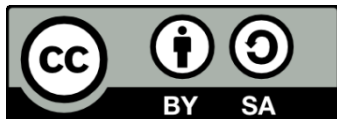




Μοριακή Βιολογία

Ενότητα # (5): Ωρίμανση του RNA, ιντρόνια/εξώνια και μεταγραφική ρύθμιση

Παναγιωτίδης Χρήστος
Τμήμα Φαρμακευτικής



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ



ΕΣΠΑ
2007-2013
πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

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.





Ωρίμανση του RNA, ιντρόνια/εξώνια και μεταγραφική ρύθμιση



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

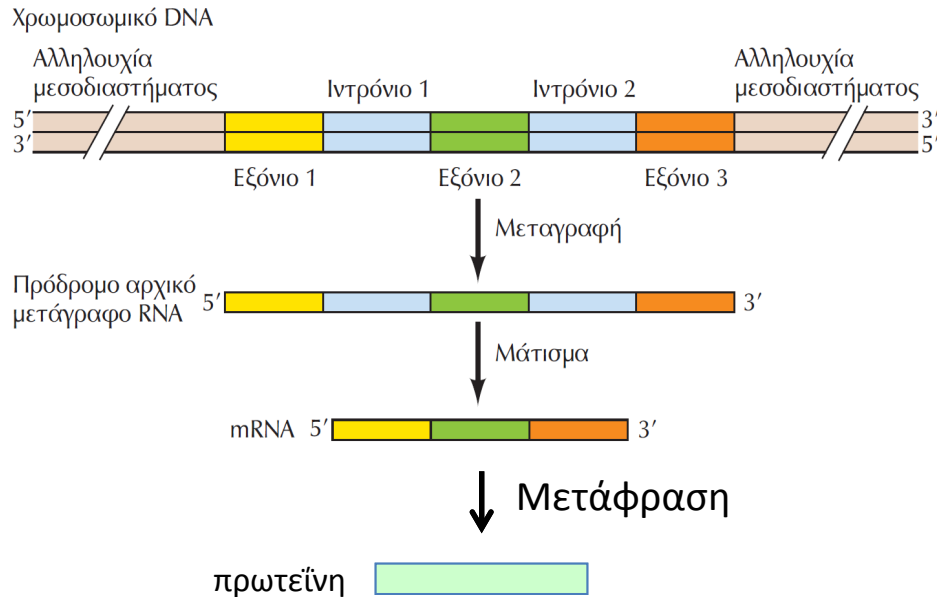
Σκοποί ενότητας

- Να περιγραφεί η διαδικασία συρραφής και «ωρίμανσης» των mRNAs.
- Να τονισθούν ο ρόλος των miRNAs στη μεταφραστική ρύθμιση και ο ρόλος τους γενικά στα ευκαρυωτικά κύτταρα.

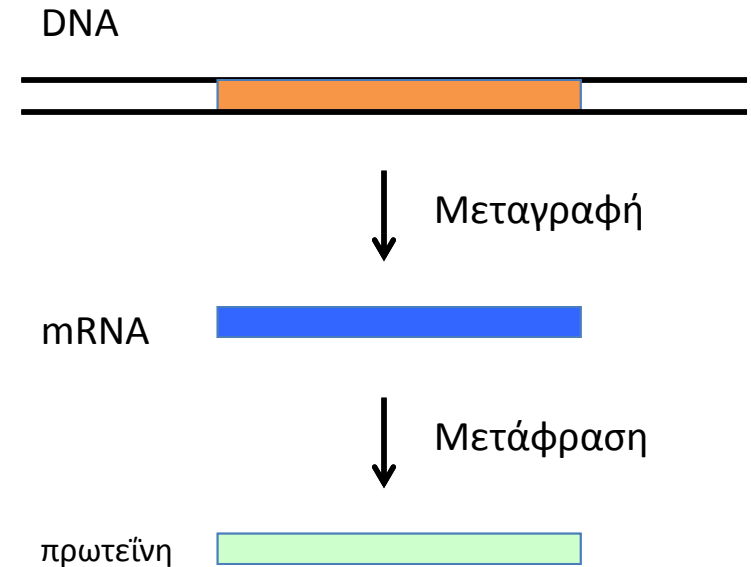


Το Βασικό Δόγμα της μοριακής βιολογίας σε ευκαρυώτες και προκαρυώτες

ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ



ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ



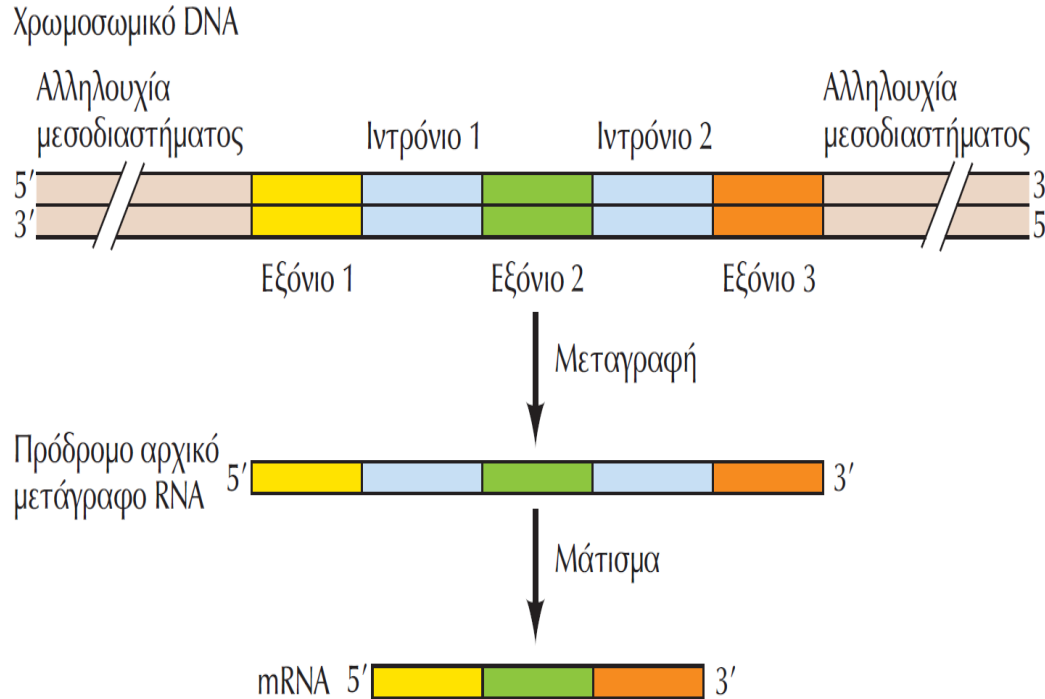
Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2011.
Το Κύτταρο-Μία Μοριακή Προσέγγιση





