

Ekspresja genu

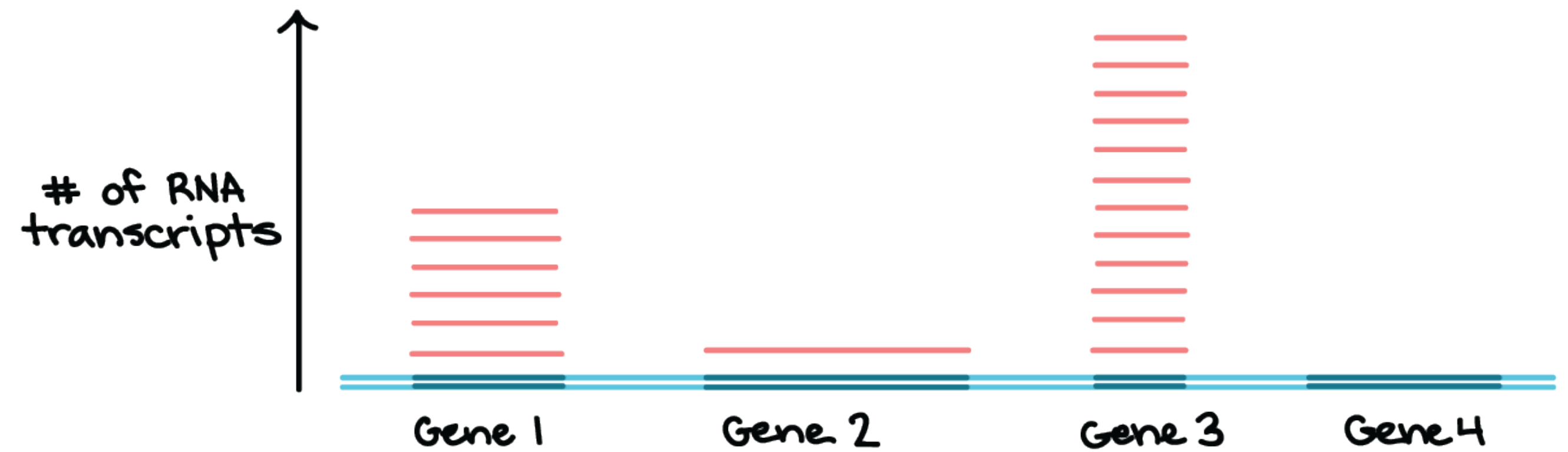
Podstawowe mechanizmy i pojęcia

Ekspresja

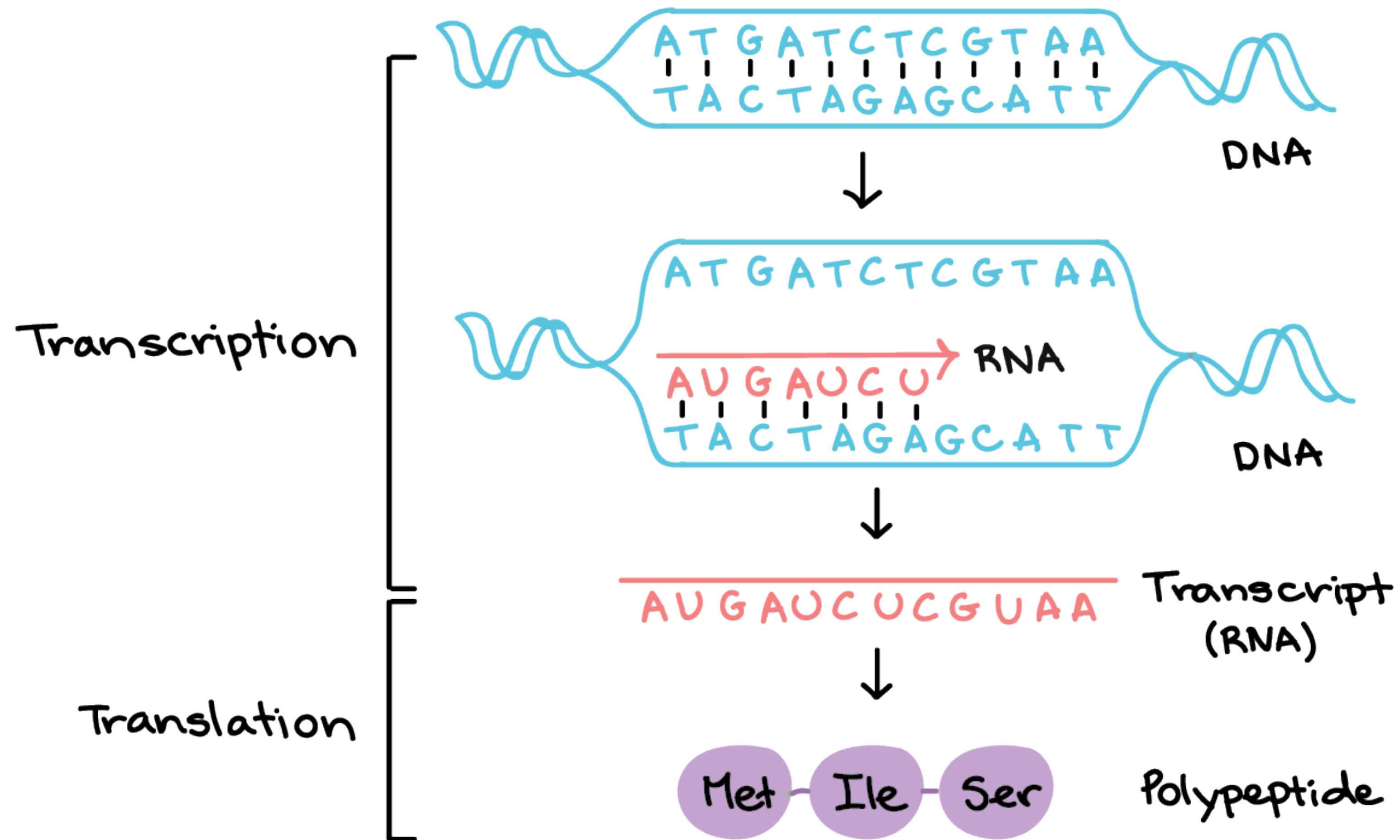
- Ekspresja (wyrażanie) genu jest regulowana na wielu etapach
- Regulacja ekspresji jest podstawowym mechanizmem dla:
 - adaptacji do zmiennych warunków
 - homeostazy
 - rozwoju i różnicowania
- Wzór regulacji ekspresji genów może być utrzymywany z kolejnymi podziałami komórki, a nawet z kolejnymi pokoleniami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

Francis Crick, 1956

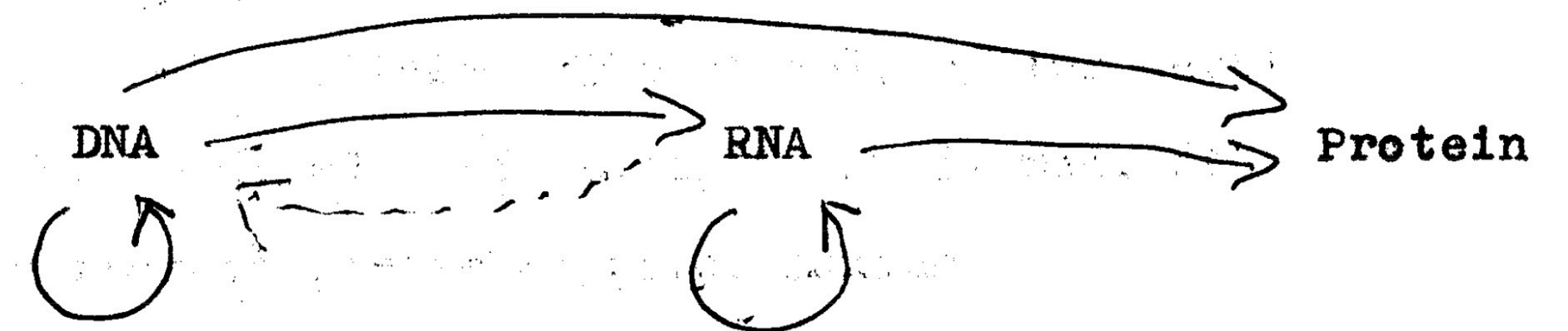
Ideas on Protein Synthesis (Oct. 1956)

The Doctrine of the Triad.

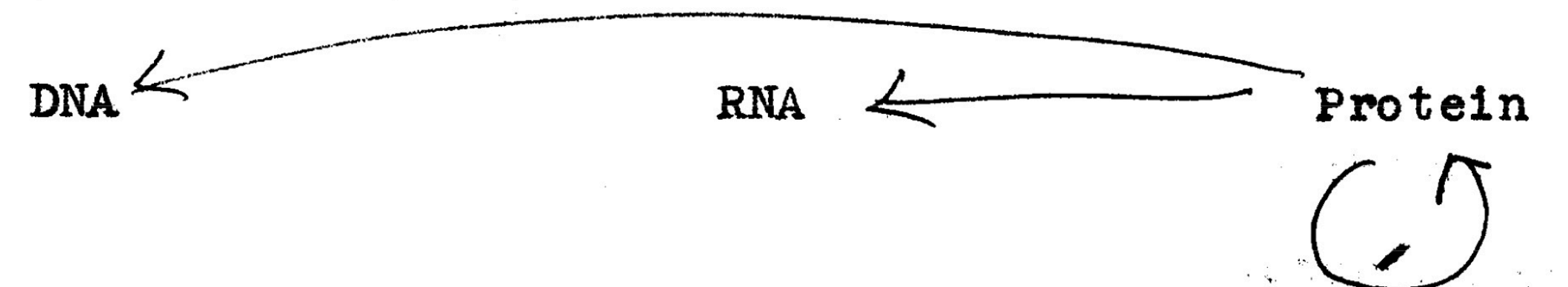
The Central Dogma: "Once information has got into a protein it can't get out again". Information here means the sequence of

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

That is, we may be able to have



but never



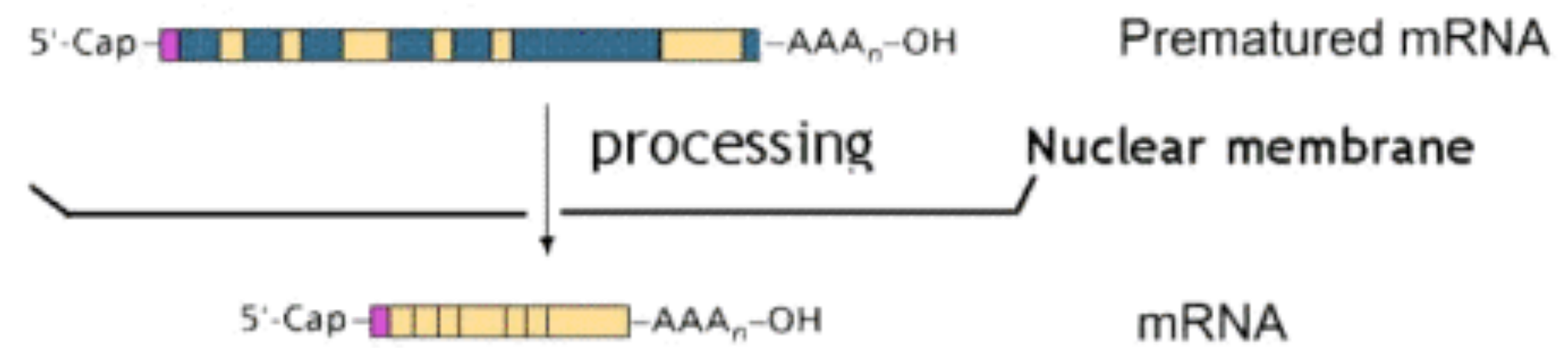
where the arrows show the transfer of information.

Centralna hipoteza („dogmat”)

