

3 REGULÁCIA EXPRESIE GÉNOV

Prostredie, v ktorom sa prokaryoty, ale i eukaryotické bunky živočíšnych tkanív nachádzajú, sa často mení. Bunky na túto zmenu musia reagovať predovšetkým prispôbením enzýmového vybavenia, ktoré bude schopné reagovať na vzniknutú situáciu. Bunke, či už prokaryot alebo živočíšna, prakticky nikdy nepotrebuje všetky bielkoviny (predovšetkým enzýmy), ktoré sú kódované v genetickej výbave bunky. Pre bunku by bolo neekonomické syntetizovať aj také bielkoviny, ktoré za daného stavu sú pre ňu nepotrebné. Preto sú bunky vybavené regulačným mechanizmom, ktorý v závislosti od podmienok v bunke zapája alebo vypína prepis štruktúrnych génov do patričných mRNA, na ktorých potom vytvára funkčné bielkoviny.

Prepis genetickej informácie z génu do mRNA a následný preklad genetického kódu z mRNA do štruktúry polypeptidového reťazca nazývame **expresia génu**. Z hľadiska expresie génu sú v bunke prítomné dva typy génov. Prvú skupinu tvoria gény, ktoré sa v bunke konštantne prepisujú a označujú sa ako **prevádzkové gény** (konštitutívne gény). Obsahujú geneticкую informáciu pre bielkoviny, ktoré zabezpečujú základné procesy v bunke. Enzýmy, ktoré vznikajú expresiou týchto génov, nazývame **konštitučné enzýmy**. Sú prítomné v bunke za rôznych podmienok v relatívne konštantnom množstve. Enzýmy, ktoré sa v bunke vytvárajú iba za určitých, často oproti bežným fyziologickým podmienkam pozmenených podmienok, nazývame **induktívne enzýmy**. Expresia génov, ktoré induktívne enzýmy kódujú, sa uskutočňuje účinkom špecifických efektorov gébovej expresie, ktoré môžu mať rôzny charakter. V prokaryotoch je to predovšetkým zmena koncentrácie substrátov alebo reakčných produktov, v eukaryotických bunkách vstupuje do regulácie expresie génov navyše ešte celý rad ďalších faktorov, ktoré súvisia nielen so situáciou v samotnej bunke, ale často aj v celom organizme.

Regulácia expresie génov sa môže uskutočňovať na viacerých úrovniach. Predovšetkým je to regulácia na úrovni transkripcie. Nie je to však jediné miesto, expresia génu môže byť regulovaná počas posttranskripčnej úpravy RNA, ďalej na úrovni translácie, a tiež posttranslačnou úpravou polypeptidového reťazca.

3.1 V prokaryotických bunkách riadi expresiu génov operón

Látky, ktoré regulujú expresiu génov, všeobecne označujeme ako regulátory. Funkciu regulátorov zastávajú **regulačné proteíny**. U prokaryotov sa viažu v oblasti promótoru a buď stimujú alebo inhibujú transkripciu štruktúrnych génov. Na základe účinku ich potom delíme na pozitívne regulačné proteíny (aktívátory) alebo negatívne regulačné faktory (represory). Účinok regulačných proteínov často modifikujú tzv. **efektory**. Tieto látky, často substráty alebo produkty enzýmových reakcií, sa správajú ako alosterické efektory (obdobu alosterických efektorov enzýmov). Po väzbe na regulačný proteín menia jeho konformáciu, a tým buď umožňujú alebo zabraňujú regulačnému proteínu väzbu na regulačné miesto v reťazci DNA. Keď regulačný proteín nadviazaním na väzbové miesto blokuje expresiu génov, nazývame takýto typ regulácie **negatívna regulácia** a naopak, keď viazaný proteín umožňuje proces transkripcie, nazývame túto reguláciu **pozitívna regulácia** expresie génu.

O objasnenie mechanizmov regulácie expresie génov u prokaryotov sa významne zaslúžili francúzski vedci Jacob a Monod. V bunkách *E.coli* študovali expresiu génov, ktoré kódujú enzýmy metabolizmu laktózy. Navrhli tzv. **operónový model** regulácie expresie génov a ich práce boli ocenené udelením Nobelovej ceny.

Expresiu génu u prokaryotov riadi **operón** (obr.40a). Pozostáva z promótoru, operátorového génu a štruktúrnych génov. Súčasťou regulačného systému je ešte regulátorový gén.

Promótor (P) je časť reťazca DNA, na ktorý sa viaže RNA-polymeráza.

Operátorový gén (O) je úsek DNA, kde sa viaže regulačný proteín. V reťazci DNA sa obyčajne nachádza medzi promótorom a štruktúrnymi génmi.

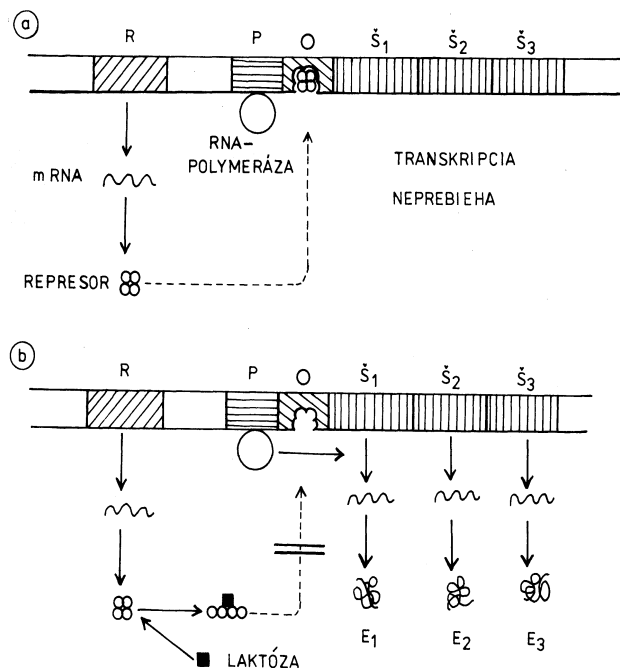
Štruktúrne gény (Š₁, Š₂, Š₃) obsahujú genetickú informáciu o štruktúre bielkovín, ktoré sa ich expresiou majú vytvoriť.

Regulačný gén (R) je časť reťazca DNA, na ktorom sa transkripciou vytvára mRNA pre regulačný proteín.

3.1.1 V laktózovom operóne *E.coli* sa uplatňuje negatívny i pozitívny typ regulácie

Laktózový operón *E.coli* obsahuje štruktúrne gény, ktoré kódujú enzýmy metabolizmu laktózy (obr.40). Na obrázku sú označené ako Š₁, Š₂ a Š₃, v literatúre sa zvyknú označovať písmenami „z“, „y“ a „a“. Prvý gén kóduje β-galaktózidázu, ktorá v bunke *E.coli* hydrolyticky štiepi laktózu na glukózu a galaktózu. Druhý štruktúrny gén kóduje β-galaktózidpermeázu, ktorá umožňuje vstup laktózy z média do bunky. Tretí gén kóduje β-tiogalaktózidacetyltransferázu, ktorá katalyzuje acetyláciu β-galaktózidov. Uvedené enzýmy sú indukívne, expresia génov, ktoré ich kódujú, sa uskutočňuje iba vtedy, keď je v inkubačnom médiu prítomná laktóza.

