

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

HOX GENI

HOX GENES

SEMINARSKI RAD

Juraj Bergman

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: prof. dr. sc. Gordana Lacković – Venturin

Zagreb, 2009.

SADRŽAJ

1. UVOD	2
2. EVOLUCIJA <i>HOX</i> GENA	3
3. STRUKTURA <i>HOX</i> GENA	5
4. ULOGA <i>HOX</i> GENA	7
4.1. ULOGA U EMBRIOGENEZI <i>DROSOPHILE MELANOGASTER</i>	7
4.2. ULOGA U EMBRIOGENEZI KRALJEŠNJAKA	9
4.2.1. ULOGA U FORMIRANJU ANTERIORNO-POSTERIORNE OSI	10
4.2.2. ULOGA U FORMIRANJU EKSTREMITETA	11
4.2.3. ULOGA U FORMIRANJU ORGANA	13
4.3. ULOGA KOD BOLESTI	15
5. REGULACIJA <i>HOX</i> GENA	17
5.1. REGULACIJA <i>HOX</i> GENA KOD <i>DROSOPHILE MELANOGASTER</i>	17
5.2. REGULACIJA <i>HOX</i> GENA KOD KRALJEŠNJAKA	19
6. LITERATURA	21
7. SAŽETAK	22
8. SUMMARY	22

1. UVOD

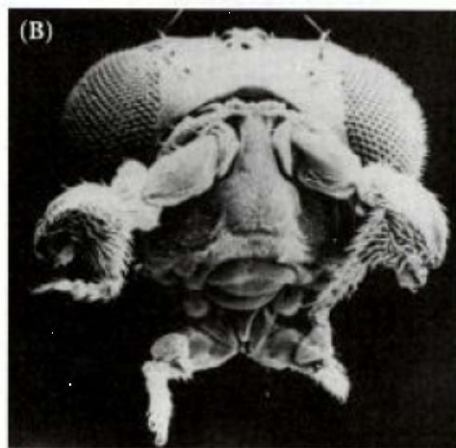
Široka raznolikost struktura i oblika u životinjskom svijetu jest rezultat ograničene aktivnosti različitih gena u određenim skupinama stanica. Godine 1983. Walter J. Gehring i njegovi suradnici, te Matthew P. Scott i Amy J. Weiner neovisno su kod *Drosophila melanogaster* otkrili homeobox sekvencu, koja ima ključnu ulogu u genima koji su u velikoj mjeri odgovorni za stvaranje ove očaravajuće biološke raznolikosti.

Geni koji u svojoj strukturi sadržavaju homeobox, pripadaju transkripcijskim faktorima koji određuju anteriorno-posteriornu os svih bilateralnih životinja. *Homeobox* ili *hox* geni su različito eksprimirani uzduž anteriorno-posteriorne osi bilateralnih životinja i najpotrebniji su tijekom embrionalnog razvitka, te ostaju eksprimirani u gotovo svim organima i tkivima tijekom života. Ovi geni se ističu kao glavni elementi kod objašnjavanja raznovrstnosti životinjskog svijeta.

Mutacije u *hox* genima mogu promijeniti jednu strukturu u drugu; tzv. homeotičke mutacije. U *Drosophila melanogaster* mutacija u *ultrabithorax (ubx)* genu transformira treći torakalni segment, na kojem se normalno nalaze haltere, u drugi torakalni segment, na kojem se nalaze krila (sl. 1). Mutacija u još jednom *hox* genu, *antennapedia (antp)*, uzrokuje pogrešnu ekspresiju *antp* proteina u stanicama iz kojih inače nastaju ticala, te se tako ticala zamijene nogama (sl. 2). *Antp* je normalno eksprimiran u drugom torakalnom segmentu gdje kontrolira razvoj specifičnih struktura, uključujući noge. Takve transformacije povezane s homeotičkim mutacijama su potaknule ideje o ulozi *hox* gena u embrionalnoj segmentaciji. Otkriće *hox* gena u kralješnjacima koji su bili homologni onima u *Drosophila* (Lewis, 1978; Graham, 1989; Duboule i Dollé, 1989) je dovelo do pretpostavke da su *hox* geni ključni čimbenici ne samo u razvoju, nego i u evoluciji bilateralnih životinja.



Slika 1. *Ubx* mutacija (Gilbert, 2000)

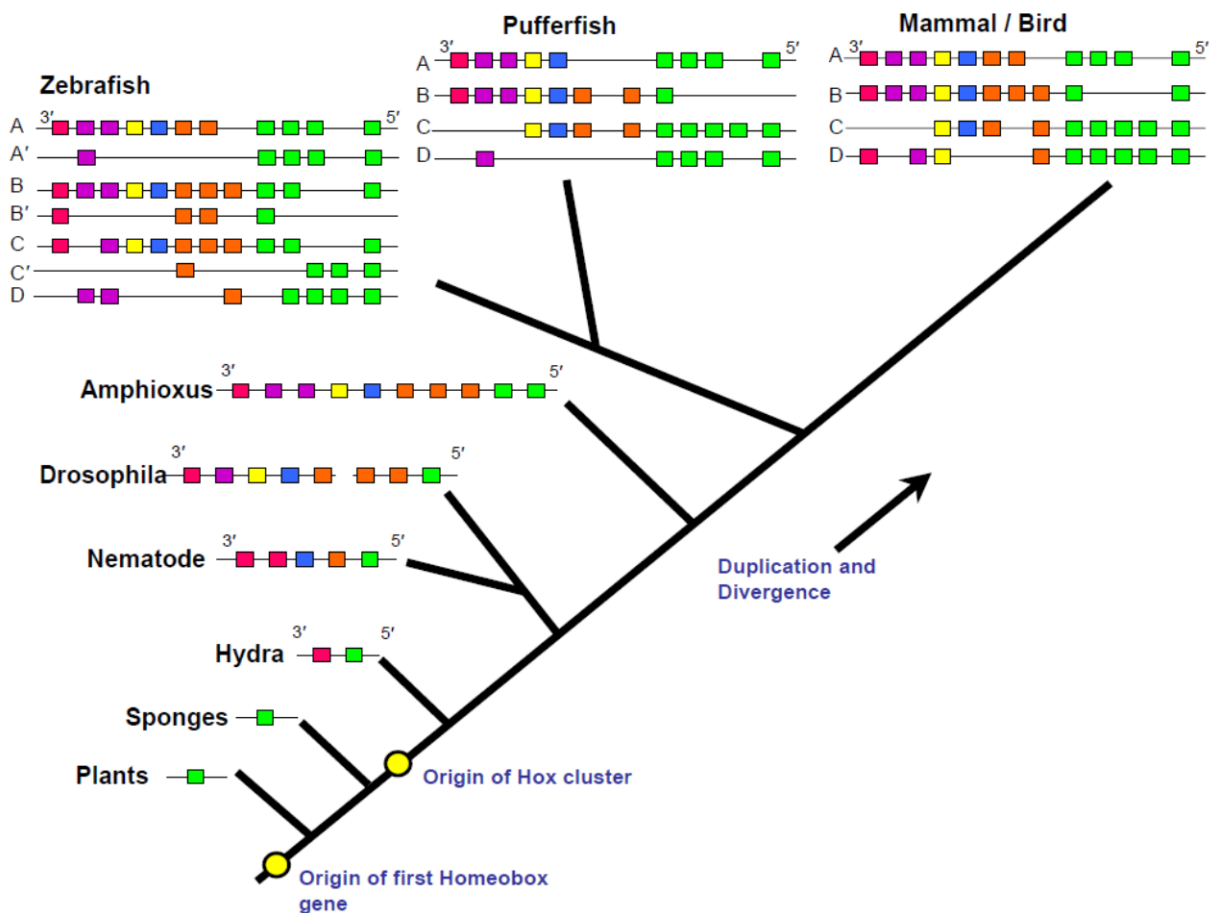


Slika 2. *Antp* mutacija (Gilbert, 2000)

2. EVOLUCIJA *HOX* GENA

Hox geni su evolucijski vrlo očuvani. Funkcionalna jednakost može se demonstrirati činjenicom da *Drosophila* može bez poteškoća funkcionirati s ugrađenim pilećim *hox* genom umjesto vlastitog, što je gotovo nevjerojatno jer je njihov zajednički predak živio prije 670 milijuna godina. *Hox* geni su prisutni u genomima svih životinja čiji su genomi dosad mapirani, te također u genomima gljiva i biljaka, što dovodi do zaključka da je ishodište *hox* gena vrlo staro, te prethodi divergenciji ovih carstva. Većina životinja ima klaster *hox* gena, no biljke, gljive i neke životinje nemaju, doduše, klasterirane (duplicirane) *hox* gene.

