

FARKLILAŐMANIN MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ

Hücre farklılaşma mekanizmaları

Promotor yapısı ve fonksiyonu

- Gen yapısına ilave olarak genlerin her iki ucunda düzenleyici diziler vardır (bu diziler genin içinde bile olabilir).
- Bu diziler **promotorlar** ve **enhancerler**dir.
- Bunlar özel bir genin kopyalanacağı yeri ve zamanı kontrol etmek için gereklidirler.

- *E. coli*'deki lac operonundaki gen indükleme işlemini düşünürseniz, represör bir genin lac operon genlerinin operatör dizilerle etkileşim içinde olan represör bir proteini oluşturduğunu hatırlayacaksınız.
- Bu durumda operatör DNA kendi kromozomu üzerinde yalnız komşu lac operonunu kontrol ettiği için bir cis-regülatör elemandır.
- Buna karşın represör protein bir trans regülatördür, çünkü o bir kromozom tarafından oluşturulabilir ve başka bir kromozomda cis-regülatör operatöre bağlanabilir.

- mRNA kodlayan ökaryotik genlerde iki tip cis-regülatör DNA dizisi keşfedilmiştir. Bunlar hücrede transkribe edilecek genleri etkiler.
- Bunlar promotor ve enhancerlerdir.
- **Promotorlar** tipik olarak transkripsiyonun başladığı yerde dizinin hemen başında yerleşmiştir ve bunlar genellikle yüzlerce baz çifti uzunluğundadır.
- Promotor bölge RNA polimeraz II'nin bağlanması için gereklidir ve transkripsiyonun başlaması için uygun bir durum oluşur.
- Ökaryotik RNA polimerazlar etkin bir şekilde promotora bağlanabilmek için ilave protein faktörlerine ihtiyaç duyarlar.

- **Enhancer** bir DNA dizisidir.
- Promotorun kullanımını aktive edebilir.
- Özel bir promotordan transkripsiyonun hızını ve etkinliğini kontrol eder.
- Enhancerler yalnız cis'e bağlı promotorları aktive edebilir (aynı kromozomdaki promotorlar), fakat onlar bunu büyük mesafelerde yapabilir (bazen promotordan 50 kilobaz kadar uzak).
- Üstelik, enhancerler genin 5' tarafında (upstream) olmak zorunda değildirler.
- İntronlarda, 3' ucunda, ya da tamamlayıcı DNA ipliğinin üzerinde bile olabilirler.
- Promotorlar gibi, spesifik trans-regülatör proteinlerini bağlayarak görev yapan enhancerlere **transkripsiyon faktörleri** denir.

- Bir tip enhancer “negatif enhancer”dir. Ayrıca buna **silencer** da denir.
- Transkripsiyon faktörleri silencer’lara bağlandıkları zaman cis’e bağlı promotorlardaki transkripsiyonu baskılar.
- Bazı diziler başka transkripsiyon faktörlerinin hücrede bulunmasına bağlı olarak, bazı hücrelerde pozitif enhancerler, diğerlerinde negatif enhancerler olarak etki gösterebilir.

Promotor Yapısı

- Nisbeten çok miktarlarda mRNA kopyalayan genlerin promotorları benzer yapıdadır.
- Bunlar transkripsiyonun başladığı yerde (upstream'de) yaklaşık 30 baz çiftlik bir TATA dizisine sahiptir (bazen **TATA kutusu** veya Goldberg-Hogness kutusu da denilir), upstream'ın ötesinde bir veya daha fazla promotor elementinde olduğu gibi

- Bir promotor bölgenin “fonksiyonel anatomisi” etkin transkripsiyon için gerekli olan bazlarının belirlenmesiyle analiz edilebilir.
- Klonlanmış genler, kurbağa oositlerinin veya fibroblastların nukleusları içine yerleştirildikleri zaman, veya nükleotidler ve nükleer ekstratın varlığında RNA polimerazla inkübe edildiklerinde doğru bir şekilde transkribe edilebilirler.
- Bir genin transkripsiyonu teyit edildiği zaman, araştırmacı, gende veya onun çevresindeki bölgelerde spesifik delesyon yapmak için kesim (restriksiyon) enzimleri kullanır.
- Böyle modifiye bir genin doğru bir şekilde transkribe edilip edilmediği görülebilir.
- β -globin geni üzerinde böyle çalışmalar, cap bölgesinin öncesindeki ilk 109 baz çiftinin, RNA polimerazla β -globin gen transkripsiyonunun doğru başlaması için yeterli olduğunu göstermiştir.

