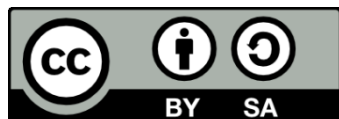




Μοριακή Βιολογία

Ενότητα # (3): Εισαγωγή στη Μεταγραφή

Παναγιωτίδης Χρήστος
Τμήμα Φαρμακευτικής



Άδειες Χρήσης

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό υπόκειται σε άδειες χρήσης Creative Commons.
- Για εκπαιδευτικό υλικό, όπως εικόνες, που υπόκειται σε άλλου τύπου άδειας χρήσης, η άδεια χρήσης αναφέρεται ρητώς.



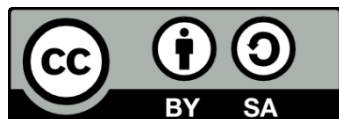
Χρηματοδότηση

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό έχει αναπτυχθεί στα πλαίσια του εκπαιδευτικού έργου του διδάσκοντα.
- Το έργο «Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα στο Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης» έχει χρηματοδοτήσει μόνο τη αναδιαμόρφωση του εκπαιδευτικού υλικού.
- Το έργο υλοποιείται στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» και συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και από εθνικούς πόρους.





Εισαγωγή στη Μεταγραφή



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΣΠΑ
2007-2013
πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

Σκοποί ενότητας

- Να περιγραφεί η διαδικασία της μεταγραφής και οι μηχανισμοί του κυττάρου που είναι υπεύθυνοι για τη ρυθμισή της.
- Να περιγραφεί το οπερόνιο της λακτόζης και το πως ρυθμίζεται η έκφρασή του.
- Να περιγραφεί ο τερματισμός της μεταγραφής.

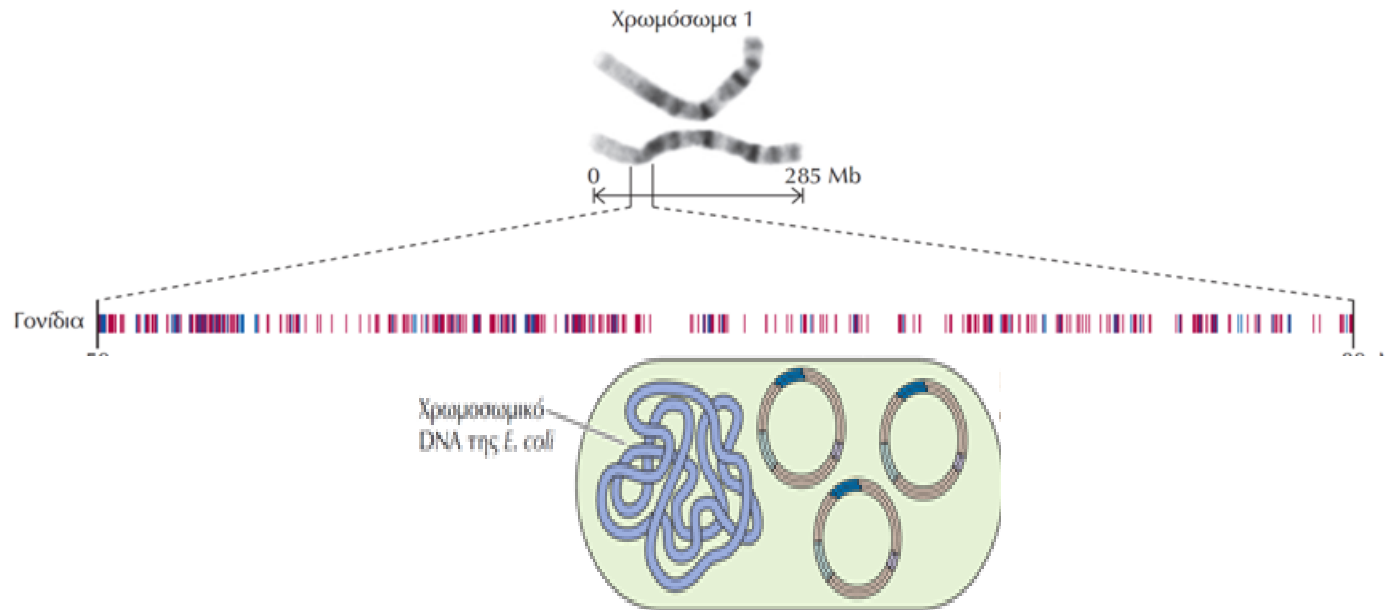


Γενικές αρχές

- Είναι απόλυτα αναγκαίο για ένα κύτταρο να μπορεί να ανταποκρίνεται σε περιβαλλοντικές αλλαγές.
- Εδώ, θα συζητήσουμε για τους μηχανισμούς που χρησιμοποιεί ένα κύτταρο προκειμένου να ρυθμίσει εάν, τότε και σε ποιά έκταση θα εκφρασθεί ένα γονίδιο, το προϊόν του οποίου είναι απαραίτητο για την προσαρμογή του κυττάρου στις νέες περιβαλλοντικές συνθήκες.



Η γενετική πληροφορία βρίσκεται κωδικοποιημένη στο DNA



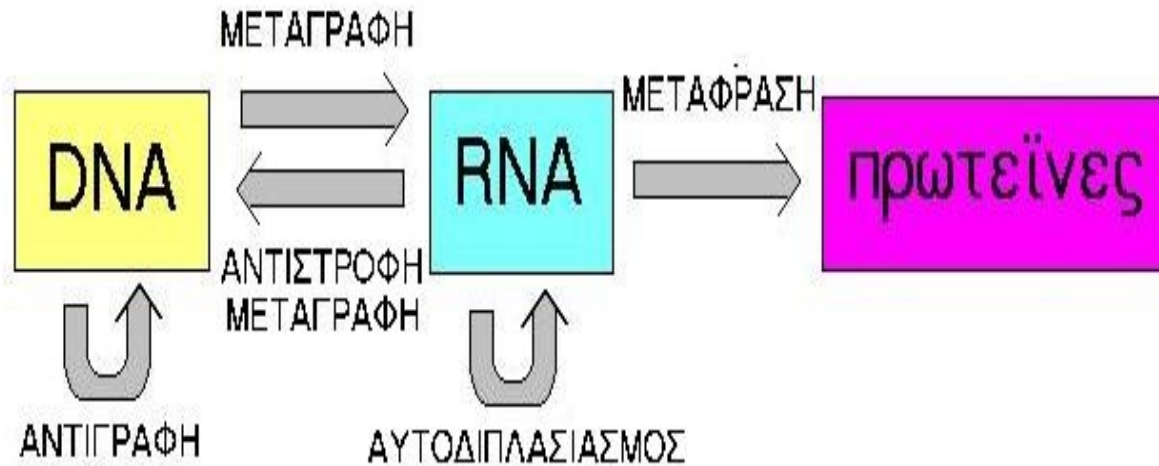
Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2011.

