

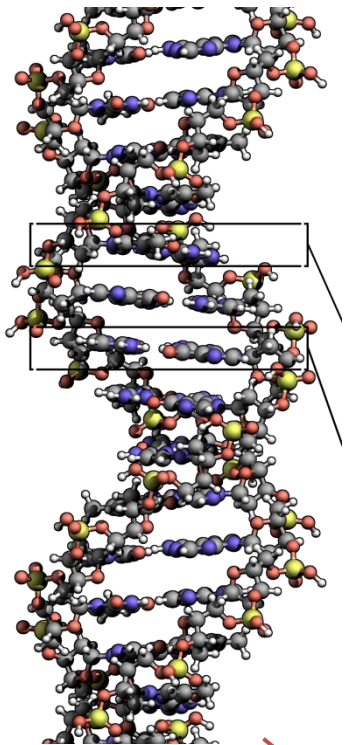
Μεταγραφή

- Τα γενικά χαρακτηριστικά της μεταγραφής
- Μεταγραφή στους προκαρυωτικούς οργανισμούς
- Ωρίμανση του RNA στους προκαρυωτικούς οργανισμούς
- Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης στους προκαρυωτικούς οργανισμούς
- Μεταγραφή στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς
- Ωρίμανση του RNA στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς
- Γενικές αρχές για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς

Βιβλιογραφία

- Μοριακή βιολογία του γονιδίου, Watson, Baker, Bell, Gann, Levine, Losick, 7^η έκδοση, Εκδόσεις Utopia
Κεφάλαια 13 και 14 και στοιχεία από 18 και 19.
- Molecular Biology, principles and practice, Cox, Doudna, O'Donell, 1st edition, Freeman publishing
- Genomes 3, T.A. Brown, Garland Science
- Εισαγωγή στη Μοριακή Βιολογία, Ρ. Λεκανίδου, Σ. Τσιτήλου, Γ.Κ. Ροδάκης, Σημειώσεις Τμήματος Βιολογίας
- Color Atlas of Biochemistry, Koolman, Roehm, 3rd edition, Thieme
- Βασικές αρχές Μοριακής Βιολογίας, Burton E. Tropp, Ελληνική έκδοση, Ακαδημαϊκές εκδόσεις 2015
- Επιστημονικά άρθρα, ανασκοπήσεις όπως αναφέρονται στις διαφάνειες.

Το κεντρικό δόγμα της μοριακής βιολογίας



DNA

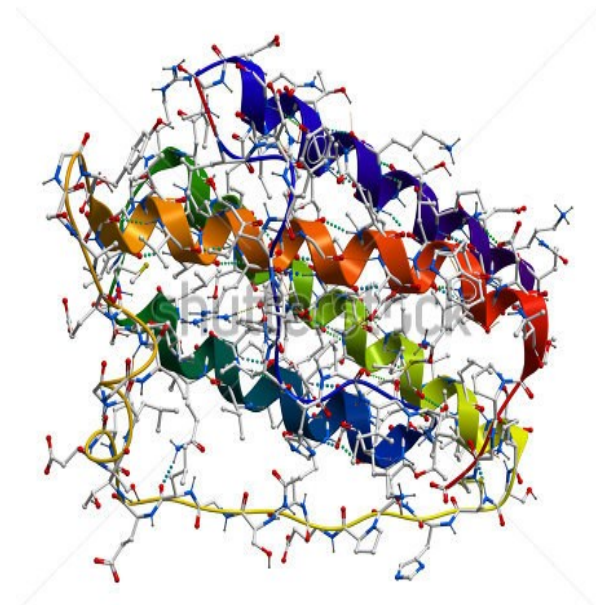
Αντιγραφή

Μεταγραφή



RNA

Μετάφραση

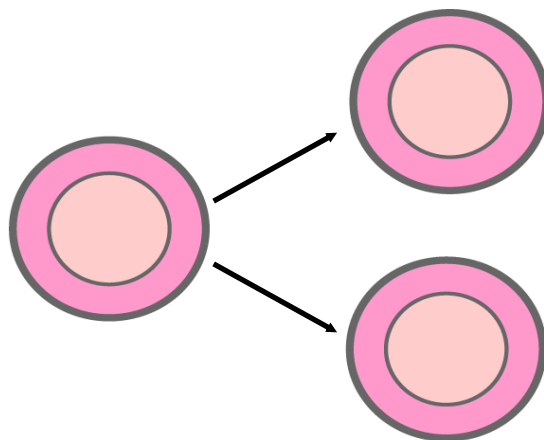


Πρωτεΐνη

Πέρα από τις μηχανιστικές διαφορές μεταξύ της αντιγραφής και της μεταγραφής, μια σημαντική διαφορά είναι αυτή που αναφέρεται στους διαφορετικούς σκοπούς που εξυπηρετούνται από αυτές τις διαδικασίες.

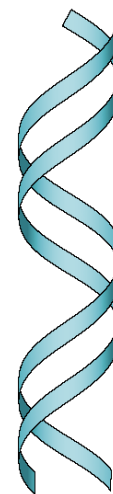
Αντιγραφή του DNA

Κυτταρική διαίρεση

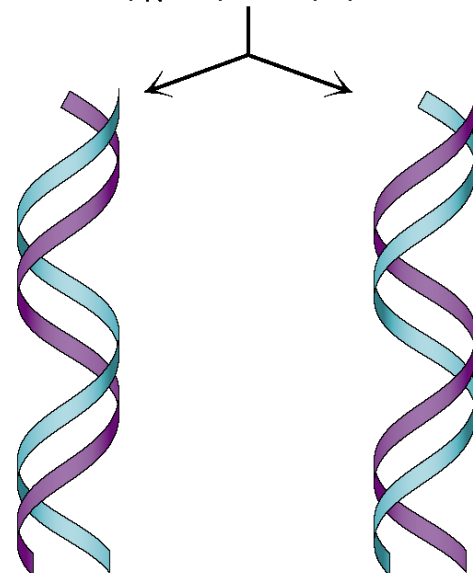


Αντιγράφεται ολόκληρο το γονιδίωμα πριν από κάθε κυτταρική διαίρεση.

Η αντιγραφή του DNA γίνεται με «ημισυντηρητικό» μηχανισμό. Δηλαδή κάθε μια από τις θυγατρικές αλυσίδες χρησιμοποιεί ως εκμαγείο για τη σύνθεσή της μια μητρική αλυσίδα.



Αρχικό γονικό μόριο



Θυγατρικά μόρια της πρώτης γενεάς

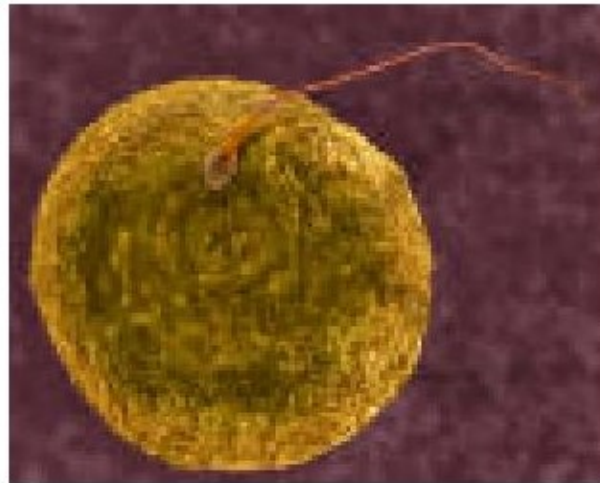
Μεταγραφή του DNA

Αποτελεί το πρώτο βήμα στην έκφραση της γενετικής πληροφορίας.

Μεταγράφονται επιλεκτικά περιοχές του γονιδιώματος παράγοντας από ένα μικρό έως πολύ μεγάλο αριθμό αντιτύπων RNA.

Αποτέλεσμα, στο ίδιο κύτταρο σε διαφορετικές χρονικές στιγμές ή σε διαφορετικά κύτταρα ενός πολυκύτταρου οργανισμού να συντίθενται διαφορετικές πρωτεΐνες.

Τόσο η
αναπτυξιακή
πορεία ενός
οργανισμού



Sperm and egg



A human being

όσο και η **κυτταρική διαφοροποίηση** εξαρτώνται κύρια από την **μεταγραφική ρύθμιση**.



Neuron



Macrophage



Muscle

Προϊόντα της μεταγραφής

mRNA (messenger RNA): Μήνυμα RNA

Φέρει την πληροφορία για τη σύνθεση των πρωτεϊνών

Ribosomal RNA-rRNA: Ριβοσωμικό RNA

Βασικό συστατικό των ριβοσωμάτων

Transfer RNA-tRNA: Μεταφορικό RNA

Μεταφέρει τα αμινοξέα στα ριβοσώματα

Small nuclear RNA-snRNA: Μικρά πυρηνικά RNA

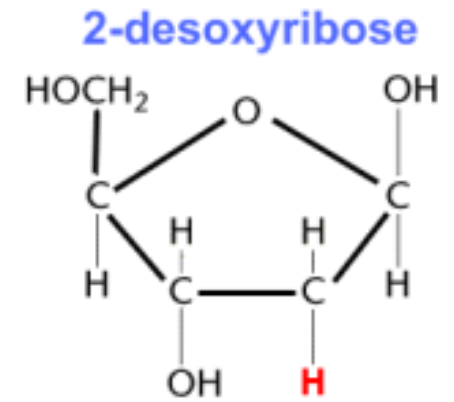
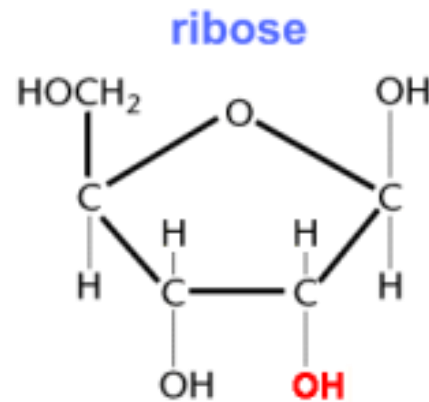
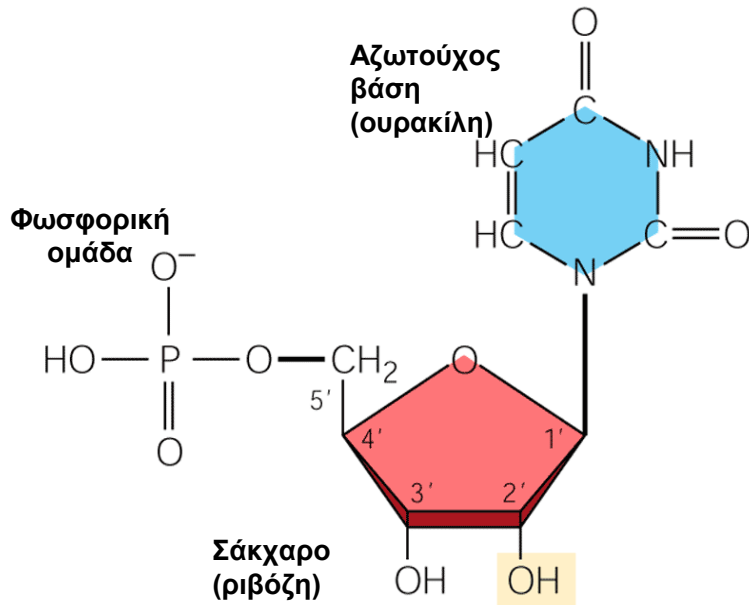
Συμμετέχουν στην ωρίμανση των προδρόμων μορίων pre-mRNA pre-rRNA

miRNA και siRNA- microRNA και short interfering RNA: μικρο RNA και μικρά παρεμβατικά RNA παίζουν ρυθμιστικούς ρόλους σε σημαντικές βιολογικές λειτουργίες

μεγάλα μη-κωδικά -long noncoding RNA

κυκλικά - circular RNAs

Το RNA είναι πολυμερές ριβονουκλεοτιδίων



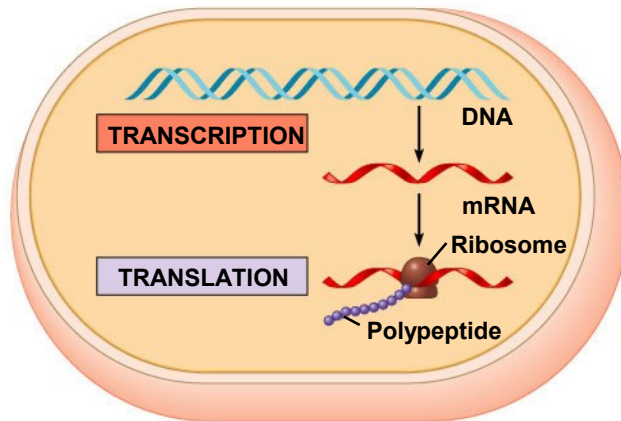
Ομοιότητες αντιγραφής – μεταγραφής

- Και στις δύο περιπτώσεις **μήτρα** είναι το DNA.
- Πραγματοποιείται σύνθεση φωσφοδιεστερικών δεσμών.
- Η κατεύθυνση σύνθεσης της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας είναι 5'→3'

Διαφορές αντιγραφής – μεταγραφής

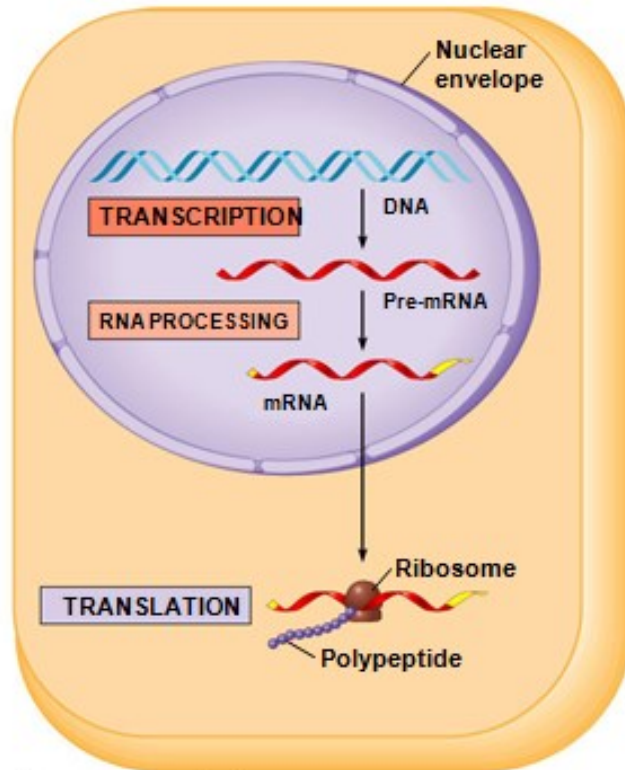
	Αντιγραφή	Μεταγραφή
Υπόστρωμα	dNTP	NTP
Πρωταρχικό τμήμα	ναι	όχι
Ένζυμο	DNA πολυμεράση	RNA πολυμεράση
Προϊόν	dsDNA	ssRNA
Ζεύγη βάσεων	A-T, G-C	A-U, T-A, G-C

ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ-ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ



(a) Προκαρυωτικό κύτταρο

Πραγματοποιούνται στον ίδιο τόπο, την ίδια χρονική στιγμή.



(b) Ευκαρυωτικό κύτταρο

Διακριτές τοπολογικά και χρονικά διαδικασίες.

Ποια αλυσίδα χρησιμοποιείται ως μήτρα για τη σύνθεση του RNA;

5'----- **G C A G T A C A T G T C**----- 3'

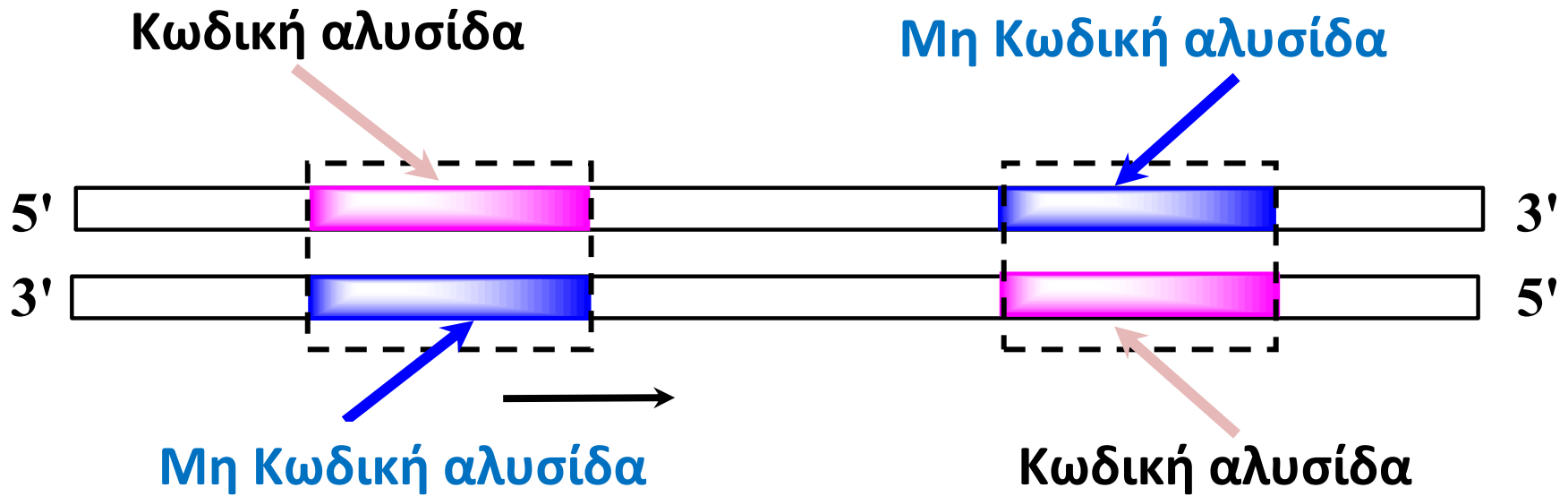
Κωδική αλυσίδα

3'----- **C G T C A T G T A C A G**----- 5'

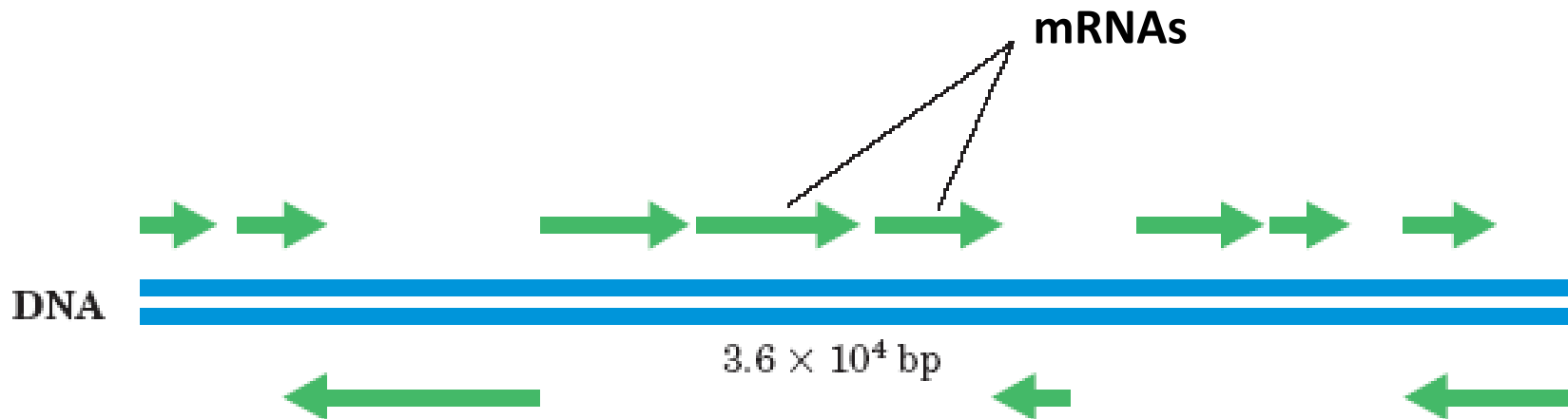
Μη κωδική
αλυσίδα
(μεταγραφόμενη)



5'----- **G C A G U A C A U G U C**----- 3' **RNA**



Οργάνωση της γενετικής πληροφορίας
στο γονιδίωμα του Αδενοϊού.



ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΜΟΝΑΔΑ



Η περιοχή του DNA που μεταγράφεται από ένα σημείο έναρξης ως ένα σημείο λήξης, αποτελεί μία μεταγραφική μονάδα, ανεξάρτητα από το αν περιλαμβάνει ένα μόνο γονίδιο ή μια ομάδα γονιδίων.

ΥΠΟΚΙΝΗΤΗΣ

Υποκινητής (promoter): Αλληλουχία που αναγνωρίζει και προσδένεται η RNA πολυμεράση ή οι πρωτεΐνες που προσελκύουν στη συνέχεια την RNA πολυμεράση (στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς) στο DNA

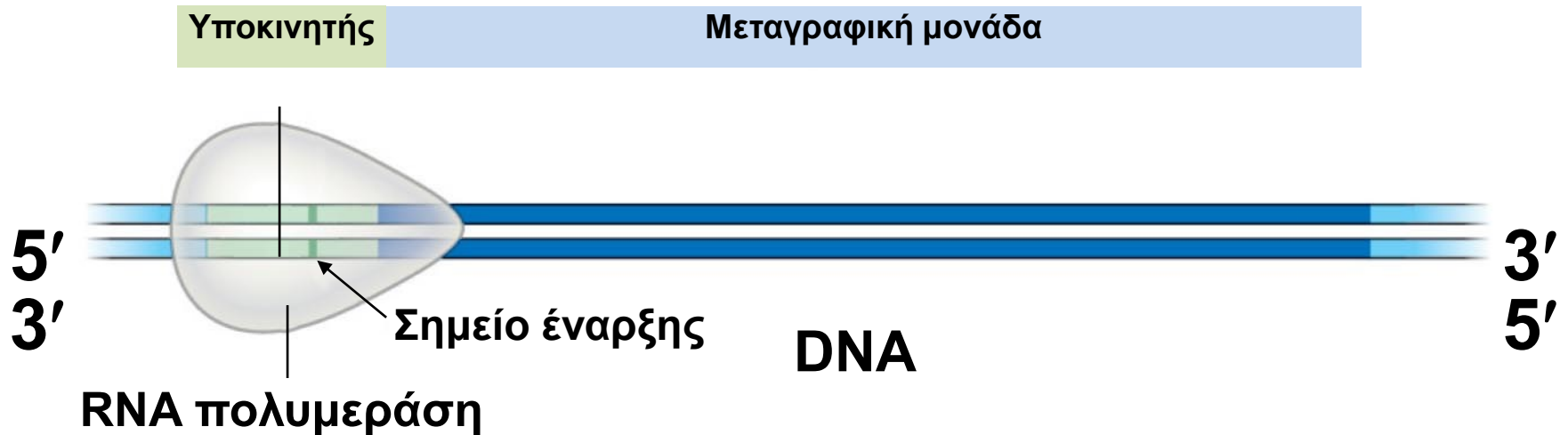
- Ένας υποκινητής μπορεί να ελέγχει τη μεταγραφή ενός μόνο γονιδίου ή μιας ομάδας γονιδίων.
- Οι υποκινητές είναι υπεύθυνοι για την αποτελεσματικότητα της μεταγραφής. Μεταλλαγές στην αλληλουχία του υποκινητή μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή αυξημένης ή ελαττωμένης ποσότητας RNA.

Στάδια της μεταγραφής

Έναρξη (initiation): Πρόσδεση της RNA πολυμεράσης στην συγκεκριμένη αλληλουχία του υποκινητή, δημιουργία του συμπλόκου έναρξης και τοπική αποδιάταξη του DNA.

Επιμήκυνση (elongation): Σύνδεση ριβονουκλεοτιδίων με φωσφοδιεστερικό δεσμό βάσει συμπληρωματικότητας με την μη κωδική αλυσίδα υπό την δράση της RNA πολυμεράσης

Λήξη (termination): Απομάκρυνση του ενζύμου και του συντιθέμενου μορίου RNA, επαναδιάταξη της αλυσίδας DNA.



RNA πολυμεράσες

- Στα **Αρχαία** υπάρχει μία μόνο RNA πολυμεράση, δομικά όμοια με τις ευκαρυωτικές.
- Η **βακτηριακή** RNA πολυμεράση διαφέρει σημαντικά, αποτελείται από 5 υπομονάδες ($\alpha_2\beta\beta'\sigma$) και έχει μοριακό βάρος ~480kD.
- Όμοια με την βακτηριακή είναι αυτή των **χλωροπλαστών** ενώ διαφέρει σημαντικά και ομοιάζει με την RNA πολυμεράση του φάγου η RNA πολυμεράση των **μιτοχονδρίων**.

Ευκαρυωτικές RNA πολυμεράσες:

Πολυμεράση	Γονίδια που μεταγράφονται από την δράση της
RNA πολυμεράση I	28S, 5.8S και 18S ριβοσωμικό RNA (rRNA γονίδια)
RNA πολυμεράση II	mRNA, snRNA γονίδια, miRNA γονίδια
RNA πολυμεράση III	Γονίδια για μεταφορικά RNA (tRNA), 5S rRNA, U6 snRNA, snoRNA

Η αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνικών μορίων με συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA ή του RNA είναι καθοριστικής σημασίας για την επίτευξη και ρύθμιση της μεταγραφής.

Οι **πρωτεΐνες** (δομικές, ρυθμιστικές, ένζυμα) αλληλεπιδρούν τόσο με DNA όσο και με RNA σε διάφορα στάδια για να εξασφαλίζουν την **δομική σταθερότητα**, την ομαλή **γονιδιακή έκφραση**, και την **ρύθμισή** της.

Λειτουργία	Παραδείγματα
Πρωτεΐνες που προσδέονται σε DNA	
Γονιδιακή έκφραση	Υπομονάδα σ της βακτηριακής RNA πολυμεράσης, ευκαρυωτικοί ενεργοποιητές και καταστολείς, RNA πολυμεράσες, Βακτηριακοί καταστολείς
Οργάνωση DNA	Ευκαρυωτικές ιστόνες, πρωτεΐνες του βακτηριακού «χρωμοσώματος»
Ανασυνδυασμός DNA	RecA
Αντιγραφή DNA	DNA πολυμεράσες και λιγάσες, SSB (Single Strand Binding proteins), DNA τοποϊσομεράσες
Άλλες λειτουργίες	Προκαρυωτικές περιοριστικές ενδονουκλεάσες
Πρωτεΐνες που προσδέονται σε RNA	
Επεξεργασία RNA	snRNP πρωτεΐνες
Σταθεροποίηση mRNA	Ευκαρυωτικές πρωτεΐνες που δεσμεύονται στο κάλυμμα και στην Poly(A) ουρά.
Μετάφραση	Παράγοντες ρύθμισης της μετάφρασης
Αποικοδόμηση και επεξεργασία RNA	Ριβονουκλεάσες
Συστατικά ριβοσώματος	Ριβοσωμικές πρωτεΐνες

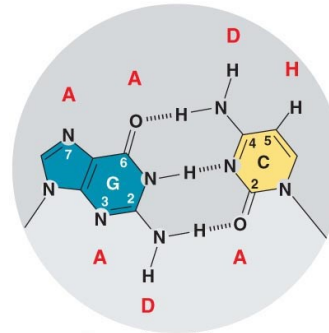
Πώς πραγματοποιούνται οι αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών - DNA

Αναγνώριση μιας αλληλουχίας DNA:

- Πραγματοποιείται μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ χημικών ομάδων των αζωτούχων βάσεων που εκτίθενται μέσω της μικρής και της μεγάλης αύλακας
- Σταθεροποιείται περαιτέρω από τη γενικότερη στερεοδιαμόρφωση μιας περιοχής με συγκεκριμένη αλληλουχία DNA.

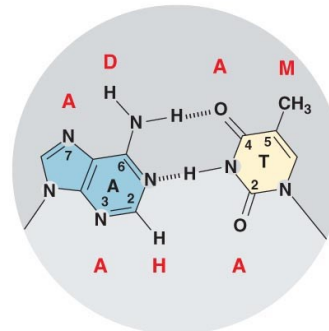
Οι βάσεις που εκτίθενται στη μεγάλη αύλακα ξεχωρίζουν αβίαστα ενώ αυτές της μικρής αύλακας αναγνωρίζονται ως ζεύγος (αν δηλαδή πρόκειται για θέση ζεύγους A-T ή G-C).

μεγάλη αύλακα



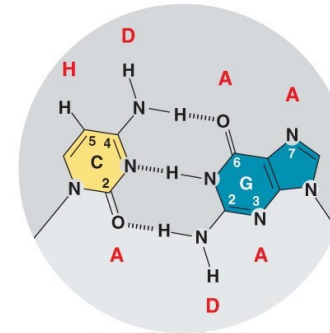
μικρή αύλακα

μεγάλη αύλακα



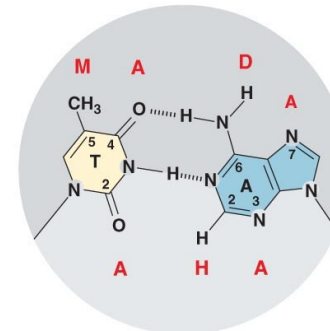
μικρή αύλακα

μεγάλη αύλακα



μικρή αύλακα

μεγάλη αύλακα



μικρή αύλακα

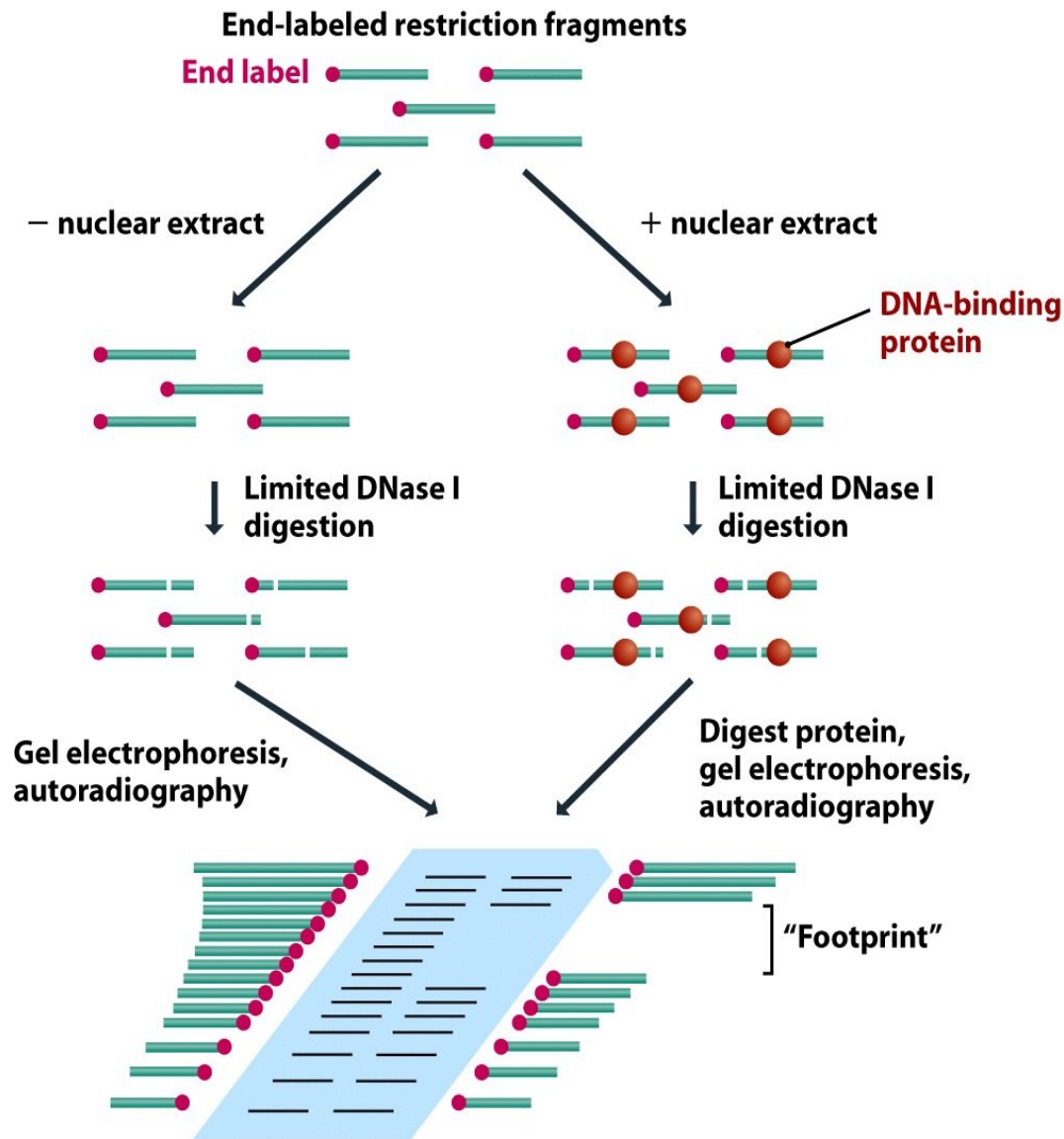
Αλληλεπιδράσεις μεταξύ DNA και πρωτεϊνών:

Είναι πάντα **μη ομοιοπολικές** και κυρίως δεσμοί υδρογόνου, ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και αλληλεπιδράσεις Van der Waals.

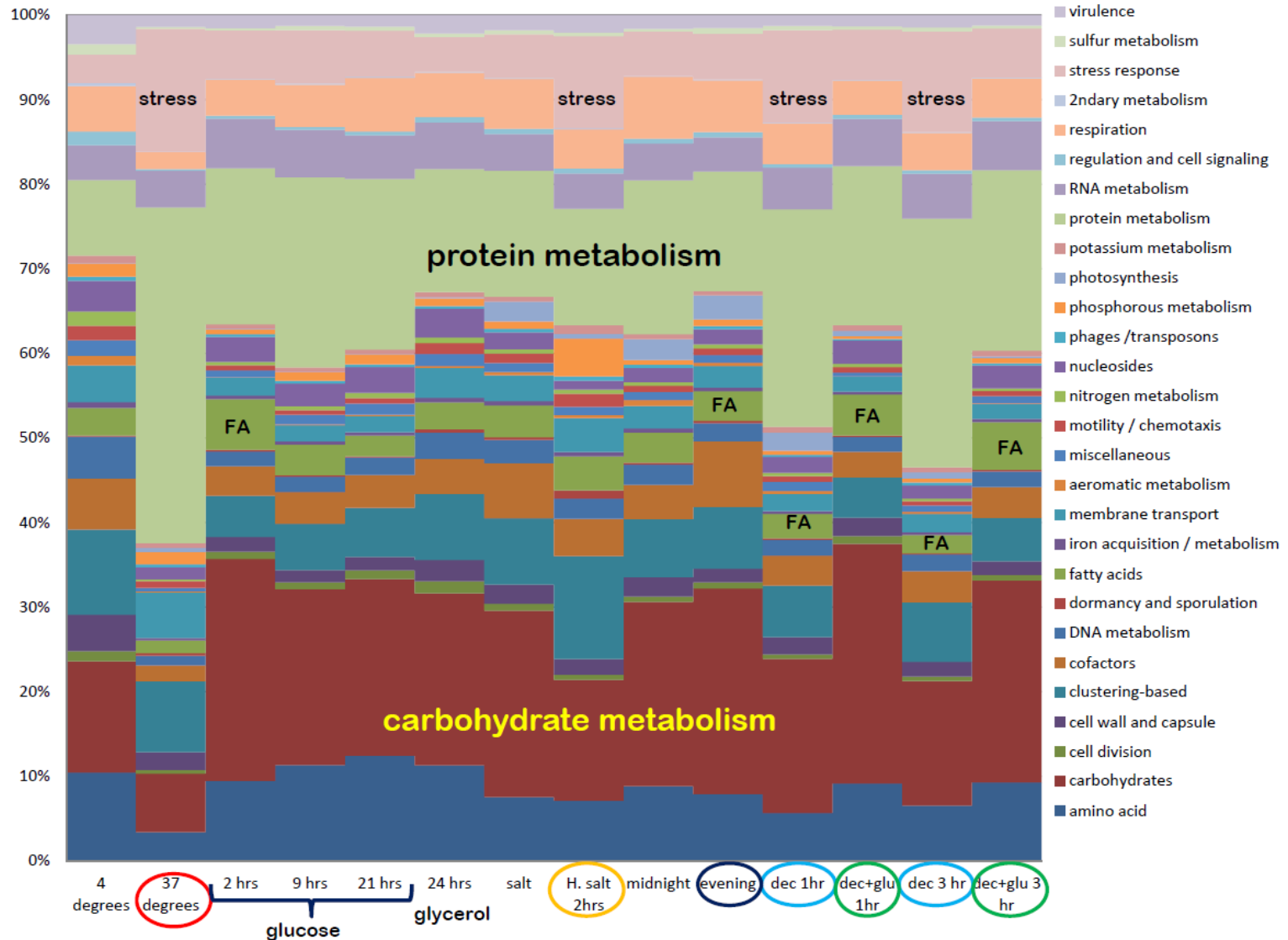
- Κάθε πρωτεΐνη που προσδένεται σε DNA μπορεί να αλληλεπιδράσει είτε ειδικά με συγκεκριμένες αλληλουχίες είτε μη ειδικά. Οι ειδικές αλληλεπιδράσεις ευνοούνται θερμοδυναμικά.
- Οι περισσότερες από αυτές αλληλεπιδρούν στην μεγάλη αύλακα.

Η ειδικότητα βελτιώνεται όταν οι πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν ως διμερή με το DNA.

Μεθοδολογία εύρεσης αλληλουχιών του DNA όπου προσδένονται ειδικές πρωτεΐνες.

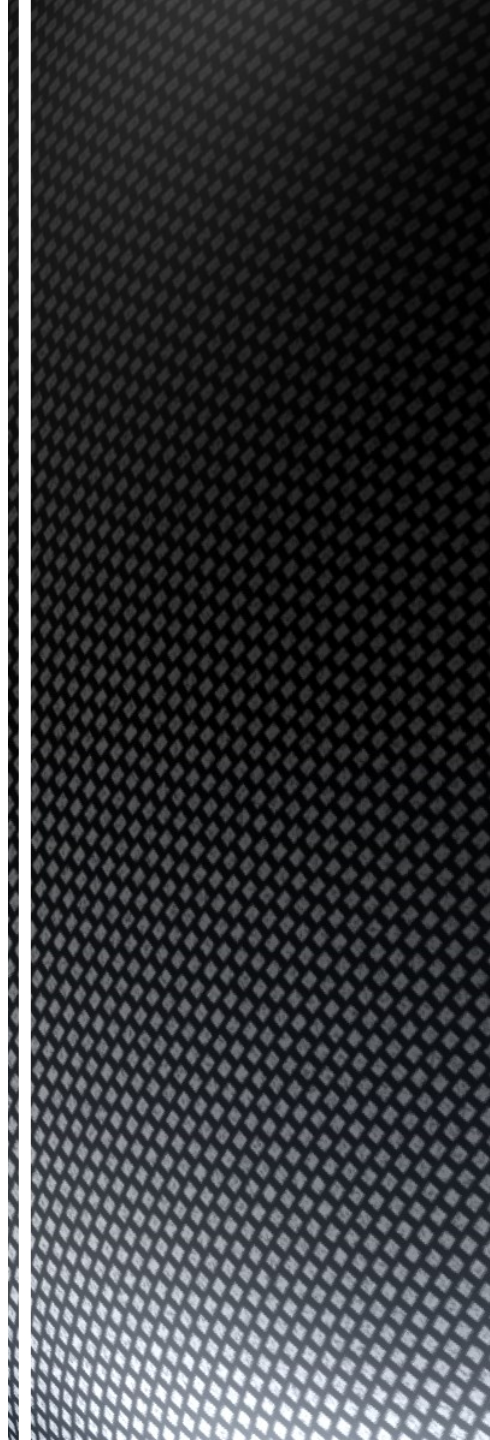


Μεταγράψωμα: Το σύνολο των RNA μορίων που εκφράζονται σε ένα κύτταρο, ιστό ή οργανισμό ανά πάσα στιγμή. Προκύπτει από την αυστηρά ρυθμιζόμενη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων αλλά και την ρύθμιση του ρυθμού αποικοδόμησης των RNA.

