

15. A GÉNEXPRESSZIÓ SZABÁLYOZÁSA EUKARIÓTÁKBAN.

A differenciális génexpresszió. Sejtdifferenciáció és a sejtek DNS-tartalma. Az eukarióta gének expresszióját szabályozó DNS-szakaszok. Transzkripciósfaktorok. DNS-kötő fehérjemotívumok. Riporter gének. A génexpresszió szabályozásának szintjei. Kromatin és génexpresszió. Mikro-RNS-ek és RNS-interferencia.

A fejezetet szabad János egyetemi tanár állította össze, módosította Lippai Mónika

BEVEZETÉS

A prokarióta élőlények életében a génexpresszió szabályozásának célja elsősorban az, hogy a baktérium a leghatékonyabban alkalmazkodjon környezetéhez. Mivel a soksejtű eukarióta élőlények sejtjei viszonylag állandó környezetben élnek életüket, bennük a génexpresszió szabályozásának elsődleges célja nem a környezethez való alkalmazkodás, hanem a sejtdifferenciáció kiteljesedése az egyedfejlődés folyamán, és a kifejlett élőlény sejtfunkcióinak összehangolása. Milyen mechanizmusok biztosítják a soksejtű élőlényekben, hogy a gének a megfelelő sejtekben, a megfelelő időben és mértékben fejeződjenek ki (azaz expresszálódnak)? Melyek azok a DNS-szakaszok, amelyek a gének kifejeződésében szerepet játszanak? Milyen fehérjék és hogyan szabályozzák a gének expresszióját? Milyen szintjei vannak a génexpresszió szabályozásának? A jelen fejezet célja a fenti kérdések megválaszolása.

A differenciális génexpresszió

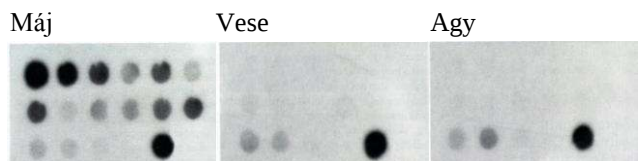
A soksejtű eukarióta élőlények testét kétféle sejt alkotja: (i) az ivarsejt-vonal sejtjei, amelyekből a kifejlett élőlény ivarsejtjei származnak, valamint (ii) a testi sejtek, amelyekből a legtöbb élőlényben nem származnak utódok (a kivételek zömét az ivartalan szaporodás különféle típusai jelentik). Vajon a testi sejtek mindegyikében minden gén expresszálódik? A kérdés például a következő kísérlet alapján eldönthető.

Egy adott sejttypusból (pl. máj) származó különböző cDNS-eket rögzítenek egy nitrocellulóz filterhez (15.1. ábra). Miután a cDNS-eket mRNS-ek alapján lehet reverz transzkriptáz enzim segítségével szintetizálni, mRNS-ek pedig csak akkor keletkeznek, ha egy gén kifejeződik, egy adott cDNS jelenléte az jelenti, hogy a neki megfelelő gén kifejeződik a vizsgált sejtfeleségben. Ugyanakkor csak az RNS-ekbe beépülő ^{32}P -UTP-t adnak máj-, valamint vese-, és idegsejtekhez - ha egy gén átíródik ezekben a sejtekben, a róla képződő mRNS-ekbe is ^{32}P -UTP épül be. Össz-mRNS mintákat izolálnak ezekből a máj-, vese- és agysejtekből, hibridizálják a ^{32}P -UTP-vel megjelölt mRNS-ek-et a nitrocellulóz filterhez kötött, májsejtekből származó cDNS-ekhez. Az autoradiográfia módszerével el lehet dönteni, hogy képződött-e az adott sejttypusban olyan mRNS, ami a

májsejtekben is jelen van. Ha expresszálódott a gén, képződött ^{32}P -jelzett mRNS, amely hibridizál a májból származó cDNS komplementer szálával, és az autoradiogramon sötét folt képződik (15.1. ábra).

Nyilvánvaló, hogy ha nincs jel az autoradiogramon, nincs olyan ^{32}P -el megjelölt mRNS, ami a cDNS-el hibridizálhatna, vagyis az adott szövetben nem expresszálódik az a gén, amelyet a májból származó cDNS reprezentál. Ugyanakkor a 15.1. ábrán láthatjuk, hogy (i) van olyan gén, amely alapján a máj-, a vese- és idegsejtekben is képződik mRNS. Ebben az esetben a 3. sor 1., 2. és 5. helyén levő cDNS-ek aktin, tubulin, és riboszomális fehérje géneknek felelnek meg, amelyek az ún. *háztartási* gének jellegzetes példái. A háztartási gének termékére minden sejtnek szüksége van. (ii) Vannak olyan gének, amelyek csak az egyik sejttypusban expresszálódnak (itt: csak a májsejtekben), más sejttypusokban nem. A jelenség neve *differenciális génexpresszió*. (iii) Egy sejttypuson belül is a különféle gének expressziójának mértéke erősen változó – lásd a 15.1. ábra első képét. Kell tehát, hogy legyenek olyan mechanizmusok, amelyek szabályozzák, hogy egyrészt mely sejttypusban mely gének expresszálódnak, másrészt szabályozni tudják a gének expressziójának mértékét is.

Az mRNS-ek forrása



15.1. ábra. A differenciális génexpresszió bemutatása. A képen olyan nitrocellulóz filterekről készült autoradiogramok vannak, amelyekhez májsejtekből izolált különböző mRNS-ek alapján készült cDNS-eket kötöttek foltokban. A szűrőpapírokhoz ^{32}P -vel jelzett máj-, vese-, valamint idegsejtekből izolált mRNS-eket hibridizáltak. Látható, hogy kis számban ugyan, de vese- és agymintában is találhatók olyan mRNS-ek, amelyek a májsejtekben is jelen vannak – ezek lehetnek például a minden sejtben működő háztartási gének termékei.

A sejtek DNS-tartalma a differenciáció folyamán

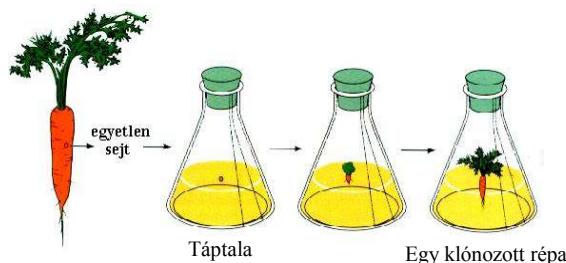
Lehetséges ugyanakkor olyan magyarázat is, amely szerint azért nem expresszálódik valamely gén valamely sejttypusban, mert a sejt nem tartalmazza az illető gént. Elképzelhető, hogy az egyedfejlődés során, miközben egy testi sejttypus valamely speciális feladat elvégzésére differenciálódik, elveszti azokat a géneket, amelyekre nem lesz szüksége hátralevő élete során. A feltételezés nem alaptalan. Vannak olyan fereg- és rovarfajok, amelyek testi sejtjeinek differenciálódása során kromoszómák vagy kromoszóma-részek vesznek el. (A jelenség neve a kromoszóma-diminúció, mechanizmusa pedig a következő: kromoszómák vagy kromoszóma részek erősen kondenzálódnak (úgy, mint a heterokromatin), majd a sejtosztódások során elvesznek a sejtekből.)

