

# **SEJTBIOLÓGIA**

biomérnök hallgatók számára

**Harmadik rész:**

**A sejtmag**

**Novák Béla**

docens

**Proofreading:**

Sveiczter Ákos

ösztöndíjas kutató

1994. október 26.

Copyright © 1994

BME, Mezőgazdasági Kémiai Technológia Tanszék

## A sejtmag

Eukariótákban a DNS a sejtmagban található, ami a teljes sejttérfogat kb. 10%-a. A sejtmagot a **sejtmaghártya (nuclear envelope)** határolja, ami 2 koncentrikus membrán, rajta **pórusok (nuclear pores)** vannak. A sejtmaghártya folytonos az ER membránnal. Intermediér filamentumokból álló 2 hálózat merevíti:

1. **nukleáris lamina:** vékony réteget alkot a belső membrán belső felszínén
2. kívül sokkal szabálytalanabb hálózat.

Miért alakult ki a nukleáris kompartment?

1. azért, hogy megvédje a törékeny DNS-t a citoskeleton által létrehozott mechanikai erőktől.

2. RNS érés van az eukariótákban:

Prokariótákban:

- az mRNS 5' vége transzlálódik, mielőtt a 3' átíródott volna (transzkripció és transzláció térben és időben nincs szétválasztva);
- nem lehet az RNS-t módosítani a transzláció előtt (primer transzkript = mRNS).

Eukariótákban a transzkripció és transzláció térben és időben el vannak választva.

A nukleusz biztosítja, hogy az **RNS splicing** (illesztés) nem interferál a riboszómákkal, azaz a primer transzkript mRNS-sé érik a sejtmagban, de átírása nem indulhat el közben.

## A KROMOSZÓMA DNS ÉS ANNAK PAKOLÁSA

A DNS molekula nagyon **hosszú, nem elágazó, lineáris** polimer, ami nukleotidok millióiból áll. Minden DNS molekula szeparált **kromoszómákba** tömörül és a sejt kromoszómaiban tárolt genetikai információ a **genom**. Az *E.coli* egy  $4.7 \cdot 10^6$  darab nukleotid párból álló, egyetlen, cirkuláris DNS-t tartalmaz. A humán genomban  $6 \cdot 10^9$  nukleotid pár van, 46 kromoszómában (22 pár autoszóma és 2 szex kromoszóma). Tehát 24 különböző DNS molekula, amik  $50 \cdot 10^6$  és  $250 \cdot 10^6$  bázispár közötti értéket képviselnek.

Diploid szervezetben 2 kópia van minden kromoszómából (kiv. szex kromoszómák). Ez a DNS mennyiség egy  $1.9 \mu\text{m}$  oldalú kockába pakolható.

A kromoszómák struktúrájukat és aktivitásukat változtatják a **sejtciklus fázisa** szerint: **mitózis (M-fázis)** alatt kondenzáltak és transzkripciósan inaktívak; **interfázisban** kevésbé kondenzáltak és RNS szintézist irányítanak.

### **Minden lineáris kromoszómát képező DNS-nek tartalmaznia kell egy centromért, 2 telomért és replikációs kezdőpontokat**

A funkcionális kromoszómának nemcsak az RNS szintézist kell irányítania, hanem önmagát is továbbítania kell az utódokba. Ez 3 jellegzetes nukleotid szekvenciát követel, melyekhez specifikus fehérjék kötnek, amik a replikációt és a szegregációt biztosítják. Élesztőknek kicsi a kromoszómája, és rekombináns DNS technikával manipulálható. Velük azonosították ezeket a nukleotid szekvenciákat. A háromból kettőt cirkuláris plazmid DNS-sel azonosítottak:

**1. DNS replikációs kezdőpontok:** minden kromoszómán több van, és ha a plazmidba egyet tesznek, akkor replikálódik.

**2. Centromér:** olyan DNS szakasz, ami bármilyen DNS-t a mitózisos orsóhoz köt. Ha a plazmidba teszik, akkor ez garantálja, hogy mindkét utód kap egy-egy kópiát a DNS-ből. A centromér DNS-hez kötnek a **kinetochor** fehérjék, és ezek kötik a kromoszómát a mikrotubulusokhoz.

### **3. A telomérek olyan rövid ismétlődő szekvenciák, amiket a telomeráz ad a kromoszóma végéhez**

A lineáris kromoszómák minden végéhez szükséges a telomér. Ha egy cirkuláris plazmid DNS-t felszakítanak, és 2 szabad vége lesz, akkor az replikál, és köt a magorsóhoz, de az utódok elvesztik, mert minden replikációs ciklusban rövidebb lesz a DNS. Baktériumok ezt a "replikációs vég" problémát a cirkuláris DNS-sel oldották meg. Eukariótáknál a telomér DNS szekvenciák minden kromoszóma végén megtalálhatók, amik ismétlődő egységekből állnak. A telomér szekvenciák értelmetlenek: a sejt azért szintetizálja őket, hogy replikáció végén, amikor rövidül a DNS, nehogy az értelmes (kódoló) régiókból veszítsen. Ugyanis a DNS polimeráz nem tudja replikálni a lineáris DNS molekula végét. A vezető szálon, amikor lebontódik az RNS primer, nem tudja a szintézist miről elkezdni  $5' \rightarrow 3'$

irányba. A telomér szekvenciák nagyon hasonlóak az egyes eukariótákban: humán sejtekben pl. GGGTTA szekvenciák **ismétlődnek**.

