

---

# Regulacja transkrypcji genów eukariotycznych

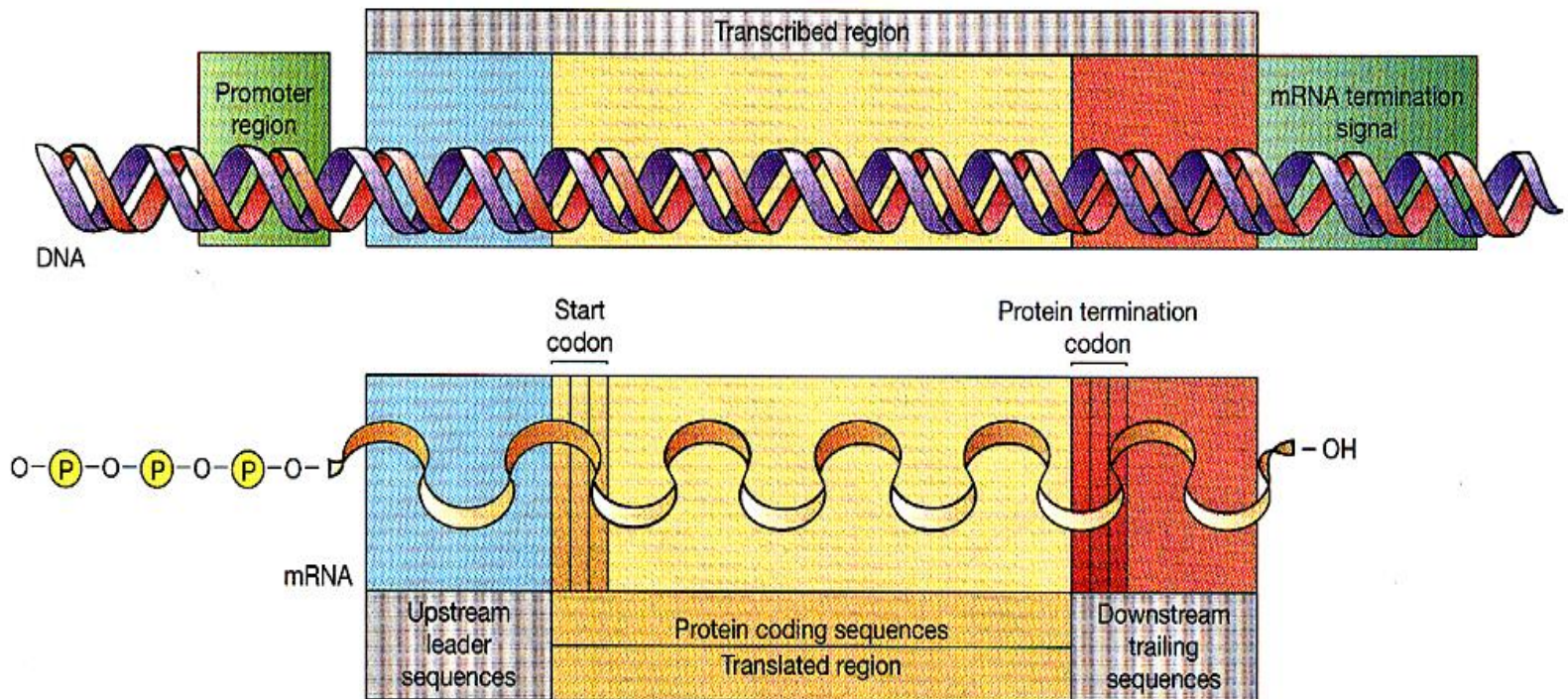
Dr hab. Marta Koblowska, prof. UW

Zakład Biologii Systemów, Wydział Biologii UW

Pracownia Analiz Mikromacierzy i Sekwencjonowania UW/IBB PAN

---

# Klasyczne wyobrażenie genu – fragment DNA, który koduje mRNA



---

## Definicja genu

GEN– podstawowa jednostka dziedziczenia

Region DNA, który określa charakterystyczną dziedziczną cechę organizmu;

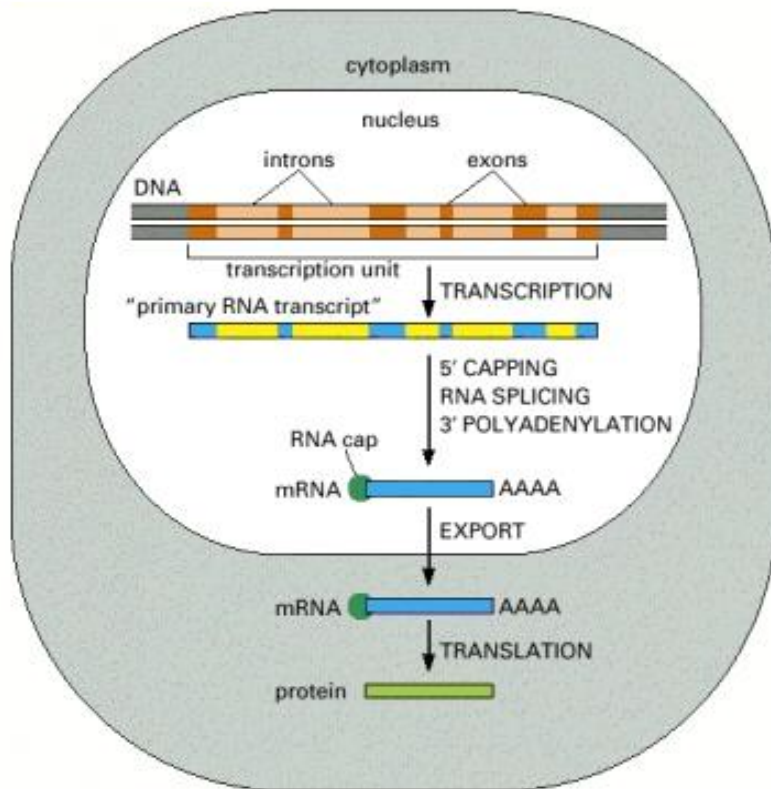
zwykle koduje pojedyncze białko lub RNA. Zawiera całą funkcjonalną podjednostkę wraz z sekwencją kodującą, niekodującymi sekwencjami regulatorowymi DNA oraz z intronami.

---

## Współczesne definicje odnoszą się do produktu, jakim jest funkcjonalny transkrypt i nie biorą pod uwagę białka

- Jak zawsze w biologii, istnieją wyjątki.
  - *Trans-splicing*: Istnieją geny ‘ w kawałkach’. Transkrypt pochodzący z jednego fragmentu jest łączony z transkryptem z innego fragmentu, aby mógł powstać funkcjonalny RNA.
  - *Geny nakładające się*: Niektóre ‘geny’ nakładają się. Oznacza to, że pojedynczy fragment DNA może być częścią dwóch lub nawet trzech genów.
  - *Redagowanie RNA*: Niekiedy pierwotny transkrypt ulega intensywnemu redagowaniu zanim stanie się transkryptem funkcjonalnym. W najbardziej skrajnych przypadkach dochodzi do wstawiania lub usuwania nukleotydów. Oznacza to, że zawartość informacyjna ‘genu’ jest niepełna dla zapewnienia jego funkcjonalności i musi być uzupełniona z udziałem innych ‘genów’
-

# Geny eukariotyczne



- Proces ekspresji genu składa się z wielu etapów
- Na każdym z etapów możliwe działanie regulacyjne
- Procesy transkrypcji i translacji są rozdzielone w przestrzeni i czasie
- Informacja kierująca syntezą białka może być modyfikowana po transkrypcji (alternatywne składanie, redagowanie) – złożoność proteomu przekracza złożoność genomu

---

# Etapy ekspresji/poziomy regulacji

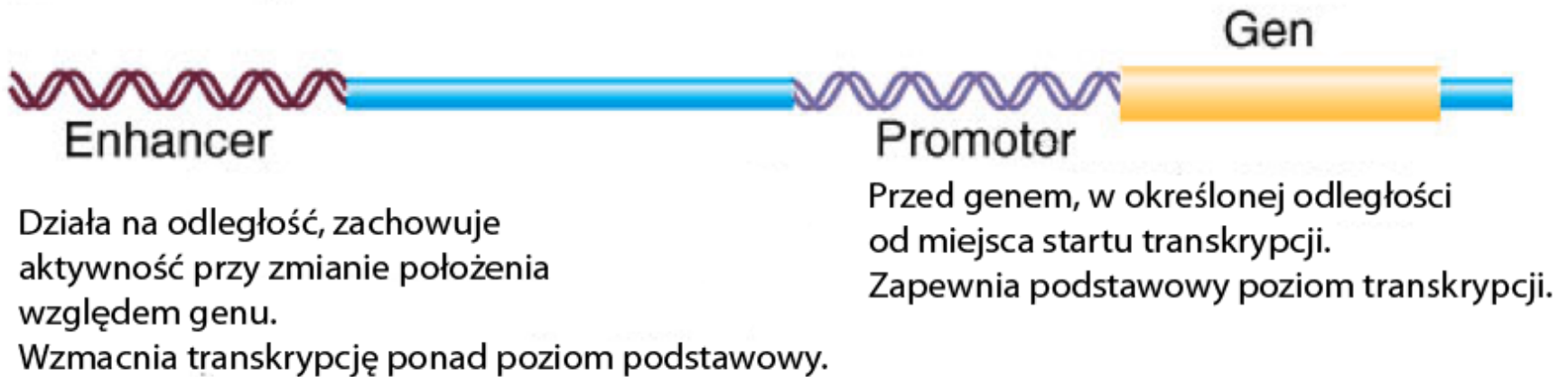
- struktura chromatyny
  - transkrypcja
  - obróbka i kontrola jakości RNA
  - transport RNA
  - degradacja RNA
  - translacja
  - modyfikacje post-translacyjne
  - degradacja białka
-

