

EFOP-3.4.3-16-2016-00014

Transzkripciós és epigenetikai szabályozás

Kolozsvár

*AP4_TTIK KÁRPÁT-MEDENCEI OKTATÁSI TÉR KIALAKÍTÁSA
ÉRDEKÉBEN TETT TEVÉKENYSÉGEK A TTIK-N
BBTE OKTATÁSI EGYÜTTMŰKÖDÉS*

Boros Imre
egyetemi tanár

SZÉCHENYI  2020



MAGYARORSZÁG
KORMÁNYA

Európai Unió
Európai Szociális
Alap



BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

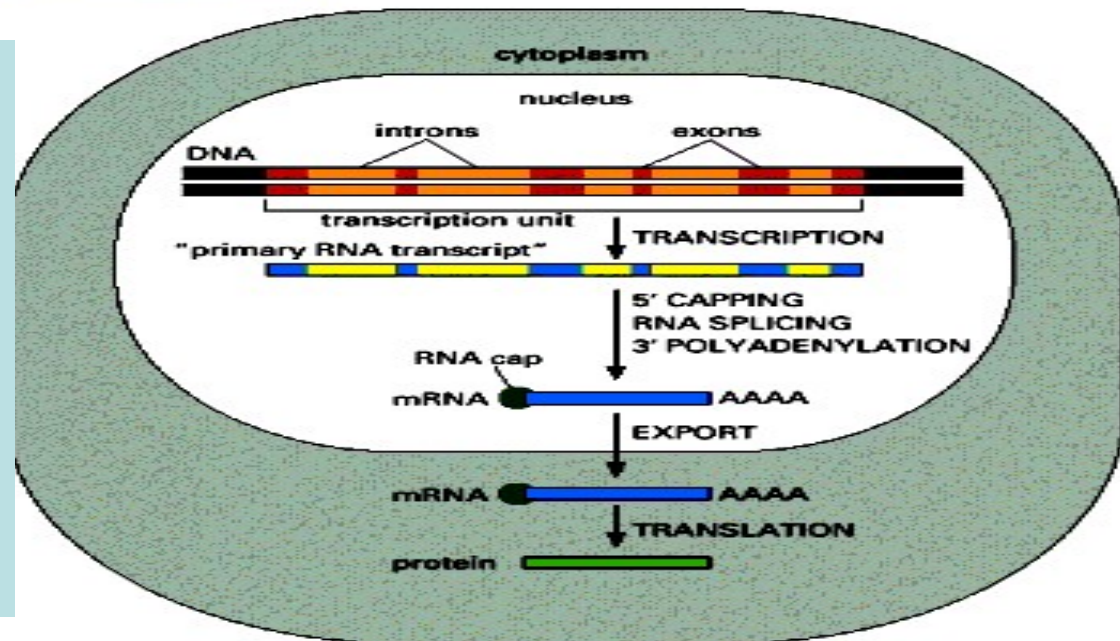
A génextpresszió szabályozás szintjei pro- és eukariotákban

Az átírás és fordítás egy helyben és folyamatosan. A gének a „csupasz” DNS folyamatos kódoló régiói, gyakran közösen szabályozott csoportokba rendeződve

(B) PROCARYOTES



EUCARYOTES

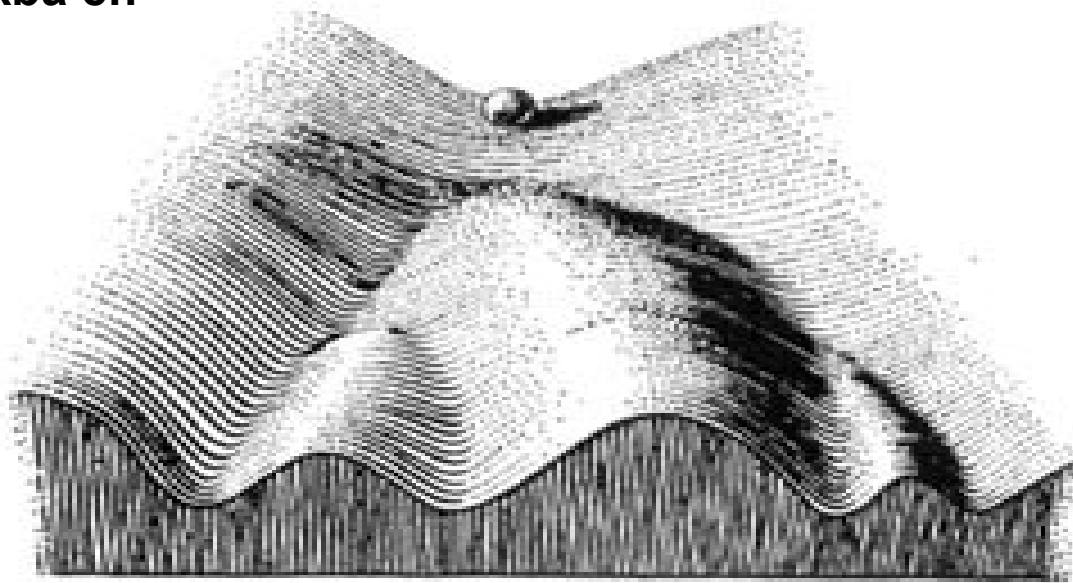


Az átírás és fordítás térben és időben elválasztott. A gének kromatinba csomagolt DNS kódoló és nem kódoló régióiból állnak és többségüknek kiterjedt, esetenként nagyon távol elhelyezkedő szabályozó régiói vannak.

A többsejtű eukariota szervezet egyes sejt típusai jellegzetes, az adott sejt típusra jellemző génműködés mintázatot mutatnak.

Az eukarióta sejt génexpressziós (transzkripciós) programjának megvalósítása azt eredményezi, hogy a megtermékenyített zigótából az ugyanolyan genetikai tartalom ellenére az egyedfejlődés során változatos funkciók ellátására képes sejtek jönnek létre.

A differenciálódás során a sejt különböző utakon haladva eltérő végállapotokba ér.



Mi határozza meg a golyó útját?

Mennyire meghatározott?

Visszafordítható?

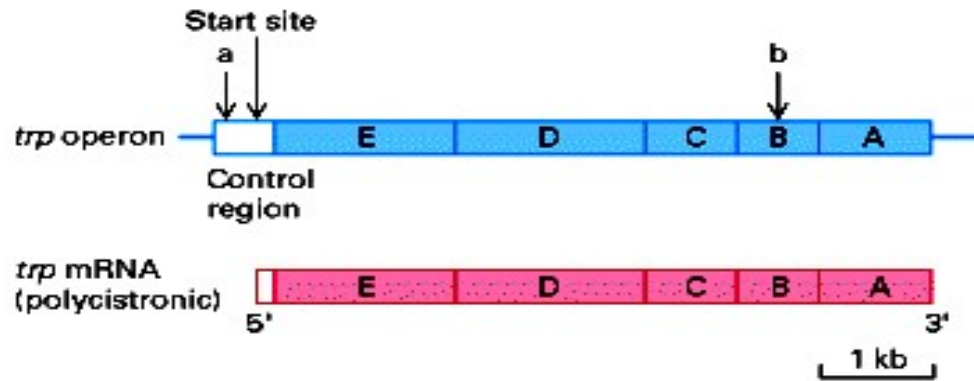
Mi biztosítja a gének egyes csoportjainak működését, ki és bekapcsolását?

???

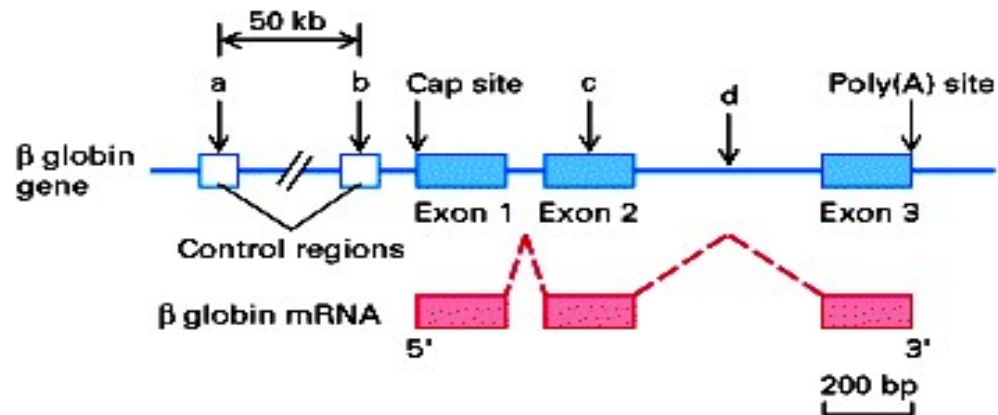
HOGYAN SZABÁLYOZÓDIK A TRANSZKRIPCIÓ ?

A pro- és eukariota gének szerveződése eltérő

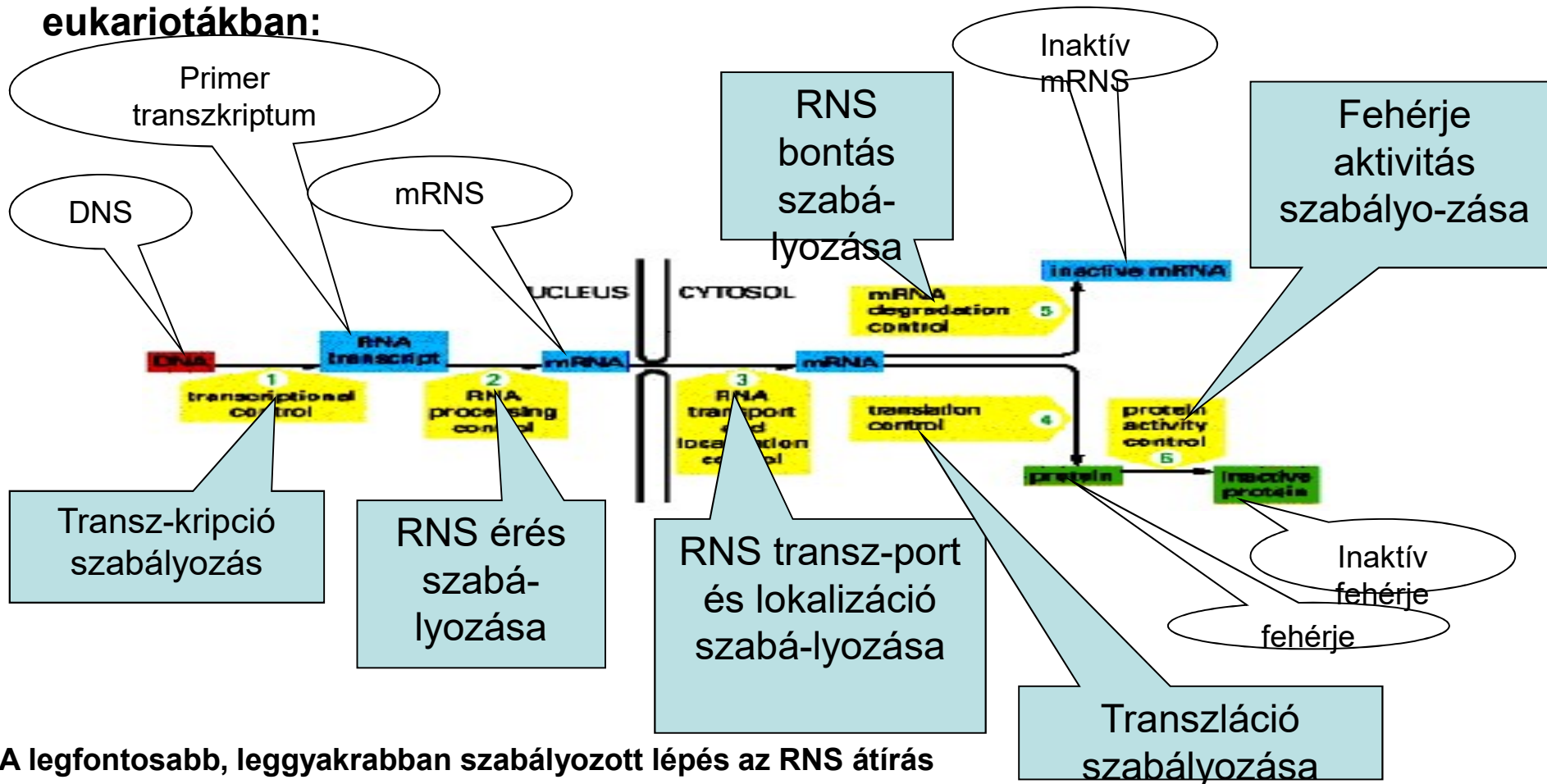
(a) Prokaryotic polycistronic transcription unit



(b) Eukaryotic simple transcription unit



A génexpresszió lehetséges szabályozási szintjei eukariotákban:



A legfontosabb, leggyakrabban szabályozott lépés az RNS átírás kezdete, transzkripció iniciáció.

A szabályozás alapja mindig DNS és fehérjék kölcsönhatása.

A szabályozás megértéséhez beszélni kell: az enzimről ami RNS-t szintetizál, a fehérjéről, amelyek módosítják a működését, a DNS szerkezet alkotta jelzésekről, és a DNS becsomagolásról, ami a jelzéseket elfedi, vagy hozzáférhetővé teszi.

Eukarióta sejtek RNS polimerázai:

Pol I (pol a) (RNAPI) Rpa alegységek

Pol II (pol b) (RNAPII) Rpb alegységek

Pol III (pol c) (RNAPIII) Rpc alegységek

(Organellumok (mitokondrium, kloroplaszt RNS polimerázai)

Mindegyikben 12-16 alegység. Tömegük > 500kD.

4-5 alegység hasonló a bakteriális pol alegységeihez.

5-6 további közös mind a három sejtmagi polimerázban és 4-7 további specifikus az egyes polimerázokra.

Biokémiai elkülönítésük alapja:

érzékenységük alfa amanitin oktapeptidre

Pol II – kis koncentrációban, gyorsan inaktiválja,

Pol I - nem érzékeny,

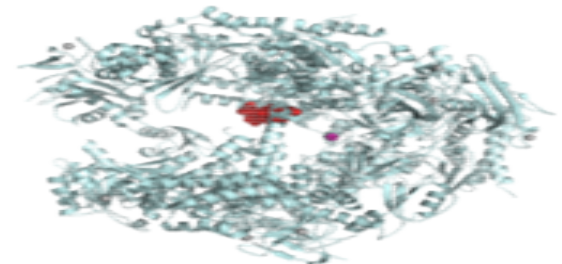
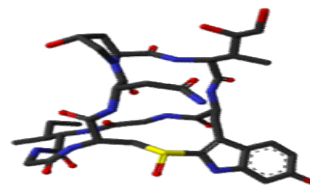
Pol III - átmeneti érzékenységet mutat.

