

Interakcje genetyczne

Genetyczne podstawy biologii systemów

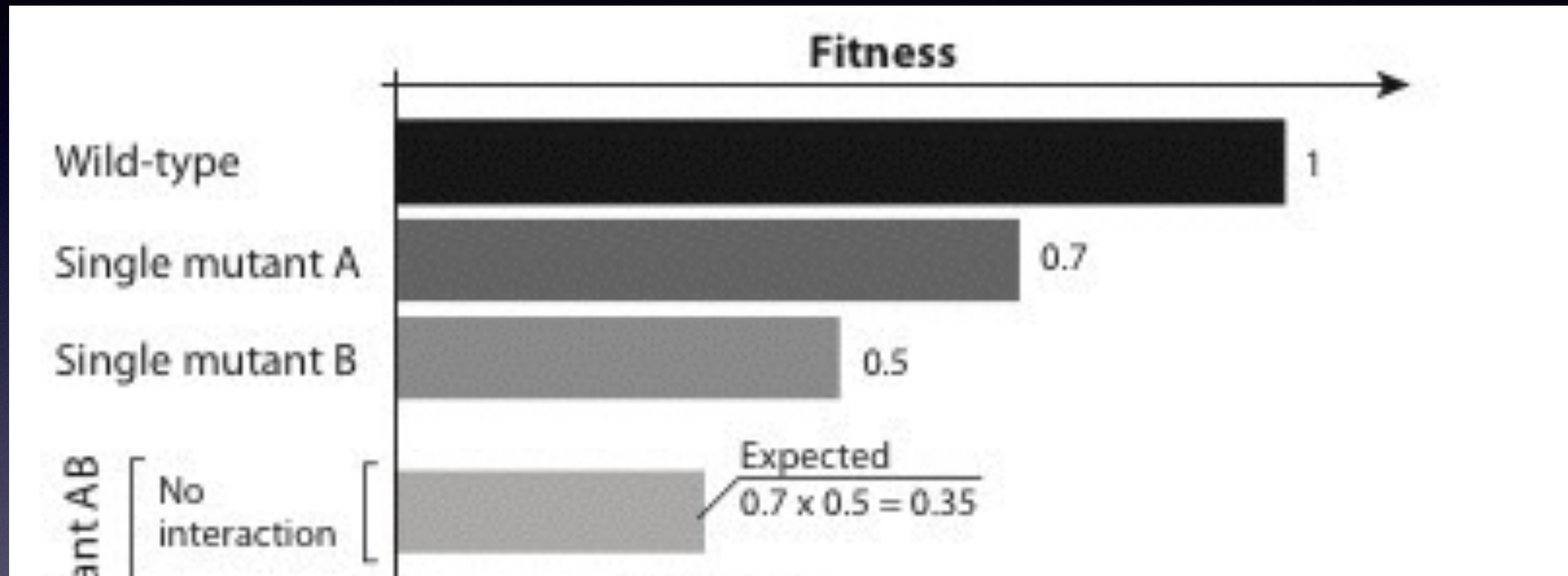
Interakcja genetyczna

- Fenotyp podwójnego mutantu AB nie jest prostą konsekwencją fenotypów mutacji A i B
- Dla ujęcia ilościowego wymagana jest liczbowa miara fenotypu
 - Np. czas podziału (czas generacji) – czas wymagany do podwojenia liczby komórek w hodowli
- Ujęcie jakościowe wymaga dobrze zdefiniowanych, dyskretnych (0,1) fenotypów – np. letalność

Interakcje

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

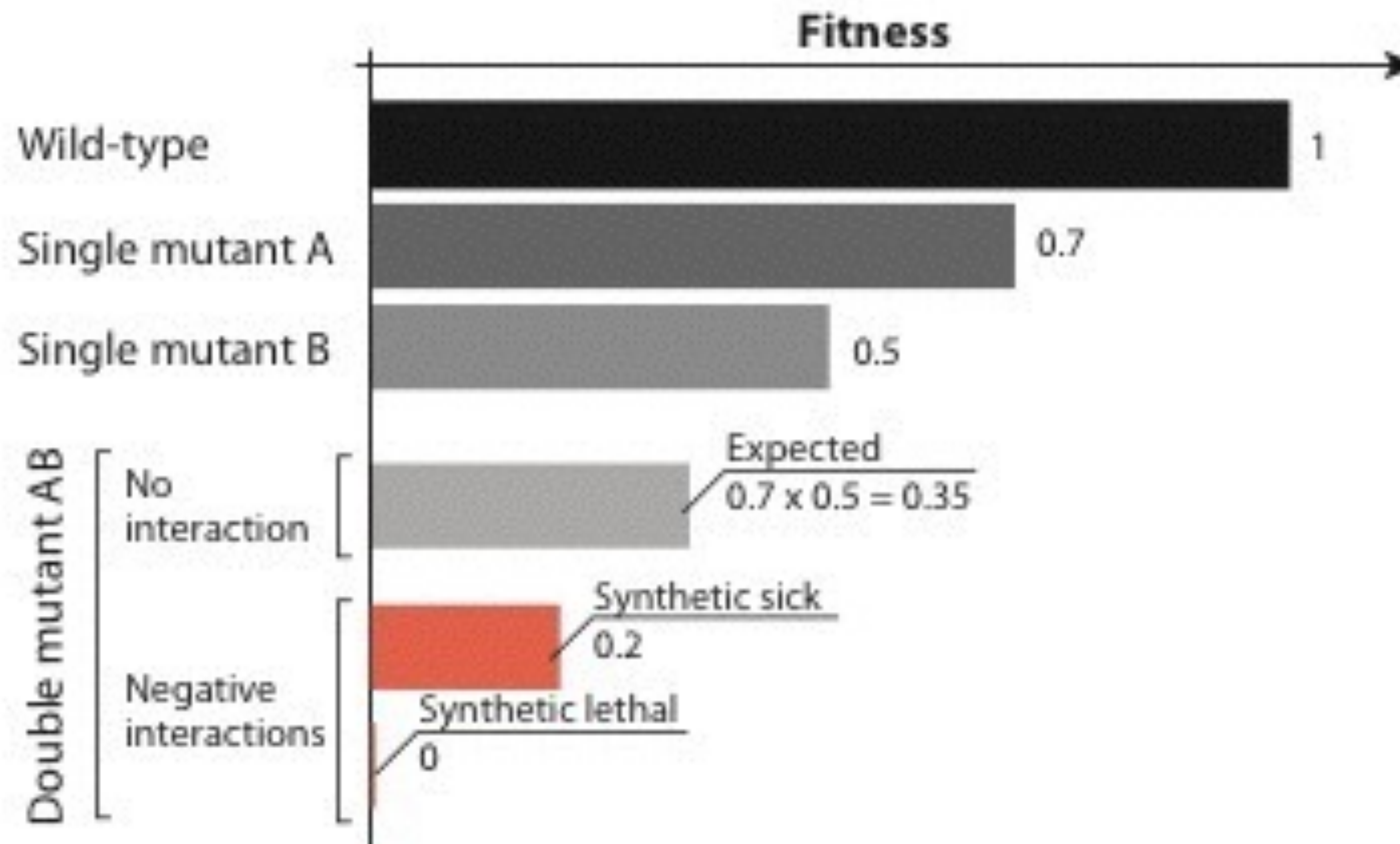
Ujęcie ilościowe



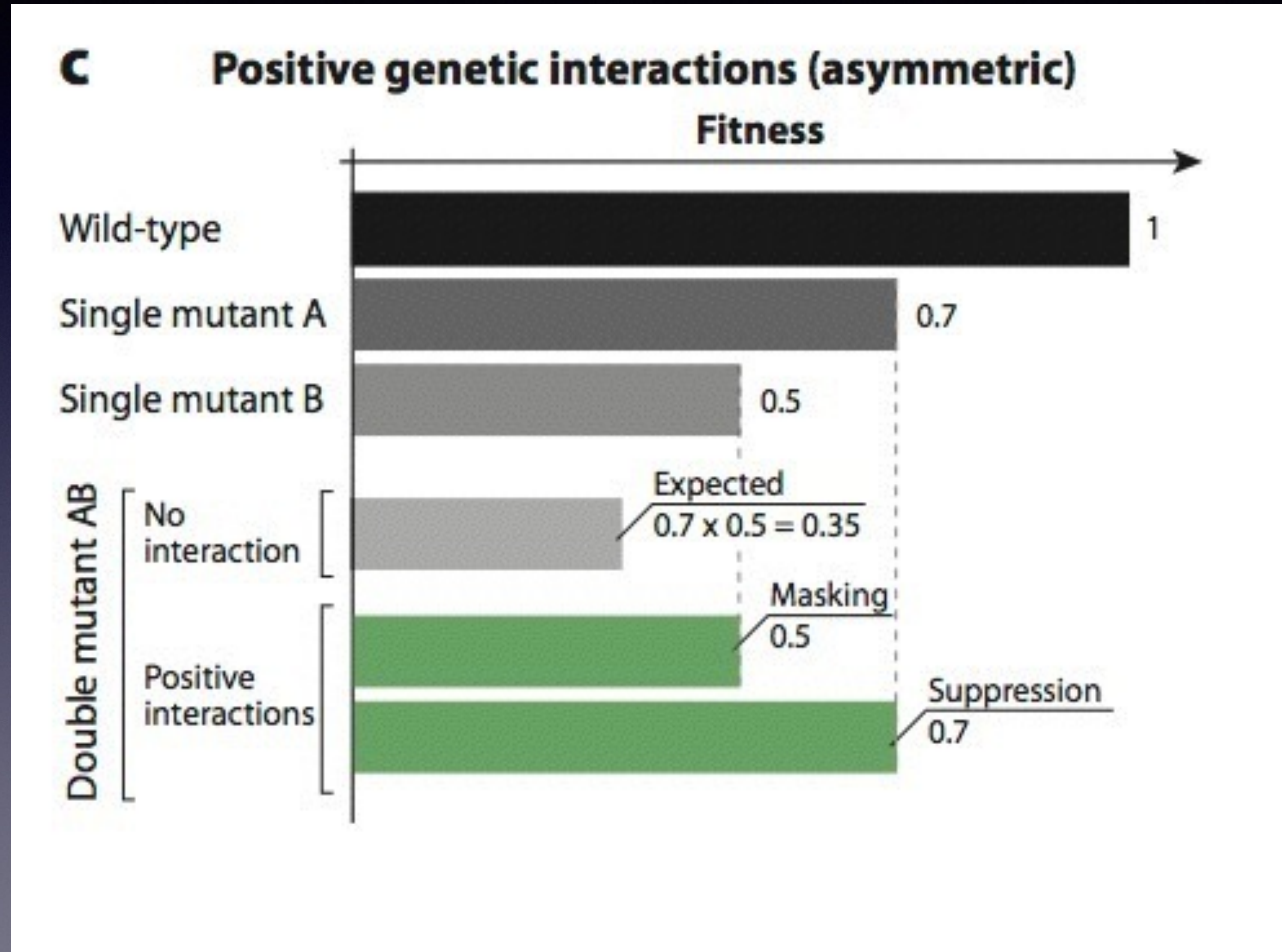
- U mikroorganizmów typową miarą dostosowania (fenotypu) jest tempo podziałów
- Przy braku interakcji oczekiwane tempo podziałów podwójnego mutantu to iloczyn wartości mutantów pojedynczych

Ujęcie ilościowe - interakcje syntetyczne

a Negative genetic interactions



Ujęcie ilościowe – interakcje łagodzące



Interakcje łagodzące

- **Supresja**

- Fenotyp mutacji (a) znoszony przez mutację w innym genie (b)
 - Podwójny mutant *ab* ma fenotyp dziki lub bliski dzikiemu