Ubrzo nakon pojave životinja primordijalni *hox* gen se duplicirao te stvorio *protohox* klaster od dva gena koji je još uvijek prisutan u žarnjacima poput hidre (sl. 3). Spužve nemaju ovaj *protohox* klaster, pa se pretpostavlja da se ova duplikacija dogodila prije divergencije *Parazoa*. To se također moglo odraziti i na vrlo jednostavnu tjelesnu strukturu spužva u usporedbi s ostalim višestaničnim organizmima.



Slika 3. Ilustracija evolucije *hox* klastera. Smatra se da su se klasteri razvili procesom duplikacije i divergencije iz primordijalnog *hox* gena koji se pojavio prije otprilike 1000 milijuna godina. (Lappin i sur., 2006)

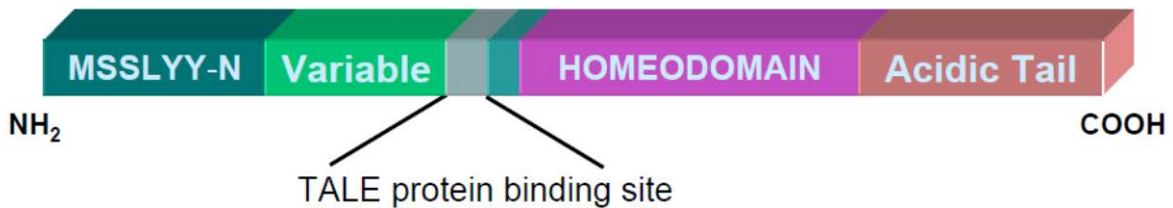
Razlike u broju *hox* gena i *hox* klastera vidljive su kako se krećemo po filogenetskom stablu. Nematoda *Caenorhabditis elegans* ima jedan klaster od najmanje pet *hox* gena te dijeli zajedničkog pretka s *Drosophilom*, dok *Amphioxus*, ili kopljača, ima klaster od deset *hox* gena za kojeg se smatra da je homologan s ancestralnim klasterom iz kojeg su proizašli svi kralješnjački *hox* klasteri. Dva duplikacijaska događaja koja su se dogodila rano u evoluciji kralješnjaka, prethodila su nastanku četiri *hox* klastera koje nalazimo kod sisavaca i ptica. Ti se klasteri sastoje od grupa paralognih gena koji pokazuju veliku sličnost u sekvenci nukleotida, području ekspresije i funkciji. No, zbog gubitka pojedinih *hox* gena u svakom klasteru, svaki *hox* gen se ne nalazi u svakom od četiri klastera. Zanimljivo je da u nekih riba, kao što je *Danio rerio*, došlo do dodatne duplikacije i pojave sedam klastera *hox* gena (Lappin i sur., 2006).

Za evoluciju životinja otkriće *hox* gena je toliko značajno da vjerojatno još nismo ni svjesni prave važnosti *hox* gena. Prvi puta u povijesti biologije nađen je zajednički genetički okvir koji je ujedinio ontogenezu svih *Metazoa*; prije *hox* gena mali broj biologa je mogao zamisliti da kralješnjaci i beskralješnjaci dijele takve osnovne razvojne genetičke osobine.

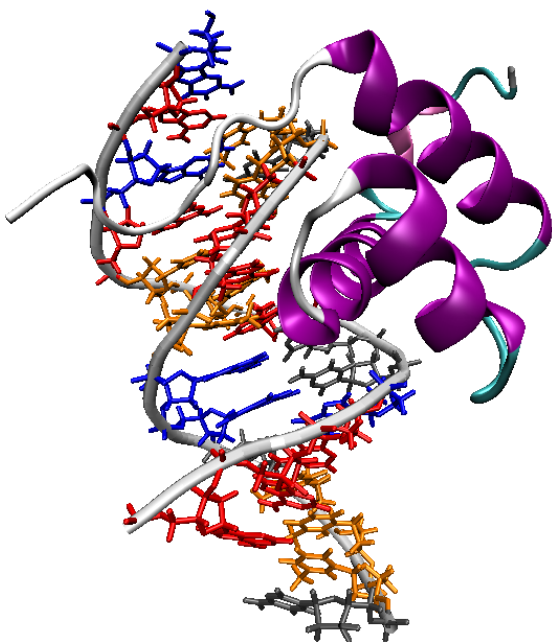
Pomalo kontradiktorno je da *hox* geni imaju tako važnu ulogu u evoluciji pošto su oni vrlo očuvani, a ne evoluirajući dijelovi genoma pa se nameće pitanje: koje su zapravo temeljne razlike kod formiranja građe tijela u različitim životinja, te kakvu ulogu igraju naizgled očuvani dijelovi genoma u ovim razlikama? Takva pitanja danas najviše istražuje jedan od novijih pravaca u biologiji – evolucijska razvojna biologija, čije ideje pretpostavljaju da je prostorno-vremenska regulacija zajedničkih setova gena (tzv. “toolkit”) primarni uzrok morfološke evolucije. Također su važne i duplikacije genoma i nastajanje klastera *hox* gena. Evolucija, tj. nastanak novih *hox* gena bio je važan za daljnji razvoj bilateralne simetrije i za bolju definiciju anteriorno-posteriorne osi (Futuyma, 2005).

3. STRUKTURA *HOX* GENA

Hox geni kodiraju za transkripcijske faktore koji sadrže homeodomenu. Hox proteini (sl. 4) imaju kiselinski ostatak na C-terminusu i pentamernu regiju uzvodno od homeodomene koja se veže na TALE (three amino acid loop extension) proteine koji imaju ulogu kofaktora. Homeodomena jest DNA-vezujuća regija transkripcijskog faktora, koja se sastoji od 60 aminokiselina, kodiranih sekvencom od 180 nukleotida, tzv. homeobox. Za nju je, kao i za mnoge druge DNA-vezujuće sekvence, karakterističan helix-turn-helix DNA-vezujući motiv. Homeodomena se može podijeliti na tri helikalne regije (sl. 5); heliks 3 je u kontaktu s velikim utorom DNA, dok se heliksi 1 i 2 nalaze iznad DNA. DNA sekvenca koja se veže za homeodomenu sadrži sekvencu nukleotida TAAT, s time da je timin na 5' kraju sekvence najvažniji za vezanje. Daljnju interakciju homeodomene i DNA ostvaruje sekvenca koja se nastavlja na heliks 1, tzv. N-terminalni krak. Vezanje kofaktora (*exd* kod *Drosophile* i *meis* ili *pbx* kod sisavaca) stabilizira interakciju DNA i hox proteina.



Slika 4. Struktura hox proteina. (Lappin i sur., 2006)



Slika 5. Struktura veze homeodomene antp proteina sa DNA; heliks 3 se veže za veliki utor, a N-terminalni krak je vezan za mali utor DNA. (http://en.wikipedia.org/wiki/Homeodomain_fold)

Hox geni kod sisavaca su mali i svaki se sastoji od samo dva eksona i jednog introna koji varira u veličini od 200 baza do nekoliko kilobaza (sl. 6). *Homeobox* je uvijek prisutan unutar drugog eksona i pokazuje visok stupanj homologije između *hox* gena, osobito između paralognih gena. Strukture *hox* gena izvan *homeoboxa* su više varijabilne, često prekrivajući eksonsko splicing mjesto. *Hox* geni su, kao što je već spomenuto, organizirani u klastere koji se nalaze na različitim kromosomima, a čiji broj varira ovisno o evolucijskoj odvedenosti organizma. Također je važno napomenuti da su *hox* geni kod svih skupina poredani u nizu na kromosomu po redosljedu po kojem se izražavaju (Lappin i sur., 2006).