Expresiu génov riadi operón. Na obrázku 40a je znázornená situácia, keď v médiu nie je prítomná laktóza. Na regulačnom gène sa tvorí mRNA (tvorí sa stále), podľa ktorej sa syntetizuje regulačný proteín. Je to tetramér, zložený zo 4 pod-jednotiek. Viaže sa na operátorový gén, bráni pohybu RNA-polymerázy po štruktúrnych génoch, a tým aj ich prepisu do mRNA. Regulačný gén však neovplyvňuje väzbu RNA-polymerázy na promótor. Za tejto situácie sa netvoria enzýmy metabolizmu laktózy. Keďže regulačná bielkovina blokuje expresiu štruktúrnych génov, takúto reguláciu nazývame **negatívna regulácia operónu**. Regulačný proteín má funkciu represora. Keď sa baktérie *E.coli* prenesú do média, kde zdrojom uhlíka bude laktóza, nastane situácia znázornená na obrázku 40b. Do bunky sa z média dostane niekoľko molekúl laktózy, ktorá má funkciu **induktora**. Bezprostredným induktorom je ale tzv. alolaktóza, ktorá v bunke vznikne z laktózy. Alolaktóza sa viaže na represorovú bielkovinu, mení jej konformáciu tak, že represor sa nemôže viazať na väzbové miesto operátorového génu. Súčasne nastáva disociácia už nadviazaného represora z operátora. To umožňuje pohyb RNA-polymerázy po štruktúrnych génoch operónu, ich prepis do mRNA a následnú syntézu enzýmov potrebných pre metabolizovanie laktózy. Laktóza teda plní funkciu induktora a tento regulačný mechanizmus označujeme **indukcia expresie génov**.



Obr.40 Štruktúra laktózového operónu *E.coli*.

- inhibícia expresie štruktúrnych génov väzbou regulačného proteínu (represora) na operátorový gén;
- indukcia expresie štruktúrnych génov väzbou laktózy na represor

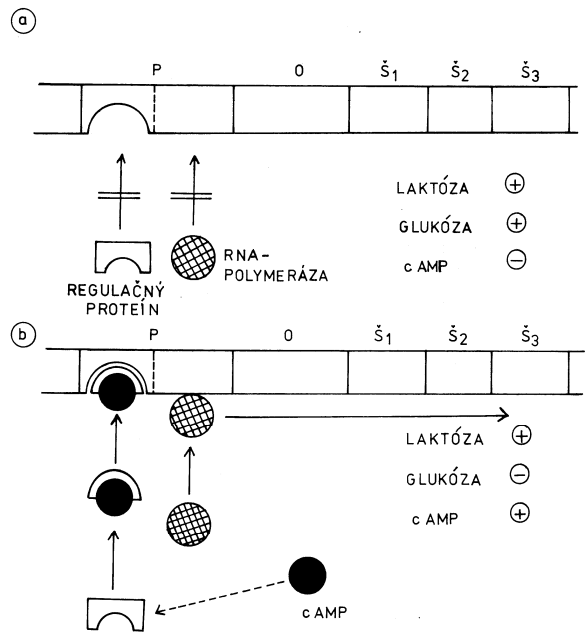
V bunkách *E.coli* je expresia štruktúrnych génov laktózového operónu regulovaná okrem negatívnej regulácie ešte **pozitívnou reguláciou** expresie génov (obr.41). Väzbu RNA-

polymerázy na promótor podmieňuje ďalšia regulačná bielkovina tzv. katabolický aktivačný proteín (CAP). Táto bielkovina sa viaže na promótor a umožňuje tak väzbu RNA-polymerázy na promótor. CAP je schopný viazať sa na promótor iba v komplexe s cyklickým adenosínmonofosfátom (cAMP). cAMP väzbou na CAP mení jeho kon-formáciu, pôsobí ako efektor. Expresia génov je tak podmienená prítomnosťou cAMP v bunke. Hladina tohto cyklického nukleotidu je závislá od zdroja uhlíka, ktorý je prítomný v inkubačnom médiu. Keď je v médiu glukóza, bunky *E.coli* ju transportujú do bunky a metabolizujú. Za tohto stavu je hladina cAMP v bunke nízka.

Prítomnosť glukózy v inkubačnom médiu znižuje v bunke *E.coli* množstvo cAMP. Predpokladalo sa, že katabolity metabolizmu glukózy znižujú hladinu cAMP a preto sa tento regulačný mechanizmus pomenoval katabolická represia. Neskôr sa ale zistilo, že pokles cAMP v bunke, keď je v médiu glukóza, súvisí s transportom glukózy do bunky.

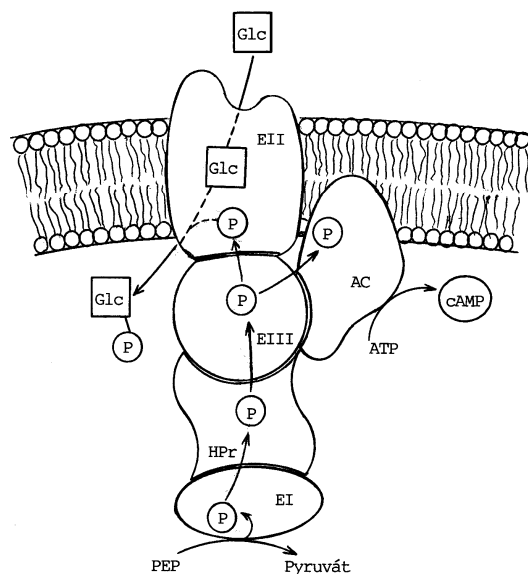
Transport glukózy do bunky *E.coli* katalyzuje **fosfotransferázový systém (PTS)**. Ten pozostáva zo 4 enzýmov (obr.42). S PTS komplexom je spojená aj adenylátcykláza (AC). Je viazaná na membránu bunky a katalyzuje premenu ATP na cAMP. Enzým je aktívny vo fosforylovanom stave. Z fosfoenolpyruvátu, ktorý v bunke vznikne pri glykolýze, sa makroergický fosfát prenáša bielkovinami PTS na enzým II, ktorý má funkciu translokázy. Katalyzuje fosforyláciu glukózy a súčasne aj jej transport do bunky. Keď však glukóza nie je v médiu prítomná, z enzýmu II sa fosfát nemôže prenášať na glukózu a tak dochádza k fosforylácii adenylátcyklázy. Tá sa fosforyláciou aktivuje a katalyzuje tvorbu cAMP. Vytvorený cAMP sa viaže na CAP proteín a komplex aktivuje väzbu RNA-polymerázy na promótor.

Na obrázku 41a je situácia, keď inkubačné médium obsahuje glukózu i laktózu. Laktóza síce väzbou na represorovú bielkovinu bráni jej väzbe na operátorový gén, avšak prítomnosť glukózy v médiu spôsobuje nízku hladinu cAMP v bunke. Nemôže sa tak vytvoriť komplex CAP – cAMP, RNA-poly-meráza sa neviaže na promótor a expresia génov neprebíha. Ide teda o katabolickú represiu expresie génov.



Obr.41 Pozitívny typ regulácie expresie génov laktózového operónu *E.coli*.

