



EFOP-3.4.3-16-2016-00014

SZÉCHENYI 2020

Transzkripció és epigenetikai szabályozás

Dr. Boros Imre Miklós, egyetemi tanár

BBTE, Haladó Genetika

Jelen tananyag a Szegedi Tudományegyetemen készült az Európai Unió támogatásával.

Projektazonosító: EFOP-3.4.3-16-2016-00014

Olvasási idő: 45m perc.



Transzkripció és epigenetikai szabályozás

Boros Imre, egyetemi tanár

A génkifejeződés, vagy génexpresszió, két szintje a transzkripció (átírás) és transzláció (átfordítás). Az elnevezések kifejezik, hogy a két folyamat során a DNS genetikai információtartalma előbb egy másik nukleinsav féleség, RNS szerkezetbe „íródik át”, majd ez alapján polipeptid aminosav sorrendjére „fordítódik”. Mindkét folyamat összetett és önmagában is sok lépésből áll, melyek során több ponton érvényesül szabályozás. A szabályozás alapelvei sok tekintetben nagyon hasonlóak pro- és eukarióta sejtekben, ami természetes, hiszen azonosak az alapfolyamatok – ribonukleozid-trifoszfátokból RNS és aminosavakból polipeptid láncok szintézise történik. Vannak azonban fontos, a pro- és eukarióta sejtek szerveződésének sajátosságai által meghatározott eltérések is.

Hasonlóság, hogy mindkét rendszerben legfontosabb szabályozási pont az RNS szintézis kezdete, a transzkripció iniciációja, és az is megegyező a két sejtípusban, hogy ezt DNS részek és fehérje molekulák között kialakuló kapcsolatok irányítják. Az iniciációhoz a közreműködő molekulák megtalálják, a gének kezdetét és a sejt igényeinek megfelelő gyakorisággal ott RNS átírat szintézisét kezdik el. Jelzésként a DNS viszonylag rövid nukleotid részletei szolgálnak (cis hatású szabályozók), amelyekhez a DNS-hez szekvencia specifikusan kötődni képes fehérjék (transz hatású szabályozók) kapcsolódnak. A kialakuló DNS-fehérje kapcsolatok biztosítják, hogy transzkripció mindig azokon a géneken és olyan intenzitással történjen, hogy az megfeleljen a sejt differenciálódási és fiziológiás igényeinek. Hasonló a két rendszerben a fehérjeszintézis alapvető mechanizmusa is: a riboszómák felületén a hírvivő (messenger) RNS nukleotid sorrendje szerint meghatározott sorrendben peptid kötések kialakításával, aminosavak összekapcsolása valósul meg. A mRNS nukleotid sorrendjének tripletjei határozzák meg, hogy a húsz lehetséges aminosav közül mikor, melyik lesz a szintetizálódó polipeptid láncban a következő. Az aktivált aminosav egy szállító (transzfer) RNS molekulához kapcsolódva, a mRNS és tRNS nukleotid hármasai között létrejött kapcsolat szerint kerül a riboszómán olyan helyzetbe, ami lehetővé teszi a peptid kötés kialakulását. Az nukleinsav szerkezet által meghatározott információ polipeptid sorrendbe történő áttételében tehát a riboszóma az összeszerelő felületet, a mRNS a programot biztosítja, a tRNS pedig a nukleotid hármasok és aminosavak közötti adaptor szerepet tölti be. A program nyelve a genetikai kód, ami a fehérje szintézis alapfolyamataihoz hasonlóan, gyakorlatilag az egész élővilágban azonos.