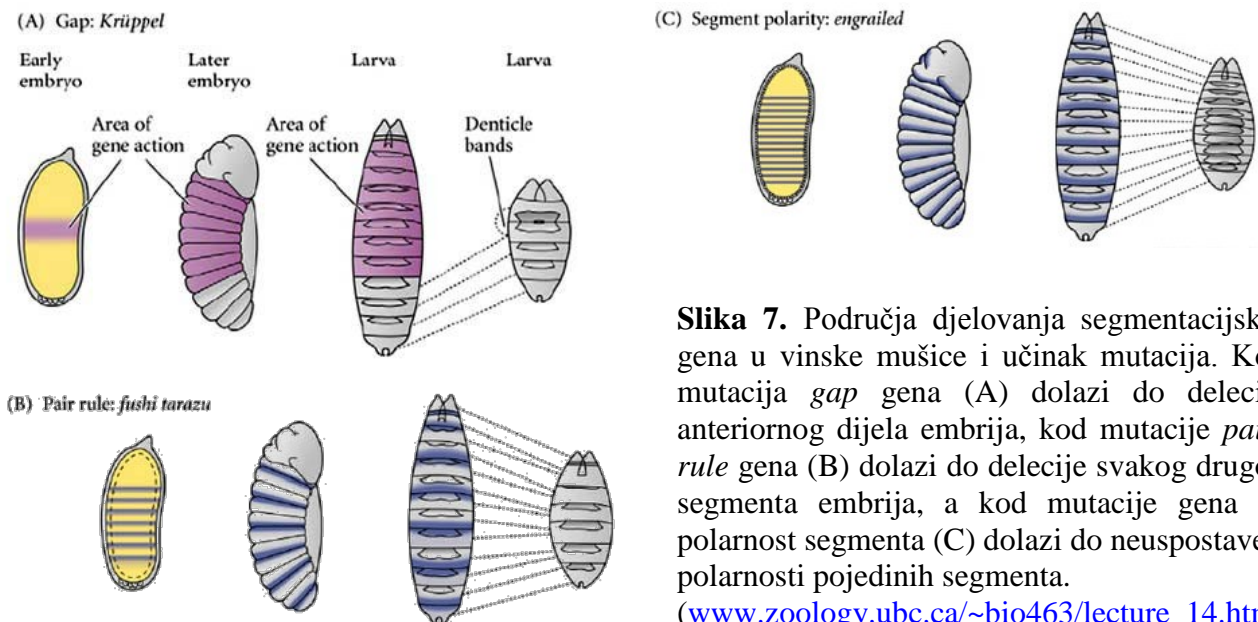
Slika 6. Struktura *hox* gena. (Lappin i sur., 2006)

4. ULOGA *HOX* GENA

Uloga *hox* gena je najbolje istražena kod embrionalnog razvitka životinja. *Hox* geni su ključni za pravilan broj i raspored segmenta embrija; od broja krila vinske mušice do broja prstiju čovjeka. No, osim embriogenetske i evolucijske važnosti, *hox* geni imaju ulogu i u razvitku bolesti poput raka i leukemije, te malformacija ekstremiteta.

4.1. ULOGA U EMBRIOGENEZI *DROSPHILE MELANOGASTER*

Pošto su prvenstveno otkriveni u vinskoj mušici, treba najprije objasniti ulogu *hox* gena u njezinoj embriogenezi. Naime, da bi došlo do aktivacije *hox* gena kod vinske mušice prvo mora doći do segmentacije embrija. Većinu onoga što znamo o embrionalnom razvitku vinske mušice dugujemo znanstvenicima koji su se bavili izolacijom i karakterizacijom razvojnih mutanta, a ti znanstvenici su Ed Lewis, Christiane Nusslein-Volhard i Eric Wieschaus. Za svoj trud dobili su 1995. godine Nobelovu nagradu.



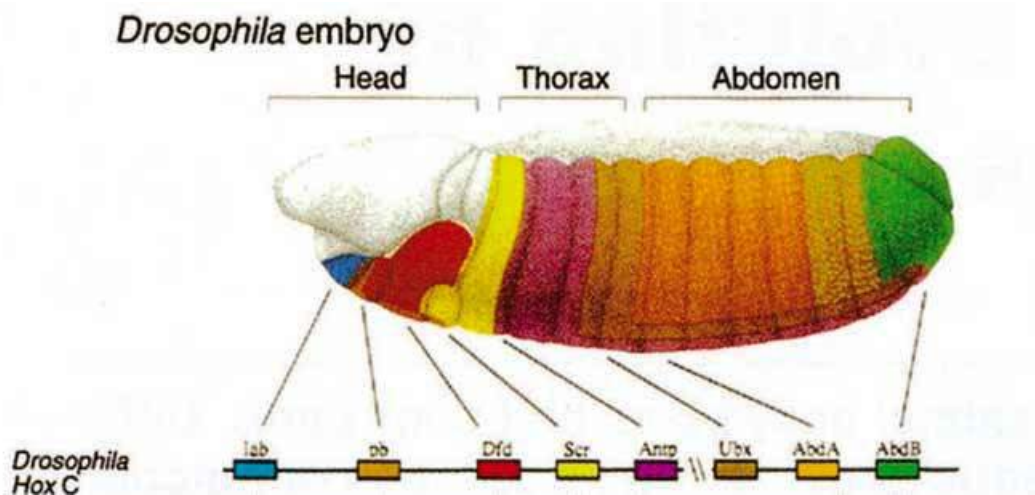
Slika 7. Područja djelovanja segmentacijskih gena u vinske mušice i učinak mutacija. Kod mutacija *gap* gena (A) dolazi do delecije anteriornog dijela embrija, kod mutacije *pair-rule* gena (B) dolazi do delecije svakog drugog segmenta embrija, a kod mutacije gena za polarnost segmenta (C) dolazi do neuspostave polarnosti pojedinih segmenta.

www.zoology.ubc.ca/~bio463/lecture_14.htm

Prilikom rane embriogeneze vinske mušice aktivne su tri vrste gena, koji se zajednički nazivaju segmentacijskim genima (sl. 7). *Gap* geni, koje reguliraju geni majčinske mRNA (*maternal-effect* genes) poput *bicoid* i *nanos*, su aktivni u početku embriogeneze i određuju grubi tjelesni plan u smjeru anteriorno-posteriorne osi. Ti geni kodiraju za transkripcijske

faktore koji aktiviraju *pair-rule* gene koji su aktivni u svakom drugom segmentu embrija i dijele embrij u parove segmenata. *Pair-rule* geni pak kodiraju za transkripcijske faktore koji reguliraju ekspresiju gena za polarnost segmenta koji određuju anteriorno-posteriornu polarnost segmenta (http://biology.kenyon.edu/courses/biol114/Chap13/Chapter_13A.html).

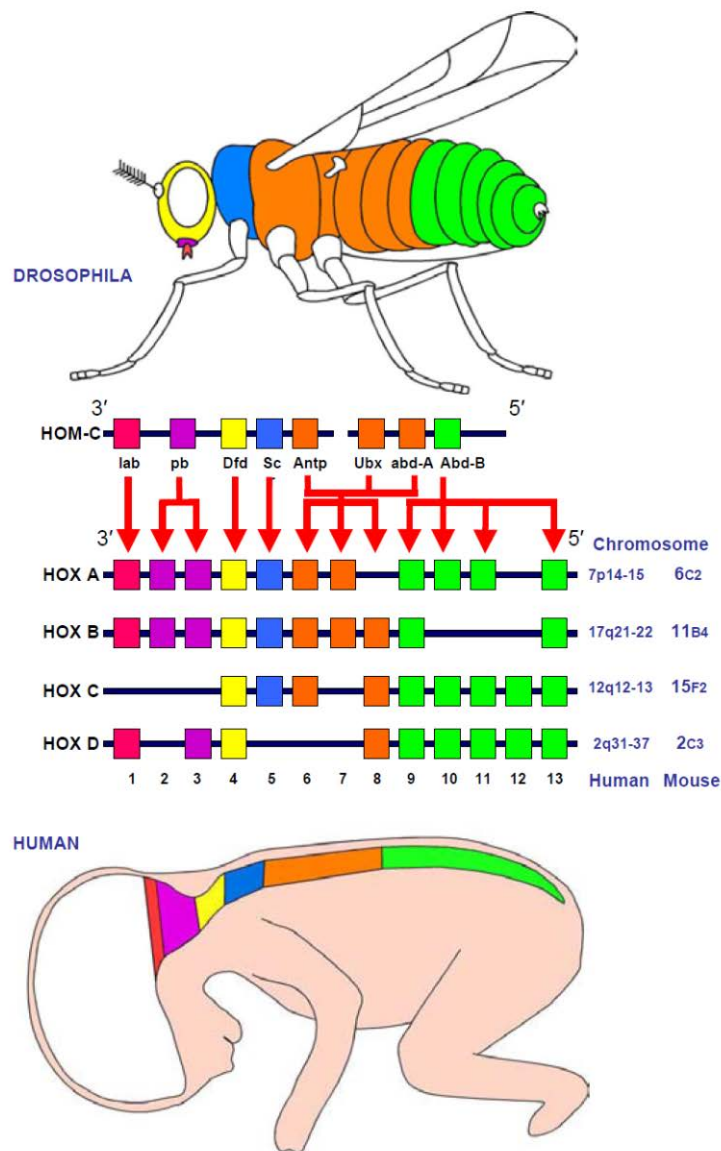
Nakon prvotne segmentacije embrija, u kasnijoj embriogenezi do izražaja dolaze *hox* geni. Oni u pojedinom segmentima određuju strukturu koja će se iz njih razviti, bila to krila, ticala ili noge. *Drosophila* ima jedan *hox* klaster (*Hom-C*) koji se sastoji od osam gena od kojih svaki sudjeluje u specijalizaciji pojedinih segmenata glave, toraksa ili abdomena (sl. 8). Taj se klaster nalazi na trećem kromosomu te je podijeljen u dvije grupe; *Antennapedia* kompleks i *Bithorax* kompleks. *Antennapedia* kompleks se sastoji od pet gena, i to *labial* (*lab*), *proboscipedia* (*pb*), *deformed* (*dfd*), *sex combs reduced* (*scr*) i *antennapedia* (*antp*) gena, dok su *ultrabithorax* (*ubx*), *abdominal-A* (*abd-A*) i *abdominal-B* (*abd-B*) geni *Bithorax* kompleksa. Međutim, iz evolucijskog pogleda, ovo je jedan klaster koji je fizički podijeljen. Najprije dolazi do ekspresije gena na 3' kraju kromosoma, tj. prvo se u budućoj glavi eksprimira *lab* gen, dok se zadnji eksprimira *abd-B* gen na kraju abdomena vinske mušice. (<http://www.hoxfulmonsters.com/2008/04/homeotic-genes-hox-genes/>)



