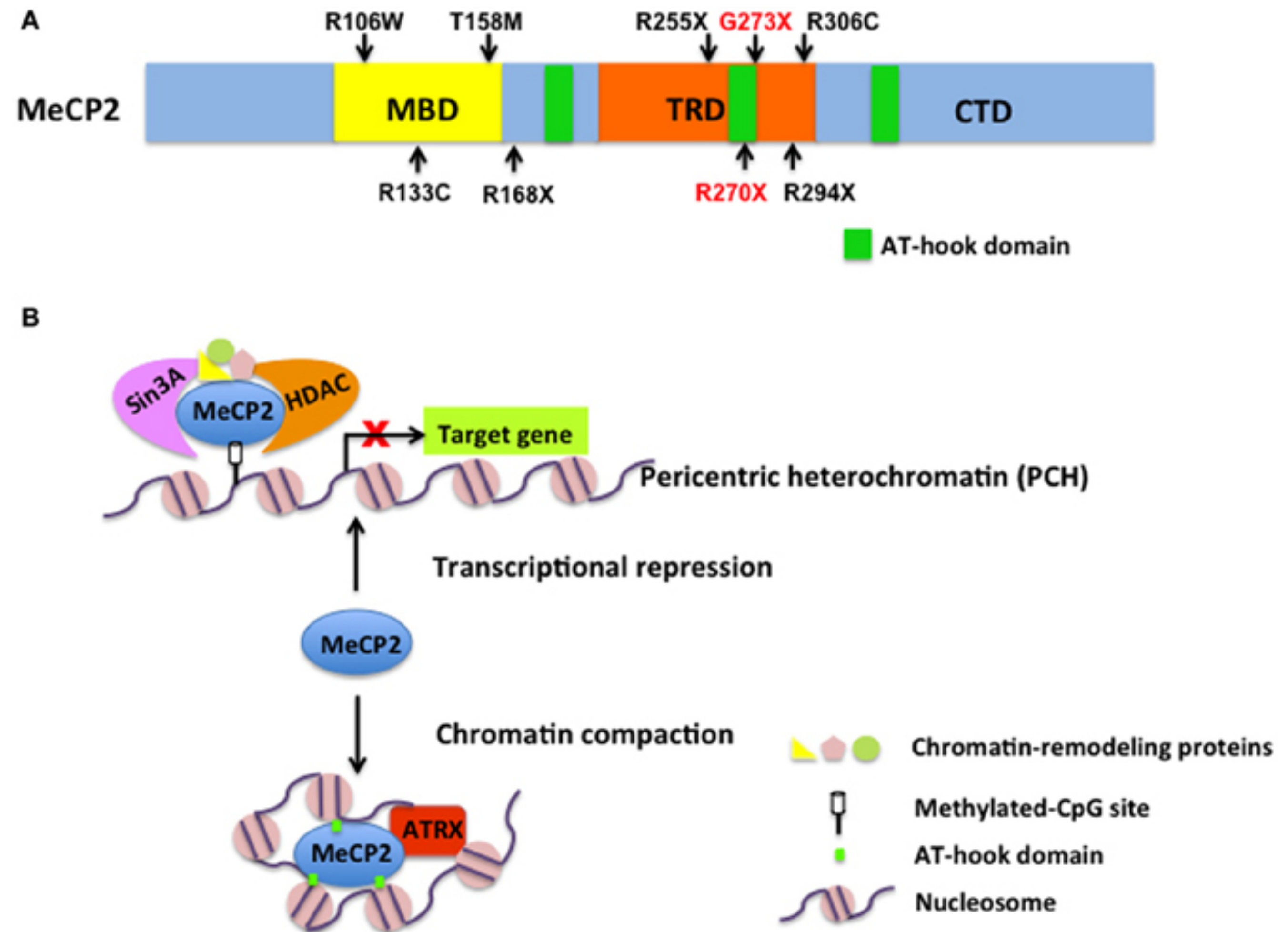
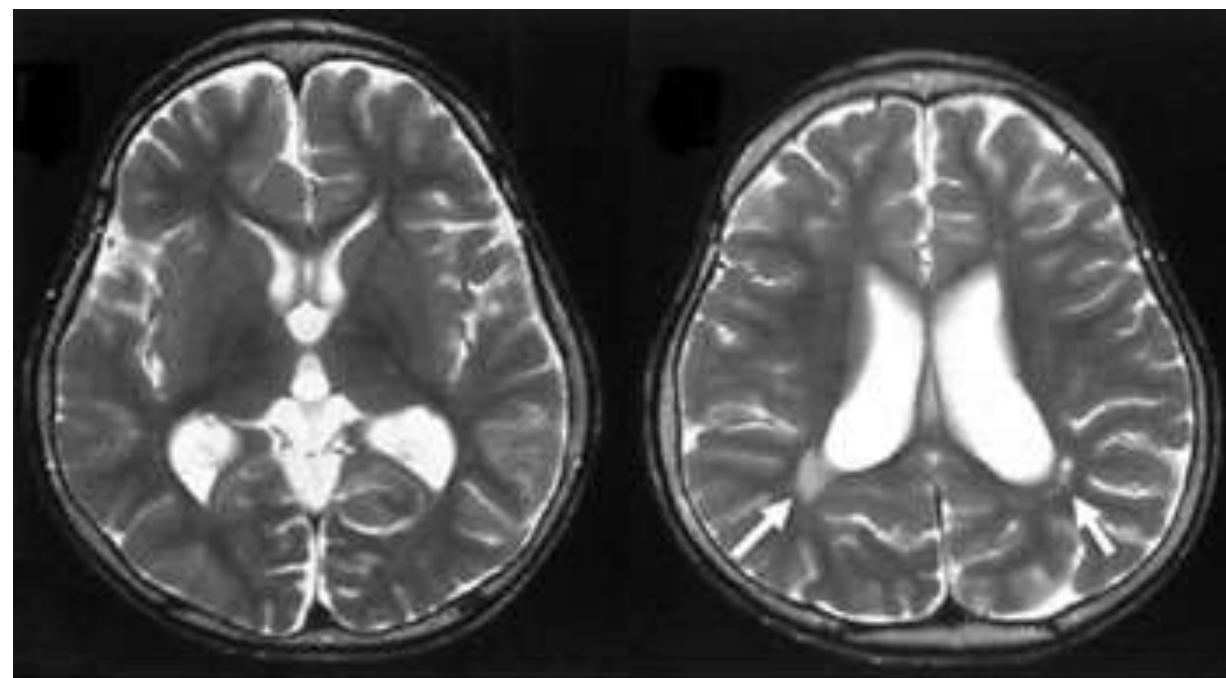
Prader-Willi syndrome : Genetic mechanisms



<http://www.genetics4medics.com/prader-willi-syndrome.html>

Zespół Retta

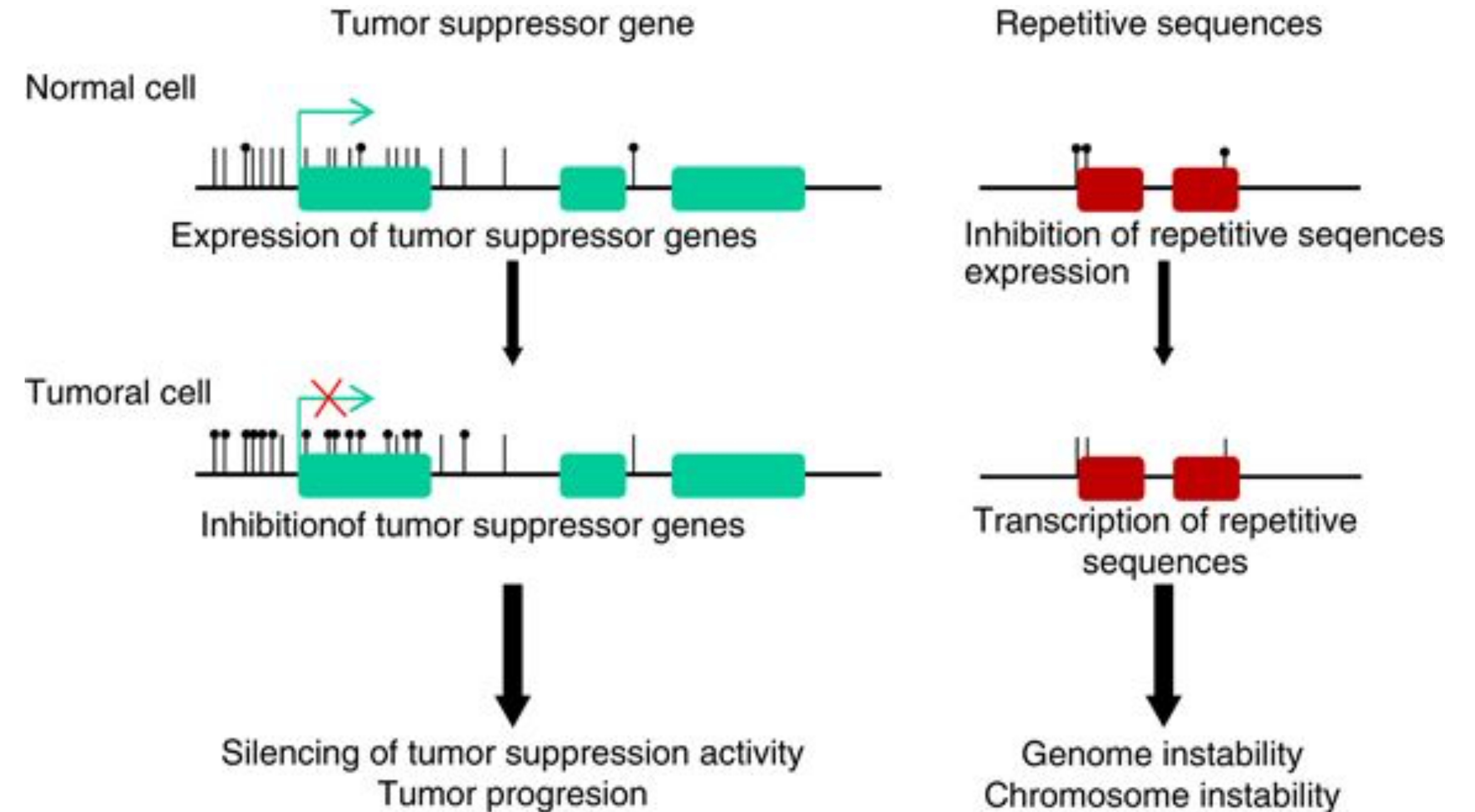
- Najczęściej mutacje genu *MECP2* (methyl-CpG binding protein-2)
- Białko wyrażane w neuronach
- Defekty wyciszania ekspresji genów
- Niedorozwój umysłowy i motoryczny, ciężkie zaburzenia behawioralne



Xu & Miller, *Front. Cell. Neurosci.*, 2013

Metylacja DNA i nowotwory

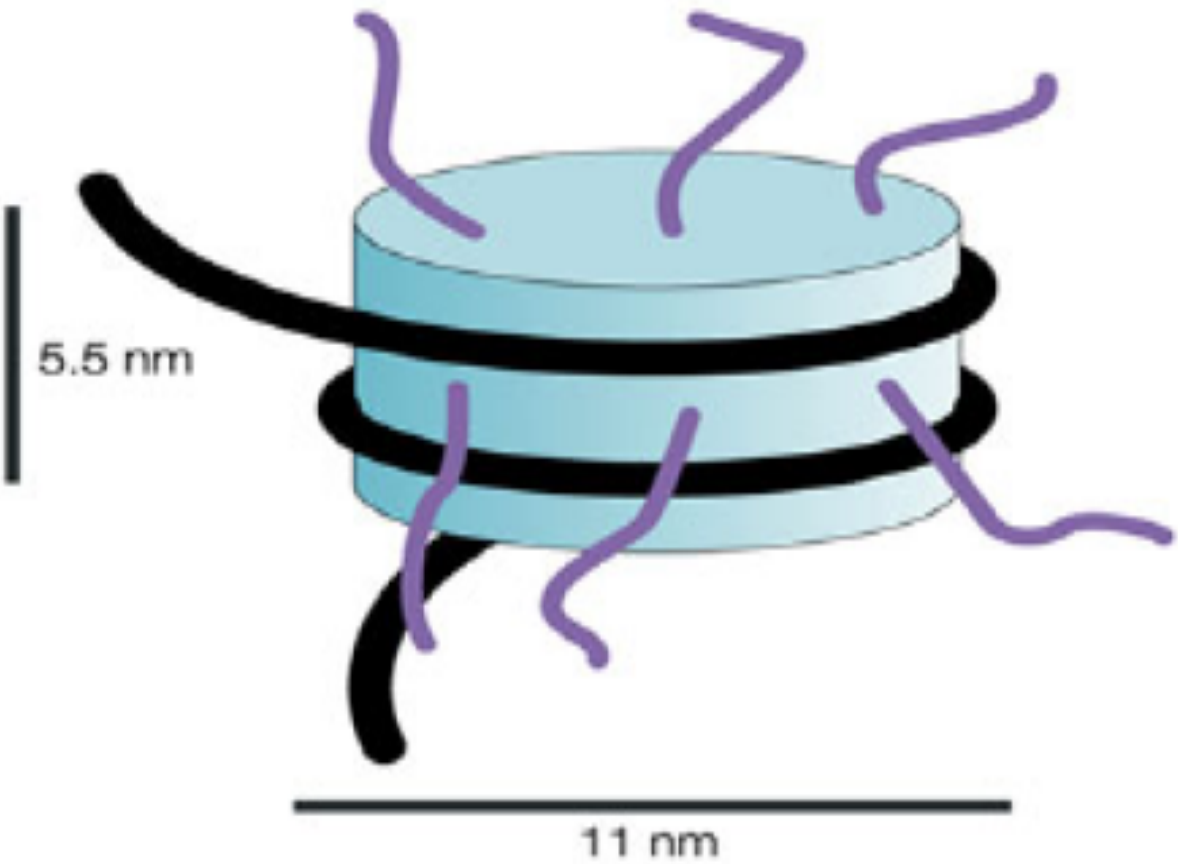
- W komórkach nowotworowych obniżony ogólny poziom metylacji (**hipometylacja**)
- Hipometylacja sekwencji repetytywnych przyczynia się do niestabilności genomowej
- Hipermetylacja w niektórych obszarach DNA skutkująca m. in. wyciszeniem genów supresorów nowotworzenia



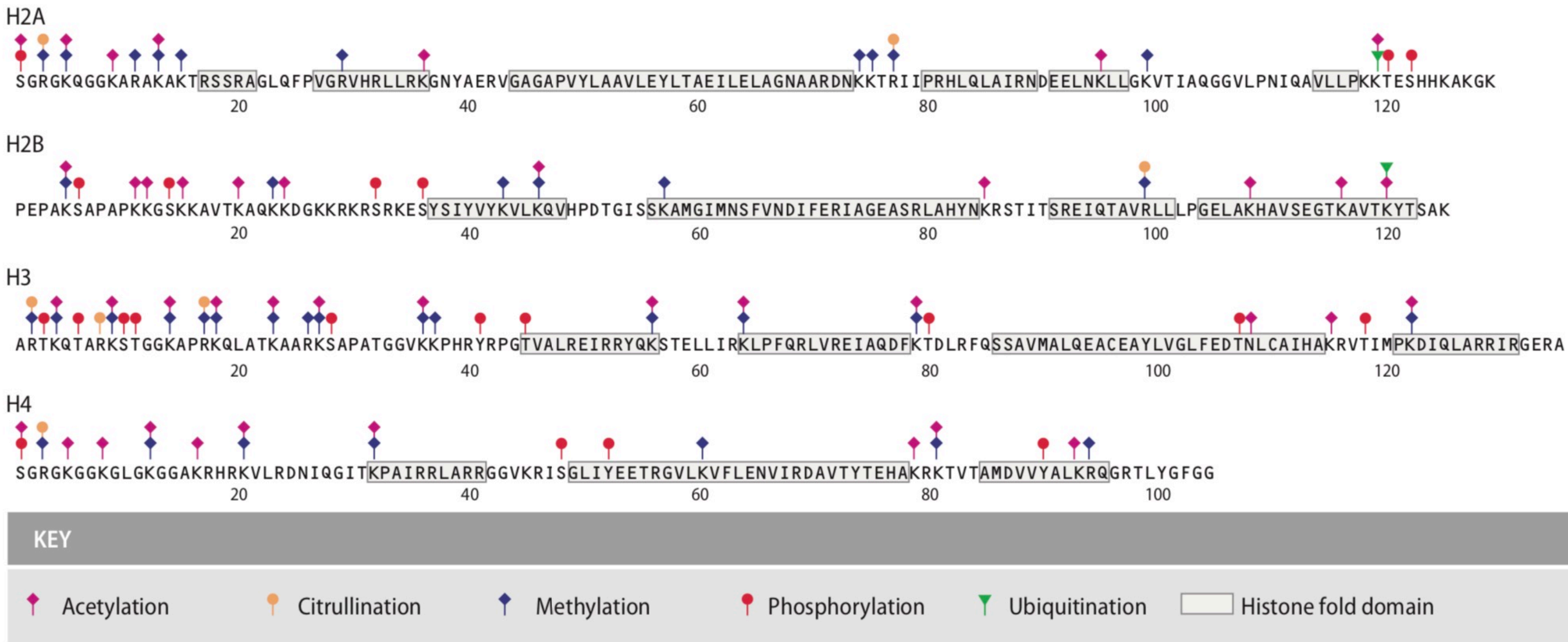
Lopez-Serra & Esteller, *Oncogene*, 31,1609–1622, 2012

