

## ZAJĘCIA nr 5

# ZAGADNIENIA TEORETYCZNE DO PRZYGOTOWANIA NA ĆWICZENIE: „Genom jądrowy i mitochondrialny”

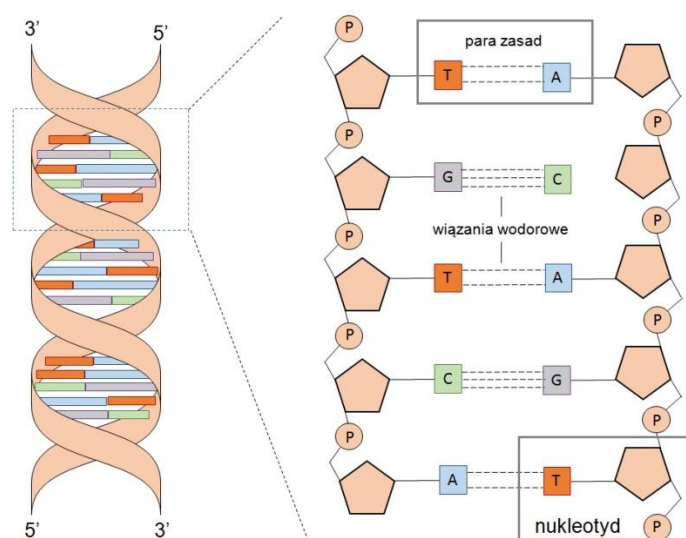
Budowa genomu jądrowego i mitochondrialnego. Replikacja genomu jądrowego. Ekspresja genu (transkrypcja i translacja).

## LITERATURA

1. *Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.: Podstawy biologii komórki. PWN, Warszawa 2009.*
2. *Brown T. : Genomy. PWN, Warszawa 2001*

## I. Część teoretyczna

Genom to całkowity DNA (kwas deokserybonukleinowy) zawarty w komórce danego organizmu. Częsteczka DNA składa się z dwóch przeciwrównolegle ułożonych łańcuchów polinukleotydowych, które owijają się wzajemnie tworząc podwójną helisę (Rysunek 1). Podwójna helisa jest utrzymywana dzięki wiązaniom wodorowym między adeniną i przeciwległą tyminą (A-T) oraz cytozyną i przeciwległą guaniną (C-G). Liczba par zasad (pz) jest używana do określenia wielkości genomu (długości DNA).



Rysunek 1. Schemat budowy DNA.

## 1. Budowa genomu jądrowego

Genom jądrowy składa się z liniowych cząsteczek DNA, zlokalizowanych w chromosomach. Zawiera geny i sekwencje związane z genami oraz DNA pozagenowe. Ludzki genom jądrowy ma wielkość około 3 miliardów par zasad (3000 mega par zasad, Mpz) i zawiera około 25 tysięcy genów w pojedynczym zestawie chromosomów ( $n=23$ ). Geny i sekwencje związane z genami stanowią 30% genomu, natomiast pozostała część genomu (70%) to DNA pozagenowe.