Slika 8. Prikaz *hox* klastera *Drosophile* i regije ekspresije pojedinih *hox* gena. (www.press.uchicago.edu/books/gee/carroll1.html)

4.2. ULOGA U EMBRIOGENEZI KRALJEŠNJAKA

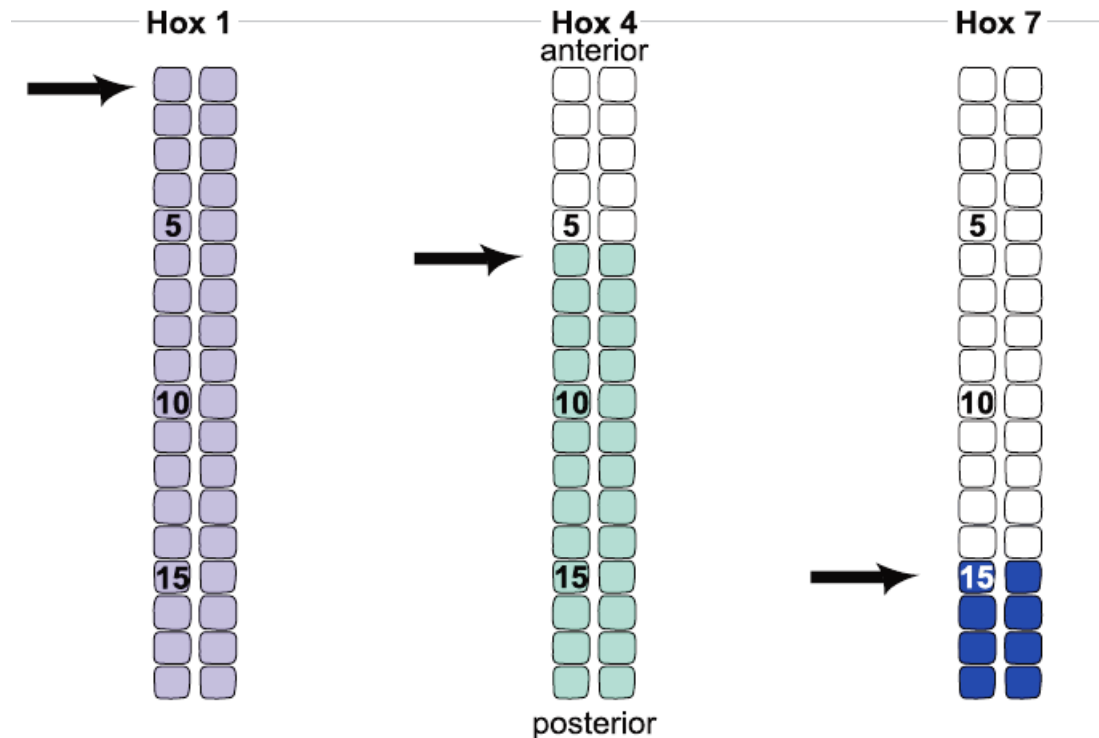
Kralješnjački homologzi *Antennapedia* i *Bithorax* kompleksa su klasteri *hox* gena, kojih ima četiri kod sisavaca (A, B, C, D), te se nalaze na četiri različita kromosoma, a ukupno se sastoje od 39 gena. Kod čovjeka, ti se klasteri nalaze na kromosomima 7, 17, 12 i 2, dok se kod miša nalaze na kromosomu 6, 11, 15 i 2. Svaki se klaster sastoji od 13 paralognih grupa, s time da pojedini klaster ima devet do jedanaest funkcionalnih gena. Visok stupanj homologije je vidljiv između ljudskih *hox* gena i *Hom-C* gena vinske mušice (sl. 9). Humane paralogne grupe 1-8 su homologne s genima *Antennapedia* kompleksa, te *ubx* i *abd-A* genima, dok su grupe 9-13 homologne s *abd-b* genom (Lappin i sur., 2006).



Slika 9. Prikaz homologije *Hom-C* kompleksa s paralognim skupinama *hox* gena u čovjeka. (Lappin i sur., 2006)

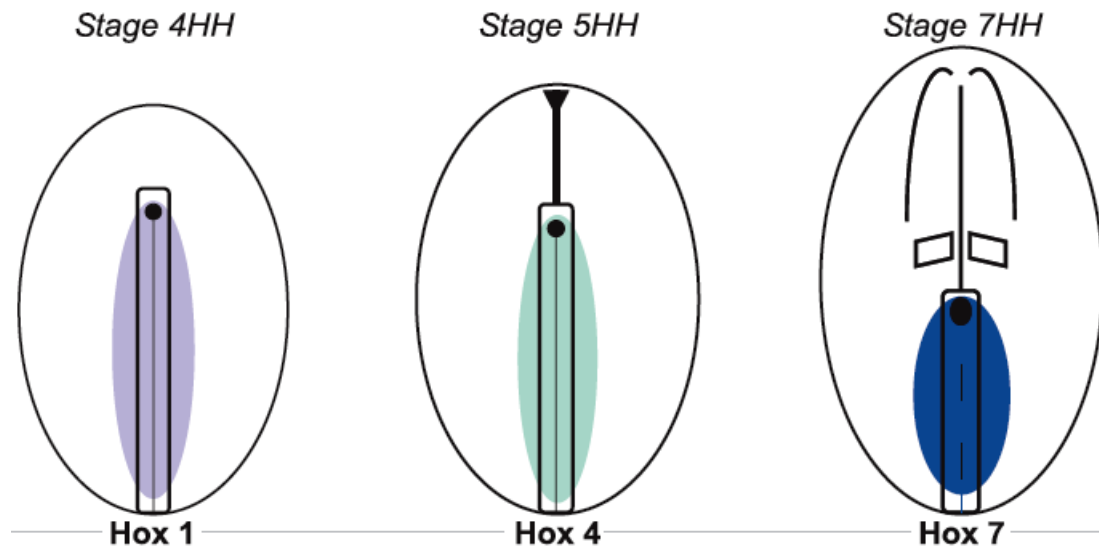
4.2.1. ULOGA U FORMIRANJU ANTERIORNO-POSTERIORNE OSI

U embrionalnom razvoju kralješnjaka *hox* geni se najprije eksprimiraju tijekom rane gastrulacije u periodu kada se formira anteriorno-posteriorna os (AP os). Svaki *hox* gen ima svoju domenu ekspresije unutar AP osi, što je poznato pod terminom “prostorna kolinearnost” (sl. 10).



Slika 10. Prostorna kolinearnost *hox* gena. Ekspresijska domena je u korelaciji s položajem *hox* gena na kromosomu. Domena je veća što je položaj *hox* gena bliži 3' kraju kromosoma. Ovdje su prikazani somiti pilećeg embrija, te ekspresijske domene 3 *hox* gena: *hox 1* (ljubičasto), *hox 4* (svijetloplavo) i *hox 7* (tamnoplavo). (Iimura i Pourquié, 2007)

Embriji kralješnjaka se razvijaju od anteriornih prema posteriornim strukturama, koje se progresivno nadodavaju pritom slijedeći kretanje primitivne pruge i Hensenovog čvora. Stoga, položaj ovih struktura uzduž AP osi direktno odražava vrijeme njihovog nastanka. Ekspresija *hox* gena je takva da se prvi eksprimiraju 3' geni, a kako se embrio razvija, dolazi do formiranja sve više embrionalnih struktura, i kasnije do sve veće ekspresije 5' gena. Takav uzorak ekspresije se naziva “vremenska kolinearnost” (sl. 11) i prisutan je i u drugim razvojnim modelima, npr. hematopoiezi.

