

# Proteini HOX u razvoju organizma

---

Hrabar, Vjeko

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:614458>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-15**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Vjeko Hrabar

# **Proteini HOX u razvoju organizma**

Završni rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Vjeko Hrabar

# **HOX proteins in development of organism**

Bachelor thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj rad je izrađen u sklopu studijskog programa preddiplomskog studija molekularne biologije na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Maje Matulić.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Završni rad

## Proteini HOX u razvoju organizma

Vjeko Hrabar

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Proteini HOX su skupina transkripcijskih faktora, primarno povezana s ulogom regulatora formacije anteriorno-posteriorne osi u ranom embrionalnom razvoju. Zbog svoje su se važne uloge u razvojnim procesima održali visoko konzerviranima među pripadnicima životinja bilatelarne simetrije. Kao i ostali predstavnici porodice proteina Homeobox, sadrže homeodomenu, trodimenzionalnu strukturu koja im omogućuje interakciju s regulatornim sekvencama DNA. Njihovo je djelovanje uvjetovano interakcijom s većim brojem, različitih skupina kofaktora, koji također pripadaju porodici proteina Homeobox te moduliraju svojstva proteina HOX, odnosno njihovu specifičnost i afinitet vezanja pojedinih regulacijskih elemenata. Kako su neispravno formirani uzorci ekspresije gena *HOX* često uzroci malformacija i pojava nenormalnosti u embrionalnom razvoju, ispravna se ekspresija gena *HOX* osigurava regulacijom putem velikog broja, međusobno povezanih, mehanizama. Međutim, greške u regulaciji ekspresije gena *HOX* su neminovne te posljedično i pojava povezanih patoloških stanja, kao što je primjerice razvoj nekih tipova tumora.

Ključne riječi: transkripcijski faktori, uzorci ekspresije, *Drosophila melanogaster*, razvojni procesi, proteinske interakcije

(25 stranice, 7 slika, 1 tablica, 19 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Maja Matulić

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Bachelor thesis

### HOX proteins in development of organism

Vjeko Hrabar

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

HOX proteins are a group of transcription factors, primarily associated with the role of regulators of anterior-posterior axis formation in early embryonic development. Because of their important role in developmental processes, they have remained highly conserved among members of animals with bilateral symmetry. Like other members of the Homeobox protein family, they contain a homeodomain, a three-dimensional structure that enables them to interact with regulatory DNA sequences. Their action is determined by the interaction with a large number of different groups of cofactors, which also belong to the Homeobox protein family and modulate the properties of HOX proteins, that is, their specificity and binding affinity of individual regulatory elements. As improperly formed patterns of *HOX* gene expression are often the cause of malformations and abnormalities in embryonic development, the correct expression of *HOX* genes is ensured by regulation through a large number of interconnected mechanisms. However, errors in the regulation of *HOX* gene expression are inevitable and, consequently, the occurrence of related pathological conditions, such as the development of some cancer types.

Keywords: transcriptional factors, expression patterns, *Drosophila melanogaster*, development processes, protein interactions

(25 pages, 7 figures, 1 tables, 19 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Maja Matulić

## SADRŽAJ

|  |    |
|--|----|
| 1. UVOD.....   | 1  |
| 2. POVIJEST OTKRIĆA I MODELNI ORGANIZMI.....           | 2  |
| 3. STRUKTURA I MEHANIZMI DJELOVANJA PROTEINA HOX.....  | 4  |
| 3.1. Osnovna struktura proteina HOX .....              | 4  |
| 3.2. Mehanizmi djelovanja proteina HOX .....           | 6  |
| 4. MODULATORI FUNKCIJE PROTEINA HOX.....               | 8  |
| 5. PARALOZI HOX I NJIHOVA DIFERENCIJACIJA .....        | 11 |
| 6. POJAČIVAČI REGULIRANI PROTEINIMA HOX .....          | 12 |
| 7. REGULACIJA EKSPRESIJE GENA <i>HOX</i> .....         | 14 |
| 7.1. Ekspresija uvjetovana modulacijom kromatina ..... | 14 |
| 7.2. Ekspresija uvjetovana djelovanjem lncRNA .....    | 16 |
| 7.3. Ekspresija uvjetovana RNA procesiranjem .....     | 17 |
| 7.4. Ekspresija regulirana putem miRNA .....           | 18 |
| 7.5. Ekspresija regulirana na razini translacije ..... | 19 |
| 8. ULOGA GENA <i>HOX</i> U RAZVOJU TUMORA .....        | 21 |
| 9. ZAKLJUČAK .....                                     | 22 |
| 10. LITERATURA .....                                   | 23 |
| 11. ŽIVOTOPIS .....                                    | 25 |

## 1. UVOD

Proteini HOX porodica su transkripcijskih faktora s evolucijski konzerviranom homeodomenom, veličine 60 aminokiselina, koja im omogućuje interakciju s molekulom DNA (Viola i Gonzalez 2016). Od presudne su važnosti u regulaciji morfološkog razvoja Metazoa, odnosno mnogostaničnih životinja, te budući da su prisutni u gotovo svim predstavnicima skupine Bilateria, može se zaključiti da imaju i važnu ulogu u evoluciji morfologije pretka životinja bilateralne simetrije. S proteinima HOX se tako povezuje ispravno pozicioniranje specifičnih morfoloških identiteta, kao što su prsti na distalnim krajevima udova te rebra na torakalnom djelu kralježnice, putem regulacije mnogobrojnih procesa, među kojima su apoptoza, stanična pokretljivost i adhezija, angiogeneza te receptorska signalizacija (Kmita i Duboule 2003; Shah i Sukumar 2010). Međutim, osim uloge u razvojnim procesima, proteini HOX omogućuju diferencijaciju pojedinih populacija stanica.

Geni skupine *HOX*, grupirani su u klastere unutar kojih njihov raspored korelira s ekspresijskim uzorkom duž anteriorno-posteriorne (AP) osi organizma, te koja je član veće, heterogenije, skupine gena sa sekvencom homeobox DNA (Shah i Sukumar 2010). Djelovanje se proteina HOX temelji na interakciji s regulatornim elementima na promotorima gena, na koje se vežu kao monomeri ili homodimeri, ili formiraju komplekse s drugim transkripcijskim faktorima te tako reguliraju transkripciju (Shah i Sukumar 2010; Zandvakili i Gebelein 2016). Interakcije s drugim transkripcijskim faktorima omogućuju paralozima HOX, nastalima duplikacijom gena kroz evoluciju, različite aktivnosti unutar istog staničnog tipa (Zandvakili i Gebelein 2016). Različitom se regulacijom njihove ekspresije, putem složene mreže regulacijskih mehanizama, formiraju gradijenti proteina HOX koji, potom, uvjetuju nastanak različitih razvojnih programa tijekom embrionalnog razvoja organizma, a njihovo narušavanje rezultira pojavom razvojnih poremećaja i bolesti (Mallo i Alonso 2013). Prema tome, nameće se ideja o genima *HOX* kao korisnim alatima u dijagnostici i terapiji pojedinih bolesti (Shah i Sukumar 2010).



## 2. POVIJEST OTKRIĆA I MODELNI ORGANIZMI

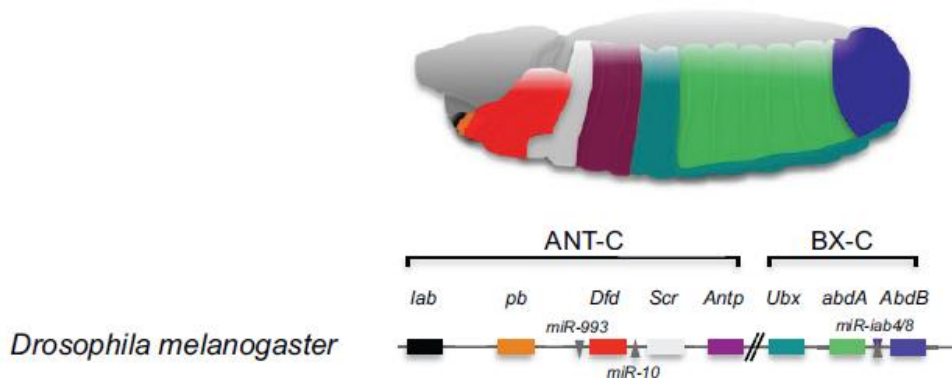
Počeci su istraživanja gena *HOX* te njihovih funkcija bili usko povezani s proučavanjem mutanata promijenjene morfologije (Kmita i Duboule 2003; Mallo i Alonso 2013; Pearson i sur. 2005; Shah i Sukumar 2010). Tako je otkriće gena *HOX*, inače zasluga T. H. Morgana i C. B. Bridgesa 1923. godine, rezultat izučavanja homoeotskih transformacija uočenih na vinskoj mušici, *Drosophila melanogaster*, koja je dosada ostala jedan od glavnih modelnih organizama u istraživanjima gena *HOX*. Homoeotske su transformacije skupina mutacija kod kojih jedan dio organizma preuzima oblik drugoga te su takve promjene ondašnjim znanstvenicima dale ideju da su molekule, u kojima su se dogodile navedene promjene, odgovorne za „raspodjelu“ pojedinih morfoloških struktura na svakom od tjelesnih segmenata (Slika 1.) (Mallo i Alonso 2013; Pearson i sur. 2005).