Itt említjük meg a kromoszóma(rész) eliminációjával ellentétes folyamatot, a *génamplifikációt*, amely folyamat során a DNS olykor meglehetősen nagy szakaszai replikálódnak (és néha a kromoszómából kivágódva független életet élnek). A DNS-kópiák tovább replikálódnak, miáltal néhány (vagy csak egyetlen) gén kópiaszáma megsokszorozódik. Ismert példa a selyemhernyó nyálmirigy-sejtjeiben, a gubó képződése során az úgynevezett selyem-gének amplifikációja, valamint az multidrog-rezisztencia gén amplifikációja a daganatsejtek bizonyos típusaiban (a multidrog-rezisztenciáért felelős fehérje egy pumpa: a sejthártyába épül, és miután eltávolítja a sejtekből a káros anyagokat, lecsökkenti a kemoterápia hatékonyságát).

Vajon a magasabbrendű élőlények differenciálódott sejtjei tartalmazznak minden gént? A kérdésre a következő két kísérlet is adhat választ.

1. A sárgarépa-klónozás tanulsága

Egy kísérletsorozatban sárgarépa gyökeréből származó sejteket különítettek el és tették egyenként steril táptalajra (15.2. ábra). A répansejt osztódni kezdett, az utódsejtek úgynevezett kalluszt képeztek. Megfelelő hormontartalmú táptalajra téve a kalluszból répa keletkezett. Az a tény, hogy egyetlen, már differenciálódott sejtből növényt lehetett regenerálni, azt jelenti, hogy a kiindulási sejt tartalmazta mindazt a genetikai információt, amely a sejtek osztódáshoz, és a differenciálódásához szükséges, vagyis a répagyökér-sejtből nem vészett el gén.



15.2. ábra. A sárgarépa klónozása. A répa terminálisan differenciálódott testi sejtjeinek mindegyikéből egy-egy répa regenerálható, jelezve, hogy a differenciálódott testi sejtek DNS-tartalma nem változott a sárgarépa élete során.

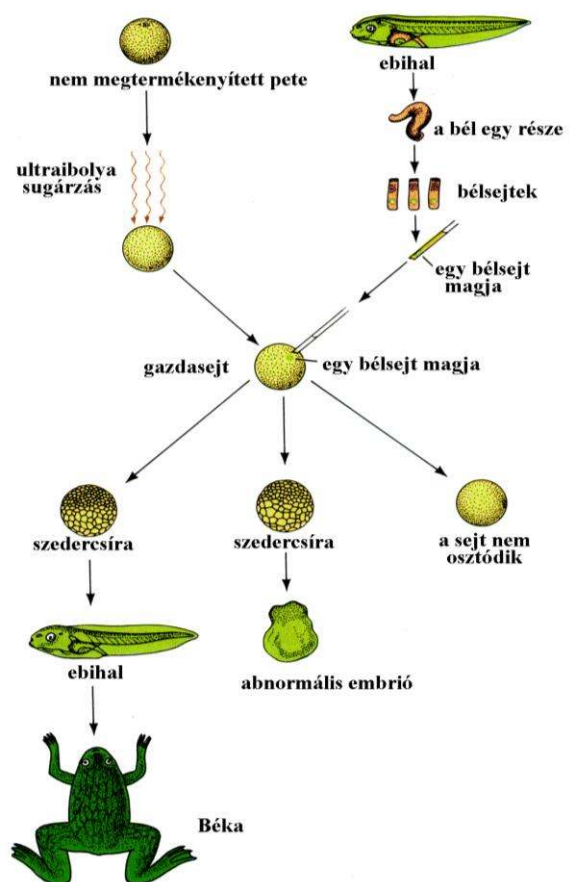
Az a technika, amellyel egy növény testi sejtjeiből nagyon sok utódnövényt lehet előállítani, példa a klónozás egyik típusára, és mindennapos eljárás a növény-nemesítésben. (Klón: egyetlen sejt vagy élőlény ivartalan szaporodással/szaporítással létrejött, azonos genotípusú leszármazottai.)

2. A béka-klónozás tanulsága

Vajon az előző kísérlet működik az állatvilágban is? Igen, amint azt először J. Gurdon az 1960-as évek közepén megmutatta. Gurdon az afrikai karmosbéka (*Xenopus laevis*) ebihal bélhámsejtjeiből, a terminálisan differenciálódott sejtek egyik típusából izolált sejtmagokat (15.3. ábra). A sejtmagokat

egyenként olyan meg nem termékenyített petesejtbe ültette, amelyek sejtmagját előzőleg vagy eltávolította, vagy ultraibolya sugárzással tönkretette. A testi sejtek magját tartalmazó peték némelyikéből olyan békák fejlődtek, amelyek utódai ma is élnek (15.3. ábra). Gurdon 2012-ben Nobel-díjat kapott munkásságáért.

A Gurdon-kísérlet elegánsan bizonyítja, hogy a béka bélhámsejtek örökítőanyagának anyaga sem csökken a sejt-differenciáció során - és azt is, hogy akár egy terminálisan differenciálódott sejt génexpressziós mintázata is áthangolható. Ezzel a módszerrel „készítették” többek között a világhírű Dolly birkát is 1996-ban.



15.3. ábra. A béka klónozása. Béka fejlődhet abból a „zigótából”, amelyet úgy hoztak létre, hogy a sejtmagtól megfosztott petesejtbe ebihal bélhámsejtjének magját ültették.

A génexpressziót szabályozó DNS-szakaszok típusai

Nyilvánvaló, hogy a génexpresszió szabályozásához szükség van (i) olyan DNS-szakaszokra, amelyek befolyással vannak a gének kifejeződésére és (ii) olyan fehérjemolekulákra is, amelyek szabályozzák a gének transzkripcióját. A génexpressziót szabályozó DNS-szakaszoknak eukariótákban három fő típusa van.

(1) Promóter

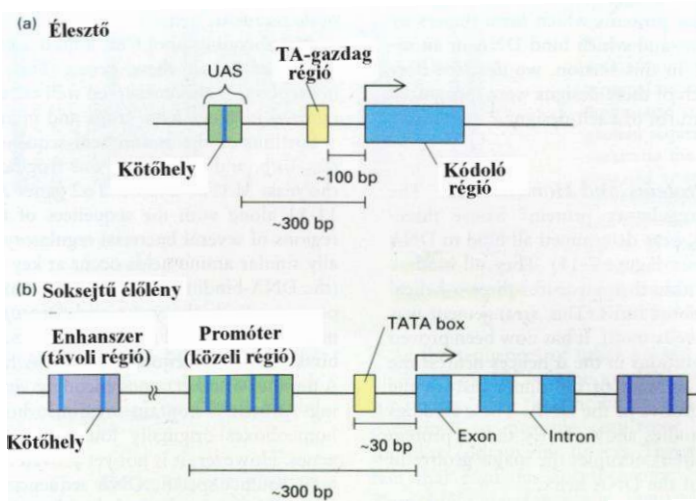
Amint azt a 9. fejezet áttekinti, a gén átíródo részének 5' vége közelében van a promóter, az a DNS-

szakasz, amelyhez - egyebek mellett - az RNS polimeráz enzim kapcsolódik. Az RNS polimeráz végzi a transzkripciót, a génexpresszió első lépését. Eukariótákban, hasonlóan a prokariótákhoz, a promóter része az A=T bázispárokban gazdag TATA- (Hogness-) box, az evolúció folyamán erősen konzerválódott szekvenciák egyike (15.4. ábra).

5'																			3'
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						
Konszenzus szekvencia:		T	A	T	A	A/T	A												

15.4. ábra. A TATA-box 60 eukarióta gén promótere alapján.