Lényeges eltérés van azonban a gén kifejeződésben pro- és eukarióták között többek között abban, hogy a két nagy folyamat együttes, a transzkripció és transzláció a prokariótákban térben és időben egymástól nem elválasztott, míg eukariótákban az előbbi a sejtmagban, az utóbbi a citoplazmában zajlik. Prokariótákban a transzkripcióval egyidejűleg, amint a képződő RNS 5' vége hozzáférhető, riboszóma kapcsolódik hozzá és elkezdődhet a transzláció. Eukariótákban a transzkripció terméke (pre-mRNS) közvetlenül szintézisét követően még nem vehet részt fehérje szintézisben, mert ahhoz egyrészt ki kell jutnia a sejtmagból a citoplazmába, másrészt egy érési folyamaton kell átesnie, ami részben az eukarióta gének szerkezetéből adódóan

szükséges. Az eukariota gének ugyanis rendszerint alternálva tartalmazzak aminosav részeket kódoló és nem kódoló részeket. Az előbbieket az exonok, az utóbbiak ezek között, az intronok. A transzkripció során az exonoknak és intronoknak megfelelő részek egyaránt átíródnak, de már a transzkripcióval egyidejűleg elkezdődik az intronok kivágása és ez exon részek összekapcsolása, a splicing folyamata. Ezen kívül az eukariota mRNS érés két másik fontos lépése, az 5' végen egy sapka (cap) szerkezet kialakítása, ami egy fordított, 5'-5' kötéssel kapcsolódó metilált guanozin nukleotid, és a 3' végen 150-200 adenin nukleotid polimerizációjával egy poliA vég képzése. Mindkét véget specifikus enzimek hozzák létre és mindkét végmódosítás szerepet játszik az RNS molekula nukleázokkal szembeni védelmében, valamint fontos szerepük van a mRNS „minőségi ellenőrzésében” és a transláció kezdetében is. A splicing folyamata önmagában is összetett és sok molekula (fehérjék és kis magi RNS-ek, snRNS) közreműködését igényli. Sok gén esetében lehetőség van arra is, hogy exonok eltérő kivágásával (alternatív splicing) ugyan olyan primer transzkriptumból eltérő fehérjék szintézisét biztosító mRNS-ek képződhessenek. (Ezzel kapcsolatban érdemes észrevenni, hogy az „exon egyenlő fehérjét kódoló rész”, meghatározás túlzottan egyszerűsítő. Helyesebb az, hogy exonok a primer transzkriptum nem kivágódó részei, mindaz, ami egy érett mRNS része lesz.)

Prokariota sejtekben is lehet egy génnek több fehérje (több polipeptid lánc) terméke, de egészen más mechanizmus eredményeként, mint ahogy ezt eukariota alternatív mRNS érés eredményezi. Prokariotákban gyakran több olyan kódoló szekvencia alkot egy transzkripció egységet, amelyek termékei egy-egy összekapcsolódó metabolikus folyamat megvalósításában közreműködő fehérjék. (Pl. egy-egy katabolit felvételében és lebontásában szerepet játszó fehérjék kódoló szekvenciái, mint a laktóz, vagy arabinóz operonok esetében, vagy egy-egy aminosav szintézisében szerepet játszó fehérjéket kódoló részek, mint a triptofán, hisztidin vagy más aminosav operonok esetében.) Az ilyen „gén együttesek”, a működésüket szabályozó DNS részekkel együtt, az operonok. Az operonok egyes polipeptidjeit kódoló szekvencia részek a cisztronok. A prokarioták génjeinek operonokba szerveződése tükrözi, hogy a kapcsolódó folyamatokban szerepet játszó fehérjékre egyidejűleg van szükség, így ezek szintézisét gazdaságos együtt szabályozni. A közös szabályozása ellenére persze az operonban kódolt egyes polipeptidok képződhetnek eltérő arányokban, mert minden kódoló egység saját szabályozó szekvencia által meghatározott gyakorisággal kapcsolódik majd riboszómához és biztosít fehérje szintézist.

Az eltérő génszerkezet és eltérő mRNS képződésen kívül fontos különbség van a pro- és eukarioták között a transzkripciót végző fehérjék génekhez történő hozzáféréseben és a transzkripcióban, legfőképpen annak iniciációjában közreműködő molekulák sokféleségében is. Eukariota sejtek magjában a DNS elsősorban a hiszton fehérjékkel történő kapcsolódása, valamint egyéb fehérjékkel történő kölcsönhatásai miatt sokszorosan feltekeredve, kromatin szerkezetben van. A kromatin tömörsége, (kondenzációja), meghatározza, hogy a transzkripciót végző fehérjék hozzáférhetnek-e a DNS-hez és történhet-e gén átírás. Az alapállapotnak az tekinthető, hogy a feltekeredés és kromatinba szerveződés gátolja a transzkripciót és ahhoz, hogy átírás történjen a kromatin fellazítására, dekonkondenzációjára van szükség, ami aktiváló hatású fehérjék közreműködését igényli. Ezzel ellentétben, bár a prokariota sejtek DNS-e is