Funkcionális különbségeik: az átírt gének

Lokalizációjuk:

Pol I és Pol III nukleolusz

Pol II: nukleoplazma

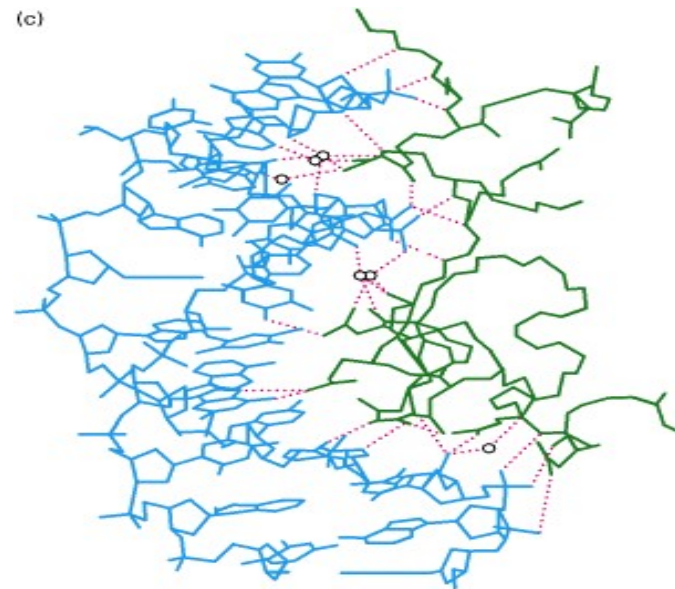
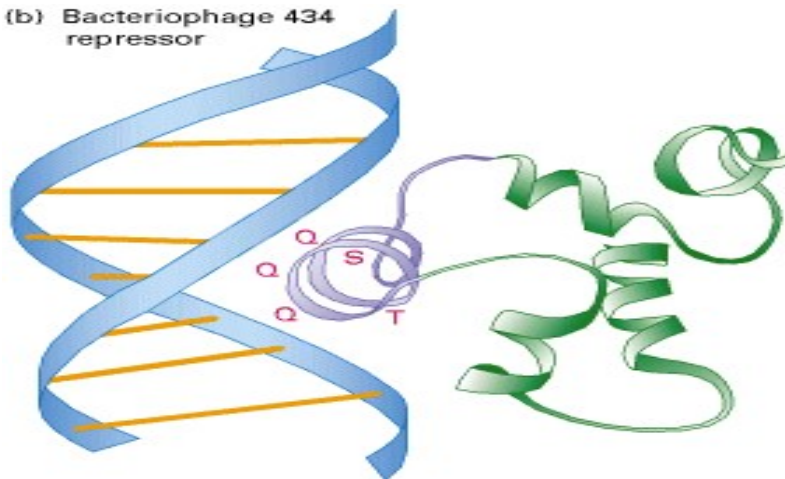


Szekvencia specifikus transzkripciós faktorok (TF)

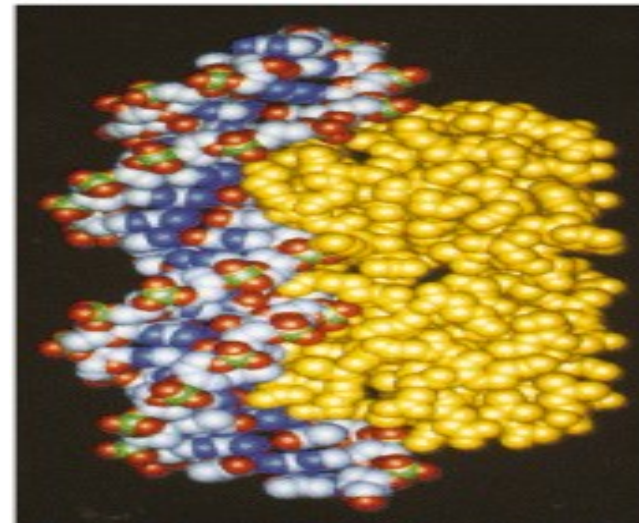
Nem kovalens DNS-fehérje kötődés. DNS felismerés a nagyárokban, 5-6 nukleotidos felismerési szekvencia (RE), leggyakrabban egy alfa-hélix részlet fekszik be a nagyárokba és néhány aminosav oldallánc képez bázis specifikus kölcsönhatásokat. A fehérje rendszerint dimer – a felismerési hely ismétlődő, vagy palindrom szekvencia. A transzkripciós faktornak elkülönülő DNS kötő, dimerizációs és más fehérjével kölcsönható, aktiváló (esetleg még ligand, vagy hormonkötő) doménjai vannak.

Hasonló szerkezetű DNS kötő domént tartalmazó transzkripciós faktor családok léteznek

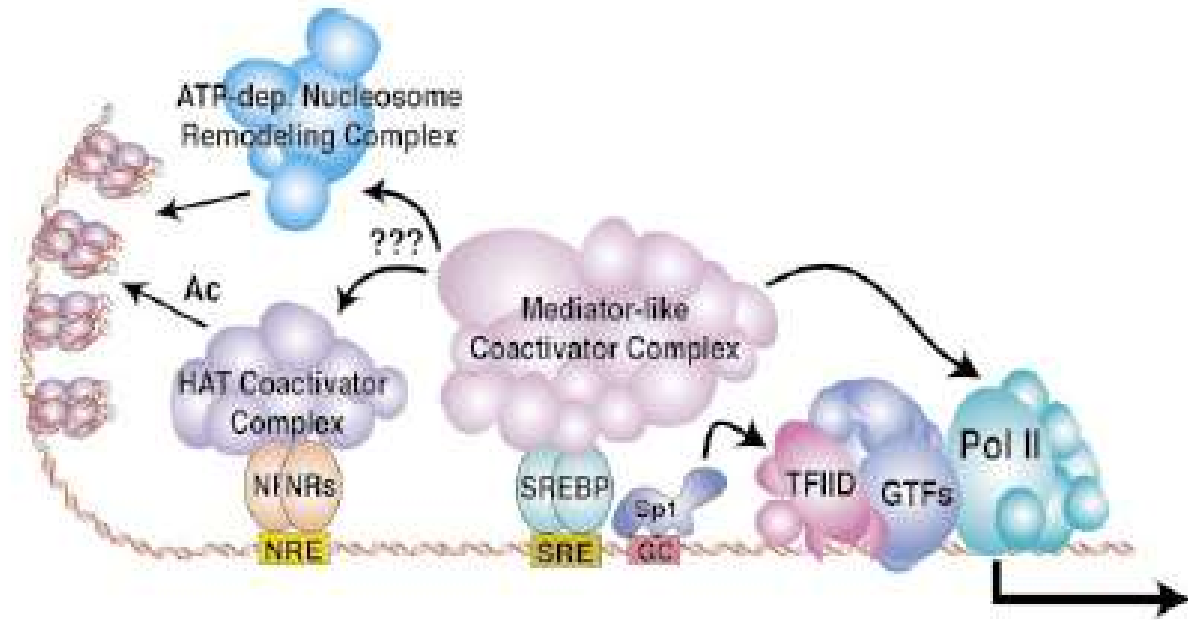
(b) Bacteriophage 434 repressor



(a)



A transzkripció
közreműködői
eukariota
sejtekben:



**Kiterjedt (akár több tíz, vagy több száz kb-ra kiterjedő)
szabályozó szekvenciák,
kromatinba csomagolt DNS**

A legáltalánosabb cisz szabályozó részek:

**Core-promoter a start körül +/- 20-50 nukleotidra (TATA,
INR, DPE, ...)**

Promoter proximális kötőhelyek (kb. -200 –ig)

Disztális elemek (akár messze távol -10 000)

A cisz elemek (DNS, RNS?) szolgálnak kötőhelyekként a transz-hatású szabályozóknak (fehérjék, RNS)

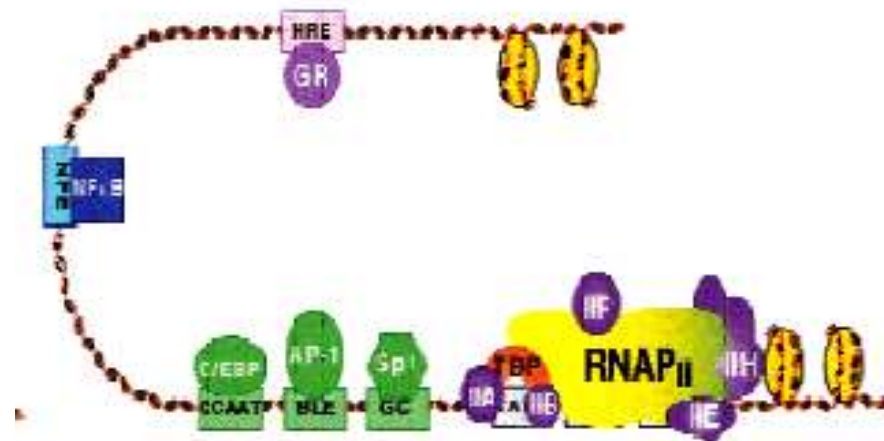
Az alap transzkripció apparátus komponensei:

RNS polimeráz (RNAP II, Pol II) és

Általános transzkripció faktorok (GTF: TFIIA, TFIIB, TFIID,...)

A promoter proximális részen gyakran SP1, AP-1, C/EBP kötőhelyek, kicsit távolabb: RE = response elemek

B



**Isolation of Activators and
the Basal Machinery**

Ko-aktivátorok

Olyan fehérjék, amelyek rendszerint nem specifikus DNS szekvenciához kapcsolódnak, hanem az alap transzkripciós faktorokkal létesítenek kölcsönhatásokat (a transzkripciós apparátust három dimenziós kiterjedésűvé teszik)

TAFs = TBP associated factors (12 or more)

TBP : TATA binding protein

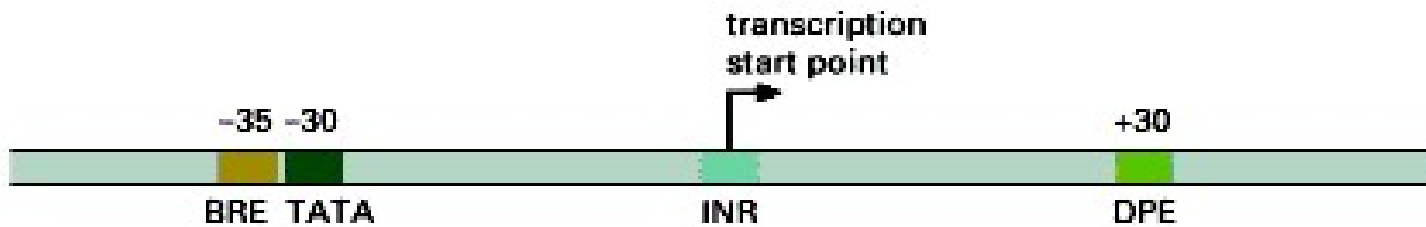
TBP + TAFs = TFIID

A TAF fehérjék szerepe, hogy az alap transzkripciós faktorok és a távolabb kapcsolódó szekvencia specifikus faktorok közötti kapcsolatot biztosítják.



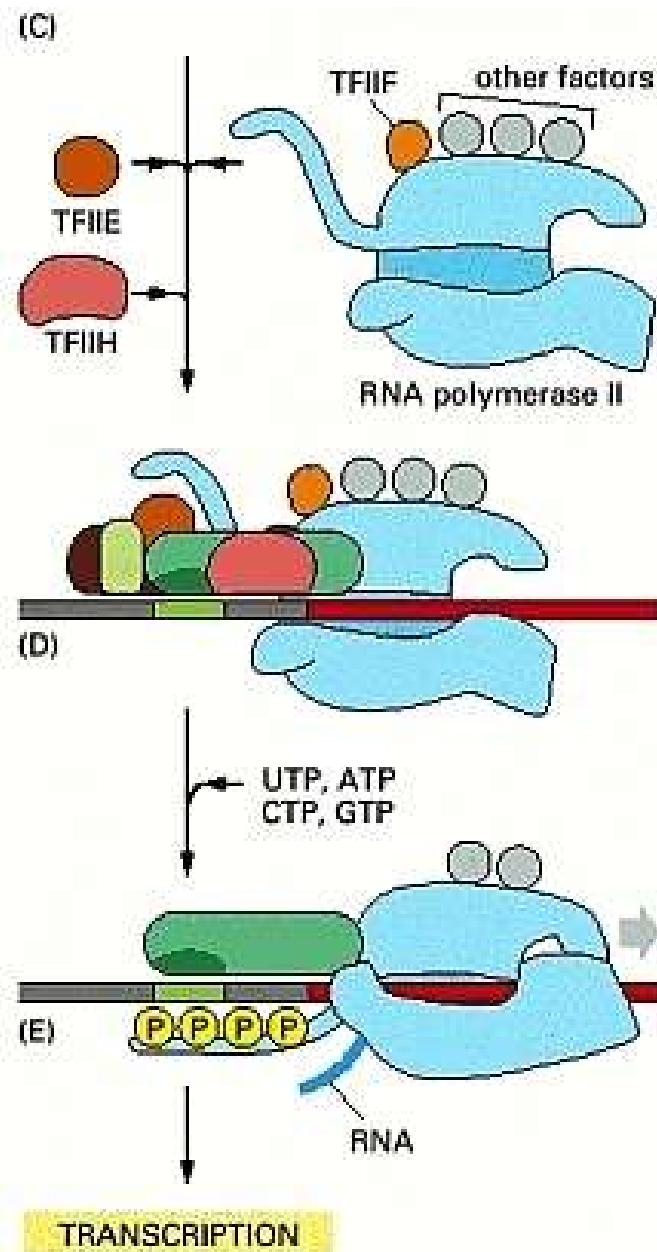
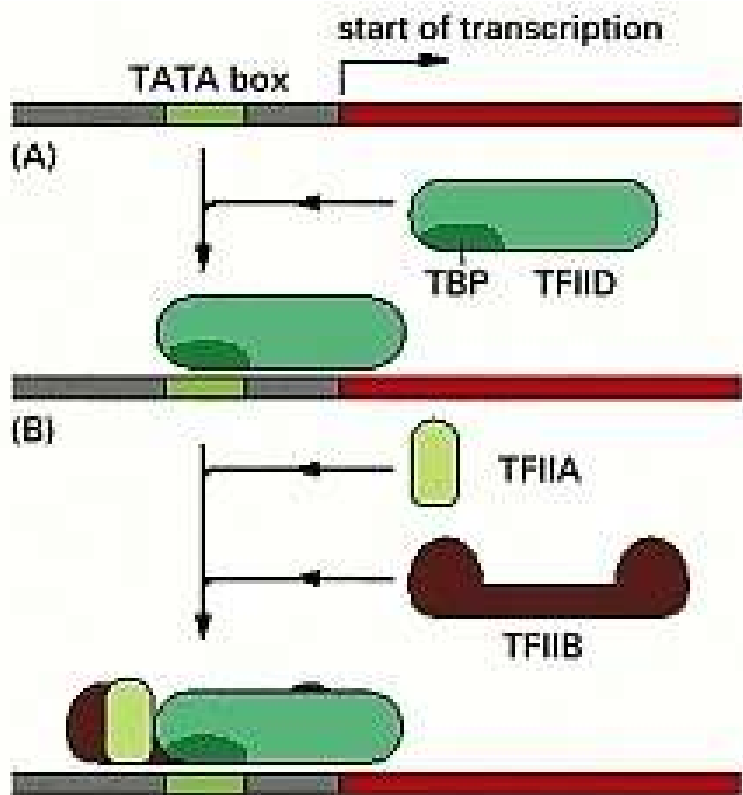
Discovery of Co-Activators

A leggyakoribb alap promoter konszenzus szekvenciák:

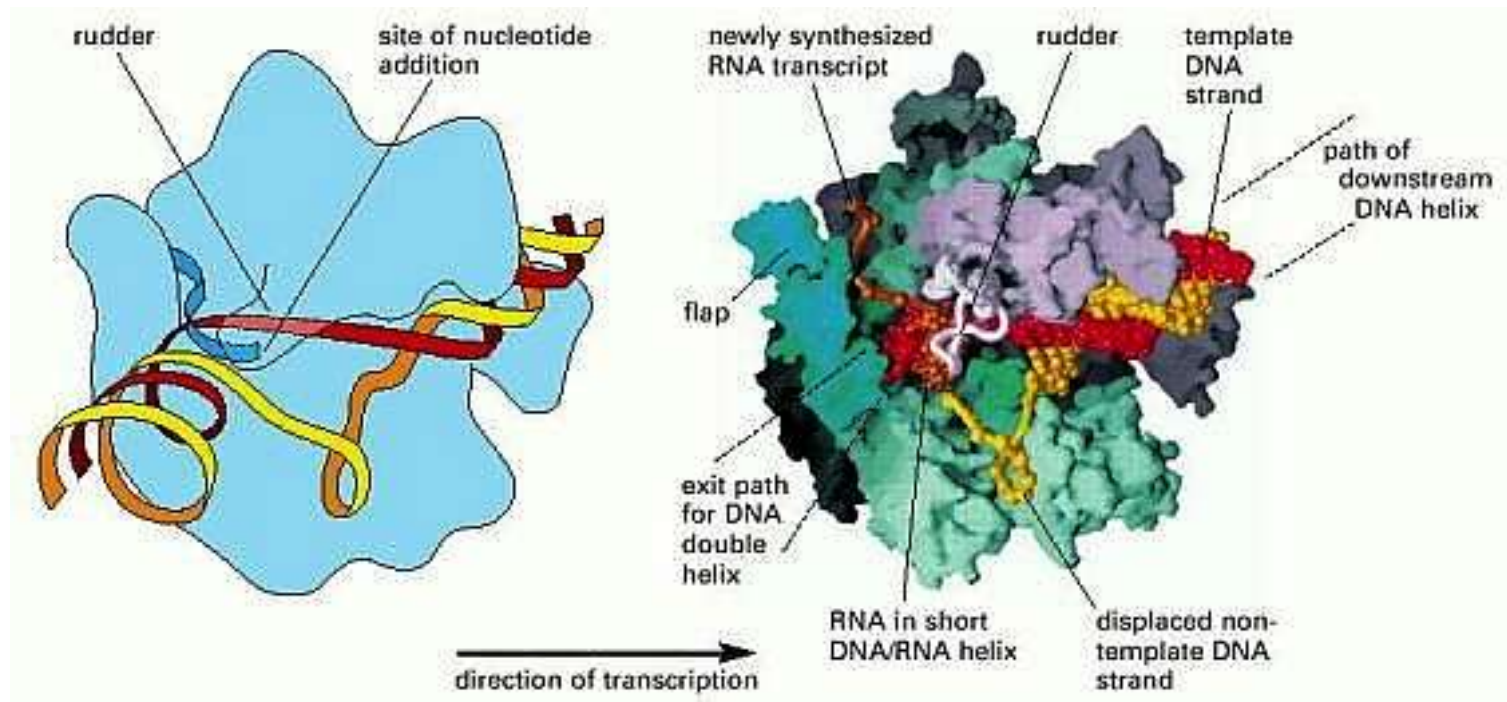


element	consensus sequence	general transcription factor
BRE	G/C G/C G/A C G C C	TFIIB
TATA	T A T A A/T A A/T	TBP
INR	C/T C/T A N T/A C/T C/T	TFIID
DPE	A/G G A/T C G T G	TFIID

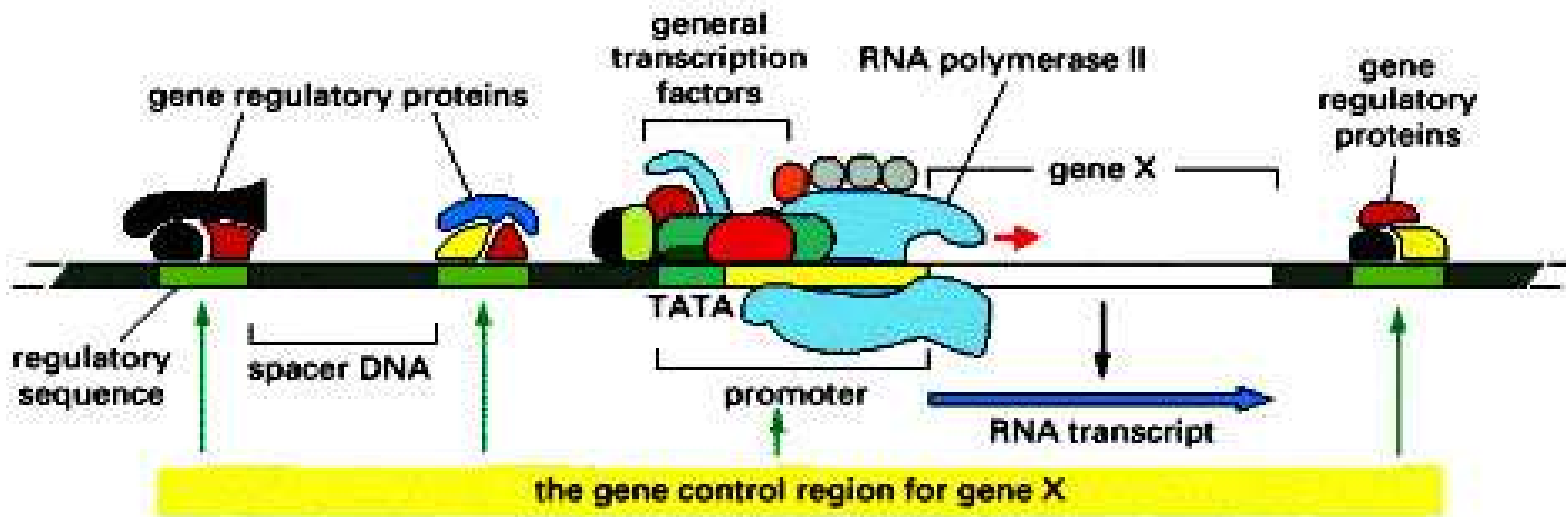
A pre-iniciációs komplex képződésének lépései (PIC: pre-initiation complex)



A polimeráz egy DNS-t kitekerő RNS-t folyamatosan építeni képes nanogépezet.
(R. Kornberg Nobel díj)

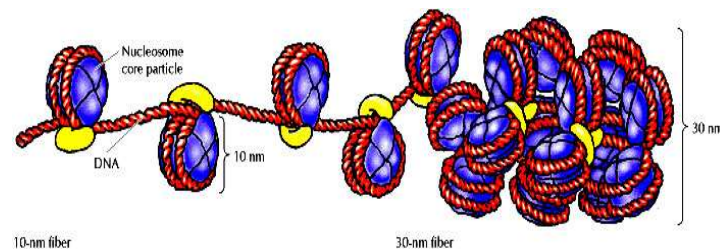
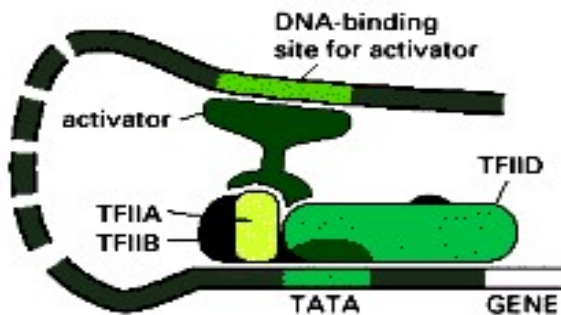


Az összeszerelő transzkripció apparátus egyszerűsített szerkezete egy szabályozandó génen



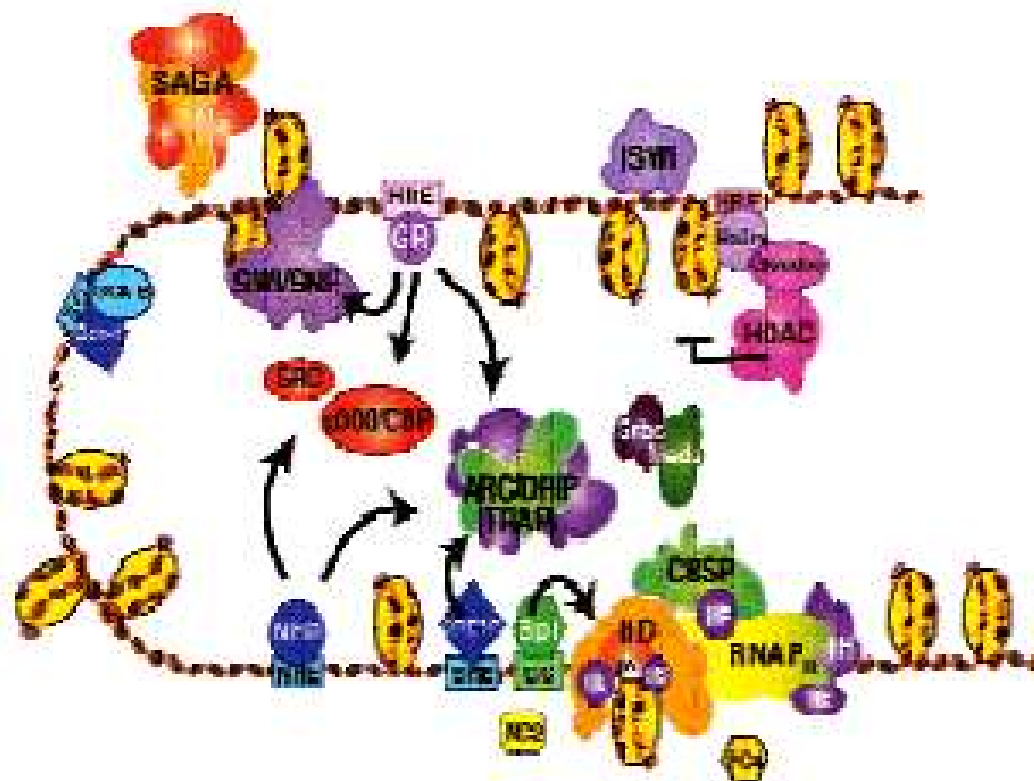
De: a szabályozó elemek egy része távolról hat

A DNS kromatin szerkezetben van

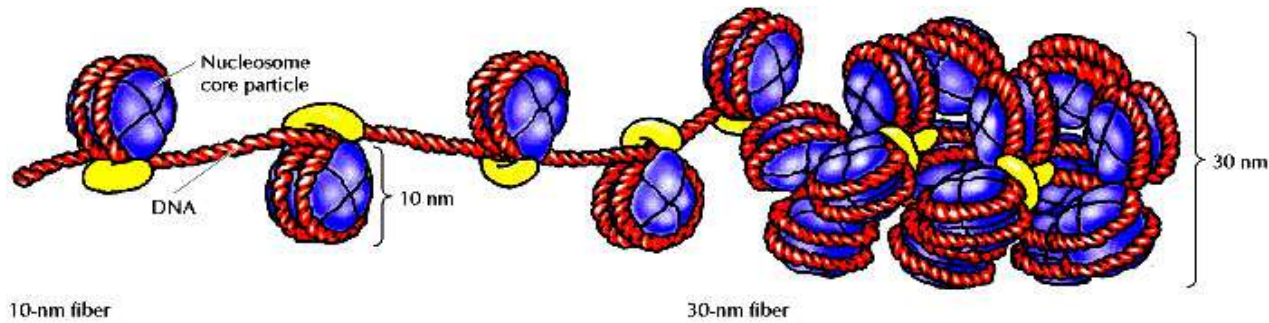


További ko-aktivátorok/mediatorok/adapterek, amelyekkel feloldhatók a nehézségek:

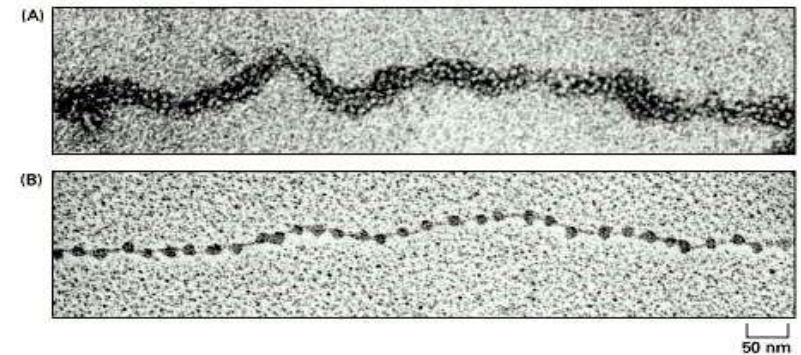
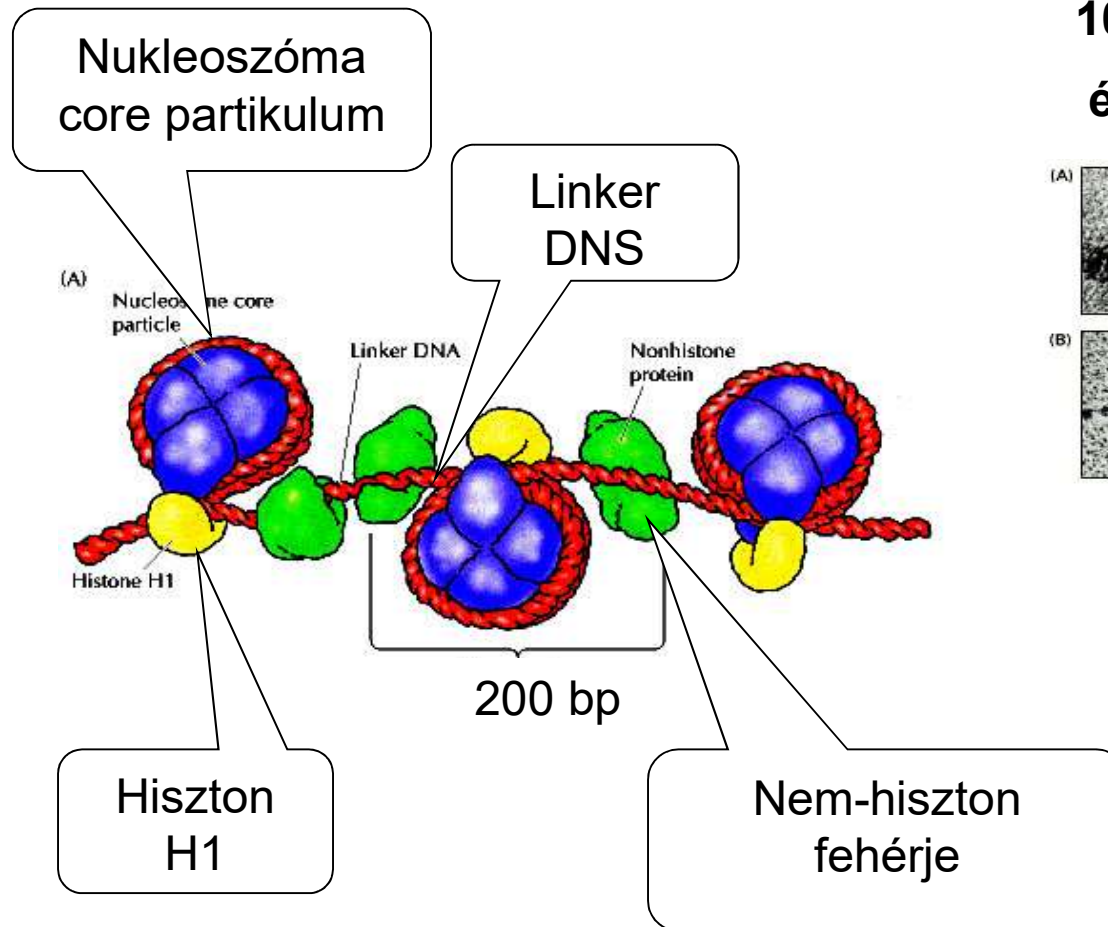
Hiszton módosító és kromatin átrendező (remodelling) komplexek

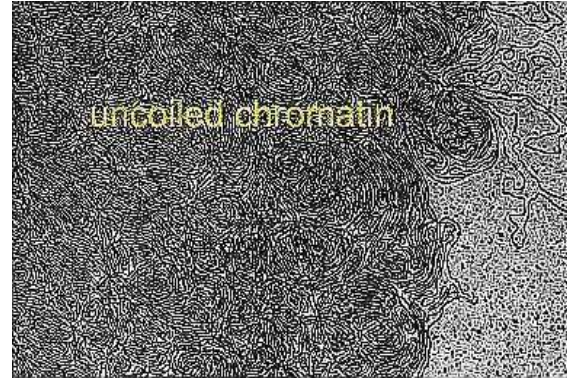
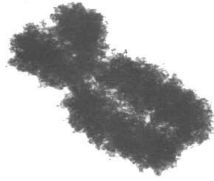
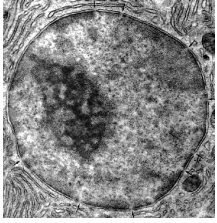


Diversity of Co-Regulators



10 nm-es rost (gyöngyfüzér) és 30 nm-es rost (szolenoid)





