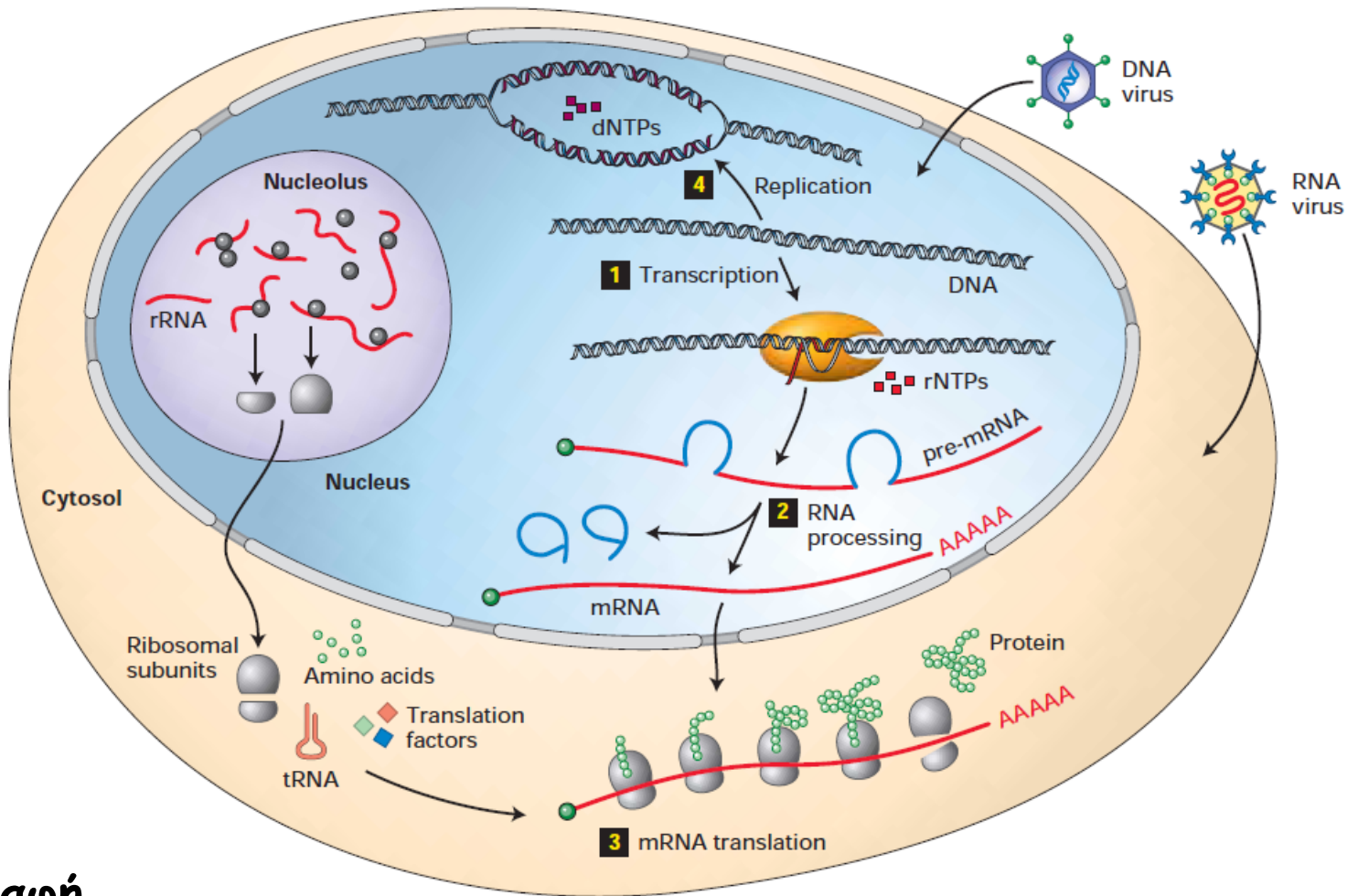


Μεταγραφή, ωρίμανση
και αρχές της ρύθμισης της
γονιδιακής έκφρασης
στους **ευκαρυωτικούς** οργανισμούς

Η μεταβίβαση της γενετικής πληροφορίας από το γονίδιο στην πρωτεΐνη στα ευκαρυωτικά κύτταρα

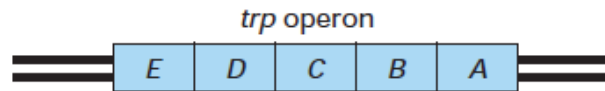


1. Μεταγραφή
2. Επεξεργασία πρόδρομου RNA
3. Μετάφραση

Σύγκριση της γονιδιακής οργάνωσης, της μεταγραφής και της μετάφρασης σε προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς οργανισμούς

(a) Prokaryotes

E. coli genome



Start site
for *trp* mRNA
synthesis

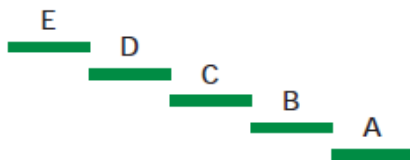
↓ Transcription

trp mRNA 5' ————— 3'

Start sites for
protein synthesis

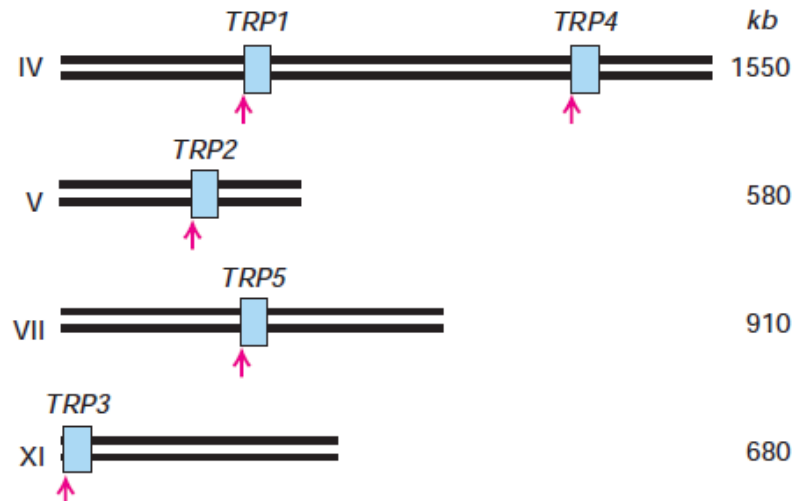
↓ Translation

Proteins

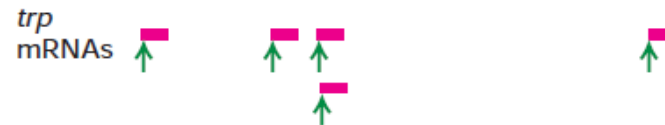


(b) Eukaryotes

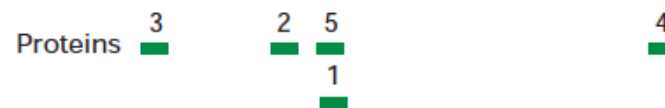
Yeast chromosomes



↓ Transcription and
RNA processing



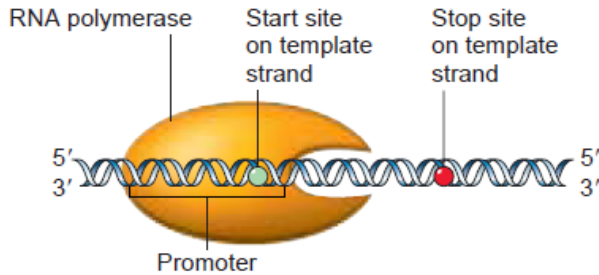
↓ Translation



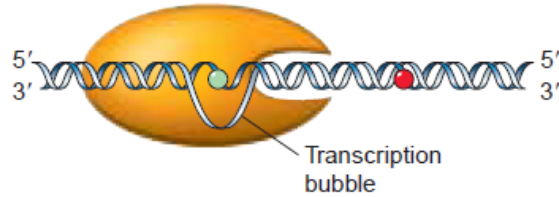
Τα στάδια της μεταγραφής

INITIATION

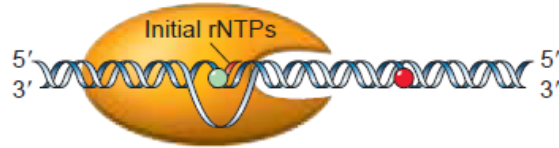
1 Polymerase binds to promoter sequence in duplex DNA. "Closed complex"



2 Polymerase melts duplex DNA near transcription start site, forming a transcription bubble. "Open complex"

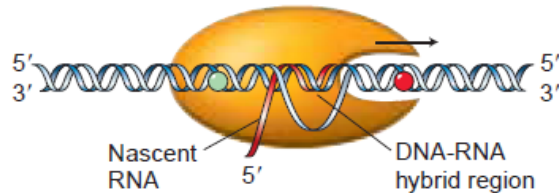


3 Polymerase catalyzes phosphodiester linkage of two initial rNTPs.



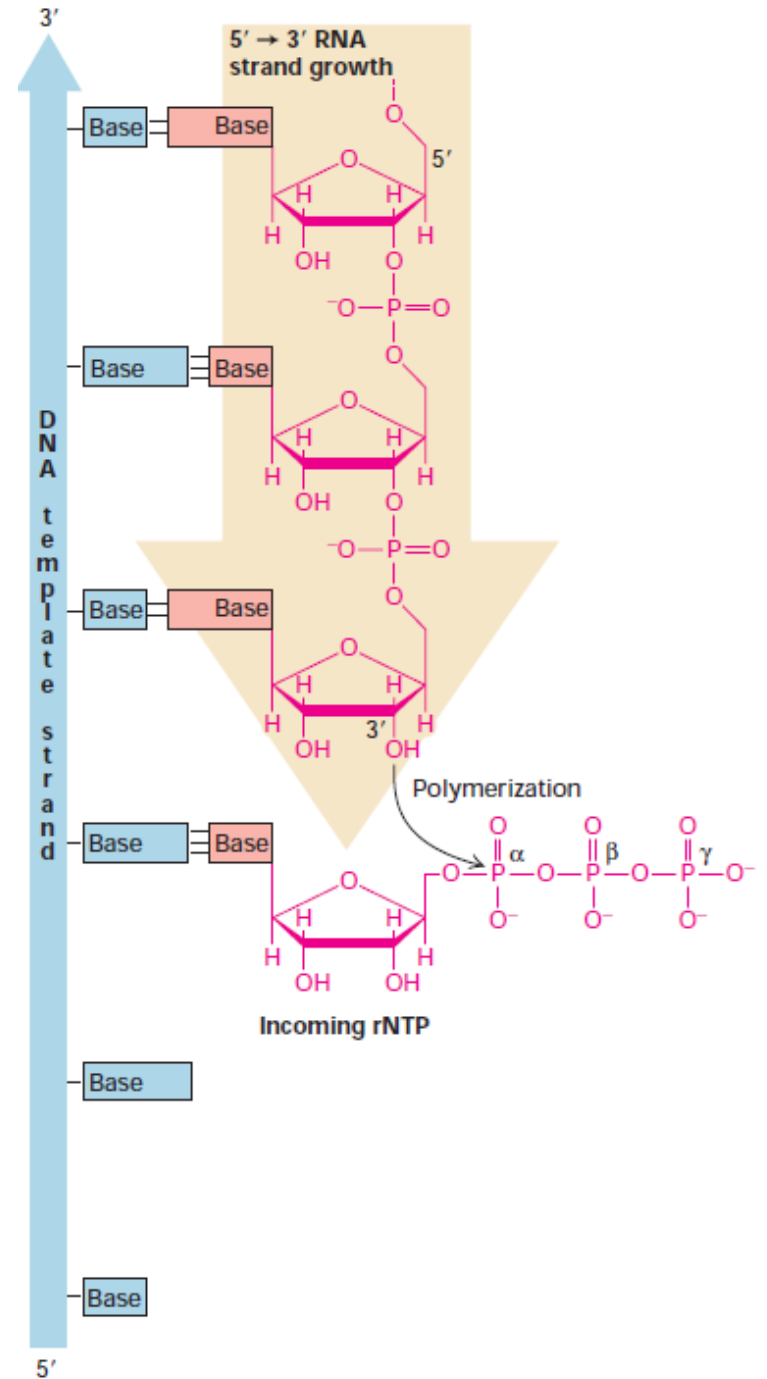
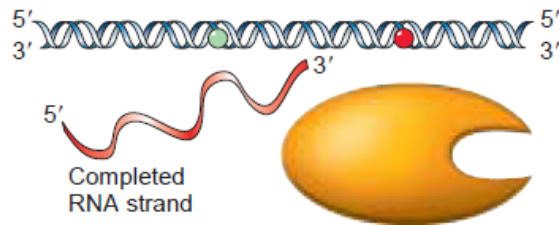
ELONGATION

4 Polymerase advances 3' → 5' down template strand, melting duplex DNA and adding rNTPs to growing RNA.



TERMINATION

5 At transcription stop site, polymerase releases completed RNA and dissociates from DNA.



Μεταγραφή στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς

Ιδιαιτερότητες

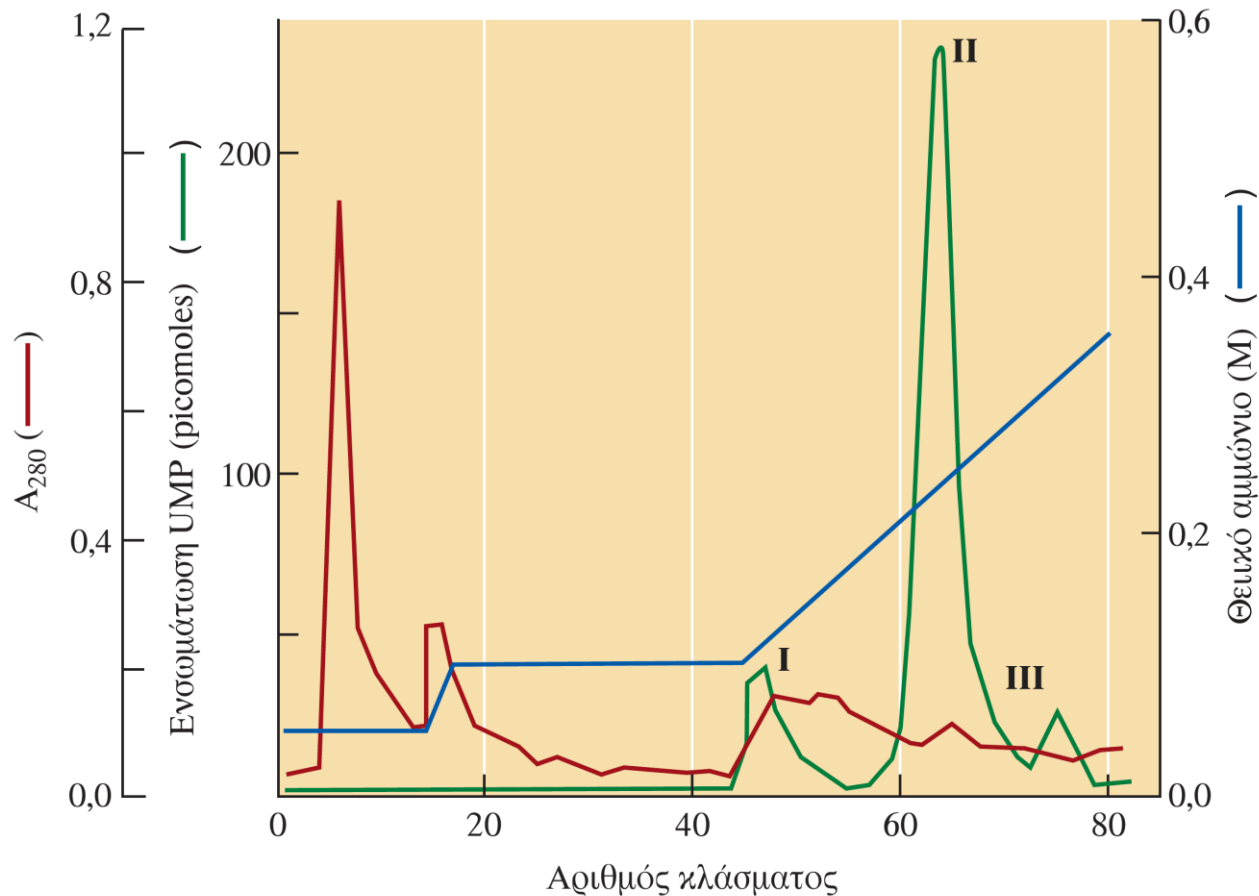
- DNA και χρωματίνη: η δομή της χρωματίνης επιβάλλει αλλαγές κατά τη μεταγραφή, τροποποιήσεις των ιστονών, σύμπλοκα αναδόμησης της χρωματίνης (chromatin remodelling complexes) και μεθυλίωση του DNA
- Υποκινητές
- Ρυθμιστικές αλληλουχίες και αντίστοιχα ρυθμιστικές πρωτεΐνες (μεταγραφικοί παράγοντες)
- RNA πολυμεράσες I, II, III (IV και V στα φυτά)
- Ο ρόλος των μη-κωδικών RNA στη ρύθμιση της μεταγραφής
- Κεντρικός ρόλος της ωρίμανσης: όλα τα μόρια RNA συντίθενται υπό τη μορφή προδρόμων μορίων

RNA πολυμεράσες στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς

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

- Όλες αποτελούνται από 10-14 υπομονάδες
- Οι υπομονάδες έχουν MW από 10 ως 220 kDa
- Όλες έχουν 2 μεγάλες υπομονάδες (>125 kD) και αρκετές μικρότερες
- Κάποιες από τις μικρότερες είναι κοινές και στις 3 πολυμεράσες
- Διαφορετική ευαισθησία στην α -αμανατίνη: η RNA πολυμεράση II είναι ευαίσθητη ακόμη και σε μικρές συγκεντρώσεις

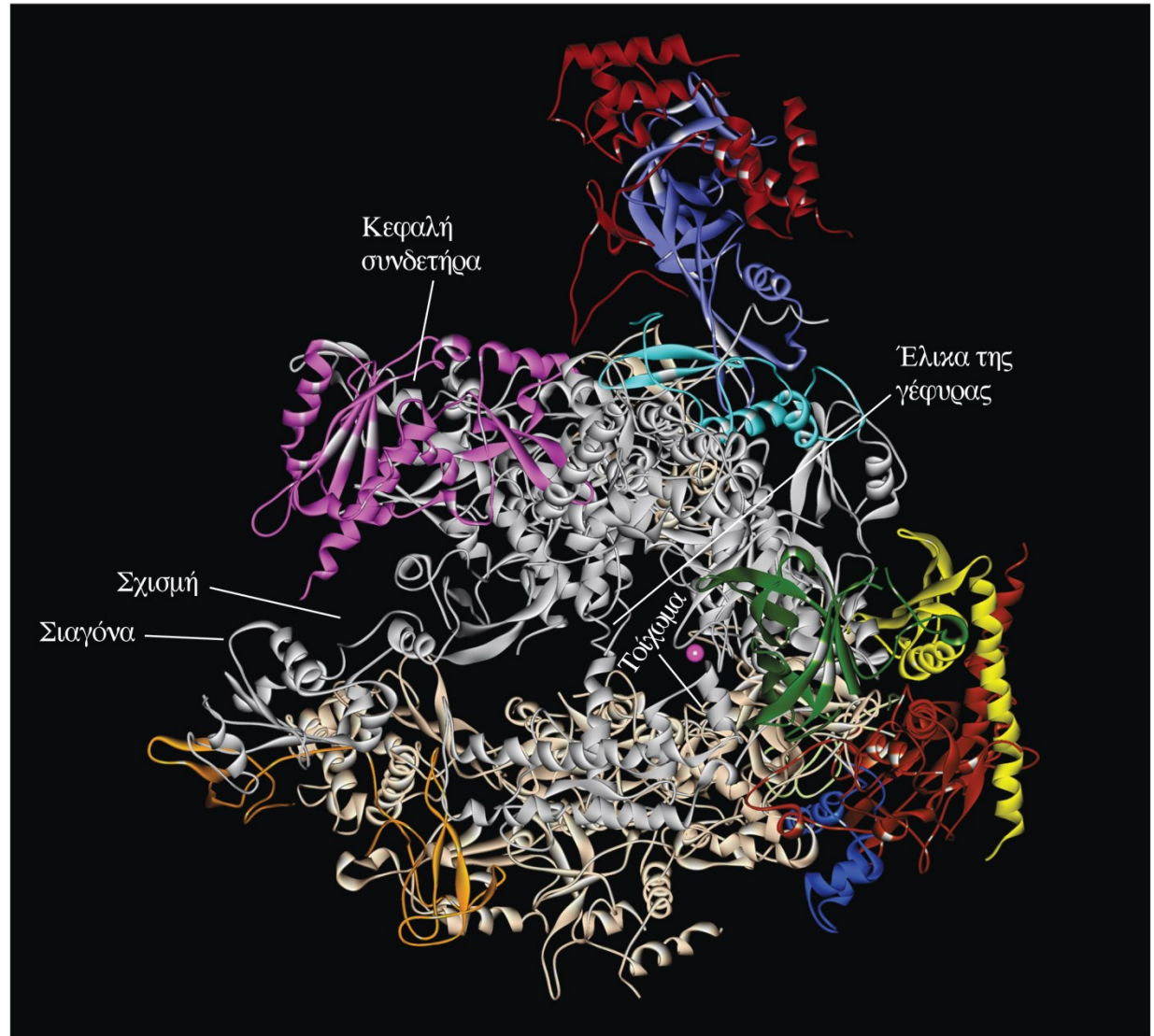
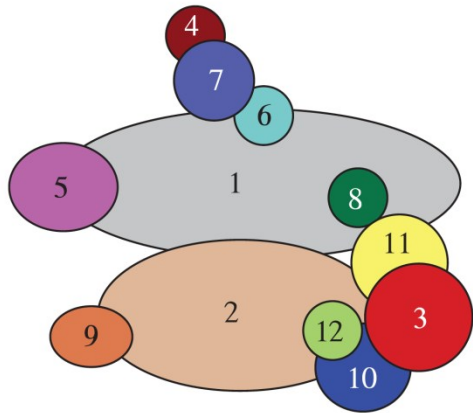
Οι τρεις RNA πολυμεράσες διαχωρίστηκαν με ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία DEAE-Sephadex



Χρησιμοποιώντας χρωματογραφία DEAE-Sephadex, οι Roeder και Rutter (1970) διαχώρισαν τις τρεις RNA πολυμεράσες από εκχύλισμα εμβρύων αχινού.

Κόκκινο: ανίχνευση πρωτεϊνών με μέτρηση οπτικής απορρόφησης στα 280 nm. **Πράσινο:** η ενεργότητα της RNA πολυμεράσης όπως μετρήθηκε από την ενσωμάτωση ραδιοσημασμένης μονοφωσφορικής ουριδίνης (UMP). **Μπλε:** η συγκέντρωση θειικού αμμωνίου που χρησιμοποιήθηκε στο ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης.

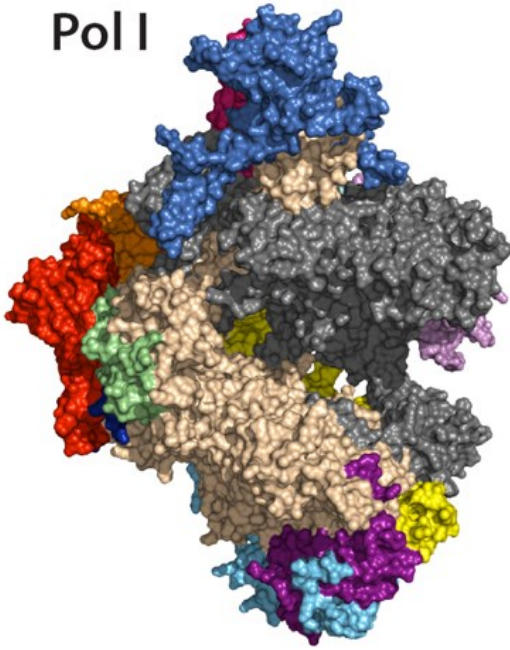
Μοντέλο της δομής της 12-μερούς RNA πολυμεράσης II του ζυμομύκητα



Οι υπομονάδες έχουν τα ίδια χρώματα όπως στο διάγραμμα στα αριστερά. Οι αριθμοί υποδηλώνουν την αρίθμηση των υπομονάδων Rpb1-12.

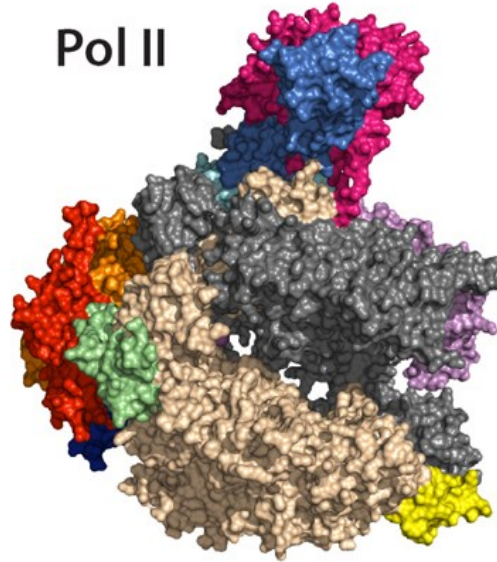
Ευκαρυωτικές RNA πολυμεράσες

Pol I



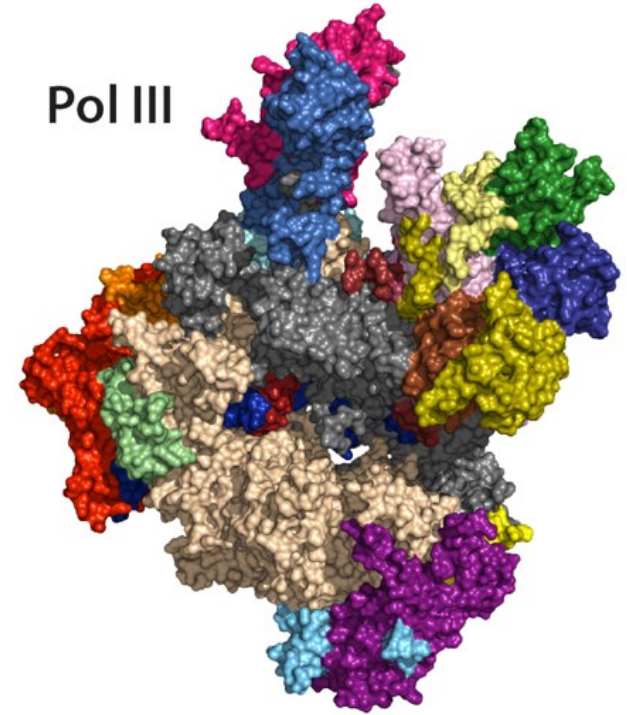
28S, 5.8S και
18S rRNA

Pol II



Γονίδια που
κωδικοποιούν
πρωτεΐνες, snRNA
miRNA

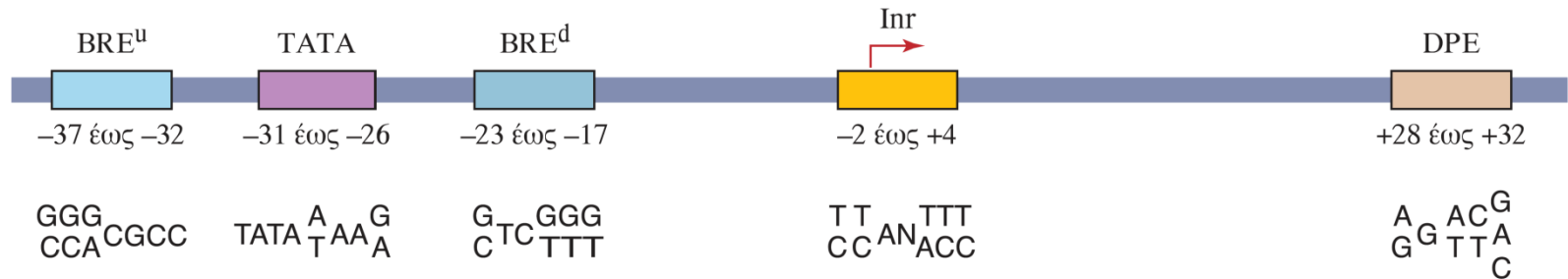
Pol III



Γονίδια για
(tRNA), 5S rRNA,
U6 snRNA,
snoRNA

Βασικοί υποκινητές της RNA Pol II

- Η δομή των ευκαρυωτικών υποκινητών είναι περισσότερο σύνθετη από αυτή των προκαρυωτικών.
- Ο ευκαρυωτικός **βασικός ή κεντρικός υποκινητής** (core promoter) αναφέρεται στο ελάχιστο σύνολο στοιχείων αλληλουχίας που απαιτείται για την ακριβή εκκίνηση της μεταγραφής *in vitro*.
- Έχει τυπικά μήκος 40-80 νουκλεοτιδίων και εκτείνεται ανοδικά και καθοδικά της θέσης έναρξης της μεταγραφής.



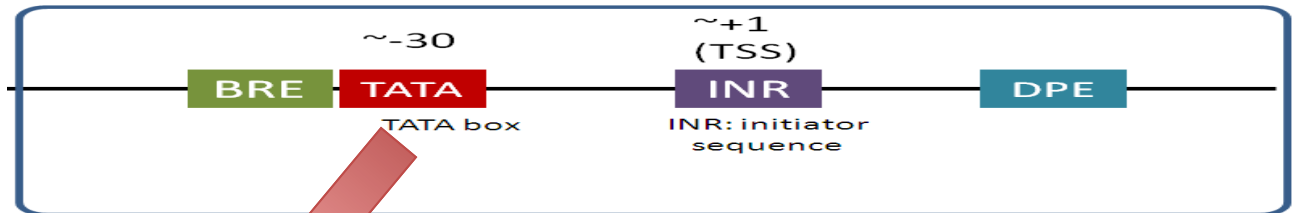
Συναινετική
αλληλουχία

Τα βασικά στοιχεία του κεντρικού υποκινητή είναι:

- Το πλαίσιο **TATA**, εντοπίζεται 25-30 bp ανοδικά της θέσης έναρξης της μεταγραφής
- Το έναρκτήριο στοιχείο **Inr** (Initiator element)
- Το καθοδικό στοιχείο **DPE** (Downstream Promoter Element)
- Τα στοιχεία αναγνώρισης του TFIIB **BRE^u** και **BRE^d** (TFIIB Recognition Element)

Συναινετική αλληλουχία του πλαισίου TATA

core region
(+40 to -50 bp)



TATA box

	A	21	16	4	91	0	95	67	97	52	41	16	24
Base frequency (%)	C	23	39	10	0	0	0	0	0	0	9	35	37
	G	28	35	3	0	0	0	0	3	12	40	38	30
	T	28	10	83	9	100	5	33	0	36	10	11	9

mRNA starts

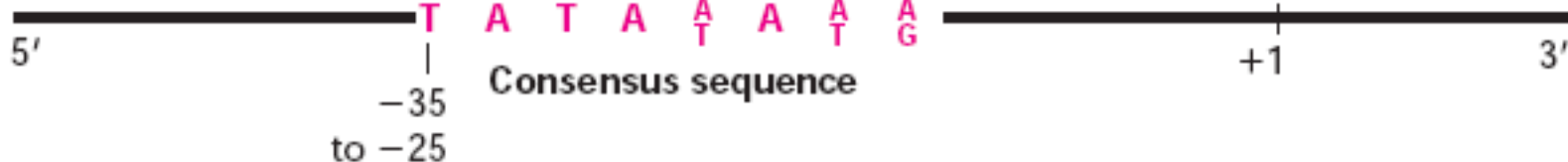
A ≈ 50%

G ≈ 25%

C, U ≈ 25%



Transcription



Τυπικά, ένας υποκινητής περιλαμβάνει κάποια υποσύνολα των βασικών στοιχείων.

Ο Inr είναι το συνηθέστερο στοιχείο.

Για την εύρεση των στοιχείων TATA, Inr, DPE και BRE μελετήθηκαν 10.000 κεντρικοί υποκινητές.

- Το στοιχείο Inr, εντοπίστηκε στους μισούς περίπου υποκινητές.
- Τα στοιχεία DPE και BRE βρέθηκαν στο $\frac{1}{4}$ των κεντρικών υποκινητών.
- Το πλαίσιο TATA στο $\frac{1}{8}$.
- Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το $\frac{1}{4}$ των κεντρικών υποκινητών που μελετήθηκαν δε φέρει κανένα από τα τέσσερα στοιχεία.

Συνεπώς, η πιθανότητα να υπάρχουν και άλλα στοιχεία που δεν έχουν ακόμα αναγνωρισθεί, δεν μπορεί να αποκλειστεί.

Μεταγραφικοί παράγοντες

Καμία από τις ευκαρυωτικές RNA πολυμεράσες δεν αναγνωρίζει μόνη της τον υποκινητή, απαιτούνται μεταγραφικοί παράγοντες που αναγνωρίζουν τους υποκινητές και αυτοί στρατολογούν την RNA πολυμεράση.

Οι μεταγραφικοί παράγοντες ταξινομούνται σε:

- 1) **Γενικούς** μεταγραφικούς παράγοντες (general transcription factors)
- 2) **Ρυθμιστικούς** μεταγραφικούς παράγοντες (regulatory transcription factors)

Η πρόσδεση της RNA πολυμεράσης II στον κεντρικό υποκινητή πραγματοποιείται με τη συνδρομή των γενικών μεταγραφικών παραγόντων, οπότε σχηματίζεται το **προεναρκτήριο σύμπλοκο**.