fehérjékkel kölcsönhatásban és valamilyen mértékben feltekeredetten van a sejt citoplazmájában, az egyes gének rendszerint hozzáférhető a transzkripciót végző fehérjék számára. Egyszerűsítve úgy tekinthetjük, hogy prokariotákban az alapbeállításként a transzkripció megengedett. A gének kikapcsolása gátló hatású, negatív szabályozók közreműködésével valósul meg. A valós helyzet persze ettől sokkal összetettebb és negatív és pozitív hatású transzkripciós faktorok egyaránt szerepet játszanak a pro- és eukariota gének átírásban is. Eukariotákban nagyságrenddel nagyobb a szabályozást végző transzkripciós faktorok száma, mint prokariotákban. Szerkezetükben és működésükben azonban az eukariota szabályozók egy része sok hasonlóságot mutat prokariota rokonaikhoz. A DNS-hez kapcsolódó szabályozó fehérjék általában rövid, 5-6 nukleotidos DNS részletet ismernek fel, a DNS nagy árka felől kapcsolódva és bázis specifikus kölcsönhatásokat kialakítva aminosav oldalláncaikkal. A kapcsolódás soha nem kovalens kötésekkel, hanem ionos, és gyenge kölcsönhatásokon át valósul meg, ami biztosítja a reverzibilis kötődést és disszociációt. A DNS-sel kölcsönható fehérje szerkezeti motívum leggyakrabban egy alfa hélix részlet, ami mintegy befekszik a DNS nagy árkába. Az hogy a polipeptid lánc többi része hogyan járul hozzá ennek a DNS kötő motívumnak a megfelelő orientálásához és kapcsolásához a fehérje többi részéhez meghatározza, hogy milyen típusú DNS kötő motívumról, vagy doménről beszélünk (helx-loop-helix, helix-turn-helix, bZIP, cink-ujjak, stb). A hasonló szerkezetű DNS kötő részek apró különbségei lehetővé teszik a DNS szekvenciák közötti egy-két nukleotidnyi eltérések megkülönböztetését. Ezért DNS kötő fehérje családok léteznek, amelyek tagjaira jellemző a hasonló szerkezetű DNS-kötő motívum és a kötött szekvenciák rokonsága. Mivel igen gyakran a DNS kötő fehérjék dimerként kapcsolódnak a felismert szekvencia részek direkt vagy indirekt ismétlődéseikhez, a sok tagból álló fehérje családok polipeptidjeinek kapcsolódása változatos homo- és heterodimer kombinációkban, sokkal több gén szabályozásra ad lehetőséget, mint a faktorok száma. Prokariotákban a szekvencia specifikus szabályozó fehérjék rendszerint a transzkripció kezdőpontja előtti néhányszor tíz nukleotidnyi szabályozó régióban kapcsolódnak. Ennek a szabályozó régióknak központi része a promóter, ahova az RNS polimeráz kötődik. Prokariotákban minden gént ugyan olyan RNS polimeráz ír át, aminek két alfa egy béta és egy béta vessző jelölésű alegységei az un. core enzimet alkotják. Ez önmagában képes poli-ribonukleotid lánc szintézisre, de nem képes megtalálni a gének kezdőpontját. A promóter felismeréshez szükség van a polimeráz ötödik alegységére, a szigma faktorra, ami az előbbi négygel együtt a holo-enzimet alkotja. Szigma faktor többféle is van egy prokariota sejtben és az egyes szigma faktorok, gének különböző csoportjainak átírására teszik alkalmassá a polimerázt. A legáltalánosabban használt gének átírását a szigma 70 alegységet tartalmazó polimeráz végzi. Ez a holoenzim képes felismerni az ilyen génekre jellemző promótereket, amelyeket két nem túl szigorúan meghatározott, egymástól 17 nukleotidra levő, nukleotid hexamer alkot (-10 és -35 régió). Az aktivátorok segítik a polimeráz kapcsolódását a promóterhez, vagy megkönnyítik az RNS szintézis elkezdését. A gátló fehérjék nem engedik a polimeráz kapcsolódását a promóterhez, vagy akadályozzák a polimeráz haladását. Az aktivátorok rendszerint a polimeráz mögött kapcsolódnak a DNS-hez, a gátló hatású faktorok pedig rendszerint a transzkripció kezdőpontjához közelebb eső részen.

