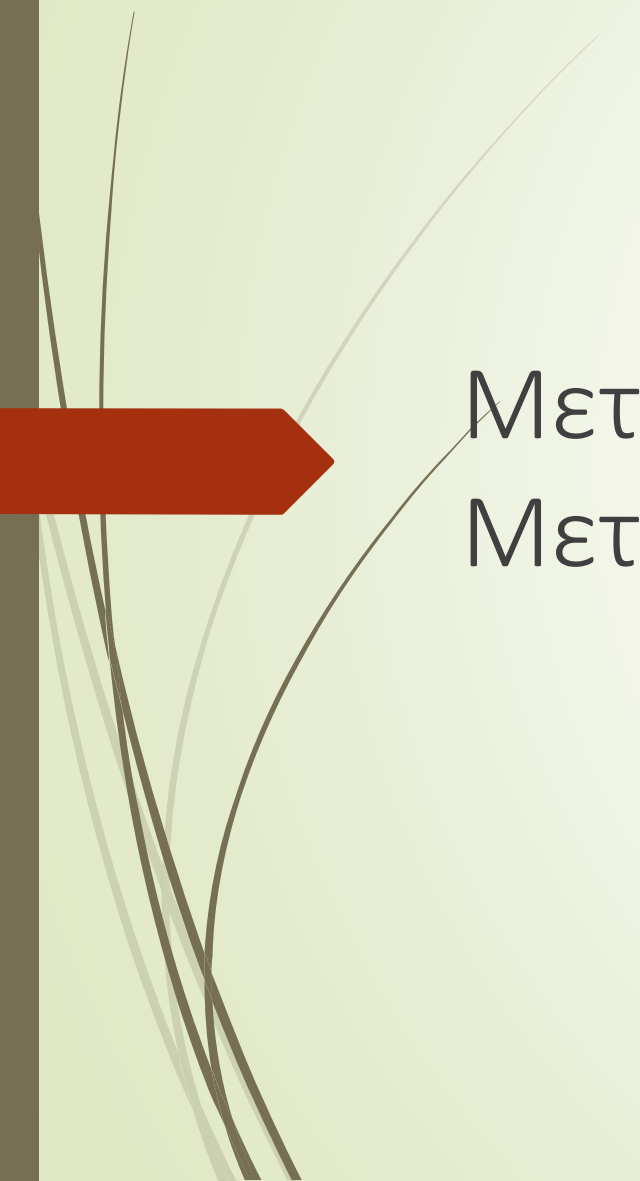




ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ





Φροντιστήριο

Μάθημα 9^ο



Μετάφραση σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς
Μεταφραστική ρύθμιση

Τα ριβοσώματα

Ριβοσώματα		rRNAs	Πρωτεΐνες r
Βακτηριακό (70S) Μάζα: 2,5 MDa 66% RNA	 50S	23S = 2904 βάσεις 5S = 120 βάσεις	31
	 30S	16S = 1542 βάσεις	21
Θηλαστικά (80S) Μάζα: 4,2 MDa 60% RNA	 60S	28S = 4718 βάσεις 5,8S = 160 βάσεις 5S = 120 βάσεις	49
	 40S	18S = 1874 βάσεις	33

Λειτουργικές ομολογίες παραγόντων μετάφρασης

Παράγοντες έναρξης

Προκαρυωτικοί	Ευκαρυωτικοί	Γενική λειτουργία	Σημειώσεις
IF-1	eIF1A	Μπλοκάρει τη θέση A	Ο eIF1A βοηθά τον eIF2 και προωθεί την πρόσδεση του Met-tRNA ^{iMet} στη 40S. Επίσης προωθεί την διάσταση των ριβοσωμικών υπομονάδων.
IF-2*†	eIF2, eIF3, eIF5B*	Είσοδος του εναρκτήριου tRNA στη μικρή υπομονάδα	Ο eIF2 είναι μια GTPάση. Ο eIF3 πυροδοτεί το σχηματισμό του τριαδικού συμπλόκου. Η πρόσδεσή του στη 40S ενεργοποιεί την πρόσδεση της 40S στο mRNA, καθώς και τη σάρωση του mRNA. Ο eIF5B είναι μια GTPάση και εμπλέκεται στην είσοδο του εναρκτήριου tRNA στην 40S.
IF-3	eIF1, σύμπλοκο eIF4, eIF3	Πρόσδεση της μικρής υπομονάδας στο mRNA	Το σύμπλοκο eIF4 λειτουργεί για την πρόσδεση στην καλύπτρα.

Παράγοντες επιμήκυνσης

Προκαρυωτικοί	Ευκαρυωτικοί	Γενική λειτουργία
EF-Tu ^{†‡} , EF-G [†]	eEF1a [‡]	Πρόσδεση GTP
EF-Ts	eEF1β, eEF1γ	Ανταλλαγή GDP
EF-G [§]	eEF2 [§]	Μετατόπιση ριβοσώματος

Παράγοντες αποδέσμευσης

Προκαρυωτικοί	Ευκαρυωτικοί	Γενική λειτουργία
RF1	eRF1	Αναγνώριση UAA/UAG
RF2	eRF1	Αναγνώριση UAA/UGA
RF3 [†]	eRF3	Ενεργοποίηση των άλλων RFs

* Ο IF-2 και ο eIF5B εμφανίζουν ομολογία αλληλουχίας.

† Οι IF-2, EF-Tu, EF-G, και RF3 εμφανίζουν ομολογία αλληλουχίας.

‡ Ο EF-Tu και ο eEF1a εμφανίζουν ομολογία αλληλουχίας.

§ Ο EF-G και ο eEF2 εμφανίζουν ομολογία αλληλουχίας.



Έλεγχος ακρίβειας μετάφρασης

rRNAs και ο ενεργός ρόλος τους στη μετάφραση

- ✓ Το 3' άκρο του **16S rRNA** αλληλεπιδρά άμεσα με το mRNA κατά την έναρξη, την υπομονάδα 50S και τα αντικωδικόνια των tRNA στις θέσεις P και A.
- ✓ Το 16S rRNA διαδραματίζει έναν ενεργό ρόλο στη λειτουργία της υπομονάδας 30S.
- ✓ Η αλληλεπίδραση των υπομονάδων περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις μεταξύ 16S και 23S rRNA.
- ✓ Το **23S rRNA** αλληλεπιδρά με το άκρο CCA του πεπτιδυλο-tRNA τόσο στην θέση P όσο και στη θέση A.
- ✓ Η ενεργότητα της πεπτιδυλο-τρανσφεράσης έγκειται αποκλειστικά στο 23S rRNA.

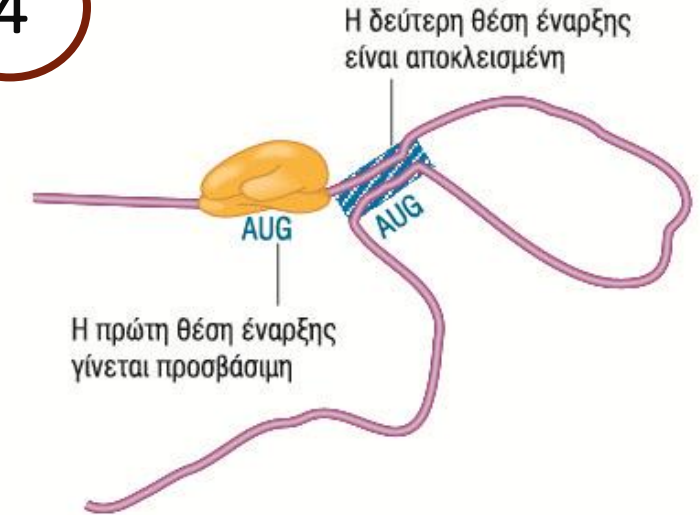
Ρύθμιση μετάφρασης

Η μετάφραση μπορεί να ρυθμίζεται από:

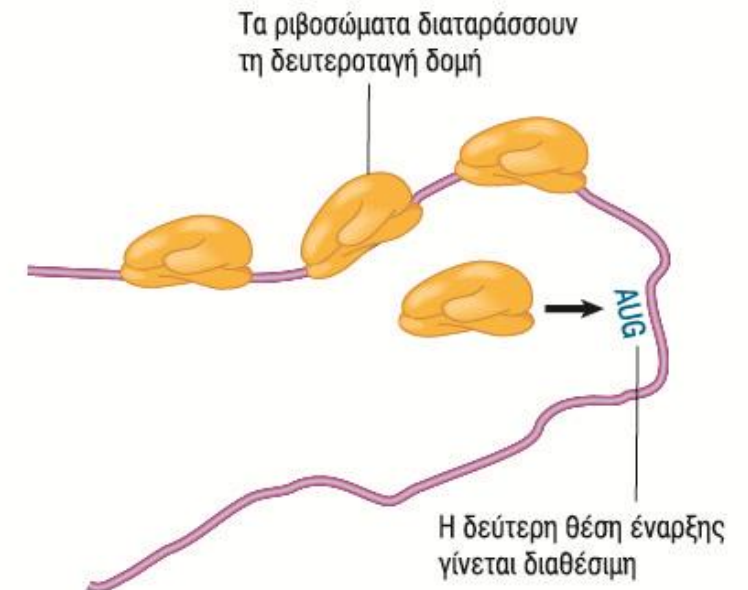
1. Την 5' UTR του mRNA,
2. Την αφθονία των διαφόρων tRNA,
3. Μια πρωτεΐνη καταστολέα που αποτρέπει την πρόσδεση των ριβοσωμάτων στο κωδικόνιο έναρξης,
4. Τις αλλαγές στη δομή του mRNA που προκύπτουν ως αποτέλεσμα της μετάφρασης, αλλάζοντας την προσβασιμότητα των κωδικονίων έναρξης στα πολυσιτρονικά mRNA.