- a) neprítomnosť cAMP v bunke bráni väzbe regulačného proteínu na promótor;
- b) väzba komplexu cAMP - regulačný proteín na promótor umožňuje väzbu RNA-polymerázy na promótor



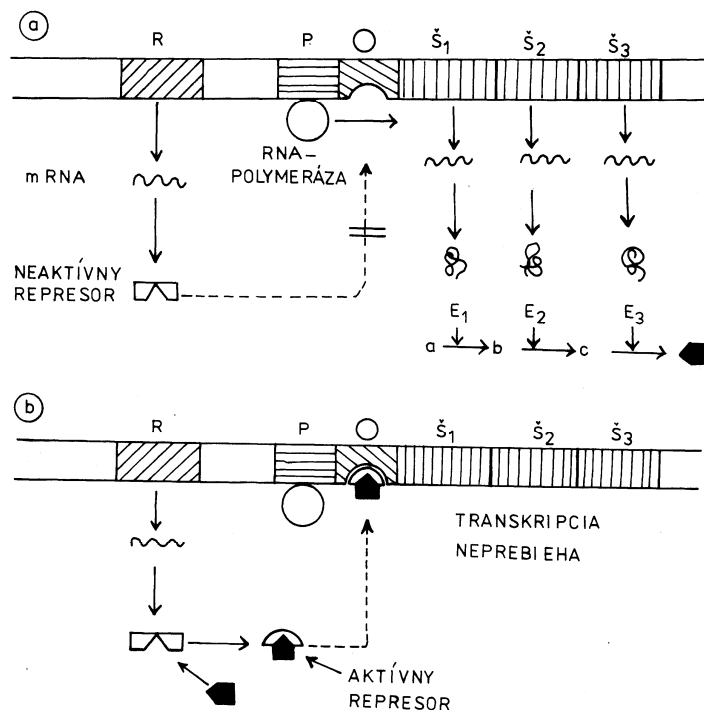
Obr.42 Fosfotransferázový systém zabezpečujúci transport glukózy do bunky, ale i fosforyláciu adenylátcyklázy v bunkách *E.coli*

Na obrázku 41b je znázornený stav, keď je v médiu prítomná iba laktóza. Neprítomnosť glukózy v médiu spôsobí, že hladina cAMP v bunke sa zvýši, tvorí sa komplex CAP – cAMP, viaže sa na promótor a to umožní aj väzbu RNA-polymerázy. Keďže laktóza väzbou na represor blokuje jeho väzbu na operátorový gén, RNA-polymeráza sa môže posúvať po štruktúrnych génoch a prepisovať ich do mRNA. V tomto mechanizme regulačný proteín (CAP) po väzbe na väzbové miesto na promótor aktivuje expresiu génov a takýto typ regulácie nazývame **pozitívna regulácia** expresie génov.

3.1.2 Tryptofánový operón *E.coli* je regulovaný represiou expresie génov

V bunkách prokaryotov sa nachádza ešte systém, ktorý tiež radíme k negatívnej regulácii operónu, no v tomto systéme nastáva represia expresie génu. Tento systém reaguje na situáciu v bunke, keď sa v nej v určitej metabolickej dráhe utvorilo dostatočné, prípadne nadbytočné množstvo výsledného reakčného produktu. Na obrázku 43a je znázornená situácia, keď sa na štruktúrnych génoch tvoria mRNA a im zodpovedajúce enzýmy metabolickej dráhy. Tieto katalyzujú tvorbu produktu. V tejto situácii sa na regulačnom gène tvorí mRNA a na nej represorová bielkovina, ale jej konformácia neumožňuje väzbu tejto bielkoviny na operátorový gén, a tak nenastáva inhibícia transkripcie.

Na obrázku 43b je znázornená situácia, keď sa vytvorilo dostatočné množstvo výsledného produktu metabolickej dráhy. Vzniká potreba zastaviť tvorbu enzýmov, ktoré katalyzujú tvorbu reakčného produktu. To sa uskutočňuje tak, že reakčný produkt (obyčajne koncový produkt) sa viaže na represorovú bielkovinu a mení jej konformáciu tak, aby bola schopná viazať sa na operátorový gén. Tým sa zablokuje RNA-polymeráza a súčasne inhibuje transkripciu štruktúrnych génov. Reakčný produkt, ktorý sa viaže na represorovú bielkovinu, nazývame korepresor. Príkladom takejto negatívnej regulácie operónu s represiou expresie génov je **tryptofánový operón** v *E.coli*, ktorý riadi systém piatich enzýmov, zúčastňujúcich sa na syntéze tryptofánu z chorizmatu.



Obr.43 Štruktúra tryptofánového operónu *E.coli*. a) neaktívny represor sa nemôže viazať na operátorový gén a RNA-polymeráza prepisuje štruktúrne gén; b) väzbou tryptofánu na neaktívny represor sa komplex viaže na operátorový gén a inhibuje expresiu štruktúrnych génov

3.1.3 Tryptofánový operón reguluje aj atenuátor

Tryptofánový operón je regulovaný aj ďalším mechanizmom, ktorý nazývame **atenuácia**. Aké sú štruktúrne jednotky tohto regulačného systému?

Súčasťou transkripčnej jednotky je vedúca sekvencia nachádzajúca sa medzi operátorovým génom a štruktúrnymi génmi v reťazci DNA (obr.44). Časť vedúcej sekvencie tvorí úsek DNA o dĺžke 45 bp, ktorý nazývame **atenuátor**. Tento úsek, ktorý obsahuje iniciačný i terminačný kodón, sa prepisuje do úseku vedúcej sekvencie mRNA a kóduje tvorbu krátkeho peptidu (14 aminokyselín). V transkripte sa nachádzajú štyri úseky, ktoré sú schopné vytvárať slučky a síce v kombinácii 1-2, 2-3 a 3-4. Úsek 1 obsahuje aj dva kodóny UGG, na ktoré sa viaže transferová RNA s nadviazaným tryptofánom. Za úsekom 4 sa v reťazci mRNA nachádza úsek polyU, ktorý vznikol prepisom terminačného úseku polyA z transkripčnej jednotky. Pokiaľ pri prepise atenuátora vznikne na mRNA slučka 3-4, polyU úsek spolu so slučkou 3-4 je stop signálom a RNA-polymeráza po vytvorení tohto úseku sa od reťazca DNA odpojí. Slučka 3-4 teda pôsobí ako terminačná slučka.

Ako sa tento systém využíva na reguláciu transkripcie tryptofánového operónu?