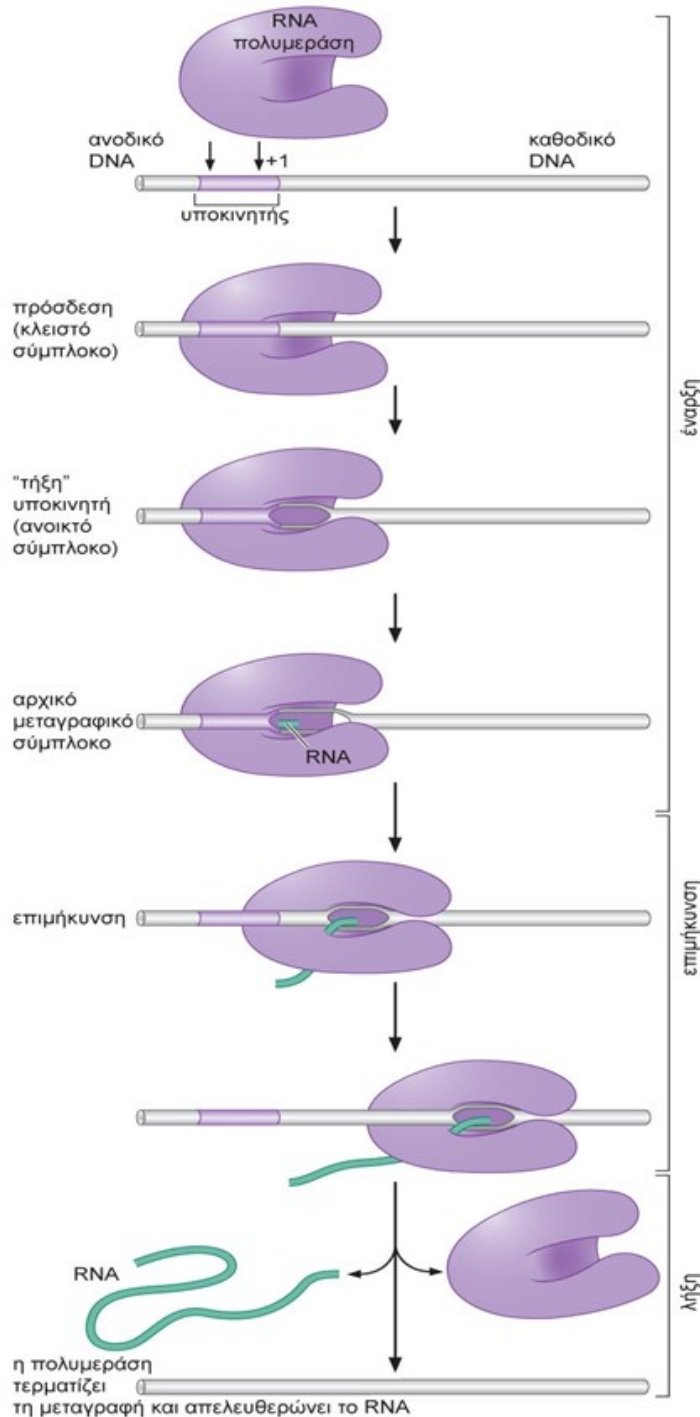


Μεταγραφή στους προκαρυωτικούς οργανισμούς

Εισαγωγή στη Μοριακή Βιολογία



Η μεταγραφή στους προκαρυωτικούς οργανισμούς

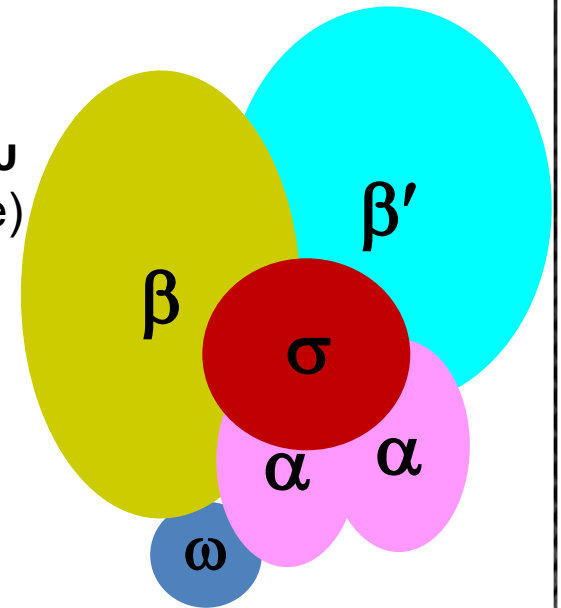


- RNA πολυμεράση στην *E.coli*
- Υποκινητές
- Παράγοντας σ
- Έναρξη της μεταγραφής
- Επιμήκυνση
- Λήξη της μεταγραφής

RNA πολυμεράση στην *E.coli*

Αποτελείται από πέντε υπομονάδες:
Δύο πανομοιότυπες α υπομονάδες
και από μία β , β' και ω

Πυρήνας του ενζύμου
(core RNA polymerase)



Μία σ^{70} υπομονάδα (παράγοντας σ):
Απαιτείται για την **ειδική έναρξη** της μεταγραφής και
απομακρύνεται εύκολα από τον πυρήνα του μορίου.
-παράγοντας έναρξης (initiation factor)

Η μορφή του ενζύμου ($\alpha_2\beta\beta'\omega$) σ ονομάζεται **ολοένζυμο**.

Υπομονάδες $\beta - \beta'$: Συγκροτούν το ενεργό κέντρο του ενζύμου.

Υπομονάδα α : Σημαντικός ρόλος στην **συγκρότηση του ολοενζύμου**. Τα 85 αμινοξέα του καρβοξυτελικού της άκρου αποτελούν μια ανεξάρτητη περιοχή (α-carboxyterminal domain, α -CTD) που επιτρέπει τον **διμερισμό** και την **πρόσδεση στο DNA**. Συνδέεται με την υπόλοιπη πρωτεΐνη μέσω μιας περιοχής 13-20 αμινοξέων ευαίσθητης στην πρωτεΐνάση που επιτρέπει την αλληλεπίδραση με διαφορετικό τρόπο με διάφορους υποκινητές → **ρυθμιστικός ρόλος**.

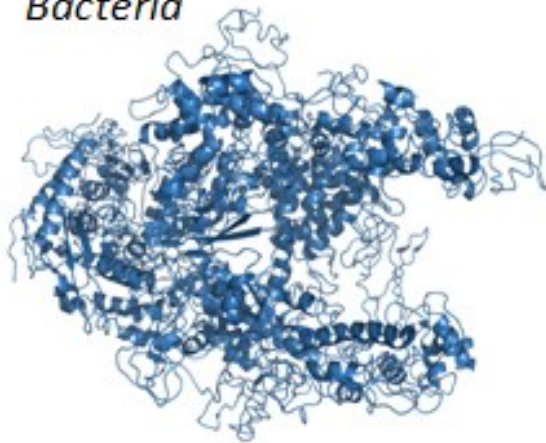
Η RNA πολυμεράση (RNAP) καταλύει την ίδια αντίδραση σε όλους τους οργανισμούς από τα βακτήρια μέχρι τον άνθρωπο και επομένως οι υπομονάδες που συνδέονται με το τοπικό ξετύλιγμα των αλυσίδων του DNA και τη σύνθεση του RNA έχουν κοινά δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά.

		Cellular life forms						
		<i>Bacteria</i>	<i>Archaea</i>	<i>Eukaryotes</i>				
				RNAPII	RNAPIII	RNAPI	RNAPIV	RNAPV
Subunits of RNAP								
	β^*	Rpo1 (A)	RPB1	C160	A190	NRPD1	NRPE1	
	β	Rpo2 (B)	RPB2	C128	A135	NRPD/E2	NRPD/E2	
	α	Rpo3 (D)	RPB3	AC40	AC40	RPB3(+1)	RPB3(+1)	
	α	Rpo11 (L)	RPB11	AC19	AC19	RPB11	RPB11	
	ω	Rpo6 (K)	RPB6	RPB6	RPB6	RPB6(+1)	RPB6(+1)	
		Rpo5 (H)	RPB5	RPB5	RPB5	RPB5(+3)	NRPE5	
		Rpo8* (G)	RPB8	RPB8	RPB8	RPB8(+1)	RPB8(+1)	
		Rpo10 (N)	RPB10	RPB10	RPB10	RPB10	RPB10	
		Rpo12 (P)	RPB12	RPB12	RPB12	RPB12	RPB12	
		Rpo4 (F)	RPB4	C17	A14	NRPD/E4	NRPD/E4	
		Rpo7 (E)	RPB7	C25	A43	NRPD7(+1)	NRPE7	
		TFS**	RPB9	C11	A12	NRPD9b	RPB9	
	Rpo13*							
			C53	A49				
			C37	A34.5				
			C82					
			C34					
			C31					

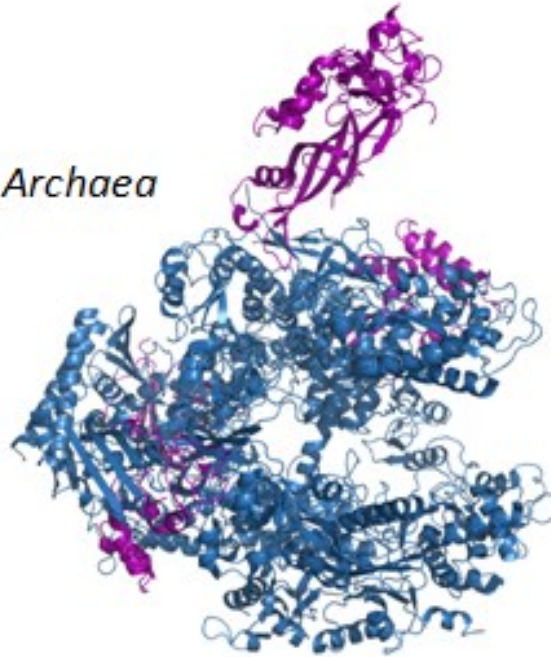
Structure of RNAP

- Universally conserved
- Archaeal/eukaryotic

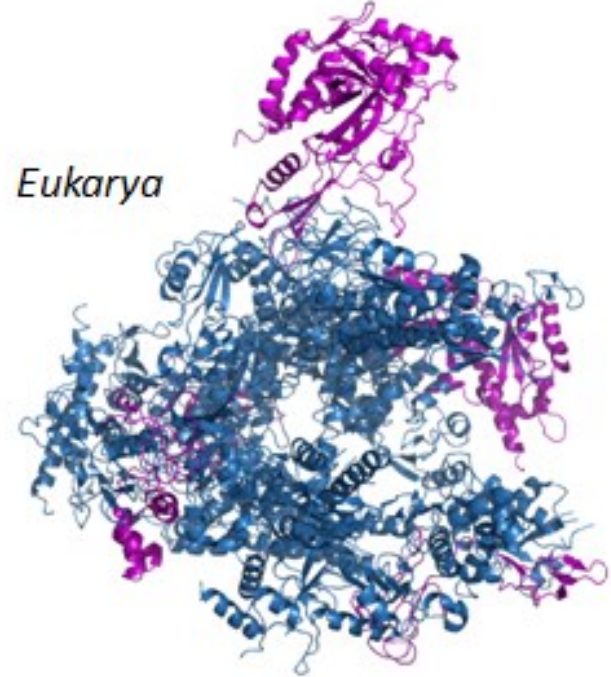
Bacteria



Archaea



Eukarya

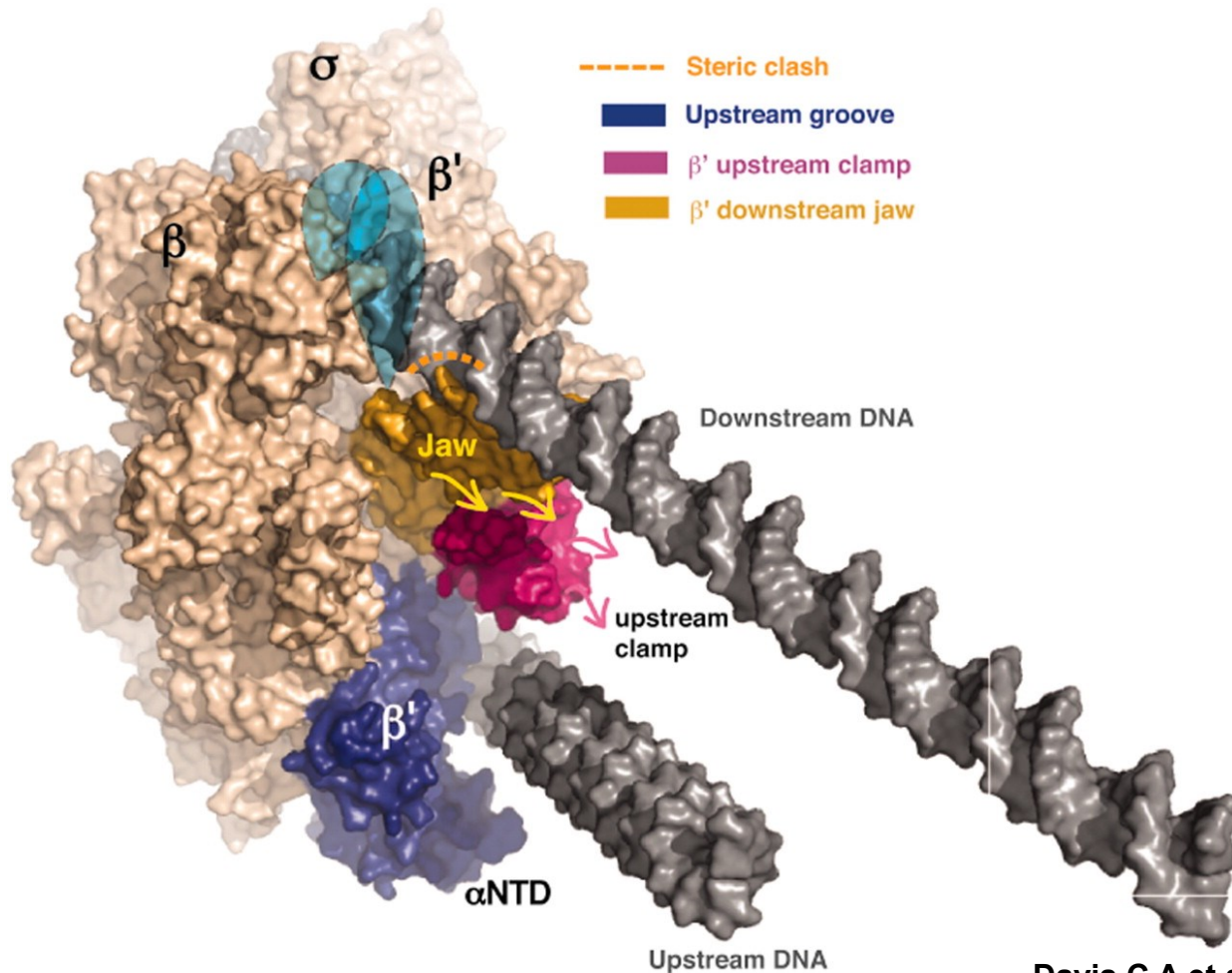


→
Transcription

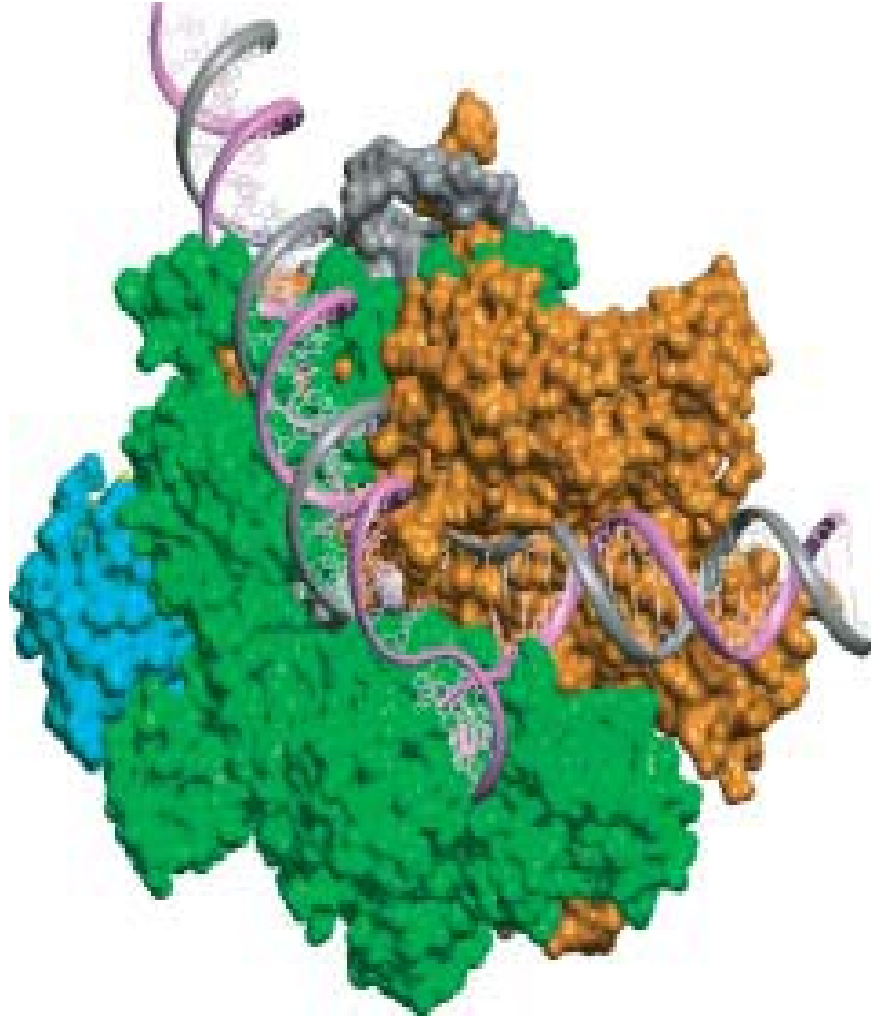
Werner and Grohmann (2011),
Nature Rev Micro 9:85-98

Οι επιπλέον υπομονάδες της RNAP παρέχουν θέσεις αλληλεπίδρασης για παράγοντες μεταγραφής, DNA και RNA, και ρυθμίζουν ποικίλες άλλες δραστηριότητες.

Η RNA πολυμεράση άλλων προκαρυωτικών συστημάτων ομοιάζει με αυτήν της *E.coli* ως προς τη δομή και την λειτουργία. Η διευθέτηση των υπομονάδων δημιουργεί κανάλια που επιτρέπουν την είσοδο και την έξοδο από το ενεργό κέντρο των DNA, RNA και ριβονουκλεοτιδίων.



Ένα μοντέλο της βακτηριακής RNA πολυμεράσης που έχει προσδεθεί στον υποκινητή



Με διαφορετικά χρώματα απεικονίζονται οι υπομονάδες όπως και οι αλυσίδες του DNA

Πορτοκαλί: β' υπομονάδα

Πράσινο : β υπομονάδα

Μπλε : φαίνεται μέρος μόνο των δύο α υπομονάδων

Γκρι : ω υπομονάδα

Γκρι και ροζ: οι αλυσίδες του DNA, η αλυσίδα-μήτρα και η συμπληρωματική της (**κωδική**) αντίστοιχα

Υποκινητές – Παράγοντας σ – Έναρξη

Πώς συνδέονται μεταξύ τους;

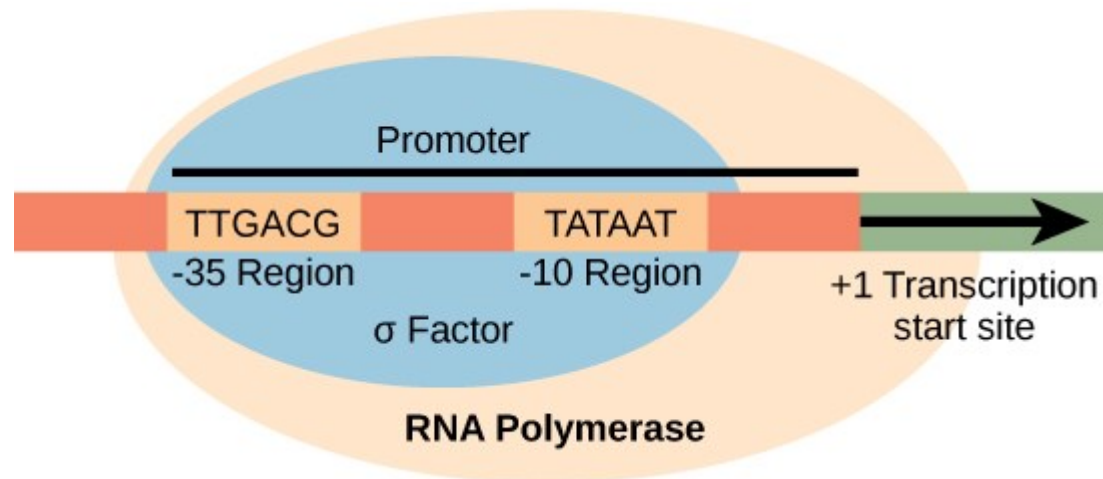
Η πρόσδεση της RNA πολυμεράσης γίνεται στην περιοχή του υποκινητή. Στην περιοχή αυτή η RNA πολυμεράση πρέπει:

- να αναγνωρίσει μία ειδική αλληλουχία DNA
- να προσδεθεί σ' αυτήν με την κατάλληλη στεροδιάταξη
- να ξετυλίξει τοπικά τις αλυσίδες του DNA
- ν' αρχίσει τη σύνθεση του RNA

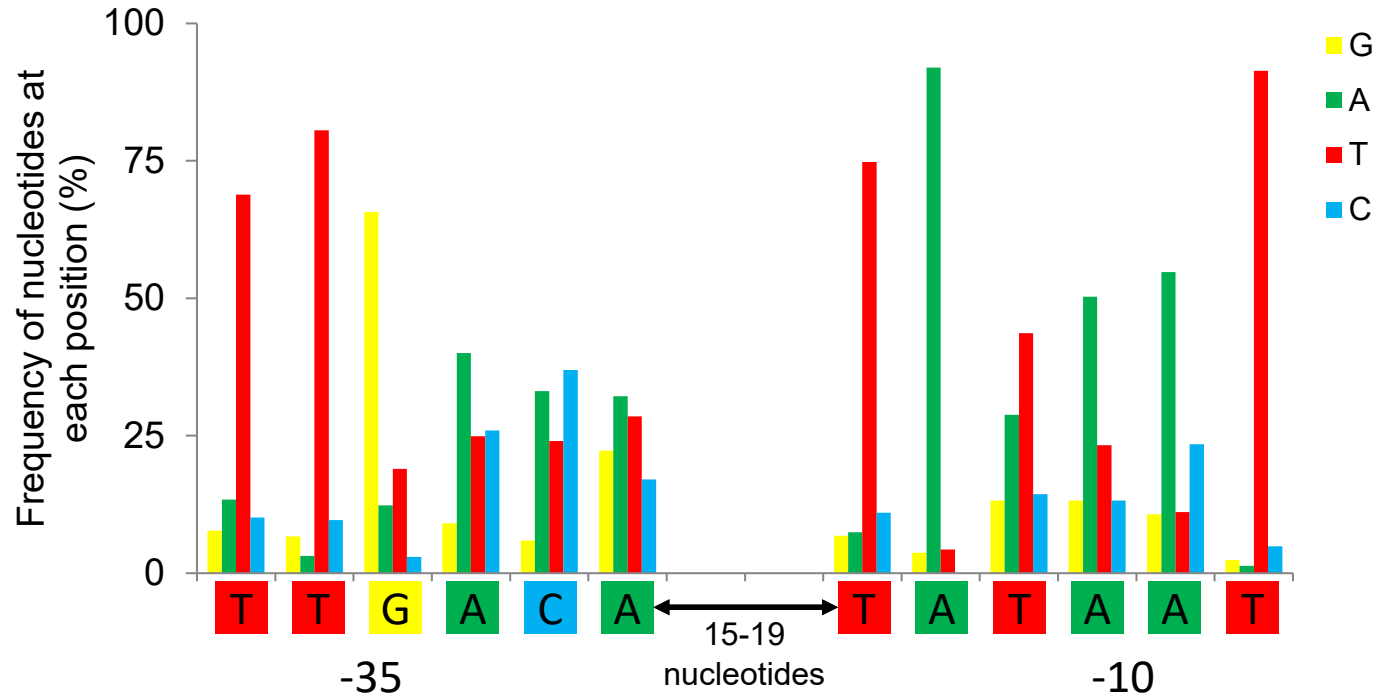
Οι διαδικασίες αυτές καθορίζονται από:

- την αλληλουχία των βάσεων του DNA
- τον παράγοντα σ της πολυμεράσης (χωρίς τον οποίο δεν μπορεί να γίνει η αναγνώριση του υποκινητή)
- βοηθητικές πρωτεΐνες για ορισμένους υποκινητές

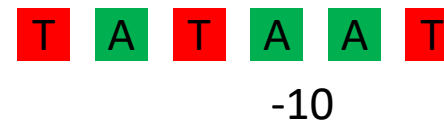
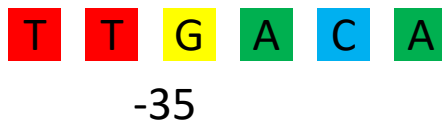
- Η RNA πολυμεράση είναι μεγάλο μόριο που έρχεται σε επαφή με πολλές αλληλουχίες DNA συγχρόνως, με έκταση περίπου 70 bp.
- Οι υποκινητές που αναγνωρίζονται από τον παράγοντα σ_{70} έχουν χαρακτηριστική δομή:
- **Δύο συντηρημένες αλληλουχίες**, κάθε μία μήκους **6 νουκλεοτιδίων** σε απόσταση **35** και **10** νουκλεοτίδια από την θέση έναρξης της μεταγραφής που διαχωρίζονται από ένα μη ειδικό τμήμα έκτασης 17-19 νουκλεοτιδίων.
- Ονομάζονται -35 και -10 στοιχεία (boxes) και δείχνουν να έχουν συγκεκριμένες **συναινετικές αλληλουχίες** (δεν περιέχουν όλοι οι υποκινητές την ίδια ακριβώς αλληλουχία βάσεων σ' αυτή την περιοχή, αλλά πάντα υπάρχει μια αλληλουχία παρόμοια με αυτή)
- Η αλληλουχία της περιοχής -10 ονομάζεται επίσης και Pribnow box από το όνομα του ερευνητή που την αναγνώρισε.



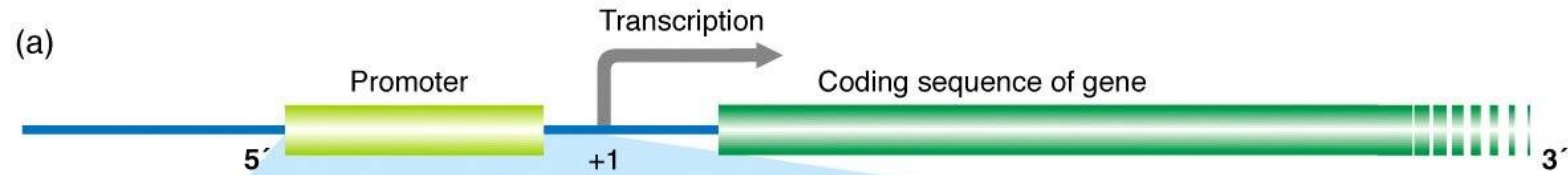
Μια προσεκτική ματιά στους προκαρυωτικούς υποκινητές



Γενικευμένη
αλληλουχία
συναίνεσης



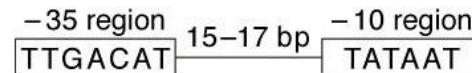
- **Συμπέρασμα: Δεν έχουν όλοι οι υποκινητές την ίδια αλληλουχία**



(b) Strong *E. coli* promoters

<i>tyr tRNA</i>	TCTCAACGTAACACTTTACAGCGGCG • • CGTCATTTGATATGATGC • GCCCCGCTTCCCGATAAGGG
<i>rrn D1</i>	GATCAAAAAAAAAATAC TTGTGCAAAAAA • • TTGGGATCCCTATAATGCGCCTCCGTTGAGACGACAACG
<i>rrn X1</i>	ATGCATTTTTTCCGC TTGTCTT CCTGA • • GCCGACTCCCTATAATGCGCCTCCA TCGACACGGCGGAT
<i>rrn (DXE)₂</i>	CCTGAAATTCAGGG TTGACTCTGAAA • • GAGGAAAGCGTAATATAC • GCCACTCGCGACAGTGAGC
<i>rrn E1</i>	CTGCAATTTTTCTATTGCGGCCTGCG • • GAGA ACTCCCTATAATGCGCCTCCA TCGACACGGCGGAT
<i>rrn A1</i>	TTTTAAATTTCTCTTTGT CAGGCCGG • • AATAACTCCCTATAATGCGCCACCA CTGACACGGAACAA
<i>rrn A2</i>	GCAAAAAATAAATGCTTGACTCTGTAG • • CGGGAAGGCGTATTATGC • ACACC CGCGCCGCTGAGAA
<i>λ P_R</i>	TAACACCGTGCGTGTGACTATTTTA • CCTCTGGCGGTGATAATGG • • TTGCATGTACTAAGGAGGT
<i>λ P_L</i>	TATCTCTGGCGGTGTTGACATAAATA • CCACTGGCGGTGACTACTGA • • GCACATCAGCAGGACGCAC
<i>T7A3</i>	GTGAAACA AAAACGGTTGACAACATGA • AGTAAACACGGTACGATGT • ACCACATGAAACGACAGTGA
<i>T7A1</i>	TATCAAAAAGAGTATTGACTTAAAGT • CTAACCTATAGGATACTTA • CAGCCATCGAGAGGGACACG
<i>T7A2</i>	ACGAAAAACAGGTATTGACAACATGAAGTAACATGCAGTAAGATAC • AAATCGCTAGGTAACACTAG
<i>fd VIII</i>	GATACAAATCTCCGTTGTACTTTGTT • • TCGCGCTTGGTATAATCG • CTGGGGGTCAAAGATGAGT G
	-35 -10 +1 →

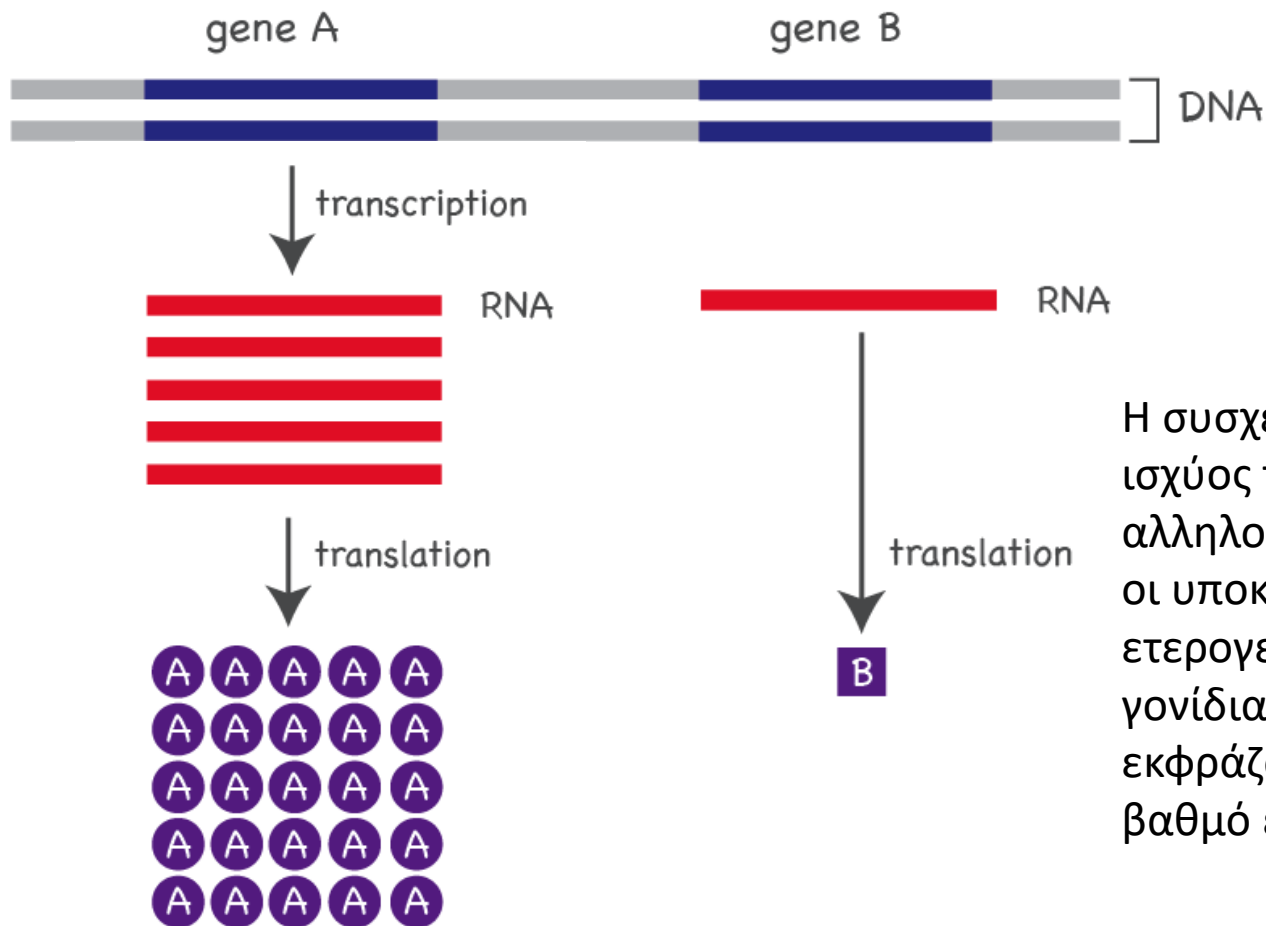
(c) Consensus sequences for all *E. coli* promoters



Γιατί οι υποκινητές είναι τόσο ετερογενείς;

Οι υποκινητές με αλληλουχίες πιο κοντά στη συναινετική αλληλουχία είναι γενικά «ισχυρότεροι» έναντι εκείνων που αποκλίνουν περισσότερο.

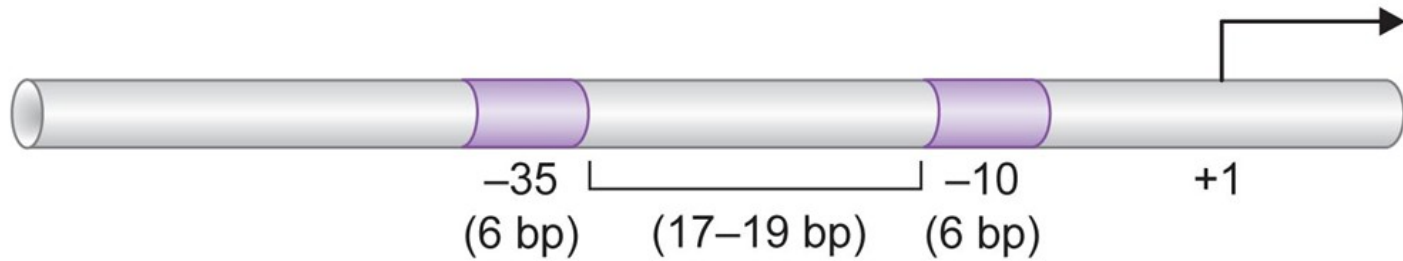
Ισχύς υποκινητή: αριθμός έναρξης σύνθεσης μεταγράφων ανά μονάδα χρόνου.



Η συσχέτιση μεταξύ της ισχύος του υποκινητή και της αλληλουχίας εξηγεί το γιατί οι υποκινητές είναι τόσο ετερογενείς: ορισμένα γονίδια πρέπει να εκφράζονται σε υψηλότερο βαθμό έναντι άλλων.

Υπάρχουν διάφοροι συνδυασμοί στοιχείων υποκινητών

α



β



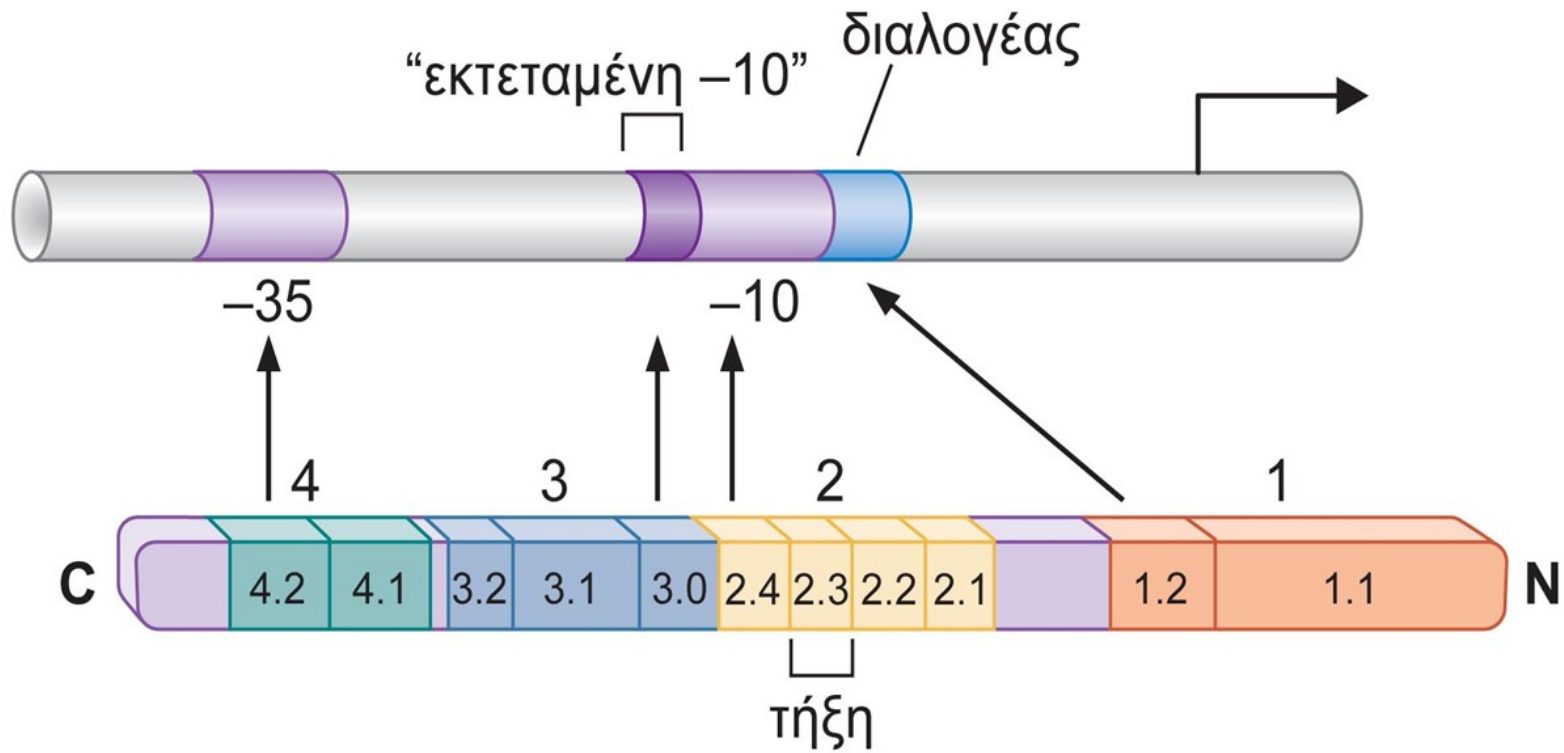
γ



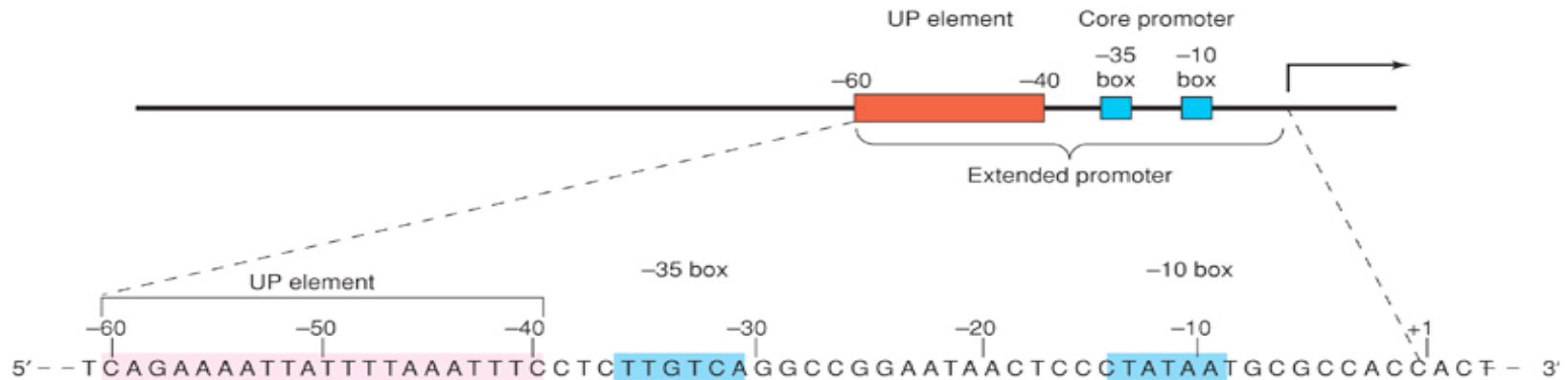
δ



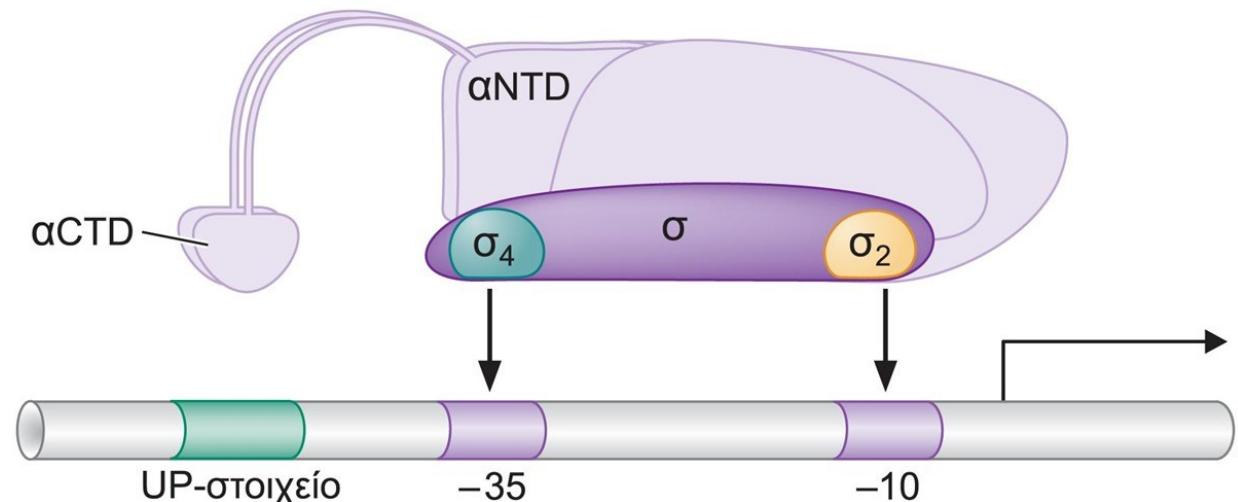
Αλληλεπίδραση των στοιχείων των υποκινητών με τον παράγοντα σ



- **Στοιχείο UP:** Πρόσθετη αλληλουχία DNA μήκους ~20 bp πλούσια σε AT που δεσμεύει την RNA πολυμεράση και απαντάται σε ορισμένους ισχυρούς υποκινητές (όπως τα γονίδια rRNA). Βρίσκεται -40 έως -60 bp από το σημείο έναρξης.



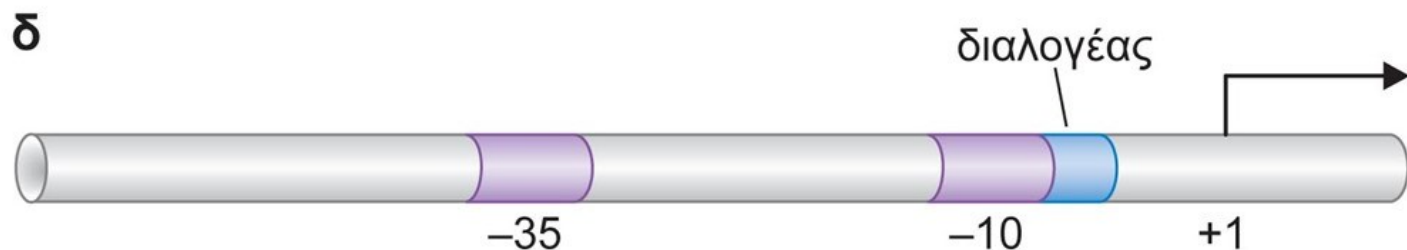
Αλληλεπιδρά με το καρβοξυτελικό άκρο της α υπομονάδας (α CTD).