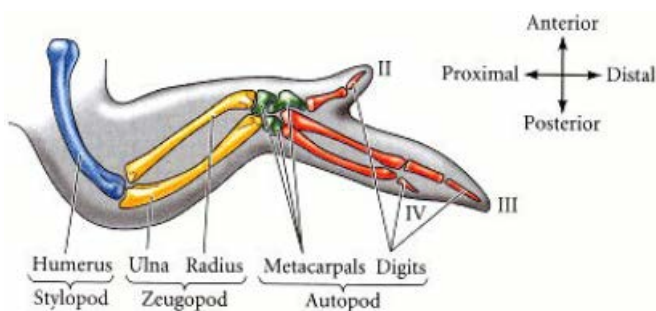


Slika 11. Vremenska kolinearnost *hox* gena. Ekspresija *hox* gena je sekvencijalno potaknuta po redu u primitivnoj pruzi i susjednom epiblastu za vrijeme embriogeneze. Ova uređena ekspresija je u korelaciji sa položajem *hox* gena na kromosomu. Ovdje je prikazana sekvencijska aktivacija 3 *hox* gena: *hox 1* (ljubičasto), *hox 4* (svijetloplavo) i *hox 7* (tamnoplavo) koji se aktiviraju u fazama 4HH, 5HH i 7HH (Hamburger i Hamilton) embriogeneze piletina. (Imura i Pourquié, 2007)

Iako su isprva somiti, koji nastaju početkom 3. tjedna embriogeneze segmentacijom paraksijalnog mezoderma, morfološki vrlo slični, iz njih na kraju nastaju razne strukture ovisno o položaju uzduž AP osi. Diferencijacija somita uvelike ovisi o kombinatornom učinku *hox* gena eksprimiranih u određenom somitu (Imura i Pourquié, 2007).

4.2.2. ULOGA U FORMIRANJU EKSTREMITETA

Ekstremiteti kralješnjaka su iznimno kompleksni organi čiji su dijelovi asimetrično raspoređeni. Postoje tri glavne osi koje formiraju ekstremitet od kojih je jedna proksimalno-distalna os. Kostí ekstremiteta, bilo to krilo, noga, ruka ili peraja, sadrže proksimalni stilopod (humerus/femur) koji se nalazi najbliže tijelu, zeugopod (radius-ulna/tibia-fibula) u središnjoj regiji i distalni autopod (carpus-prsti/tarsus-nožni prsti) (sl. 12). Položaj svake kosti i mišića je

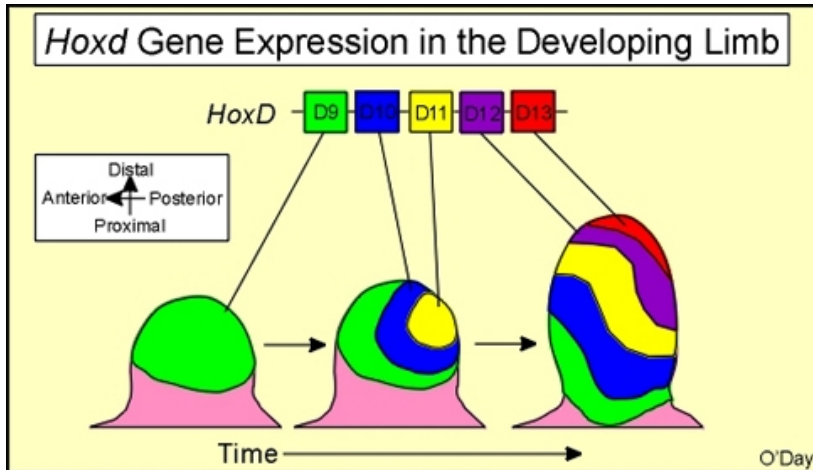


Slika 12. Položaj stilopoda, zeugopoda i autopoda u kralješnjaka. (Gilbert, 2000)

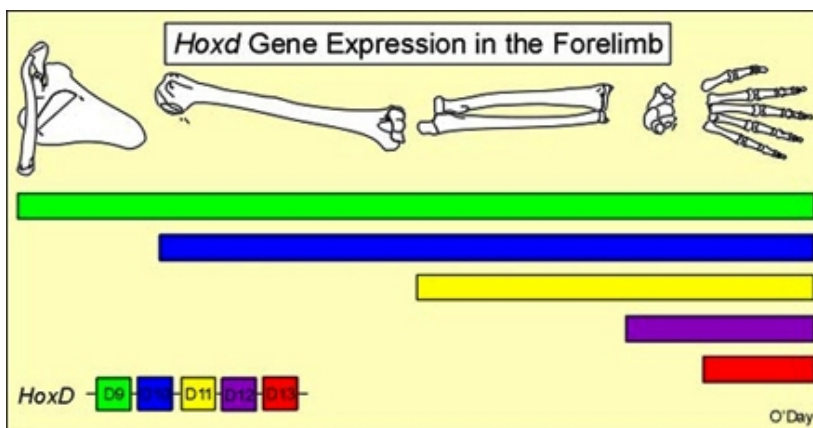
precizno određen. Druga os koja definira ekstremitete je anteriorno-posteriorna, a treća je dorzalno-ventralna os. No, uloga *hox* gena u formiranju ekstremiteta dolazi i prije nego što dođe do formiranja samih osi ekstremiteta. Najprije mora doći do stvaranja polja ekstremiteta (limb fields), tj. područje iz kojih se dalje razvijaju pupoljci ekstremiteta (limb buds). Iako se ekstremiteti kralješnjaka razlikuju po položaju somita iz kojeg nastaju, sam položaj ekstremiteta je konstantan u odnosu na razinu ekspresije *hox* gena uzduž anteriorno-posteriorne osi. Na primjer; u riba, vodozemaca, ptica, i sisavaca, pupoljci prednjih ekstremiteta se nalaze na mjestu najanteriornije ekspresije *hoxC-6* gena (Gilbert, 2000).

Hox geni su aktivni i u nastajućim udovima, pa je tako u pileta dokazano da je *hoxA-9* gen eksprimiran u proksimalnom dijelu ekstremiteta gdje se razvijaju humerus ili femur. *HoxA-9*, *hoxA-10* i *hoxA-11* su eksprimirani u dijelovima gdje se radius i ulna (ili tibia i fibula) razvijaju. Geni *hoxA-9* do *hoxA-13* su eksprimirani u zapešću (ili gležnju), te u prstima. Sličan uzorak ekspresije je nađen kod *hoxD* gena, dok je ekspresija *hoxC* gena kompliciranija (Imura i Pourquié, 2007). Kod miša su poznate regije ekspresije *hoxD* gena u formiranju ekstremiteta (sl. 13 i sl 14) što je dokazano i *hox* knockout mutantima (sl.15).

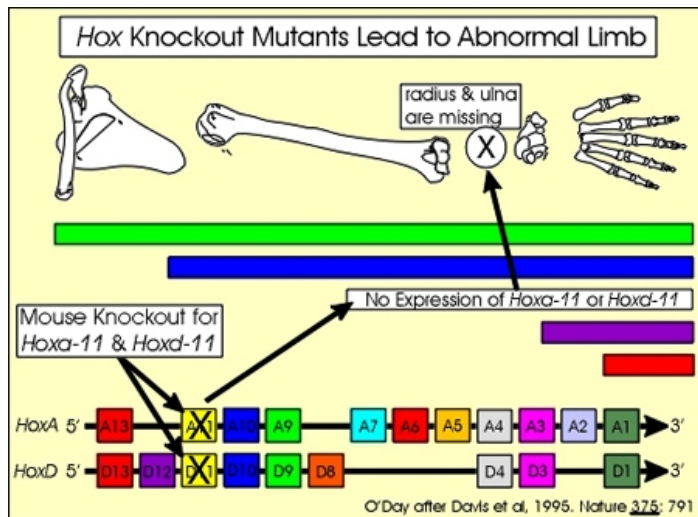
(<http://www.utm.utoronto.ca/~w3bio380/lecture20.htm#section10>)



Slika 13. Uzorak ekspresije *hoxD* gena u pupoljku prednjeg ekstremiteta. Prvo dolazi do ekspresije *hoxD-9* gena, a zatim po redu do *hoxD-13* gena. <http://www.utm.utoronto.ca/~w3bio380/lecture20.htm#section10>



Slika 14. Uzorak ekspresije *hoxD* gena u prednjem ekstremitetu. Najveću domenu ekspresije ima *hoxD-9* gen koji se prvi eksprimira, a najmanju domenu ekspresije ima *hoxD-13* gen koji je eksprimiran samo u prstima. <http://www.utm.utoronto.ca/~w3bio380/lecture20.htm#section10>



Slika 15. Knockout gena *hoxA-11* i *hoxD-11* kao posljedicu ima neformiranje radiusa i ulne kod prednje noge miša.
<http://www.utm.utoronto.ca/~w3bio380/lecture20.htm#section10>

4.2.3. ULOGA U FORMIRANJU ORGANA

Kao i kod formiranja ekstremiteta, u formiranju ostalih organa sudjeluje mnoštvo gena čija su djelovanja “umrežena”. Utjecaj *hox* gena na izgradnju organa se ugrubo može podijeliti u dvije grupe koje su dokazane raznim mutacijama *hox* gena. S jedne strane mutacije *hox* gena mogu djelovati tako da transformiraju jedan organ u drugi (homeotičke mutacije). Takav učinak se postiže između struktura koje su homologne, a u kojima *hox* geni modificiraju hedgehog, wingless, decapentaplegic i notch signalne puteve, koji sudjeluju u diferencijaciji organa. Drugi učinak mutacija *hox* gena jest taj da se mutacijom modificira ili potpuno eliminira organ, bez transformacije organa. Zanimljivo je da ista mutacija može uzrokovati dva različita efekta, ovisno o vrsti tkiva, organa i vremenu analize. Ustanovljeno je također da *hox* geni prilikom formiranja organa sudjeluju u kontroli apoptoze, kontroli proliferacije stanica, i u kontroli specifikacije stanica. Iz ovih rezultata se vidi da se *hox* geni ponašaju više kao sporedni geni u formiranju organa, koji sudjeluju u modifikaciji razvojnih puteva. (Foronda i sur., 2008).

