



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



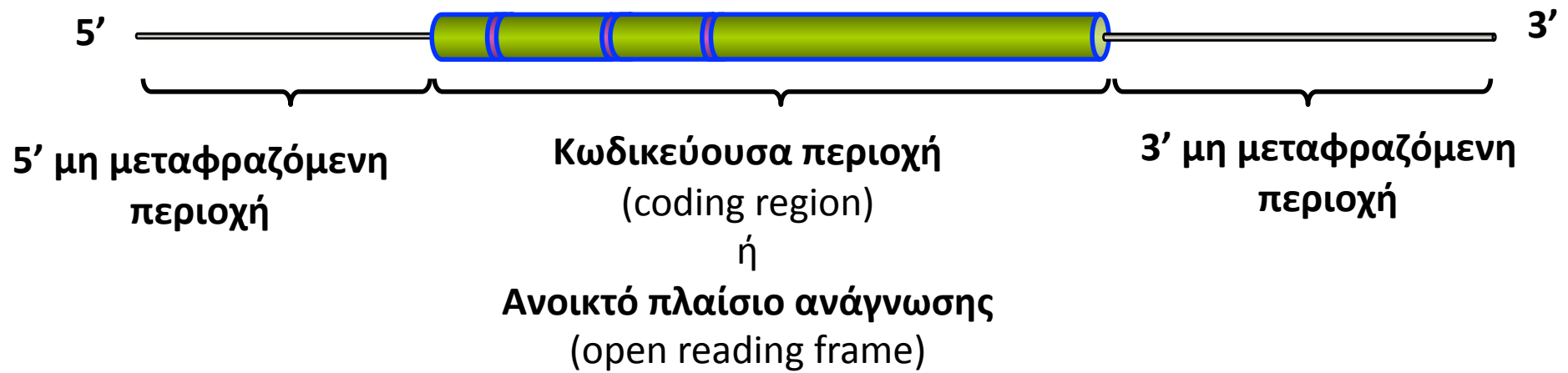
Βιοσύνθεση μακρομορίων

3. Η ωρίμανση των RNAs

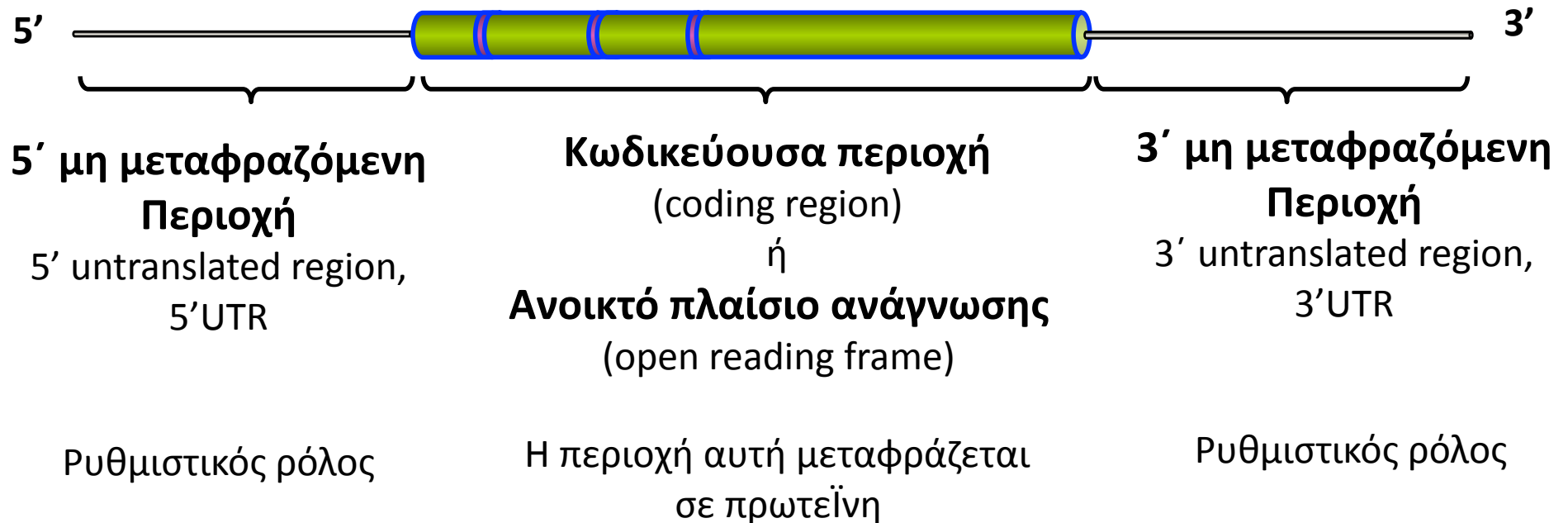
Νικόλαος Μπαλατσός

**ΩΡΙΜΑΝΣΗ του
αγγελιαφόρου RNA,
mRNA**

Μετάγραφα γονιδίων

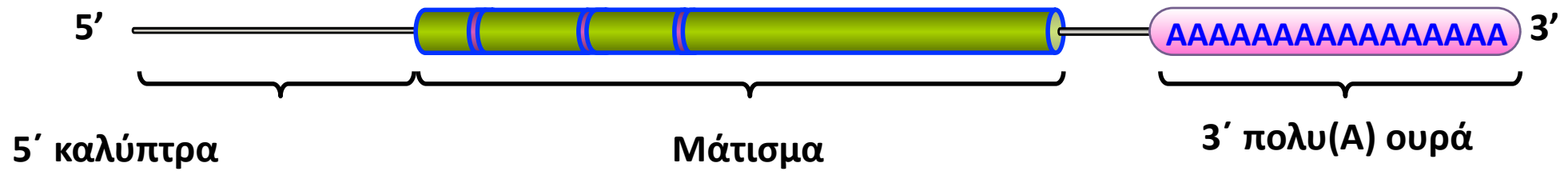


Μετάγραφα γονιδίων



Ωρίμανση mRNA

Συμμεταγραφικές τροποποιήσεις (co-transcriptional modifications)



Οι τροποποιήσεις των δύο άκρων 5' καλύπτρα - 3' πολυ(A) ουρά



- Εξοδος στον πηρήνα
- Προστασία από αποικοδόμηση
- Εκτομή 5' εξονίου (5' proximal intron)
- Προώθηση μετάφρασης
- Αποικοδόμηση

- Εξοδος στον πυρήνα
- Προστασία από αποικοδόμηση
- Μάτισμα
- Προώθηση μετάφρασης
- Αποικοδόμηση

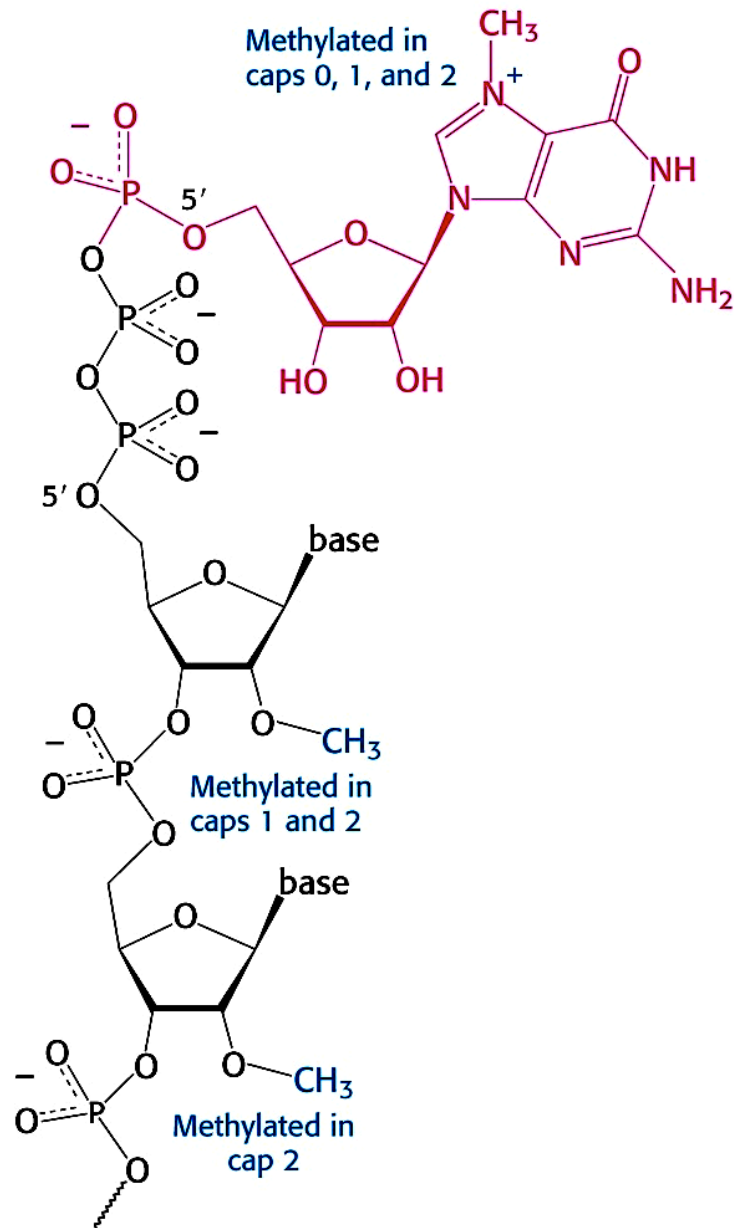
5' cap - 3' poly(A) tail



- Nuclear export
- Prevention of degradation
- 5' proximal intron excision
- Promotion of translation
- Degradation

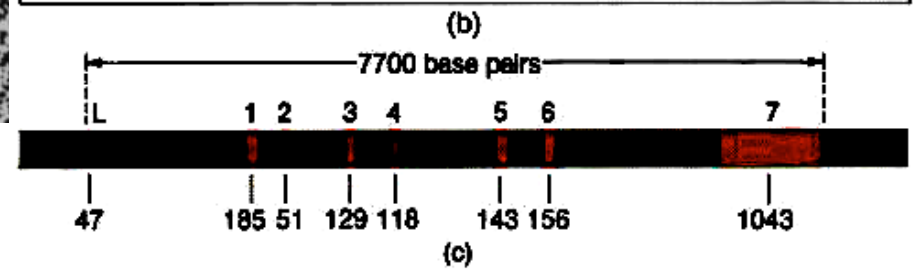
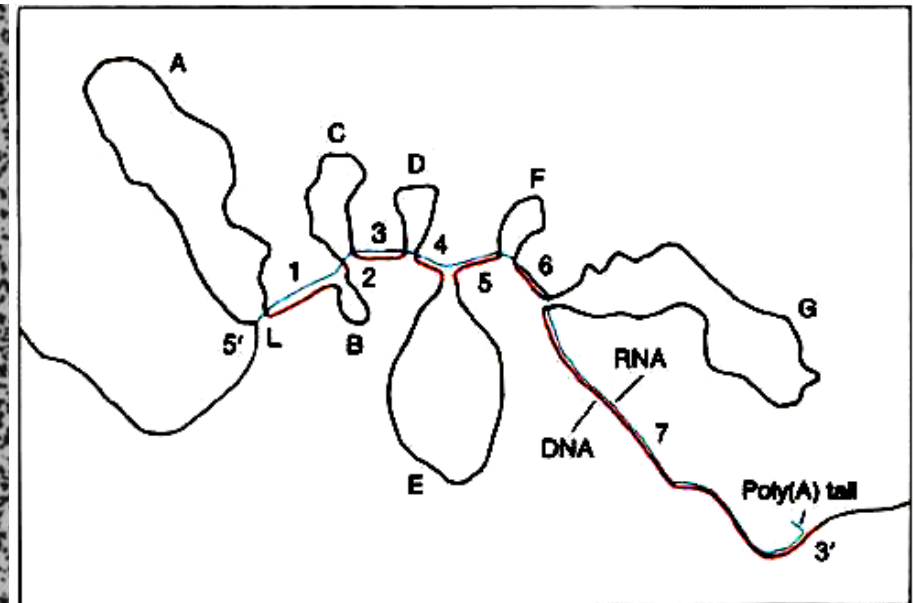
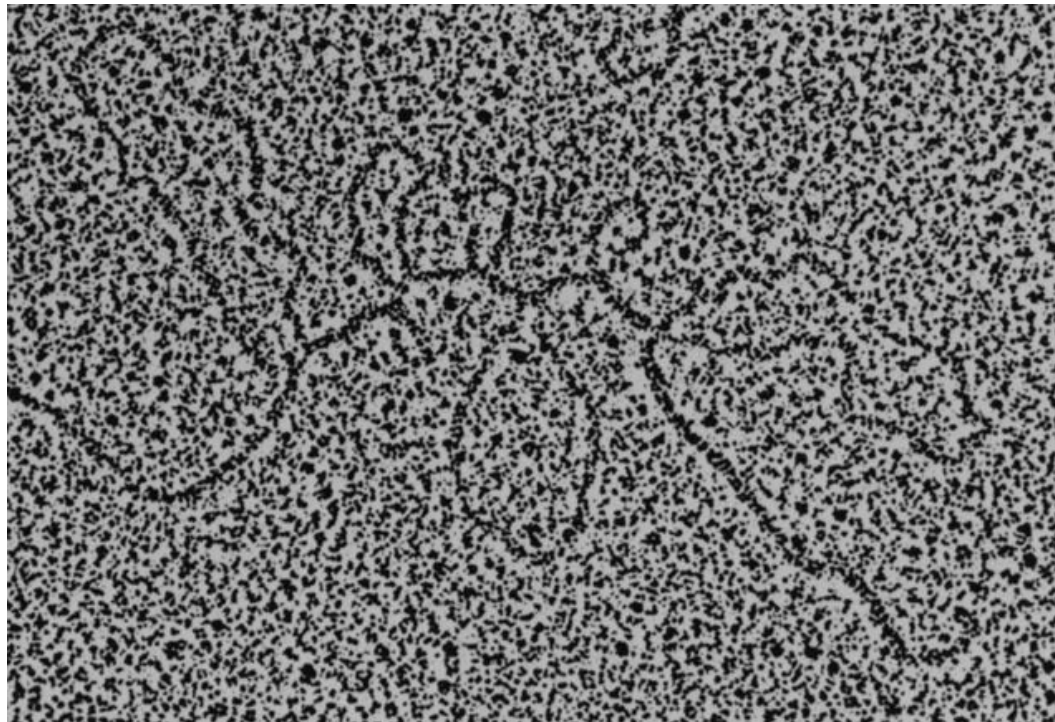
- Nuclear export
- Prevention of degradation
- Splicing
- Promotion of translation
- Degradation

5' κάλυμμα (cap)

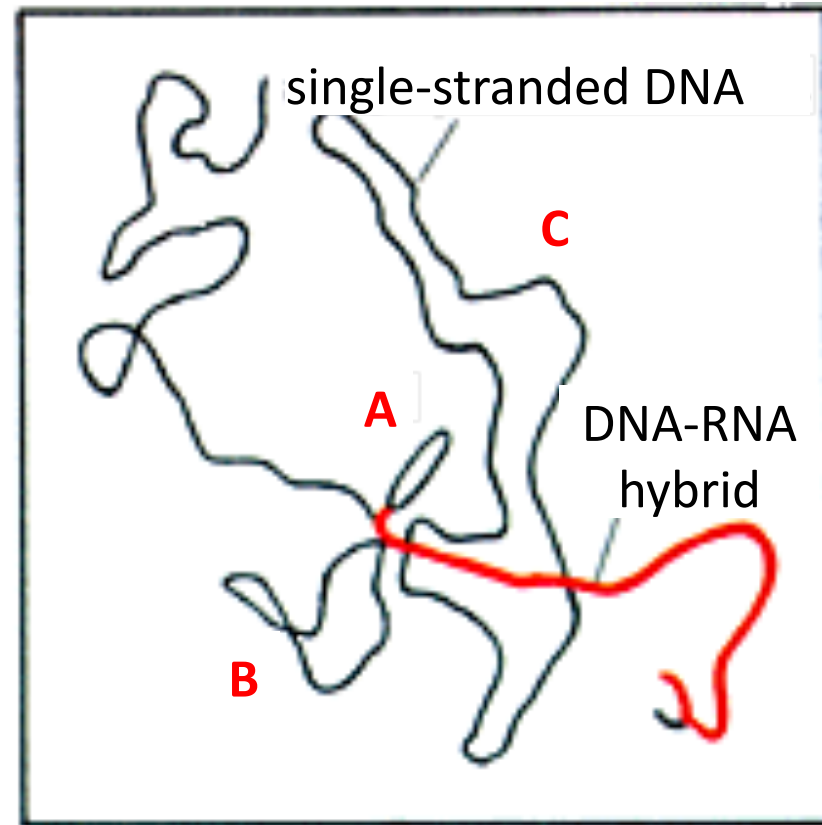
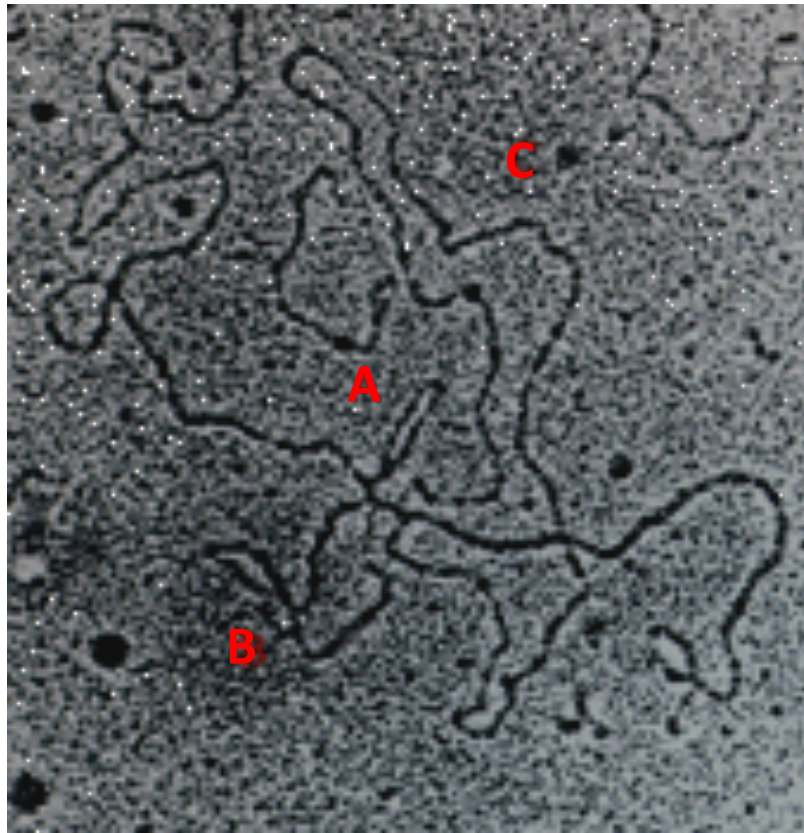


- Προστασία από αποικοδόμηση
- Συμμετοχή στο μάτισμα
- Εξοδος στο κυτταρόπλασμα
- Προώθηση μετάφρασης
- Συμμετοχή σε μηχανισμούς αποικοδόμησης

Ασυνεχή γονίδια (split genes) ευκαρυωτικών οργανισμών

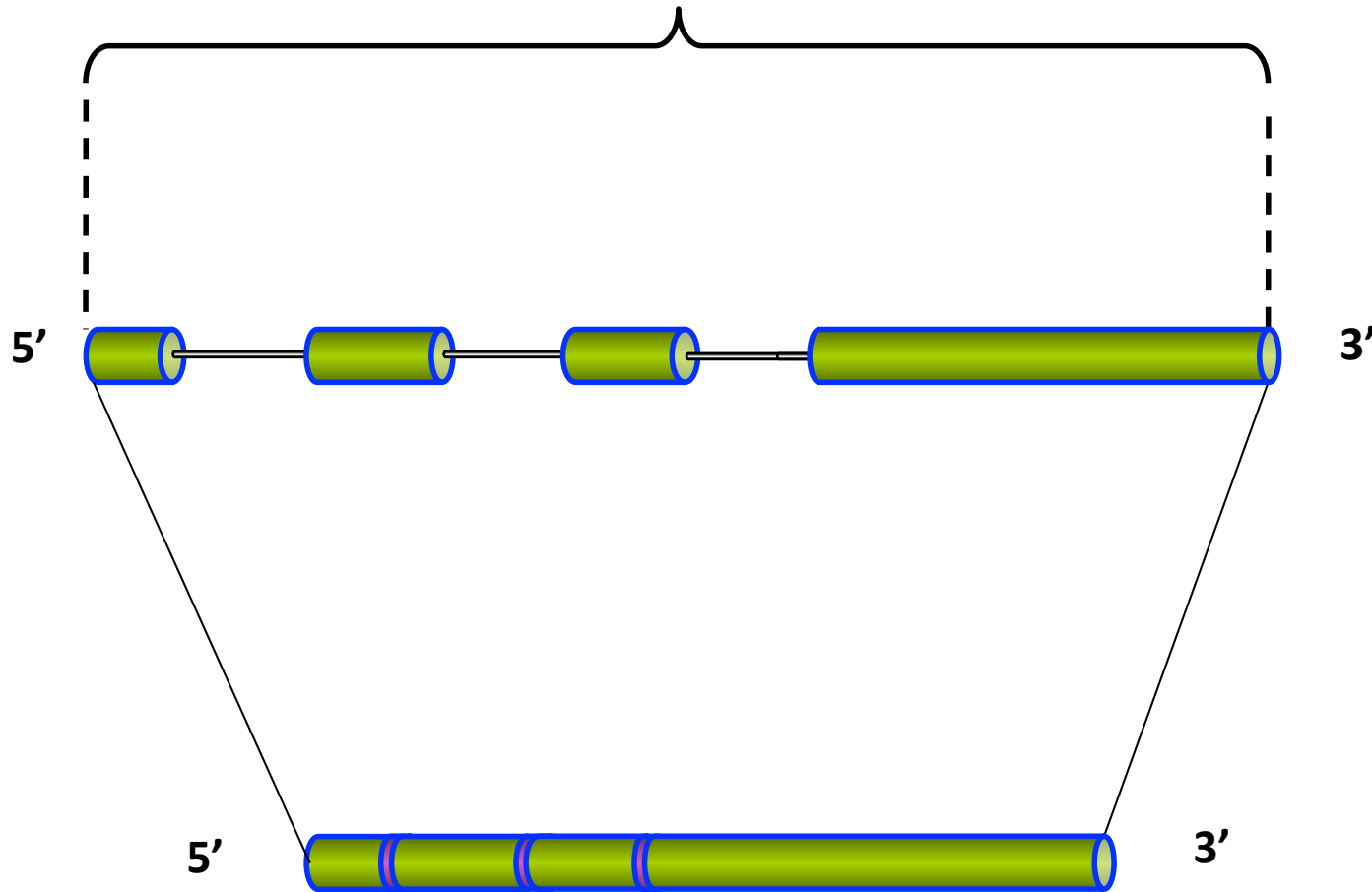


Ασυνεχή γονίδια (split genes) ευκαρυωτικών οργανισμών



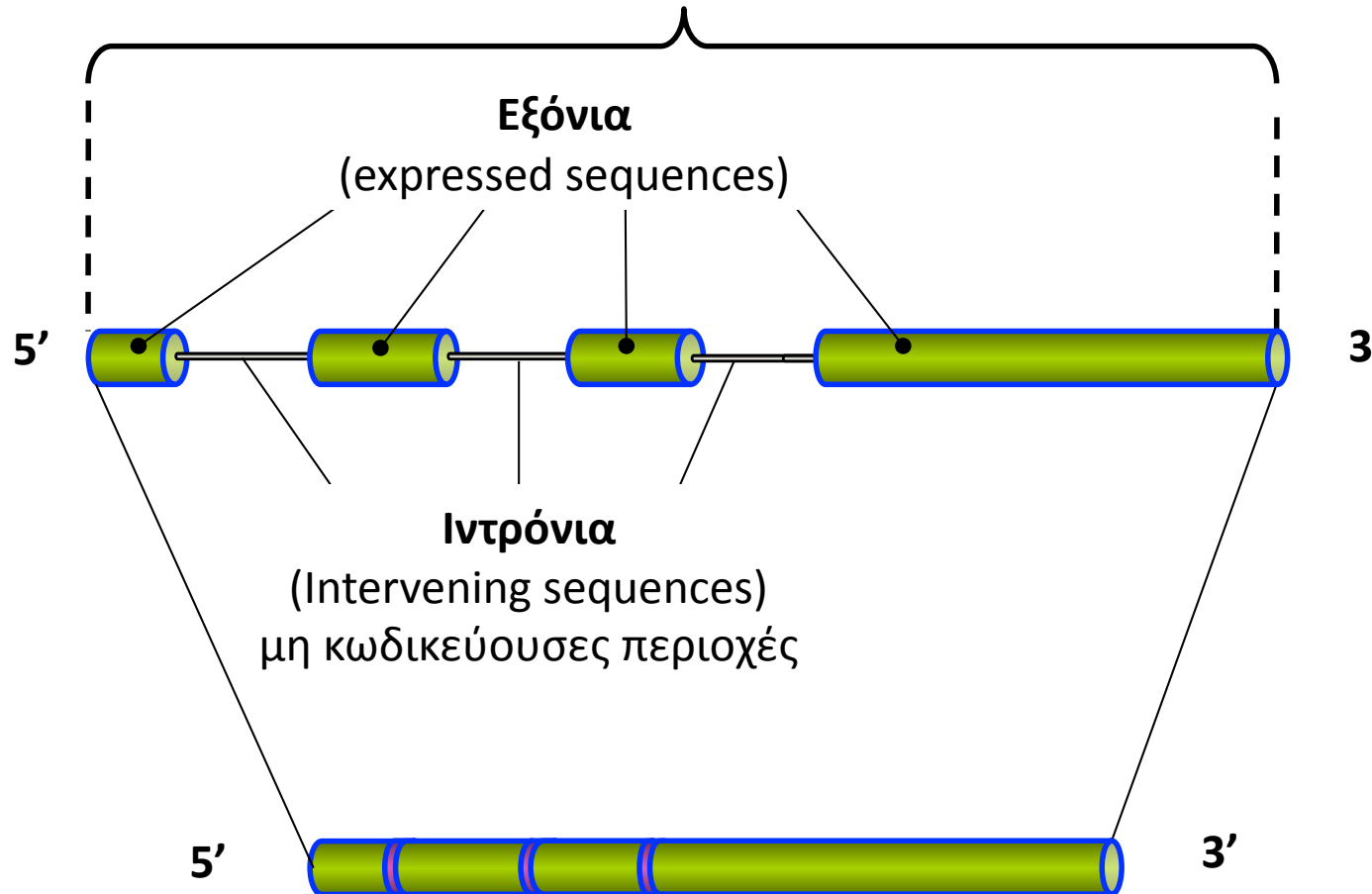
Μονάδα μεταγραφής ευκαρυωτικών γονιδίων

Αρχικό μετάγραφο ενός ευκαρυωτικού γονιδίου



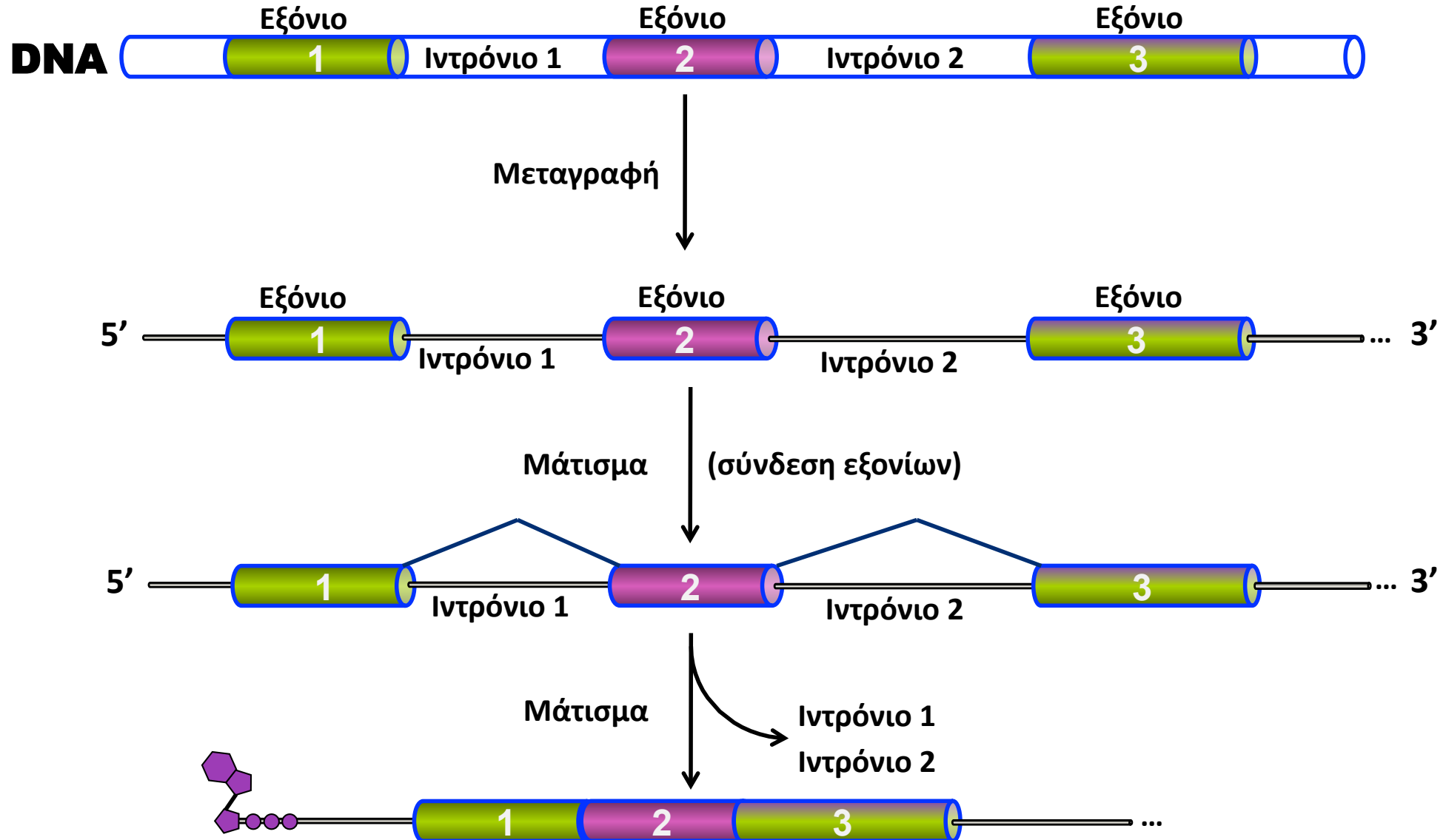
Μονάδα μεταγραφής ευκαρυωτικών γονιδίων

Αρχικό μετάγραφο ενός ευκαρυωτικού γονιδίου

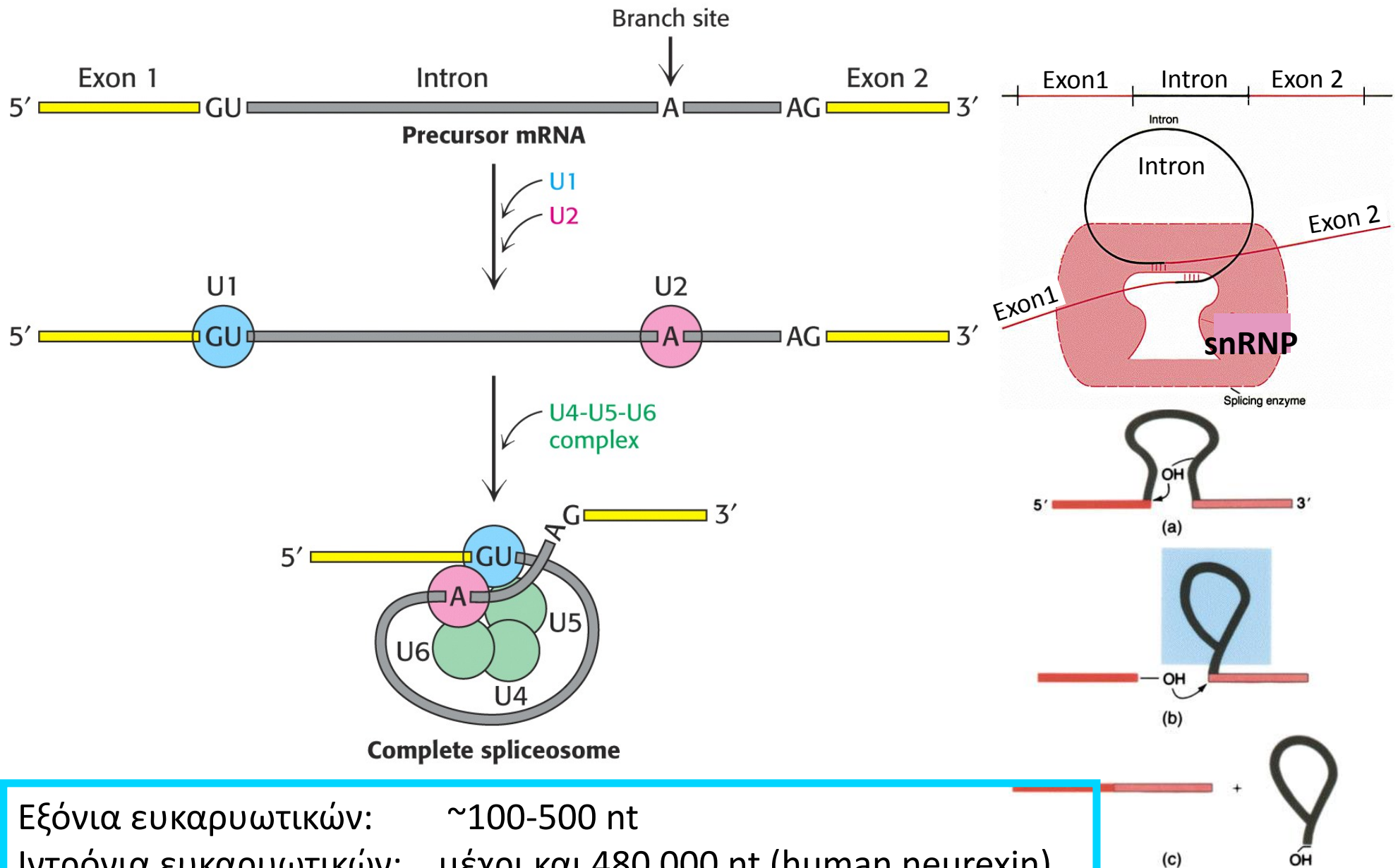


Τα ευκαρυωτικά γονίδια είναι ασυνεχή, Μάτισμα

Τα ευκαρυωτικά γονίδια είναι ασυνεχή και περιέχουν: εξόνια (exons) και ιντρόνια (introns)
Τα εξόνια διατηρούνται στο τελικό (ώριμο) mRNA.