- Μία άλλη κατηγορία υποκινητών σ^{70} στερείται το στοιχείο -35 και περιλαμβάνει ένα «**εκτεταμένο -10**» στοιχείο που αυξάνει την περιοχή επαφής με την RNA πολυμεράση και αντισταθμίζει την έλλειψη της αναρροϊκής ρυθμιστικής αλληλουχίας. Χαρακτηριστικό παράδειγμα τα γονίδια *gal* (υπεύθυνα για τον μεταβολισμό της γαλακτόζης)

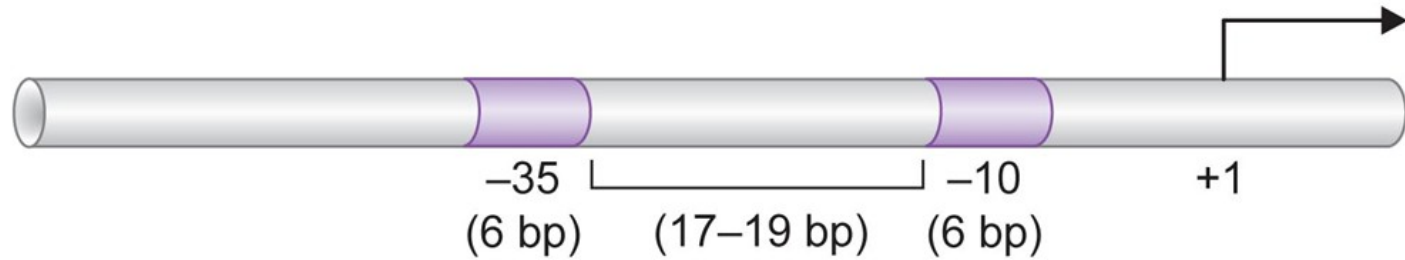


- **Διαλογέας:** ρυθμιστικό στοιχείο DNA που δεσμεύει την RNA πολυμεράση ακριβώς καταρροϊκά από το στοιχείο -10 και σταθεροποιεί το σύμπλοκο πολυμεράσης – υποκινητή.



Υπάρχουν διάφοροι συνδυασμοί στοιχείων υποκινητών

α



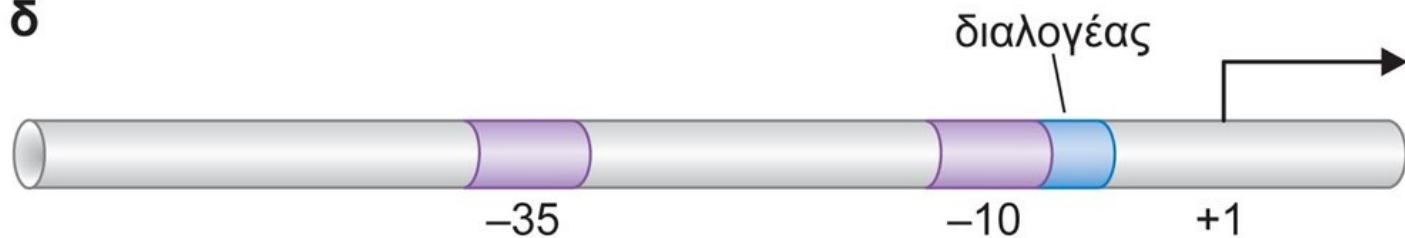
β



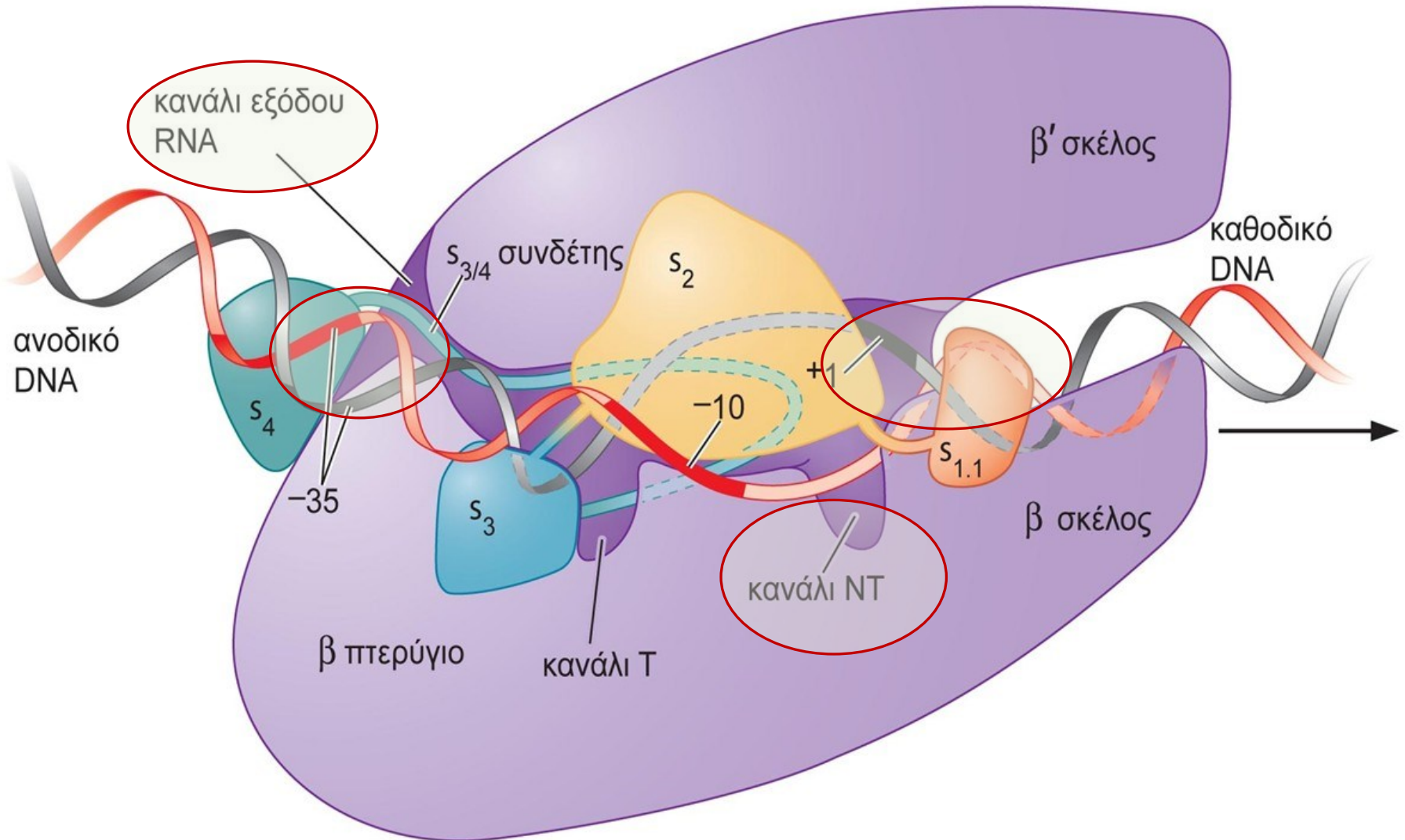
γ



δ



Η διάταξη των υπομονάδων της RNA πολυμεράσης δημιουργεί **5 κανάλια** εντός του ενζύμου, το σχήμα του οποίου μοιάζει με δαγκάνα.



- Οι περιοχές του παράγοντα σ που αναγνωρίζουν τα στοιχεία -10 και -35 είναι οι περιοχές 2 και 4 αντίστοιχα.
- Το εκτεταμένο στοιχείο -10, όπου είναι παρόν, αναγνωρίζεται από μια α έλικα στην περιοχή 3.

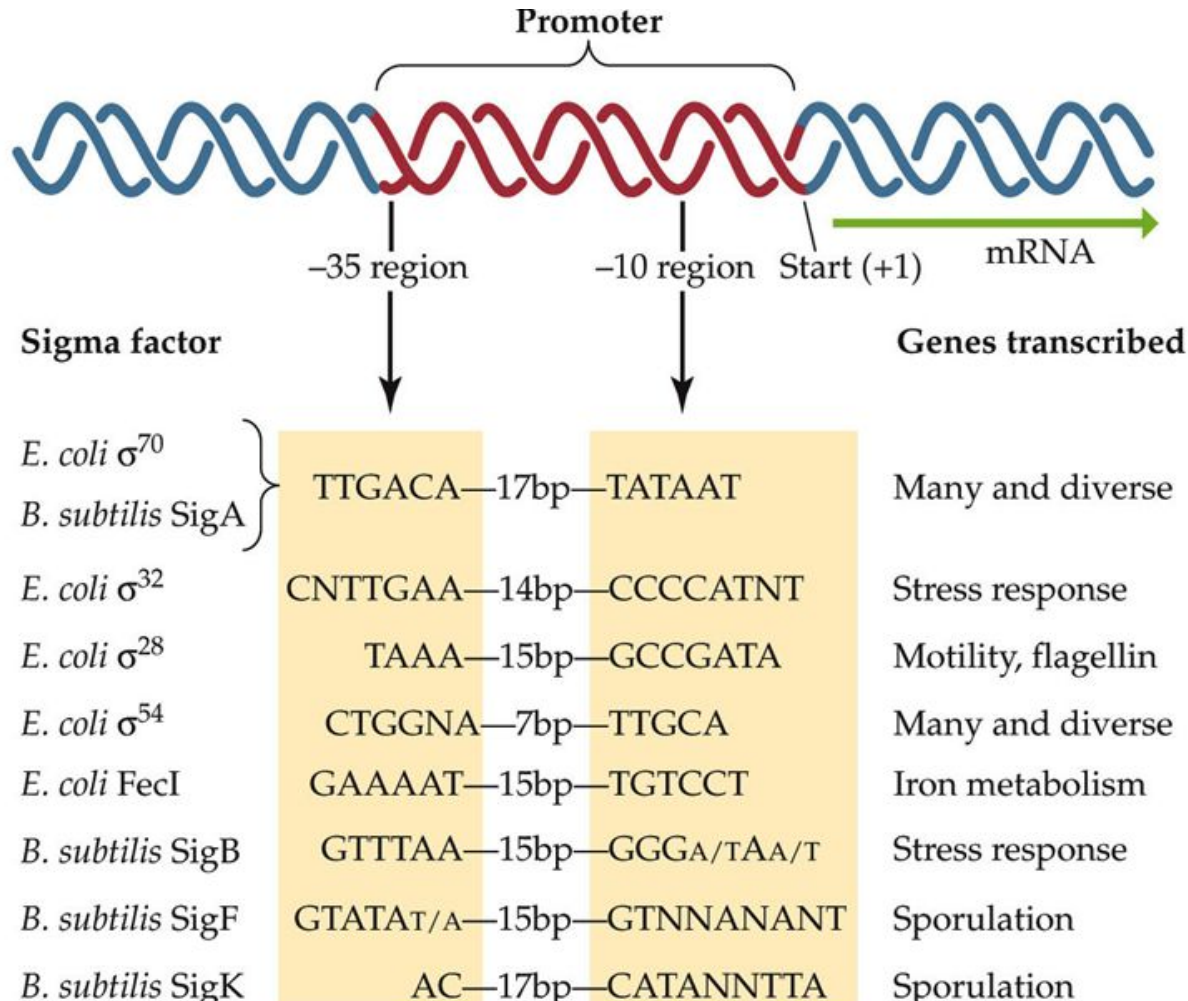
Οι παράγοντες σ

- Ο παράγοντας σ^{70} είναι γενικός μεταγραφικός παράγοντας.
- Ωστόσο στο βακτήριο *E. coli* έχουν αναγνωριστεί εκτός από τον σ^{70} τέσσερις επιπλέον παράγοντες σ που εμπλέκονται στη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων, όπως π.χ. ο σ^{32} που παίζει ρόλο στην έκφραση των γονιδίων του θερμικού σοκ.

Gene	Factor	Use	-35 Sequence	Separation	-10 Sequence
<i>rpoD</i>	σ^{70}	general	TTGACA	16–18 bp	TATAAT
<i>rpoH</i>	σ^{32}	heat shock	CCCTTGAA	13–15 bp	CCCGATNT
<i>rpoE</i>	σ^E	heat shock	not known	not known	not known
<i>rpoN</i>	σ^{54}	nitrogen	CTGGNA	6 bp	TTGCA
<i>fliA</i>	σ^F	flagellar	CTAAA	15 bp	GCCGATAA

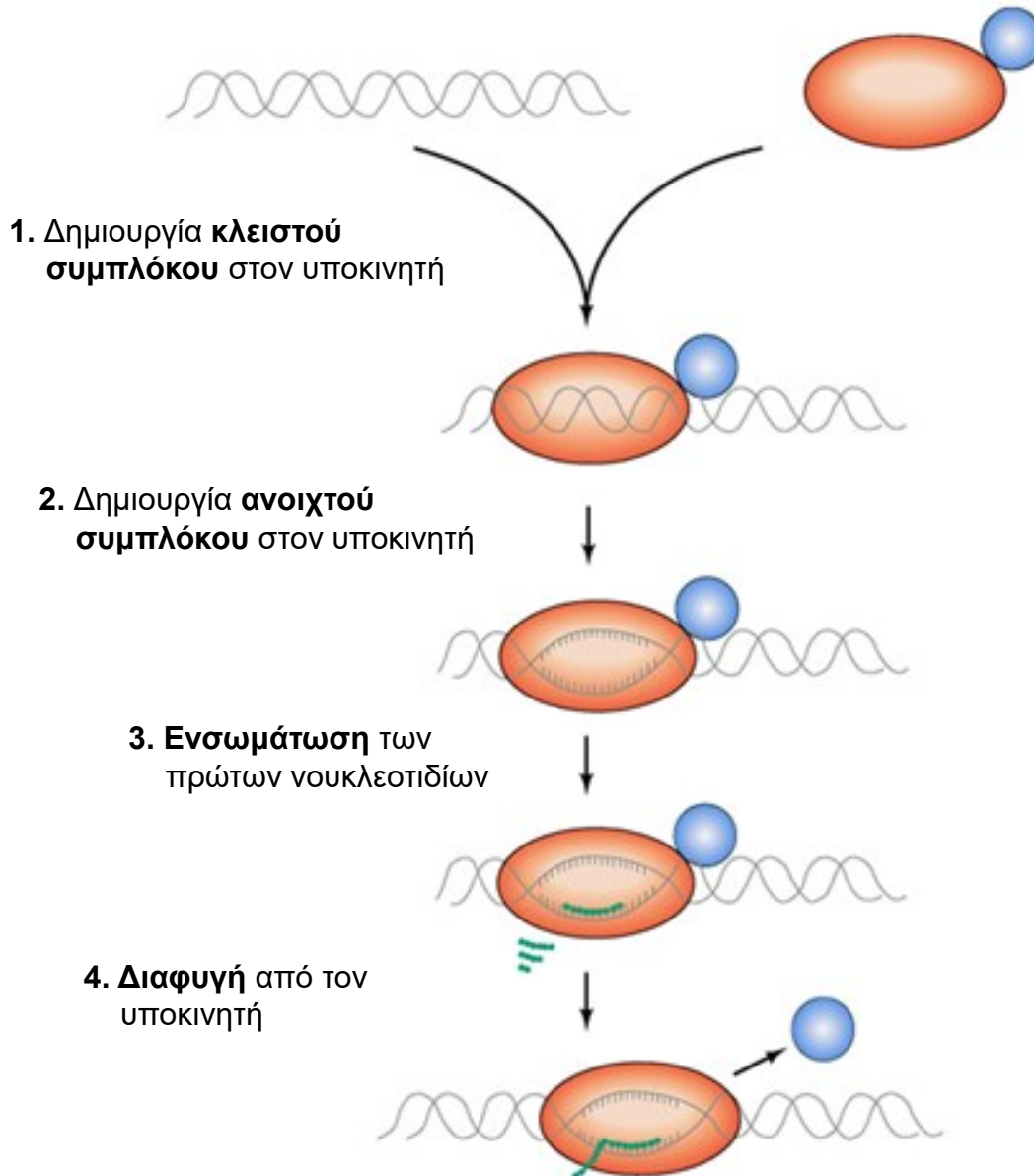
Εναλλακτικοί παράγοντες σ κατευθύνουν την RNA πολυμεράση σε εναλλακτικές ομάδες υποκινητών.

Τόσο η *E. coli* όσο και ο *Bacillus subtilis* εκτός του παράγοντα σ^{70} κωδικοποιεί αρκετές ακόμα διαφορετικές υπομονάδες σ της RNA πολυμεράσης, που αναγνωρίζουν εναλλακτικές αλληλουχίες υποκινητών και επιτρέπουν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων υπό δεδομένες συνθήκες.



π.χ. Όταν η *E. coli* υποβάλλεται σε θερμική καταπόνηση, αυξάνεται η ποσότητα του παράγοντα σ^{32} , ο οποίος εκτοπίζει τον παράγοντα σ^{70} από ένα ποσοστό μορίων της RNA πολυμεράσης, και κατευθύνει τα ένζυμα αυτά στο να μεταγράψουν γονίδια, των οποίων τα προϊόντα προστατεύουν το κύτταρο από τη θερμική καταπόνηση.

Τα στάδια έναρξης της μεταγραφής



- Κατά το πρώτο στάδιο της έναρξης, η RNA πολυμεράση δεσμεύεται χαλαρά στον υποκινητή δημιουργώντας ένα «κλειστό» σύμπλοκο (closed complex) που αφήνει το DNA σε δίκλινη μορφή. Η αρχική αναγνώριση γίνεται κυρίως στην περιοχή **-35** (βρέθηκε με πειράματα κατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης).
- Κατόπιν το κλειστό σύμπλοκο μετατρέπεται σε **ανοιχτό** (open complex) και η RNA πολυμεράση προσδένεται ισχυρότερα. Η περιοχή **-10** είναι πλούσια σε AT και συνεπώς ξετυλίγεται ευκολότερα (μεταλλαγές στην περιοχή αυτή εμποδίζουν την δημιουργία του «ανοιχτού συμπλόκου»). Η μετατροπή αυτή συνοδεύεται από δομικές **αλλαγές στο ένζυμο** και από **τοπικό ξετύλιγμα της διπλής έλικας** στις θέσεις **-11 έως +3** προς το σημείο έναρξης της μεταγραφής.
- Η μετάβαση αυτή που ονομάζεται και **ισομέρεια** δεν απαιτεί ενέργεια και είναι ουσιαστικά μη αναστρέψιμη μόλις ολοκληρωθεί.
- Η διάταξη των υπομονάδων της RNA πολυμεράσης δημιουργεί **5 κανάλια** εντός του ενζύμου, το σχήμα του οποίου μοιάζει με δαγκάνα:
 - Το κανάλι για την είσοδο νουκλεοτιδίων
 - Το κανάλι για την έξοδο του RNA
 - Τα υπόλοιπα τρία κανάλια επιτρέπουν την είσοδο και την έξοδο του DNA

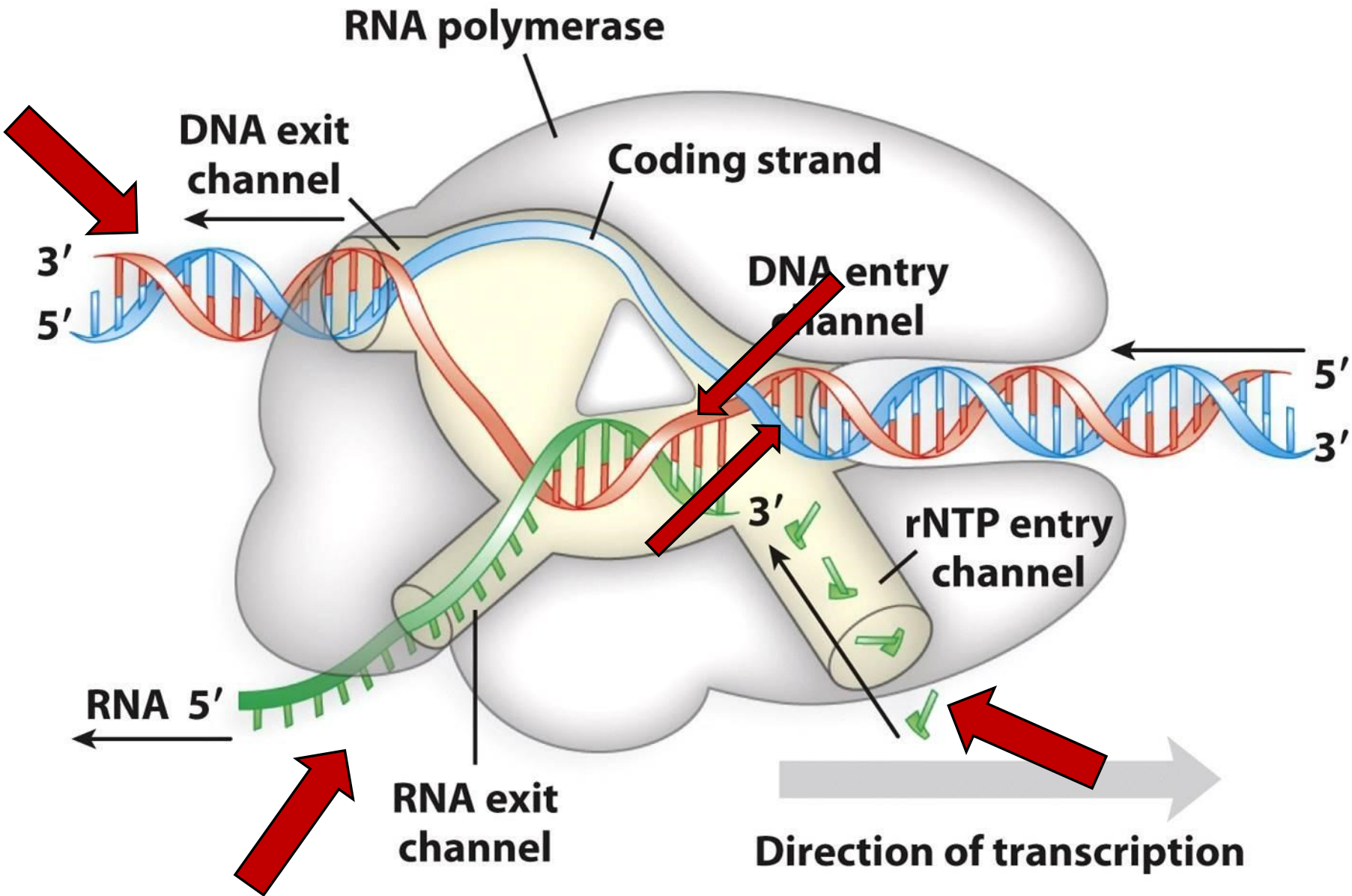
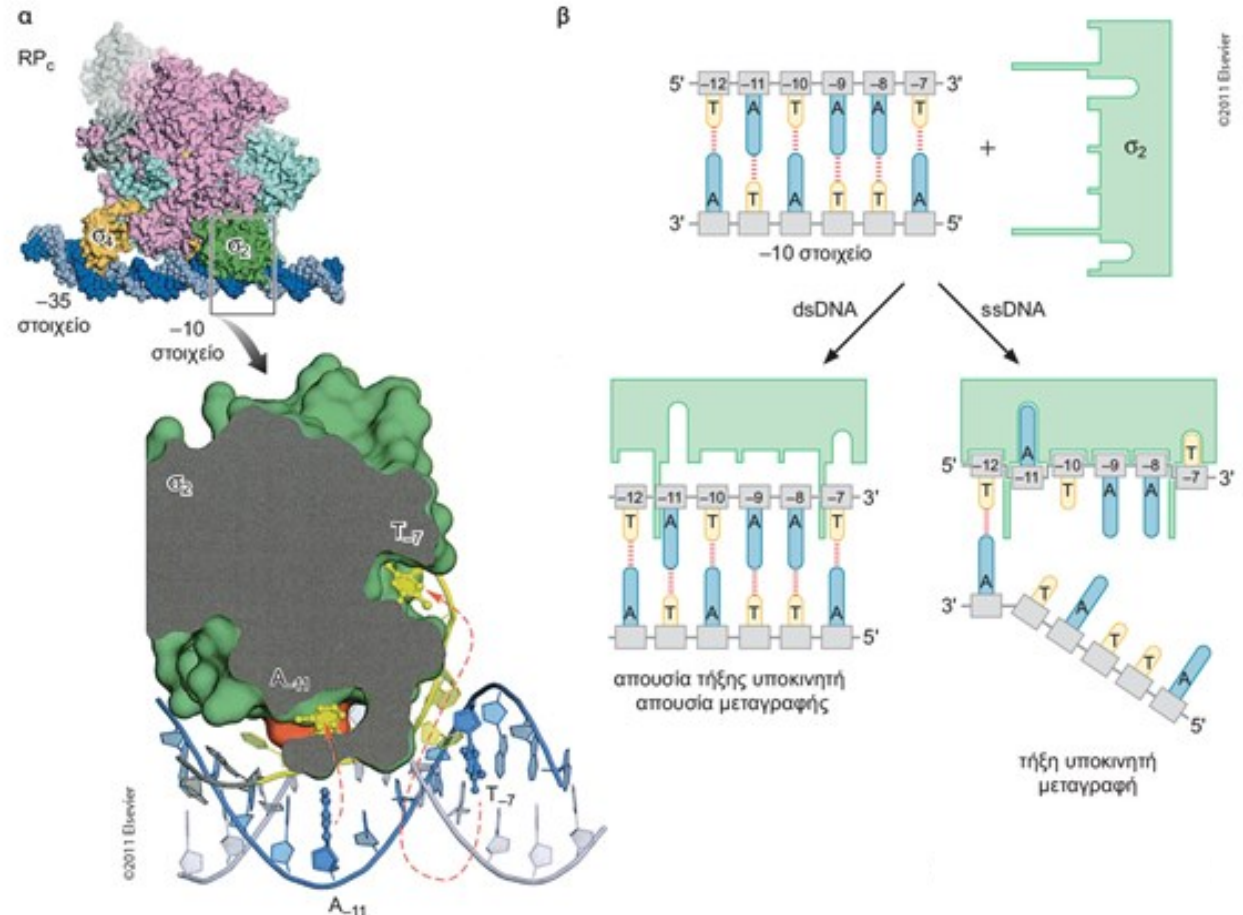


Figure 15-14
Molecular Biology: Principles and Practice
 © 2012 W. H. Freeman and Company

Η μετάβαση στο ανοικτό σύμπλοκο περιλαμβάνει δομικές αλλαγές στην RNA πολυμεράση και στο DNA του υποκινητή

Η περιοχή 2 του σ έχει δύο θύλακες καθένας εκ των οποίων δεσμεύει μία βάση που προβάλλει προς τα έξω από την αλυσίδα που δεν λειτουργεί ως εκμαγείο στο στοιχείο -10. Αυτές οι ενεργειακά προτιμητέες αντιδράσεις δέσμωσης οδηγούν στην τήξη του υποκινητή και έτσι στη μετάβαση από το κλειστό στο ανοικτό σύμπλοκο, χωρίς την ανάγκη υδρόλυσης του ATP.

(α) Μεγεθυμένη προβολή του σ_2 της Taq RNA πολυμεράσης, με το dsDNA του κλειστού συμπλόκου (μπλε) και το τμήμα ssDNA του ανοικτού συμπλόκου (κίτρινο). Το σχέδιο αποκαλύπτει τις δύο βάσεις που προβάλλουν προς τα έξω, τις A και T (κίτρινο), στους θύλακες δέσμωσης.



- Η RNA πολυμεράση μπορεί να αρχίσει τη μεταγραφή απουσία εκκινήτη. (βασική διαφορά με την αντιγραφή)
- Η RNA πολυμεράση φέρει δύο θέσεις πρόσδεσης νουκλεοτιδίων: θέση έναρξης, θέση επιμήκυνσης (καταλυτική θέση)
- Η θέση έναρξης προσδένει συνήθως πουρίνες (ATP και GTP) και το ATP είναι συνήθως το πρώτο νουκλεοτίδιο.
- Η θέση επιμήκυνσης καταλαμβάνεται κατόπιν από ένα τριφωσφορικό νουκλεοσίδιο που επιλέγεται βάσει της συμπληρωματικότητας.
- Τα δύο νουκλεοτίδια συνδέονται με φωσφοδιεστερικό δεσμό και η πρώτη βάση απομακρύνεται από την θέση έναρξης.
- Συνήθως στην αρχή παρατηρείται το φαινόμενο το ένζυμο να συνθέτει αλυσίδες RNA μικρού μήκους (λιγότερο από 10 νουκλεοτίδια) και αυτές αντί να επιμηκυνθούν αποδεσμεύονται από το ένζυμο. Η φάση αυτή ονομάζεται ανεπιτυχής έναρξη και δεν είναι σαφές γιατί συμβαίνει.

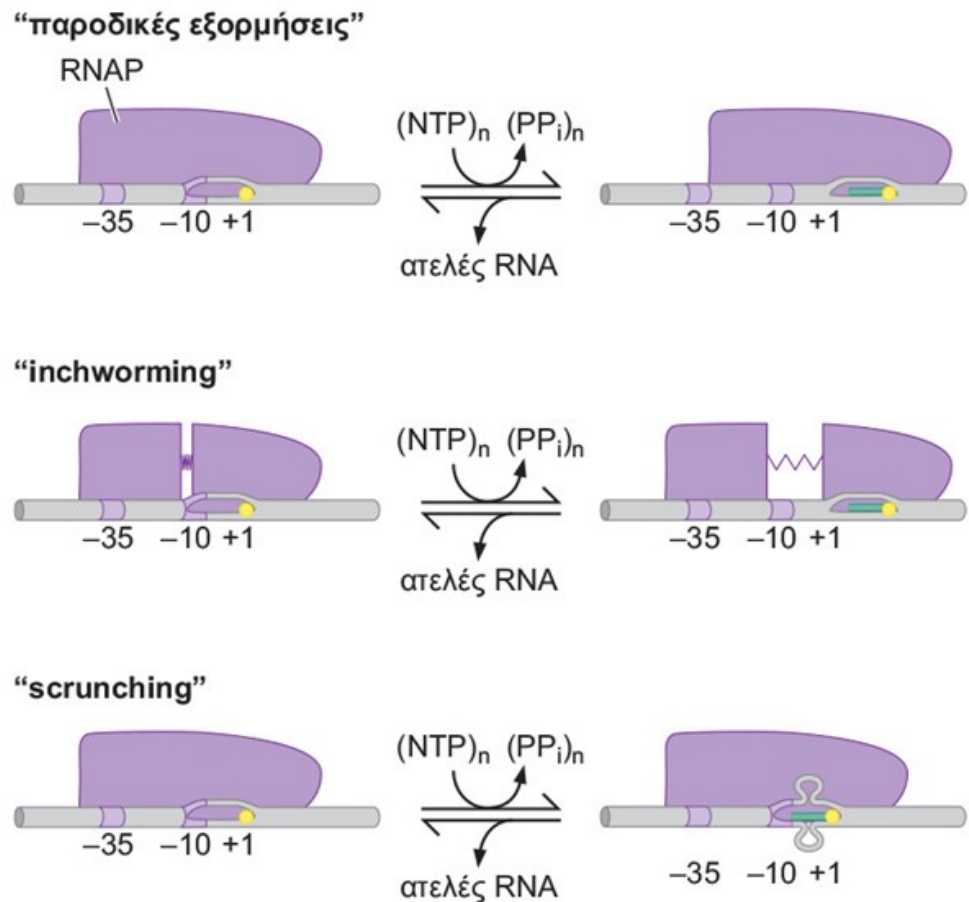
Προτεινόμενοι μηχανισμοί της αρχικής μεταγραφής.

Κατά τη διάρκεια της αρχικής μεταγραφής, το ενεργό κέντρο της RNA πολυμεράσης μετατοπίζεται προς τα εμπρός σε σχέση με το DNA εκμαγείο και συνθέτει βραχεία μετάγραφα έως 10 βάσεων προτού σταματήσει και στη συνέχεια επαναλάβει αυτό τον κύκλο έως ότου διαφύγει από τον υποκινητή. Έχουν προταθεί τρία μοντέλα για την εξήγηση του μηχανισμού.

Σύμφωνα με το πρώτο από αυτά — τις παροδικές εξορμήσεις — η πολυμεράση κινείται κατά μήκος του DNA.

Στο δεύτερο — *inchworming* [βραδεία κίνηση σαν σκώληκα]— το πρόσθιο μέρος του ενζύμου κινείται κατά μήκος του DNA, αλλά λόγω μίας εύκαμπτης περιοχής εντός του ενζύμου, το πίσω μέρος μπορεί να παραμείνει στάσιμο στον υποκινητή.

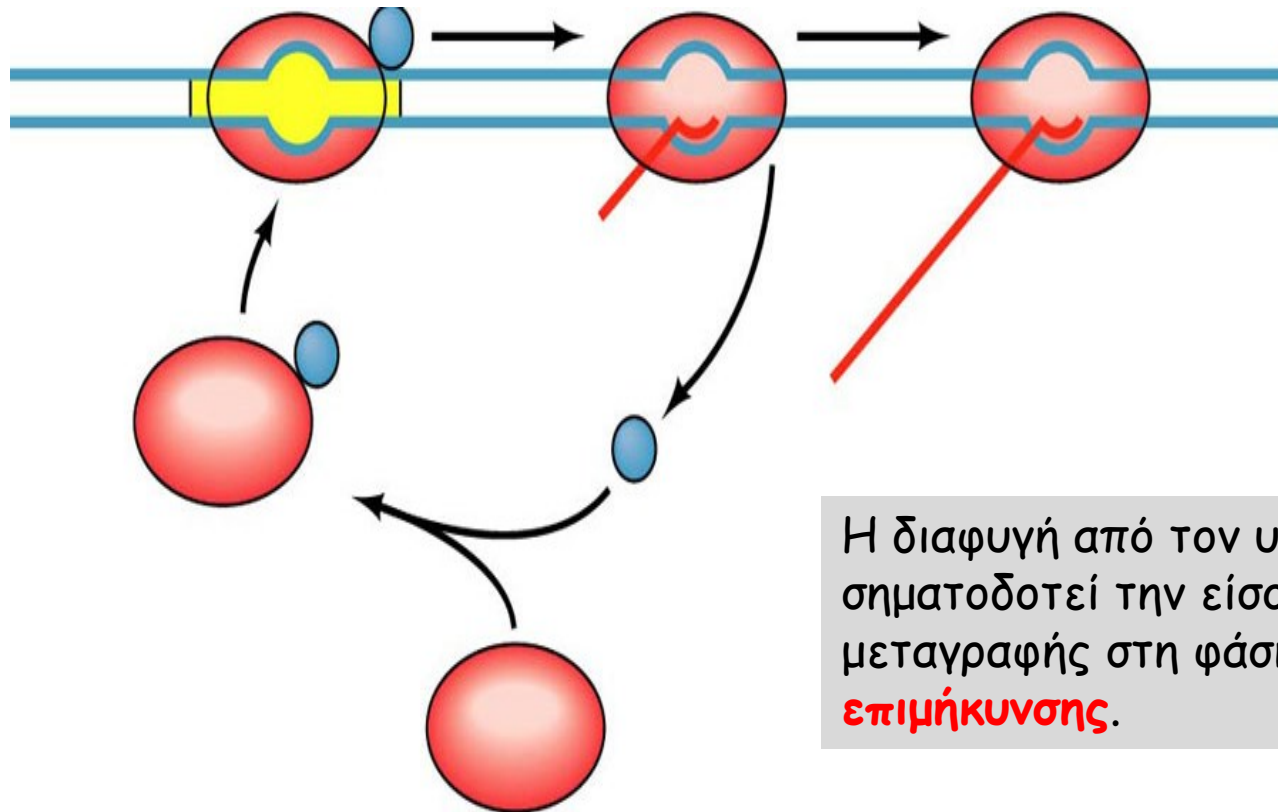
Στο τρίτο μοντέλο — *scrunching* — το ένζυμο παραμένει στάσιμο και τραβά το DNA προς αυτό.



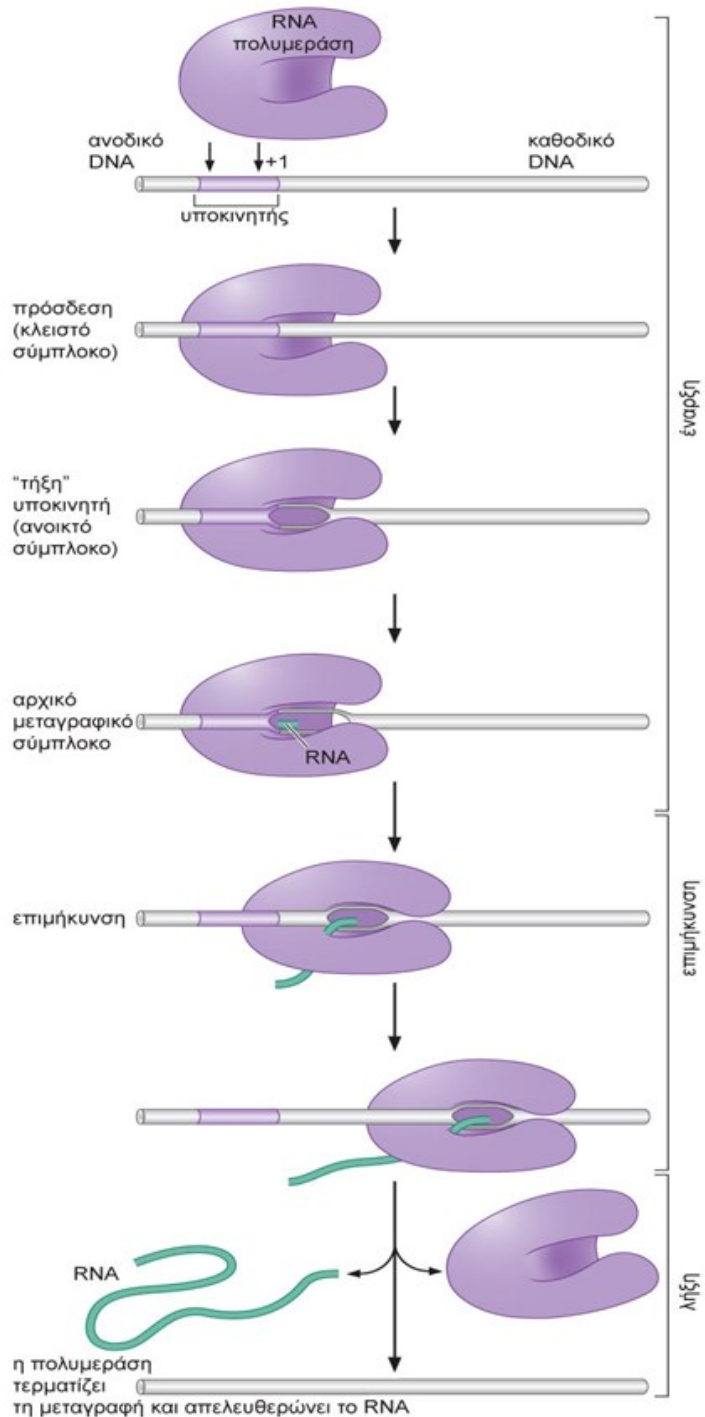
Η διαφυγή από τον υποκινητή περιλαμβάνει τη διακοπή των αλληλεπιδράσεων πολυμεράσης - υποκινητή και πυρήνα πολυμεράσης - παράγοντα σ.

- Η πολυμεράση κατορθώνει να διαφύγει από τον υποκινητή και να εισέλθει στη φάση της επιμήκυνσης μόνο όταν έχει κατορθώσει να συνθέσει ένα μετάγραφο κατ' ελάχιστον 10 ή περισσότερων νουκλεοτιδίων.
- Το μετάγραφο αυτό δεν μπορεί να φιλοξενηθεί πλέον στην περιοχή όπου υβριδίζεται με το DNA και πρέπει να διέλθει από το κανάλι εξόδου.
- Η διαφυγή από τον υποκινητή συνδέεται με τη διάσπαση όλων των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της πολυμεράσης και των στοιχείων του υποκινητή, καθώς και μεταξύ της πολυμεράσης και οποιονδήποτε ρυθμιστικών πρωτεϊνών λειτουργούν στον δεδομένο υποκινητή.

Αφού η διαφυγή από τον υποκινητή περιλαμβάνει τη διακοπή της αλληλεπίδρασης πυρήνα πολυμεράσης - παράγοντα σ , ο παράγοντας σ ανακυκλώνεται.

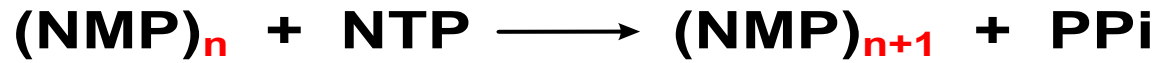


Η διαφυγή από τον υποκινητή σηματοδοτεί την είσοδο της μεταγραφής στη φάση της **επιμήκυνσης**.



Η διαφυγή από τον υποκινητή περιλαμβάνει τη διακοπή της αλληλεπίδρασης πυρήνα πολυμεράσης - παράγοντα σ , και σηματοδοτεί την είσοδο της μεταγραφής στη φάση της **επιμήκυνσης**.