- Myers ve arkadaşları (1986) bu analizi fare β -globin geninin transkripsiyonunun başladığı 106 baz çiftlik upstreamden, birinci ekzonun ilk 475 baz çiftine kadar olan bölgesini klonlayarak daha ayrıntılı olarak yapmışlardır.
- Bu klonlar, in vitro mutageneze tabi tutulmuşlardır (spesifik mutasyonlar klonlanmış genin içine yerleştirilebilir).
- Bu yolla, globin geninin promotor bölgesinde 130 farklı tek-baz değişimi yapılmıştır.
- Bu klonlanmış genler tüm dokularda normal olarak eksprese edilen bir gendeki bir enhanceri içeren plazmidlere yerleştirilmiştir. Sonra rekombinant plazmidler, normalde globin üretmeyen kültür hücrelerine transfeksiyonla sokulmuşlardır.
- Hücreler klondaki kesilmiş (eksik) globin mesajını transkribe edebilecek mi?

- Birçok durumda 5' yanındaki bölgedeki bir baz değişimi, globin gen transkripsiyonunu etkilememiştir.
- Fakat mutasyonlarda, transkripsiyonu kesin olarak azaltan üç nükleotid grubu vardır.
- Bir grup, TATA kutusundadır,
- diğeri promotor elementinin upstream'inde CAAT bölgesindedir ve
- üçüncüsü cap bölgesinden yaklaşık 95-87 baz çifti upstreamde yer alan CACCC bölgesindedir.

- **CAAT** ve **TATA** kutularının çok sayıda ökaryot promotorunda kritik elementler olduğu bulunmuştur,
- fakat **CACCC** dizisi birkaç türdeki β -globin gen promotorları dışında nadiren görülmüştür.
- İnsanlarda bu dizinin kritik olduğu açıktır.
- Bu dizide doğal olarak oluşan bir mutasyon, β -globin gen transkripsiyonunun total kaybına sebep olur ve bu dizi, eritroside özgü bir transkripsiyon faktörü tarafından tanınabilir.
- -78 ve -79 pozisyonundaki iki mutasyon, transkripsiyonu normal seviyesinin üç katına çıkarmıştır.
- Bu değişikliklerin, *trans*-düzenleyici proteinlerle promotorun interaksiyonunu kolaylaştırdığı düşünülmüştür.

Promotor Fonksiyonu

- Promotorlar, sadece RNA polimeraz bağlama fonksiyonu yapmaz, ayrıca bu gendeki transkripsiyonun yerini ve zamanını da tayin eder.
- Promotorun bu fonksiyonu, bazı transgenik hayvanlarda canlı olarak gösterilebilmiştir.
- Belirli bir genin normal promotoru yerine bir başka genin promotoru yerleştirilerek yeni bir gen yapılmıştır ve bu birleşik gen bir memeli zigotunun pronukleusuna yerleştirilmiştir.
- Palmiter ve ark. (1982), rat büyüme hormonu genini izole etmişler ve onun 5' promotor bölgesini çıkarmışlardır.
- Bu boşluğa, serum çinko seviyelerini düzenlemede işe karışan küçük bir proteini üreten bir başka genin (***Mt-1*** :Mouse metallothionein 1) promotor dizisini yerleştirmişlerdir.