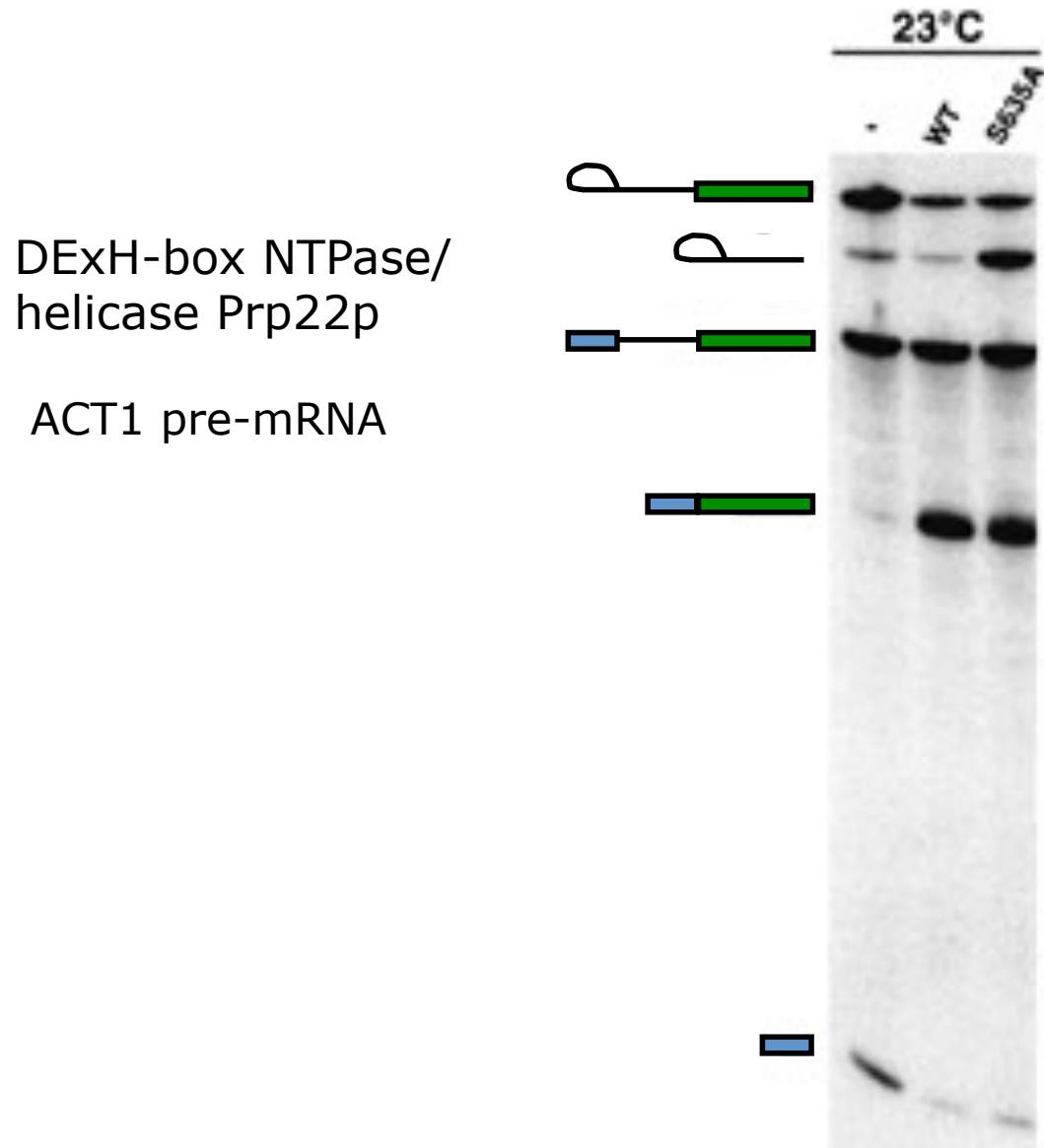
Τα ευκαρυωτικά γονίδια είναι ασυνεχή, Μάτισμα



Εξόνια ευκαρυωτικών: ~100-500 nt

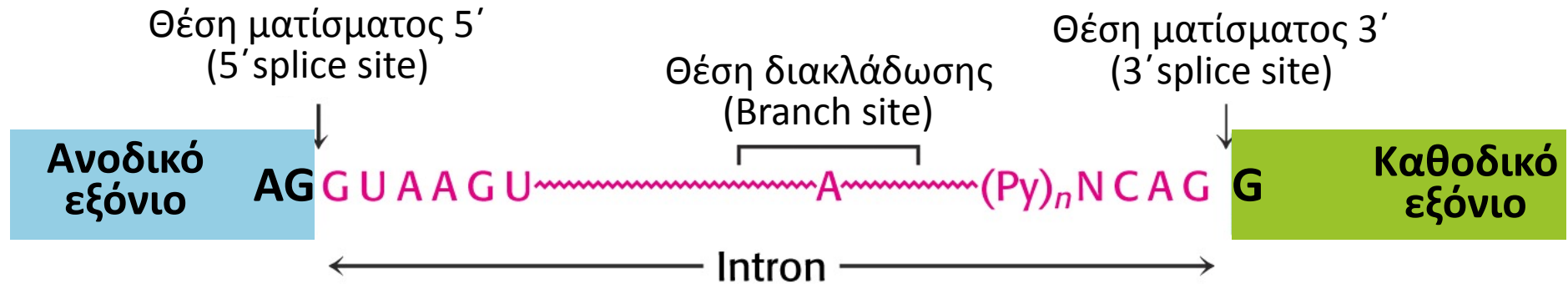
Ιντρόνια ευκαρυωτικών: μέχρι και 480 000 nt (human neurexin)

Η μελέτη της αντίδρασης



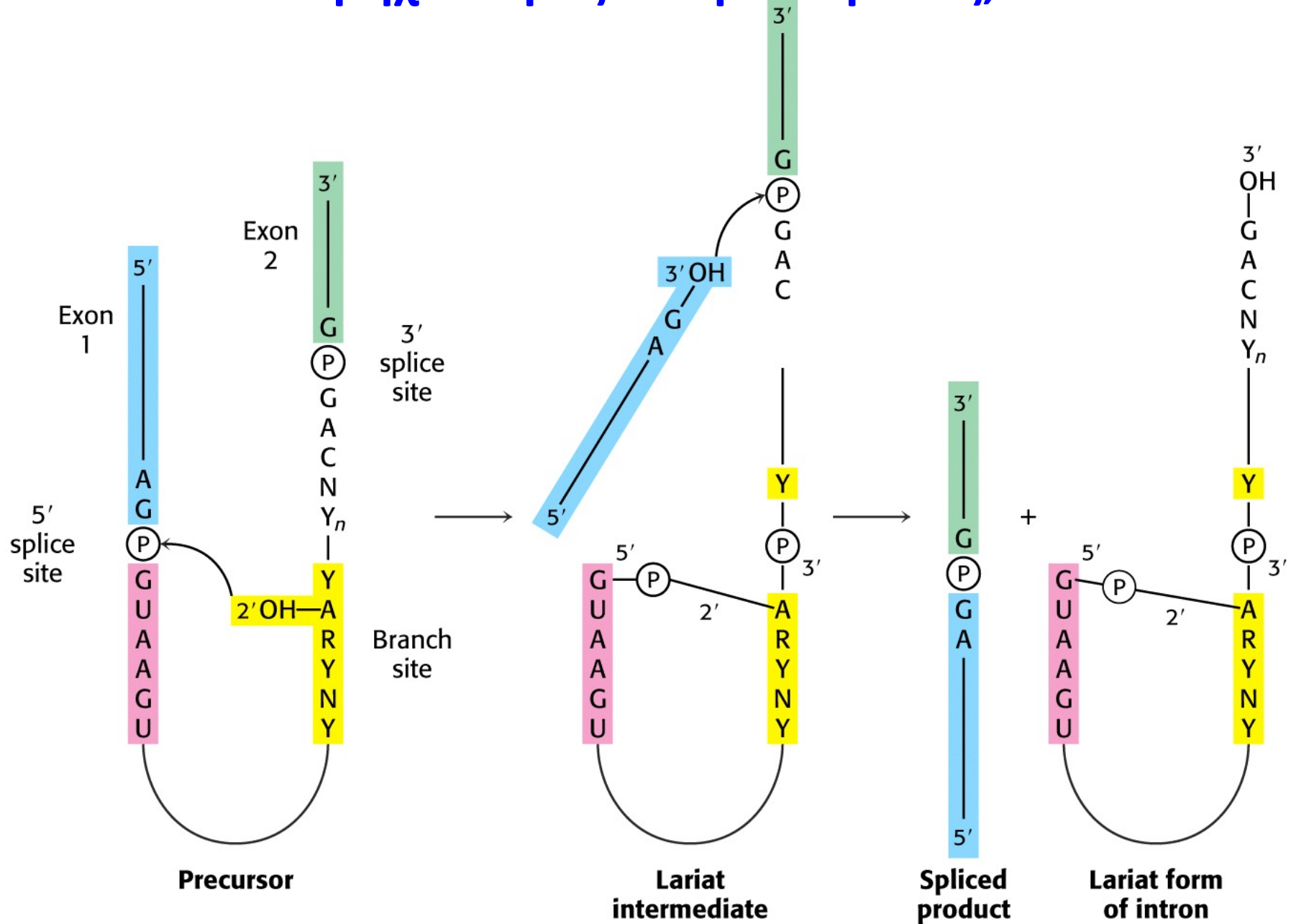
Schwer B and Meszaros T
EMBO J 2000; 19: 6582

Οι θέσεις ματίσματος (splice sites) στα πρόδρομα μόρια mRNA οριοθετούνται από ειδικές αλληλουχίες στα άκρα των ιντρονίων

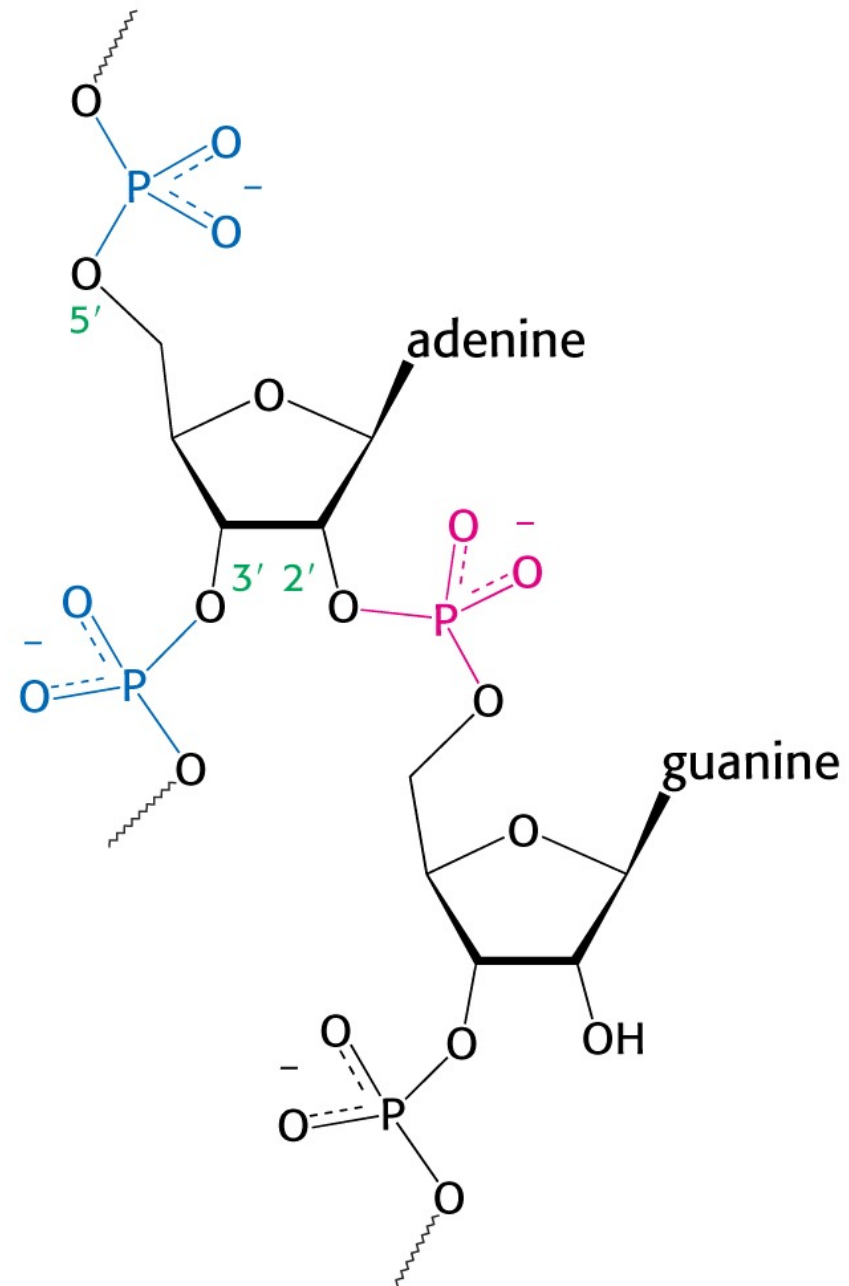


Ανοδικό εξόνιο, Upstream exon;
Καθοδικό εξόνιο, Downstream exon

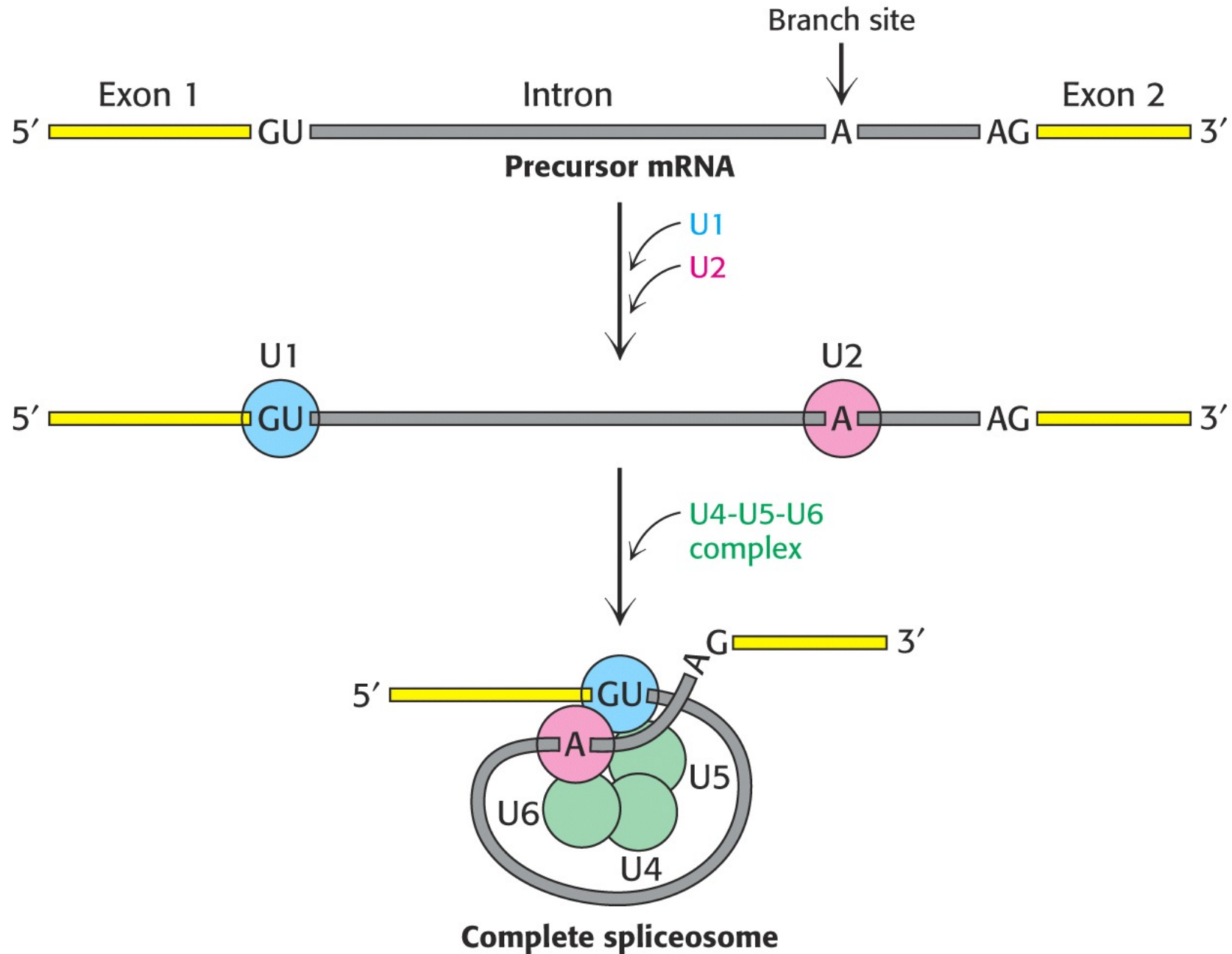
Ο μηχανισμός του ματίσματος, I



Η θέση διακλάδωσης (branch site) στο μάτισμα



Η συναρμολόγηση του σωματίου ματίσματος (spliceosome)



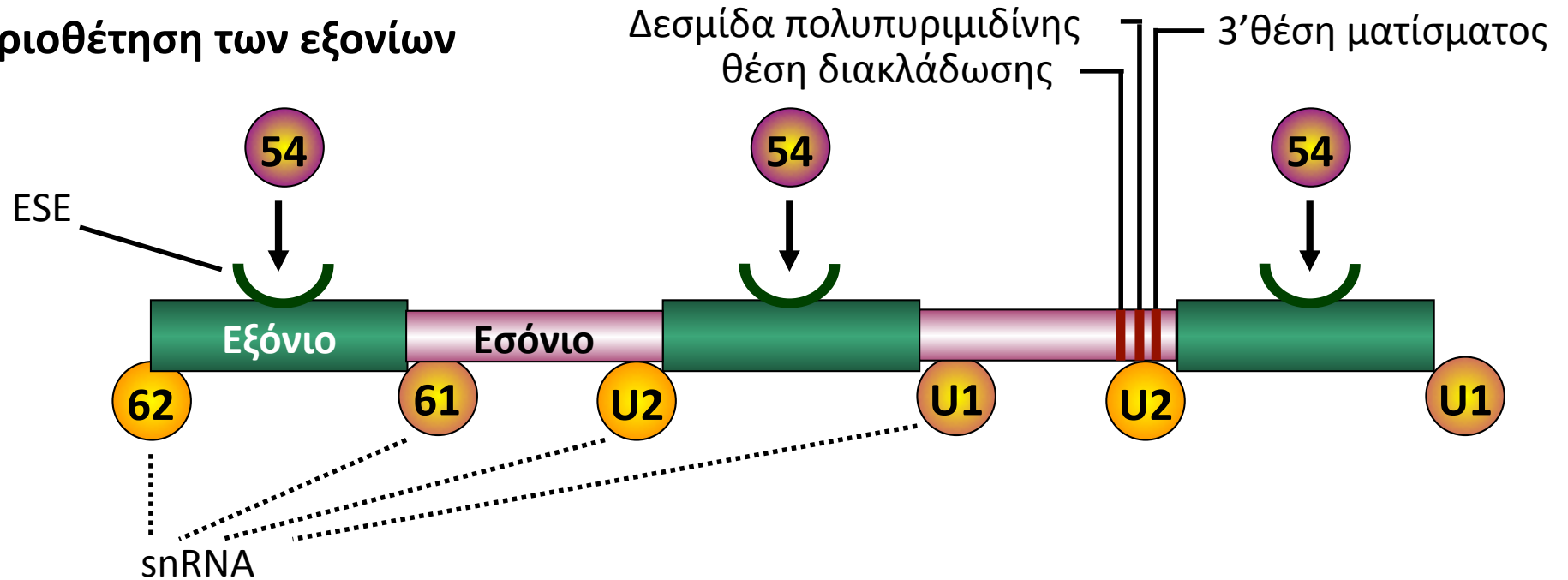
Οι παράγοντες ματίσματος

TABLE 28.3 Small nuclear ribonucleoprotein particles (snRNPs) in the splicing of mRNA precursors

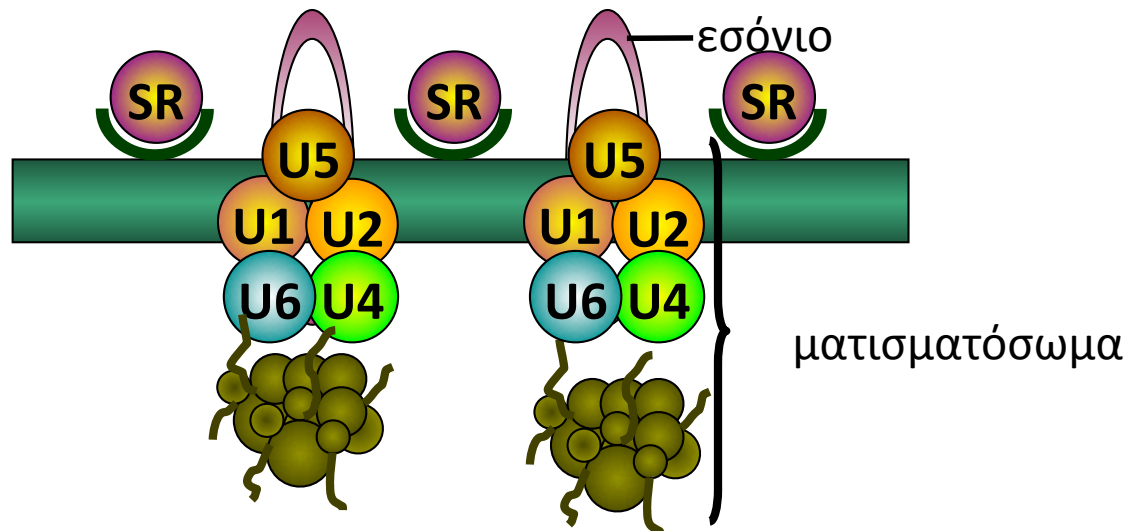
snRNP	Size of snRNA (nucleotides)	Role
U1	165	Binds the 5' splice site and then the 3' splice site
U2	185	Binds the branch site and forms part of the catalytic center
U5	116	Binds the 5' splice site
U4	145	Masks the catalytic activity of U6
U6	106	Catalyzes splicing

Άλλοι παράγοντες ματίσματος I

A. Οριοθέτηση των εξονίων

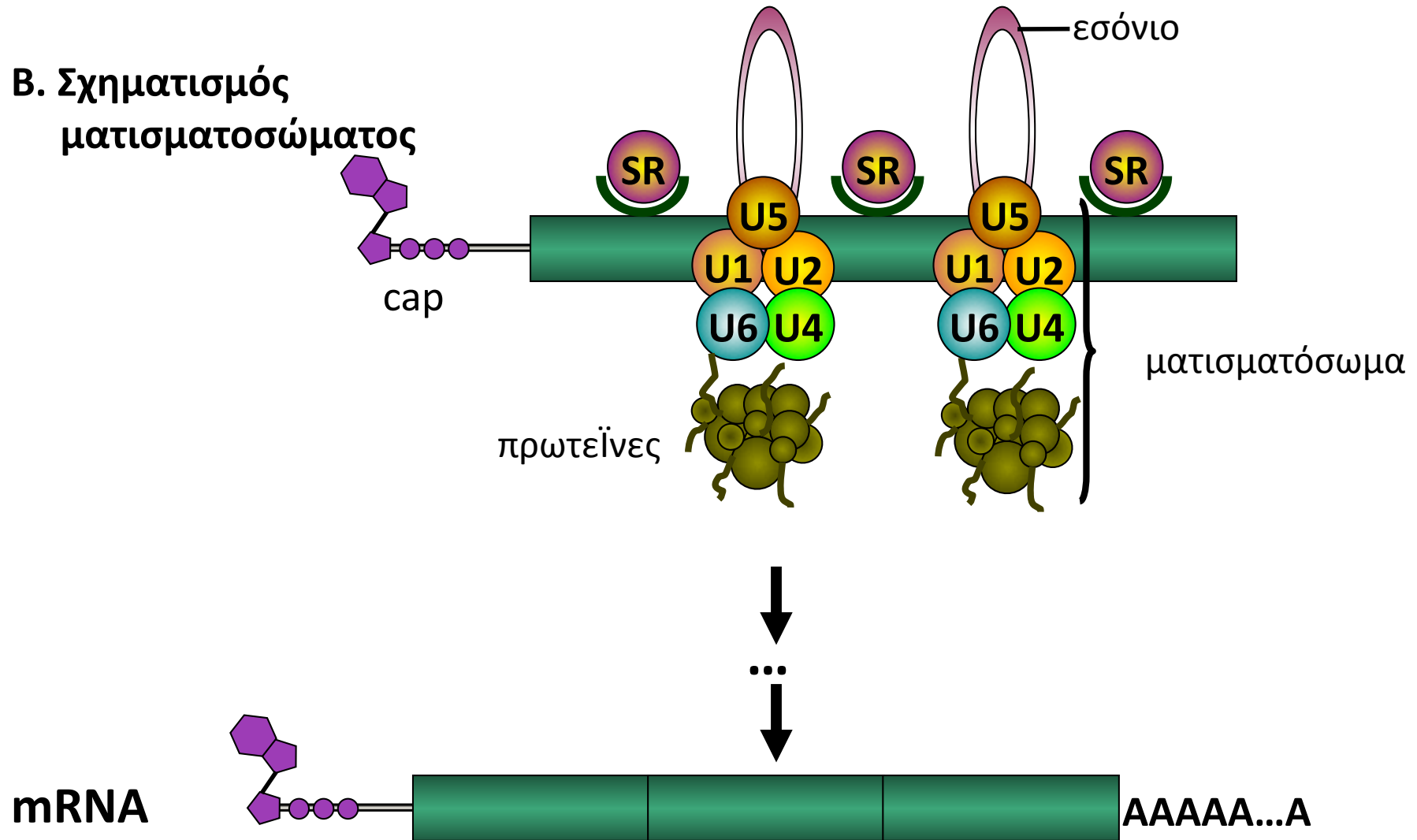


B. Σχηματισμός ματισματοσώματος

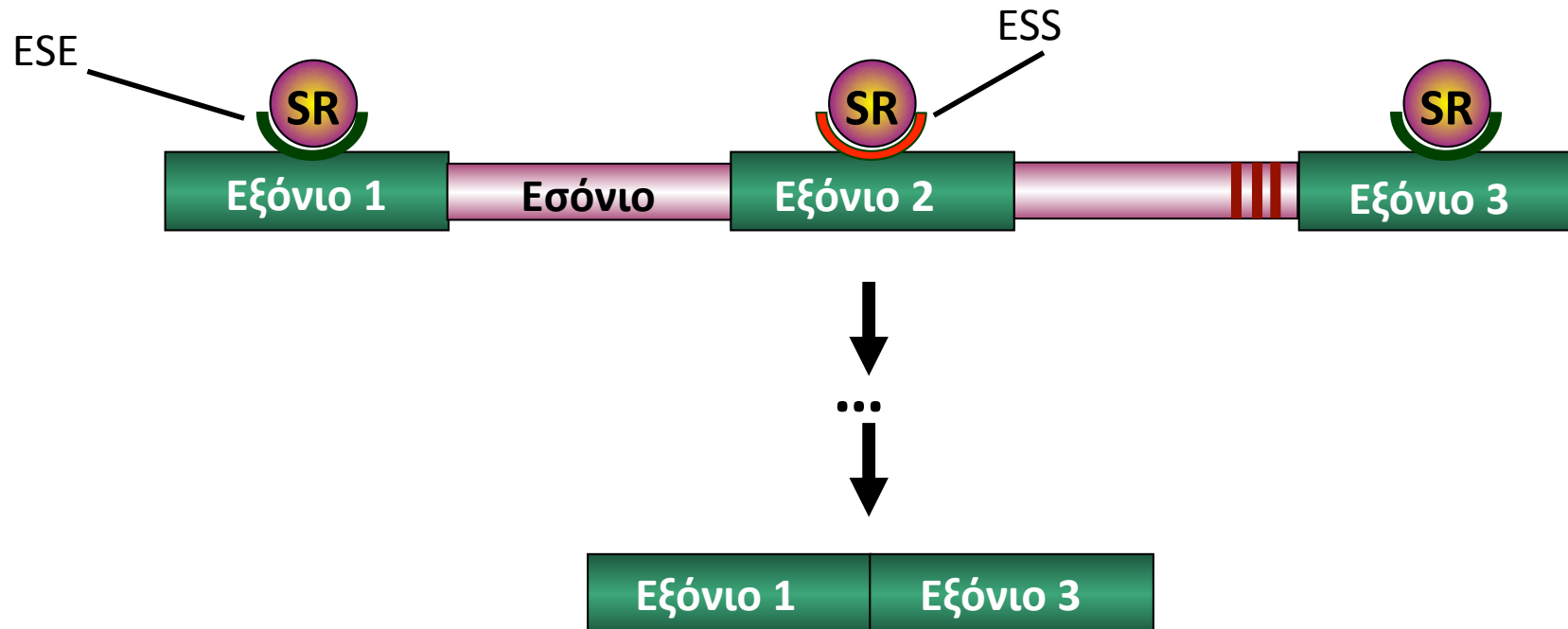


Άλλοι παράγοντες ματίσματος II

B. Σχηματισμός ματισματοσώματος



Άλλοι παράγοντες ματίσματος και παράλειψη εξονίου



ESE: Εξονικός ενισχυτής ματίσματος (Exonic splicing enhancer)

ESS: Εξονικός καταστολέας ματίσματος (Exonic splicing supressor)

Η σύνθεση του RNA στη *Drosophila*, live

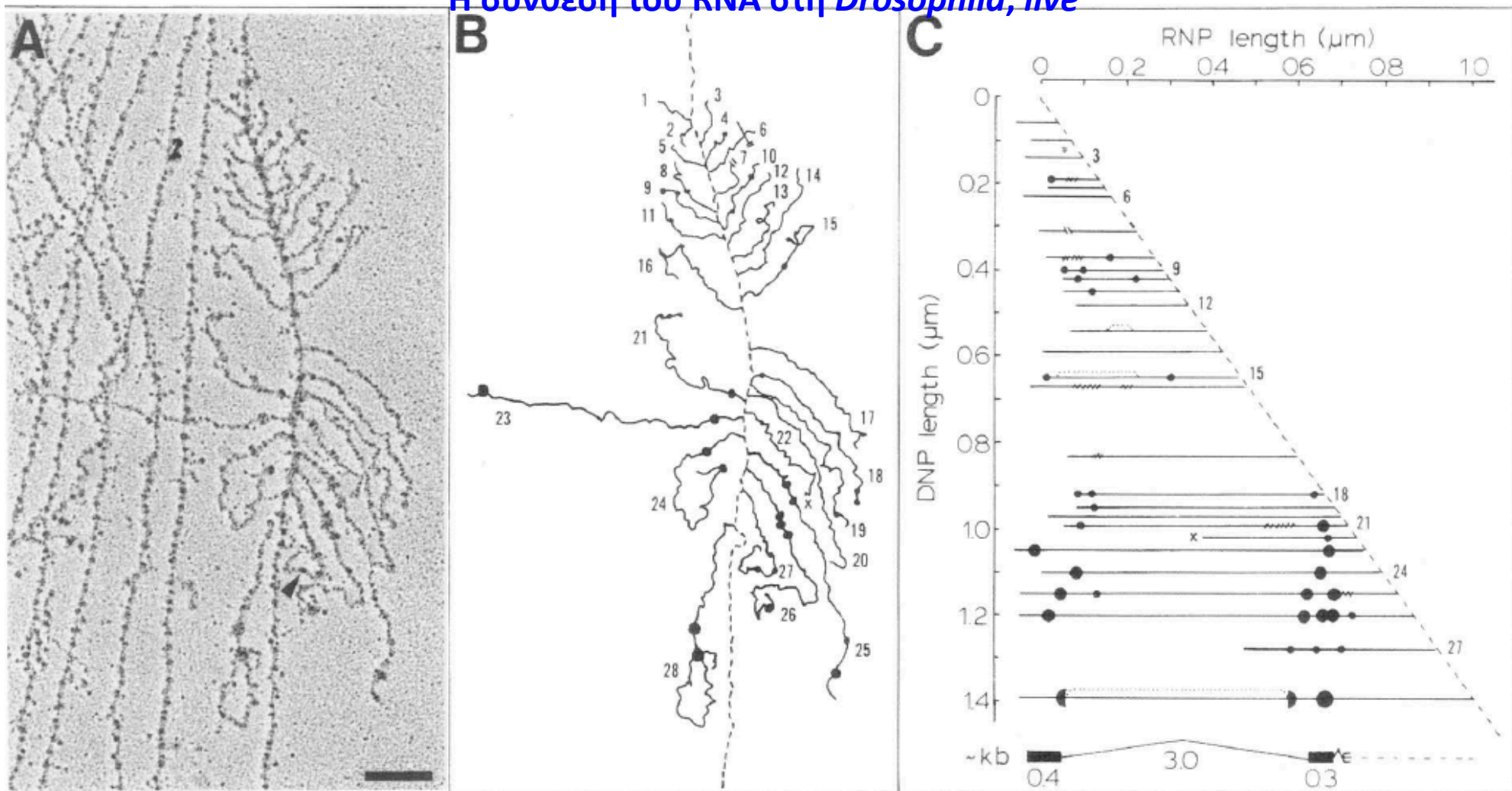


Figure 1. General phenomenon of loop formation and removal. (A) Electron micrograph of a *Drosophila* embryo transcription unit. Arrowhead indicates possible small particle at site of proposed intron excision. Bar represents 0.2 μm . (B) Interpretive tracing of micrograph. (---) Template chromatin; (—) RNP fibrils; (●) RNP particles; (×) presumed broken transcript. Transcript numbering starts at initiation end of gene. (C) RNP fibril map. Spacing of the fibrils on the vertical axis corresponds to their position on the chromatin template. Transcripts are shown as straight lines of the appropriate length, with corresponding sequences approximately aligned (5' termini to the left). This is accomplished by abutting the 3' termini to the sloped dashed line, which represents the best fit least-squares line of fibril length for the unprocessed and unbroken transcripts, (all except 22 and 27). (●) RNP particles of three sizes: small (≤ 20 nm), intermediate (20–35 nm), and large (>35 nm); (hatched regions) short lateral projections from the fibrils traced as hairpin loops. The dotted line drawn over the schematic fibrils represents the loop structure and connects points of intramolecular contact. At the bottom is shown the proposed exon–intron structure of the transcripts and approximate lengths in kb (see Methods). (■) Exons; (thin lines) intron; (. . . .) difficult to assign as intron or exon.