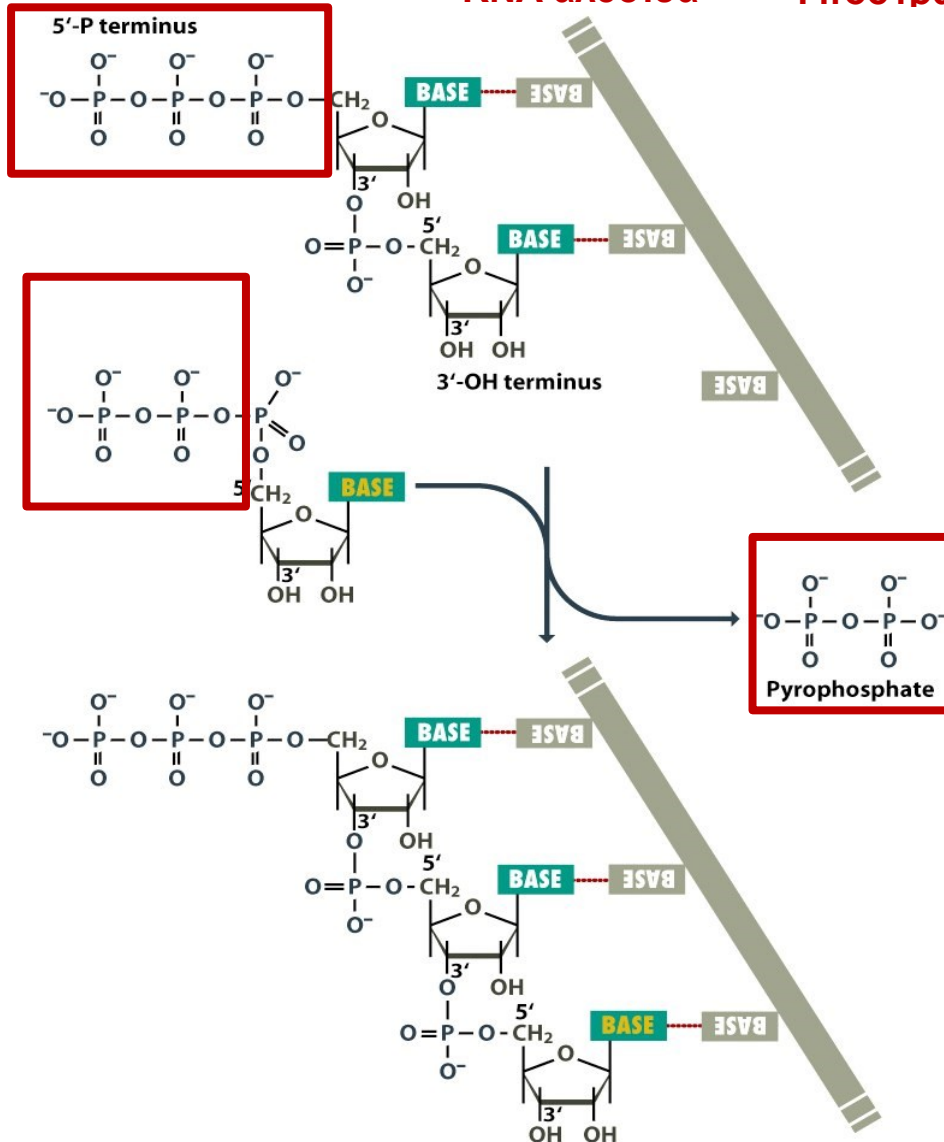
Μηχανισμός της αντίδρασης πολυμερισμού



RNA αλυσίδα

Υπόστρωμα

Αυξανόμενη
RNA αλυσίδα



Το πρώτο 5' ακραίο νουκλεοτίδιο διατηρεί την τριφωσφορική ομάδα του, όλα τα άλλα χάνουν τις β- και γ- φωσφορικές ομάδες τους.

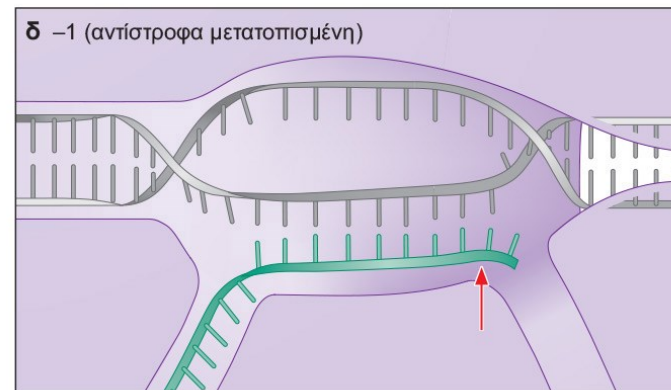
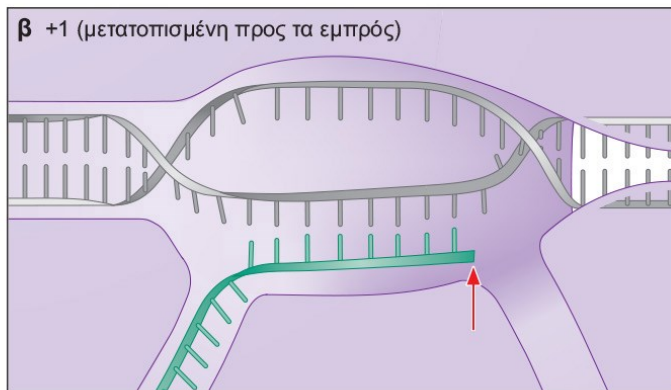
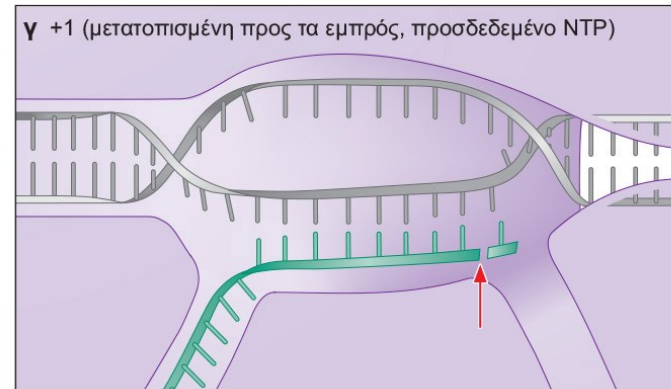
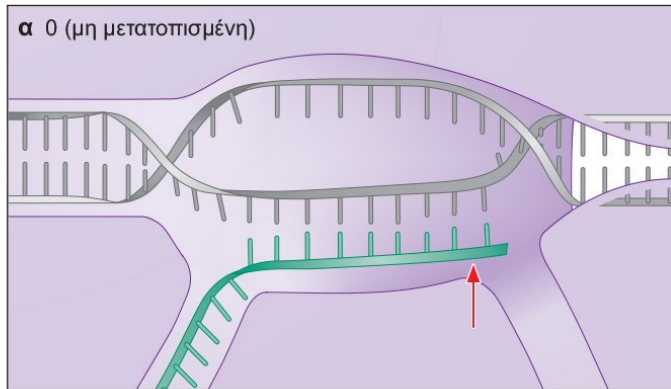
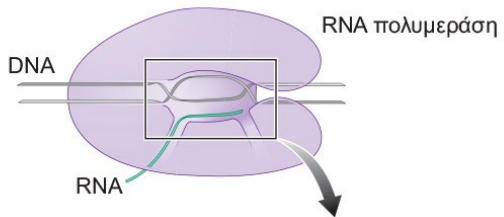
Έτσι, *in vitro* είναι δυνατή η διάκριση μεταξύ έναρξης και επιμήκυνσης με ραδιενεργά σημασμένα νουκλεοτίδια ($\gamma^{32}\text{P}$ -NTP για την έναρξη και $\alpha^{32}\text{P}$ -NTP για την επιμήκυνση).

Στερεοδιαταξικές αλλαγές στα μόρια που συμμετέχουν

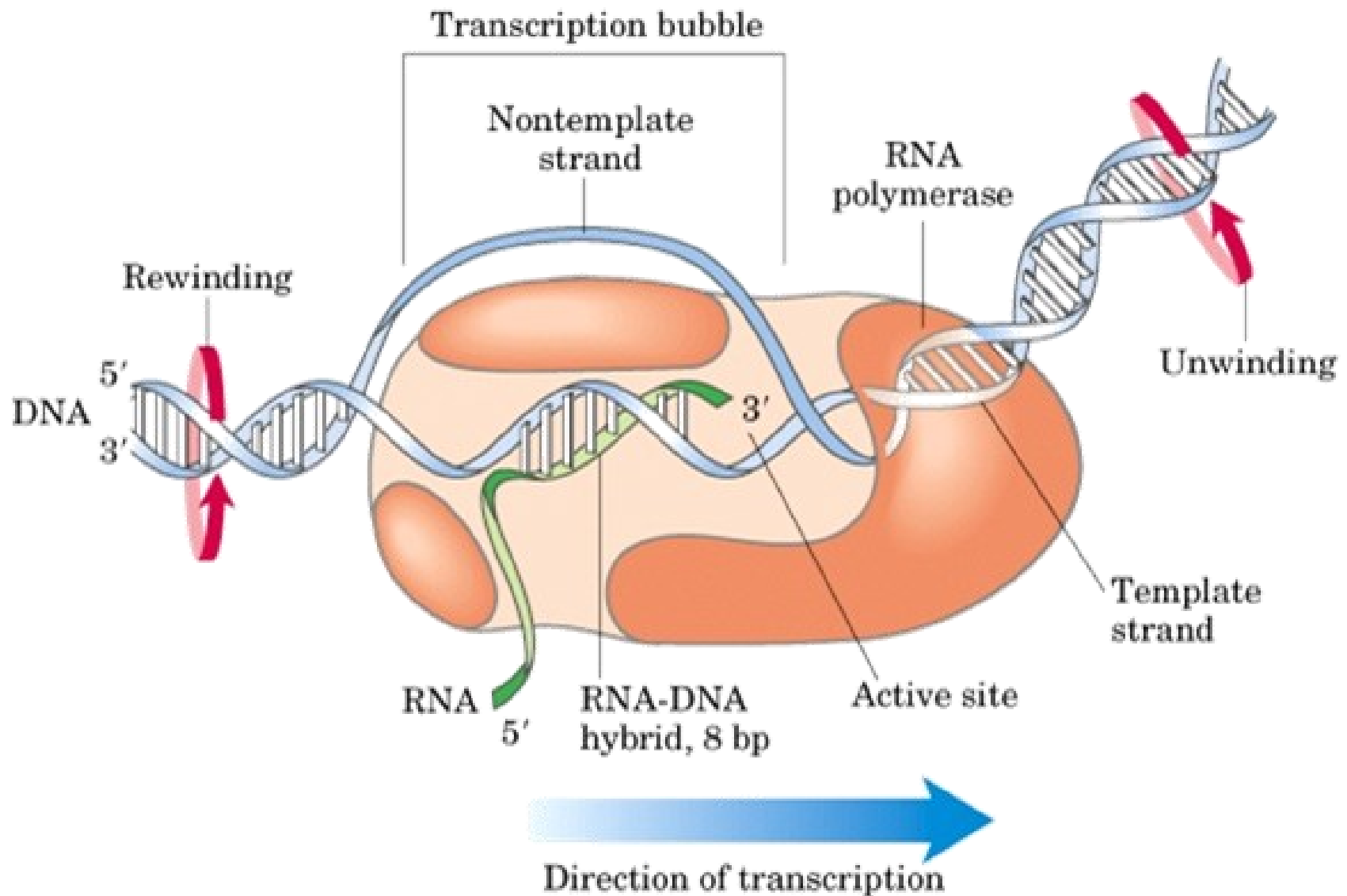
DNA: Ξετυλίσσεται τοπικά υπό τη δράση της καταλυτικής σχισμής της RNA πολυμεράσης που οδηγεί τις δύο αλυσίδες σε διαφορετικά μονοπάτια εντός του ενζύμου. Μόλις το ένζυμο μετακινηθεί η διπλή έλικα αποκαθίσταται και η περιοχή που ξετυλίσσεται κινείται κατά μήκος του μορίου μαζί με το ένζυμο.

RNA πολυμεράση: Ενώ στην έναρξη δημιουργείται σταθερό σύμπλοκο με το DNA κατά την επιμήκυνση προσδένεται χαλαρά γιατί δεν έχει ειδικότητα για συγκεκριμένη αλληλουχία απουσία του παράγοντα σ.

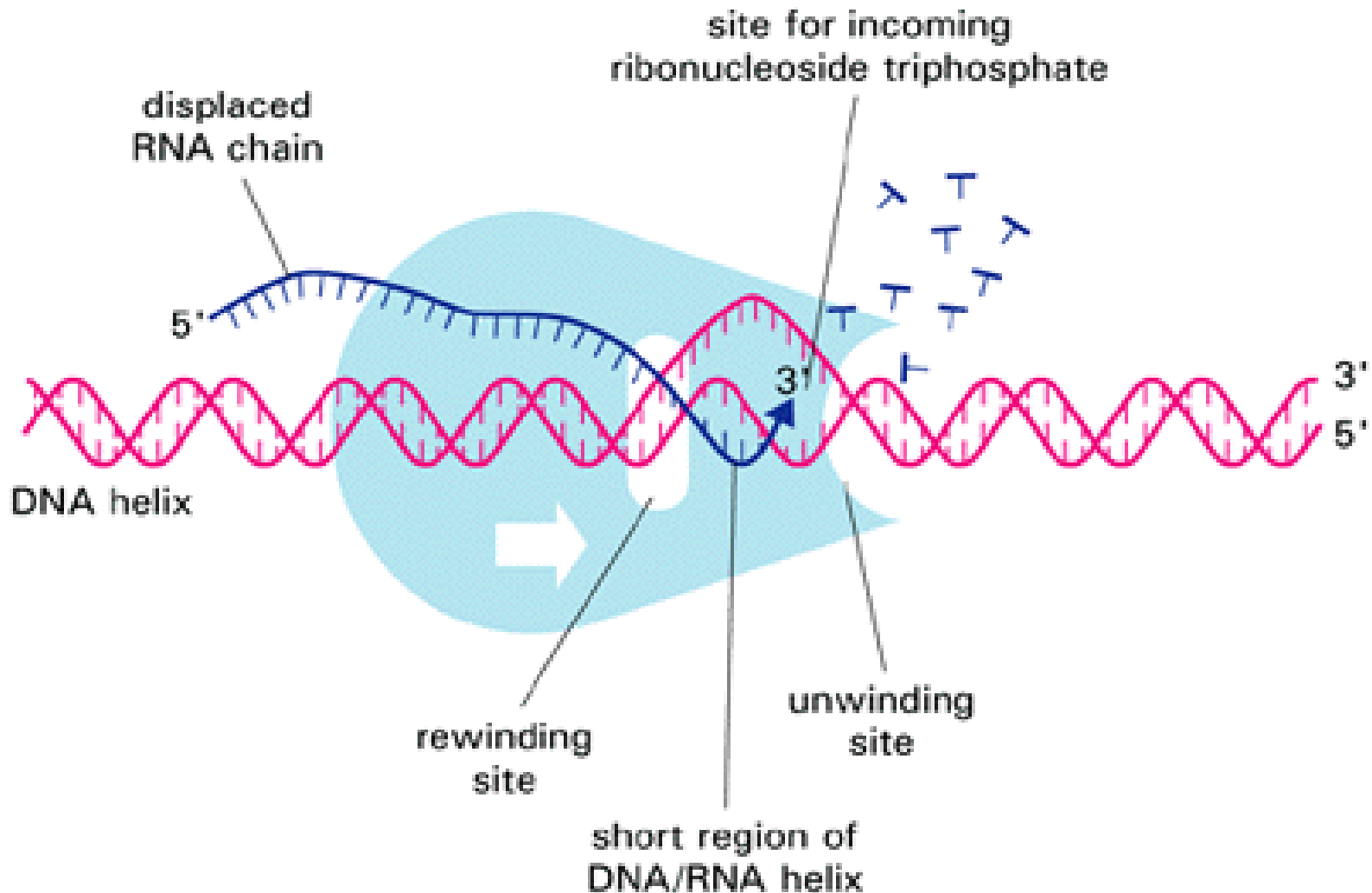
Νεοσυντιθέμενο RNA: Απομακρύνεται από το DNA καθώς η διπλή έλικα στο τμήμα που έχει μεταγραφεί επανασχηματίζεται. Το υβρίδιο με το DNA έχει μήκος περίπου 8-9 βάσεις ενώ το μήκος DNA που ξετυλίγεται είναι λίγο μεγαλύτερο από το υβρίδιο.



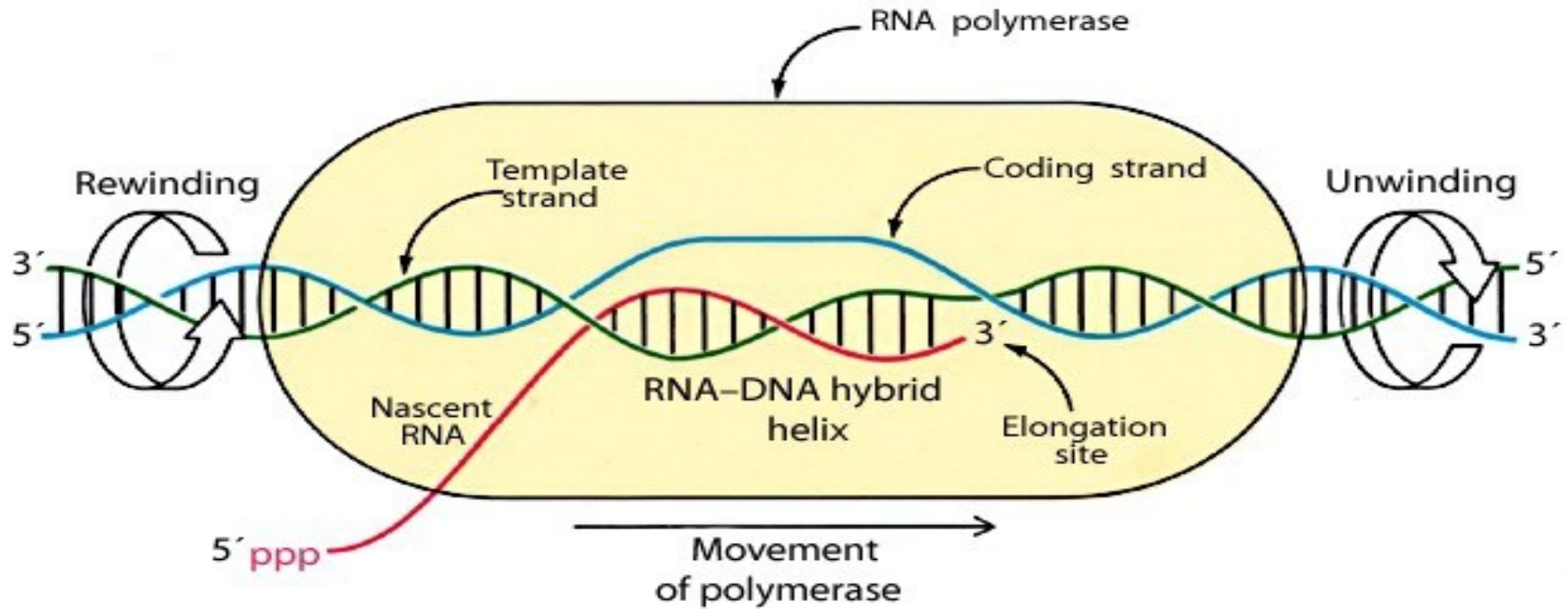
Επιμήκυνση κατά τη μεταγραφή



Το DNA ξετυλίγεται τοπικά για να μεταγραφεί και επανέρχεται σε δίκλωνη μορφή το τμήμα που έχει μεταγραφεί



Διαγραμματική απεικόνιση της επιμήκυνσης

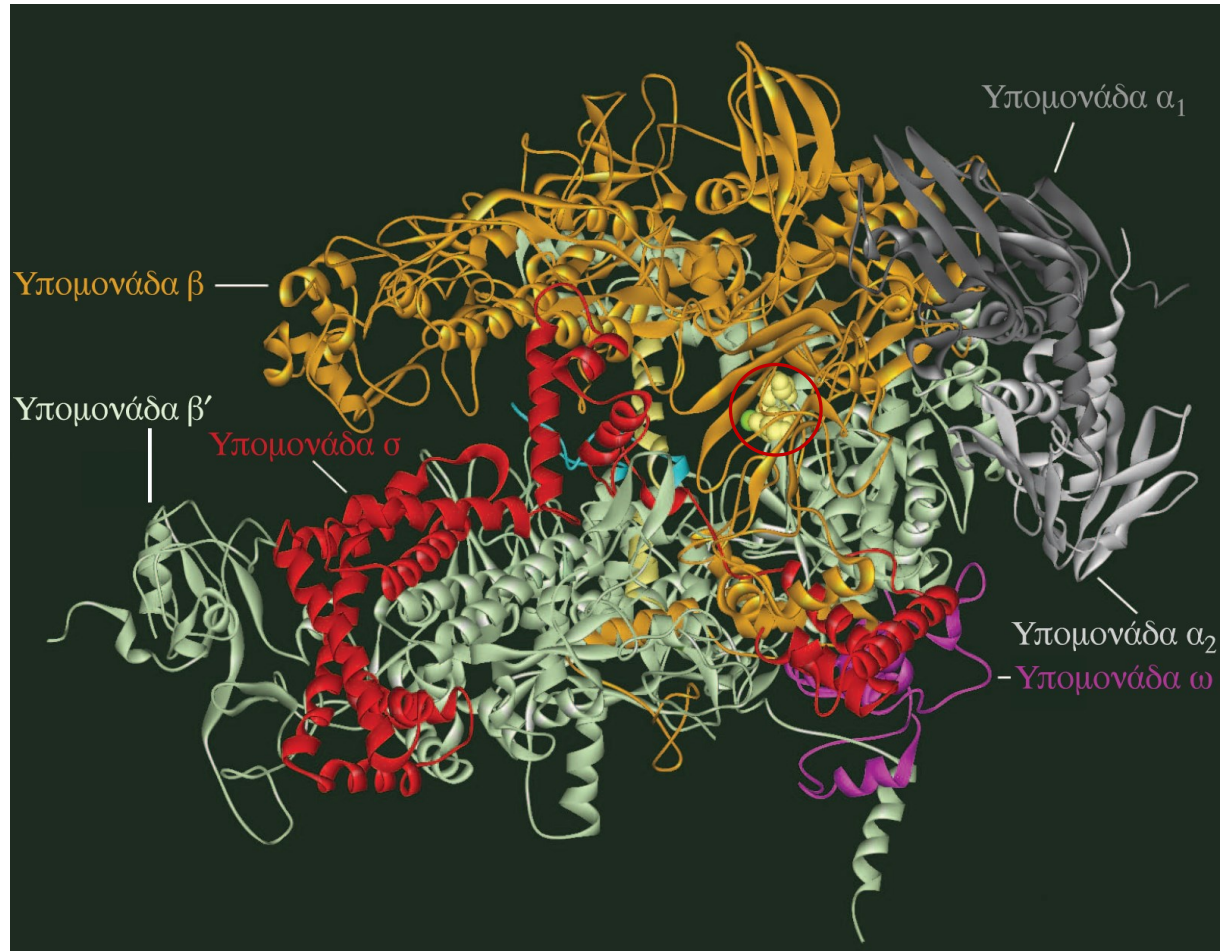


Η δομή της RNA πολυμεράσης

Οι υπομονάδες β και β' συνιστούν αθροιστικά το 60% περίπου της μάζας της RNA πολυμεράσης και αλληλεπιδρούν εκτενώς μεταξύ τους.

Η υπομονάδα β παρέχει ένα πλήρως συντηρημένο μοτίβο – NADFDGD- το οποίο είναι απαραίτητο για την κατάλυση.

Για το σχηματισμό του φωσφοδιεστερικού δεσμού απαιτούνται τα τρία κατάλοιπα ασπαρτικού σ' αυτό το μοτίβο (κίτρινο), μαζί με το ιόν Mg^{+2} (πράσινο) που είναι ενωμένο με αυτά.



Οι ριφαμυκίνες, είναι μια οικογένεια αντιβιοτικών που παράγονται από στελέχη του μικροοργανισμού *Streptomyces*, και χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία πολλών διαφορετικών βακτηριακών λοιμώξεων.



Η ριφαμικίνη (ένα ημισυνθετικό παράγωγο της ριφαμυκίνης) προσδένεται στο θύλακα της β υπομονάδας, κοντά στο ενεργό κέντρο, παρεμποδίζοντας τη σύνθεση του RNA μετά το σχηματισμό του πρώτου φωσφοδιεστερικού δεσμού.

Η RNA πολυμεράση δε μετακινείται κατά μήκος της μήτρας DNA με σταθερή ταχύτητα.

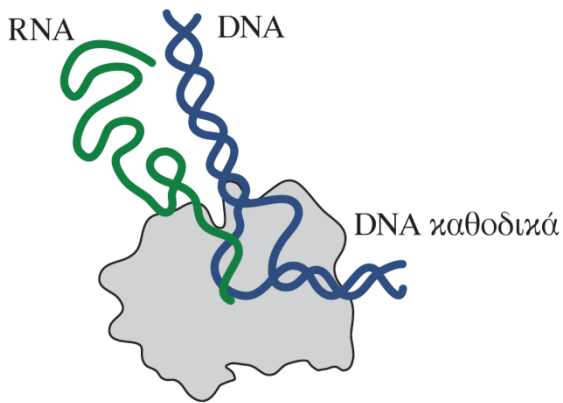
Η RNA πολυμεράση περνά περισσότερο χρόνο σε ορισμένες θέσεις της μήτρας DNA, οι οποίες ονομάζονται **θέσεις παύσης (transcription pause sites)**, απ' ότι σε άλλες.

Η χρησιμοποίηση των θέσεων παύσης (δηλαδή, η παροδική καθυστέρηση στην επιμήκυνση της αλυσίδας):

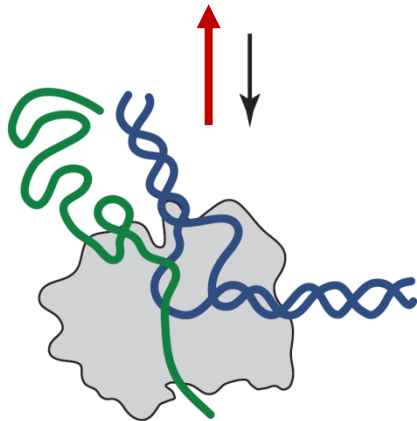
- συμβάλλει στον συγχρονισμό μεταξύ μεταγραφής και μετάφρασης
- επιβραδύνει την κίνηση της RNA πολυμεράσης ώστε να αποτρέψει την αλληλεπίδραση ρυθμιστικών πρωτεϊνών με το σύμπλοκο και
- οδηγεί τόσο σε **στάση της μεταγραφής** (transcription arrest, πλήρες σταμάτημα της μεταγραφής χωρίς διάσπαση του συμπλοκου), όσο και σε **τερματισμό της μεταγραφής** (transcription termination, διάσπαση του συμπλόκου).

Πιστότητα της μεταγραφής

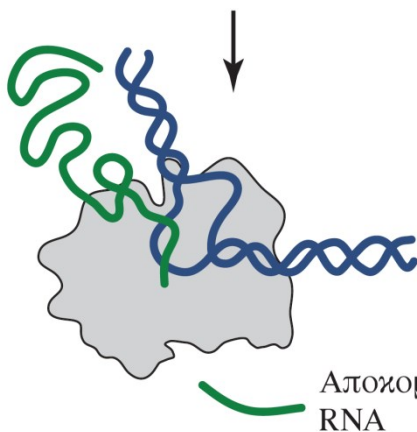
- Η μεταγραφή, αν και πολύ ακριβής, είναι λιγότερο ακριβής έναντι της αντιγραφής (ένα λάθος ανά 10^4 προστιθέμενα νουκλεοτίδια, συγκριτικά με ένα λάθος ανά 10^9 της αντιγραφής).
 - Το κύτταρο «ανησυχεί» περισσότερο για την ακρίβεια της αντιγραφής, παρά για εκείνη της μεταγραφής. Γιατί;
 - Η RNA πολυμεράση κατά την επιμήκυνση παίρνει μέρος σε δύο διαδικασίες ελέγχου της πιστότητας της μεταγραφής και επιδιόρθωσης.
- **Πυροφωσφορολυτική επιμέλεια:** Η RNA πολυμεράση καταλύει την απομάκρυνση ενός λανθασμένα ενσωματωμένου ριβονουκλεοτιδίου με την προσθήκη ενός PPI. Μπορεί να αφαιρέσει τόσο ορθά όσο και λανθασμένα ενσωματωμένα νουκλεοτίδια αλλά παραμένει περισσότερο χρόνο σε λάθος θέσεις με αποτέλεσμα να έχει συνήθως επιδιορθωτική δράση.
- **Υδρολυτική επιμέλεια:** Η πολυμεράση οπισθοδρομεί κατά ένα ή περισσότερα νουκλεοτίδια και διασπά το RNA προϊόν αφαιρώντας την αλληλουχία που περιέχει το λάθος. Επηρεάζεται από τους παράγοντες Gre που ενισχύουν την επιδιορθωτική δράση και κατόπιν εξασφαλίζουν την αποδοτική επιμήκυνση.



Επιμήκυνση από την RNA πολυμεράση



Οπισθοδρομηση της RNA πολυμεράσης



Αποκομμένο
RNA

Επιμήκυνση από την RNA πολυμεράση

Μεταγραφή και διορθωτικός έλεγχος από την RNA πολυμεράση

Υπό κανονικές συνθήκες, η RNA πολυμεράση (γκρι χρώμα) επιμηκύνει τη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα RNA (πράσινο) καθώς το ένζυμο μετακινείται καθοδικά στο DNA (μπλε).

Όταν υπάρχει ένα αταίριαστο ζεύγος στην περιοχή του υβριδίου DNA-RNA, η RNA πολυμεράση σταματά και στη συνέχεια οπισθοδρομεί κατά μία θέση, ώστε το 3' άκρο της αλυσίδας RNA να εκτοπιστεί από το ενεργό κέντρο του ενζύμου.

Η οπισθοδρομημένη RNA πολυμεράση μπορεί:

- είτε να ολισθήσει και πάλι προς τα εμπρός, επιστρέφοντας στην προηγούμενη κατάσταση επιμήκυνσης (πάνω),
- είτε να αποκόψει την 3' πλευρά από το νεοσυντιθέμενο RNA (κάτω) και κατόπιν να συνεχίσει την επιμήκυνση της μεταγραφής.

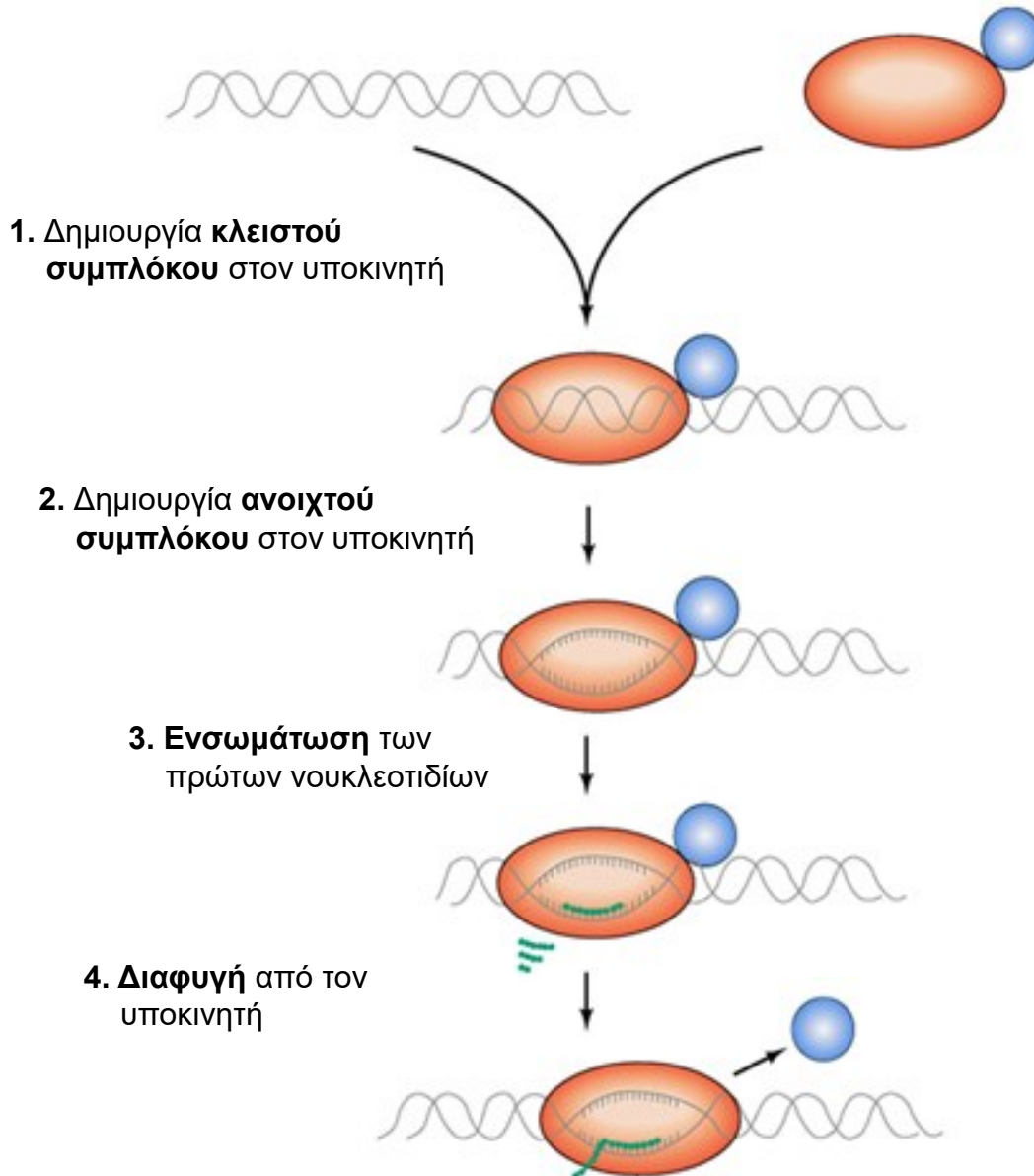
Η RNA πολυμεράση μπορεί να σταματήσει και να χρειαστεί να αφαιρεθεί.

Μια συνήθης αιτία παύσης είναι μια κατεστραμμένη αλυσίδα DNA. Οι συνέπειες της παύσης μπορεί να είναι καταστροφικές εάν το γονίδιο που μεταγράφεται είναι βασικό.

Για την αντιμετώπιση αυτής της κατάστασης ενεργοποιείται ένας μηχανισμός που ονομάζεται επιδιόρθωση συζευγμένη με τη μεταγραφή.

- Αφαιρούνται οι «σταματημένες» RNA πολυμεράσες υπό τη δράση της πρωτεΐνης TRCF
- και στρατολογούνται ένζυμα επιδιόρθωσης: όπως η ενδονουκλεάση Uvr(A)BC.

Τα στάδια έναρξης της μεταγραφής



Λήξη της μεταγραφής

Η μεταγραφή για κάθε γονίδιο ή ομάδα γονιδίων έχει συγκεκριμένο σημείο λήξης. Αλληλουχίες καλούμενες **τερματιστές (terminators)** διακόπτουν την κίνηση της RNA πολυμεράσης και προκαλούν την αποσύνδεσή της από το DNA, ενώ ταυτόχρονα απομακρύνεται η αλυσίδα του RNA.



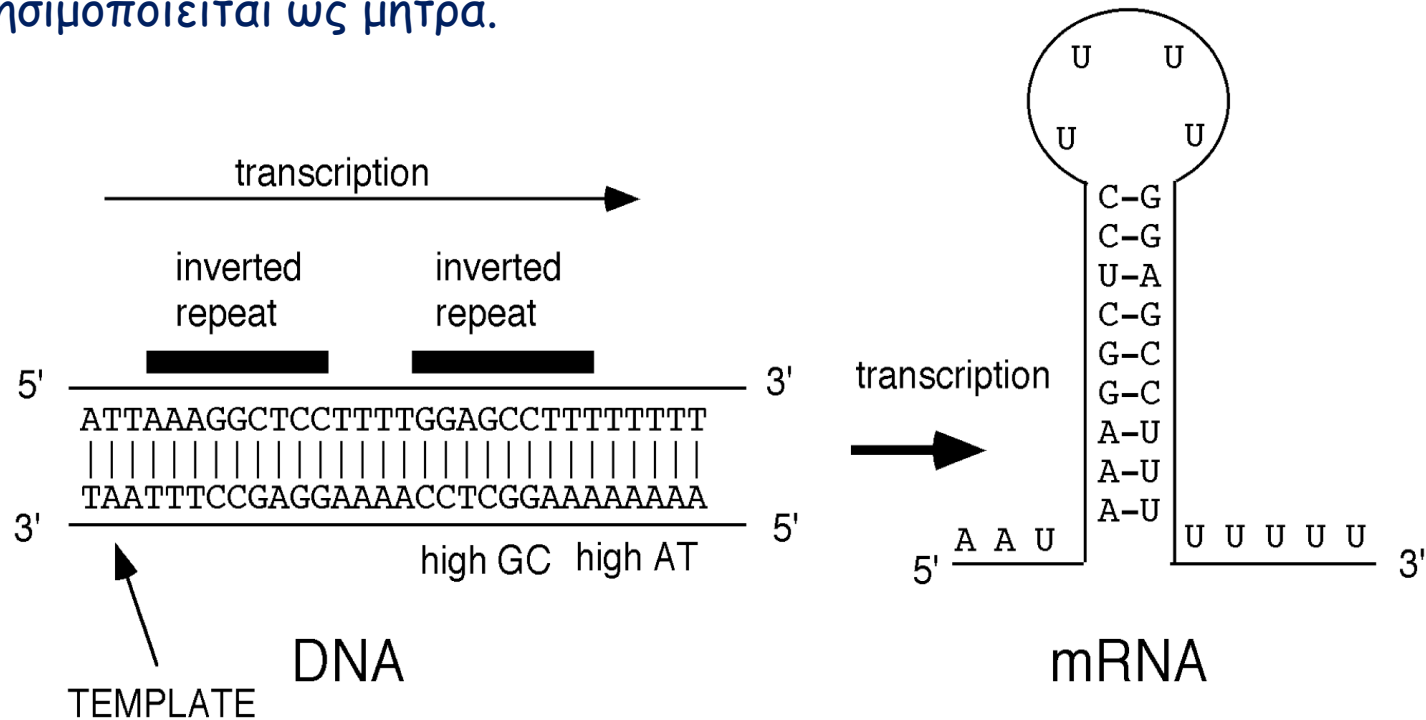
Τύποι αλληλουχιών λήξης

(α) Απλές αλληλουχίες λήξης ή ενδογενείς τερματιστές

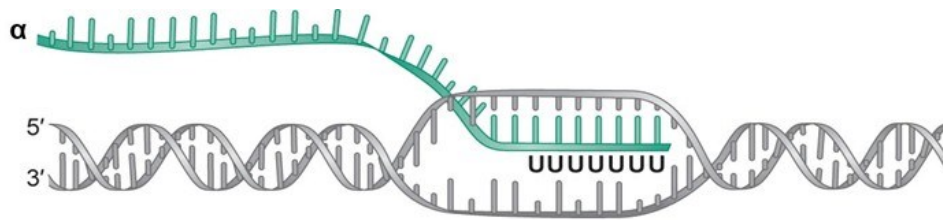
(β) Αλληλουχίες που απαιτούν βοηθητικούς παράγοντες λήξης (termination factors), όπως ο παράγοντας ρ.

Οι απλές αλληλουχίες λήξης ή ενδογενείς τερματιστές, έχουν τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

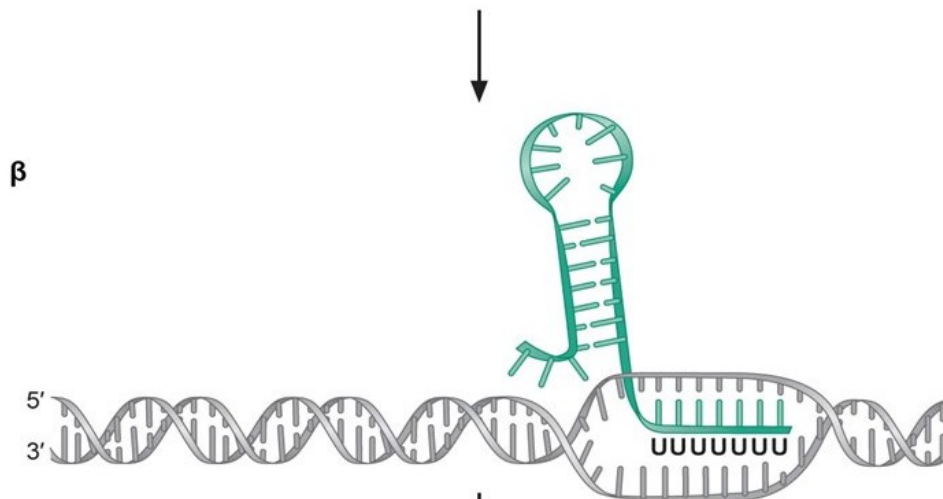
1. Μια περιοχή που αποτελείται από μια αντίστροφα επαναλαμβανόμενη αλληλουχία που μπορεί να δημιουργεί δομές φουρκέτας
2. Μια περιοχή πλούσια σε G+C που βρίσκεται στην περιοχή της φουρκέτας
3. Μια αλληλουχία πλούσια σε A+T με τις A στην αλυσίδα που χρησιμοποιείται ως μήτρα.



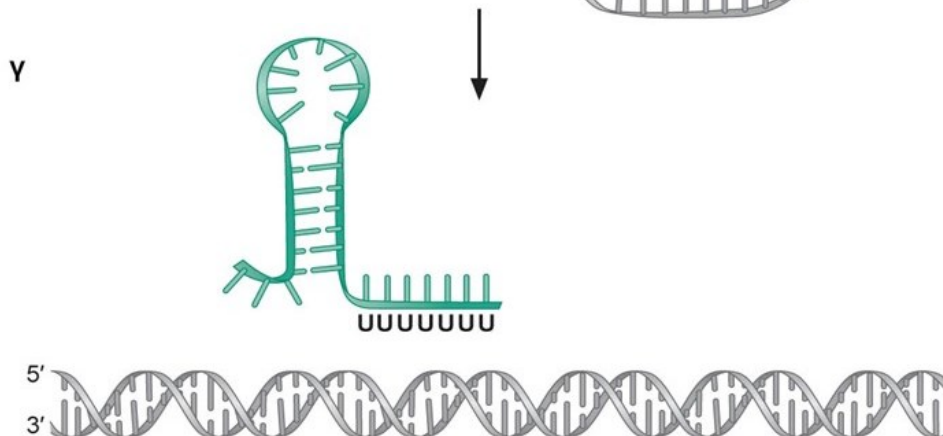
Μοντέλο λήξης της μεταγραφής



Το σύμπλοκο επιμήκυνσης έχει μόλις ολοκληρώσει τη σύνθεση των ουριδινών (U).



Ο σχηματισμός της φουρκέτας του RNA διασπά μέρος του υβριδίου DNA-RNA, αφήνοντας μόνο τις U συνδέσεις με το DNA.

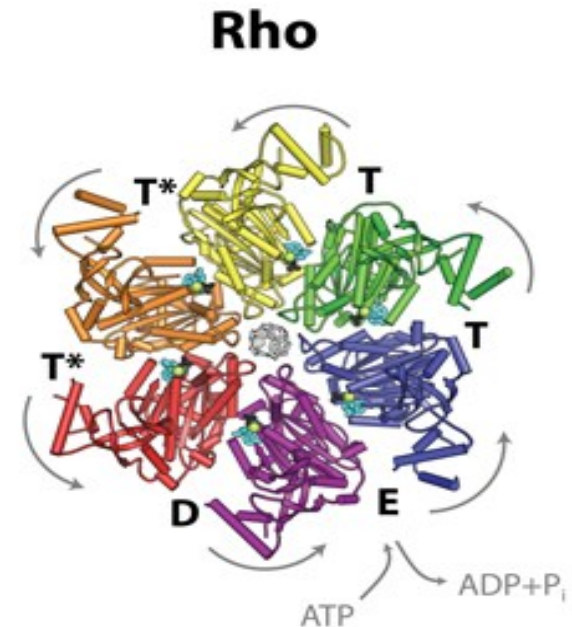


Το ασταθές υβρίδιο poly(U)-poly(dA), αποσυνδέεται αποδεσμεύοντας το προϊόν της μεταγραφής.

