

15. A génexpresszió szabályozása eukariótákban

2016. február 18.

Lippai Mónika

lippai@elte.hu

Soksejtűekben egy adott gén nem mindig és nem minden sejtben fejeződik ki (differentiális génexpresszió)

Ecetmuslica embrióban:



Az *evenless* gén kifejeződési mintázata

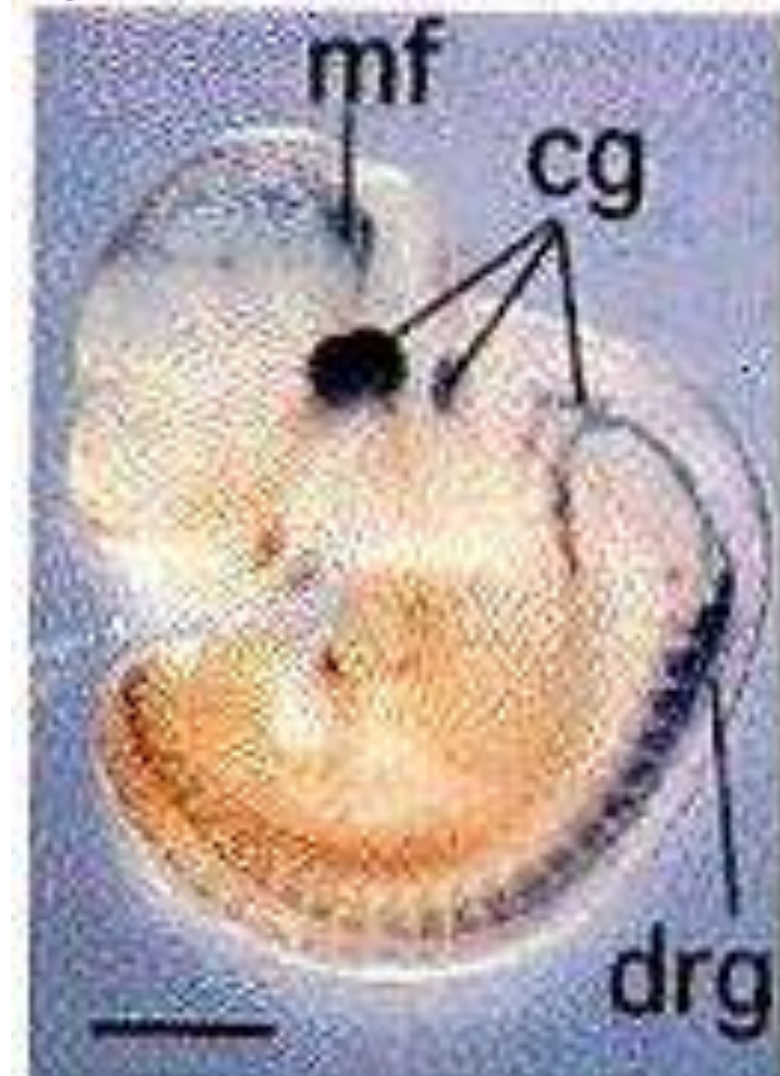


A *krüppel* gén kifejeződési mintázata



A *knirps* gén kifejeződési mintázata

Egér embrióban:



Az *L1* gén kifejeződési mintázata

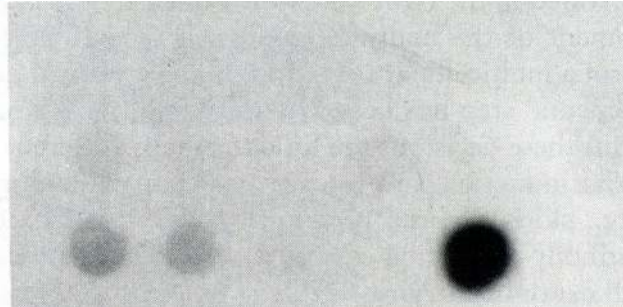
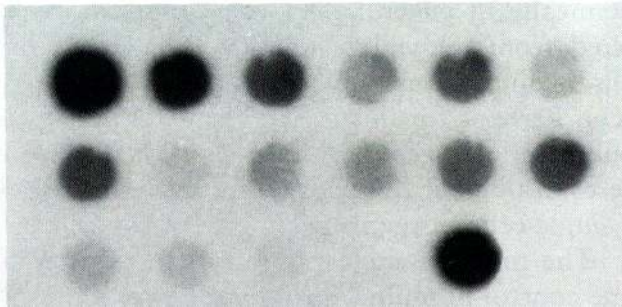
Bizonyíték a differenciális génexpresszió létezésére

A próbaként szolgáló mRNS-ek forrása:

máj

vese

agy



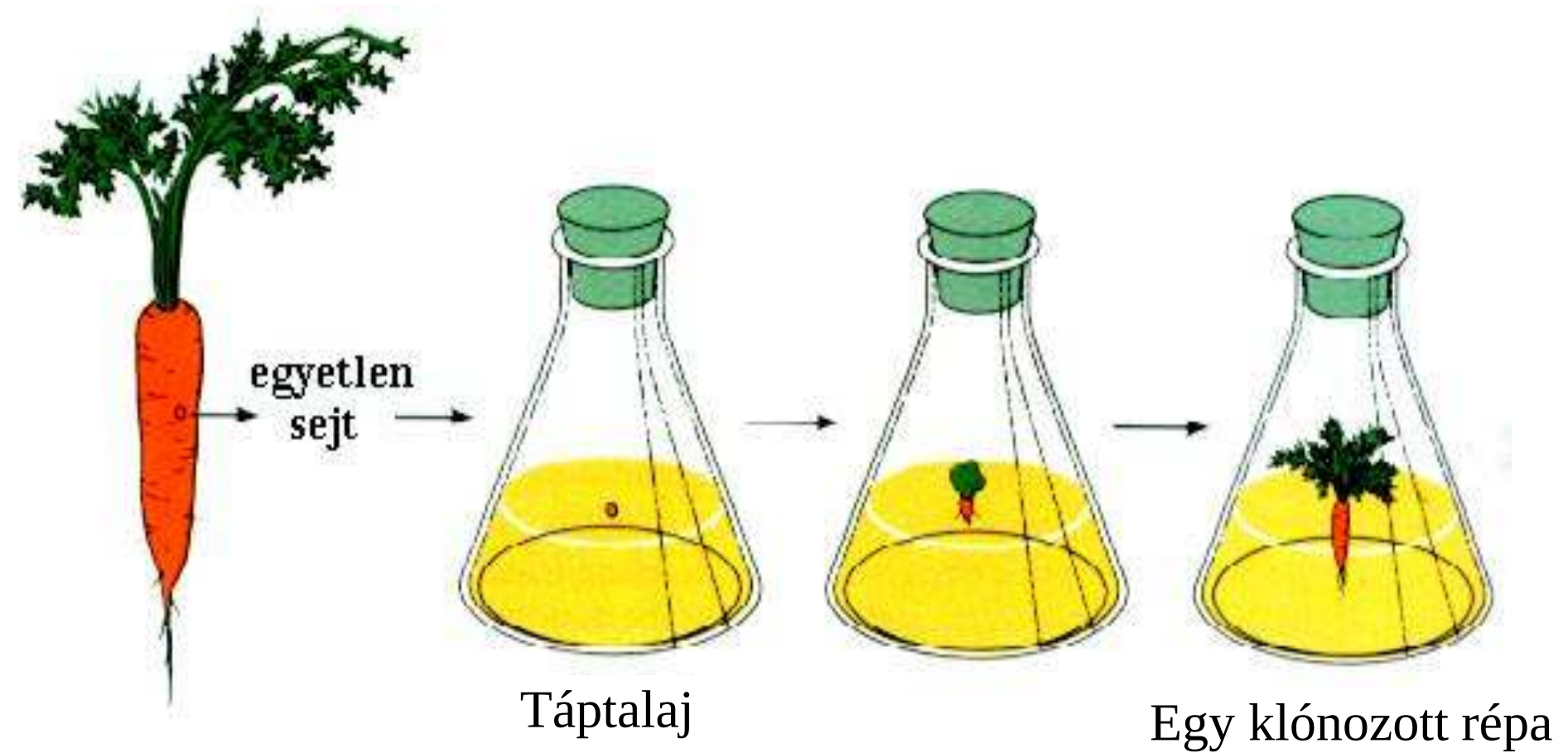
Háztartási gén

A filterre foltokban rákötött 16 cDNS 16 különböző, májból izolált mRNS-nek felel meg

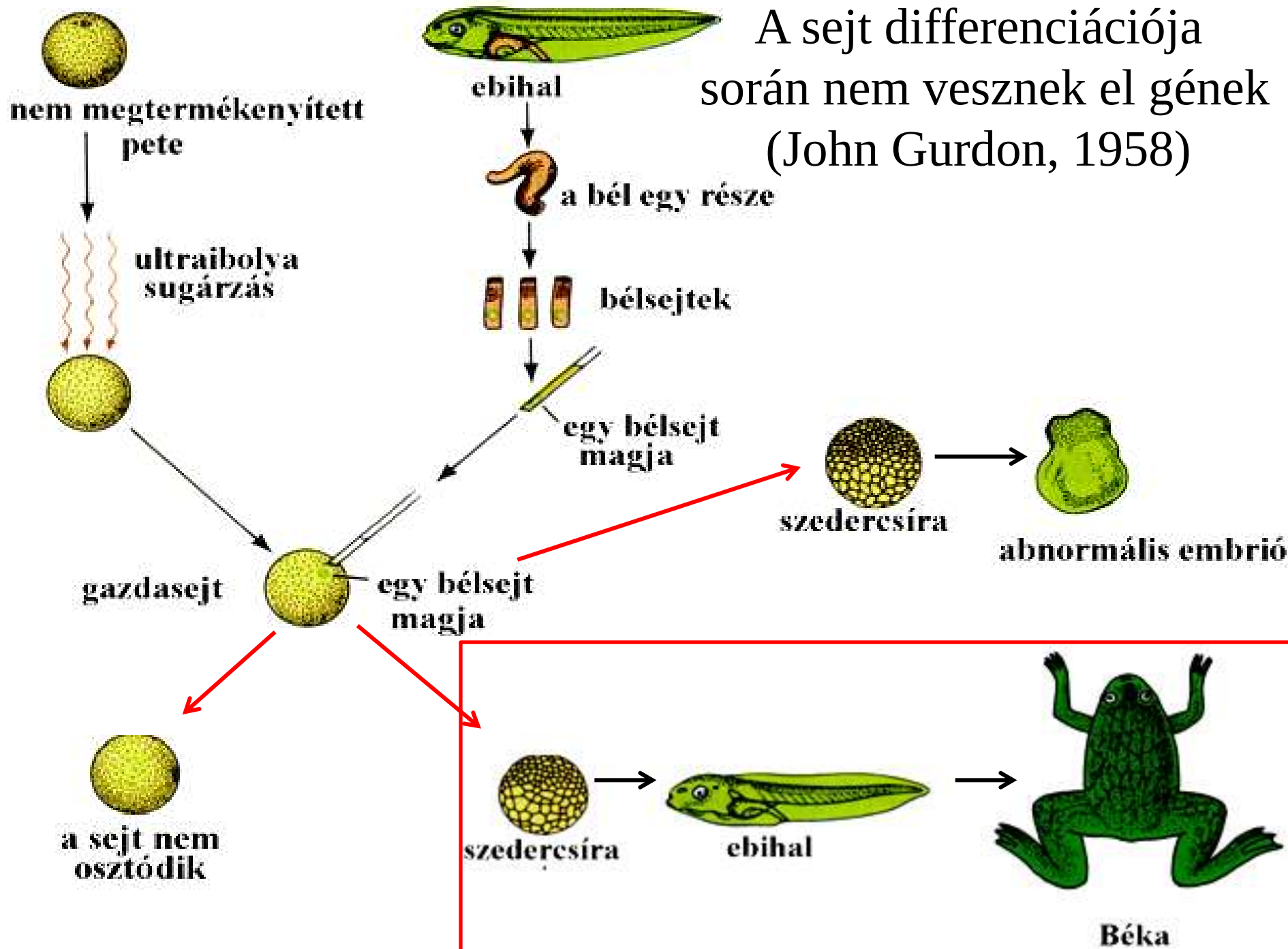
A nitrocellulóz filterekre májsejtekből izolált 16 különböző mRNS alapján készült cDNS-t kötöttek foltokban (ez az úgynevezett *dot-blot*). A filterekhez ^{32}P -vel jelzett máj-, vese-, valamint idegsejtekből izolált mRNS-eket hibridizáltak.

Az autodiagramokon látható, hogy a májból izolált 16 mRNS többsége nem található meg a másik két szövetben. Ugyanakkor kis számban, de vese- és agymintában is találhatóak olyan mRNS-ek, amelyek a májsejtekben is jelen vannak – ezek lehetnek például a minden sejtben működő *háztartási gének* termékei.

A sejtek differenciációja során nem vesznek el gének



A sejt differenciációja
során nem vesznek el gének
(John Gurdon, 1958)



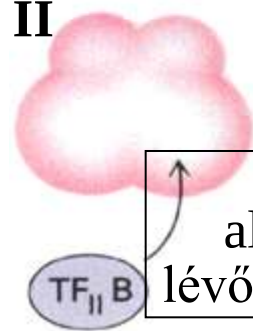
Az eukarióta TATA box

												+1 → mRNS	
A bázisok gyakorisága	A	17	22	13	7	97	7	85	63	89	50	33	18
	T	17	27	11	82	2	93	10	37	10	33	12	16
	C	50	38	53	1	1	0	0	0	0	13	38	48
	G	16	13	23	10	0	0	5	0	1	4	17	18
A konszenzus szekvencia					T	A	T	A	A/T	A			

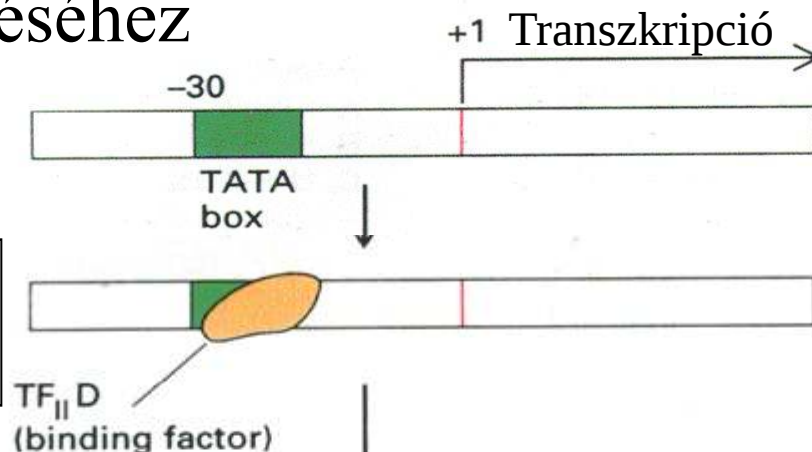
Az RNS-polimeráz II kötődéséhez transzkripciós faktorok szükségesek

Az RNS-polimeráz
működéséhez a $TF_{II}D$
kötődése szükséges

RNS-polimeráz II



A polimeráz $TF_{II}B$
alegysége a DNS-en
lévő $TF_{II}D$ -hez kötődik



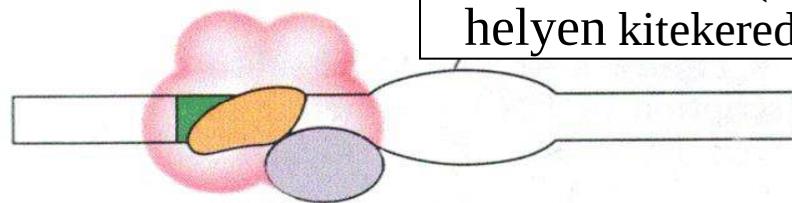
$TF_{II}D$
(binding factor)

