

Dr. Bodai László

A génkifejeződés főbb lépései (transzkripció, transláció) és a génkifejeződés megismert szabályozási módjai. A génkifejeződésben megfigyelhető főbb eltérések a pro- és eukarióták között

Segédlet a BSc záróvizsgára való felkészüléshez

Jelen tananyag a Szegedi Tudományegyetemen készült az Európai Unió támogatásával.

Projekt azonosító: EFOP-3.4.3-16-2016-00014

A gének kifejeződése és szabályozása

Segédlet a BSc záróvizsgára felkészüléshez

Készítette: Dr. Bodai László
SZTE, 2020.

Záróvizsga tétel címe: A génkifejeződés főbb lépései (transzkripció, transláció) és a génkifejeződés megismert szabályozási módjai. A génkifejeződésben megfigyelhető főbb eltérések a pro- és eukarióták között.

A génkifejeződés áttekintése

A sejtek genetikai információja a DNS-ben van tárolva. Ez a genetikai anyag RNS és fehérje molekulák felépítéséhez szükséges információkat tartalmaz.

- Amikor a sejtnek egy adott fehérjére van szüksége, először a DNS megfelelő szegmenséről RNS másolat készül a **transzkripciónak** vagy génátírásnak nevezett folyamat során.
- Fehérjét kódoló gének esetén ezeknek a hírvivő (messenger) mRNS molekuláknak a bázissorrendje (szekvenciája) határozza meg a képződő fehérje aminosav sorrendjét a fehérje szintézis, a **transzláció** folyamata során.

A prokarióta és eukarióta génszerveződés áttekintése

A gén promótertől transzkripciós terminátorig terjedő egyben átírt részét **transzkripciós egységnek** nevezzük.

- Prokariótákra jellemző a gének operonokba szerveződése: az összefüggő funkciójú, például egy metabolikus útban eső fehérjéket kódoló gének egy *transzkripciós egység*be esnek.
 - A közös szabályozás alá eső transzkripciós egységeket, amelyekben egyetlen promóterről kiindulva egyetlen policisztronos mRNS képződik, **operonoknak** nevezzük.
 - Ezekről egyetlen, több polipeptidet kódoló úgynevezett **policisztronos mRNS** képződik.
 - A policisztronos mRNS-ben minden gén által kódolt fehérjének saját transzlációs START és STOP helye van.
- Eukariótákban a gének jellemzően különállóak, egy transzkripciós egységről jellemzően egyetlen polipeptidláncot kódoló RNS íródik át. Eredményeként ún. elsődleges transzkriptum (naszcens RNS) jön létre, mely további módosításokon megy keresztül, mielőtt felveszi végleges, funkcionális formáját.

A transzkripció biokémiája

A transzkripció során az **RNS polimeráz** enzim a DNS egyik száláról vele antiparalel lefutású, komplementer szekvenciájú **RNS** másolatot készít ($G \equiv C$, $C \equiv G$, $A = U$, $T = A$ bázispárosodás).

- *Templát szál* (antiszensz szál): a DNS molekula azon szála, amelyet mintául felhasználva az RNS másolat készül. Szekvenciája a képződő RNS molekulával komplementer.
- *Értelmes szál* (szensz szál): a templát szállal komplementer DNS szál, szekvenciája az RNS molekuláéval megegyezik. (Leszámítva, hogy U helyett T található benne.)

A templát szál / értelmes szál megkülönböztetés csak egy génen belül érvényes. Eltérő géneknek a kromoszómális DNS eltérő szála szolgálhat templátjául.

Az RNS szál szintézisének biokémiája:

- Szálhosszabbítás nukleotidok egyenkénti hozzáadásával: $(NMP)_n + NTP \rightarrow (NMP)_{n+1} + PP_i$
- DNS templát alapján, báziskomplementaritás szabályait betartva történik ($G \equiv C$, $C \equiv G$, $A = U$, $T = A$).
- A szintézis iránya mindig $5' \rightarrow 3'$, a templát DNS szállal ellentétes irányú (antiparalel).
- A nukleotidok (ribonukleozid-trifoszfát, rNTP) egyesével adódnak a növekvő RNS lánc $3'$ végéhez, Foszfodiészter kötés alakul ki a $3'$ -vég és a következő nukleotid $5'$ α -foszfátja között.
- RNS polimeráz enzimek katalizálják.

