



Struktura genomu, replikacja DNA, naprawa DNA, transkrypcja DNA

Monika Ołdak

Struktura genomu człowieka odnosi się do organizacji informacji genetycznej w komórkach człowieka i obejmuje:
genom jądrowy i genom mitochondrialny

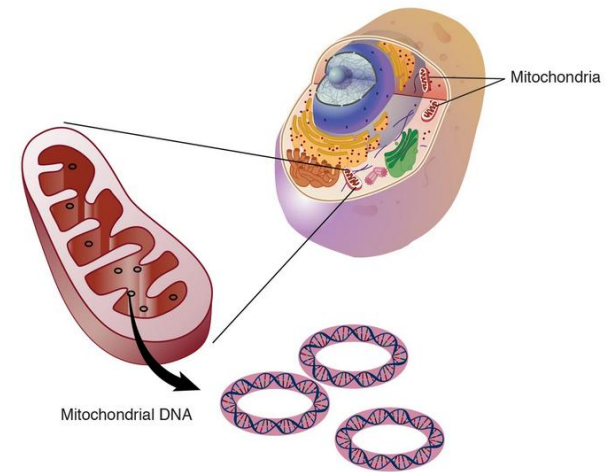
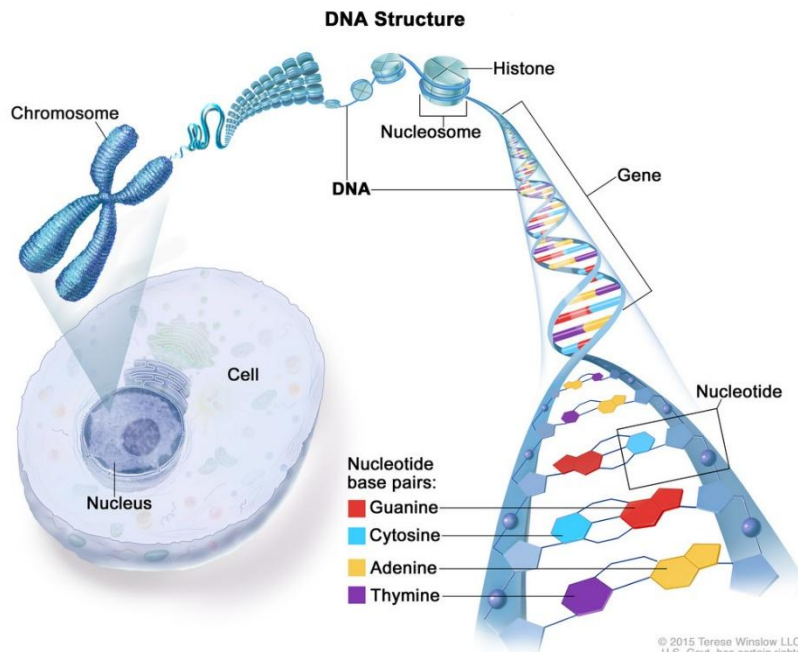
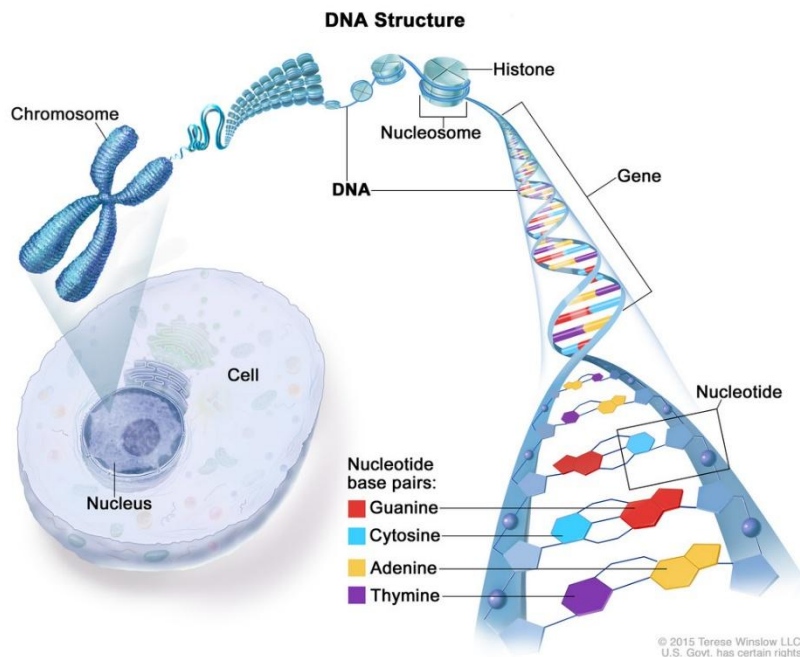


Image by National Human Genome Research Institute (NHGRI)

Struktura genomu człowieka odnosi się do organizacji informacji genetycznej w komórkach człowieka i obejmuje:
genom jądrowy i genom mitochondrialny



Genom jądrowy

- Około 3,2 mld par zasad DNA
- Zorganizowany w 23 pary chromosomów (22 autosomy + chromosomy płci)
- Około 20–22 tys. genów kodujących białka
- Zawiera liczne sekwencje niekodujące, m.in.:
 - regiony regulatorowe (promotory, enhancery, sekwencje tłumiące)
 - introny, pseudogeny
 - powtórzenia tandemowe i rozproszone (LINEs, SINEs, satelity)

Struktura genomu człowieka odnosi się do organizacji informacji genetycznej w komórkach człowieka i obejmuje:
genom jądrowy i **genom mitochondrialny**

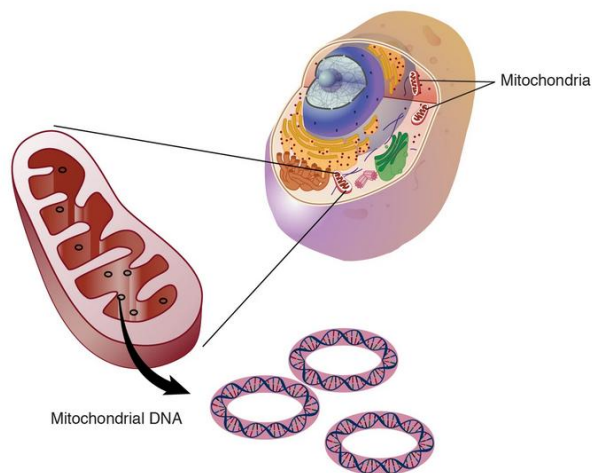


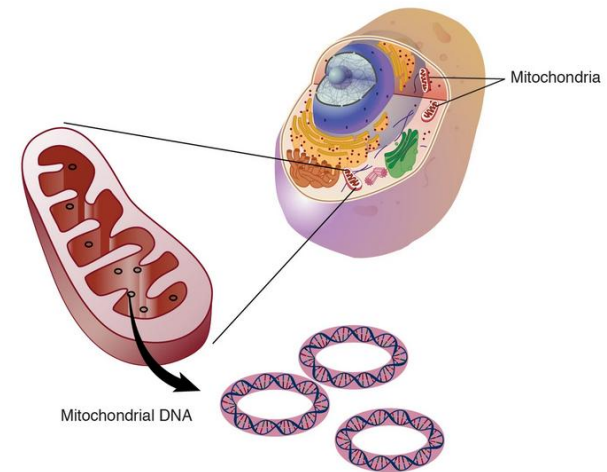
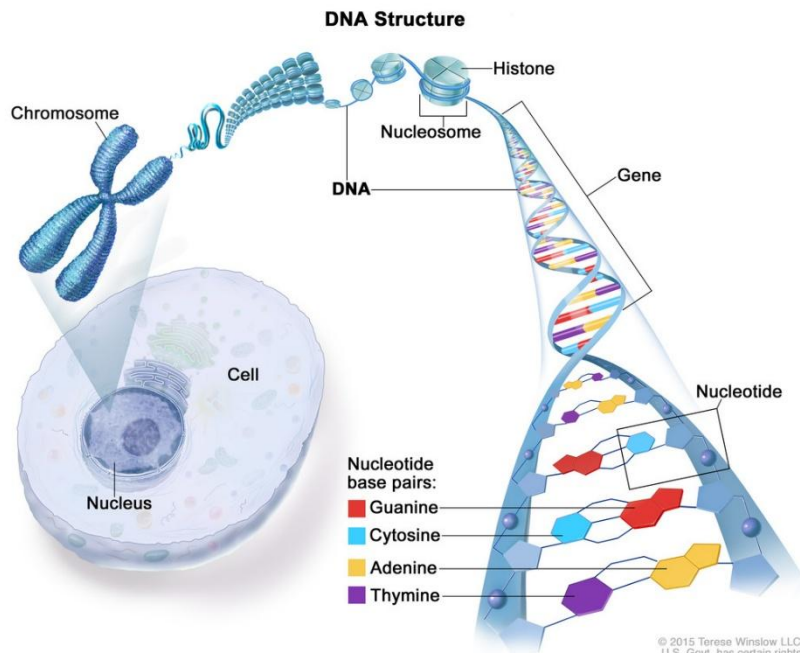
Image by National Human Genome Research Institute (NHGRI)

Genom mitochondrialny

- Kłosa cząsteczka DNA o długości ~16,6 tys. pz
- Około 37 genów:
 - 13 genów białek łańcucha oddechowego
 - 22 geny tRNA
 - 2 geny rRNA
- Występuje w licznych kopiach w każdej komórce

Genom jądrowy i mitochondrialny tworzą kompletny zestaw informacji genetycznej człowieka

Struktura genomu odzwierciedla jego organizację fizyczną (chromosomy, mitochondria) oraz funkcjonalną (geny i elementy regulatorowe)



...dopiero na początku XX wieku odkryto, że jądro przechowuje informację genetyczną

Struktura i funkcja jądra komórkowego i jąderka

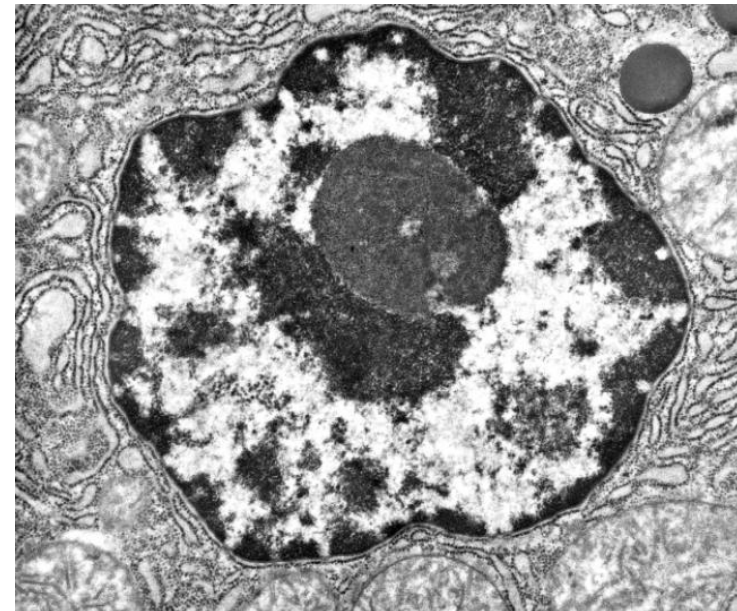
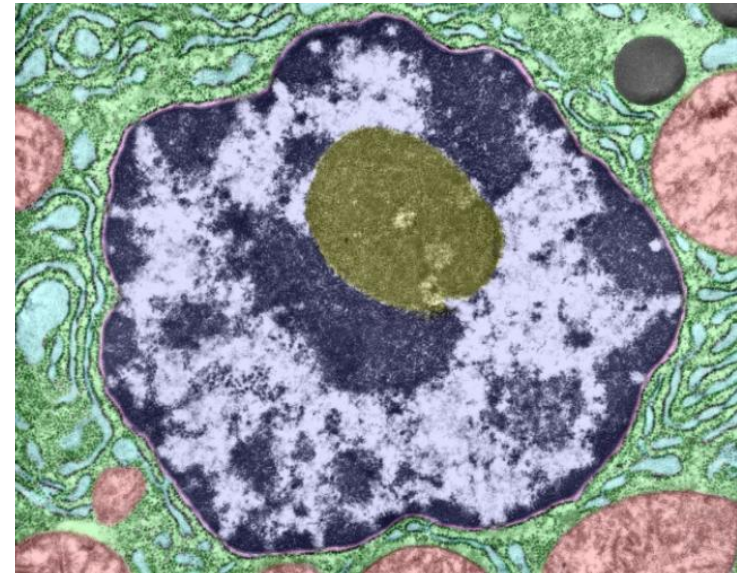


Jądro: największa organella komórki, zawiera materiał genetyczny zakodowany w DNA

Funkcja: kieruje syntezą białek w cytoplazmie za pośrednictwem

- rybosomalnego RNA – rRNA
- informacyjnego RNA- mRNA
- transferowego RNA – tRNA

Wszystkie typy RNA (w tym regulatorowe RNA, niekodujące RNA) są syntetyzowane w jądrze komórkowym



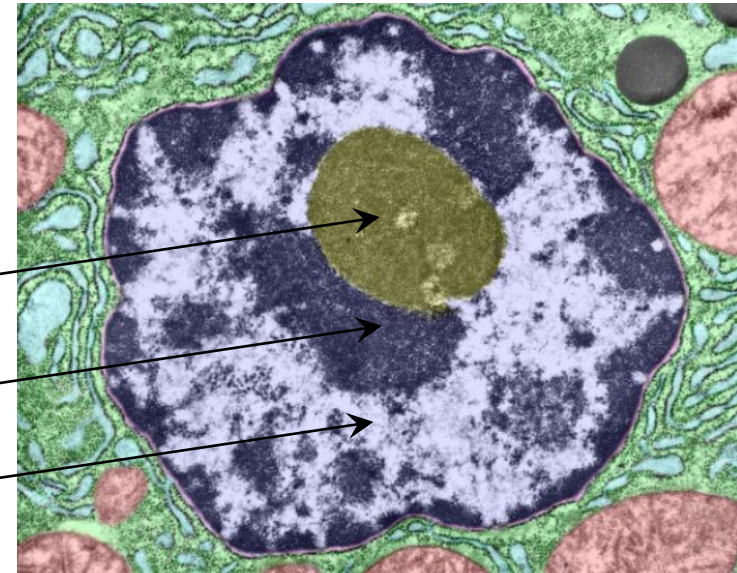
Struktura i funkcje jądra komórkowego i jąderka



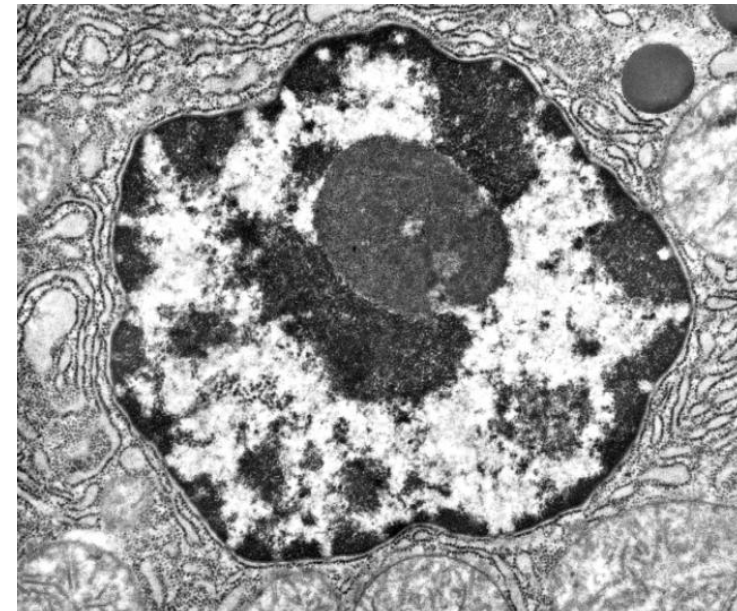
Jąderko

Heterochromatyna

Euchromatyna



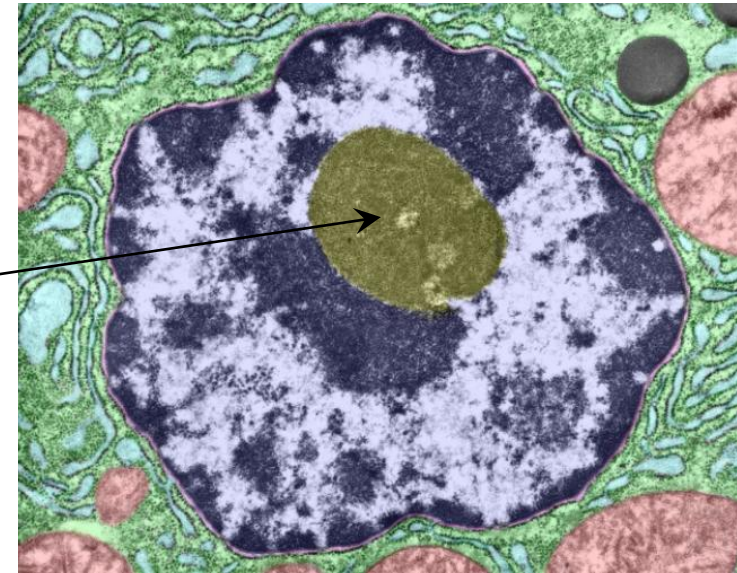
- **Chromatyna (niebieska)** - DNA związane z histonami i innymi białkami
- **Heterochromatyna (ciemnoniebieska)** - chromatyna skondensowana, nieaktywna transkrypcyjnie
- **Euchromatyna (jasnoniebieska)** - rozproszone obszary nieupakowanej chromatyny (często aktywnie transkrybowane)
- **Jąderko (zielony)** - miejsce transkrypcji rybosomalnego RNA (rRNA), produkcja rybosomów