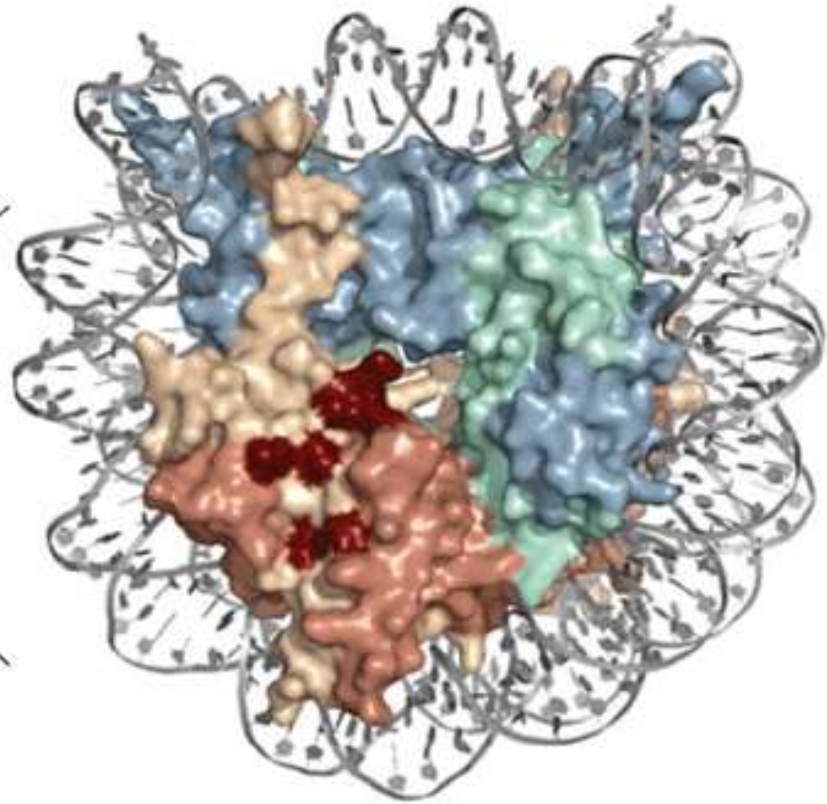
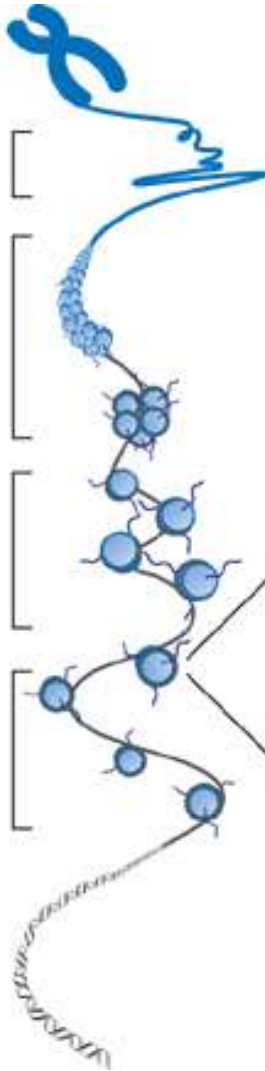
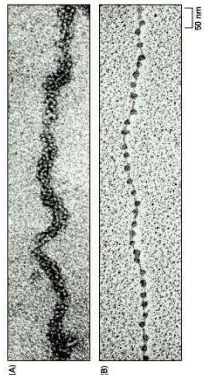
3° structures
(inter-fiber contacts)

Maximum folded
2° structures
(e.g., 30-nm
chromatin fiber)

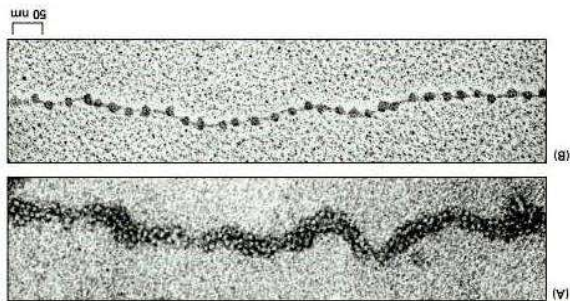
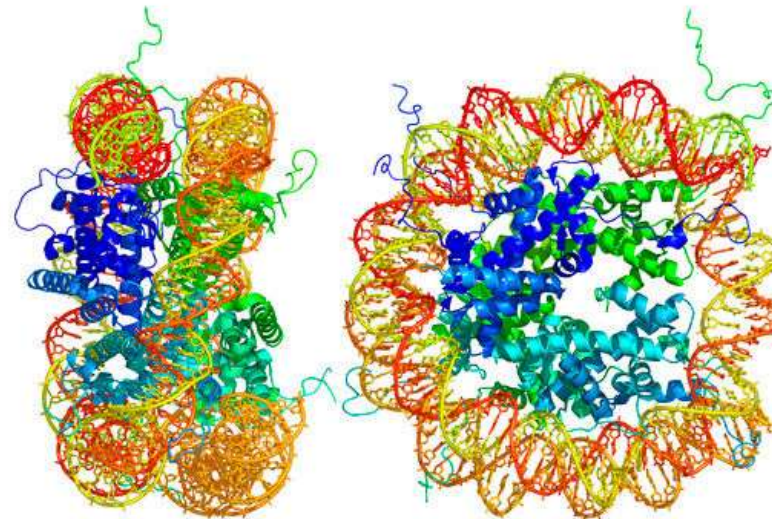
Moderately
folded 2°
structures

Extended
nucleosome
arrays

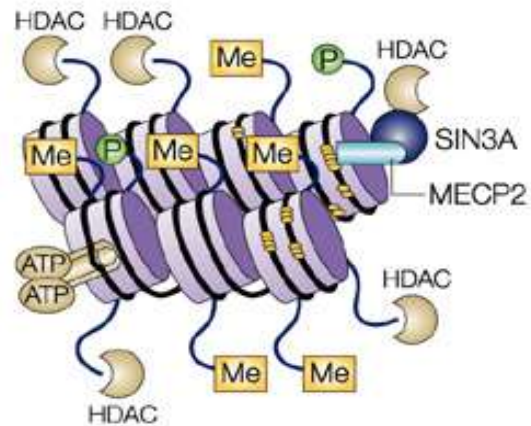
DNA



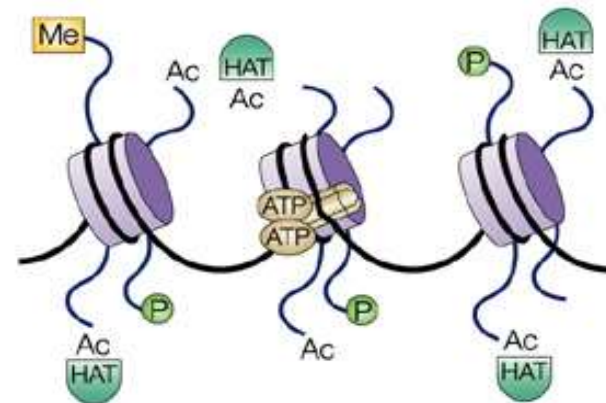
A hisztonok poszt-transzlációs módosítása szabályozza a kromatin állapotot (kondenzált/relaxált, zárt/nyitott kromatin, transzkripciósan inaktív/aktív állapot)



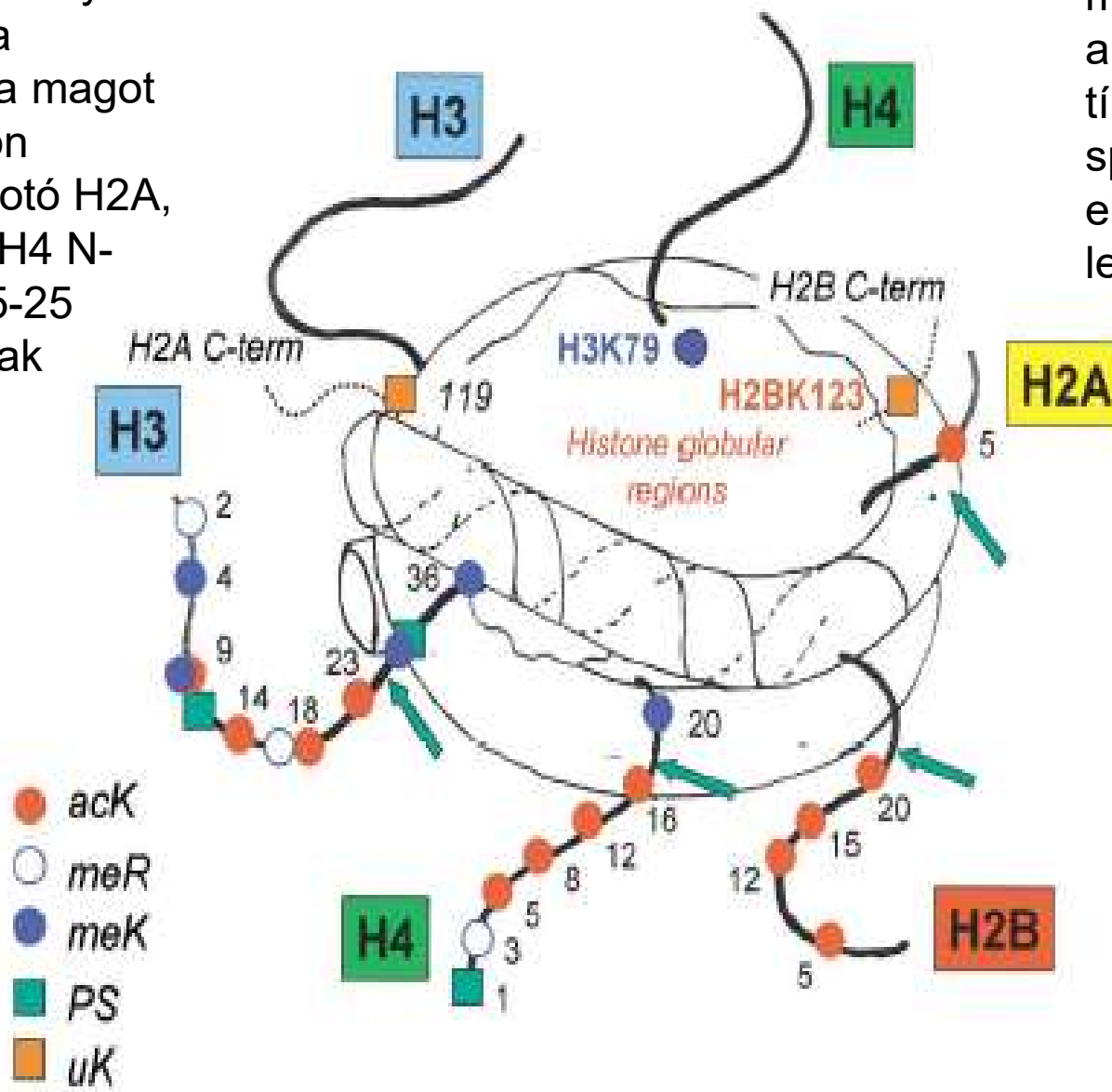
a Closed chromatin: transcriptional repression



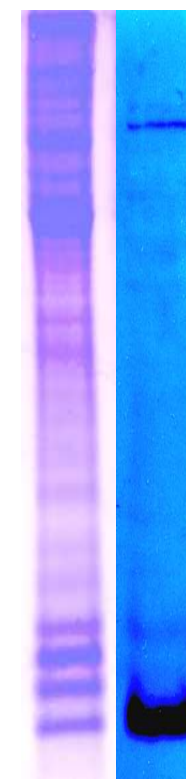
b Open chromatin: transcriptional activation



A hiszton módosítások helyei elsősorban a nukleoszóma magot képző hiszton oktamert alkotó H2A, H2B, H3 és H4 N-terminális 25-25 aminosavának oldalláncai



A legtöbb hiszton módosítást a módosítás típusára és helyére specifikus ellenanyaggal ki lehet mutatni.



Hiszton módosítások típusai

(nincs, vagy van töltés módosulás,
kis, vagy nagy méretű csoport,
mono-, di-, trimetil,
szimmetrikus és aszimmetrikus elrendezésben)

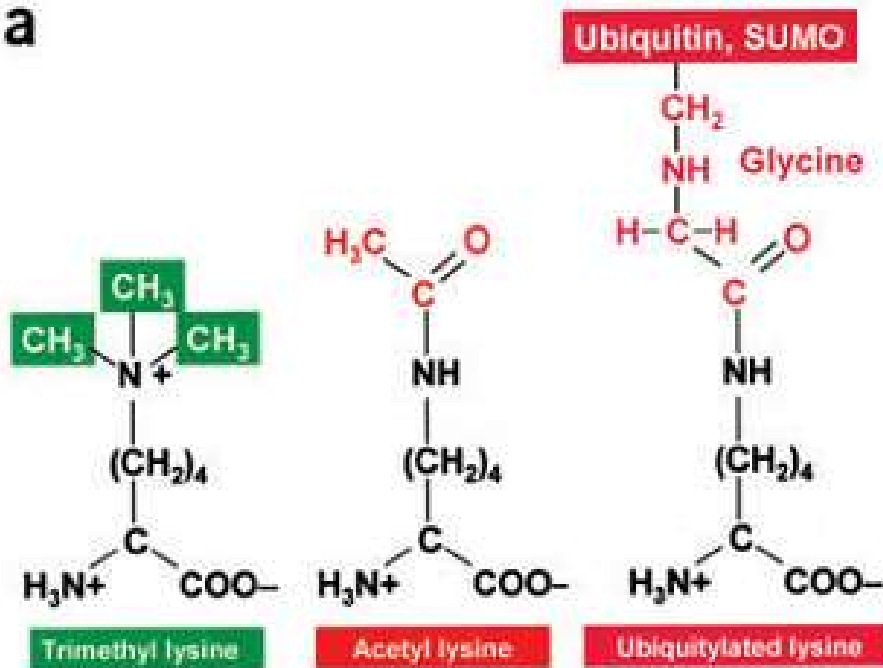
Fél élet idő:

acetiláció: percek

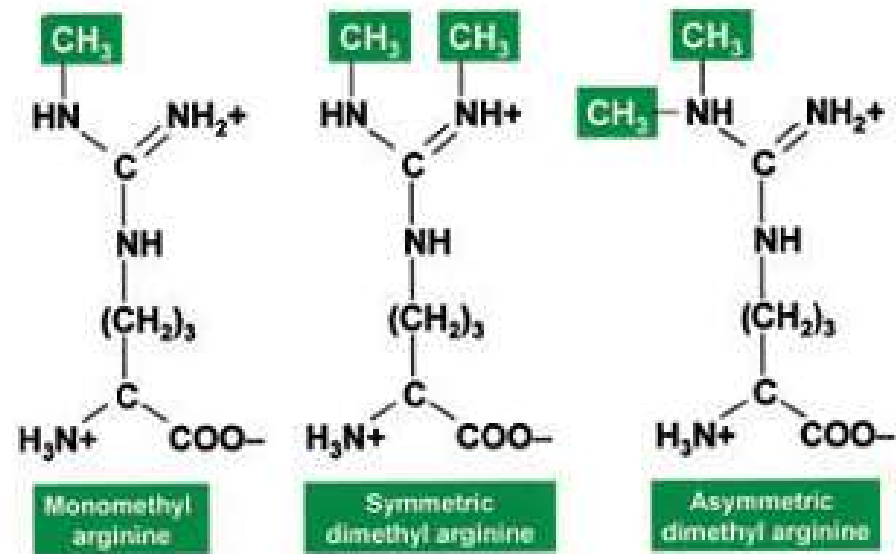
foszforiláció: órák

metiláció: napok

a



b



60 target, 10 módosító csoport, 110 féle módosítás

2000: Histone code

A módosítások kombinációja egy kódot jelent

(de mi a kód:

hely, idő, sorrend,...?)

