

RENDÍTHETETLEN REGENERÁCIÓ

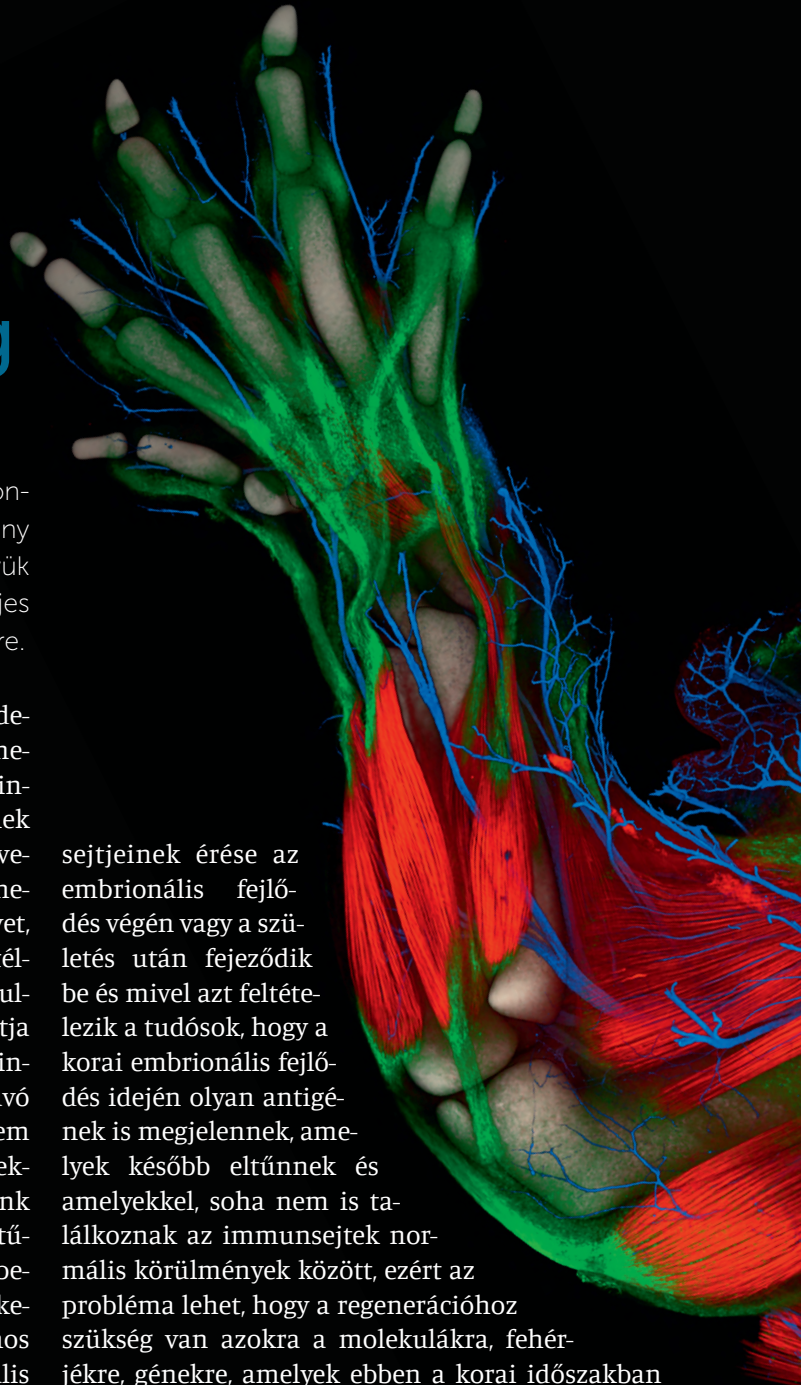
A Hox gének szerepe a végtag fejlődésében

A regeneráció képessége elidegeníthetetlen tulajdonsága minden élő szervezetnek, viszont csak néhány állatcsoport képes arra, hogy egy elvesztett szervük helyett, azzal funkcionálisan és anatómiailag is teljes mértékben megegyező, új struktúrát hozzanak létre.

Biológiai szempontból olyan szervek, testrészek — ideértve a végtagokat is — regenerálódása lehetséges, amelyek ugyan fontosak az élőlény számára, hiszen minden szervnek megvan a maga feladata, viszont ezeknek a hiánya nem okoz azonnali halált, így képes a szervezet áthidalni azt az átmeneti időszakot, amíg a regenerálódás intervalluma tart. A gerincesek közül a szövet, illetve végtag regenerálódás élenjáró bajnokai a kétéltűek és habár a regenerálódási folyamataiknak a tanulmányozása rengeteg új és hasznos információval látja el a tudományos világot és segít közelebb vinni minket a regenerálódási folyamatok hátterében megbúvó molekuláris mechanizmusok azonosításához, nem szabad azt a tévképzetet erősíteni, hogy pusztán ezeknek az adatoknak a felhasználásával képesek leszünk a végtagregenerálódás képességét átültetni a kétéltűekből az emlős szervezetekbe, és végső soron az emberekbe. A magzatburkosok csoportján belül elhelyezkedő madarak és emlősök felnőtt kori állapota számos vonatkozásban lényegesen különbözik az embrionális állapottól, példának okáért a test víztartalma nagyjából 20%-kal kevesebb és a hialuronsav koncentráció is jelentősen csökken a felnőtt szervezetben, a magzati léthez viszonyítva. Ezzel szemben a magzatburok nélküliek (halak, kétéltűek) és a magzatburkosok közül a hüllők felnőtt alakja sokkal közelebb áll az embrionális állapothoz. Ezek az élőlények majdnem teljes életük során folyamatosan növekednek, így megőrződnek olyan aktív növekedési központok és őssejt-csoportosulások a felnőtt szervezetben is, amelyek a madarak és az emlősök felnőtt formáira nem jellemzőek. Emellett a halak és a kétéltűek immunrendszerének az adaptív immunválasz kialakításáért felelős része kevésbé hatékonyan működik, mint a magzatburkosok esetében, ennek pedig fontos következményei lehetnek a regenerálódást illetően. Mivel az immunrendszer e