- **Epistaza**

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

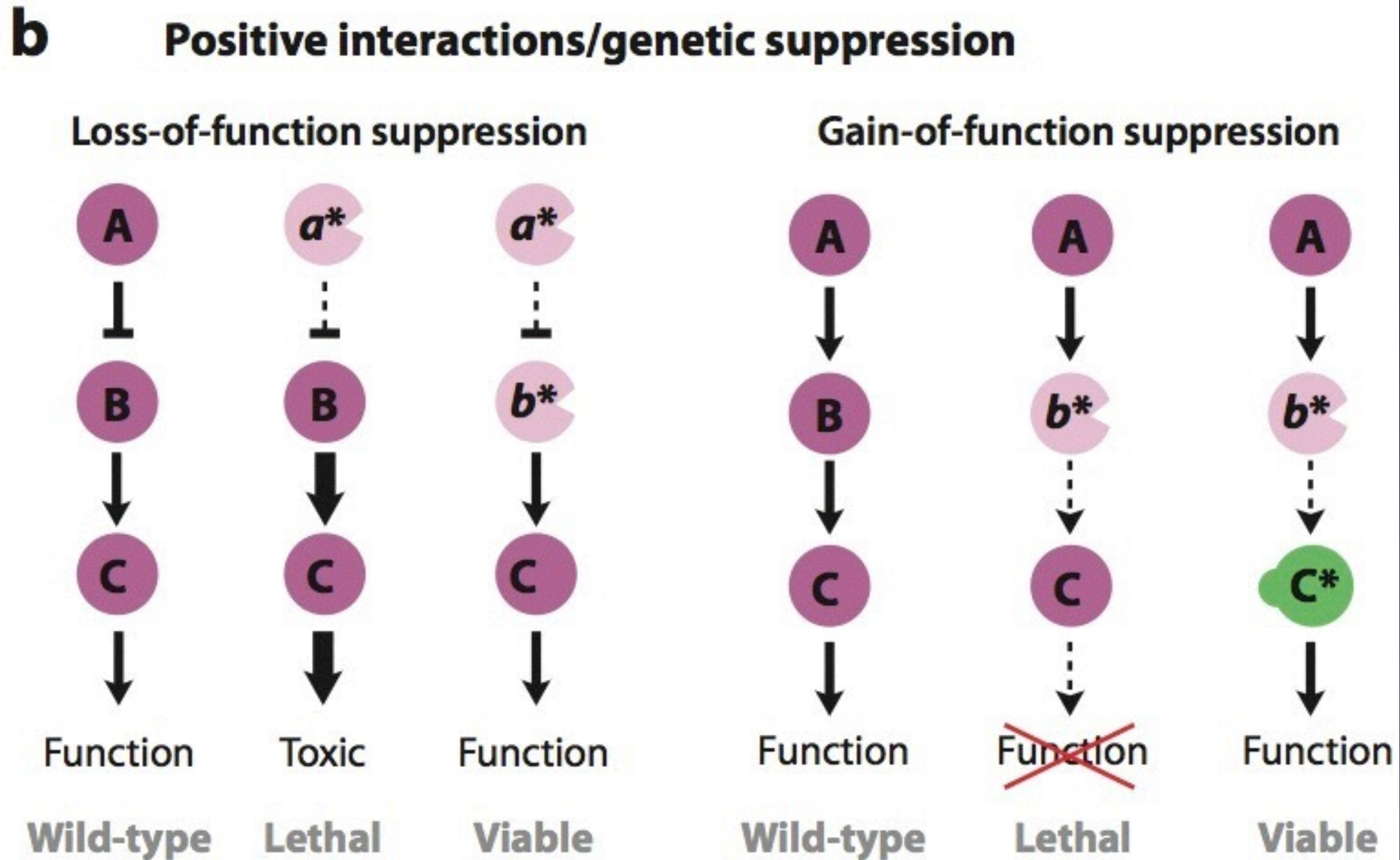
Supresja

- 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

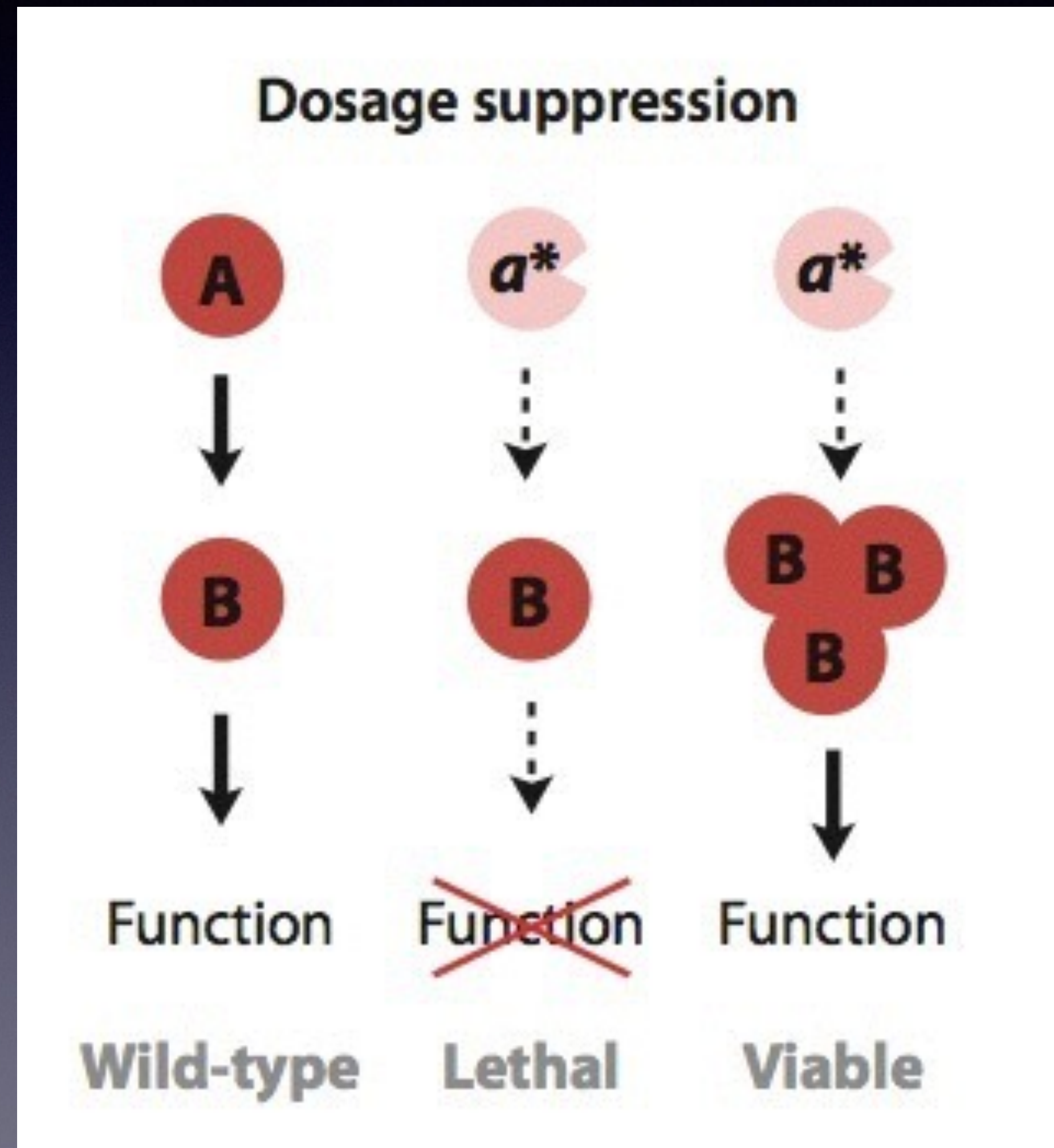
Supresja informacyjna

- Supresory związane z przekazywaniem informacji genetycznej (*informational suppressors*)
- Najbardziej znana supresja translacyjna nonsens
- Też zmiana transkrypcji, obróbki RNA, stabilizacja RNA
- Z reguły supresja jest specyficzna wobec konkretnego allelu
- Wiele supresorów informacyjnych może działać na mutacje w różnych genach (np. supresory nonsens)
- Przydatne w badaniu ekspresji genu, ale nie w badaniu funkcji konkretnych genów

Supresja



Supresja ilościowa

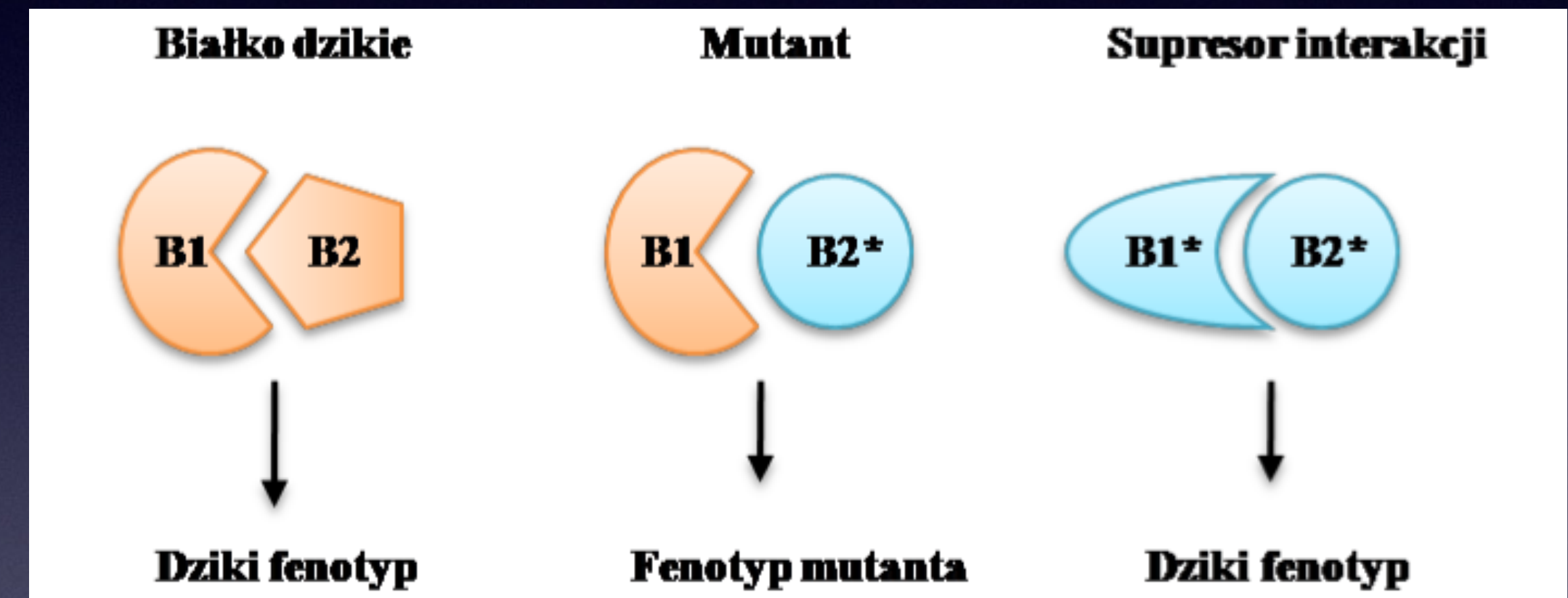


Supresja ilościowa

- 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 wielokopijnymi
- Często niezależna od konkretnego allelu

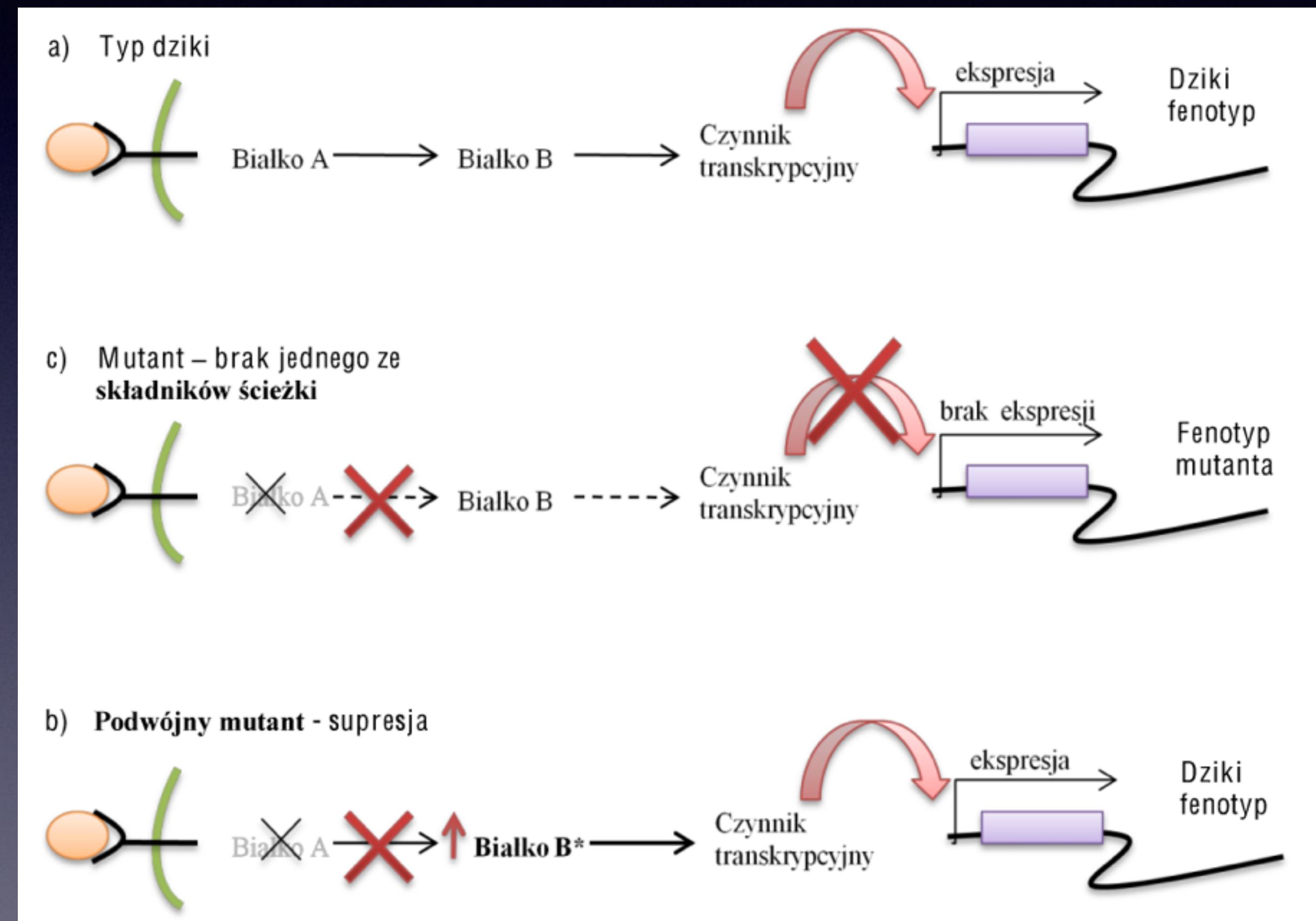
Supresja przez interakcję

- 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
 - Często wzajemne (mutacja a supresorem b, a b supresorem a)



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).



