

# Genetyka ogólna

wykład dla studentów II roku biotechnologii

Andrzej Wierzbicki

Uniwersytet Warszawski

Wydział Biologii

andw@ibb.waw.pl

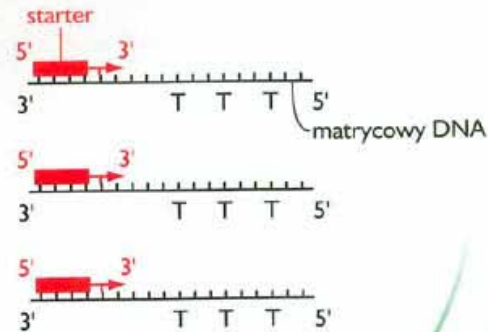
<http://arete.ibb.waw.pl/private/genetyka/>

- 
1. Gen to odcinek DNA odpowiedzialny za kodowanie funkcjonalnego produktu.
  2. W genomie występuje szereg sekwencji nie będących genami.
  3. Mitochondria i chloroplasty mają własne genomy.

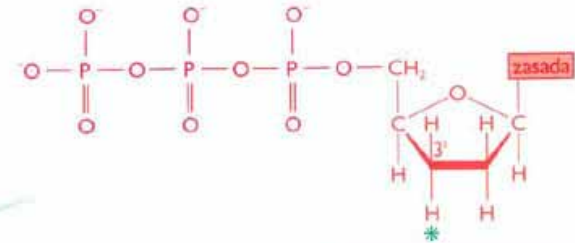
# Sekwencjonowanie DNA

## Technika terminacji łańcucha (dideoksy)

(A) Początek syntezy nici

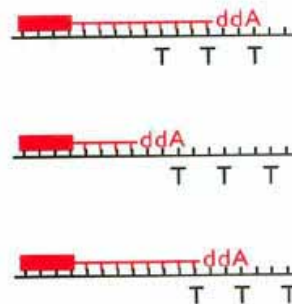


(B) Dideoksyrybonukleotyd A



\* miejsce zastąpienia w dNTP grupy -OH przez -H

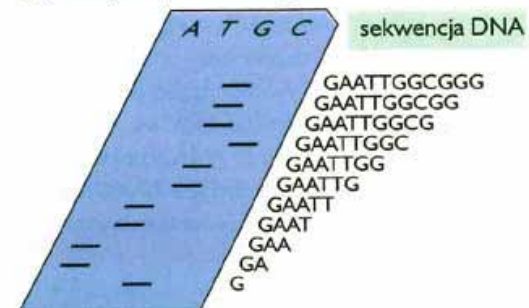
(C) Synteza nowej nici kończy się po włączeniu ddNTP



pula cząsteczek zakończonych A



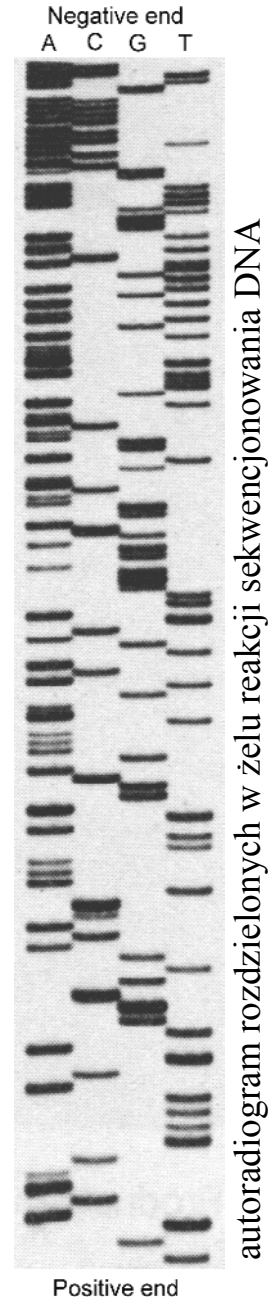
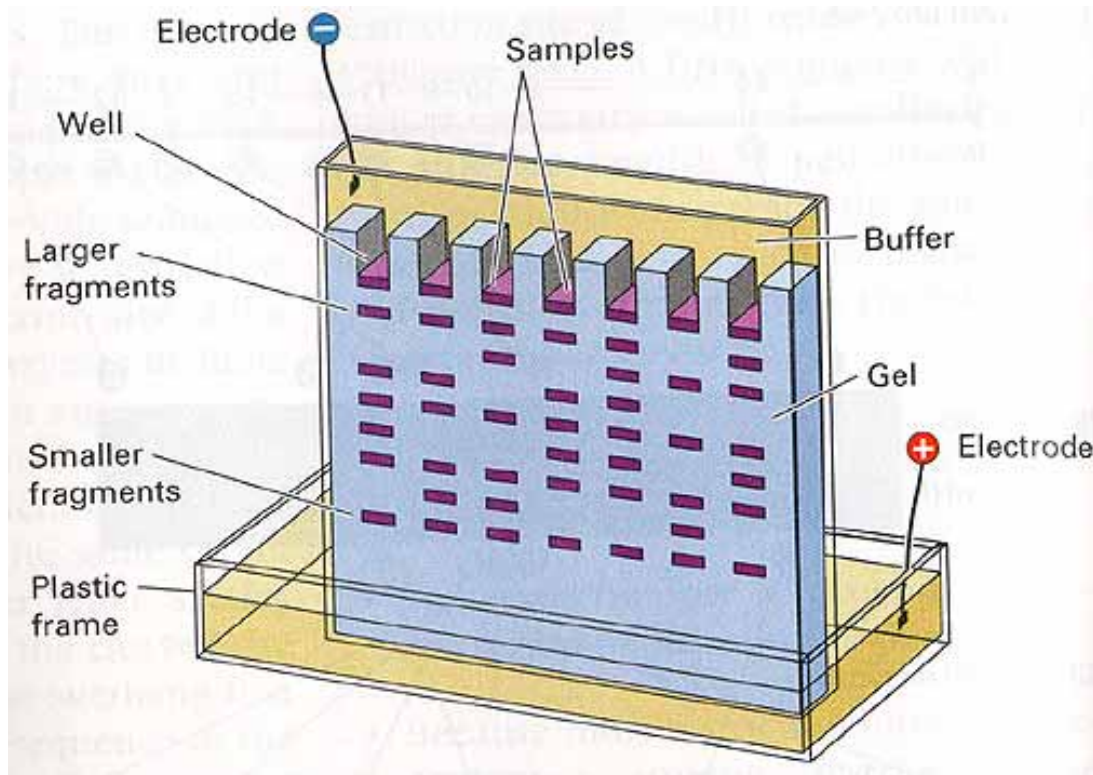
(D) Otrzymany autoradiogram



# Sekwencjonowanie DNA

## Elektroforeza DNA

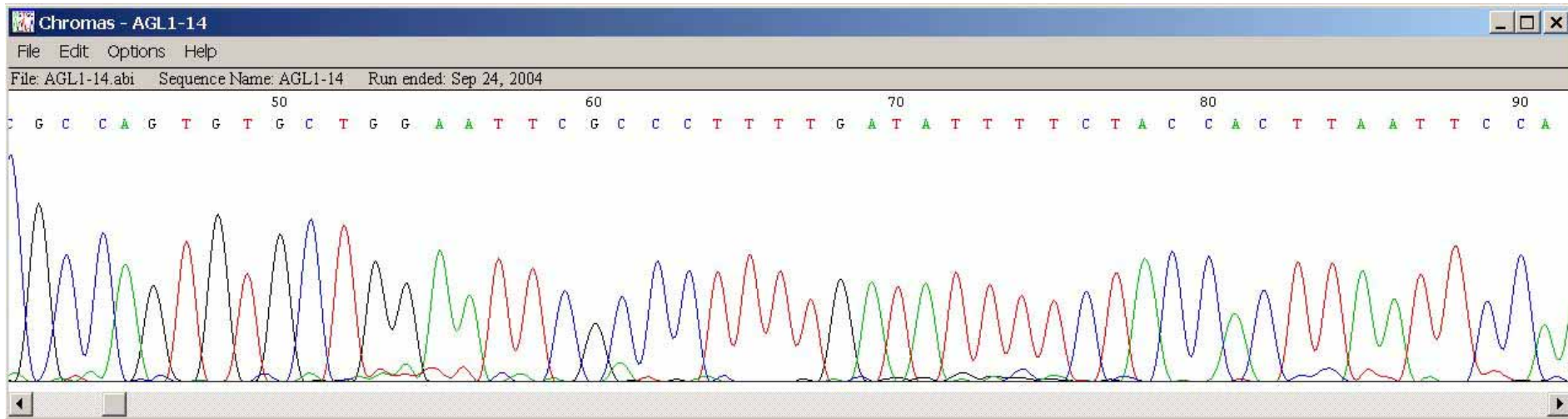
- pole elektryczne - DNA się porusza
- żel stawia opór proporcjonalny do wielkości cząsteczki
- małe cząsteczki DNA wędrują szybko, duże wolno
- prążki - grupy cząsteczek o identycznej długości



# Sekwencjonowanie DNA

## Co zrobić, aby zsekwencjonować DNA?

- uzyskać właściwą matrycę
- wybrać startery
- reakcję i rozdział zlecić wyspecjalizowanemu laboratorium
- przeanalizować uzyskane wyniki

