




# ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

Μάθημα 10<sup>ο</sup>



# Ευκαρυωτική μεταγραφή Συρραφή και επεξεργασία του RNA

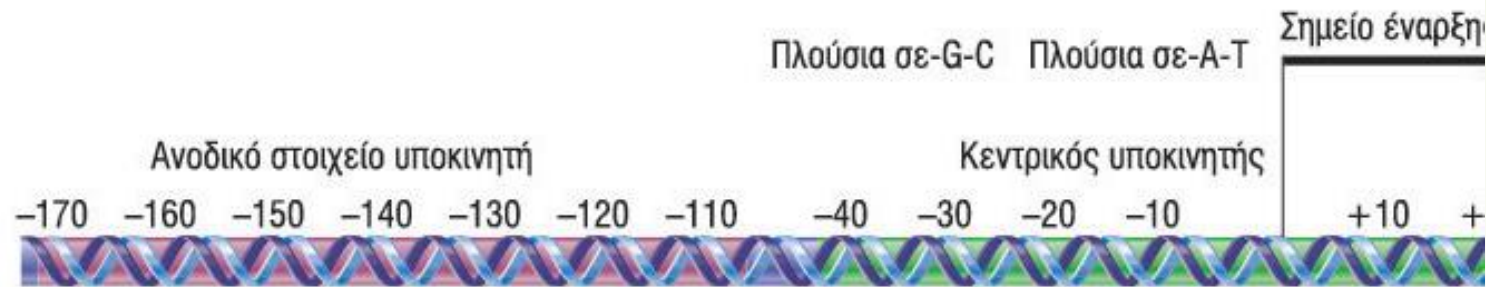
# Ευκαρυωτική μεταγραφή και επεξεργασία RNA

- ✓ RNA πολυμεράσες I, II και III στους ευκαρυώτες
- ✓ Core υποκινητή, pre-initiation complex και έναρξη μεταγραφής
- ✓ Splicing, 5' capping, 3' cleavage και poly(A) tail
- ✓ Συντονισμός μεταγραφής και co-transcriptional RNA processing

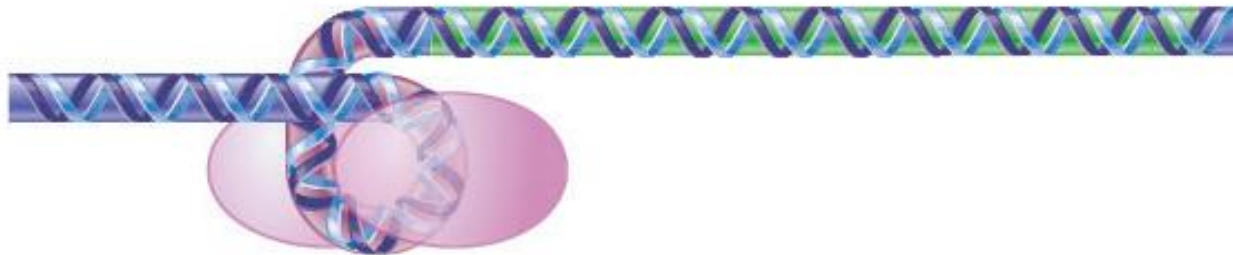
## Οι τρεις πυρηνικές RNA πολυμεράσες

- ✓ Pol I: κυρίως μεγάλο πρόδρομο rRNA στον πυρηνίσκο
- ✓ Pol II: mRNA, πολλά snRNA, miRNA και lncRNA
- ✓ Pol III: tRNA, 5S rRNA και άλλα μικρά RNA
- ✓ Κάθε πολυμεράση χρησιμοποιεί διαφορετικούς παράγοντες έναρξης

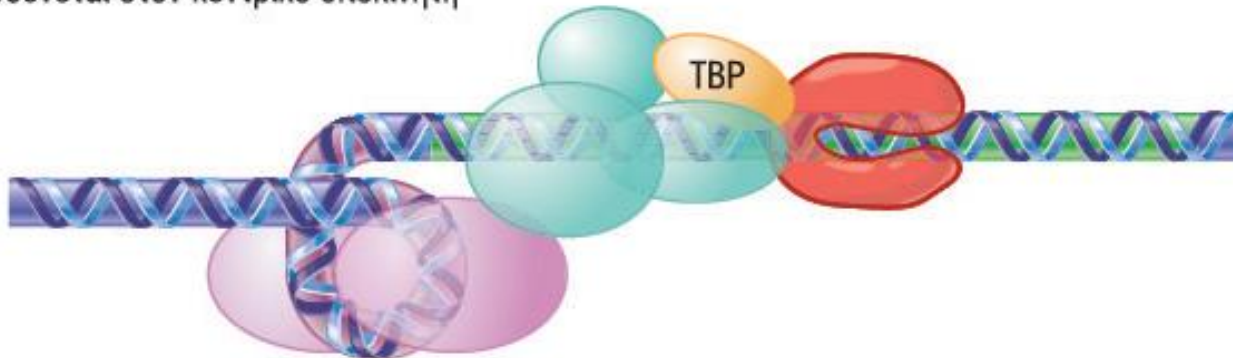
# RNA Πολυμεράση I



Ο UBF προσδένεται στο ανοδικό στοιχείο του υποκινητή



Το ολοένζυμο της RNA πολυμεράσης I περιλαμβάνει τον κεντρικό παράγοντα πρόσδεσης (SL1) που προσδένεται στον κεντρικό υποκινητή



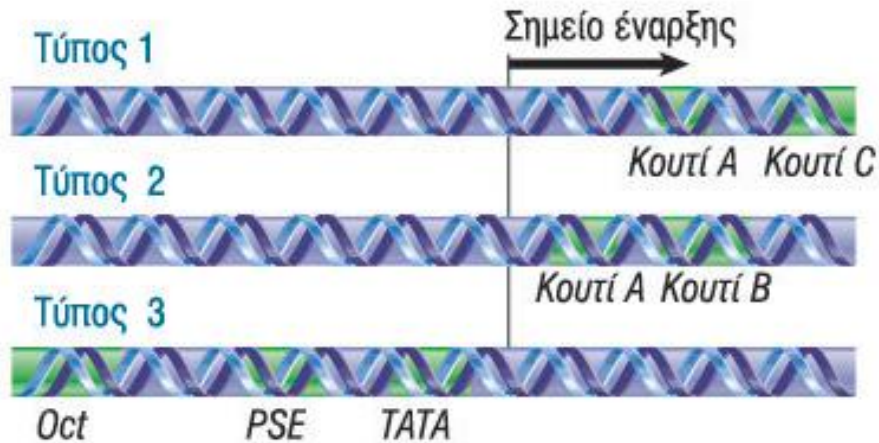
- ✓ Ο υποκινητής της RNA πολυμεράσης I αποτελείται από έναν κεντρικό υποκινητή και έναν **UPE**.
- ✓ Ο UBF1 είναι ένας δομικός μεταγραφικός παράγοντας που περιλίσει το DNA για να φέρει τον κεντρικό υποκινητή κοντά στο **UPE**.
- ✓ Ο SL1 περιλαμβάνει τον παράγοντα TBP που εμπλέκεται στην έναρξη και από τις τρεις RNA πολυμεράσες.
- ✓ Η RNA πολυμεράση I προσδένεται στον TIF-1A, με αποτέλεσμα να γεφυρώνει την πολυμεράση με τον SL1 στον κεντρικό υποκινητή.