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 splicingu, wzrost stężenia kompensuje defekty czynników wspomagających reakcję

Supresja w innym szlaku

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

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

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

wt white vermillion

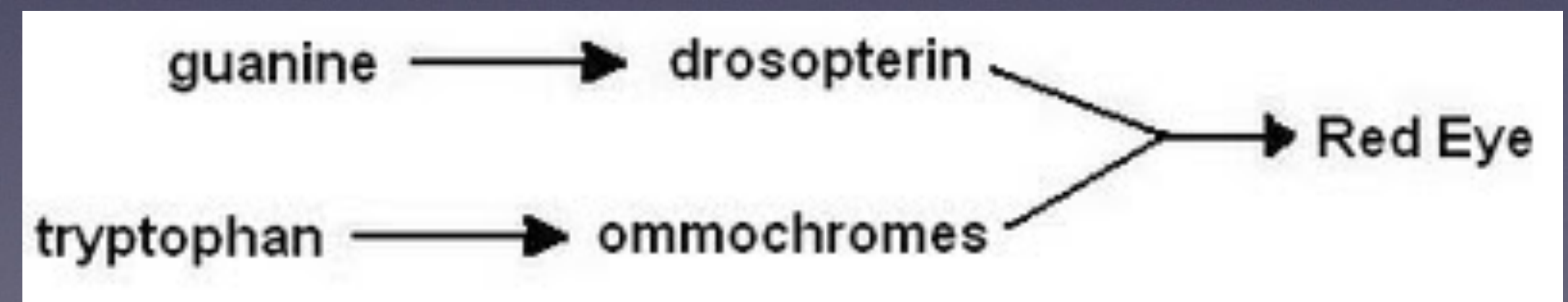


Epistaza

- 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

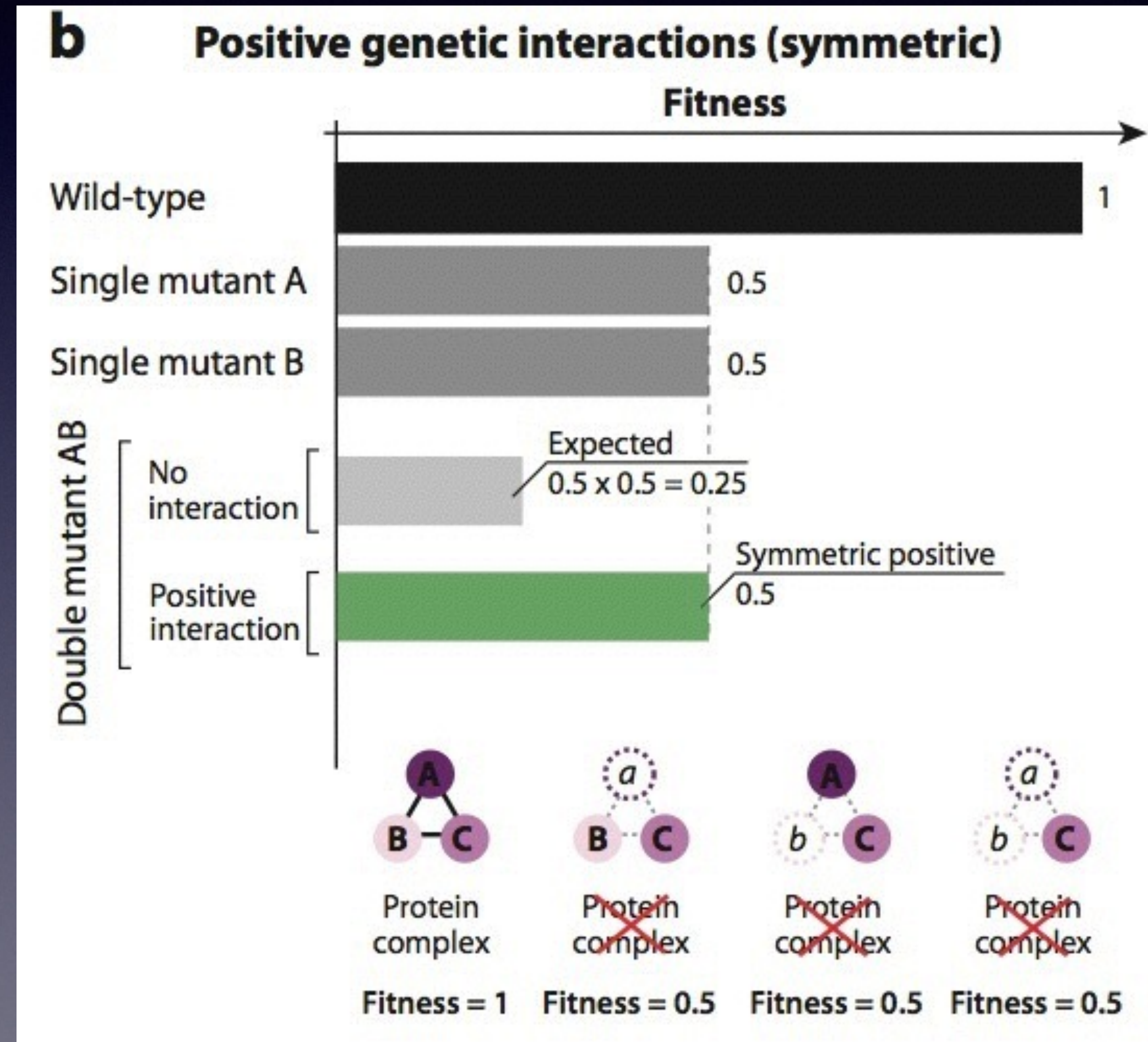
wt white

vermillion



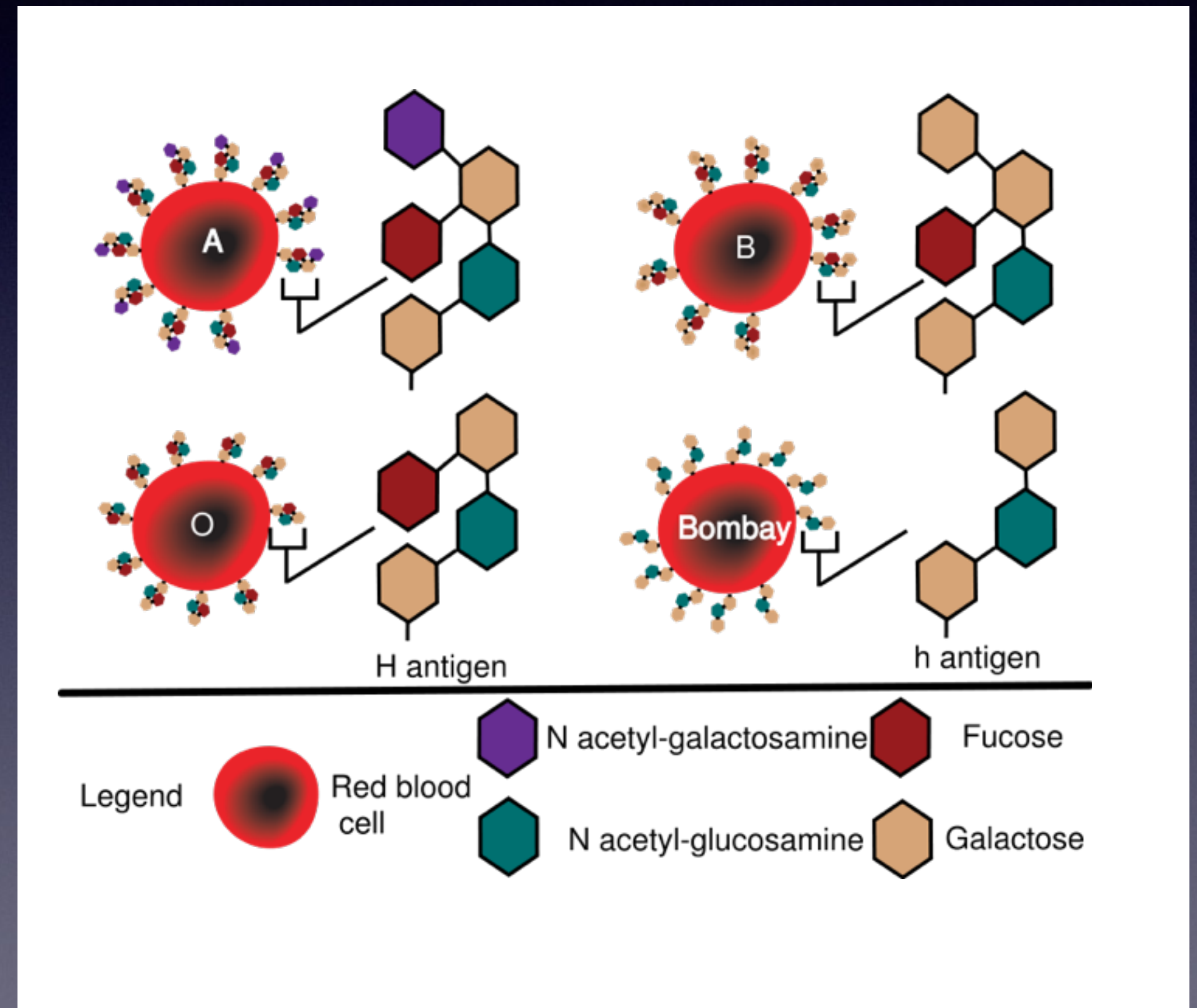
Epistaza symetryczna

Podwójny mutant nieodróżnialny od pojedynczych



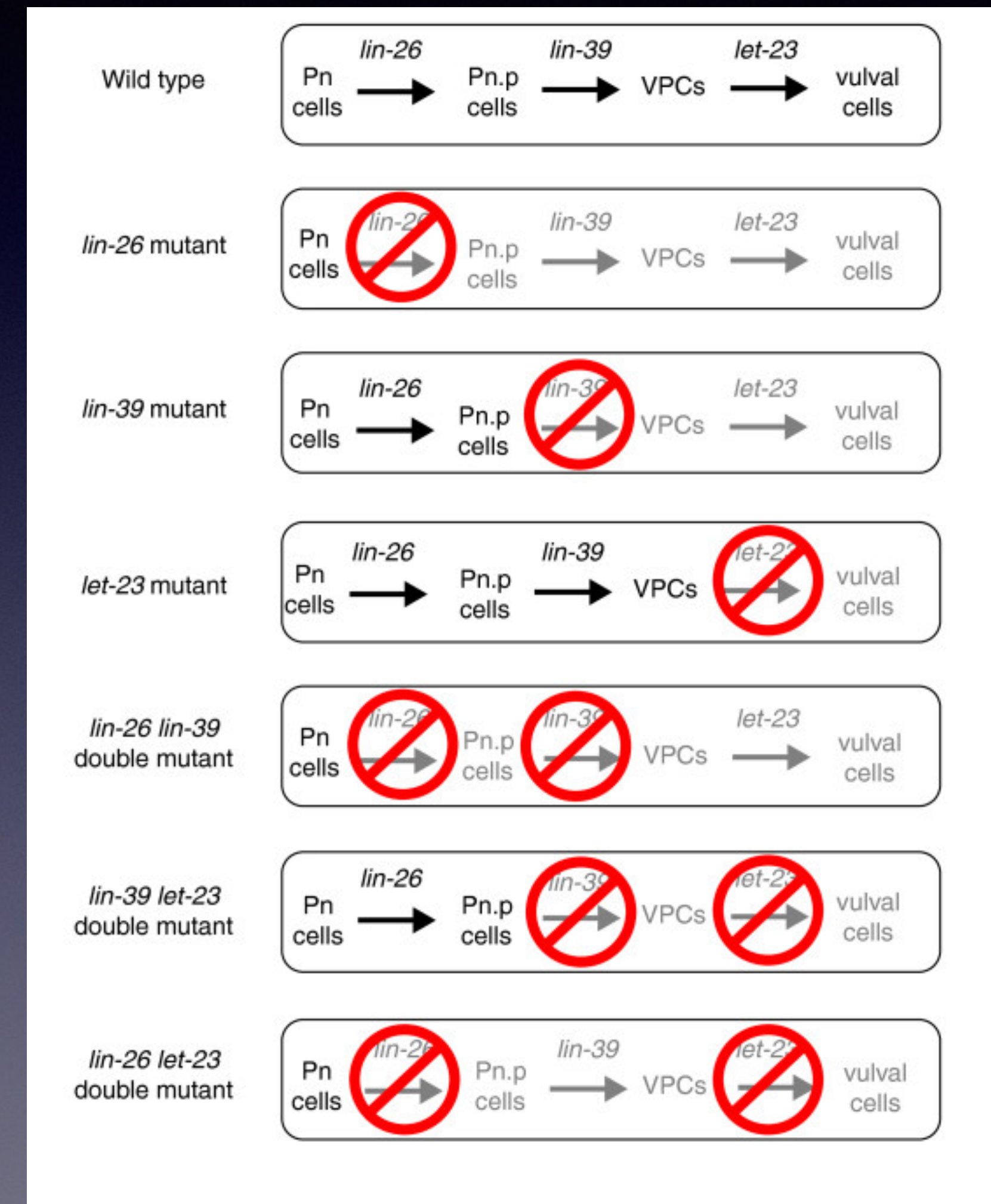
Grupa krwi Bombay

- 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 donator, biorca tylko od innej osoby hh
- Ok. 4 osoby na milion (w Bombaju 1:10 000, wyspa Reunion 1:1000)



Epistaza

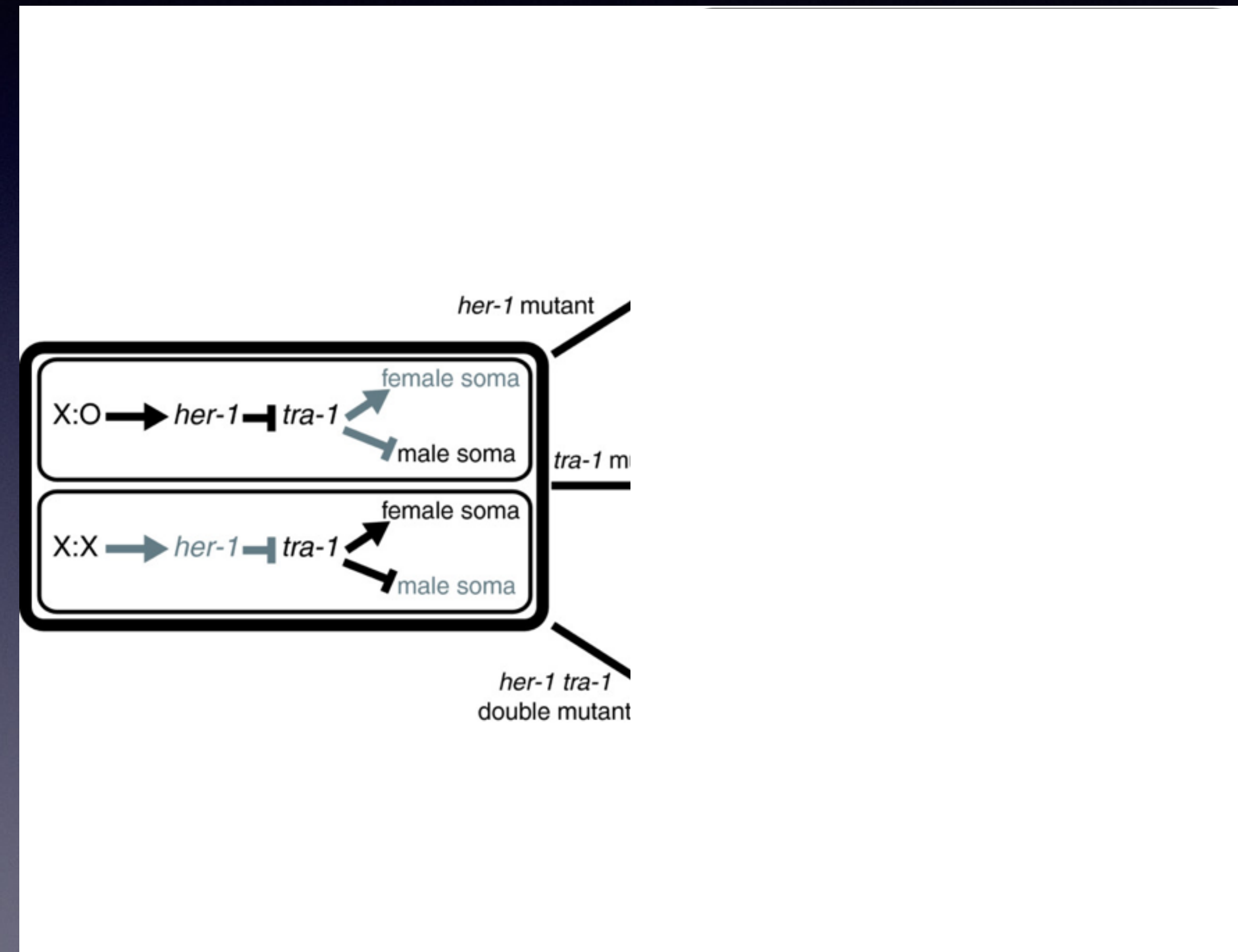
- Przy regulacji pozytywnej (i np. szlakach biosyntezy) mutacja elementu leżącego wyżej w szlaku będzie epistatyczna