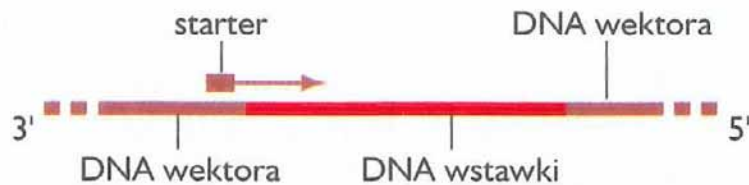


# Sekwencjonowanie genomów

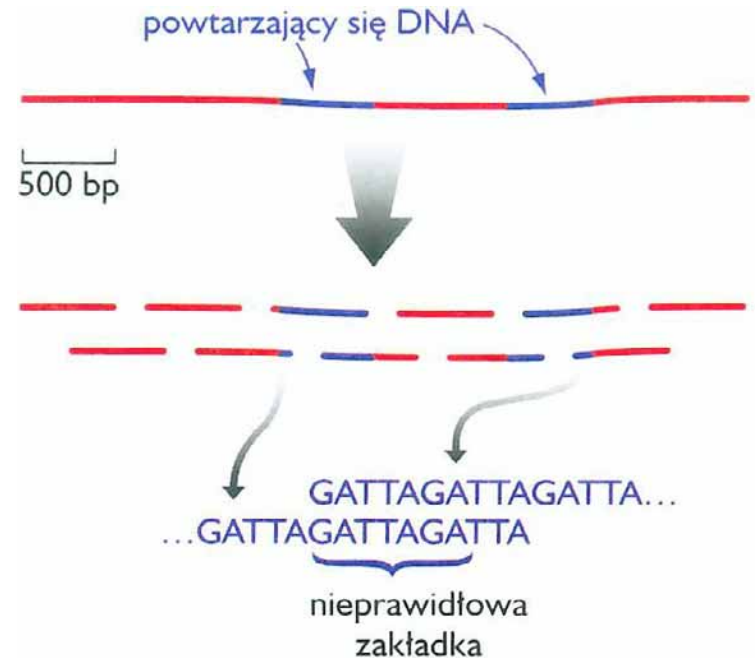
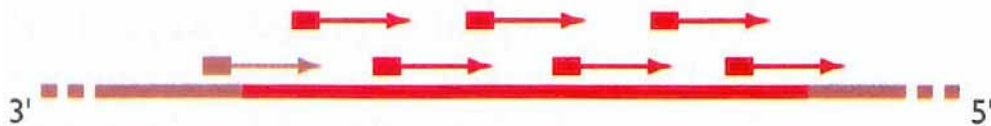
Główny problem: reakcja sekwencjonowania sięga tylko do 1000 pz

- startery wewnętrzne lub DNA pocięty na krótkie fragmenty
- jak ustalić kolejność krótkich sekwencji?
- jak zsekwencjonować sekwencje repetytywne?

(A) Starter uniwersalny



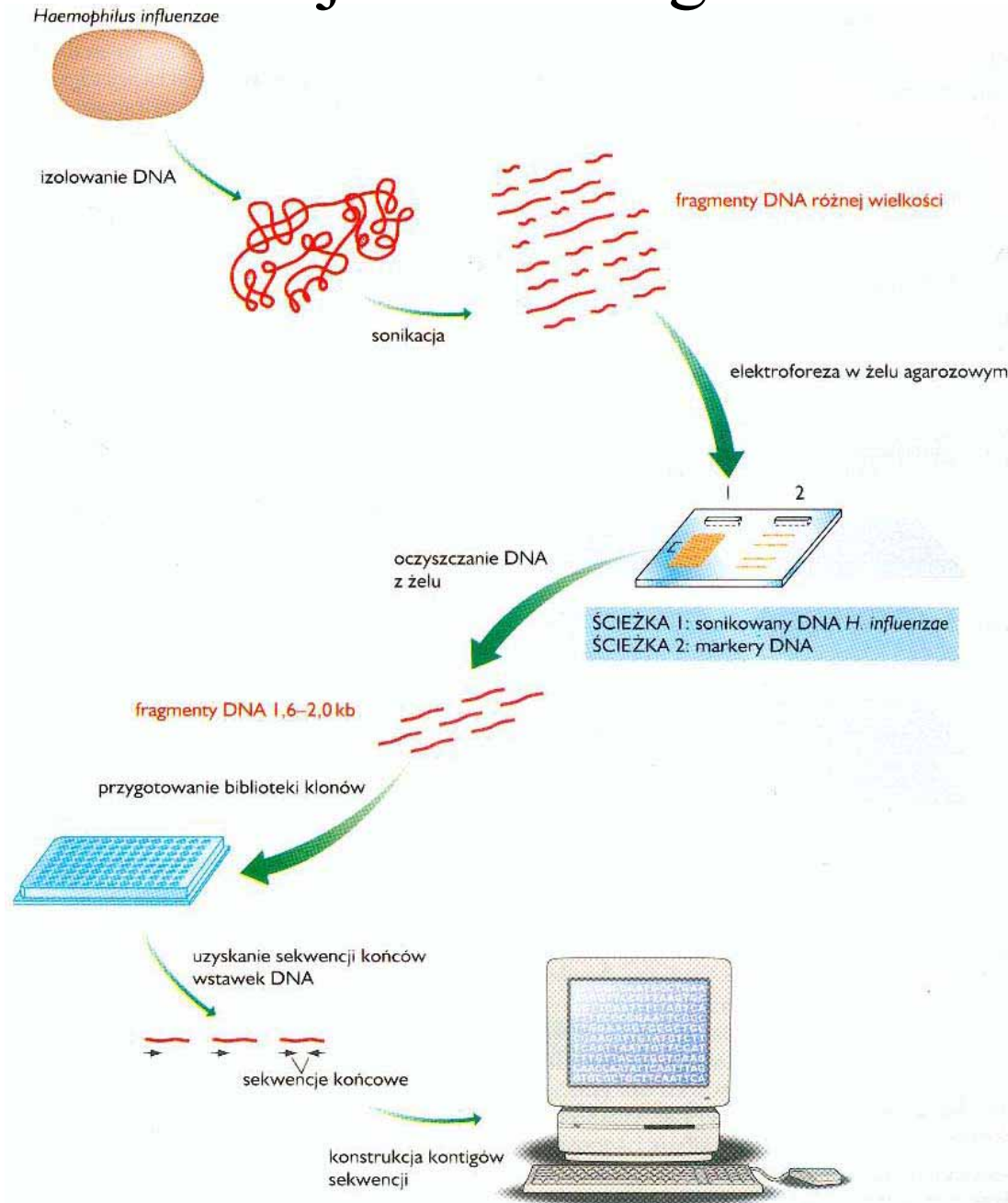
(B) Startery wewnętrzne



# Sekwencjonowanie genomów

## Metoda shotgun

- losowa fragmentacja DNA
- wybór fragmentów o odpowiedniej wielkości
- wstawianie do wektora
- sekwencjonowanie
- składanie sekwencji w komputerze



# Zsekwencjonowane genomy

---

## Organizmy o zsekwencjonowanych genomach (listopad 2004)

- 66 prokariotycznych w tym szereg chorobotwórczych
- wszystkie główne organizmy modelowe
- niektóre rośliny użytkowe
- człowiek

1. Gen to odcinek DNA odpowiedzialny za kodowanie funkcjonalnego produktu.
2. W genomie występuje szereg sekwencji nie będących genami.
3. Mitochondria i chloroplasty mają własne genomy.
4. Genomy wielu organizmów są zsekwencjonowane.

## Regulacja ekspresji genów

- po co regulować ekspresję genów?
- jakie są mechanizmy regulacji ekspresji genów?
- na jakich poziomach ekspresja genów jest regulowana

# Regulacja ekspresji genów

---

## Znaczenie regulacji ekspresji genów

- rozwój i różnicowanie
- odpowiedź na warunki środowiska
- procesy chorobowe
- wydajność organizmów użytkowych