Η σύνθεση του RNA στη *Drosophila, live*

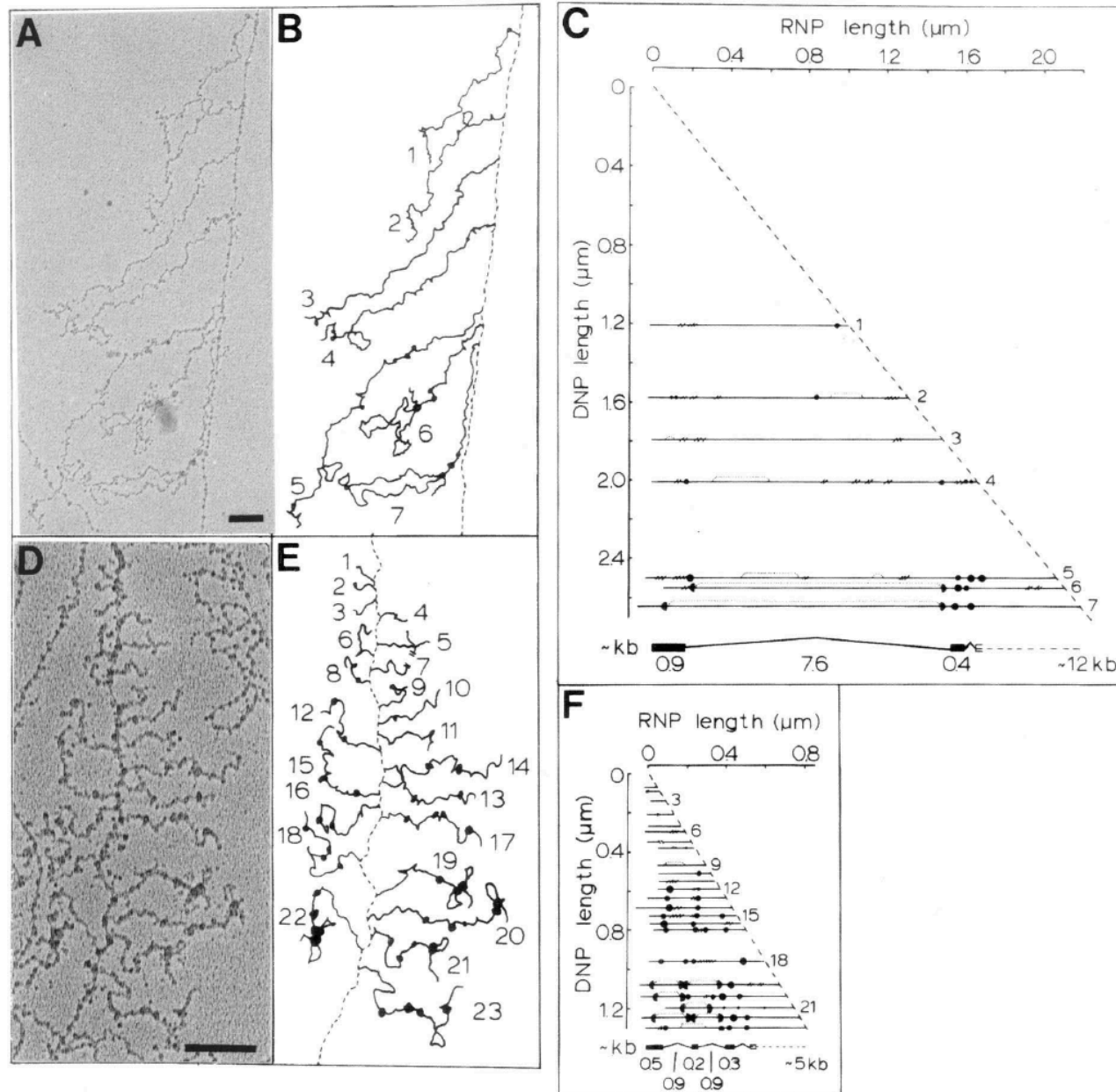


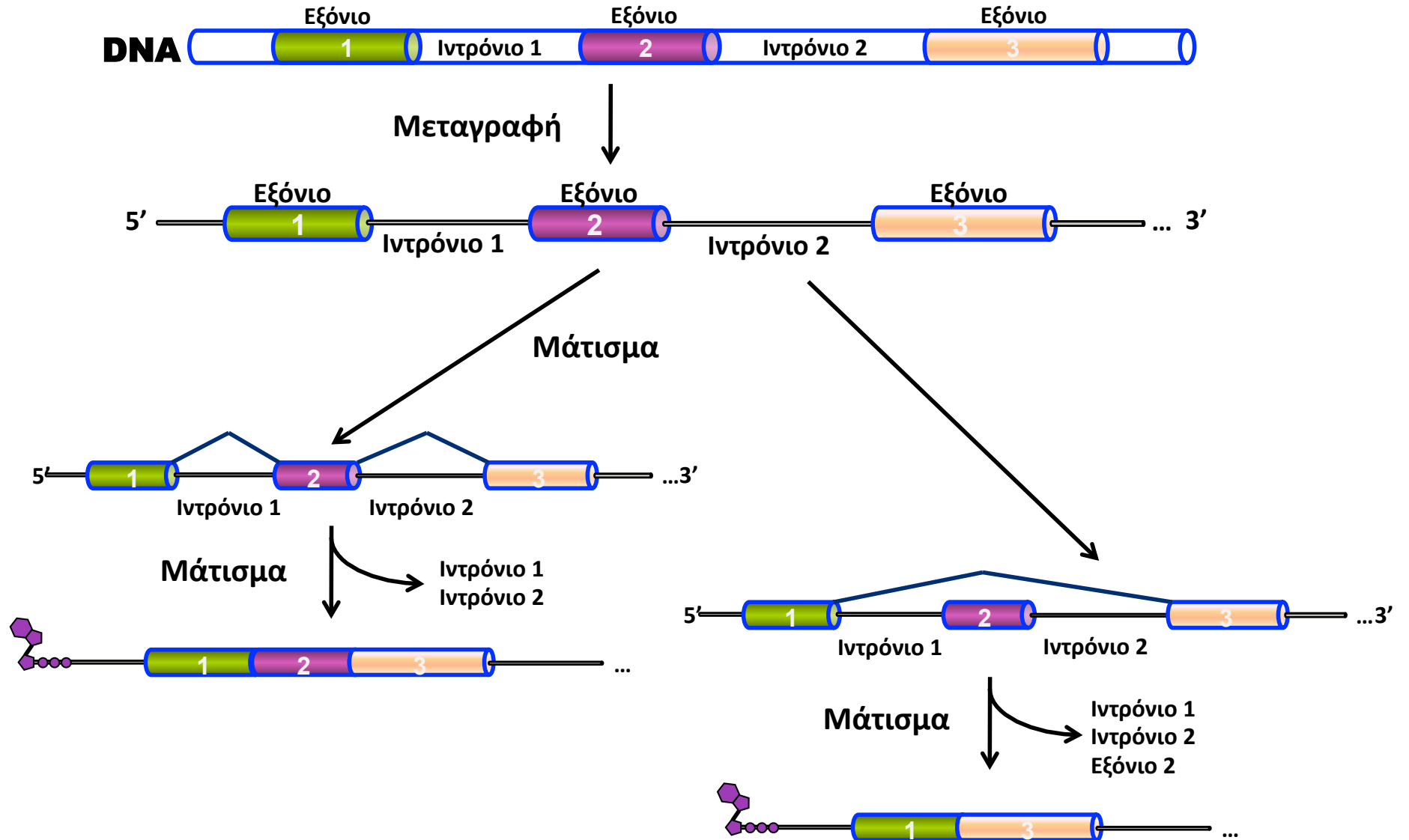
Figure 2. RNP particle deposition at splice junction regions follows 3' splice site synthesis for both long and short introns. (A,D) Electron micrographs of two different *Drosophila* embryo transcription units. Bars represent 0.2 μm . (B,E) Interpretive tracing of EMs in A and D, respectively. (C,F) RNP fibril maps, drawn to the same scale, for the transcription units in A and D, respectively. For additional details of RNP fibril maps, see Figure 1.

Μάτισμα και ασθένειες:

Μετάλλαξη μιας βάσης στο γονίδιο της β-σφαιρίνης οδηγεί σε β-θαλασσαιμία δημιουργώντας μια θέση μάτισματος διαφορετική από τη κανονική

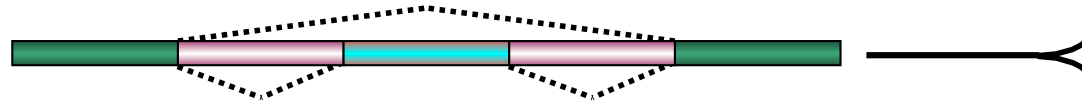


Εναλλακτικό μάτισμα (alternative splicing)

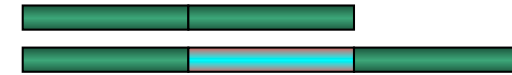


Το εναλλακτικό μάτισμα

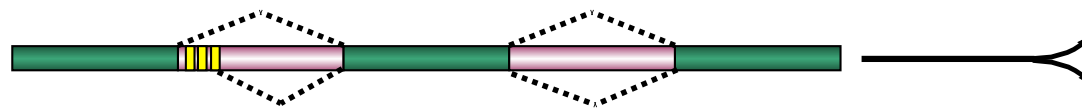
α. παραλειπόμενο εξόνιο



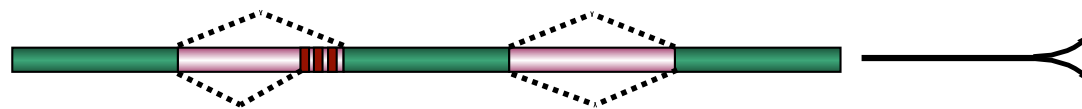
προκύπτουν mRNA



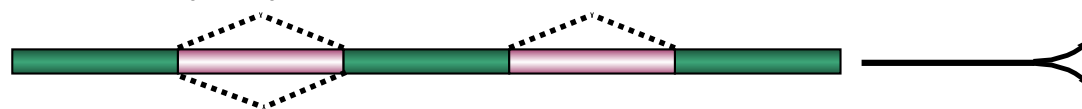
β. εναλλακτικές 5' θέσεις ματίσματος



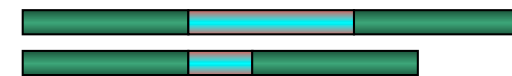
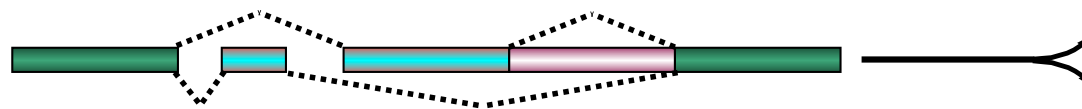
γ. εναλλακτικές 3' θέσεις ματίσματος



δ. διατηρούμενο εξόνιο



ε. διατήρηση αμοιβαία αποκλειόμενων εξονίων



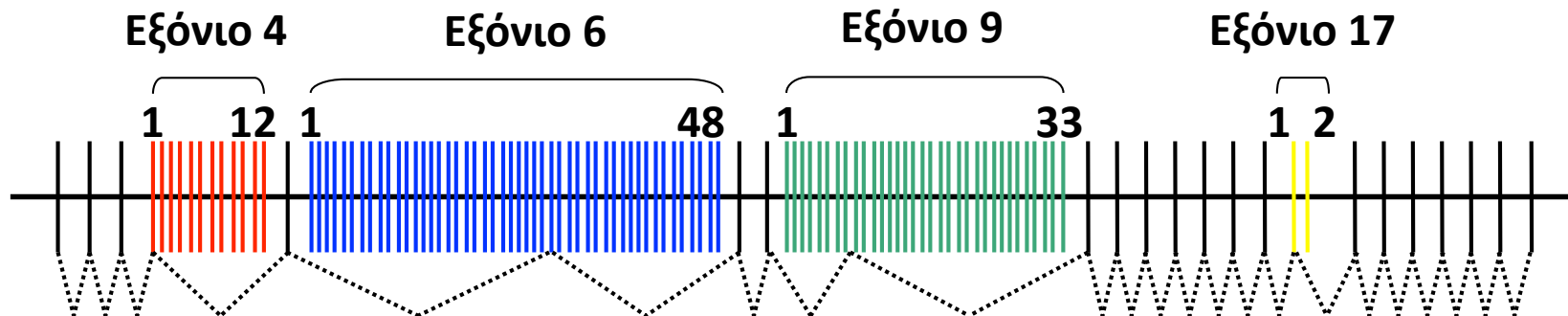
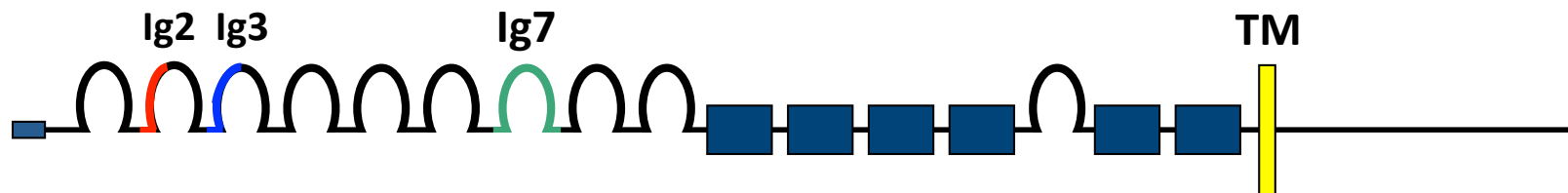
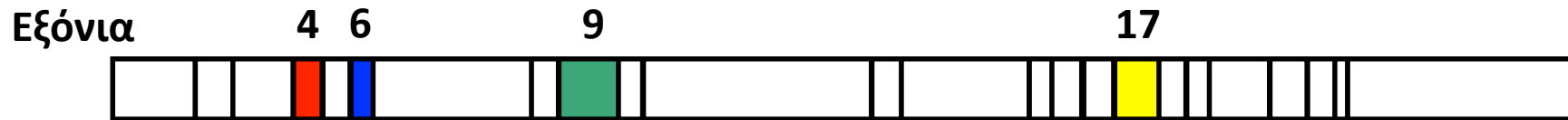
Ο μηχανισμός αφορά στα ~3/4 των ανθρώπινων γονιδίων

TABLE 28.4 Selected proteins exhibiting alternative RNA splicing

Actin
Alcohol dehydrogenase
Aldolase
K-ras
Calcitonin
Fibrinogen
Fibronectin
Myosin
Nerve growth factor
Tropomyosin
Troponin

Source: R. E. Breitbart, A. Andreadis, and B. Nadal-Ginard. *Annu. Rev. Biochem.* 56(1987):467–495.

Το γονίδιο *DSCAM* της *Drosophila*

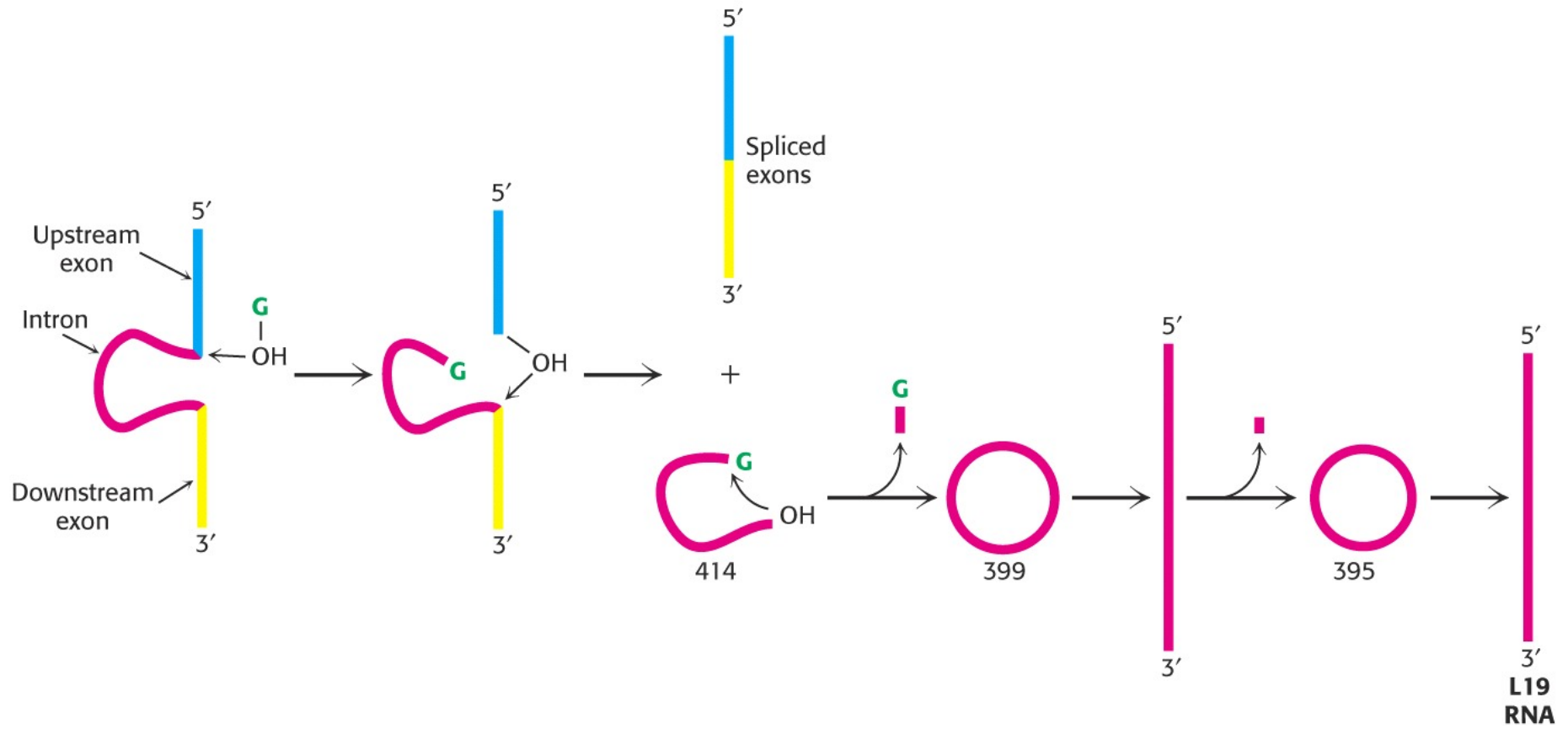


Schmucker et al. *Cell* 2000; 101: 671-684

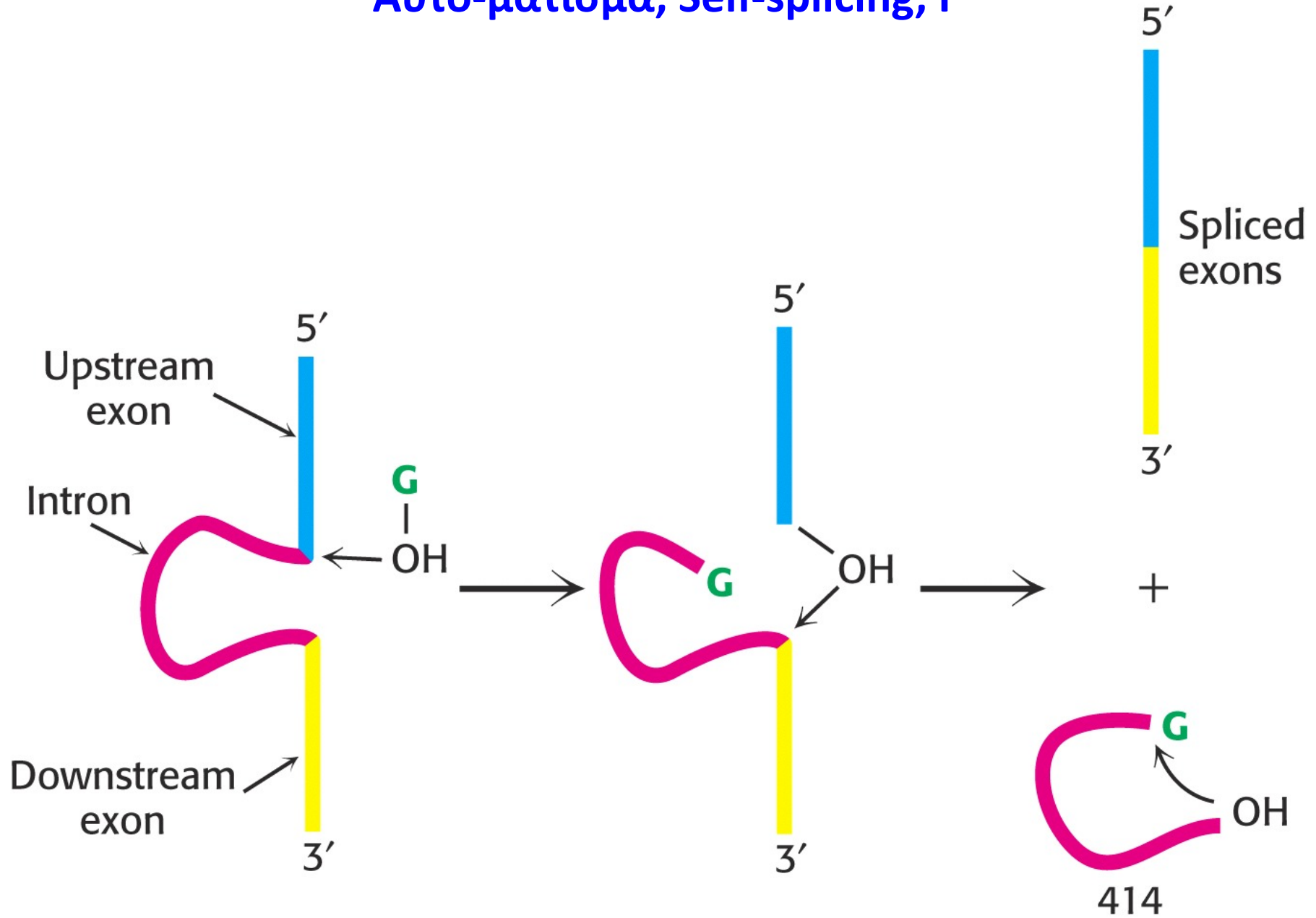
12 x 48 x 33 x 2 = 38.016 mRNAs/πρωτεΐνες (!)

(TM: Διαμεμβρανική περιοχή (TransMembrane region))