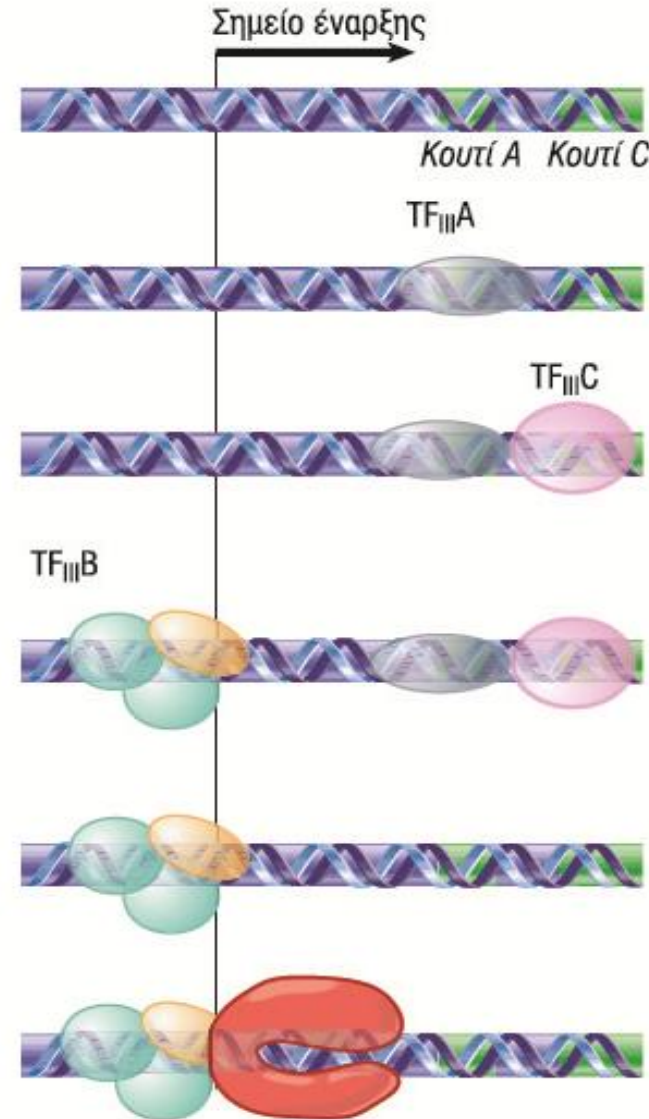
## RNA Πολυμεράση III

- ✓ Μεταγράφει tRNA και 5S rRNA
- ✓ Παράγει επίσης ορισμένα άλλα μικρά RNA
- ✓ Έχει εξειδικευμένους παράγοντες έναρξης
- ✓ Συνδέεται με υψηλή απόδοση σε μικρά γονίδια

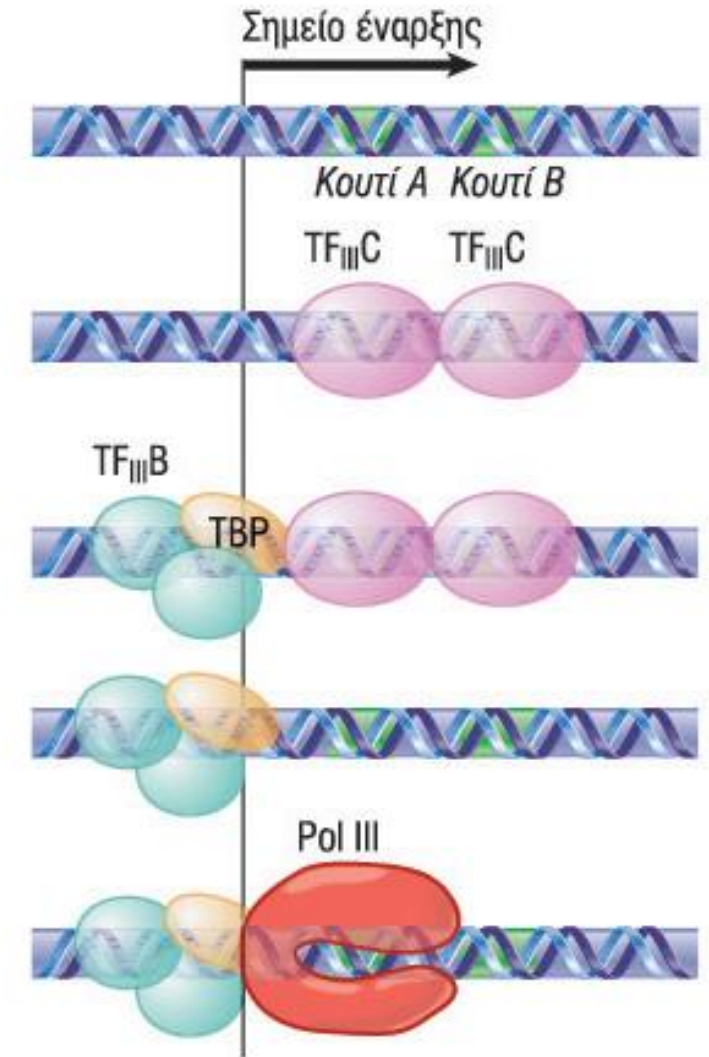
# Υποκινητές RNA Πολυμεράση III



## Τύπου I



## Τύπου II



## RNA Πολυμεράση II

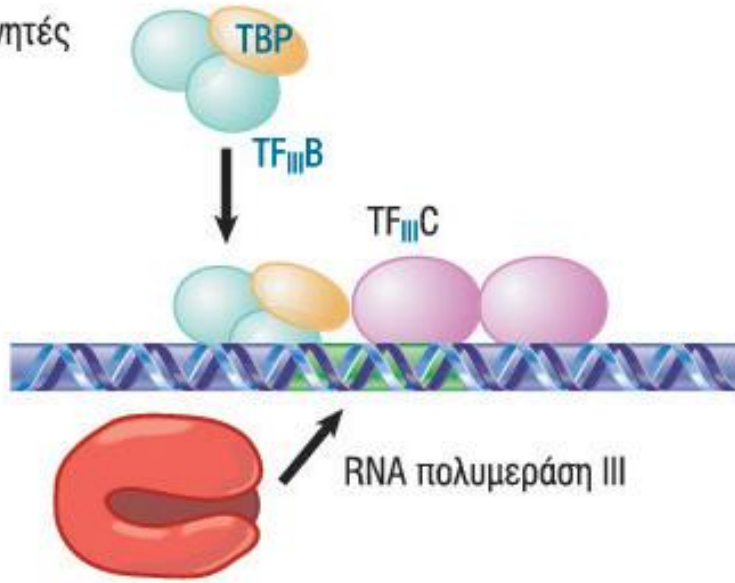
- ✓ Μεταγράφει τα περισσότερα γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες
- ✓ Παράγει pre-mRNA που απαιτεί εκτεταμένη επεξεργασία
- ✓ Φέρει το χαρακτηριστικό CTD στην υπομονάδα RPB1
- ✓ Συνδέει τη μεταγραφή με capping, splicing και 3' processing

## Υποκινητές RNA Πολυμεράση II

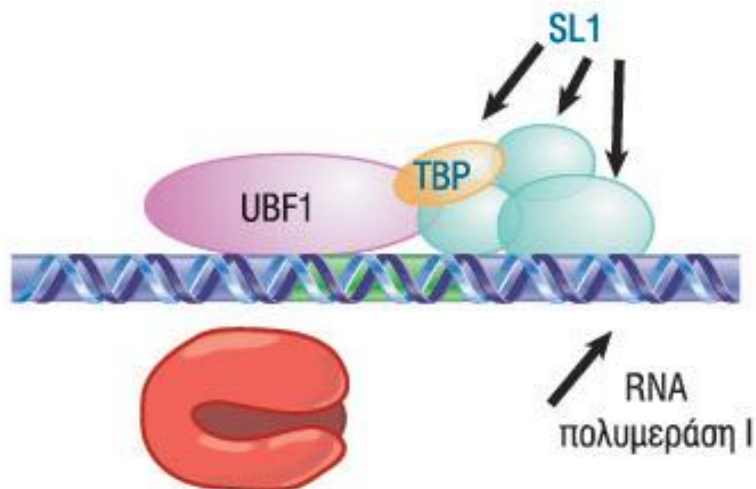


Οι RNA πολυμεράσες τοποθετούνται στους υποκινητές από έναν παράγοντα που περιέχει TBP.