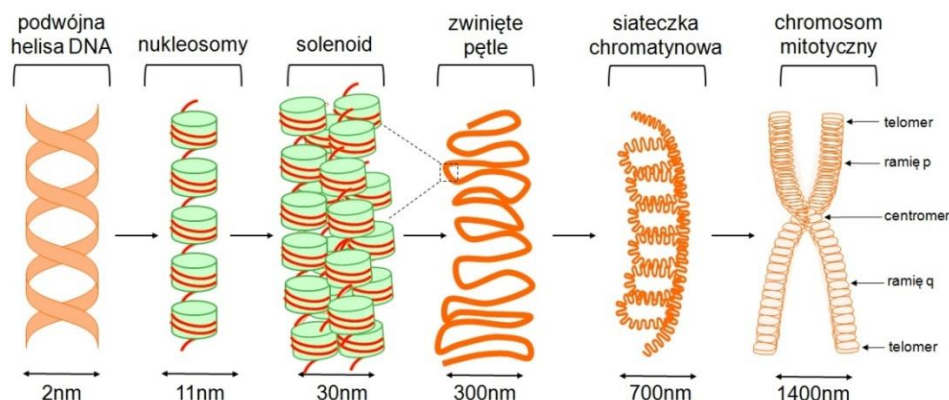
Genom jądrowy człowieka (3000 Mpz)	
Geny i sekwencje związane z genami (900 Mpz)	DNA pozagenowy (2100 Mpz)
<p>DNA kodujący - <b>eksony</b> (90Mpz)</p> <p>DNA niekodujący (810 Mpz): <b>introny</b>, sekwencje promotorowe, początkowe i końcowe genów, pseudogeny</p>	<p>Pojedyncze sekwencje o małej liczbie kopii (1680 Mpz)</p> <p>Seqwencje powtórzone (420 Mpz):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- powtórzenia tandemowe (satelitarne DNA)</li> <li>- powtórzenia rozproszone w genomie (retrotranspozony i transpozony)</li> </ul>

Całkowita długość DNA w podwójnym zestawie chromosomów (46 chromosomach) wynosi około 6,4 miliardów par zasad.

## Upakowanie DNA w chromosomach (Rysunek 2)

DNA jest upakowany w chromosomach dzięki połączeniu z białkami – histonami. Kompleks DNA z histonami nazywany jest chromatyną. Podstawową jednostką strukturalną chromatyny jest nukleosom. Nukleosom zawiera dwuniciowy DNA o długości 146 par zasad, owinięty wokół rdzenia białkowego, składającego się z ośmiu białek histonowych (po dwa histony H2A, H2B, H3 i H4). Nukleosomy są połączone ze sobą krótkimi odcinkami DNA łącznikowego. W wyniku zwijania się nukleosomów powstaje struktura zwana solenoidem lub włóknem o średnicy 30 nm. Solenoid i nukleosomy można obserwować w jądrach interfazowych w mikroskopie elektronowym. Natomiast podczas podziału jądra komórkowego, chromosomy występują w stadium silnie skondensowanym i można je oglądać w mikroskopie świetlnym. W chromosomie mitotycznym wyróżnia się ramię krótkie (p), ramię długie (q), centromer i telomery. Centromer utrzymuje razem dwa chromosomy siostrzane (chromatydy) i jest miejscem przyłączenia się mikrotubul. Jest on utworzony z

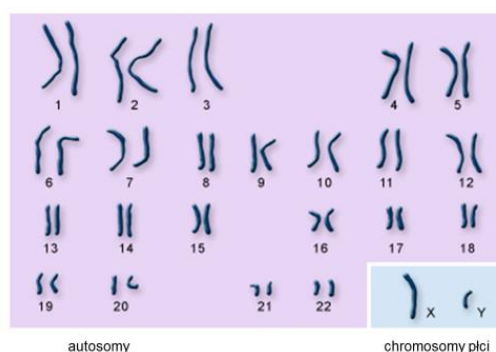
wielu kopii sekwencji powtórzonych tandemowo (heterochromatyna konstytutywna). W obrębie centromeru powstaje kompleks białek nazwany kinetochorem, który przyłącza



Rysunek 2. Stopnie upakowania DNA w chromosomach.

podwojone chromosomy do wrzeciona podziałowego i umożliwia ich segregację. Telomer to region końcowy każdej chromatyd, utworzony z setek kopii powtórzeń tandemowych (5'-TTAGGG-3'). Skracają się one podczas każdego podziału komórki.