Το Κύτταρο-Μία Μοριακή Προσέγγιση

Στην πάνω εικόνα απεικονίζεται ένα ευκαρυωτικό χρωμόσωμα ενώ στην κάτω εικόνα το χρωμόσωμα του προκαρυωτικού *E. coli*.



Το βασικό δόγμα της μοριακής βιολογίας



<http://el.wikipedia.org/wiki/%CE%9A%CE%B5%CE%BD%CF%84%CF%81%CE%B9%CE%BA%CF%8C%CE%B4%CF%8C%CE%B3%CE%BC%CE%B1%CF%84%CE%B7%CF%82%CE%BC%CE%BF%CF%81%CE%B9%CE%B1%CE%BA%CE%AE%CF%82%CE%B2%CE%B9%CE%BF%CE%BB%CE%BF%CE%B3%CE%AF%CE%B1%CF%82>



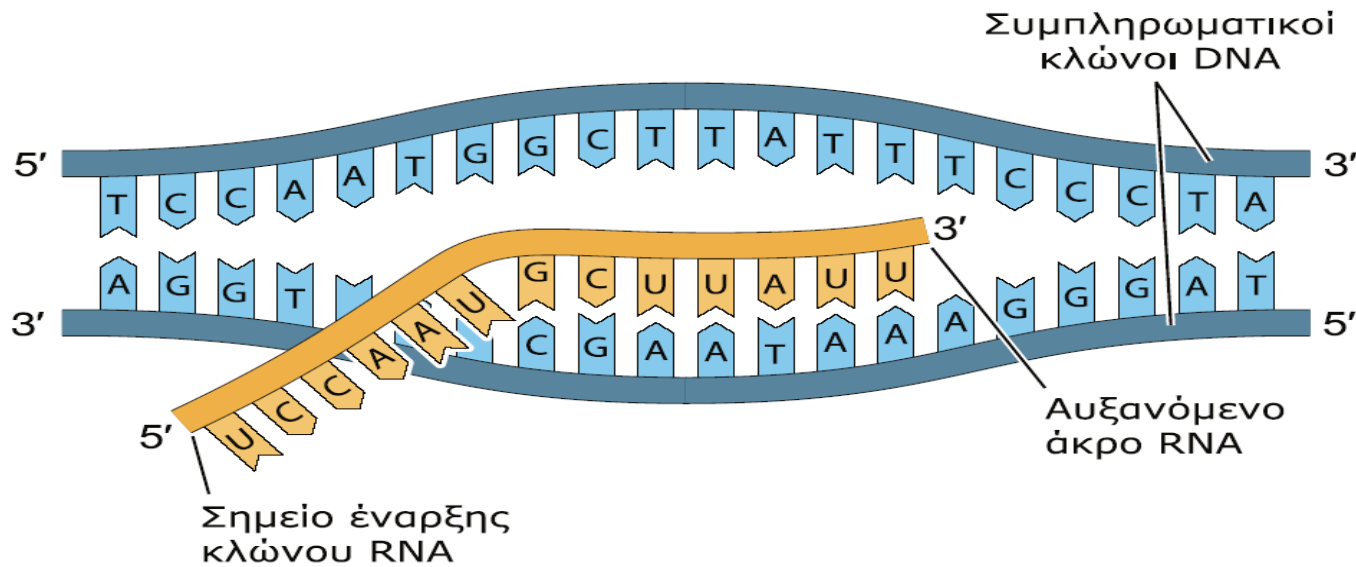
Μεταγραφή, η μεταβίβαση της γενετικής πληροφορίας

ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ;

- Μεταγραφή είναι η παραγωγή μορίων RNA, με χρησιμοποίηση του DNA σαν μήτρα.
- Μόνο η μία αλυσίδα του DNA (template strand) χρησιμοποιείται σαν μήτρα.
- Η αλληλουχία των βάσεων του παραγομένου μορίου RNA είναι συμπληρωματική της μιάς αλυσίδας του DNA, δηλ. της αλυσίδας μήτρας.