+1 Transzkripció

ATP

ADP

A DNS a Start (+1)
helyen kitekeredik



$TF_{II}E$, $TF_{II}S$, valamint
nukleotid trifoszfátok

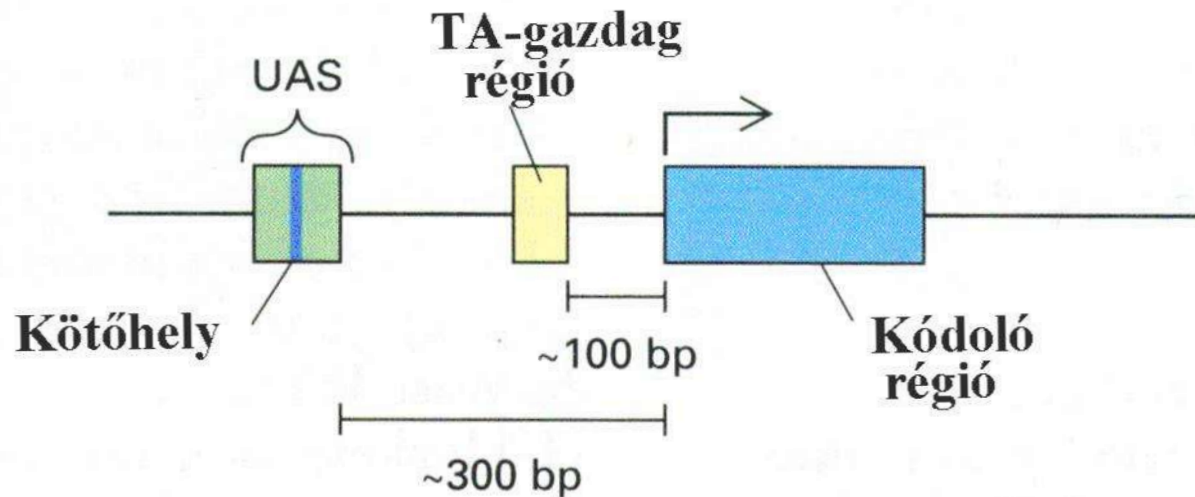
Transzkripció

Pre-mRNS

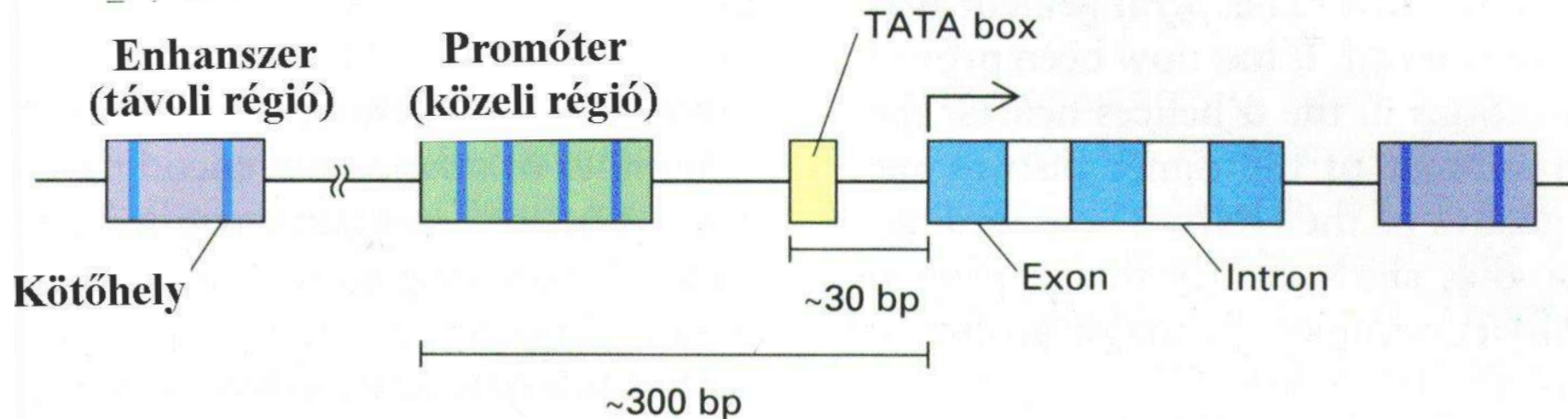


Az eukarióta gének expresszióját szabályozó szekvenciák

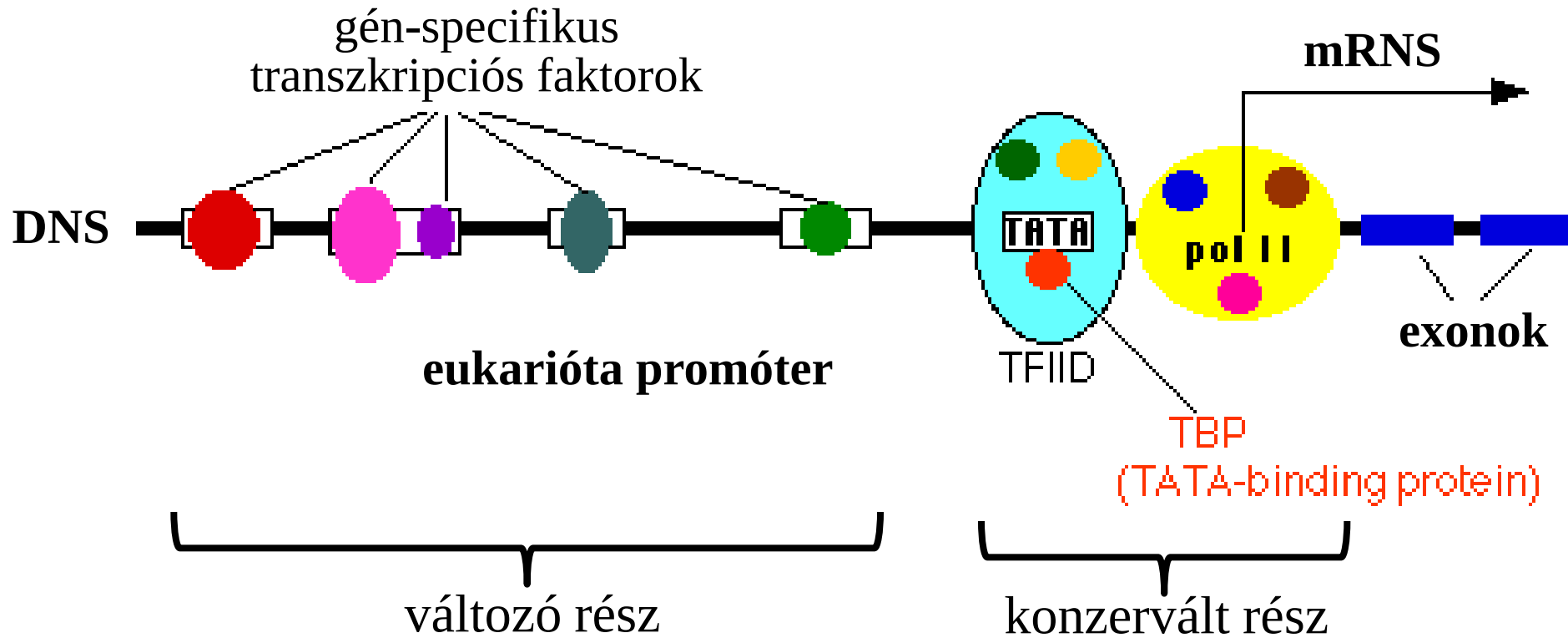
(a) **Élesztő**



(b) Soksejtű élőlény



Az eukarióta gének expresszióját szabályozó szekvenciák

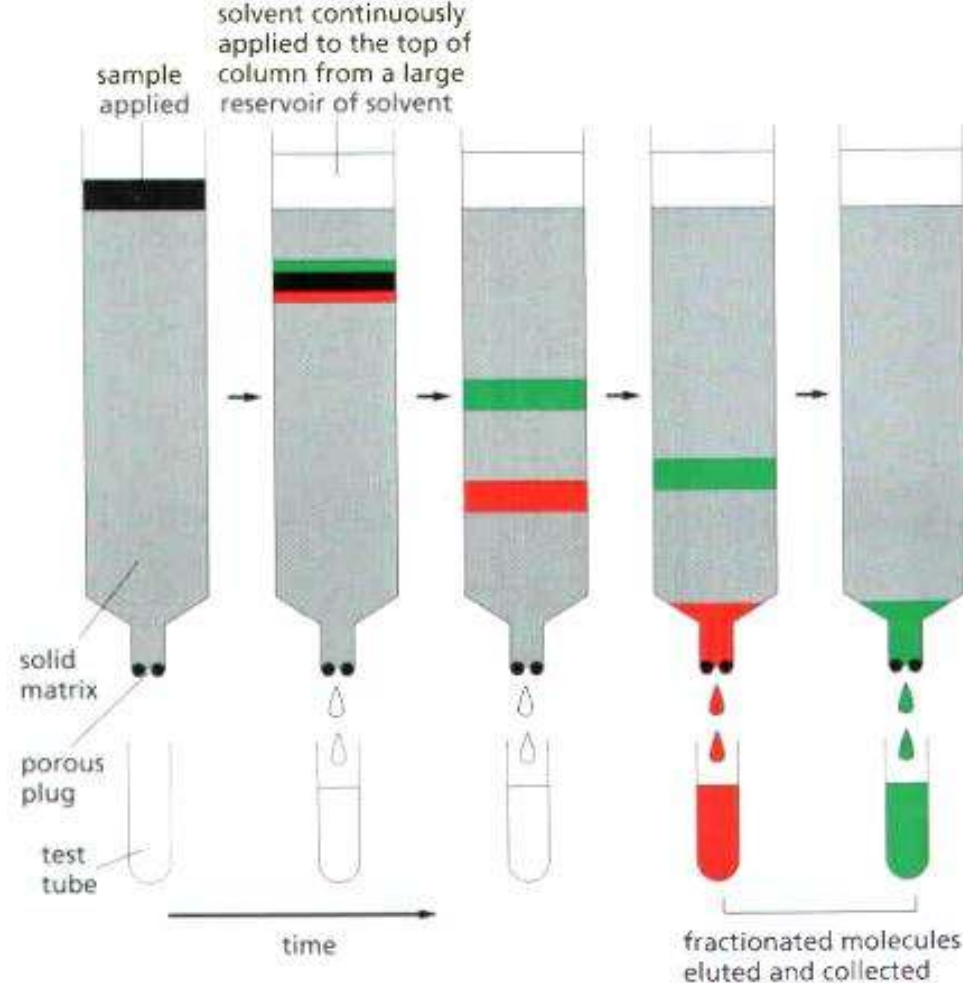


Az eukarióta promóternek van konzervált („core”) része és a differenciált expressziót lehetővé tevő, akár sok, génenként más-más szakaszból összetevődő része

Hogyan lehet transzkripciós faktorokat és/vagy kötőhelyüket azonosítani?

1. Ismert DNS-szekvenciához keresünk kötőfehérjét

Biokémiai módszerekkel különböző tulajdonságaik alapján a fehérjéket el lehet különíteni



Oszlopkromatográfia: az oszlopot megtöltő anyagon (mátrix) keresztül a fehérjék (a kötődés minősége vagy méretük miatt) nem egyszerre érkeznek az oszlop aljára –különböző frakciókban lesznek jelen.

Gél-shift vagy EMSA (electrophoretic mobility shift assay): a DNS gél-elektroforézise során a DNS-darabhoz kötődő fehérje lelassítja a DNS gélben való haladását

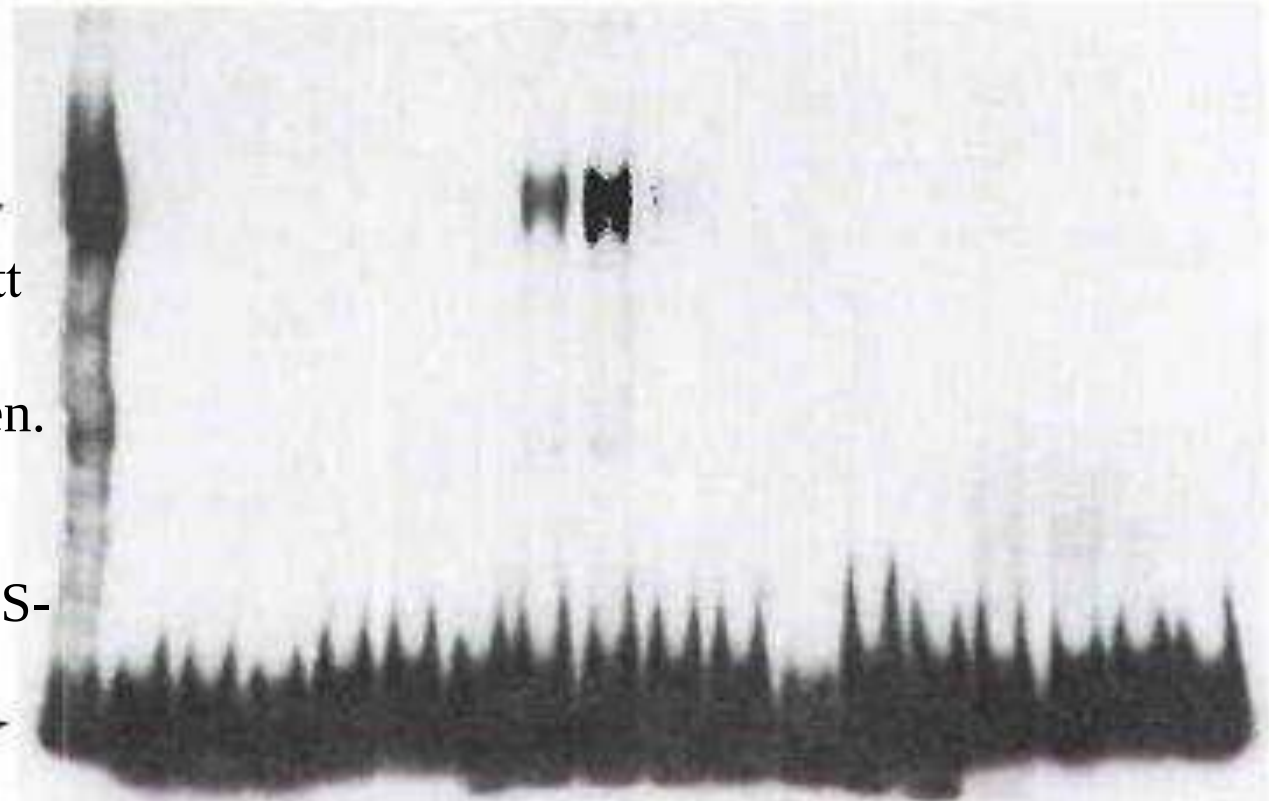
Fraction ON 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 14 16 18 20 22

Bound probe →

A fehérjéhez kötődött jelölt DNS-darab lassabban fut a gélben.

„szabad”, fehérjéhez nem kötött jelölt DNS-darab

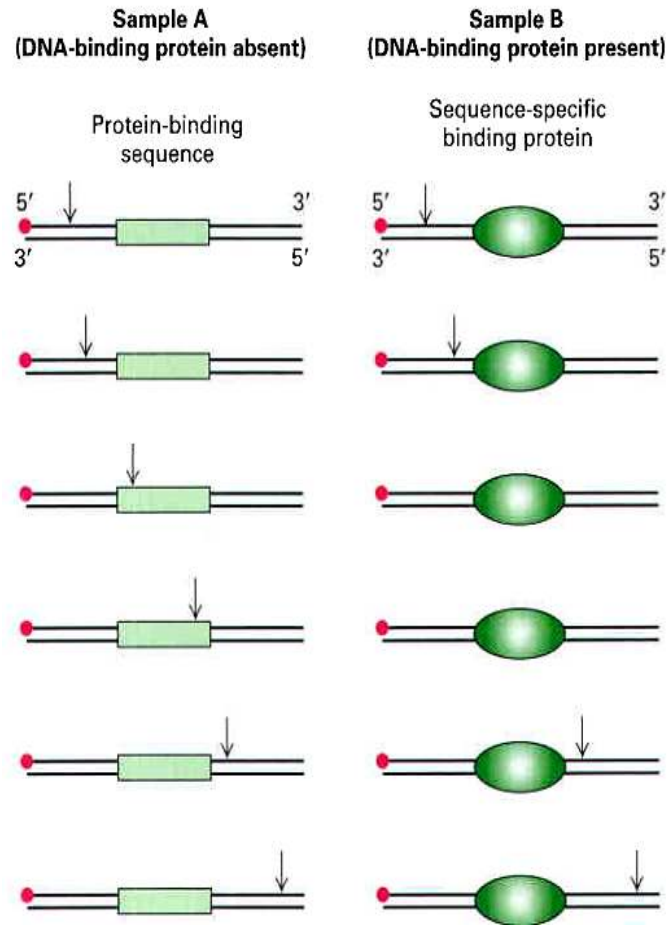
Free probe →



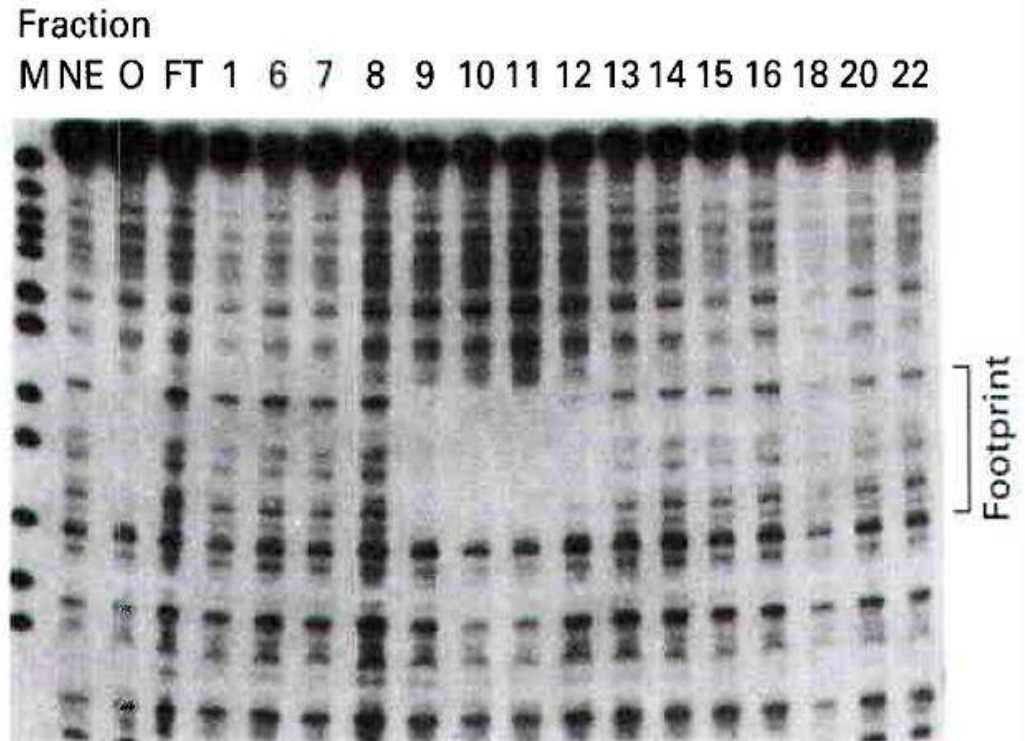
ON: minta az oszlopra felvitt teljes fehérjeelegyből

1.-22. minta: az oszlopkromatográfiával elkülönített frakciók a vizsgálandó DNS-darabbal keverve. A 7. és 8. frakció tartalmazta azokat a fehérjéket, amelyek kötődtek az elegyhez adott DNS-darabhoz.

DNS „footprinting”: az egyik végén jelölt DNS-hez kötődő fehérje a kötés helyén megakadályozza a DNS emésztést



1. A fehérjefrakciókhoz hozzáadják a jelölt DNS-darabot, majd a frakciókhoz DN-ázt is adnak, olyan koncentrációban, hogy mindenféle méretű darabok keletkezzenek („létra” kép a szeparálás után).

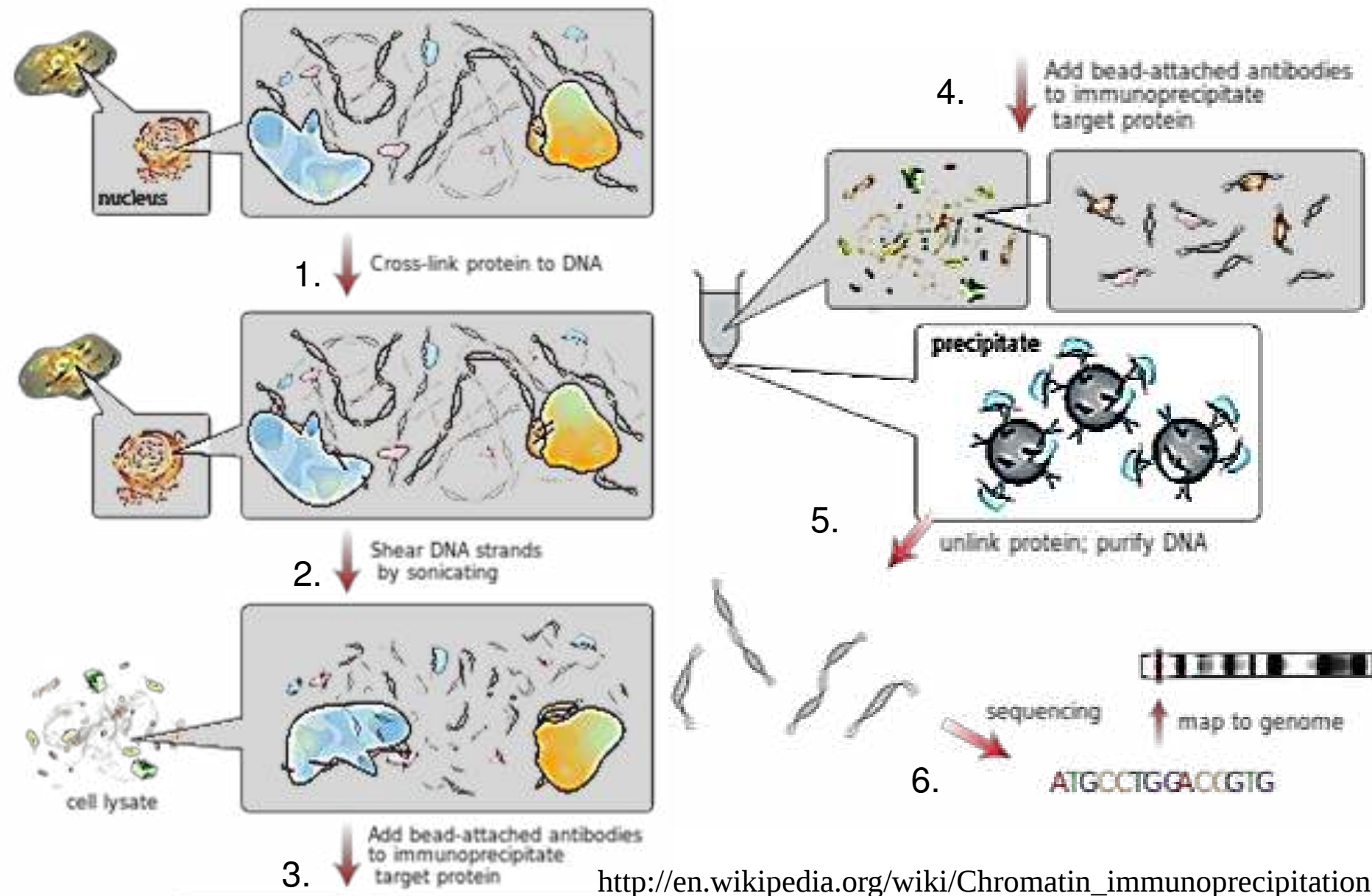


2. Az egyes frakciókat (1.-22.) gélelektroforézissel szeparálják, majd a jelölés alapján (pl. autoradiográfiával) detektálják a DNS-fragmenteket.