4

Μόνο μια θέση έναρξης είναι αρχικά διαθέσιμη

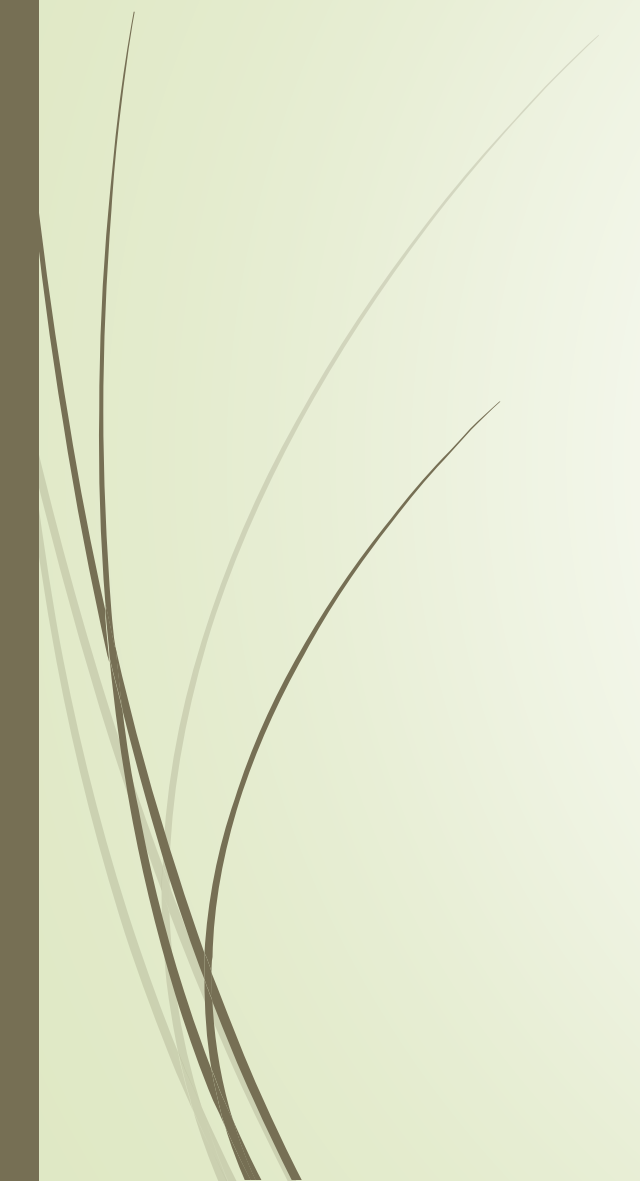


Η μετάφραση εκθέτει τη δεύτερη θέση έναρξης

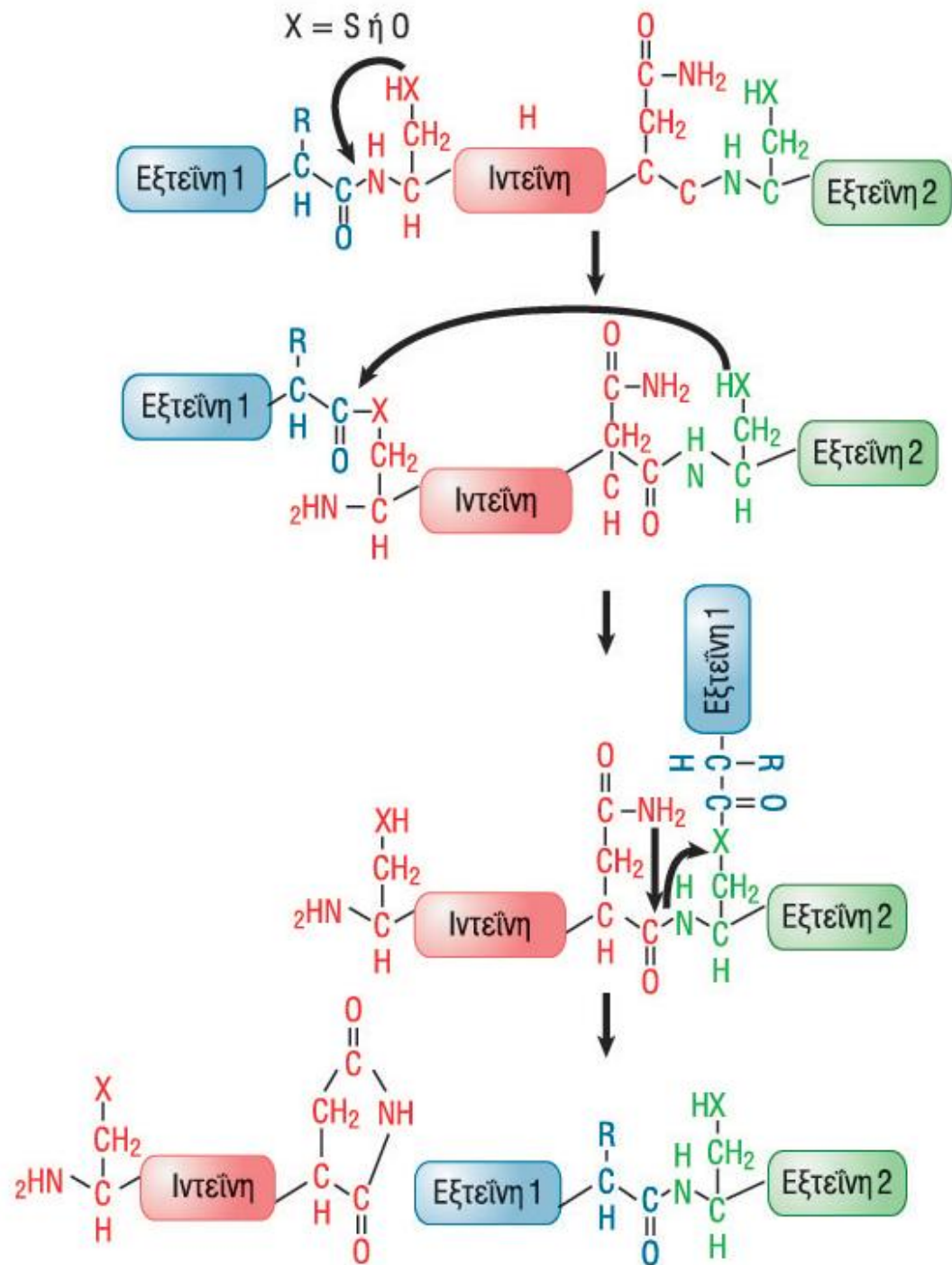




Αυτοκαταλυτικό μάτισμα των πρωτεϊνών



Αυτοκαταλυτικό μάτισμα των πρωτεϊνών



Αυτοκαταλυτικό μάτισμα των πρωτεϊνών

1. Μια ιντεΐνη έχει την ικανότητα να καταλύει τη δική της απομάκρυνση από μια πρωτεΐνη με τέτοιο τρόπο ώστε να συνδέονται οι πλευρικές εξτεΐνες.
2. Το μάτισμα των πρωτεϊνών καταλύεται από την ιντεΐνη.
3. Οι περισσότερες ιντεΐνες έχουν δύο ανεξάρτητες ενεργότητες: το **μάτισμα πρωτεϊνών** και την **ενδονουκλεάση εποικισμού**.

Αυτοκαταλυτικό μάτισμα των πρωτεϊνών & ενεργότητα ενδονουκλεάσης εποικισμού

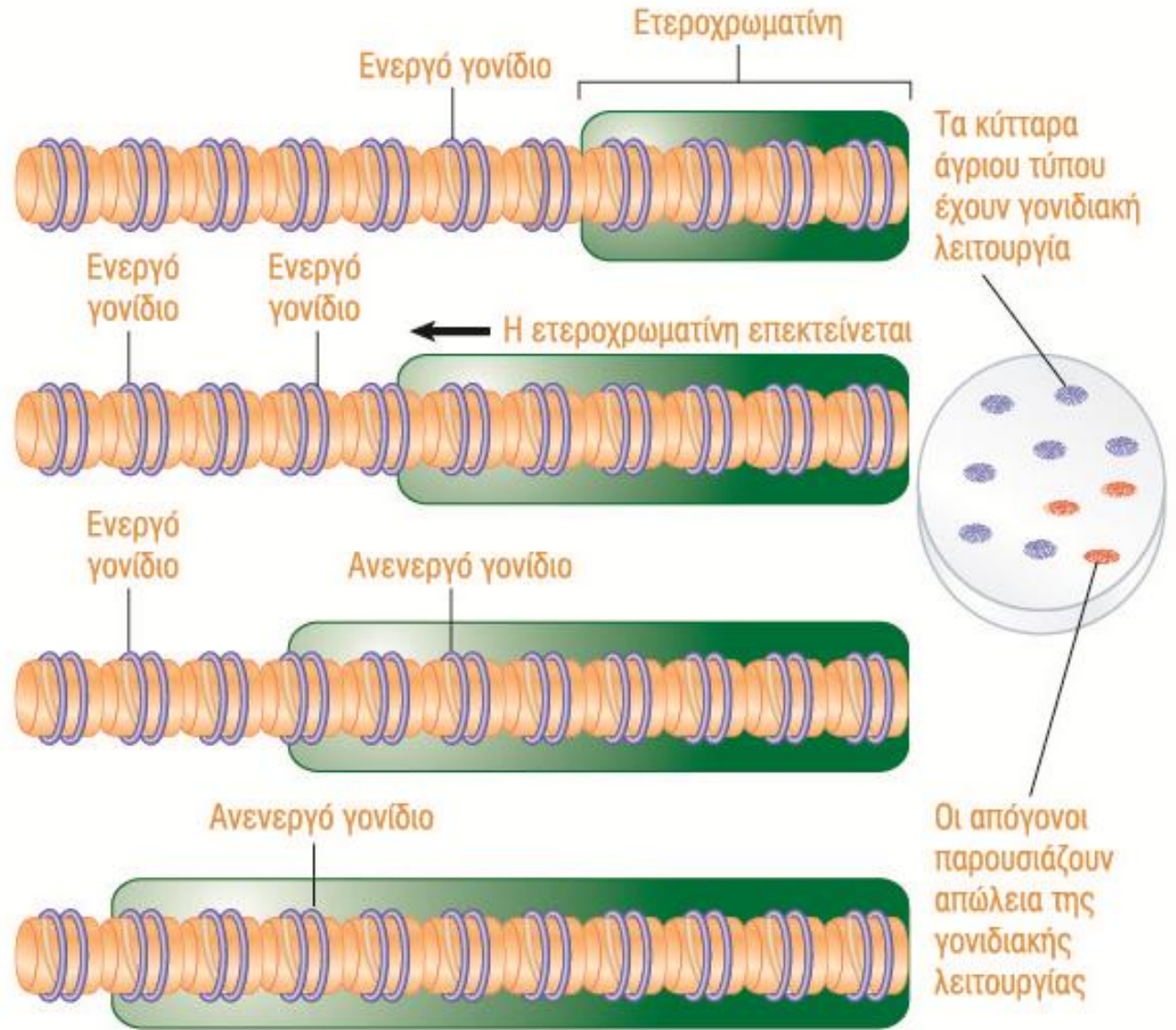
Οργανισμός	Πρωτεΐνη-υποδοχέας (host)	Τύπος ιντεΐνης	HEN (ενδονουκλεάση εποικισμού)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	VMA1 (υπομονάδα A της κοκκώδους ATPάσης)	Πλήρους μήκους ιντεΐνη	Ναι
<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	TFIIB (παράγοντας μεταγραφής IIB)	Πλήρους μήκους ιντεΐνη	Ναι
<i>Thermococcus / Pyrococcus spp.</i>	DNA πολυμεράση	Πλήρους μήκους ιντεΐνη	Ναι
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	DnaB ελικάση	Mini- ή πλήρους μήκους ιντεΐνη	Συνήθως
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	RecA	Mini-ιντεΐνη	Όχι
Διάφορα βακτήρια	GyrA (υπομονάδα A DNA γυράσης)	Ιντεΐνη σε ομόλογη θέση σε διαφορετικά είδη	Μεταβλητό