sejtjeinek érése az embrionális fejlődés végén vagy a szünetelés után fejeződik be és mivel azt feltételezik a tudósok, hogy a korai embrionális fejlődés idején olyan antigének is megjelennek, amelyek később eltűnnek és amelyekkel, soha nem is találkoznak az immunsejtek normális körülmények között, ezért az probléma lehet, hogy a regenerációhoz szükség van azokra a molekulákra, fehérjékre, génekre, amelyek ebben a korai időszakban fejeződnek ki. Ezeknek az antigéneknek és az ezeket nem ismerő, vagyis idegen anyagnak tekintő immunsejteknek a találkozásából pedig súlyos autoimmun folyamatok indulhatnak el, amely végső soron nem regenerálódáshoz, hanem sejt- és szövetpusztuláshoz vezethet. Sok orvosi problémát kell megoldani ahhoz, hogy a végtag-regenerálódás valósággá válhasson, többek között létre kell hozni a magas hialuronsav- és víztartalmú szövetet gyógyszerek segítségével, illetve ki kell küszöbölni az immunrendszer gátló hatását,

Az új végtag regenerálódása a blasztéma sejtjeiből indul ki, ami egy embrionális-szerű sejtcsoporthoz tartozó sejtcsoporthoz. A blasztéma egy puha, 80%-os víztartalmú szövet, magas hialuronsav koncentrációval, amely bizonyítottan serkenti a sejtosztódást, a sejtek vándorlását és csökkenti az immunrendszer aktivitását.

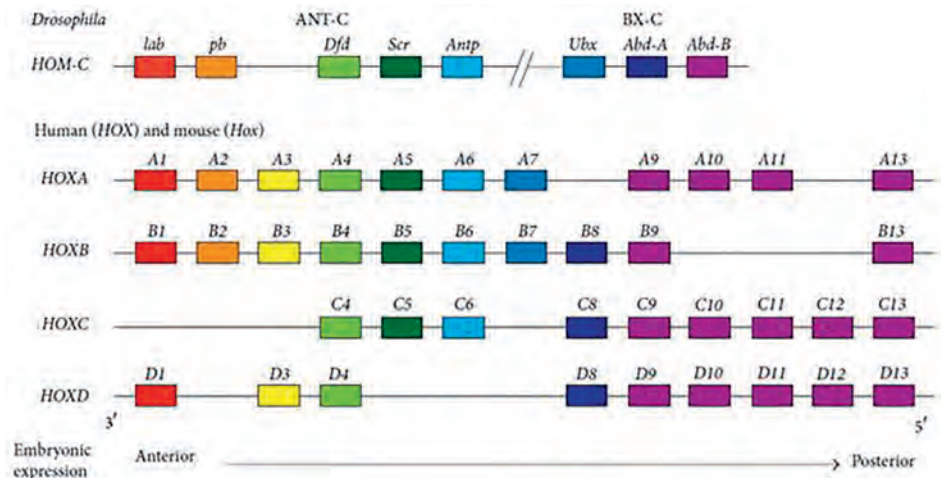


valamint el kell érni, hogy a regenerálódási folyamat csak egy, általunk kiválasztott helyen induljon meg, a regenerálódás idejének csökkentéséről már nem is beszélve [1].

De addig is, amíg ezek megoldásra várnak, tanulmányozni kell a végtag fejlődését részleteiben, hogy meg tudjuk, milyen gének játszanak szerepet benne és ezek hogyan hatnak kölcsön egymással. Mindezek vizsgálatára az egér, mint modellszervezet alkalmas, mivel a végtag fejlődésének módozata emlős állat lévén, lényegesen közelebb áll az emberi végtagfejlődés folyamataihoz, mint a kétélűek fejlődésének vizsgálata, azonban nyilvánvalóan ez sem feleltethető meg teljes mértékben az emberi szervezetben lezajló szabályozási mechanizmusoknak. Az egyik legfontosabb géncsalád

azokat nevezhetjük Hox géneknek, amelyek a Hox clusterben foglalnak helyet. Ezen definíció értelmében a *Drosophilában* (ecetmuslica) összesen 8 darab, bennünk, emlősökben pedig 39 darab Hox gén található és ez a jelentős mértékű számbeli fölény előfeltétele egy komplexebb szervezet kialakításának. A gerincesek genomját illetően azt feltételezik, hogy az evolúciójuk korai szakaszában kétszer is teljes genom duplikáció zajlott le, azaz a teljes genetikai állományuk kétszer is megduplázódott. Az első duplikáció még a többi újszájúval közös ős fejlődési vonalán, a második pedig kizárólag a gerincesek fejlődési útján történt. Ennek eredményeképpen a gerincesek többségében az eredeti egy Hox cluster helyett négy darab található, négy különböző kromoszómán [9].

1. ábra. A Hox gének elhelyezkedése a *Drosophila* 3. kromoszómáján, összehasonlítva az emlősök Hox clusterével. Azoknál az élőlényeknél, akik több Hox clusterrel rendelkeznek, a különböző kromoszómán elhelyezkedő, de azonos számmal rendelkező Hox gének egymás paralógjai, amelyek rendszerint hasonló funkcióval rendelkeznek és egy adott feladatkört látnak el. (Taniguchi, 2015)



a végtag fejlődése szempontjából a Hox gének családja, amelyeket joggal neveznek az egyedfejlődés mester regulátorainak is, hiszen ezek a gének a genetikai útvonalak elején állnak a végtagok fejlődése esetén is, és a leendő végtagok területén kifejeződve embrionális korban a végtag teljes genetikai programját képesek elindítani, amely a végtag kinövéséhez és formálódásához vezet.