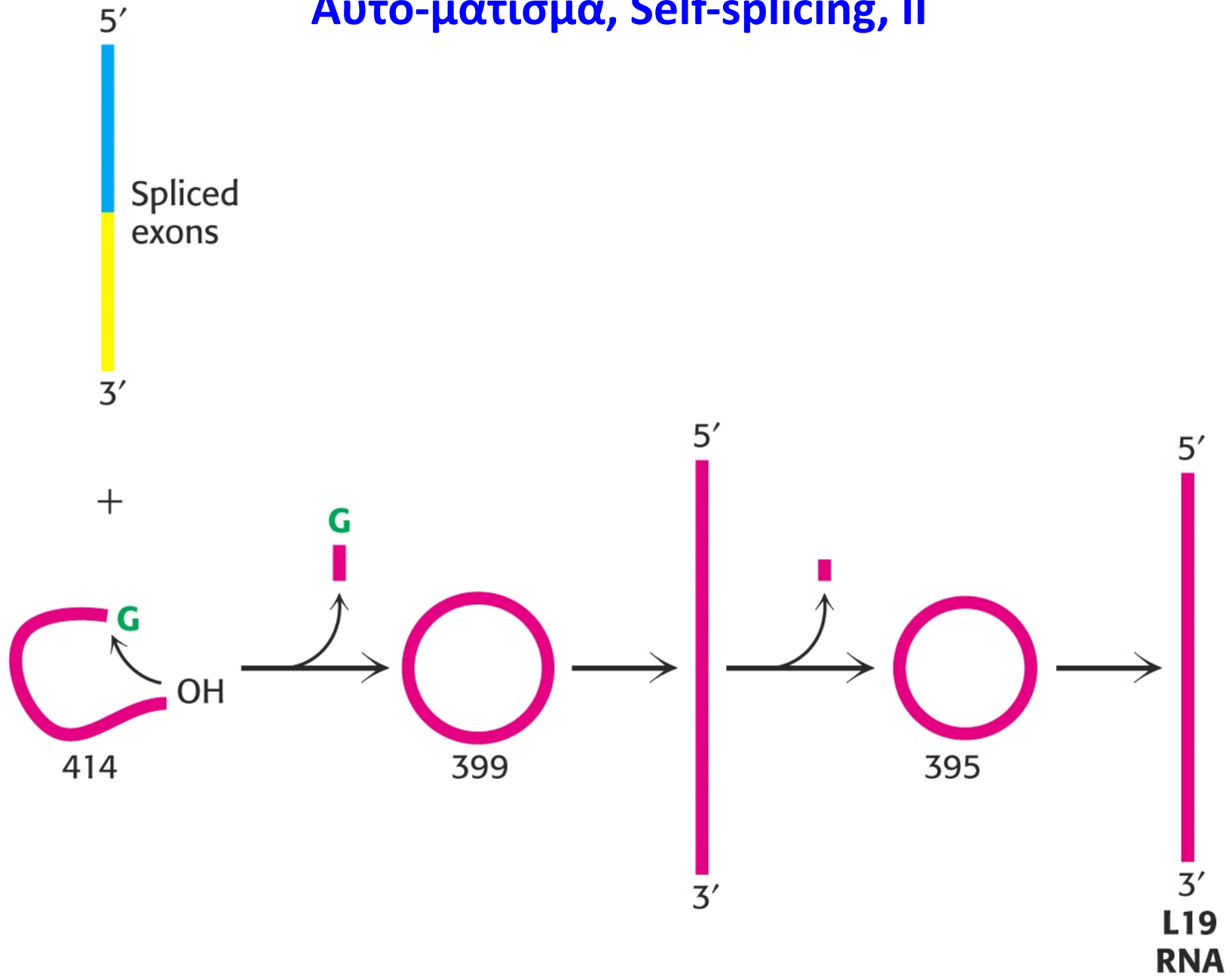
Αυτο-μάτισμα, Self-splicing



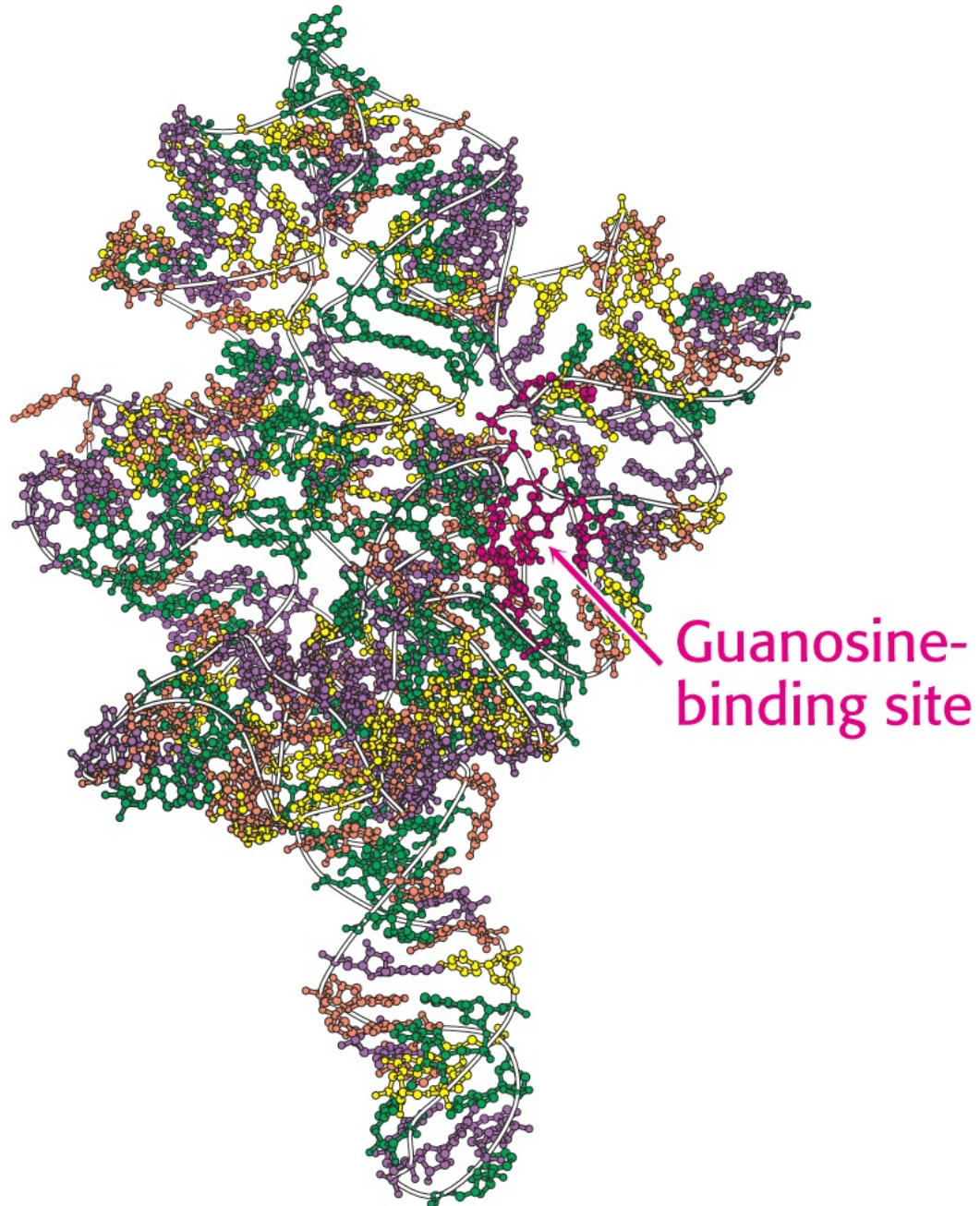
Αυτο-μάτισμα, Self-splicing, I



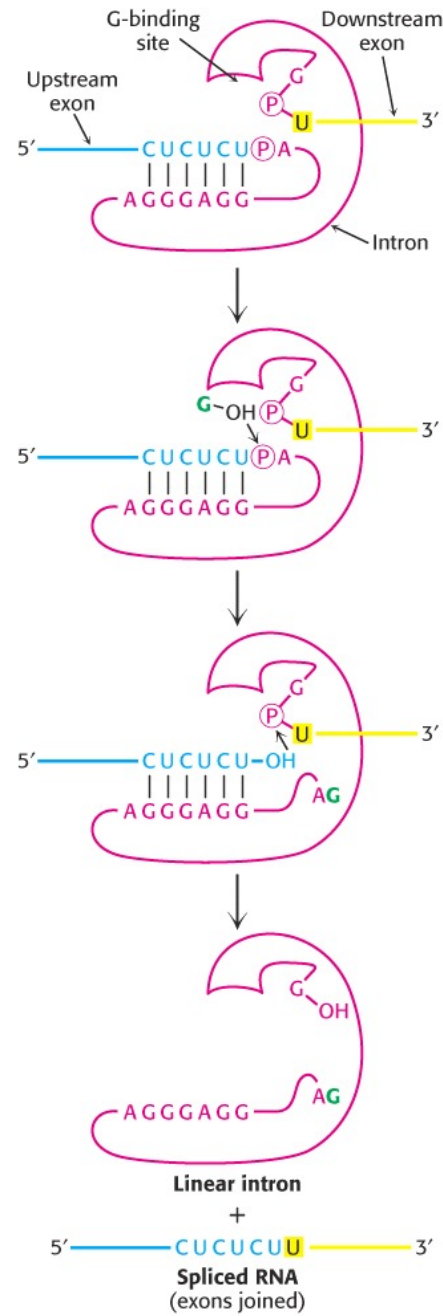
Αυτο-μάτισμα, Self-splicing, II



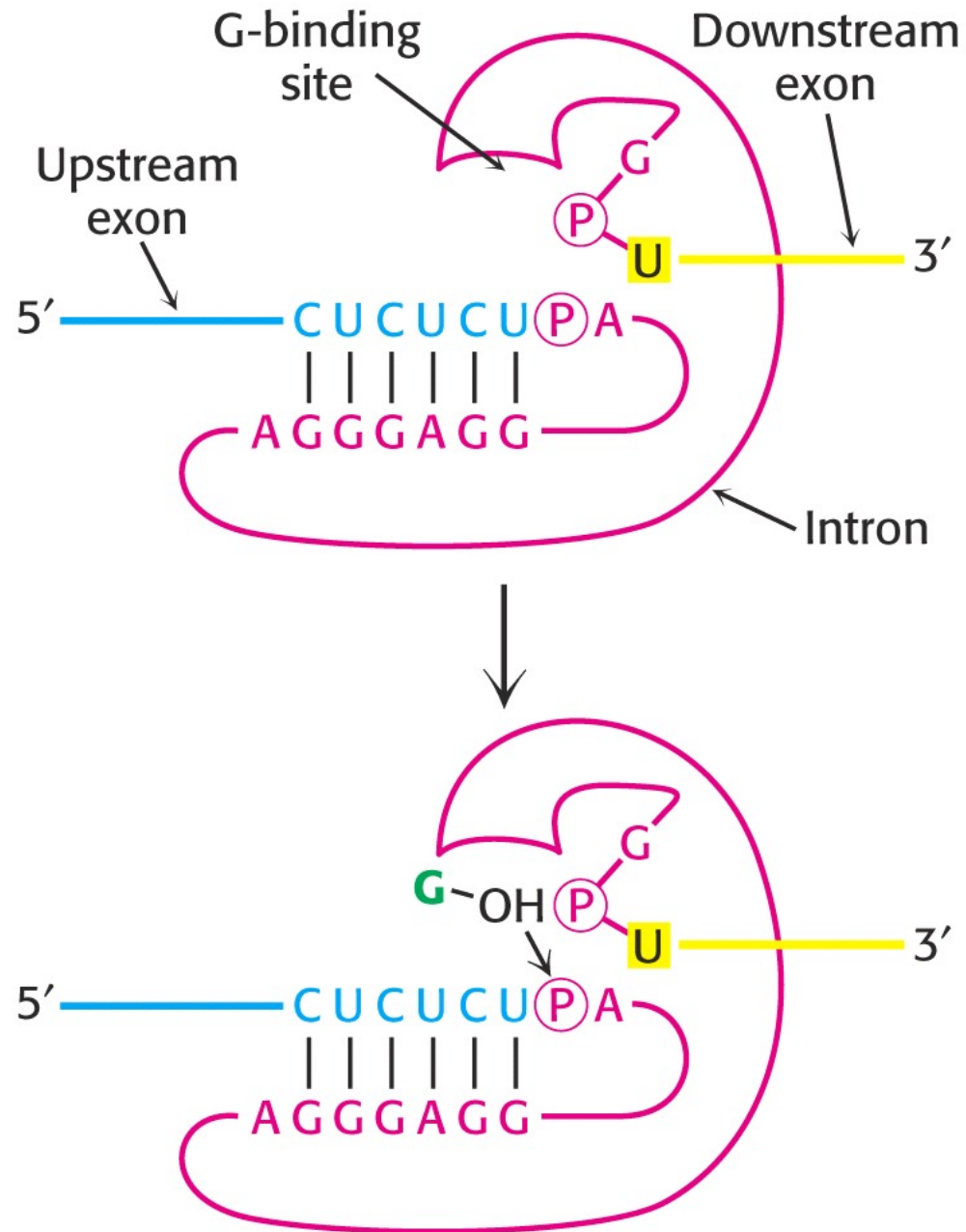
Δομή αυτο-ματιζόμενου ιντρονίου



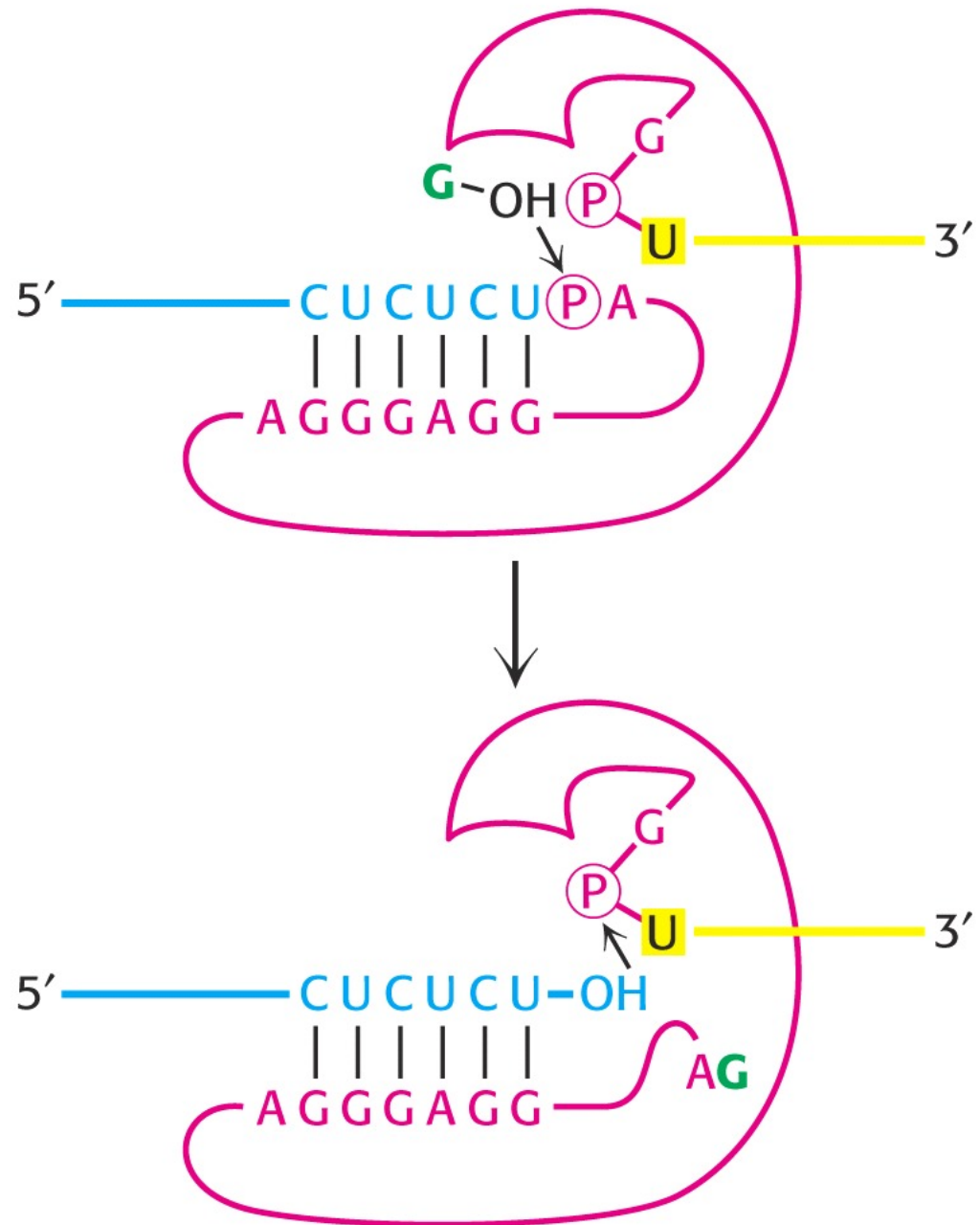
Μηχανισμός αυτο-ματίσματος



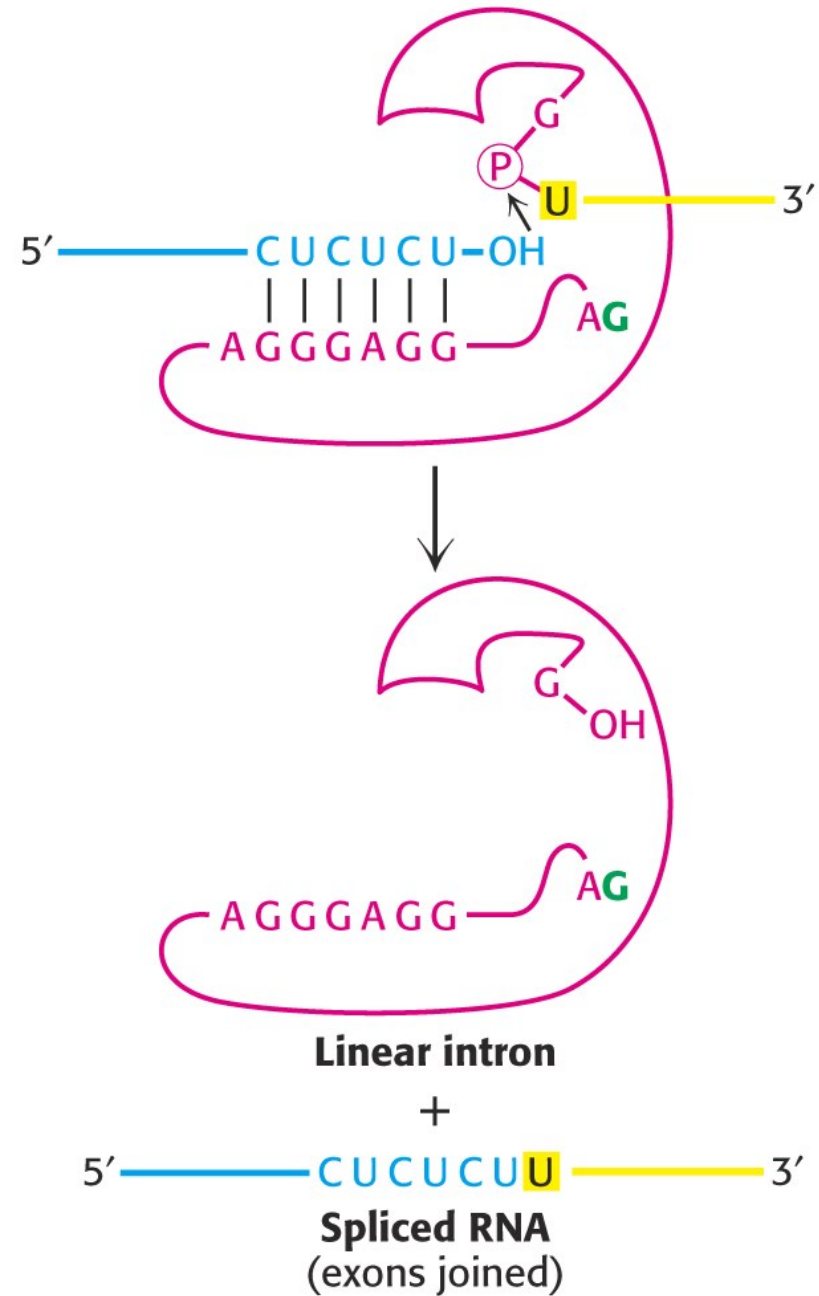
Μηχανισμός αυτο-ματίσματος, I



Μηχανισμός αυτο-ματίσματος, II



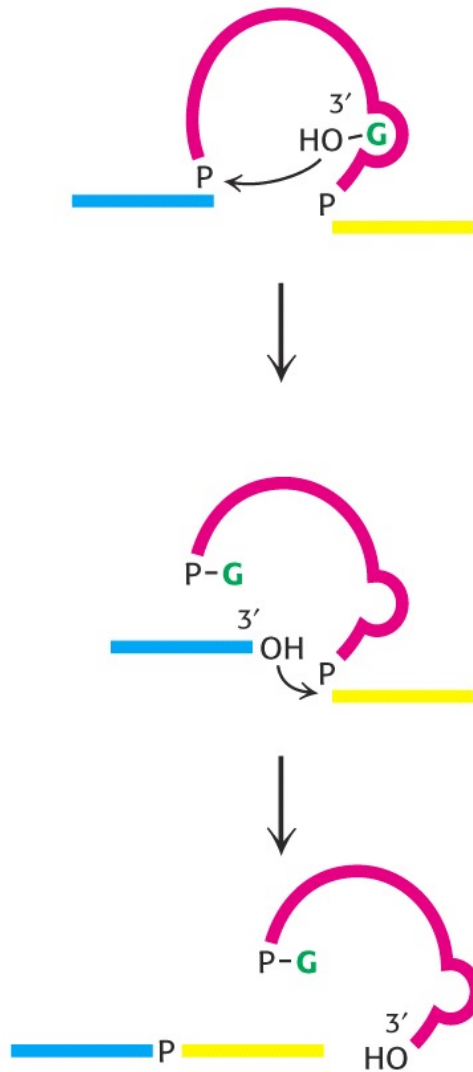
Μηχανισμός αυτο-ματίσματος, III



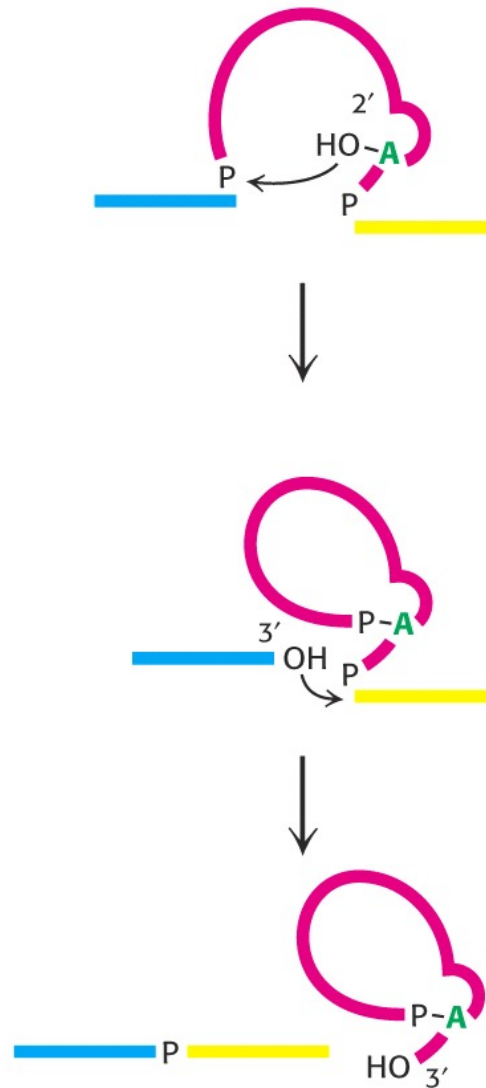
Σύγκριση πορειών ματίσματος

SELF-SPLICING INTRONS

Group I

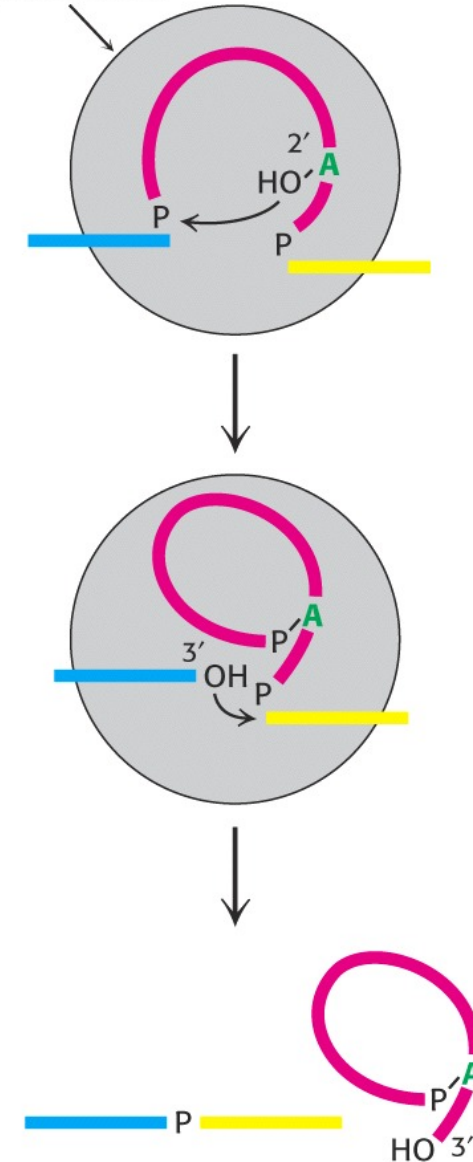


Group II



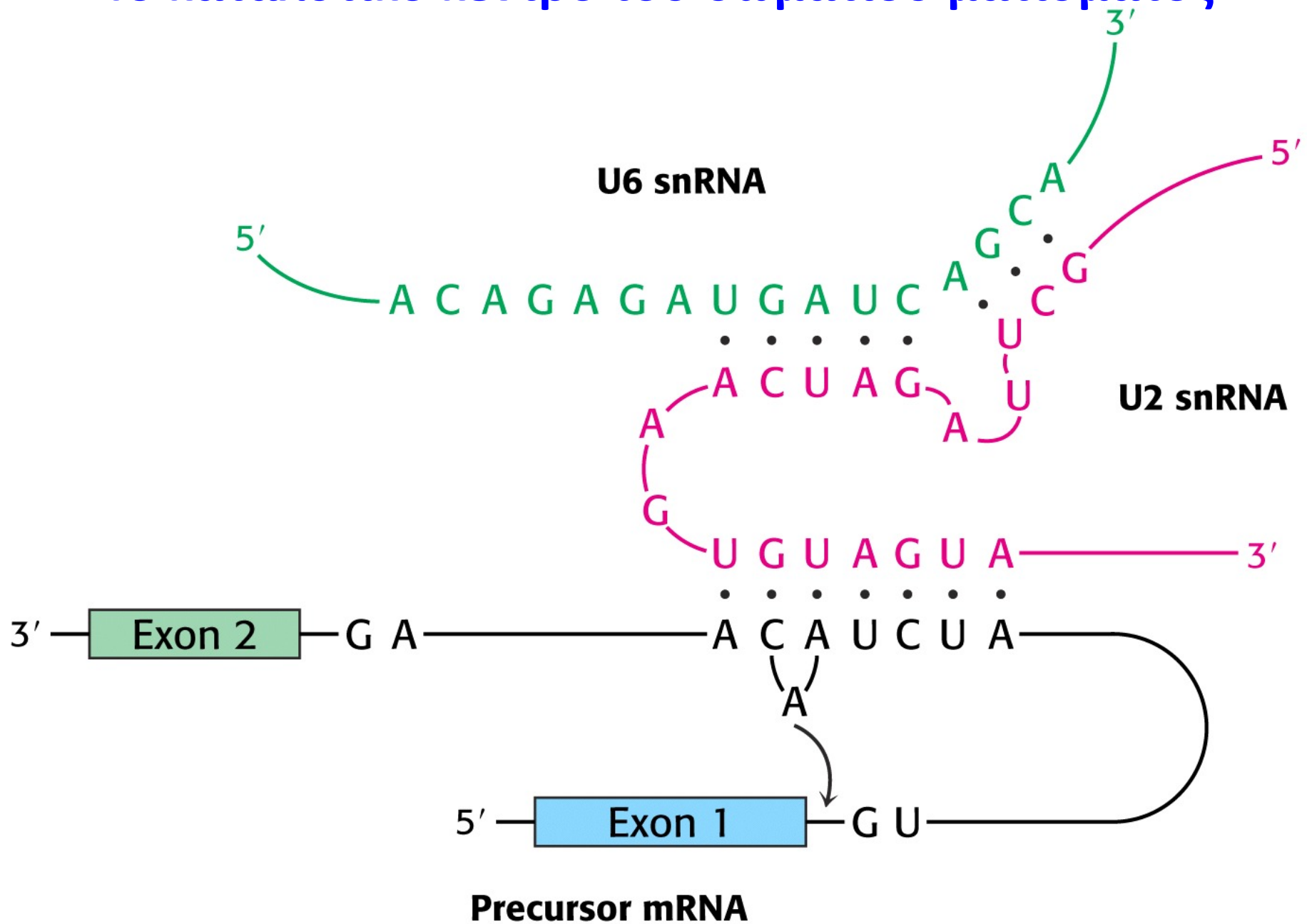
SPLICEOSOME-CATALYZED SPLICING OF NUCLEAR mRNA

Spliceosome

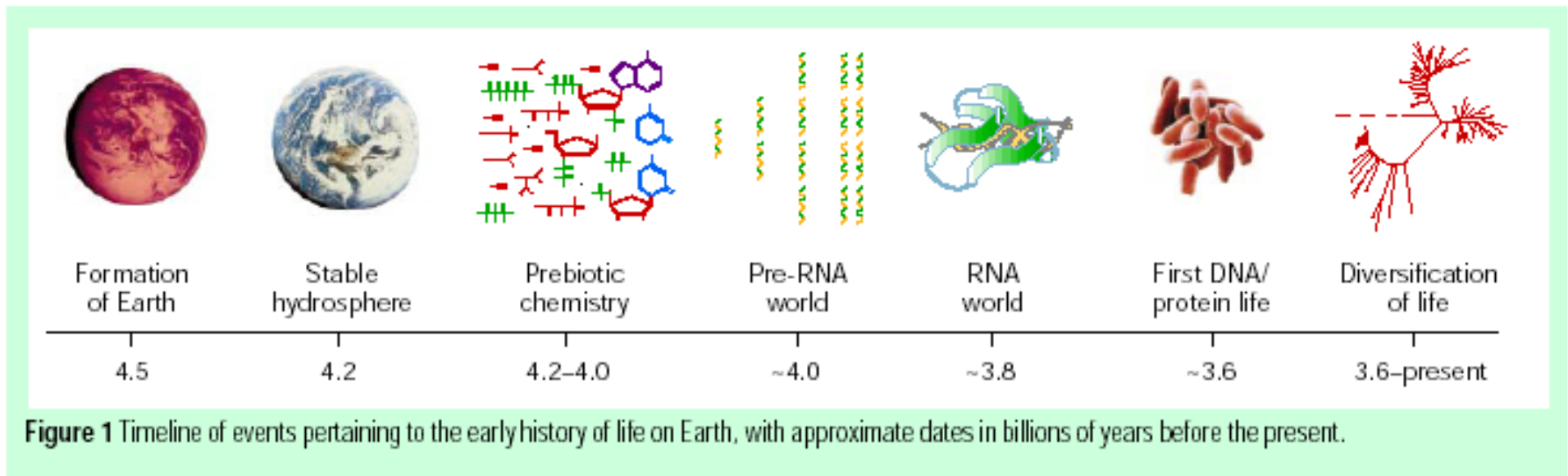


snRNA U2 και snRNA U6:

Το καταλυτικό κέντρο του σωματίου ματίσματος



Ο κόσμος του RNA (RNA World)





The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1993

The discovery of split genes



Richard J. Roberts



Phillip A. Sharp

Richard J. Roberts and Phillip A. Sharp made their amazing discovery of split genes in the adenovirus when they examined a hybrid between a viral mRNA and its template DNA in the electron microscope. They observed that the mRNA was not encoded as a colinear segment on the DNA molecule. Instead, remarkable loops of unhybridized DNA (A, B and C in figure) were seen. The interpretation was that mature messenger RNA was derived from *four discontinuous segments* on the viral DNA. The segments retained in the mRNA are called *exons* and the intervening sequences (A, B and C), excised during mRNA maturation, are called *introns*.

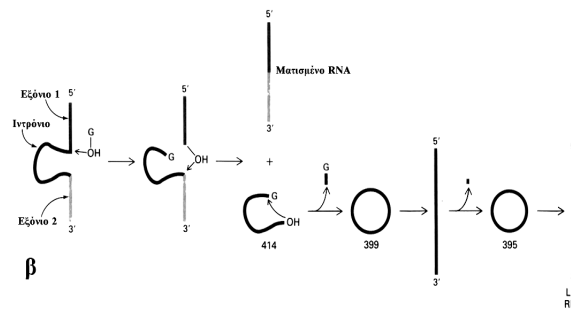
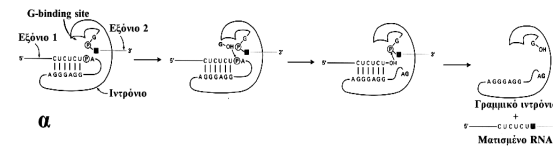
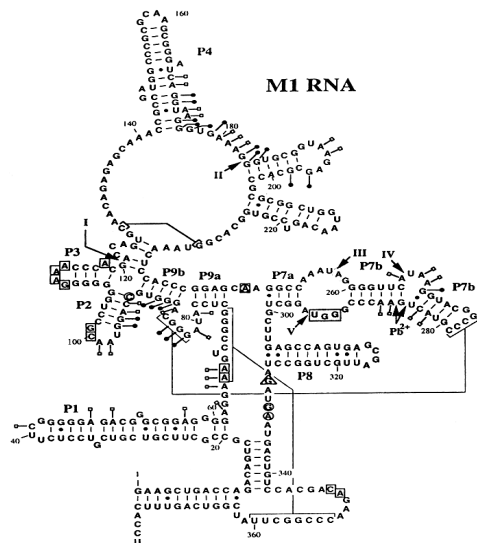
Ribozymes (ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΑ)



Sidney Altman

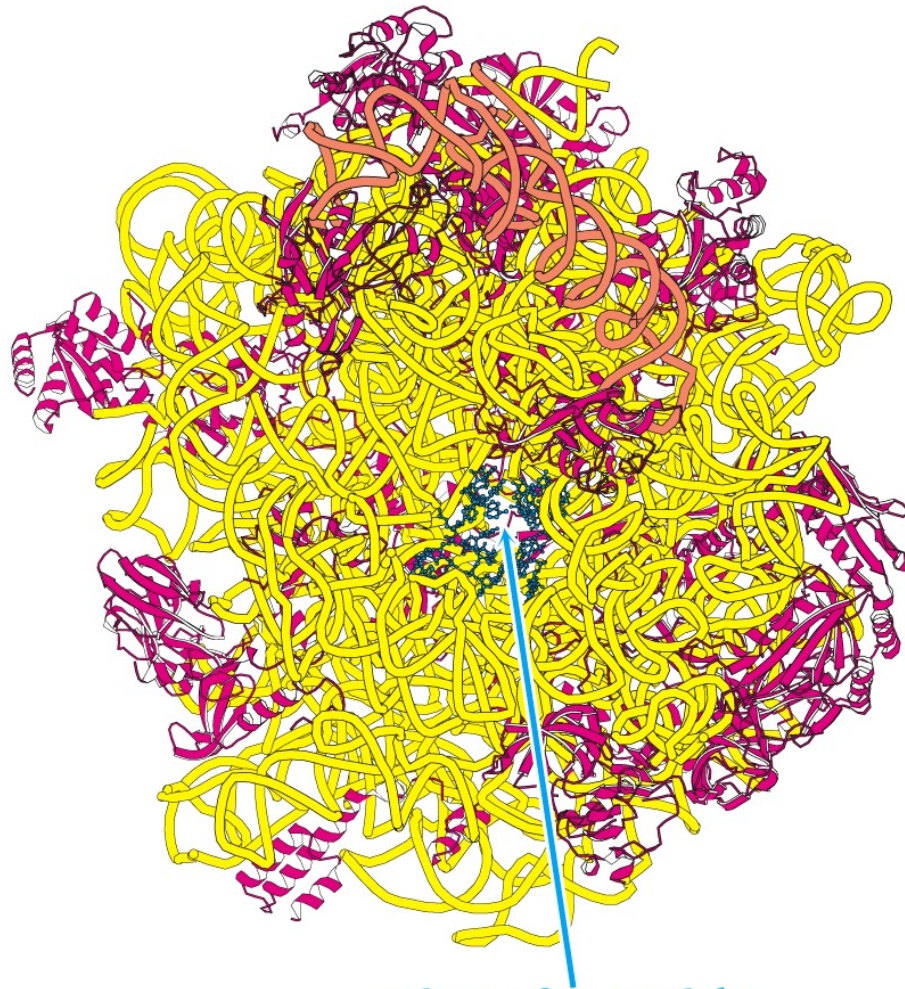


Tom Cech



Το ριβόσωμα είναι ριβοένζυμο

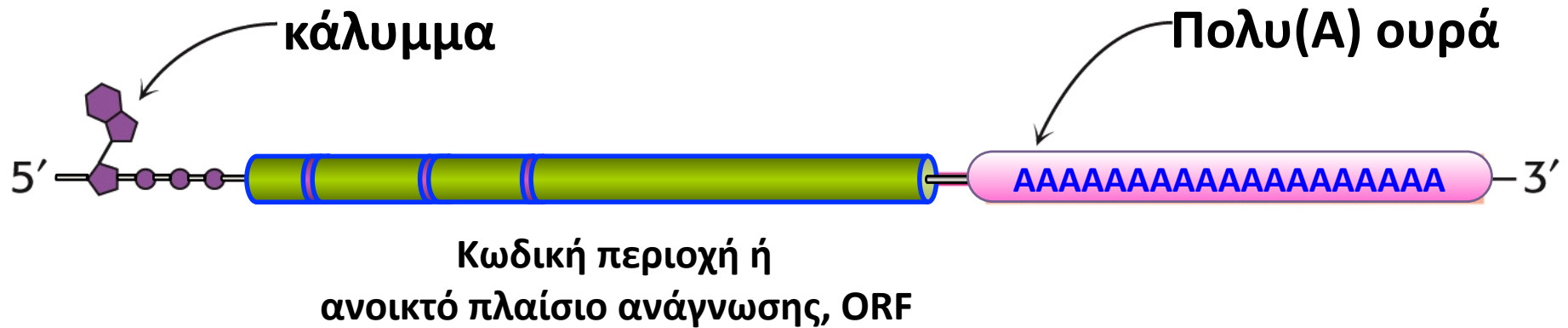
2000-2001 Noller, Steitz, Rammakrishnan



Site of peptide
bond formation



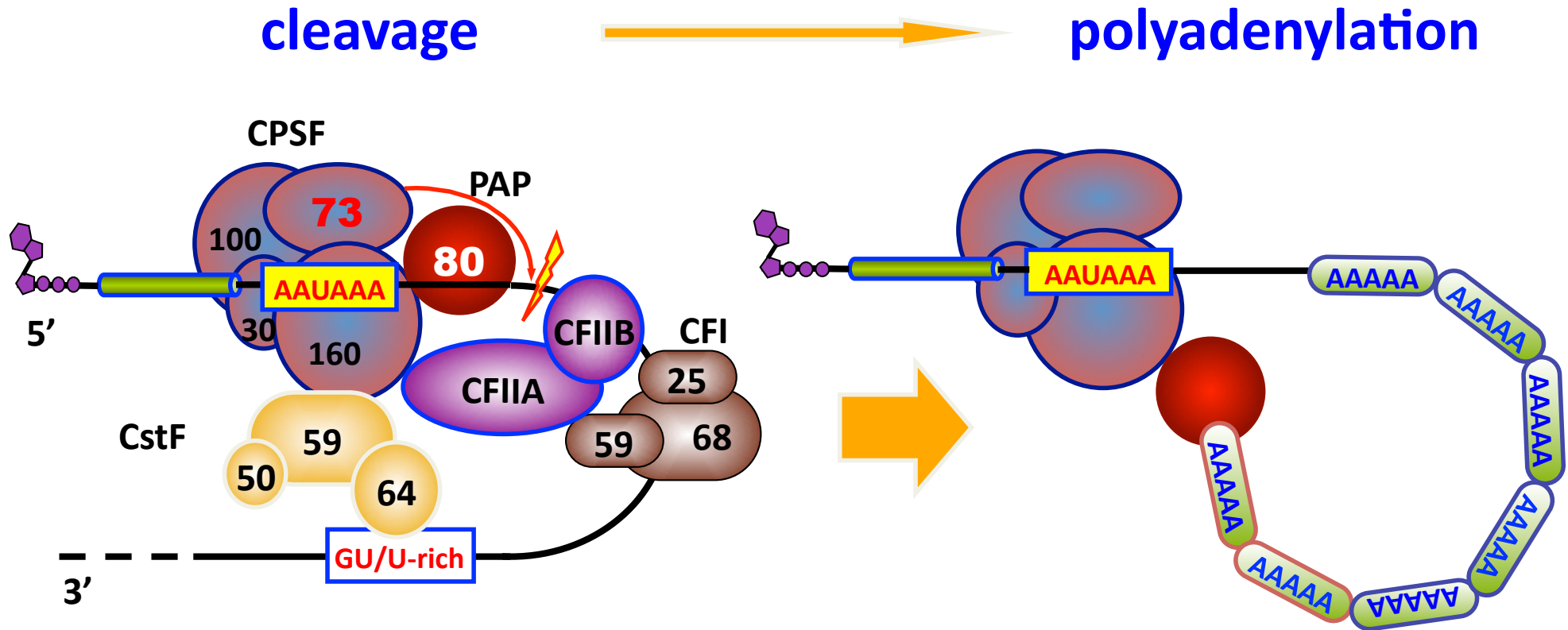
5' κάλυμμα – 3' πολυ(A) ουρά 5'cap - 3'poly(A) tail



Η διεργασία του 3' άκρου (3'-end processing)

- Προσθήκη μιας αλληλουχίας νουκλεοτιδίων αδενίνης στο 3' άκρο των mRNAs, γνωστής ως πολυ(A) ουρά.
- Η αλληλουχία αυτή ΔΕΝ είναι κωδικοποιημένη στο DNA (δηλ. δεν υπάρχουν αλληλουχίες μήκους ~ 300 βάσεων θυμίνης στο DNA)
- Μήκος ουράς: ~70 νουκλεοτίδια αδενίνης (A) σε κατώτερους ευκαρυωτικούς
250-300 (A) σε θηλαστικά
- Η προσθήκη της ουράς γίνεται από το ένζυμο πολυ(A)-τελική αδενοσινοτρανσφεράση ή (συνήθως) πολυ(A) πολυμεράση (PAP)
- Η προσθήκη της πολυ(A) ουράς είναι μια αντίδραση σε δύο στάδια:
 1. Τμήση (Cleavage)
 2. Πολυαδενυλίωση [Polyadenylation, Προσθήκη πολυ(A) ουράς]

3'-end processing



CPSF, Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor;
CF, Cleavage Factor; **CstF**, Cleavage-stimulating Factor;
PAP, Poly(A) Polymerase; **PABP**, Poly(A)-Binding Protein

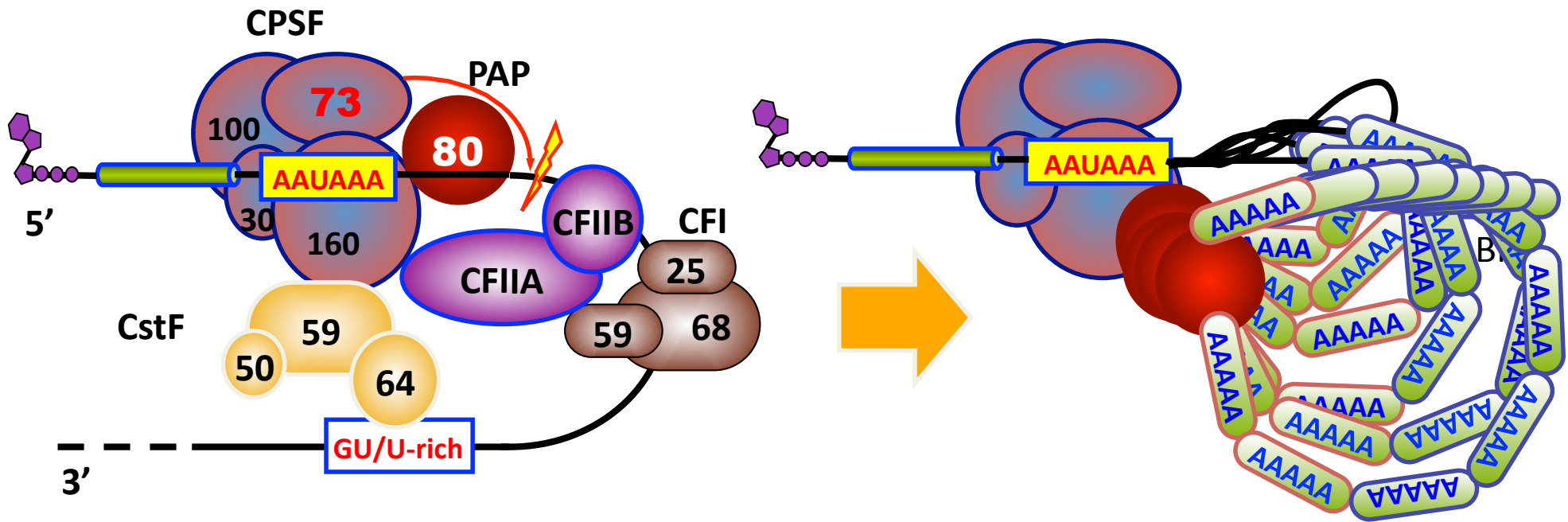

PABP II

3'-end processing

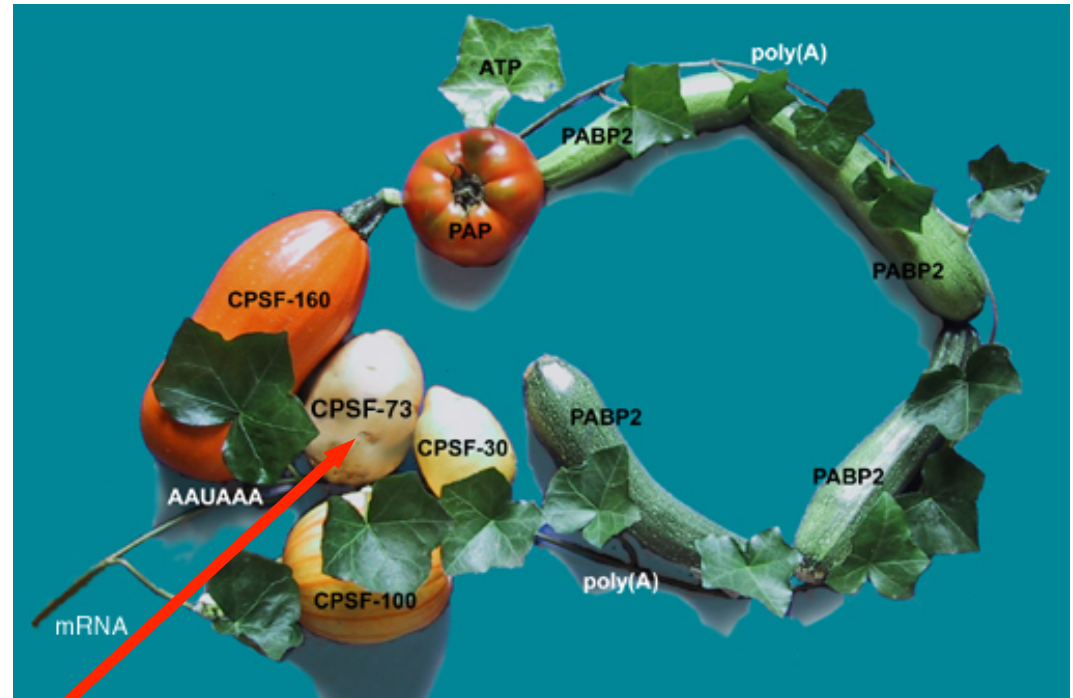
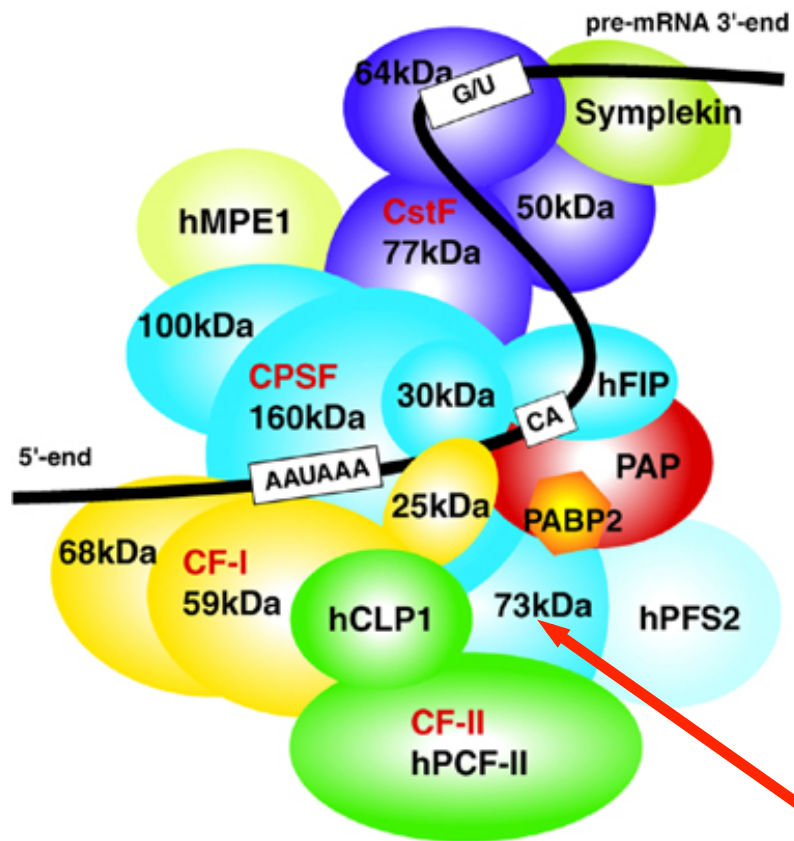
cleavage