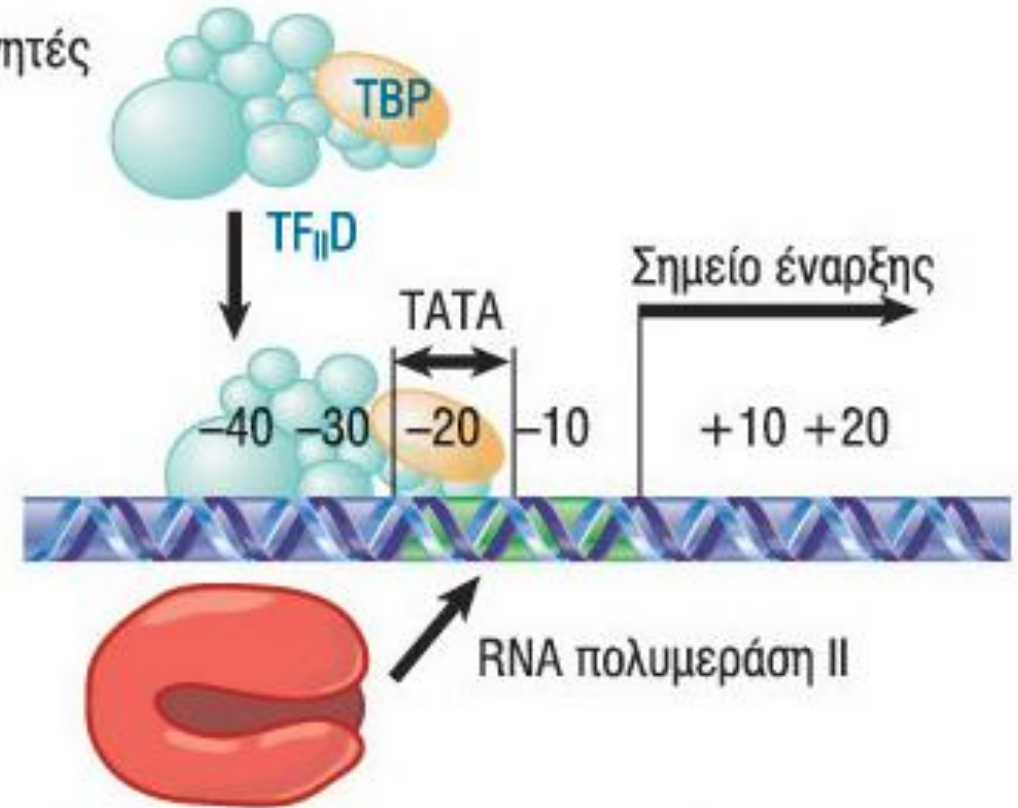
Pol III υποκινητές



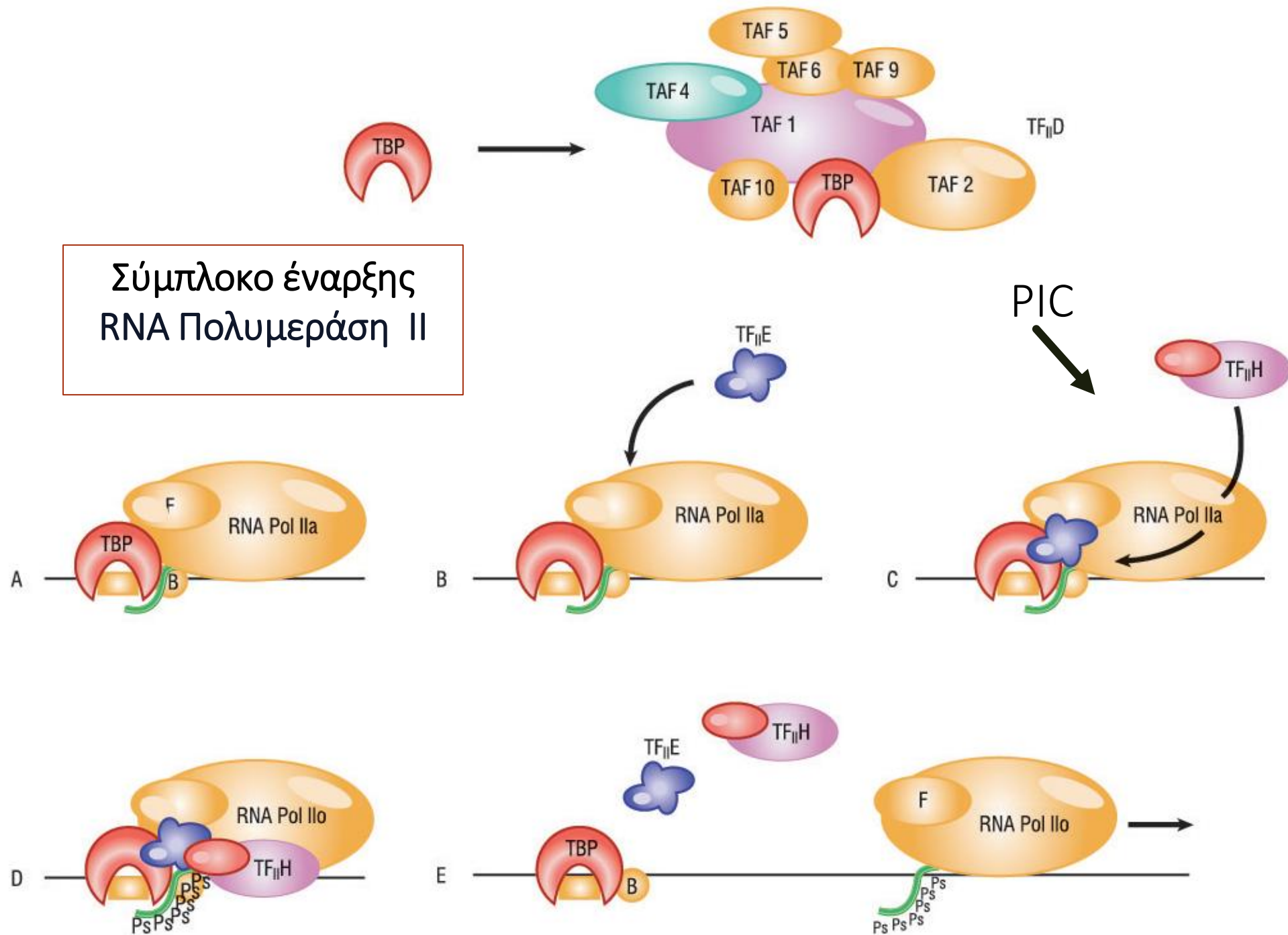
Pol I υποκινητές



Pol II υποκινητές



Σύμπλοκο έναρξης  
RNA Πολυμεράση II



## Συγκριτική εικόνα Pol I, II και III

- Κοινός εξελικτικός πυρήνας, αλλά διαφορετική εξειδίκευση
- Η Pol II έχει μοναδικό ρόλο στη γονιδιακή ρύθμιση
- Η Pol I εστιάζει σε rRNA, η Pol III σε tRNA/5S rRNA
- Οι μηχανισμοί έναρξης διαφέρουν παρά τις δομικές ομοιότητες