3. A 9.-12. frakció tartalmazta azokat a fehérjét, amelyek kötődtek az elegyhez adott DNS-darabhoz, mert ezek esetében hiányoznak bizonyos méretű DNS-fragmentek („lábnyom” a gélképen)

2. Ismert kötőfehérjéhez keresünk DNS-szekvenciát

Kromatin immunoprecipitáció (ChIP): egy **adott fehérje** által a genomban felismert DNS-szakasz azonosítása

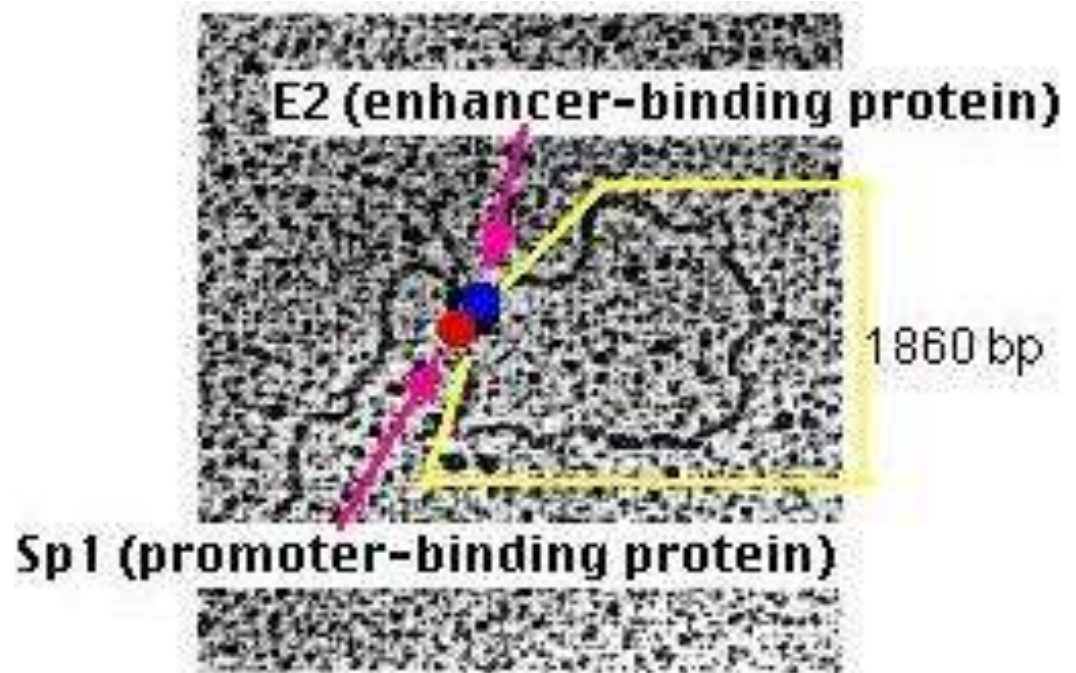
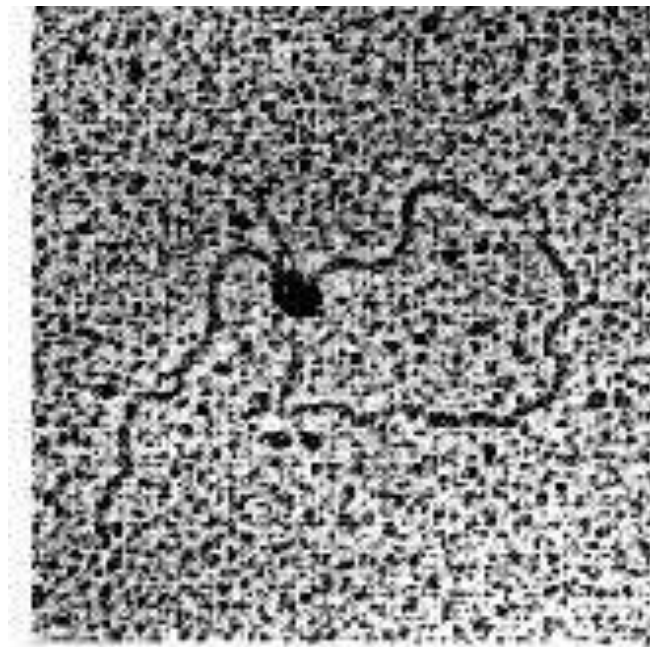
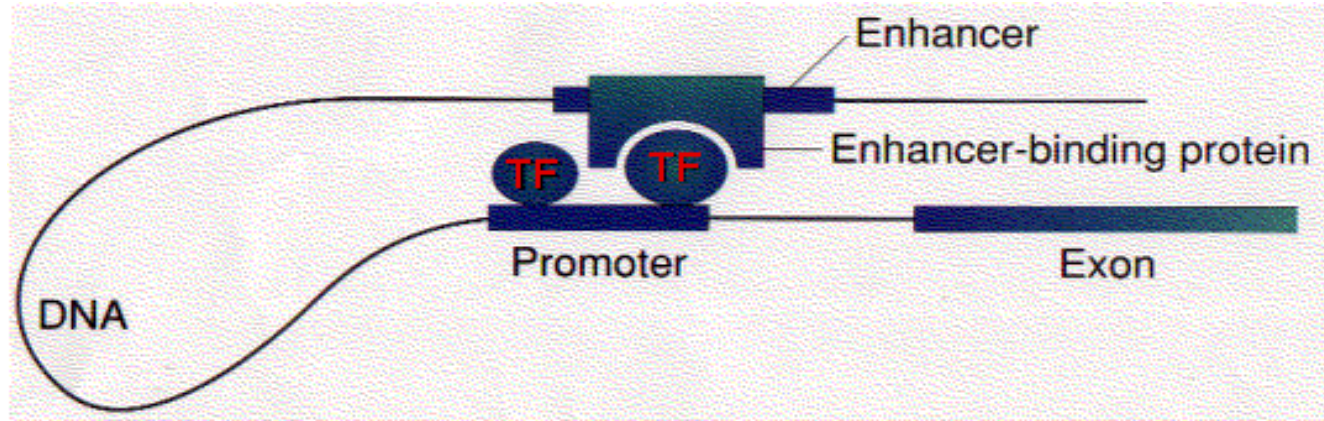


Vajon hogyan ellenőrizhető, hogy egy fehérje valóban
transzkripciós aktivátorként (vagy represszorként)
működik *in vivo*?

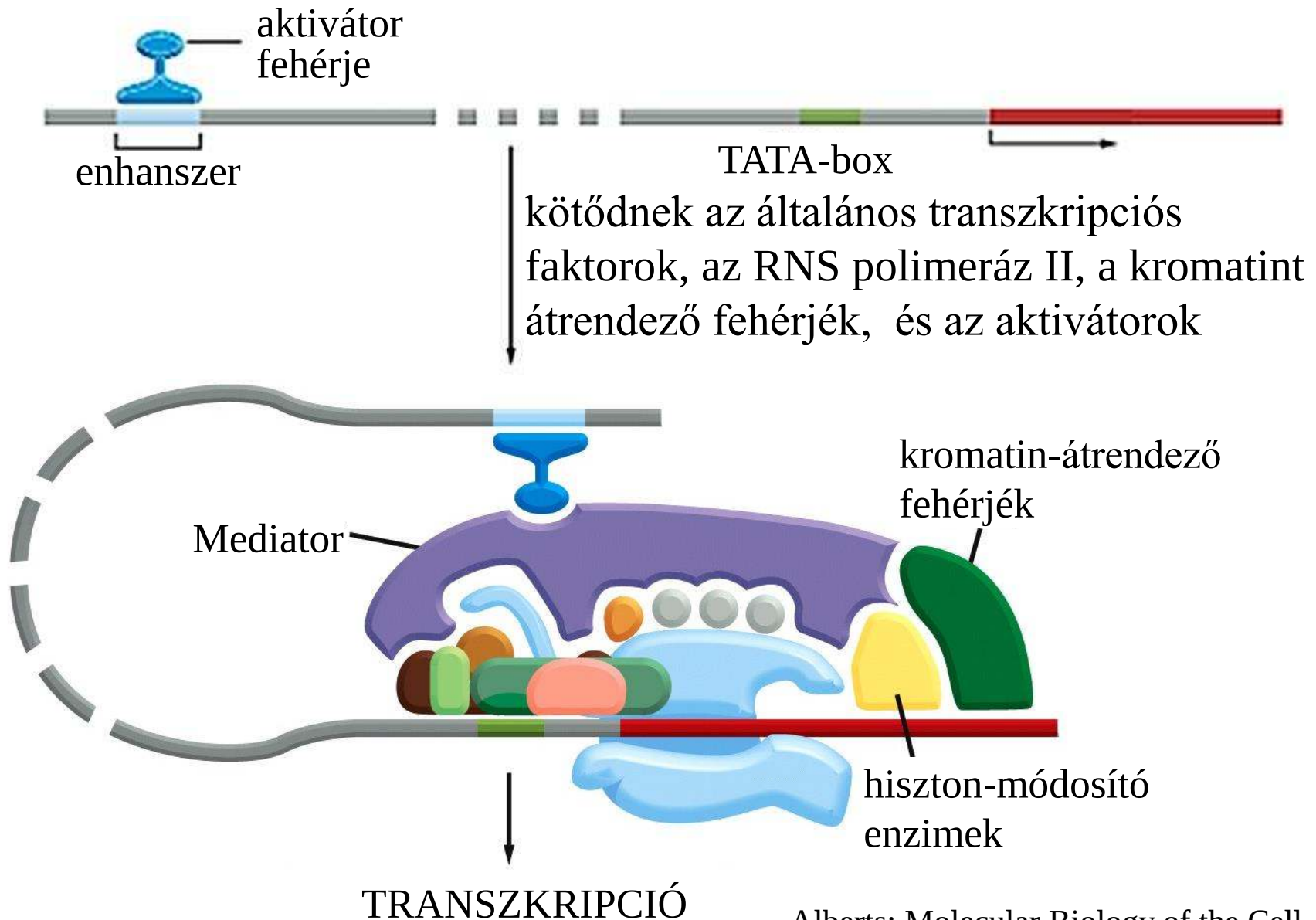


15.3-as feladat

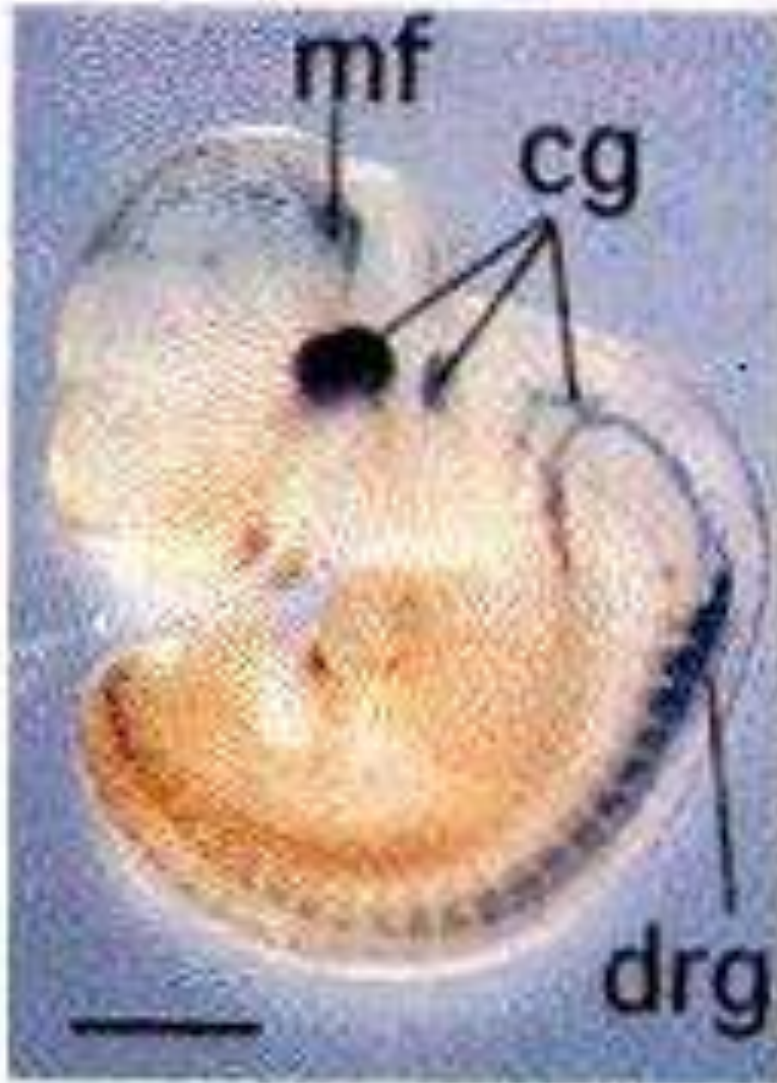
Az eukarióta génszabályozás elemei az enhanszerek és silencerek – távoli helyekről hatnak, hurokképződéssel. Gyakran több gén együttes szabályozását végzik



A Mediator nevű fehérjekomplex „összehozza” a transzkripció szabályozásában szerepet játszó fehérjéket



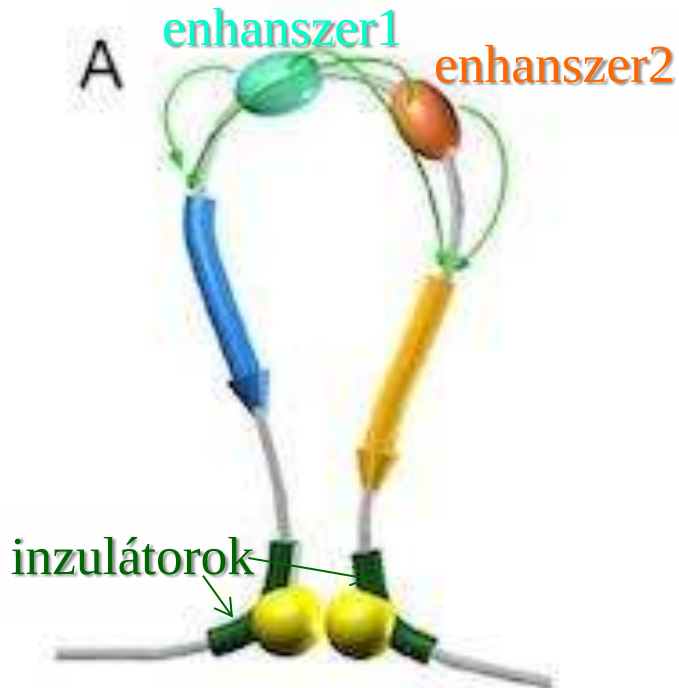
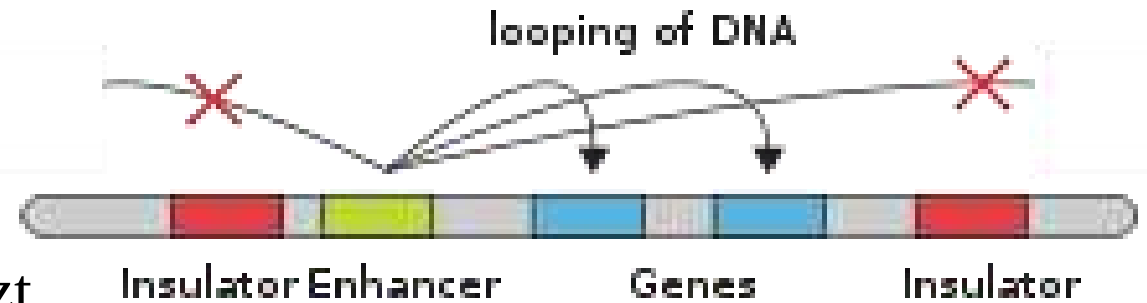
Egy példa a silencierek szerepére



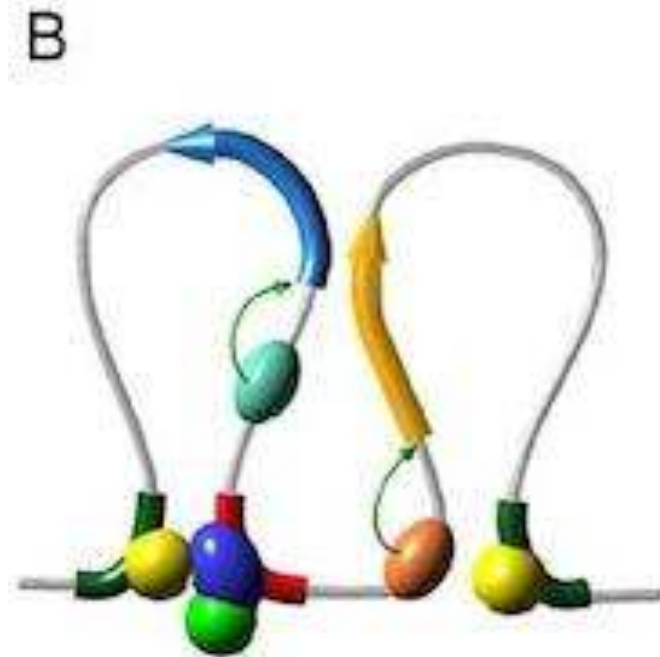
Az *L1* gén expressziója normál egérben, ill. egy adott silencer eltávolítása után (bw, body wall; cg, cranial ganglia; cm, cephalic mesenchyme; drg, dorsal root ganglia; h, heart, mf, midbrain)

Hogyan lehet elérni azt, hogy az enhanszerek csak bizonyos gének kifejeződésére hassanak a távolból?

