

Podstawy genetyki - biologia molekularna genu

Rekombinacja. Ekspresja i regulacja. Systemy regulacyjne.

Rekombinacja

Literatura

- Brown, rozdział 17
- Allison, rozdział 7

Rekombinacja

- Procesy pęknięcia i ponownego łączenia łańcuchów nukleotydowych
 - Opisana w związku z *crossing-over*
 - Pierwotna funkcja – naprawa pęknięć nici po replikacji, odblokowywanie widełek replikacyjnych
 - *Crossing-over* utrzymuje chromosomy homologiczne razem – ułatwia segregację
 - Bardzo ważna funkcja dla zapewnienia ewolucyjnej dynamiki genomu (wtórna)

Rekombinacja a płęć

- Rekombinacja (*crossing-over*) jest waźna dla procesów płciowych
- Ale nie jest to jej pierwotna funkcja
- Mechanizm starszy i bardziej rozpowszechniony, niź płęć
- Pierwotna i głuwna funkcja - DSBR

Rekombinacja homologiczna

- Rekombinacja homologiczna (ogólna)
 - zachodzi między fragmentami DNA o znacznej homologii
 - pomiędzy dwiema cząsteczkami lub w obrębie jednej
- crossing-over, naprawa DNA

Homologous recombination

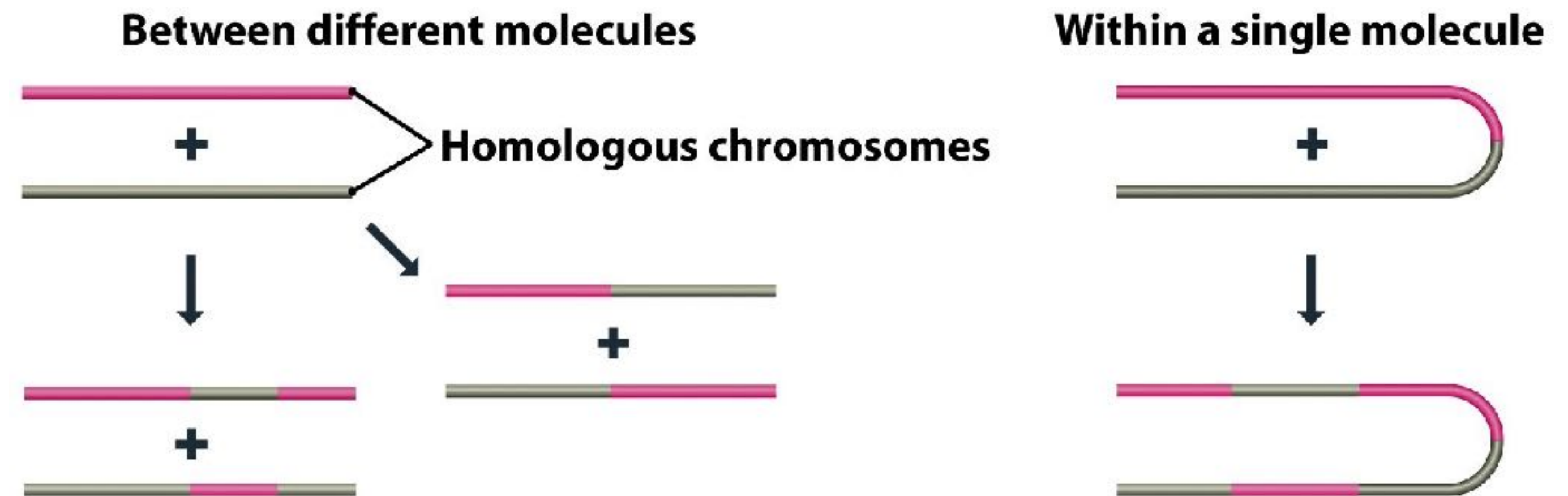


Figure 17-1a Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Rekombinacja umiejscowiona

- Zachodzi między cząsteczkami mającymi jedynie krótki obszar homologii
- Regulowana przez specyficzne enzymy
- Np. integracja genomów fagowych

Site-specific recombination

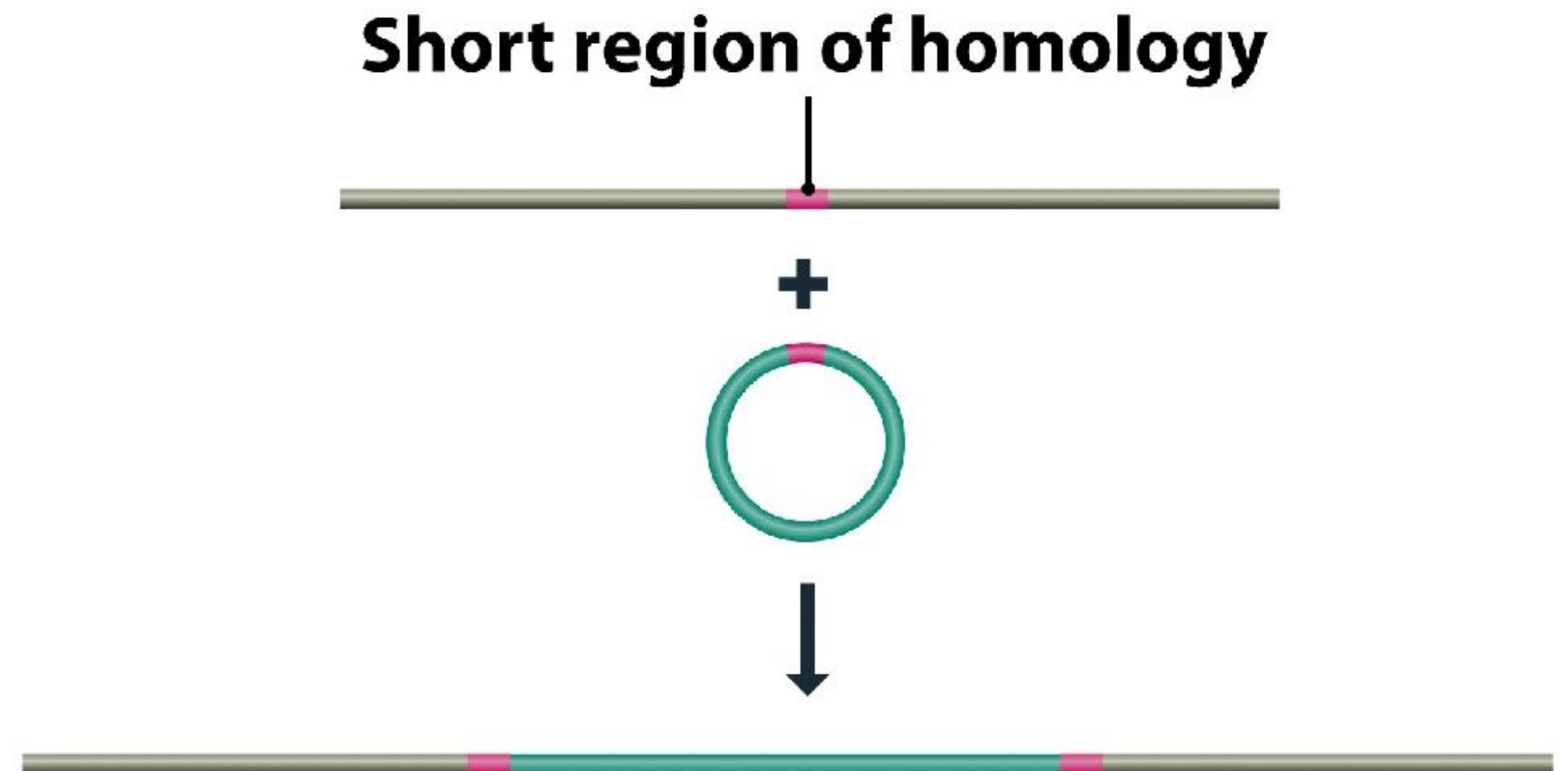


Figure 17-1b Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Rekombinacja umiejscowiona

- Przykłady
 - Integracja faga (np. λ) do genomu
 - Wykorzystywana przez ruchome elementy genetyczne (transpozony, wirusy, niektóre introny)
 - Specyficzne enzymy – rekombinazy (np. integraza λ)
 - Wykorzystywana w inżynierii genetycznej (system rekombinazy Cre)
 - Delecje warunkowe
 - Usuwanie markerów selekcyjnych

Transpozycja

- Transpozycja
 - Przeniesienie fragmentu DNA z jednej pozycji w genomie w inną
 - Replikatywna: przenoszona kopia sekwencji
 - Konserwatywna: przenoszona sekwencja oryginalna
 - Różne mechanizmy (z udziałem DNA i odp. białek, retrotranspozycja za pośrednictwem RNA itp.)

Transposition

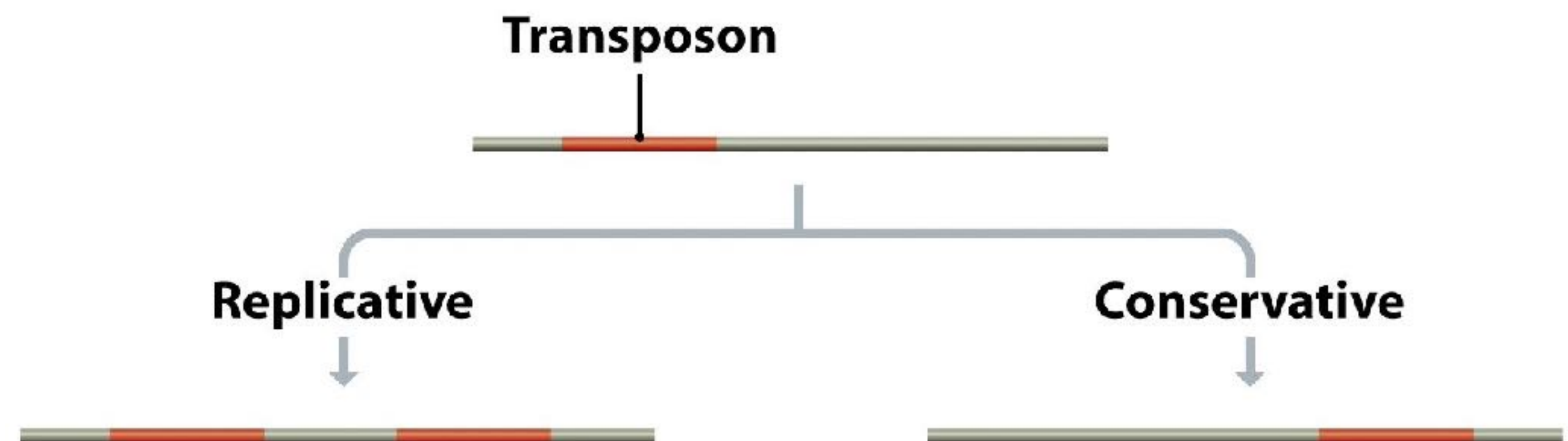


Figure 17-1c Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Transpozycja

- Nie jest odrębnym mechanizmem rekombinacji
- Proces wykorzystujący rekombinację do przenoszenia fragmentów DNA
- Transpozycja DNA
 - replikatywna
 - konserwatywna
- Retrotranspozycja
 - Przepisanie RNA na DNA – odwrotna transkryptaza
 - Integracja utworzonego DNA do genomu (integrazy)
 - Np. retrowirusy, retrotranspozony, niektóre mobilne introny

Modele rekombinacji homologicznej

- Holliday
- Meselson-Radding

The Meselson-Radding modification

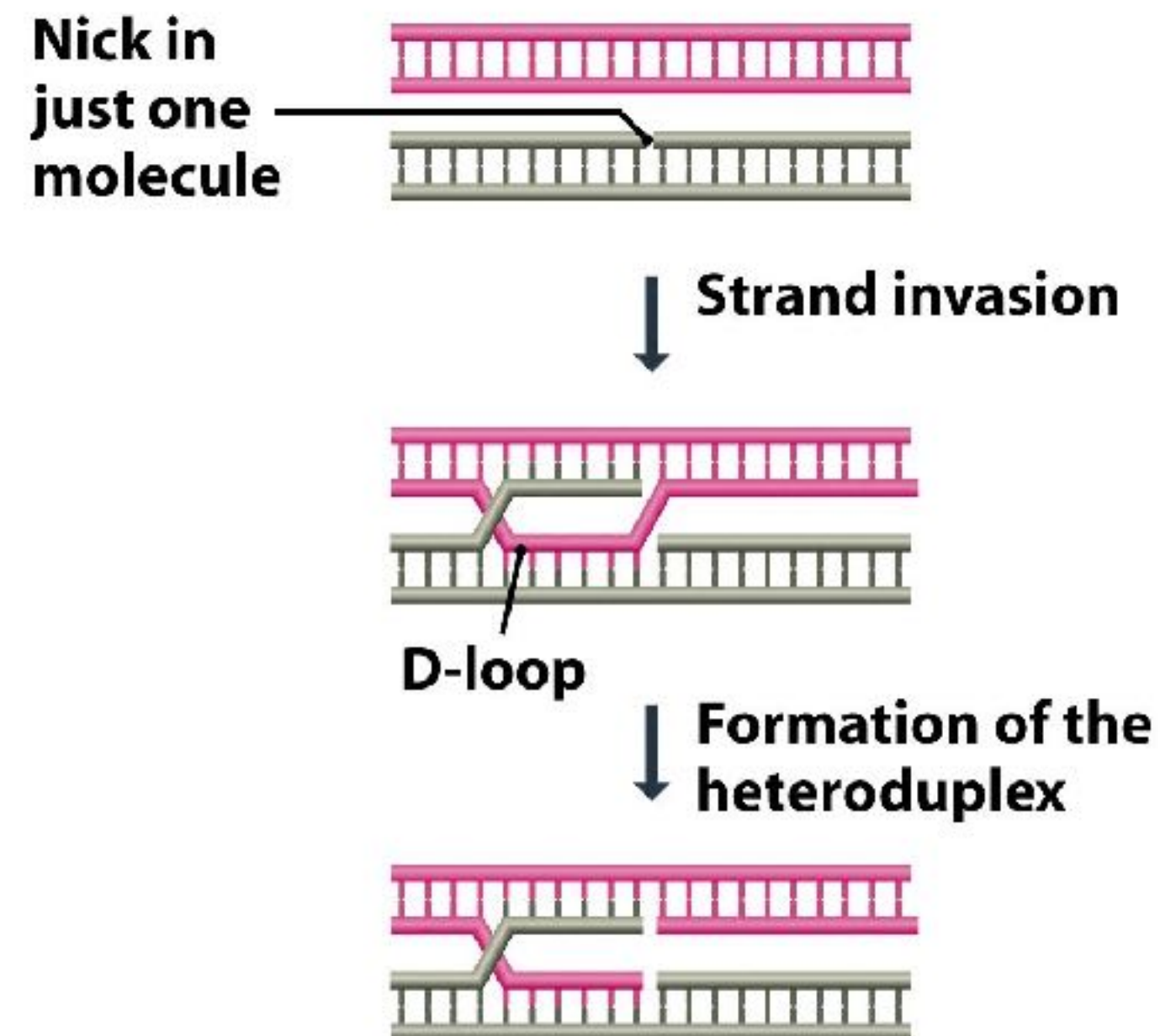


Figure 17-3b Genomes 3 (© Garland Science 2007)

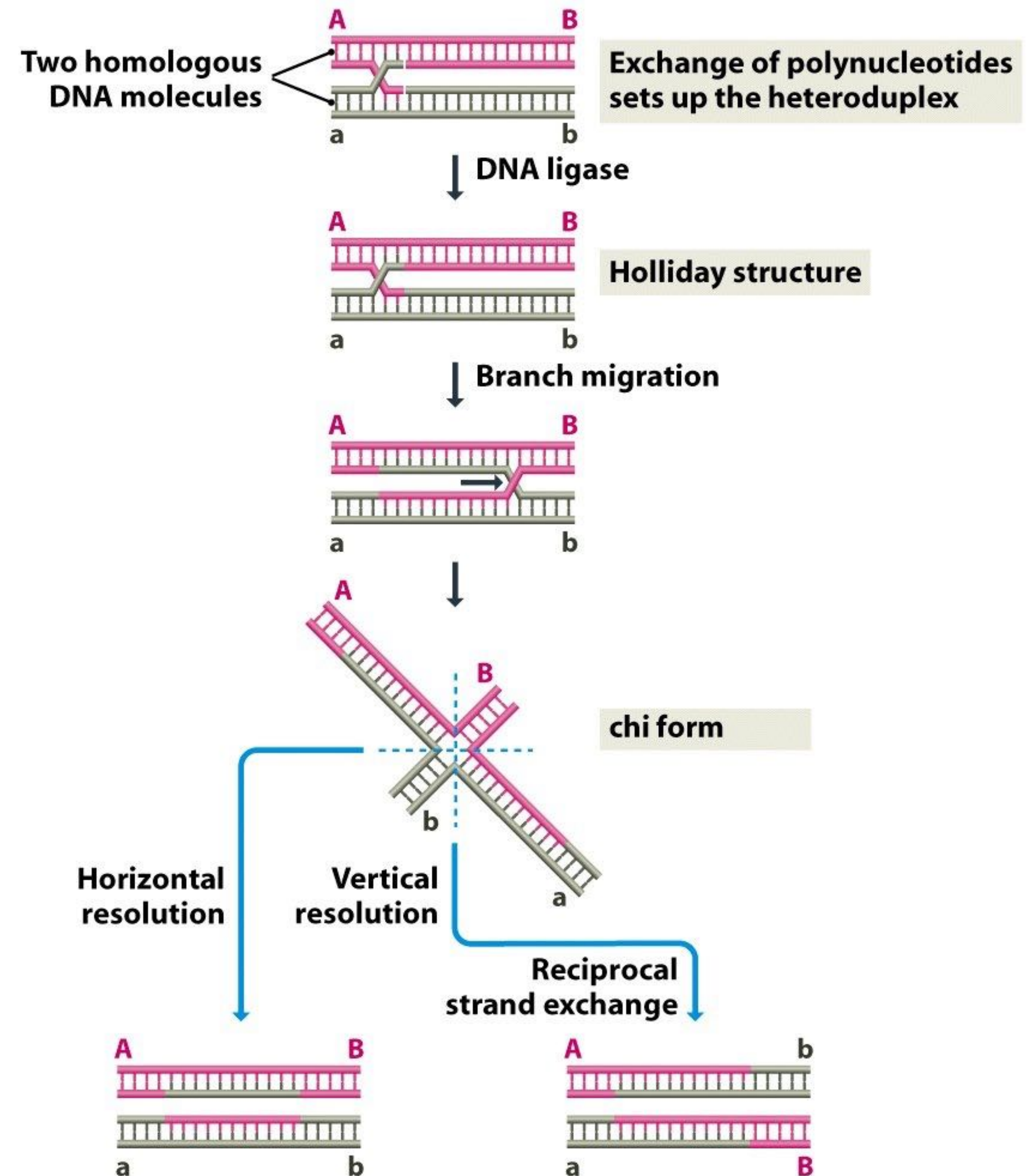


Figure 17-2 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Konwersja genu

- Zmiana allelu w trakcie mejozy.
- Zmienia rozkład w krzyżówce z 2:2 na 3:1.
- Nie da się wyjaśnić w modelu Hollidaya.

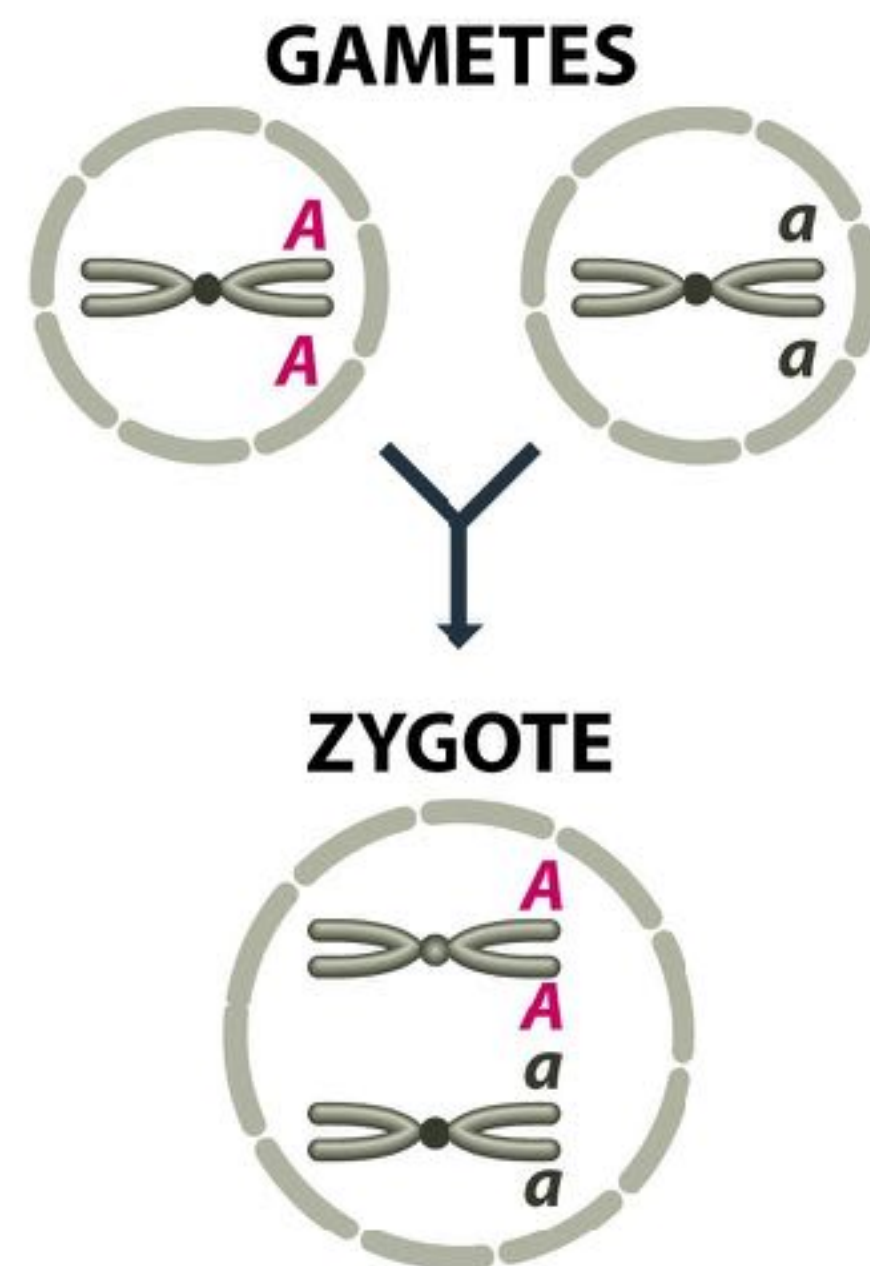


Figure 17-4 part 1 of 2 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

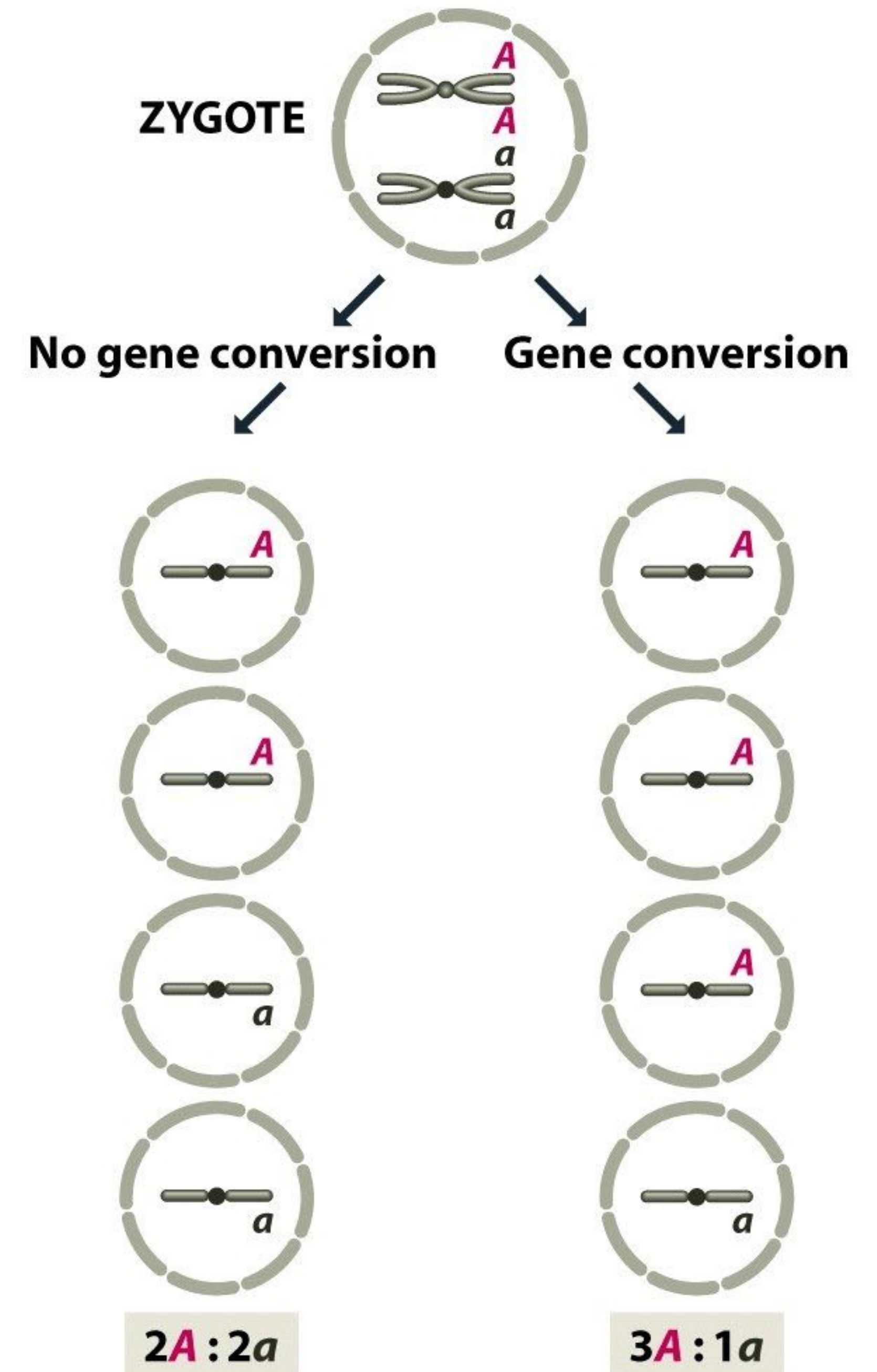


Figure 17-4 part 2 of 2 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Model pęknięć dwuniciowych

Double-strand cut

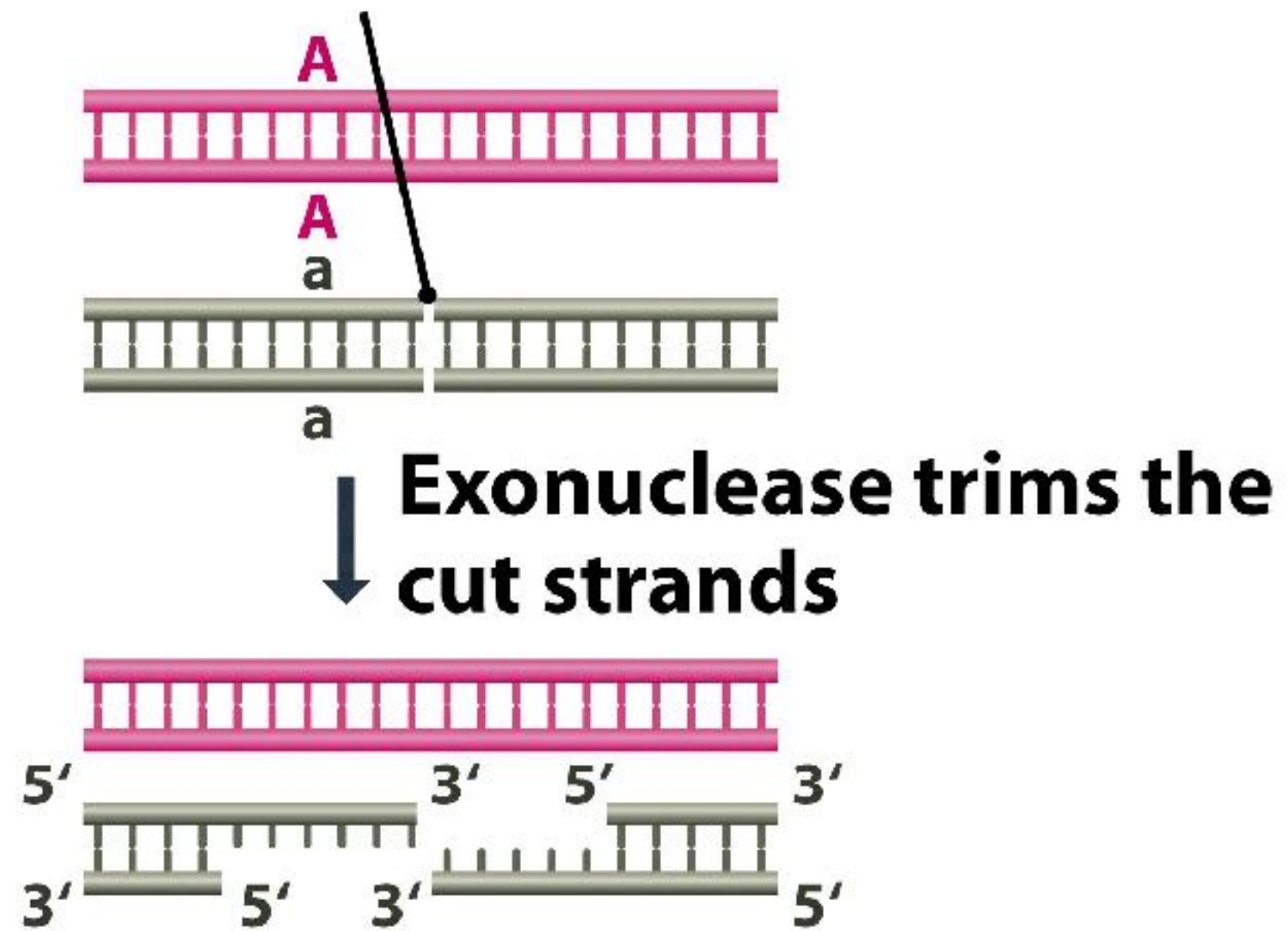


Figure 17-5 part 1 of 6 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

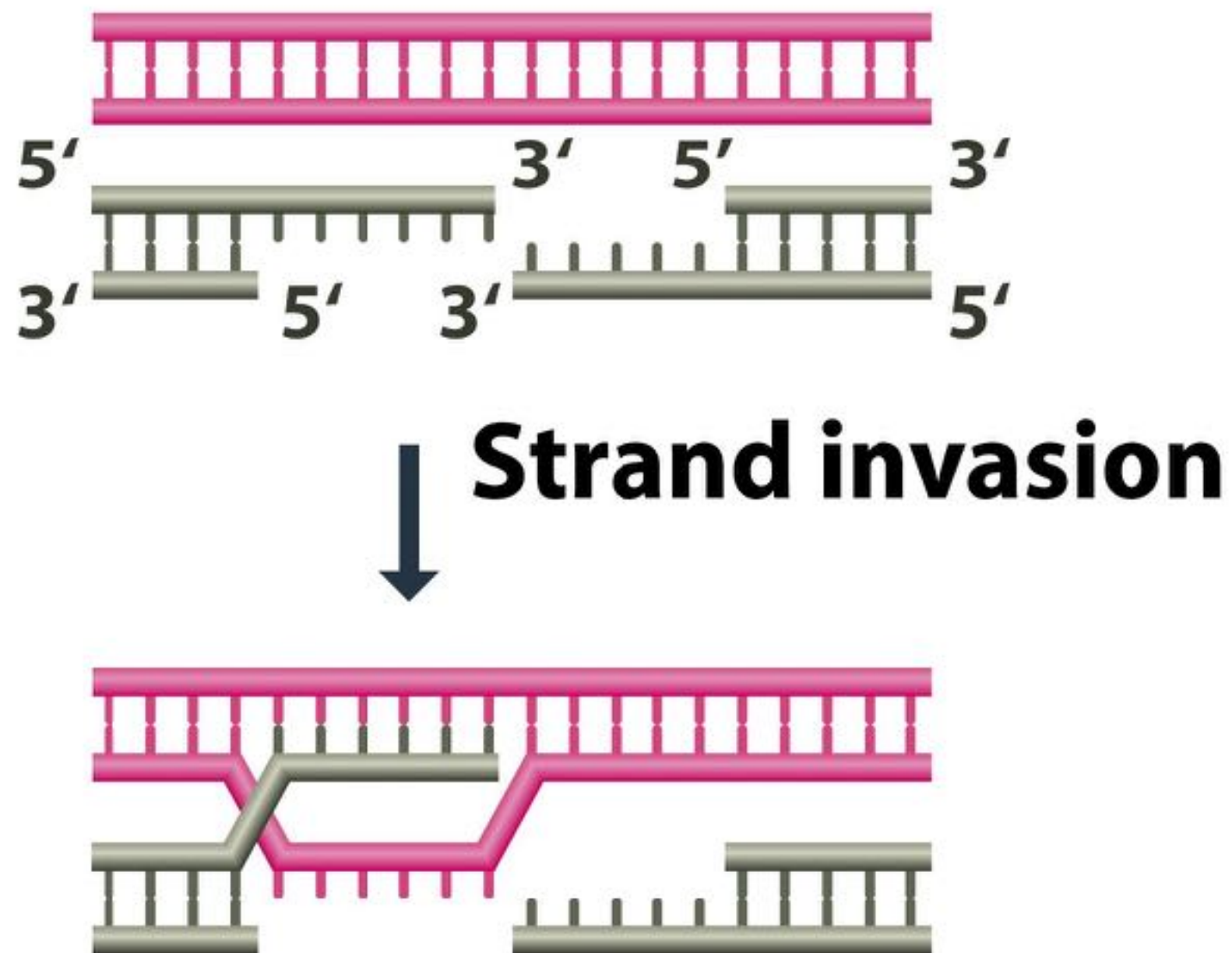


Figure 17-5 part 2 of 6 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

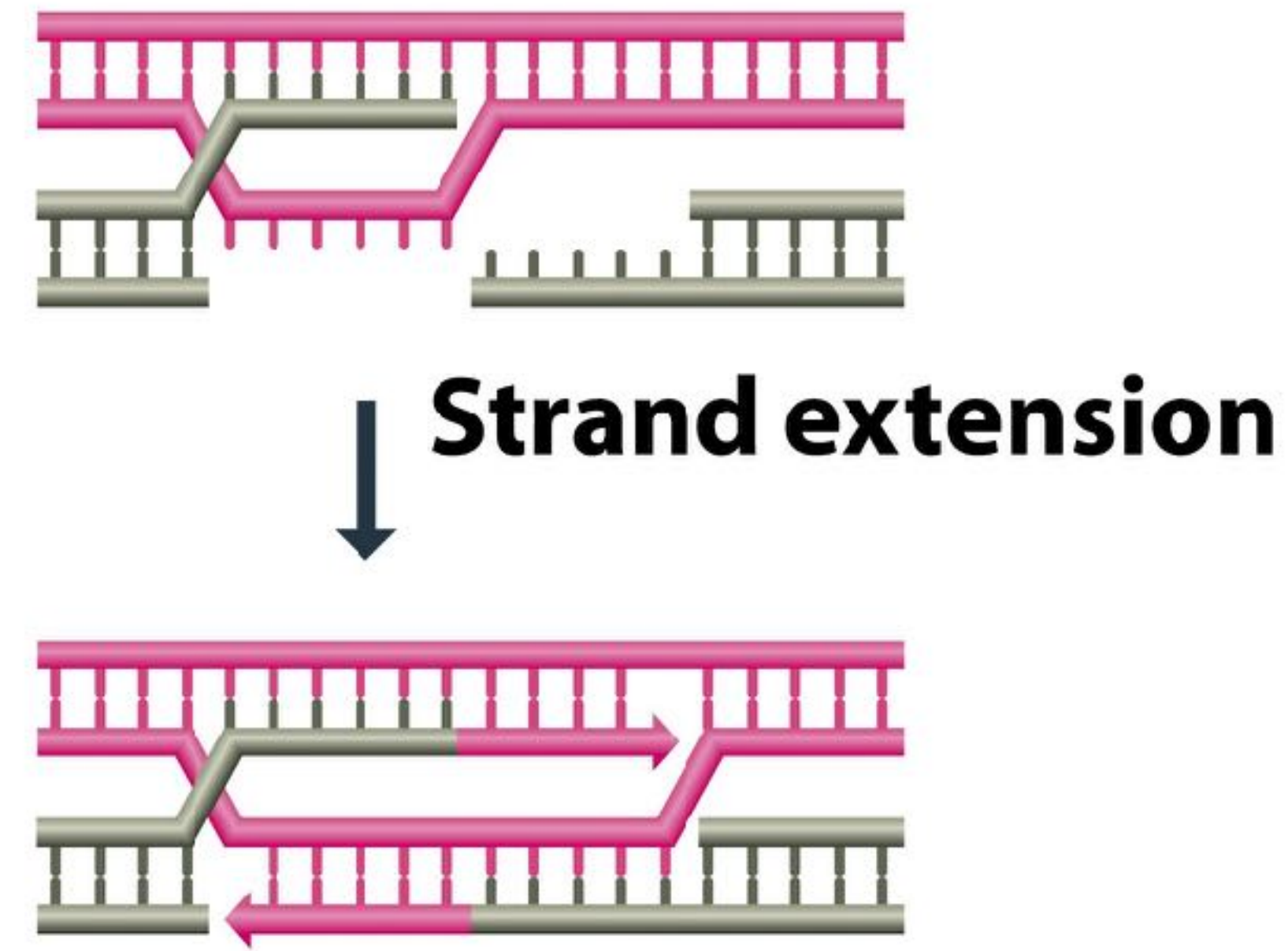
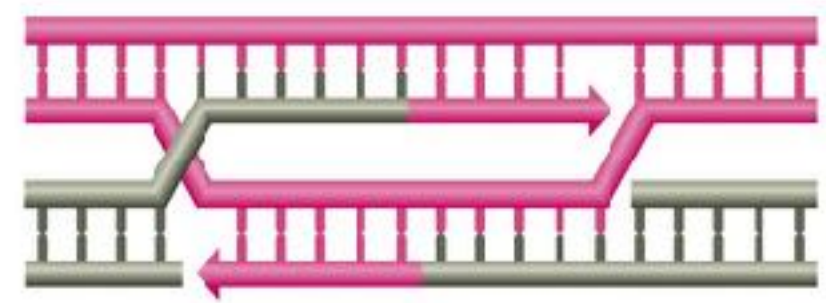
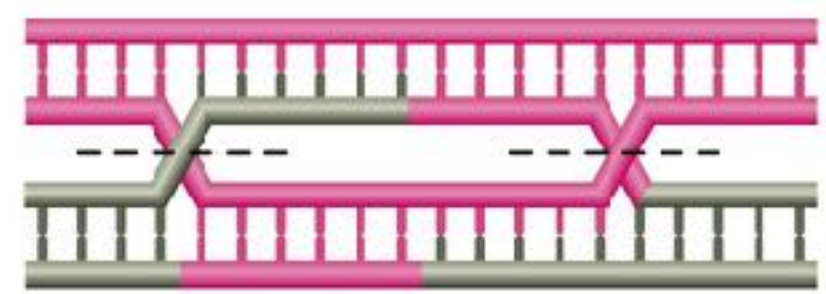


Figure 17-5 part 3 of 6 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Model pęknięć dwuniciowych

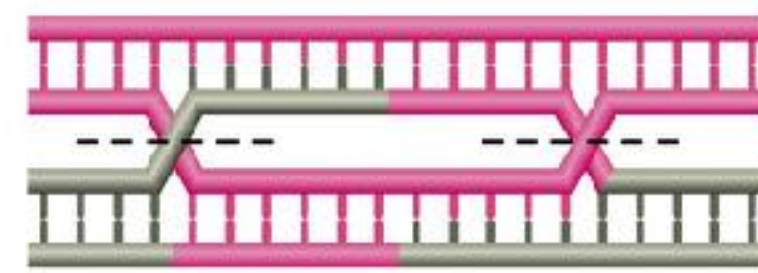


↓ **Ligase joins up the gaps**



Heteroduplex with two Holliday junctions

Figure 17-5 part 4 of 6 Genomes 3 (© Garland Science 2007)



Heteroduplex with two Holliday junctions

↓ **Cleavage of the Holliday junctions**

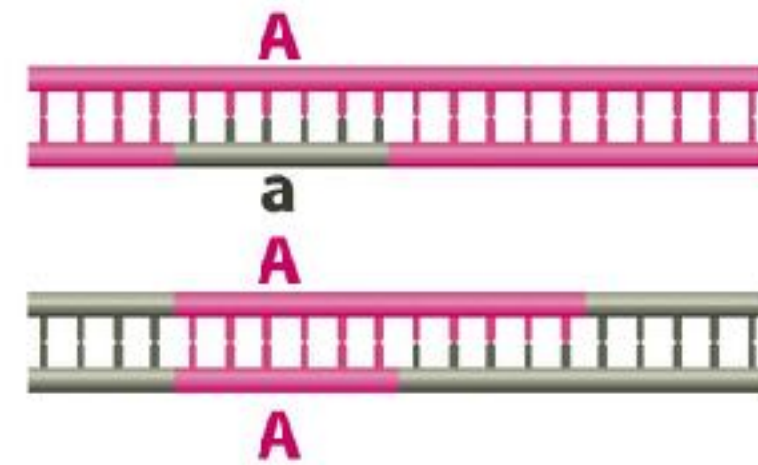
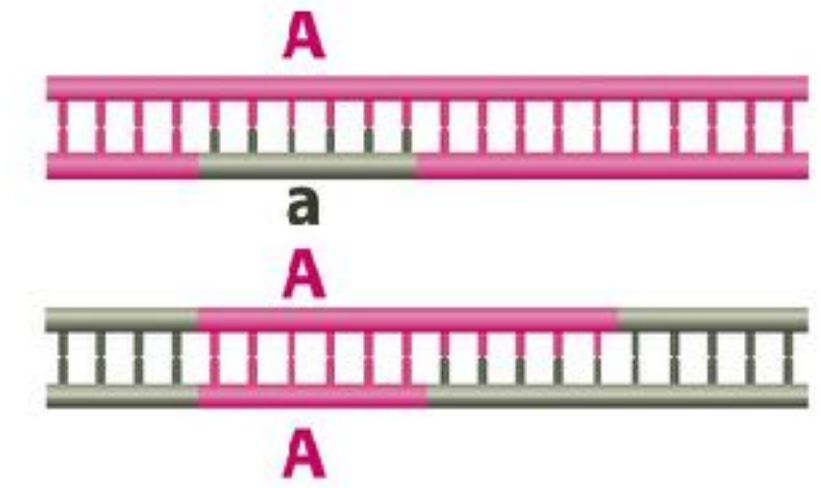