RNS polimerázok:

- több alegységből álló, abszolút processzivitású enzimek, hibarátájuk $\sim 10^4$
- iniciációjukhoz primert nem, viszont *promóter* DNS szekvenciát igényelnek
- prokarióta RNS polimeráz: az RNS polimeráz holoenzimet RNS polimeráz core enzim (β és β' nagy alegységek, 2α alegység, ω alegység) és a σ faktor (iniciációs faktor) alkotja.
- eukarióta RNS polimerázok: többfajta polimeráz különböző típusú RNS molekulák átírását végzi RNS pol. I (rRNS), RNS pol. II (mRNS, miRNS, snoRNS, lncRNS), RNS pol. III (tRNS, 5S rRNS). Szerkezetileg egymáshoz hasonlóak, két nagy alegység + 10-12 kisebből állnak.

A transzkripció ciklus

- iniciáció: a folyamat lényege, hogy az RNS polimeráz kötődve a promóterhez felismerje a transzkripció kiindulási pontját, alkalmassá váljon az RNS lánc szintézisének megkezdésére.
 - prokariótákban: Az RNS polimeráz holoenzim lazán asszociálódik a DNS-sel, rajta elmozdulva megtalálja a promótert (RNS polimeráz kötőhelye), létrejön az ú.n. *zárt komplex*. A holoenzim a promóternél egy 12-14 bp szakaszon felbontja a kettősszalú DNS szerkezetet: transzkripció buborék alakul ki (*nyitott komplex*). Az első két nukleotid összakapcsolásával megindulhat a szintézis, ekkor a holoenzimról leválik a σ faktor.
 - eukariótákban: A különböző RNS polimerázok eltérő promóterekhez kötődnek. RNS pol. II-nél pre-iniciációs komplex alakul ki: ebben általános transzkripció faktorok szükségesek a promóter megtalálásához (TFIID, A, B), a transzkripció buborék kialakításához (TFIIH), RNS pol II CTD-n aktiváló foszforilációjához (TFIIH). Mediátor komplex közvetíti transzkripció faktorok hatását.
- elongáció: a folyamat lényege az RNS lánc szintézise.
 - prokariótákban: Az σ faktor nélküli RNS polimeráz core enzim RNS-t szintetizálva a templát szállal komplementer másolatot készít a DNS-ről, a transzkripció buborék a polimerázzal halad.
 - eukariótákban: Az RNS pol. II-höz elongációs faktorok kötődve segítik a kiszabadulást a promóter közeli leállásból, lánchosszabbítást, foszforilálják RNS pol II CTD-t. Kromatin átrendező faktorok teszik hozzáférhetővé a DNS-t a polimeráz számára.
- termináció: a folyamat lényege az RNS lánc szintézis befejezése.
 - prokariótákban: Hajtű szerkezetet felvenni képes terminátor szekvencia után következik be, lehet Rho fehérje faktor függő vagy Rho független. A terminátor szekvencia átírása után a szintézis leáll, az RNS polimeráz elereszti mind a DNS mind az RNS molekulát.
 - eukariótákban: RNS pol II terminációja a polyA addíciós szekvencia után 0,5-2 kb távolságra következik be.

A génkifejeződés szabályozása

Ugyan azon élőlény sejtjei között is jelentős morfológiai és funkcionális eltéréseket lehet megfigyelni; emellett a sejtek válaszolnak a külső és belső stimulusokra. E jelenségeket részben a gének kifejeződésének szabályozása magyarázza.

A gének kifejeződésének szabályozása több szinten valósulhat meg:

- prokariótákban: transzkripció szabályozása, transláció szabályozása
- eukariótákban: transzkripció (iniciáció, elongáció) szabályozása, RNS érés szabályozása, Az RNS exportjának és lokalizációjának szabályozása, a transláció szabályozása, RNS degradáció szabályozása, a fehérje aktivitásának szabályozása (pl. poszttranszlációs módosításokkal).