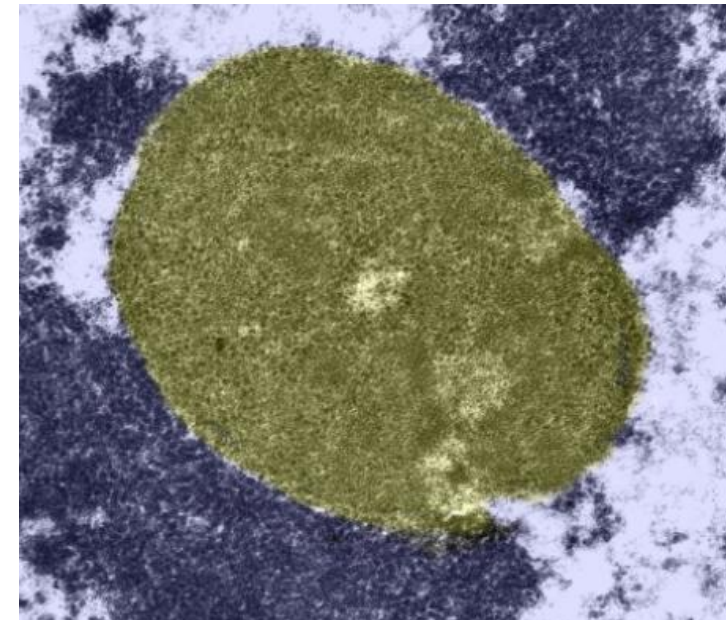
Jąderko

Jąderko



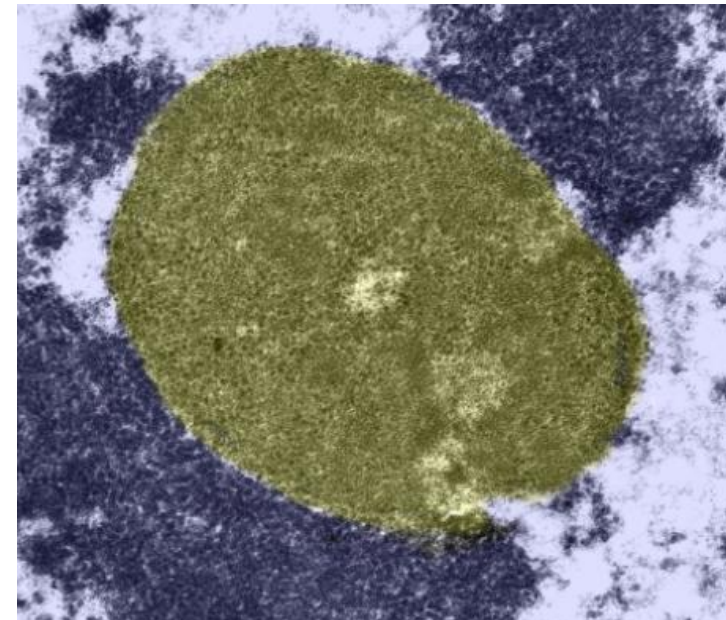
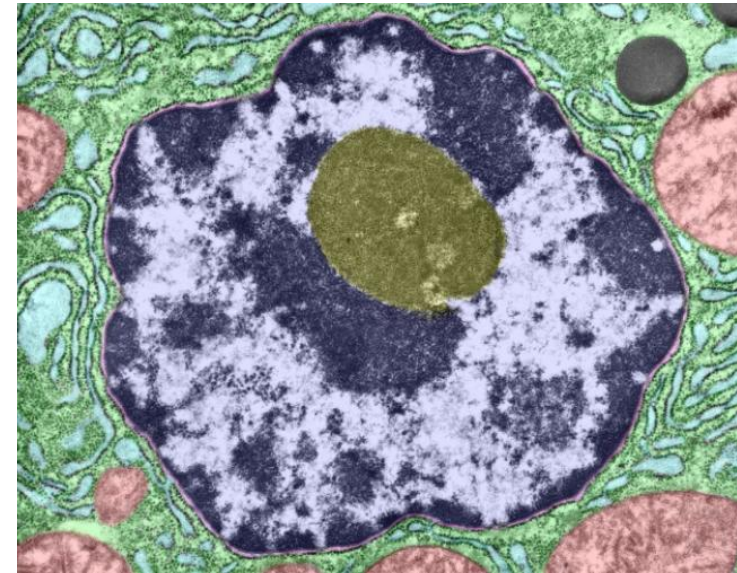
Miejsce transkrypcji rybosomalnego RNA i produkcji rybosomów, ale także miejsce, w którym przechowywane są niektóre białka:

- **nukleolina** – reguluje transkrypcję rRNA
- **fibrylaryna** – uczestniczy w obróbce prerRNA w kompleksach snoRNP
- **telomeraza** – nie jest aktywna w jąderku
- **nukleostemina** – wiąże i inaktywuje p53



Jąderko

- W jądrze może znajdować się od 1 do 5 jąderek
- Jąderko (nucleolus) zawiera około 500 genów niezbędnych do produkcji rybosomów; geny te pochodzą z chromosomów 13, 14, 15, 21 i 22
- Krótkie ramiona tych chromosomów zawierają regiony organizujące jąderko (NOR), umożliwiając odtworzenie jąderka po podziale komórki
- Geny rRNA są transkrybowane przez polimerazę RNA I
- rRNA jest modyfikowane po transkrypcji i łączone z białkami rybosomalnymi (syntetyzowane w cytoplazmie i importowane do jądra przez pory jądrowe)



Otoczka jądrowa

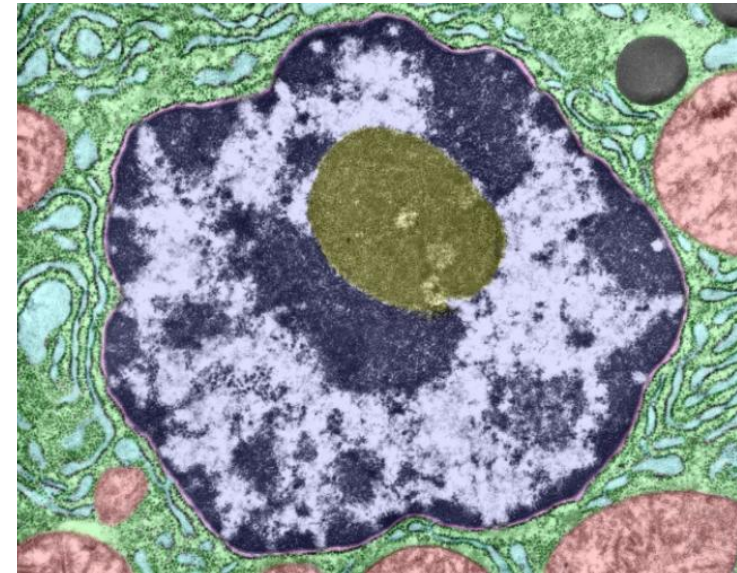
Otoczka jądrowa: składa się z dwóch błon

- **Zewnętrzna błona jądrowa:**

- w niektórych miejscach ciągła ze światłem retikulum endoplazmatycznego
- otoczona elementami cytoszkieletu - wimentyna

- **Wewnętrzna błona jądrowa:**

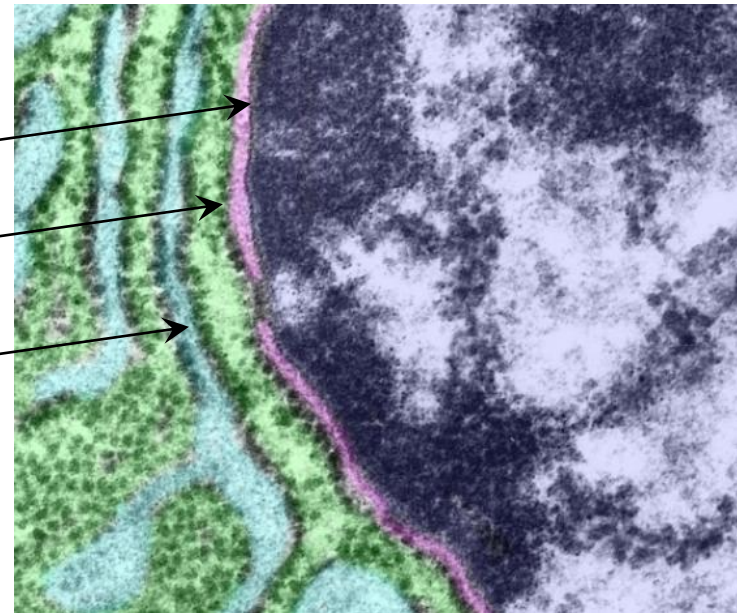
- oddzielona od chromatyny blaszką jądrową (głównie laminy A, B1, B2, C)



Otoczka jądrowa

Rybosom

Szorstkie retikulum endoplazmatyczne

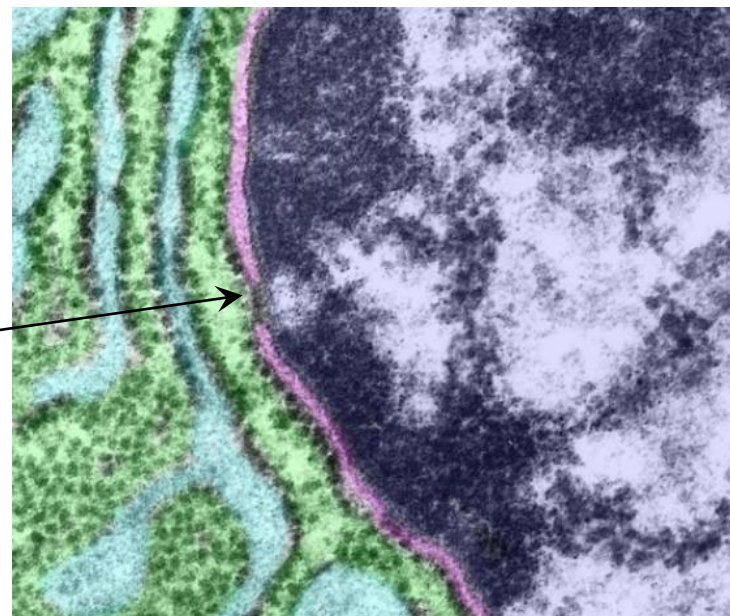
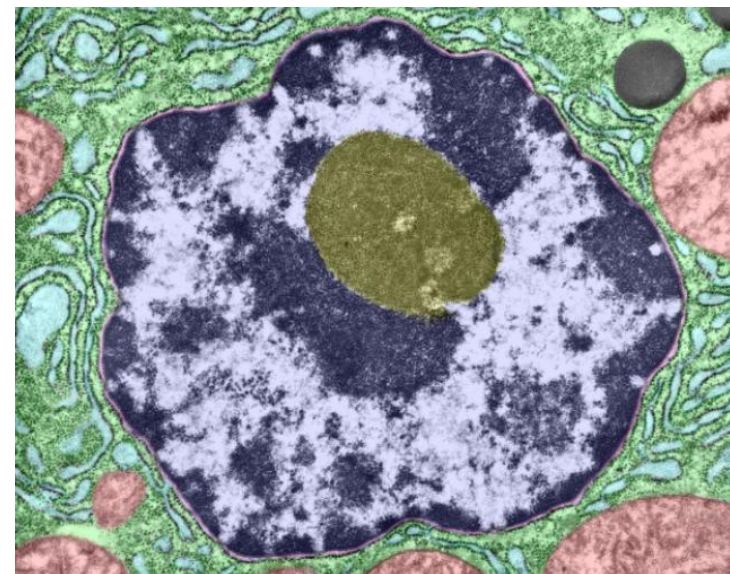




Pory jądrowe: kanały w błonie jądrowej

służą do dwukierunkowego transportu ładunków (od różnych typów RNA do różnych białek) między jądrem a cytoplazmą