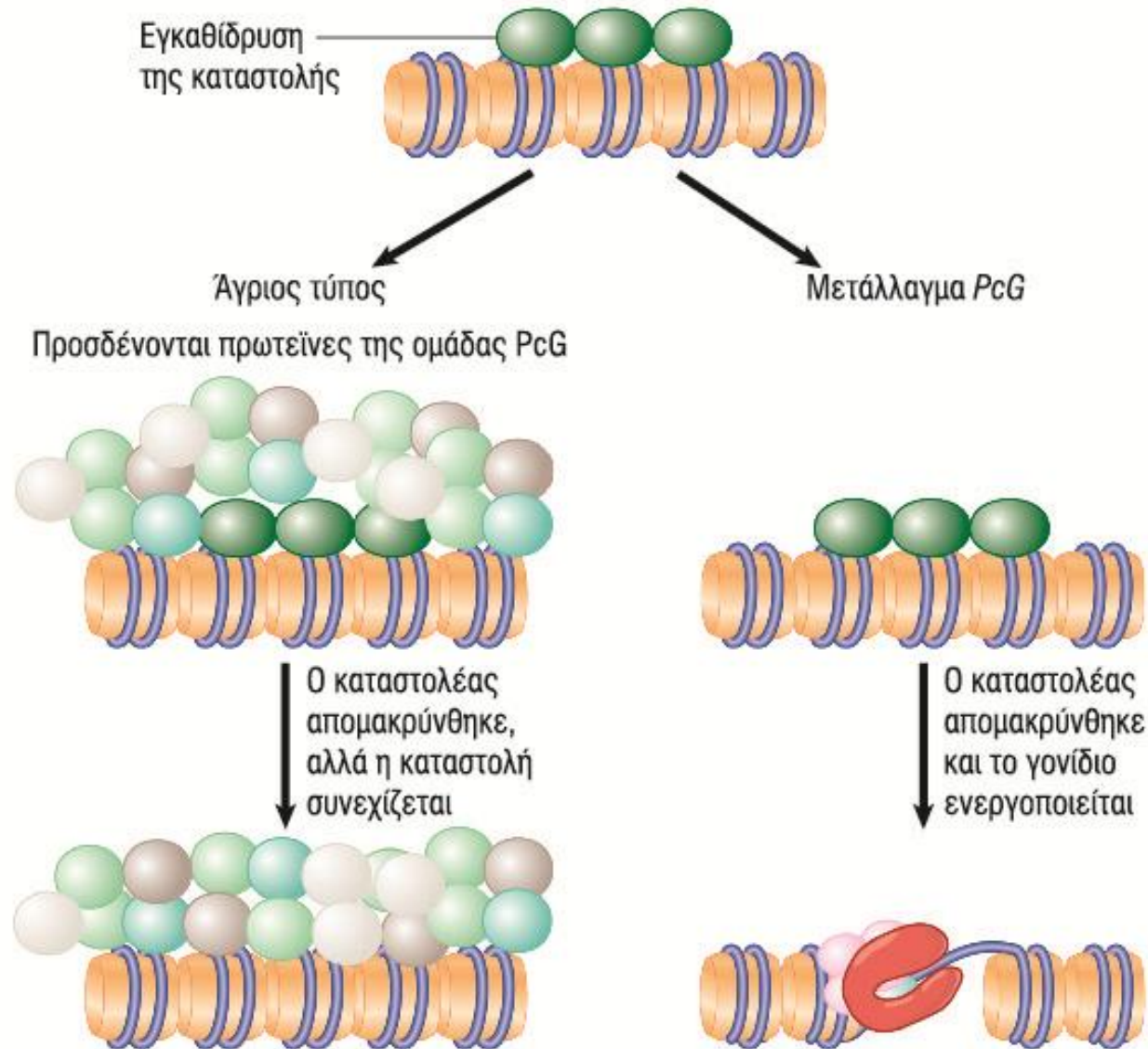
Επιγενετική



Διάδοση ετεροχρωματίας



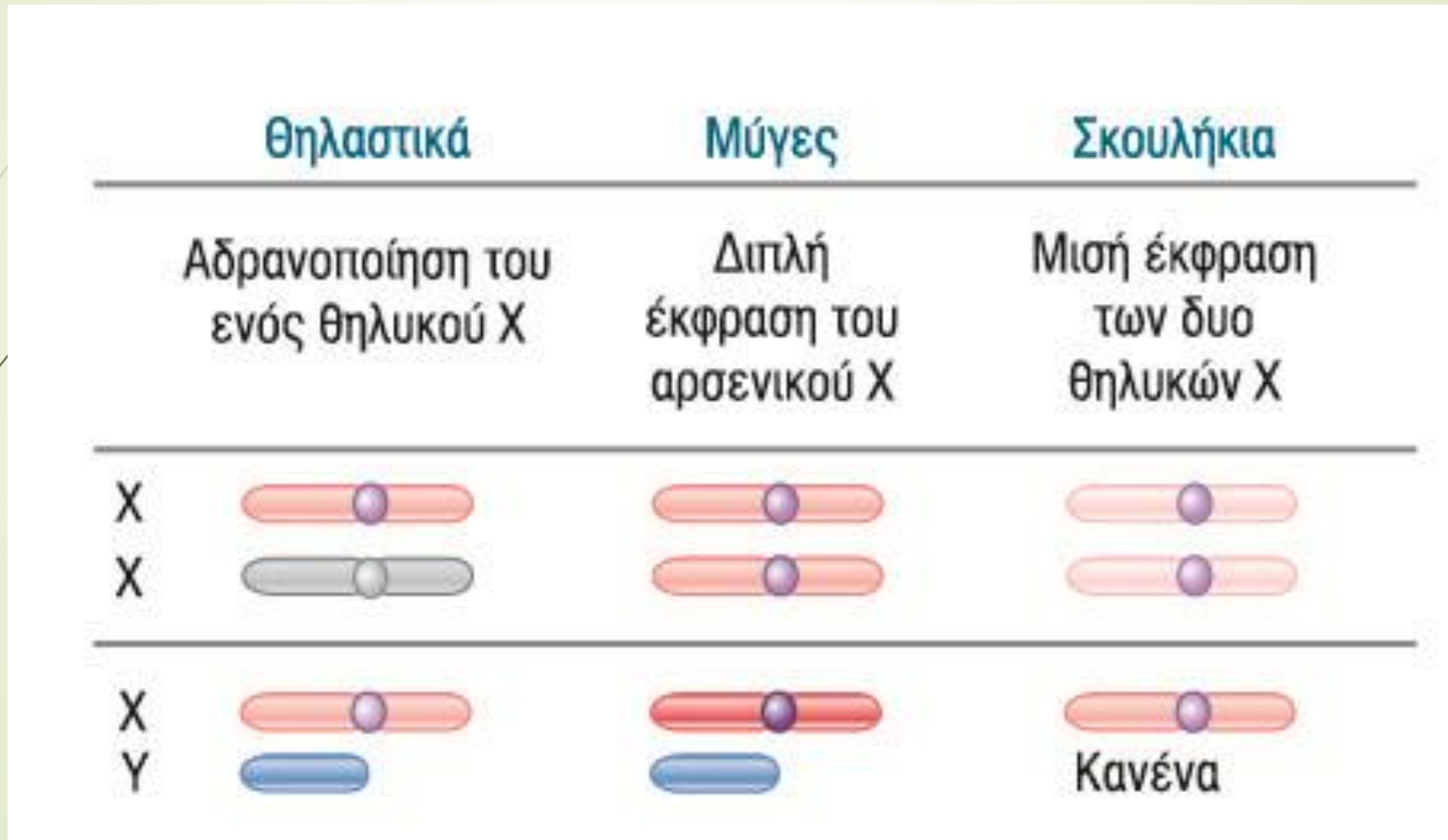
PcG - TrxG



Εικόνα 26.8 Οι πρωτεΐνες PcG δεν ξεκινούν την καταστολή, αλλά είναι υπεύθυνες για τη διατήρησή της.

