

9. TRANSZKRIPCIÓ PRO- ÉS EUKARIÓTÁKBAN

Promóter és TATA box. Templát és nem-templát szál. RNS polimeráz és mRNS. Pre-mRNS érés, intron, exon.

A fejezetet Szabad János egyetemi tanár állította össze, módosította Lippai Mónika.

BEVEZETÉS

Bár a DNS az örökítő anyag, a sejtek és így az élőlények jellegzetességeit is döntően az őket alkotó fehérjemolekulák határozzák meg. A fehérjék tulajdonságai attól függenek, hogy őket milyen aminosavak, és milyen sorrendben alkotják - az aminosavak sorrendje pedig a DNS nukleotid-sorrendjében kódolt. A fehérjeszintézis előfeltételeként a DNS információ-tartalma először hírvivő-RNS-be (messenger, vagy mRNS) másolódik át a transzkripció során, amely alapján aztán fehérjék képződnek. A 9. fejezet a transzkripció mechanizmusát tekinti át.

Transzkripció: RNS-molekulák képződése DNS templát alapján.

Az mRNS felfedezése

Miután Watson és Crick 1953-ban leírta a DNS szerkezetét, az mRNS-eket még nem ismerték, és kérdések tucatja fogalmazódott meg a DNS funkcióját illetően. Például: milyen mechanizmus irányítja a fehérjék szintézisét a DNS-ben kódolt genetikai információ alapján? Milyen "szerkezet", és hogyan olvassa a DNS-ben kódolt információt? Az akkori ismeretek alapján az egyik elméleti lehetőség az volt, hogy a DNS-ben kódolt információt a frissen szintetizálódott rRNS közvetíti (az rRNS-ek létezéséről ugyanis addigra már tudtak, mert elég stabilak voltak ahhoz, hogy a centrifugálással izolált riboszómákban a fehérjék mellett ki lehessen mutatni őket). Az elmélet szerint az új rRNS persze mindig újonnan képződő riboszómákba tud csak beépülni, az elmélet szerint ezek „leolvassák” az rRNS-t, majd fehérjéket készítenek.

Az rRNS-ek szerepét Sydney Brenner, Francis Jacob és Mathew Meselson tanulmányozta (1961). Ők baktériumokat a nitrogén és a szén nehéz izotópjait (^{15}N és ^{13}C) tartalmazó tápoldatban szaporítottak, tehát a baktériumok riboszómáinak fehérjei is ^{15}N és ^{13}C épült be (9.1. ábra). Majd ezeket a baktériumokat izolálták, és olyan tápoldatba tették, amely a nitrogén és a szén könnyű izotópjait (^{14}N -et és ^{12}C -t) tartalmazta.

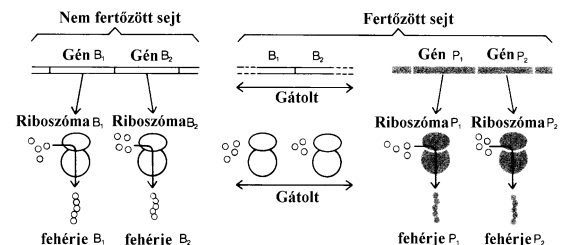
Korábban már ismert volt, hogy a fágfertőzést követően a baktériumok percek alatt abbahagyják saját fehérjeik szintézisét és csak fágfehérjéket szintetizálnak, ezért egyidejűleg a baktériumokat egy virulens (T4) fággal is megfertőzték. Ha a fág-DNS információ-tartalma valóban újonnan képződött fág-rRNS-en keresztül íródik át fág-fehérjére, akkor ehhez új riboszómák keletkeznek. Tehát az várható, hogy a baktériumokban nagyon sok új, már „könnyű” riboszóma is lesz a régi „nehéz” mellett. Ha azonban nem szükséges új rRNS a fágfehérjék szintéziséhez (azaz nem az rRNS az információ átadója), akkor a régi („nehéz”) riboszómák képesek a fágfehérjéket is elkészíteni, vagyis nincs szükség friss, immár „könnyű riboszómák” tömeges képződésére percek alatt.

Kis idő múltán izolálták tehát a riboszómákat (az rRNS-sel együtt) és meghatározták, hogy a riboszómák a nehéz izotópok jelenlétében, még a fágfertőzés előtt képződtek, vagy már „könnyűek” voltak (vagyis az új tápoldatban, a fágfertőzés után képződtek).