## Υποκινητής- Core υποκινητή

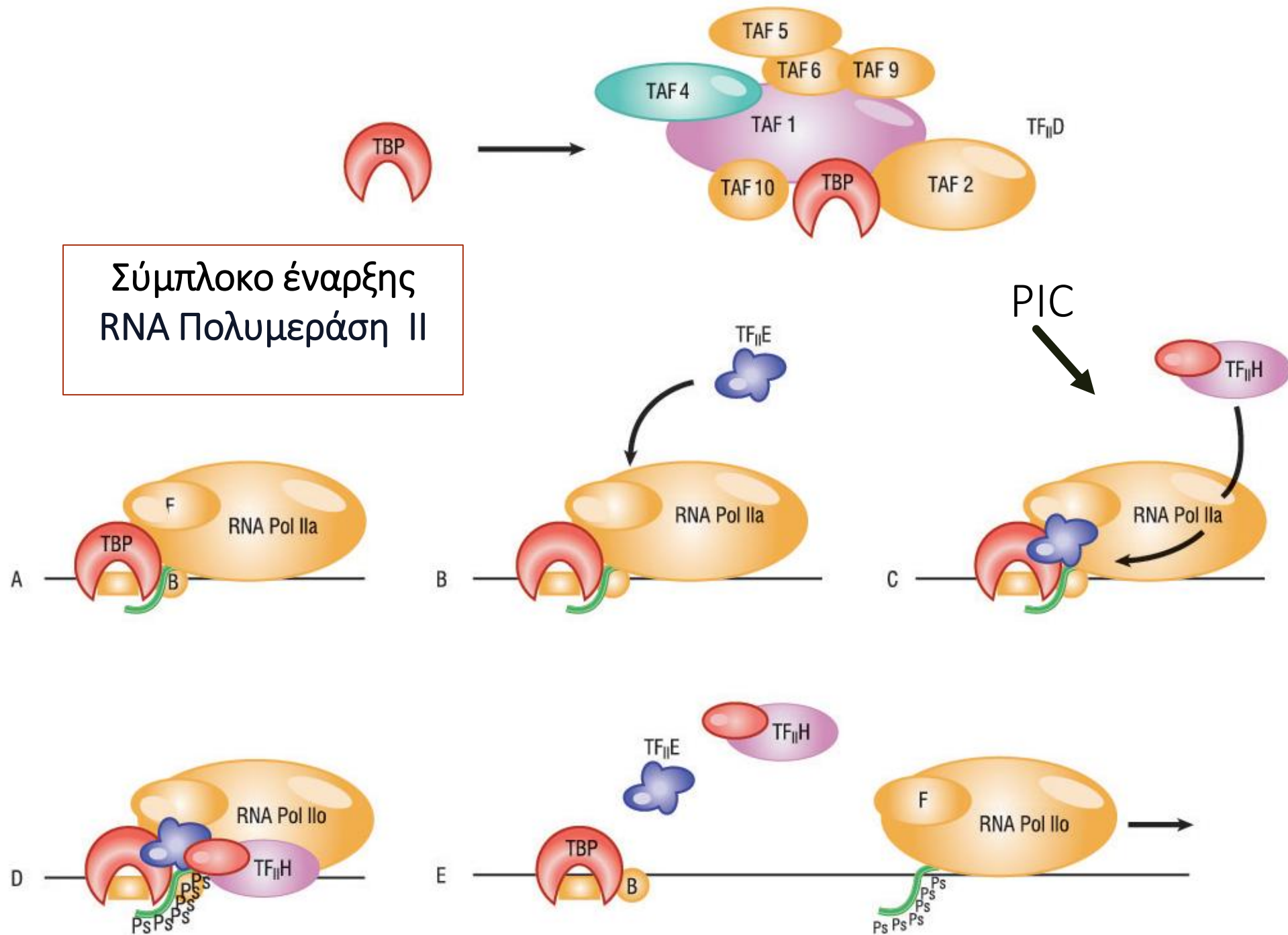
- ✓ Μικρή περιοχή γύρω από το σημείο έναρξης μεταγραφής
- ✓ Καθορίζει πού συναρμολογείται το pre-initiation complex
- ✓ Ενσωματώνει πληροφορία για την έναρξη της μεταγραφής
- ✓ Δεν είναι ίδιος σε όλα τα γονίδια



## Συναρμολόγηση του pre-initiation complex

- ✓ TFIIID προσδένεται πρώτο στον υποκινητή
- ✓ Ακολουθούν TFIIA και TFIIIB
- ✓ Προστίθεται η Pol II μαζί με TFIIIF
- ✓ Προστίθενται TFIIIE και TFIIH για πλήρες PIC

Σύμπλοκο έναρξης  
RNA Πολυμεράση II



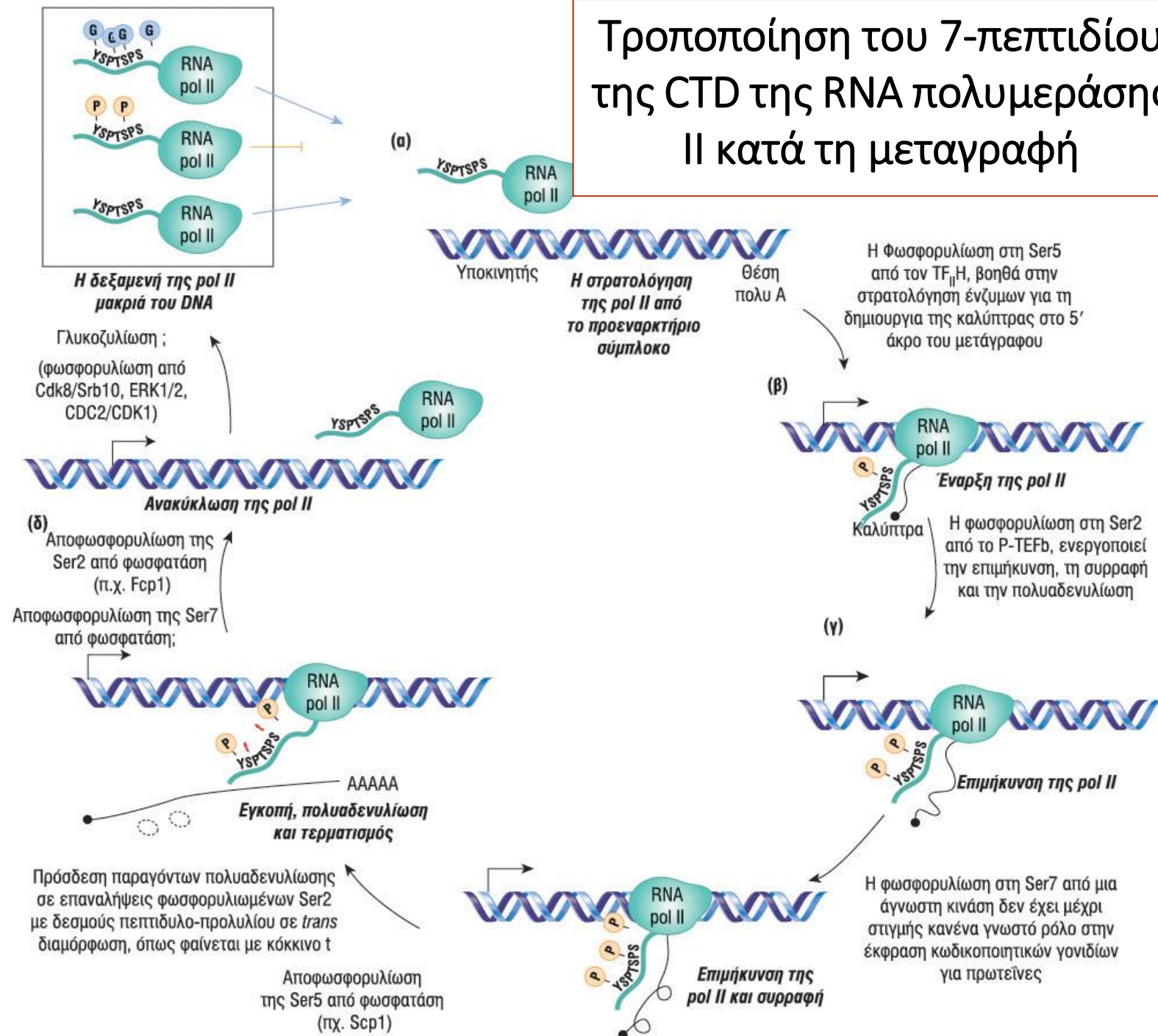
## TFIIH και melting υποκινητή

- ✓ Το TFIIH έχει δραστηριότητα ελικάσης-εξαρτώμενης από ATP
- ✓ Ανοίγει το DNA στο σημείο έναρξης
- ✓ Δημιουργεί μεταγραφική φούσκα- transcription bubble
- ✓ Συμβάλλει και στη φωσφορυλίωση του CTD

## CTD Κύκλος φωσφορυλίωσης

- ✓ Μη φωσφορυλιωμένο CTD στην αρχική πρόσληψη της Pol II
- ✓ Φωσφορυλίωση Ser5 κοντά στην έναρξη
- ✓ Φωσφορυλίωση Ser2 κατά την επιμήκυνση και εμπλέκεται στην απελευθέρωση από την αναμονή
- ✓ Διαφορετικά μοτίβα φωσφορυλίωσης στρατολογούν διαφορετικούς παράγοντες
- ✓ Η CTD συντονίζει τη μεταγραφή με την επεξεργασία και την εξαγωγή του RNA από τον πυρήνα.