Razvitak pluća ovisi o koordiniranoj ekspresiji velikog broja gena koji su strogo kontrolirani u vremenu i prostoru. Istraživanja ekspresije gena u ljudskim i mišjim plućima pokazuju visoku ekspresiju 3' *hox* gena klastera A i B. Kako se pluća razvijaju dolazi do smanjenja ekspresije ovih gena, što sugerira da su ti geni potrebni samo u ranim fazama morfogeneze pluća, kao što je grananje dušnika. Međutim, neki geni, poput *hoxA-5* gena, ostaju eksprimirani tijekom cijelog razvoja pluća, te je vjerojatno potreban za maturaciju pluća (Lappin i sur., 2006).

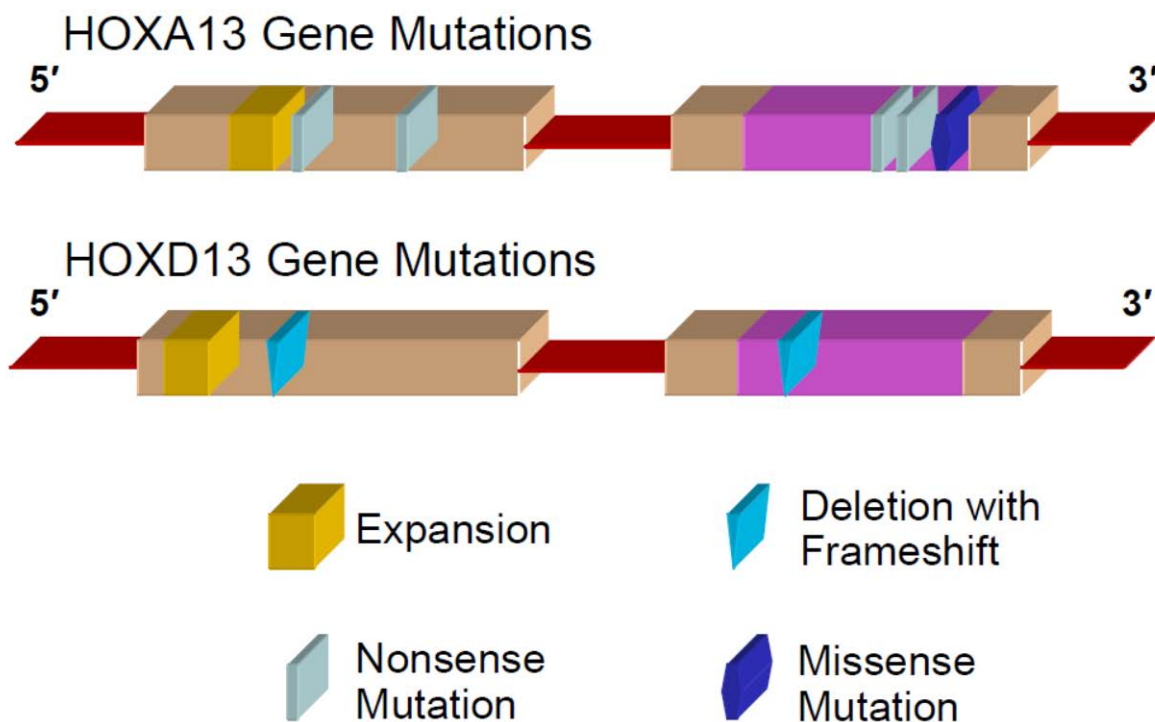
Kod ranog razvitka srca pileta je dokazano da sudjeluju *hoxA-4*, *hoxD-3* i *hoxD-4* geni, te je također dokazano da dolazi do pojačane ekspresije *hoxA-4*, *hoxD-3* i *hoxB-5* gena u kardiogeničnom tkivu tretiranim retinskom kiselinom. *HoxD-3* gen je jedan od važnijih gena za razvoj srca jer je potreban u anteriornim kardiogeničnim strukturama i prije formiranja primitivne srčane cijevi. Ograničena ekspresija *hox* gena u ranim razvojnim stadijima srca je tipična za organe koji se također razvijaju pod utjecajem *hox* gena, poput pluća, bubrega, crijeva i urogenitalnog trakta (Searcy i Yutzey, 1998).

Hox geni također imaju ulogu u kontroli neurona koji su odgovorni za razvoj živčanog sustava. *HoxA-2* gen djeluje na neurone u Varolijevom mostu (pons, ili pons Varolii) na način da kontrolira njihovu sposobnost odgovaranja na kemijske spojeve. Naime, *hoxA-2* kontrolira ekspresiju neuronskih Robo2 receptora koji vežu Slit2, kemijski spoj koji onemogućava migrirajućim neurone da vežu kemoatraktante. Knockoutom *hoxA-2* gena neuroni ponsa postaju neosjetljivi na Slit2, te preuranjeno migriraju prema kemoatraktantu. Takva migracija neurona rezultira pogrešnim smještanjem neurona u mozgu. Ovo otkriće djelovanja *hoxA-2* gena u mozgu otvorilo je nove mogućnosti istraživanja učinka *hox* gena na migraciju neurona i razvoj mozga sisavaca (Geisen i sur., 2008).

4.3. ULOGA KOD BOLESTI

Nepravilna ekspresija *hox* gena može rezultirati čitavim nizom bolesti, od raznih malformacija organa ili ekstremiteta, prvenstveno prstiju, do leukemije i raka. To su uglavnom urođene abnormalnosti nastale mutacijama *hox* gena.

Sinpolidaktilija (SPD) jest malformacija prstiju koja je kombinacija sindaktilije (fuzija prstiju) i polidaktilije (višak prstiju). Molekularna osnova SPD-a je određena tijekom proučavanja pojedinaca u jednom izoliranom turskom selu. Ustanovljeno je da se SPD lokus nalazi na drugom kromosomu, gdje je smješten *hoxD* klaster. U normalnih pojedinaca ekson 1 *hoxD-13* gena sadržavao je ponavljajuću sekvencu od tri nukleotida koja je kodirala za polialaninski slijed koji se sastojao od 15 alanina. Kod onih pojedinaca koji su imali SPD ustanovljeno je da je došlo do proširenja polialaninskog slijeda od 7, 8 do 10 alanina (sl. 16).



Slika 16. Mjesta i vrste mutacija koje dolaze kod *hoxA-13* i *hoxD-13* gena i uzrokuju raznovrsne poremećaje u formiranju ekstremiteta kao što su sinpolidaktilija (SPD), hand-foot-genital sindrom (HFGS), i brahidaktilija. (Lappin i sur., 2006)

Brahidaktilija je malformacija prstiju kod koje dolazi do skraćivanja prstiju. Također je uzrok mutacija u *hoxD-13* lokusu, dok kod hipodaktilije (smanjenje broja prstiju) dolazi do delecije unutar eksona 1 *hoxA-13* gena. Hand-foot-genital sindrom (HFGS) je razvojni

poremećaj za kojeg su karakteristične malformacije prstiju i genitalija. Prva *hoxA-13* mutacija povezana s HFGS-om je bila nonsense mutacija u eksonu 2 koja se očituje zamjenom triptofanskog kodona u homeodomeni u stop kodon. Neki pacijenti s HFGS-om imaju i ekspanziju polialaninskog slijeda gena *hoxA-13*, slično kao u *hoxD-13* genu SPD-a. No, za razliku od SPD-a, kod HFGS su deformacije prstiju bilateralne, simetrične i jednake po stupnju deformiranosti.

Kada u plućima dođe do prekomjerne ekspresije *hoxB-5* gena dolazi do bronhopulmonarne sekvestracije (kada dio tkiva koji se razvija unutar plućnog tkiva nije povezan s plućnim optokom krvi, te uopće nije u komunikaciji s ostatkom pluća) i urođene cistične adenomatoidne malformacije (stvaranje mase abnormalnog benignog plućnog tkiva koja može formirati tekućinom ispunjene ciste). Dugotrajna ekspresija *hoxB-5* gena tijekom ranog razvitka pluća, rezultira primitivom morfologijom pluća. Promijenjeni uzorci ekspresije *hox* gena su također dokazani u poremećajima poput emfizema (kronični poremećaj pluća uglavnom uzrokovan pušenjem), primarna plućna hipertenzija (povišen plućni arterijski tlak) i rak pluća.