Ο ένας κλώνος του DNA μεταγράφεται σε RNA

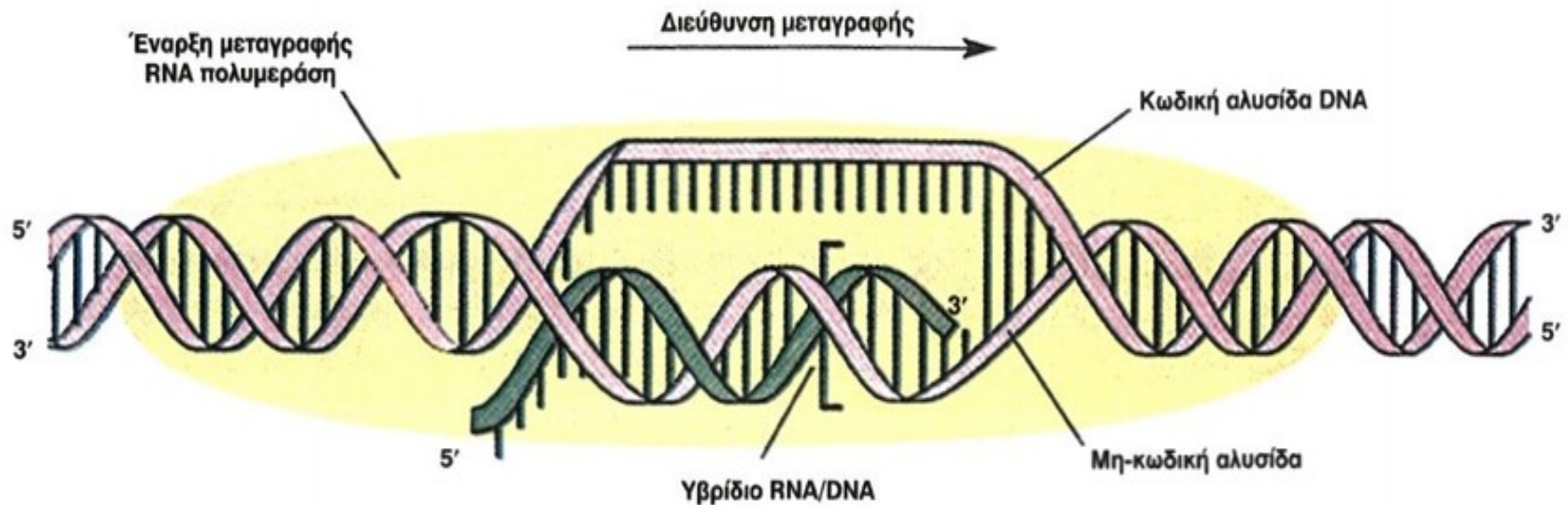


Ανασυνδυασμένο DNA. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2007.

- Κατά τη μεταγραφή συντίθεται μονόκλωνο RNA πάνω σε ένα τοπικά μονόκλωνο DNA-μήτρα.



Ο βασικός μηχανισμός της μεταγραφής

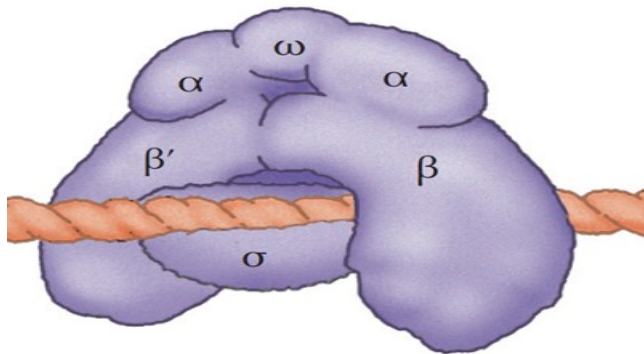


<http://ebooks.edu.gr/modules/ebook/show.php/DSGL-C112/52/390,1505/>



Προκαρυωτική RNA πολυμεράση

Βακτηριακή πολυμεράση



Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2011.
Το Κύτταρο-Μία Μοριακή Προσέγγιση

- Η RNA πολυμεράση έχει 4 τύπους υπομονάδων.

• Γονίδιο

groA (2 υπομονάδες α)

Λειτουργίες

Συναρμολόγηση του ενζύμου, αναγνώριση υποκινητή, σύνδεση με ορισμένους ενεργοποιητές

groB (υπομονάδα β)

Καταλυτικό κέντρο

groC (υπομονάδα β')

Καταλυτικό κέντρο

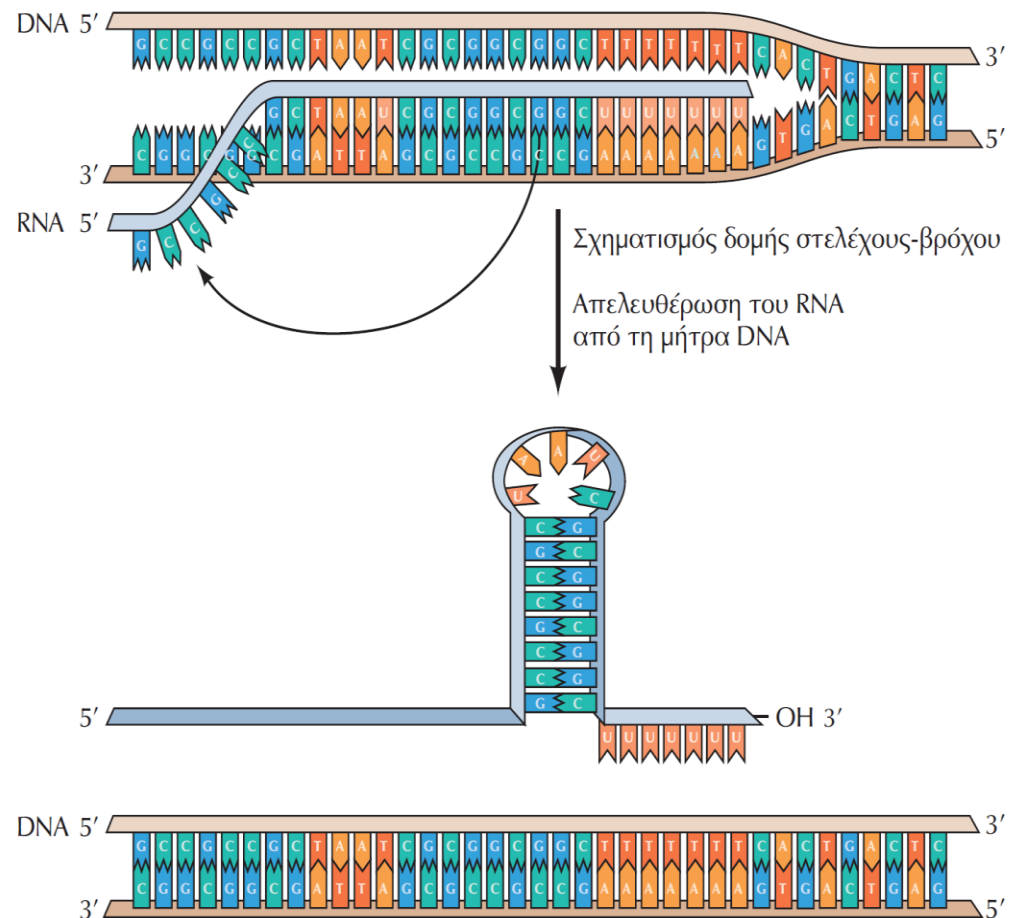
groD (υπομονάδα σ)

Εξειδίκευση υποκινητή



Οριοθέτηση μιας μεταγραφικής μονάδας

- Η μεταγραφή ξεκινάει μετά από μία αλληλουχία που καλείται υποκινητής.
- Ο τερματισμός της μεταγραφής σηματοδοτείται από μια ανάστροφα επαναλαμβανόμενη αλληλουχία πλούσια σε GC, η οποία ακολουθείται από περίπου επτά νουκλεοτίδια αδενίνης (A) στην αλυσίδα-μήτρα.
- Η μεταγραφή της ανάστροφης επανάληψης οδηγεί στον σχηματισμό μιας δομής στελέχους-βρόχου στο μόριο του RNA, η οποία αποσταθεροποιεί τη σύνδεση του μεταγράφου με τη μήτρα DNA προκαλώντας την απελευθέρωσή του.