Figure 17-5 part 5 of 6 Genomes 3 (© Garland Science 2007)



↓ **Mismatch repair**

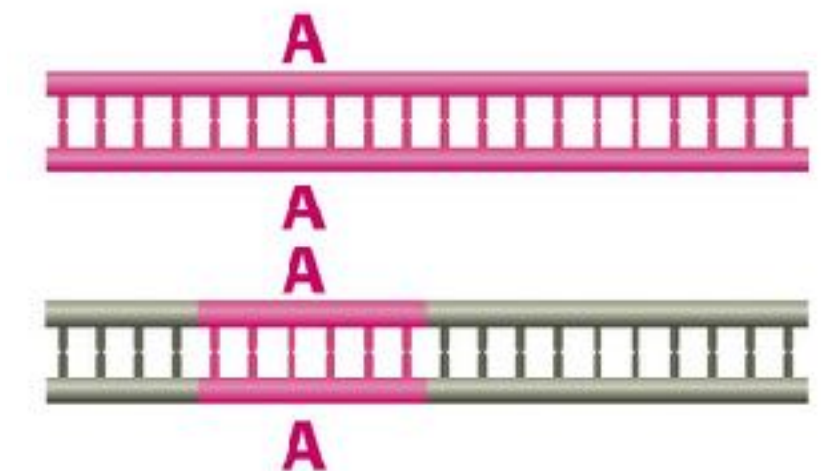


Figure 17-5 part 6 of 6 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

- Konwersja genu przez MMR
- Możliwe jest wiele sposobów rozcięcia podwójnej struktury Hollidaya, dających wymianę nici, brak wymiany, konwersję itp

Maszyneria rekombinacyjna

- Wiele różnych wariantów, niektóre enzymy zachowane od bakterii do ssaków, inne specyficzne
 - Kompleks *RecBCD* – tworzy dwuniciową cząsteczkę z wolnym jednoniciowym końcem. Helikaza + nukleaza
 - inne warianty: *RecF*, *RecE*
 - *RecA* – wiąże koniec jednoniciowy, inwazja nici
 - *RuvA*, *RuvB*, *RuvC* – przemieszczanie się rozgałęzienia, rozłączenie struktury Hollidaya
 - U eukariontów i niekt. bakterii w rozłączaniu bierze udział topoisomeraza

Rekombinacja i naprawa DNA

- Naprawa pęknięć dwuniciowych
- Gdy maszyna widłek replikacyjnych napotka miejsca z uszkodzeniami DNA, w nici potomnej powstaje luka. Replikacja często się zatrzymuje (kolaps widłek replikacyjnych)
- Naprawa polega na wykorzystaniu nieuszkodzonej cząsteczki potomnej do uratowania replikacji
- Mechanizm rekombinacji homologicznej – główna funkcja

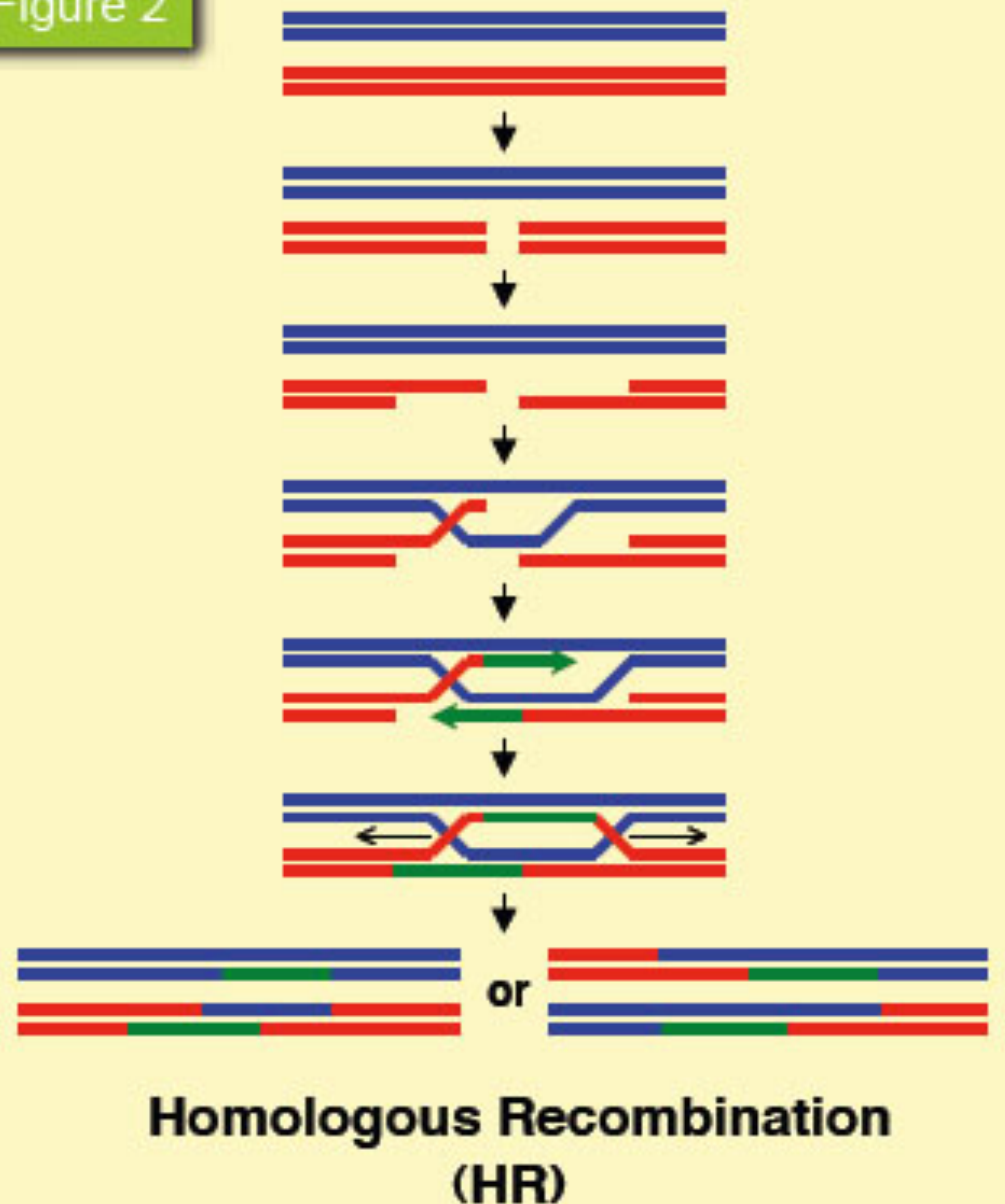
Naprawa pęknięć przez rekombinację

- Postreplikacyjna - w fazie stacjonarnej
- Replikacyjna - zapobieganie kolapsowi replikacji przy pęknięciach matrycy

Naprawa pęknięć dwuniciowych przez rekombinację

- Pęknięcia dwuniciowe często powodowane są przez promieniowanie jonizujące, UV.
- Mutanty defektywne w rekombinacji – większa wrażliwość na promieniowanie (mutanty *rad* drożdży)

Figure 2



Naprawa przez rekombinację

- Próba replikacji pękniętej nici – kolaps widełek

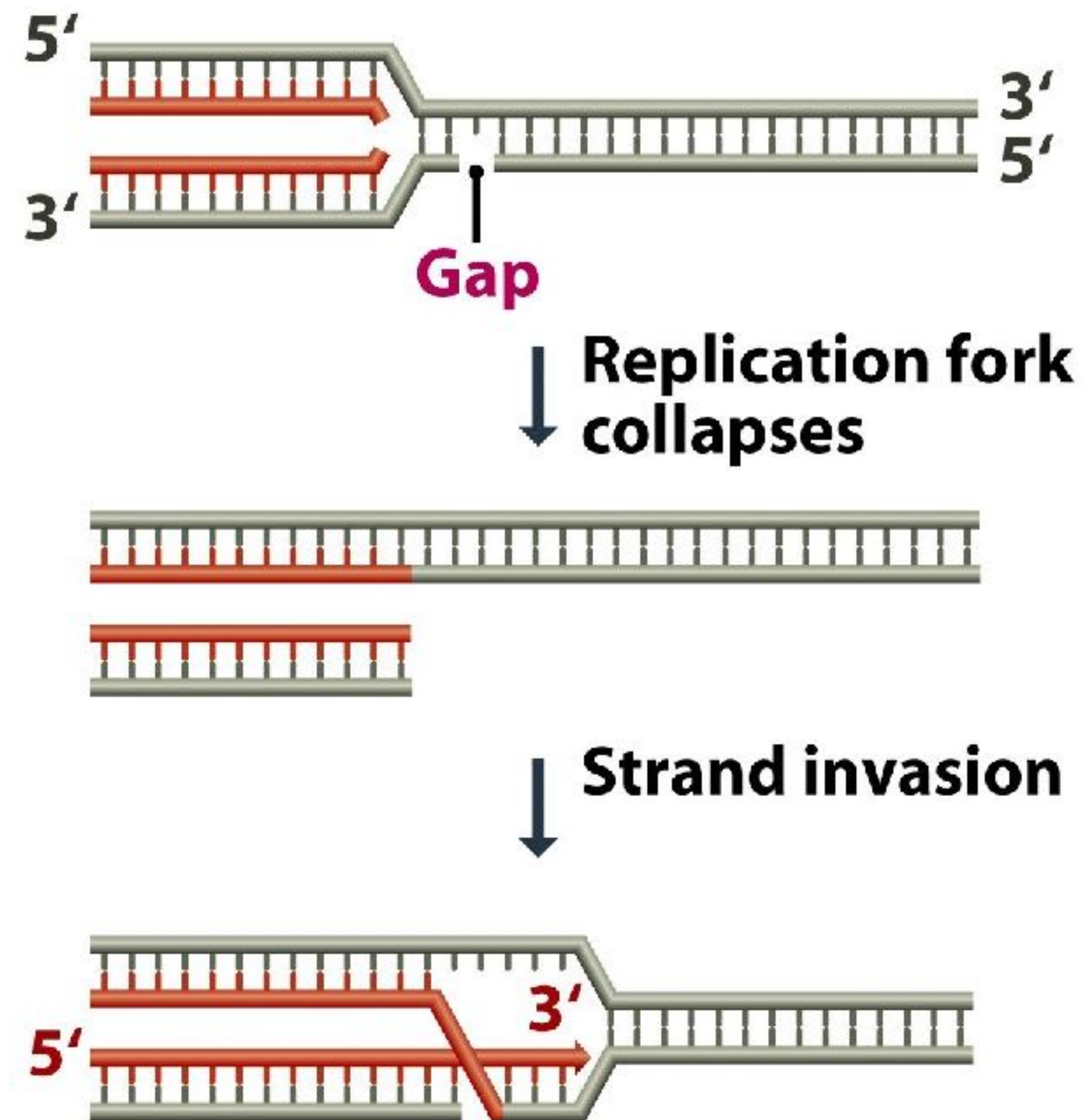


Figure 17-11 part 1 of 2 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

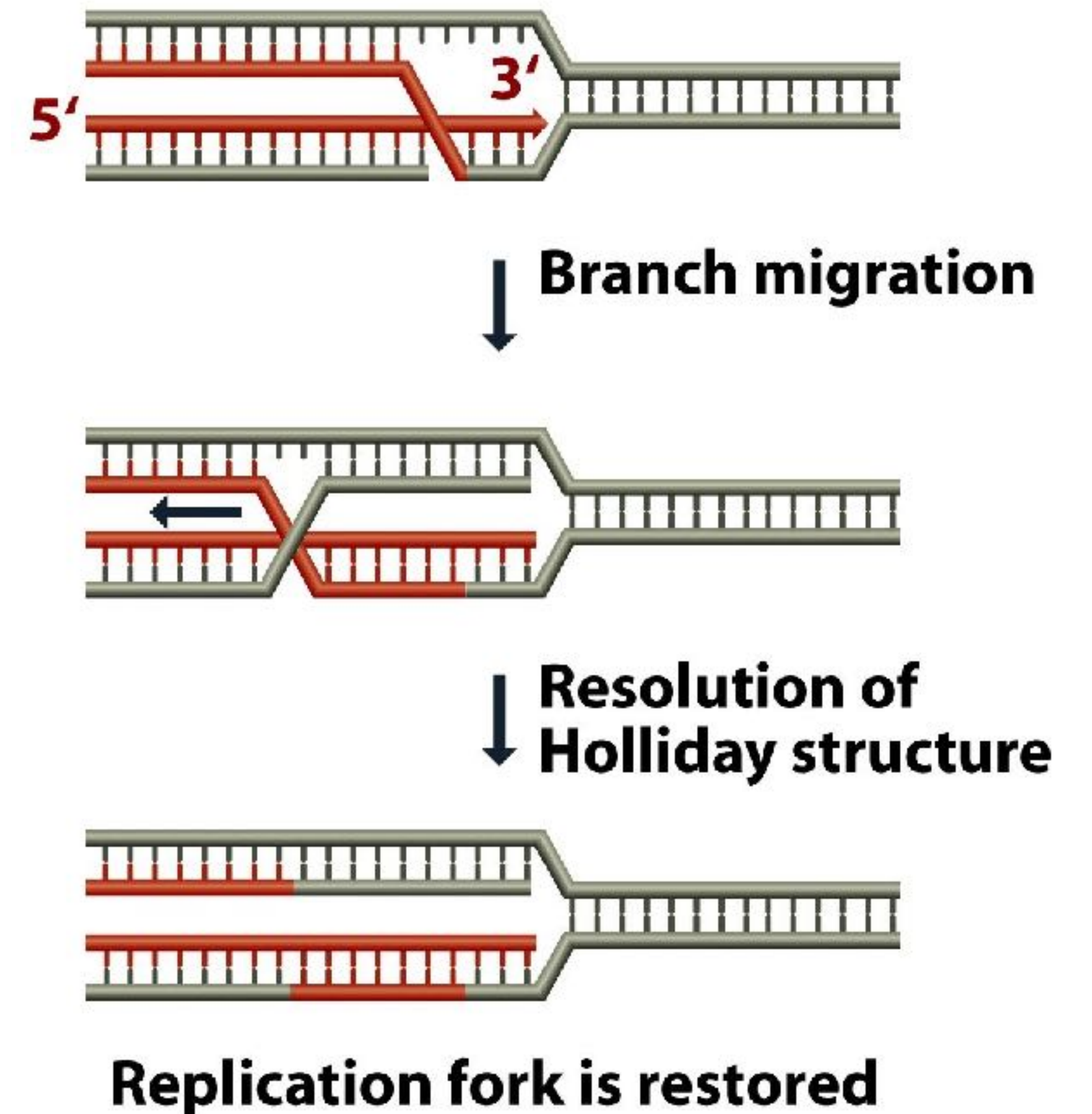


Figure 17-11 part 2 of 2 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Funkcje rekombinacji

- Naprawa pęknięć i utrzymywanie widełek replikacyjnych – najstarsza i podstawowa funkcja
- Pomaga w parowaniu chromosomów homologicznych – u Eukaryota
- Generuje różnorodność genotypów w rozmnażaniu płciowym (Eukaryota) – funkcja wtórna

Ekspresja genu

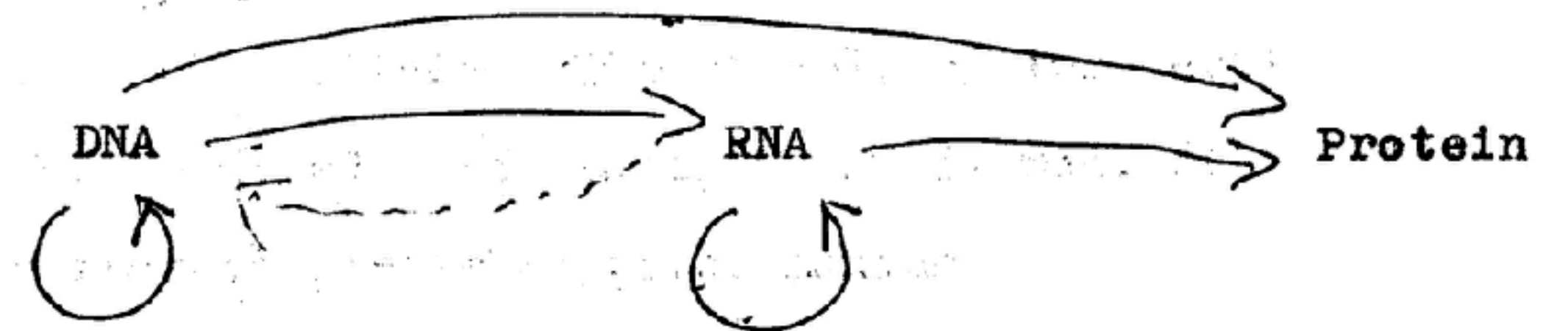
Centralna hipoteza ("dogmat")

Ideas on Protein Synthesis (Oct. 1956)

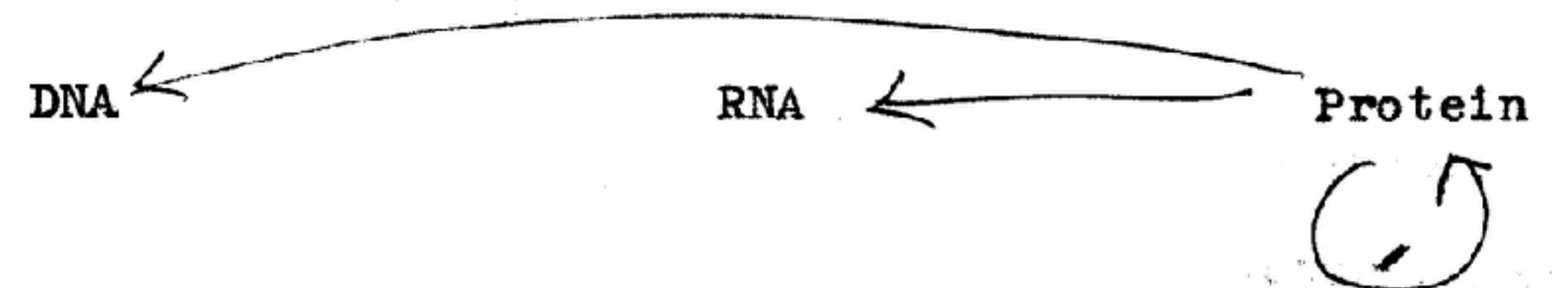
Francis Crick, 1956

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



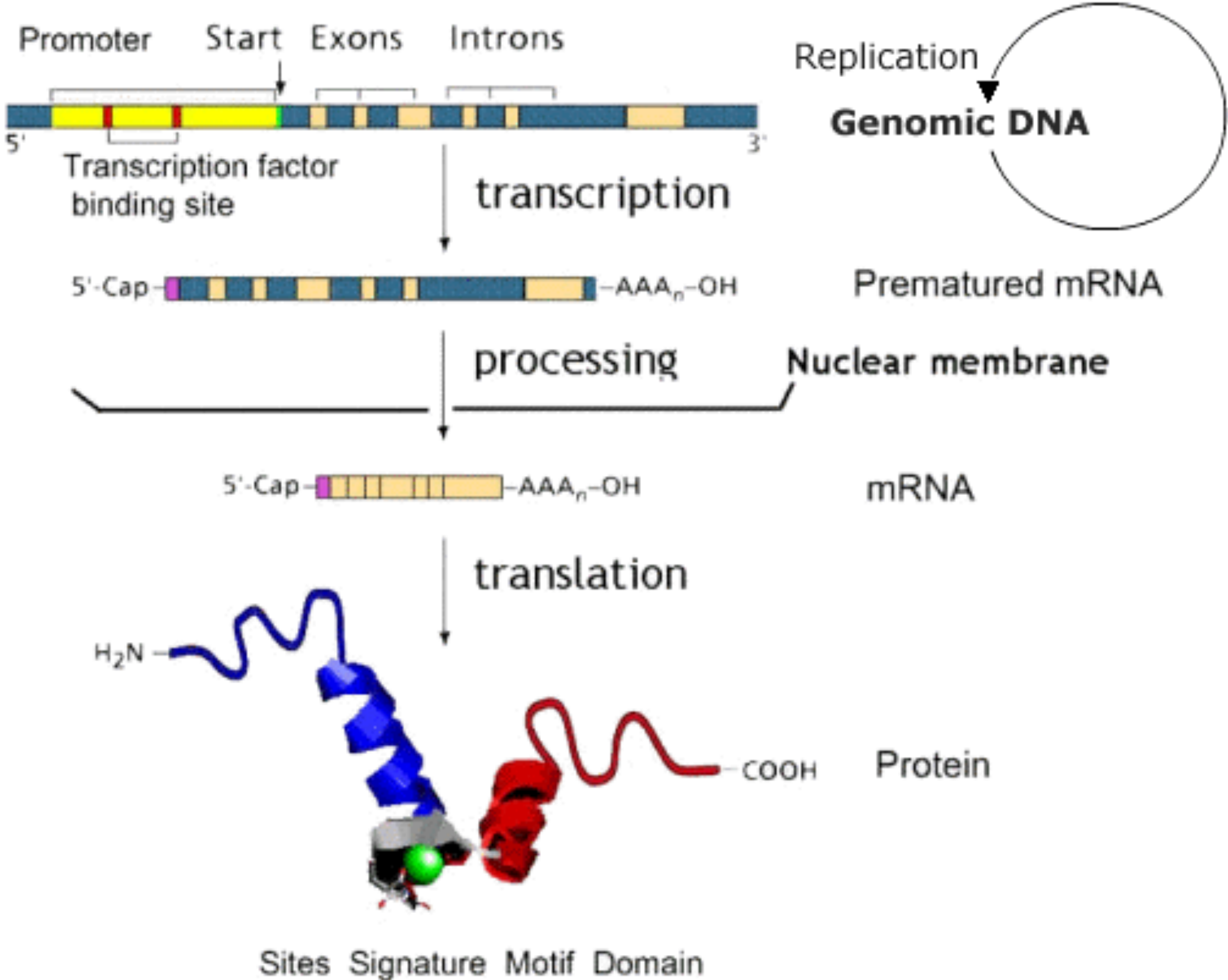
where the arrows show the transfer of information.

Centralna hipoteza („dogmat”)

DNA

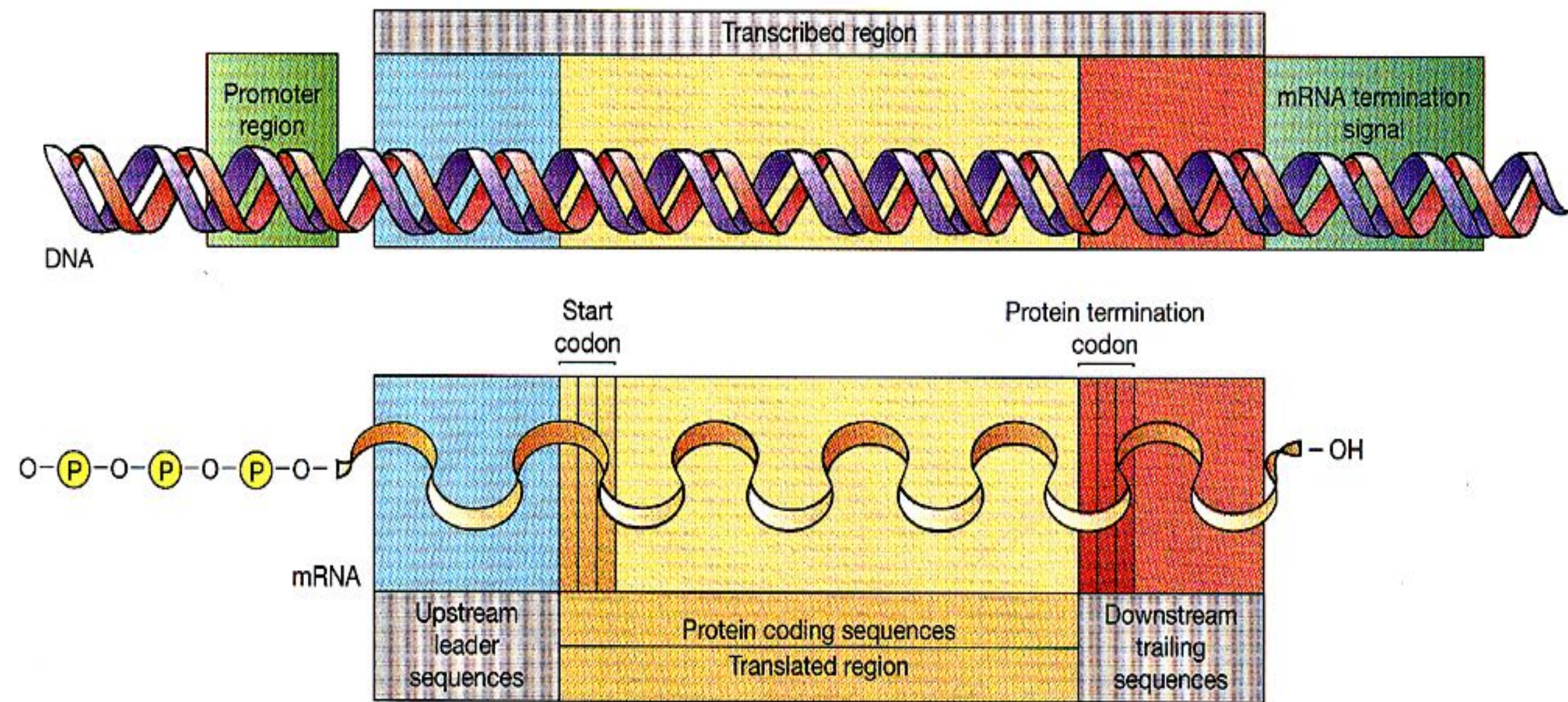
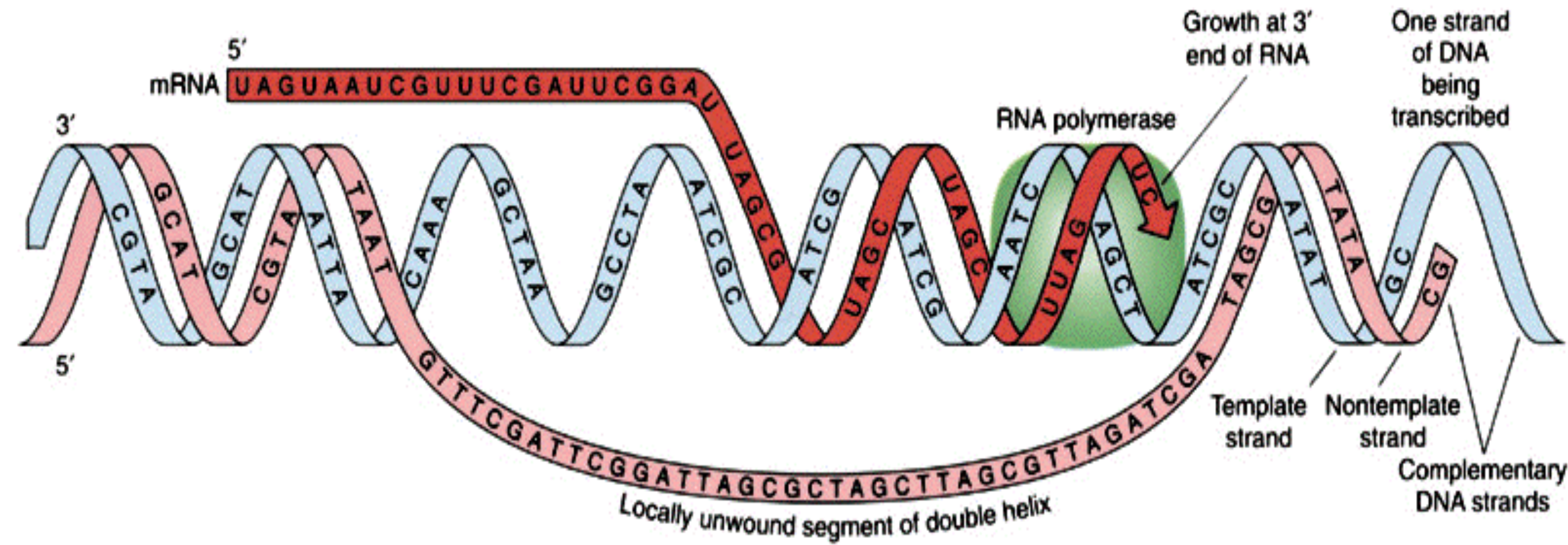
RNA

BIAŁKO



Transkrypcja

- Konkretny mechanizm różny u Prokaryota i Eukaryota
- Inicjacja w miejscu promotora, zwiążanie 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 wiąże się z DNA, u Eukaryota z DNA wiążą się ogólne czynniki transkrypcyjne, a z nimi dopiero polimeraza
- U Eukaryota kilka (3 główne) polimeraz
 - 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 szybko degradowane, translacja zachodzi zasadniczo równocześnie z transkrypcją

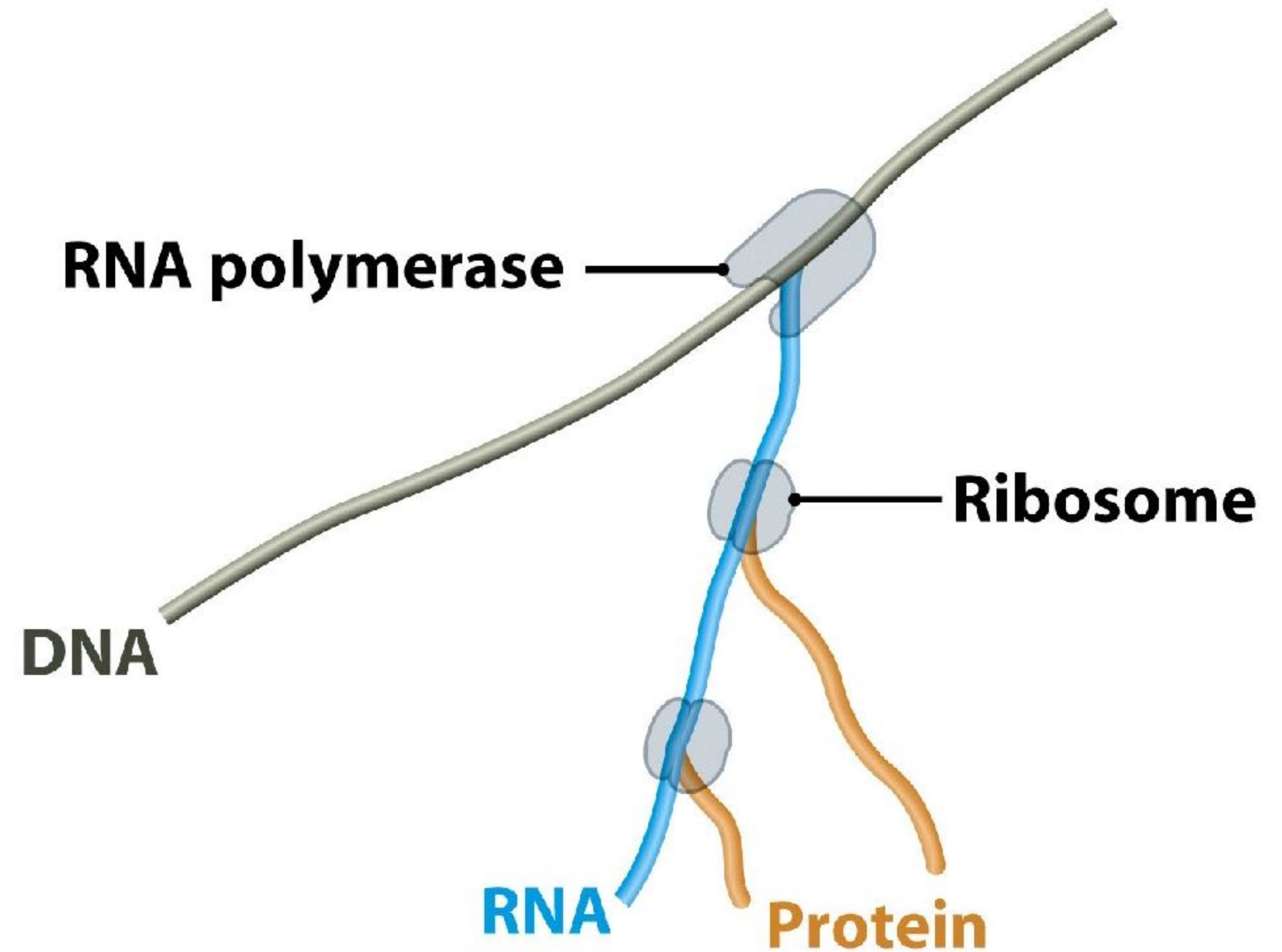


Figure 12-10 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Ekspresja genów eukariotycznych

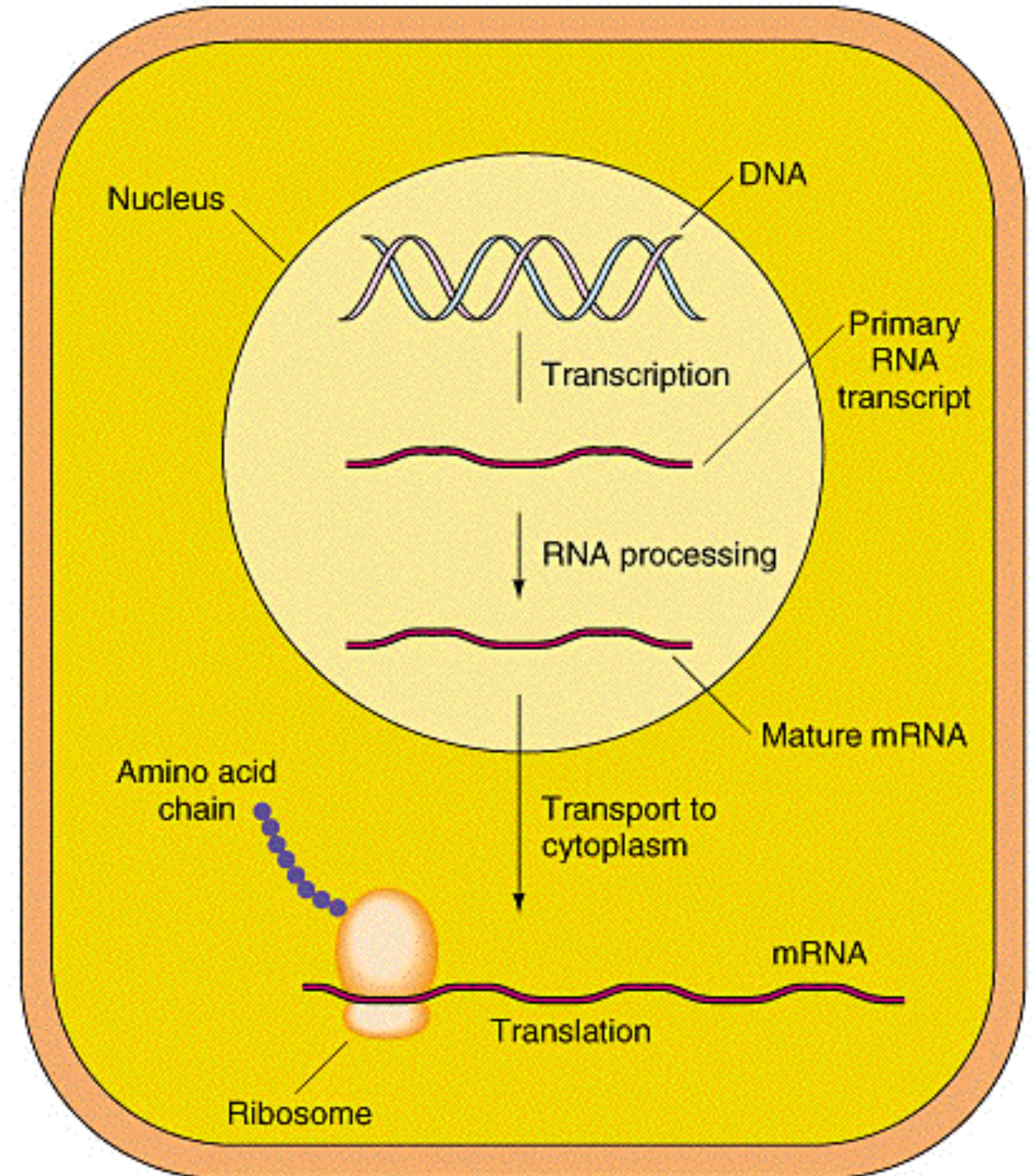
- Eukaryota
 - Procesy transkrypcji i translacji są rozdzielone w przestrzeni i czasie
 - Każdy gen ma własny promotor, nie występują operony
 - Proces ekspresji genu składa się z wielu etapów
 - Na każdym z etapów możliwe działanie regulacyjne
 - Informacja kierująca syntezą białka może być modyfikowana 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

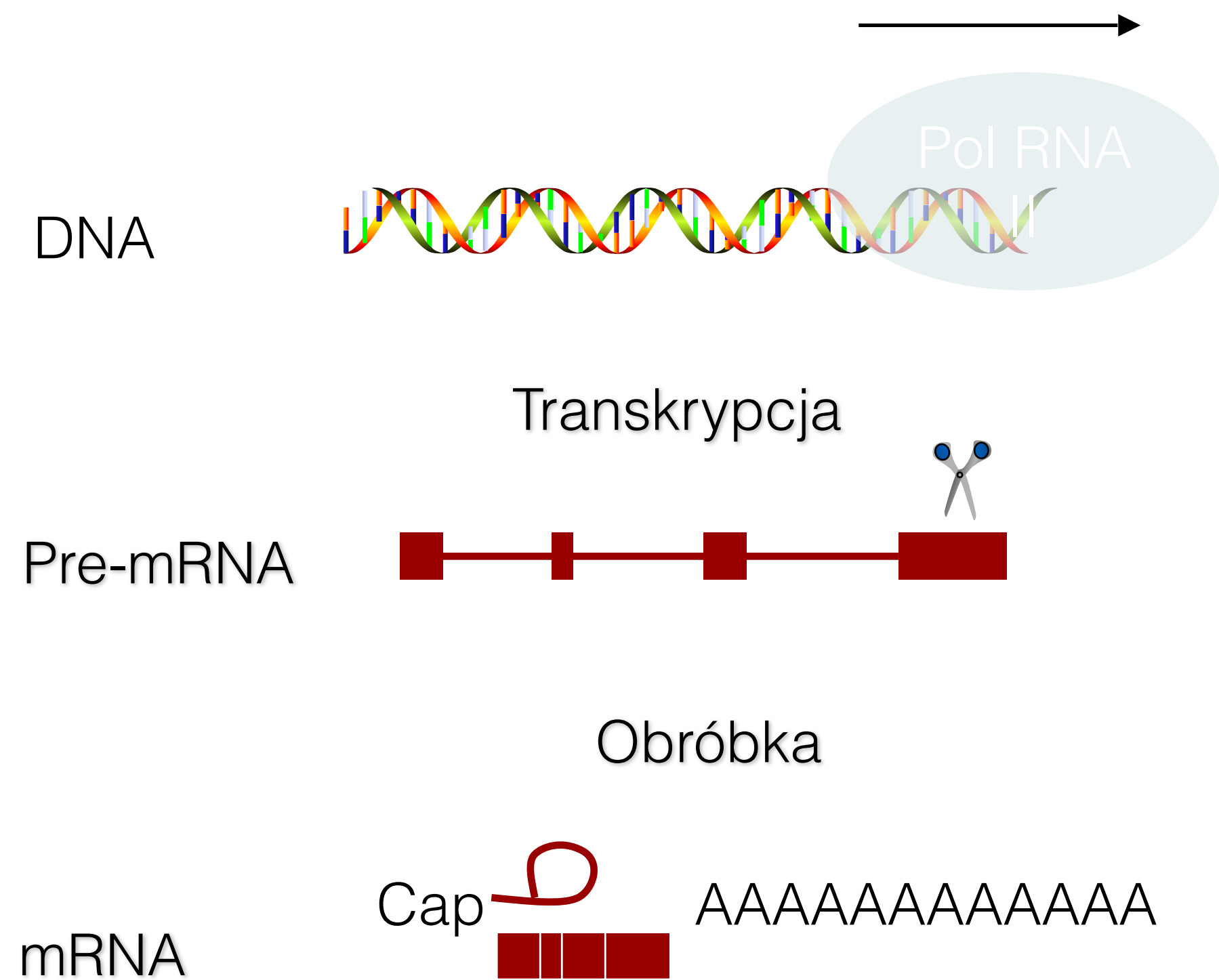
Losy mRNA w komórce eukariotycznej

- Transkrypcja
- Dodanie „czapeczki” na końcu 5’
- Składanie (splicing)
- Poliadenylacja na końcu 3’
- Transport do cytoplazmy
- Translacja
- Degradacja

