

Interakcje genetyczne

Od ujęcia klasycznego do biologii systemów

Interakcje genetyczne między różnymi genami

- Fenotyp podwójnego mutantu AB nie jest prostym połączeniem fenotypów mutacji A i B
- Gdy nie ma interakcji:
 - mutacja w (białe oczy) i mutacja y (żółte ciało) u *Drosophila*: mutant wy ma białe oczy i żółte ciało
 - mutacja $leu2$ i mutacja $ura3$ u drożdży: podwójny mutant $leu2, ura3$ wymaga leucyny i uracylu
- Ujęcie jakościowe wymaga dobrze zdefiniowanych, dyskretnych (0,1) fenotypów – np. letalność

Interakcje genetyczne między różnymi genami

- Dla ujęcia ilościowego wymagana jest liczbowo miara fenotypu (fitness)
 - np. czas podziału (czas generacji) – czas wymagany do podwojenia liczby komórek w hodowli
 - np. mutant *m1* rośnie w tempie 0,5 dzikiego, mutant *m2* w tempie 0,9 dzikiego, przy braku interakcji wzrost podwójnego mutantu w tempie $0,5 \cdot 0,9 = 0,45$ dzikiego - model multiplikatywny

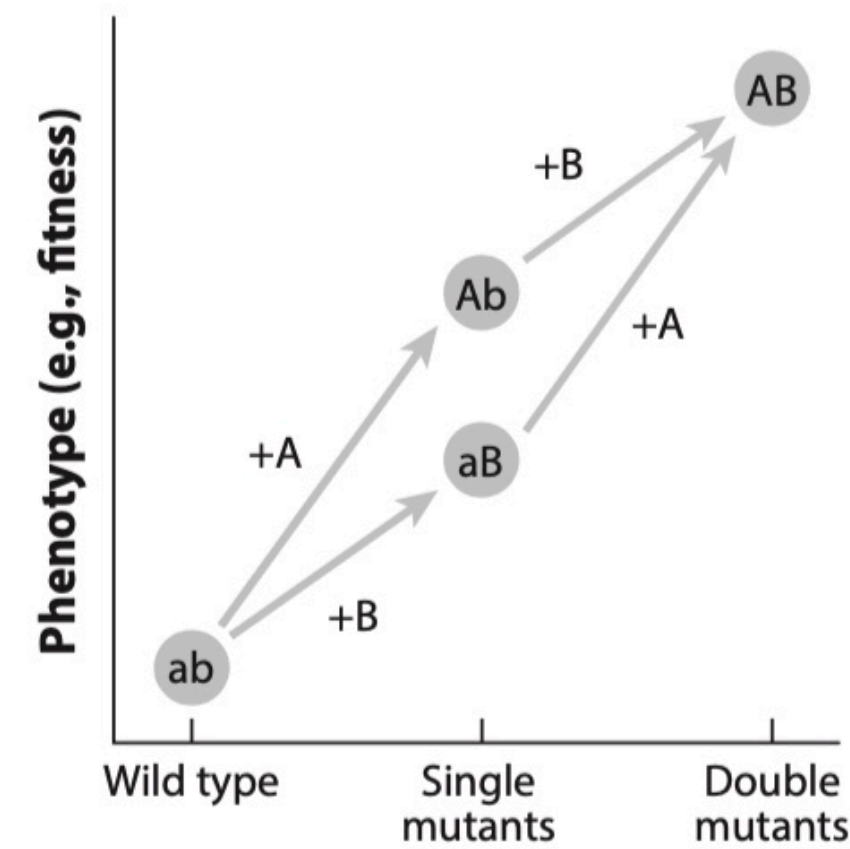
Interakcje

- **Łagodzące, pozytywne** (*positive, alleviating interactions*)
 - Fenotyp podwójnego mutantu lżejszy (bliższy dzikiemu), niż przewidywany dla sumowania fenotypów mutantów pojedynczych
- **Syntetyczne, pogarszające, negatywne** (*negative, synthetic, aggravating interactions*)
 - Fenotyp podwójnego mutantu cięższy, niż przewidywany dla sumowania fenotypów pojedynczych mutantów

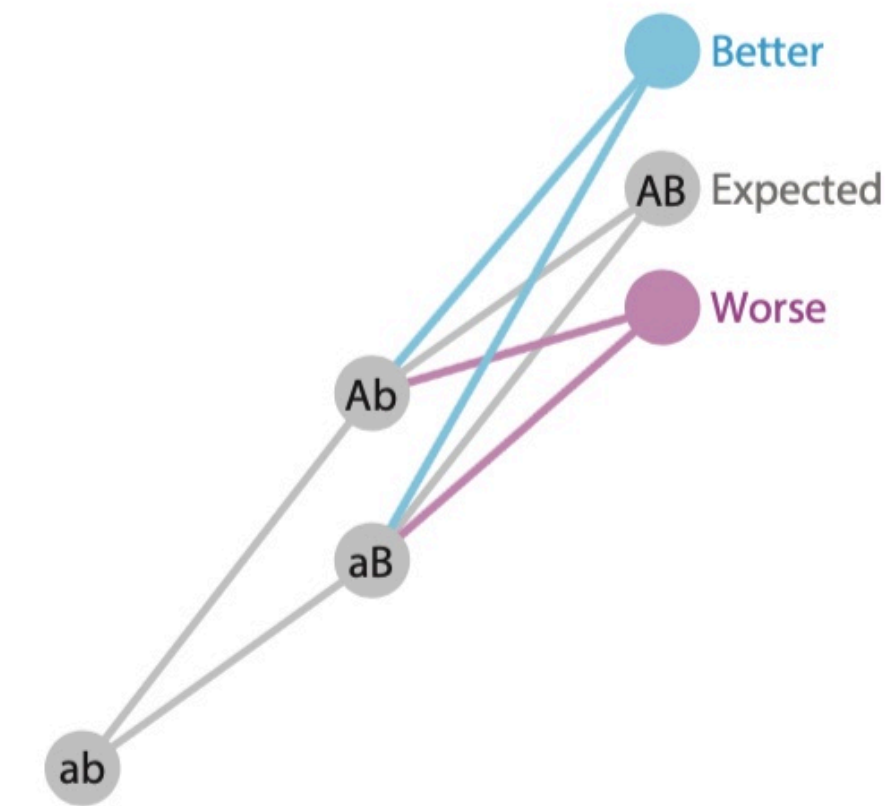
Interakcje genetyczne

- Epistaza maskująca - podwójny mutant ma fenotyp pojedynczego - to jest epistaza w znaczeniu wąskim (Batesona)
- Epistaza (w znaczeniu szerokim) znaku - druga mutacja zmniejsza albo zwiększa dostosowanie w zależności od pierwszej
- Epistaza (w znaczeniu szerokim) znaku wzajemna - pierwsza i druga mutacja są pojedynczo niekorzystne, ale razem są korzystne (lub *vice versa*)
- przykład: systemy toksyna-antytoksyna

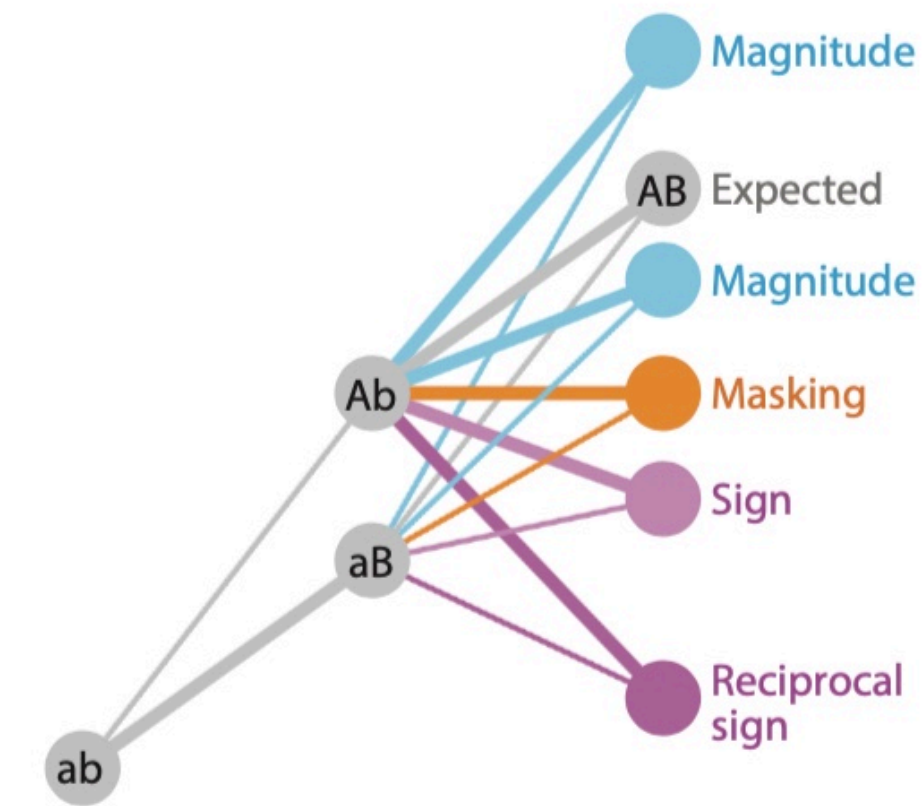
a Log-additive model



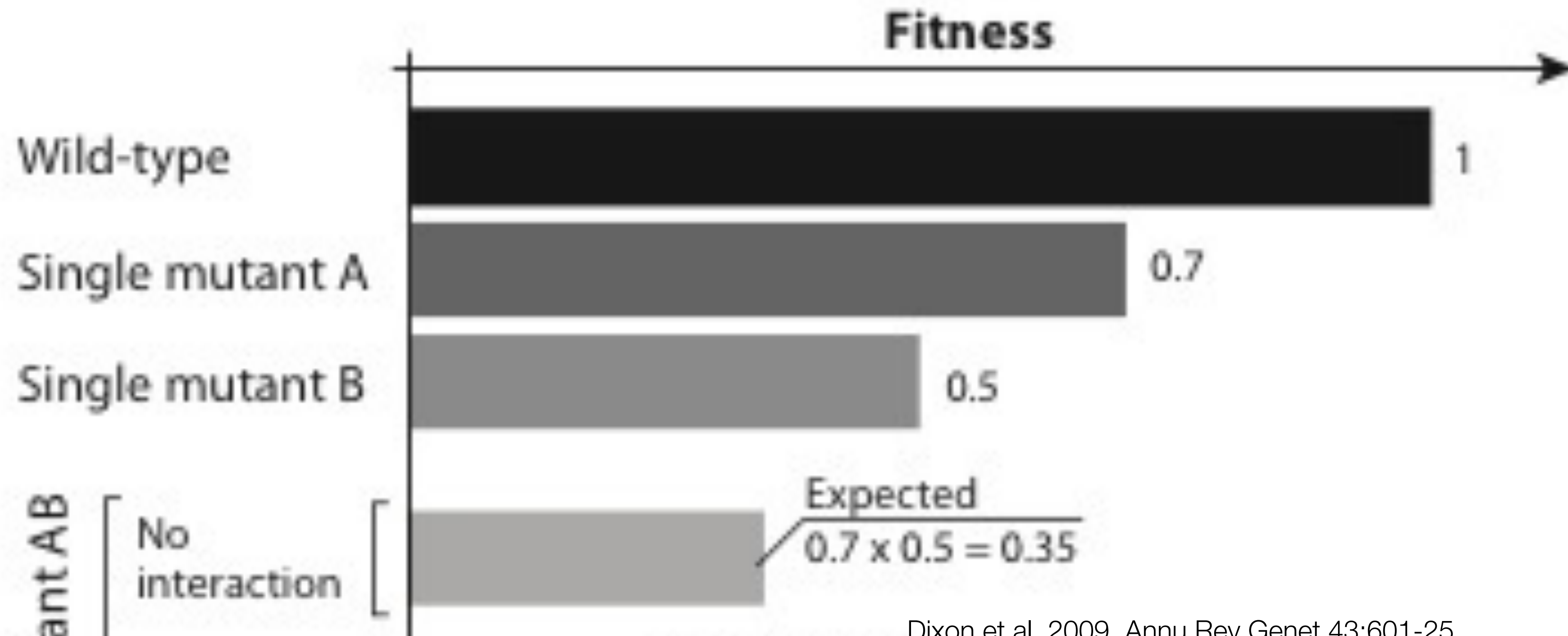
b Positive versus negative



c Magnitude versus sign



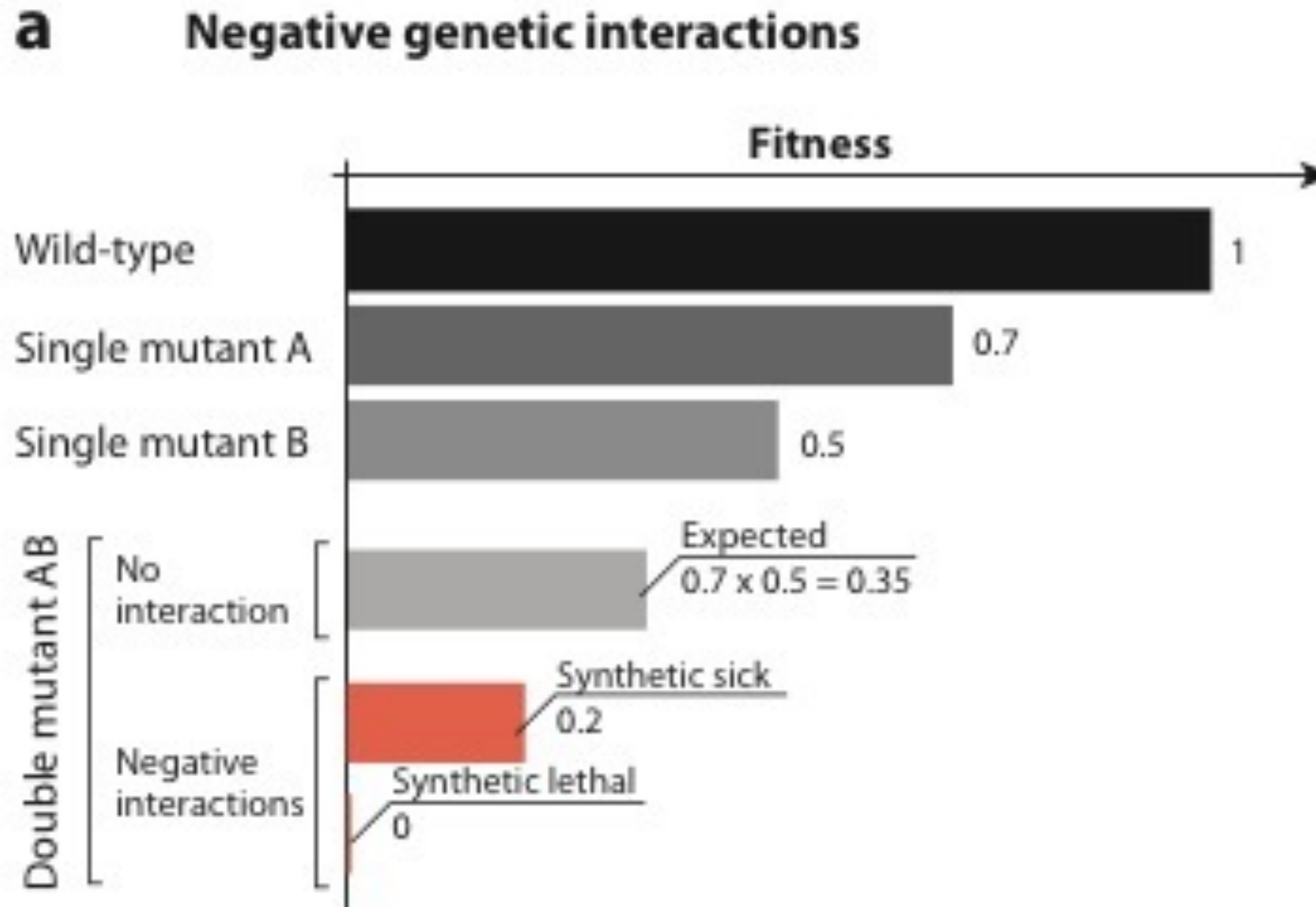
Ujęcie ilościowe - multiplikatywne



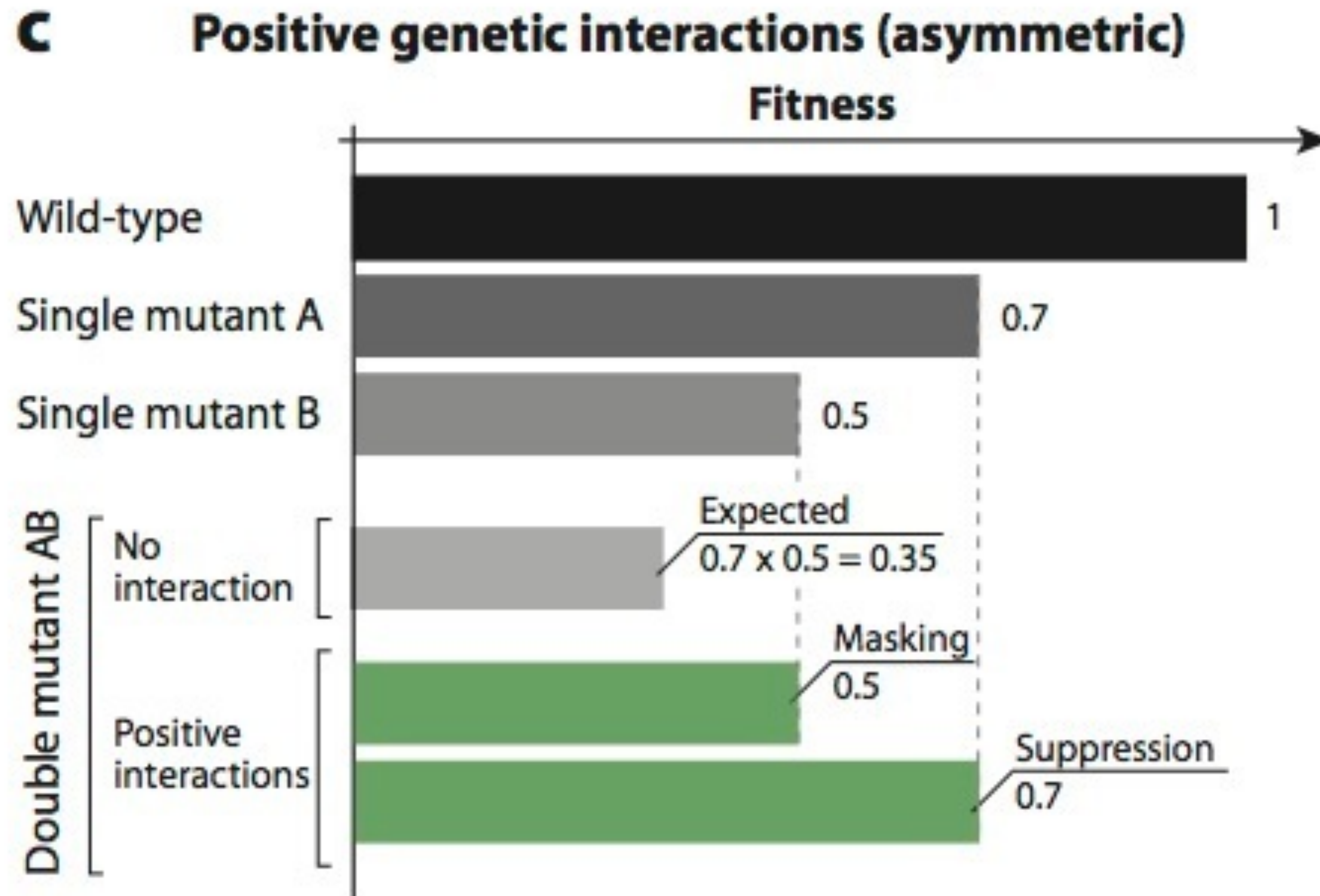
Dixon et al. 2009, Annu Rev Genet 43:601-25

U mikroorganizmów typową miarą dostosowania (fenotypu) jest tempo podziałów. Przy braku interakcji oczekiwane tempo podziałów podwójnego mutantu to **iloczyn** wartości mutantów pojedynczych.

Ujęcie ilościowe - interakcje syntetyczne



Ujęcie ilościowe – interakcje łagodzące



Miary dostosowania

- Najczęściej stosowaną miarą jest tempo podziałów
- Inne miary:
 - efektywność metaboliczna: przyrost biomasy przy stałym dopływie substancji pokarmowych
 - przeżywalność w warunkach stresowych (np. w fazie stacjonarnej hodowli)

Interakcje łagodzące

- **Supresja**

- Fenotyp mutacji (a) znoszony przez mutację w innym genie (b)
 - Podwójny mutant ab ma fenotyp dziki lub bliski dzikiemu (nie cięższy, niż sam b)

- **Epistaza**

- Fenotyp mutacji (a) maskowany przez mutację w innym genie (b)
 - Podwójny mutant ab ma fenotyp taki sam, jak mutacja b (**epistatyczna**) – obecność mutacji b narzuca fenotyp niezależnie od allelu genu a (**hipostatycznego**) i maskuje allele genu a
 - epistaza symetryczna – pojedyncze mutanty a i b mają taki sam fenotyp, jak podwójny ab

Supresja

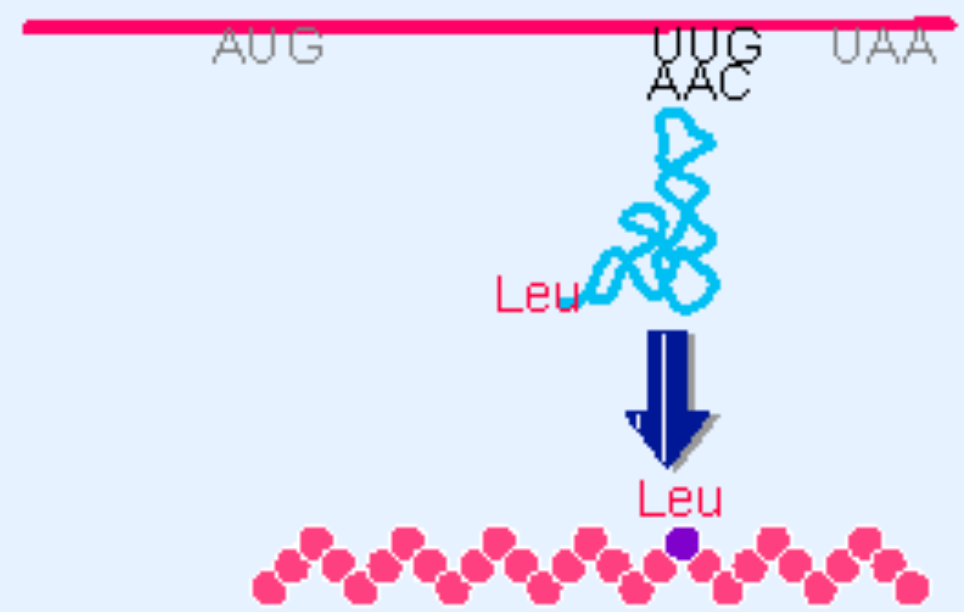
- Fenotyp mutacji (a) znoszony przez mutację w innym genie (b)
- Różne grupy mechanizmów
 - Informacyjne
 - np. translacyjna supresja mutacji nonsens
 - Ilościowe
 - Interakcyjne (“zamka i klucza”)
 - Zmieniające ten sam szlak
 - Zmieniające inny szlak
 - obejście
 - zmiana środowiska komórki
 - obniżenie/podwyższenie aktywności szlaku antagonistycznego

Supresja informacyjna

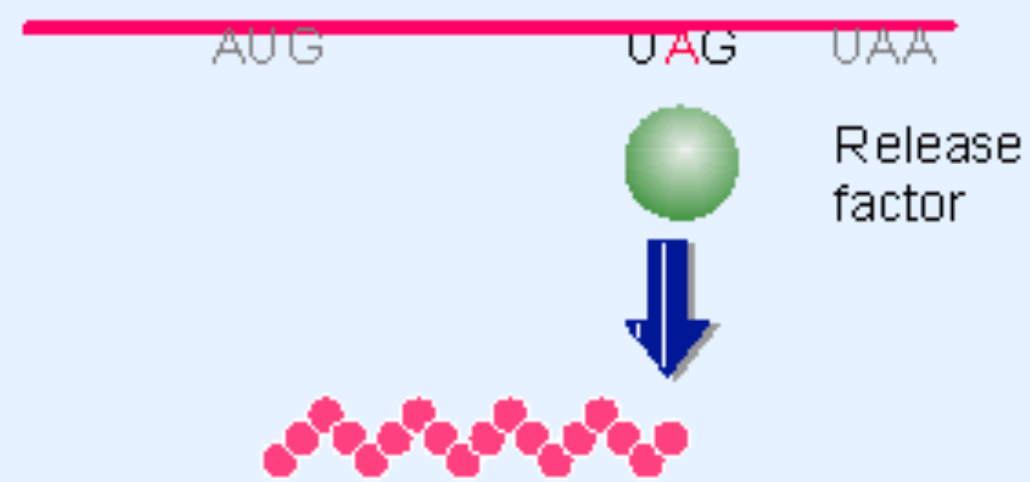
- Supresory związane z przekazywaniem informacji genetycznej (*informational suppressors*)
- Najbardziej znana supresja translacyjna nonsense - mutacje genów tRNA (antykodeon) umożliwiające rozpoznanie kodonu stop
- Przydatne w badaniu ekspresji genu, ale nie w badaniu funkcji konkretnych genów

Supresja nonsens

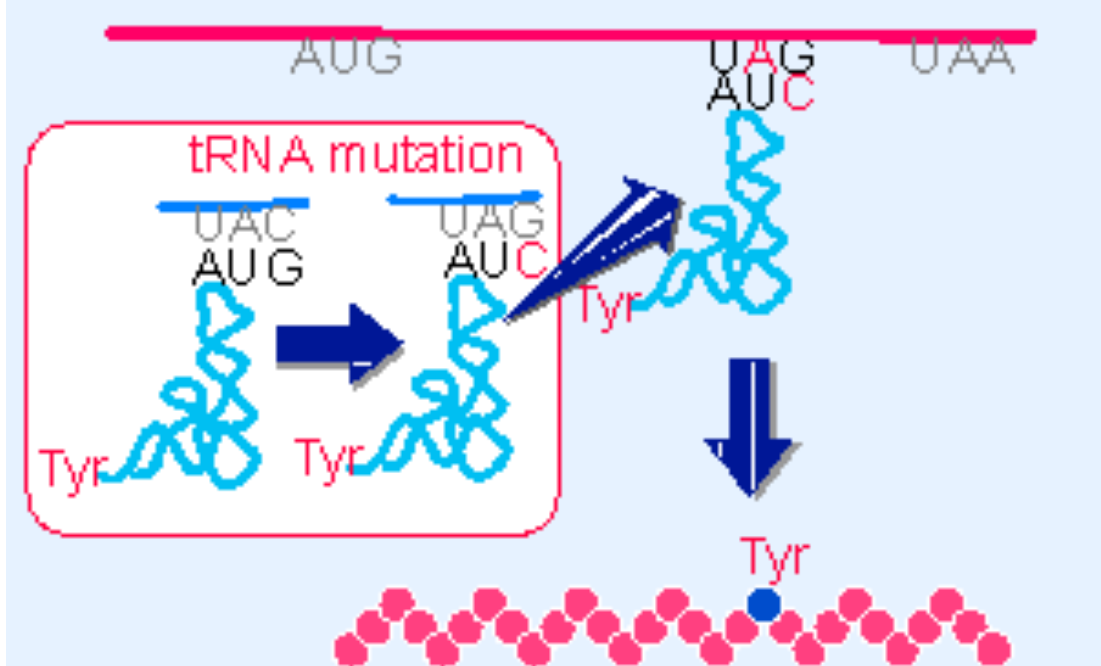
Wild type: UUG codon is read by Leu-tRNA



Nonsense mutant: UAG codon terminates



Suppressor mutation: changes Tyr-tRNA anticodon



Locus	tRNA	Wild Type	Suppressor
		Codon/Anti	Anti/Codon
supD (su1) Ser	UCG	CGA	CUA UAG
supE (su2) Gln	CAG	CUG	CUA UAG
supF (su3) Tyr	UA ^C U	GUA	CUA UAG
supC (su4) Tyr	UA ^C U	GUA	UUA UAG ^A
supG (su5) Lys	AA ^A G	UUU	UUA UAG ^A
supU (su7) Trp	UGG	CCA	UCA UG ^A G

Zmodyfikowane supresorowe tRNA mogą być stosowane do syntezy białek z nietypowymi aminokwasami

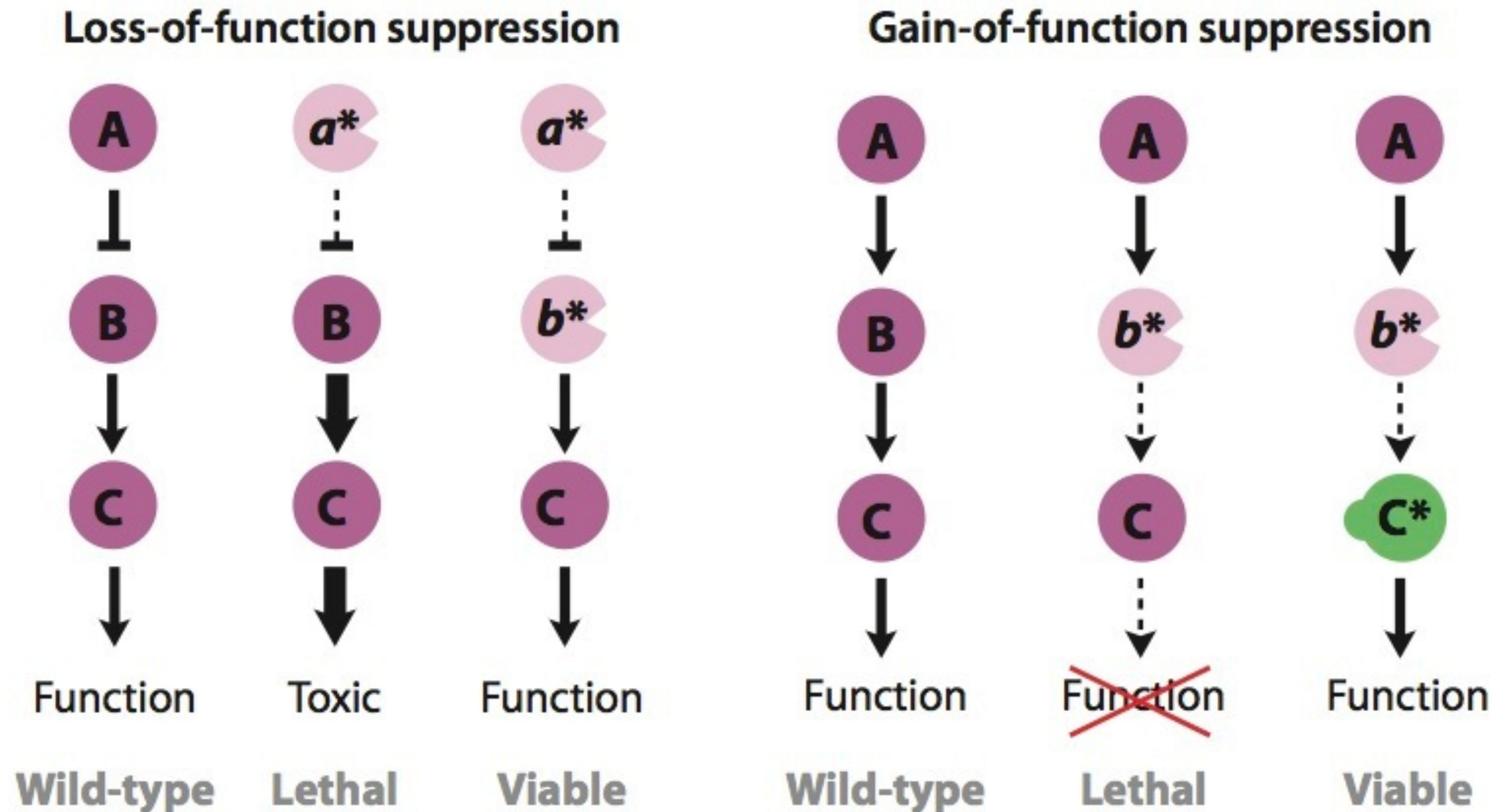
Symbole stosowane w schematach szlaków regulacyjnych

↓ Aktywacja, stymulacja

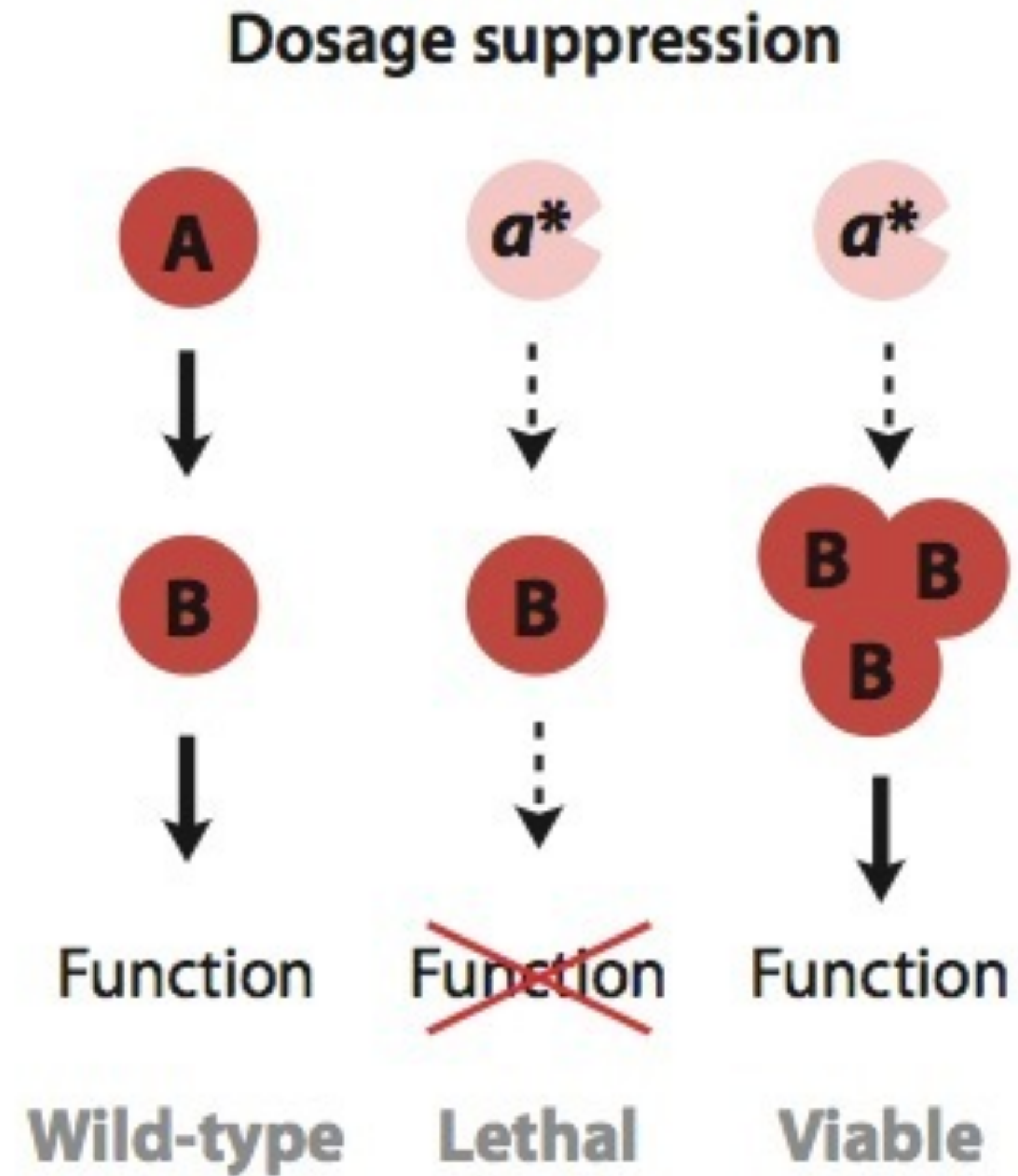
⊥ Hamowanie

Supresja przez zmianę szlaku

b Positive interactions/genetic suppression



Supresja ilościowa

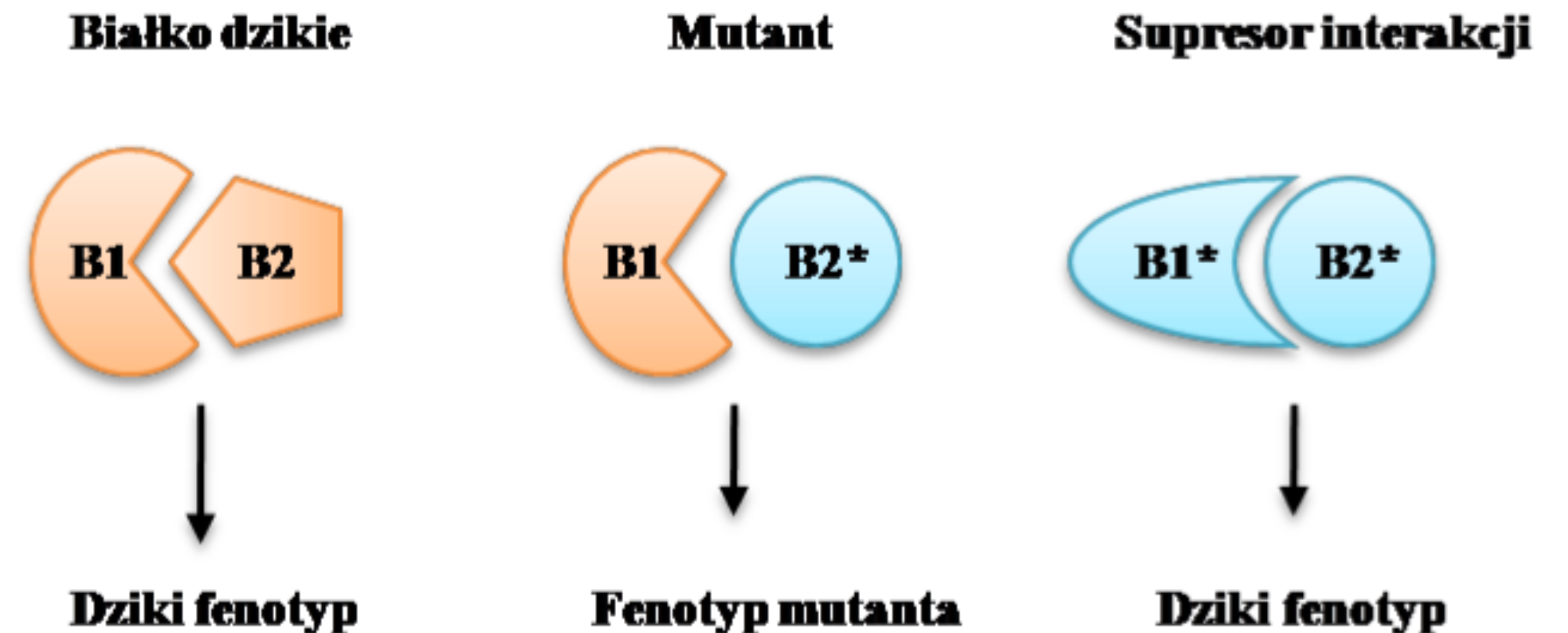


Supresja ilościowa

- Mutacja regulatorowa zwiększa ekspresję genu, kompensując efekt mutacji hipomorficznej, albo
- Zwiększenie ilości produktu innego genu kompensuje brak (lub obniżoną aktywność) produktu genu
- Różne mechanizmy
 - Aktywacja ekspresji (mutacje elementów regulatorowych)
 - Duplikacja genu
 - Supresja plazmidami wielokopionymi
- Często niezależna od konkretnego allelu

Supresja przez interakcję

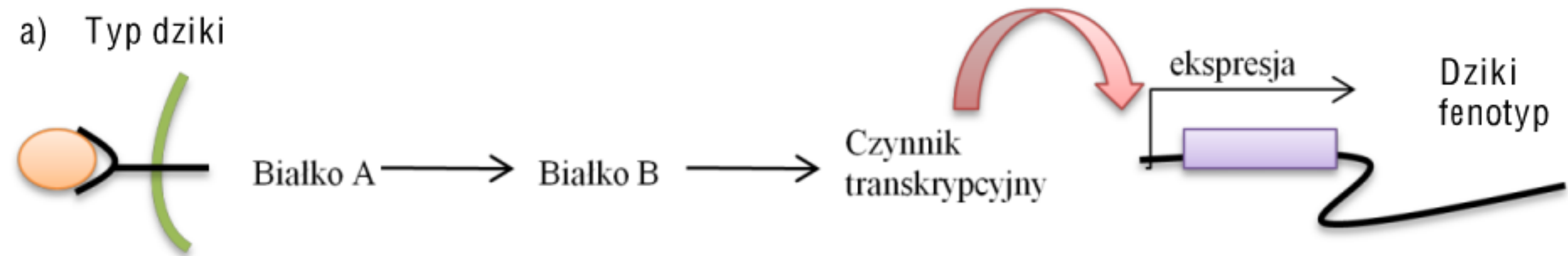
- Mechanizm “zamka i klucza” – mutacja supresorowa zmienia miejsca interakcji tak, by “pasowały” do zmutowanego białka
- Silnie specyficzna wobec allelu
- Rzadko spotykana
- Uogólniona zmiana (np. wzmocnienie) interakcji
- Mutacja supresorowa ogólnie wzmocnia siłę interakcji tak, że toleruje osłabienie wywołane mutacjami w drugim białku



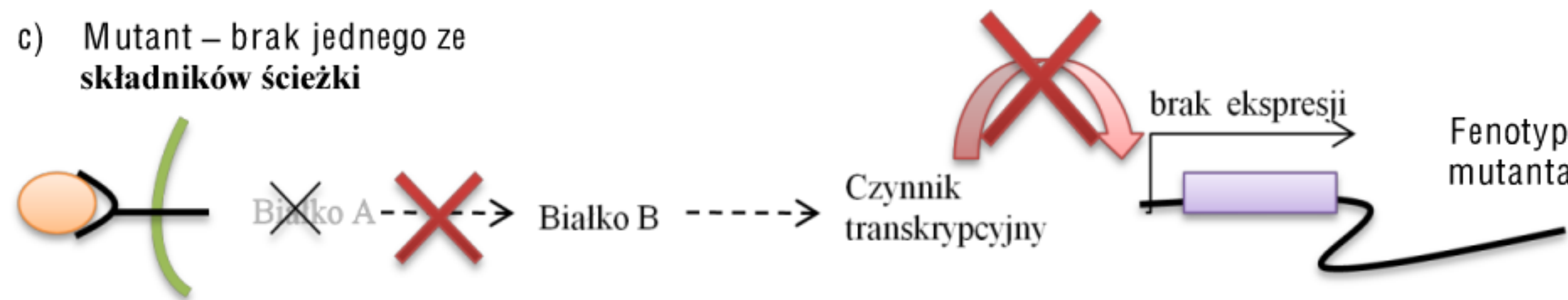
Supresja w obrębie tego samego szlaku

- Jeżeli mutacja jest nullomorfem, to supresja możliwa tylko przez mutację genu kodującego białko leżące **poniżej** w szlaku.
- Dla hipomorfów możliwa też supresja w elemencie leżącym powyżej (silniejszy sygnał powyżej kompensuje defekt).