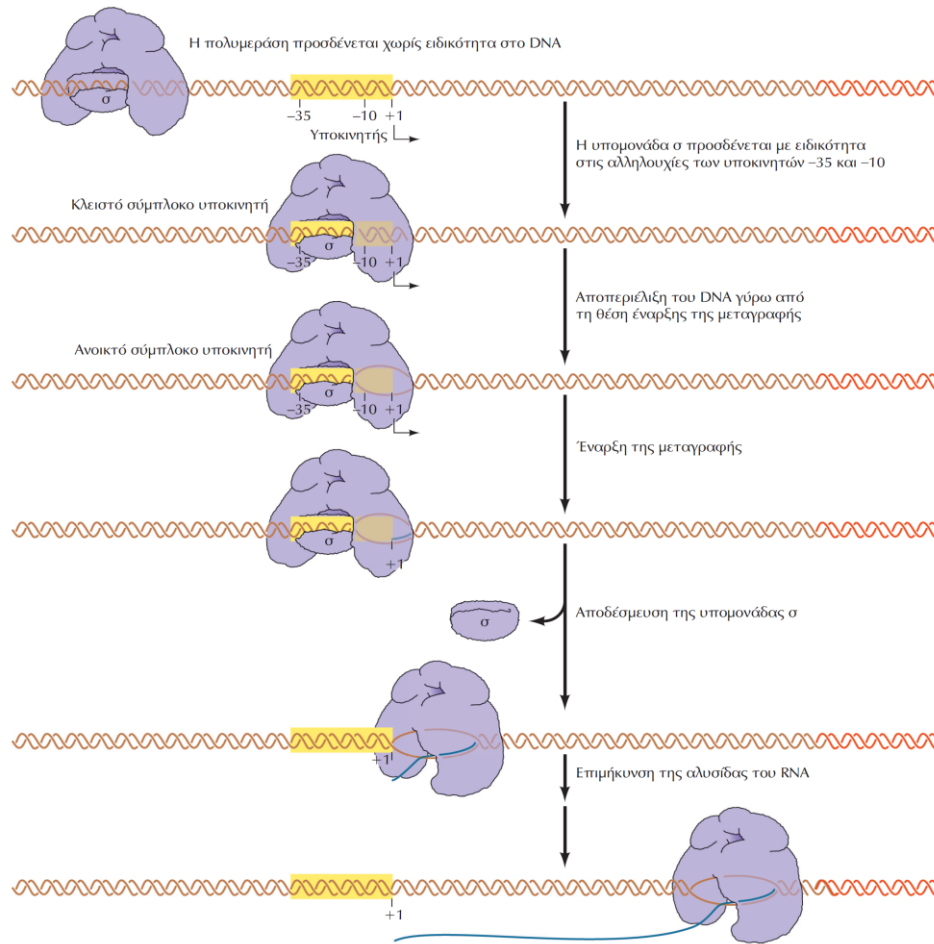


Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2011.

Το Κύτταρο-Μία Μοριακή Προσέγγιση



Η διαδικασία της προκαρυωτικής μεταγραφής- ο παράγοντας σ



- Η προκαρυωτική RNA πολυμεράση προσδένεται μη ειδικά στο DNA.
- Ο παράγοντας σίγμα (σ) μειώνει τη συγγένεια για τις τυχαίες αλληλουχίες και παρέχει εξειδίκευση για τους υποκινητές, ώστε τελικά το ολοένζυμο συνδέεται στον υποκινητή.

Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2011.
Το Κύτταρο-Μία Μοριακή Προσέγγιση

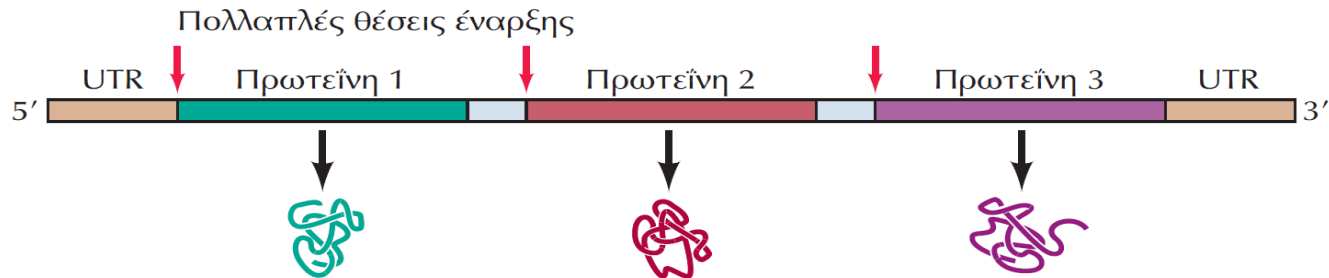
Υπάρχουν περισσότεροι από ένας παράγοντες σ

| Παράγοντας σίγμα | Υποκινητές που αναγνωρίζει | <u>Τμήμα -35</u> | <u>Τμήμα -10</u> |
|------------------|---|------------------|------------------|
| σ^{70} | Τα περισσότερα γονίδια | TTGACAT | TATAAT |
| σ^{32} | Γονίδια που επάγονται από θερμική καταπόνηση (heat-shock) | TCTCNCCTTGAA | CCCCATNTA |
| σ^{28} | Γονίδια που εμπλέκονται στη κινητικότητα και στη χημειοταξία | CTAAA | CCGATAT |
| σ^{38} | Γονίδια της στατικής φάσης ανάπτυξης και της απόκρισης σε στρες | ? | ? |
| | | <u>Τμήμα -24</u> | <u>Τμήμα -12</u> |
| σ^{54} | Γονίδια του μεταβολισμού του αζώτου αλλά και άλλων λειτουργιών | CTGGNA | TTGCA |