A TATA-box a gén 5' vége közelében levő kb. 300 bp-nyi DNS-szakasz része (15.5. ábra). A promóterben olyan további DNS-szakaszok vannak, amelyekhez a transzkripciót szabályozó fehérjemolekulák, ún. *transzkripciós faktorok* kapcsolódhatnak. Minthogy ezek a szekvenciák a gén 5' vége közelében, "felfelé" vannak, élesztőkben UAS-nek (Upstream Activating Sequences) nevezik őket. A soksejtű eukarióta promóterekben sok esetben nagyon nagyszámú olyan DNS-szakasz van, amelyekhez különféle transzkripciós faktorok kapcsolódhatnak. A kötődő transzkripciós faktorok típusa, száma, kombinációja, a kapcsolódás helye és erőssége határozza meg, hogy mely sejttypusban és milyen mértékben expresszálódik az általuk szabályozott gén.



15.5. ábra. A génexpressziót szabályozó DNS-szakaszok szerveződése egysejtű (élesztő) és soksejtű eukarióta élőlényekben.

(2) Enhanszer

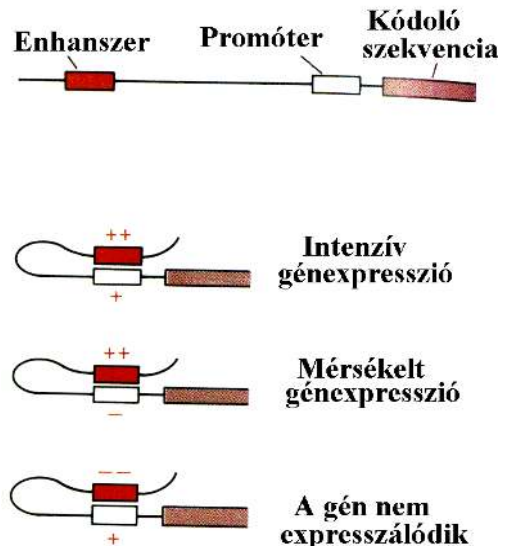
Az enhanszerek olyan DNS szakaszok, amelyekhez (i) transzkripciós faktorok kapcsolódhatnak, szabályozva gének expresszióját, (ii) amelyek a szabályozott gén(ek)től akár nagyon messze is lehetnek (akár 100

kb-nyira), és (iii) a gén strukturális részéhez viszonyítva 5' és 3' irányban, sőt, az intronokban is lehetnek.

(3) Szilenszer

A szilenszerek olyan DNS-szakaszok, amelyek csökkentik egy gén kifejeződésének mértékét. A szilenszerek is lehetnek az 5' vagy 3' irányban, vagy akár az intronokban is.

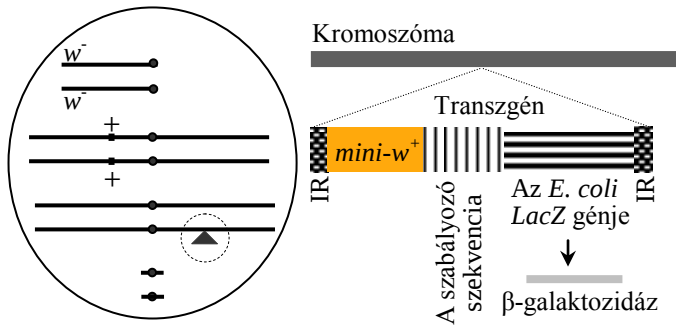
Hogyan szabályozhatják a génexpressziót az enhanszerek és a szilenszerek? Ne feledjük, hogy a gén a strukturált kromatin része, vagyis például egy gén promótere és egy adott enhanszer a DNS-szekvenciában távol, de térben egymás közelében is lehet. Vannak olyan fehérjék is, amelyeknek feladata éppen az, hogy egymás közelébe hozzák az enhanszert és a promótert. Tehát a génexpresszió szempontjából nagyon fontos, hogy milyen fehérjék kapcsolódnak a génexpressziót szabályozó DNS szakaszokhoz, és fontos a DNS-fehérje komplex térbeli szerkezete is (15.6. ábra). Például egyetlen foszfátcsoport jelenléte a DNS-hez kapcsolódott fehérjén már drámai módon megváltoztathatja a génexpresszió jellegét és mértékét.



15.6. ábra. Egy példa: a promóter és az enhanszer, illetve a hozzájuk kapcsolódó (+) illetve nem kapcsolódó (-) fehérjék kombinációinak hatása a szabályozott gén expressziójára és az expresszió mértékére.

A riportergének és a transzgénikus élőlények szerepe a génexpresszió tanulmányozásában

A génexpresszió megfelelő szabályozása olyan mechanizmusokat feltételez, amelyek funkcióképes fehérjék képződését jelentik (i) az egyedfejlődés megfelelő szakaszában, (ii) a megfelelő sejtekben és (iii) a megfelelő mértékben. Hogyan lehetne azonosítani azokat a DNS szakaszokat, amelyek egy adott gén kifejeződését szabályozzák? Hogyan lehetne kideríteni az egyes szakaszok szerepét a gén kifejeződésében? A *riportergének* elegáns megoldást adnak a fenti kérdések megválaszolására (15.7. ábra).



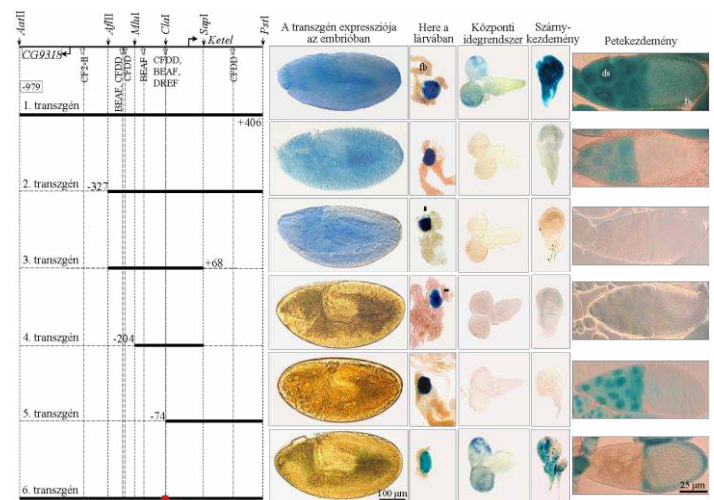
15.7. ábra. Egy *Drosophila*-ban alkalmazott riporter-konstrukció szerkezete. Egy transzpozon kétoldali fordítva ismétlődő szekvenciái (IR) a következő DNS-szakaszokat fogják közre: (i) azt, amely a riporter gén expresszióját szabályozza. (Ugyanez a szekvencia szabályozza a $+$ -szal jelölt tanulmányozni kívánt gént) expresszióját!) (ii) a riporter gént (itt az *E. coli lacZ* génjét), valamint (iii) egy úgynevezett markergént (a markergén itt *mini-w*⁺, ami a *w*⁻/*w*⁻ – fehér szemű – háttérén narancssárga szemszín eredményez). A fenti elemeket hordozó DNS-szerkezet a kromoszómák egyikébe inszertálódott (▲). A kromoszómák annak a génnek a két ép kópiáját (+) is hordozzák, amelynek az expresszióját szabályozó elemeket és szerepüket kívánjuk megismerni.