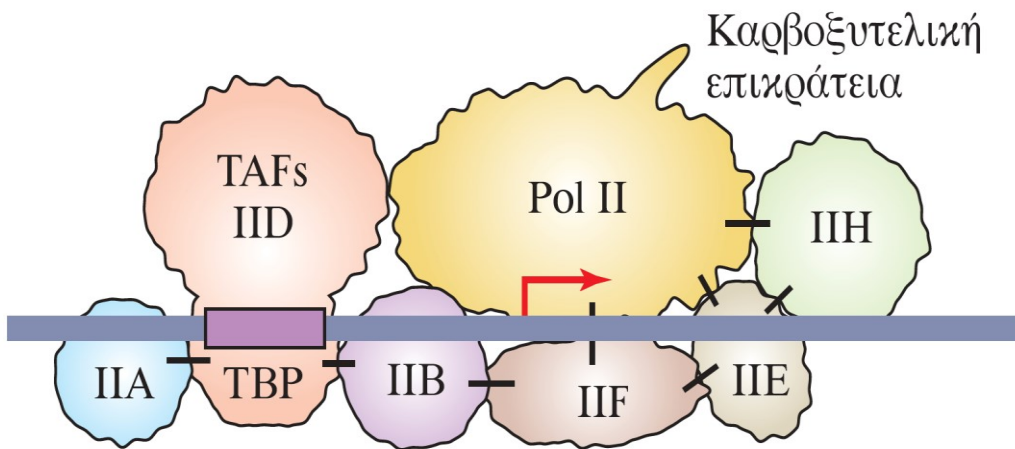
Οι γενικοί μεταγραφικοί παράγοντες ονομάστηκαν TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIIF και TFIIH. Τα γράμματα TF υποδηλώνουν ότι πρόκειται για γενικό μεταγραφικό παράγοντα (Transcription Factor), ο λατινικός αριθμός II ότι συμμετέχουν στην μεταγραφή που καταλύεται από την RNA πολυμεράση II και το τελευταίο γράμμα αποδόθηκε με βάση τον αριθμό του αντίστοιχου κλάσματος όπου βρέθηκε ο συγκεκριμένος παράγοντας και όχι με βάση τη λειτουργία του.

Γενικοί μεταγραφικοί παράγοντες	Αριθμός υπομονάδων
TBP	1
TFIIA	2
TFIIB	1
TFIIIE	2
TFIIIF	3
TFIIH	10
TAFs	11

Οι πρωτεΐνες TAFs και TBP συγκροτούν τον μεταγραφικό παράγοντα TFIID.

Οι γενικοί μεταγραφικοί παράγοντες εκτελούν συλλογικά τις λειτουργίες που πραγματοποιούνται από τον παράγοντα σ στη βακτηριακή μεταγραφή δηλαδή,

- Βοηθούν την πολυμεράση να προσδεθεί στον υποκινητή
- Να τήξει το DNA (μετάπτωση από το κλειστό στο ανοικτό σύμπλοκο)
- Βοηθούν επίσης την πολυμεράση να διαφύγει από τον υποκινητή και να αρχίσει τη φάση της επιμήκυνσης.

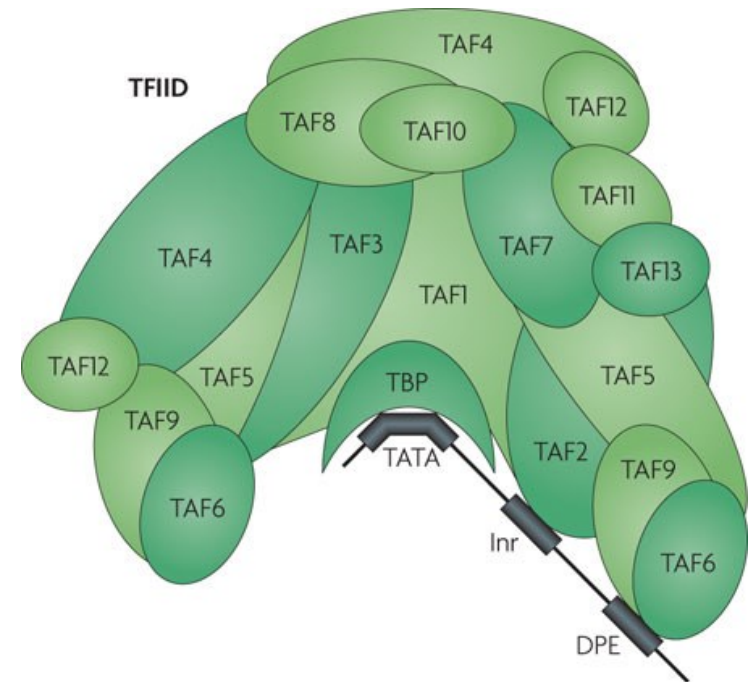


Το προεναρκτήριο σύμπλοκο συναρμολογείται στον κεντρικό υποκινητή με τη βοήθεια πολλών βημάτων.

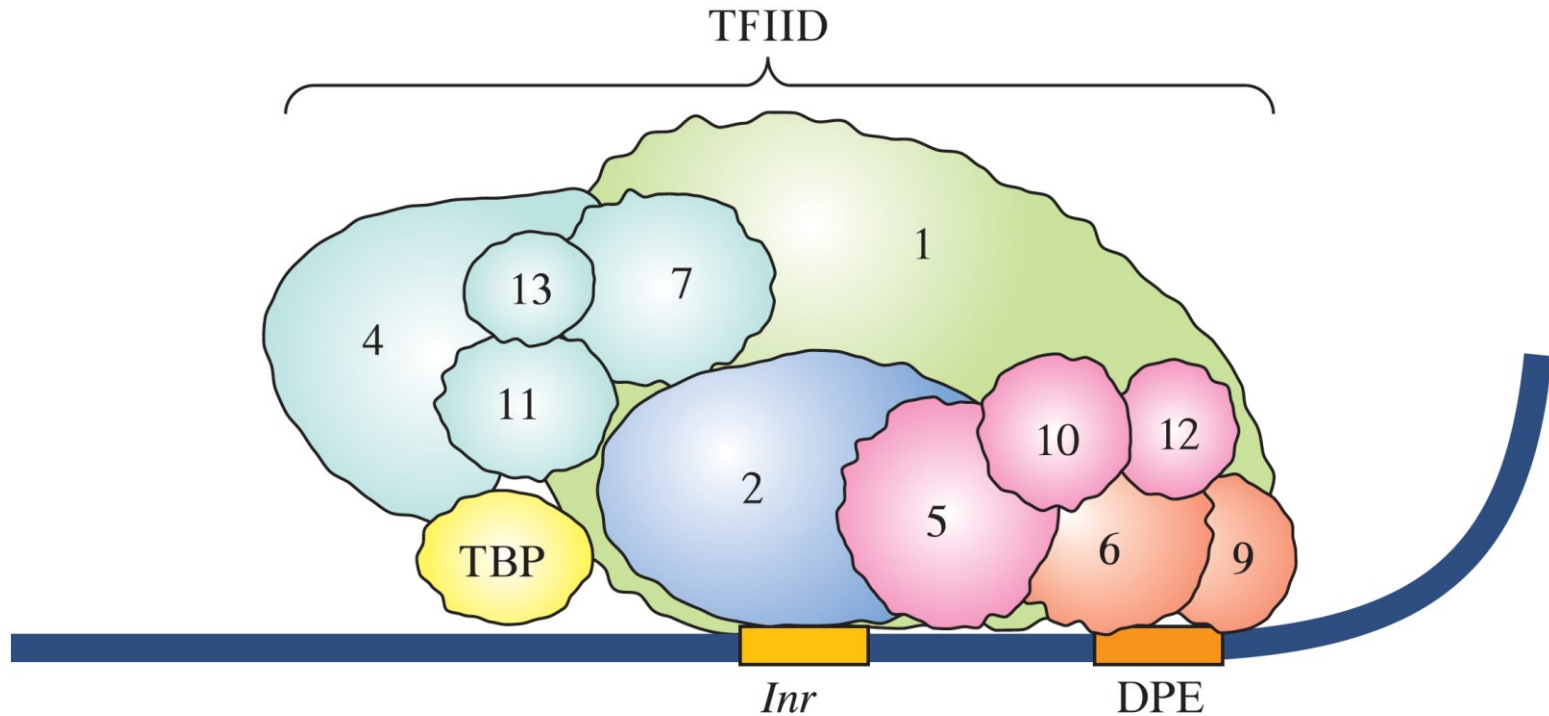
Μερικές από τις γνωστές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στους γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες και στην RNA πολυμεράση II υποδηλώνονται με συνδετικές γραμμές.

Ο TFIID γενικός μεταγραφικός παράγοντας είναι ένας κρίσιμος παράγοντας στην αναγνώριση του υποκινητή και στην εγκατάσταση του προεναρκτηρίου συμπλόκου.

Ο σχηματισμός του προεναρκτηρίου συμπλόκου αρχίζει στο στοιχείο TATA, που περιέχουν αρκετοί υποκινητές της RNA pol II. Το στοιχείο αυτό αναγνωρίζεται από τον γενικό μεταγραφικό παράγοντα **TFIID**, ο οποίος είναι ένα σύμπλοκο πολλών υπομονάδων. Το συστατικό του TFIID που προσδένεται στην αλληλουχία TATA του DNA ονομάζεται **TBP** (TATA-binding protein), ενώ οι άλλες υπομονάδες του TFIID καλούνται **TAF** (TBP-associated-factors). Ορισμένοι TAF αναγνωρίζουν άλλα στοιχεία του βασικού υποκινητή όπως τα Inr, DPE και BRE.



Σχηματική αναπαράσταση των υπομονάδων του συμπλόκου TFIID που βρίσκεται σε σύνδεση με έναν κεντρικό υποκινητή χωρίς TATA

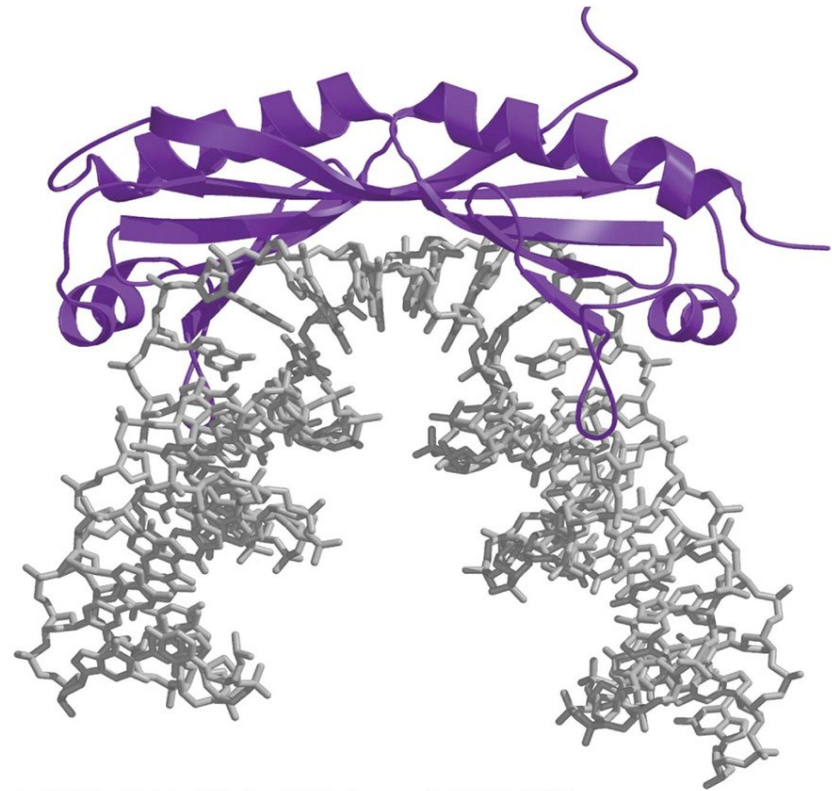


Στο σύμπλοκο του παράγοντα TFIID με τον κεντρικό υποκινητή συμπεριλαμβάνονται ο TBP (κίτρινο), που προσδένεται στο πλαίσιο TATA (αν υπάρχει), η πρωτεΐνη TAF2 (μπλε), που αλληλεπιδρά με το εναρκτήριο στοιχείο (*Inr*), και οι πρωτεΐνες TAF6 και TAF9 (πορτοκαλί), οι οποίες αλληλεπιδρούν με το καθοδικό στοιχείο υποκινητή (DPE). Στο σχήμα εμφανίζονται οι περισσότεροι από τους 13 συντηρημένους παράγοντες TAF.

TATA-box-binding protein (TBP)

Συντηρημένη πρωτεΐνη: 80% ταυτότητα αμινοξέων στην περιοχή που προσδέεται στην αλληλουχία TATA-box από τον ζυμομύκητα στον άνθρωπο.

Η TBP προσδέεται στο DNA προκαλώντας του μια κάμψη $\sim 80^\circ$, χρησιμοποιώντας ένα β -πτυχωτό φύλλο που εντίθεται στη μικρή αύλακα, ενώ τυπικά οι πρωτεΐνες αναγνωρίζουν το DNA χρησιμοποιώντας α -έλικες που εντίθενται στη μεγάλη αύλακα.



Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

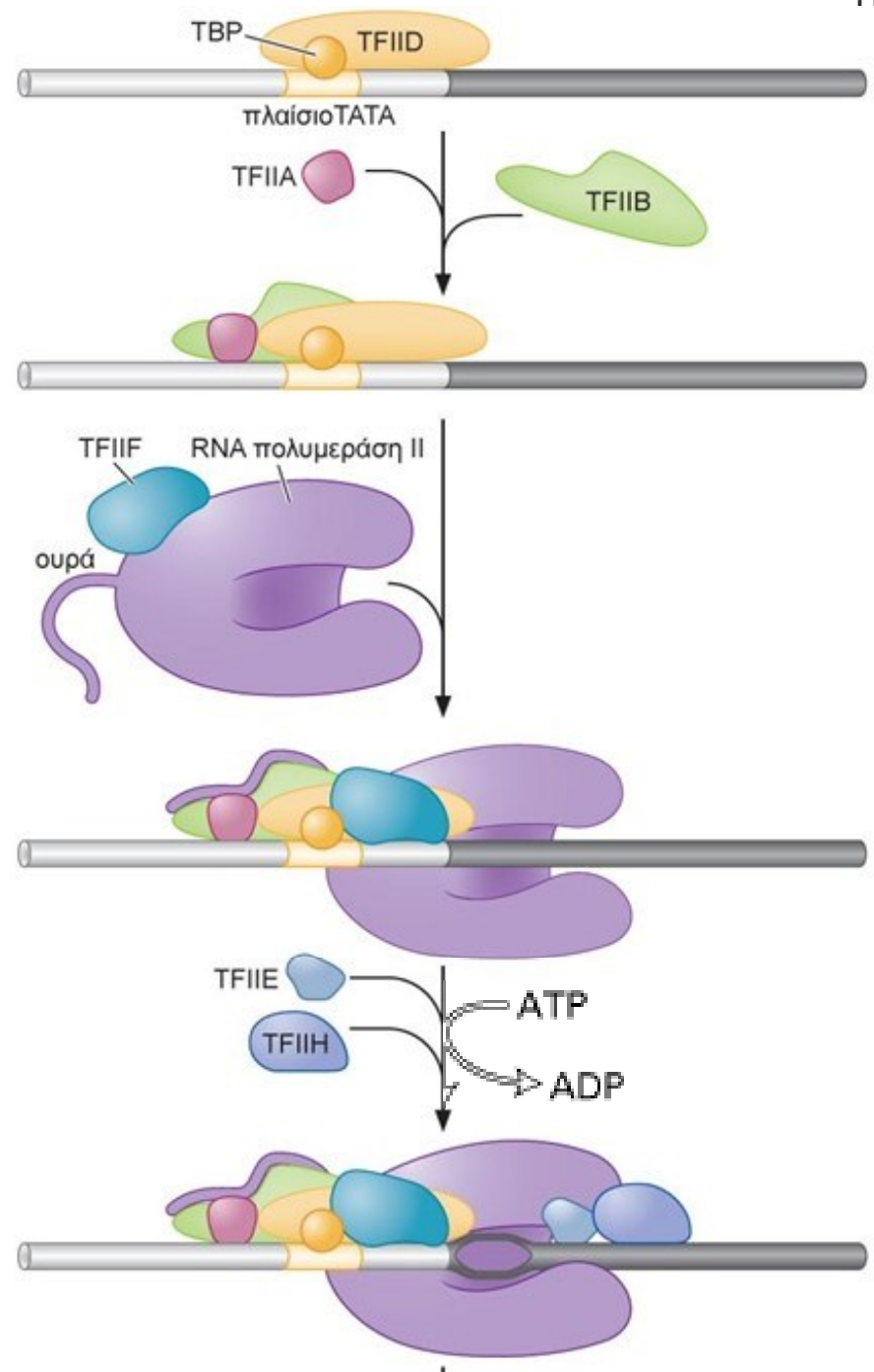
Copyright © 2010 Utopia Publishing

Η TBP είναι απαραίτητη και στη μεταγραφή από τις **RNA πολυμεράσες I και III**

Σταδιακή συγκρότηση του προεναρκτηρίου συμπλόκου της pol II

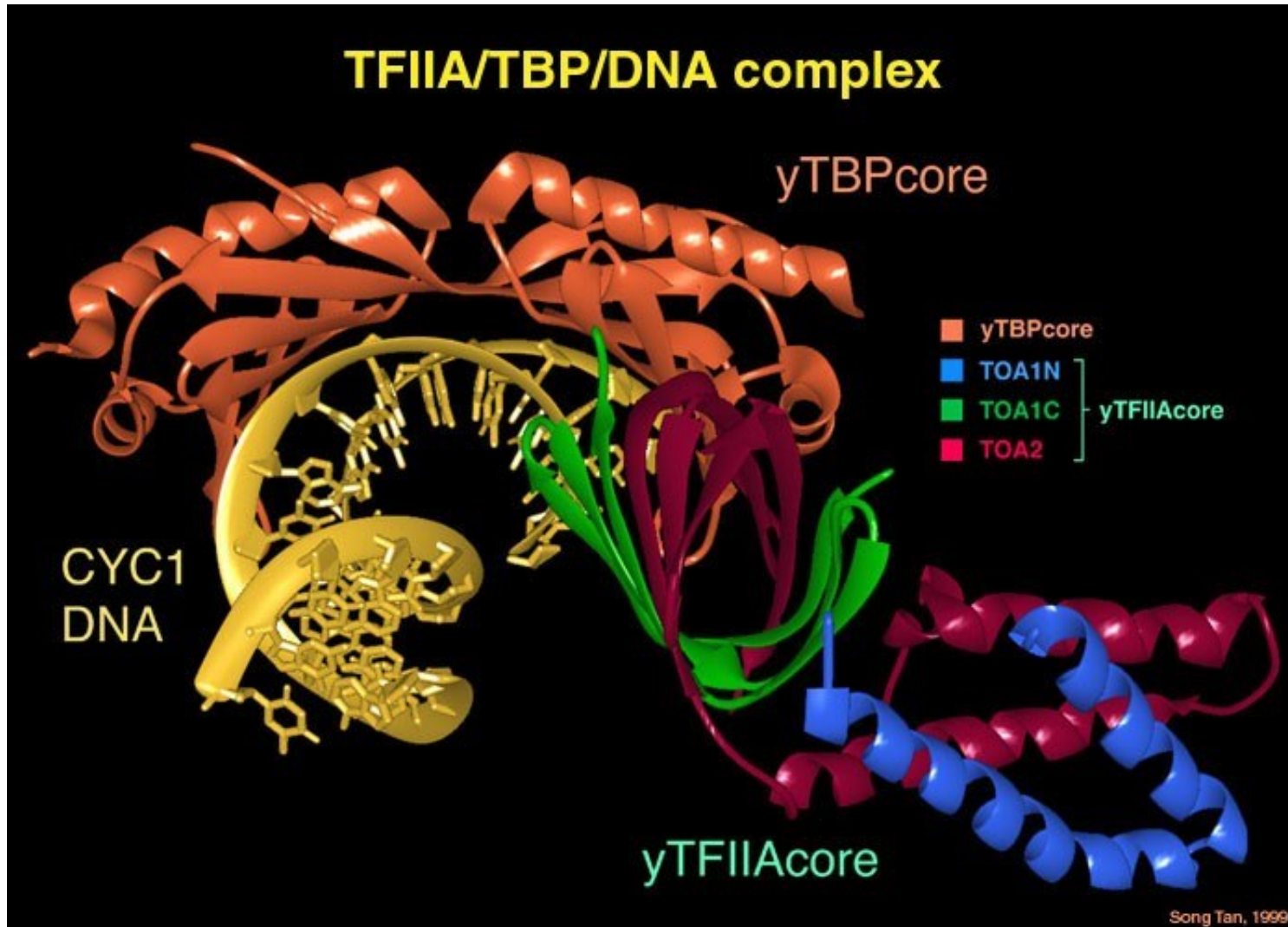
Το σύμπλοκο TBP-DNA παρέχει μια πλατφόρμα για την προσέλκιση άλλων γενικών μεταγραφικών παραγόντων, καθώς και της RNA πολυμεράση στον υποκινητή. *In vitro*, οι πρωτεΐνες αυτές συγκεντρώνονται στον υποκινητή με την εξής σειρά: TFIIA, TFIIIB, TFIIIF μαζί με την πολυμεράση και στη συνέχεια TFIIIE και TFIIH που προκαλεί την τήξη του υποκινητή.

Σε αντίθεση με την κατάσταση στα βακτήρια, η τήξη του υποκινητή απαιτεί υδρόλυση του ATP.



TFIIA: Ενισχύει την πρόσδεση της TBP

- Θεωρείται απαραίτητος παράγοντας *in vitro*

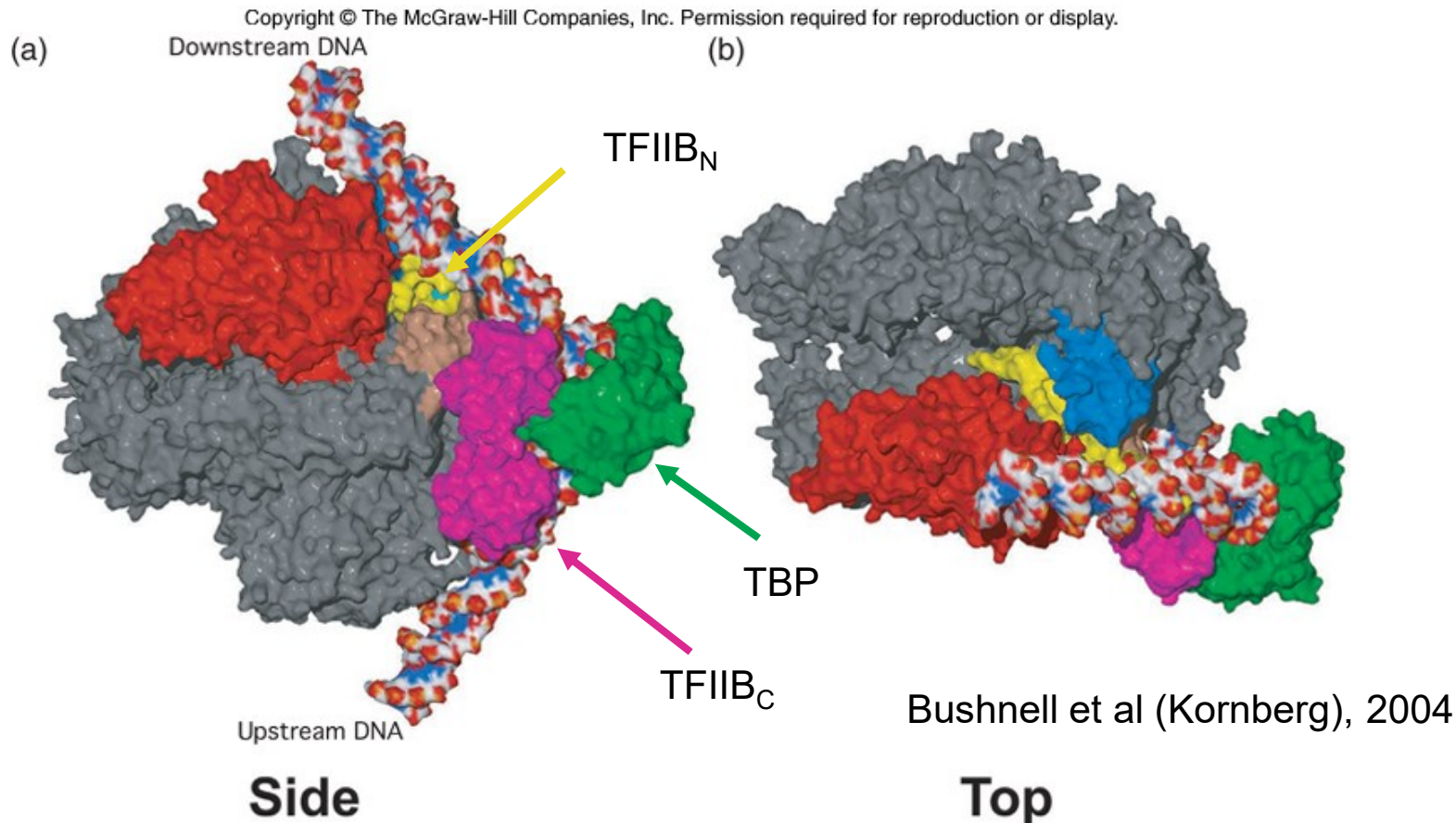


- Συντηρημένος στους ευκαρυωτικούς

- Αποτελείται από δύο υπομονάδες

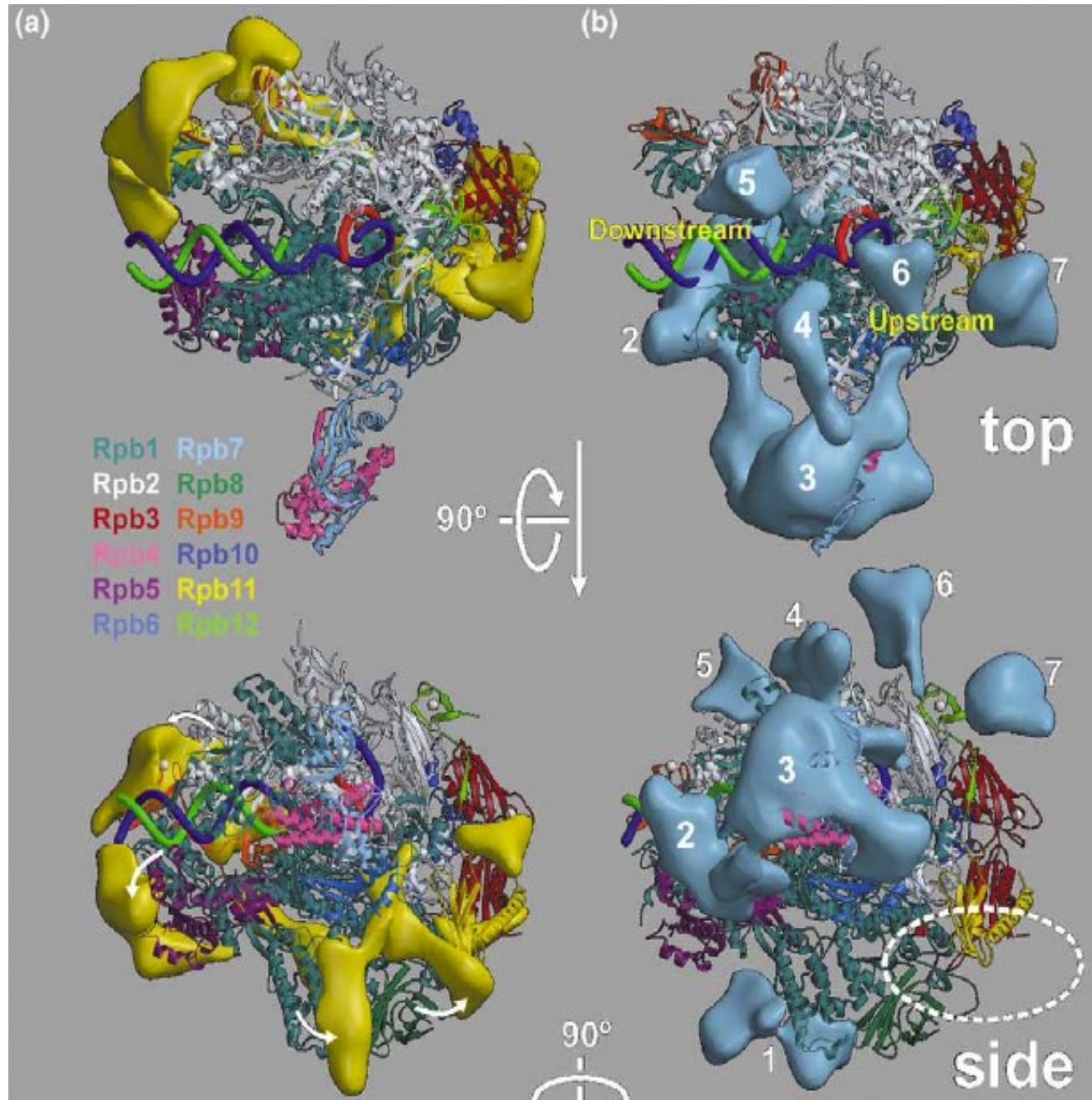
TFIIB: Επιτρέπει την δέσμευση της RNA πολυμεράσης II

- Αποτελείται από μία υπομονάδα 35 kDa
- Προσδένεται μετά το σύμπλοκο TFIID και τον TFIIA
- Απαραίτητος για την πρόσδεση της RNA πολυμεράσης II
- Αποτελείται από δύο περιοχές: Το **N-τελικό άκρο** προσδένεται στην RNA πολυμεράση II και το **C-τελικό** αλληλεπιδρά με την **TBP**, λυγίζει το DNA



TFIIF: Συνδέεται ισχυρά με την RNA πολυμεράση II

- Cryo-EM (16 Å) of RNAPII-TFIIF (2003)
- TFIIF (μπλε χρώμα)
- Στερεοδιαταξικές αλλαγές στη δομή της RNAP μετά την πρόσδεση του TFIIF φαίνονται **με κίτρινο**
- Μια υπομονάδα του TFIIF είναι πιθανόν ομόλογη του βακτηριακού παράγοντα σ



TFIIH: Δομή και λειτουργία

- Ο τελευταίος στη σειρά γενικός μεταγραφικός παράγοντας που προσδένεται *in vitro*
- Αποτελείται από 9 τουλάχιστον υπομονάδες. 2 ΑΤΡάσες, 1 κινάση και 1 ελικάση. Κάποιες από τις υπομονάδες του παίζουν ρόλο και στην επιδιόρθωση του DNA

Βιολογικοί ρόλοι:

- Φωσφορυλιώνει το καρβοξυτελικό άκρο (C-terminal domain) της RNA πολυμεράσης II το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο σε όλη τη διαδικασία της μεταγραφής αλλά και της ωρίμανσης
- Αποδιατάσσει το DNA στη θέση έναρξης για να δημιουργηθεί η «φούσκα της μεταγραφής»- «transcription bubble»

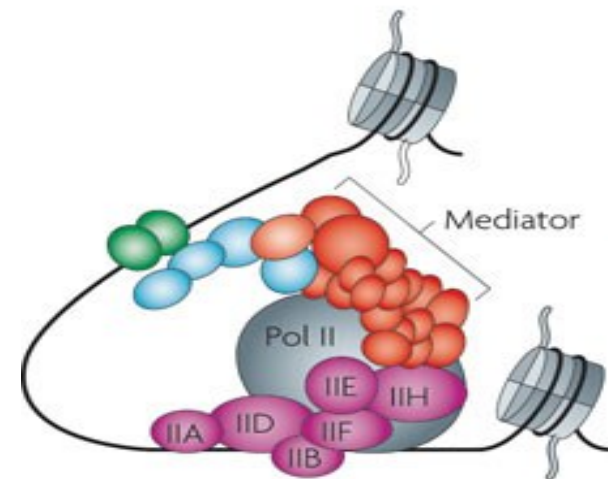
TFIIE: Βοηθά την πρόσδεση του TFIIH

Η έναρξη της μεταγραφής *in vivo* απαιτεί πρόσθετους πρωτεϊνικούς παράγοντες.

Η πρόσβαση των γενικών μεταγραφικών παραγόντων στον υποκινητή δυσκολεύεται γιατί το DNA βρίσκεται στα νουκλεοσώματα.