A szigetelő szekvenciák -
inzulátorok – szerepe: a
kromatin-hurkok
kialakításában vesznek részt



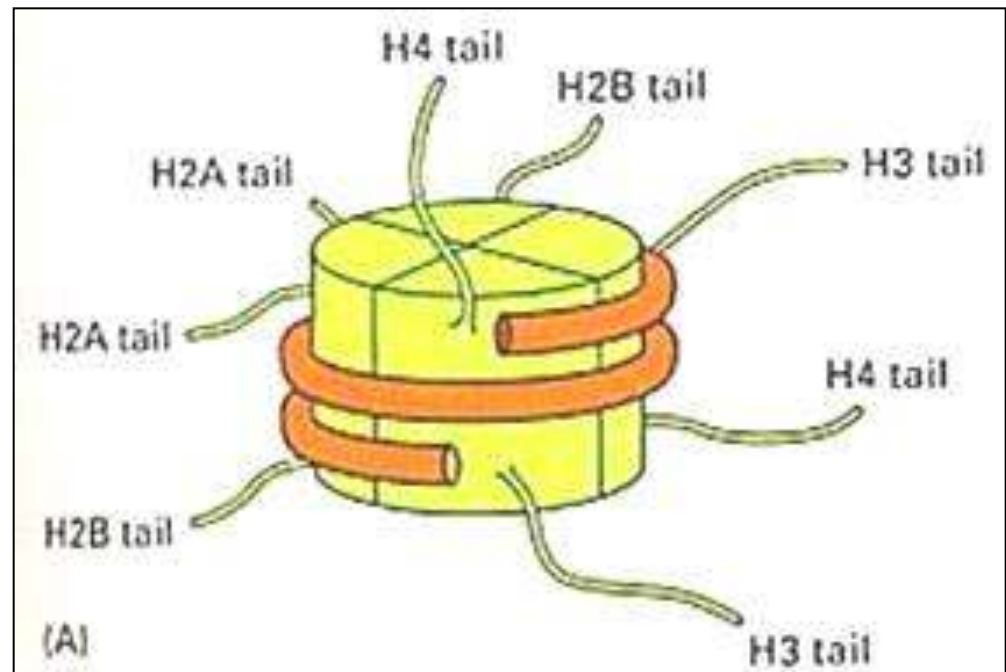
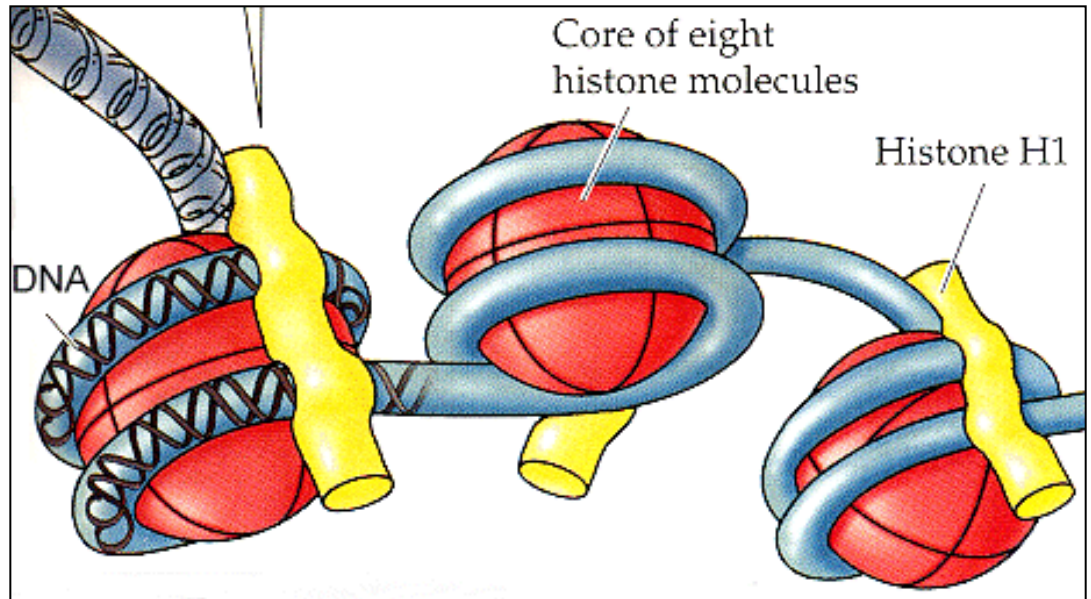
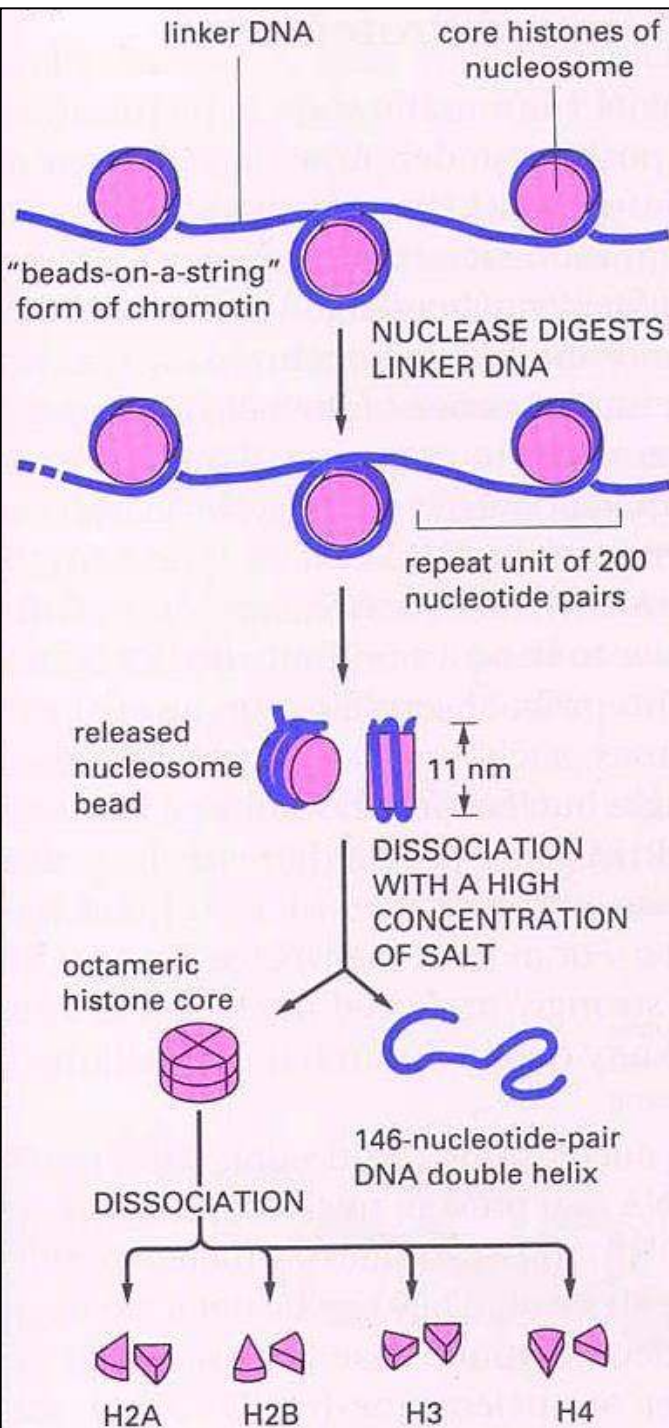
A: Ha két enhanszer egy hurokban
van: hathatnak ugyanazon génekre



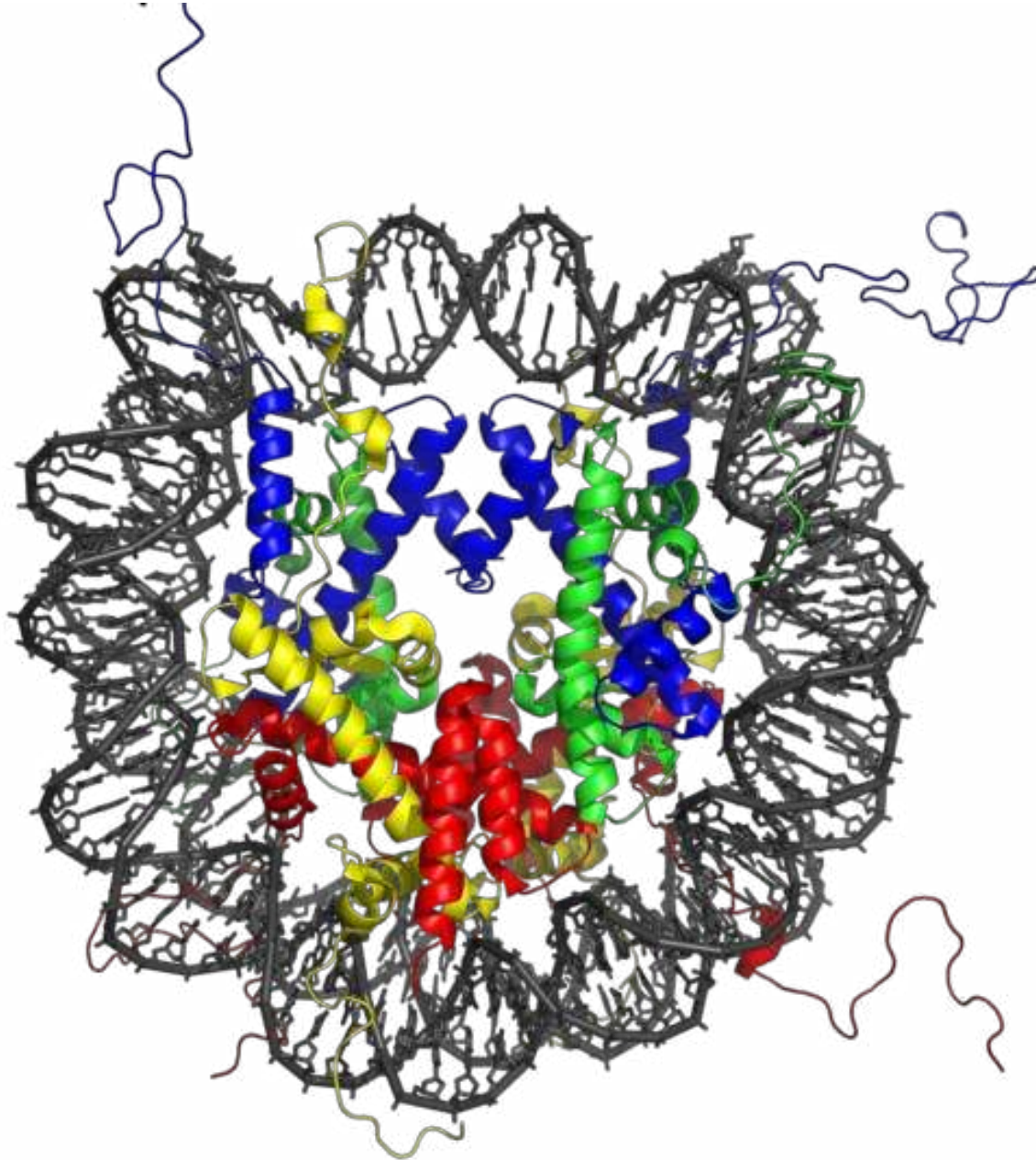
B: Másik hurokban lévő génre nem
tudnak hatni

Az eukarióta transzkripció szabályozásában
a kromatinszerkezet is szerepet játszik!

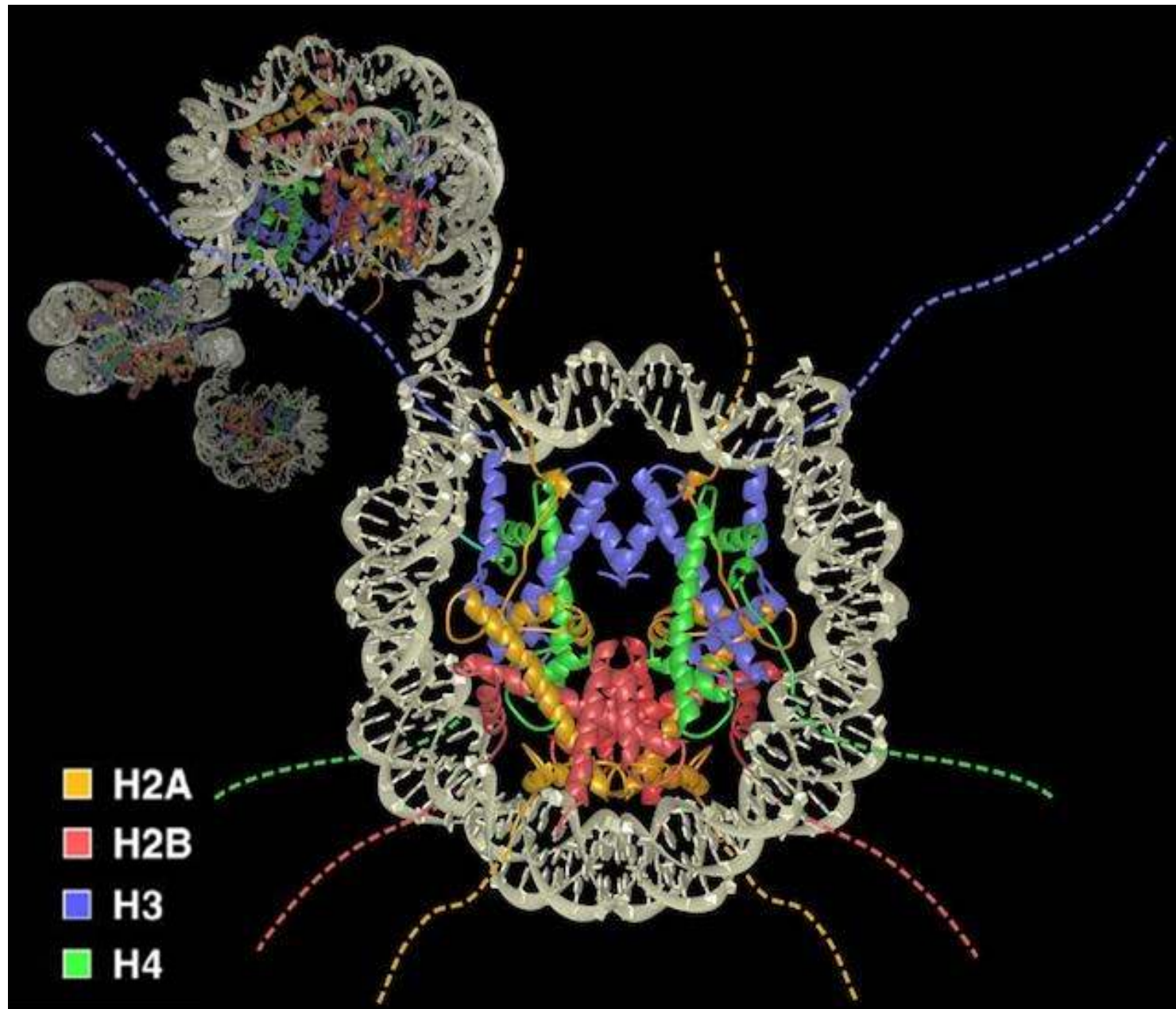
A nukleoszóma szerveződése



A nukleoszóma szerkezete



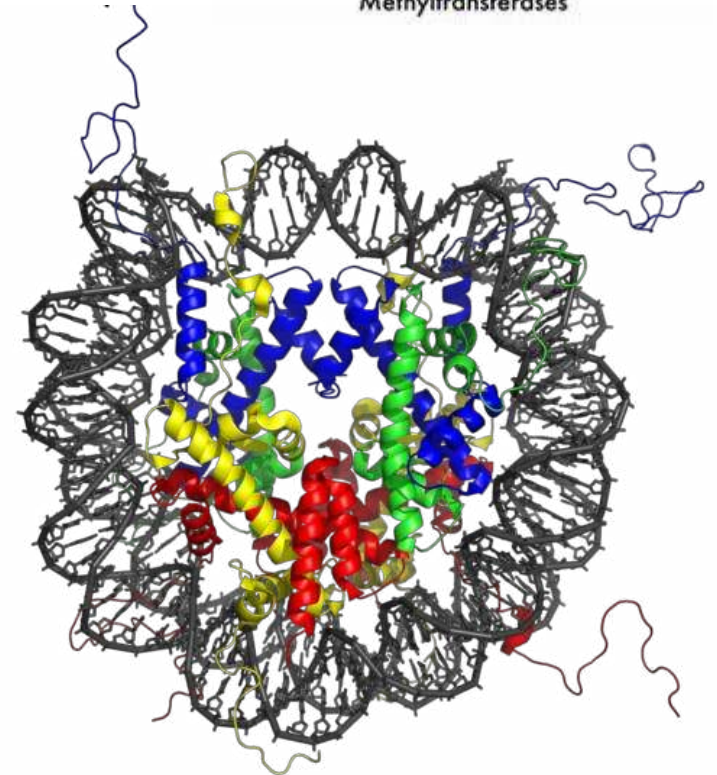
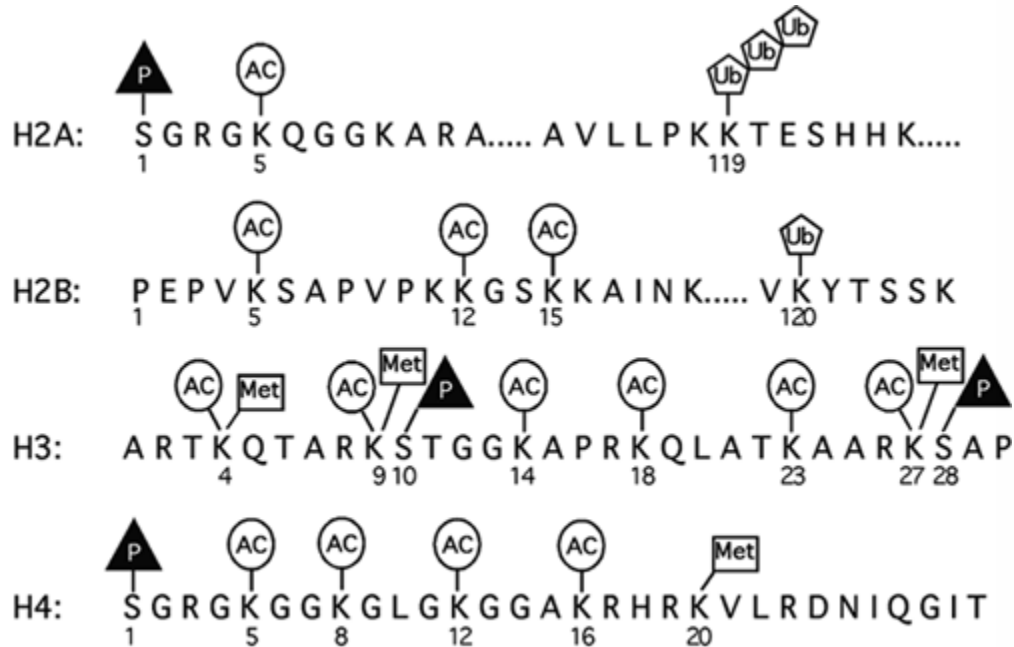
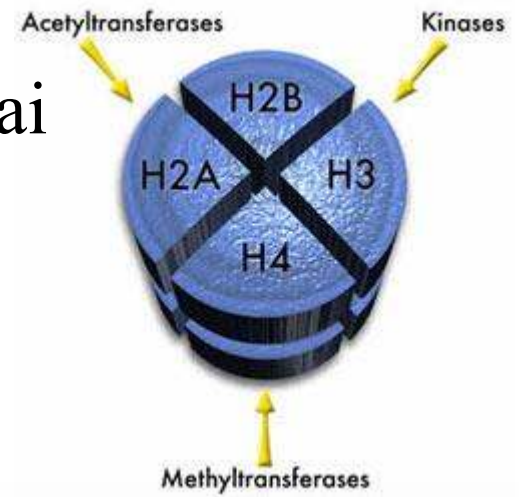
A nukleoszóma szerkezete



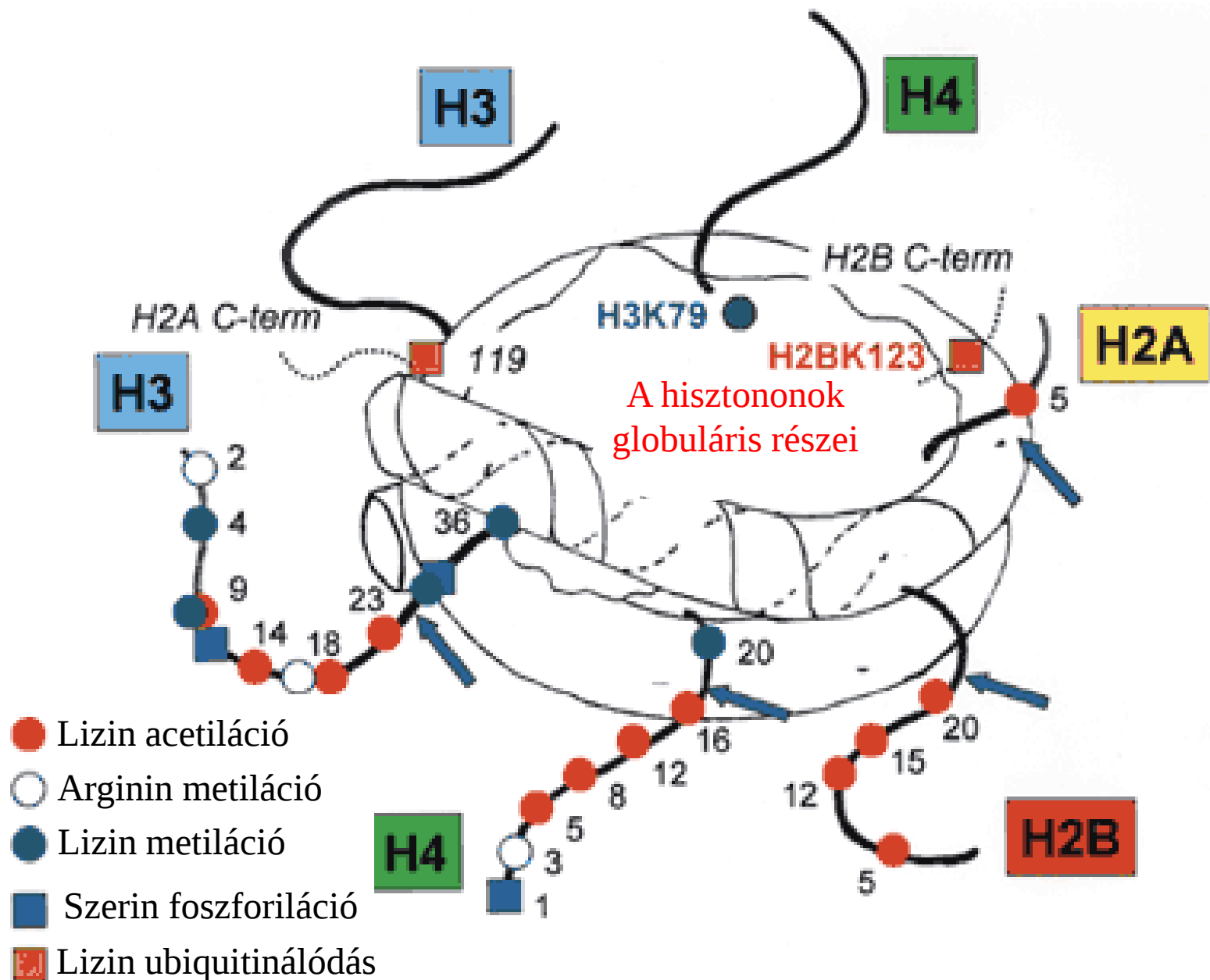
A nukleoszómát alkotó hisztonfehérjék N-terminálisának (hiszton-”farok”) módosulásai meghatározzák a kromatin szerkezetét.