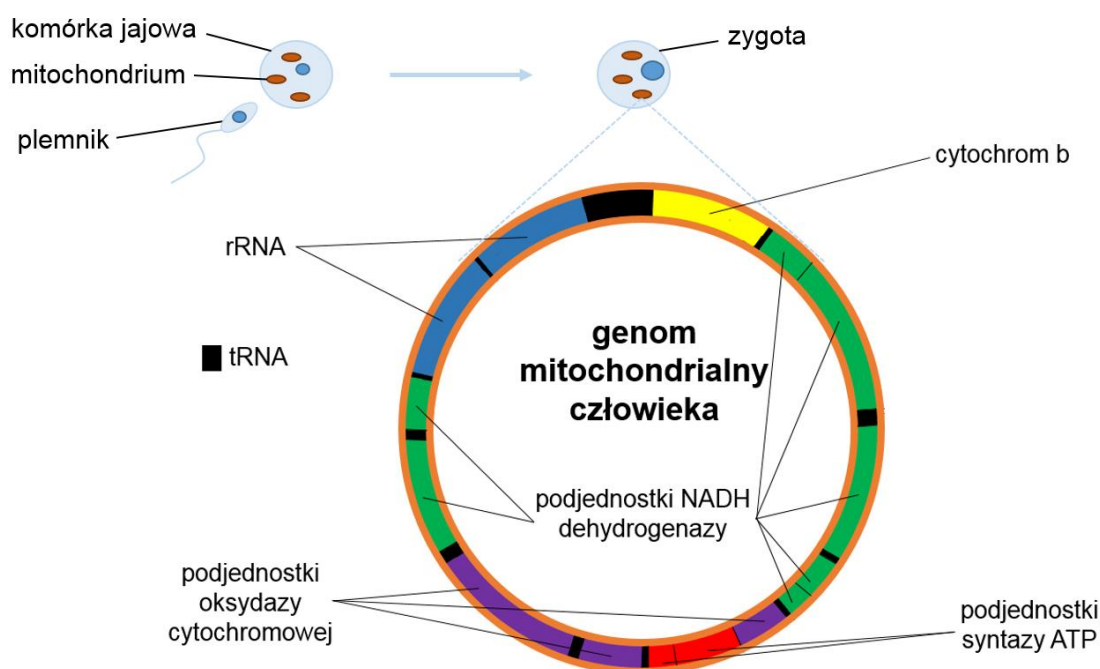
Każda komórka człowieka (z wyjątkiem komórek rozrodczych) ma dwie kopie chromosomów: jedną odziedziczoną po matce, a drugą odziedziczoną po ojcu. Kompletny zestaw chromosomów w komórce to kariotyp. Tworzą go 22 pary homologicznych chromosomów autosomalnych i jedna para chromosomów płci: XX (kobieta) i XY (mężczyzna; Rysunek 3).



Rysunek 3. Kariotyp komórki człowieka (mężczyzna). Źródło: U.S. National Library of Medicine.

## 2. Budowa genomu mitochondrialnego człowieka (Rysunek 4)

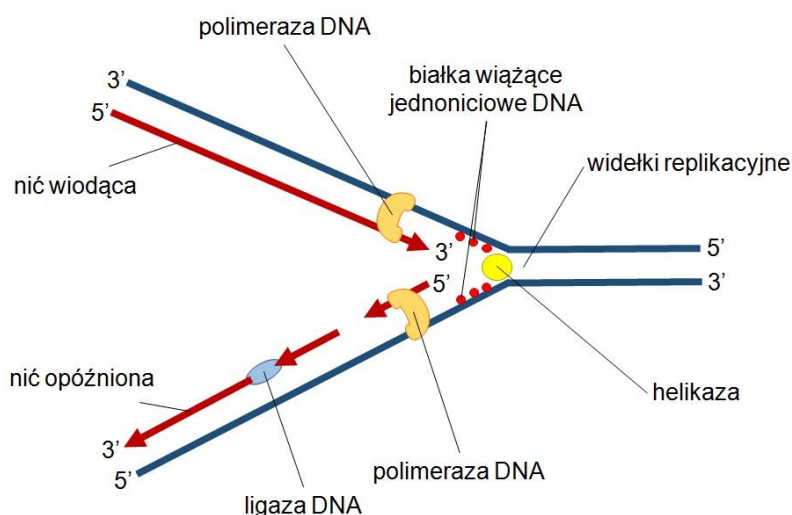
Genom mitochondrialny (*mtDNA*) to kolista dwuniciowa cząsteczka DNA, występująca w wielu kopiach. Jest dziedziczony wyłącznie po matce (w komórce jajowej jest około 100 000 mitochondriów, a w plemniku około 100; po zapłodnieniu ojcowskie mitochondria są niszczone). Ludzki genom mitochondrialny ma długość 16569 par zasad (co stanowi mniej niż 1% całkowitego DNA w komórce). Zawiera 37 genów, w tym 22 geny kodujące tRNA, 2 geny kodujące rRNA oraz 13 genów kodujących białka łańcucha oddechowego (cytochrom b, 3 podjednostki oksydazy cytochromowej, dwie podjednostki ATP-azy, 7 podjednostek dehydrogenazy NADH). Pozostałe białka mitochondrialne (ok. 1500) są kodowane przez genom jądrowy. Geny kodujące białka mitochondrialne nie zawierają intronów, leżą blisko siebie i odstęp między nimi są niewielkie. Mutacje w genach *mtDNA* nasilają się w miarę starzenia się komórki i mogą przyczyniać się do rozwoju chorób mitochondrialnych.