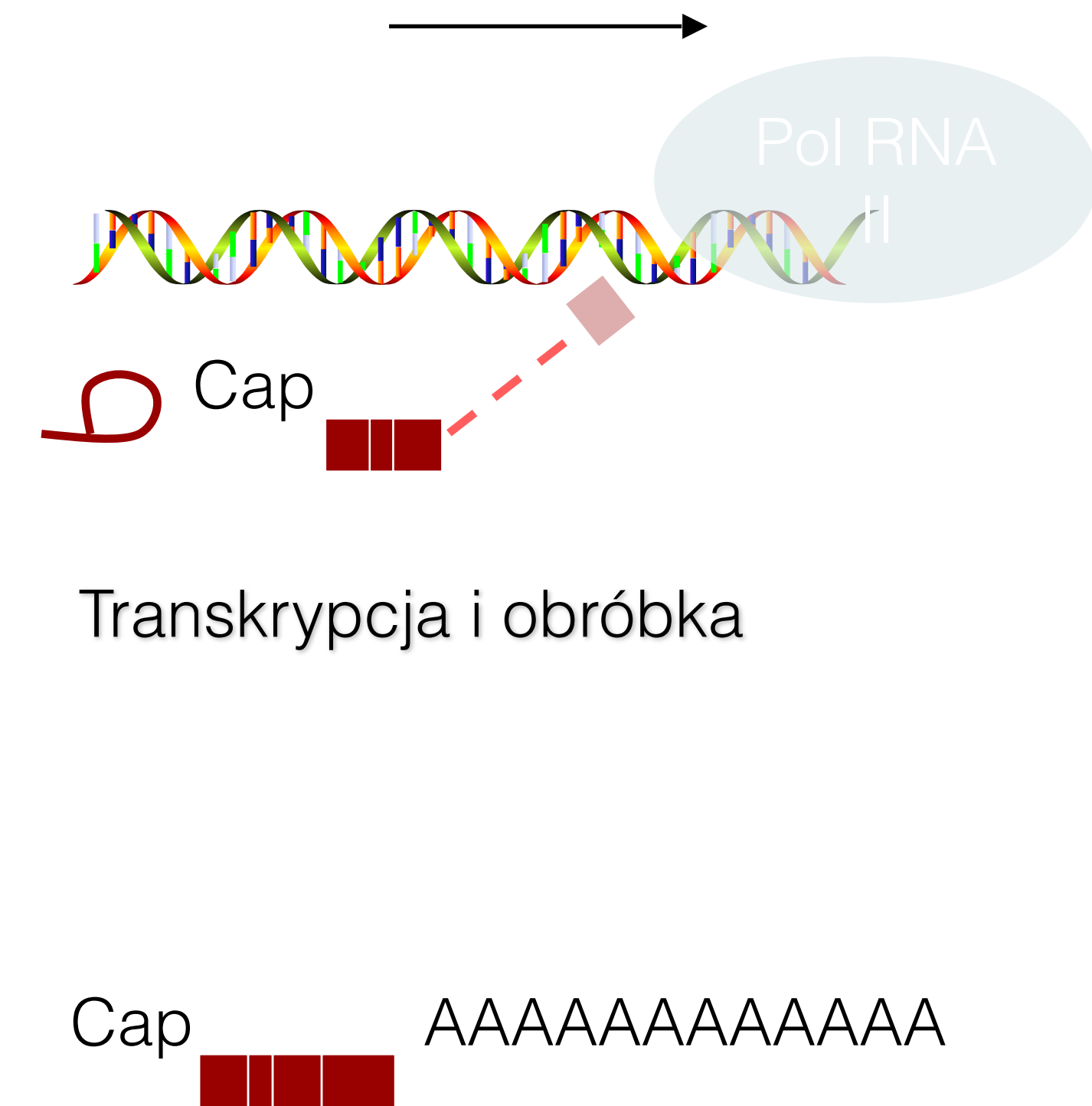


U Eukaryota transkrypcja i obróbka RNA są sprzężone

Tradycyjny obraz ekspresji genu



Współczesny obraz ekspresji genu



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

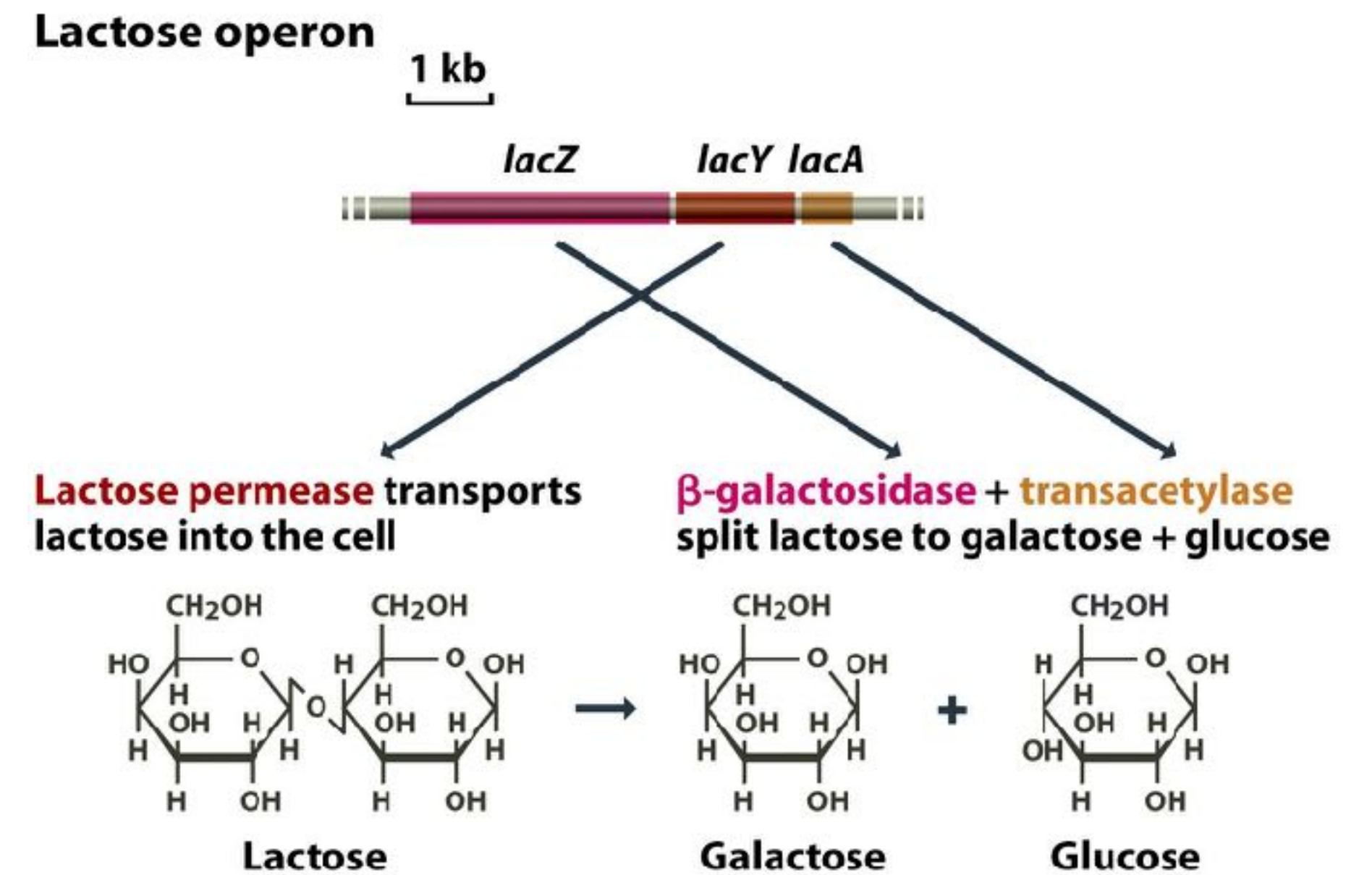
- Regulacja pozytywna
 - czynnik *trans* jest **aktywatorem** – zwiększa ekspresję
- Regulacja negatywna
 - czynnik *trans* jest **represorem** – osłabia ekspresję

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

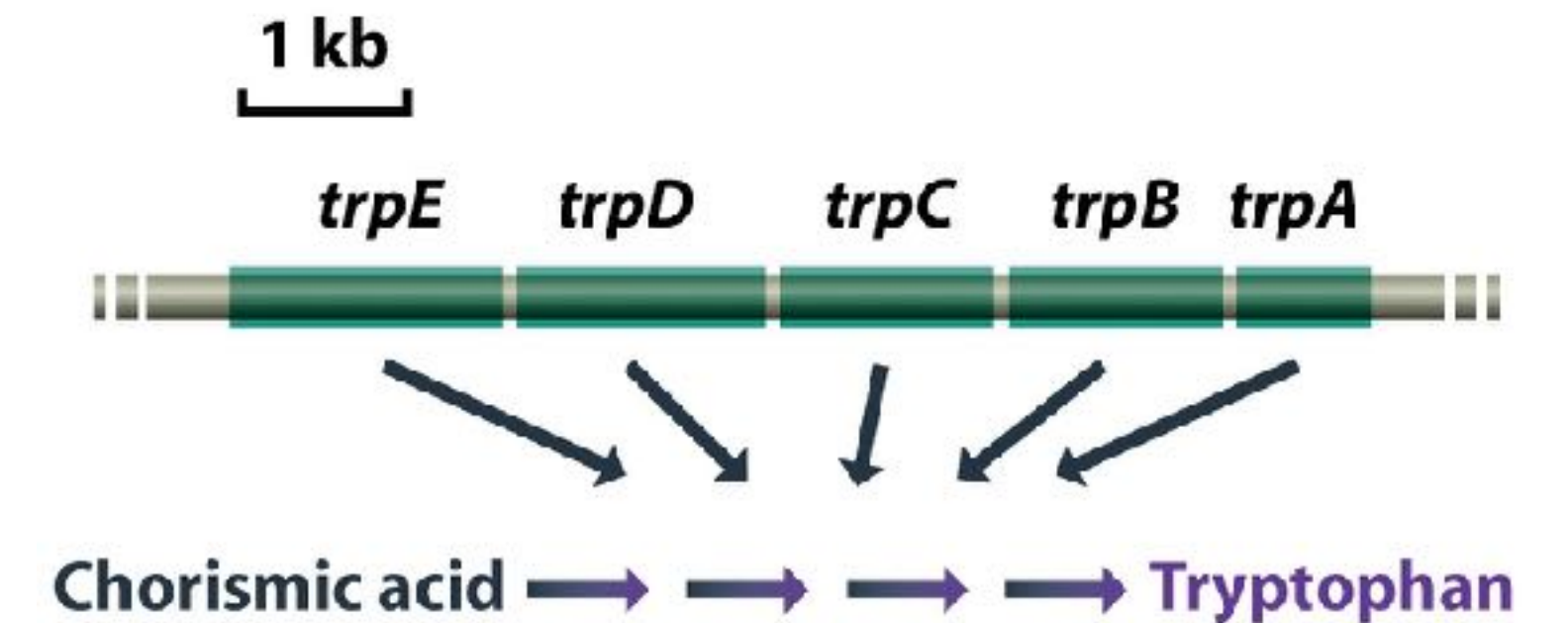
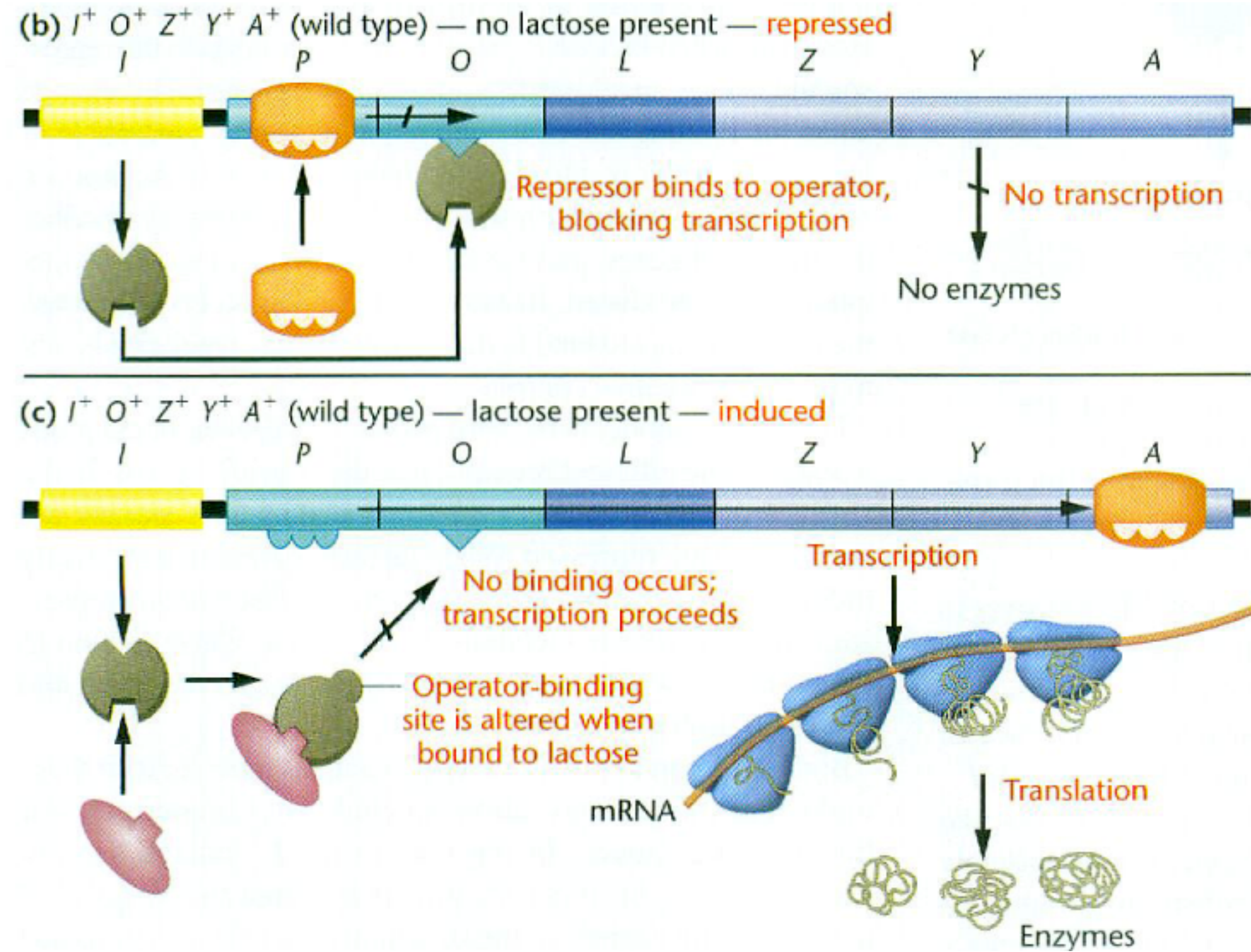


Figure 8.8 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

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 (3 kolejne insercje lub delecje przywracały funkcje)

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 ($20^2=400$).
 - 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

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

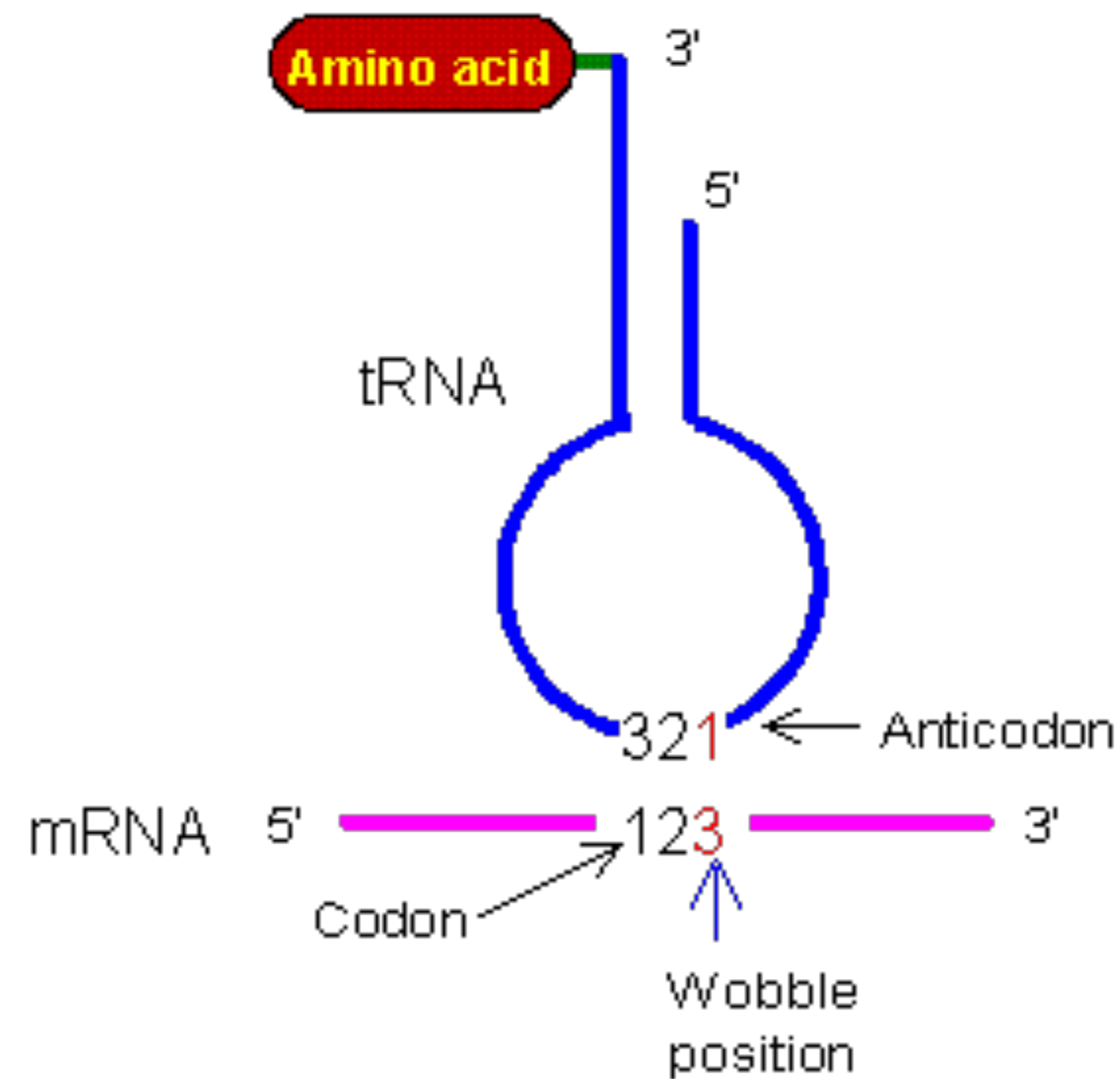
Parowanie *wobble*

- W 3 pozycji kodonu (1 antykodonu) dozwolone parowanie:

- G-U

- I-U/A/A (I – inozyna)

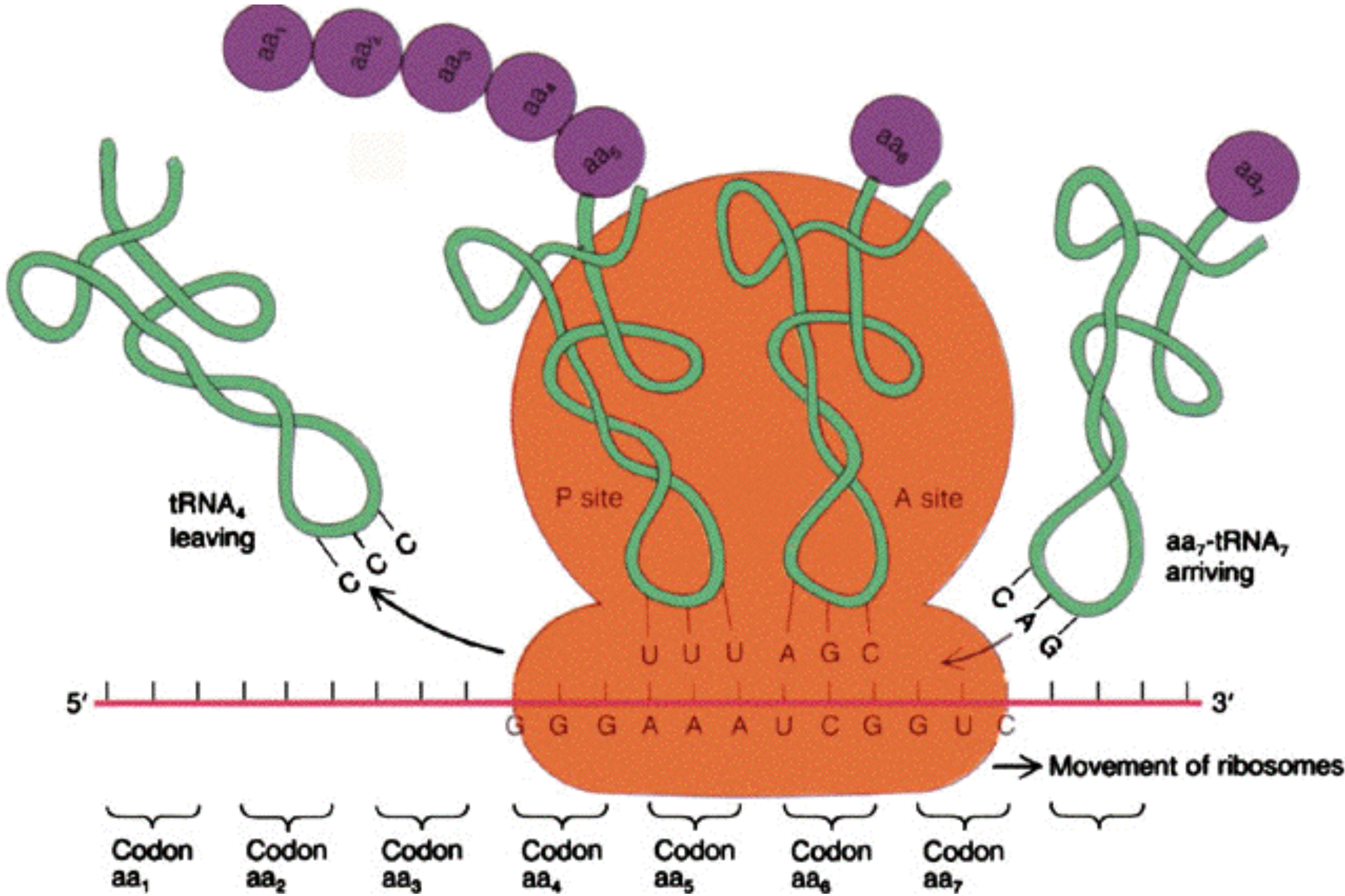
- Tzw. zasada tolerancji Cricka



	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

Translacja



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

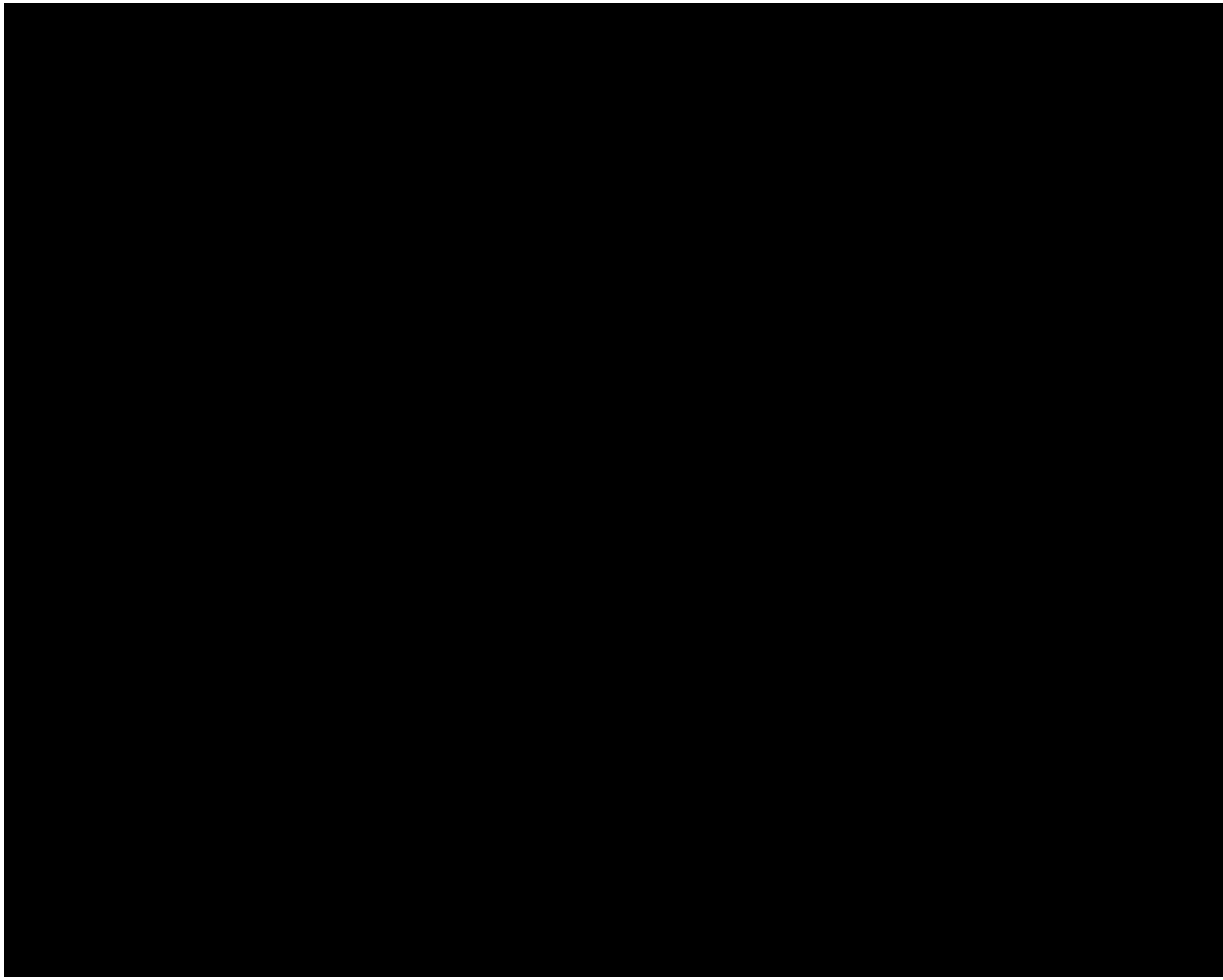
Ada E. Yonath

🕒 1/3 of the prize

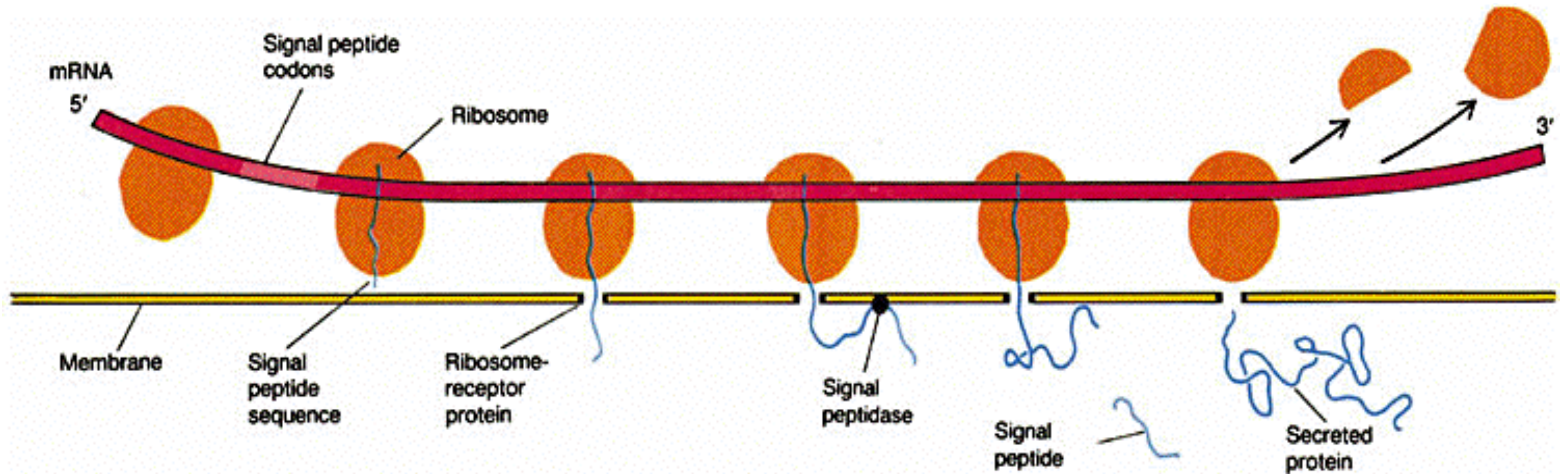
Israel

Weizmann Institute of Science
Rehovot, Israel





Sekwencja białka zawiera sygnały sortowania do przedziałów komórki



Kierowanie do ER i szlaku wydzielniczego zachodzi równocześnie z translacją
Kierowanie do mitochondrium zachodzi po translacji

Białka podlegają złożonym modyfikacjom

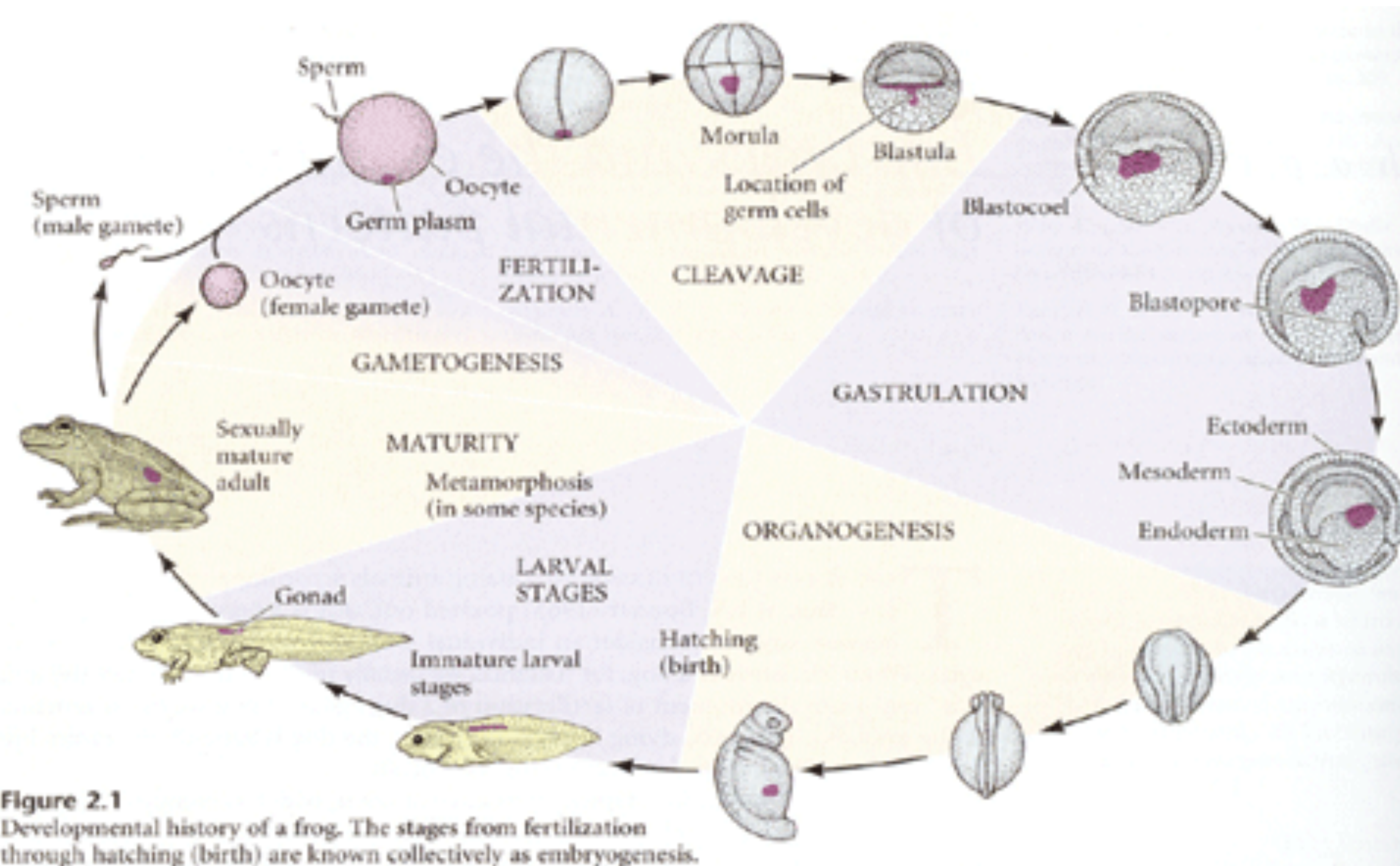
- Fałdowanie – wspomagane przez białka opiekuńcze
 - Białka opiekuńcze odgrywają ważną rolę w patogenezie wielu chorób (nowotwory, choroba Huntingtona i inne choroby agregacyjne, choroba Parkinsona i Alzheimerera, mukowiscydoza)
- Modyfikacje chemiczne (fosforylacja, glikozylacja itp.)
- Ubikwitynacja i degradacja
 - Zaburzenia w ubikwitynacji i degradacji białek stwierdzono w rodzinnej postaci choroby Parkinsona, zespole Angelmana, anemiach Fanconiego, zespole von Hippel-Landau i innych

Przełączniki genetyczne

Genetyczne podstawy rozwoju i różnicowania

Ekspresja genów a rozwój

- Zmiany ekspresji genu odpowiadają na czynniki środowiskowe i wewnętrzne
- Utrzymanie homeostazy
- Adaptacja do środowiska
- Rozwój i różnicowanie – tworzenie złożonych struktur przez lokalne interakcje

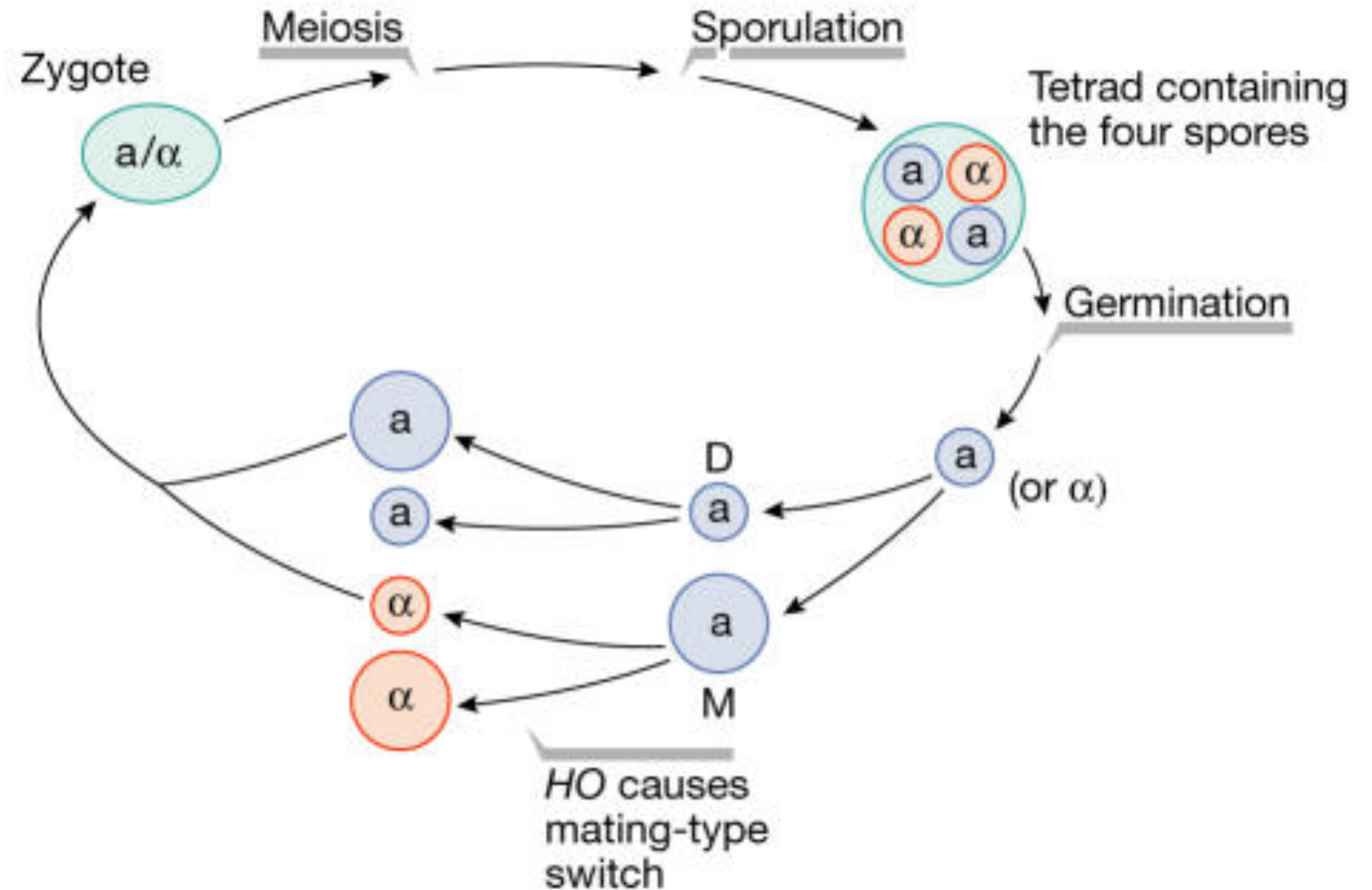


Przełączniki genetyczne

- Zmiana informacji genetycznej
 - Rearanżacje DNA: nieodwracalne lub odwracalne
- Epigenetyczne
 - Zmiany wzoru ekspresji, utrzymujące się po podziale komórki - np. piętno genomowe, regulatorowe RNA
- Regulacja ekspresji genu
 - Kaskady i sieci regulacyjne oparte na kontroli ekspresji
 - Transdukcja sygnału – integracja informacji ze środowiska

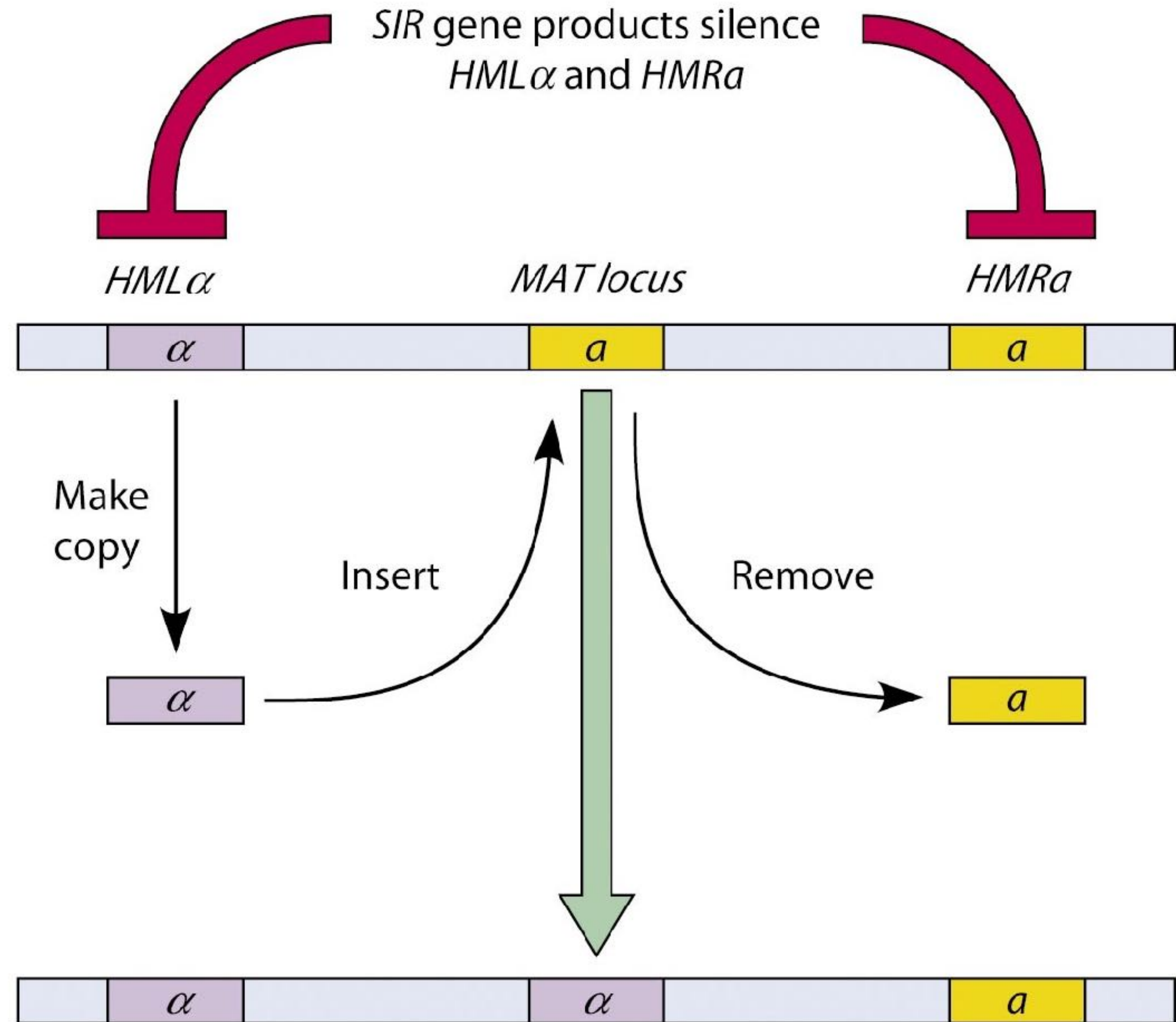
Odwracalna rearanżacja DNA

- System *MAT* u *S. cerevisiae*
- Dwa typy płciowe: a i α
- Po podziale (pączkowaniu) komórka może zmienić typ płciowy (tylko komórka-matka)