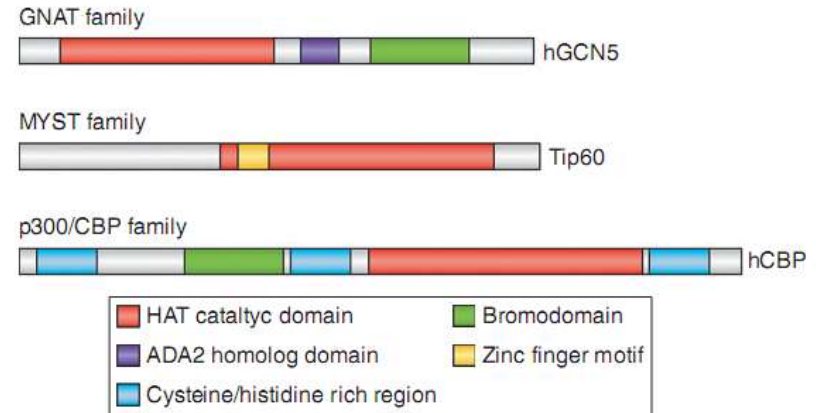
	N termini	Modification state	Associated protein/module	Function
H3	Residue: 1 4 9 10 14 18 23 28 N —————	Unmodified	Sir3/Sir4/Tup1	Silencing
	N ————— (green flag at 14)	Acetylated	Bromodomain	Transcription
	N ————— (green flag at 9)	Acetylated	?	Histone deposition?
	N ————— (white circles at 10 and 28)	Phosphorylated	SMC/ Condensins?	Mitosis/meiosis
	N ————— (white circle at 10, green flag at 14)	Phos/acetyl	?	Transcription
	N ————— (green hexagons at 4, 9, 28)	Methylated	?	Transcription?
	N ————— (green hexagons at 4, 9, 28; white circle at 10; green flag at 14; white square with ? at 23)	Higher-order combinations	?	?
	N ————— (green flags at 8 and 16)	Acetylated	?	Transcription
H4	N ————— (green flags at 5 and 12)	Acetylated	RCAF?	Histone deposition
	N ————— (white circles with ? at 7 and 27)	Phosphorylated	?	Mitosis
CENP-A	N ————— (residues 7, 17, 27)	Phosphorylated	?	Mitosis

A módosításokat létrehozó fehérjék a hiszton kódot írók.

PI. HAT enzimek:

A (mag) és B (citoplazma) típus.

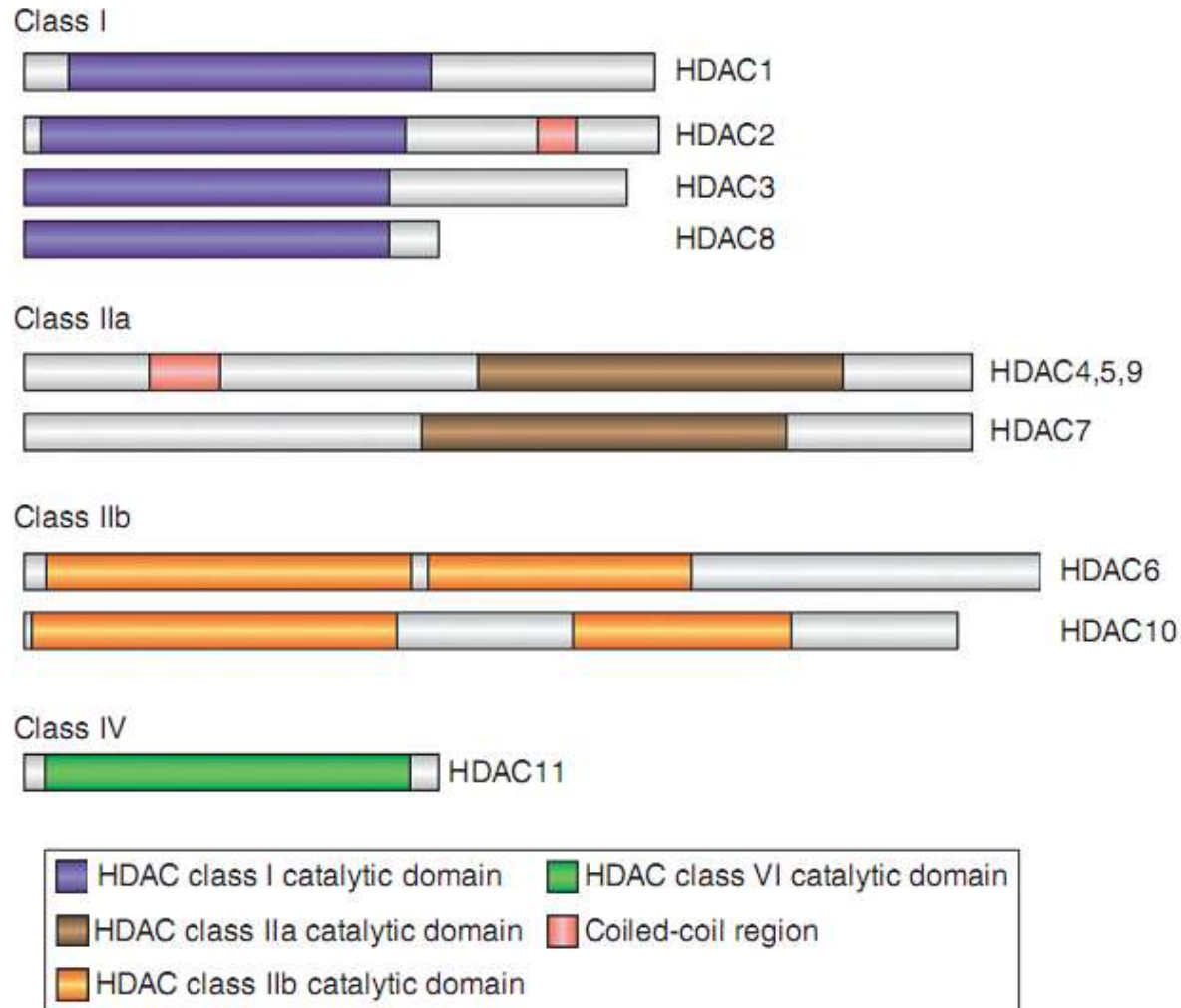
**Rendszerint komplexben,
a specifitást a többi alegység
szabályozza.**



Acetyltransferase

HAT1	H4 (K5, K12)
CBP/P300	H3 (K14, K18) H4 (K5, K8) H2A (K5) H2B (K12, K15)
PCAF/GCN5	H3 (K9, K14, K18)
TIP60	H4 (K5, K8, K12, K16) H3 K14
HB01 (ScESA1, SpMST1)	H4 (K5, K8, K12)
ScSAS3	H3 (K14, K23)
ScSAS2 (SpMST2)	H4 K16
ScRTT109	H3 K56

**A módosítás akkor szolgálhat jelzésként ha dinamikusan változtatható.
Azaz vannak hiszton kódot kitörölő (radírozó) fehérjék:
PI. hiszton de-acetilázok.**

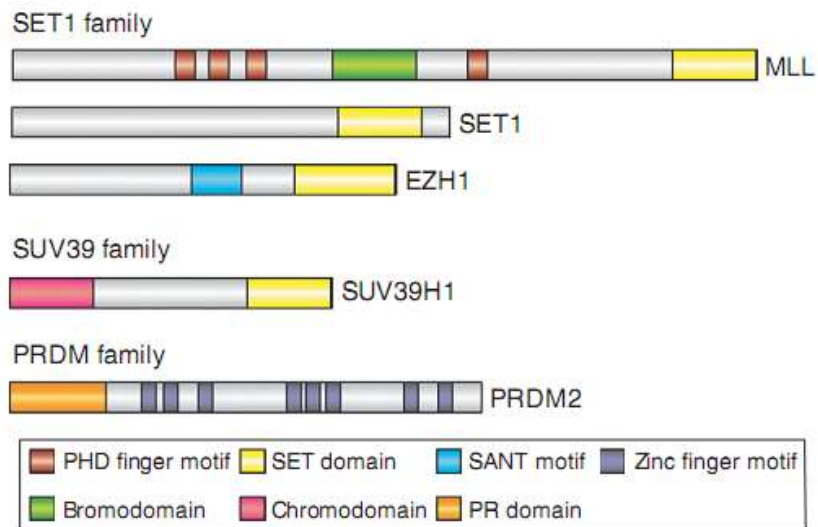


Hiszton metil-transzferázok

Lysine
Methyltransferase

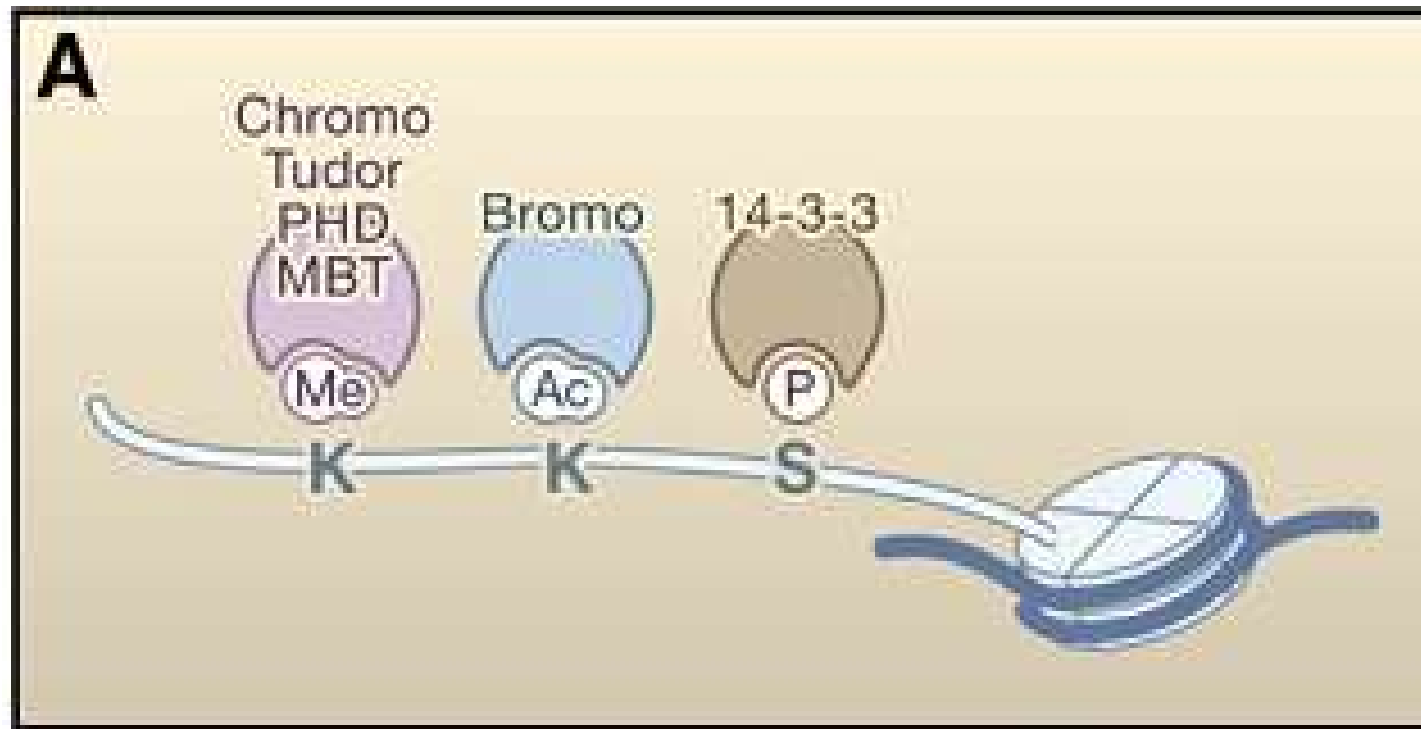
SUV39H1	H3K9
SUV39H2	H3K9
G9a	H3K9
ESET/SETDB1	H3K9
EuHMTase/GLP	H3K9
CLL8	H3K9
SpClr4	H3K9
MLL1	H3K4
MLL2	H3K4
MLL3	H3K4
MLL4	H3K4
MLL5	H3K4
SET1A	H3K4
SET1B	H3K4

ASH1	H3K4
Sc/Sp SET1	H3K4
SET2 (Sc/Sp SET2)	H3K36
NSD1	H3K36
SYMD2	H3K36
DOT1	H3K79
Sc/Sp DOT1	H3K79
Pr-SET 7/8	H4K20
SUV4 20H1	H4K20
SUV420H2	H4K20
SpSet 9	H4K20
EZH2	H3K27
RIZ1	H3K9

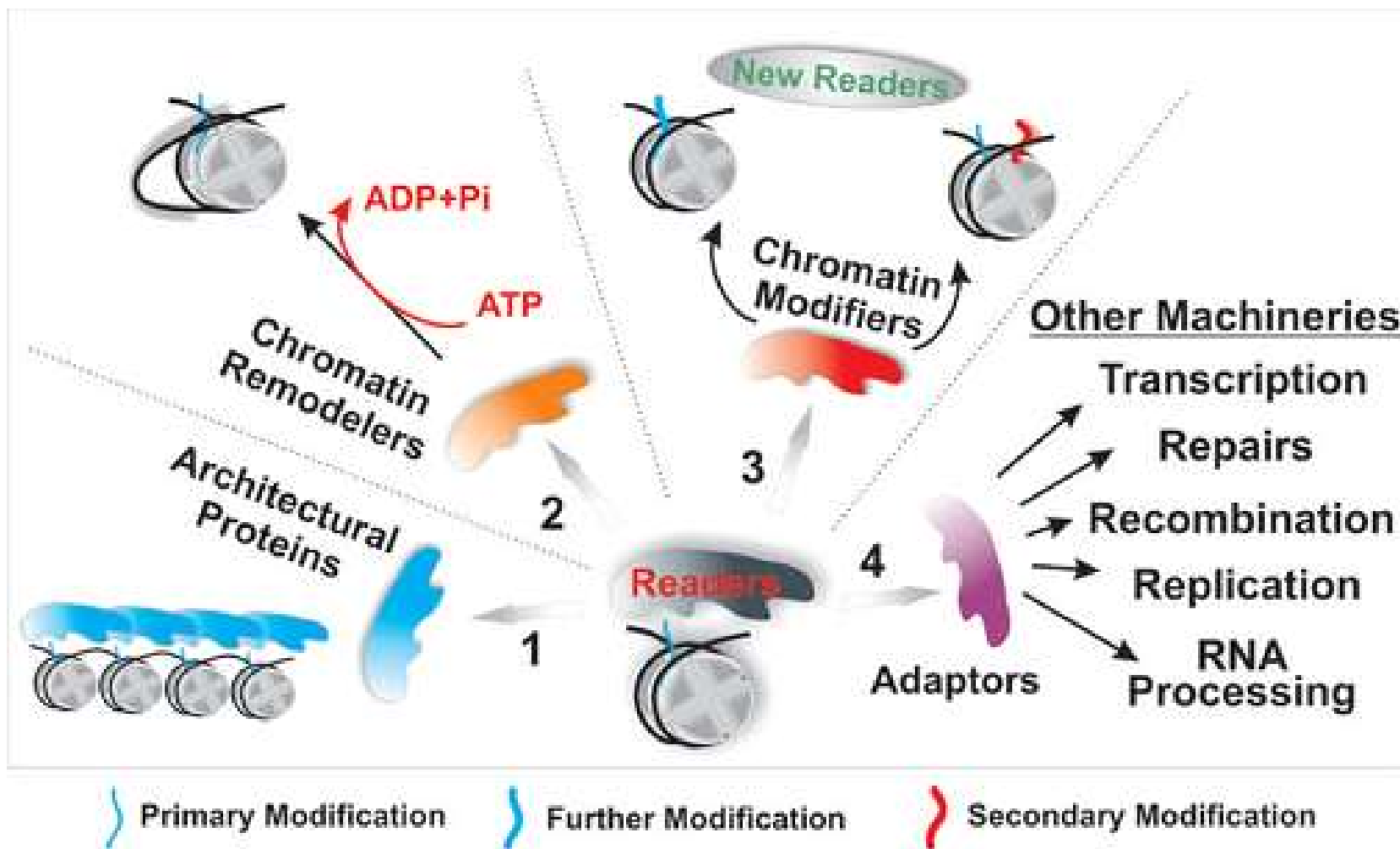


A hiszton kódot „olvasó” fehérjék a módosított hiszton oldalláncokat felismerő fehérje doméneket tartalmaznak:

Pl.:



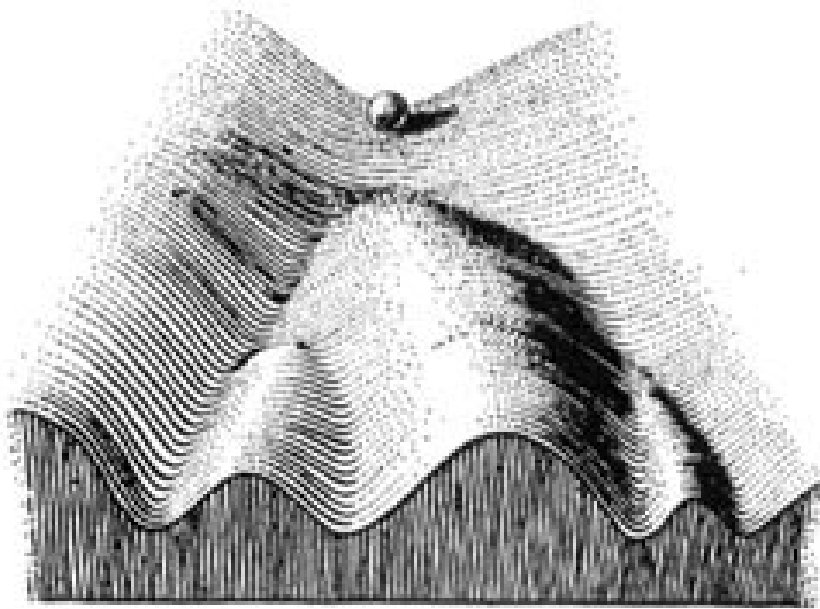
A módosítások együttesen gyakorlatilag minden folyamatot befolyásolnak, ami a kromatinon zajlik. Részben azért, mert közvetlen szerkezetet módosító hatásuk van, részben azért mert jelzésként szolgálnak más módosító, szerkezetet alakító, vagy egyéb folyamatban résztvevő (adaptor) fehérjének ill. fehérjék együtteseinek.