---

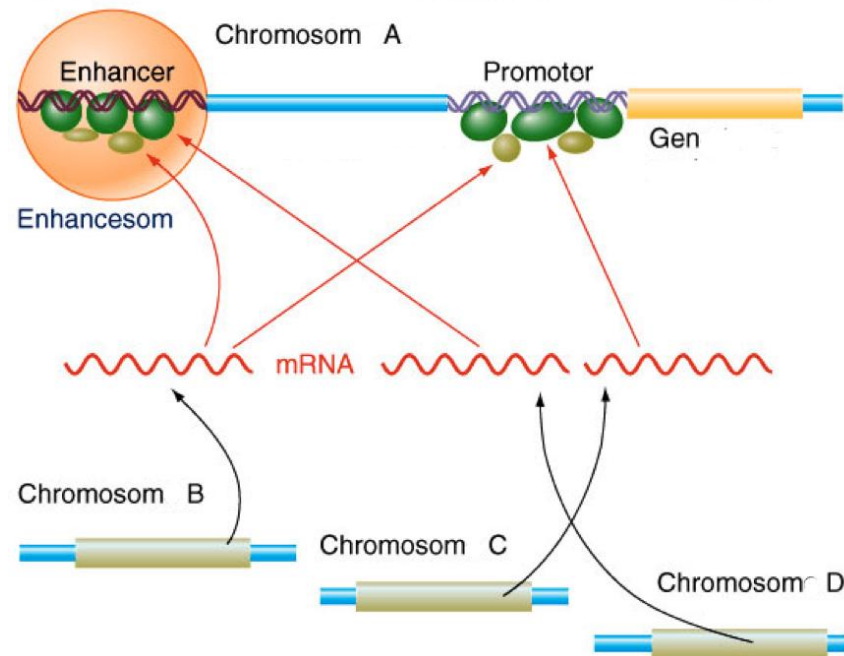
# Transkrypcja

- Kluczowym etapem regulacyjnym większości genów jest transkrypcja
  - Regulacja odbywa się z reguły na poziomie inicjacji transkrypcji
  - Czynniki *cis* – sekwencje regulatorowe w obrębie **promotorów** i **enhancerów** (wzmacniaczy)
  - Czynniki *trans* – białka wiążące się z sekwencjami regulatorowymi (elementami *cis*)
-

# Czynniki *cis*

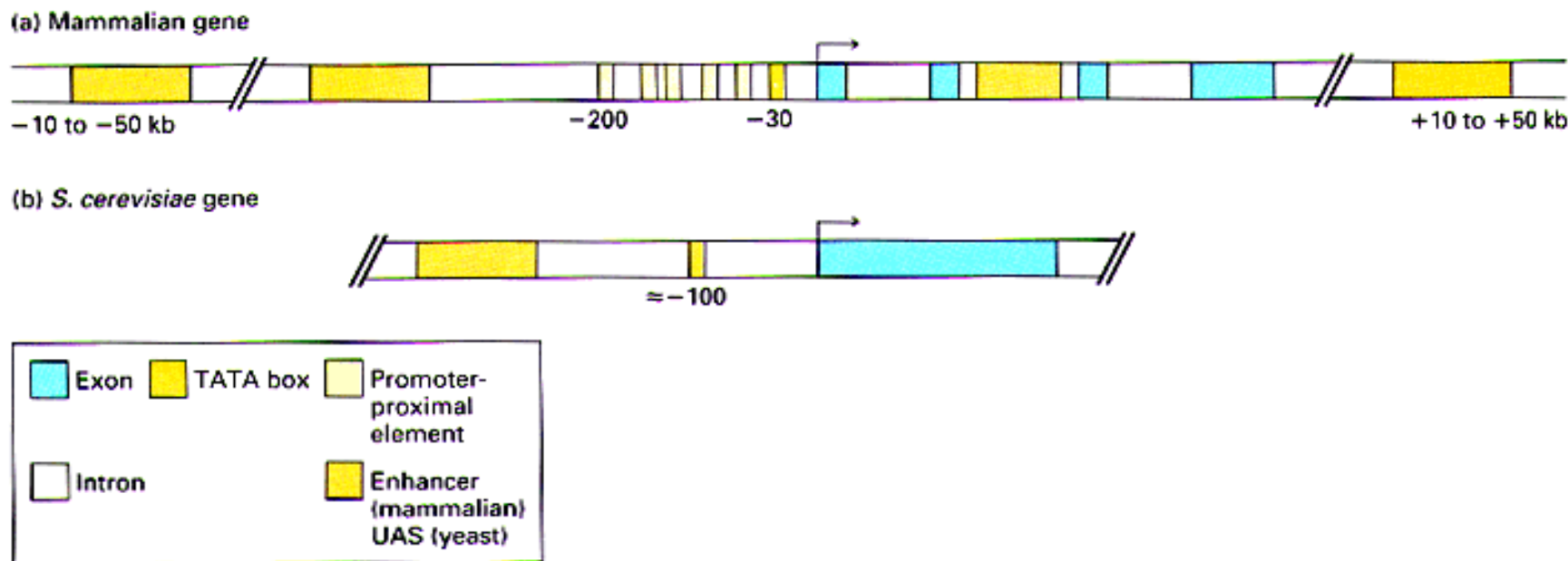


# Czynniki *trans*



Hartwell, Hood, Goldberg, Reynolds, Silver, Veres. Genetics. From Genes to Genomes. Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc.

# Rozmieszczenie sekwencji regulatorowych



Ekson - odcinek genu, który koduje sekwencje aminokwasów w białku

Intron - niekodujący odcinek genu, rozdziela eksony

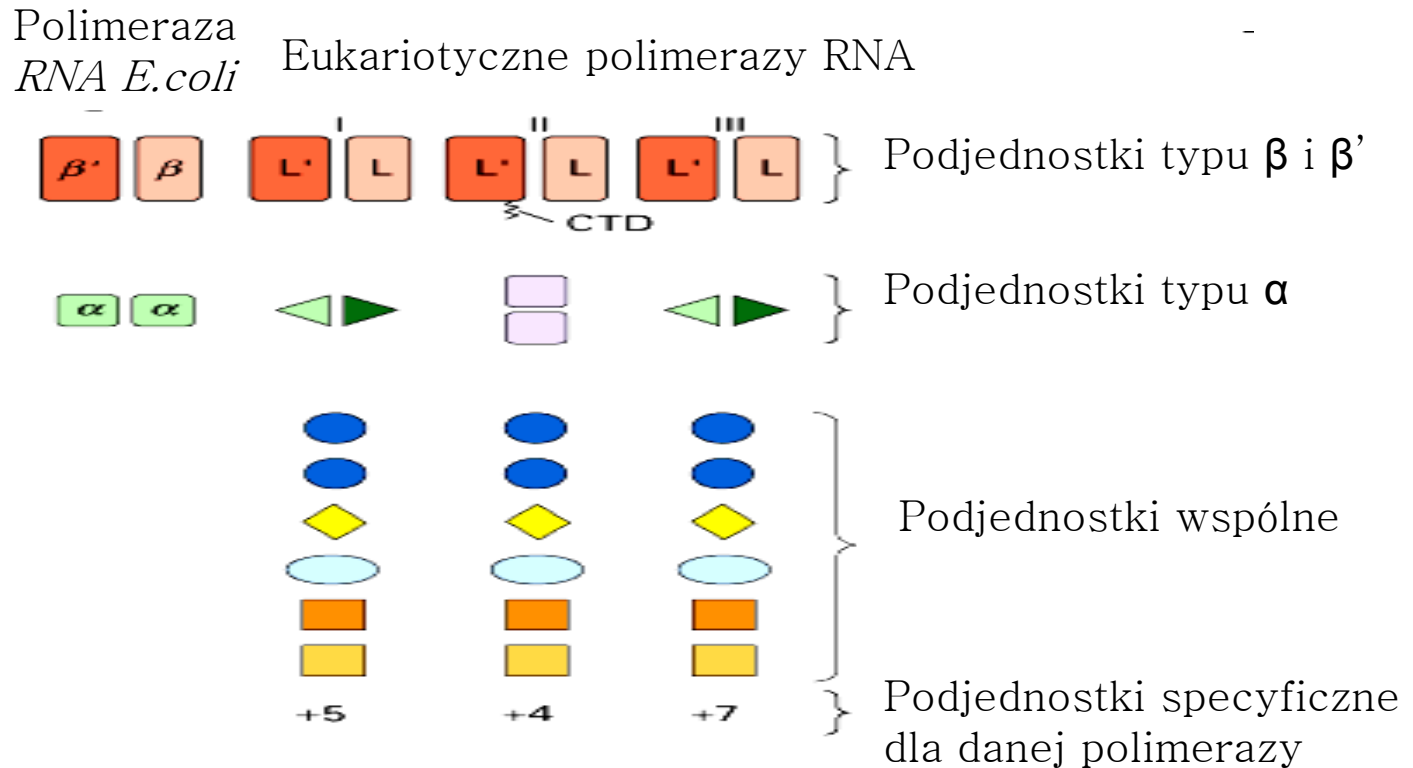
UAS – ang. upstream activating sequence

## 3 (+ 1) główne polimerazy RNA *Eukaryota*

polimeraza	produkty	wrażliwość na $\alpha$ -amanitynę
Polimeraza I	geny rRNA (18S; 28S; 5,8S)	nie wrażliwa
Polimeraza II	hn/mRNA, większość snRNA (U1, U2, U4, U5), miRNA	bardzo wrażliwa
Polimeraza III	małe RNA: tRNA, snoRNA, 5S rRNA, U6 snRNA	umiarkowanie wrażliwa