Αλληλουχίες του DNA που δεν διαθέτουν συνήθως τα χαρακτηριστικά των απλών αλληλουχιών λήξης, απαιτούν βοηθητικούς παράγοντες.

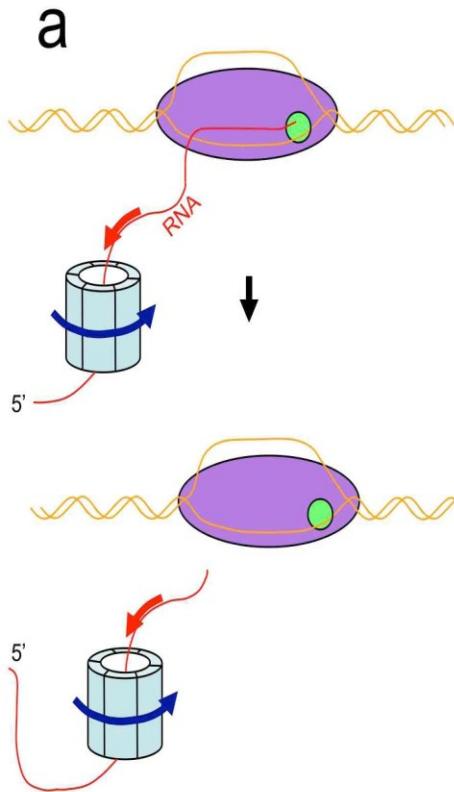
Πρωτεΐνη Rho ή παράγοντας Rho (Rho dependent termination)

Εξαμερής πρωτεΐνη με **δομή δακτυλίου** και δράσεις ATPάσης και ελικάσης. Προσδένεται σε ειδικές αλληλουχίες του RNA (rut sites) μήκους περίπου 40 νουκλεοτιδίων και πλούσιες σε C.

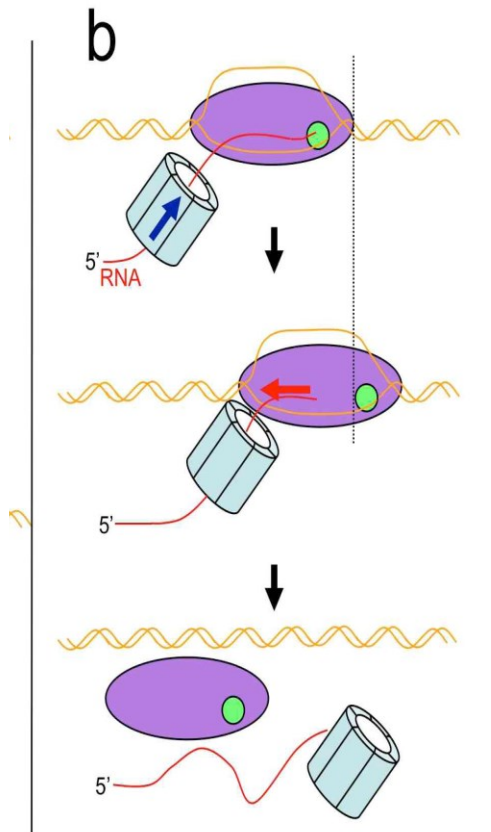


Αντιληκτικοί παράγοντες (Antitermination factors): Μελέτη έκφρασης των γονιδίων του φάγου λ έδειξε ότι υπάρχουν πρωτεΐνες που σε ορισμένες περιπτώσεις εμποδίζουν τη λήξη της μεταγραφής ορισμένων γονιδίων του φάγου.

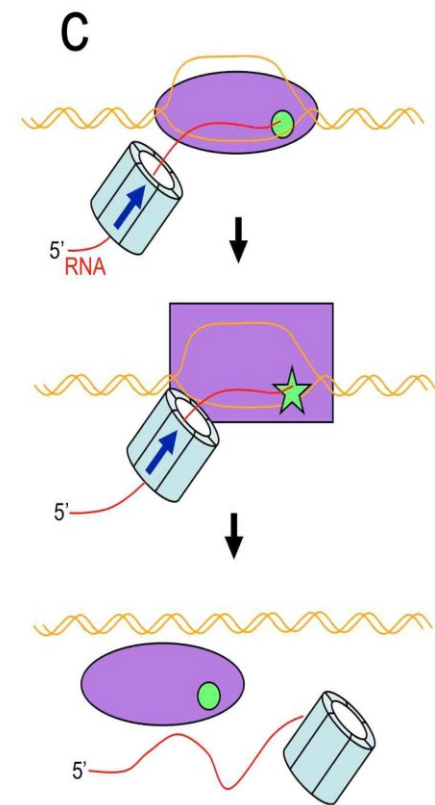
Μοντέλα λήξης της μεταγραφής με τον Rho



(α) Ο Rho ως εξαμερές (μπλε βαρέλι) μέσω της ενεργότητας ΑΤΡάσης «σπρώχνει» το RNA έξω από το σύμπλοκο επιμήκυνσης.



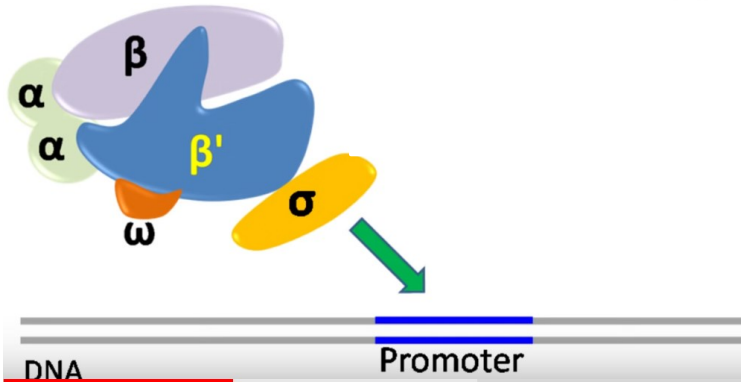
(β) Ο Rho μετακινείται κατά μήκος του νεοσυντιθέμενου RNA ως το σύμπλοκο επιμήκυνσης όπου «σπρώχνει» το RNA έξω από το σύμπλοκο επιμήκυνσης.



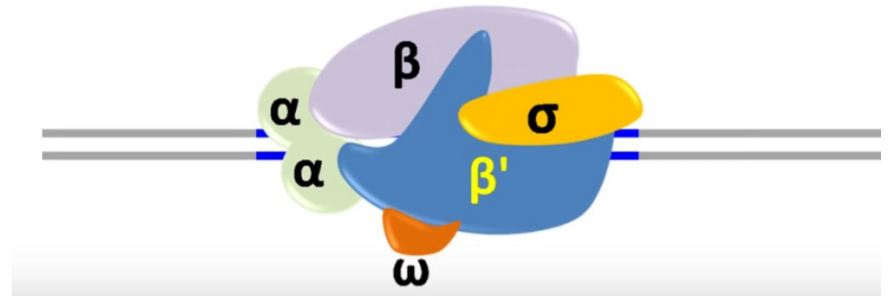
(γ) Ο Rho σταματάει τη μεταγραφή μέσω αλλοστερικής αλληλεπίδρασης με το καταλυτικό κέντρο (πράσινο) του ενζύμου (Nature 2010, 463, 245-249)

Σύνοψη μεταγραφής

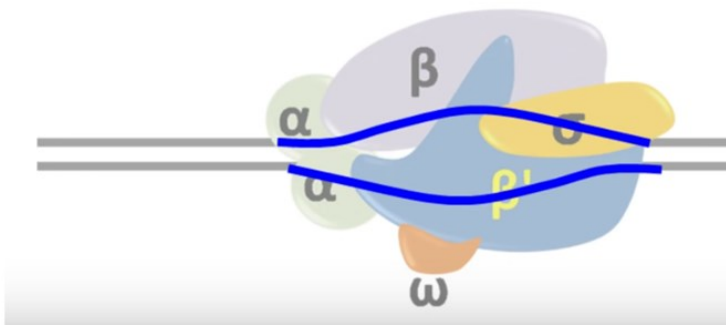
Initiation



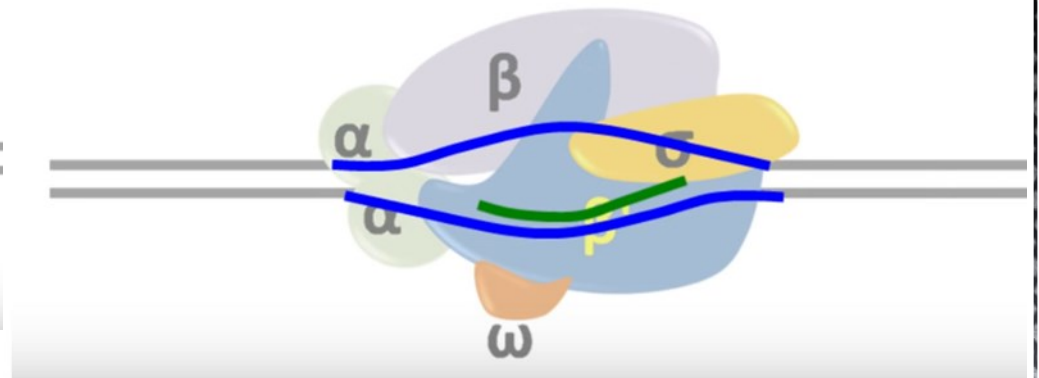
Closed complex



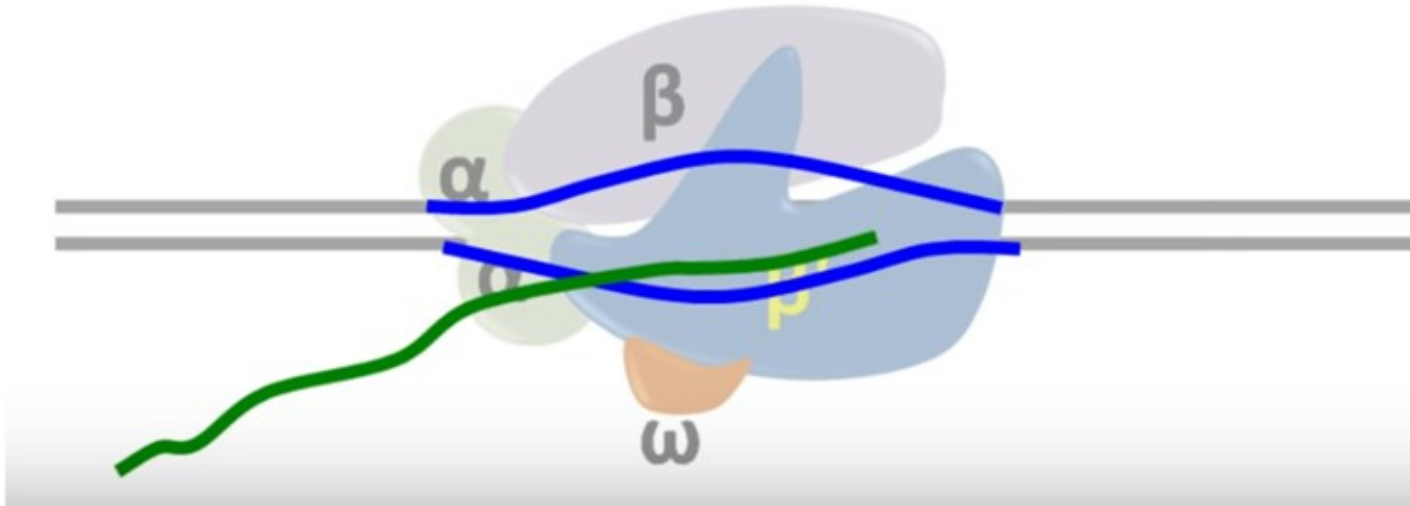
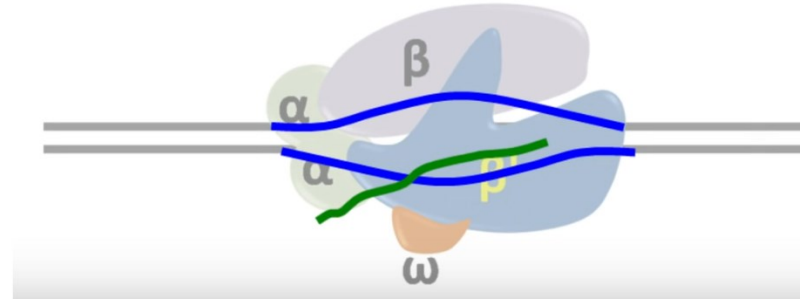
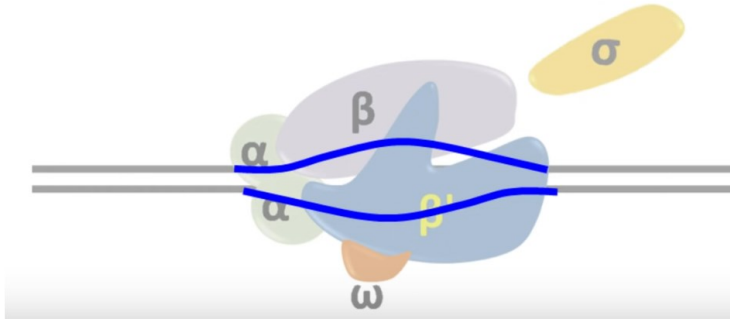
Open complex



Abortive Initiation



Elongation

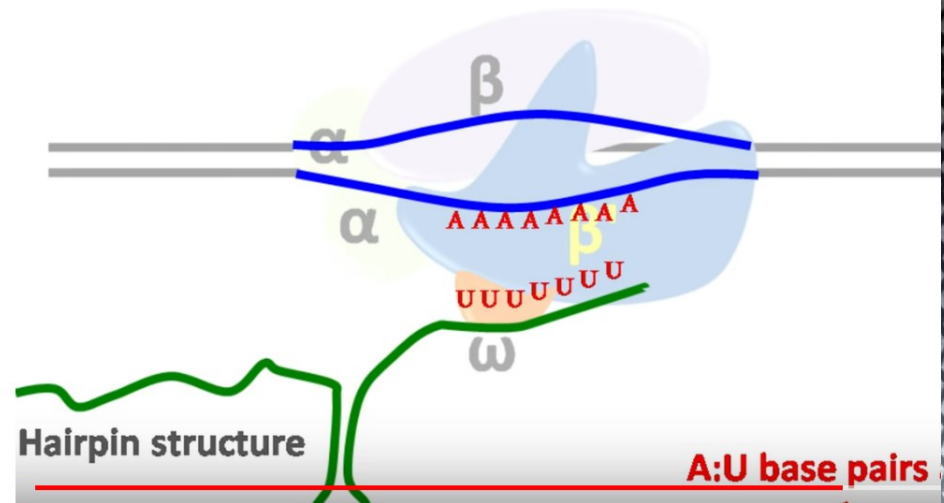
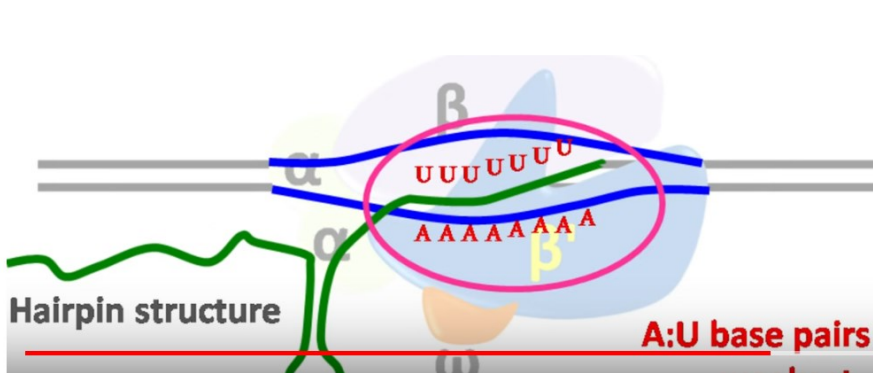


Termination

Rho independent Termination

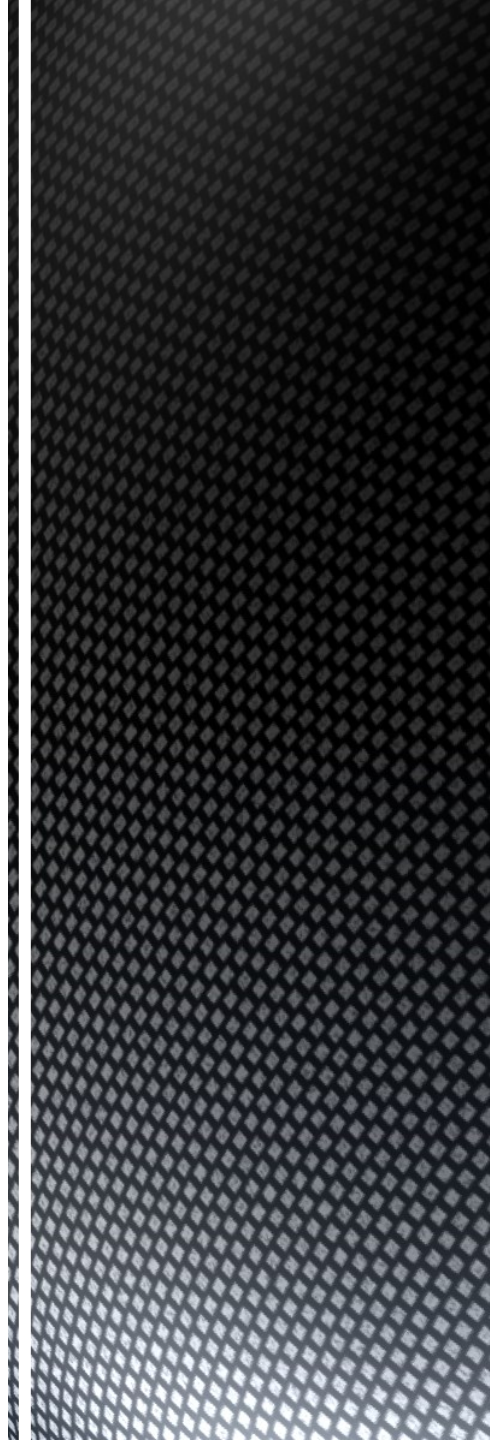


Hairpin structure



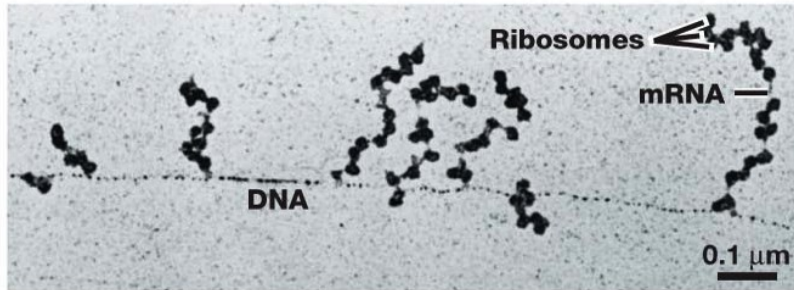
Ωρίμανση και ρύθμιση της μεταγραφής στους προκαρυωτικούς οργανισμούς

Εισαγωγή στη Μοριακή Βιολογία

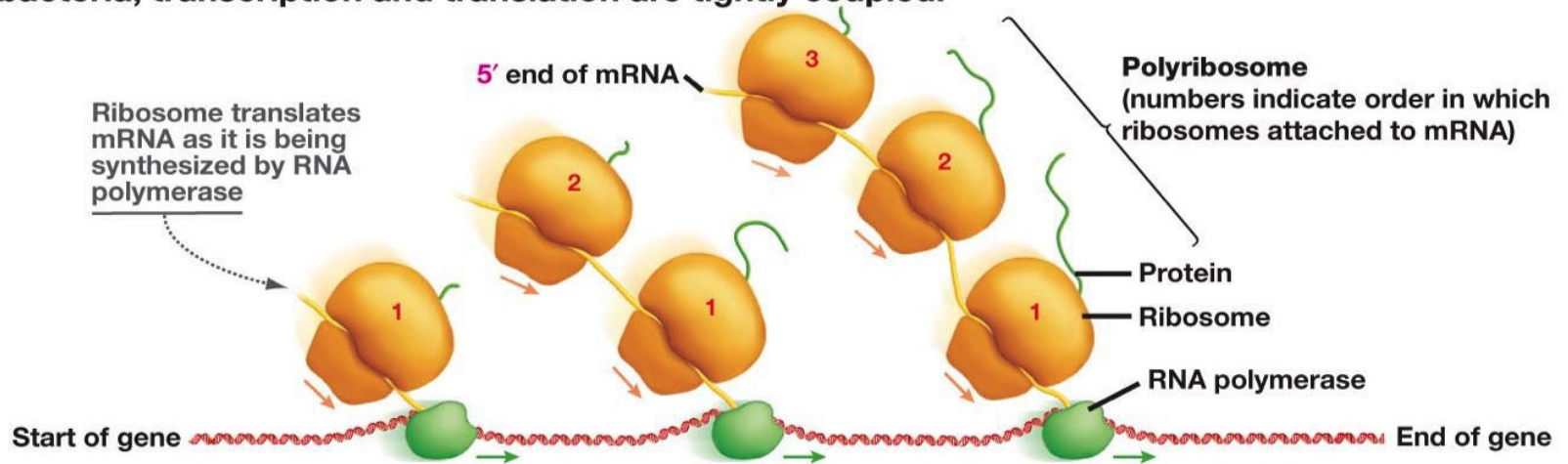


Στους προκαρυωτικούς οργανισμούς η έναρξη της μετάφρασης δεν προϋποθέτει την ολοκλήρωση της μεταγραφής.

(a) Bacterial ribosomes during translation



(b) In bacteria, transcription and translation are tightly coupled.



Γενικά για την ωρίμανση του RNA

Τα αρχικά μετάγραφα- primary transcripts- υπόκεινται σε ωρίμανση:

Η μεταγραφή παράγει RNA τα οποία στις περισσότερες περιπτώσεις δεν είναι λειτουργικά αν δεν υποστούν ωρίμανση. **Εξαιρέση αποτελούν τα mRNA** των προκαρυωτικών οργανισμών (υπάρχουν εξαιρέσεις).

Η ωρίμανση **γίνεται συγχρόνως** με τη μεταγραφή σε προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Σε ορισμένα βιβλία υπάρχει ακόμα ο όρος μετα-μεταγραφική ωρίμανση -posttranscriptional processing)

Η ωρίμανση περιλαμβάνει:

1. **Νουκλεολυτικές αντιδράσεις** δηλ. αφαίρεση αλληλουχιών από το πρόδρομο μόριο
2. **Προσθήκες νουκλεοτιδίων** π.χ. CCA στο 3' άκρο του tRNA ή κάλυψη στο 5' άκρο του mRNA ή προσθήκη poly(A) στο 3' άκρο του mRNA
3. **Τροποποιήσεις βάσεων** π.χ μετατροπή της ουρακίλης σε ψευδοουρακίλη

Ωρίμανση στους προκαρυωτικούς οργανισμούς

- Στο mRNA των προκαρυωτικών δεν συναντάται συνήθως, γιατί η **μετάφραση** των mRNA αρχίζει από το 5' άκρο **πριν ακόμα ολοκληρωθεί η μεταγραφή** τους στο 3' άκρο.
- Όλα τα mRNA (και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς) περιλαμβάνουν αλληλουχίες στο 5' και 3' άκρο που δεν μεταφράζονται - **5' και 3' untranslated regions UTR**. Συχνά οι περιοχές αυτές είναι ρυθμιστικές αλληλουχίες
- Τα rRNA και tRNA συντίθενται υπό τη μορφή προδρόμων μορίων και η ωρίμανση είναι απαραίτητη
- Στην ωρίμανση αυτών των μορίων παίρνουν μέρος ένζυμα
- Για τα **rRNA**, η **RNAάση III**
- Για τα **tRNA**, η **RNAάση P** στο 5' άκρο και οι **RNAάσες F και D** στο 3' άκρο.
- **Αυτά τα ένζυμα αναγνωρίζουν κυρίως τριτοταγείς δομές και όχι συγκεκριμένες αλληλουχίες**

Προκαρυωτικά mRNA

Η ωρίμανση του mRNA στους προκαρυωτικούς οργανισμούς δεν είναι διαδεδομένη. Με εξαίρεση τα mRNA ορισμένων βακτηριοφάγων, τα mRNA των προκαρυωτικών οργανισμών δεν υπόκεινται σε ωρίμανση. **Γιατί**

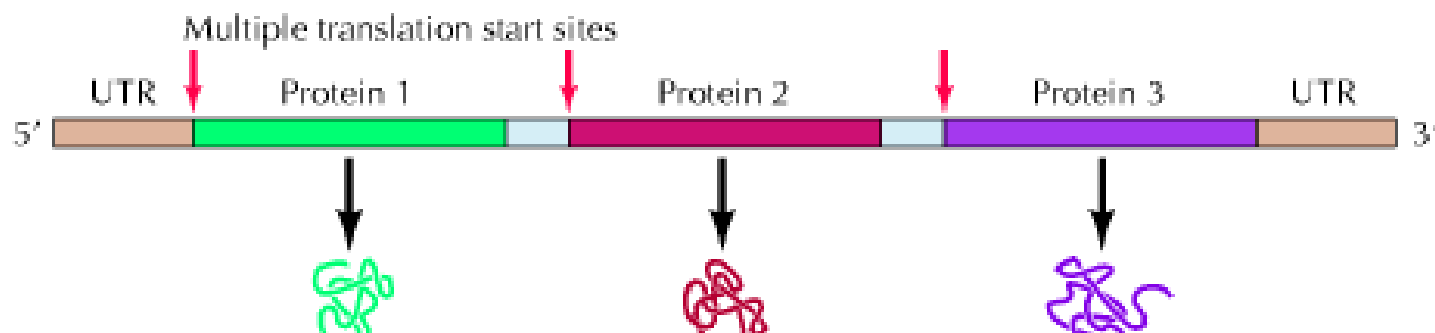
- Η μεταγραφή και η μετάφραση γίνονται συγχρόνως.
- Τα mRNA έχουν μικρή διάρκεια ζωής και σε ορισμένες περιπτώσεις αρχίζει η αποικοδόμηση από το 5' άκρο τους πριν ακόμα ολοκληρωθεί η σύνθεση του 3' άκρου.

Πολυαδενυλίωση: Μέχρι πρόσφατα κυριαρχούσε η άποψη ότι στα προκαρυωτικά mRNA (σε αντίθεση με τα ευκαρυωτικά) δεν προστίθενται αδενίνες στο 3' άκρο τους. Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι αρκετά προκαρυωτικά mRNA πολυαδενυλιώνονται και αυτό σχετίζεται με τη σταθερότητά τους.

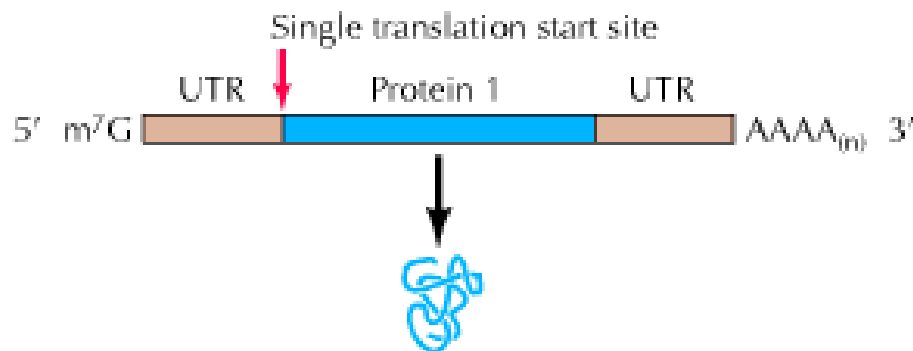
Τα προκαρυωτικά mRNA είναι συνήθως πολυσιστρονικά, δηλ. κωδικοποιούν περισσότερες της μιας πολυπεπτιδικές αλυσίδες.

Σιστρόνιο (cistron) ονομάζεται το τμήμα του DNA που αντιστοιχεί σε μια πολυπεπτιδική αλυσίδα και στο οποίο περιλαμβάνονται τα σημεία έναρξης και λήξης της μετάφρασης. Η αλληλουχία που προηγείται της κωδικής περιοχής και δεν μεταφράζεται ονομάζεται αλληλουχία-οδηγός και σε ορισμένες περιπτώσεις περιέχει ρυθμιστική περιοχή.

Prokaryotic mRNA

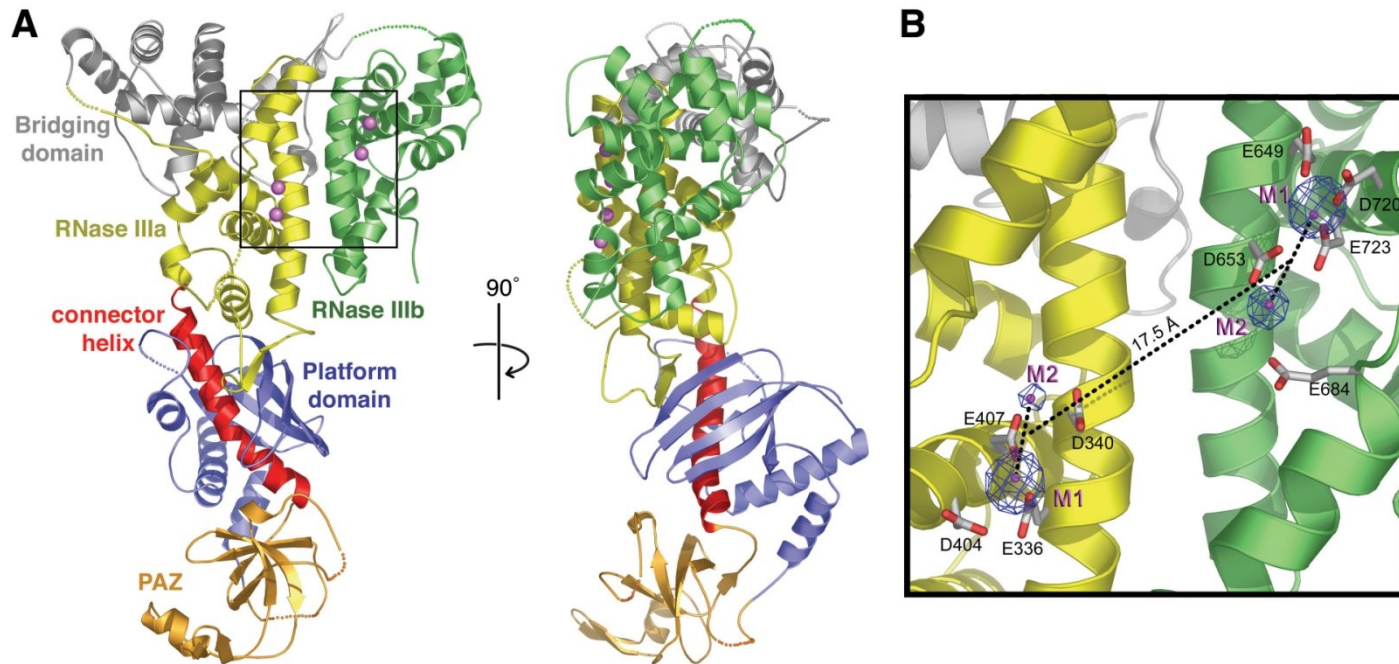


Eukaryotic mRNA



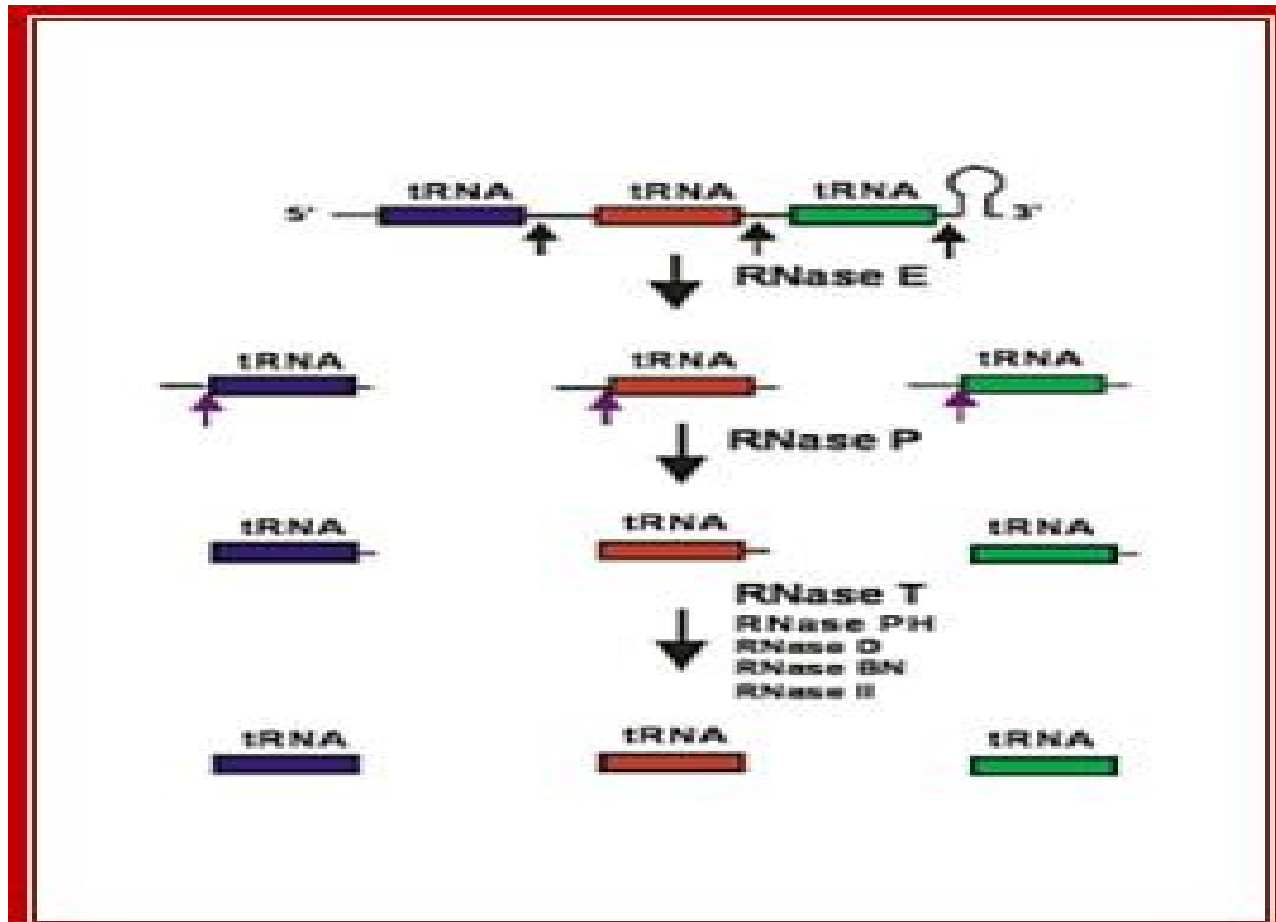
Τα mRNA ορισμένων βακτηριοφάγων υπόκεινται σε ωρίμανση.

Στους φάγους T3 και T7, τα πρώιμα και τα όψιμα γονίδια μεταγράφονται σ' ένα πολυσιστρονικό μετάγραφο και τα mRNA που αντιστοιχούν σε ξεχωριστά γονίδια προκύπτουν με τη δράση του ενζύμου RNάση III, η οποία φαίνεται να αναγνωρίζει συγκεκριμένες δομές φουρκέτας και όχι συγκεκριμένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες.



Οργάνωση των γονιδίων tRNA στα βακτήρια

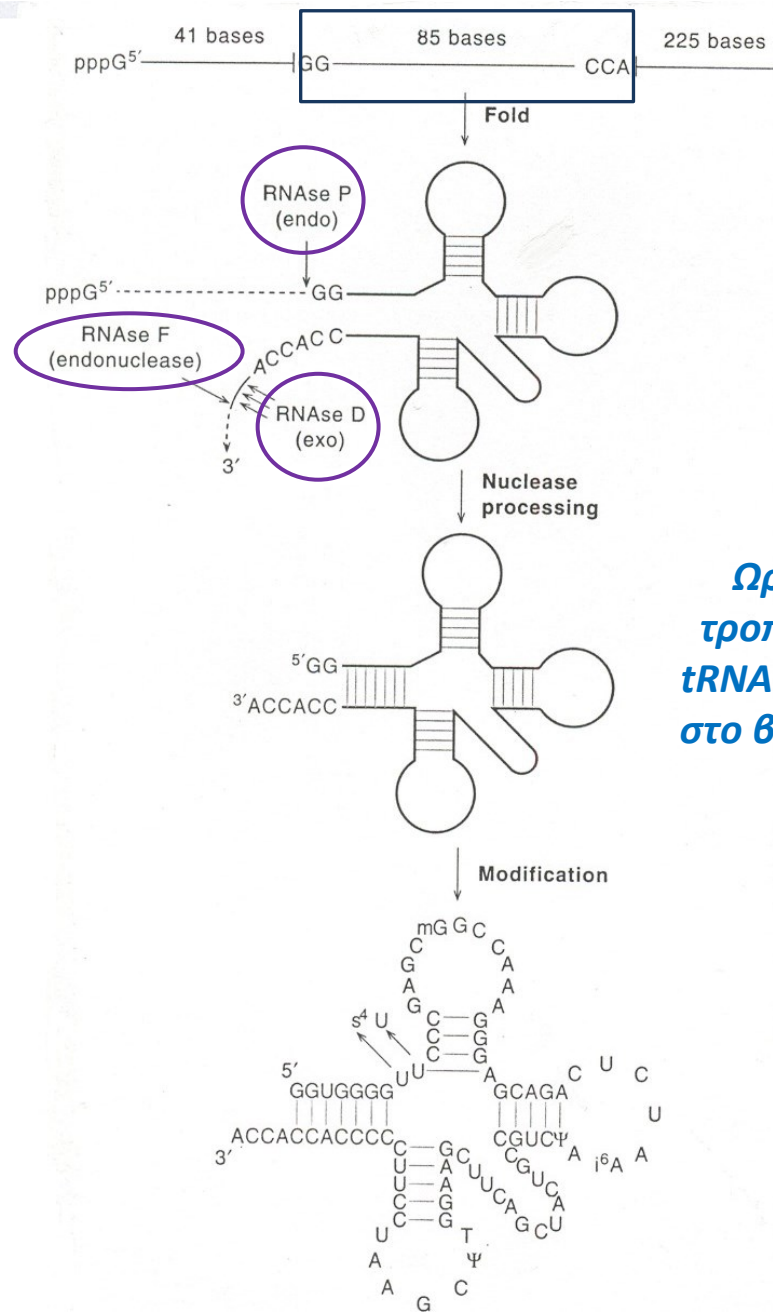
Στα γονίδια που κωδικοποιούν tRNA παρατηρείται μια ποικιλία οργάνωσης. Συναντώνται μονάδες μεταγραφής που περιέχουν την πληροφορία για ένα μόνο tRNA, μονάδες μεταγραφής για 2 ή και περισσότερα tRNA και μονάδες μεταγραφής όπου γονίδια tRNA είναι διάσπαρτα μεταξύ γονιδίων που κωδικοποιούν rRNA.



Ωρίμανση των tRNAs

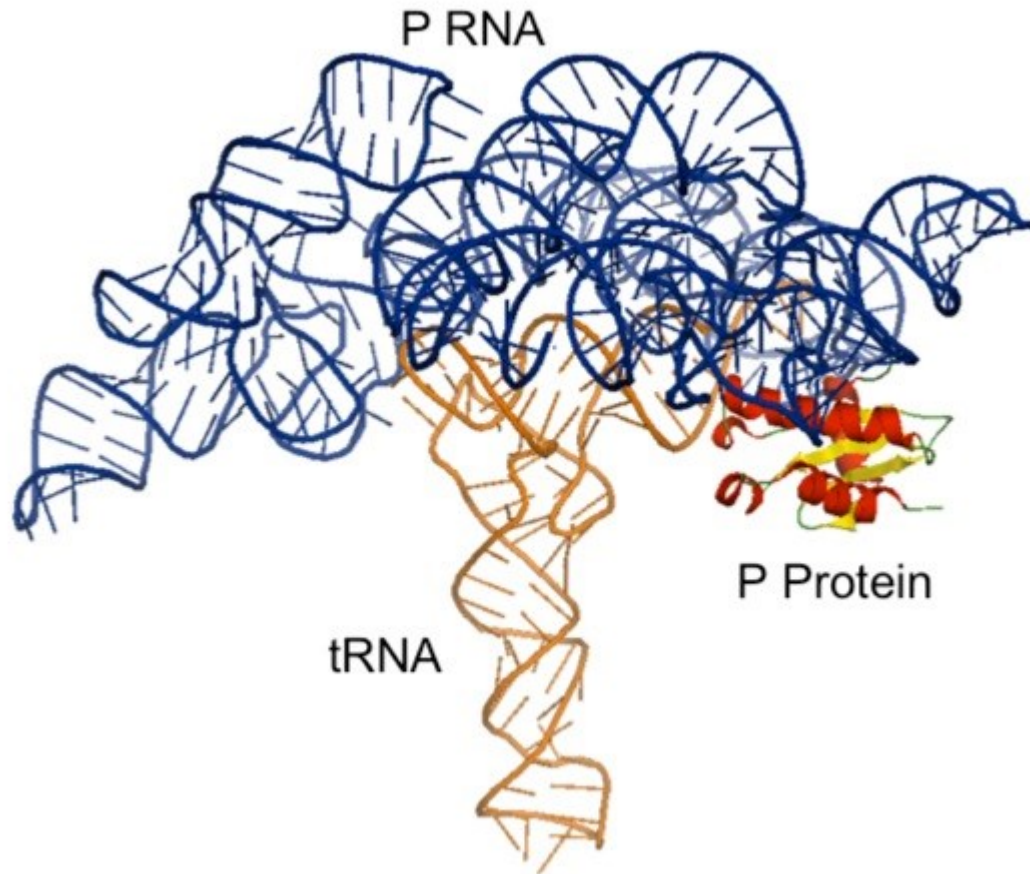
Τα αρχικά προϊόντα της μεταγραφής των γονιδίων tRNA είναι μεγάλα πρόδρομα μόρια (precursor molecules).

Τα βασικά στάδια της ωρίμανσης περιλαμβάνουν τομή στο πρόδρομο μόριο και τροποποίηση ενός αριθμού νουκλεοτιδίων.