Epigenetika

Az egyedtet alkotó sejtek genetikai anyaga megegyező, a differenciálódás során mégis eltérővé válnak.

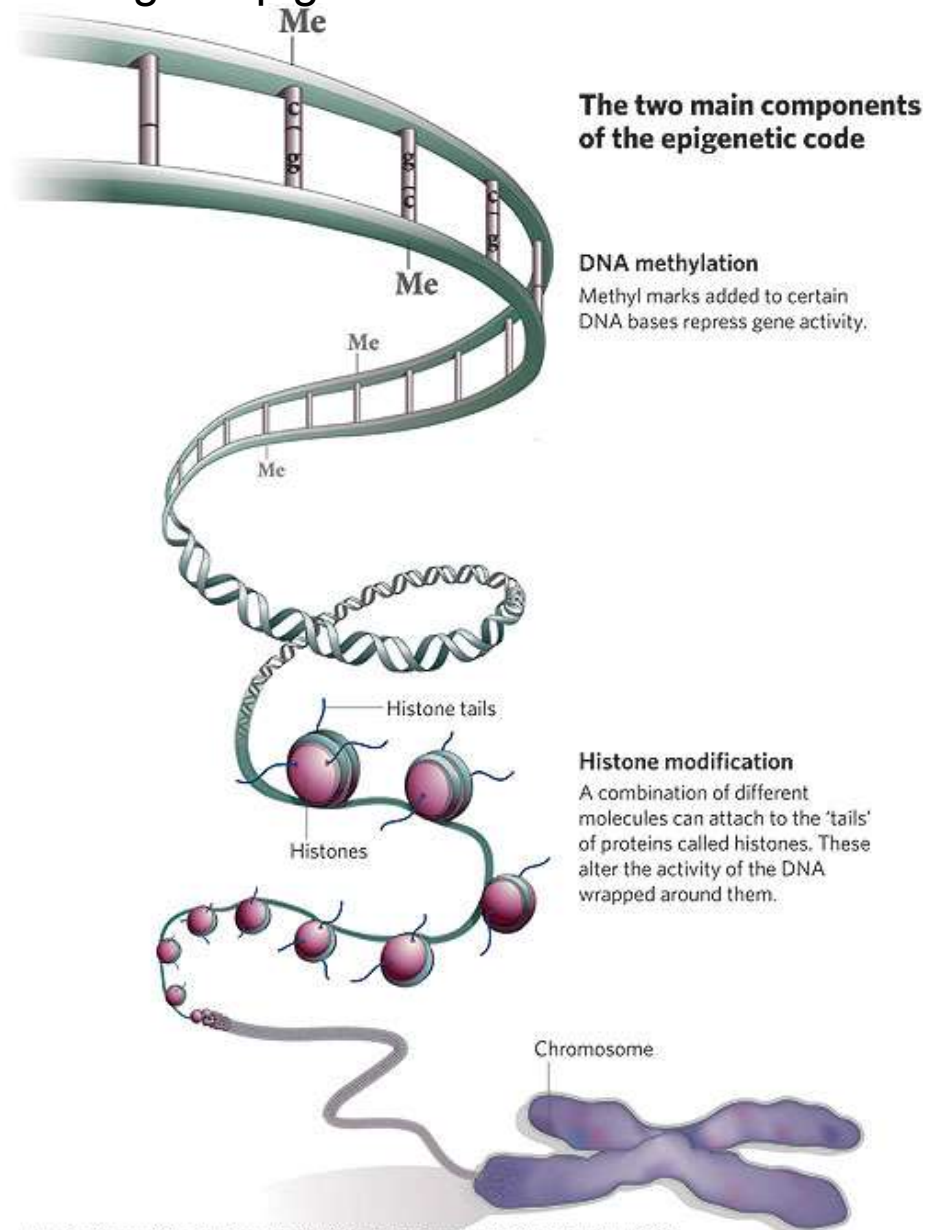
Waddington epigenetikai tájképe (1957):



Conrad Hal Waddington
1905-1975

Az eltérő differenciálódási út egy eltérő génexpressziós program végrehajtásának eredménye. Ezt pedig a kromatin állapot határozza meg!

Epigenetikai kód: a kromatin módosítások összessége - epigenom



Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd.: Epigenetics Unfinished Symphony c2006

Nem az aminosav kód jelentését érintő
DNS módosítások
(pl. citozin metiláció)

A DNS hozzáférhetőségének, értelmezhetőségének változásai

nukleoszómák típusa –
hiszton variánsok

nukleoszómák jelzései –
hiszton módosítások
(egy részük !)

nukleoszómák helyzete

ncRNS-ek

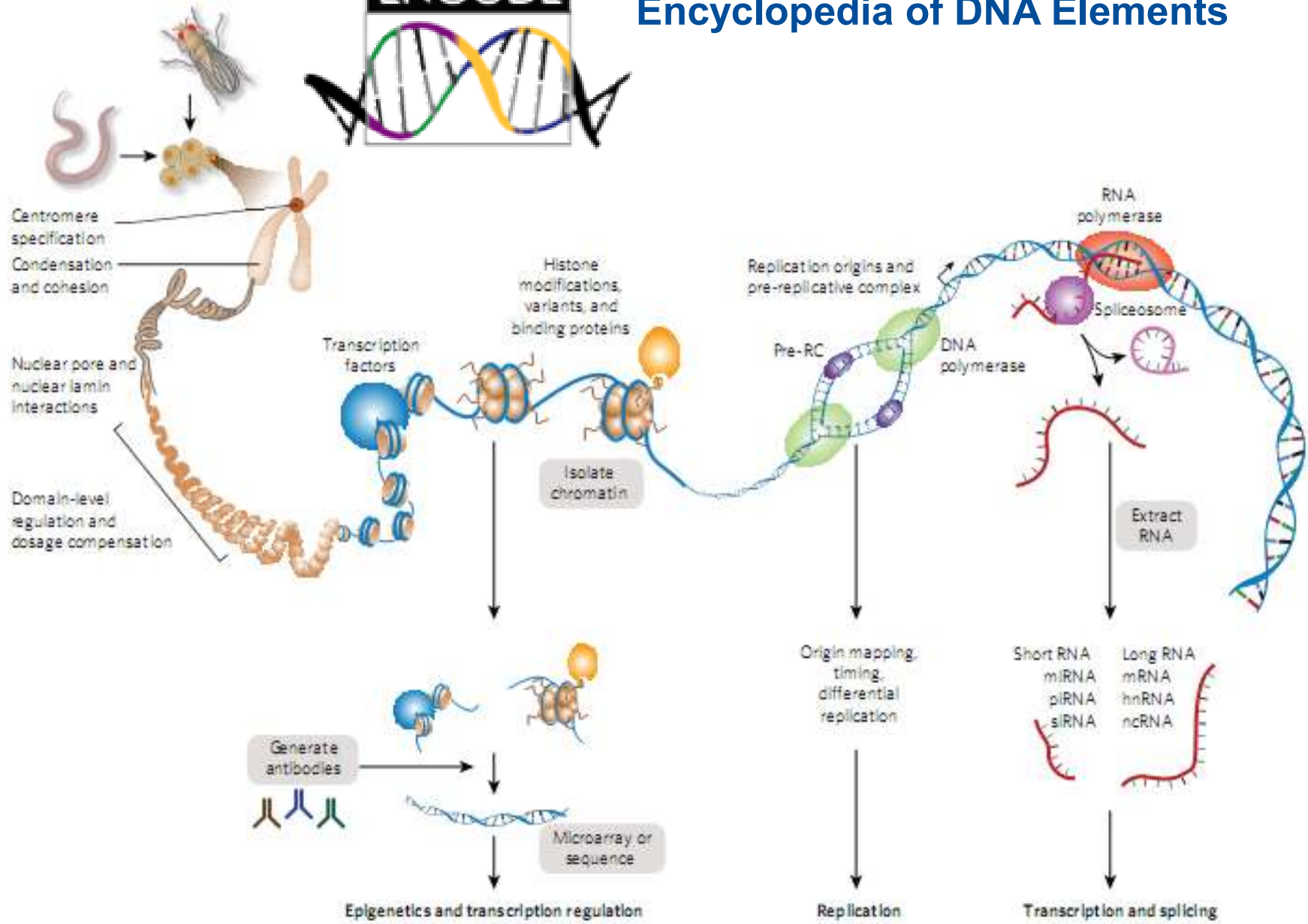
Epigenetikai az olyan stabilan öröklődő jelleg, amit kromoszómában létrejött változás, de nem a DNS nukleotid sorrend megváltozása okoz.

- Kromoszomális (nem organellum, nem fehérje (prion) stb)
- Az organizmusra és sejtekre is értelmezett (sejtről-sejtre, (a mitózisokon át) és nemzedékről nemzedékre (a meiosisokon át) át öröklődő tulajdonság (cancer epigenome, transgenerational)

**Azonos nukleotid sorrend mellett fennálló és öröklődő eltérések.
(a nukleotid sorrend eltérő működése, értelmezése, értelmezhetősége)**

ENCODE

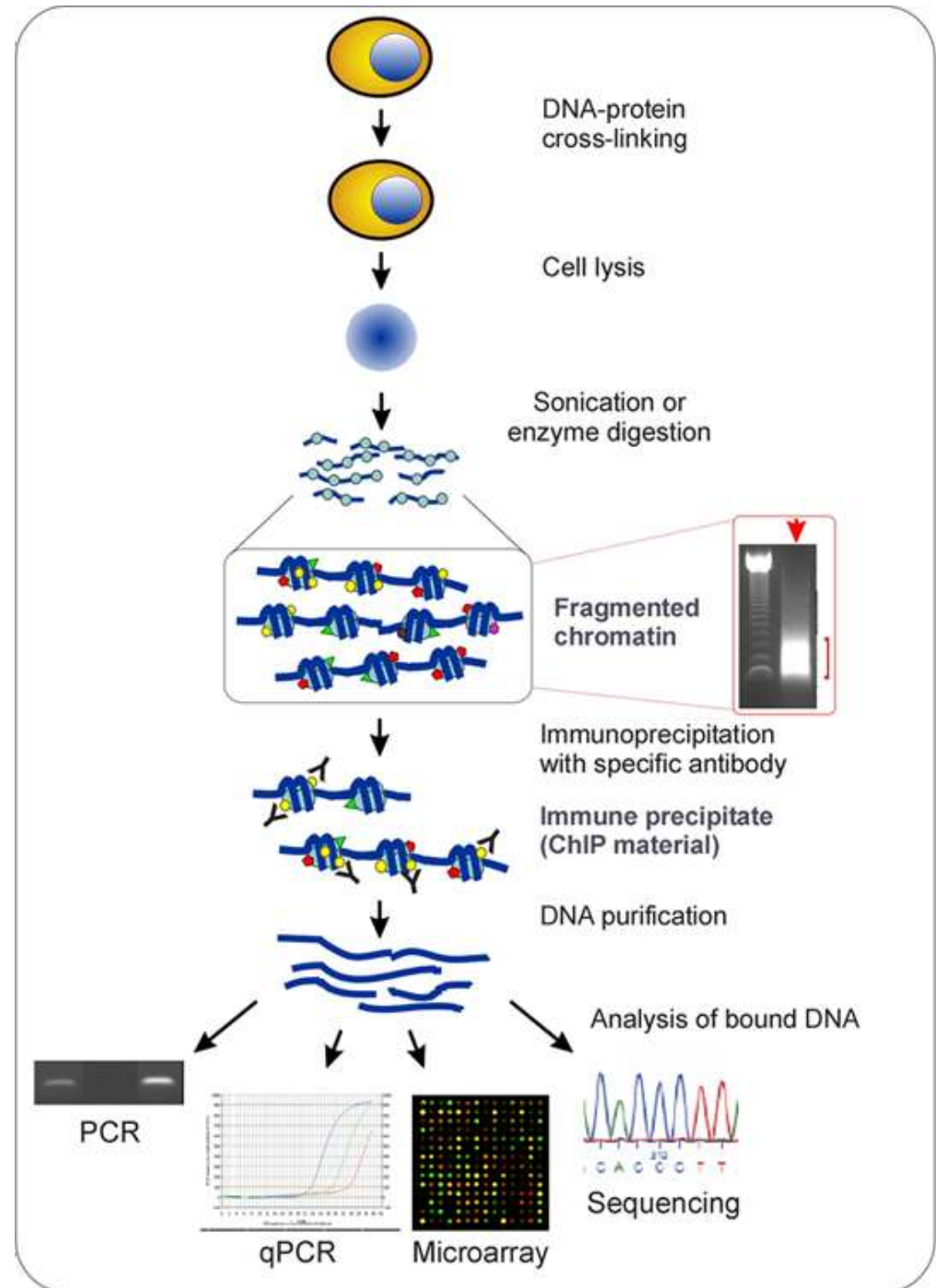
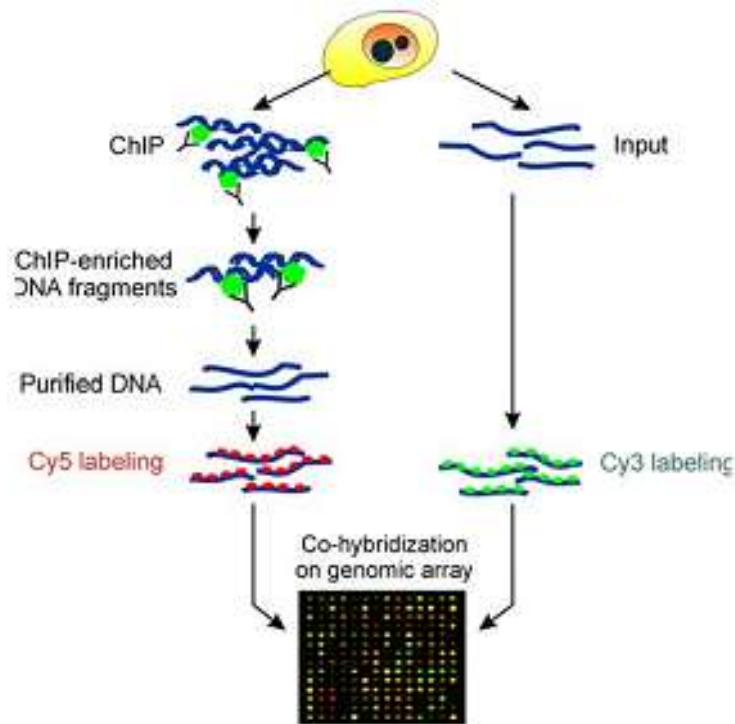
Encyclopedia of DNA Elements



