

A génkifejeződés szabályozása

I. A DNS

1953. A DNS szerkezetének meghatározása
(James Watson és Francis Crick)

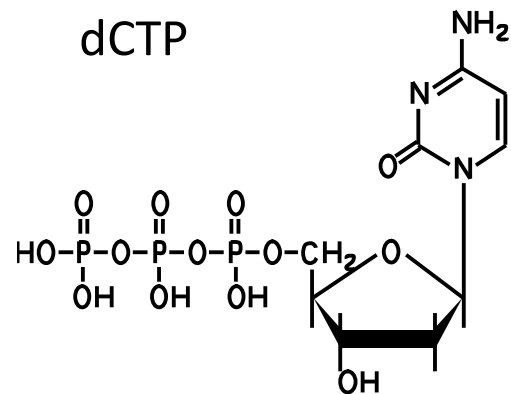
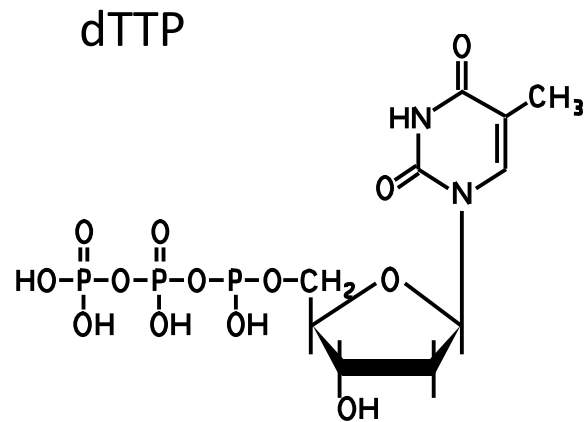
Transzkripció, transzláció felfedezése



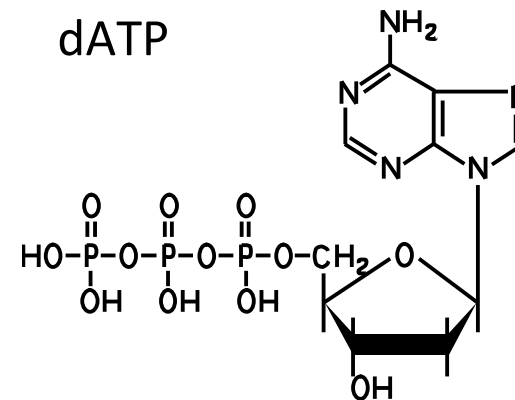
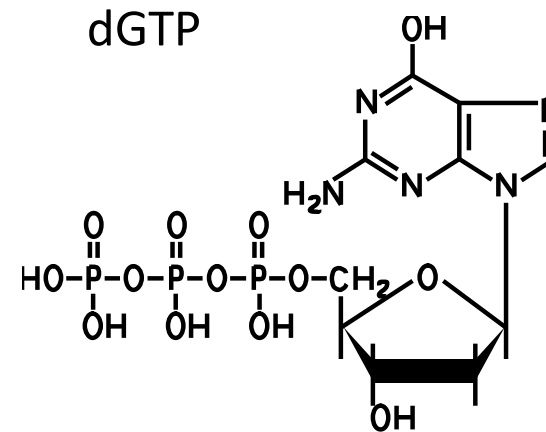
A genetikai információt a DNS hordozza

A DNS-t felépítő nukleotidok

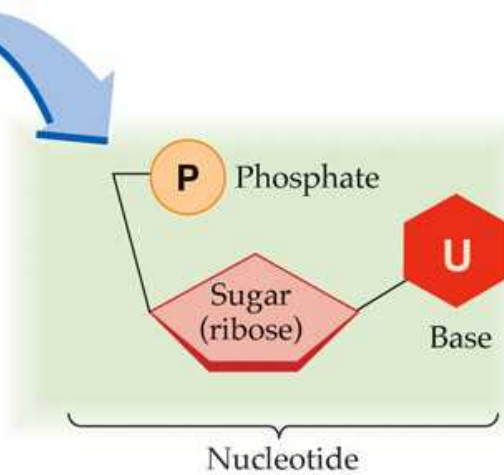
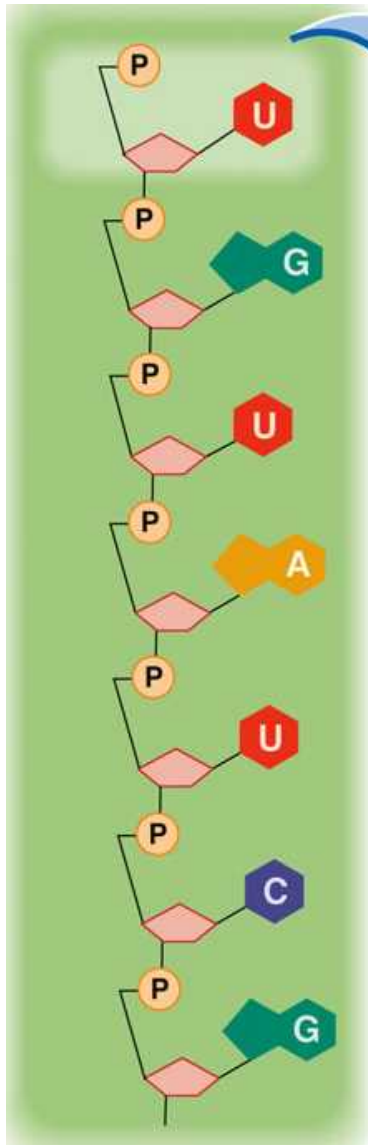
Pirimidin bázist tartalmaznak:



Purin bázist tartalmaznak:



A DNS szerkezete



„Elsődleges szerkezet”: a nukleotidok sorrendje

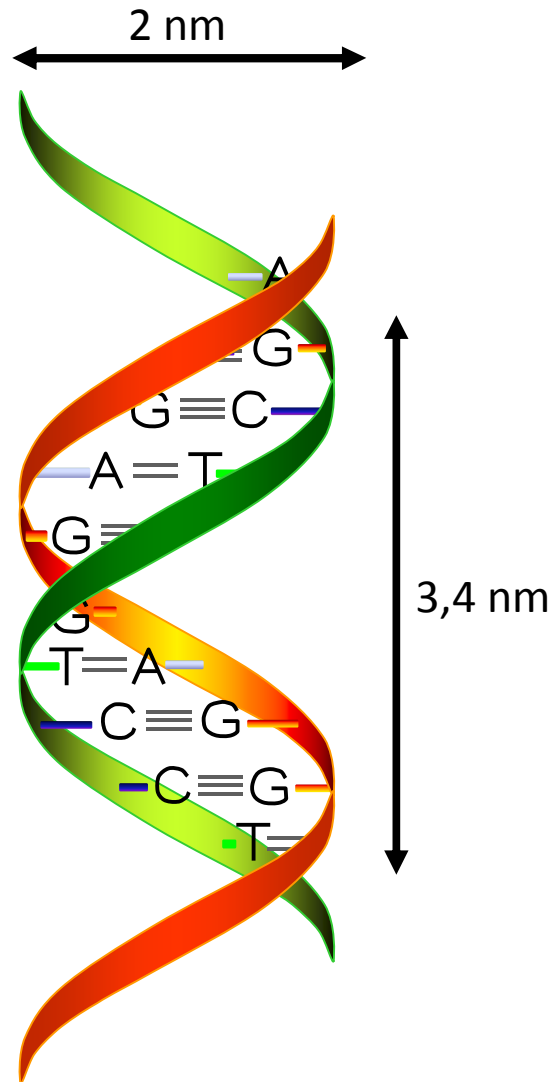
- ✓ Kovalens kapcsolat a dezoxiribózok és a foszfát csoportok között (foszfo-diészter kötés)



Cukor-foszfát gerinc

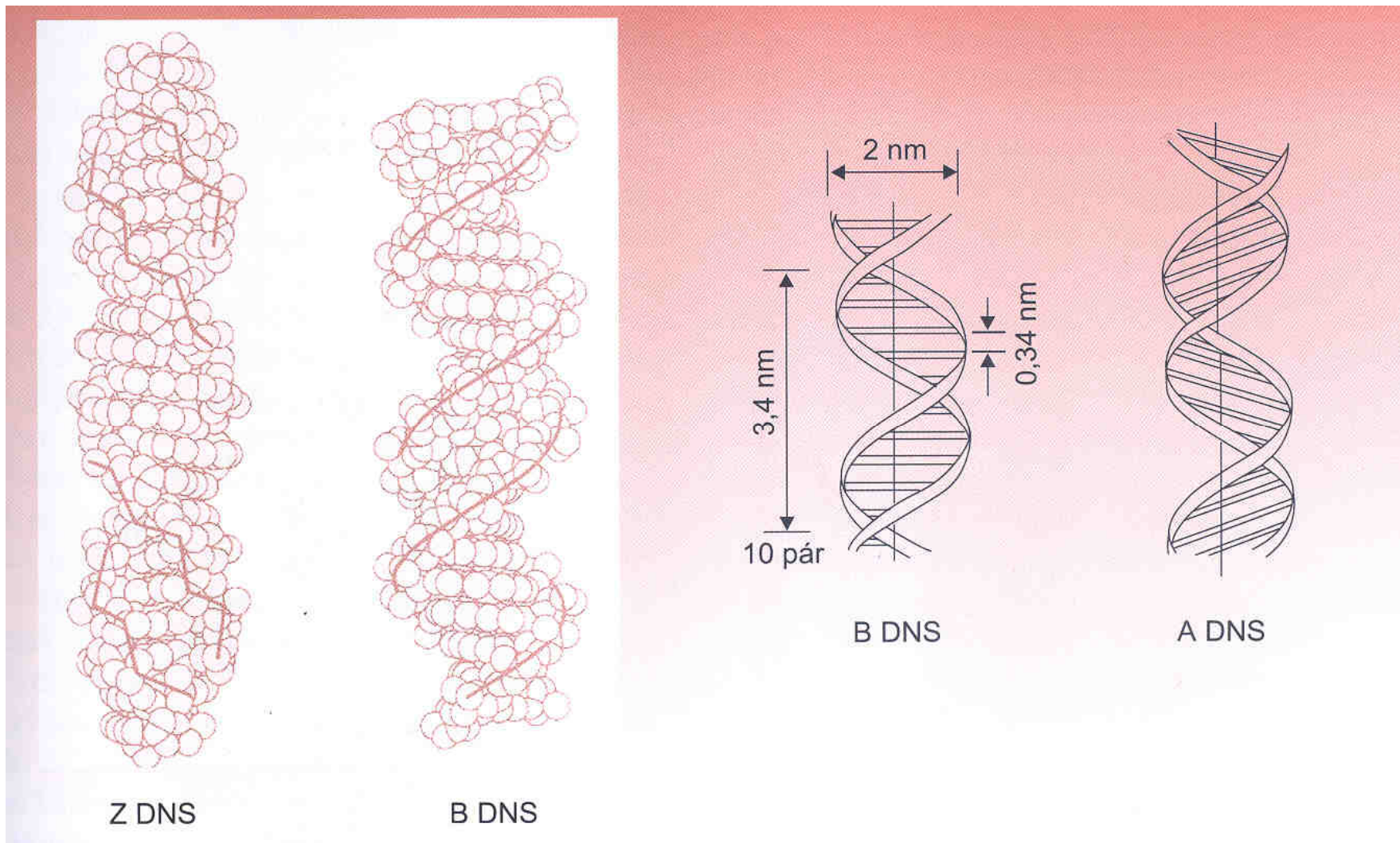
- ✓ A genetikai információt a bázissorrend kódolja