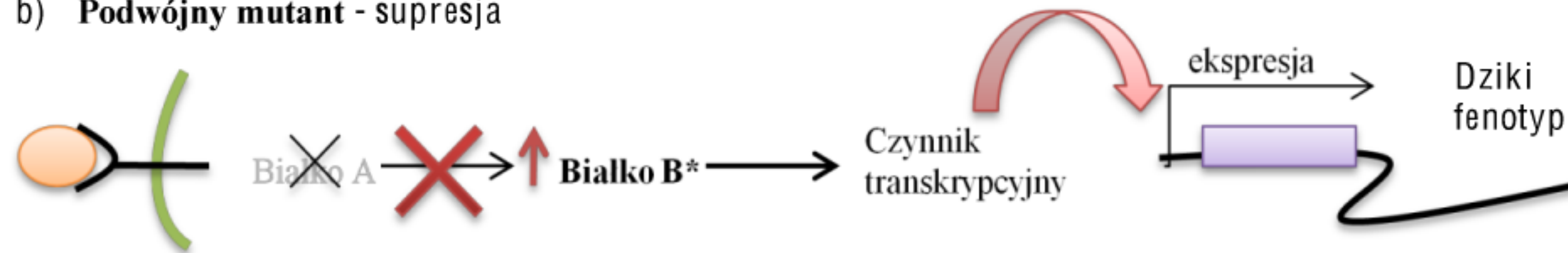
a) Typ dziki



c) Mutant – brak jednego ze składników ścieżki



b) Podwójny mutant - supresja



Mutant o podwyższonej aktywności B

Supresja w innym szlaku

- Obejście (*bypass*)
- Zmiana środowiska komórkowego
- Przywrócenie równowagi

Supresja w innym szlaku

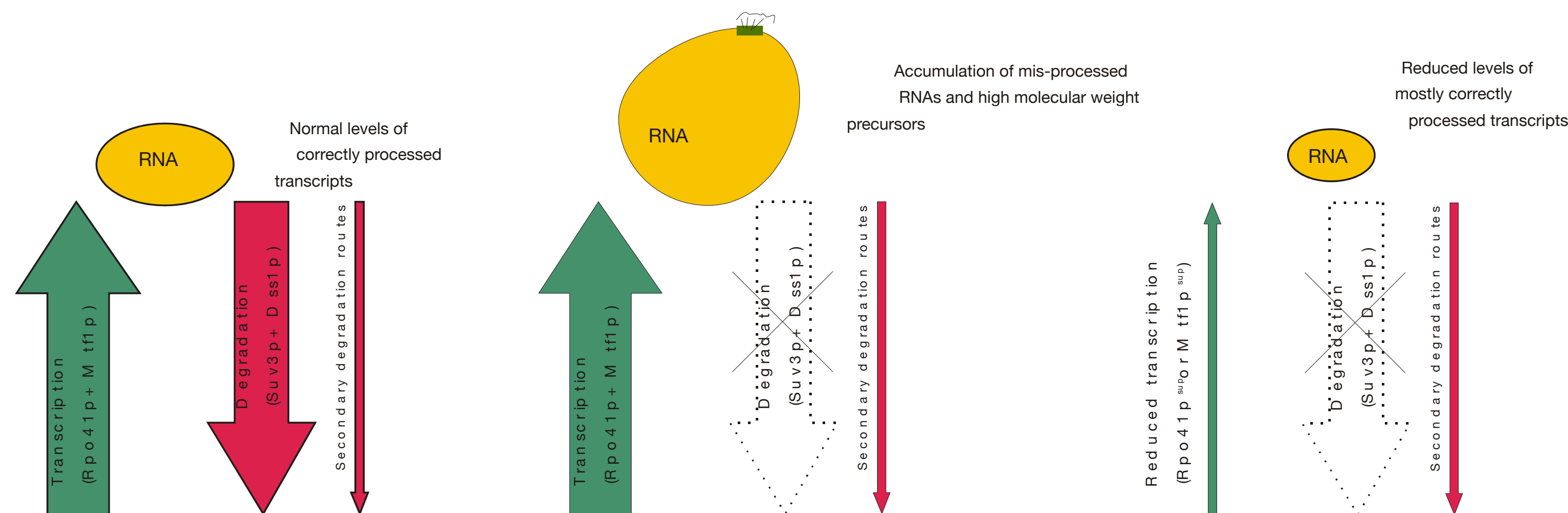
- Obejście (*bypass*)
 - Np. u *E. coli* mutanty permeazy maltozowej suprymowane przez mutacje genu permeazy laktozowej – zmutowane białko nabiera zdolności transportu maltozy
 - Mutacje odblokowujące (np. przez inaktywację represora) alternatywną drogę

Supresja w innym szlaku

- Zmiana środowiska komórkowego
 - Np. defekty genów zaangażowanych w wycinanie intronów w mitochondriach drożdży suprymowane przez mutacje w genach kodujących mitochondrialne transportery jonów Mg^{2+}
 - Mg^{2+} to kofaktor w reakcji składania RNA (splicingu), wzrost stężenia kompensuje defekty czynników wspomagających reakcję

Supresja w innym szlaku

- Przywrócenie równowagi
- np.: mutacje osłabiające transkrypcję suprymują defekty szlaku degradacji RNA



Molecular Biology of the Cell
Vol. 17, 1184–1193, March 2006

Balance between Transcription and RNA Degradation Is Vital for *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondria: Reduced Transcription Rescues the Phenotype of Deficient RNA Degradation

Agata T. Rogowska,^{**} Olga Puchta,^{*} Anna M. Czarnecka,^{*} Aneta Kaniak,[†] Piotr P. Stepień,^{**} and Paweł Golik^{**}

Interakcje łagodzące

- **Supresja**

- Fenotyp mutacji (a) znoszony przez mutację w innym genie (b)
 - Podwójny mutant ab ma fenotyp dziki lub bliski dzikiemu (nie cięższy, niż sam b)

- **Epistaza**

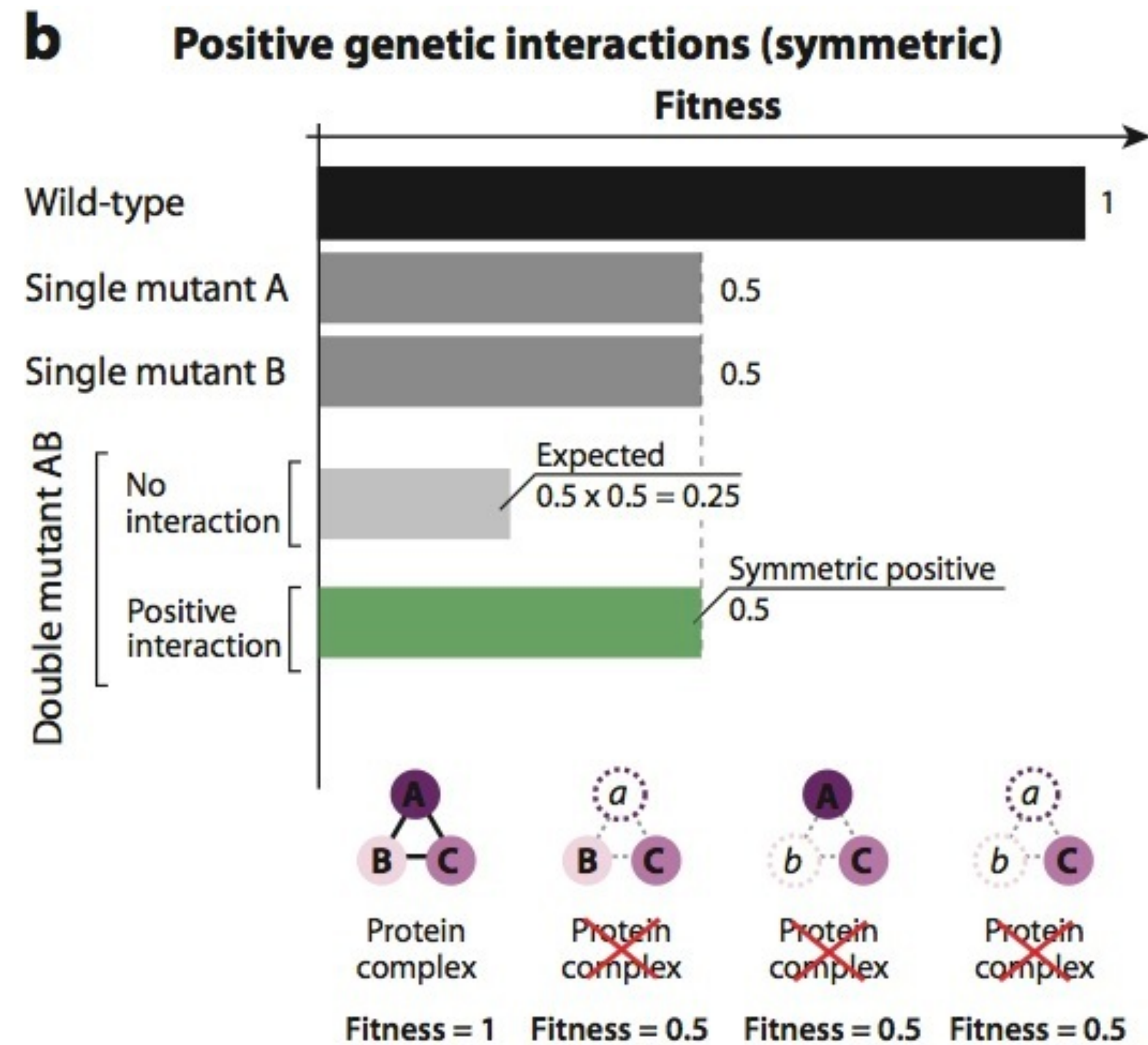
- Fenotyp mutacji (a) maskowany przez mutację w innym genie (b)
 - Podwójny mutant ab ma fenotyp taki sam, jak mutacja b (**epistatyczna**) – obecność mutacji b narzuca fenotyp niezależnie od allelu genu a (**hipostatycznego**) i maskuje allele genu a
 - epistaza symetryczna – pojedyncze mutanty a i b mają taki sam fenotyp, jak podwójny ab

Epistaza (sensu stricte)

- Mutacje w jednym genie (**epistatyczne**) maskują fenotyp alleli innego genu (hipostatycznego)
- Z reguły wskazuje na funkcję w tym samym szlaku lub kompleksie,
 - może posłużyć do ustalenia kolejności etapów
- Zauważona jako czynnik zmieniający typowy rozkład 9:3:3:1 w krzyżówkach dwugenowych

Epistaza symetryczna

Podwójny mutant nieodróżnialny od pojedynczych



Epistaza

- *D. melanogaster* – mutanty barwy oka
- Podwójny mutant *white, vermilion* ma oczy białe, nieodróżnialne od pojedynczego mutantu *white*
- Mutacje *white* epistatyczne względem *vermillion* (i wielu innych mutacji barwy oka)

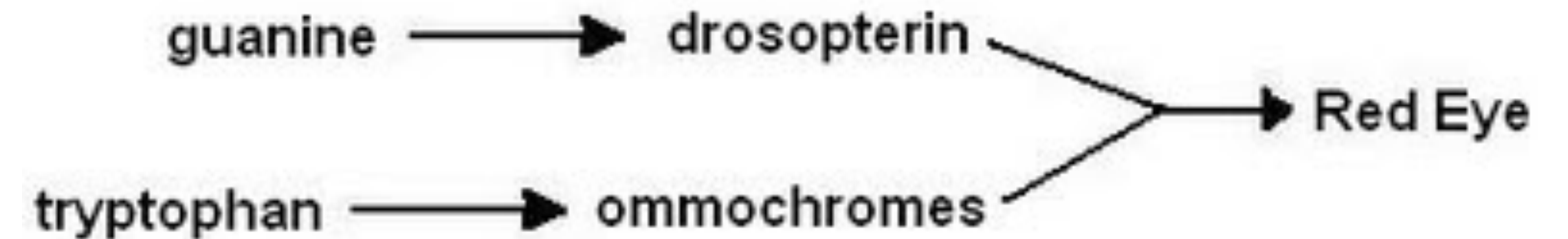
wt white vermilion



Epistaza

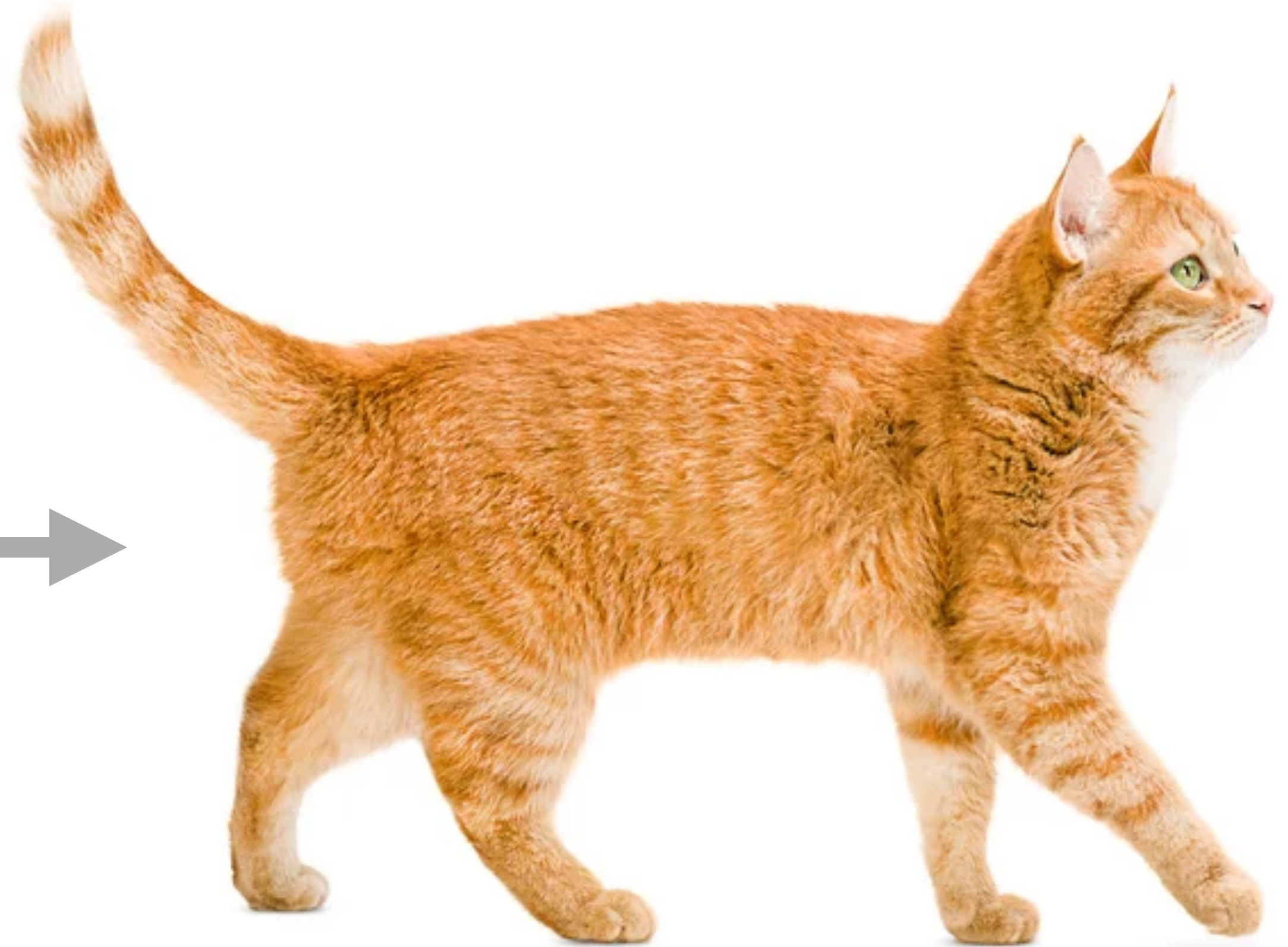
- Drozopteryna – jasnoczerwona, ommochromy – brunatne
- Defekty szlaku drozopteryny – oczy ciemnobrązowe
- Defekty szlaku ommochromów – oczy jaskrawoczerwone (np. *vermillion*)
- Produkt genu *white* – transport prekursorów barwników (guaniny i tryptofanu) do komórek zawiązka oka w zarodku

wt white vermillion



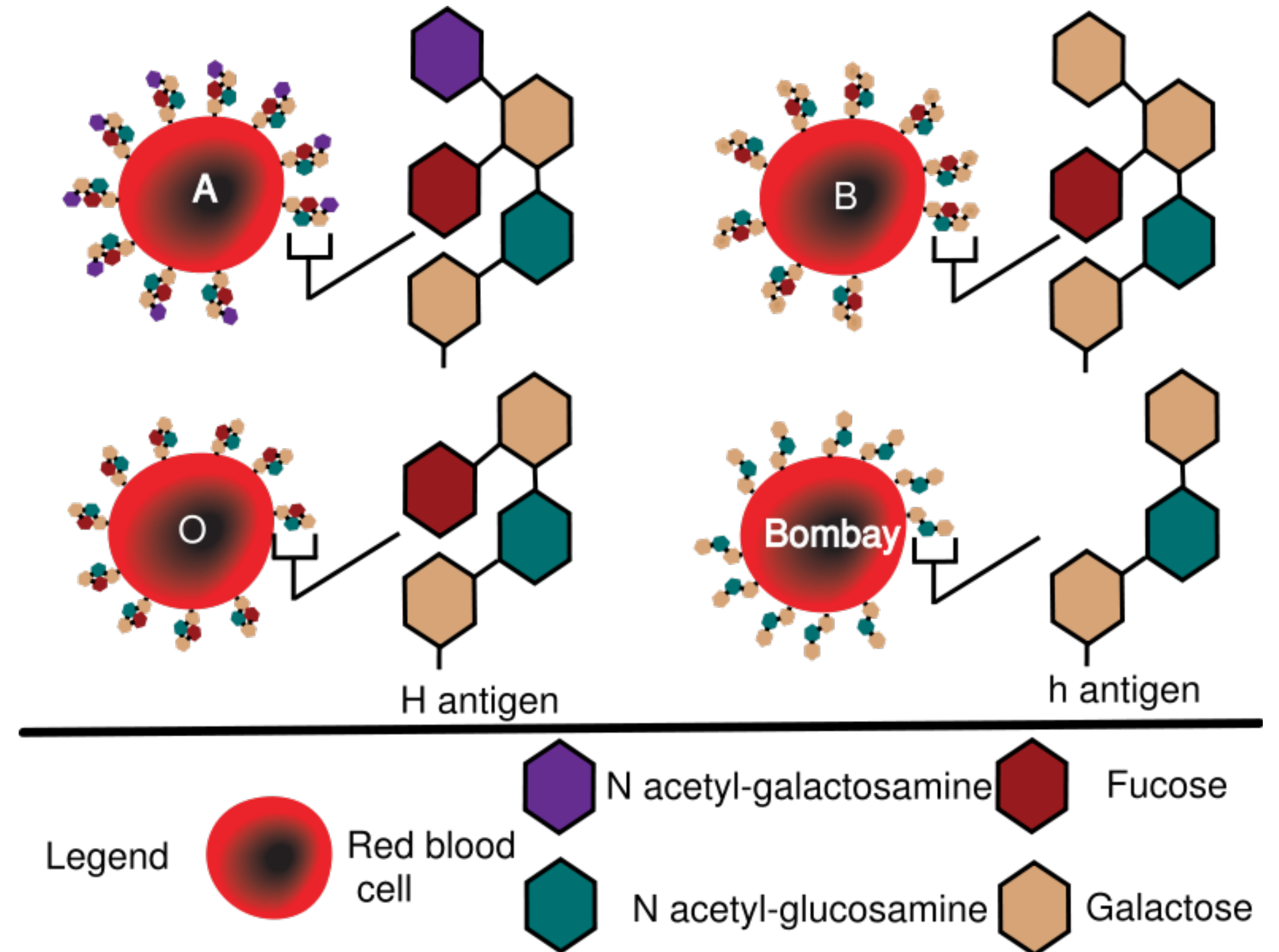
Gen O

- Obecność allelu *O* (*orange*) u kotów daje rude ubarwienie
- Niezależnie od tego, jaki jest genotyp alleli genu *B* (*black*) - *O* jest epistatyczny



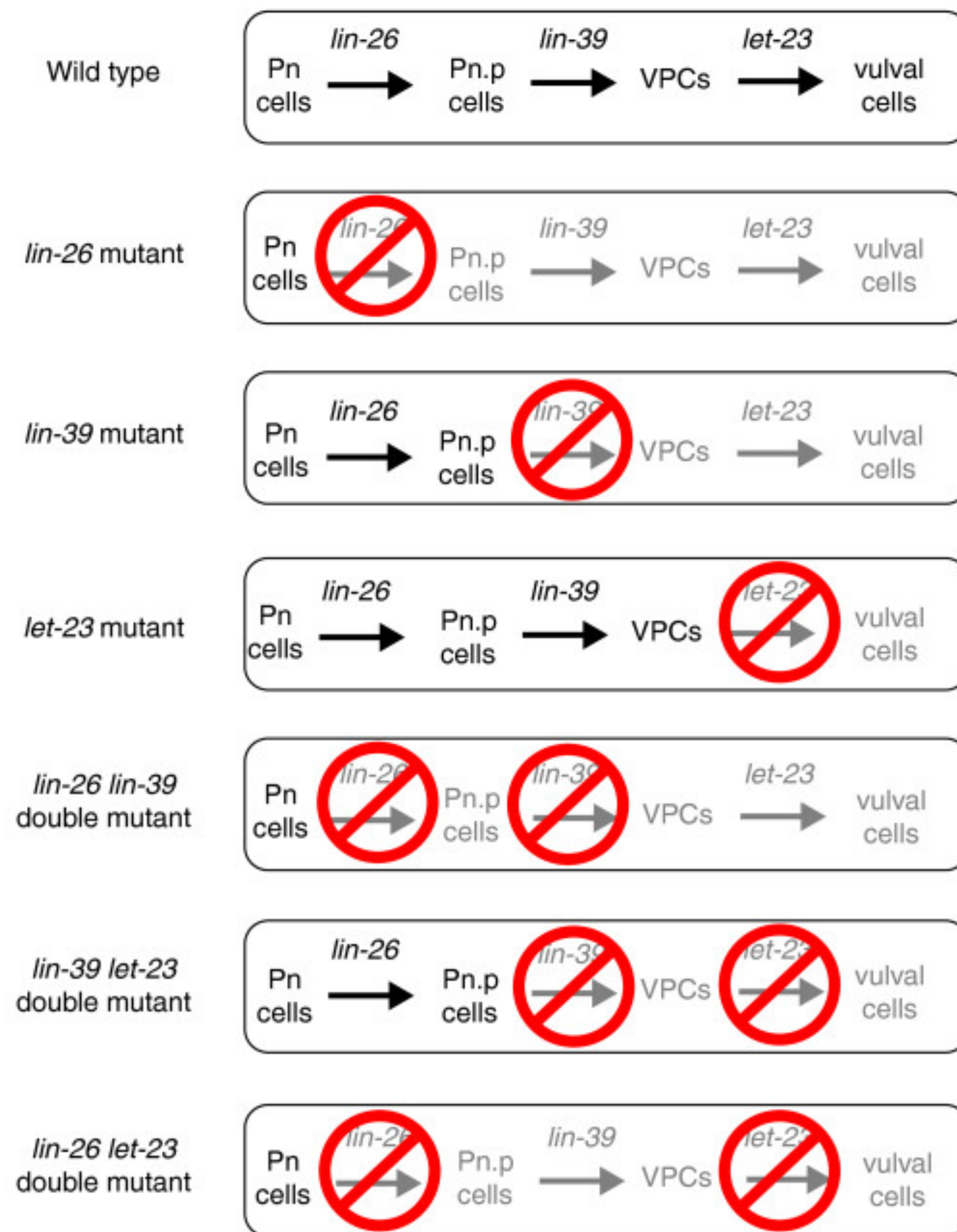
Grupa krwi Bombay

- Rzadki recesywny allel h genu innego niż I
- Homozygoty hh nie wytwarzają antygeny H, który jest prekursorem antygenów A i B
- Homozygoty hh w testach dają grupę 0, niezależnie od genotypu I^A lub I^B
- Uniwersalny donor, biorca tylko od innej osoby hh
- Ok. 4 osoby na milion (w Bombaju 1: 10 000, wyspa Reunion 1:1000)



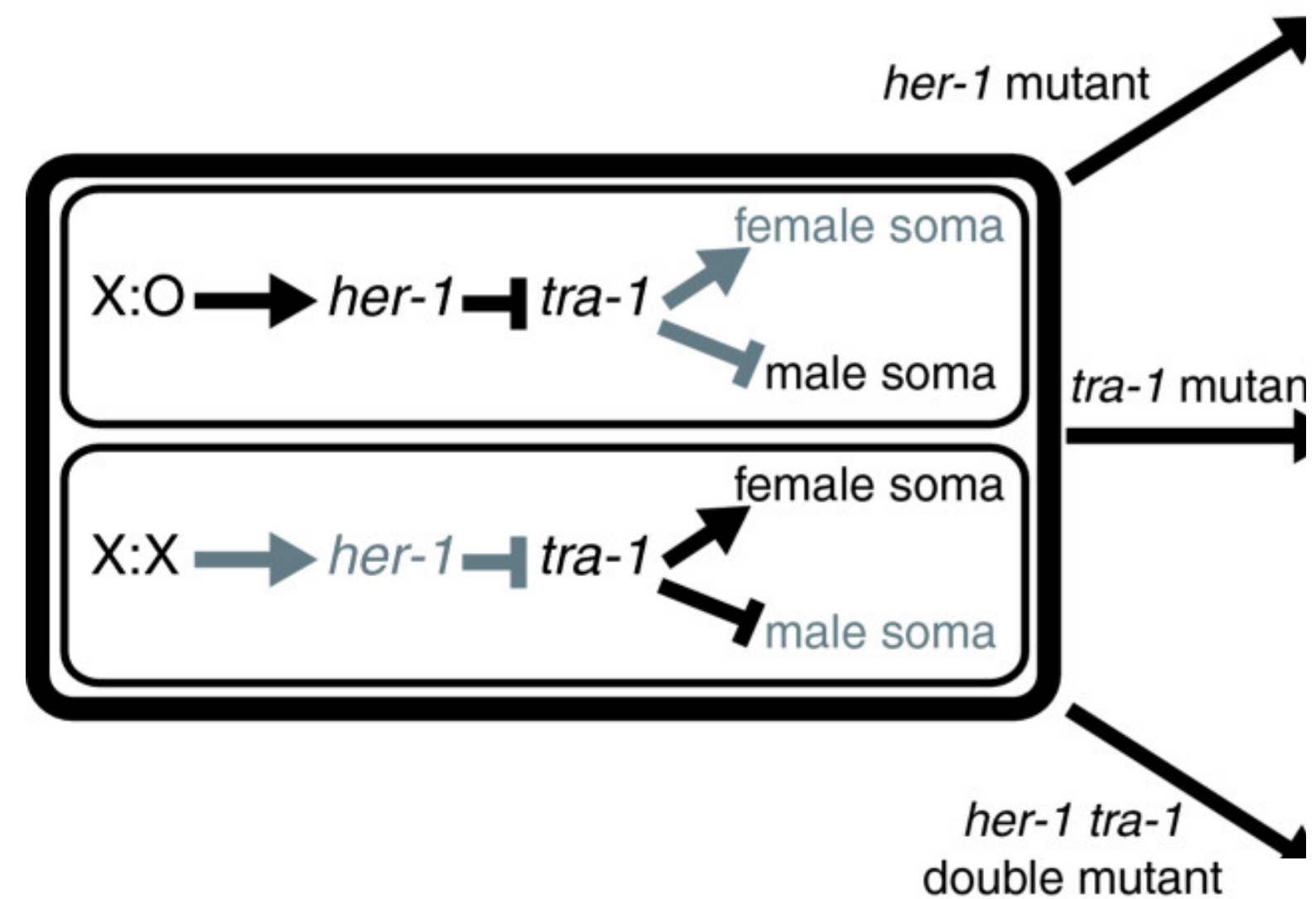
Epistaza

- Przy regulacji pozytywnej (i np. szlakach biosyntezy) mutacja elementu leżącego wyżej w szlaku będzie epistatyczna względem mutacji poniżej
- Fenotyp podwójnego mutantanta taki sam, jak mutantanta w genie, którego produkt działa na wcześniejszym etapie szlaku
- Wykorzystywane do mapowania kolejności etapów w szlakach regulatorowych, rozwojowych i metabolicznych



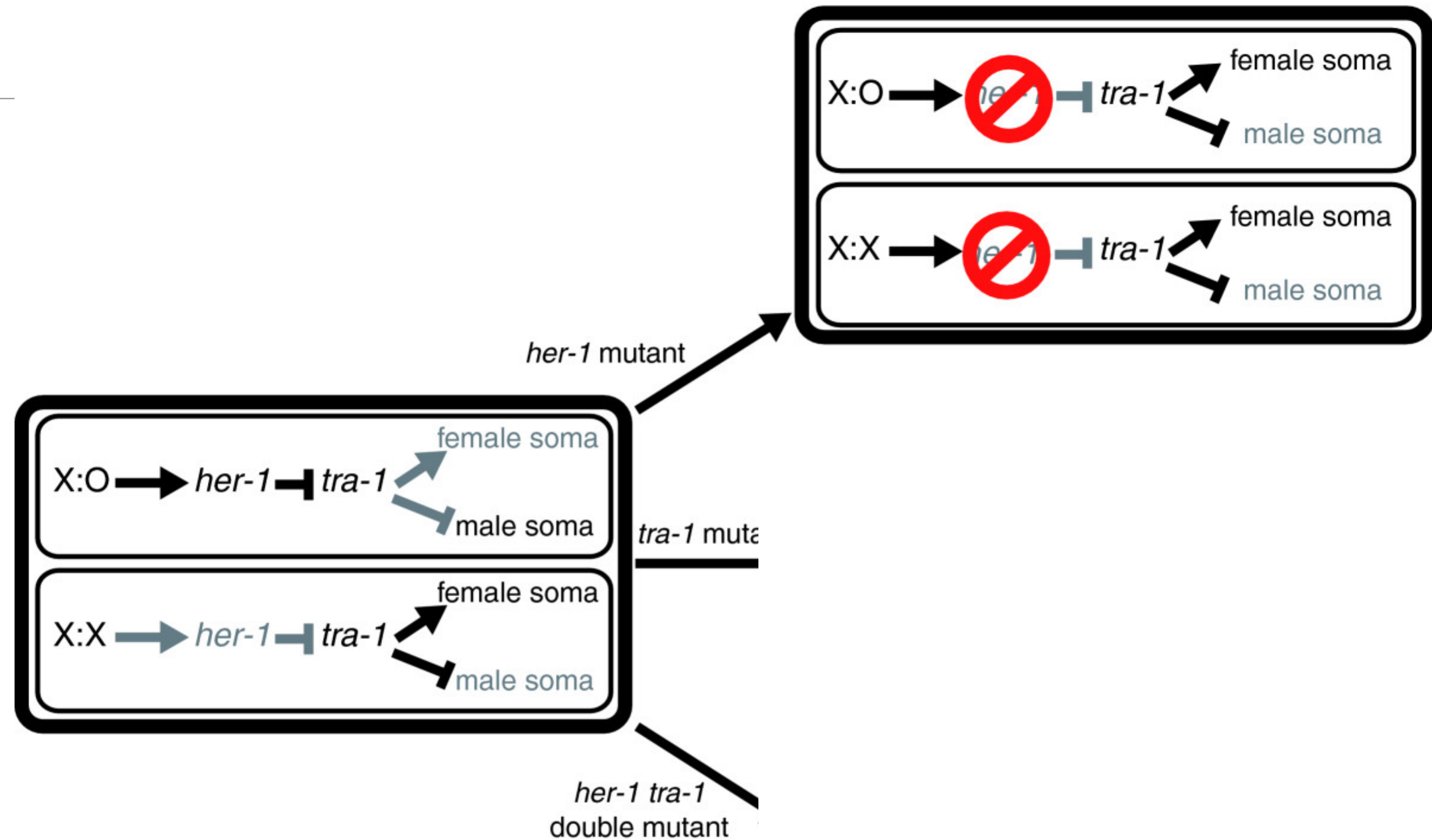
Epistaza i szlaki regulatorowe

- Obecność mutantów o przeciwnym efekcie sugeruje regulację negatywną jednego z etapów szlaku



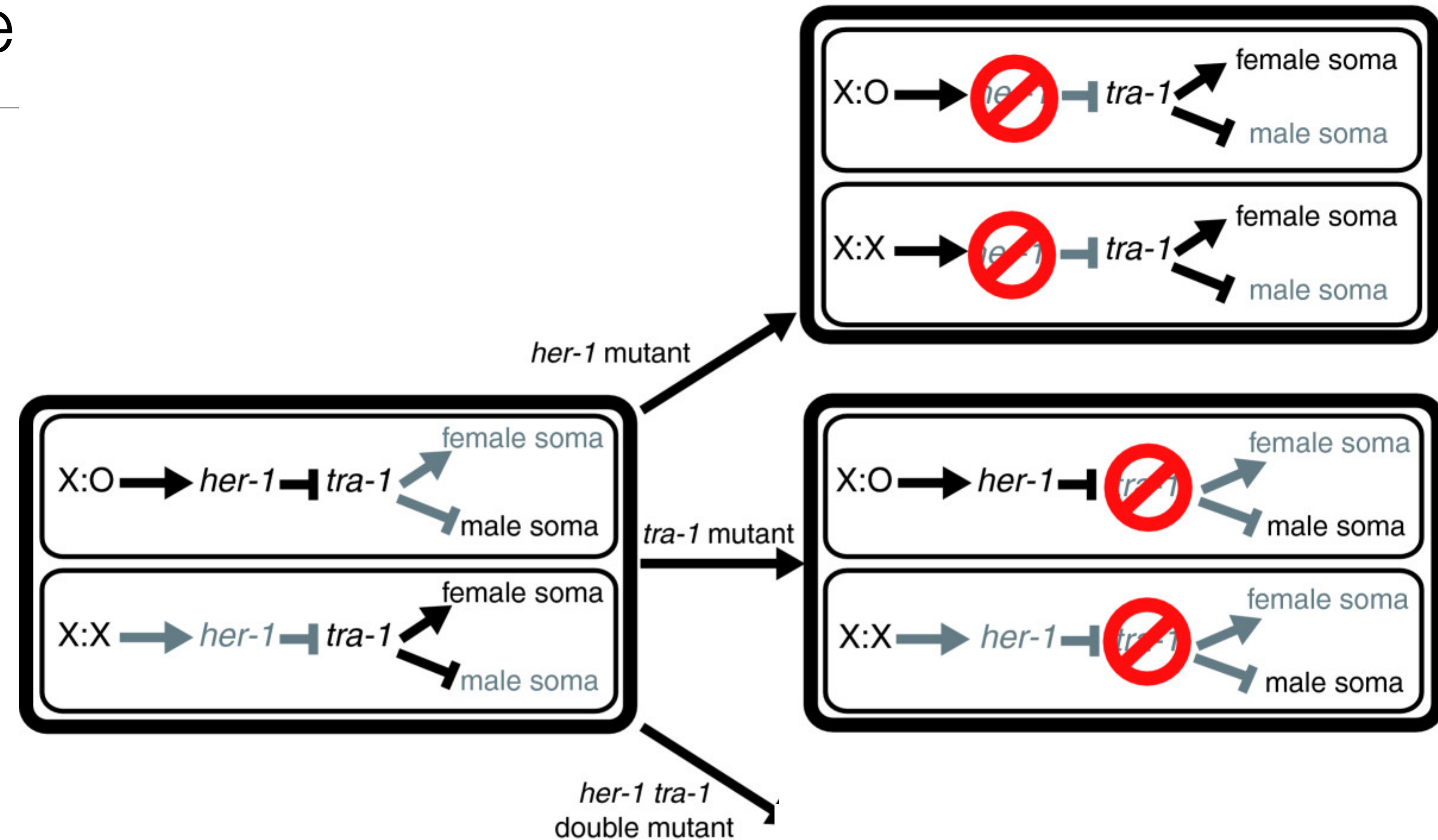
Epistaza i szlaki regulatorowe

- Obecność mutantów o przeciwnym efekcie sugeruje regulację negatywną jednego z etapów szlaku



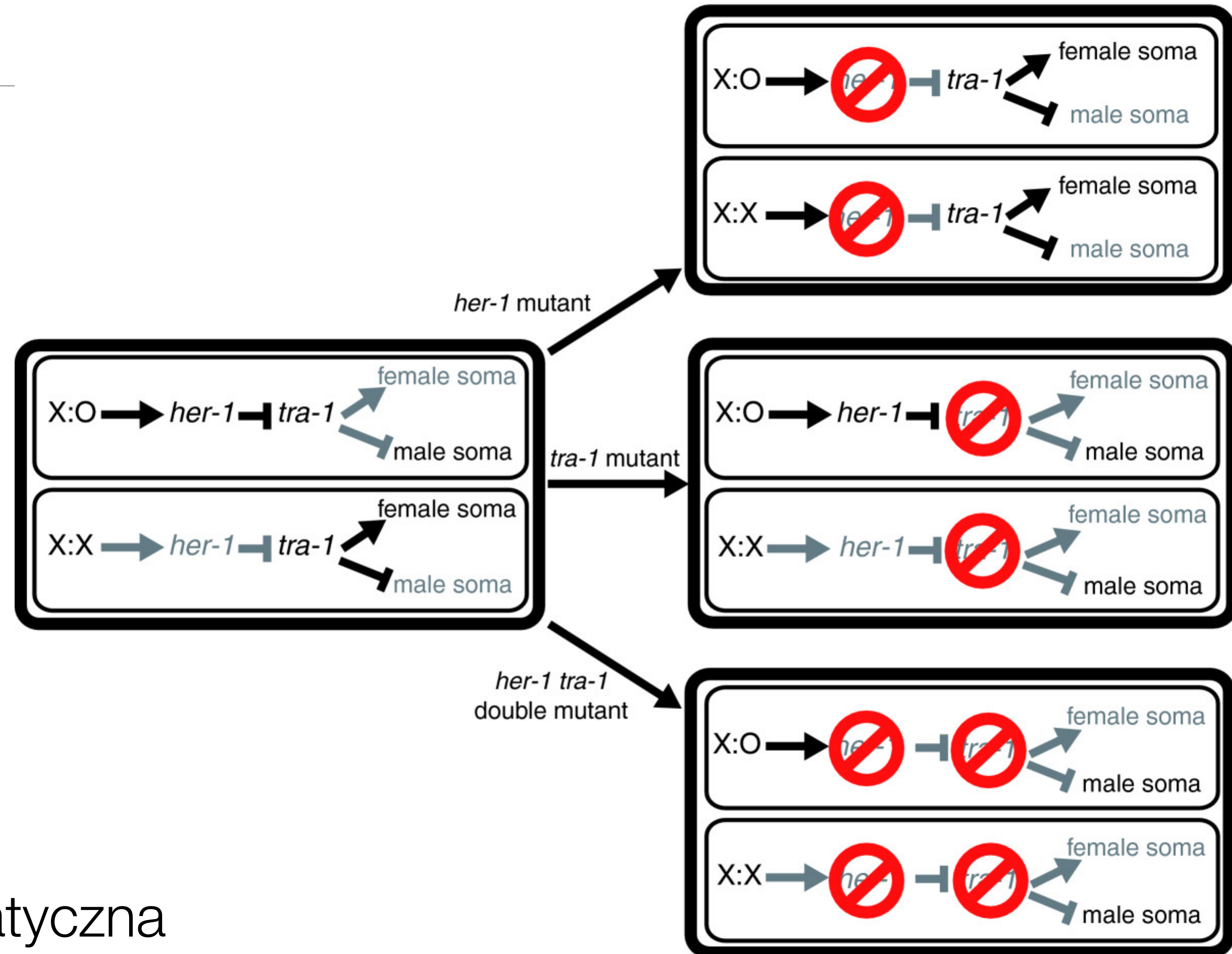
Epistaza i szlaki regulatorowe

- Obecność mutantów o przeciwnym efekcie sugeruje regulację negatywną jednego z etapów szlaku



Epistaza i szlaki regulatorowe

- Obecność mutantów o przeciwnym efekcie sugeruje regulację negatywną jednego z etapów szlaku



mutacja *tra* epistatyczna

Interakcje syntetyczne

- **Syntetyczne wzmocnienie**

- Fenotyp podwójnego mutantu silniejszy (lub nieoczekiwany) niż suma fenotypów pojedynczych mutacji

- **Syntetyczna letalność**

- Pojedyncze mutacje nie są letalne, podwójny mutant letalny

- **Niekomplementacja niealleliczna** (SSNC – *second-site non-complementation*)

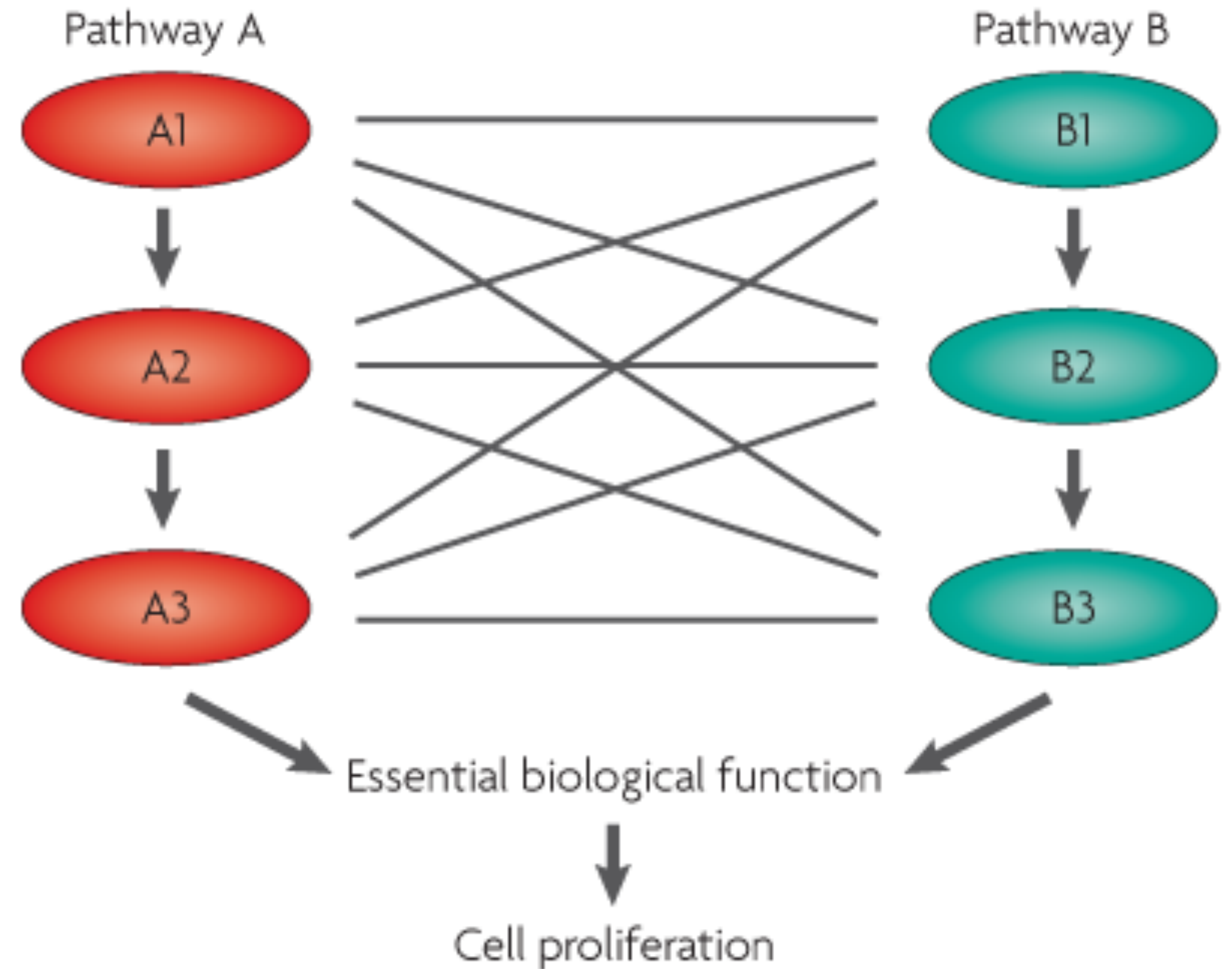
- Dwie recesywne mutacje a i b w podwójnej heterozygocie dają fenotyp zmutowany

Syntetyczne wzmocnienie

- Nieoczekiwanie silny (synergistyczny) efekt połączenia dwóch mutacji
 - np. mutacja *a* obniża tempo wzrostu o 10%, mutacja *b* o 20%, a w podwójnym mutancie obniżenie o 90%
 - Skrajny przypadek: syntetyczna letalność
- Zwykle dotyczy alleli nullomorficznych lub hipomorficznych
 - Inny wariant: SDL (*synthetic dosage lethality*)
 - nadekspresja jednego genu ujawnia silny fenotyp dopiero w kontekście mutacji innego genu
- Łatwiejsza do badania w organizmach mających wegetatywną fazę haploidalną (np. drożdże)

Syntetyczna letalność

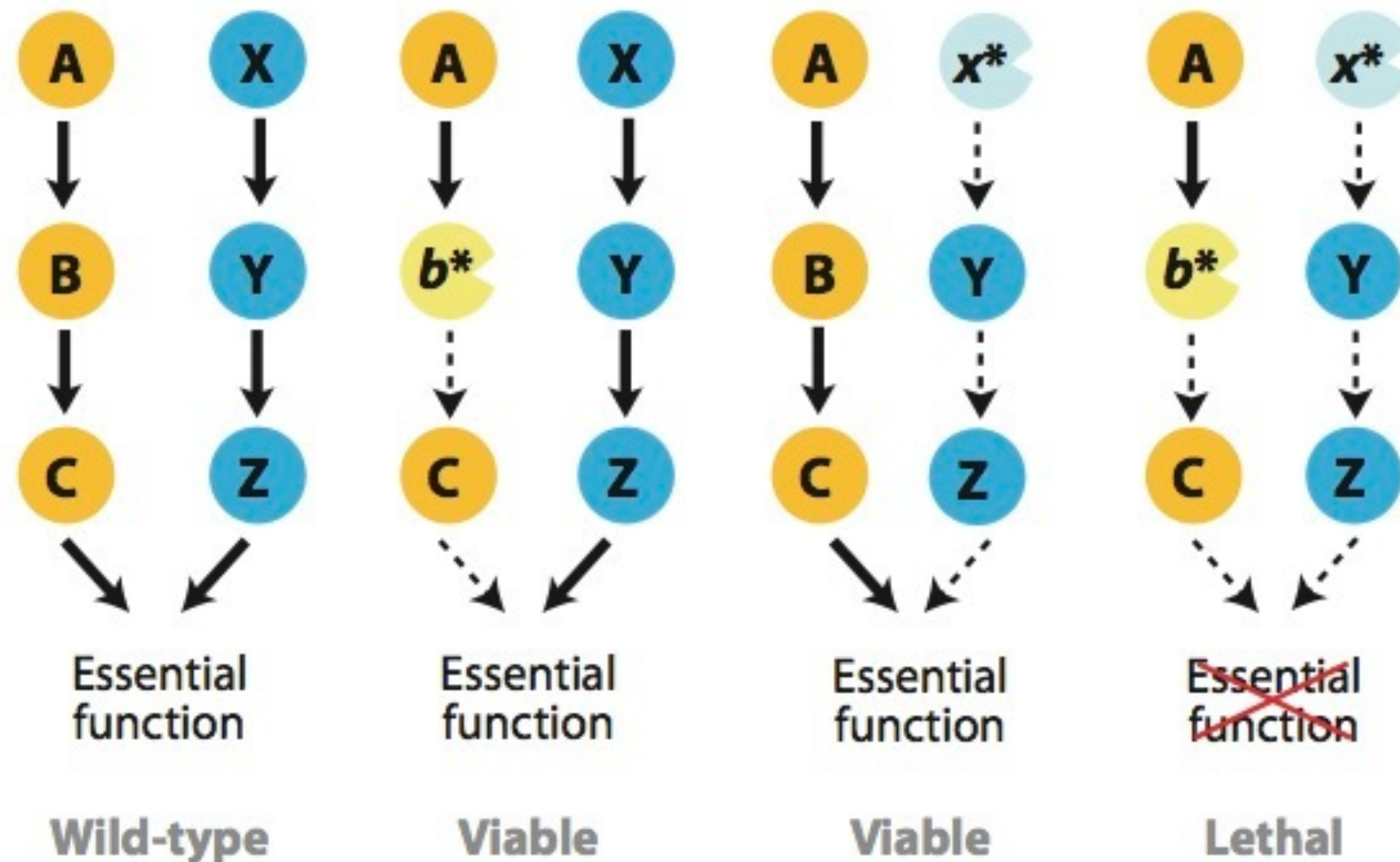
- W przypadku alleli null dotyczy szlaków działających równoległe
- Szlaki A i B wykazują redundancję, ale defekt obydwu jest letalny
- Interakcje syntetyczne wskazują na istnienie redundancji w systemach biologicznych
- Podobnie dla fenotypów nieletalnych (syntetyczne wzmocnienie)



Interakcje syntetyczne pomiędzy szlakami

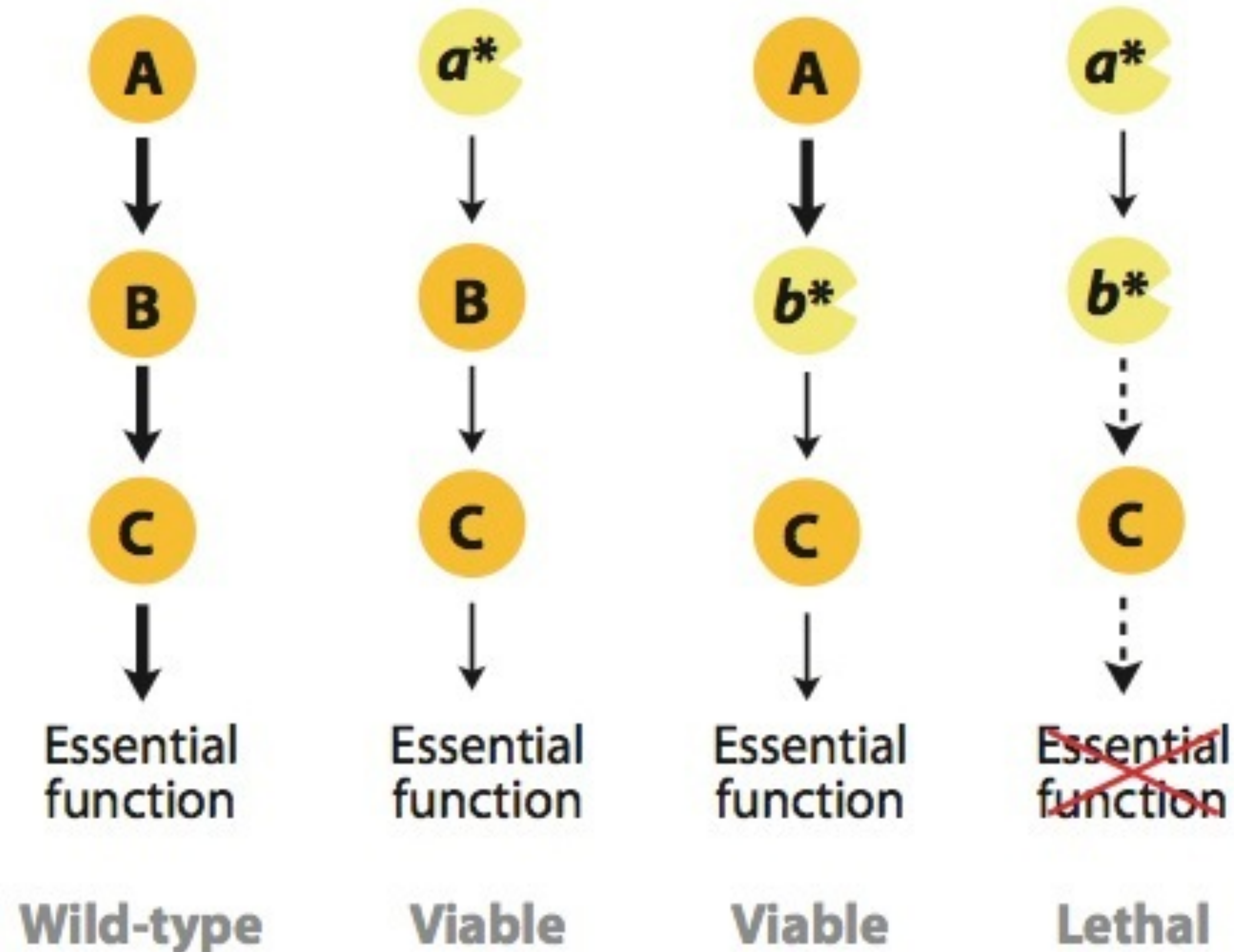
a Negative interactions

Between pathway genetic interactions (nonessential pathways)



Interakcja syntetyczna w tym samym szlaku

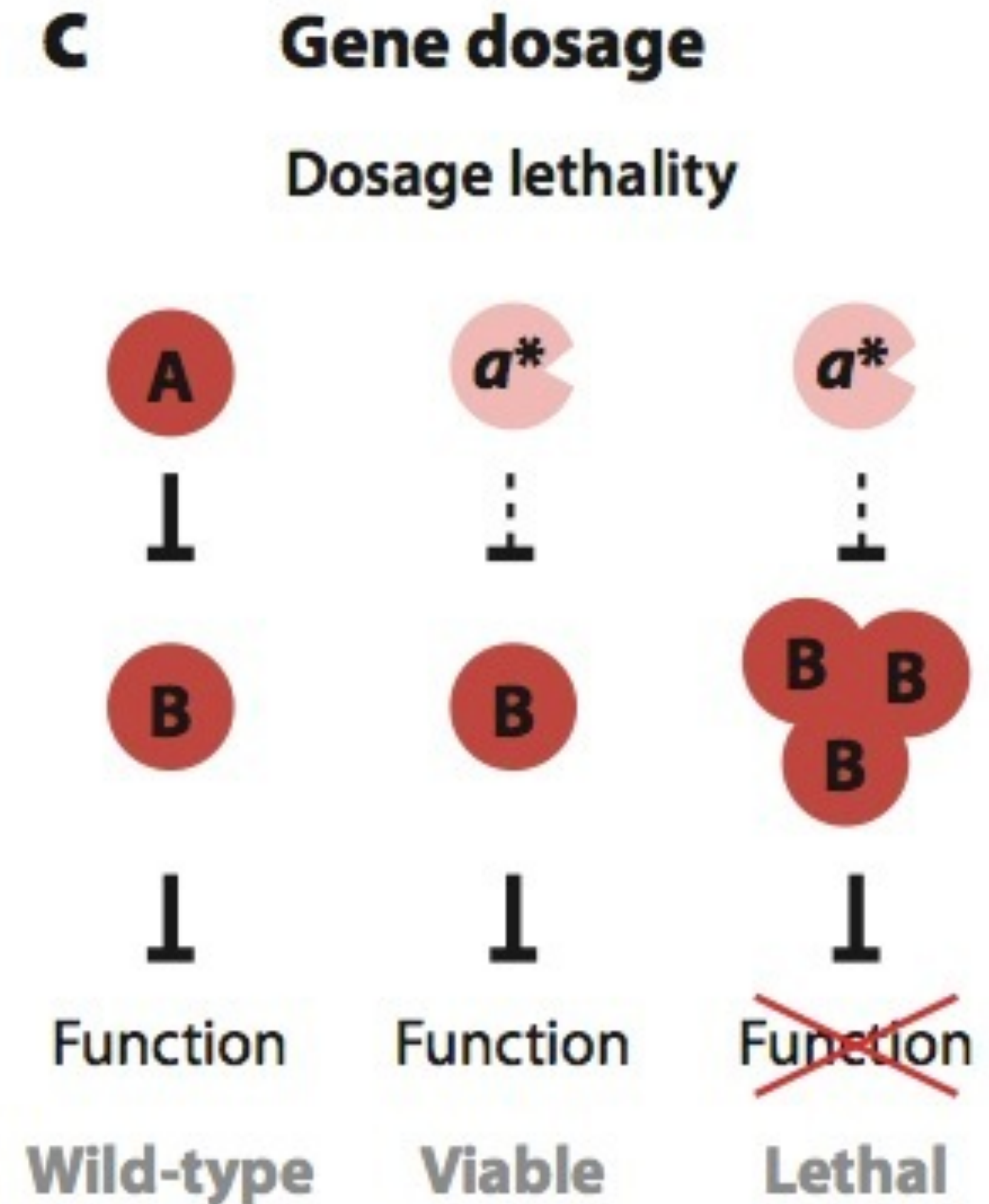
Within pathway genetic interactions (essential pathways)



W przypadku alleli **hipomorficznych** może dotyczyć elementów tego samego szlaku

Syntetyczna letalność dawki (nadekspresja)

- Syntetyczna letalność dawki (nadekspresji) – *synthetic dosage lethality*
- Nadekspresja genu B letalna tylko w kontekście mutacji genu A



Poszukiwanie interakcji

- Interakcje dające się selekcjonować pozytywnie (np. supresje) można wykrywać stosując bezpośrednią selekcję (np. po mutagenezie albo po transformacji plazmidem wysokokopiowym)
- Przy selekcji negatywnej - przeszukiwanie (*screening*)
- W niektórych organizmach modelowych (np. drożdże) możliwa jest systematyczna analiza interakcji dla **wszystkich** par genów
 - cel: stworzenie i opis kompletnej mapy interakcji - **interaktom**
- Poszukiwanie interakcji syntetycznych: np. metody SGA i dSLAM