Eukariótákban sokkal összetettebb a transzkripció szabályozás: RNS polimeráz is többféle van (I, II és III), amelyek specializálódtak rRNS, mRNS és tRNS molekulák szintézisére. Az egymással szerkezeti rokonságot mutató polimerázok mindegyike 12-14 alegységből épülnek fel és szabályozott működésükhöz még legalább ennyi, de a fehérje géneket átíró Pol II-hoz akár 50-60, további fehérje molekula közreműködése szükséges. Ezek egy része a kromatinszerkezet megváltoztatásában játszik szerepet, más részük segít a promóter felismerésében, egy harmadik csoportjuk pedig szekvencia specifikusan kötődve a DNS-hez, közvetít külső, vagy belső eredetű jelzéseket, fiziológias hatások. Ha a csupasz DNS-t tekintjük, a gének elején, a transzkripció kezdőpontja előtt 100 nukleotidnyi rész alkotja az alap promótert, ahova a polimeráz II általános transzkripciós faktorok (GTF), segítségével kapcsolódik. A TFIIA, B C... jelzésű, esetenként önmagukban is akár tíznél több fehérjéből álló alap transzkripciós faktorok a polimerázzal együtt alakítják ki a promóteren a pre-iniciációs komplexet (PIC). Az alap faktorok kapcsolódása a DNS-hez néhány rövid szekvencia részlet (TATA boks, DRE, INT) felismerésével valósul meg, de kapcsolódásuk egymáshoz és a polimerázhoz is fontos szerepet játszik a promóter felismerésében. A PIC kialakulása még nem jelent szabályozott transzkripciót. Ahhoz további, a promóter közelében (promóter proximálisan) és távoli helyeken kapcsolódó fehérjék hatására van szükség. Ezeknek a fehérjéknek egy része a baktériumok szekvencia specifikus transzkripció szabályozóihoz hasonlóan, rövid DNS szekvencia motívumokhoz kapcsolódik és fejt ki hatását. Az akár több ezer nukleotidnyi távolságból, aktiváló hatást kifejteni képes DNS régió neve enhanszer. A promóter proximálisan és enhancerekben található fehérjét kötő DNS szekvencia motívumokat „response” elemeknek (RE) nevezik, kifejezve, hogy az ezekhez kötődő fehérjék jelzést közvetítenek és kapcsolódásuk a gén transzkripciójának aktiválásával eredményez választ erre a jelzésre (pl. GRE: glükokortikoid response elem, SRE: szérum response elem, CRE: cAMP response elem). A távoli régiókból a szekvencia specifikus transzkripciós faktorok hatásukat adapter és koaktivátor komplexeken át tudják kifejteni, igen gyakran a kromatin szerkezet változásának elősegítésével.

Mint a korábbiakban ez már szerepelt, a kromatin szerkezet és a transzkripció aktivitás szorosan összefügg, az előbbi meghatározza az utóbbit. A hiszton fehérjék szoros kapcsolódása a DNS-hez a nukleoszómban és ezek további kölcsönhatásai, olyan kondenzált kromatin szerkezetet alakítanak ki, ami biztosítja a lineáris kiterjedésében méteres nagyságrendű humán genom DNS összecsomagolását az átmérőjét tekintve öt nagyságrenddel kisebb sejtmag térfogatában. Az összecsomagolt DNS azonban nem ad lehetőséget transzkripcióra. Ehhez a kromatin szerkezet fellazítása szükséges, amit epigenetikai hatások biztosítanak. Epigenetikai a genetikai anyag minden olyan változása, ami öröklődik (egészen pontosan öröklődhet, mint majd látjuk), de nem a nukleotid sorrend megváltozását jelenti. A legfontosabb ilyen változások típusai a DNS metilációja, a kromatin szerkezet hiszton fehérjék cseréjével, módosításával vagy eltávolításával létrejött megváltoztatása, és bizonyos szabályozó RNS molekulák, részleteiben pontosan nem tisztázott úton kifejtett hatása. Fontos annak tisztázása, hogy bár az előbbi három mechanizmus bármelyikével létrejöhet a genetikai anyag állapotában valóban öröklődő változás, az öröklődés generációkon át csak nagyon ritka esetben figyelhető meg, és valójában az epigenetikai hatások génműködés mintázatok beállítását jelentik, ami a szomatikus sejtek