Epistaza i szlaki regulatorowe

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

mutacja *tra* epistatyczna



Interakcje syntetyczne

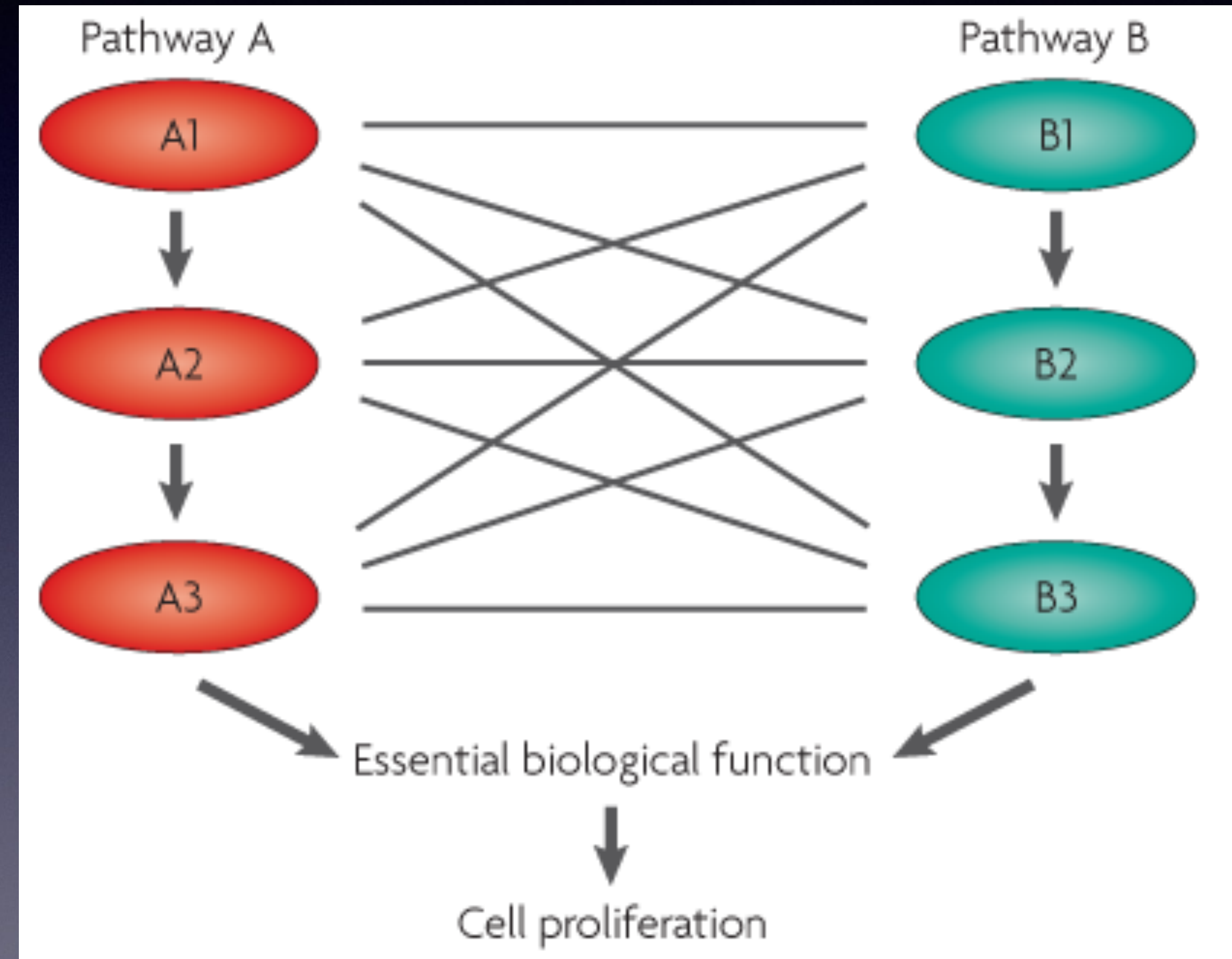
- **Syntetyczne wzmocnienie**
 - Fenotyp podwójnego mutantu silniejszy (lub nieoczekiwany) niż suma fenotypów pojedynczych mutacji
- **Syntetyczna letalność**
 - Pojedyncze mutacje nie są letalne, podwójny mutant letalny
- **Niekomplementacja niealleliczna** (SSNC – second-site non-complementation)
 - 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
- Łatwiejsza do badania w organizmach mających wegetatywną fazę haploidalną (np. drożdże)
- Inny wariant: SDL (*synthetic dosage lethality*)
 - nadekspresja jednego genu ujawnia silny fenotyp dopiero w kontekście mutacji innego genu

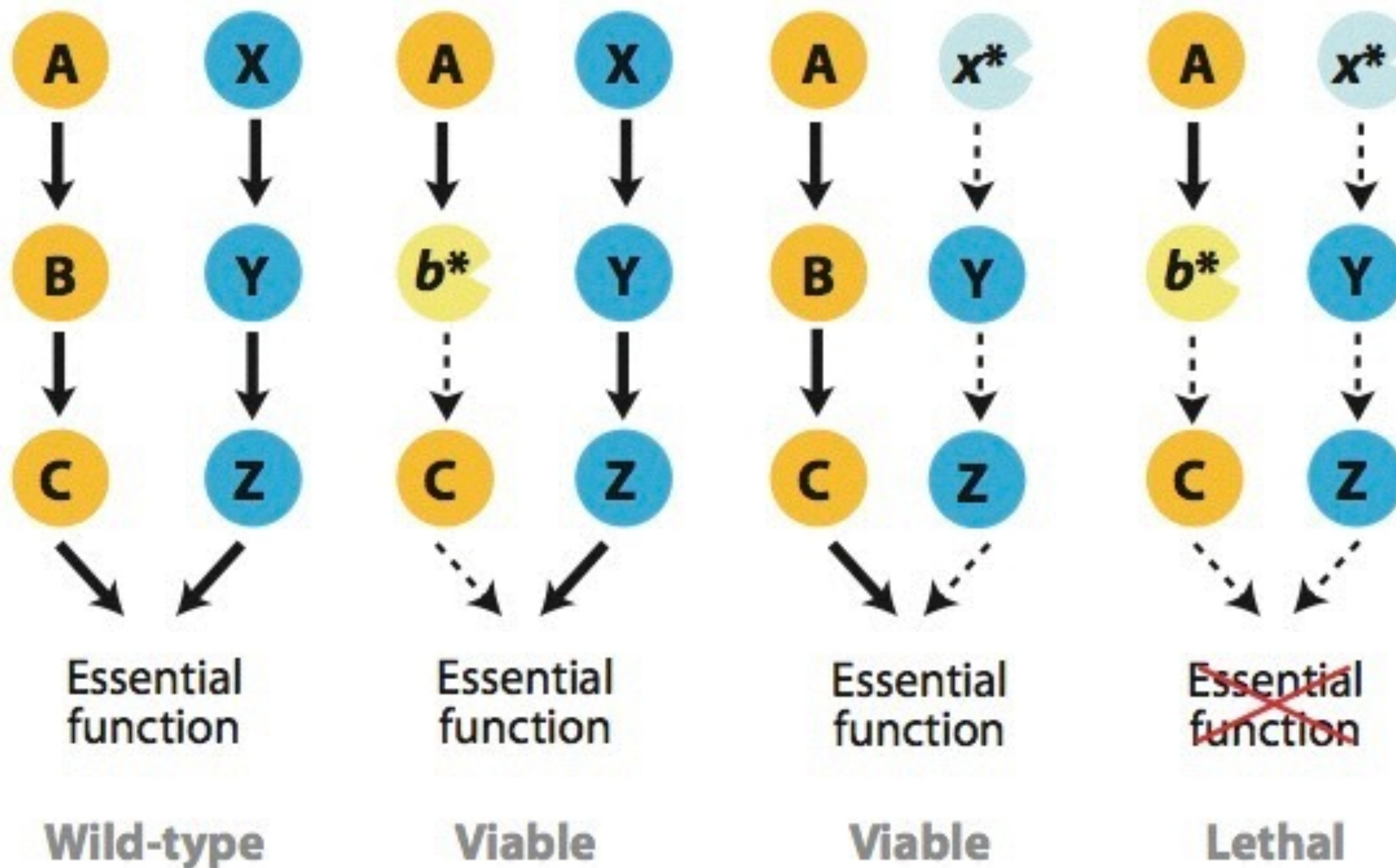
Syntetyczne wzmocnienie

- 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



a Negative interactions

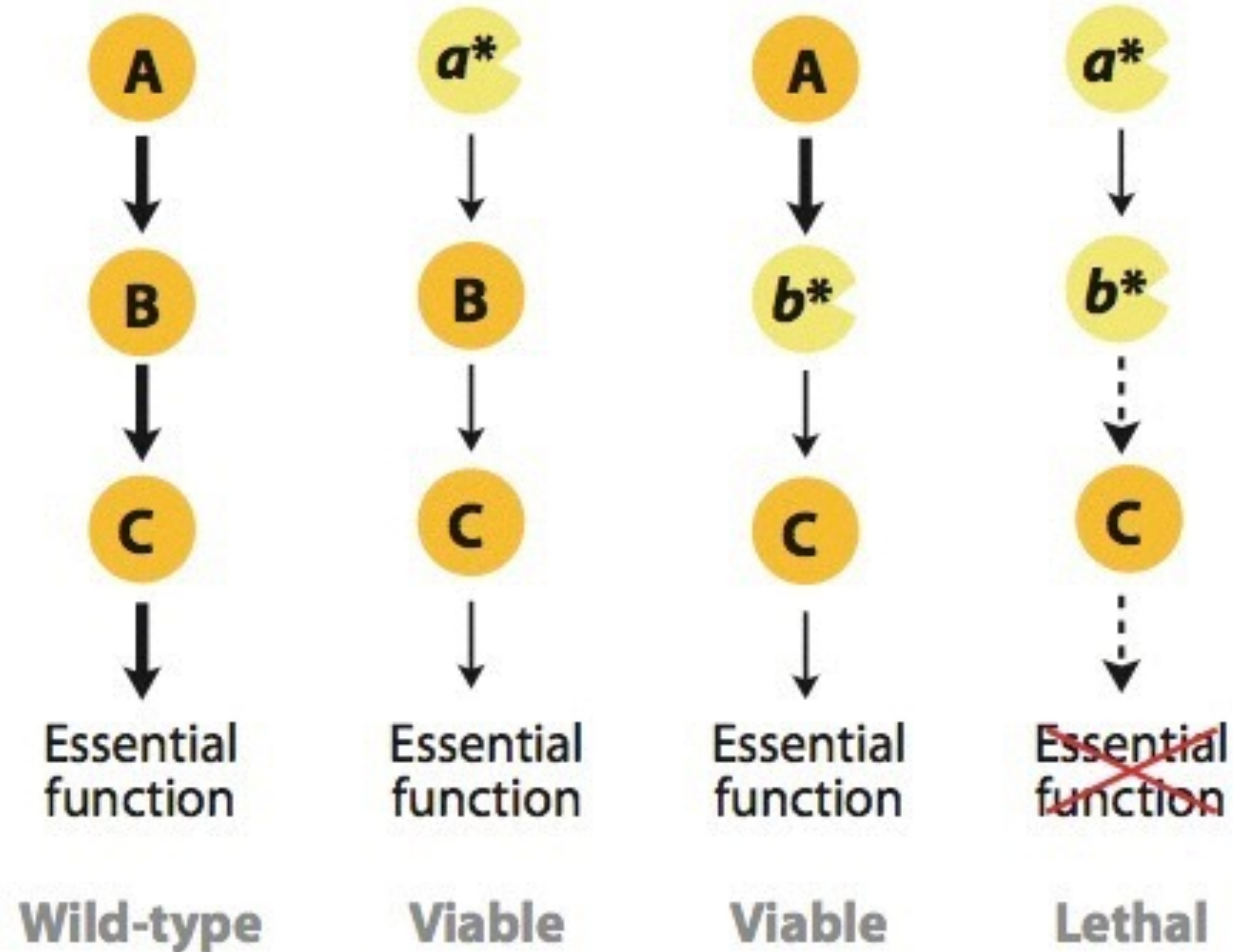
Between pathway genetic interactions (nonessential pathways)