Vegyük azt a DNS-szakaszt, amely tartalmazza azokat a szekvenciákat, amelyek a vizsgált gén kifejeződését szabályozzák (15.7. ábra). Készítsünk egy olyan *rekombináns konstrukciót*, amely különböző eredetű DNS-darabokból áll: ligáljuk a vizsgálandó szabályozó DNS-szakaszt például az *E. coli lac* operonjának *lacZ* génjével (a *lacZ* gén a β-galaktózidáz enzimet kódolja). A konstrukcióban a *lacZ* gén expresszióját tehát a mesterségesen hozzá kapcsolt szakaszok szabályozzák. Ennek megfelelően a *lacZ* gén expressziója (azaz a β-galaktózidáz enzim képződése) pontosan úgy alakul, amint a tanulmányozandó gén expressziója: a *lacZ* gén, mint egy riporter, tudósít a vizsgálandó (+) gén expressziójáról. Érthető, hogy a *lacZ* gént *riporter génnek* nevezik. A β-galaktózidáz aktivitásának kimutatásához egy olyan szintelen X-gal nevű (β-galaktózid típusú laktóz-analóg) vegyületet használnak, amelyből a β-galaktózidáz enzim hatására kékszínű vegyület képződik (15.8. ábra). Néhány más riporter gén is “forgalomban van”, mint például a *luciferáz* enzim, amelynek működése miatt világítanak a szentjánosbogarak, a CAT (kloramfenikol-acetil-transzferáz) vagy a ma már leggyakrabban alkalmazott riporter, egy medúzafaj *zölden fluoreszkáló proteinje*, a GFP, illetve sokféle színben világító „rokonai” (YFP, CFP, RFP..).

A riporter gén kifejeződésének időtartama függ a sejten belüli sorsától. (i) A riporter gént is tartalmazó konstrukciót például plazmidban eukarióta sejtekbe juttatják (transzfektálják), és úgynevezett tranziens génexpresszió során követik a riporter gén expresszióját. A sejtekbe juttatott DNS-szakaszok egy ideig jelen vannak, és működnek a *transzformált* sejtekben, majd degradálódnak. (ii) A rekombináns

konstrukciót beleültetik a genomba. Erre alkalmasak például a transzpozonok: a mesterséges DNS „széleire” egy transzpozon fordítva ismétlődő szekvenciáit ligálják, és vektorban ivarsejt-vonal sejtekbe juttatják. Természetesen transzpozáz enzim jelenlétében, hogy a “szerkezet” eredeti helyéről kivágódhasson és a kromoszómális DNS-be inszertálódhasson. Így olyan transzformánsok képződnek, amelyek stabilak, és genomjuk átadásával utódokra is öröklítik a *transzgént*. Az ivarsejt-transzformáció során létrejövő élőlények *transzgénikusak*: saját DNS-ük mellett idegen fajból származó (vagy akár mesterségesen előállított) DNS-t is hordoznak. A megfelelően megtervezett transzgén nem befolyásolja a sejtek normális funkcióját.

A szabályozó elemeket tartalmazó DNS-szakaszok egyes részeit, különböző kombinációit a riporter génnel kombinálva specifikus génexpressziót szabályozó szakaszokat lehet azonosítani, és szerepüket vizsgálni a génműködés szabályozásában (15.8. ábra).



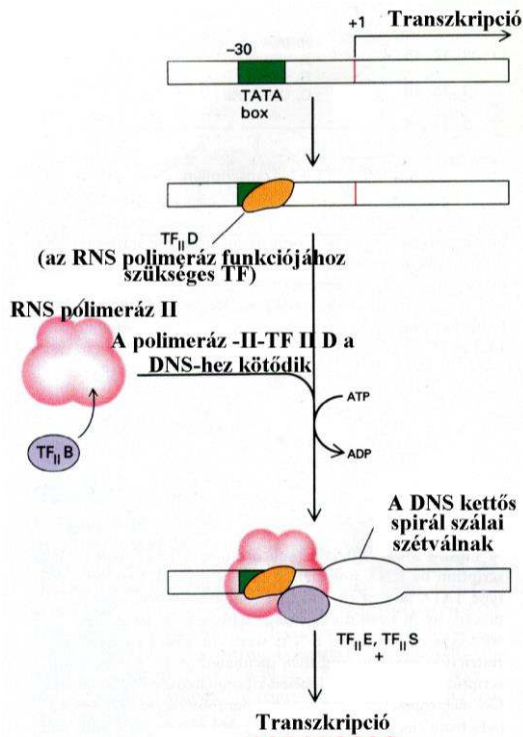
15.8. ábra. Riporter gén felhasználása annak vizsgálatára, hogy milyen DNS-szakaszok biztosítják a *Drosophila Ketel* génjének expresszióját a különféle sejt típusokban. A transzgénekhez tartozó vastagított szakaszok azt mutatják, hogy a promóter mely szakaszai voltak a *lacZ* génnel kombinálva. A kéken festődő szövetekben a β-galaktózidáz riporter gén expresszálódik. A * jel egy olyan *in vitro* indukált mutáció helyét mutatja, amely megszüntette egy transzkripciós faktor kötőhelyét. (Részletesen lásd: Villányi et al. Mech. Dev. 125, 822–831, 2008.)

A DNS-kötő fehérjék jellemzői

A génexpresszió szabályozásának további fontos tényezői a fehérjék. Közülük a transzkripciót „végző” RNS polimerázok szerepe kézenfekvő, de az eukarióta gének transzkripciójához nem elegendőek az RNS polimerázok. A transzkripció iniciációjához szükség van arra, hogy a promóter megfelelő szakaszához *transzkripciós faktorok* (TF-ek) kötődjenek (15.9. ábra).

Az *általános transzkripciós faktorok* olyan fehérjék, amelyek közvetlen szerepet játszanak a transzkripció

szabályozásában. Például a TFIID a TATA-boxhoz kapcsolódik, és kötődése úgy változtatja meg a fehérje és a DNS térbeli szerkezetét, hogy további TF-ek, valamint az RNS polimeráz II is csatlakozhat a komplexhez, és végül elkezdődhet a transzkripció. TF-ek azonban nemcsak a promóterhez, hanem az enhanszerekhez és a szilenszerekhez is kapcsolódhatnak. A minden sejtben jelen lévő általános TF-eken kívül a *specifikus TF-ek* csak bizonyos típusú sejtekben, az egyedfejlődés bizonyos stádiumaiban fejtik ki hatásukat, biztosítva a differenciális génexpressziót.



15.9. ábra. Az eukarióta gének transzkripciójához nem csak az RNS polimerázra, hanem általános (és specifikus) transzkripciós faktorokra is szükség van.

DNS-kötő fehérjemotívumok

Azok a fehérjék, amelyek a DNS-hez kapcsolódhatnak, tartalmaznak olyan funkcionális egységeket (doméneket), amelyek ehhez a kapcsolódáshoz szükségesek. A legfontosabb DNS-kötő motívumok a következők (15.10. ábra):

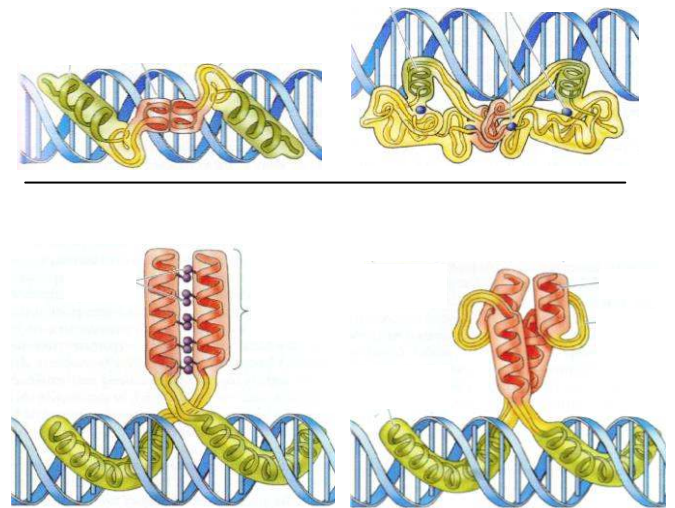
(1) A *hélix-turn-hélix* motívumot tartalmazó fehérjék dimert képezve kapcsolódnak a DNS-hez, úgy, hogy a hélixek egyike a DNS nagy árkába illeszkedik, és felismeri a bázispárok megfelelő szekvenciáit. Hélix-turn-hélix motívumot tartalmaz egyebek között a triptofán-operon expresszióját szabályozó represszor fehérje, vagy a testszélvények kialakulásában fontos szerepet játszó, később bemutatásra kerülő úgynevezett homeodómén.