A génexpresszió szabályozásának egyik legfontosabb lépése a transzkripció iniciációjának szabályozása.

Különböző génekről eltérő gyakorisággal íródhatnak át transzkriptumok, a génekről eltérő mennyiségű RNS másolat készülhet. Ez lehetővé teszi a génexpresszió szövet és stádium specifikus szabályozását.

Transzkripciós szabályozás csoportosítása annak hatása szerint:

- Negatív szabályozás: a DNS-hez kötődő fehérje faktor (represszor) gátolja a transzkripciót.
 - A represszor gátolja a transzkripciót, inducer molekula szükséges a derepresszióhoz.
 - A represszor önmagában (aporepresszor) nem gátolja a transzkripciót, ahhoz korepresszor molekula kötődése szükséges.
- Pozitív szabályozás: a DNS-hez kötődő fehérje faktor (aktivátor) serkenti a transzkripciót.
 - Az aktivátor önmagában képes fokozni a transzkripciót. Az aktivátorhoz kapcsolódó ligand megszüntetheti az aktivátor hatását.
 - Az aktivátor önmagában nem fokozza a transzkripciót, ahhoz koaktivátor is szükséges.

A génkifejeződés szabályozása

A transzkripció szabályozásában szerepet játszó szabályozó elemek csoportosítása a szabályozott génhez viszonyított elhelyezkedésük szerint:

- Cisz-hatású elemek: A szabályozott génnel azonos DNS szakaszon elhelyezkedő DNS elemek.
 - prokariótákban: promóterek, operátorok
 - eukariótákban: promóterek, promóter közeli szabályozó elemek, távoli enhanszerek.
- Transz-hatású elemek: Fehérje faktorok és kofaktoraik, a cisz-hatású elemekhez kötődnek.
 - Transzkripciós aktivátorok és represszorok, ko-aktivátorok, ko-represszorok.
 - A transzkripciós faktorok szekvenciaspecifikusan kötődnek a cisz-hatású elemekhez úgy, hogy a DNS nagyárában másodlagos kötésekkel ismerik fel a bázisokat. Jellegzetes DNS kötő doménekkel rendelkeznek: pl. helix-turn-heli, cink-ujj, leucin cippzár, homeodomén.
 - A transzkripciós faktorokra jellemző a dimerizáció és a kooperatív DNS kötés.

Transzkripció szabályozásának főbb jellemzői:

- prokarióták: koordinált génszabályozás figyelhető meg, ezt az azonos metabolikus útvonalban szereplő enzimek génei egyszerre aktívak vagy inaktívak, ezt a gének operonba rendeződése teszi lehetővé. A polimeráz különböző σ faktorokat használhat. A gének működését aktivátorok, represszorok szabályozzák. példák: lac operon, Trp operon, attenuáció jelensége.
- eukarióták: a gének egyedileg szabályozottak. A promóterek és promóter közeli szabályozó elemek mellett jellemzőek a távoli enhanszerek. Többféle RNS polimeráz, az RNS pol II iniciációja általános transzkripciós faktorokat igényel. Enhanszerekhez kötődő transzkripciós faktorok hatását a mediátor komplex közvetíti az RNS pol II felé. A kromatin szerkezet is befolyásolja a transzkripciós aktivitást: aktiváló (pl. hiszton acetiláció) és represszív (pl. DNS metiláció) hatású jelek.

A transláció áttekintése, a genetikai kód

- A génkifejeződés során a fehérjét kódoló mRNS molekulák alapján a transláció nevezett folyamattal fehérje molekula készül.
- A transláció a citoplazmában, a riboszómákon zajlik; prokariótákban a transzkripcióval kapcsolatosan, eukariótákban attól elválasztva a citoszolban vagy az DER felületén lévő riboszómákon.
- A transláció során a mRNS –ben tárolt információ 5' – 3' irányban bázisháromasonként olvasódik le; az alapján N-terminális - C-terminális irányban polipeptidlánc szintetizálódik.
- A polipeptid láncban lévő aminosavak sorrendjét az mRNS-ről leolvasott bázis tripletek sorrendje határozzák meg. A tripletek és az aminosavak közötti megfeleltetést genetikai kódnak nevezik.
- A bázis tripletek leolvasása egy mRNS-ről egyetlen *leolvasási keretben* történik.