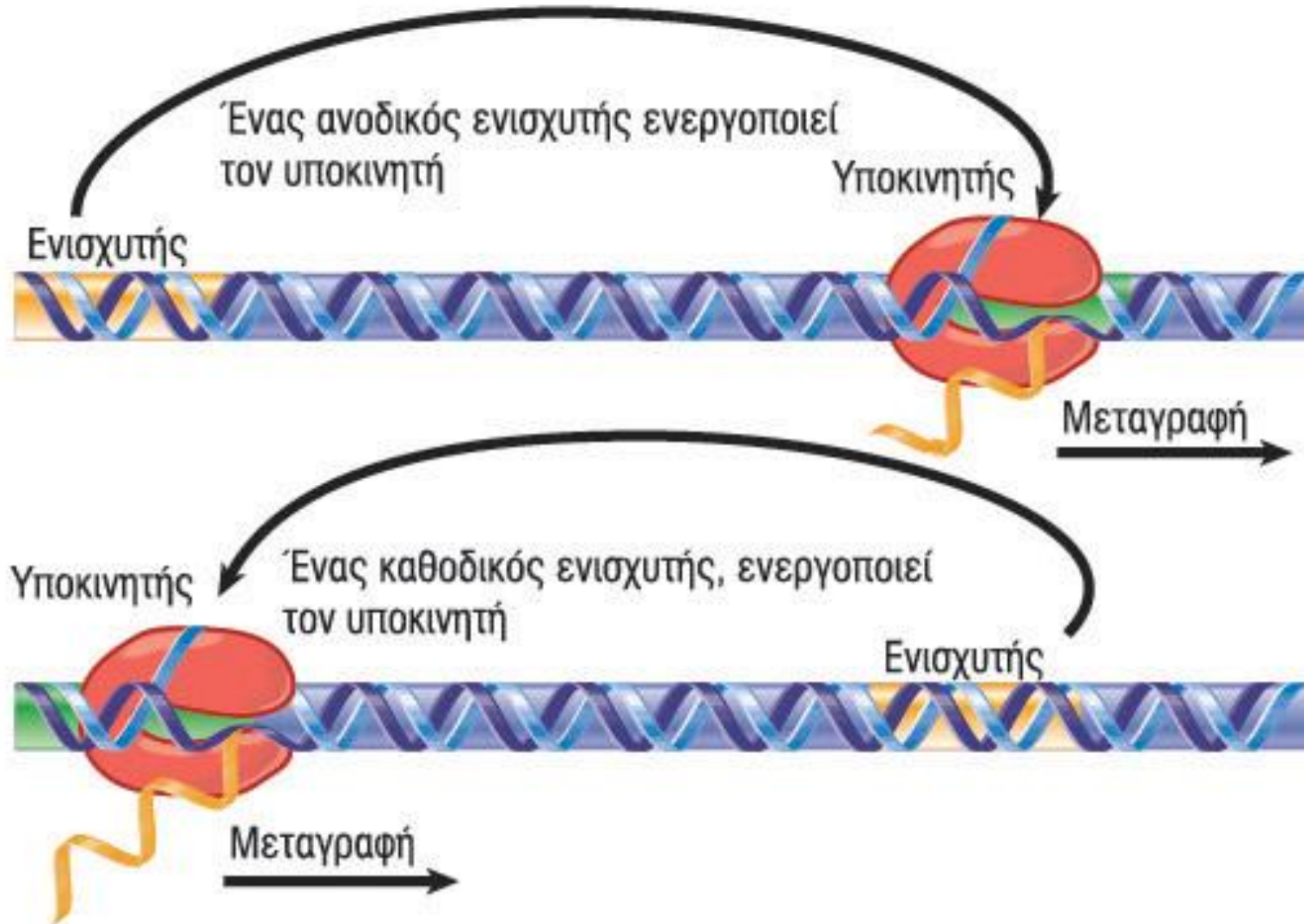
# Τροποποίηση του 7-πεπτιδίου της CTD της RNA πολυμεράσης II κατά τη μεταγραφή



## Ενεργοποιητές, ενισχυτές και Mediator

- ✓ Οι Ενεργοποιητές προσδένονται σε απομακρυσμένα ρυθμιστικά στοιχεία και έχουν τρεις γενικούς τρόπους δράσης
- ✓ Ο Mediator μεταφέρει το σήμα στο PIC
- ✓ Ενισχύεται η στρατολόγηση ή ενεργοποίηση της Pol II
- ✓ Συνδέεται η τρισδιάστατη οργάνωση της χρωματίνης με τη μεταγραφή

# Ενεργοποιητές, ενισχυτές και Mediator



## Συγκριτικός πίνακας προς απομνημόνευση

- ✓ Pol I → rRNA → πυρηνίσκος
- ✓ Pol II → pre-mRNA και πολλά ρυθμιστικά RNA → CTD
- ✓ Pol III → tRNA και 5S rRNA → μικρά λειτουργικά RNA
- ✓ Διαφορετικά γονίδια-στόχοι, διαφορετικοί παράγοντες έναρξης

# Συντονισμός capping, συρραφής και poly(A) ουράς από την RNA πολυμεράση II

Στάδιο μεταγραφής	Κατάσταση του CTD	Συνδεδεμένη διεργασία	Κύριοι παράγοντες	Λειτουργικό αποτέλεσμα
Έναρξη / πρώιμη έναρξη	Αύξηση της Ser5 phosphorylation	5' capping	RNA triphosphatase, guanylyltransferase, methyltransferase	Προστασία του 5' άκρου και αναγνώριση από πρωτεΐνες δέσμευσης cap
Πρώιμη επιμήκυνση	Υψηλό Ser5P και αρχική μεταβολή του προφίλ φωσφορυλίωσης	Πρώιμη στρατολόγηση παραγόντων συρραφής	Cap-binding complex και splice-related adaptors	Διευκολύνεται η αναγνώριση του νεοσυντιθέμενου pre-mRNA
Παρατεταμένη επιμήκυνση	Αύξηση της Ser2 phosphorylation	Συν-μεταγραφική συρραφή	snRNPs, SR proteins, spliceosome components	Τα introns αναγνωρίζονται και αφαιρούνται ενώ συνεχίζεται η μεταγραφή
Προσέγγιση της 3' περιοχής	Κυριαρχία Ser2P	Συναρμολόγηση συμπλόκου 3' end processing	CPSF, CstF, CFIm, CFIIIm, PAP	Αναγνώριση του AAUAAA και προετοιμασία για cleavage
Μετά την κοπή	Το CTD παραμένει πλατφόρμα για τελικές αλληλεπιδράσεις	Polyadenylation και σύζευξη με termination	Poly(A) πολυμεράση, PABP-related factors, Xrn2 pathway	Σχηματισμός σταθερού ώριμου 3' άκρου και αποδέσμευση της Pol II

## Ανακεφαλαίωση

- ✓ Οι Pol I, II και III είναι συγγενείς αλλά λειτουργικά εξειδικευμένες
- ✓ Η Pol II ξεχωρίζει λόγω του CTD και του coupling με RNA processing
- ✓ Το pre-mRNA ωριμάζει με capping, splicing και polyadenylation
- ✓ Η μεταγραφή και η επεξεργασία RNA αποτελούν ενιαίο λειτουργικό σύστημα