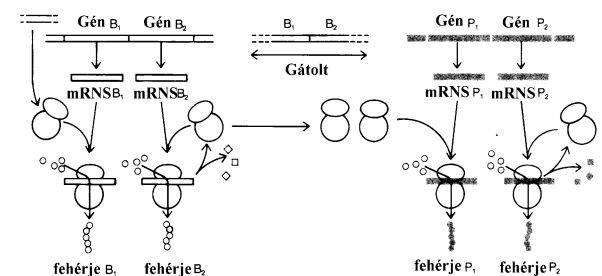
Minthogy az izolált valamennyi riboszóma nehéz volt, Brenner, Jacob és Meselson arra következtetett, hogy a fágfertőzést követően nem képződnek új riboszómák, a régiak szintetizálják a fágfehérjéket. Tehát nem köthető új rRNS-szintéziséhez az új fehérjék megjelenése.

Egy további kísérletben Brenner, Jacob és Meselson a fágfertőzéssel egyidejűleg ^{14}C -el jelzett uracilt adott a baktériumokhoz (az uracil csak az RNS alkotója). Azt tapasztalták, hogy a ^{14}C -uracil gyorsan viszonylag rövid életű RNS-ekbe épült be, és ezek egy része kapcsolódott a riboszómákhoz. Minthogy az újonnan felfedezett RNS-fajta hírvivőként szerepelt a DNS és a riboszómák között, messenger (hírvivő) RNS-nek nevezték el, és mRNS-nek jelölték.

MODELL I.



MODELL II.



9.1. ábra. Elméleti lehetőségek a DNS-ben tárolt információ olvasására.

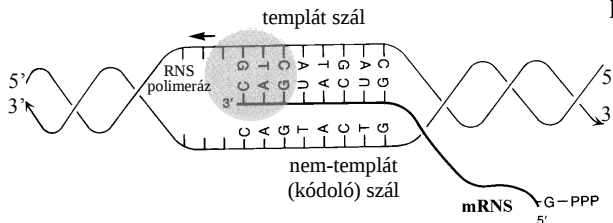
Benjamin Hall és Sol Spiegelman (1961) olyan környezetben fertőzték meg *E. coli* sejteket fágokkal, amely ^{32}P -t tartalmazott. Az volt a céljuk, hogy így jelölődjenek az újonnan, tömegesen szintetizálódott RNS-molekulák. Hall és Spiegelman ezután RNS-t izolált a fertőzött sejtekből. A ^{32}P -vel jelölt RNS-molekulákat denaturált egyszálú, méret alapján elválasztott bakteriális és fág DNS-el is hibridizálták. Minthogy ^{32}P -RNS/DNS hibridek csak a fág DNS-el képződtek, Hall és Spiegelman arra következtetett, hogy a ^{32}P -RNS templátja a fág DNS-e volt – a fágfertőzés hatására tehát nemcsak fágfehérje-szintézis indult be, de a fág DNS-éről is nagymennyiségű RNS képződött. Ez a kísérlet is a mRNS-ek létezését igazolta.

A transzkripció során csak az egyik DNS-szál szolgál mintaként (templátként) az mRNS szintéziséhez

Más kísérletek segítségével azt is bebizonyították, hogy a DNS kettős spirál egy adott szakaszán csak az egyik szál alapján képződik mRNS (bár ma már tudjuk,

hogyan vannak ritka kivételek...). Ezt a szálakat magyarul *templát* (vagy *értelmes*, de: angolul: antisense) szálaknak nevezik (9.2. ábra).

Ugyanakkor – prokariótákban és eukariótákban is – a teljes kromoszómán belül a DNS kettős spirálnak *mindkét szálán* vannak *templátként szolgáló szakaszok* (ezek természetesen legtöbbször különböző génekhez tartoznak).

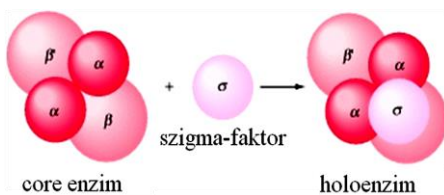


9.2. ábra. Az mRNS szintézisekor mintaként szolgáló DNS-szálat templátnak nevezik – ez komplementer a képződő mRNS-sel, míg a nem-templát DNS-szál szekvenciája *megegyezik* vele (ezért ez utóbbit gyakran kódoló szálnak hívják). A templát szál az RNS-polimeráz 3'→5' irányban olvassa, mert az mRNS csak 5'→3' irányban történhet.