polyadenylation

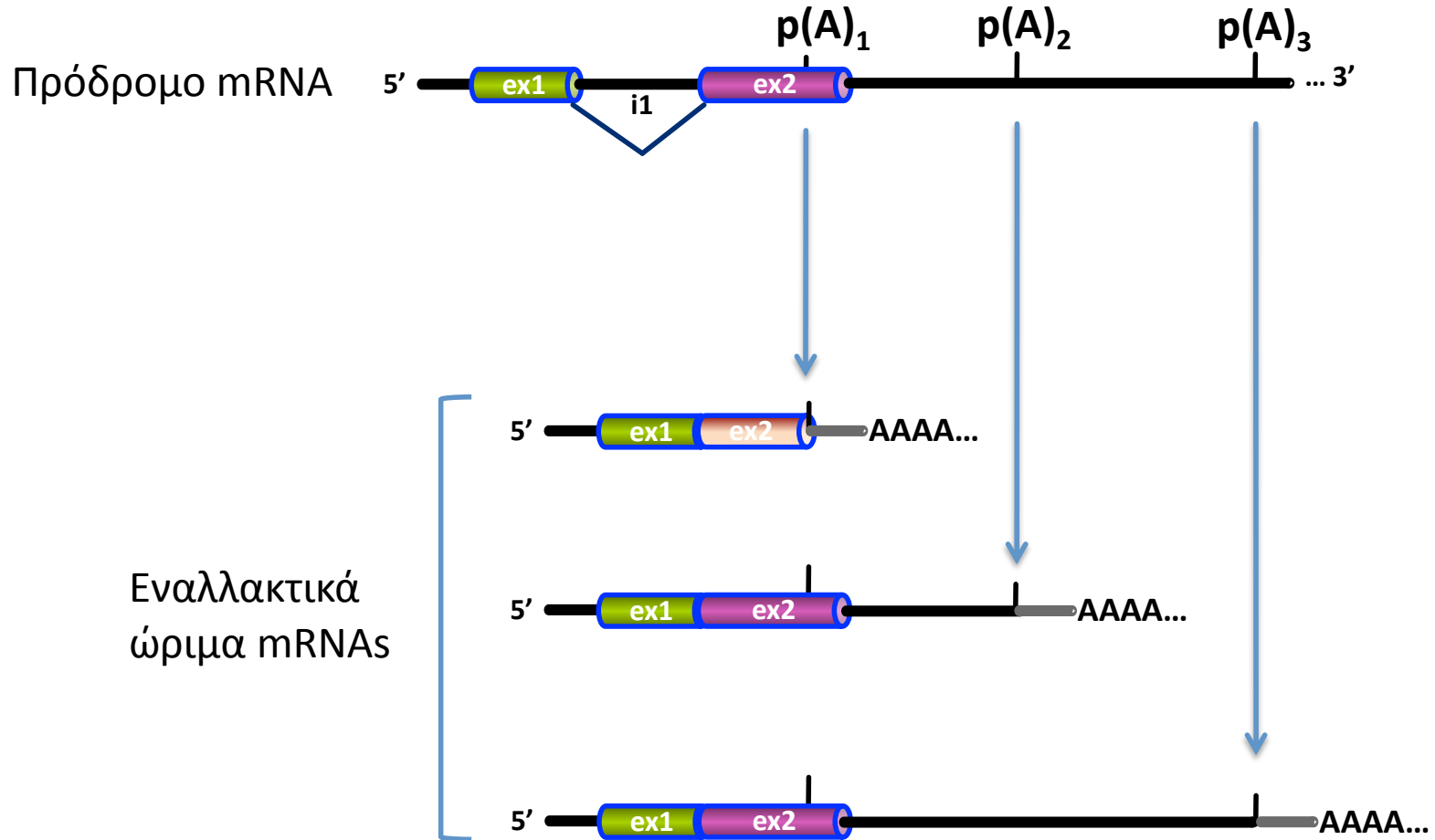


Οι πολλοί παράγοντες της διεργασίας του 3' άκρου



www.biozentrum.unibas.ch/personal/keller/

Η εναλλακτική πολυαδενυλίωση

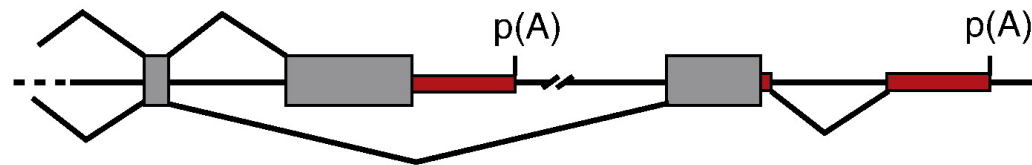


p(A): θέση πολυαδενυλίωσης • **AAAA...**: πολυ(A) ουρά • **ex**, εξόνιο • **i**, ιντρόνιο

Η εναλλακτική πολυαδενυλίωση (και το εναλλακτικό μάτισμα)

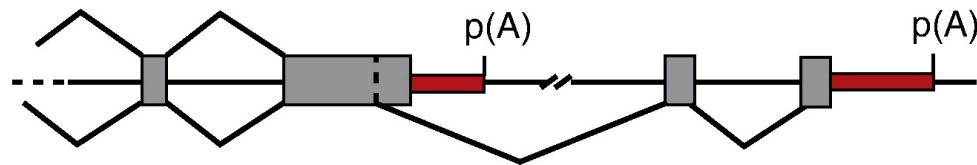
Skipped – exon associated

A Calcitonin/CGRP



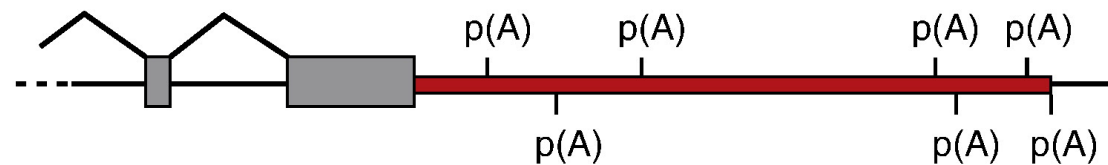
Composite exons associated

B Immunoglobulin μ heavy chain



*Single terminal exons
with two or more p(A) sites
(tandem UTRs)*

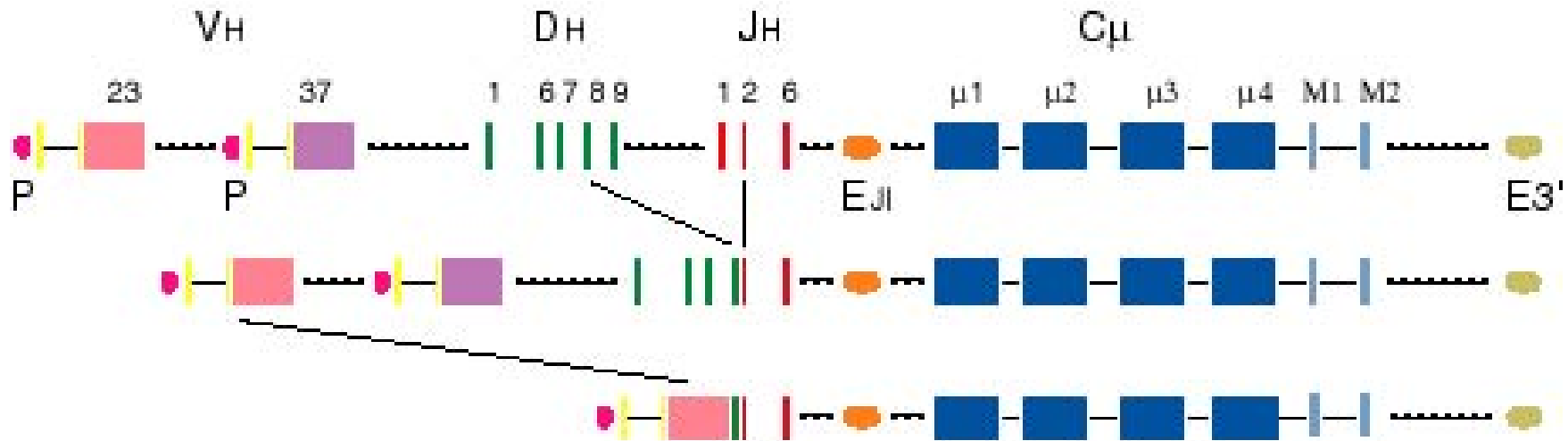
C Dihydrofolate reductase



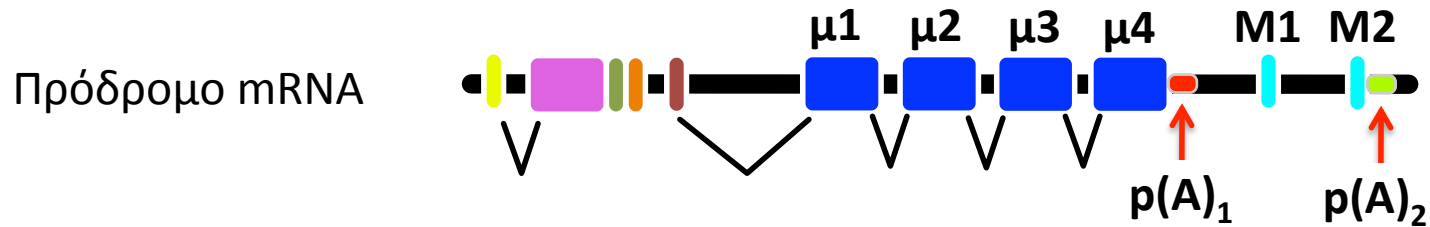
■ Coding regions
■ 3' Untranslated regions

p(A): θέσεις πολυαδενυλίωσης

Η εναλλακτική πολυαδενυλίωση I



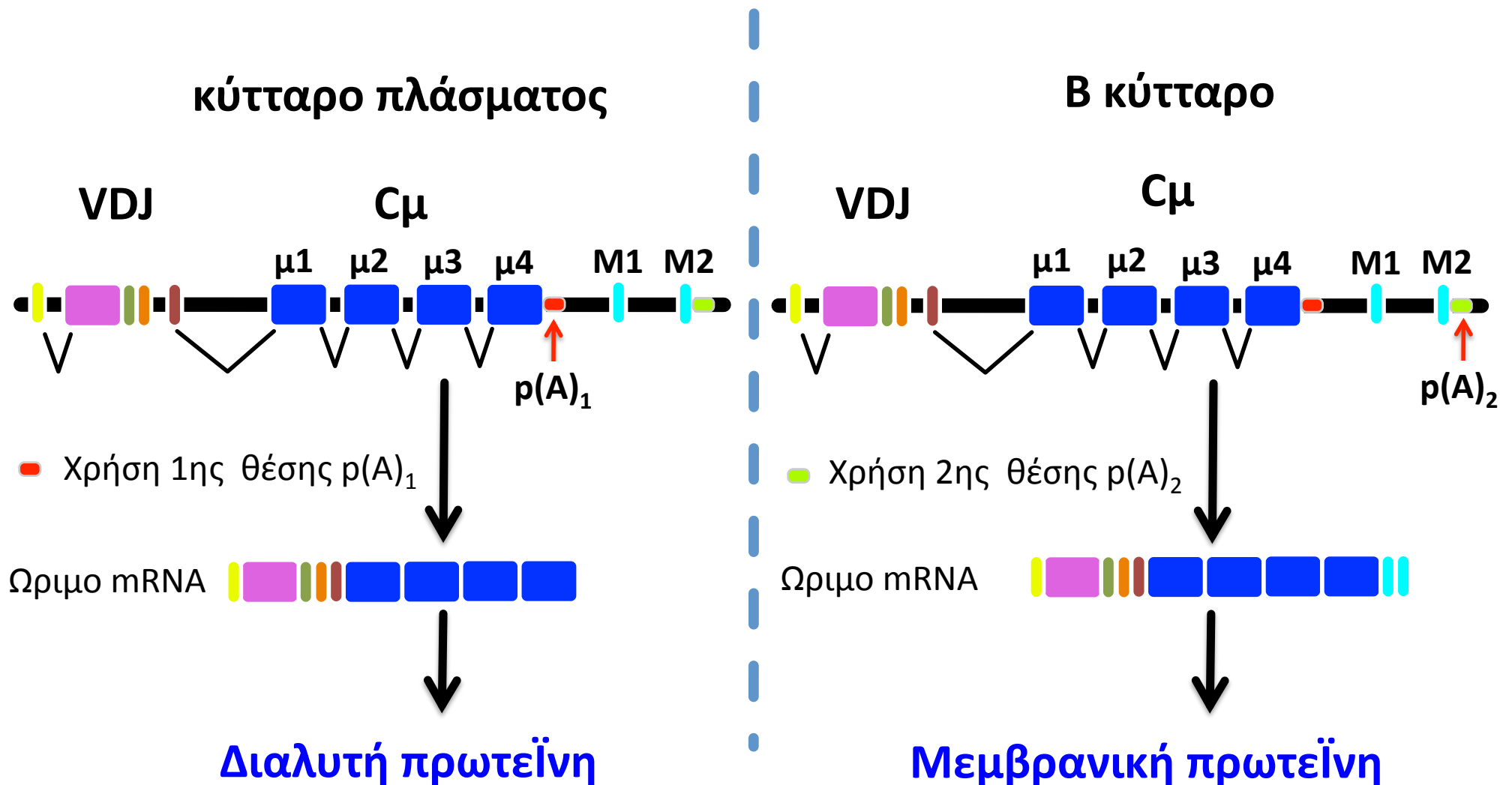
VDJ recombination



p(A): θέσεις πολυαδενυλίωσης [προσθήκης πολυ(A) ουράς]

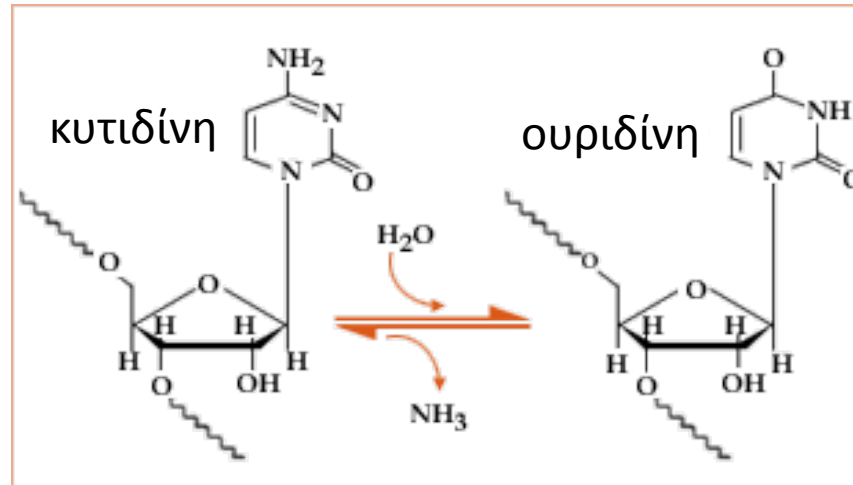
Η εναλλακτική πολυαδενυλίωση II

Η μεμβρανική και η διαλυτή μορφή της IgM



Ο μηχανισμός αφορά στα ~25% των ανθρώπινων γονιδίων

Επιμέλεια RNA, Editing



- Παρατηρείται σε pre-mRNAs οργανιδίων (μιτοχόνδρια, χλωροπλάστες)
- Αφορά σε:
 - αλλαγή βάσης (π.χ. C→U ή A→G)
 - παρεμβολή ή αφαίρεση νουκλεοτιδίου ή μικρού αριθμού νουκλεοτιδίων
- Μεταβάλλεται η πληροφορία του mRNA.

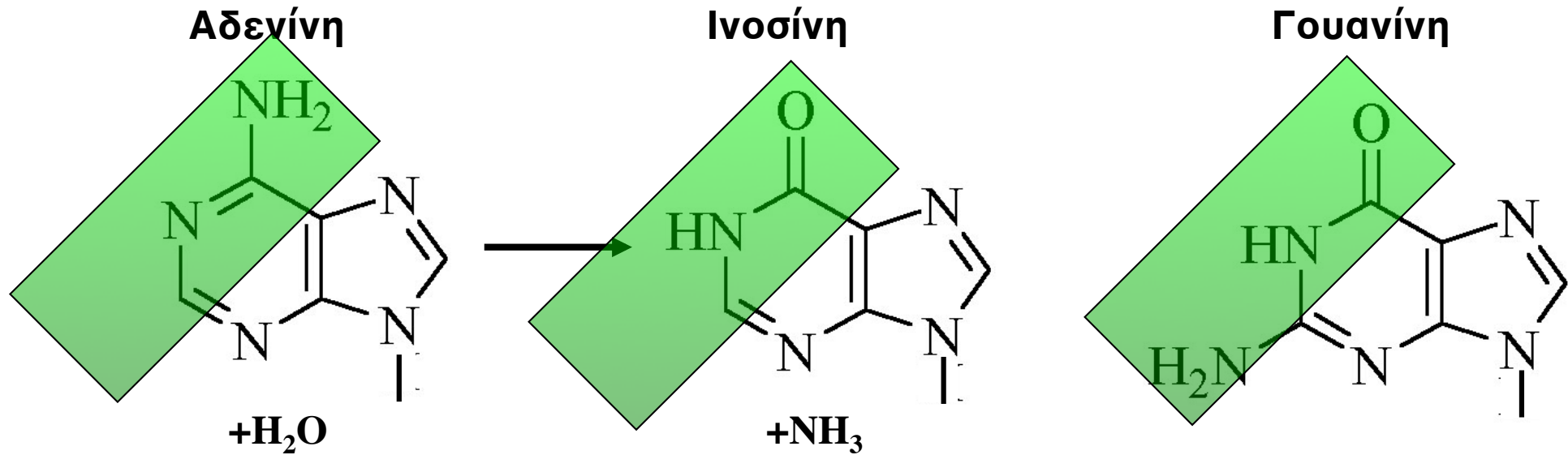
RNA editing (Επιμέλεια RNA).

Editing = Αλλαγές των νουκλεοτιδίων RNA που αλλάζουν την κωδικοποίηση (coding potential)

Τρεις κύριοι τύποι:

- Παρεμβολή ή αφαίρεση πολλών ουριδινών (U) σε γονίδια τρυπανοσώμων.
- Μετατροπή Αδενινών (A) σε Ινοσίνες (I) σε μετάζωα.
- Μετατροπή κυτιδινών (C) σε ουριδίνες (U) σε μετάζωα.

Απαμίνωση Α σε Ι.



Η Ινοσίνη (I) υβριδίζει όπως η Γουανίνη (G): εισαγωγή διαφορετικών αμινοξέων κατά τη μετάφραση.

Παράδειγμα: Αλλαγές αμινοξέων υποδοχέα γλουταμινικού.

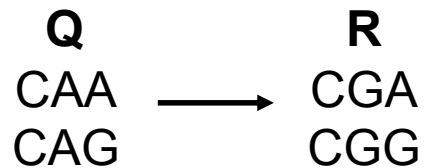
Δράση σε υποδοχείς GluR2 (AMPA υποδοχέας) και κανάλια Ca^{2+}

4 υπομονάδες: GluR1-4

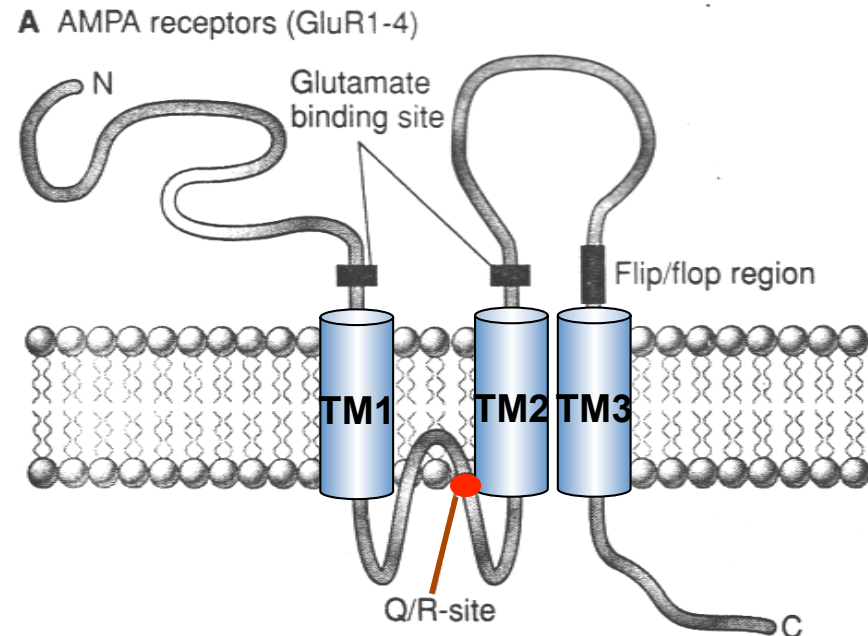
Έλλειψη της GluR2



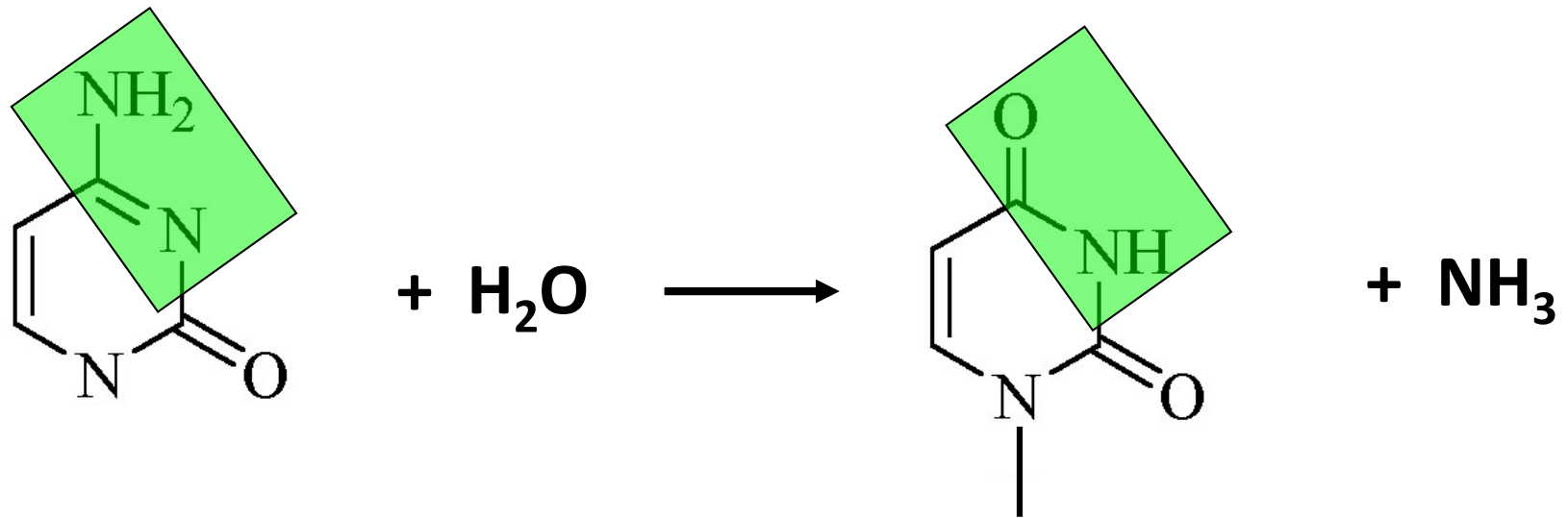
Υψηλή διαπερατότητα σε Ca^{2+} ,
οφείλεται στην περιοχή Q/R.
Η αλλαγή $\text{Q} \rightarrow \text{R}$ οφείλεται σε
επιμέλεια RNA (editing).



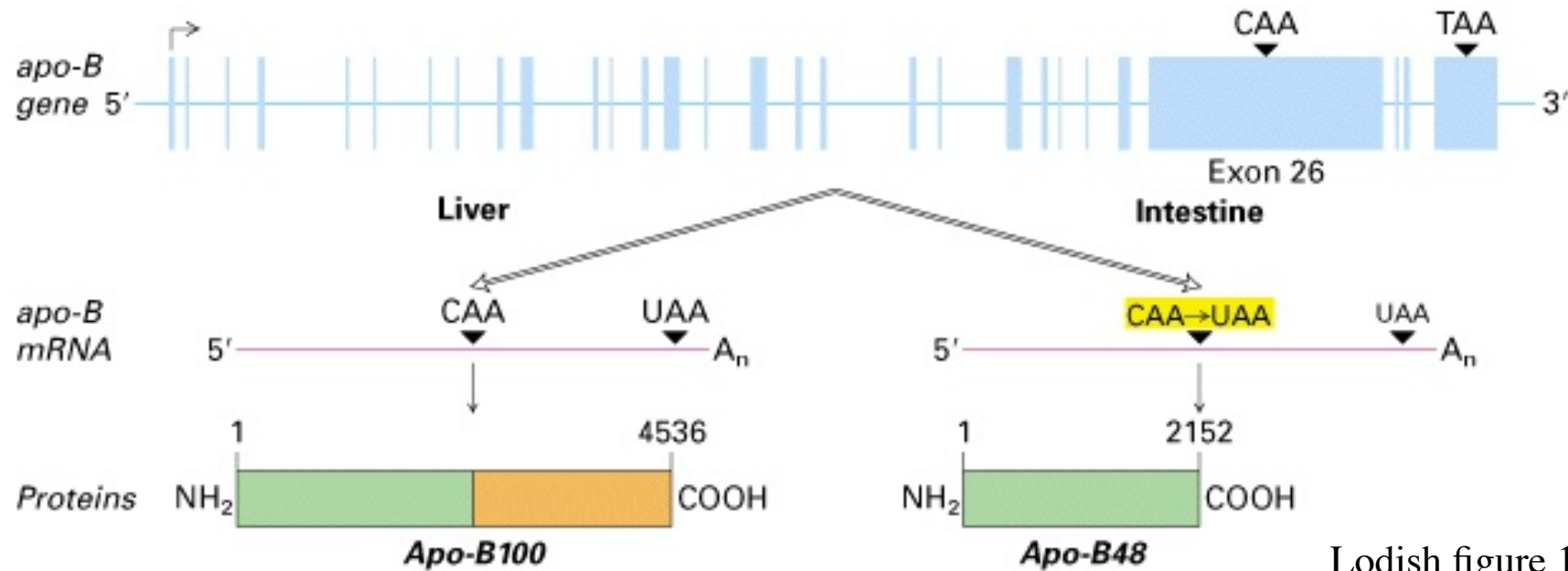
Η αλλαγή αυτή μειώνει
τη διαπερατότητα των μεμβρανών
σε ιόντα Ca .



Απαμίνωση C σε U



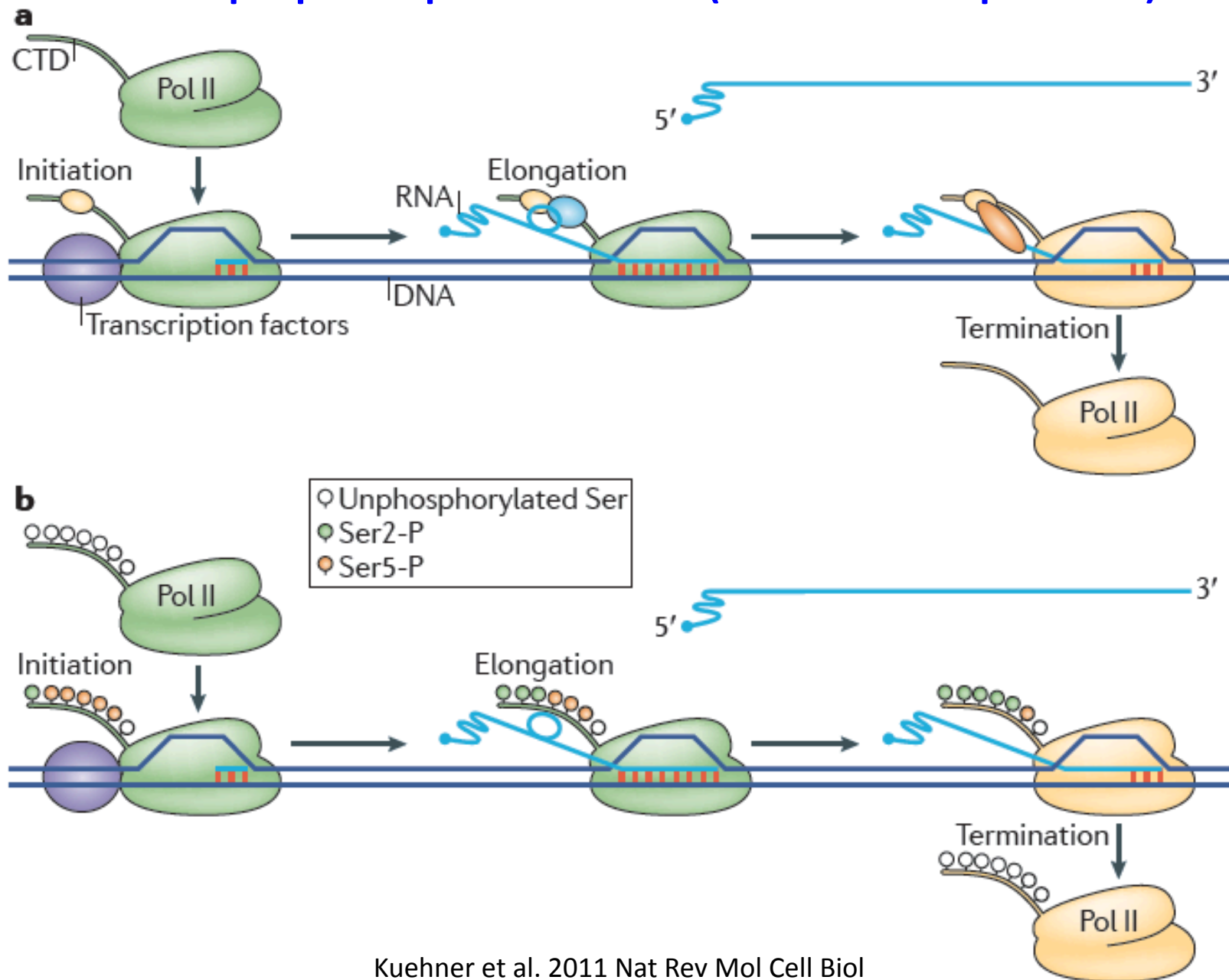
Απαμίνωση C σε U



Lodish figure 11-39

Αλλαγή ενός κωδικονίου στο mRNA της ανθρώπινης apoB σε κωδικόνιο τερματισμού:
Αλλαγές στη λειτουργικότητα των πρωτεϊνών 100kDa (ήπαρ) και 48kDa (έντερο)

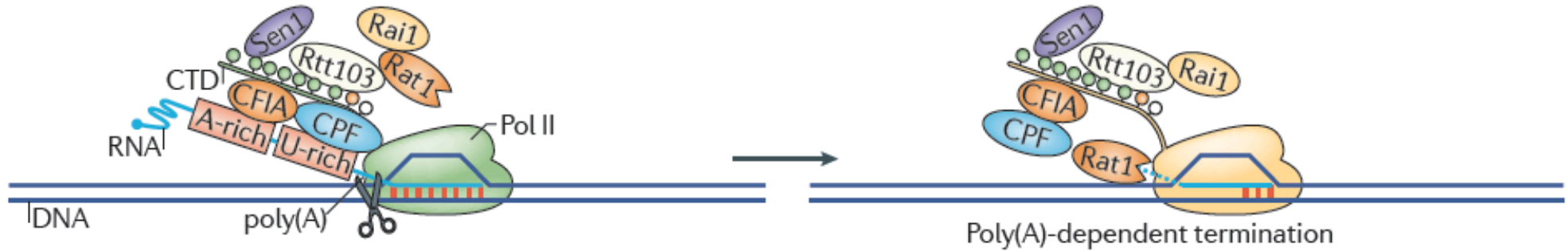
Ο τερματισμός της μεταγραφής από την Πολυμεράση του RNA (RNAP II ή Pol II)