Modyfikacje histonów

- N- i C-końce histonów rdzeniowych wystają poza globularną strukturę owiniętą DNA i są miejscem wielu modyfikacji
- acetylacja, fosforylacja, metylacja, cytrulinacja, ADP-rybozylacja, ubikwitynylacja, sumoylacja
- Złożony i kombinatoryczny mechanizm niekiedy zwany “kodem histonowym”

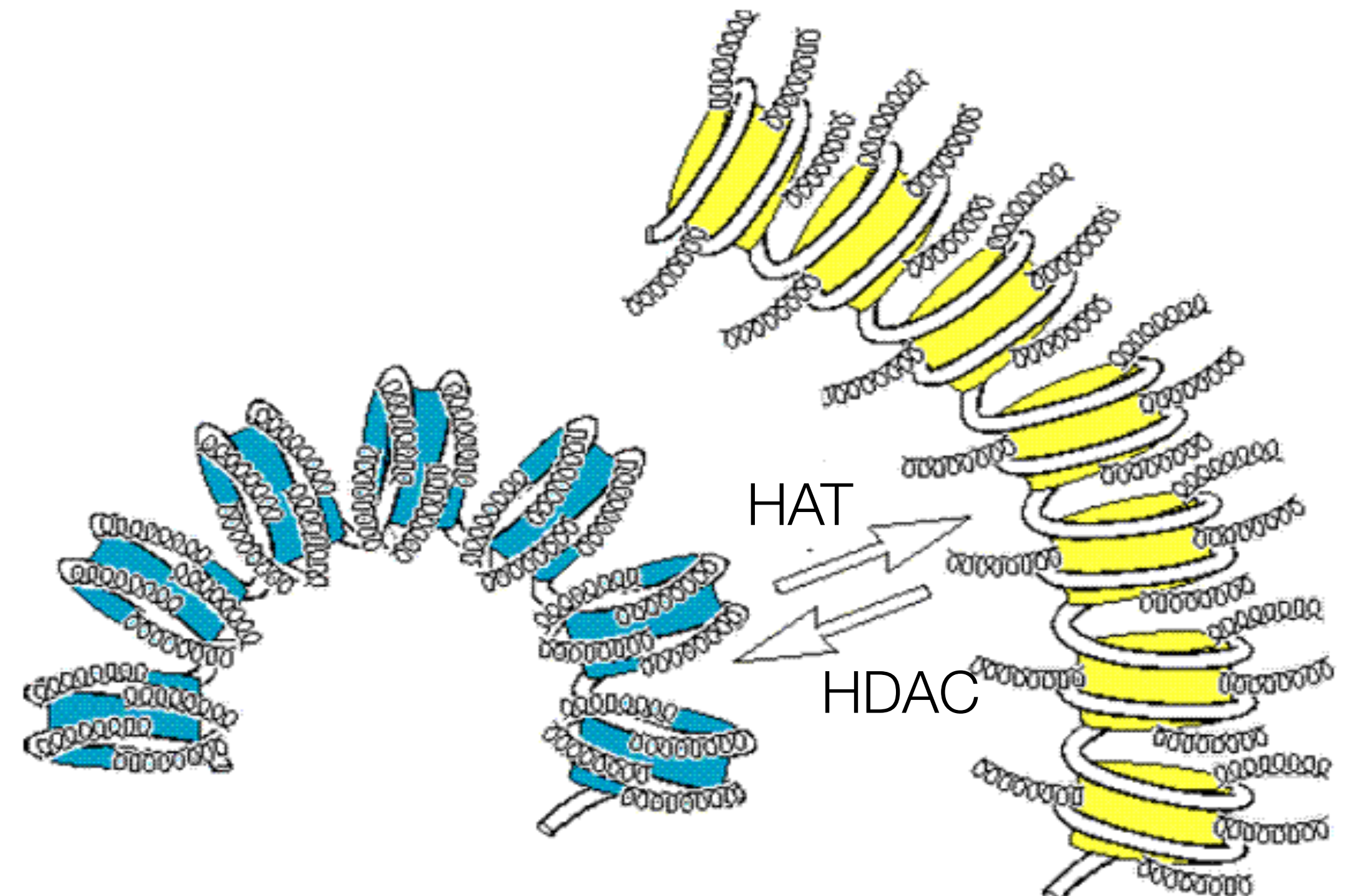


Nature Reviews Molecular Cell Biology 4, 809-814, 2003



Acetylacja histonów

- Prowadzi do **rozluźnienia** (otwarcia) chromatyny
- **Aktywacja** ekspresji
- enzymy: acetylazy histonów (HAT)
 - substrat: reszta lizyny
 - elementy większych kompleksów (np. SAGA, TFTC)
- wymazywanie: deacetylazy histonów (HDAC)
 - kompleksy: np. Sin3, NuRD
- **Deacetylacja** prowadzi do **zamknięcia** chromatyny (**hamuje** ekspresję)

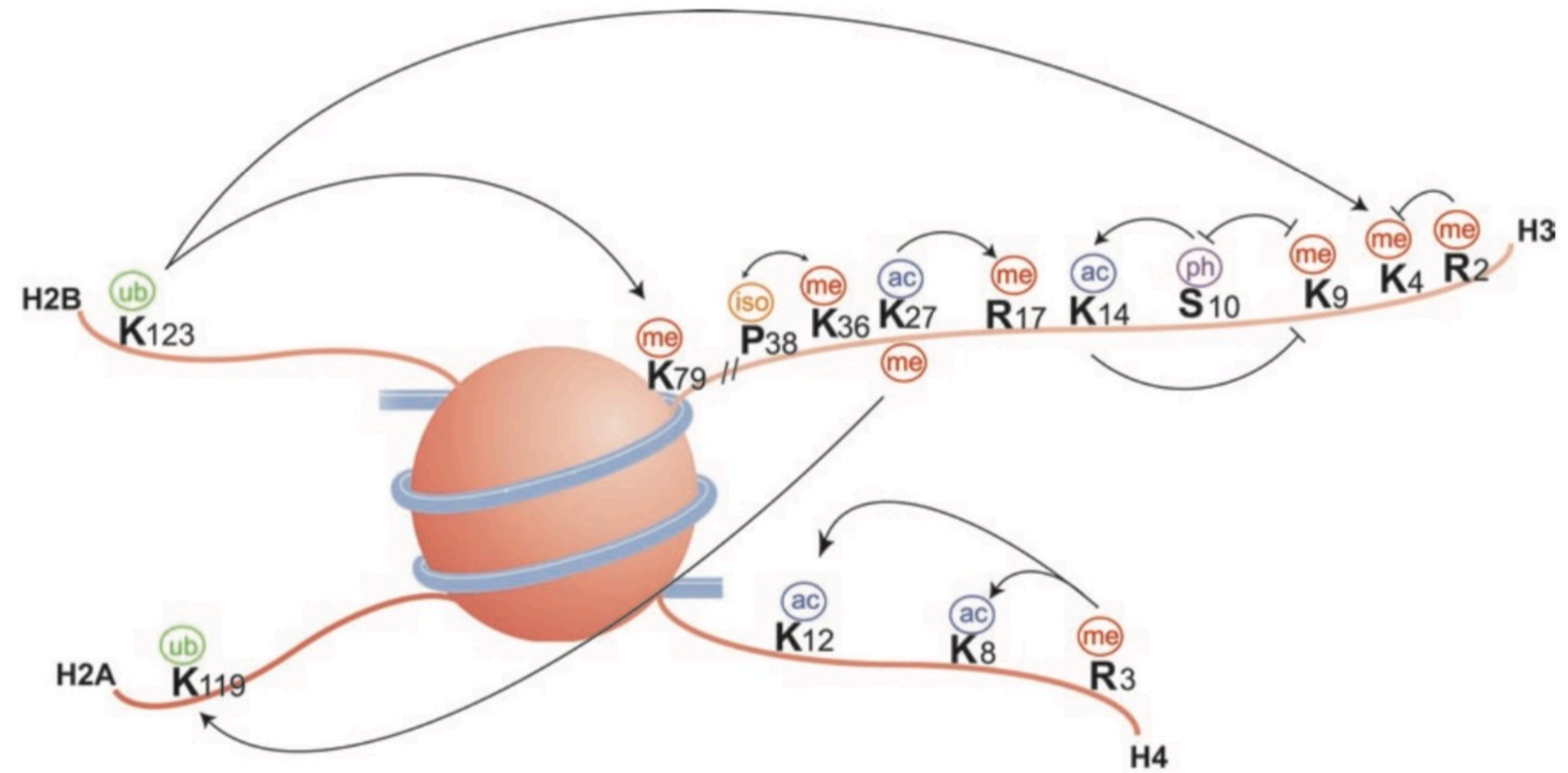


Metylacja histonów

- Metylacja lizyny (do trzech grup metylowych, me1, me2, me3)
- Różne znaczenie w zależności od pozycji i liczby grup metylowych
- Np.:
 - H3K4me2,3 H3K9me1, H3K27me1, H3K36me3 i H4K20me1 to znaczniki aktywnej chromatyny
 - H3K9me2,3 H3K27me2,3 i H4K20me3 to znaczniki heterochromatyny
- Oprócz tego też metylacja arginin

Inne modyfikacje

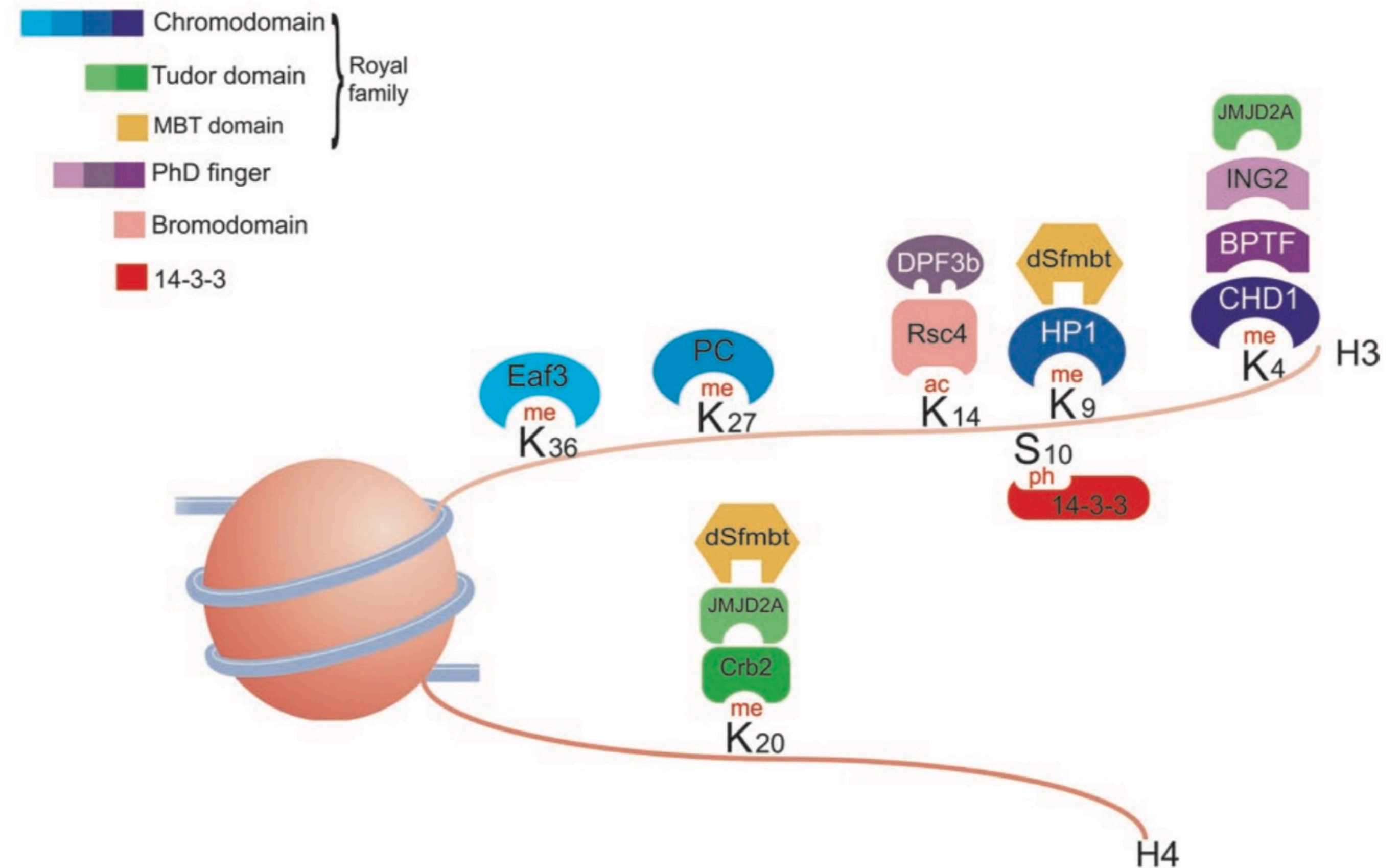
- Fosforylacja i defosforylacja (seryna, treonina, tyrozyna)
- Ubikwitynylacja i sumoilacja (H2A i H2B)
- Cytrulinacja (H3 i H4) - przemiana argininy w cytrulinę
- Różne efekty: oprócz regulacji ekspresji też naprawa DNA, koordynacja cyklu komórkowego
- Skomplikowane interakcje



Bannister & Kozaurides, *Cell Research* (2011) 21:381-395.

Białka odczytujące modyfikacje histonów

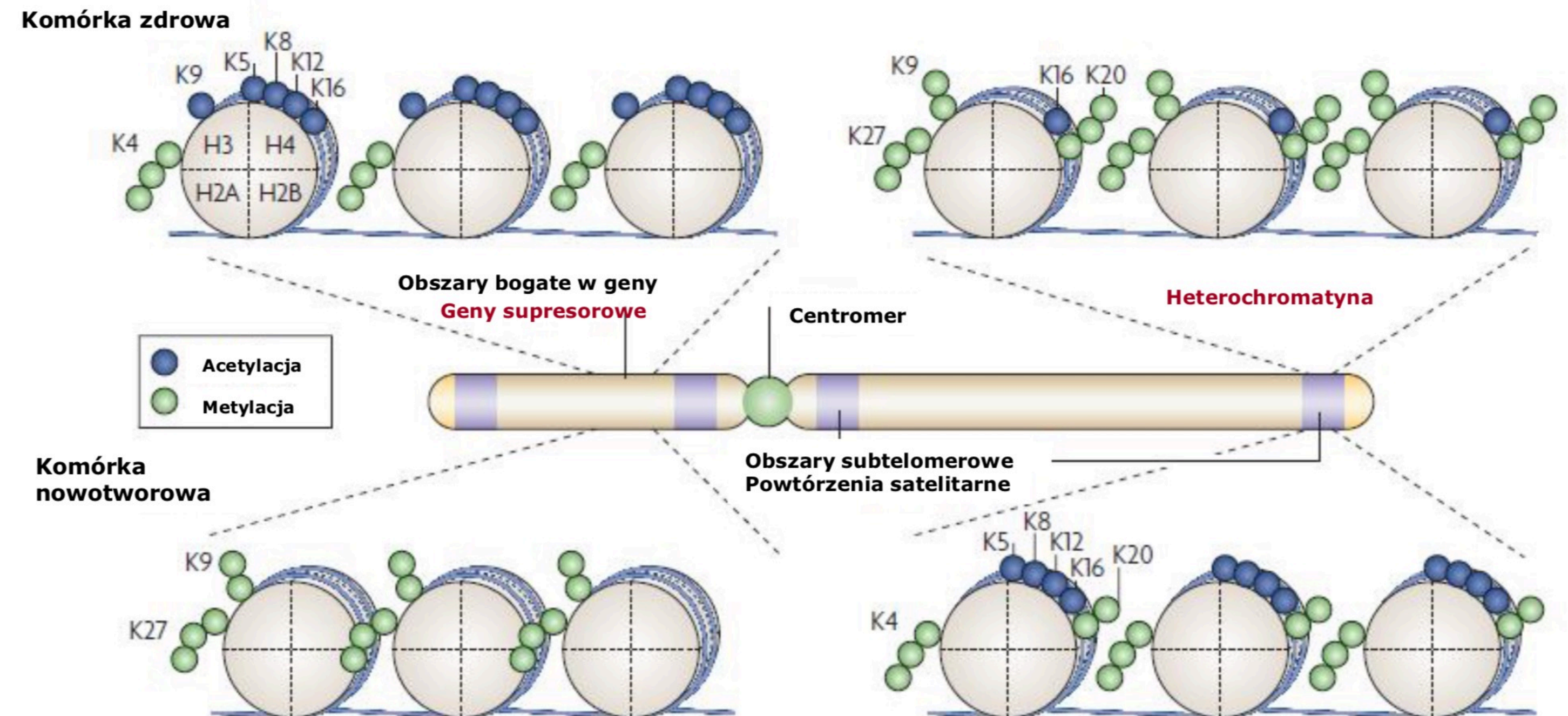
- Modyfikacje histonów rekrutują specyficzne białka lub hamują wiązanie innych białek
- Domeny np.
 - tudor
 - chromodomena
 - bromodomena



Bannister & Kozaurides, *Cell Research* (2011) 21:381-395.