Mnogi *hox* geni klastera A, B i C, ali ne i D, su eksprimirani u hematopoietskim matičnim stanicama. Narušavanje redosljeda stanične diferencijacije kromosomskim translokacijama može dovesti do razvitka leukemije. Takve transklokacije tvore fuzijske gene, te mogu obuhvatiti *hox* gene kao što su *hoxA-9* i *hoxD-13*. Oni se mogu fuzionirati s genom za nukleoporin i u takvim slučajevima dolazi do pojave rijetke akutne mijeloidne leukemije (AML). Rearanžmani gena MLL1 (mixed-lineage leukaemia), koji djeluje kao pozitivni regulator stanično-specifične ekspresije *hox* gena, rezultiraju agresivnim akutnim leukemijama kod djece i odraslih. Fuzijski protein MLL-ENL je nađen kod infantilnih akutnih leukemija mijeloidne i limfoidne loze. Također je ustanovljeno da je MLL-ENL kompleks potreban za inicijaciju i održavanje besmrtnosti mijeloidnih progenitora, te može doprinijeti razvitku leukemije neprirodno održavajući ekspresiju *hoxA-4* i *hoxA-11* gena.

Rak dojke povezan je s prekomjernom ekspresijom humanog faktora rasta (hGF). Dokazano je da ekspresija hGF-a kod raka dojke pojačava ekspresiju *hoxA-1* gena, koji regulacijom Bcl-2 gena, antiapoptotičkog faktora, uzrokuje povećanje stanične brojnosti. Kod karcinoma epitela jajnika dolazi do ekspresije *hox* gena koji nisu normalno eksprimirani u epitelu jajnika, već samo kod karcinoma. Prekomjerna ekspresija *hoxA-9*, *hoxA-10* i *hoxA-11* gena u epitelu jajnika dovodi do stvaranja papilarnih tumora karakterističnih za karcinom epitela jajnika (Lappin i sur., 2006).

5. REGULACIJA HOX GENA

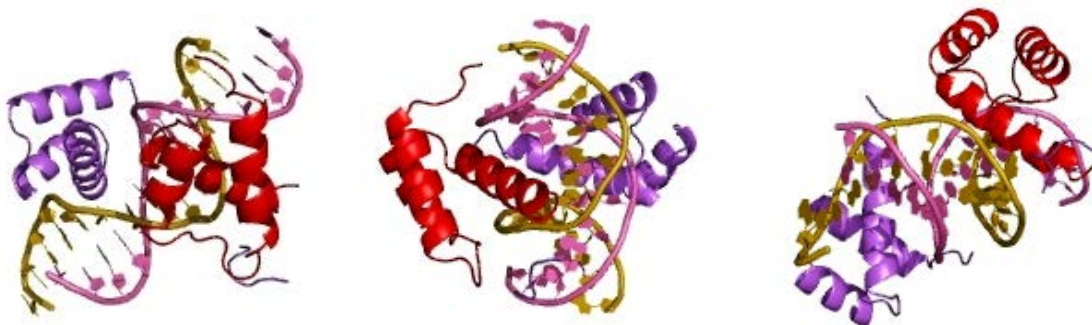
Ovo poglavlje se bavi učinkom raznih tvari i kofaktora na ekspresiju *hox* gena, te na aktivnost *hox* proteina. *Hox* geni, kao i svi ostali geni uključeni u razvitak organizma, su strogo regulirani. U protivnom slučaju dolazi do raznih oboljenja i malformacija, a u najgorem slučaju i do smrti organizma.

5.1. REGULACIJA HOX GENA KOD *DROSOPHILE MELANOGASTER*

Aktivacija *hox* gena je već bila spominjana u prijašnjem poglavlju. Jedan od najbolje istraženih primjera aktivacije *hox* gena u *Drosophile* jest aktivacija pomoću *gap* i *pair-rule* gena, koji su regulirani majčinskom RNA. *Hox* geni zatim aktiviraju gene koji uzrokuju diferencijaciju segmenata.

Regulacija se u *Drosophile* postiže koncentracijskim gradijentima, tzv. morfogeničnim poljima (morphogenic fields). Na primjer, visoke koncentracije jednog majčinskih proteina i niske koncentracije drugog će aktivirati ili inhibirati određenu grupu *gap* ili *pair-rule* gena, koji dalje aktiviraju *hox* gene. *Drosophila* zatim koristi *polycomb* i *trithorax* skupine gene koji održavaju ekspresiju *hox* gena. Polycomb proteini mogu i utišati ekspresiju *hox* gena remodelirajući kromatin (http://en.wikipedia.org/wiki/Hox_genes#Regulation_of_Hox_genes).

U uvjetima *in vitro* *hox* proteini se na većinu odgovarajućih DNA sekvenci vežu jednakim afinitetom, dok se specifičnost vezanja *hox* proteina *in vivo* objašnjava djelovanjem raznih kofaktora. Kod vinske mušice najbolje je istražen Extradenticle (Exd) kofaktor (sl. 17). On spada u TALE (three amino acid loop extension) grupu proteina koja je karakteristična po prisustvu tri aminokiseline između heliksa 1 i heliksa 2 homeodomene. Exd je karakteriziran kao kofaktor zato što su mutacije *exd* gena stvarale homeotičke fenotipove bez utjecaja na



Slika 17. Tri različita pogleda na strukturu *ubx/exd*/DNA kompleksa. (<http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/1b8i>)

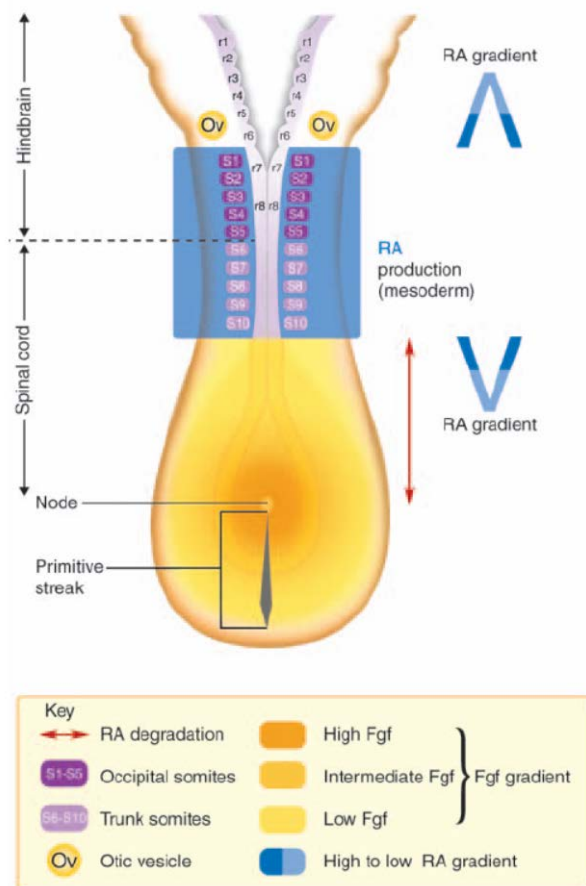
ekspresiju *hox* gena.

Dva modela su predložena kao način djelovanja kofaktora (naročito *exd* proteina) *in vivo*. Prvi model je model selektivnog vezanja (selective binding model). Ovaj model predlaže da različite *exd/hox* kombinacije diskriminiraju, između sličnih sekvenci (veličine do 10 parova baza) gena koji su regulirani pomoću *hox* gena. Dokazano je da se različiti *exd/hox* heterodimeri različitim afinitetom vežu na odgovarajuće sekvence *in vitro*, te da se prisustvom *exd* proteina povećava selektivnost *hox* proteina. No, postoje i nedostaci ovog modela. U genomu vinske mušice postoje homeotic response elementi (HRE) koji ne sadrže *exd/hox* vezno mjesto, te još neki geni koji su pod kontrolom *hox* gena, ali im nije potrebna prisutnost *exd* proteina. To govori da nije samo *exd* protein ključan za specifičnost vezanja *hox* proteina, nego postoje i neki drugi kofaktori.

Drugi model jest model regulacije aktivnosti (activity regulation model). Ovaj model predlaže da se *hox* proteini vežu slučajno, i da razlike kod vezanja na *exd/hox* mjesto nisu ključne za specifičnost vezanja. Različiti *exd/hox* heterodimeri se mogu vezati na isto *exd/hox* mjesto, a specifičnost regulacije tog gena bi bila određena različitim aktivnostima određenog heterodimera (npr. regrutacijom koaktivatora ili korepresora). *Exd* bi imao ulogu mijenjanja aktivnosti heterodimera (u aktivatore ili represore) bez mijenjanja afiniteta vezanja *hox* proteina (Foronda i sur., 2008).