- ✓ Τα PcG διαιωνίζουν μια κατάσταση καταστολής, μετά από κυτταρικές διαιρέσεις.
- ✓ Οι πρωτεΐνες TrxG ανταγωνίζονται τις δράσεις του PcG και προωθούν προσβάσιμες δομές χρωματίνης.
- ✓ Υπάρχουν πολλά διαφορετικά σύμπλοκα PcG και TrxG - τα περισσότερα περιέχουν υπομονάδες που καταλύουν ή αφαιρούν άμεσα, συγκεκριμένες τροποποιήσεις ιστόνης, αναγνωρίζουν ειδικές τροποποιήσεις ή προσδένουν RNA, DNA ή ακόμη άλλα συστατικά χρωματίνης.
- ✓ Οι τροποποιήσεις των ιστονών που προκύπτουν από την ενεργότητα των συμπλόκων PcG ή TrxG, μπορούν να σταθεροποιήσουν ή να αποσταθεροποιήσουν τη στρατολόγηση άλλων συμπλόκων PcG ή TrxG.
- ✓ Το PRE είναι μια αλληλουχία DNA στρατολόγησης του PcG και περιέχει έναν αριθμό θέσεων πρόσδεσης παραγόντων μεταγραφής.
- ✓ Τα σύμπλοκα των PcG στα θηλαστικά, συνδέονται με υπομεθυλιωμένες CGI.
- ✓ Τα lncRNA μπορεί να εμπλέκονται στη στόχευση των PcG ή TrxG.

Αντιστάθμιση Δόσης



Ετεροχρωματίνη

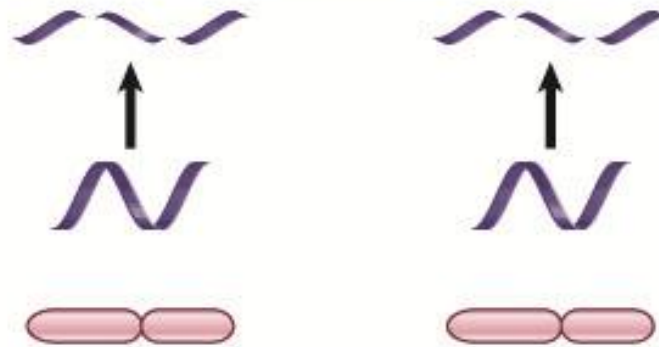
✓ Η **συστατική ετεροχρωματίνη** (constitutive heterochromatin) περιέχει συγκεκριμένες αλληλουχίες (συχνά επαναλαμβανόμενου δορυφορικού DNA) που δεν έχουν λειτουργία κωδικοποίησης πρωτεϊνών.

Η συστατική ετεροχρωματίνη βρίσκεται συνήθως σε κεντρομερικές και τελομερικές επαναλήψεις και παραμένει πάντα σταθερά ετεροχρωματινική, σε όλους τους τύπους κυττάρων.

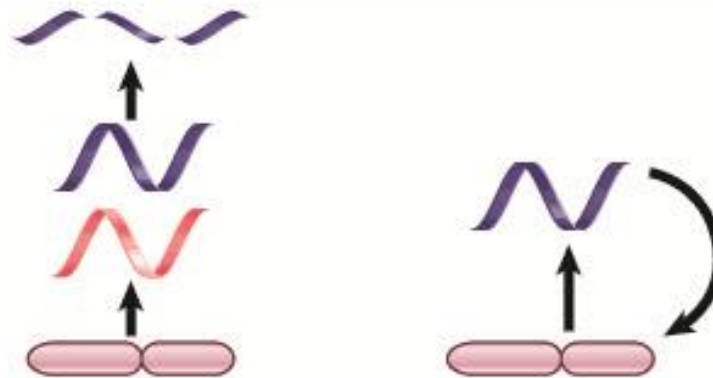
✓ Η **δυνητική (ή προαιρετική) ετεροχρωματίνη** (facultative heterochromatin) εμφανίζεται μέσα σε εντοπισμένες χρωμοσωμικές περιοχές ή σε ολόκληρα χρωμοσώματα, υπό ειδικές συνθήκες. Ένας γενετικός τόπος μπορεί να συναρμολογείται σε προαιρετική ετεροχρωματίνη και έτσι να είναι ανενεργός σε μια κυτταρική γενεαλογία, αλλά μπορεί να είναι ευχρωματινικός και να εκφράζεται σε άλλες γενεαλογίες.

Απενεργοποίηση X χρωμοσώματος: κανόνας (n-1)

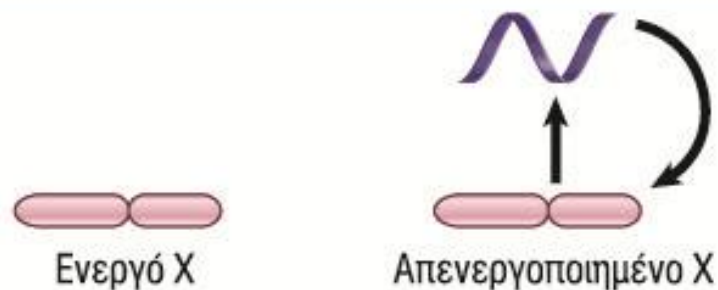
Και τα δυο χρωμοσώματα X εκφράζουν *Xist*: το RNA είναι ασταθές

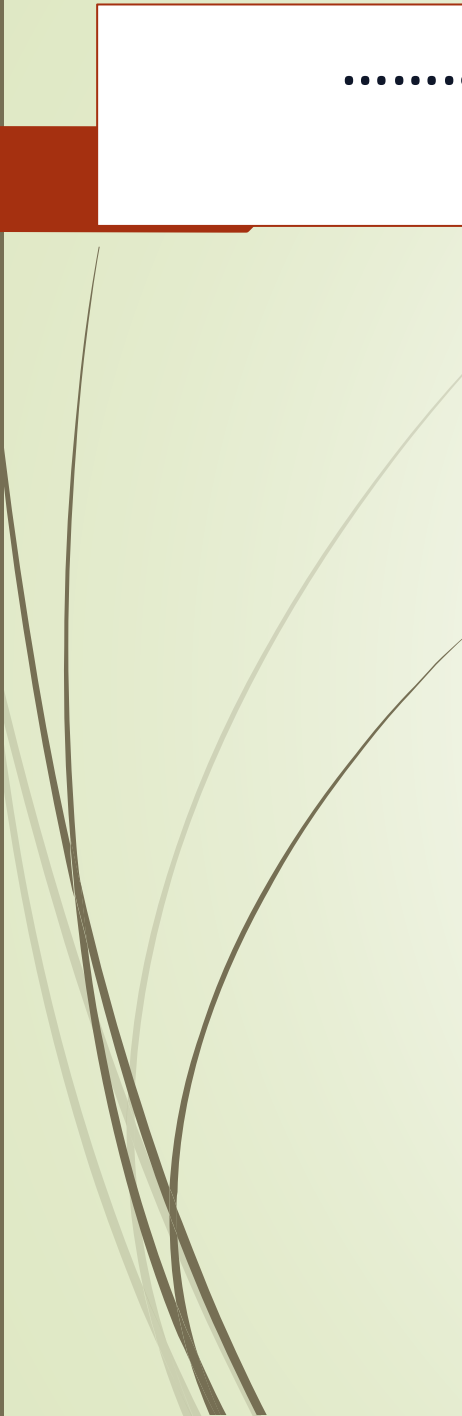


Το αντικωδικό *Tsix* RNA εκφράζεται από το μελλοντικό ενεργό X



Το ενεργό X σταματά τη σύνθεση του *Xist* RNA



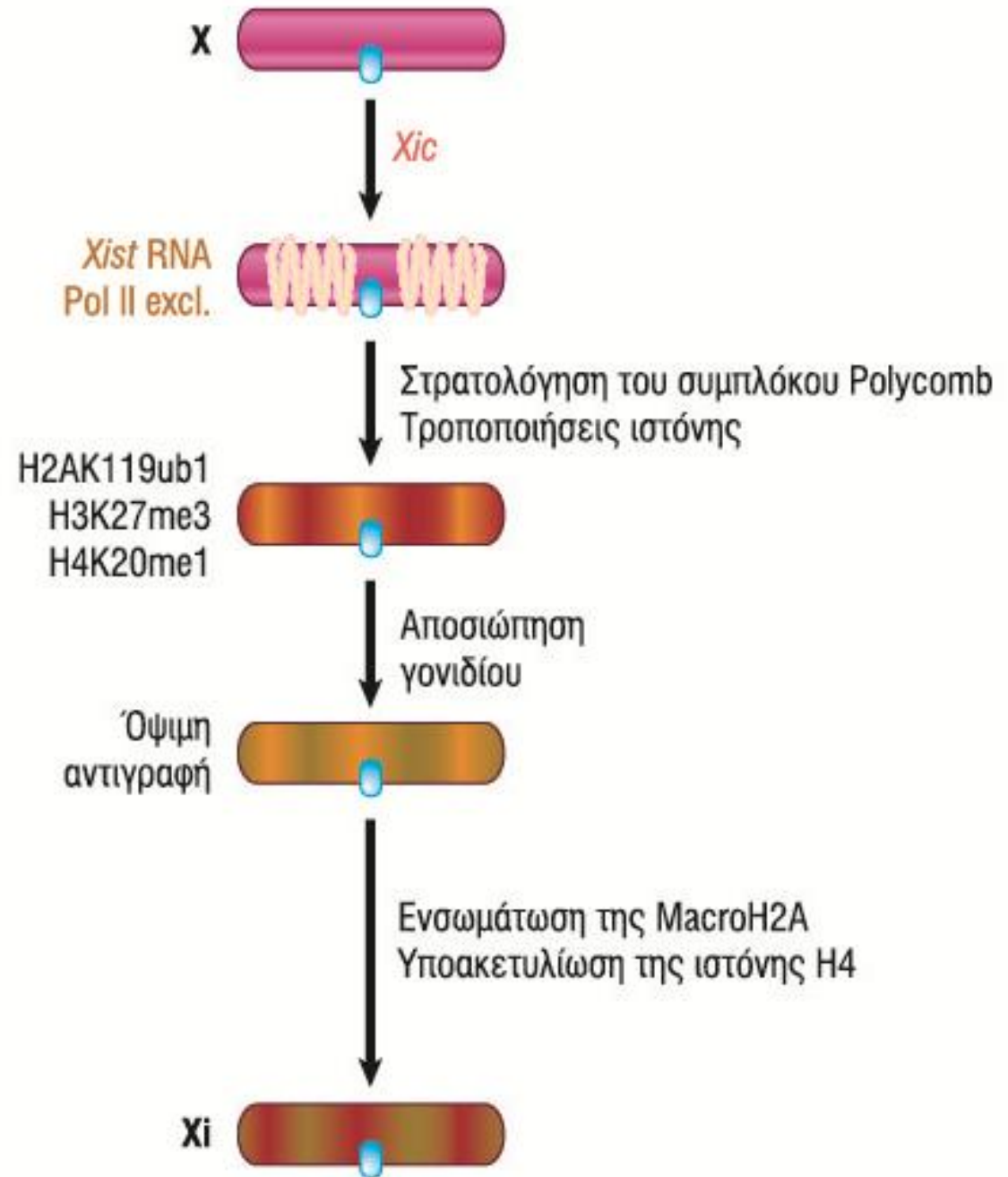


.....