A Hox gének rövid áttekintése

A Hox gének a homeotikus gének közé tartoznak, amelyek közös jellemzője egy konzervált, 180 bázispárból álló DNS-szakasz, a homeobox, amelyről a génexpresszió során egy 60 aminosavas, 3 α -hélixből álló polipeptid szakasz íródik át, más néven a homeodomén. Az átíródó fehérjék transzkripciós faktorok, tehát más gének expresszióját szabályozzák és ez a speciális domén, a homeodomén az, ami elengedhetetlen a specifikus DNS-kötésükhöz, és ezáltal a hatásuk kifejtéséhez [4]. A legújabb egyezmények szerint a homeotikus gének közül csak

A Hox gének szerepe egyszerűen meghatározható, mégis komplex feladatkört jelent. Ezeknek a géneknek a feladata a test anteroposzterior tengelye mentén végbemenő differenciálódás kivitelezése. Ezt a különleges expresszáladási mintázatuk teszi lehetővé, ugyanis a Hox gének mind időben, mint térben anteroposzterior irányban fejeződnek ki. Ez azt jelenti, hogy a kromoszómán elfoglalt helyüket tekintve az anterior Hox gének íródnak át az embrionális fejlődés során legelőször, illetve a test anteroposzterior tengelye mentén a legcraniálisabban, azaz a test azon részén, ahol az állat feji vége fog kialakulni, míg a poszterior Hox gének expressziója a fejlődés során a legkésőbb valósul meg és a legközelebb az állat farki végéhez. A fő anteroposzterior testtengely mentén az expresszáladásuk egyszer megy végbe, egyetlen hullámban, azonban a végtagokban ettől eltérően, három egymástól elkülöníthető periódusban íródnak át a különböző Hox gének.

A továbbiakban ezekről a külön periódusokról, az alattuk kifejeződő Hox génekről és az általuk kialakított változásokról lesz szó. Az ismerttetett eredmények főleg

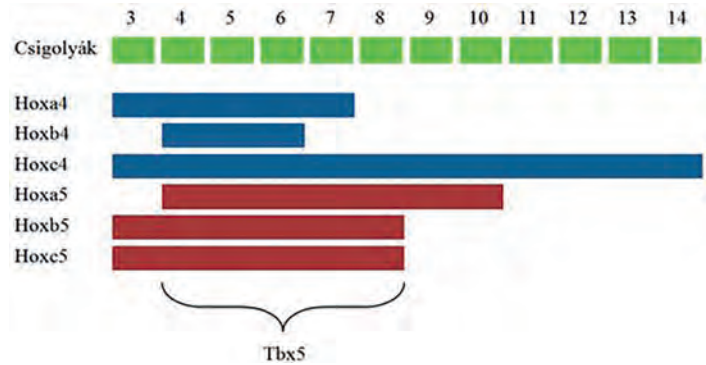
mutációs kísérletek eredményei által láttak napvilágot és a modellszervezet minden esetben egér volt. Ezt azért fontos kiemelni, mivel más fajok, más csoportok esetében természetesen eltérő génextpresszáldási mintázatok jellemzik a végtagokat.

Az első hullámban átíródo Hox gének és hatásuk

Embrionális korban a végtagok a test hossz tengelye mentén előre meghatározott régiókból indulnak fejlődésnek. A Hox gének aktivitása először a mesodermális eredetű oldallemez, azon belül is a poszterior oldallemez laterális sejtjeiben detektálható. Annak a megfigyelése és leírása, hogy végtagfejlődés során a mesodermában és nem az ectodermában található az a faktor, amely a fő szabályozó eleme a végtagok differenciálódásának, Edgar Zwilling-től származik [11], akinek megfigyelését a későbbi kutatások is igazolták. Az oldallemezből, mivel mesoderma származék, ezért a végtagokat felépítő csontok, izmok, ínák, porcok, illetve egyéb kötőszöveti struktúrák fognak kialakulni. A poszterior oldallemez sejtjeiben a Hox gének a meghatározott sorrendjük szerint expresszáldódnak az anteroposzterior tengely mentén és nagy valószínűséggel szerepet játszanak e régióknak a további felosztásában, ezáltal kialakul a leendő elülső végtag területe, a végtagok közötti terület és a leendő hátulsó végtag területe (3. ábra) [12].

Az elülső végtag leendő területét a *hoxa4*, *hoxa5*, *hoxb4*, *hoxb5*, *hoxc4*, *hoxc5* gének egymástól, az anteroposzterior tengely mentén eltérő, néhol egymással átfedő, néhol egyéni kifejeződési mintázata jelöli ki, ugyanis ennek a génextpresszáldási mintázatnak a következményeként íródik át kizárólag a leendő elülső végtagnak a területén a T-box5 gén, amely a végtagkezdemény megjelenésében, a végtag kinövésében játszik szerepet (2. ábra).