**Telomeráz enzim:** G-ben gazdag szálat ismer fel a meglévő telomérben, és azt hosszabbítja 5' → 3' irányban. Komplementer DNS hiányában szintetizál, úgy hogy egy RNS templátot használ, ami az enzimnek része.

Mindhárom fenti szekvencia rövid: < 1000 bázispár. Humán sejtekben csak a telomért azonosították. Az élesztő szekvenciák nem működnek humán sejtben. De az élesztő szekvenciák humán DNS-hez adva replikálnak élesztőben (**mesterséges kromoszómák**).

### **A legtöbb kromoszómális DNS nem kódol fehérjét vagy RNS-t**

A magasabbrendű organizmusokban a DNS nagy feleslegben van. A haploid DNS tartalom nincs kapcsolatban a sejt komplexitásával (humán sejtben 700-szor annyi a DNS, mint az *E.coli*-ban, kétéltűekben pedig 30-szor annyi, mint humánban).

Az emlős genom elvileg 3 millió átlagos méretű fehérjét kódolhatna, de gyakorlatilag max. 60 ezret kódol. Az ecetmuslica 5000 esszenciális génnel rendelkezik, és a humán sejt kb. 10-szer többel. A mutációs ráta meghatározza ugyanis az esszenciális gének maximális számát, amitől a sejt túlélése függhet (bonyolult autók gyakrabban romlanak el). Számítások alapján az emlős genom csak kis része kódolhat esszenciális géneket.

A nem kódoló extra DNS szakaszok cipelése nem hátrány a sejtnek.

### **Minden gén RNS molekulát termel**

A genom elsődleges funkciója RNS molekulák kódolása, ami lehet:

1. fehérje kód (ha a termék mRNS),
2. struktúrális RNS: tRNS vagy rRNS.

A funkcionális RNS-t kódoló szakasz neve **gén**.

Magasabbrendű eukariótákban a 100.000 bp-nál hosszabb gének elterjedtek. (van 2 milliónál hosszabb is). Kb. 1000 bp elegendő egy átlagos (300-400 aminosavból álló) fehérje kódolásához. A gén 2 részből áll:

1. A legnagyobb része hosszú nem kódoló (megszakító) szakaszok: **intronok**.
2. A rövidebb kódoló szakaszok az **exonok**.

Az **elsődleges RNS transzkript**, ami egy ilyen génről keletkezik, **illesztésen (splicing)** megy keresztül.

A génnek vannak **regulációs DNS szekvenciái** is. Ez lehet:

1. **upstream** (5' végen)
2. **downstream** (3' végen)

### **A rokon fajok DNS-ének összehasonlítása konzervált és nem konzervált DNS szekvenciákat különböztet meg**

A humán genom szekvenálása már folyamatban van (Human Genome Project). A genom 90%-a azonban nem fontos. Hogyan lehet tudni melyik az a kis rész, ami fontos? A fontos részek konzerváltak, a nem fontosak viszont mutálnak.

Stratégia: a humán szekvencia összehasonlítása pl. az egérével. A közös emlős őstől 80 millió évvel ezelőtt divergáltak. Ennyi idő alatt 3-ból 2 bázis mutálhat. Azok a DNS szakaszok fontosak, ahol a mutáció a funkciót károsítja. Aki ilyen mutációt hordoz, azt a természetes szelekció eliminálja.

**Konzervált szakaszok:** exonok és regulációs szekvenciák

**Nem konzervált szakaszok:** nem kódoló szakaszok a gének között és az intronok.

### **Az eukarióta kromoszóma alapvető struktúrális fehérjéi a hisztonok**

Minden kromoszóma DNS-e speciális fehérjékkel kompakt struktúrákba pakolt. A DNS kötő fehérjék 2 nagy csoportja:

1. **hisztonok**
2. **nem hiszton fehérjék.**

**kromatin** = a nukleáris DNS ezen fehérjékkel alkotott komplexe.

**Hisztonok:** az eukariótákra jellemzők. **Nagy mennyiségben** vannak jelen (60 millió molekula / sejt). Mennyiségük a kromatinban a DNS tömeggel azonos.

Relatív **kis fehérjék**, és sok bennük a **pozitívan töltött aminosav** (lizin és arginin) bennük. Segíti, hogy a negatív töltésű DNS-hez kössenek szekvenciától függetlenül. Nem disszociálnak a DNS-ről és **nem szabályozhatnak**.

5 féle hiszton van, amik 2 csoportba sorolhatók:

1. **nukleoszómás hisztonok:** H2A, H2B, H3 és H4; 102-135 aminosav; H3 és H4 a legkonzerváltabb fehérjék. Minden aminosavuk fontos.
2. **H1 hisztonok:** kevésbé konzervatívak és hosszabbak (220 aminosav).

