

## Sejtszintű biológiai szabályozás Szabályozás élő rendszerekben



2018 őszi

## Génexpresszió szabályozása I

2018. október 29.

### Szabályozási lehetőségek és szintek a génkifejeződésben

**Transzkripció szabályozása:** mikor mely génekről indulhat meg az mRNS átírása

- represszorok, inducerek, transzkripció faktorok

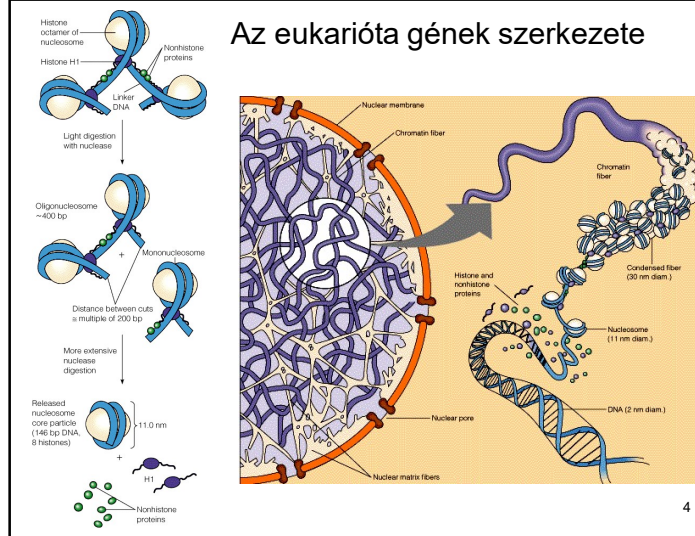
→ kromatin szerkezet – epigenetika: a DNS és az őt körülvevő fehérjék kódja

**Poszttranszkripcionális szabályozási lehetőségek:** mRNS érés, stabilitás

**Kis RNS-ek szerepei**

3

### Az eukarióta gének szerkezete



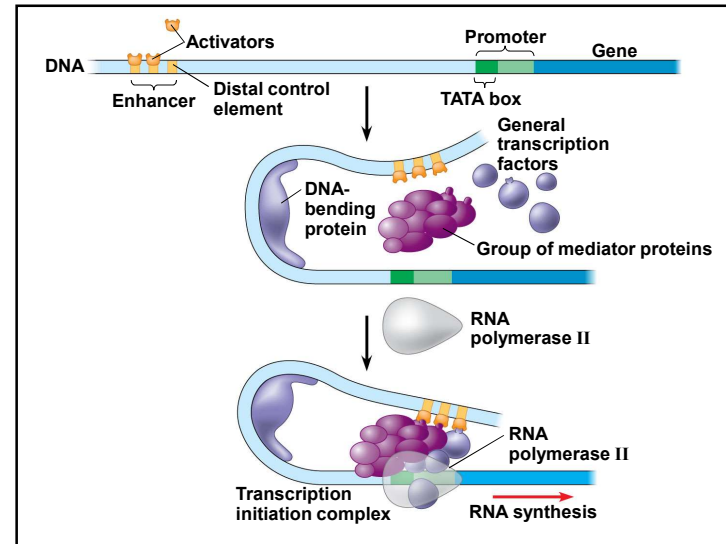
4

## Hisztonok

Histone Type	Molecular Weight	Number of Amino Acid Residues	mol %		Role
			Lys	Arg	
H1	22,500	244	29.5	1.3	Associated with linker DNA; helps form higher-order structure Two of each go to form the histone octamer core of the nucleosome.
H2A	13,960	129	10.9	9.3	
H2B	13,774	125	16.0	6.4	
H3	15,273	135	9.6	13.3	
H4	11,236	102	10.8	13.7	

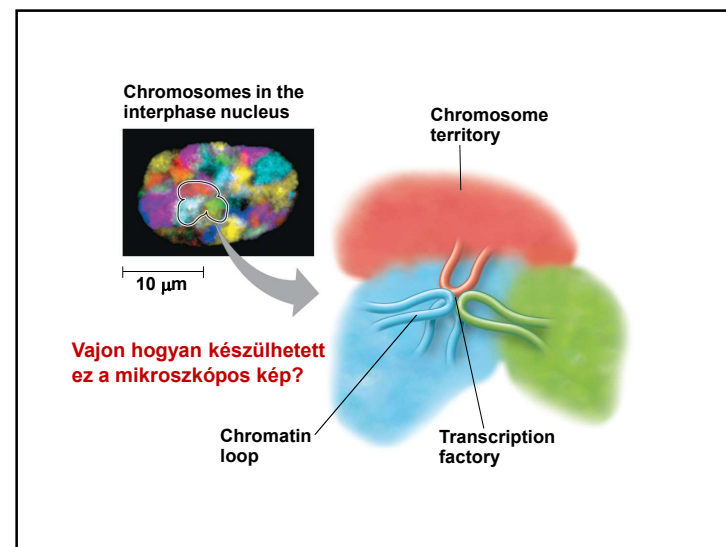
Note: All data are for calf thymus histones, except for H1, which is from rabbit.

5



## A kromatin szerkezet szerepe a szabályozásban

- Egyes kromatin hurkok különböző egyedi kromozómákról behajlanak a sejtmag egy központi régiójába
- Ez a központi régió sok RNS polimeráz és transzkripció faktor fehérje molekulát tartalmaz
- Különböző helyről származó kromozóma részletek együtt átírhatók és még a fehérje molekulákkal is spórolni lehet



## Eukromatin

- Génekben gazdag kromatin (legalábbis a heterokromatin régióhoz viszonyítva).
- A géneket körülvevő hiszton fehérjék nem szorosan kötődnek a DNS-hez, ezért a génexpresszió (génkifejeződés) aktív, szinte folyamatosan íródnak át az mRNS-be (messenger RNS-be) a gének információi
- Nehezen festhető, laza szerkezete miatt.