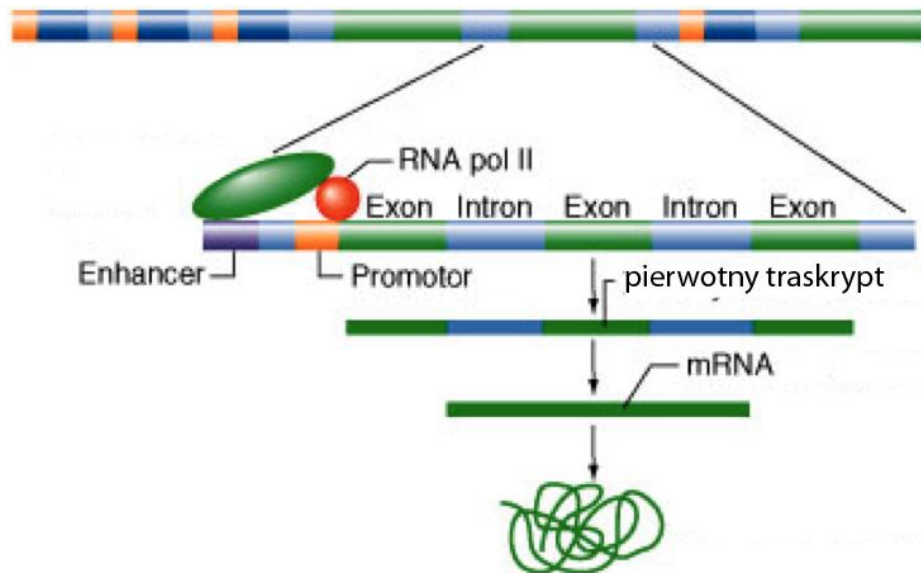
- Polimeraza mitochondrialna

# Skład podjednostkowy 3 głównych polimeraz RNA *Eukaryota*



CTD- C końcowa domena Pol II, o krytycznym znaczeniu dla transkrypcji

# Polimeraza II



Polimeraza II RNA rozplata nici DNA, syntetyzuje RNA i łączy ponownie obie nici DNA.

Samodzielnie nie jest w stanie rozpoznać promotora genu i zainicjować transkrypcji.

Do tego celu niezbędna jest obecność **OGÓLNYCH CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH**

Hartwell, Hood, Goldberg, Reynolds, Silver, Veres.  
Genetics. From Genes to Genomes. Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc.

- U prokariontów geny są najczęściej ciągłe, tj. kolinearne z ich mRNA.
- U wyższych eukariontów geny są nieciągłe, tj. niekolinearne z ich mRNA.
- Części genu ulegające ekspresji noszą nazwę eksonów, zaś sekwencje przedzielające eksony – intronów.

---

# Inicjacja transkrypcji

- Ogólne czynniki transkrypcyjne (podstawowe) – wspólne dla wielu promotorów, wiązanie w proksymalnej części promotora

GTF – ang. general transcription factor  
TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF, TFIIH

---

## General Transcription Initiation Factors from Human Cells

Factor	Number of Subunits	Molecular Weight (kDa)	Function	
TFIID	TBP	1	38	Core promoter recognition (TATA); TFIIB recruitment
	TAFs	12	15–250	Core promoter recognition (non-TATA elements); positive and negative regulatory functions
TFIIA	3	12, 19, 35	Stabilization of TBP binding; stabilization of TAF–DNA interactions; antirepression functions	
TFIIB	1	35	RNA pol II–TFIIF recruitment; start-site selection by RNA pol II	
TFIIF	2	30, 74	Promoter targeting of pol II; destabilization of nonspecific RNA pol II–DNA interactions	
RNA pol II	12	10–220	Catalytic functions in RNA synthesis; recruitment of TFIIE	
TFIIE	2	34, 57	TFIIH recruitment; modulation of TFIIH helicase, ATPase, and kinase activities; direct enhancement of promoter melting (?)	
TFIIH	9	35–89	Promoter melting using helicase activity; promoter clearance (?) by CTD kinase activity	

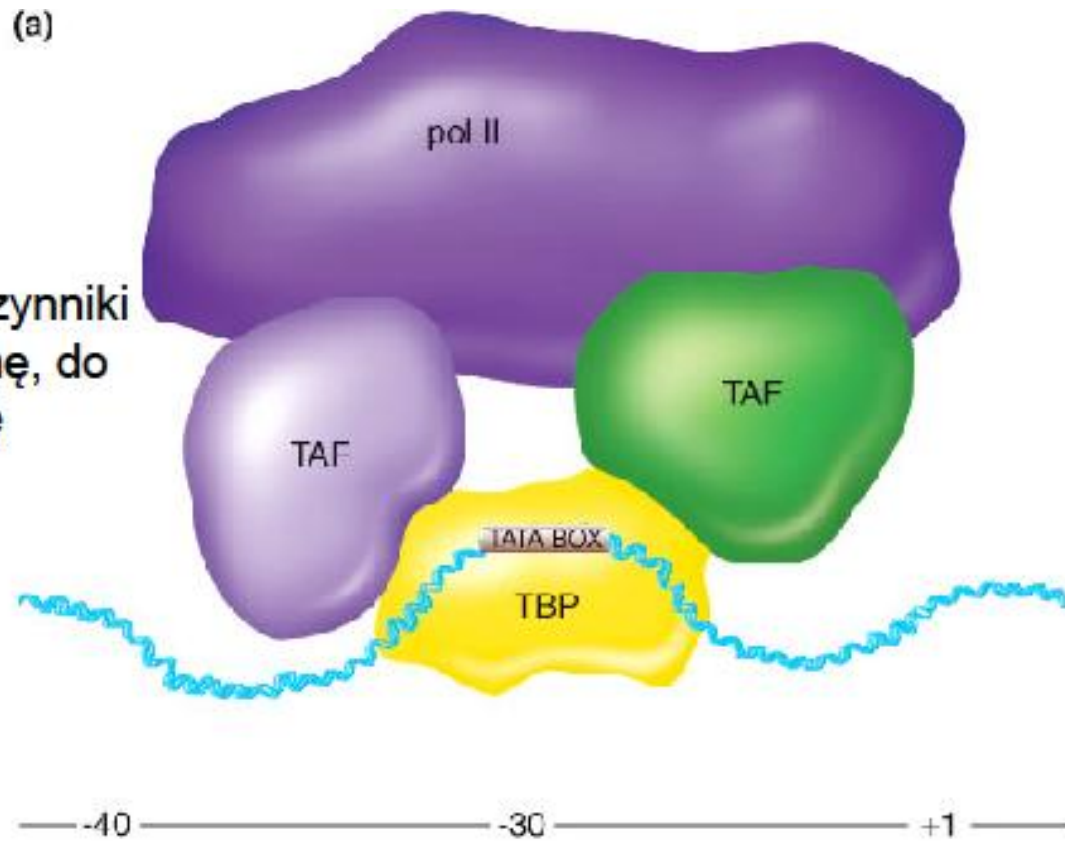
<sup>a</sup> The subunit compositions and polypeptide sizes are those described for the human factors, but homologues for virtually all have also been identified in rat, *Drosophila*, and yeast.

<sup>b</sup> Abbreviations used: CTD, carboxy-terminal domain of pol II; RNA pol II, RNA polymerase II; TAFs, TATA-binding protein–associated factors; TBP, TATA-binding protein.

Source: From R. G. Roeder, *Trends Biochem. Sci.* (1996) 21:327–335. © 1996 with permission of Elsevier Science.

(a)

Podstawowe czynniki  
tworzą platformę, do  
której wiąże się  
polimeraza



---

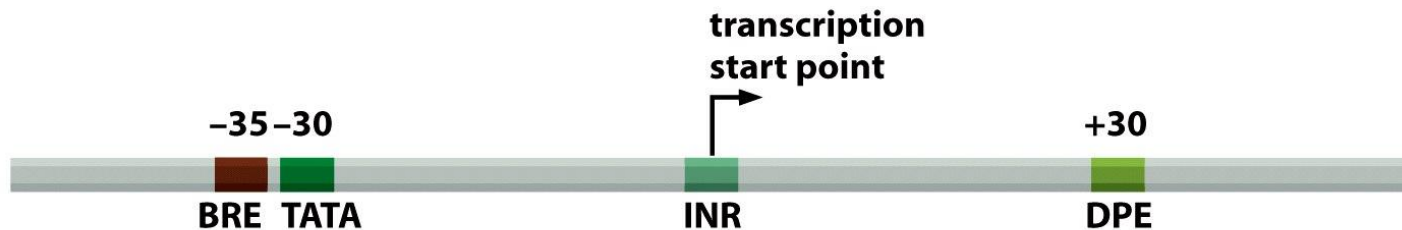
# Podstawowe elementy *cis*

- Promotor rdzeniowy (podstawowy) – wiąże ogólne czynniki transkrypcyjne

Elementy bliskiego promotora – wiążą czynniki wspólne dla wielu różnych promotorów, które zapewniają podstawowy poziom transkrypcji

- element CAAT – czynniki NF-1 i NF-Y
- element GC – czynnik Sp1
- oktamer – czynnik Oct1

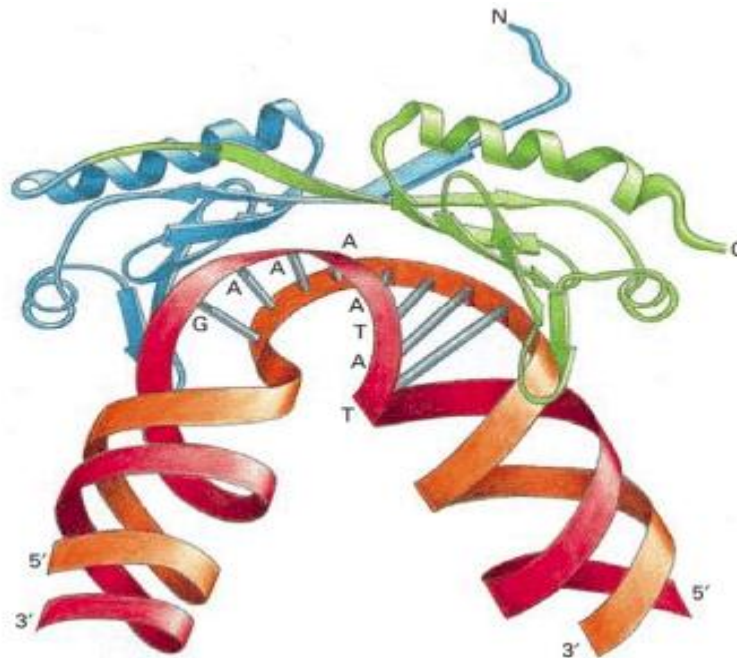
# Promotor podstawowy



element	consensus sequence	general transcription factor
BRE	G/C G/C G/A C G C C	TFIIB
TATA	T A T A A/T A A/T	TBP
INR	C/T C/T A N T/A C/T C/T	TFIID
DPE	A/G G A/T C G T G	TFIID

