

אפיגנטיקה בשירות הבקרה על ביטוי גנים

מאת אהרן רזין

מכלול הגנים שהם בני ביטוי נמצאים בהרכב מלא בכל רקמות הגוף ובכל תאיו אלא שרק חלקם מתבטאים בתא נתון. הגנים שאינם אמורים להתבטא בתא נתון נמצאים בבקרה הדוקה. עד כמה בקרה זו הדוקה אפשר לראות בתמונה 2.



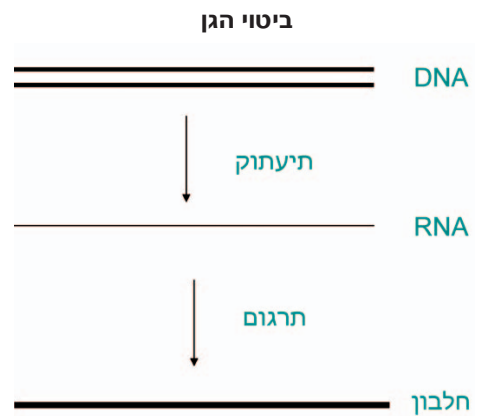
תמונה 2: ביטוי גנים ייחודיים לרקמה

הגן המקודד להורמון הגדילה (Growth Hormone) מתבטא במוח בשמונה סדרי גודל יותר מבכל תא אחר. הגן המקודד לאינסולין מתבטא בתאי בלבב בשמונה סדרי גודל יותר מבכל רקמה אחרת ואפילו בהשוואה לתאי אלפא בלבב.

כיצד מושגת בקרה מחמירה כל כך ומה מקנה לה את הייחודיות לרקמה? כיצד בתא נתון גן אחד מתבטא וגן אחר מדוכא לחלוטין? יתר על כן, לעתים אחד משני עותקים של אותו הגן באותו התא מתבטא והעותק השני מושקט. זה קורה בגנים מוטבעים שהמקור ההורי שלהם מסומן בביצית או בזרע והם מתבטאים מעותק שמקורו באב או באם. גם גנים המצויים על כרומוזום X בנקבה עותק אחד שלהם נבחר אקראית להתבטא ואילו בן זוגו בלתי פעיל. נוסף על כך רק עותק אחד של גנים של המערכת החיסונית מתבטא, וכאשר זה מתבטא מושקט בן זוגו, והשאלה הנשאלת היא כיצד נשמר במקרים כגון אלה עותק אחד במצב לא פעיל כאשר קיימים בתא כל הגורמים הדרושים לביטוי הגן. על שאלות חשובות אלה עונה האפיגנטיקה, המשנה הלכה למעשה ביטוי גנים בלי לשנות את רצף ה-DNA.

בשני העשורים האחרונים הולכת וגדלה המודעות לתפקיד המרכזי שממלאת האפיגנטיקה בבקרה על ביטוי גנים. בד בבד הולכת ומתבררת החשיבות שיש לתפקוד לקוי של האפיגנטיקה במצבי מחלה כמו סרטן, מחלות התנהגותיות, מחלות גנטיות של מערכת העצבים ואחרות.

גן הוא מקטע DNA דומם עד שהוא מתעורר לחיים ומתחיל להתבטא בהשפעת גורמי תיעתוק אשר נקשרים לאזור האתחול שלו. גן מתבטא בשני תהליכים ביוכימיים עוקבים: בראשון האינפורמציה הגנטית הגלומה במקטע ה-DNA מתועתקת תוך שימוש ב-DNA כתבנית ליצירת מולקולת RNA שליוח (mRNA). ברוב המקרים האינפורמציה שתועתקה והגלומה כעת במולקולת ה-mRNA מתורגמת לחלבון בתהליך מורכב המתבצע על גבי חלקיקים הנקראים ריבוזומים. החלבונים, ובמקרים מסוימים מולקולות ה-RNA עצמן, מוציאים מן הכוח אל הפועל תפקידים ביולוגיים מגוונים (תמונה 1).