DNA



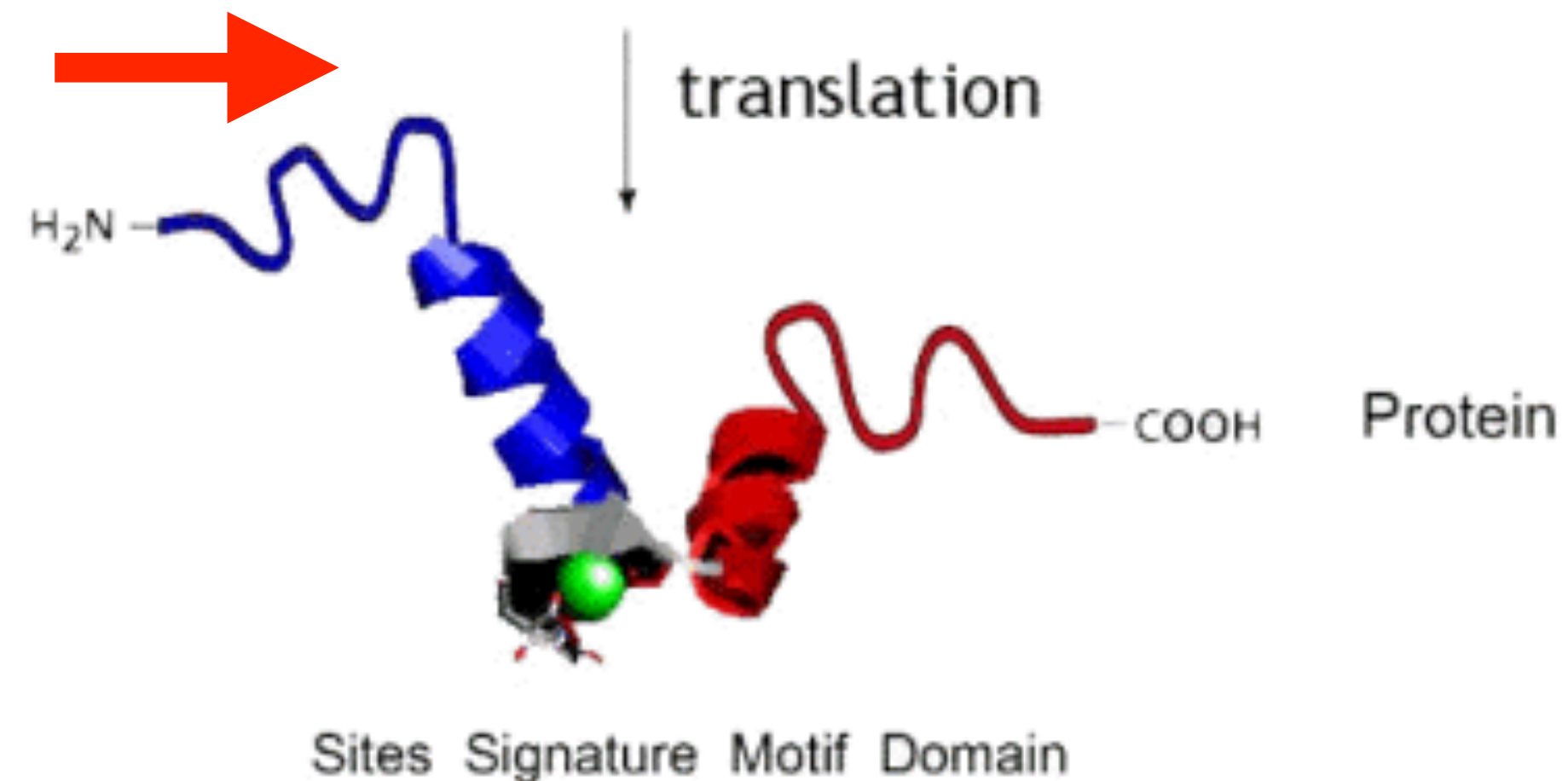
RNA



Ten etap jest jednokierunkowy

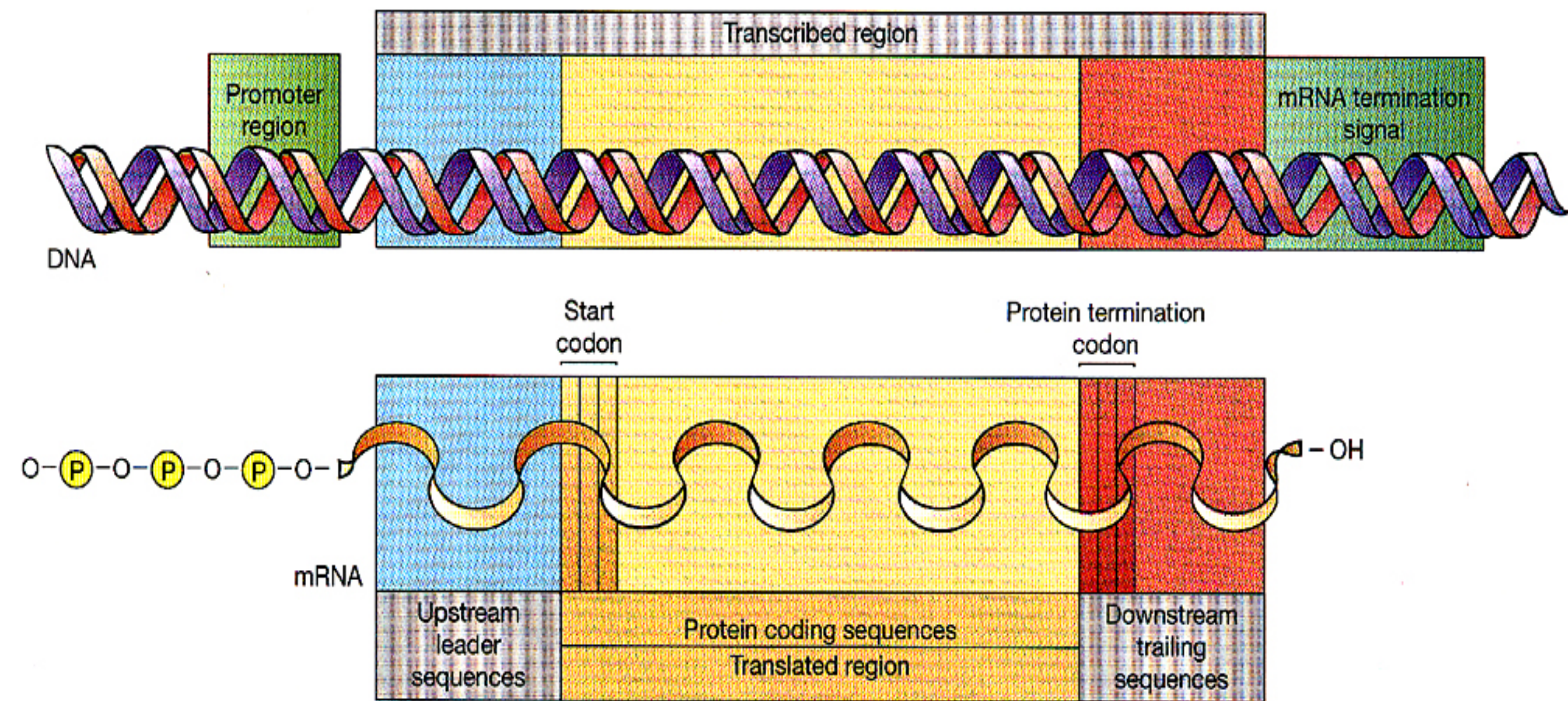
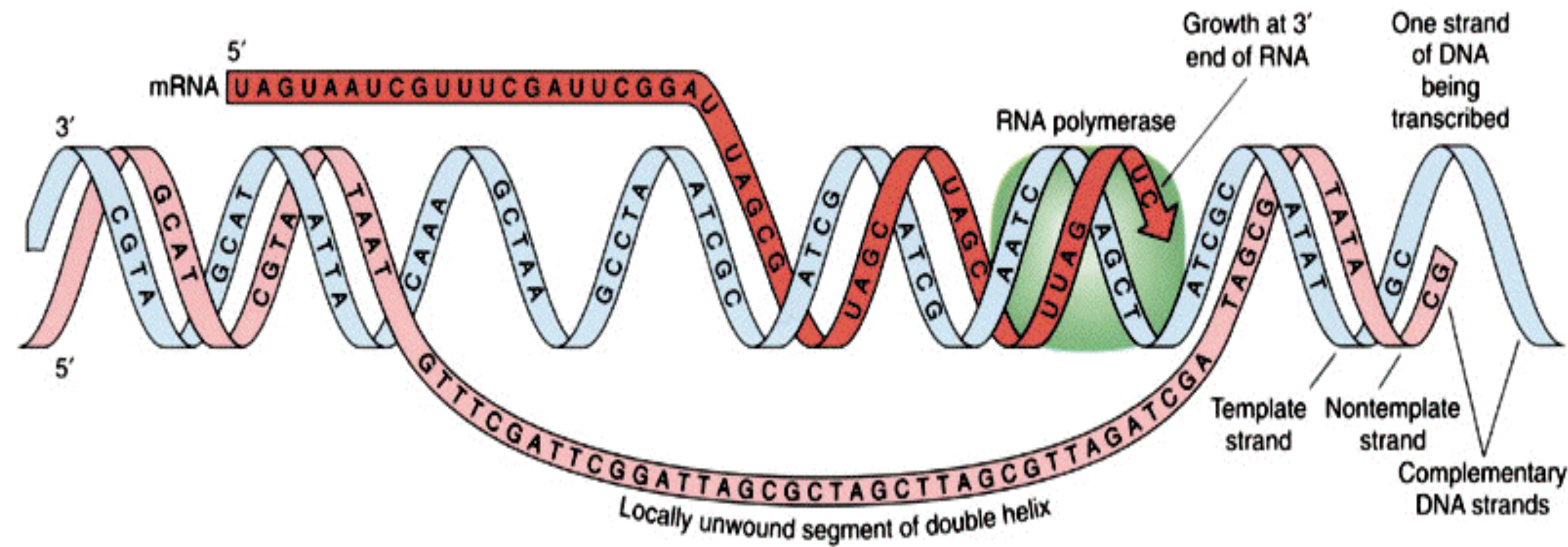


BIAŁKO



Transkrypcja

- Konkretny mechanizm różny 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'

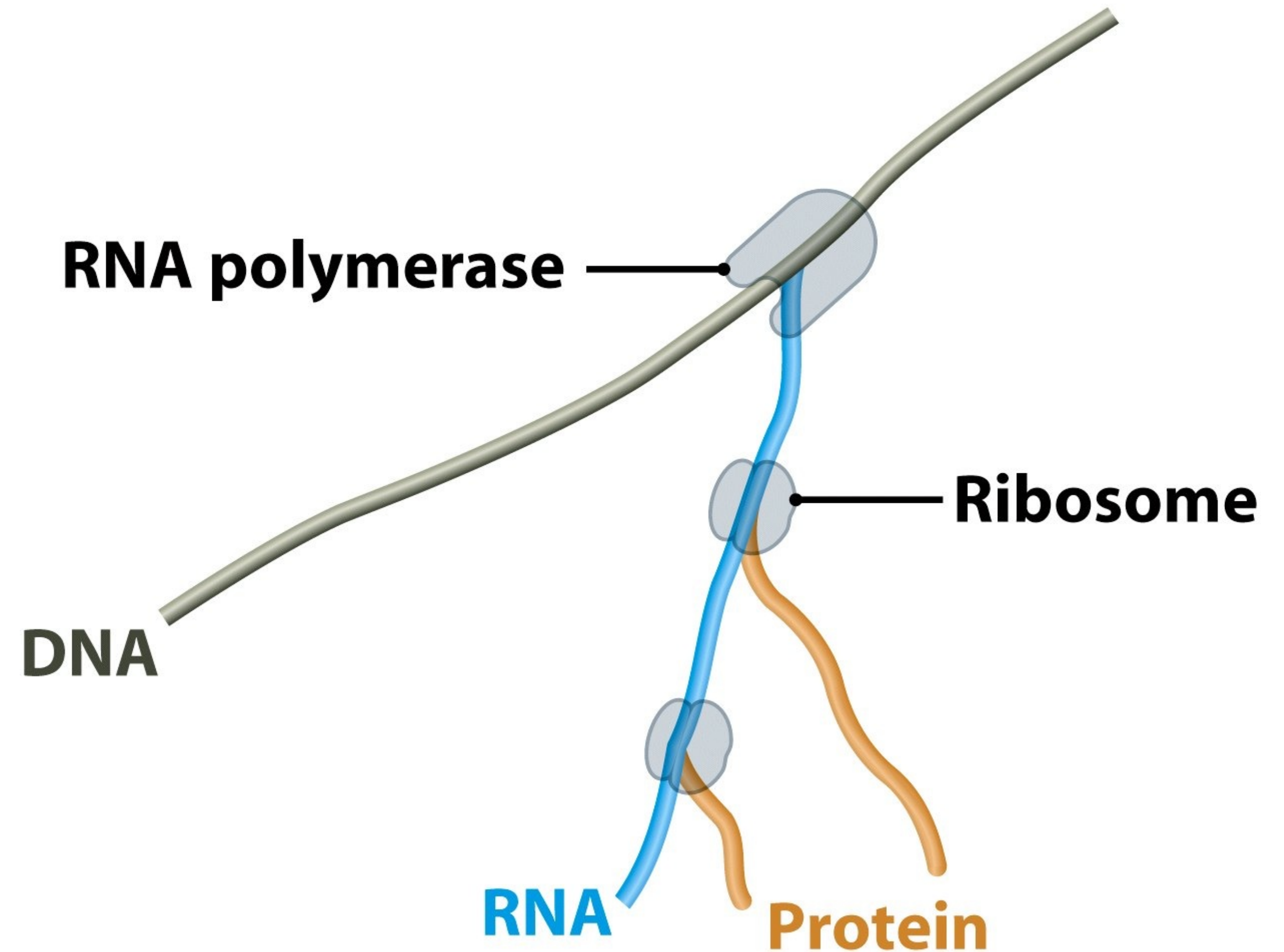


Figure 12-10 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

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

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

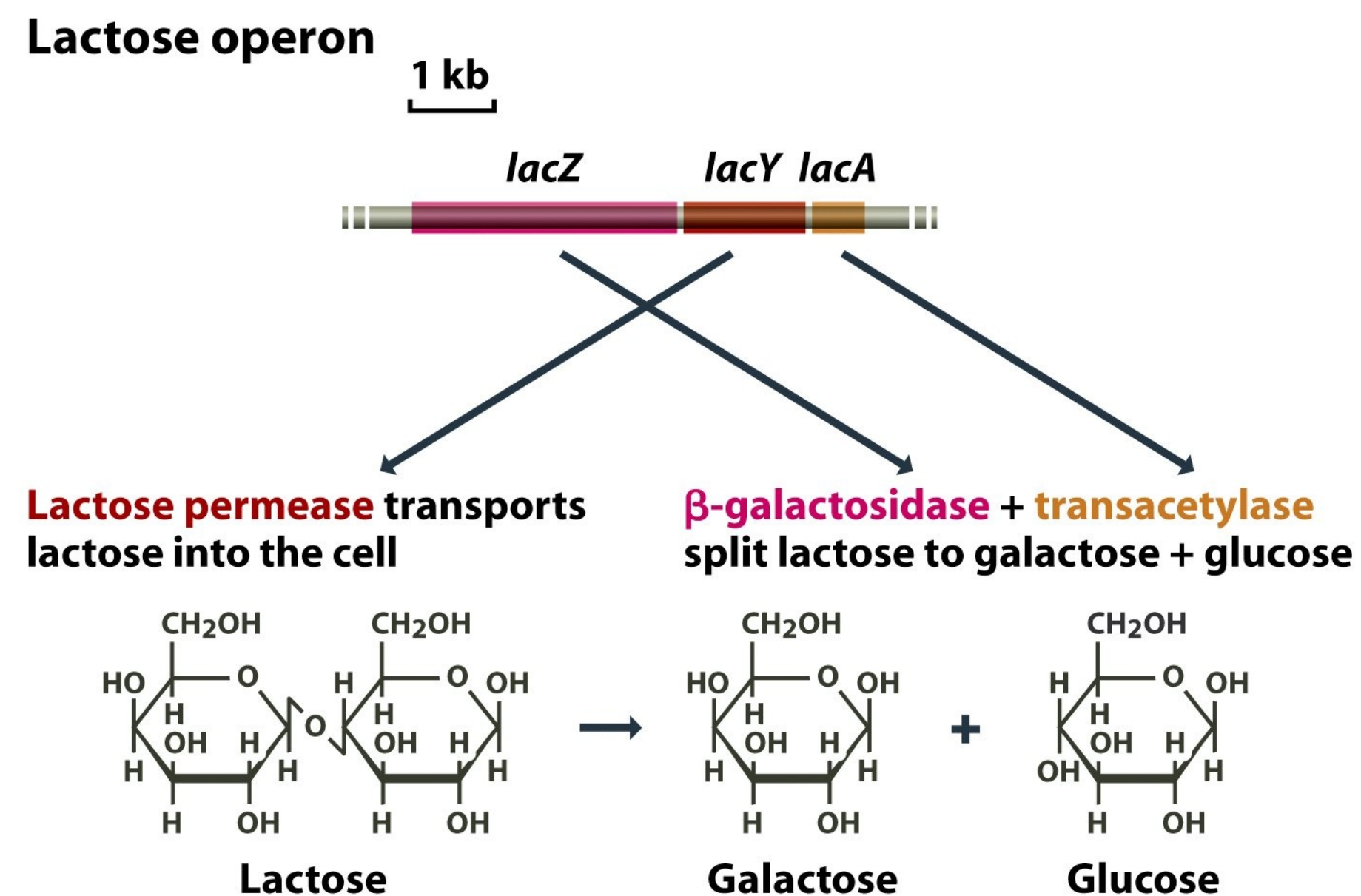
- Regulacja pozytywna
 - czynnik *trans* jest **aktywatorem** – zwiększa ekspresję
- Regulacja negatywna
 - czynnik *trans* jest **represorem** – osłabia ekspresję

Podstawy regulacji genu

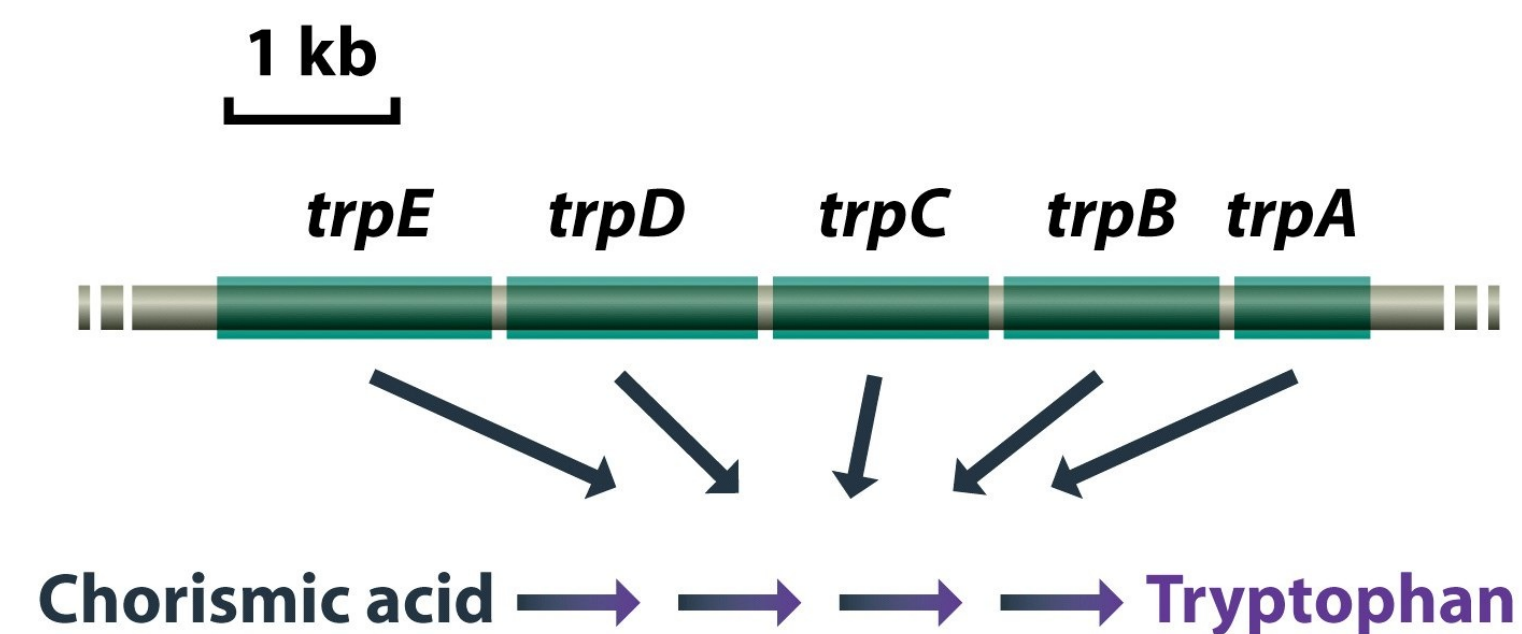
- Regulacja indukowalna
 - Sygnał zwiększa (indukuje) ekspresję
- Regulacja reprimowalna
 - Sygnał zmniejsza (reprimuje) ekspresję
- Możliwe są różne układy, np. regulacja negatywna indukowalna
 - Nie należy mylić pojęć: pozytywna/negatywna dotyczy aktywności czynnika *trans* a indukowalna/reprimowalna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