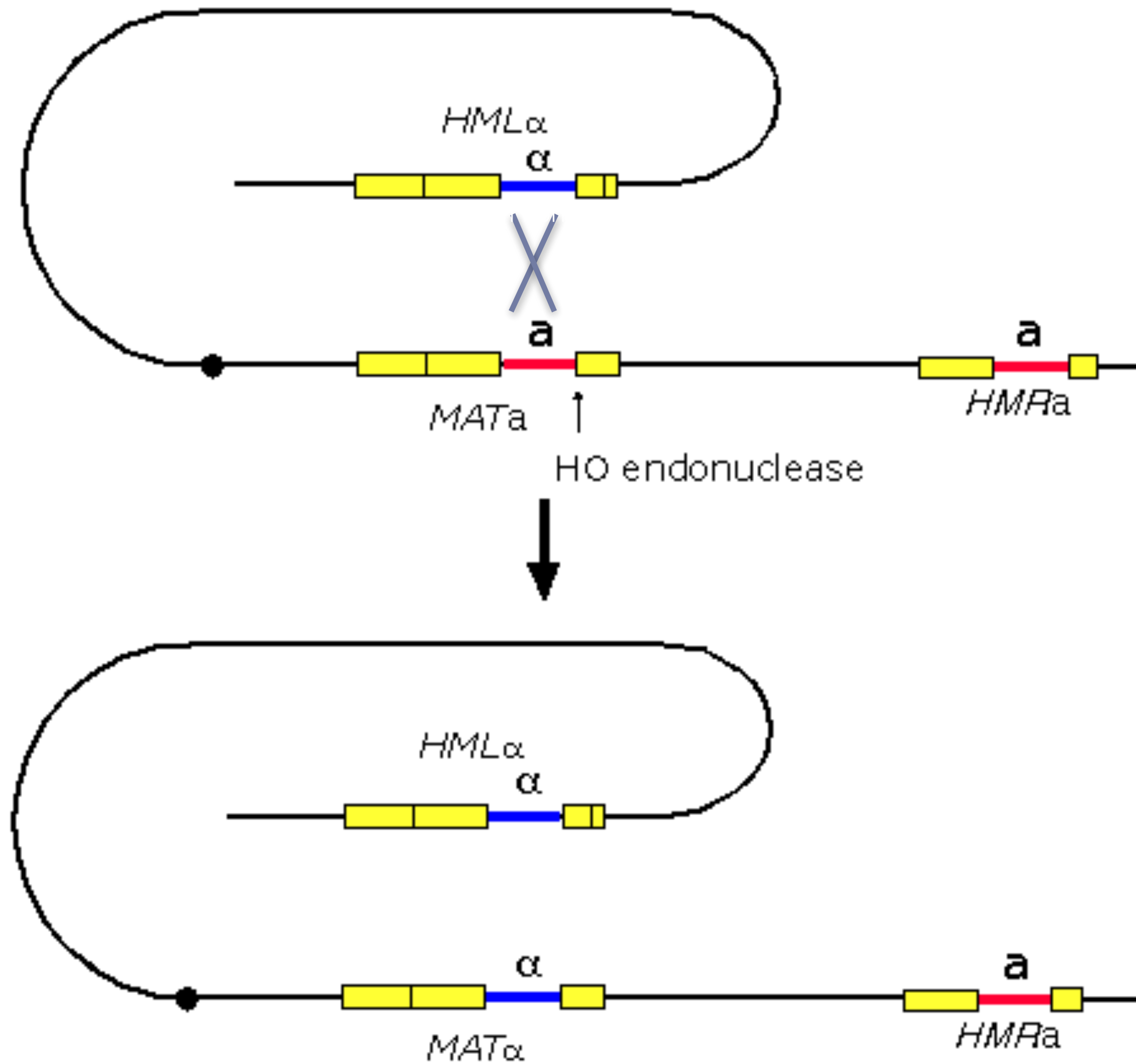


Przełączanie typu płciowego drożdży

- Na chr. III oprócz aktywnego locus *MAT* dwie wyciszone kasety *HML α* i *HMR a*
- Przełączenie typu: mechanizm konwersji genu przez rekombinację
- Inicjowany przez nacięcie DNA endonukleazą HO

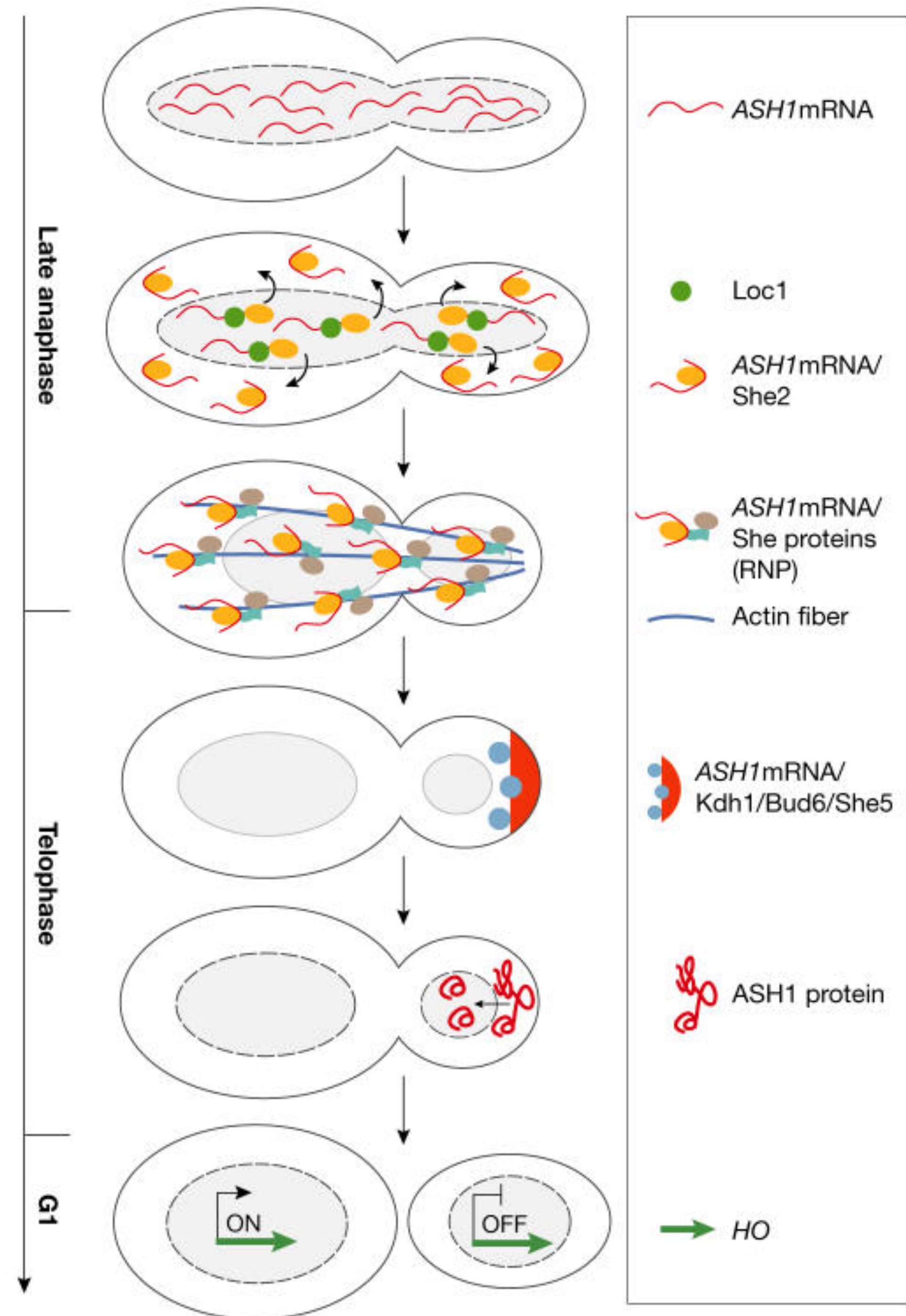


Konwersja kasety MAT - rekombinacja



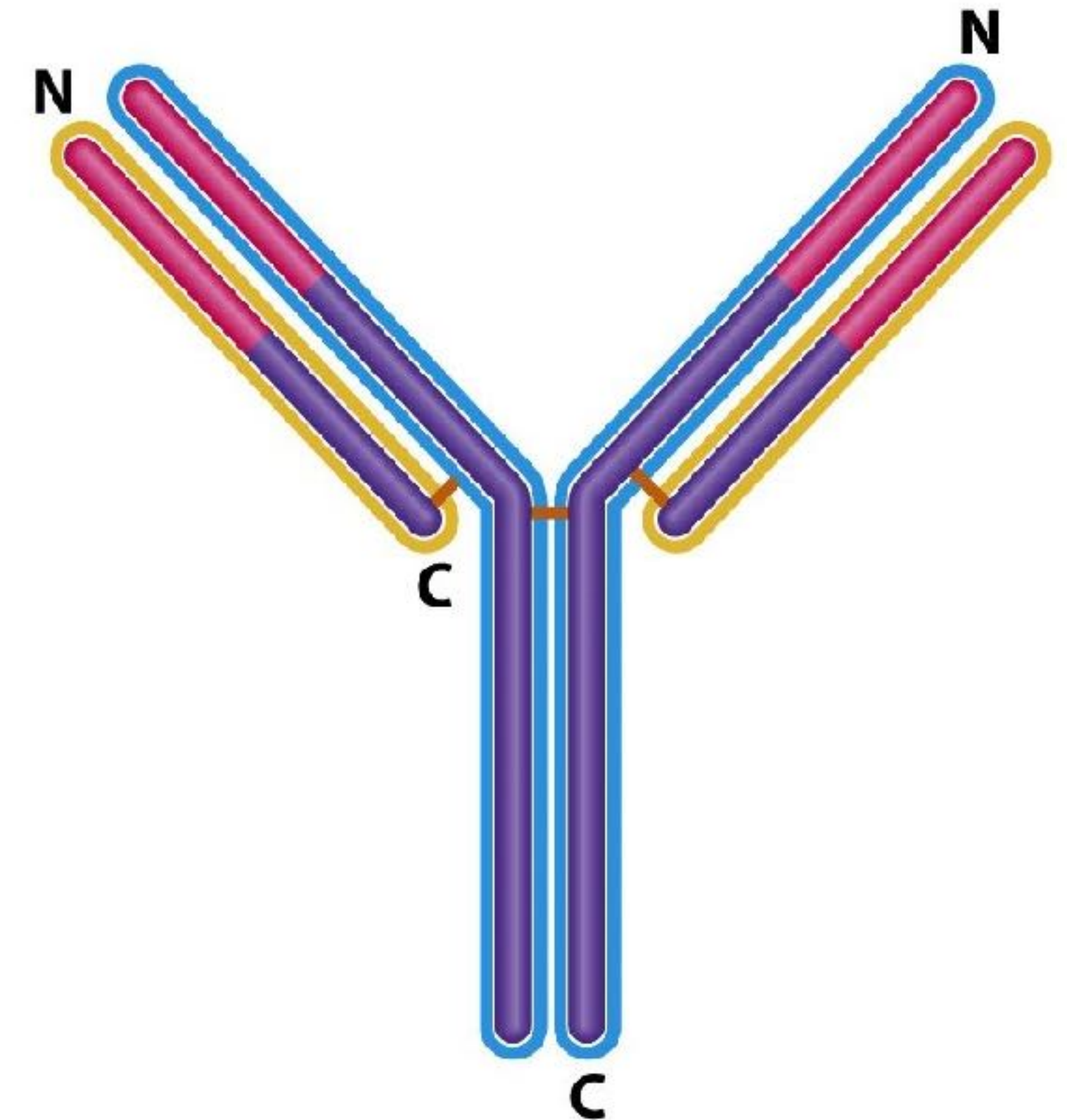
Dlaczego przełączenie zachodzi tylko w komórce-matce?

- Endonukleaza HO aktywna tylko w komórce-matce
- W pączku wyciszona przez białko Ash1
- mRNA *ASH1* transportowany do pączka podczas podziału



Nieodwracalna rerańżacja DNA

- Generowanie różnorodności przeciwciał i receptorów limfocytowych
- Obszary zmienne łańcuchów przeciwciał determinują swoistość wobec antygeny
- Różne limfocyty wyrażają różne przeciwciała/receptory
- Populacje swoiste wobec odpowiednich antygenów podlegają selekcji



KEY

- | | |
|-----------------|-------------|
| Variable region | Heavy chain |
| Constant region | Light chain |
| Disulfide bond | |

Figure 14-17 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Generowanie różnorodności przeciwciał i receptorów limfocytowych

- Geny przeciwciał występują w postaci segmentów:
 - Obszar zmienny: segmenty V, D (tylko w łańcuchu H) i J
 - determinuje swoistość wobec antygeny
 - Obszar stały: segmenty C
 - determinuje klasę immunoglobuliny
- Podczas rozwoju prekursorów limfocytów dochodzi do rearanżacji segmentów w różnych kombinacjach

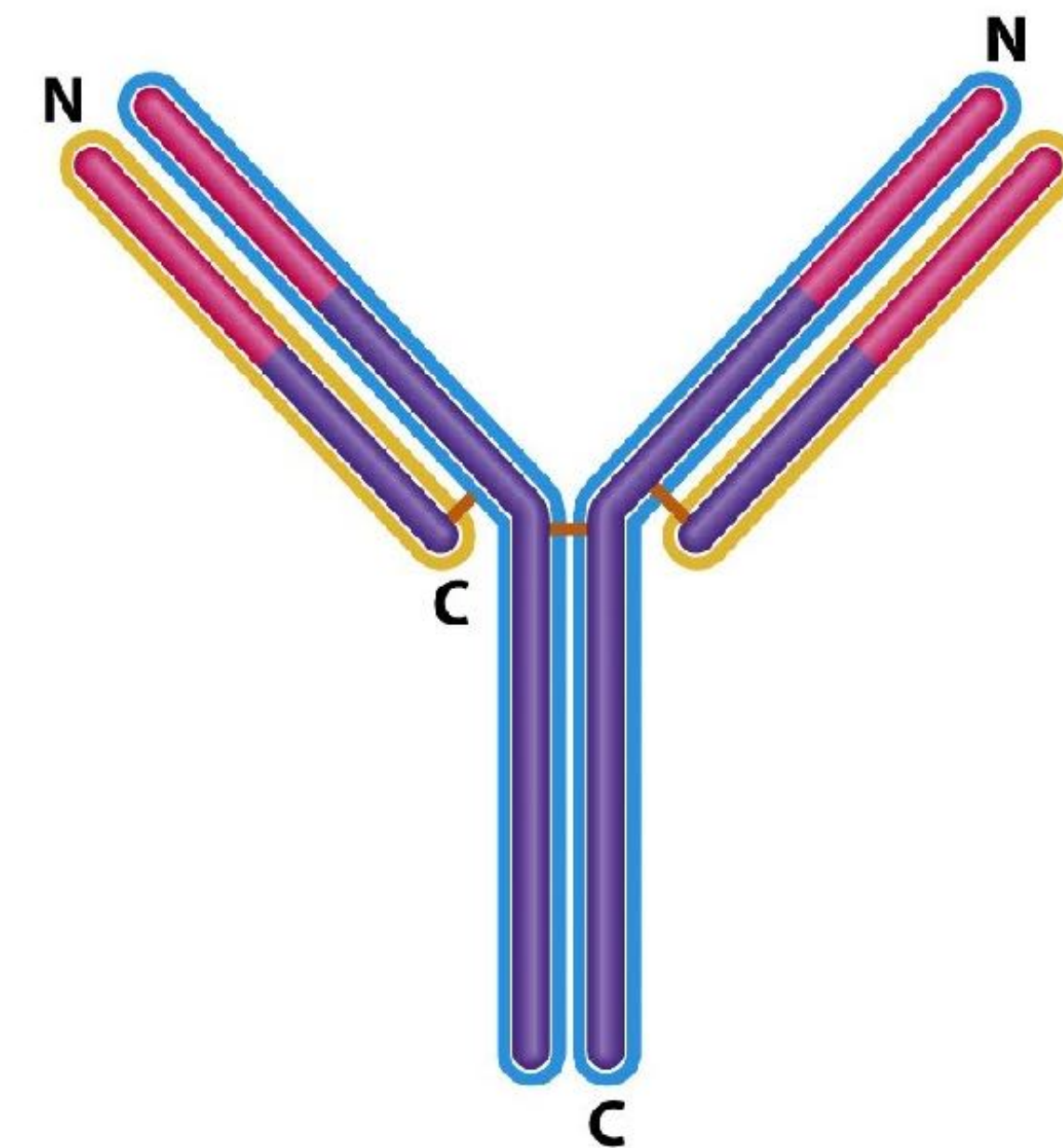


Figure 14-17 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

	V	D	J	C
Łańcuch H	120-13	27	9	11
Łańcuch L	70	-	7-11	7-11

Rearranżacja V-D-J i synteza IgM i IgD

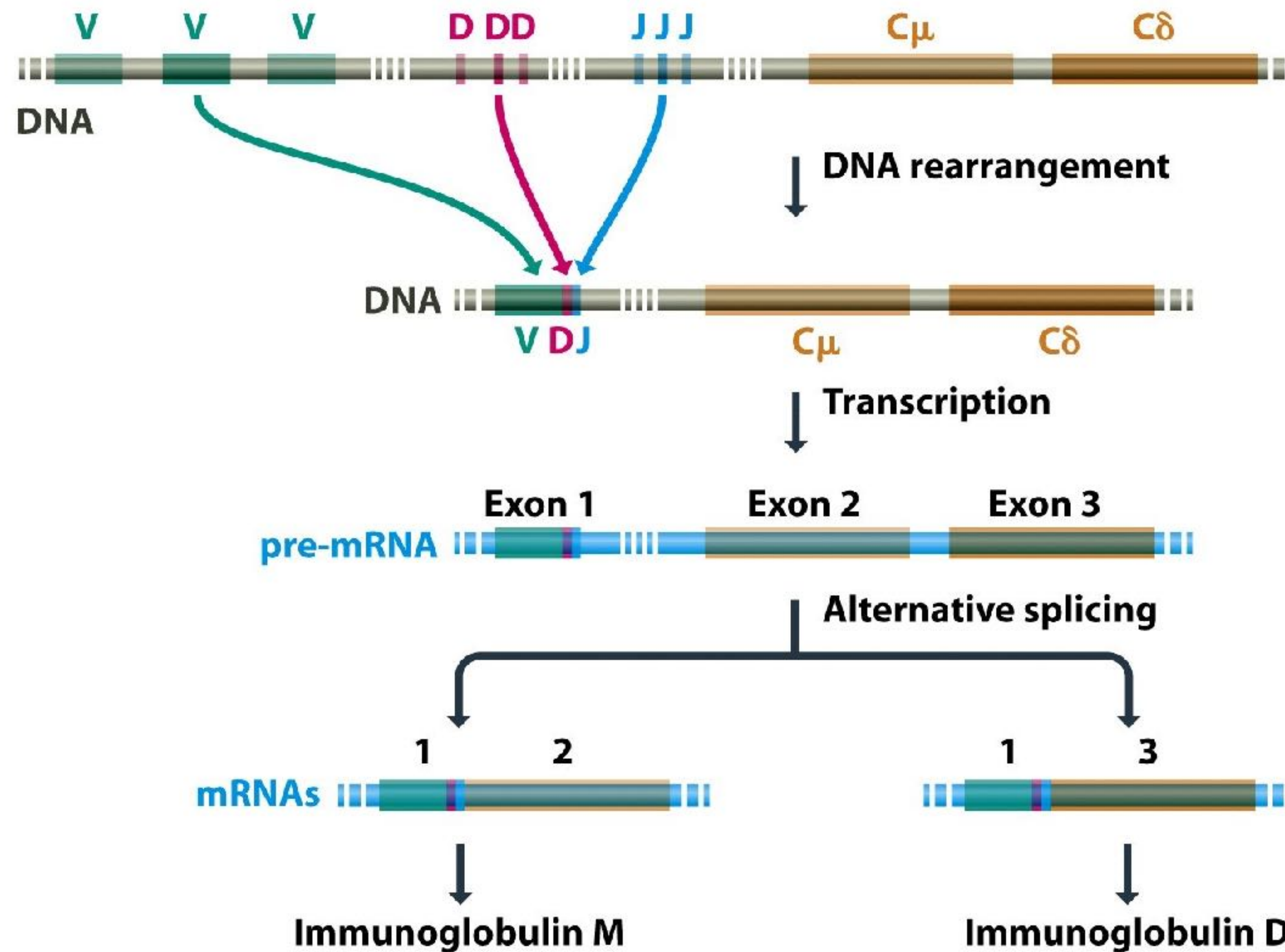


Figure 14-19 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Dalsze przełączanie klas

- Zmiana z IgM/IgD na inne klasy – delecja segmentów C i wykorzystanie kolejnych
- Indukowane przez aktywność transkrypcyjną
- np. dla IgG:

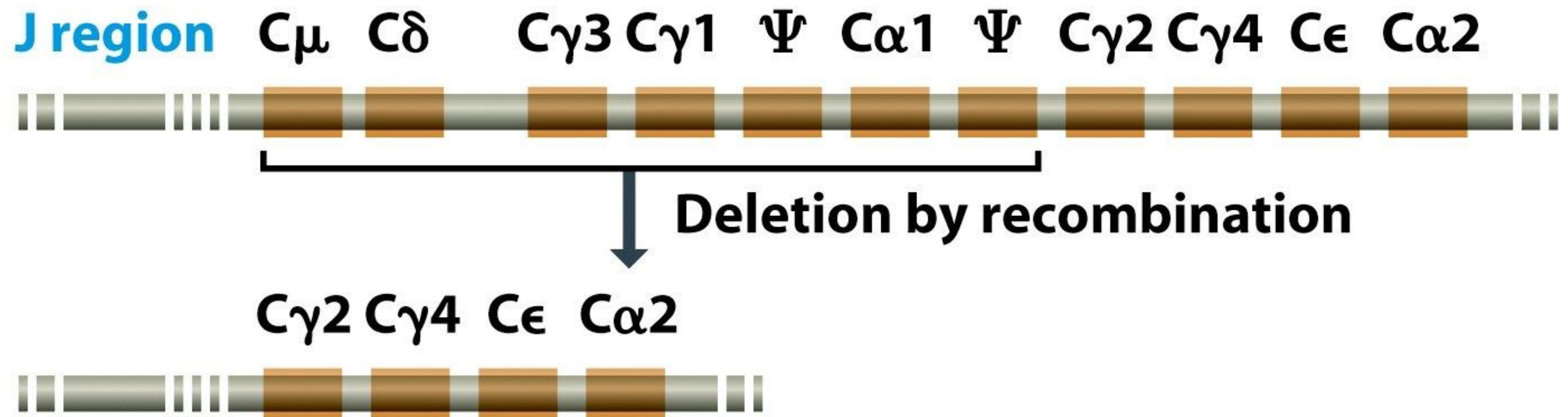
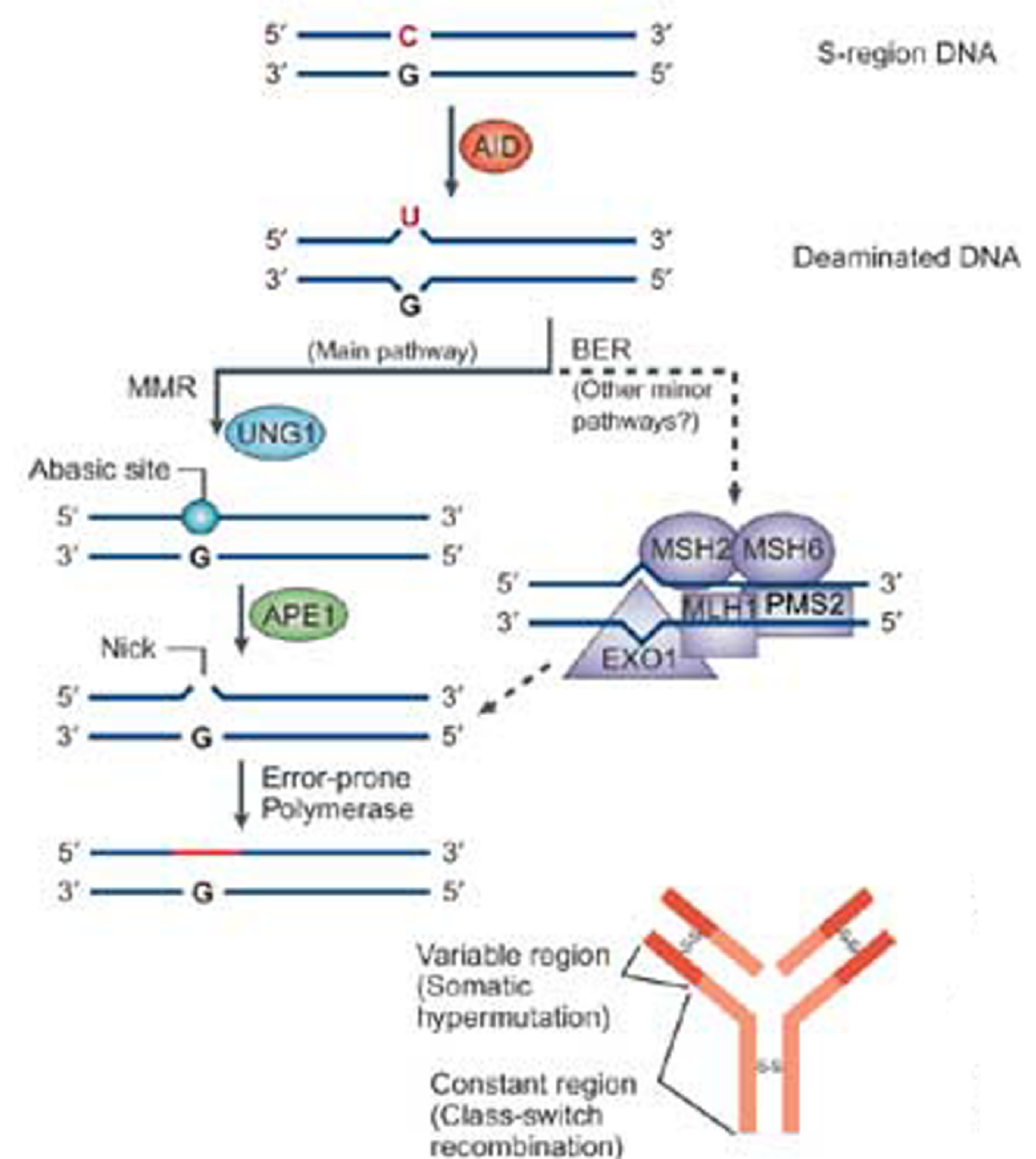


Figure 14-20 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Inne mechanizmy zwiększania różnorodności przeciwciał

- Forma błonowa i wydzielana IgM – alternatywne miejsce poliadenylacji
- Hipermutacja somatyczna
 - Po zaindukowaniu proliferacji limfocytów B przez antygen dochodzi do bardzo znacznego (105-106 razy) zwiększenia częstości mutacji w obszarach hiperzmiennych (determinujących rozpoznawanie antygeny)
 - Deaminacja cytozyn (C->U) i naprawa z wykorzystaniem glikozydazy i polimeraz DNA o niskiej wierności (error-prone)
 - Proces indukowany przez transkrypcję

a Somatic hypermutation

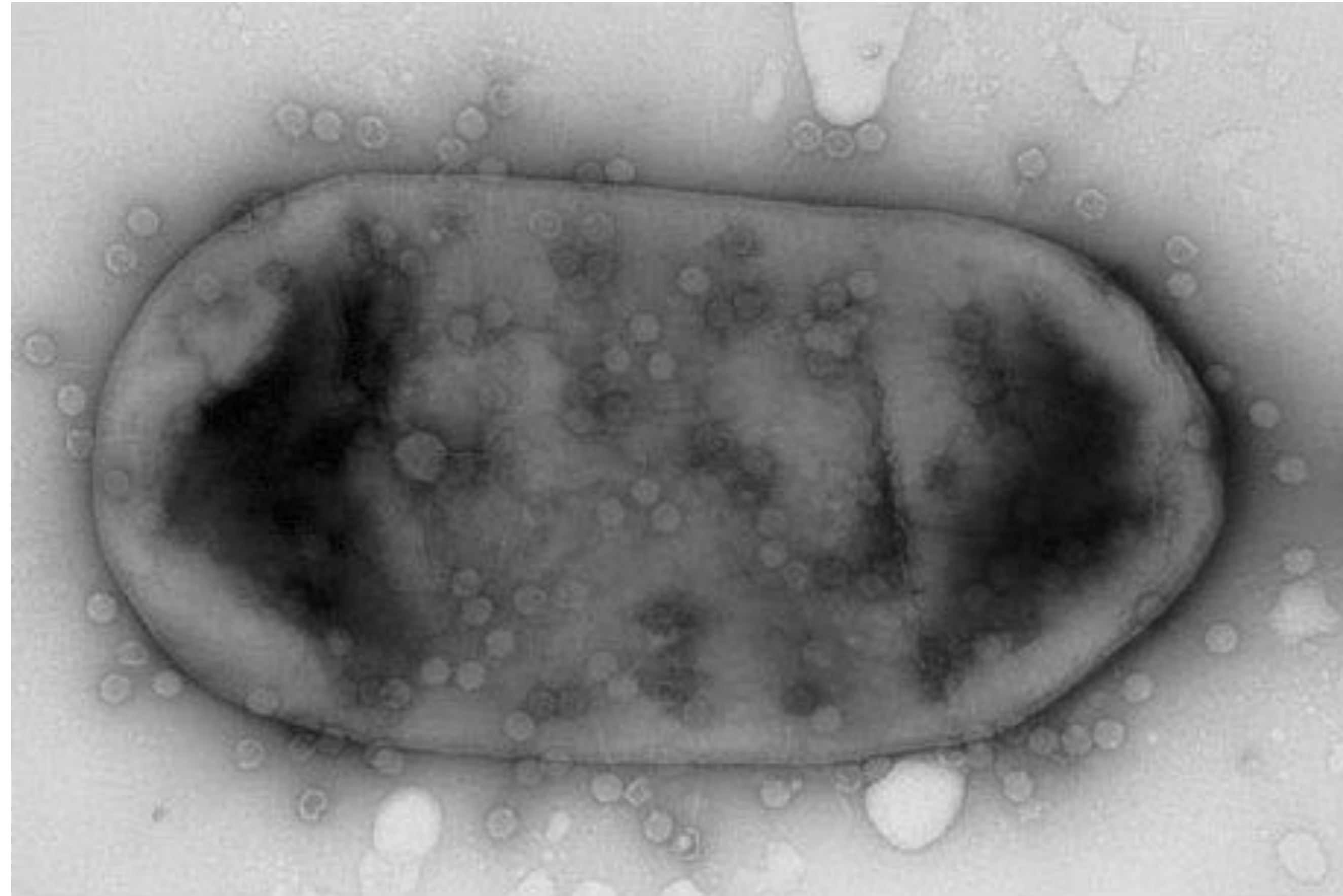


Przełączniki oparte na regulacji ekspresji

- Nie dochodzi do zmiany sekwencji DNA
 - Teoretycznie odwracalne, ale mogą być bardzo stabilne
 - Mechanizmy transkrypcyjne lub inne (np. alternatywne składanie)
- Proste układy:
 - Pętle sprzężenia zwrotnego
 - Przełączniki dwustanowe
- Bardziej złożone układy
 - Oscylatory i zegary
 - Integracja sygnałów z otoczenia: gradienty morfogenów i efekty lokalne
- Sieci

Prosty przełącznik dwustanowy: fag λ

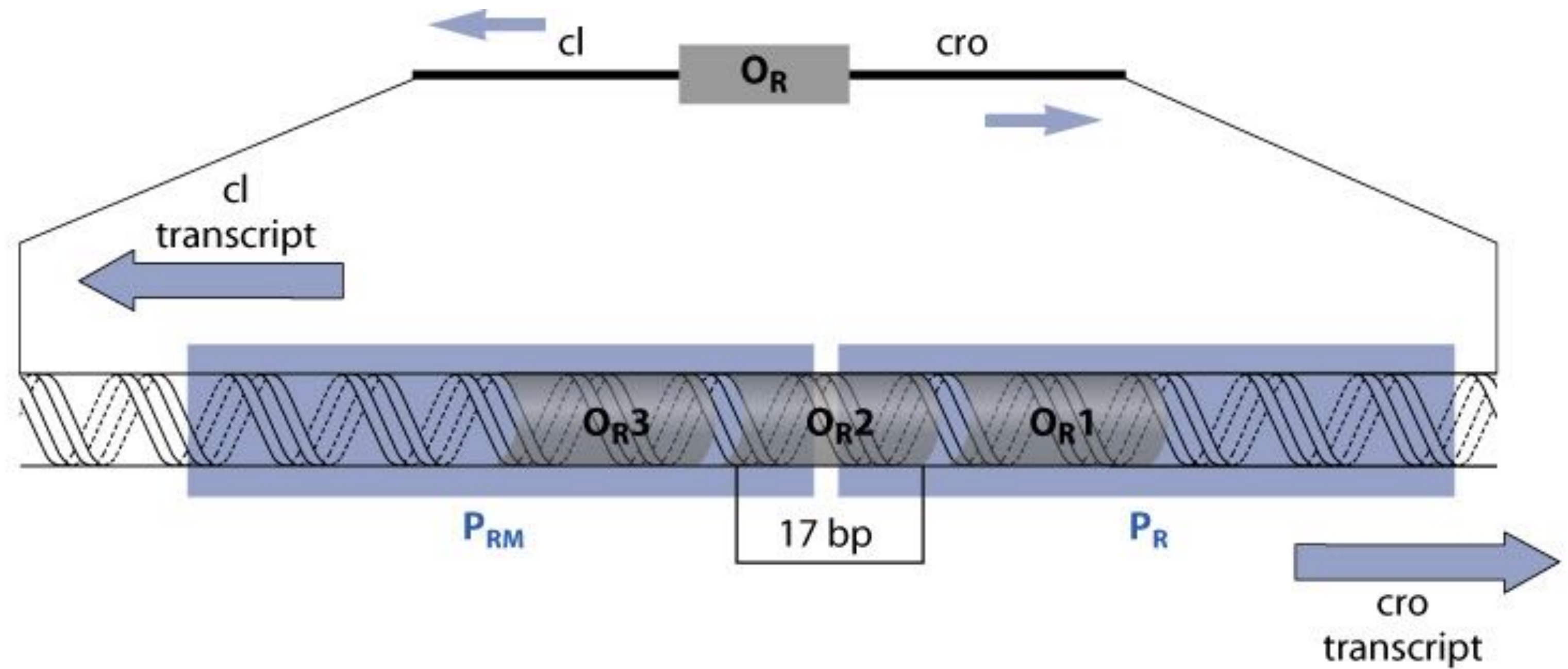
- Cykl lizogenny
 - Integracja do genomu
 - Wyciszenie ekspresji genów faga
- Cykl lityczny
 - Wycięcie z genomu
 - Ekspresja genów faga
 - Replikacja



A Genetic Switch, 3rd edition, 2004
© Cold Spring Harbor Laboratory Press
Introduction, Figure 1b

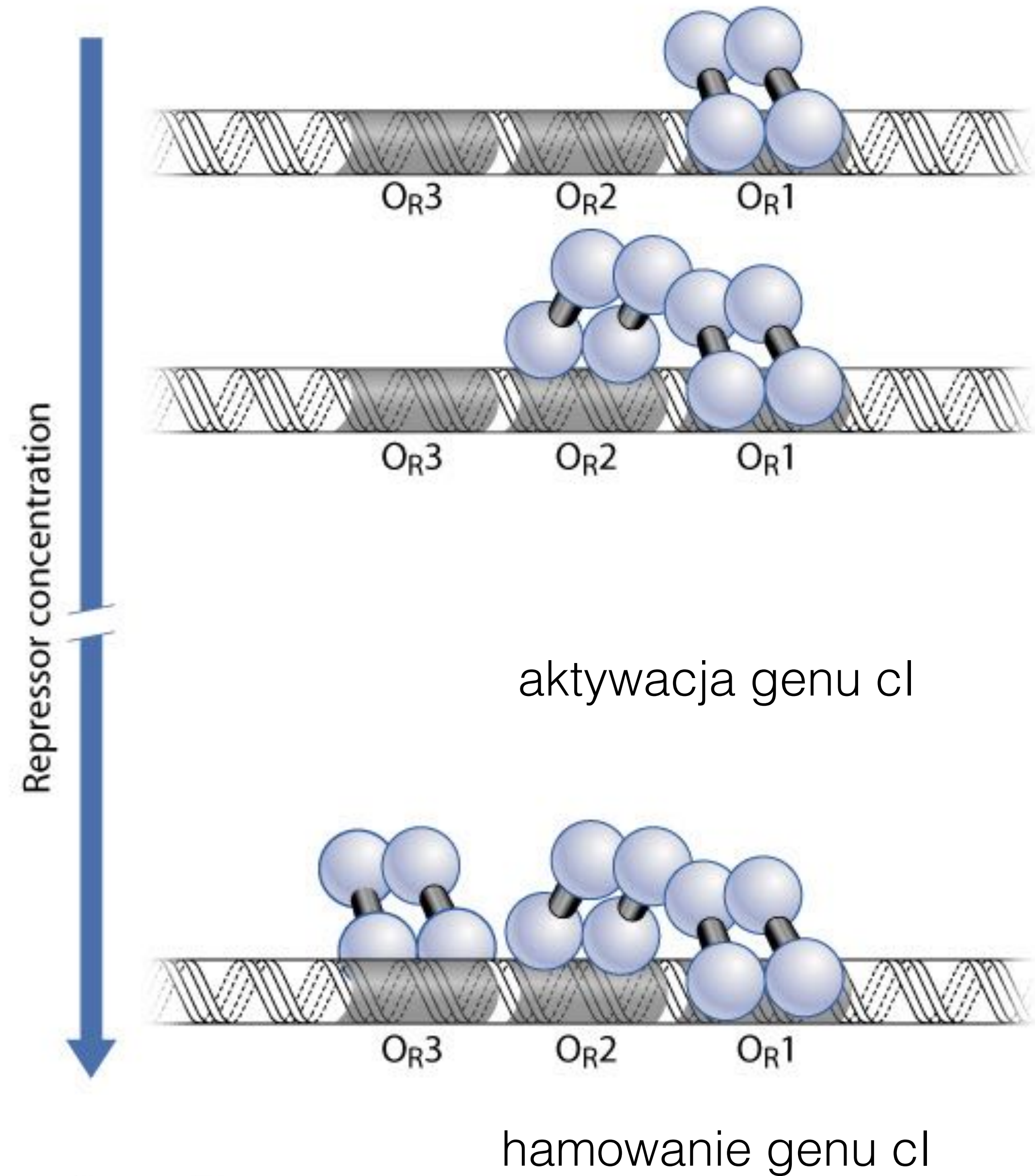
Kontrola przełącznika faga λ

- *cl* – represor: cykl lizogenny
- *cro* – cykl lityczny
- wspólne sekwencje cis



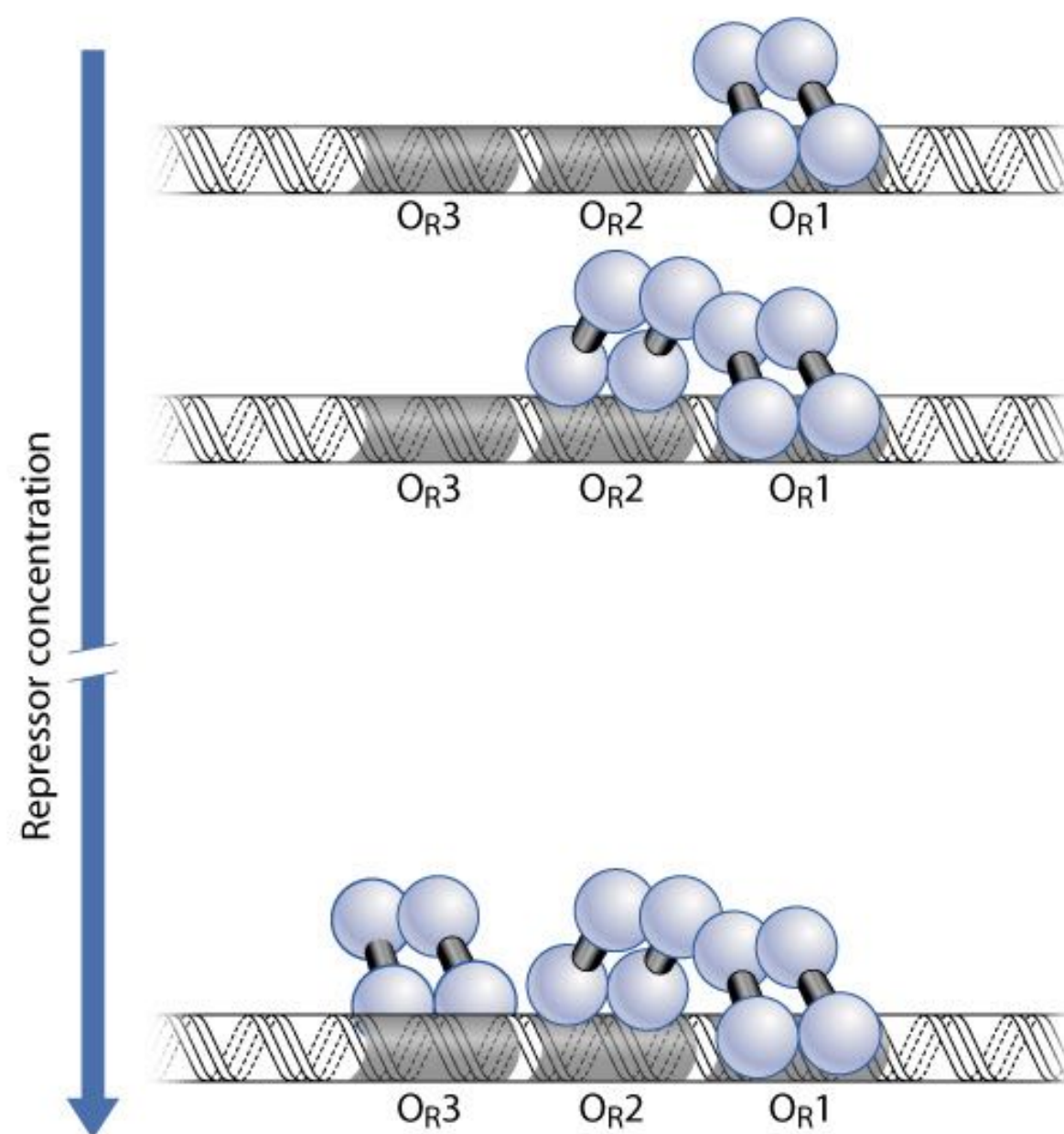
Działanie represora

- Hamuje ekspresję genów wczesnych, w tym *cro*
- Aktywuje własną ekspresję
 - Zależnie od poziomu białka
 - Przy niskim i średnim stężeniu białka represora wiązanie z O_{R1} i O_{R2}
 - Przy dużym stężeniu białka represora wiązanie też z O_{R3} – hamowanie ekspresji *cl*
- Dodatnie sprzężenie zwrotne utrzymuje wysoki stały poziom represora *cl*