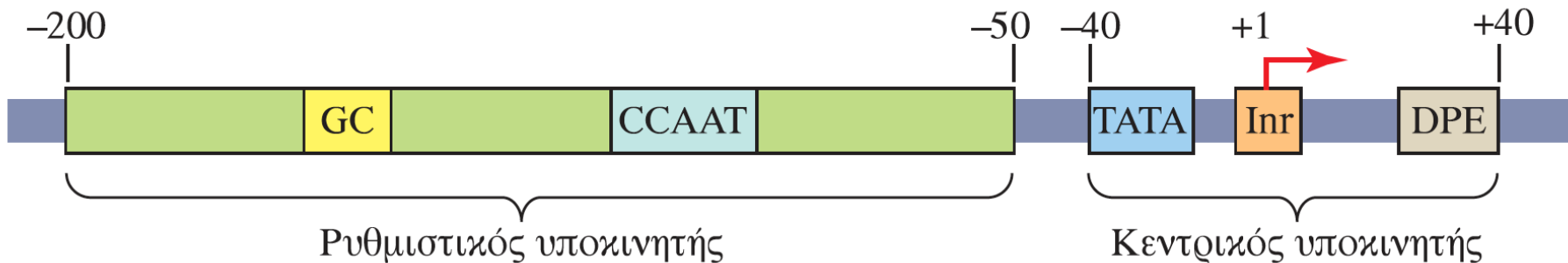
Για να επιτευχθούν **υψηλά** και **ρυθμιζόμενα** επίπεδα μεταγραφής απαιτούνται και άλλοι παράγοντες όπως:

- Ρυθμιστικές πρωτεΐνες
- Το σύμπλοκο του μεσολαβητή (mediator complex) και
- Ένζυμα τροποποίησης της χρωματίνης



Οι ρυθμιστικοί πρωτεϊνικοί παράγοντες αναγνωρίζουν και δεσμεύονται σε ειδικές αλληλουχίες του DNA που ανάλογα με το ρόλο που επιτελούν ονομάζονται:

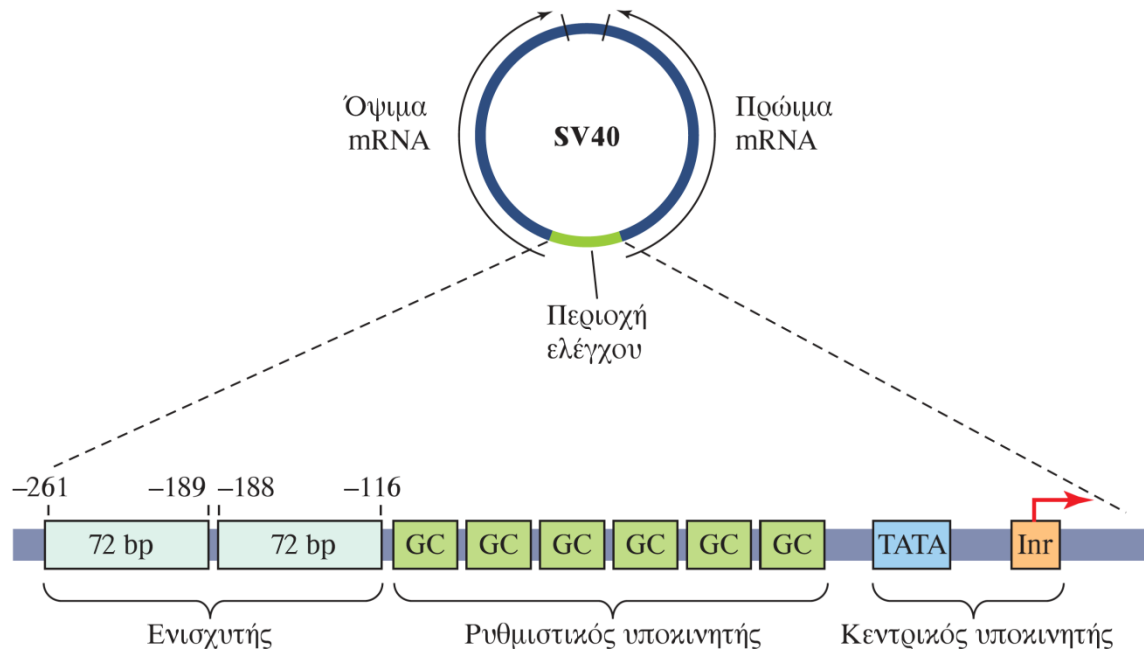
- Ρυθμιστικοί υποκινητές
- Ενισχυτές και
- Αποσιωπητές



Ο ρυθμιστικός υποκινητής (αποκαλείται και εγγύς υποκινητής) περιλαμβάνει μοτίβα αλληλουχίας γνωστά ως εγγύς στοιχεία υποκινητή (promoter proximal elements), όπως είναι τα πλαίσια CCAAT και GC στα οποία προσδένονται ειδικές πρωτεΐνες-ενεργοποιητές της μεταγραφής. Ο ρυθμιστικός υποκινητής εκτείνεται συνήθως από τη θέση -200 έως τη θέση -50 ως προς το σημείο έναρξης της μεταγραφής (+1).

Οι ενισχυτές (enhancers) είναι ρυθμιστικές αλληλουχίες που επάγουν την μεταγραφή και χαρακτηρίζονται από δύο ιδιαίτερα χαρακτηριστικά γνωρίσματα που τις διακρίνουν από τις υπόλοιπες ρυθμιστικές αλληλουχίες.

1. Μπορούν να επάγουν την μεταγραφή που αρχίζει από τη σωστή θέση ακόμα και όταν εντοπίζονται αρκετές χιλιάδες bp ανοδικά ή καθοδικά από αυτή.
2. Μπορούν να επάγουν την μεταγραφή ανεξάρτητα από τον προσανατολισμό τους.



Οι περιοχές του ενισχυτή και των υποκινητών στην πρώτη μονάδα μεταγραφής του ιού SV40

Τα ευκαρυωτικά κύτταρα φέρουν και αρνητικά ρυθμιστικά στοιχεία που ονομάζονται **αποσιωπητές (silencers)**.

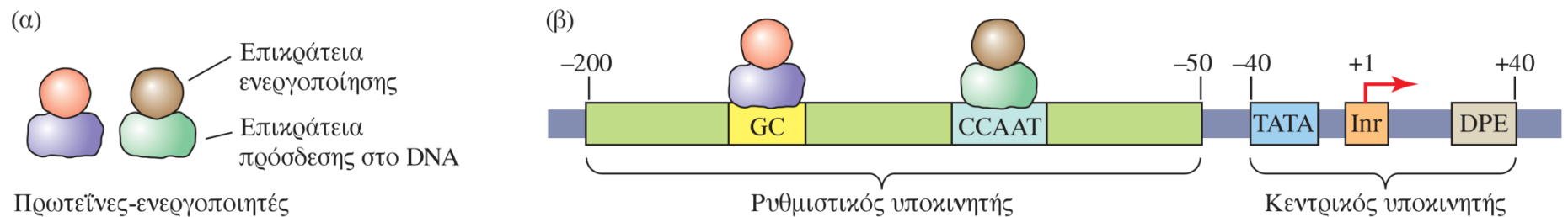
Πρόκειται για στοιχεία με ειδικές αλληλουχίες πρόσδεσης αρνητικών μεταγραφικών παραγόντων (καταστολέων) που δρουν:

- είτε αποτρέποντας την πρόσδεση στο DNA κάποιου ενεργοποιητή
- είτε παρεμποδίζοντας τον σχηματισμό του προεναρκτηρίου συμπλόκου.

Για τον εντοπισμό των γονιδίων που πρέπει να μεταγραφούν, η βασική μεταγραφική συσκευή απαιτεί την αλληλεπίδραση με τους **μεταγραφικούς ενεργοποιητές**.

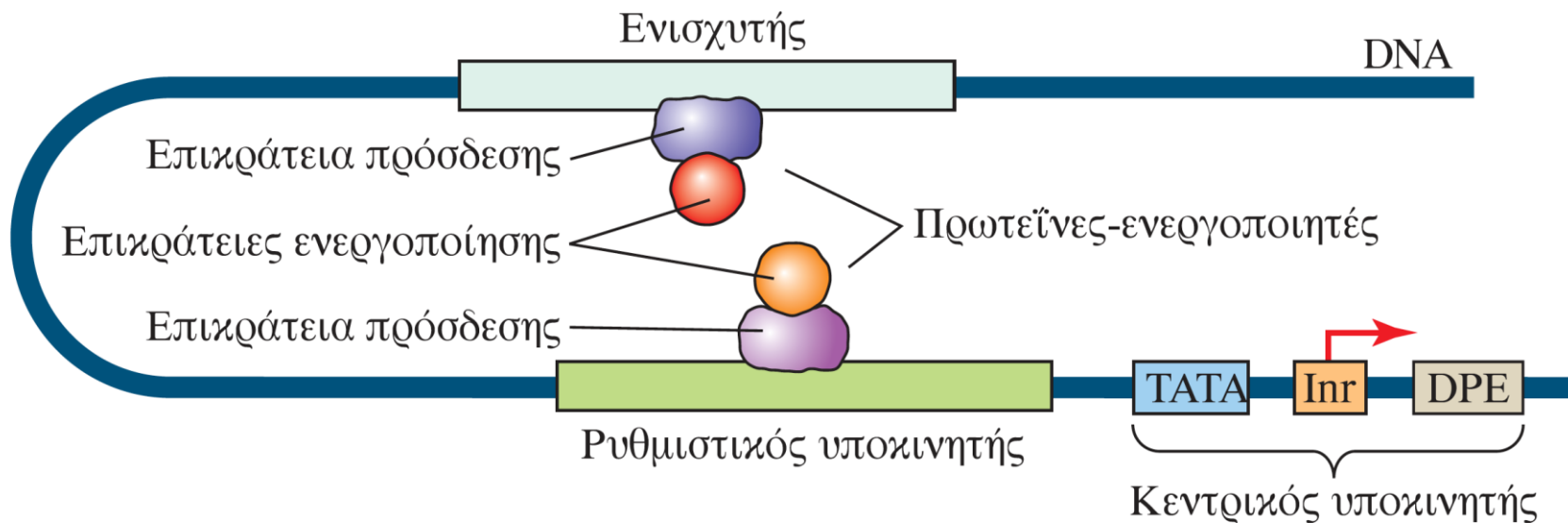
Κάθε πρωτεΐνη-ενεργοποιητής διαθέτει δύο ανεξάρτητες αυτοτελείς δομικές περιοχές ή επικράτειες:

- την **επικράτεια πρόσδεσης στο DNA** (DNA-binding domain) και
- την **επικράτεια ενεργοποίησης** (activation domain)



Οι επικράτειες πρόσδεσης στο DNA του ενεργοποιητή προσδένονται σε ειδικά μοτίβα αλληλουχιών των στοιχείων του ρυθμιστικού υποκινητή ή του ενισχυτή του γονιδίου, ενώ οι επικράτειες ενεργοποίησης των ενεργοποιητών είναι ελεύθερες να συμβάλλουν συνεργικά στη στρατολόγηση της μεταγραφικής συσκευής στο γονίδιο.

Δημιουργία βρόχου DNA. Το DNA που βρίσκεται ανάμεσα στον ενισχυτή και στον ρυθμιστικό υποκινητή σχηματίζει βρόχο, επιτρέποντας στις επικράτειες ενεργοποίησης των ενεργοποιητών να πλησιάσουν η μία την άλλη.



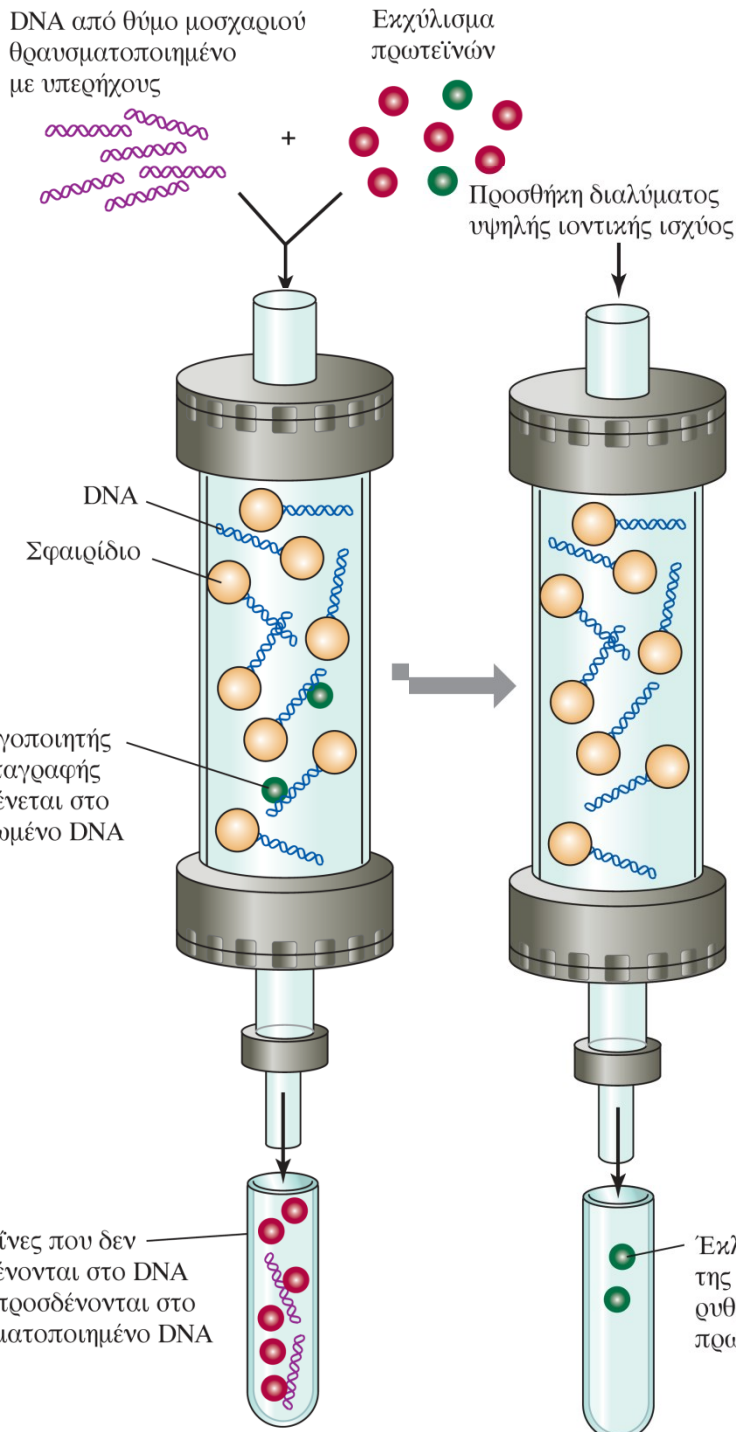
Επομένως, η ρύθμιση της μεταγραφής κάθε γονιδίου εξαρτάται από την πρόσδεση **ενός ξεχωριστού συνδυασμού ενεργοποιητών** και η αποδοτικότητα καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από την συνεργασία των επικρατειών ενεργοποίησης για τη στρατολόγηση της μεταγραφικής συσκευής στο γονίδιο.

Απομόνωση ενός ενεργοποιητή της μεταγραφής με χρωματογραφία συγγένειας με το DNA

DNA θύμου αδένος μοσχαριού θραυσματοποιημένο με υπερήχους αναμειγνύεται με πρωτεϊνικό εκχύλισμα που περιέχει ενεργοποιητές της μεταγραφής (πράσινο) και διάφορες άλλες πρωτεΐνες (κόκκινο).

Όσες πρωτεΐνες του εκχυλίσματος έχουν ικανότητα πρόσδεσης στο DNA με μη ειδικό τρόπο (δηλαδή που δεν εξαρτάται από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία) θα προσδεθούν στο DNA από τον θύμο αδένος μοσχαριού, έτσι ώστε στη συνέχεια, κατά τη διέλευσή τους από τη στήλη, να μην προσδεθούν στο καθηλωμένο τμήμα DNA με την ειδική αλληλουχία. Το τμήμα αυτό του DNA (μπλε) περιλαμβάνει την αλληλουχία του στοιχείου στο οποίο προσδέεται η πρωτεΐνη-ενεργοποιητής της μεταγραφής που προσπαθούμε να απομονώσουμε. Έτσι, ο ενεργοποιητής προσδέεται ειδικά στο καθηλωμένο DNA, ενώ οι υπόλοιπες πρωτεΐνες εξέρχονται από τη στήλη.

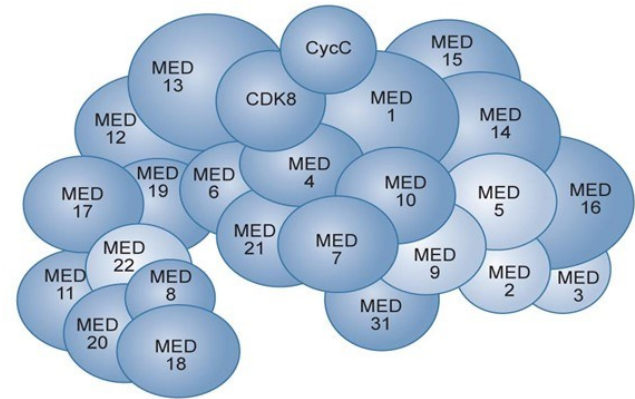
Η έκλυση του μεταγραφικού ενεργοποιητή που έχει συγκρατηθεί από τα σφαιρίδια της στήλης πραγματοποιείται κατά την έκπλυση της στήλης με ρυθμιστικό διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης αλάτων.



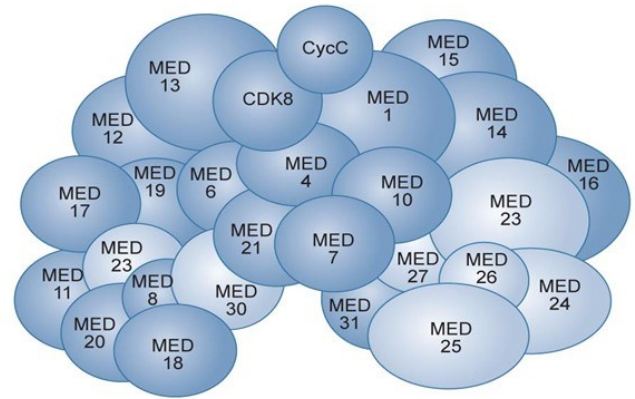
Το σύμπλοκο του μεσολαβητή (mediator complex)

Παρόλο που οι ενεργοποιητές της μεταγραφής αλληλεπιδρούν με στοιχεία της βασικής μεταγραφικής συσκευής, όπως ο TBP, οι παράγοντες TAFs και ο TFIIB, οι αλληλεπιδράσεις αυτές δεν αρκούν για την προσέλκυση της πολυμεράσης στον υποκινητή.

Για την ενεργοποίηση της μεταγραφής απαιτείται ένα επιπλέον σύμπλοκο πρωτεϊνών που ονομάζεται **μεσολαβητής**.



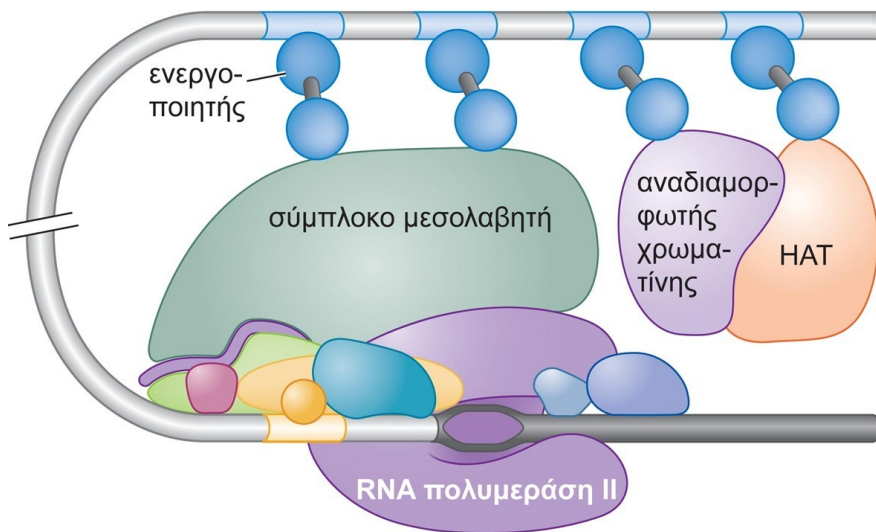
μεσολαβητής ζυμομύκητα



μεσολαβητής ανθρώπου

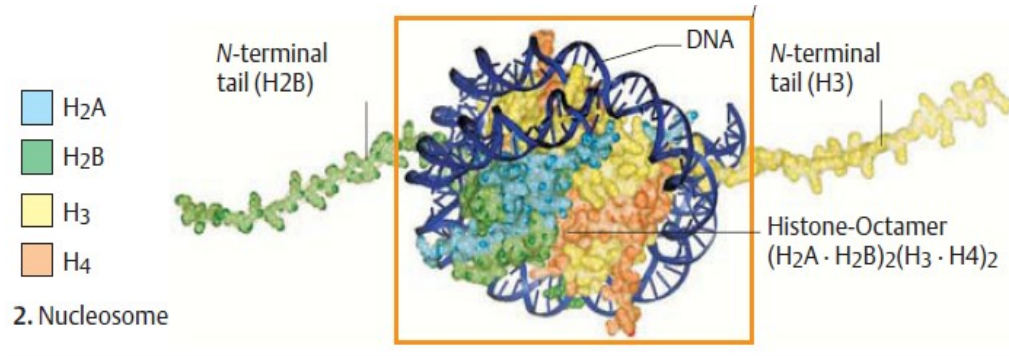
Ο μεσολαβητής αποτελείται από πολλές υπομονάδες ορισμένες εκ των οποίων διατηρούνται συντηρημένες από το ζυμομύκητα έως τον άνθρωπο.

Ο ανθρώπινος μεσολαβητής ποικίλει σε σύσταση και μέγεθος ανάλογα με τον ιστό που απομονώνεται. Συνεπώς δεν αποκλείεται να υπάρχουν διάφορες μορφές μεσολαβητή που εμπλέκονται στη ρύθμιση διαφορετικών υποσυνόλων γονιδίων ή στην απόκριση σε διαφορετικές ομάδες ρυθμιστών (ενεργοποιητών και καταστολέων).



Ο μεσολαβητής λειτουργεί σαν «γέφυρα» σύνδεσης πρωτεϊνών που προσδένονται στους απομακρυσμένους ενισχυτές με τους γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες που προσδένονται κοντά στην θέση έναρξης.

Ο ρόλος της χρωματίνης στη ρύθμιση της μεταγραφής



Οι ιστόνες των νουκλεοσωμάτων φέρουν αμινοτελικές «ουρές» που περιλαμβάνουν πολλές θέσεις μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων.

	A	P	M	
	Acetylation	Phosphorylation	Methylation	
	A	P	A	A
Animals	S	G	R	G
Plants	S	G	R	G
Yeast	S	G	R	G
	K	G	G	K
	G	G	K	G
	L	G	K	G
	G	G	A	K
	R	H	R	K
	V	L	R	D
	N	I		
	10			
Animals	Q	G	I	T
Plants	Q	G	I	T
Yeast	Q	G	I	T
	K	P	A	I
	R	R	L	A
	R	R	L	A
	R	R	L	A
	R	R	L	A
	G	G	V	K
	R	I	S	G
	L	I	Y	E
	30			40
Animals	E	T	R	G
Plants	E	T	R	G
Yeast	E	V	R	A
	V	L	K	S
	F	L	E	S
	V	I	R	D
	S	V	T	Y
	T	E	H	A
	K	R		
	60			70
Animals	K	T	V	T
Plants	K	T	V	T
Yeast	K	T	V	T
	M	D	V	V
	Y	A	L	K
	R	Q	G	R
	T	L	Y	G
	F	G	G	
	80			90
Animals	K	T	V	T
Plants	K	T	V	T
Yeast	K	T	V	T
	L	D	V	V
	Y	A	L	K
	R	Q	G	R
	T	L	Y	G
	F	G	G	
	100			

Amino acid sequence of histone H4

Οι τροποποιήσεις αυτές μπορούν να προκαλέσουν αλλαγές στη δομή των ιστονών που αλλάζουν τον βαθμό συσπείρωσης της χρωματίνης διευκολύνοντας ή παρεμποδίζοντας την έναρξη της μεταγραφής.

Η δομή της χρωματίνης επηρεάζεται από την **διάταξη των νουκλεοσωμάτων**. Δύο κύριες ομάδες ενζύμων επηρεάζουν τη δομή της χρωματίνης:

1. Τα **σύμπλοκα αναδόμησης της χρωματίνης** (chromatin remodeling complexes)
 - Μεταφέρουν τα νουκλεσώματα σε νέες θέσεις
 - Απομακρύνουν τα νουκλεσώματα
 - Αντικαθιστούν τα νουκλεσώματα με νέα που φέρουν τροποποιημένες υπομονάδες ιστονών και προσδίδουν στην χρωματίνη νέες ιδιότητες: στρατολόγηση πρωτεϊνών και ρύθμιση της έναρξης της μεταγραφής.
2. Τα **ένζυμα τροποποίησης των ιστονών** τροποποιούν ομοιοπολικά τα αμινοτελικά άκρα (ουρές) των ιστονών
 - Επηρεάζουν τη δομή της χρωματίνης λόγω της τροποποίησης προκαλώντας τοπική «χαλάρωση» ή «συσπείρωση» της χρωματίνης και μπορούν να στρατολογήσουν και άλλες πρωτεΐνες (σύμπλοκα αναδόμησης) προκαλώντας περαιτέρω αλλαγές στη δομή της χρωματίνης.
 - **Η ακετυλίωση καταλοίπων λυσίνης (ακετυλοτρανσφεράσες) γενικά επάγει τη μεταγραφή**
 - **Η μεθυλίωση καταλοίπων λυσίνης και αργινίνης μπορεί να οδηγεί σε ενεργοποίηση ή καταστολή της μεταγραφής**
 - **Η φωσφορυλίωση γενικά προκαλεί καταστολή της μεταγραφής.**

Η διαφυγή από τον υποκινητή απαιτεί τη φωσφορυλίωση της «ουράς» της πολυμεράσης.

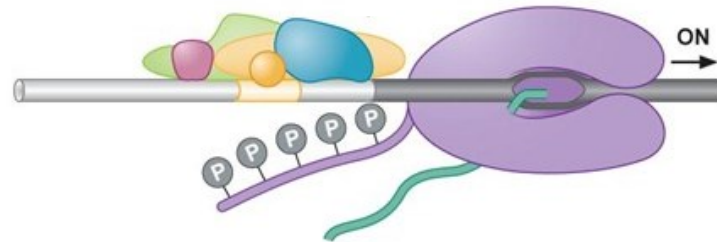
Μετά το σχηματισμό του προεναρκτήριου συμπλόκου, ακολουθεί μια περίοδος **ατελούς εκκίνησης** της αντίδρασης πολυμερισμού (όπως αναφέραμε και στην περίπτωση των βακτηρίων), πριν η πολυμεράση διαφύγει από τον υποκινητή και εισέλθει στη φάση επιμήκυνσης.

Η διαφυγή περιλαμβάνει δύο βήματα που δεν απαντώνται στα βακτήρια:

- την υδρόλυση του ATP
- Την φωσφορυλίωση της πολυμεράσης

Η μεγάλη υπομονάδα της Pol II έχει μια επικράτεια (carboxy-terminal domain, CTD) η οποία αναφέρεται ως ουρά και περιέχει πολλαπλές επαναλήψεις της επταπεπτιδικής αλληλουχίας: Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser, ο αριθμός των οποίων ποικίλει σε κάθε είδος (π.χ. 32 στο ζυμομύκητα, 52 στον άνθρωπο). Κάθε επανάληψη περιέχει θέσεις φωσφορυλίωσης από συγκεκριμένες κινάσες μεταξύ των οποίων και μια υπομονάδα του TFIID.

Η προσθήκη αυτών των φωσφορικών ομάδων βοηθά την πολυμεράση να αποβάλλει τους γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες, τους οποίους το ένζυμο αφήνει πίσω τους καθώς διαφεύγει από τον υποκινητή.



2^η Διάλεξη

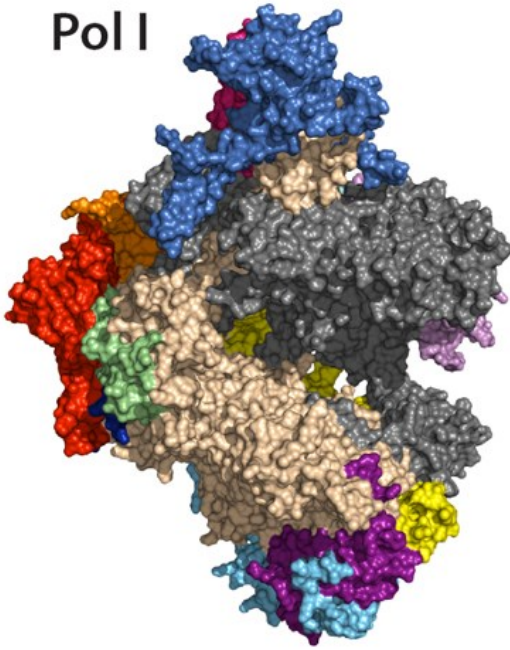
Μεταγραφή στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς

Ιδιαιτερότητες

- **DNA και χρωματίνη:** η δομή της χρωματίνης επιβάλλει αλλαγές κατά τη μεταγραφή, τροποποιήσεις των ιστονών, σύμπλοκα αναδόμησης της χρωματίνης (chromatin remodelling complexes) και μεθυλίωση του DNA
- **Υποκινητές**
- **Ρυθμιστικές αλληλουχίες και αντίστοιχα ρυθμιστικές πρωτεΐνες (μεταγραφικοί παράγοντες)**
- **RNA πολυμεράσες I, II, III (IV και V στα φυτά)**
- **Κεντρικός ρόλος της ωρίμανσης:** όλα τα μόρια RNA συντίθενται υπό τη μορφή προδρόμων μορίων

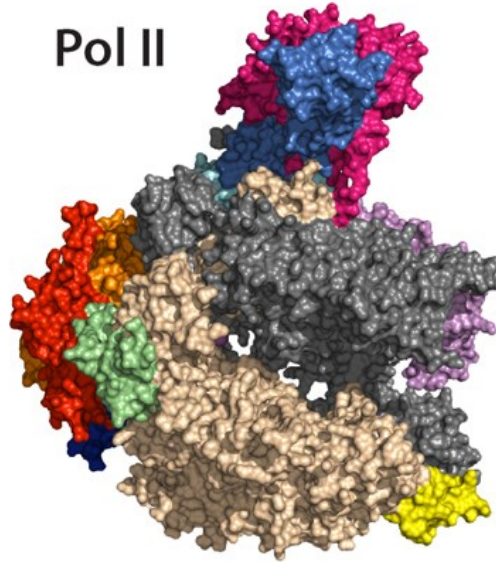
Ευκαρυωτικές RNA πολυμεράσες

Pol I



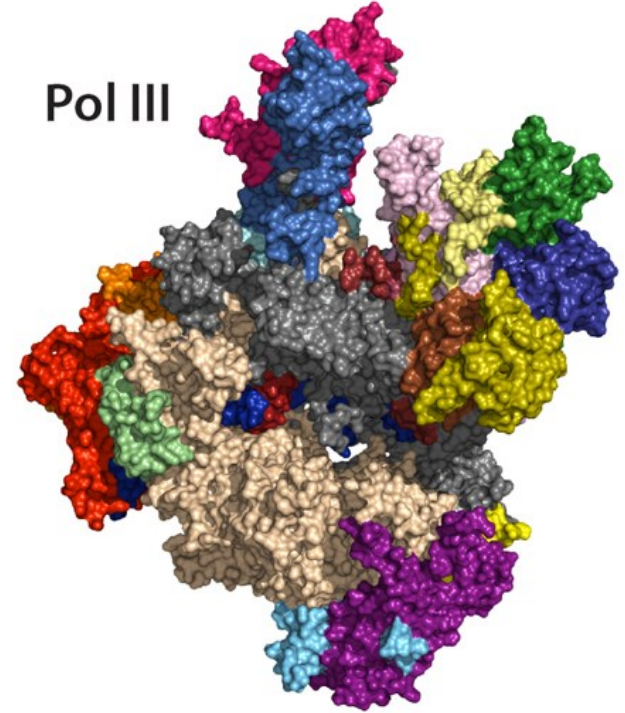
28S, 5.8S και
18S rRNA

Pol II



Γονίδια που
κωδικοποιούν
πρωτεΐνες, snRNA
miRNA

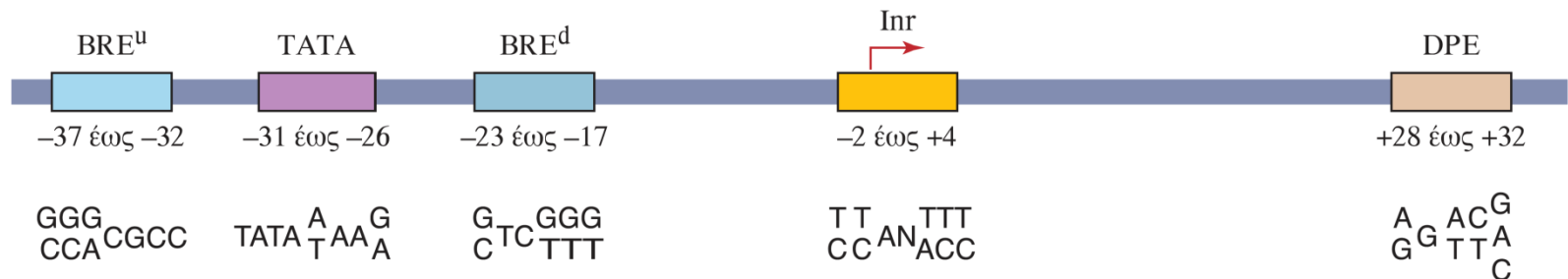
Pol III



Γονίδια για
(tRNA), 5S rRNA,
U6 snRNA,
snoRNA

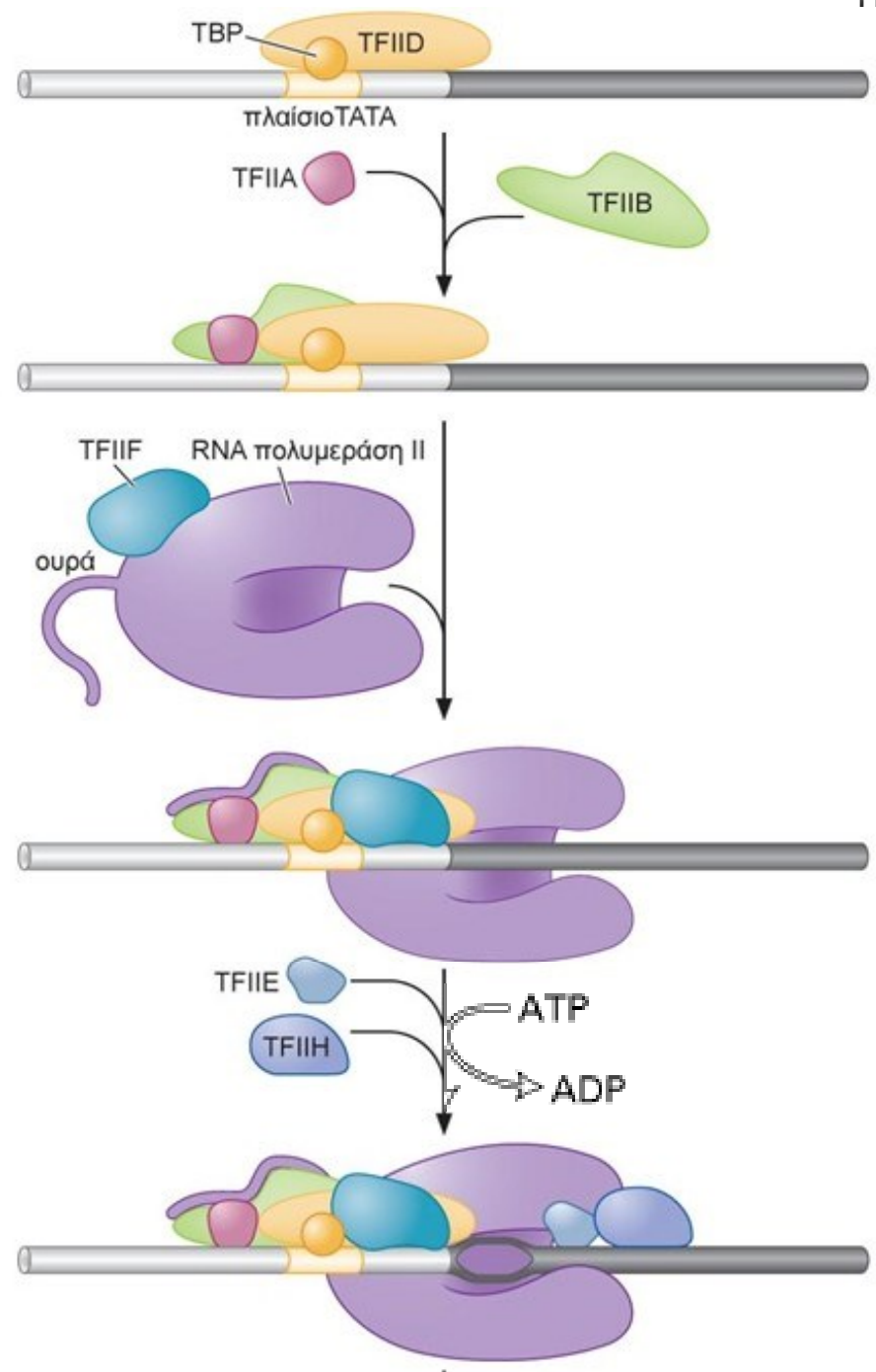
Βασικοί υποκινητές της RNA Pol II

- Η δομή των ευκαρυωτικών υποκινητών είναι περισσότερο σύνθετη από αυτή των προκαρυωτικών.
- Ο ευκαρυωτικός **βασικός ή κεντρικός υποκινητής** (core promoter) αναφέρεται στο ελάχιστο σύνολο στοιχείων αλληλουχίας που απαιτείται για την ακριβή εκκίνηση της μεταγραφής *in vitro*.
- Έχει τυπικά μήκος 40-80 νουκλεοτιδίων και εκτείνεται ανοδικά και καθοδικά της θέσης έναρξης της μεταγραφής.