# Regulacja ekspresji genów

---

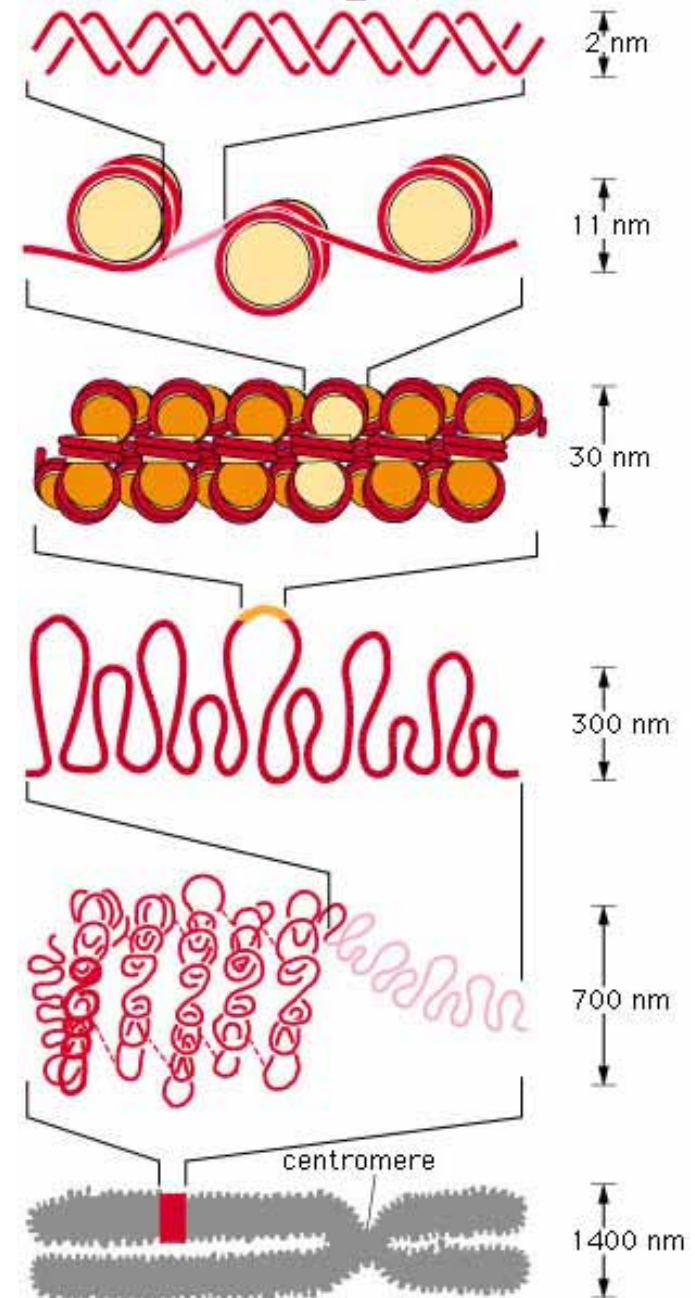
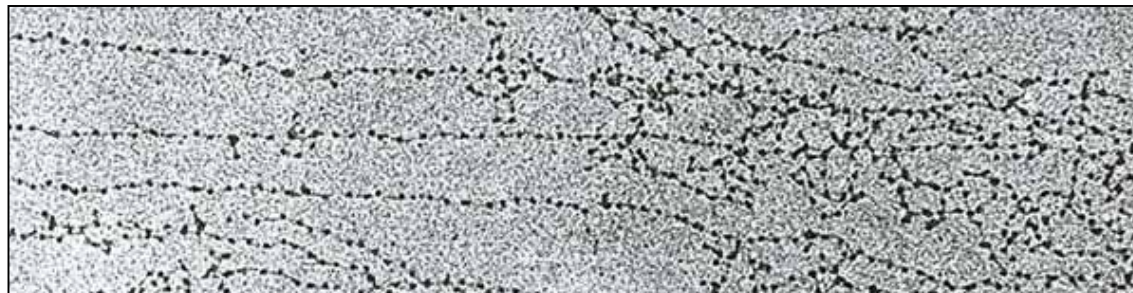
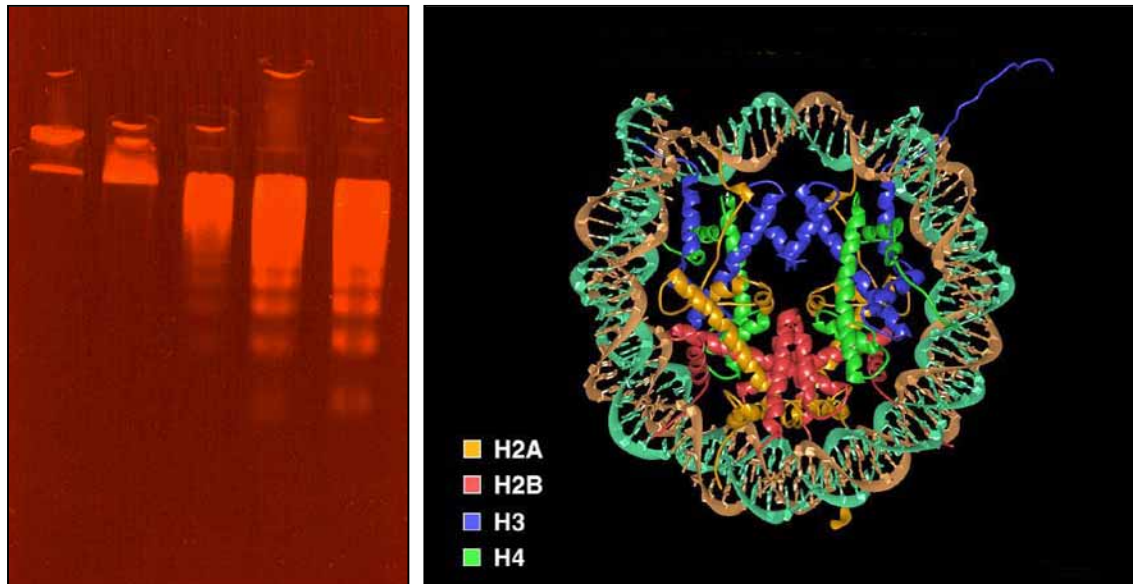
Poziomy na których ekspresja genów jest regulowana

- dostęp do DNA
- inicjacja transkrypcji
- terminacja transkrypcji
- splicing
- stabilność RNA
- inicjacja translacji
- transport białka
- cięcie białka
- modyfikacje posttranslacyjne białka
- degradacja białka

# Dostęp do DNA

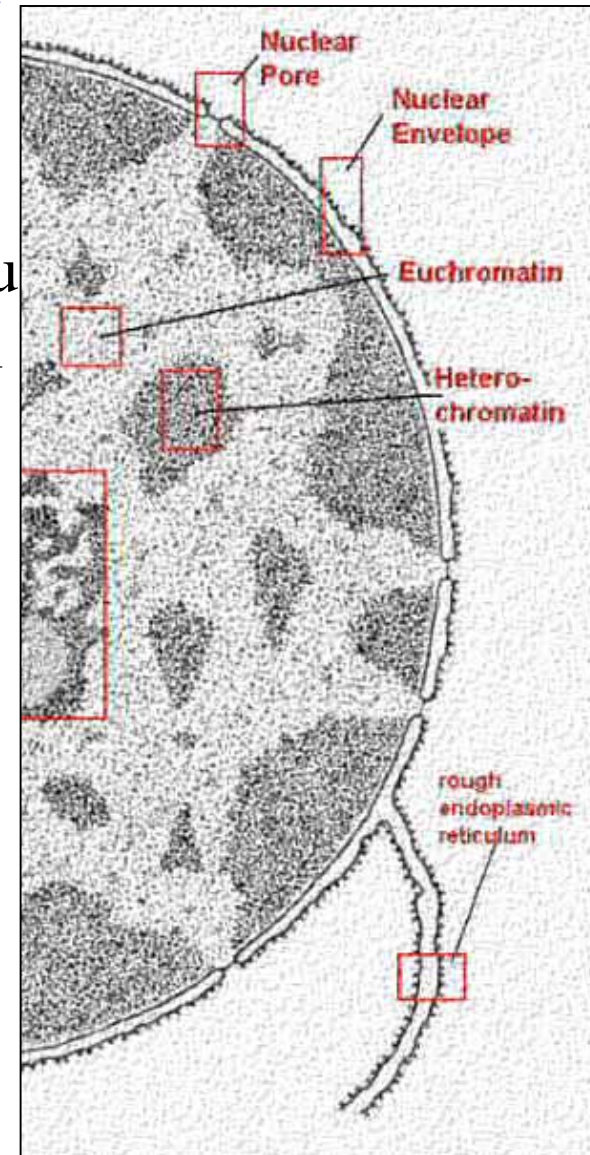
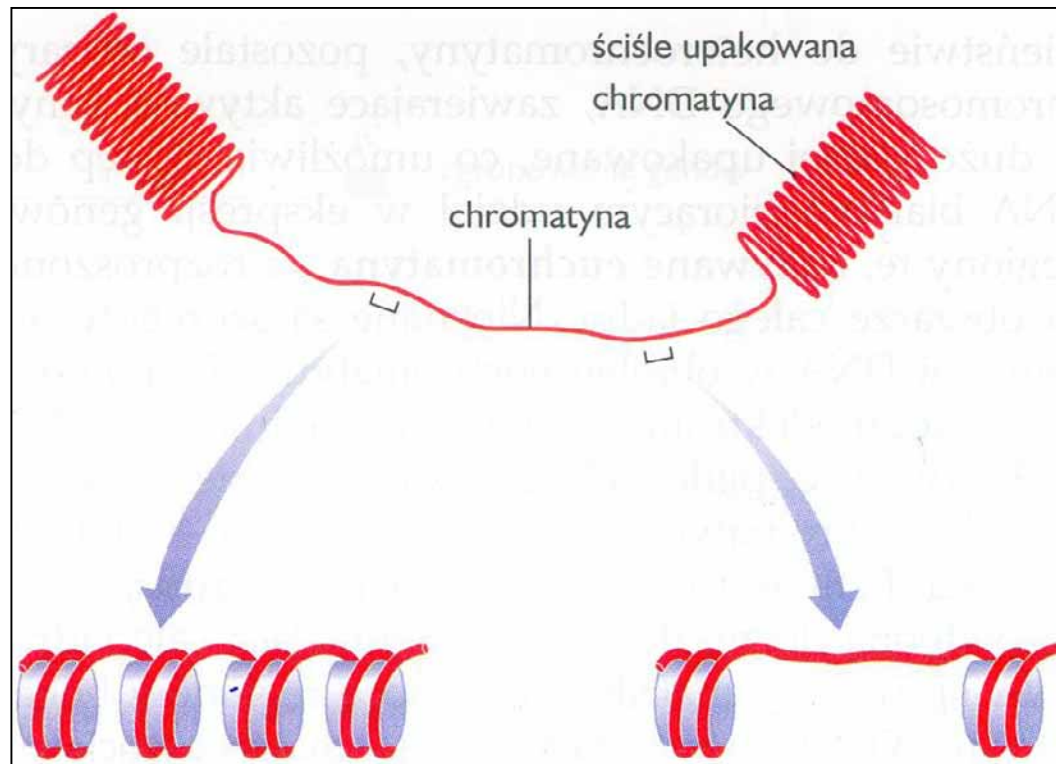
## Struktura nukleosomowa chromatyny