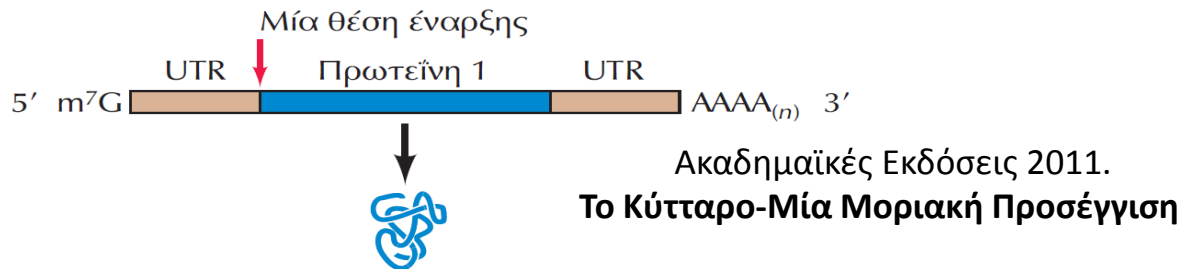


Δομή γενετικού υλικού προκαρυωτικών κυττάρων

Προκαρυωτικό mRNA



Ευκαρυωτικό mRNA



- Τόσο τα προκαρυωτικά όσο και τα ευκαρυωτικά mRNA φέρουν μη μεταφραζόμενες περιοχές (UTR) στο 5' και στο 3' άκρο τους. Τα ευκαρυωτικά mRNA φέρουν επίσης μία καλύπτρα 7-μεθυλογουανωσίνης (m⁷G) στο 5' άκρο τους και μία ουρά πολυ(A) στο 3' άκρο τους.
- Τα προκαρυωτικά mRNA είναι συχνά πολυσιστρονικά, κωδικοποιούν δηλαδή πολλαπλές πρωτεΐνες, καθεμία από τις οποίες μεταφράζεται από ένα ανεξάρτητο ανοικτό αναγνωστικό πλαίσιο. Με ελάχιστες εξαιρέσεις, τα ευκαρυωτικά mRNA είναι μονοσιστρονικά, κωδικοποιούν δηλαδή ένα μόνο πολυπεπτίδιο.



Το μοντέλο του οπερονίου

- Η πρόταση του μοντέλου του **οπερονίου**, ως μηχανισμού γονιδιακής ρύθμισης, από τους Francois Jacob και Jacques Monod το 1961, ήταν από τους θεμέλιους λίθους της σύγχρονης Μοριακής Βιολογίας.
- Το κεντρικό σημείο του μοντέλου βασίζονταν στην παραδοχή ότι τα επίπεδα των πρωτεϊνών μέσα στα κύτταρα ρυθμίζονταν στο γενετικό επίπεδο. Επίσης προέβλεπε την ύπαρξη του mRNA-ενός ασταθούς ενδιάμεσου μορίου που υπάρχει μεταξύ γονιδιώματος και εκφραζομένης πρωτεΐνης.
- Πριν από το οπερόνιο, η επικρατούσα άποψη βασίζονταν στη λεγόμενη **υπόθεση καθοδήγησης (instruction hypothesis)** που έλεγε ότι οι πρωτεΐνες είναι πάντα παρούσες στο κύτταρο, αλλά απουσία επαγωγέα αποτυγχάνουν να αναδιπλωθούν σωστά και είναι ανενεργές.
- Οι Jacob και Monod τιμήθηκαν με το βραβείο Nobel το 1965 για δουλειά τους πάνω στο χαρακτηρισμό των γονιδίων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό της λακτόζης.



Γονιδιακή έκφραση και διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης

- Τα βακτήρια αποκρίνονται στις αλλαγές του περιβάλλοντος τους μεταβάλλοντας την έκφραση των γονιδίων τους.
- Η γονιδιακή έκφραση των βακτηρίων μπορεί να ρυθμίζεται σε πολλαπλά επίπεδα:
 - ✓ μεταγραφή
 - ✓ σταθερότητα mRNA
 - ✓ μετάφραση
 - ✓ σταθερότητα πρωτεϊνών.



Χρήση της λακτόζης ως πηγή άνθρακα από τα βακτηριακά κύτταρα

- Για να χρησιμοποιηθεί η λακτόζη, σαν πηγή άνθρακα, από τα βακτηριακά κύτταρα απαιτείται η συγχρονισμένη έκφραση αρκετών νέων πρωτεϊνών.
- **Περμεάση της λακτόζης:** Πρωτεΐνη της εσωτερικής μεμβράνης με 12 διαμεμβρανικές α-έλικες. Μεταφέρει λακτόζη μέσα στο κύτταρο.
- **β-γαλακτοσιδάση:** Ένζυμο που διασπά το γλυκοσιδικό δεσμό μεταξύ γαλακτόζης και γλυκόζης.



Θετική και αρνητική μεταγραφική ρύθμιση των προκαρυωτικών οπερονίων

- Η έκφραση των περισσότερων προκαρυωτικών οπερονίων ρυθμίζεται ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου
 - είτε θετικά (επαγωγή)
 - είτε αρνητικά (καταστολή).