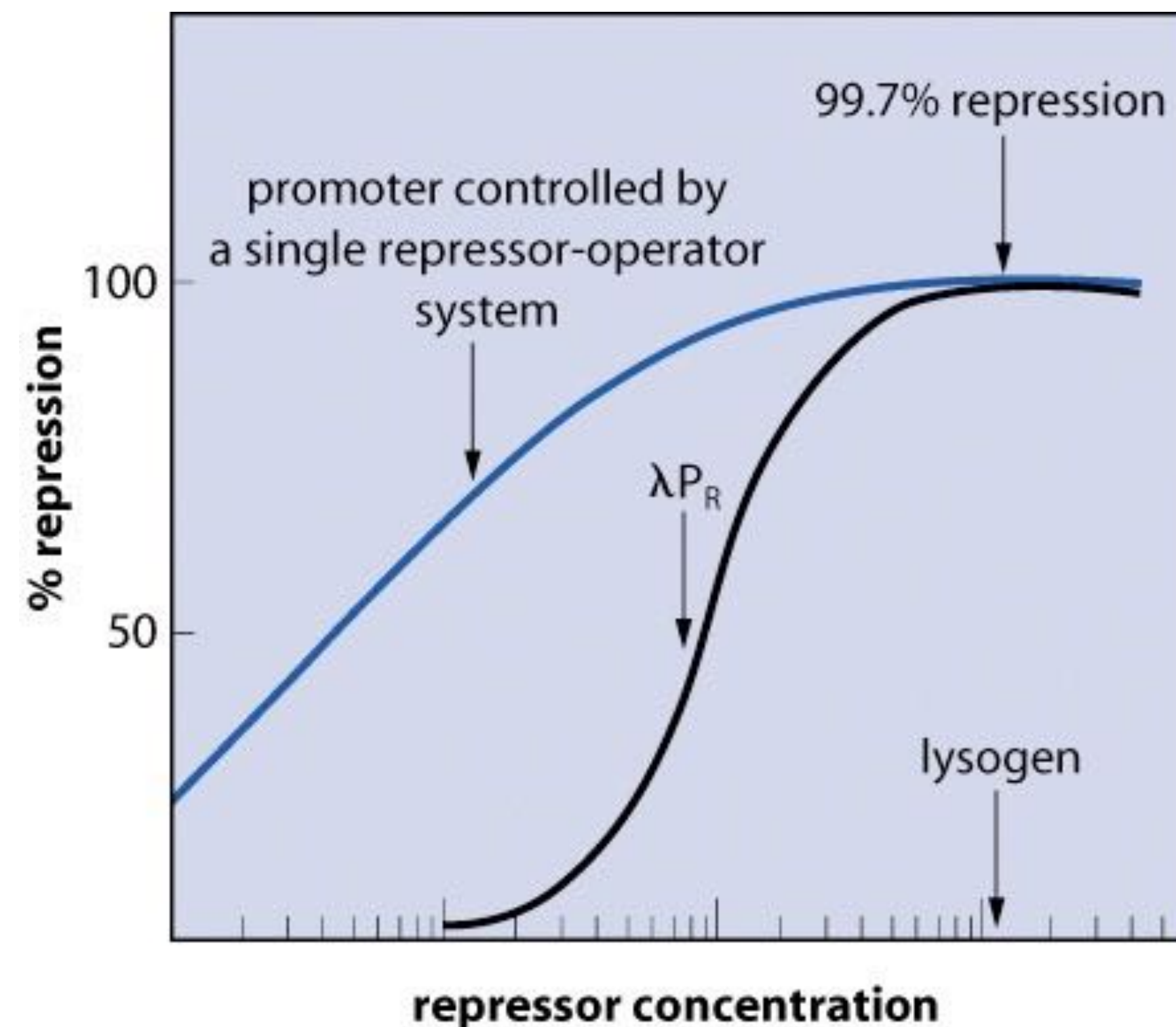


Efekt kooperatywny

- Powinowactwo do O_{R2} dużo niższe, niż do O_{R1}
- Związanie cI z O_{R1} zwiększa powinowactwo do O_{R2} – wiązanie kooperatywne
- Taki rodzaj wiązania daje szybką i jednoznaczną odpowiedź układu na stężenie cI



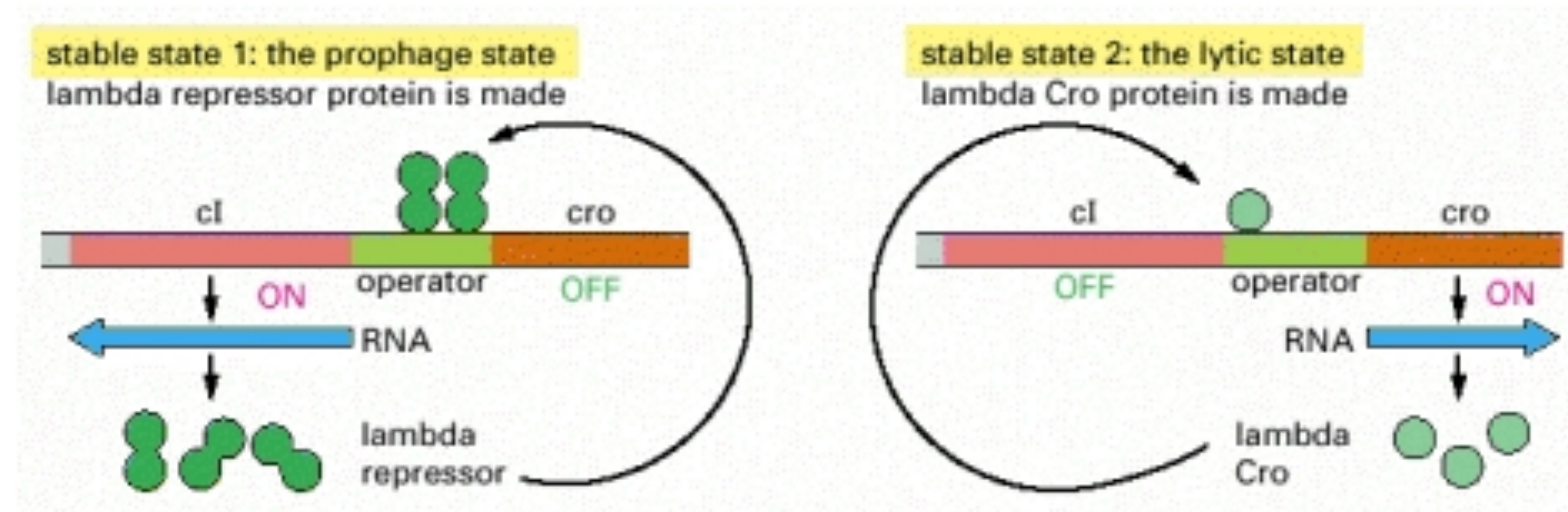
A Genetic Switch, 3rd edition, 2004
© Cold Spring Harbor Laboratory Press
Chapter 1, Figure 16



A Genetic Switch, 3rd edition, 2004
© Cold Spring Harbor Laboratory Press
Chapter 1, Figure 25

Działanie cro

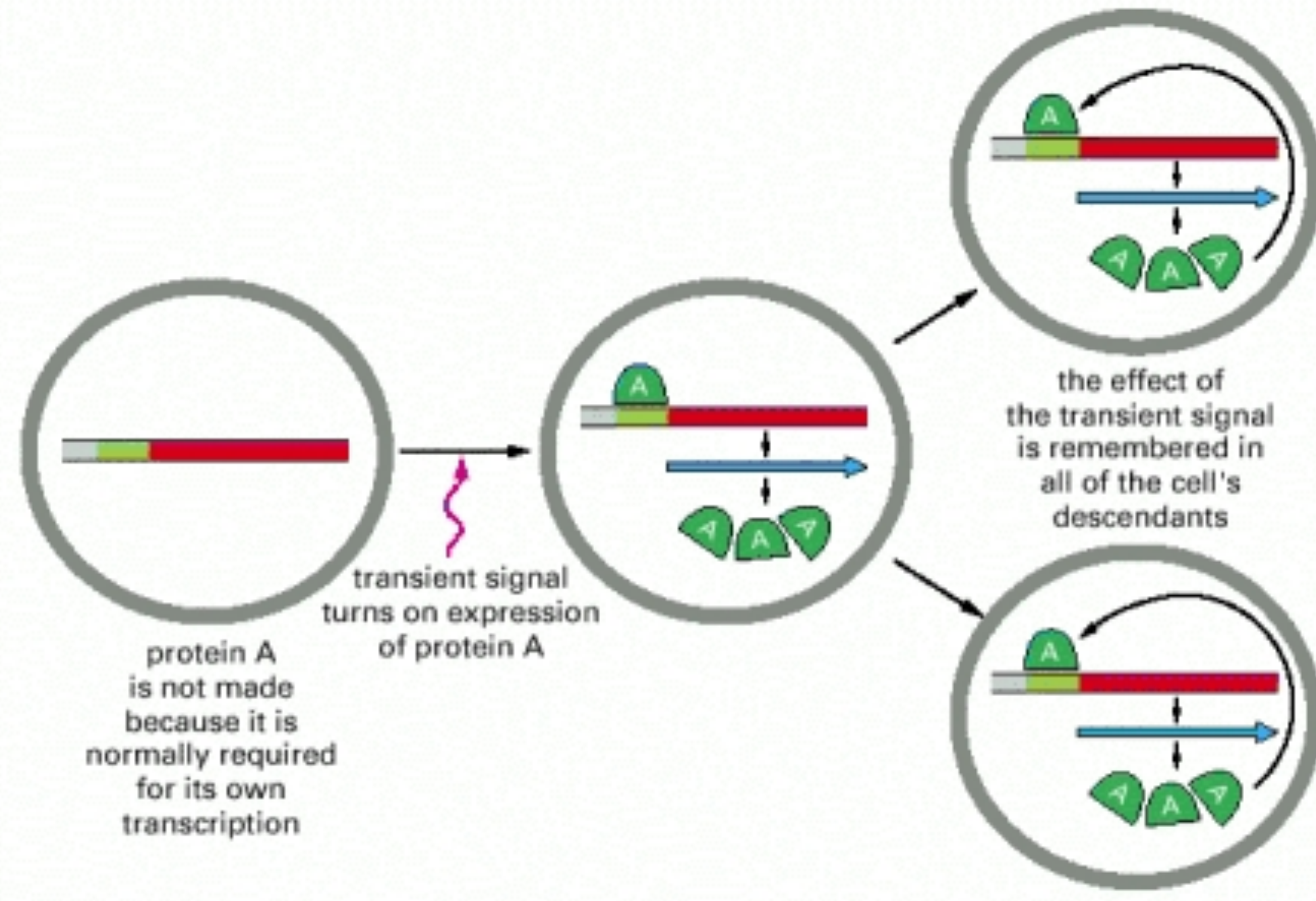
- Blokuje ekspresję represora cl
- Brak cl – ekspresja genów wczesnych, kaskada lityczna
- Dalsze etapy przez antyterminację zależną od produktu genu N
- Efekt: przełącznik dwustanowy (bistabilny)
 - cl aktywny -> nieaktywny cro
 - cro aktywny -> nieaktywny cl



Dodatnie sprzężenie zwrotne

XII

Może dawać efekt pamięci –
stabilnego utrzymywania zmienionego stanu



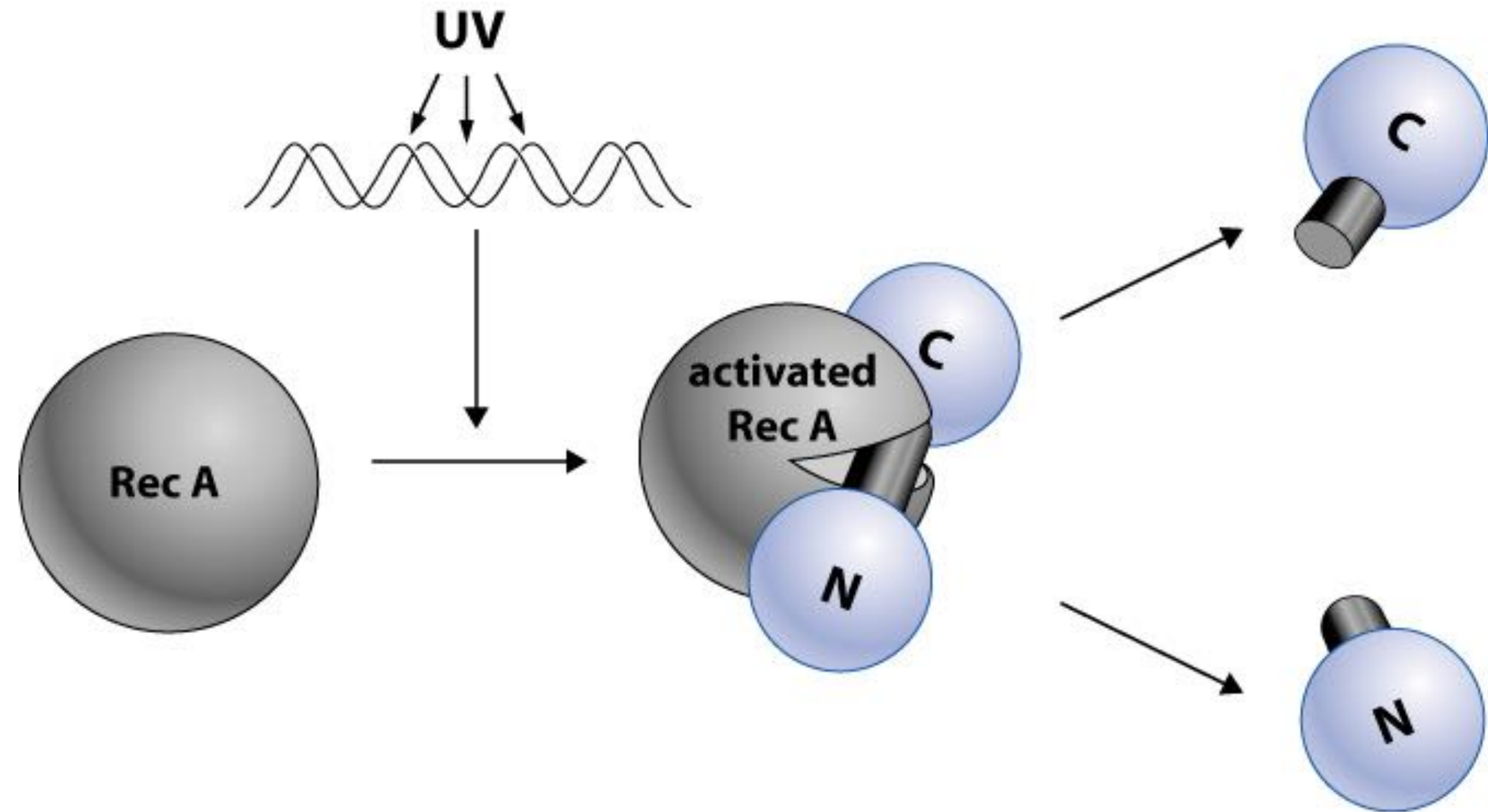
La planète suivante était habitée par un buveur. Cette visite fut très courte, mais elle plongea le petit prince dans une grande mélancolie :

« Que fais-tu là ? dit-il au buveur, qu'il trouva installé en silence devant une collection de bouteilles vides et une collection de bouteilles pleines.

- Je bois, répondit le buveur, d'un air lugubre.
- Pourquoi bois-tu ? lui demanda le petit prince.
- Pour oublier, répondit le buveur.
- Pour oublier quoi ? s'enquit le petit prince qui déjà le plaignait.
- Pour oublier que j'ai honte, avoua le buveur en baissant la tête.
- Honte de quoi ? s'informa le petit prince qui désirait le secourir.
- Honte de boire ! » acheva le buveur qui s'enferma définitivement dans le silence.

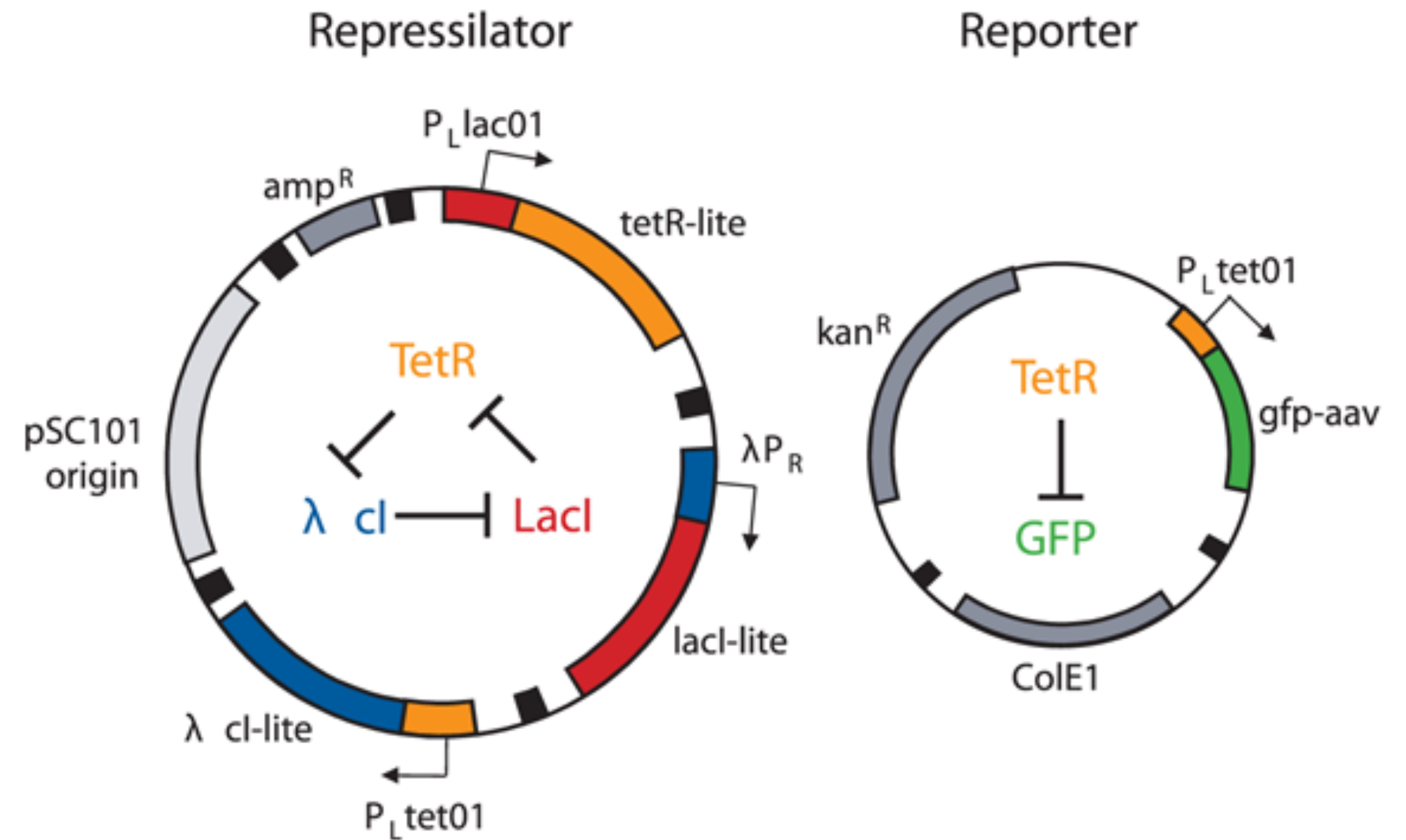
Wyjście z blokady lizogennej

- Przełączenie z lizogenii w cykl lityczny: proteoliza białka represora przez RecA (sygnał uszkodzeń genomu)

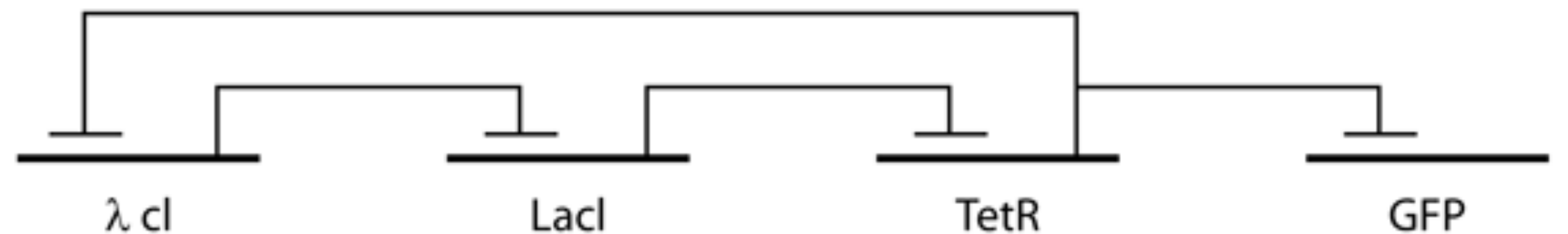


Oscylatory

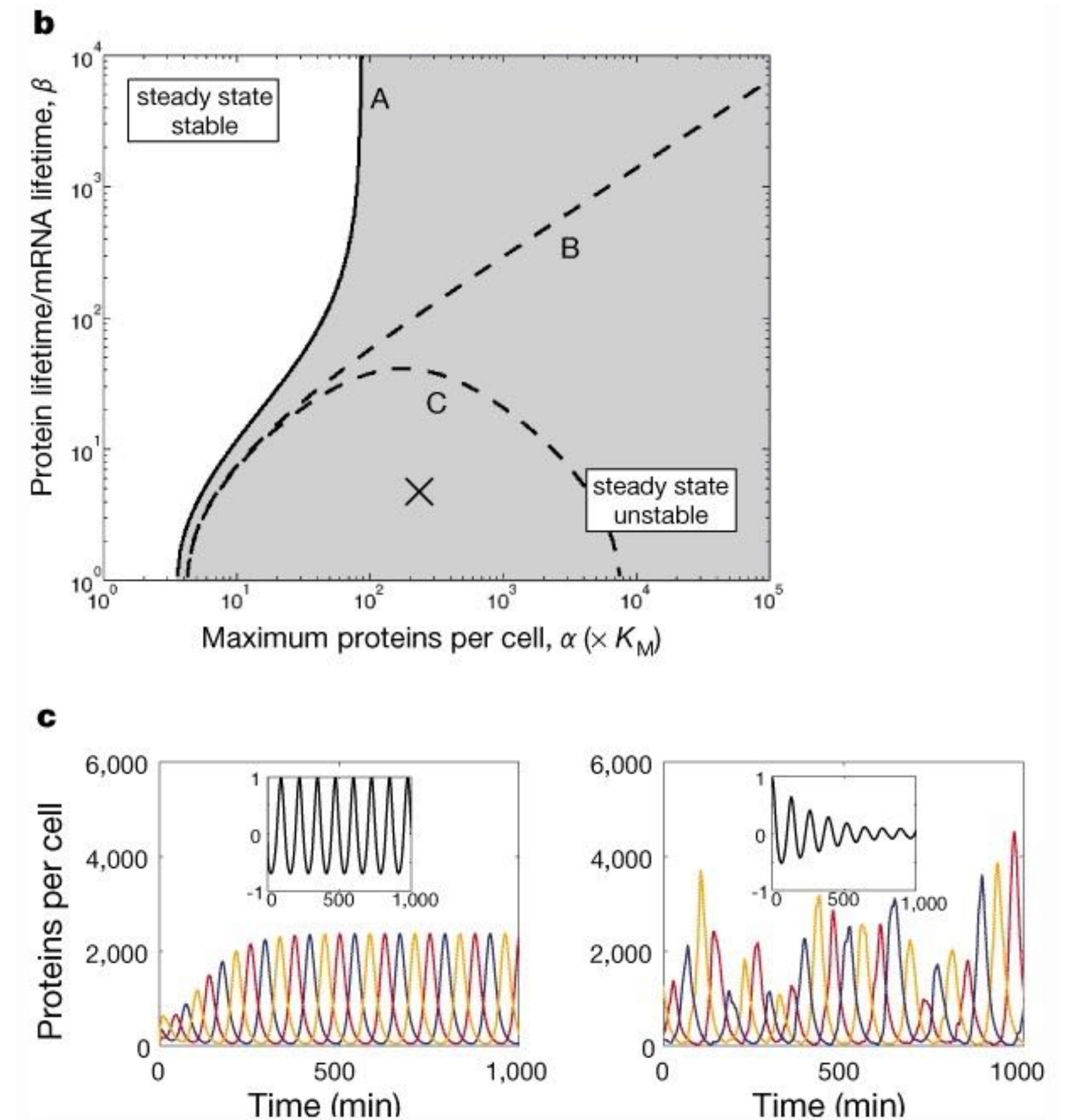
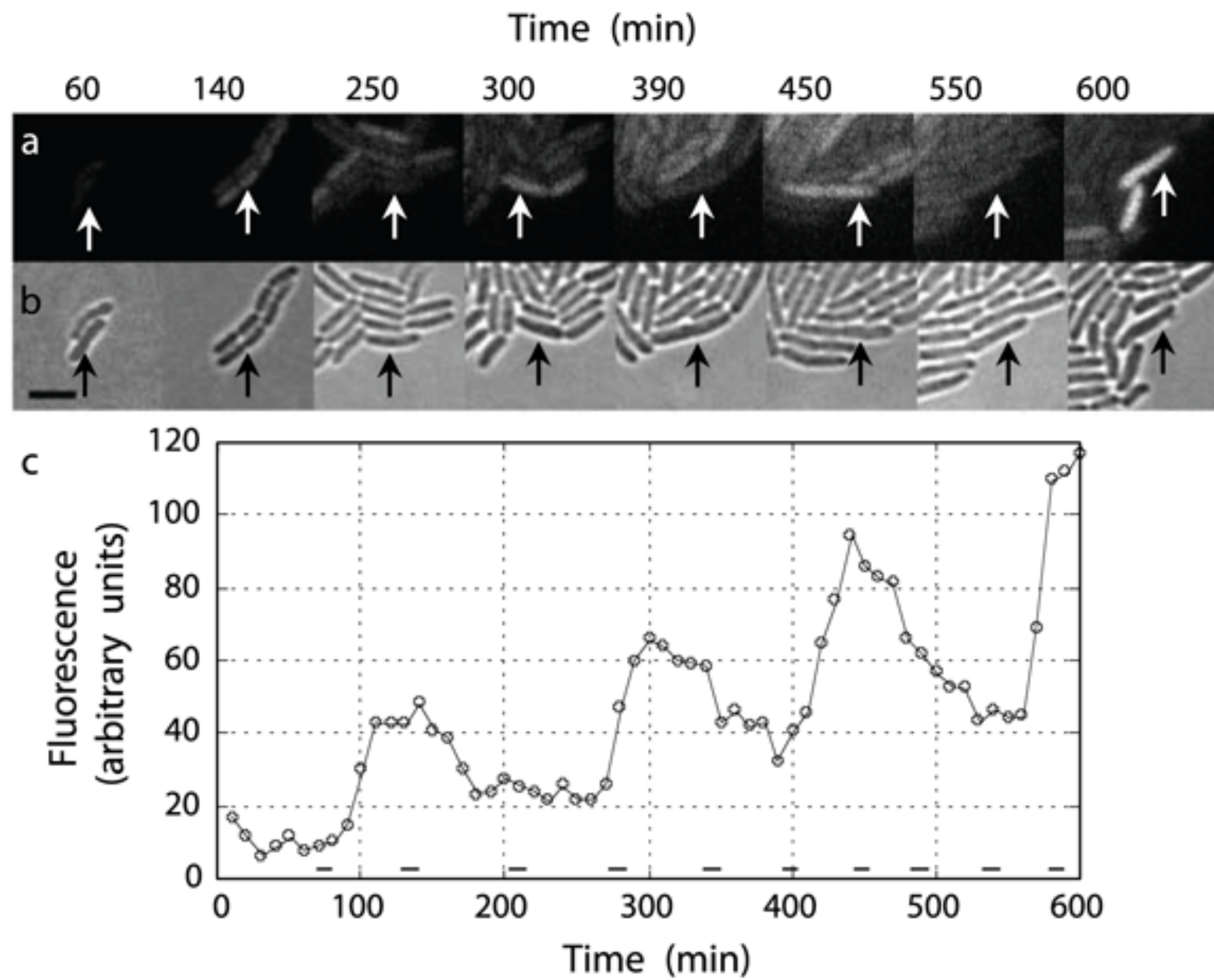
- Kombinacja kilku prostych opartych na represji przełączników może dać układ periodycznie oscylujący – konieczne ujemne sprzężenie zwrotne
- Przykład (skonstruowany sztucznie) – tzw. repressilator (Elowitz & Leibler, 2000)



Elowitz & Leibler, Nature. 2000 Jan 20;403(6767):335-8.



Repressillator



Oscylacje układu

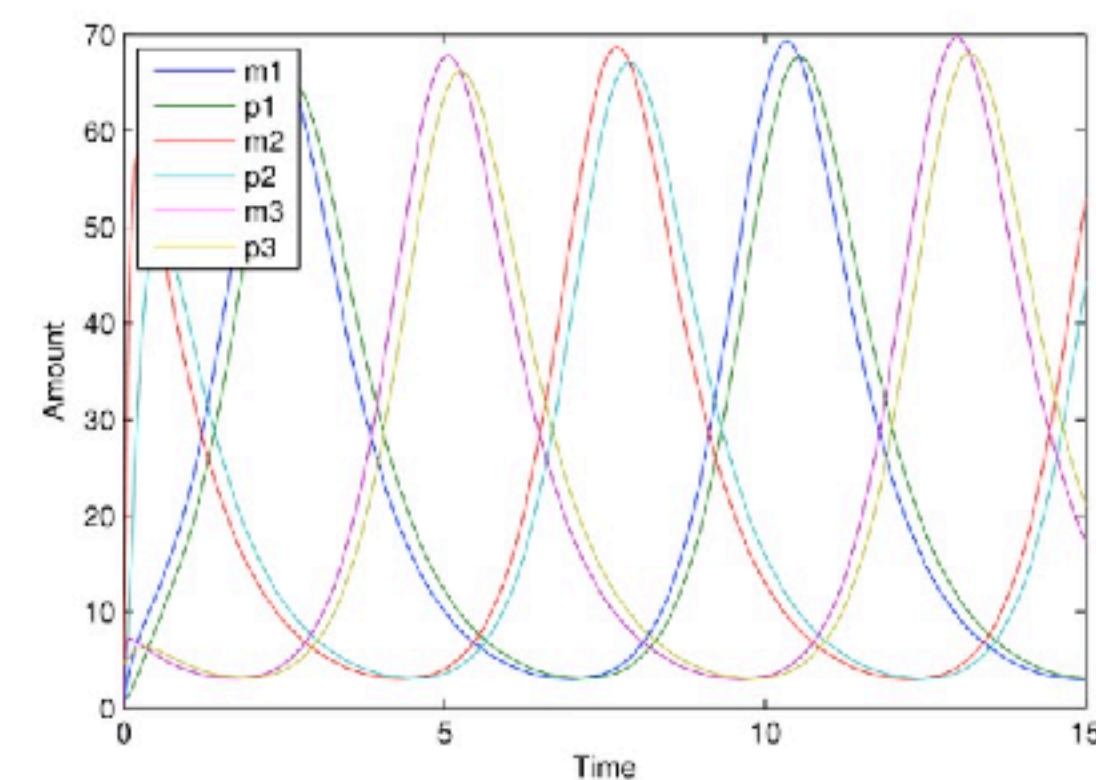


<http://www.elowitz.caltech.edu/movies.html>

Modelowanie

```
function ydot=repressilator(t,y,p)
    alpha0 = 1;
    n = 2.0;
    beta = 5;
    alpha = 1000;
    % order of species; y = [m1 p1 m2 p2 m3 p3]
    m1 = -y(1) + alpha/(1+y(6)^n) + alpha0;
    p1 = -beta*(y(2) - y(1));
    m2 = -y(3) + alpha/(1+y(2)^n) + alpha0;
    p2 = -beta*(y(4) - y(3));
    m3 = -y(5) + alpha/(1+y(4)^n) + alpha0;
    p3 = -beta*(y(6) - y(5));
    ydot = [m1; p1; m2; p2; m3; p3];
```

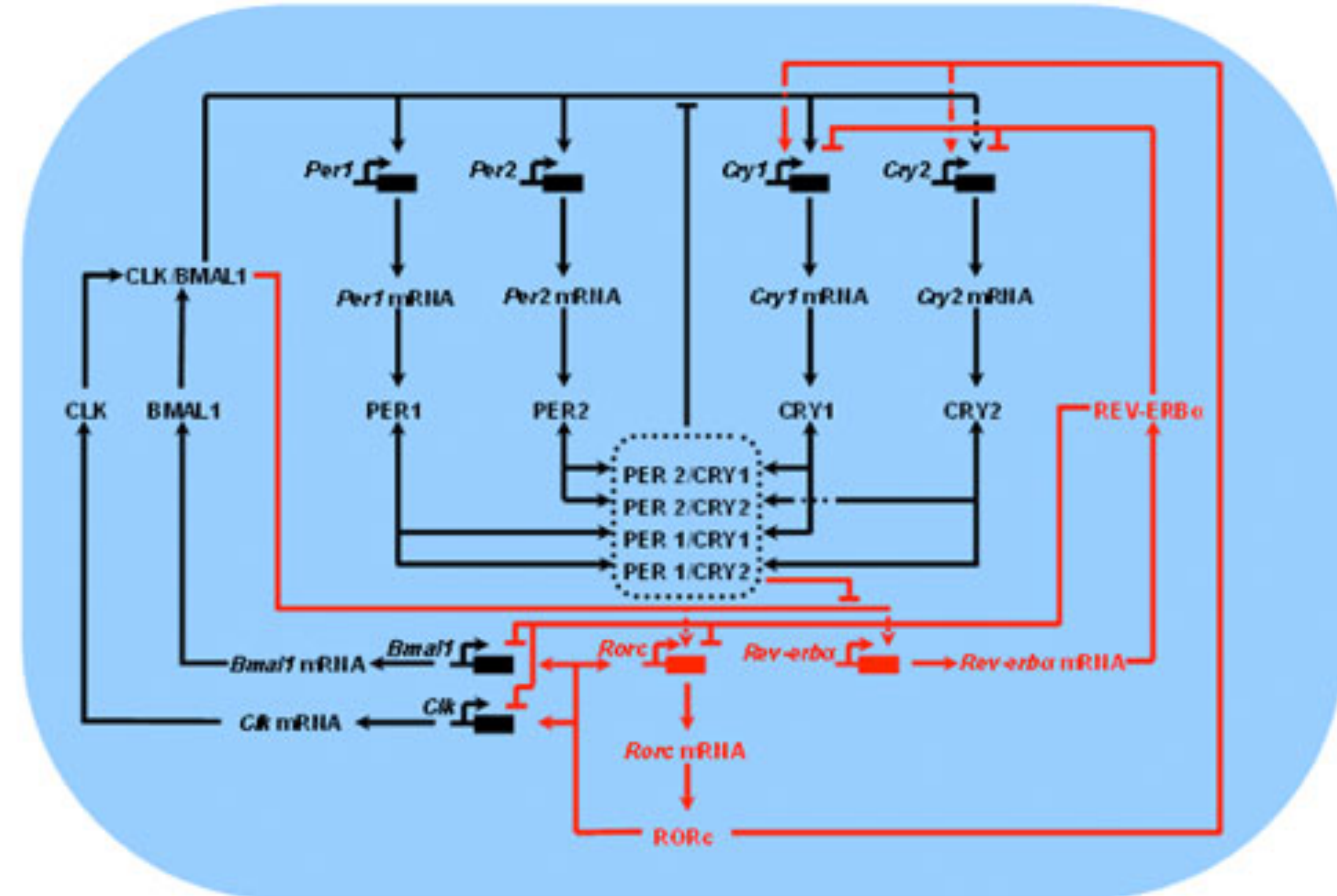
```
timespan=[0 15];
y0 = [0 1 0 2 0 5];
[t,y] = ode45(@repressilator,timespan,y0);
figure();
plot(t,y)
xlabel('Time')
ylabel('Amount')
legend('m1','p1','m2','p2','m3','p3','Location','NorthWest')
figure();
plot(y(:,1), y(:,2))
xlabel('Amount m1')
ylabel('Amount p1')
```



1.9.3

Oscylatory cyklu dobowego

- Podobna zasada, ale bardziej złożone (i bardziej stabilne)

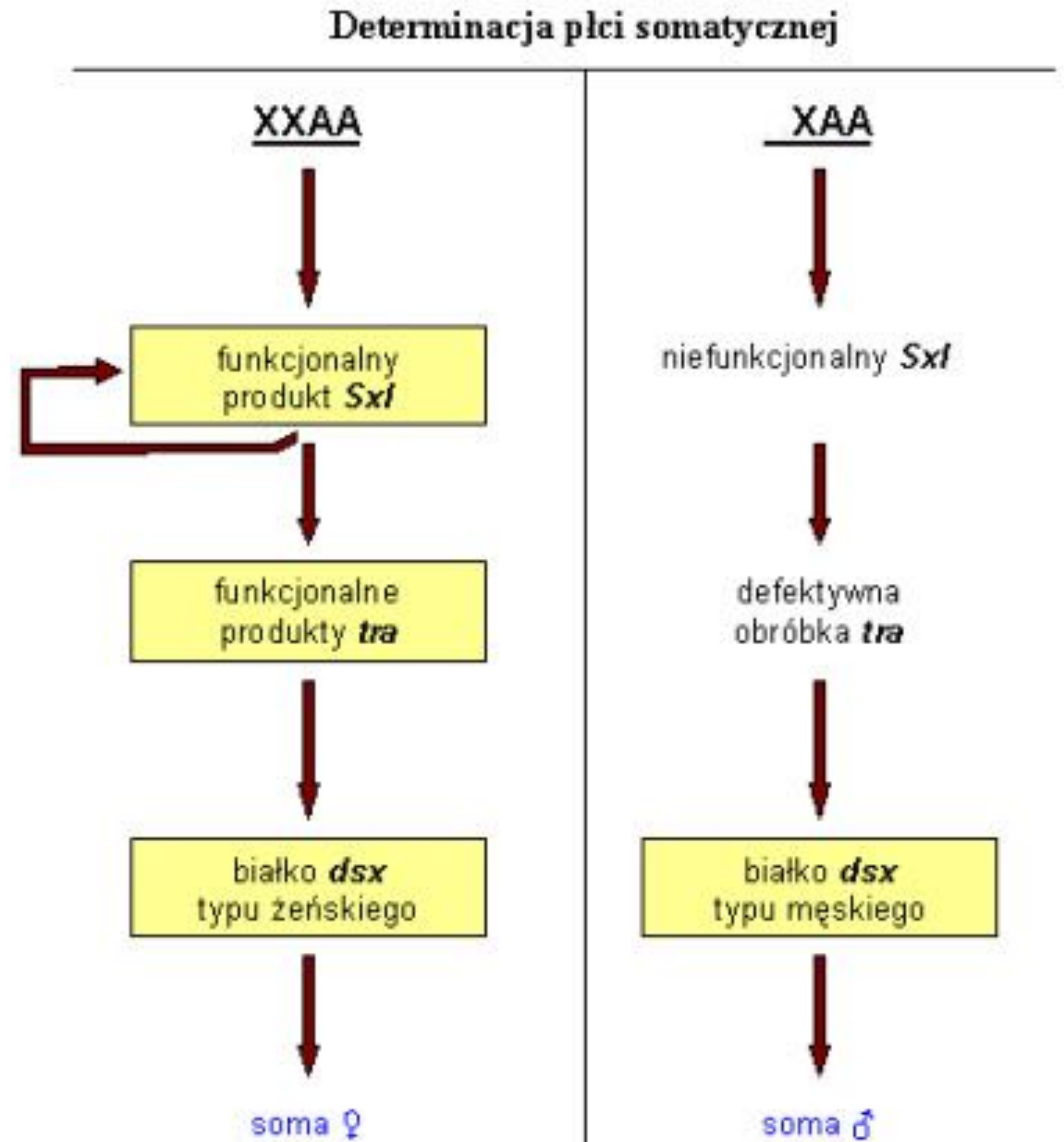


Wewnątrzkomórkowy oscylator dobowy myszy

(<http://www.bmse.ucsb.edu/profiles/mirsky/>)

Przełączniki posttranskrypcyjne

- Przełączniki genetyczne Eukaryota mogą być oparte na mechanizmach posttranskrypcyjnych
- Np. alternatywne składanie (splicing) i alternatywna poliadenylacja/terminacja w limfocytach (przeciwciała)
- Determinacja płci *Drosophila*
- Decyduje aktywność SXL w zarodku



Kaskada przełączników alternatywnego składania

- Ekson 3 zawiera kodon STOP – degradacja NMD
- Białko SXL aktywuje “żeński” tryb składania transkryptu SXL – dodatnie sprzężenie zwrotne
- Początkowa aktywność systemu: białka regulatorowe kodowane na X i kodowane na autosomach, tworzą dimery
 - przewaga autosomów – dimery nieaktywne (aktywatory kodowane na X wymiarczowane)
 - równowaga (X:A=1) – aktywacja transkrypcji SXL przez białka kodowane na X