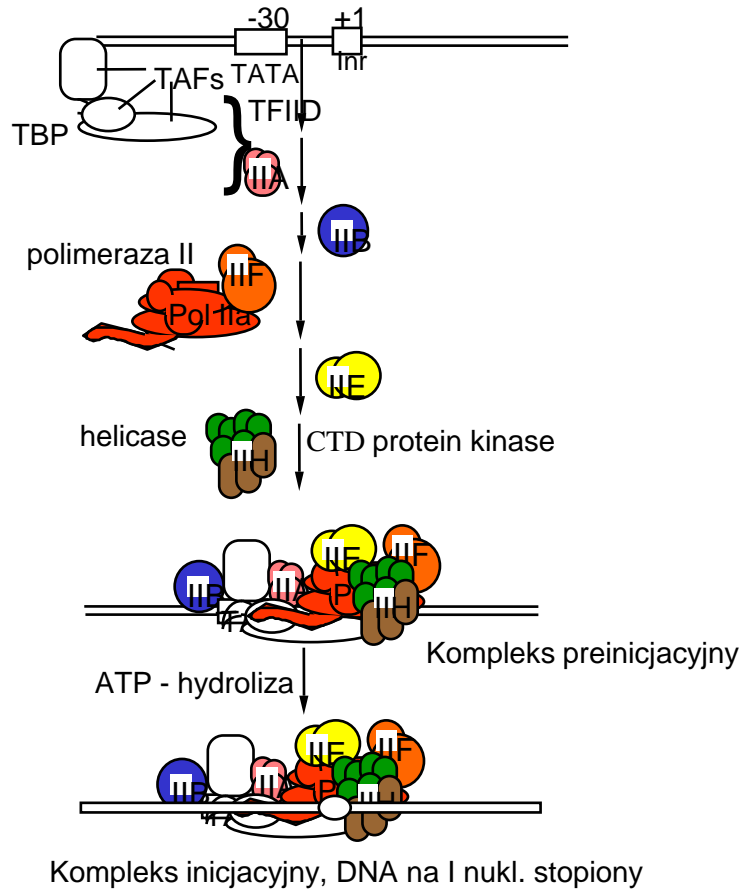
# Pierwszy etap inicjacji transkrypcji przyłączenie **ogólnego czynnika transkrypcyjnego TFIID**

TATA binding protein (TBP) w kompleksie z DNA w rejonie 'TATA-box'  
TBP- składnik ogólnego czynnika transkrypcyjnego TFIID



# Sekwencyjny model składania Kompleksu Preinicjacyjnego (PIC – preinitiation complex)

Aktywność transkrypcyjna na poziomie podstawowym, jeszcze nie regulatorowym



TFII A, B, D,E, H, F – Ogólne Czynniki Transkrypcyjne (GTF)

Czynniki TAF – składowe TFIID (ang. TBP Associated Factors)

TATA – TATA box – sekwencja TATAAA rozpoznawana przez białko TBP

Inr – sekwencja inicjatorowa rozpoznawana przez białka TAF

Polimeryzacja pierwszych kilku nukleozydotrifosforanów i fosforylacja CTD prowadzą do uwolnienia promotora.

---

# Regulacja inicjacji transkrypcji – czynniki transkrypcyjne i koaktywatory

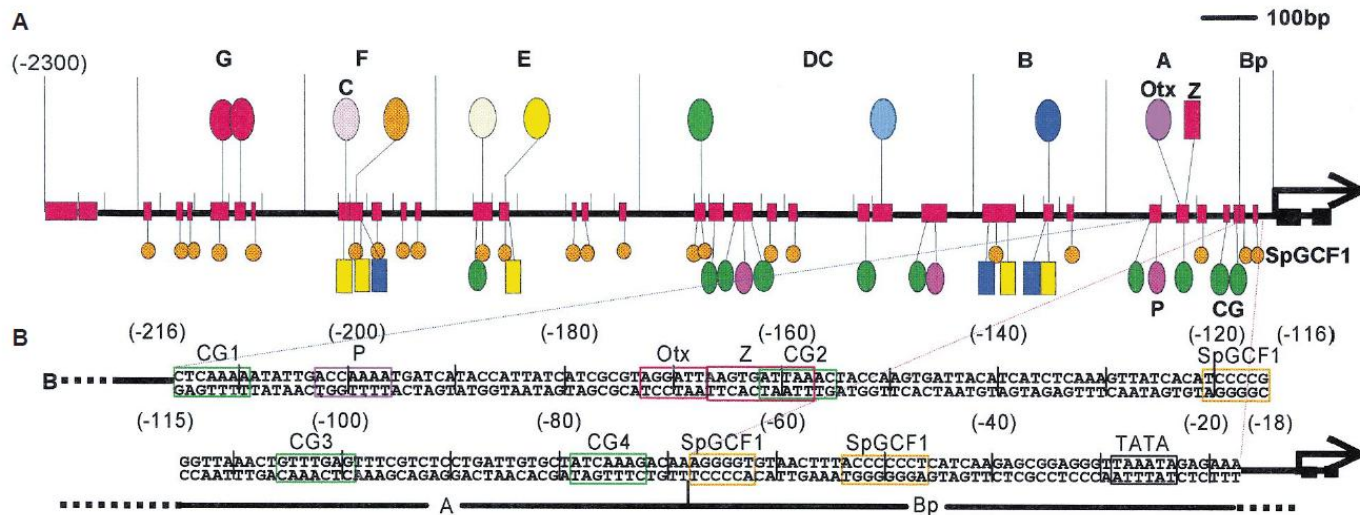
- Podstawowe – wspólne dla wielu promotorów, wiązanie w proksymalnej części promotora
  - Specyficzne (tkankowo, w odpowiedzi na sygnały regulacyjne, w rozwoju), wiązanie w dystalnej części promotora i w enhancerach
-

---

# Specyficzne elementy *cis* promotorów i enhancerów

- **Moduły odpowiedzi na sygnał**
  - np. moduł CRE – odpowiedź na cAMP (czynnik transkrypcyjny CREB)
- **Moduły specyficzne dla komórek i tkanek**
  - np. moduł mioblastowy rozpoznawany przez czynnik MyoD; moduł limfoblastoidalny – czynnik NF- $\kappa$ B
- **Moduły rozwojowe**
  - np. moduły Bicoid i Antennapedia *D. melanogaster*

# Modularna organizacja elementów cis



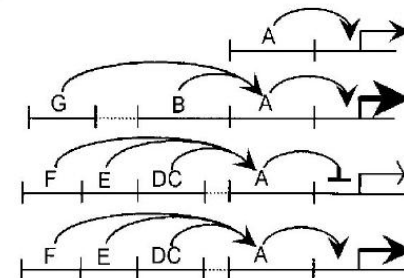
## C Module A functions:

Vegetal plate expression in early development:

Synergism with modules B and G enhancing endoderm expression in later development:

Repression in ectoderm (modules E and F) and skeletogenic mesenchyme (module DC):

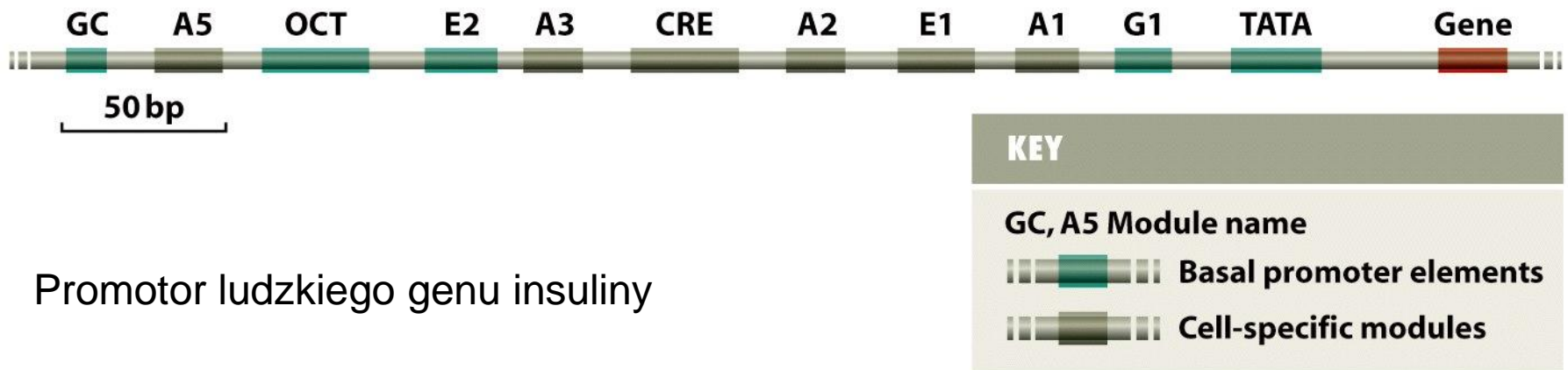
Modules E, F and DC with LiCl treatment:



Yuh *et al.* (1998) *Science* **279**, 1896-1902. *Endo16* regulatory system of the sea urchin.