**Πριν μεταφρασθούν, τα ευκαρυωτικά
RNAs τροποποιούνται πολλαπλώς.**

Ωρίμανση των ευκαρυωτικών RNAs

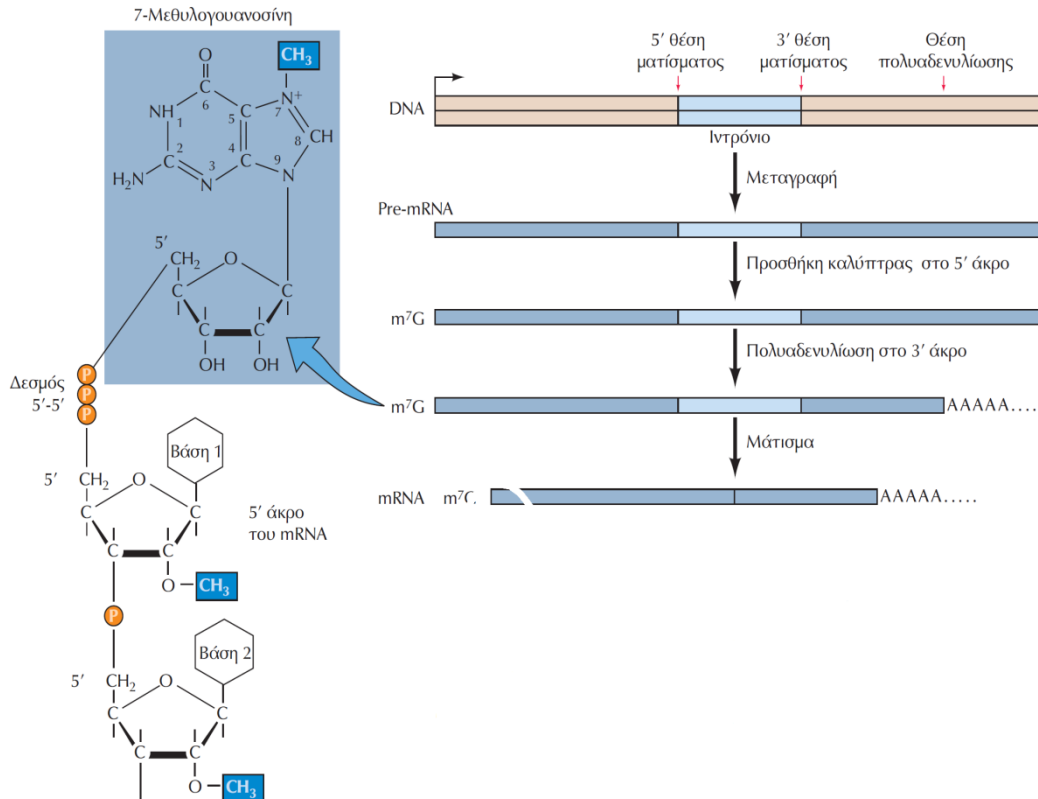


Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2011.
Το Κύτταρο-Μία Μοριακή Προσέγγιση

- Τα περισσότερα ευκαρυωτικά γονίδια περιέχουν τμήματα κωδικών αλληλουχιών (εξόνια) τα οποία διακόπτονται από μη κωδικές αλληλουχίες (ιντρόνια).
- Τα εξόνια και τα ιντρόνια μεταγράφονται σε ένα πρόδρομο αρχικό μετάγραφο RNA.
- Στη συνέχεια, τα ιντρόνια απομακρύνονται με τον μηχανισμό του ματίσματος για να σχηματιστεί το ώριμο mRNA.