TRANSZKRIPCIÓ PROKARIÓTÁKBAN

Az RNS-polimeráz

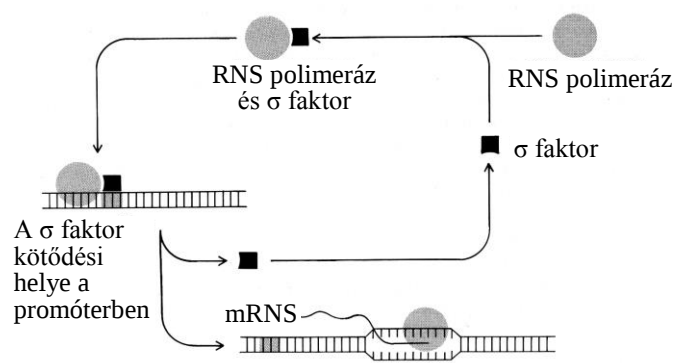
Az mRNS molekulákat óriás méretű fehérjekomplex szintetizálja, a DNS-függő RNS polimeráz, röviden *RNS-polimeráz*. *E. coli*-ban az RNS-polimeráz tömege kb. 490 kDa. Az enzim magját (core enzim) két α , egy β , egy β' és egy ω egység alkotja (9.3. ábra). Az RNS polimeráz magja a DNS bármely részéhez kapcsolódhat és elkezdheti az mRNS szintézisét. Az úgynevezett holoenzim, azaz a teljes enzimkomplex akkor alakul ki, amikor az enzim magja egy további fehérjével egészül ki, a σ (szigma) faktorral (9.3. ábra).



9.3. ábra. A bakteriális RNS-polimeráz enzim magja + σ faktor = holoenzim

A σ faktor az a komponens, amely az RNS-polimeráz a DNS jellegzetes helyeihez, a promóterekhez irányítja. A promóterhez történt kapcsolódás és az első nukleotidok szintézise után a σ faktor kiválik a komplexből, hogy egy további RNS-polimeráz irányítson egy másik promóterhez (9.4. ábra).

Eukariótákban egy RNS-polimeráz komplexet 10-15 fehérje alkot. Az RNS-polimeráz tömege 500 kDa. Mégis, a pro- és eukarióta polimerázok minden bizonnyal közös eredetűek, mert az *E. coli* RNS-polimeráz minden alegysége homológ az eukarióta RNS-polimeráz valamelyik komponensével. Az eukarióta RNS-polimerázoknak funkcióik és α -amanitin



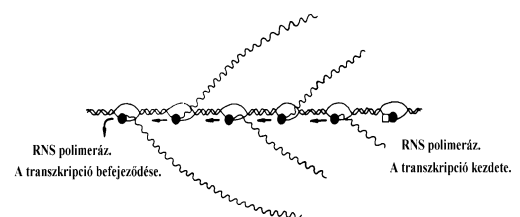
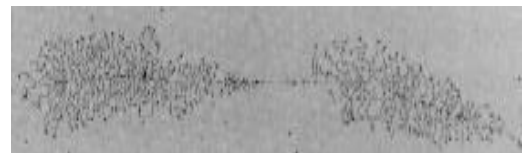
9.4. ábra. A σ faktor az RNS polimeráz holoenzimet a promóterhez irányítja.

érzékenységek alapján három típusuk van (9.1. táblázat).

Az mRNS-nek, mint minden más nukleinsavnak a szintézise 5'→3' irányban történik (9.2. ábra). Miután az mRNS komplementere a DNS templát szálának, és miután a komplementer szálak antiparalel állásúak, az RNS-polimeráz a templát szálát 3' → 5' irányban olvassa. A transzkripció sebessége 15-20 nukleotid/sec. (Az összehasonlítás kedvéért: a replikáció sebessége eukariótákban 170 nukleotid/sec, a translációé 2 aminosav/sec.) A különböző génekről különböző gyakorisággal képződnek mRNS-ek: némelyik gén esetében 1-2 mRNS/sec, mások esetében óránként mindössze egy.