Syntetyczne wzmocnienie

Pomiędzy szlakami

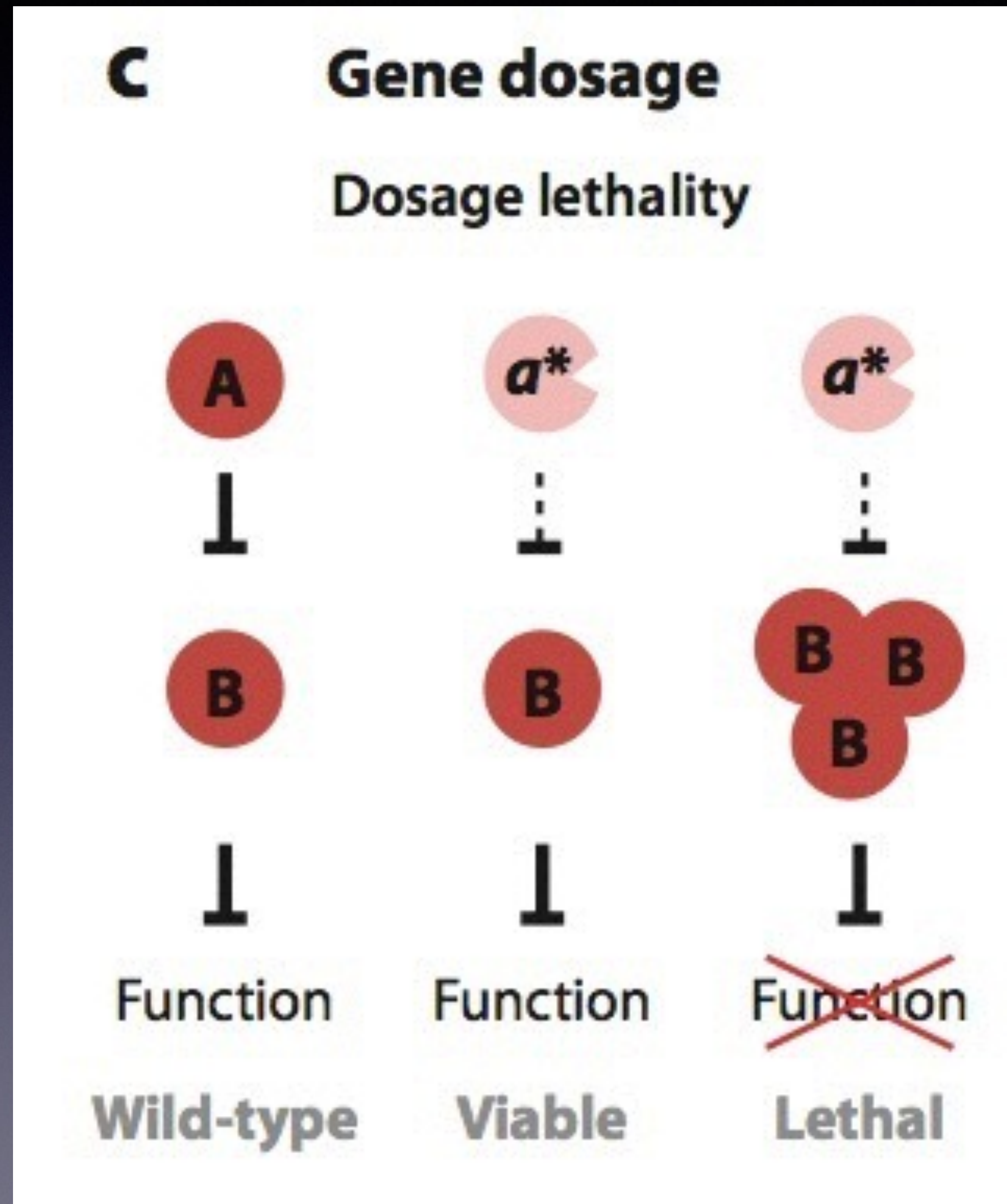
Within pathway genetic interactions (essential pathways)



Syntetyczne wzmocnienie

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

Syntetyczna letalność dawki



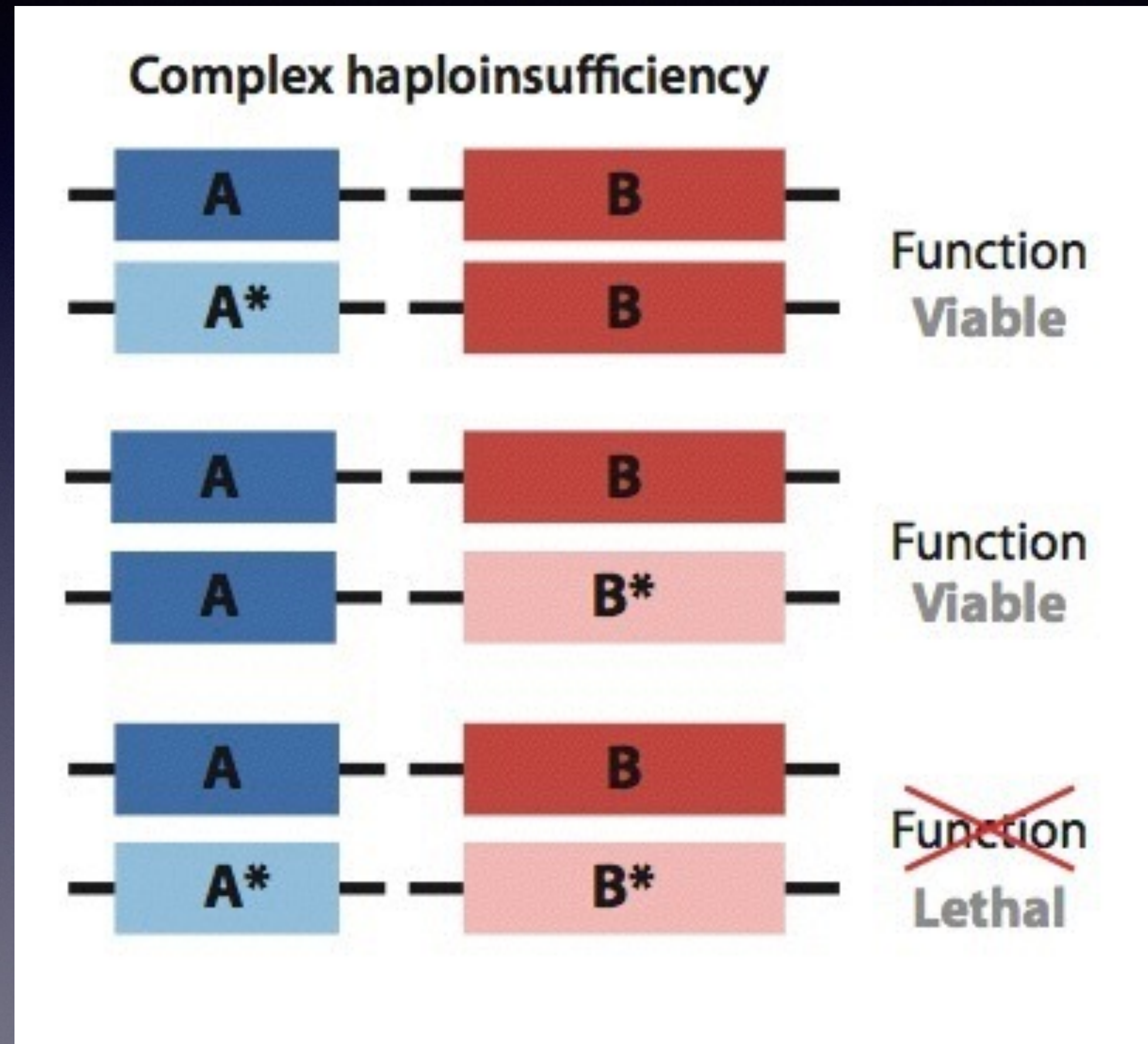
SDL

- Syntetyczna letalność dawki (nadekspresji) – *synthetic dosage lethality*
- Np. nadekspresja genu *PHO4* jest letalna w kontekście delecji genu *PHO85*
 - *PHO85* koduje kinazę białkową, której substratem jest, m. in., produkt *PHO4*. Fosforylacja hamuje aktywność białka. Letalny efekt nadmiaru aktywnego białka Pho4p.

Niekomplementacja niealleliczna

- *Second-site non-complementation (SSNC)*
- Mutacja *a* jest recesywna, mutacja *b* w innym genie też, ale podwójna heterozygota *a/+ b/+* ma fenotyp mutantna
- Różne mechanizmy
 - SSNC typ I – interakcja toksyczna
 - SSNC typ II – sekwestracja
 - SSNC typ III – efekt dawki (złożona haploinsuficjencja)

SSNC typ III – złożona haploinsuficjencja



SSNC typu III

- Złożona haploinsuficjencja
- Nie wymaga interakcji fizycznej produktów genów
- Obniżenie aktywności genów A i B w heterozygotach pojedynczo nie daje efektu
- W podwójnej heterozygocie efekty obniżenia aktywności obu genów się sumują i pojawia się defekt
- Nie jest specyficzna wobec alleli, występuje też dla alleli null

Złożona haploinsuficjencja (SSNC typu III)

- Geny *nod* i *ncd* u *Drosophila* – w podwójnej heterozygocie defekt mejozy
- Systematyczne analizy u drożdży:
 - Dla szczepu heterozygotycznego pod względem delecji genu aktyny znaleziono 208 innych heterozygotycznych delecji, które w połączeniu dawały defekty morfologii aktyny

Poszukiwanie interakcji

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

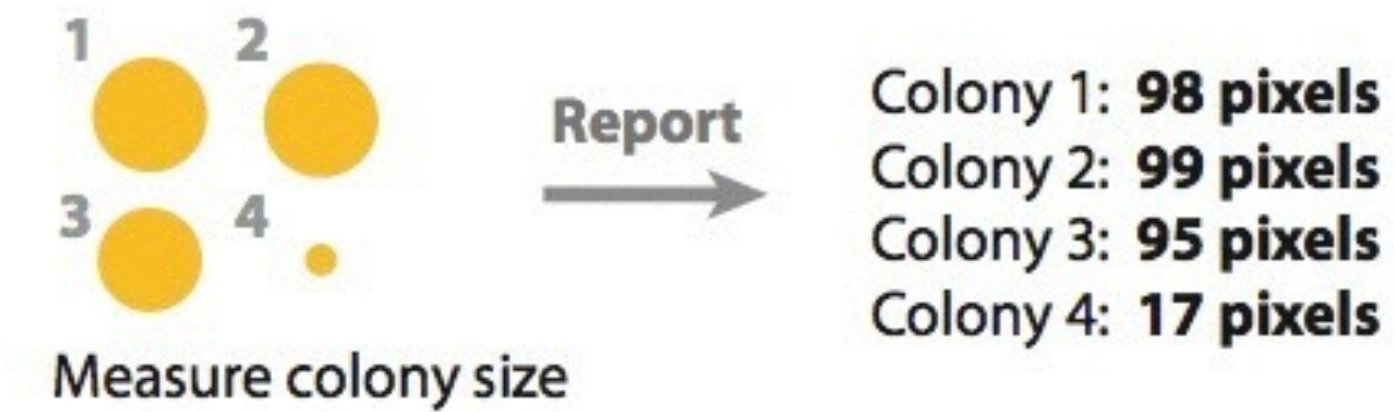
Mapowanie interakcji

Step 1: Generate double mutant

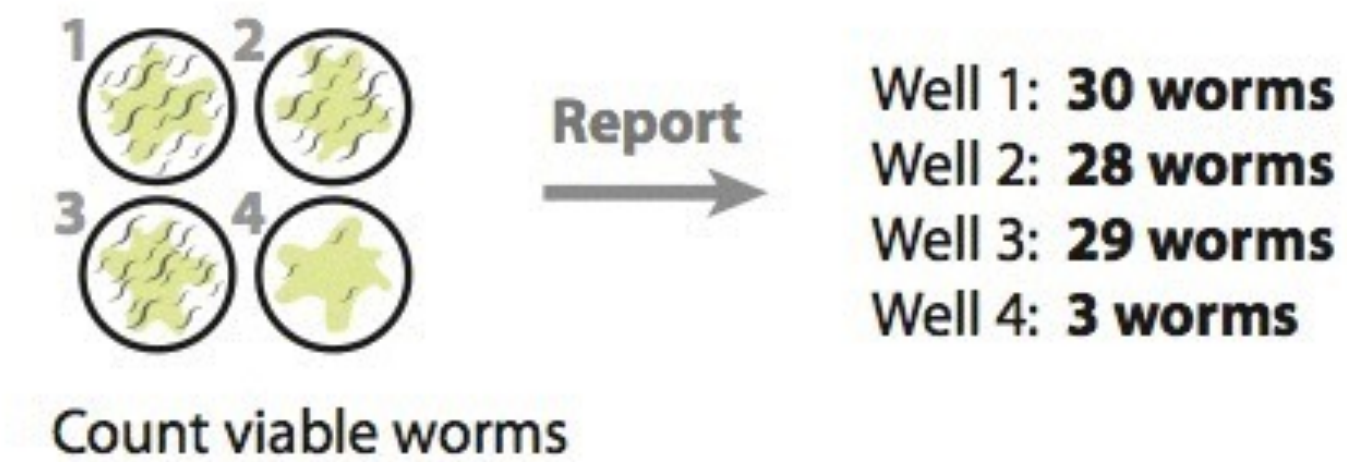
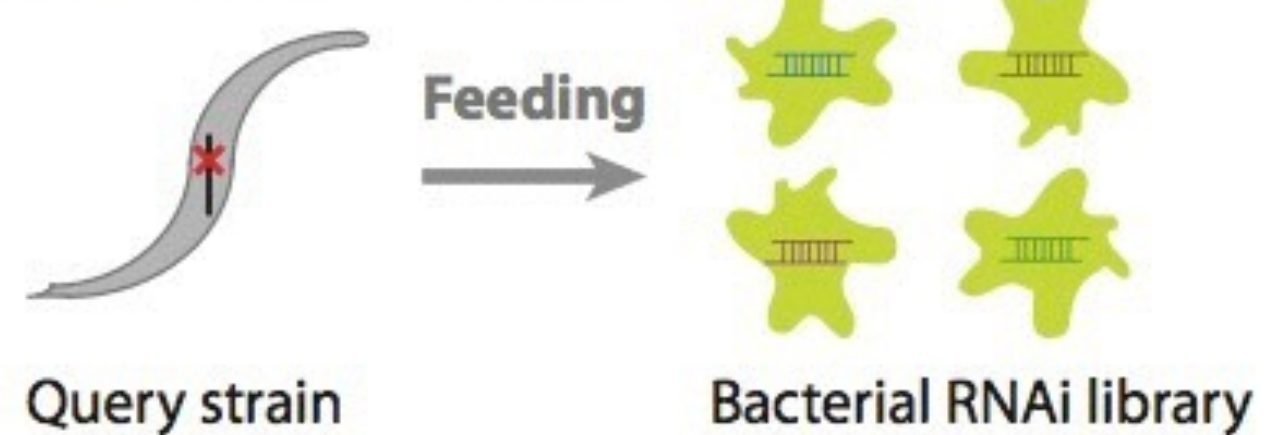
Saccharomyces cerevisiae