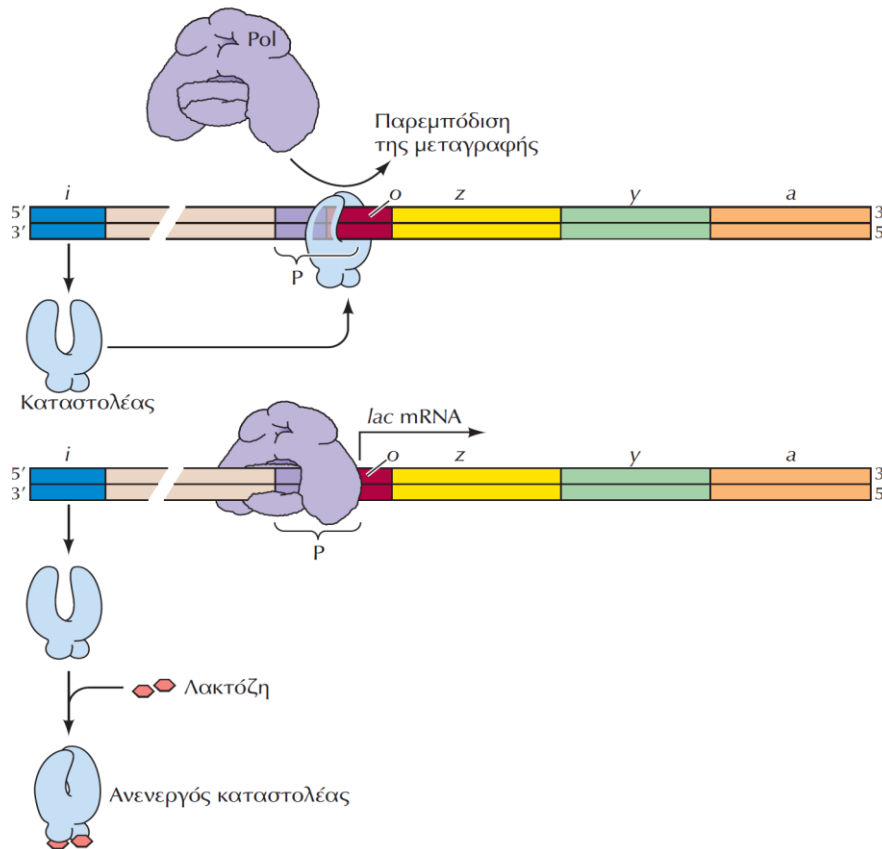


Ενεργοποιητές και καταστολείς

- Τόσο οι ενεργοποιητές όσο και οι καταστολείς είναι πολυπεπτίδια που κωδικοποιούνται από ρυθμιστικά γονίδια.
- Οι ενεργοποιητές και οι καταστολείς συνδέονται με ρυθμιστικά τμήματα του DNA σχετικά κοντά στο σημείο έναρξης της μεταγραφής.
- Οι ενεργοποιητές ενεργοποιούν (επάγουν) τη μεταγραφή οι καταστολείς την καταστέλλουν.
- Οι δράση των ενεργοποιητών και των καταστολέων είναι ρυθμιζόμενη.



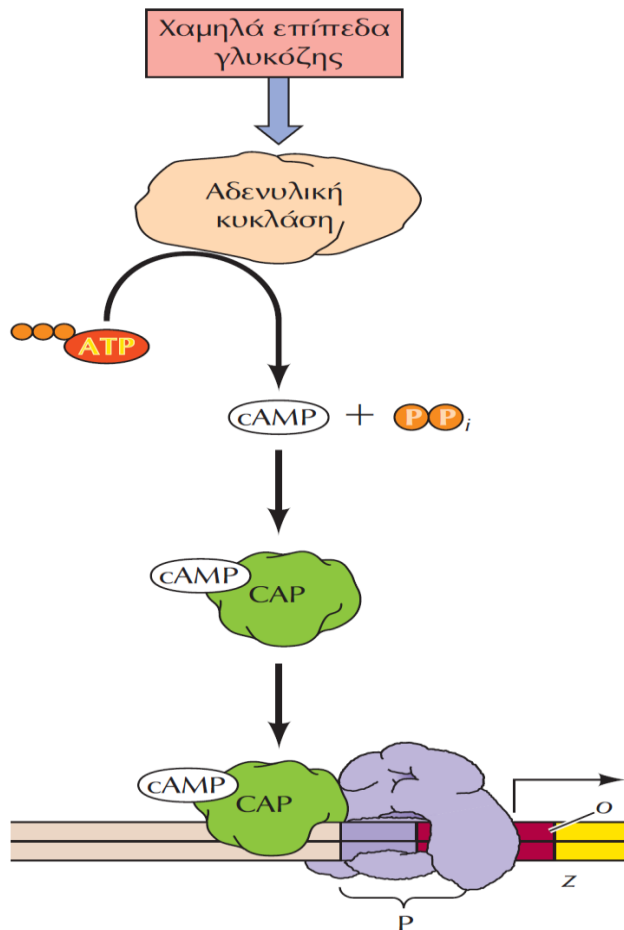
Ρυθμιζόμενη μεταγραφή στο οπερόνιο της λακτόζης (1)



Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2011.
Το Κύτταρο-Μία Μοριακή Προσέγγιση

- Αρνητική ρύθμιση του οπερονίου *lac*.
- Το γονίδιο *i* κωδικοποιεί έναν καταστολέα ο οποίος, όταν δεν υπάρχει λακτόζη (επάνω τμήμα της εικόνας), προσδένεται στον χειριστή (*o*) και εμποδίζει την RNA πολυμεράση να μεταγράψει τα τρία δομικά γονίδια του οπερονίου (*z*: β-γαλακτοζιδάση, *y*: περμεάση και *a*: τρανσακετυλάση).
- Όταν υπάρχει λακτόζη (κάτω τμήμα της εικόνας), αυτή προσδένεται στον καταστολέα και τον εμποδίζει να προσδεθεί στον χειριστή, με αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης του οπερονίου.
- P = υποκινητής, Pol = RNA πολυμεράση.

Ρυθμιζόμενη μεταγραφή στο οπερόνιο της λακτόζης (2)



Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2011.

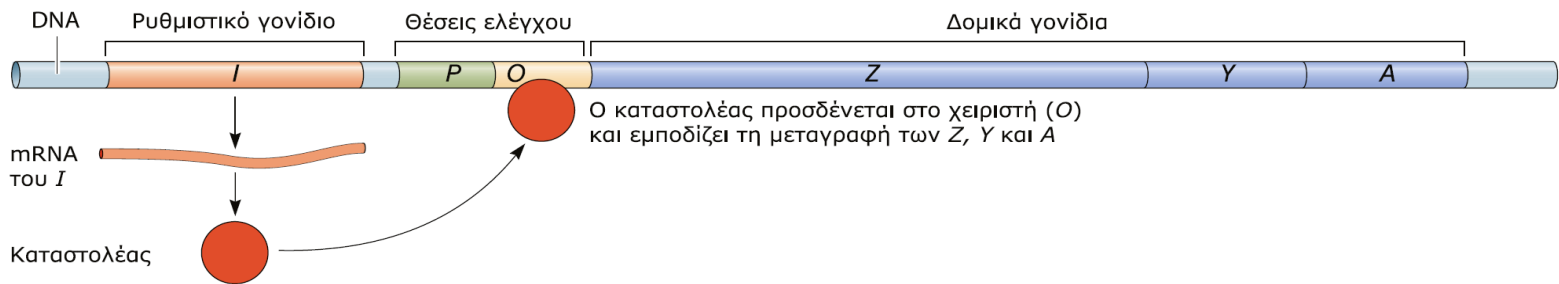
Το Κύτταρο-Μία Μοριακή Προσέγγιση

- Θετική ρύθμιση του οπερονίου *lac* από τη γλυκόζη.
- Όταν τα επίπεδα γλυκόζης είναι μειωμένα, ενεργοποιείται η αδενυλική κυκλάση, η οποία μετατρέπει το ATP σε κυκλικό AMP (cAMP).
- Το cAMP προσδένεται στον ενεργοποιητή καταβολικών γονιδίων (CAP) και διεγείρει την πρόσδεσή του σε ρυθμιστικές αλληλουχίες διαφόρων οπερονίων.
- Τα οπερόνια που ενεργοποιούνται από τον CAP κωδικοποιούν ένζυμα του μεταβολισμού άλλων, πέραν της γλυκόζης, εναλλακτικών σακχάρων, για παράδειγμα της λακτόζης.
- Η πρωτεΐνη CAP διευκολύνει την πρόσδεση της RNA πολυμεράσης στον υποκινητή μέσω αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσει με την υπομονάδα α του ενζύμου.