acetiláció → kitekeredés

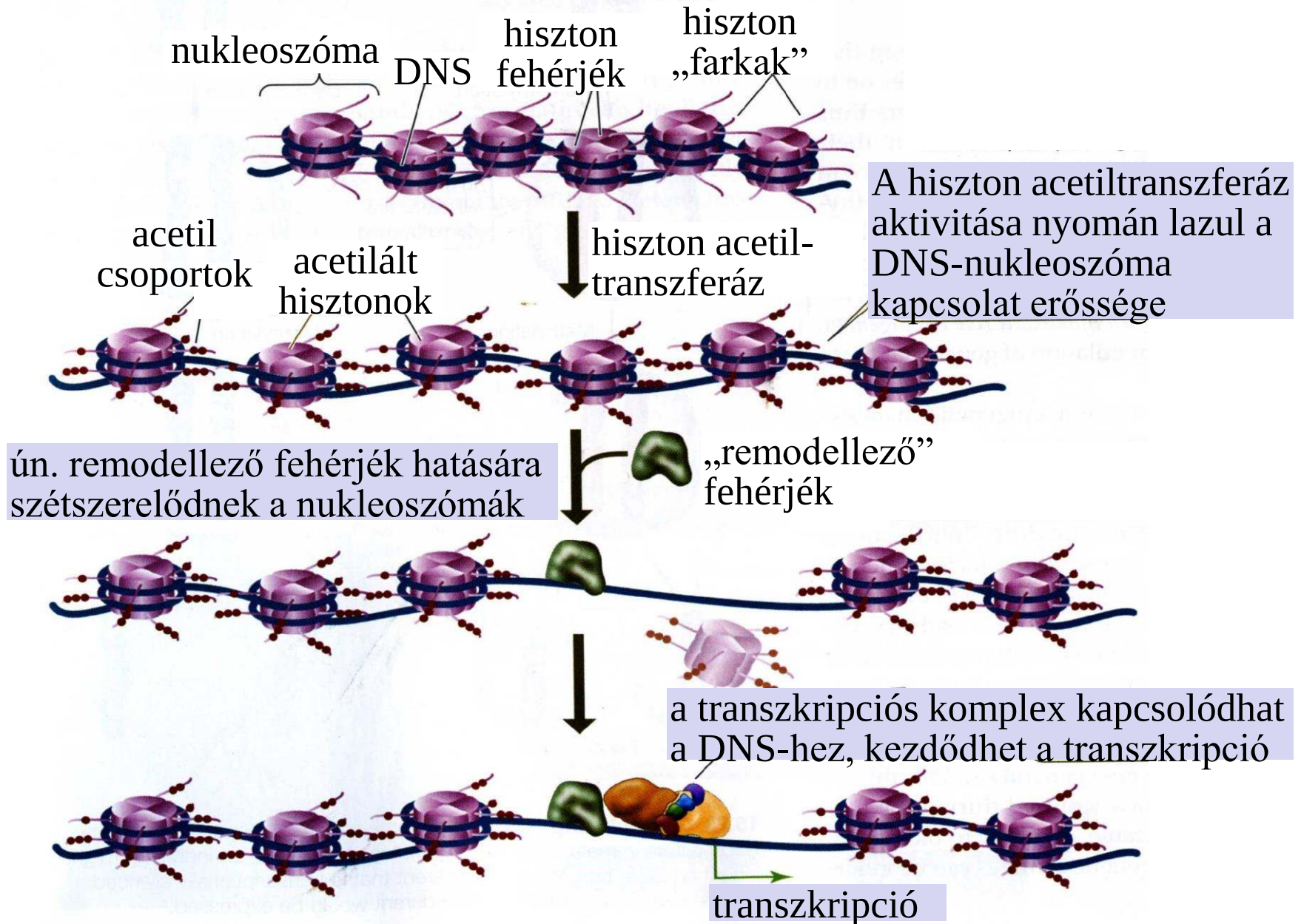
deacetiláció, metiláció → tömörülés



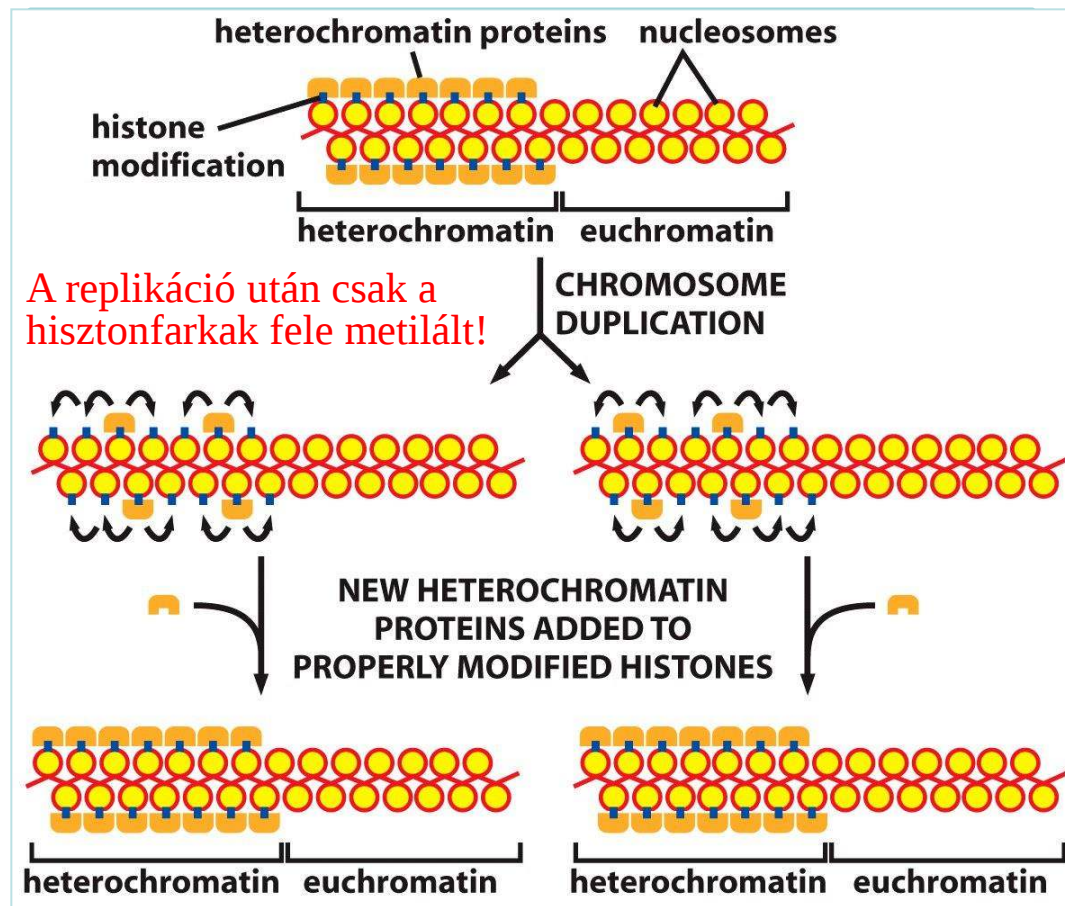
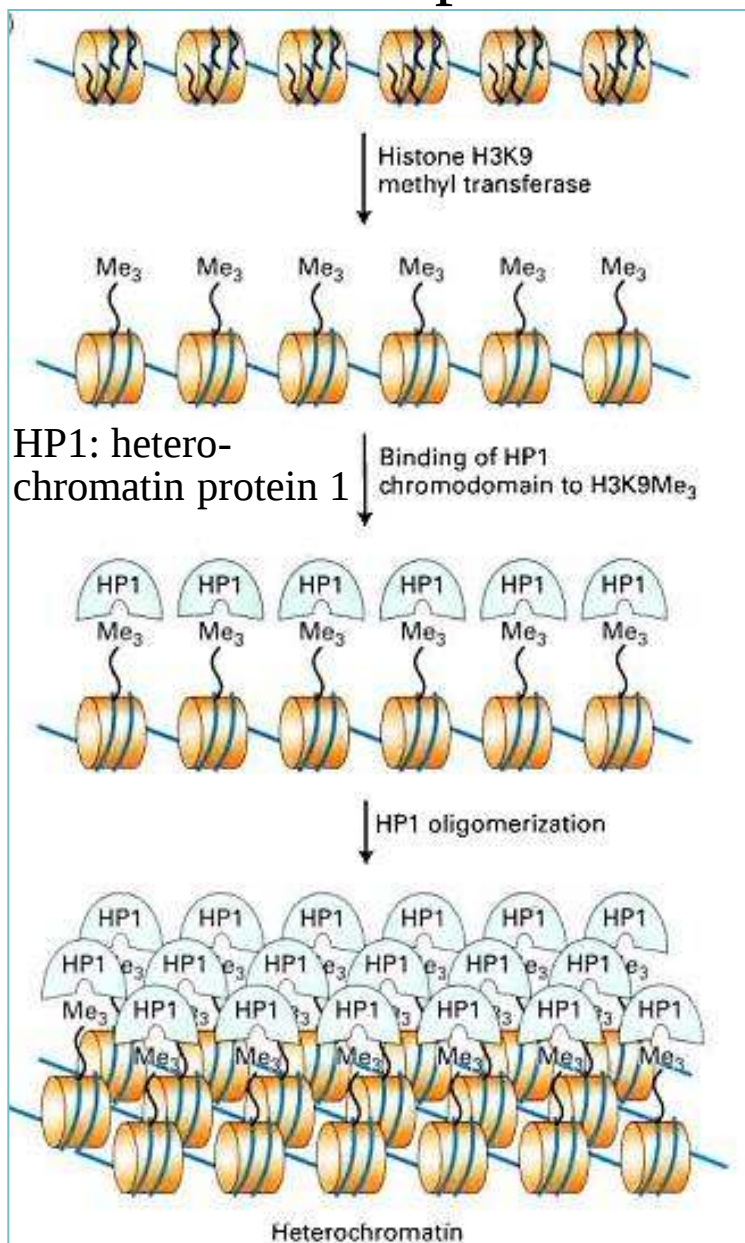
A hisztonok aminosav-oldalláncainak leggyakoribb módosításai



A hisztonok acetilációjának szerepe a sikeres transzkripcióban

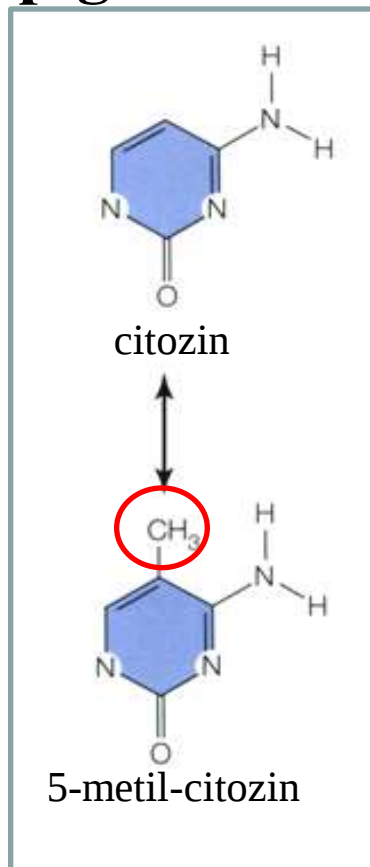


A hisztonok deacetilációja és metilációja tömöríti a kromatint, nincs transzkripció

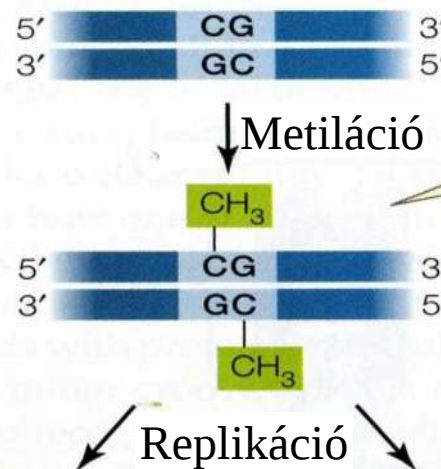


A kromatin tömör (represszált) állapota képes az utódsejtekben fennmaradni – **epigenetikus öröklődés!**

A metilált **citozin** segíti a kromatin tömörödését, így gátolja a transzkripciót. A DNS metiláltsági állapota is **epigenetikusan öröklődik**

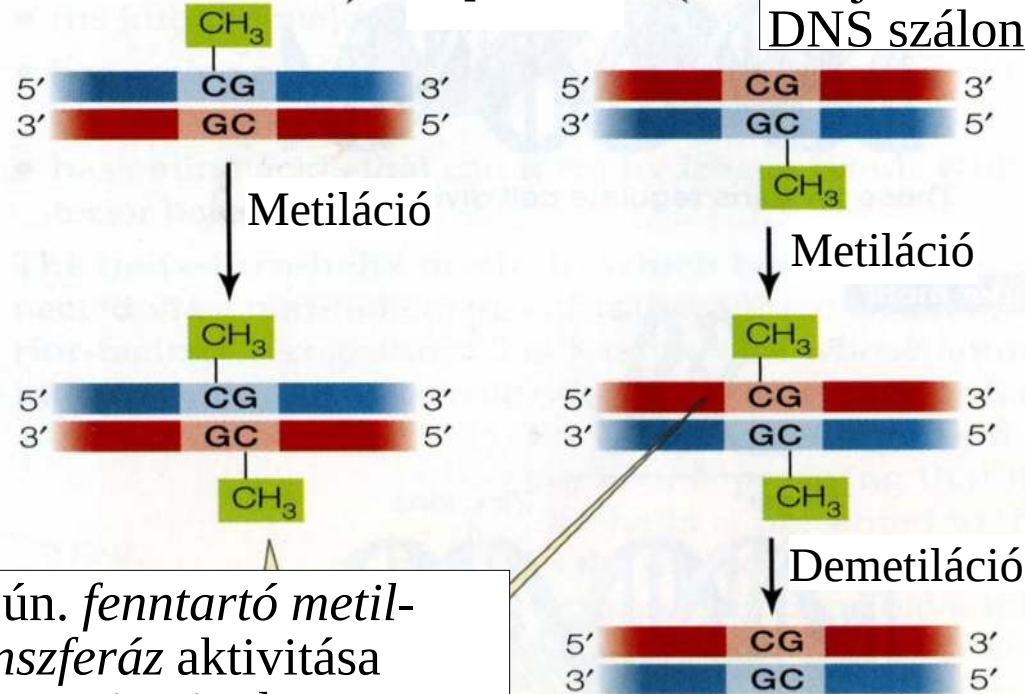


Az ún. *fenntartó metil-transzferáz* aktivitása miatt a citozinok metilálódnak az újonnan képződött DNS szálon



A transzkripció represszált, ha a *DNS metil-transzferáz* tevékenysége nyomán 5-metil-citozinok alakulnak ki

Replikációt követően a citozinok nem metiláltak az újonnan képződött DNS szálon

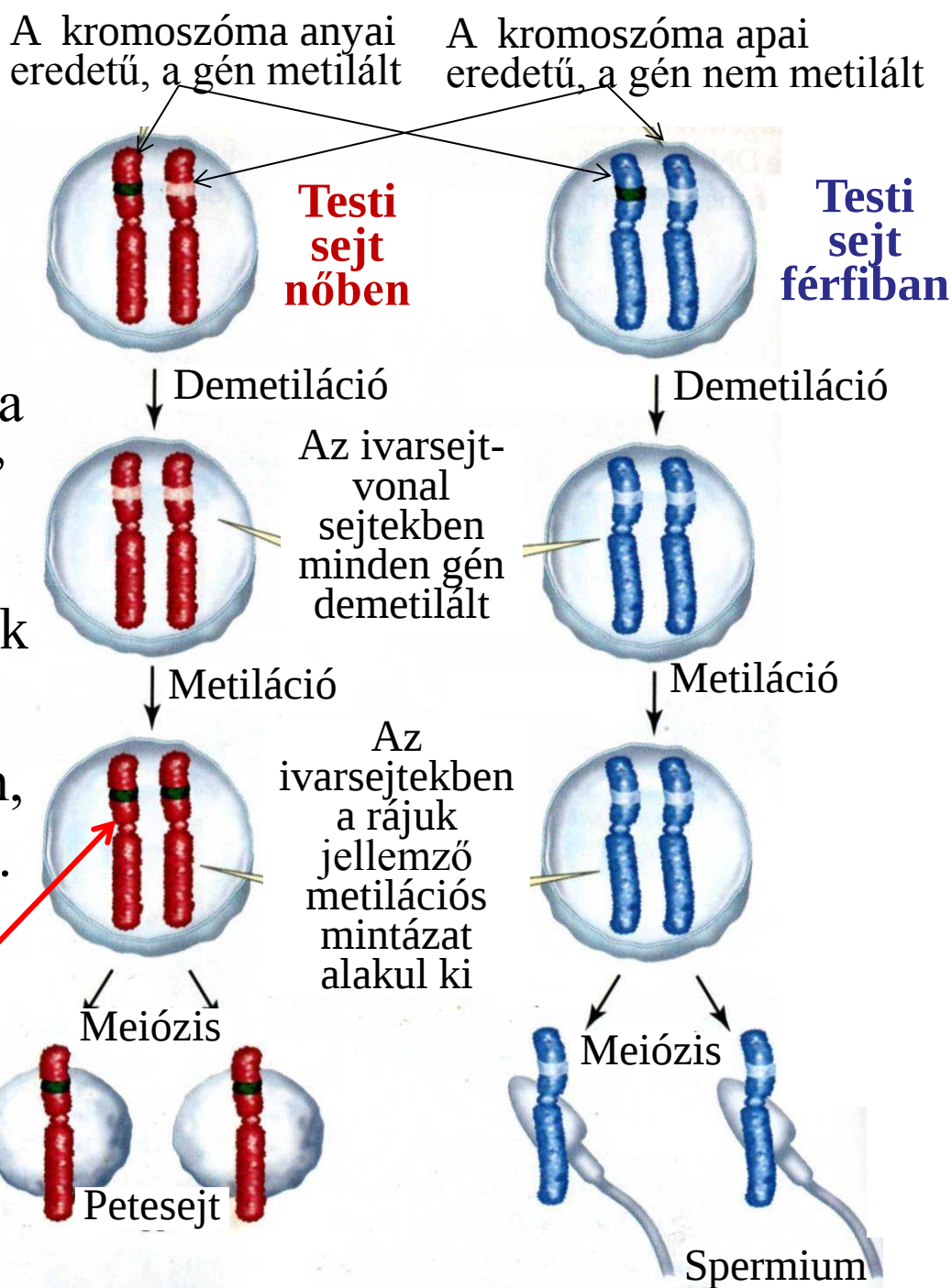


A *metiláz* aktivitása hatására a citozinokról eltávoznak a metil-csoportok, elkezdődhet a transzkripció