Eukariótákban speciális fehérjék, úgynevezett *transzkripciós faktorok* is szükségesek a transzkripcióhoz. A transzkripciós faktorok valamennyien a DNS-hez kötődni képesek fehérjék, a DNS nagy árkának „letapogatásával” specifikus szekvenciákat ismernek fel.

A transzkripció elektronmikroszkópban láthatóvá is tehető (Oscar Miller). Egy intenzíven átírt gén esetében a képződő mRNS-ek úgy néznek ki, mint karácsonyfán az ágak (9.5. ábra). Az mRNS-ek elhelyezkedése és mérete világosan kijelöli a gén határait, azt a két pontot, ahol elkezdődik, és ahol befejeződik az mRNS szintézise.



9.5. ábra. A transzkripció során az egy génről képződő mRNS-ek karácsonyfaszerű képet mutatnak.

9.1. táblázat. Az RNS polimerázok jellemzői

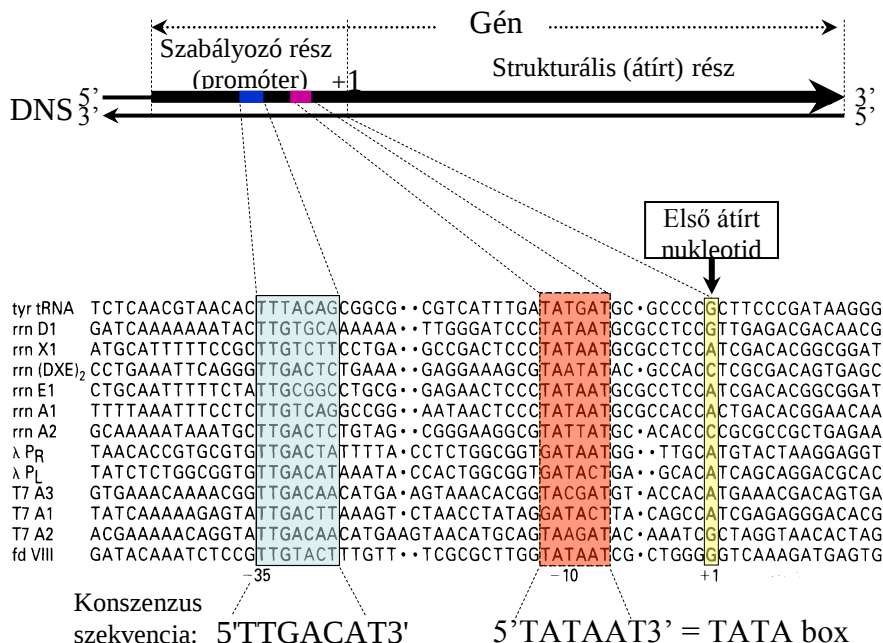
RNS polimeráz	A szintetizált RNS típusa	α -amanitin* érzékenység	Számuk sejtenként
I.	Riboszomális RNS	Nem érzékeny	Negyvenezer
II.	mRNS	Nagyon érzékeny	Negyvenezer
III.	transzfer RNS és 5S rRNS	Mérsékelt érzékeny	Húszezer

* a gyilkos galóca (*Amanita phalloides*) alkaloidja.

A promóter

Korábban szó volt róla, hogy az RNS-polimeráz a DNS promóter régiójához kötődik. Az RNS-polimeráz a promóterhez kötődve marad, ha hiányoznak az elindulásához, az mRNS szintéziséhez szükséges építőelemek. Ekkor a DNS a hozzá kapcsolódó RNS-polimerázzal együtt izolálható. A DNS-nek az RNS-polimerázzal nem lefedett részeit a DNS-t hasító endonukleázzal el lehet bontani, így a DNS-nek csak az RNS-polimeráz által védett promóter-részei maradnak épek, amelyeket izolálni, vizsgálni, szekvenálni lehet.

A polimeráz egy kb. 50 bázispárból álló DNS szakaszt véd meg a DN-áztól. A különféle gének promóter-szekvenciáinak összehasonlítása alapján arra derült fény, hogy a promóterekben két erősen konzervált szakasz, úgynevezett box van (boxnak a DNS evolúciósan erősen konzervált szakaszát nevezzük). A leggyakoribb nukleotidokból álló, az összeshez legjobban illeszkedő szekvenciát *konszenzus szekvenciának* nevezik.