# Modularna organizacja elementów cis

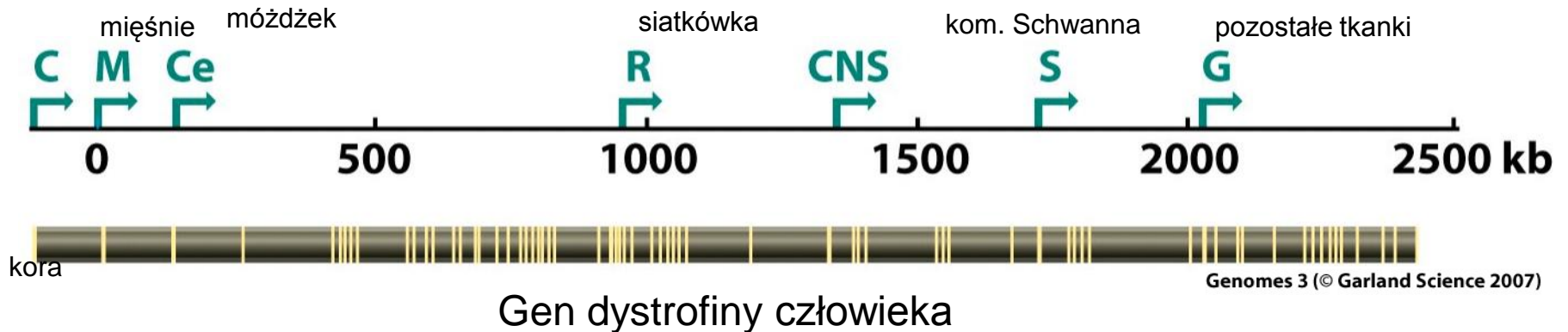
- W sekwencjach regulatorowych występują różne kombinacje elementów *cis* wiążących różne czynniki *trans*, co daje bardzo wiele możliwości regulacji przy udziale stosunkowo niewielkiej liczby regulatorów – kombinatoryka



Promotor ludzkiego genu insuliny

# Alternatywny start transkrypcji

- Wiele genów wyższych eukariontów posiada wiele alternatywnych miejsc startu transkrypcji (promotorów), specyficznych tkankowo
- Dzięki temu z jednego genu powstają różne transkrypty i białka w różnych komórkach i tkankach



---

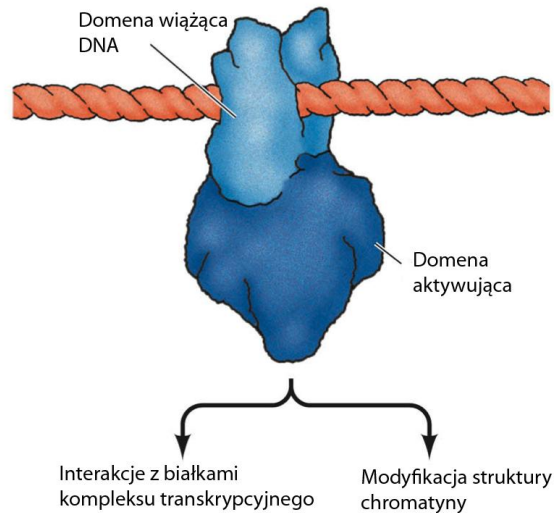
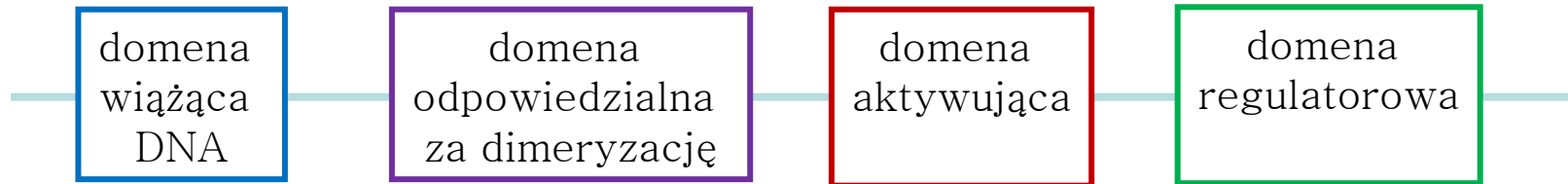
# Sekwencje wzmacniające i wyciszające „Enhancery” i „Silencery”

- Enhancery stymulują transkrypcję, silencery hamują transkrypcję .
  - Jedne i drugie działają niezależnie od orientacji, tj. odwrócenie ich sekwencji nie wpływa na efekt.
  - Jedne i drugie działają niezależnie od miejsca położenia w genomie.
    - Mogą działać na odległość w stosunku do promotora
    - Enhancery wykrywa się nieomal wszędzie
  - Jedne i drugie stanowią miejsce wiązania dla specyficznych czynników transkrypcyjnych.
-

---

# Specyficzne czynniki transkrypcyjne

# Struktura domenowa aktywatorów transkrypcji



Hartwell, Hood, Goldberg, Reynolds, Silver, Veres. Genetics.  
From Genes to Genomes. Copyright © The McGraw-Hill Companies,  
Inc.

---

## Domeny obecne w czynnikach transkrypcyjnych

- Palce cynkowe
  - Helisa-skręt-helisa (H-T-H) – np. homeodomena, domena HMG, domena PAU
  - Suwak leucynowy
  - Helisa-pętla-helisa (H-L-H)
  - i wiele innych
-

# Domeny wiążące DNA

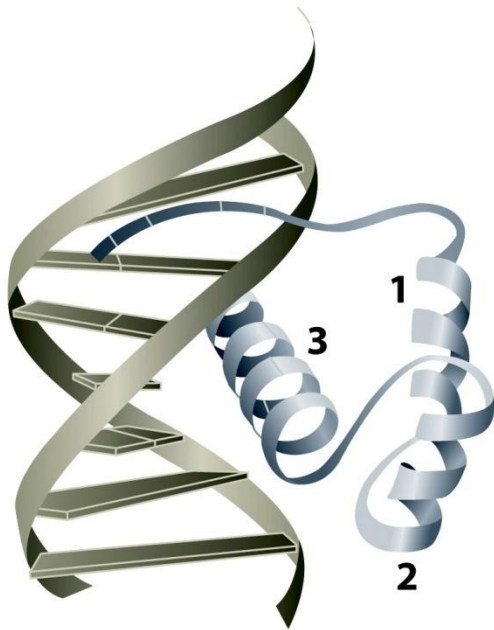
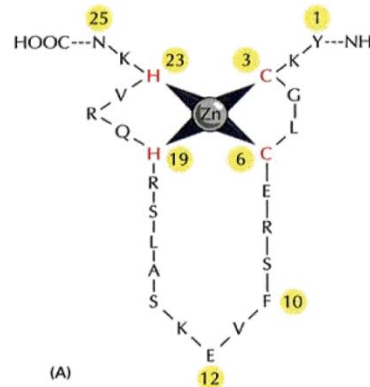


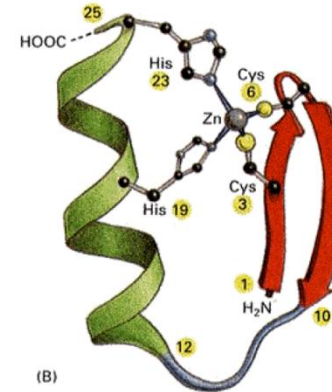
Figure 11-3 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Homeodomena  
zawiera domenę HTH  
(helisa-skręt-helisa)



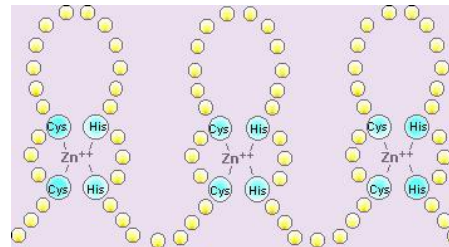
(A)

Palec cynkowy



(B)

From The Art of MBoC<sup>2</sup> © 1995 Garland Publishing, Inc



[atlasgeneticsoncology.org/Deep/Images/TFfig2.jpg](http://atlasgeneticsoncology.org/Deep/Images/TFfig2.jpg)

Czynnik transkrypcyjny  
SP1

# Dimeryzacja czynników transkrypcyjnych

- Suwak leucynowy
- Np. protoonkogeny rodziny c-Fos i c-Jun
- Rodzina CREB –  
(cAMP response element binding protein)