- DNA jest nawinięty na rdzenie z histonów H2A, H2B, H3 i H4
- struktury wyższego rzędu



## Regulacja struktury nukleosomowej chromatyny

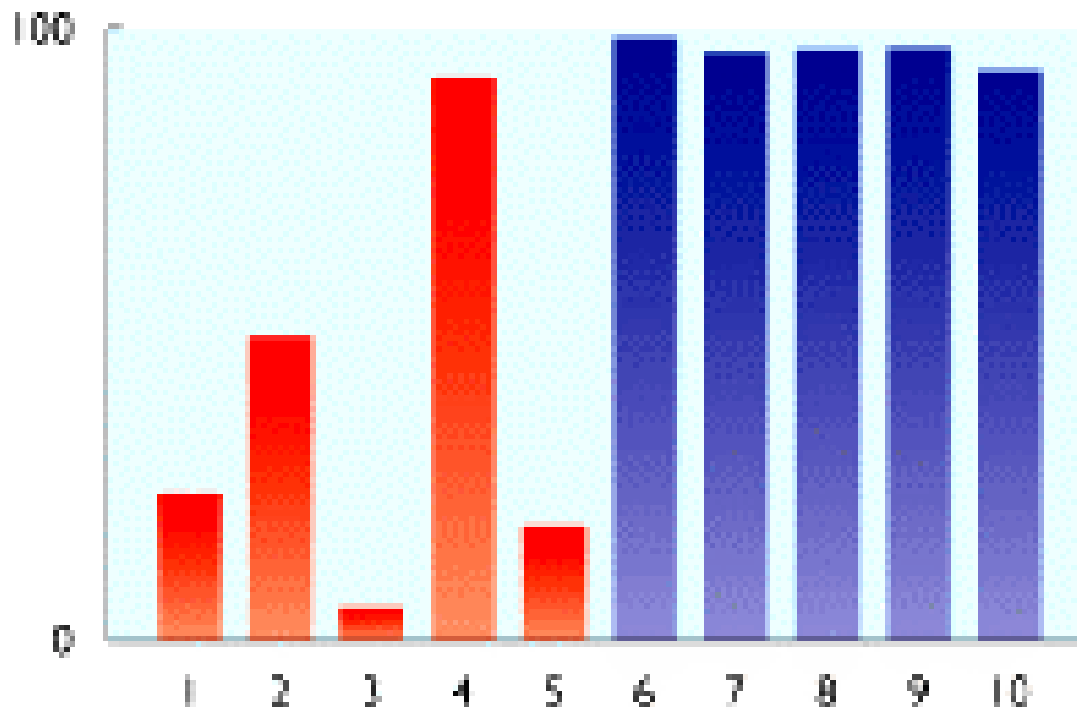
- euchromatyna i heterochromatyna - obszary o strukturze rozluźnionej lub zagęszczonej
- przesuwanie nukleosomów - zwalnianie dostępu do miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych



elementy jądra komórkowego

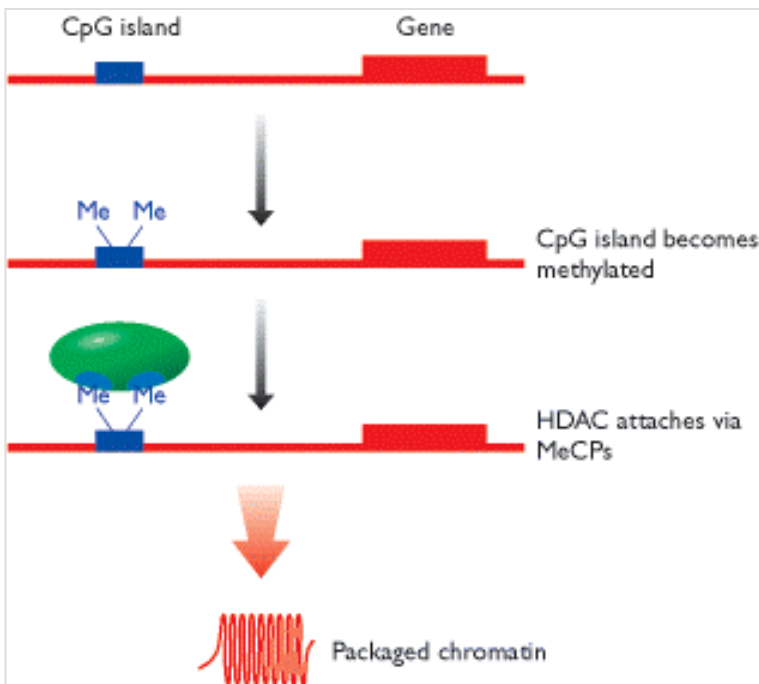
## Znaczenie struktury chromatyny dla uzyskiwania organizmów transgenicznych

- miejsce integracji transgenu w genomie silnie wpływa na poziom ekspresji
- sekwencje modyfikujące strukturę chromatyny mogą niwelować efekt pozycyjny

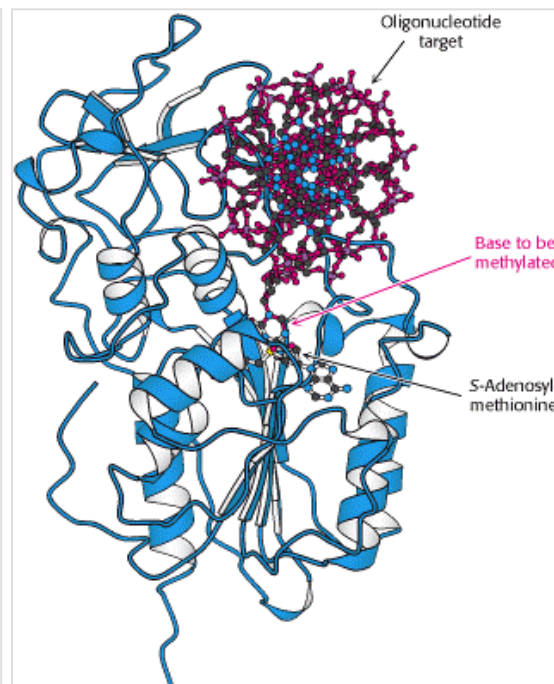


## Metylacja DNA

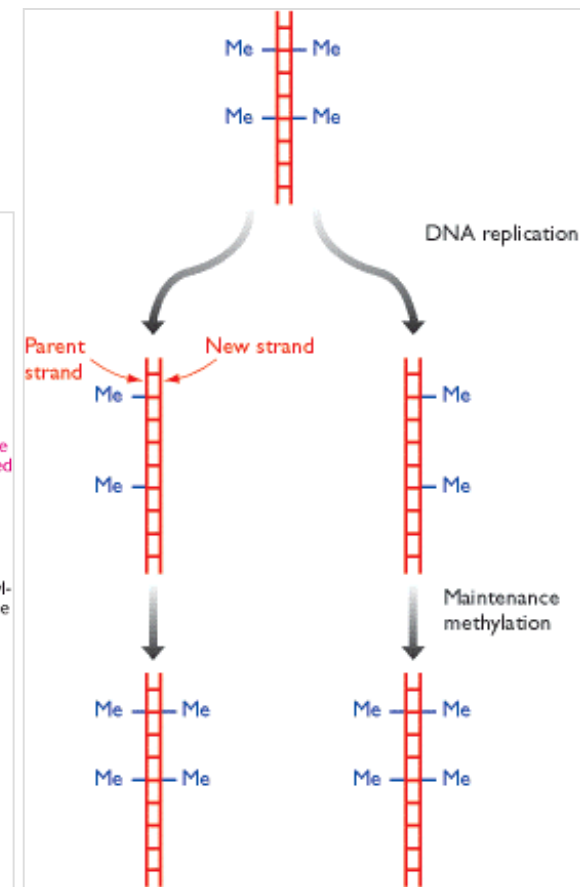
- przyłączenie grupy metylowej do cytozyny
- powoduje zamknięcie danego obszaru chromatyny
- może być podtrzymywana podczas podziałów komórkowych



metylacja DNA a struktura chromatyny



metylotransferaza DNA



podtrzymywanie metylacji DNA

## Alternatywne czynniki sigma u *E. coli*

- $\sigma^{70}$  - wariant główny
- $\sigma^{54}$  - rozpoznaje geny metabolizmu azotu
- $\sigma^{32}$  - rozpoznaje geny aktywowane w wysokiej temperaturze
- $\sigma^S$  - rozpoznaje geny stacjonarnej fazy wzrostu
- $\sigma^F$  - rozpoznaje geny kodujące białka wici
- $\sigma^E$  - rozpoznaje geny kodujące białka wydzielane na zewnątrz komórki
- $\sigma^{FecI}$  - rozpoznaje geny kodujące białka transportu żelaza

## Operon laktozowy

- przykład mechanizmu regulacji transkrypcji



*LacI*

- sekwencje o nieznanej funkcji
- mutacja (*lacI*<sup>-</sup>) *LacZ* aktywny również przy braku laktozy

*LacZ*

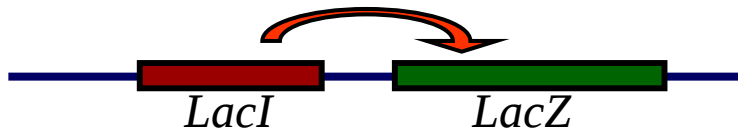
- gen kodujący enzym  $\beta$ -galaktozydazę
- ekspresja indukowana przez laktozę
- mutacja (*lacZ*<sup>-</sup>) brak zdolności rozkładania laktozy

Pytanie: czy *LacI* to czynnik *cis* czy *trans*?