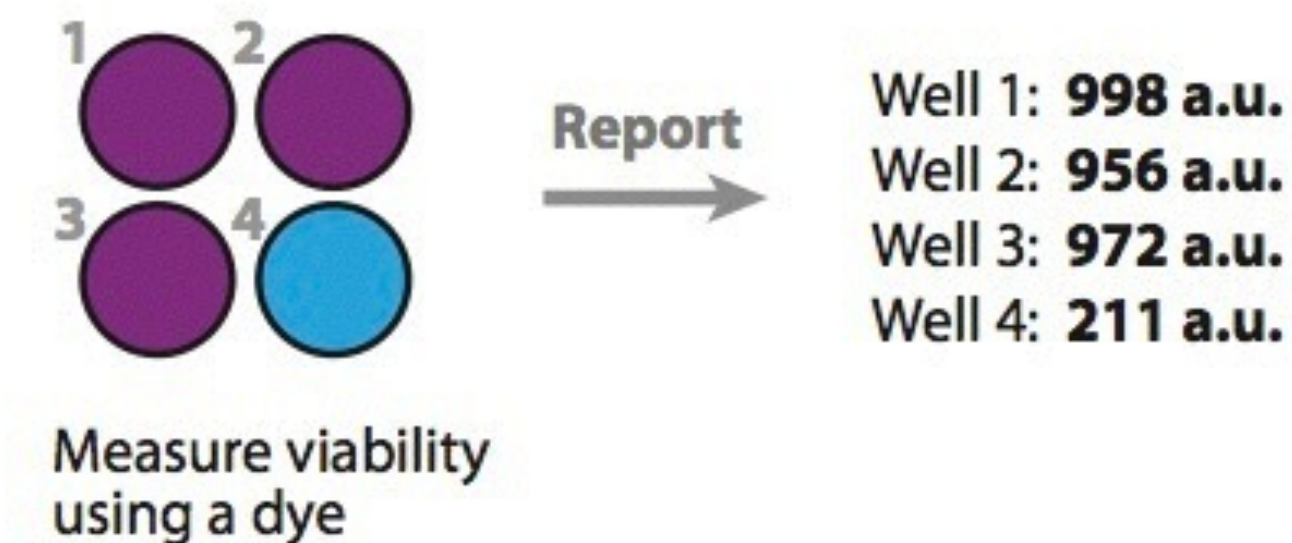
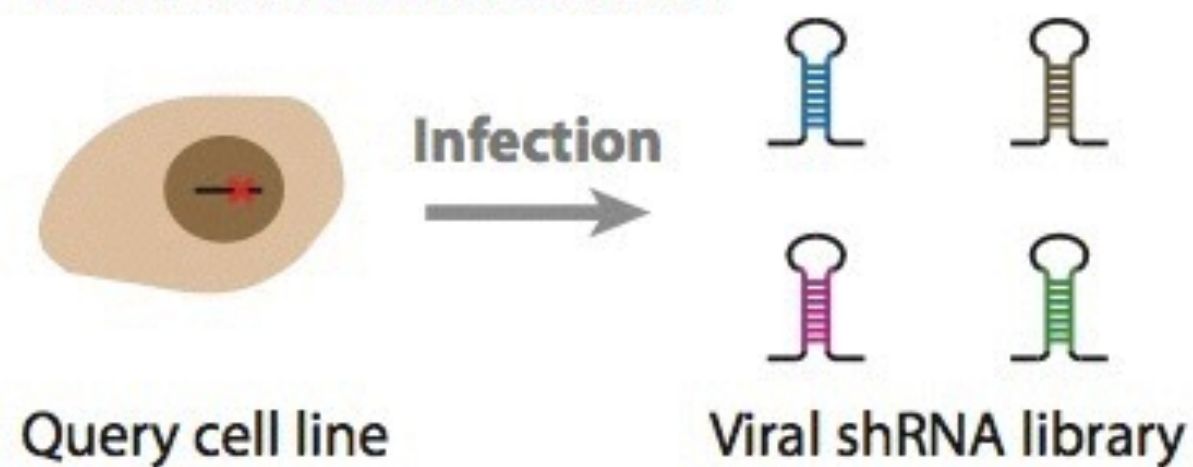
Step 2: Score phenotype and identify interactions



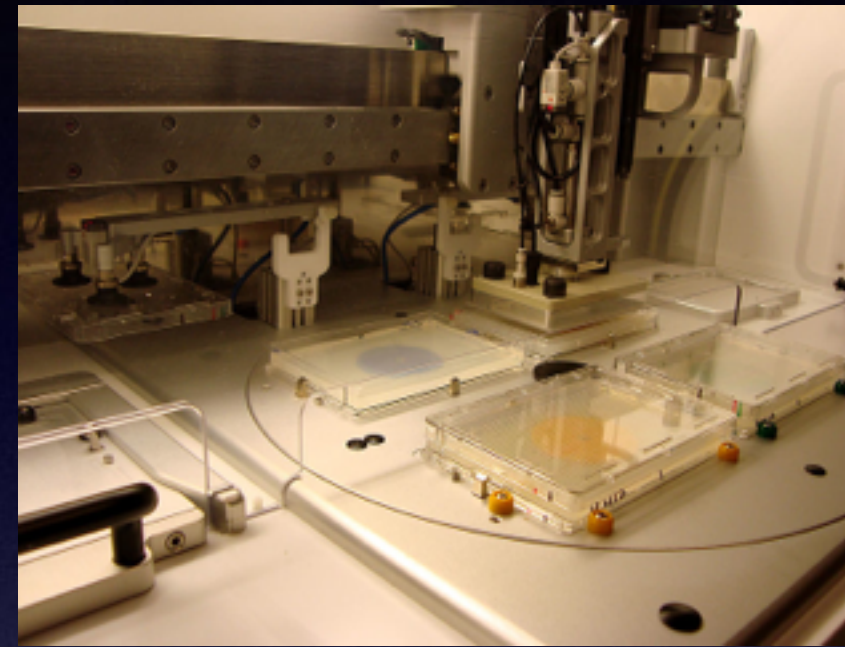
Caenorhabditis elegans



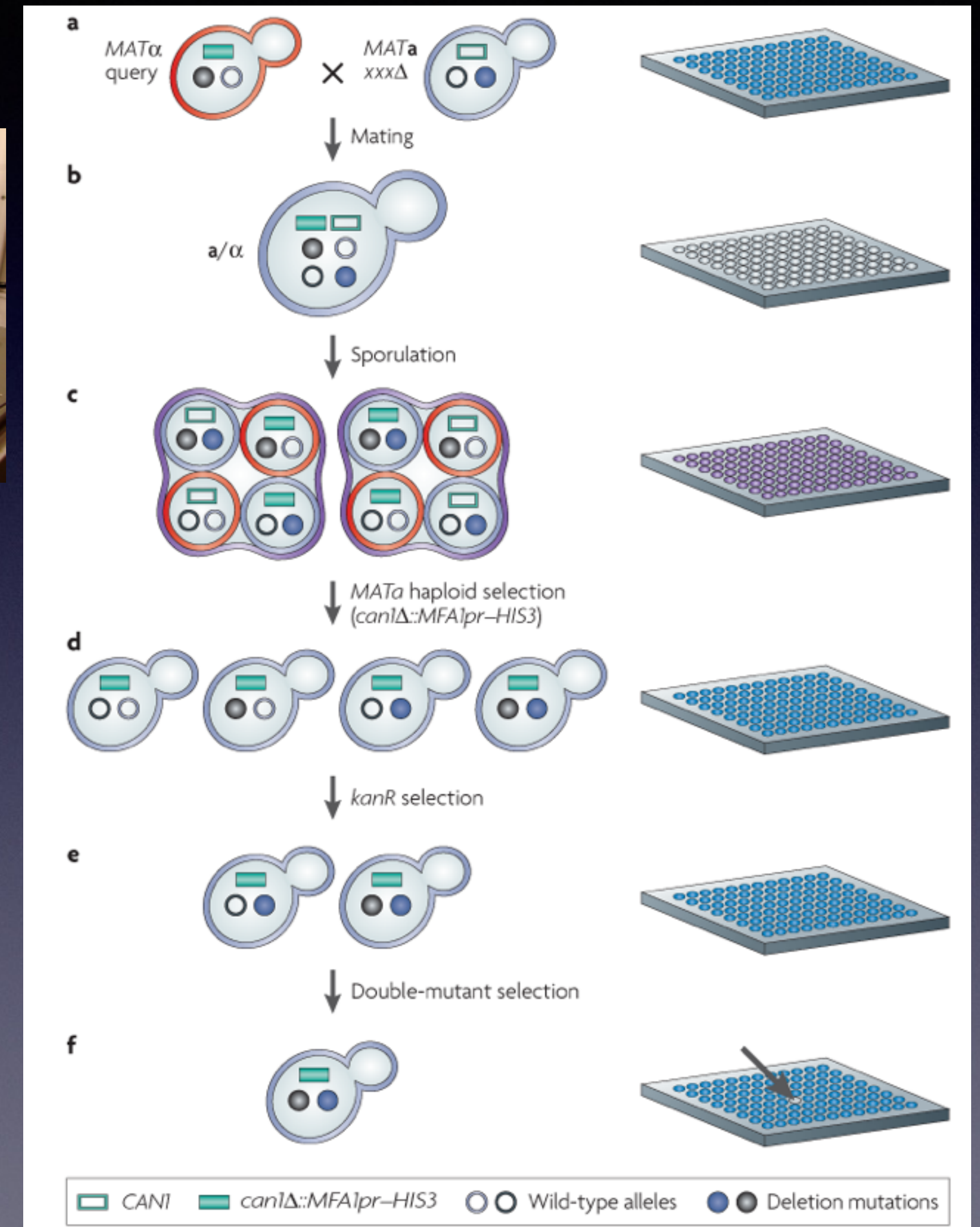
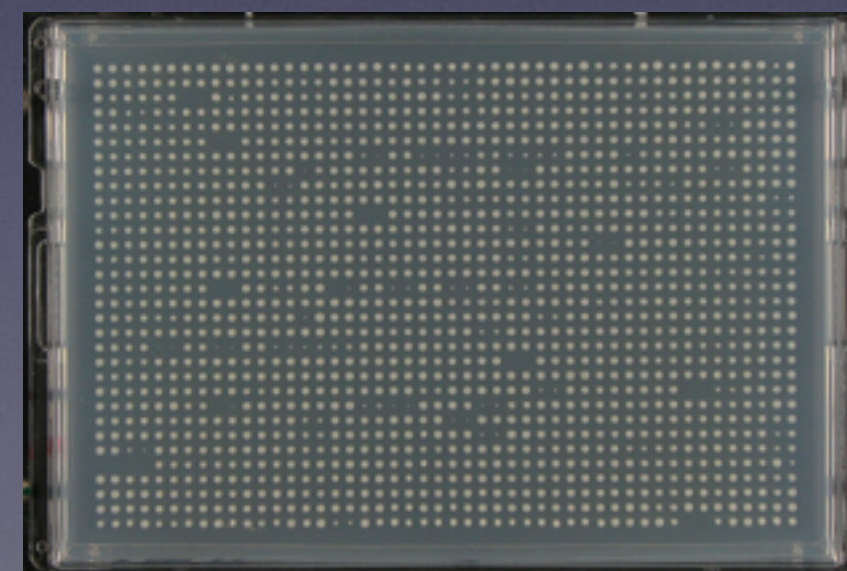
Mammalian cell culture



SGA

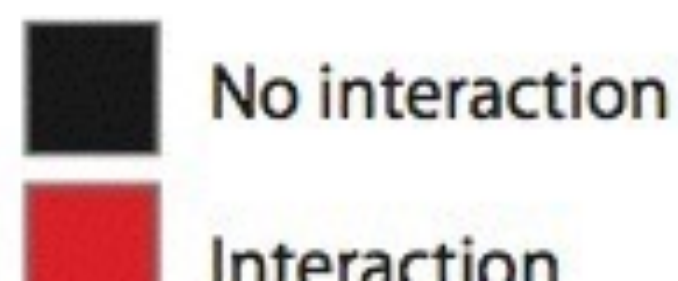
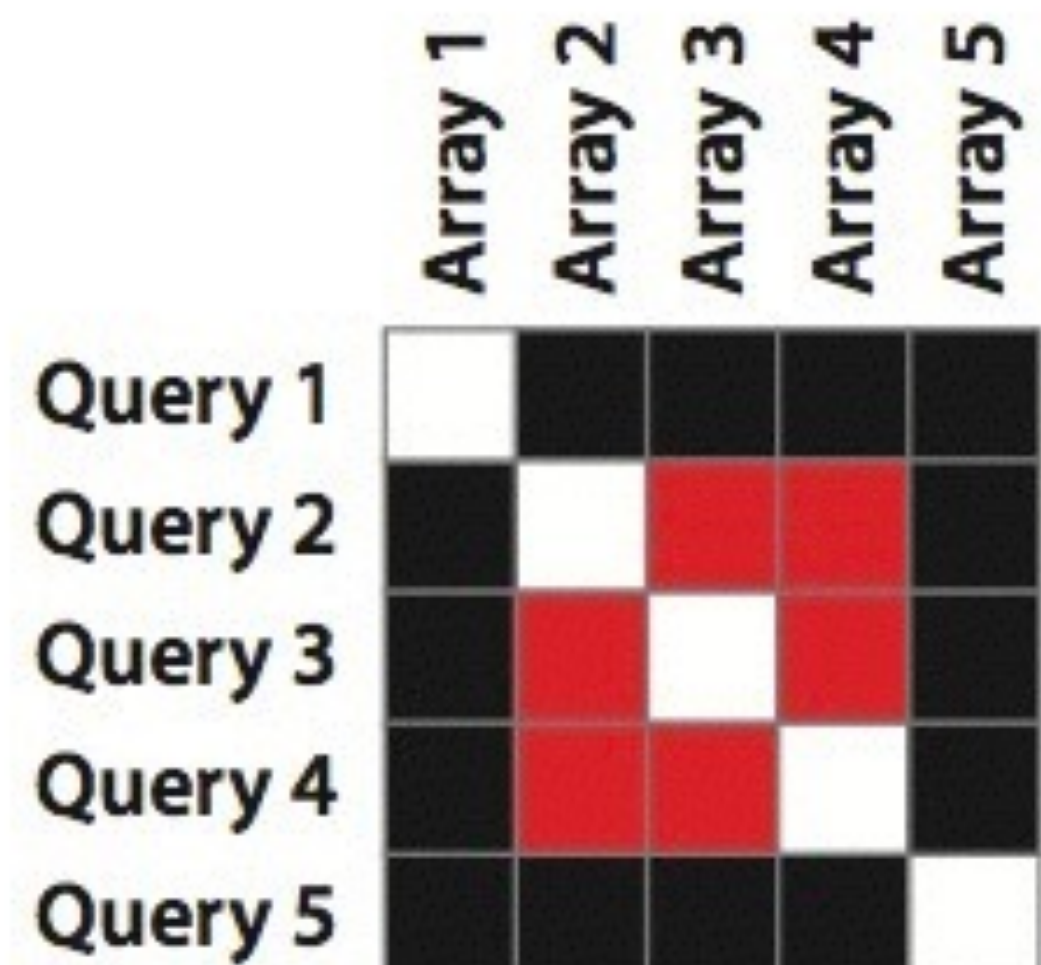