Operony

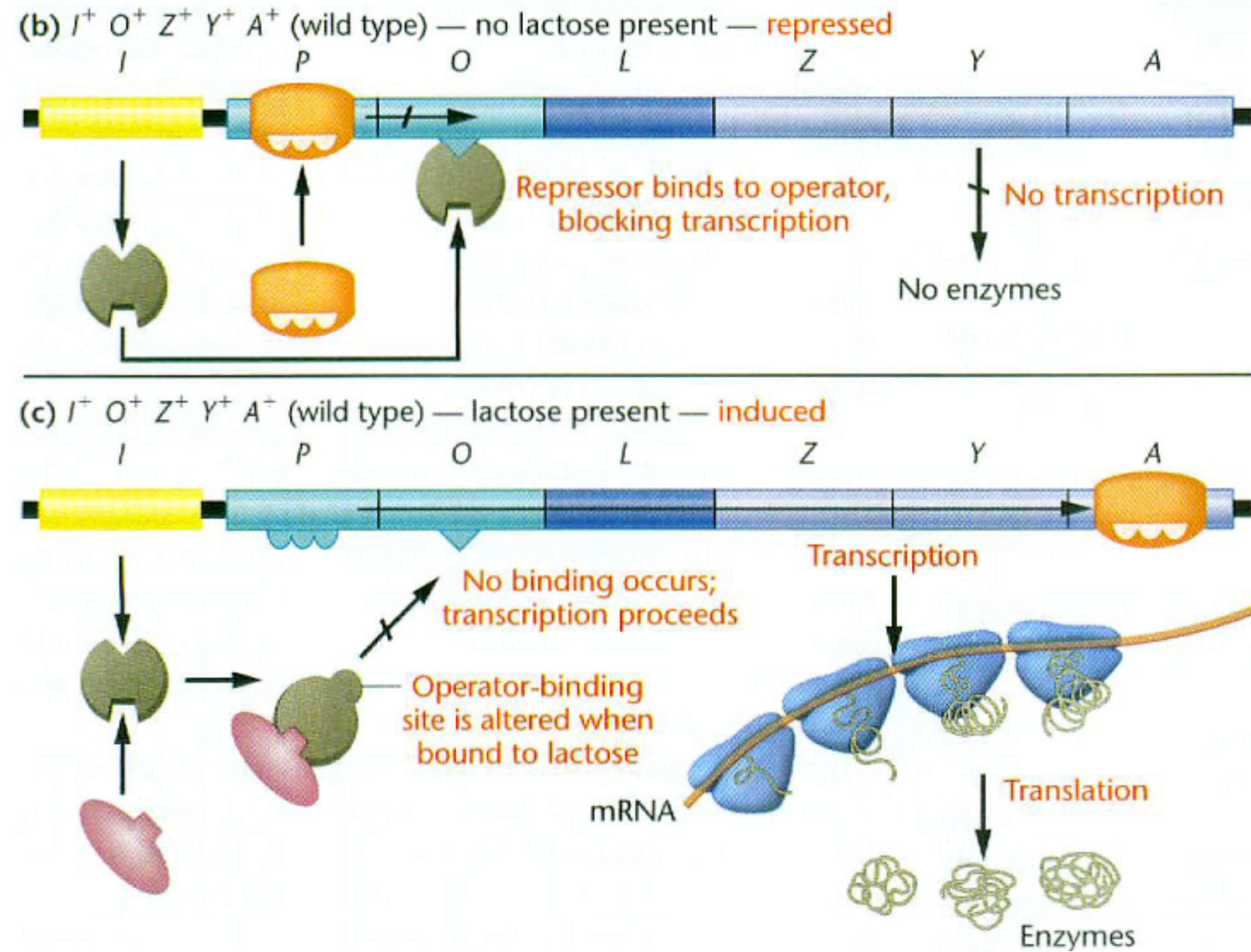
- Typowy dla bakterii i archeonów system ekspresji
- Policistronowy transkrypt – wspólna ekspresja wielu genów z jednego promotora
- Przeważnie geny związane funkcją, ale są wyjątki



Tryptophan operon



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 deleccyjnych

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

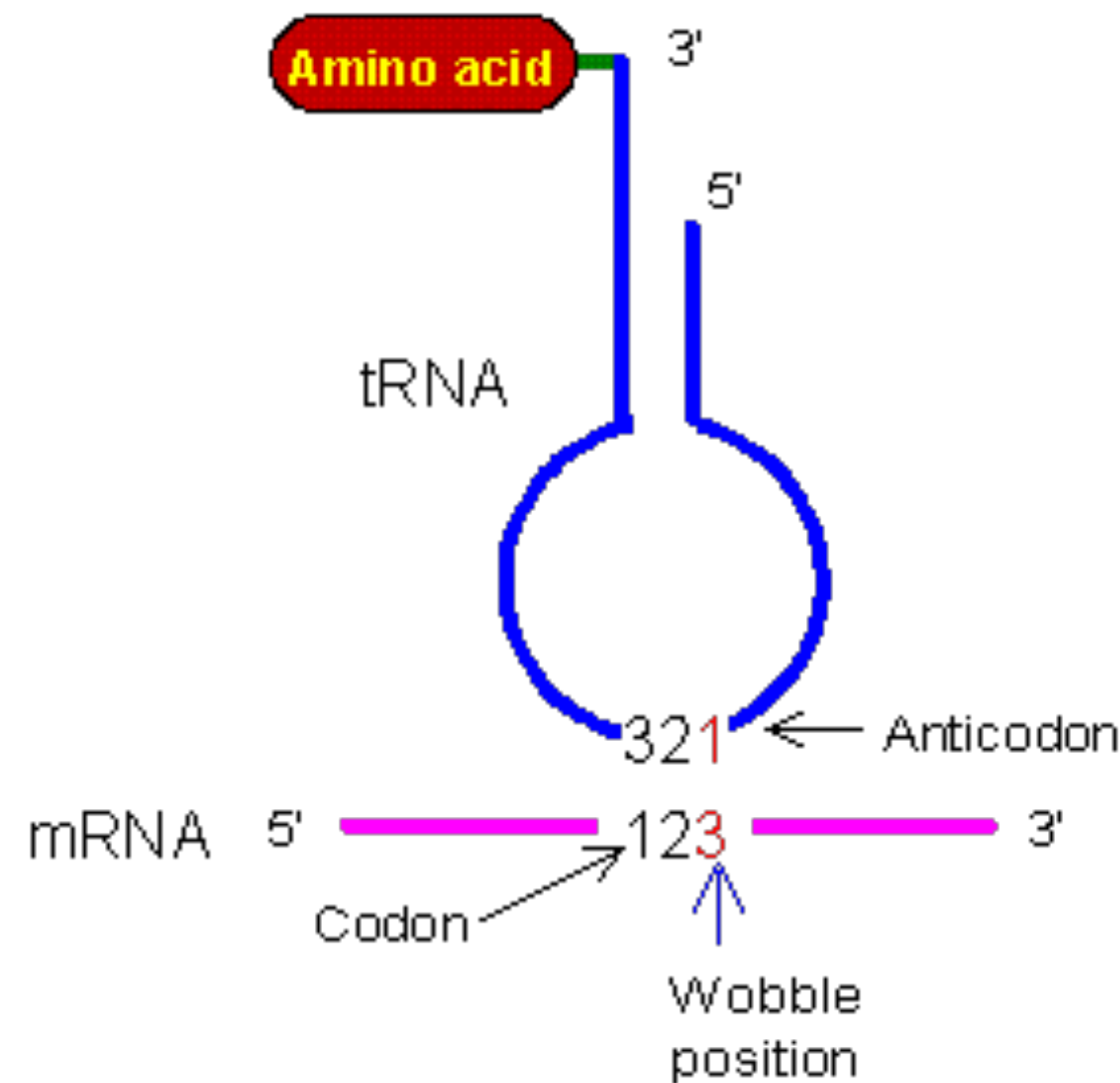
Regularności w kodzie

- 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

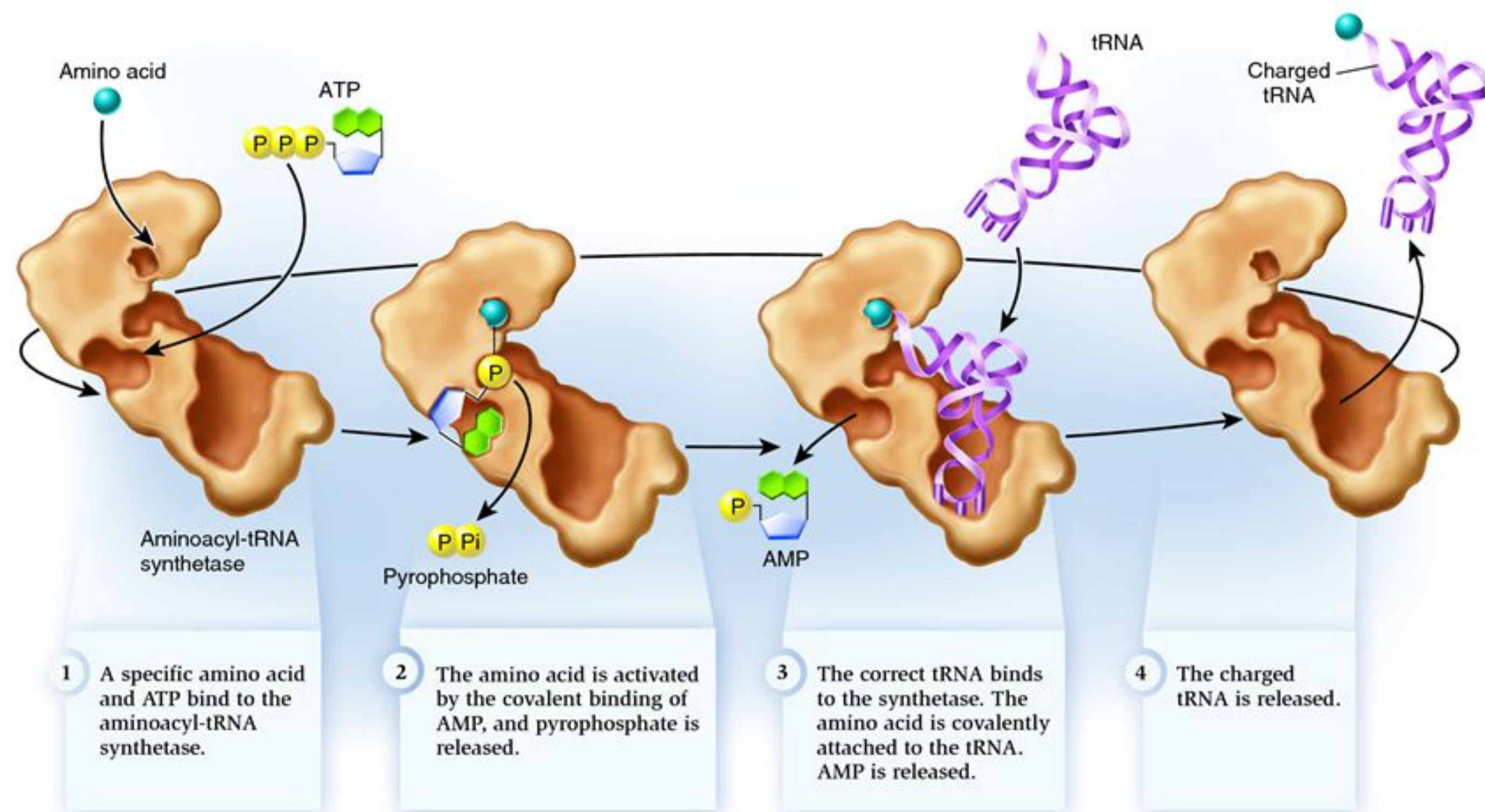


	Wobble bases				
tRNA	C	A	G	U	I
mRNA	G	U	C	A	C
			U	G	A
					U

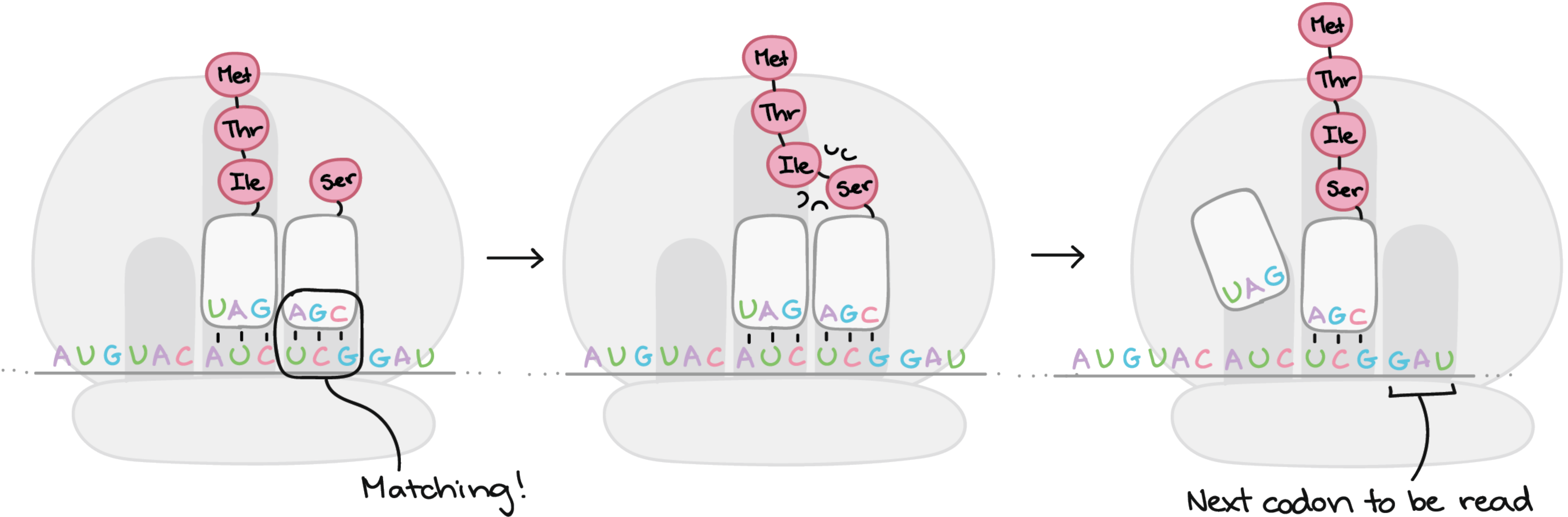
	Wobble bases			
mRNA	C	A	G	U
tRNA	G	U	C	A
	I	I	U	I