9

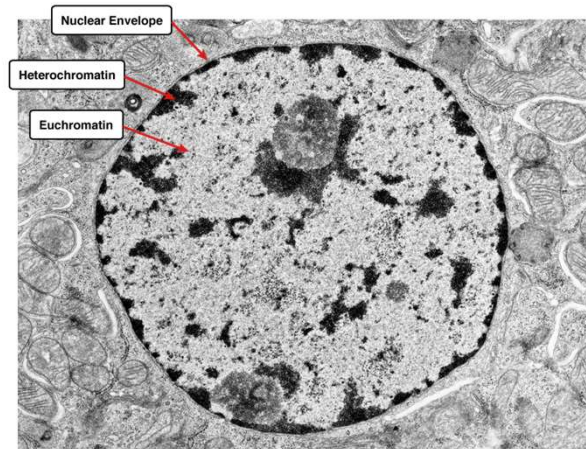
## Heterokromatin

- Nem aktív, az RNS polimeráz nem fér hozzá. Két fő típus: konstitutív vagy fakultatív heterokromatin.
- A konstitutív heterokromatin sohasem íródik át, mind funkciójában, mind formájában irreverzibilisen inaktívvá vált. Az emberi kromoszómák közül az 1-es, 9-es, 16-os és az Y kromoszóma tartalmaz ilyen régiókat.
- Fakultatív heterokromatin: képes visszatérni az eukromatikus állapotba, ezzel lehetővé téve génjeinek kifejeződését. A nőkben található inaktív X kromoszómájuk ilyen kromatinból áll. Ezen kromatin régiók metilációval és hiszton acetilációval tudnak ebben az állapotukban maradni, megakadályozva az enzimeket, hogy a DNS-hez férjenek.
- Jól festhető (Giemsa-festés): fénymikroszkóp alatt szabálytalan körvonalú sötét szemcséket mutat.

[https://en.wikipedia.org/wiki/Giemsa\\_stain](https://en.wikipedia.org/wiki/Giemsa_stain)

10

## Eukromatin vs heterokromatin



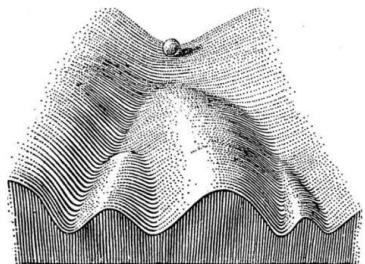
11

## Mi a molekuláris háttér?

- A genetikai információ a nukleinsav szekvencián kívül még további elemeket tartalmaz: epigenetika (C.H. Waddington)
- Hisztonok módosulásai
- DNS módosulásai
- Így létrejöhet egy olyan elköteleződés, ami alapján a részlegesen differenciálódott sejtek csak néhány további úton mehetnek tovább (pl hemopoetikus sejtekből csak véralkotó sejtek lesznek)

12

## C.H. Waddington



Waddington's Epigenetic Landscape

Mioblaszt → izomsejt, keratonocita → bőrsejt  
Jóllehet a genom ugyanaz

Itt olyan elköteleződésről van szó, ami a sejtek generációin át tud érvényesülni!

Egyszer mioblaszt lett – utána már visszamenni nem tud!

Omnipotens őssejt – pluripotens sejtvonala - differenciálódott

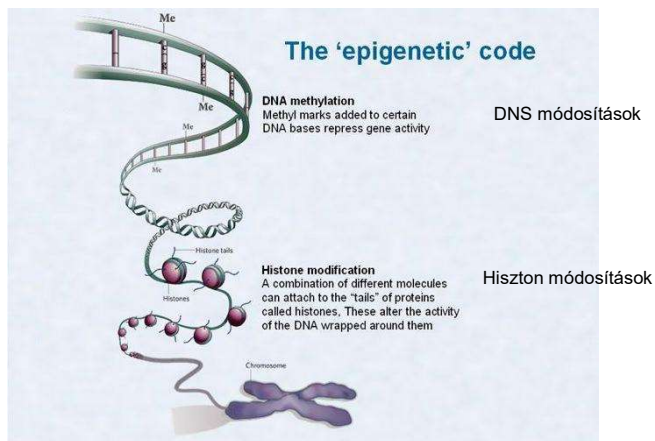
## Örökletes és nem génszekvencia-alapú tulajdonságok

-Egyetétjű ikrek különböző hajszínnel, egy alomból származó utódállatok eltérő szőrzettel

-Női X kromoszóma inaktiválás

-Szerzett tulajdonságok örökítése! Micsurin...