### **A hisztonok a DNS-sel asszociálva nukleoszómákat képeznek, ami a kromatin egysége**

Ha kitekernénk egy humán kromoszóma DNS-ét, több ezerszer átölelné a sejtmagot. A hisztonok pakolják be ezt a hosszú DNS-t.

A kromatin struktúra alapvető csomagolási egysége a **nukleoszóma** (1974-ben fedezték fel). **“Gyöngyök a zsinóron”** elvű elhelyezkedést mutatnak az elektronmikroszkópos felvételeken, ha a magasabbrendű szerveződés megszűnt.

Nukleázzal kezelve rövid ideig csak a nukleoszómák között hidrolizál a DNS: a 146 bázispárból álló DNS kettős hélix 8 (**oktamer**) hisztonhoz (2 db H2A, H2B, H3 és H4) kötődve marad. **Lemezszerű struktúra** (átmérő = 11nm), amiben a DNS kétszer van feltekerve a hisztonok körül.

**Linker DNS:** nukleoszómák közötti kettős hélix szakasz, ami 0-80 bp hosszú lehet.

Az ismétlődések (nukleoszóma + linker) átlagos hossza: 200 bázispár.  
1 átlagos gén (10 ezer nukleotid) tehát kb. 50 nukleoszómából áll.

### **A nukleoszómák pozíciójának meghatározása**

Bizonyos régióknál erősen kötődő fehérjék akadályozzák a nukleoszóma kialakulását: ezek a régiók többszáz bázispárból is állhatnak. DN-áz I bontja ezeket, mert a fehérjék azt nem gátolják. Ezek a gének regulációs szakaszai.

Összefoglalva: az eukarióta DNS alapállapota a nukleoszómas szerveződés, és a nukleoszóma mentes szakaszokat gén regulátor fehérjék kötődése okozza.

### **A nukleoszóma H1 hisztonnal összepakolva magasabbrendű struktúrákat alkotnak**

A “gyöngyök a zsinóron” struktúrák egymásra lapulnak: elektronmikroszkópos felvételen ugyanis a kromatin 30 nm vastag szálnak tűnik, ami szélesebb a “gyöngyök a zsinóron” struktúrájánál. 6 darab lemezalakú struktúra spirálisan.

Ennek a 30 nm vastag struktúrájának a kialakulásában a H1-hisztonoknak van szerepe: ezekből emlős sejtekben 6 féle van: evolúciósan konzervált, globuláris középső szakaszból és kevésbé konzervált N- és C-terminális karokból állnak.

### **A KROMOSZÓMÁK GLOBÁLIS STRUKTÚRÁJA**

A 30 nm vastag szálak még mindig 0.1 cm hosszúak lennének, ami a sejtmag méretének 100-szorosa. Más proteinnel még tovább csomogódik a DNS, de ennek molekuláris részletei kevésbé ismertek.

### **A lámpakefe kromoszómák dekondezált kromatint tartalmazó hurkokat mutatnak**

Az interfázisban a kromatin pakolás olyan finom, hogy nem látjuk. Néhány kivételes esetben azonban láthatunk egy magasabb szerveződésű struktúrát.

Kételtűek oocitáiban (éretlen pete) a meiózis első profázisakor aktív RNS szintézis van, amikor azok a mRNS-ek készülnek el, amik megtermékenyítés után lesznek fontosak. Kromatin hurkok láthatók a DNS tengelyére merőlegesen, amik újonnan átírt RNS-t tartalmaznak. Minden hurkból 4 darab van, mert az első meiózisos osztódás előtt vagyunk. A struktúra a kémcsőkefére (**lampbrush = lámpakefe**) emlékeztető alakú, ami lineáris **inaktív** szegmensekből (**kromomer**) ágazik ki. A hurkok aktívan résztvesznek az RNS szintézisben, míg a kromomer “csendes”. A hurkok 30 nm vastag szálból állnak.

**Konklúzió:** ha a kromatin aktívan átíródik, akkor kitekeredik; ha nem íródik át, akkor kondenzált marad.

### **A rovarok politén kromoszómái**

A kromatin struktúra különösen jól látható rovarok (pl. ecetmuslica) bizonyos sejtjeiben (pl. nyálmirigyek). A lárvának ezek a sejtjei szokatlanul nagy méretet érnek el többszörös DNS replikációval, sejtosztódás nélkül. A képződött sejt a normális DNS tartalom több ezerszeresét tartalmazza (**poliploid**). A rovarok nyálmirigyeiben ezek az ún. homológ kromoszómák oldalukkal összetapadva együttmaradnak és egy gigantikus méretű **politén** kromoszómát alkotnak. Később a politén kromoszóma valódi poliploiddá alakul, ami azt mutatja, hogy szerkezete a valódi kromoszómáét tükrözi.

Pl. a *Drosophila* 4 kromoszómája 10 DNS replikációs cikluson megy keresztül anélkül, hogy a leánykromoszómák szeparálódnának, és az  $1024 (= 2^{10})$  azonos kromatin lánc egymás mellett helyezkedik el.