# Inicjacja transkrypcji

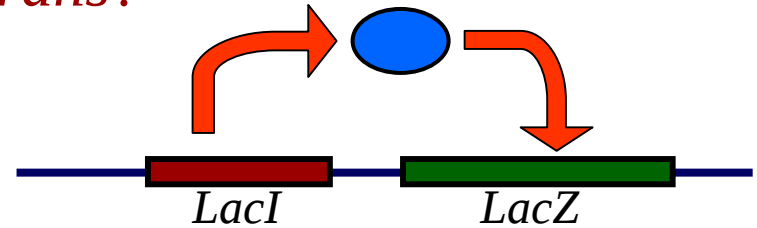
## Operon laktozowy

- wiemy że: mutacja (*lacI*<sup>-</sup>) - *LacZ* aktywny również przy braku laktozy
- pytanie: czy *LacI* działa w *cis* czy w *trans*?



działanie *cis*

- *LacI* to sekwencja regulatorowa *LacZ*
- mutacja *lacI*<sup>-</sup> powinna być dominująca



działanie *trans*

- *LacI* produkuje czynnik regulujący aktywność *LacZ*
- mutacja *lacI*<sup>-</sup> powinna być recesywna

***T6<sup>S</sup> Pro<sup>+</sup> lacI<sup>-</sup> LacZ<sup>+</sup> x T6<sup>R</sup> pro<sup>-</sup> LacI<sup>+</sup> lacZ<sup>-</sup>***

fenotyp: ekspresja *LacZ* indukowana  
wniosek: *LacI* działa w *trans*

# Inicjacja transkrypcji

## Operon laktozowy

- wiemy że: mutacja (*lacI*<sup>-</sup>) - *LacZ* aktywny również przy braku laktozy
- wiemy że: *LacI* działa w *trans*
- pytanie: czy *LacI* koduje aktywator czy represor?

|           | aktywator   | represor    |
|-----------|-------------|-------------|
| - laktoza | niezwiązany | związany    |
| + laktoza | związany    | niezwiązany |
| co robi   | aktywuje    | hamuje      |
| mutant    | aktywny     | nieaktywny  |



*LacI*<sup>+</sup> *LacZ*<sup>+</sup> x *lacI*<sup>-</sup> *lacZ*<sup>-</sup>



1. *lacI*<sup>-</sup> *lacZ*<sup>-</sup>

2. *lacI*<sup>-</sup> *lacZ*<sup>-</sup> *LacZ*<sup>+</sup>

3. *lacI*<sup>-</sup> *lacZ*<sup>-</sup> *LacZ*<sup>+</sup> *LacI*<sup>+</sup>

aktywność *LacZ*

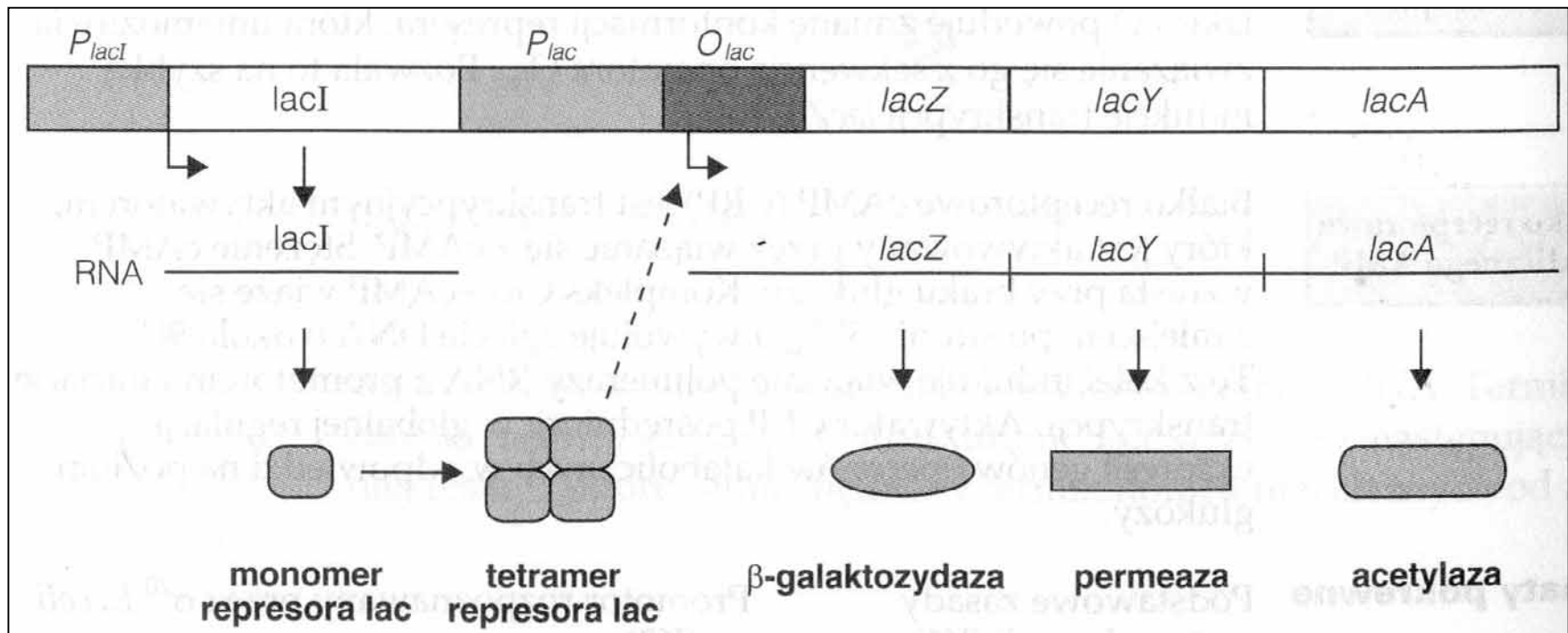
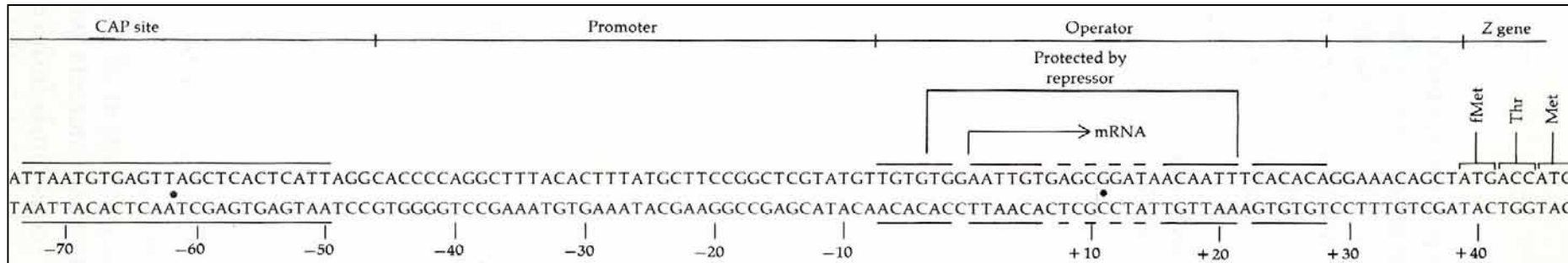
-laktoza    +laktoza

|   |   |
|---|---|
| - | - |
| + | + |
| - | + |

wniosek: *LacI* koduje represor

# Inicjacja transkrypcji

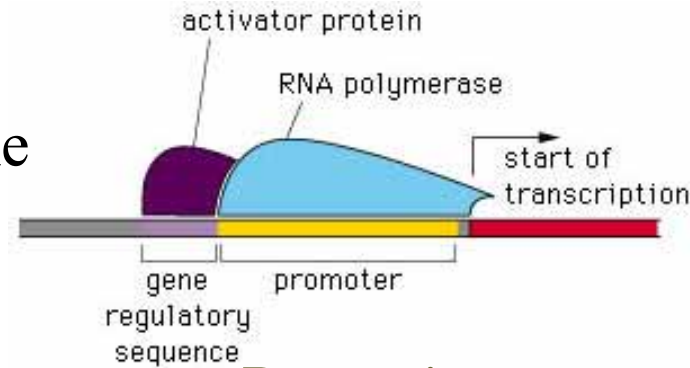
## Operon laktozowy - budowa i zasada działania