Επίπεδα «ωρίμανσης» των mRNAs



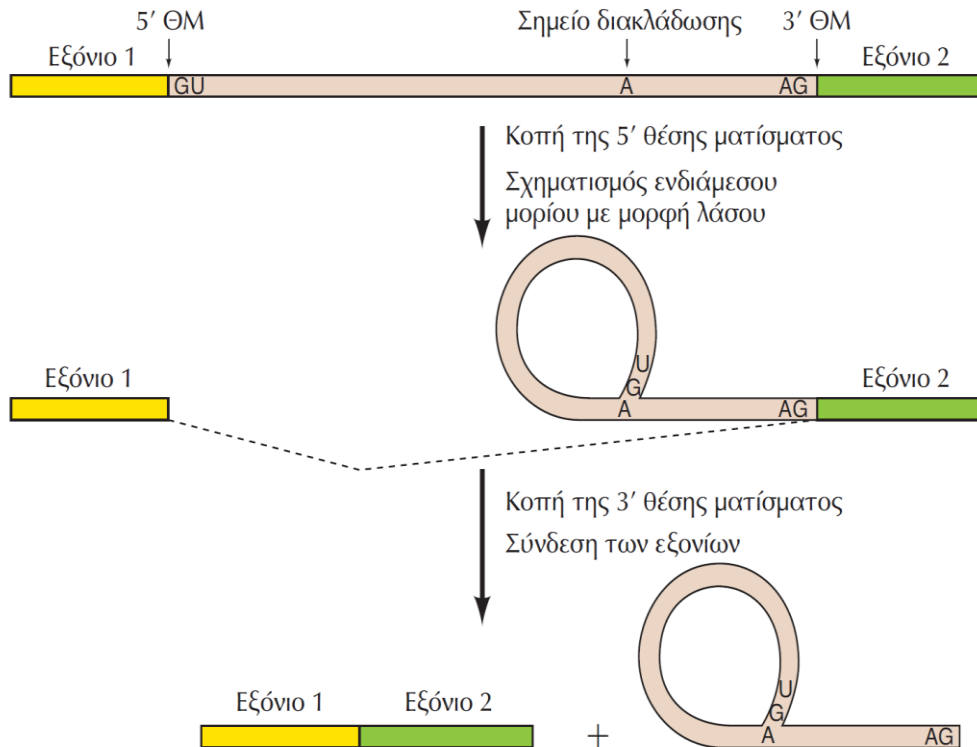
- Η επεξεργασία του mRNA περιλαμβάνει την τροποποίηση του 5' άκρου του μέσω της προσθήκης μιας καλύπτρας 7-μεθυλογουανοσίνης (m⁷G).
- Αυτή η 5' καλύπτρα σχηματίζεται με την προσθήκη στο 5' άκρο του mRNA ενός GTP σε αντίστροφο προσανατολισμό, σχηματίζοντας έναν δεσμό 5'-5'.
- Το πρόσθετο G μεθυλιώνεται στη θέση N-7 και μεθυλομάδες προστίθενται επίσης στις ριβόζες του ενός ή των δύο πρώτων νουκλεοτιδίων του RNA.
- Η τροποποίηση του 3' άκρου συνίσταται στην προσθήκη μιας ουράς πολυ(A).

Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2011.

Το Κύτταρο-Μία Μοριακή Προσέγγιση



Η συρραφή των mRNAs



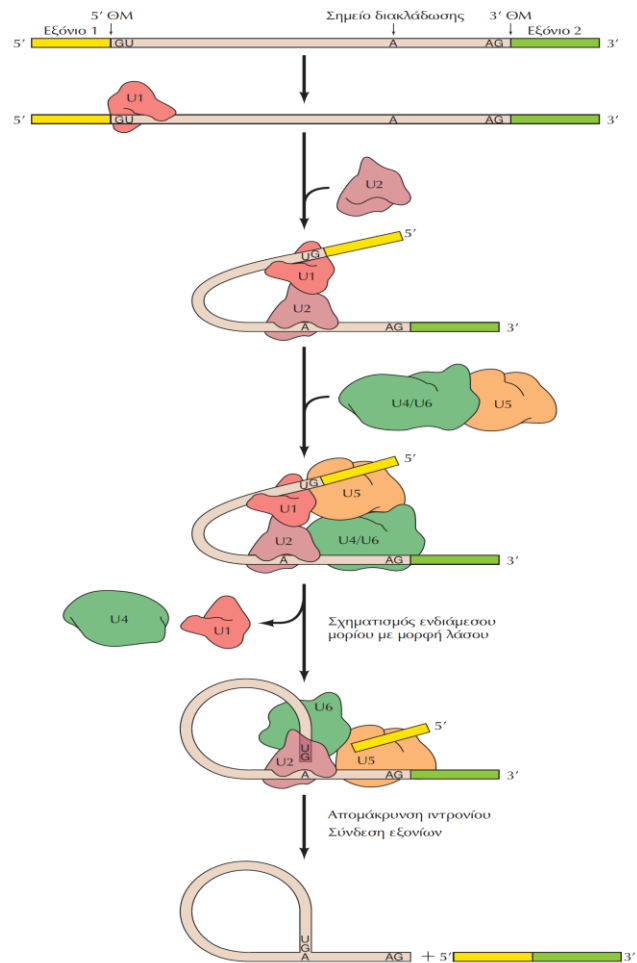
Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2011.

Το Κύτταρο-Μία Μοριακή Προσέγγιση

- Η διαδικασία του ματίσματος λαμβάνει χώρα σε δύο στάδια.
- Κατά το πρώτο στάδιο, η 5' θέση ματίσματος (ΘΜ) προσβάλλεται από το υδροξύλιο της 2' θέσης ενός νουκλεοτιδίου αδενίνης (στο σημείο διακλάδωσης) το οποίο βρίσκεται κοντά στο 3' άκρο του ιντρονίου. Με τον τρόπο αυτό, το 5' άκρο του ιντρονίου συνδέεται με το νουκλεοτίδιο της αδενίνης του σημείου διακλάδωσης και έτσι προκύπτει ένα ενδιάμεσο μόριο που έχει τη μορφή λάσου.
- Κατά το δεύτερο στάδιο κόβεται η 3' θέση ματίσματος και ταυτόχρονα τα δύο εξόνια συνδέονται μεταξύ τους, ενώ το ιντρόνιο απομακρύνεται ως ένα μόριο με μορφή λάσου το οποίο αργότερα αποικοδομείται μέσα στον πυρήνα του κυττάρου.