A genetikai kód: 64 lehetséges triplet határoz meg 20 aminosavat (+stop kodont)

- Az mRNS-en egy bázis triplet (kodon) egyetlen aminosavat határoz meg (egyértelmű).
- Egy aminosavat több kodon is meghatározhat (a kód degenerált, vagy redundáns).
- A kód vesszőmentes (de vannak start és stop kodonok); a kodonok nem átfedő módon olvasódnak le.
- A genetikai kód majdnem teljesen univerzális az élővilágban.

A transláció folyamata két fő lépésre osztható:

➤ Aminosavak aktiválása és megfelelő tRNS-ra kapcsolása:

Aminoacil tRNS-ek végzik a aminosav – tRNS megfeleltetést és kapcsolást; végeredménye az aktivált aminoacil-tRNS.

➤ Fehérje szintézise a riboszómán. Az mRNS szekvenciája alapján, annak kodonjait felismerve aminoacil-tRNS-ek szállítják az aminosavakat, amelyek között peptid kötések jönnek létre.

A transláció résztvevői, az aminosavak aktiválása

A fehérjék szintézise energiaigényes, számos makromolekula együttműködését igénylő folyamat. A transláció folyamatában részt vevő molekulák:

- mRNS: a genetikai információt szállítja a DNS-ről lineáris formában.
- riboszómák: rRNS-ek fehérjékkel együtt alkotják a nagy- és kisalegységből álló riboszómákat (Prok: 70S=50S+30S, Euk: 80S=60S+40S), melyek az mRNS által kódolt polipeptid szintézisét végzik. RNS kötő helyei: mRNS kötő, tRNS kötő: A (aminoacil-tRNS), P (peptidil-tRNS, E (exit)
- tRNS molekulák (~40 féle, kevesebb mint ahány kodon – *lötyögés*): adaptor molekulaként felismeri az mRNS kodonokat, amonoacil-tRNSként aktivált formában szállítja az aminosavat
- aminosavak: a fehérjék monomerjei
- aminoacil-tRNS szintáz enzimek (20 féle): az aminosavak aktiválását végzik, aminoacil-tRNS-t hoznak létre
- szabályozó hatású fehérje faktorok: iniciációs, elongációs és terminációs faktorok
- GTP (2 GTP/aminosav + 1-2 / iniciáció + 1 / termináció), ATP (aminosav aktiváláshoz, eukariótákban start kereséséhez): energia forrás

Aminosavak aktiválása és megfelelő tRNS-ra kapcsolása

- A tRNS egy nagyenergiájú kötéssel hozzákapcsolódik a neki megfelelő aminosavhoz – így **aminoacil-tRNS** jön létre, ami részt vesz a polipeptid lánc szintézisében.
- Az aminoacil-tRNS-ek létrejöttét **aminoacil-tRNS szintetáz** enzimek katalizálják, melyek specifikusak az aminosavra és a megfelelő tRNS-ekre is. Mind a 20 aminoacil-tRNS szintetáz enzim egyetlen aminosav, és a neki megfelelő összes tRNS kapcsolását végzi. Ezek az enzimek végzik a genetikai kódnak megfelelő megfeleltetést.
- Az aminosav először ATP felhasználásával adenilálódik, aktivált aminoacil-AMP jön létre.
- Ezt követően a tRNS aminosav akceptor karjának 3'-végéhez kapcsolódik a 3'-OH és az aminosav karboxil csoportja között kialakuló észter kötéssel – ezzel létrejött az aminoacil-tRNS.