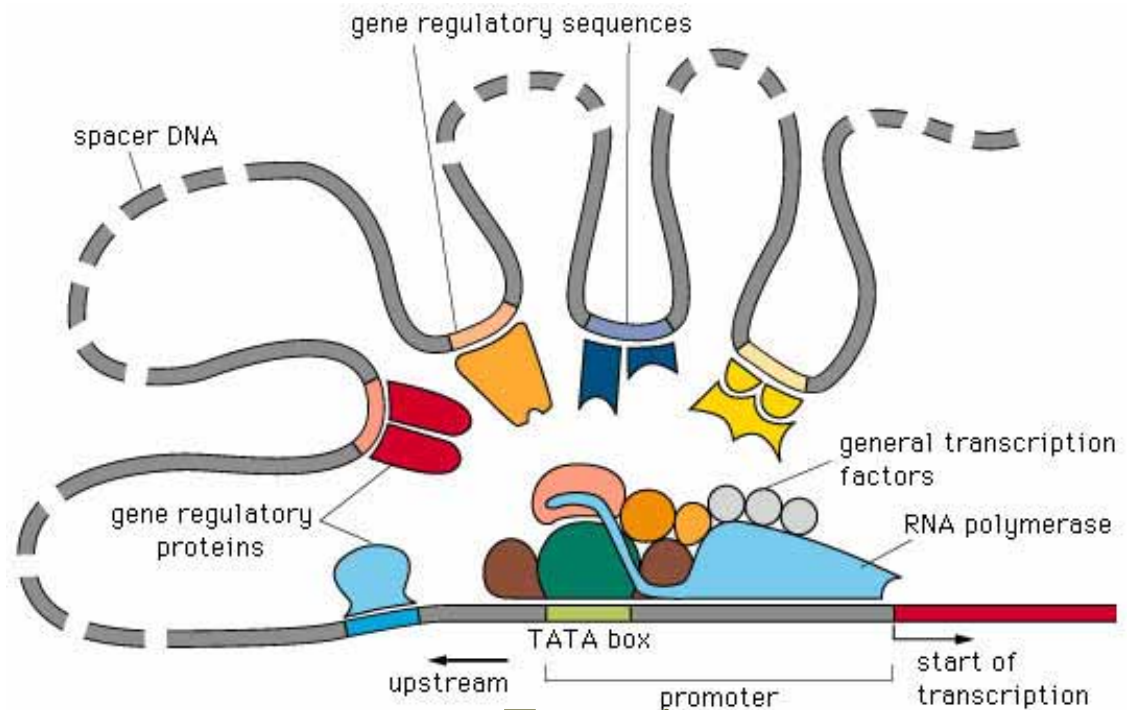
# Inicjacja transkrypcji

## Regulacja inicjacji transkrypcji u *Eucariota*

- bardziej rozbudowane sekwencje regulacyjne
- przykład: czynniki transkrypcyjne będące receptorami hormonów sterydowych



*Procariota*

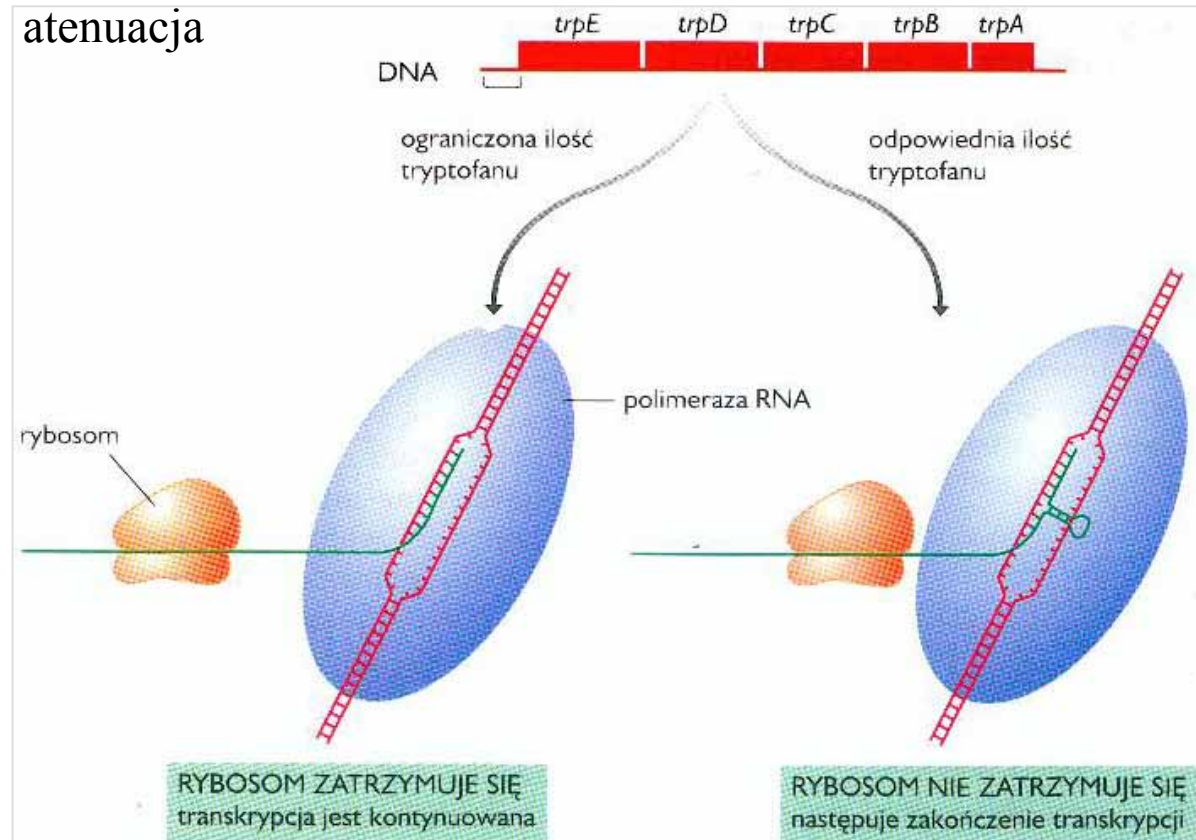
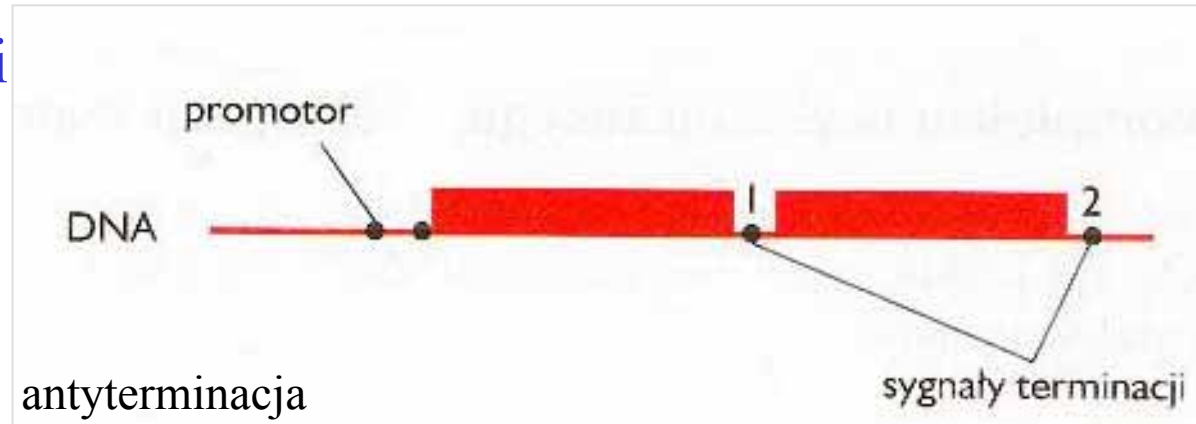