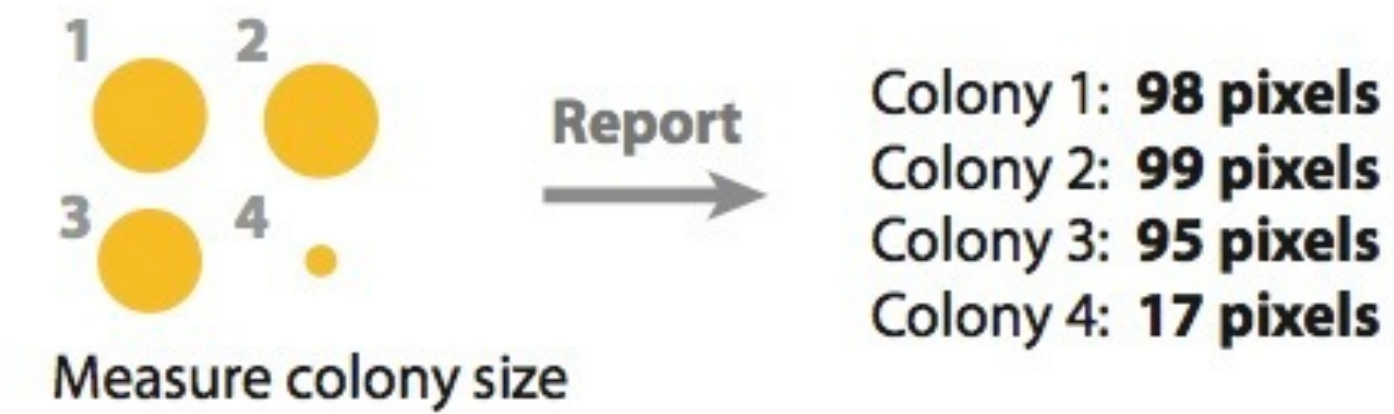
Mapowanie interakcji

Step 1: Generate double mutant

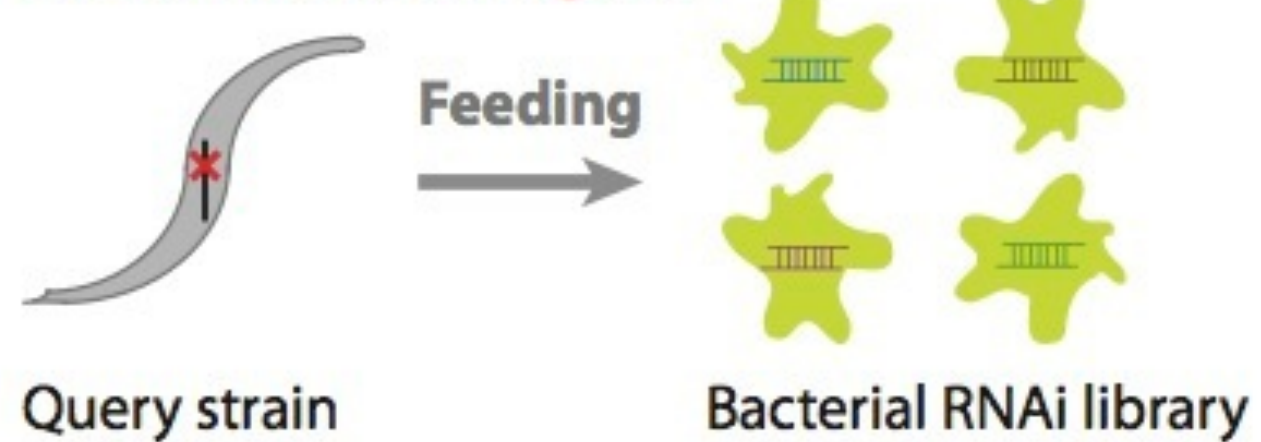
Saccharomyces cerevisiae



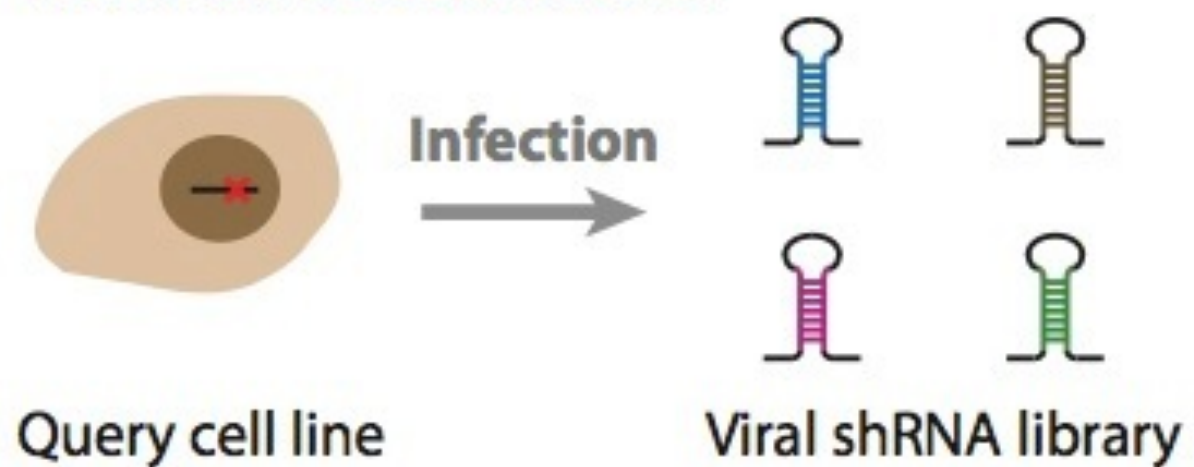
Step 2: Score phenotype and identify interactions



Caenorhabditis elegans

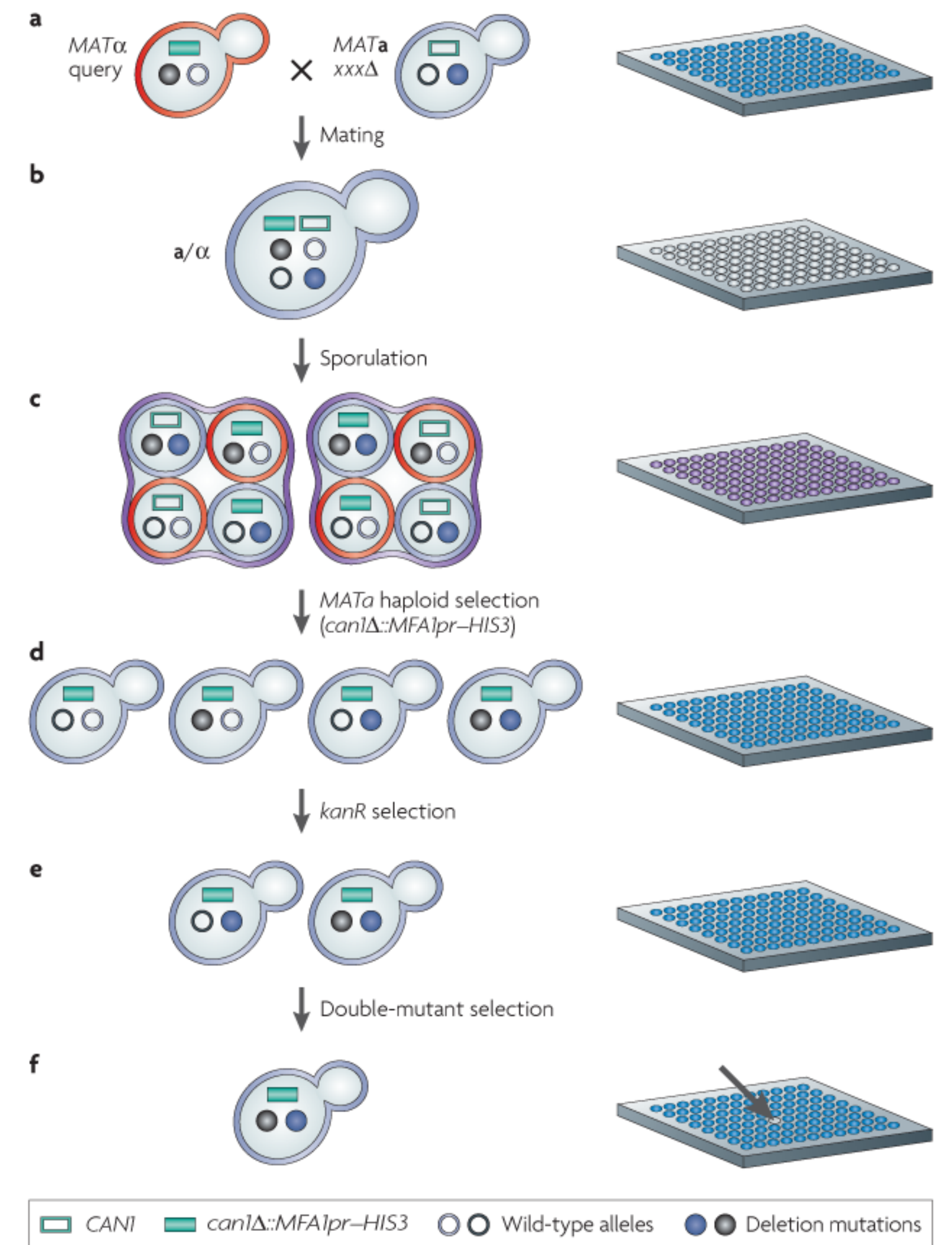
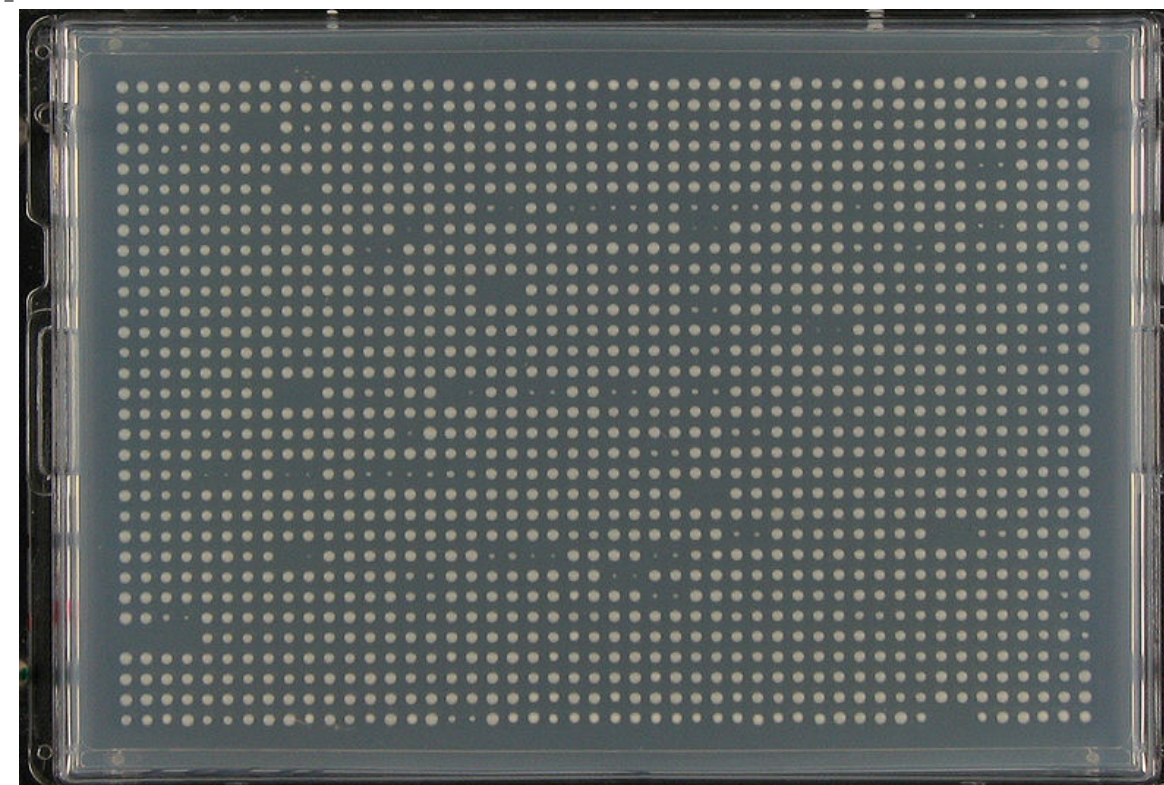
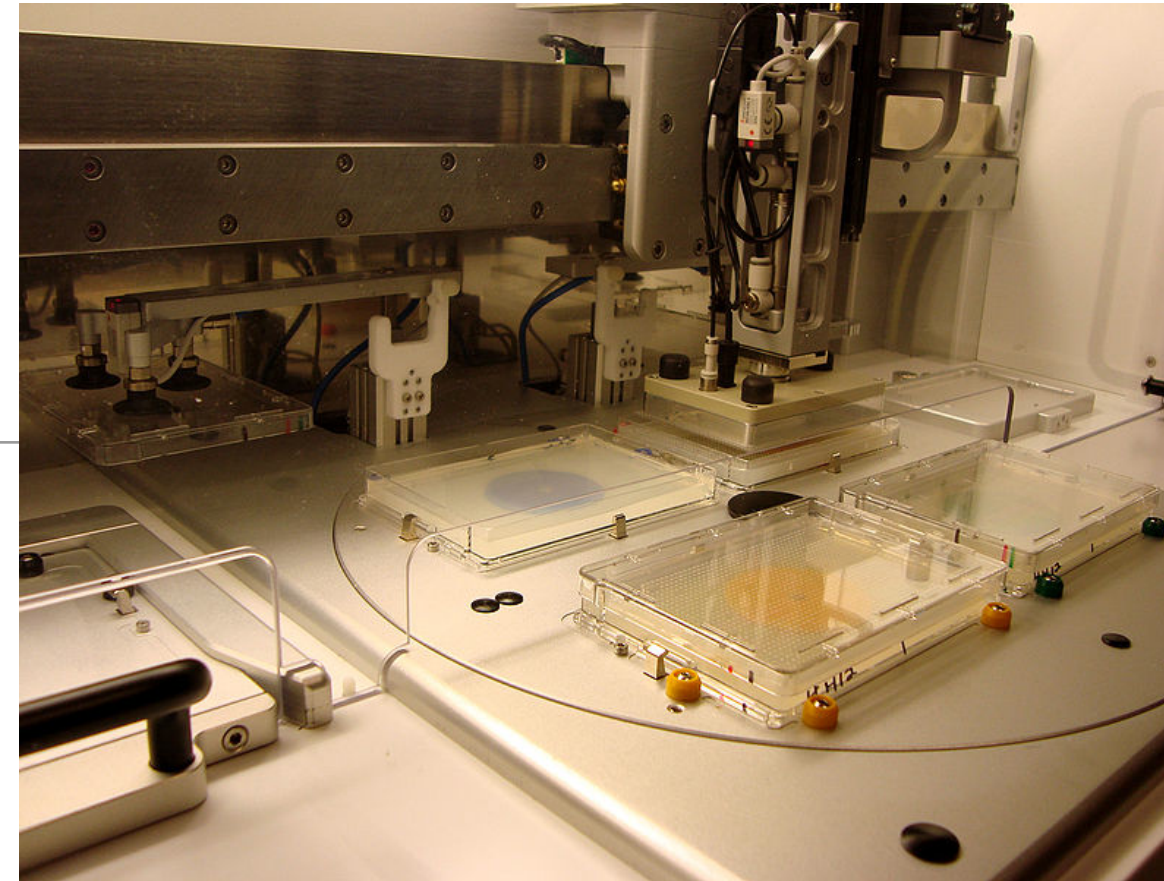


Mammalian cell culture



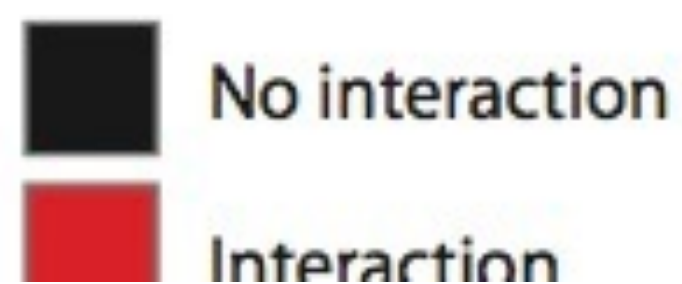
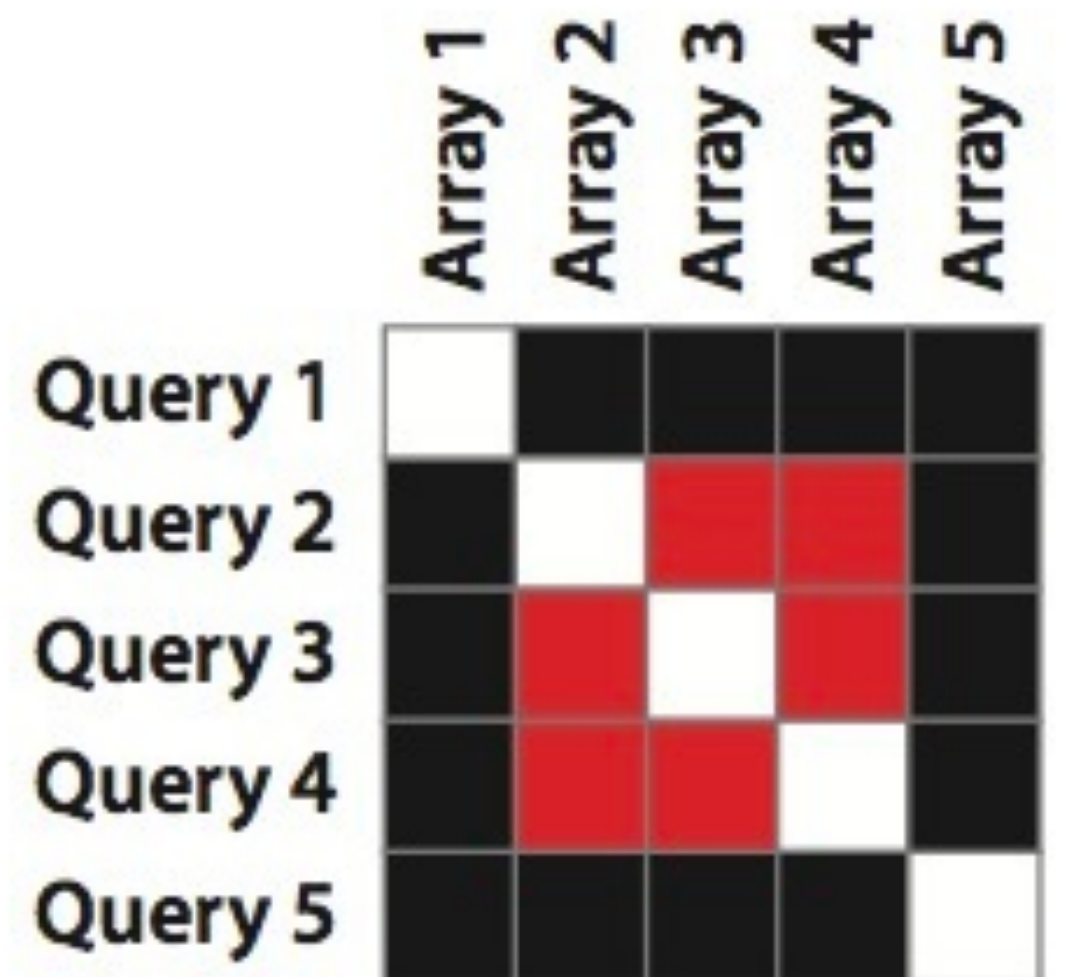
SGA w drożdżach *S. cerevisiae*

- *Synthetic Gene Array*
- Kolekcja mutantów delecyjnych
- Każdy mutant z kolekcji krzyżowany ze wszystkimi pozostałymi
- Sporulacja (mejoza)
- Selekcja haploidów
- Selekcja pojedynczych i podwójnych mutantów
- Test wzrostowy

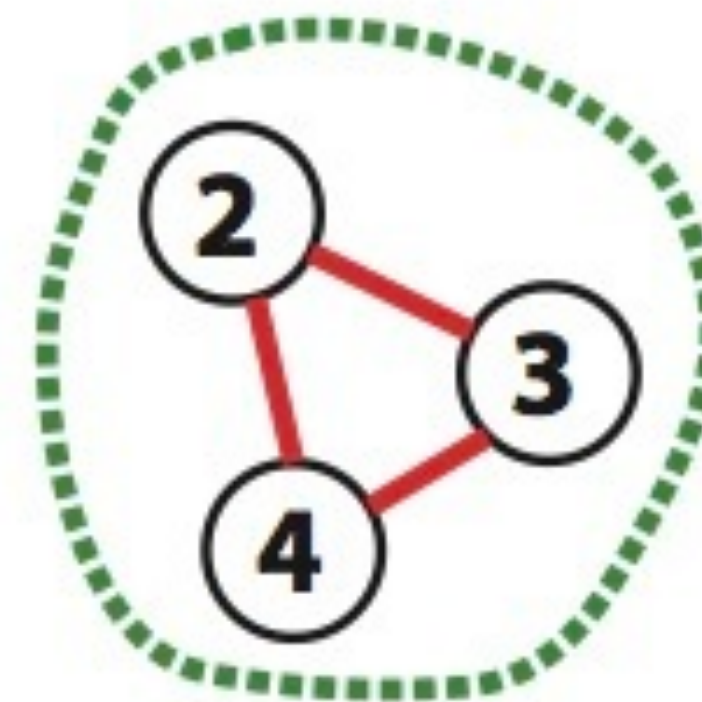


Rekonstrukcja sieci interakcji

Step 3: Build genetic interaction networks



Common biological process



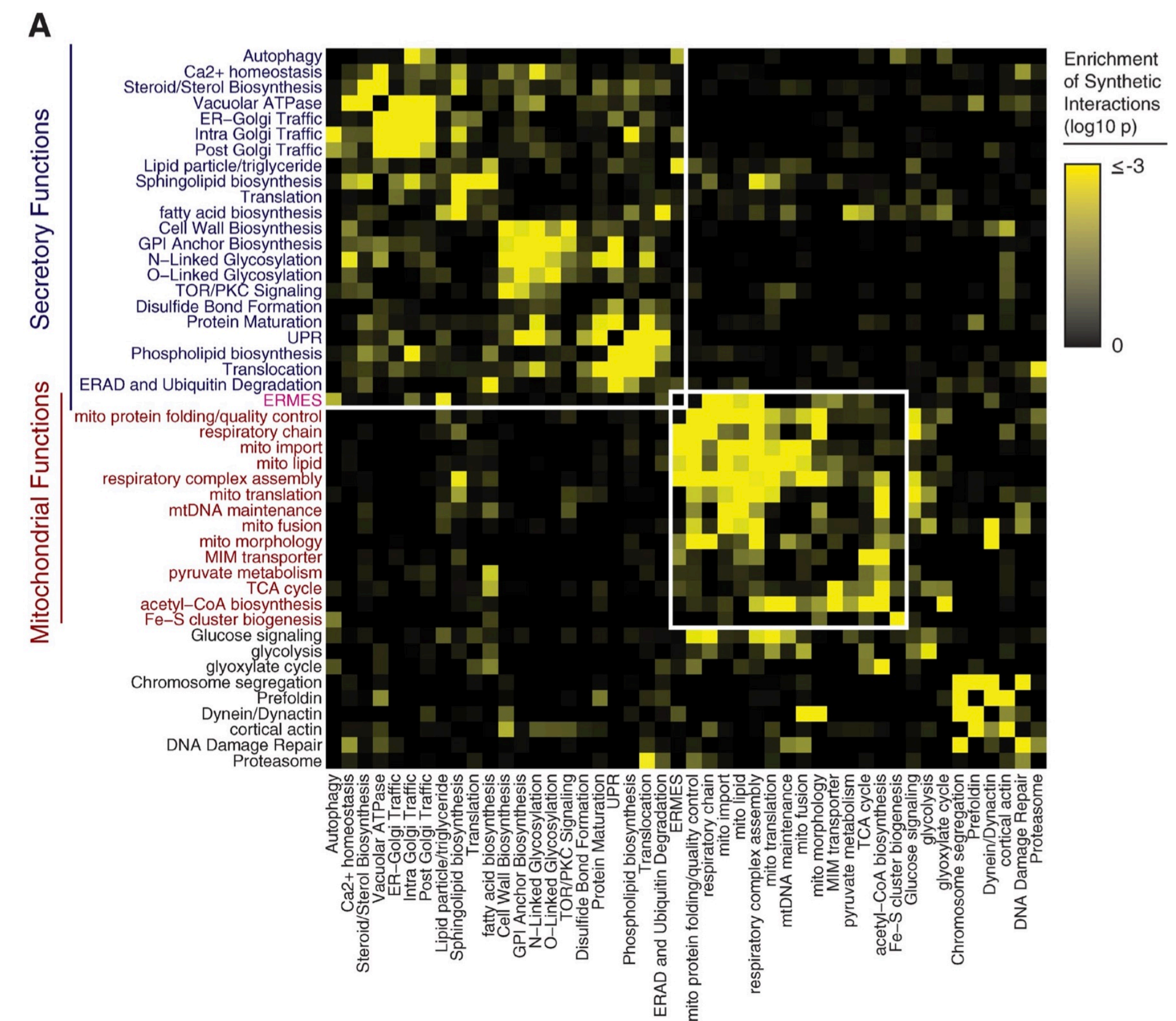
Explore function of gene cluster

Interakcje genetyczne – ujęcie systemowe

- Interakcje genetyczne wskazują na związki funkcji
 - Mogą wiązać elementy tego samego szlaku/kompleksu, ale też różnych szlaków, powiązanych funkcją
 - Zestaw interakcji (pozycja na mapie interaktomu genetycznego) może wskazywać na funkcję genu

Sieci interakcji odkrywają nowe funkcje

- Mapa interakcji genetycznych 1482 genów związanych z funkcjonowaniem mitochondriów u drożdży (Hoppins i wsp. 2011)
- W sumie 616 270 interakcji
- Wyraźna modularność
- Odkrycie nieznanego wcześniej modułu: 4 geny, z których tylko jeden miał wcześniej opisaną funkcję - kompleks MitOS zaangażowany w organizację struktury przestrzennej błony wewnętrznej



A mitochondrial-focused genetic interaction map reveals a scaffold-like complex required for inner membrane organization in mitochondria

Suzanne Hoppins,¹ Sean R. Collins,² Ann Cassidy-Stone,¹ Eric Hummel,³ Rachel M. DeVay,¹ Laura L. Lackner,¹ Benedikt Westermann,³ Maya Schuldiner,⁴ Jonathan S. Weissman,⁵ and Jodi Nunnari¹

Interaktomy - baza danych

BioGRID 3.5 [home](#) [help](#) [wiki](#) [tools](#) [contribute](#) [stats](#) [downloads](#) [partners](#) [about us](#)

Welcome to the Biological General Repository for Interaction Datasets

BioGRID is an interaction repository with data compiled through comprehensive curation efforts. Our current index is version **3.5.170** and searches **68,754** publications for **1,670,339** protein and genetic interactions, **28,093** chemical associations and **726,378** post translational modifications from major model organism species. All data are **freely** provided via our search index and available for download in standardized formats.

[BioGRID Statistics](#) [Latest Downloads](#)

Search BioGRID:

By Identifier

[Submit Identifier Search Q](#)

[Advanced Search](#) [Helpful Search Tips](#) [Featured Datasets](#)

<https://thebiogrid.org>

Wizualizacja i analiza interaktomu

Intro ▾ Download Apps Documentation ▾ Community ▾ Report a Bug Help ▾ Google Custom Search

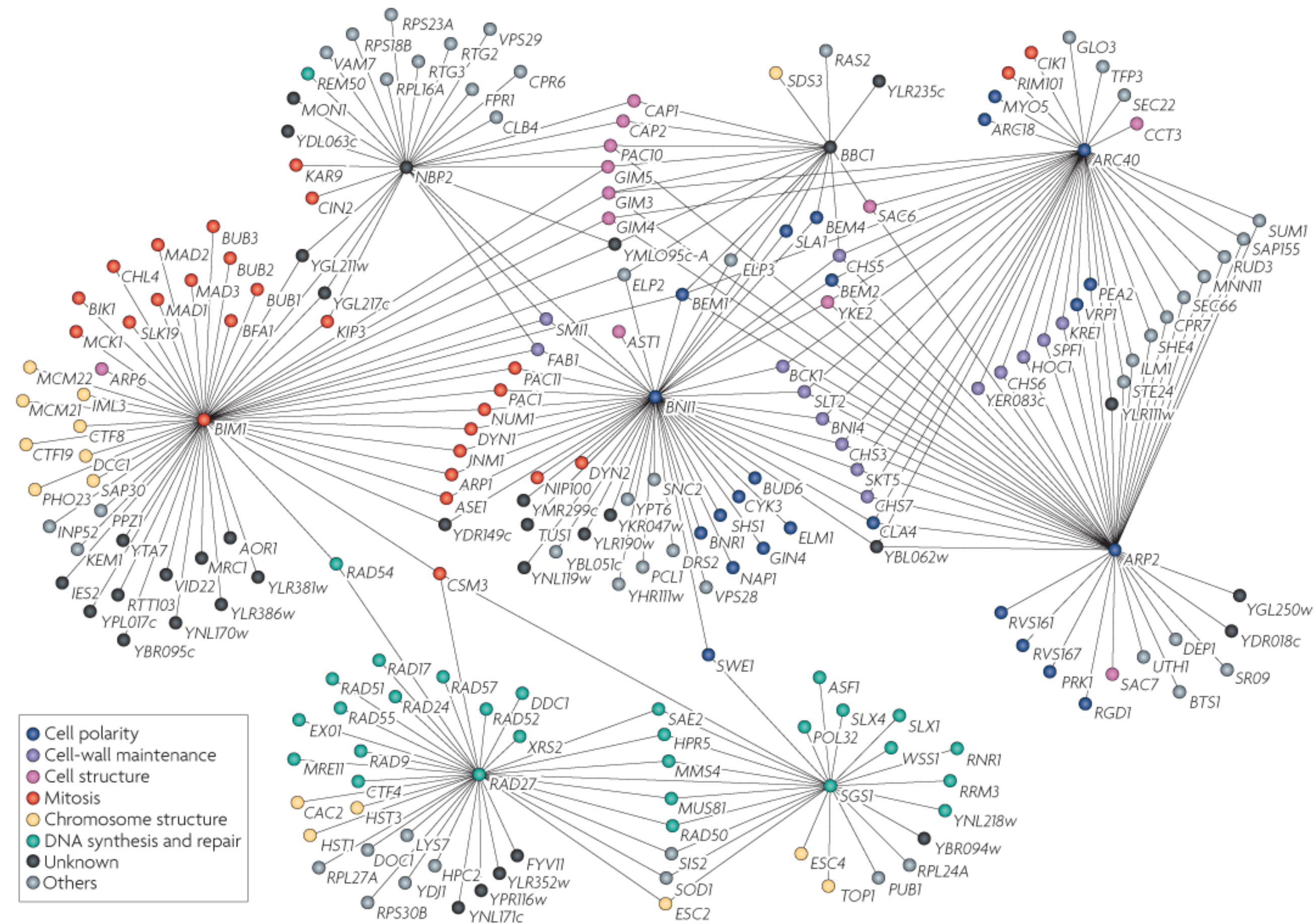
Cytoscape
Network Data Integration, Analysis, and Visualization in a Box

Introduction

Download 3.7.1

<https://cytoscape.org>

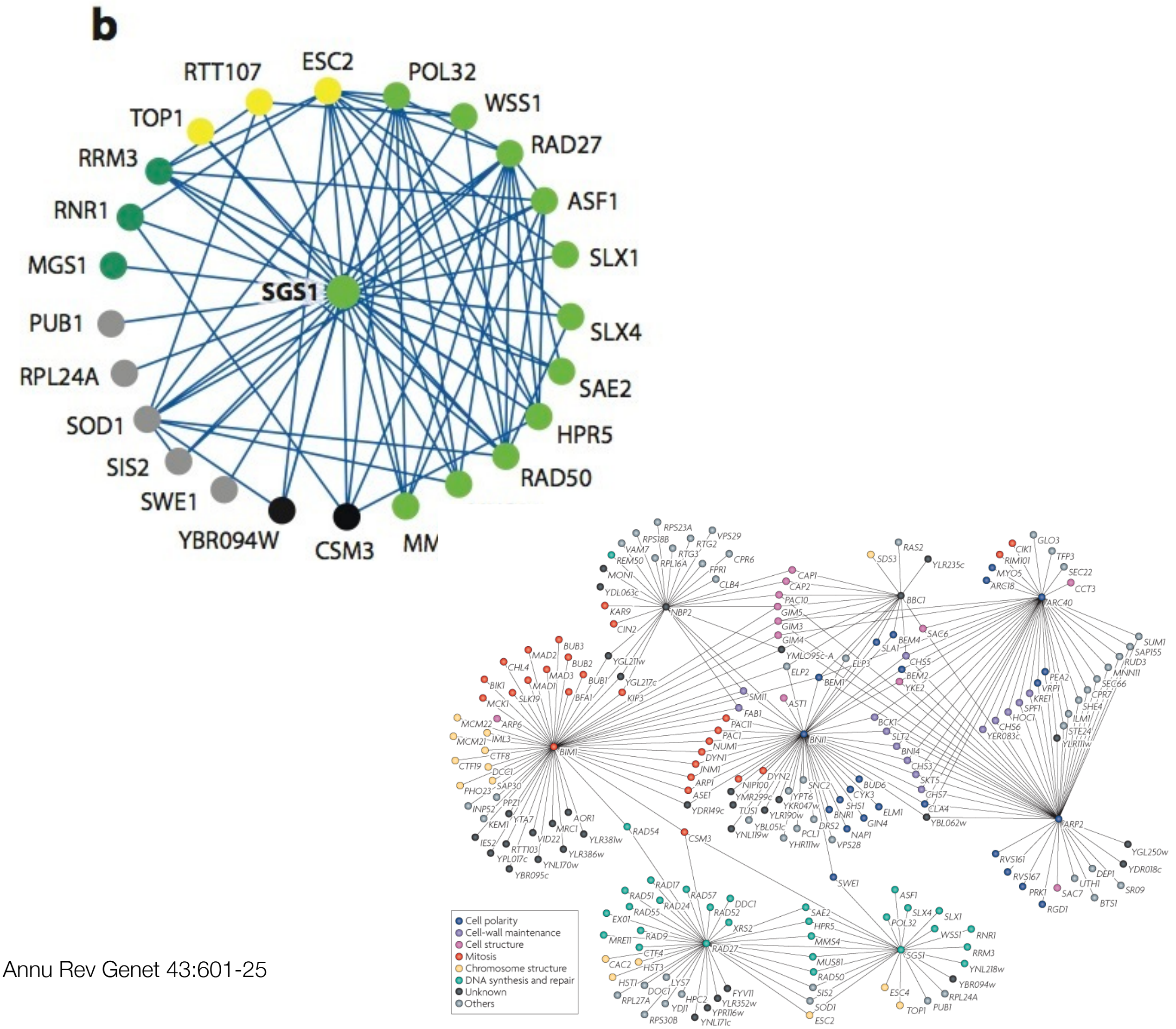
Sieci biologiczne



Przykładowa sieć dla 204 genów drożdżowych – interakcje syntetycznie letalne

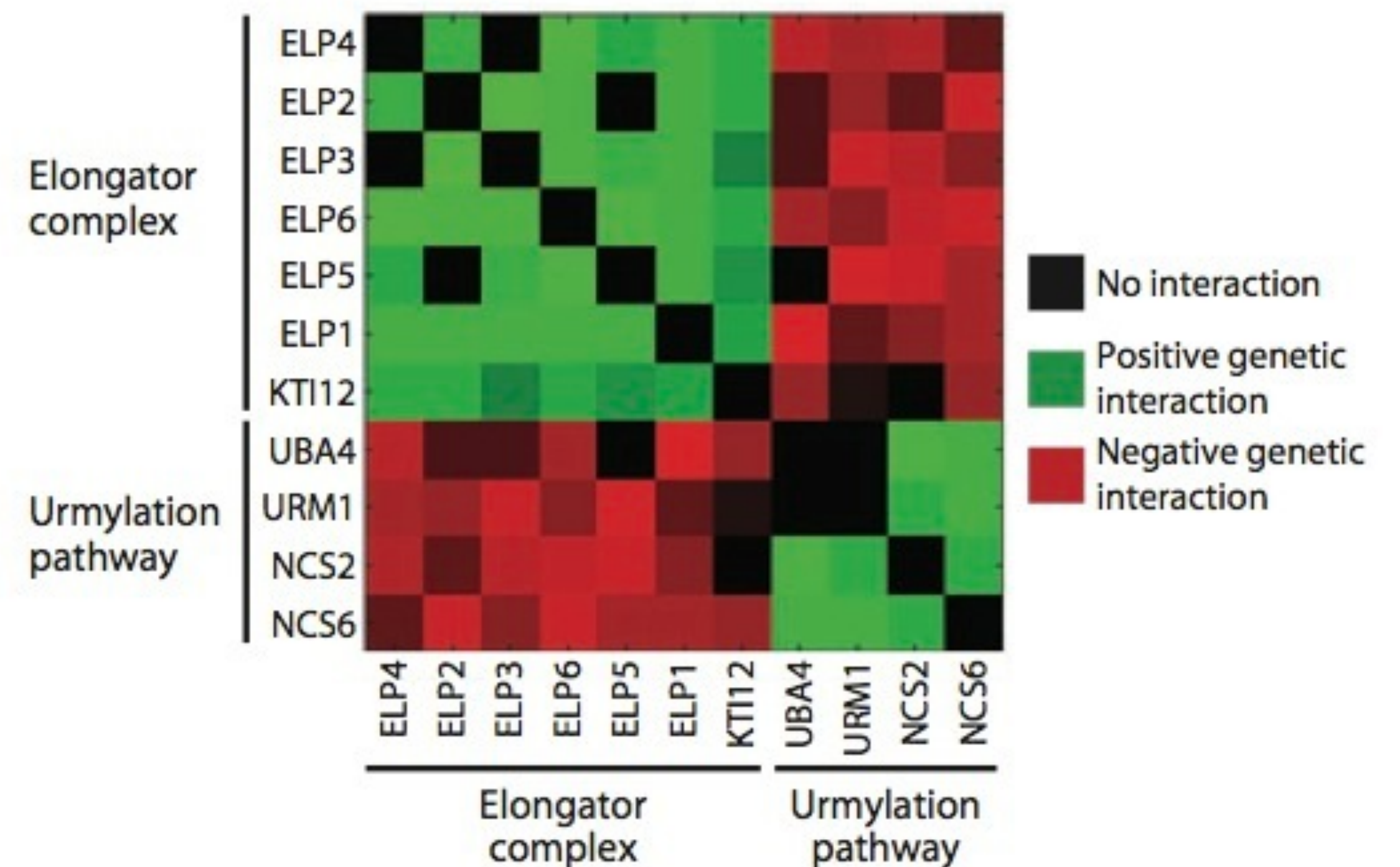
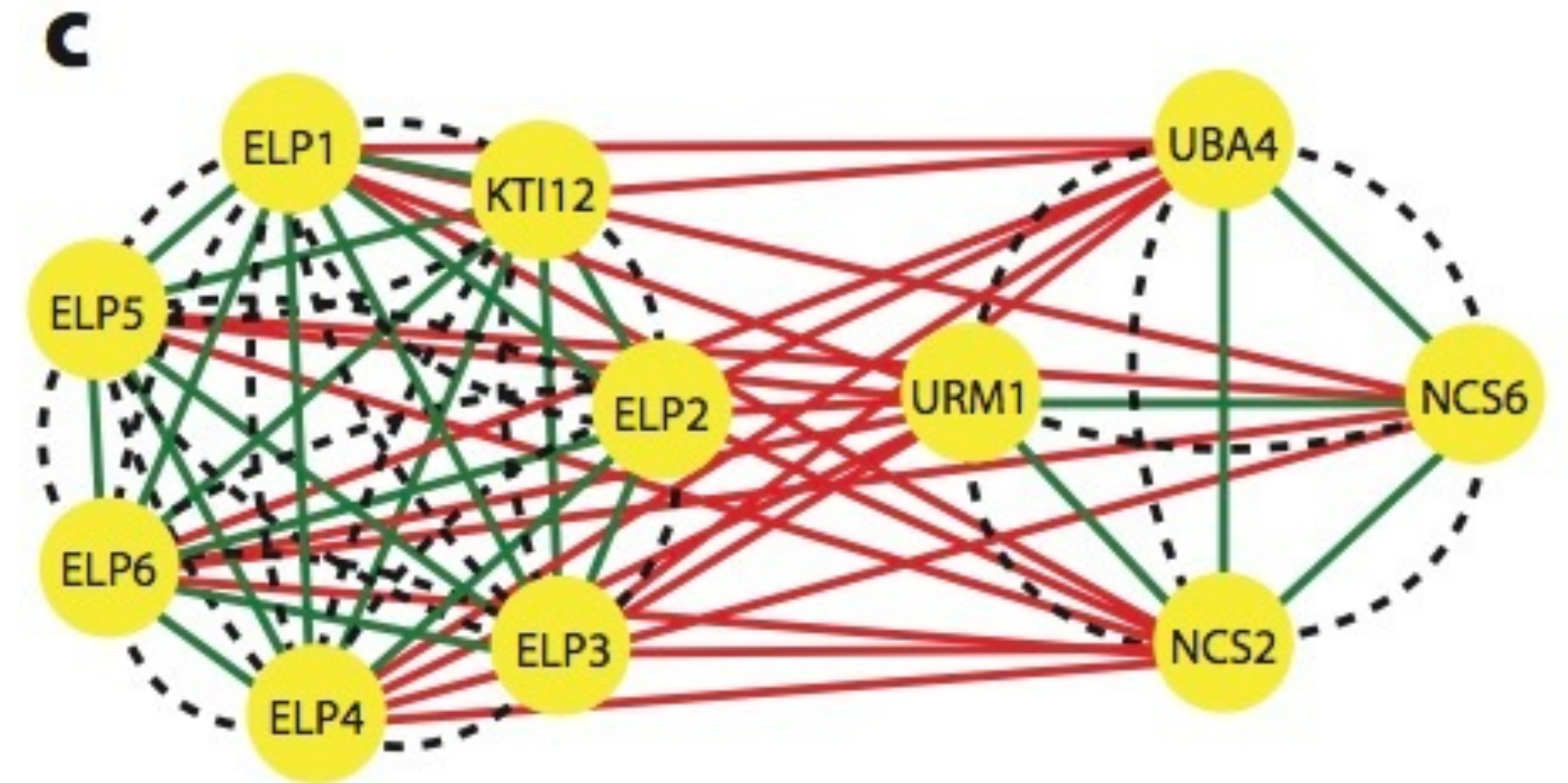
Sieci interakcji

- Sieć interakcji syntetycznych letalnych jest rzadka – około 1% możliwych połączeń istnieje
- Interakcje syntetyczne są jednak częste pomiędzy genami o powiązanej funkcji (18%-25%)



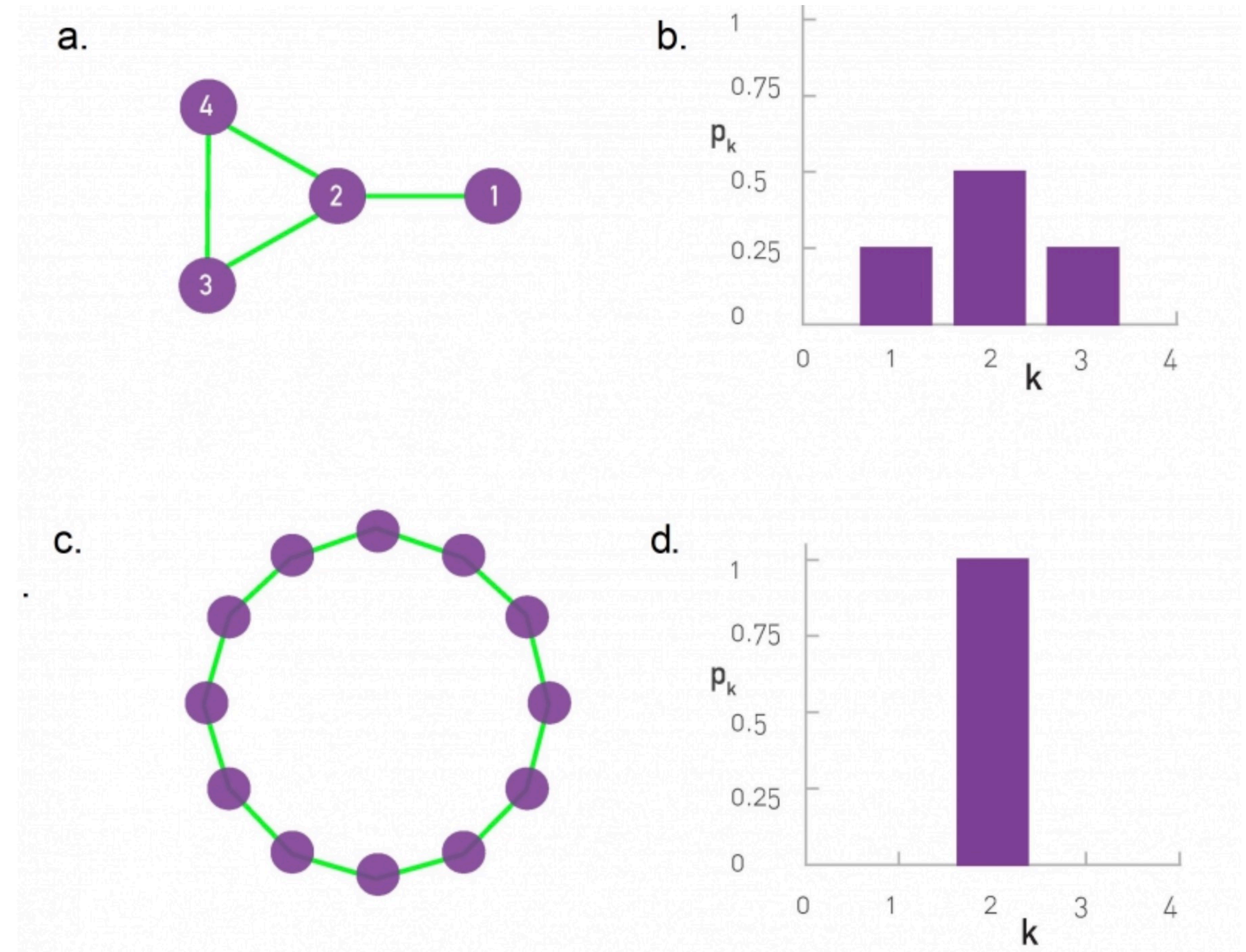
Interakcje genetyczne a fizyczne

- Interakcje fizyczne i genetyczne rzadko się nakładają, choć częściej, niż przewidywano by dla pełnej losowości
- Nakładanie się interakcji genetycznych i fizycznych częste dla interakcji pozytywnych (epistaza)
- Interakcje negatywne z reguły pomiędzy różnymi kompleksami fizycznymi



Sieci biologiczne

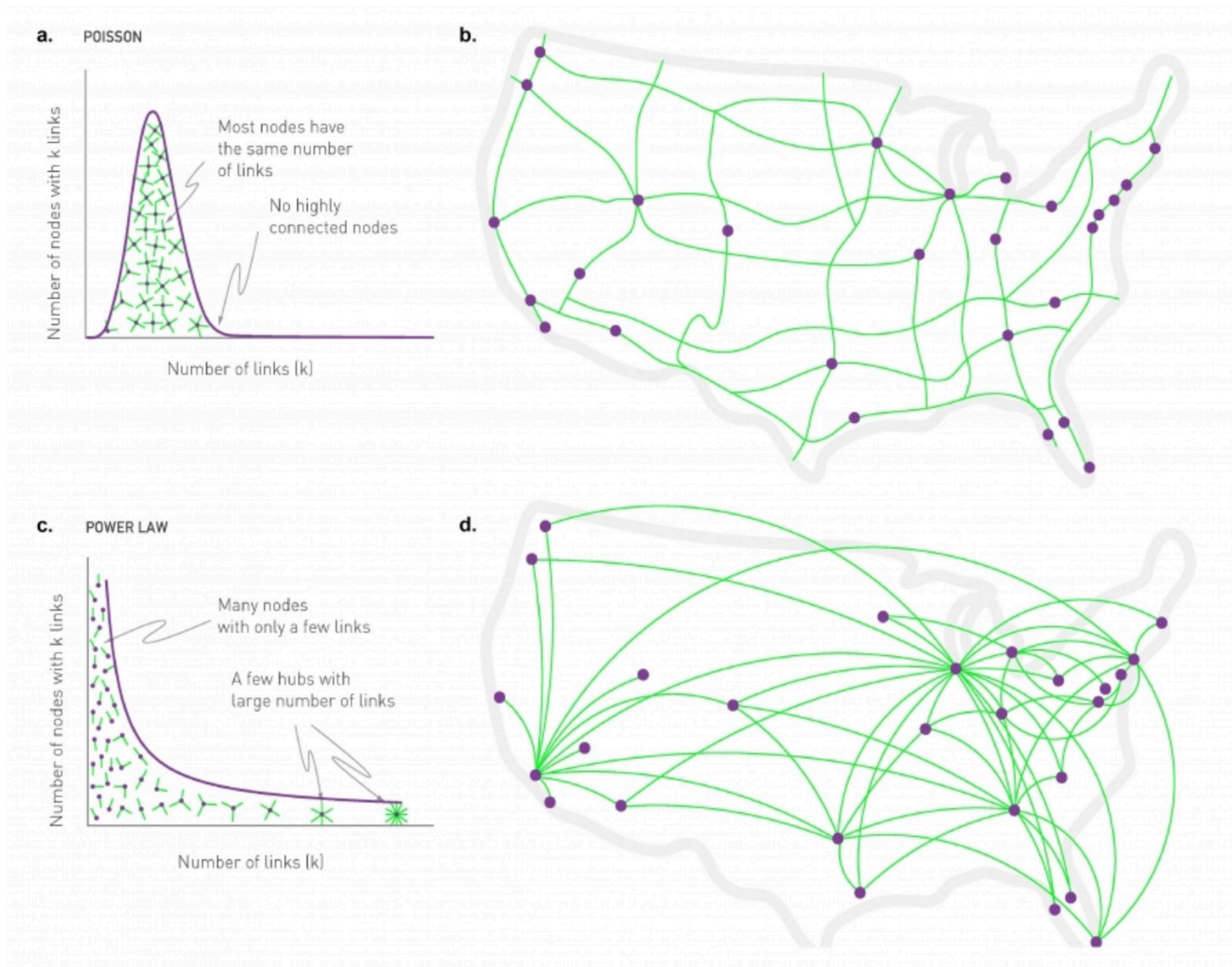
- Zastosowanie pojęć teorii grafów i sieci
 - N - liczba węzłów
 - k - stopień węzła (liczba połączeń)
 - L - całkowita liczba połączeń
 - $P(k)$ - rozkład prawdopodobieństwa znalezienia węzła o stopniu k
- Najważniejsze odkrycie - opisanie sieci bezskalowych: Barabási & Albert.
Emergence of scaling in random networks.
Science, 286: 509, 1999.