Ο τερματισμός της μεταγραφής από την Pol II

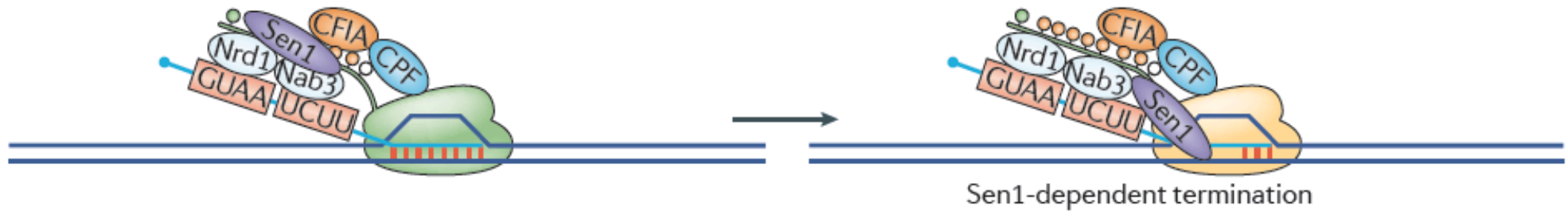
a Yeast

● ↑ Ser2-P
 ● ↓ Ser5-P
 ◊ Unphosphorylated Ser



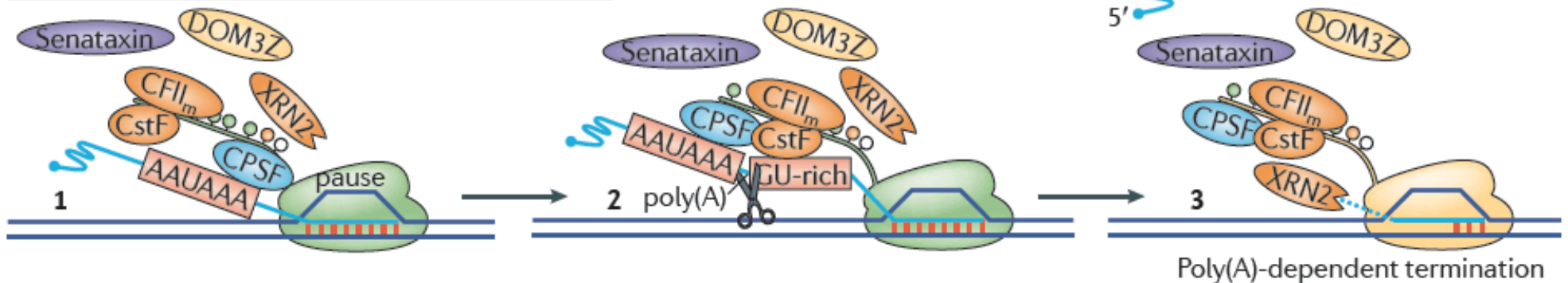
b Yeast

● ↓ Ser2-P
 ● ↑ Ser5-P
 ◊ Unphosphorylated Ser

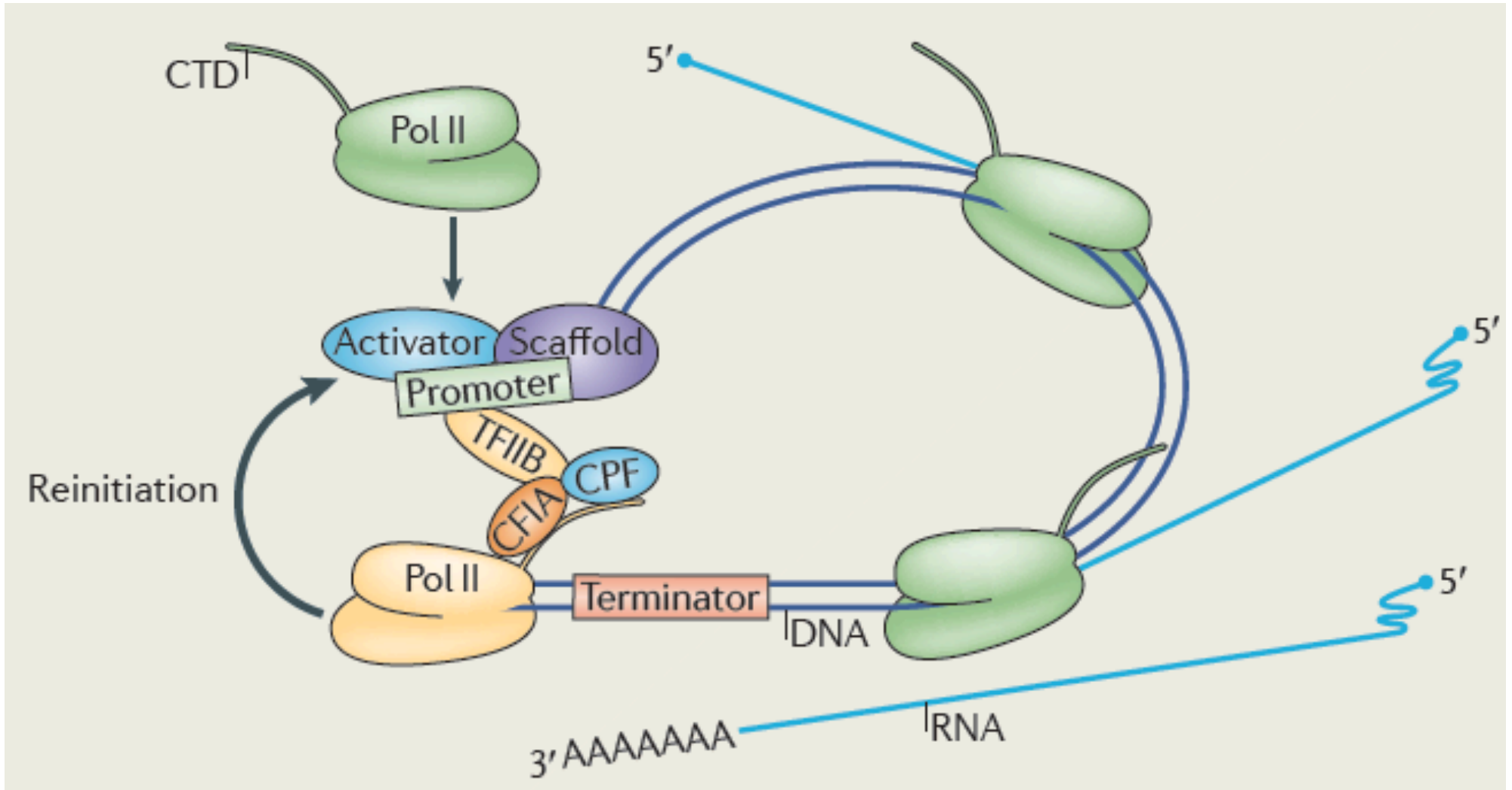


c Human

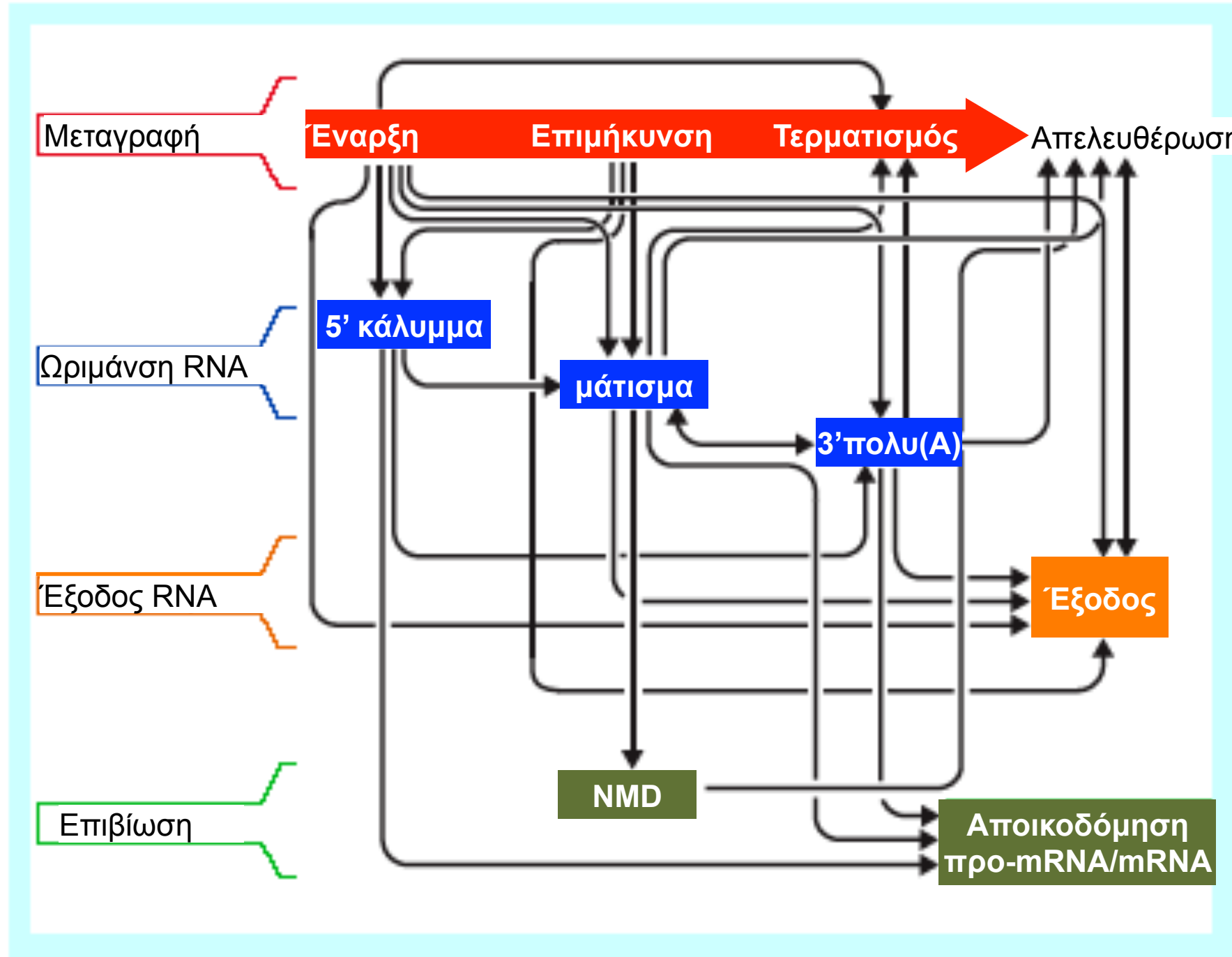
● ↑ Ser2-P
 ● ↓ Ser5-P
 ◊ Unphosphorylated Ser



Τερματισμός της μεταγραφής από Pol II, η έναρξη, ο τερματισμός...

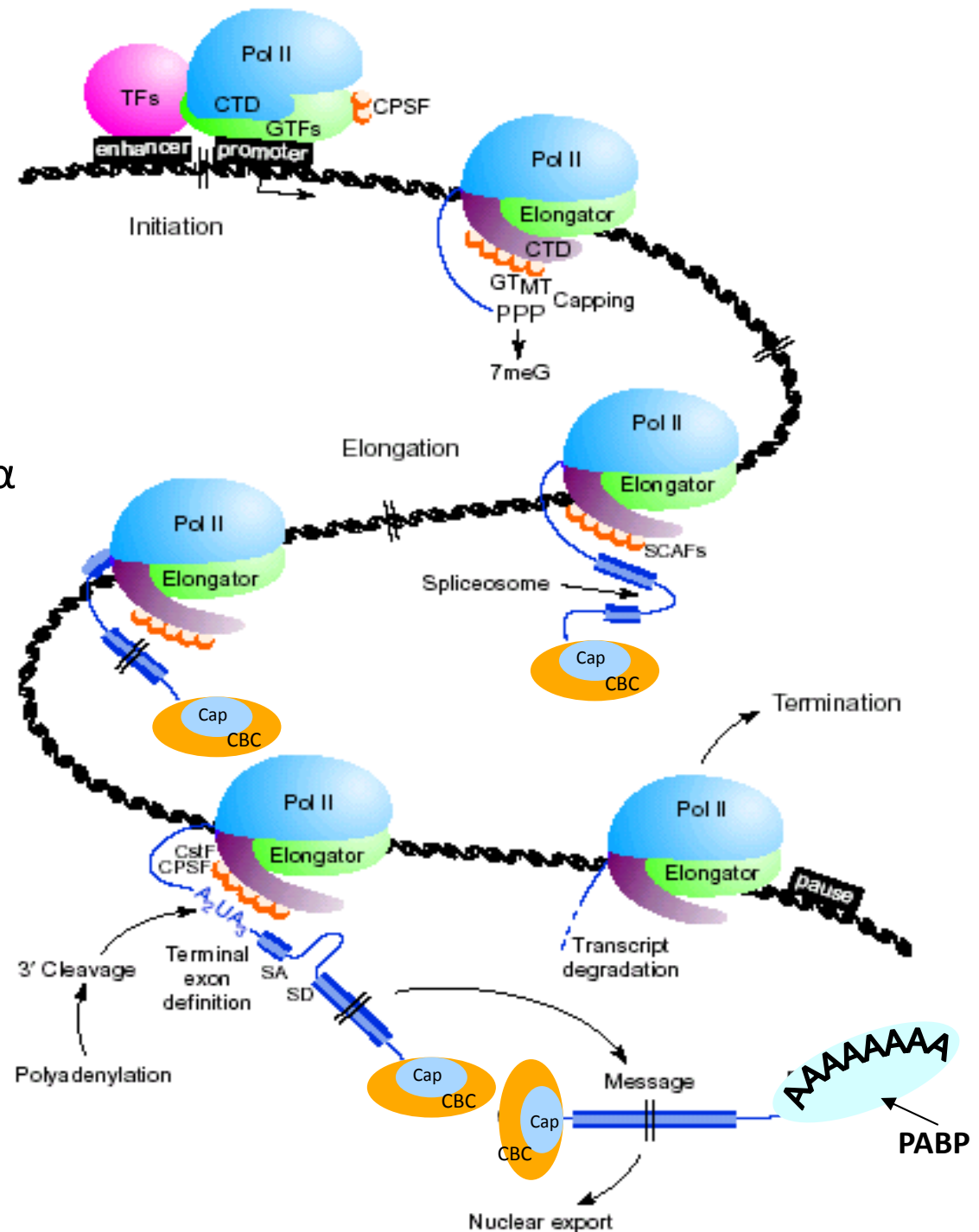


Οι διεργασίες της γονιδιακής έκφρασης είναι συζευγμένες

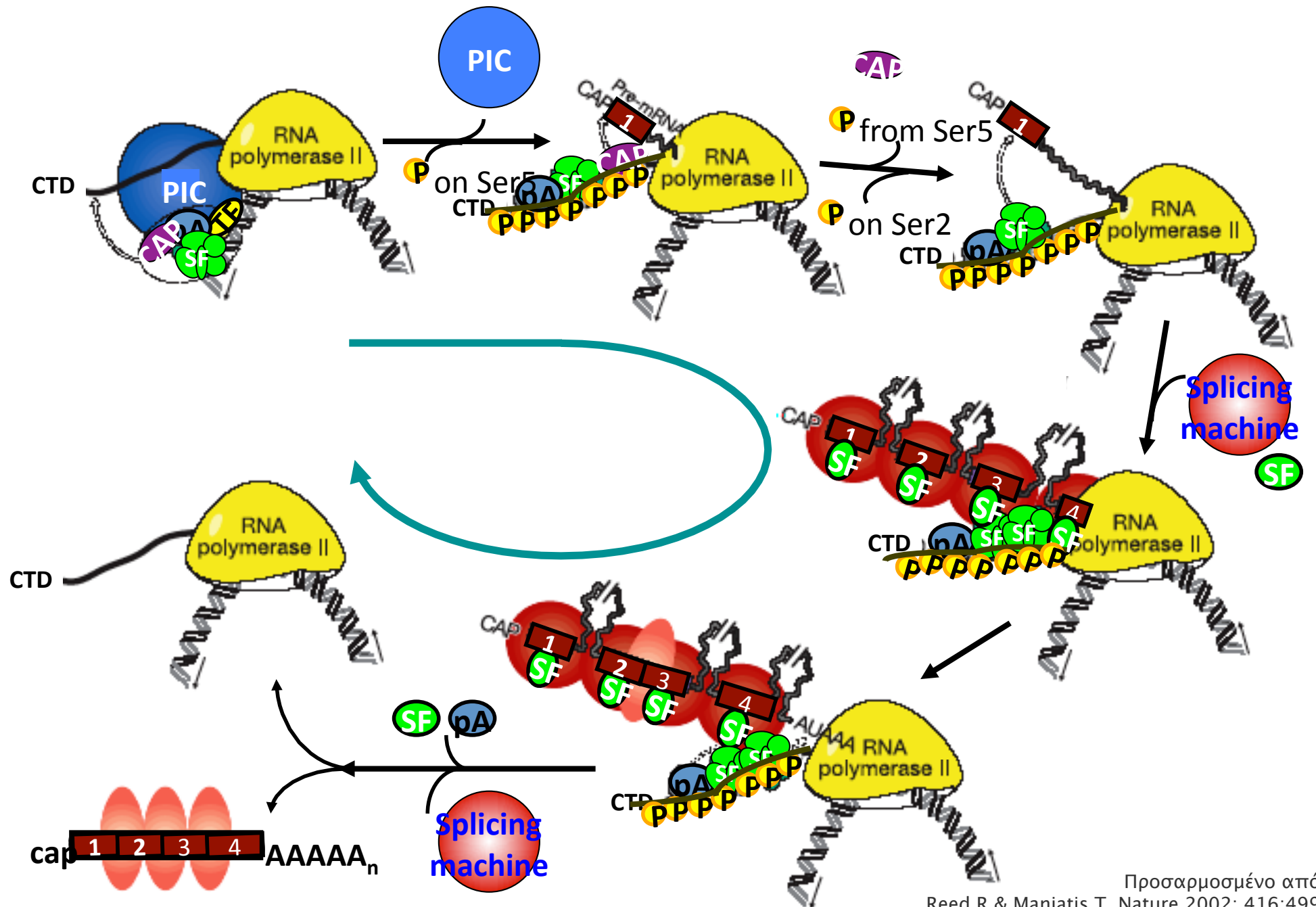


Πολυμεράση II του RNA και συμμεταγραφικές τροποποιήσεις

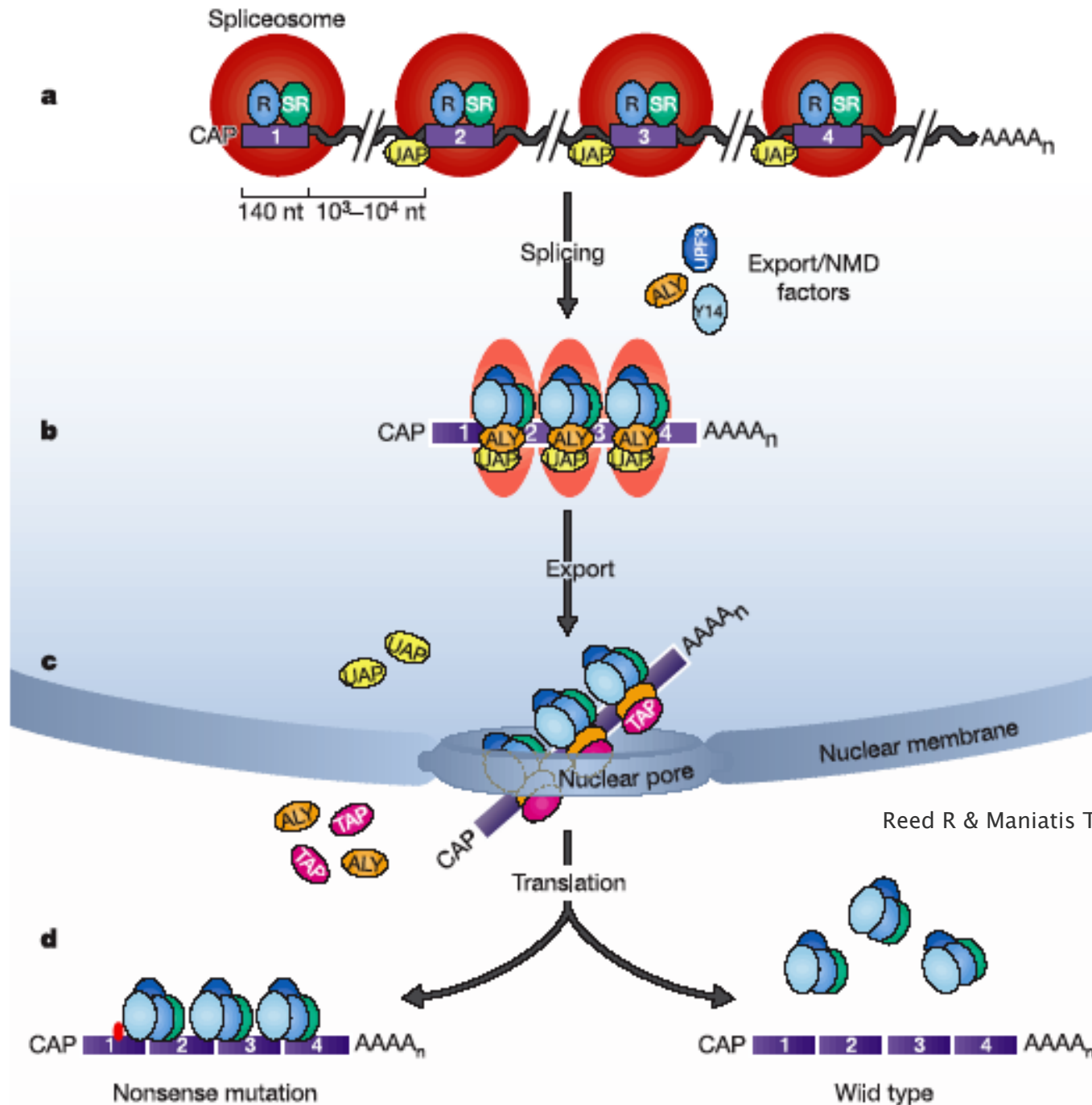
- 🌈 Κάλυμμα στο 5' άκρο
- 🌈 Μάτισμα/εναλλακτικό μάτισμα
- 🌈 Πολυ(A) ουρά στο 3' άκρο
- 🌈 Επιμέλεια (editing)



Οι διεργασίες της γονιδιακής έκφρασης είναι συζευγμένες

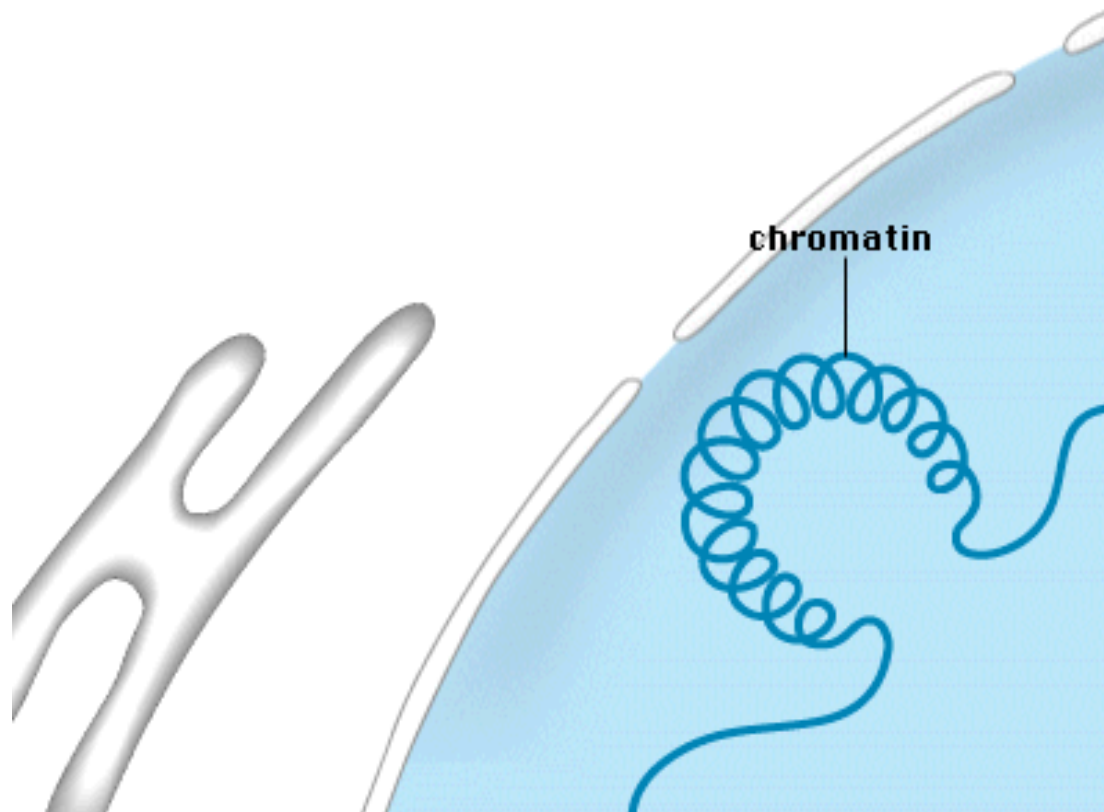


Οι διεργασίες της γονιδιακής έκφρασης είναι συζευγμένες

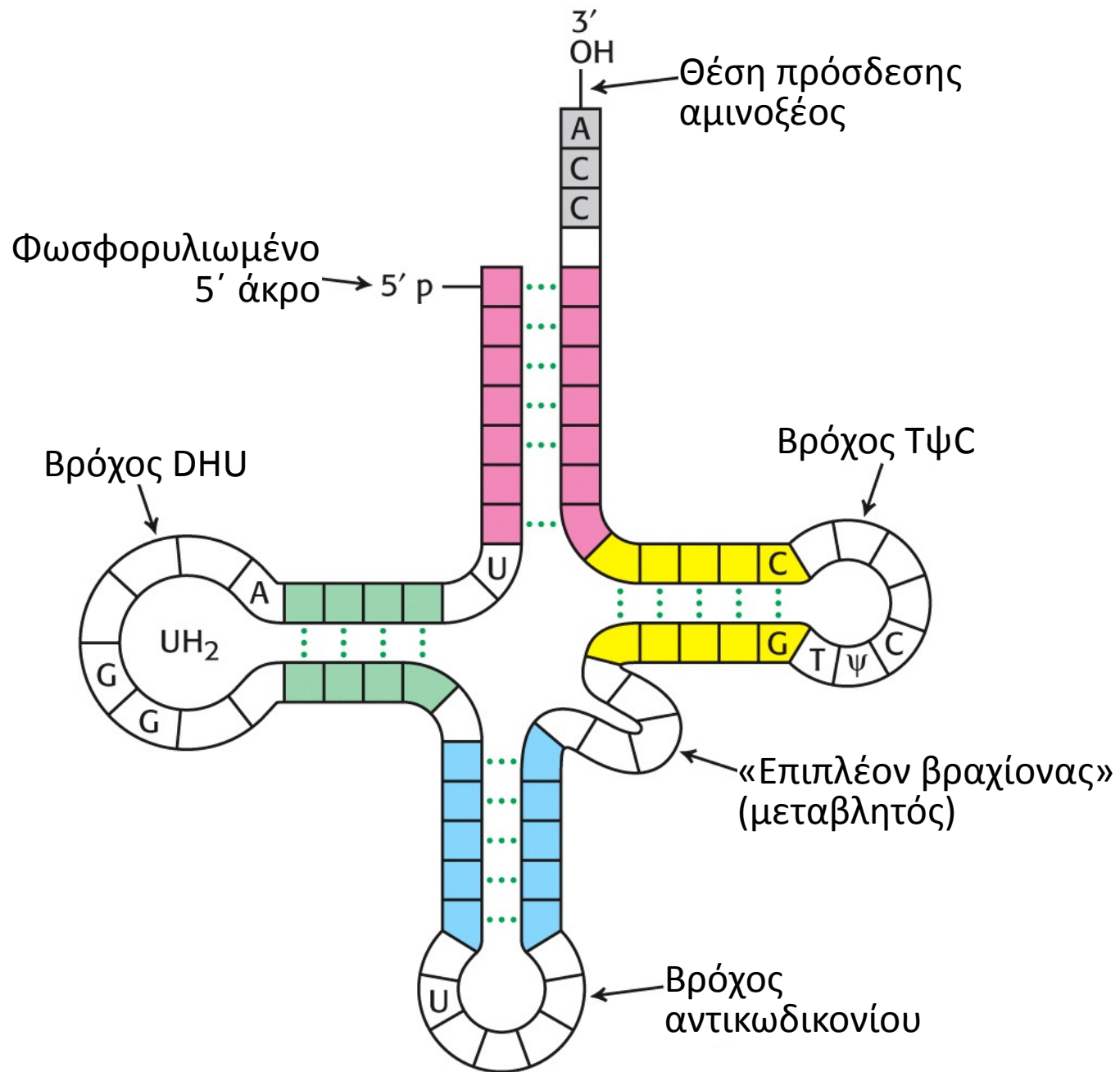


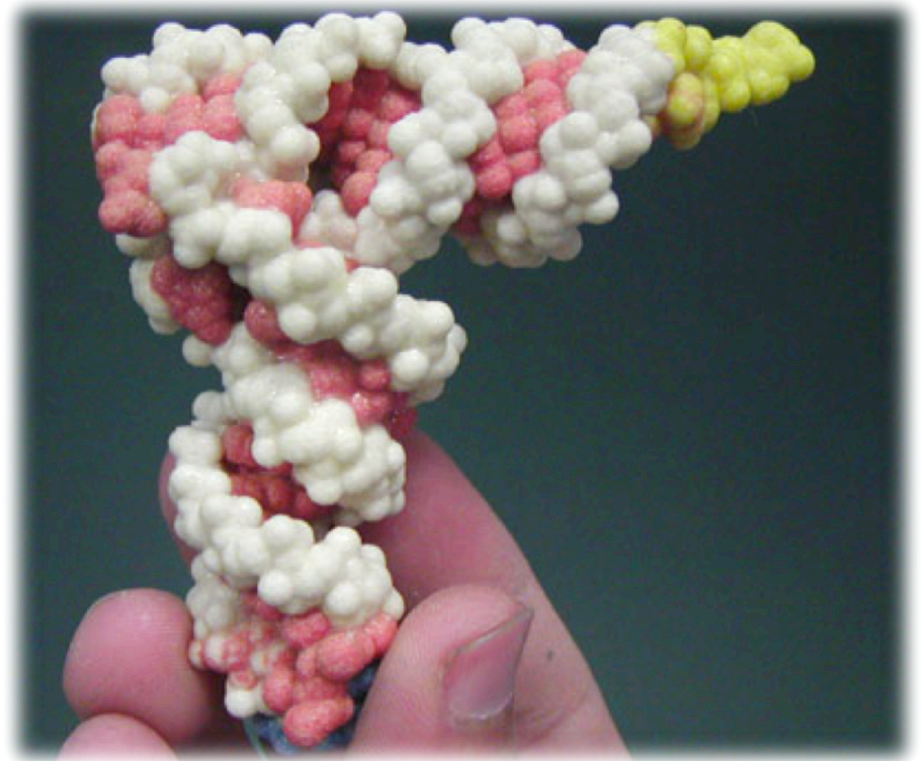
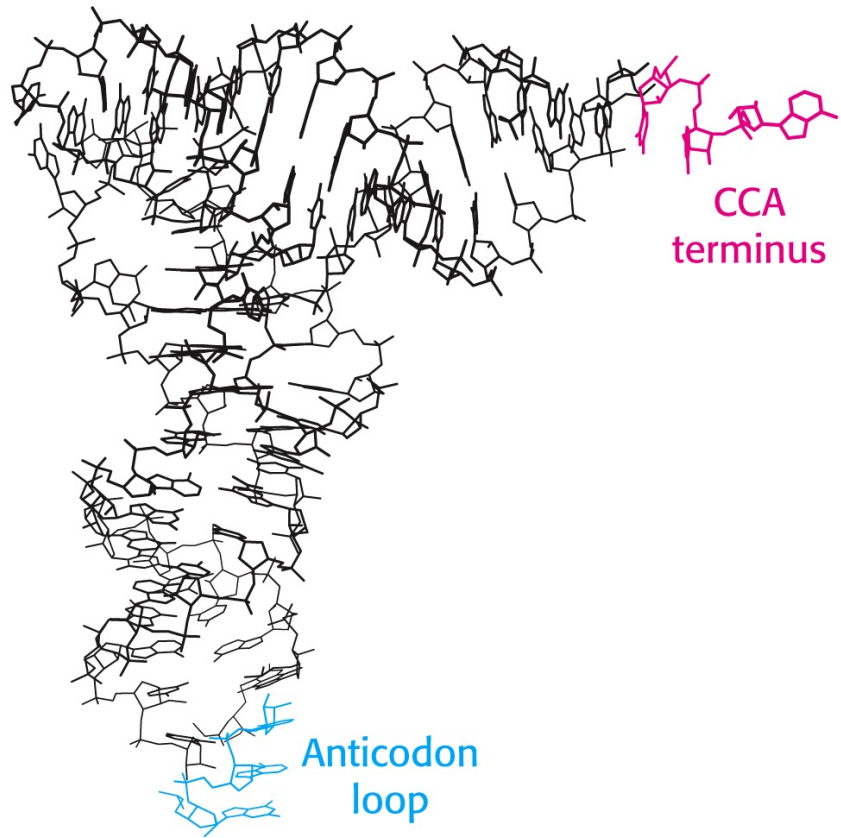
Reed R & Maniatis T. Nature 2002; 416:499