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



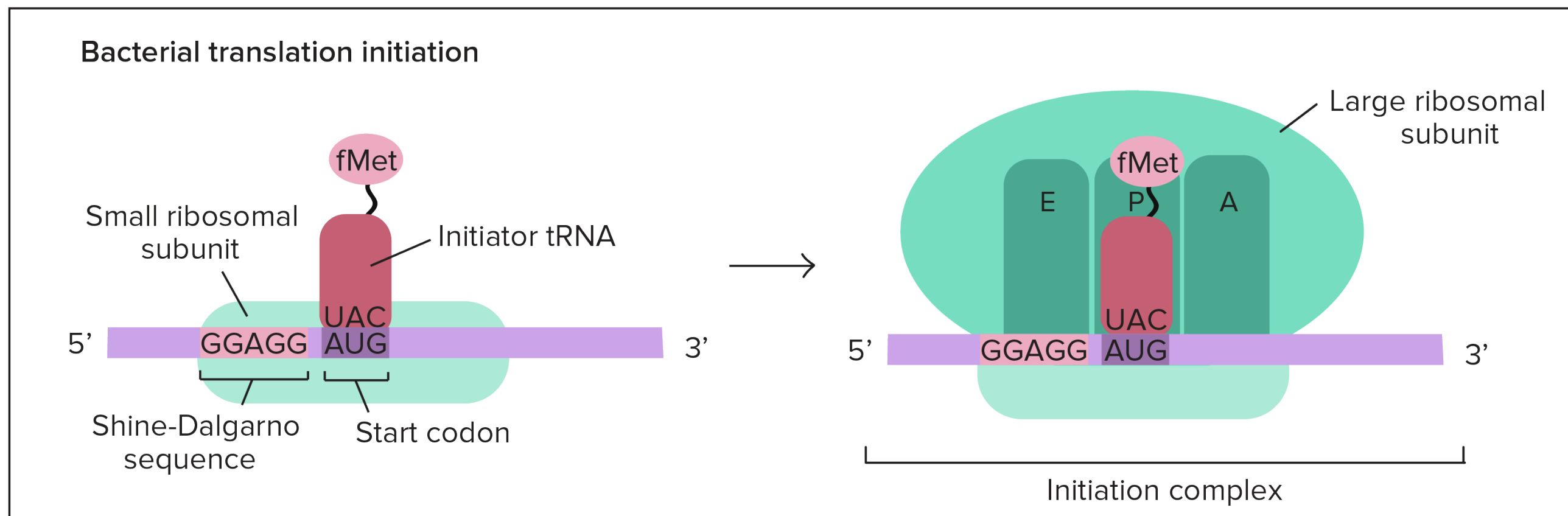
tRNA binds to exposed codon.

New amino acid attaches to polypeptide chain.

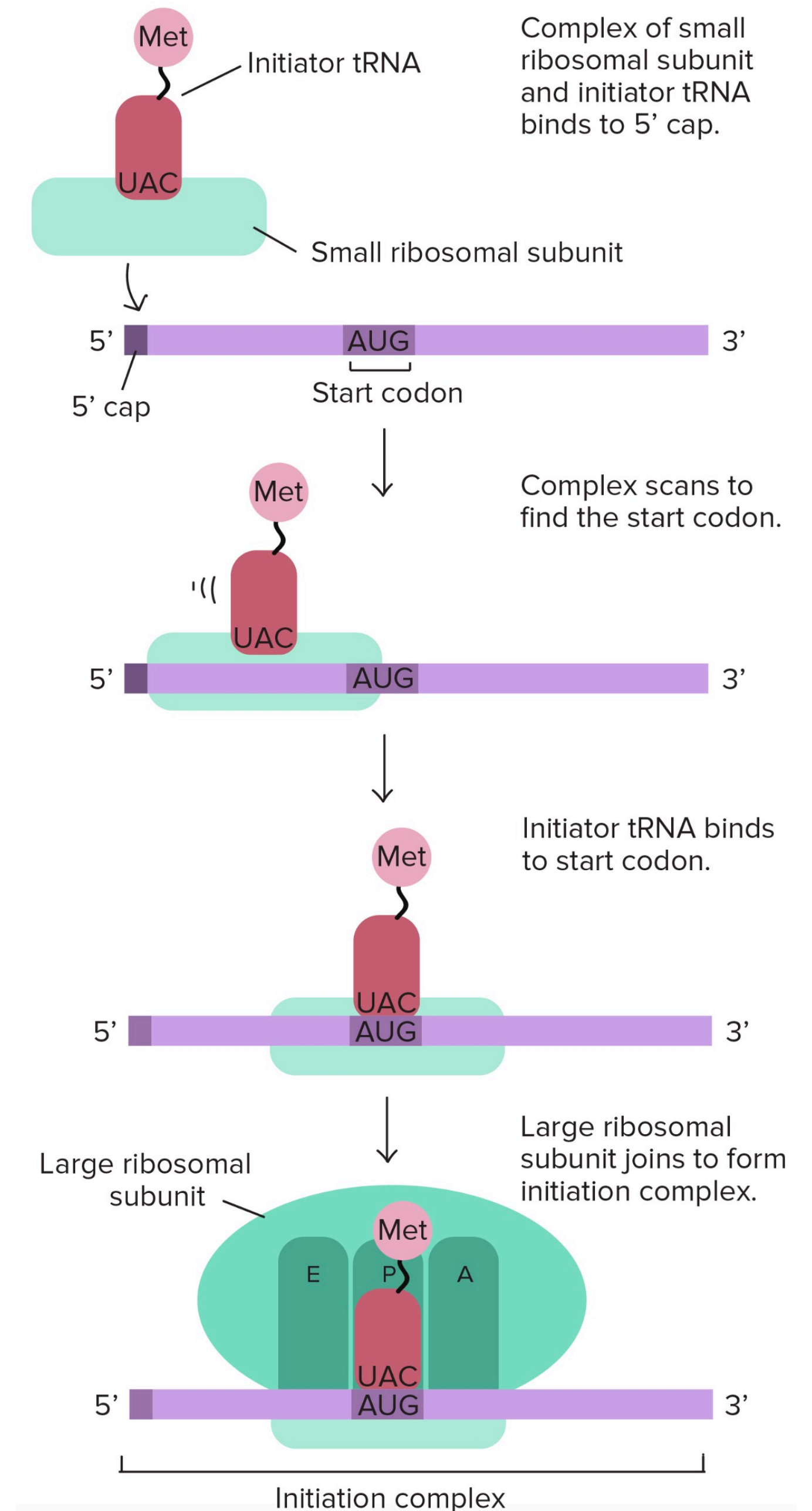
Ribosome shifts one codon over on the mRNA.

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)