תמונה 1: תהליך הביטוי של הגנים

כולל שני שלבים עיקריים: השלב הראשון הוא תיעתוק שבו מועברת האינפורמציה הגנטית הגלומה במקטע ה-DNA (גן) ל-RNA שליוח. בשלב השני האינפורמציה הגנטית הכתובה בשפת RNA מתורגמת לשפת החלבונים (חומצות אמיניות) בתהליך מורכב המערב אנזימים שונים וחלקיקים (ריבוזומים) המורכבים ממולקולות RNA וחלבונים.



תמונה 4: הפרדיגמה לתבניות מתילציה של הגנים

אזור אתחול התיעתוק (מסומן בחץ אופקי) של גנים של תחזוקה, עשיר ברצפי CpG שאינם ממותלים (קווים אנכיים). אתרי CpG בגוף הגן ממותלים (עיגולים מלאים); גנים של תחזוקה מתבטאים (+) בכל רקמה; גנים ייחודיים לרקמה אינם ממותלים ברקמה במקום שבו הגן מתבטא (+) וממותלים ואינם מתבטאים ברקמות האחרות שבהן הגן אינו מתבטא (-).

באזורים הדלים בנוקלאוזומים ובשיירי מתיל ציטוסין נמצאו הגנים הפעילים; באזורים עשירים בנוקלאוזומים ובמתיל ציטוסין לא נמצאו גנים מתבטאים. עבודה זו בישרה את ראשית עידן המחקר בתחום האפיגנטיקה (מתילציה) ובקרת ביטוי גנים והייתה תחילתו של שיתוף פעולה מחקרי פורה בין המעבדות של סידר ושלי, שנמשך כבר למעלה משלושים שנה. המשך המחקר שבוצע במעבדות של סידר ושלי בשנות השמונים הניב את העקרונות הבסיסיים של תופעת המתילציה של DNA והשתתפות המתילציה במנגנון הבקרה על ביטוי גנים.

לכל גן תבנית מתילציה ייחודית הנקבעת בעובר. משהיא נקבעת היא מורשת הורשה שבטית (clonal inheritance) ונשמרת במהימנות רבה דורות רבים (חלוקות) של התא. [2, 3].

התבניות הללו נמצאות בהתאמה עם ביטוי הגן. ככלל, גני משק בית (house keeping genes) מתבטאים בכל התאים ואינם ממותלים באזור האתחול (promoter) של הגן. גנים ייחודיים לרקמה אינם ממותלים ברקמה שבה הם מתבטאים וממותלים בכל שאר הרקמות שבהן הם מושקעים [4].

הבקרה האפיגנטית על ביטוי גנים מתבצעת בכמה אופנים: 1. שינויים במתילציה של ה-DNA;

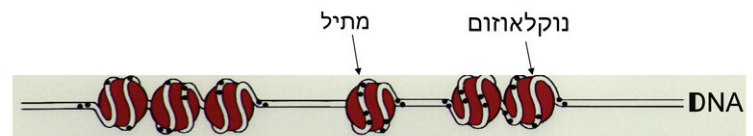
2. מודיפיקציות של חלבונים הנמצאים באינטראקציה עם ה-DNA, בייחוד החלבונים הנקראים היסטונים, שהם המרכיבים החלבוניים של חלקיקים הנקראים נוקלאוזומים המאפשרים דחיסה של ה-DNA בגרעין למבנה-על הידוע בשם כרומטין;

3. לאחרונה מצטרפות לרשימת הגורמים האפיגנטיים המשתתפים בבקרה של ביטוי הגנים מולקולות RNA קצרות (miRNA).

להבנה שהמודיפיקציות של היסטונים קשורות לביטוי גנים קדמה ההכרה שמתילציה של DNA ממלאת תפקיד חשוב בבקרה של ביטוי הגנים.