Albert-László Barabási & Réka Albert
PREFERENTIAL ATTACHMENT
NETWORK SCIENTISTS

<http://barabasi.com/networksciencebook/>

Sieci losowe i bezskalowe

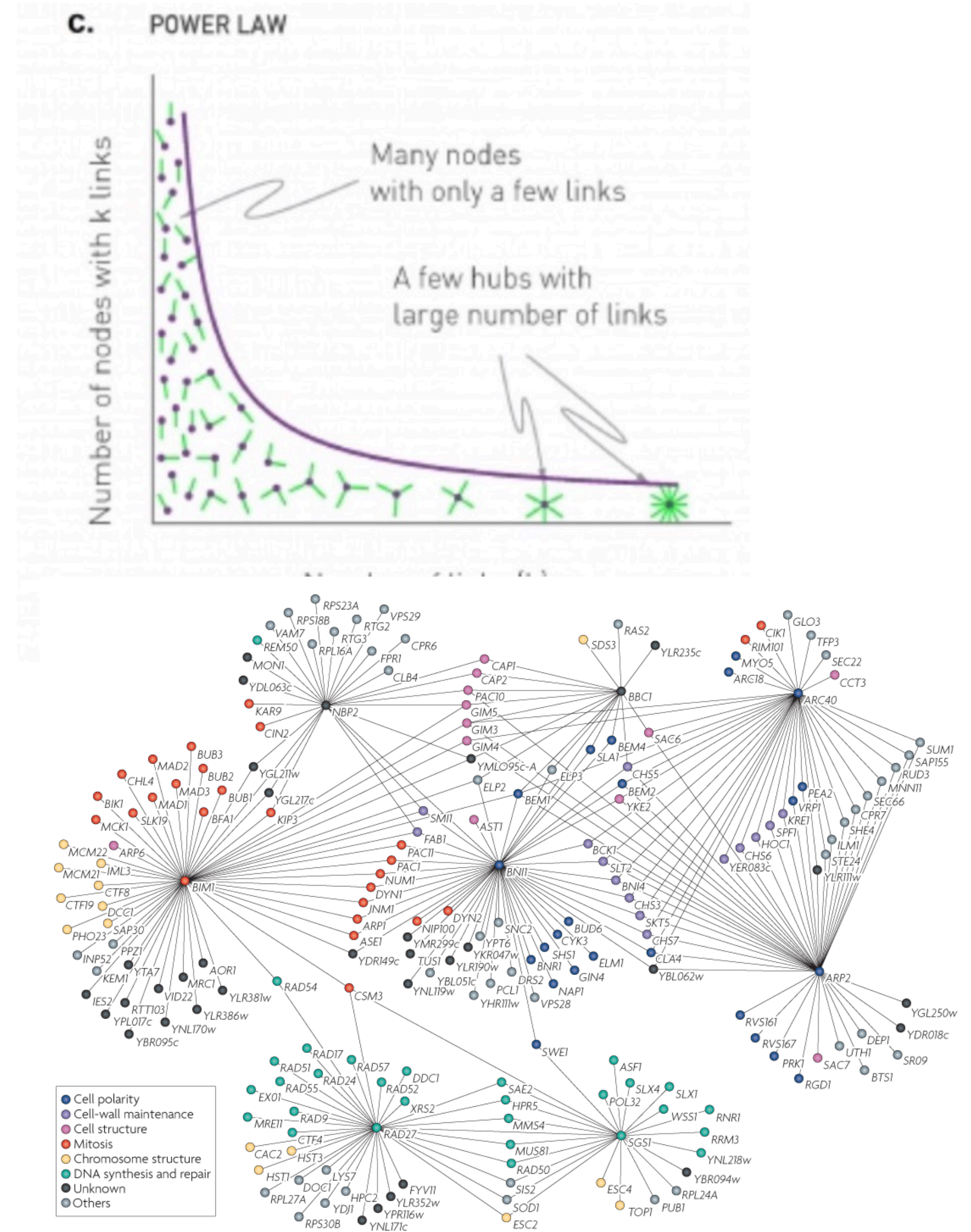


$$P(k) \sim \binom{n}{k} p^k (1-p)^{n-k}$$

$$P(k) \sim k^{-\gamma}$$

Sieci interakcji

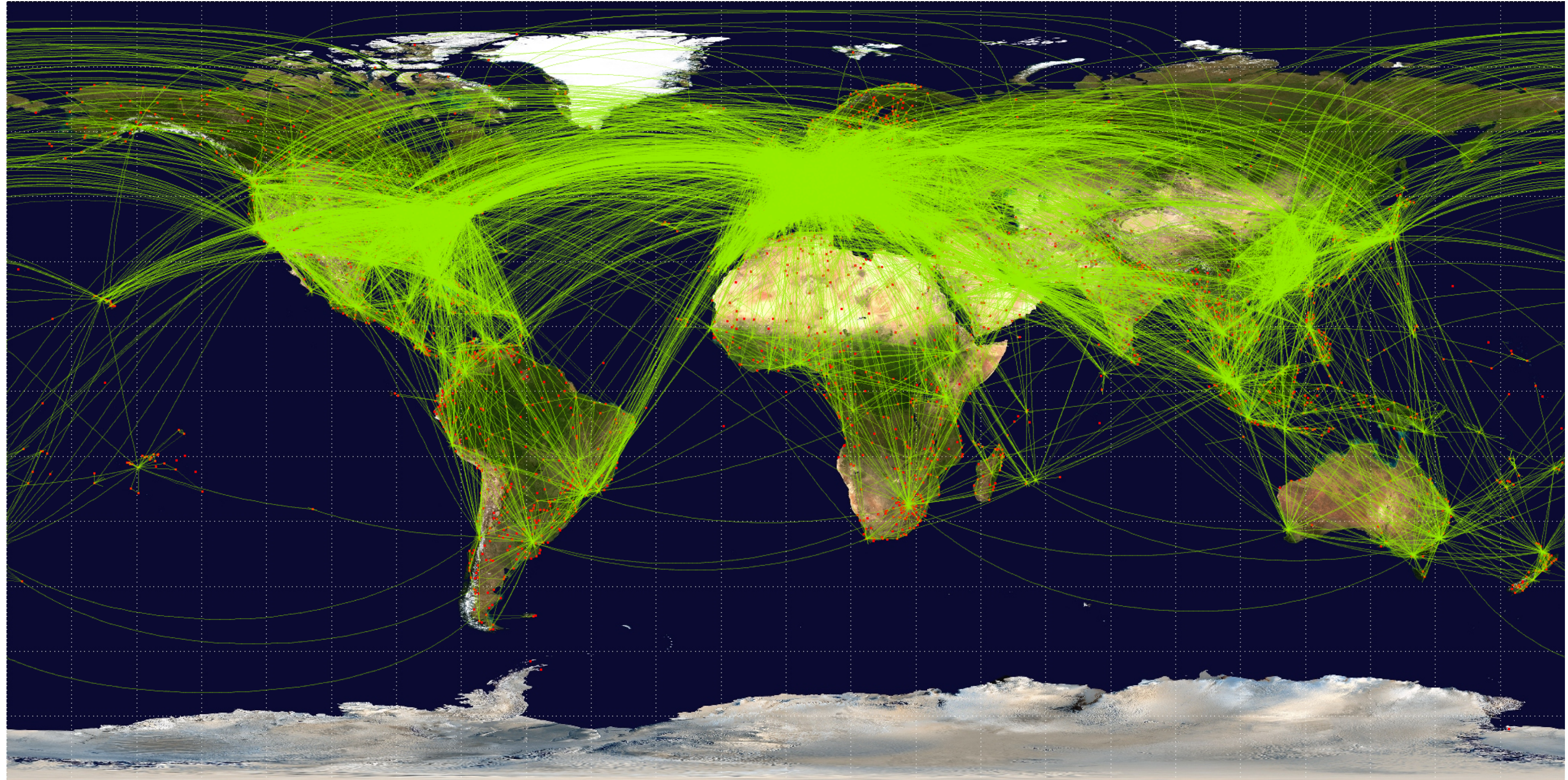
- Sieci interakcji biologicznych mają charakter bezskalowy
- węzły centralne (hubs) z dużą liczbą połączeń
- węzły peryferyjne, z małą liczbą połączeń
- węzły centralne częściej odpowiadają genom niezbywalnym (których defekt jest letalny)



Sieci biologiczne i inne

- Węzły centralne i peryferyjne
- “Mały świat” – długość najkrótszej ścieżki pomiędzy dwoma węzłami jest niewielka (~3,3 węzły u drożdży)
 - Niewielkie zwiększenie odległości przy zwiększaniu liczby węzłów (“ultra mały świat”)
- Podobne właściwości ma np. sieć połączeń lotniczych, WWW, sieci interakcji społecznych, liczba Erdősa wśród matematyków

Świat sieci

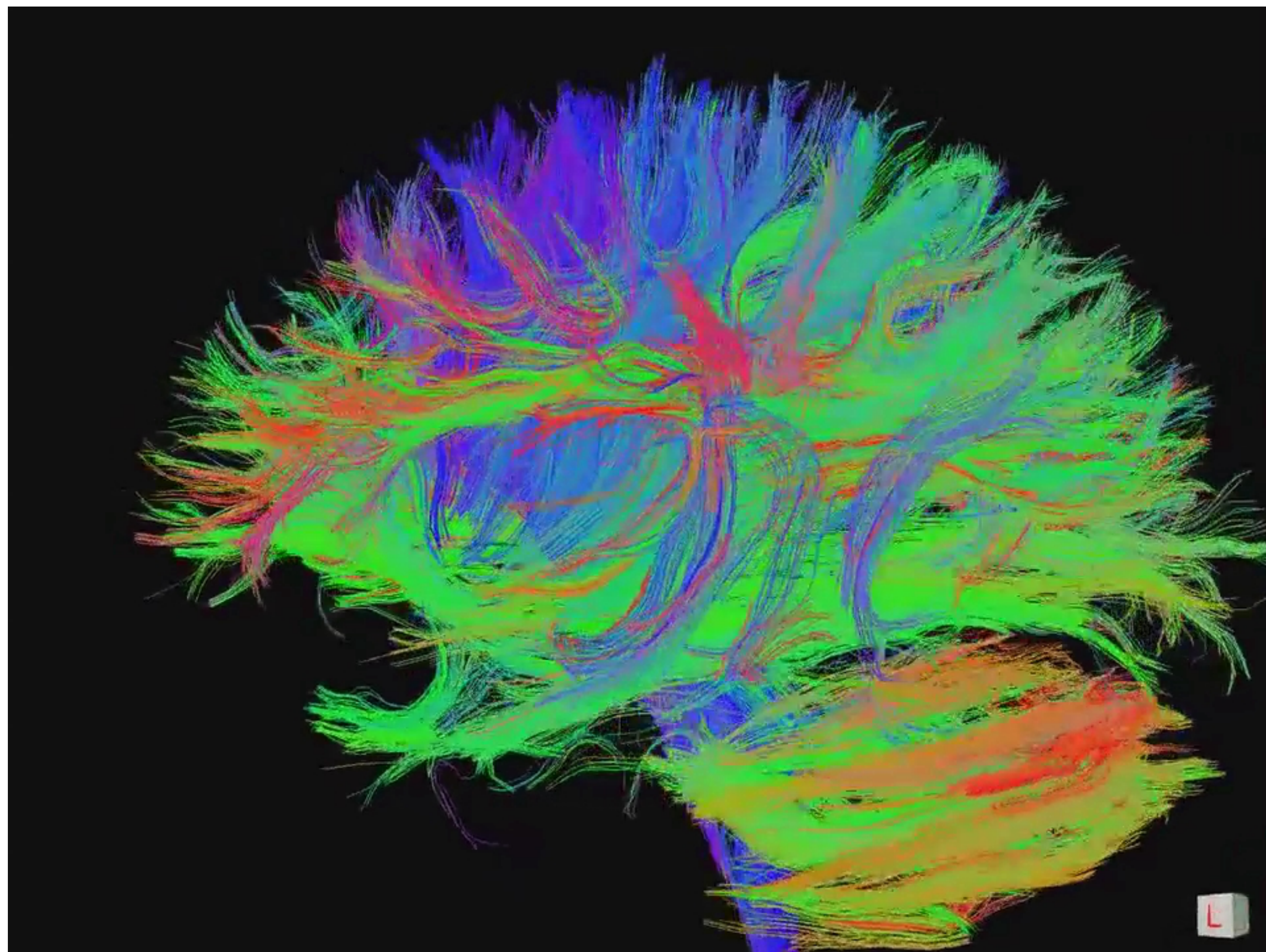
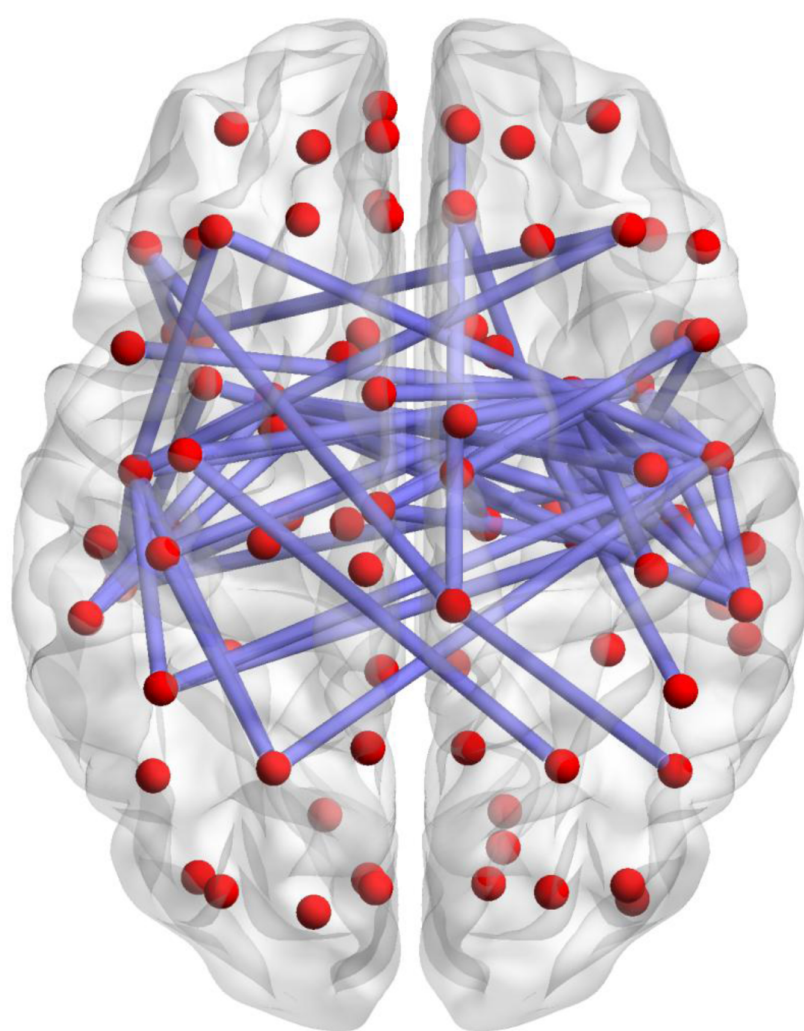
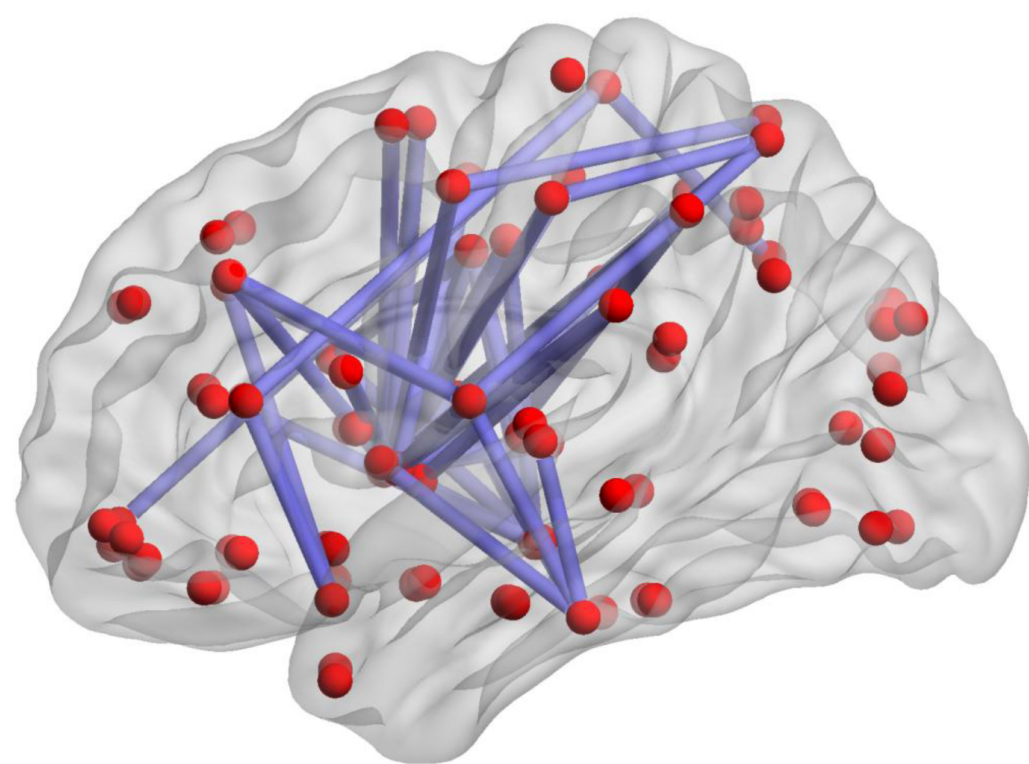


Połączenia lotnicze

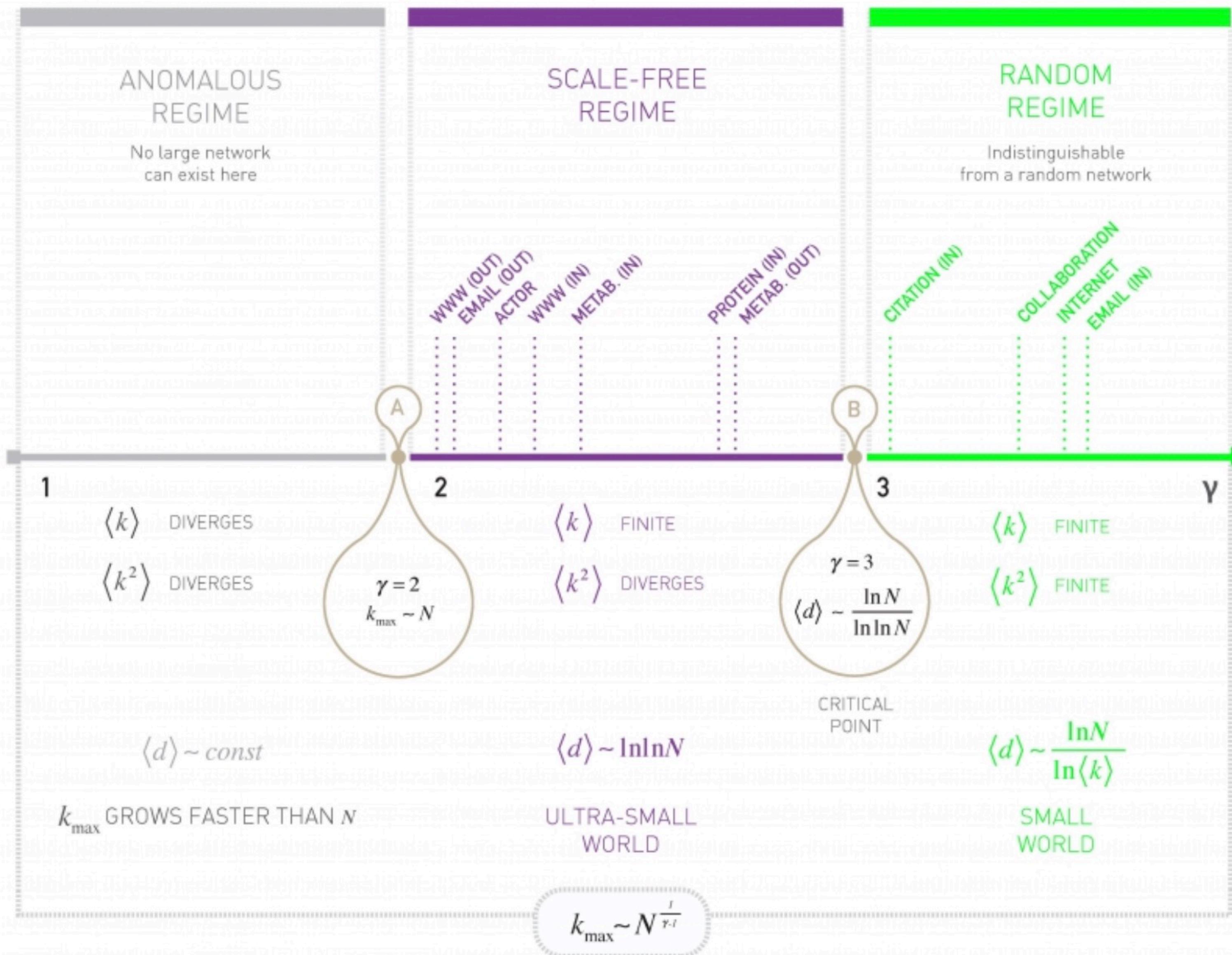


The “Social Graph” behind Facebook

Mózg jest siecią



The γ Dependent Properties of Scale-Free Networks



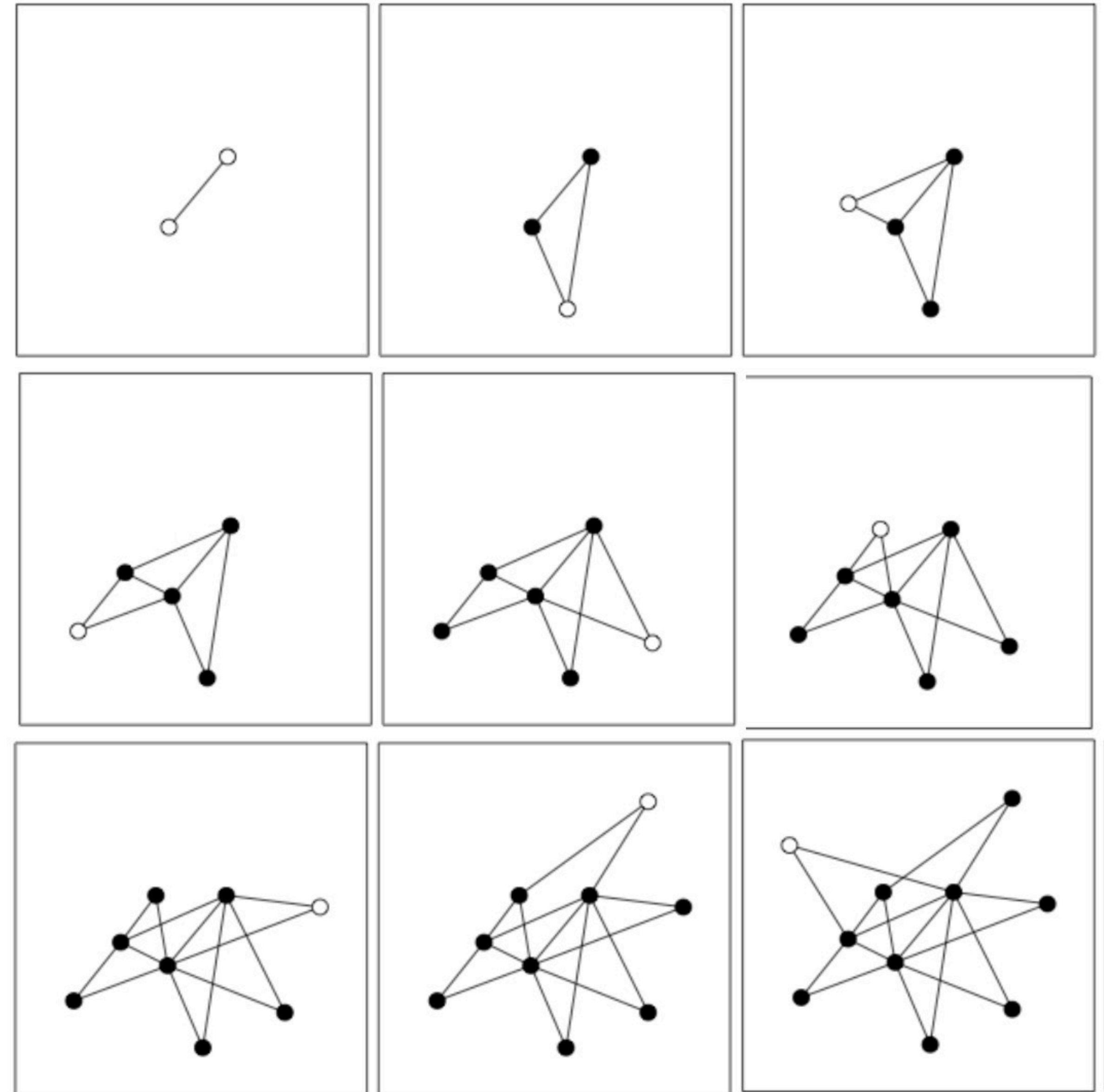
$$P(k) \sim k^{-\gamma}$$

$$2 < \gamma < 3$$

Ewolucja sieci bezskalowych

- Preferencyjne przyłączanie: model Barabásiego-Albert
- Nowy węzeł dołącza do istniejących z prawdopodobieństwem proporcjonalnym do stopnia węzła

$$\Pi(k_i) = \frac{k_i}{\sum k_j}$$

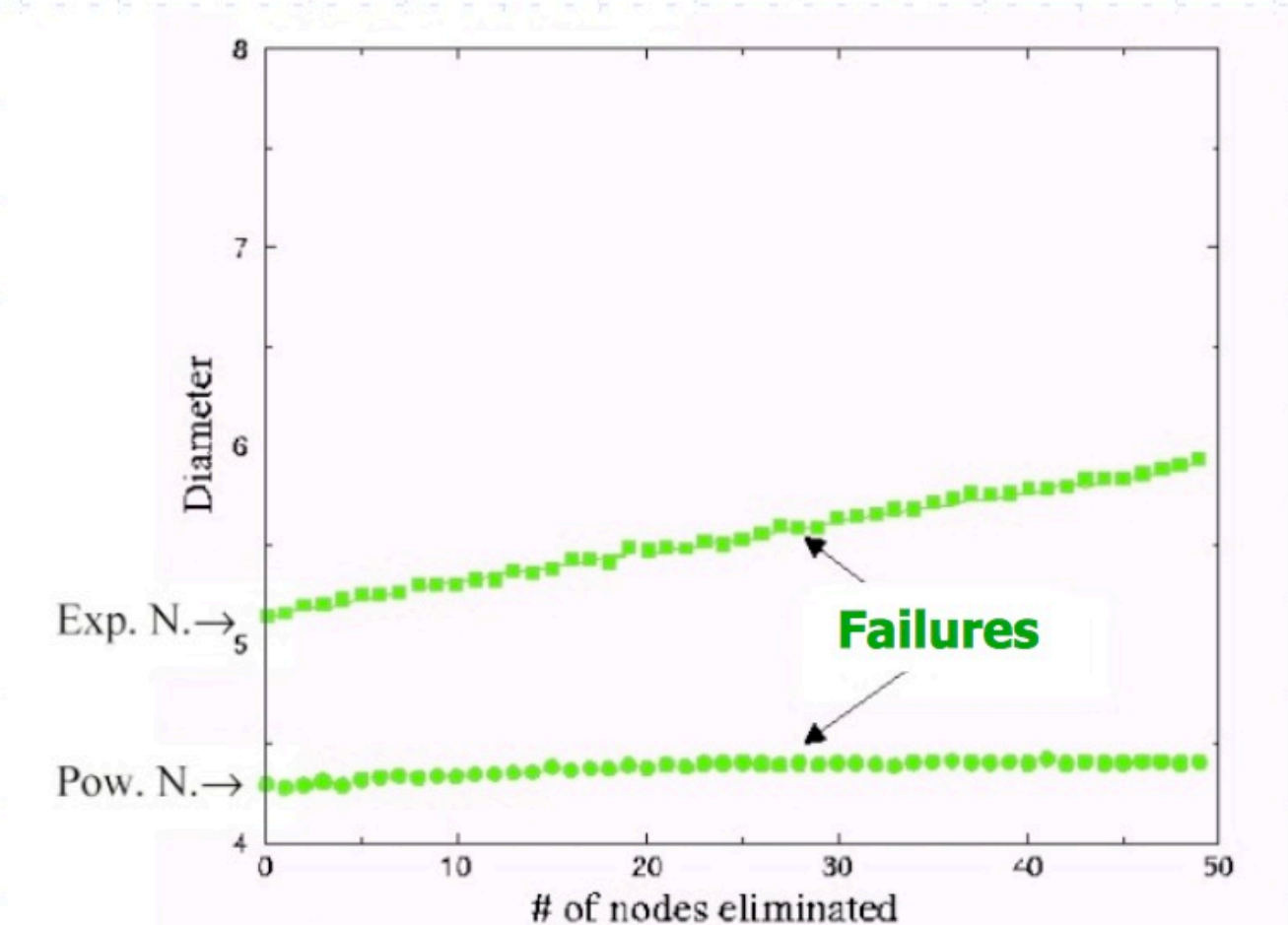
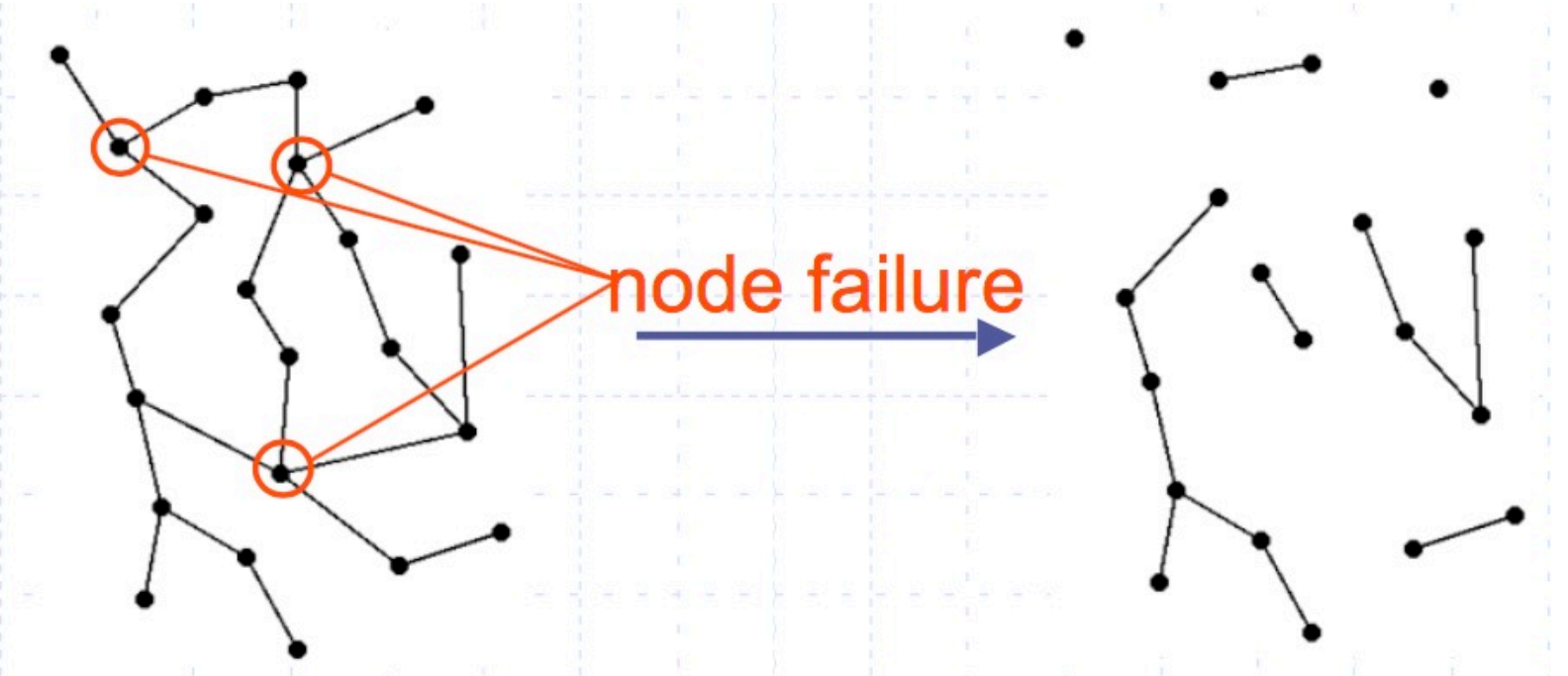
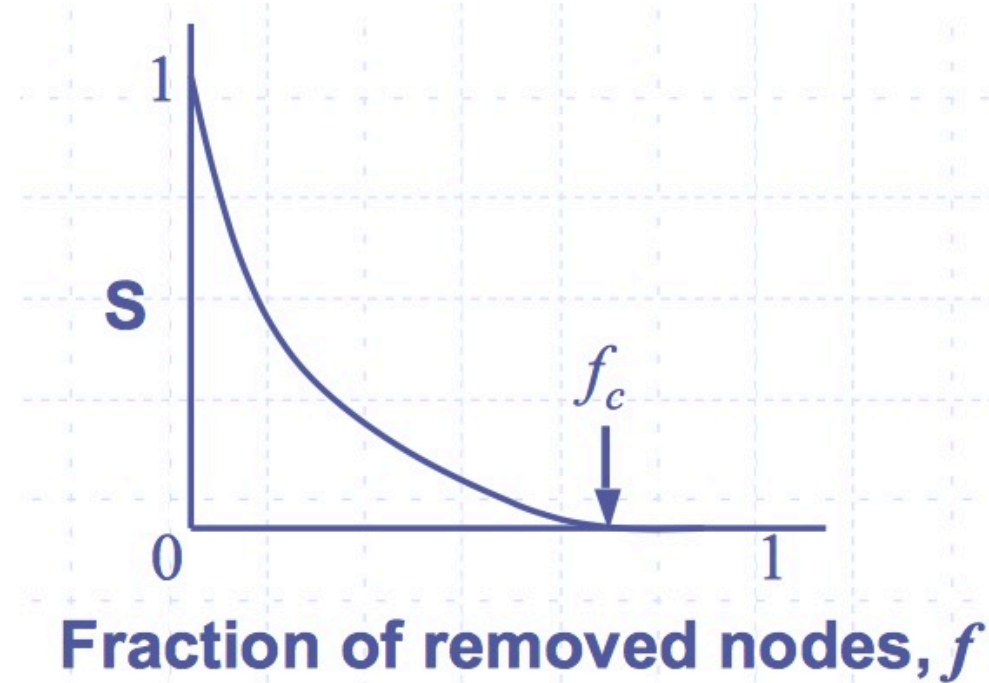


Sieci

- Dwie własności sieci
 - *robustness* (krzepkość) – odporność na zaburzenie np. mutację jednego z elementów)
 - *evolvability* – potencjał zmienności
- Zależą od topologii sieci

Krzepkość sieci

- Sieci bezskalowe są bardziej odporne na przypadkowe zaburzenia niż sieci losowe (wykładnicze)
- Są wrażliwe jeżeli atak skierowany jest na węzły centralne
- wykorzystanie znajomości sieci w projektowaniu leków itp.

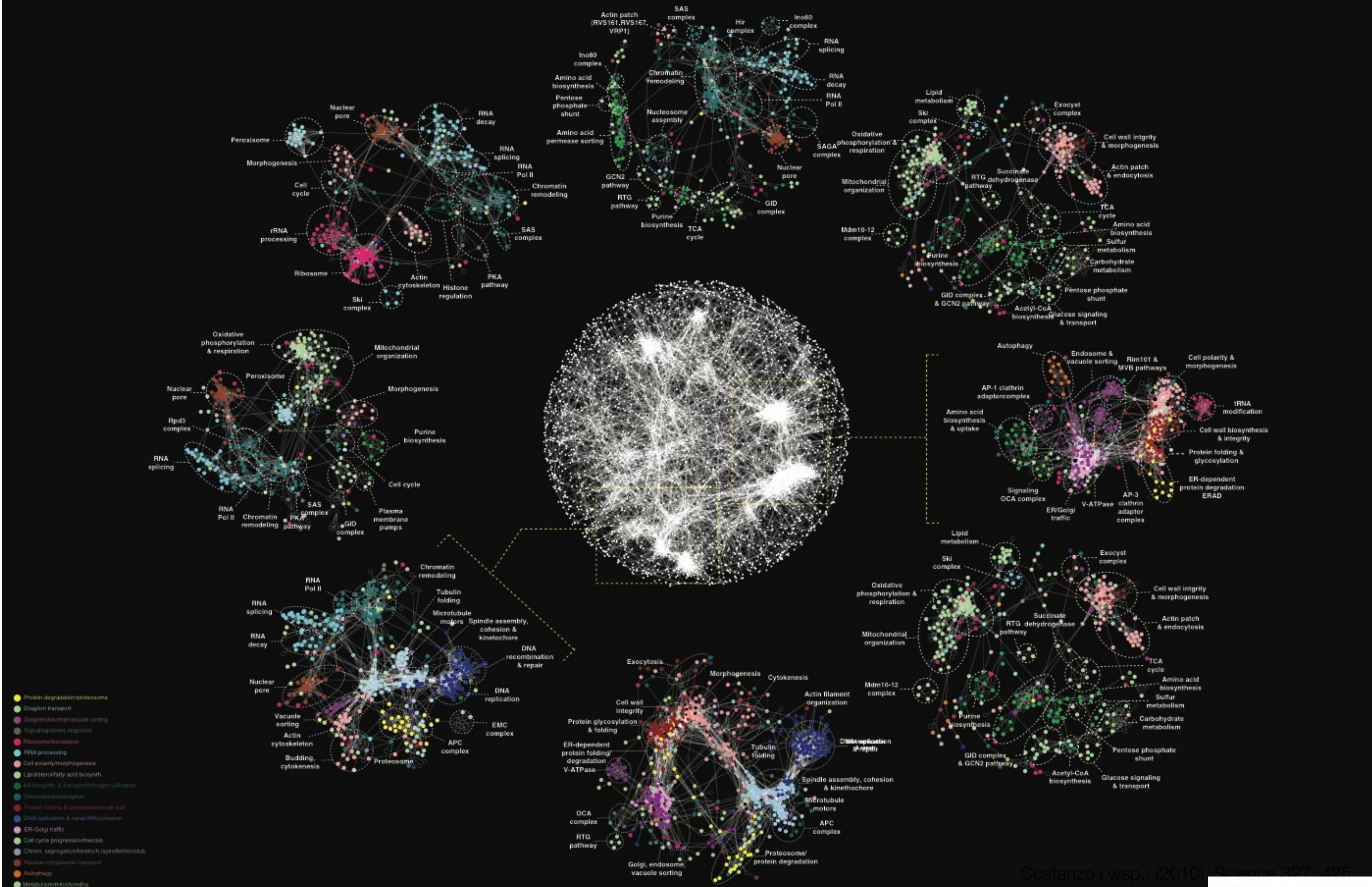


Error and attack tolerance of complex networks
Réka Albert, Hawoong Jeong and Albert-László Barabási
Nature **406**, 378-382(27 July 2000)
doi:10.1038/35019019

Interakcje genetyczne a biologia systemów

- Badanie sieci interakcji funkcjonalnych na skalę całego organizmu to podstawa biologii systemów
- Interakcje genetyczne są ważnym elementem takiej sieci
 - Może nawet bardziej, niż interakcje fizyczne
 - Interakcje fizyczne identyfikują kompleksy, interakcje genetyczne mogą pokazać, w jakim kontekście te kompleksy funkcjonują
- Wszystkie dotychczasowe wyniki są bardzo niekompletne, nawet u drożdży
- Nie ma biologii systemów bez genetyki

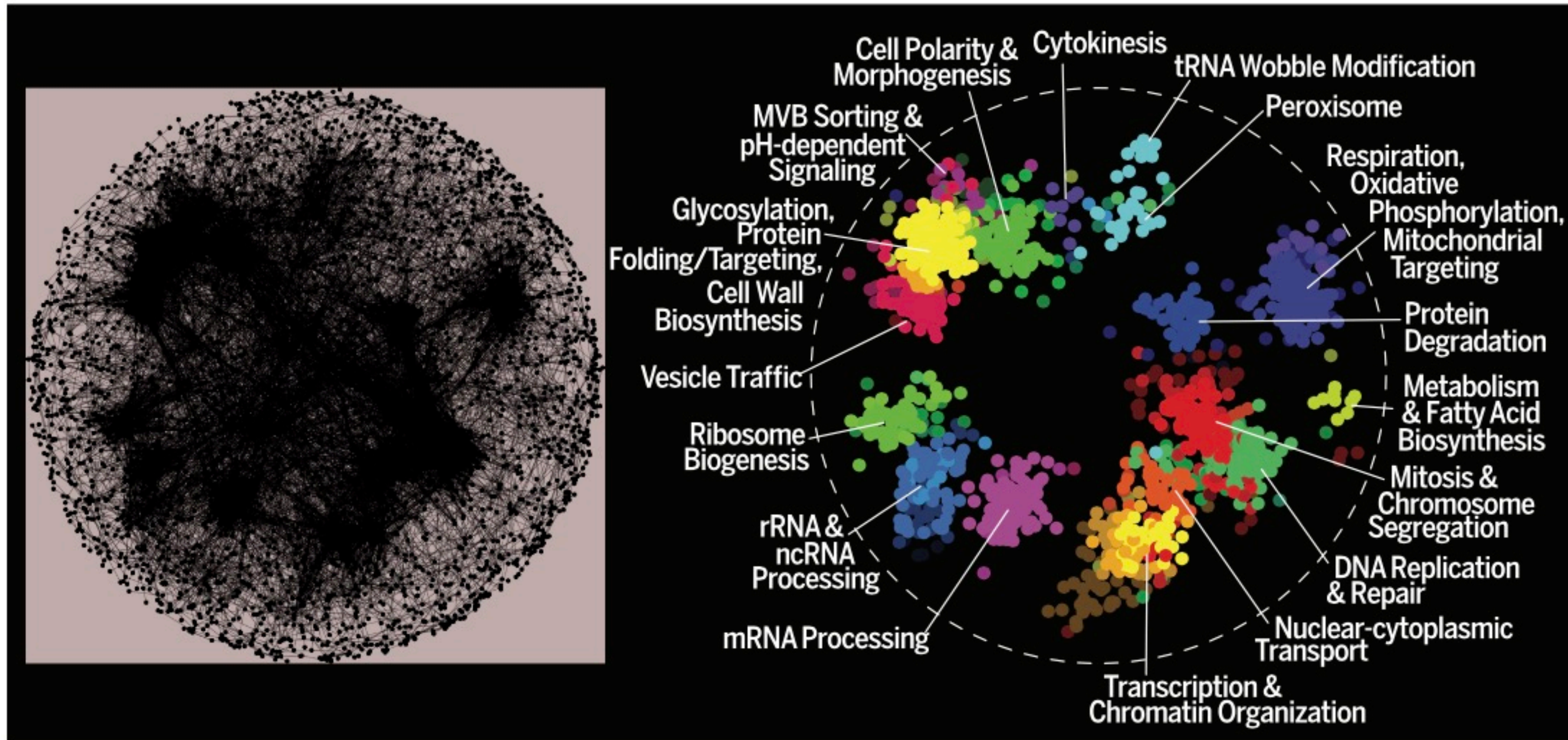
The Genetic Landscape of a Cell



Costanzo et al., (2010) Science 327: 425

A global genetic interaction network maps a wiring diagram of cellular function

Michael Costanzo,* Benjamin VanderSluis,* Elizabeth N. Koch,* Anastasia Baryshnikova,* Carles Pons,* Guihong Tan,* Wen Wang, Matej Usaj, Julia Hanchard, Susan D. Lee, Vicent Pelechano, Erin B. Styles, Maximilian Billmann, Jolanda van Leeuwen, Nydia van Dyk, Zhen-Yuan Lin, Elena Kuzmin, Justin Nelson, Jeff S. Piotrowski, Tharan Srikumar, Sondra Bahr, Yiqun Chen, Raamesh Deshpande, Christoph F. Kurat, Sheena C. Li, Zhijian Li, Mojca Mattiazzi Usaj, Hiroki Okada, Natasha Pascoe, Bryan-Joseph San Luis, Sara Sharifpoor, Emira Shuteriqi, Scott W. Simpkins, Jamie Snider, Harsha Garadi Suresh, Yizhao Tan, Hongwei Zhu, Noel Malod-Dognin, Vuk Janjic, Natasa Przulj, Olga G. Troyanskaya, Igor Stagljar, Tian Xia, Yoshikazu Ohya, Anne-Claude Gingras, Brian Raught, Michael Boutros, Lars M. Steinmetz, Claire L. Moore, Adam P. Rosebrock, Amy A. Caudy, Chad L. Myers,† Brenda Andrews,† Charles Boone†



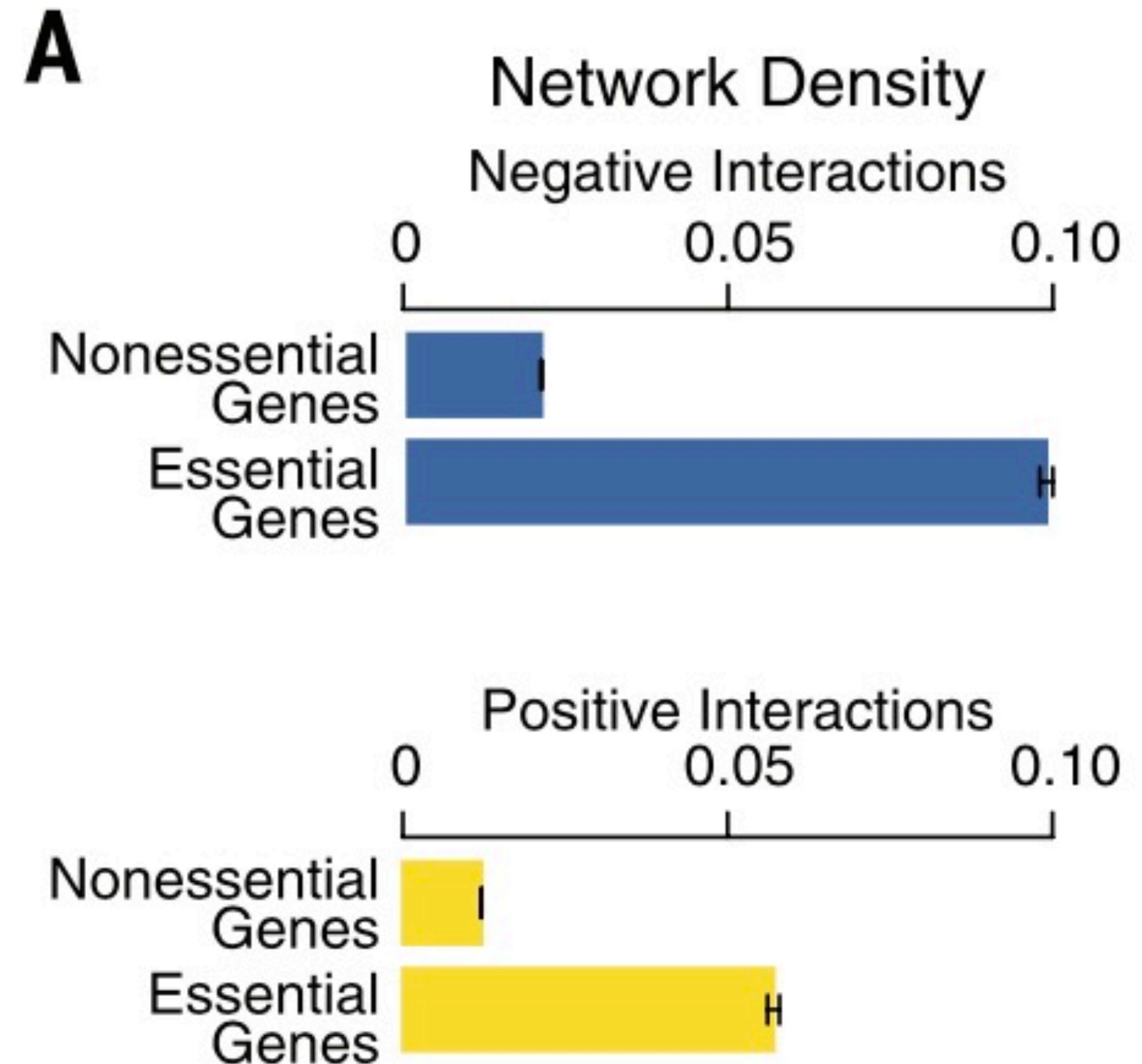
A global network of genetic interaction profile similarities. (Left) Genes with similar genetic interaction profiles are connected in a global network, such that genes exhibiting more similar profiles are located closer to each other, whereas genes with less similar profiles are positioned farther apart. (Right) Spatial analysis of functional enrichment was used to identify and color network regions enriched for similar Gene Ontology bioprocess terms.