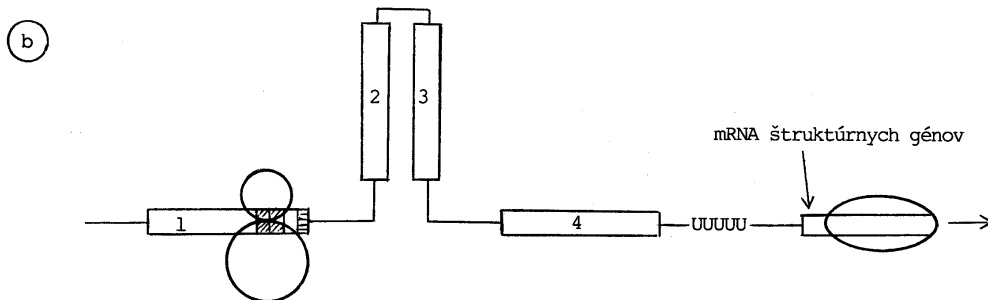
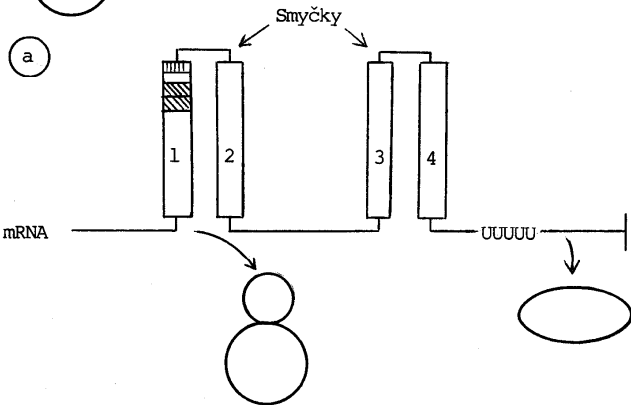
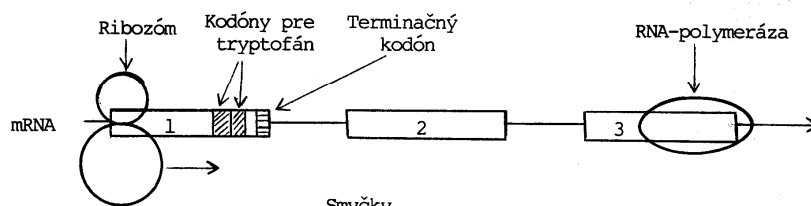
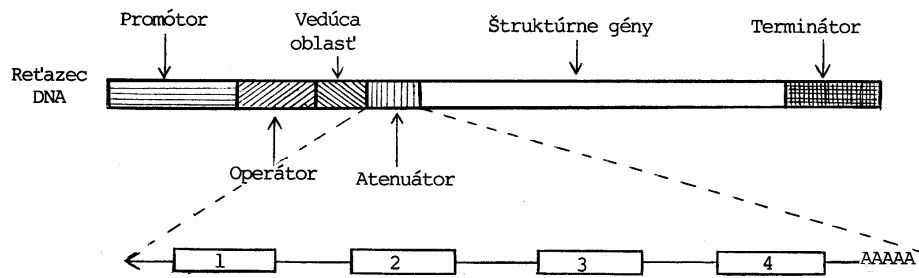
V prípade, že bunka má dostatok tryptofánu, je potrebné transkripciu operónu zastaviť. RNA-polymeráza prepisuje vedúci úsek vrátane atenuátora. Po vytvorení úsekov 1 a 2 sa vytvorí slučka 1-2 (obr.44a). Súčasne sa na vytvorený úsek mRNA nadviaže ribozóm, ktorý začne syntetizovať krátky peptid. Keď ribozóm príde k slučke 1-2, tá sa rozvinie a ribozóm prepíše úsek 1. Je to umožnené tým, že v bunke je dosť tryptofánu, vytvára sa komplex tRNA – tryptofán a na kodóny UGG sa viaže tRNA s tryptofánom. Po prepise úseku 1 ribozóm príde na terminačný kodón a odpojí sa spolu s peptidom z mRNA. To umožní opäť vytvoriť slučku 1-2. RNA-polymeráza pokračuje v prepise ďalšej časti atenuátora a prepíše úseky 3 a 4 a tiež terminačný úsek. Keďže úsek 2 je viazaný v slučke 1-2, nemôže sa vytvoriť slučka 2-3, ale vytvorí sa slučka 3-4. Keďže slučka 3-4 má funkciu terminačnej slučky, spolu s polyU úsekom tvoria terminačný signál.

RNA-polymeráza sa odpojí z reťazca DNA a prepis štruktúrnych génov tryptofánového operónu sa neuskutoční.

Iná situácia nastane, keď v bunke je nedostatok tryptofánu (obr.44b). RNA-polymeráza vytvorí úseky 1 a 2, ribozóm sa pohybuje po mRNA a začne prepisovať úsek 1. Na tomto úseku ale dochádza k zastaveniu pohybu ribozómu po mRNA, nakoľko v dôsledku nedostatku tryptofánu sa netvorí komplex tRNA – tryptofán a neviaže sa na kodóny UGG. Prítomnosť ribozómu v mieste úseku 1 bráni vytvoreniu slučky 1-2. RNA-polymeráza vytvorí úseky 3 a 4, ale nakoľko je voľný úsek 2, vznikne slučka 2-3 a nie slučka 3-4. Slučka 2-3 je stabilnejšia ako slučka 3-4. Nakoľko sa nevytvorila terminačná slučka 3-4, RNA-polymeráza aj po prepise terminačného úseku polyA sa od DNA reťazca nemôže odpojiť a pokračuje v prepise štruktúrnych génov tryptofánového operónu. Tvorba mRNA a následne enzýmov syntézy tryptofánu umožňuje bunke syntetizovať tryptofán. Tryptofánový operón je v *E.coli* regulovaný jednak represiou iniciácie transkripcie (negatívny typ regulácie) a tiež atenuáciou. Obidva regulačné systémy tvoria spolu vysoko účinný mechanizmus, ktorý riadi tvorbu enzýmov katalyzujúcich syntézu tryptofánu v závislosti od množstva tejto aminokyseliny v bunke.

3.2 Regulácia expresie génov v eukaryotických bunkách

Chromatín v jadre bunky vytvára zložité štruktúry, čo umožňuje uloženie dlhých reťazcov dvojvlákna DNA v malom priestore bunkového jadra. Vyskytuje sa v dvoch základných formách, kondenzovanej, ktorú nazývame **heterochromatín** a dekonenzovanej ako **euchromatín**. Tieto dve formy sa môžu vzájomne meniť jedna na druhú, čo závisí od toho, či sa gény uložené v DNA prepisujú do RNA. Transkripčne aktívny chromatín je euchromatín, keď je štruktúra chromozómov rozvinutá do 10 nm nukleozómových reťazcov alebo 30 nm chromatínových vlákien (kap.1.1.2.4). Kondenzovaná forma heterochromatínu je transkripčne neaktívna.

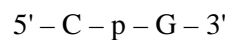


Obr.44 Schéma štruktúry tryptofánového operónu s atenuátorom. **a)** dostatok tryptofánu umožňuje tvorbu slučky 3-4 a tým odpojenie RNA-polymerázy od reťazca DNA; **b)** nedostatok tryptofánu zastaví pohyb ribozómu po mRNA, netvorí sa slučka 3-4 a RNA-polymeráza pokračuje v prepise štruktúrnych génov

Genetická informácia každej somatickej bunky človeka je prakticky rovnaká. Rozdiel medzi hepatocytom, neurónom alebo adipocytom je dôsledkom toho, že v každej z uvedených buniek sa prepisujú rôzne gény. V rámci embryonálneho i postnatálneho vyvinu jedinca dochádza postupne k diferenciacii buniek jednotlivých tkanív. Nastáva výrazná zmena v expresii génov, keď expresia jedných sa zastavuje a druhých, dosiaľ „nemých“, sa aktivuje. Táto zmena je sprevádzaná zmenou štruktúry chromatinu, keď časť heterochromatinu sa mení na euchromatín a naopak, euchromatínové štruktúry kondenzujú na heterochromatín (remodelovanie chromatinu). Príkladom

takýchto zmien chromatinu je zmena jeho štruktúry počas embryonálneho a postnatálneho vývoja v oblasti, ktorá kóduje globínové podjednotky hemoglobínu. V embryonálnom vývine gény, ktoré kódujú podjednotky embryonálneho hemoglobínu, sa nachádzajú vo forme transkripčne aktívneho euchromatinu. Naproti tomu gény pre podjednotky hemoglobínu dospelého organizmu sú vo forme heterochromatinu. Dokázalo sa to v experimentoch, kde sa tieto gény vystavili účinku deoxyribonukleázy. Tá je schopná degradovať len rozvinutú formu molekuly DNA, čiže euchromatín. Deoxyribonukleáza hydrolyticky štiepila v embryonálnom chromatine gény kódujúce embryonálne podjednotky, ale v chromatine dospelého jedinca degradovala gény, kódujúce podjednotky dospelého hemoglobínu. Tieto výsledky podporujú predstavu, že jednou z foriem zastavenia alebo aktivácie prepisu určitej skupiny génov pri diferenciácii buniek je premena euchromatinu na heterochromatín a naopak.