Megvizsgálva a T-box5 gén szerkezetét, a kutatók rábukkantak egy 361 bázispár hosszúságú régióra a második számú intronon belül, amely hat darab olyan szekvenciát tartalmaz, ahová a homeodoménnel rendelkező fehérjék kapcsolódnak tudnak, ezzel szabályozva

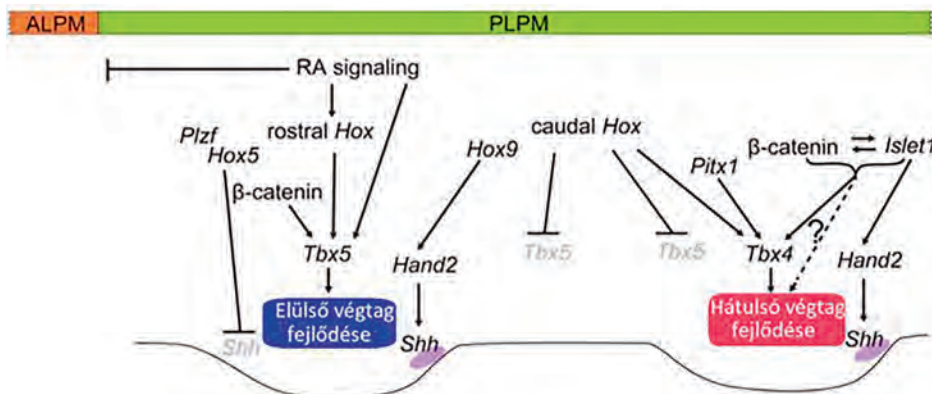


2. ábra. A képen a fejlődő csigolyák helyzetéhez viszonyítva a 3' Hox gének térben eltérő kifejeződési mintázata látható az egér embrióban, a test hossz tengelye mentén azon a területen, ahol a leendő mellső végtagokat kialakító sejtek lokalizálódnak. Az ábra ezen kívül jelöli a Tbx5 expressziójának térbeli helyzetét is.

a génextpressziót. Ezeket a területeket elnevezték Hox binding site-nak (Hbs) és 3' végtől 5' vég irányába haladva számokkal látták el őket 1-től 6-ig [7]. A hat darab Hbs két csoportra osztható a működésük alapján, az egyes, hármas, négyes, ötös és hatos Hox binding site-ra, mint aktivátorkötő helyekre tekintenek, ahová a *hox4* és *hox5* paralógok kötnek be. Ezzel ellentétben a Hbs2 szekvenciája a T-box5 expresszióját gátló Hox fehérjék felismerési helye. Ide tartoznak a caudális, azaz a *hox8*, *hox9* és *hox10* paralógok, amelyek nem is annyira a mellső végtag kialakításánál kerülnek előtérbe, hanem sokkal inkább a hátsó végtag esetében fejtik ki gátló hatásukat. Ezek a caudális Hox paralógok képesek hozzákötödni a második számú Hox binding site-hoz, ezáltal represszálni a T-box5 expresszióját, megakadályozva a kifejeződését a leendő hátsó végtag területén [8].

A hátsó végtag specifikációját kialakító molekuláris mechanizmusok egyelőre nem olyan pontosan feltártak, mint ahogyan azt a mellső végtag esetében tapasztaljuk. Valószínűleg a hátulsó végtag területén kifejeződő T-box4 gén hasonló szerepet tölt be a hátsó végtag fejlődésében, mint a T-box5 az elülső testfüggelék fejlődésében (3. ábra) [12].

3. ábra. A jelenlegi elképzelés, hogy milyen szignálok vesznek részt az elülső és hátulsó végtag identifikációjának meghatározásában. Látható, hogy a Hox géneken kívül sok egyéb más tényező is döntő szerepet játszik a differenciálódásban. ALPM: anterior oldallemez, PLPM: poszterior oldallemez, RA: retinsav, Tbx5: T-box5, Tbx4: T-box4, Shh: Sonic hedgehog. (Tanaka, 2016)



A Hox gének második expresszálódási periódusa

A második átíródási hullámot a Hox géneknek a proximodisztális tengely mentén kifejtett hatásának is tekinthetjük. Ez esetben ésszerű, ha a végtagot felépítő nagyobb régiók (stylopod, zeugopod, autopod) önálló tárgyalásával vesszük szemügyre ezeknek a géneknek a diverzifikációra gyakorolt hatását. Az emlősöket figyelembe véve a stylopod régió a mellső végtag esetében a felkart jelenti, míg hátulsó végtag esetében a combnak feleltethető meg. A zeugopod szakaszt tekintjük az ulna-ból és radius-ból álló alkarnak, illetve a tibia-ból és fibula-ból összeépülő lábszárnak. Az autopod régió pedig magába foglalja a tenyeret és az ujjakat, valamint a lábfejet és a lábujjakat.

Ha összehasonlítjuk az elülső és a hátulsó végtag fejlődését, akkor a legnagyobb eltérés a Hox gének mintázatában a stylopod régióban tapasztalható. Egyrészt az elülső végtaggal ellentétben, ahol kizárólag a HoxA és a HoxD cluster tagjai vesznek részt a struktúrák kialakításában, a hátulsó végtagban a HoxC cluster tagjai is képviseltetik magukat. Mégpedig oly módon, hogy a hoxc10 a stylopod régióban fejeződik ki, a hoxc11 pedig a zeugopod szakaszon fejt ki hatását az általa kódolt fehérje átíródása által. Ezért lehetséges például az, hogy olyan mutánsokban, ahol a hoxa és hoxd gének hibásak, viszonylag normális hátsó végtagok képesek fejlődni a felismerhetetlenségig deformálódott elülső végtagokkal szemben. Másrészt eltérés tapasztalható a kifejeződő Hox paralógok sorszámában, így míg az elülső végtagban a hox9 és hox10 paralógok expresszálódnak a stylopodban, addig a hátulsó végtagban kizárólag a hox10 paralógok íródnak át. Az is megállapítható, hogy az egyes paralógok nem azonos jelentőséggel bírnak a fejlődés folyamán, ugyanis az összes paralóg esetében helytálló a megállapítás, hogy a hoxa gének alárendelt szerepet játszanak a hoxd génekkel szemben. (4. ábra) [10].