14

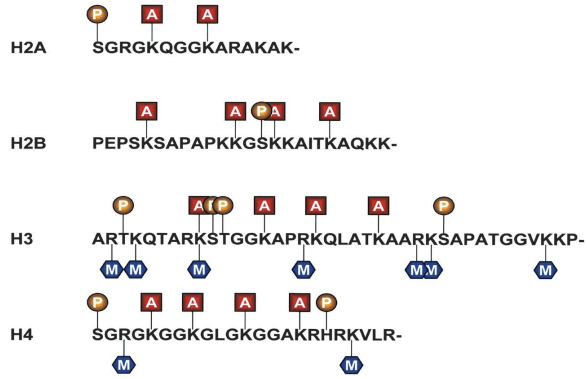


15

- Fehérje kovalens módosítások
- DNS kovalens módosítások

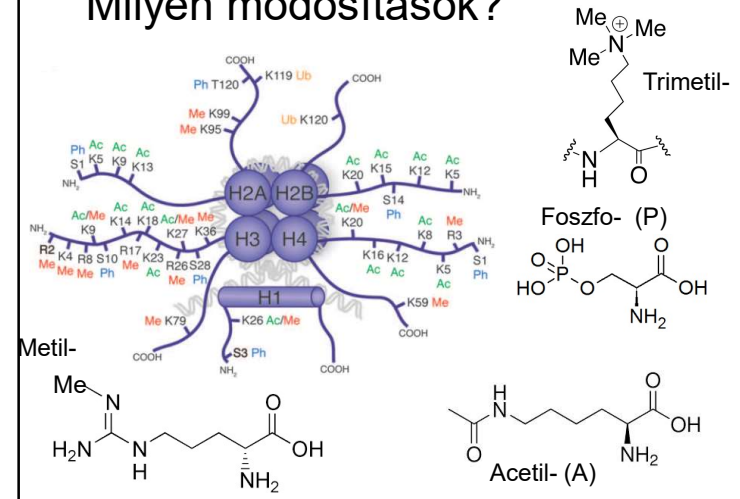
16

# Hisztion módosítások

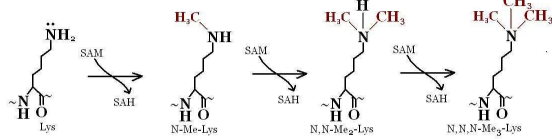


17

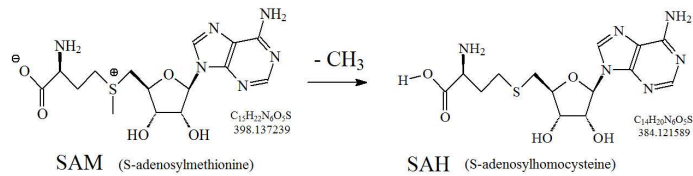
# Milyen módosítások?



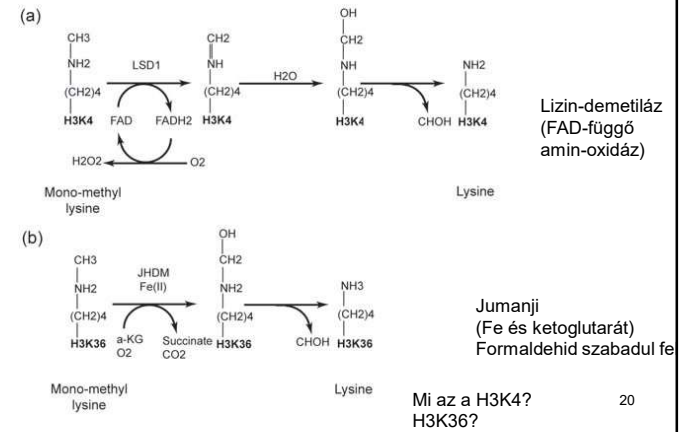
# Lizin metilálás



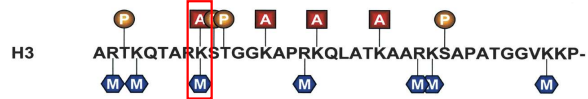
S-adenozil-metionin (SAM) a metil-donor, ebből lesz S-adenozil-homocisztein (SAH)  
 Enzim: hisztion metil-transferáz (lizin-metiltransferáz)



# Metil-lizin demetilálás



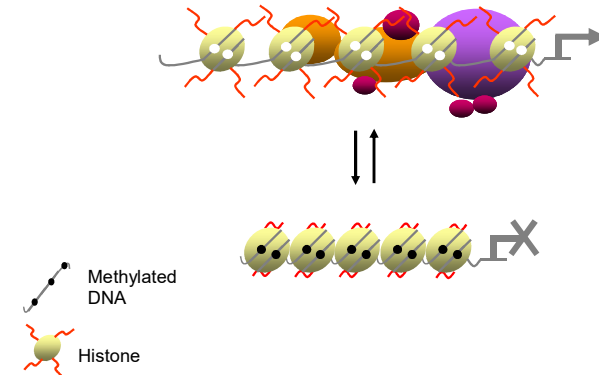
## Hisztion módosulás vs transzkripció



- Gén bekapcsolás: **H3-K9 acetilálás**
- Gén kikapcsolás: **H3-K9 metilálás**

21

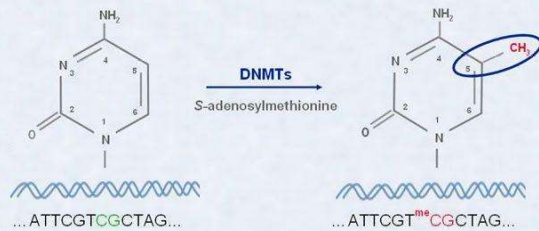
## Metilált DNS vs transzkripció



22

## DNS-metiltranszferázok

### Cytosine methylation

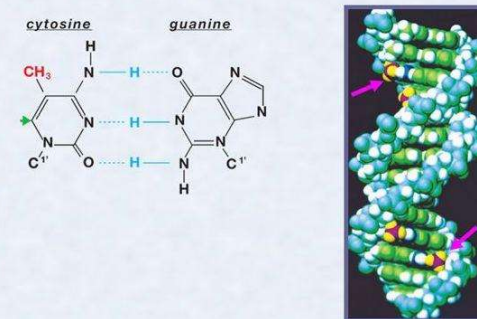


Ugyanaz a metildonor! Mi következhet ebből?