9.6. ábra. A prokarióták promótereiben (itt az *E. coli* 13 génjének promóterében) két erősen konzervált szekvencia ismerhető fel. Mindkettőhöz az RNS-polimeráz kötődik. A -35. hely környékén levőt kék, az ún. TATA-boxot narancssárga téglalap jelzi. A transzkripció a +1-el jelölt helyen kezdődik (sárga). Az első átírt nukleotid az esetek többségében A vagy G.

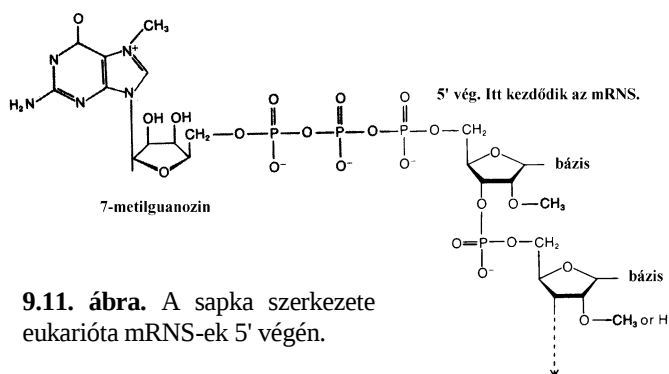
Az egyik szakasz a -35. hely körül helyezkedik el, és leggyakrabban az 5'TTGACAT3' sorrendű nukleotidok alkotják (9.7. ábra). Az 5'TTGACAT3' szekvencia ahhoz szükséges, hogy az RNS-polimeráz σ faktora a DNS-hez kötődhessen.

Az úgynevezett *TATA-boxot* többnyire 5'TATAAT3' sorrendben alkotják a nukleotidok (9.6. ábra). (A TATA-boxot prokariótákban felfedezője, David Pribnow tiszteletére Pribnow-boxnak is nevezik.) A TATA-box A=T bázispárokból gazdag. Ez az a hely a promóteren belül, ahol az RNS-polimeráz kötődése után a DNS két szála könnyen elválasztható, lehetőséget teremtve a templát DNS-szál átírására. A transzkripció a TATA-boxtól 5-9 bázispárral „lentebb”, a 3' irányban kezdődik. A templát az a szál lesz, amely komplementer a TATA-boxot tartalmazó (kódoló) szállal. Az első átírt nukleotid többnyire purin bázis (9.6. ábra).

Bár a két erősen konzervált szekvencia közötti rész nem konzervált, hossza mindig 15-17 bázispár. A két box közötti szakasz egy részének, vagy akár egyetlen bázispárjának deléciója csökkenti, vagy megszünteti az adott promóter aktivitását, a gén kifejeződését.

A transzkripció terminációja

E. coli-ban a transzkripció terminációjának két típusa van. (i) Sok gén esetében egy fehérje, az ún. *rho* faktor, biztosítja a transzkripció befejeződését. (ii) A második megoldás alapjai fordítva ismétlődő (inverted repeat) szekvenciák. A fordítva ismétlődő szekvenciák transzkripciója után az mRNS olyan komplementer szekvenciákat tartalmaz, amelyek egymással párosodnak és nyél-hurok (hajtű) szerkezetet képeznek (9.7. ábra). A nyél-hurok szerkezet kialakulása után nem sokkal az mRNS leválik az RNS-polimerázról, befejeződik a transzkripció.

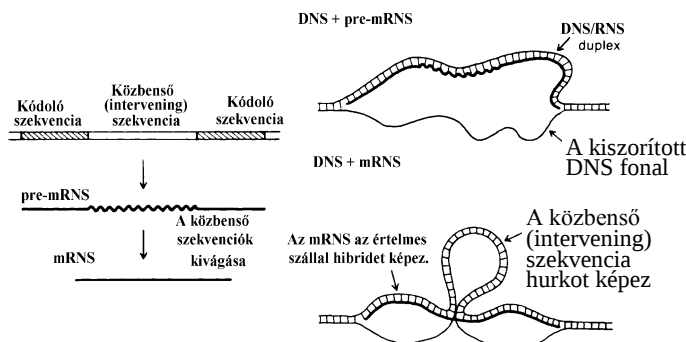


9.11. ábra. A sapka szerkezete eukarióta mRNS-ek 5' végén.