Pory jądrowe

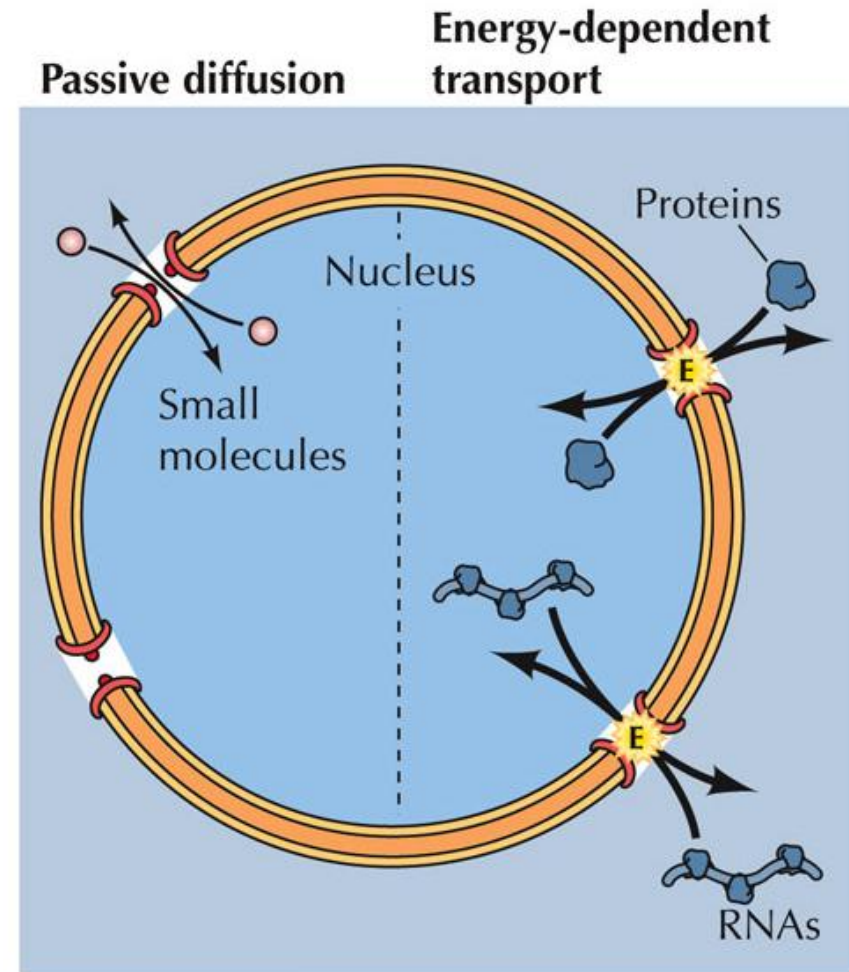


Por jądrowy

Pory jądrowe

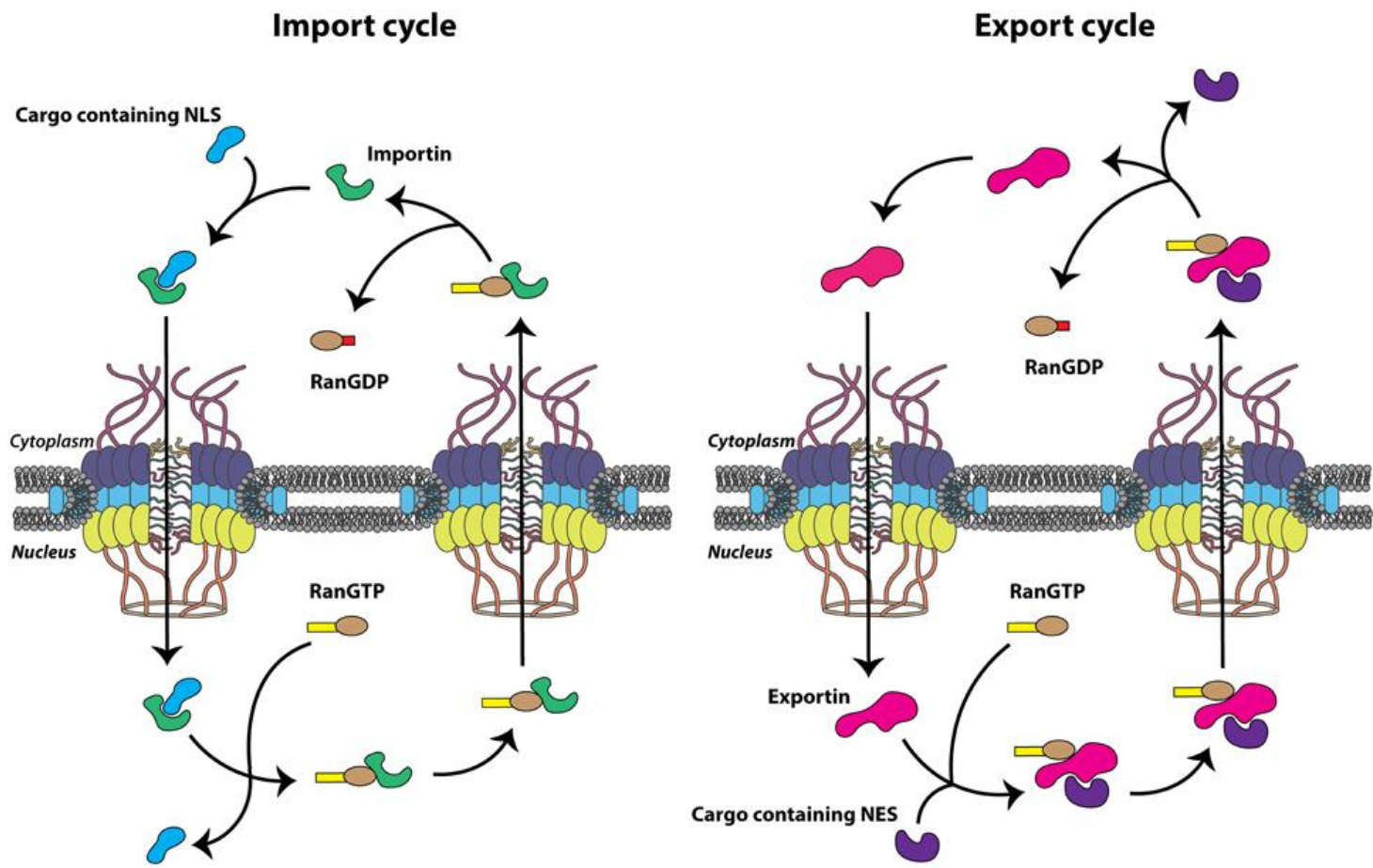
Mniejsze cząsteczki (małe metabolity lub białka poniżej 40 kDa) – transport pasywny przez NPC

Większe cząsteczki (mRNA, tRNA, rybosomy i cząsteczki sygnałowe) – aktywny transport



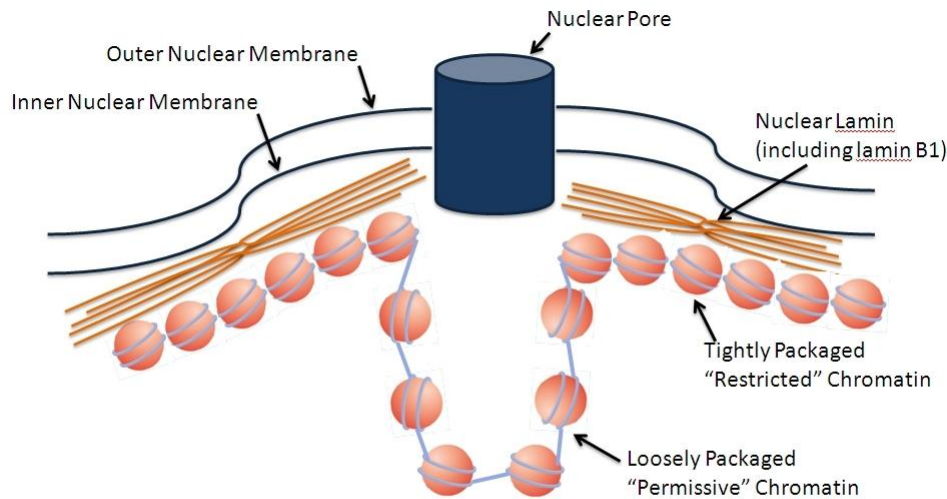
Recykling jądrowych receptorów transportowych (importyna (zielona) i eksportowa (różowa)),
poprzez kompleks porów jądrowych - (hydroliza GTP)

Cząsteczki importowane: sygnał lokalizacji jądrowej (NLS) (jasnoniebieski) lub sygnał eksportu
jądrowego (NES) (fioletowy)



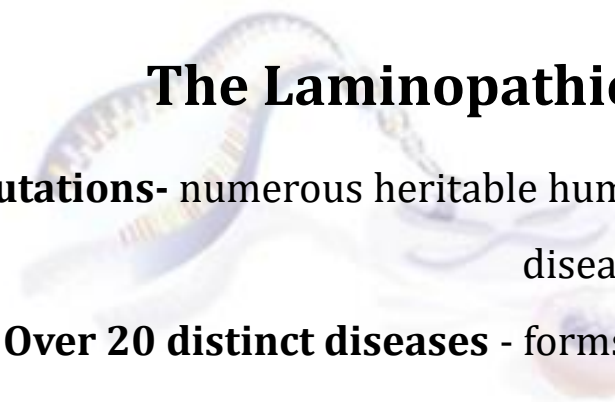
Błaszka jądrowa - laminy

Podczas interfazy chromatyna w jądrze jest upakowana na **terytoriach chromosomów** i zakotwiczona do blaszki jądrowej



Laminy są regulatorami pozycji chromatyny. Transkrypcyjnie ciche obszary genomu, takie jak centromery, telomery i nieaktywny chromosom X, są preferencyjnie umieszczone pod blaszką jądrową

Adapted from Kind and van Steensel, *Curr Opin Cell Biol*



The Laminopathies

Mutations- numerous heritable human diseases

Over 20 distinct diseases - forms

Over 20 distinct diseases - forms of
cardiomyopathy, muscular dystrophy,
dystrophy and aging-related progeria

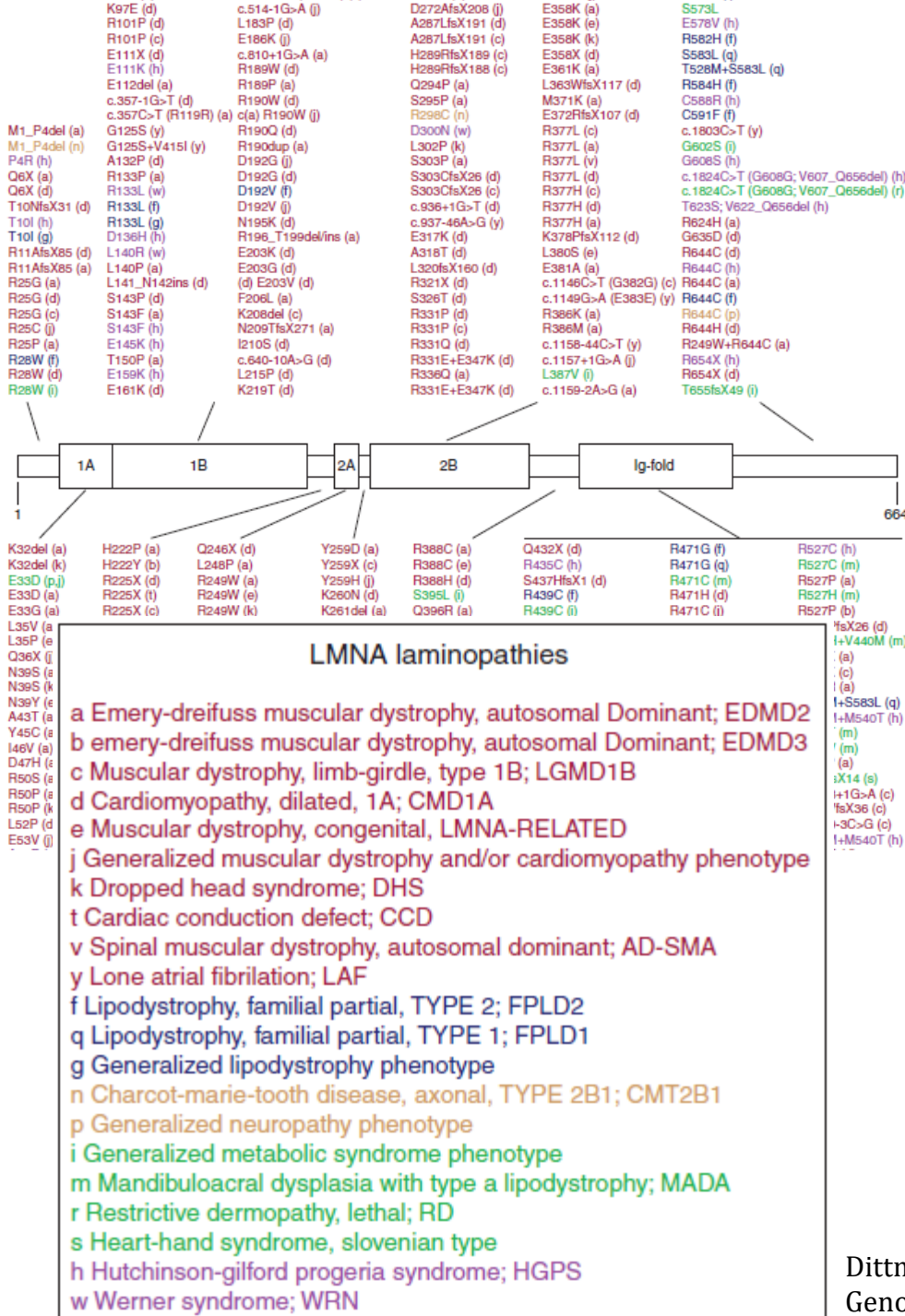
Red - preferential involvement of skeletal and cardiac muscle

Blue - lipodystrophies;

Yellow - neuropathy disorders (motor and sensory neurons of the peripheral nervous system)

Green - 'systemic' laminopathies- multiple tissue systems

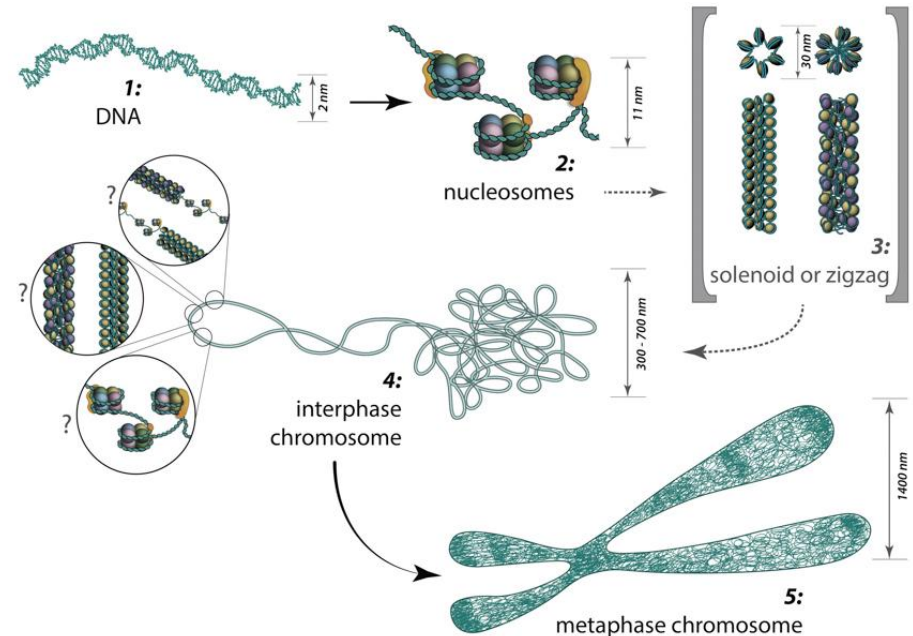
Purple - mutations associated with premature aging disorders.



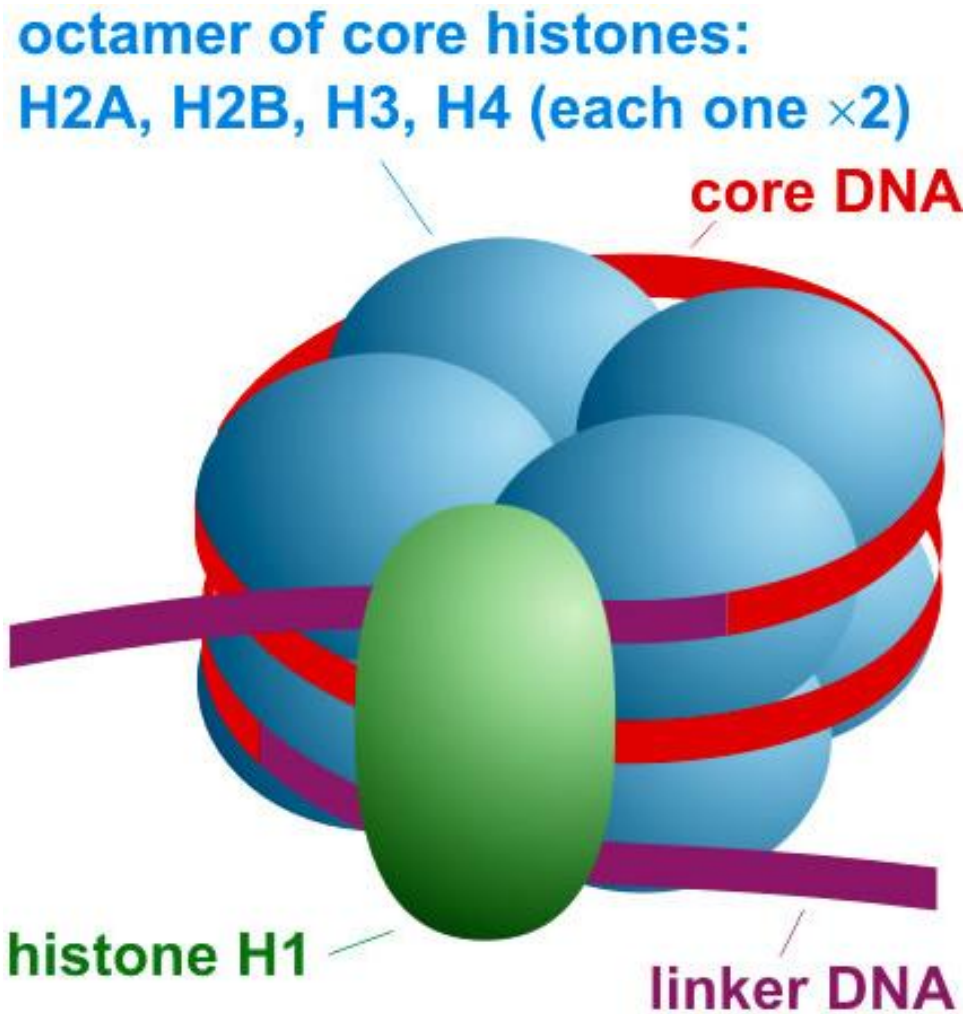
Dittmer, Travis & Misteli, Tom. (2011). The lamin protein family. *Genome biology*. 12. 222. [10.1186/gb-2011-12-5-222](https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-5-222).