mRNA lifecycle

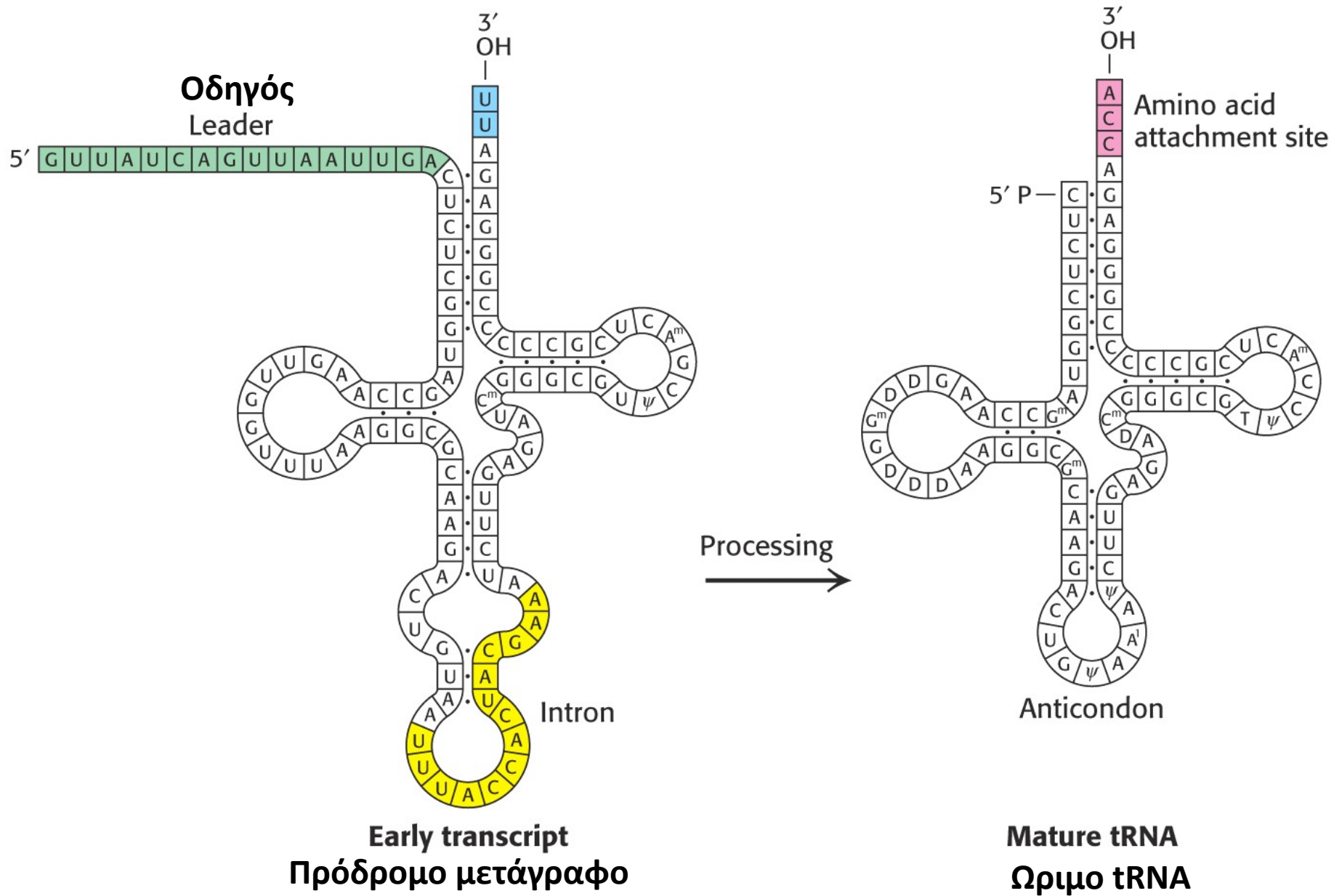


ΩΡΙΜΑΝΣΗ tRNA



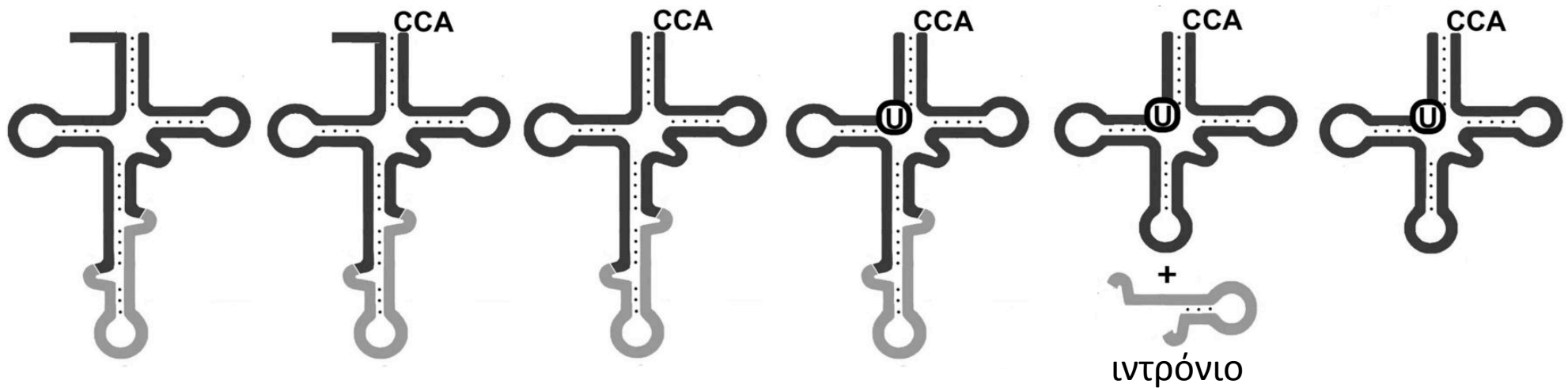


Η ωρίμανση του tRNA



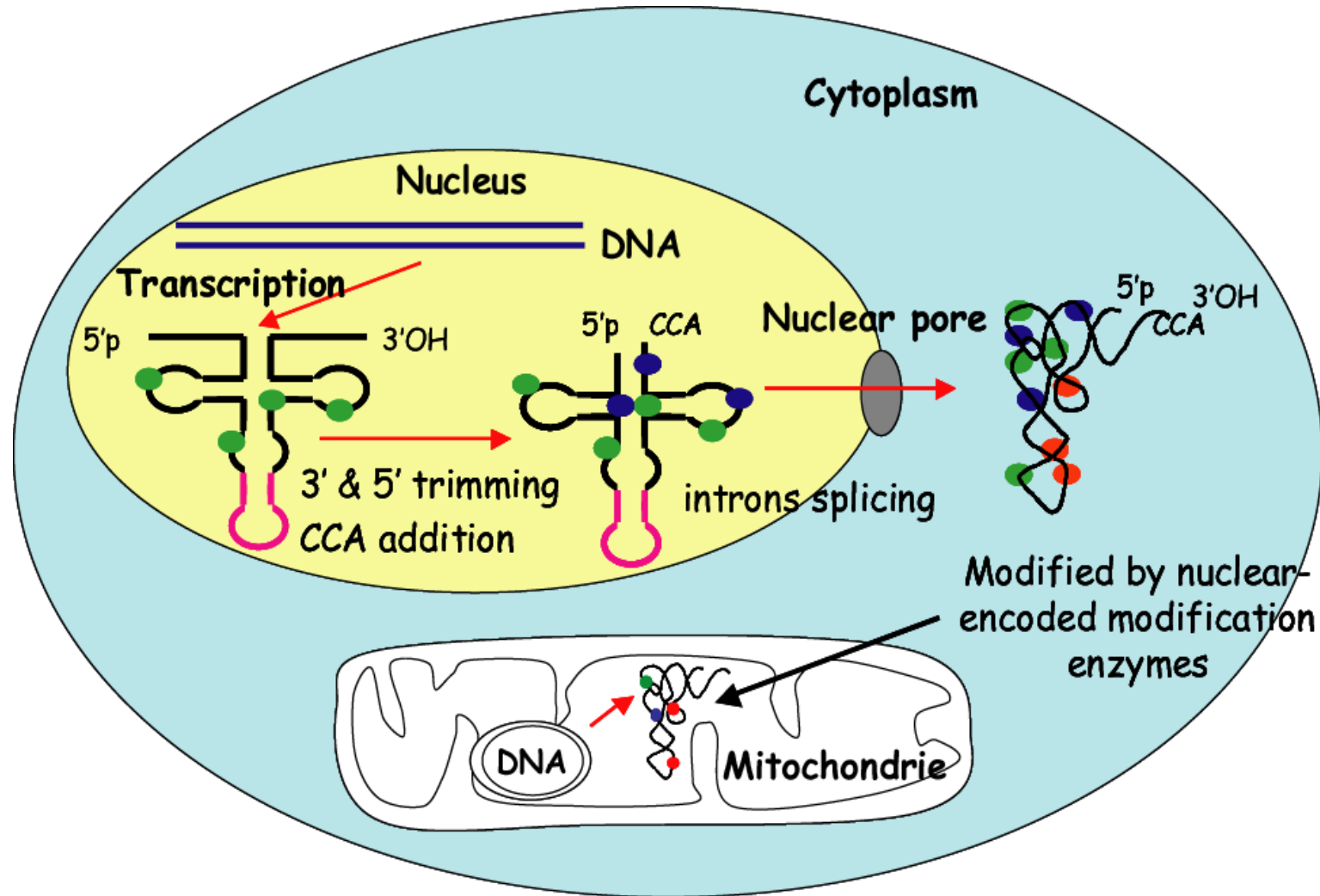
Η ωρίμανση του tRNA

Ωρίμανση 3' (tRNase Z) → Ωρίμανση 5' (tRNase P) → Επεξεργασία (editing) C8 σε U8 (CDAT8) → Μάτισμα (HSPC117) → Λειτουργικό tRNA



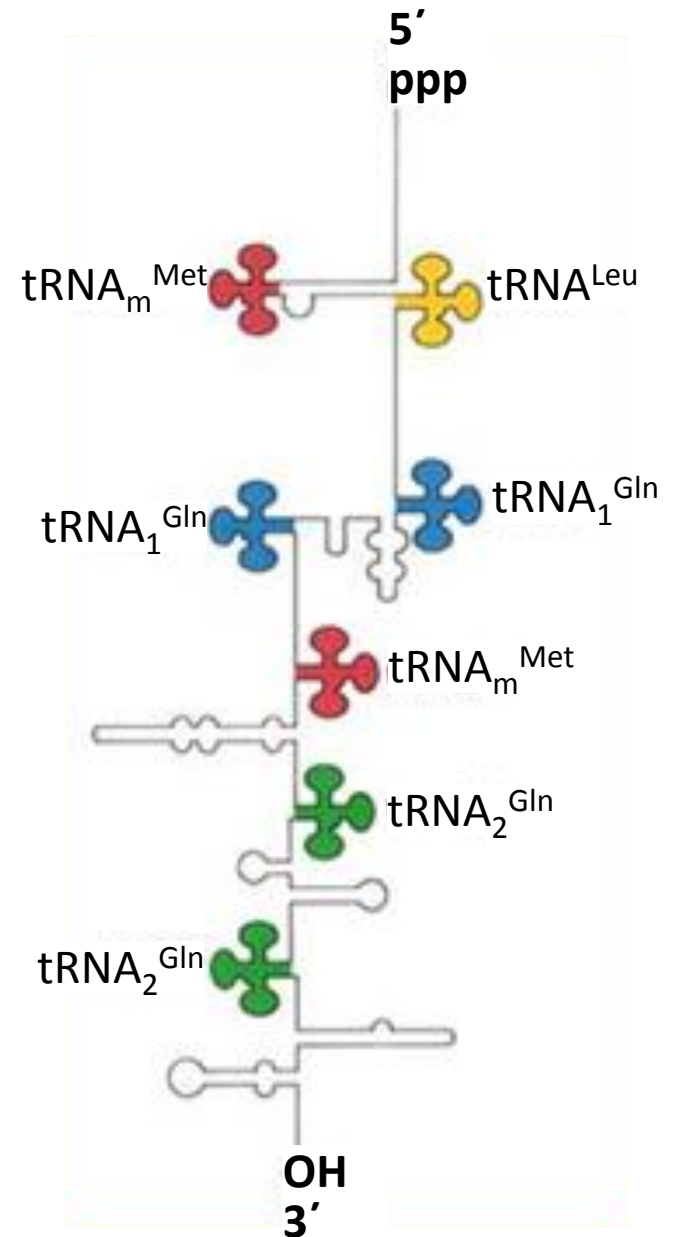
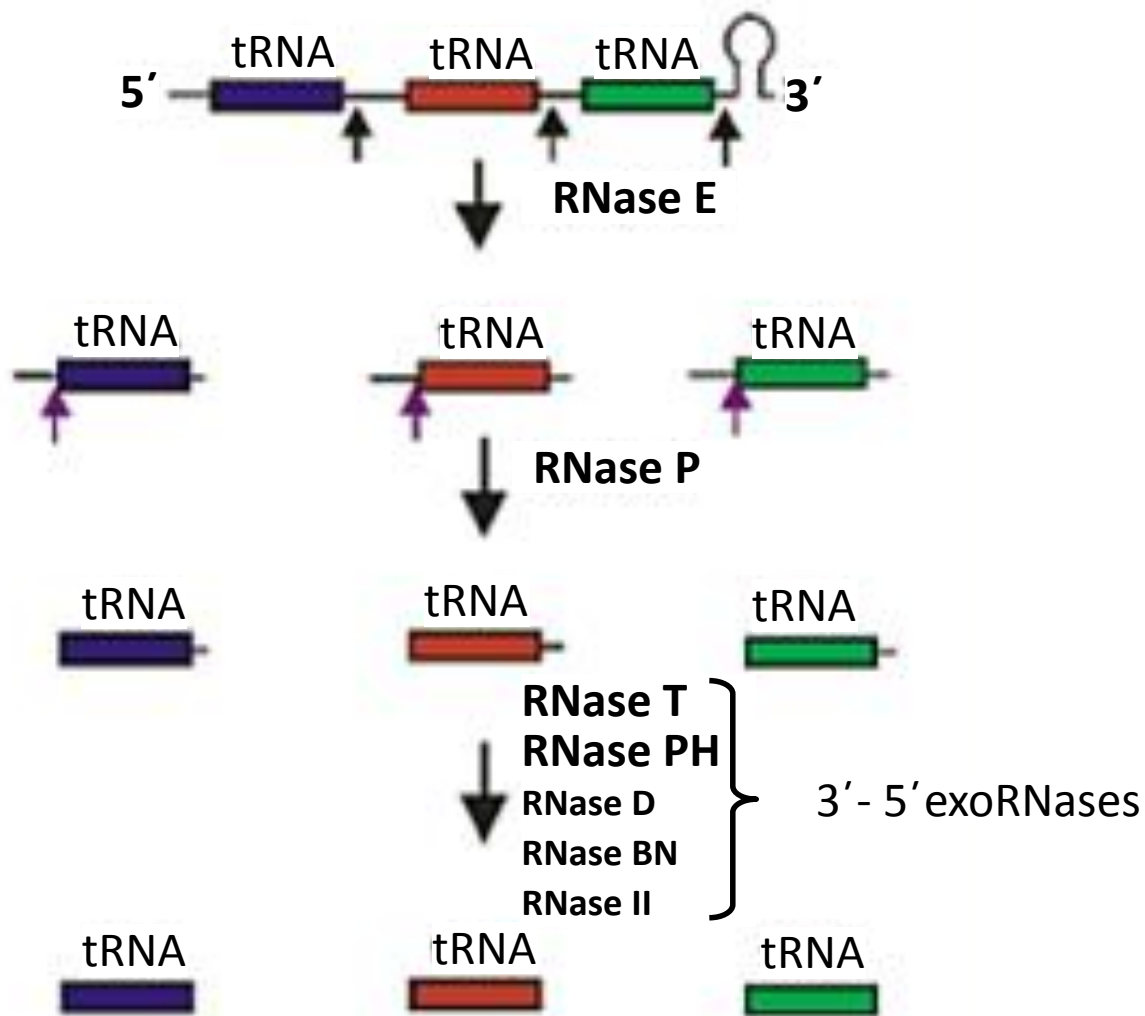
ΠΟΡΕΙΑ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ

Η ωρίμανση του tRNA



● ● ● → Various modified nucleotides

Οργάνωση γονιδίων tRNA *E. coli*



Οργάνωση γονιδίων tRNA *B. subtilis*

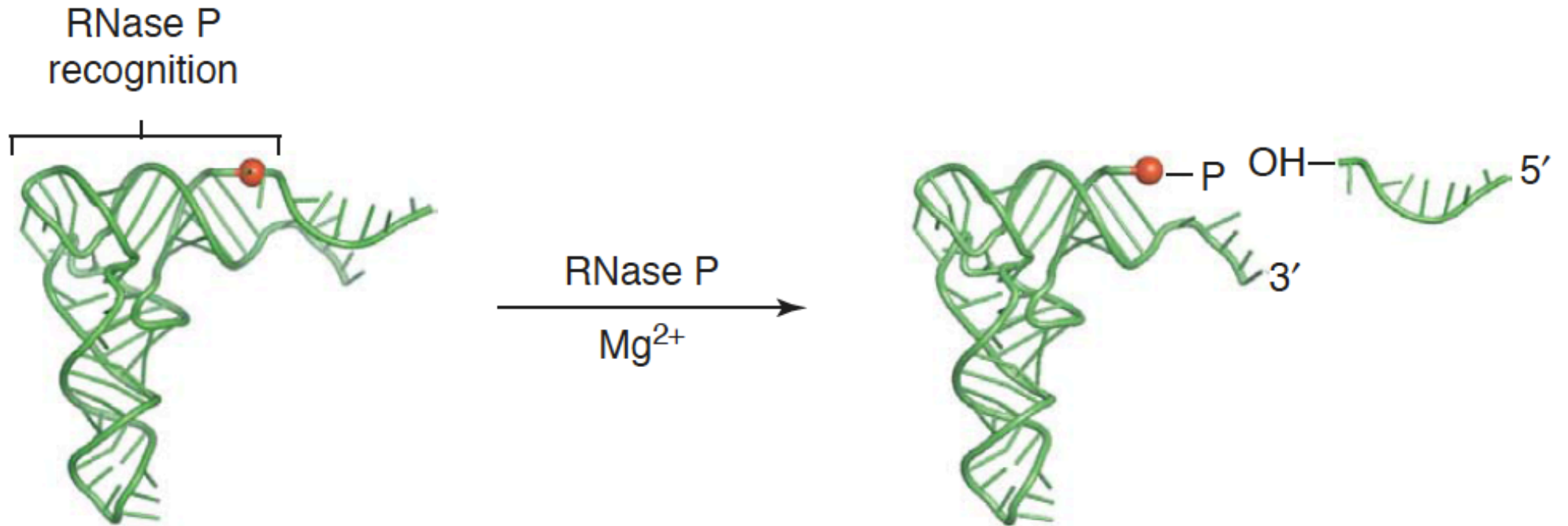


P, προαγωγέας
T, τερματική αλληλουχία

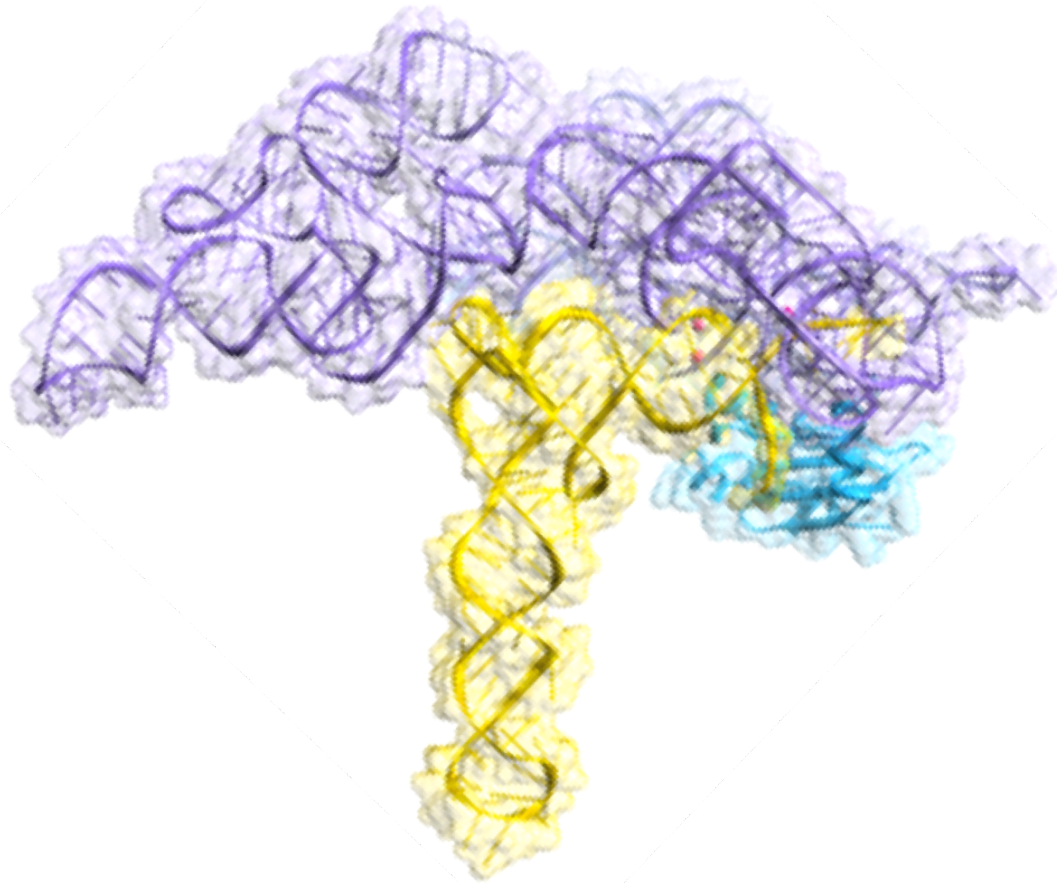


<http://cbm.msoc.edu/modGallery/ribosome/riboviewer.swf>

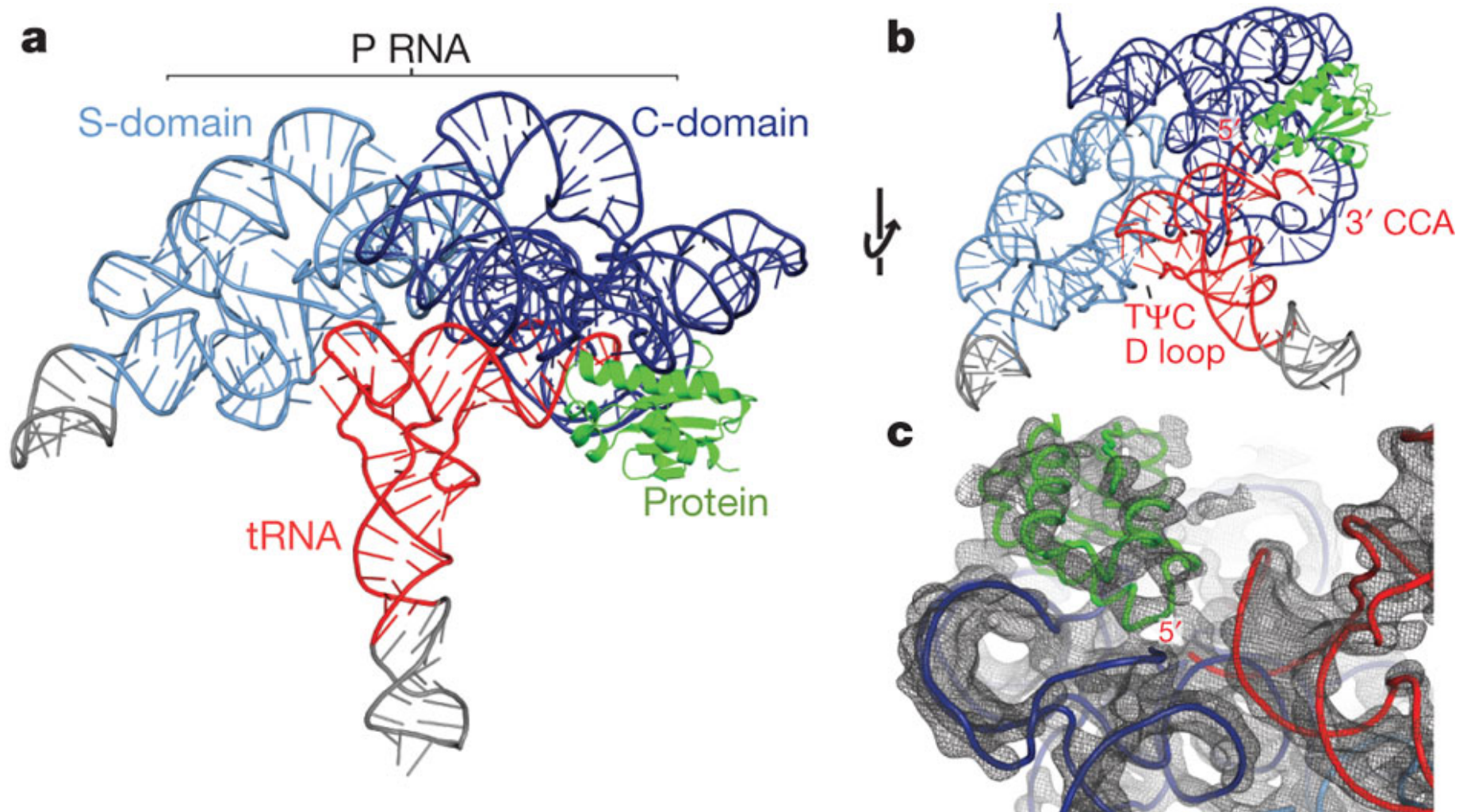
RNase P – pre-tRNA



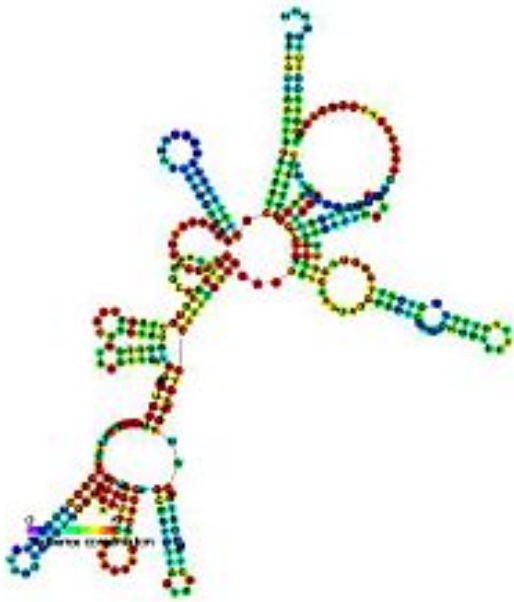
RNase P – pre-tRNA



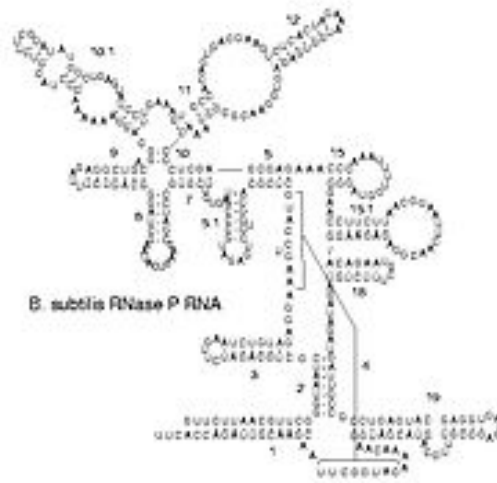
Crystal structure of the *T. maritima*
RNase P holoenzyme in complex with tRNA.



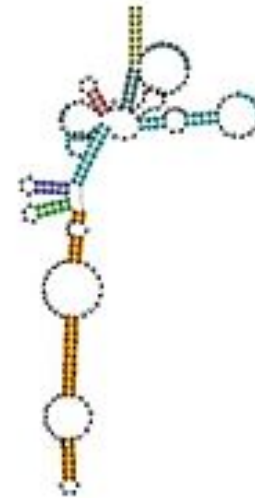
RNase P



Κατηγορία Α
βακτηριακή

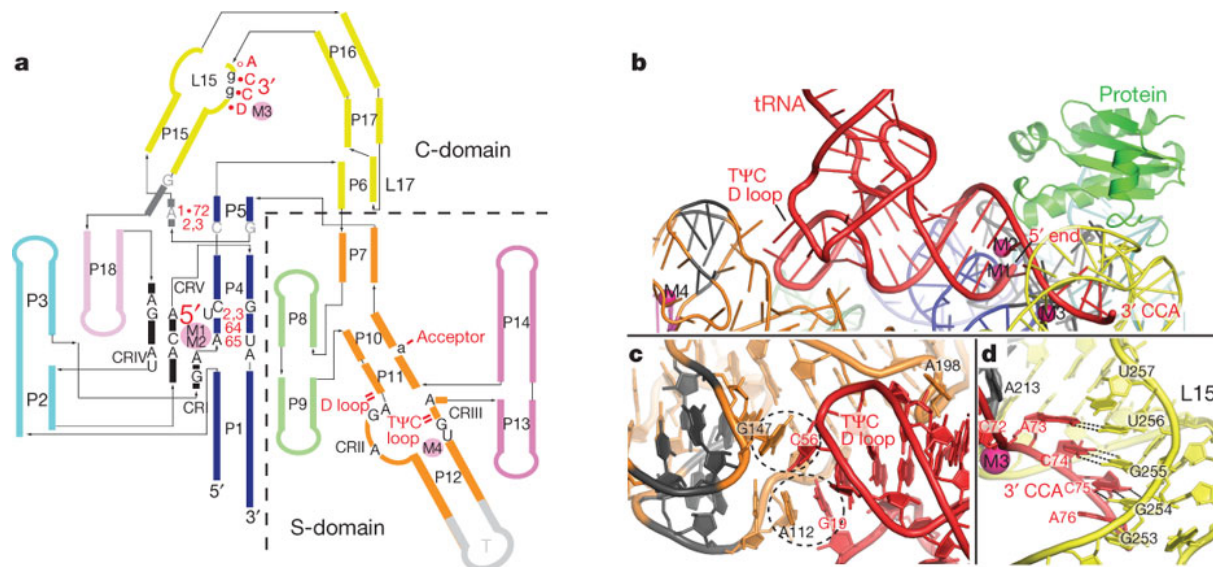


Κατηγορία Β
βακτηριακή



Αρχαία

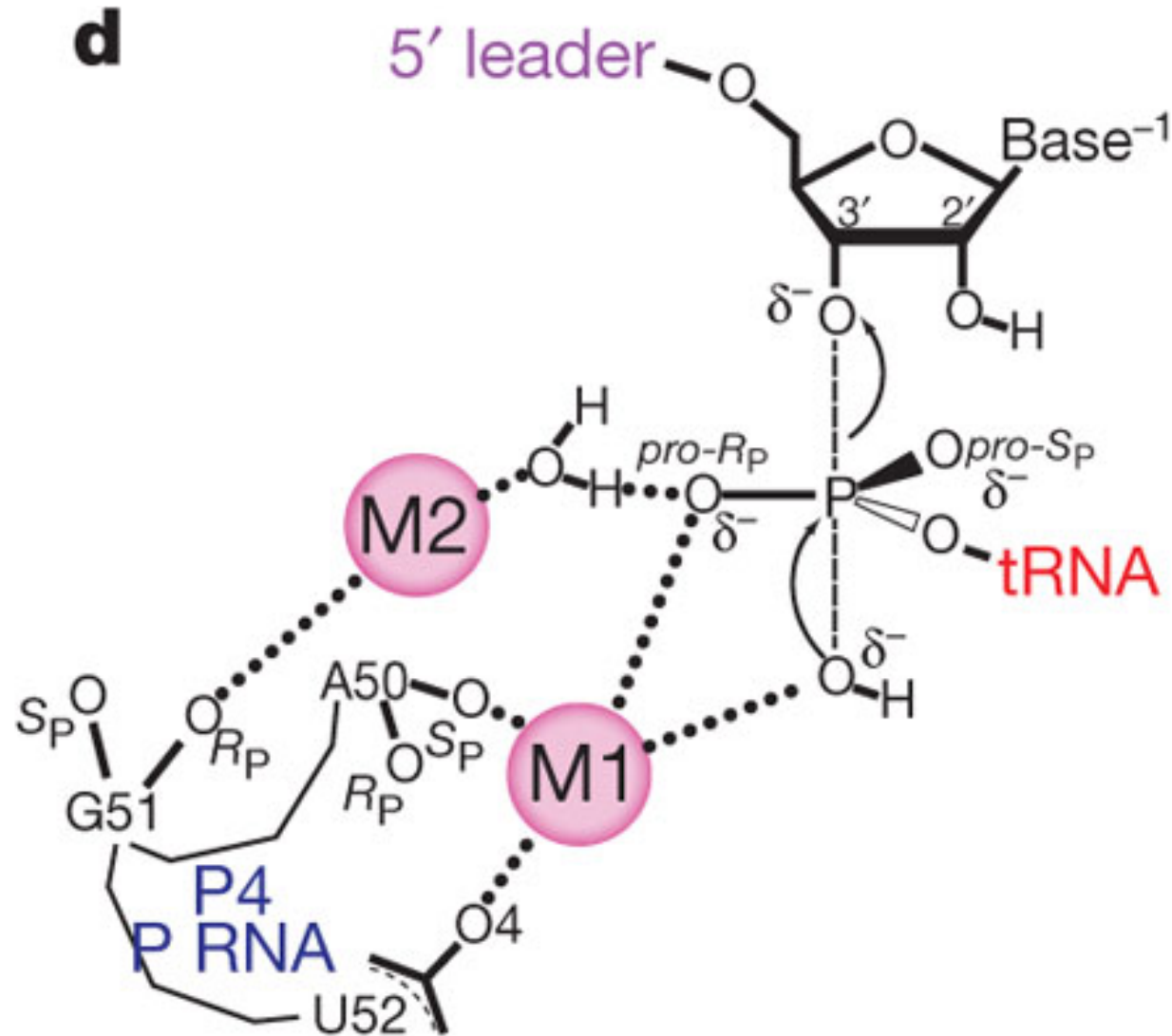
Η αναγνώριση του tRNA από την RNase P γίνεται μέσω αλληλεπιδράσεων RNA–RNA.