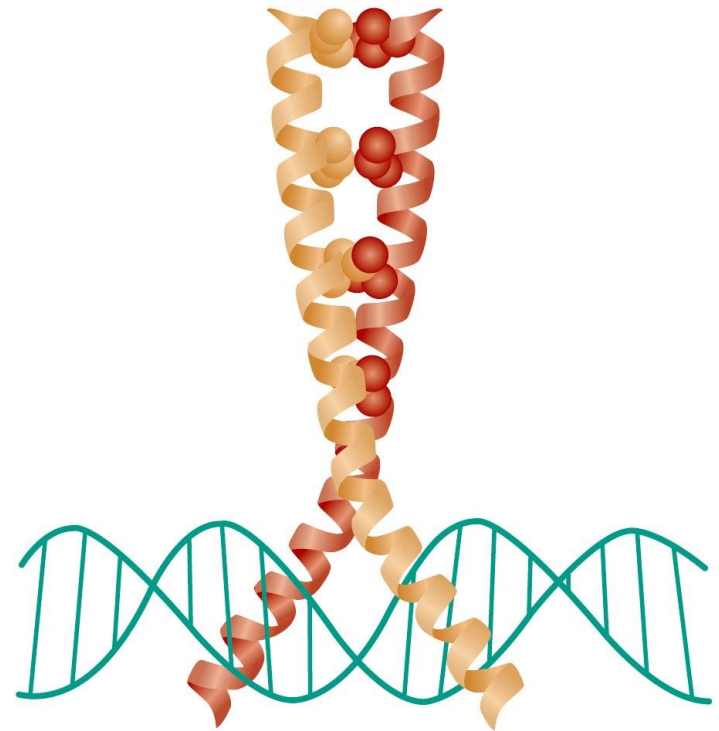
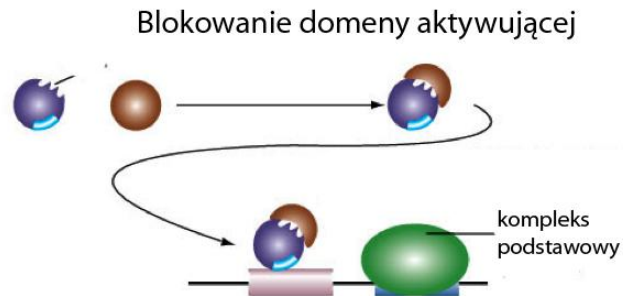
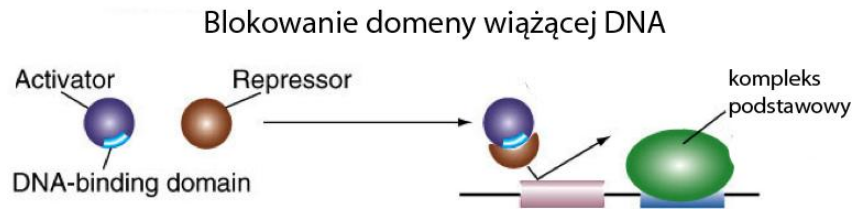
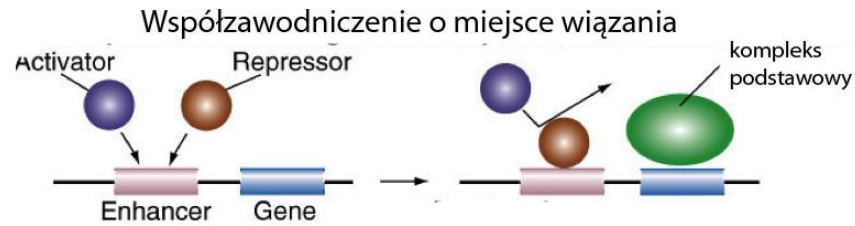


Figure 11-13 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

# Represory



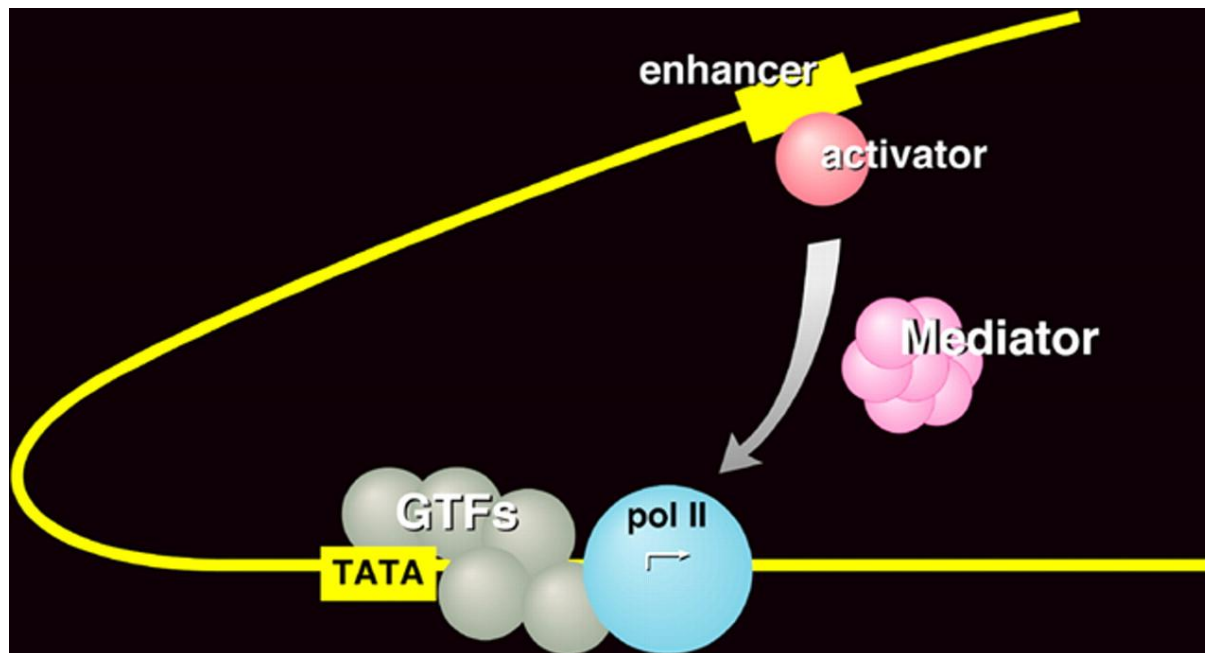
---

# Regulacja inicjacji transkrypcji

## Czynniki transkrypcyjne i koaktywatory

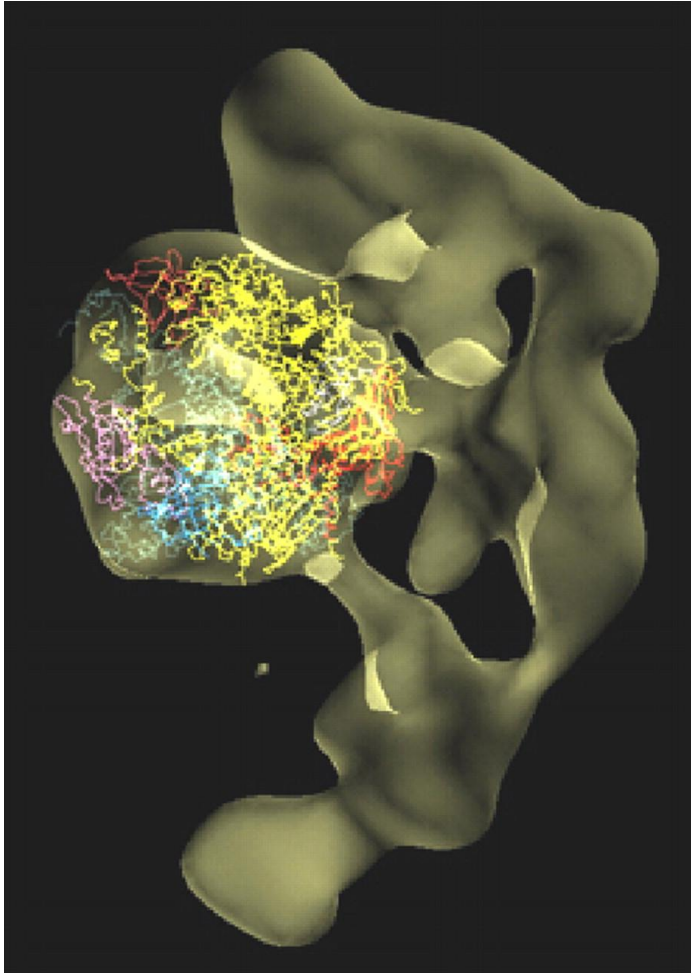
- Podstawowe – wspólne dla wielu promotorów, wiązanie w proksymalnej części promotora
  - Specyficzne (tkankowo, w odpowiedzi na sygnały regulacyjne, w rozwoju), wiązanie w dystalnej części promotora i w enhancerach
  - Koaktywatory –uczestniczą w aktywacji transkrypcji, ale nie wiążą się z DNA. Działają przez oddziaływania z białkami kompleksu transkrypcyjnego
    - Kompleks mediatora jest ogólnym koaktywatorem polimerazy II
-