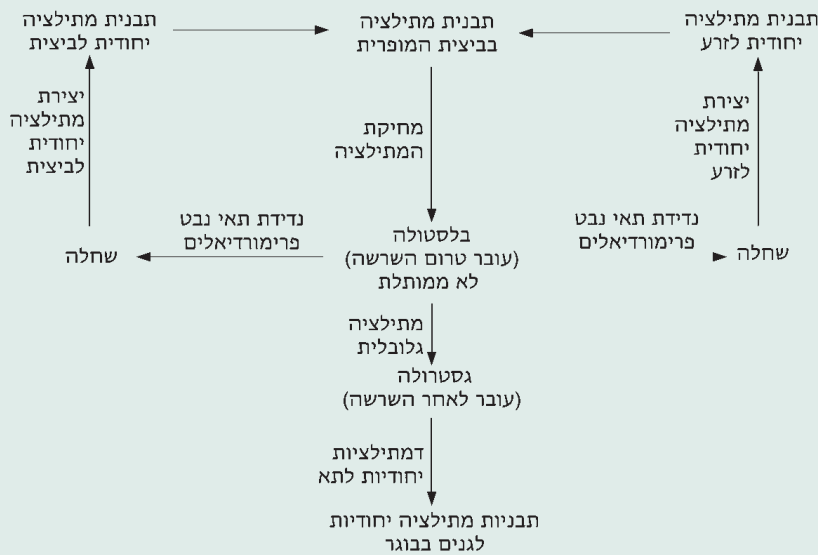
מתילציה של DNA היא הוספה אנזימטית של שיירי מתיל (CH₃) לבסיס ציטוסין (C) הסמוך לגואנין (G) ב-DNA, ולכן רצפי ה-DNA הממותלים נקראו רצפי mCpG (מתיל ציטוסין-גואנין). תופעת המתילציה של DNA התגלתה לפני כשישים שנה כאשר הוצ'קיס (Hotchkiss), חוקר אמריקאי, גילה ב-DNA את הבסיס המינורי הממותל 5 מתיל ציטוסין. הממצא לא זכה לתשומת לב מיוחדת עד לסוף שנות השבעים של המאה הקודמת, אז החלה חשיבותו הביולוגית של הבסיס 5 מתיל ציטוסין להתברר עם התפתחות הטכנולוגיה של שיבוט גנים.

תחום מחקרי זה היה שדה בור כאשר החלו החוקרים בתחום להתעניין במתילציה של DNA בשנות השבעים של המאה הקודמת. נפלה בחלקנו הזכות לחרוש את התלמים הראשונים ולתרום לקידומו. במחקר שפרסמנו חיים סידר ואנוכי בסוף שנות השבעים [1] דיווחנו על התפלגות מסודרת של שיירי מתיל ציטוסין בכרומטין. אזורי כרומטין צפופים בנוקלאוזומים היו עשירים בשיירי מתיל ציטוסין, ואילו אזורים דלים בנוקלאוזומים היו דלים גם בשיירי מתיל ציטוסין (תמונה 3).



תמונה 3: התפלגות שיירי הציטוסין הממותלים בכרומטין עיגולים אדומים מייצגים נוקלאוזומים, ועיגולים שחורים את קבוצות המתיל בשיירי הציטוסין הממותלים.

היווצרות תבניות מתילציה בתאי הנבט ובעובר



תמונה 5: היווצרות תבניות המתילציה בתאי הנבט ובעובר

תבניות המתילציה הייחודיות לזרע ולביצית משתקפות בביצית המופרית. לאחר ההפריה מתרחשת דמתילציה, המביאה את הגנום למצב של חסר מתילציה כמעט כללי. המצב של חסר מתילציה נמשך עד לשלב הבלסטולה. מהבלסטולה, שבו כל תאי העובר אינם ממותלים, נודד מספר קטן של תאים שיהיו תאי הנבט הראשוניים (פרימורדיאלים). תאים אלה מגיעים לאחר מסע של כמה ימים לשחלות כשהם אינם ממותלים.

השלב הבא בהתפתחות העובר (גסטולה) בשל להשרשה ברחם. הגנום בעובר המושרש מתמל (מתילציה de novo) חוץ מרצפים הקרויים CpG Island, המוגנים מפני המתילציה de novo. רצפים אלה, שנשארים לא ממותלים, מצויים באזור האתחול של גנים של תחזוקה (עין בתמונה 4). מכאן ואילך חלות בעובר דמתילציות ספציפיות לתא המייצרות תבניות מתילציה לגנים הייחודיים לרקמה. התבניות נשמרות כל חי הבוגר.