Zaburzenia modyfikacji histonów w nowotworach

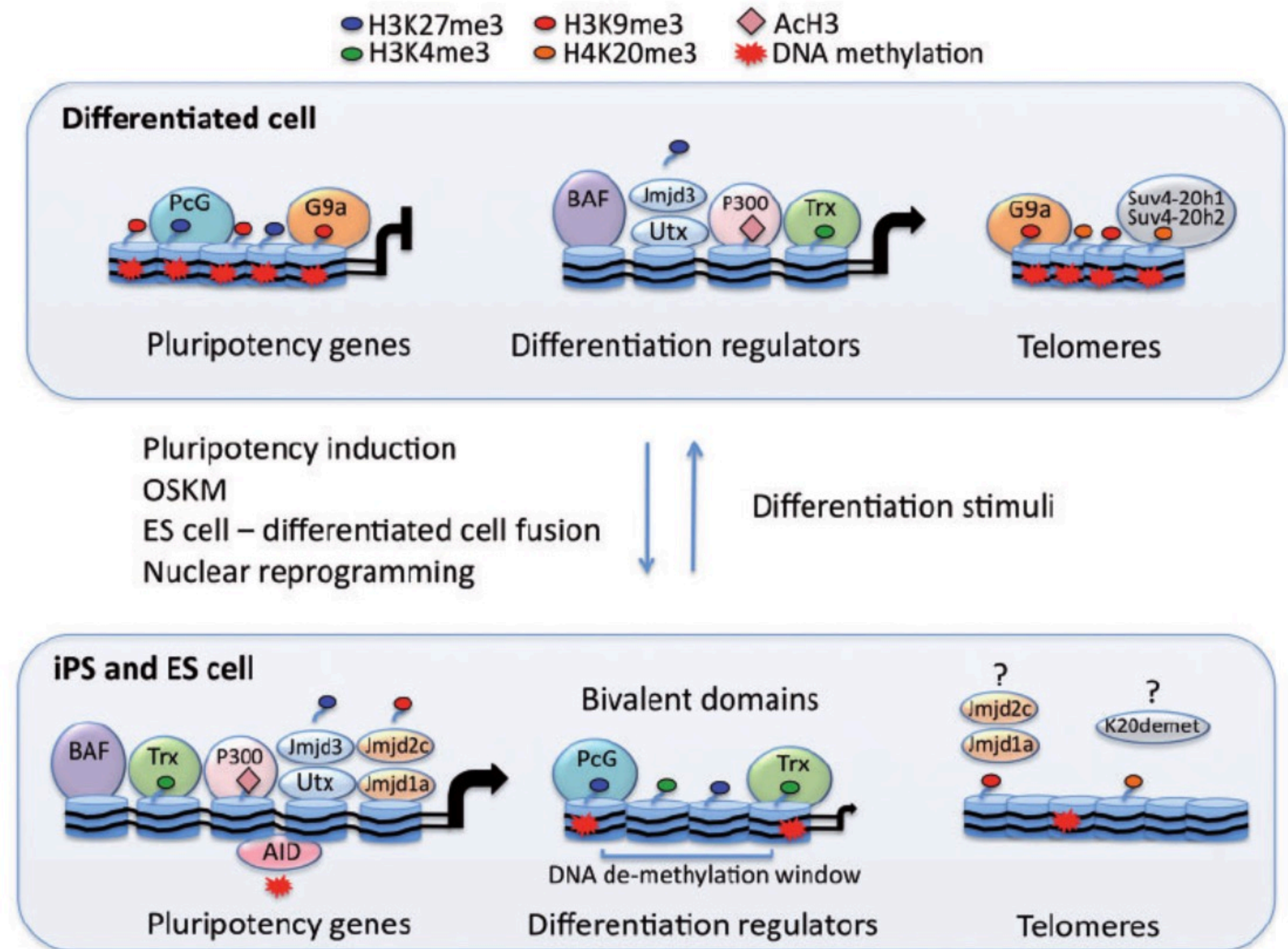
- Wyciszenie genów kodujących supresory nowotworów
- Aktywacja obszarów repetytywnych - niestabilność genomowa



Modyfikacje chromatyny w komórkach macierzystych

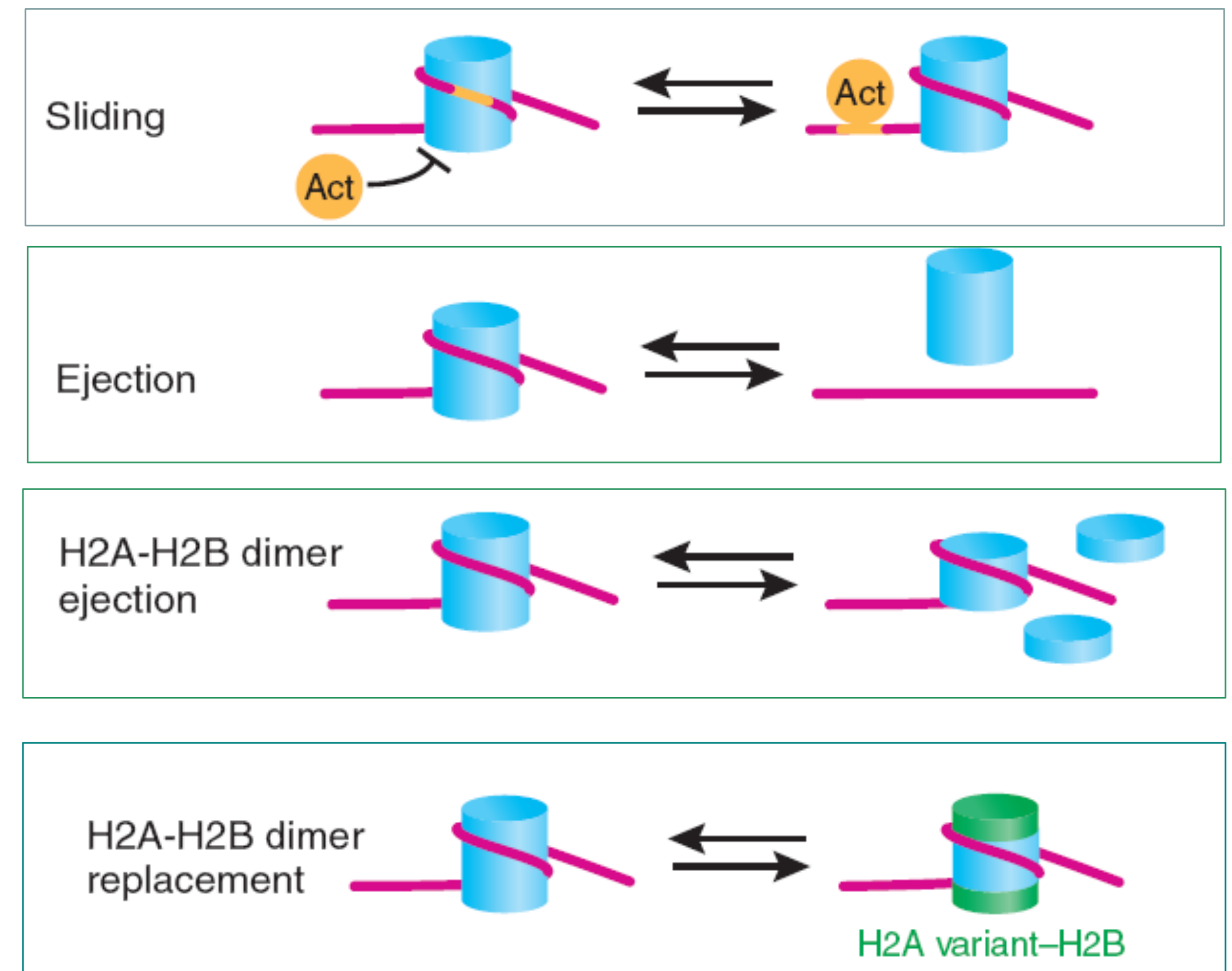
- indukowane pluripotentne komórki macierzyste (iPS) wykazują szereg zmian w stanie chromatyny

Chromatin structure of ES and iPS cells



Remodelowanie chromatyny

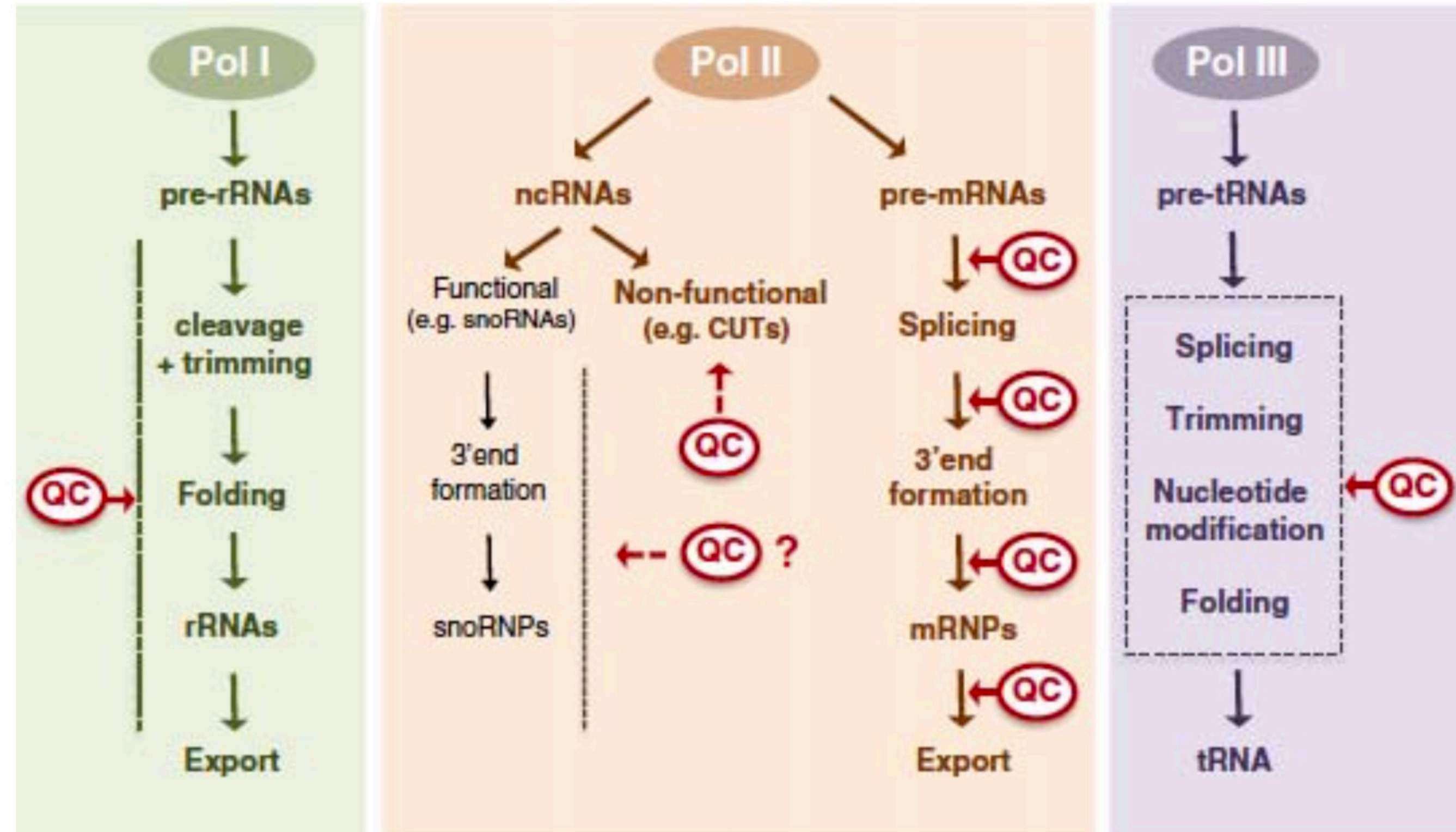
- Przesuwanie nukleosomów względem DNA
- Odstanianie lub zasłanianie miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych
- Zależne od ATP
- Może też przebiegać z wymianą wariantów histonów
- Kompleksy remodelujące: najbardziej znany SWI/SNF
- Powiązanie z innymi mechanizmami: kompleksy remodelujące rozpoznają metylację DNA i modyfikacje histonów



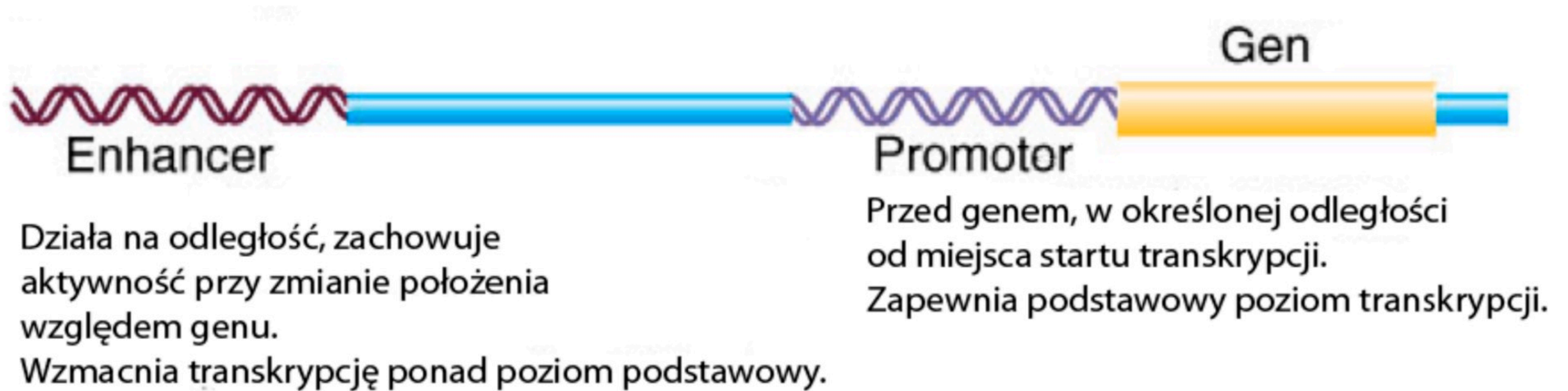
Cairns *Nature Structural and Molecular Biology* 14: 989-996, 2007

Transkrypcja u eukariotów

- Trzy główne polimerazy RNA
- **pol I** - prekursor **rRNA** 35S (obrabiany do 25S, 18S i 5.8S rRNA)
- **pol II** - **mRNA**, większość snRNA, snoRNA, miRNA, RNA telomerazy, i transkrypty niekodujące
- **pol III** - **tRNA**, 5S rRNA, niektóre snRNA, RNA RNazy P, 7S RNA
- pol IV i pol V - tylko u roślin, siRNA
- polimeraza mitochondrialna (mtRNAP) i chloroplastowa