Slika 1. Homeotske transformacije u mutanata *antennapedia* (lijevo) i *bithorax* (desno) vinske mušice (Beurier i sur. 2005).

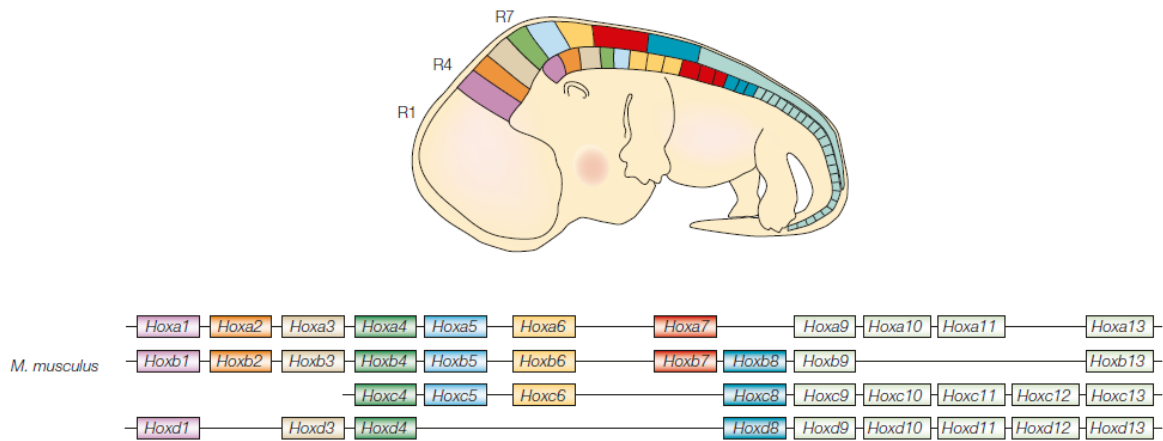
Do kraja su osamdesetih godina dvadesetog stoljeća, geni *HOX* otkriveni i u miševima te uz samo otkriće prisutnosti ove skupine gena u dvjema, filogenetski udaljenim, vrstama, utvrđeno je da se i genomski organizacija gena *HOX* u miševa podudara s onom u vinske mušice. Naime, uočeno je da se geni *HOX* organiziraju u klastere, no sama uloga ovog, njima intrinzičnog, svojstva ostaje nerazjašnjena. Tako je za beskralježnjake karakteristično organiziranje gena *HOX* u najčešće jedan, a kod kralježnjaka obično u četiri genska klastera (uz iznimku skupine paklara) (Mallo i Alonso 2013). Još jedna iznimka od ovog pravila je, već spomenuta, vinska mušica kod koje su geni *HOX* raspoređeni u dva genska kompleksa, Antennapedia (ANT-C) te Bithorax (BX-C), oba locirana na trećem kromosomu. U ova je dva kompleksa raspoređeno svih osam gena *HOX* vinske mušice. Tako se prvih pet, uzvodnih, gena (*lab*, *pb*, *Dfd*, *Scr* i *Antp*) nalazi unutar kompleksa ANT-C, dok se tri nizvodna (*Ubx*, *abd-A*, *abd-B*) nalaze unutar kompleksa BX-C. (Slika 2.).

Većina je prvotnih otkrića ostvarena istražujući navedene gene kod vinske mušice. Upravo tako je otkriće prostorne kolineranosti gena *HOX* proizašlo iz molekularnog kloniranja i ekspresijske analize kompleksa BX-C. E. B. Lewis je 1978. godine uočio da redosljed ekspresije pojedinih faktora HOX, prati anteriorno-posteriornu os organizma, te da odgovara njihovom rasporedu unutar genskog klastera (Slika 2.) (Mallo i Alonso 2013). Drugim riječima, fenotip se mutacije gena, lociranog na 3' kraju klastera, očituje na anterirnoj strani organizma, a fenotip mutacije gena, lociranog na 5' kraju klastera, ogleda na posteriornoj strani. Ova je opažena pravilnost naknadno proširena i na kralježnjake, a Lewis je sedamnaest godina kasnije, zajedno s Christiane Nüsslein-Volhard i Ericom Wieschausom, podijelio Nobelovu nagradu za fiziologiju ili medicinu za otkrića u području genetičke kontrole ranog embrionalnog razvoja (Duncan i Montgomery 2002; Kmita i Duboule 2003).



Slika 2. Shematski prikaz ekspresije gena *HOX* te njihove organizacije u dva kompleksa (ANT-C i BX-C) u embrionalnom razvoju vinske mušice. Na shematskom prikazu klastera su naznačeni geni *miR-993*, *miR-10* te *miR-iab4/8* koji ne pripadaju genima *HOX*, nego sudjeluju u regulaciji njihove ekspresije (Mallo i Alonso 2013).

Nakon otkrića gena *HOX* u vinskoj mušici te desetljeća analiza njihovih svojstava, 1985. godine, C.P. Hart i suradnici, otkrivaju kako su transkripcijski faktori HOX svojstveni i kralježnjacima, odnosno miševima. Otkriveno je, također, kako su se kod kralježnjaka, kroz evoluciju, klasteri gena *HOX* udvostručili te u ljudi i miševa postoje 4 klastera s ukupno 39 gena (Slika 3.) (Shah i Sukumar 2010).



Slika 3. Shematski prikaz ekspresije gena *HOX* te njihove organizacije u četiri klastera u embrionalnom razvoju miša. Na shematskom prikazu, ekspresije gena, kraticama su naznačene rombomere (R1, R4 i R7), odnosno razvijajući segmenti zadnjeg mozga (Pearson i sur. 2005).

Na kralježnjacima je, primjerice, izučen fenomen temporalne, odnosno vremenske, kolineranosti. Naime, geni *HOX* su u najranijim fazama embrionalnog razvoja uglavnom utišani. Potom, kroz razvoj organizma dolazi do postupne aktivacije sve većeg broja gena *HOX*, a raspored kojim se geni *HOX* aktiviraju, kroz vrijeme, odgovara njihovom slijedu unutar genskog klastera, u smjeru 3' prema 5' kraju klastera (Mallo i Alonso 2013). Ovo se svojstvo gena *HOX* može uočiti u procesu somitogeneze, gdje se aktiviraju uzduž primitivne pruge. Budući da je to mjesto nastanka prekursora svih zametnih listića, nastale će stanice prvo doprinijeti formaciji anteriornih struktura, a tek potom posterornijih (Kmita i Duboule 2003).

### 3. STRUKTURA I MEHANIZMI DJELOVANJA PROTEINA HOX

#### 3.1. Osnovna struktura proteina HOX

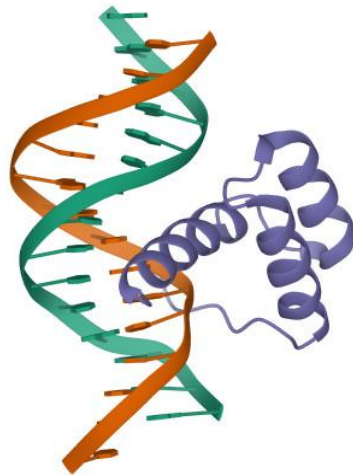
Prisutnost proteina HOX u širokom spektru predstavnika carstva *Animalia*, dokaz je kako je njihova uloga bila presudna u oblikovanju i formiranju današnjih životinja. Kroz 600 milijuna godina njihove evolucije, transkripcijski regulatori HOX očuvali su ulogu formiranja anteriorno-posteriorne osi kao njihove primarne funkcije kod organizama u najranijim fazama razvoja. Osim očuvanja funkcionalnosti, njihova je struktura također ostala donekle konzervirana te se može podijeliti na pet osnovnih regija, odnosno N-terminalnu, heksapeptidni (HX) motiv, veznu regiju (LR), homeodomenu te C-terminalnu. Među

navedenim, motiv HX te homeodomena su visoko konzervirane regije, dok je kod ostalih prisutna značajna varijabilnost između različitih proteina HOX (Pearson i sur. 2005).

Heksapeptidni motiv je lociran između N-terminalne i vezne regije (iznimka je protein Abd-A u *D.melanogaster*) te posreduje u interakciji s drugim skupinama transkripcijskih faktora, kao što su PBC (Pre-B-cell homeobox protein). Motiv HX formira klasični  $\beta$ -okret tipa I, sastavljen od četiri aminokiseline, te njime stupa u interakciju s hidrofobnim džepom homeodomenne spomenute skupine proteina PBC. Naime, navedena skupina proteina pripada razredu proteina TALE koje karakterizira tripeptidna insercija između prvog i drugog heliksa homeodomenne te prema njoj nose i ime, a ogranci aminokiselina spomenutog tripeptida formiraju hidrofobni džep za interakciju s proteinima. U uvjetima *in vitro*, uočena je pojava povećanja afiniteta i specifičnosti za vezna mjesta na DNA stvaranjem kompleksa HOX/PBC u odnosu na monomere (Merabet i sur. 2003).