## Κλινική και βιολογική σημασία

- ✓ Σφάλματα στην αναγνώριση του υποκινητή επηρεάζουν τη μεταγραφή
- ✓ Διαταραχές στο splicing οδηγούν σε νόσο- παράδειγμα η Νωτιαία μυϊκή ατροφία (SMA)
- ✓ Η απορρύθμιση του CTD coupling επηρεάζει γονιδιακή έκφραση

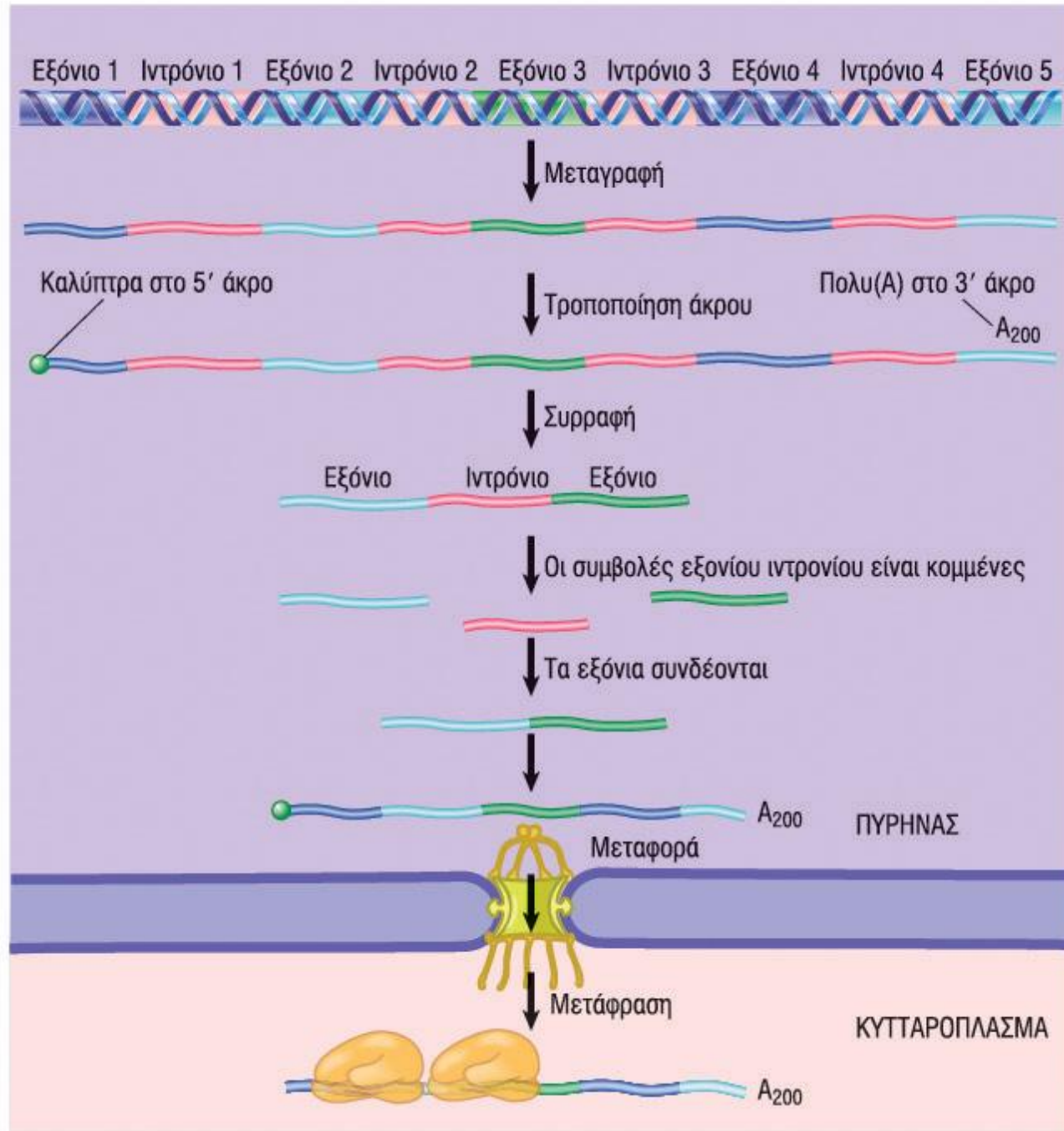
## Τι είναι το pre-mRNA

- ✓ Περιέχει εξόνια και ιντρόνια
- ✓ Φέρει 5' και 3' αμετάφραστες περιοχές
- ✓ Υφίσταται επεξεργασία στον πυρήνα
- ✓ Αποτελεί πρόδρομο του ώριμου mRNA

## Ορισμός του splicing

- ✓ Απομάκρυνση ιντρονίων από το pre-mRNA
- ✓ Ένωση γειτονικών εξονίων
- ✓ Δημιουργία συνεχούς ώριμης αλληλουχίας
- ✓ Απαραίτητο για σωστή γονιδιακή έκφραση

Το RNA τροποποιείται στον πυρήνα με προσθήκες στα 5' και 3' άκρα και με συρραφή για την αφαίρεση των ιντρονίων.





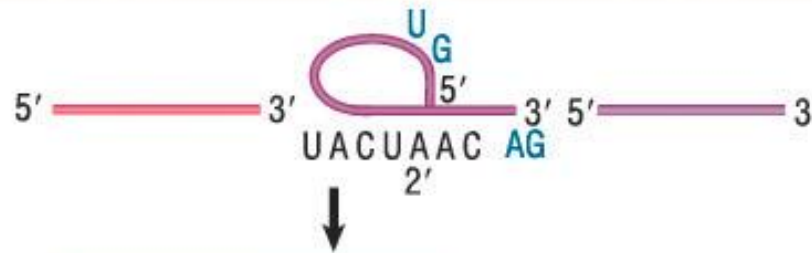
Py<sub>80</sub> N Py<sub>80</sub> Py<sub>87</sub> Pu<sub>75</sub> A Py<sub>95</sub>

Συναινετική αλληλουχία στα ζώα

Τομή στη θέση 5' και σχηματισμός δομής θηλιάς με δεσμό 5'-2' που συνδέει το 5'-G του ιντρονίου με το 2' της A στη θέση διακλάδωσης



Τομή στη θέση 3' και σύνδεση εξόντων. Το ιντρόνιο απελευθερώνεται ως δομή θηλιάς



Αποδιακλάδωση ιντρονίου



Η πυρηνική συρραφή συμβαίνει σε δύο αντιδράσεις μετεστεροποίησης, στις οποίες μια ομάδα -OH προσβάλλει έναν φωσφοδιεστερικό δεσμό.