23

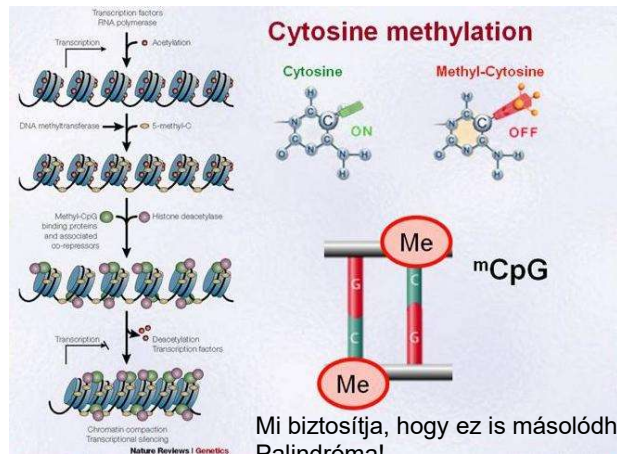
## C-metilálás a DNS-ben

### Cytosine methylation





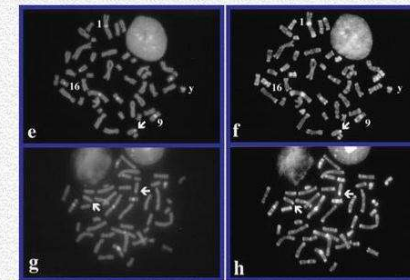
## C-metilálás: fenntartja az inaktív állapotot



## Metil-C a heterokromatinban

### The distribution of cytosine methylation in mammals

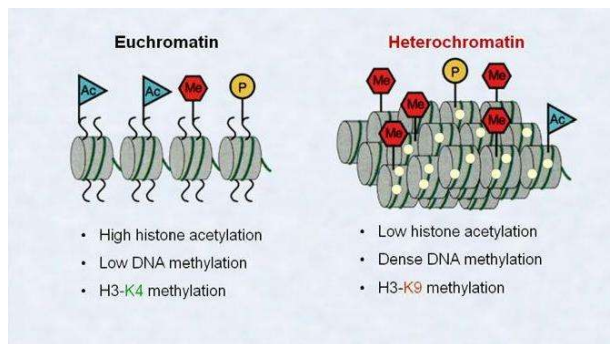
- Heterogeneity visible at cytogenetic scale
- Associated with heterochromatic regions



PMID: 9609659

26

## A DNS és a hisztonok együttes módosításai határozzák meg a genom átírásának lehetőségeit

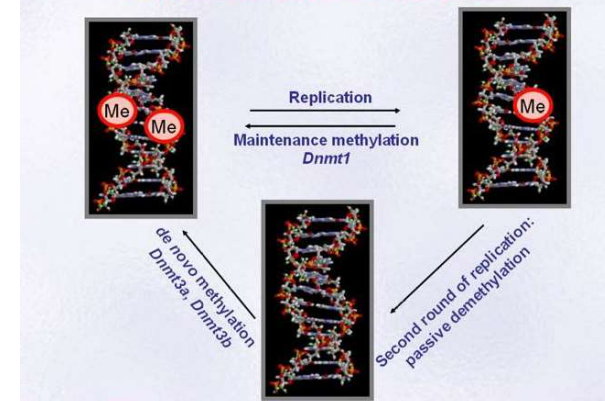


Együttes szabályozás kell! Mi lehet a közös kapcsoló?

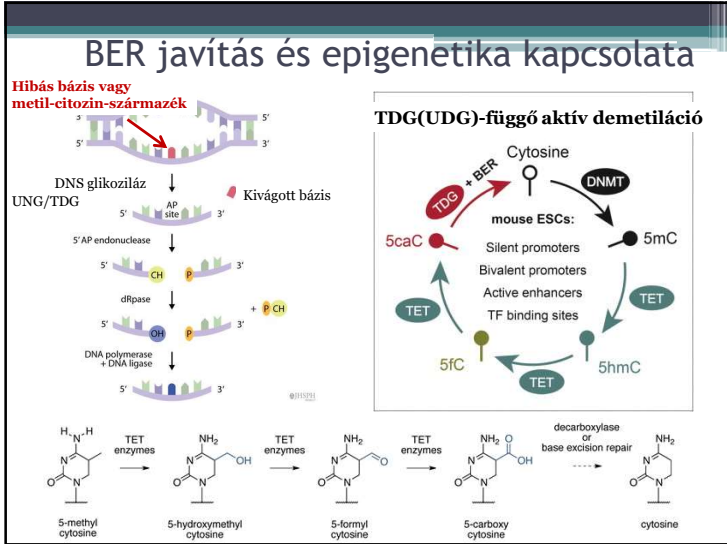
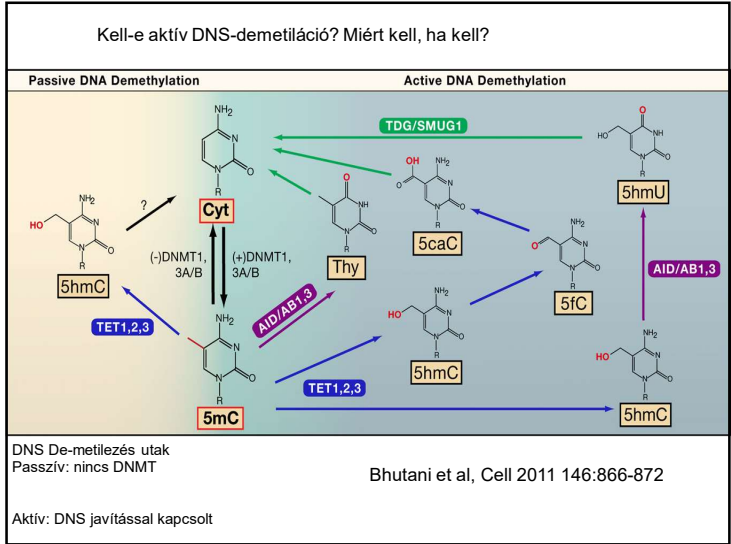
27