(2) A *cink-ujj* motívumokban egy Zn^{2+} -ion úgy létesít kapcsolatot négy ciszteinnel, hogy a közbelső aminosavak kétdimenziós ábrázolásokon ujszerű kitérkedést képeznek. Ezek a fehérjerészek szintén a DNS nagy árkába illeszkednek, és a

megfelelő bázispár-sorrendet felismerve a DNS-hez kapcsolják a fehérjét. A Zn-ujjakat tartalmazó fehérjék jellegzetes példái a szteroid hormon receptorok (lásd 16. fejezet).

(3) A *leucin-cipzárok* szintén dimert képeznek, a hidrofób leucin oldalláncok cipzárszerűen illeszkednek egymáshoz, miközben DNS-kötő fehérjemotívum alakul ki (15.10. ábra). Leucin-cipzárt tartalmaz néhány, a sejtosztódásban szerepet játszó transzkripciós faktor (funkcióyeréses mutációjuk sok esetben rákos daganat forrása).

(4) A *hélix-hurok-hélix* (angolul helix-loop-helix) motívum például az immunoglobulinok és bizonyos izomfehérjék szintézisét kódoló gének expresszióját szabályozó fehérjékben található meg.



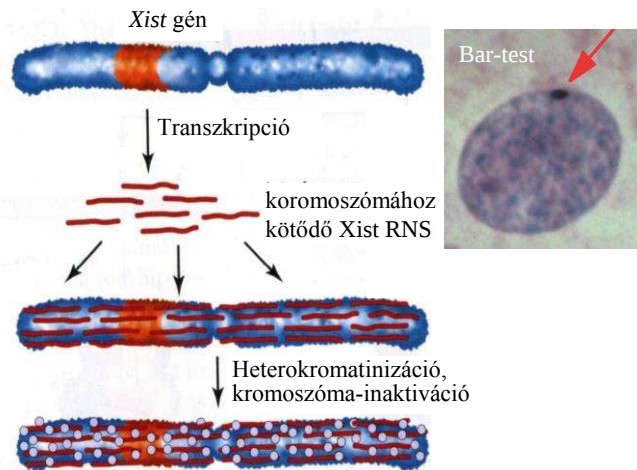
15.10. ábra. A DNS-kötő fehérjemotívumok típusai.

A kromatin és génexpresszió

Az eukarióta génműködés szabályozásában a kromatinnak is óriási szerepe van. Az eukarióta genom nagy (emberben $\sim 3 \times 10^9$ bp). Nem kis feladat a genomként kb. 10-30 ezer gén között a megfelelő megtalálni, be- vagy kikapcsolni. Annál kevésbé, mert a DNS nukleoszómbákba van tekeredve, a nukleoszómbák pedig szupertekercseket képeznek. Ismertek olyan kromatin-fehérjék, amelyek "nyitva tartanak" bizonyos kromatin-szakaszokat, mások más kromatin-szakaszokat "örökre bezárnak". Vannak olyan fehérjék, amelyek a kromatinhoz kapcsolódva a transzkripcióra alkalmas, nyitottabb területekre irányítják a transzkripciós faktorokat.

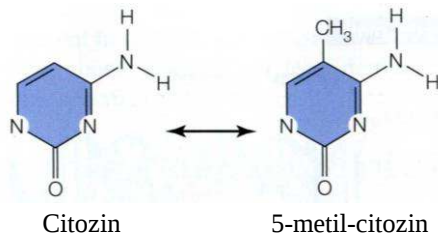
Az X-kromoszóma inaktiváció a génexpresszió szabályozásának olyan típusa, amely nőnemű emlősök sejtjeiben az egyik X-kromoszóma nagy részét, és ezzel együtt persze a benne levő géneket inaktíválja. Az inaktiváció alapja a kromatin erős feltekeredése (Barr-test képződése; 15.11. ábra). „Értelme” pedig az, hogy a nő (XX) és a hímneműek (XY) sejtjeiben a X kromoszómához kapcsolt gének termékeinek dózisa

azonos legyen a sejtekben. Az X-kromoszóma inaktiváció mechanizmusa a dóziskompensáció egy fajtája.



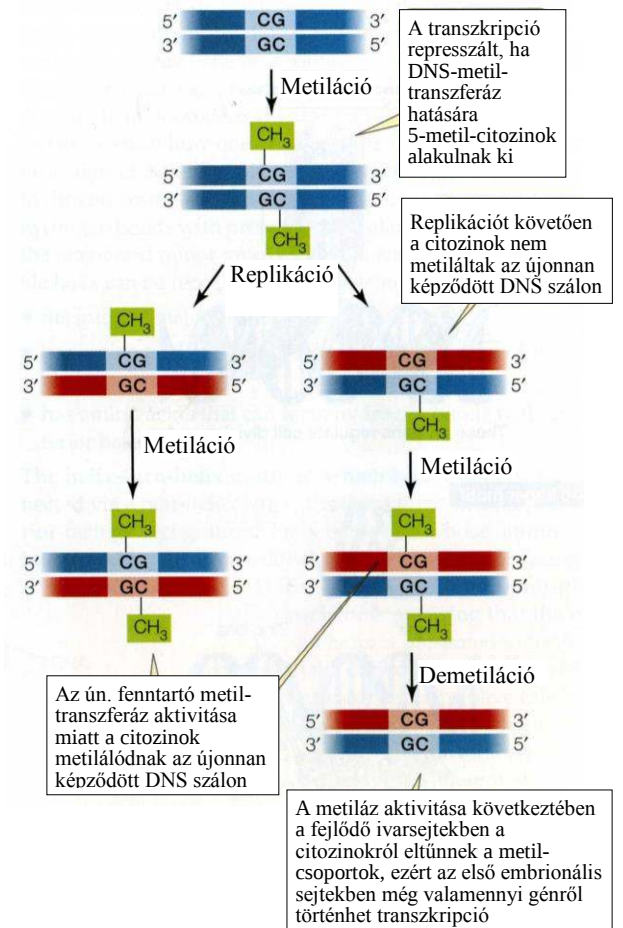
15.11. ábra. Az X-kromoszóma inaktiváció mechanizmusának modellje. Az inaktiváció első lépésében az X-kromoszómához kapcsoltan öröklődő *Xist* gén transzkripciója nyomán úgynevezett interferáló RNS molekulák képződnek. Az interferáló RNS molekulák ahhoz az X kromoszómához kötődnek, amelyen levő *Xist* gén alapján képződtek. A kötődés hatására hiszton metilációk és deacetilációk játszódnak le (lásd később), heterokromatin képződik, miközben az X kromoszóma inaktíválódik. Az ábra jobb oldala egy Barr-testet mutat, amely az egyik heterokromatinizálódott X kromoszóma.