Zakonzervovanie niektorých génov počas diferenciácie buniek, to znamená premenu transkripčne aktívneho chromatinu na neaktívny, sa pravdepodobne uskutočňuje aj metyláciou báz v reťazcoch DNA. Predovšetkým je to metylácia bázy v deoxycytidínovom nukleotide, keď je prítomný v sekvencii:



Metyláciu katalyzuje DNA-metyláza. Avšak nedá sa vo všeobecnosti tvrdiť, že každý metylovaný úsek chromatinu je transkripčne neaktívny a demetylovaný transkripčne aktívny.

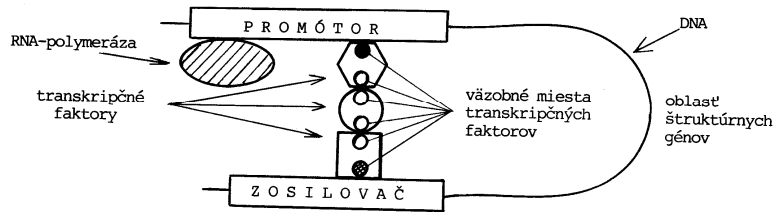
Oveľa viac poznatkov v súčasnosti máme o mechanizmoch regulácie génovej expresie prostredníctvom väzby transkripčných faktorov na reťazec DNA. Ako už bolo uvedené v kapitole 2.4, rozoznávame obecné a špeciálne transkripčné faktory. Bunka človeka obsahuje tzv. **prevádzkové gény**, ktoré sa prepisujú prakticky v každej bunke. Takéto gény kódujú základné proteíny, ktoré zabezpečujú funkcie bunky. Počet týchto génov sa odhaduje na 10 000 a ich prepis umožňujú tzv. **obecné transkripčné faktory** (kap.2.4).

Špeciálne transkripčné faktory sa v aktívnej forme v bunke vytvárajú buď v rámci diferenciácie buniek, alebo za určitých špecifických podmienok (často odlišných od fyziologických). Väzba týchto faktorov na regulačné miesto môže mať buď stimulačný alebo inhibičný účinok na transkripciu génov. Keď transkripčný faktor stimuluje transkripciu, hovoríme o zosilnení expresie a miesto v reťazci DNA, kde sa faktor viaže, označujeme **zosilovač**. V opačnom prípade hovoríme o oslabení transkripcie a o zoslabovači.

Zosilovač transkripcie môže s promótorom bezprostredne susediť, môže sa nachádzať vzdialený od miesta transkripcie smerom k 5'- i 3'-koncu reťazca DNA, ale môže byť aj vo vnútri transkripčnej jednotky. Súčasťou zosilovača je tzv. **responzívny element** (RE). Je to krátky úsek DNA (8-20 nukleotidov). Túto sekvenciu rozoznáva transkripčný faktor a umožňuje väzbu zosilovač-transkripčný faktor.

3.2.1 Transkripčné faktory majú rozpoznávacie úseky

Transkripčný faktor ovplyvňuje transkripciu určitého génu tak, že pôsobí na aktivitu RNA-polymerázy, ktorá po nadviazaní sa na promótor katalyzuje transkripciu. Má bielkovinovú štruktúru a obsahuje v polypeptidovom reťazci sekvencie aminokyselín, ktorými sa viaže na cieľovú štruktúru. Takúto sekvenciu nazývame **rozpoznávacie miesto** transkripčného faktora (niekedy aj väzbové miesto). Prostredníctvom rozpoznávacieho miesta sa transkripčný faktor viaže buď priamo na promótor, alebo na zosilovač, prípadne na väzbové miesto ďalšieho transkripčného faktora, ktorý sa podieľa na regulácii transkripcie. Interakciou väzbových miest transkripčných faktorov s pro-mótorom, zosilovačom a navzájom medzi sebou sa vytvára komplex týchto faktorov (obr.45), ktorý reguluje aktivitu RNA-polymerázy.

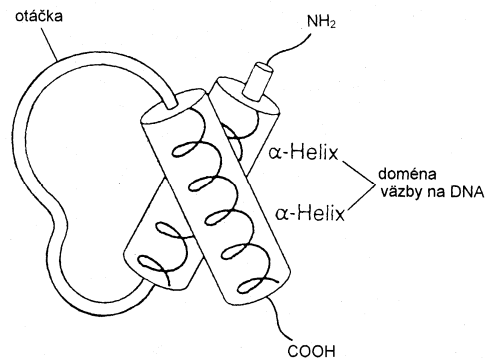


Obr.45 Vázba transkripčných faktorov a RNA-polymerázy na promótor a zosilovač v aktívnom transkripčnom komplexe

Rozpoznávacie miesto transkripčného faktora je charakterizované sekvenciou časti polypeptidového reťazca (primárna štruktúra), ale hlavne je to sekundárna štruktúra tohto úseku. Sumár primárnej a sekundárnej štruktúry nazývame **motív** transkripčného faktora. Súčasťou motívu transkripčných faktorov sú úseky, ktoré tvoria α -helix. Ten pri väzbe faktora na DNA zapadá do žliabku dvojzávitnice DNA, pričom aminokyseliny α -helixu vytvárajú vodíkové mostíky s bázami reťazca DNA.

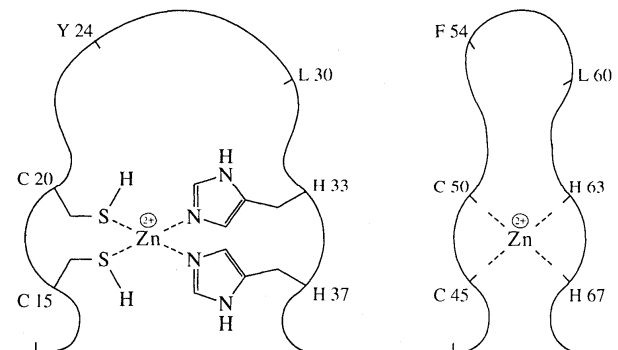
Podľa motívu rozdeľujeme transkripčné faktory do troch základných skupín:

a) Transkripčné faktory s motívom **helix-otáčka-helix** (HTH) (obr.46). Vázbové miesto tohto faktora vytvárajú dva úseky α -helixu a jedna otáčka. Druhý α -helix, zložený z 9 aminokyselín, zapadá do žliabku DNA, pričom vzniká väzba DNA- α -helix.



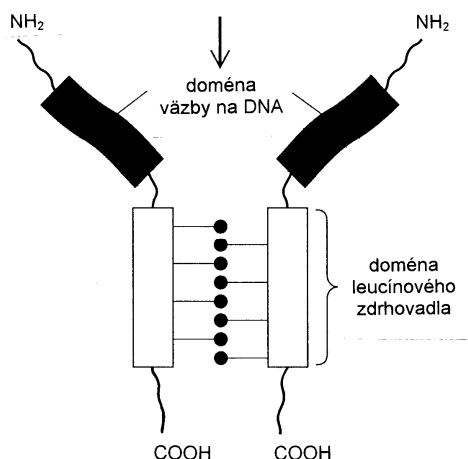
Obr.46 Schéma motívu helix-otáčka-helix. Na bázy DNA sa viaže helix, ktorý je lokalizovaný bližšie k -COOH koncu reťazca bielkoviny

b) Transkripčné faktory s motívom **zinkových prstov**. Motív týchto faktorov tvoria slučky, ktoré pripomínajú prsty (obr.47). Súčasťou slučky je kation Zn^{2+} , ktorý je v slučke viazaný buď dvoma cysteínovými a dvoma histidínovými zvyškami alebo štyrmi cysteínovými. Súčasťou slučky je α -helix, ktorý sa ukladá do žliabku reťazca DNA.