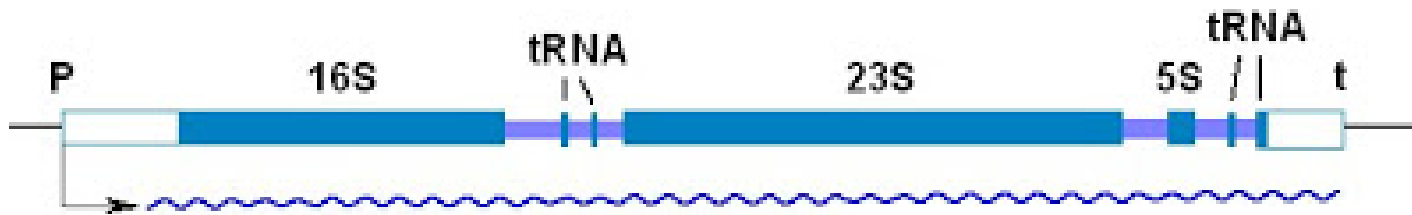
Ωρίμανση και τροποποίηση του tRNA της τυροσίνης στο βακτήριο *E. coli*

Η **RNάση P** δεν αναγνωρίζει ειδικές βάσεις στα σημεία που επιδρά, αλλά συγκεκριμένες δομές. Είναι ένα ασυνήθιστο ένζυμο που αποτελείται από RNA (375 νουκλεοτίδια) και πρωτεΐνη (~ 130 kDa). Το RNA σε αυτή την περίπτωση έχει καταλυτική ενεργότητα (ριβοένζυμο).



Οργάνωση των γονιδίων rRNA στα βακτήρια

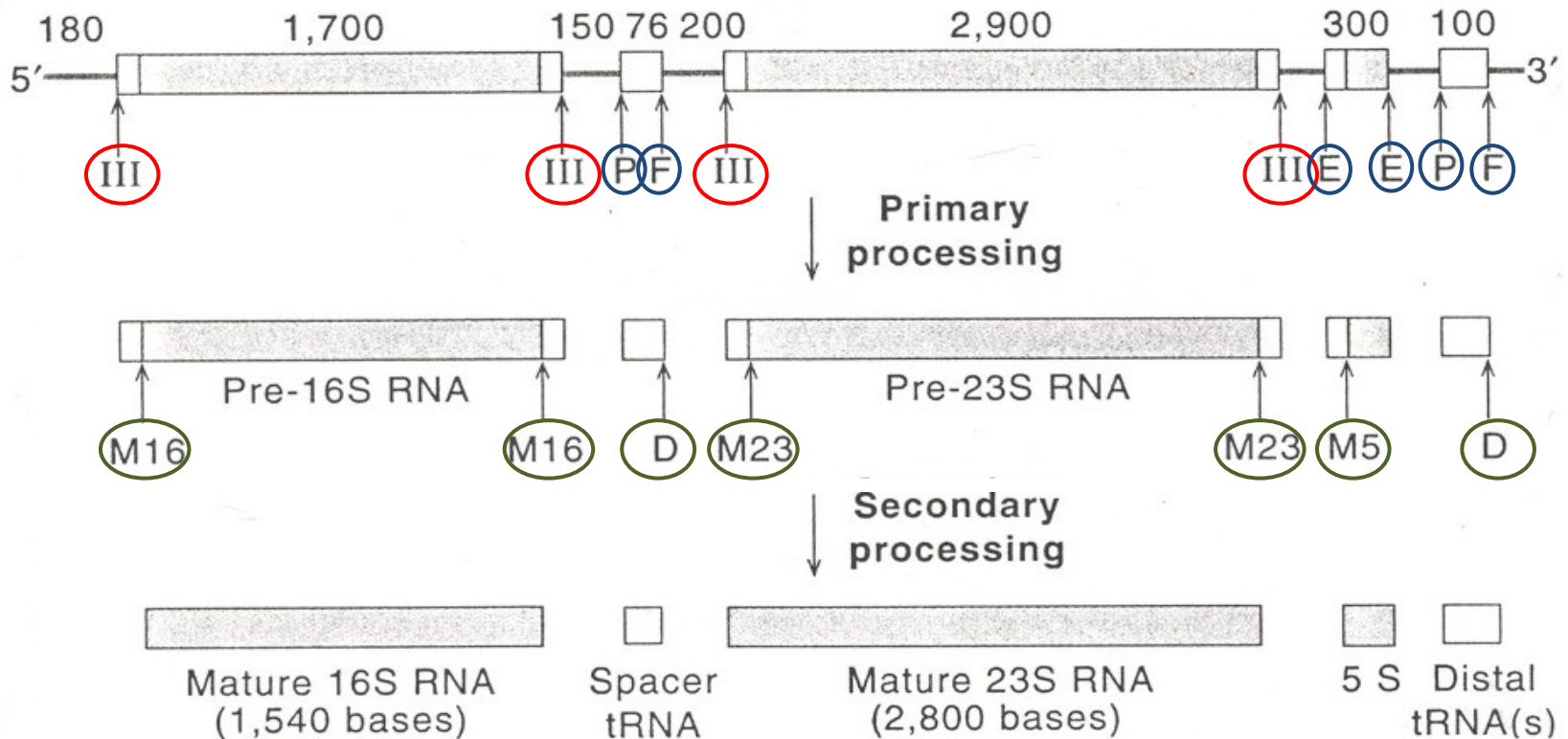
Τα γονίδια που κωδικοποιούν τα 3 rRNA συγκροτούν μια μονάδα μεταγραφής από την οποία μέσω της ωρίμανσης προκύπτουν τα μεμονωμένα και ώριμα rRNA.



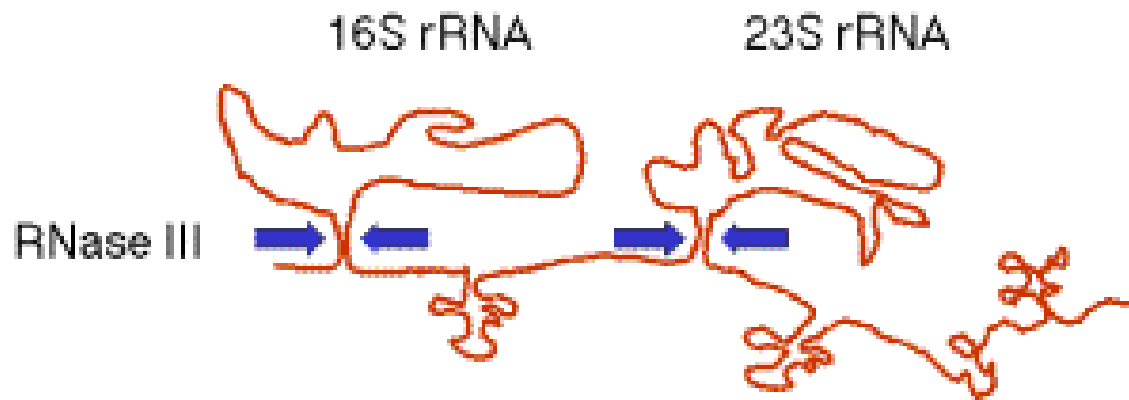
Σε όλες τις περιπτώσεις η διαδικασία της ωρίμανσης που γίνεται συγχρόνως με τη μεταγραφή (cotranscriptional processing) είναι απαραίτητη προκειμένου να προκύψουν τα λειτουργικά μόρια RNA.

Ωρίμανση των rRNAs

Τα γονίδια για τα τρία ριβοσωμικά RNA οργανώνονται σε μονάδες μεταγραφής οι οποίες περιλαμβάνουν τις αλληλουχίες για τα ώριμα RNA που διαχωρίζονται μεταξύ τους με συνδετικές περιοχές, στις οποίες πολλές φορές υπάρχουν και αλληλουχίες μορίων tRNA.



Παράδειγμα των σταδίων ωρίμανσης ενός αρχικού μεταγράφου από το οποίο δημιουργούνται τα ώριμα rRNA και δύο tRNA στην *E. coli*.



No apparent primary sequence specificity - perhaps RNase III recognizes a particular stem structure.



Μωβ: δίλωνο RNA

Σύνοψη για την ωρίμανση στους προκαρυωτικούς οργανισμούς

- Όλα τα σταθερά RNA υπόκεινται σε ωρίμανση.
(Τα mRNA σε ορισμένες περιπτώσεις υπόκεινται και αυτά σε ωρίμανση).
- 10 περίπου νουκλεάσες παίρνουν μέρος σε αυτή τη διαδικασία.
- Ορισμένα από τα ένζυμα αναγνωρίζουν δομές και όχι αλληλουχίες.
- Η RNάση P αποτελείται από RNA και πρωτεΐνη και το RNA σε αυτή την περίπτωση έχει καταλυτική ενεργότητα.
- Τροποποίηση βάσεων μετά από επίδραση ειδικών ενζύμων.

Γονιδιακή ρύθμιση στους προκαρυωτικούς οργανισμούς

Στα βακτήρια, η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης αποσκοπεί κυρίως στην προσαρμογή του μονοκύτταρου οργανισμού στις εναλλασσόμενες συνθήκες του περιβάλλοντος, κυρίως του θρεπτικού υλικού, έτσι ώστε να εξασφαλίζονται οι καλύτερες συνθήκες για την αύξηση και την διαίρεση τους.

Τα επίπεδα ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης:

1. Οργάνωση των γονιδίων.

Συνεργιώμα (operon): ομάδα γονιδίων που οργανώνονται σε ειδικές μεταγραφικές μονάδες και υπόκεινται σε κοινή ρύθμιση της έκφρασής τους

Η οργάνωση αυτή διευκολύνει την **συντονισμένη έκφραση** γονιδίων, τα προϊόντα των οποίων συμμετέχουν σε σχετικές μεταξύ τους λειτουργίες π.χ. ένζυμα της σύνθεσης ενός αμινοξέος.

2. Ρύθμιση της μεταγραφής.

Η αλληλεπίδραση υποκινητών - μεταγραφικών παραγόντων επιτρέπει την ενεργοποίηση και την καταστολή έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων.

3. Σταθερότητα του mRNA

Αφορά τον χρόνο που το mRNA παραμένει ακέραιο και μεταφράζεται. Η διάσπαση mRNA-στόχων μειώνει και τα επίπεδα της αντίστοιχης πρωτεΐνης.

4. Ρύθμιση της απόδοσης της μετάφρασης

5. Σταθερότητα των παραγόμενων πρωτεϊνών

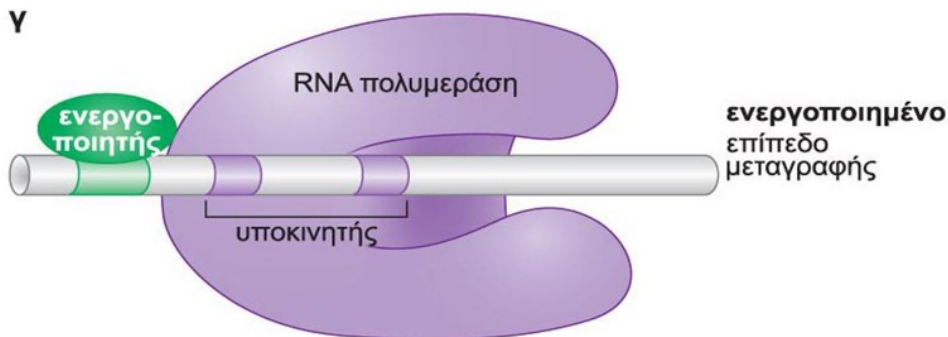
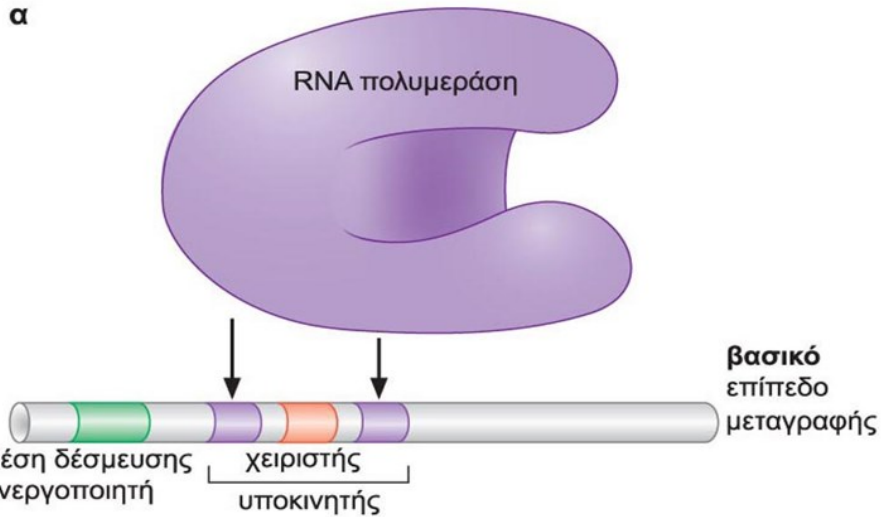
Οργάνωση των βακτηριακών γονιδίων

- 1) **Δομικά γονίδια (structural genes)**: κωδικοποιούν πρωτεΐνες ή RNA που εμφανίζουν βιολογική δράση (ένζυμα, ριβοσωμικές πρωτεΐνες, μεμβρανικές πρωτεΐνες, ριβοσωμικά RNA, tRNA κ.λ.π.)
- 2) **Ρυθμιστικά γονίδια (regulatory genes)**: κωδικοποιούν την σύνθεση ρυθμιστικών πρωτεϊνών που έχουν ρόλο ενεργοποιητή (activators) ή καταστολέα (repressors) που αντίστοιχα επάγουν ή καταστέλουν την έκφραση άλλων γονιδίων.
Βασική τους λειτουργία είναι να βοηθήσουν το κύτταρο να προσαρμοστεί στις αλλαγές του περιβάλλοντος, ρυθμίζοντας την ταχύτητα της μεταγραφής των δομικών γονιδίων.

Τα χαρακτηριστικά των ρυθμιστικών πρωτεϊνών

- Οι περισσότεροι ενεργοποιητές και καταστολείς δρουν στο επίπεδο **έναρξης της μεταγραφής** γιατί
 - I. Αποδοτικό σημείο ελέγχου από ενεργειακή άποψη
 - II. Ευκολότερη η ρύθμιση: στο απλοειδές γονιδίωμα υπάρχει ένα αντίγραφο κάθε γονιδίου και συνεπώς ένας υποκινητής. Ο έλεγχος της έκφρασης σε αυτό το επίπεδο είναι ευκολότερος και «γενικότερος» από την ρύθμιση π.χ. στο επίπεδο της μετάφρασης.
- Οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες επηρεάζουν την δέσμευση της RNA πολυμεράσης στο DNA προκαλώντας την **ενεργοποίηση ή την καταστολή της μεταγραφής**. Η θέση πρόσδεσής τους στο DNA ονομάζεται **χειριστής (operator)** και η αλληλουχία του χειριστή είναι σχεδόν πάντα πολύ κοντά στην αλληλουχία του υποκινητή (συχνά επικαλύπτεται με αυτή).

Πολλοί υποκινητές ρυθμίζονται από ενεργοποιητές ή καταστολείς.

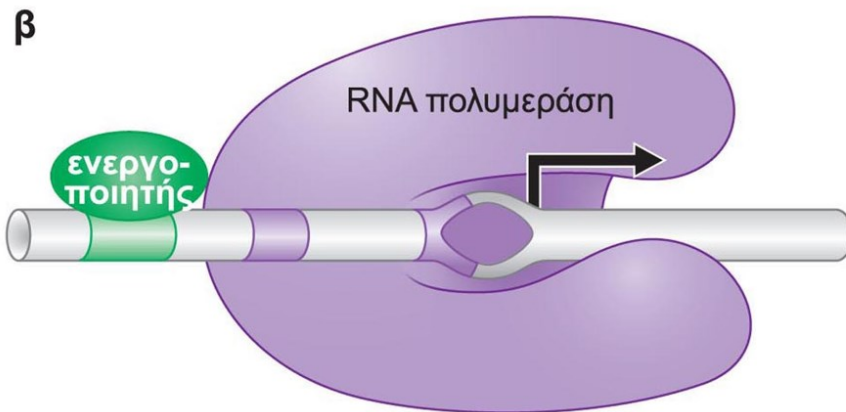
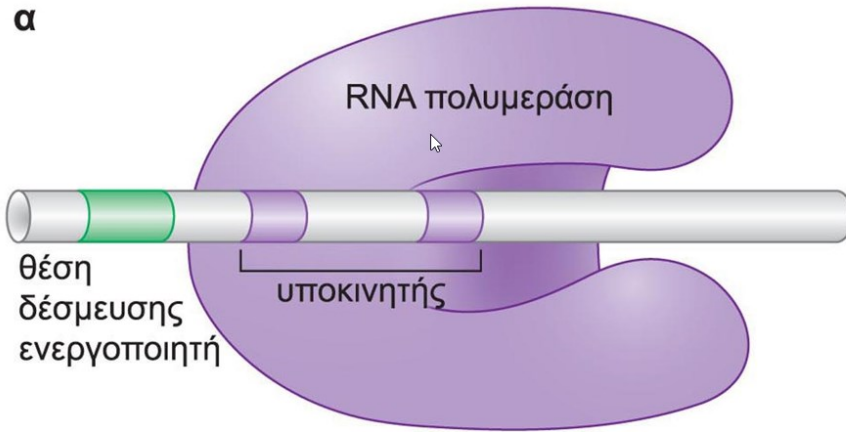


Απουσία ρυθμιστικών πρωτεϊνών, η RNA πολυμεράση δεσμεύεται ασθενώς μόνον σε πολλούς υποκινητές (π.χ. στοιχεία υποκινητή χαμηλής ισχύος ή έλλειψη στοιχείων υποκινητή). Στις περιπτώσεις αυτές η πολυμεράση μπορεί να δεσμευτεί «κατά τύχη», γεγονός που οδηγεί σε πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης.

Εάν σ' έναν τέτοιο υποκινητή δεσμευτεί μια πρωτεΐνη-καταστολέας η μεταγραφή παρεμποδίζεται πλήρως γιατί η πολυμεράση δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με τον υποκινητή.

Αντίθετα, η δέσμευση μιας πρωτεΐνης - ενεργοποιητή, προσελκύει την RNA πολυμεράση και παρέχει υψηλά επίπεδα μεταγραφής.

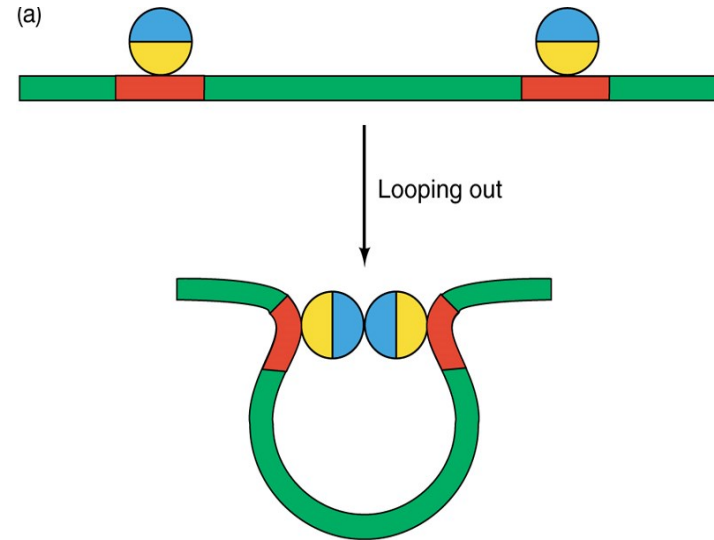
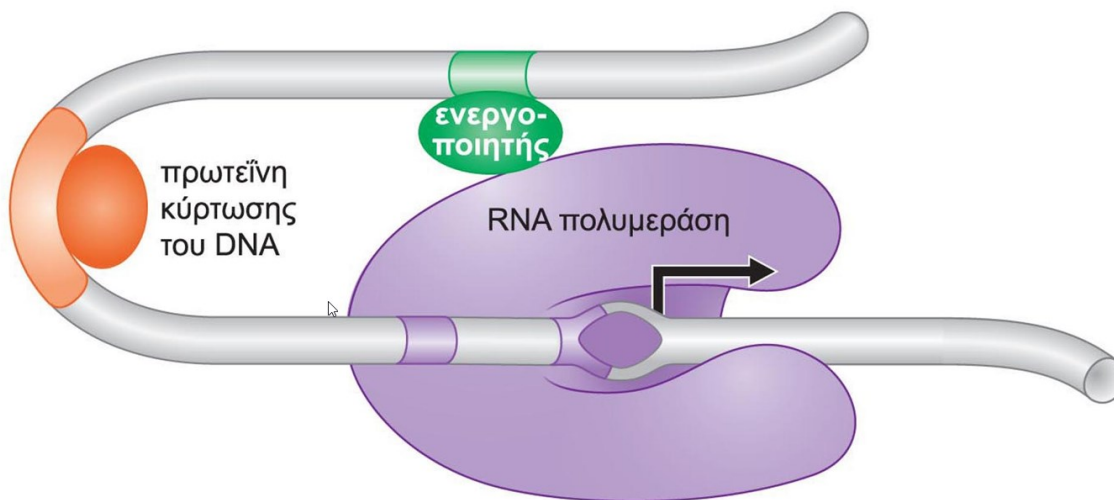
Ορισμένοι ενεργοποιητές και καταστολείς δρουν μέσω αλλοστερισμού.



Σε αυτή την περίπτωση οι ενεργοποιητές αλλά και οι καταστολείς μπορούν να επιδράσουν στην έναρξη της μεταγραφής, όχι μόνον μέσω της πρόσδεσης ή της παρεμπόδισης πρόσδεσης της RNA πολυμεράσης στον υποκινητή, αλλά μέσω μιας μεταβολής της διαμόρφωσης του ενζύμου που προκαλεί μετάβαση από το κλειστό σύμπλοκο προς το ανοικτό.

Συνεργατική δέσμευση ρυθμιστικών πρωτεϊνών σε γειτονικές ή και σε απομακρυσμένες μεταξύ τους θέσεις

- **Η δράση εξ' αποστάσεως και ο σχηματισμός βρόχου στο DNA.** Σε ορισμένες περιπτώσεις οι πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους ακόμη και όταν δεσμεύονται σε πολύ απομακρυσμένες περιοχές μεταξύ τους. Για να διευκολυνθεί η αλληλεπίδραση, το DNA σχηματίζει βρόχο (θηλιά) φέρνοντας τις θέσεις δέσμευσης κοντά μεταξύ τους.

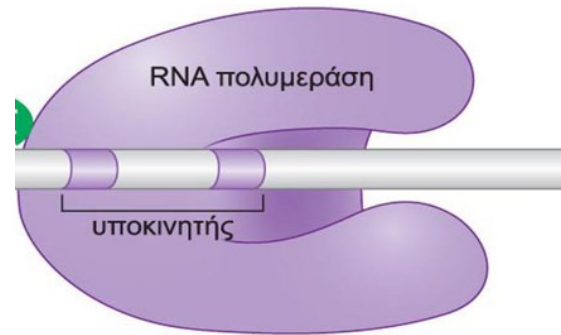


Π.χ Μια πρωτεΐνη δέσμευσης του DNA μπορεί να προκαλέσει κύρτωση του DNA διευκολύνοντας έτσι την αλληλεπίδραση της RNA πολυμεράσης με τον ενεργοποιητή που βρίσκεται δεσμευμένος σε μια απομακρυσμένη από τον υποκινητή θέση.

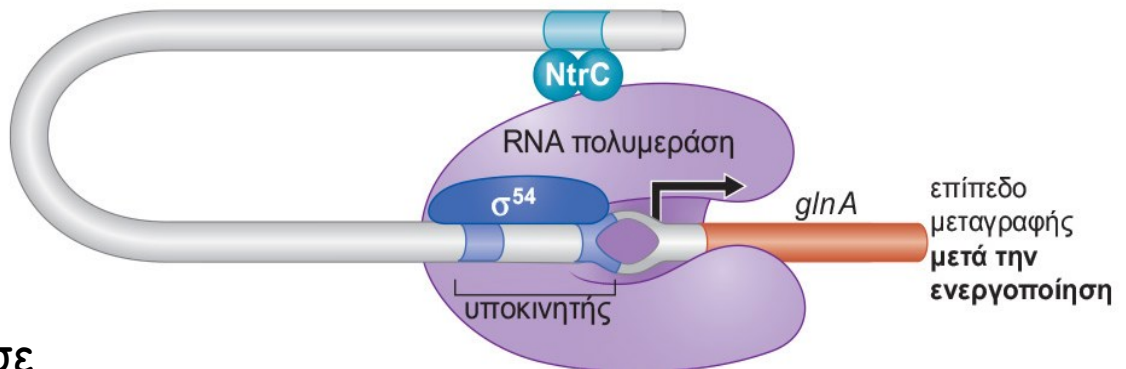
Αν και η πλειονότητα των ενεργοποιητών δρα μέσω στρατολόγησης, οι NtrC και MerR αποτελούν παραδείγματα ενεργοποιητών που δρουν μέσω αλλοστερικών μηχανισμών

Ο ενεργοποιητής NtrC ελέγχει την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό του αζώτου.

Απουσία του ενεργοποιητή το ολοένζυμο της RNA πολυμεράσης που μεταγράφει το γονίδιο *glnA* δεσμεύεται στον υποκινητή και το σύμπλεγμα παραμένει σε κατάσταση **κλειστού συμπλόκου**.



Η πρόσδεση του ενεργοποιητή στο DNA δημιουργεί ένα βρόγχο που τον φέρνει σε αλληλεπίδραση με την RNA πολυμεράση στην οποία προκαλείται μεταβολή της στερεοδιαμόρφωσης, πυροδοτώντας τη μετάβαση σε **ανοικτό σύμπλοκο**.

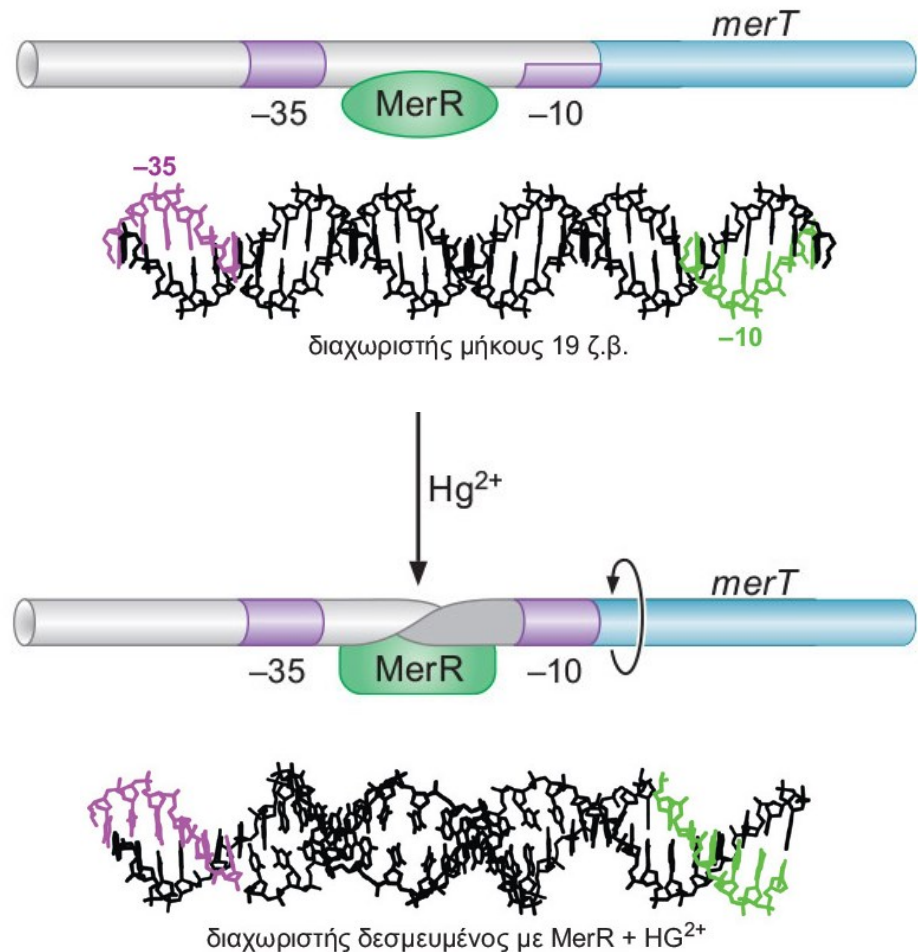


Ο ενεργοποιητής MerR επάγει τη μεταγραφή ασκώντας αλλοστερική επίδραση στο DNA και όχι στην πολυμεράση.

Ο ενεργοποιητής MerR ελέγχει την έκφραση του γονιδίου *merT*, το οποίο εμπλέκεται στην ανθεκτικότητα του υδραργύρου.

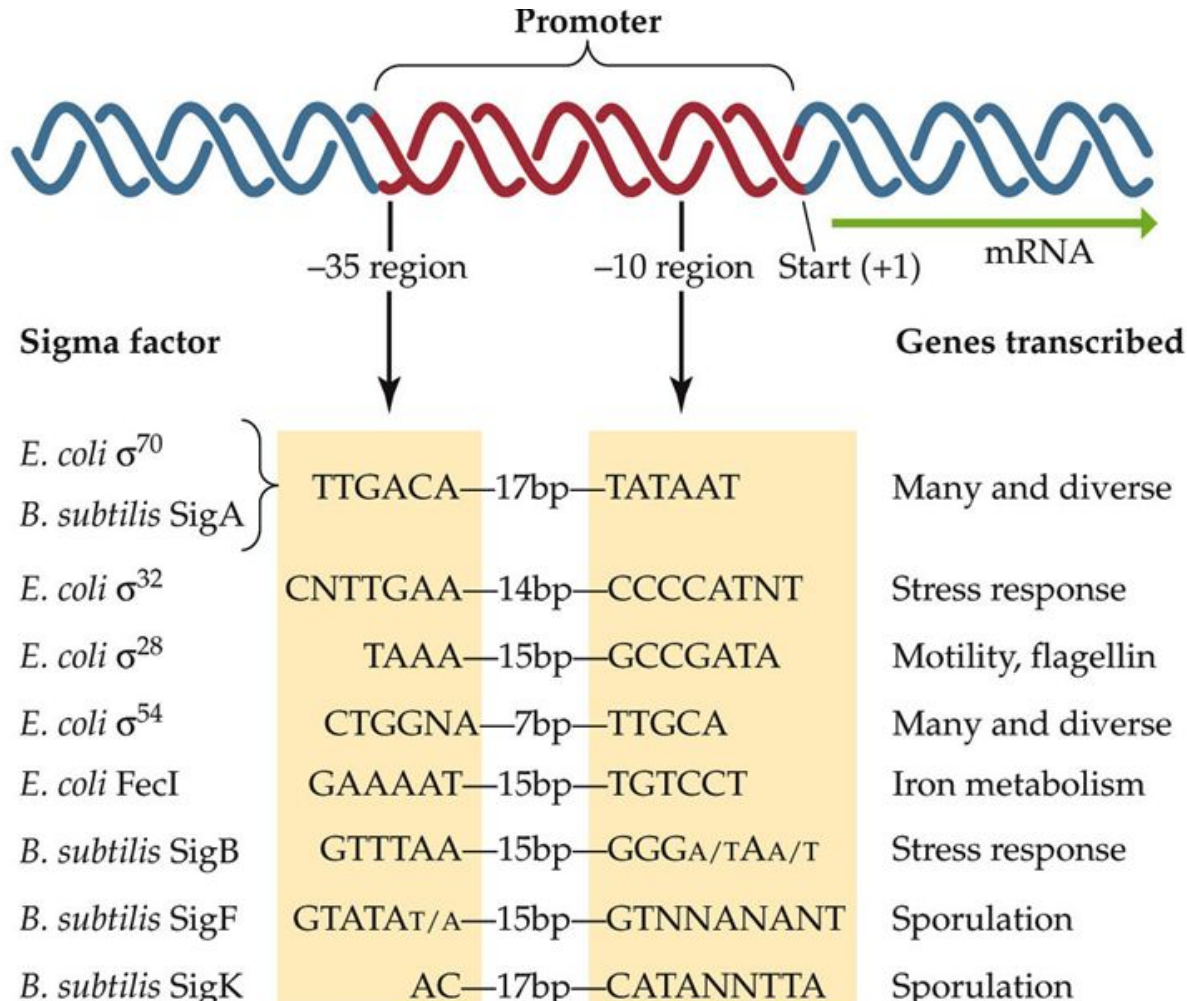
Απουσία Hg^{2+} , ο MerR δεσμεύεται στον υποκινητή του γονιδίου *merT*, του οποίου τα στοιχεία -10 και -35 εδράζονται σε σχεδόν αντίθετες πλευρές της διπλής έλικας του DNA, με αποτέλεσμα η πολυμεράση να μπορεί μεν να δεσμευτεί, αλλά όχι κατά τρόπο που να της επιτρέπει να εκκινήσει την μεταγραφή.

Παρουσία Hg^{2+} , ο MerR υφίσταται μια μεταβολή της διαμόρφωσής του που προκαλεί τη συστροφή του DNA ώστε να ευθυγραμμιστούν σωστά τα στοιχεία του υποκινητή και να επιτραπεί έτσι στην RNA πολυμεράση να εκκινήσει αποτελεσματικά τη μεταγραφή του γονιδίου *merT*.



Εναλλακτικοί παράγοντες σ κατευθύνουν την RNA πολυμεράση σε εναλλακτικές ομάδες υποκινητών.

Τόσο η *E. coli* όσο και ο *Bacillus subtilis* εκτός του παράγοντα σ^{70} κωδικοποιεί αρκετές ακόμα διαφορετικές υπομονάδες σ της RNA πολυμεράσης, που αναγνωρίζουν εναλλακτικές αλληλουχίες υποκινητών και επιτρέπουν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων υπό δεδομένες συνθήκες.



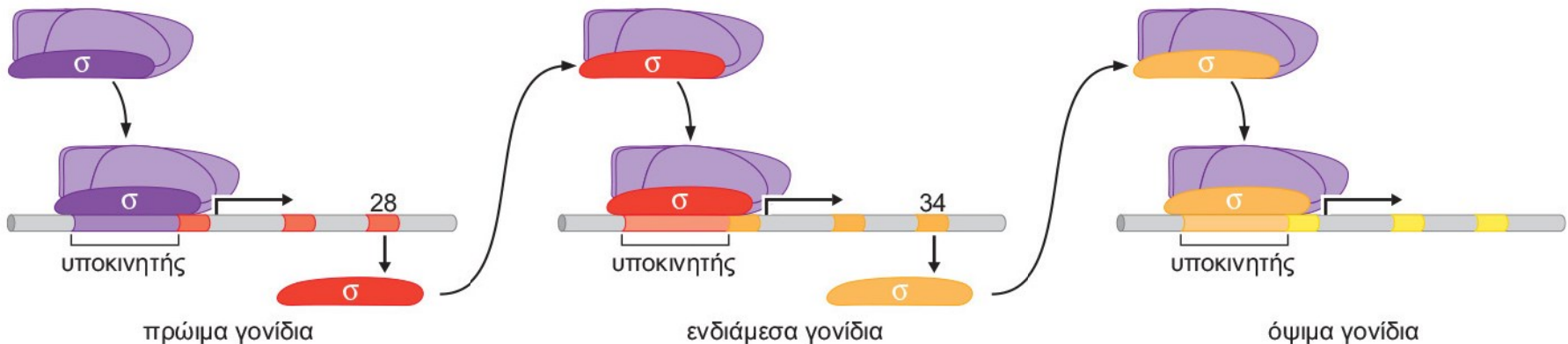
π.χ. Όταν η *E. coli* υποβάλλεται σε θερμική καταπόνηση, αυξάνεται η ποσότητα του παράγοντα σ^{32} , ο οποίος εκτοπίζει τον παράγοντα σ^{70} από ένα ποσοστό μορίων της RNA πολυμεράσης, και κατευθύνει τα ένζυμα αυτά στο να μεταγράψουν γονίδια, των οποίων τα προϊόντα προστατεύουν το κύτταρο από τη θερμική καταπόνηση.

Εναλλακτικοί παράγοντες σ ελέγχουν την χρονικά καθορισμένη έκφραση των γονιδίων ενός βακτηριακού ιού.

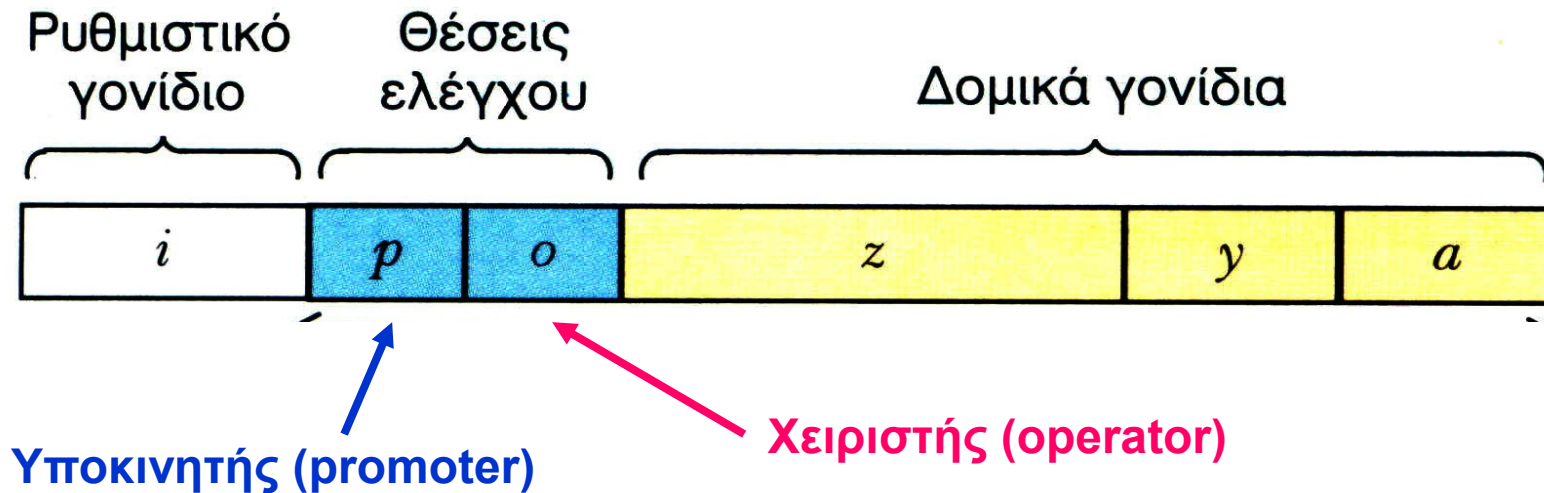
Ο βακτηριοφάγος SPO1 μολύνει τον *B. subtilis*, στον οποίο αναπαράγεται λυτικά. Η διαδικασία αυτή απαιτεί την έκφραση των γονιδίων του φάγου με μια προσεκτικά ελεγχόμενη σειρά.

Ο έλεγχος αυτός επιβάλλεται στην πολυμεράση μέσω μιας σειράς εναλλακτικών παραγόντων σ .

- Μετά την μόλυνση από τον φάγο, η βακτηριακή RNA πολυμεράση που φέρει τον παράγοντα σ^{70} αναγνωρίζει τους λεγόμενους «πρώιμους» υποκινητές του φάγου και μεταγράφει τα γονίδια τα προϊόντα των οποίων απαιτούνται στο πρώιμο στάδιο της μόλυνσης.
- Ένα από τα γονίδια αυτά κωδικοποιεί τον εναλλακτικό παράγοντα σ^{28} που κατευθύνει την πολυμεράση στην έκφραση μιας δεύτερης ομάδας γονιδίων, τα επονομαζόμενα «ενδιάμεσα» γονίδια.
- Ένα από τα γονίδια αυτά κωδικοποιεί τον εναλλακτικό παράγοντα σ^{34} που κατευθύνει την πολυμεράση στην έκφραση των «όψιμων» γονιδίων του φάγου.

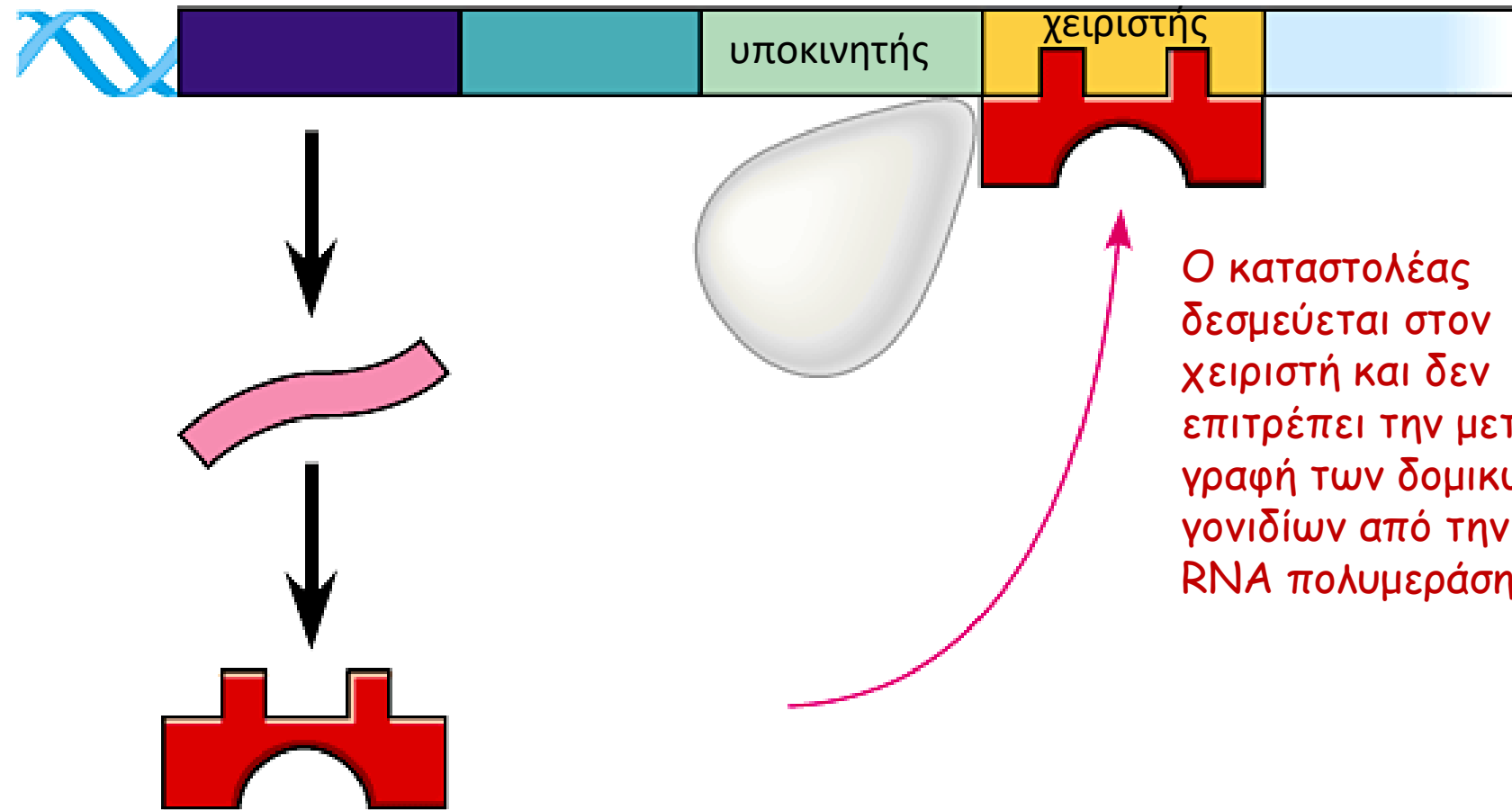


Ρύθμιση της μεταγραφής σε συνεργιώματα (operons)



Περιοχή του DNA που περιέχει στη σειρά έναν αριθμό γονιδίων η έκφραση των οποίων ελέγχεται από έναν κοινό υποκινητή και οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν σχετίζονται λειτουργικά μεταξύ τους, π.χ. συμβάλλουν στη λειτουργία μιας μεταβολικής οδού.