U primarnoj strukturi proteina, nizvodno od motiva HX slijedi vezna regija koja je, zbog svoje velike varijabilnosti te manjka organiziranosti, okarakterizirana kao pasivna struktura s primarnom ulogom povezivanja dvije važnije formacije unutar strukture proteina HOX, odnosno motiva HX i homeodomenne. Homeodomena omogućava proteinima HOX direktno vezanje za molekulu DNA. Iako homeodomeni karakterizira visoka konzerviranost, prisutna je izrazita raznolikost u spektru afiniteta i specifičnosti u vezanju DNA među paralogima porodice HOX. Budući da nisu uočene velike razlike u preferencijama pri vezanju monomera HOX na različita vezna mjesta na DNA, u uvjetima *in vitro*, može se zaključiti da međuproteinske interakcije igraju važnu ulogu u nastanku selektivnosti faktora HOX prema različitim veznim mjestima DNA (Zandvakili i Gebelein 2016).

Struktura homeodomenne poznata je već preko trideset godina, kada je 1990. godine nekoliko skupina znanstvenika, koristeći se metodama kristalografske analize i NMR spektroskopije, razriješilo njezinu strukturu. Tako je uočeno da homeodomena formira strukturu sastavljenu od tri  $\alpha$ -heliksa, povezanih strukturom zavoj-okret. Heliksi I i II su međusobno antiparalelni, dok je heliks III na njih okomit (Slika 4). Homeodomena oblikuje globularnu strukturu s hidrofobnim džepom bogatim nepolarnim aminokiselinama. U tom hidrofobnom džepu nalaze se najkonzerviranije aminokiseline, među kojima se ističu Trp48 i Asn51, unutar trećeg heliksa, koje su gotovo savršeno očuvane (Viola i Gonzalez 2016).



Slika 4. Kristalna struktura homeodome proteina PBX1 u kompleksu s molekulom DNA (Longo i sur. 2007).

Heliks III se naziva još i „prepoznavajući heliks“ te je on taj koji se umeće u veliki utor molekule DNA, dok N-terminalna „ruka“, prvih devet aminokiselina homeodome, formira specifične interakcije s malim utorom (Viola i Gonzalez 2016).

Osim proteina HOX, homeodomena, ili njezin modificirani oblik, prisutni su i na velikom broju drugih proteina te služe za interakcije s molekulom DNA. Primjer takve skupine je grupa proteina TALE, kojoj pripadaju porodice proteina PBC i HMP te koja, zajedno s proteinima Hox, pripada porodici Homeobox (Shah i Sukumar 2010). Ovi važni transkripcijski faktori te modulatori funkcije proteina HOX, sadrže modificirani oblik homeodome.

Ostatak sekvence proteina HOX čine nekonzervirane regije koje donose raznolikost u ovu porodicu proteina. Međutim, njihove uloge nisu posve razjašnjene (Zandvakili i Gebelein 2016).

### 3.2. Mehanizmi djelovanja proteina HOX

Proteini HOX, u uvjetima *in vivo*, reguliraju transkripciju vežući se na široki spektar veznih mjesta na DNA. Na većinu se takvih mjesta vežu kooperativno s predstavnicima skupina proteina PBC ili HTH/MEIS te tako, formirajući heteromultimere, moduliraju svoj afinitet i specifičnost. Djelovanje proteina HOX je širokog opsega te pretežito temelji na regulaciji ekspresije drugih signalnih molekula ili morfogenih signala. Među ciljne gene proteina HOX,

zasad je ubrojeno oko 35 gena u velikom broju organizama, na čiju regulaciju direktno utječe jedan ili više proteina HOX istovremeno (Pearson i sur. 2005).

Direktna regulacija ekspresije ciljnih gena samo je jedan oblik djelovanja proteina HOX. Karakteristika mutanata spomenutih ciljnih gena karakterističan je fenotip koji odgovara fenotipu mutanata gena *HOX* koji reguliraju njihovu ekspresiju. Odnosno, karakteristika oba mutanta je izostanak funkcionalnog genskog produkta u suficijentnoj količini. Primjer takvog ciljnog gena je *decapentaplegic (dpp)*, morfogen *D. melanogaster* koji potiče promjenu fenotipa stanica visceralnog mezoderma probavila. Njegovu lokaliziranu ekspresiju reguliraju dva proteina HOX, Ultrabithorax (UBX), koji djeluje aktivirajuće te Abdominal-A (ABD-A), koji djeluje represivno. Međutim, osim što proteini HOX mogu djelovati kao transkripcijski aktivatori i represori, također je moguće da isti protein posjeduje obje uloge, ovisno kojem je ciljnom genu riječ. Tako, spomenuti UBX, reprimira ekspresiju gena *Distal-less (Dll)* koji kodira transkripcijski faktor s homeodomenom odgovoran za formaciju tjelesnih privjesaka. UBX tako onemogućuje formaciju udova na abdomenu vinskih mušica (Pearson i sur. 2005).

Još jedan oblik djelovanja produkata gena *HOX* je modulacija stanične adhezije. Primjer takvog gena *HOX* je *HOXA13*, koji je eksprimiran pri razvoju udova kod zdravih miševa. Prekomjerna ekspresija ovog gena u stanicama udova rezultira pomanjkanjem hrskavice i nenormalnim razvojem. Uočeno je kako je pojava ovih poremećaja posljedica mutacije u genu *HOXA13* koja utječe na homofilno povezivanje stanica (Pearson i sur. 2005).

Osim u regulaciji stanične adhezije, u sisavaca je zapažena dodatna uloga proteina HOX. Aktivacijom gena *HOXA10* potiče se razvoj krvnih stanica, odnosno, diferencijacija mijelomonocita u monocite. Kompleksna priroda djelovanja genskog produkta, spomenutoga gena, na regulaciju diferencijacije krvnih stanica je (zasada) onemogućila detaljniji uvid u pojedinosti samog mehanizma djelovanja. Međutim, proteinima HOX se sigurno u spektar djelovanja može dodati i regulacija staničnog ciklusa (Pearson i sur. 2005).

Još jedan način, kojim proteini HOX utječu na morfologiju organizama, regulacija je stanične smrti. U vinskoj mušici granica između mandibularnih i maksilarnih segmenata nastaje lokaliziranom staničnom smrti u embrionalnom razvoju. Glavni gen koji regulira spomenuti proces je *reaper (rpr)*, a njegovu pak ekspresiju direktno modulira gen *HOX Deformed (Dfd)*. Uočeno je da mutanti obaju gena daju isti fenotip, odnosno nemaju mandibularno-maksilarnu granicu, što je potvrdilo njihovu međusobnu ovisnost. Otkriven je i pojačivač *rpr* s četiri vezna mjesta DFD nužna za transkripcijsku aktivnost (Pearson i sur. 2005).

Stanična migracija jedan je od procesa nužnih u razvoju. Stoga nije iznenađujuće kako su upravo proteini HOX ti koji reguliraju usmjerene migracije stanica. Jedan od primjera ove regulacija je moduliranje kretanja neuroblasta Q tijekom razvoja oblića *C. elegans*. Glavnu ulogu ovdje imaju geni *mab-5* i *lin-39*, pri čemu je *mab-5* nužan za migraciju stanica potomaka neuroblasta QL ka posteriornom dijelu organizma, a *lin-39* za migraciju stanica potomaka neuroblasta QR ka anteriornom dijelu organizma (Pearson i sur. 2005).

Gore navedeni primjeri su dokaz raznolikog utjecaja gena *HOX* na morfologiju organizama te uvid u složenost oblikovanja organizama tokom njihova razvoja (Pearson i sur. 2005).

#### 4. MODULATORI FUNKCIJE PROTEINA HOX

Kao što je već navedeno, proteini HOX se, kao monomeri, ne razlikuju značajno u stupnju afiniteta i specifičnosti prema različitim veznim mjestima na DNA, te u tom obliku ne bi mogli fino regulirati ekspresiju gena. Promjene specifičnosti vezanja DNA koje nastaju uslijed stupanja u interakciju protein-protein, nazivaju se latentnom specifičnošću te su posljedica izlaganja varijabilnih sekvenci (vezna regija i N-terminalna ruka homeodomene) paraloga HOX, tj. konformacijske promjene nastale interakcijama s drugim proteinima (Zandvakili i Gebelein 2016).

Jedna od skupina proteina s kojima regulatorski faktori HOX ostvaruju interakcije su transkripcijski faktori PBC. Pripadaju, već opisanoj, skupini proteina TALE koja modulira funkciju faktora HOX u vinskoj mušici. Kod sisavaca su neki proteini TALE proto-onkogeni. Neki od predstavnika ove skupine proteina su Exd kod vinske mušice, CEH-20 i CEH-40 kod *C. elegans*, te faktori Pbx kod sisavaca (Laurent i sur. 2008; Zandvakili i Gebelein 2016).