A kromatinszerkezet szabályozására többféle lehetőség is van. Az emlősök promótereiben található, guanin előtt lévő citozinok metilációja (15.12., 15.13. ábra) azt eredményezi, hogy a metilált DNS-hez olyan fehérjék csatlakoznak, amelyek a kromatin tömörítésével megakadályozzák a transzkripciót. A metilált citozinok mintázata a replikáció során is fennmarad, és az utódsejtekbe átöröklhető, de a metiláció meg is szüntethető (15.13. ábra).



15.12. ábra. A citozin metilációja.

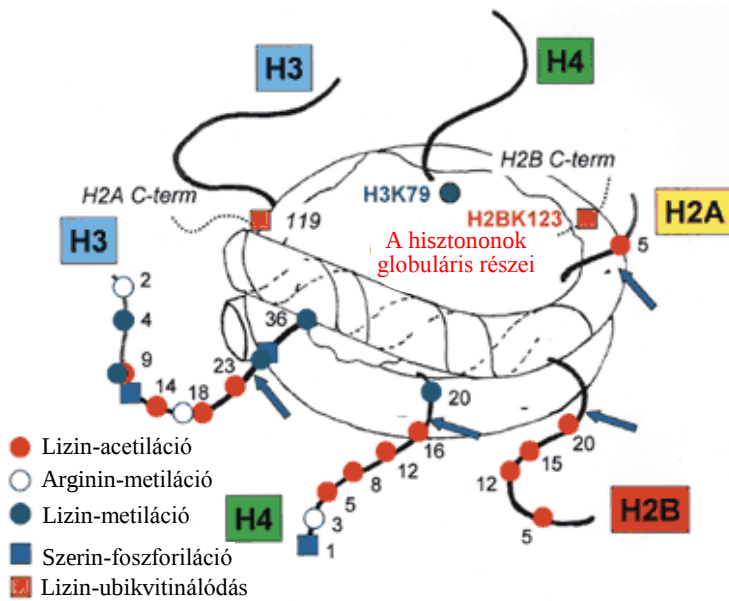
A DNS metilációjának szerepe különösen fontos az egyedfejlődés folyamán. Az érő spermiumban illetve petesejtben szinte valamennyi gén demetilálódik, azaz aktiválható állapotba kerül. A megtermékenyítés után, ahogy az embrió fejlődik, szövetei differenciálódnak, azok a géneik, amelyekre az adott sejt típusban immáron nincs szükség, metilálódnak, inaktíválódnak, „elhalkítódnak” (angolul: silenced). A metiláltság



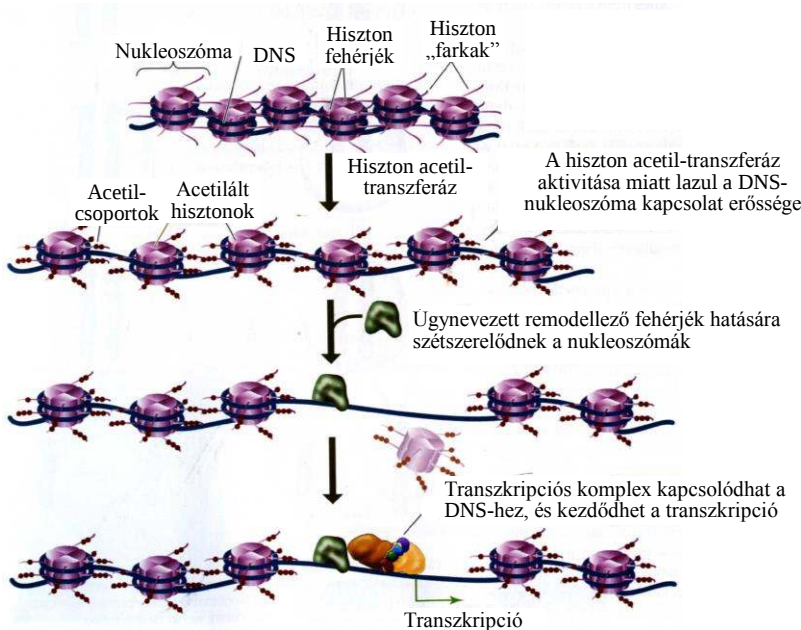
15.13. ábra. A metilált citozin mintázata megőrződik a replikáció során, így öröklődhet az utódsejtbe. Az ivarsejtekben törölődik a mintázat, hogy a megtermékenyítés után az embrióban még minden gén működhesen

normális állapotának megváltozása, amint azt egy későbbi fejezetben látni fogjuk, gyakran vezet rákos daganatok kialakulásához.

Az eukarióták sejtjeiben a DNS nukleoszómákra van feltekerve (lásd a 3.13. ábrát). Ebben az állapotában a DNS-hez nem tud hozzáférni a transzkripció apparátus. Amint azt a 15.14. ábra mutatja, a nukleoszómákat alkotó hisztonfehérjéknek van egy kb. 20 aminosav hosszúságú „farka” az N terminálisuknál, amely kilóg a nukleoszómából. A „farkak” lizinjei, argininjei és szerinjei módosulhatnak. A hiszton acetyl-transzferázok, amelyek acetyl csoportokat kapcsolnak ezen aminosavak némelyikéhez, mintegy kinyitják a kromatint, lehetővé téve a transzkripciót (15.15. ábra). Ezzel szemben a hiszton deacetylázok, amelyek eltávolítják az acetyl-csoportokat, tömörítik a kromatint, megnehezítve a transzkripciót. A hisztonok metilációja szintén ilyen hatást gyakorol, így a gének inaktíválódásához vezet. A szerinek foszforilációja pedig attól függően vezet gének aktiválódásához vagy éppen inaktíválódásához, hogy melyik hiszton melyik szerinjét érinti. A fent említett módosulások reverzibilisek, különféle kombinációkban következhetnek be, és a gének aktivitását rendkívül komplex módon szabályozhatják – a mára elterjedt „hiszton-kód” kifejezés ezt tükrözi.



15.14. ábra. A hisztonok „farkában” levő aminosav-oldalláncok módosításainak leggyakoribb példái.



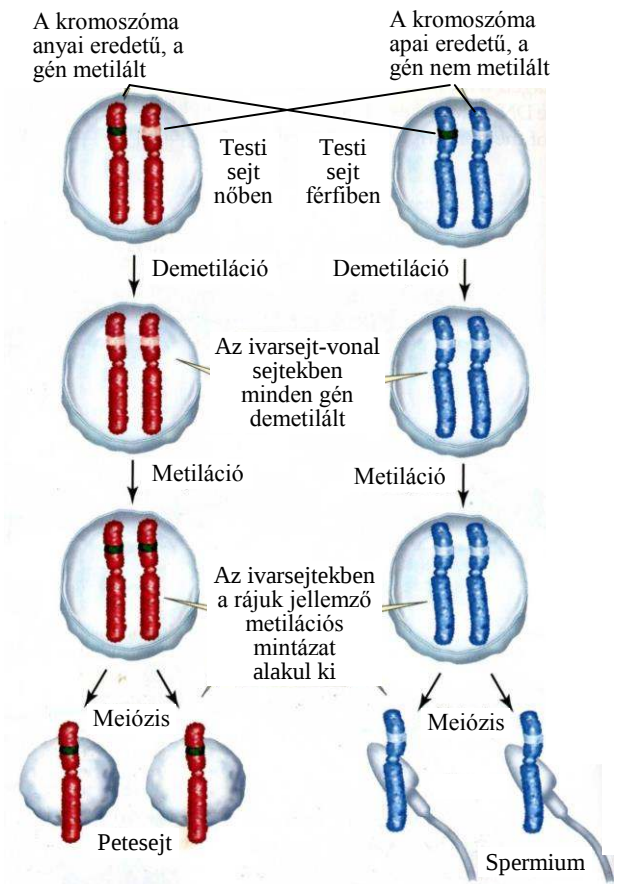
15.15. ábra. A hisztonok acetilációja a kromatin lazítása révén teszi lehetővé a gének expresszióját. A hisztonok deacetilációja a kromatin tömörödésével jár, hatására az expresszió gátlódik.