Συναινετική
αλληλουχία

Ανακεφαλαίωση της
σταδιακής
συγκρότησης του
προεναρκτηρίου
συμπλόκου της pol II
από τους γενικούς
μεταγραφικούς
παράγοντες *in vitro*.

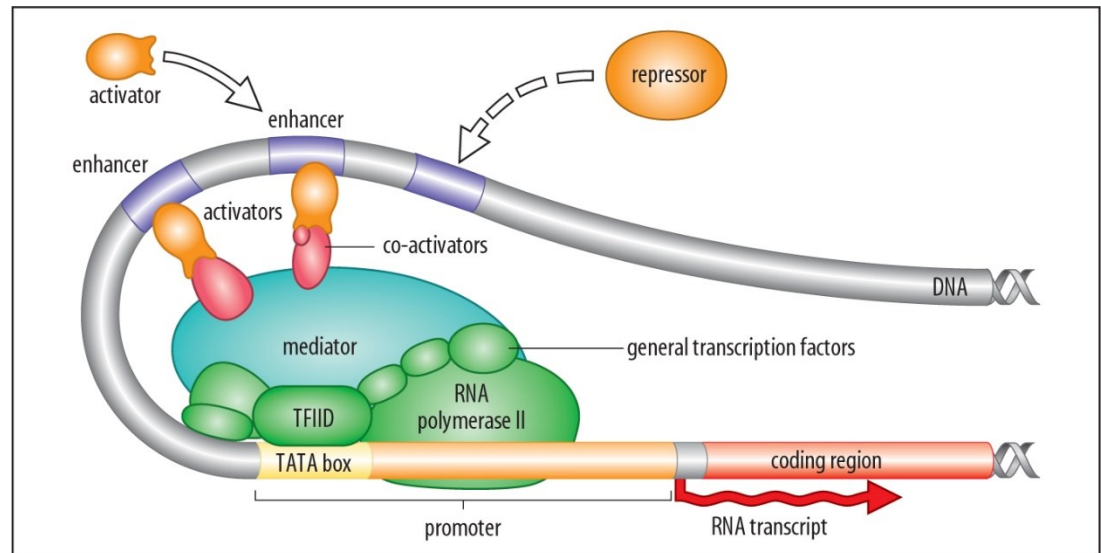


Η έναρξη της μεταγραφής *in vivo* απαιτεί πρόσθετους πρωτεϊνικούς παράγοντες.

- Ρυθμιστικές πρωτεΐνες (ρυθμιστικοί μεταγραφικοί παράγοντες)
- Το σύμπλοκο του μεσολαβητή (mediator complex) και
- Ένζυμα τροποποίησης της χρωματίνης

Οι ρυθμιστικοί πρωτεϊνικοί παράγοντες αναγνωρίζουν και δεσμεύονται σε ειδικές αλληλουχίες του DNA που ανάλογα με το ρόλο που επιτελούν ονομάζονται:

- Ρυθμιστικοί υποκινητές
- Ενισχυτές και
- Αποσιωπητές



Η δομή της χρωματίνης επηρεάζεται από την **διάταξη των νουκλεοσωμάτων**. Δύο κύριες ομάδες ενζύμων επηρεάζουν τη δομή της χρωματίνης:

1. Τα σύμπλοκα αναδόμησης της χρωματίνης (chromatin remodeling complexes)

- Μεταφέρουν τα νουκλεσώματα σε νέες θέσεις
- Απομακρύνουν τα νουκλεσώματα
- Αντικαθιστούν τα νουκλεσώματα με νέα που φέρουν τροποποιημένες υπομονάδες ιστονών και προσδίδουν στην χρωματίνη νέες ιδιότητες: στρατολόγηση πρωτεϊνών και ρύθμιση της έναρξης της μεταγραφής.

2. Τα ένζυμα τροποποίησης των ιστονών τροποποιούν ομοιοπολικά τα αμινοτελικά άκρα (ουρές) των ιστονών

- Επηρεάζουν τη δομή της χρωματίνης λόγω της τροποποίησης προκαλώντας τοπική «χαλάρωση» ή «συσπείρωση» της χρωματίνης και μπορούν να στρατολογήσουν και άλλες πρωτεΐνες (σύμπλοκα αναδόμησης) προκαλώντας περαιτέρω αλλαγές στη δομή της χρωματίνης.

Η διαφυγή από τον υποκινητή απαιτεί τη φωσφορυλίωση της «ουράς» της πολυμεράσης.

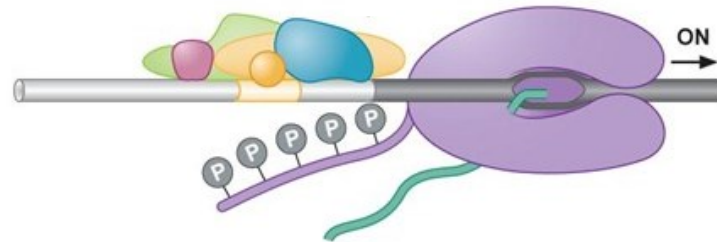
Μετά το σχηματισμό του προεναρκτήριου συμπλόκου, ακολουθεί μια περίοδος **ατελούς εκκίνησης** της αντίδρασης πολυμερισμού (όπως αναφέραμε και στην περίπτωση των βακτηρίων), πριν η πολυμεράση διαφύγει από τον υποκινητή και εισέλθει στη φάση επιμήκυνσης.

Η διαφυγή περιλαμβάνει δύο βήματα που δεν απαντώνται στα βακτήρια:

- την υδρόλυση του ATP
- Την φωσφορυλίωση της πολυμεράσης

Η μεγάλη υπομονάδα της Pol II έχει μια επικράτεια (carboxy-terminal domain, CTD) η οποία αναφέρεται ως ουρά και περιέχει πολλαπλές επαναλήψεις της επταπεπτιδικής αλληλουχίας: Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser, ο αριθμός των οποίων ποικίλει σε κάθε είδος (π.χ. 32 στο ζυμομύκητα, 52 στον άνθρωπο). Κάθε επανάληψη περιέχει θέσεις φωσφορυλίωσης από συγκεκριμένες κινάσες μεταξύ των οποίων και μια υπομονάδα του TFIID.

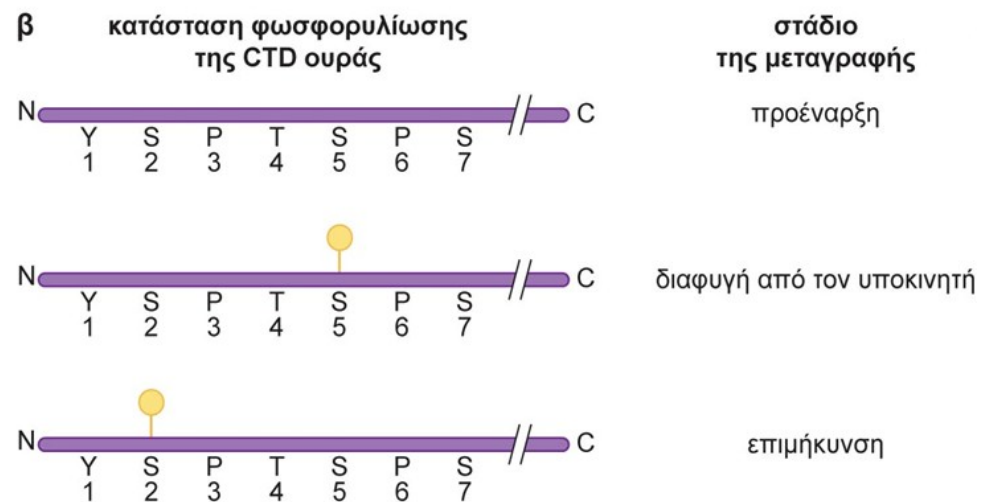
Η προσθήκη αυτών των φωσφορικών ομάδων βοηθά την πολυμεράση να αποβάλλει τους γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες, τους οποίους το ένζυμο αφήνει πίσω τους καθώς διαφεύγει από τον υποκινητή.



Επιμήκυνση

- Η διαφυγή της πολυμεράσης από τον υποκινητή πυροδοτεί την διαδικασία της επιμήκυνσης.
- Η μετάβαση στη φάση αυτή προϋποθέτει την απομάκρυνση των γενικών μεταγραφικών παραγόντων και του μεσολαβητή.
- Στη θέση τους προσελκύεται ένα άλλο σύνολο παραγόντων που παίζουν ρόλο στην επιμήκυνση (**παράγοντες επιμήκυνσης, elongation factors**), αλλά και παράγοντες που είναι απαραίτητοι για την ωρίμανση.

Η απομάκρυνση των παραγόντων έναρξης και η προσέλκυση των παραγόντων επιμήκυνσης και επεξεργασίας του RNA πραγματοποιείται με αλλαγή των θέσεων φωσφορυλίωσης των καταλοίπων της CTD ουράς της RNA πολυμεράσης.

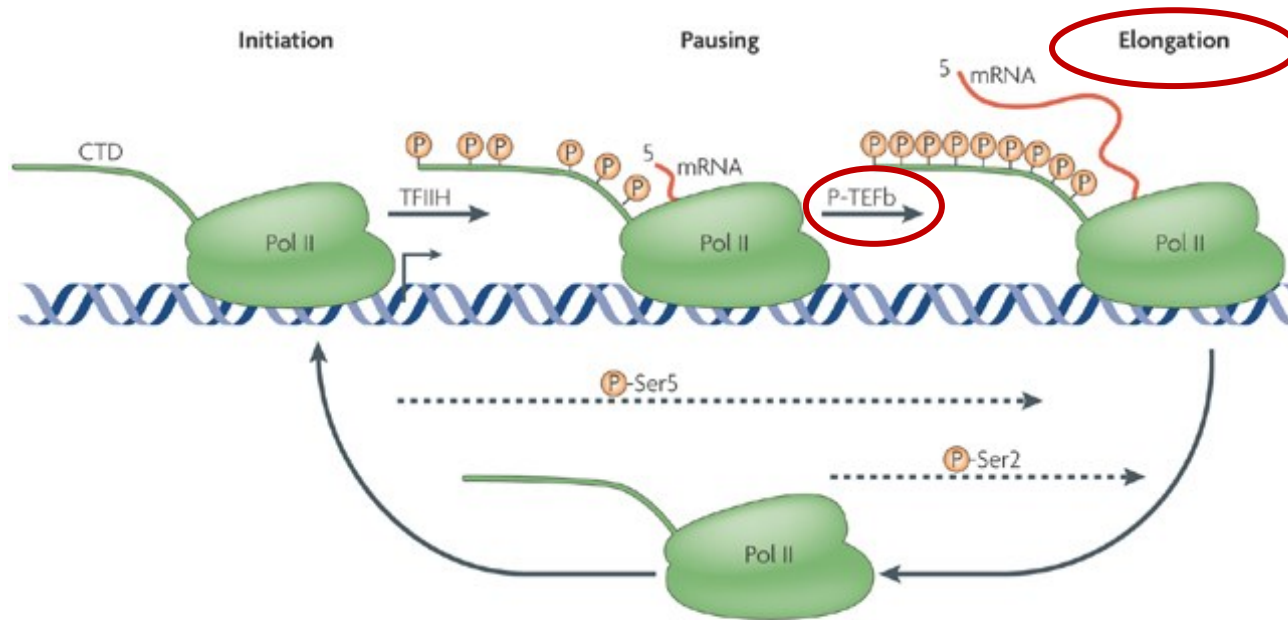


Η κινάση P-TEFb

Η φωσφορυλίωση της σερίνης στη θέση 2 της CTD ουράς της RNA πολυμεράσης ΙΙ γίνεται από μία κινάση που ονομάζεται P-TEFb, η οποία προσελκύεται στην πολυμεράση από μεταγραφικούς ενεργοποιητές.

Ο παράγοντας P-TEFb:

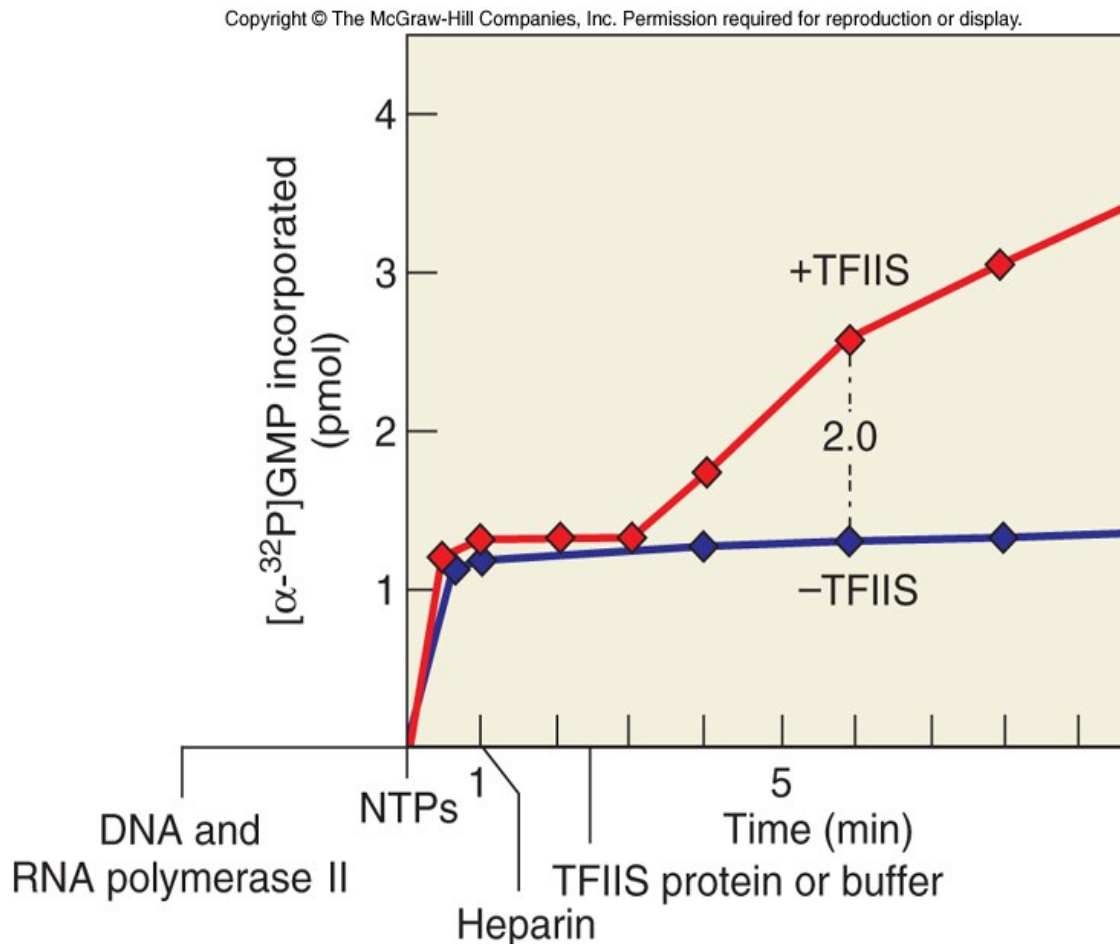
- φωσφορυλιώνει επίσης και ενεργοποιεί με αυτόν τον τρόπο τον παράγοντα επιμήκυνσης **hSPT5**
- και στρατολογεί τον παράγοντα **TAT-SF1**.



Ο παράγοντας επιμήκυνσης TFIIS

Ενισχύει την επιμήκυνση, μειώνοντας το χρόνο παύσης της πολυμεράσης όταν μεταγράφει ορισμένες αλληλουχίες, δεδομένου ότι η πολυμεράση δεν μεταγράφει με σταθερή ταχύτητα όλες τις αλληλουχίες.

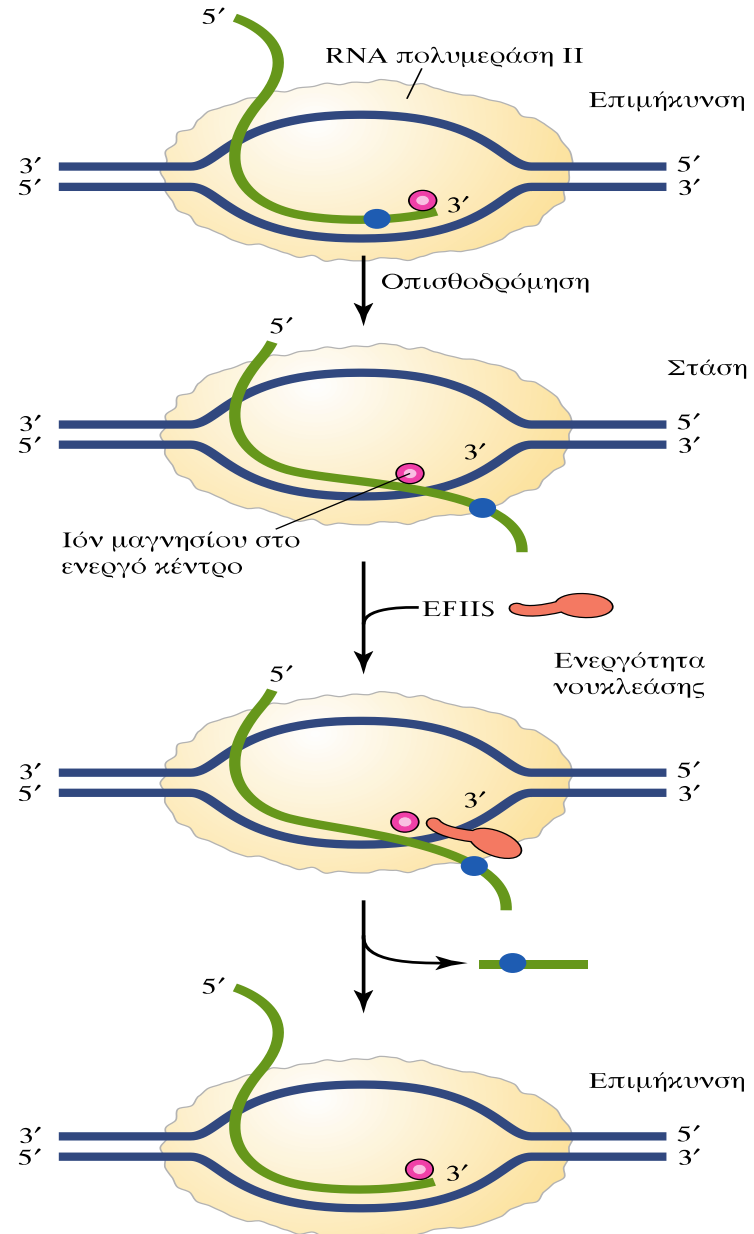
(μέση ταχύτητα 40 νουκλεοτίδια/sec)



Ο παράγοντας επιμήκυνσης TFIIS συμβάλλει επίσης στον έλεγχο πιστότητας (proofreading) που διενεργείται από την RNA πολυμεράση II.

Οι RNA πολυμεράσες μπορούν να απομακρύνουν, όχι πάντα αποτελεσματικά, λάθος ενσωματωμένα νουκλεοτίδια.

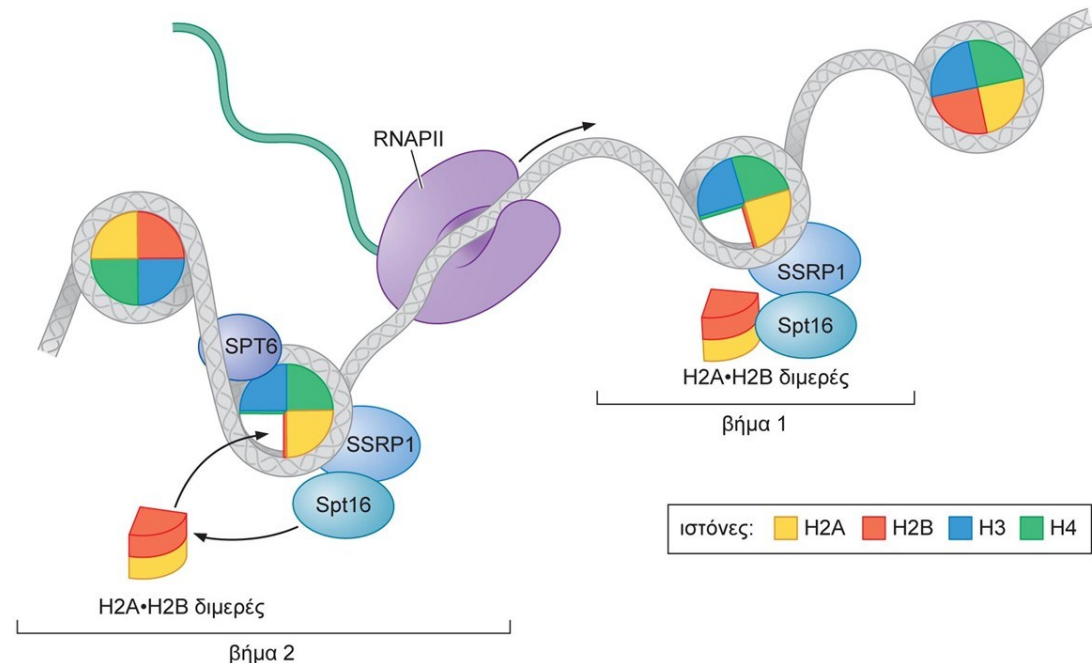
Ο TFIIS ενεργοποιεί μια ενεργότητα RNάσης της πολυμεράσης που επιτρέπει να απομακρύνει τα λανθασμένα νουκλεοτίδια με τοπική και περιορισμένη αποικοδόμηση του RNA.



Η RNA πολυμεράση πρέπει να αντιμετωπίσει τις ιστόνες κατά την πορεία της επιμήκυνσης.

Τα νουκλεοσώματα του εκμαγείου DNA αποτελούν εμπόδια στην πορεία της πολυμεράσης. Ο φραγμός αυτός ξεπερνιέται με τον **παράγοντα FACT** (facilitates chromatin transcription), ο οποίος είναι ετεροδομερές δύο καλά συντηρημένων πρωτεϊνών που ονομάζονται Spt16 και SSRP1.

Ο FACT:
αποσυναρμολογεί τις ιστόνες αφαιρώντας το διμερές H2A/H2B μπροστά από την RNA πολυμεράση (βήμα 1) και επανασυναρμολογεί τα νουκλεοσώματα πίσω της με την βοήθεια της πρωτεΐνης SPT6 (βήμα 2).



Ο FACT επιτρέπει στην πολυμεράση να **επιμηκύνει** και ταυτόχρονα να **διατηρεί την ακεραιότητα** της μεταγραφόμενης **χρωματίνης**.

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς η επιμήκυνση, ο τερματισμός και η επεξεργασία του RNA διασυνδέονται, πιθανώς για να εξασφαλίσουν τον κατάλληλο συντονισμό τους.

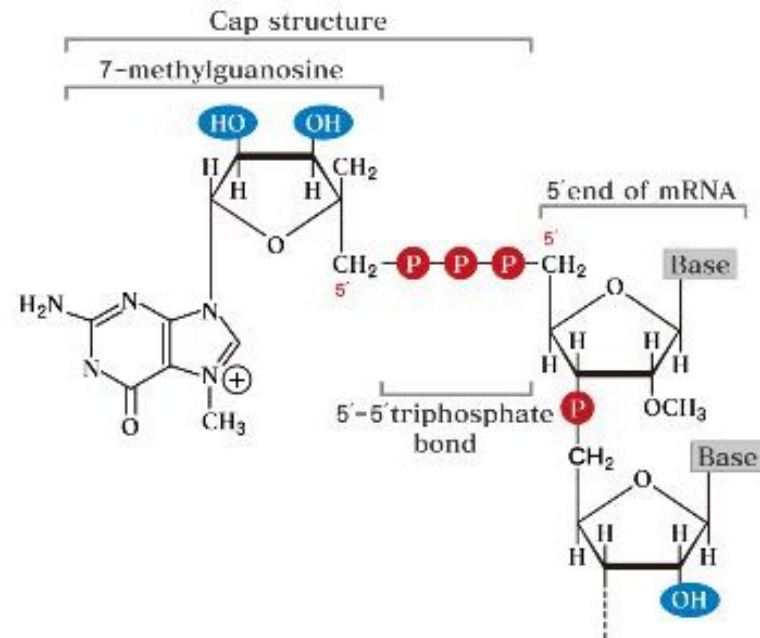
Η ωρίμανση των νεοσυντιθέμενων μεταγράφων της RNA πολυμεράσης II γίνεται συγχρόνως με τη μεταγραφή -cotranscriptional processing- και περιλαμβάνει:

1. Προσθήκη του καλύμματος (Capping) στο 5' άκρο
2. Πολυαδενυλίωση στο 3' άκρο
3. Απομάκρυνση εσωνίων και σύνδεση εξωνίων- συρραφή του RNA (RNA splicing)

Εδώ θα εξετάσουμε την κάλυψη του 5' άκρου και την πολυαδενυλίωση.

Κάλυμμα (cap): τριφωσφορικό κατάλοιπο μεθυλι- ωμένης γουανοσίνης

- Μια m⁷G συνδέεται μέσω 5' -5' τριφωσφορικού δεσμού.
- Πραγματοποιείται αμέσως μετά την έναρξη της μεταγραφής (συνήθως μετά τον πολυμερισμό 20-30 νουκλεοτιδίων) στα RNAs που συντίθενται από την RNA πολυμεράση II.

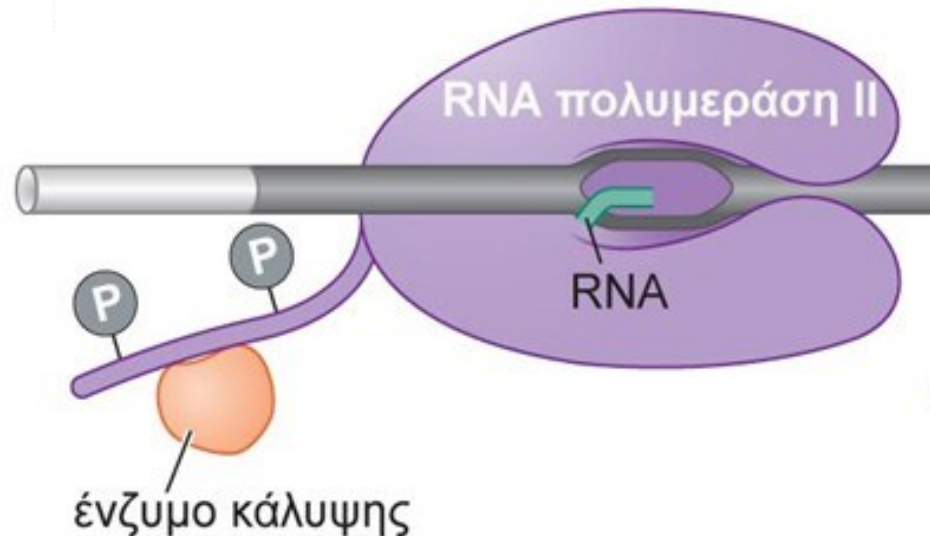


Ρόλοι του καλύμματος:

1. Προστασία από ριβονουκλεάσες
2. Ενίσχυση της συρραφής
3. Μεταφορά στον κυτταρόπλασμα
4. Ενίσχυση της μετάφρασης

Η φωσφορυλίωση της Ser στη θέση 5 της CTD ουράς της πολυμεράσης II που πραγματοποιείται κατά την διαφυγή από τον υποκινητή, συνδέεται με την στρατολόγηση των παραγόντων κάλυψης.

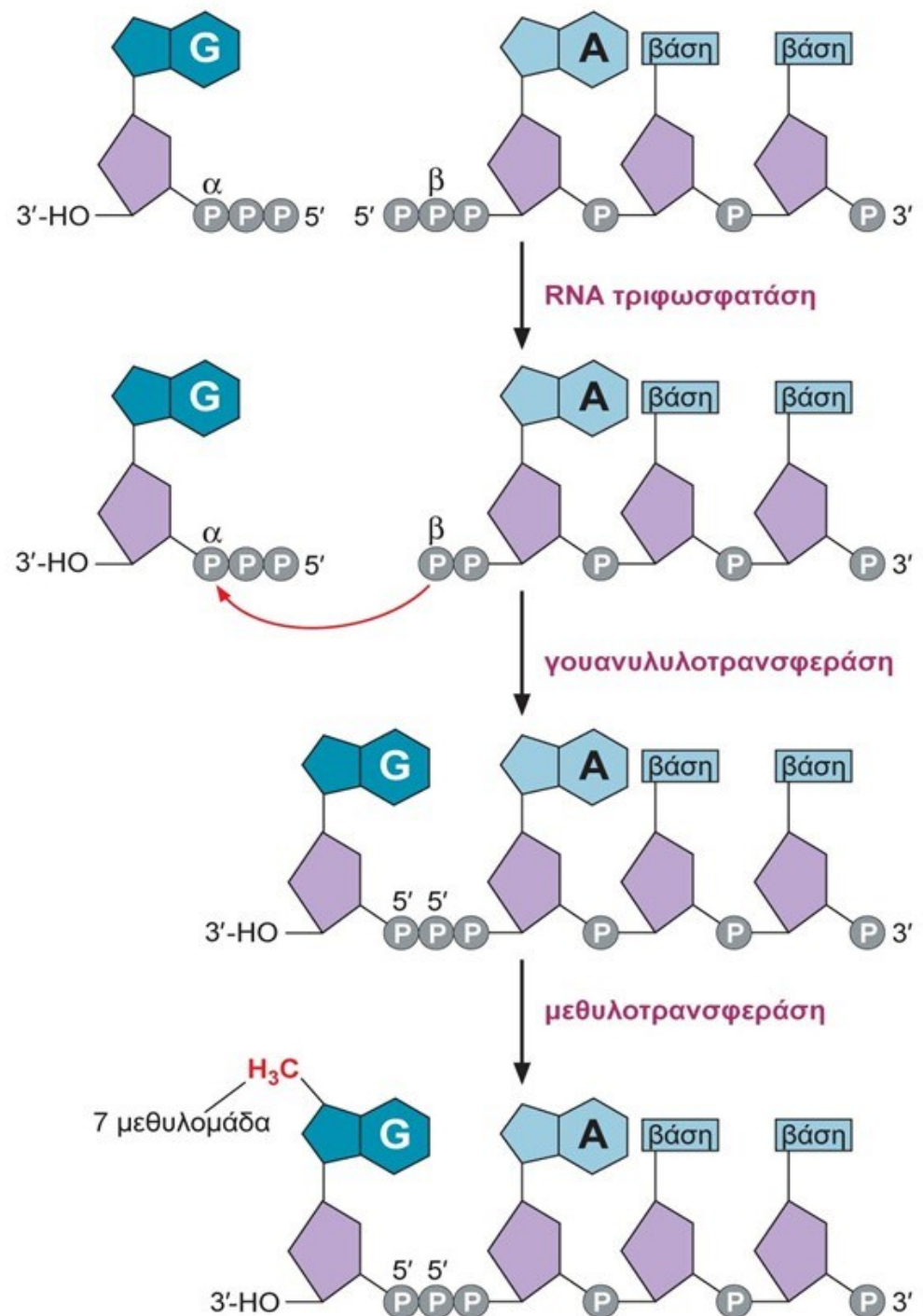
Συγκεκριμένα ο παράγοντας επιμήκυνσης hSPT5 βοηθά στην προσέλκυση και ενεργοποίηση του ενζύμου κάλυψης του 5' άκρου στην CTD ουράς της πολυμεράσης.