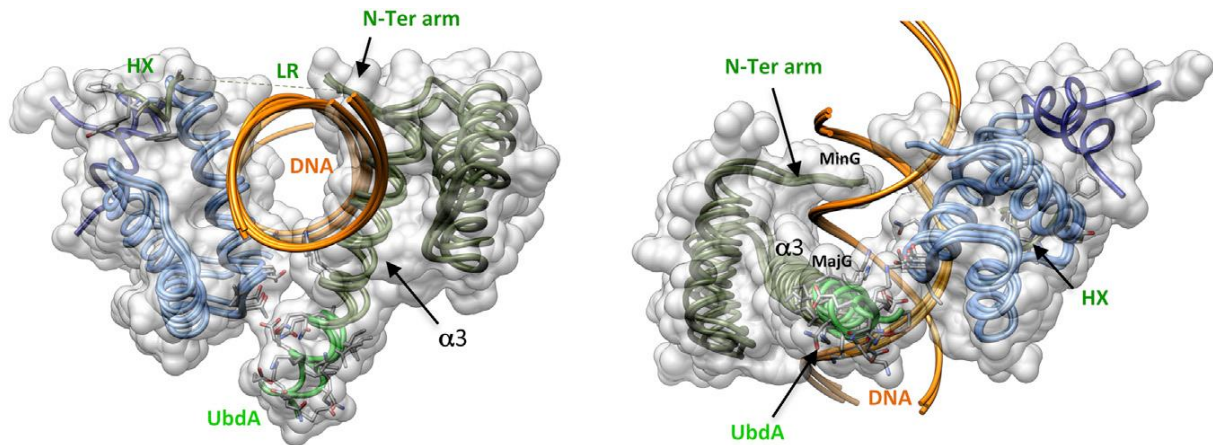
Vrlo je brzo nakon njihova otkrića, 1990. godine, uočeno da proteini PBC, preko svoje atipične homeodomene, formiraju interakcije s motivom HX proteina HOX te kooperativno vežu DNA. Prema tome, proteine PBC se može okarakterizirati kao esencijalne kofaktore proteina HOX. Spomenute su interakcije izučene metodom SELEX-seq (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment followed by sequencing), u uvjetima *in vitro*, te su rezultati pokazali kako, primjerice, heterodimer Exd-HOX ima puno veću specifičnost prepoznavanja veznih mjesta DNA u odnosu na monomerni oblik HOX. Također, uočeno je kako ovaj heterodimerni par proteina prepoznaje specifičnu heksanukleotidnu sekvencu, A<sub>5</sub>YNNAY<sub>10</sub>, unutar veznog mjesta DNA, tipično građenog od dvanaest nukleotida (Pearson i sur. 2005; Zandvakili i Gebelein 2016).

Drugo istraživanje, s proteinom HOX Scr (Sex Combs Reduced) u paru s proteinom Exd, pokazalo je kako se i sam mehanizam vezanja za vezna mjesta DNA razlikuje ovisno o tome kolika je specifičnost ciljnih DNA sekvenci. Naime, kada je riječ o sekvencama DNA visoke specifičnosti, varijabilne regije proteina HOX, imaju važnu ulogu u formiranju interakcija s DNA. U ovom slučaju, N-terminalna ruka homeodomene preuzima pravilnu strukturu te se veže s malim utorom DNA.

Pri moduliranju afiniteta i selektivnosti vezanja gena *HOX*, osim vezanja kofaktora, ulogu imaju i vezna mjesta za HOX-PBC, koja se razlikuju u afinitetu te često kombinacija susjednih veznih mjesta za HOX-PBC, različitog afiniteta, uvjetuje vezanje različitih paraloga. Ideja ovog koncepta je ta da kod veznih mjesta visokog afiniteta, najveći dio energije vezanja otpada na vezne regije DNA koje formiraju jake interakcije. Međutim, one se često znatno ne razlikuju unutar obitelji transkripcijskih faktora te se stoga za takva mjesta može vezati veći broj paraloga. S druge strane, kod mjesta s nižim afinitetom vezanja se veći doprinos vezanju za DNA imaju regije proteina koje formiraju slabije interakcije, a koje inače karakterizira veća varijabilnost. Tako bi mjesta slabijeg afiniteta imala selektivnu prednost. Dodatna potvrda ovoga je i istraživanje u kojem je zamjena veznog mjesta niskog afiniteta s veznim mjestom visokog afiniteta, unutar pojačivača Ubx-Exd lokusa *Drosophila shavenbaby*, rezultirala vezanjem većeg broja faktora HOX (Zandvakili i Gebelein 2016).

Istraživanja su pokazala da, uslijed mutacije ili delecije motiva HX, proteini HOX ne gube mogućnost stvaranja kompleksa s PBC faktorima te zajedničkog vezanja za DNA. Navedeni su rezultati dali naslutiti kako motiv HX, iako čini osnovu interakcija između proteina, nije isključivo jedini element strukture proteina HOX kojim se vežu za druge transkripcijske faktore. Alternativni mehanizam, kojim je omogućena formacija kompleksa proteina HOX, Ubx ili Abd-A s faktorom Exd, temelji se na motivu Ubd-A lociranom iza homeodomene (Slika 5.) (Zandvakili i Gebelein 2016).





Slika 5. Ortogonalni pogledi interakcije proteina HOX Ubx (zeleno) te kofaktora Exd (plavo) preko domena HX i UbdA (Foss i sur. 2015).

Uočeno je da se motiv Ubd-A ponaša različito u uvjetima kada je motiv HX prisutan i kad nije. Kad nema motiva HX, motiv Ubd-A preuzima ulogu spona, a, kad su oba motiva prisutna, samo motiv HX formira interakcije s proteinom Exd, dok motiv Ubd-A gubi strukturiranost (Zandvakili i Gebelein 2016).

Porodica proteina HMP (Homothorax, Meis, Prep) čini drugu skupinu faktora koji se vežu za proteine HOX te koja također pripada široj grupaciji faktora TALE. U ovu se skupinu ubrajaju proteini Homothorax (Hth), vinske mušice, UNC-62 *C. elegans*, te Meis i Prep u kralježnjaka. Proteini HMP reagiraju i s faktorima PBC, a mogu nastati i trimeri HOX-PBC-HMP. Međutim, važno je za istaknuti kako, iako proteini HMP Meis1A i Meis1B kralježnjaka formiranju interakcije s velikom skupinom paraloga HOX, vežu DNA samo s paralogima HOX posteriorne ekspresije. Iz ovih zapažanja proizlazi pretpostavka kako raspored veznih mjesta HOX-HMP preferira posteriorne, u odnosu na anteriorne, faktore HOX (Zandvakili i Gebelein 2016).

Novija istraživanja su pokazala kako su interakcije među ovim skupinama proteina drevne i evolucijski očuvane, budući da su zabilježene interakcije proteina izoliranih iz različitih skupina organizama. Posljedica je to međusobne ovisnosti ovih proteina u regulaciji ekspresije kroz dugi evolucijski period. Razvili su se i dodatni mehanizmi, npr. proteini PBC su pretežito lokalizirani u citoplazmi te za unos u jezgru trebaju proteine HMP. S druge strane, proteini HMP se dimerizacijom stabiliziraju (Zandvakili i Gebelein 2016).

Budući da su zabilježeni primjeri asociiranja proteina HOX s oba kofaktora, nije neobično što je potvrđeno postojanje elemenata DNA s veznim mjestima za sva tri proteina. Takva su

vezna mjesta uočena u stražnjem mozgu kralježnjaka te u vinskoj mušici. No takvi su slučajevi rjeđi u odnosu na ostale kombinacije zabilježene u prirodi. Najčešće je riječ o veznim mjestima za HOX-HMP sa obližnjim veznim mjestom PBC ili pak mjesto HOX-PBC s obližnjim mjestom vezanja HMP proteina (Zandvakili i Gebelein 2016).

U konačnici, iako su zabilježene raznolike kombinacije veznih mjesta DNA na različitim udaljenostima te različitim afinitetom za različite kofaktore, konkretan utjecaj rasporeda različitih veznih mjesta na paralognu specifičnost još nije utvrđen (Zandvakili i Gebelein 2016).

## 5. PARALOZI HOX I NJIHOVA DIFERENCIJACIJA

Paralogni geni, odnosno paralozi, podskupina su homolognih gena čiji je nastanak posljedica genske duplikacije. Nakon duplikacije geni mogu zadržati istu funkciju ili pak divergirati i razviti različite uloge (Moreira i López-García 2011). Za paraloge HOX svojstveno je da, iako imaju izrazito slična vezna svojstva za DNA, obavljaju različite uloge *in vivo*. Istraživanja s povećanjem ili gubitkom funkcije gena pokazala su da geni *HOX* određuju različite stanične sudbine, po anteriorno-posteriornoj osi, te da u istoj stanici provode različite aktivnosti. Povećanje ili smanjenje ekspresije nekog od gena *HOX* rezultira različitim fenotipovima (Zandvakili i Gebelein 2016).