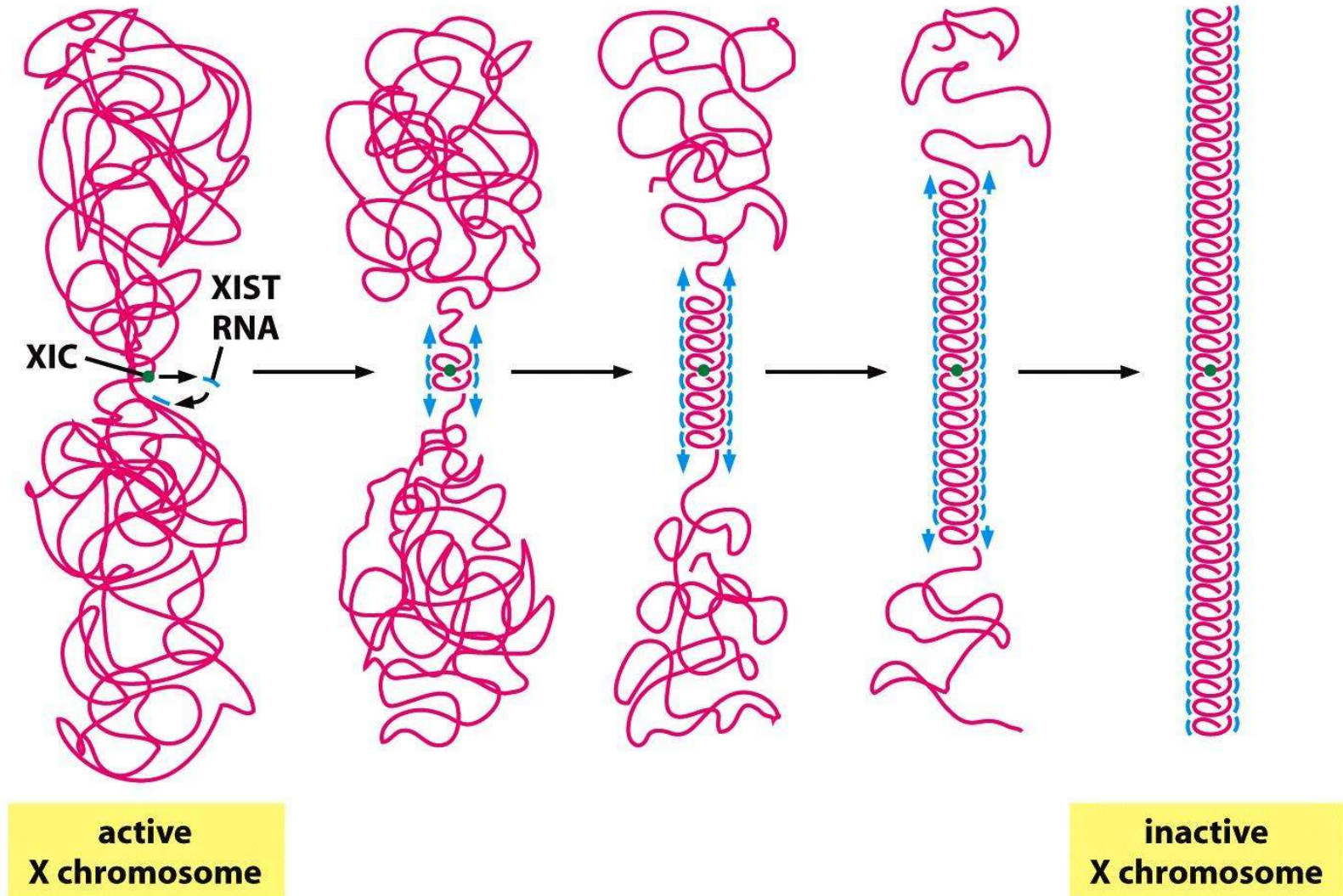
A genom imprintálódása az epigenetikus öröklődés egyik példája

Az ivarsejtek érése során *demetilációs „hullám”* fut végig a genomon, a zigóta „tiszta lappal” kezd. Kivéve néhány száz gént, amely *nemtől függően* metilálódik közvetlenül a meiózis előtt (egy részük a leendő hímivarsejtekben, más részük a leendő petesejtben).

Az ábrán az anyai imprintingre láthatunk példát. Az apában más gének ugyanilyen módon imprintálódnak



X-kromoszóma inaktiváció

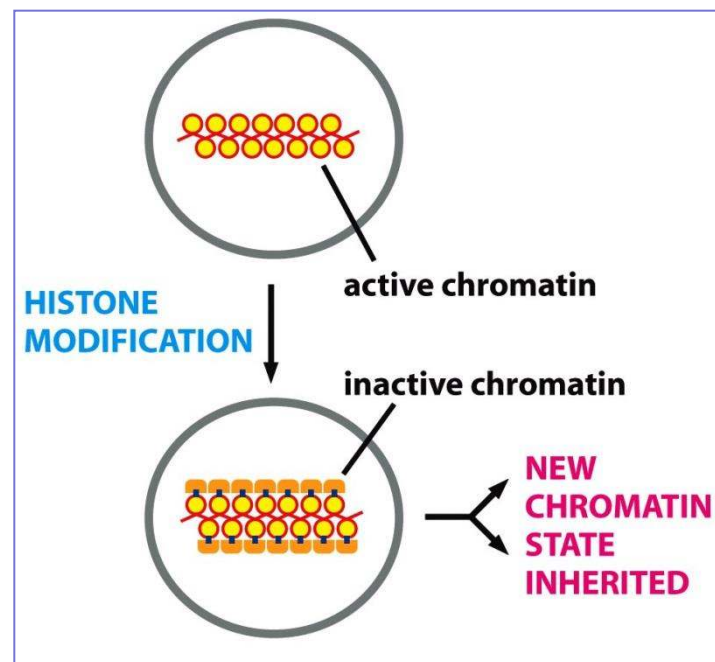
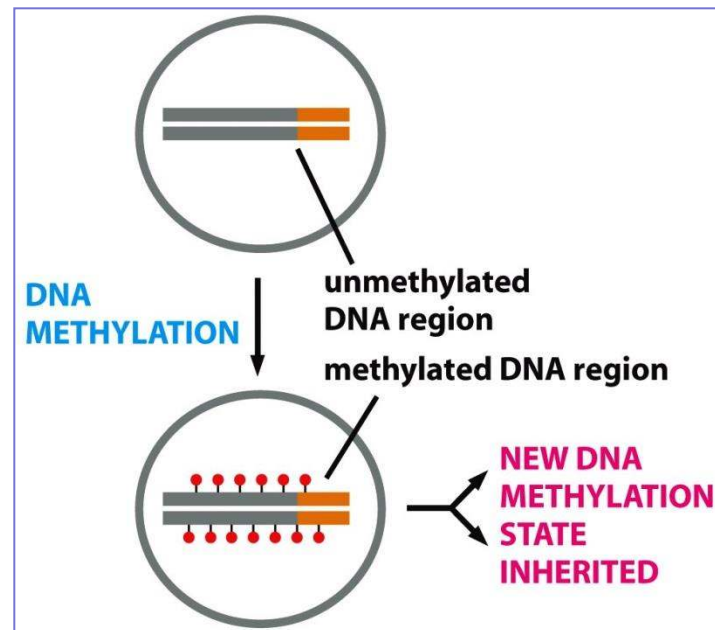
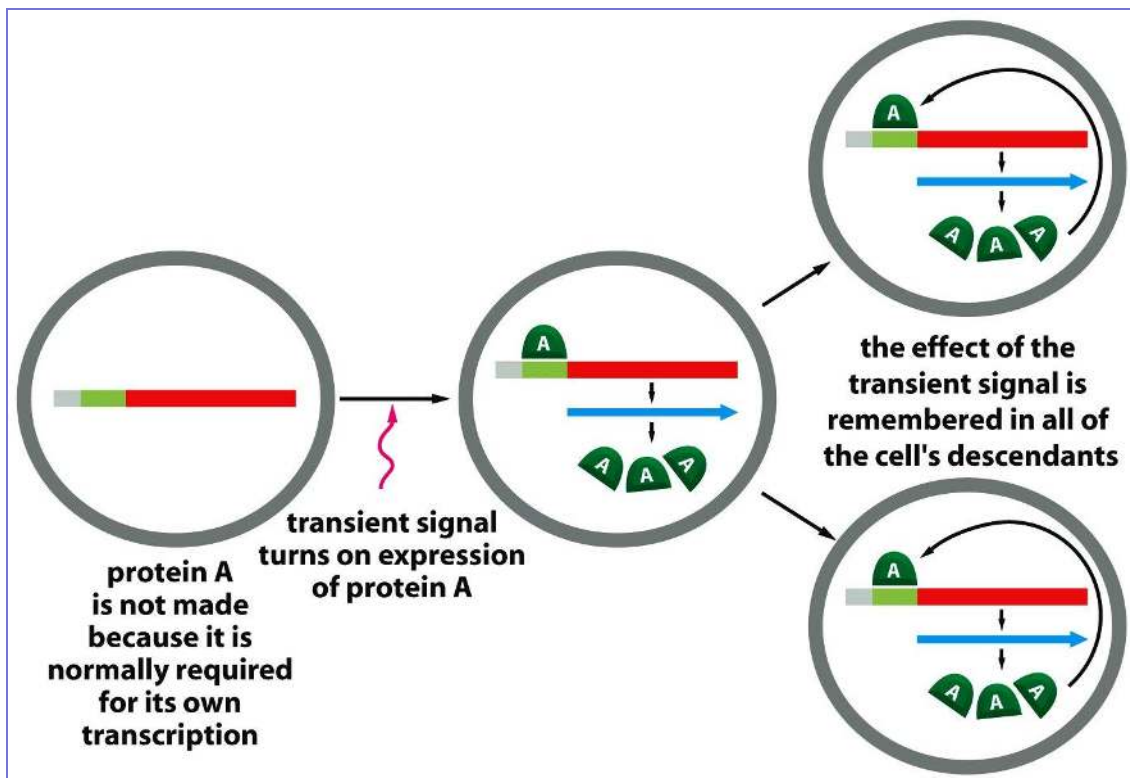


Az Xist RNS szétterjed az őt kifejező X kromoszómán és megváltoztatja a kromatin-szerkezetet – a mintázat az összes utódsejtben megmarad

A „sejtmemória” kialakulása

Az epigenetikus információk öröklődhetnek, ezért hozzájárulnak a „sejtmemória” kialakításához

DNS-metiláció →



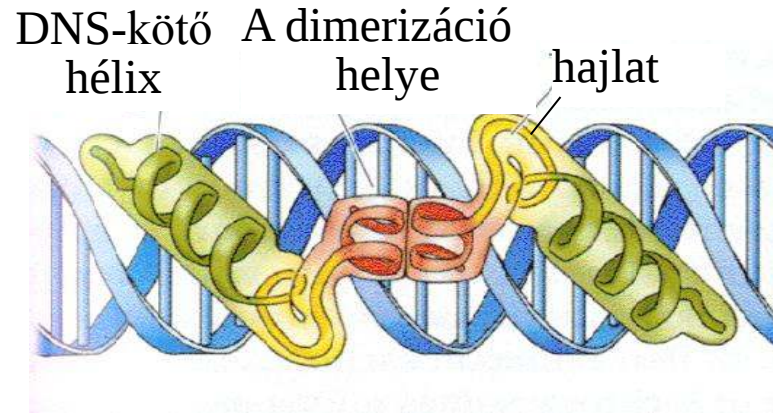
pozitív visszacsatolás: a citoplazmában található, és az utódsejtekbe jutó faktorok által