Μηχανισμός προσθήκης του καλύμματος

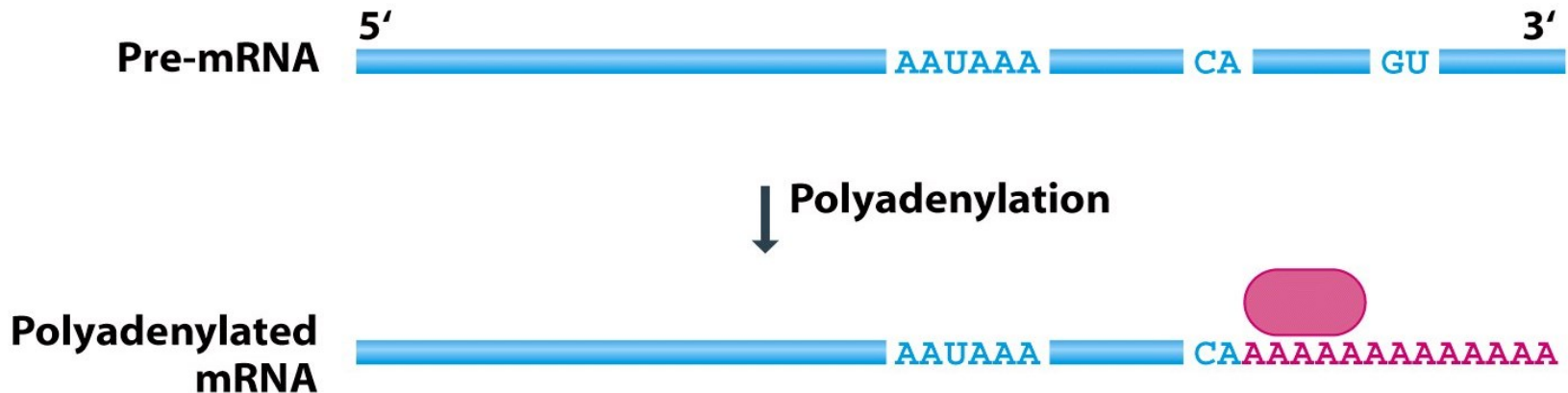
Περιλαμβάνει τρία διακριτά βήματα:

1. Αφαίρεση της γ-φωσφορικής ομάδας από το 5' άκρο του μεταγράφου.
2. Προσθήκη μιας GMP ομάδας και δημιουργία ενός 5'-5' δεσμού.
3. Προσθήκη μιας μεθυλομάδας στην γουανίνη.



Η προσθήκη poly(A) ουράς

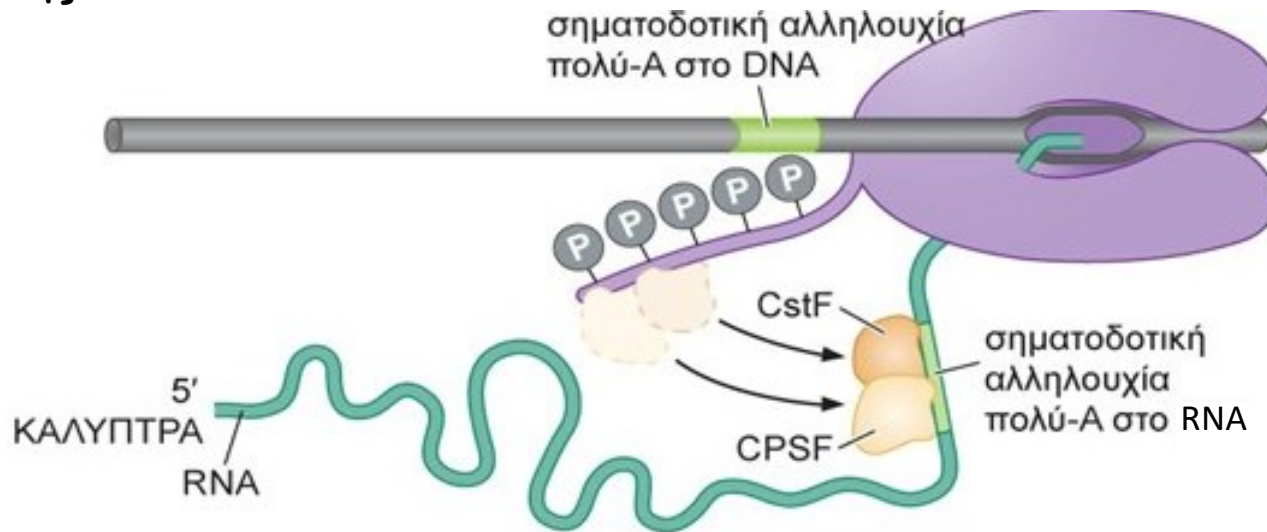
- Τα περισσότερα από τα mRNA μετάγραφα (χαρακτηριστική εξαίρεση τα mRNAs των ιστονών) φέρουν μια poly(A) αλληλουχία μήκους έως 250 νουκλεοτιδίων που προστίθεται υπό τη δράση μιας **poly(A) πολυμεράσης** που δρα έπειτα από νουκλεολυτική διάσπαση.
- Η αλληλουχία 5'-AAUAA-3' αποτελεί **αρκετά συχνά** το **σήμα της πολυαδενυλίωσης** και βρίσκεται 10-35 νουκλεοτίδια πριν από το σημείο πολυαδενυλίωσης (CA αλληλουχία που ακολουθείται από μια GU πλούσια περιοχή)



Η πολυαδενυλίωση του 3' άκρου του RNA συνδέεται στενά με τον τερματισμό της μεταγραφής.

Όπως με την κάλυψη του 5' άκρου του RNA, έτσι και με την πολυαδενυλίωση του 3' άκρου του, η CTD ουρά της πολυμεράσης εμπλέκεται στην προσέλκυση ορισμένων από τα ένζυμα που είναι απαραίτητα για την πολυαδενυλίωση.

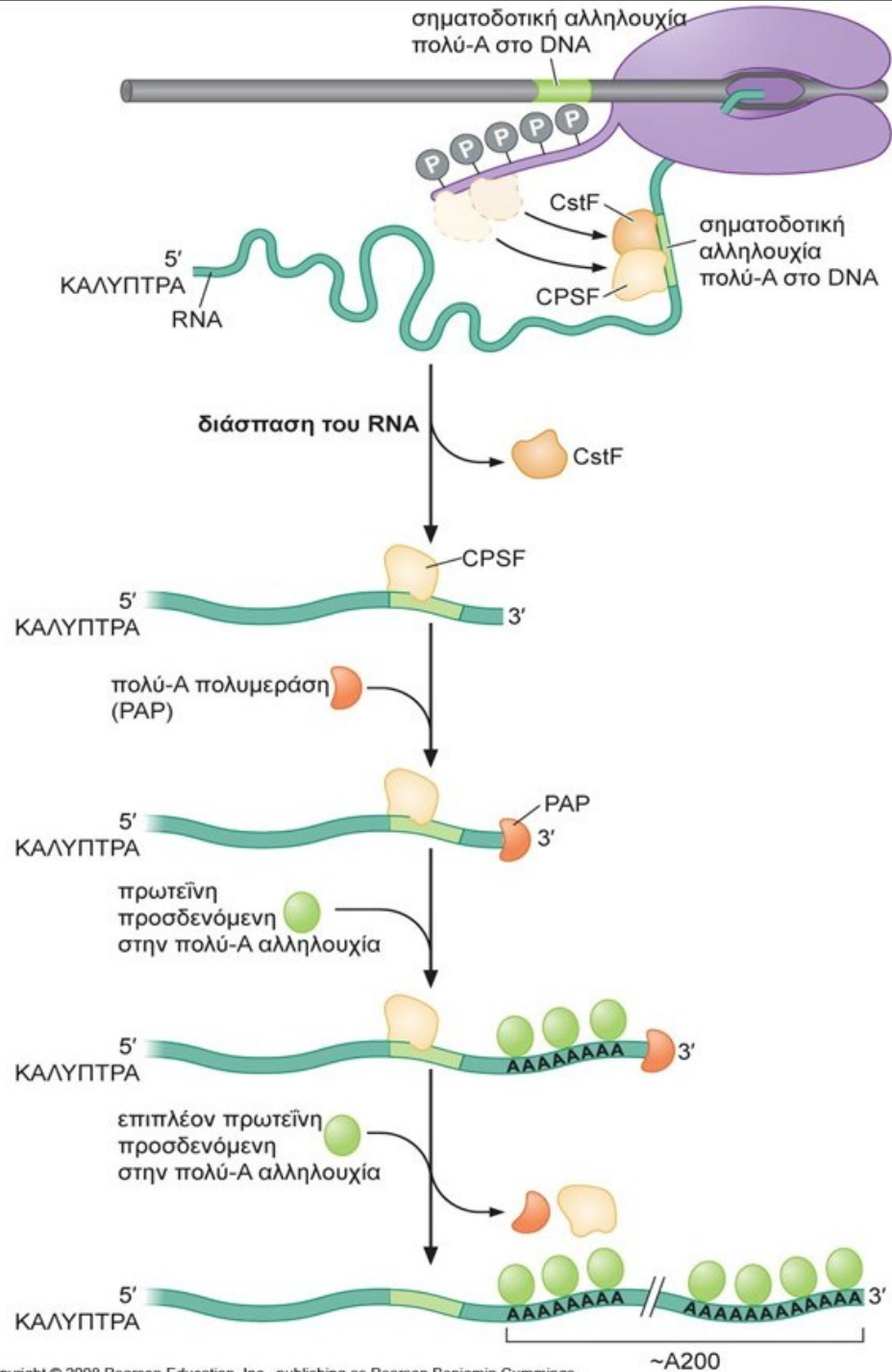
Μόλις φτάσει η πολυμεράση στο τέλος ενός γονιδίου, συναντά ειδικές αλληλουχίες, οι οποίες αφού μεταγραφούν σε RNA, πυροδοτούν την μεταφορά των ενζύμων της πολυαδενυλίωσης από την CTD ουρά της πολυμεράσης στο RNA.



Οι παράγοντες **CPSF** (παράγοντας τομής και πολυαδενυλίωσης) και **CstF** (παράγοντας επαγωγής της τομής) διασπούν το RNA.

Η **PAP** (πολυ-A πολυμεράση) προσθέτει 200 περίπου αδενίνες στο 3' άκρο του RNA που παράγεται από τη διάσπαση.

Η πρωτεΐνη **PABP** (Polyadenylate-binding protein) βοηθάει στην προσθήκη των As από την πολυμεράση και διατηρεί την polyA ουρά.



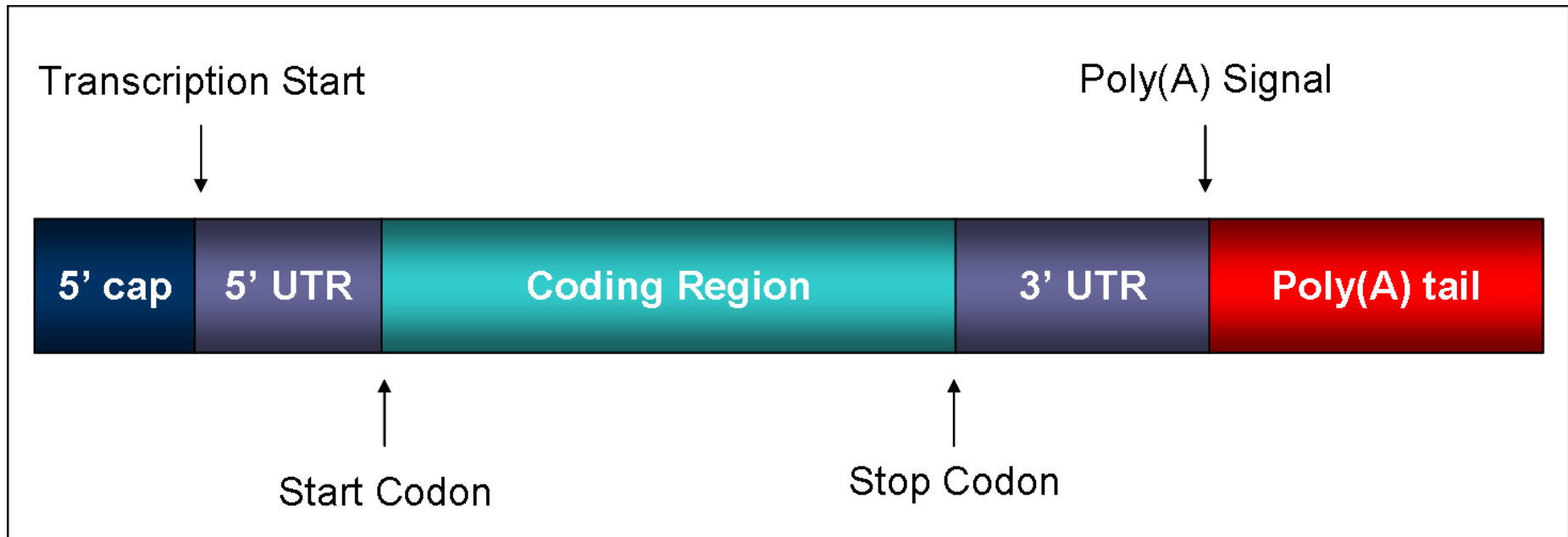
Αντίδραση προσθήκης poly(A) ουράς

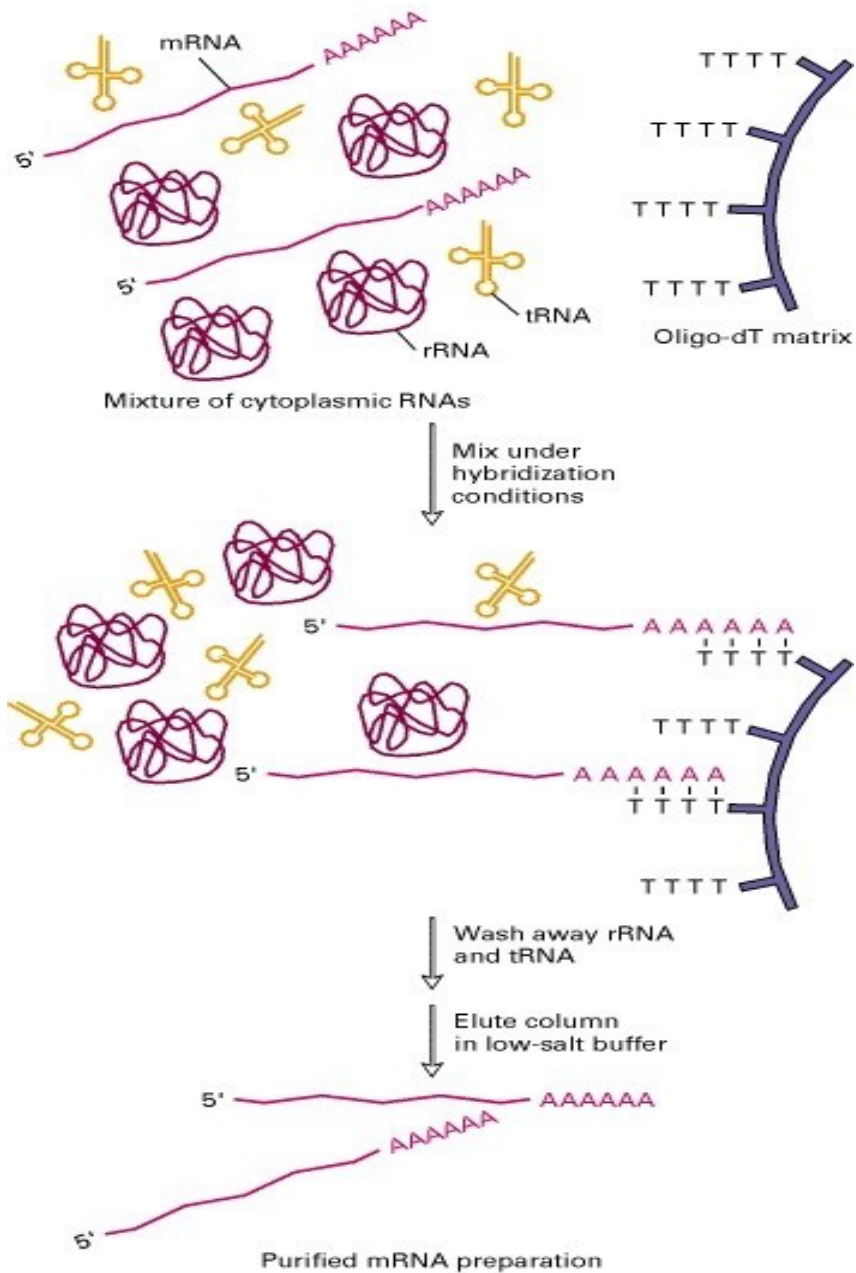


Οι βιολογικοί ρόλοι της poly(A) ουράς:

1. Προστασία από ριβονουκλεάσες: Η μείωση του μήκους της αποσταθεροποιεί το αντίστοιχο mRNA, ένας σημαντικός μηχανισμός ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης στο επίπεδο μετά την μεταγραφή
2. Ενίσχυση της συρραφής
3. Ρόλος στη μεταφορά του mRNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα
4. Ενίσχυση της μετάφρασης

Η δομή ενός ώριμου mRNA



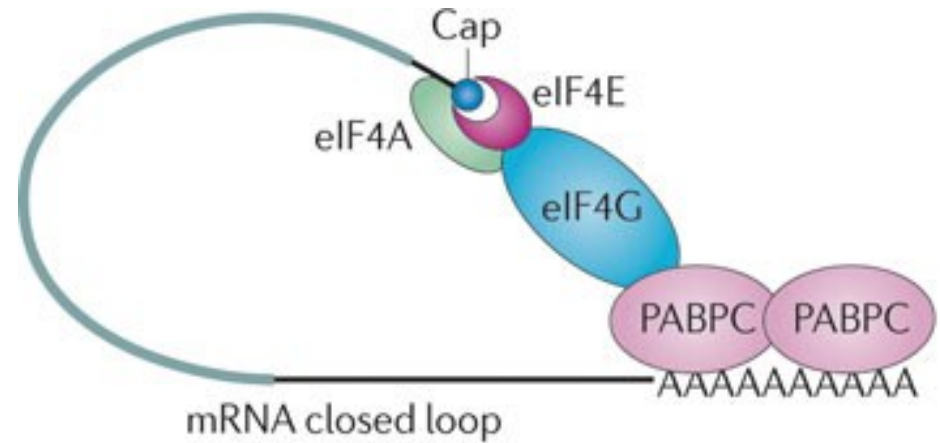


Η μακριά ουρά των αδενινών απαντάται μόνο στα μετάγραφα που συντίθενται από την ΡοΙ ΙΙ.

Το χαρακτηριστικό αυτό επιτρέπει την πειραματική απομόνωση των mRNA που κωδικοποιούν πρωτεΐνες με χρωματογραφία συγγένειας.

Πώς εξασφαλίζεται η «επιβίωση» ενός ώριμου mRNA;

Ένα ώριμο mRNA δεν έχει ελεύθερα άκρα, αφού αυτά αλληλεπιδρούν και συνεπώς είναι **ανθεκτικό στην δράση εξωνουκλεασών**.



Βρίσκεται σε **διαρκή δυναμική αλληλεπίδραση** με ένα σύνολο πρωτεϊνών που μπορούν:

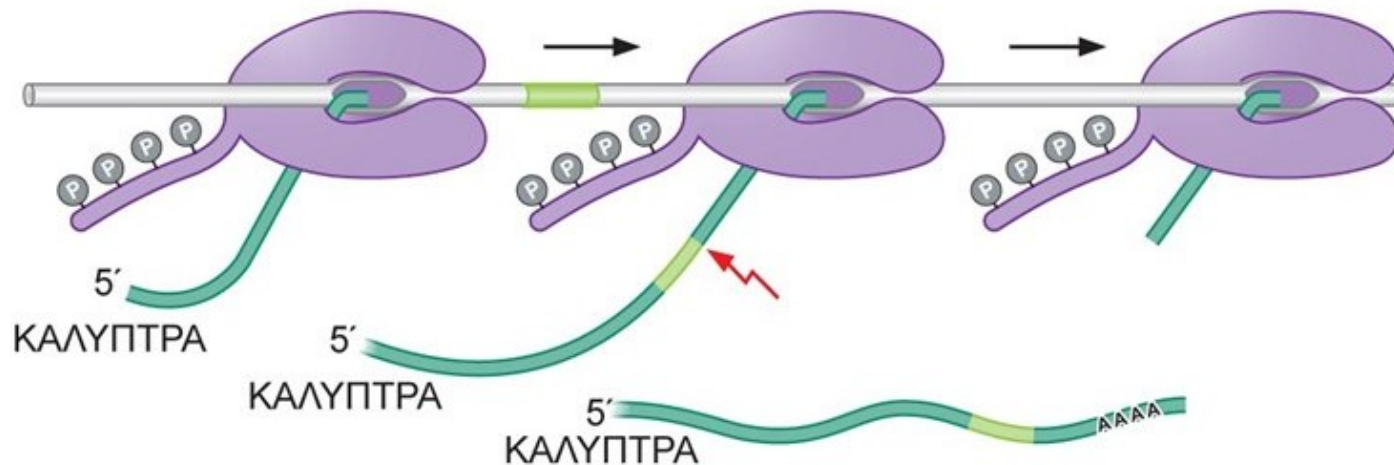
- Να επάγουν ή να καταστέλουν τη μετάφρασή του
- Να επάγουν ή να καταστέλουν την αποικοδόμησή του

Πως ολοκληρώνεται η μεταγραφή και απελευθερώνεται η RNA πολυμεράση;

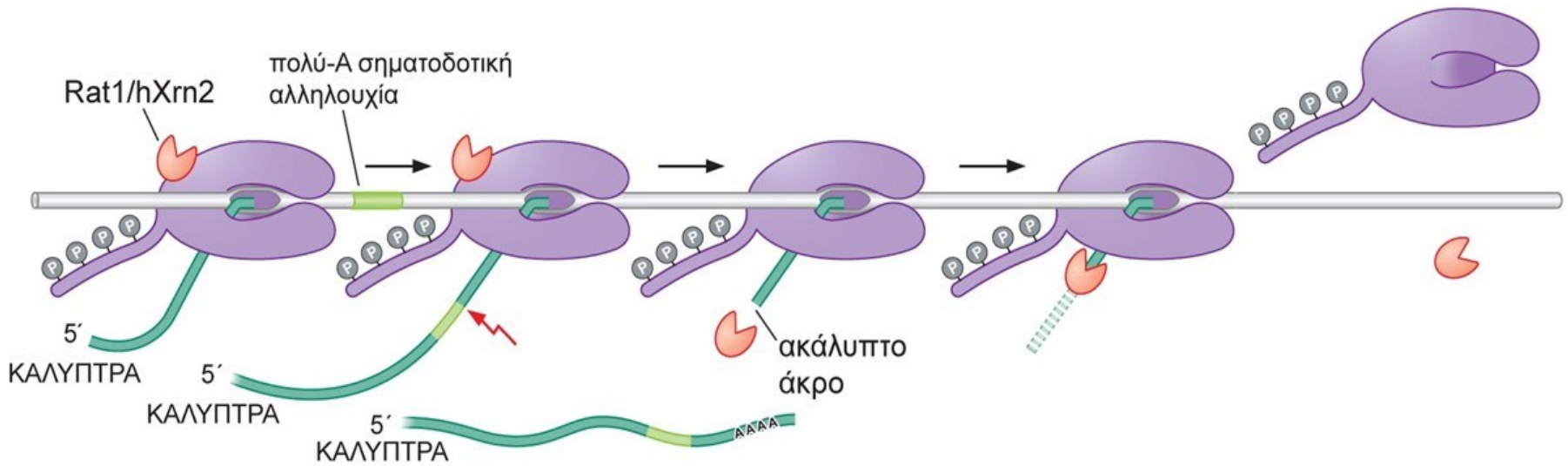
Η RNA πολυμεράση δεν τερματίζει αμέσως αφού το RNA διασπαστεί και πολυαδενυλιωθεί.

Συνεχίζει να μεταγράφει για αρκετές χιλιάδες νουκλεοτίδια προτού αποσυνδεθεί από το εκμαγείο DNA.

Έτσι δημιουργείται ένα δεύτερο μόριο RNA που προβάλλει από την πολυμεράση.



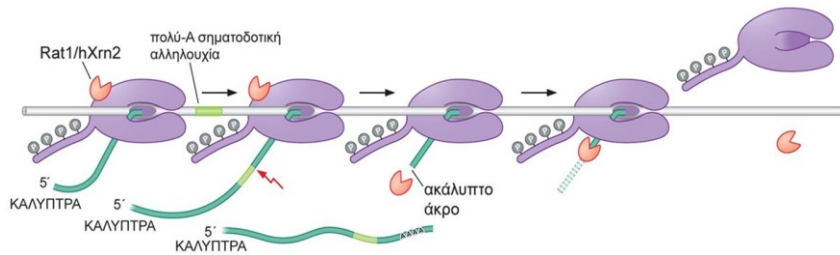
Ο τερματισμός της μεταγραφής συνδέεται με καταστροφή του RNA που προβάλλει από την πολυμεράση.



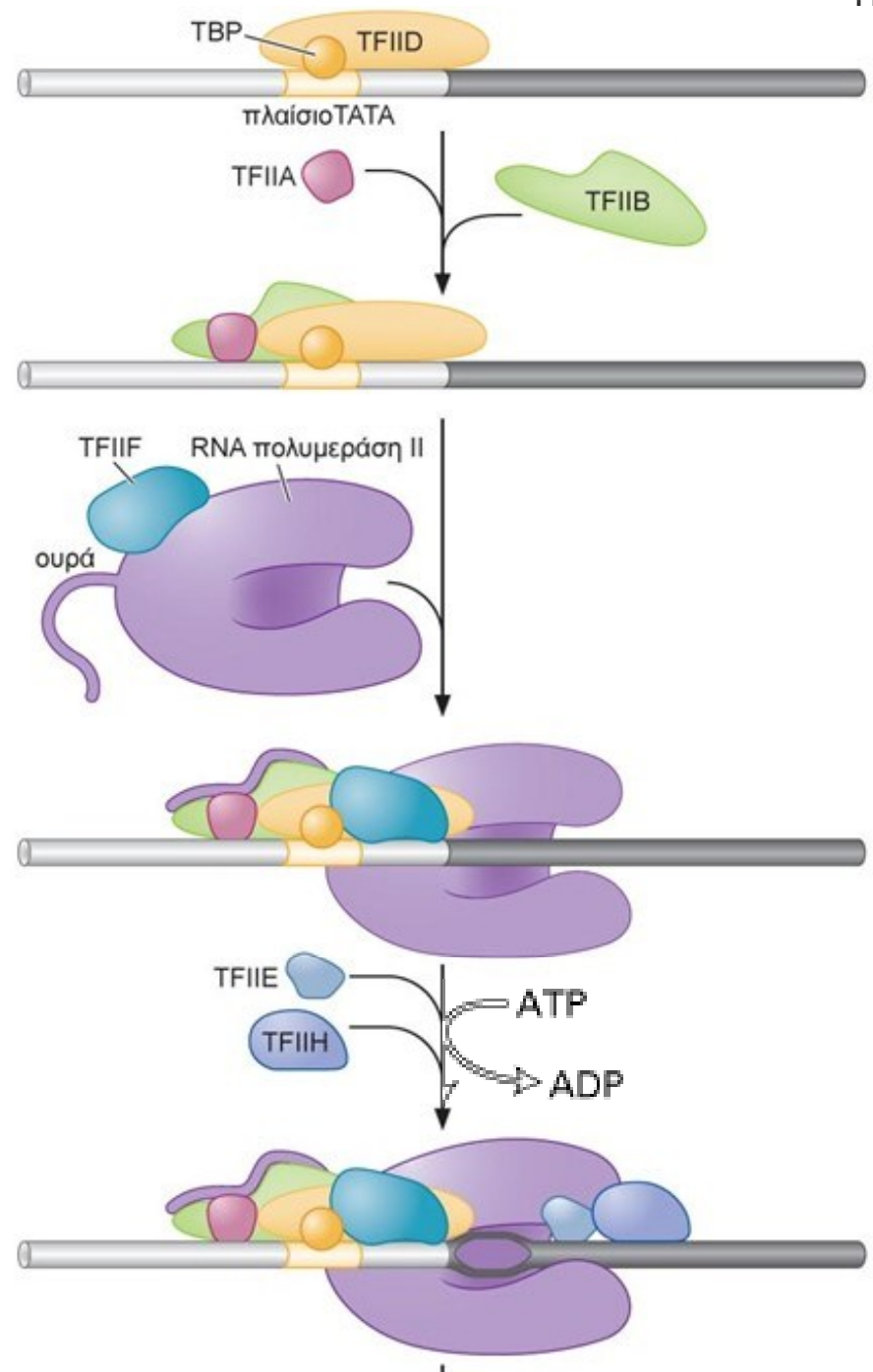
Σύμφωνα με το προκρινόμενο μοντέλο (μοντέλο της τορπίλης) ο τερματισμός της μεταγραφής από την Pol II προκαλείται από μια RNάση (Xrn2) που προσβάλλει το ακάλυπτο άκρο του δεύτερου μορίου RNA και το αποικοδομεί ταχέως με κατεύθυνση 5' → 3'. Όταν η ριβονουκλεάση αυτή προφτάσει την πολυμεράση, προκαλεί την αποσύνδεσή της από το εκμαγείο DNA και τον τερματισμό της μεταγραφής.

ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΑΠΟ ΤΗΝ RNA ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ ΙΙ

Η απομάκρυνση των παραγόντων έναρξης και η προσέλκυση των παραγόντων επιμήκυνσης και επεξεργασίας του RNA πραγματοποιείται με αλλαγή των θέσεων φωσφορυλίωσης των καταλοίπων της CTD ουράς της RNA πολυμεράσης.



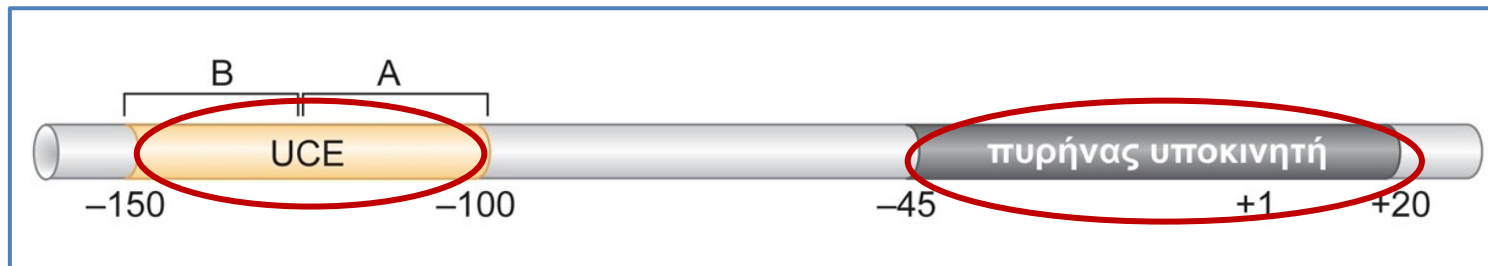
Ο τερματισμός της μεταγραφής συνδέεται με καταστροφή του RNA που προβάλλει από την πολυμεράση.



ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΑΠΟ ΤΗΝ RNA ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ I

Τα τρία (18S, 28S και 5,8S) από τα τέσσερα ριβοσωμικά RNA των ευκαρυωτικών οργανισμών οργανώνονται σ' ένα γονίδιο που μεταγράφεται από την πολυμεράση I.