A kettős hélix modell



- ✓ Két antiparallel lefutású polinukleotid láncból álló kettős hélix
- ✓ Komplementer bázispárok között hidrogénhidak stabilizálnak
A=T, G≡C
- ✓ A dupla hélixen megkülönböztethető az ún. nagy árok (major groove) és a kis árok (minor groove), a transzkripció faktorok többsége az előbbihez kötődik

A kettős hélix



Z: 12 b/fordulat,
balmenetes purin-
pirimidin váltakozás

B: 10 b/fordulat, jobbm.,
nincs purin-pirimidin
váltakozás

A: 10-11 b/fordulat, jobbm., nincs purin-
pirimidin váltakozás, alacsony só cc és
nedvesség tart.esetén

Kromatin szerkezet

A sejt DNS-állományának hiszton és nem hiszton fehérjékkel kialakított komplexe

- Hisztonok:
- ✓ bázikus jellegű szerkezetkialakító proteinek
 - ✓ az eukarióták legkonzerváltabb fehérjéi
 - ✓ H1, H2A, H2B, H3, H4 hisztonok
 - ✓ prokariótákból hiányoznak

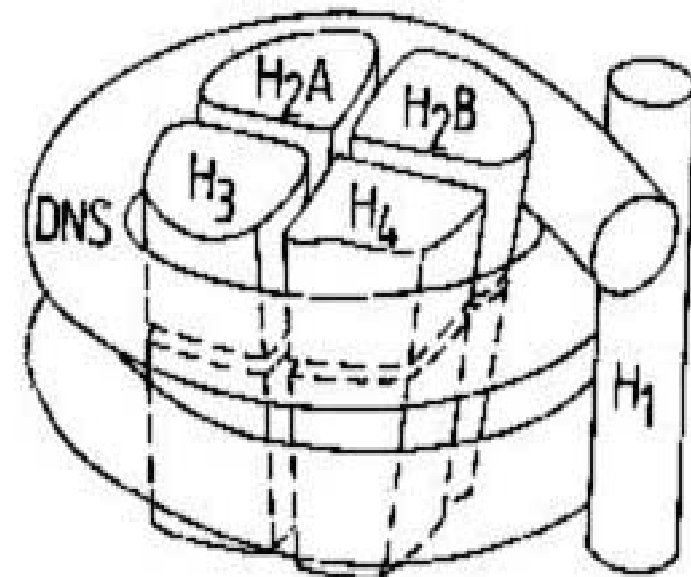
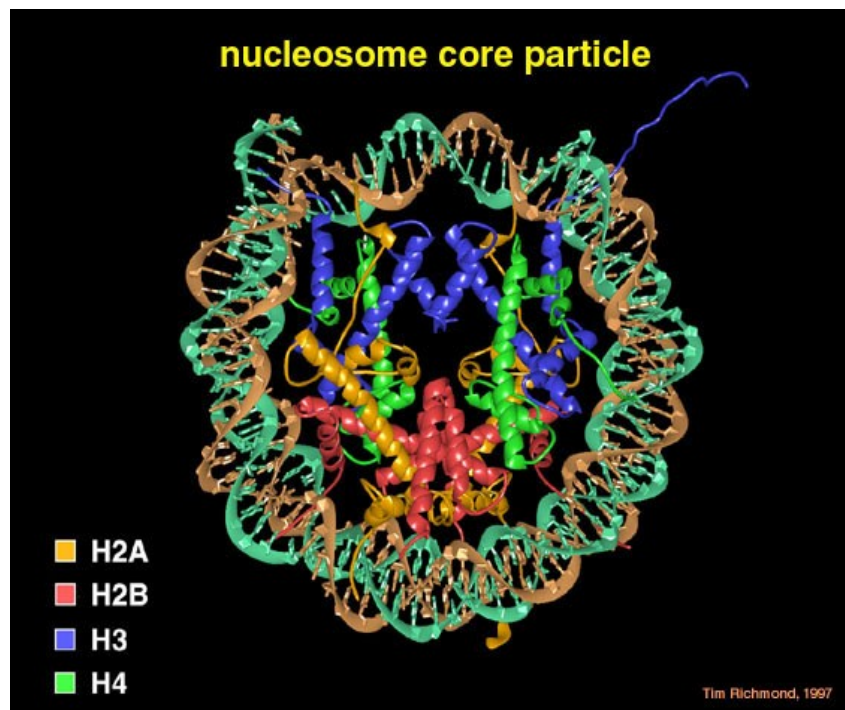
Nem hiszton fehérjék:

- ✓ DNS replikációban, RNS szintézisben, génkifejeződés szabályozásában játszanak szerepet
- ✓ savas vagy neutrális fehérjék
- ✓ jellemző rájuk a nagyfokú heterogenitás

Kromatin szerkezet

Elemi egység a nukleoszóma= a DNS hiszton oktamerek köré

A hiszton oktamert H2A, H2B, H3 és H4 hisztonok alkotják, minegyikből két példány

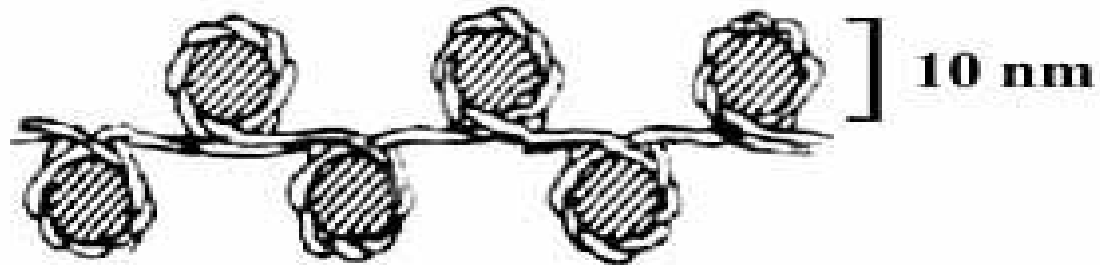


Kromatin szerkezet

hiszton oktamer köré 146 bp DNS tekeredik fel

Nukleoszómák összekötése: linker DNS szakaszok

→ gyöngysorhoz hasonló struktúra



Nukleoszómák között: H1 hisztonok → a DNS még szorosabb csomagolódás

hisztonok módosítása → befolyásolható a génexpresszió kapcsolódó csoportok lehetnek pl. acetil, metil, foszfát csoport

Kromatin szerkezet

Kromoszómák:

A sejt kromatinállományának egymástól különálló egységei, lineáris DNS molekulák erőteljesen kondenzált formái.

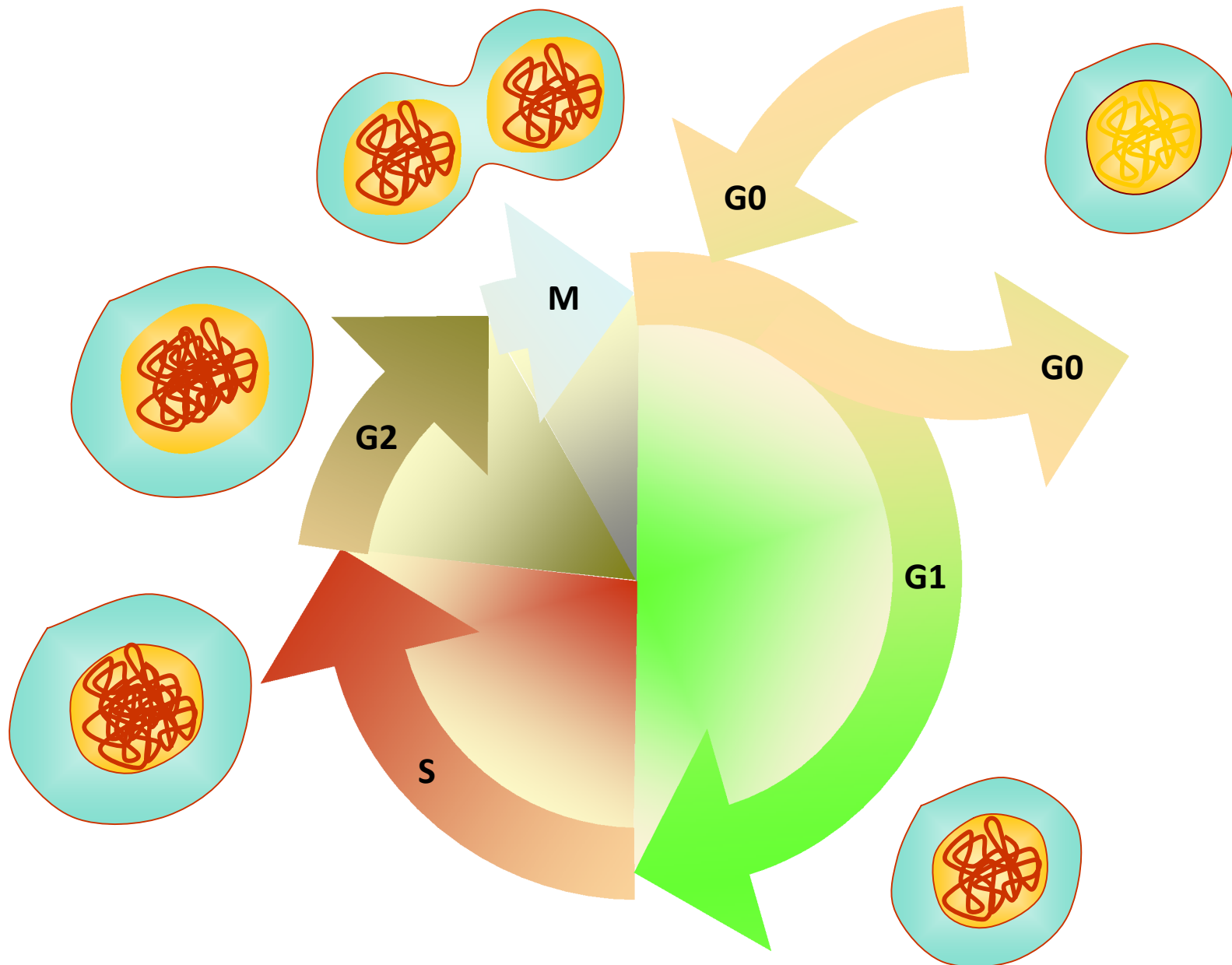
- ✓ Mitózis- legkompaktabbak a kromoszómák
- ✓ Interfázis- lazább szerkezet, de így is 100-1000X-es kondenzáció