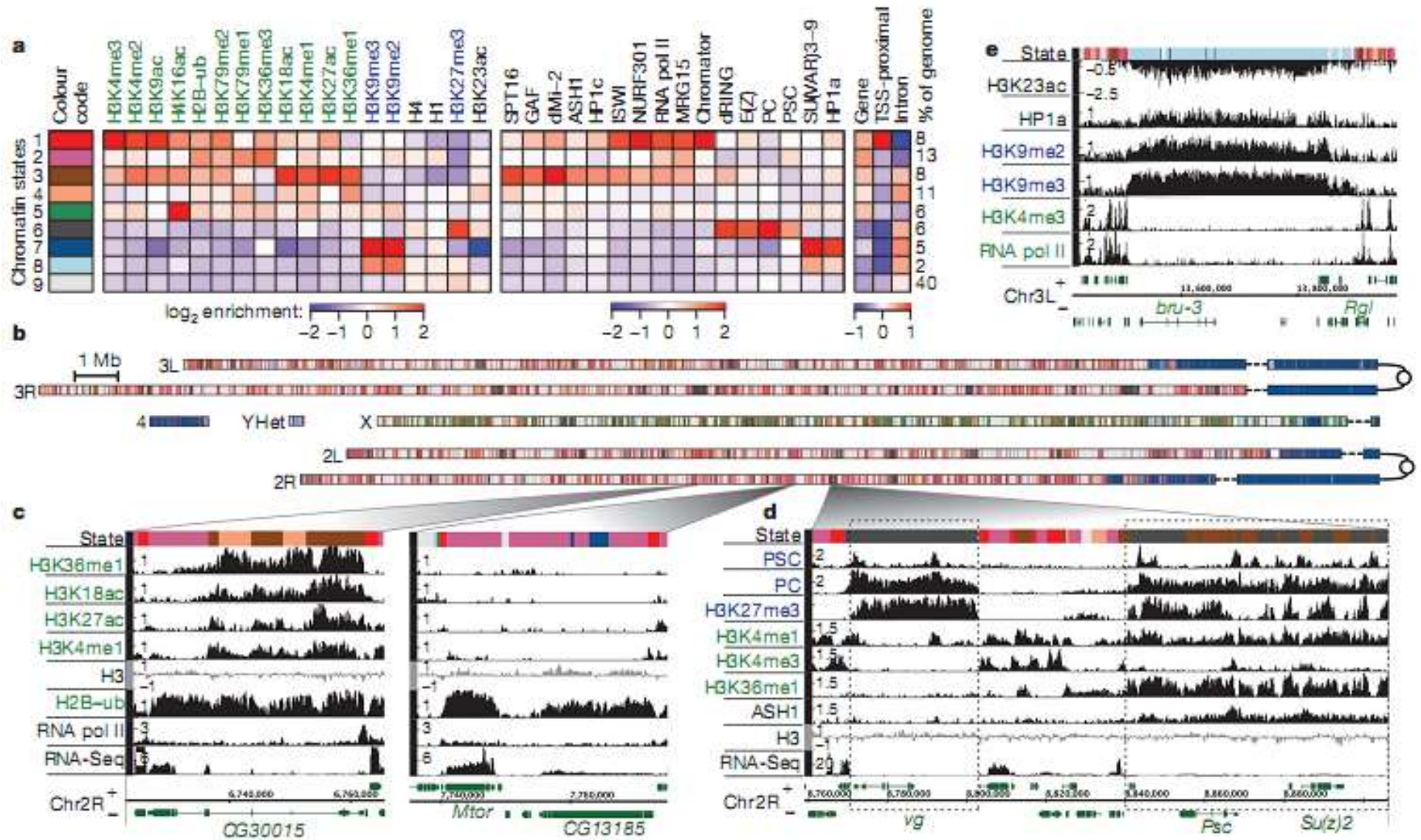
Módszerek

ChIP és variációi, DAMip, meDNS detektálás, proteom analízis, SILAC, MALDI

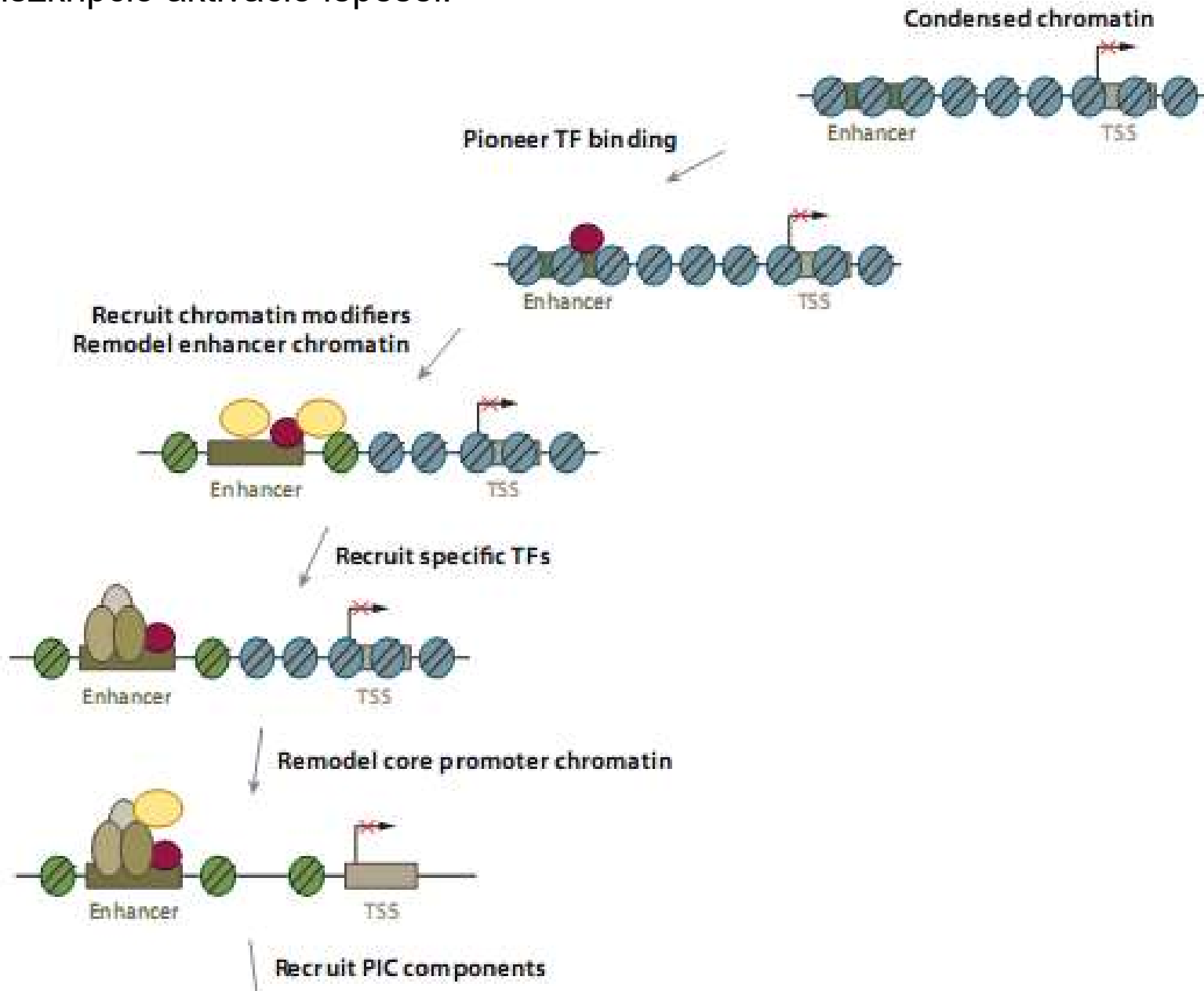
ChIP on chip , ChIP-seq, ...:



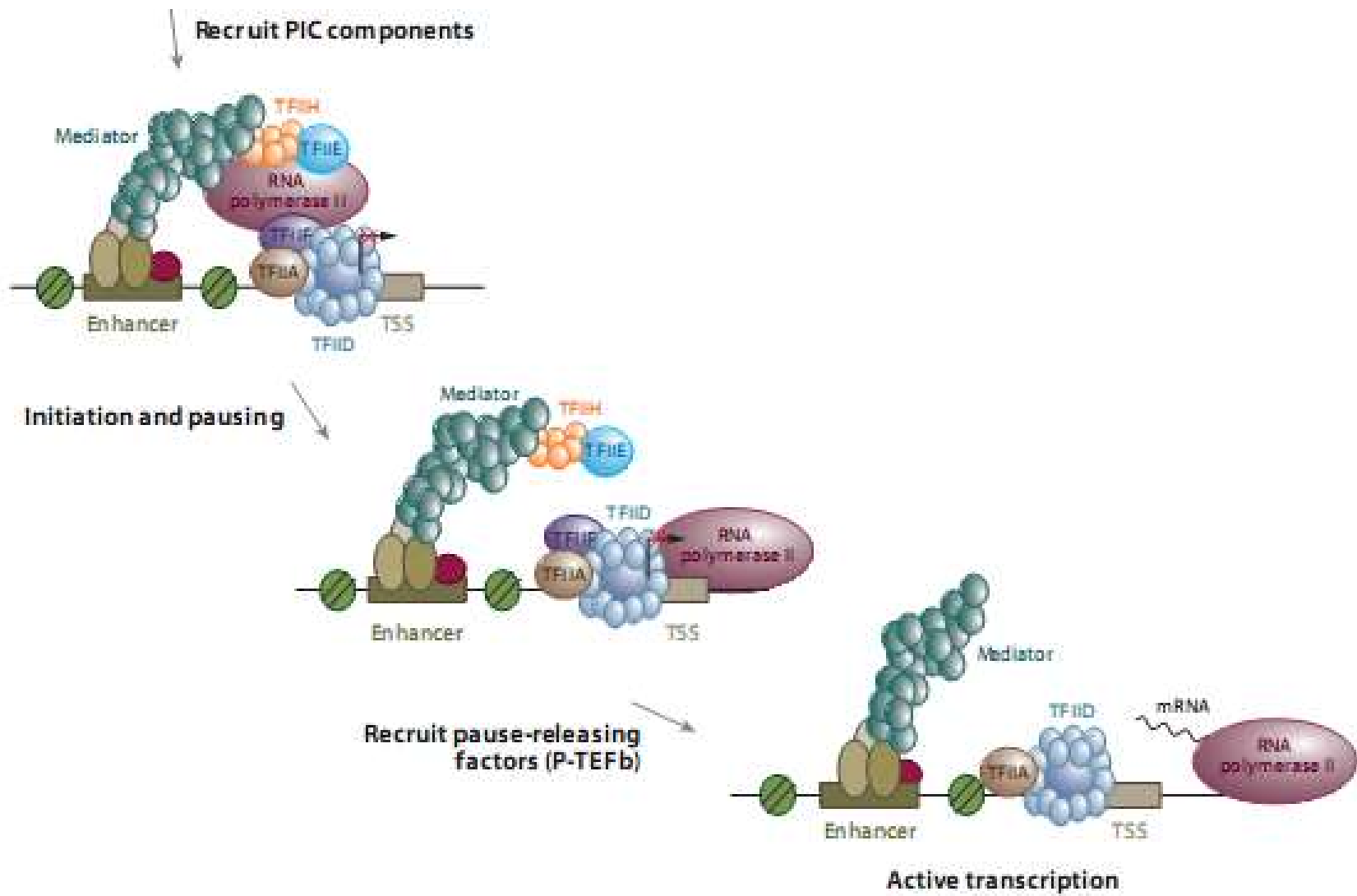
Epigenetikai „tájkép” a muslica kromoszómákról (18 módosítás, 32 fehérje)
 (9 módosítási mintázattal az egész genom kromatin szerkezete jó közelítéssel leírható)



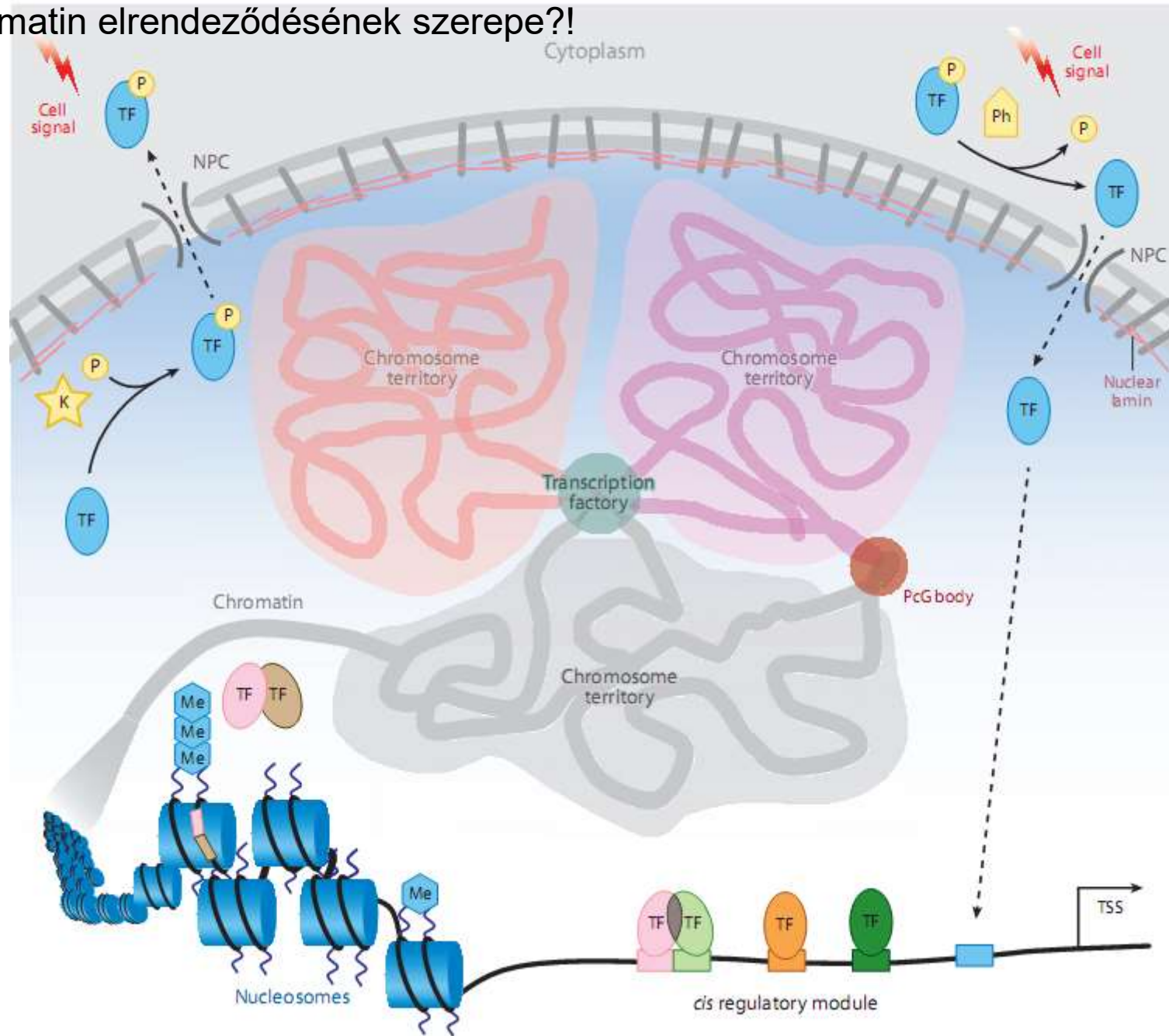
A transzkripció aktiváció lépései:



A transzkripció aktiváció lépései (folyt):