Ο μηχανισμός της συρραφής των mRNAs



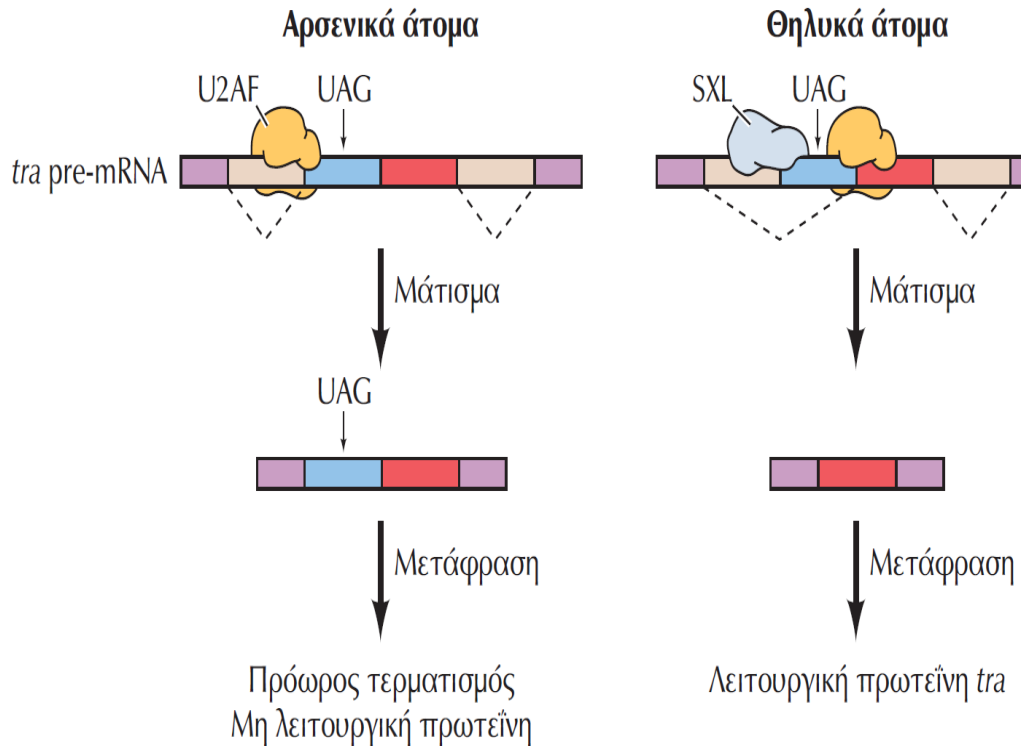
- Το πρώτο βήμα κατά τον σχηματισμό του σωματίου ματίσματος έγκειται στην πρόσδεση του U1 snRNP στην 5' θέση ματίσματος (ΘΜ) του pre-mRNA.
- Ακολουθεί η πρόσδεση του U2 snRNP στο σημείο διακλάδωσης. Κατόπιν, ένα προσχηματισμένο σύμπλοκο που αποτελείται από τα U4/U6 και U5 snRNP ενσωματώνεται στο σωματίο ματίσματος μέσω δεσμών υδρογόνου οι οποίοι αναπτύσσονται ανάμεσα στο U5 snRNA και τις αλληλουχίες που βρίσκονται ανοδικά της 5' θέσης ματίσματος.
- Κατόπιν, τα U1 και U4 αποσυνδέονται από το σύμπλοκο, ενώ το U6 αντικαθιστά το U1 στην 5' θέση ματίσματος και αναπτύσσει αλληλεπιδράσεις με το U2. Έτσι έρχονται κοντά η 5' θέση ματίσματος και το σημείο διακλάδωσης, προκειμένου να σχηματιστεί η δομή σε σχήμα λάσου.
- Το U5 προσδένεται στην 3' θέση ματίσματος και διευθετεί τα δύο εξόνια κατά τέτοιο τρόπο ώστε να συνδεθούν μεταξύ τους και παράλληλα να απομακρυνθεί το ιντρόνιο.

Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2011.

Το Κύτταρο-Μία Μοριακή Προσέγγιση



Εναλλακτική συρραφή

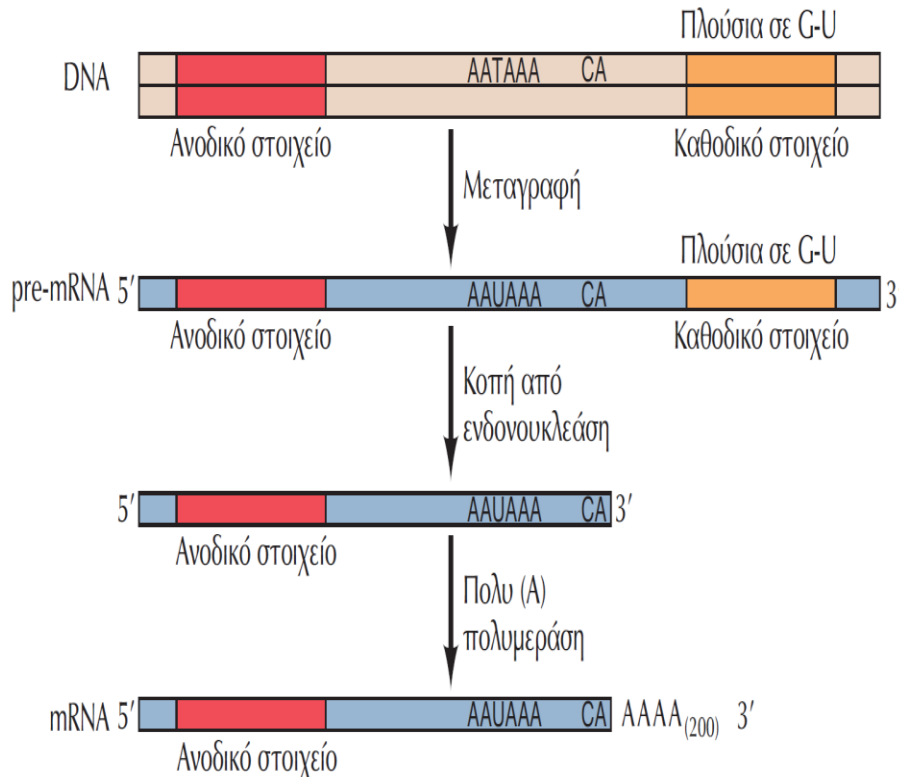


Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2011.
Το Κύτταρο-Μία Μοριακή Προσέγγιση

- Το εναλλακτικό μάτισμα του mRNA του γονιδίου *transformer (tra)* ρυθμίζεται από την πρωτεΐνη SXL, η οποία εκφράζεται μόνο στις θηλυκές μύγες. Στα αρσενικά άτομα, το πρώτο εξόνιο του mRNA του *tra* συνδέεται σε μια τέτοια 3' θέση ματίσματος, ώστε το δεύτερο εξόνιο να περιέχει ένα κωδικόνιο τερματισμού της μετάφρασης (UAG). Συνεπώς δεν παράγεται η πρωτεΐνη του γονιδίου *tra*.