A DNS egyes citozinjainak metilációja és a hisztonok fent említett módosulásai olyan, a kromoszómák állapotával kapcsolatos jellemzők, melyek anélkül öröklődnek sejtről sejtre, olykor generációról generációra, hogy magának a DNS-nek a genetikai információ-tartalma megváltozna. A fenti jelenséget *epigenetikus öröklődésnek* nevezzük.

Emlősökben az ivarsejtek képződése folyamán – bár a legtöbb gén metiláltsága megszűnik, ahogy erről már volt szó – egyes gének esetében a DNS mégis metilálódik, mégpedig a nemekre jellemzően. A

folyamat két lépésben történik. Először az 5-metilcitozinokról a metiláz eltávolítja az összes metilcsoportot, majd közvetlenül a meiózis előtt egy metiltranszferáz néhány génben a megfelelő citozinokat – nemtől függően – metilálja. A DNS metilációs mintázata mintegy 200 génben különbözik a spermiumban és a petesejtben: egy részük csak az anyában (a petesejtben), másik részük csak az apában metilálódik. A megtermékenyítés után a metiláció új mintázata, mint egyfajta epigenetikus információ megőrződik (15.16. ábra). Az ivarsejtekben bekövetkező, nemtől függő metiláció mintegy előre programozza némely gén inaktivitását az utódban. A jelenség neve: *genom-imprintálódás*, bevésődés.

A jelenség következményei nyilvánvalók: ha például egy utód az anyától egy ép, ám metilált (inaktív) gént örököl, az apától pedig annak egy mutáns, funkcióképtelen változatát, kifejeződik benne a mutáns fenotípus, bár heterozigóta a recesszív mutáns allélra...

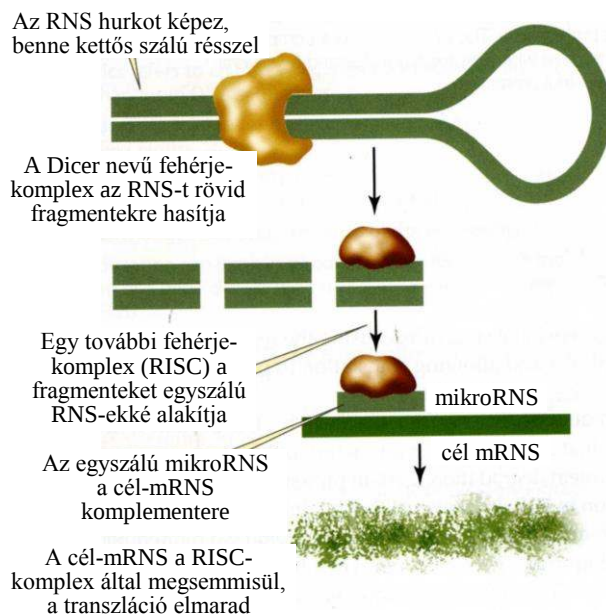


15.16. ábra. Egy csak az anyában imprintálódó gén metilációs mintázatának öröklődése. A genom imprintálódása az epigenetikus öröklődés egyik típusa.

MikroRNS-ek

A gének az eukarióta fajok többségében a genom kis hányadát teszik ki. A nem kódoló részt a legutóbbi időkig feleslegesnek, „hulladéknak” (angolul: junk) vélték a szakemberek. A közelmúltban arra derült fény, hogy az eddig nem kódolónak hitt DNS egyes szakaszairól is íródhatnak át RNS-molekulák. Miután ezek az RNS molekulák rövidek, mikroRNS-eknek

(miRNS) nevezték el őket. A 2000-es évek elején vált nyilvánvalóvá, hogy a miRNS-ek fontos szerepet töltenek be az eukarióta gének expressziójának szabályozásában, elsősorban csökkentésében, azaz a gének „csendesítésében” (angolul: gene silencing) (15.17. ábra). És miután a miRNS-ek nagyon ősi eukarióta fajokban is jelen vannak, a gének csendesítése miRNS-ekkel a génexpresszió szabályozásának minden bizonnyal ősi, konzervált mechanizmusa. A miRNS-ekkel és legismertebb hatásmechanizmusukkal, az úgynevezett RNS-interferenciával kapcsolatos kutatások elismeréseként Andrew Z. Fire és Craig C. Mello 2006-ban Nobel-díjat kapott.



15.17. ábra. A génfunkció „csendesítése” mikroRNS-ekkel, RNS-interferenciával. Az RNS egy úgynevezett RISC-komplex segítségével (angolul: RNA-induced silencing complex) semmisül meg.

Az első miRNS-t Victor Ambros és munkatársai fedezték fel 1993-ban a *Caenorhabditis elegans* fonalféregben. Először arra derítettek fényt, hogy a *lin-14*⁺ gén terméke egy olyan transzkripciósfaktor, amely a féregben az első fejlődési stádium bekövetkeztét teszi lehetővé. Azok a férgek, amelyekben a *lin-14* nevű gén elvesztette funkcióját, a fejlődés első stádiumát kihagyva a második stádiumba lépnek. Ugyanakkor a *lin-4* nevű mutánsokban a sejtek némelyike az első stádium eseményeit ismételte. Kiderült, hogy az ép *lin-4*⁺ gén terméke gátolja a *lin-14*⁺ gén működését: így teszi lehetővé, hogy a normális fejlődés során a férgek az első stádium után a második stádiumba jussanak. Arra számítottak, hogy a *lin-4*⁺ gén terméke egy olyan fehérje, amely a *lin-14*⁺ gén funkcióját gátolja. Ehelyett azt találták, hogy a *lin-4*⁺ gén terméke nem fehérje, hanem egy olyan, mindössze 22 nukleotidból álló kis (mikro-)RNS amely megsemmisíti a *lin-14*⁺-kódolt mRNS-t, csendesítve a *lin-14* gén funkcióját (15.17. ábra).

Időközben sok száz miRNS-féleséget írtak le. Mindegyik kb. 22 nukleotidból áll, és egyetlen miRNS általában különböző mRNS-ek tucatjait ismeri fel és járul hozzá megsemmisítéséhez. A humán genom többezerféle miRNS-t kódol, amelyeknek célpontjai a géneknek mintegy 60%-át teszik ki.

RNS interferencia (RNSi, angolul RNAi)

Az RNS-interferencia szerepe nagyon fontos a sejtek a vírusokkal szembeni védekezésében és a génexpresszió szabályozásában, különösen az egyedfejlődés során. A kis RNS molekulának két típusa van: az előbb bemutatott miRNS-ek, valamint az úgynevezett kis interferáló RNS-ek (angolul: small interfering RNA, siRNA), amelyek az RNS-interferencia „kívülről történő” indukálásának kulcsfontosságú tényezői. Míg a miRNS-ek a saját genom által kódolt, eredetileg egyszálú RNS alapján képződnek, a siRNA-ek kívülről (vírusok által, vagy mesterségesen) bejutó rövid kettős szálú RNS-ek, és legtöbbször szintén a sejt saját mRNS-eihez kapcsolódva, RNS-interferencia révén fejtik ki hatásukat.