Osim već spomenutih kofaktora HOX, koji se združuju s različitim proteinima HOX, istraživanje na modelu vinske mušice ukazalo je na postojanje dodatnih transkripcijskih faktora specifičnih za paraloge. Naime, pomoću analize BiFC (bimolekularne fluorescencijske komplementacije), u živom embriju vinske mušice, promatrano je sparivanje pet probranih faktora HOX (Scr, Antp, Ubx, Abd-A i Abd-B) s 35 drugih transkripcijskih faktora. Analiza BiFC se koristi za potvrdu interakcija protein-protein pomoću izrađenih proteinskih konstrukata (protein HOX + fluorescencijska domena), uslijed čije interakcije nastupa fluorescencija. Ono što je uočeno jest da svaki od faktora HOX stupa u interakciju sa specifičnom kombinacijom ovih 35 faktora, pri čemu je sličnost između setova transkripcijskih faktora 59% (Baëza i sur. 2015).

Osim transkripcijskih faktora karakterističnih za određene proteine HOX, paralozi se razlikuju po posttranslacijskim modifikacijama koje povećavaju ili smanjuju njihov afinitet za vezanje. Poli(ADP)riboza polimeraza 1 (PARP-1) je primjer enzima koji vrši jedan tip spomenutih modifikacija. Do sada je uočeno da PARP-1 poli(ADP)-ribozilira nekoliko proteina HOX

sisavaca (HOXA5, HOXA7, HOXB6, HOXB7, HOXC6, HOXC8) te da navedena promjena smanjuje afinitet proteina za vezanje DNA u uvjetima *in vitro*. Međutim, kako bi se ostvario negativni utjecaj poli(ADP)-ribozilacije na afinitet proteina HOX, potrebna je prisutnost duge repeticije bogate glutamatom na C-terminalnom motivu. Ovakvu repeticiju, među gore navedenim proteinima, sadrže proteini HOXA7 i HOXB7 te je jedino kod njih uočeno smanjenje afiniteta za vezanje DNA uslijed poli(ADP)-ribozilacije. Dodatkom duge repeticije bogate glutamatom na C-terminalni motiv proteina HOXB6 dolazi do smanjenja afiniteta za vezanje DNA *in vitro*.

Drugi primjer modifikacijskog enzima je kazeinska kinaza II (CKII) koja fosforilira homeodomena proteina HOX. Međutim, utjecaj ove modifikacije nije jednoznačan kao kod prethodne. Istraživanje je pokazalo kako ova modifikacija kod proteina HOXA9 smanjuje afinitet vezanja za DNA, dok kod HOXB7 povećava. Fosforilacijska mjesta kod HOXB7, serin132 i tirozin203, nakon mutacije u alanin, onemogućavaju fosforilaciju. Podrijetlo i priroda signala koji potiču ove modifikacije još nisu poznati (Zandvakili i Gebelein 2016).

## 6. POJAČIVAČI REGULIRANI PROTEINIMA HOX

Transkripcijski regulatori HOX svojim homeodomenama, prepoznaju i vežu specifične sekvence DNA koje se nazivaju pojačivačima (Pearson i sur. 2005). Takve sekvence, zajedno s promotorima, nose naziv *Cis*-regulatorni elementi (CRE). Mutacije u ovim regijama smatraju se nosiocima fenotipske, osobito morfološke, raznolikosti (Wittkopp i Kalay 2011).

Vežanjem transkripcijskih faktora za pojačivače potiče se ili utišava genska ekspresija. Najčešće je riječ o većem broju pojačivača koji reguliraju ekspresiju jednog gena. Budući da su pojačivači funkcionalno neovisni, mutacije u pojedinim pojačivačima imaju, najčešće, limitirani fenotipski učinak. Pozicija pojačivača u odnosu na gen koji regulira može biti uzvodno, nizvodno, unutar introna ili pak mogu biti locirani daleko od gena. Lokacija funkcionalno homolognih pojačivača je najčešće očuvana između vrsta (Wittkopp i Kalay 2011).

Pojačivači za koje se vežu proteini HOX često sadrže veći broj veznih mjesta za koje se mogu kooperativno vezati sa svojim kofaktorima. Međutim, cijeli mehanizam još nije razjašnjen. Primjer metode koja se koristi za pronalaženje pojačivača temelji se na ciljanoj mutagenezi veznih mjesta za protein HOX unutar pojačivača, zamjenom konsenzus sekvenci koje prepoznaju protein HOX sa sekvencama izrazito niskog afiniteta za divlji tip proteina HOX,

ali visokog afiniteta za protein Bicoid, koji također sadrži homeodomenu, ali s lizinom na poziciji 50 te nije protein HOX. Analizom „otiska prsta“ pomoću DNaze1 potvrđen je manjak interakcija mutiranog pojačivača i proteina HOX. Sljedeći korak je uvođenje komplementarne mutacije u DNA veznom mjestu proteina HOX, tako da sada protein prepoznaje izmijenjeno vezno mjesto proteina HOX. Ukoliko su mutacije uspješno provedene i ukoliko je riječ o pojačivaču, izmijenjeni bi protein trebao djelovati na izmijenjeni pojačivač i to bi trebao biti čvrst dokaz da se doista radi o pojačivaču (Capovilla i sur. 2001). Međutim, malobrojni su pojačivači otkriveni ovom metodom te se češće koristi metoda koja se svodi na testiranje daje li mutirani pojačivač, s uklonjenim svim veznim mjestima proteina HOX, isti fenotip kao i pojačivač divljeg tipa u embriju s uklonjenim pripadajućim proteinom HOX (Pearson i sur. 2005).

Izučavajući veći broj različitih pojačivača s mjestima vezanja proteina HOX, koji su inače varijabilniji u odnosu na promotore, znanstvenici su uočili nekoliko zajedničkih karakteristika. Prva takva karakteristika je tkivna specifičnost. Naime, već spomenuti morfogen *dpp* vinske mušice je aktivan isključivo u visceralnom mezodermu, dok je inaktivan u epitelmalnom i somatskom mezodermu te centralnom neuralnom sustavu, iako je u svim navedenim tkivima prisutan regulatorni protein HOX, UBX. Posljedica je to činjenice da pojačivač *dpp*, osim proteina UBX, veže i transkripcijski faktor Biniou/FoxF, specifičan za visceralni mezoderm. Sličan je mehanizam uočen i kod gena *Dfd* s dva autoaktivacijska pojačivača (Pearson i sur. 2005).

Drugo je karakteristika pojačivača reguliranih s proteinima HOX postojanje većeg broja monomernih veznih mjesta, a nerijetko i veznih mjesta za HOX-PBC te MEIS u neposrednoj blizini (Pearson i sur. 2005).

Važno je, također, istaknuti kako se putem većeg broja bioinformatičkih istraživanja ustvrdilo kako struktura pojačivača HOX ne prati jednostavne uzorke te se s toga njihove pozicije u genomu ne mogu razotkriti jednostavnim pretraživanjem konsenzus sekvenci (Pearson i sur. 2005).

## 7. REGULACIJA EKSPRESIJE GENA *HOX*

### 7.1. Ekspresija uvjetovana modulacijom kromatina

Krajem osamdesetih godina prošlog stoljeća, istraživanjem ranog embrionalnog razvoja u jedinkama roda *Drosophila*, utvrđeno je da je regulacija ekspresije gena *HOX* regulirana na najmanje tri razine. Riječ je o regulaciji transkripcije putem ranijih segmentacijskih gena, sustavu stanične memorije temeljene na proteinskim kompleksima polikomb (polycomb group, PcG) i tritoraks (trxG) te regulacije putem međusobnih interakcija samih gena *HOX*. Utvrđeno je da posteriorniji geni imaju mogućnost represije i suzbijanja funkcije anteriornih gena („posteriorna nadmoć“), odnosno imaju dominantniji fenotip (Kmita i Duboule 2003; Mallo i Alonso 2013; Shah i Sukumar 2010). Međutim, kroz desetljeća istraživanja mehanizama regulacije ekspresije gena te izučavanjem prirode proteina *HOX*, uočeno je da regulacija ekspresije još složenija te da joj se može pridodati još veći broj razina regulacije (Tablica 1.) koji su najvjerojatnije, do neke mjere, umreženi. Danas se u mehanizme regulacije ekspresije gena *HOX* mogu ubrojiti i alternativno prekranje, djelovanje mikroRNA (miRNA), dugih nekodirajućih RNA (lncRNA, long noncoding RNA), trodimenzionalna konformacija kromatina.. Također, važno je istaknuti kako se važnost i prisutnost ovih mehanizama razlikujekod različitih gena *HOX* i organizama u kojima se nalaze (Mallo i Alonso 2013).

Fizikalna svojstva kromatina jedna su od najviše istraženih komponenti regulacije ekspresije gena *HOX*. Stupanj kondenzacije kromatina, u regijama koje sadržavaju specifične gene *HOX* direktno uvjetuje njihovu ekspresiju. U kralježnjaka je uočeno da je prelazak iz rane globalne represije ekspresije gena *HOX* u kolinearnu aktivaciju povezan s razinom heterokromatinizacije kromatina. Zamijećeno je da je vrsta histonske modifikacije kromatina jedan od ključnih faktora regulacije transkripcije gena *HOX*, pri čemu je trostruka metilacija lizina na mjestu 27, trećeg histona, odnosno H3K27m3, represijske naravi, a trostruka metilacija lizina na mjestu 4, istog histona, odnosno H3K4m3, aktivacije naravi. Analizom mišjih embrija je uočeno da u ranijim stupnjevima embrionalnog razvoja u potpunosti prevladava modifikacija H3K27m3 te nedostatak ekspresije gena *HOX*. Kroz vrijeme dolazi do smanjenja modifikacije H3K27m3, koju zamjenjuje aktivirajuća modifikacija H3K4m3, te povećana ekspresija gena *HOX* (Mallo i Alonso 2013; Shah i Sukumar 2010).