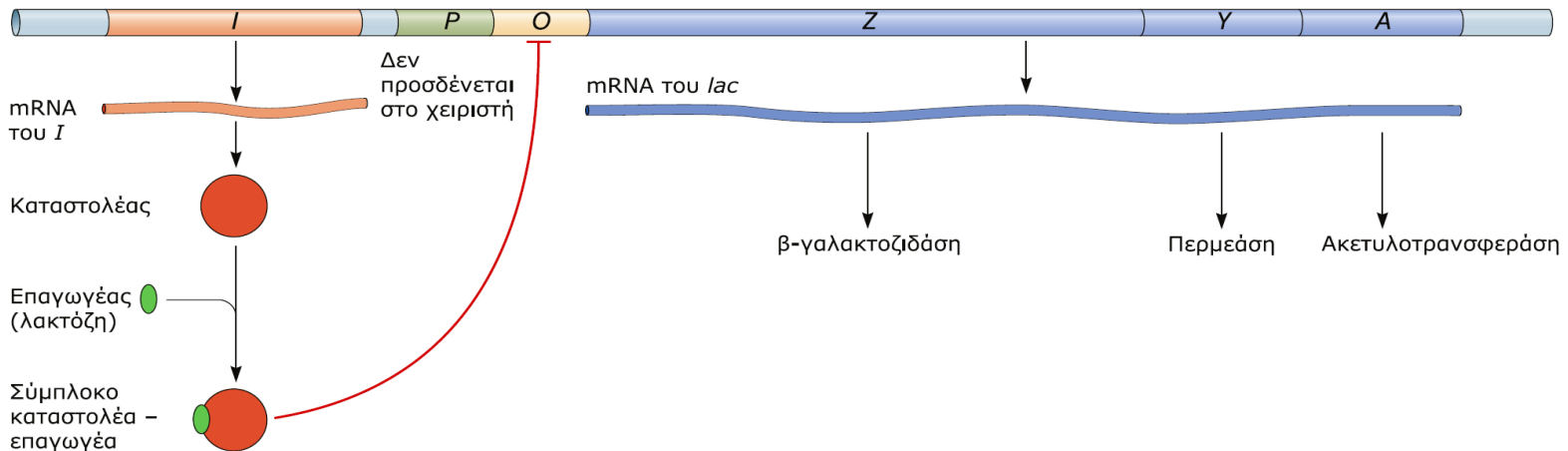


Ρύθμιση έκφρασης του *lac* οπερονίου από καταστολέα και ενεργοποιητή

(α) Κατάσταση καταστολής του οπερονίου της λακτόζης



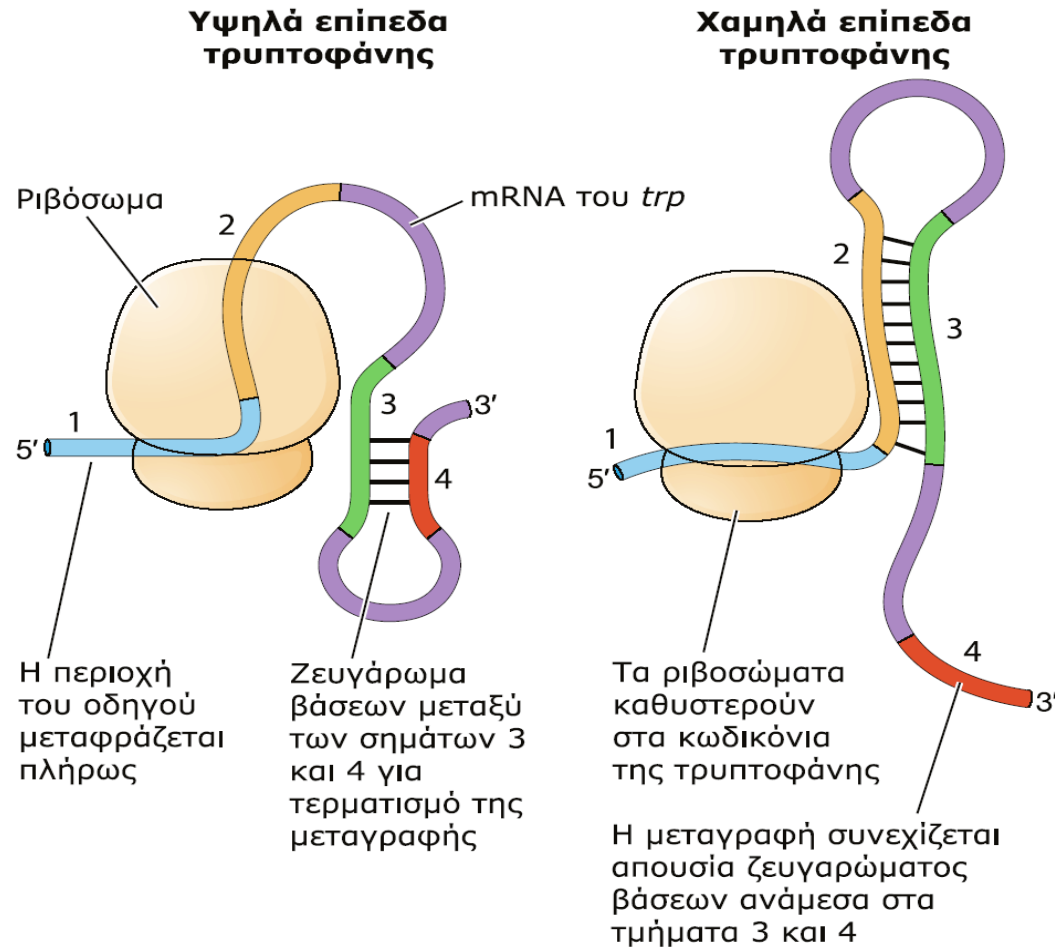
(β) Κατάσταση επαγωγής του οπερονίου της λακτόζης



Ανασυνδυασμένο DNA. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2007.