2. A splicing

A hnRNS-állományt alkotó pre-mRNS-ek mérete néhány száz és több mint egy millió nukleotid között változik. Ugyanakkor, míg például a β -globin pre-mRNS kb. 1500 nukleotid hosszú, az érett, már a citoplazmában levő β -globin mRNS csak kb. 700 nukleotidból áll. Amikor a β -globint nagyon nagy mennyiségben szintetizáló madár vörösvérsejtekből sejtmagi hnRNS-t (ma már tudjuk: pre-mRNS-t) izoláltak, majd a kódoló (denaturált) DNS-el hibridizálták és az RNS/DNS hibridet elektronmikroszkópban vizsgálták, két egymáshoz tapadó vastagabb, kettős szál (az RNS-DNS-hibrid) és egy vékony, egyszálú DNS-szakasz látszott (9.12. ábra).

A citosolból izolált érett mRNS is hibridizált a kódoló DNS-el. Azonban az előzőtől különböző szerkezetet láttak: a DNS-szakasz egy része hurkot képezett (9.12. ábra) – mert a neki megfelelő szekvencia hiányzott az mRNS-ből. Tehát a pre-mRNS-ből bizonyos szakaszok kivágtak még a sejttagon belül. A kivágott szakaszt *intronnak* (angolul intervening sequence, intron) nevezik. Az a folyamat, amely során az intronok kivágódnak a pre-mRNS-ekből, a *splicing* (szplájszing). A megmaradó RNS szakaszok (*exonok*) képezik az érett mRNS-t. Az intron/exon fogalma nemcsak pre-mRNS-re, hanem a gén megfelelő DNS-szakaszaira is alkalmazható: a kódoló régió belül intronok, amelyek az érett mRNS-ben nincsenek benne, illetve exonok, amelyek az érett mRNS-ben is jelenlévő szakaszt kódolnak.



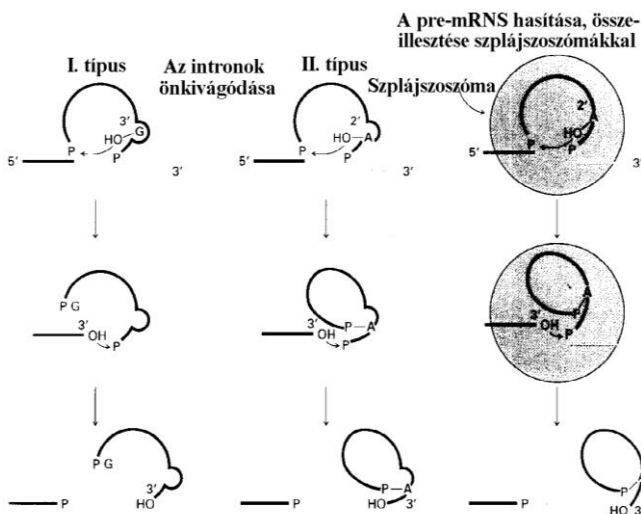
9.12. ábra. Az intronnak megfelelő szekvenciák kihurkolódnak az RNS/DNS hibridekből.

Ugyanabból a pre-mRNS-ből különféle mRNS-ek képződhetnek a különféle sejt típusokban vagy az egyedfejlődés különböző szakaszaiban (*alternatív splicing*). Vannak olyan DNS-szekvenciák, amelyek bizonyos

esetekben intronok, máskor exonok. Az intronok/exonok változó kombinációja a kódoló DNS gazdaságos felhasználását biztosítja: egyetlen génnel többféle, többé-kevésbé eltérő funkciójú fehérje is kódolható. Az intronoknak másfajta, evolúciós jelentősége is van: az intronok területén „szabadabb” a rekombináció lehetősége (mert nem érintik a képződő fehérje szerkezetét), exonok kerülhetnek egyik génből a másikba, és maguk is exonokká válhatnak az evolúció során. Sőt, vannak olyan gének, amelyek egy másik gén intronjában vannak.

A pre-mRNS-ek splicingja többféle módon történhet.