Obr.47 Motív zinkových prstov v štruktúre transkripčného faktora. Kation Zn^{2+} je viazaný cez dva cysteínové a dva histidínové zvyšky

c) Transkripčné faktory s motívom **leucínového zipsu** (zdrhovadla) (obr.48). Polypeptidové reťazce tohto faktora obsahujú α -helix, vytvorený z 30 aminokyselín, z ktorých štyri tvorí leucín. Vzájomným preložením α -helixov vzniká štruktúra podobná zdrhovadlu (zipsu). Súčasťou reťazcov sú ešte zásadité helixy, ktoré sa viažu na DNA reťazec.



Obr.48 Motív leucínového zipsu v reťazcoch transkripčného faktora

3.2.2 Transkripčné faktory sa musia aktivovať

V organizme často vznikajú situácie, ktoré vyžadujú zvýšenú tvorbu niektorých špecializovaných bielkovín. Napr. pri pretrvávajúcom poklese hladiny glukózy v krvi je potrebné zvýšiť v pečeni syntézu enzýmov glukoneogenézy, ktoré katalyzujú syntézu glukózy z aminokyselín. Pri infekcii organizmu je zasa potrebné stimulovať tvorbu protilátok v imunokompetentných bunkách, kde podnetom bude prítomnosť antigénnych štruktúr a pod. Za takýchto pozmenených podmienok dochádza v špecializovaných bunkách k aktivácii špeciálnych transkripčných faktorov, ktoré sú často v bunke už prítomné, ale v neaktívnej forme. Signálna molekula (hormón, antigén a pod.) prináša k cieľovej bunke informáciu (signál) a buď priamou väzbou na transkripčný faktor, alebo sprostredkovanne aktivuje inaktívnu formu transkripčného faktora, ktorý sa po aktivácii viaže buď priamo na promótor transkripčnej jednotky, alebo častejšie na zosilovač a stimuluje expresiu génu cieľovej bielkoviny. V menej častých prípadoch môže aktivácia transkripčného faktora viesť k inhibícii expresie génu.

V organizme človeka ako signálne molekuly pôsobia predovšetkým **hormóny**. Aktivovaná forma transkripčného faktora sa potom v reťazci DNA viaže na špecifické väzbové miesto (promótor, zosilovač), ktoré nazývame **element hormonálnej odpovede** (hormon response element, HRE). Podľa mechanizmu aktivácie môžeme rozdeliť hormóny do dvoch skupín:

1. Jedna skupina hormónov (lipofilný charakter) prechádza cez bunkovú membránu do cytozolu alebo až do jadra bunky, kde sa tieto hormóny viažu na receptory, ktoré súčasne tvoria neaktívnu formu transkripčného faktora. Komplex hormón – receptor predstavuje aktívnu formu transkripčného faktora a viaže sa v DNA na HRE.

2. Druhá skupina hormónov (hydrofilné hormóny) neprechádza do bunky, ale sa viaže na membránový receptor a spúšťa kaskádu biochemických procesov, vedúcu k aktivácii transkripčného faktora. Ten sa po aktivácii viaže na HRE v reťazci DNA.

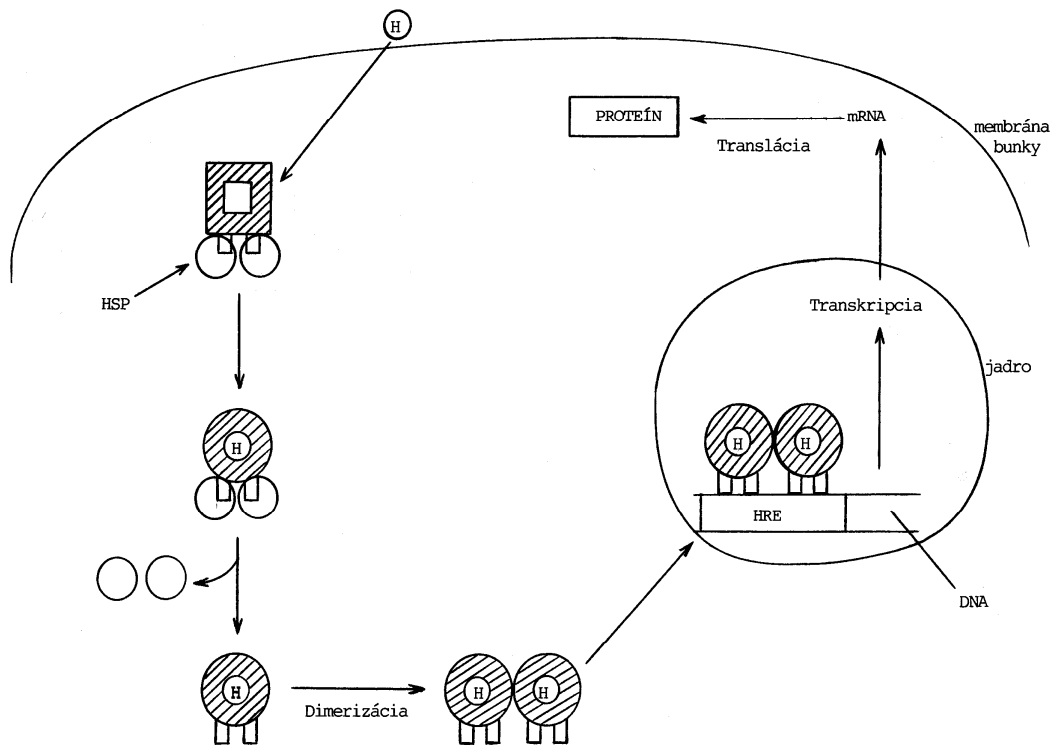
3.2.2.1 Receptor pre glukokortikoidy obsahuje motív zinkového prstu

Medzi lipofilné hormóny, ktoré prechádzajú cez bunkovú membránu do cytoplazmy, prípadne až do jadra bunky, patria steroidné hormóny (mineralokortikoidy, glukokortikoidy, pohlavné hormóny), tyreoidné hormóny (tyroxín, trijódtyronín), vitamín D a retinoidy. Receptory pre glukokortikoidy a mineralokortikoidy sú prítomné v cytozole bunky, receptory pre pohlavné hormóny by podľa viacerých literárnych údajov mali byť viazané na reťazec DNA v jadre bunky. V jadre sú prítomné aj receptory pre tyreoidné hormóny, vitamín D a retinoidy.