Rysunek 4. Budowa genomu mitochondrialnego człowieka.

### 3. Replikacja genomu jądrowego (Rysunek 5)

Jest to proces syntezy nowej kopii genomu. Każdy łańcuch macierzystej cząsteczki DNA służy jako matryca do syntezy jednego nowego łańcuch polinukleotydowego. Replikacja rozpoczyna się zawsze w tych samych miejscach cząsteczki DNA, nazywanych miejscami ori (ang. *origin* – początek). Do tych miejsc przyłącza się enzym – helikaza oraz białka wiążące jednoniciowe DNA. Helikaza odpowiada za rozplecenie dwuniciowej helisy i utworzenie widełek replikacyjnych, natomiast białka wiążące jednoniciowe DNA przeciwdziałają ponownemu połączeniu się obu nici. Za syntezę nowych nici DNA odpowiadają polimerazy DNA. Jedna nowa nić DNA jest syntetyzowana w sposób ciągły (nić wiodąca), a druga nowa nić jest tworzona w krótkich fragmentach (nić opóźniona). Przerwy pomiędzy fragmentami DNA są łączone przez enzym ligazę DNA.



Rysunek 5. Schemat replikacji DNA z uwzględnieniem enzymów uczestniczących w tym procesie.

#### 4. Ekspresja genu: transkrypcja i translacja

Gen jest odcinkiem genomu o określonej sekwencji zasad nukleotydowych, który koduje pojedyncze białko lub RNA (tRNA lub rRNA).

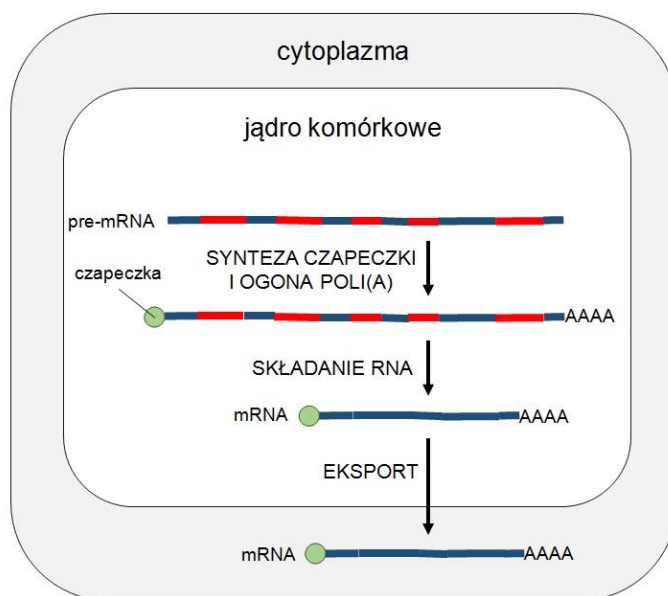
**Transkrypcja** to przepisanie sekwencji nukleotydów genu na sekwencje nukleotydów RNA. Pierwszy etap (inicjacja transkrypcji) polega na utworzeniu kompleksu złożonego z polimerazy RNA i dodatkowych białek (tzw. podstawowych czynników transkrypcji) w pobliżu początku genu (miejsce promotorowe; najczęściej sekwencja TATA). W drugim etapie polimeraza RNA przesuwa się wzdłuż genu, rozplata dwuniciową helisę i syntetyzuje pierwotny transkrypt (pre-mRNA) (zawsze w kierunku 5'-3'). W procesie tym biorą udział 3 różne polimerazy RNA:

- polimeraza RNA I - odpowiada za transkrypcję genów kodujących rybosomalne RNA (rRNA),
- polimeraza RNA II - przeprowadza transkrypcję genów kodujących białka,
- polimeraza RNA III - odpowiada za transkrypcję genów kodujących transportujące RNA (tRNA).

Transkrypcja kończy się, gdy polimeraza RNA napotka kodon stop.

Po transkrypcji, pre-mRNA kodujący białko podlega obróbce (dojrzwaniu) (Rysunek 6). Do końca 5' dołączany jest nietypowy nukleotyd, zwany czapeczką, a do końca 3' łańcuch poliadenylowy (250 reszt adenyłowych). Następnie usuwane są sekwencje niekodujące – introny (kolor czerwony) natomiast sekwencje kodujące białko - eksony (kolor niebieski) są składane w całość. Istnieje również mechanizm alternatywnego składania cząstek mRNA, w którym eksony w pre-mRNA są składane w różnych kombinacjach, dzięki czemu z jednego pre-mRNA powstają różne cząsteczki mRNA kodujące różne białka w różnych komórkach.





Rysunek6. Proces dojrzewania pre-mRNA kodującego białko. Sekwencje kodujące – eksony (kolor niebieski); sekwencje niekodujące – introny (kolor czerwony).

**Translacja** to proces syntezy łańcucha polipeptydowego w oparciu o informację zawartą w mRNA. Białko jest polimerem aminokwasów połączonych ze sobą wiązaniami peptydowymi. Sposób w jaki sekwencje nukleotydowe mRNA są tłumaczone na sekwencje aminokwasowe łańcucha polipeptydowego określa kod genetyczny (schemat w Części praktycznej).

Etapy translacji:

- synteza aminoacylo-tRNA (przyłączenie właściwego aminokwasu do cząsteczki transportującego RNA (tRNA),
- inicjacja, czyli przyłączenie cząsteczki mRNA do małej podjednostki rybosomu (40S) i dołączenia tRNA z metioniną do kodonu start (5'-AUG-3'),
- elongacja, czyli wydłużanie łańcucha polipeptydowego: przyłączenie dużej podjednostki rybosomu, wiązanie właściwego aminoacylo-tRNA i tworzenie wiązania peptydowego pomiędzy dwoma aminokwasami,
- terminacja - gdy rybosom napotka na jeden z trzech kodonów „stop”(UAA, UGA, UAG)w cząsteczce mRNA. Powstały polipeptyd uwalniany jest z rybosomu, a mRNA jest degradowane.

## II. Część praktyczna

### 1. Rozwiązywanie zadań dotyczących odczytywania kodu genetycznego.

Biosynteza białka zachodzi zgodnie z zasadami kodu genetycznego (Rysunek7). Korzystając z tabeli kodu genetycznego, zapisz kolejność ułożenia aminokwasów w oparciu o sekwencję nukleotydów w mRNA: 5'-AUUAGGUUCGUGGGG-3'. Podaj sekwencję nici kodującej i nici matrycowej DNA dla przedstawionego powyżej odcinka mRNA.