Fénymikroszkópos vizsgálat:

1. sötét **sávok** (a DNS 85%-a); sötét, mert a DNS kondenzált;
2. világos **intersávok** (a DNS 15%-a); világosabb, mert nem annyira kondenzált.

Minden sáv és intersáv 1024 azonos DNS szekvencia egymás mellett. Minden sáv 3.000-300.000 bp-ból áll egy kromatin szálon. Kb. 5000 sáv és intersáv van.

### **Az egyedi kromatin részek kitekeredhetnek és kondenzálódhatnak**

A politén kromoszómák vizsgálata már korán jelezte, hogy a DNS pakolásában alapvető változás van a gén transzkripciója során:

1. az egyedi kromoszóma szálak kiterjednek, ha gén a aktív, és
2. kondenzálódnak, ha a gén inaktív.

A kromoszóma azon szakasza, ami átíródik,  $^3\text{H}$ -uridines autoradiográfiával láthatóvá tehető. A legaktívabb szakaszok dekondenzáltak, és **puffokat** alkotnak.



A lárva fejlődése során különböző szakaszok duzzadnak meg, és húzódnak vissza.

### **A politén kromoszómában a sávok és az intersávok is géneket tartalmaznak**

Régi elképzelés: minden sáv egy génnek felel meg.

Kb. 5000 gén van a *Drosophila*-ban, ami kb. egyezik a sávok számával.

Ma már tudjuk, hogy egy sávban több gén is van, és az intersávokban is van gén.

Összefoglalva: a DNS a politén kromoszómák sávjaiban a lámpakefe kromoszómák hurkaihoz hasonlóan rendeződik el. A puff képződés a hurok struktúrák dekonzenzációjából adódik.

### **A transzkripciósan aktív kromatin kevésbé kondenzált**

A puffképződés konklúziója: az átírt géneknél a kromatin struktúra szelektíven dekonzenzációját követi.

Más sejtekben a DNáz I-es kezeléssel a genomnak az a része bontható, ami éppen átíródik (neve: **aktív kromatin**).

### **Az aktív kromatin biokémiailag különbözik az inaktívtól**

Az aktív kromatin régió jellemzői:

1. a H1 hiszton kevésbé erősen kötődik,
2. nukleosómás hisztonok erősen acilezettek,
3. a H2B hiszton kevésbé foszforilezett.

### **A heterokromatin erősen kondenzált és transzkripciósan inaktív**

Korai mikroszkópos vizsgálatok a kromatin 2 típusát különböztették meg:

1. **Heterokromatin**: erősen kondenzált, szokatlanul kompakt az interfázisban is, transzkripciósan inaktív, a genom kb. 10%-a.
2. **Eukromatin**: kevésbé kondenzált, két formája van:
  - 10%-a aktív kromatin, ami a legkevésbé kondenzált,

- a többi inaktív eukromatin, ami kondenzáltabb, de kevésbé, mint a heterokromatin.

A heterokromatin a transzkripciósan inaktív kromatin különös fajtája: pl. a centroméra melletti ún. **szatellit DNS**-t ismétlődő szekvenciák alkotják.

### **A mitózisos kromoszómák a kromatin legkondenzáltabb formái**

A kromoszómák szinte kivétel nélkül láthatók minden sejtben a mitózis alatt. Feltekerednek, és még kompaktabb struktúrát alkotnak, ami a DNS 5 cm-es hosszát 5 µm-re redukálja. A folyamatot a H1 hisztonok (amik a nukleoszómákat pakolják össze) 5 szerinjenek a foszforilációja kíséri.

A mitózisos kromoszóma a metafázisban: a 2 leány DNS molekula egymástól függetlenül tekeredik, és 2 **leány kromatidát** alkot, amik csak a centroméránál vannak összekapcsolva.

A mitózisos kromoszóma kondenzált kromatinja a heterokromatinra hasonlít: nagyfokú pakoltság. Ezért transzkripciósan inaktívak a kromoszómák a mitózis alatt.

## **KROMOSZÓMA REPLIKÁCIÓ**

Mielőtt a sejt osztódna, minden kromoszómájának egy új kópiáját kell elkészítse. Ezt az **interfázis** egy része alatt teszi: **S-fázis**, ami egy átlagos magasabbrendű eukariótában 8 órát tesz ki. Az S-fázis végétől az M-fázisig a 2 komplett DNS kópia a centroméráknál még összetapad. A kromoszóma **duplikáció** nemcsak a DNS replikációját, hanem a kromoszómás fehérjék megduplázódását és beépülését is magában foglalja.

### **Specifikus DNS szekvenciák szolgálnak replikációs origóként**

A baktériumokban specifikus DNS szekvenciák vannak, amik a DNS replikációs apparátus kötődésére szolgálnak, és **bidirekcionális replikációt** tesznek lehetővé. A *Saccharomyces cerevisiae* sarjadzó élesztőben is találtak ilyen genetikai módszerekkel: **autonóm replikációs szekvencia (ARS)** = plazmid replikációját biztosítani képes génszakasz. Ezek autentikus kromoszómás replikációs origók. Egy 11 nukleotidból álló konszenzus szekvencia jellemzi őket, ami ismétlődik 100 nukleotid hosszú szakaszon.