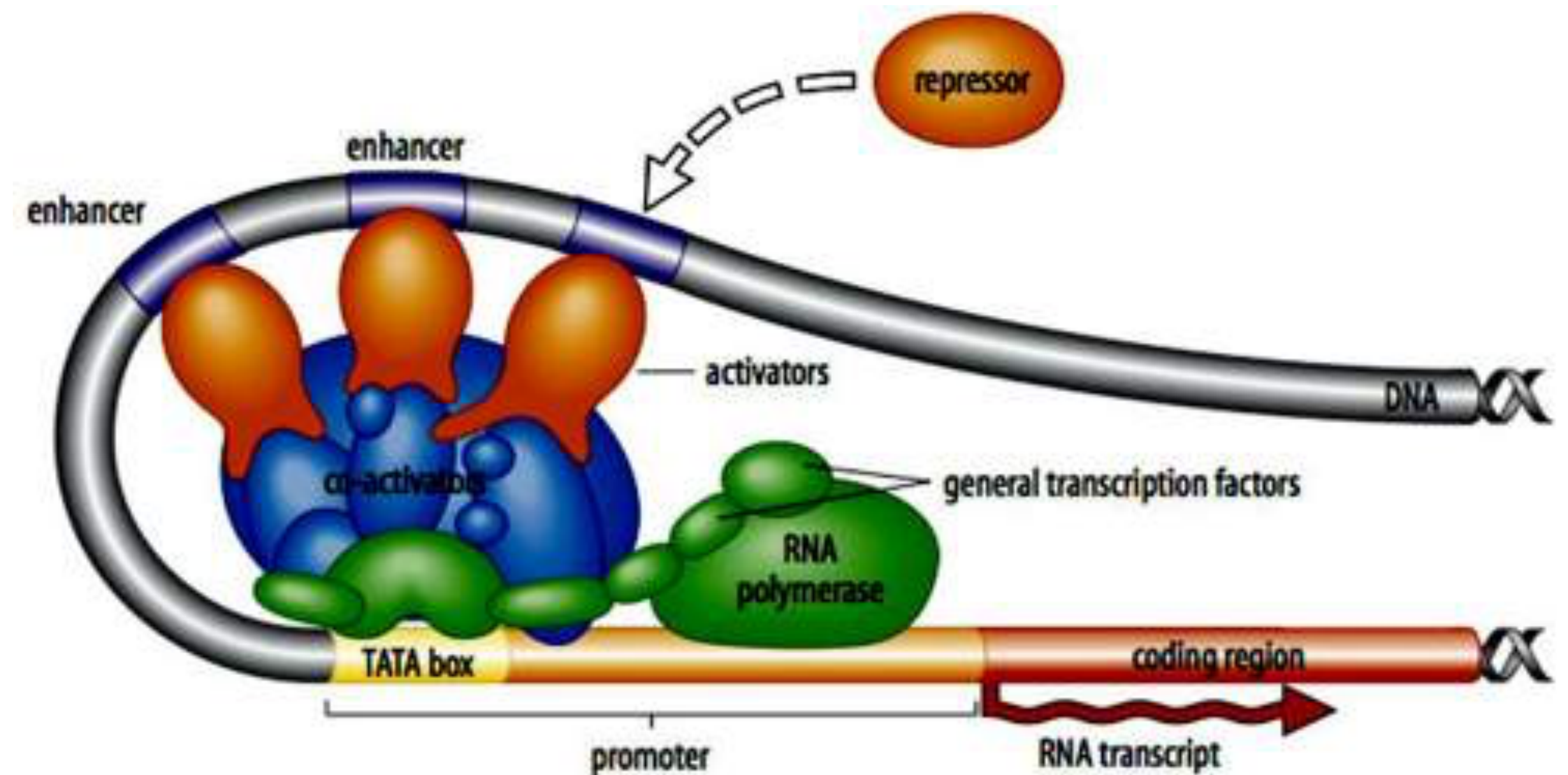


Czynniki *cis*



Czynniki transkrypcyjne

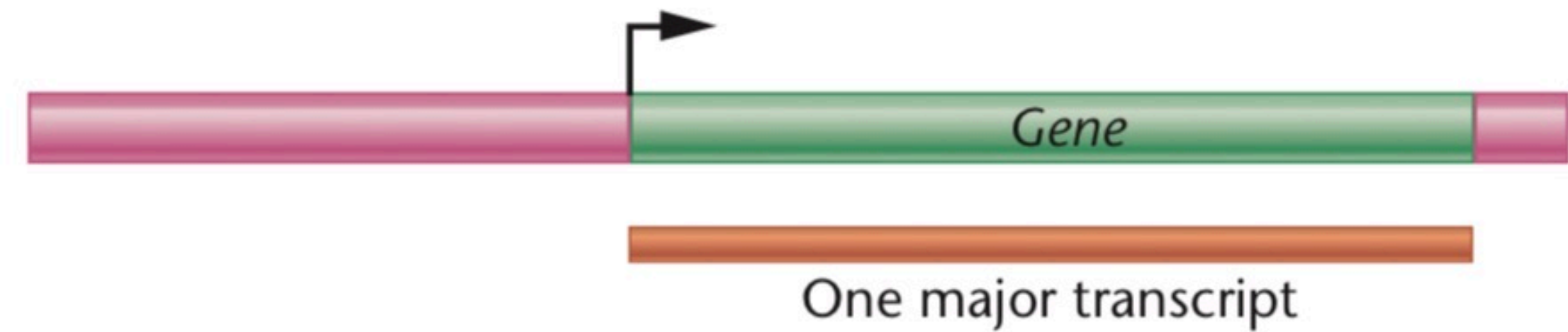
- **Ogólne czynniki transkrypcyjne:** wiążą się w obrębie rdzenia promotora, konieczne dla zapewnienia podstawowego poziomu ekspresji
- **Specyficzne czynniki transkrypcyjne:** wiążą się w dystalnej części promotora i w enhancerach
- Eukariotyczne polimerazy jądrowe I - III nie są w stanie z wiązać się z DNA (w odróżnieniu od bakteryjnych i organellarnych) - ogólne czynniki transkrypcyjne są niezbędne do zainicjowania transkrypcji



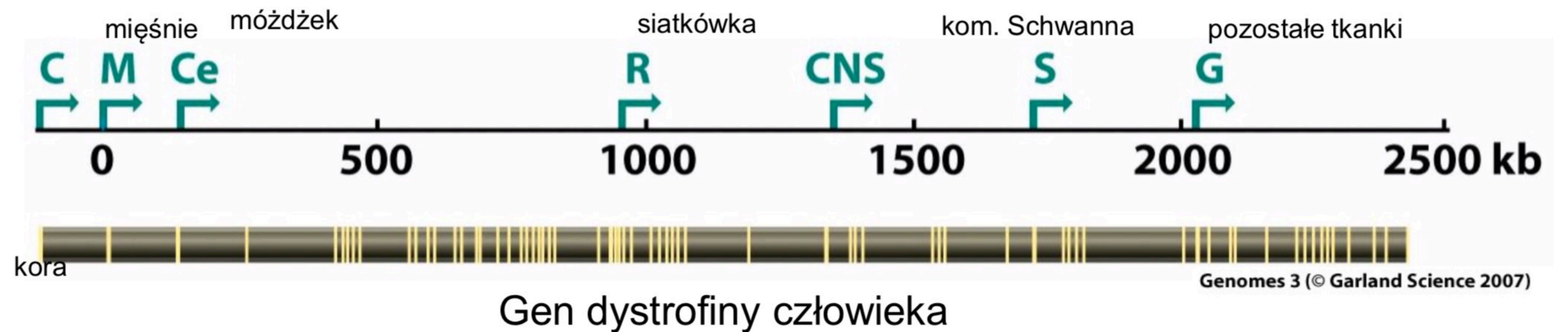
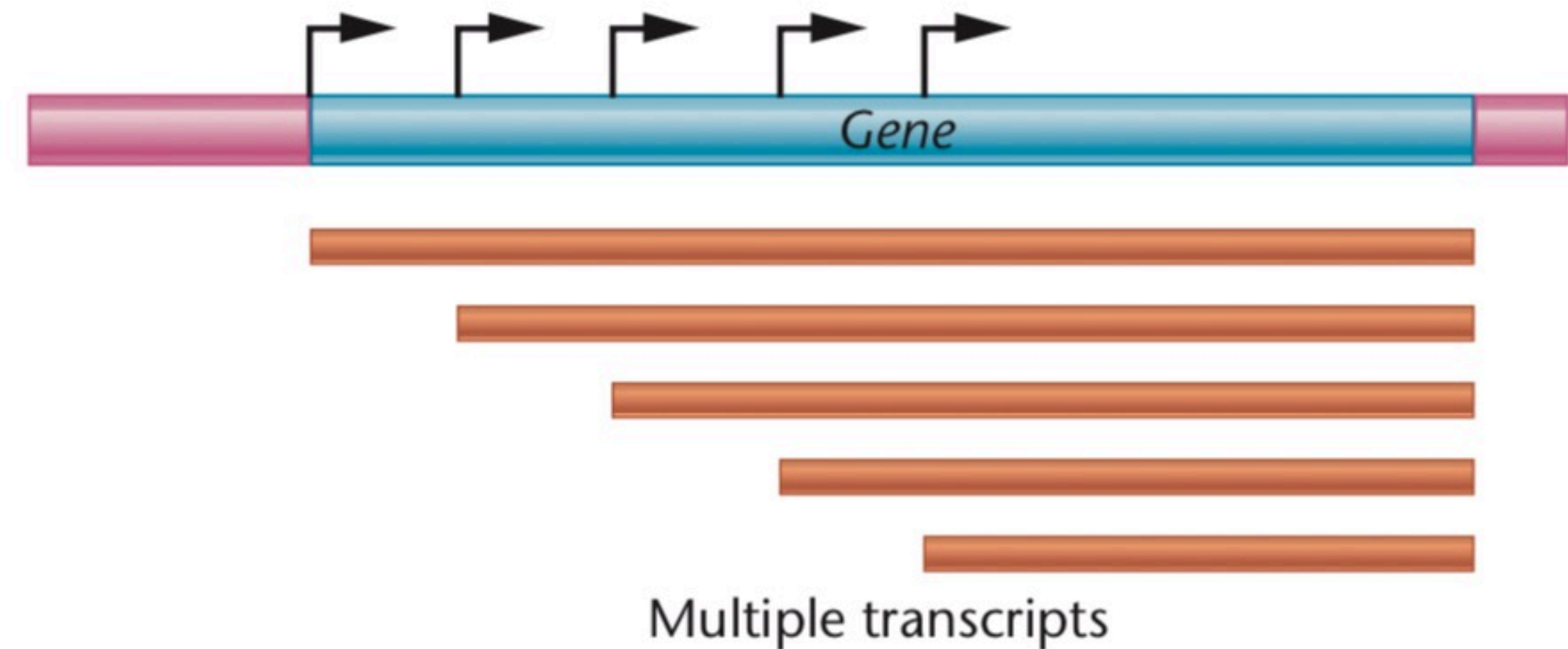
Transkrypcja pol II

- Promotory pol II wykazują dużą różnorodność, zależnie od wzoru ekspresji genu
- Geny metabolizmu podstawowego (*housekeeping*) - ekspresja na stałym poziomie (możliwe zwiększenie)
- Geny regulowane (np. w rozwoju)
- Niektóre promotory mają wiele alternatywnych miejsc startu transkrypcji (tzw. promotory rozproszone) - może być regulowane w zależności od tkanki

(a) Focused promoter

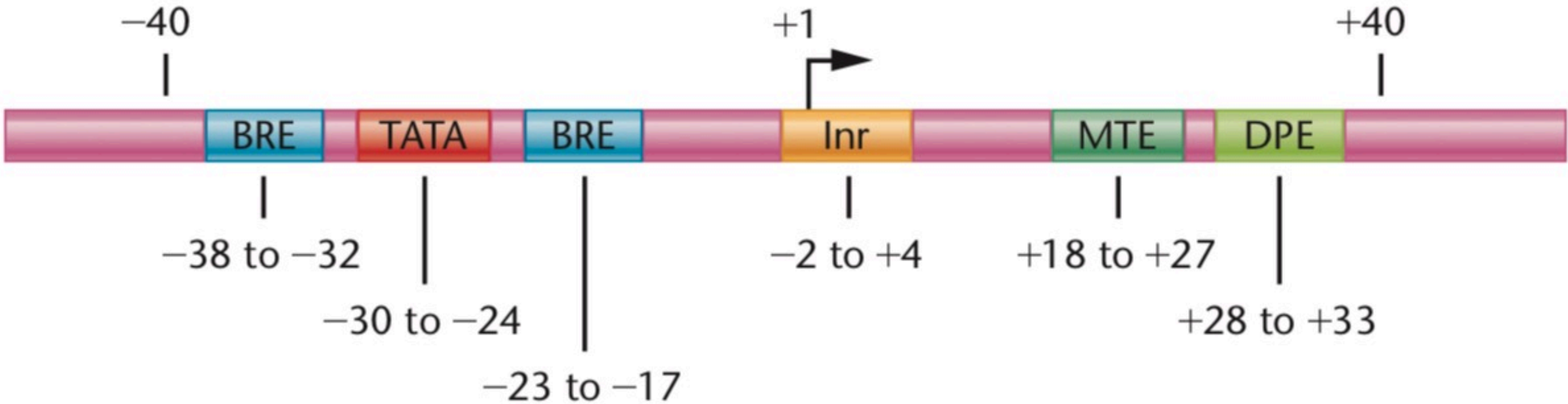


(b) Dispersed promoter



Promotor rdzeniowy

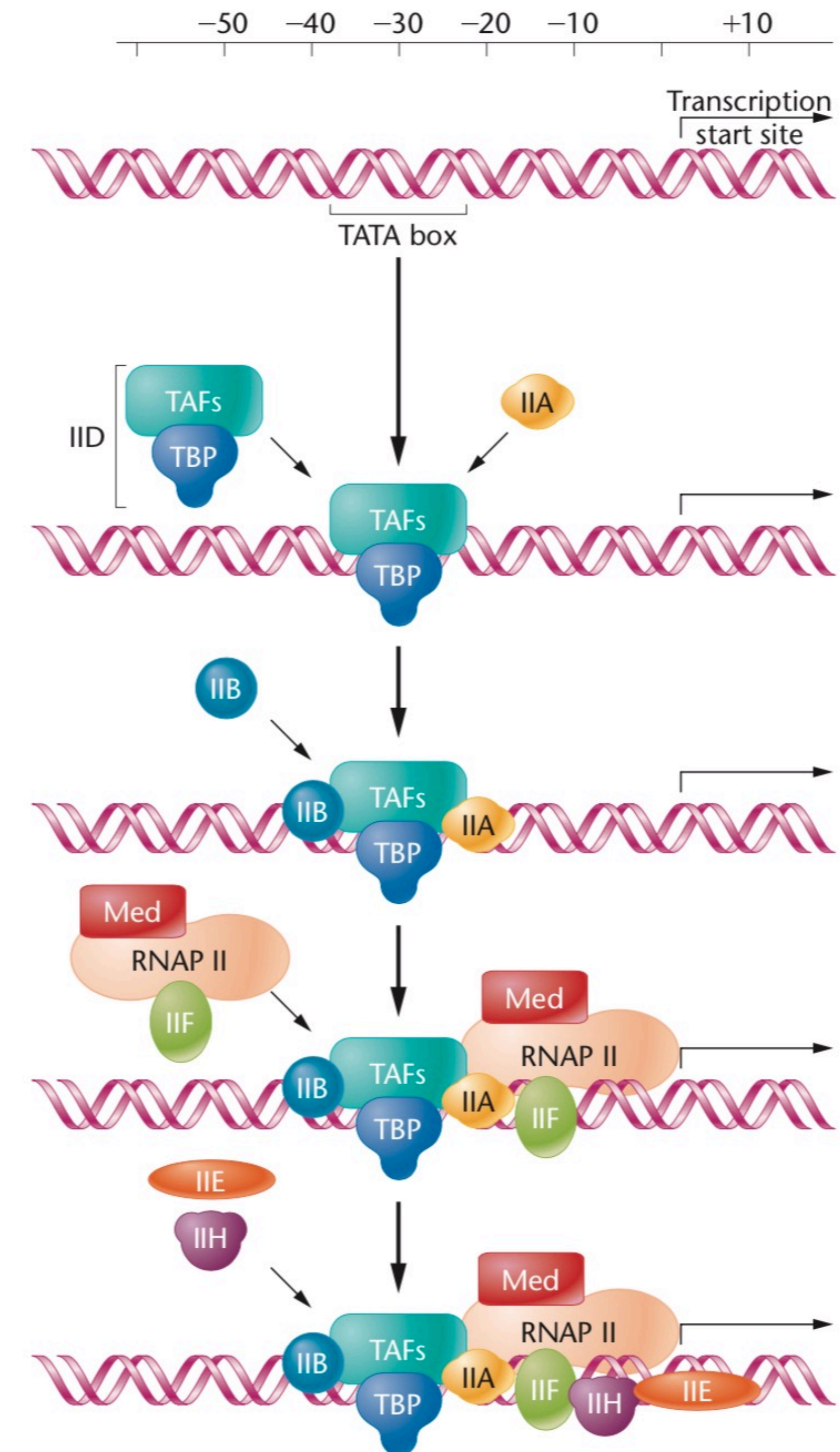
- Z elementami *cis* promotora rdzeniowego wiążą się ogólne czynniki transkrypcyjne, a następnie polimeraza



BRE	TFIIB
TATA	TBP
Inr	TFIID
DPE	TFIID
MTE	TFIID (?)