A kromoszómákon belül eltérő festődésű részek különíthetők el:

- ✓ eukromatin- lazább szerkezet → transzkripciósan aktív
- ✓ heterokromatin- erősen kondenzált régió → transzkripciósan inaktív



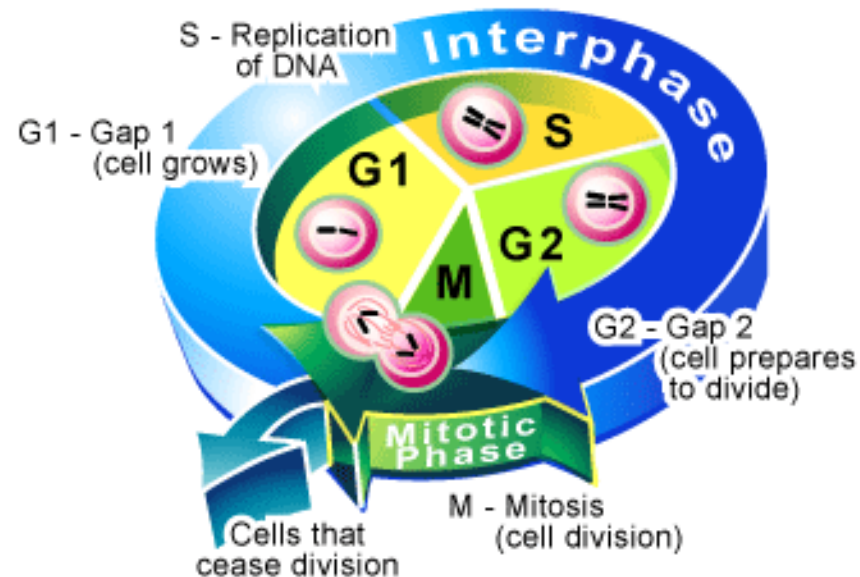
A sejtciklus



A sejtciklus

S fázis: DNS duplikáció

G1 fázis: S fázishoz
szükséges
makromolekulák
szintézise



G2 fázis:
mitózishoz kellő
sejtalkotók,
makromolekulák
szintézise

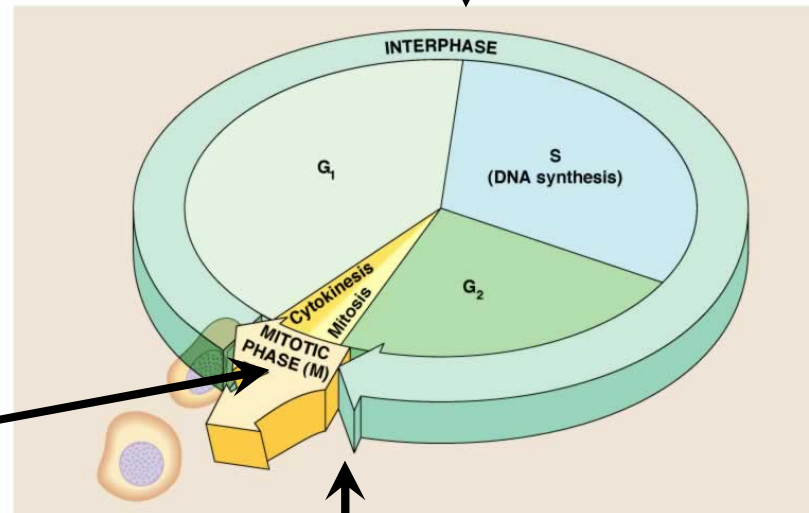
G₀ fázis: tartós
nyugalmi állapot

M fázis: a sejt kettéosztódik

A sejtciklus ellenőrző pontjai

G1/S checkpoint – Elég nagy a sejt? Megfelelőek a körülmények?

M checkpoint –
Minden
kromoszóma
hozzákötődött a
húzófonalakhoz?



©Addison Wesley Longman, Inc.

G2/M checkpoint – Minden DNS molekula replikálódott?

A sejtciklus szabályozása

- a szabályozás középpontját a **ciklinek** és a **ciklin-függő kinázok** (Cdk) alkotják
- a ciklinek mennyisége és ezáltal a Cdk-k aktivitása jellegzetes oszcillációt mutat a sejtciklus folyamán.
- a Cdk-k számos célfehérjét foszforilálnak, működésükhöz ciklint kell kötniük.
- ciklinek 3 csoportba sorolhatók:
 - ✓ G1/S ciklinek
 - ✓ S ciklinek
 - ✓ M ciklinek
- ciklin-Cdk komplexek: molekuláris kapcsolók

A sejtciklus szabályozása

Retinoblastoma protein (Rb):

- G1/S átmenetet szabályozza
- nem foszforilált Rb: köti az E2F transzkripciós faktort (ez a fehérje felelős az S fázisban fehérjéinek átíródásáért) → G1-ben tartja a sejtet.
- Ciklin-Cdk komplex foszforilálja az Rb-t → átlépés az S fázisba, megkezdődhet a DNS replikáció
- tumorszupresszor

Az Rb fehérjét egy gyerekkorban jelentkező, örökletes, a szemet érintő rákos sejtburjánzás vizsgálatakor azonosították.

A mutáns Rb gént öröklő utódsejtek nagy valószínűséggel lesznek tumorosak, mert a sejtciklusuk nem kontrollált.

A sejtciklus szabályozása

p53 fehérje:

- transzkripciós faktor, mely számos, a DNS repair-ben szerepet játszó gén átíródását szabályozza
- aránylag kis mennyiségben található meg a sejtekben, de pl. UV sugárzás esetén megemelkedik a szintje
- a DNS károsodás protein-kinázokat aktivál, melyek foszforilálják a p53-t → repair fehérjék transzkripciója
- nem engedi, hogy a sejtciklus továbbmenjen, amíg a repair be nem fejeződött (G1-ben tartja a sejtet)
- az apoptózis megindításában is alapvető szerepet játszik
- tumorszupresszor fehérje

Az emberi daganatok mintegy felében kimutatható a p53 gén valamilyen mutációja.

A sejtciklus szabályozása

Kijutás a G₀ fázisból

- A tartós nyugalmi állapotú sejtek különböző kémiai szignálok hatására visszakerülhetnek G1 fázisba, és újra osztódóképessé válhatnak
- stimuláló anyagok: növekedési faktorok, citokinek - bonyolult szignáltranszdukciós rendszereken keresztül fejtik ki hatásukat

A jelátviteli út különböző komponenseinek mutációja daganatos transzformációt idézhet elő. (protoonkogén → onkogén) Ezek lehetnek receptorfehérjék (EGFR), G-fehérjék (pl. ras), protein kinázok (pl. src), transzkripciós faktorok (pl. jun, myc)

A sejtciklus szabályozása

Protoonkogének:

- növekedést, sejtosztódást stimuláló fehérjéket kódolnak
- mutációjuk (protoonkogén → onkogén) fokozott funkcióval rendelkező fehérjéket eredményez → daganatok képződését idézik elő
- már heterozigóta formában is kifejtik hatásukat

Tumorszupresszorok:

- sejtproliferációt gátló fehérjéket kódolnak
- funkcióképtelenség csak homozigóta mutáns állapotban (egyik allélról sem képződik normális fehérje)
- a protoonkogénekkal ellentétben itt nem a funkciónyerés, hanem a funkcióvesztés vezet daganat képződéséhez

DNS repair

- Számos mutagén képes hibát generálni a DNS szerkezetében pl. ionizáló sugárzások, UV-fény, kémiai anyagok
- ha ezeket a hibákat még replikáció előtt képes kijavítani a sejt repair mechanizmusa: nem marad nyomuk a genetikai állományban

Milyen hibákat kell javítania a repair rendszernek?

- mismatch (helytelen bázispárok)
- timidin dimerek
- depurinizáció
- dezamináció
- lánctörések
- nukleotidok kiesése/felesleges nukleotidok beékelődése

DNS repair

A repair-ben részt vevő főbb enzimek:

- endonukleázok
- glikozidázok (bázisok lehasítása)
- β -DNS-polimeráz (prokarióták: DNS-polimeráz I.)
- DNS-ligáz

DNS repair szabályozása

A legfőbb regulátor: p53

- Tumorszupresszor- a DNS repair-ben szerepet játszó gének átíródását szabályozza
- aránylag kis mennyiségben található meg a sejtekben, de pl. UV sugárzás esetén megemelkedik a szintje
- a DNS károsodás protein-kinázokat aktivál, melyek foszforilálják a p53-t → az aktiválódott p53 megindítja a repair fehérjék transzkripcióját
- nem engedi, hogy a sejtciklus továbbmenjen, amíg a repair be nem fejeződött (G1-ben tartja a sejtet)
- az apoptózis megindításában is alapvető szerepet játszik –ha a sérülés olyan nagy mértékű, hogy nem javítható

DNS repair szabályozása

A p53 fehérje szerepének vizsgálata knock-out technikával

- géntechnikai módszerekkel létrehoztak p53 mutáns egereket (homológ rekombinációval génkiütés, majd beltenyésztéssel homozigóta mutáns állatok létrehozása).
- a knock-out egerek életképesek, de bennük sokkal gyorsabban és nagyobb valószínűséggel alakulnak ki tumorok, mint a kontroll állatokban

RNS típusok

rRNS

- riboszómát alkotják
- **5S**; **5,8S**; **28S** rRNS-ek: nagy alegység rRNS-ek
18S rRNS: kis alegység rRNS-e
- RNS-ek 70-80%-a

tRNS

- aminosavakat visznek a riboszómához, melyek beépülnek a szintetizálódó peptidbe
- RNS-ek 12%-a

mRNS

- a DNS-ről átíródott genetikai információt viszi a riboszómához
- RNS-ek 3-5%-a

RNS típusok

Eukarióta sejtekben az mRNS érésen megy keresztül, így a sejtmagokban találunk olyan RNS-eket, melyek hiányoznak a prokariótákból

hnRNS

- heteronukleáris RNS
- az érett mRNS „előanyaga”

snRNS

- kis sejtmagi RNS
- mRNS érésében játszik szerepet (splicing)

scRNS

- kisméretű citoplazmatikus RNS
- szekretálódó fehérjéket szintetizáló riboszómákat irányítja az ER-hez

A prokarióta gének szerkezete, expressziója

- a gének operonokba szerveződnek
- policisztronos mRNS képződik a transzkripció során, mely nagyon rövid életidejű
- 1 enzim, az RNS polimeráz felelős a gének átírásáért
- a primer transzkriptum szerkezete nem módosul (nincs splicing)
- a transzkripció és a transzláció kapcsolt folyamat, térben és időben nem szeparáltak (prokarióta sejt: nincsenek kompartmentek)

Operon: több, összefüggő funkciójú fehérjét kódoló gént tartalmazó, közös szabályozású transzkripciós egység (pl. egy metabolikus útvonal enzimfehérjéit kódoló régió)