Niezbywalność a interakcje

- Węzły odpowiadające genom niezbywalnym (*essential*) mają więcej interakcji (wyższy stopień)

A global genetic interaction network maps a wiring diagram of cellular function

Michael Costanzo,* Benjamin VanderSluis,* Elizabeth N. Koch,* Anastasia Baryshnikova,* Carles Pons,* Guihong Tan,* Wen Wang, Matej Usaj, Julia Hanchard, Susan D. Lee, Vicent Pelechano, Erin B. Styles, Maximilian Billmann, Jolanda van Leeuwen, Nydia van Dyk, Zhen-Yuan Lin, Elena Kuzmin, Justin Nelson, Jeff S. Piotrowski, Tharan Srikumar, Sondra Bahr, Yiqun Chen, Raamesh Deshpande, Christoph F. Kurat, Sheena C. Li, Zhijian Li, Mojca Mattiazzi Usaj, Hiroki Okada, Natasha Pascoe, Bryan-Joseph San Luis, Sara Sharifpoor, Emira Shuteriqi, Scott W. Simpkins, Jamie Snider, Harsha Garadi Suresh, Yizhao Tan, Hongwei Zhu, Noel Malod-Dognin, Vuk Janjic, Natasa Przulj, Olga G. Troyanskaya, Igor Stagjar, Tian Xia, Yoshikazu Ohya, Anne-Claude Gingras, Brian Raught, Michael Boutros, Lars M. Steinmetz, Claire L. Moore, Adam P. Rosebrock, Amy A. Caudy, Chad L. Myers,† Brenda Andrews,† Charles Boone†



Interakcje genetyczne a fizyczne

- Produkty w różnych kompleksach - częstsze interakcje negatywne
- Produkty w tym samym kompleksie - częstsze pozytywne (ale tylko dla genów nie będących niezbywalnymi)

A global genetic interaction network maps a wiring diagram of cellular function

Michael Costanzo,* Benjamin VanderSluis,* Elizabeth N. Koch,* Anastasia Baryshnikova,* Carles Pons,* Gulhong Tan,* Wen Wang, Matej Usaj, Julia Hanchard, Susan D. Lee, Vicent Pelechano, Erin B. Styles, Maximilian Billmann, Jolanda van Leeuwen, Nydia van Dyk, Zhen-Yuan Lin, Elena Kuzmin, Justin Nelson, Jeff S. Piotrowski, Tharan Srikumar, Sondra Bahr, Yiqun Chen, Raamesh Deshpande, Christoph F. Kurat, Sheena C. Li, Zhijian Li, Mojca Mattiazzi Usaj, Hiroki Okada, Natasha Pascoe, Bryan-Joseph San Luis, Sara Sharifpoor, Emira Shuteriqi, Scott W. Simpkins, Jamie Snider, Harsha Garadi Suresh, Yizhao Tan, Hongwei Zhu, Noel Malod-Dognin, Vuk Janjic, Natasa Przulj, Olga G. Troyanskaya, Igor Stagijar, Tian Xia, Yoshikazu Ohya, Anne-Claude Gingras, Brian Raught, Michael Boutros, Lars M. Steinmetz, Claire L. Moore, Adam P. Rosebrock, Amy A. Caudy, Chad L. Myers,† Brenda Andrews,† Charles Boone†

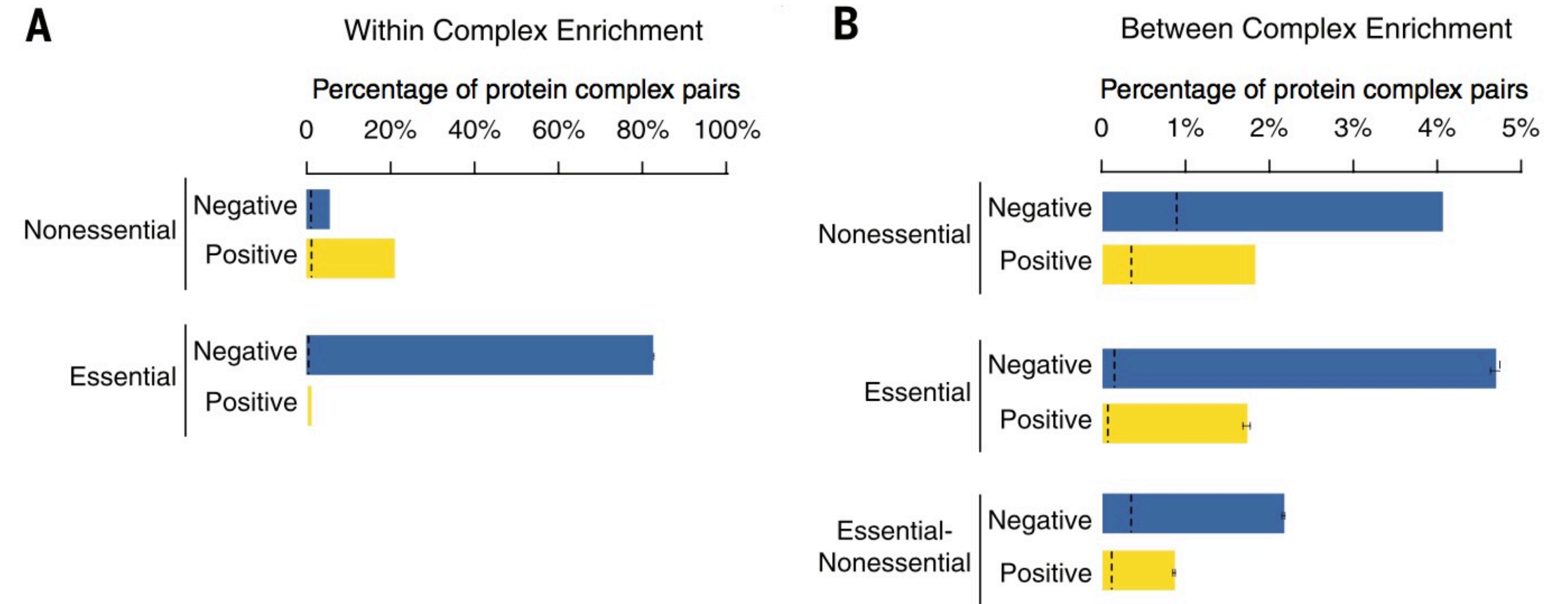


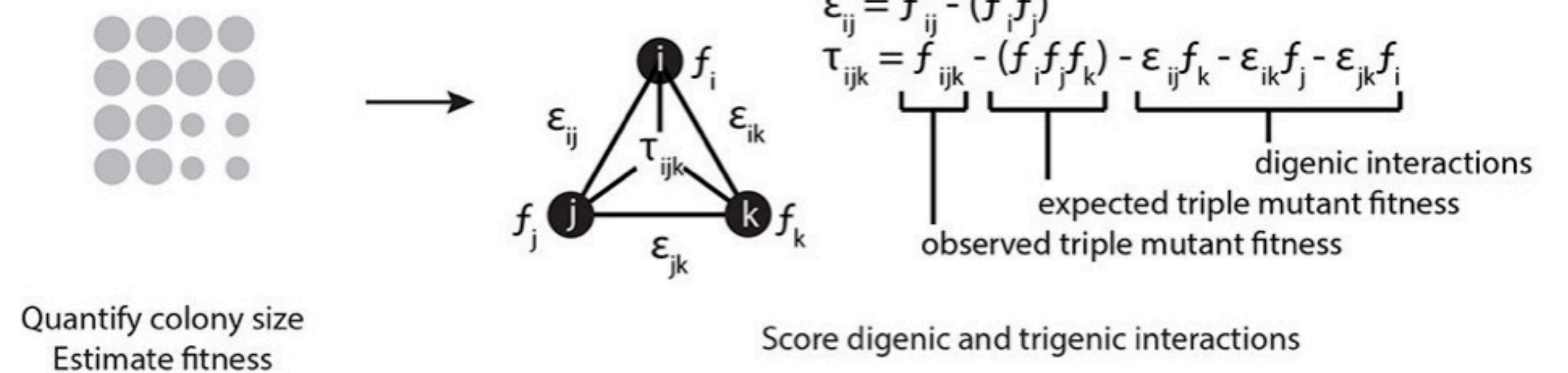
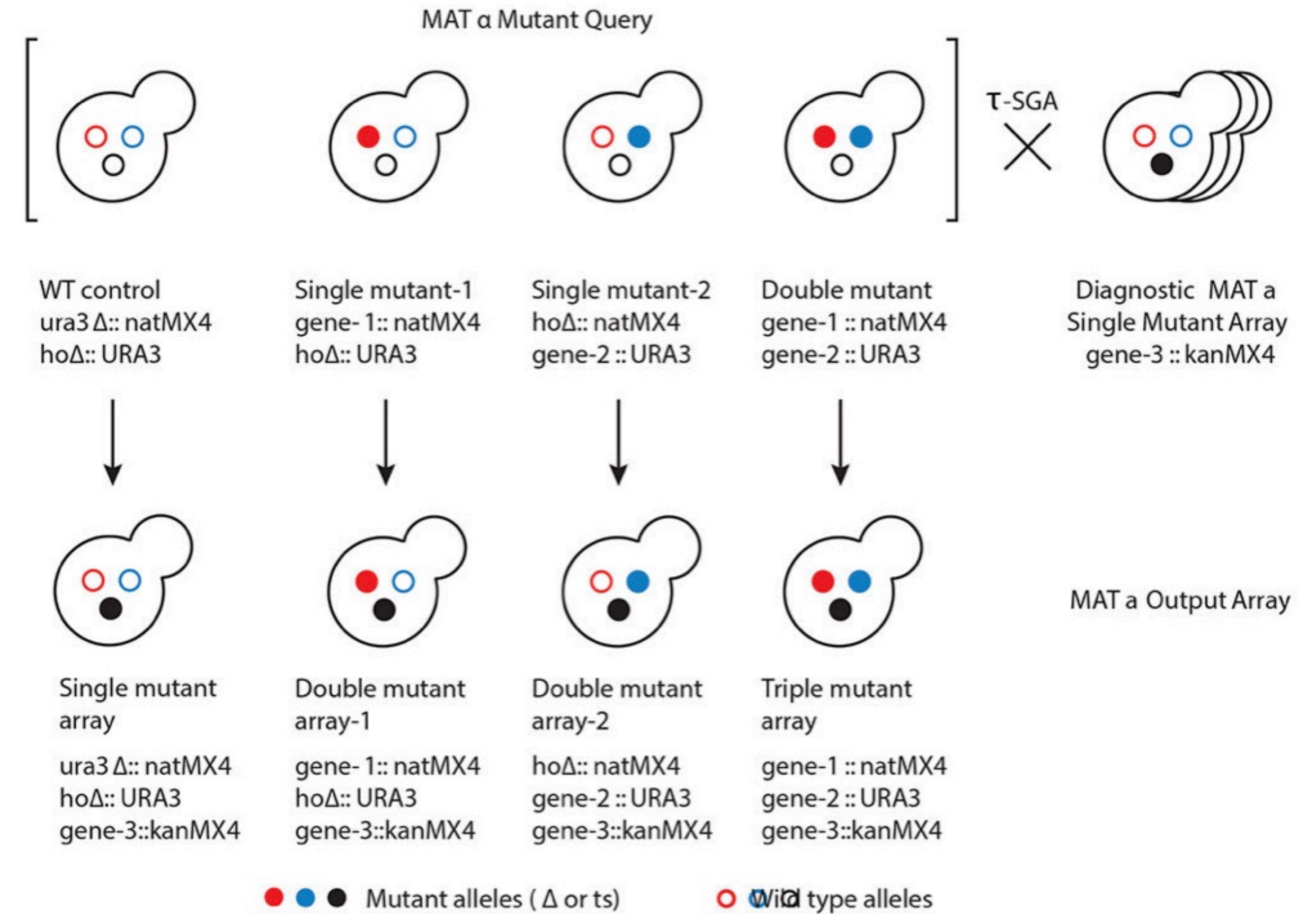
Fig. 8. Genetic interactions within and between protein complexes. (A) The percentage of nonessential and essential complexes whose members were enriched for genetic interactions with each other and biased (i.e., coherent) for either mostly negative (blue) or mostly positive (yellow) interactions. (B) The percentage of nonessential-nonessential, essential-essential, or essential-nonessential complex-complex pairs found to be enriched for genetic interactions and biased (i.e., coherent) for either mostly negative (blue) or mostly positive (yellow) interactions. Black dashed lines indicate the background rate of coherent genetic interaction enrichment within individual complexes or between pairs of protein complexes. Error bars indicate the standard deviation across multiple samplings of different alleles for the same essential genes, where each gene is represented by a single, randomly selected allele in each sampling.

Przyszłość

- Systematyczne badania interakcji genetycznych są obecnie w fazie początkowej
- Zagadnienia na przyszłość:
 - Oddziaływania wyższego rzędu niż podwójne (3 i więcej genów)
 - Wpływ środowiska i tła genetycznego
 - Allele inne, niż delecja (null) i nadekspresja – mniej ekstremalne formy zmienności genetycznej
 - Systematyczne analizy w innych, bardziej złożonych organizmach

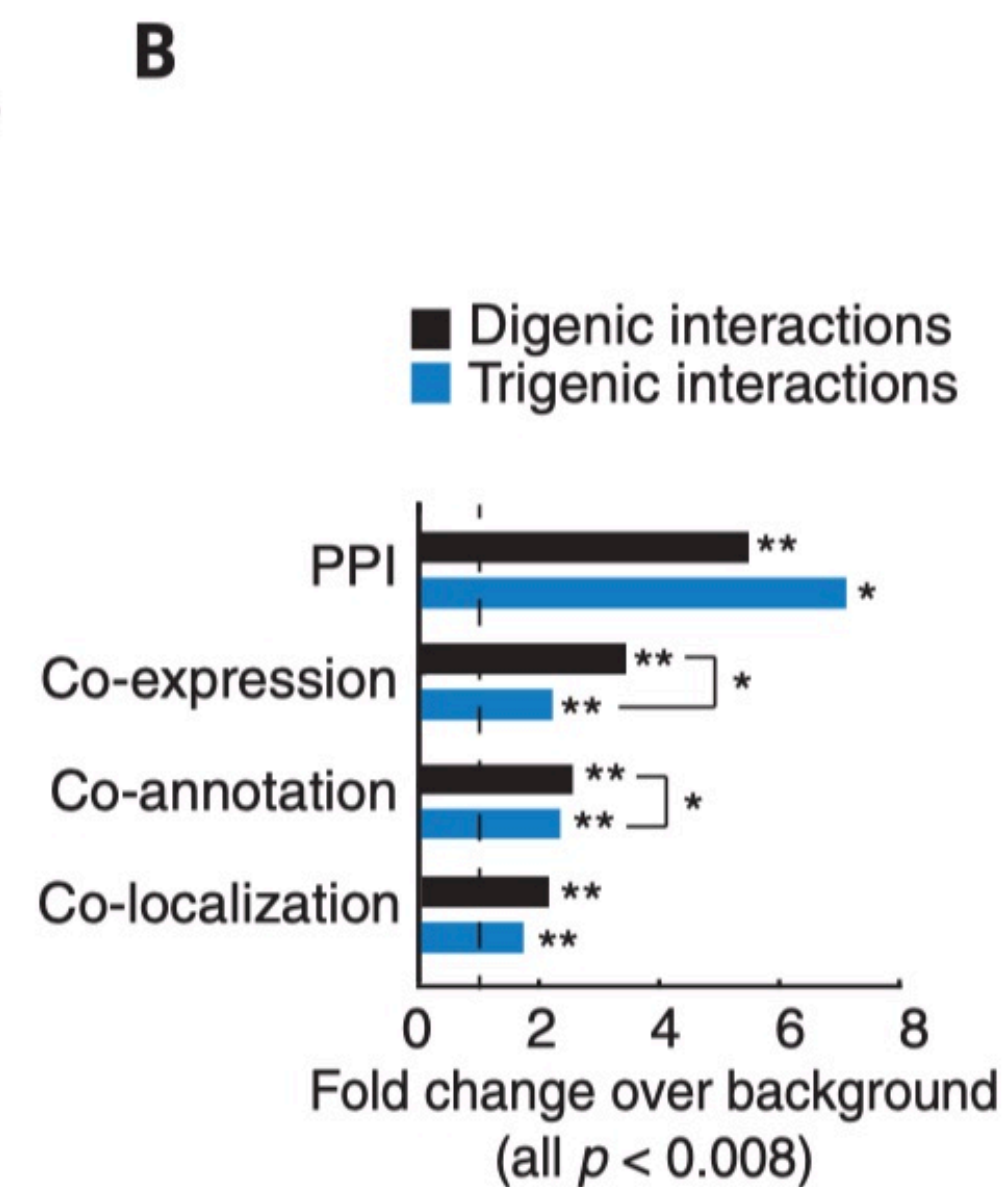
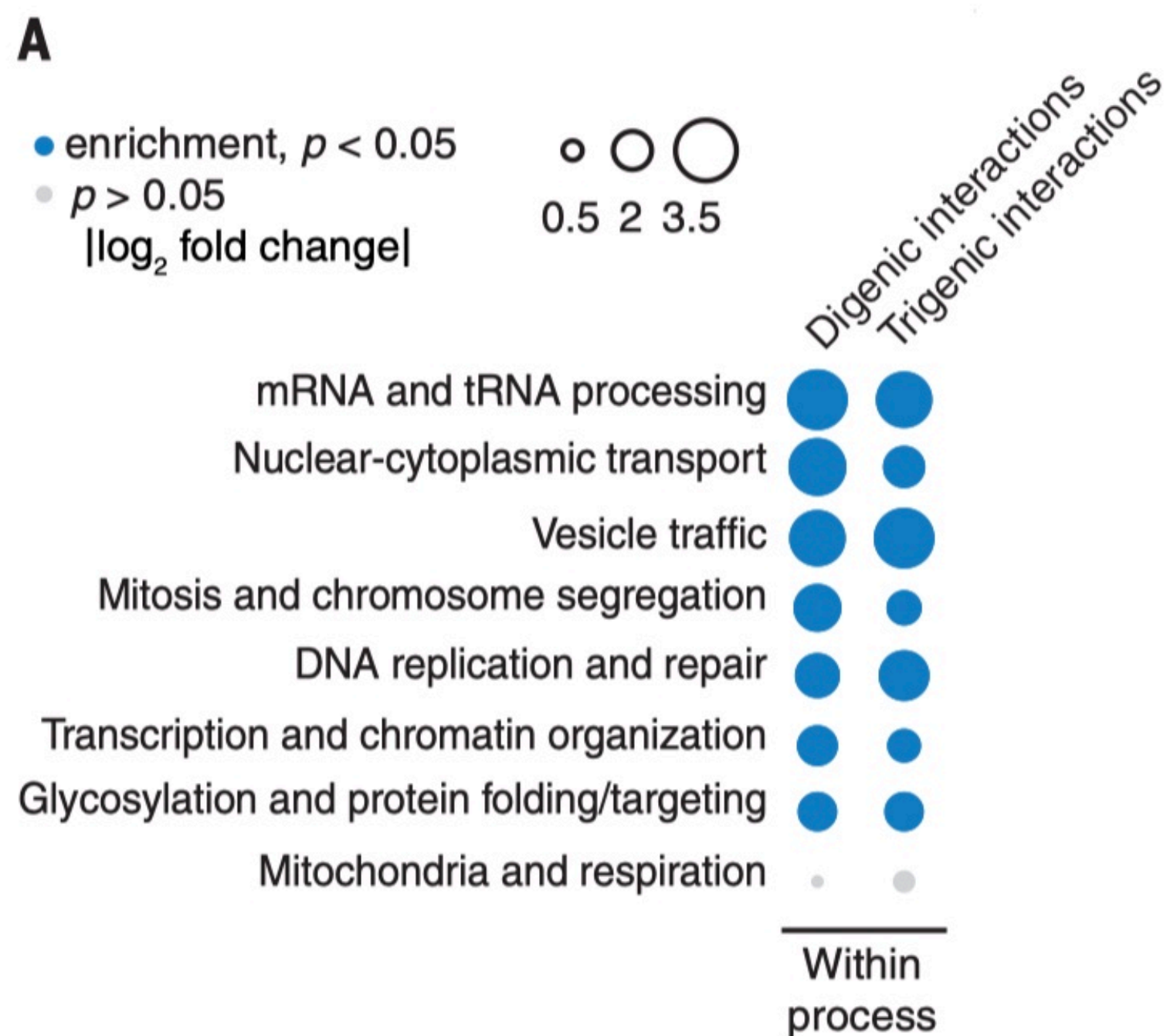
τ -SGA

- Poszukiwanie interakcji syntetycznych pomiędzy trzema genami
- Trzy szczepy "query": dwa pojedyncze mutanty + podwójny (+ kontrola WT)
- Krzyżowanie z biblioteką daje mutanty podwójne i potrójne



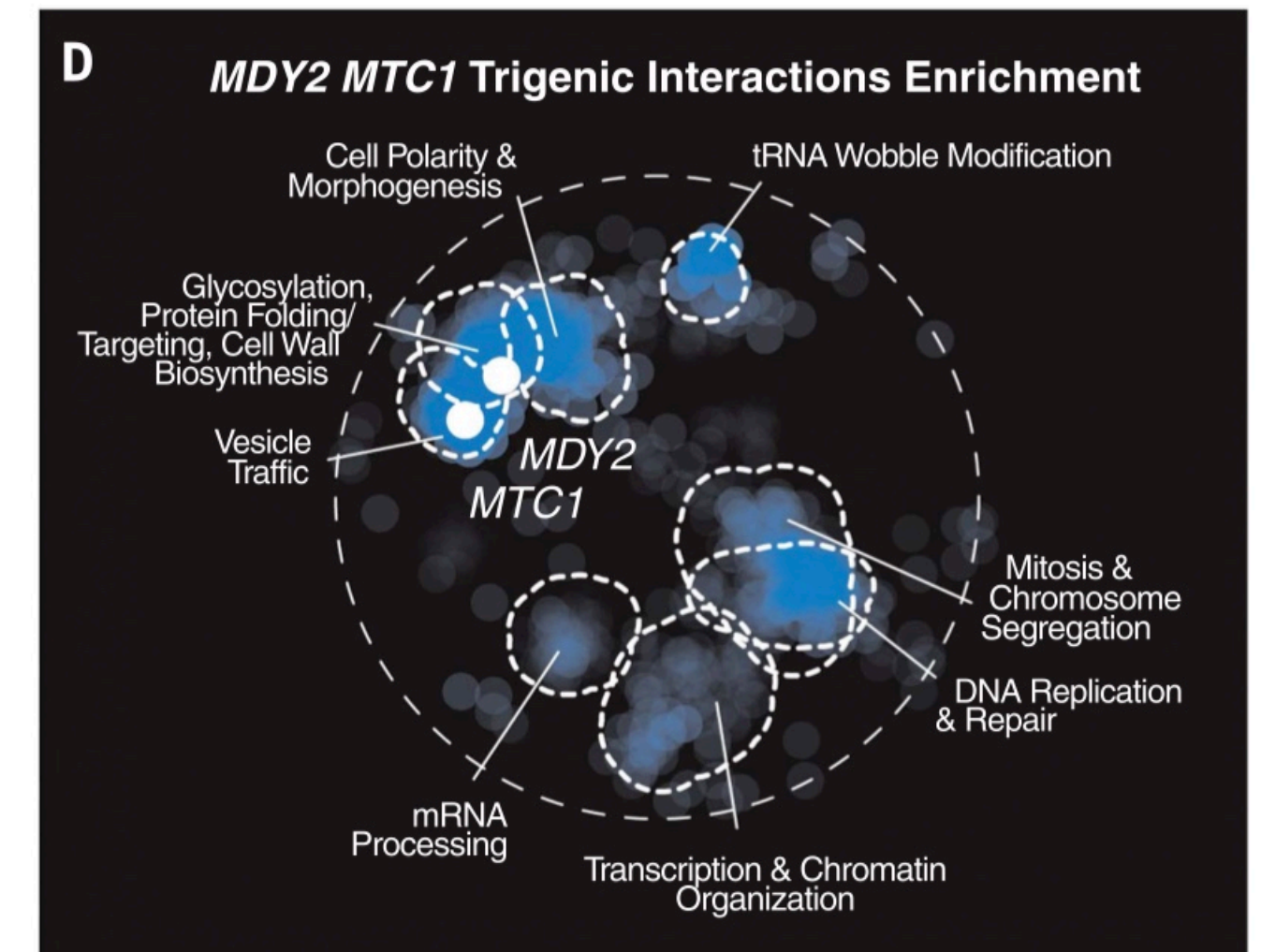
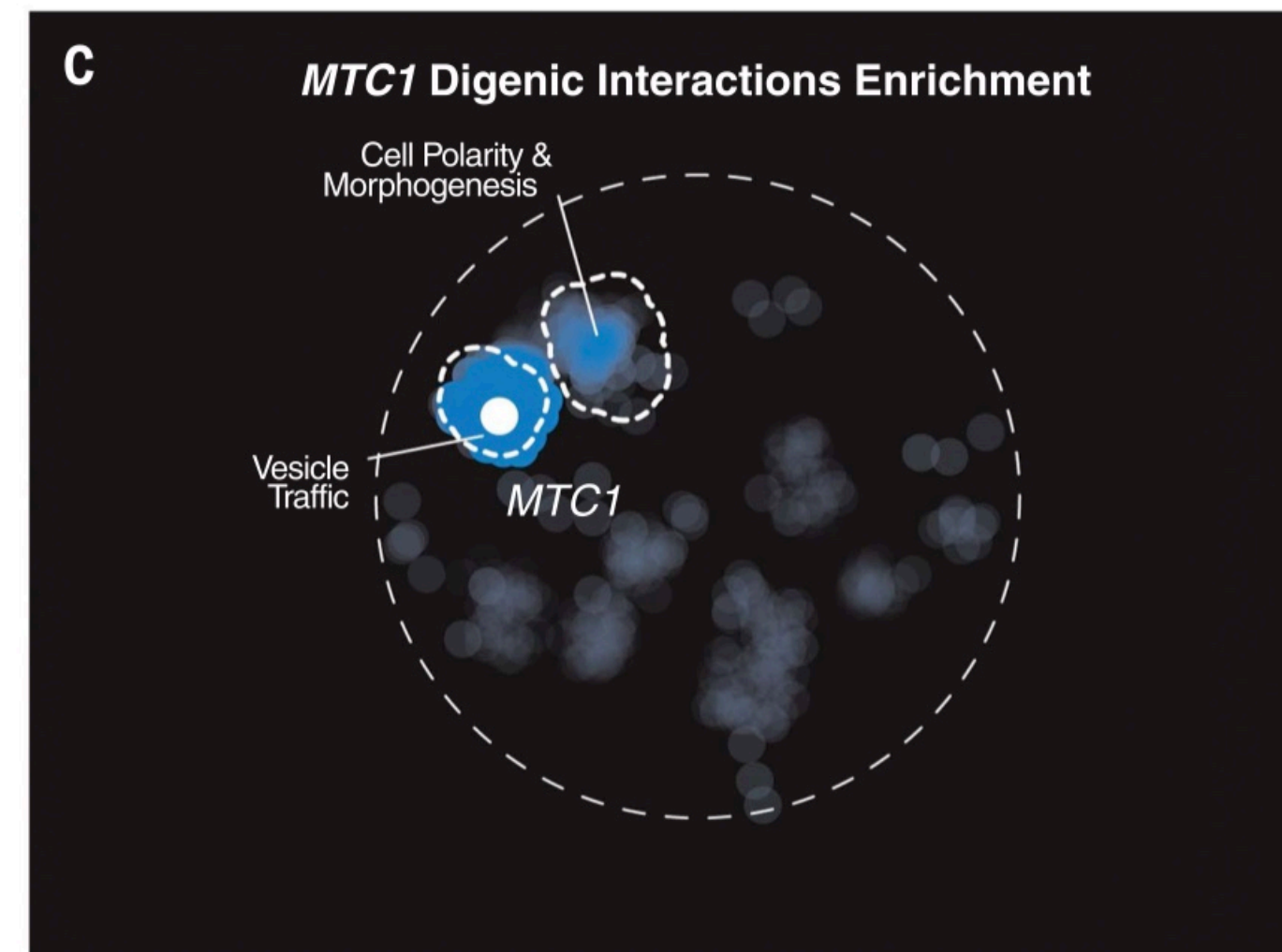
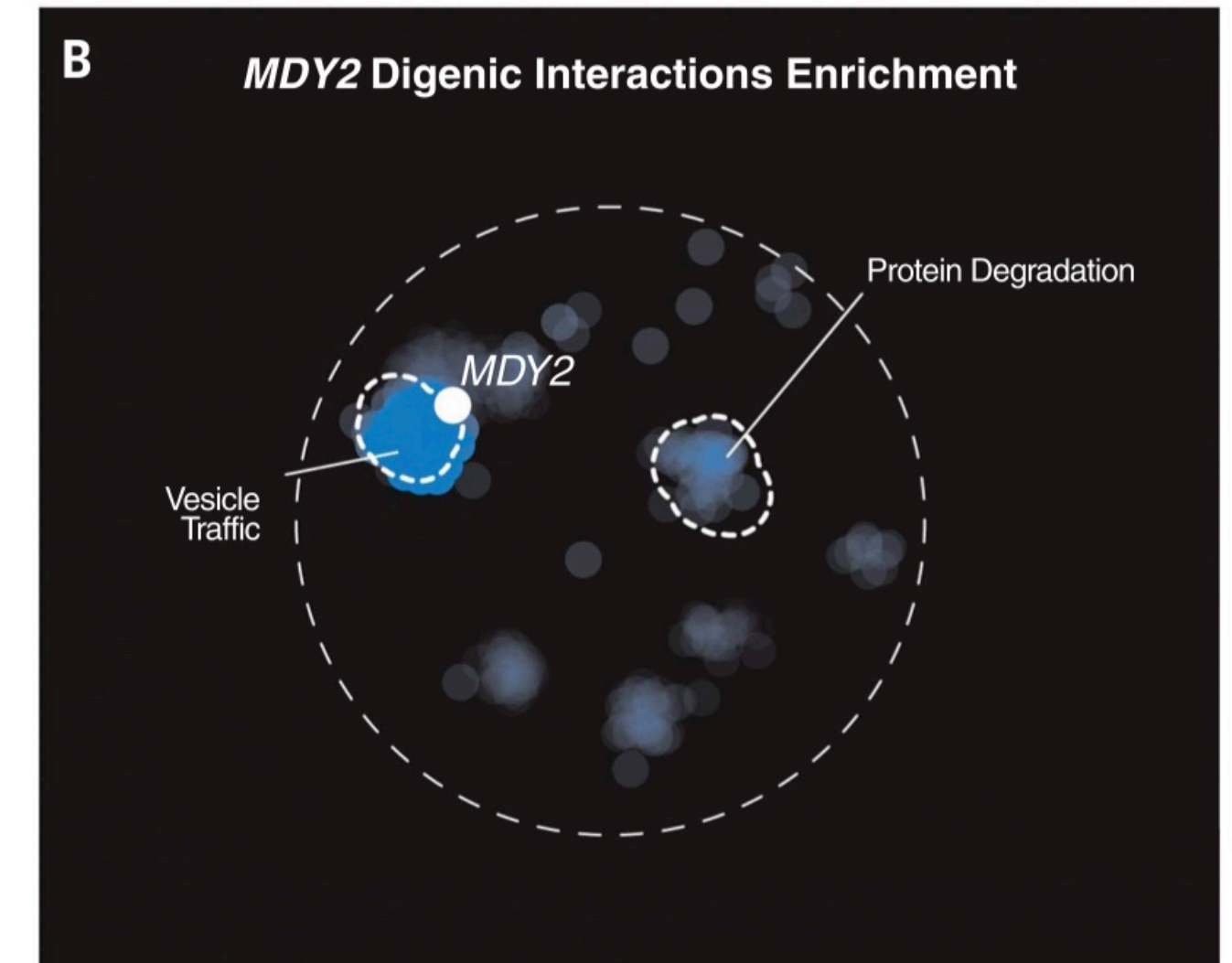
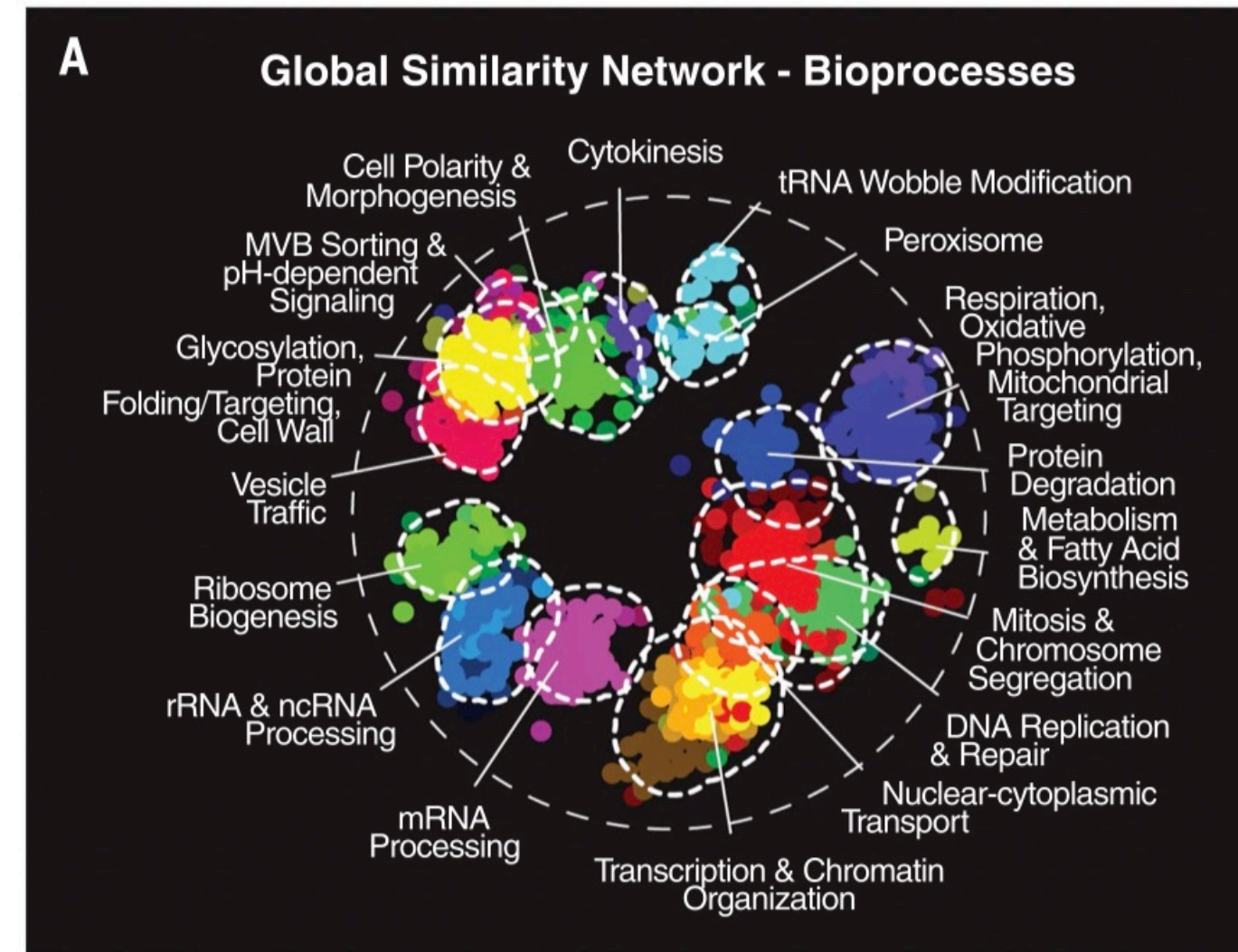
T-SGA

- Interakcje trójgenowe istotnie wzbogacają sieć interaktomu



Interakcje trójgenowe istotnie wzbogacają sieć interaktomu

- *MDY2* - szlak GET (guided entry of tail-anchor) - kierowanie białek do ER
- *MTC1* - białko o nieznannej funkcji, lokalizacja w ap. Golgiego
- Interakcje dwugenowe związane z procesami transportu
- Interakcje trójgenowe - też inne procesy



Biologia molekularna genu

Replikacja i stabilność genomu

Lektura

- Allison, rozdziały 2 i 6
- Brown, rozdział 15
- Zakładam znajomość podstaw biochemii kwasów nukleinowych (budowa DNA i RNA)

Funkcje informacji genetycznej

- **Replikacja**

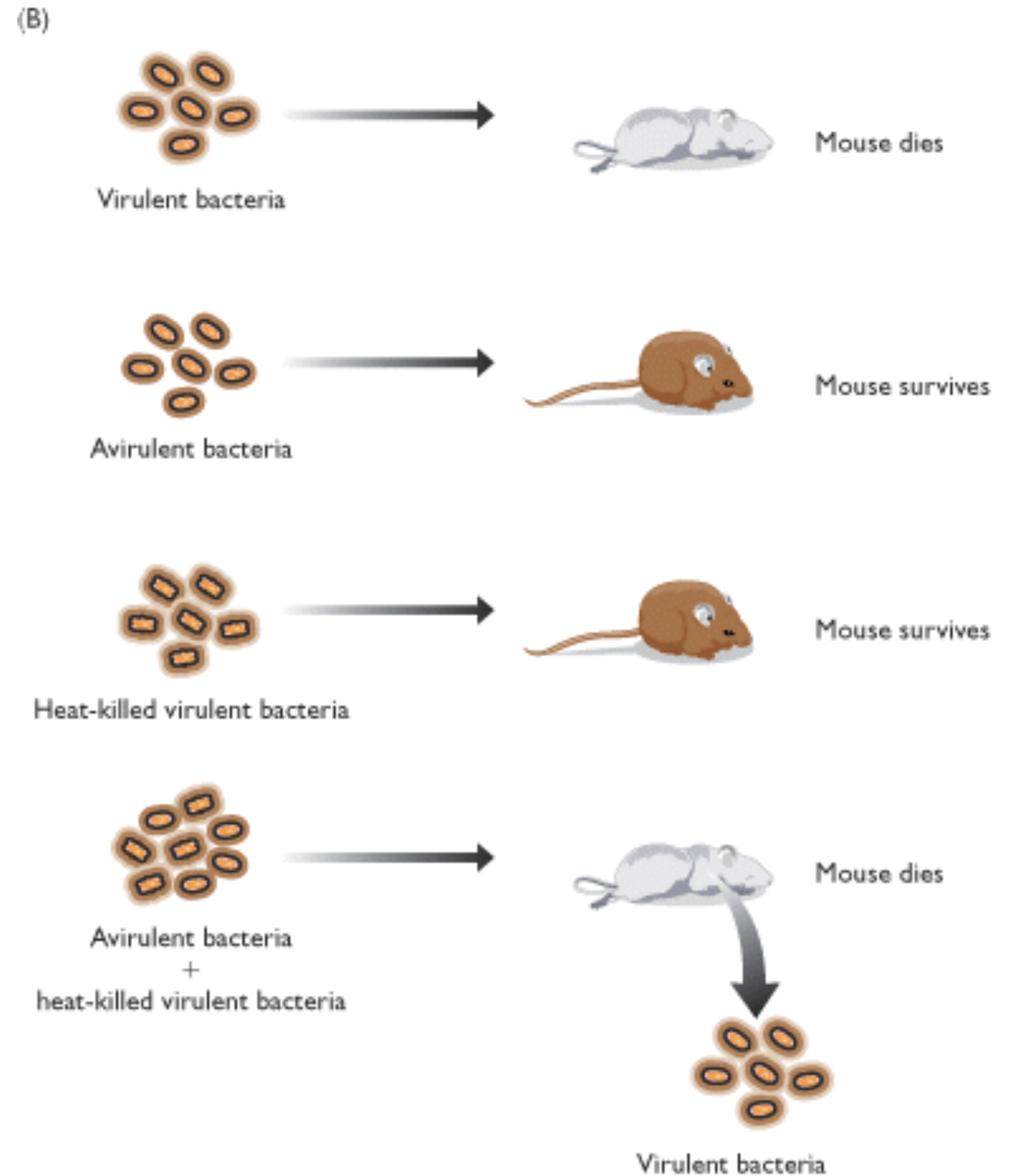
- powielanie genomu, utrzymywanie stabilności genomu

- **Ekspresja**

- Odczytywanie informacji, niezbędne do funkcjonowania komórki
- Regulowana

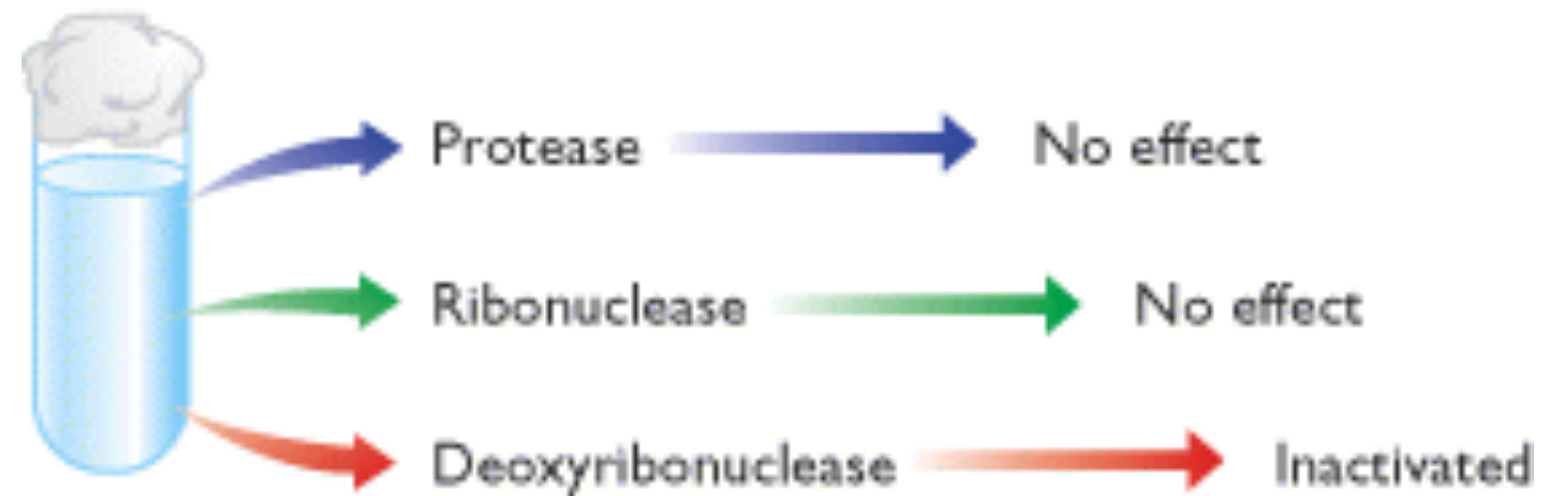
Materiał genetyczny - natura fizyczna

- Eksperyment Griffitha (1928)
- Bakterie zawierają „czynnik transformujący, zdolny do przekazania informacji z martwych bakterii do żywych



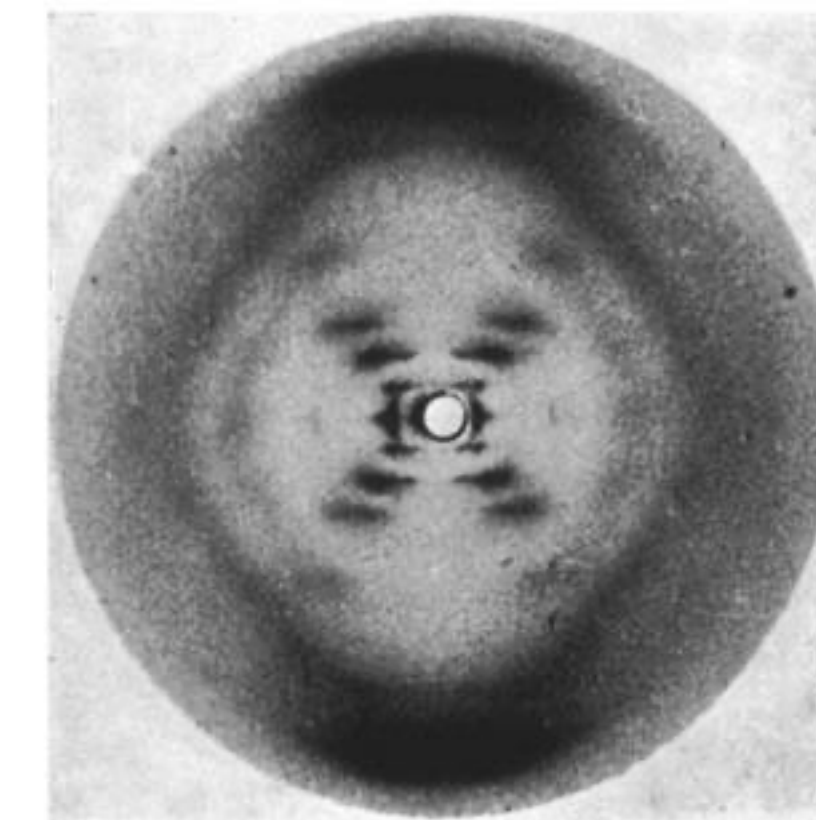
Natura materiału genetycznego

- Avery, MacLeod, McCarthy (1943)
- Czynnikiem transformującym jest DNA



Materiał genetyczny

- Materiałem genetycznym są kwasy nukleinowe
- Materiałem genetycznym organizmów komórkowych jest kwas deoksyrybonukleinowy (DNA)
- Struktura DNA: Franklin, Watson, Crick, 1953



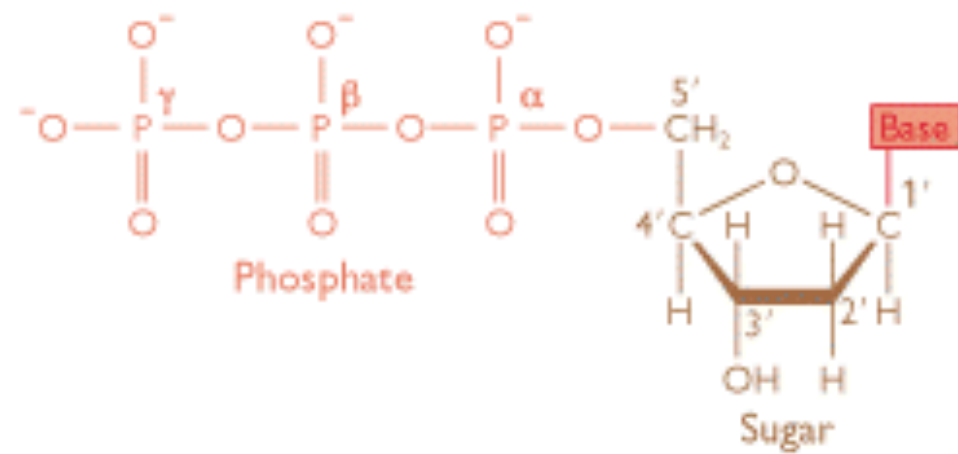
zdjęcie nr 51, 1952
Gosling & Franklin



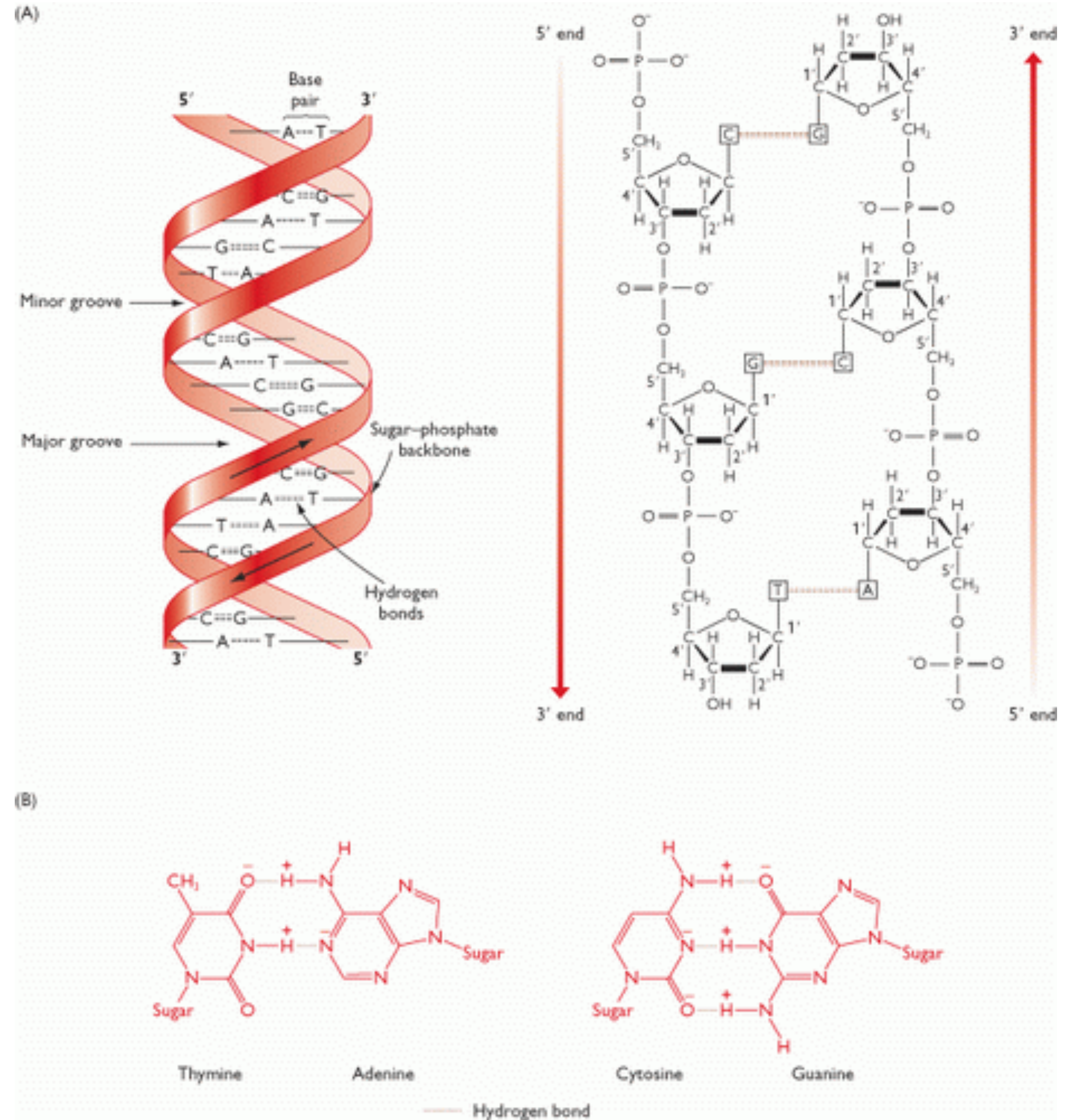
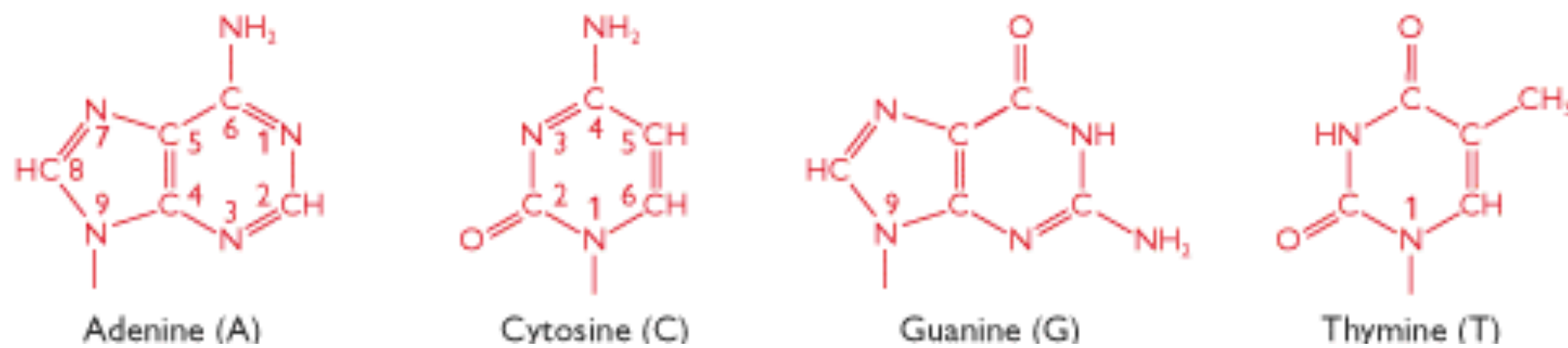
Budowa DNA

- DNA zbudowany jest z nukleotydów
- Łańcuchy mają kierunek 5'-3'
- W cząsteczkach dwuniciowych łańcuchy są przeciwbieżne

(A) A nucleotide



(B) The four bases in DNA



Zasada komplementarności

Na podstawie sekwencji jednej nici
można jednoznacznie odtworzyć
sekwencję nici komplementarnej

A zawsze z T

G zawsze z C

5' GATGTA CTGATGACATA 3'

3' CTACATGACTACTGTAT 5'

5' GATGTA CTGATGACATA 3'

3' CTACATGACTACTGTAT 5'