Poziomy organizacji DNA w jądrze komórkowym

- **Podwójna helisa DNA**
- **Nukleosom** – fragment DNA (ok. 146 pz) owinięty wokół oktameru histonów
- **Włókno 10 nm** – tzw. „korale na sznurku” (*beads on a string*)
- **Włókno 30 nm** – bardziej skondensowana forma, może przyjmować dwa modele:
 - model solenoidu
 - model zygzakowy
- **Włókno 300 nm** – wyższy poziom kondensacji, np. pętle włókien 30 nm podtrzymywane przez rdzeń białkowy
- **Chromosom metafazowy** (~700–1400 nm) – maksymalnie skondensowane włókno w czasie mitozy



Nukleosomy



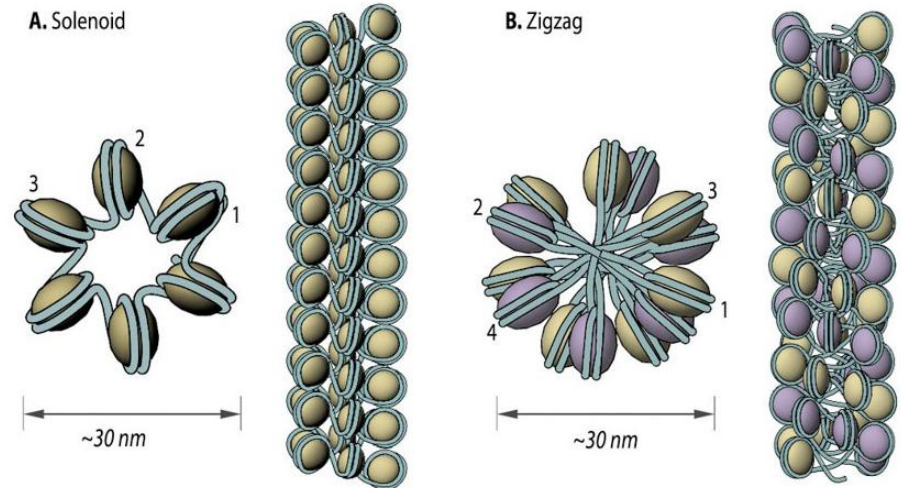
Solenoid/zygzak (włókno 30 nm)

Model solenoidu

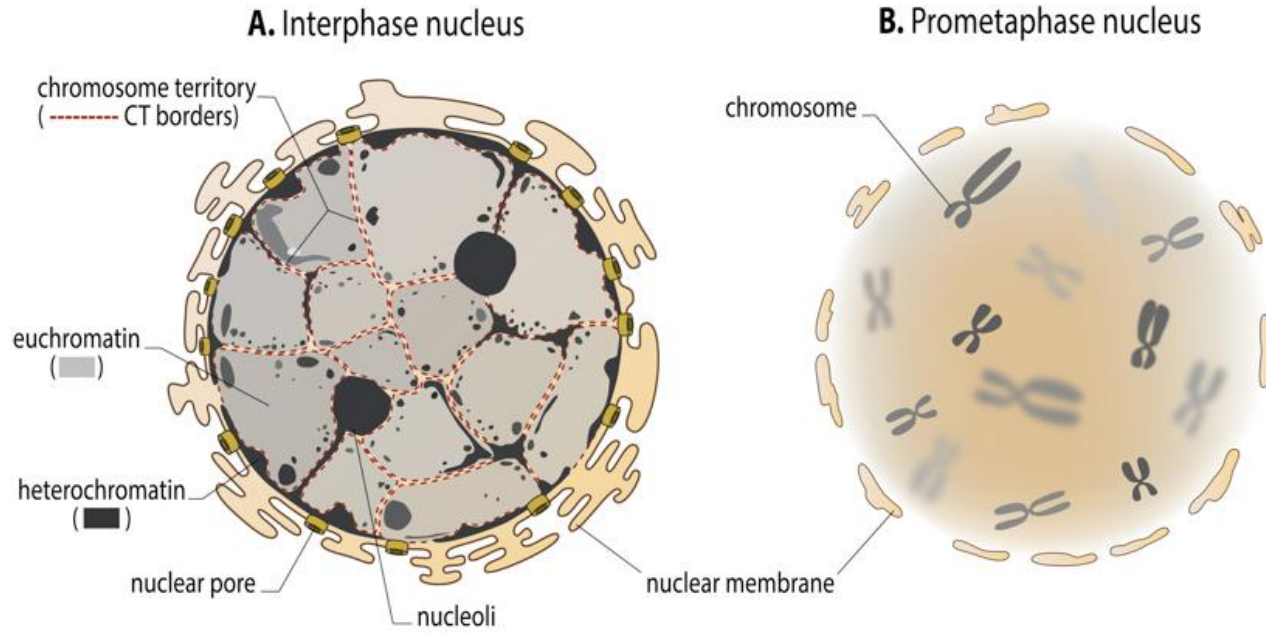
- Nukleosomy ułożone spiralnie, w zwartą, helikalną strukturę
- Każdy nukleosom kontaktuje się z sąsiadującymi
- DNA łącznikowe (linker DNA) jest zagięte do wnętrza spirali
- Struktura bardziej zwarta i stabilna

Model zygzakowy

- Nukleosomy ułożone naprzemiennie po przeciwnych stronach osi włókna
- DNA łącznikowe biegnie prostymi odcinkami, łącząc co drugi nukleosom
- Struktura mniej zwarta, bardziej elastyczna



Terytoria chromosomów

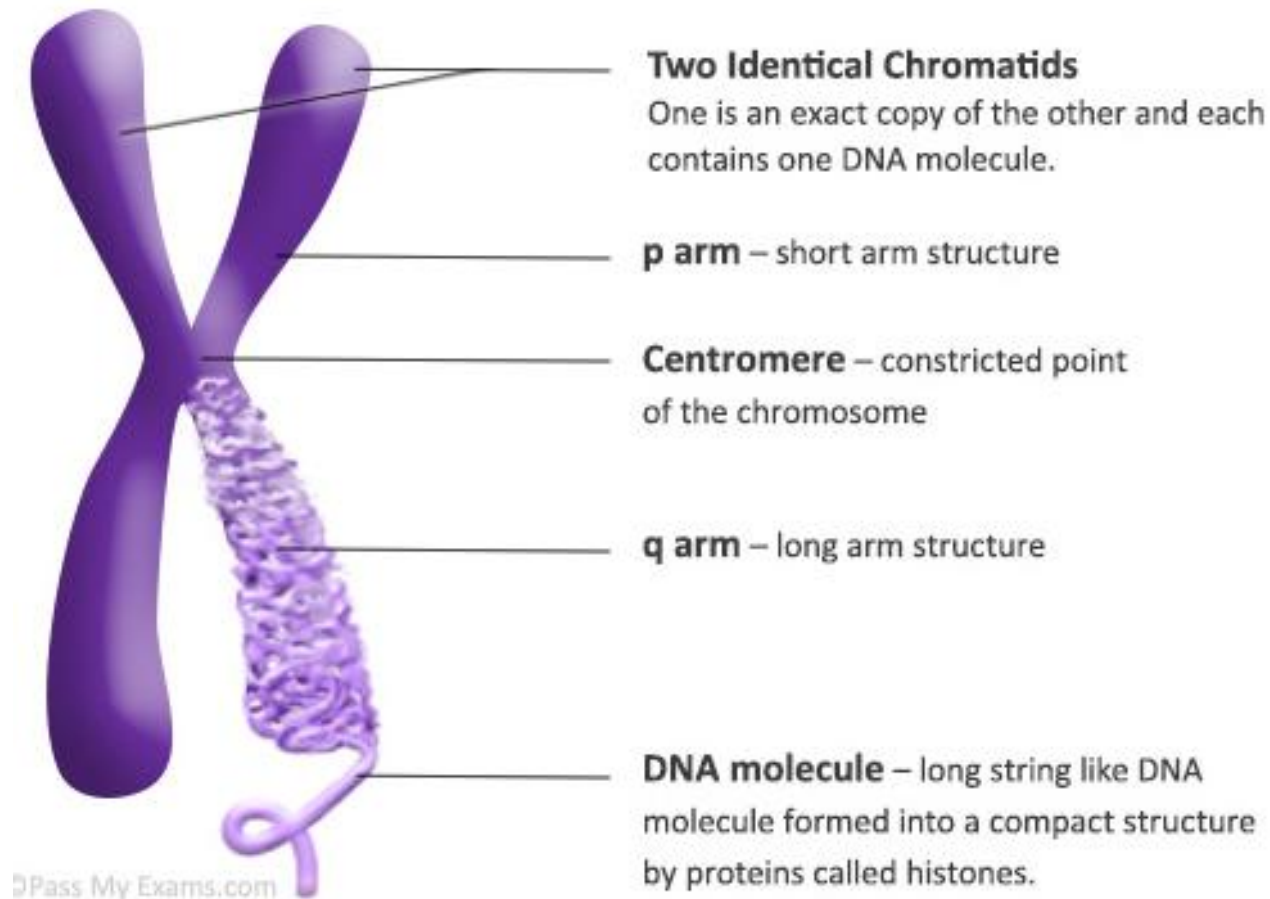


Chromosomy bogate w geny - pozycje wewnętrzne

Chromosomy ubogie w geny – peryferie

Geny mogą przenosić się z peryferii w kierunku wnętrza po ich "włączeniu"

Struktura chromosomów



Struktura chromosomów

Chromosomy metacentryczne

Centromer w środku, oba ramiona są równej długości. Ludzki chromosom 1, 3, 16, 19, 20.

Chromosomy submetacentryczne

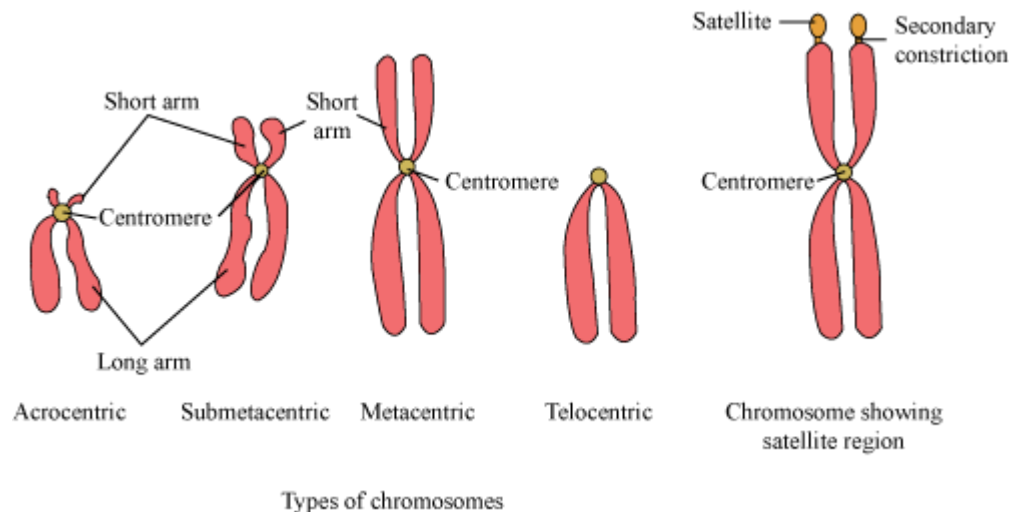
Niewielka asymetria w długości dwóch ramion. Ludzkie chromosomy 2, 4 -12, 17,18.

Chromosomy akrocentryczne

Jedno ramię bardzo długie, jedno mocno skrócone. Ludzkie chromosomy 13, 14, 15, 21 i 22.

Chromosomy telocentryczne

Centromer na samym końcu chromosomu. Człowiek nie posiada chromosomów telocentrycznych, występują u innych gatunków, takich jak myszy



Kariotyp

Co możemy określić na podstawie kariotypu?

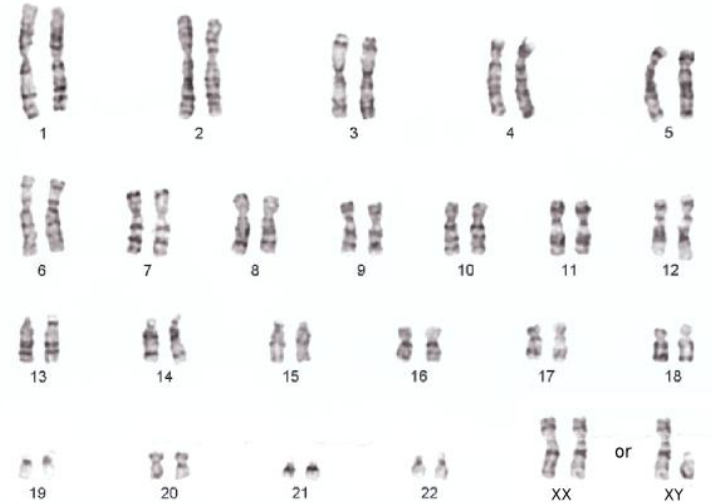
Liczba chromosomów

Wielkość chromosomów

Położenie centromeru, długość ramion chromosomalnych

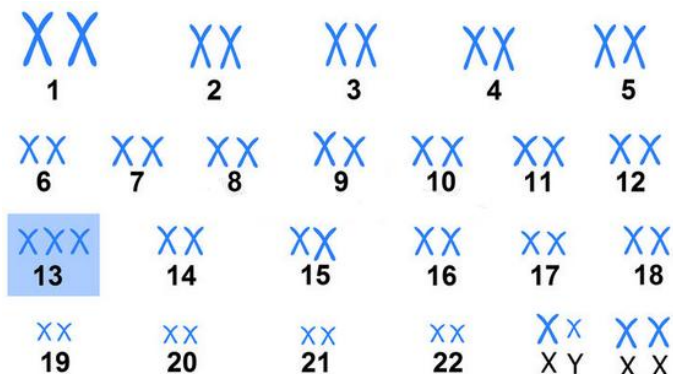
Obecność satelitów

Wzór prążków

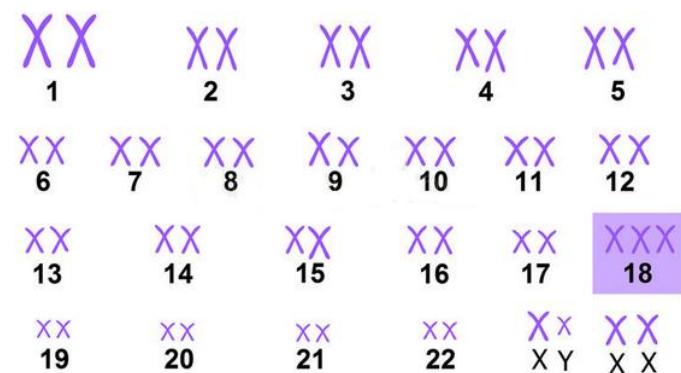


Człowiek - łącznie 46 chromosomów (23 od każdego z rodziców), 44 autosomy

Aberracje chromosomowe w obrębie autosomów

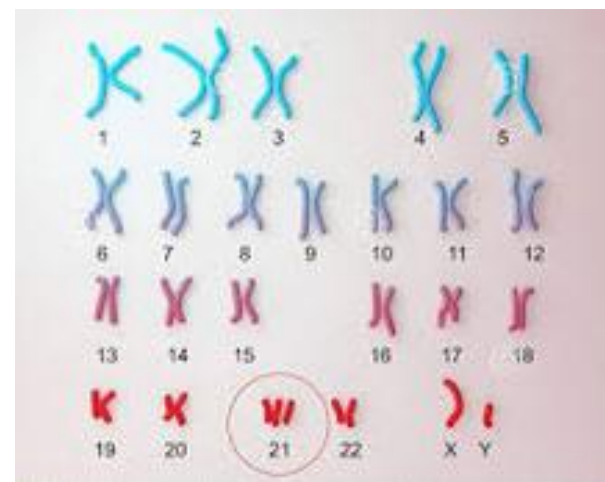


Zespół Patau – ciężka niepełnosprawność intelektualna, liczne wady rozwojowe, w tym wady serca i nerek, hipotonia mięśniowa oraz dysmorfia twarzoczaszki

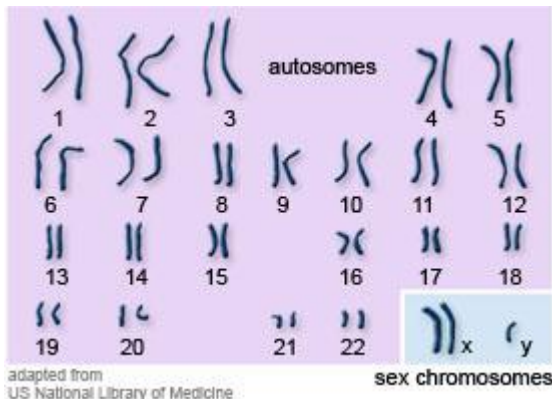


Zespół Edwardsa – liczne wady wielonarządowe, wady serca, mikrocefalia, zaciśnięte pięści z nakładającymi się palcami oraz ciężka niepełnosprawność intelektualna

Zespół Downa - opóźnienia wzrostu fizycznego, charakterystyczna dysmorfia twarzoczaszki oraz łagodna do umiarkowanej niepełnosprawność intelektualna

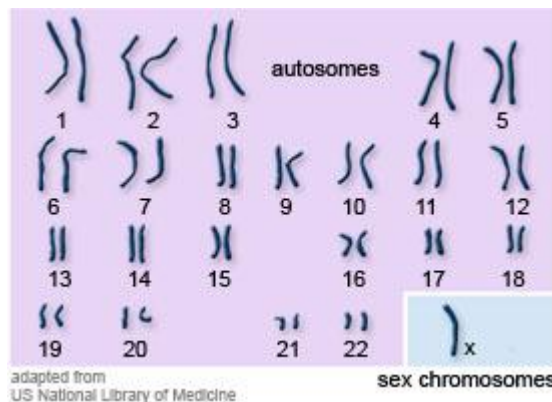


Aberracje chromosomowe w obrębie chromosomów płciowych



Zespół Klinefeltera - Dwa chromosomy X i jeden Y (47,XXY).