U regulaciji modifikacije histona posreduju proteini polikomb i tritoraks, čija djelovanja imaju oprečan utjecaj na ekspresiju gena. Naime, sustav PcG potiče utišavanje gena *HOX* aktivirajući protein PRC2 (polycomb repressive complex 2) i dovodeći do trostruke metilacije

dvadesetsedmog lizina na histonu H3, odnosno oznaku H3K27m3. Ta oznaka sama po sebi nije dovoljna da utiša gene, već to radi kompleks PRC1 koji prepoznaje uvedenu oznaku te dovodi do daljnjih modifikacija, kao što je ubikvitiniranje lizina pozicije 119 na histonu H2A, putem enzima RingB. Mutanti ove E3 ligaze, inače aktivne i u embrionalnim matičnim stanicama (ESC), imaju ekspresiju gena *HOX* na razini koju postižu ESC uslijed diferencijacije, unatoč prisutnim histonskim modifikacijama. Pri tome, ESC predstavljaju tip stanica u najranijim fazama embrionalnog razvoja sisavaca, koje karakterizira izostanak ekspresije gena *HOX* (Mallo i Alonso 2013).

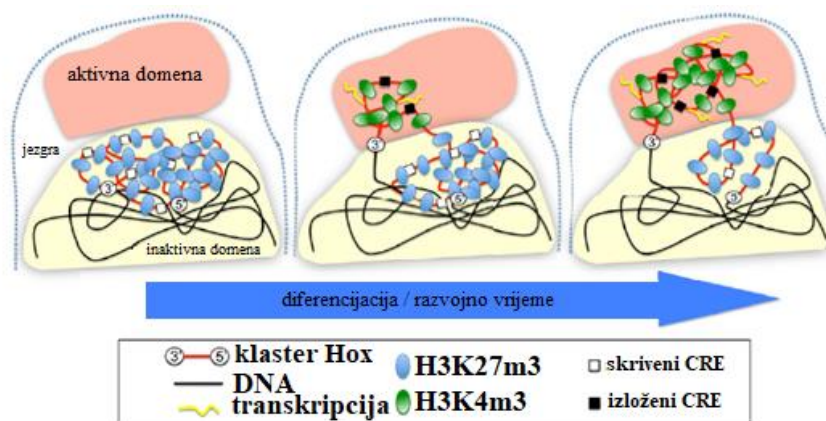
Mehanizam odgovoran za reguliranje aktivnosti PcG na specifičnom lokusu razlikuje se kod vinske mušice, kao predstavnika beskralježnjaka, i kralježnjaka. Kod vinske mušice, kompleks PRC2 asocira s elementima koji vežu polikomb proteine, PRE (polycomb responsive elements). Primjer je element *Fab-7*, koji regulira represiju gena *ANT-C* i *BX-C*. Element *Fab-7* ima funkciju razmaknice između *Cis*-regulatornih elemenata, osiguravajući im autonomnu aktivnost. Delecijom elementa *Fab-7* dolazi do fuzioniranja regulatornih elemenata i „gain of function“ fenotipa. Kod kralježnjaka mehanizam usmjeravanja aktivnosti PcG nije razjašnjen u potpunosti (Hagstrom i sur. 1996; Mallo i Alonso 2013).

Nakon što sustav PcG provede globalnu represiju gena *HOX*, u ranom embrionalnom razvoju, slijedi njihovo postupno aktiviranje, popraćeno uklanjanjem oznaka H3K27m3 u smjeru 3' prema 5'. Specifične histonske demetilaze, npr. Kdm6b i Kdm6a uklanjaju represivne oznake na promotoskim histonima gena *HOX*. Međutim, glavni pokretač aktivacije gena *HOX* je uvođenje aktivacijskih histonskih modifikacija, H3K4m3. Pokazano je kako se uvođenje H3K4m3 oznaka odvija prije uklanjanja H3K27m3 te kako oba procesa, zajedno, dovode do aktivacije klastera *HOX* (Mallo i Alonso 2013).

Za aktivacijske modifikacije H3K4m3 odgovorni su proteini tritoraks. Iako je mehanizam djelovanja još uvijek nepoznat, poznato je kako produkt gena *Mil2*, inače metil transferaza i član sustava tritoraks, stupa u interakciju s histonskom demetilazom Kdm6a. Koordinirane akcije dvaju sustava, PcG i TrxG, rezultiraju formacijom specifičnih trodimenzionalnih kromatinskih konformacija, koje na višem nivou reguliraju ekspresiju gena *HOX* (Mallo i Alonso 2013).

Novija su istraživanja pokazala da je djelovanje modificirajućih sustava ograničeno na specifične regije unutar jezgre nazvane polikombna ili PC tjelešca, te da se, kod vinske mušice, svi inaktivni geni *HOX* nalaze unutar istog PC tijela. Sličan tip lokalizacije inaktivnih

gena u specifične odjeljke u jezgri zamijećen je i u kralježnjaka. Embrionalne matične stanice, deficitantne u nekoj od komponenti sustava PcG, nisu imale pojavu kompaktizacije klastera HOX, prisutne kod divljeg tipa. Nakon segregacije aktivnih i inaktivnih gena HOX u pripadajuće odjeljke, regije iste razine aktivnosti stupaju u međusobne interakcije, neovisno nalaze li se unutar istog klastera. Budući da se aktivnost gena HOX mijenja tijekom razvoja organizama, a odjeljci jezgre koji sadrže gena HOX istog stupnja aktivnosti fiksni, prelazak ovih gena iz jednog stupnja aktivnosti u drugi popraćen je relokacijom u pripadajući jezgrin odjeljak i to linearnim klizanjem kromatinskog vlakna u smjeru 3' prema 5' (Slika 6.) (Mallo i Alonso 2013).



Slika 6. Prelazak stanice iz nediferencirani u diferencirani oblik te popratno relociranje gena HOX iz inaktivne u aktivnu domenu jezgre (Mallo i Alonso 2013).

Iako se očekuje sličan princip trodimenzionalne organizacije kromatina u sva četiri klastera HOX kod sisavaca (*HOXA*, *HOXB*, *HOXC* i *HOXD*), izgledno je da kod njih postoje određene značajke kromatinske organizacije koje su uvjetovane tkivno ili na razini klastera (Mallo i Alonso 2013).

## 7.2. Ekspresija uvjetovana djelovanjem lncRNA

Istraživanja kroz zadnjih desetak godina su potvrdila da duge nekodirajuće RNA molekule, odnosno lncRNA, mogu stupiti u interakciju s transkripcijskim faktorima te kromatinskim modifikatorima. Predložen je model njihova djelovanja prema kojem one usmjeravaju modificirajuće sustave prema specifičnim ciljevima. Primjeri djelovanja lncRNA su zabilježeni i u beskralježnjaka i u kralježnjaka. Jedan ogledni primjer djelovanja lncRNA, u vinske mušice, je RNA molekula *iab-8* koja djeluje represivno na transkripciju gena *abd-A* u posteriornom djelu embrionalnog centralnog živčanog sustava te je primjer efekta

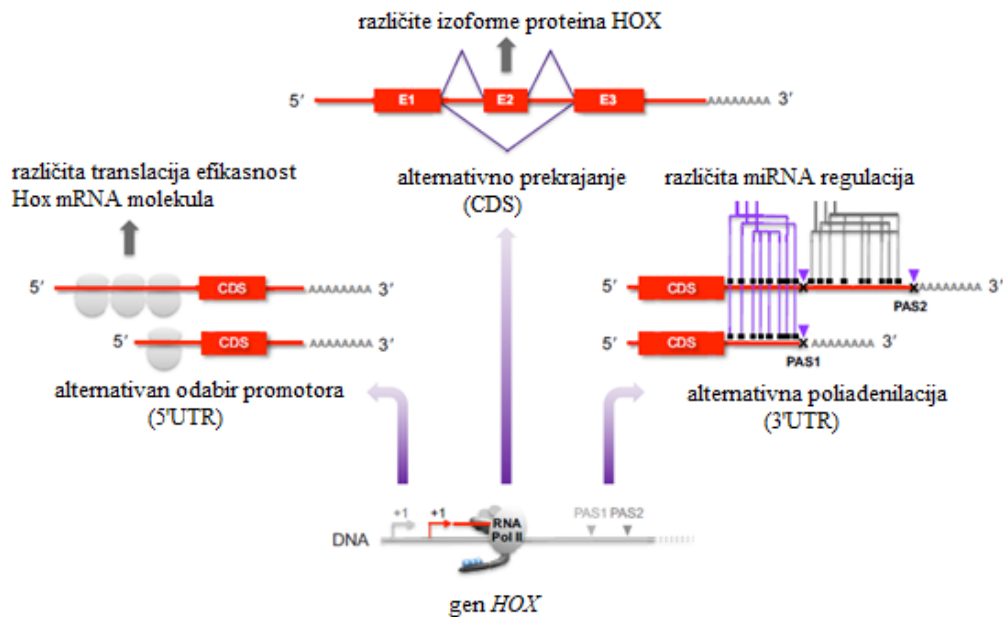
„posteriorne nadmoći“. S druge strane, kod kralježnjaka je zabilježen primjer jedne nekonvencionalne lncRNA pod nazivom *HOTAIR*. Naime, riječ je o molekuli lncRNA koja regulira ekspresiju distalnih gena unutar klastera *HOXD*. Njezina se uloga očituje u usmjeravanju komponenti modificirajućeg sustava histona, PRC2 i histonske demetilaze LSD1 na specifičnim regijama sustava *HOXD*. Dodatnu važnost u otkriću ove lncRNA daje činjenica da je ona slabo konzervirana između ljudi i miševa te da je potencijalno riječ o stjecanju novih uloga u ljudskoj povijesti (Mallo i Alonso 2013).