hiszton-módosulás →

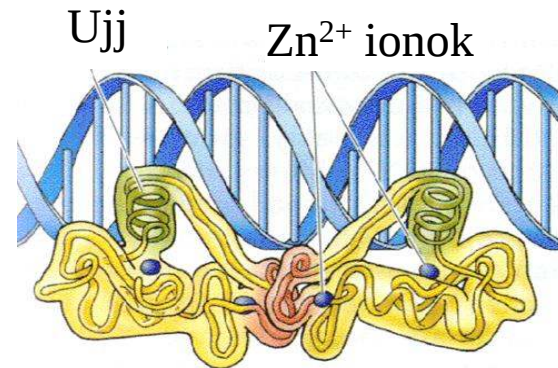
A transzkripció faktorok szerkezete

A transzkripciós faktorok DNS-kötő motívumokat tartalmaznak

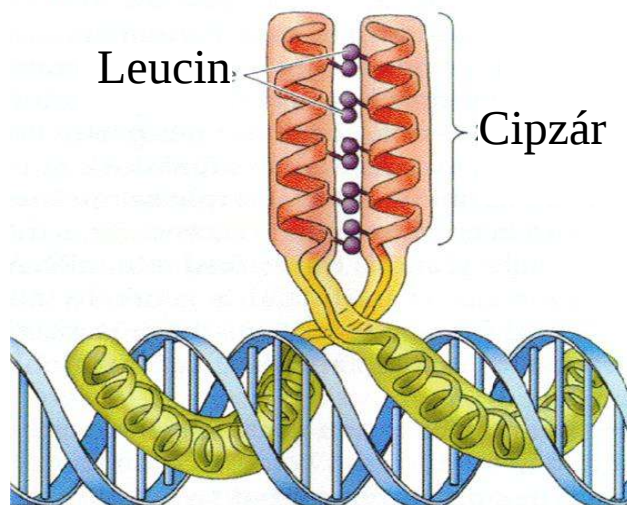
Hélix-hajlat (*turn*)-hélix



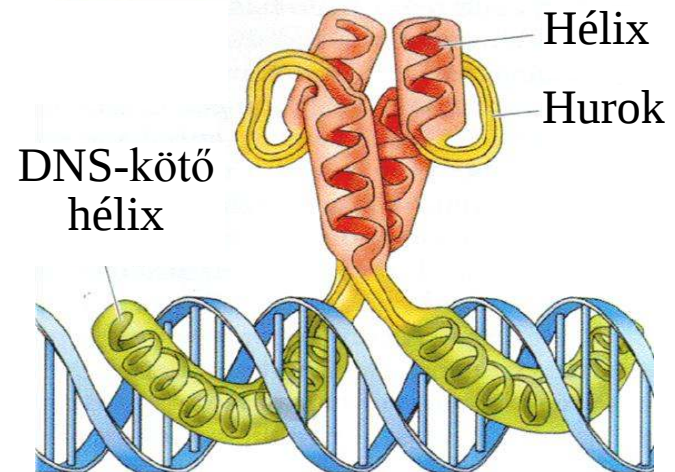
Cink-ujjak



Leucin-cipzár

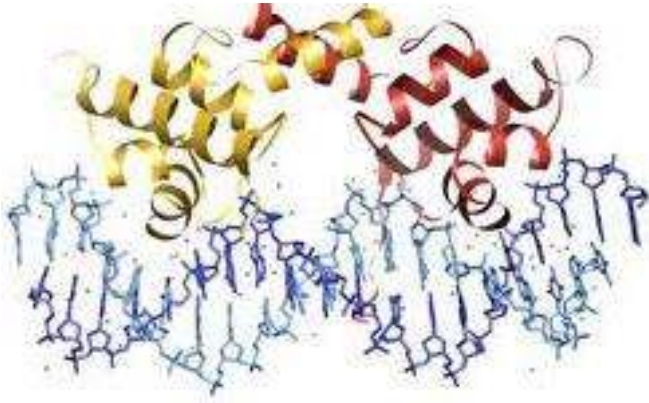


Hélix-hurok (*loop*)-hélix

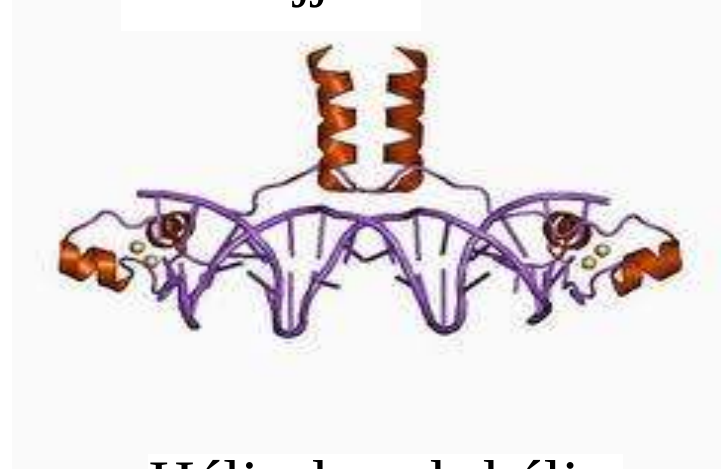


A transzkripció faktorok DNS-kötő motívumokat tartalmaznak

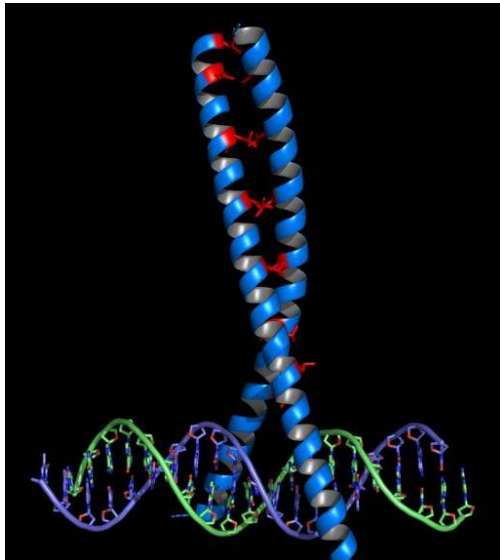
Hélix-hajlat (*turn*)-hélix



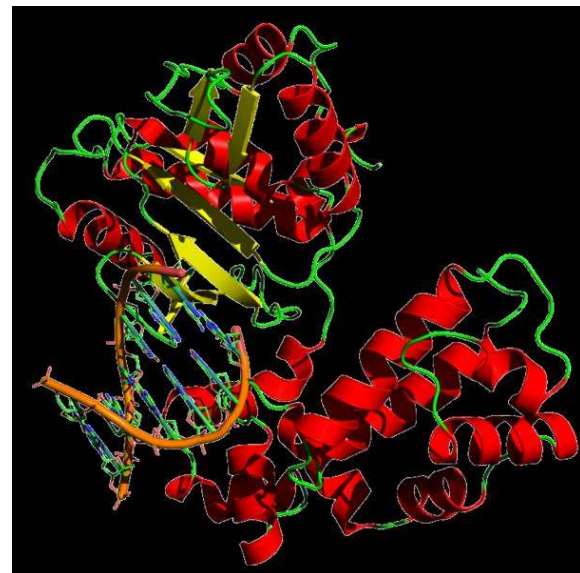
Cink ujjak



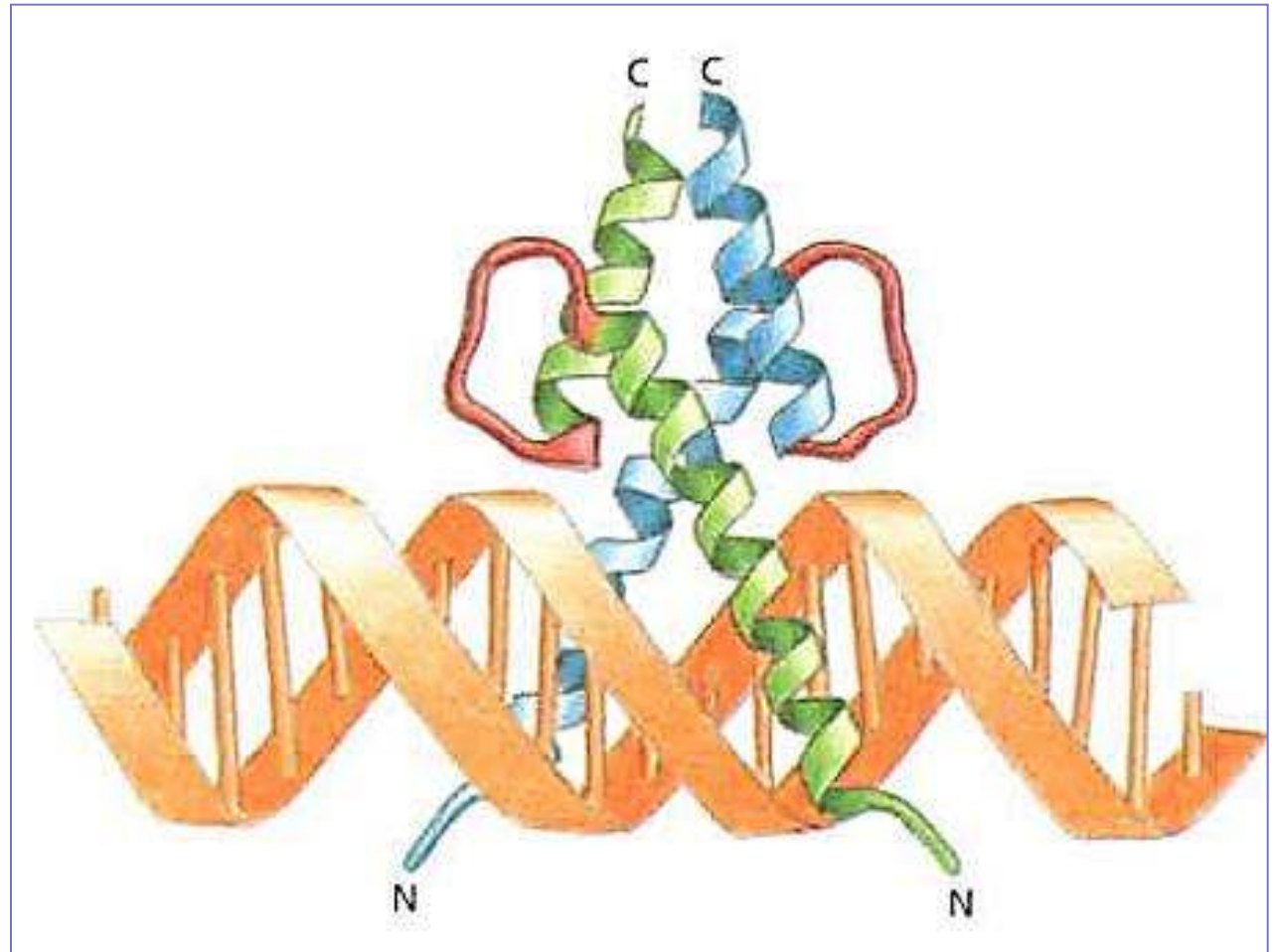
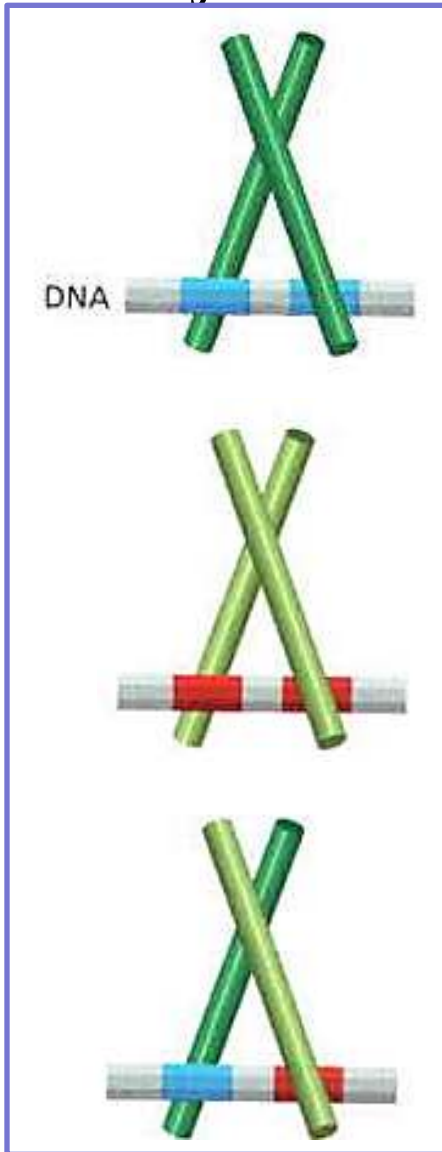
Leucin-cipzár



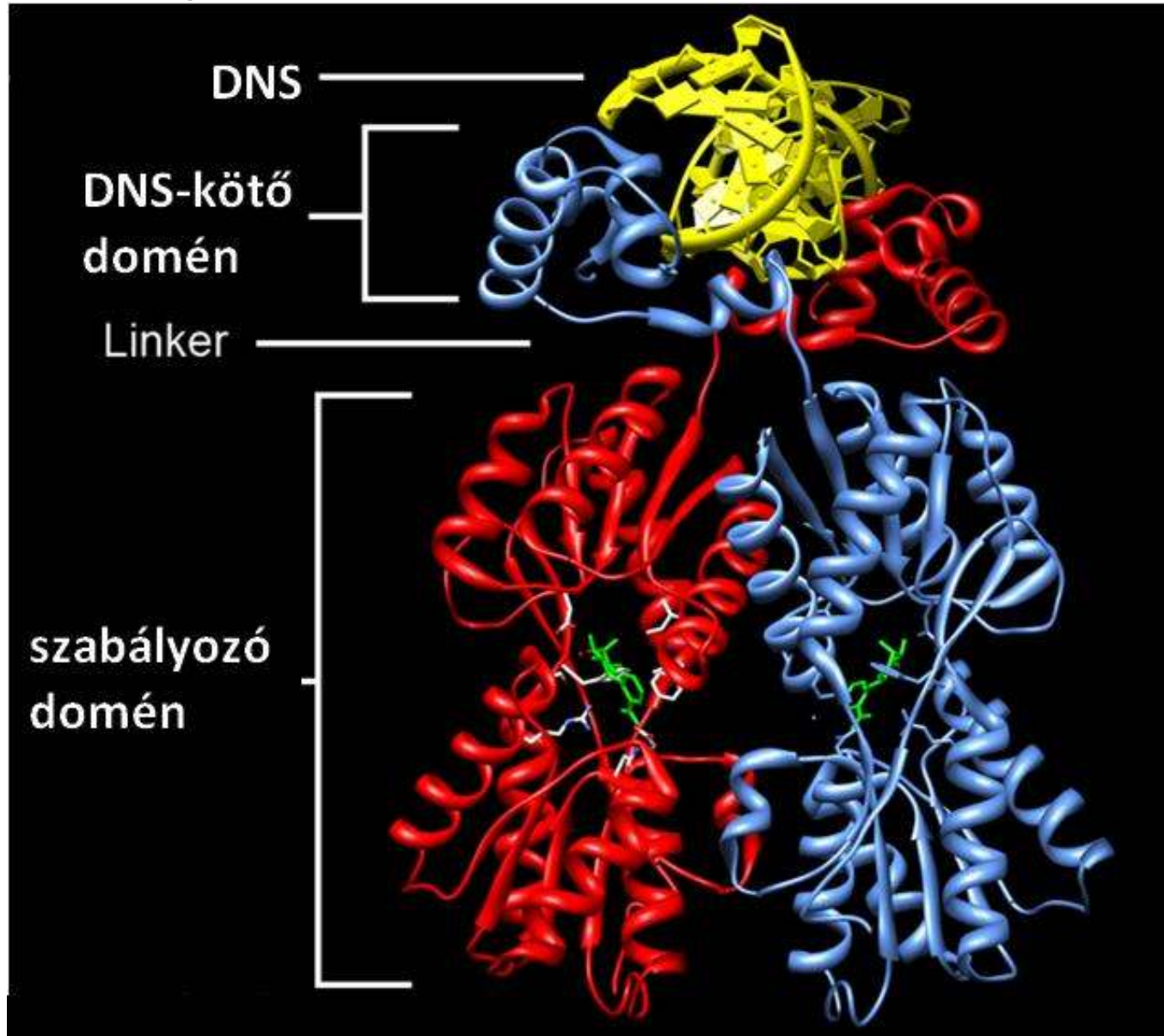
Hélix-hurok-hélix



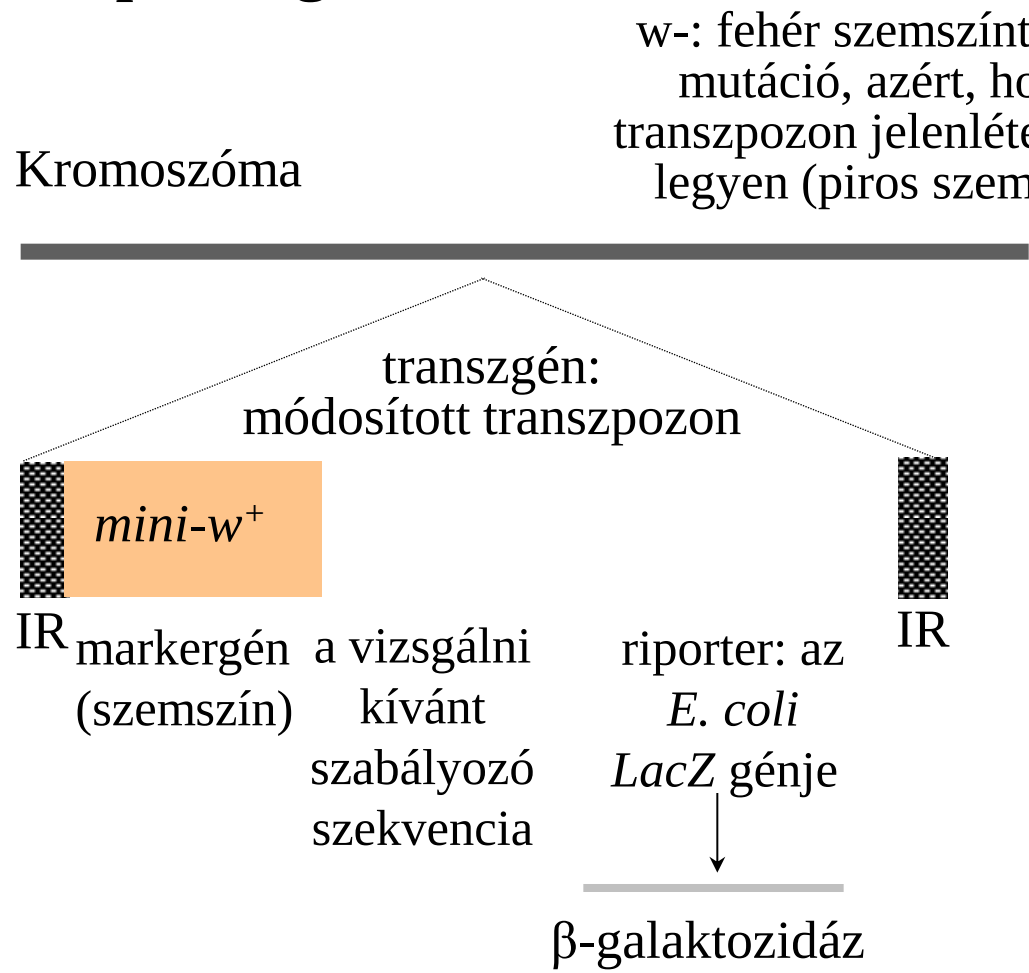
A transzkripciós faktorok többsége dimer formában szabályoz.
A **heterodimerizáció** növeli a szabályozható DNS-szekvenciák repertoárját



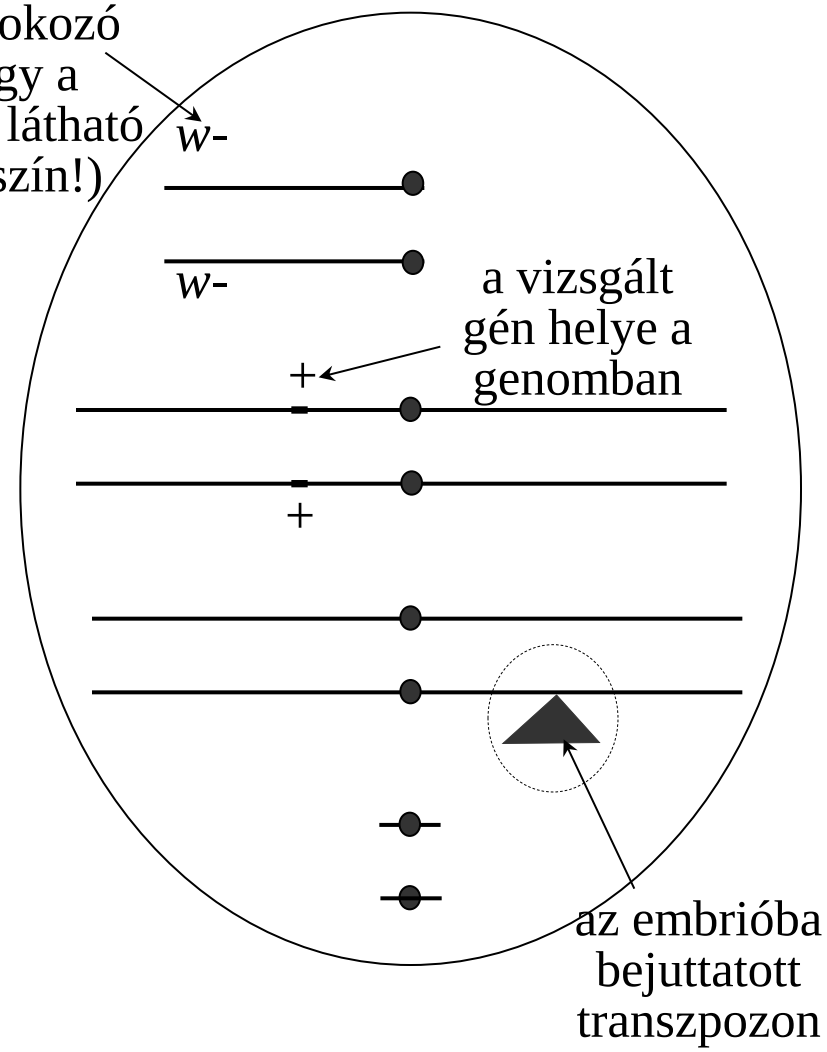
A transzkripciós faktorok szabályozó doménja teszi lehetővé a fehérje-fehérje interakciókat



Szabályozó régiók egyes elemei funkciójának megismerése: A riporter génnek haszna



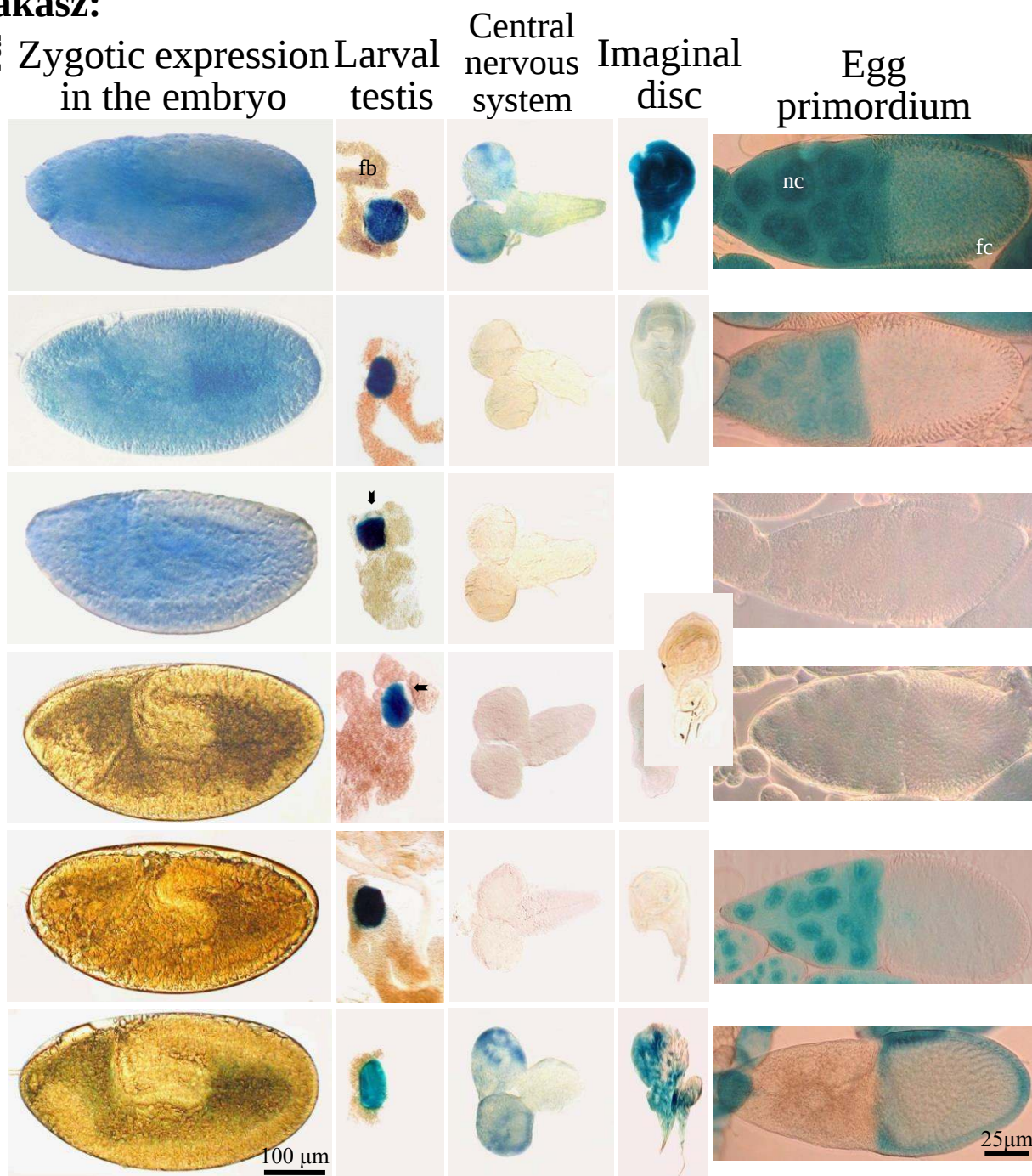
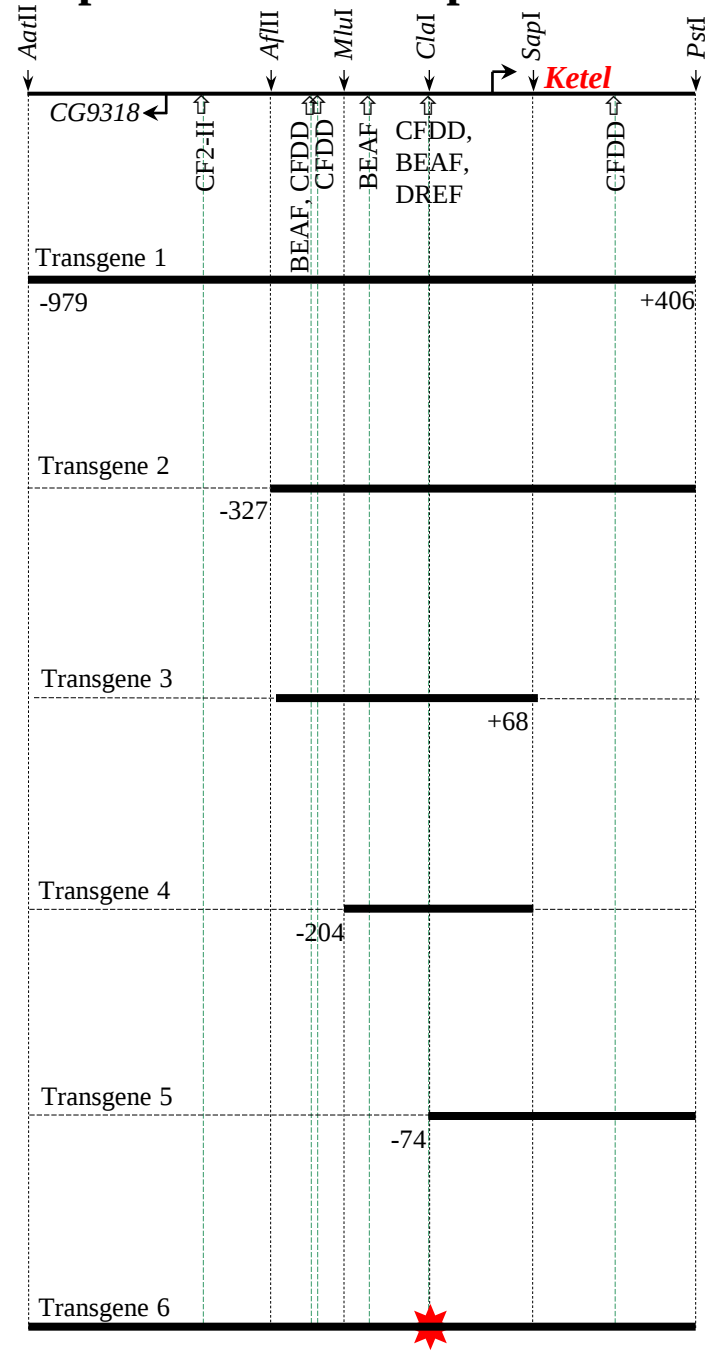
w-: fehér szemszín okozó mutáció, azért, hogy a transzpozon jelenléte látható legyen (piros szemszín!)