Istota replikacji

- Potomna kopia ma te same właściwości jak cząsteczka macierzysta i jest pełnoprawną matrycą umożliwiającą odtworzenie całości informacji

Replikacja a ewolucja

- Replikacja jest warunkiem koniecznym zachodzenia ewolucji biologicznej
- Replikacja nieuchronnie wprowadza zmienność
 - Osiągnięcie zerowej częstości błędów jest nierealistyczne (wymaga nieskończonej energii)
- Zmienność + zróżnicowane dostosowanie = ewolucja
- Powstanie replikacji to powstanie życia i początek ewolucji

Replikacja

- Model semikonserwatywny:
- w każdej cząsteczce potomnej jedna nić rodzicielska i jedna nowa
- doświadczenie Meselsona i Stahla (Brown, r. 15)

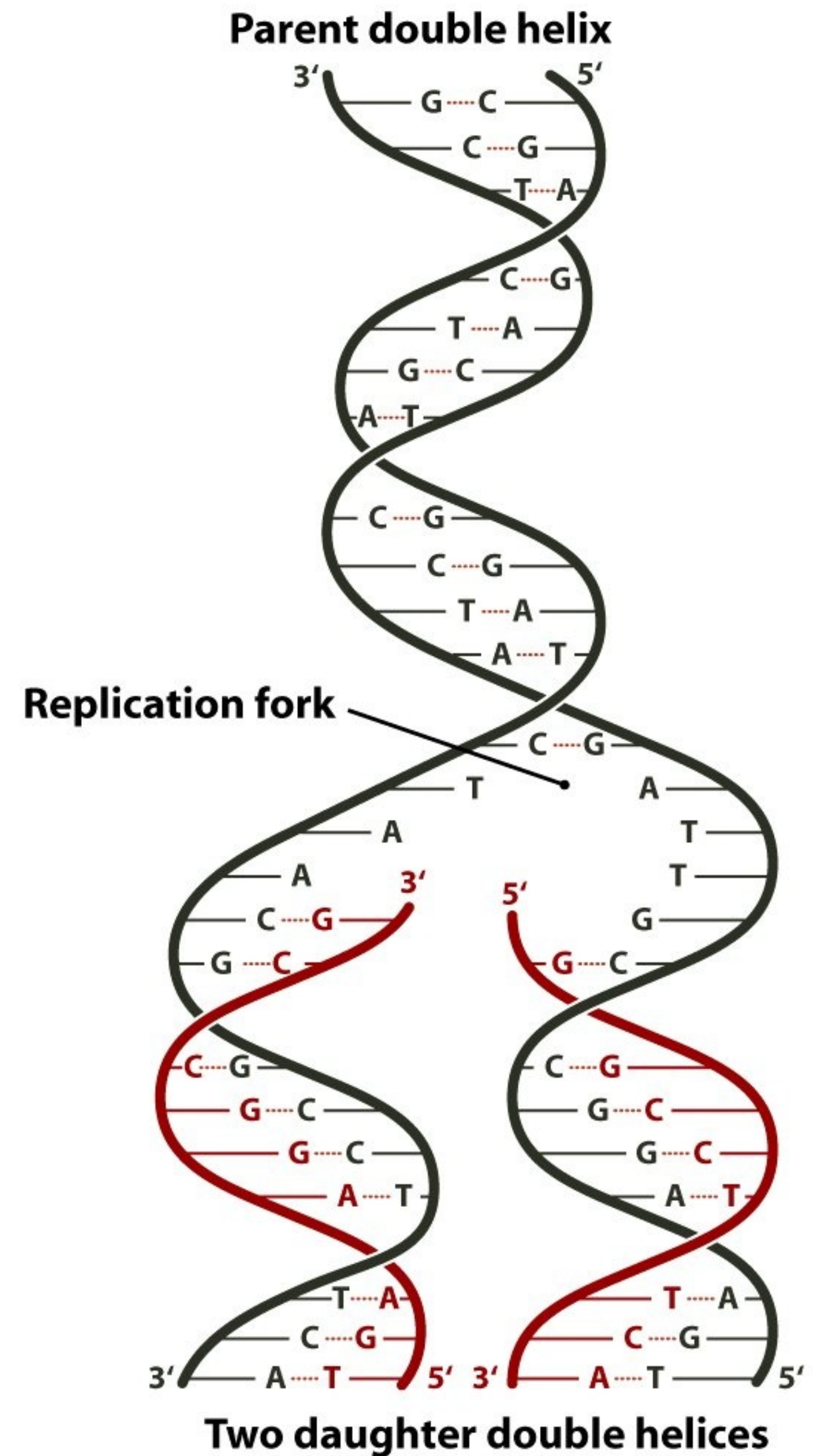
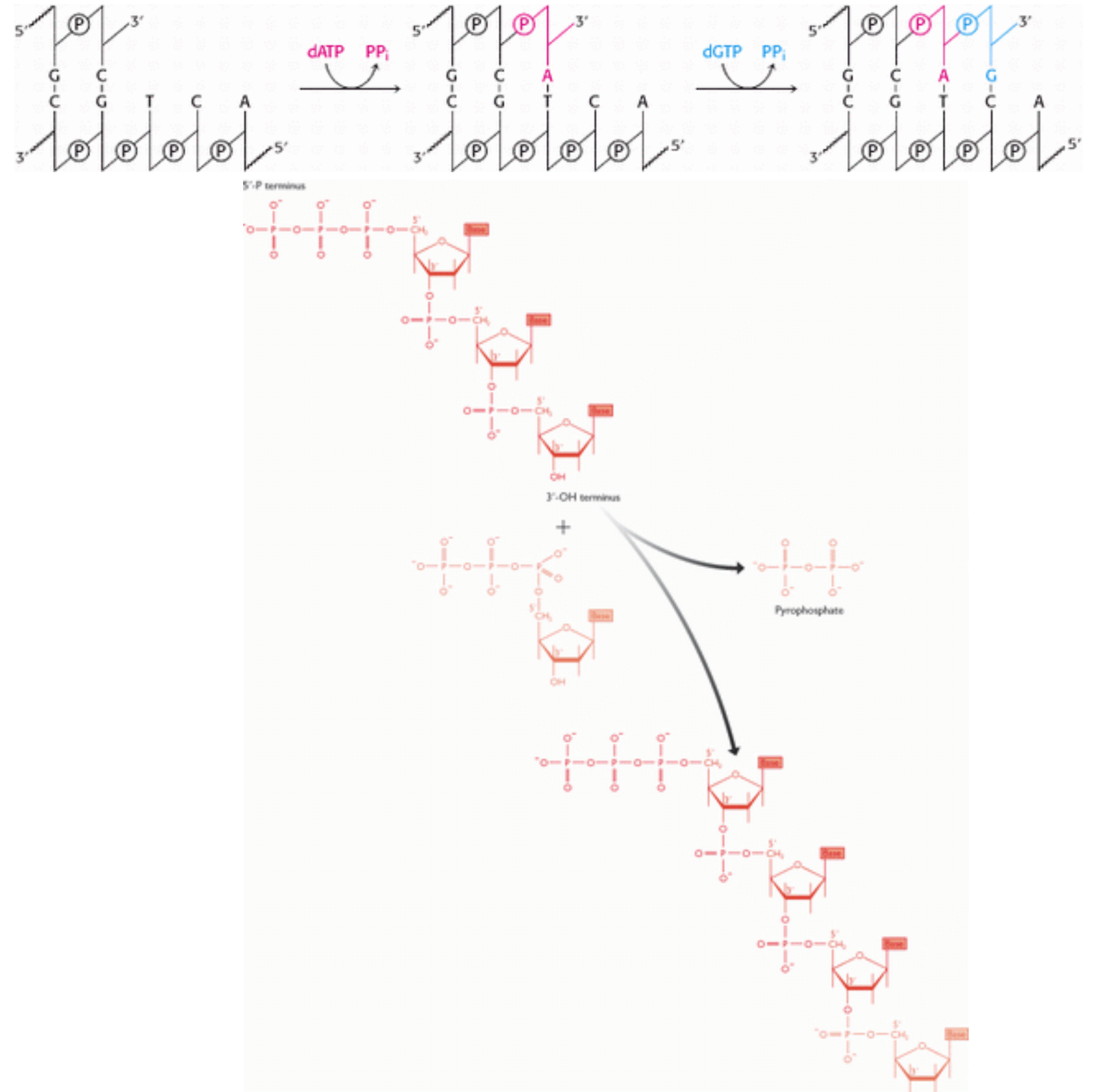


Figure 15-1 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Synteza DNA - polimeraza

- Synteza DNA (i RNA też) zawsze zachodzi przez dołączanie nowych nukleotydów do grupy $-OH$ **na końcu 3'** syntetyzowanej cząsteczki
 - zawsze w jednym kierunku!
- Substratem są trójfosforany nukleotydów, enzymem polimeraza (zależna od DNA polimeraza DNA)
- Polimeraza DNA potrafi dobudowywać nukleotydy do istniejącego łańcucha, nie potrafi rozpocząć syntezy



Etapy replikacji

- Inicjacja - kiedy, gdzie i jak rozpocząć
- Elongacja (wydłużanie)
 - procesywność - jak nie skończyć przedwcześnie
- Terminacja - gdzie i jak zakończyć

Inicjacja u bakterii

- Replikacja rozpoczyna się w miejscu *ori*
- Wiązanie białka DnaA
- Rozplecenie (topnienie) podwójnej helisy DNA w obszarach bogatych w pary AT

The structure of *oriC*

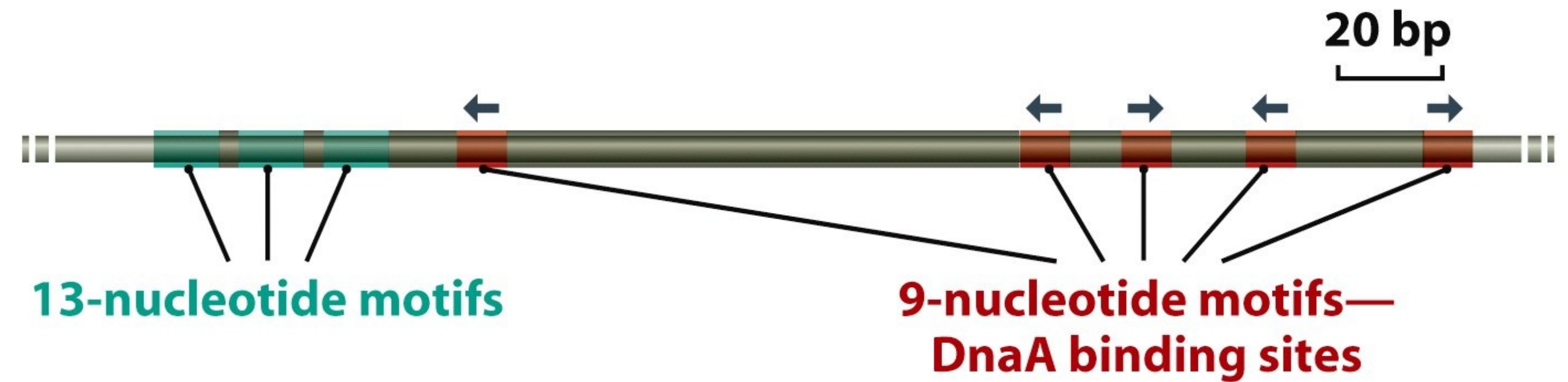


Figure 15-9a Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Melting of the helix

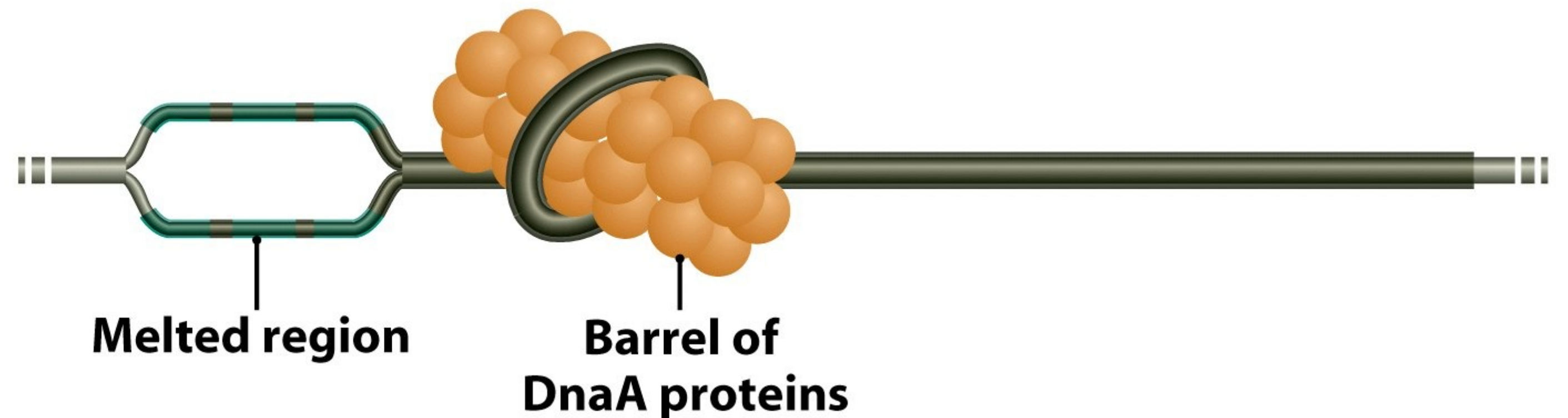
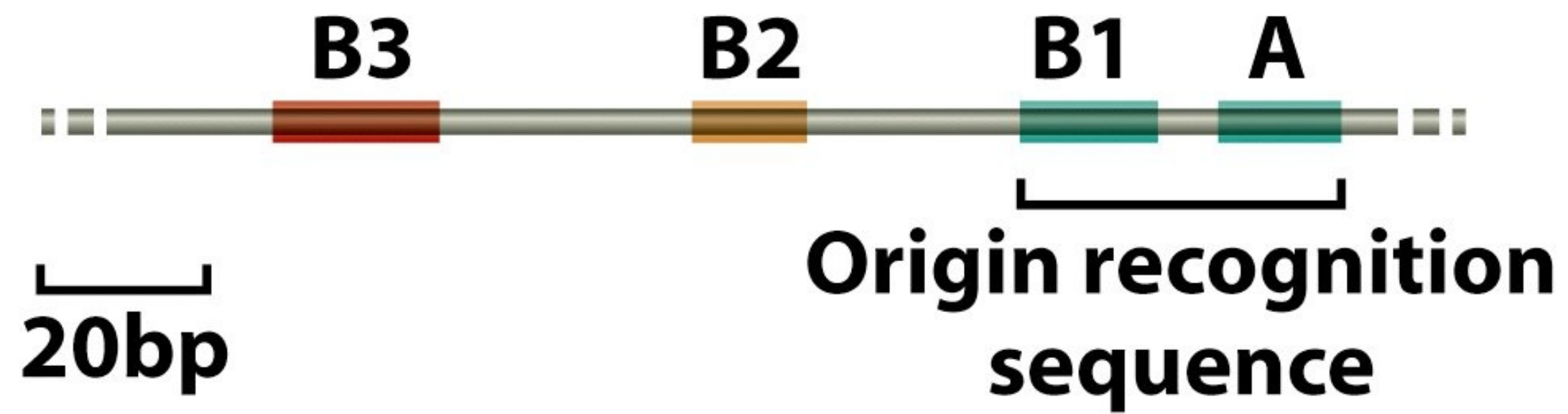


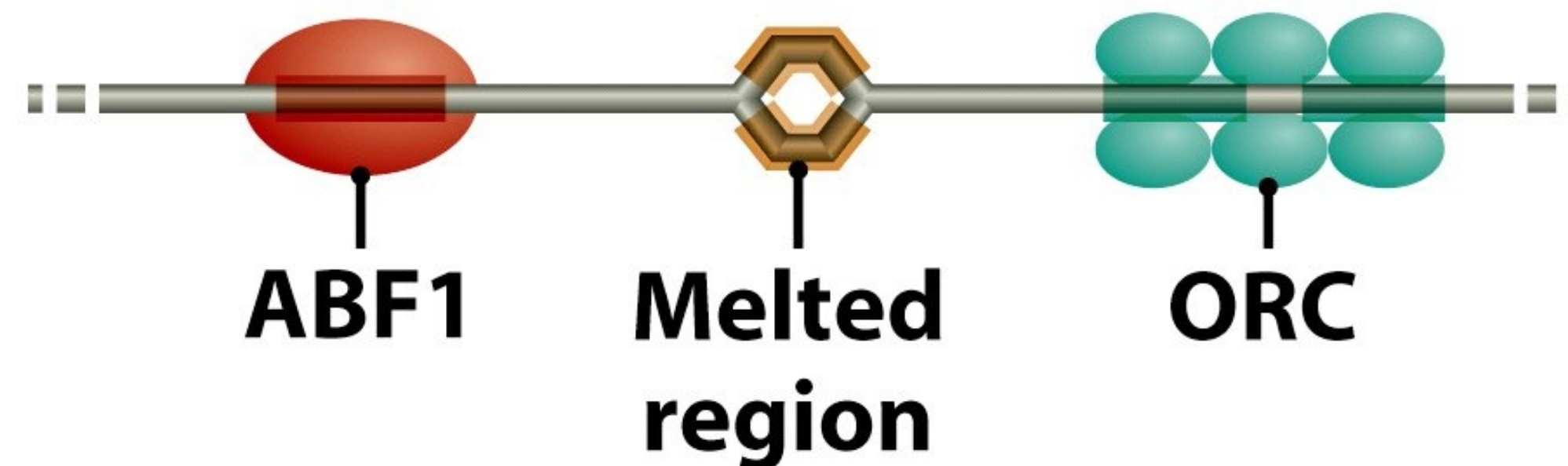
Figure 15-9b Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Inicjacja u Eukaryota

(A) Structure of a yeast origin of replication



(B) Melting of the helix



Elongacja a struktura genomu

Replication of a circular bacterial chromosome



← Direction of replication →

Figure 15-8a Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Replication of a linear eukaryotic chromosome

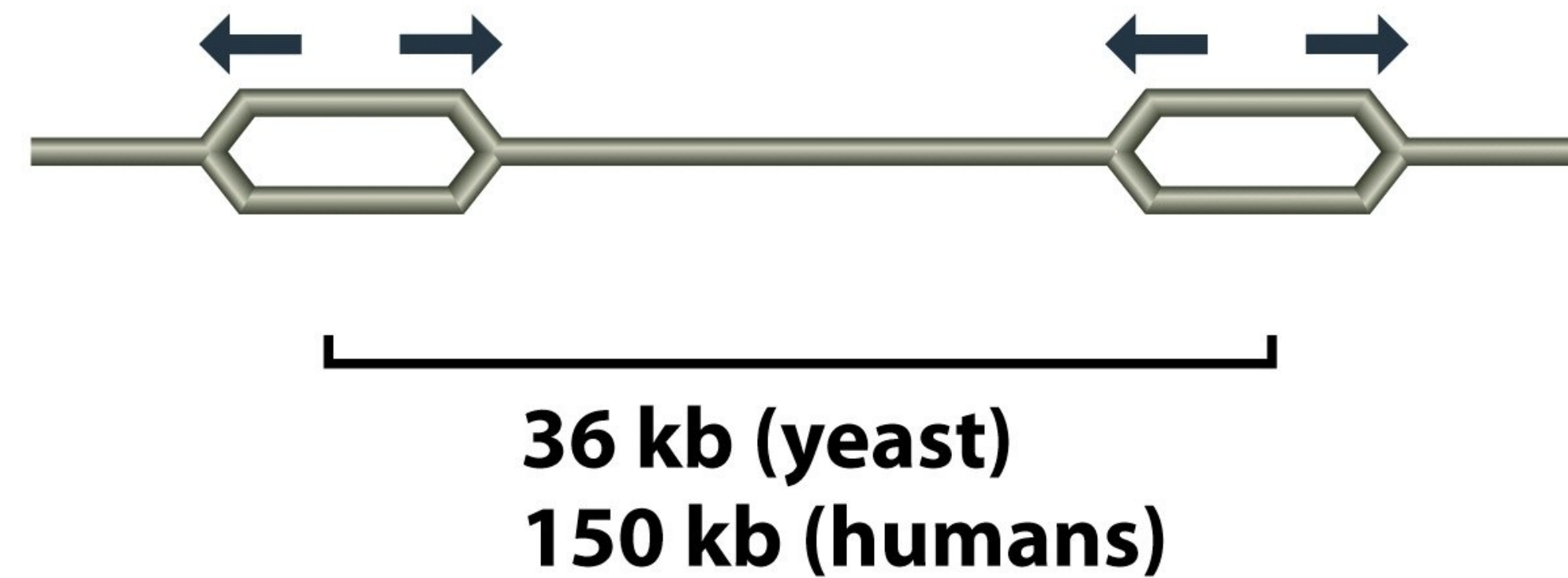
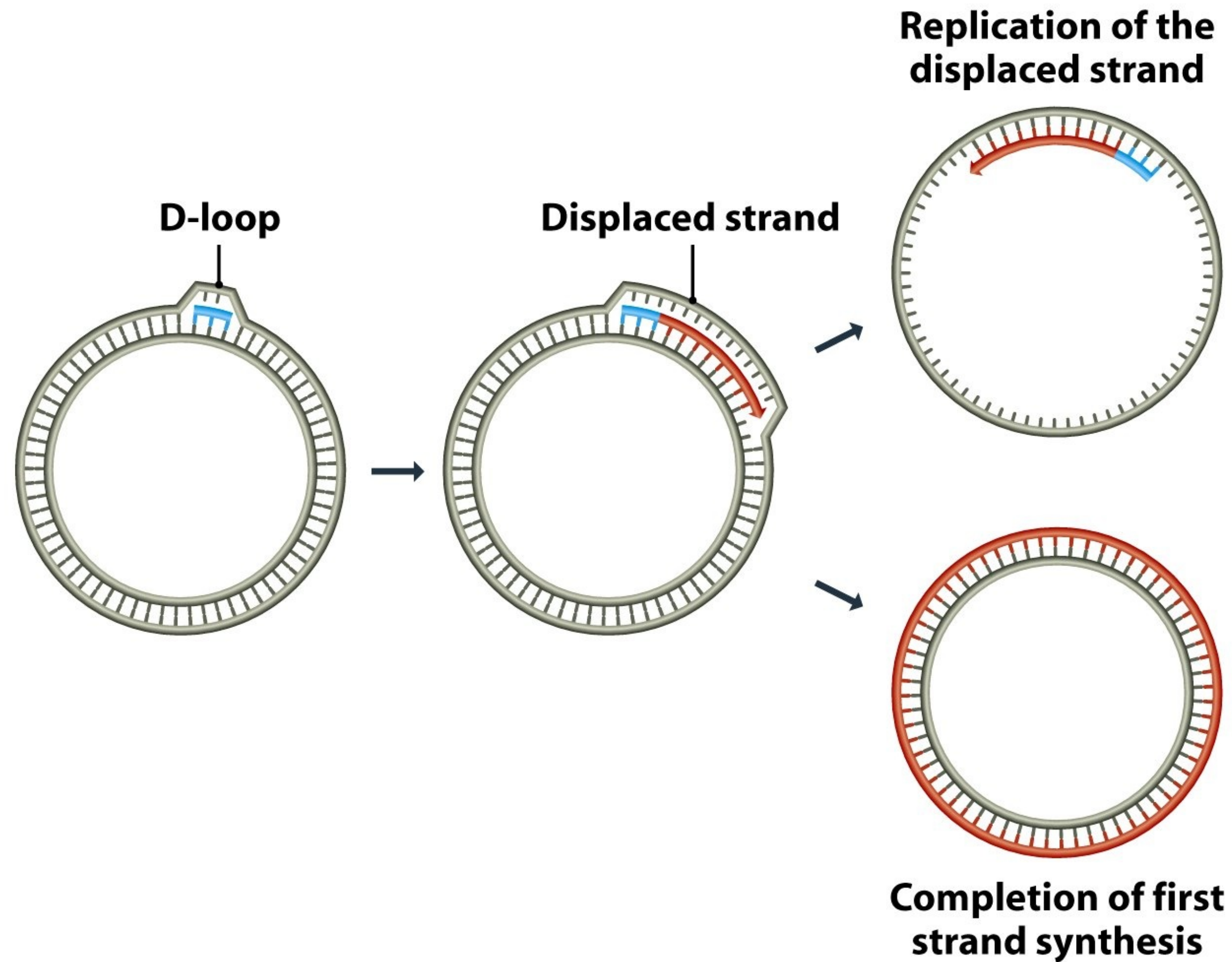


Figure 15-8b Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Replikacja małego genomu kolistego – pętla D



Replikacja małego genomu kolistego – rolling circle

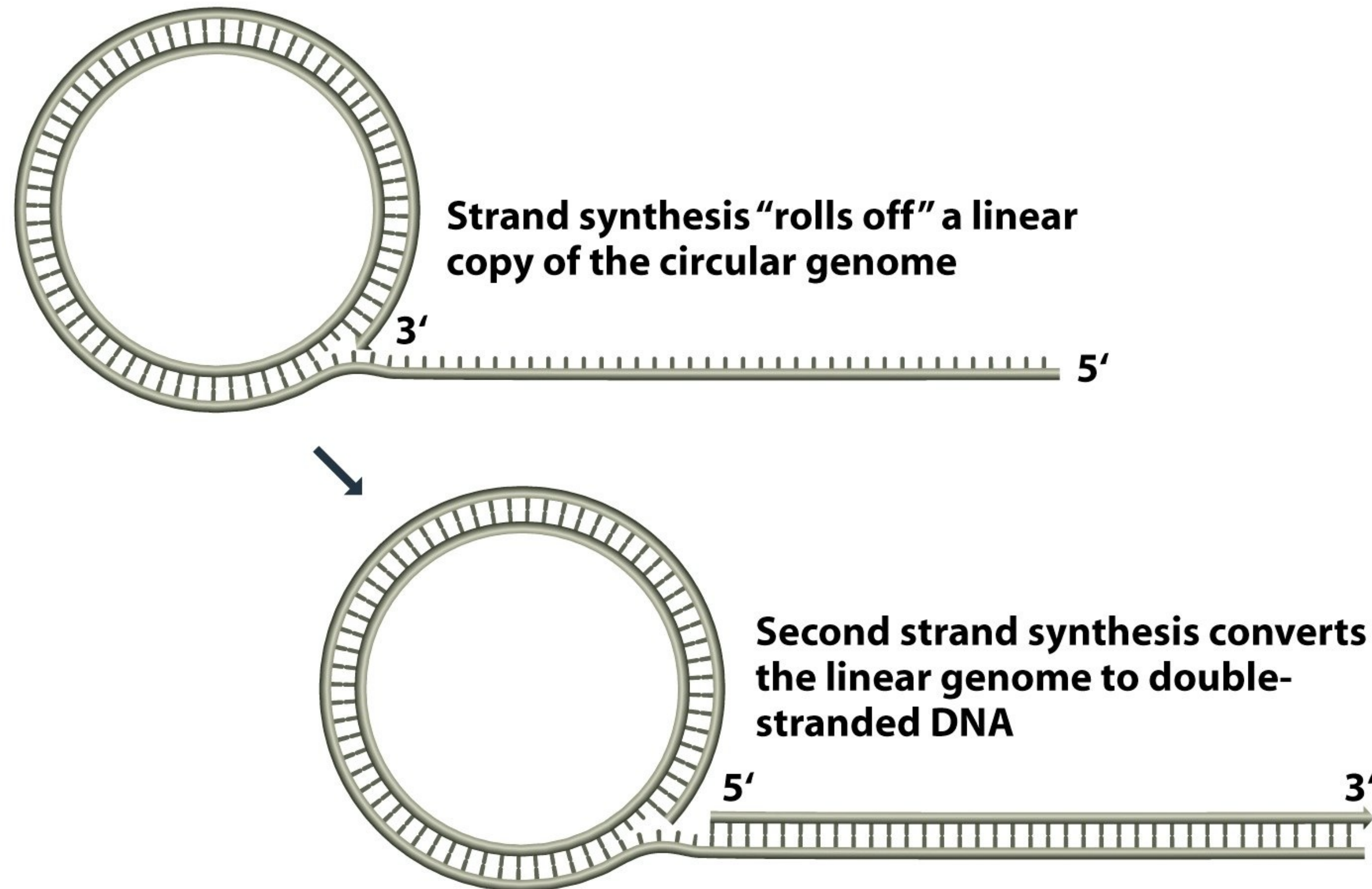
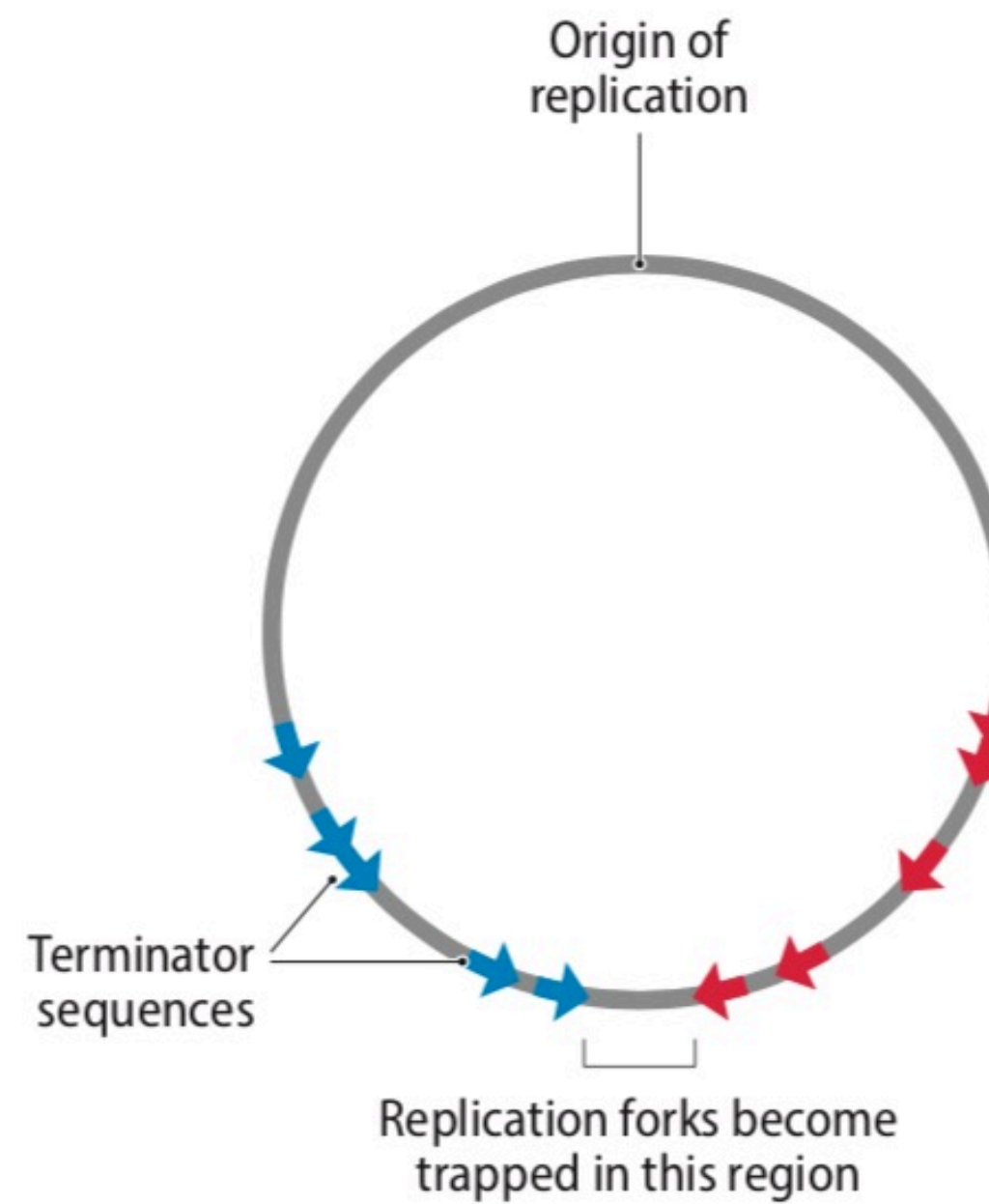


Figure 15-7 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

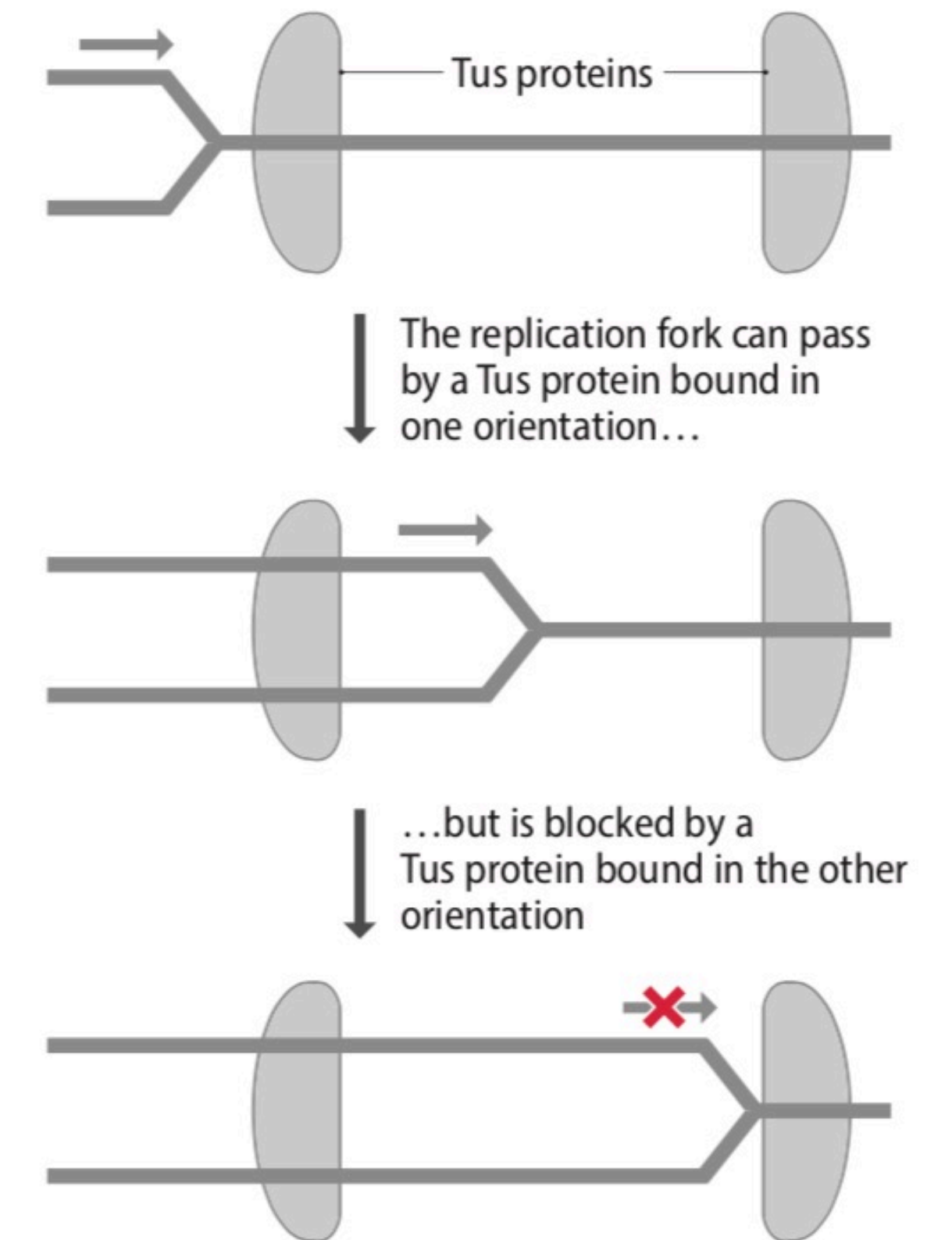
Terminacja transkrypcji genomu kolistego bakterii

- Pojedyncze widełki replikacyjne nie przekraczają połowy genomu (unikanie kolizji)
- Mechanizm zależny od białek Tus

(A) Terminator sequences in the *E.coli* genome

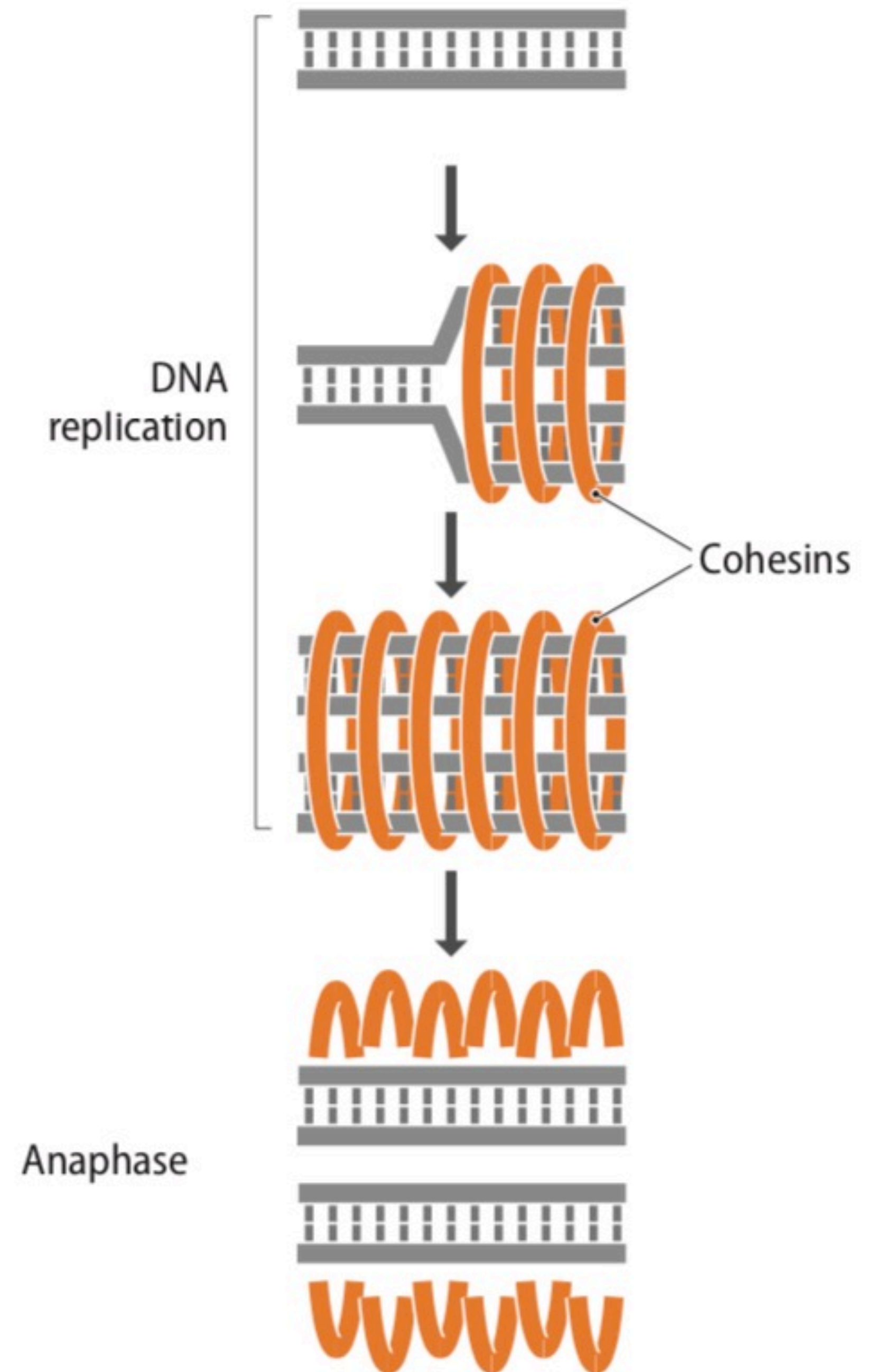


(B) The role of Tus



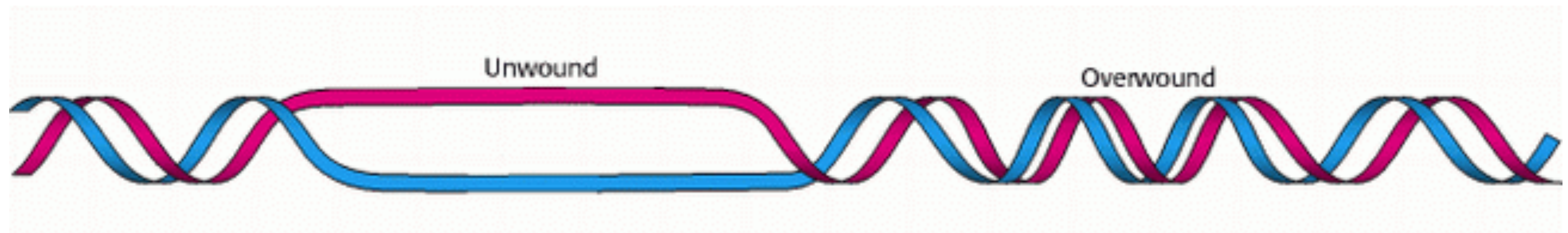
U Eukaryota

- Podczas replikacji chromosomy utrzymywane są razem przez białka: kohezyny aż do rozłączenia w anafazie



Problem topologiczny replikacji

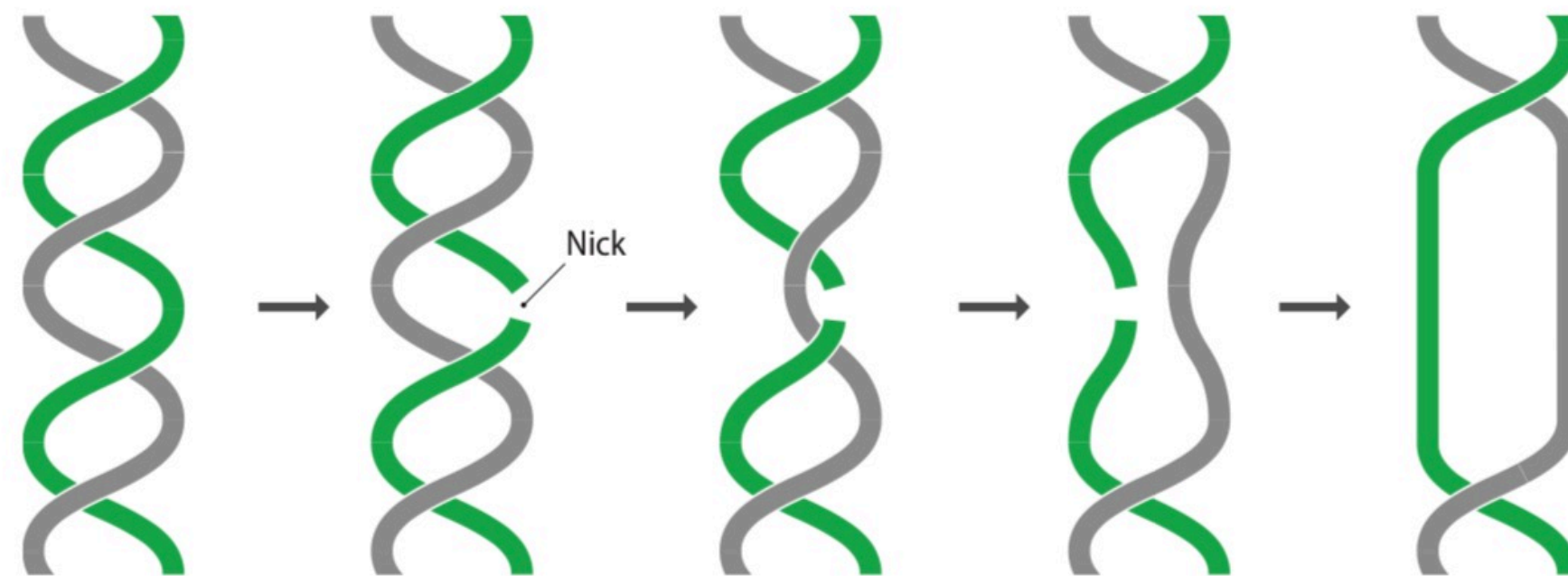
- Replikacja DNA postępując będzie generować naprężenia (superskręty)
- W DNA liniowym praktycznie nierozwiązywalne ze względu na upakowanie w komórce
- W DNA kolistym absolutnie nierozwiązywalne ze względu na brak wolnych końców



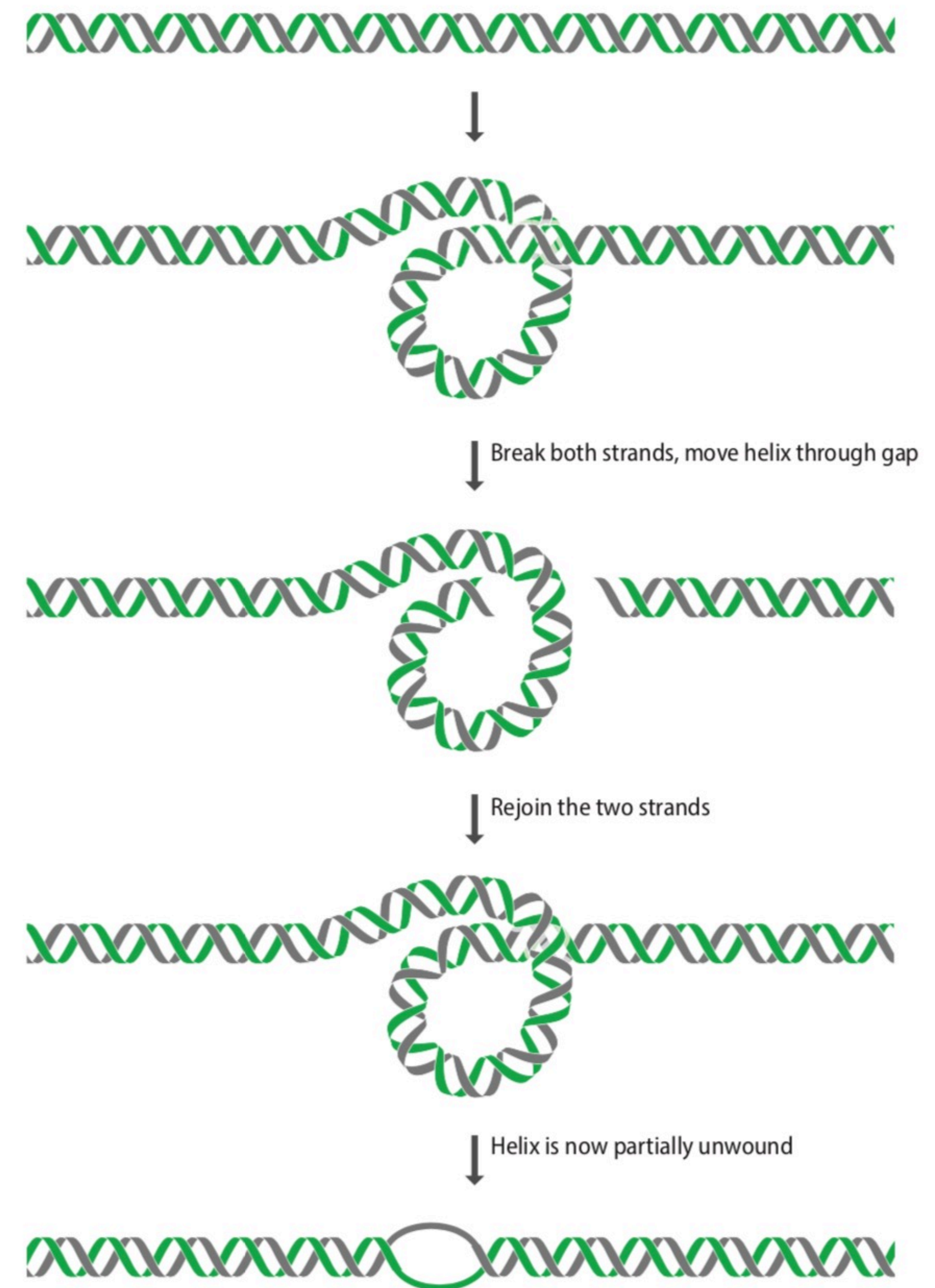
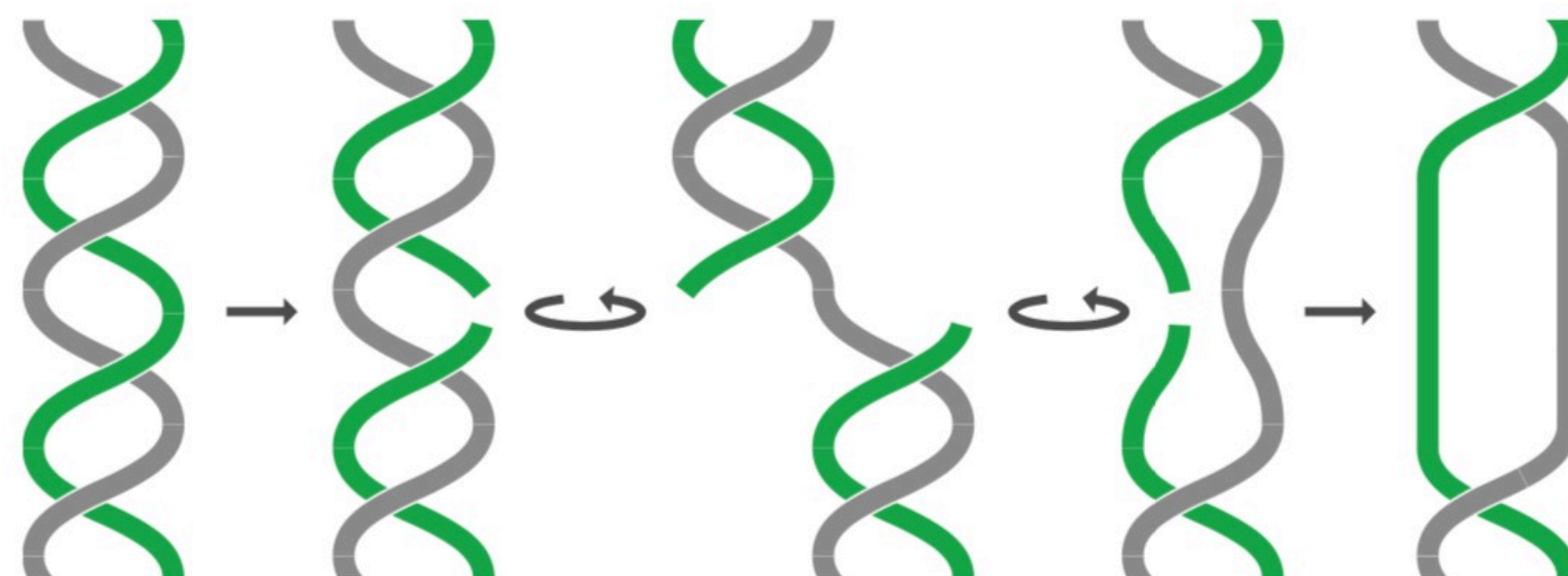
Problem topologiczny - topoizomerazy