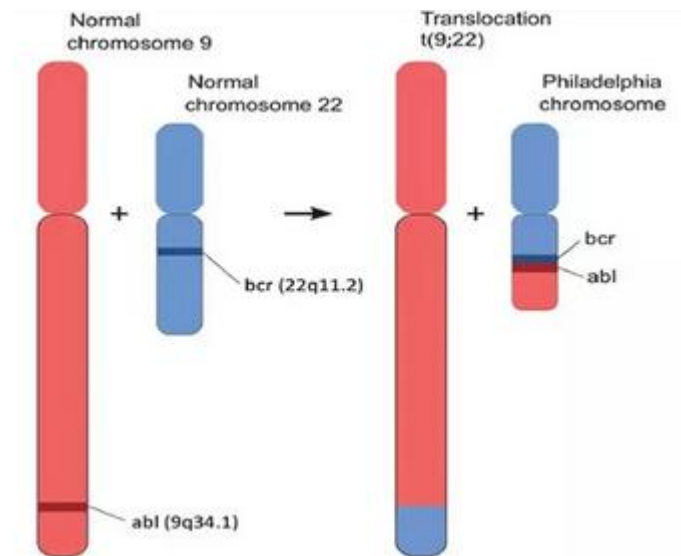
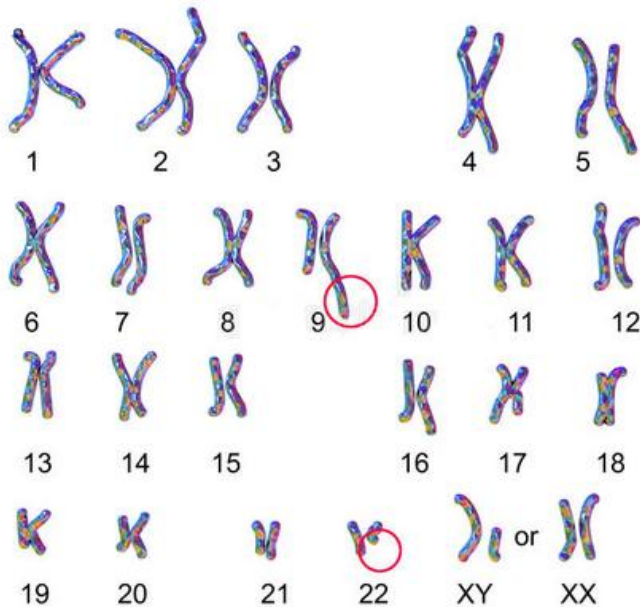
U wielu mężczyzn z dodatkowym chromosomem X brak jest wyraźnych objawów klinicznych, a rozpoznanie może pozostać nieustalone; najczęstszym objawem jest niepłodność.



Zespół Turnera – monosomia chromosomu X (45,X), brak drugiego chromosomu płciowego, prowadząca do typowych cech fenotypowych i zaburzeń rozwojowych, w tym niskiego wzrostu i niewydolności jajników.

Aberracje chromosomowe – chromosom fuzyjny

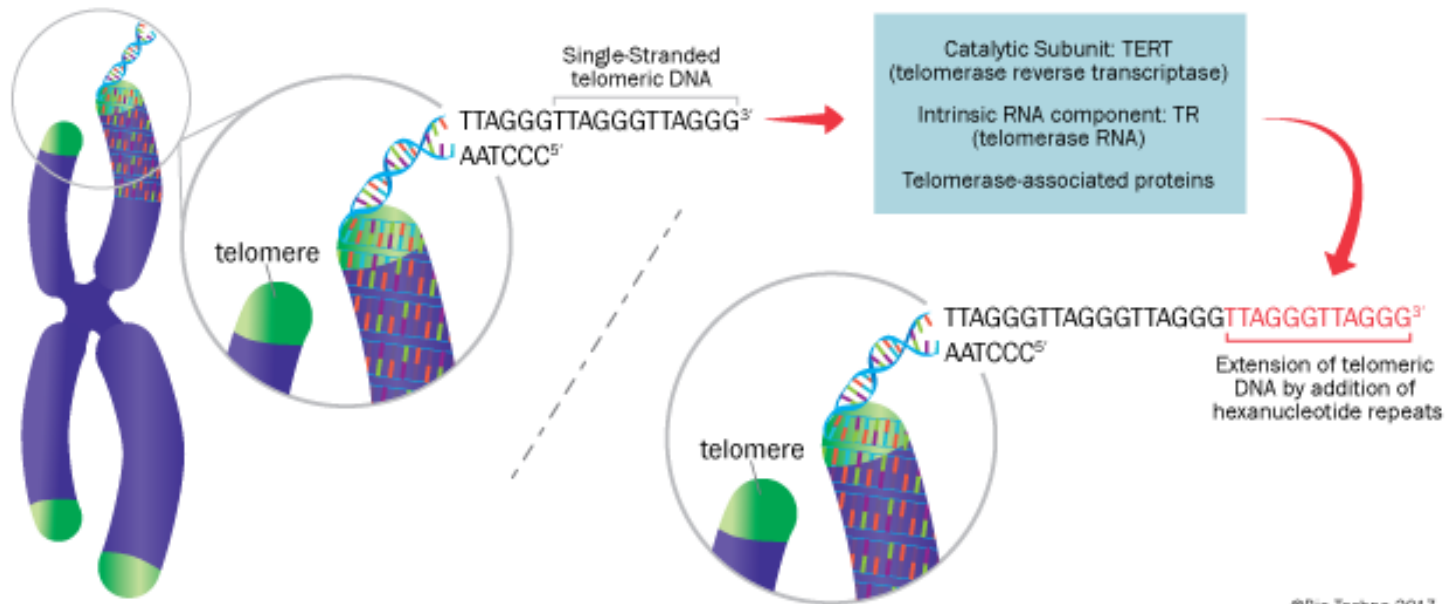
Chromosom Filadelfia – aberracja genetyczna polegająca na translokacji $t(9;22)(q34;q11)$, w której materiał genetyczny między chromosomem 9 a 22 zostaje wymieniony, prowadząc do powstania skróconego, „wadliwego” chromosomu 22; charakterystyczny dla przewlekłej białaczki szpikowej (CML) i niektórych przypadków ostrej białaczki limfoblastycznej.



Telomery

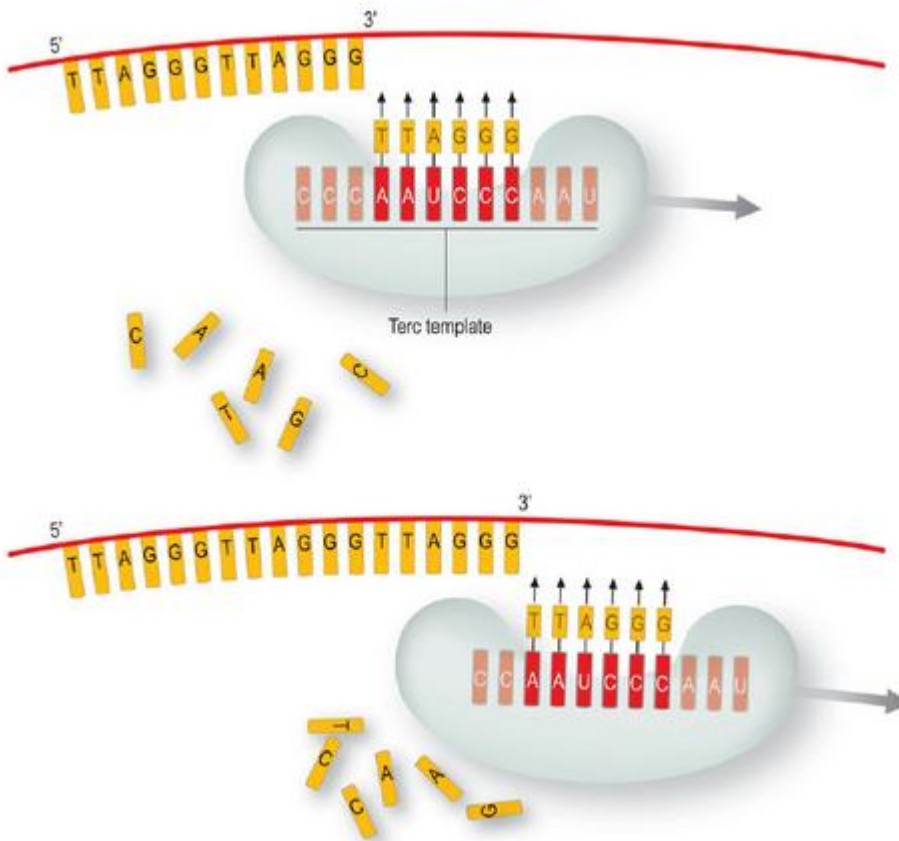
Heksameryczne powtórzenia DNA [(TTAGGG) n]- na końcach chromosomów, chronią chromosomy przed degradacją i sklejaniem

Replikacyjne skracanie telomerów - główna przyczyna starzenia się człowieka i chorób związanych ze starzeniem się



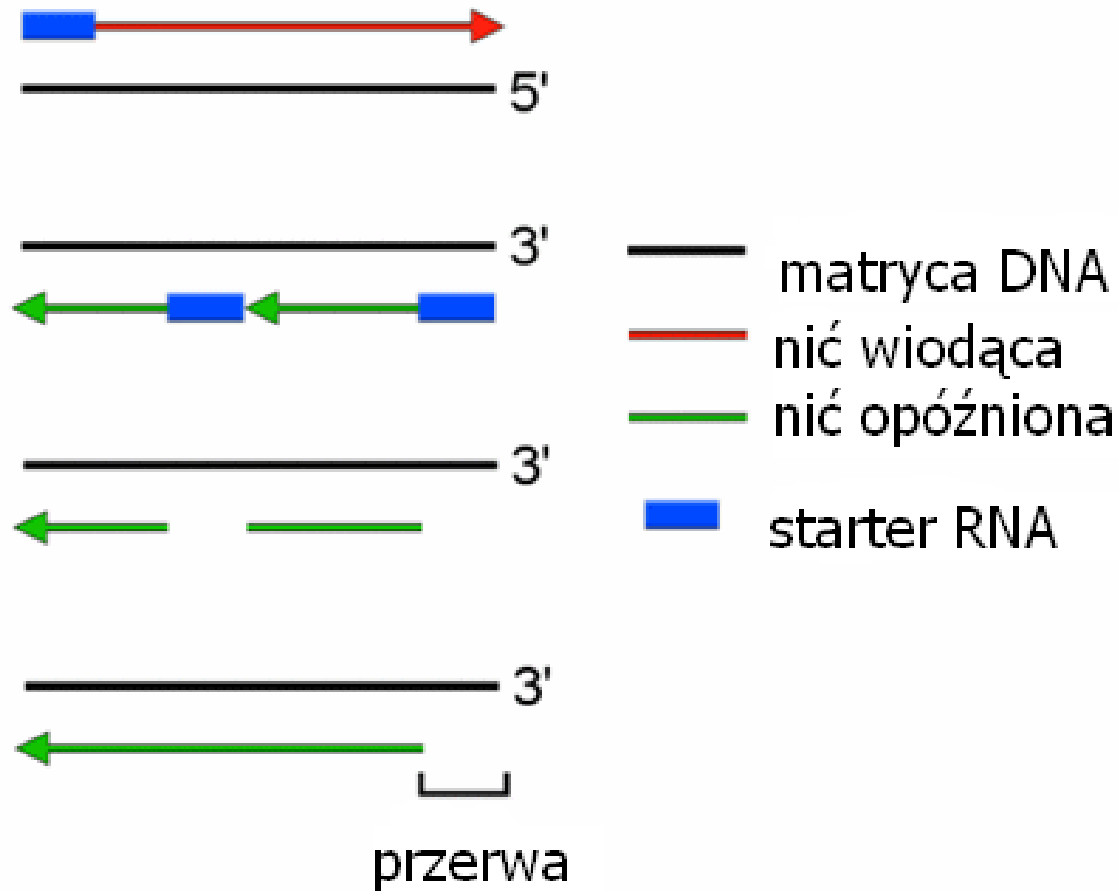
Telomery

Wydłużenie telomeru przez telomerazę.



Telomeraza zawiera matrycę RNA, która jest używana do dodawania powtórzeń nukleotydów telomerowych (w ludzkim TTAGGG) do 3' końców telomerów.

Telomery i „end-replication problem”



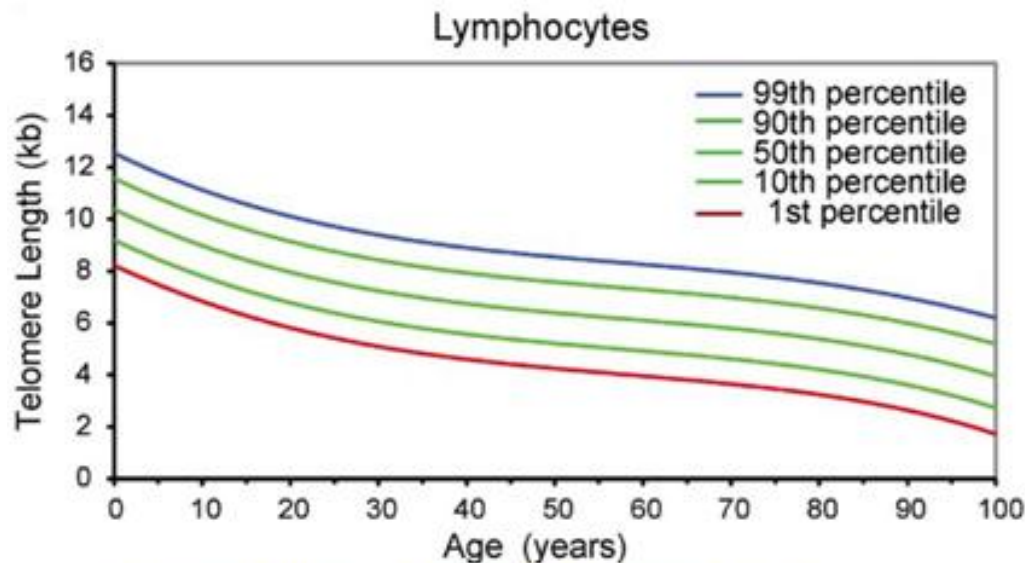
Sekwencje telomerowe (TTAGGG)_n

Telomery

Średnia długość telomerów w komórkach ludzkich w momencie **zapłodnienia** - 15 000 par zasad.