## Első kialakítás (de novo) és azt követő fenntartás (maintenance)

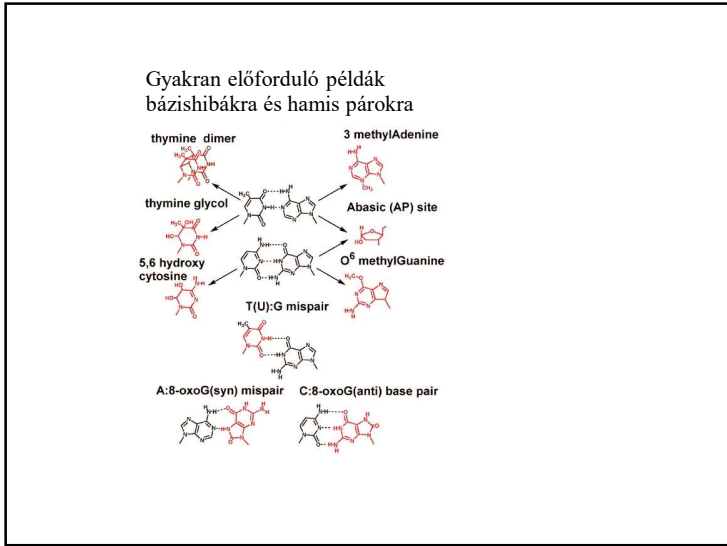
### Establishment and maintenance



Alex Meissner, Henry Stewart Talks

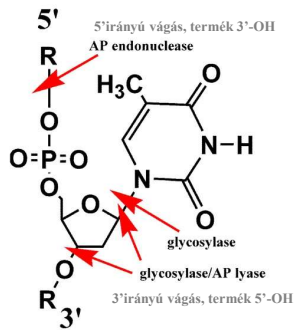


BER – mi is az?





**Hasítandó kötések**

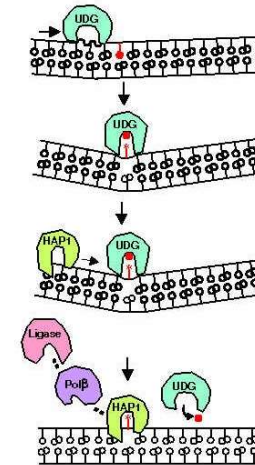


Enzimaktivitások:

1. Glikoziláz
2. AP endonukleáz
3. Polimeráz
4. Ligáz

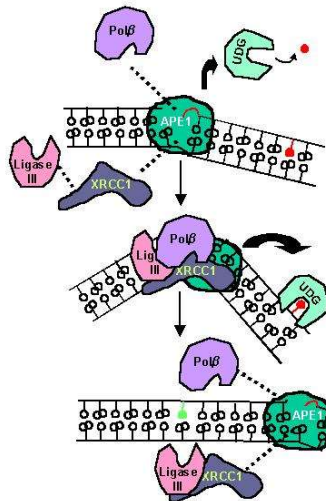
Sematikusan:

UDG = uracil-DNS  
glikoziláz]  
HAP1 = humán AP endonukleáz

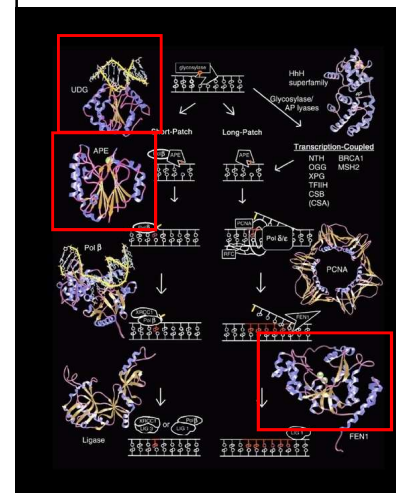
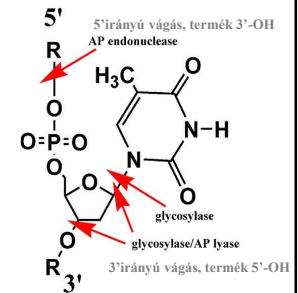


Fehérje kölcsönhatások:

Pol – APE  
XRCC – APE  
Ligáz - XRCC



**Hasítandó kötések**



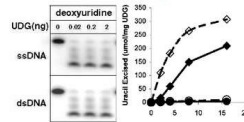
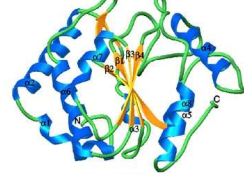
## Uracil-DNS- glikoziláz

PDB: 1EMH, 4SKN

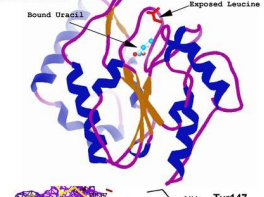
egyes és kettős szálú DNS  
egyaránt szubsztrát

G:U jobb szubsztrát mint A:U

Uracil-DNA Glycosylase (UDG) removes uracil, but not thymine, from single- and double-stranded DNA, and preferentially excises uracil from mispairs with Guanine (G:U) than from base pairs with Adenine (A:U).



UDG binds uracil via specific interactions with the uracil Watson-Crick atoms. Thus, uracil in dsDNA must be **flipped-out** of the DNA helix.



Asn204 Tyr147  
His268 Phe158

Savva B, McAuliffe, Meeth K, Brown T, & Patel L. "The structural basis of specific base-excision repair by uracil-DNA glycosylase." *Nature*, 374:80-83 (1995)

Mai C-D, Arvai A-S, Shupliang G, Kavli B, Alami I, Krivanek H-E, & Tainer J-A. "Crystal structure and molecular analysis of human uracil-DNA glycosylase: structural basis for the specificity and catalysis". *CMB*, 62:669-678 (1995)

cikkek - további info

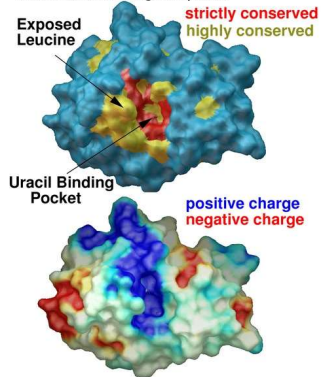
Uracil kötés:

A bázispárosodásban  
szereplő U-atomok  
kötnék a fehérjéhez,  
(ez kb a várható,  
DE: glikozilos N is lehetne)

Tehát:  
ki kell fordítani

H-hidak és aromás átlapolás

UDG leucine residue is conserved and lies above a positively-charged groove encompassing the extrahelical uracil recognition pocket



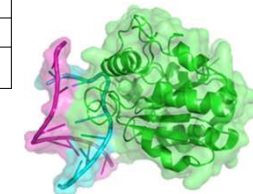
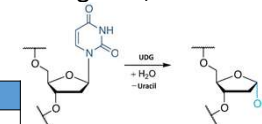
A konzervált Leu: exponált,  
szerepe van a DNS szálakkal  
kialakított kölcsönhatásban

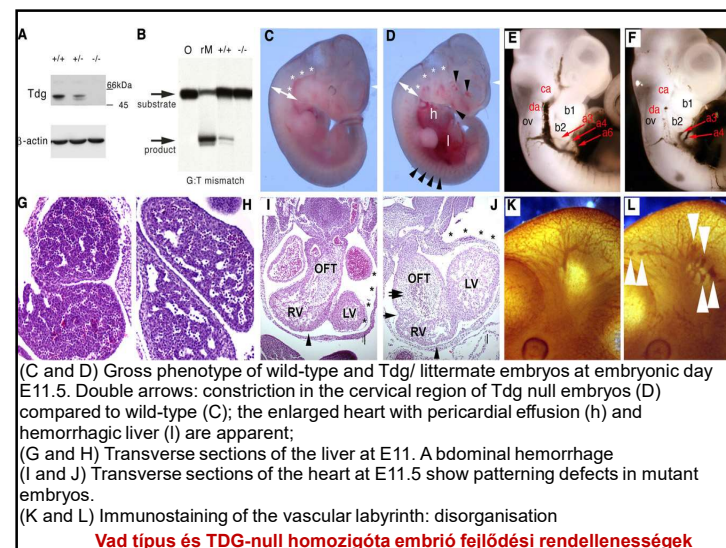
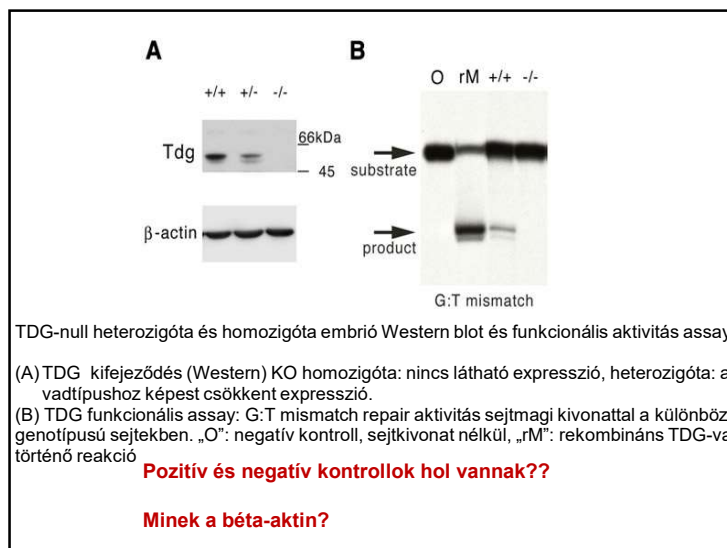
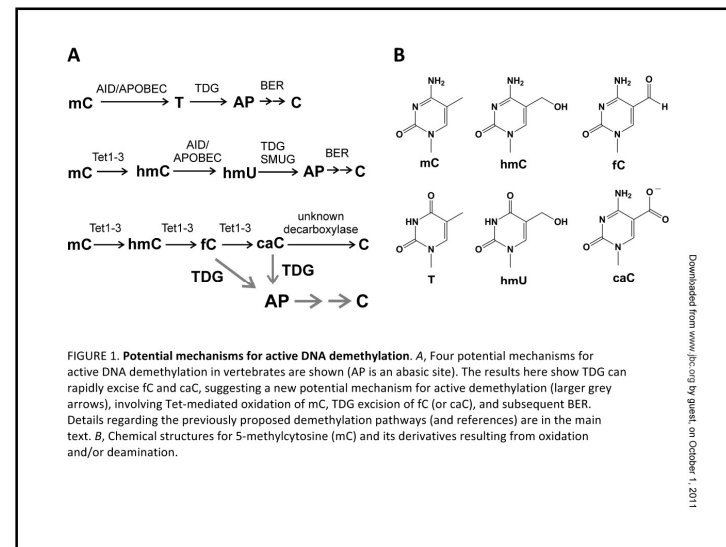
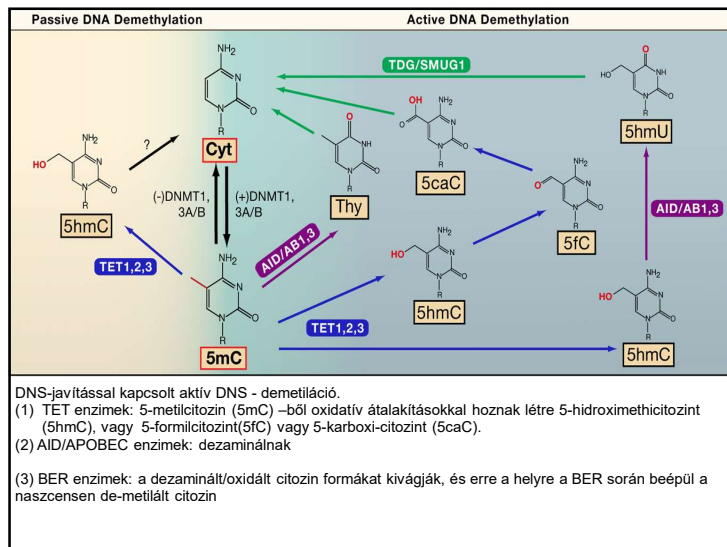
U-zseb: hidrofób  
Az aktív centrum körül  
a fehérje pozitív árkot mutat