Η εξαρτώμενη από το *Xist*
έναρξη της αποσιώπησης

Λειτουργία αποσιώπησης του *Xist*

Η ανεξάρτητη από το
Xist διατήρηση της
απενεργοποίησης του X



Διαφορετικοί μηχανισμοί αντιστάθμισης δόσης, εξισορροπούν τη γονιδιακή έκφραση που συνδέεται με Χ, σε άλλα είδη

- Ένα από τα δύο θηλυκά χρωμοσώματα Χ αδρανοποιείται τυχαία σε κάθε κύτταρο κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης του πλακούντα, στα θηλαστικά.
- Σε εξαιρετικές περιπτώσεις όπου υπάρχουν περισσότερα από δύο χρωμοσώματα Χ, απενεργοποιούνται όλα εκτός από ένα.
- Το Xic είναι μια cis-δραστική περιοχή, στο χρωμόσωμα Χ, που είναι απαραίτητη και επαρκής για να εξασφαλίσει ότι παραμένει ενεργό μόνο ένα χρωμόσωμα Χ.
- Το Xic περιέχει το γονίδιο Xist, το οποίο κωδικοποιεί ένα RNA που βρίσκεται μόνο σε απενεργοποιημένα χρωμοσώματα Χ.
- Ο Xist στρατολογεί σύμπλοκα Polycomb, τα οποία τροποποιούν τις ιστόνες στο απενεργοποιημένο Χ.
- Το Tsix, ένα lncRNA που είναι αντικωδικό του Xist, προστατεύει το μελλοντικά ενεργό Χ από την αδρανοποίηση, που εξαρτάται από το Xist.

Εντύπωμα

- ✓ Τα αλληλόμορφα του πατέρα και της μητέρας μπορεί να έχουν διαφορετικά πρότυπα μεθυλίωσης κατά τη γονιμοποίηση.
- ✓ Η μεθυλίωση συνήθως σχετίζεται με την αδρανοποίηση του γονιδίου.
- ✓ Όταν τα γονίδια εντυπώνονται διαφορετικά, η επιβίωση του εμβρύου μπορεί να απαιτεί την παροχή του λειτουργικού αλληλόμορφου από τον γονέα με το μη μεθυλιωμένο αλληλόμορφο.
- ✓ Η επιβίωση των ετεροζυγωτών με τα εντυπωμένα γονίδια είναι διαφορετική, ανάλογα με την κατεύθυνση της διασταύρωσης.
- ✓ Τα εντυπωμένα γονίδια εμφανίζονται σε συστάδες και συχνά εξαρτώνται από μια τοπική θέση ελέγχου που προστατεύει τα πρότυπα μεθυλίωσης της γαμετικής σειράς από τον επαναπρογραμματισμό, στο ζυγωτό.



Μη Κωδικοποιητικό RNA

Τι είναι το ncRNA

Μη κωδικοποιητικό RNA είναι κάθε λειτουργικό RNA που δεν μεταφράζεται σε πρωτεΐνη, αλλά συμμετέχει στη δομική οργάνωση, στην ωρίμανση άλλων RNA ή στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.

Housekeeping

rRNA, tRNA, snRNA, snoRNA:
απαραίτητα για μετάφραση και επεξεργασία RNA.

Regulatory

miRNA, siRNA, piRNA, lncRNA, circRNA:
επιδρούν στη ροή πληροφορίας
 $DNA \rightarrow RNA \rightarrow$ πρωτεΐνη.

Πυρηνικά

Καθοδηγούν επιγενετικές τροποποιήσεις και οργάνωση πυρηνικών δομών.

Κυτταροπλασματικά

Ρυθμίζουν σταθερότητα mRNA, μετάφραση και αποκρίσεις stress.

Ρυθμιστικό RNA

RNA στόχος



Ρυθμιστικό RNA



Δίκλωνη περιοχή



miRNA

~21–23 nt. Προέρχονται από hairpin πρόδρομα RNA και καταστέλλουν μετάφραση ή ενισχύουν αποικοδόμηση mRNA μέσω Argonaute/RISC.

siRNA

~20–25 nt. Συνήθως από διπλόκλωνο RNA· υψηλή συμπληρωματικότητα οδηγεί αποικοδόμηση του στόχου.

piRNA

~24–31 nt. Συνδέονται με Piwi, καταστέλλουν transposons και προστατεύουν τη γαμετική σειρά.

lncRNA

>200 nt. Ιστο- ειδικά, συχνά δρουν σε χρωματίνη, μεταγραφή και αρχιτεκτονική πυρήνα.

circRNA

Κυκλικά RNA από back-splicing· αυξημένη σταθερότητα, δυνατότητα δέσμευσης miRNA ή πρωτεϊνών.

sn/sno/tRF/crRNA

Επεξεργασία pre-mRNA, τροποποιήσεις rRNA και RNA-guided άμυνα ή ρύθμιση σε προκαρυωτικούς οργανισμούς.

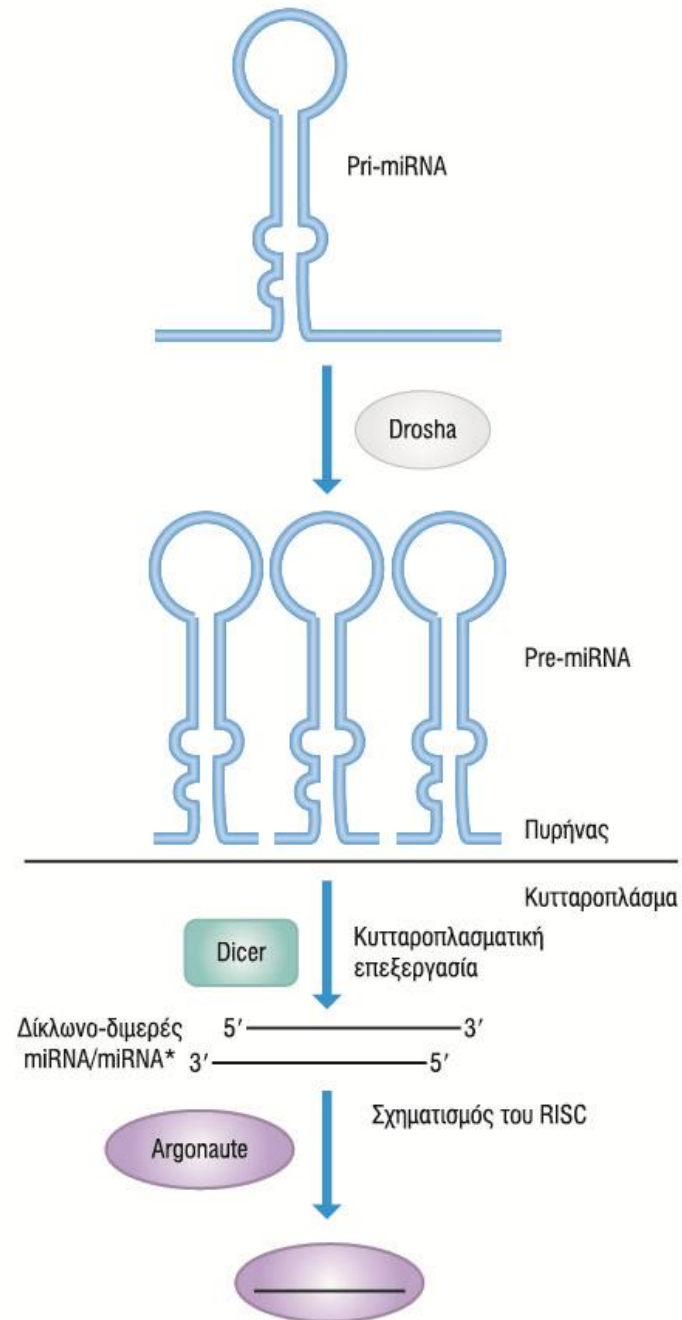
tRF (tRNA-derived fragment)

- ✓ Μικρά RNA που προέρχονται από tRNA (tRNA-derived fragments, tRFs ή tRNA-derived small RNAs).
- ✓ Μπορεί να προκύπτουν από το 5' ή 3' άκρο ώριμων ή πρόδρομων tRNA, ή ως “tRNA halves”, και συμμετέχουν σε ρύθμιση μετάφρασης, stress response και κάποιες φορές σε σίγαση γονιδίων παρόμοια με miRNA/siRNA.

crRNA (CRISPR RNA)

- ✓ CRISPR RNA (crRNA) είναι μικρά RNA που παράγονται από τα **CRISPR loci** σε **βακτήρια και αρχαία**.
- ✓ Κάθε crRNA φέρει μια μικρή “spacer” αλληλουχία συμπληρωματική σε ιικό ή πλασμιδιακό DNA και, σε σύμπλοκο με πρωτεΐνες Cas, καθοδηγεί το σύστημα CRISPR-Cas για **RNA-καθοδηγούμενη διάσπαση** του ξένου νουκλεϊκού οξέος.

miRNAs



Μηχανισμοί δράσης μικρών ρυθμιστικών RNA

Μετα-μεταγραφική ρύθμιση

miRNA/siRNA μειώνουν τη σταθερότητα mRNA ή την αποδοτικότητα μετάφρασης μέσω αλληλεπίδρασης κυρίως με 3'UTR.