Vnútrobnkové receptory majú niekoľko **funkčných oblastí (domén)**. Sú to:

- a) **Doména väzby na DNA** – oblasť receptora, ktorá sa viaže v DNA na HRE
- b) **Doména pre nadviazanie hormónu** – na ňu sa viaže hormón
- c) **Doména pre väzbu na transkripčný faktor** – aktívny receptor sa viaže aj na ďalší transkripčný faktor nadviazaný na promótor
- d) **Doména pre dimerizáciu receptora** – vnútrobnkové receptory v aktívnej forme vytvárajú diméry

Mechanizmus účinku glukokortikoidu na expresiu génu je schematicky znázornený na obrázku 49. Steroidný hormón po uvoľnení z väzby na transportný proteín v krvnom riečisku prechádza membránou do cytozolu bunky, kde sa viaže na receptorové miesto inaktívneho receptora. Neaktívna forma receptora má väzbovú doménu na DNA blokovánú inhibičným proteínom, v literatúre označovaným heat-shock protein (HSP). To bráni receptoru väzbe na DNA. Po nadviazaní hormónu na receptorové miesto dochádza k oddisociovaniu HSP z receptora a odblokovaniu väzbovej domény pre väzbu na DNA. Komplex hormón – receptor najprv vytvára dimér s druhým takýmto komplexom a vo forme diméru prechádza do jadra a viaže sa na HRE v reťazci DNA. Doména pre väzbu na HRE v receptore pre glukokortikoidy má štruktúru zinkového prstu, v ktorom je kation Zn^{2+} viazaný pomocou štyroch cysteínových zvyškov. Väzba prvého diméru na reťazec DNA stimuluje väzbu druhého diméru na susedný HRE. Viazaním dvoch dimérov na HRE miesto sa vytvára efektívny systém, ktorý po interakcii s ďalšími transkripčnými faktormi, viazanými na promótor, aktivuje expresiu génu riadenú glukokortikoidom.



Obr.49 Schéma aktivácie receptora pre steroidný hormón a jeho väzba na DNA v jadre bunky

Receptory pre pohlavné hormóny, tyroxín, vitamín D a retinoidy sú viazané priamo na DNA v jadre bunky. Sú to inaktívne formy, aj keď nie sú viazané s inhibičným HSP. Po nadviazaní hormónu dochádza ku konformačnej zmene receptora za vzniku aktívnej formy s vlastnosťami transkripčného faktora. Ten aktivuje expresiu génu mechanizmom, ktorý je podobný ako v prípade cytozolového receptora pre glukokortikoidy.

3.2.2.2 Hydrofilné hormóny pôsobia cez proteínkinázy

Hormóny so štruktúrou peptidov majú hydrofilný charakter a neprechádzajú cez lipofilnú membránu bunky. Pri svojom pôsobení sa viažu na membránový receptor a prostredníctvom tejto väzby ovplyvňujú procesy v bunke. Niektoré hormóny tohto typu, spolu s viacerými rastovými faktormi peptidovej štruktúry, ovplyvňujú okrem iných procesov aj expresiu génov v jadre bunky.

Receptory, na ktoré sa tieto signálne molekuly viažu, môžeme zdeliť do dvoch skupín:

1. Receptory, ktoré pôsobia prostredníctvom **G-proteínu**, stimulujú tvorbu **druhého posla** vo vnútri bunky. Ten potom spúšťa kaskádu ďalších procesov, vedúcich k aktivácii transkripčných faktorov v cytozole, alebo priamo v jadre bunky. Druhým poslom býva najčastejšie cAMP alebo Ca^{2+} ióny.

2. Receptory, ktoré po väzbe ligandu získavajú enzýmovú aktivitu tyrozínkinázy, ktorá začne kaskádu fosforylácie ďalších bielkovín, predovšetkým proteínkináz a proteínfosfatáz. Výsledkom je fosforylácia, prípadne defosforylácia transkripčného faktora, čo vedie k jeho aktivácii.

V bunkách sa nachádza viac druhov hormónov, prípadne iných ligandov, ktorých mechanizmus účinku je spojený s tvorbou cAMP. cAMP prostredníctvom aktivácie proteínkinázy A spúšťa kaskádu vzájomných fosforylácií proteínkináz a koncovým produktom takejto kaskády je fosforylovaná cieľová bielkovina, najčastejšie enzým. Cieľovým proteínom fosforylačnej kaskády však býva aj transkripčný faktor. Fosforyláciou sa aktivuje, viaže sa na regulačné miesto v reťazci DNA a ovplyvňuje expresiu génu.

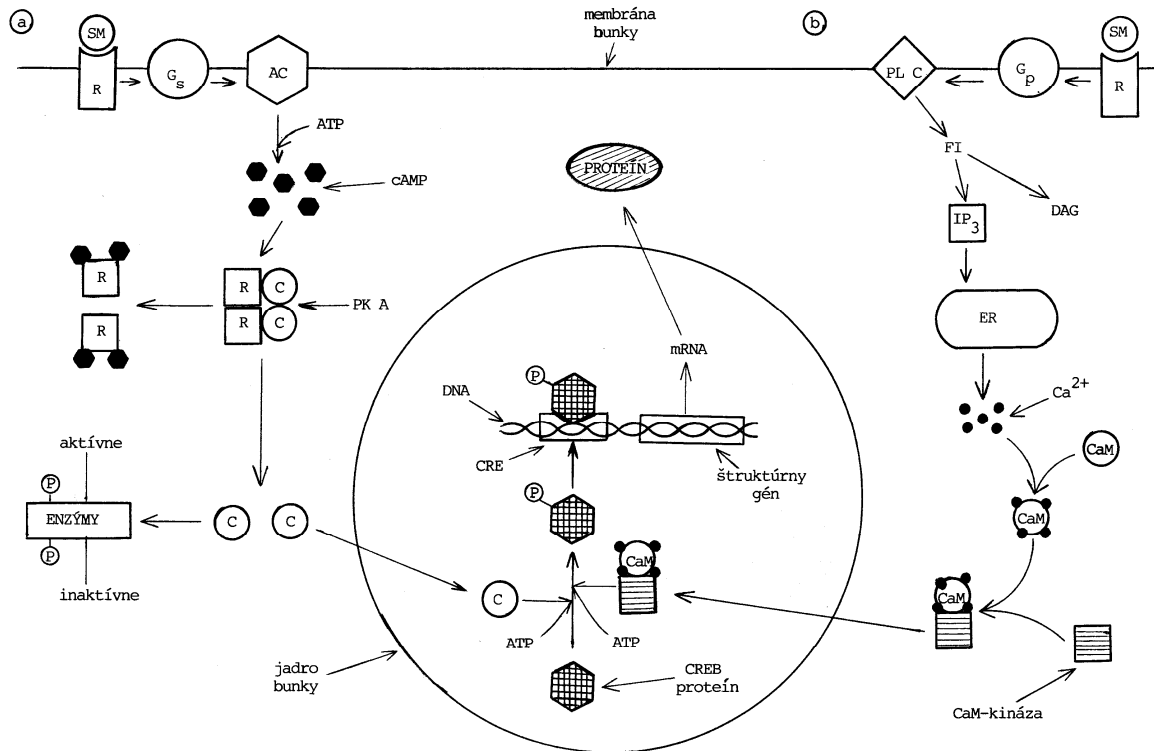
Aktivácia transkripčného faktora, označovaného ako CREB-proteín (cAMP response element binding protein), je znázornená na obrázku 50a. Hormónom aktivovaná adenylátcykláza (AC) syntetizuje z ATP cyklický 3'→5' -AMP (cAMP). Tento sa viaže na proteínkinázu A (PK A), ktorá je zložená z dvoch regulačných (R) a dvoch katalytických (C) podjednotiek. Po väzbe cAMP na regulačné podjednotky sa katalytické podjednotky z komplexu PK A uvoľnia, a tak nadobudnú kinázovú aktivitu. V cytozole katalyzujú fosforyláciu špecifických bielkovín, napr. enzýmov a menia ich enzýmovú aktivitu. Pri regulácii expresie génu prechádza katalytická podjednotka PK A do jadra bunky a tam fosforyluje CREB-proteín. Tento sa fosforyláciou aktivuje, viaže sa na cAMP-responzívny element (CRE) v reťazci DNA a takto stimuluje prepis génu do mRNA.