Részei: struktúrgének
szabályozó elemek

Az eukarióta genom

- az eukarióta genomnak csak nagyon kis %-a kódol géneket
pl. emberi genom: 90-95 %-a nem kódol géneket
- 1990. A Human Genom Project kezdetét veszi (emberi DNS szekvenálás, gének funkciójának felderítése), 2000. eredmények:
 - ✓ 20000-25000 gént tartalmaz az 5-10 % kódoló szekvencia
 - ✓ ebből kb. 6000 génnek ismert a funkciója
- a nem kódoló rész szabályozó szekvenciákat, nagyfokú repetitív szekvenciákat, illetve pszeudogéneket (mutáció következtében elvesztették a funkciót) tartalmaz

Az eukarióta genom

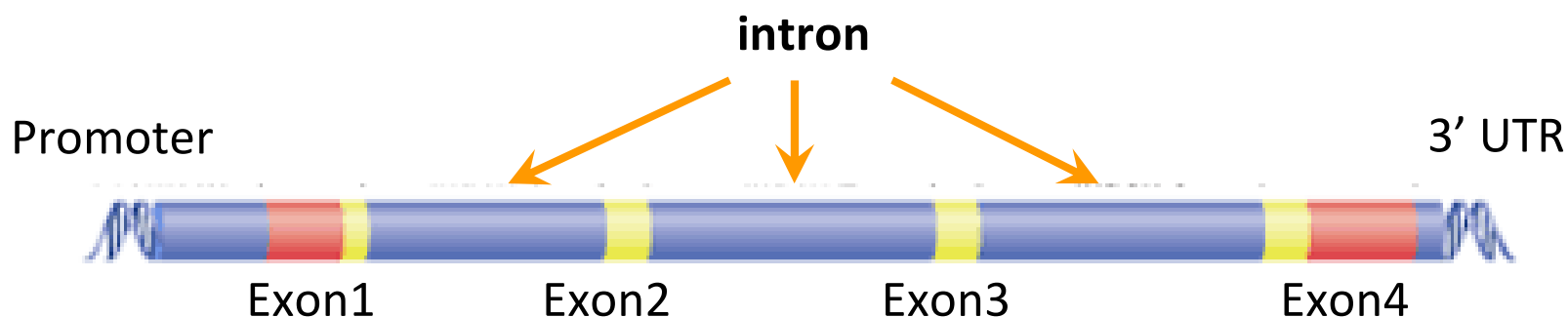
A genomikus szekvenciák ismétlődésük alapján 3 csoportba oszthatók:

- néhányszor ismétlődnek- pl. rRNS, hiszton gének
- néhány százszor ismétlődnek- pl. transzkripció szabályozásban szerepet játszó szekvenciák
- néhány ezerszer ismétlődnek- pl. telomerben, centromerben található szekvenciák

UTR:

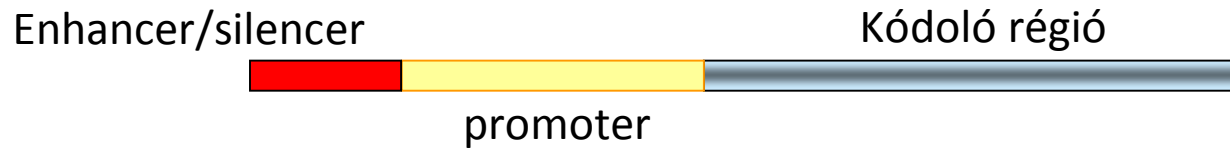
- untranslated region
- mRNS 5', ill. 3' végén
- meghatározzák az mRNS stabilitását (3'), riboszómához kötődését (5')

Az eukarióta gének szerkezete, expressziója



- az eukarióta gének monocisztronosak (egy fehérjét kódolnak)
- az intronok hossza általában 80-1000 bp
- a primer transzkriptum (hnRNS) szerkezete módosul a transzláció előtt
- 3 különböző RNS-polimeráz enzim
- a transzkripció és a transzláció időben és térben szeparált folyamatok
 - ✓ mRNS szintézis (transzkripció): sejtmag
 - ✓ Fehérjeszintézis (transzláció): citoplazma

A transzkripció szabályozása



A regulált génhez közel találunk specifikus DNS szekvenciákat, melyek befolyásolják a génről történő mRNS átírást

- ✓ enhancer: olyan cisz-elem, mely elősegíti a transzkripciót azáltal, hogy aktiváló fehérjéket köt. Az enhancer nem csak 5' helyezkedhet el, hanem 3' irányban vagy akár intronban is.
- ✓ silencer: „csendesítő szekvencia” – transzkripciót gátló fehérjéket köt → mRNS átítás represszálódik

Response element

- Specifikus konszenzus DNS szekvenciák
- 10 nukleotidnál nem hosszabbak
- specifikus kémiai jelre adott sejtválaszban érintett gének promoterében találhatóak
- pl. cAMP emelkedés hatására indukálódó gének promoterében CRE (cAMP response element)



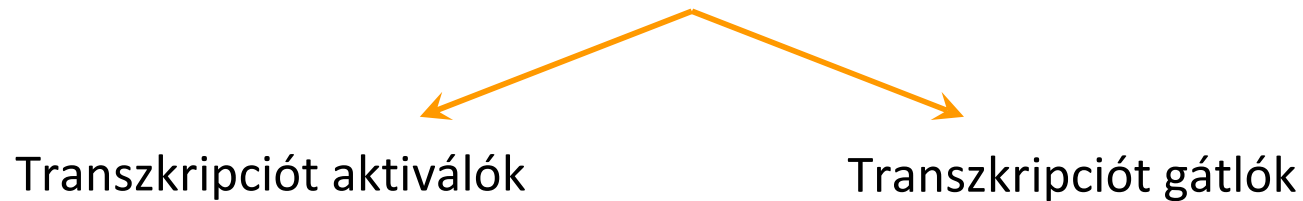
Specifikus transzkripciós faktor kötődik be:
cAMP response element binding protein (CREB)



Transzkripció aktiválás

A transzkripció szabályozása

A gének kifejeződését számos fehérje képes befolyásolni
(transzkripciós faktorok)

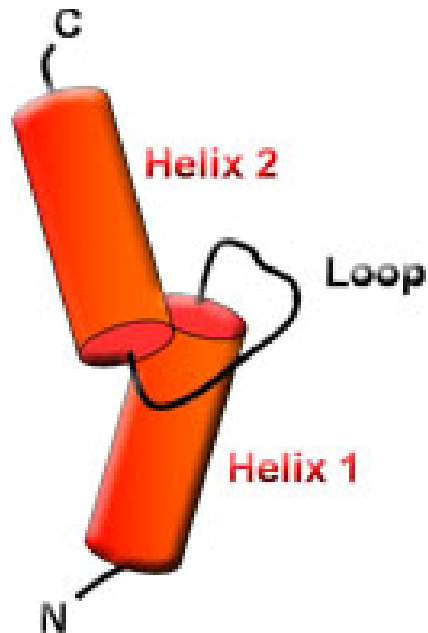


A transzkripciós faktorokra jellemző motívumok:

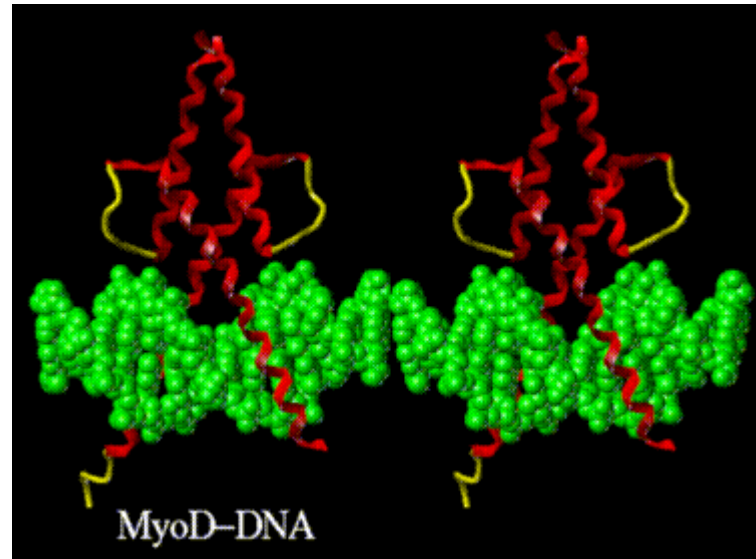
- ✓ helix-loop-helix (HLH proteinek)
- ✓ ZN-finger
- ✓ Leucin cippzár

Számos transzkripciós faktor hormon receptor (szteroid hormonok intracelluláris receptorai) vagy tumorszuppresszor!

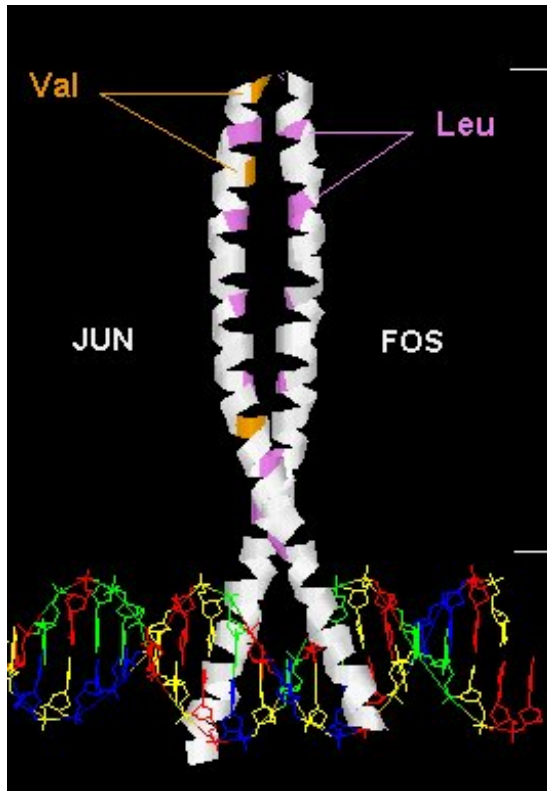
HLH fehérjék



- a DNS nagy árkába illeszkednek
- többnyire dimerként működnek
- pl. MyoD, Myogenin izomdifferenciálódásban fontosak
- Achete-scute komplex (Drosophila)