# Mediator – kompleks białkowy



Kornberg R D PNAS 2007;104:12955-12961

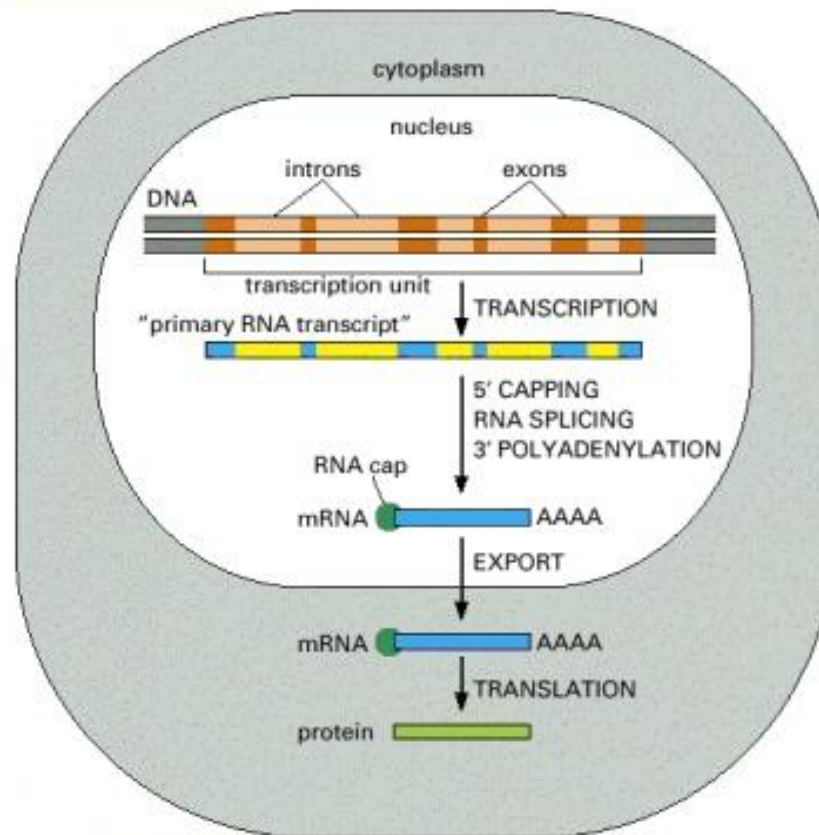
## Polimeraza II RNA wraz z Mediatorem



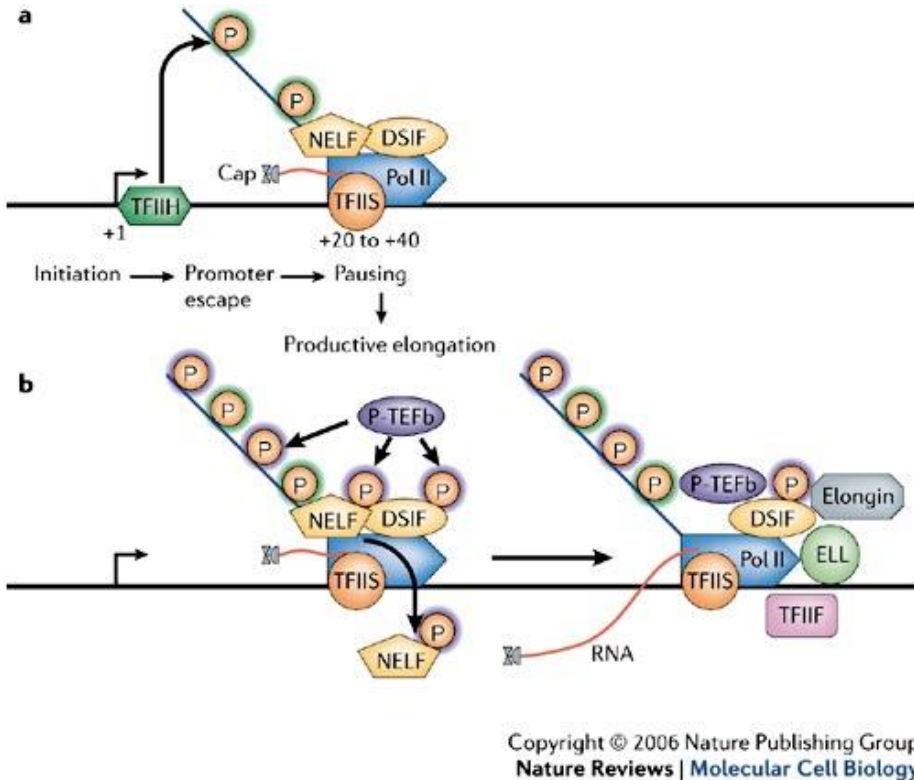
Kornberg R D PNAS 2007;104:12955-12961

- niezbędny do regulowanej transkrypcji
- absolutnie wymagany do transkrypcji większości genów eukariotycznych
- oddziałuje bezpośrednio z aktywatorami transkrypcji i polimerazą II RNA
- ważny zarówno dla pozytywnej jak i negatywnej regulacji transkrypcji

# Elongacja transkrypcji genów eukariotycznych jest ściśle związana z obróbką RNA



# Domena CTD polimerazy II RNA koordynuje wydarzenia transkrypcyjne



Domena CTD zawiera powtarzającą się sekwencję aminokwasową (YSPTSPS)

Hiperfosforylacja domeny CTD determinuje nowy zestaw regulatorów przyłączających się do pol II i zaznacza przejście od inicjacji do elongacji transkrypcji.

Zatrzymanie w pobliżu promotora i uwolnienie promotora; przejście do fazy produktywnej transkrypcji – jest zależne od fosforylacji CTD