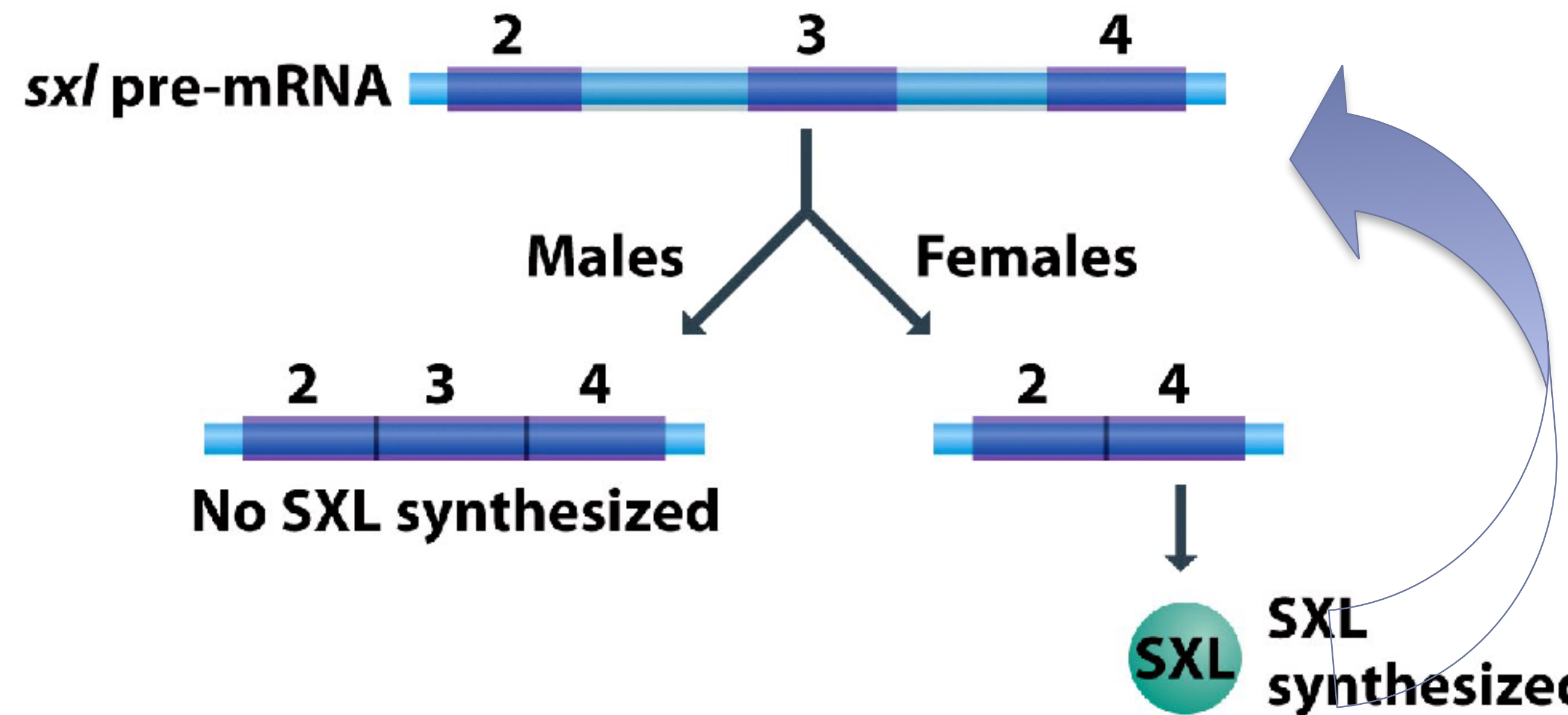


Figure 12-33a Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Kolejne etapy

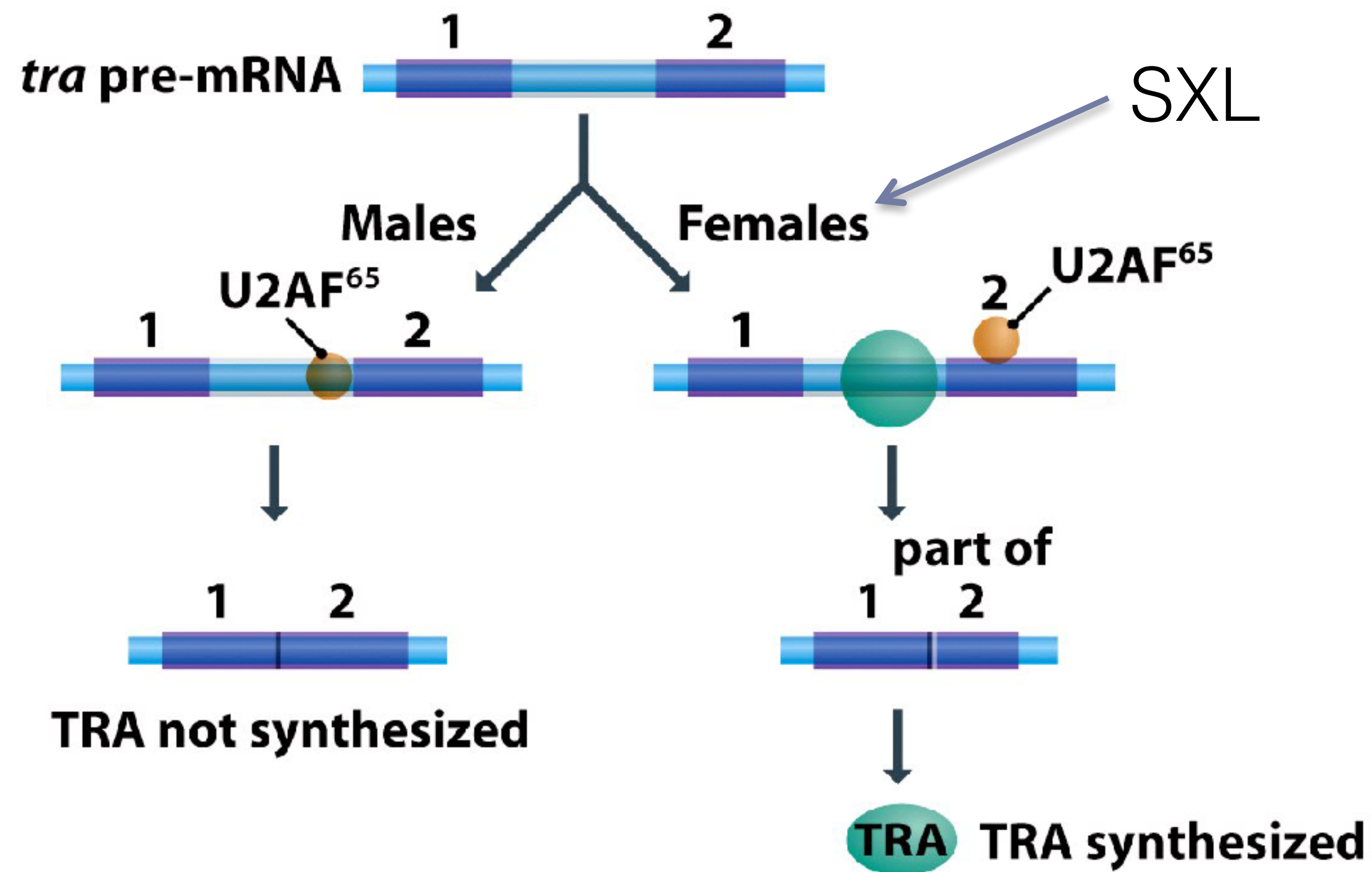


Figure 12-33b Genomes 3 (© Garland Science 2007)

SXL aktywuje wybór kryptycznego miejsca styku intron/ekson w transkrypcie genu *tra*

Kolejne etapy

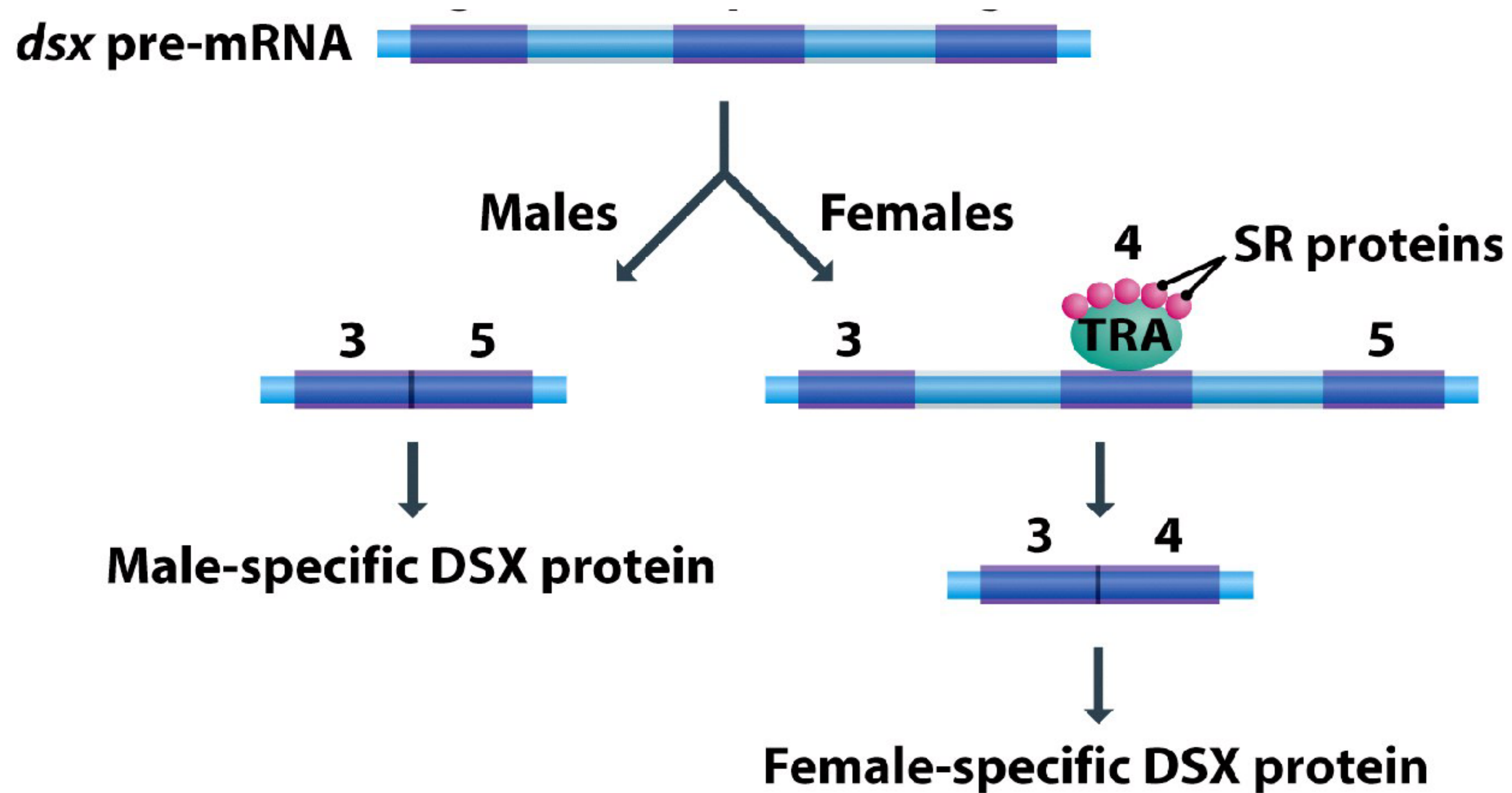
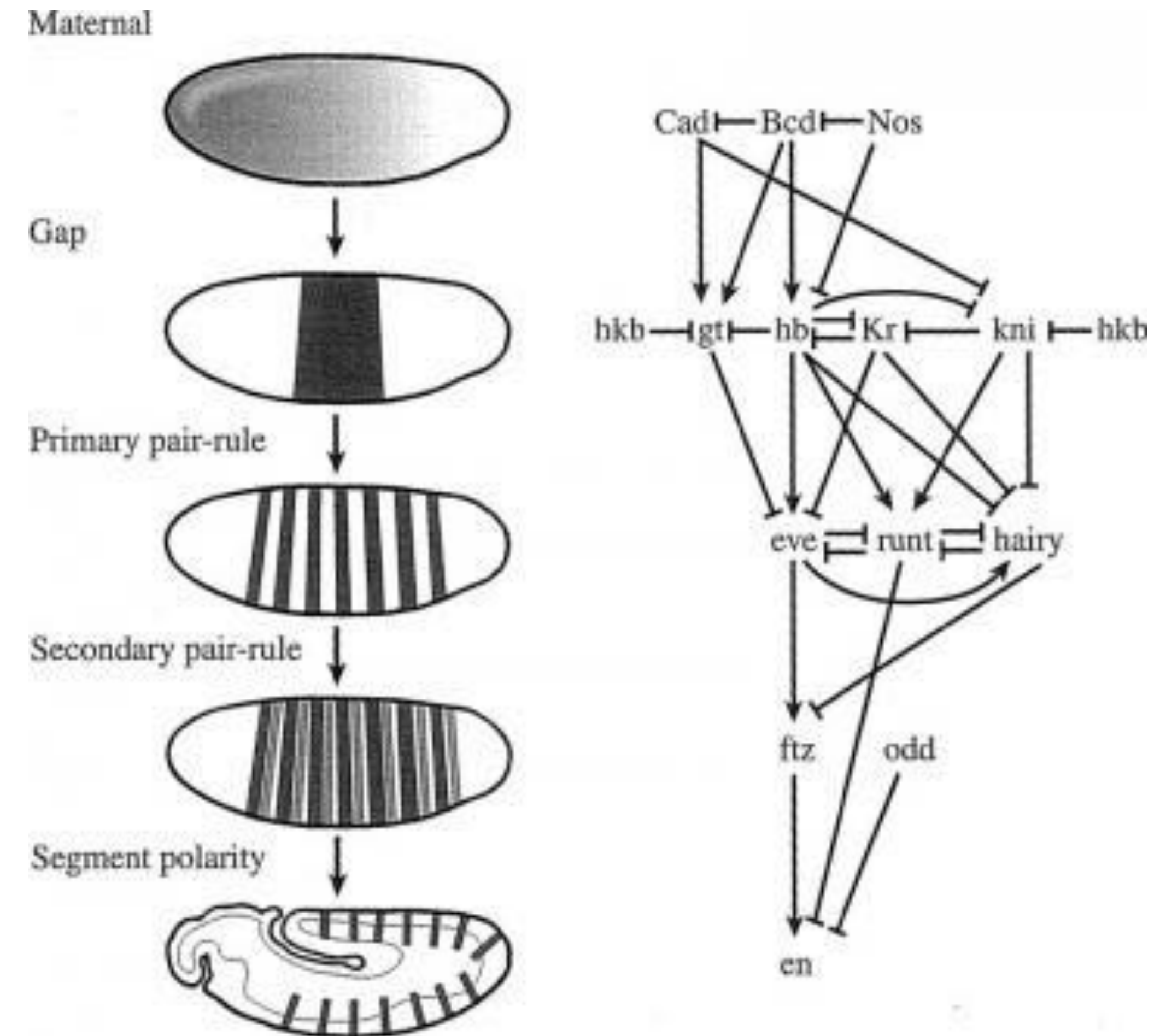


Figure 12-33c Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Tra jest aktywatorem składania dla eksonu 4 genu *dsx*

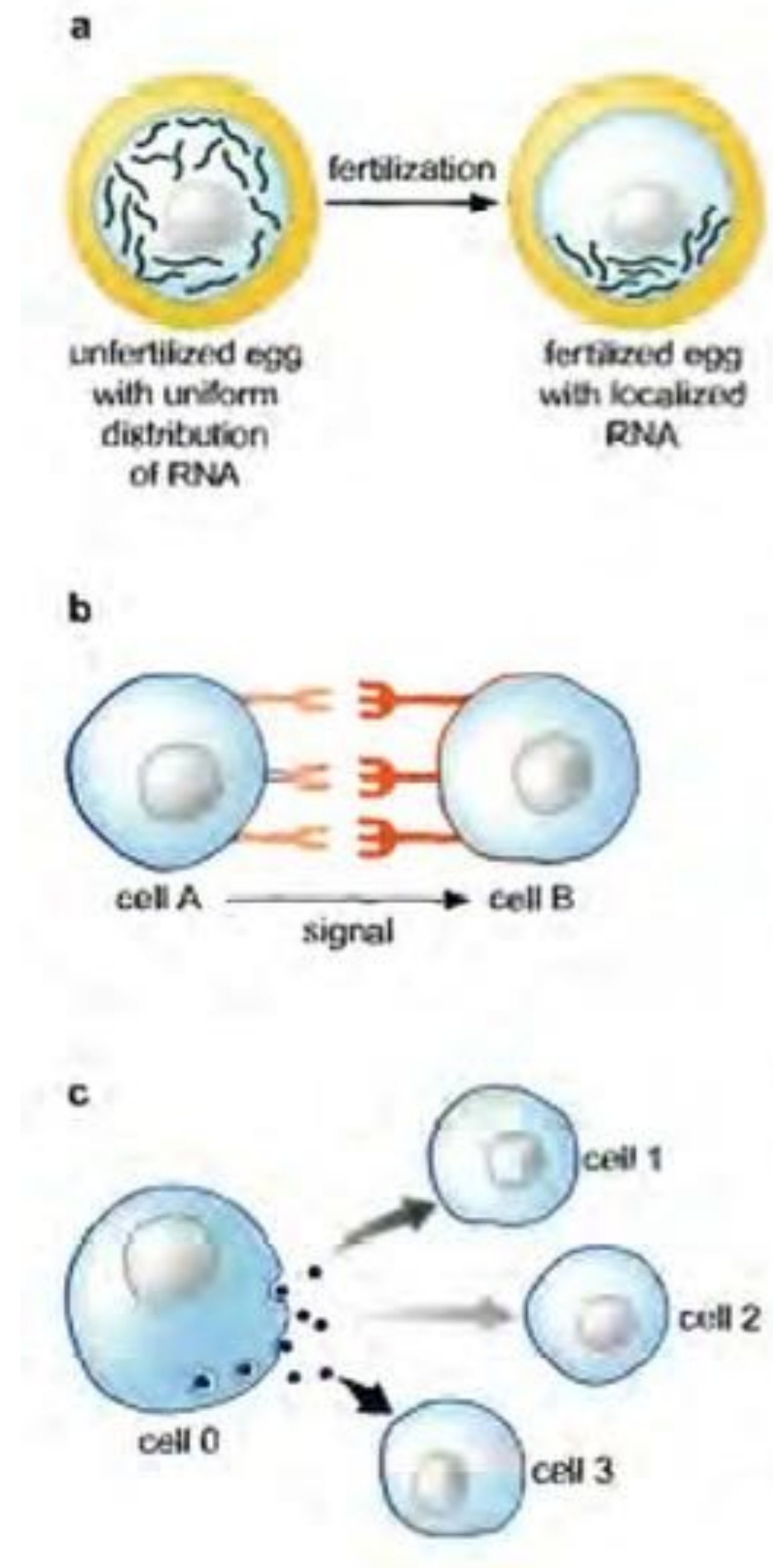
Genetyczne podstawy rozwoju zarodkowego

- Lokalne interakcje między komórkami – ustalanie pozycji
 - Bezpośrednie
 - Przez wydzielane morfogeny
- Sieci i kombinacje modułów regulacji ekspresji genów



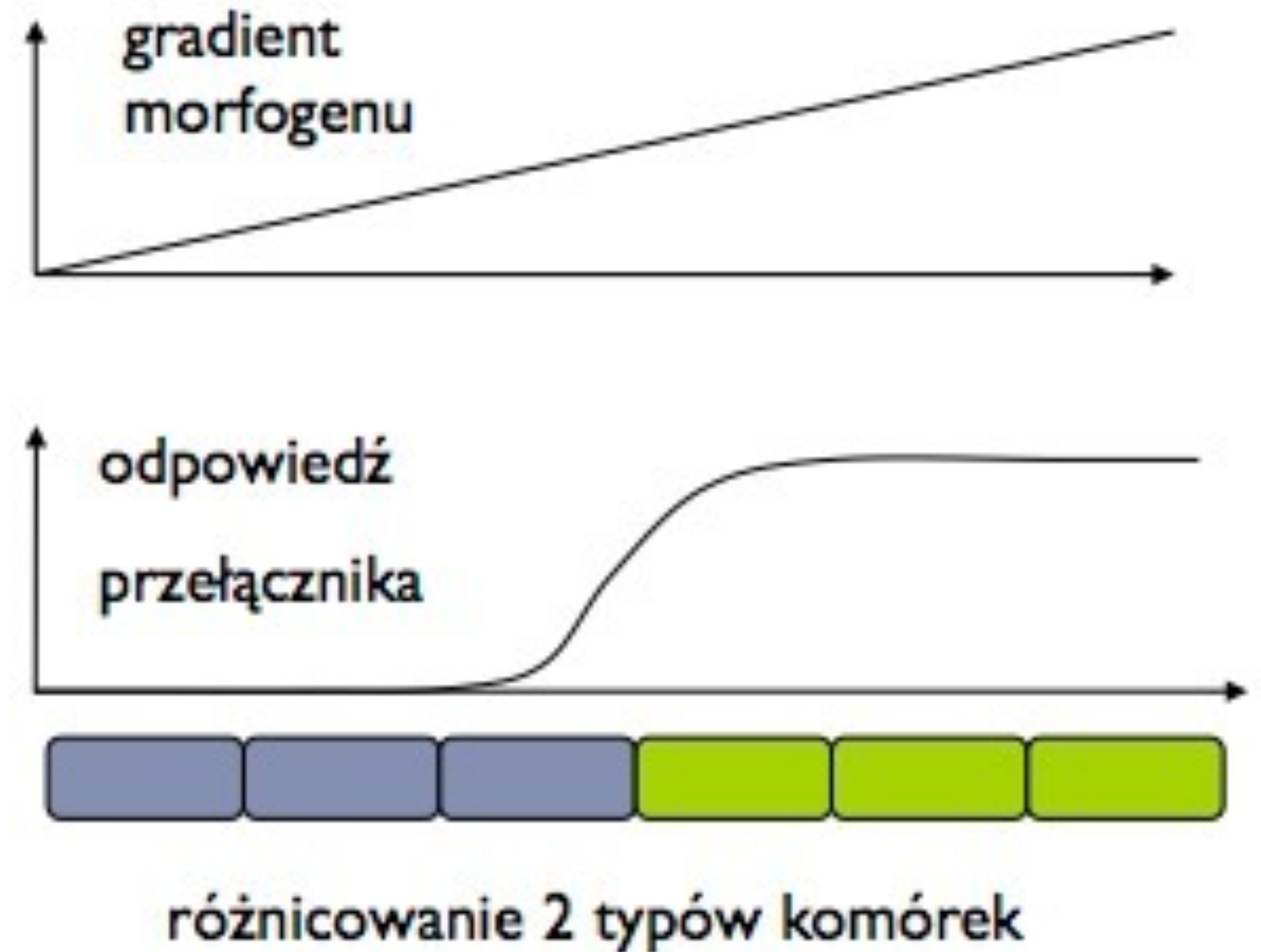
Mechanizmy interakcji

- Gradienty mRNA
- Bezpośredni kontakt komórek
- Wydzielane morfogeny



Gradientsy i przełączniki

- Dzięki mechanizmom kooperatywnego wiązania przełącznik genetyczny może dać jednoznaczną odpowiedź na gradient morfogenu/sygnału



Różnicowanie zarodka *Drosophila*

geny efektu matczynego

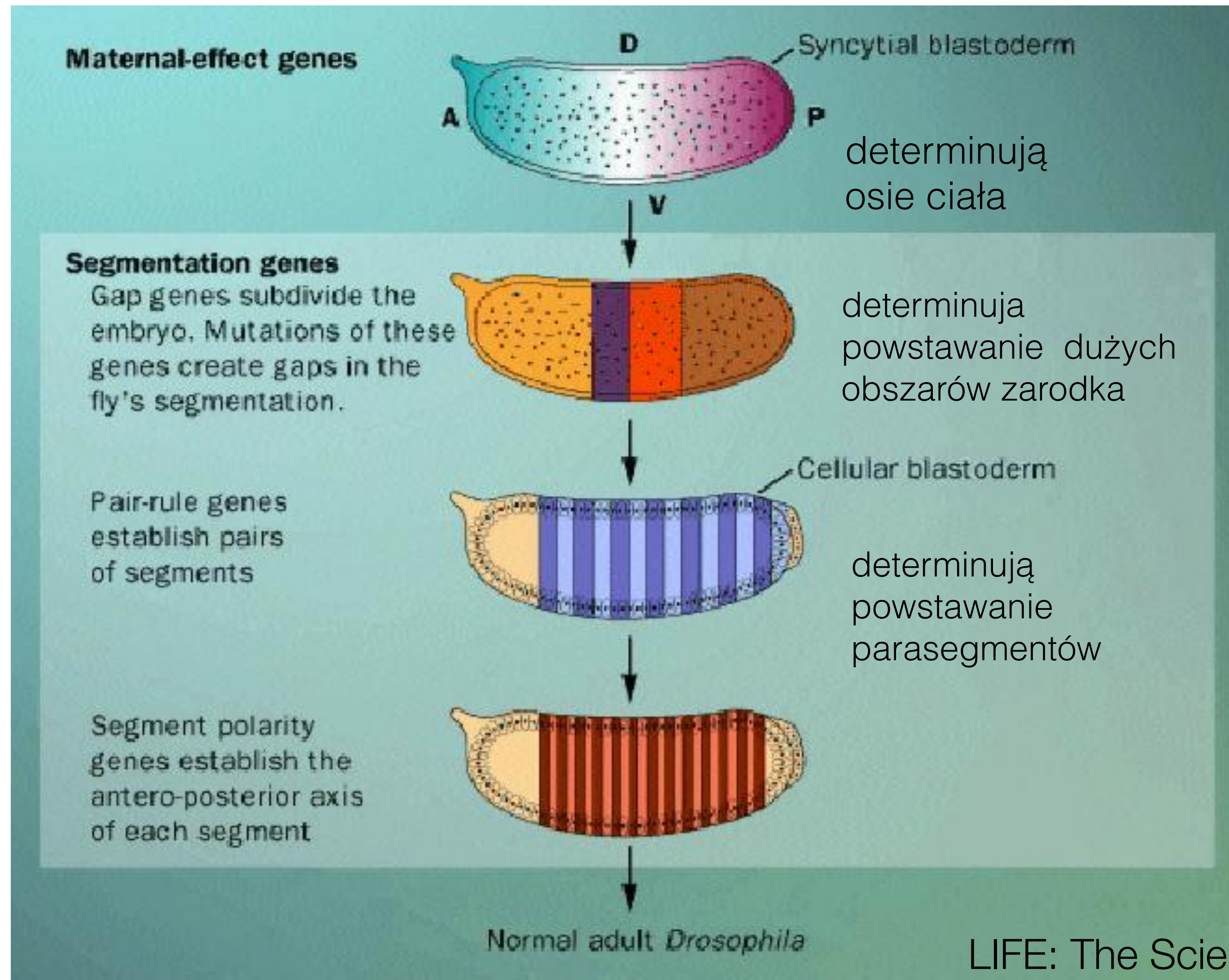
geny zygotyczne:

geny ubytku

geny reguły parzystej

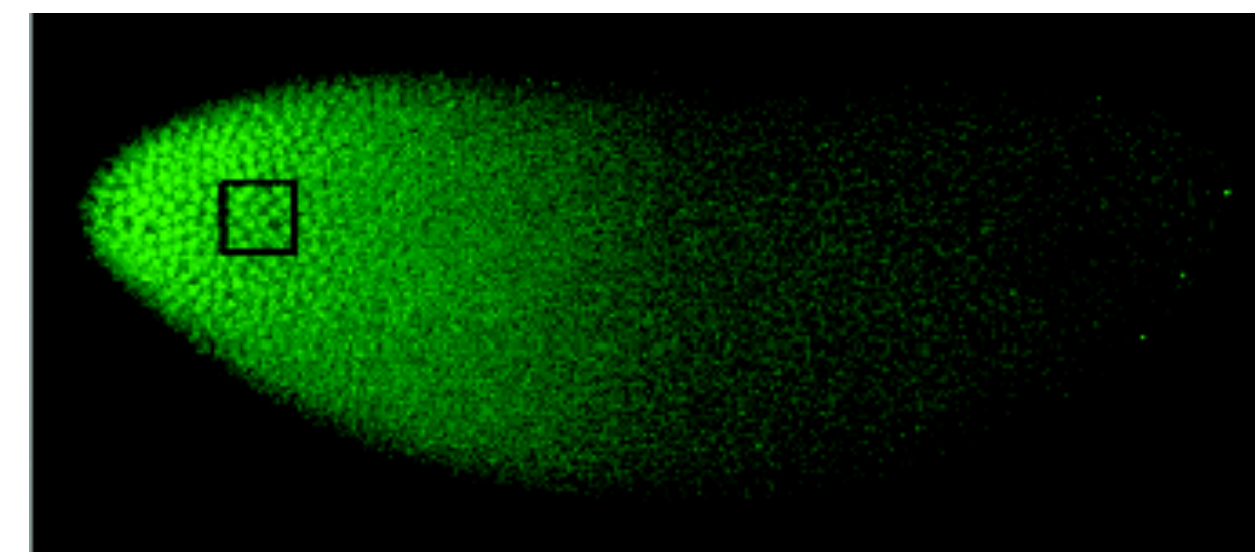
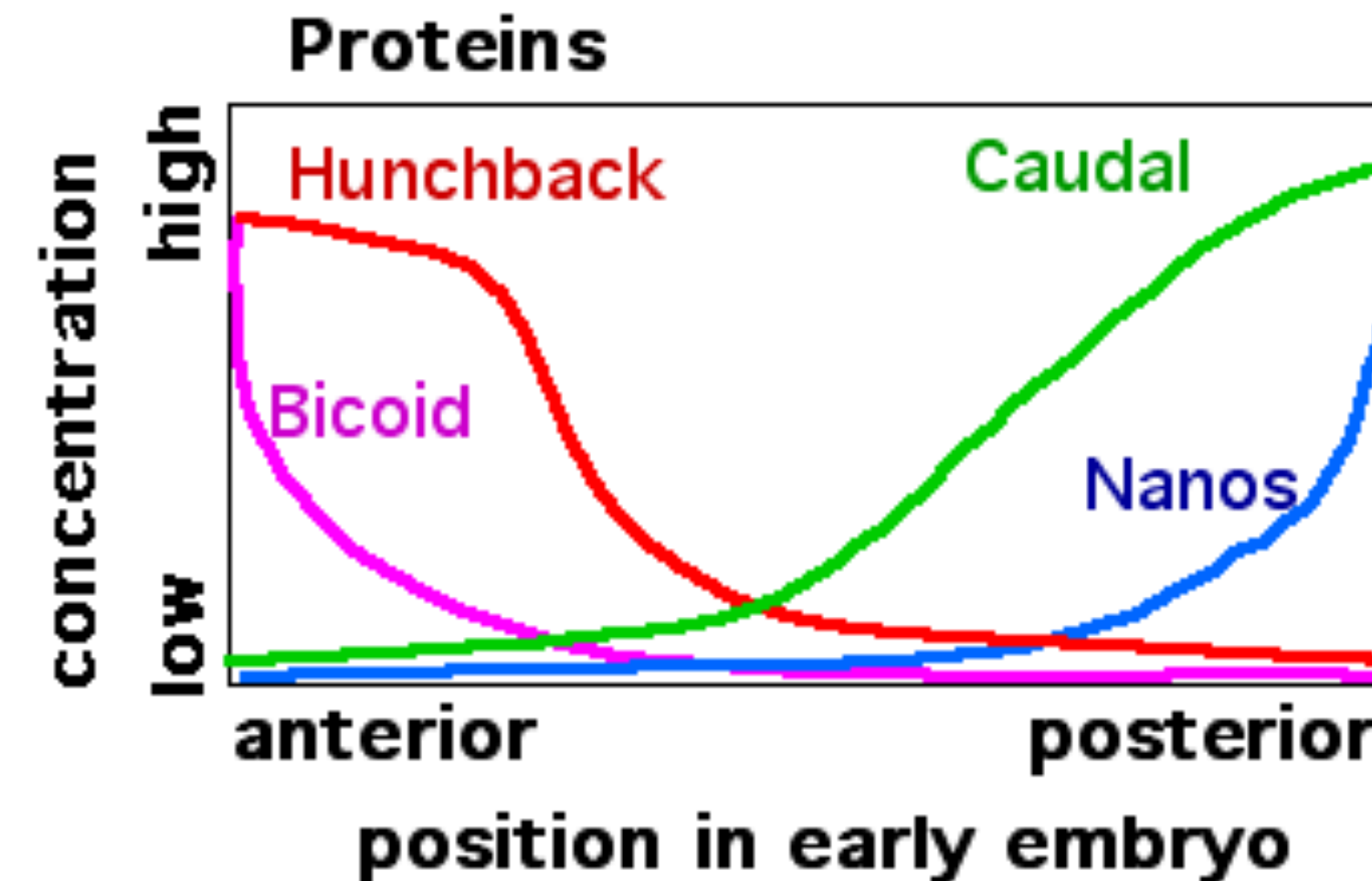
geny polarności segmentów

geny homeotyczne



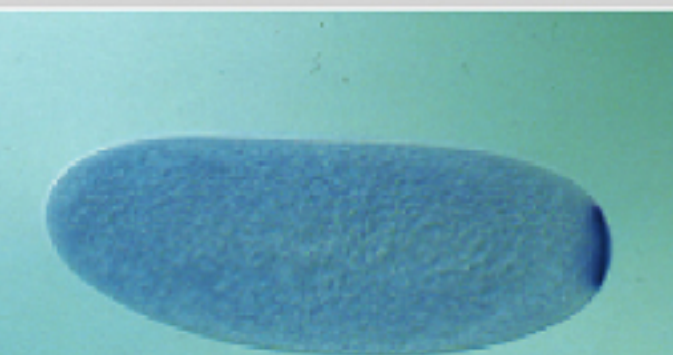
Geny efektu matczynego

- Gradient mRNA tworzony podczas oogenezy: synteza w trofocytach i transport przez mostki cytoplazmatyczne do oocyty
- Inne geny (np. *hunchback*) – mRNA matczyne oraz syntetyzowany w zygocie – ekspresja regulowana przez gradienty matczyne na poziomie transkrypcyjnym i post-transkrypcyjnym
- *hunchback* – transkrypcja aktywowana przez *bicoid*, translacja hamowana przez *nanos*

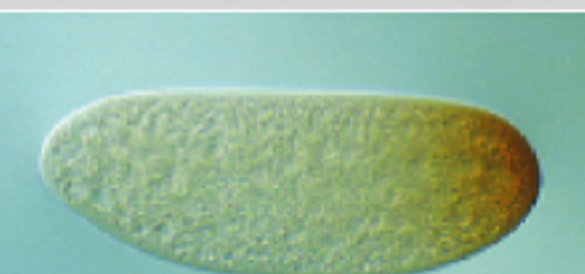


nanos RNA and protein are posterior

nanos RNA is localized at the posterior end at the 3rd division

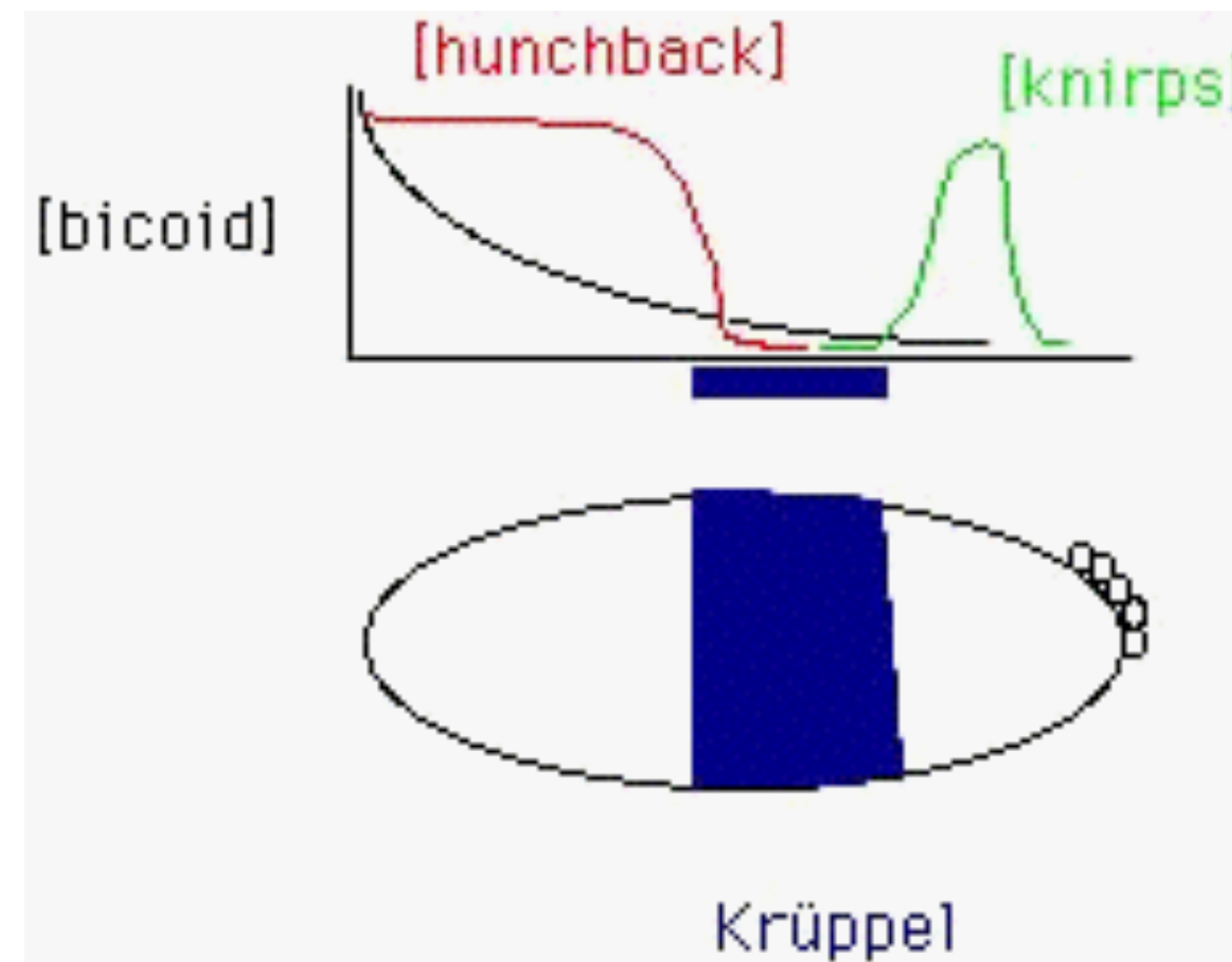
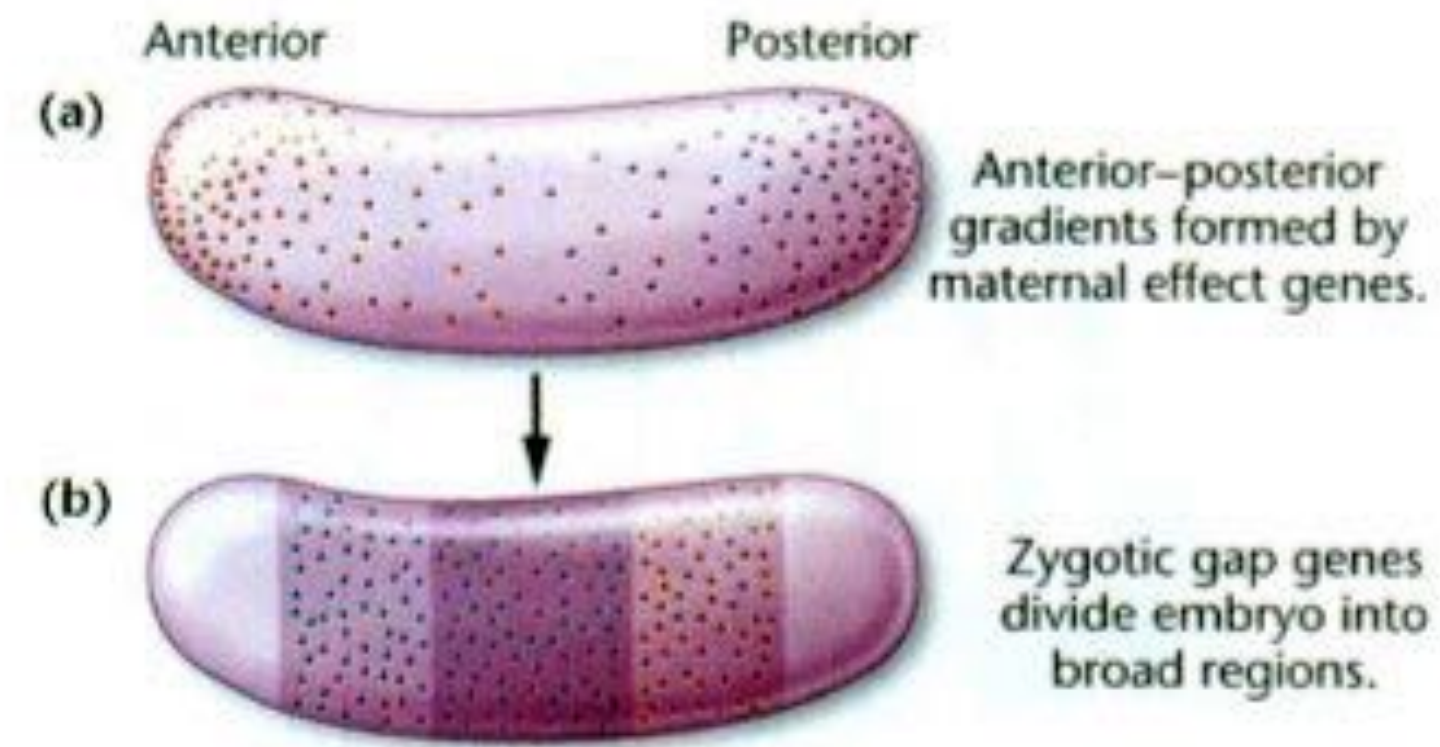


nanos protein spreads from the posterior end at the 8th division

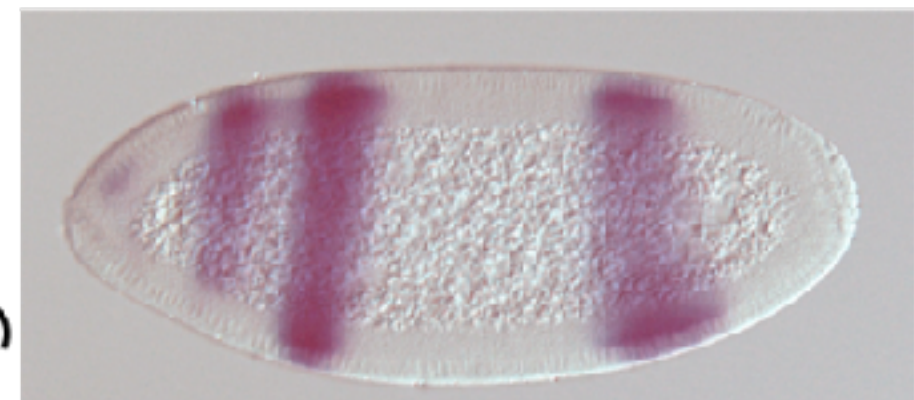
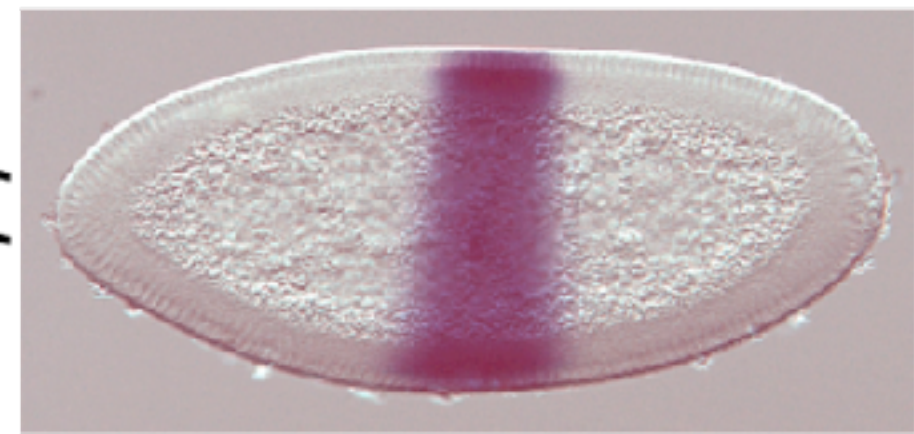