		Druga litera					
		U	C	A	G		
Pierwsza litera	U	UUU   Phe UUC   UUA   Leu UUG	UCU   Ser UCC   UCA   UCG	UAU   Tyr UAC   UAA STOP UAG STOP	UGU   Cys UGC   UGA STOP UGG   Trp	U C A G	Trzecia litera
	C	CUU   CUC   Leu CUA   CUG	CCU   Pro CCC   CCA   CCG	CAU   His CAC   CAA   Gln CAG	CGU   CGC   Arg CGA   CGG	U C A G	
	A	AUU   Ile AUC   AUA   AUG Met	ACU   ACC   Thr ACA   ACG	AAU   Asn AAC   AAA   Lys AAG	AGU   Ser AGC   AGA   Arg AGG	U C A G	
	G	GUU   GUC   Val GUA   GUG	GCU   GCC   Ala GCA   GCG	GAU   Asp GAC   GAA   Glu GAG	GGU   GGC   Gly GGA   GGG	U C A G	

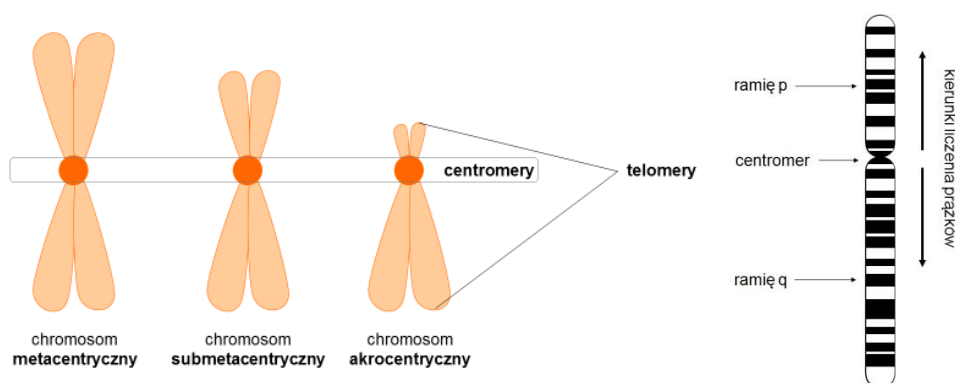
Rysunek 7. Tabela kodu genetycznego. Źródło: <http://xaktly.com/GeneticCode.html>

### 2. Klasyfikacja ludzkich chromosomów w oparciu o położenie centromeru oraz ustalenie lokalizacji wybranych genów w chromosomach (Rysunek 8 i 9).

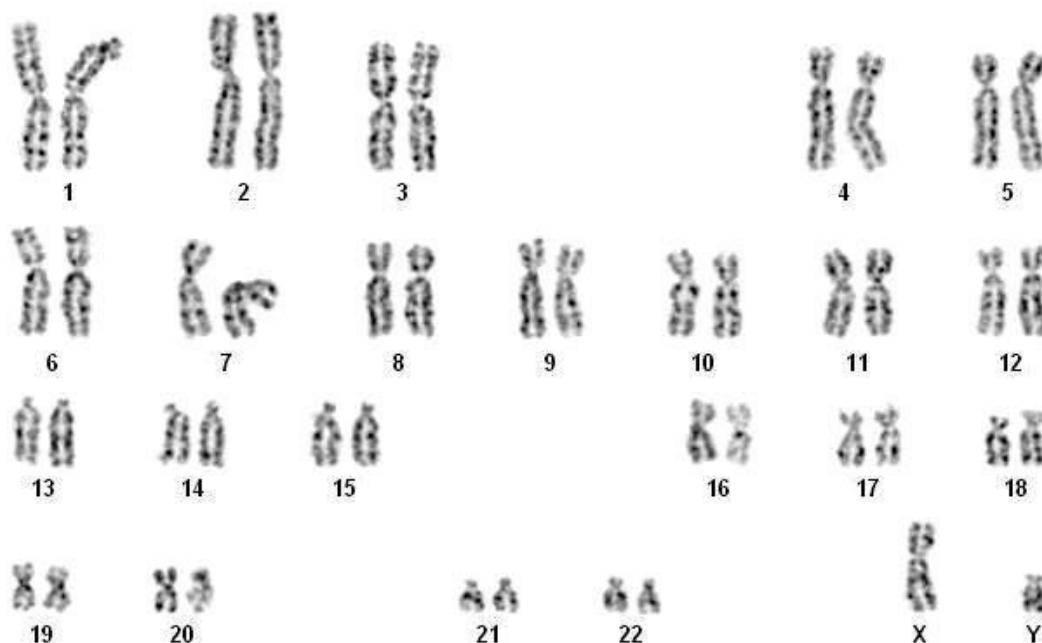
Mapa cytogenetyczna (kariogram) pozwala na rozróżnienie chromosomów na podstawie ich rozmiaru i położenia centromeru, wyróżnienie w chromosomach zestawu prążków oraz określenie lokalizacji genów (każdy gen zajmuje stałe miejsce - locus na chromosomie). Ze względu na położenie centromeru, ludzkie chromosomy dzieli się na metacentryczne