A fehérjék szintézise a riboszómákon

- iniciáció: a folyamat lényege, hogy a riboszóma alegységei összeszerelődjenek az mRNS körül, a riboszóma pozícionálódjon a start kodonra, és a P helyre kapcsolódjon az iniciátor aminoacil-tRNS
 - prokariótákban: mRNS a 30S alegységhez kötődik (IF1, IF3), a start kodon a Shine-Dalgarno szekvencia segítségével a P-helyhez pozícionálódik, IF2 szállította formil-Met-tRNS kötődik a P helyre, majd kapcsolódik az 50S alegység.
 - eukariótákban: A 40S alegység, P-helyhez kapcsolódó eIF2:Met-tRNS, és eIF1, eIF3 iniciációs faktorok kölcsönhatásával 43S pre-iniciációs komplex alakul ki. eIF4-ek felismerik a mRNS cap és polyA végeit, hozzákapcsolják 43S-hez. eIF4 faktorial start kodon megkeresése. eIF5 segítségével kötődik a 60S alegység, az eIF faktorok leválnak.
- elongáció: a folyamat lényege a polipeptid lánc ismétlődő lépésekben történő szintézise.
 1. *aminoacil-tRNS riboszómához kötődése*: az A helyre kerül az mRNS következő kodonjának megfelelő antikodonnal rendelkező aminoacil-tRNS. Prok: EF-Tu:GTP, Euk: eEF1:GTP
 2. *peptid kötés létrehozása*: a növekvő polipeptid lánc C-terminálisa felszabadul a P-helyen lévő peptidil-tRNS-ről, majd az A helyen lévő tRNS-hez kapcsolt aminosav amino-csoportjával peptid kötet alakít ki a riboszóma nagy alegység 23S rRNS **peptidil transzferáz** aktivitása.
 3. *nagy riboszóma alegység transzlokációja*: a tRNS-ek áthelyeződnek: A → P, P → E. Prok: EF-G:GTP, Euk: eEF2:GTP
 4. *kis riboszóma alegység transzlokációja*: az üres tRNS kilökődik az E helyről
- termináció: a fehérje szintézis befejezése a stop kodonnál – nincs ennek megfelelő tRNS, hozzá release faktorok kötődnek. A peptidlánc és a tRNS közötti észterkötés felszakad, majd a riboszóma is disszociál alegységeire.
 - prokariótákban: RF1, RF2 kötődik az A helyre, a peptidil-tRNS kapcsolatot felszakad.
 - eukariótákban: eRF1 kötődik az A helyre, a peptidil-tRNS kapcsolatot felszakad.

A génkifejeződésben megfigyelhető főbb eltérések pro- és eukarióták között

Prokarióták:	Eukarióták:
Nincs sejtmag, a transzkripció és a transláció térben nem elválasztott – a transláció már az félig kész mRNS-eken is megkezdődik (kapcsolt folyamatok).	Van sejtmag, a transzkripció és a transláció térben elválasztott. Elsődleges transzkriptum (pre-mRNS) érésével létrejövő mRNS a citoplazmában transzlálódik.
A génszerveződésre jellemző az operon szerveződés. A gének nem szabdaltak (nincsenek intronok).	A gének jellemzően saját szabályozással rendelkeznek. A gének szabdaltak (exonok, intronok).
Az operonokról egyetlen policisztronos mRNS íródik át.	A génekről átírt mRNS jellemzően egyetlen polipeptidláncot kódol (monocisztronos).
Egyféle RNS polimeráz.	Többféle RNS polimeráz (eltérő szerkezet, eltérő promóter, eltérő RNS féléket írnak át).
Nincs kromatin szerkezet, nincsenek távoli cisz-szabályozó szabályozó elemek.	Kromatin szerkezet befolyásolja a génkifejeződést, távoli szabályozó elemek (enhanszerek).
Az mRNS nem esik át érési folyamatokon.	A pre-mRNS érési folyamatokon esik át (CAP addíció, splicing, polyA addíció).
70S riboszóma	80S riboszóma
A transláció iniciációja során RNS motívum (Shine-Dalgarno szekvencia) pozícionálja a start kodont a riboszómán.	A transláció iniciációja során az mRNS-t a CAP struktúra és a polyA farok segítségével ismerik fel és iniciációs faktorok; Kozak szekvencia pozícionálja a start kodont.