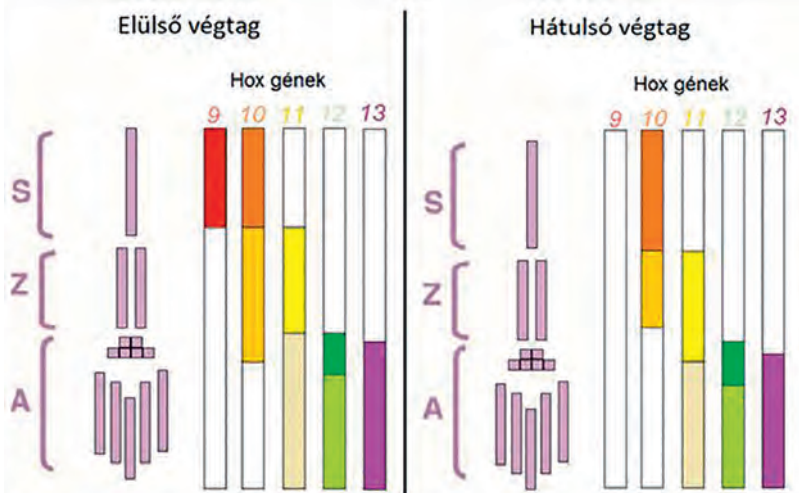
A zeugopod régió normál differenciációjának kivitelezésében a hox11 paralógoknak van kitüntetett szerepe. Ahogy a stylopod régióra, úgy a zeugopod régióra is igaz, hogy a hoxc gének közül a megfelelő paralógok, jelen esetben a hoxc11 csak a hátulsó végtagban fejeződik ki (4. ábra).

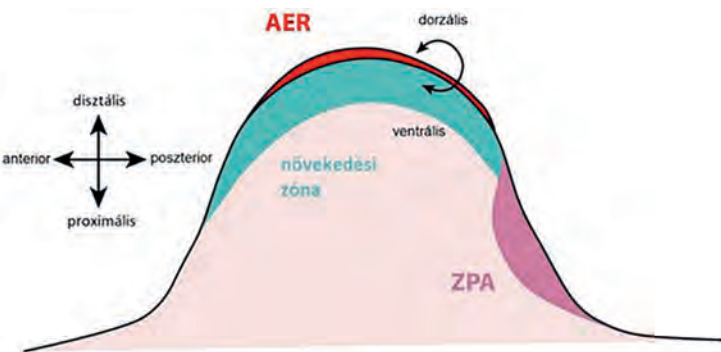
A hoxa11, hoxd11 kettős mutáns esetében késik magának a végtag primordiumnak a kiemelkedése a test felszínéből, amely vad típusú egérben

a kilencedik embrionális nap környékén figyelhető meg. Ez a késés az Fgf8 (fibroblast growth factor 8) és az Fgf10 (fibroblast growth factor 10) csökkent expressziójához köthető, amelyek tudvalevően felelősek a sejtosztódás serkentéséért, ezáltal a végtagbimbó kinövéséért. Az Fgf10 a mesenchymális sejtek terméke, és kifejeződése serkenti a mesenchymális sejtek felett fekvő apical ectodermal ridge-ben (AER) (5. ábra) az Fgf8 aktiválódását, ami visszahat az alatta fekvő területre és serkenti a sejtek proliferációját, ezáltal a növekedést. Mivel a hoxa11 és a hoxd11 is a mesenchyma területén fejeződik ki, nem pedig az ectodermában, így azt feltételezik, hogy a hox11 paralógok hiányának az elsődleges hatása a csökkent Fgf10 expresszió, tehát alapesetben a hox11 gének serkentik az Fgf10 átíródását. A végtag primordium megjelenésének késésén kívül megfigyelhető még, hogy a skeletális elemek fejlődésének korai stádiumában csökkent intenzitású a sejtek proliferációja a leendő zeugopod területén, valamint ezzel egy időben megnövekszik az apoptózissal elpusztuló sejtek száma a mellső végtag területén. Mindezek együttes hatása miatt az ulna és a radius extrém mértékben megrövidült a kettős mutánsokban [2].

A legtöbb olyan kutatás, amellyel a Hox gének proximodisztális tengely mentén betöltött szerepét vizsgálják, a hox11 paralógokat használja fel kísérletezésre, így ezeknek a géneknek az eredményei alapján következtetnek a többi Hox gén szerepére. hoxa11, hoxd11 homozigóta kettős mutánsok esetében megvizsgálták a leendő ulna és radius területén lokalizálódó porcsejteket is, és meglepődve tapasztalták, hogy az intenzíven osztódó, vad típusú sejtekhez képest, a chondrocyták festődése a nyugvó állapotú porcsejtek festődésével

4. ábra. Az ábra a Hox gének eltérő kifejeződési mintázatát mutatja be az elülső és a hátulsó végtag esetében is. Emlékeztetőül, a végtagban kizárólag a hoxa és a hoxd paralógok fejeződnek ki, ez alól egyedül a hátulsó végtagban kifejeződő hoxc10 és hoxc11 kivétel. Az elülső végtagban a Hox9 paralógok vesznek részt a végtag stylopod régiójának formázásában, ezzel ellentétben a hátulsó végtagban nincsenek jelen ezek a gének. Látható hogy a hox11, hox12, hox13 gének expressziója megegyező a két végtagtípusban. (Wellik és Capecchi, 2003)