Średnia długość telomerów **przy urodzeniu** - 10.000 par zasad

Chromosomy stają się niestabilne z długością telomerów mniejszą niż 4.500 par zasad

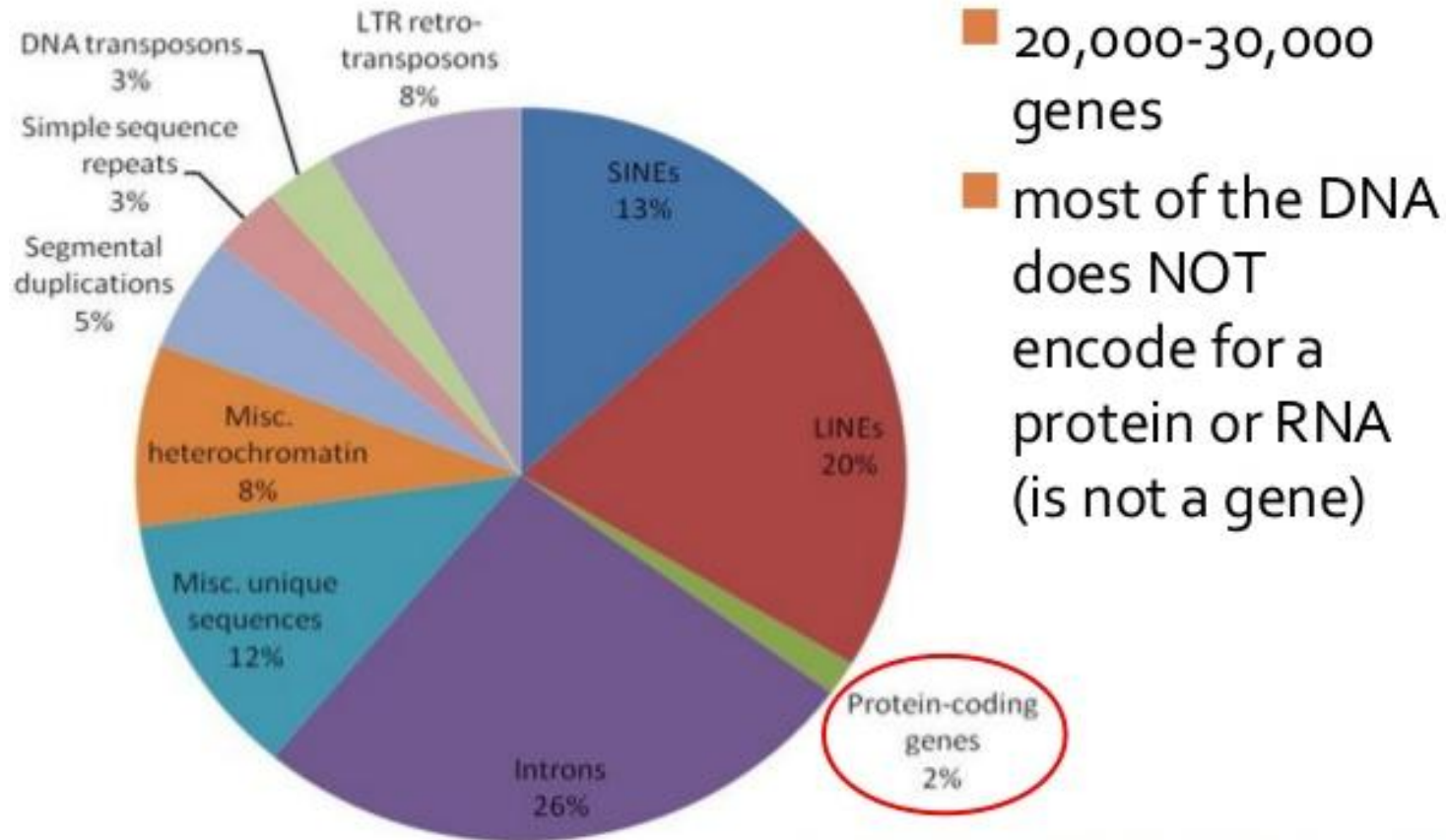


Average telomere length in relation to age.

Modified from J. Exp. Med. 2014 Vol. 211 No. 13.

PIK3R1 mutation augments PI3K signaling in new PID | Lucas et al.

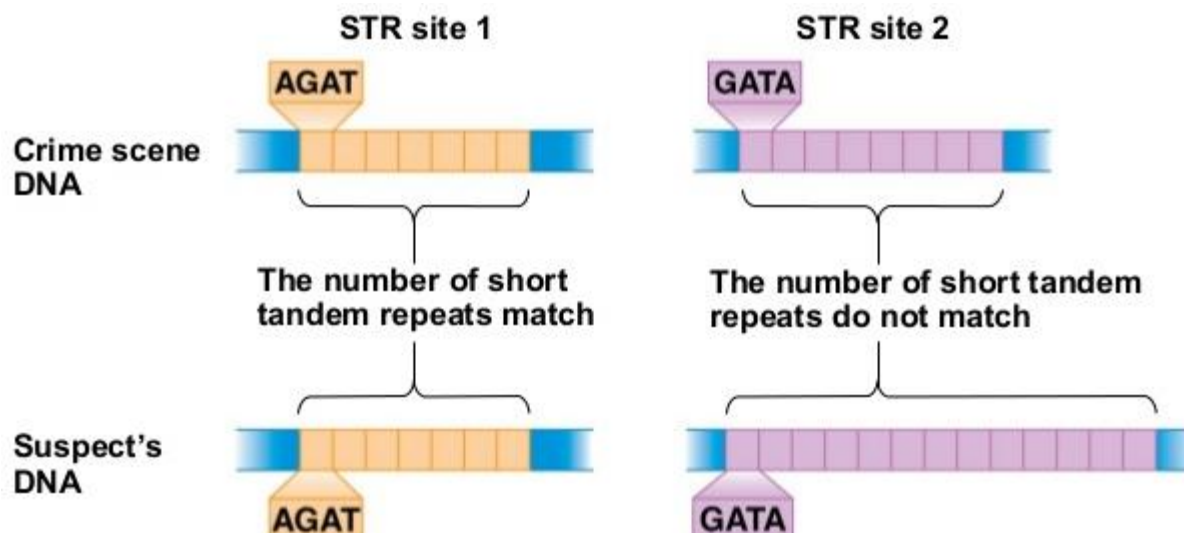
Informacja genetyczna u człowieka



Mini- i mikro- satelity

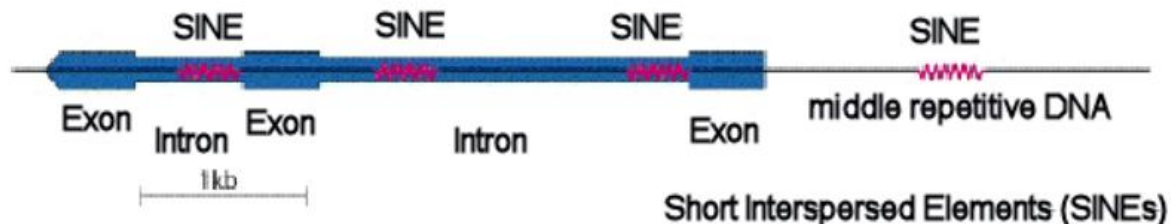
Minisatelitey (VNTR – Variable Numer Tandem Repeats) – średniej wielkości powtórzenia tandemowe (10-100 pz), powtórzone od kilkunastu do kilkuset razy, hiperzmienne, wysoce polimorficzne, występujące głównie w pobliżu telomerów; stosowane w pobieraniu “odcisków palców DNA” (medycyna sądowa)

Mikrosatelitey lub “Short Tandem Repeats” (STR) – małe powtórzenia tandemowe (1-6 pz), powtórzone od kilku do kilkudziesięciu razy, rozproszone; najczęściej są to powtórzenia dinukleotydów, stosowane w pobieraniu “odcisków palców DNA” (medycyna sądowa)



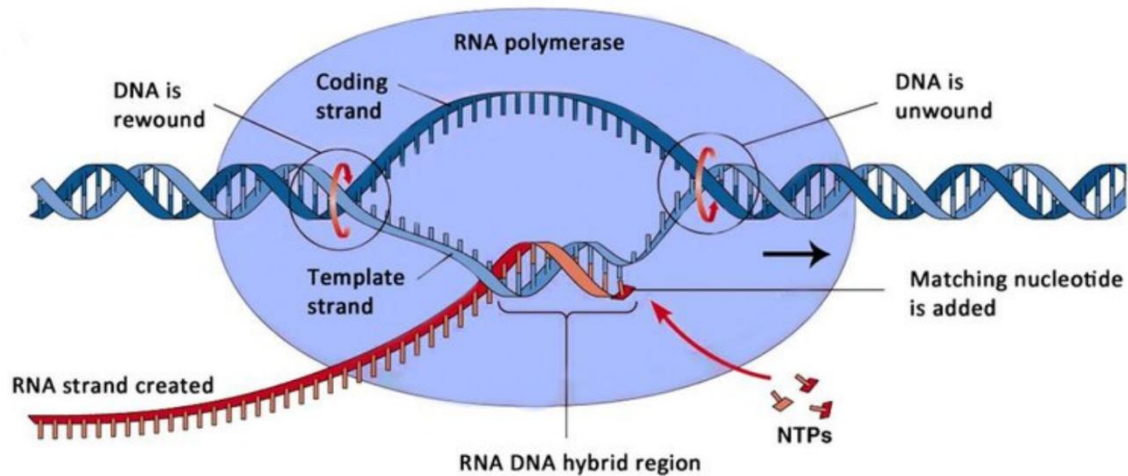
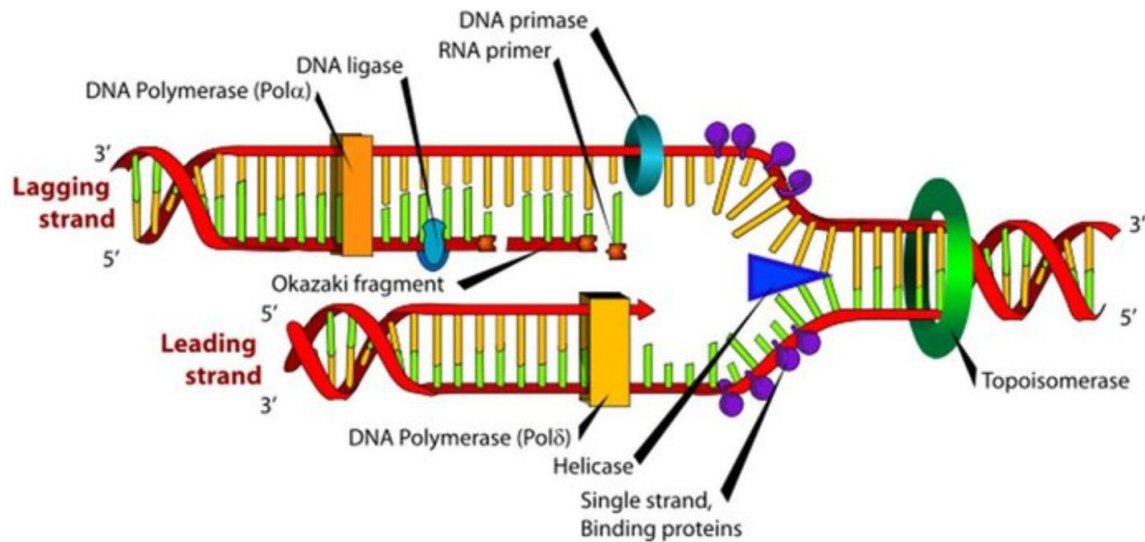
LINES, SINES, transpozony

- Transpozony – elementy transpozycyjne migrujące w genomie
- **LINE (*Long Interspersed Nuclear Elements*)**
 - Długie elementy rozproszone w genomie — mają zwykle **6–7 tysięcy par zasad**
 - Najliczniejszy typ to **LINE-1 (L1)**
 - **Stanowią ok. 17% genomu człowieka**
 - Pochodzą od dawnych **retrotranspozonów** — sekwencji, które potrafiły kopiować się w genomie poprzez RNA
 - Część z nich jest nadal **aktywnych**, czyli może wstawiać swoje kopie w nowe miejsca DNA
- **SINE (*Short Interspersed Nuclear Elements*)**
 - Krótsze sekwencje — około 100–300 par zasad
 - Najbardziej znane to Alu-sekwencje (około 1,1 miliona kopii w genomie)
 - Stanowią ok. 11% genomu człowieka
 - Nie mają własnych enzymów do kopiowania, więc korzystają z mechanizmu LINE-1



DNA

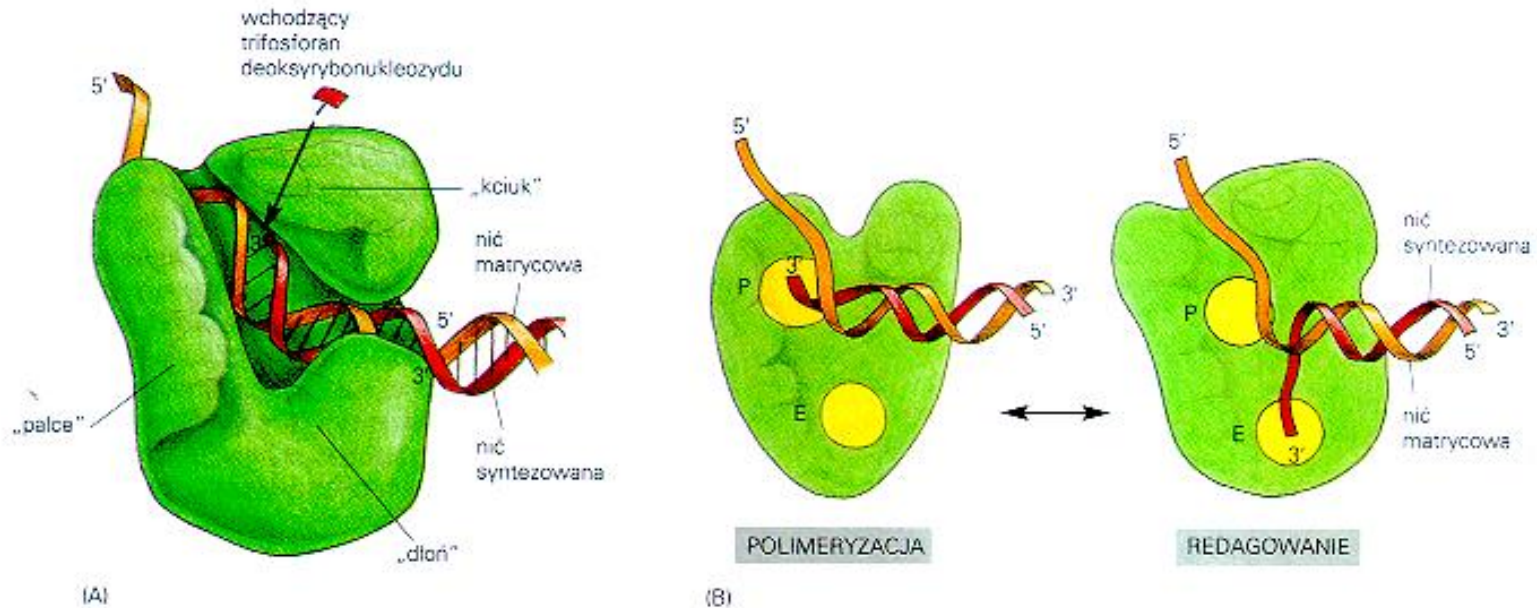
replikacja i transkrypcja



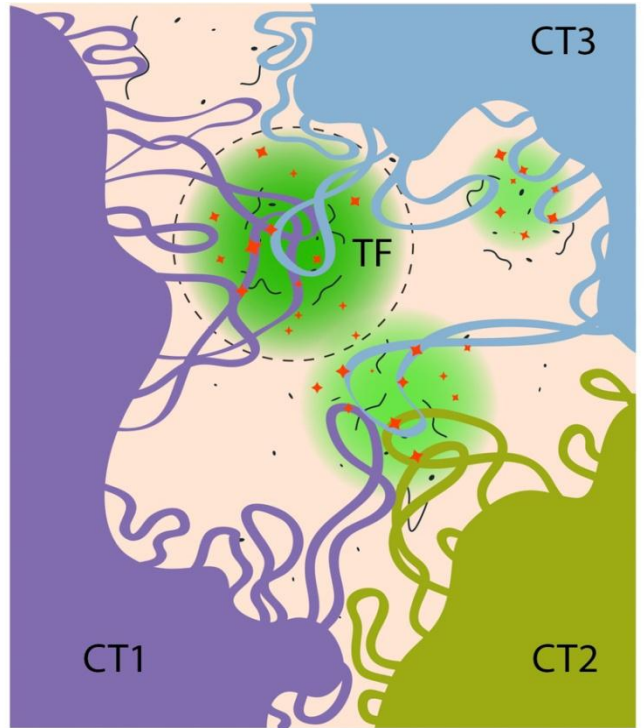
Replikacja DNA

- Zachodzi w fazie S cyklu komórkowego
- Jest semikonserwatywna – z jednej nici powstają dwie kompletne, podwójne helisy
- Miejsca początku replikacji (ok. 10 000) – bogate w pary A–T (łatwiejsze do rozerwania)
- **Widelki replikacyjne** – przesuwają się z szybkością ok. 100 par zasad/s
- **Helikaza** – rozplata podwójną helisę DNA.
- **SSB** (ang. *Single-Strand Binding proteins*) – stabilizują pojedyncze nici
- **Topoizomeraza** – usuwa naprężenia przed widelkami replikacyjnymi
- **Prymaza** – syntetyzuje starter RNA, od którego **polimeraza DNA** może rozpocząć dobudowywanie nowej nici
- **Polimeraza DNA** – dobudowuje nową nić (5'→3').
- **Ligaza DNA** – łączy fragmenty Okazaki na nici opóźnionej
- **Telomeraza** – wydłuża końce chromosomów (telomery)

Aktywność egzonukleazowa (3'-5') polimerazy DNA



Transkrypcja



TF - transcription factory
CT - chromosome territory

★ RNA polymerase
— mRNA transcript
— chromatin loop

Ogniska transkrypcyjne (fabryki transkrypcyjne) - submikronowe regiony jądrowe (o średnicy 40–100 nm), które są wzbogacone w kompleksy polimerazy RNA II (RNAPol II).