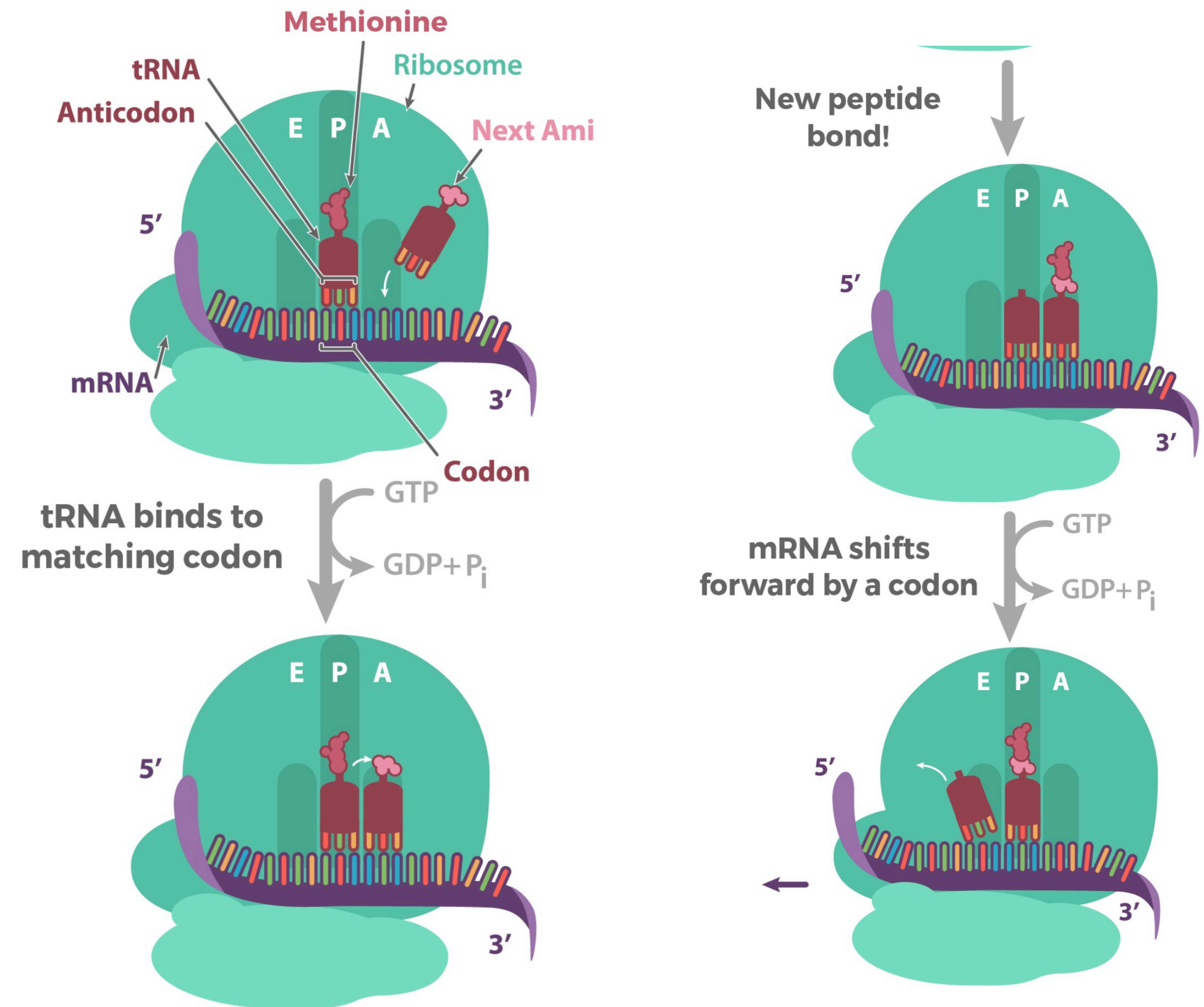


Eukaryotic translation initiation



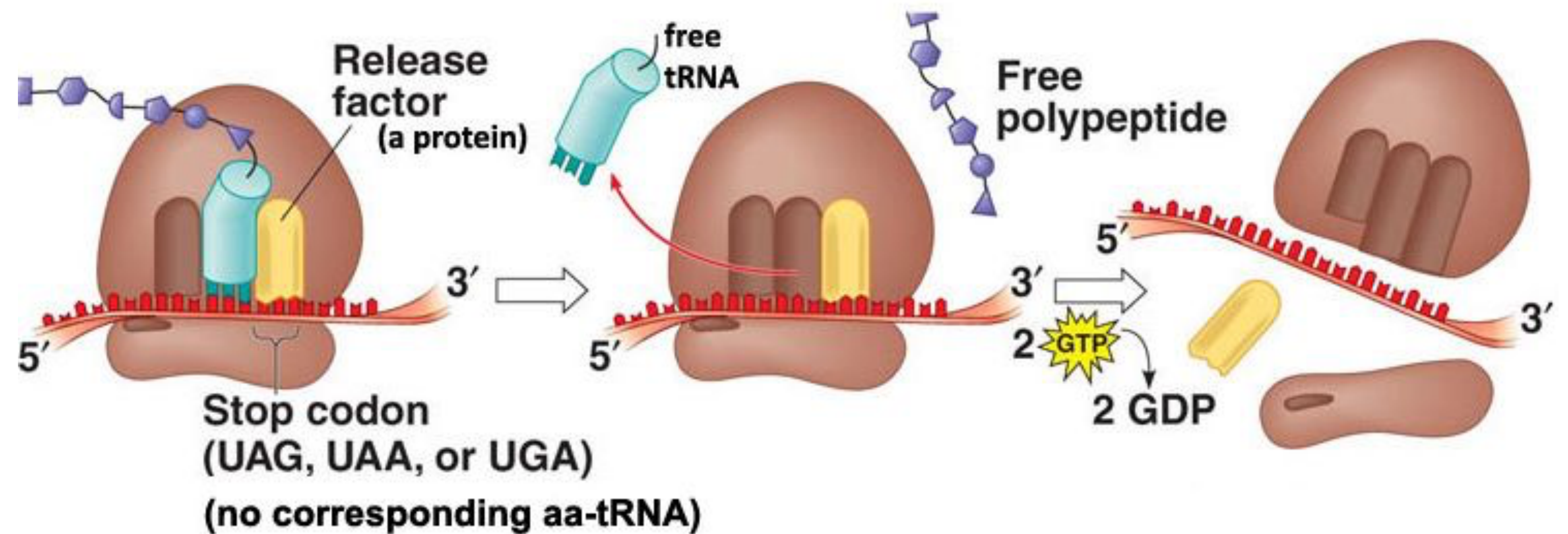
Elongacja

- 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

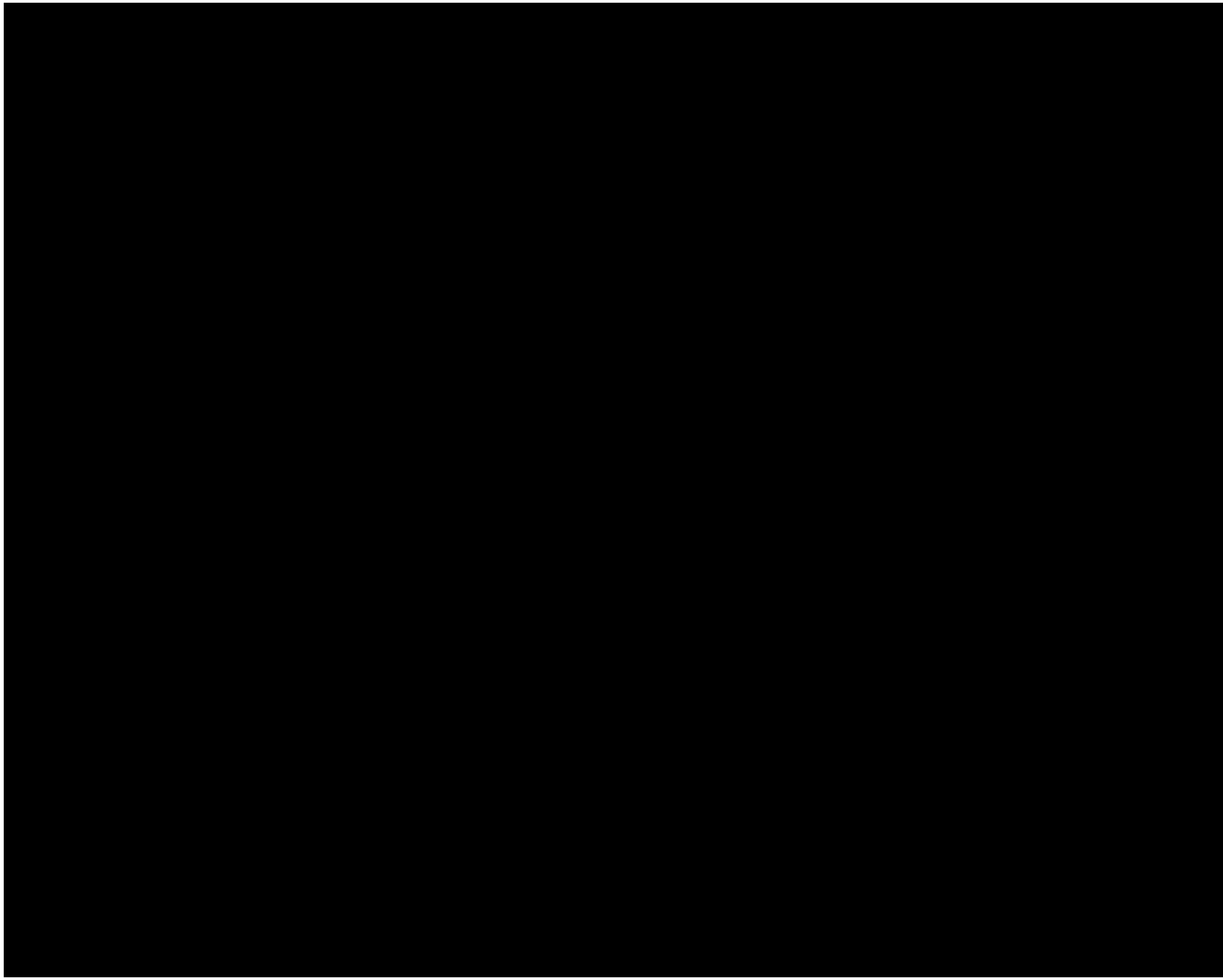
Ada E. Yonath

🕒 1/3 of the prize

Israel

Weizmann Institute of Science
Rehovot, Israel





Animacje i struktury

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

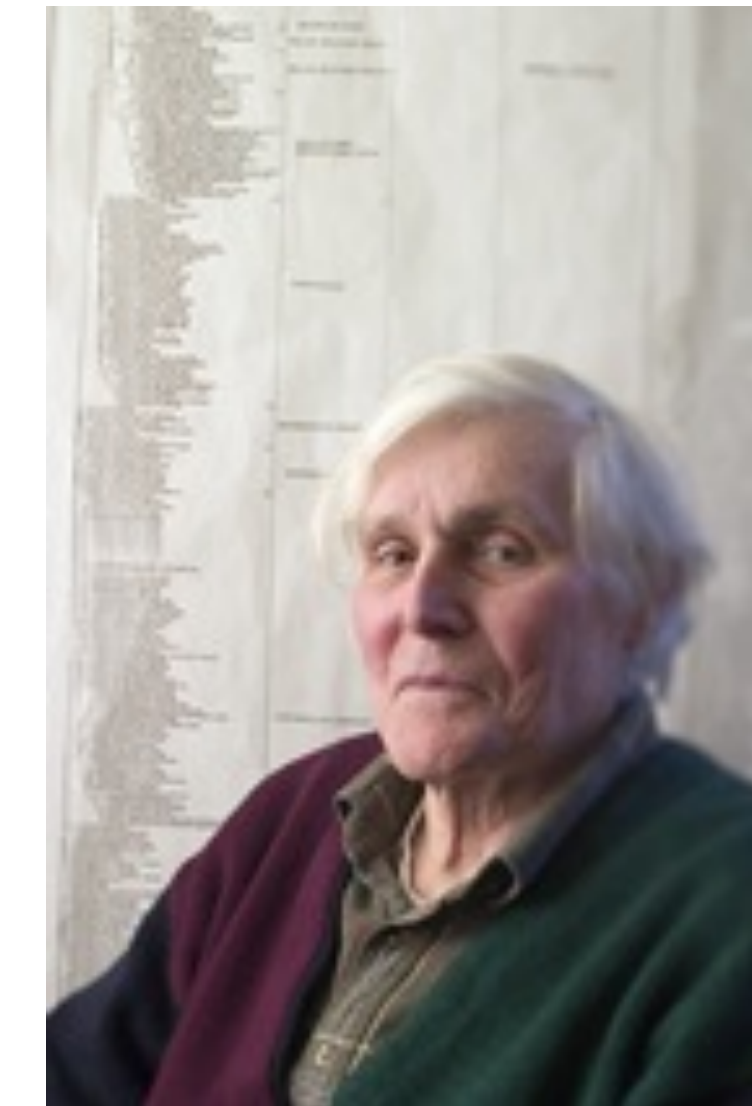
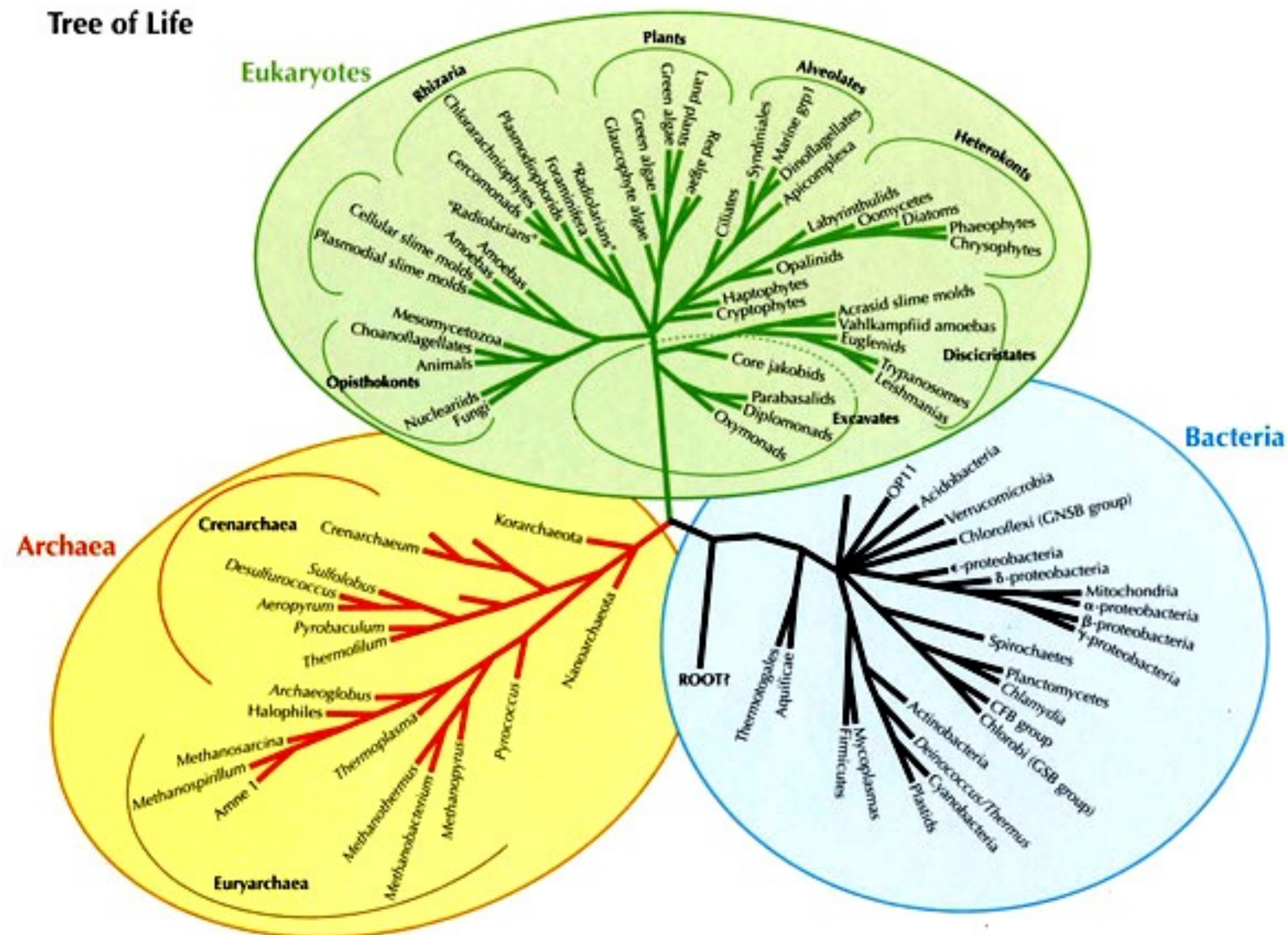
Prokaryota