5. ábra. A tengelyek eloszlása a végtag eltérő síkjaiban fejlődő embrió esetében. Az ábrán emellett láthatóak az egyes tengelyek kialakításában résztvevő régiók. Az AER főleg a proximodisztális tengely mentén való növekedésért és morfológiai változásokért felelős, a ZPA pedig az anteroposzterior aszimmetria kialakításában kulcsfontosságú. AER: Apical ectodermal ridge. ZPA: Zone of polarizing activity. (<https://bit.ly/2UPPMTy>)

mutatott homológiát. Maguk a *hox11* paralógok a perichondriumban fejeződtek ki intenzíven, mintegy körbe véve a leendő csontokat, kijelölve azok körvonalát. További kísérletek során kiderült, hogy a *hox11* paralógoknak feladata van a csontok megfelelő orientációjának kialakításában, ugyanis mutánsokban a radiust kialakító porcsejtek 90°-val elfordulva fejlődtek a vad fenotípus irányához képest [10]. A porcsejtek sorsa a hosszú csöves csontokban, hogy ők alakítsák ki azt a kezdetleges struktúrát, amire az osteoblastok építhetnek és elkezdődhet a csontosodási folyamat. Ez a folyamat le is zajlik a mutánsokban, viszont a csont nem képes felvenni a megfelelő anatómiai morfológiáját. Eszerint a perichondriumból érkező Hox szignáloknak szignifikáns szerepe van abban, hogy az egyes csontok milyen morfológiai struktúrát vegyenek fel. *hoxa11* és *hoxd11* mutáns egyedekben a chondrocyták nem mentek keresztül érési folyamaton a számukra meghatározott fejlődési stádiumban az ulna és a radius területén. A *hox11* géneknek szerepe van az epiphysis porckorong létrehozásában is, mivel hiányukban a radius és az ulna mindkét végén extrém hosszan késett az epiphysis porckorong kialakulása és kondenzálódása. A hosszú, csöves csontok növekedése a proximodisztális tengely mentén óriási mértékben függ attól, hogy megfelelő módon és megfelelő időben alakul-e ki az epiphysis, hiszen normál esetben a csontosodási folyamatok után a porcsejtek osztódása és érése az epiphysis porckorong területére korlátozódik, így a hosszirányú növekedés, az ezen a területen jelenlévő megfelelő szignálmolekulák és receptorjaik finom egyensúlya által szabályozott. Az epiphysis hiánya azt

eredményezni, hogy a porcsejtek rendezetlen módon osztódnak tovább, ami abnormális radius-hoz és ulna-hoz vezet [2].

Összefoglalásképpen elmondható, hogy a *hox11* paralógok a perichondriumban fejeződnek ki, kijelölve a végtag vázát adó csontos elemek körvonalát, és ezzel definiálva morfológiáját, segítenek a zeugopod elemek orientációjának meghatározásában, valamint az epiphysis területének kialakításában. Ezen kívül hatnak a porcsejtek érésére és növekedésére is. Ezek a megfigyelések valószínűleg kiterjesztők a végtagban expresszáldó többi 5' Hox paralógra is.

Az autopod régió vizsgálata során kapott eredmények kiértékelése bonyolult, mivel ezen a területen érvényesül leginkább a Hox géneknek az anteroposzterior tengely mentén lévő kifejeződése, amely már a harmadik hullámhoz tartozik. A *hoxd13* mutánsokban specifikusan az autopod régió poszterior struktúráinak fejlődése szenvedett zavart, ujjpercek veszttek el, vagy fuzionáltak a carpalis vagy tarsalis elemekkel. Ezeket a struktúrákat felépítő porcsejtek megragadtak a korai fejlődés stádiumában. Ezzel ellentétben a *hoxa13* mutációja hatással volt a poszterior és az anterior elemekre is. A *hoxa13* mutánsok esetében egy időbeli növekedés figyelhető meg a végtagfejlődés során legkésőbb kialakuló ujjak, illetve a tarsaliak és carpalis megjelenésében. A *hoxa13* és a *hoxd13* gének termékei csak részlegesen redundánsak a fejlődő végtagban, mindemelett a *hoxd11* a *hoxd12* és a *hoxd13* is részben átfedő szerepet tölt be az elülső végtag fejlődő autopod régiójában, de ez valószínűleg az anteroposzterior tengely kialakításában lényeges (4. ábra) [5].

A Hox gének harmadik és egyben utolsó kifejeződési hulláma

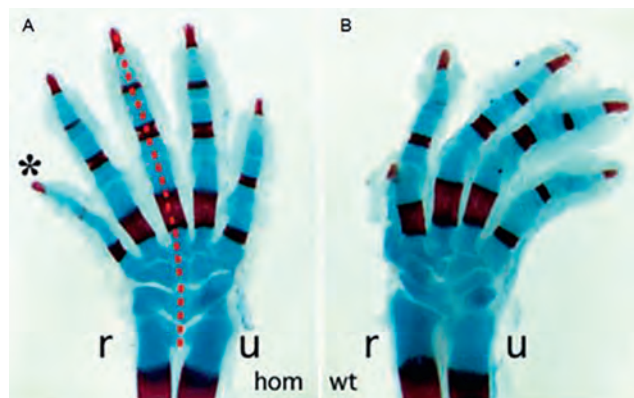
A harmadik átíródási periódus már nem a proximodisztális, hanem az anteroposzterior tengely mentén lezajló differenciálódásban működik közre. E tengely mentén megvalósuló szabályozással lehetőség nyílik az ujjak identifikációjára, egymástól eltérő morfológiájuk kialakítására. Ennek fő irányító központja a mesenchymális sejtek egy kitüntetett csoportja, amelyet zone of polarizing activity-nek (ZPA) neveztek el. Ez a terület az apical ectodermal ridge ectodermális sejtjei alatt terül el az elülső és a hátsó végtag poszterior részén (5. ábra).