Ωρίμανση των 3' άκρων των mRNAs



Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2011.

Το Κύτταρο-Μία Μοριακή Προσέγγιση

- **ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ RNA ΚΑΘΟΡΙΖΟΥΝ ΤΗΝ ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΩΝ 3'-ΑΚΡΩΝ ΤΩΝ mRNAs**

- Τα σήματα πολυαδενυλίωσης στα θηλαστικά αποτελούνται από ένα εξανουκλεοτίδιο, το AAUAAA, και μια πλούσια σε G και U αλληλουχία η οποία βρίσκεται καθοδικά από αυτό.
- Επιπλέον, σε ορισμένα mRNA υπάρχει και μια πλούσια σε U αλληλουχία ανοδικά του στοιχείου AAUAAA. Κατά την πολυαδενυλίωση, μια ενδονουκλεάση κόβει το pre-mRNA 10 έως 30 νουκλεοτίδια καθοδικά του στοιχείου AAUAAA, συνήθως μετά από ένα δινουκλεοτίδιο CA.
- Κατόπιν, η πολυ(A) πολυμεράση προσθέτει στο 3' άκρο του RNA μια ουρά πολυ(A), η οποία αποτελείται από 200 περίπου νουκλεοτίδια αδενίνης.

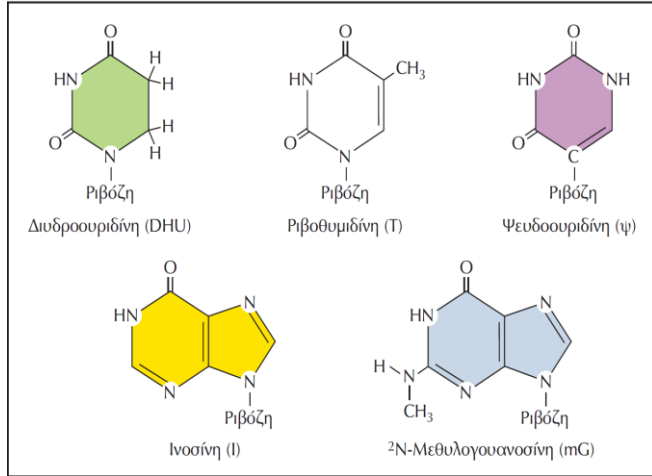




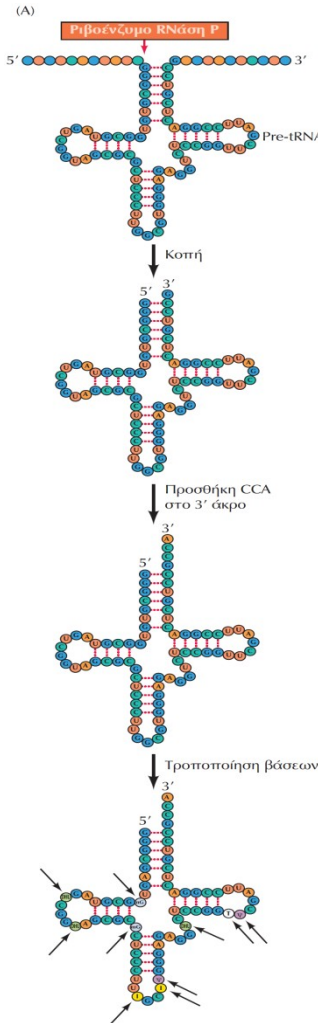
**Αλληλουχίες RNA καθορίζουν την
«ωρίμανση» των 3'-άκρων των
mRNAs.**

Η «ωρίμανση» των tRNAs

(B) Τροποποιημένες βάσεις



Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2011.
 Το Κύτταρο-Μία Μοριακή Προσέγγιση