## Az uracil-DNS glikozilázok

- A DNS-ben található uracilt specifikusan megkötik, majd kivágják
- Az enzimszám tagjai:

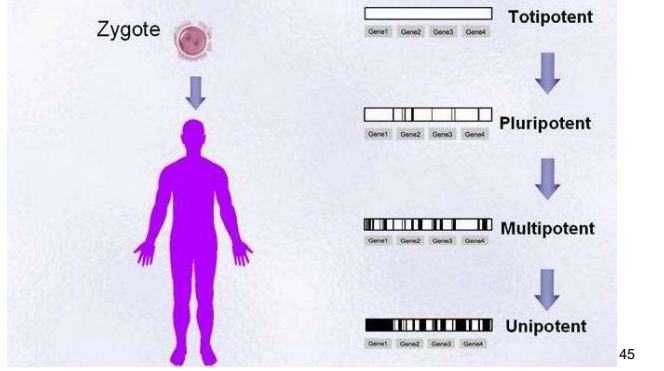
Enzim	Funkció
UNG	Emberben legaktívabb, replikáció során is véd
SMUG	Egyes szálú DNS-en aktívabb
TDG	U:G, T:G hibaspárok javítása
MDB4	CpG szigetekben keletkező uracil kivágása





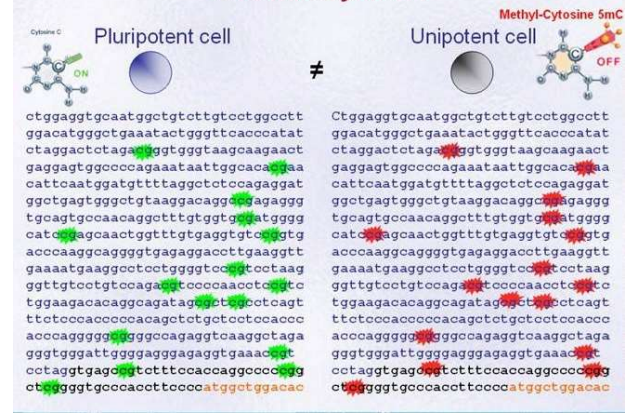
## A differenciálódás állomásai

Differentiated cells become more restricted in their potential

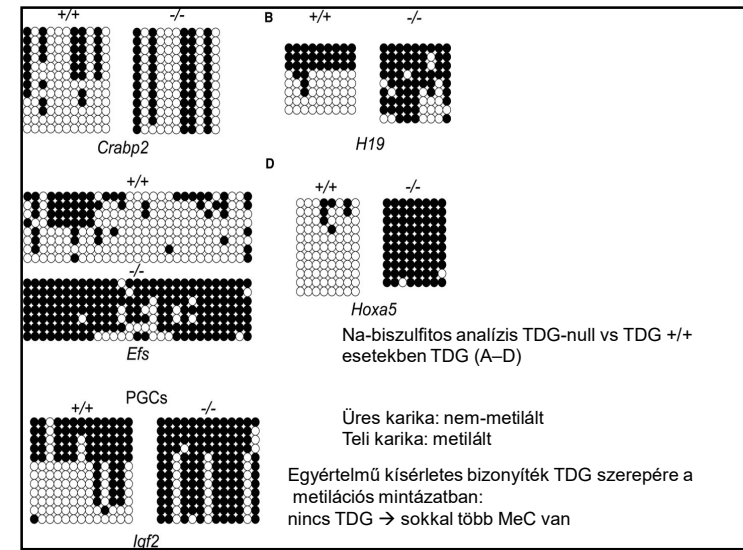
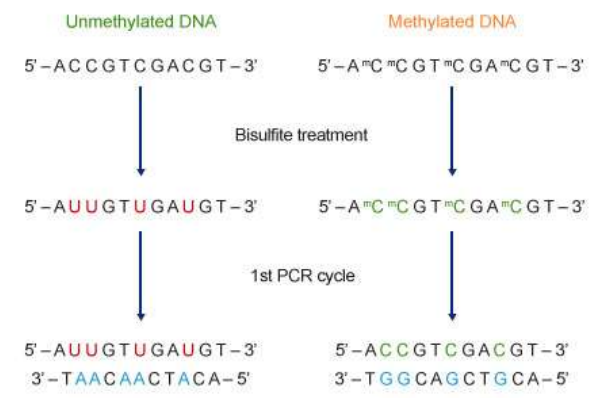


## DNS metilálásban van a különbség

### DNA methylation



## Na-biszulfit szekvenálás : C→U, DE!! MeC nem dezaminálódik, marad MeC





### Általános kérdés:

A DNS kémiai tere limitált – de mennyire is?