Το ρυθμιστικό γονίδιο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη γνωστή ως **καταστολέας** (repressor).



Ο καταστολέας δεσμεύεται στον χειριστή και δεν επιτρέπει την μεταγραφή των δομικών γονιδίων από την RNA πολυμεράση.

Τα συνεργιώματα βρίσκονται:

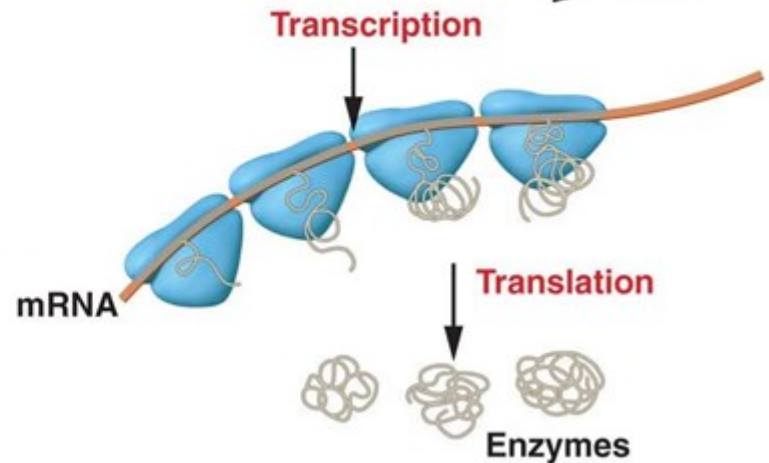
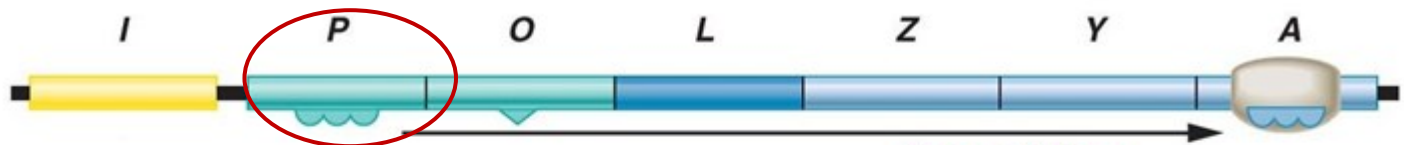
Κάτω από **αρνητικό έλεγχο (επαγωγή)** όπου τα δομικά γονίδια σε κανονικές συνθήκες δεν μεταγράφονται γιατί ο χειριστής είναι κατειλημμένος από τον καταστολέα. Τα συνεργιώματα αυτά μεταγράφονται όταν προστεθεί μια ουσία που λέγεται **επαγωγός (inducer)**, η οποία συμπλοκοποιούμενη με τον καταστολέα απελευθερώνει τον χειριστή π.χ. συνεργίωμα λακτόζης

Ή

Κάτω από **θετικό έλεγχο (καταστέλλομενα)** όταν τα δομικά γονίδια μεταγράφονται συνεχώς γιατί ο καταστολέας δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με τον χειριστή, παρά μόνο όταν συμπλοκοποιηθεί με μια ουσία που λέγεται **συγκαταστολέας (corepressor)** π.χ. συνεργίωμα τρυπτοφάνης

Το συνεργίωμα της λακτόζης (lac operon)

- Αποτελεί το πρώτο παράδειγμα εκτεταμένης μελέτης της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης στους προκαρυωτικούς οργανισμούς.
- Αποτελείται από τρία δομικά γονίδια (*lacZ*, *lacY*, *lacA*) που γειτνιάζουν στο γονιδίωμα της *E. coli*, εκ των οποίων τα *lacZ* και *lacY* είναι απαραίτητα για το μεταβολισμό της λακτόζης.
- Ο υποκινητής του συνεργιώματος εδράζεται ανοδικά του *lacZ* και κατευθύνει τη μεταγραφή και των τριών γονιδίων σε ένα μοναδικό πολυσιστρονικό μήνυμα mRNA.



Jacob and Monod, δεκαετία του '60

Το συνεργίωμα της λακτόζης (lac operon)

- Το lacZ κωδικοποιεί την β-γαλακτοζιδάση: διασπά τη λακτόζη σε γλυκόζη και γαλακτόζη.
- Το lacY κωδικοποιεί την περμεάση της λακτόζης: διαμεμβρανική πρωτεΐνη υπεύθυνη για την μεταφορά της λακτόζης στο εσωτερικό του κυττάρου
- Το lacA κωδικοποιεί την τρανσακετυλάση των θειογαλακτοζιδίων που επιτρέπει την διάσπαση των τοξικών θειογαλακτοζιδίων.

**Το συγκεκριμένο
συνεργίωμα δεν διαθέτει
ισχυρό υποκινητή.**

-35	-10
■ TTTACAC	----- TATGTT (Lac)
-35	-10
■ TTGACAT	----- TATAAT (consensus)

Συνεπώς απαιτείται ένας ρυθμιστικός μηχανισμός που θα εξασφαλίζει την έκφρασή του παρουσία λακτόζης στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης των βακτηρίων

Το συνεργίωμα της λακτόζης (lac operon)

Κύτταρα *E. coli* που αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό που περιέχει γλυκόζη έχουν πολύ χαμηλή ενεργότητα β-γαλακτοζιδάσης.

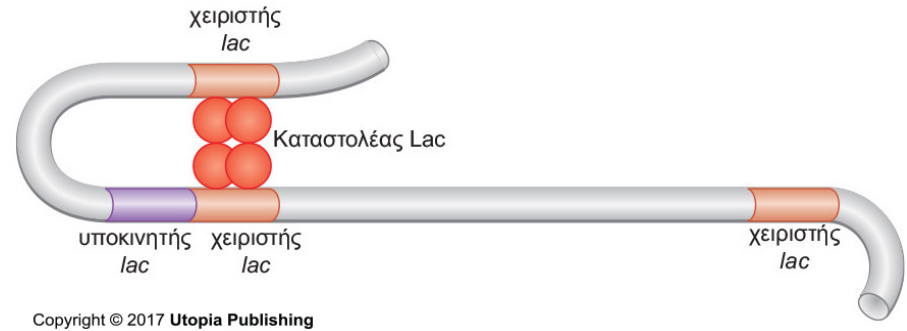
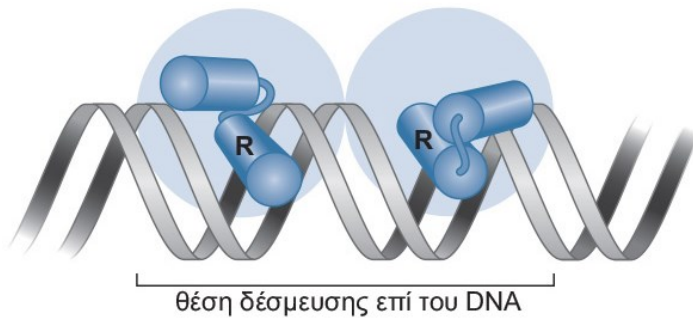
Όταν αυτά τα κύτταρα μεταφερθούν σε θρεπτικό υλικό που περιέχει λακτόζη οι ενεργότητες της β-γαλακτοζιδάσης και της περμεάσης αυξάνονται κατά 1000 φορές μέσα σε 20 λεπτά.

Με ποιο μηχανισμό επιτυγχάνεται η έκφραση των γονιδίων αυτών όταν τα κύτταρα βρίσκονται σε θρεπτικό υλικό που περιέχει λακτόζη;

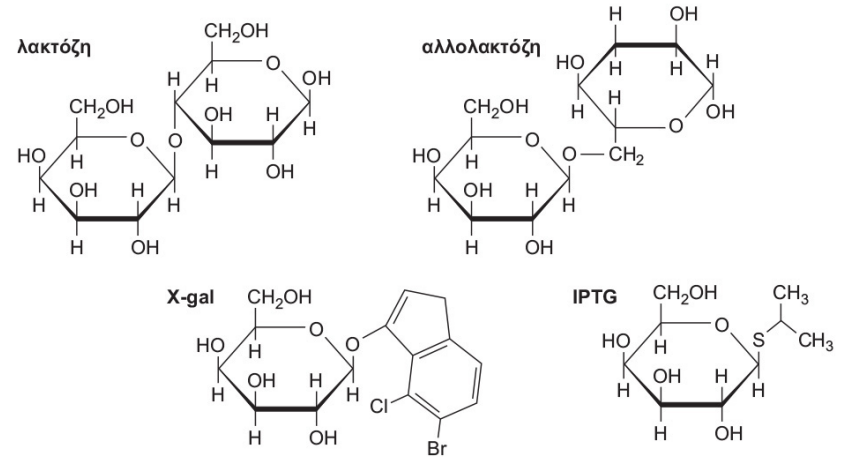
Δύο ρυθμιστικές πρωτεΐνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο:

Ο ενεργοποιητής CAP (catabolite activator protein) και ο καταστολέας Lac.

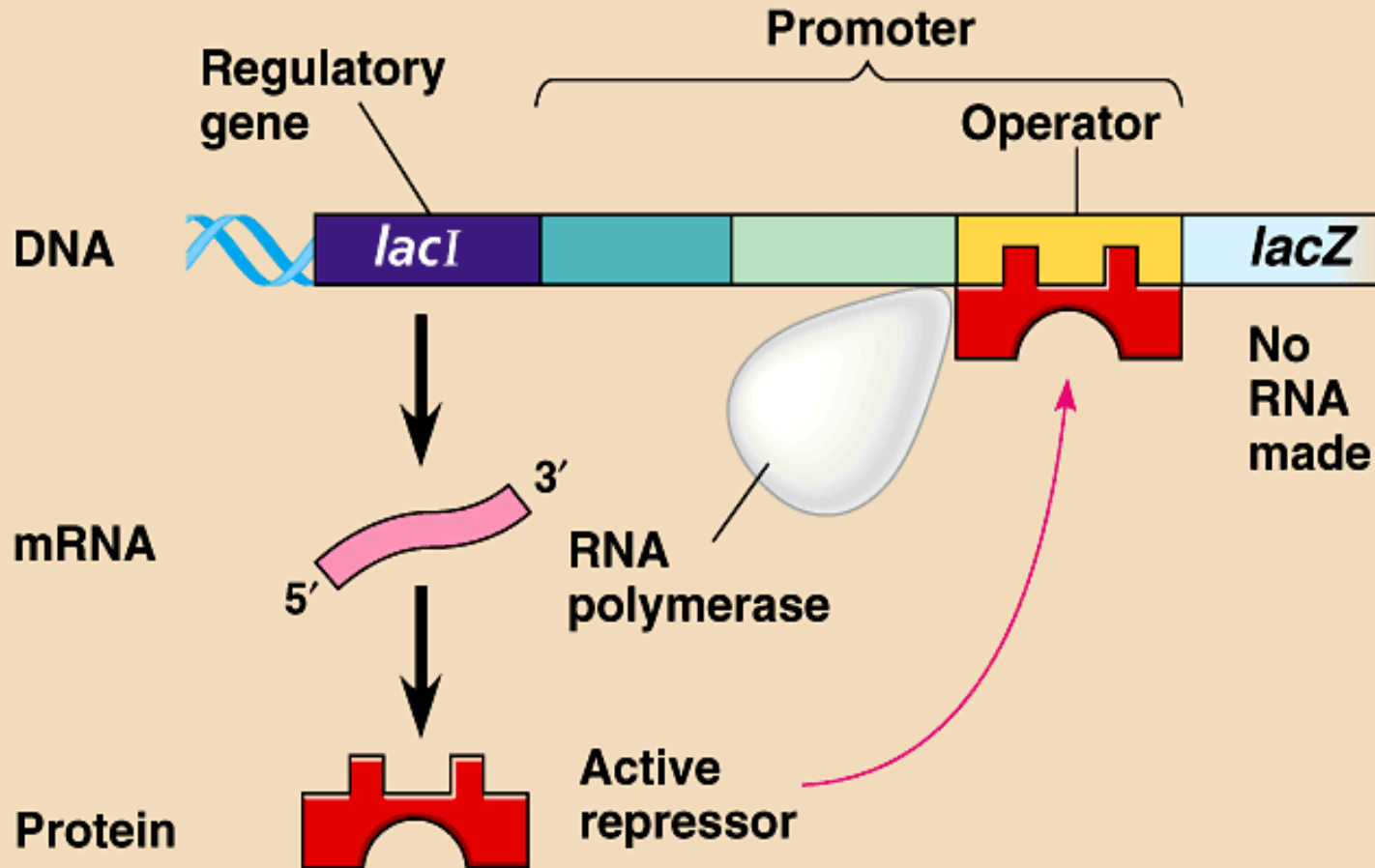
Ο καταστολέας Lac δεσμεύεται στο DNA χρησιμοποιώντας κοινά δομικά μοτίβα έλικας-στροφής-έλικας και η ενεργότητά του ελέγχεται αλλοστερικά.



Η αλλολακτόζη (και όχι η ίδια η λακτόζη) είναι η ένωση που ελέγχει αλλοστερικά τον καταστολέα Lac, παρεμποδίζοντάς τον να δεσμευτεί στη θέση του χειριστή. Ως επαγωγείς μπορούν να δράσουν και άλλα συνθετικά μόρια όπως το IPTG, ενώ ως υπόστρωμα της β-γαλακτοσιδάσης μπορεί εκτός της λακτόζης να χρησιμοποιηθεί το X-gal. Όταν το ένζυμο επιδράσει στο υπόστρωμα αυτό, το X-gal απελευθερώνει ένα κυανό χρώμα και αυτό καθιστά το υπόστρωμα χρήσιμο για δοκιμές.

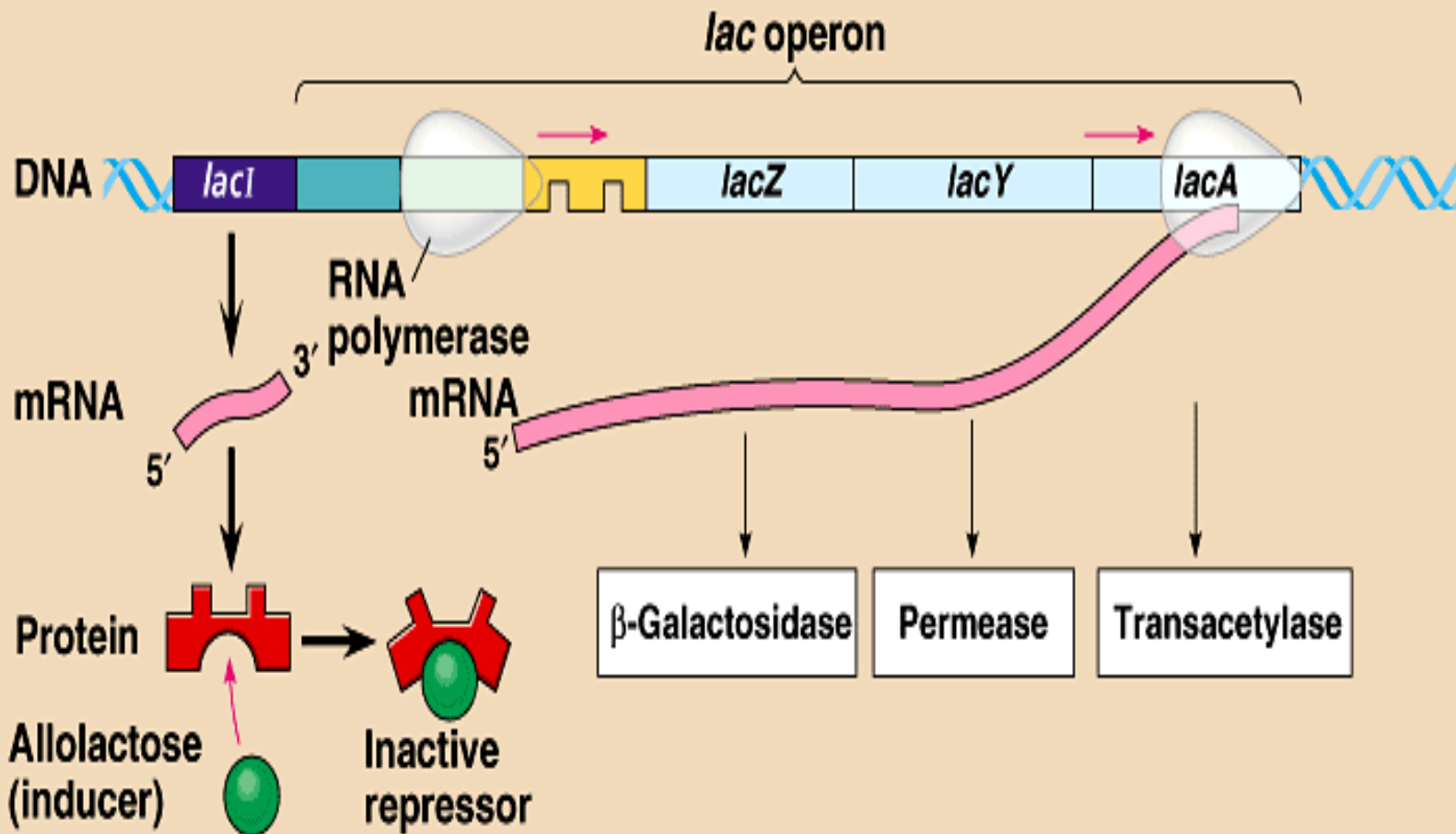


Απουσία λακόζης, τα γονίδια δεν μεταγράφονται γιατί ο καταστολέας (Lac) είναι ενεργός δηλ. αλληλεπιδρά με το χειριστή και παρεμποδίζει την πρόσβαση στην RNA πολυμεράση.



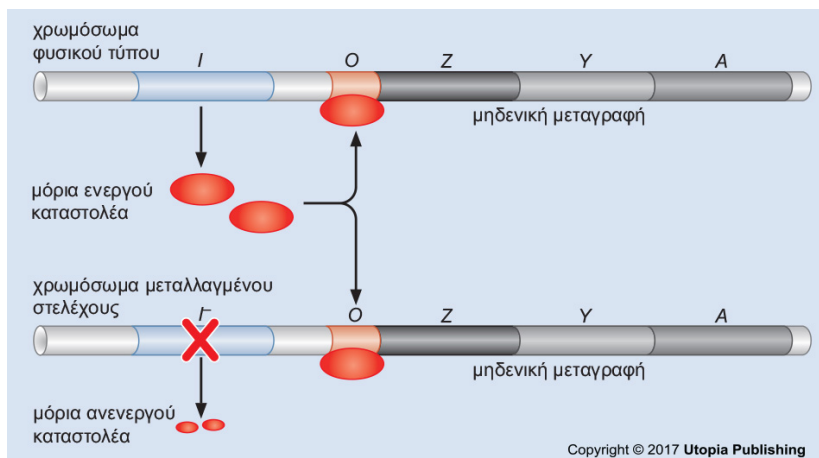
(a) Lactose absent, repressor active, operon off

Παρουσία λακτόζης ο καταστολέας είναι αδρανής αφού συμπλοκοποιού-
μενος με την επαγωγό ουσία (λακτόζη) δεν μπορεί να συνδεθεί με το
χειριστή και συνεπώς η RNA πολυμεράση προσδένεται στην υποκινητή τα
δομικά γονίδια που κωδικοποιούν τα ένζυμα του μεταβολισμού της
λακτόζης μεταγράφονται.

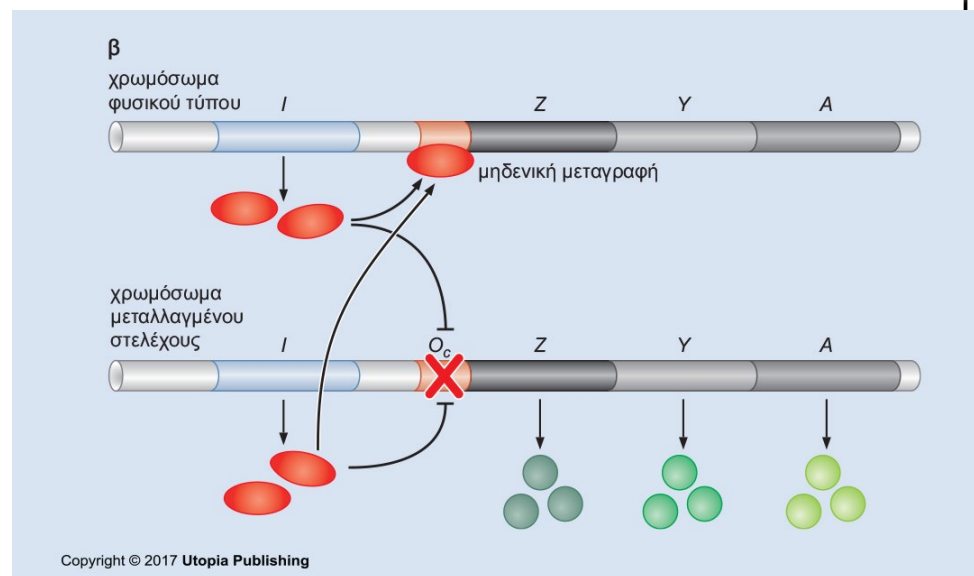


(b) Lactose present, repressor inactive, operon on

Τα μερικώς διπλοειδή κύτταρα που κατασκεύασαν οι Jacob και Monod δείχνουν ότι οι λειτουργικοί καταστολείς δρουν από θέση *trans* και οι χειριστές μόνον από θέση *cis*.



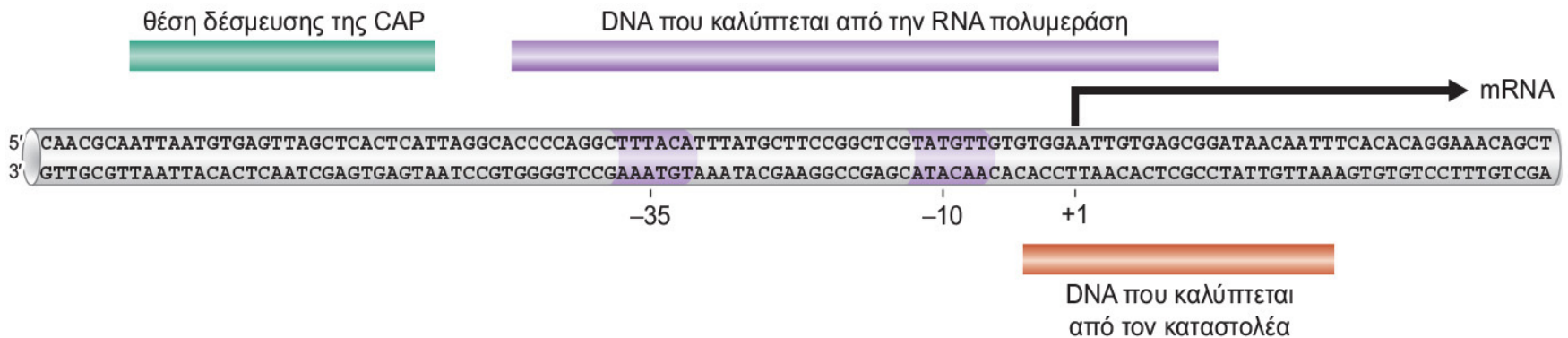
Copyright © 2017 Utopia Publishing



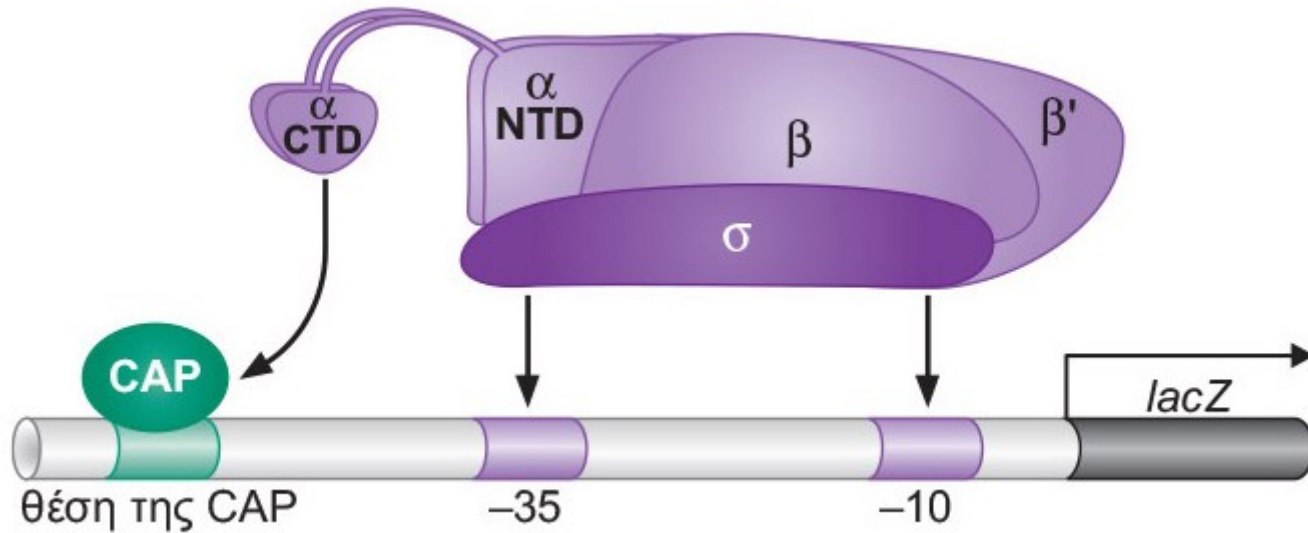
Copyright © 2017 Utopia Publishing

Το συνεργίωμα της λακτόζης βρίσκεται και κάτω από θετικό έλεγχο, μέσω πρωτεϊνών ενεργοποιητών.

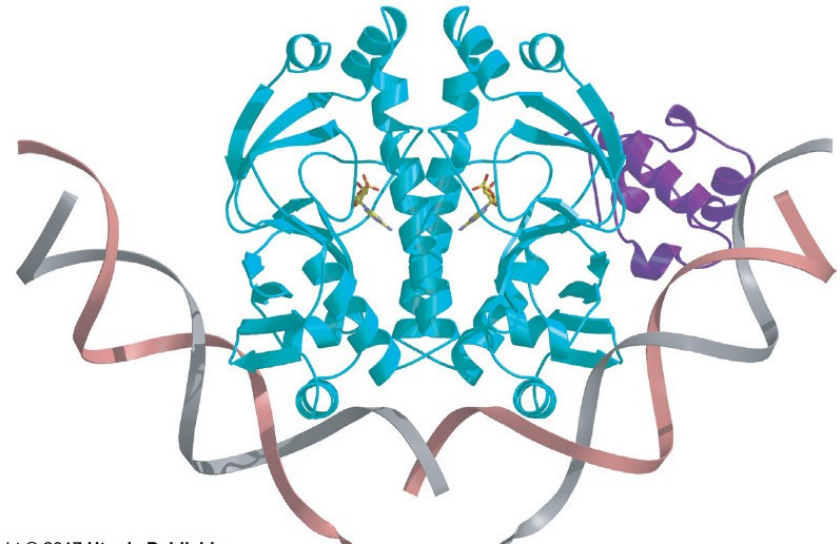
Ανοδικά του υποκινητή, υπάρχει μια περιοχή, γνωστή ως **ενεργοποιός θέση**, στην οποία προσδένεται μια πρωτεΐνη που συμπλοκοποιείται με το **cAMP**, γνωστή ως **CAP ή CRP** (Catabolite gene Activator ή Regulator Protein), με αποτέλεσμα την ενίσχυση της μεταγραφής των δομικών γονιδίων από την RNA πολυμεράση.



Η δέσμευση της RNA πολυμεράσης στον υποκινητή *lac* υποβοηθείται λόγω της αλληλεπίδρασης της α CTD περιοχής της με την CAP-cAMP.



Η CAP-cAMP (χρώμα μπλέ) δεσμεύεται ως διμερές στο DNA και αλληλεπιδρά με την α -CTD περιοχή της RNA pol (χρώμα μωβ)



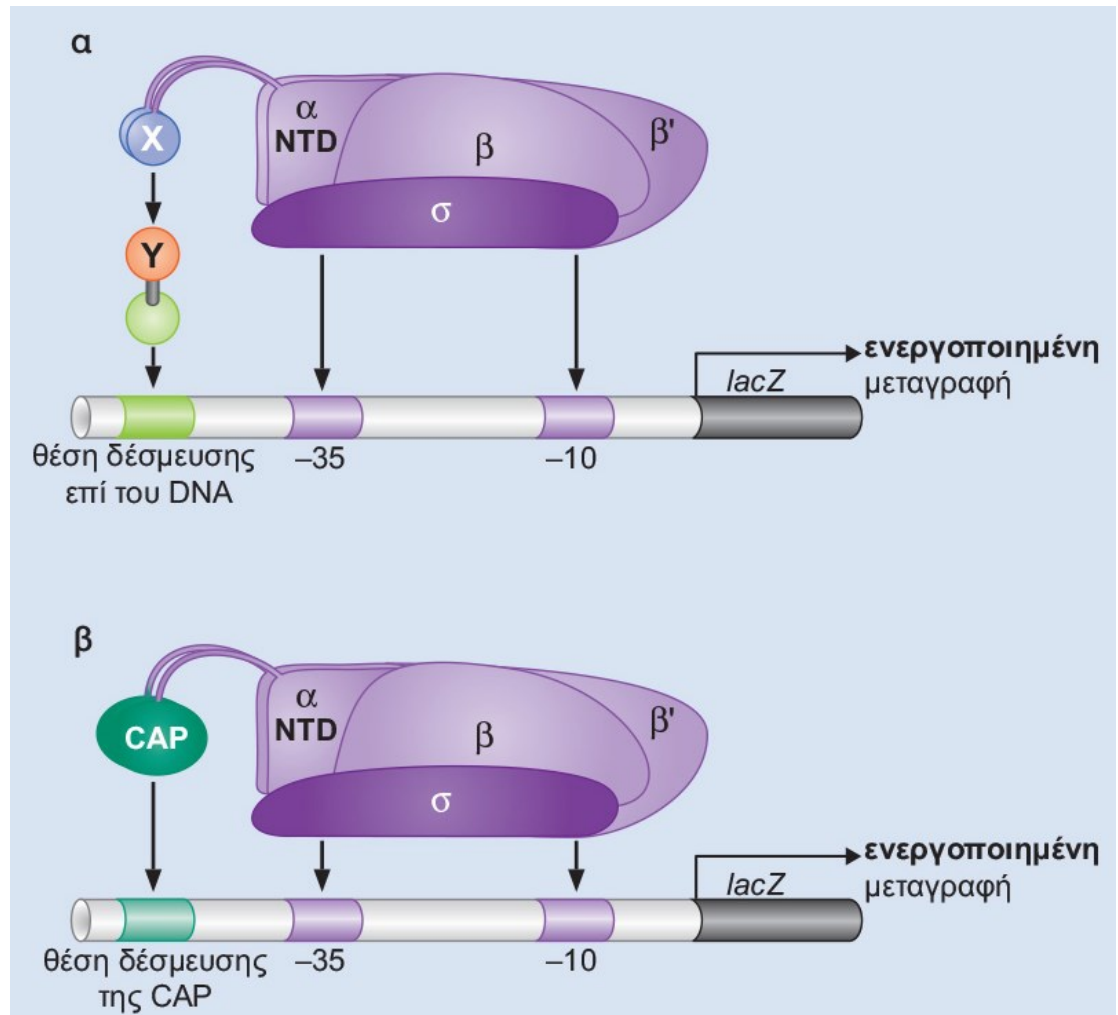
Δομή του συμπλόκου CAP- α CTD-DNA.

Πειράματα παράκαμψης του ενεργοποιητή.

(α) Η α CTD

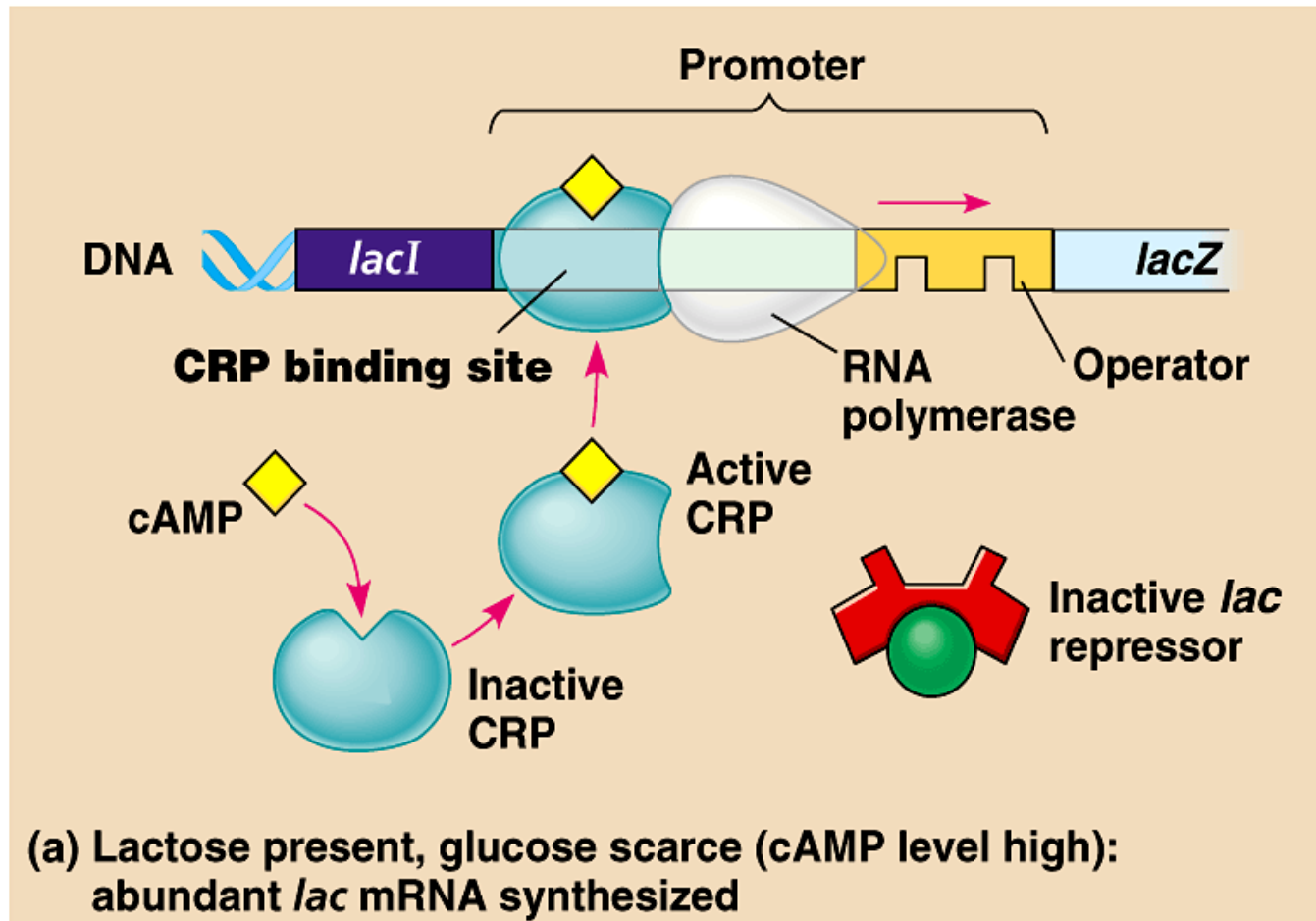
αντικαθίσταται από μία πρωτεΐνη Χ, η οποία αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Υ. Η πρωτεΐνη Υ έχει συντηχθεί με μία επικράτεια δέσμησης του DNA και η θέση που αναγνωρίζεται από αυτή την επικράτεια, έχει τοποθετηθεί πλησίον των γονιδίων *lac*.

(β) Η α CTD έχει αντικατασταθεί από το τμήμα της CAP που αποτελεί την επικράτεια δέσμησης του DNA.

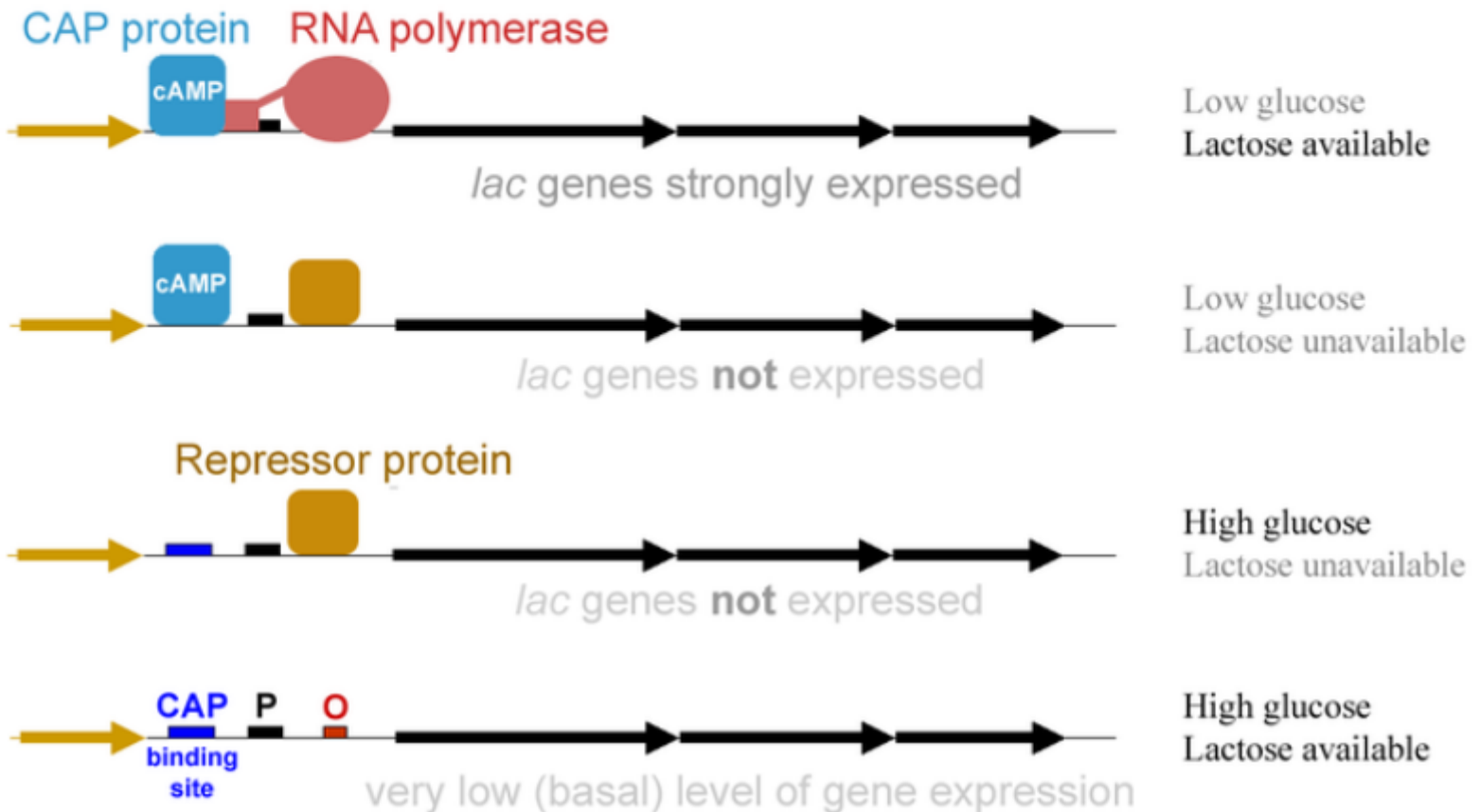
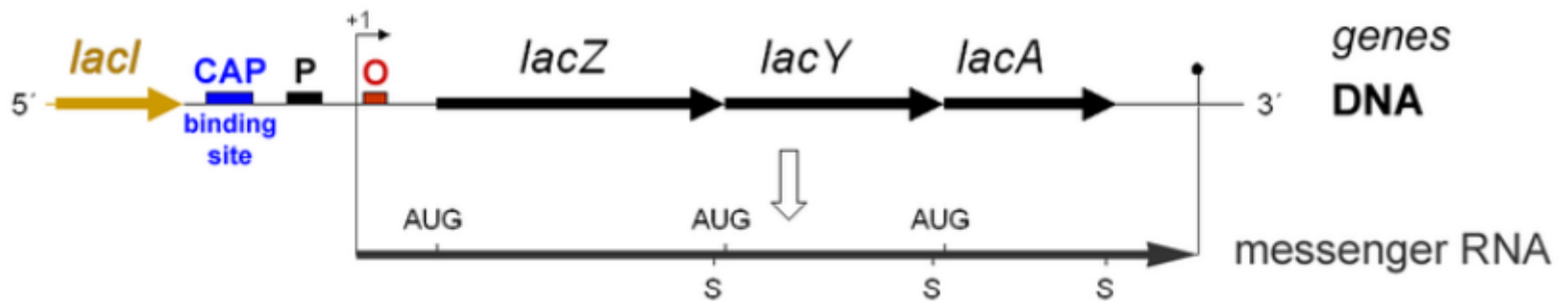


Η συγκέντρωση του cAMP μέσα στο κύτταρο είναι αντιστρόφως ανάλογη προς την συγκέντρωση της γλυκόζης.