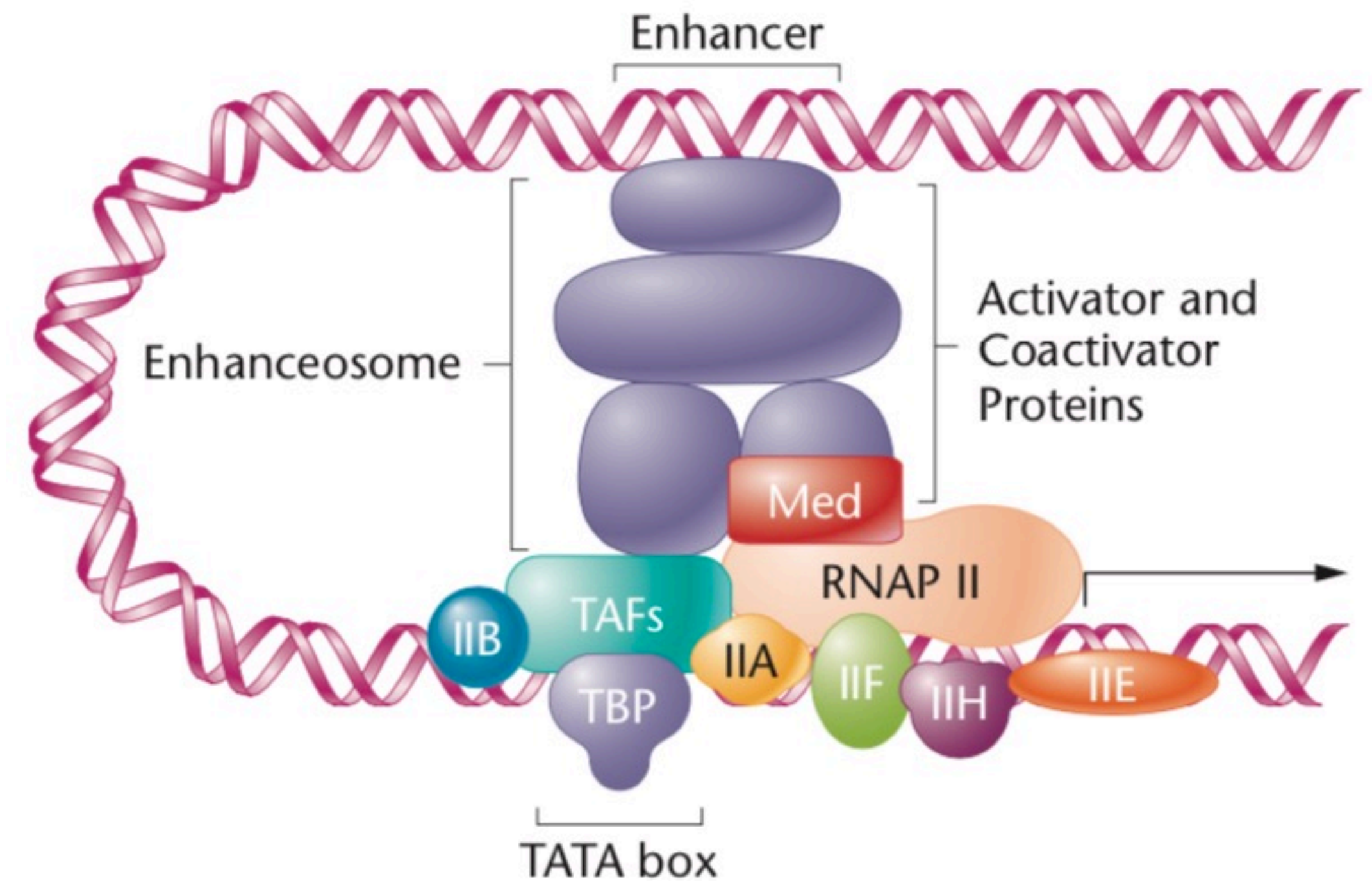
Składanie kompleksu inicjacyjnego

- Rozpoczyna się od przyłączenia TFIID (TBP + podjednostki pomocnicze TAF) do DNA w obszarze TATA-box
- Następnie rekrutowane są kolejne czynniki ogólne
- Do platformy utworzonej przez czynniki ogólne przyłącza się pol II wraz z kompleksem mediatora
- TFIIH ma aktywność helikazy - rozplecenie DNA (zależne od ATP)
- Fosforylacja C-końcowej domeny pol II - przejście do elongacji



Czynniki regulacyjne

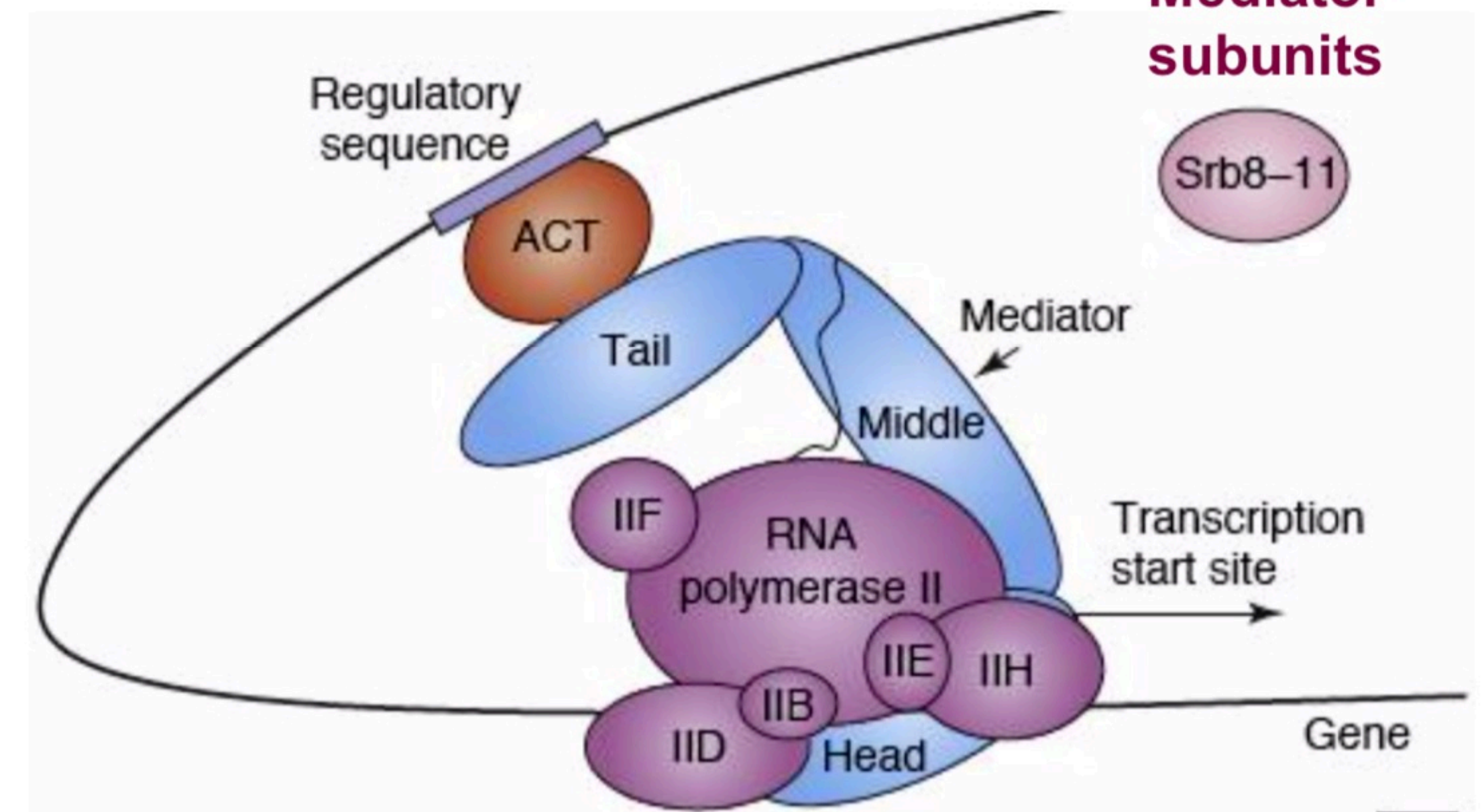
- Specyficzne czynniki transkrypcyjne
 - wiążą DNA w obrębie promotora (część dystalna lub enhancera)
- Specyficzność tkankowa, rozwojowa, w odpowiedzi na sygnał, itp.
- Koaktywatory
 - uczestniczą w regulacji, ale nie wiążą DNA, tylko oddziałują z innymi białkami kompleksu transkrypcyjnego
 - mediator: ogólny koaktywator pol II



Klug, Cummings, Spencer, Palladino, Concepts of Genetics 11th ed. ©Pearson

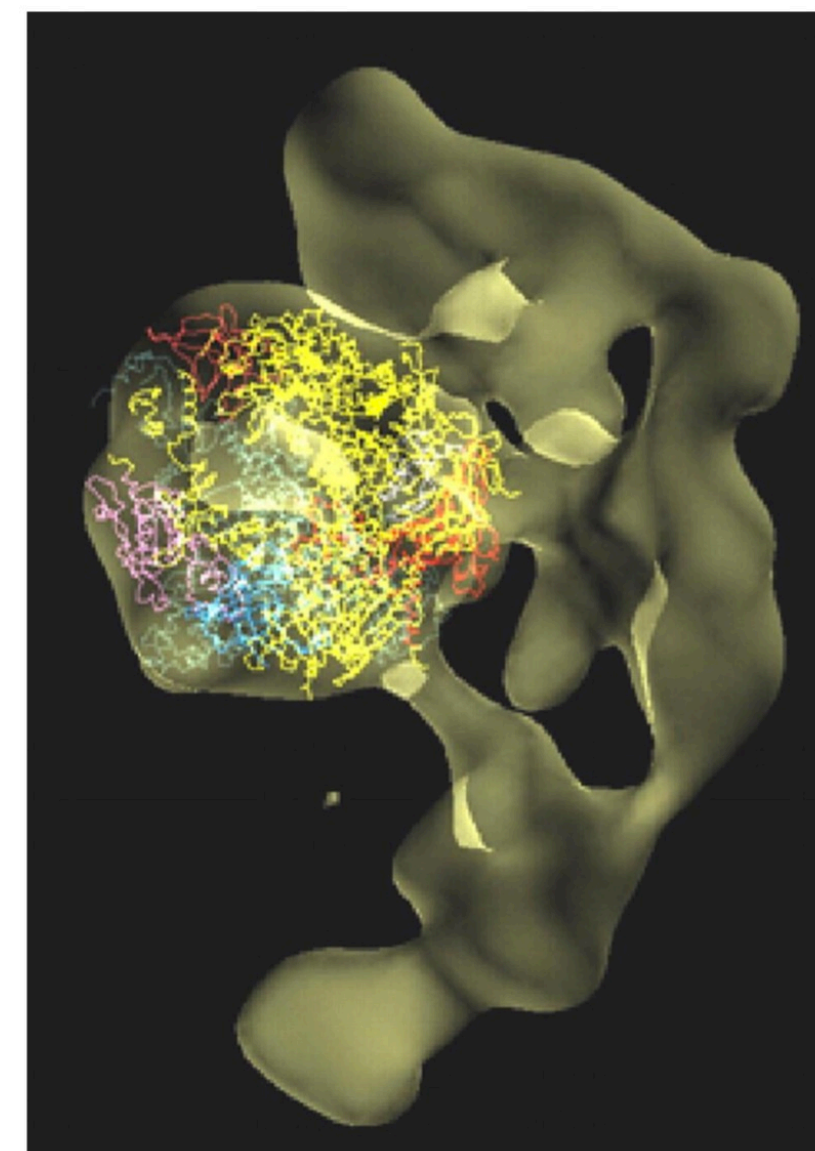
Enhancery - model pętli

- Białka wiążące enhancery oddziałują z kompleksem polimerazy za pośrednictwem **mediatora**
- Mediator to złożony kompleks wielu (25 u drożdży) białek, konserwowany ewolucyjnie
- Niezbędny do zachodzenia transkrypcji
- Dzięki temu enhancery działają na odległość i niezależnie od orientacji
- Organizacja chromatyny w domeny zapobiega niespecyficznemu działaniu enhancerów



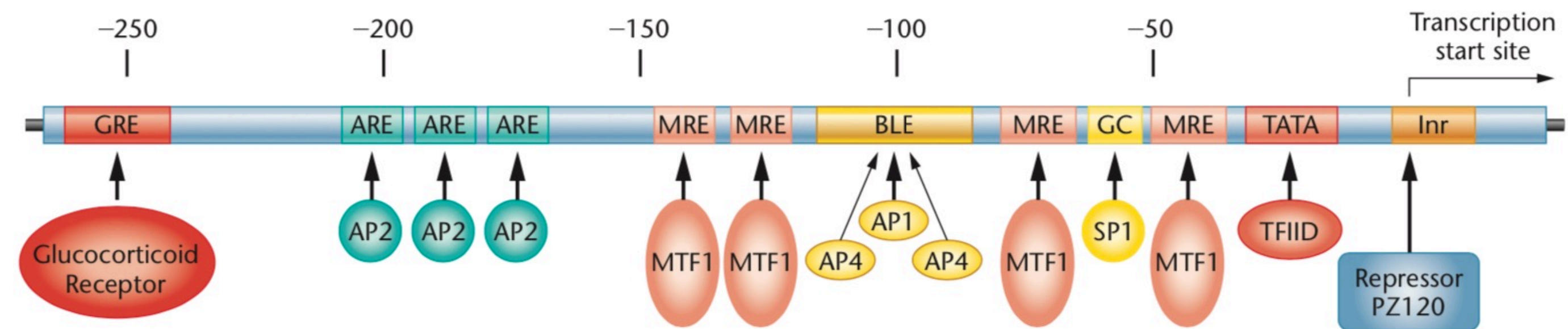
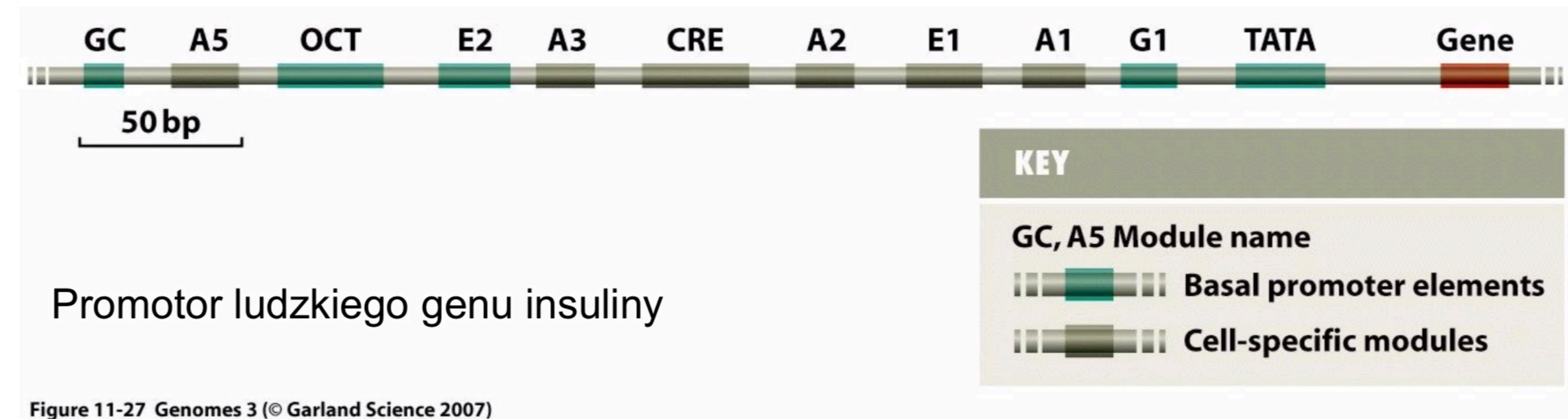
ACT - trx activator
II B D E H F – trx factors

Bjorklund and Gustafsson, 2005, TiBS



Elementy *cis*

- W promotorach i enhancerach znajdują się moduły - motywy sekwencji rozpoznawane przez czynniki transkrypcyjne
- Np.:
 - CRE (wiązany przez CREB) - odpowiedź na cAMP
 - specyficzne tkankowo: np. MyoD (mięśnie), NF- κ B (limfoblastoidalny)
 - rozwojowe (np. homeobox)