CREB-proteín sa môže aktivovať aj cez signálny mechanizmus, ktorý navodzuje zvýšenie hladiny Ca^{2+} v cytozole bunky (obr.50b). Signálna molekula po väzbe na receptor aktivuje cez G proteín (Gp) fosfolipázu C (PL C), ktorá štiepi fosfatidylinozitol (FI) za vzniku inozitoltrifosfátu (IP_3) a diacylglycerolu (DAG). IP_3 spôsobuje uvoľnenie iónov Ca^{2+} z endoplazmatického retikula (ER) do cytozolu. Ióny Ca^{2+} sa viažu na kalmodulín (CaM) a komplex Ca^{2+} – kalmodulín aktivuje špecifickú kalmodulínom aktivovanú proteínkinázu (CaM-kináza). Táto prechádza do jadra bunky a podobne ako katalytická podjednotka PK A fosforyláciou aktivuje transkripčný faktor CREB-proteín.

Medzi signálne molekuly, ktoré pôsobia cez väzbu na receptor s tyrozínkinázovou aktivitou, patrí napr. hormón inzulín a celý rad rastových faktorov. Výsledkom účinku týchto ligandov je veľmi často aktivácia génovej expresie v bunke.

Hormón inzulín v celom rade buniek ľudského organizmu vyvoláva jednak okamžitý metabolický účinok, ale pôsobí na bunky aj prostredníctvom dlhšie trvajúcich efektov. Rýchly účinok inzulínu pozorujeme hlavne pri jeho pôsobení na metabolizmus cukrov a tukov aktiváciou alebo inhibíciou enzýmov prostredníctvom ich fosforylácie alebo defosforylácie. Pomalý efekt inzulínu vyžaduje jeho vyššiu koncentráciu a uskutočňuje sa stimuláciou expresie génov pre špecifické proteíny. V takomto prípade sa inzulín môže viazať buď na svoj vlastný receptor, alebo na receptor pre insulin-like growth factor 1 (IGF-1). IGF-1 je rastový faktor, ktorý sa tvorí

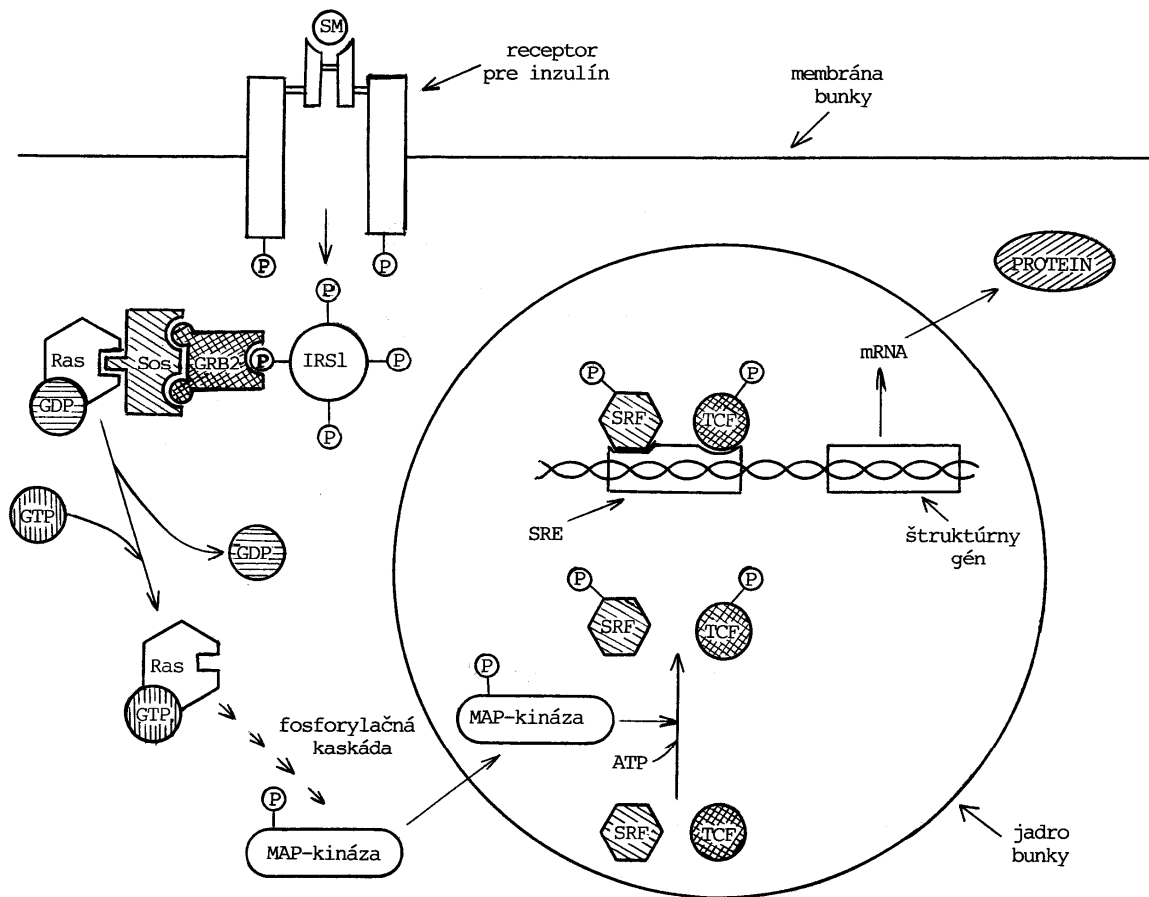
v hypofýze a reguluje procesy rastu v organizme. Má podobnú štruktúru ako inzulín a v membráne buniek sa nachádzajú receptory pre tento rastový faktor.



Obr.50 Signálna cesta aktivácie transkripčného faktora signálnymi molekulami, ktoré sa viažu na membránový receptor a pôsobia prostredníctvom G-proteínu. a) signálna molekula aktivuje adenylátcyklázu; b) signálna molekula aktivuje fosfolipázu C

Schéma pôsobenia inzulínu na expresiu génov je znázornená na obrázku 51. Inzulín sa viaže na receptor, čo spôsobuje, že tento receptor získava aktivitu tyrozínkinázy. Aktivovaný receptor fosforyluje bielkovinu IRS1, čo je špecifický substrát pre inzulínový receptor. Na fosforylovaný IRS1 sa špecificky viaže bielkovina GRB2, ktorá viaže ďalšiu bielkovinu – Sos. Tento komplex má potom schopnosť viazať sa na komplex Ras-proteín – GDP. To umožňuje výmenu GDP za GTP na Ras-proteíne. Väzba GTP na Ras-proteín znamená jeho aktiváciu a tým spustenie fosforylačnej kaskády, na konci ktorej je vznik fosforylovanej formy MAP-kinázy. Fosforylovaná MAP-kináza prechádza do jadra bunky a tu katalyzuje fosforyláciu špecifických transkripčných faktorov, ako sú serum-response factor (SRF) a ternary complex factor (TCF). Fosforylované faktory sa viažu na sérum-responzívny element (SRE) a aktivuje expresiu génov špecifických bielkovín. Takto vytvorený proteín je odpoveďou bunky na mimobunkovú signálnu molekulu, napr. inzulín.

Podobným mechanizmom, aký predpokladáme u inzulínu, pôsobia aj iné signálne molekuly charakteru rastových faktorov. Ako peptidy sa viažu na receptory podobných vlastností ako je inzulínový receptor a aktiváciou fosforylačných procesov navodzujú aktiváciu transkripčných faktorov a tým aj expresiu génov.



Obr.51 Schéma mechanizmu účinku inzulínu pri aktivácii transkripčného faktora