Ρύθμιση του οπερονίου *trp* με εξασθενιστές



Ανασυνδυασμένο DNA. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2007.

Στα βακτήρια η λήξη της μεταγραφής γίνεται σε συγκεκριμένες θέσεις

- Οι αλληλουχίες DNA που απαιτούνται για τον τερματισμό εντοπίζονται πριν την αλληλουχία τερματισμού. Ίσως είναι αναγκαίος ο σχηματισμός μιας φουρκέτας στο RNA.
- Οι ενδογενείς αλληλουχίες τερματισμού περιλαμβάνουν παλινδρομικές περιοχές οι οποίες σχηματίζουν φουρκέτες (δομές στελέχους-βρόχου) με ποικίλο μήκος, από 7-20 bp. Η δομή στελέχους-βρόχου περιλαμβάνει μια περιοχή πλούσια σε G-C και ακολουθείται από μια σειρά καταλοίπων U.



Οι Rho-εξαρτώμενοι τερματιστές

- Ένας Rho-εξαρτώμενος τερματιστής έχει αλληλουχία πλούσια σε C και φτωχή σε G, και εντοπίζεται πριν από την ακριβή θέση (ή θέσεις) τερματισμού.
- Ο παράγοντας Rho «καταδιώκει» την RNA πολυμεράση κατά μήκος του RNA και μπορεί να προκαλέσει τερματισμό όταν προλάβει το στάσιμο ένζυμο σε μια Rho-εξαρτώμενη αλληλουχία τερματισμού.
- Η δράση του παράγοντα Rho μπορεί να συνδέσει τη μεταγραφή με τη μετάφραση όταν η Rho-εξαρτώμενη αλληλουχία τερματισμού βρίσκεται λίγο μετά από μια ανερμηνεύσιμη μετάλλαξη.



Ο αντιτερματισμός

- Ο αντιτερματισμός μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της μεταγραφής, καθορίζοντας το αν η RNA πολυμεράση θα τερματίσει τη σύνθεση του RNA ή αν θα πραγματοποιήσει αναγνωστική διέλευση προχωρώντας προς την περιοχή που ακολουθεί.
- Μια πρωτεΐνη αντιτερματισμού μπορεί να επιδράσει στην RNA πολυμεράση επιτρέποντας την αναγνωστική διέλευσή της από μια ειδική αλληλουχία τερματισμού.



Οι παράγοντες αντιτερματισμού

- Οι παράγοντες αντιτερματισμού μπορούν να δράσουν σε διάφορες θέσεις της μεταγραφικής μονάδας.
- Η RNA πολυμεράση του ξενιστή μεταγράφει τα γονίδια του φάγου λ και τερματίζει τη μεταγραφή στις θέσεις *t*.
- Η πρωτεΐνη pN επιτρέπει την αναγνωστική διέλευση της RNA πολυμεράσης από τις αλληλουχίες τερματισμού tL και tR.
- Η πρωτεΐνη pQ επιτρέπει την αναγνωστική διέλευση της RNA πολυμεράσης από την αλληλουχία τερματισμού tR.
- Τα σημεία στα οποία δρα η pN (*nut*) και η pQ (*gut*) εντοπίζονται αντίστοιχα σε διαφορετικές σχετικές θέσεις στις μεταγραφικές μονάδες.



Παράγοντες τερματισμού και αντιτερματισμού

- Βοηθητικοί παράγοντες προσδένονται στην RNA πολυμεράση καθώς διέρχεται από τη θέση *nut*. Αυτοί εμποδίζουν τον Rho να προκαλέσει τερματισμό, όταν η πολυμεράση φτάσει στην αλληλουχία τερματισμού.
- Η θέση *nut* αποτελείται από δύο αλληλουχίες. Ο παράγοντας NusB-S10 ενώνεται με το κεντρικό ένζυμο καθώς αυτό διέρχεται από το *boxA*.
- Στη συνέχεια, προσδένονται οι πρωτεΐνες NusA και ρN καθώς η πολυμεράση διέρχεται από το *boxB*. Η παρουσία της ρN επιτρέπει την αναγνωστική διέλευση του ενζύμου από την αλληλουχία τερματισμού.
- Έτσι, παράγεται ένα ενιαίο mRNA που περιέχει αμέσως πρώιμες αλληλουχίες ενωμένες με καθυστερημένες πρώιμες αλληλουχίες.



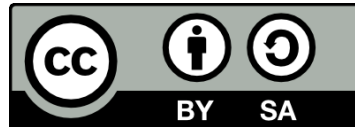
Σημείωμα Αναφοράς

Copyright Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, **Παναγιωτίδης Χρήστος**. «**Μοριακή Βιολογία. Εισαγωγή στη Μεταγραφή**». Έκδοση: 1.0. Θεσσαλονίκη 2014. Διαθέσιμο από τη δικτυακή διεύθυνση: <https://opencourses.auth.gr/courses/OCRS496/>



Σημείωμα Αδειοδότησης

Το παρόν υλικό διατίθεται με τους όρους της άδειας χρήσης Creative Commons Αναφορά - Παρόμοια Διανομή [1] ή μεταγενέστερη, Διεθνής Έκδοση. Εξαιρούνται τα αυτοτελή έργα τρίτων π.χ. φωτογραφίες, διαγράμματα κ.λ.π., τα οποία εμπεριέχονται σε αυτό και τα οποία αναφέρονται μαζί με τους όρους χρήσης τους στο «Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων».



Ο δικαιούχος μπορεί να παρέχει στον αδειοδόχο ξεχωριστή άδεια να χρησιμοποιεί το έργο για εμπορική χρήση, εφόσον αυτό του ζητηθεί.

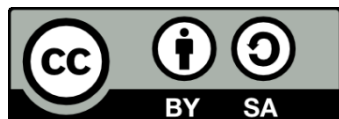
[1] <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>





Τέλος ενότητας

Επεξεργασία: Τσαχουρίδου Βασιλική
Θεσσαλονίκη, Σεπτέμβριος 2015



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