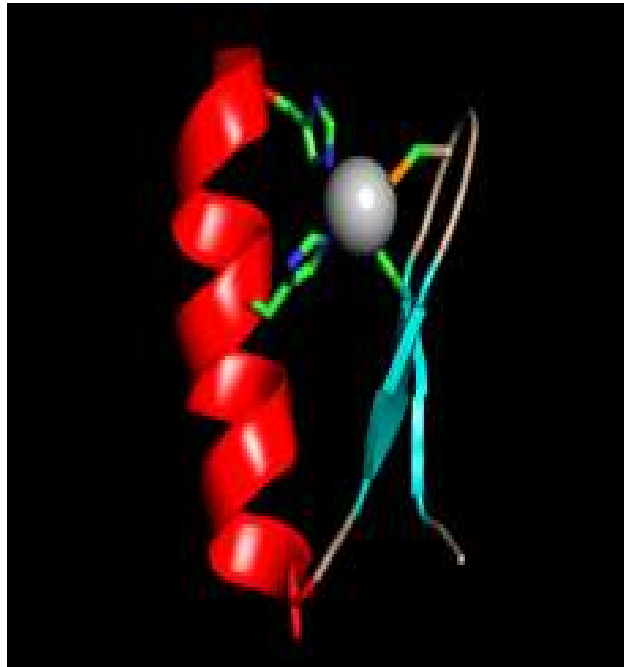


Leucin cipzár fehérjék

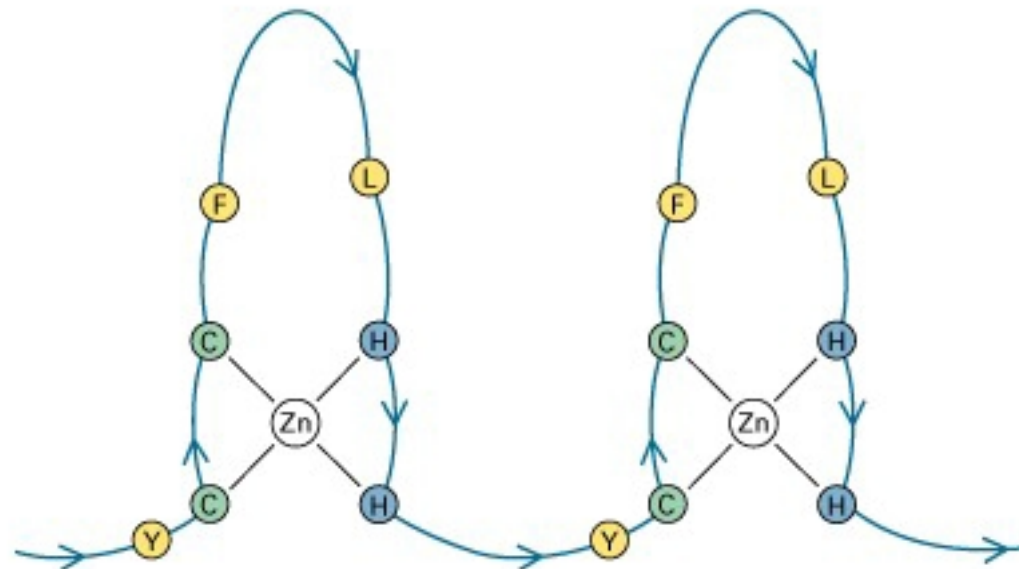


- nem a DNS-hez kötődésben játszik szerepet
- két fehérje közti szoros kapcsolódás (dimerizáció)
- a fehérje helikális szakaszán legalább 4 leucin van 6 aminosavnyi távolságra egymástól (leu-6as.-leu-6as.-leu...)
- pl. fos, jun, myc fehérjék (protoonkogének)

Zn-finger fehérjék



- a fémiont 4 speciálisan elrendezett aminosav oldallánc köti
- 2 His és 2 Cys vagy 4 Cys köti a Zn-t
- pl. szteroid receptorok, TFIIIA fehérje (5S rRNS transzkripcióját szabályozza)



Egyéb transzkripciós faktorok

A) p53 fehérje

- Sejtciklust szabályozó tumorszupresszor fehérje
- DNS repair enzimek transzkripcióját aktiválja
- Apoptózis megindításának alapvető fehérjéje

B) Hox fehérjék

- egyedfejlődés szabályozásában az egyik legfontosabb transzkripciós faktor

RNS-polimerázok

RNS-polimeráz I.

- 5,8S + 28S + 18S rRNS átírását végzi
- nucleolusban működik
- α -amanitinre rezisztens (gyilkos galóca toxin)

RNS-polimeráz II.

- mRNS-ek transzkripciójáért felelős
- snRNS-ek egy részét is átírja
- nukleoplazmában lokalizálódik
- α -amanitin nagyon erősen gátolja

RNS-polimeráz III.

- 5S rRNS, tRNS-ek átírását végzi
- snRNS-ek másik részét írja még át
- nukleoplazmában található
- α -amanitinre közepesen érzékeny

A transzkripció menete

A transzkripció szakaszai:

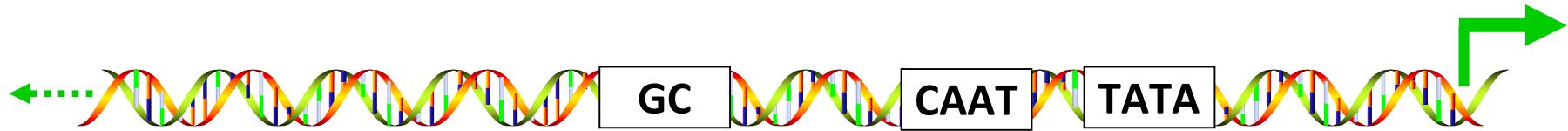
iniciáció → elongáció → termináció

Az RNS-polimeráz nem tud önmagában kötődni a DNS-hez



A transzkripcióhoz kellenek olyan fehérjék (transzkripciós faktorok), melyek kötődnek a promoteren lévő specifikus szekvenciákhoz

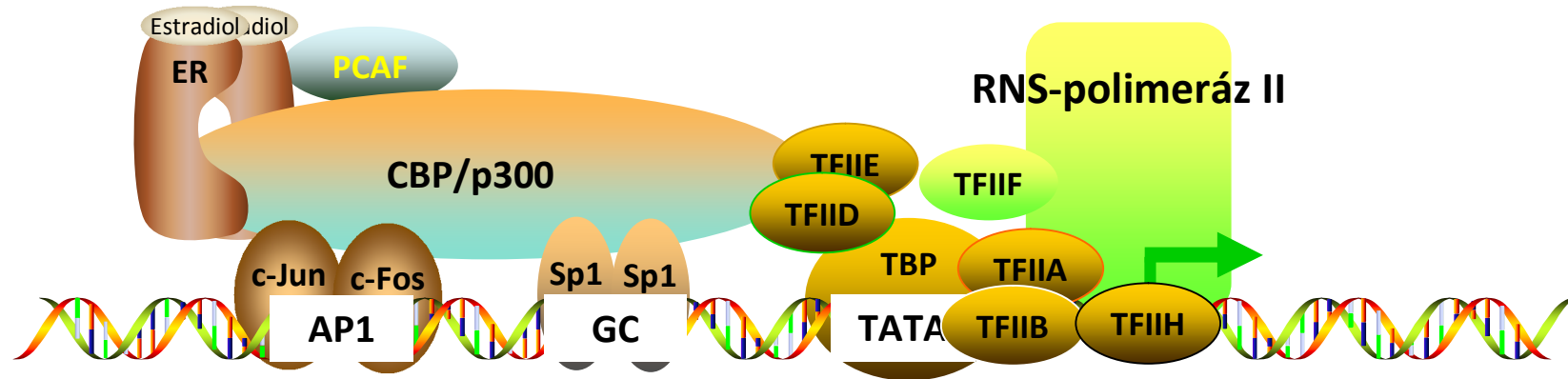
Az eukarióta promoter szerkezete



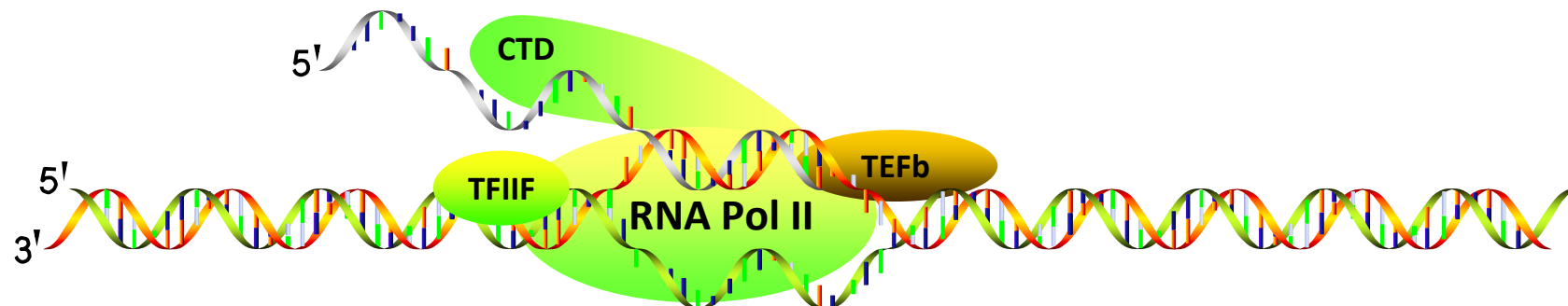
- Az eukarióta gének promotere nem fix méretű
- Nem mindig 5' irányba helyezkedik el, lehet intronban is!
- TATA-box felismerő fehérje: TBP (TATA Binding Protein)
A DNS kis árka felől kötődik!!
- TATA-box szerepe: úgy pozícionálja az RNS-polimerázt, hogy a +1 nukleotidnál induljon meg a transzkripció