Genetyka molekularna i genomika

Literatura

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

Prokaryota – nie są jedną grupą



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*

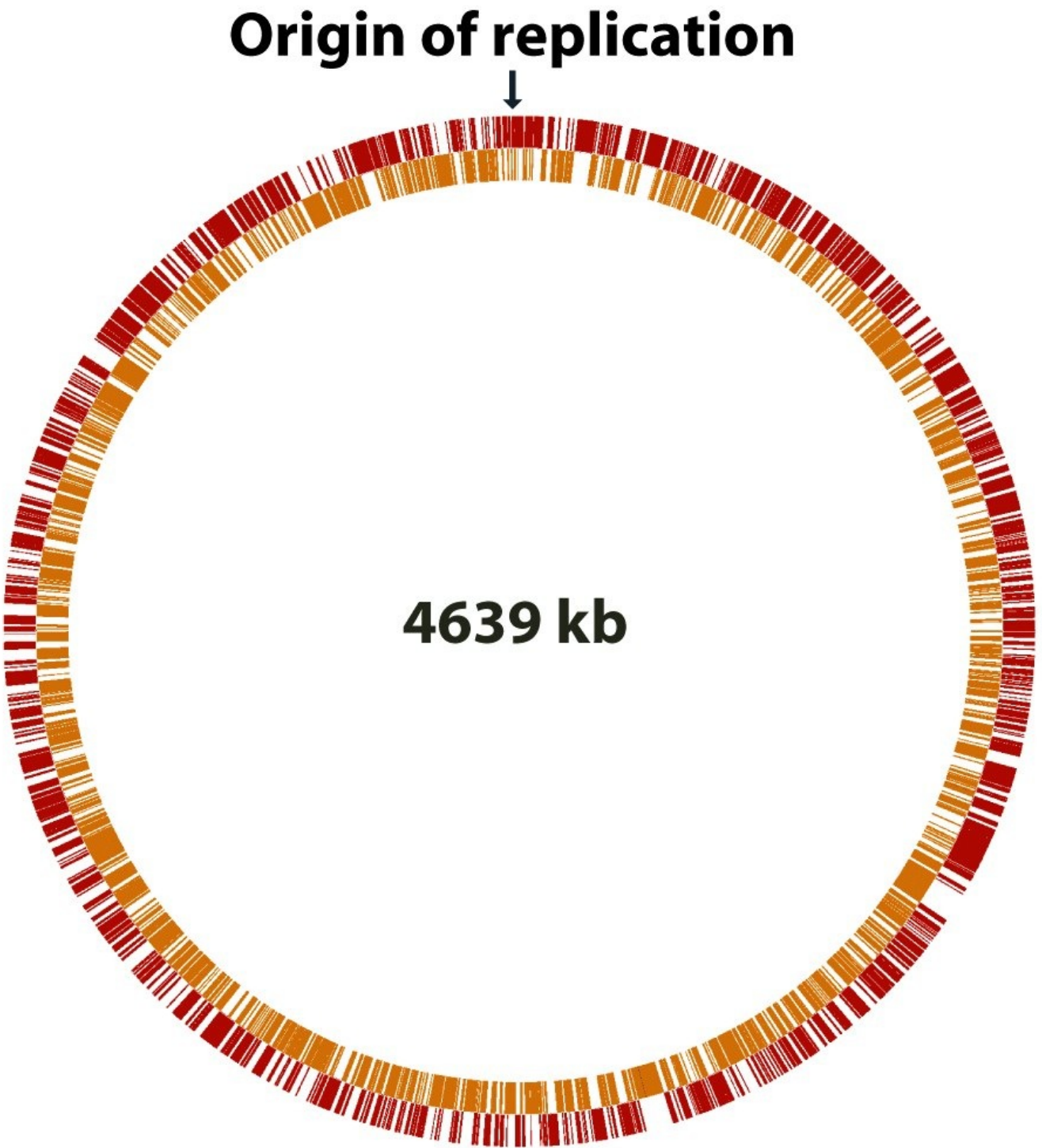


Figure 8.6 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

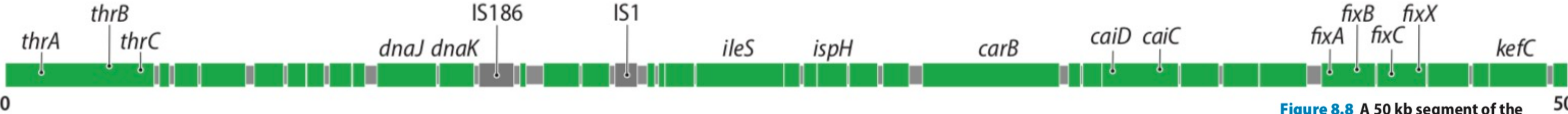


Figure 8.8 A 50 kb segment of the *Escherichia coli* genome. The segment

Upakowanie DNA

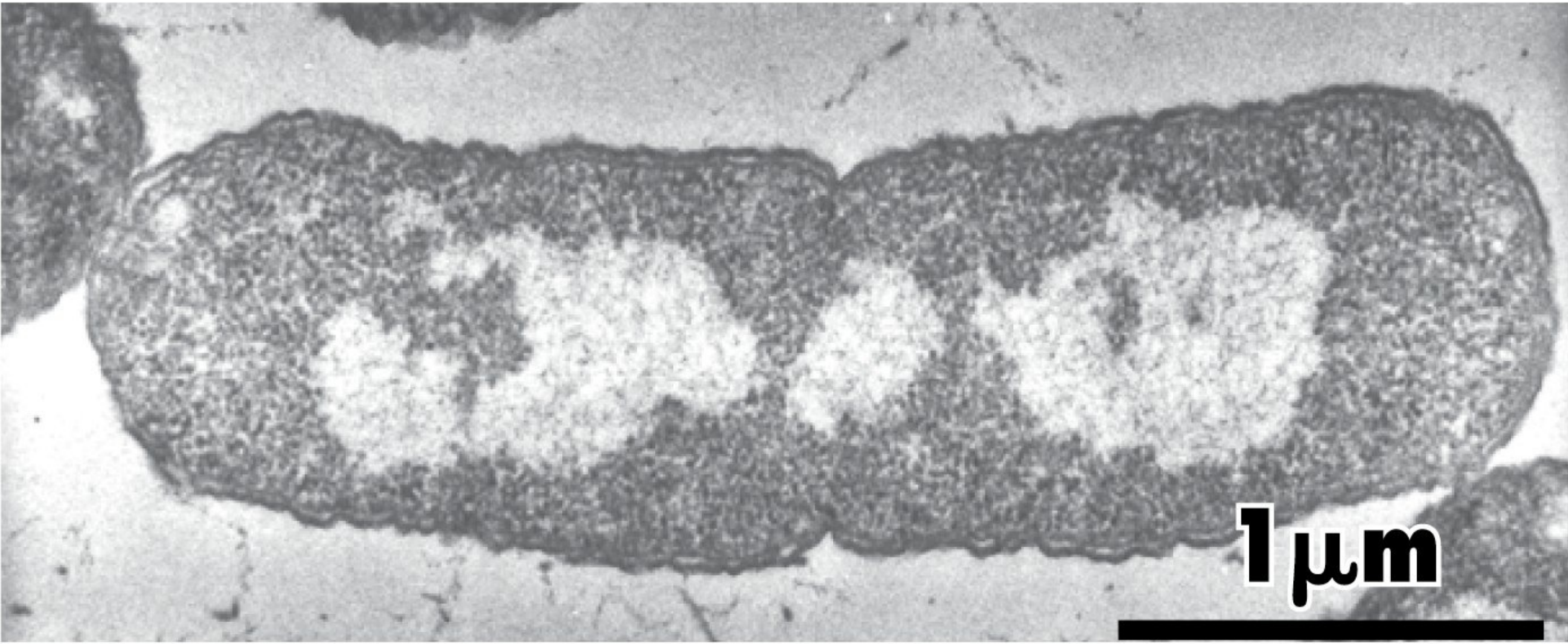


Figure 8.1 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

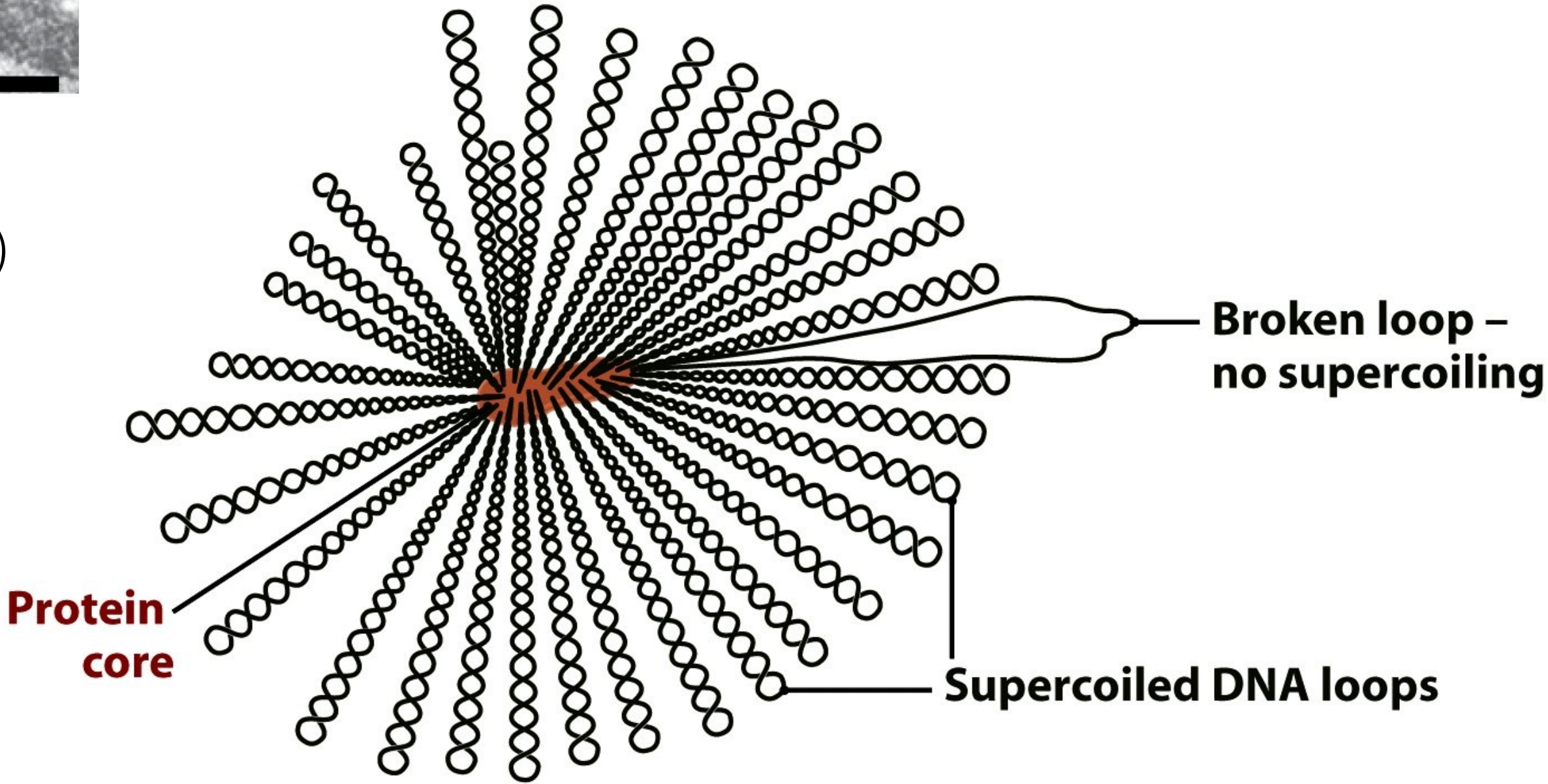


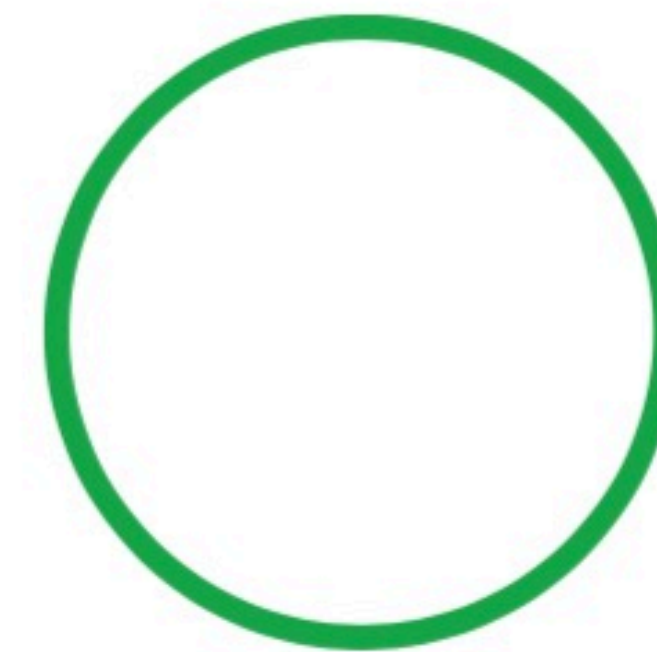
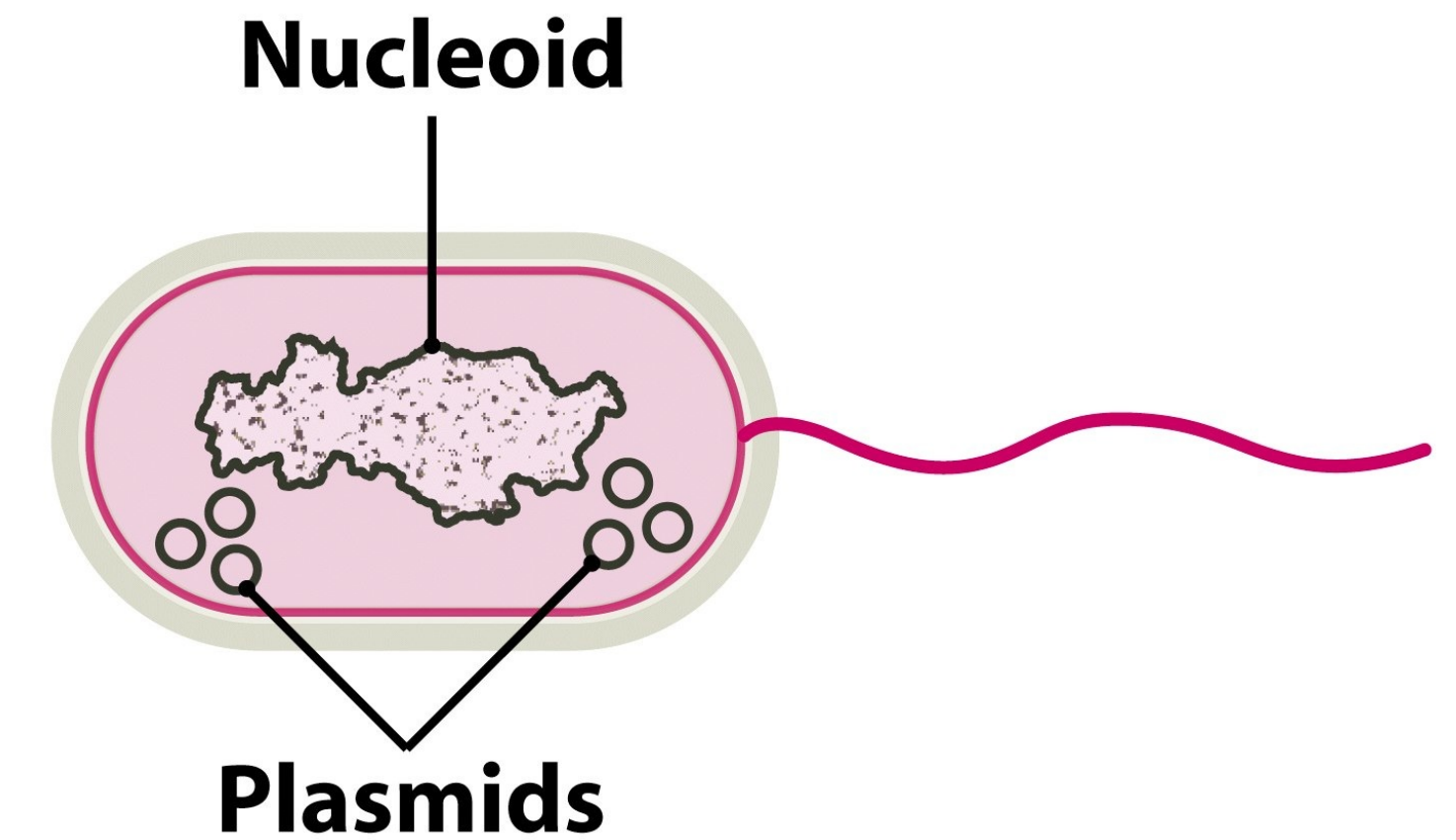
Figure 8.3 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Gen prokariotyczny

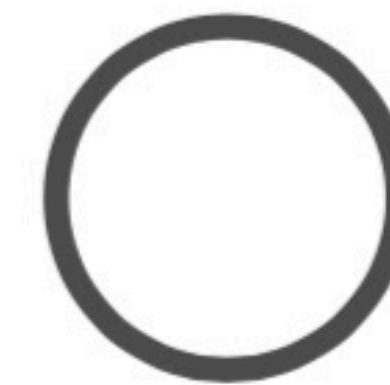
- Introny nieliczne, w mRNA praktycznie niespotykane
- Łatwo zidentyfikować gen w sekwencji DNA - **otwarta ramka odczytu** (ORF) od ATG do pierwszego STOP

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)

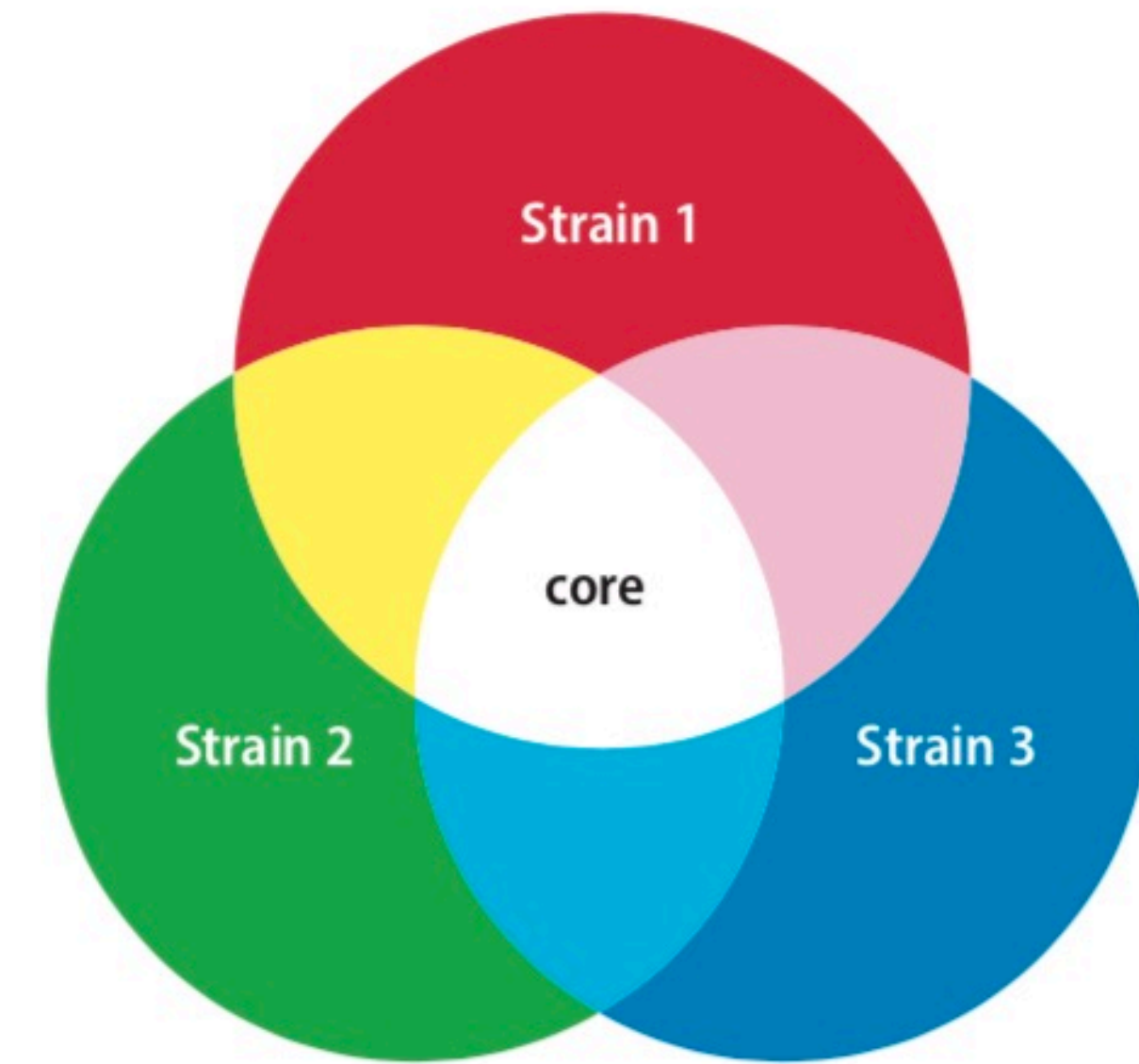
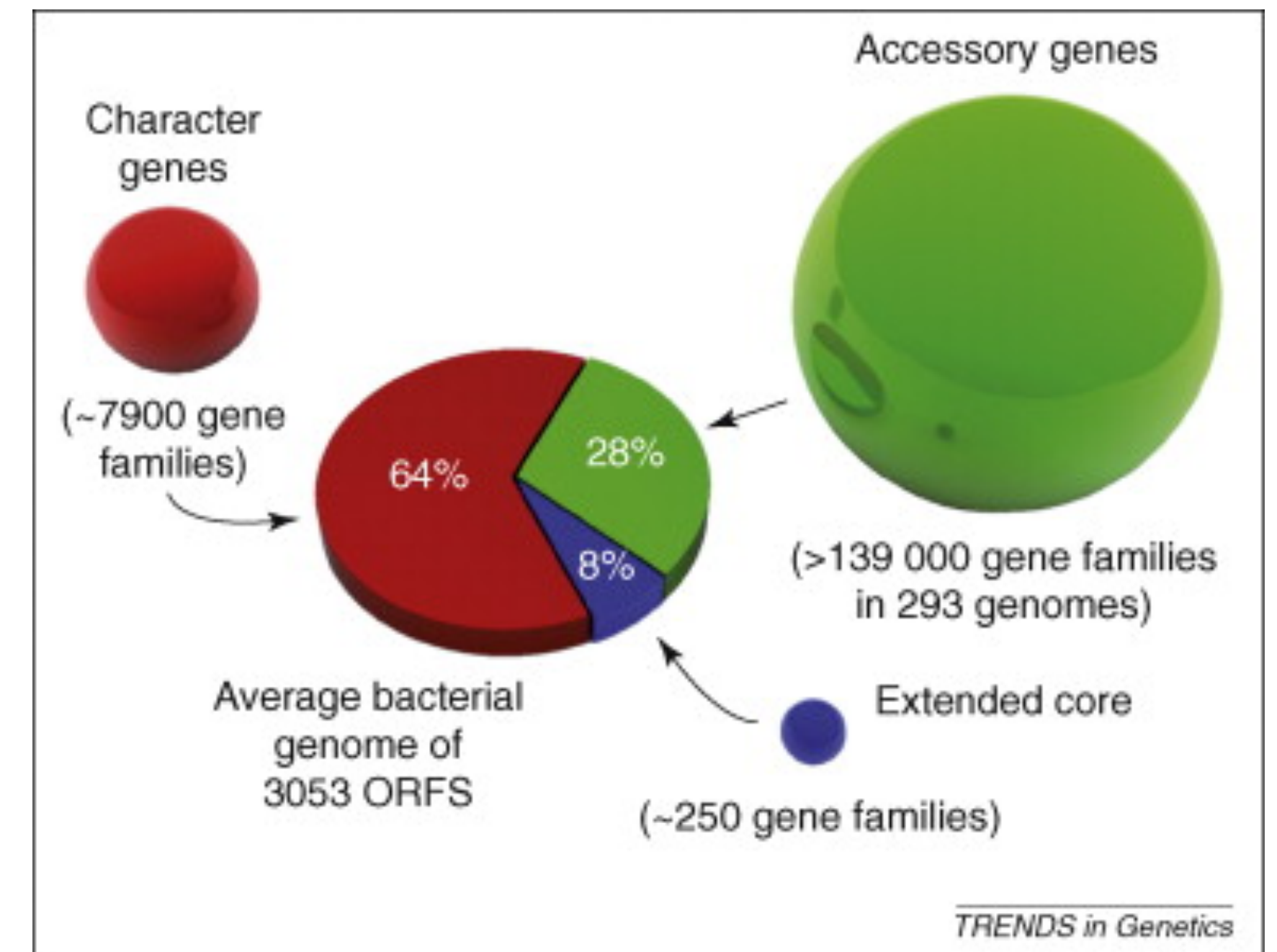


Figure 8.10 The pan-genome concept.