Két különböző DNS polimeráz működik eukariótákban: a követő szálon a **DNS polimeráz  $\alpha$**  (lazán kötött, és ugrál az Okazaki fragmenseknél), míg a vezető szálon a **DNS polimeráz  $\delta$**  (szorosan kötött a DNS-hez).

### **A magasabbrendű eukarióták kromoszómaiban a replikációs kezdőpontok csoportokban aktíválódnak**

Baktériumban egy kezdőhely van, és abból kiindulva két irányban halad a replikáció 1000 nukleotid / sec sebességgel. 40 perc alatt meg tudja duplikálni a kromoszómát. Eukariótáknál annyival nagyobb a kromoszóma, hogy valószínűleg több origó van.

Emlős sejtek: pulzus jelölés  $^3\text{H}$ -timidinnel és autoradiográfia. A replikációs villák sebessége kb. 50 nukleotid / sec. Egy átlagos humán kromoszóma 150 millió nukleotidpárt tartalmaz, aminek a szintézise egy villával  $150 \cdot 10^6 / 50 = 3 \cdot 10^6 \text{ sec} = 800 \text{ óráig}$  tartana. Az autoradiográfia mutatja is, hogy több villa mozog egyszerre. Sőt a legtöbb villa közel van egymáshoz a kromoszómán, míg a kromoszóma más részein nincs is villa:

1. Replikációs origók 20-80-as csoportokban (**replikációs egységek**) aktíválódnak,
2. Az S-fázis alatt mindig újabb egységek aktíválódnak,
3. az egyes egységekben az origók 30-300 ezer nukleotid távolságra vannak egymástól,
4. a replikációs villák párokban képződnek, és replikációs buborékokat alkotnak, ellentétes irányban haladnak, amíg a szembejövőkkel nem ütköznek.

### **Egyazon kromoszóma különböző régiói eltérő időben replikálódnak**

Két replikációs origó közti szakasz replikációja kb. 1 órát igényelne, figyelembe véve a villák sebességét. Ennek ellenére az S-fázis 8 órát vesz igénybe emlős sejteknél. Miért? A replikációs origók nem szimultán replikálódnak, és az egyes egységek az S-fázis egy tört része alatt replikálódnak.

## **Az erősen kondenzált kromatin későn, az aktív pedig korán replikálódik**

Úgy tűnik, hogy a replikációs origók aktiválódási sorrendje annak a kromatin struktúrájával kapcsolatos, ahol az origó elhelyezkedik:

1. a heterokromatin az S-fázis vége felé replikálódik,
2. az aktívabb kromatin aktiválódik előbb.

A villák sebessége nem változik az S-fázis alatt, a kromatin kondenzációs állapota az iniciációt befolyásolja, nem pedig a sebességet.

Az S-fázis nagyon gyors a megtermékenyített petékben, ahol a kromatin komponensek (pl. hisztonok) nagy raktárai találhatóak. A rövid S-fázis nagy számú replikációs origót igényel, amik néhány ezer nukleotid távolságra, nem pedig 10 vagy 100 ezer bp távolságra vannak. Mivel bármilyen idegen DNS replikálódik ilyen rendszerekben, ezért feltehetően nem kell specifikus DNS szekvencia a kezdéshez.

A DNS replikáció egy gyors folyamatnak tekinthető, ami a legtöbb sejtben szigorú szabályozásnak van alávetve: a replikációs villák iniciációja visszafogott, a genom egyes részei különböző időben replikálódnak.

### **Kromatin kötött faktorok biztosítják, hogy a DNS minden egyes darabja csak egyszer replikálódjon**

A normális S-fázis alatt a genom csak egyszer replikálódhat. A legtöbb sejtben a replikáció **aszinkron** folyamat, ami relatíve hosszú ideig tart. Mivel a kromoszóma egyes régióiban lévő origók eltérő időben aktiválódnak, ezért pl. az S-fázis közepén egyes szakaszok már replikálódtak, mások pedig még nem. Hogyan valósul az meg, hogy a már replikálódott origók nem aktiválódnak többet, míg a nem használtak pedig replikációba kezdenek?

Sejtfúziós kísérletek:

1. S- és G1-fázisú sejtek fúziója: a G1-fázisú sejtmagban S-fázis indukálódik.

**Konklúzió:** az S-fázist egy **diffúzibilis aktivátor** váltja ki.

2. S- és G2-fázisú sejtek fúziója: a G2-fázisú sejtmagban nem indul el újra a DNS replikáció (**re-replikáció** gátolt), de az S-fázisúban befejeződik.

**Konklúzió:** a G2-fázisú sejtmagban valami gátolja az újabb replikációt.

**Modell (Laskey & Blow): licensing factor** szükséges a replikációhoz, de az a replikáció során elhasználódik. A re-replikáció gátlása a mitózis után oldódik fel: a licensing factor talán ekkor mehet be csak a sejtmagba.