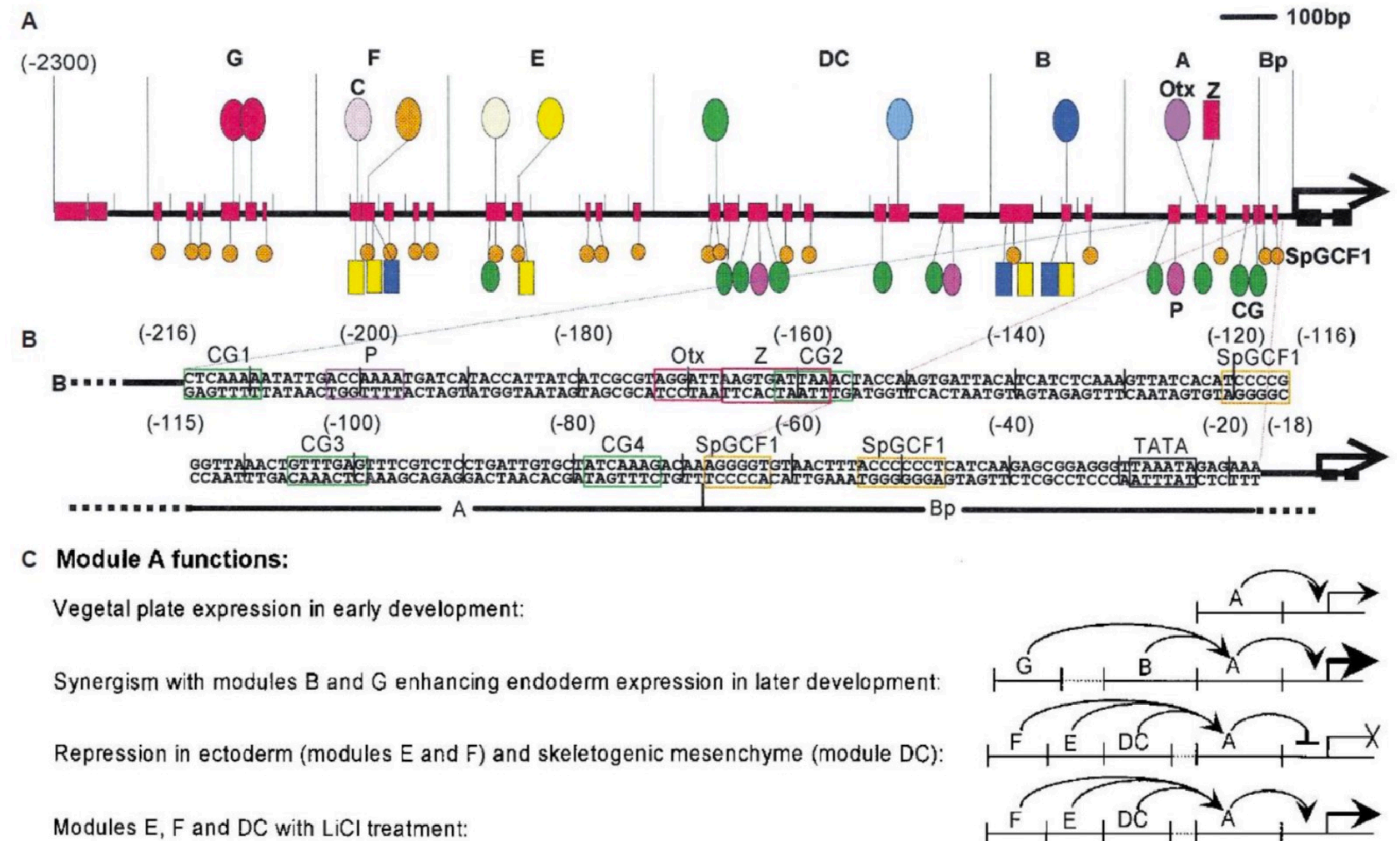


Promotor ludzkiego genu metalotioneiny *hMTIIA*

Klug, Cummings, Spencer, Palladino, Concepts of Genetics 11th ed. ©Pearson

Regulacja kombinatoryczna

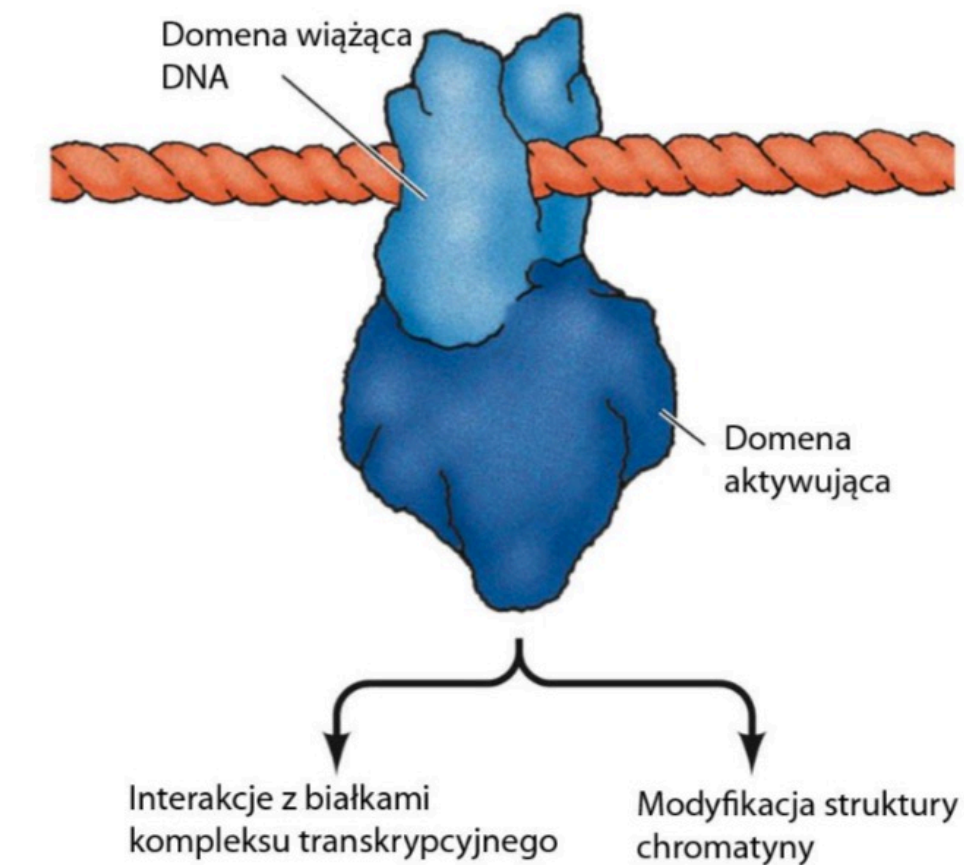
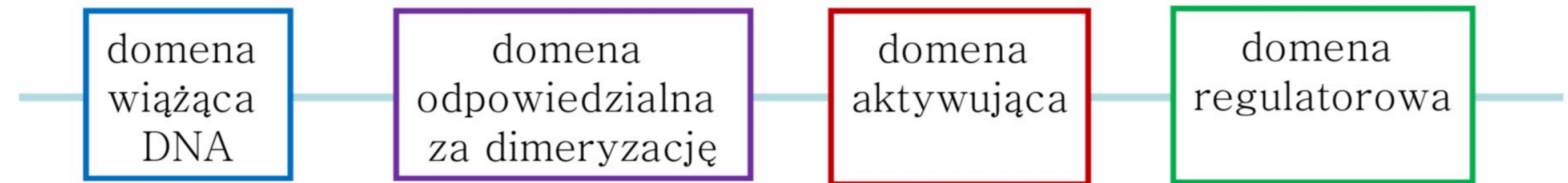
- Różne motywy wiążące różne czynniki transkrypcyjne łączą się w bardzo wiele różnych kombinacji
- Bardzo różne wzory ekspresji różnych genów przy ograniczonej liczbie motywów i czynników transkrypcyjnych
- Wyzwanie dla opisu systemowego



Yuh *et al.* (1998) *Science* **279**, 1896-1902. *Endo16* regulatory system of the sea urchin.

Domenowa struktura aktywatorów transkrypcji

- Domena wiążąca DNA i domena odpowiadająca za aktywację działają niezależnie od siebie
- Możliwe tworzenie białek hybrydowych (np. system dwuhybrydowy)
- Często działają jako dimery (homo- lub hetero-) - aktywacja zależna od dimeryzacji
- Domena aktywacyjna często bogata w aminokwasy kwasowe



Hartwell, Hood, Goldberg, Reynolds, Silver, Veres. Genetics. From Genes to Genomes. Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc.

Przykłady domen wiążących DNA

- Palce cynkowe
- HLH (helisa-pętla-helisa)
- HTH (helisa-skręt-helisa)
- suwak leucynowy (dimer)
- i wiele innych

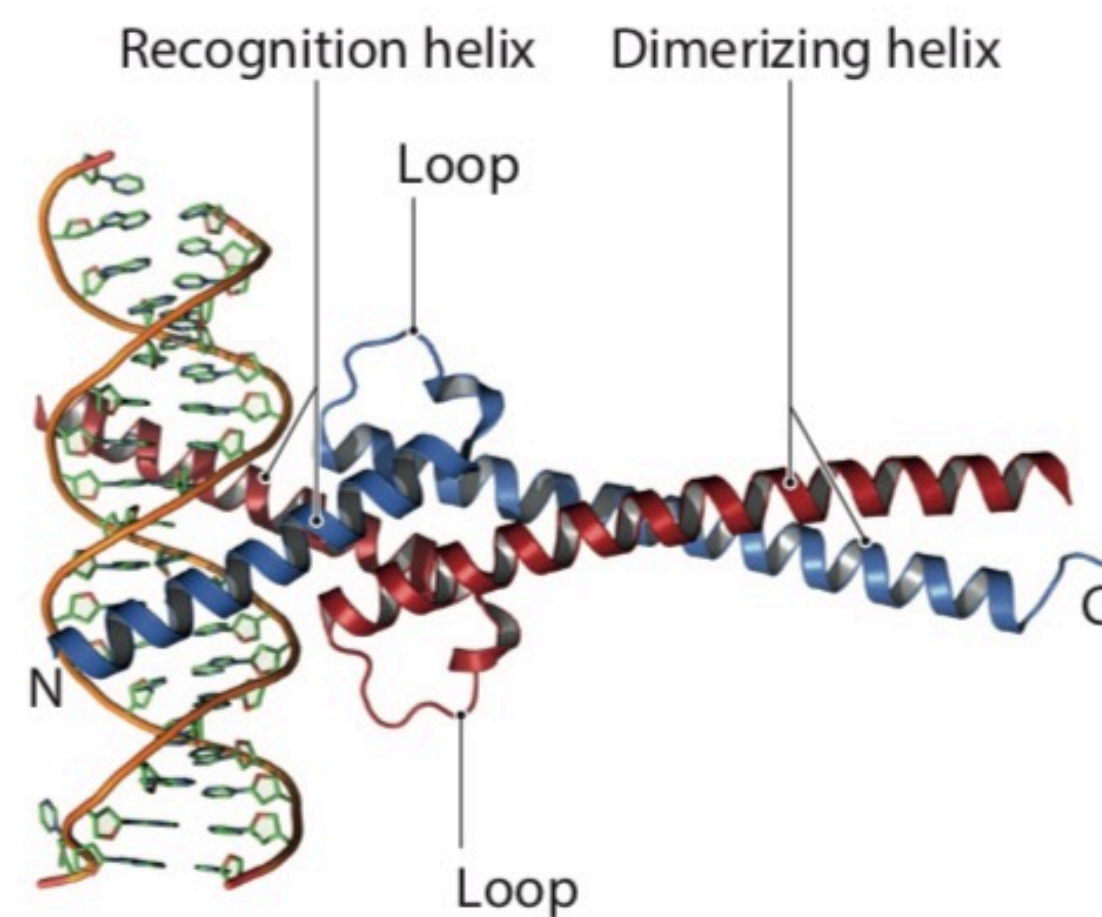


Figure 11.15 Basic helix-loop-helix

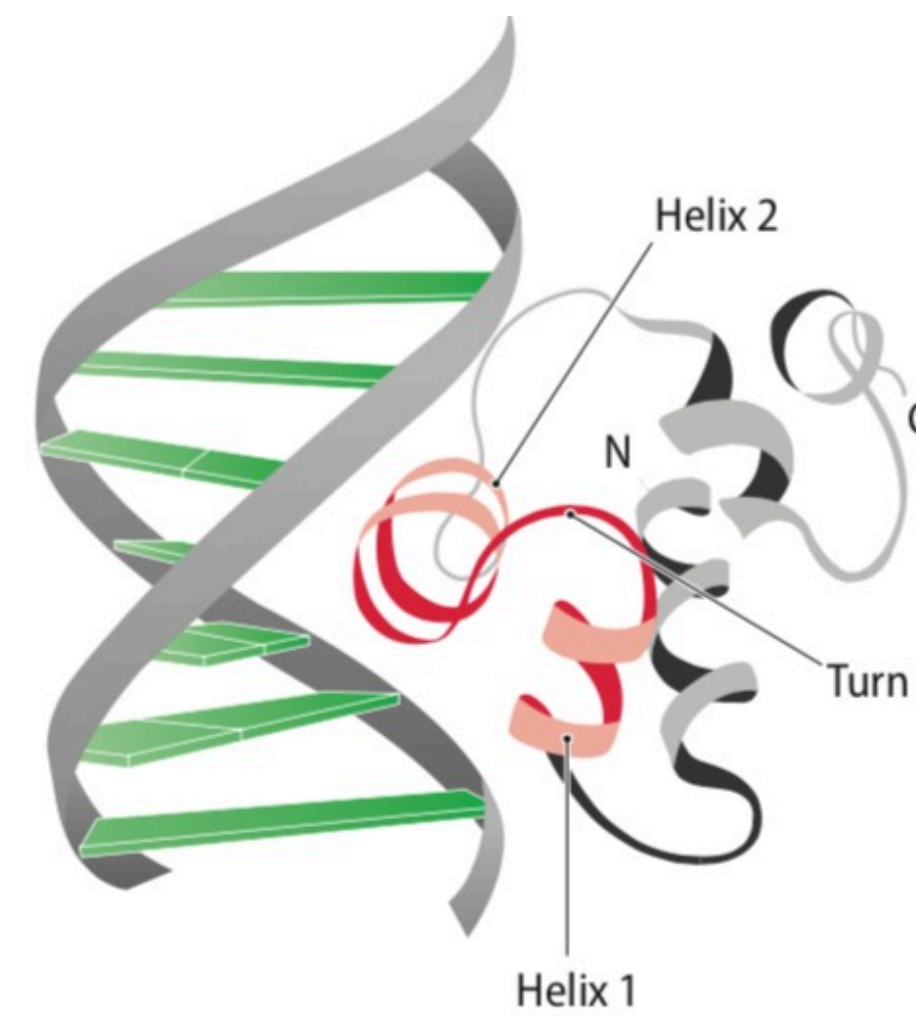


Figure 11.11 Helix-turn-helix motif.



Figure 11.12 Homeodomain motif.

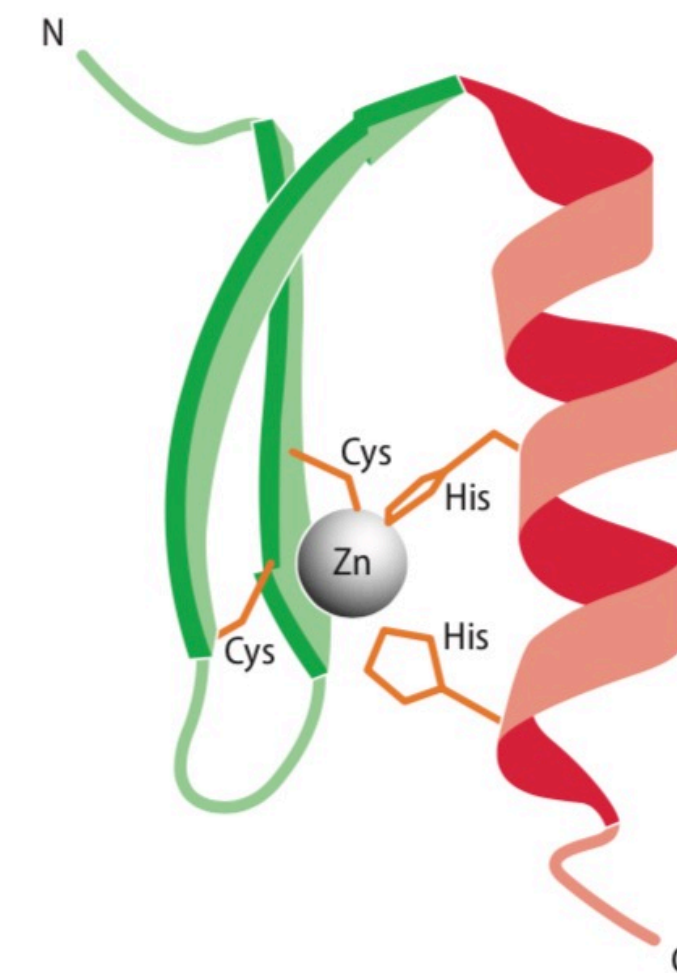


Figure 11.13 Cys₂His₂ zinc finger.