Polimeraza RNA I jest ograniczona do jąderka, podczas gdy polimerazy RNA II i III są nukleoplazmowe

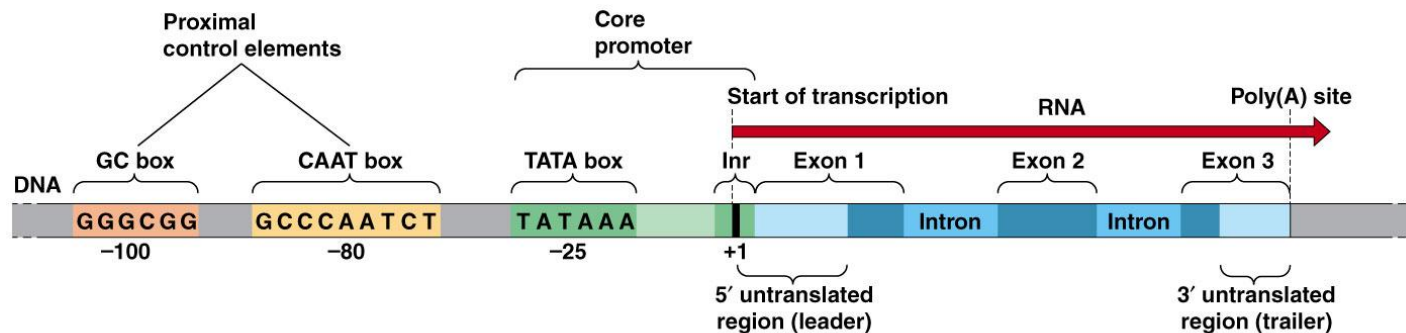
Transkrypcja

U eukariotów istnieją trzy polimerazy RNA (I, II i III) zaangażowane w transkrypcję :

polimeraza RNA I (zlokalizowana w jąderku) transkrybuje cząsteczki prekursora rRNA.

Polimeraza RNA II wytwarza większość mRNA oraz miRNA.

Polimeraza RNA III jest odpowiedzialna za produkcję pre-tRNA, 5S rRNA i innych małych RNA.



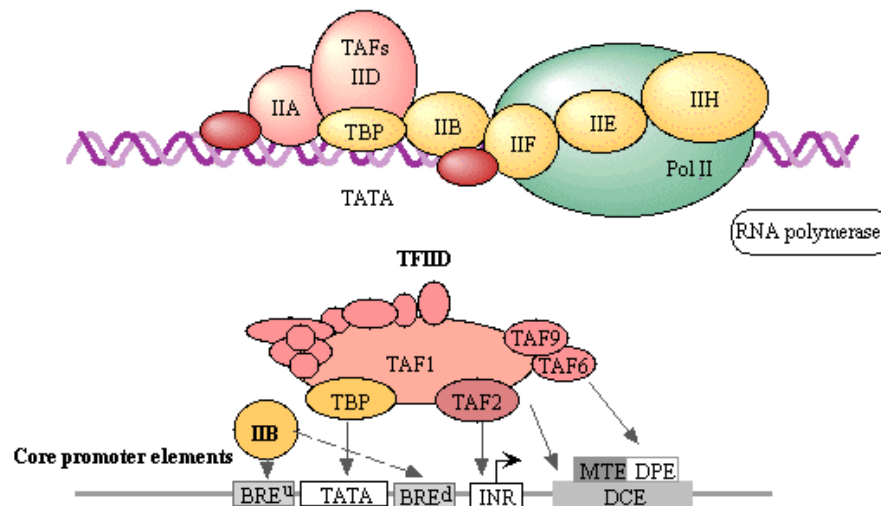
Sekwencje promotorów - zazwyczaj mają dwa składniki:

Składnik proksymalny - kaseta TATA (kieruje polimerazę RNA II we właściwe miejsce)

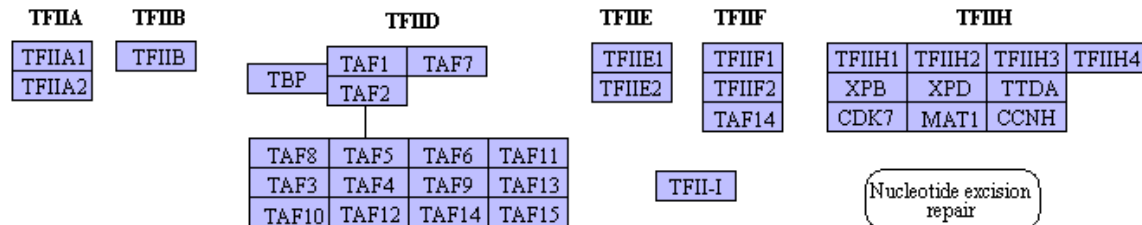
Komponent dystalny - sekwencje CAAT i GC (określa częstotliwość inicjacji transkrypcji)

Ogólne czynniki transkrypcyjne

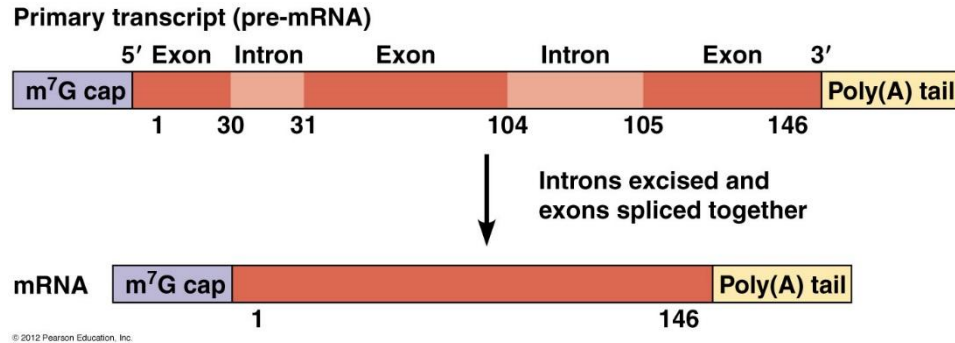
BASAL TRANSCRIPTION FACTORS (EUKARYOTES)



General transcription factors for RNA polymerase II



Dojrzewanie RNA

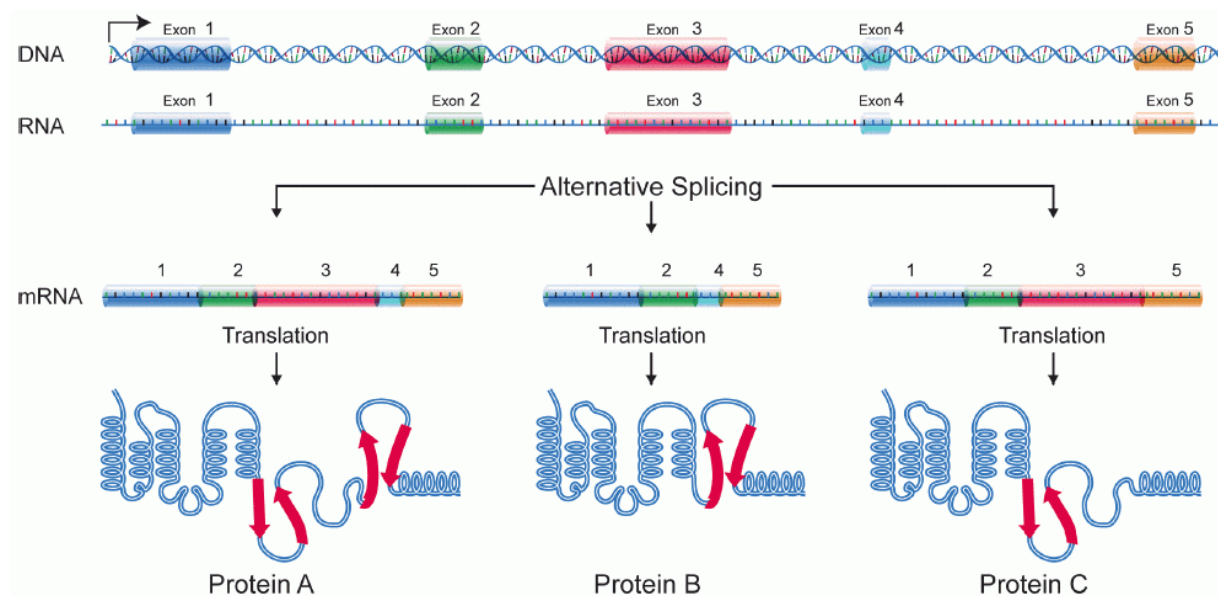


mRNA jest najpierw wytwarzany jako pre-mRNA (heterogeniczny jądrowy RNA; hnRNA), a następnie modyfikowany do dojrzałego mRNA:

1. Dodanie struktury **czapeczki 5'** (nukleotyd guanozyny metylowany na 7 pozycji) - chroni przed degradacją przez 5'egzonukleazy; pomaga transkryptom wiązać się z rybosomem podczas syntezy białek
2. Dodanie **ogonów poli-A** - pierwotne transkrypty zawierają wysoce zachowaną sekwencję AAUAAA znaną jako sygnał poliadenylacji (w pobliżu końca 3'); stabilizuje transkrypt i umożliwia eksport do cytoplazmy
3. **Splicing** - wycinanie intronów

Alternatywne składanie transkryptu

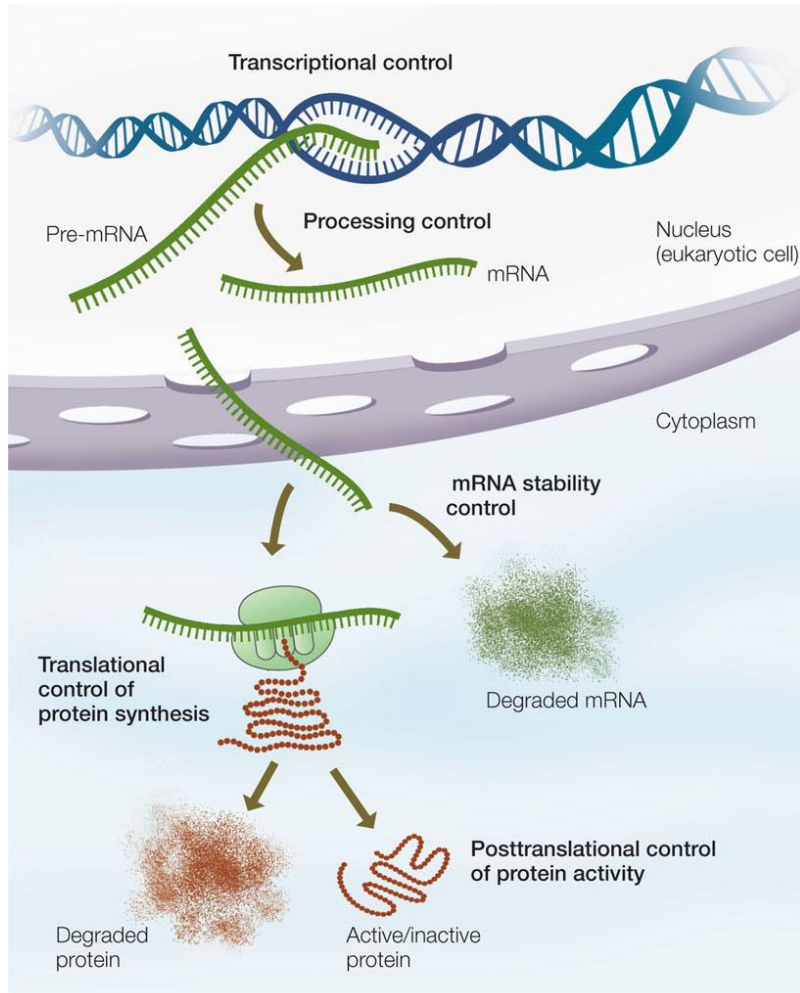
Alternatywny splicing - alternatywne formy mRNA



Białka powstające z alternatywnych mRNA różnią się sekwencją aminokwasową a także często funkcją.

Alternatywny splicing pozwala na syntezę znacznie większej liczby białek, niż można by oczekiwać od 20 000 genów kodujących białka.