בד בבד עם התפתחות העובר מתחוללות בשחלות, כמו בעובר עצמו, מתילציה de novo ודמתילציות ייחודיות המייצרות תבניות מתילציה אופייניות לביצית או לזרע. התבניות נמחקות לאחר ההפריה כמתואר לעיל.

בניסויים מעבדתיים שבהם החדרנו לתאים גנים שמותלו במבחנה והשוונו את פעילותם לגנים שהוחדרו לתאים כאשר אינם ממותלים, נוכחנו בחשיבות המתילציה כמכשיר מרכזי בהשקת הגנים: כאשר הגן הוחדר ממותל הוא לא התבטא בתאים; כשאותו גן הוחדר לא ממותל – הוא התבטא [5].

לימים כאשר הטכנולוגיה התפתחה והיה אפשר לבצע אנליזה של תבניות מתילציה במולקולות DNA בודדות, התאפשרה בחינת המתילציה של גנים בודדים בביצית ובתאי העובר המוקדם, וגם היה אפשר לגלות כיצד ומתי תבניות מתילציה ייחודיות נוצרות [6] (תמונה 5). מתוצאות הניסויים היה אפשר להסיק מהי חשיבות המתילציה בהתפתחות העובר. כאשר שובטו הגנים המקודדים למתילז [7] – האנזים המבצע את פעולת המתילציה – היה אפשר ליצור עכבר מוטנטי שאינו מבטא את המתילז, ולכן ה-DNA שלו אינו ממותל (תמונה 6). הצאצא של עכבר כזה אינו מתפתח מעבר ליום העשירי להיריון (סוף השליש הראשון) וכמובן אינו מגיע לפרקו. דבר זה מעיד באופן נחרץ על חשיבות המתילציה בהתפתחות העובר [8].

נשארה פתוחה השאלה איך אפשר לקשור את שלושת הקצוות – המתילציה של ה-DNA, המבנה הכרומטיני באזור הגן וביטוי הגן. השאלה נפתרה כאשר התגלו על ידי החוקר הסקוטי אדריאן בירד (Adrian Bird) חלבונים הנקשרים לשיירי ציטוסין ממותל ב-DNA. אחד החלבונים הנקשרים למתילים ב-DNA נקרא MeCP2 (תמונה 7). לחלבון זה שני אזורים החשובים לתפקודו:

אזור ה-MBD (methyl binding domain), האחראי לקשירתו של החלבון ל-CpG ממותל ב-DNA [9], ואזור ה-TRD (transcription repressor domain), המגייס את הקורפרסור Sin3A, שמצדו מגייס שני אנזימים היסטון דאצטילזות (HDAC 1&2) המביאים לסילוק שיירי אצטיל הנמצאים בקצה ההיסטונים. נוכחות שיירי אצטיל אלה בקצה

ההיסטונים מסמלת מצב פעיל של הגן. הדאצטילציה גורמת למבנה כרומטיני "סגור" באזור הגן ומביאה להשקתו של הגן [10].

לסיכום, לאחרונה הולכת ומתבססת ההכרה שקיימים יחסי גומלין ושיתוף פעולה מלאים בין השינויים האפיגנטיים באזור הגן, המתילציה של ה-DNA, המודיפיקציות של ההיסטונים