(centromer w środku chromosomu), submetacentryczne (centromer w pobliżu środka) i akrocentryczne (centromer w pobliżu jednego z końców). W celu ustalenia lokalizacji genu prążki liczy się zawsze od strony centromeru do końca ramienia p lub q chromosomu.



Rysunek 8. Typy chromosomów człowieka ze względu na położenie centromeru i wzór prążkowy chromosomu 7.



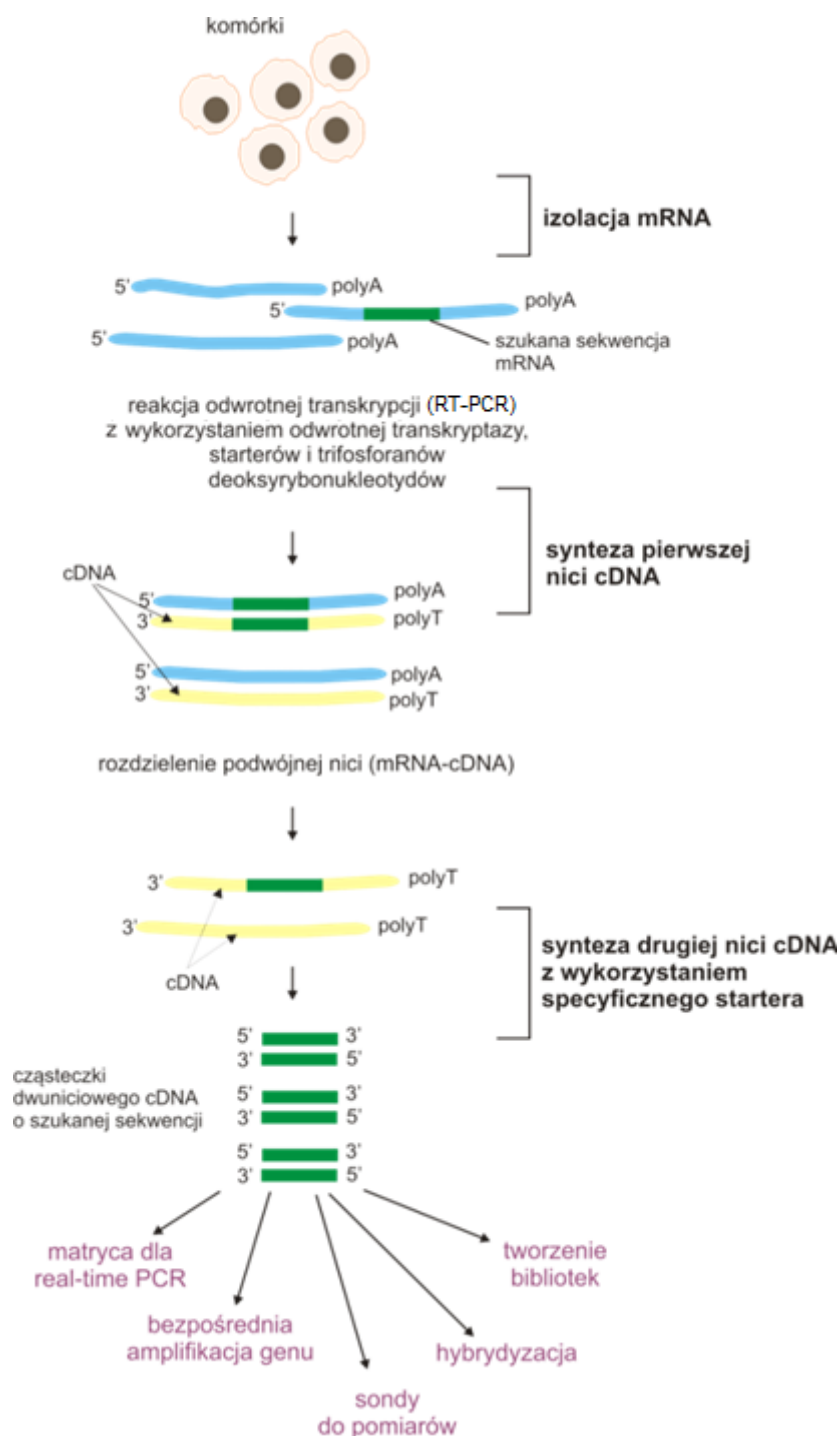
Rysunek 9. Kariogram człowieka. Źródło: <https://prenumeruj.forumakademiczne.pl/fa/2014/06/dzien-z-cytogenetyka/>