*Eucariota*

# Terminacja transkrypcji

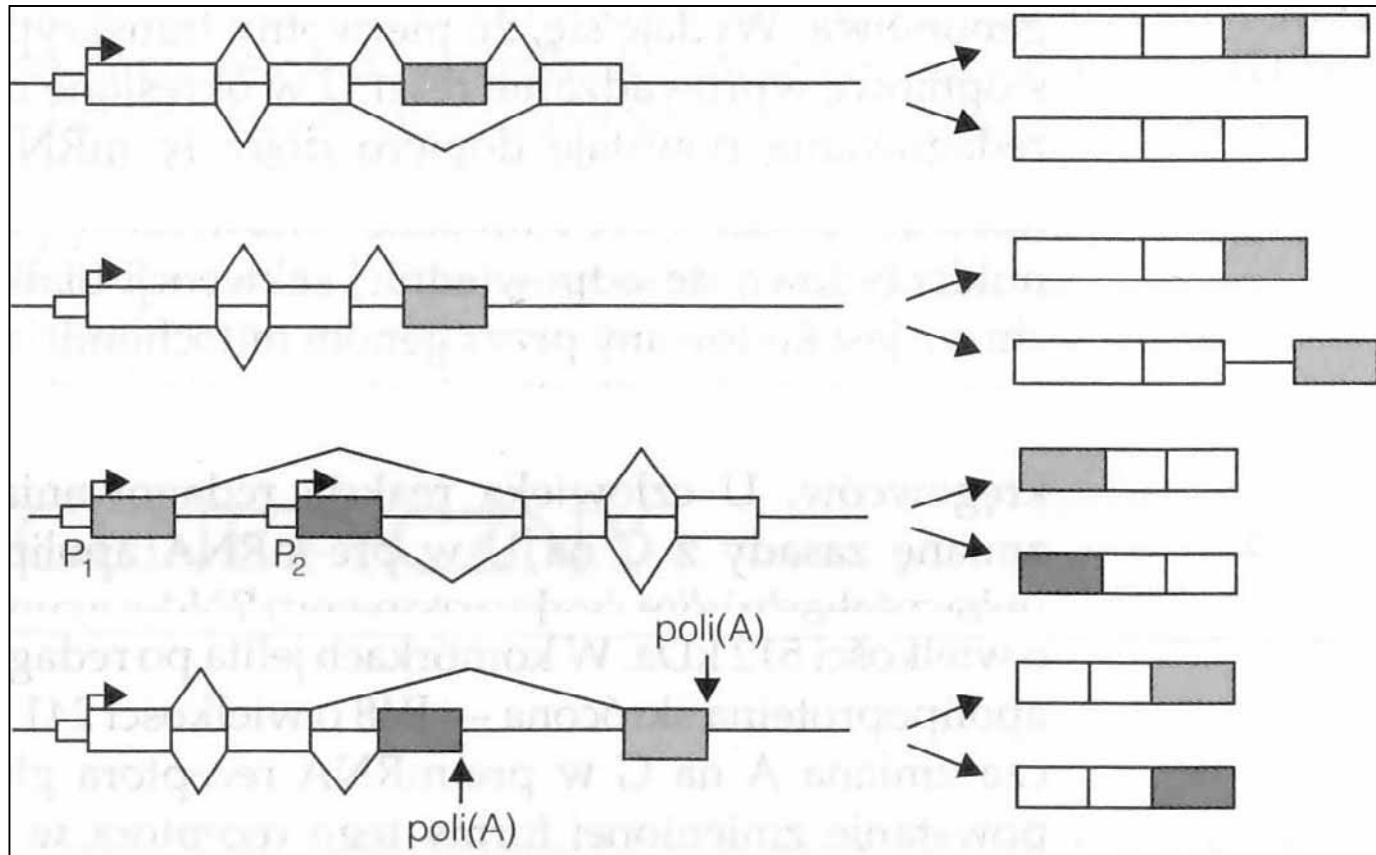
## Wybór miejsca terminacji

- antyterminacja - regulacja ekspresji dalszych genów operonu
- atenuacja - regulacja genów biosyntezy aminokwasów



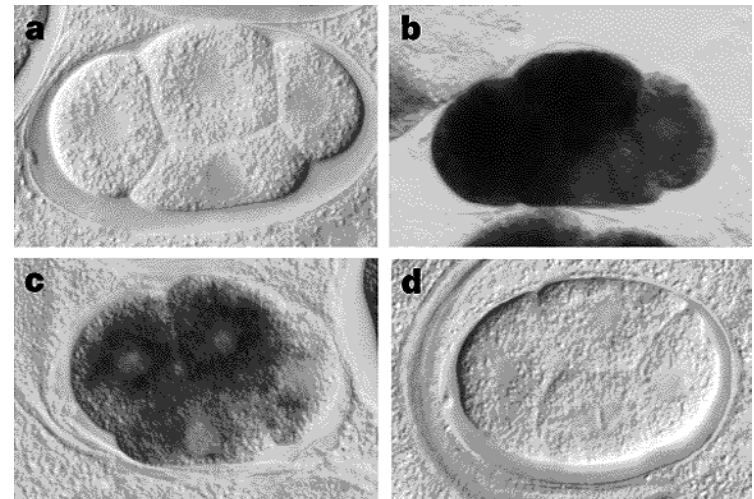
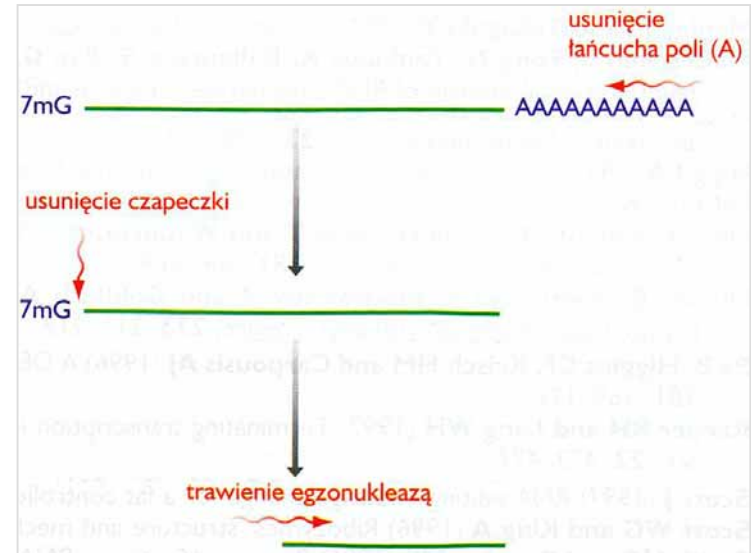
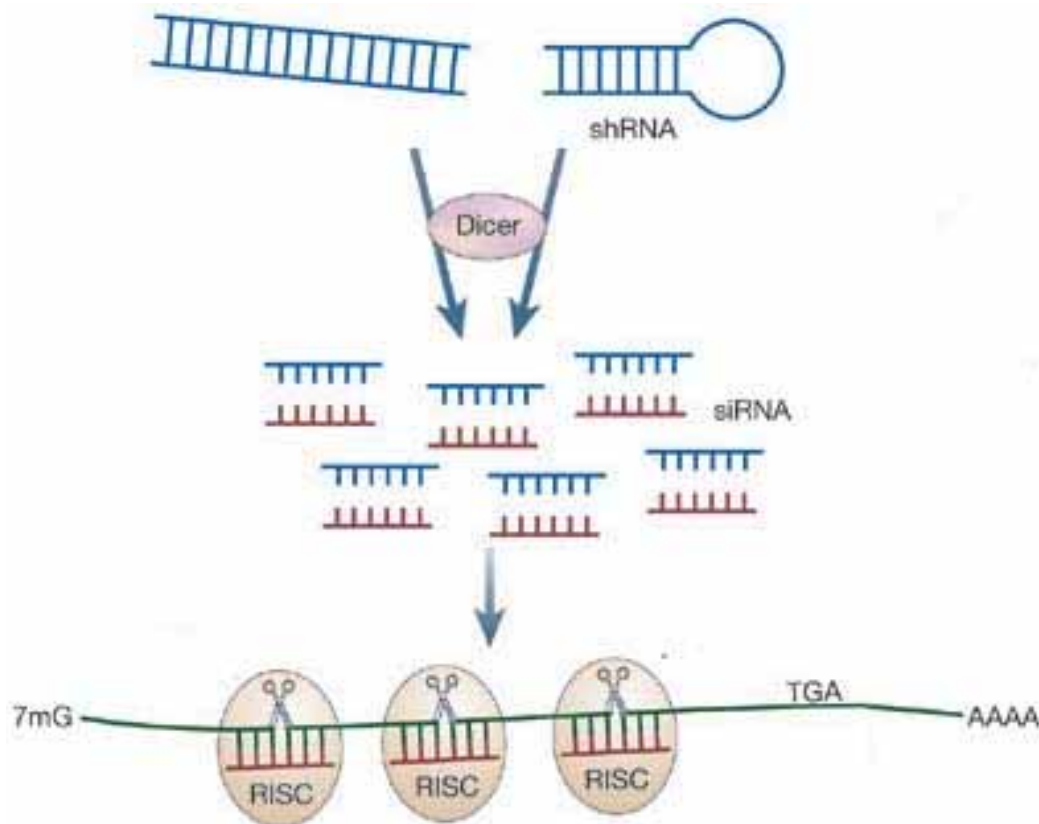
## Alternatywny splicing

- omijanie lub pozostawianie egzonu
- wycięcie lub pozostawienie intronu
- wybór egzonu początkowego
- wybór egzonu kończącego



## Regulacja stabilności mRNA

- mechanizm zależny od deadenylacji
- sekwencje przyspieszające degradację
- interferencja RNA