## Συναρμολόγηση του spliceosome

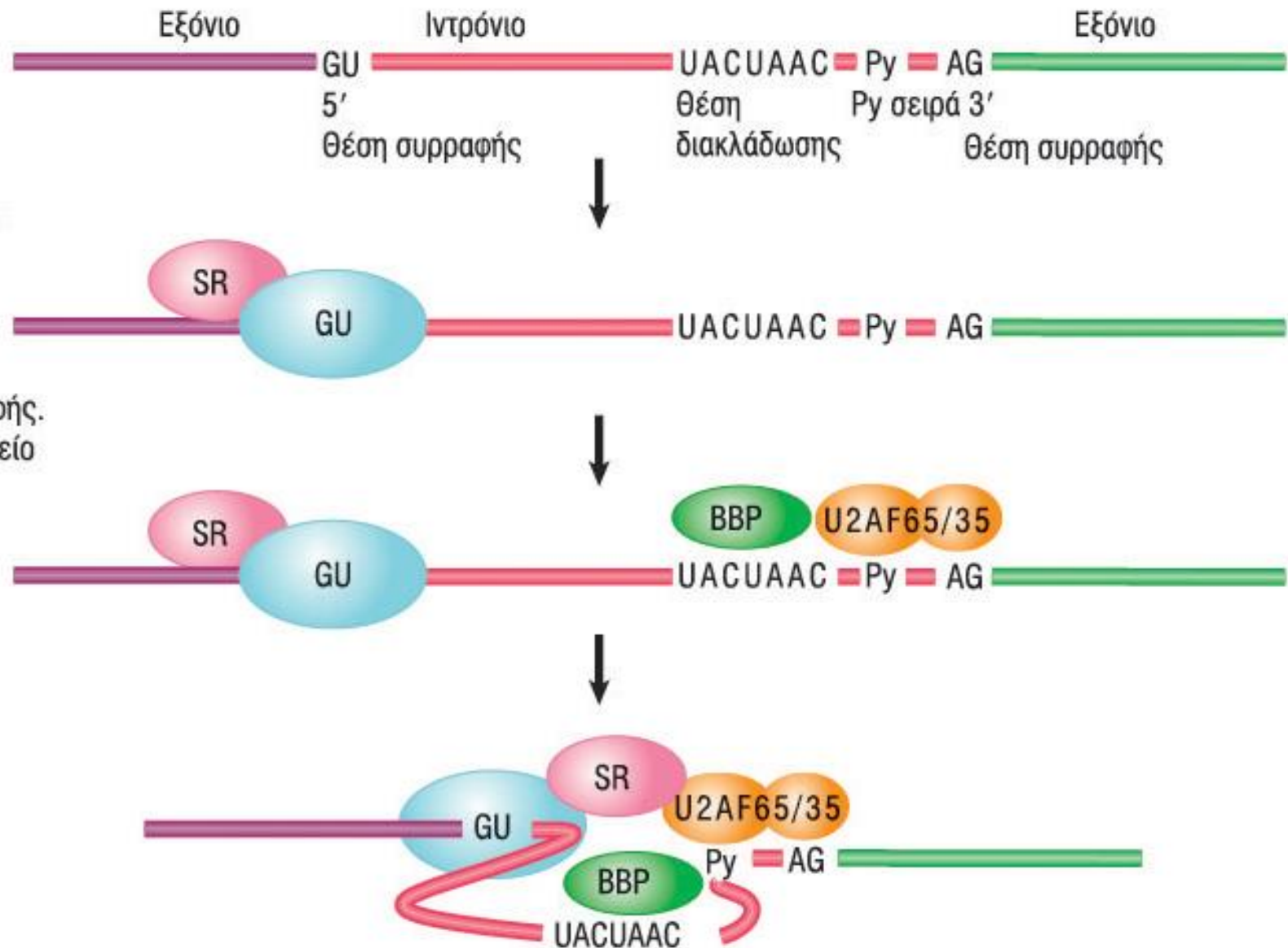
- ✓ Το U1 αναγνωρίζει το 5' splice site
- ✓ Το U2 αναγνωρίζει το branch point
- ✓ Το tri-snRNP U4/U6.U5 προστίθεται αργότερα
- ✓ Οι αναδιατάξεις οδηγούν σε ενεργό καταλυτικό σύμπλοκο

# Σύμπλοκο δέσμησης E

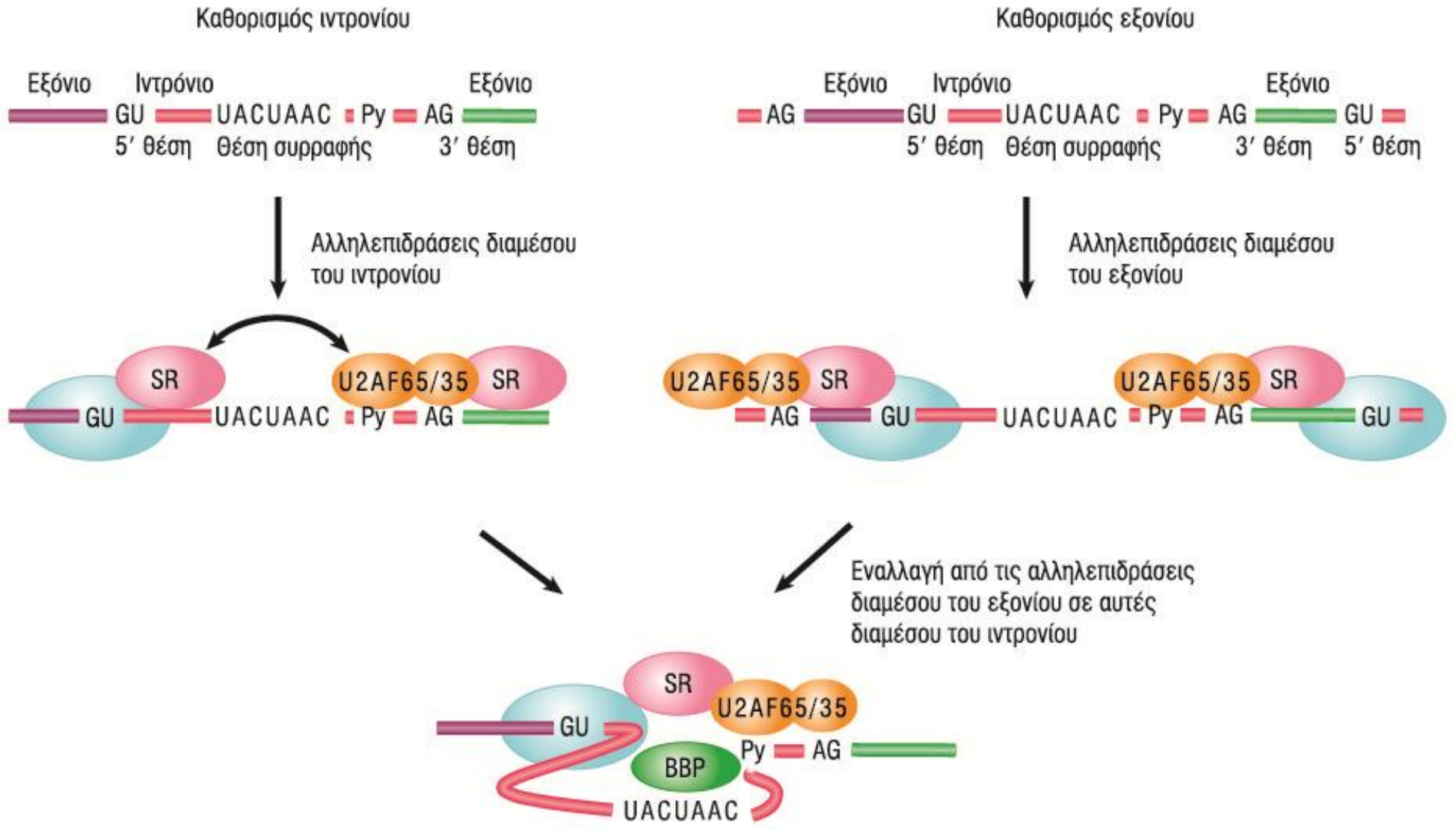
Οι πρωτεΐνες U1 και SR καθορίζουν την 5' θέση συρραφής

Το U2Af προσδένει σε μια σειρά πυριμιδινών και τη 3' θέση συρραφής. Η πρωτεΐνη που προσδένει το σημείο διακλάδωσης αναγνωρίζει τη θέση διακλάδωσης

Οι πρωτεΐνες SR γεφυρώνουν τα σύμπλοκα στις 5' και 3' θέσεις συρραφής για να διαμορφώσουν την δέσμηση του συμπλόκου (E)