A transzkripció menete

Iniciációs komplex

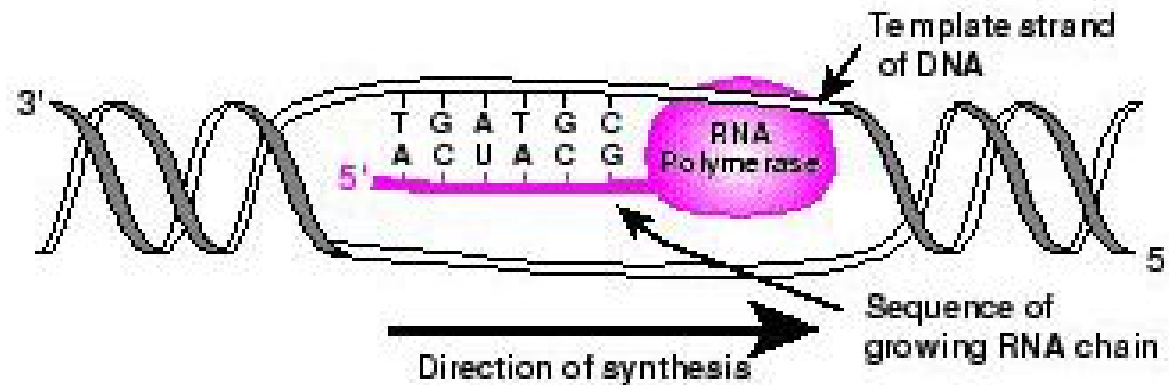


Elongációs komplex



Elongáció

6.7 SYNTHESIZING THE MESSAGE

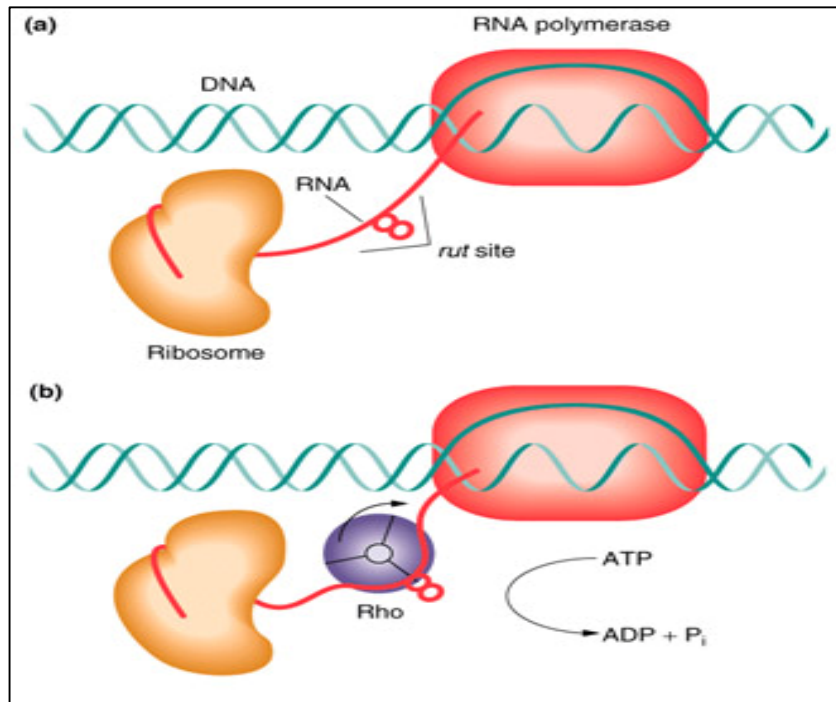


Nukleotidok beépülése:

- nukleotid-trifoszfátok pirofoszfát kihaladása közben beépülnek a képződő hnRNS láncba

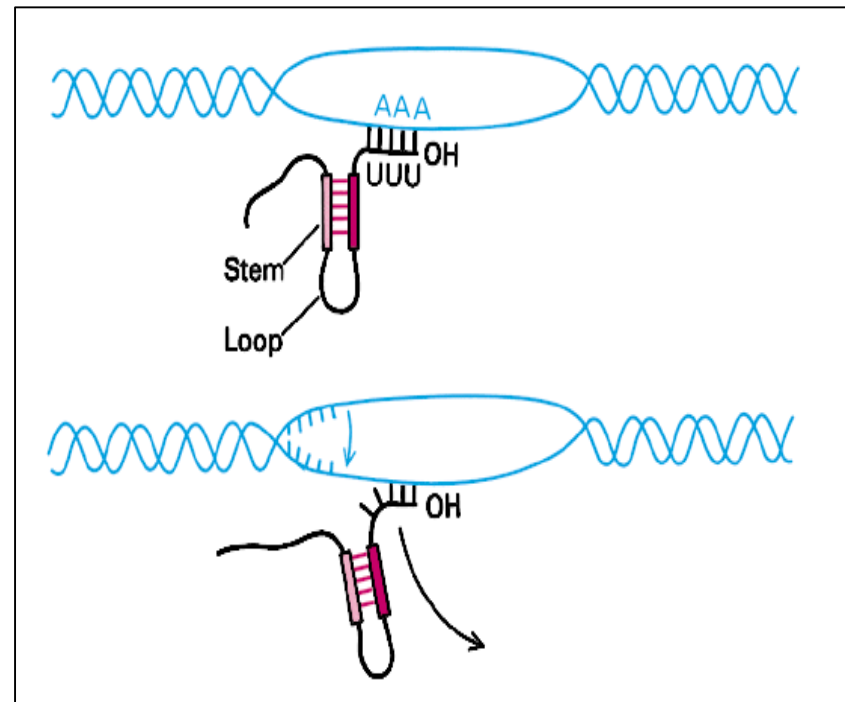
Termináció

Rho faktor dependens



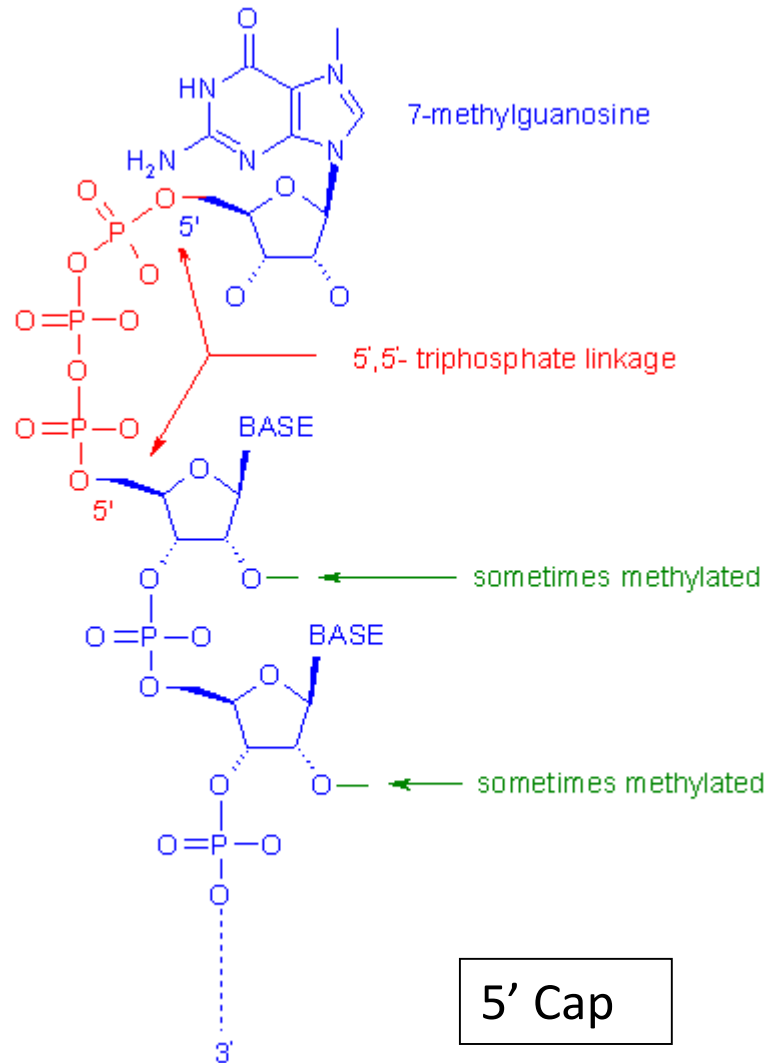
Oligomer szerkezetű faktor
„kihúzza az RNS-t a DNS-ből”

Rho faktor independens



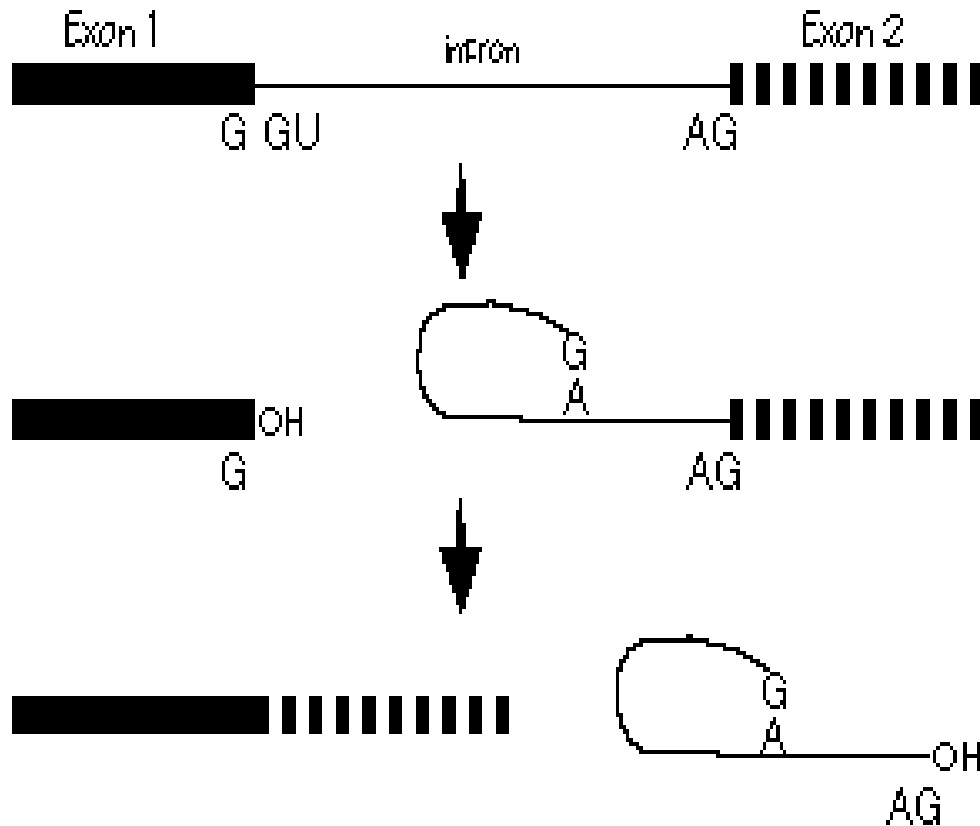
Képződő RNS szerkezetében
hurok struktúra alakul ki →
leválik a DNS-ről

hnRNS érése



- 5' vég módosulása
= Cap-képződés
- 3' vég módosulása
= poliA farok kialakulása
- intronok kivágása,
exonok összeillesztése
= splicing

Splicing



Mechanizmus:

- intron közepén adenin nukleofil támadást indít az intron 5' végéhez
- az 1. exon 3' vége támadást intéz a 2. exon 5' végéhez



Az exonok összekapcsolódnak, a lasszó alakú intron kivágódik

Alternatív splicing, splice hibák, antisense RNS

- a splicing lehet szövetre, fejlődési állapotra jellemző; bizonyos exonok az egyik féle sejtben kivágódnak, a másokban nem = **alternatív splicing**
- alternatív splicingra példa:
 - Immunglobulinok nehézláncának szintézise
 - patkány tropomiozin szintézise különböző sejtekben
- a splicing mechanizmusának károsodása számos betegségben ismert, pl. a thalassaemia (hemoglobin láncát kódoló gén egyik intronjában új splice hely alakult ki → aberráns splicing, kóros polipeptidlánc → vérszegénység)
- **antisense RNS**: adott mRNS-sel komplementer, azzal hibridizálni képes nukleinsav. Mesterségesen beadott antisense nukleinsavval szelektíven meg lehet akadályozni egy adott fehérje szintézisét → kialakuló RNS-RNS hibrid: transzlációosan inaktív

A transzláció jellemzői

- ❖ az aminosavakat az egymást követő nukleotid tripletek = **kodonok** határozzák meg mRNS-en
- ❖ összesen 64 kodon van, ebből
 - 3 **stopkodon** (nem kódolnak aminosavat)
 - többi 60 kodon aminosavat kódol