A DNS szekvenálási módszerek legtöbbször „inherens előítélettel” rendelkeznek

Többféle bázist egybemosnak, mert csak 4-félét tudnak illeszteni

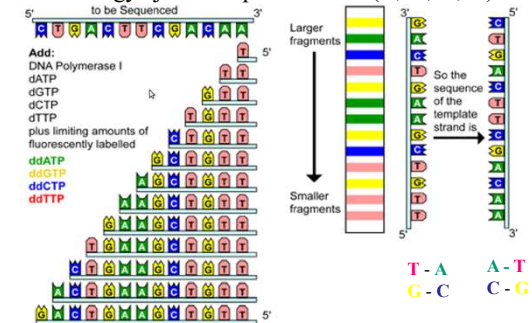
### DNS szekvenálás: a bázissorrend meghatározása (Sanger – dideoxi)

A két DNS szálát kettéválasztjuk

Az egyikhez hozzáépítünk egy új szálát

a négy bázis jelenlétében (T, G, C, A)

A hozzáépítés közben figyeljük a beépülő bázisok (T, G, C, A) sorrendjét



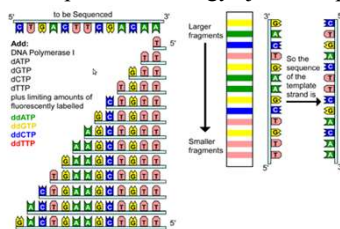
### DNS szekvenálás: a bázissorrend meghatározása (Sanger – dideoxi)

A két DNS szálát kettéválasztjuk

Az egyikhez hozzáépítünk egy új szálát

a négy bázis jelenlétében (T, G, C, A)

A hozzáépítés közben figyeljük a beépülő bázisok (T, G, C, A) sorrendjét



T - A De-metil-T - A oxidált - A - T  
G - C Oxo-G - C Dezaminált-C - G

Ez a módszer mindig csak 4-féle bázist fog leolvasni, még akkor is, ha ennél többféle van a mintában!

### Általános kérdés:

A DNS kémiai tere limitált – de mennyire is?

A DNS szekvenálási módszerek legtöbbször „inherens előítélettel” rendelkeznek

Többféle bázist egybemosnak, mert csak 4-félét tudnak illeszteni

„IGAZI” szekvenálás kellene a „furcsa” bázisokra (v.ö. Na-biszulfit 5MeC/C)

Ehhez kell valami okos kémia vagy antitest-jellegű felismerés

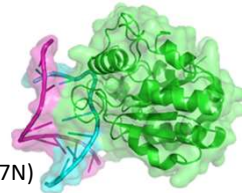
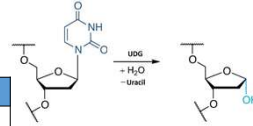
Ki lehet használni a glikozilázokat



## Az uracil-DNS glikozilázok

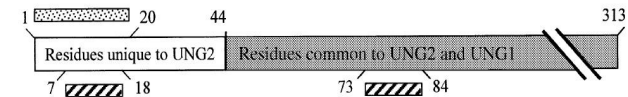
- A DNS-ben található uracilt specifikusan megkötik, majd kivágják
- Az enzimes család tagjai:

Enzim	Funkció
UNG	Emberben legaktívabb, replikáció során is véd
SMUG	Egyes szálú DNS-en aktívabb
TDG	U:G, T:G hibaspárok javítása
MDB4	CpG szigetekben keletkező uracil kivágása



- Mesterséges, módosított UNG
  - Kettős pontmutációt hordoz (D154N, H277N)
  - Specifikusan kikötődik az uracilhoz
  - Katalitikusan inaktív, nem hasítja ki

## UNG CONSTRUCTS FOR CELLULAR ASSAYS



▨ PCNA-binding ▨ RPA-binding

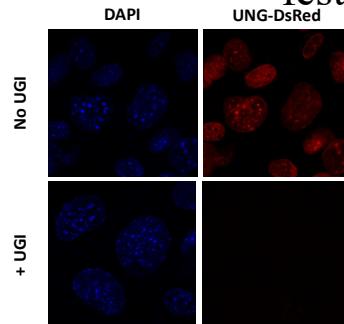
### I. Currently used construct:



### II. New construct with 1XFlag or 3XFlag-tag:



## UNG-alapú szenzor kromoszóma festésre



Ung<sup>-/-</sup> cells were treated with fluoro-deoxyuridine,

than stained with the UNG-reagent

Staining is visible in mostly the heterochromatic regions (cf DAPI),

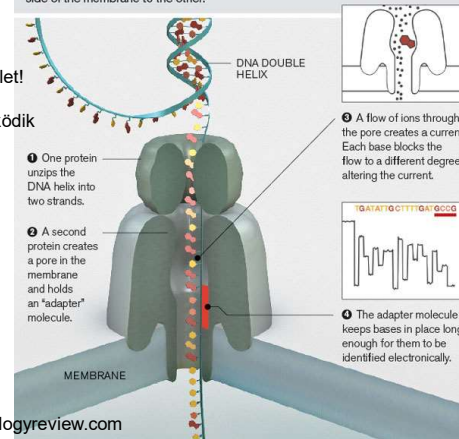
Staining is erased by UGI, arguing for specificity

## Másféle alapokon: Nanopórusos szekvenálás

DNA can be sequenced by threading it through a microscopic pore in a membrane. Bases are identified by the way they affect ions flowing through the pore from one side of the membrane to the other.

Nincs előítélet!

Ez már működik sokféle módosított citozinra

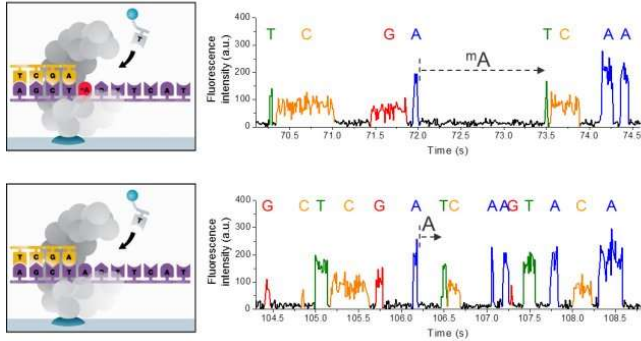


www2.technologyreview.com

56

**DNS bázis módosítások detektálása :  
single-molecule real-time sequencing (SMRT, PacBio)**

Valósidejű szekvenálás: ha metil-adenin van a láncban,  
akkor ahhoz sokkal tovább tart, amíg a polimeráz beépíti a timint



<http://www.labonline.com.au/articles/50190-DNA-base-modification-detection-using-single-molecule-real-time-sequencing>