Ezen a területen fejeződik ki a Sonic hedgehog (Shh) gén, amelynek az egyik főszerepet tulajdonítják a differenciációban, ugyanis az Shh gén terméke kizárólag a poszterior régiókban detektálható a fejlődő végtagokban, ennek a területnek a formálását

végzi. Az Shh szintén egy transzkripciósfaktort kódol, csakúgy, mint a Hox gének, vagyis a kifejeződésének köszönhetően más gének aktiválódnak a poszterior és más gének az anterior területeken. Az Shh kifejeződési mintázatának szabályozásában természetesen intenzíven részt vesznek a különböző Hox paralógok és általánosságban elmondható, hogy az anterior Hox paralógok gátolják, míg a poszterior Hox paralógok serkentik a Sonic hedgehog transzkripcióját [14].

Két eltérő konstrukciójú egértörzset állítottak elő a kutatók, hogy igazolják a Hox gének szerepét az Shh aktiválása kapcsán. Az egyik a teljes HoxD clustert érintő inverziós mutánsokat foglalt magába, a másik pedig *hoxd1–10* deléziós mutáns egereket tartalmazott. Előbbi esetben azt tapasztalták, hogy a *hoxd11* és *hoxd13* gének termékei, amelyek alapesetben a végtag poszterior régiójában találhatóak, megjelentek a teljes anterior területen is. Ennek az a magyarázata, hogy a HoxD clustertől nem messze a *hoxd1* gén irányában lokalizálódik egy enhancer elem, az úgynevezett early limb control region (ELCR). Ennek az enhancernek a feladata a *hoxd* gének expressziójának növelése, amire a különböző sorszámú gének azonos intenzitással reagálnak, viszont az ELCR-nek a hatása folyamatosan csökken, ahogy távolodnak tőle a gének (7. ábra). Ezért valószínűleg az anterior *hoxd* gének expresszióját normál körülmények között képes növelni, azonban a poszterior *hoxd* gének, mint a *hoxd11*, *hoxd12* és *hoxd13* normál esetben kívül esnek a hatósugarán. Viszont az inverzió megváltoztatta a Hox paralógok eredeti sorrendjét, aminek eredményeképpen az 5' Hox-ok közelebb kerültek az enhancerhez, ezért ki tudtak fejlődni az anterior részen, melynek velejáró következménye volt az Shh kifejeződése is. Ezt megerősítik a *hoxd1–10* deléziós mutánsokkal végzett kísérletek eredményei is. Hiszen ha a *hoxd11*, *hoxd12* és *hoxd13* gének megőrizve egymáshoz viszonyított eredeti helyzetüket, a deléció miatt a DNS-en közelebb kerültek az ELCR-hez, akkor az aktivitásuk megnövekedett és szignifikáns változások mutatkoztak a végtag területén, hiszen az anteroposzterior tengely mentén jelenlévő aszimmetria eltűnt, vagyis a végtagban az anterior és a poszterior régió egymás tükörképévé vált. Igazság szerint az anterior régió alakult át a poszteriorhoz hasonlóvá, míg a poszterior régió változatlan maradt a vad típushoz képest. Az állatnak az alapesetben rövidebb nagyujja megnyúlt, a carpalis régió teljes mértékben szimmetrikussá vált, illetve még a radius disztális része is megegyezővé vált az ulna disztális részével (6. ábra).

A jelenségek magyarázata mögött a homozigóta mutánsokban szimmetrikussá vált *hoxd13* gén expressziója húzódik meg. Vad típusú egér esetében az enhancer segítségével nélkül a *hoxd13* aszimmetrikusan fejlődik ki a fejlődő végtag területén, döntő többségében a poszterior részen lokalizálódva. Azonban a deléziós mutánsokban a kifejeződés mintázata szimmetrikussá válik, és mivel a *hoxd13* aktiváló hatással bír a Sonic hedgehog átíródására, így természetesen az Shh expressziója is szimmetrikussá válik a végtagban, aminek eredményeképpen az Shh által elindított, alapvetően a poszterior



6. ábra. (A) A *hoxd1-10* deléziós homozigóta mutáns egerek elülső végtagja, amelyen *-gal jelölt a nagyujj. (B) A vad típusú egér mellső végtagja. Látható, hogy a deléziós mutánsban a vad típushoz képest jóval hosszabb a nagyujj, illetve a kéztő és közézkézcsontok erőteljes szimmetriát mutatnak. (Zákány és mtsai, 2004)

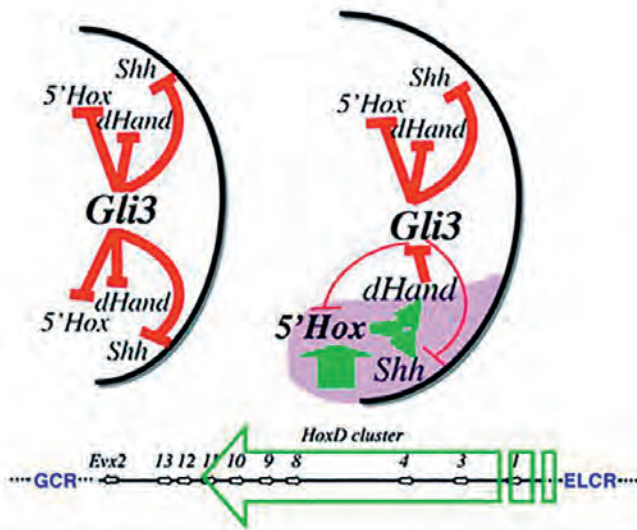
régió kialakításáért felelős mechanizmus átterjed az anterior részekre is [16]. A Sonic hedgehog-tól poszterior irányba található egy evolúciósan erősen konzervált, 745 bázispár hosszúságú enhancer szekvencia, az ShhE. Ehhez az enhancerhez a *hoxd10* és a *hoxd13* gének terméke direkt módon, kofaktorok nélkül képes kötődni és ezzel együtt növelni a transzkripció hatékonyságát [3]. Maga az Shh gén terméke más gének kifejeződését képes szabályozni közvetlenül a mesoderma területén, ami azt eredményezi, hogy hatására eltérő gének fognak aktiválódni a poszterior mesodermában, mint hiányában az anterior részekben.