Co to jest *Escherichia coli* ?

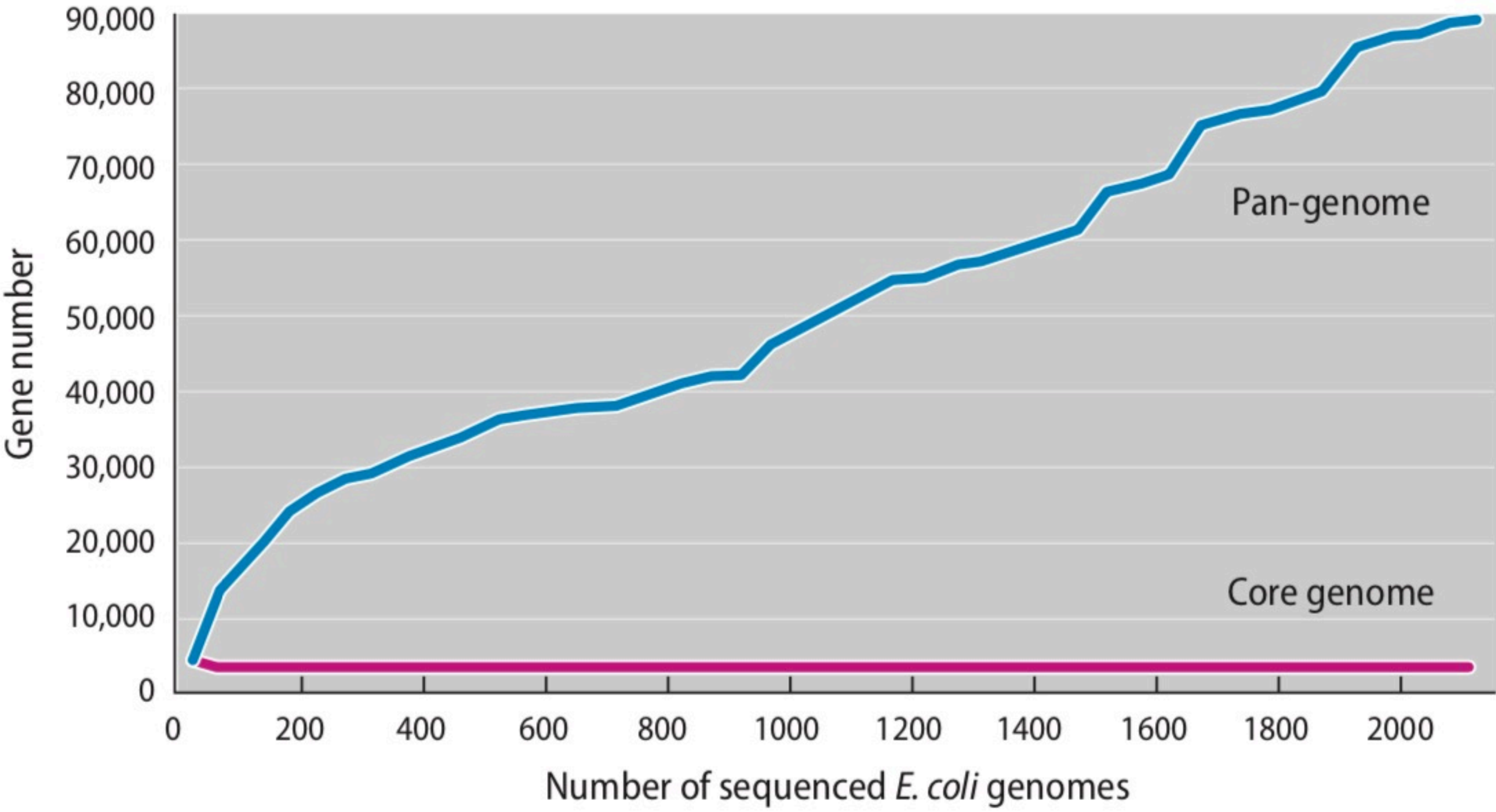
Dla 61 zsekwencjonowanych szczepów:

- 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



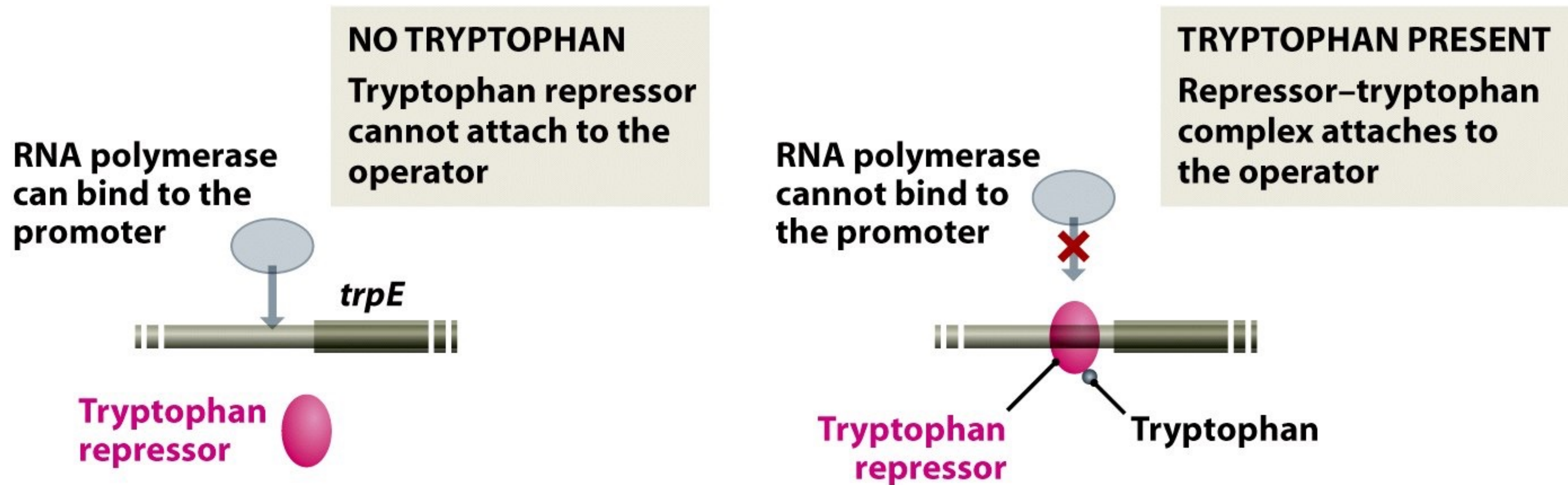
Poziomy przepływ genów - bakterie

- 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)

Regulacja transkrypcji u bakterii

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

Represor operonu *Trp*

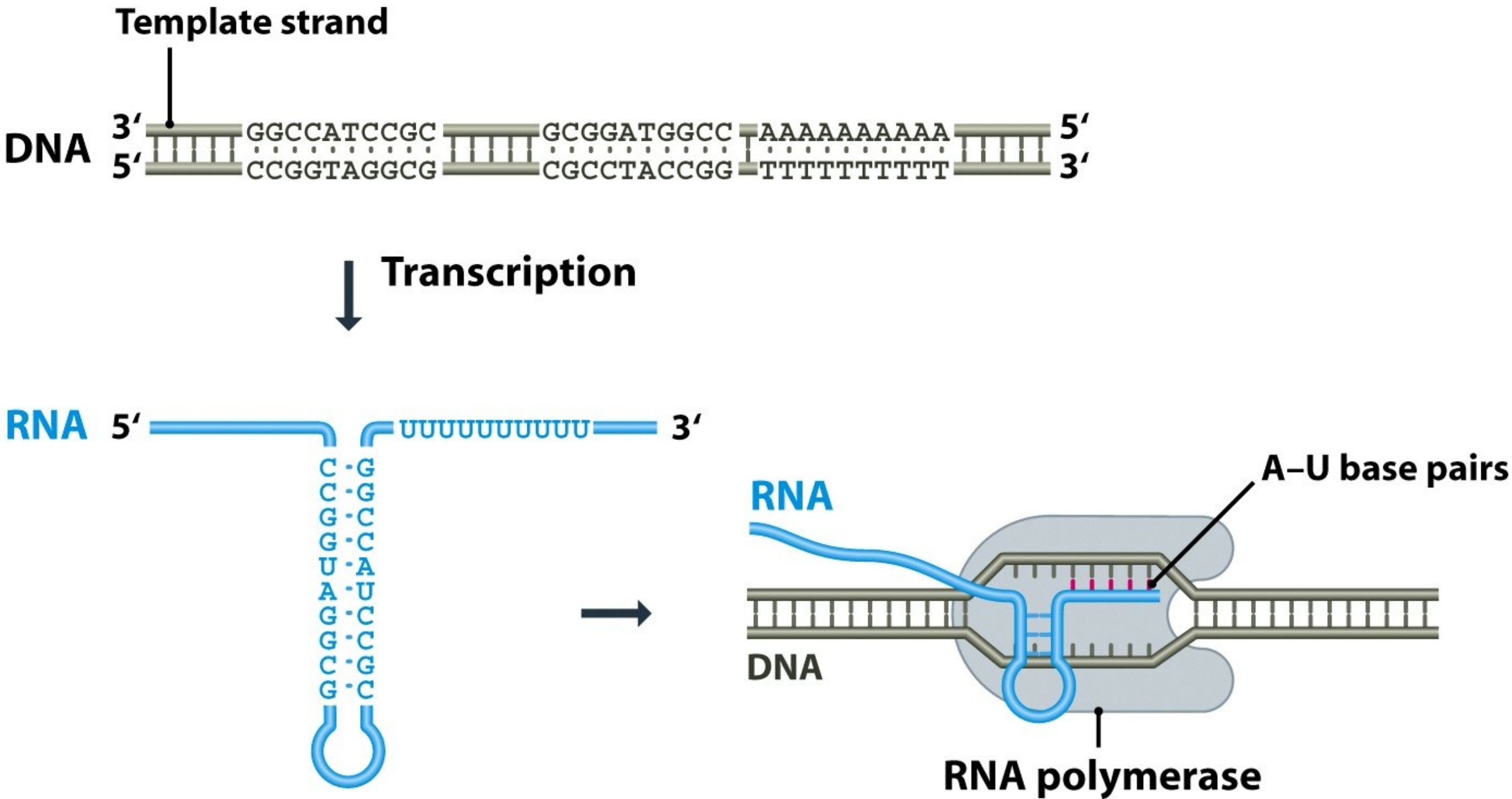


Regulacja negatywna reprimowalna

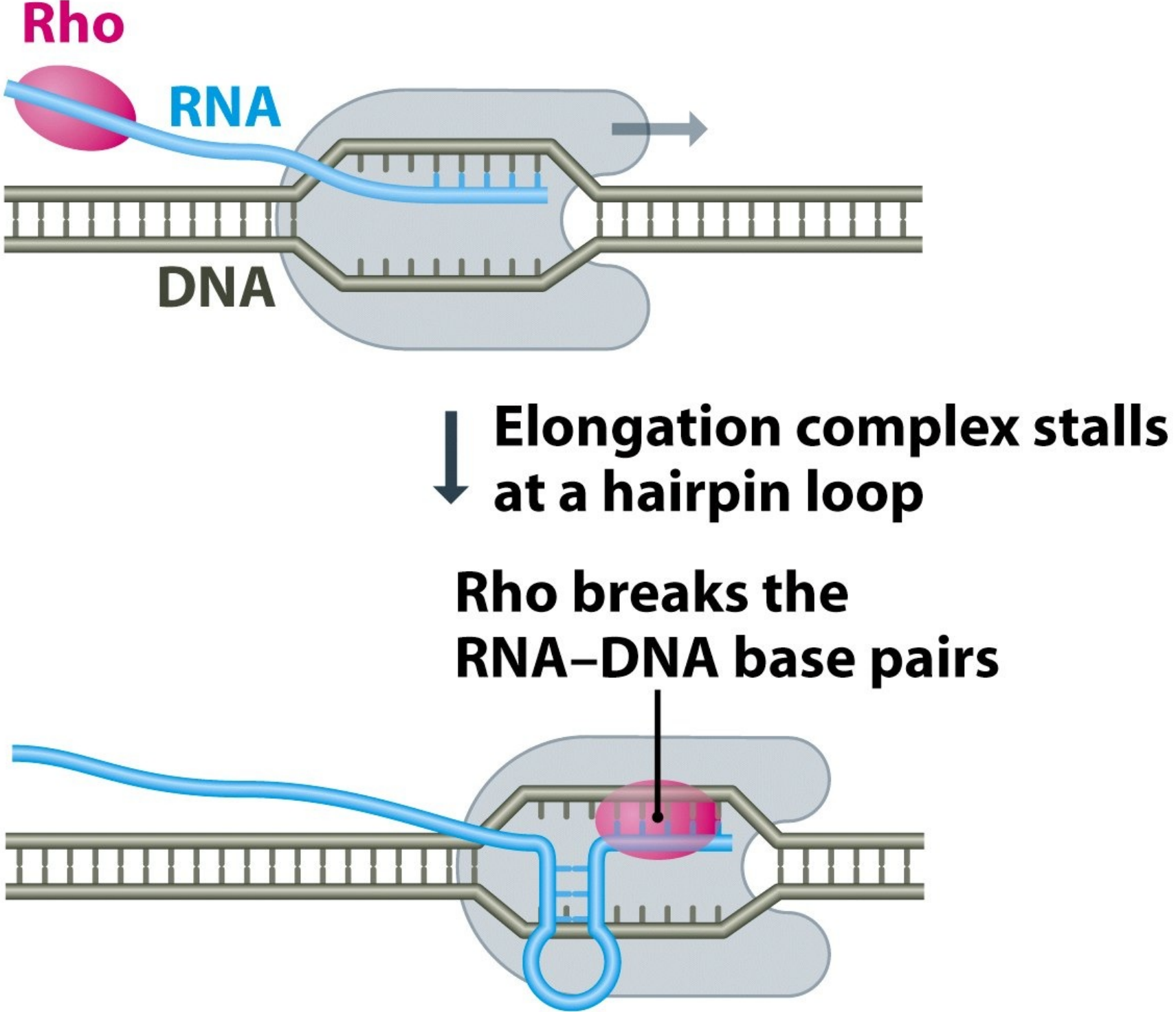
Terminacja transkrypcji

- 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)