osztódásai során megőrződhet. A megtermékenyített sejt egymást követő osztódásaival kialakuló új egyed szöveteinek differenciálódása is epigenetikai hatásokkal beállított génműködés állapotok létrejöttét és fenntartását jelenti az egyes szövet típusoknak megfelelően. Természetesen a sejt élete során is bekövetkeznek időszakos változások egyes gének működésében és ezeknek a változásoknak a létrejöttében is szerepet játszanak epigenetikai hatások, ez azonban nincs feltétlenül öröklődéssel összekapcsolva.

Transzkripció szabályozásában a legváltozatosabban és legszélesebb körűen érvényesülő epigenetika hatások a nukleoszóma hisztonjainak (H2A, H2B H3 és H4) poszt-transzlációs módosításai. Négy hiszton oktamerje alkotja a nukleoszóma magot, amit közel két teljes feltekeredéssel, 146 pb DNS vesz körbe. A hisztonok N-terminális végeinek 25-35 aminosavnyi része a nukleoszóma felszínén helyezkedik el és hozzáférhető a kromatinhoz kapcsolódó fehérjék számára. A kapcsolódó fehérjék egy része képes metil, acetil, foszfát, ubiquitin SUMO és számos másféle csoporttal módosítani egyes hiszton aminosav oldalláncokat (hiszton kódot írók). A módosítások leggyakrabban lizin, arginin és szerin oldalláncokat érintenek. Hatásukra megváltozhat az oldallánc töltése (pl. szerin foszforiláció, lizin acetiláció) és megváltozik térbeli alakja, aminek hatására módosul a hiszton és DNS kölcsönhatása és a nukleoszómák kapcsolata egymással. Összességében, módosul a kromatin szerkezet. Más fehérjék képesek felismerni a módosított hiszton oldalláncokat (hiszton kód olvasók) és kapcsolódásukkal további módosításokat indítanak, vagy nukleoszómák elmozdítását, esetleg eltávolítását segítik elő. Természetesen léteznek módosításokat eltávolító demetiláz, deacetiláz, foszfatáz, stb enzimek csoportok is, amelyek a hiszton jelzések (hiszton kód) reverzibilitását biztosítják.

Mindennek eredményeként egy-egy eukariota gén transzkripciójának szabályozása rendszerint több tíz fehérje koordinált együttműködésekként alakul ki. E fehérjék a gén transzkripciójának kezdőpontját megelőzően, akár több ezer nukleotid távolságra kiterjedően kapcsolódhatnak a DNS-hez és fejtenek ki hatást. A fehérjék egy részének specifikus nukleotid sorrendekhez van affinitása és ilyenekhez kötődik. Kapcsolódásuk területet biztosít más fehérjéknek olyan módosítások és átalakítások elindítására, amelyek fellazítják a kromatin állományt az adott gén transzkripció kezdőpontja környezetében. Ide aztán kapcsolódhatnak az alap transzkripciós faktorok és segítségével az RNS polimeráz. Az egyes szekvencia specifikus DNS kötő fehérjék jelenlétét és aktivitását a sejtmagban, és hasonlóan a sokféle hiszton kód író, olvasó és kitörülő fehérjék aktivitását metabolikus és a sejthez kívülről érkező jelzések határozzák meg. Ez teszi lehetővé, hogy a sejtben a génműködés mindig megfeleljen a külső és belső környezet igényeinek.