Uczniowie dokonują klasyfikacji chromosomów człowieka na podstawie położenia centromeru oraz opisują lokalizację genu o locus 7q31, 12p15 i 17q12.

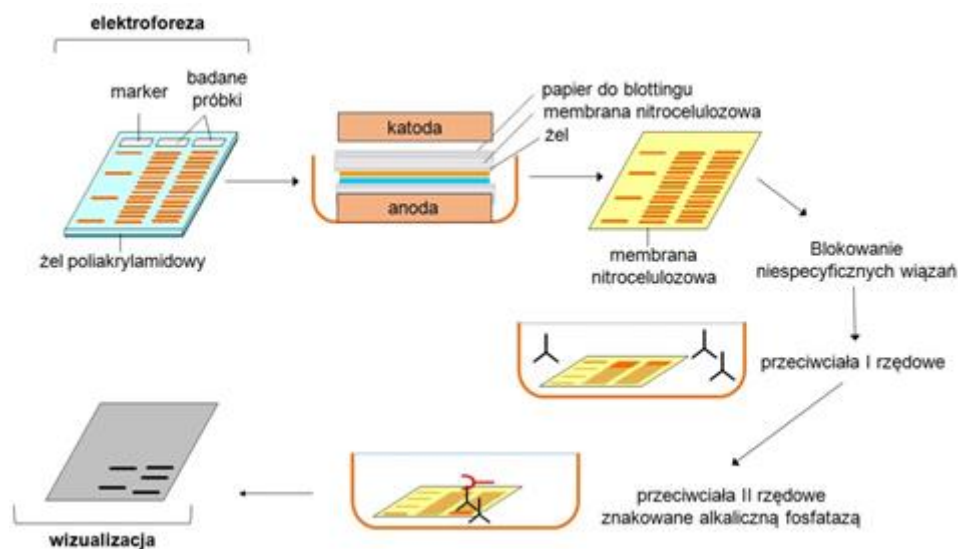
### 3. Metody badania ekspresji genu (Real Time – PCR) i ekspresji białka (metoda Western blot).

Metoda łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (*ang. Real Time – PCR*) umożliwia jednoczesne powielanie materiału genetycznego i monitorowanie ilości powstającego produktu (DNA) w każdym kolejnym cyklu reakcji (Rysunek 10). Natomiast metoda Western blot pozwala na ocenę zawartości białka (produktu genu) w materiale biologicznym (Rysunek 11).

Uczniowie zapoznają się z zasadą metody RT-PCR (*ang. reverse transcriptase PCR*) i Western blot oraz aparaturą. Analizują również wyniki badania ekspresji proteasomów w tkance prawidłowej i tkance nowotworowej.



Rysunek 10. Etapy metody RT-PCR.



Rysunek 11. Etapy detekcji białek metodą Western blot.