### 7.3. Ekspresija uvjetovana RNA procesiranjem

Dodatnu razinu kontrole ekspresije gena čini mehanizam procesiranja RNA koji, alatima alternativnog prekrajanja, poliadenilacije i alternativnog odabira promotora, uvjetuje nastanak transkripata različite strukture i informacija (Slika 7.) (Mallo i Alonso 2013).

Djelovanje alternativnog prekrajanja dobro je opisano u primjeru gena *Ubx*, vinske mušice, kojim nastaje šest izoformi, mRNA. Navedene se izoforme razlikuju u malim eksonskim segmentima i/ili u netranskribiranom 3' kraju. Nadalje, istraživanja su pokazala kako različite izoforme transkripta gena *Ubx* imaju različite uloge u razvojnim procesima i kod odraslih jedinki. Tako, primjerice, stresom induciranim alternativnim prekrajanjem transkripta *Ubx* nastaje izoforma *Ia* koja ektopičnom ekspresijom transformira periferni živčani sustav torakalnih parasegmenata u periferni živčani sustav abdomenalnih parasegmenata. S druge strane, uloga koju ima procesiranje RNA, u ukupnoj regulaciji gena *HOX* kralježnjaka, manje je poznata te je zasigurno predmet budućih istraživanja. Uz to, daljnji poticaj za buduća istraživanja, spomenute tematike, je, svakako, dala i neobjavljena bioinformatična analiza koja ukazuje na to da čak trećina mišjih gena *HOX* daje spektar mRNA izoformi, od kojih su brojni očuvani između miševa i ljudi (Mallo i Alonso 2013).





Slika 7. Alati procesiranja RNA: alternativan odabir promotora, alternativno prekranje te alternativna poliadenilacija (Mallo i Alonso 2013).

#### 7.4. Ekspresija regulirana putem miRNA

Molekule mikroRNA obuhvaćaju kratke, nekodirajuće sekvence koje u principu reprimiraju translaciju. Sačinjavaju još jedan vid regulacije ekspresije gena *HOX*, kako u vinske mušice, tako i u kralježnjaka. One se, u sklopu s proteinom Argonaut sparuju s komplementarnim sekvencama segmenta 3' UTR mRNA pojedinih gena te vode ili, degradaciji mRNA ili represiji translacije. Molekule miRNA koje reguliraju gena *HOX* kodirane su genima lociranim unutar klastera HOX (Mallo i Alonso 2013; Pearson i sur. 2005).

Jedan od primjera regulacije putem miRNA je sustav miR-196, sastavljen od tri genska paraloga, *miR-196b*, *miR-196a-1* i *miR-196a-2*, raspoređena u klasterima A, B i C. Sva se tri paraloga nalaze između mišjih gena *HOX9* i *HOX10*, no, osim u miševa, ovakva je konformacija uočena i u zebrice, žabe te čovjeka. Ovakav očuvan raspored gena miRNA sugerira da je riječ o važnim procesima za ispravan razvoj i preživljavanje stanica. Drugi su sustavi miRNA regulacije još drevniji i stoga prisutniji u filogenetski udaljenijim skupinama. Takav je, primjerice, sustav *miR-10*, zabilježen u vinskoj mušici i miševima. S druge strane, sustav *miR-615* je karakterističan samo za sisavce (Mallo i Alonso 2013; Pearson i sur. 2005).

Djelovanje sustava *miR-196* je usmjereno na represiju gena *HOXB8*, čija se aktivnost povećava ako se *miR-196* utiša. Utišavanje navedenog sustava rezultira homeotskim transformacijama, što je još jedan pokazatelj važnosti ovog stupnja regulacije (Mallo i Alonso 2013).

Kod vinske su mušice, osim spomenute miRNA *miR-10*, prisutne još tri regulatorne molekule miRNA, odnosno *miR-iab-4*, *miR-iab-8* i *miR-993*, koje reguliraju ekspresiju većeg broja gena *HOX*. Pozicija *miR-iab-4/8* gena u vinskoj mušici te *miR-196* u mišu ekvivalentna je pozicijama ortologa *HOX* drugih vrsta. No, iznenađujuće, ne postoji preklapanje sekvenca spomenutih gena, sugerirajući kako je do pojave ove regulacije gena *HOX* došlo više puta u evoluciji. Ova otkrića ukazuju kako su regulacijski sustav miRNA i njegovo precizno pozicioniranje u odnosu na gene *HOX* neophodni za njihovu pravilnu ekspresiju (Mallo i Alonso 2013).

#### 7.5. Ekspresija regulirana na razini translacije

Regulacija ekspresije gena *HOX* na razini translacije je još podosta neistražena, iako je zabilježeno nekoliko primjera, u vinskoj mušici i miševima. Primjer su, već višestruko spomenuti, geni *Antp* i *Ubx*, čiju ekspresiju u embrionalnom razvoju regulira specifična translacija transkripta. Transkripti ovih gena sadrže unutarnje vezno mjesto za ribosom, sekvencu IRES, te je stoga omogućena translacija neovisna o kapi na mRNA (CITE). Kod ovakvog tipa translacije, mRNA ne treba sadržavati kapu na 5' kraju transkripta, koju inače prepoznaje ribosom, već je sekvenca IRES dovoljna da bi ribosom vezao transkript i pokrenuo translaciju. Sekvenca IRES je na transkriptima ovih gena prisutna u ranom embrionalnom razvoju vinske mušice te se pretpostavlja da ima ulogu u vremenskoj i prostornoj kontroli translacije. Važno je istaknuti kako ova razina regulacije mora biti koordinirana s transkripcijom i prekrajanjem jer se sekvenca IRES javlja kao posljedica odabira alternativnog promotora, a zatim i specifičnim prekrajanjem (Mallo i Alonso 2013).

Kod miševa je regulacija ekspresije gena *HOX* putem translacije, uočena 2003. godine, kada je, promatranjem razvoja leđne moždine, zapaženo nepreklapanje područja rasprostranjenosti transkripta gena *HOXB4* i njegovog proteina. Naime, ovaj oblik regulacije je tkivno specifičan. Transkript je široko rasprostranjen, a protein lokaliziran na područje paraksijalnog mezoderma (Mallo i Alonso 2013).

Tablica 1. Pregled regulacijskih mehanizama ekspresije gena *HOX* vinske mušice (*Drosophila melanogaster*) i miša (*Mus musculus*), karakterističnih predstavnika skupine beskralježnjaka i kralježnjaka (Mallo i Alonso 2013).

| <b>regulacijski mehanizam</b>       | <i>Drosophila melanogaster</i> | <i>Mus musculus</i> |
|-------------------------------------|--------------------------------|---------------------|
| dinamika jezgre                     | da                             | da                  |
| remodeliranje kromatina (rana faza) | ne                             | da                  |
| remodeliranje kromatina             | da                             | da                  |
| transkripcijska regulacija          | da                             | da                  |
| regulacija putem lncRNA             | da                             | da                  |
| procesiranje RNA                    | da                             | da                  |
| regulacija putem miRNA              | da                             | da                  |
| regulacija translacije              | vjerojatno                     | da                  |

## 8. ULOGA GENA *HOX* U RAZVOJU TUMORA

S obzirom na važnost gena *HOX* za pravilni razvoj organizama, nije iznenađujuće da njihova mutacija ili neispravna regulacija rezultira pojavama patološke prirode. Budući da je spektar bolesti i deformacija, povezanih s genima *HOX* dosta širok, kao primjer je odabrana njihova povezanost s razvojem tumora (Quinonez i Innis 2014; Shah i Sukumar 2010).