Potencjalne punkty regulacji ekspresji genów

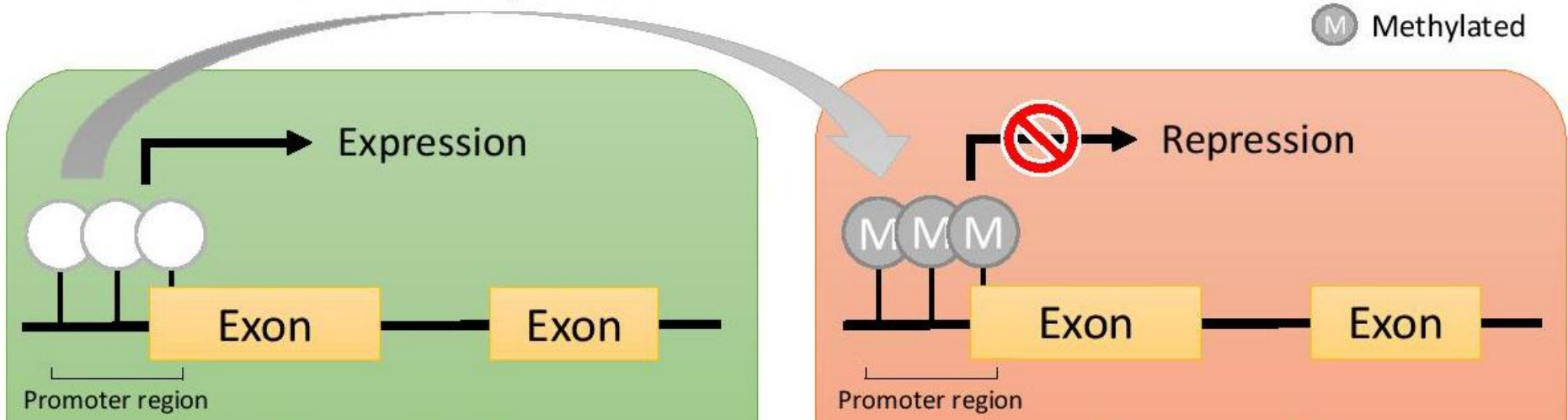


Na każdym etapie drogi od DNA do białka ekspresja genów może być regulowana

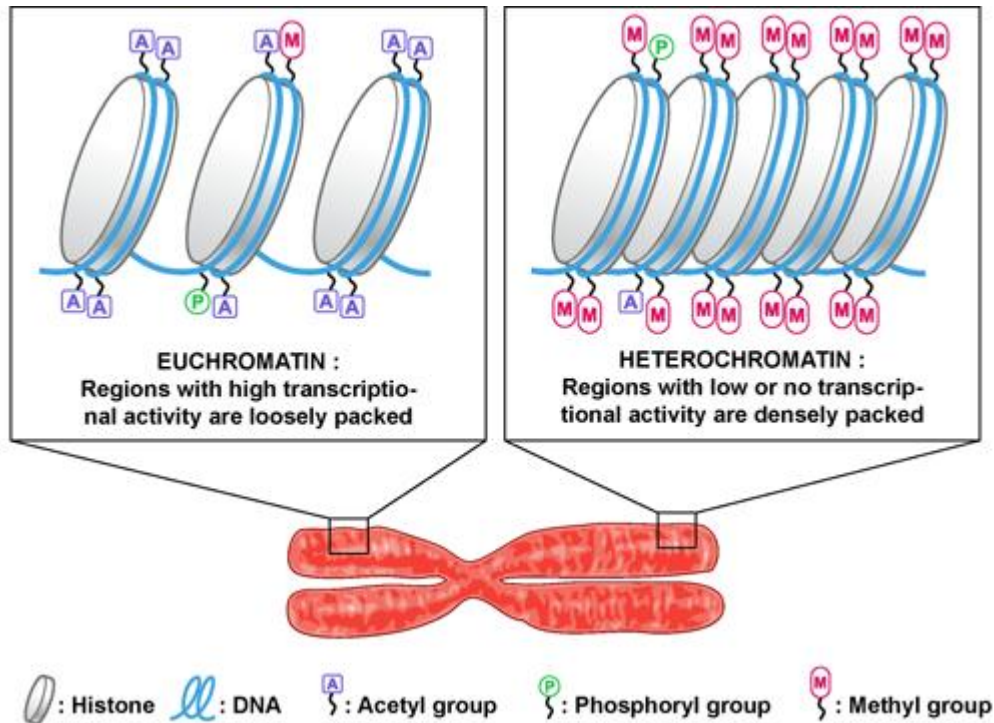
Metylacja DNA

DNA methylation

○ Unmethylated
● M

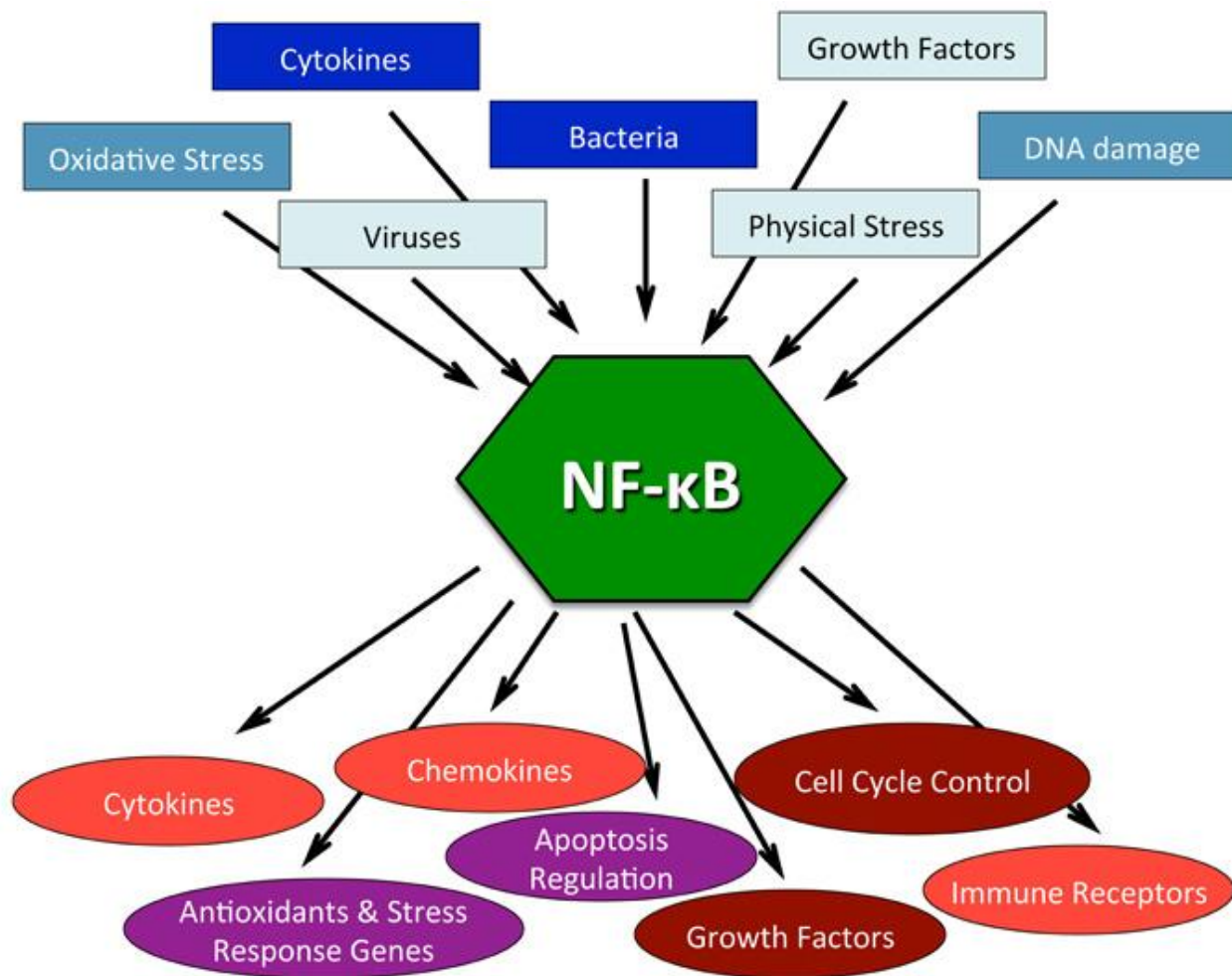


Modyfikacje histonów



Potranslacyjne modyfikacje histonów – regulują ekspresję genów poprzez organizowanie genomu w aktywne regiony euchromatyny, gdzie DNA jest dostępne do transkrypcji, lub nieaktywne regiony heterochromatyny, gdzie DNA jest bardziej zwarte i mniej dostępne do transkrypcji.

Specyficzne czynniki transkrypcyjne – NF-kappaB



Interferencja RNA



Wild-type
V26 petunia

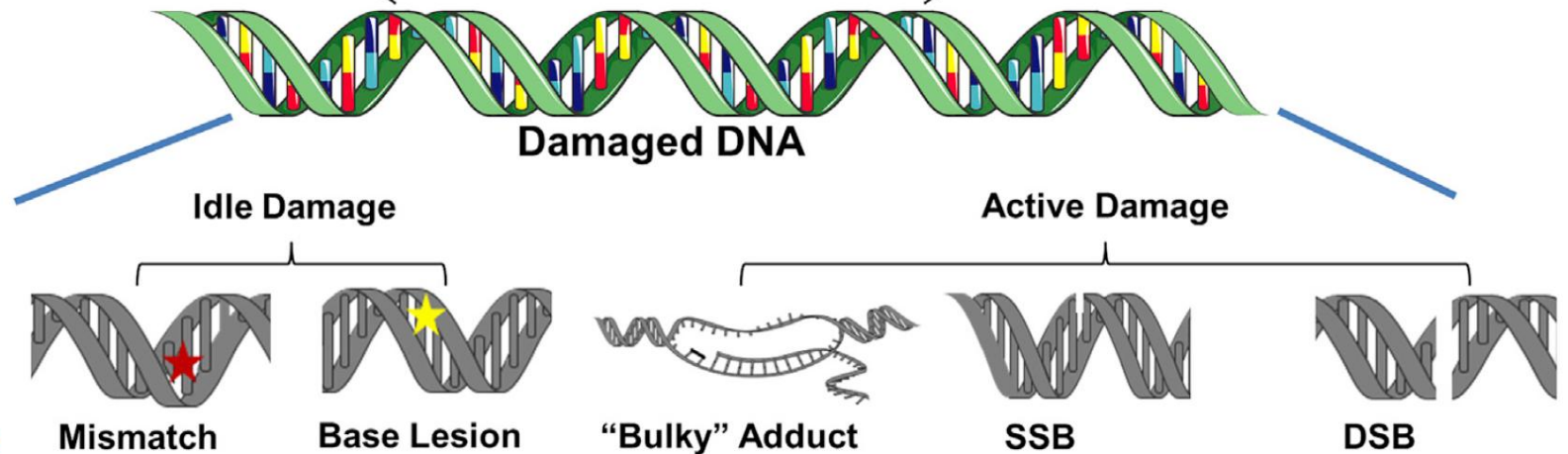
Flowers of chalcone synthase
silenced transformants

Craig C. Mello and Andrew Fire's 1998 *Nature* paper reported a potent gene silencing effect after injecting double stranded RNA into *C. elegans*. In investigating the regulation of muscle protein production, they observed that neither mRNA nor antisense RNA injections had an effect on protein production, but double-stranded RNA successfully silenced the targeted gene. As a result of this work, they coined the term *RNAi*.

Interferencja RNA (RNAi) to naturalny mechanizm regulacji genów, w którym krótkie cząsteczki RNA – głównie siRNA lub miRNA – powodują wyciszenie ekspresji genów. Dzieje się tak, ponieważ wiążą się one z komplementarnym mRNA i prowadzą do jego zniszczenia lub zablokowania translacji, co uniemożliwia powstanie białka. Proces ten odgrywa ważną rolę w obronie komórek przed wirusami i transpozonomi oraz w precyzyjnym sterowaniu aktywnością genów.

Intrinsic Damaging Agents
(ROS, replication mistakes, replication stress, alkylating chemicals, & metabolically-derived aldehydes)

Extrinsic Damaging Agents
(radiation, environmental chemicals, & chemotherapeutic agents)



DNA Damage

Mismatch

Base Lesion

"Bulky" Adduct

SSB

DSB

Molecular Effect

Mutagenesis

Mutagenesis

Blocked transcription
Blocked replication
Mutagenic bypass

Blocked transcription
Faithful recombination

Blocked transcription
Replication fork collapse
Genomic instability

Cellular Consequence

Transformation

Transformation

Transformation
Death

Death

Transformation
Death

Disease Outcome

Cancer

Cancer
Immunodysfunction

Cancer
Neurological disease
Premature aging

Neurological disease

Cancer
Neurological disease
Immunodysfunction

Responsible Repair Pathway

MMR

BER

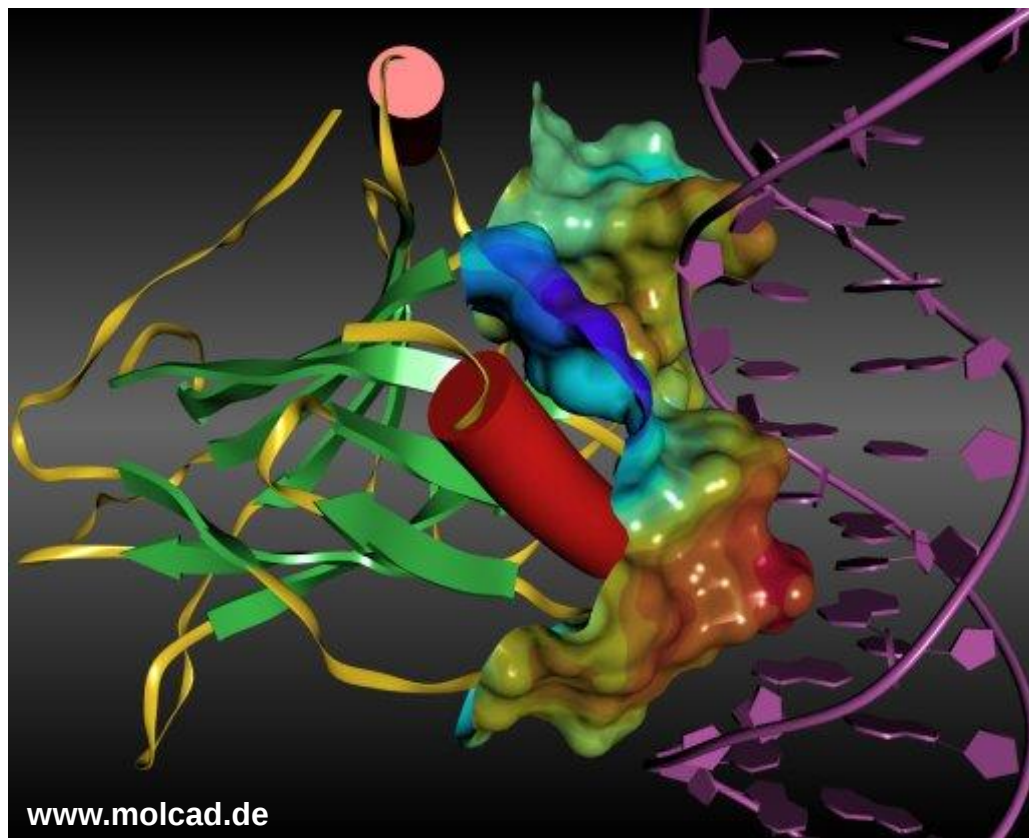
NER

SSBR

DSBR

p53 strażnik integralności genomu

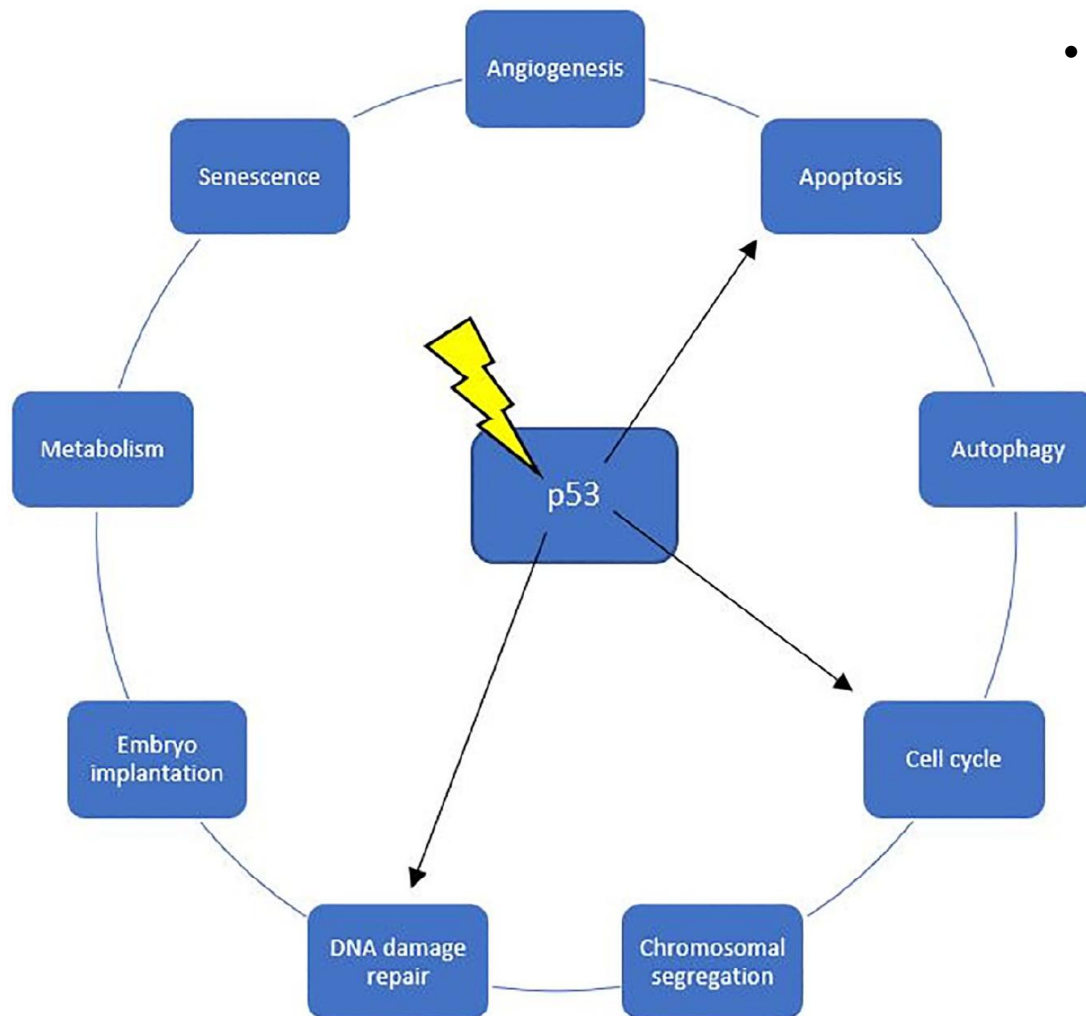
koordynuje odpowiedź komórki na stres genotoksyczny i utrzymuje integralność genomu



- p53 jest supresorem nowotworów
- jeden z najważniejszych genów w biologii nowotworów
- zapobiega namnażaniu się komórek o potencjale nowotworzenia
- nasila apoptozę, zatrzymanie cyklu komórkowego i naprawę uszkodzeń DNA w prawidłowych komórkach
- bezpośrednio reguluje ~ 500 genów
- najczęstsze mutacje tego genu w nowotworach

p53

zaangażowany w szeroki wachlarz funkcji komórkowych



- Białko p53 utrzymywane na niskim poziomie aż do wystąpienia stresu genotoksycznego - stymuluje stabilizację i akumulację białka
 - akumulacja p53 następuje w odpowiedzi na uszkodzenie DNA
 - p53 jest regulowany w komórkach nie poddanych żadnemu stresowi na początku fazy S, aby zainicjować szybką odpowiedź w przypadku wykrycia uszkodzonego DNA

Zespół Li Fraumeni

Frederick Pei Li i Joseph F. Fraumeni, Jr

- uwarunkowany genetycznie zespół predyspozycji do nowotworów
- mutacje w genie *TP53* – dziedziczenie w sposób autosomalny dominujący
- zwiększone ryzyko zachorowania na choroby nowotworowe u dzieci i osób młodych w szczególności na mięsaki tkanek miękkich i kości, raka sutka, ostre białaczki, guzy mózgu, raka kory nadnerczy
- inne przypadki obejmują nowotwory przewodu pokarmowego, płuc, nerek, tarczycy, skóry, a także narządów płciowych (jajników, jąder, prostaty)