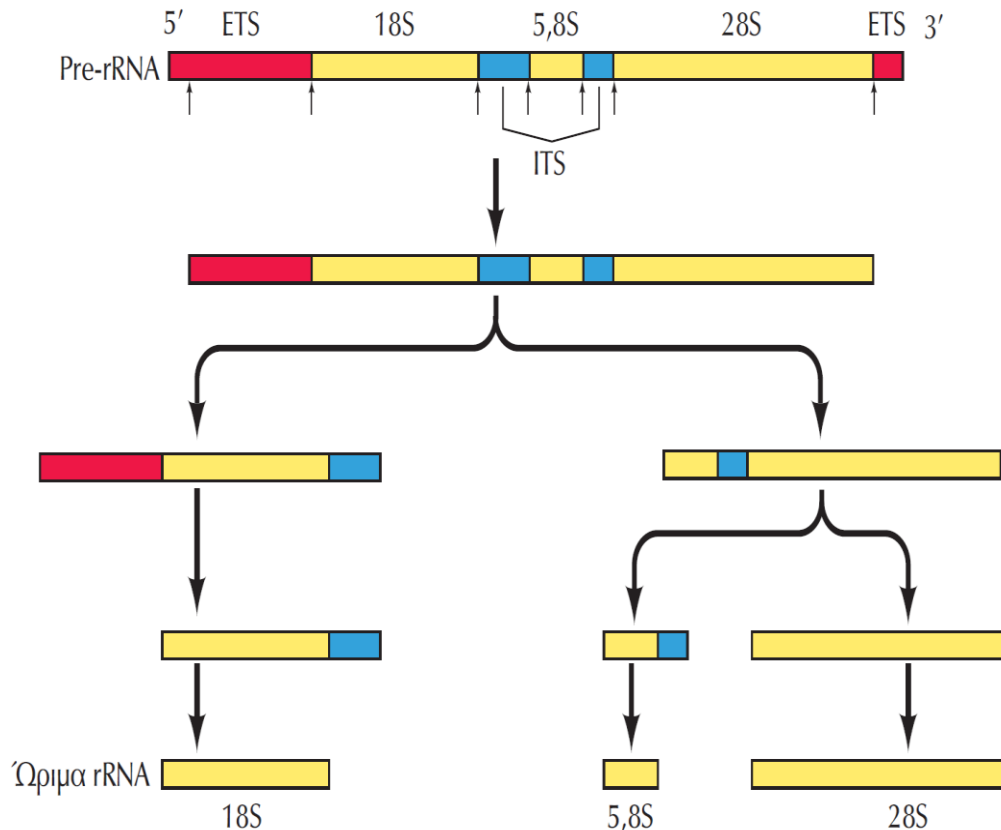


• (A) Τα μεταφορικά RNA προέρχονται από pre-tRNA, ορισμένα από τα οποία περιέχουν περισσότερα από ένα ανεξάρτητα μόρια tRNA. Στο πλαίσιο της ωρίμανσης των πρόδρομων μορίων το ριβοζένζυμο RNάση P καταλύει την κοπή του 5' άκρου, ενώ μια δεύτερη κοπή στο 3' άκρο καταλύεται από μια συμβατική, πρωτεϊνική RNάση. Στη συνέχεια, στο 3' άκρο πολλών tRNA προστίθεται το τρινουκλεοτίδιο CCA. Τέλος, ορισμένες βάσεις που βρίσκονται σε συγκεκριμένες θέσεις του μορίου υφίστανται κάποιες χαρακτηριστικές τροποποιήσεις. Μεταξύ των τροποποιημένων νουκλεοσιδίων που μπορεί να προκύψουν συμπεριλαμβάνονται η διυδροουριδίνη (DHU), η μεθυλογουανοσίνη (mG), η ινοσίνη (I), η ριβοθυμιδίνη (T) και η ψευδοουριδίνη (ψ).

• (B) Η δομή των τροποποιημένων βάσεων. Η ριβοθυμιδίνη, η διυδροουριδίνη και η ψευδοουριδίνη σχηματίζονται μέσω της τροποποίησης ουριδινών του tRNA. Η ινοσίνη και η μεθυλογουανοσίνη σχηματίζονται μέσω της τροποποίησης καταλοίπων γουανοσίνης.



Η «ωρίμανση» των ριβοσωμικών RNAs



Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2011.

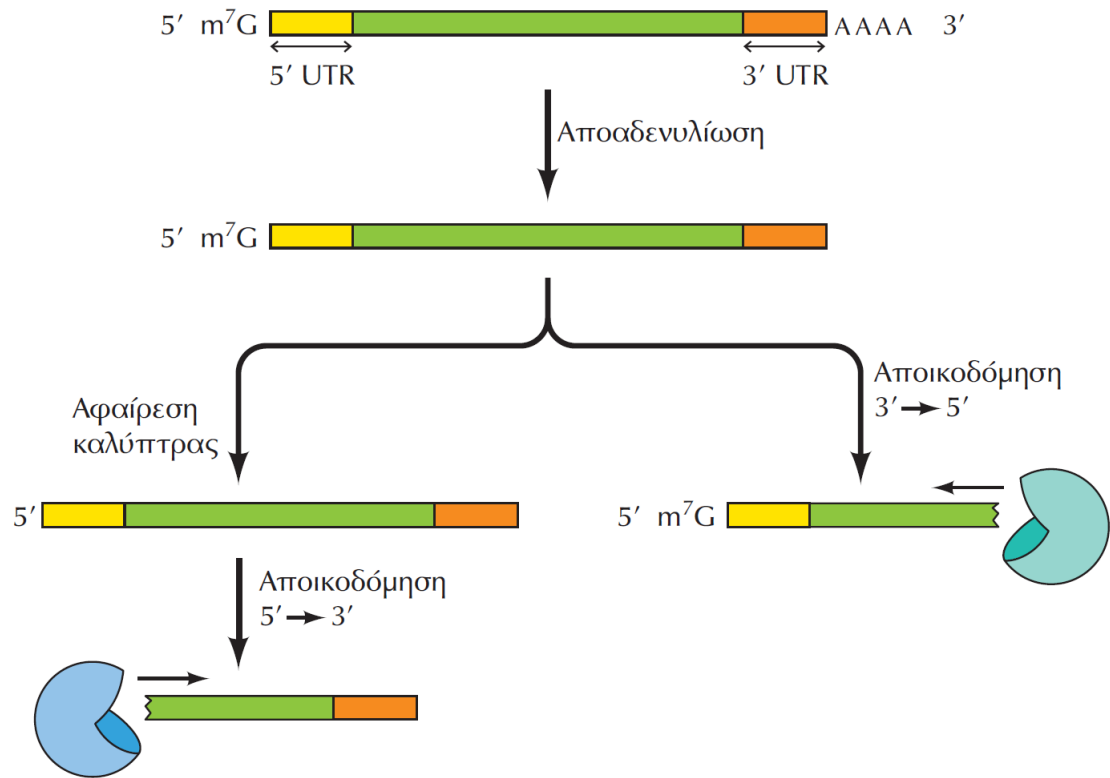
Το Κύτταρο-Μία Μοριακή Προσέγγιση

- Το μεταγράφο 45S pre-rRNA των ανώτερων ευκαρυωτών περιέχει εξωτερικά μεσοδιαστήματα μεταγραφόμενης αλληλουχίας (ETS, External Transcribed Spacers) στα δύο άκρα του και εσωτερικά μεσοδιαστήματα μεταγραφόμενης αλληλουχίας (ITS, Internal Transcribed Spacers) ανάμεσα στις αλληλουχίες των 18S, 5,8S και 28S rRNA.
- Το pre-rRNA υπόκειται σε επεξεργασία μέσω μιας σειράς τομών, από τις οποίες παράγονται τα ώριμα rRNA.