Geny zygotyczne: geny ubytku

- Ekspresja regulowana przez geny matczyne
- Interakcja gradientów o działaniu aktywującym i hamującym tworzy wyraźne strefy
- Jednym z głównych regulatorów jest *hunchback*
- Np. Krüppel:
 - aktywowany przez bicoid
 - aktywowany przez niskie stężenie *hunchback*, hamowany przez wysokie
 - hamowany przez Knirps

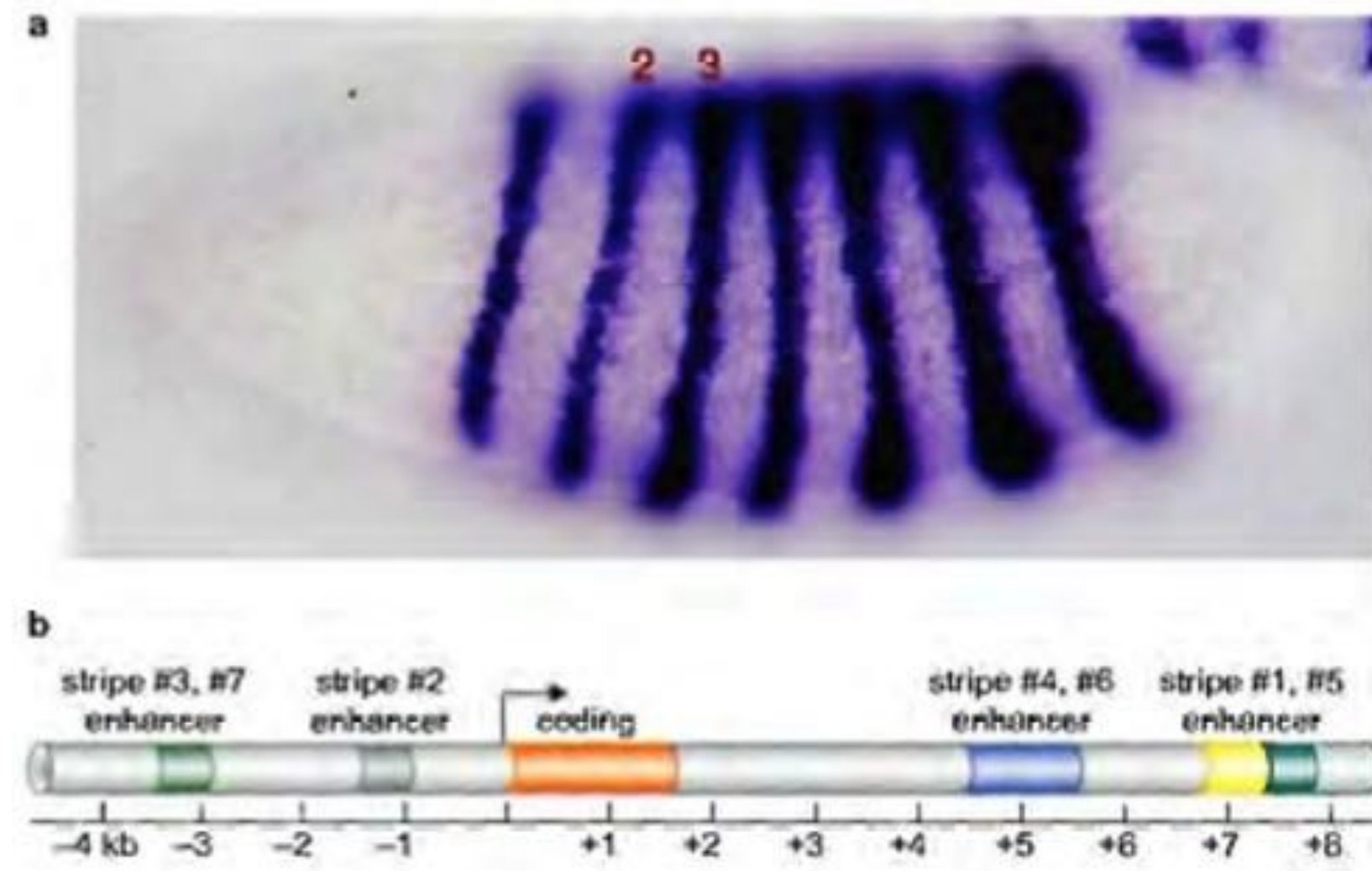


giant Krüppel knirps

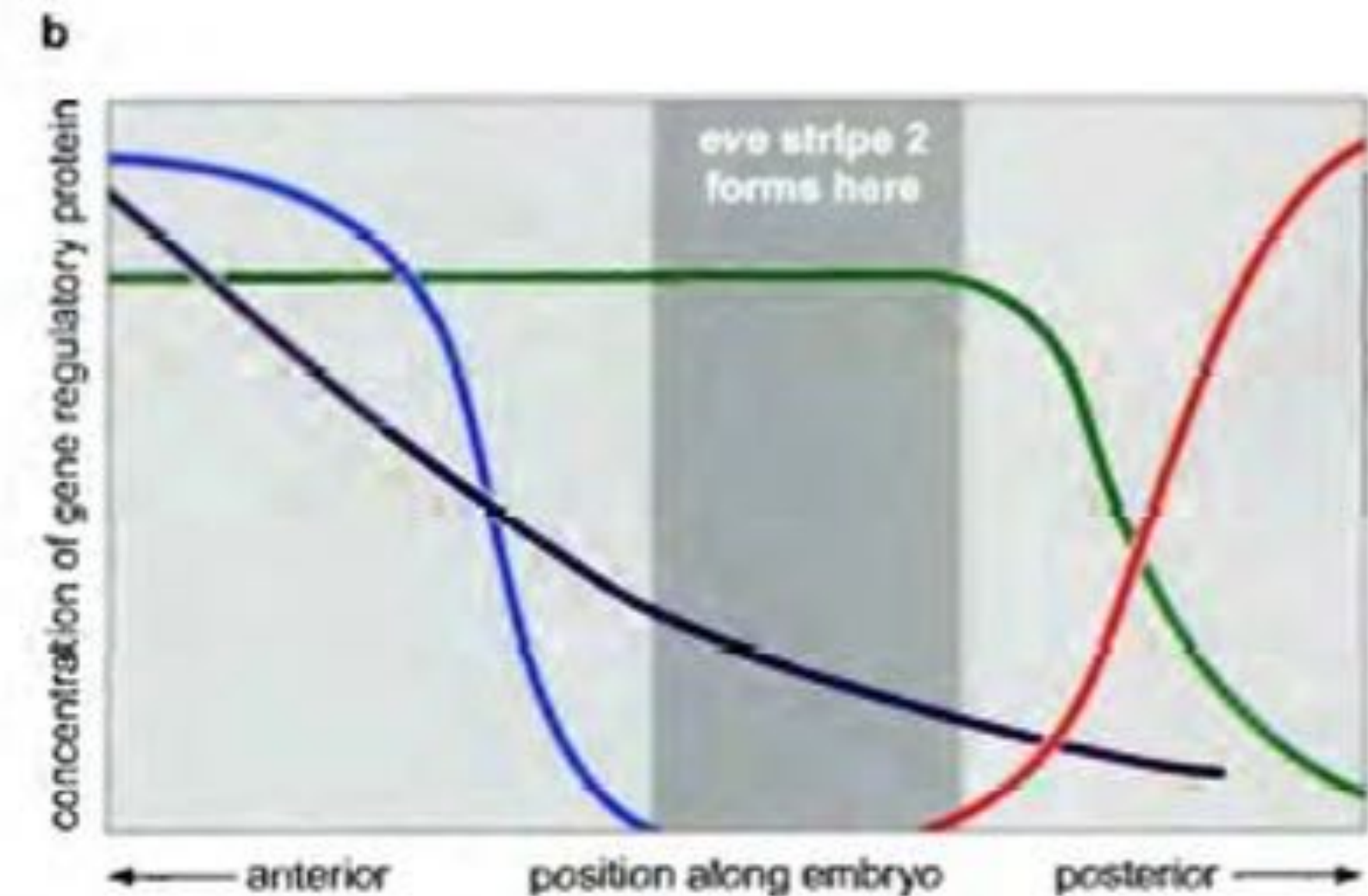
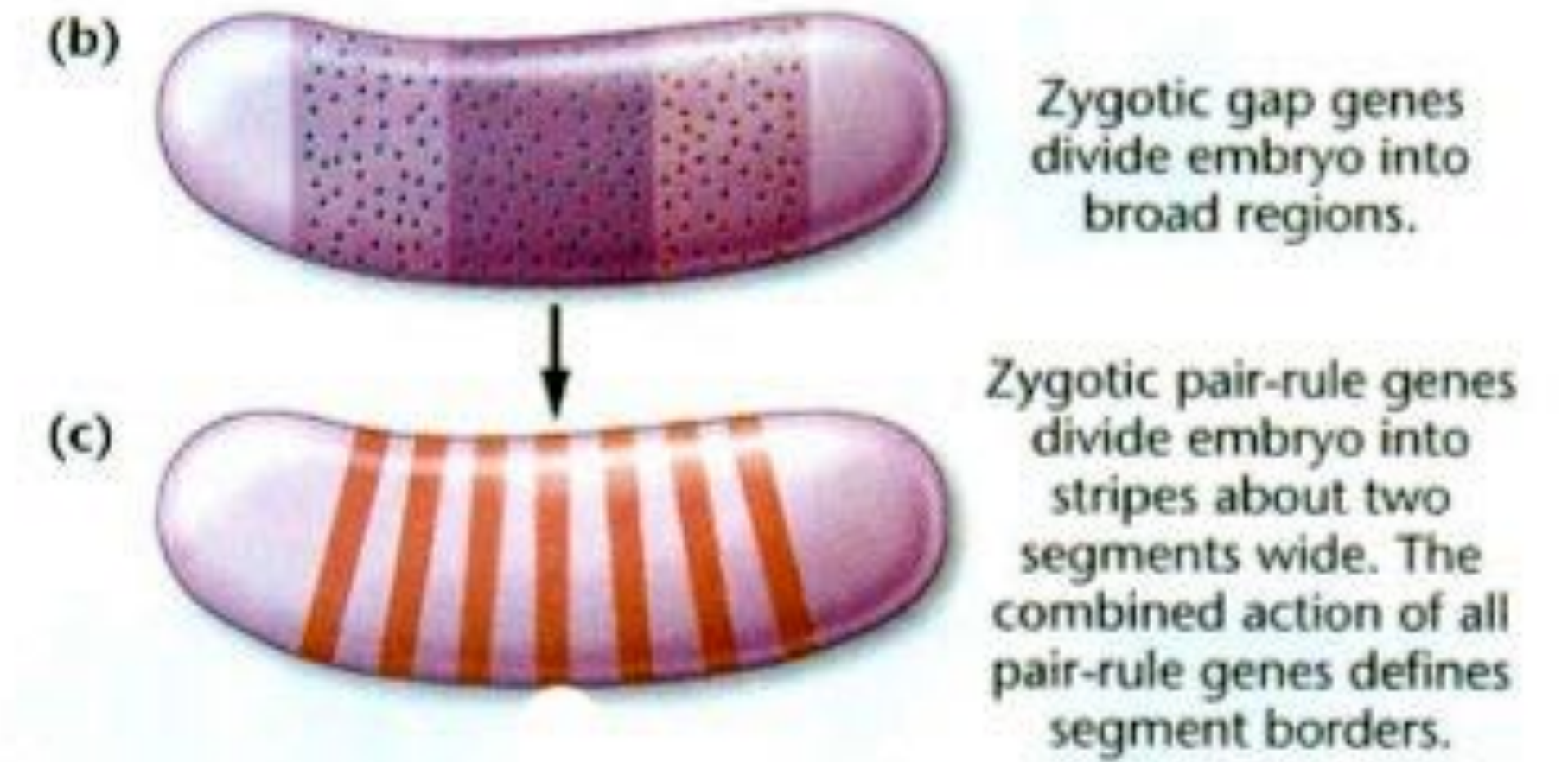


Geny reguły parzystej

- Dalszy podział na strefy – pary segmentów
- Mutacje powodują zaburzenia co drugiego segmentu
- Złożona regulacja kombinatoryczna przez geny ubytku i hunchback



Obszar regulatorowy even-skipped –
12 kb, enhancery determinujące każdą ze stref ekspresji



Geny polarności segmentów

- Wyznaczane przez oddziaływania genów reguły parzystej i innych genów polarności
- Np. engrailed: 14 segmentów zależnie od 6 genów reguły parzystej
- Ustalenie osi przód-tył każdego segmentu
- Krótkodystansowe oddziaływania na styku segmentów
- Poprzez szlaki transdukcji sygnału
 - Np. engrailed -> hedgehog

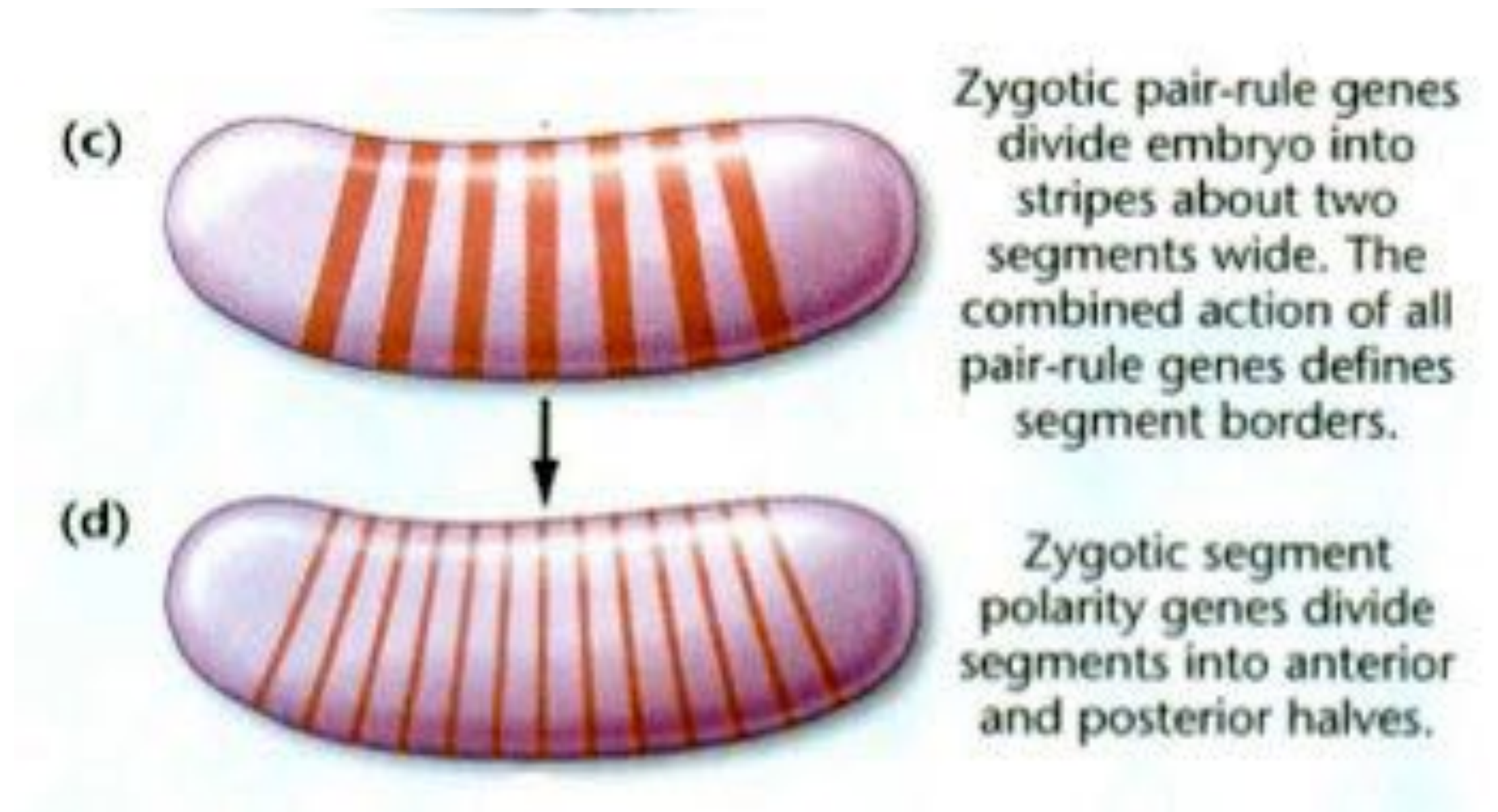
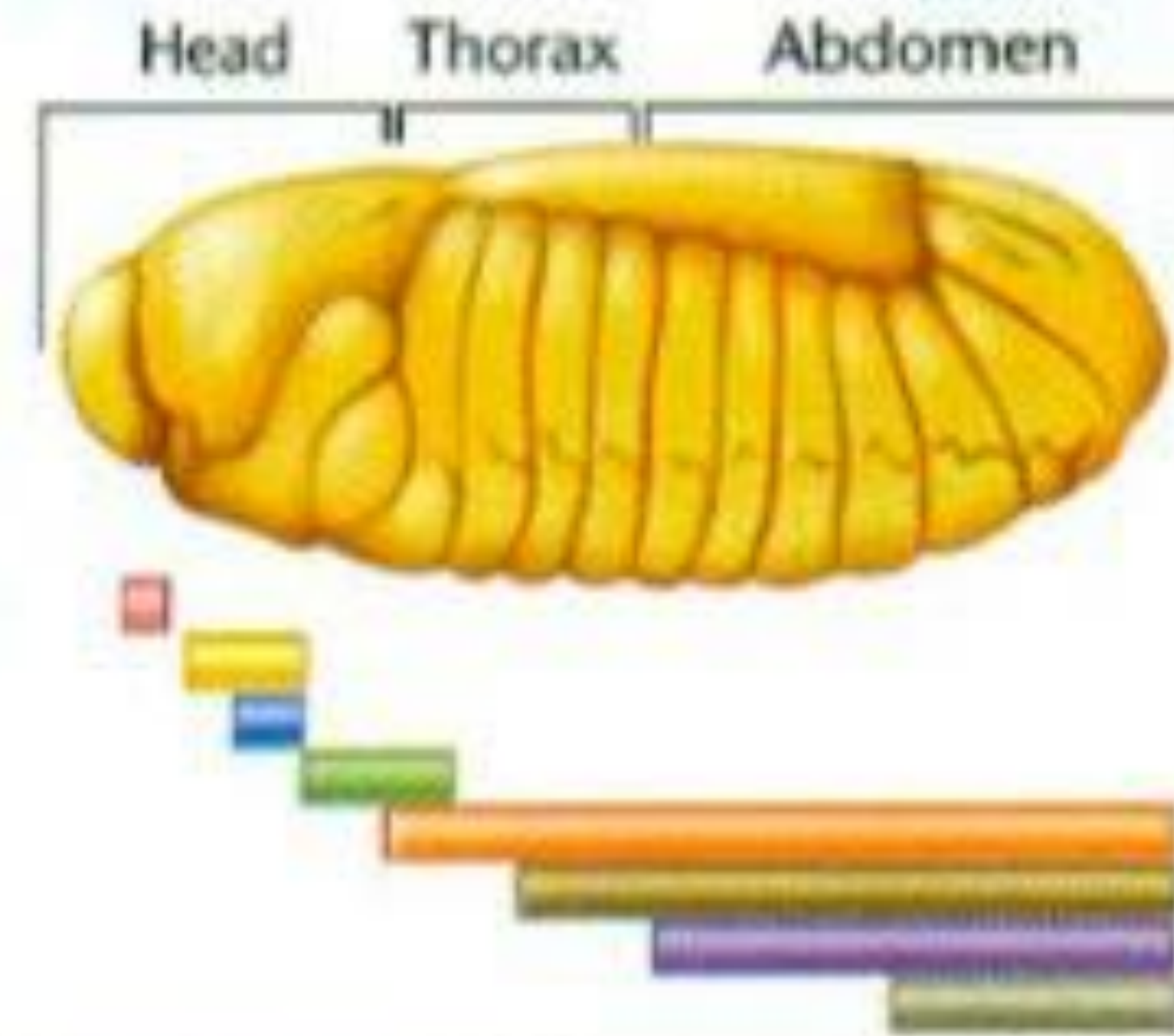


FIGURE 23-14 The 14 stripes of expression of the segment polarity gene *engrailed* in a *Drosophila* embryo.

Geny homeotyczne

- Ekspresja w segmentach zależna od aktywności genów reguły parzystej i polarności segmentu
- Czynniki transkrypcyjne (homeodomena – wiązanie DNA)
- Wyznaczają tożsamość segmentu
- Domeny ekspresji kolinearne z położeniem na chromosomie

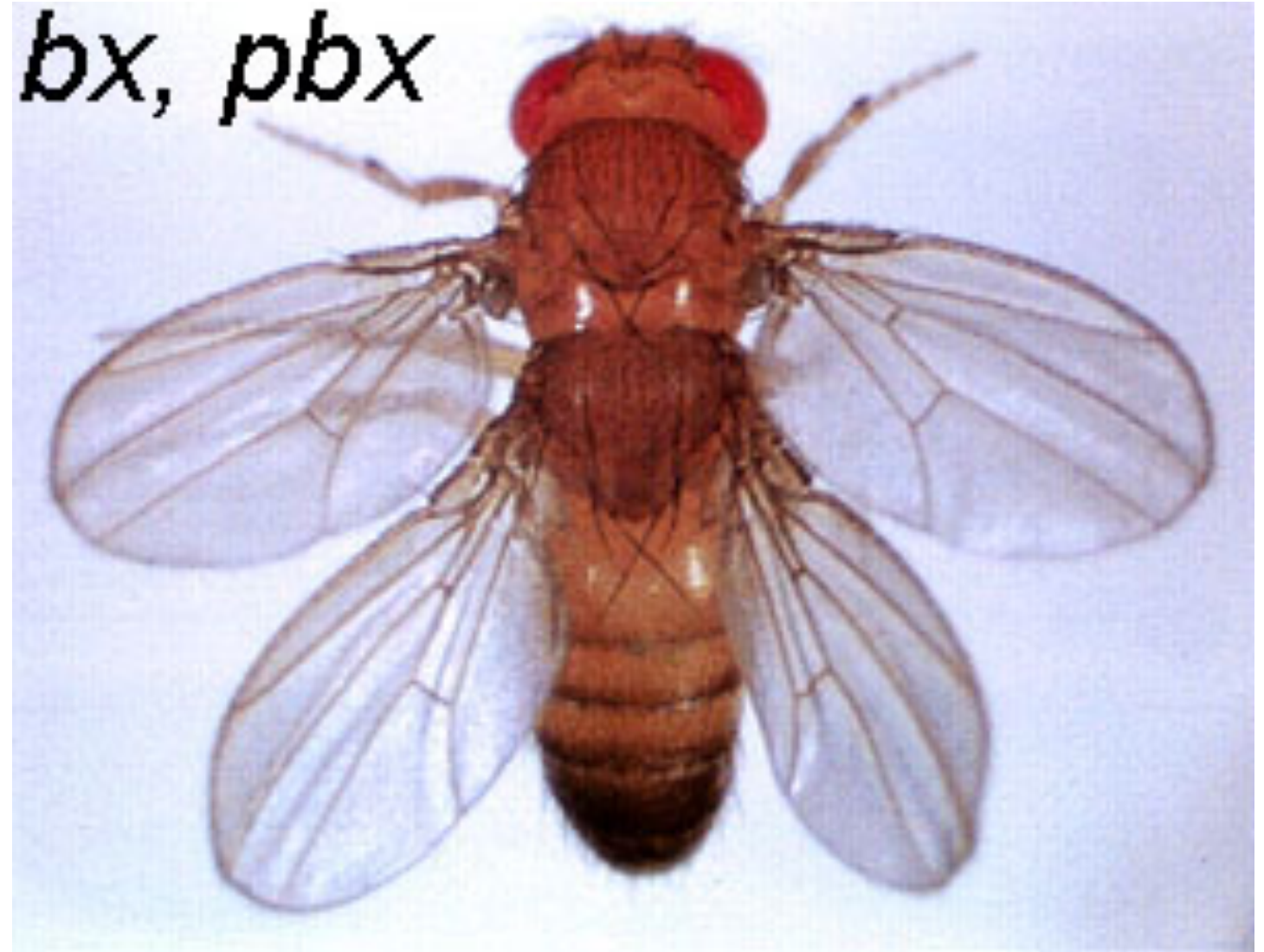
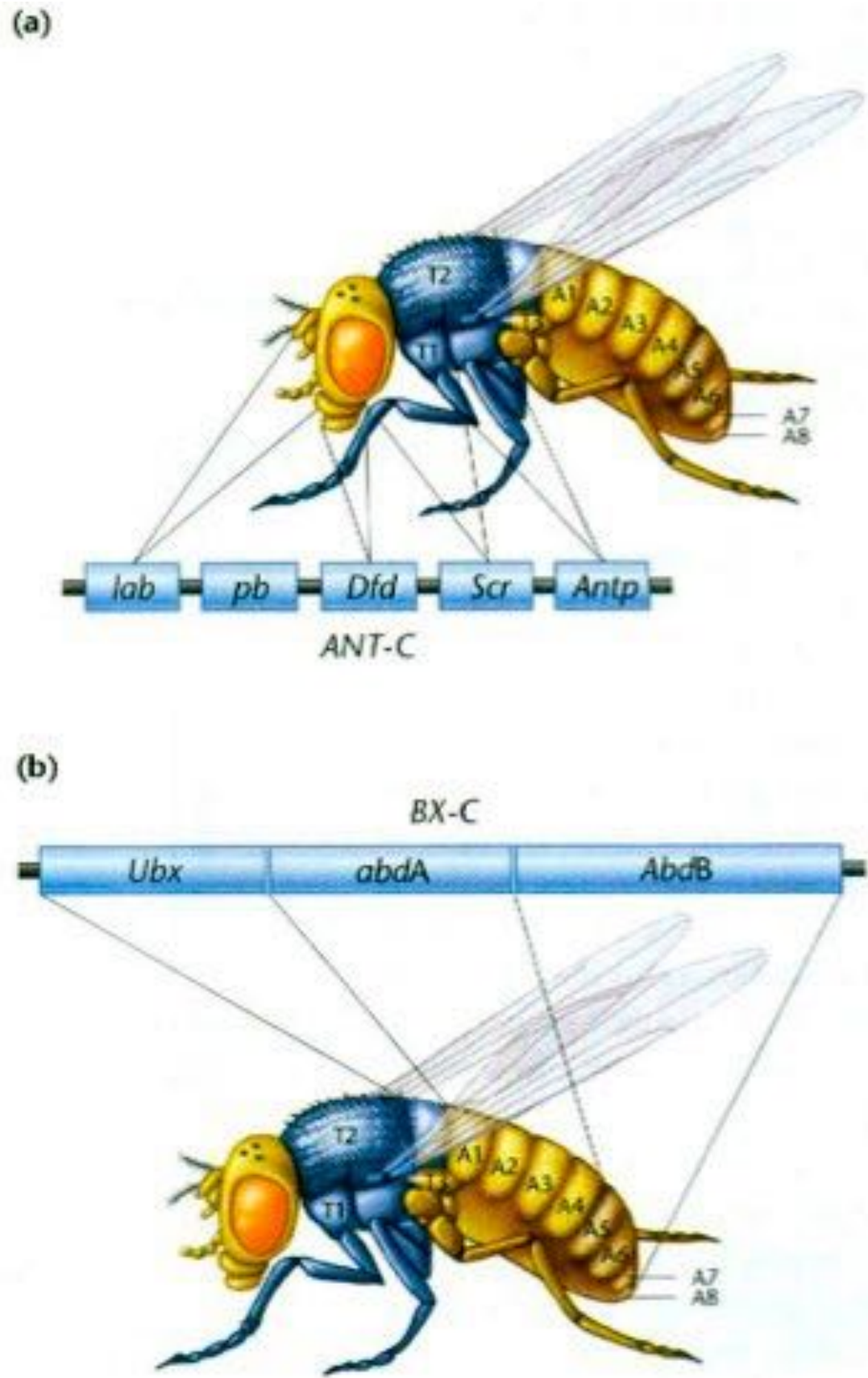
(a) Expression domains of homeotic genes



(b) Chromosomal locations of homeotic genes



Geny homeotyczne



Np. Antennapedia – zestaw 5 genów, Bithorax – 3 geny

Geny homeotyczne są konserwowane w ewolucji

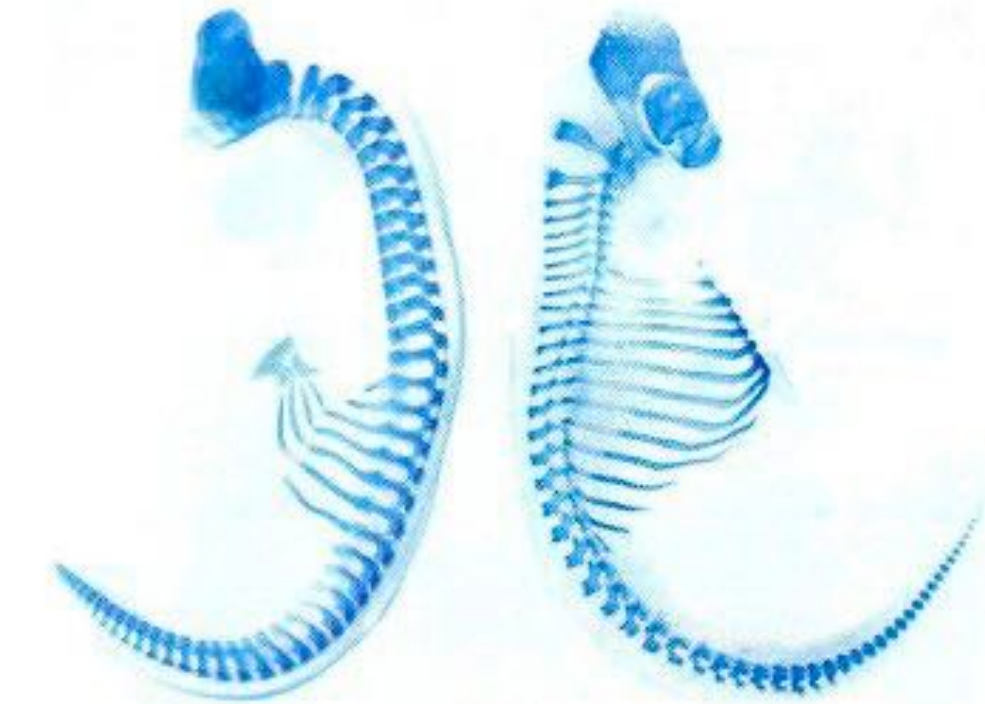
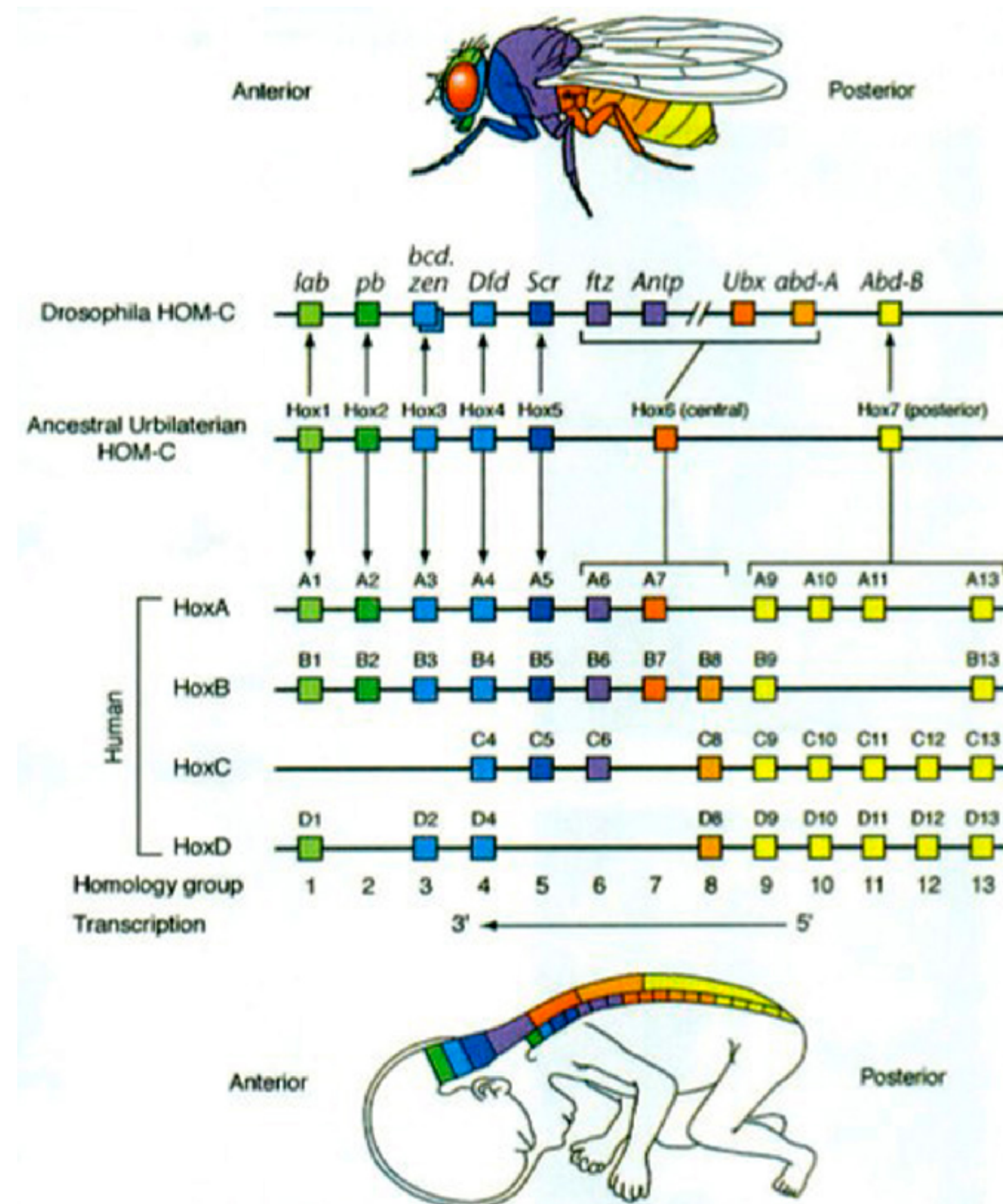


FIGURE 23-19 Patterns of *Hox* gene expression control the formation of structures along the anterior-posterior axis of bilaterally symmetrical animals in a species-specific manner. In the chick (left) and the mouse (right) expression of the same set of *Hox* genes is differentially programmed in time and space to produce different body forms.

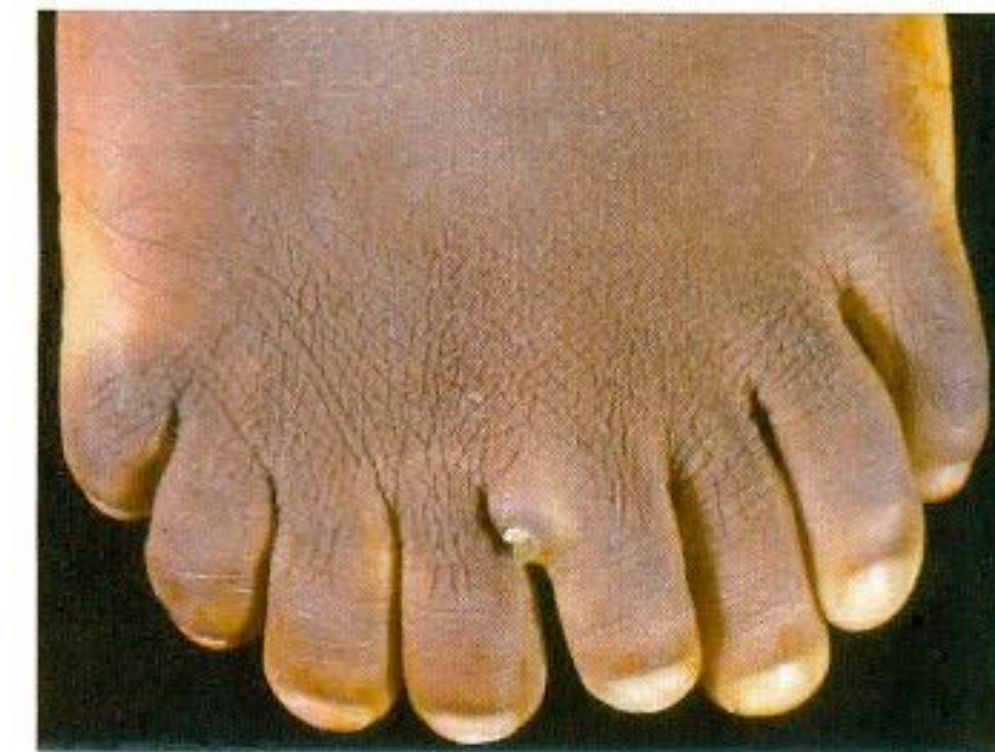
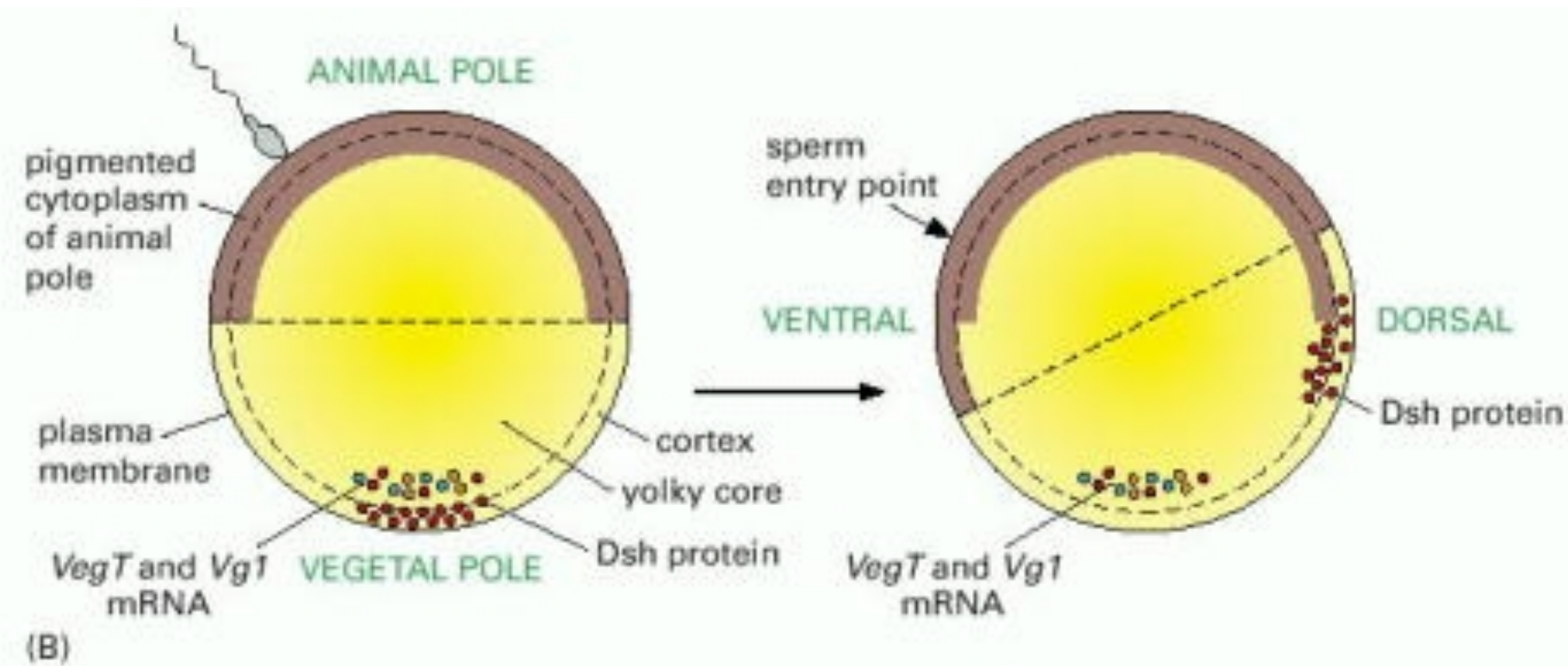
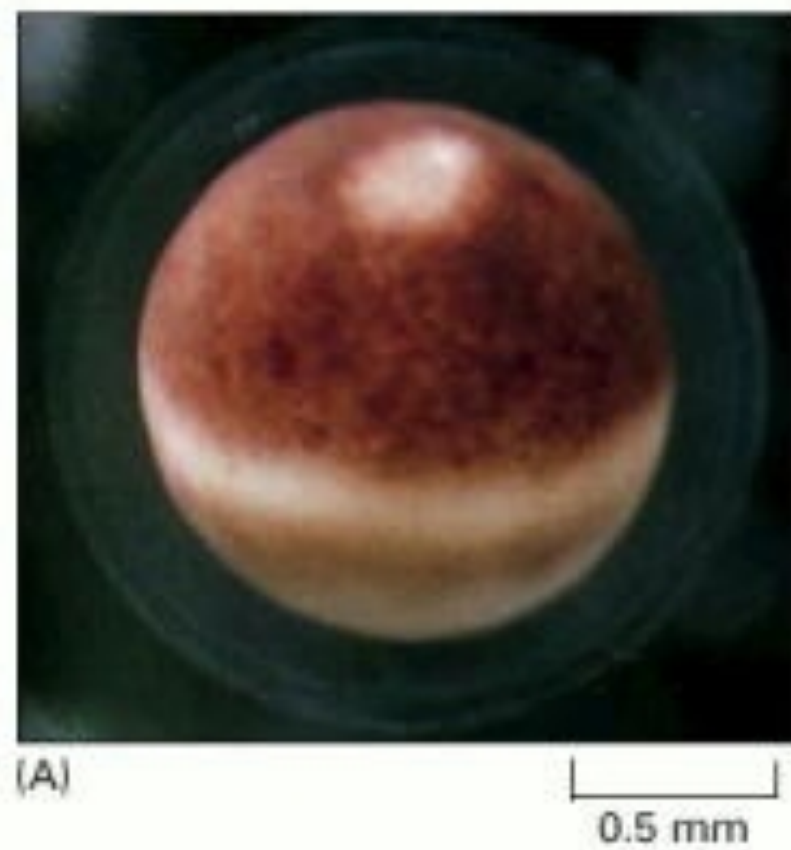


FIGURE 23-20 Mutations in posterior *Hox* genes (*HoxD13* in this case) in humans result in malformations of the limbs, shown here as extra toes. This condition is known as synpolydactyly. Mutations in *HoxD13* are also associated with abnormalities of the bones in the hands and feet.