Neki karcinomi mogu imati poremećenu ekspresiju gena *HOX*, a potencijalni mehanizmi, kojima je došlo do navedene pojave, su višebrojni. Tako je, primjerice, u nekim tkivima uočeno utišavanje određenih gena *HOX* koji djeluju kao tumor supresori. U drugim tkivima, poremećena prostorno-vremenska ekspresija gena *HOX* ima onkogeni efekt. Uloga pojedinog gena *HOX* nije nužno jednoznačna, ali je često tkivno specifična. Npr. gen *HOXB13*, ovisno o tipu tkiva može djelovati kao tumor supresor ili onkogen (Shah i Sukumar 2010). Međutim, iako je zapaženo kako je uzorak ekspresije pojedinih proteina *HOX* karakterističan za tip tkiva i mjesto tumora, uočene su i određene pravilnosti u općoj ekspresiji gena *HOX* u tumorskim tkivima. Ekspresija je porodice *HOXC* povišena u većine tumora, npr. debelog crijeva, pluća i prostate. U tumorima je najčešće promijenjena ekspresija gena *HOXA9* i *HOXB13*, pri čemu je gen *HOXA* povezana s karcinomima dojke i jajnika, a *HOXB* s karcinomom debelog crijeva. Međutim, vjerojatno najbolji prikaz uključenosti gena *HOX* u tumorigenezi je činjenica da, od ukupno 39 ljudskih gena *HOX*, samo dva (*HOXC10* i *HOXC12*) nemaju izmijenjene uzorke ekspresije u tumorskom tkivu (Bhatlekar i sur. 2014).

Pokušalo se odrediti mehanizam kojim geni *HOX* djeluju na tumorigenezu, odnosno tumor supresiju. Prva je mogućnost da je u tumorima promijenjen prostorno-vremenski uzorak ekspresije gena *HOX*, a druga da dolazi do povećane ekspresije gena *HOX*. Postoji i mogućnost da se određeni geni *HOX*, aktivni u zdravome tkivu, uslijed epigenetičkih promjena, metilacije DNA u području CpG otoka i djelovanja proteina sustava polikomb i tritoraks, utišavaju te tako više ne djeluju kao tumorski supresori (Shah i Sukumar 2010).

## 9. ZAKLJUČAK

Obnašanje funkcije transkripcijskih regulatora velikog broja razvojnih procesa u ranoj fazi embrionalnog razvoja, diferencijacija pojedinih populacija stanica te tumor-supresijsko djelovanje samo su neki od procesa na koje značajan utjecaj ima skupina transkripcijskih faktora HOX. Poremećena ravnoteža u njihovoj ekspresiji rezultira vidljivim morfološkim promjenama koje odudaraju od klasičnog fenotipa jedinke neke vrste te se kao najekstremniji primjer takve promjene navode homeotičke transformacije, čije je proučavanje dovelo do otkrića ove skupine gena.

Kako bi se osigurao ispravan razvoj organizma, kroz 600 milijuna godina duge povijesti gena *HOX* razvili su se brojni mehanizmi koji su većinski prisutni i u kralježnjaka i beskralježnjaka. Ekspresija je gena *HOX* tako regulirana pomoću specifične trodimenzionalne konformacije kromatina, sustava miRNA te lncRNA molekula, različitih oblika procesiranja RNA te regulacijski aktivnosti na razini translacije. Važnost ovih mehanizama pokazuje činjenica kako su se neke od navedenih regulatornih razina pojavile više puta u evoluciji.

Kako bi se osigurala što finija regulacija, faktori HOX, koji se kao monomeri ne razlikuju značajno u afinitetu za različite CRE-ove, stupaju u interakcije s nizom kofaktora, koji im na različite načine mijenjaju svojstva te u konačnici omogućuju da paralozi HOX provode različite aktivnosti *in vivo* unutar istog staničnog tipa.

Mehanizmi djelovanja kojima faktori HOX, posredno, utječu na morfologiju organizama obuhvaćaju procese stanične adhezije i regulacije staničnog ciklusa, potom staničnu migraciju te regulaciju stanične smrti. Pojava je greške u ekspresiji gena *HOX* nerijetko popraćena nekim od brojnih poremećaja koji se nalaze u spektru induciranih morfoloških promjena proteinima HOX. Međutim, spoznaje koje su znanstvenici akumulirali kroz posljednja desetljeća intenzivnih istraživanja na području ove tematike, daju nadu da će se one moći iskoristiti kao vrijedni alati u dijagnostici ili terapiji.

## 10. LITERATURA

- 1 Baëza, M., Viala, S., Heim, M., Dard, A., Hudry, B., Duffraisse, M., Rogulja-Ortmann, A., Brun, C., & Merabet, S. (2015). Inhibitory activities of short linear motifs underlie Hox interactome specificity in vivo. *ELife*, 4.
- 2 Beurier, G., Michel, F., Ferber, J., & Beurier, G. (2005). *Towards an evolution model of multiagent organisms*.
- 3 Bhatlekar, S., Fields, J. Z., & Boman, B. M. (2014). *HOX genes and their role in the development of human cancers*.
- 4 Capovilla, M., Kambris, Z., & Botas, J. (2001). Direct regulation of the muscle-identity gene *apterous* by a Hox protein in the somatic mesoderm. *Development*, 128(8), 1221–1230.
- 5 Duncan, I., & Montgomery, G. (2002). E. B. Lewis and the Bithorax Complex: Part I. *Genetics*, 160(4), 1265–1272.
- 6 Foos, N., Maurel-Zaffran, C., Maté, M. J., Vincentelli, R., Hainaut, M., Berenger, H., Pradel, J., Saurin, A. J., Ortiz-Lombardía, M., & Graba, Y. (2015). A Flexible extension of the *drosophila* ultrabithorax homeodomain defines a Novel Hox/PBC interaction mode. *Structure*, 23(2), 270–279.
- 7 Hagstrom, K., Muller, M., & Schedl, P. (1996). Fab-7 functions as a chromatin domain boundary to ensure proper segment specification by the *Drosophila* bithorax complex. *Genes & Development*, 10(24), 3202–3215.
- 8 Kmita, M., & Duboule, D. (2003). Organizing axes in time and space; 25 years of colinear tinkering. *Science*, 301(5631), 331–333.
- 9 Laurent, A., Bihan, R., Omilli, F., Deschamps, S., & Pellerin, I. (2008). PBX proteins: much more than Hox cofactors. *International Journal of Developmental Biology*, 52(1), 9–20.
- 10 Longo, A., Guanga, G. P., & Rose, R. B. (2007). Structural basis for induced fit mechanisms in DNA recognition by the Pdx1 homeodomain. *Biochemistry*, 46(11), 2948–2957. Preuzeto 25.8.2022. s RCSB Protein Data Bank.
- 11 Mallo, M., & Alonso, C. R. (2013). The regulation of Hox gene expression during animal development. *Development (Cambridge)*, 140(19), 3951–3963.

- 12 Merabet, S., Kambris, Z., Capovilla, M., Bérenger, H., Pradel, J., & Graba, Y. (2003). The hexapeptide and linker regions of the AbdA Hox protein regulate its activating and repressive functions. *Developmental Cell*, 4(5), 761–768.
- 13 Moreira, D., & López-García, P. (2011). Paralogous Gene. *Encyclopedia of Astrobiology*, 1215–1215.
- 14 Pearson, J. C., Lemons, D., & McGinnis, W. (2005). Modulating Hox gene functions during animal body patterning. *Nature Reviews Genetics* 2005 6:12, 6(12), 893–904.
- 15 Quinonez, S. C., & Innis, J. W. (2014). Human HOX gene disorders. *Molecular Genetics and Metabolism*, 111(1), 4–15.
- 16 Shah, N., & Sukumar, S. (2010). The Hox genes and their roles in oncogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 10(5), 361–371.
- 17 Viola, I. L., & Gonzalez, D. H. (2016). Structure and Evolution of Plant Homeobox Genes. *Plant Transcription Factors: Evolutionary, Structural and Functional Aspects*, 101–112.
- 18 Wittkopp, P. J., & Kalay, G. (2011). Cis-regulatory elements: molecular mechanisms and evolutionary processes underlying divergence. *Nature Reviews Genetics* 2011 13:1, 13(1), 59–69.
- 19 Zandvakili, A., & Gebelein, B. (2016). Mechanisms of specificity for hox factor activity. *Journal of Developmental Biology*, 4(2)

## 11. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 4.5.2000. u Trogiru gdje sam završio Osnovnu školu Majstora Radovana te Glazbenu školu Josipa Hatzea. Nakon završenog osnovnoškolskog obrazovanja upisujem smjer Opća gimnazija Srednje škole Ivana Lucića. Za vrijeme srednjoškolskog obrazovanja sudjelujem u projektu Centra Izvrsnosti Splitsko-dalmatinske županije, u prirodoslovnoj sekciji, te postajem aktivni član puhačkog orkestra Narodne glazbe Trogir. Nakon maturiranja, 2019. godine, upisujem Preddiplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu te sam trenutno student treće godine spomenutog studija. Tijekom studiranja sam kao volonter sudjelovao u Noći muzeja 2020. godine te sam odradio Laboratorijsku stručnu praksu na Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, sudjelujući na projektu Uloga peroksidaza i kaloze u obrambenom odgovoru biljaka na infekciju viroidom vretenastog gomolja krumpira (PSTVd) pod vodstvom dr.sc. Snježane Mihaljević (2022. godina).