Viszont az Shh kapcsolata nem ér véget a Hox génekkel azután sem, miután elősegítették az aktiválódását, hiszen az 5' *hoxa* és *hoxd* paralógok kifejeződési helye erőteljesen függ az Shh jelenlététől [6]. A HoxD clustertől poszterior irányban a *hoxd13*-hoz legközelebb található egy másik enhancer szekvencia

is, a global control region (GCR), amely a késői kifejeződési stádiumban serkenti a *hoxd* gének átíródását, méghozzá oly módon, hogy a hozzá közelebb eső gének kifejeződését nagyobb mértékben a távolabb lévőkét kisebb mértékben. Egészen pontosan a *hoxd*10-13 gének expresszáldását növeli, csökkenő hatékonysággal. Ezzel párhuzamosan pedig a

kialakul a meghatározott poszterior Hox mintázat, amely végső soron az ujjak morfológiai identifikációjához vezet (8. ábra) [16].

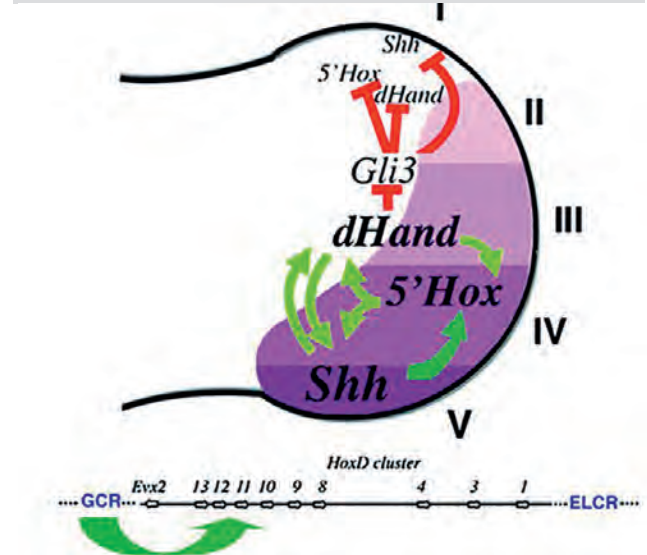
Ahogy láthattuk ebben a rövid cikkben is, a Hox gének hatása és ennek vizsgálata, részleteiben való megértése bonyolult, ugyanakkor rendkívül fontos a végtag fejlődése szempontjából. Ugyanakkor nem



7. ábra. Egér mellső végtag a fejlődés viszonylag korai stádiumában. Alatta a *HoxD* cluster és a 3' *hoxd* génekre ható ELCR enhancer aktivitási területe vad típusú állatban. Az ábra a *hoxd* génekről átíródó fehérjéknek a Sonic hedgehog-ra gyakorolt hatását is mutatja. (A) Egy korábbi fejlődési stádiumban lévő végtag, amikor az 5' Hox paralógok még nem fejeződtek ki a végtagban. (B) A fejlődés egy későbbi stádiuma, ahol a már kifejeződő 5' Hox gének serkentik az Shh és a dHand átíródását is, mely utóbbi gátolja az Shh-t is gátló Gli3 gént. (Zákány és mtsai, 2004)

poszterior részek felé haladva egyre jobban növekszik ezen *hoxd* gének expressziója, így egy jellegzetes poszterior *hoxd* mintázat alakul ki. Egy Gli3 nevű fehérje képes gátolni ennek az enhancernek a működését, és alapesetben gátolja is, viszont a *hoxd* gének hatására kifejeződő Shh képes aktiválni a poszterior területeken a dHand gén expresszióját, melynek génterméke gátolja a Gli3 fehérje átíródását. Természetesen ez a kölcsönhatás kizárólag azokon a területeken valósulhat meg, ahol a Sonic hedgehog még képes kifejteni hatását. A végtag anterior régiójában az embriónális fejlődés teljes időszakában fennmarad a Gli3 fehérje gátló hatása. Ily módon hat vissza az Shh a *hoxd* fehérjék keletkezésére, aminek köszönhetően

8. ábra. Egér mellső végtag egy késői fejlődési stádiumban, amikor kialakul a jellegzetes 5' Hox mintázat a leendő ujjak területén. A Shh serkenti az 5' Hox paralógok átíródását ebben a későbbi fázisban, aminek köszönhetően különböző morfológiával jellemezhető ujjak fognak kialakulni. A serkentés indirekt módon történik, az 5' *hox* géneket gátló Gli3 gén expresszióját gátló dHand gén aktivációján keresztül. A Gli3-ról átíródó fehérje képes gátolni az 5' Hox gének egy enhancerét, a GCR-t. A gének közötti interakció következményeként a *hoxd*10–13 gének fejeződnek ki sorrendben, az anteroposzterior tengely mentén növekvő intenzitással. (Zákány és mtsai, 2004)



szabad megfedelkeznünk, hogy ők csupán egy gén család a rengeteg egyéb gén mellett, amelyek szintén nélkülözhetetlen szerepet töltenek be ebben a folyamatban. Sok mindent tudhatunk már a Hox génekről – és egyéb itt nem említett, de a végtag fejlődése szempontjából lényeges génekről –, viszont sok részlet, mechanizmus rejtve maradhatott a szemünk előtt, amelyek arra várnak, hogy valaki felfedezze őket, ezáltal közelebb kerülhessük a végtag fejlődésének és idővel regenerálódásának titkához, amelyet felhasználva reményeink szerint képesek leszünk új, működő végtagot fejleszteni egy elvesztett helyére.

RABB MÁRTON MIHÁLY