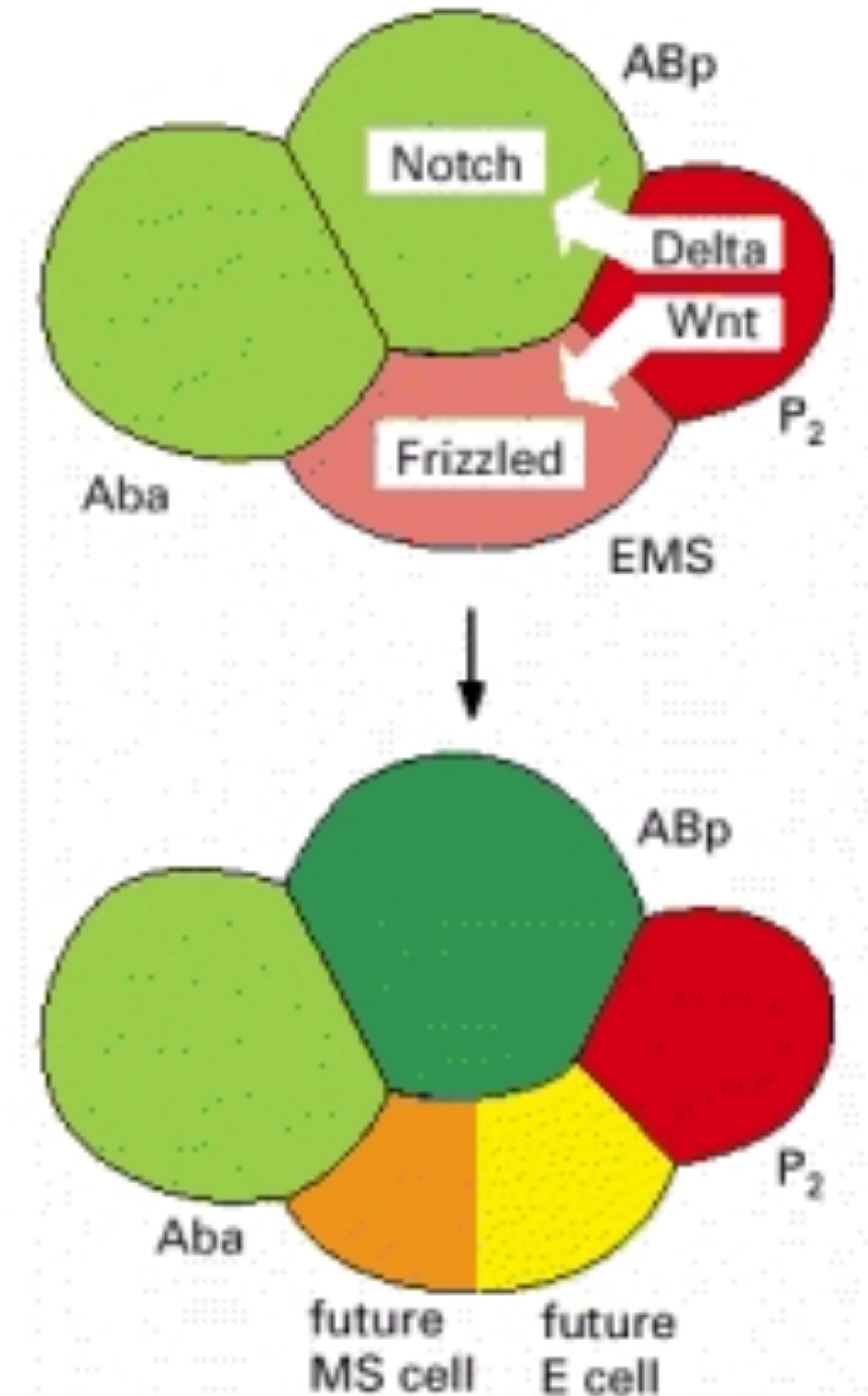
Rozwój u innych organizmów

- Ogólne zasady są wspólne
 - gradienty morfogenów
 - szlaki transdukcji (często zachowana homologia, np. hedgehog)
- lokalizacja RNA w oocycie (np. *Xenopus*)



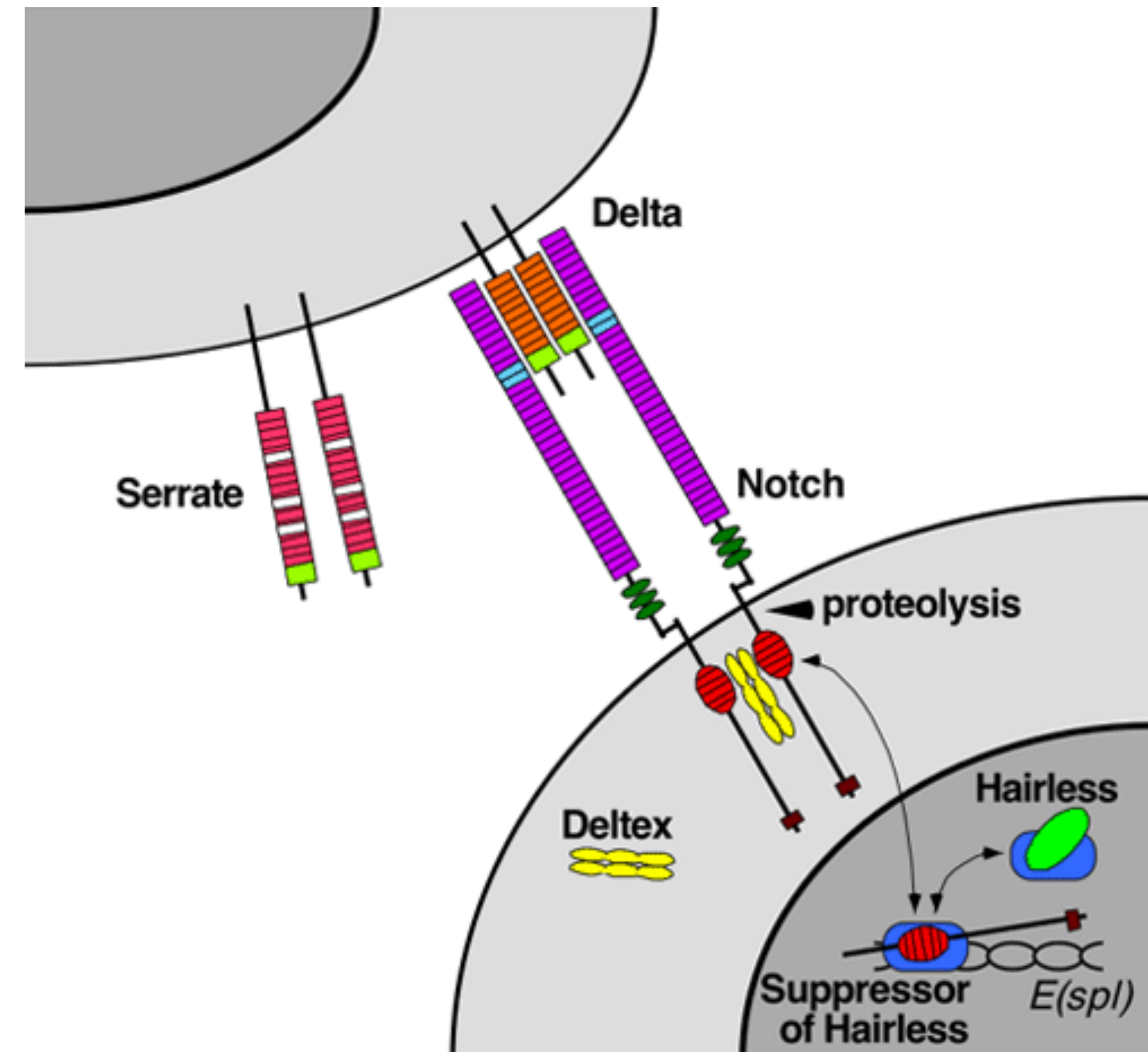
Przekazywanie sygnału a rozwój

- Inne niż stawonogi organizmy, np. *C. elegans* i kręgowce nie mają fazy syncytialnej zarodka
- Geny i mRNA matczyne determinują polarność komórki jajowej
- Później przepływ informacji przez interakcje i ruch komórek
- Za pośrednictwem szlaków transdukcji sygnału
- Istotna rola apoptozy

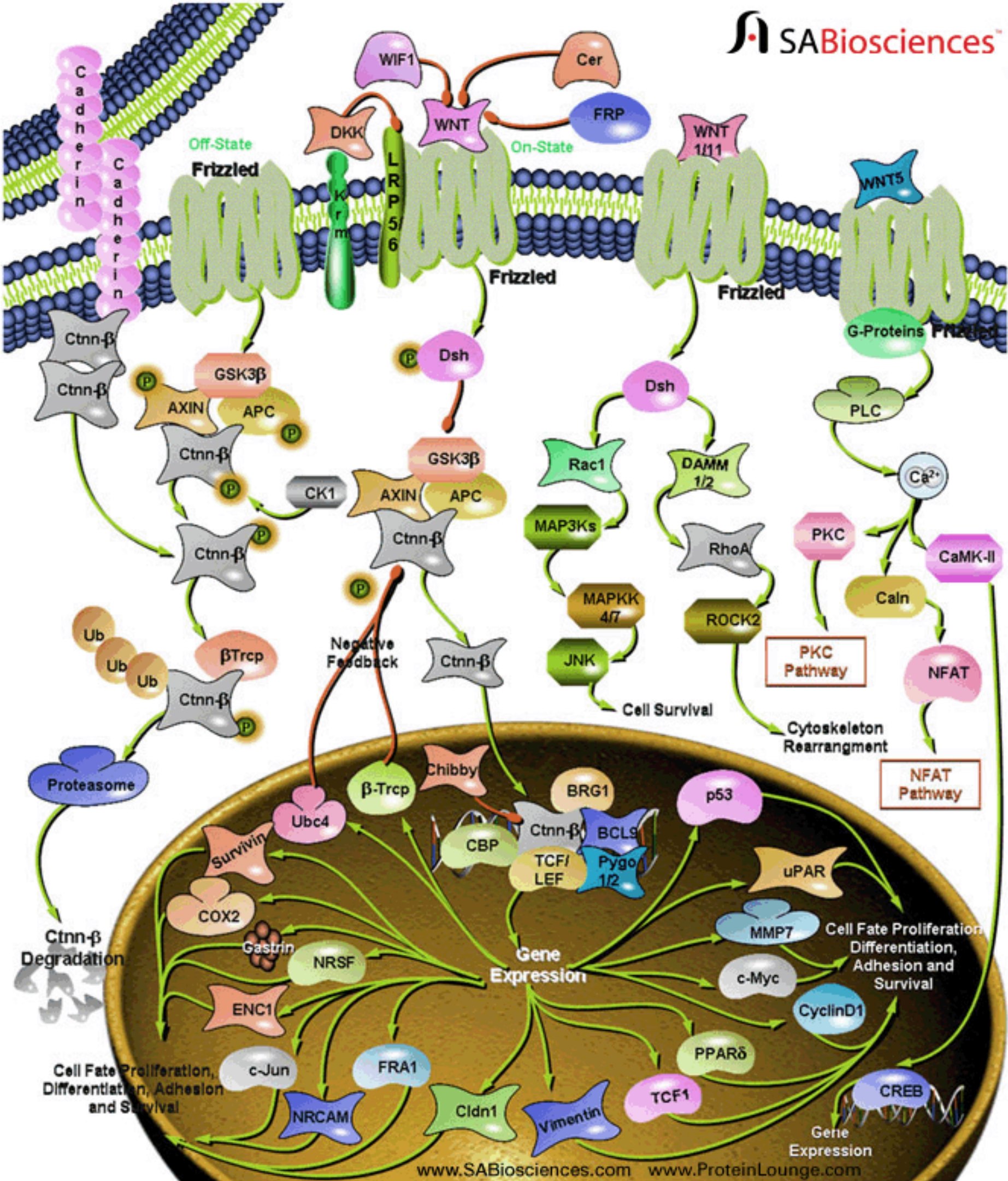


Szlaki transdukcji sygnału w rozwoju

- Komunikacja między komórkami w rozwoju – kilka klas szlaków transdukcji sygnału konserwowanych w ewolucji
 - Hedgehog
 - Wnt
 - TGF- β
 - receptorowe kinazy tyrozynowe
 - Notch
 - JAK/STAT
 - hormony jądrowe (sterydowe, np. kwas retinowy)
- Kluczowa jest zawsze kombinatoryka



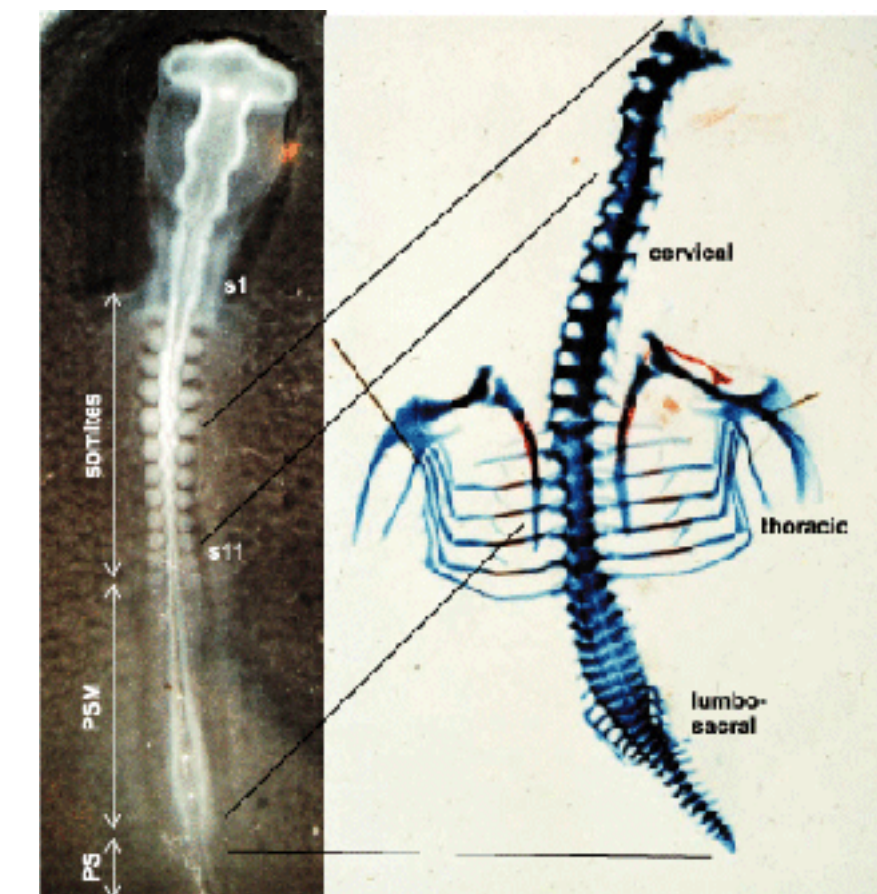
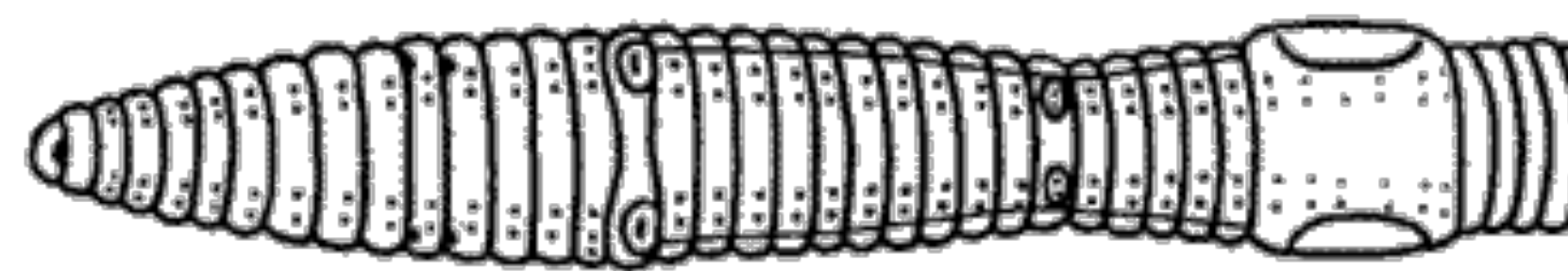
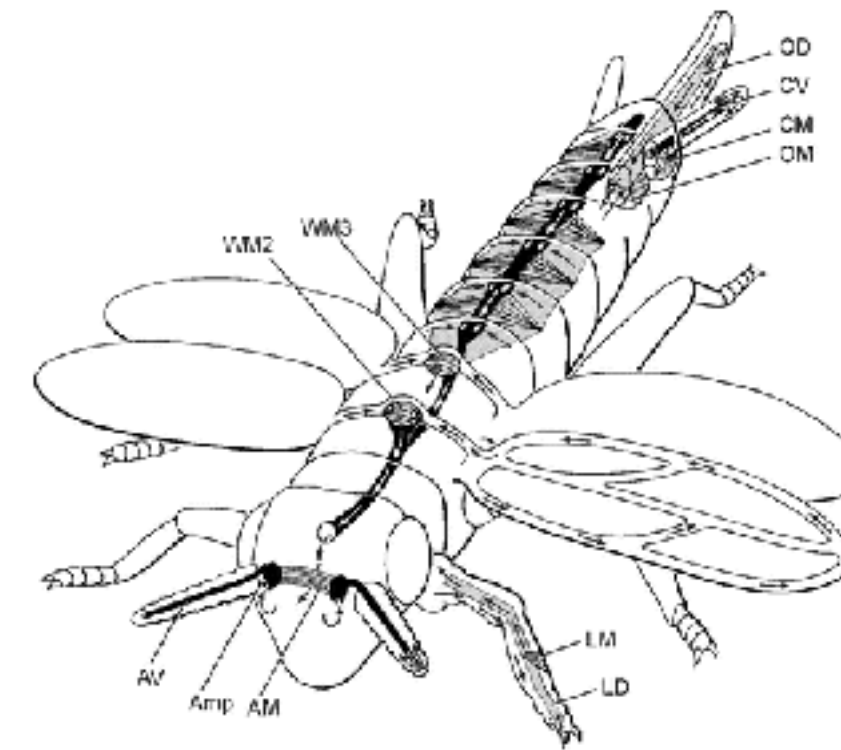
Systemy transdukcji mogą być złożone



Szlak Wnt

Metameria

- Podstawą różnicowania wielu grup jest struktura powtarzających się segmentów
 - Takich samych
 - Zróżnicowanych (dzięki genom Hox)



Oscylator w rozwoju kręgowca – “zegar i czoło fali”

- Cooke & Zeeman 1976
- Oscylacje + ruch (np. wzrost)

(Polezhaev, J Theor Biol v 156, p 169, 1992):

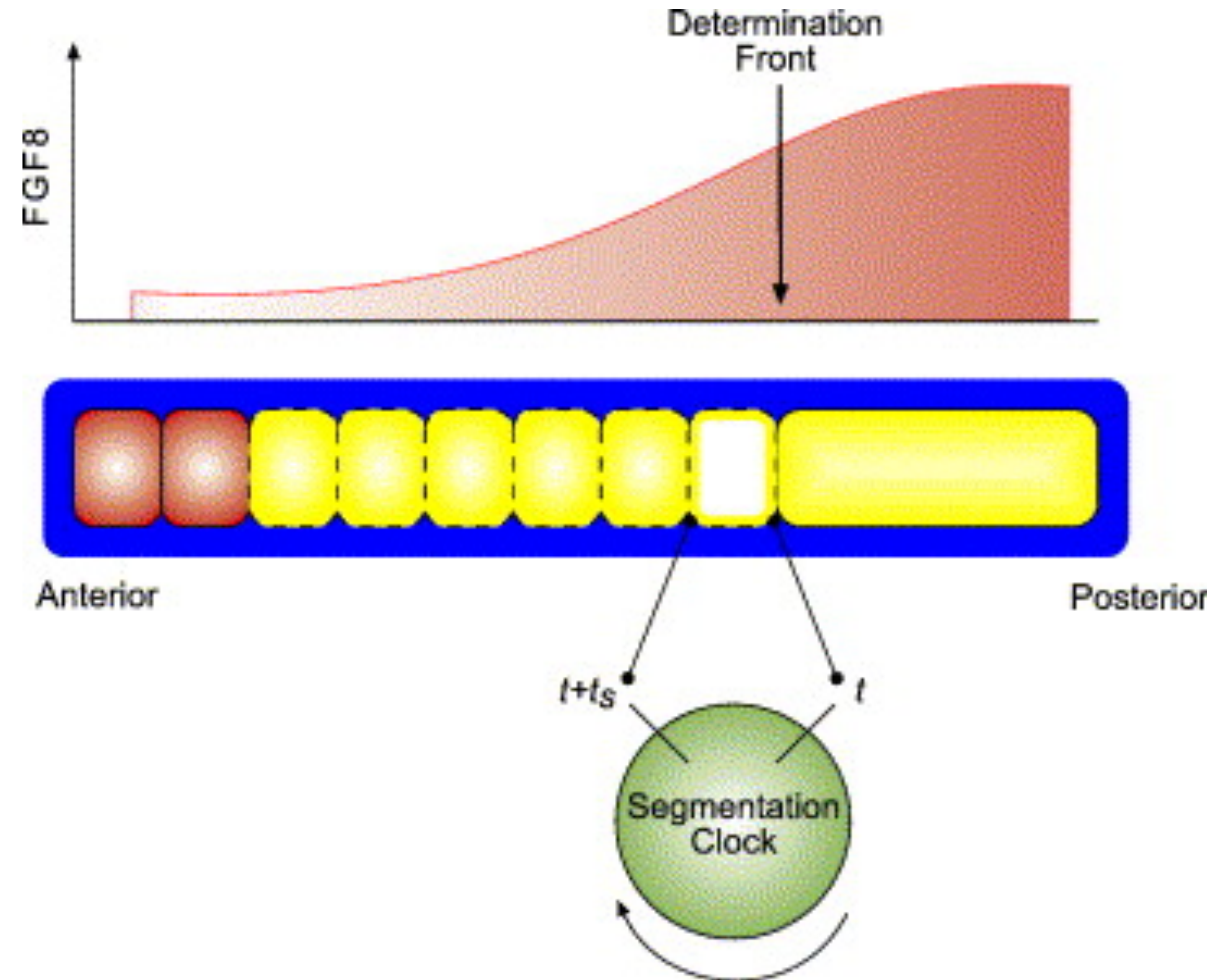
$$\frac{\partial a}{\partial t} = \frac{M}{T} \cdot \theta(vt - r) \cdot \theta(h_0 - h(t - t_0))$$

$$\frac{\partial h}{\partial t} = ka - dh + D \frac{\partial^2 h}{\partial r^2}$$

$$a(0, r) = h(0, r) = 0, \quad r \in [0, L]$$

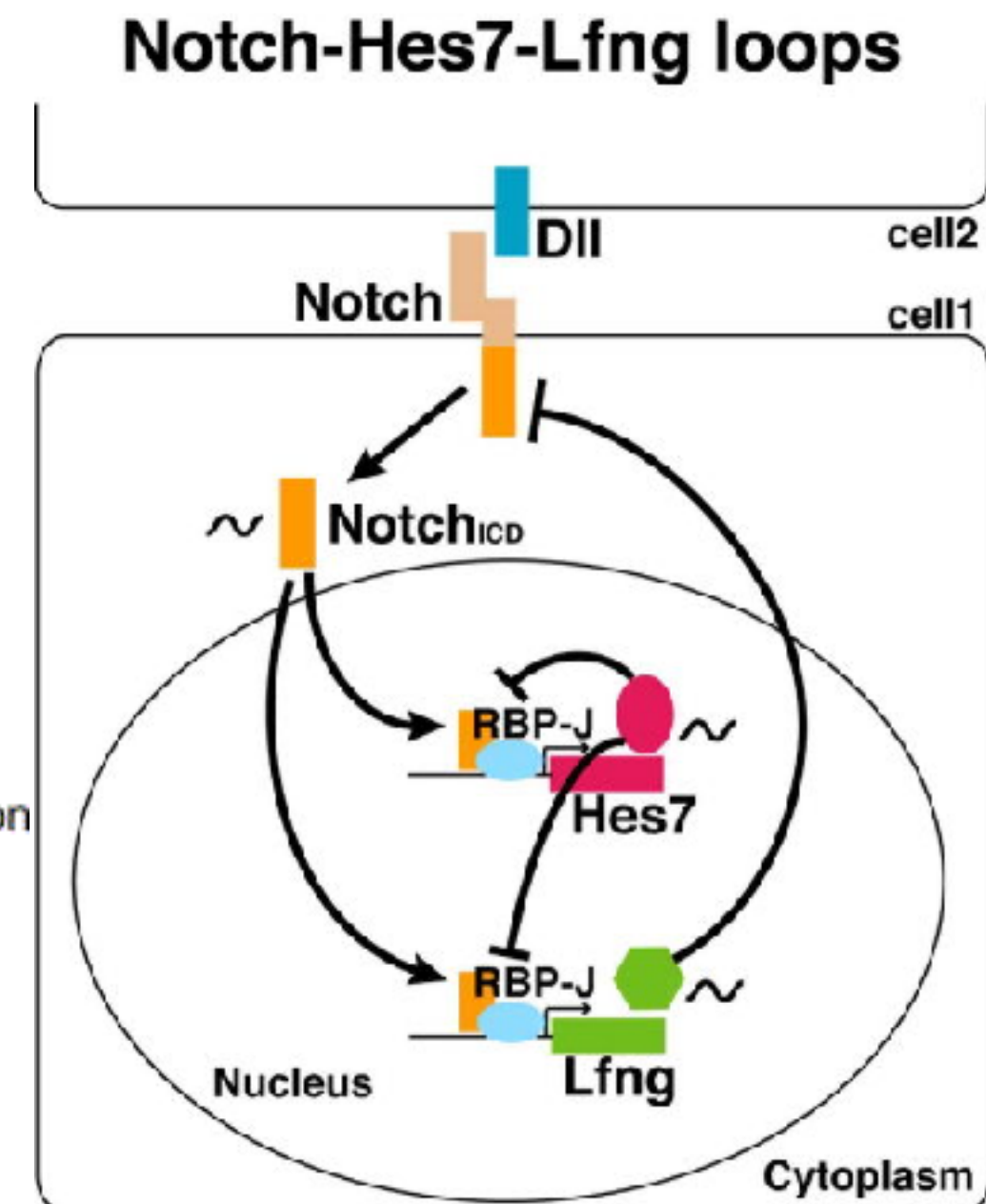
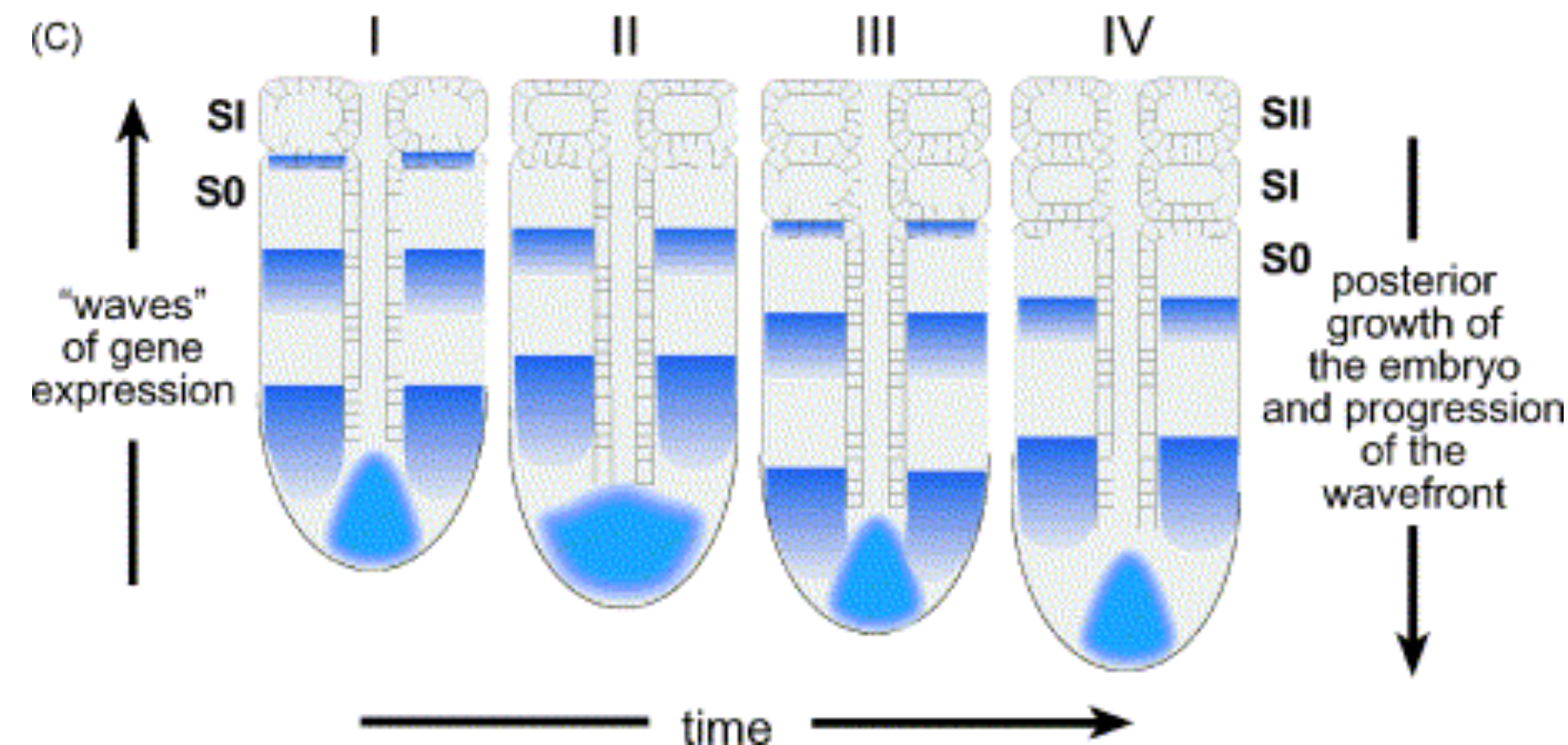
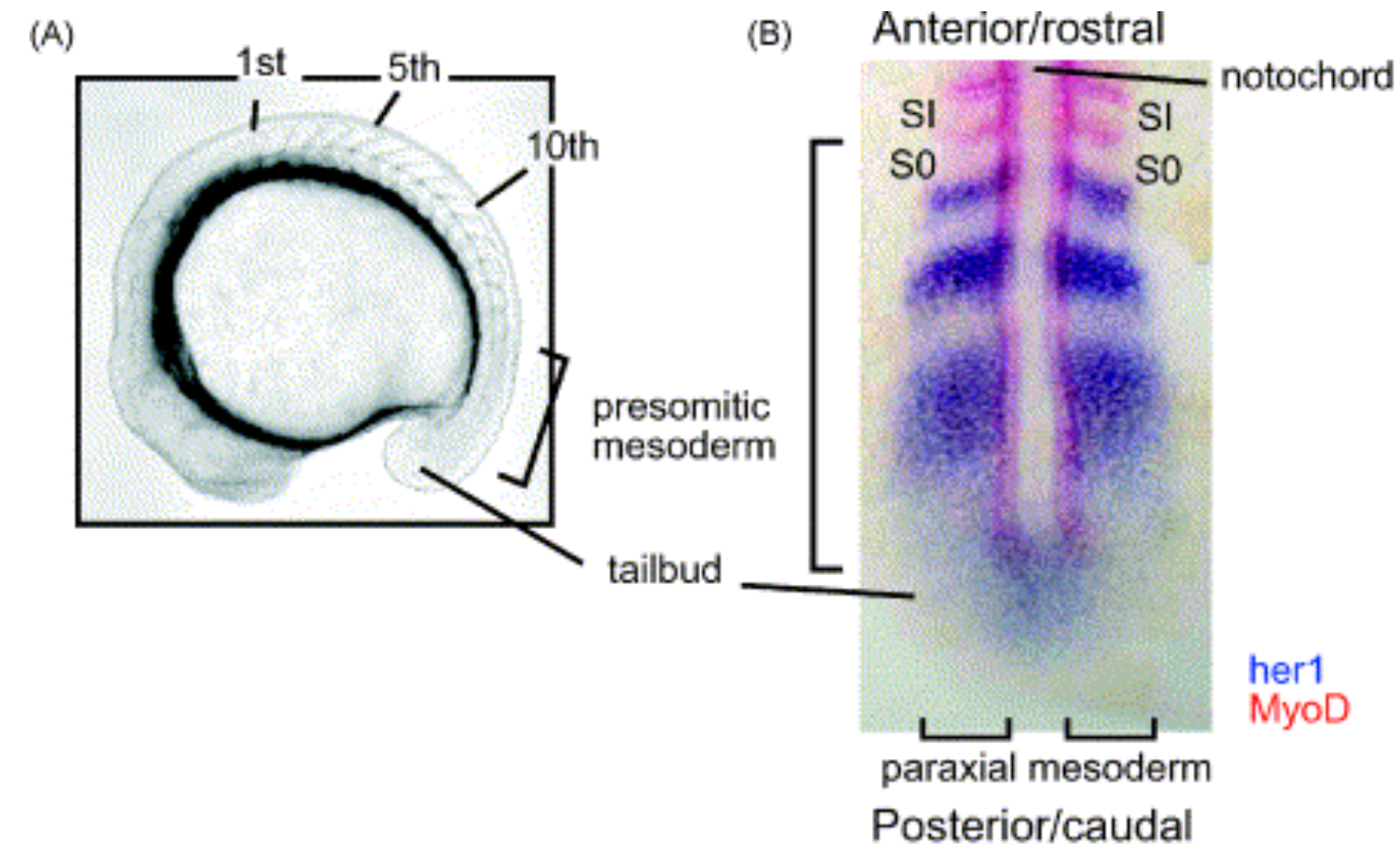
$$\frac{\partial h}{\partial r}(t, 0) = \frac{\partial h}{\partial r}(t, L) = 0$$

$$\theta(x) = 1 \text{ for } x \geq 0 \text{ and } 0 \text{ otherwise}$$

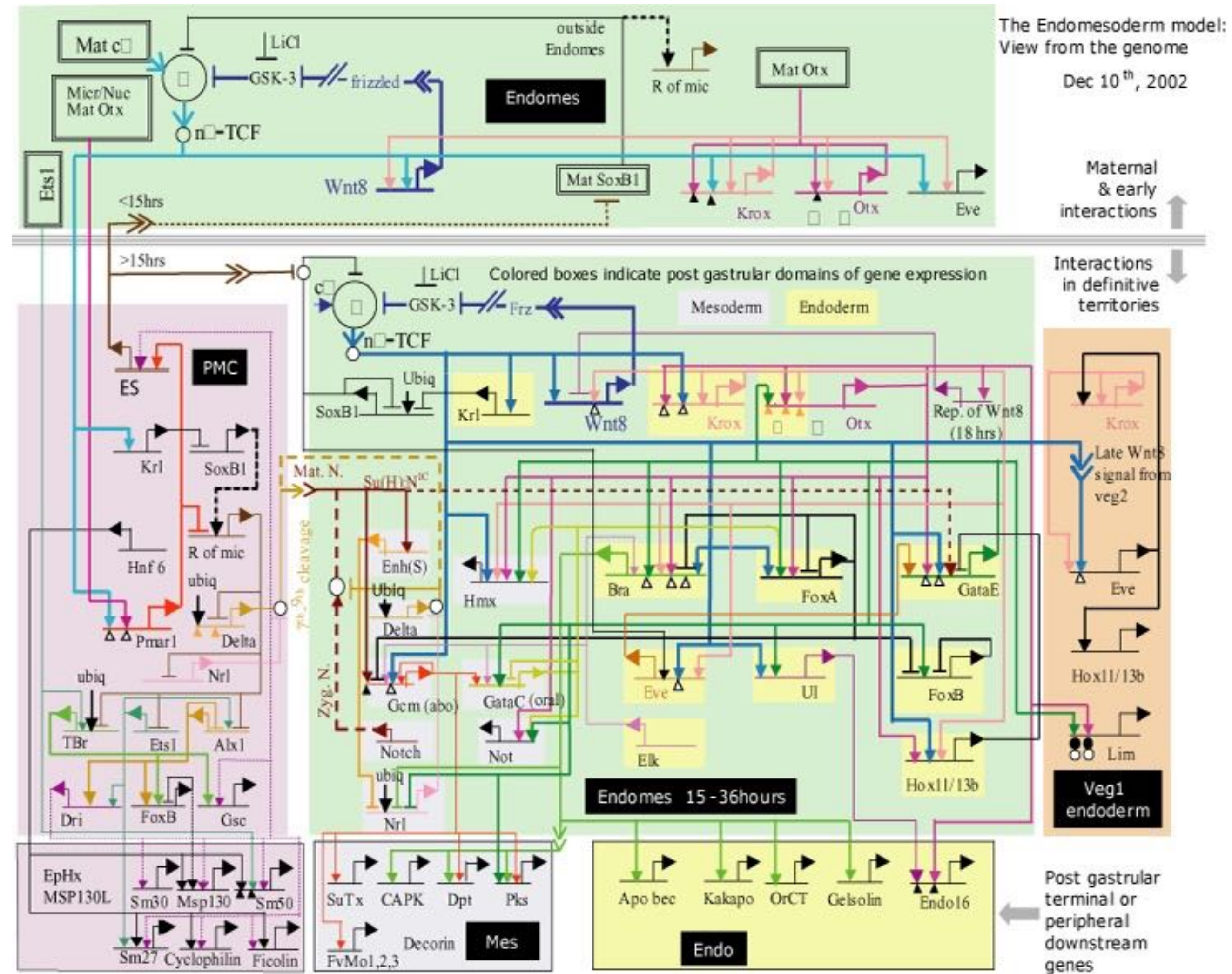


Oscylator w rozwoju kręgowca – “zegar i czoło fali”

- Strefy generowane przez oscylatory (np. rozwój somitów *D. rerio*, myszy itp.)
- oscylacje Her/hes (regulator transkrypcji)
- sygnalizacja Notch
- pętle ujemnego sprzężenia zwrotnego



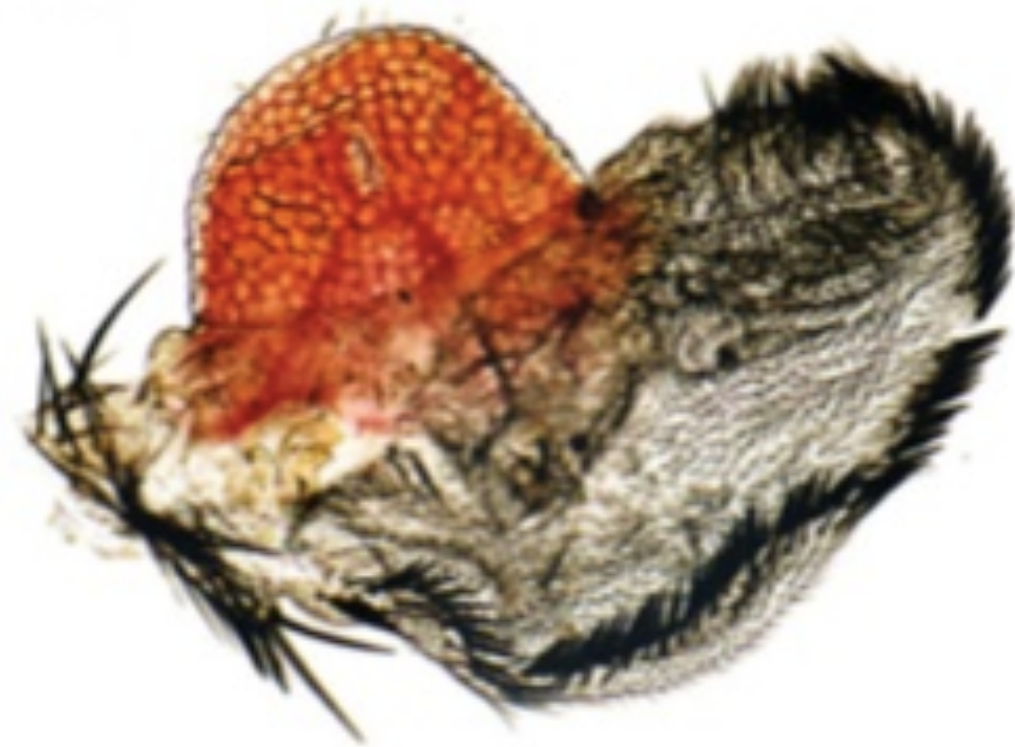
Sieci regulacji są bardzo złożone



Rozwój endomezodermu jeżowca (<http://sugp.caltech.edu/endomes/>)

Głęboka homologia

- Niektóre szlaki regulatorowe kierują rozwojem podobnych struktur u bardzo odległych organizmów
- Np. Pax6 – rozwój oczu



Gehring WJ (2012) The animal body plan, the prototypic body segment, and eye evolution. *Evolution & Development* 14(1):34-36.

Monteiro A (2012) Gene regulatory networks reused to build novel traits. *Bioessays* 34:181-186.