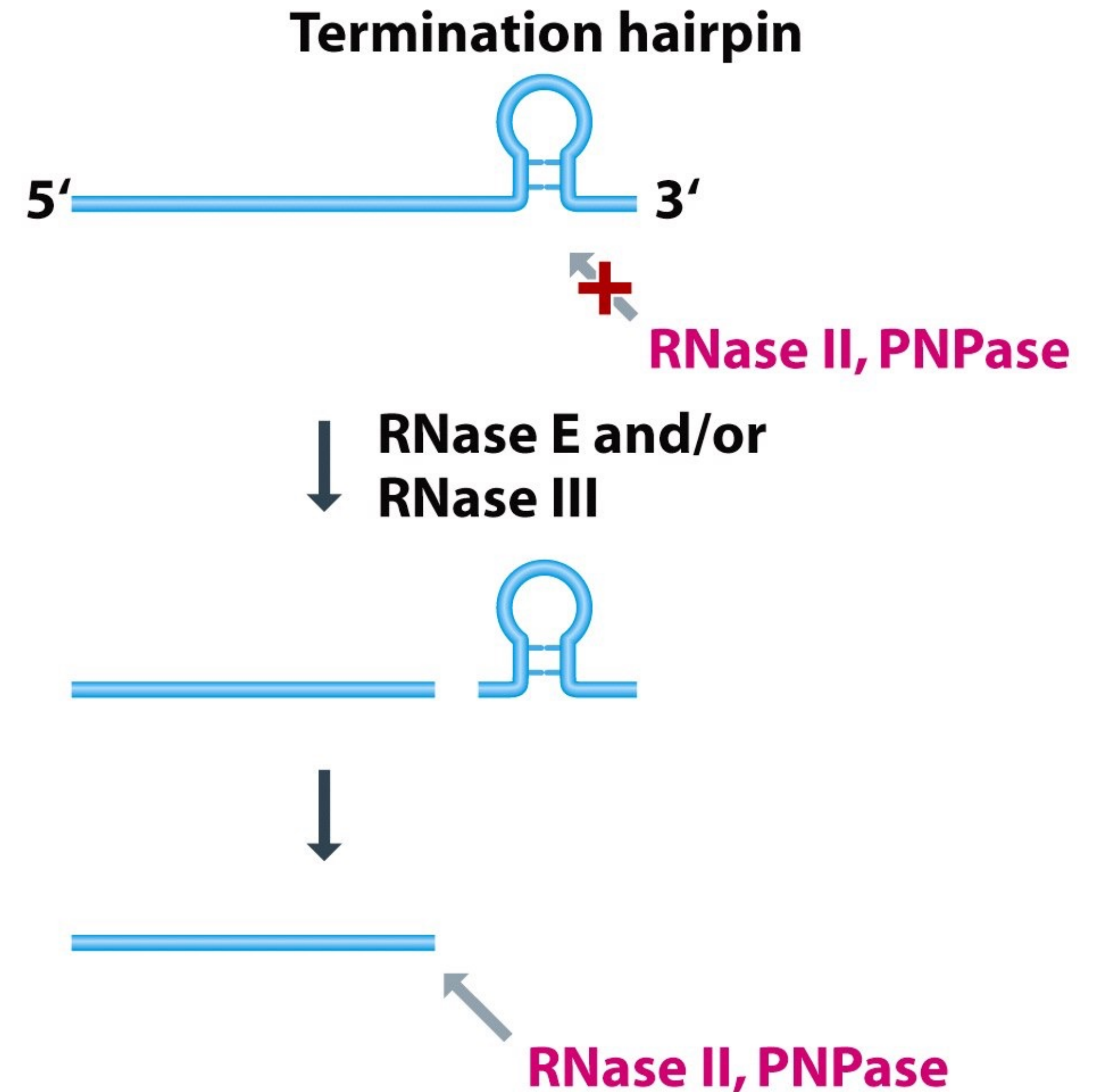


rho-zależne

Figure 12.8 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

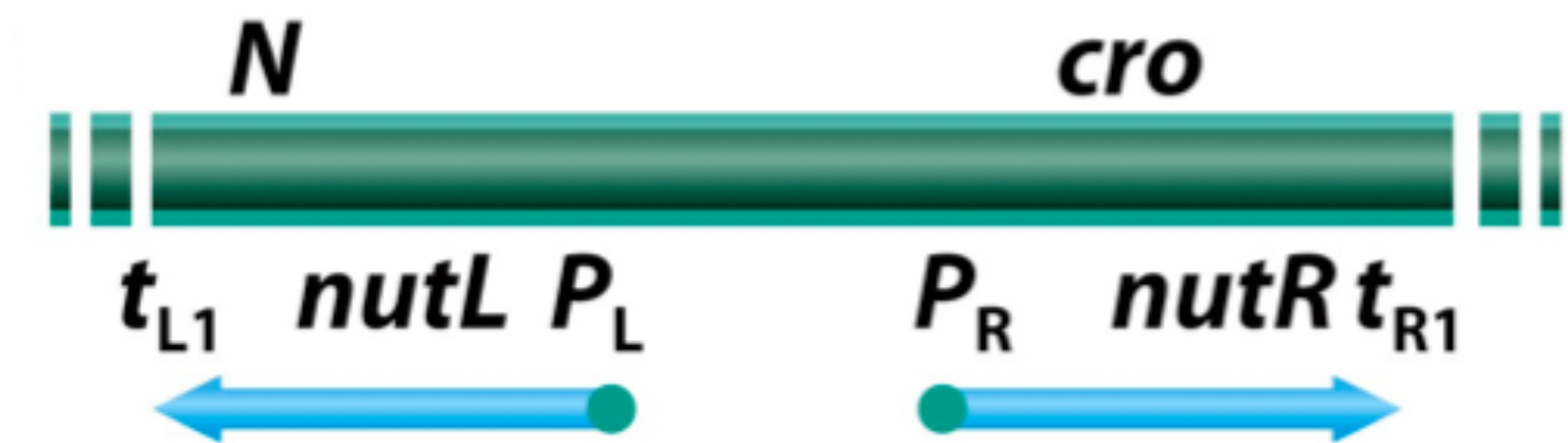
Degradacja RNA u bakterii

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

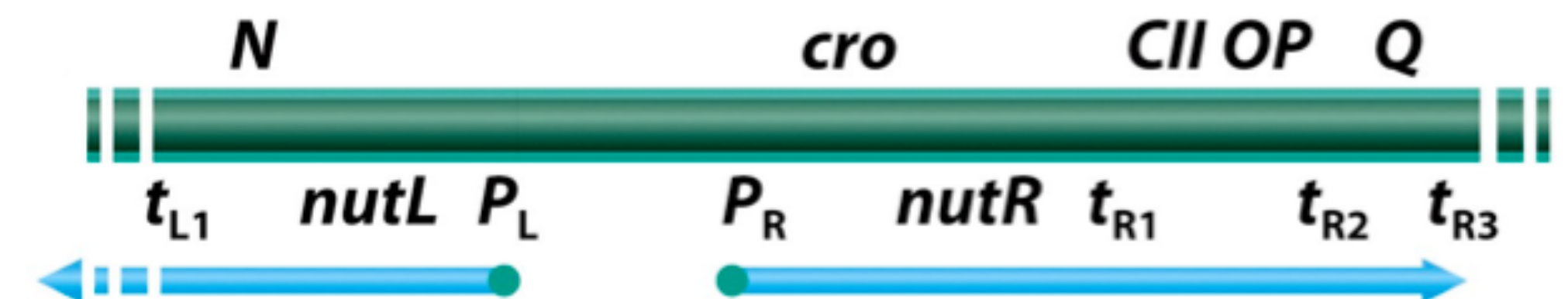


Regulacja na poziomie terminacji - antyterminacja

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



Najwcześniejsze



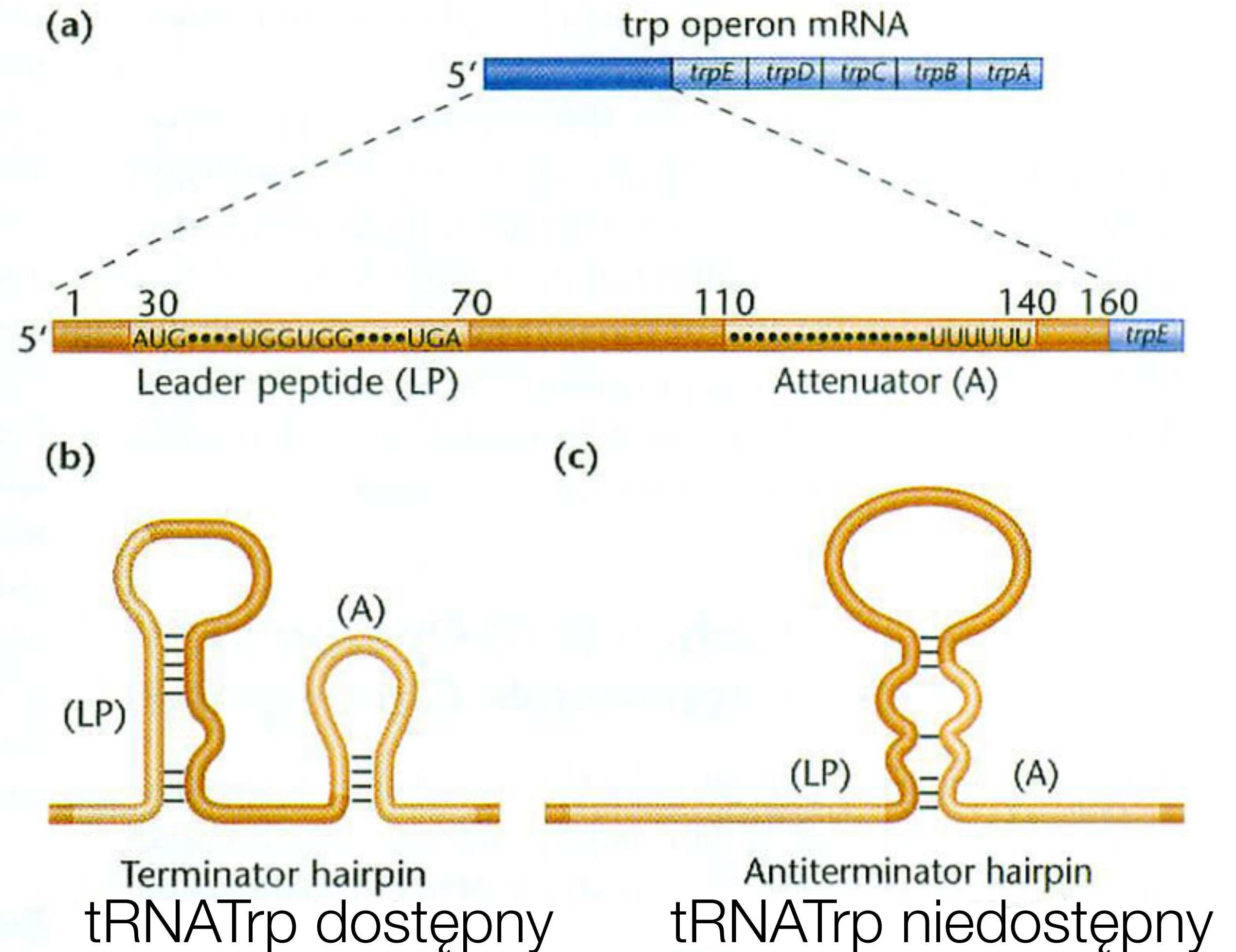
Wczesne-opóźnione

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}



Ryboprzełączniki

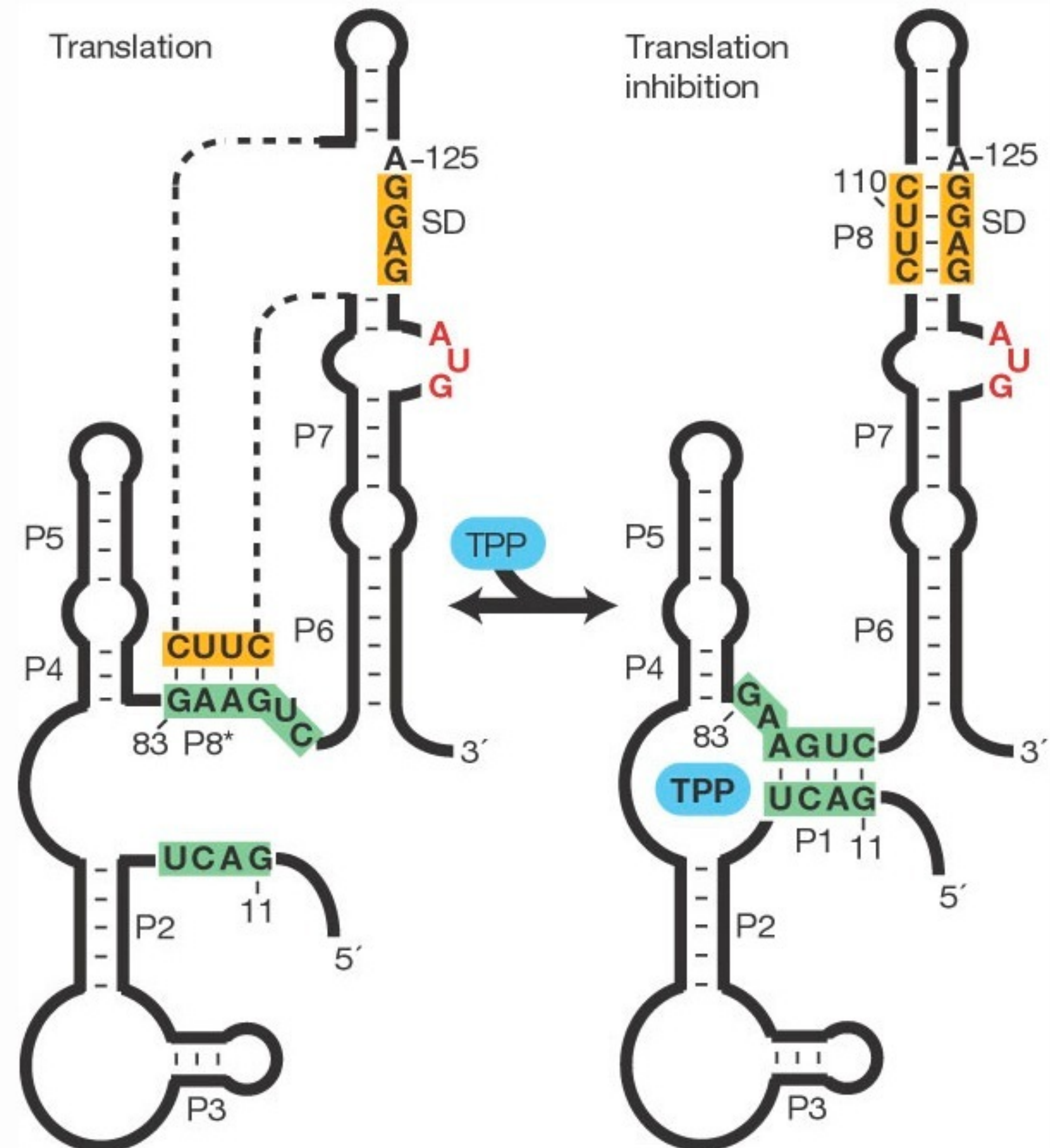
- Wiązanie związków drobnocząsteczkowych bezpośrednio z mRNA (element *cis*) zmienia konformację RNA, wpływając na ekspresję
 - Atenuacja
 - Dostępność miejsca wiązania rybosomu
 - Częste u bakterii, sporadycznie u Eukaryota (grzyby)

Ryboprzełącznik TPP – operon *thi E. coli*

Odpowiada za biosyntezę tiaminy

SD- Shine-Dalgarno

TPP- pirofosforan tiaminy



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