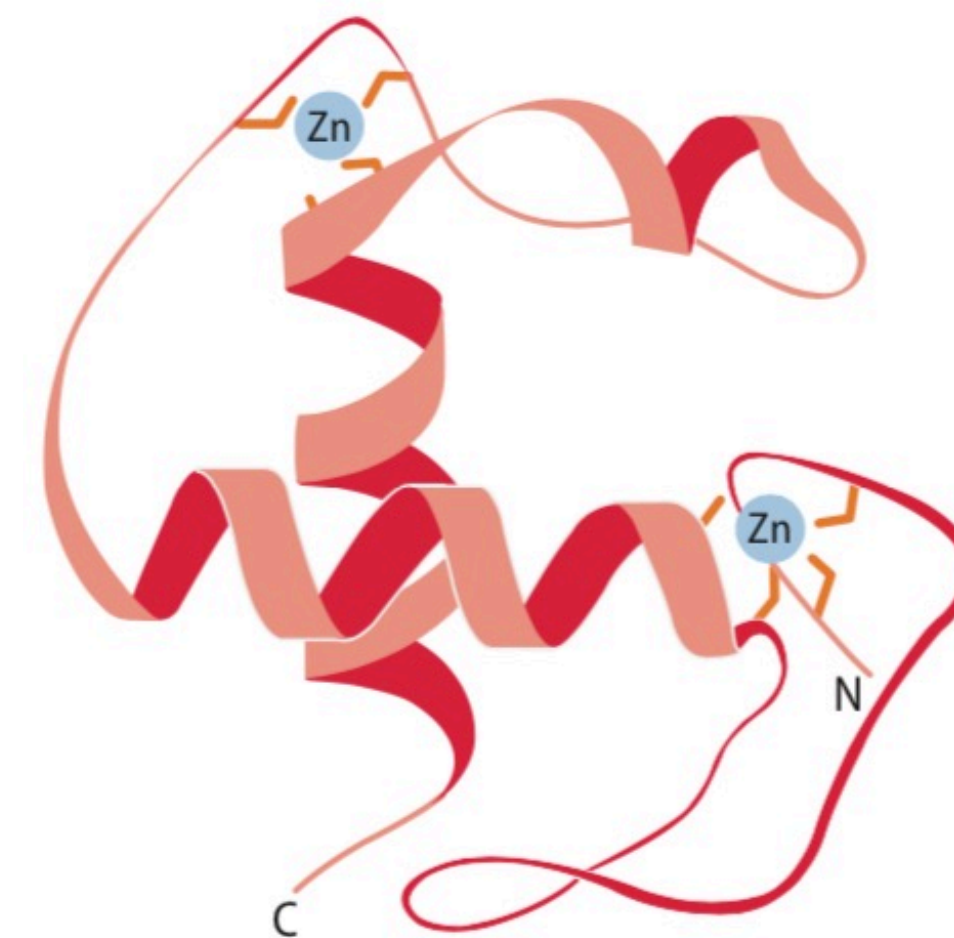
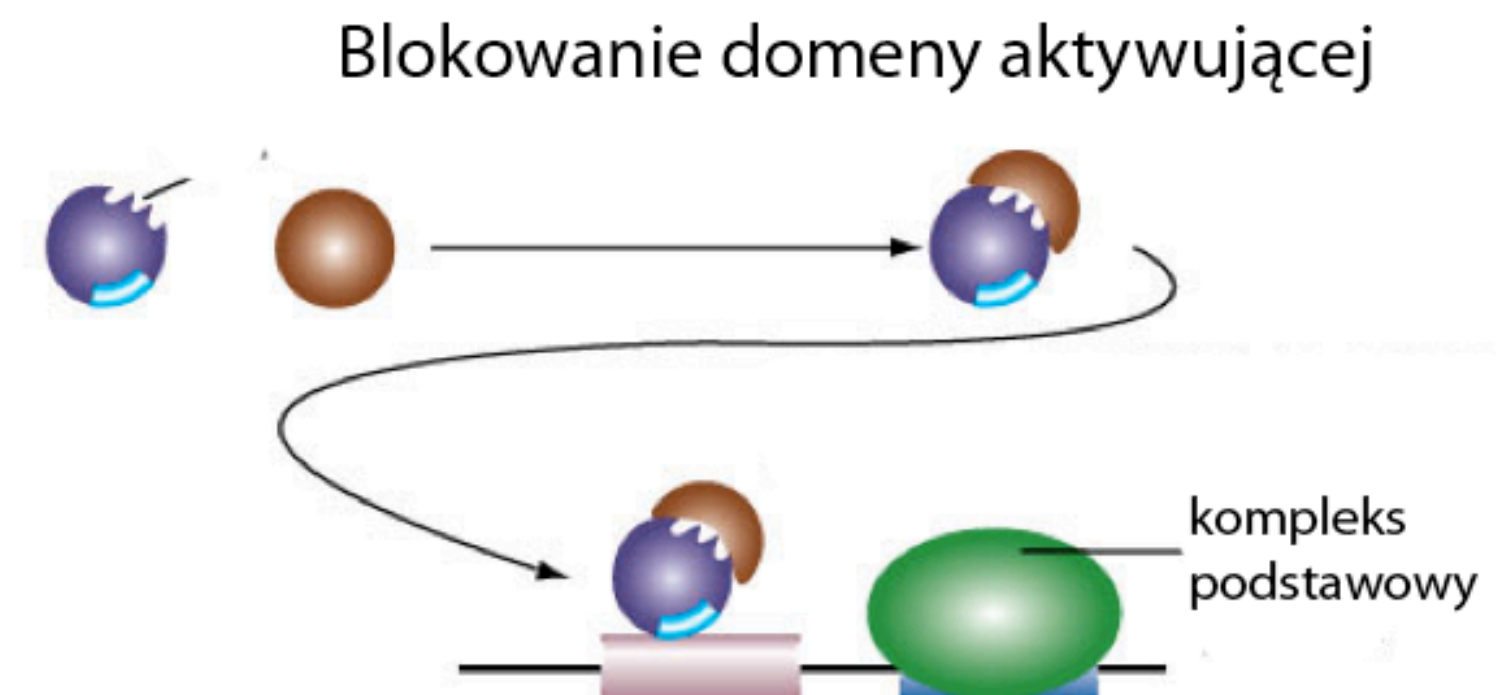
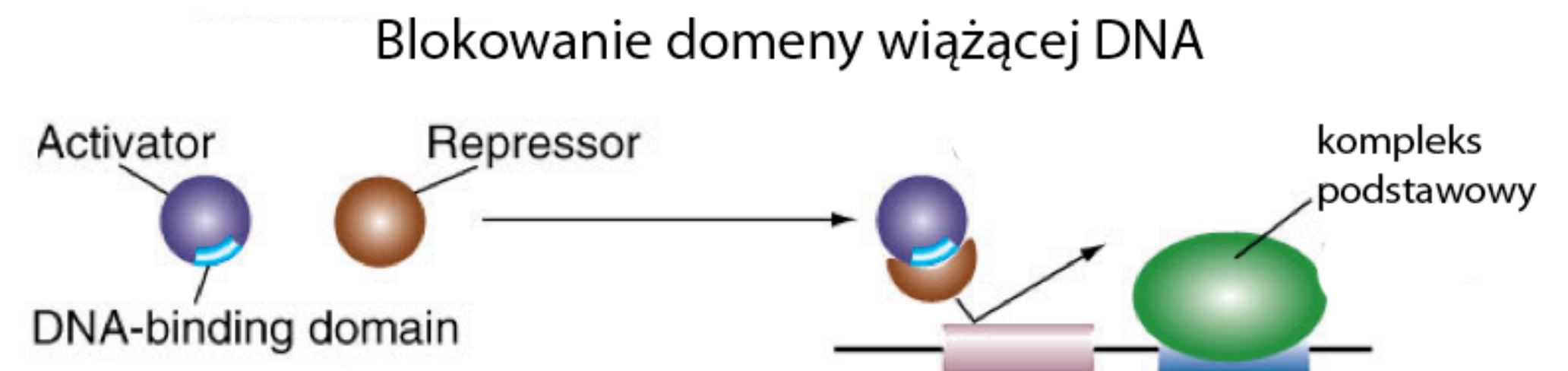
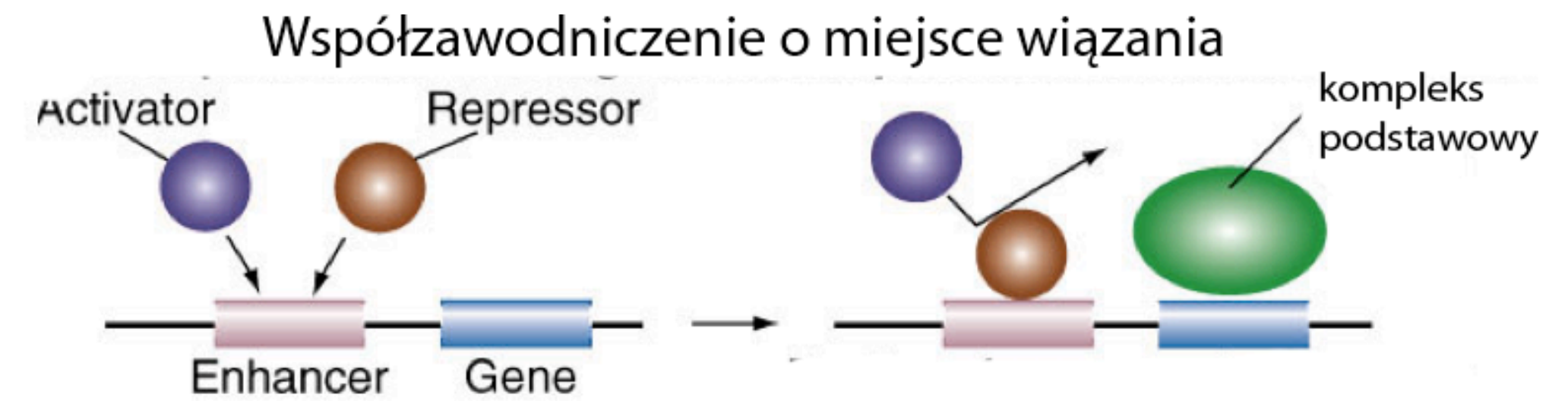


Figure 11.14 Treble clef zinc finger.

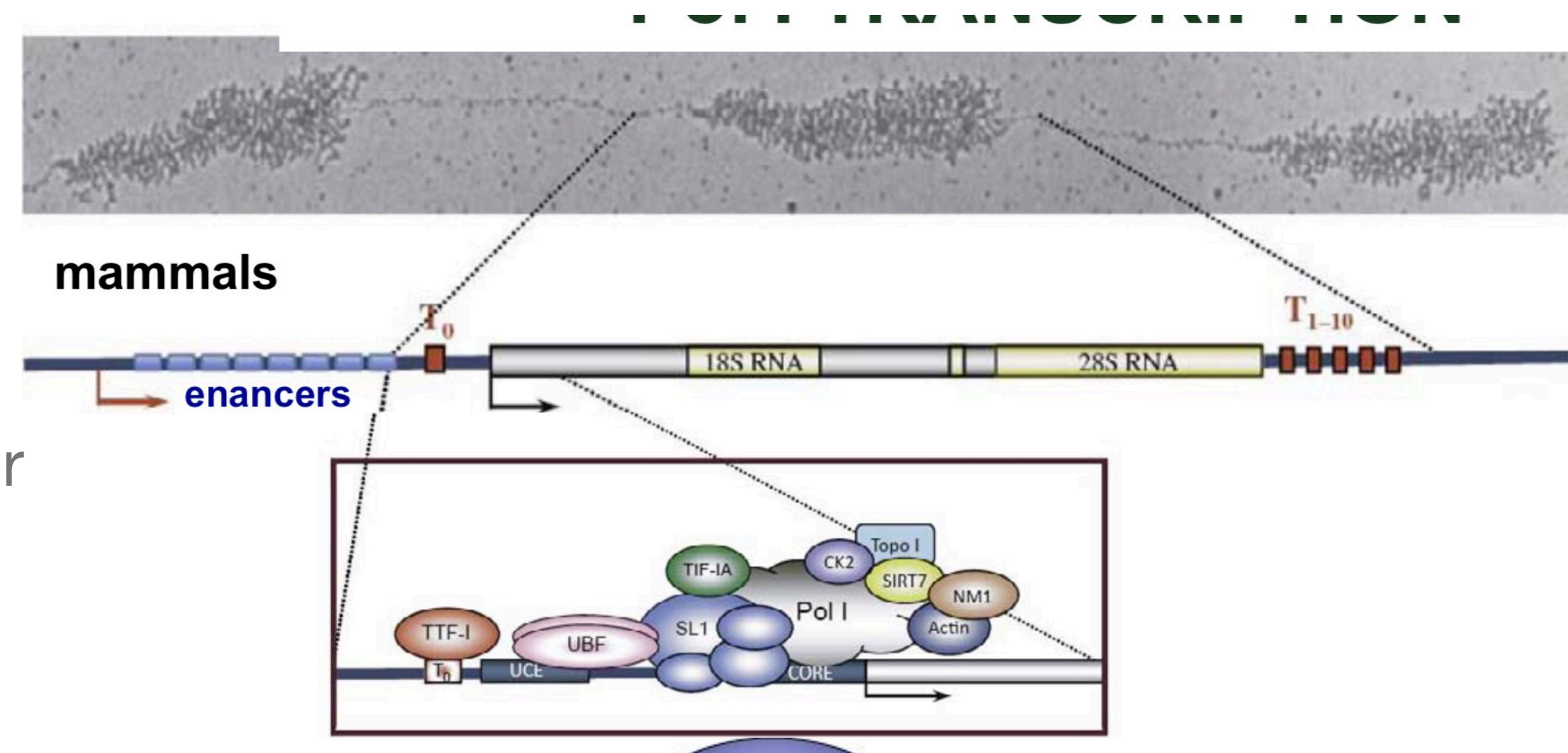
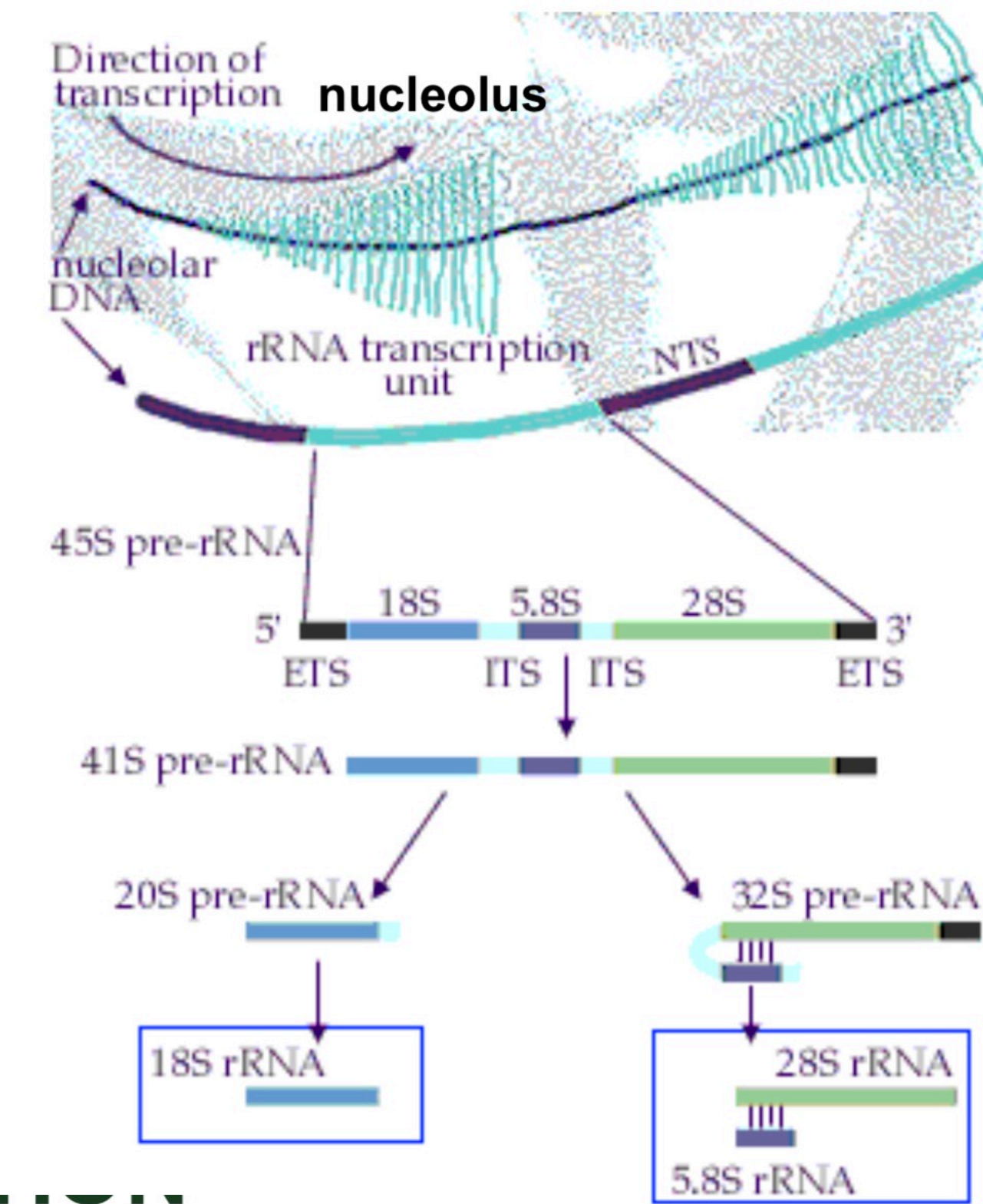
Represory

- Najczęściej przez działanie antagonistyczne do aktywatora
- blokowanie domeny aktywującej
- blokowanie domeny wiążącej DNA
- hamowanie importu do jądra
- Rzadziej przez wiązanie bezpośrednio z DNA