- Synthetic Gene Array
- Kolekcja delecji, krzyżowana z badanym genem
- Sporulacja,
- Selekcja haploidów *MATa*
- Selekcja pojedynczych i podwójnych mutantów

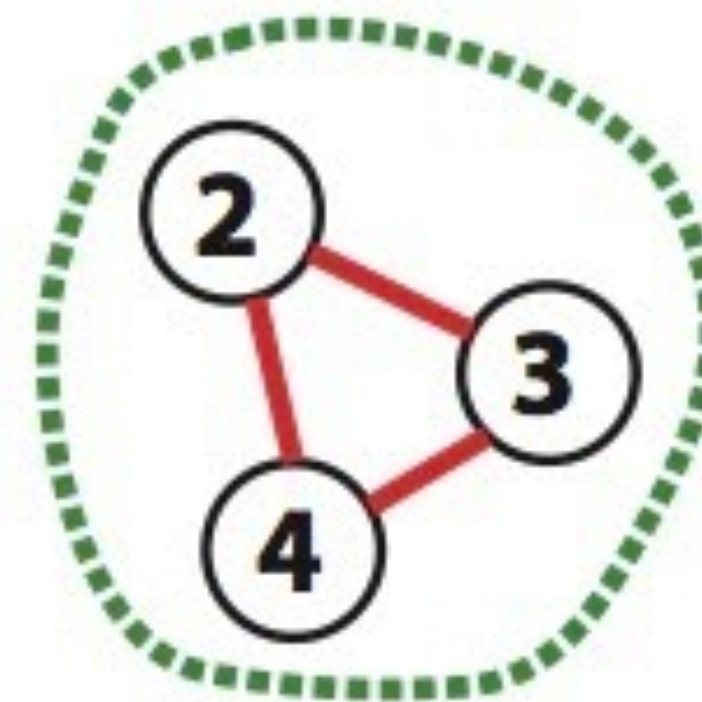


Rekonstrukcja sieci interakcji

Step 3: Build genetic interaction networks



Common biological process



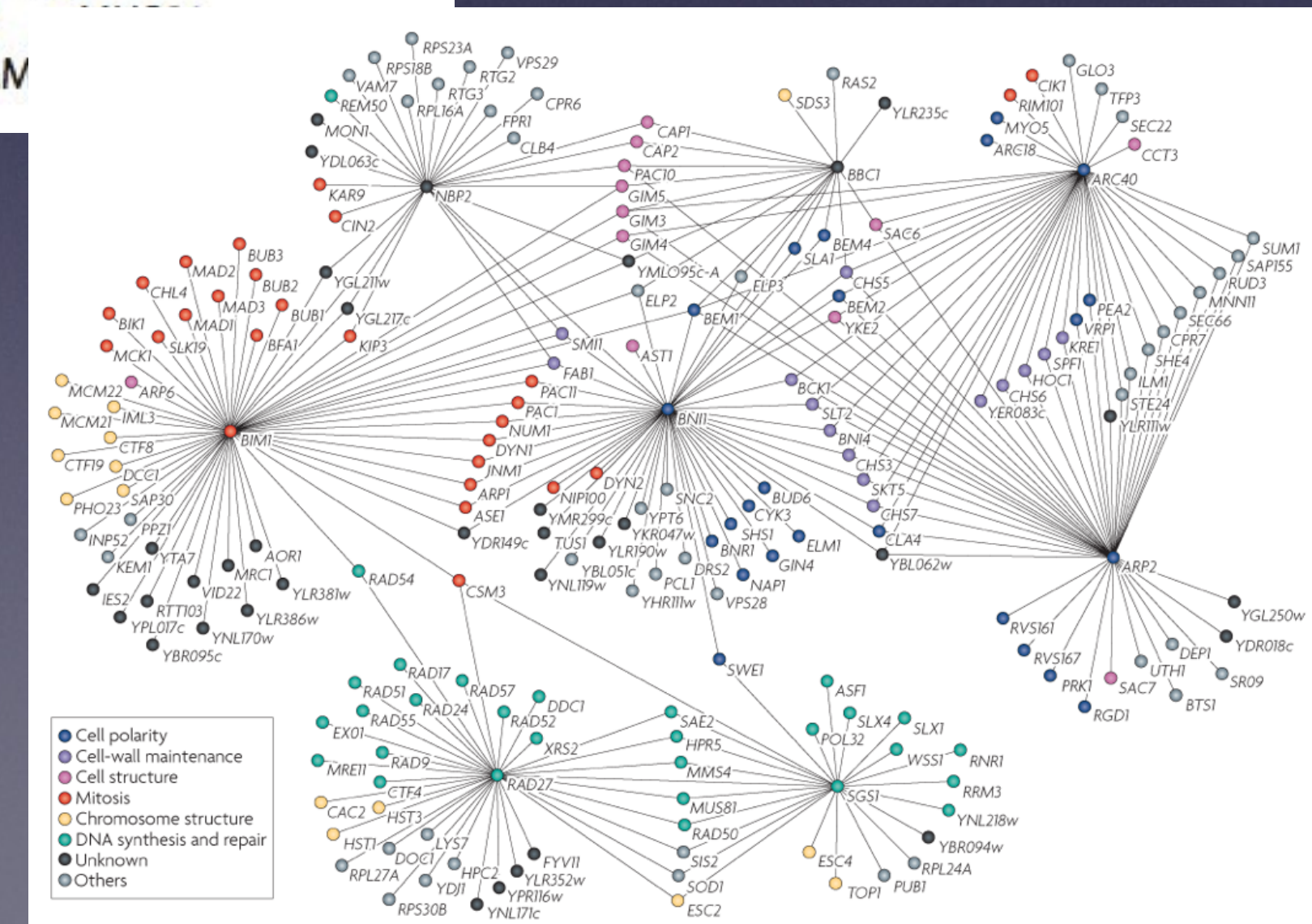
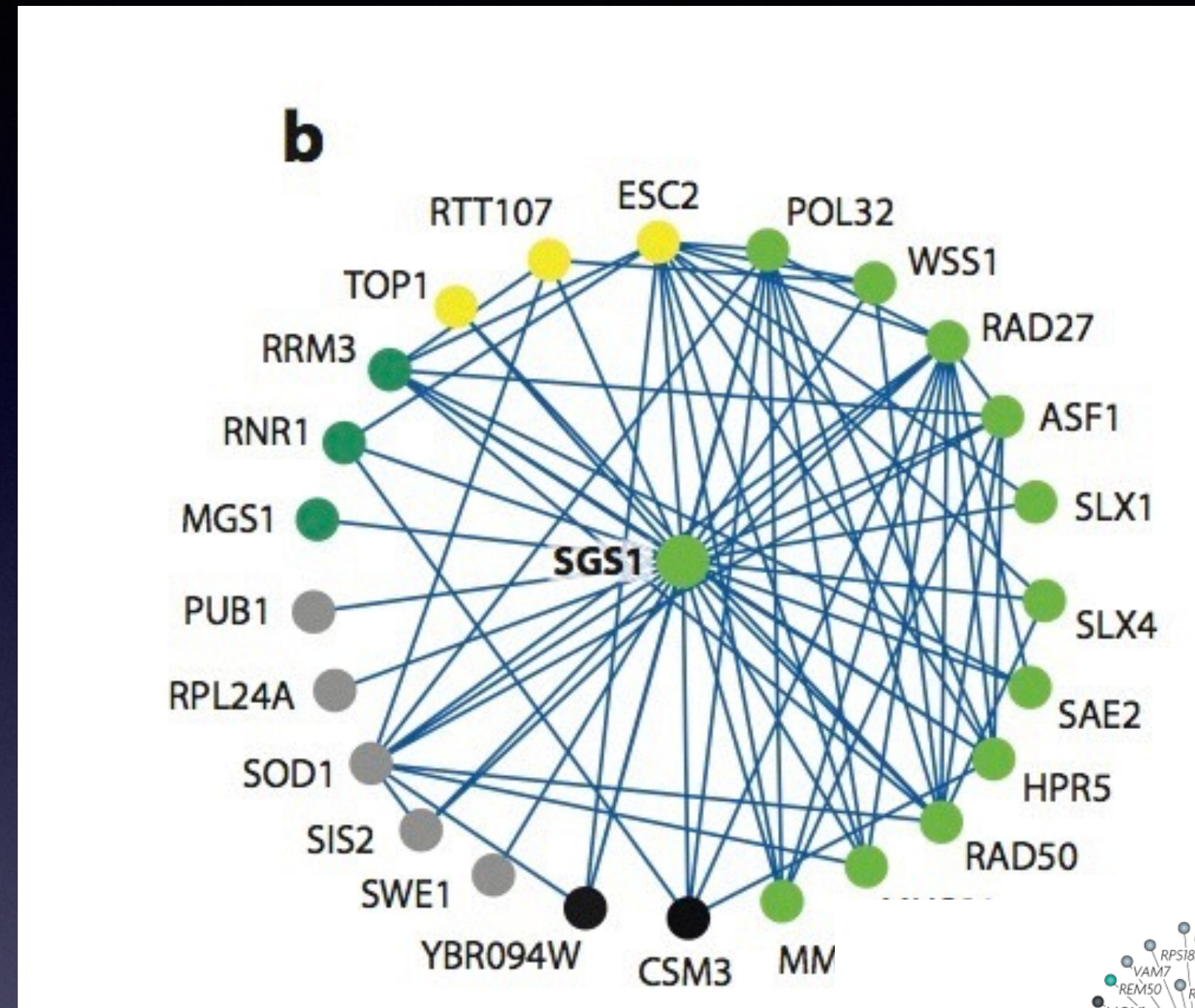
Explore function of gene cluster