- ***Mt-1*** geni, çinko veya kadmiyum gibi ağır metallerin varlığıyla uyarılabilir, ve bu uyarımdan sorumlu diziler bu genin promotorundadır.
- Rat büyüme hormonu genine (rGH) bu metallothionein promotor bölgesi birleştirilerek, metallothionein promotorunun kontrolü altına yerleştirilmiştir.
- Bu durumda, rat büyüme hormonu mesajı, *Mt-1*'in promotoru çinko veya kadmiyumun varlığında aktive edildiği zaman yapılabilmektedir.

- Bu birleşik geni içeren bir plazmid, bakterilerde geliştirilmiştir, Mt-1/rGH parçası izole edilmiş ve bu parçanın yaklaşık 600 kopyası yeni döllenmiş fare yumurtasının pronukleusuna enjekte edilmiştir.
- DNA hibridizasyonu bu yeni doğan farelerin çoğunun kromozomlarına rat büyüme hormon geninin çok sayıda kopyasının birleşmiş olduğunu göstermiştir.
- Bu transgenik fareler sonra çinko bakımından zengin bir diyetle beslenmiştir.
- Çinko, bu farelerin karaciğerinde çok miktarda rat büyüme hormonu salgılanmasını uyarmıştır
- (Karaciğer genellikle bu proteinin-metallothionein- yapıldığı yerdir, büyüme hormonu ise hipofiz bezinden salgılanır).
- Salgılanan büyüme hormonunun miktarı bu farenin büyüklüğüyle ilişkilidir.
- Transgenik fare onunla beraber doğan normal kardeşlerinden %80 kadar daha büyük olur .
- Metallothionein promotörü, bu transgenik faredeki büyüme hormonunun sentezini düzenlemiştir.

- Bu strateji Őimdi peptit hormonlar, α_1 antitripsin (emphysema=emboli ŐiŐliđi olan hastalar için kullanılan) ve kan pıhtılaşma faktörleri gibi protein ürünlerini çok miktarda üretmek için farmasötik Őirketleri tarafından kullanılmaktadır.
- İnekler, koyunlar ve keilerdeki pronukleuslara kazein, lactalbumin, veya β -lactoglobulin (üç temel süt proteini) genlerinin promotorlarıyla birleŐtirilen, istenen proteinin gen dizisini içeren rekombinant DNA enjekte edilmiştir.
- Süt veren inekler süt proteinlerini çok miktarda sentezlemiŐtir, ve bu ürünlerin çođu yeni mesajın transkripsiyonunu düzenlemiştir.

- Hayvan, (prolaktin hormonuna cevap olarak) kazein veya lactalbumin genlerini transkribe ettiği zaman, bu terapötik proteinlerin genlerinin transkribe edileceğine ve sentezlenebileceğine dair umut doğmuştur.
- Örneğin, bir durumda, α_1 antitripsin için bir insan geni bir β -lactoglobulin promotoruyla birleştirilmiş ve bir koyun zigotunun pronukleusuna enjekte edilmiştir.
- Bu koyun embriyolarının biri, sütün litresi başına 35 gram insan α_1 antitripsin proteini içeren bir dişiye gelişmiştir.
- Yani promotorlar, gelişim sırasında hangi genin hangi hücrede transkribe edileceğinin tayin edilmesinde bir rol oynar.

- Transgenik koyunda promotor fonksiyonu. α_1 antitripsin veya pıhtılaşma faktörü peptitleri gibi farmasötik olarak önemli proteinlerin yapısal geni, koyun sütü β -lactalbumin (veya kazein)'in promotoruna bağlanmıştır.
- Bu rekombinant gen, yeni döllenmiş koyun yumurtasının pronukleusuna enjekte edilmiş ve yumurta, anne koyunun uterusuna yerleştirilmiştir.
- Yeni doğan kuzu trans-genin bulunup bulunmadığını anlamak için PCR ve Southern blotting ile incelenmiştir.
- Dişi transgenik koyun olgunlaştığı zaman, trans gen süt bezinde aktive edilir ve protein süte salgılanır. Bu protein sonra, süttten izole edilebilir.