5.2. REGULACIJA *HOX* GENA KOD KRALJEŠNJAKA

Kod miševa, inicijacija transkripcije *hox* gena, te stvaranje ekspresijskih domena regulirano je događajima povezanim s nastankom i širenjem primitivne pruge. Wnt (wingless) signali koji reguliraju formaciju i funkciju primitivne pruge također mogu regulirati ekspresiju *hox* gena. Ulogu u regulaciji *hox* gena imaju i Fgf (fibroblast growth factor) signali, te retinoična kiselina (RA). Prilikom regulacije nije važna samo prisutnost ili odsutnost pojedinog signala, već koncentracijski gradijenti (sl. 18).

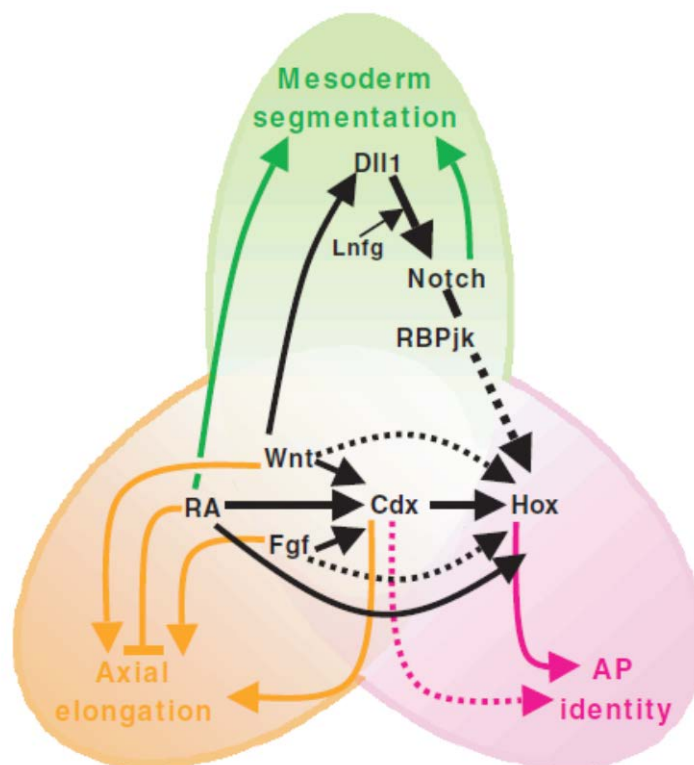


Slika 18. Signalne molekule i njihovi koncentracijski gradijenti koji utječu na ekspresiju *hox* gena. (Deschamps i van Nes, 2005)

Fgf i Wnt proteini, ključni čimbenici u maturaciji i segmentaciji paraksijalnog mezoderma, mogu regulirati *hox* gene; tako *wnt3a* i *fgfr1* mutacije ograničuju ekspresijske domene *hox* gena na posteriornije dijelove embrija uzrokujući anteriorne transformacije uzduž AP osi. Retinoična kiselina također sudjeluje u segmentaciji mezoderma jer je dokazano da abnormalne doze RA uzrokuju defekte prilikom formiranja AP osi, te defekte u regulaciji ekspresije *hox* gena. Uz ove signalne puteve, na ekspresiju *hox* gena u anteriornom

paraksijalnom mezodermu djeluju i mutacije u genima notch signalnog puta, te mutacije koje mijenjaju periodičnost njihove ekspresije.

U regulaciji *hox* gena sudjeluju i *cdx* geni. *Cdx* geni kodiraju za transkripcijske faktore i srodni su *hox* genima jer su nastali iz istog *protohox* klastera. *Cdx* geni mogu direktno regulirati ekspresiju *hox* gena u mezodermu i neuralnom ektodermu ovisno o njihovom koncentracijskom gradijentu. Transkripcijska stimulacija *hox* klastera preko *cdx* proteina događa se na *cdx*-vezujućim mjestima, koja se često nalaze unutar samih *hox* kalstera. *Cdx* geni također imaju i ulogu u regulaciji elongacije osi embrija, te su, uz *hox* gene, dio puno veće konstelacije gena koji sudjeluju u raznom razvojnim procesima (sl. 19).



Slika 19. *Hox* geni i mreža gena koja pokreće osnu elongaciju, segmentaciju mezoderma i formiranje AP osi. (Deschamps i van Nes, 2005)

Osim ovim interakcijama, *hox* geni su regulirani i višom razinom genske kontrole koja djeluje na strukturu kromatina. Kao i kod vinske mušice, tu su najvažniji geni *polycomb* i *trithorax* skupine. Globalna kontrola *hox* gena nadodaje na lokalne proksimalne elemente regulacije, omogućavajući finiju regulaciju. Kod regulacije *hox* gena još je važno spomenuti i microRNA (mRNA) koja ometa gensku ekspresiju na post-transkripcijskoj razini, a sadrži sekvence komplementarne genima *hox* klastera (Deschamps i van Nes, 2005).

6. LITERATURA

KNJIGE:

- Gilbert, Scott F. (2000): *Developmental Biology*, 6th Edition. Sinauer Associates Inc., 23 Plumtree Road, Sunderland, MA 01375, USA, str. 283-285; 505-507.
- Futuyma, Douglas J. (2005): *Evolution*. Sinauer Associates Inc., 23 Plumtree Road, Sunderland, MA 01375, USA, str. 473-501.

ZNANSTVENI RADOVI:

- Lappin T., Grier D., Thompson A., Halliday H., 2006. *HOX GENES: Seductive Science, Mysterious Mechanisms. The Ulster Medical Journal* 75, 23-31.
- Iimura T., Pourquié O., 2007. *Hox genes in time and space during vertebrate body formation. Development, Growth & Differentiation* 49, 265-275.
- Foronda D., de Navas L. F., Garaulet D. L., Sánchez-Herrero E., 2008. Function and specificity of *Hox* genes. *The International Journal of Developmental Biology* 52.
- Searcy R. D., Yutzey K. E., 1998. Analysis of *Hox* Gene Expression During Early Avian Heart Development. *Developmental Dynamics* 213, 82-91.
- Geisen M. J., Di Meglio T., Pasqualetti M., Ducret S., Brunet J., Chedotal A., Rijli F. M., 2008. *Hox* Paralog Group 2 Genes Control the Migration of Mouse Pontine Neurons through Slit-Robo Signaling. *PLoS Biology* 6, 1178-1194.
- Deschamps J., van Nes J., 2005. Developmental regulation of the *Hox* genes during axial morphogenesis in the mouse. *Development* 132, 2931-2942.

INTERNET STRANICE:

- http://en.wikipedia.org/wiki/Homeodomain_fold
- http://www.zoology.ubc.ca/~bio463/lecture_14.htm
- http://biology.kenyon.edu/courses/biol114/Chap13/Chapter_13A.html
- <http://www.hoxfulmonsters.com/2008/04/homeotic-genes-hox-genes/>
- <http://www.press.uchicago.edu/books/gee/carroll1.html>
- <http://www.utm.utoronto.ca/~w3bio380/lecture20.htm#section10>
- http://en.wikipedia.org/wiki/Hox_genes#Regulation_of_Hox_genes
- <http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/1b8i>

7. SAŽETAK

Hox geni se neprestano javljaju kao ključni čimbenici u embrionalnom razvitku i evoluciji. Zajedno s drugim genima čine signalne mreže, djelujući kao modulatori ili pak sudjeluju u formiranju novih struktura. Specifičnost i funkcija *hox* gena ovisi o njihovoj regulaciji koja je višeslojna i kompleksna.

Glavni cilj ovoga rada bio je predstaviti uloge *hox* gena kod embriogeneze, te ukazati na osnovne aspekte regulacije. Za potpuno razumijevanje uloga i specifičnosti *hox* gena potrebno je još mnogo istraživanja posebice kod dešifriranja mreža *hox* gena i njihove regulacije, što bi olakšalo liječenje bolesti povezanih s *hox* genima, i omogućilo bolje razumijevanje uloge *hox* gena u evoluciji.

8. SUMMARY

Hox genes keep on occurring as key elements in embryogenesis and evolution. Together with other genes they form signaling networks, acting as modulators or participating in the formation of new structures. Specificity and function of *hox* genes depend on their regulation which is multilayered and complex.

The main goal of this review was to present the roles of *hox* genes during embryogenesis, and to point out the basic aspects of regulation. More research is needed to completely understand the roles and specificity of *hox* genes, especially in deciphering *hox* networks and their regulation, which would make it easier to cure *hox*-related diseases, and allow better understanding of the roles of *hox* genes in evolution.