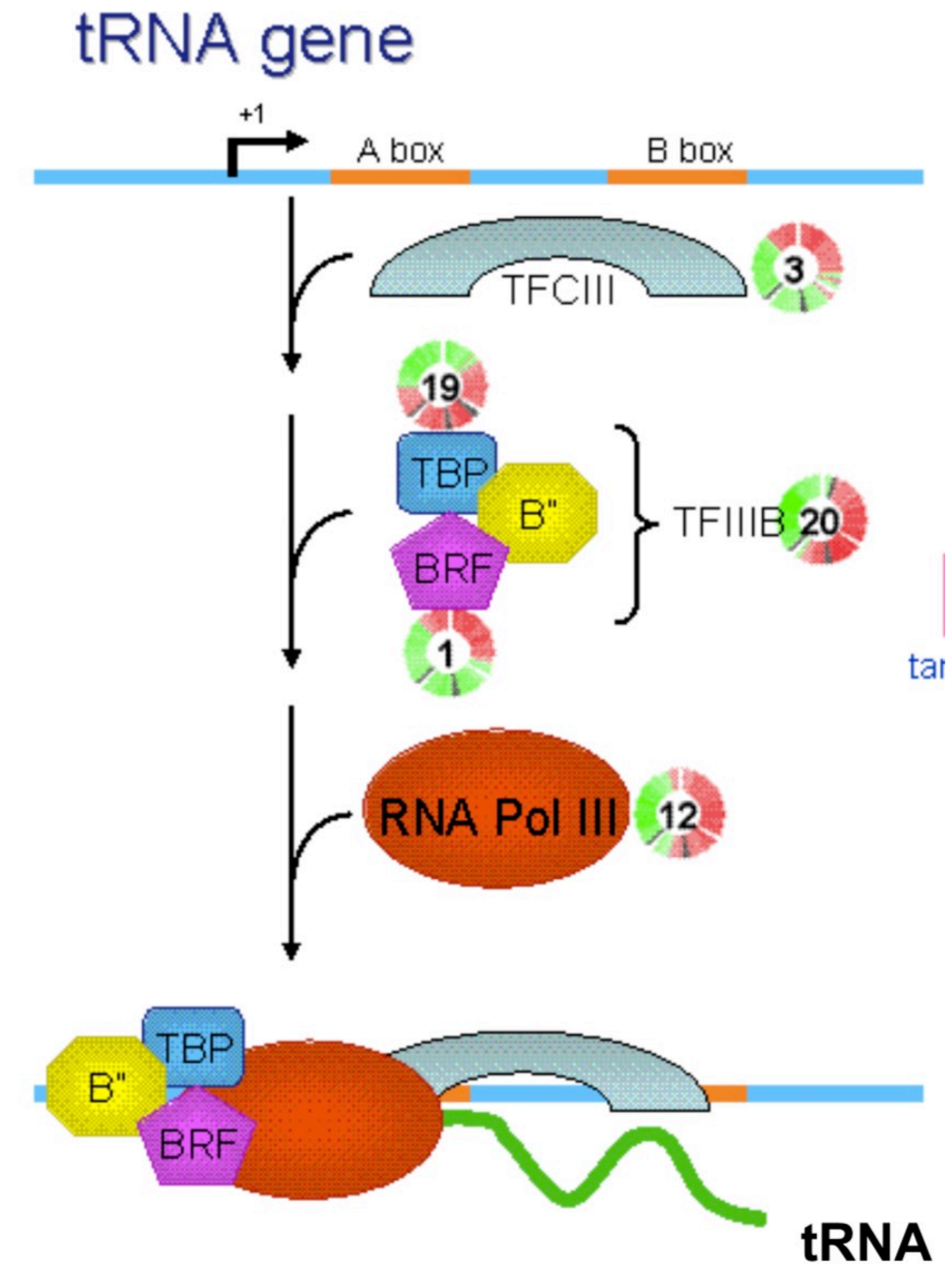
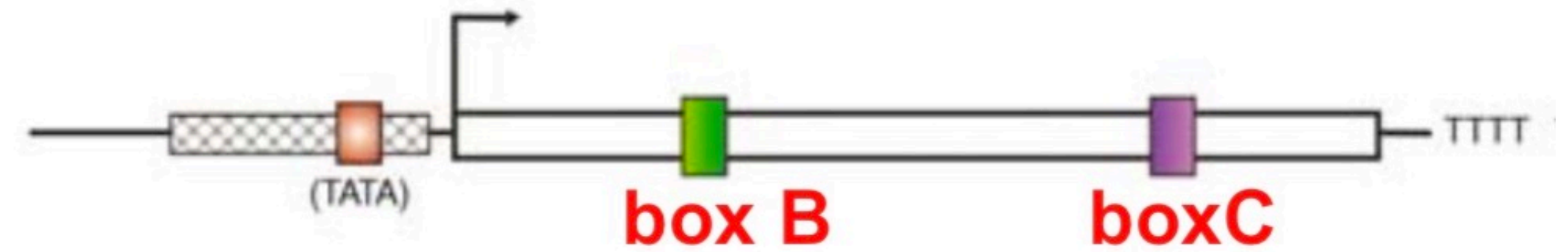
Polimeraza I i synteza rRNA

- Ponad 70% aktywności transkrypcyjnej w komórce
- Geny rDNA w postaci tandemowych powtórzeń do 200 kopii
- Niektóre ogólne czynniki transkrypcyjne wspólne z innymi polimerazami (TFIIH, TBP)
- Promotor rdzeniowy zawiera sekwencję TATA
- Regulacja zależnie od stanu energetycznego komórki - szlak Tor



Polimeraza III

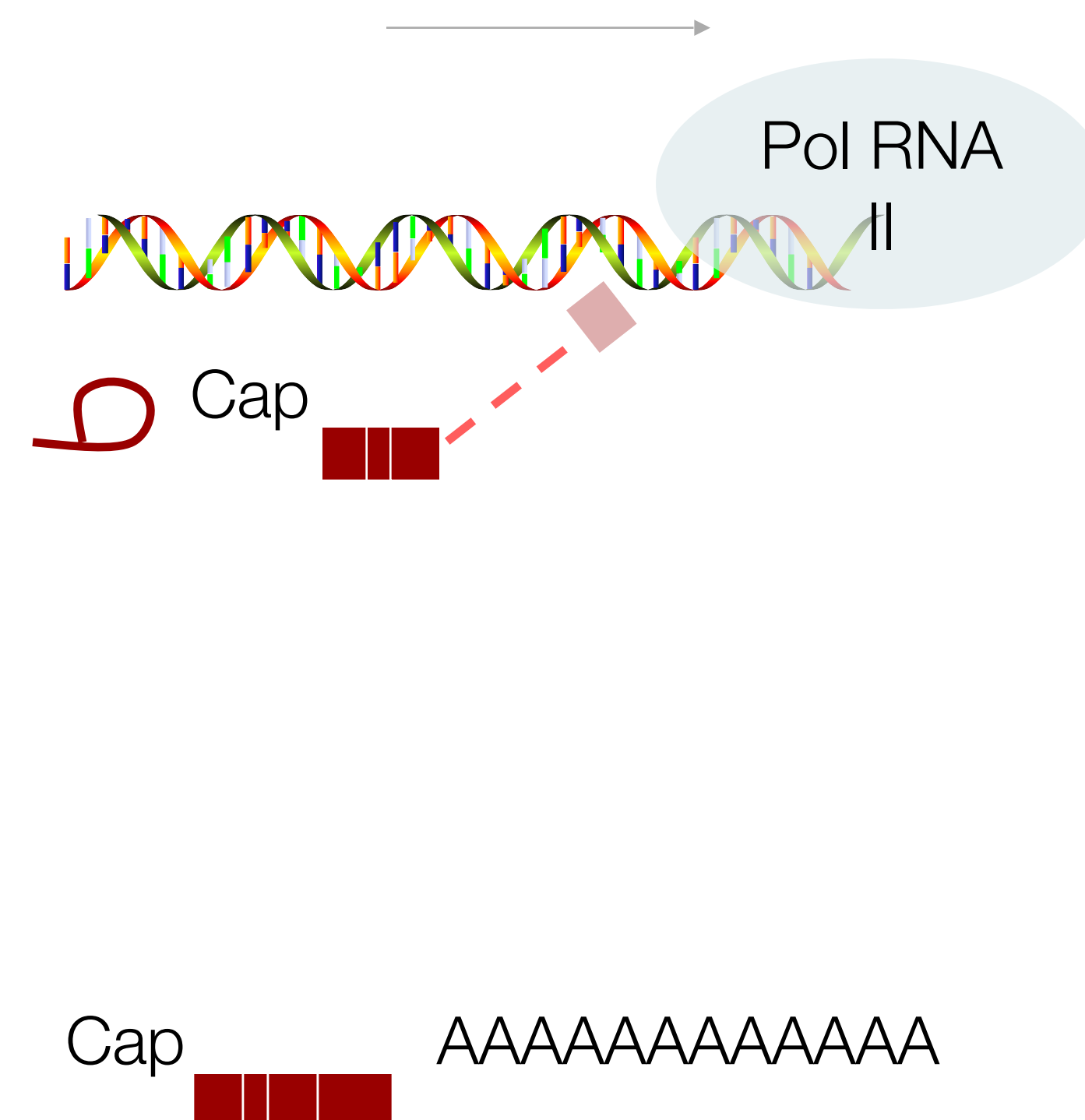
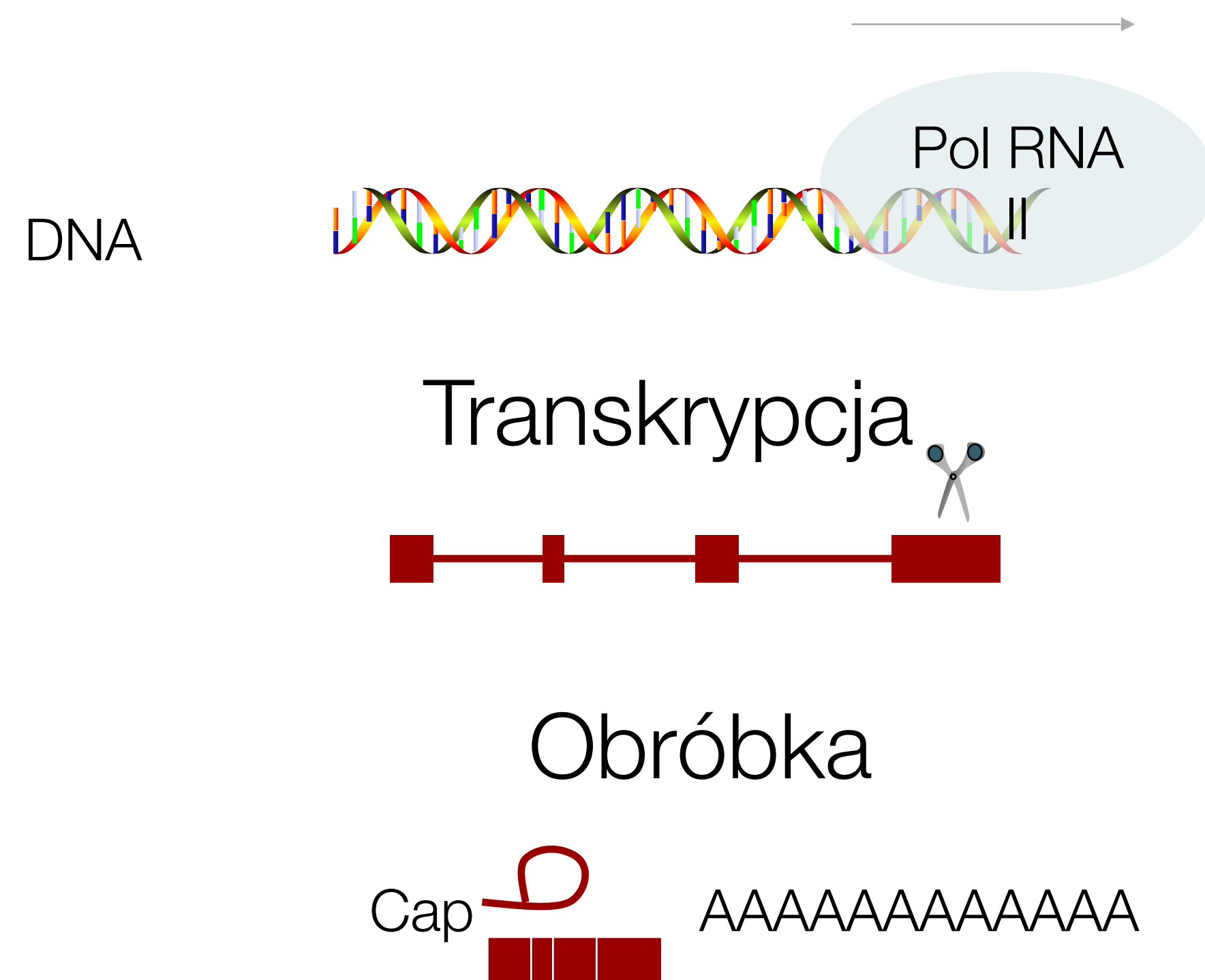
- Elementy *cis* poniżej startu transkrypcji
- Promotor rdzeniowy zawiera sekwencję TATA



Transkrypcja i obróbka RNA są sprzężone

Tradycyjny obraz
ekspresji genu

Współczesny obraz
ekspresji genu

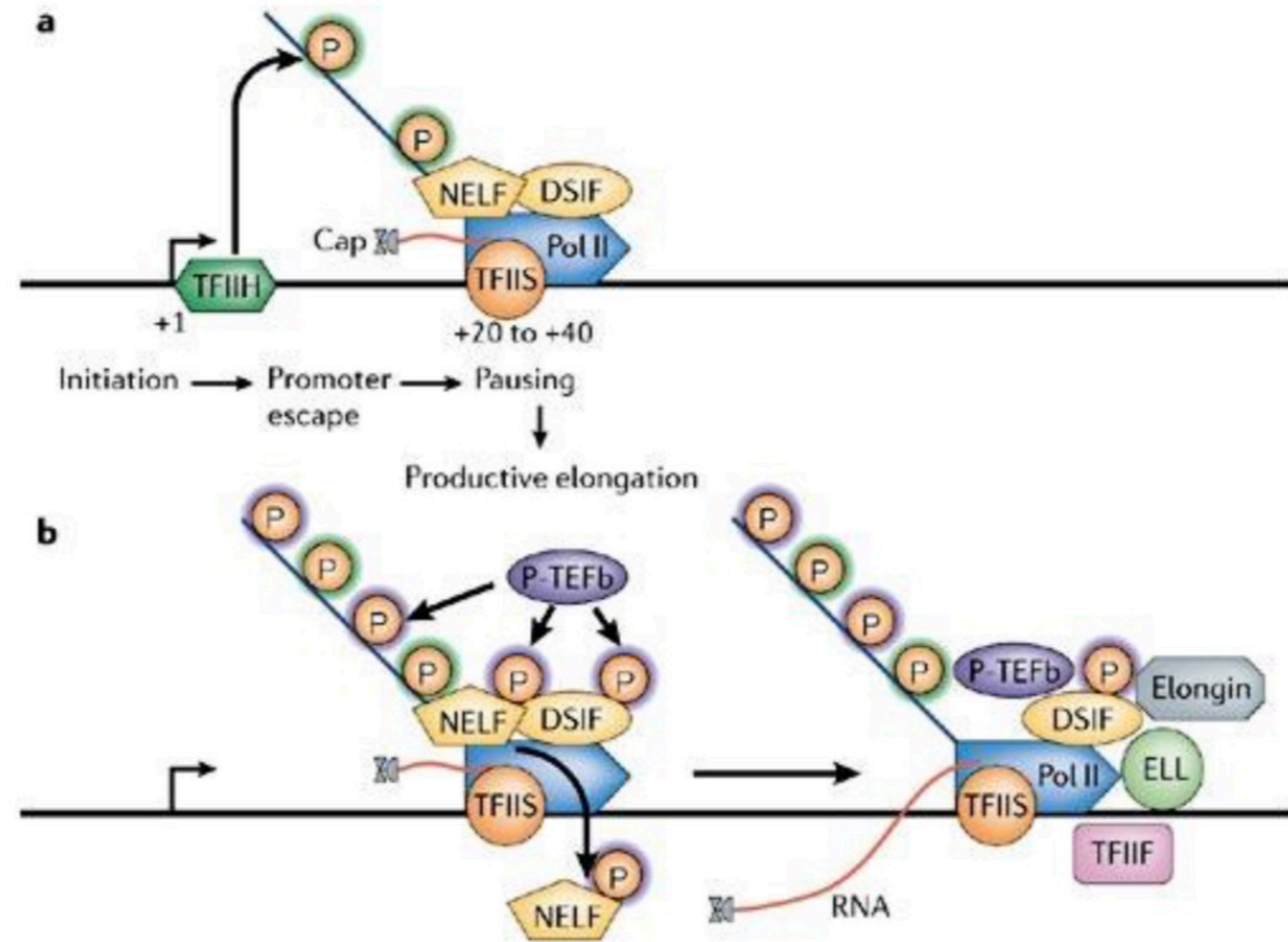


Sprzężenie transkrypcji i obróbki RNA

- Na poszczególnych etapach tworzą się kompleksy różnych białek z polimerazą RNA II
 - Inicjacja/synteza czapeczki
 - Elongacja/splicing
 - Terminacja/poliadenylacja
- Kluczowym obszarem jest **C-koniec polimerazy II (CTD)** – regulacja przez fosforylację

Przejsćie inicjacja - elongacja

- **C-końcowa domena polimerazy (CTD)** zawiera sekwencję z powtórzeniami YSPTSPS
- Fosforylacja CTD reguluje przejście od kompleksu inicjacji do kompleksu elongacji
- Uwolnienie się z promotora i przejście do produktywnej transkrypcji
- Zmienia się skład towarzyszących polimerazie białek
 - inicjacja + przyłączanie czapeczki 5' (kapu)
 - elongacja + składanie (splicing)



Saunders et al. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7, 557–567, 2006