A petékbe injektált bakteriális DNS-ekre is jellemző a re-replikációs blokk, tehát az nem lehet valami specifikus szekvenciák függvénye.

### **Az új hisztonok a DNS szintézis során épülnek be a kromatinba**

Az új kromatin felépüléséhez a DNS-sel kb. azonos tömegű hisztonra van szükség. Emiatt a legtöbb sejtípusban minden hiszton gén többszörös kópiában van jelen. Gerincesekben pl. 20 kópia van mind az 5 hisztonból.

A legtöbb fehérje folyamatosan szintetizálódik a sejtciklus alatt, de a hisztonok az S-fázis alatt szintetizálódnak. A hiszton mRNS szintje ilyenkor kb. 50-szeresre nő, mert megnő a transzkripció sebessége, és lecsökken a degradációé. Az S-fázis végén a hiszton mRNS-ek percek alatt degradálódnak. A hiszton fehérjék nagyon stabilak. A DNS szintézis és a hiszton szintézis közti kapcsolat egy olyan feedback (visszacsatolásos) mechanizmussal valósulhat meg, ami a szabad hisztonokat figyeli (ha megnő a szabad hiszton koncentráció, az mRNS degradáció is felgyorsul).

## **RNS SZINTÉZIS ÉS ÉRÉS**

A kromoszóma az RNS szintézis templátjául is szolgál. Az RNS-ek az interfázisban 20-szor gyorsabban képződnek, mint a DNS az S-fázis alatt.

**DNS transzkripció:** szelektív folyamat, ami emlős sejtekben csak a genom 1%-át írja át **funkcionális** RNS-be:

1. csak a genom egy része íródik át nukleáris RNS-be,
2. a nukleáris RNS-nek csak egy része éli túl az RNS érést.

### **Az RNS polimerázok alegységet cserélnek, amikor láncot kezdenek**

Az RNS polimeráz a promoterhez köt, és nyílt komplex képződik (ld. mikrobiális fiziológia). Ezután a szintézis 5'→3' irányban halad a terminációs szignálig. A DNS átírt szakasza: **transzkripciós egység**.

Az **RNS polimerázok** több polipeptidláncból állnak, és a molekulatömegük 500 ezer vagy annál nagyobb. A bakteriális és az eukarióta enzimek között homológia tapasztalható.

Emlékeztető: az *E.coli* RNS polimeráza 2 db  $\alpha$ , egy  $\beta$ , egy  $\beta'$  és egy  $\sigma$  alegységet tartalmaz.

A  $\sigma$  alegység az iniciációban játszik szerepet, és ha az RNS lánc 8 nukleotid hosszú, akkor ledisszociál, és **elongációs faktorok** veszik át a helyét (ezeket nem ismerjük még jól).

### **Eukariótákban 3-féle RNS polimeráz szintetizálja az RNS-eket**

3 féle RNS polimeráz (RNSP) van az eukariótákban, melyek struktúráisan hasonlóak, mert vannak azonos alegységeik, de vannak eltérők is. Legalább 10 alegységből állnak és olyan iniciációs faktorokat igényelnek, amiknek előzetesen a **promoterhez** kell kötniük, hogy az enzim kötni tudjon.

RNSP II: azokat a géneket írja át, amiknek RNS-e proteinné fordítódik.

A másik két RNSP pedig olyan RNS-eket szintetizál, amiknek struktúrális vagy katalitikus szerepük van:

RNSP I: a nagy riboszómális RNS-eket és a **kis nukleáris ribonukleo-proteinek (small nuclear ribonucleoproteins, snRNP, ld. később)** RNS-ét,

RNSP III: kis és stabil RNS-eket (pl. 5S rRNS és tRNS-ek).

Emlős sejtekben minden egyes polimerázból 20-40 ezer darab van egy sejtben.

### **Az RNS polimeráz II bizonyos DNS szekvenciákat gyakrabban ír át**

Az RNSP II készíti az mRNS-eket, és ezzel nagyrészt meghatározza, hogy egy fehérjéből mennyi legyen a sejtben. A legtöbb gént olyan ritkán írja át az RNSP II, hogy az elektronmikroszkópos felvételen csak 1 db enzim dolgozik a génen (végig megy a génen, mire egy másik elkezd).

Bizonyos géneken azonban sok polimeráz dolgozik, és ezekről sok transzkript keletkezik.

1. Átlagosan az RNSP II 7000 nukleotidból álló primer transzkripteket eredményez, ami sokkal hosszabb, mint egy átlagos (400 aminosavból álló) fehérje kódolásához szükséges 1200 nukleotid.
2. A lánc elongáció sebessége állandóan 30 nukleotid / sec, és az iniciáció sebessége van szabályozva.

### **A mRNS-ek prekursorai mindkét végükön kovalensen módosítottak**

Az RNSP II által szintetizált RNS az **elsődleges transzkript**, és ezeknek összességét régen **heterogén nukleáris RNS-eknek** (hnRNS) neveztük, mert méretük igen variábilis (ezt az intronok okozzák, ld. később).