RNA processing

snRNA και snoRNA ελέγχουν splicing, 2'-O-methylation και ψευδουριδυλίωση των rRNA.

Επιγενετική ρύθμιση

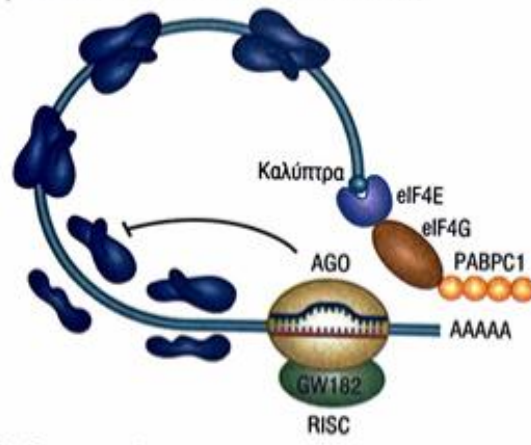
lncRNAs και ορισμένα μικρά ncRNAs στρατολογούν σύμπλοκα τροποποίησης χρωματίνης και οργανώνουν τοπικά πυρηνικά domains.

Άμυνα γονιδιώματος

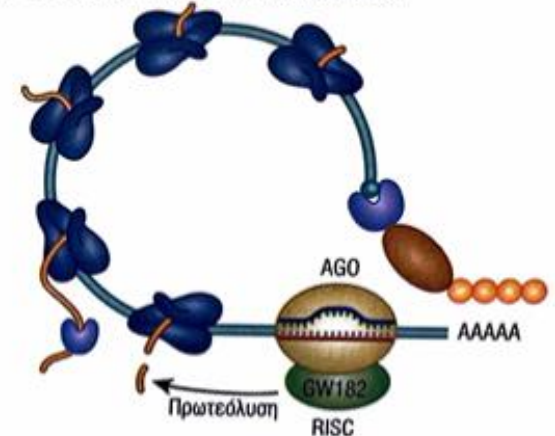
piRNA και CRISPR-derived RNAs στοχεύουν κινητά στοιχεία ή ξένα νουκλεϊκά οξέα και συμβάλλουν στη σταθερότητα του γονιδιώματος.

Μηχανισμοί καταστολής της μετάφρασης με RNAi

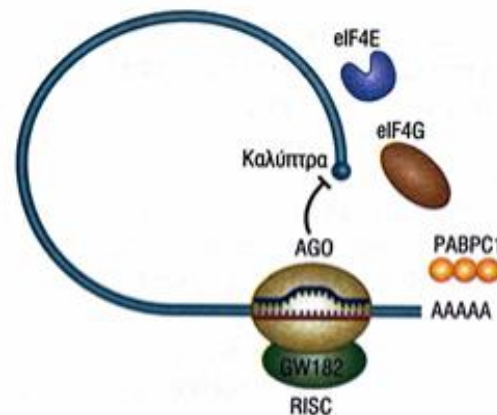
(α) Αναστολή της επιμήκυνσης της μετάφρασης



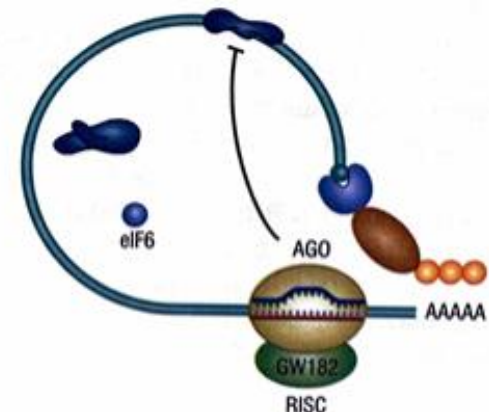
(β) Συμμεταφραστική πρωτεϊνική αποδόμηση



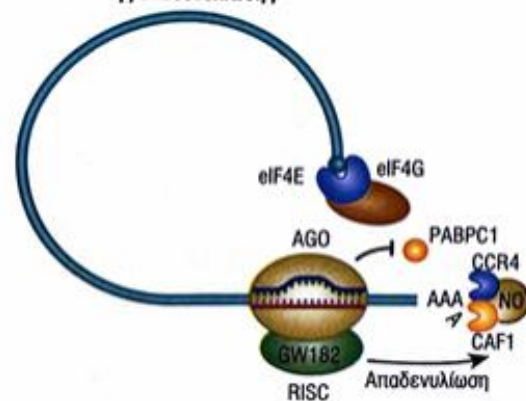
(γ) Ανταγωνισμός για τη δομή της καλύπτρας



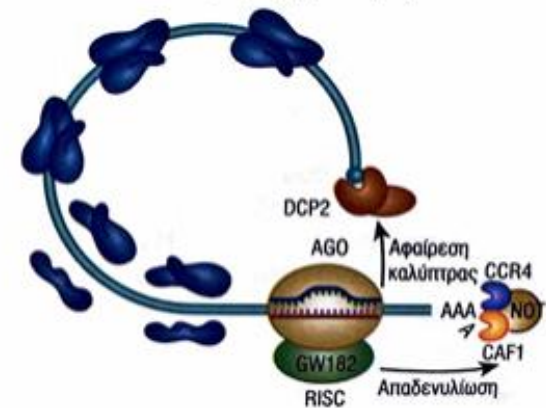
(δ) Αναστολή της ένωσης της ριβοσωμικής υπομονάδας



(ε) Αναστολή της κυκλοποίησης του mRNA μέσω της απαδενύλισης



(στ) Απαδενύλιση και σφαίραση της καλύπτρας



lncRNAs

Scaffolds

Συνδέουν πολλαπλές πρωτεΐνες και βοηθούν στη συναρμολόγηση ρυθμιστικών συμπλόκων.

Nuclear architecture

Συμμετέχουν σε condensates και λειτουργική χωροθέτηση γονιδίων στον πυρήνα.

Guides

Καθοδηγούν χρωματινικούς τροποποιητές σε συγκεκριμένες γονιδιωματικές θέσεις.

Cell-type specificity

Πολλά lncRNAs εκφράζονται σε συγκεκριμένους ιστούς και στάδια διαφοροποίησης.

Decoys / sponges

Δεσμεύουν miRNAs ή RBPs και μεταβάλλουν τη διαθεσιμότητά τους.

Ταξινόμηση

Παρουσιάζουν χαμηλή συντήρηση, πολλά ισομορφικά προϊόντα και δύσκολη λειτουργική ταξινόμηση.

Αρχαία: το ειδικό ενδιαφέρον

sRNAs έχουν ανιχνευθεί και στα τρία μεγάλα πεδία της ζωής, άρα η RNA-μεσολαβούμενη ρύθμιση είναι εξελικτικά αρχαία.

50–500+

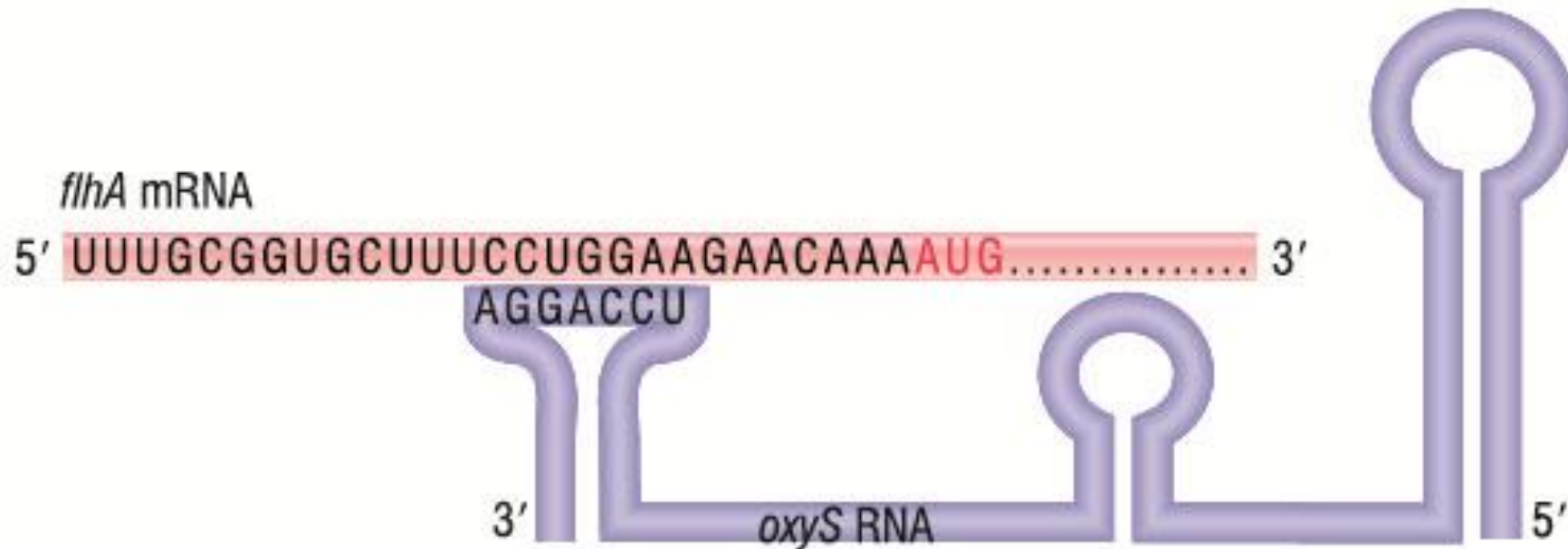
Τα archaeal sRNAs παρουσιάζουν μεγάλο εύρος μήκους και μπορεί να είναι intergenic, antisense, tRFs, crRNAs ή snoRNAs.