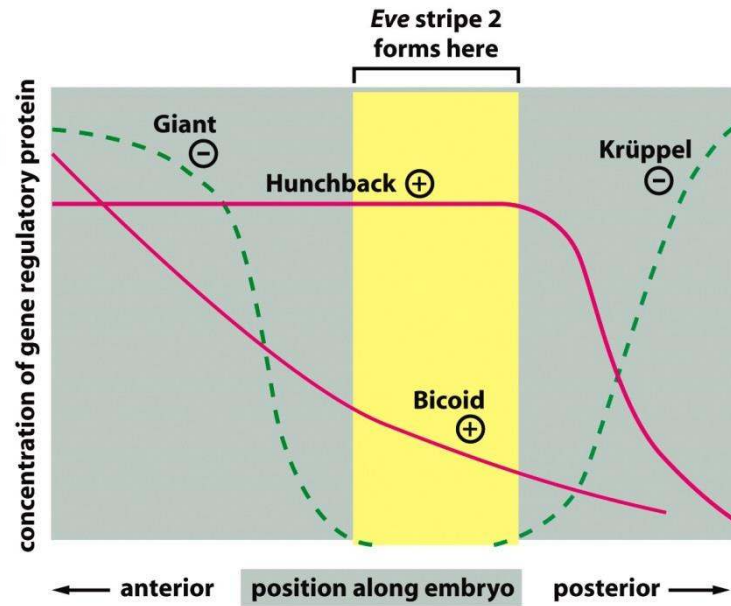
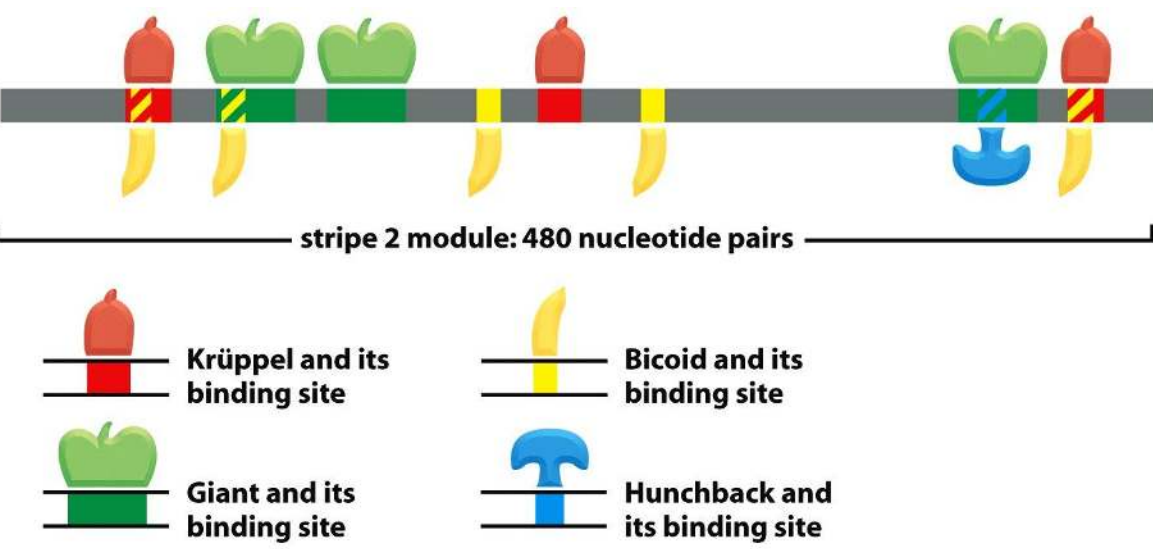
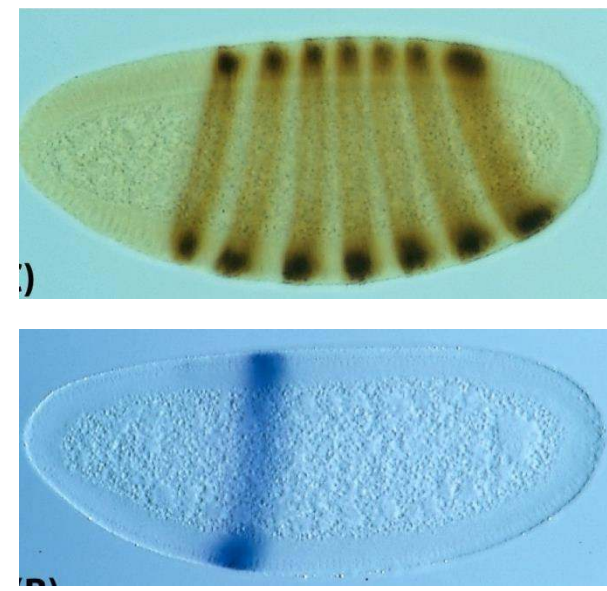
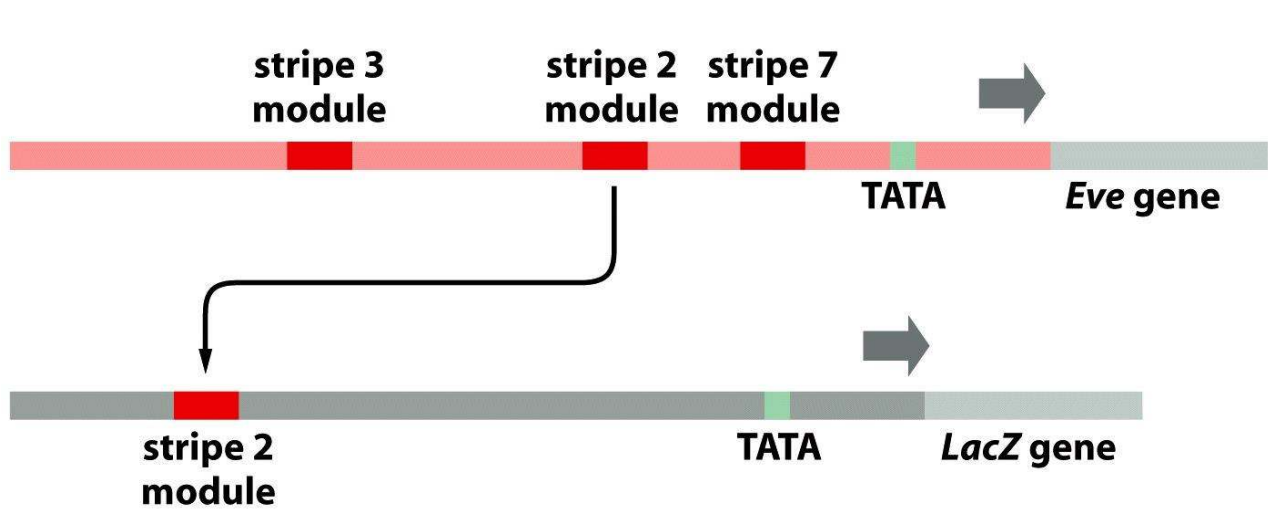
Riporter-konstrukciót tartalmazó transzpozon szerkezete (példa: ecetmuslica)

A transzgénikus ecetmuslica egy sejtjének genomja

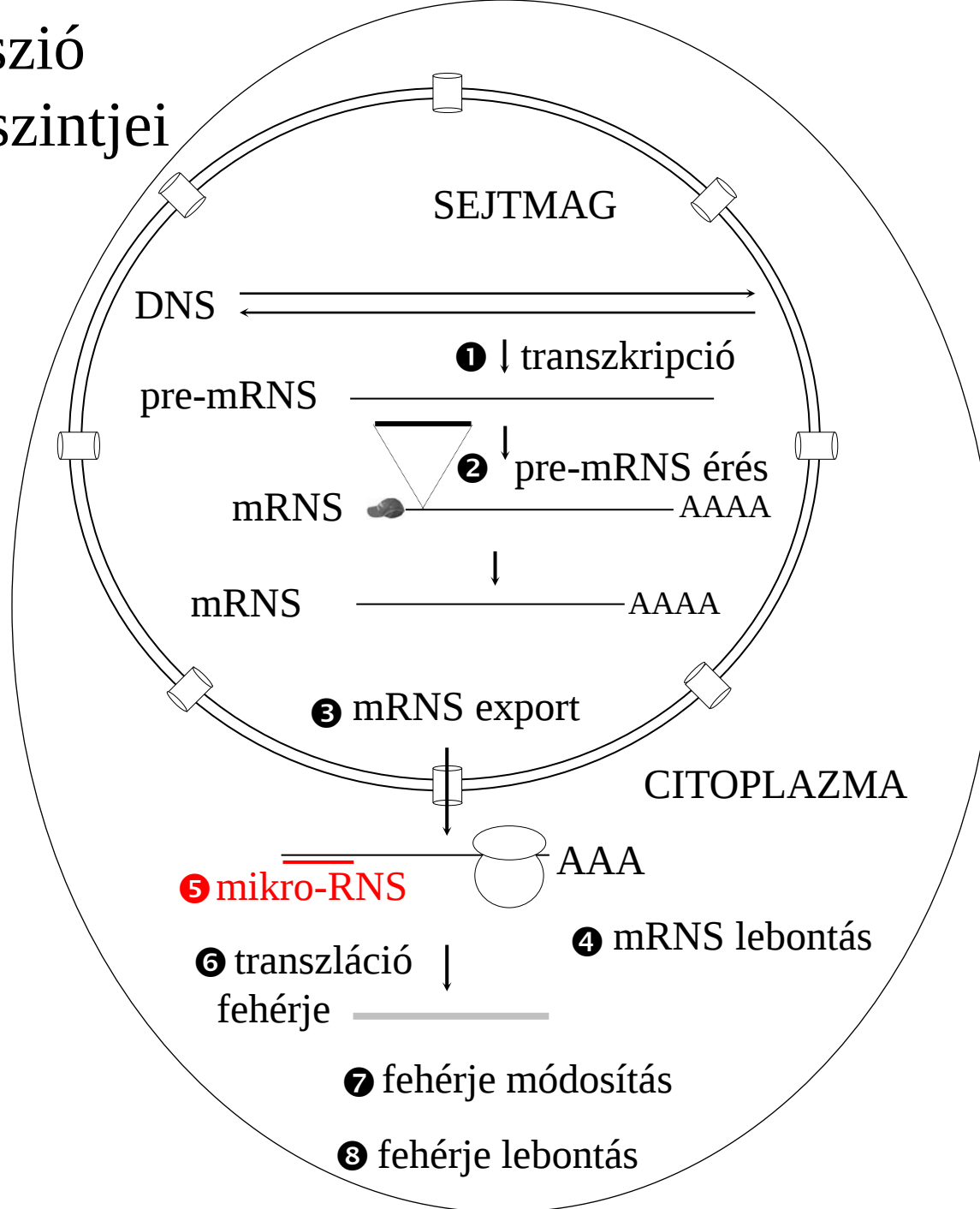
a riporter elé ültetett promóter-szakasz:



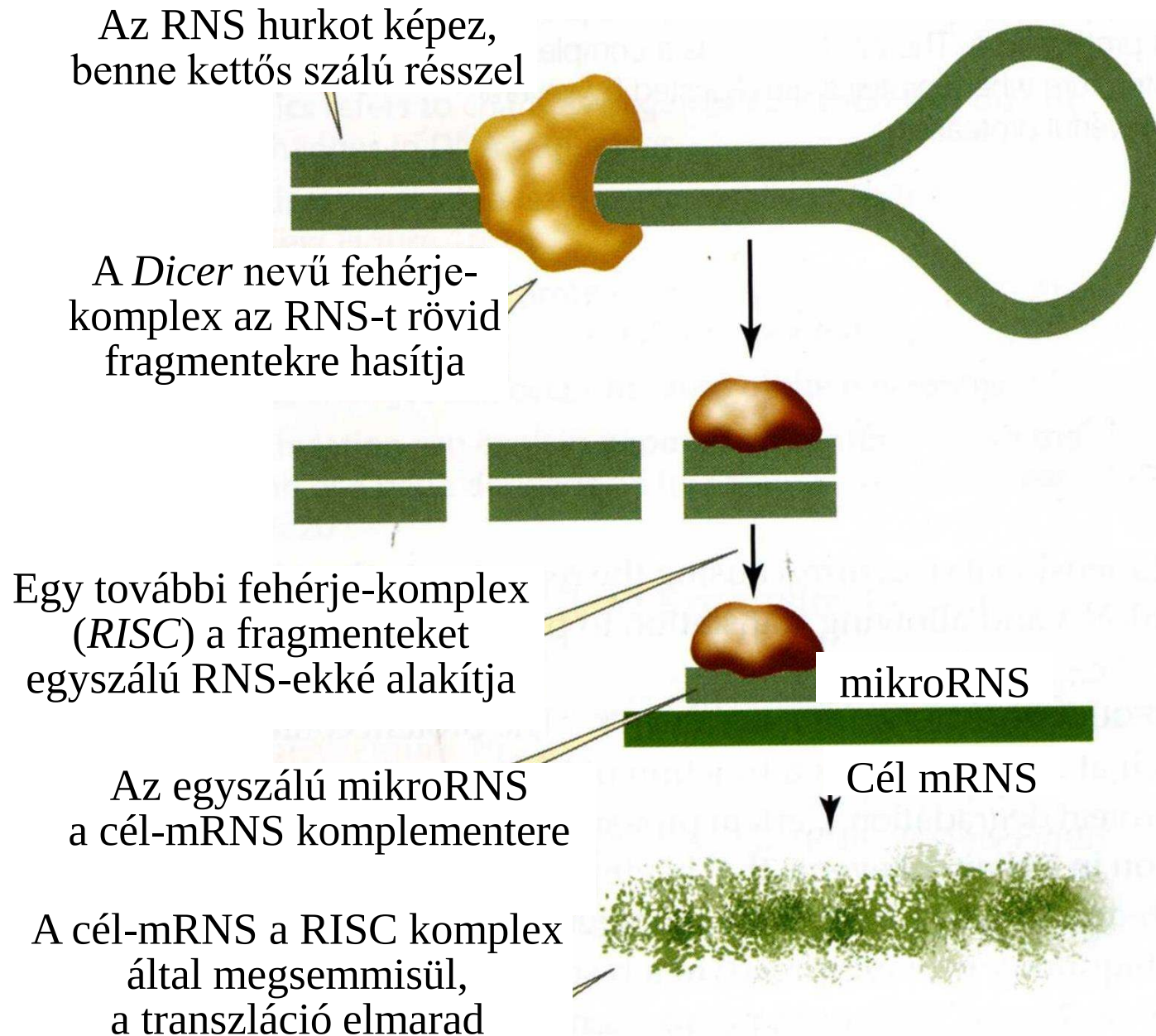
Az egyik legjobban ismert promóter: az *eve* génnek a második szelvényben történő kifejeződését szabályozza



A génexpresszió szabályozás szintjei



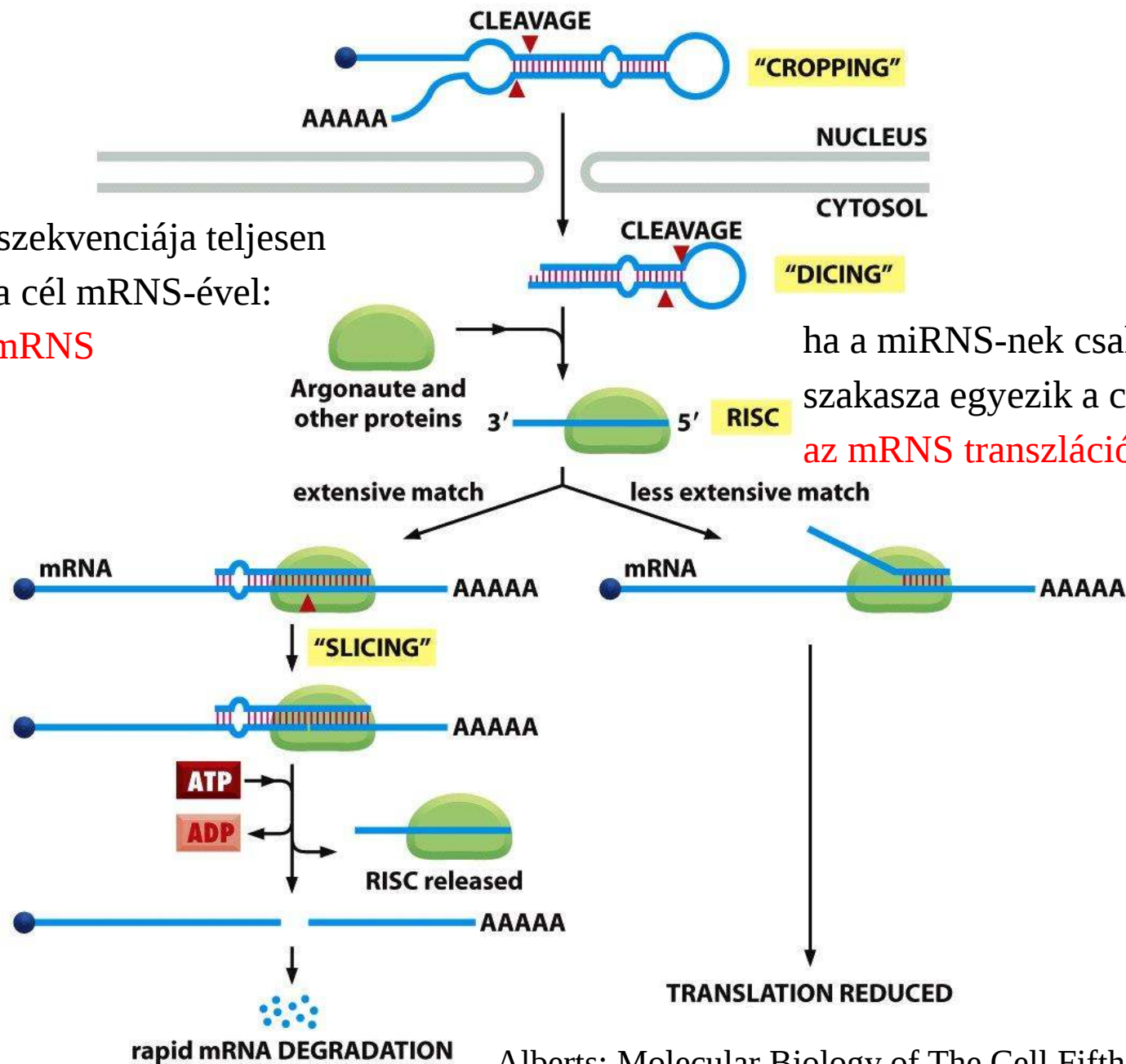
MikroRNS-ek: A génfunkció „csendesítése” RNS-interferenciával



A mikroRNS-ek érése és működése

ha a miRNS szekvenciája teljesen
meg egyezik a cél mRNS-ével:

lebomlik az mRNS



ha a miRNS-nek csak rövid
szakasza egyezik a cél mRNS-sel:
az mRNS transzlációja gátlódik

Az RNS-interferencia a génfunkció mesterséges csökkentésére használható – az alap kutatásban és gyógyításban egyaránt



Andrew Fire



Craig Mello

RNS-interferencia vizsgálata
*Caenorhabditis elegans*ban
2006, Nobel-díj

siRNA small interfering RNA:
mesterségesen van a sejtbe juttatva