Επομένως, παρουσία λακτόζης και όταν δεν υπάρχει διαθέσιμη γλυκόζη, η συγκέντρωση του cAMP αυξάνεται, δημιουργείται το σύμπλοκο cAMP-CRP, το οποίο δεσμεύεται στην ενεργοποιό θέση, με επακόλουθο την μεταγραφή των δομικών γονιδίων της λακτόζης.



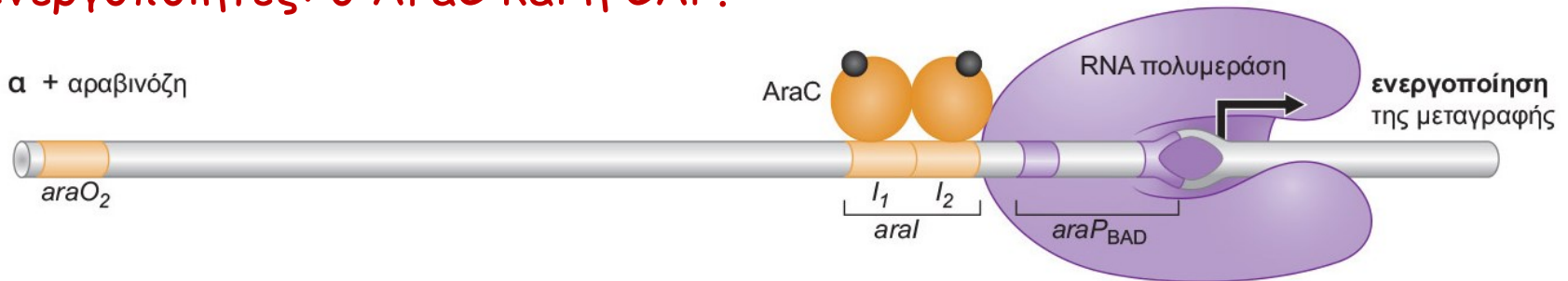
The *lac* Operon and its Control Elements



Το οπερόνιο της αραβινόζης

Ο υποκινητής του οπερονίου της αραβινόζης της *E. coli* ενεργοποιείται παρουσία αραβινόζης και απουσία γλυκόζης και κατευθύνει την έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τα απαιτούμενα για τον μεταβολισμό της ένζυμα.

Σε αντίθεση με την περίπτωση του οπερονίου *lac*, όπου συνεργάζονται ένας καταστολέας με έναν ενεργοποιητή, εδώ **συνεργάζονται δύο ενεργοποιητές: ο AraC και η CAP.**

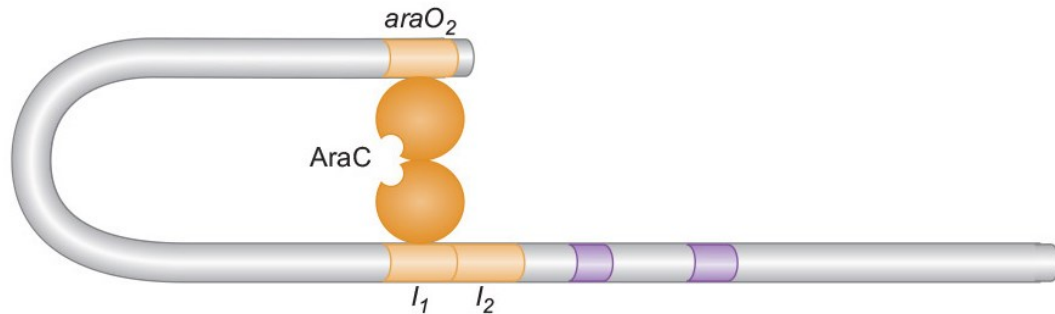


Όταν υπάρχει αραβινόζη, ο AraC δεσμεύει το σάκχαρο και παίρνει μία διαμόρφωση, η οποία του επιτρέπει να δεσμεύεται στο DNA ως διμερές στις γειτονικές θέσεις *araI₁* και *araI₂*.

Ακριβώς ανοδικά αυτών των θέσεων εδράζεται η θέση δέσμευσης της CAP (που δεν φαίνεται σε αυτή την εικόνα). Απουσία γλυκόζης, η CAP δεσμεύεται εκεί και βοηθάει στην ενεργοποίηση.

Το οπερόνιο της αραβινόζης

β – αραβινόζη

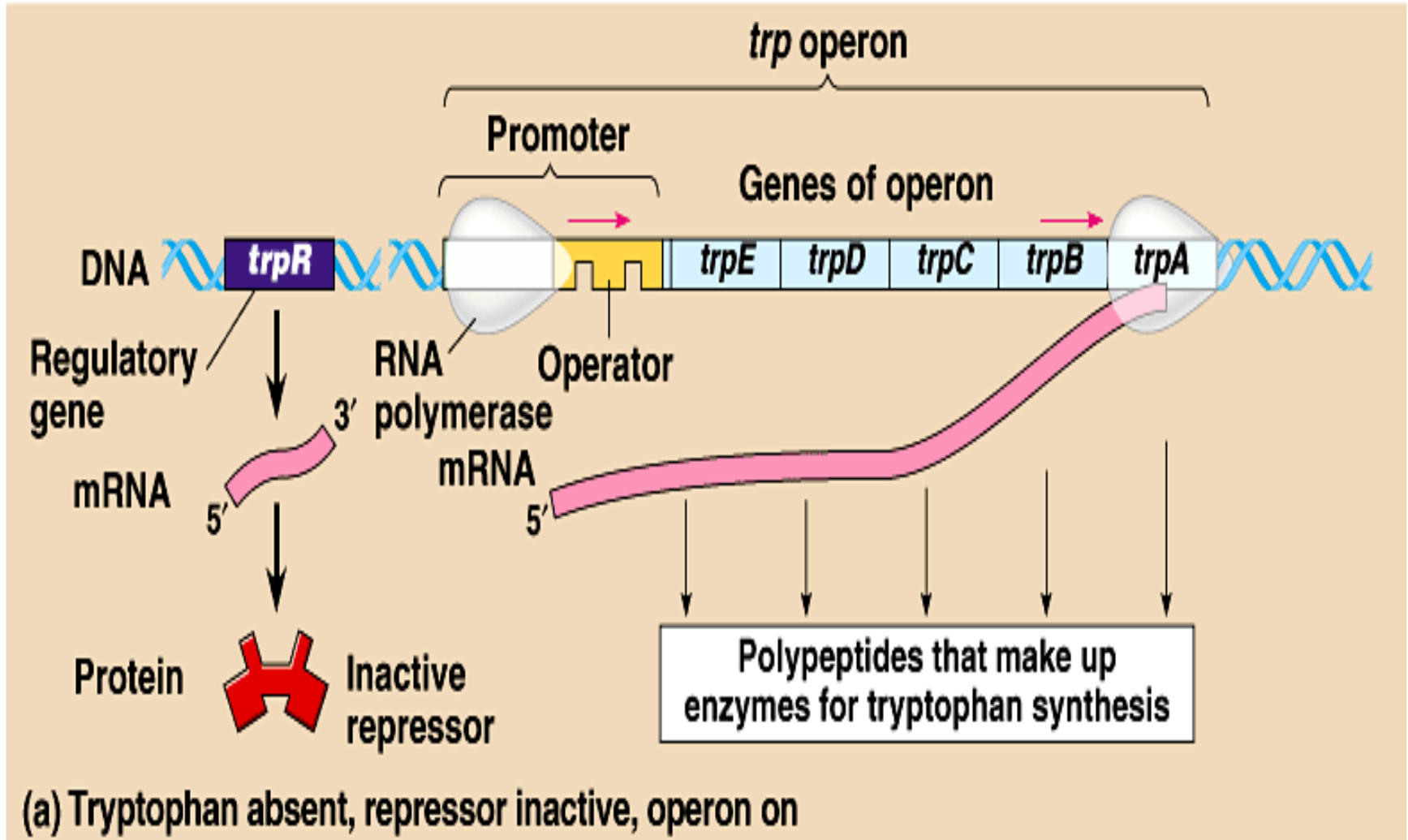


Απουσία αραβινόζης, το διμερές του AraC προσλαμβάνει μία διαφορετική διαμόρφωση και δεσμεύεται στα *araO₂* και *araI₁*.

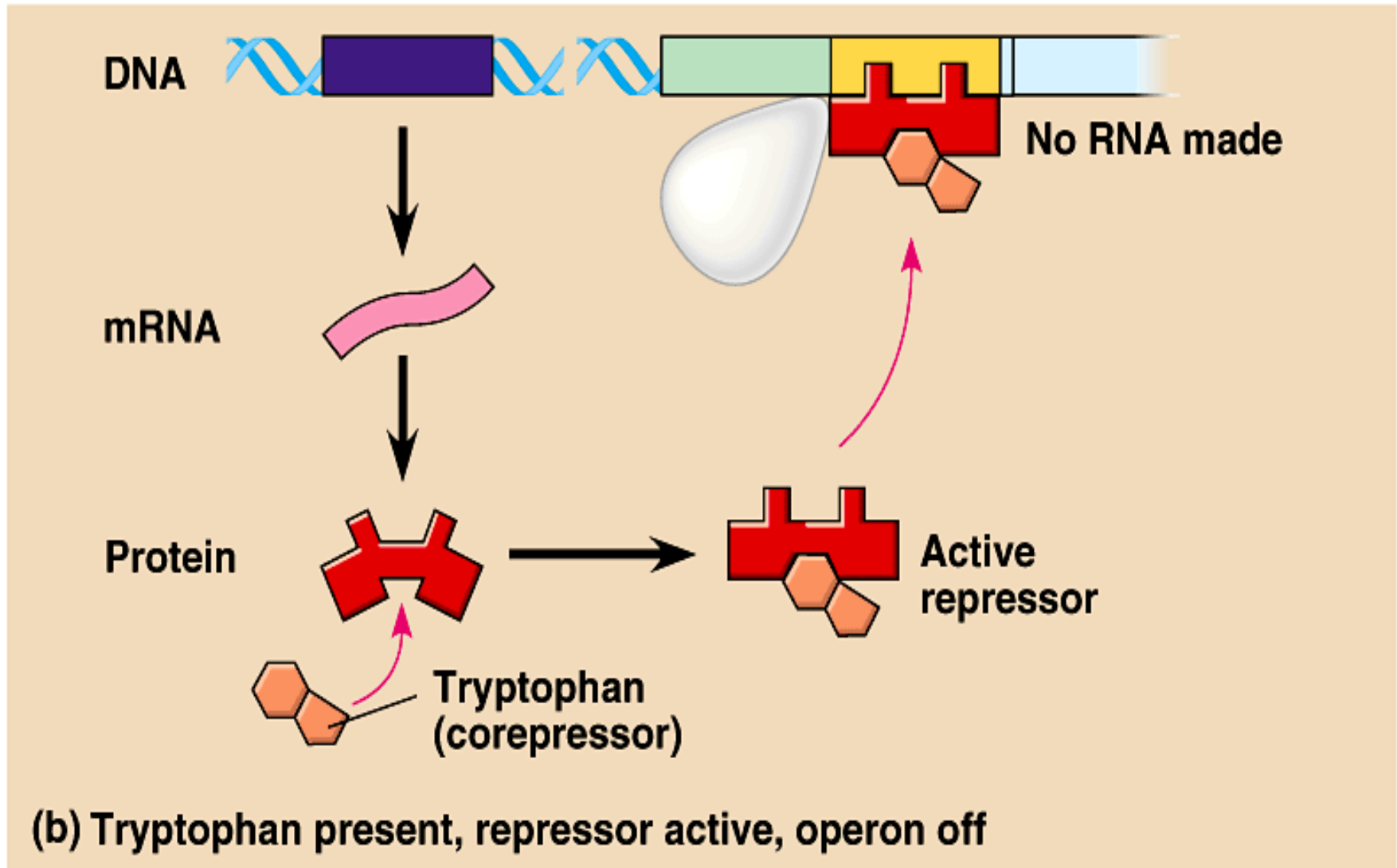
Σε αυτή τη διάταξη δεν υφίσταται πλέον μονομερές στη θέση *araI₂* και έτσι η πρωτεΐνη δεν μπορεί να ενεργοποιήσει τον υποκινητή του οπερονίου.

Παράδειγμα συνεργιώματος θετικής ρύθμισης

Οπερόνιο Τρυπτοφάνης. **Απουσία τρυπτοφάνης**, ο καταστολέας είναι ανενεργός δεν αλληλεπιδρά με το χειριστή και τα γονίδια που κωδικοποιούν τα ένζυμα της βιοσυνθετικής οδού της τρυπτοφάνης μεταγράφονται κανονικά.

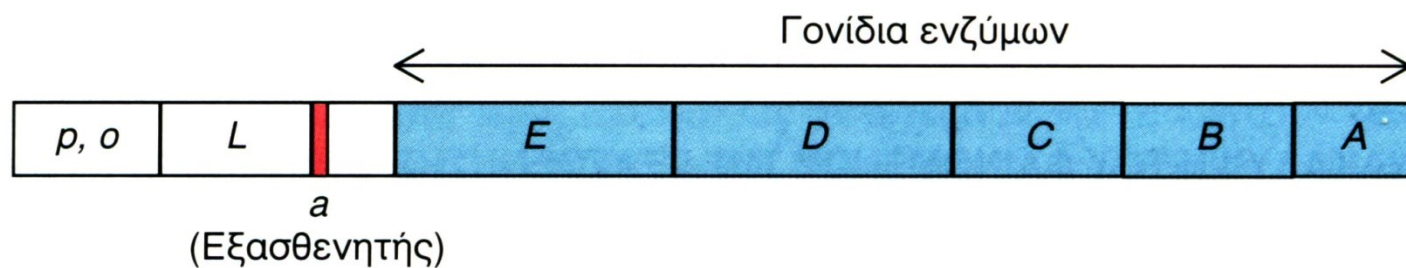


Παρουσία τρυπτοφάνης, ο καταστολέας συμπλοκοποιούμενος με τον συγκαταστολέα (τρυπτοφάνη) γίνεται ενεργός, αλληλεπιδρά με το χειριστή και παρεμποδίζεται η μεταγραφή των δομικών γονιδίων του οπερονίου.



Μηχανισμός ρύθμισης της μεταγραφής στο στάδιο της επιμήκυνσης της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας του mRNA.

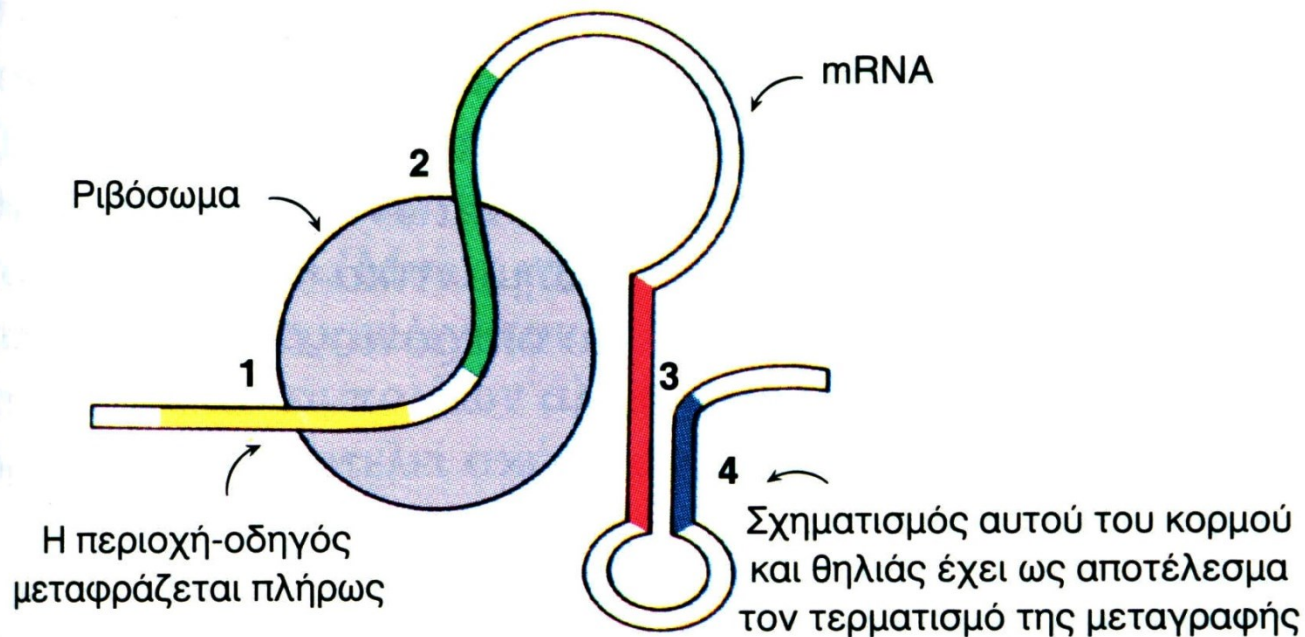
Στο οπερόνιο της τρυπτοφάνης μεταξύ του χειριστή και του πρώτου δομικού γονιδίου υπάρχει μια περιοχή (L) 162 ζευγών βάσεων μέσα στην οποία υπάρχει η πληροφορία για τη σύνθεση ενός πεπτιδίου οδηγού 14 αα που περιλαμβάνει δύο μόρια τρυπτοφάνης δίπλα-δίπλα.



-Lys-Ala-Ile-Phe-Val-Leu-Lys-Gly-Trp-Trp-Arg-Thr-Ser-Stop
~AUG AAA GCA AUU UUC GUA CUG AAA GGU UGG UGG CGC ACU UCC UGA ~

Επιπλέον, το πολυσιτρονικό mRNA που συντίθεται μπορεί να αναπτύσσει ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου, είτε μεταξύ των βάσεων της περιοχής 2 και 3, είτε μεταξύ της περιοχής 3 και 4.

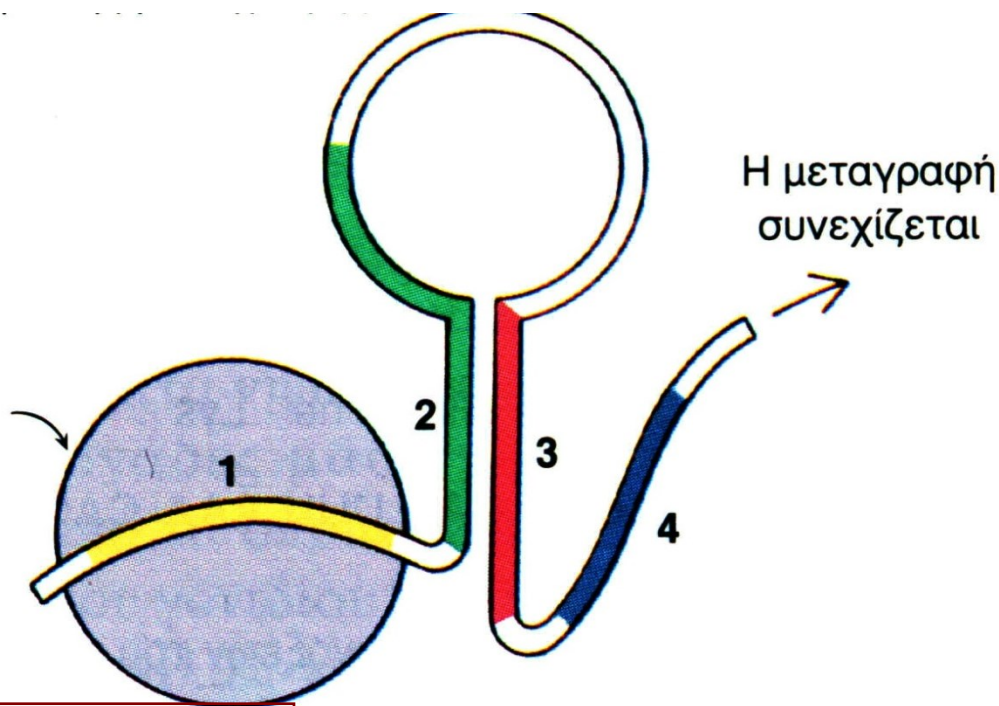
Όταν υπάρχει περίσσεια *trp* και επομένως *trp*-tRNA, το ριβόσωμα προχωρεί κανονικά την μετάφραση από την περιοχή 1 στην περιοχή 2, με αποτέλεσμα να δημιουργείται η δίκλωνη διάταξη στις περιοχές 3 και 4, που δεν επιτρέπει στην RNA πολυμεράση (που προπορεύεται του ριβοσώματος) να προχωρήσει στη μεταγραφή του πολυσιστρονικού mRNA.



A. Υψηλό επίπεδο θρυπτοφάνης

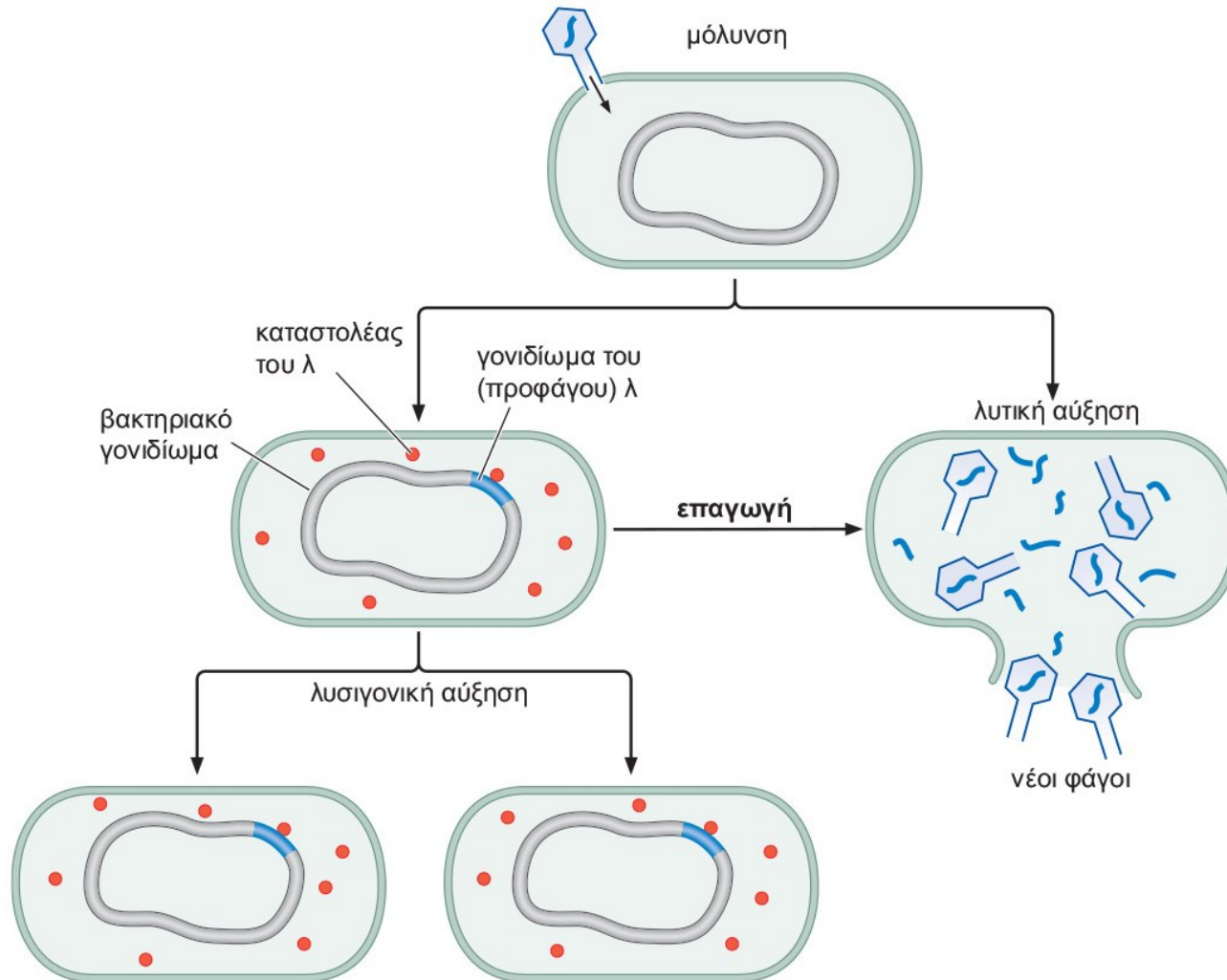
Όταν όμως υπάρχει λίγη, ή δεν υπάρχει καθόλου *trp* το ριβόσωμα ακινητοποιείται στην περιοχή 1, λόγω έλλειψης *trp*- tRNA, με αποτέλεσμα να αναπτύσσονται δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της περιοχής 2 και 3, γεγονός που δεν παρεμποδίζει την RNA πολυμεράση να προχωρά κανονικά την επιμήκυνση της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας του πολυσιστρονικού mRNA.

Το ριβόσωμα
ακινητοποιείται
στα κωδίκια *trp*



Β. Χαμηλό επίπεδο θρυπτοφάνης

Ο βακτηριοφάγος λ είναι ένας ιός που μολύνει την *E. coli*. Μετά τη μόλυνση, ο φάγος μπορεί να αναπαραχθεί είτε λυτικά, είτε λυσιγονικά.

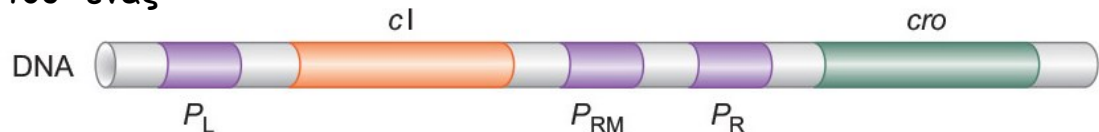
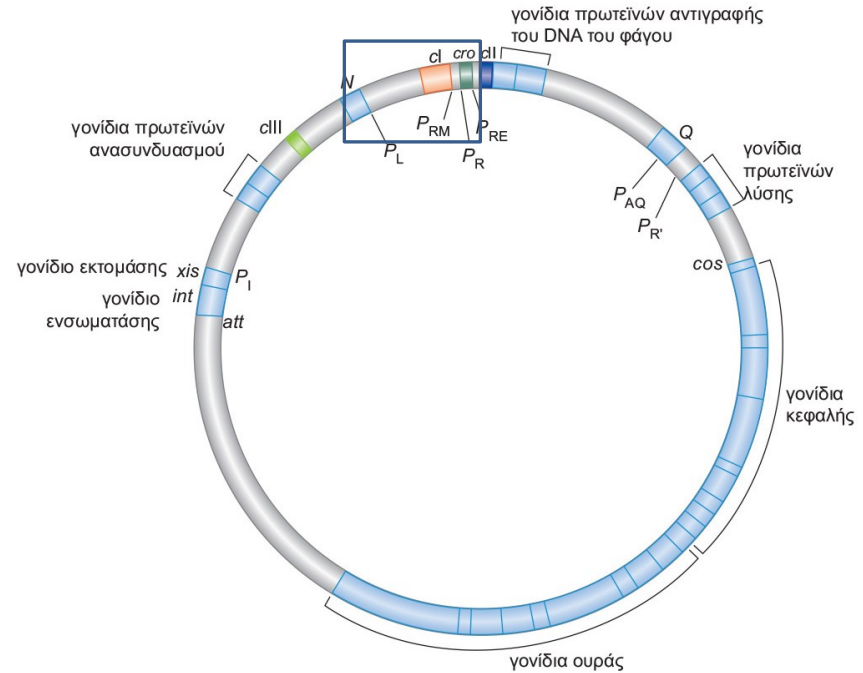


Η λυτική και η λυσιγονική αύξηση ελέγχονται από εναλλακτικά πρότυπα γονιδιακής έκφρασης

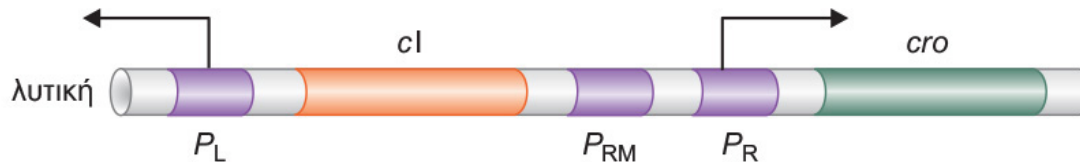
Το γονιδίωμα του φάγου περιλαμβάνει περίπου 50 γονίδια, από τα οποία μια μικρή περιοχή ελέγχει τα πρότυπα έκφρασης που οδηγούν σε λυτική ή λυσιγονική ανάπτυξη.

Η περιοχή αυτή περιέχει δύο γονίδια, (τα cI και cro) και τρεις υποκινητές (P_R , P_L και P_{RM}). Όλα τα άλλα γονίδια του φάγου βρίσκονται εκτός της περιοχής αυτής και μεταγράφονται άμεσα από τους P_R και P_L (που ονομάζονται έτσι από το: υποκινητής μεταγραφής προς τα δεξιά και προς τα αριστερά, αντίστοιχα). Ο P_{RM} (υποκινητής συντήρησης του καταστολέα) μεταγράφει μόνο το γονίδιο cI .

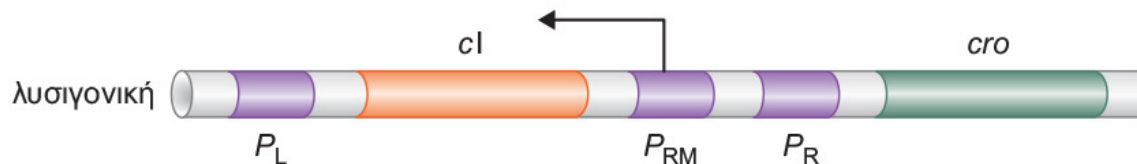
Οι P_R και P_L είναι ισχυροί, υποκινητές· δηλαδή, δεσμεύουν την RNA πολυμεράση αποτελεσματικά και κατευθύνουν τη μεταγραφή χωρίς τη βοήθεια οποιουδήποτε ενεργοποιητή. Αντίθετα ο P_{RM} είναι ένας ασθενής υποκινητής και μπορεί να καθοδηγήσει τη μεταγραφή αποδοτικά, μόνο αφού δεσμευτεί ακριβώς ανοδικά του ένας ενεργοποιητής.



Όταν οι P_L και P_R διατηρούνται ενεργοί, ενώ ο P_{RM} είναι ανενεργός έχουμε λυτική αύξηση.



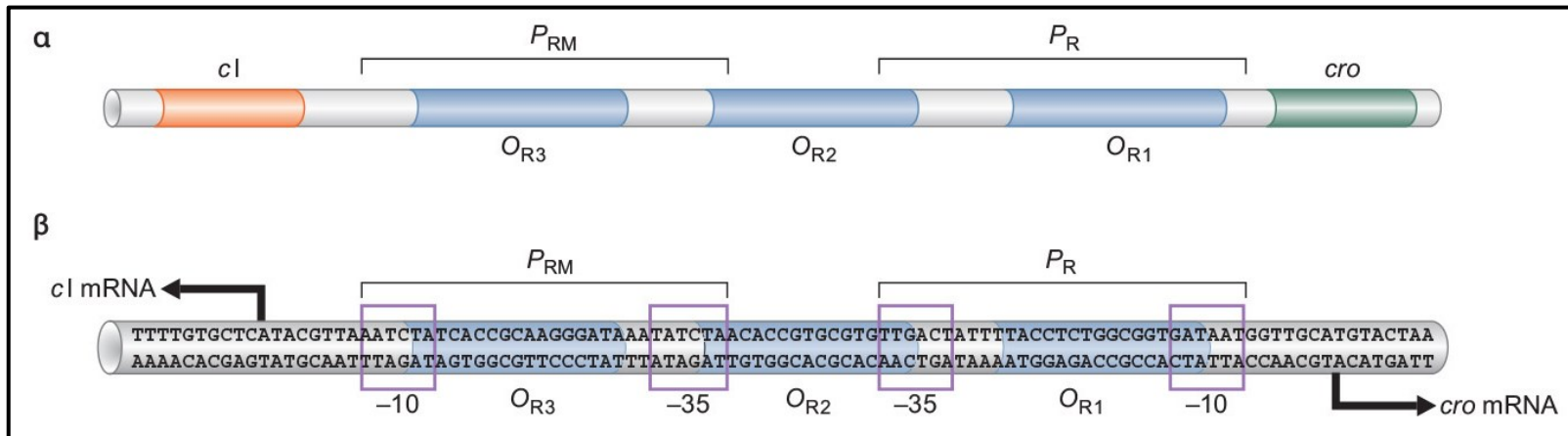
Αντιθέτως, η απενεργοποίηση των P_L και P_R και η ενεργοποίηση του P_{RM} επιφέρει την έκφραση του καταστολέα του λ και συνεπώς τη λυσιγονική αύξηση.



Πως ελέγχονται αυτοί οι υποκινητές;

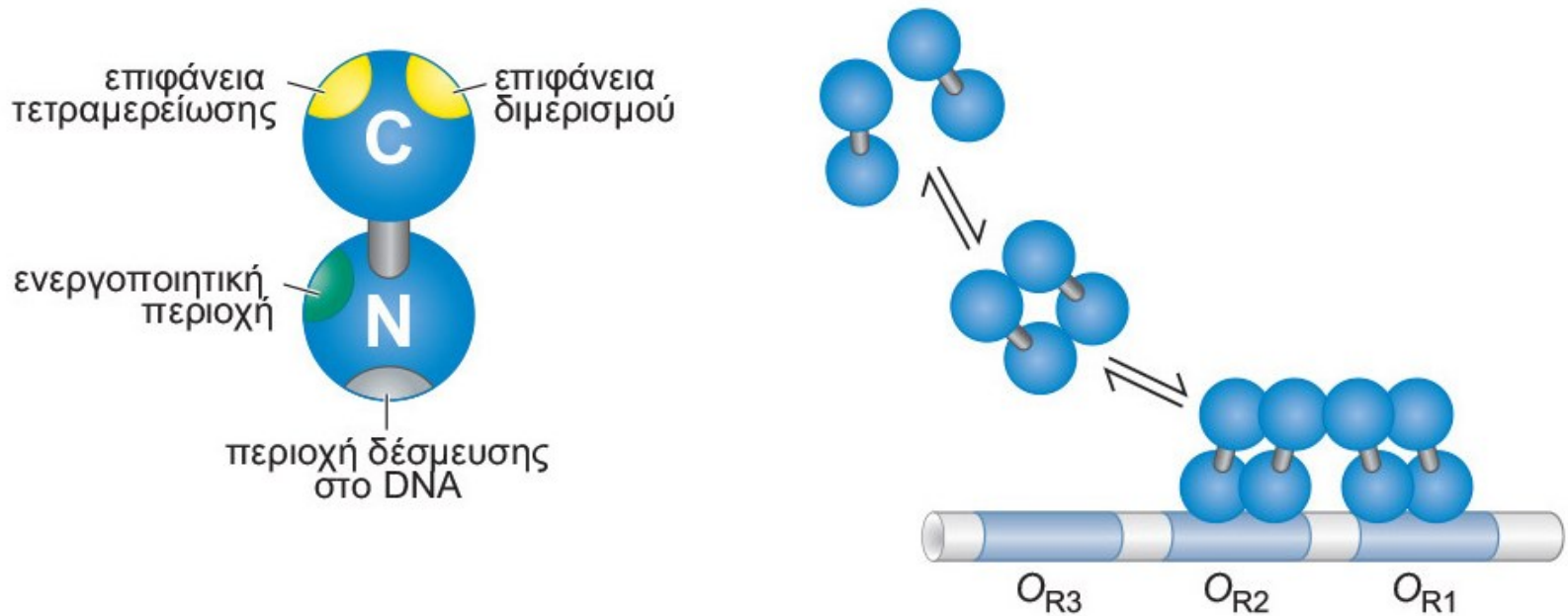
Τα γονίδια cl και cro εκφράζουν τον καταστολέα του λ και την πρωτεΐνη cro αντίστοιχα. Ο καταστολέας του λ, παρά την ονομασία του, μπορεί τόσο να ενεργοποιήσει, όσο και να καταστείλει τη μεταγραφή. Όταν λειτουργεί ως καταστολέας, δεσμεύεται σε θέσεις οι οποίες επικαλύπτουν τον υποκινητή και αποκλείει την RNA πολυμεράση, ενώ ως ενεργοποιητής δεσμεύεται σε άλλες θέσεις που βοηθούν στη στρατολόγηση της πολυμεράσης. Η πρωτεΐνη Cro δρα μόνο ως καταστολέας.

Ο καταστολέας του λ και η Cro μπορούν να δεσμευτούν με διαφορετική συγγένεια σε οποιονδήποτε από 6 υφιστάμενους χειριστές. Τρεις από αυτές τις θέσεις βρίσκονται στην αριστερή περιοχή ελέγχου και τρεις στη δεξιά. Στην **Εικόνα** παρουσιάζονται μόνο οι τρεις θέσεις δέσμευσης του καταστολέα του λ και της Cro της δεξιάς περιοχής, που ονομάζονται O_{R1} , O_{R2} και O_{R3} .

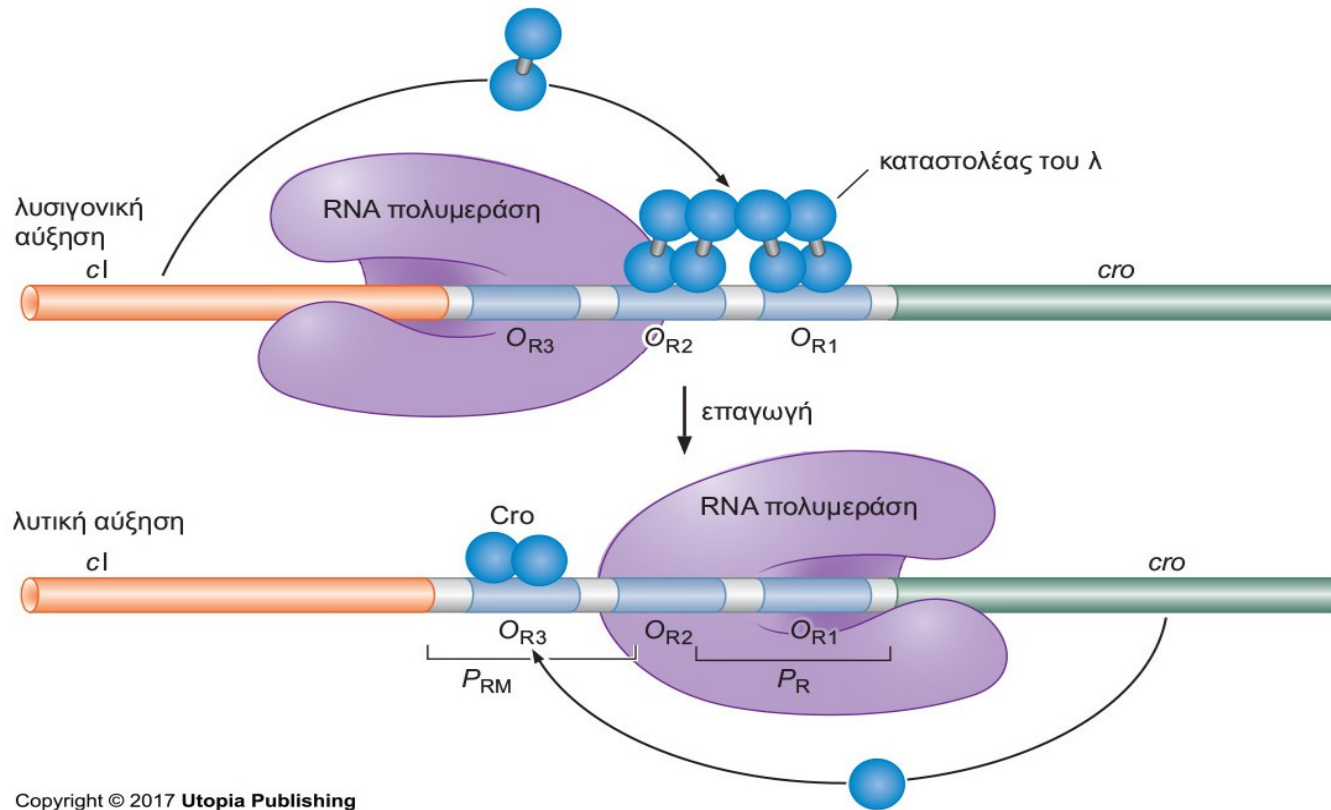


Ο καταστολέας λ δεσμεύεται με δεκαπλάσια συγγένεια στον χειριστή O_{R1} , από ότι στους χειριστές O_{R2} και O_{R3} , ενώ αντίθετα η πρωτεΐνη *cro* δεσμεύεται με δεκαπλάσια συγγένεια στον χειριστή O_{R3} , από ότι στους χειριστές O_{R3} και O_{R2} .

Επιπλέον, επειδή ο καταστολέας λ διαθέτει εκτός της θέσης δέσμευσης στο DNA και θέσεις στο καρβοξυτελικό άκρο του που του επιτρέπουν τον διμερισμό ή και τετραμερισμό του, δεσμεύεται συνεργατικά όπως φαίνεται στην στις θέσεις των χειριστών.



Όταν ο καταστολέας δεσμεύεται στις θέσεις O_{R1} και O_{R2} καταστέλλει τη μεταγραφή από τον P_R , ενώ ταυτόχρονα δεσμευόμενος στην θέση O_{R2} εφάπτεται με την RNA πολυμεράση στον P_{RM} , ενεργοποιώντας την έκφραση του ίδιου του γονιδίου και συνεπώς επάγεται η λυσιγονική αύξηση.



Copyright © 2017 Utopia Publishing

Αντίθετα, η δέσμευση της πρωτεΐνης cro ως ένα μόνο διμερές στη θέση O_{R3} καταστέλλει την έκφραση του καταστολέα λ και ενεργοποιεί την έκφραση των γονιδίων που ελέγχονται από τον υποκινητή P_R , οδηγώντας τα κύτταρα σε λυτική αύξηση.

Σύνοψη των μηχανισμών ρύθμισης της μεταγραφής στους προκαρυωτικούς οργανισμούς

- Ρύθμιση της μεταγραφής: σημαντικό επίπεδο ρύθμισης
- Βασική αρχή: Ένα σύστημα ενεργοποιείται όταν είναι απαραίτητο και αδρανοποιείται όταν δεν είναι.
- Οργάνωση γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ή RNA που σχετίζονται λειτουργικά σε μια μονάδα μεταγραφής που βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο ενός υποκινητή.
- Συνεργίωμα- για τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Τα συνεργιώματα βρίσκονται κάτω από θετική και αρνητική ρύθμιση
- Αλληλεπιδράσεις DNA-πρωτεϊνών παίζουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής.
- Ρόλος μικρών μορίων ως επαγωγέων ή συγκαταστολέων.