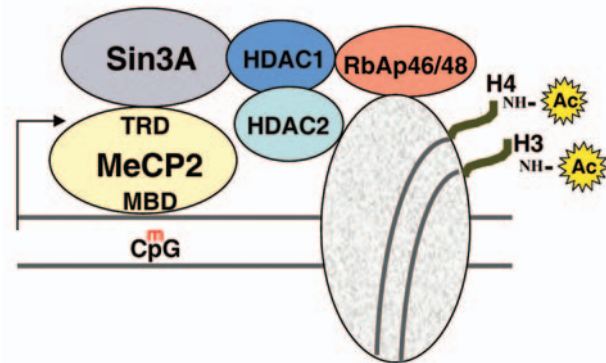
וכושרו של הגן להתבטא. יחסי הגומלין האלה עומדים בבסיס הבקרה האפיגנטית של ביטוי גנים. נודעת להם חשיבות רבה בתהליכים ביולוגיים בסיסיים כמו התפתחות העובר ותופעות ידועות הקשורות בהתפתחות העובר כמו התמינות התאים לרקמות שונות של הגוף, אינאקטיבציה של כרומוזום X, הטבעה גנומית, התפתחות מערכת העצבים, תפקוד המערכת החיסונית ועוד. תפקוד לקוי של המנגנונים האפיגנטיים מתאפיין במחלות המתבטאות בפגמים בעובר המתפתח, פגמים במערכת העצבים המרכזית וההיקפית, פגמים במערכת החיסונית והתפתחות גידולים סרטניים.

מקורות

- [1] A. Razin & H. Cedar, "Distribution of 5 methylcytosine in chromatin", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74 (1977), pp. 2725–2728.
- [2] A. Razin & A. D.Riggs, "DNA Methylation and Gene Function", *Science*, 210 (1980), pp. 604–610.
- [3] R. Stein, Y. Gruenbaum, Y. Pollack, A. Razin, & H. Cedar, "Clonal Inheritance of the Pattern of DNA Methylation in Mouse Cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79 (1982), pp. 61–65.
- [4] A. Yeivin & A. Razin, "Gene Methylation Patterns and Expression", in: J. P. Jost & H. P. Saltz (eds), *DNA Methylation: Molecular Biology and Biological Significance*, Basel, Switzerland 1993, pp. 523–568.
- [5] R. Stein, A. Razin, & H. Cedar, "In Vitro Methylation of Hamster APRT Gene Inhibits Its Expression in Mouse L Cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79 (1982), pp. 3418–3422.
- [6] T. Kafri, M. Ariel, M. Brandeis, R. Shemer, U. Lomer, J. MaCarrey, H. Cedar, & A. Razin, "Developmental Pattern of Gene Specific DNA Methylation in the Mouse Embryo and Germ Line", *Genes and Development*, 6 (1992), pp. 705–714.
- [7] T.H. Bestor, A. Landano, R. Mattaliano, & V. Ingram, "Cloning and Sequencing of a cDNA Encoding DNA Methyl Transferase of Mouse Cells", *Journal of Molecular Biology*, 203 (1988), pp. 971–983.
- [8] E. Li, T.H. Bestor, & R. Jaenisch, "Targeted Mutation of the DNA Methyltransferase Gene Results in Embryonic Lethality", *Cell*, 69 (1992), pp. 915–926.
- [9] X. Nan, R.R. Mecharis, & A. Bird, "Dissection of the Methyl-CpG Binding Domains from the Chromosomal Protein MeCP2", *Nucleic Acids Research*, 21 (1993), pp. 4886–4892.
- [10] A. Razin, "CpG Methylation, Chromatin Structure and Gene Silencing – a Three – Way Connection", *The EMBO Journal*, 17 (1998), pp. 4905–4908.



תמונה 6: מתילציה של DNA חיונית להתפתחות העובר משמאל: צאצא ביום ה־9.5 להיריון של עכבר נורמלי; מימין: עכבר חסר הגן המקודד למתילז. העובר אינו שורד את תקופת ההיריון.



תמונה 7: מתילציה של DNA, מבנה הכרומטין וביטוי הגן – הקשר המשולש

החלבון קושר DNA ממותל (MeCP2) נקשר לאתר GpG ממותל באזור האתחול של תיעתוק בעזרת ה־MBD (methyl binding domain) ובעזרת אזור ה־TRD (transcription repressor domain) של החלבון מגויסים הקורפסור וההיסטון דאצטילזות (Sim3A, HDAC1, HDAC2, וחלבון מגשר RbAp46/48. חלבונים אלה מהווים קומפלקס רב־חלבוני הגורם לסילוק שיירי אצטיל (Ac) מקצות ההיסטונים בנוקלאוזום. שיירי אצטיל בהיסטונים מאפיינים מבנה כרומטיני המקנה לגן כושר ביטוי.