5' & 3'

Σε αντίθεση με το κλασικό βακτηριακό μοντέλο, στα αρχαία έχουν βρεθεί στόχοι τόσο σε 5' περιοχές όσο και σε 3' UTRs.

Οι μελέτες σε *Methanosarcina mazei*, *Haloferax volcanii* και *Sulfolobus solfataricus* έδειξαν ότι τα sRNAs συνδέονται με **μεταβολική ρύθμιση, προσαρμογή σε ακραίες συνθήκες, απόκριση στο stress, μορφολογικές μεταβολές και μεταφραστικό έλεγχο.**

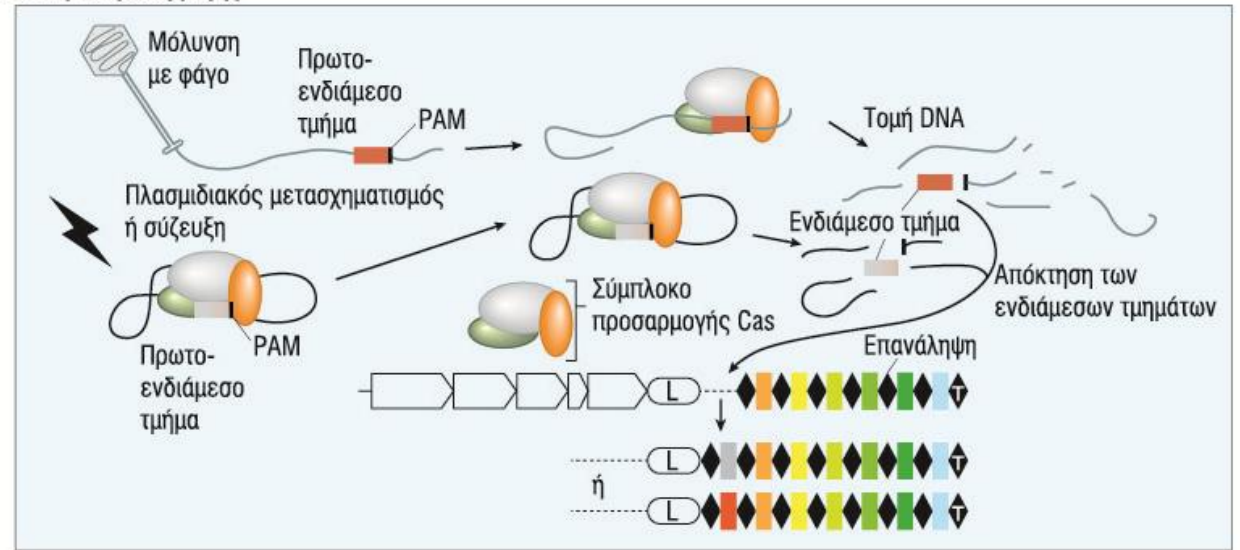
Μη Κωδικοποιητικό RNA



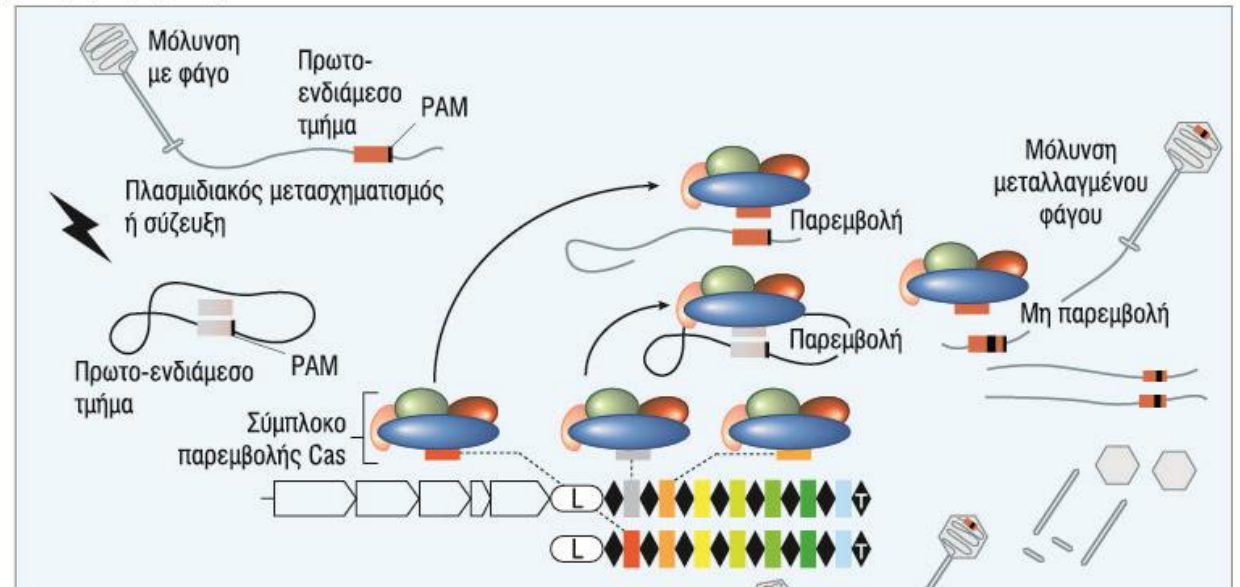
Εικόνα 28.3 Το *oxyS* RNA αναστέλλει τη μετάφραση του mRNA του γονιδίου *flhA*, ζευγαρώνοντας με μια αλληλουχία ακριβώς ανοδικά του κωδικονίου έναρξης AUG (φαίνεται με κόκκινα γράμματα).

Στάδια προσαρμογής και παρεμβολής του συστήματος CRISPR/Cas

(α) Φάση 1, προσαρμογής



(β) Φάση 2, παρεμβολής



ncRNA και νόσος

Καρκίνος

Aberrant miRNA και lncRNA δίκτυα επηρεάζουν πολλαπλασιασμό, απόπτωση, μεταστάσεις και ανταπόκριση στη θεραπεία.

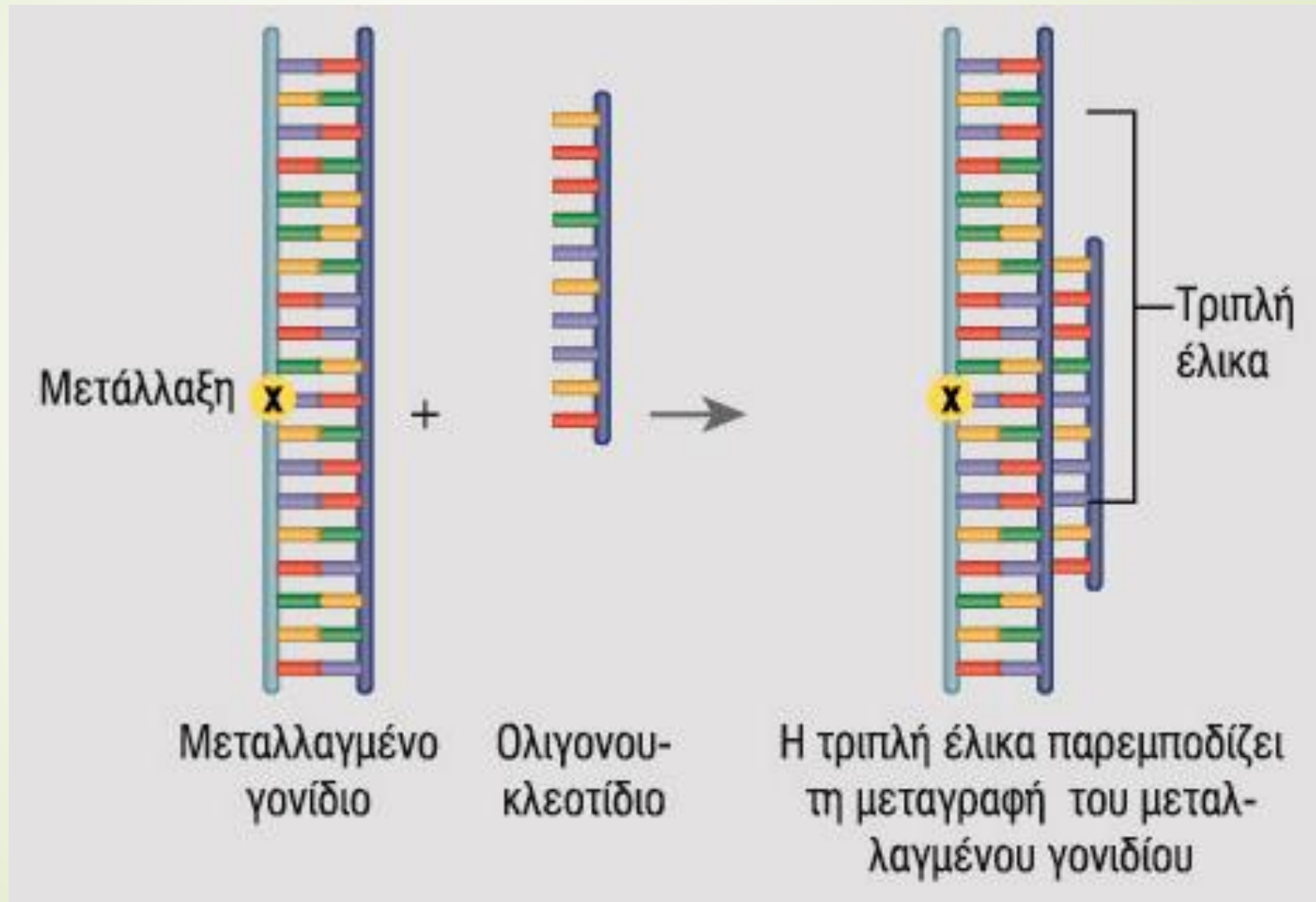
Αναγεννητική / βλαστοκύτταρα

lncRNAs όπως MALAT1 και LINC00657 συνδέονται με οστεογενετική διαφοροποίηση μέσω αξόνων που περιλαμβάνουν miRNAs.