**Csak** az RNSP II transzkriptjei módosulnak az 5' és 3' végükön (az RNSP I és III termékei nem), és ezek jelzik a sejt számára, hogy ezeket a transzkripteket fehérjébe kell fordítani.

**Az 5' vég módosítása:** amikor a transzkript kb. 30 nukleotid hosszú, az 5' végről lehidrolizálódik egy foszfát a trifoszfátból, és egy GTP kapcsolódik (PP<sub>i</sub> kilépéssel) ellentétes orientációval (5'-5'-trifoszfodiészter kötés), ami metileződik. Az **5' sapka (5' cap)** a fehérjeszintézis iniciációjához fontos, és a készítő **enzimek az RNSP II-höz kapcsolódnak** (mert a másik 2 RNSP esetében nincs ilyen módosítás).

**A 3' vég módosítása:** a transzkript ezen végét nem terminációs szignál határozza meg, hanem a következő mechanizmus: az RNS lánc szintézise során megjelenik egy **vágási szekvencia**, ahol az RNS elhasad. A **poli-A polimeráz** pedig 100-200 adenilsavból álló láncot köt hozzá, és így keletkezik az **elsődleges transzkript**. Eközben az RNSP II folytatja a gén átírását, de mivel az új 5' végre nem kerül **sapka**, ezért ezek az RNS-ek degradálódnak.

A poli-A vég szerepe:

1. az RNS transzportját segíti a sejtmagból a citoplazmába,
2. stabilizálja az RNS-t,
3. segít a riboszómának felismerni az mRNS-t.

Az RNSP II gyártja az RNS-ek felét, de mivel azok rövid életűek, ezért csak az RNS-ek kis százalékát képviselik. Mégis könnyen ki lehet halászni őket az RNS keverékből a poli-A végük miatt: **poli-dT oszlophoz köthetők**.

## **Az RNS érés hosszú nukleotid szekvenciákat távolít el az RNS molekula közepéről**

A baktériumokban a gének folytonosan kódolják a fehérjét, ezért igen váratlan volt, amikor 1977-ben felfedezték, hogy az eukarióta gének nem kódoló (megszakító) szakaszokat is tartalmaznak, mozaikosak: exonokból és intronokból állnak.

**Intron:** az a DNS szakasz, aminek másolata az mRNS-ből az érés során kihasad.

**Exon:** az a DNS szakasz, aminek másolata az mRNS-ben is benne marad.

Ez a felfedezés megmagyarázta a hnRNS-ek misztikus mivoltát: miért olyan hosszúak és miért degradálódnak olyan gyorsan. 7000 nukleotidos átlagos méretről percek alatt 1500 nukleotid méretre csökkennek anélkül, hogy elvesztenék 5' és 3' módosításaikat.

**Elsődleges (primer) transzkript:** a gén gazdaságtalan kópiája, ami exonból és intronból áll. Az utóbbiak kivágódnak, mielőtt az mRNS kijut a magból és transzlálódik.

**RNS összekapcsolás (RNA splicing):** az mRNS érési folyamata, melynek során az intron 2 oldalán lévő exonok összekapcsolódnak, az intron kihasad.

### **A hnRNS transzkripteket azonnal fehérjék és snRNP-k borítják**

Az újonnan szintetizált RNS-ek azonnal fehérje tartalmú részecskékkel kapcsolódnak. Kb. 500 nukleotidból álló RNS tekeredik a fehérje részecskére, a nukleoszómához hasonlóan: **heterogén nukleáris ribonukleoprotein részecske = hnRNP**.

Ezek a részecskék a transzkripció alatt képződnek az exon - intron határon, és ők felelősek az RNS splicing-ért (**spliceosome**).

Biokémiai analízisek a sejtmagban olyan fehérje komplexeket mutattak ki, amik kis RNS-eket (250 nukleotidból álló) tartalmaznak (U1, U2,....U12): **kis nukleáris ribonukleoproteinek (snRNP)**. A riboszómákra hasonlítanak, de annál sokkal kisebbek.

### **Az intron szekvenciák lasszó alakban vágódnak ki**



Az intronok hossza 80-1000 nukleotid lehet, és nukleotid szekvenciájuk lényegtelen (szemben az exonéval). Egyedül a kivágódásukért felelős szekvenciák fontosak, amik a végeik felé vannak, és nagyon hasonlóak az egyes intronokban: **5' kapcsolási (donor) oldal** és **3' kapcsolási (akceptor) oldal**. A kivágásnak nagyon pontosnak kell lennie, mert egyébként a fehérje szekvenciája megváltozik.

A kivágódás *in vitro* vizsgálata egy RNS-sel:

Kétlépéses enzimes folyamat, amihez ATP, U1, U2, U5 és U4/U6 snRNP-kre van szükség, és utóbbiak alkotják a **spliceosome-át**.

Az intron 5' végénél elvágódik, a 3' végéhez közeli helyhez kapcsolódik (lasszó alak), majd a 3' vég is elhasad.