- Topoizomeraza typu I wprowadza nacięcie w jednej z nici, przesuwa drugą nić przez przerwę i łączy końce
- Topoizomerazy typu II nacinają obie nici

(A) Type IA topoisomerase

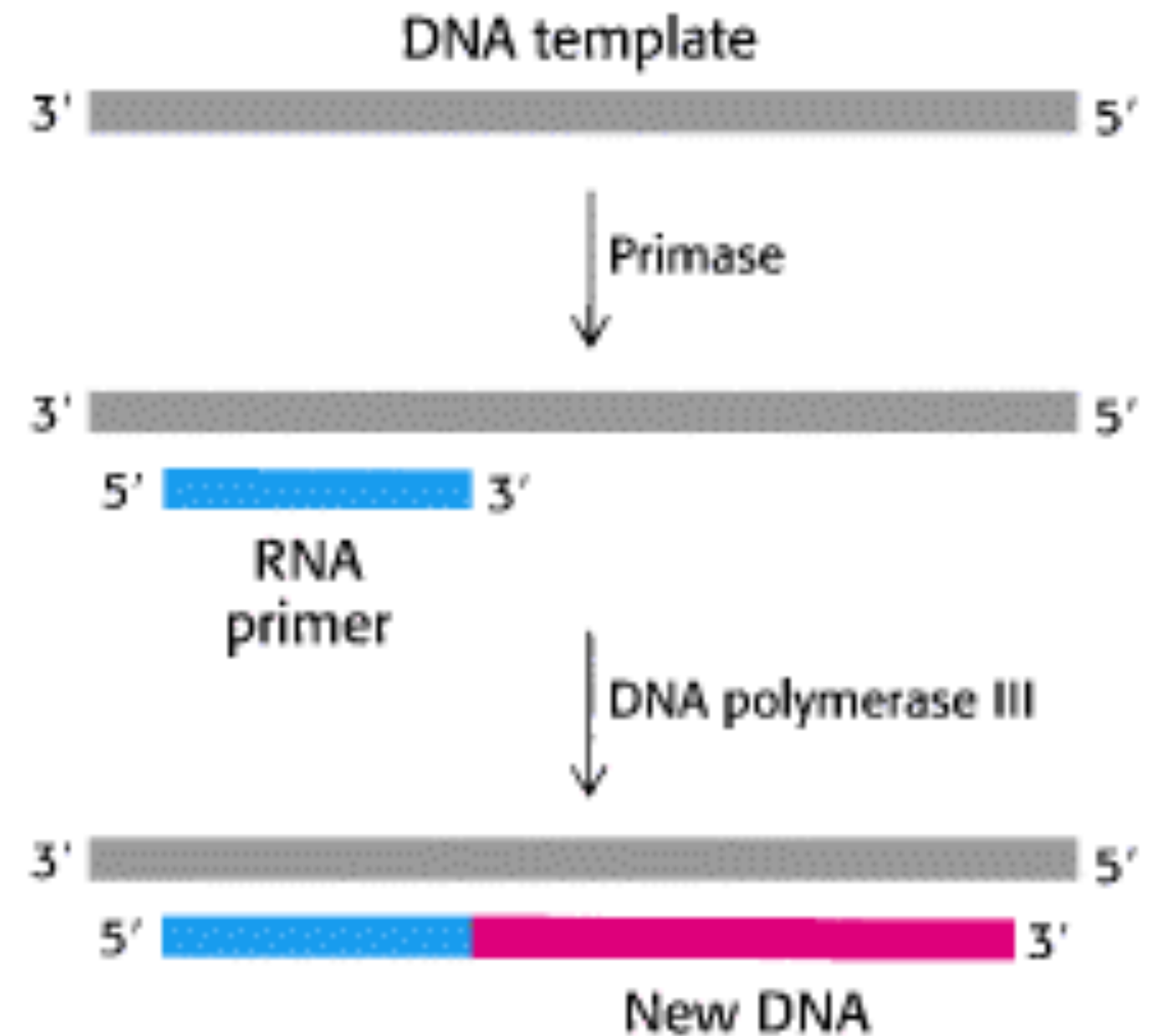


(B) Type IB topoisomerase



Startery

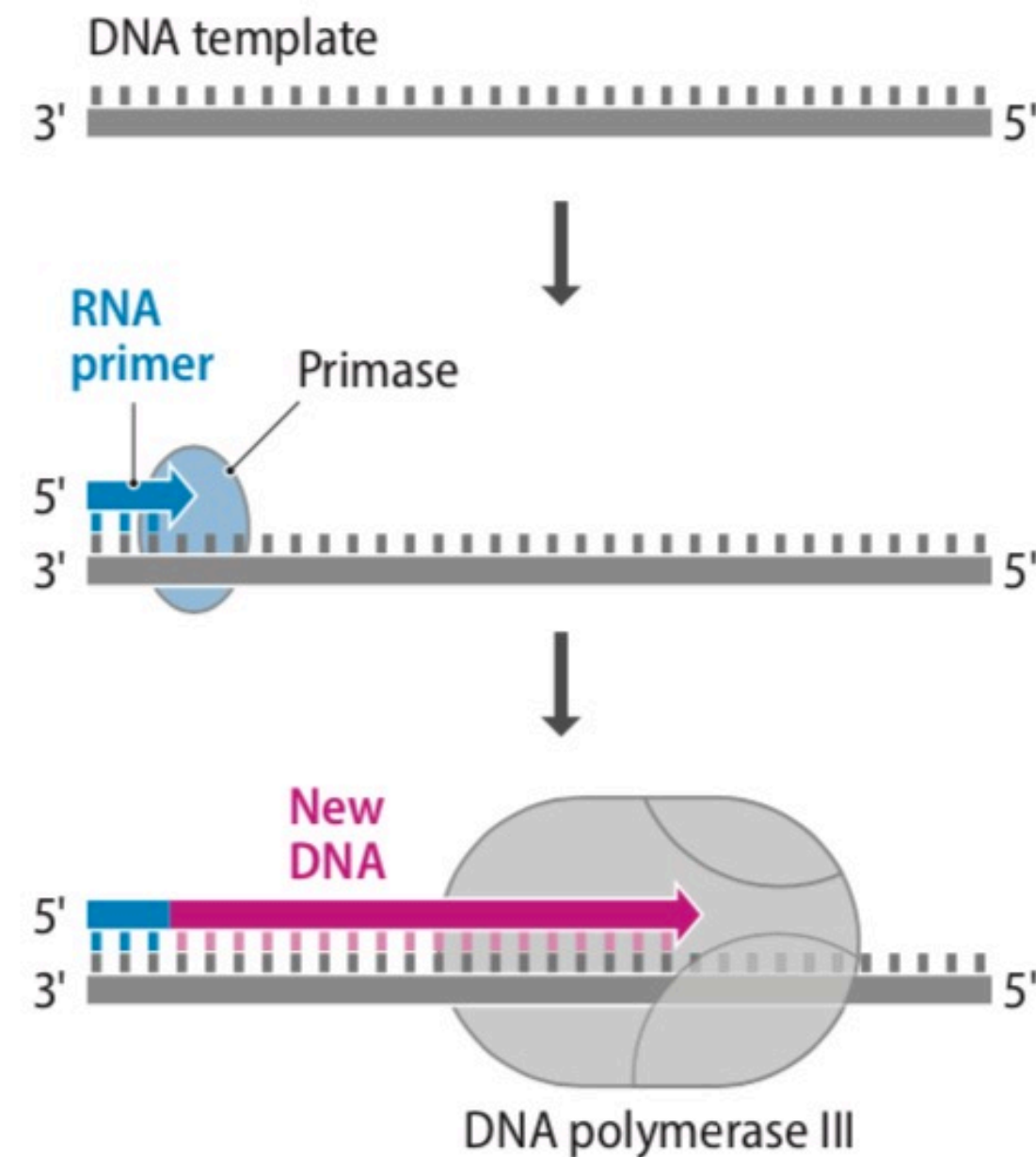
- Startery do replikacji zbudowane są z RNA
- Za ich syntezę odpowiada aktywność **prymazy**
- Prymaza (polimeraza RNA zależna od DNA) syntetyzuje starter (RNA) dla polimerazy DNA, która go wydłuża



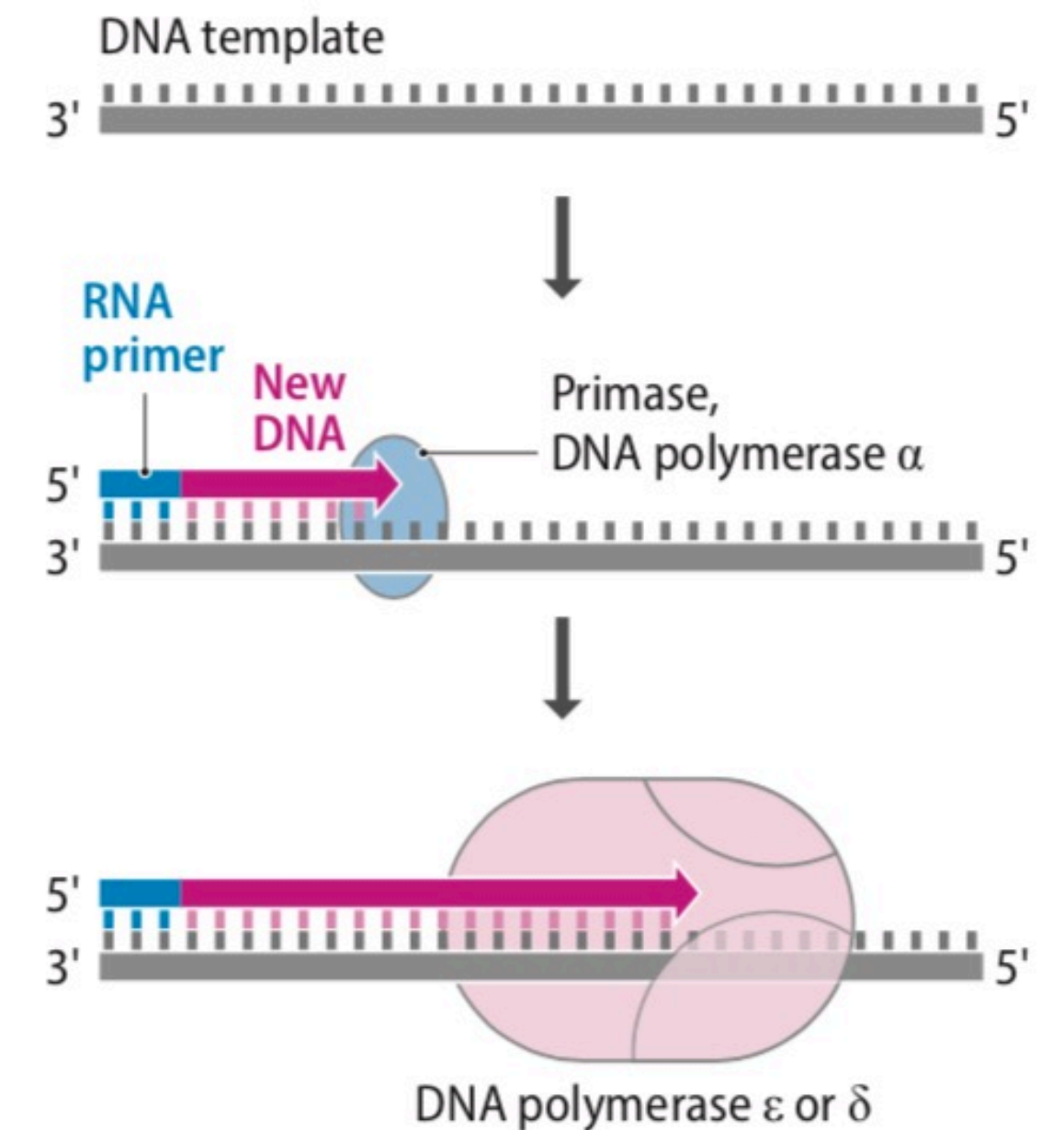
Prymaza

- U bakterii prymaza to odrębny enzym, syntezę DNA po niej przejmuje polimeraza DNA III
- U Eukaryota kompleks polimerazy α ma aktywność prymazy i polimerazy DNA - tworzy starter RNA i zapoczątkowuje syntezę DNA, po nim syntezę przejmują inne polimerazy (np. pol δ)

(A) Priming of DNA synthesis in bacteria

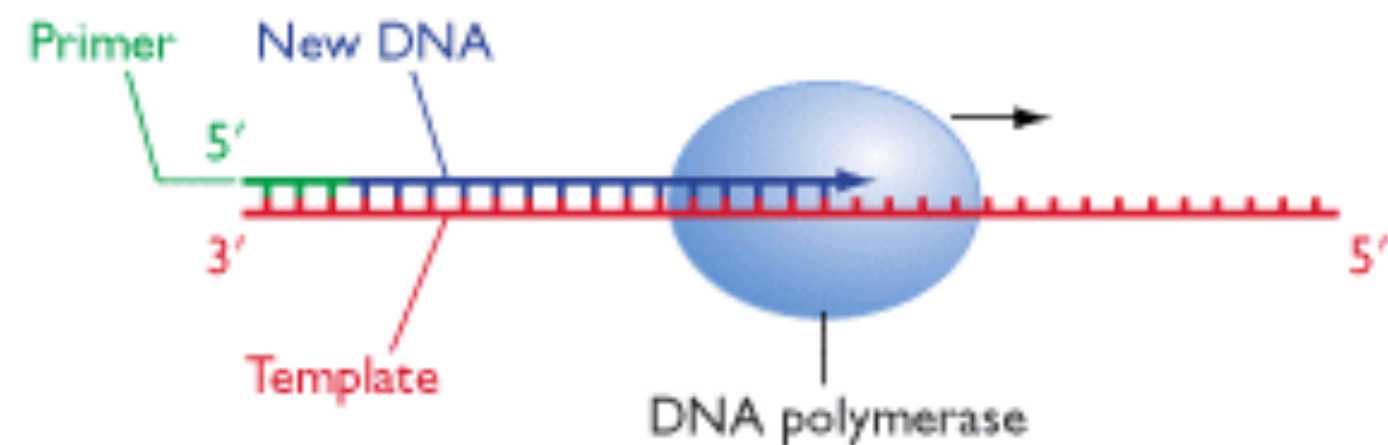


(B) Priming of DNA synthesis in eukaryotes



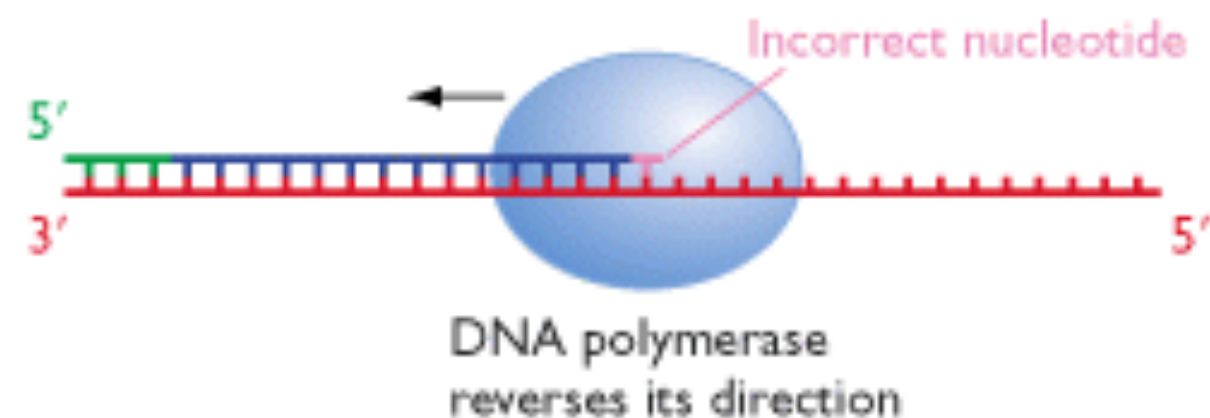
Aktywności polimeraz DNA

(A) 5'→3' DNA synthesis



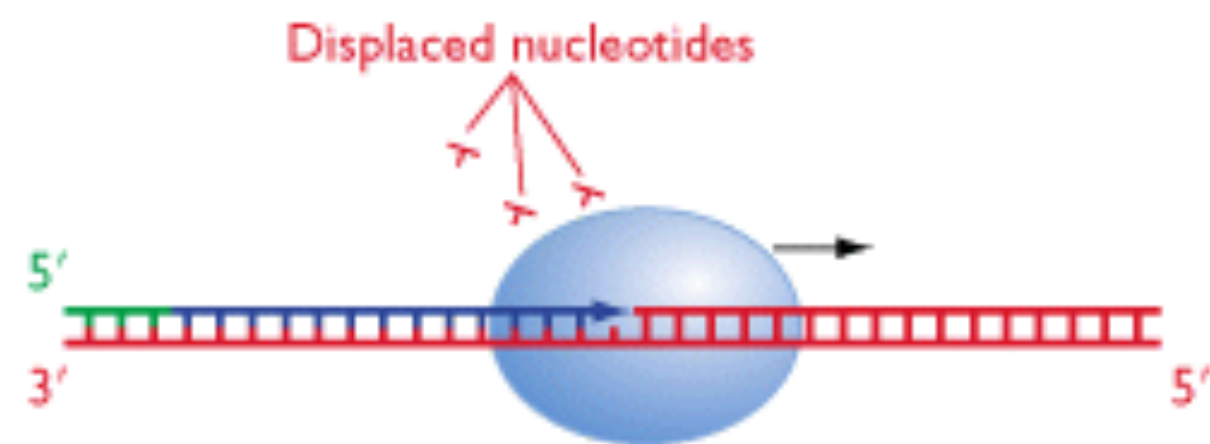
Synteza DNA – wszystkie polimerazy (z definicji).

(B) 3'→5' exonuclease activity



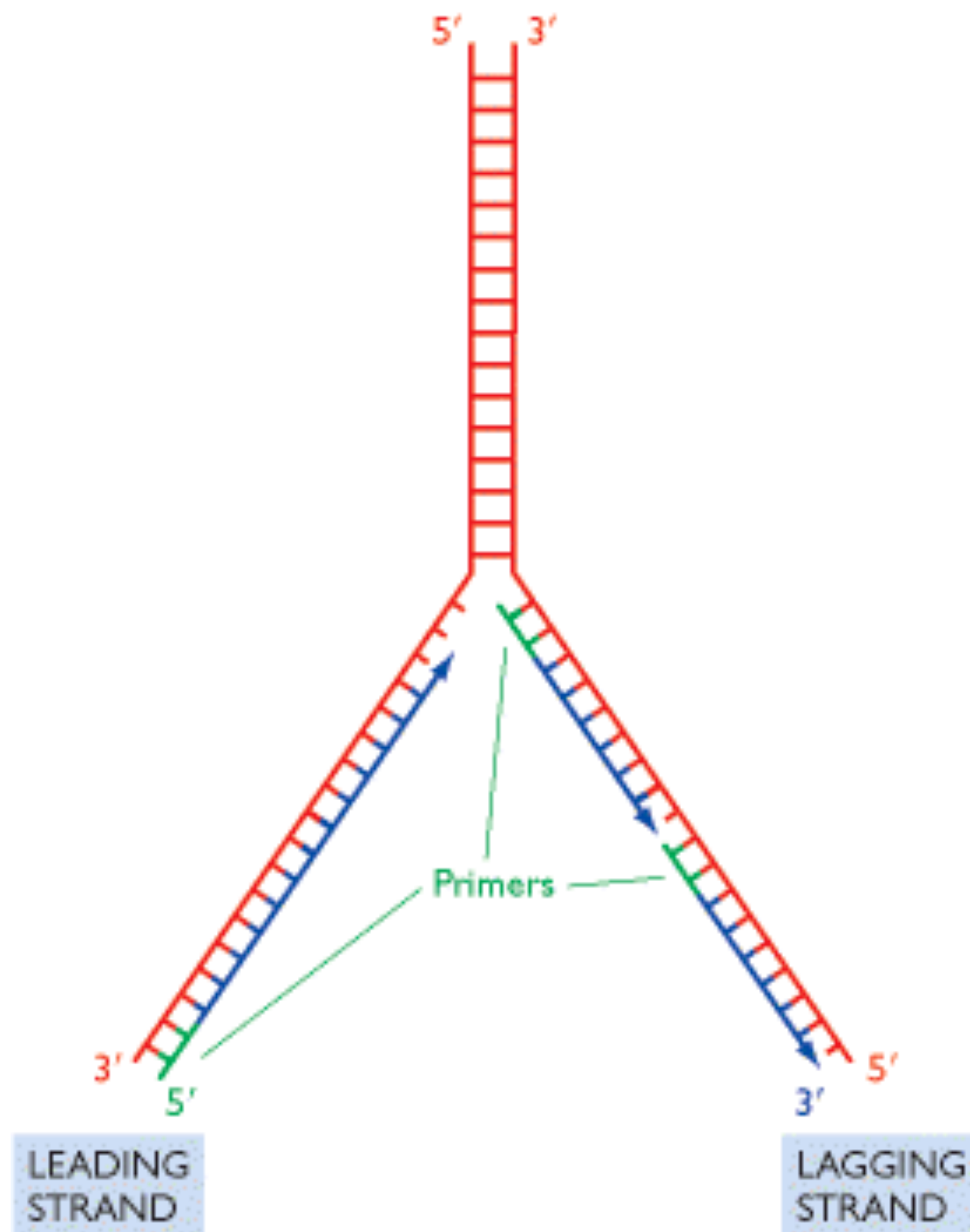
Egzonukleaza 3'-5' –
korekcja błędów (większość polimeraz
replikacyjnych, ale nie wszystkie).

(C) 5'→3' exonuclease activity

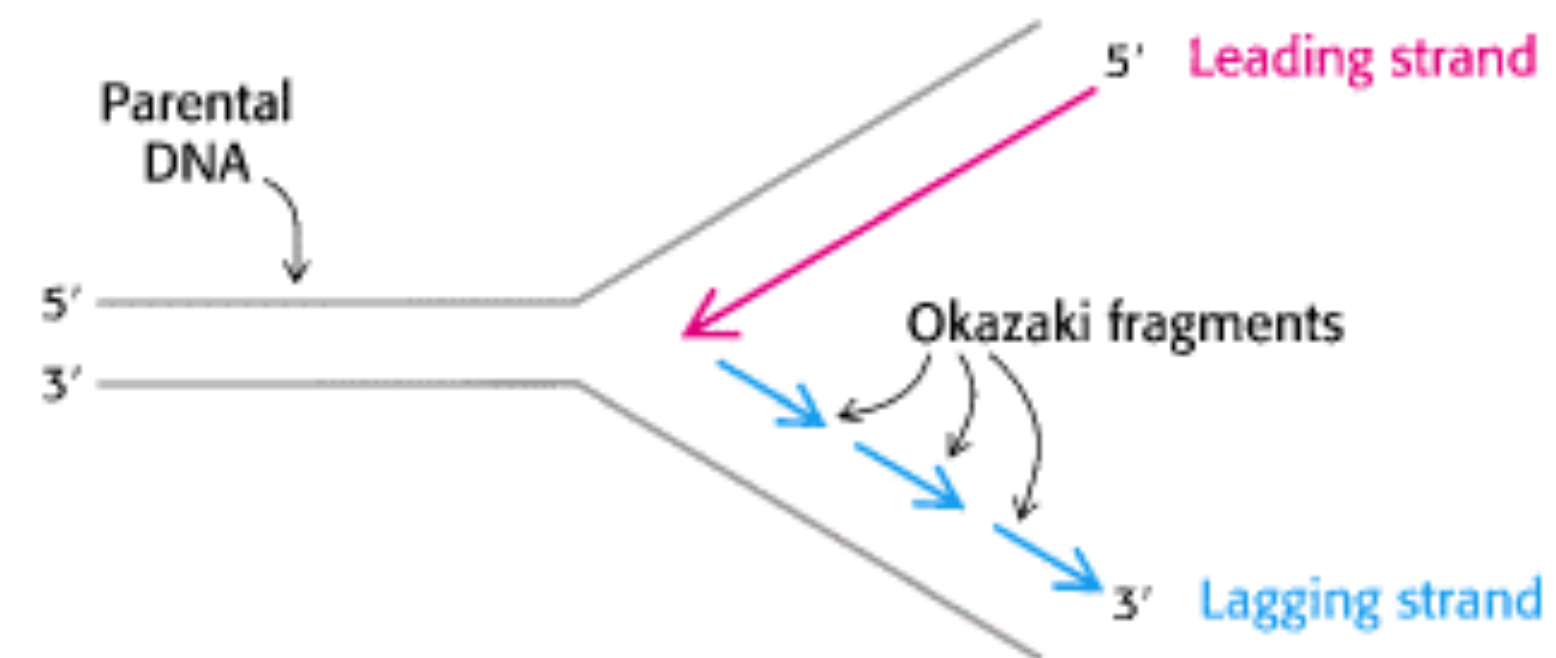


Egzonukleaza 5'-3' –
naprawa uszkodzeń, usuwanie starterów.
Niektóre polimerazy bakteryjne, u Eukaryota jest
to osobny enzym.

Problem nici nieciągłej

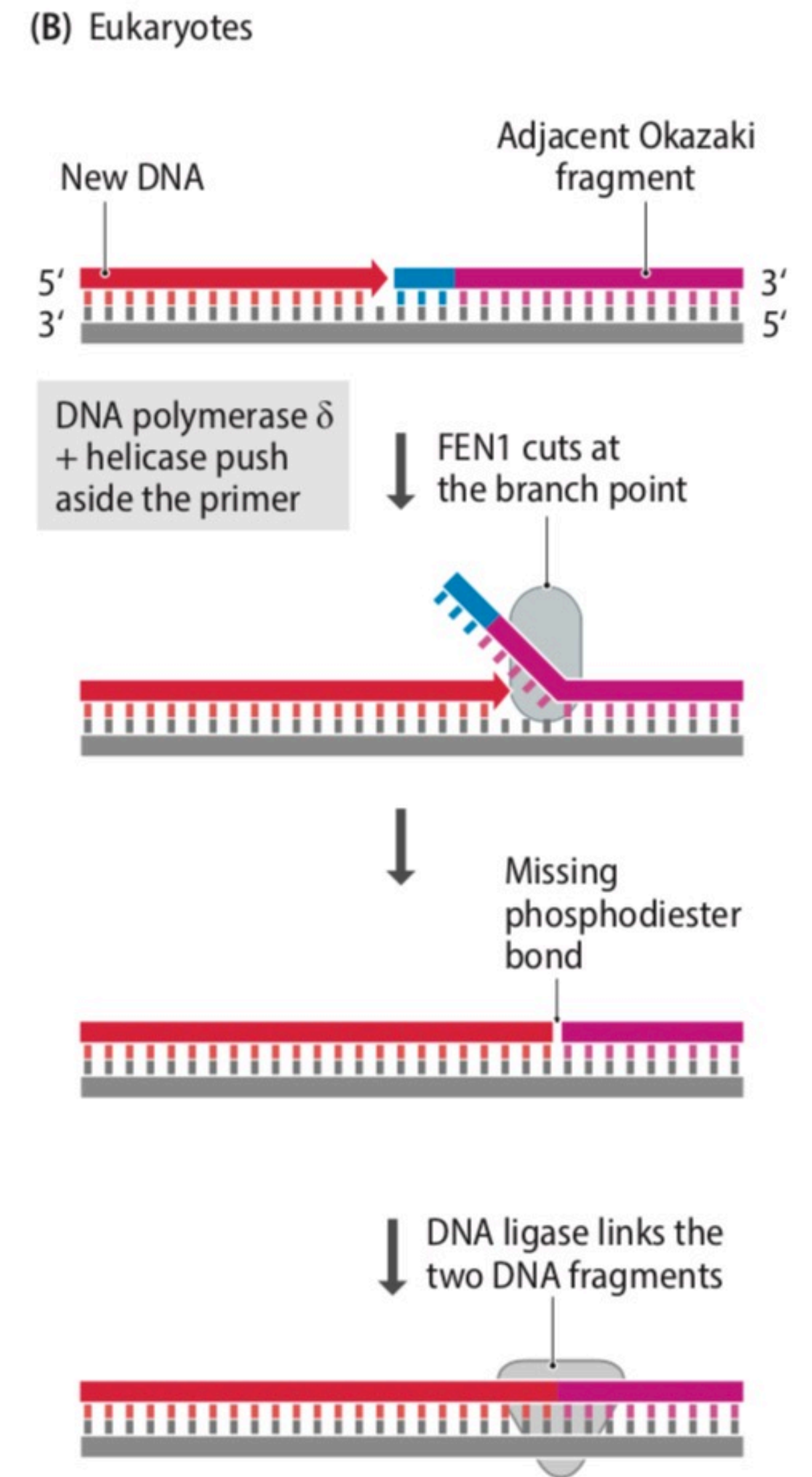
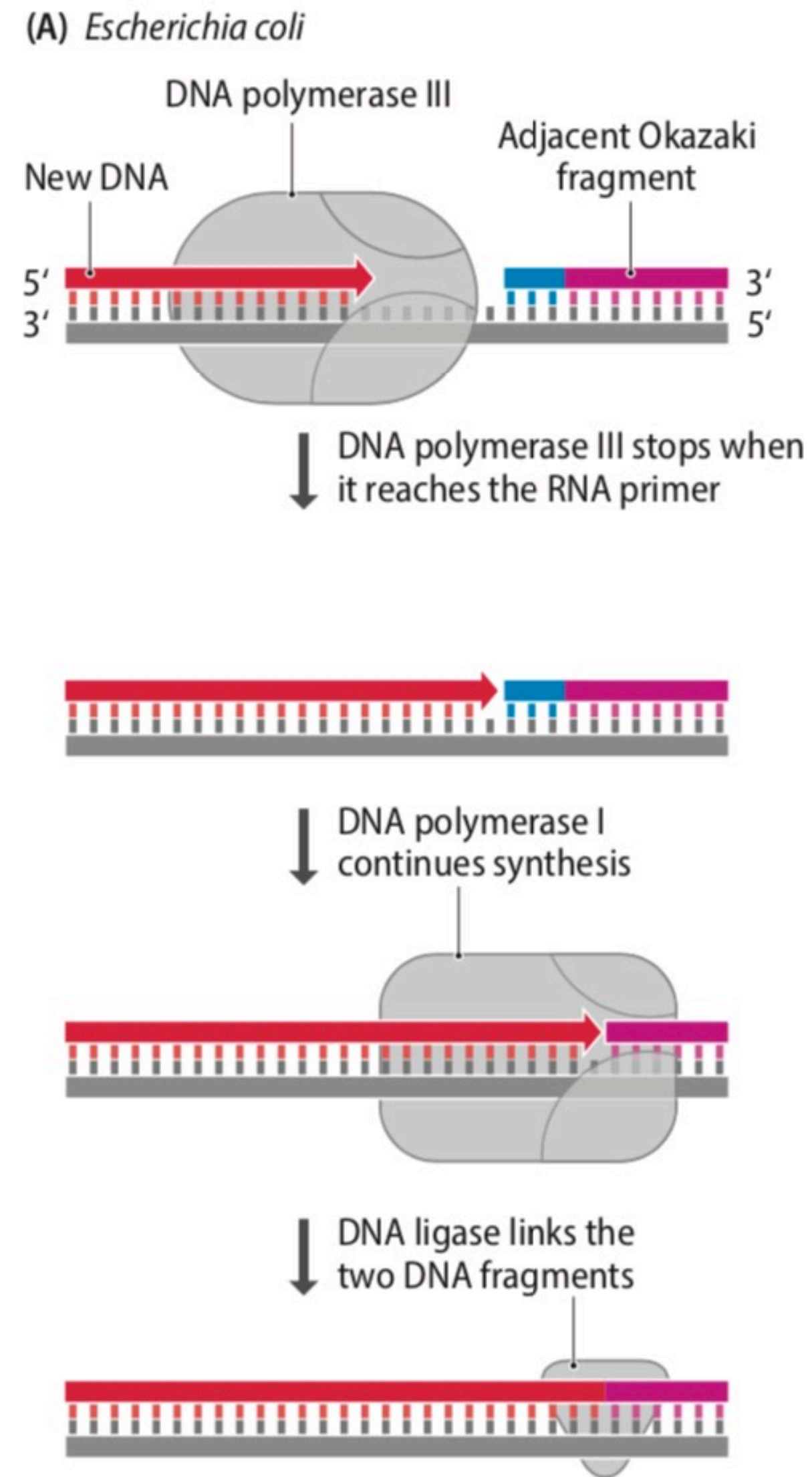


Na nici nieciągłej trzeba co pewien odcinek ponawiać syntezę startera – fragmenty Okazaki

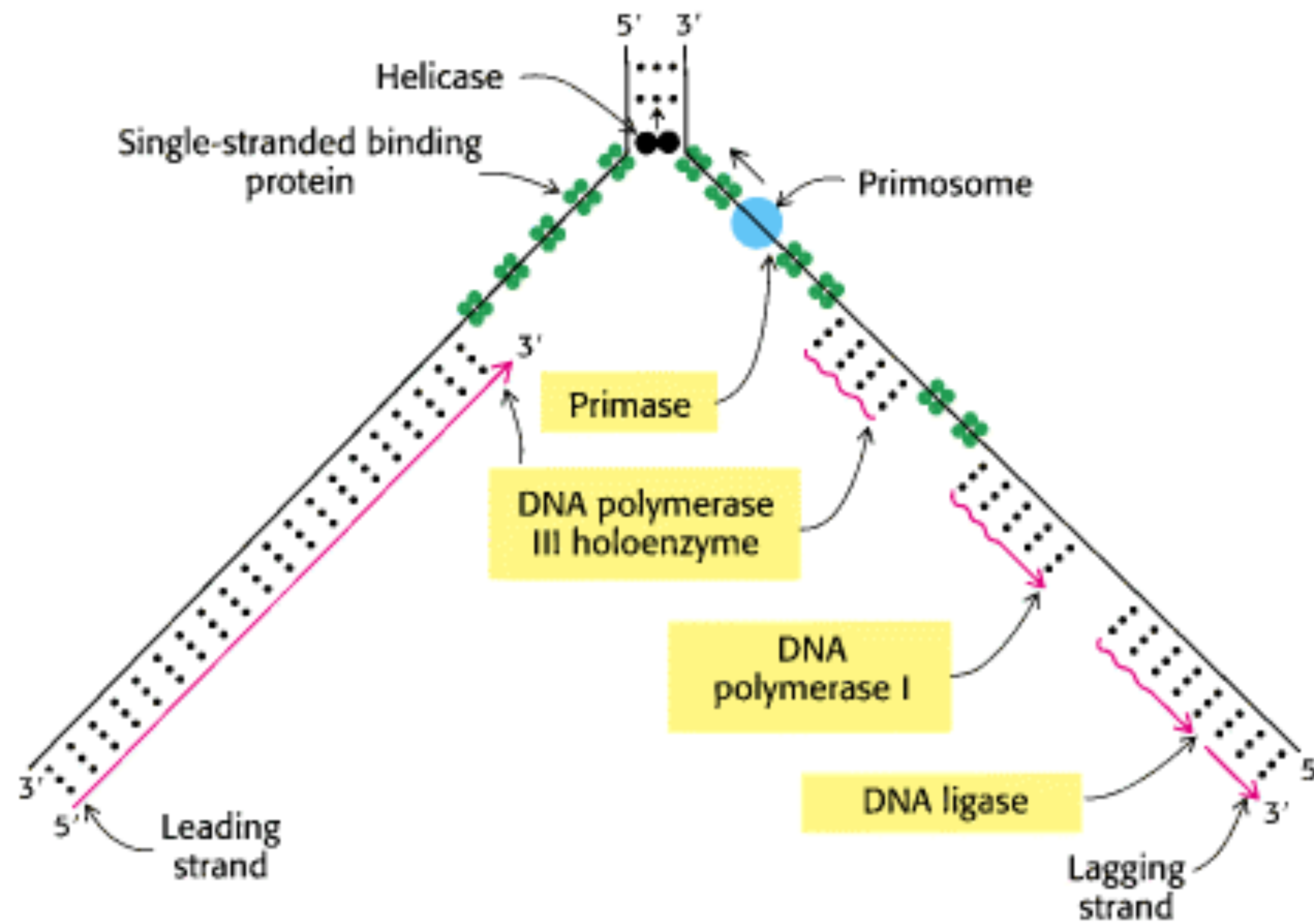


Łączenie fragmentów Okazaki

- U bakterii: aktywność egzonukleazowa 5' → 3' pol i ligaza
- U Eukaryota: polimeraza δ nie ma aktywności 5' → 3' egzo, razem z helikazą odsuwa starter, odcięcie przez endonukleazę FEN1 (flap endonuclease)

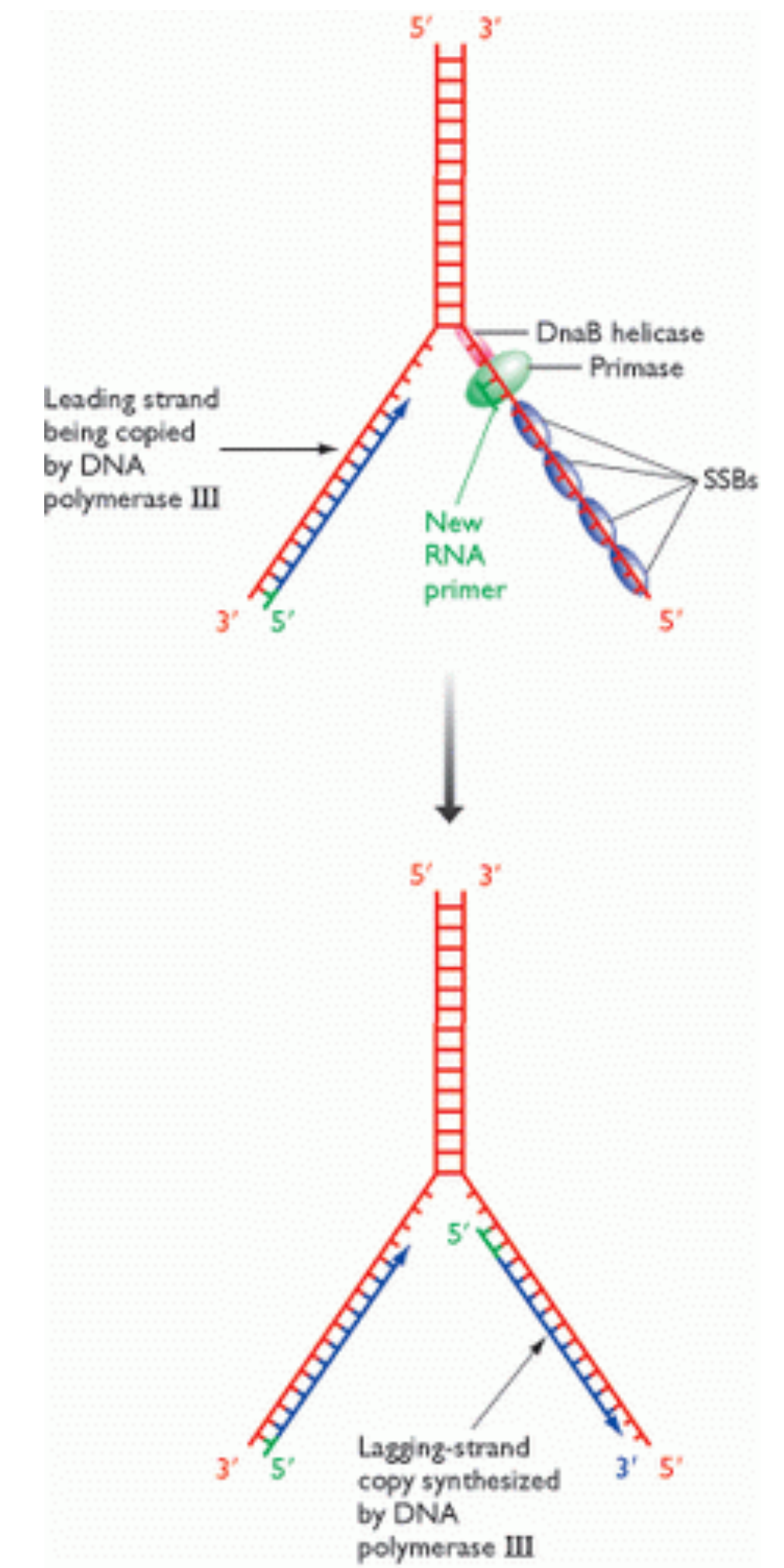
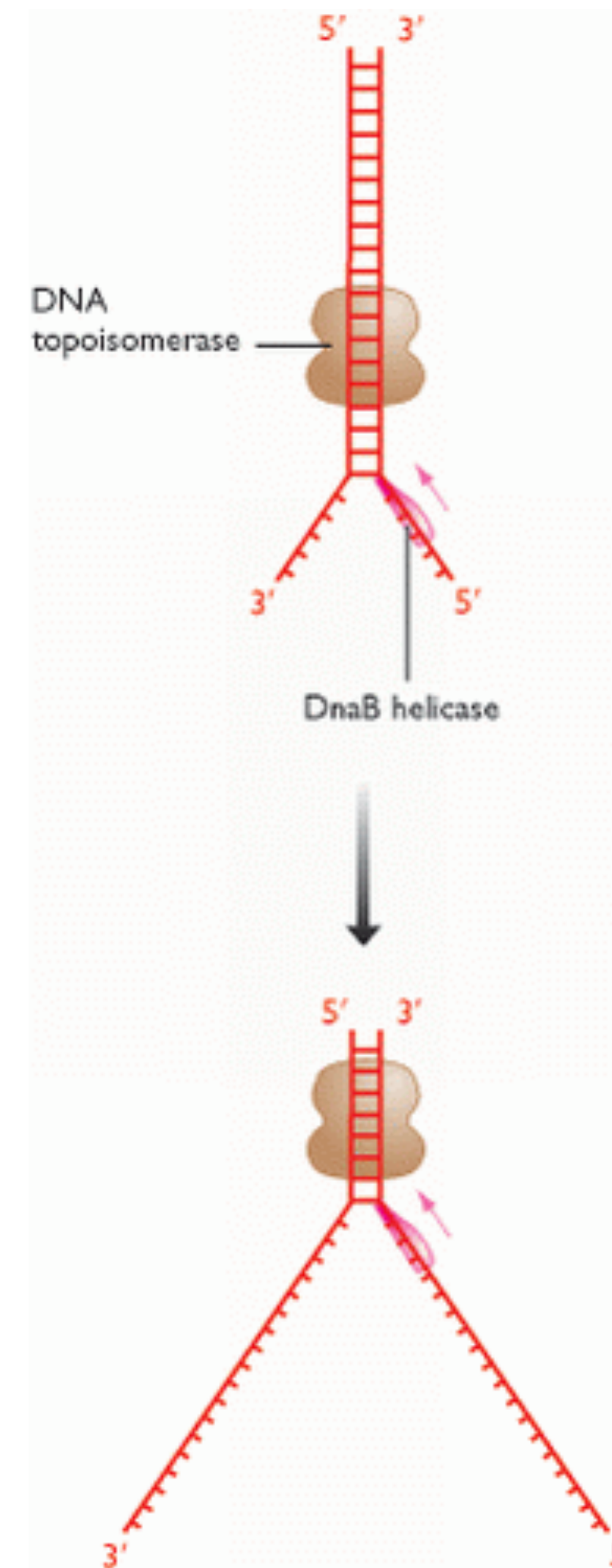


Maszynaria replikacyjna

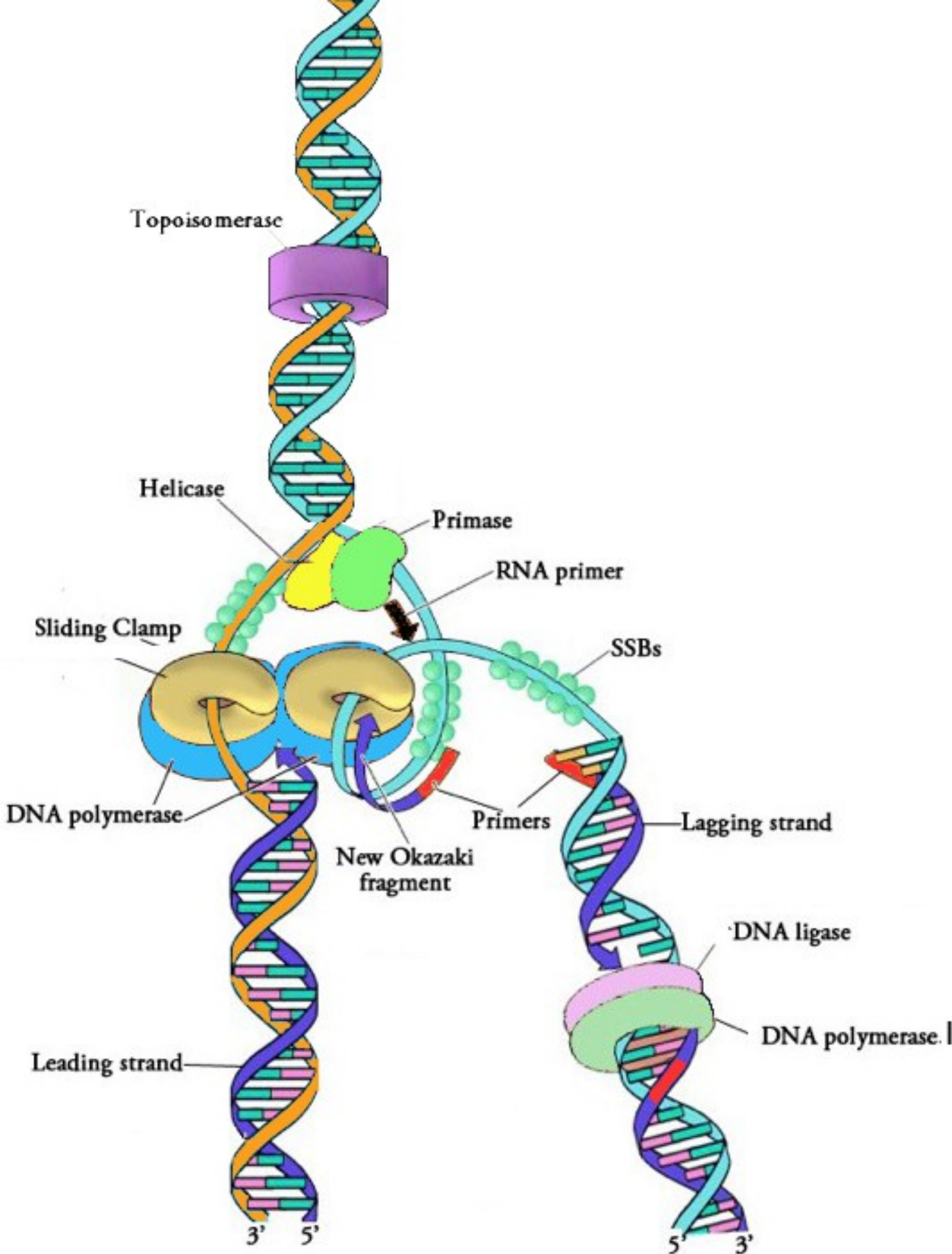
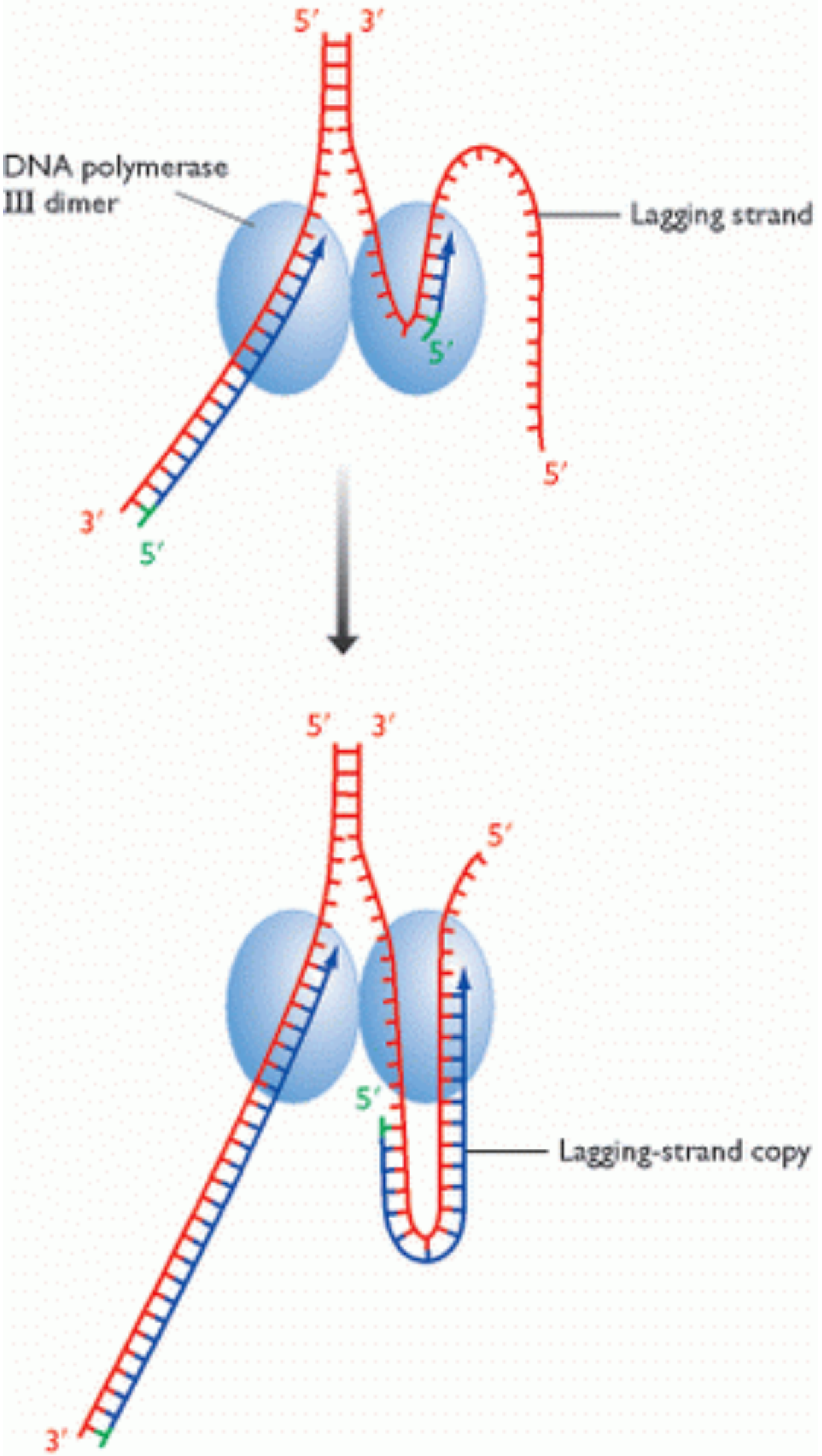