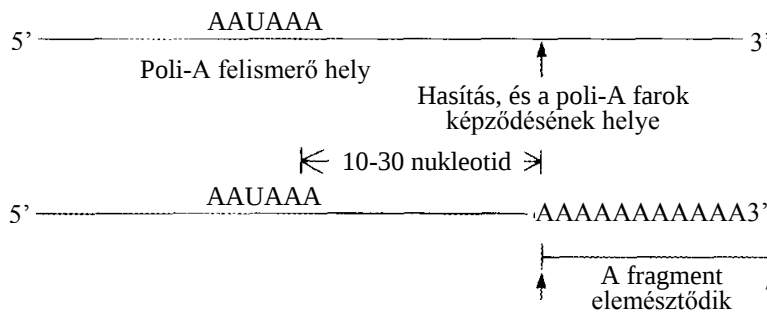
(1) A legtöbb pre-mRNS érése a *spliceosomák* közreműködésével történik. A spliceosomákat kis sejtmagi, ún. snRNS molekulák, valamint a hozzájuk kapcsolódó speciális fehérjék alkotják. Az snRNS-ekből többet ismerünk (U1 – U12), de a leggyakoribbak az együttműködő U1, U2, U4, U5 és U6 snRNS-ek. A spliceosomák snRNS-ei katalitikus aktivitással bírnak. Felismerik a pre-mRNS-ekben az intron/exon-határt (jellegzetes szekvenciákat), elhasítják a pre-mRNS-eket, két átészterezéssel lasszó alakban kivágják az intron-szekvenciákat, majd ligálják az exonoknak megfelelő részeket (9.13. ábra). Az intronok ezek után gyorsan lebomlanak a sejtmagban található RNS-bontó komplex, az *exoszóma* segítségével. A kivágódás helyének pontossága nagyon fontos, hiszen a fehérjét kódoló, az összekapcsolt exonok által meghatározott szekvencia megváltozása mutációval járhat. Ezért az exon/intron határon levő nukleotidok igen erősen konzerváltak.



9.13. ábra. Az intron-szekvenciák kivágása pre-mRNS-ből ön-splicing-gal (I. és II. típus) és a spliceosomával.

(Érdekesség, hogy a spliceosomák megismerésében a *Lupus erythematosus* - farkasfoltosság – nevű autoimmun betegség volt a kutatók segítségére: néhány farkasfoltos beteg vére olyan ellenanyagot tartalmazott, amely a spliceosomák valamelyik komponense ellen képződött. Az így rendelkezésre álló ellenanyagok tették lehetővé a spliceosomák izolálását, tanulmányozását.)

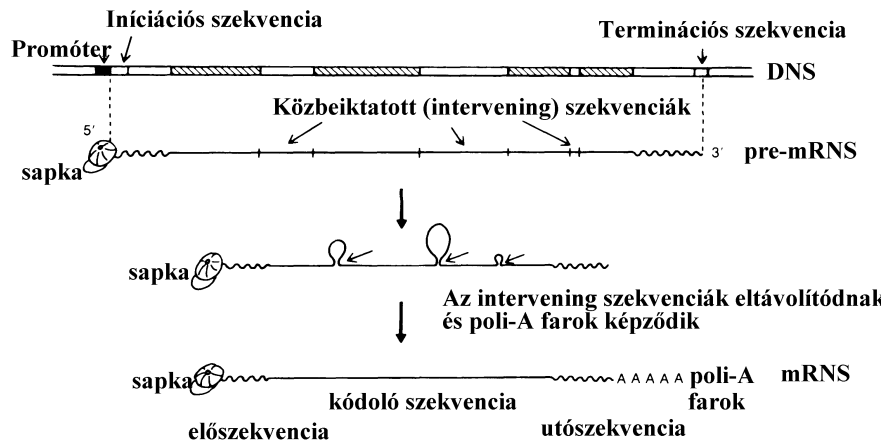
(2) Vannak olyan pre-mRNS-ek (és pre-rRNS-ek, pre-tRNS-ek is!), amelyek ön-splicinggal, kétféle módon távolíthatják el magukból az intronokat (9.13. ábra). Ezekben a pre-RNS-ekben található intronoknak maguknak van olyan katalitikus aktivitása, amely éppen saját kivágódásukat és az exonok ligálását katalizálja.