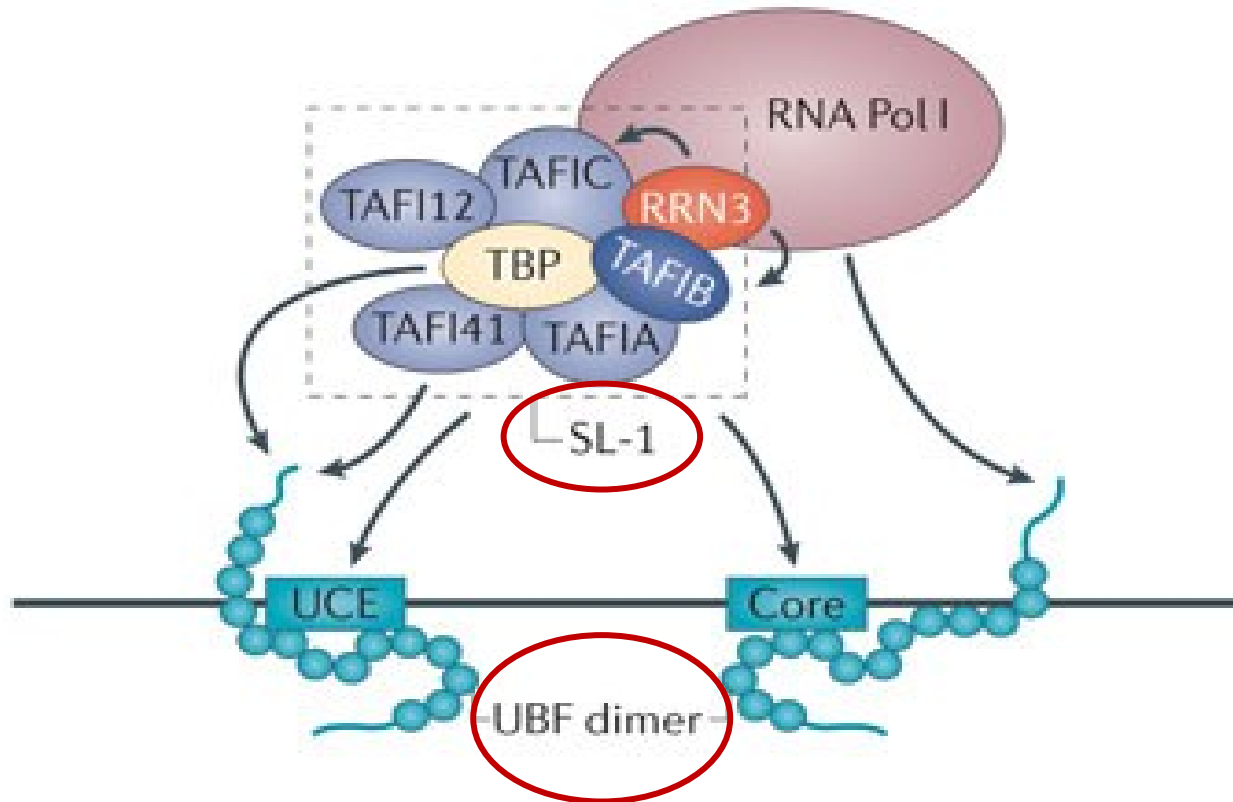
Υπάρχουν πολλά αντίγραφα αυτού του γονιδίου σε κάθε κύτταρο το οποίο και εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα από οποιοδήποτε άλλο γονίδιο, εξηγώντας ενδεχομένως το γιατί έχει τη δική του αποκλειστική πολυμεράση.



Ο υποκινητής του γονιδίου του rRNA περιλαμβάνει δύο στοιχεία πλούσια σε GC:

- Τον **πυρήνα του υποκινητή** που εδράζεται γύρω από τη θέση έναρξης (-45 έως +20) και
- Το **στοιχείο UCE** (upstream control element) στις θέσεις από -100 έως -150 περίπου.

Συγκρότηση του συμπλόκου έναρξης για τη μεταγραφή από την RNA πολυμεράση I



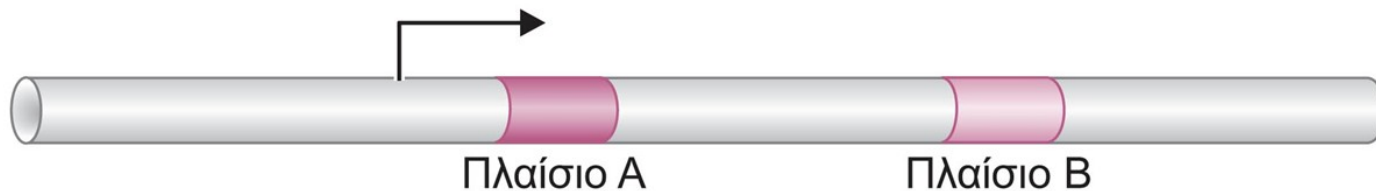
Εκτός από την Pol I, η έναρξη απαιτεί δύο άλλους παράγοντες, που καλούνται **UBF** και **SL-1**, ο οποίος περιλαμβάνει την TBP και τους παράγοντες TAFs.

Ο UBF προσδένεται στο στοιχείο UCE και στον πυρήνα του υποκινητή δημιουργώντας ένα διμερές που προσελκύει τις υπομονάδες του παράγοντα SL-1, στρατολογώντας έτσι την RNA Pol I.

ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΑΠΟ ΤΗΝ RNA ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ ΙΙΙ

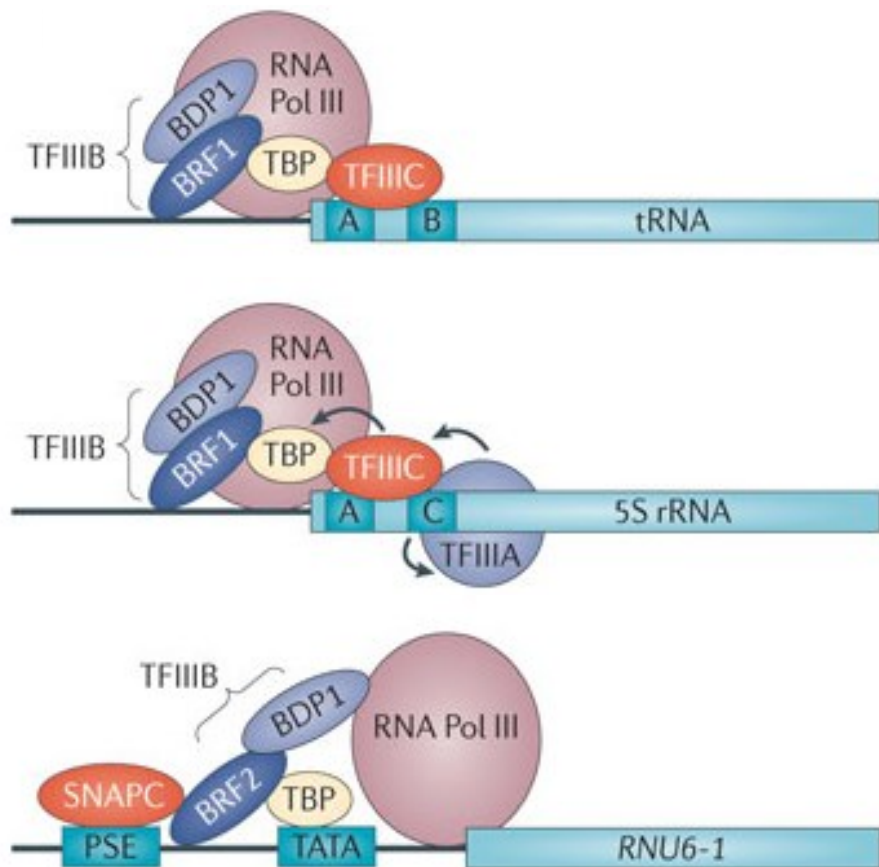
Οι υποκινητές των γονιδίων που μεταγράφονται από την RNA Pol III (5S rRNA, tRNAs και snRNAs) είναι **διαφόρων μορφών** και η συντριπτική τους πλειοψηφία έχει το ασυνήθιστο χαρακτηριστικό να **εδράζονται καθοδικά από τη θέση έναρξης** της μεταγραφής.

Οι υποκινητές των γονιδίων των tRNAs αποτελούνται από δύο περιοχές που ονομάζονται **Πλαίσιο A** και **Πλαίσιο B**.



Ο υποκινητής του γονιδίου του 5S rRNA περιέχει το **Πλαίσιο A** και το **Πλαίσιο C**,
ενώ οι υποκινητές των γονιδίων των snRNA περιλαμβάνουν περιοχές παρόμοιες ή και όμοιες με αυτές της RNA Pol II, όπως το **TATA box**.

Συγκρότηση του συμπλόκου έναρξης για τη μεταγραφή από την RNA πολυμεράση III



Nature Reviews | Cancer

Όπως συμβαίνει με την Pol II και Pol I, η μεταγραφή από την Pol III απαιτεί εκτός της πολυμεράσης και μεταγραφικούς παράγοντες (Transcription Factors III). Στην περίπτωση του tRNA, το σύμπλοκο TFIIC δεμεύεται στην περιοχή του υποκινητή και προσελκύει τον TFIIB, ο οποίος με τη σειρά του στρατολογεί την πολυμεράση III.

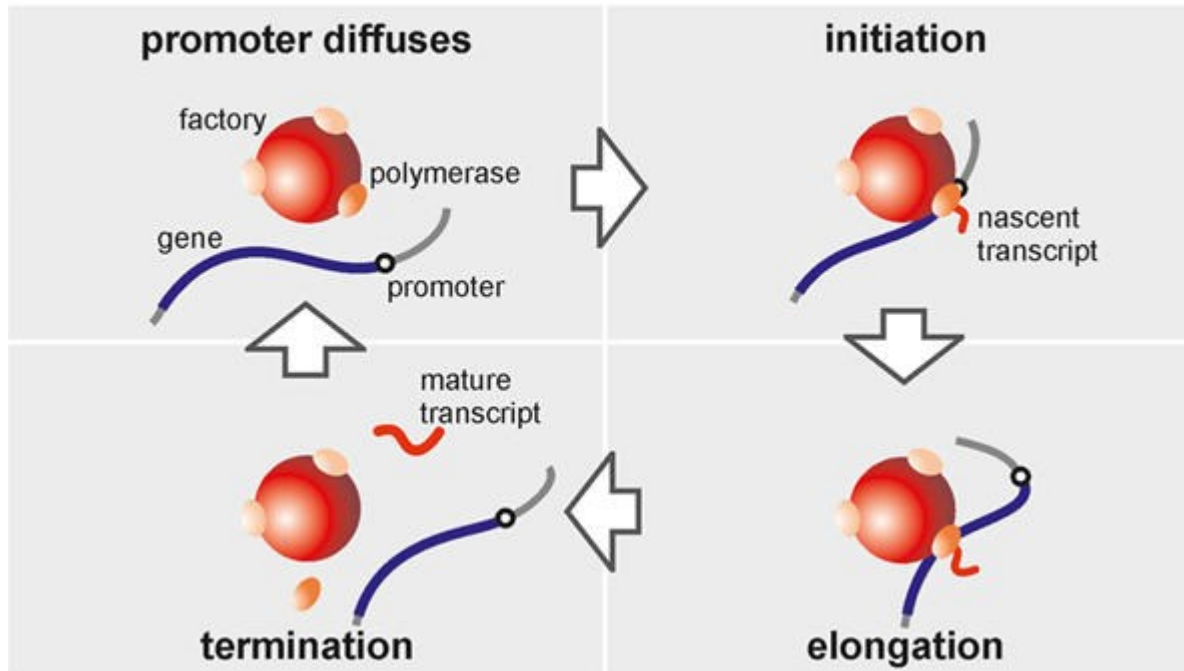
Όπως και οι άλλες δύο κατηγορίες πολυμερασών, η Pol III χρησιμοποιεί τον παράγοντα **TBP**.

Ένα εναλλακτικό μοντέλο μεταγραφής: μεταγραφικά εργοστάσια

Σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα, ένα εναλλακτικό μοντέλο μεταγραφής προβλέπει την συγκέντρωση RNA πολυμεράσης σε συγκεκριμένες θέσεις στον πυρήνα που καλούνται «μεταγραφικά εργοστάσια» (transcription factories).

Η RNA πολυμεράση φαίνεται να δεσμεύεται και να ακινητοποιείται στις θέσεις αυτές και το DNA κινείται κατά την μεταγραφή ώστε να απελευθερωθεί το νεοσυντιθέμενο μετάγραφο.

A transcription cycle



HHMI

3^η Διάλεξη

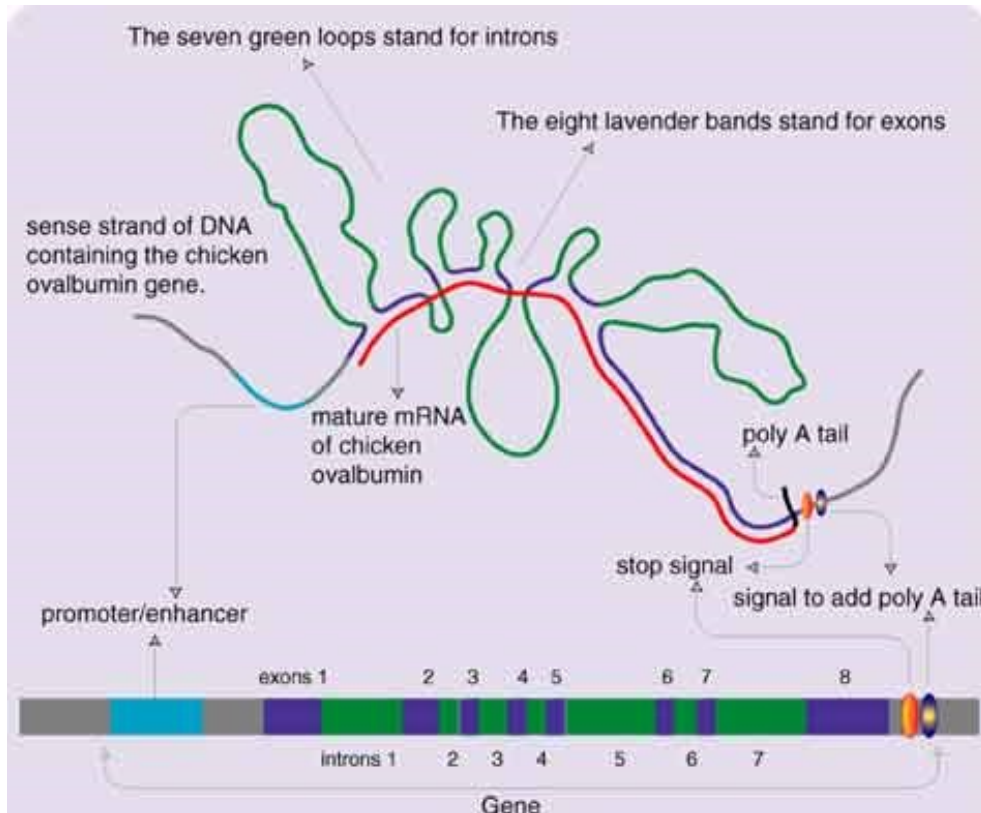
Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς η επιμήκυνση, ο τερματισμός και η **επεξεργασία του RNA** διασυνδέονται, πιθανώς για να εξασφαλίσουν τον κατάλληλο συντονισμό τους.

Η ωρίμανση των νεοσυντιθέμενων μεταγράφων της RNA πολυμεράσης II **γίνεται συγχρόνως με τη μεταγραφή -cotranscriptional processing-** και περιλαμβάνει:

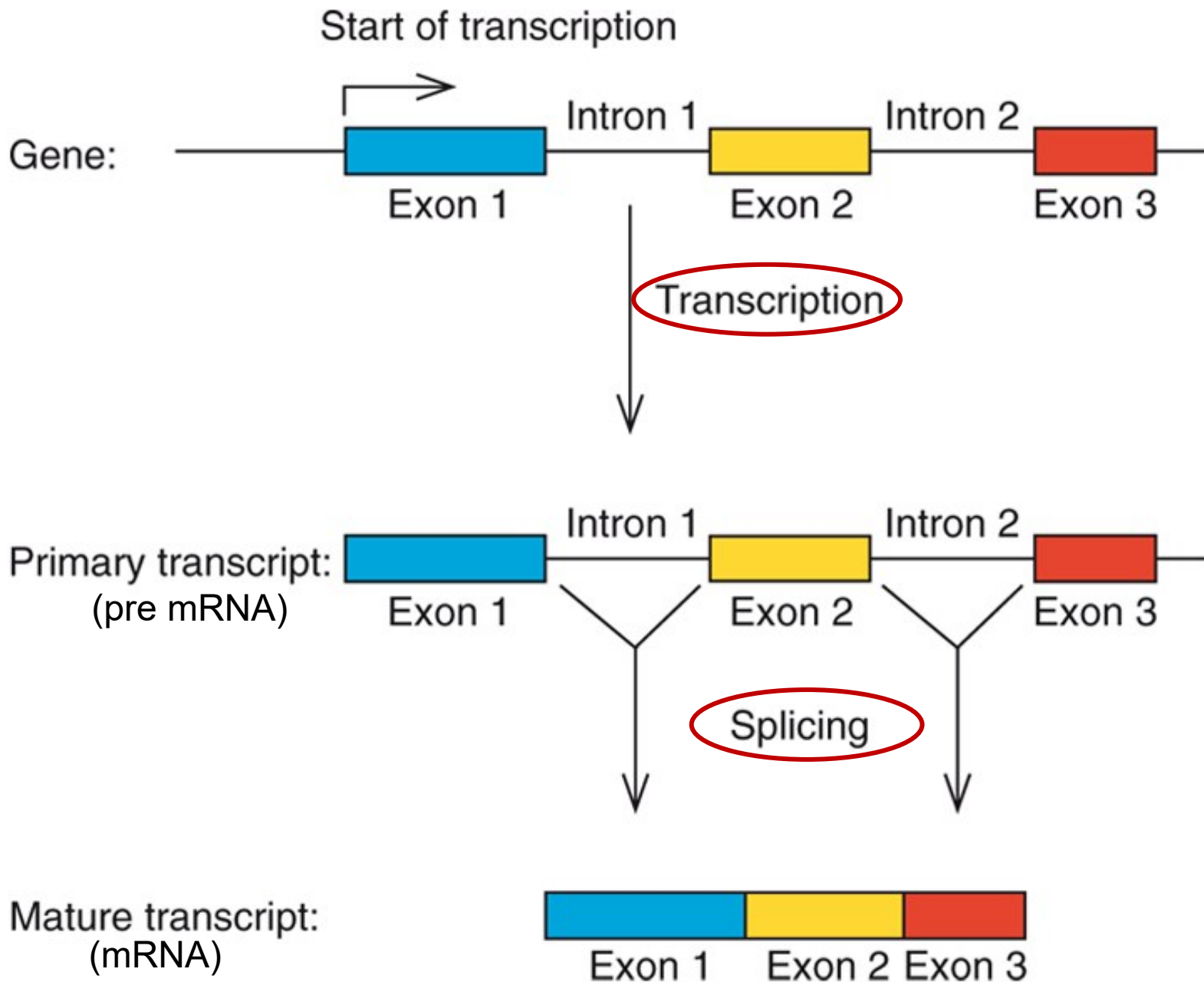
1. Προσθήκη του καλύμματος (Capping) στο 5' άκρο
2. Πολυαδενυλίωση στο 3' άκρο
3. Απομάκρυνση εσωνίων και σύνδεση εξωνίων- **συρραφή του RNA (RNA splicing)**

Συρραφή του RNA (RNA splicing)

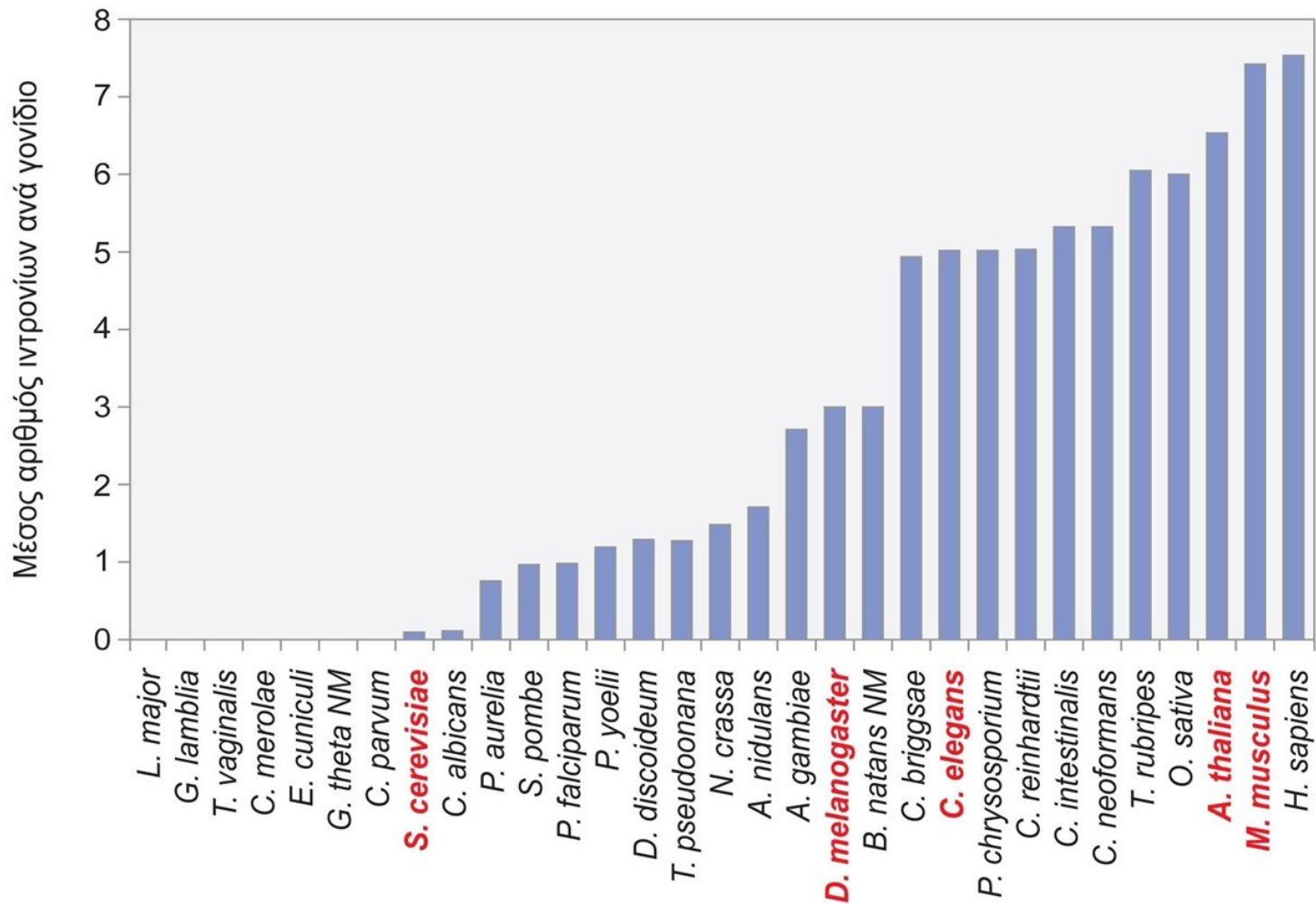
Τα περισσότερα γονίδια των ευκαρυωτικών είναι **ασυνεχή**. Περιλαμβάνουν δηλαδή αλληλουχίες που διατηρούνται (**εξώνια, exons**), και ενδιάμεσες αλληλουχίες (**εσώνια ή ιντρόνια, introns**) που δεν διατηρούνται σε ένα ώριμο RNA. Η απομάκρυνση των εσωνίων από το πρόδρομο mRNA συντελείται μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται **συρραφή** (RNA splicing).



Προσδιορισμός
ιντρονίων και
εξωνίων μέσω
υβριδοποίησης
του DNA-mRNA.



Ο αριθμός και το μέγεθος των εσώνίων που απαντάται στα γονίδια των ευκαρυωτικών οργανισμών ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό.



Στον άνθρωπο, ένα τυπικό mRNA περιλαμβάνει 7 εσώνια που είναι δεκαπλάσια σε μέγεθος (1800 βάσεις) από τις αλληλουχίες των εξωνίων (123 βάσεις).

Η σημασία των εσωνίων

- Αυξάνουν το δυναμικό κωδικοποίησης: ωρισμένα εσώνια μπορεί να συμπεριληφθούν στο τελικό ώριμο RNA κατά την εναλλακτική ωρίμανση δημιουργώντας από ένα μόνο γονίδιο διαφορετικές mRNA ισομορφές (εναλλακτική συρραφή).
- Ορισμένα εσώνια φέρουν ρυθμιστικές αλληλουχίες που εξασφαλίζουν την σωστή ωρίμανση του αντίστοιχου RNA.
- Μπορεί να οδηγούν στην σύνθεση μικρών ρυθμιστικών RNA.

Η συρραφή (splicing) περιλαμβάνει ένα σύνολο αντιδράσεων: στοχευμένης και ρυθμιζόμενης διάσπασης και επανασύνδεσης φωσφοδιεστερικών δεσμών στο πρόδρομο μόριο RNA που οδηγεί στην απελευθέρωση του ώριμου, λειτουργικού μορίου RNA.

Πως ξεχωρίζουν μεταξύ τους τα εσώνια και τα εξώνια;

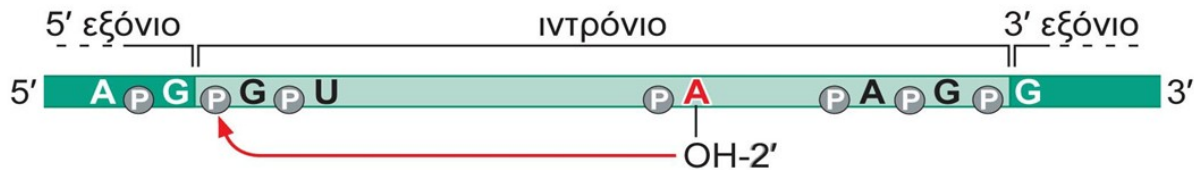
- Τα όρια μεταξύ των εσωνίων και των εξωνίων χαρακτηρίζονται από ειδικές αλληλουχίες νουκλεοτιδίων εντός των πρόδρομων mRNA, οι οποίες και προσδιορίζουν που θα λάβει χώρα η συρραφή.
- Κάθε εσώνιο φέρει μία **5'** και μία **3' θέση συρραφής** και μία εσωτερική αδενίνη αναρροϊκά από το 3' σημείο συρραφής, **το σημείο ή θέση διακλάδωσης** (branch point) η οποία ακολουθείται από μια περιοχή πολυπυριμιδίνης.
- Τα περισσότερα εσώνια αρχίζουν με **GU** και λήγουν με **AG**
- Το μεγαλύτερο μέρος της εσωτερικής αλληλουχίας δεν είναι συντηρημένο
- Εντοπίζονται και άλλες συντηρημένες αλληλουχίες κοντά στα άκρα εκτός των GU και AG.



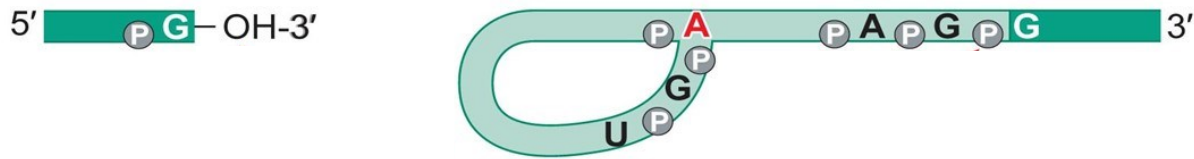
Πώς απομακρύνονται τα εσώνια και συνδέονται με υψηλή ακρίβεια τα εξώνια;

Ένα εσώνιο απομακρύνεται μέσω δύο διαδοχικών αντιδράσεων τρανσ-εστεροποίησης (διάσπασης και σύνθεσης νέου φωσφοδιεστερικού δεσμού).

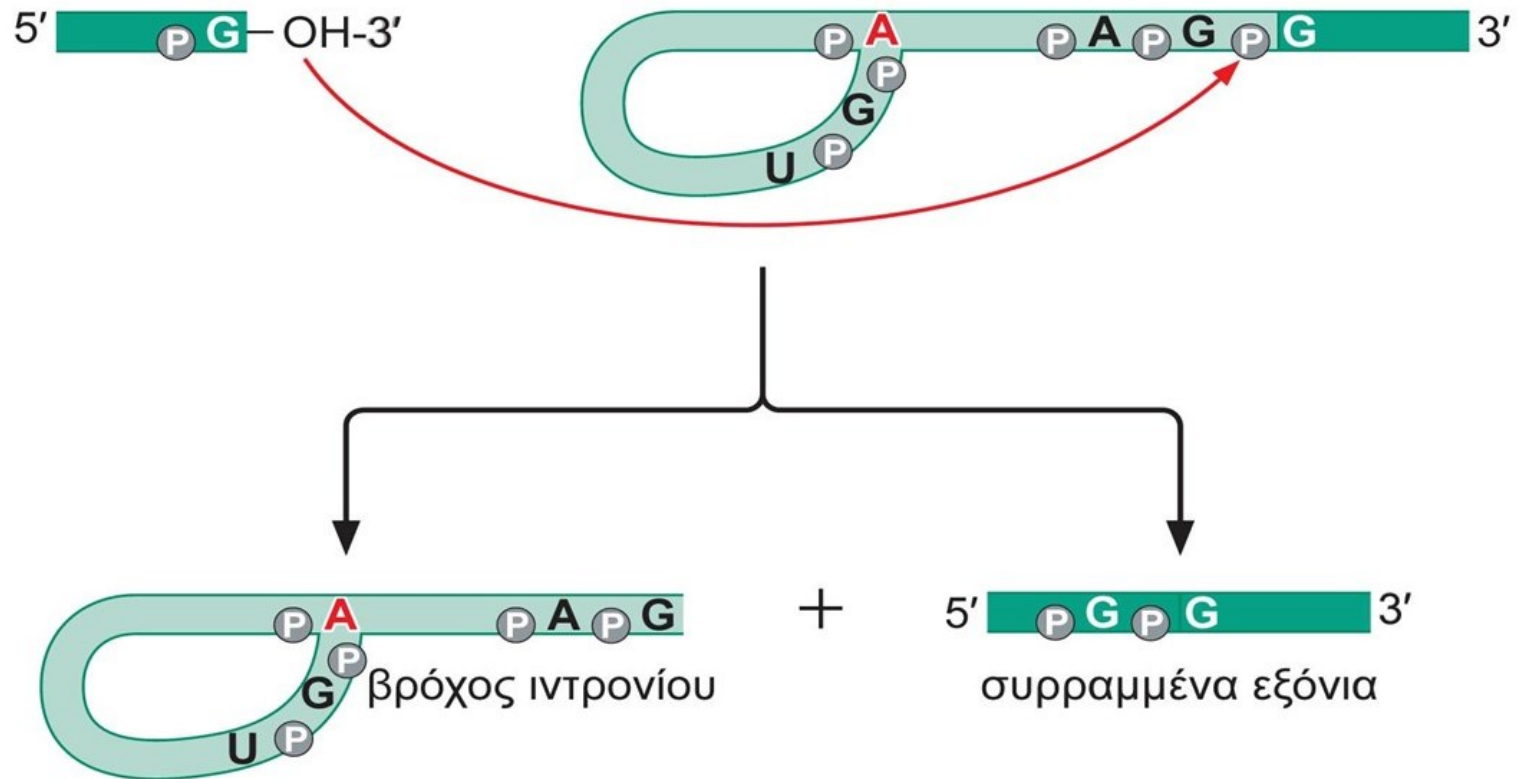
Η πρώτη αντίδραση πυροδοτείται από την 2'-OH της συντηρημένης A στη θέση διακλάδωσης, η οποία προσβάλλει την φωσφορική ομάδα της G στην 5' θέση συρραφής.



Ο φωσφοδιεστερικός δεσμός μεταξύ του ιντρονίου και του εξωνίου διασπάται και το ελευθερωμένο 5' άκρο του ιντρονίου συνδέεται με την 2-OH της A στη θέση διακλάδωσης, δημιουργώντας έναν βρόχο.



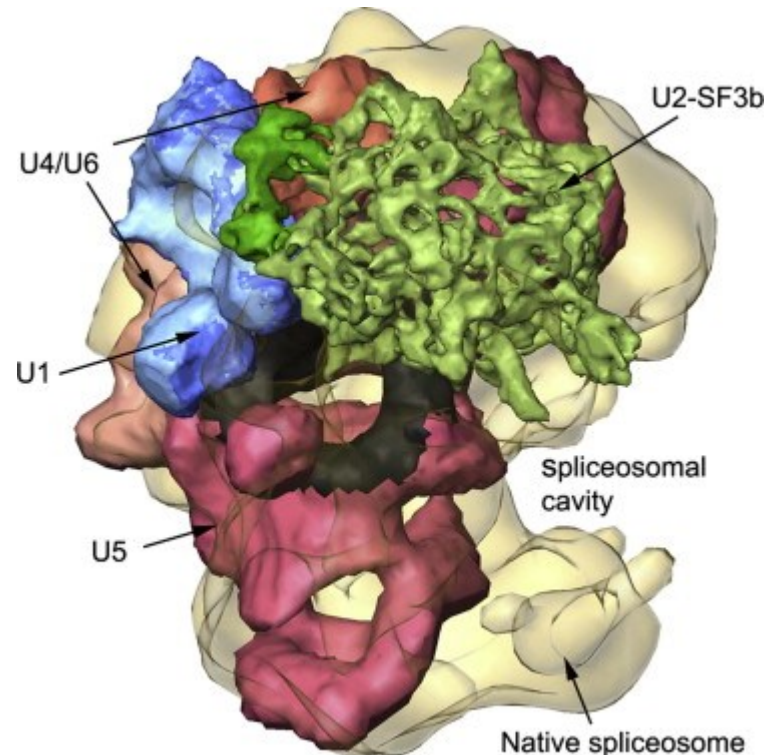
Στη δεύτερη αντίδραση, η προσφάτως δημιουργηθείσα 3'-OH του 5' εξωνίου, προσβάλλει την φωσφορική ομάδα της G στην 3' θέση συρραφής, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του εσωνίου που έχει το σχήμα του βρόχου και την σύνδεση των 5' και 3' εξωνίων.