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

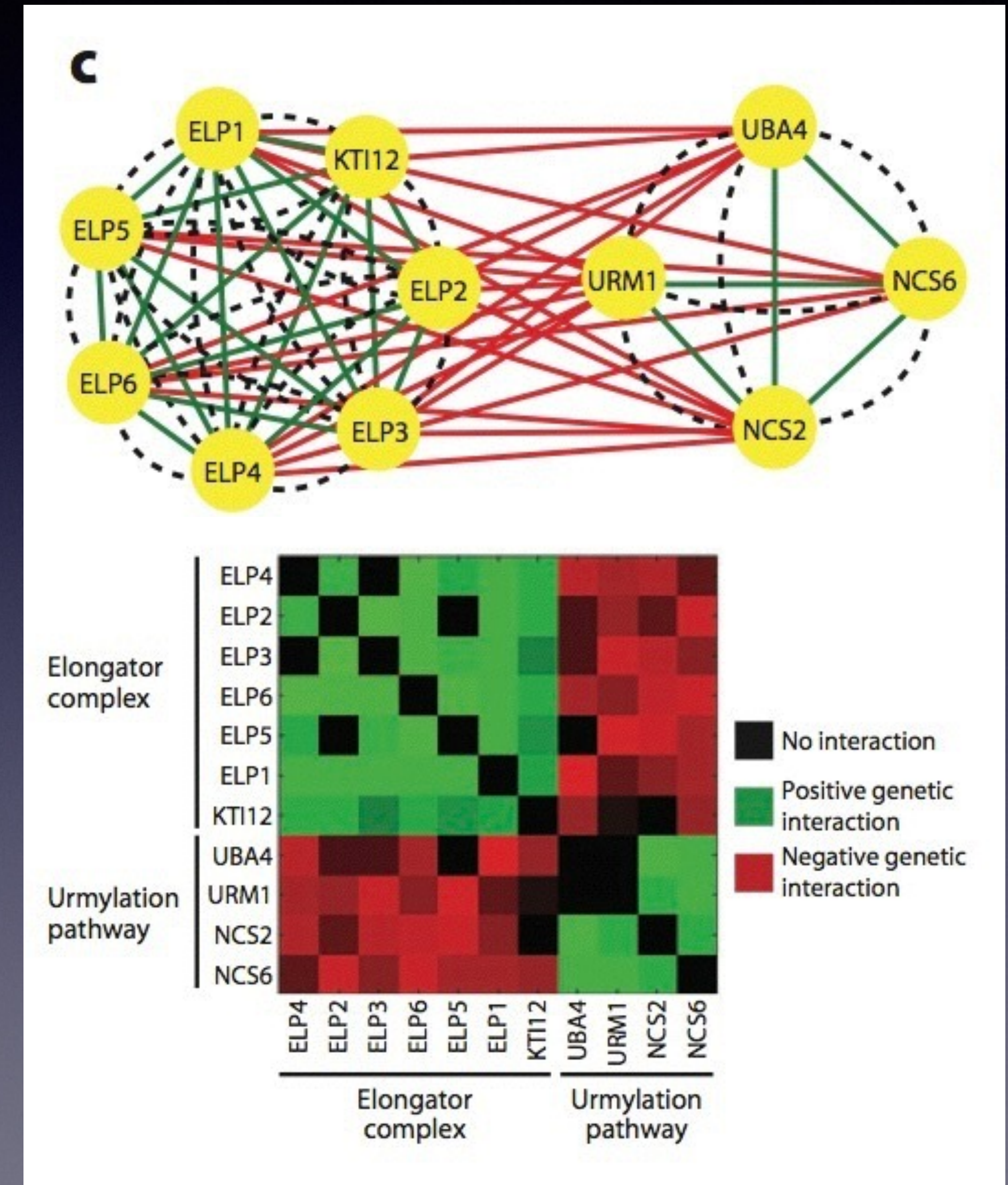
Sieci interakcji

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



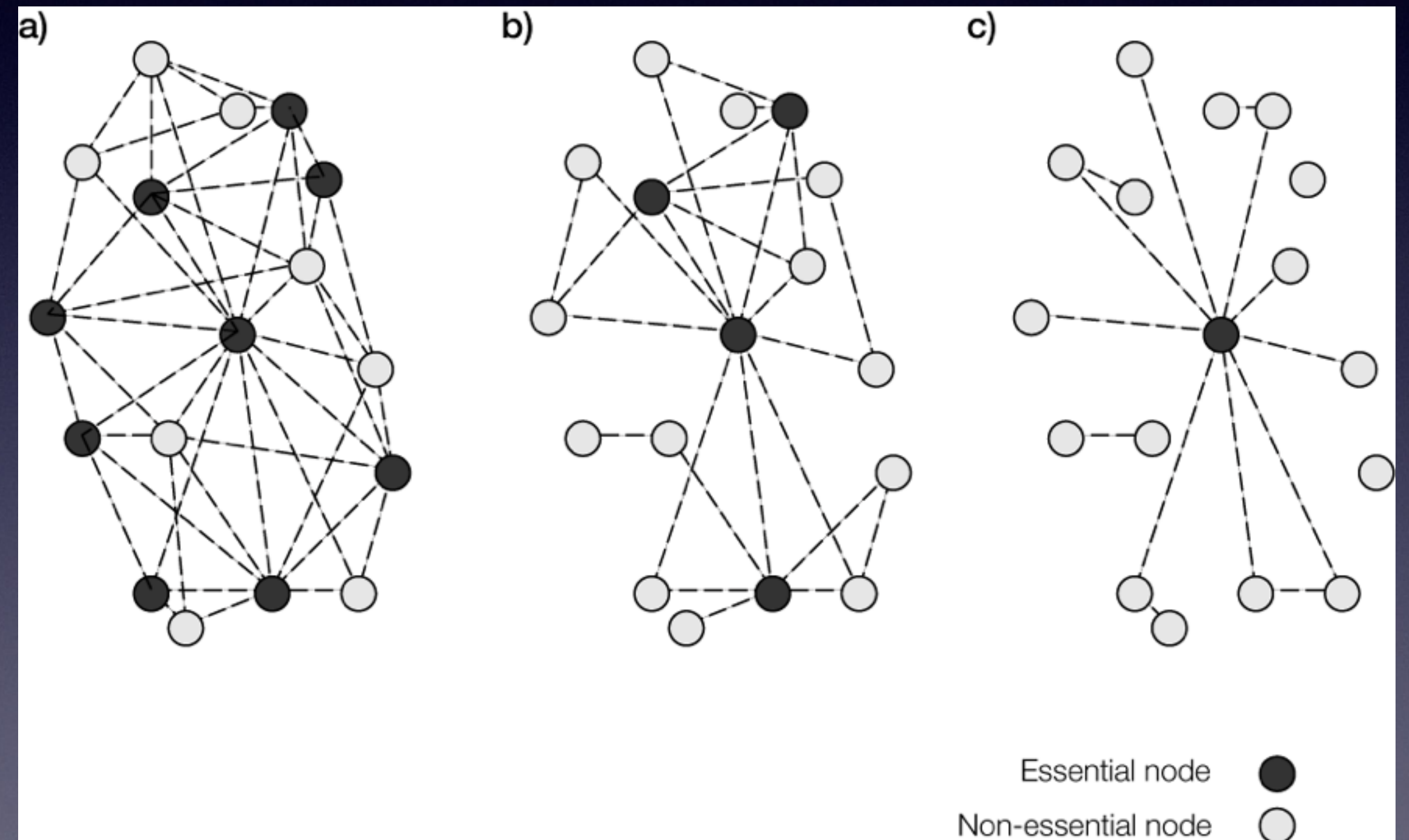
Interakcje genetyczne a fizyczne

- 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

- Sieć a) – najmniej odporna na zaburzenia, sieć c) – najbardziej
- W sieci a) najwięcej interakcji syntetycznych, w c) - najmniej
- Sieci biologiczne przypominają typ b) – struktura hierarchiczna (scale-free)



Sieci

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

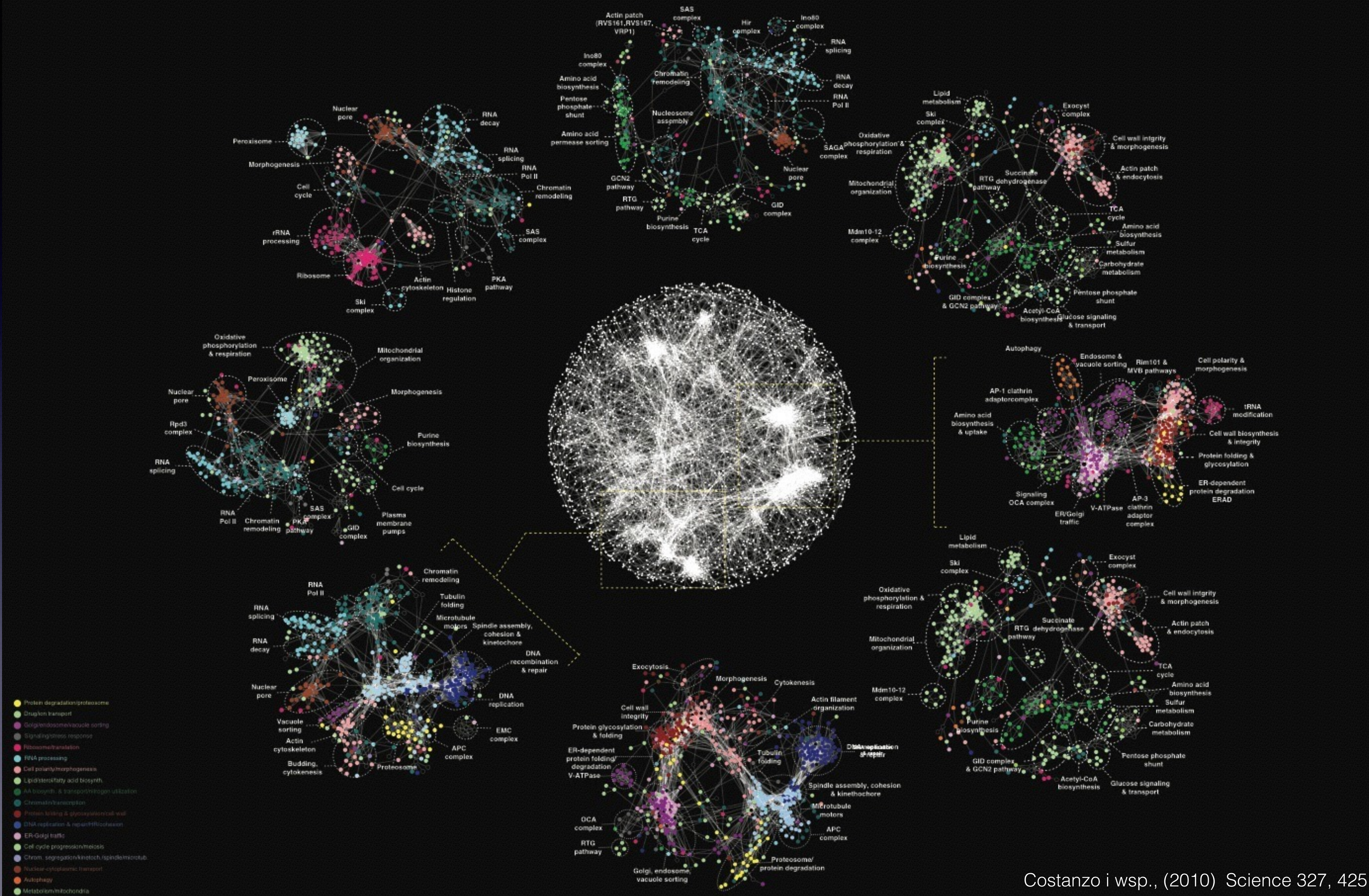
Sieci biologiczne

- Sieci interakcji biologicznych mają charakter hierarchiczny
 - węzły centralne (hubs) z dużą liczbą połączeń
 - węzły peryferyjne, z małą liczbą połączeń
 - węzły centralne częściej odpowiadają genom niezbywalnym (których defekt jest letalny)
- “Mały świat” – długość ścieżki pomiędzy dwoma węzłami jest niewielka (3,3 u drożdży)
 - Gęste otoczenia lokalne (sąsiedzi danego węzła często oddziałują ze sobą)
- Podobne właściwości ma np. Internet, sieci interakcji społecznych, liczba Erdősa wśród matematyków

Interakcje genetyczne a biologia systemów

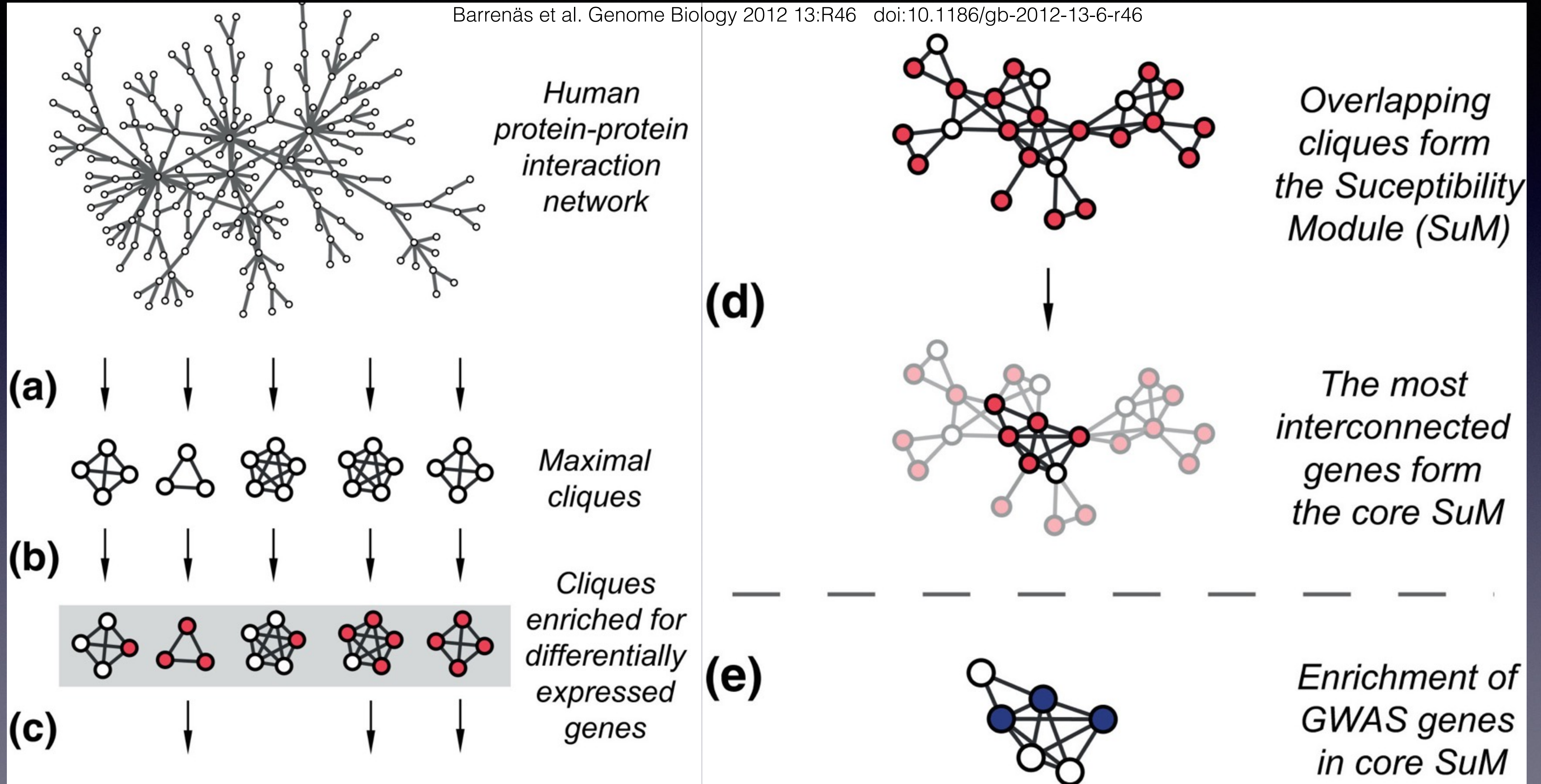
- Badanie sieci interakcji funkcjonalnych na skalę całego organizmu to podstawa biologii systemów
- Interakcje genetyczne są ważnym elementem takiej sieci
 - Może nawet bardziej, niż interakcje fizyczne
 - Interakcje fizyczne identyfikują kompleksy, interakcje genetyczne mogą pokazać, w jakim kontekście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

The Genetic Landscape of a Cell



Sieci a choroby wieloczynnikowe

Barrenäs et al. Genome Biology 2012 13:R46 doi:10.1186/gb-2012-13-6-r46



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