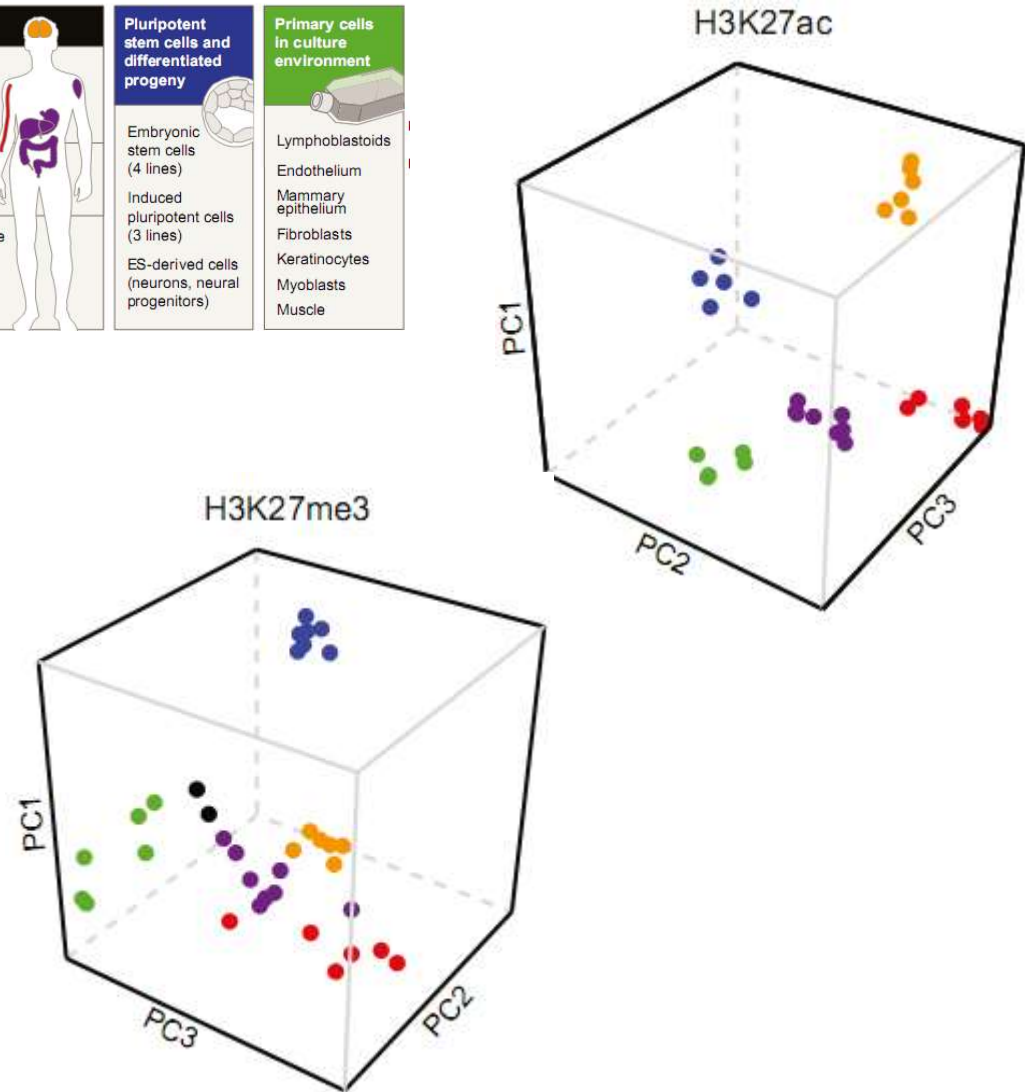
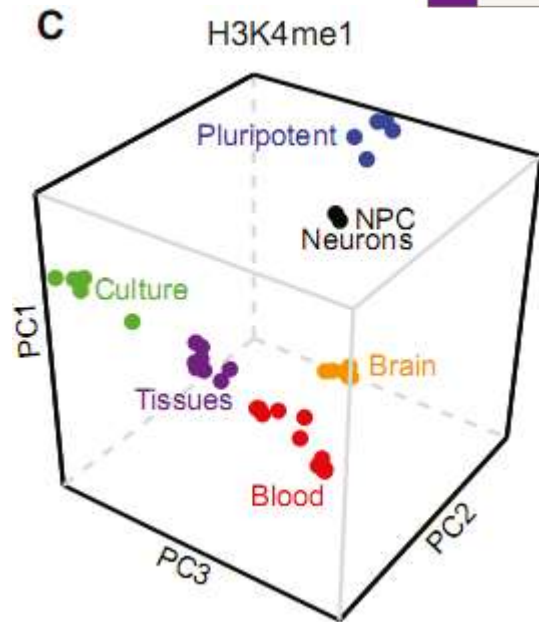
De: a kromatin elrendeződésének szerepe?!



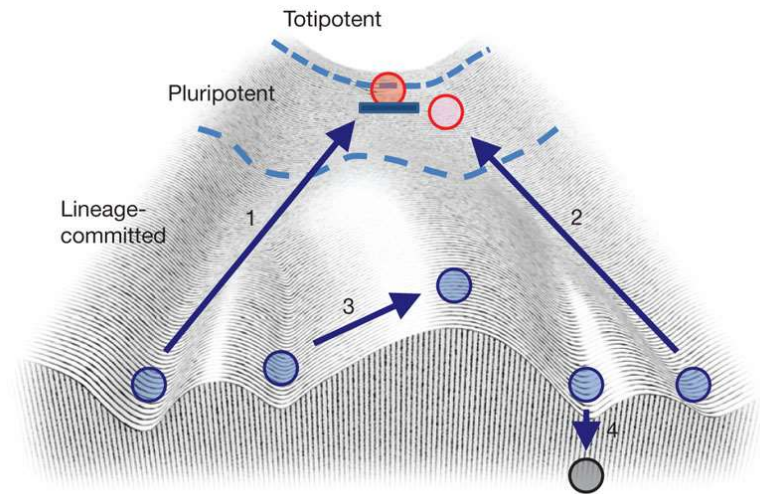
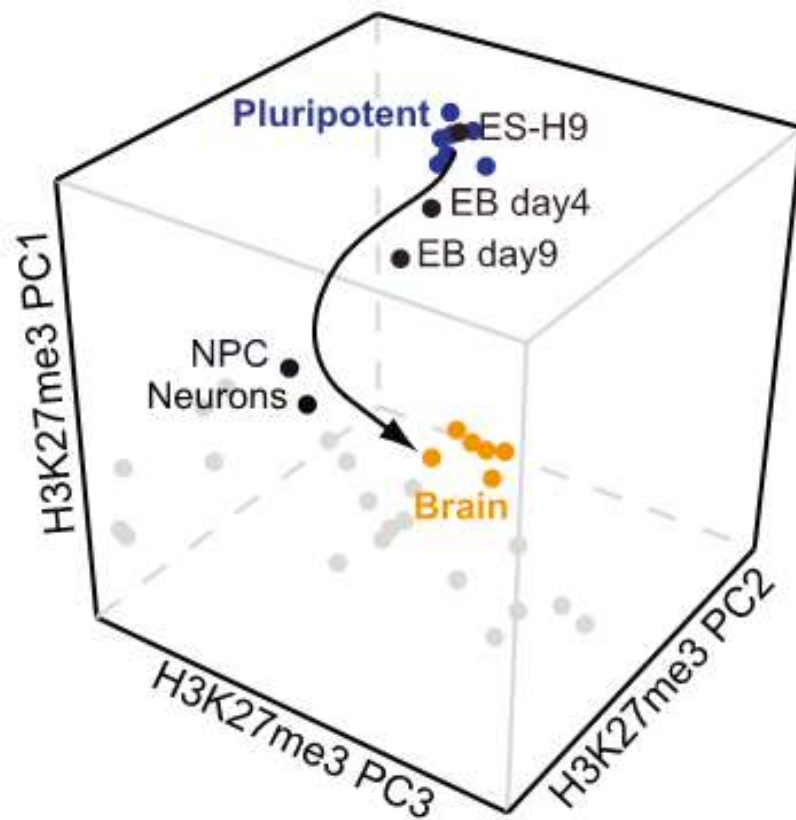
Hasonló sejtekre és szövetekre hasonló kromatin állapot jellemző

A

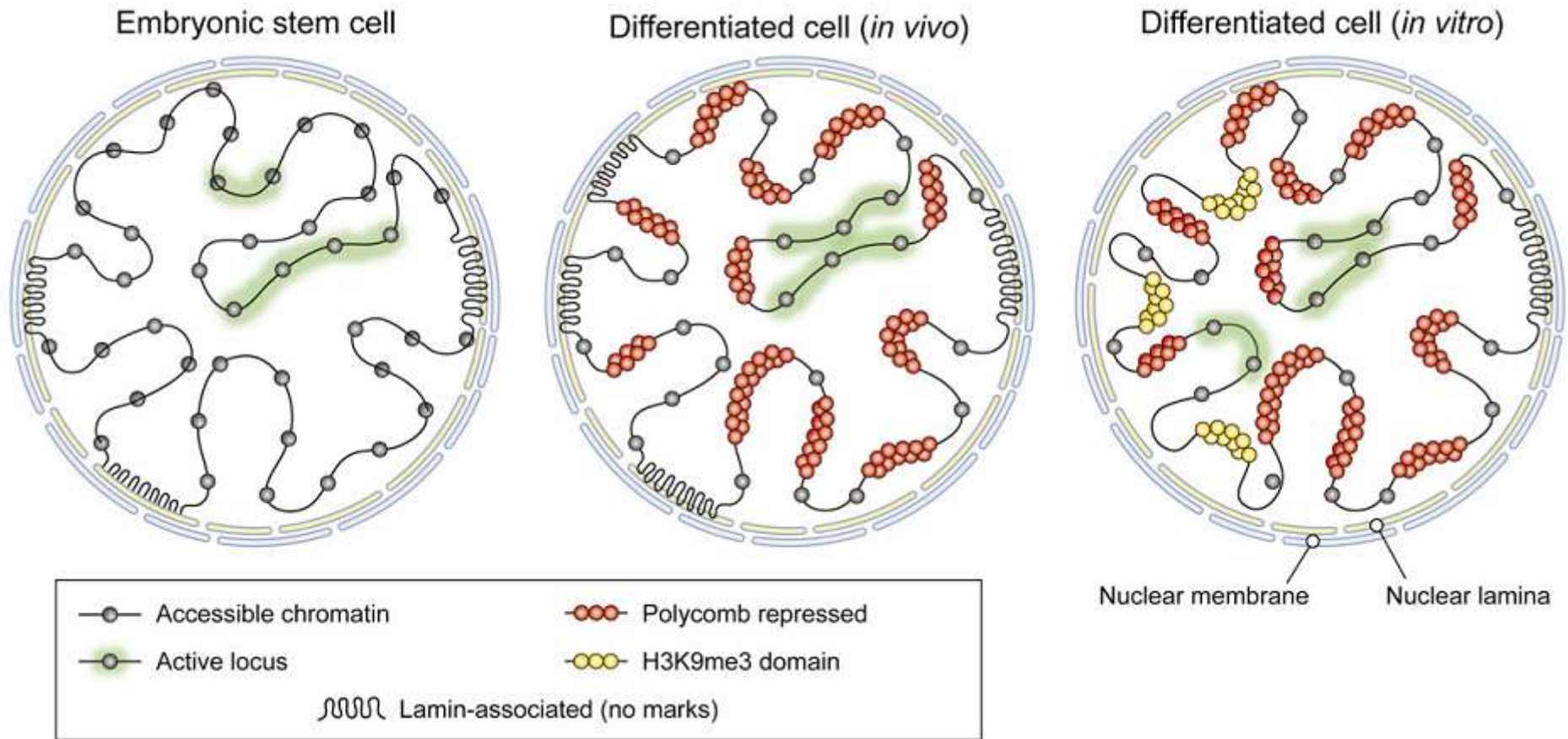
Primary cells and tissues (<i>in vivo</i>)		Pluripotent stem cells and differentiated progeny	Primary cells in culture environment
Brain sections	Anterior caudate Cingulate gyrus Hippocampus middle Inferior temporal lobe	Mid-frontal lobe Substantia nigra	Lymphoblastoids
Blood	CD19+ B-cells CD3+ T-cells	CD34+ progenitors	Endothelium Mammary epithelium Fibroblasts
Tissues	Rectal smooth muscle Stomach smooth muscle Duodenal mucosa Colonic mucosa Rectal mucosa	Skeletal muscle Adipose Liver	Keratinocytes Myoblasts Muscle



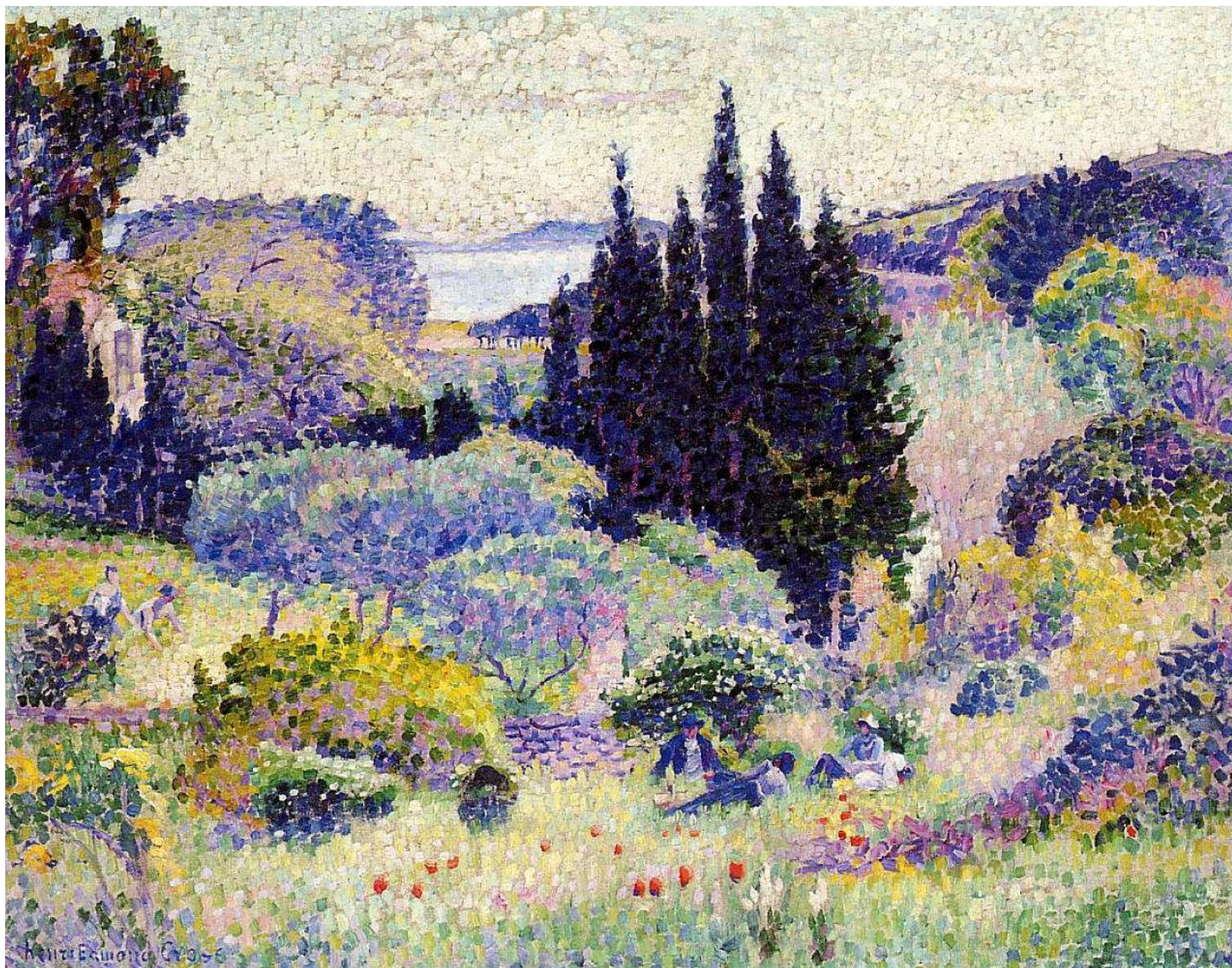
principal component analysis



Az embrionális őssejtek H3K27me3 mintázata a differenciálódás során változik, a kromatin fokozatosan egyre erősebben represszált állapotba kerül.



Modell, ami az *in vivo* és *in vitro* megvalósuló differenciálódás során kialakuló eltérő kromatin szerkezeti változásokat próbálja magyarázni.



Köszönöm a figyelmet!

KÖSZÖNÖM A FIGYELMET!

SZÉCHENYI  2020



MAGYARORSZÁG
KORMÁNYA

Európai Unió
Európai Szociális
Alap



BEFEKTETÉS A JÖVŐBE