Η αποικοδόμηση των mRNAs

- Η αποικοδόμηση του mRNA συνήθως ξεκινά με τη μείωση του μήκους της ουράς πολυ(A). Η διαδικασία της αποαδενυλίωσης ακολουθείται είτε από την αποικοδόμηση του μορίου του mRNA με κατεύθυνση 3' προς 5' είτε από την απομάκρυνση της καλύπτρας στο 5' άκρο και την αποικοδόμηση του μορίου με κατεύθυνση 5' προς 3'.



Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2011.
Το Κύτταρο-Μία Μοριακή Προσέγγιση





Η γονιδιακή έκφραση ρυθμίζεται και από μικρά, μη κωδικά RNAs

Τα μικρο-RNAs (miRNAs) ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση

- Τα μικροRNAs (miRNAs) είναι μικρά μη-κωδικά RNA που ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση κυρίως στο επίπεδο της μετάφρασης.



Τα πρώτα miRNAs ανακαλύφθηκαν στο *C. elegans*

- Οι μεταλλάξεις *lin-14(lf)* προκαλούν ανώμαλα γρήγορη ανάπτυξη.
- Οι μεταλλάξεις *lin-14(gf)* και *lin-4* προκαλούν καθυστέρηση στην ανάπτυξη.
- wild type: embryo L1 L2 L3 L4 adult
- precocious: embryo L2 L3 L4 adult
- retarded: embryo L1 L1 L2 L3.....

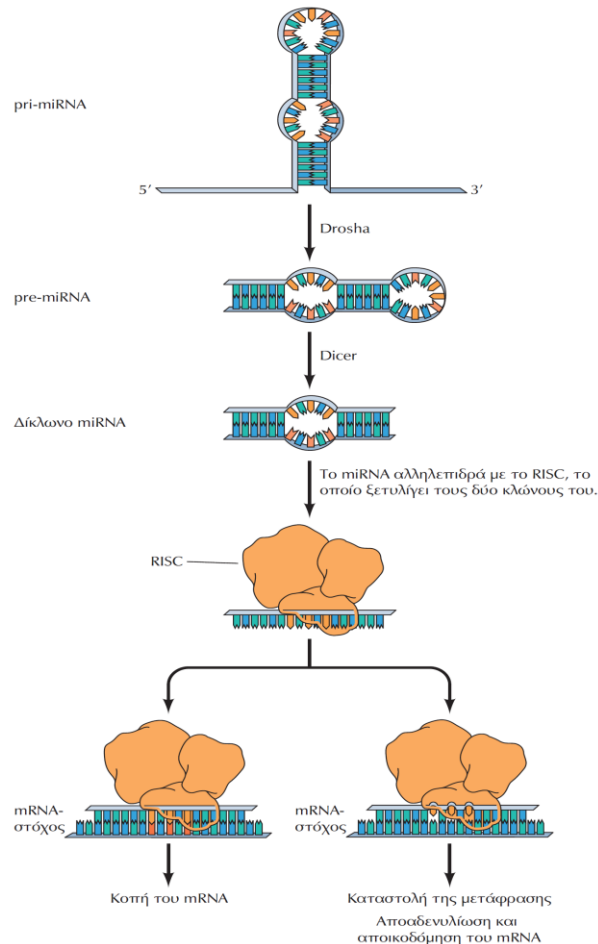


Το LIN-14 ρυθμίζεται από το lin-4

- Το lin-4 δεν κωδικοποιεί πρωτεΐνη, μόνο RNA.
- Το lin-4 RNA αυξάνεται κατά την ανάπτυξη της λάρβας.
- Το RNA του LIN-14 είναι συνέχεια παρόν, αλλά τα επίπεδα της πρωτεΐνης ελαττώνονται κατά την ανάπτυξη της λάρβας.
- Η παρουσία του lin-4 είναι απαραίτητη για να ελαττωθούν τα επίπεδα της LIN-14 πρωτεΐνης.
- Το lin-4 RNA μπορεί να υβριδισθεί με το 14 3' UTR του lin-14.



Μοντέλο της δημιουργίας και του τρόπου δράσης των miRNA



- Τα πρόδρομα μόρια των miRNA (pri-miRNA) κόβονται διαδοχικά από τις νουκλεάσες Drosha και Dicer, ώστε να παραχθούν μικρά δίκλιωνα μόρια RNA μήκους περίπου 22 νουκλεοτιδίων.
- Κατόπιν, τα miRNA αλληλεπιδρούν με το RISC, το οποίο ξετυλίγει τους δύο κλώνους του.
- Συνδεδεμένος με το RISC μένει μόνο ο ένας κλώνος, ο οποίος κατόπιν στοχεύει κάποιο ομόλογο προς αυτόν mRNA και προκαλεί είτε την κοπή του (αν ζευγαρώνει τέλεια με αυτό) είτε την καταστολή της μετάφρασής του, την αποαδενυλίωσή του και τελικά την αποικοδόμησή του (αν το ζευγάριμα δεν είναι πλήρες).

Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2011.