NJ Reiter *et al. Nature* **000**, 1-6 (2010) doi:10.1038/nature09516

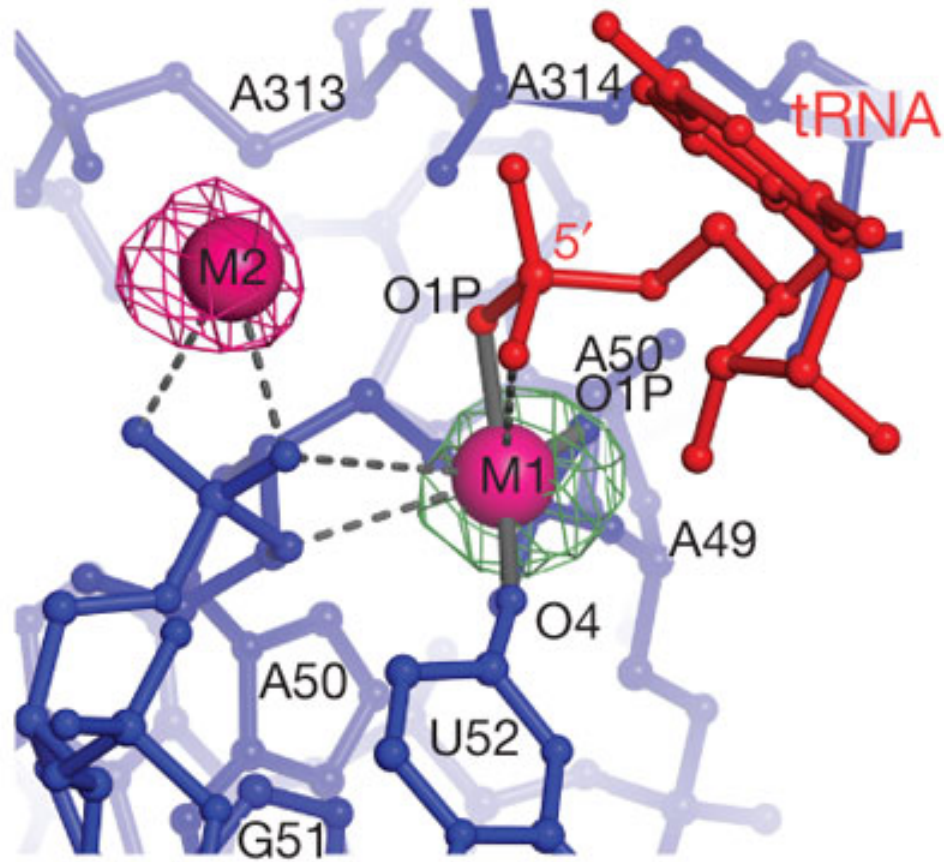
nature

RNase P, προτεινόμενος μηχανισμός δράσης

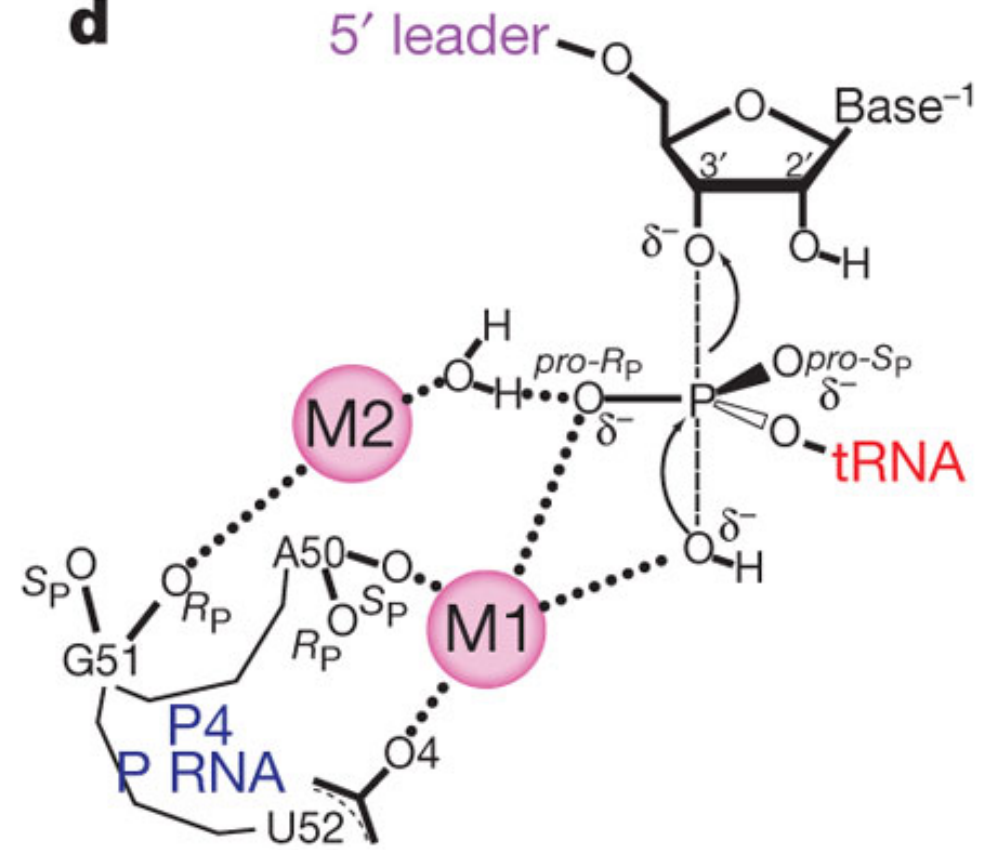


RNase P, προτεινόμενος μηχανισμός δράσης

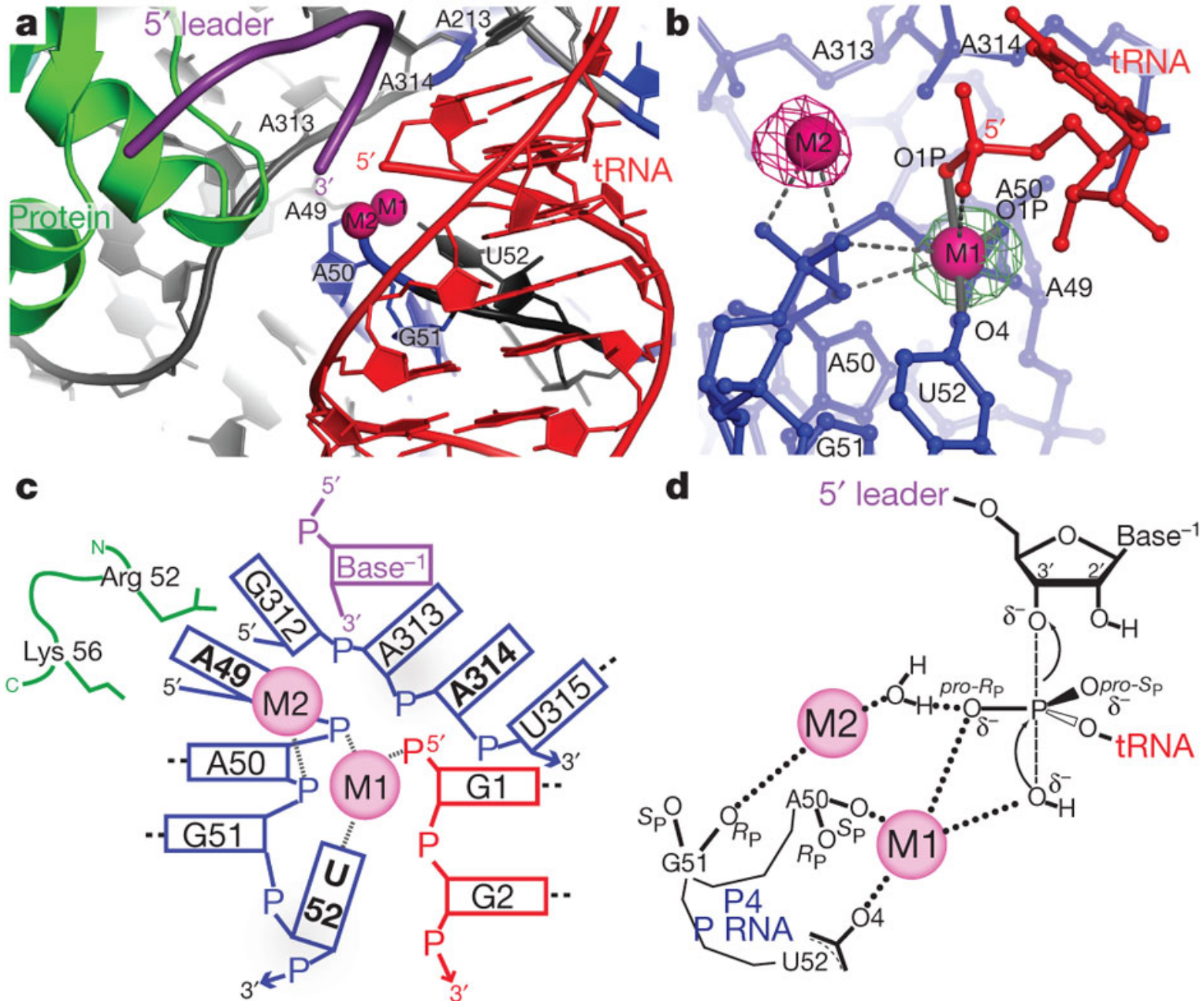
b



d



Structure of the RNase P active site environment.



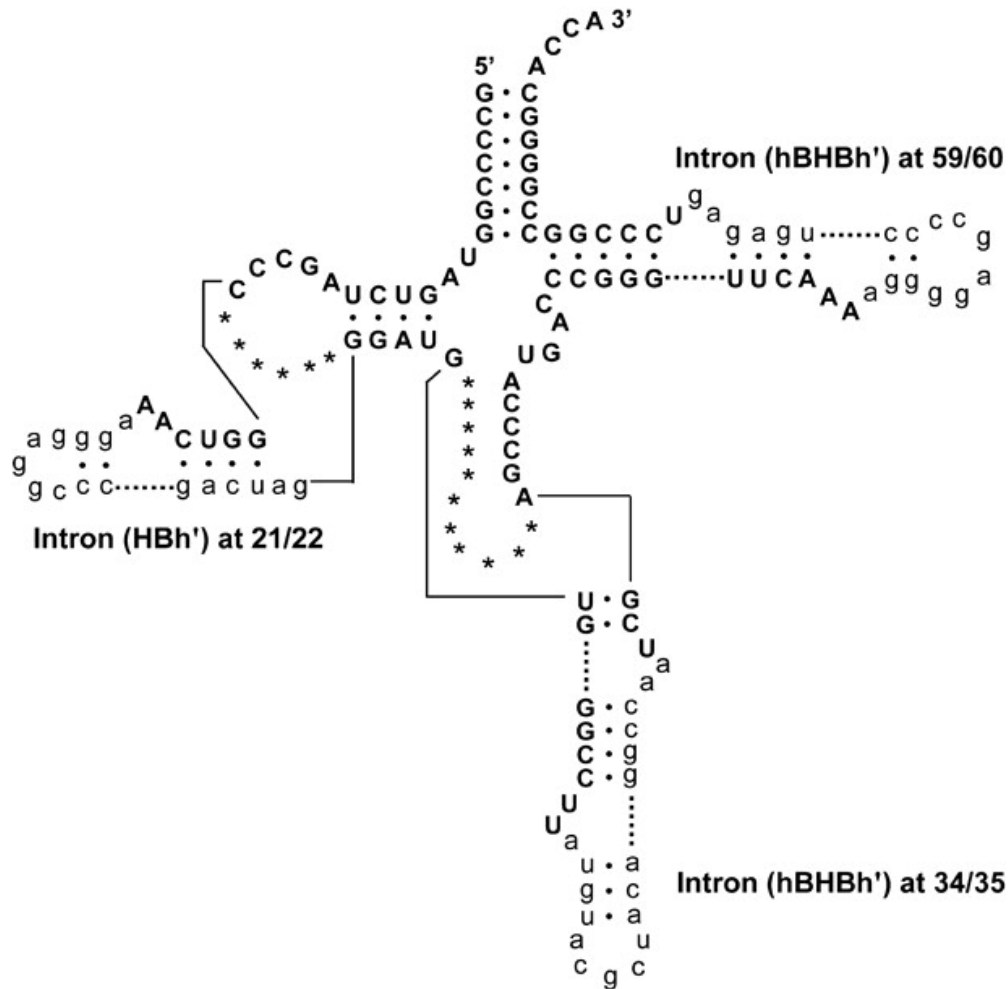
HSPC117 Is the Essential Subunit of a Human tRNA Splicing Ligase Complex

Johannes Popow,^{1*} Markus Englert,^{2*} Stefan Weitzer,¹ Alexander Schleiffer,³ Beata Mierzwa,¹ Karl Mechtler,⁴ Simon Trowitzsch,^{5†} Cindy L. Will,⁵ Reinhard Lührmann,⁵ Dieter Söll,^{2,6‡} Javier Martinez^{1‡}

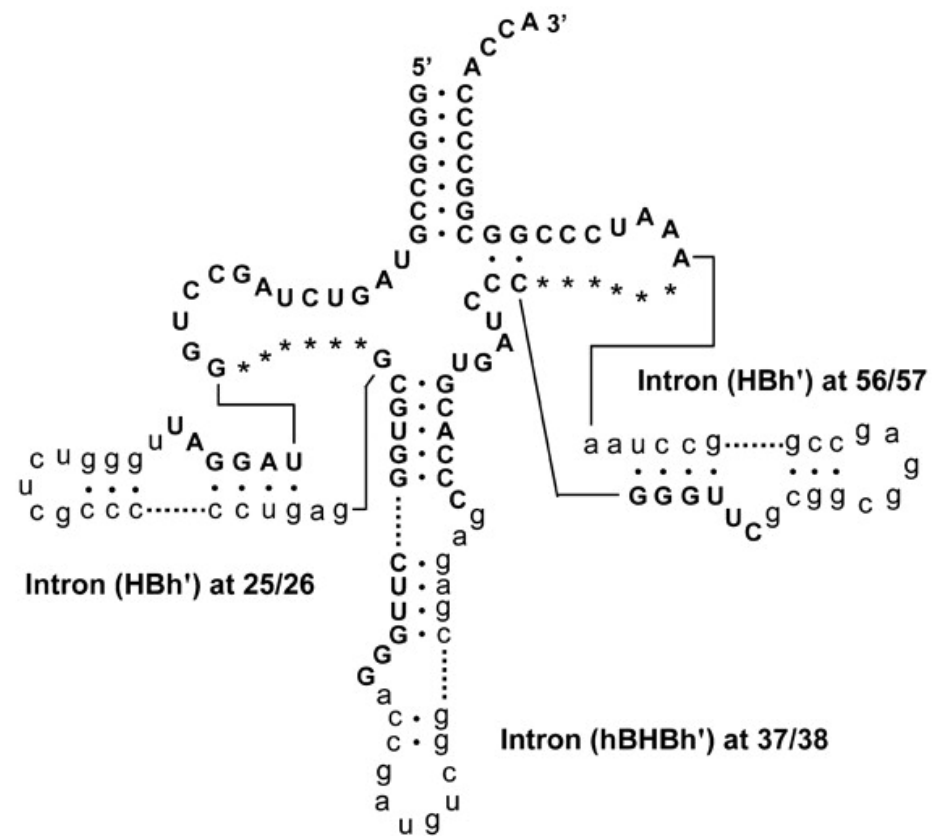
¹Institute of Molecular Biotechnology of the Austrian Academy of Sciences (IMBA), A-1030 Vienna, Austria. ²Department of Molecular Biophysics and Biochemistry, Yale University, New Haven, CT 06520, USA. ³Bioinformatics Department, Research Institute of Molecular Pathology (IMP)–IMBA, A-1030 Vienna, Austria. ⁴Protein Chemistry Department, Research Institute of Molecular Pathology (IMP)–IMBA, A-1030 Vienna, Austria. ⁵Department of Cellular Biochemistry, Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, 37077 Göttingen, Germany. ⁶Department of Chemistry, Yale University, New Haven, CT 06520, USA.

Γονίδια tRNA αρχαίων και ιντρόνια

a *Pyrobaculum calidifontis*
pre-tRNA^{Glu} (UUC)



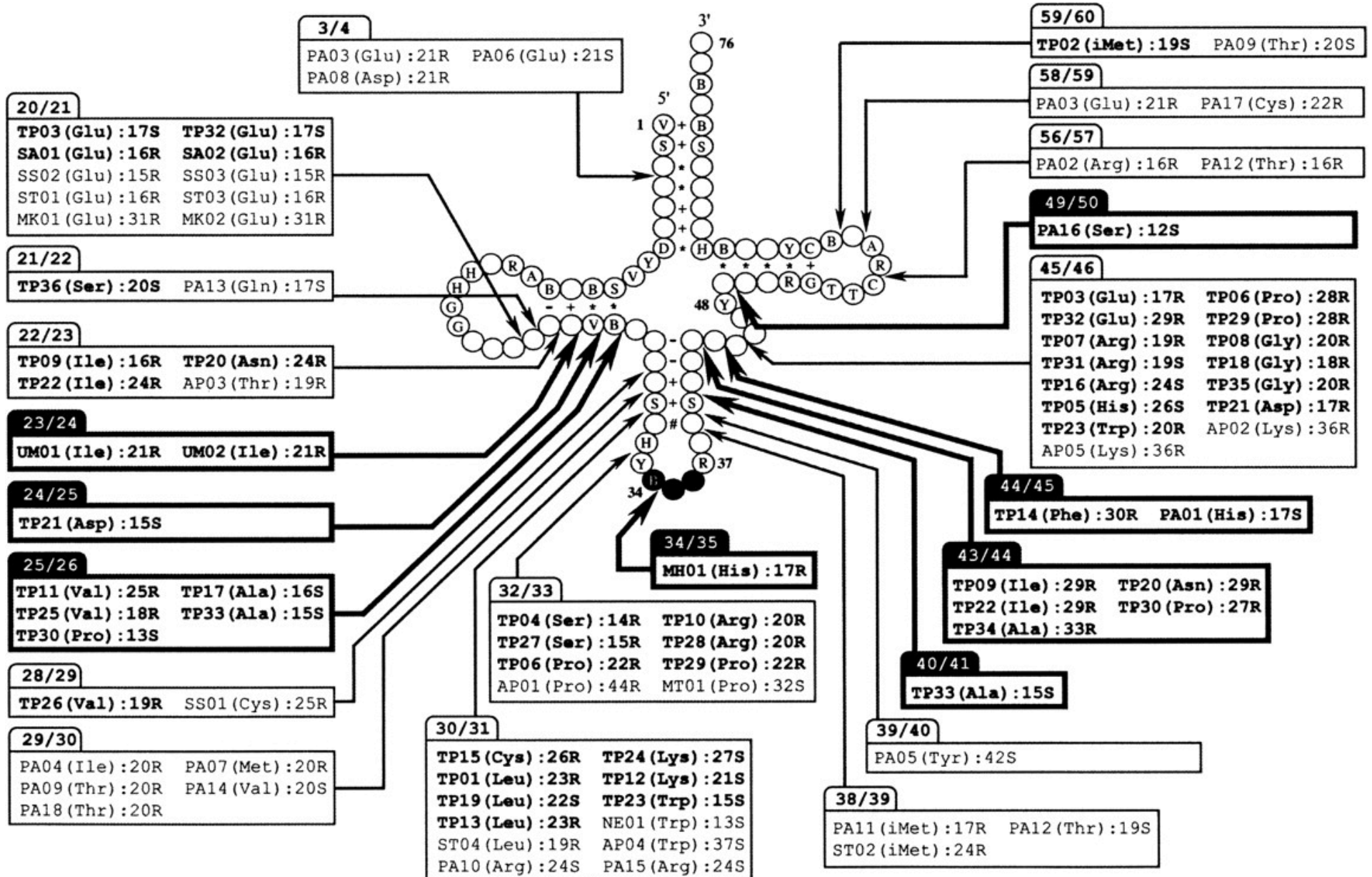
b *Pyrobaculum islandicum*
pre-tRNA^{Pro} (UGG)



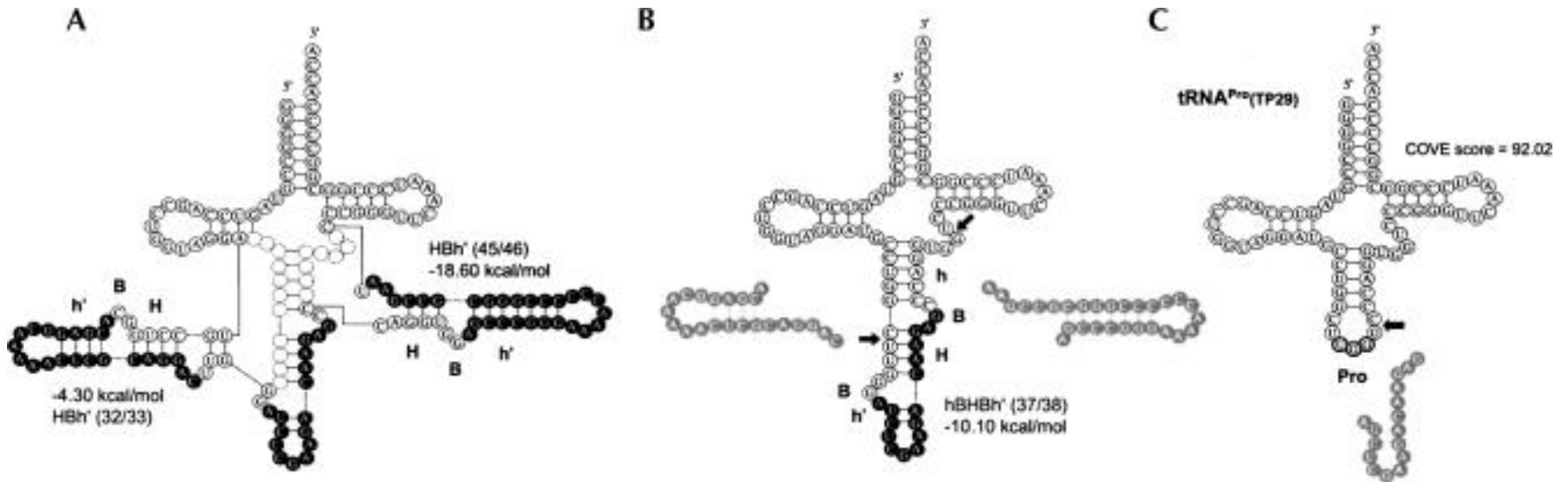
Junichi Sugahara et al. Mol Biol Evol 2008;25:2709-2716

© The Author 2008. Published by Oxford University Press on behalf of the Society for Molecular Biology and Evolution. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oxfordjournals.org

Γονίδια tRNA αρχαίων και ιντρόνια

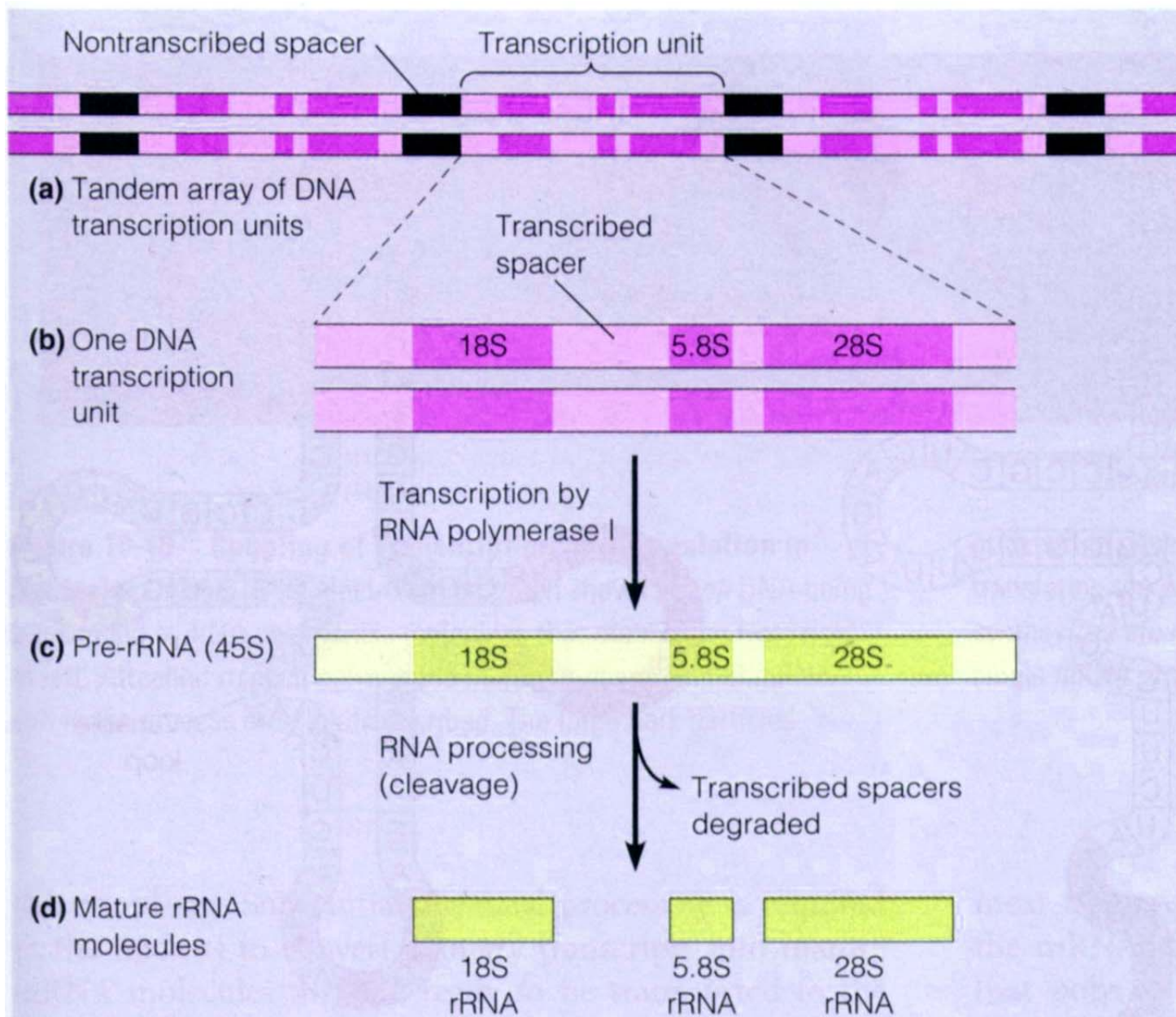


Γονίδια tRNA αρχαίων και ιντρόνια

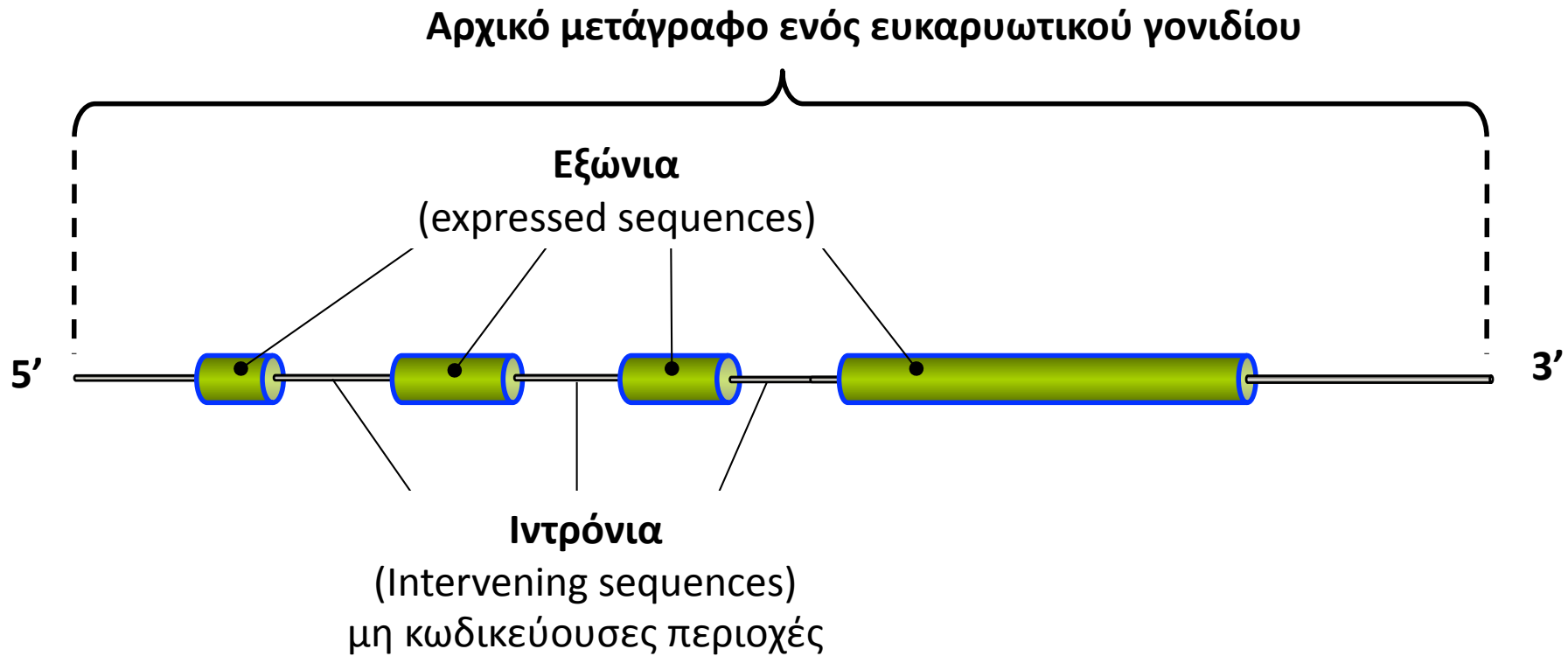


Sugahara et al., RNA. 2007; 13: 671–681.

Ωρίμανση rRNAs (RNA πολυμεράση I)



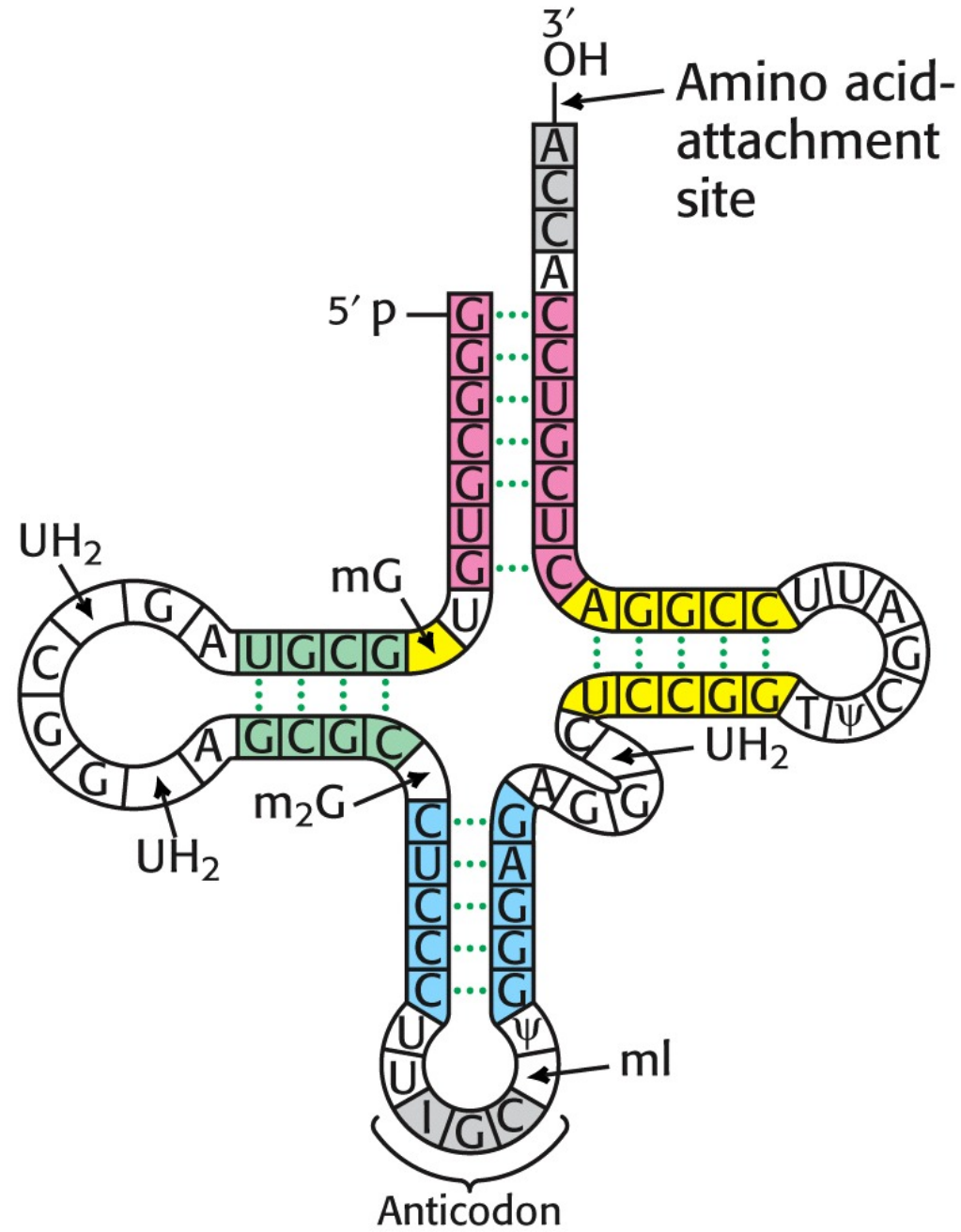
Μονάδα μεταγραφής ευκαρυωτικών γονιδίων



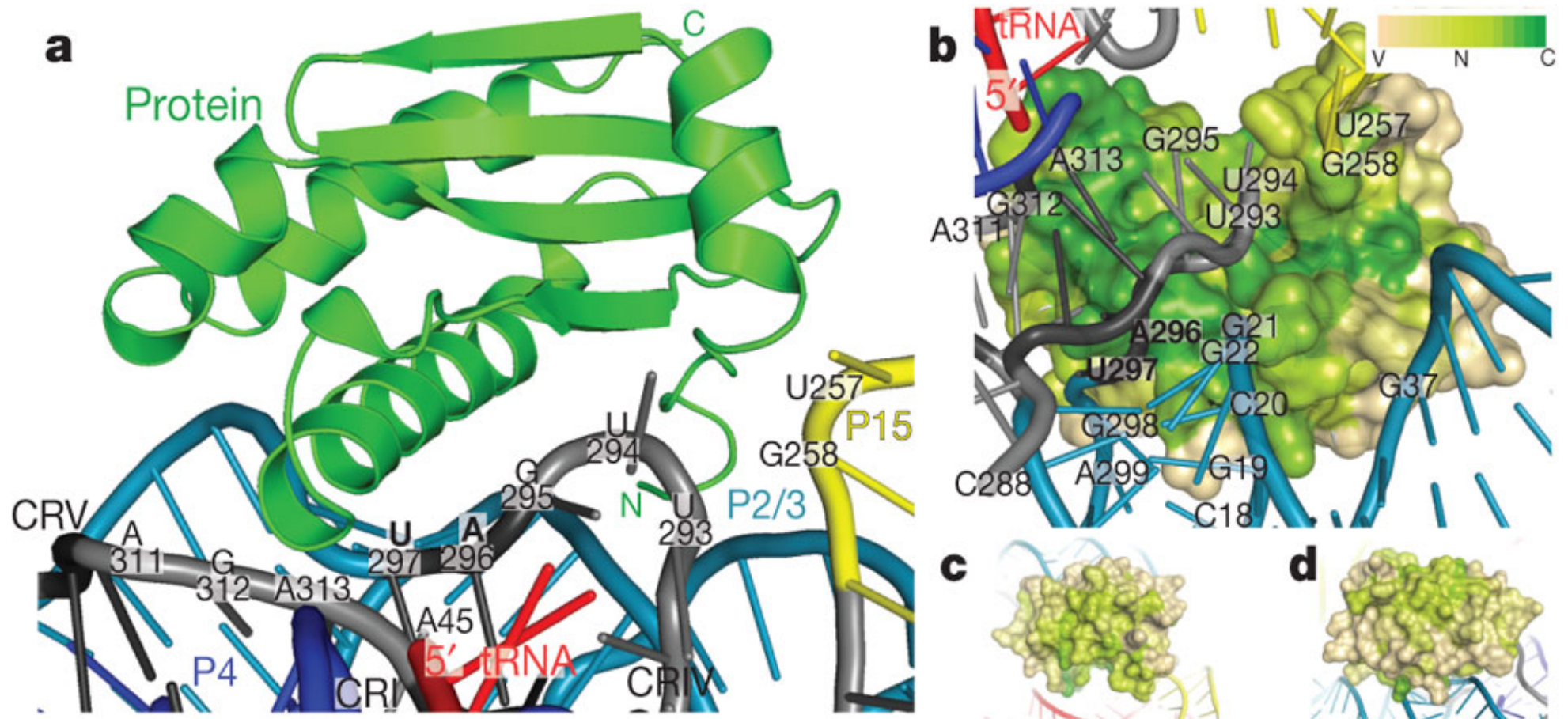
Σε γονίδια ανθρώπου:

2-50 ιντρόνια/γονίδιο, μήκους 50-20000 βάσεων

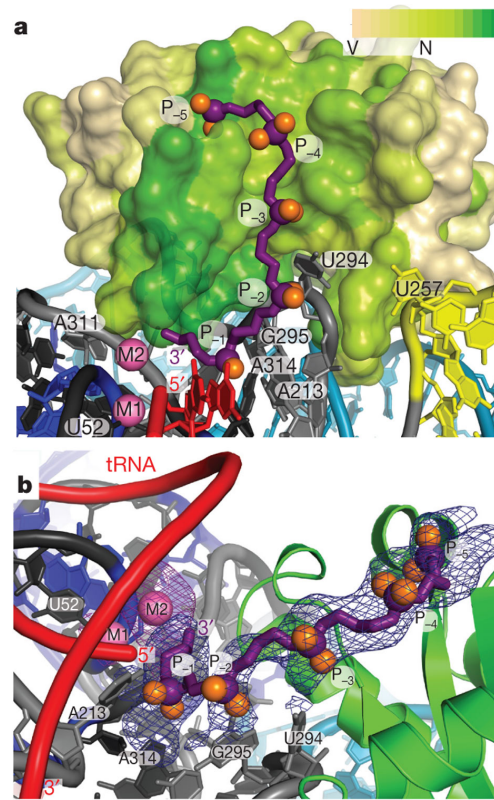
Εξώνια μήκους ~1500 βάσεων



Protein–RNA contacts within the RNase P holoenzyme.



Pre-tRNA leader–protein interactions in the RNase P holoenzyme.



NJ Reiter *et al. Nature* **000**, 1-6 (2010) doi:10.1038/nature09516

nature

Structure of the RNase P active site environment.