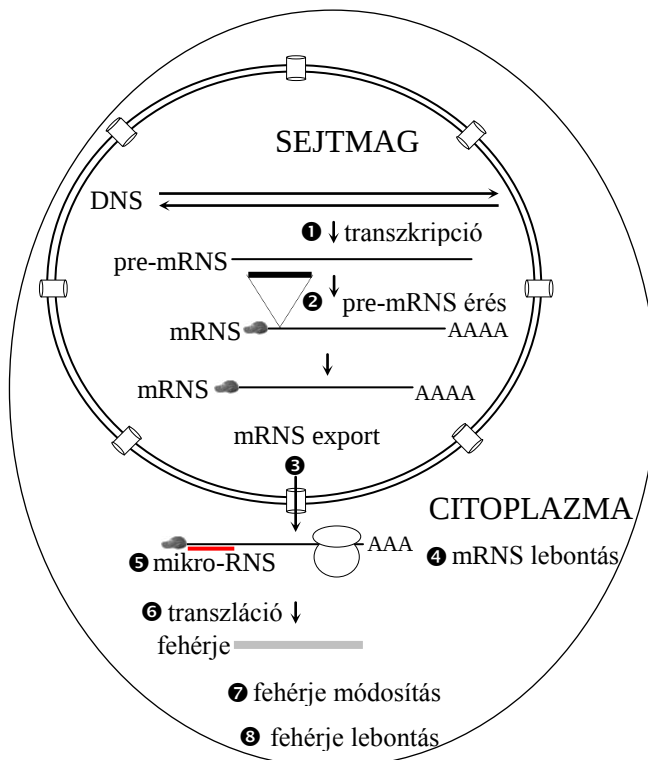
Akár miRNS, akár siRNA váltja ki, a mechanizmus fontos szereplője a Dicer fehérjekomplex, amely a hosszú, kétszálú RNS molekulákat kb. 20-22 nukleotidból álló, szintén kétszálú fragmentekre aprítja (15.17. ábra). A képződő kis kettősszálú RNS molekulákat a RISC (RNA-induced silencing complex) két egyszálúvá tekeri szét. Közülük az egyik degradálódik, a másik pedig a RISC-komplex részévé válik, és hibridizál a citoszolban található azon mRNS-ekkel, amelyek komplementer szakaszt tartalmaznak. A párosodás hatására a RISC-komplex egyik alkotója, az Argonaute fehérje teljes egészében elemeszi a felismert mRNS-t.

Az RNSi annyira hatékony technika, hogy vele egyes kiválasztott gének funkcióját lehet mesterségesen eliminálni, a génfunkció hiányában pedig az ép gén funkciójára következtetni. Az RNSi technikát egyre szélesebb körben igyekszik felhasználni a modern orvostudomány is, olyan esetekben, amikor hibásan túlműködő gének gátlására lenne szükség.

A génexpresszió szabályozásának szintjei

A normális génexpresszió nemcsak funkcióképes fehérjék képződését jelenti, hanem azt is, hogy a sejtekben éppen megfelelő mennyiségű fehérje van a funkció ellátásához (bizonyos fehérjékből sejtenként csak néhány, másokból milliónyi molekula van). A fehérjék számának és aktivitásának szabályozására a transzkripción túl további lehetőségek is vannak (15.18. ábra). A génexpresszió szabályozásának leglényegesebb szintjei a következők. (1) A transzkripció, amely mind közül a legfontosabb. (2) A képződött pre-mRNS molekulák érése: milyen kombinációban vágódnak ki az intronok, azaz milyen érett mRNS keletkezik. (3) Az mRNS-ek kijutása, azaz exportja a sejtmagból szintén befolyásolható lépés. (4) Szabályozható a citoplazmába jutott mRNS molekulák élettartama, vagyis hogy mennyi ideig „élnek”, hány fehérje képződhet egy-egy mRNS alapján. (5) A

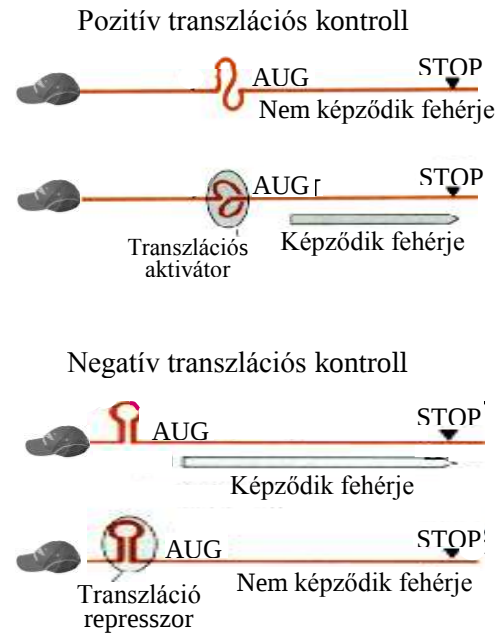
miRNS-ek tevékenysége is meghatározhatja az egyes mRNS-ek koncentrációját a citoplazmában. (6) A transzlációs kontroll azt jelenti, hogy a citoplazmába jutott mRNS-ek transzlációjának hatékonysága is szabályozható (15.19. ábra). Vannak olyan mRNS-ek, amelyek transzlációját adott fehérjék kapcsolódása serkentheti vagy éppen gátolhatja; szabályozható, hogy hozzáférhet-e hozzájuk a transzlációs apparátus. (7) A fehérjék aktivitását kémiai módosításukkal is lehet szabályozni. Akár egyetlen foszfátcsoport kapcsolása (például egy tirozin oldallánchoz) döntően megváltoztathatja a fehérje aktivitását. Ezeket a szerkezeti változásokat poszttranszlációs módosításnak nevezik gyűjtőnéven. (8) A fehérjék sem örökéletűek, egy idő múltán mindenképpen degradálódnak, de élettartamuk (amit félféltidejük jellemez) szintén szabályozható.



15.18. ábra. A génexpresszió szabályozásának lehetséges szintjei.

ÖSSZEFOGLALÁS

A sejtek jellegzetességeit döntően az határozza meg, hogy bennük mely gének, mikor és milyen mértékben expresszálódnak. A génexpresszió szabályozása soktényezős folyamat. Az alapot a DNS biztosítja, nemcsak azzal, hogy fehérjék szintézisét kódolja, hanem azzal is, hogy benne olyan szakaszok vannak, amelyekhez különféle fehérjemolekulák kapcsolódhatnak. A DNS-hez kapcsolódó fehérjék nemcsak azt határozzák meg, hogy kifejeződjenek a gének vagy sem, hanem azt is, hogy a gének melyik sejtben, az egyedfejlődés mely stádiumában, és milyen mértékben expresszálódnak. A génexpresszió szabályozásának fontosságát az is jelzi, hogy a folyamat több szinten valósul meg.



15.19. ábra. A transzlációs kontroll.

Ugyanakkor a sejtek nem csupán saját belső harmóniájukat valósítják meg a génexpresszió szabályozása révén, de arra is képesek, hogy a szomszédságból, vagy akár a távolról érkező üzeneteket is észleljék, és egyes génjeik kifejeződésének megváltoztatásával az üzeneteknek megfelelően módosítsák funkciójukat. A sejtek működése közötti összhang biztosítja az élőlény életét, alkalmazkodását a változó környezeti feltételekhez. A sejtek közötti kommunikációt lehetővé tevő jelátviteli folyamatokat a következő fejezet mutatja majd be.