Το Κύτταρο-Μία Μοριακή Προσέγγιση

Μοριακή Βιολογία
Τμήμα Φαρμακευτικής

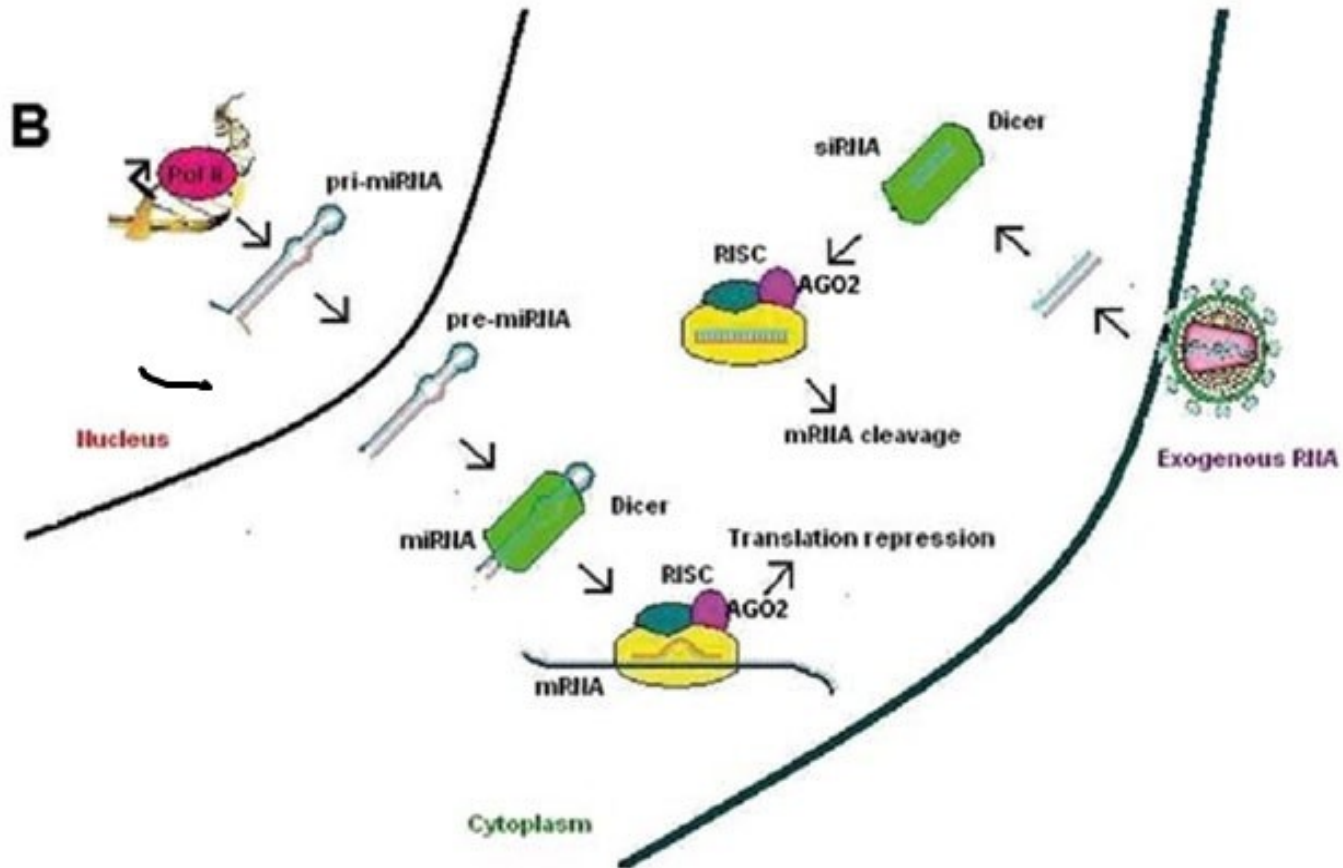
Έλεγχος του μοντέλου δράσης των miRNA



- Η έκφραση της γαλακτοσιδάσης (LacZ) ελαττώνεται κατά την ανάπτυξη της λάρβας.
- Το γονίδιο lin-4 είναι απαραίτητο για να λάβει χώρα η παραπάνω ελάττωση της LacZ.
- Ελάττωση των επιπέδων του Dicer ή των συστατικών του συμπλόκου Risc επίσης προκαλεί τον lin-4 φαινότυπο, δηλαδή η παρουσία τους είναι απαραίτητη για την ελάττωση των επιπέδων της LacZ.



Βιογένεση των miRNAs;



<http://www.pneumon.org/829/newsid844/186>





**Τα miRNAs αναστέλλουν τη
μετάφραση προκαλώντας
απομάκρυνση των ριβοσωματίων
από το mRNA;**

Χιλιάδες miRNAs επηρεάζουν πολλαπλές κυτταρικές λειτουργίες

- Διάφορα miRNAs επηρεάζουν πολλαπλές κυτταρικές λειτουργίες όπως:
 - τη διαφοροποίηση.
 - τη γήρανση.
 - την απόπτωση.
 - το μεταβολισμό.
 - την εμφάνιση μεταλλάξεων και καρκίνου.



Πόσα miRNAs υπάρχουν στον άνθρωπο;

- Συνολικός αριθμός miRNA γονιδίων σε 115 είδη 10,882.
- Συνολικός αριθμός γνωστών miRNA γονιδίων 1,580.
- Ταυτοποιηθέντα ανθρώπινα miRNA γονίδια 851.
- Αριθμός miRNA στόχων στον άνθρωπο 34,788.
- Τα miRNAs μπορεί να έχουν πολλαπλούς στόχους.
- Το κάθε mRNA-στόχος μπορεί να έχει πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης για miRNA.



Σημείωμα Αναφοράς

Copyright Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Παναγιωτίδης Χρήστος. «Μοριακή Βιολογία. Ωρίμανση του RNA, ιντρόνια/εξώνια και μεταγραφική ρύθμιση». 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.

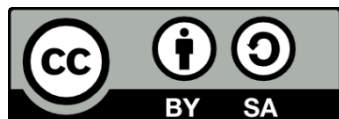
[1] <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>





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