Ha egy fehérjében több intron is van, akkor az 5' vég elvileg kapcsolódhatna egy távolabbi intron 3' végével is. Ebben az esetben több vágódna ki a mRNS-ből, mint kellene, de ez nem következik be.

### **A spliceosome-ák által katalizált reakció feltehetően egy önkapcsolásos mechanizmusból alakult ki**

Még ma is meg lehet figyelni olyan összekapcsolást, amiben fehérje nem játszik szerepet (önkapcsolás): ha egy tiszta RNS-t kémcsőbe teszünk, és abból az intron kivágódik. Kétféle önkapcsolási reakciómechanizmus ismert:

1. A 3' véghez közel az intron köt egy szabad guanin nukleotidot, és az hasítja az 5' véget.
2. Az intronban, annak 3' végéhez közeli adenin hasítja az 5' véget lasszó intermediert képezve.

Az enzimaktivitással rendelkező RNS-t, amely pl. saját érését katalizálja, ribozimnak nevezzük.

### **A legtöbb fehérje feltehetően intron tartalmú génekből ered**

Mivel a bakteriális génekben nincs intron, ezért úgy gondolhatnánk, hogy az intronok az evolúció egy későbbi stádiumában jelentek meg. Ez feltehetően nem így van.

Az intronok régi eredetűek, amit a trió-z-foszfát-izomeráz enzim példáján lehet megvilágítani. Ez az enzim még az eukarióták és a prokarióták elválása előtt alakult ki. A humán és a bakteriális enzim 46%-ban hasonlók. Gerincesekben 6 intront tartalmaz génje, és ebből 5 ugyanabban a pozícióban van, mint a búzában.

A prokarióták a leggyorsabb szaporodás szelekciós nyomása alatt vannak, ezért feltehetően evolúciósan elveszítették intronjaikat.

### **Az mRNS transzportja a citoplazmába az összeillesztés befejezéséig késleltetett**

Nagy aggregátumok képződnek, amik meggátolják, hogy a még nem összeillesztett RNS kijusson a citoplazmába. Ezek az aggregátumok analógok a **nukleólusszal**: rRNS-ek képződnek itt prekursorokból, és állnak össze riboszómákká r-proteinekkal.

### **Az rRNS-ek egymás melletti azonos génekről íródnak át**

A leggyakoribb fehérjéknek is csak egy génjük van, mert a transzláció önerősítő folyamat: egy mRNS-ről sok fehérjét lehet csinálni. Ilyen erősítés nincs az rRNS-eknél, jóllehet egy sejtnél 10 millió riboszómát kell szintetizálnia egy sejtciklus alatt.

**Megoldás:** az rRNS-ek génjei többszörös kópiában vannak jelen.

Még az *E.coli*-nak is 7 rRNS génje van, a humán sejtekben pedig kb. 200 példányban vannak 5 kromoszómán elosztatva. 8-13 ezer nukleotidból áll egy rRNS gén, és az ismétlődéseket nem átírózó szekvenciák választják el.

Az ismétlődő elrendezés és a gyors transzkripció (100 RNS polimeráz egy génen) miatt a kromatin struktúrában ez látható: **karácsonyfa** alak.

Az rRNS géneket az RNS polimeráz I írja át: egy 45 S rRNS keletkezik (13 ezer nukleotid hosszú). Ez 28S (5000 nukleotid), 18S (2000 nukleotid) és 5.8S (160 nukleotid) rRNS-ekre darabolódik, a maradék pedig degradálódik. Mivel egy prekursorból keletkeznek, ezért ekvimolárisak lesznek.

A nagy riboszóma alegység 5S rRNS-ét az RNS polimeráz III írja át, és máshol található.

## **A nukleolusz egy riboszóma termelő gépezet**

A képződött rRNS-ek a riboszóma fehérjékkel riboszómákká állnak össze még a sejtmagban, annak egy jellegzetes részében: a **nukleóluszban**. Azok a kromoszómák, amiken rRNS gének vannak, nagy hurkokat eresztenek a nukleóluszba. Minden ilyen génszakasz neve: **nukleólusz organizáló régió**. A gyorsan átíródó rRNS gének 5' végén már elkezdődik az összeszerelés. 80 különböző riboszómális fehérje jön be ide a citoplazmából.

A nukleóluszt nem borítja membrán, hanem csak a be nem fejezett riboszóma egységek közötti kölcsönhatások tartják össze.

## **A nukleólusz mitózis után specifikus kromoszómákon áll össze**

A nukleólusz jellegzetesen változik a sejtciklus alatt: a mitózis előtt csökken a mérete, és végül eltűnik, amikor a kromoszómák kondenzálnak, és az RNS szintézis leáll. Amikor az rRNS szintézis újra megindul, akkor megjelenik egy kis nukleólusz.

Humán sejtekben 5 különböző kromoszóma **végén** vannak az rRNS gének (tehát 10 kromoszómán diploid szervezetben). 10 kis sejtmagvacska jelenik meg először, de nehéz őket megkülönböztetni, mert gyorsan nőnek és fúzionálnak.