# Terminacja i poliadenylacja

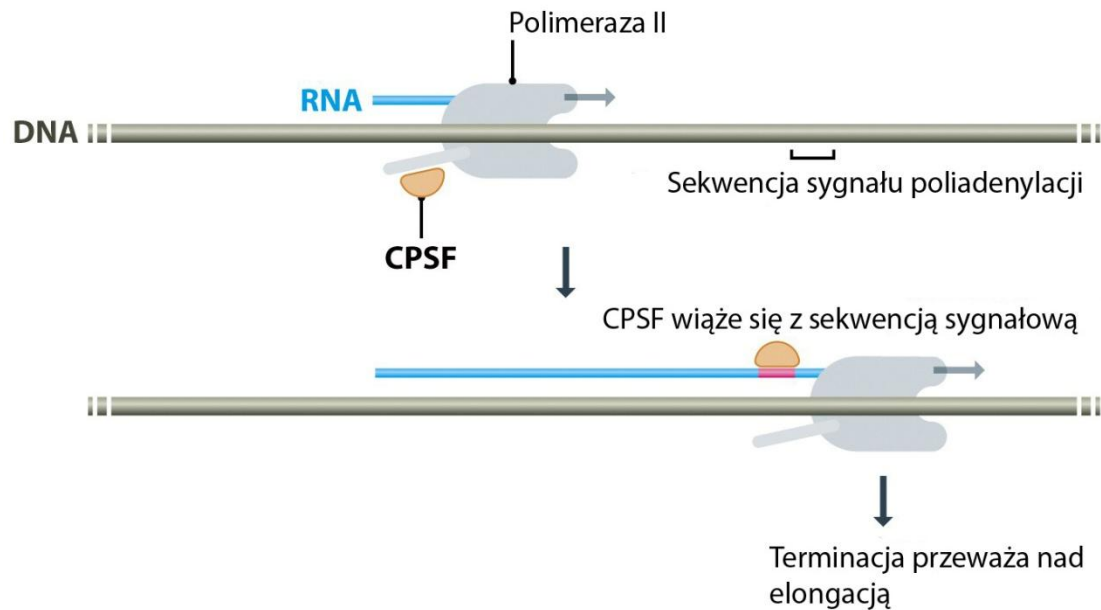


Figure 12-23 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

CPSF – kompleks białkowy, czynnik specyficzności cięcia i poliadenylacji

# Terminacja i poliadenylacja

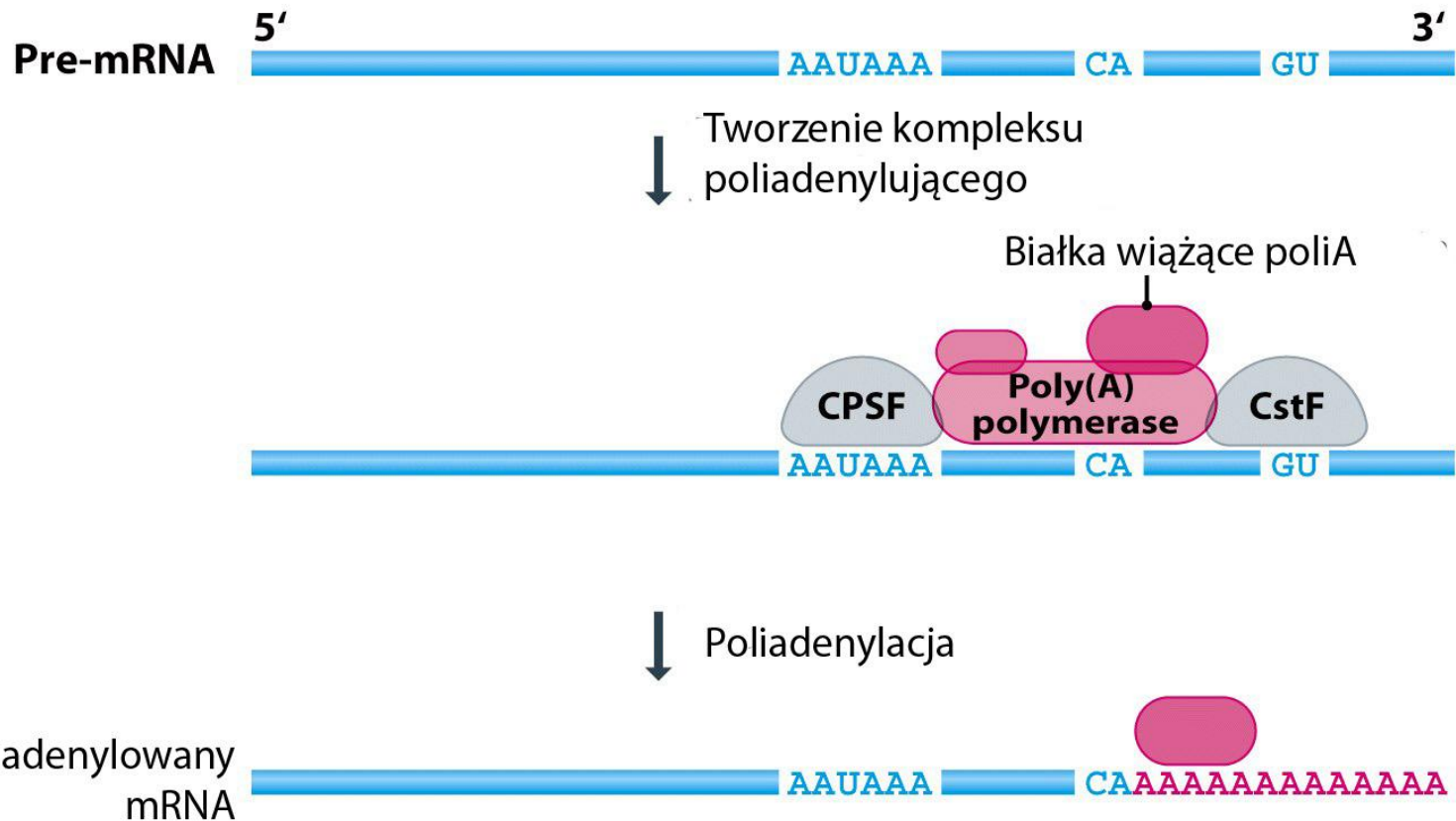


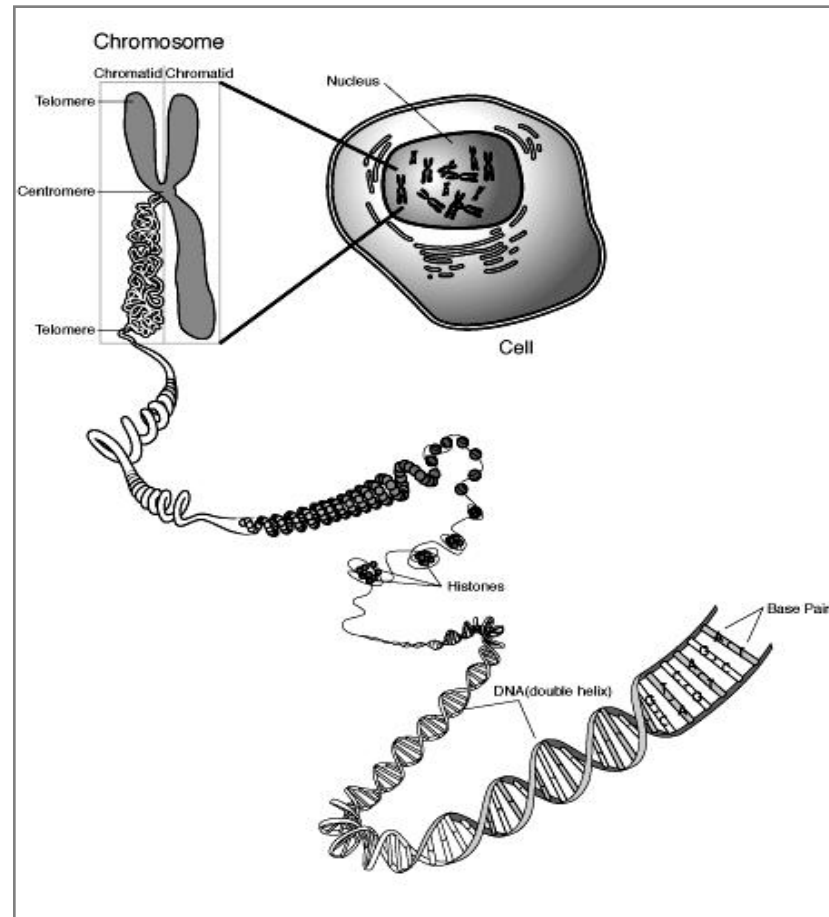
Figure 12-22 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

---

# Poliadenylacja

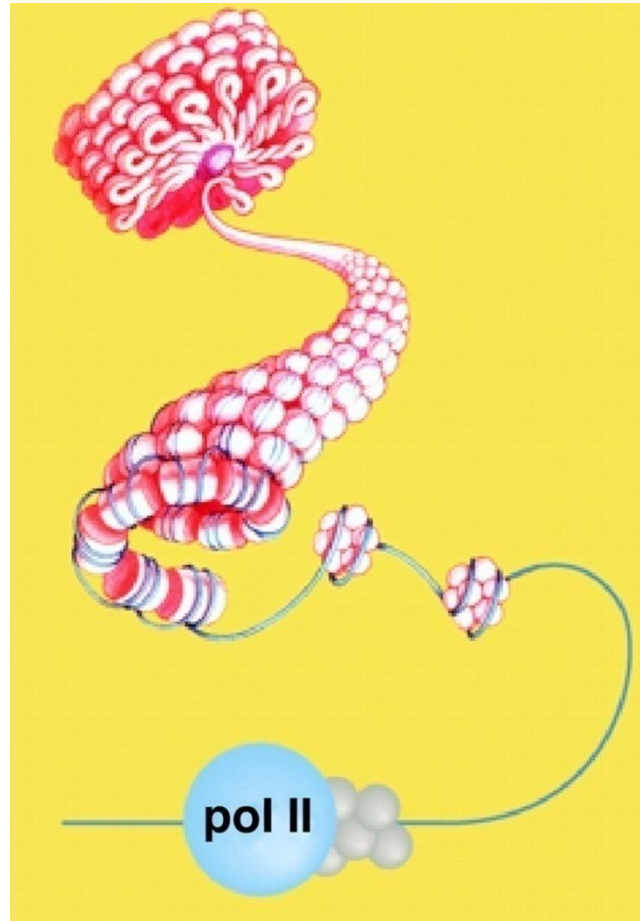
- Kontroluje (zwiększa) stabilność mRNA
  - Dotyczy większości mRNA, wyjątkiem są mRNA kodujące histony
  - Pełni funkcję w procesie translacji
-

# Chromatyna – ważny element regulacji transkrypcji genów eukariotycznych



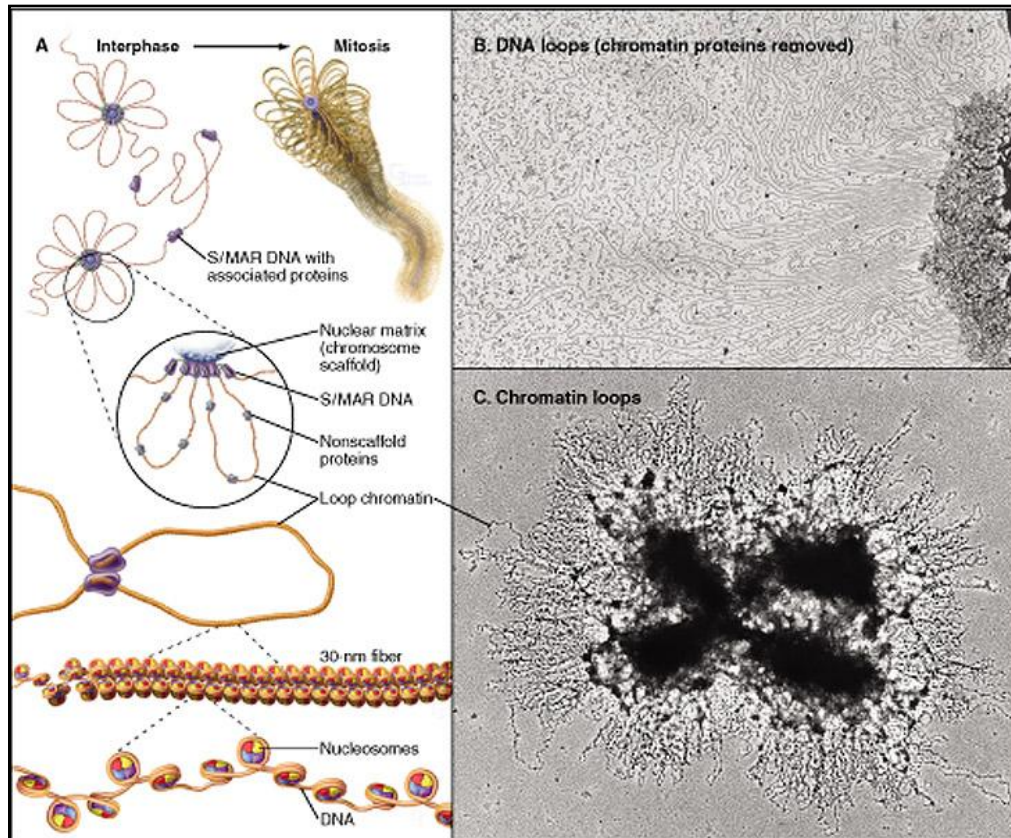
<http://www.accessexcellence.org/AB/GG/nucleosome.html>

# Transkrypcja genów eukariotycznych zachodzi w chromatynie

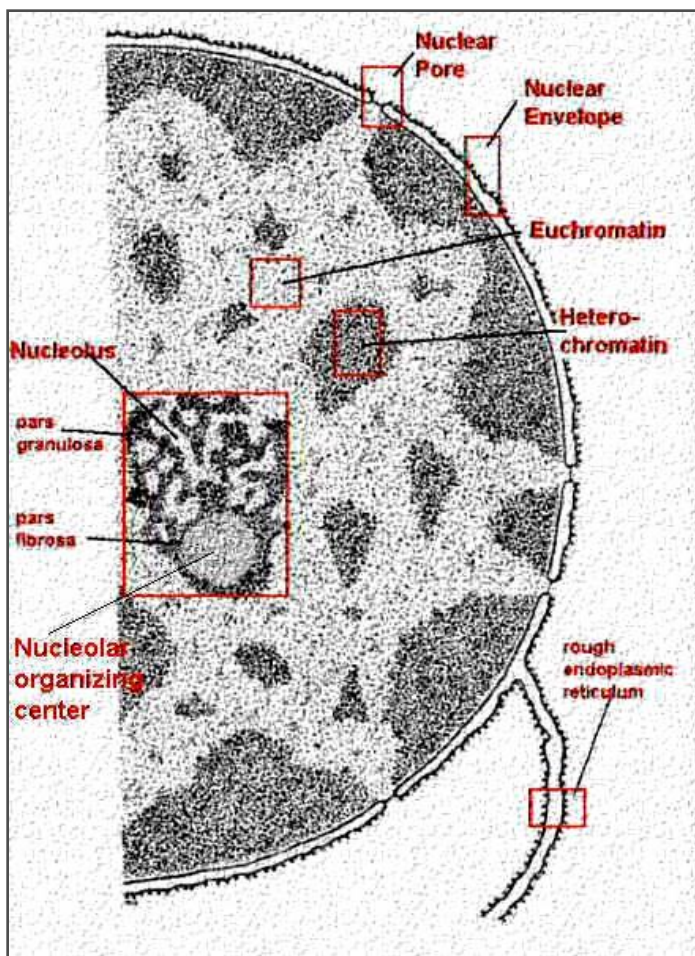


Kornberg R D PNAS 2007;104:12955-12961

# KOLEJNE STOPNIE KONDENSACJI CHROMATYNY



# Dwa podstawowe stany chromatyny



## Heterochromatyna

**konstytutywna** – jest obecna stale w komórce, DNA wchodzący w jej skład nie zawiera genów, dzięki czemu zachowuje zwartą strukturę (obszary centromerów i telomerów)

**fakultatywna** – ta forma chromatyny pojawia się w jądrze okresowo i tylko w niektórych komórkach, prawdopodobnie zawiera geny nieaktywne w czasie niektórych faz cyklu komórkowego,

**Euchromatyna** – to luźno upakowana forma chromatyny, zawierająca geny aktywne transkrypcyjnie