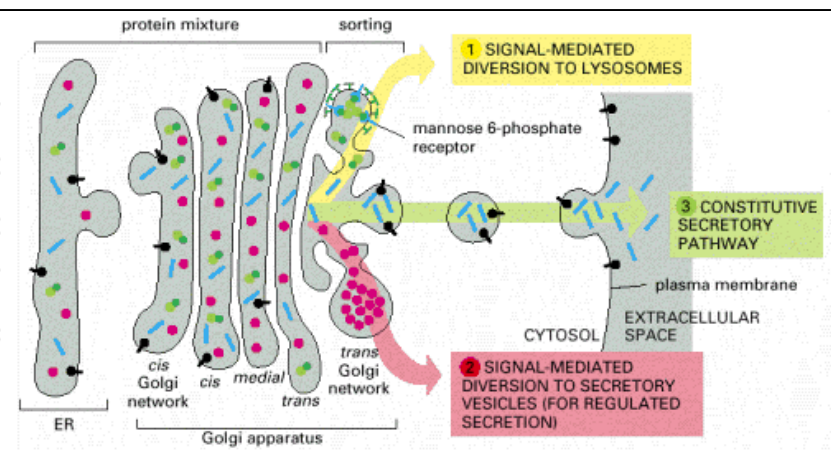
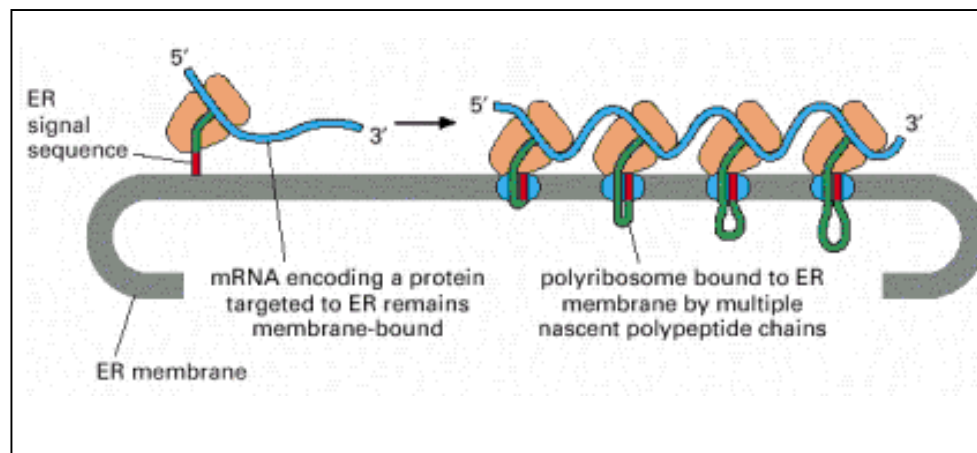
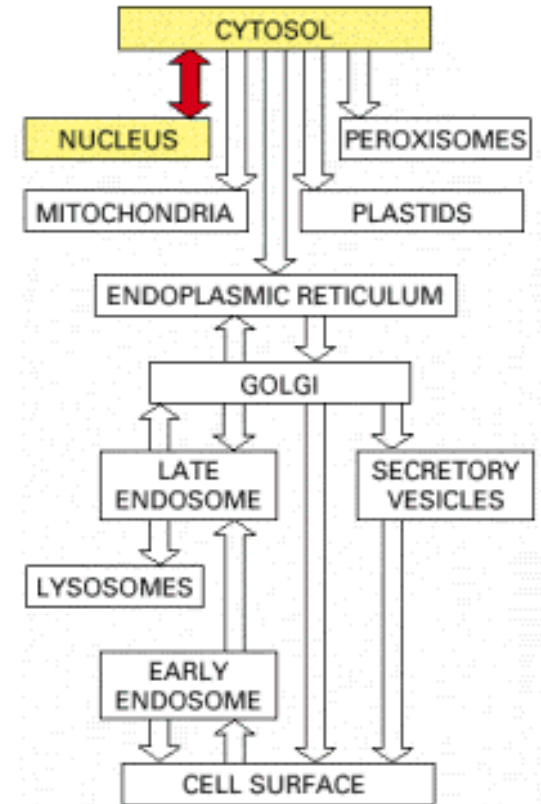
## Regulacja inicjacji translacji

- regulacja ogólnego poziomu syntezy białek
  - fosforylacja IF
- regulacja specyficzna
  - synteza białek rybosomalnych u *E. coli*
  - synteza ferrytyny u ssaków
  - synteza transferyny u ssaków

# Transport białka

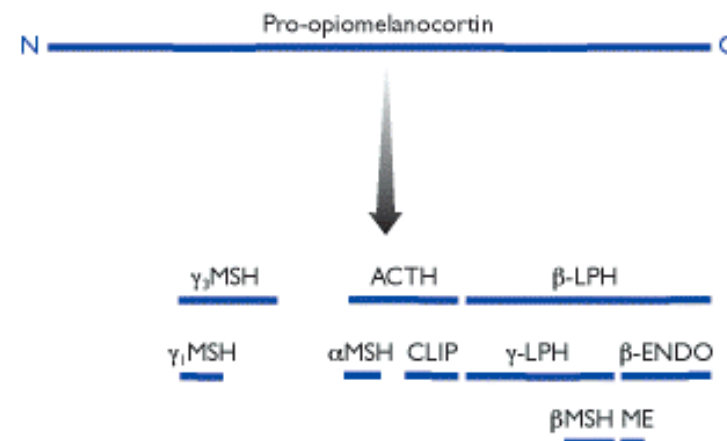
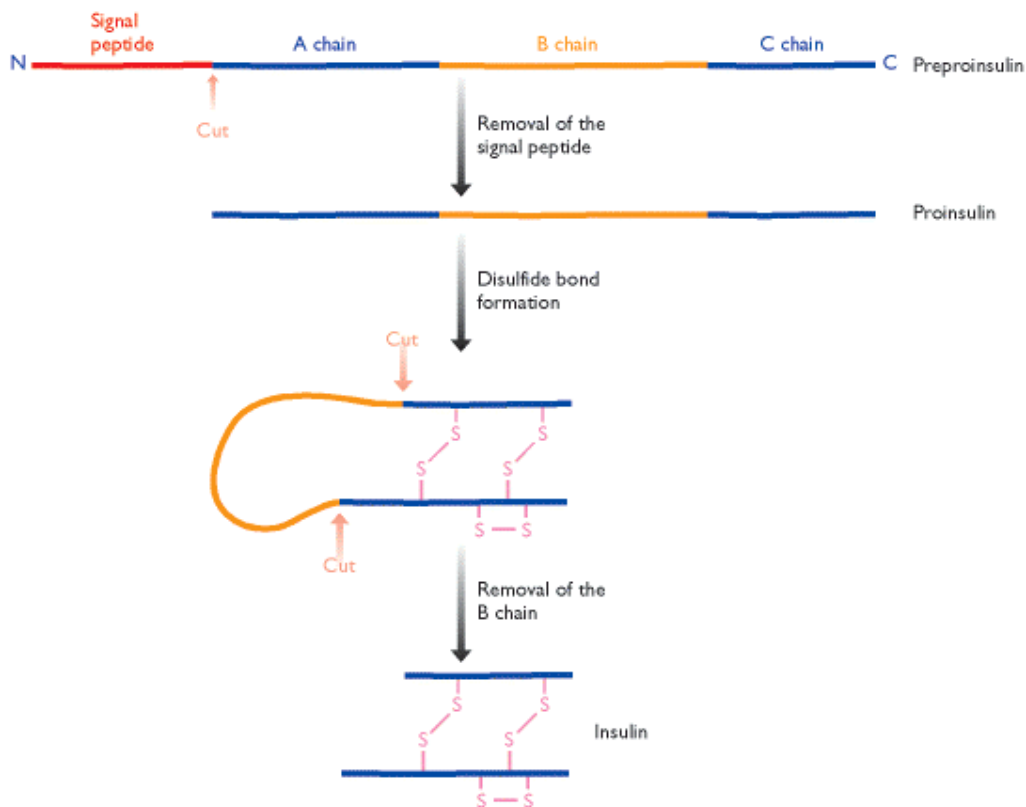
## Regulacja transportu białek do różnych przedziałów komórki

- do jądra komórkowego, mitochondriów, plastydów, peroksysomów i retikulum endoplazmatycznego
- o przeznaczeniu białka decyduje sekwencja sygnałowa w białku
- sekwencja sygnałowa jest odcinana



## Obróbka proteolityczna białka

- poliproteiny
- odcinanie końców białka
- wycinanie fragmentów ze środka białka



# Modyfikacje posttranslacyjne białka

## Modyfikacje posttranslacyjne - przyłączenie do białka różnych grup chemicznych

- zmienia właściwości białka

| Modification                             | Amino acids that are modified | Examples of proteins                                 |
|------------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------------------------|
| <b>Addition of small chemical groups</b> |                               |                                                      |
| Acetylation                              | Lysine                        | Histones                                             |
| Methylation                              | Lysine                        | Histones                                             |
| Phosphorylation                          | Serine, threonine, tyrosine   | Some proteins involved in signal transduction        |
| Hydroxylation                            | Proline, lysine               | Collagen                                             |
| <i>N</i> -formylation                    | N-terminal glycine            | Melittin                                             |
| <b>Addition of sugar side chains</b>     |                               |                                                      |
| O-linked glycosylation                   | Serine, threonine             | Many membrane proteins and secreted proteins         |
| N-linked glycosylation                   | Asparagine                    | Many membrane proteins and secreted proteins         |
| <b>Addition of lipid side chains</b>     |                               |                                                      |
| Acylation                                | Serine, threonine, cysteine   | Many membrane proteins                               |
| <i>N</i> -myristoylation                 | N-terminal glycine            | Some protein kinases involved in signal transduction |
| <b>Addition of biotin</b>                |                               |                                                      |
| Biotinylation                            | Lysine                        | Various carboxylase enzymes                          |