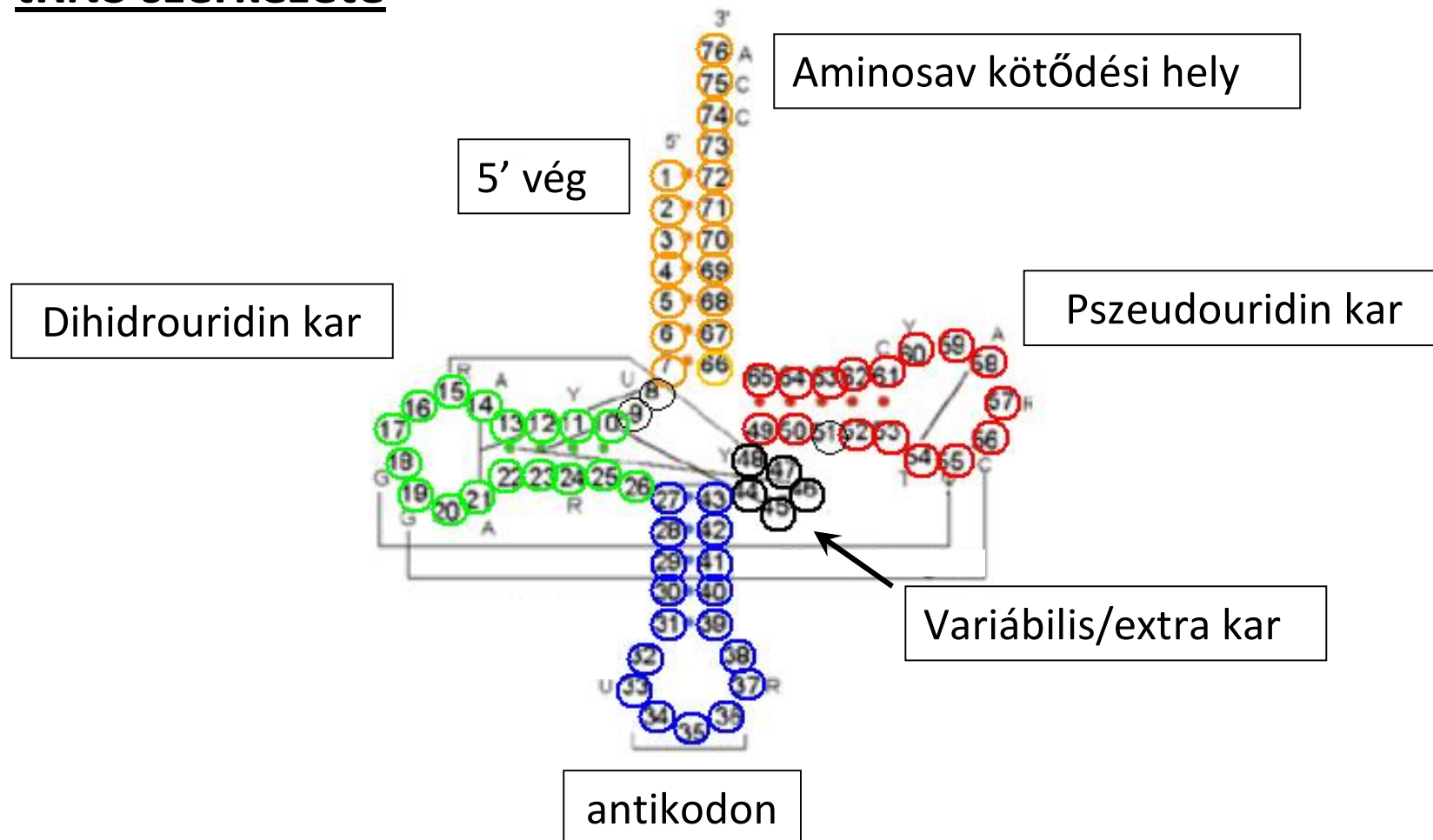


Egy aminosavat több kodon is meghatározhat!

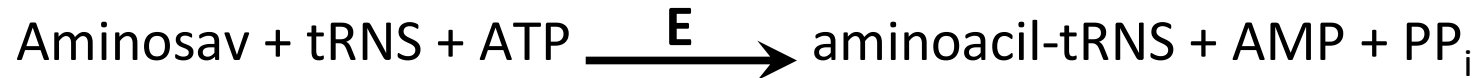
- ❖ a startkodon: AUG → metionint kódol (eukarióták)
(prokariótákban formil-metionin az első aminosav)
- ❖ az aminosavak és a nukleinsavak közti kémiai különbség miatt kell egy közvetítő molekula, ez a **tRNS** (ált. 46 db)

Aminosavak szállítása

tRNS szerkezete

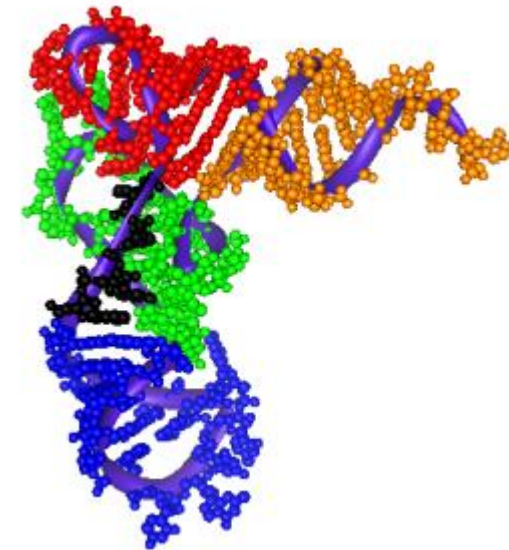


Aminosavak aktiválása



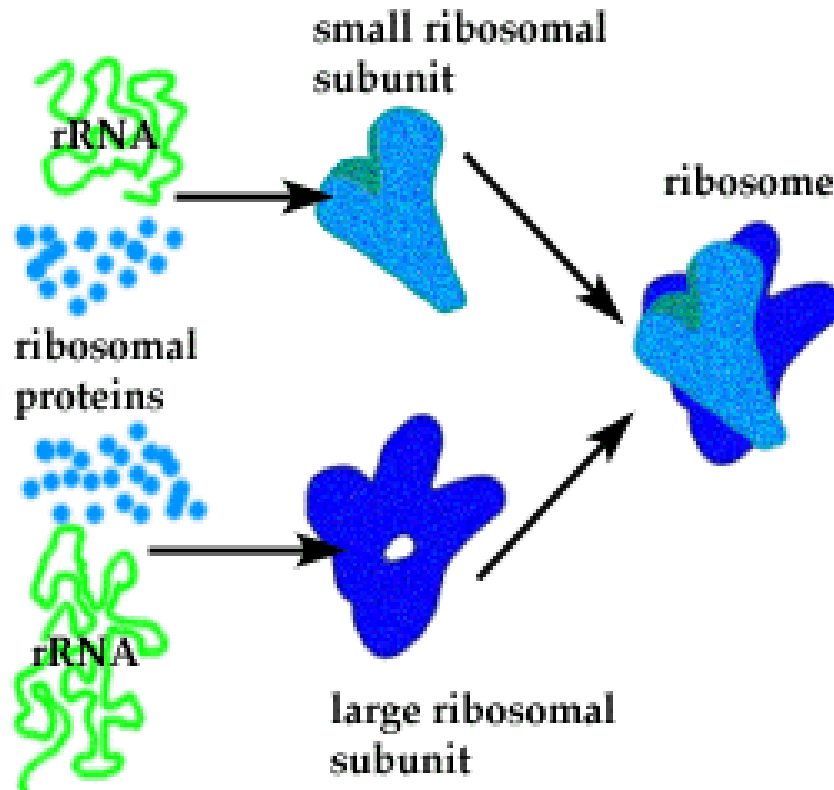
E = aminoacil-tRNS-szintetáz

- a folyamat 2 lépésben megy végbe
- tRNS és aminosav között makroerg észterkötés alakul ki, az energia a polipeptidlánc szintézise során használdik fel
- aminoacil-tRNS-szintetázok: egyik legnagyobb specifitású enzimek, a hibás aminosavat képesek lehidrolizálni a tRNS-ről



tRNS
társzerkezete

A riboszóma felépítése



Prokarióták: 70S riboszóma

- nagy alegység: 50S
- kis alegység: 30S

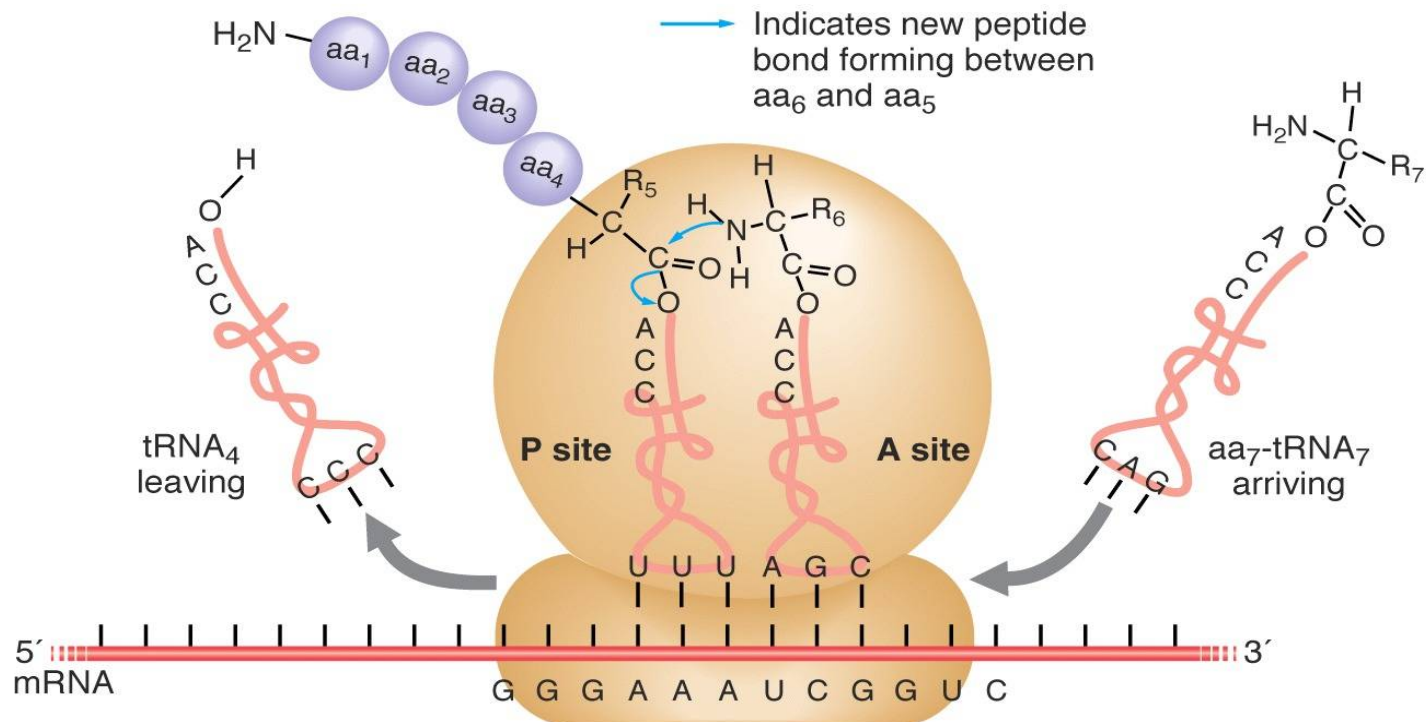
Eukarióták: 80S riboszóma

- nagy alegység: 60S
- kis alegység: 40S

A riboszóma felépítése

Kötőhelyek a riboszómán:

- P = peptidil-tRNS-t kötő hely
- A = aminoacil-tRNS-t kötő hely



A fehérjeszintézis mechanizmusa

A transláció lépései (prokarióták):

1) iniciáció: kialakul az iniciációs komplex

- mRNS köt a riboszóma kis alegységéhez
- Iniciátor tRNS beköt a riboszómához (formil-metionin-tRNS)
- iniciációs faktorok is bekötnek (IF1, IF2, IF3)

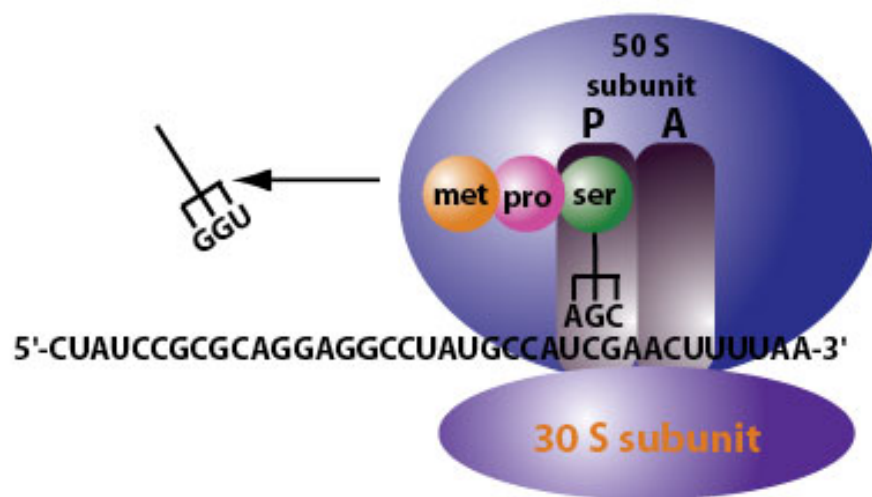
Iniciációs faktorok feladata:

- IF1: stabilizálja a kialakuló komplexet
- IF2: GTP-kötő fehérje, segíti az mRNS, a formil-metionin-tRNS és a riboszóma kötődését
- IF3: megakadályozza, hogy az üres 30S és 50S riboszóma alegység kapcsolódjon

A fehérjeszintézis mechanizmusa

2) Elongáció: ciklusosan ismétlődő 3 lépés

- aminoacil-tRNS beköt az 'A' helyre
- a 'P' és az 'A' helyen lévő tRNS-ek által hordozott aminosavak között kialakul a peptid kötés
- transzlokáció (riboszóma továbbgördül, az eddig 'P' helyen lévő tRNS leválik, az 'A' helyen lévő pedig a 'P' helyre kerül)

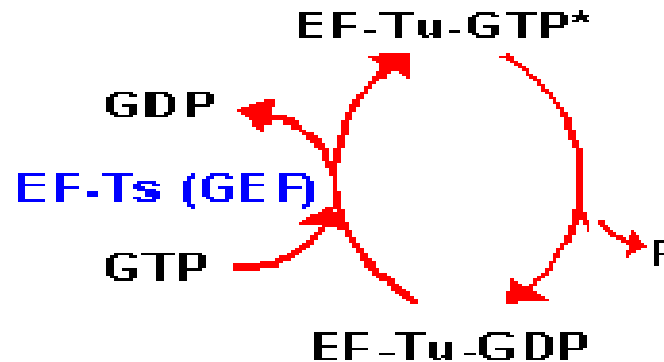


A fehérjeszintézis mechanizmusa

Az elongációnak is vannak specifikus segítő faktorai = elongációs faktorok

- EF-Tu: az aminoacil-tRNS bekötődését segíti GTP hidrolízise közben (G-fehérje)
- EF-Ts: exchange fehérje, az EF-Tu-ról segíti a GDP disszociációját
- EF-G: a transzlokációt segíti elő, miközben GTP-t hidrolizál

A peptidkötés létrejöttét a peptidil-transzferáz enzim katalizálja (50S alegység fehérjéje)

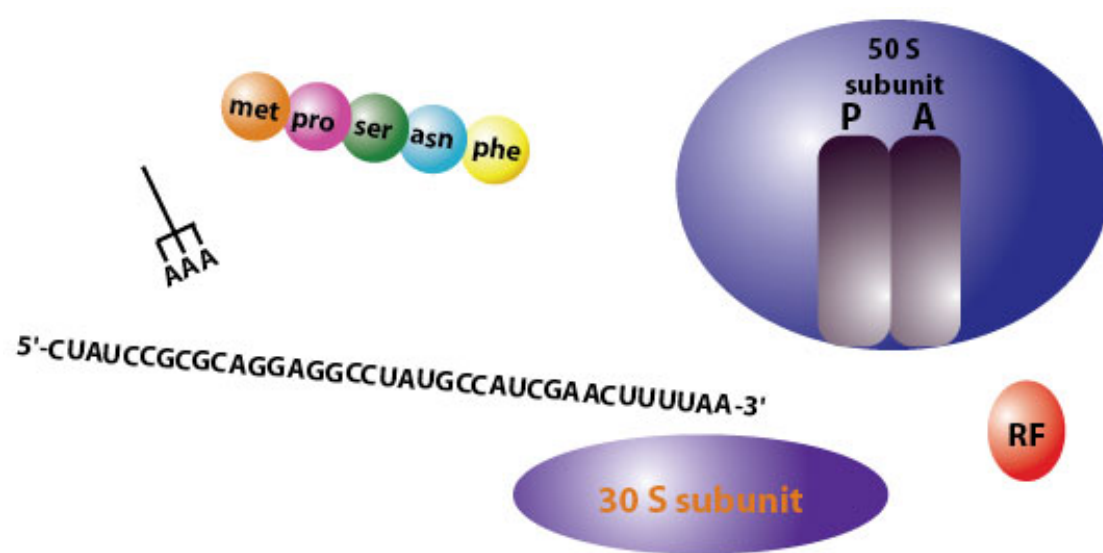


A fehérjeszintézis mechanizmusa

- 3) termináció: 'A' helyen megjelenik valamelyik stopkodon, ide nem kötődik tRNS (stop kodonoknak nincs tRNS-ük)

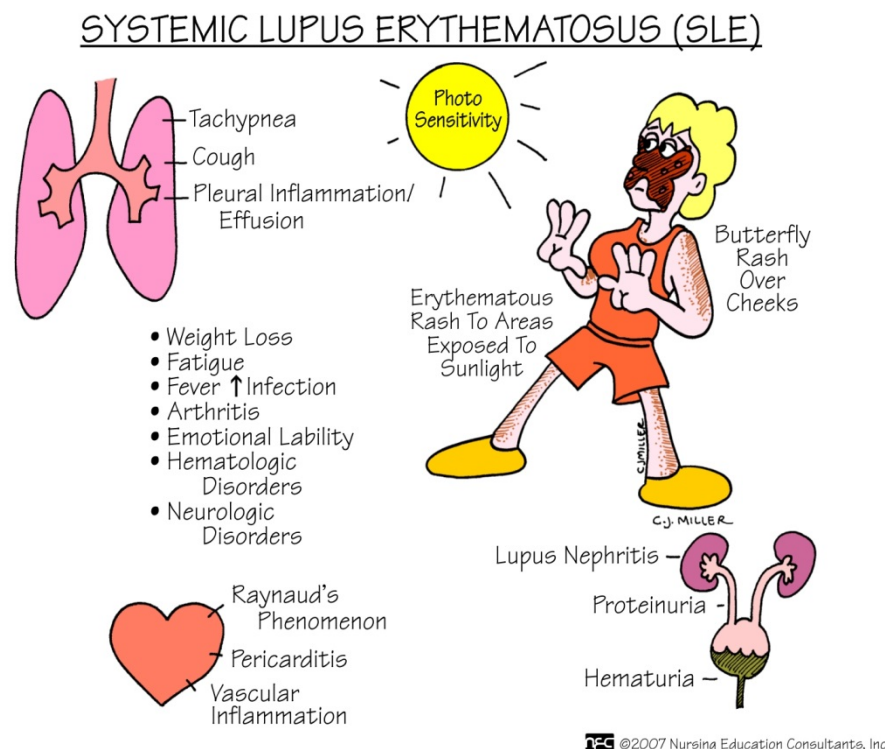


Terminációs faktorok kötődnek (release faktorok), ezek hatására a peptidil-transzferáz lehasítja a polipeptid-láncot az utolsó tRNS-ről. A riboszóma alegységeire esik, és elkezdhet egy újabb fehérjeszintézist.



Szisztémás lupus erythematosus (SLE)

- Krónikus, szisztémás, autoimmun betegség; a nagyfokú autoellenanyag termelés → immunkomplexek precipitálódnak a szövetekben → kiterjedt destrukció
- Előfordulása gyakori:nők (20-40 év)
- Komplement faktor hiányok (C1q, C2, C3) (gátolt az immunkomplexek eliminálása)
- Autoellenanyag főleg a nukleinsav komponensek és C1q ellen
- Tünetek pl.
 - Pillangó alakú bőrelváltozás az arcon – napfény hatására kifejezettebb
 - Láz, arthritis
 - Vese károsodás, elégtelenség
 - Hemolytikus anaemia



Thalassemiák

- Genetikai hiba → elveszik a normális globinláncok szintézise közötti egyensúly.
- páratlan lánc: felhalmozódik az erythropoeticus őssejtben → toxikus hatású az erythropoeticus őssejtre → ineffectivvé válik az erythropoesis
- Típusai:
 1. β THALASSAEMIA
 - β globin-lánc szintézisének genetikai zavara
 - β láncot felnőttkorban helyettesítheti a δ és a γ lánc → Hb A₂(α 2 δ 2) és Hb F (α 2 γ 2)
 - Feleslegben levő, páratlan α láncok aggregálódnak → merev falú, torz vvt-k
 - Többféle klinikai megjelenési forma
 2. α THALASSAEMIA
 - α globin-lánc szintézisének genetikai zavara
 - Lehet csendes – a tünetek attól függően változnak, hogy homozigóta vagy heterozigóta a beteg