Σημειώνεται ότι δεν απαιτείται παροχή ενέργειας για την χημεία των αντιδράσεων αυτών (δύο φωσφοδιεστερικοί δεσμοί διασπώνται και δύο σχηματίζονται). Ωστόσο, όπως θα δούμε παρακάτω καταναλώνεται μια μεγάλη ποσότητα ATP για την κατάλληλη συγκρότηση και λειτουργία του μηχανισμού της συρραφής.

Το σωματίο συρραφής (Spliceosome)

Οι αντιδράσεις της συρραφής καταλύονται από ένα υπερμοριακό συγκρότημα που ονομάζεται «σωμάτιο συρραφής» (spliceosome) και αποτελείται 150 περίπου πρωτεΐνες και 5 RNA. Τα 5 RNA (U1, U2, U4, U5 και U6) καλούνται όλα μαζί μικρά πυρηνικά RNA (sn RNAs) και συμπλοκοποιούνται με πρωτεΐνες σχηματίζοντας συμπλέγματα RNA και πρωτεϊνών που ονομάζονται (snRNPs). Το σύμπλεγμα είναι δυναμικό και περιλαμβάνει κύκλους συναρμολόγησης - αποσυναρμολόγησης.



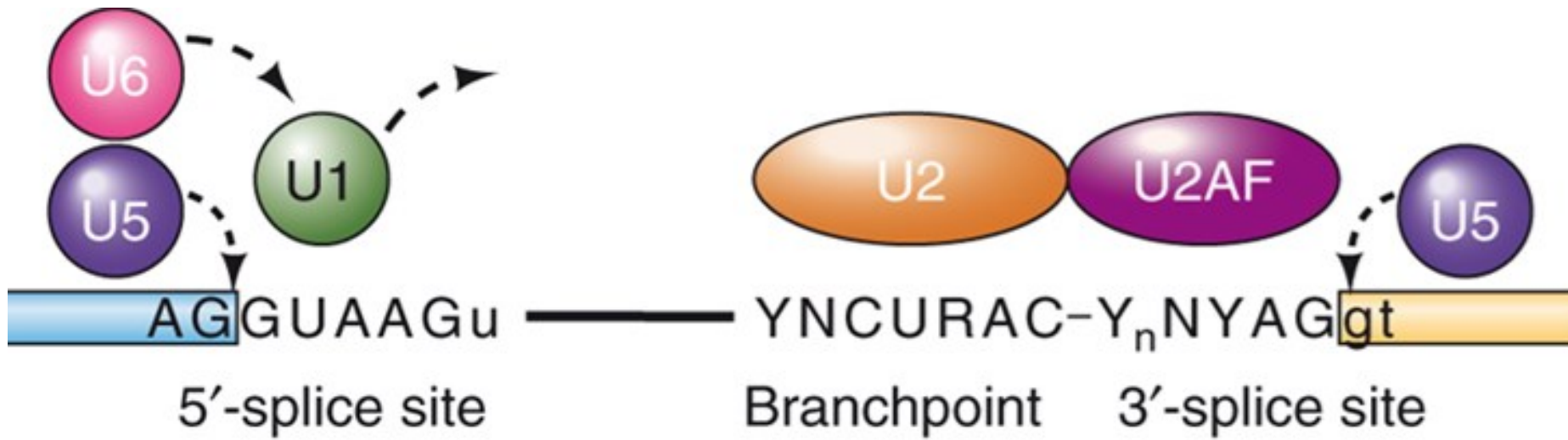
Συστατικά των snRNPs:

- Στην συρραφή συμμετέχουν τα snRNAs U1, U2, U4, U5 και U6 τα οποία είναι πολύ συντηρημένα.
 - Στον πυρήνα κάθε snRNP εντοπίζεται ένα μικρό πυρηνικό RNA μεγέθους 100-200 νουκλεοτιδίων (snRNA).
 - Κάθε snRNA φέρει θέσεις δέσμησης για ένα σύνολο Sm πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην σύσταση όλων των snRNPs.
-
- Το σύμπλεγμα snRNA - Sm πρωτεϊνών σχηματίζει τους πυρήνες του Sm σωματίου συρραφής.

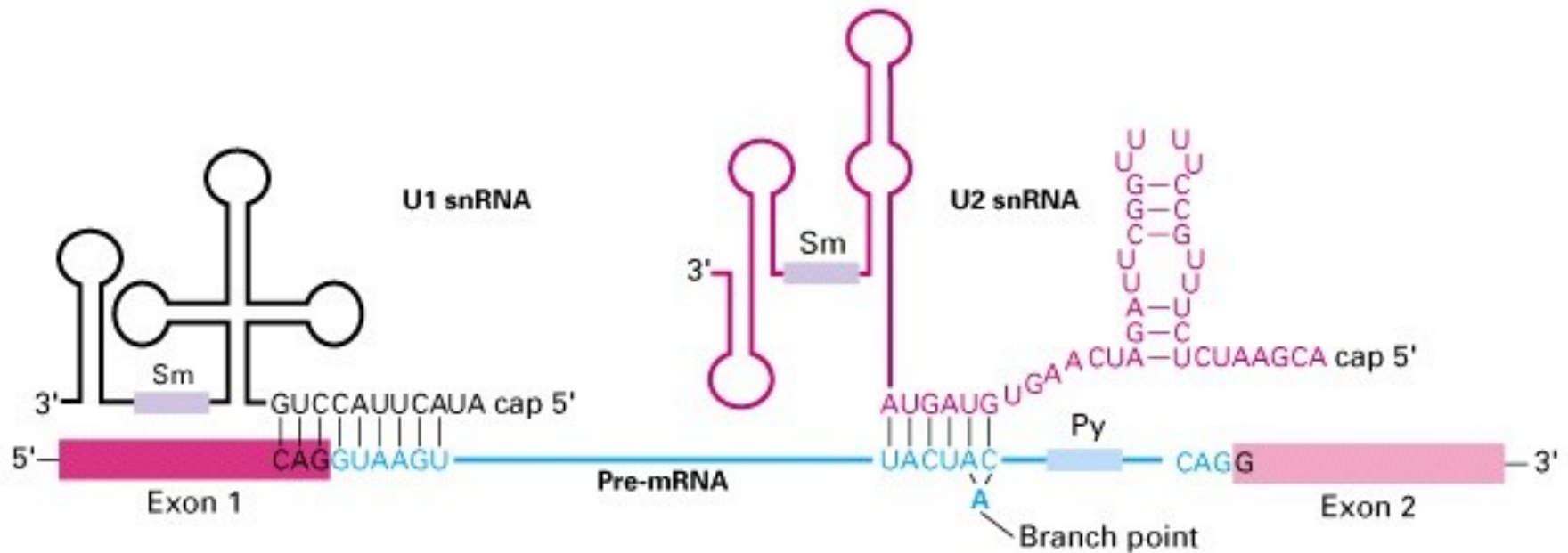
Το σωματίο συρραφής ολοκληρώνεται με την παρουσία μη ειδικά συνδεόμενων πρωτεϊνών (SR πρωτεΐνες, πλούσιες σε αργινίνη και σερίνη).



Τα snRNA και οι πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με **συγκεκριμένες αλληλουχίες του εσωνίου** και των θέσεων τομής.



Η ακρίβεια της συρραφής εξασφαλίζεται από τη δημιουργία ζευγών βάσεων μεταξύ των snRNAs και του πρόδρομου mRNA και ολοκληρώνεται με την συμμετοχή πρωτεϊνικών παραγόντων.



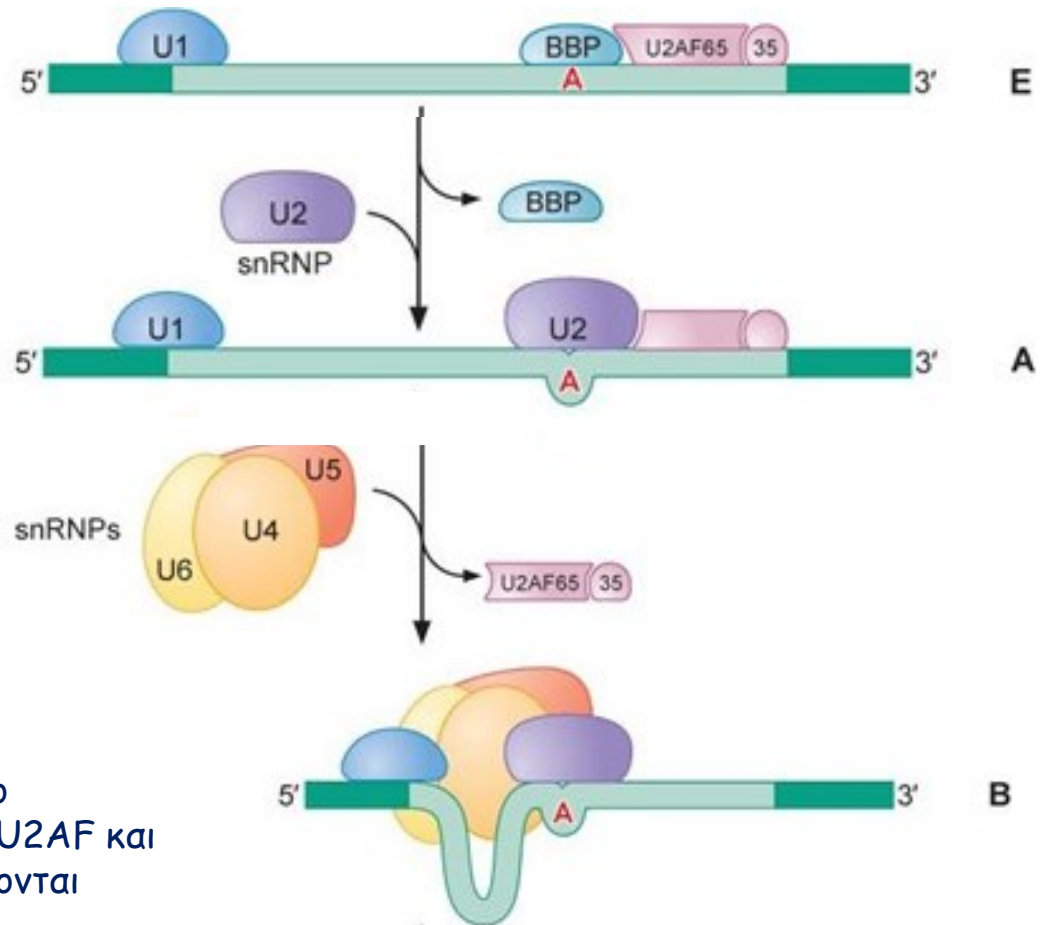
Τα U1 and U2 συνδέονται με το pre-mRNA στην 5' θέση τομής και στο σημείο διακλάδωσης (branch point) στα αρχικά στάδια της διαδικασίας συρραφής.

Μοντέλο συγκρότησης του σωματίου συρραφής και στάδια της διαδικασίας συρραφής.

Το U1 snRNP αναγνωρίζει την 5' θέση συρραφής στο εσώνιο (λόγω συμπληρωματικότητας ορισμένων βάσεων) και η πρωτεΐνη U2AF το 3' άκρο του εσωνίου. Στο σημείο διακλάδωσης αρχικά προσδένεται η πρωτεΐνη BBP (**complex E**).

Το U2 snRNP εκτοπίζει την πρωτεΐνη BBP και προσδένεται στο σημείο διακλάδωσης (**complex A**). Η συντηρημένη A δεν έχει απόλυτη συμπληρωματικότητα με το U2 snRNA και ως εκ τούτου το αζευγάρωτο κατάλοιπο A είναι διαθέσιμο να αλληλεπιδράσει με την 5' θέση συρραφής.

Τα snRNPs U4, U5 και U6 συνδέονται στο σύμπλοκο A εκτοπίζοντας την πρωτεΐνη U2AF και δημιουργούν το **complex B**, στο οποίο έρχονται κοντά οι θέσεις που αλληλεπιδρούν.

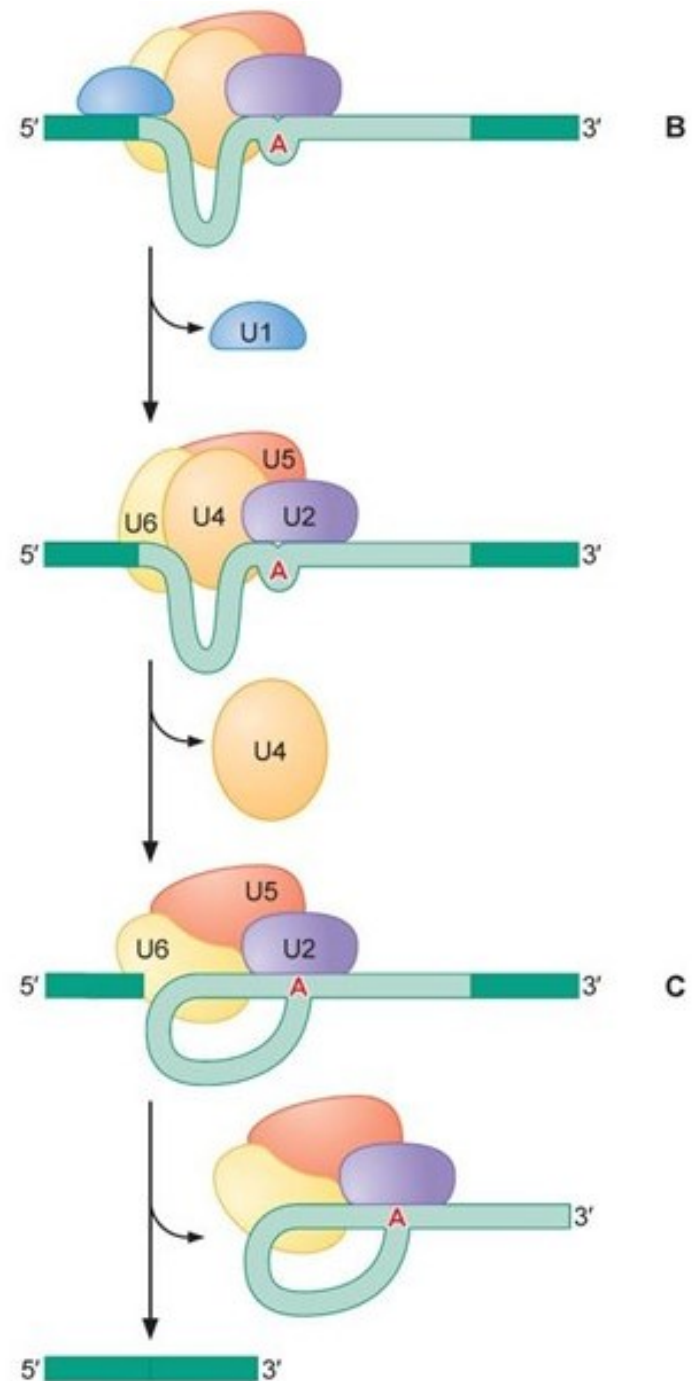


Το U1 snRNP αποσυνδέεται από το σύμπλοκο και αντικαθίσταται από το U6 snRNP, το οποίο έχει και αυτό συμπληρωματικότητα με το 5' σημείο συρραφής του pre-mRNA.

Το U4 snRNP αποσυνδέεται με αποτέλεσμα την ανάπτυξη RNA-RNA αλληλεπίδρασης μεταξύ των U6 snRNP και U2 snRNP που διευκολύνει την πραγματοποίηση της πρώτης αντίδρασης τρανσεστεροποίησης (**complex C**).

Η δεύτερη αντίδραση τρανσεστεροποίησης υποβοηθείται από το U5 snRNP και το τελικό αποτέλεσμα είναι η συρραφή των εξωνίων με παράλληλη απελευθέρωση του βρόχου ιντρονίου.

Τα snRNPs απομακρύνονται και μπορούν να πάρουν μέρος σε νέο κύκλο αντιδράσεων συρραφής, ενώ το εσώνιο αποικοδομείται από πυρηνικές ριβονουκλεάσες.



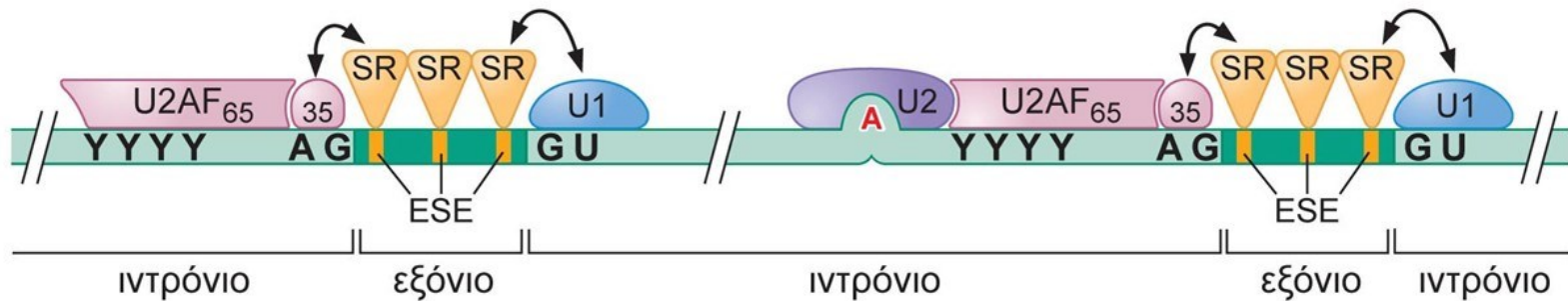
Η αναγνώριση των περιοχών συρραφής είναι επιρρεπής σε δύο είδη λαθών.

- Οι θέσεις συρραφής μπορούν να παραλειφθούν, με συστατικά δεσμευμένα πάνω τους.
- Άλλες θέσεις με παρεμφερή αλληλουχία, αλλά μη γνήσιες θέσεις συρραφής, θα μπορούσαν να αναγνωριστούν εσφαλμένα ως γνήσιες.

Η ακρίβεια της επιλογής των θέσεων συρραφής ενισχύεται με δύο τρόπους:

1. **Σύζευξη μεταγραφής και συρραφής.** Η συρραφή πραγματοποιείται πριν το νεοσυντιθέμενο RNA απελευθερωθεί από την RNA πολυμεράση. Σε πειράματα αφαίρεσης της περιοχής CTD της RNA πολυμεράσης II προκαλείται ελαττωματική ωρίμανση και συρραφή του μεταγράφου της β-σφαιρίνης. Κατά τη μεταγραφή η RNA πολυμεράση φέρνει μαζί της πρωτεΐνες συνδεδεμένες στην CTD ουρά που παίζουν ρόλο στην ωρίμανση. Έτσι όταν κατά τη μεταγραφή ενός γονιδίου εμφανιστεί μια 5' θέση συρραφής οι πρωτεϊνικοί παράγοντες μεταφέρονται από την CTD ουρά στη θέση συρραφής και μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τους παράγοντες στην 3' θέση συρραφής, όταν αυτή συντεθεί, αποφεύγοντας έτσι ανταγωνιστικές θέσεις συρραφής.

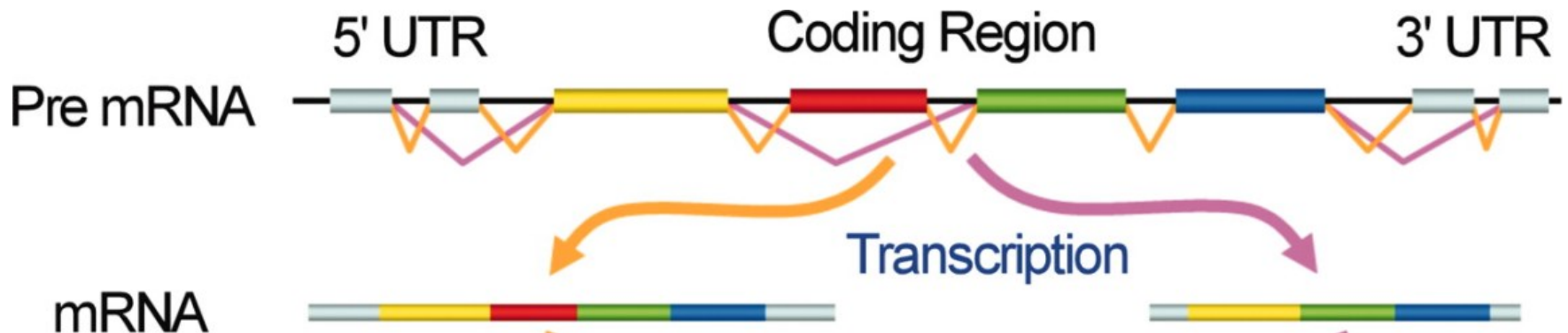
2. **Πρωτεΐνες SR.** Είναι μια ομάδα πρωτεϊνών (πλούσιες σε κατάλοιπα σερίνης S και αργινίνης R) που αναγνωρίζουν και προσδένονται στα εξώνια σε αλληλουχίες που ονομάζονται **ενισχυτές της συρραφής** (exonic splicing enhancers).



Οι πρωτεΐνες SR στρατολογούν την πρωτεΐνη U2AF στο 3' σημείο συρραφής και το U1-snRNP στο 5' σημείο συρραφής, διασφαλίζοντας με αυτόν τον τρόπο την πιστότητα και αποτελεσματικότητα της συρραφής.

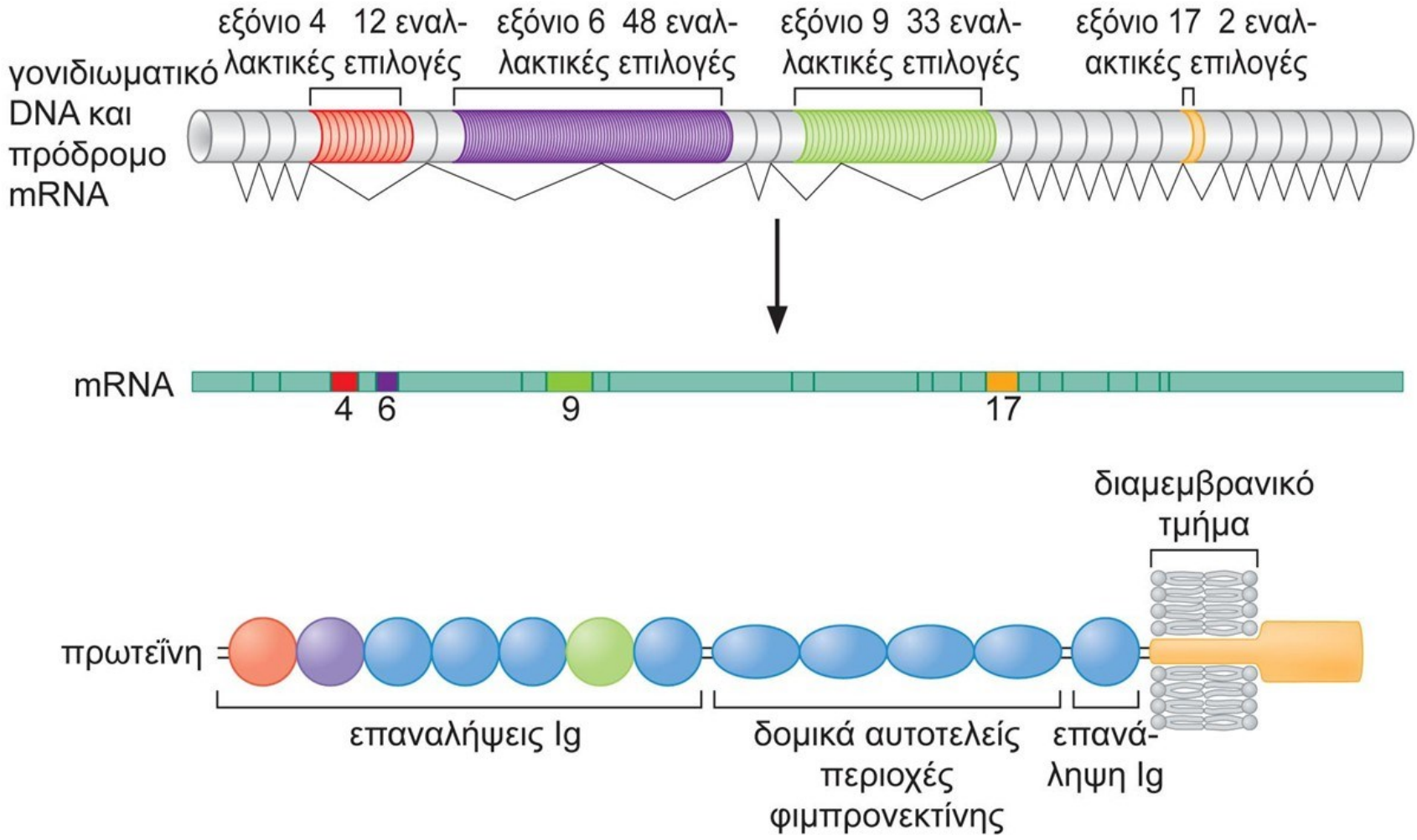
ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΗ ΣΥΡΡΑΦΗ

1 γονίδιο → Διαφορετικά mRNA → Διαφορετικές πρωτεΐνες



Η εναλλακτική συρραφή αφορά ποσοστό μεγαλύτερο του 90% των ανθρώπινων γονιδίων

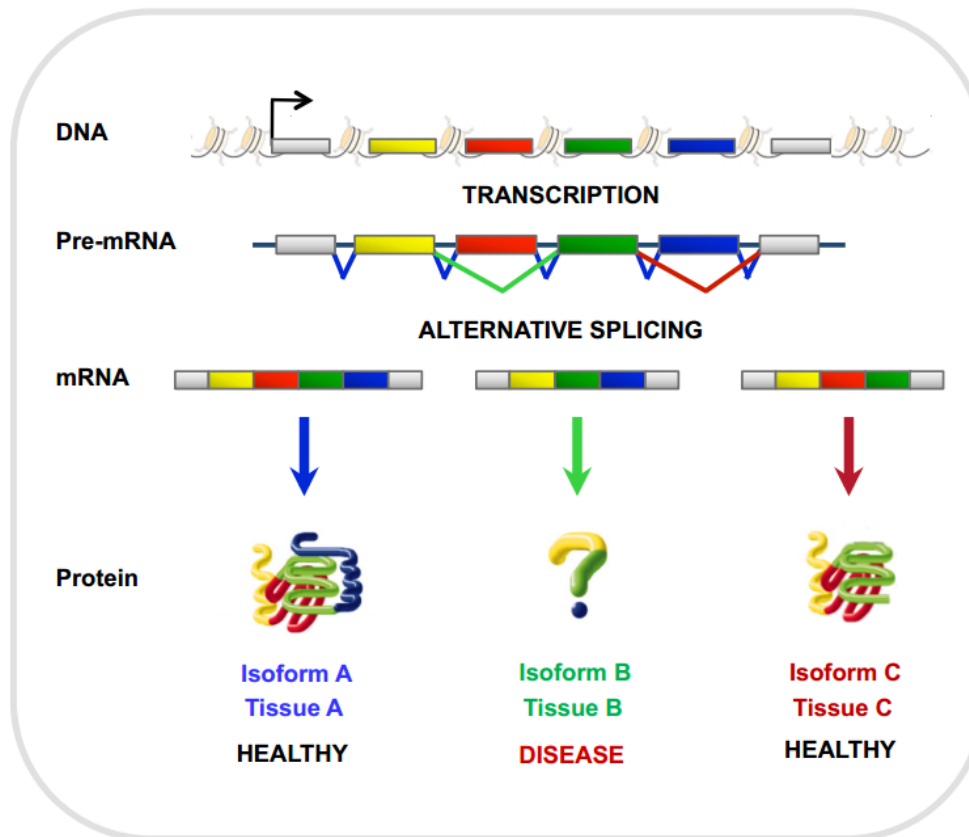
Το παράδειγμα του γονιδίου *Dscam* στα έντομα: 38016 πρωτεϊνικές ισομορφές



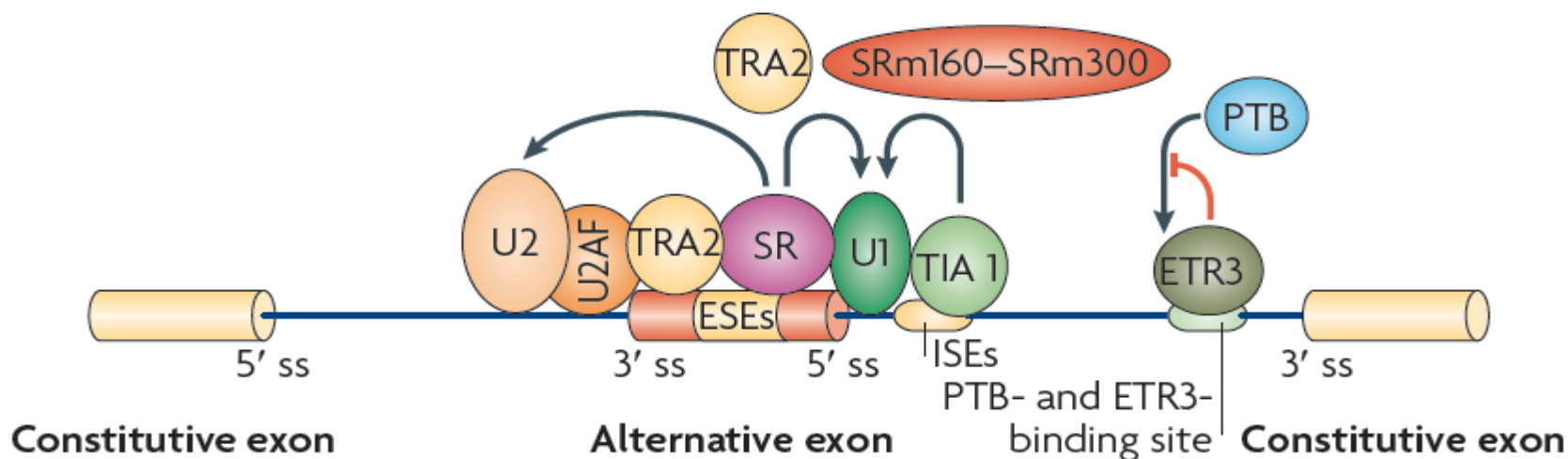
Όπως φαίνεται υπάρχουν διάφορες εναλλακτικές επιλογές για τα εξόνια 4, 6, και 9 που κωδικοποιούν επαναλήψεις περιοχών Ig και του εξονίου 17 που κωδικοποιεί το διαμεμβρανικό τμήμα με αποτέλεσμα την δημιουργία ενός πολύ μεγάλου αριθμού ανοσοσφαιρινών.

Συρραφή του RNA και ασθένειες

- Ποσοστό που αγγίζει το 15 % των μεταλλαγών που προκαλούν γενετικές ασθένειες επηρεάζουν τη συρραφή του πρόδρομου mRNA
- Σε αρκετές περιπτώσεις αφορούν μεταλλαγές στις θέσεις συρραφής, το σημείο διακλάδωσης ή αλληλουχίες που ενισχύουν (enhancers) ή καταστέλλουν (silencers) τη συρραφή ορισμένων εξωνίων

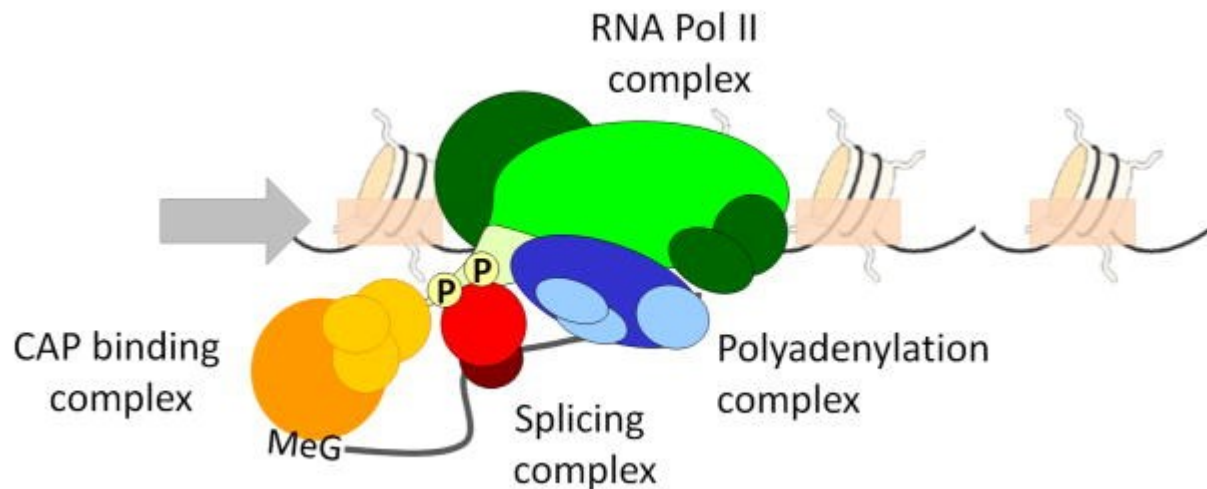


Η εναλλακτική ωρίμανση ρυθμίζεται κυρίως από την πρόσδεση ιστο-ειδικών πρωτεϊνών (SR και hRNP πρωτεΐνες) που δεσμεύονται σε ειδικές θέσεις καλούμενες ενισχυτές ή κατασιγαστές συρραφής εξονίων ή ιντρονίων, επηρεάζοντας έτσι τις τελικές θέσεις συρραφής.



Σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα, το αποτέλεσμα της εναλλακτικής ωρίμανσης επηρεάζεται και από την αλληλουχία του υποκινητή του αντίστοιχου γονιδίου με δύο τρόπους:

1. Με την τοπική στρατολόγηση παραγόντων συρραφής που επάγουν συγκεκριμένο πρότυπο ωρίμανσης
2. Επηρεάζοντας τον ρυθμό επιμήκυνσης της RNA πολυμεράσης II. Σε αρκετές περιπτώσεις όταν μειώνεται ο ρυθμός επιμήκυνσης φαίνεται να ευνοείται διαφορετικό πρότυπο ωρίμανσης.



Τι είναι γονίδιο;

Με την ανακάλυψη της εναλλακτικής συρραφής είναι σαφές ότι ο ορισμός: ένα γονίδιο-μια πολυπεπτιδική αλυσίδα δεν είναι πάντα ακριβής

Επομένως:

Ένα γονίδιο-για τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες-είναι μια αλληλουχία DNA που μεταγράφεται ως μια μονάδα που κωδικοποιεί είτε μια πολυπεπτιδική αλυσίδα ή ένα σύνολο από πολύ συγγενικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες, ισομορφές μιας πρωτεΐνης-protein isoforms.

Τελευταία μετά τα δεδομένα του ENCODE project και την έκταση της εναλλακτικής συρραφής, προτείνεται από ορισμένους, το γονίδιο να καθορίζεται με βάση το μετάγραφο του.

Αυτοσυρραφή του RNA (RNA Self-splicing)

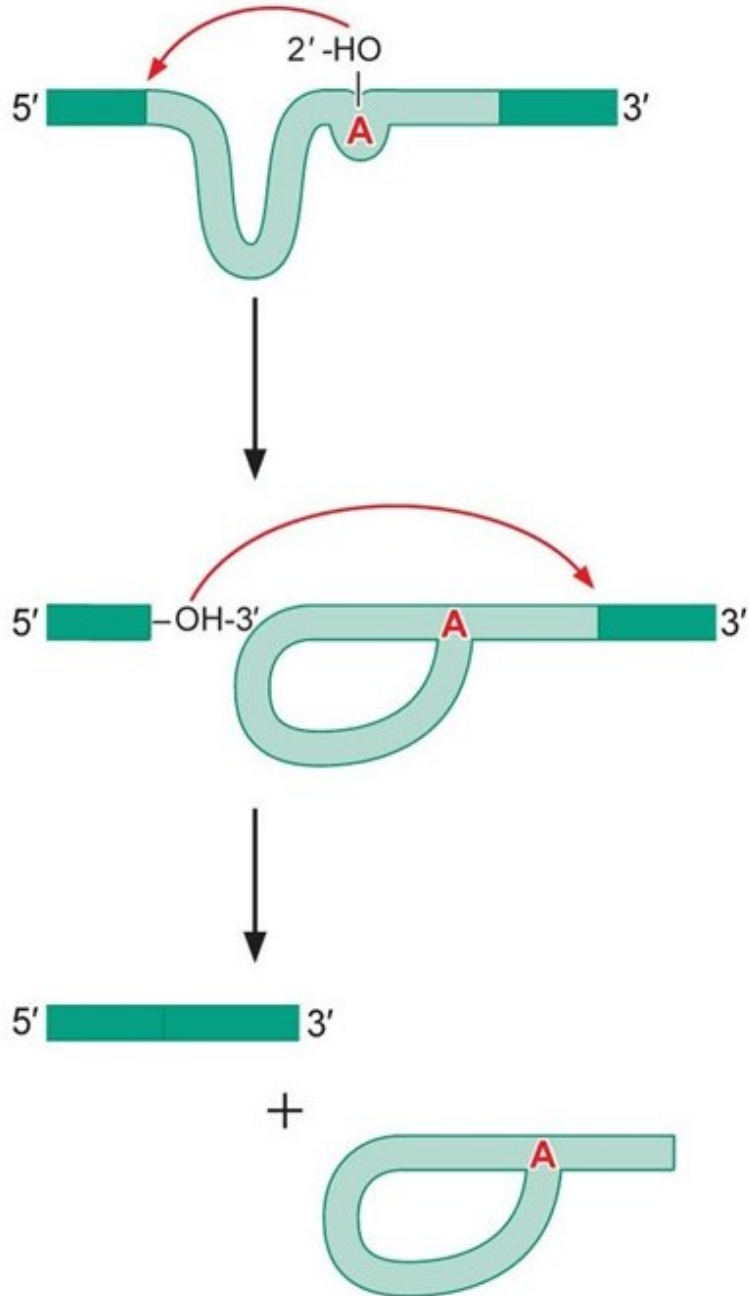
Στα ευκαρυωτικά κύτταρα έχουν παρατηρηθεί και άλλοι τρόποι συρραφής εκτός αυτού που περιλαμβάνει τη συγκρότηση του σωματίου συρραφής.

Πρόκειται για περιπτώσεις αυτοσυρραφής, όπου το εσώνιο αποκτά μια τέτοια στεροδιάταξη μέσα στο πρόδρομο RNA που καταλύει μόνο του την απομάκρυνσή του.

Τα αυτοσυρραφόμενα εσώνια ομαδοποιούνται σε δύο κατηγορίες με βάση τη δομή τους και τον μηχανισμό συρραφής.

Τάξη	Αφθονία	Μηχανισμός
Πυρηνικό πρόδρομο mRNA	Πολύ συνήθης. Χρησιμοποιείται για τα περισσότερα ευκαρυωτικά γονίδια	Δύο αντιδράσεις μετεστεροποίησης, σημείο διακλάδωσης A
Ιντρόνια Ομάδας II	Σπάνια. Ορισμένα ευκαρυωτικά γονίδια από οργανίδια και προκαρυώτες	Ίδιος όπως και στο πρόδρομο mRNA
Ιντρόνια Ομάδας I	Σπάνια. Πυρηνικά rRNA σε κάποιους ευκαρυώτες, γονίδια των οργανιδίων και μερικά προκαρυωτικά γονίδια	Δύο αντιδράσεις μετεστεροποίησης. Σημείο διακλάδωσης G

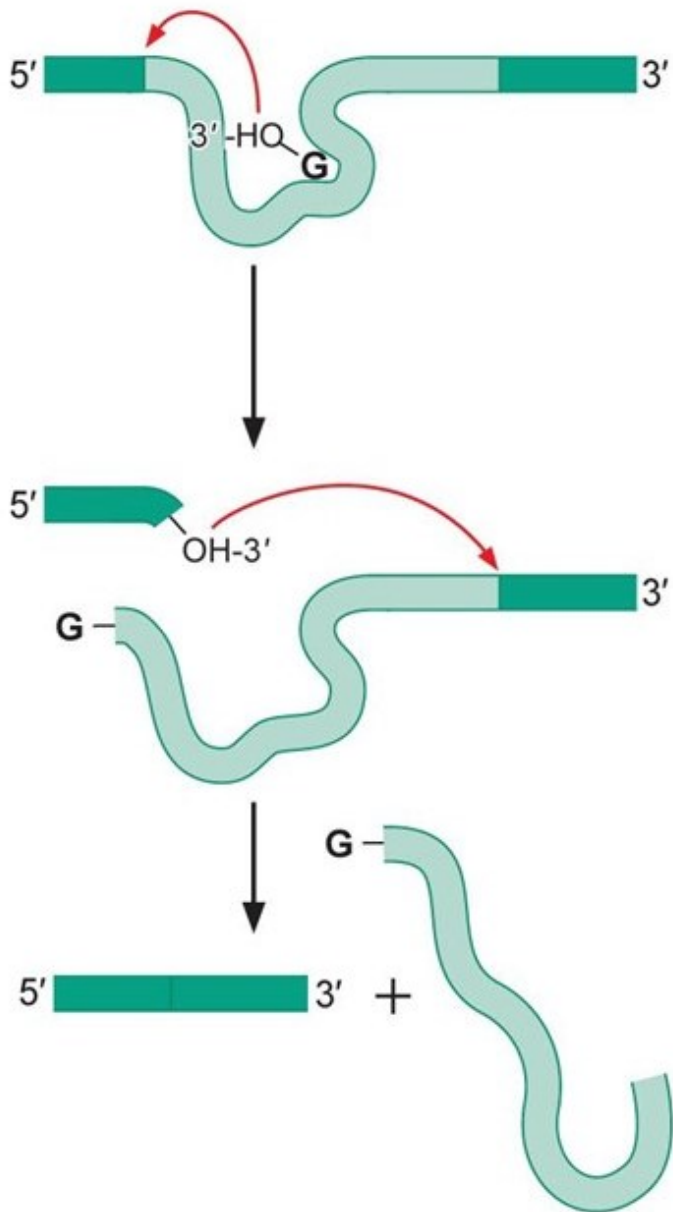
Αυτοσυρραφόμενα εσώνια ομάδας II



Η χημική αντίδραση της συρραφής καθώς και οι ενδιάμεσοι μεταβολίτες που παράγονται είναι ίδιοι με εκείνους των πυρηνικών πρόδρομων mRNA, χωρίς όμως να παίρνουν μέρος άλλα σύμπλοκα. Παρατηρείται σε μετάγραφα γονιδίων οργανιδίων.

Μια ιδιαίτερως αντιδρώσα αδερίνη εντός του εσωνίου εκκινεί τις αντιδράσεις μετεστεροποίησης με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του εσωνίου στην μορφή βρόχου.

Αυτοσυρραφόμενα εσώνια ομάδας I



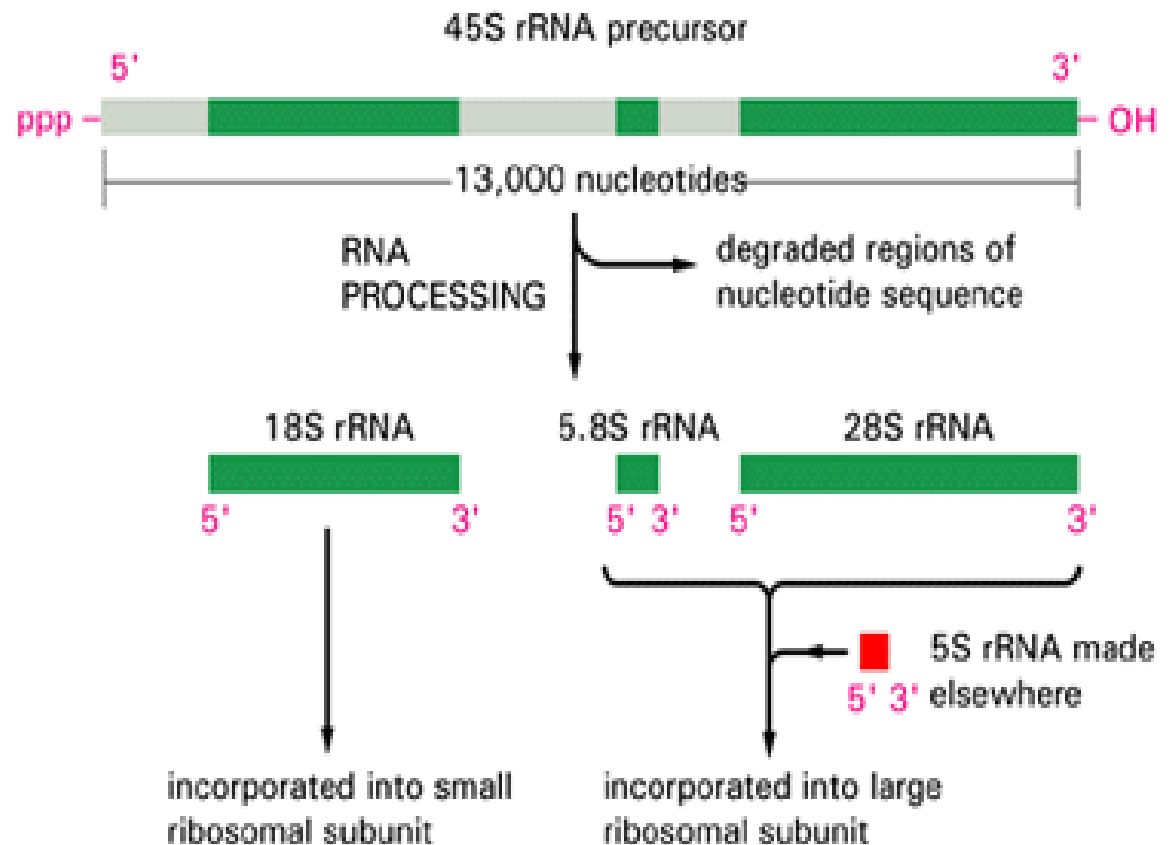
Τα εσώνια αυτής της ομάδας είναι μικρότερα από της ομάδας II, έχουν ένα θύλακα δέσμευσης ενός νουκλεοτιδίου G και έχουν βρεθεί σε ριβοσωμικά γονίδια κατώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών και σε γονίδια οργανιδίων.

Η 3'-OH της γουανοσίνης προσβάλλει το δεσμό στη θέση 5' συρραφής και προσδένεται ομοιοπολικά στο 5' άκρο του εσωνίου. Η δεύτερη αντίδραση μετεστεροποίησης συνδέει τα εξώνια και απελευθερώνει το εσώνιο σε γραμμική και όχι κυκλική μορφή.

Ωρίμανση των προδρόμων rRNA

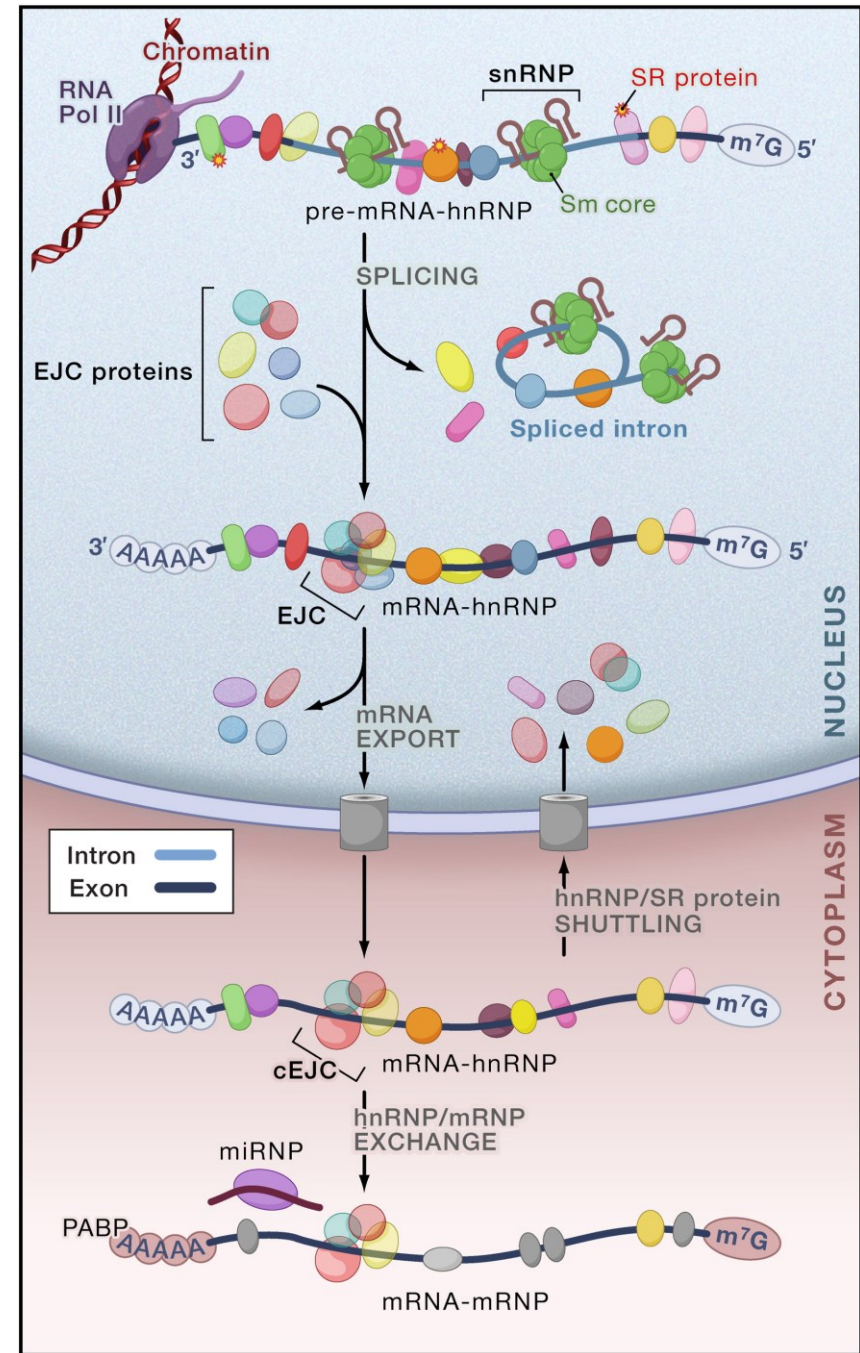
Συμμετέχουν μικρά RNA του πυρήνισκου (small nucleolar RNA-snoRNA)

Το αρχικό προϊόν της μεταγραφής συνδέεται με πρωτεΐνες σχηματίζοντας προ-ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα, και οι τομές που οδηγούν στο σχηματισμό των ώριμων rRNA γίνονται σε ειδικές αλληλουχίες και καταλύονται από σύμπλοκα πρωτεϊνών - snoRNA (snoRNP).

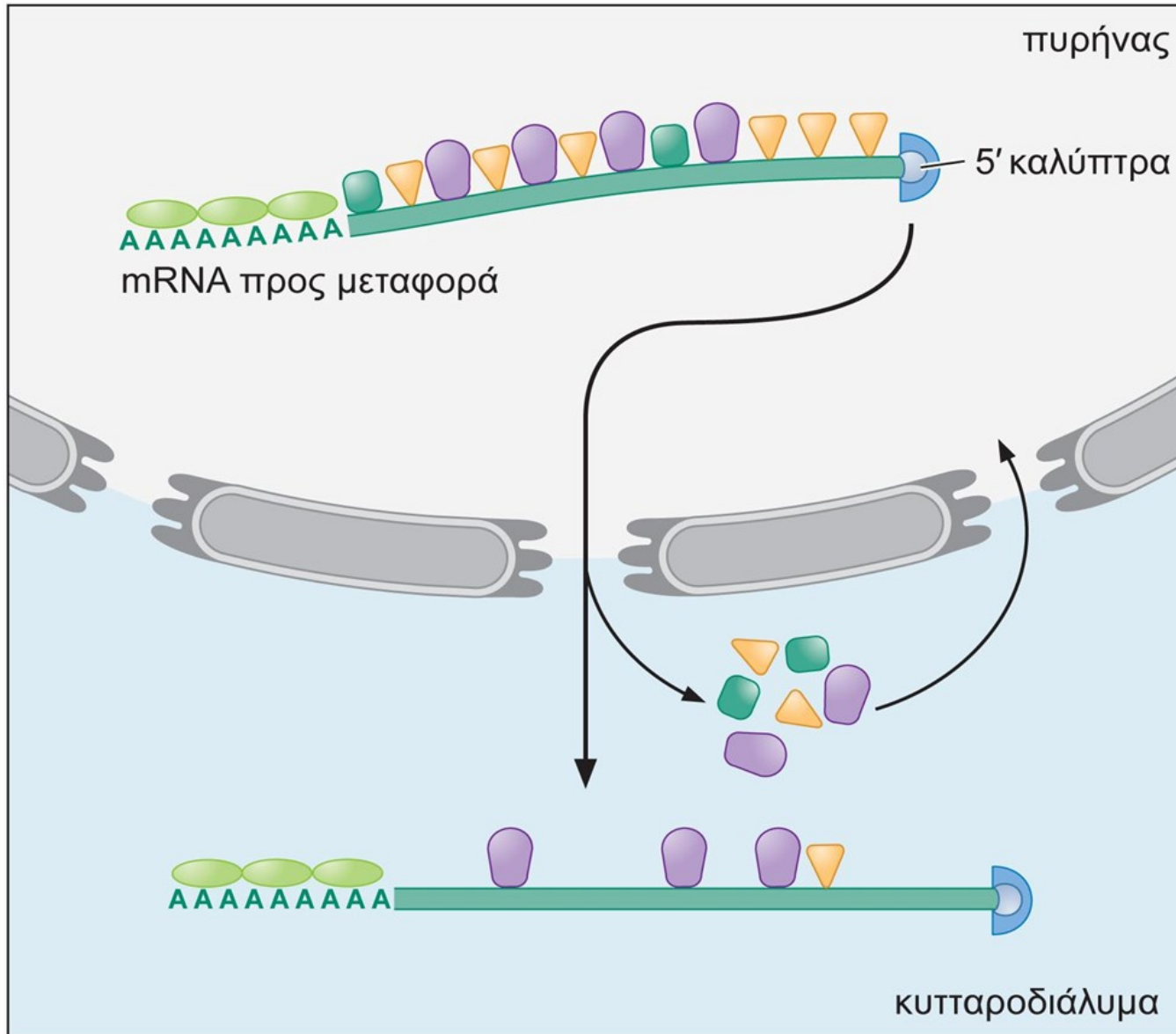


Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς

1. Ρύθμιση της μεταγραφής
(Transcriptional control)
2. Ρύθμιση της ωρίμανσης του RNA
(RNA processing control)
3. Ρύθμιση της μεταφοράς του RNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα
(Transport control)
4. Ρύθμιση της μετάφρασης του mRNA και της αποικοδόμησης του
(Translational control and mRNA degradation control)
5. Μετα-μεταφραστική ρύθμιση
(Posttranslational control)



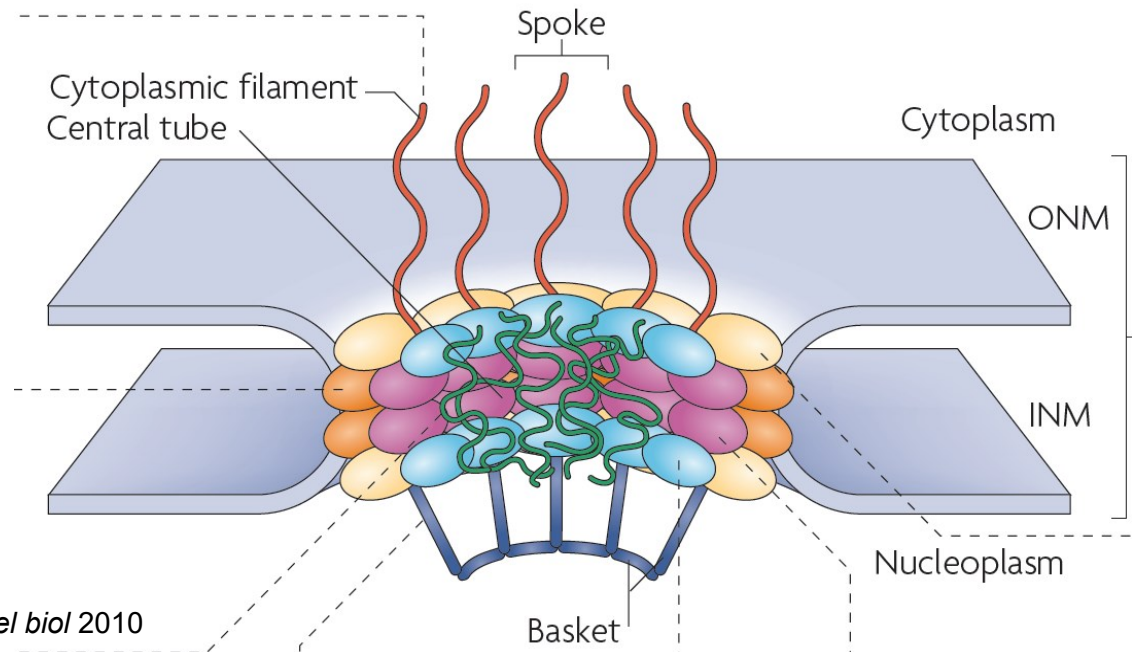
Μεταφορά mRNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα



Η εξαγωγή του RNA από τον πυρήνα είναι μια **ενεργός διαδικασία** και μόνο ορισμένα RNA επιλέγονται για μεταφορά. Για να επιλεγεί ένα RNA, και να διακριθεί από ένα άλλο που πρέπει να διατηρηθεί στον πυρήνα ή να καταστραφεί, πρέπει να έχει δεσμευμένα πάνω μια συλλογή πρωτεϊνικών συμπλόκων, όπως για παράδειγμα SR πρωτεΐνες.

Η εξαγωγή γίνεται μέσω του συμπλέγματος του πυρηνικού πόρου.

- Το σύμπλεγμα του πυρηνικού πόρου (NPC) αλληλεπιδρά με έναν μεγάλο αριθμό μορίων και δομών στο κυτταρόπλασμα και στο πυρηνόπλασμα μέσω κυτταροπλασματικών ινιδίων και μιας πυρηνικής δομής σαν «καλάθι». Αυτό επιτρέπει την εμπλοκή του NPC σε ένα μεγάλο πλήθος λειτουργιών.
- Για την μεταφορά των συμπλόκων RNA με πρωτεΐνες (RNPs) αλληλεπιδρά με μεγάλο αριθμό ελικασών και πρωτεϊνών «ελέγχου» της αρτιότητας των RNP συμπλόκων.
- Συνεπώς, η μεταφορά κάθε RNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα ελέγχεται και πραγματοποιείται με ρυθμιζόμενη ταχύτητα.



Ο κεντρικός ρόλος μη κωδικών RNAs (ncRNAs) στους μηχανισμούς ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης

ncRNAs

miRNAs, siRNAs

~18-25 nt

Συμμετέχουν στην μετα-μεταγραφική καταστολή (silencing) και στην παρεμβολή μέσω RNA (RNAi – RNA interference)

Small RNAs (snoRNAs, smRNAs, piRNAs κ.α.)

~20-300 nt

Τροποποίηση RNA-στόχων, Σύνθεση τελομερών, τροποποίηση χρωματίνης, δομικός ρόλος, γαμετογένεση

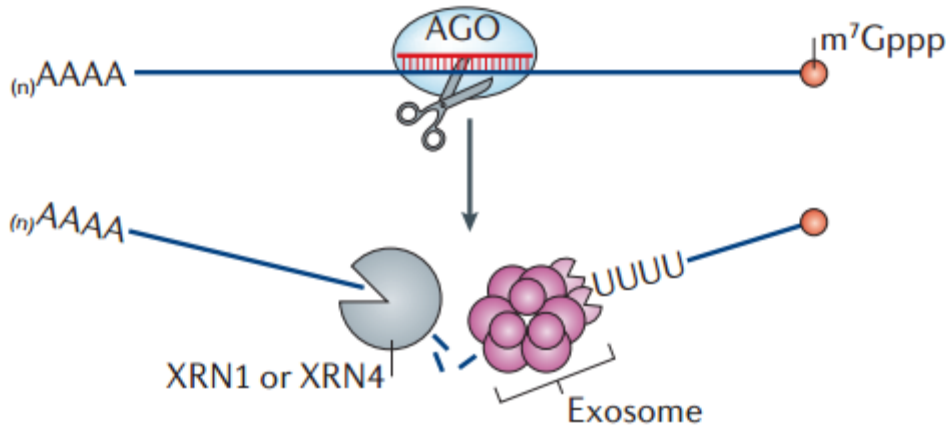
Long ncRNAs

~300-1000 nts

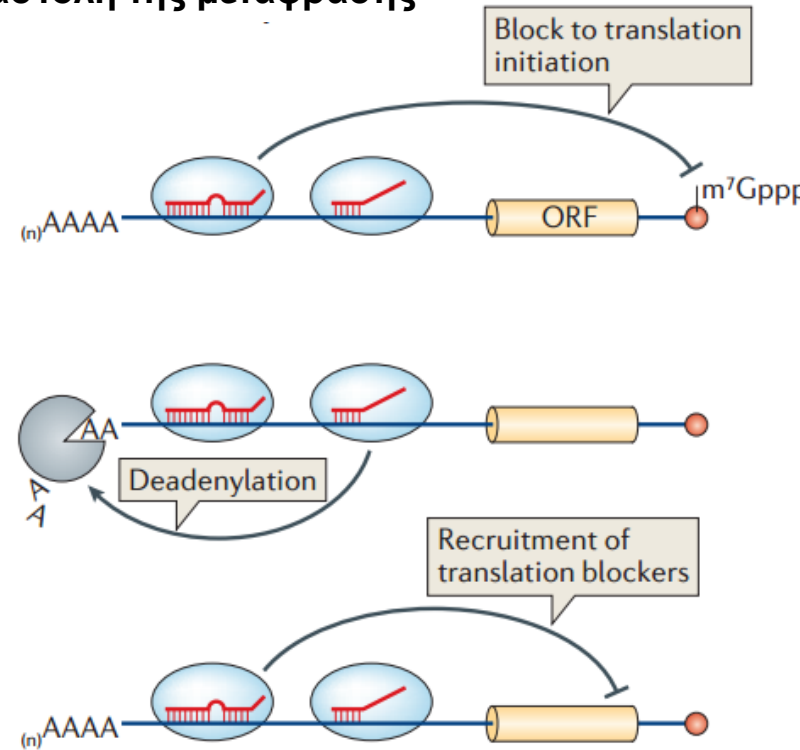
Γενετικό εντύπωμα, αδρανοποίηση X χρωμοσώματος, μεταγραφή, σύνθεση άλλων μη κωδικών RNAs, ρύθμιση επιπέδων ncRNAs.

Κύριοι μηχανισμοί δράσης των siRNAs και miRNAs επί των mRNA

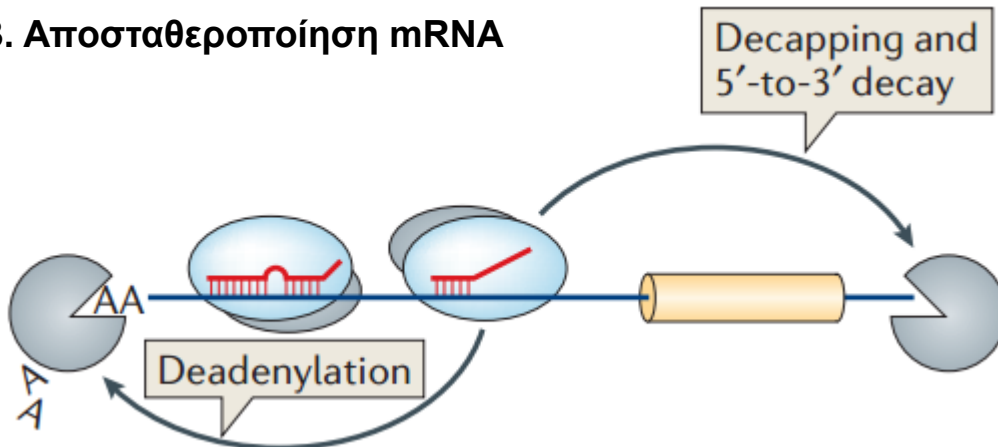
A. Ενδονουκλεολυτική αποικοδόμηση



B. Καταστολή της μετάφρασης



B. Αποσταθεροποίηση mRNA



Η αποικοδόμηση του RNA

- Όλα τα μόρια RNA τελικά αποικοδομούνται, τα συστατικά τους ανακυκλώνονται και η ενδοκυτταρική συγκέντρωση κάθε RNA καθορίζεται από το ισοζύγιο μεταξύ του ρυθμού σύνθεσης και του ρυθμού αποικοδόμησης.
- Τα ριβοσωμικά και τα μεταφορικά RNAs είναι τα περισσότερο σταθερά. Αντίθετα, τα mRNAs αποικοδομούνται με διαφορετικό ρυθμό, ο χρόνος ημιζωής τους κυμαίνεται από μερικά λεπτά μέχρι περίπου 20 ώρες.
- Η αποικοδόμηση των mRNAs συνήθως πραγματοποιείται με σταδιακή αφαίρεση της poly(A) ουράς και κατόπιν με την δράση εξωνουκλεασών που αποικοδομούν το mRNA είτε από το 5' είτε από το 3' άκρο.
- Τα mRNAs με μικρό χρόνο ημιζωής περιέχουν συχνά αλληλουχίες πλούσιες σε AU στο 3' άκρο, στρατολογούν συγκεκριμένες πρωτεΐνες και εμφανίζονται ιδιαίτερα ευάλωτα στην δράση των ριβονουκλεασών.
- Τα κύτταρα διαθέτουν και συστήματα «ελέγχου ποιότητας» τα οποία εντοπίζουν και αποικοδομούν ελαττωματικά RNAs.

Βιβλιογραφία

- Μοριακή βιολογία του γονιδίου, Watson, Baker, Bell, Gann, Levine, Losick, 7^η έκδοση, Εκδόσεις Utopia
- 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
- Επιστημονικά άρθρα, ανασκοπήσεις όπως αναφέρονται στις διαφάνειες.