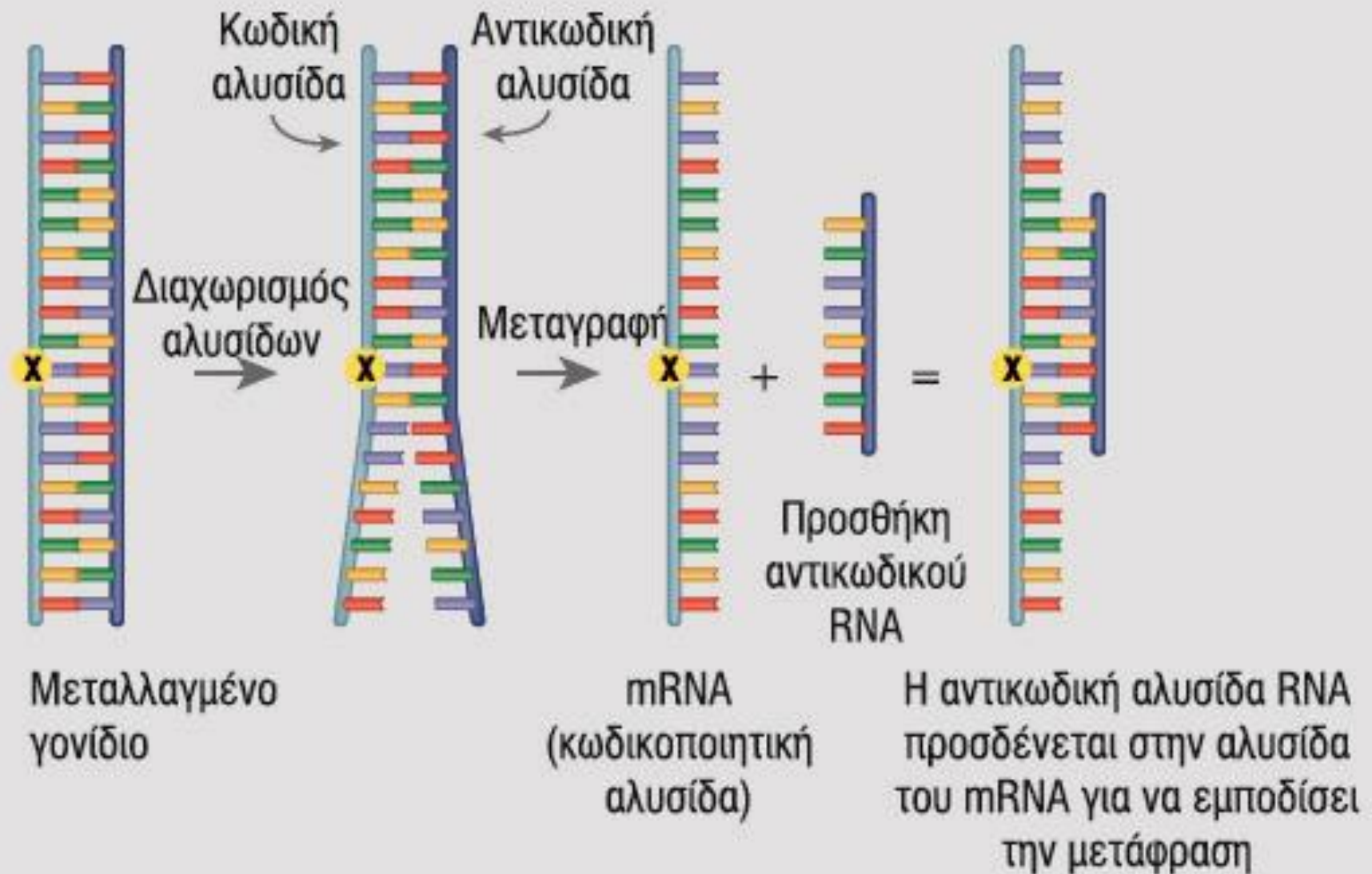
Λοιμώξεις

Διαφοροποιημένα προφίλ miRNA έχουν συσχετισθεί ακόμη και με ιογενείς αποκρίσεις όπως η COVID-19.

Παρεμπόδιση μεταγραφής με χρήση ολιγονουκλεοτιδίων



Παρεμπόδιση μετάφρασης με χρήση ολιγονουκλεοτιδίων



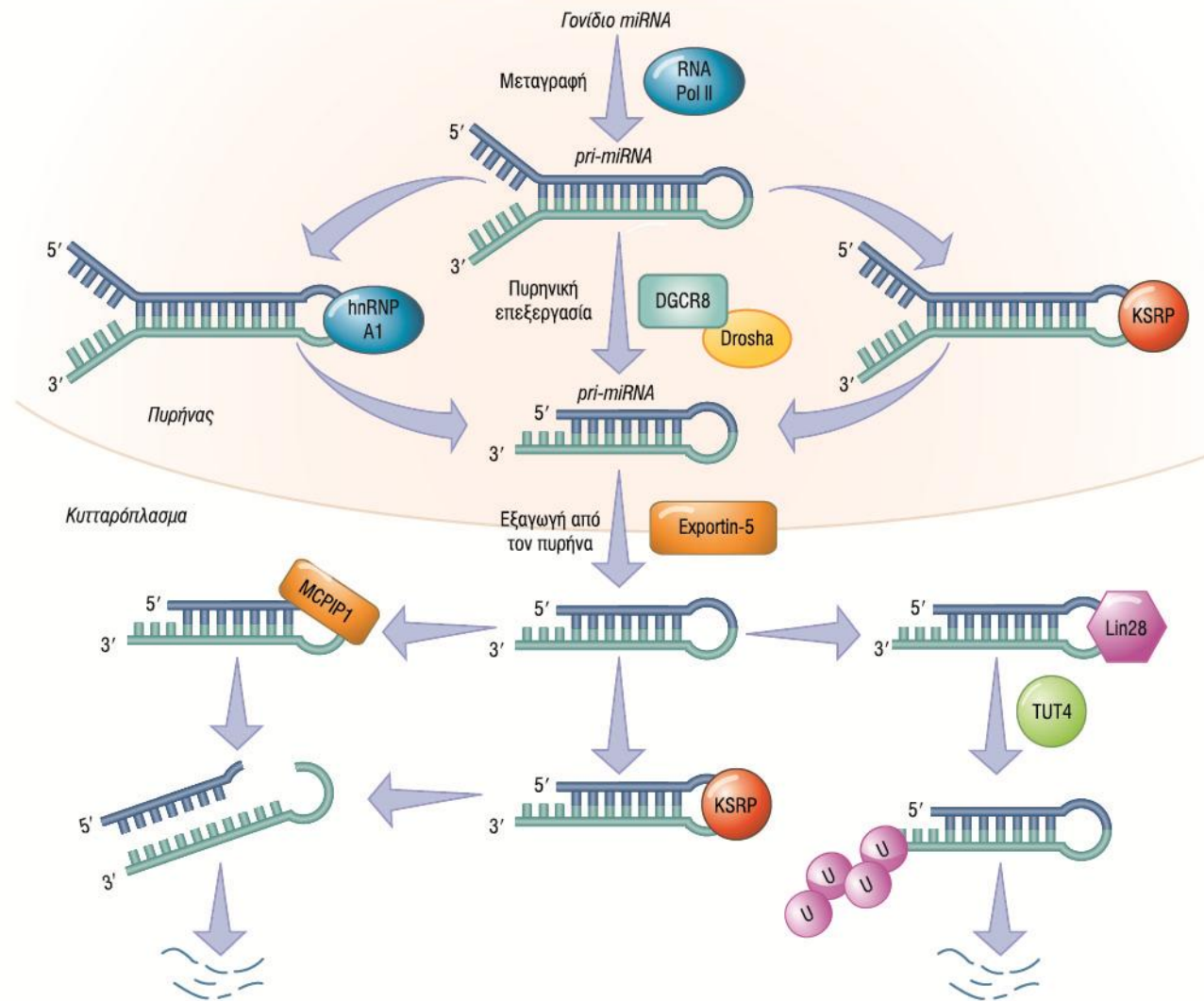
Πειραματικές προσεγγίσεις

Αναγνώριση



- ✓ RNA-Seq και small RNA-Seq για καταγραφή ρεπερτορίου.
- ✓ Northern blot για επιβεβαίωση μεγέθους και επαγωγής.
- ✓ RNomics και comparative genomics για εύρεση νέων classes.

Λειτουργική ανάλυση

- ✓ Διαγραφές / knockdown / ectopic expression.
- ✓ Reporter assays για αλληλεπίδραση με UTRs.
- ✓ EMSA, CLIP και RNA-chromatin mapping για partners και στόχους.



Εικόνα 28.6 Επεξεργασία και ρύθμιση της επεξεργασίας του miRNA μέσω του βρόχου. Τα βασικά βήματα της φυσιολογικής επεξεργασίας του miRNA από τη μεταγραφή, συνοψίζονται όπως δείχνονται στην εικόνα. Υποδεικνύονται αρκετές πρωτεΐνες που ρυθμίζουν αυτήν τη διαδικασία, μέσω της άμεσης πρόσδεσης στην αλληλουχία βρόχου του miRNA. Οι MCP1P1 και Lin28 λειτουργούν ως αρνητικοί ρυθμιστές ενός υποσυνόλου miRNA. Η MCP1P1 κόβει το βρόχο, που οδηγεί σε αποικοδόμηση του συνόλου που ρυθμίζει. Η Lin28 στρατολογεί ένα ένζυμο μεταφοράς ουριδυλίου, το οποίο προσθέτει μια πολυ-U ουρά και οδηγεί σε αποδόμηση. Η KSRP, ένας άλλος ρυθμιστικός παράγοντας, αποτελεί έναν θετικό ρυθμιστή. Από Bajan, S., and Hutvagner, G. (2011). *Molecular Cell* 44, 345–347.



Ευχαριστώ για την
προσοχή σας