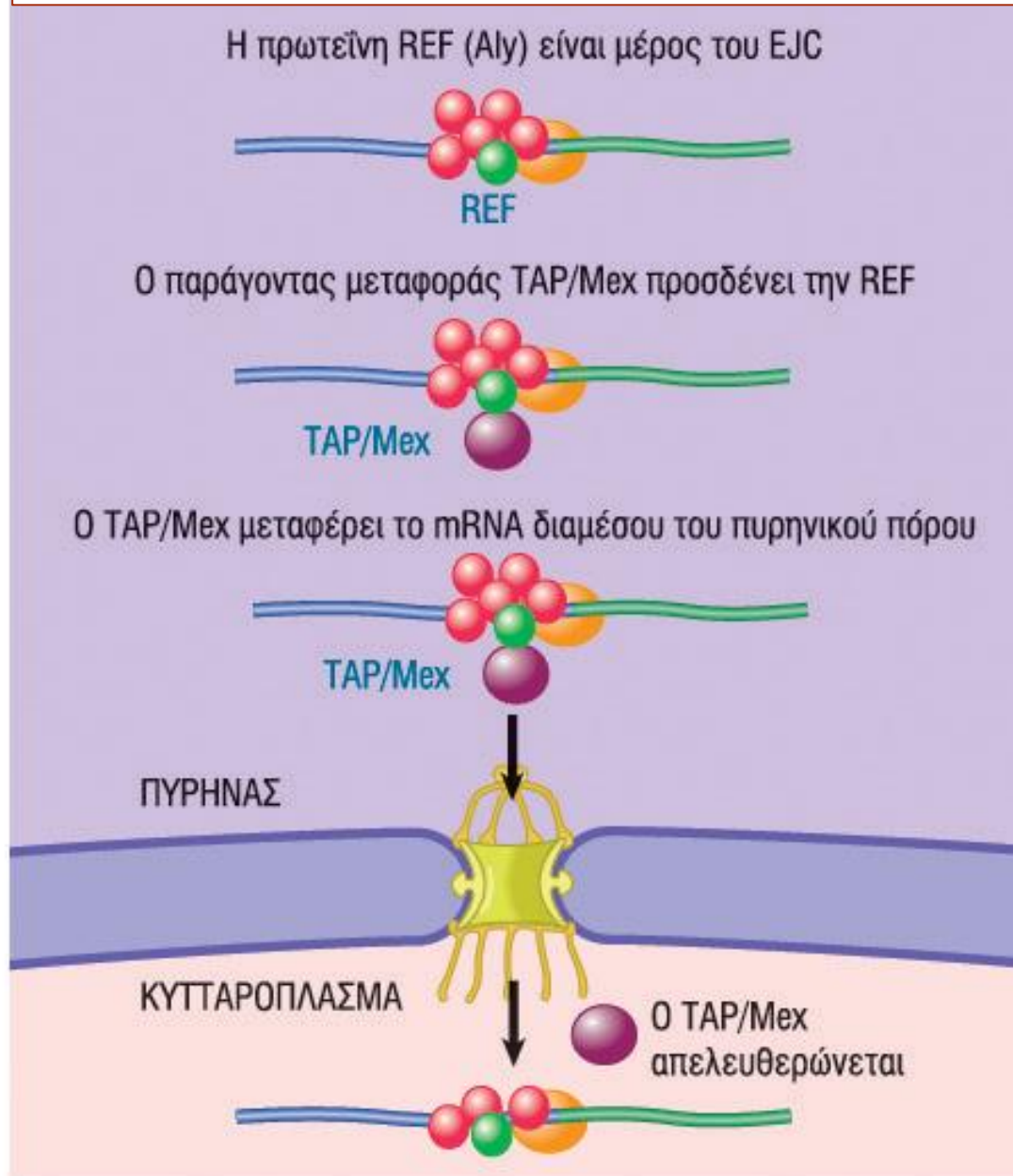
# Αρχική αναγνώριση των 5' και 3' θέσεων συρραφής



## Αρχική αναγνώριση των 5' και 3' θέσεων συρραφής

- ✓ Η συρραφή ξεκινά με την πρόσδεση του U1 snRNP στην 5' θέση συρραφής μέσω μιας αντίδρασης δημιουργίας ζευγαρώματος βάσεων RNA-RNA.
- ✓ Ο άμεσος τρόπος σχηματισμού ενός συμπλόκου E είναι η πρόσδεση του U1 snRNP στην 5' θέση συρραφής και της πρόσδεσης του U2AF σε μια σειρά πυριμιδινών μεταξύ της θέσης διακλάδωσης και της 3' θέσης συρραφής. Αυτός ο τρόπος χαρακτηρίζεται ως **καθορισμός του ιντρονίου**.
- ✓ Ένας άλλος πιθανός τρόπος για να σχηματιστεί το σύμπλοκο μεταξύ του U2AF στη σειρά πυριμιδινών και του U1 snRNP σε μια καθοδική (επόμενη) 5' θέση συρραφής. Αυτός ο τρόπος χαρακτηρίζεται ως **καθορισμός του εξονίου**.

## Σύμπλοκο συμβολής εξονίων- EJC



Μια πρωτεΐνη REF (εμφανίζεται με πράσινο χρώμα) προσδένει έναν παράγοντα συρραφής και παραμένει με το συρραπτόμενο RNA προϊόν.

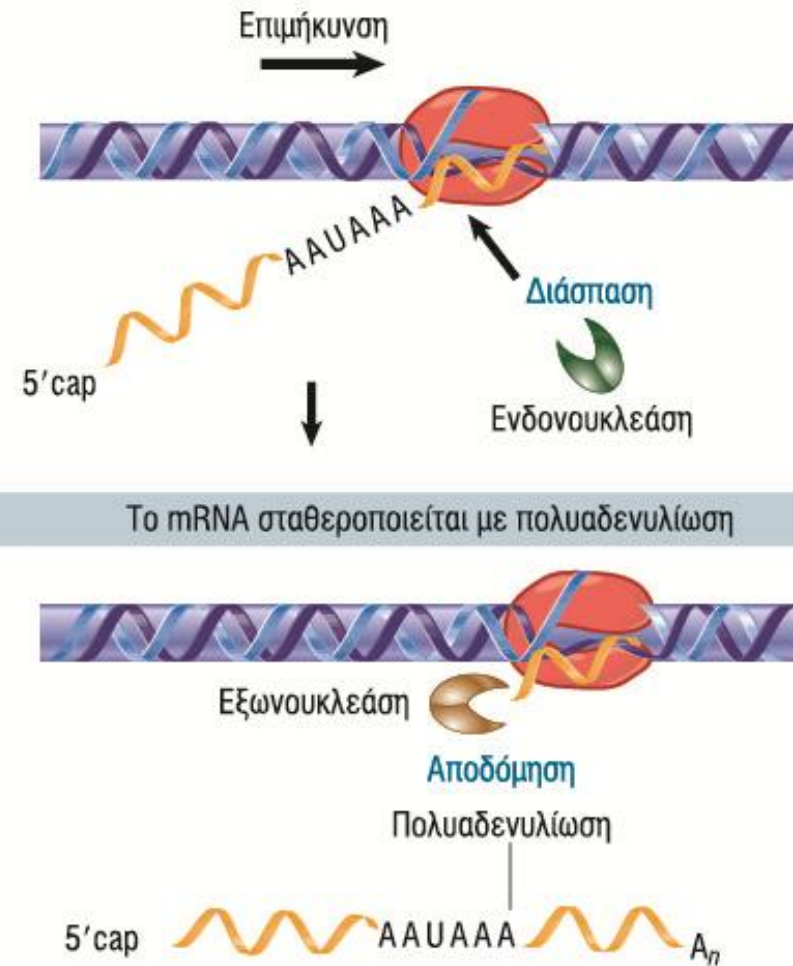
Η REF προσδένει μια πρωτεΐνη μεταφοράς (εμφανίζεται με μοβ) που προσδένει στον πυρηνικό πόρο.



## Alternative splicing

1. Παράλειψη/προσθήκη εξονίου
2. Εναλλακτικές 5' ή 3' θέσεις συρραφής
3. Εξόνια αμοιβαίου αποκλεισμού
4. Διατήρηση ιντρονίου

## 3' cleavage και polyadenylation



**Εικόνα 18.28** Η αλληλουχία AAUAAA είναι απαραίτητη για την διάσπαση ώστε να δημιουργηθεί ένα 3' άκρο για πολυαδενυλίωση.