9.14. ábra. A poli-A farok képződésének mechanizmusa eukarióta mRNS-ek 3' végén.

be és exportálódik a citoplazmába, vesz részt a transzlációban. Az intronokat alkotó szekvenciák sohasem hagyják el a sejtmagot, hanem az exoszómák révén elemésződnek. Az érett mRNS-ek pedig exportálódnak a citoplazmába.

A prokariótákhoz hasonlóan az érett eukarióta mRNS-nek is három fontos része van: az előszekvencia, a nyitott leolvasási keret és az utószekvencia (9.15. ábra). Az érett mRNS-ek alapján szintetizálódnak a fehérjék a transzláció során a citoplazmában.



9.15. ábra. Egy tipikus eukarióta mRNS képződése és szerkezete.

Közülük a II. típusú önkivágódó intronok mechanizmusukban és szerkezetükben nagyon hasonlítanak a spliceosomákban található U1-U6 snRNS-ekre. Ez utóbbiak valószínűleg ilyen önkivágódó intronoknak az evolúció során bekövetkezett „önállósodásából” származnak. A spliceosomák fehérjekomponensei főleg a katalitikus aktivitású snRNS-ek szerkezetének stabilitását biztosítják.

A katalitikus aktivitású RNS-eket *ribozimoknak* nevezzük, a spliceosomákon kívül jellegzetesen ilyenek például a riboszómában található rRNS-ek is.

3. A poly-A farok

Az eukariótákban a legtöbb mRNS-nek *poli-A farka* van az mRNS 3' végén. A poli-A farok 100-250 adenin nukleotidból áll, és *nincs* poli-T DNS-templátja a génben. A poli-A farok képződésének mechanizmusa a következő (9.14. ábra). Egy enzimkomplex egyik tagja az AAUAAA (poli-A felismerési helynek nevezett) szekvenciától 10-30 nukleotiddal lentebb, azaz a 3' irányban elvágja a pre-mRNS-t, egy másik alegység, a poli-A polimeráz pedig poli-A farkat készít. A poli-A farok az mRNS élettartalmát szabályozza: minél többször gördülnek végig a riboszómák egy mRNS-en, annál rövidebb lesz a poli-A farok.

A pre-mRNS érése kb. 30 percet vesz igénybe, természetesen a sejtmagon belül. Talán meglepő, de a pre-mRNS-eket alkotó nukleotidoknak csak kis hányada, átlagosan kb. 5%-a kerül bele az érett mRNS-

És ez egy fontos különbség a prokarióták és eukarióták között: az eukariótákkal ellentétben a prokariótákban (miután nincs sejtmagjuk) az mRNS-ek transzlációja már akkor elkezdődik, amikor szintézisük, azaz a transzkripció még be sem fejeződött. Ez előnyös számukra, mert nagyon meggyorsítja a fehérjeszintézis folyamatát, ugyanakkor prokariótákban nincs lehetőség arra, hogy egy elkülönült térben, még a fehérjeszintézis előtt módosítani lehessen az mRNS-t. Így nem működhet az eukarióta fehérjék sokféleségét biztosító splicing, és nincs meg egy másik fontos transzkripciós szabályozási pont sem: az eukariótákban adott esetben még az érett mRNS is visszatérhet a sejtmagban, ha a helyzet úgy kívánja.

ÖSSZEFOGLALÁS

A DNS-ben kódolt genetikai információ a fehérjék szintjén nyilvánul meg. A fehérjék szintézise kétféleképpen „erősítési” folyamatban történik. Először a transzkripció során a génről sok mRNS, majd minden egyes mRNS alapján nagyon sok fehérje képződhet. Az mRNS szintézisét speciális fehérjekomplex, az RNS-polimeráz végzi. Az mRNS-ek szintéziséhez specifikus DNS-szekvenciákra, promóterekre van szükség. A promóterek nem csak a transzkripció kezdetét jelölik, hanem szabályozzák a transzkripció, így a génkifejeződés mértékét is. A DNS tehát nemcsak azt kódolja, hogy milyen fehérjék képződjenek, hanem azt is, hogy belőlük milyen sejttípusban, az egyedfejlődés melyik szakaszában, és mennyi szintetizálódjon. Az eukarióta mRNS-ek érési folyamaton mennek keresztül, amelynek talán legfontosabb lépése „átszabásuk”, a splicing.