Maszyneria replikacyjna

- Topoizomeraza - usuwa naprężenia
- Helikaza (DnaB) - rozdziela nici
- SSB – stabilizuje jednoniciowy DNA
- Prymaza – syntetyzuje startery
- Polimeraza (-y)
- Ligaza – skleja fragmenty



Widelki replikacyjne - topologia

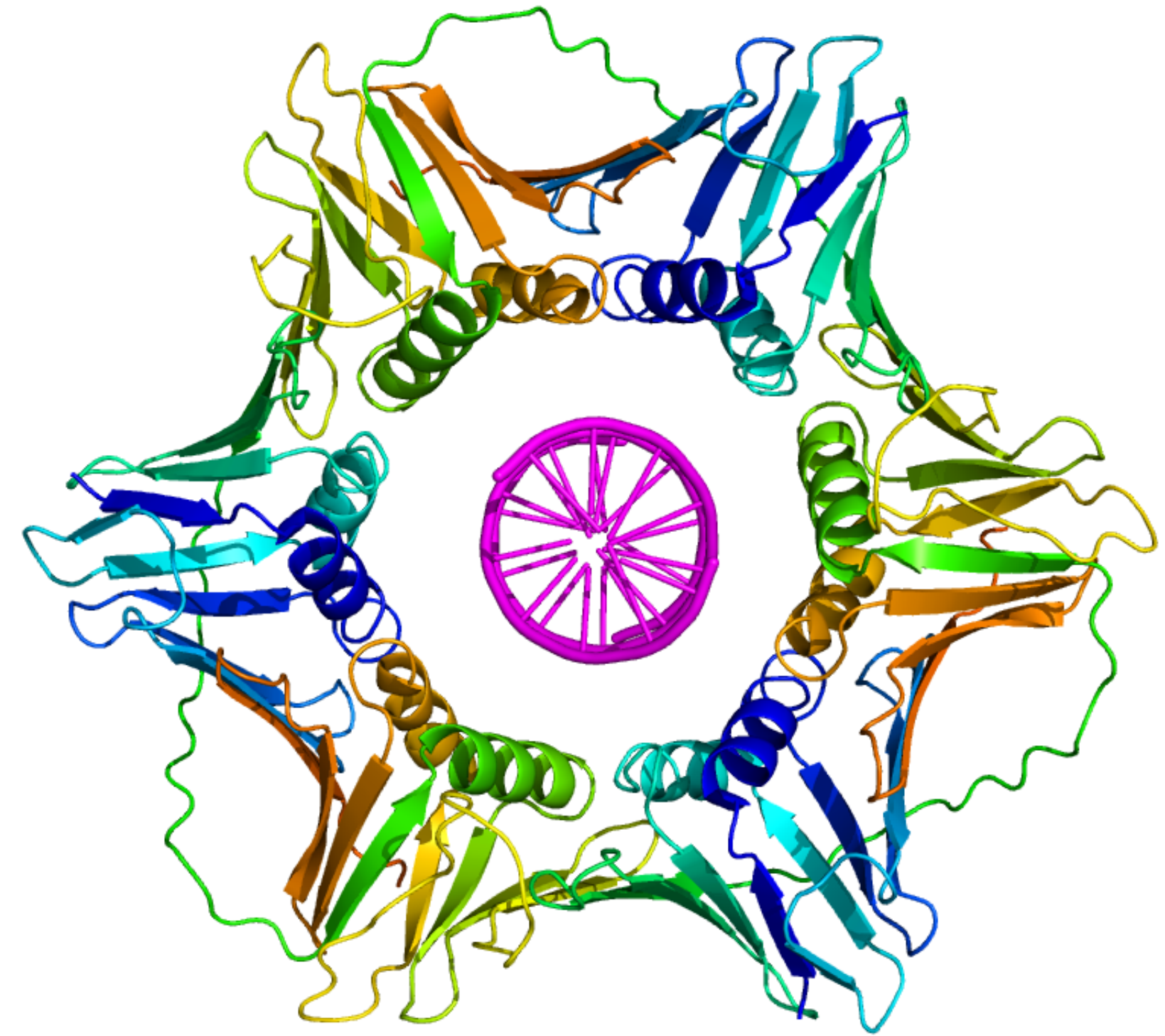




www.dnalc.org

Dodatkowe czynniki

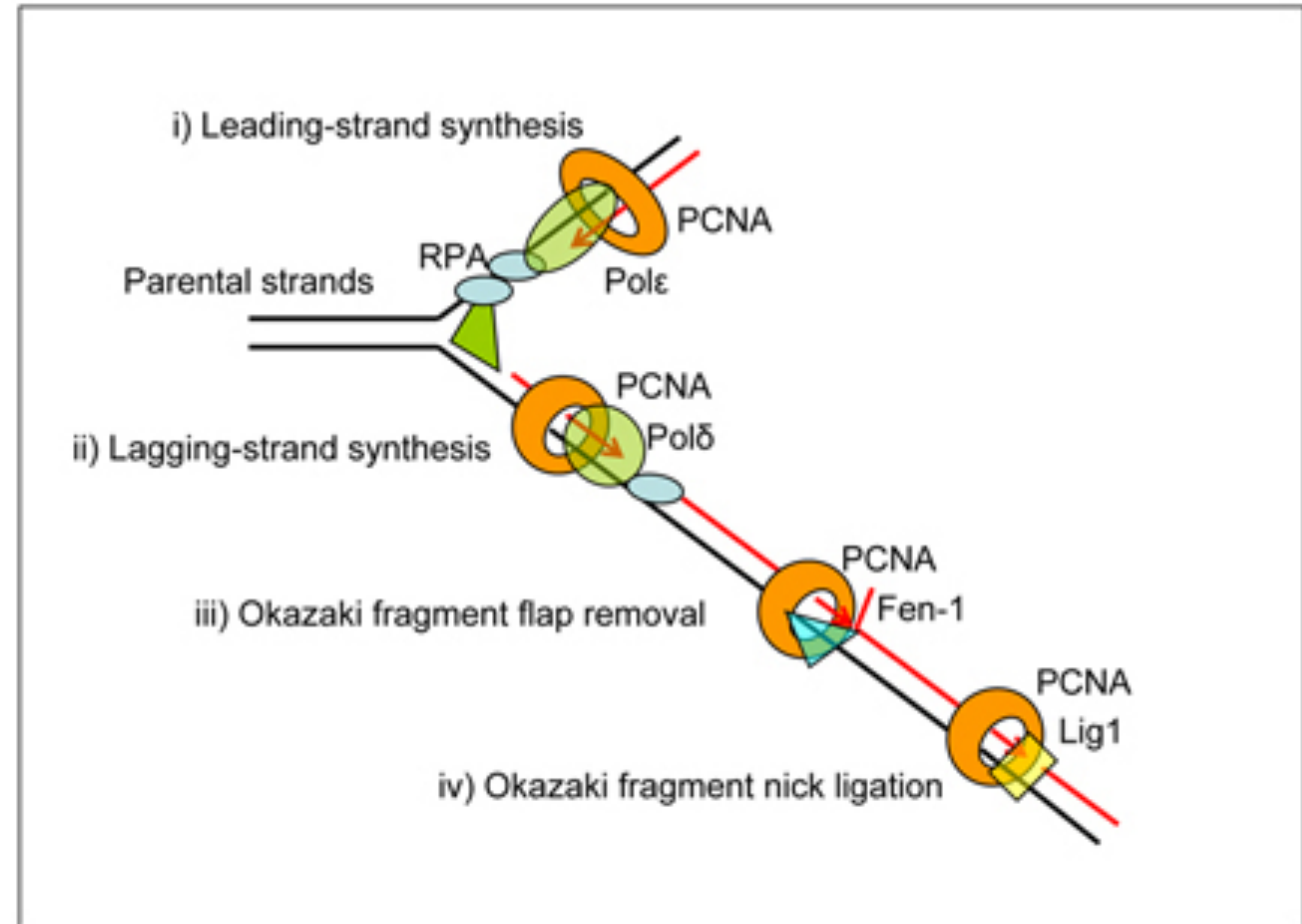
- Kompleksy białkowe o strukturze przesuwającego się pierścienia (*sliding clamp*)
- Zapewniają procesywność
- Regulacja i koordynacja replikacji



Bakterie	podjednostka β polIII
Archaea	PCNA typu archaea
Eukarionty	PCNA

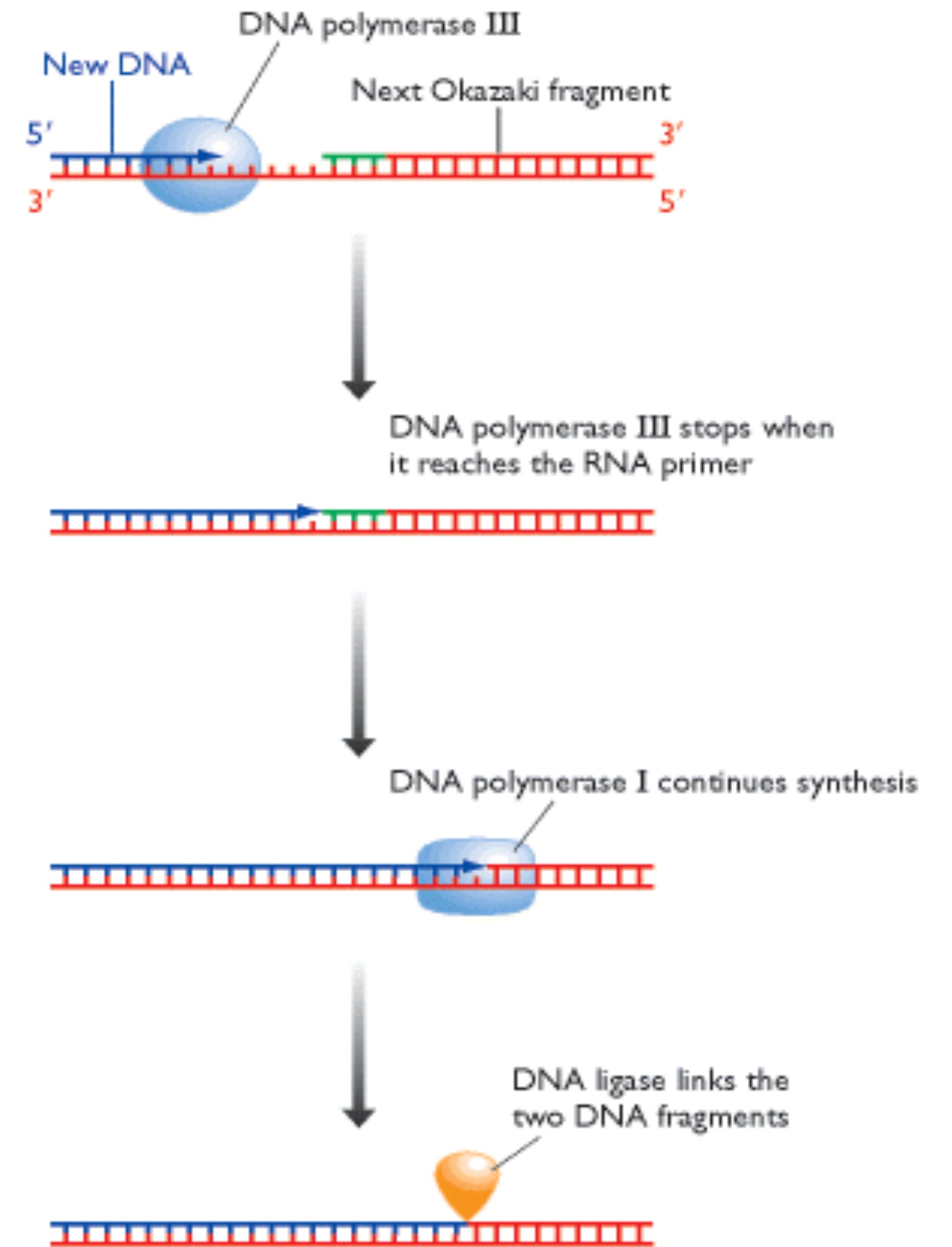
PCNA

- Proliferating Cell Nuclear Antigen
- Kompleks białkowy w formie pierścienia przesuwanego się po nici DNA w czasie replikacji
- Koordynuje różne etapy replikacji i syntezy DNA



Polimerazy bakteryjne

- PolIII (*PolC*) – główny enzym replikacyjny, ma aktywność Exo 3'-5' (korekta błędów), synteza do 1000 nt/s
- PolIII nie ma aktywności Exo 5'-3'
- PolI (*PolA*) – ma dodatkowo aktywność Exo 5'-3', usuwa startery i dokończy syntezę, do 20 nt/s



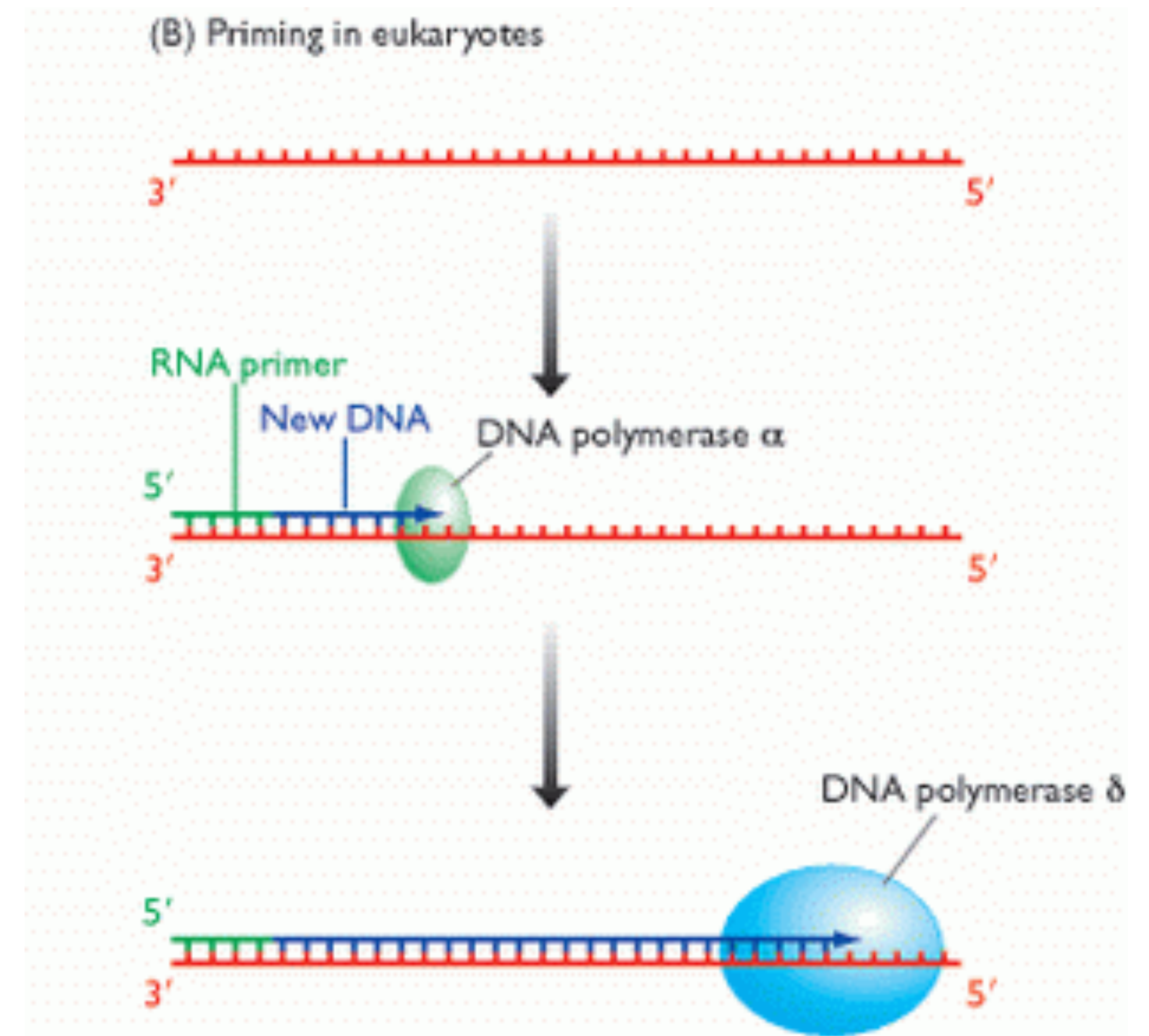
Ligaza łączy zsyntetyzowane fragmenty (nie jest polimerazą)

Polimerazy bakteryjne c.d.

- PolIII (*PolB*) – naprawa uszkodzonego DNA w fazie stacjonarnej
- PolIV i polV – synteza DNA w fazie stacjonarnej (polIV) i przy znacznych uszkodzeniach genomu (polV)

Polimerazy Eukaryota

- Pol α – prymaza, wydłuża startery
- Pol β – naprawa DNA
- Pol δ – główny enzym replikacyjny
- Pol ϵ – replikacja, kontrola cyklu kom., naprawa DNA
- Pol γ – replikacja DNA w mitochondriach



Polimerazy eukariotyczne nie mają aktywności Exo 5'-3', startery RNA usuwają nukleazy FEN1, RnazaH i inne białka

Dwie klasy polimeraz

- O dużej wierności – mało błędów, ale wrażliwe na uszkodzenia w matrycy
 - zatrzymują się w miejscu uszkodzenia
 - standardowe enzymy replikacyjne
- O niskiej wierności – więcej błędów, ale mniej wrażliwe na uszkodzenia matrycy
 - są w stanie kontynuować syntezę mimo uszkodzeń matrycy – **TLS (trans-lesion synthesis)**
 - mechanizm umożliwiający dokończenie replikacji uszkodzonego DNA (zapobiega rearanżacjom genomu)

Uszkodzenia DNA i replikacja

- Obecność uszkodzeń w DNA hamuje inicjację replikacji
- Jeżeli w trakcie replikacji napotykanne są uszkodzenia w DNA to uruchamiane są polimerazy TLS
 - replikacja z błędami jest mniej ryzykowna, niż replikacja niedokończona
- Przy dużych uszkodzeniach DNA, przekraczających możliwości naprawy
 - u bakterii - uruchomienie systemu SOS (replikacja za wszelką cenę)
 - u wielokomórkowych Eukaryota - zatrzymanie cyklu (G0), apoptoza

System SOS u bakterii

- Przy rozegłych uszkodzeniach matrycy (miejsca AP, fotoprodukty, uszkodzone zasady)
- Białko RecA pokrywa matrycę
- Polimeraza V z RecA tworzy mutasom
- Replikacja zachodzi, ale generuje wiele błędów

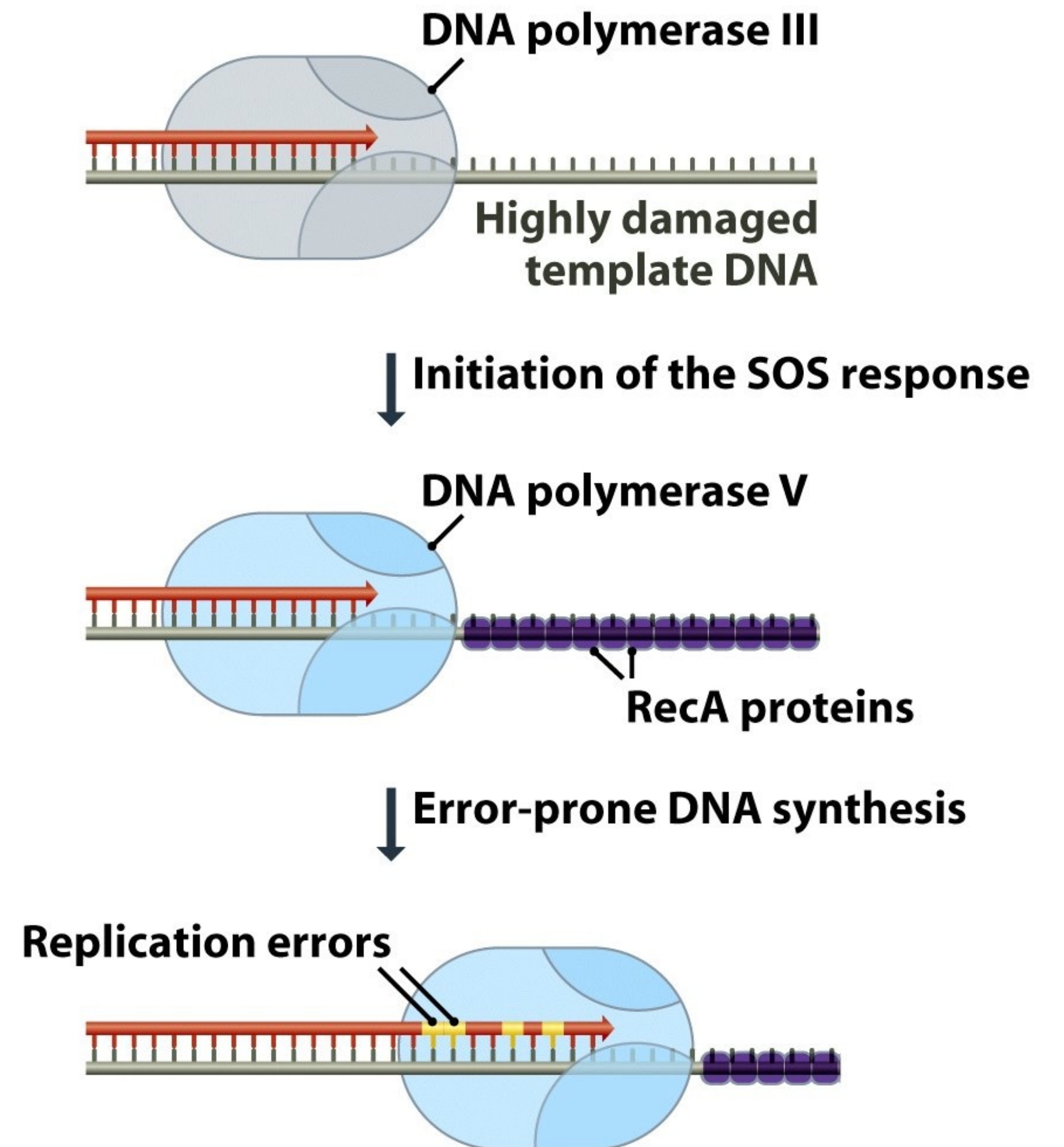
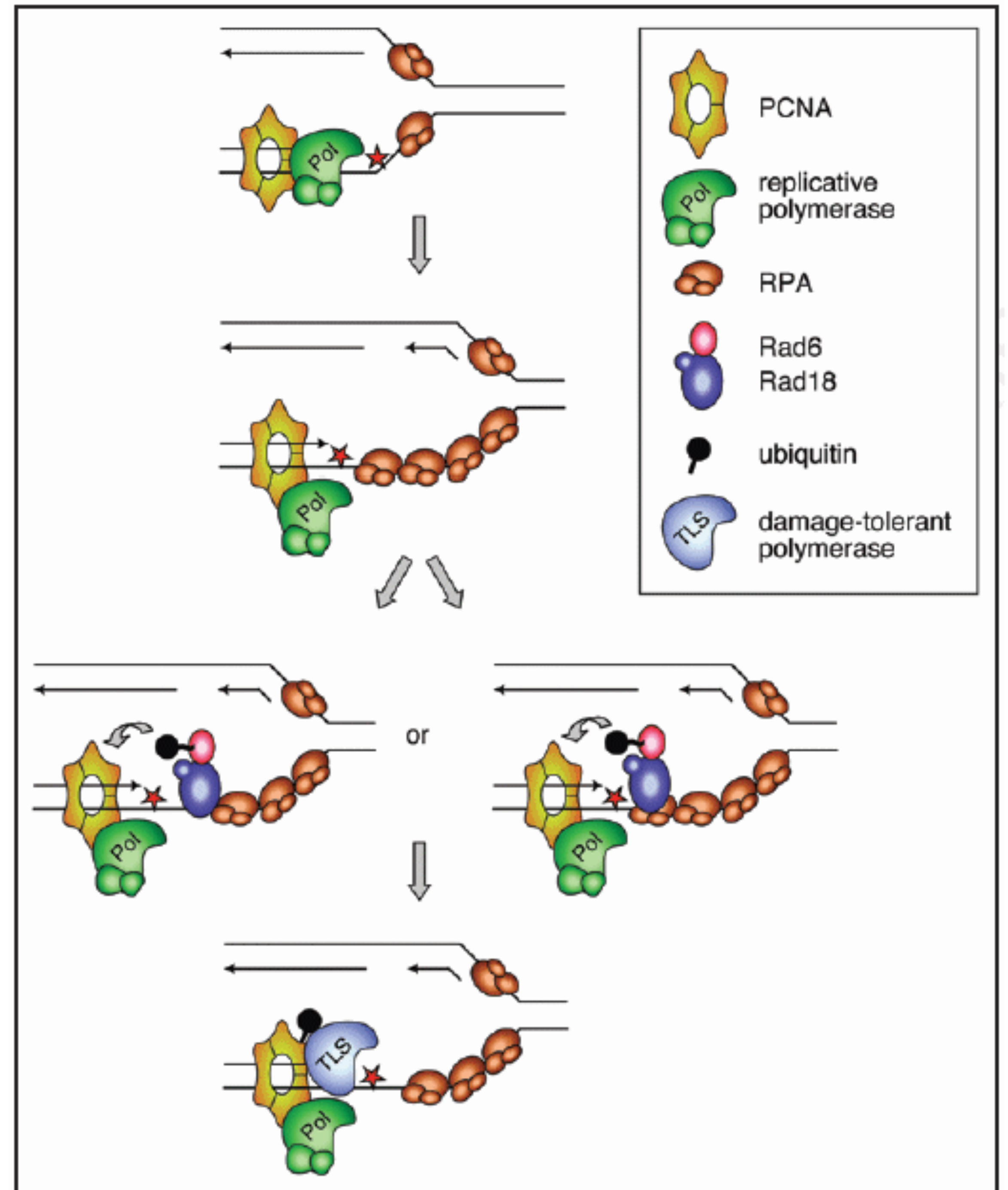


Figure 16-29 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Rola PCNA

- Ubikwitynacja i deubikwitynacja PCNA przełącza między replikacją TLS i wierną



Synteza DNA rozpoczyna się zawsze od startera RNA?

- Odkryty w 2013 enzym PrimPol, aktywny w mitochondriach ssaków
- Jest polimerazą DNA typu TLS
- Jest w stanie zainicjować syntezę DNA od startera z DNA!!

PrimPol, an Archaic Primase/Polymerase Operating in Human Cells

Sara García-Gómez,¹ Aurelio Reyes,² María I. Martínez-Jiménez,¹ E. Sandra Chocrón,¹ Silvana Mourón,³ Gloria Terrados,^{1,7} Christopher Powell,² Eduardo Salido,⁵ Juan Méndez,^{3,6} Ian J. Holt,^{4,6} and Luis Blanco^{1,6,*}

¹Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, 28049 Madrid, Spain

²MRC Mitochondrial Biology Unit, Wellcome Trust/MRC Building, Cambridge CB2 0XY, UK

³Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), 28029 Madrid, Spain

⁴MRC National Institute for Medical Research, Mill Hill, London NW71AA, UK

⁵Hospital Universitario de Canarias, Universidad de la Laguna, 38320 Tenerife, Spain

⁶These authors are co-senior authors

⁷Present address: Institute of Molecular Biology and Tumor Research (IMT), Philipps-Universität Marburg, 35032 Marburg, Germany

*Correspondence: lblanco@cbm.uam.es

<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2013.09.025>

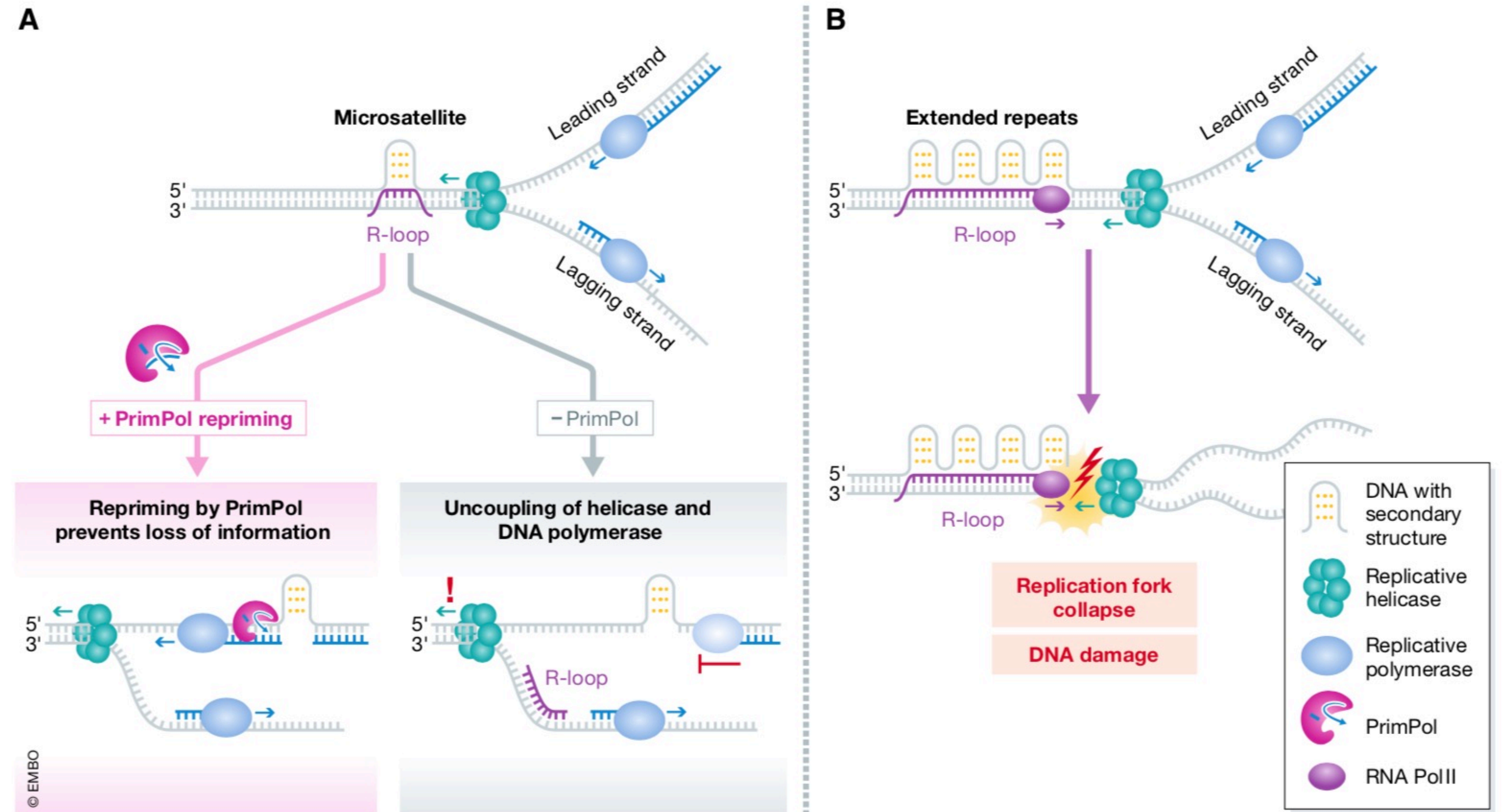
PrimPol

- Przedstawiciel rodziny obecnej też u Archaea
- Ponawia przerwana replikację w mitochondriach i w jądrze
- M. in. w obszarach repetytywnych, gdzie replikacja blokowana przez zatrzymaną transkrypcję (pętle R)

Revealing the Superpowers of PrimPol: rescuing replicating microsatellites

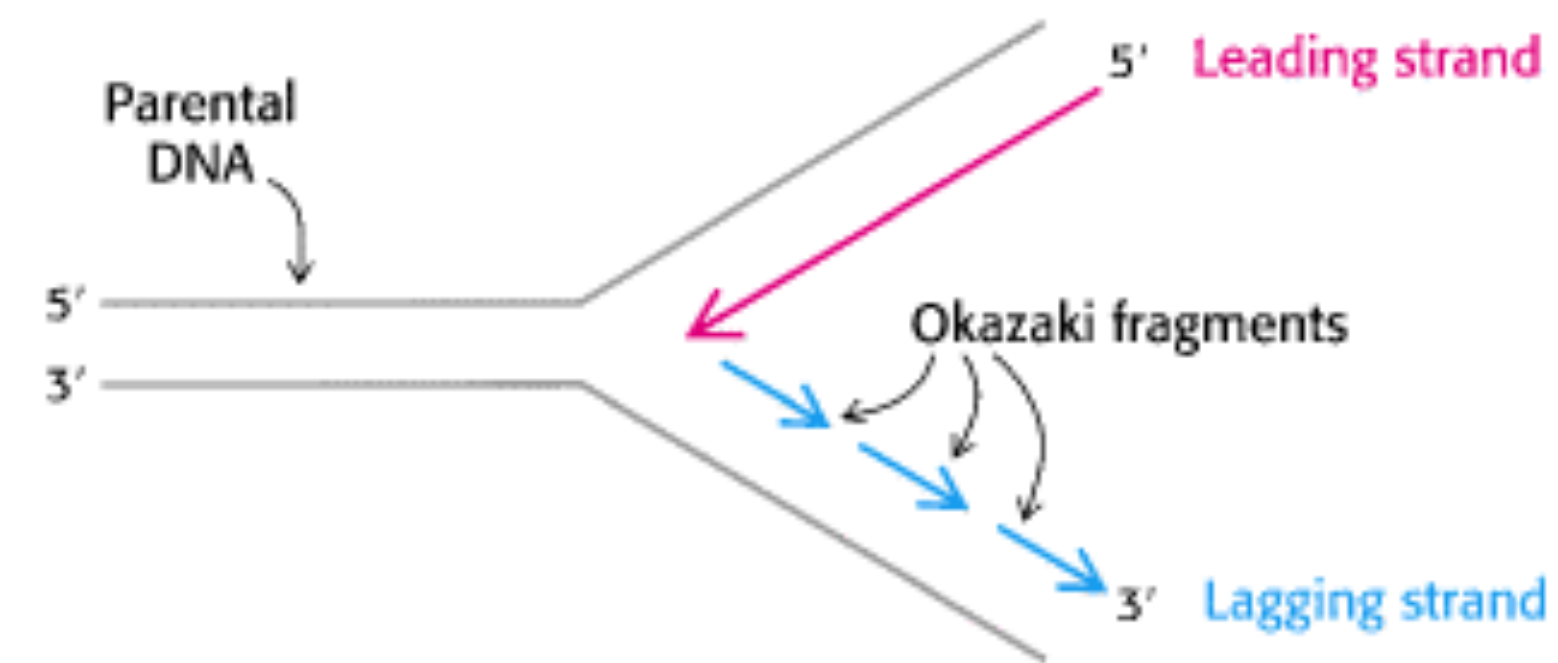
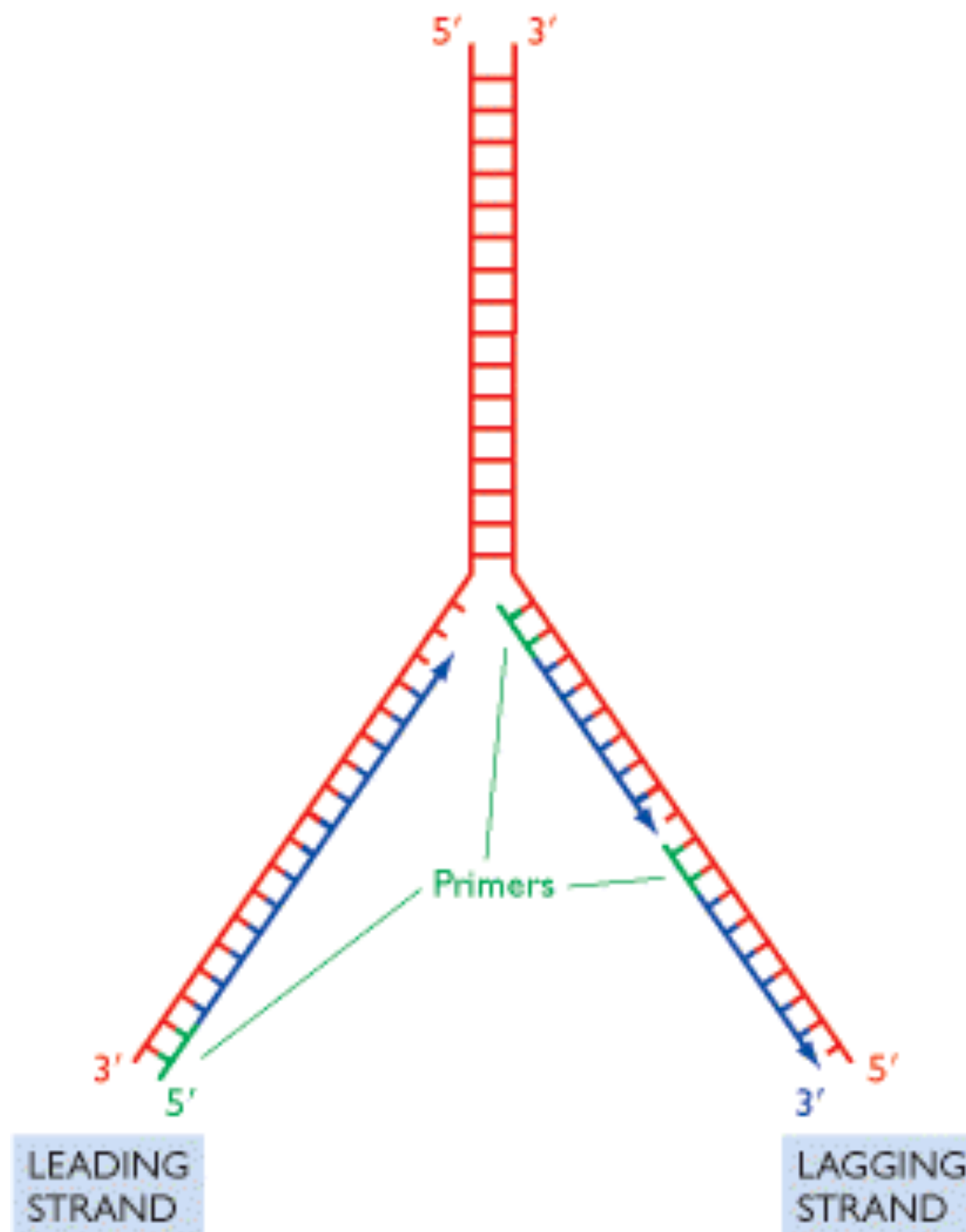
Jane EA Reid & Tamás Fischer

The EMBO Journal (2019) e101298



Problem nici nieciągłej

Na nici nieciągłej trzeba co pewien odcinek ponawiać syntezę startera – fragmenty Okazaki



Problem zakończenia replikacji DNA liniowego

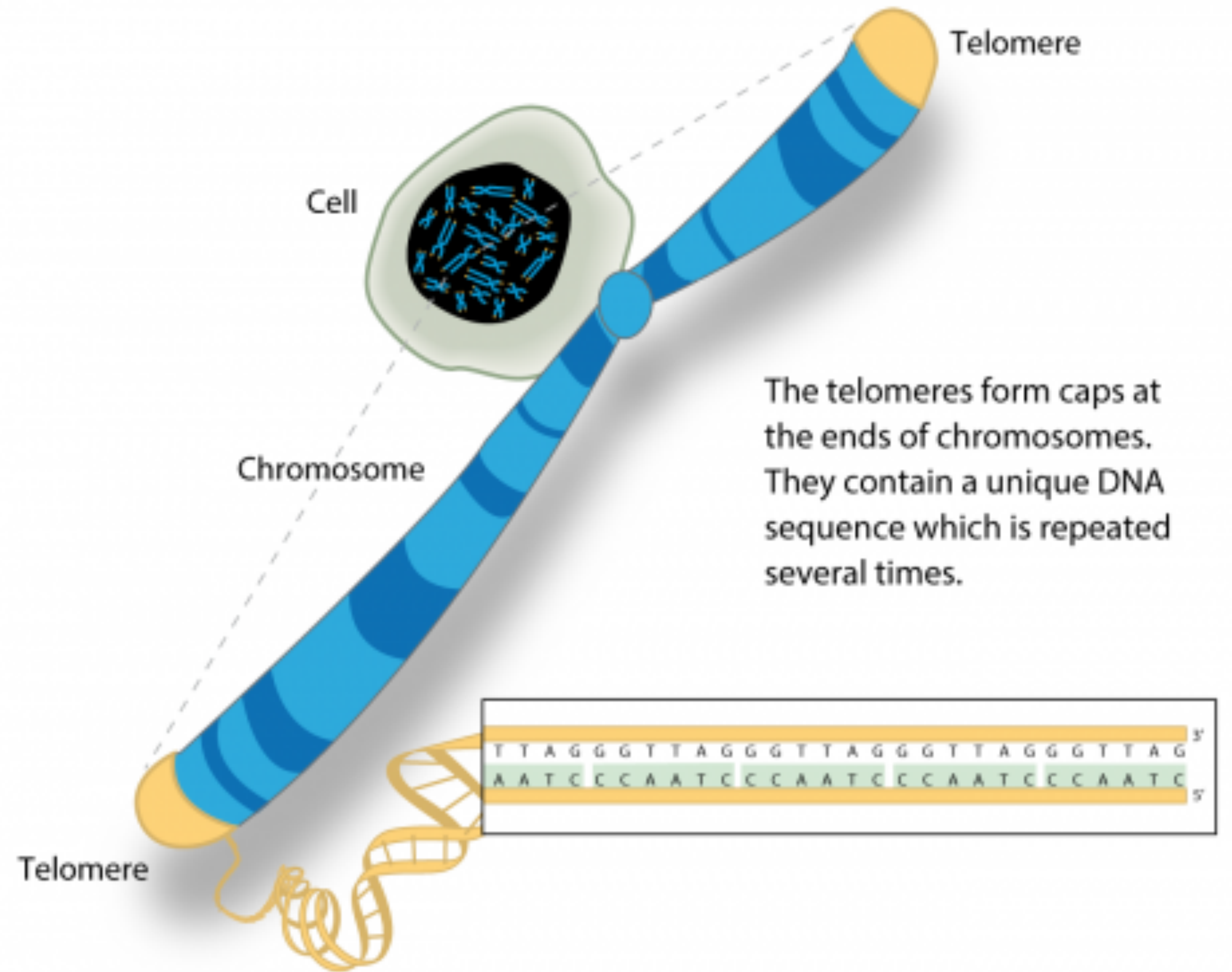
- Na końcu cząsteczki nie ma skąd zacząć nowego fragmentu Okazaki na nici opóźnionej
- Cząsteczka potomna będzie skrócona

The final Okazaki fragment cannot be primed



Telomery

- Końce chromosomów (gr. *telos*)
- Sekwencje powtórzone (u człowieka TTAGGG)
 - u człowieka ok. 2500 powtórzeń
- Skracają się przy każdym podziale komórki
 - u człowieka od ~11 kb do ~4 kb
- W niektórych komórkach mogą jednak być odtwarzane dzięki aktywności **telomerazy**



© The Nobel Committee for Physiology or Medicine 2009

Illustration: Annika Röhl

Telomeraza

- Telomeraza może wydłużać telomery wykorzystując fragment RNA
- Skracanie telomerów ogranicza liczbę podziałów niektórych komórek
- Aktywacja telomerazy związana jest z unieśmiertelnianiem komórek nowotworowych
- Istnieją też alternatywne sposoby wydłużania telomerów (oparte na rekombinacji)

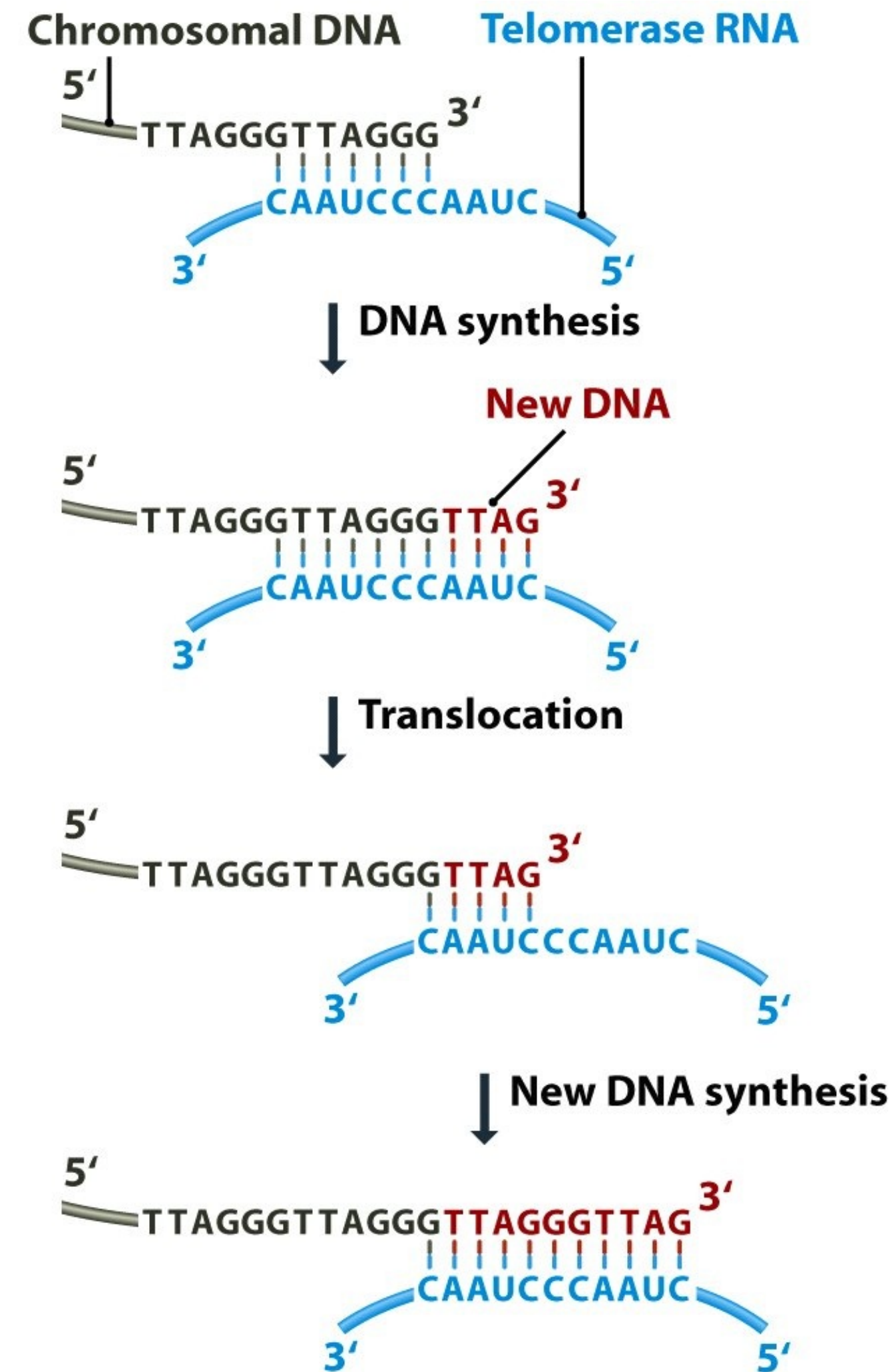


Figure 15-25 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

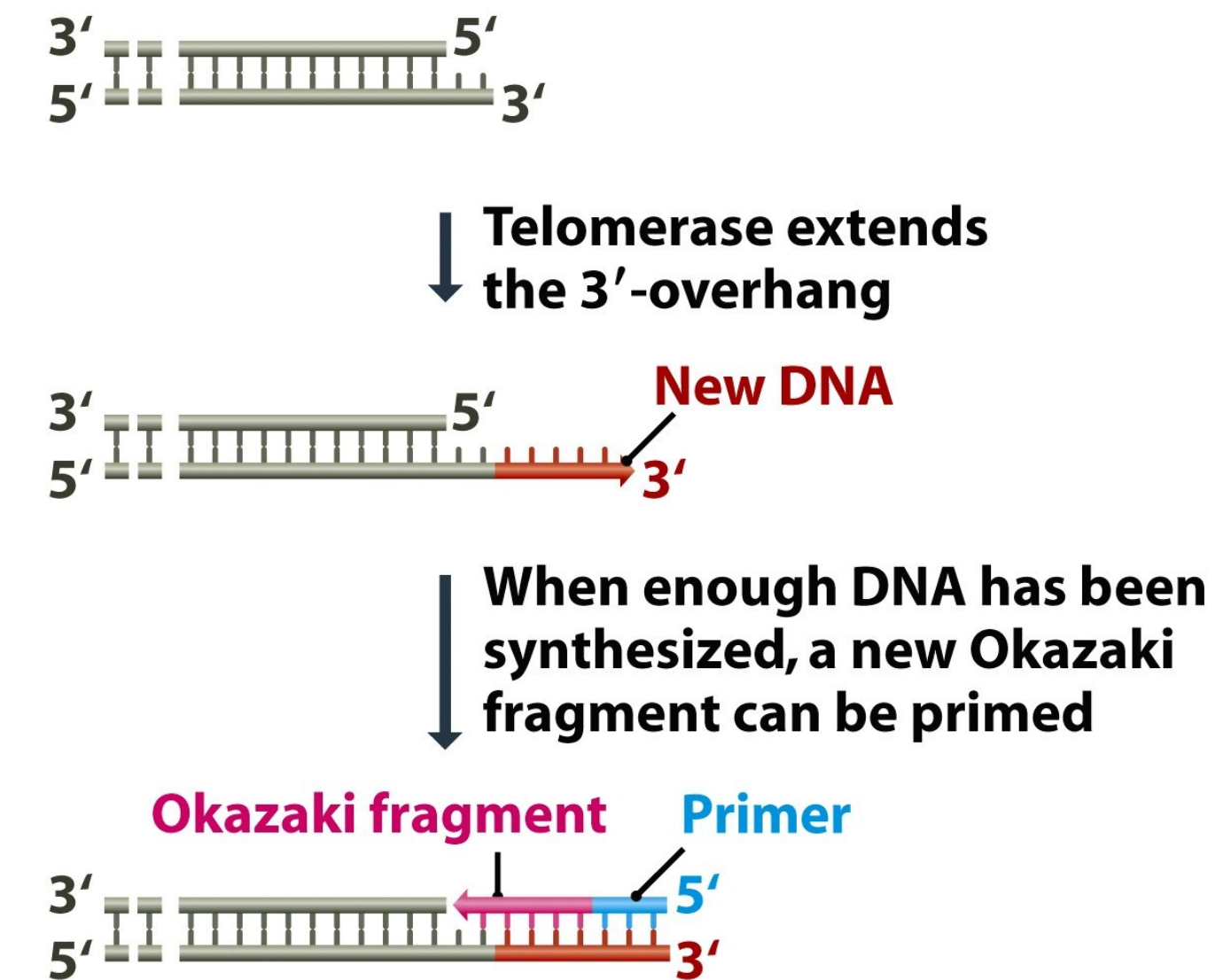


Figure 15-26 Genomes 3 (© Garland Science 2007)