



ΠΜΣ: ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ - ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

1. Η αντιγραφή του DNA
2. Η σύνθεση των RNAs
3. Η ωρίμανση των RNAs
4. Η βιοσύνθεση των πρωτεϊνών
5. Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης – παραμβολή RNA

Νικόλαος Μπαλατσός
05/02/2015



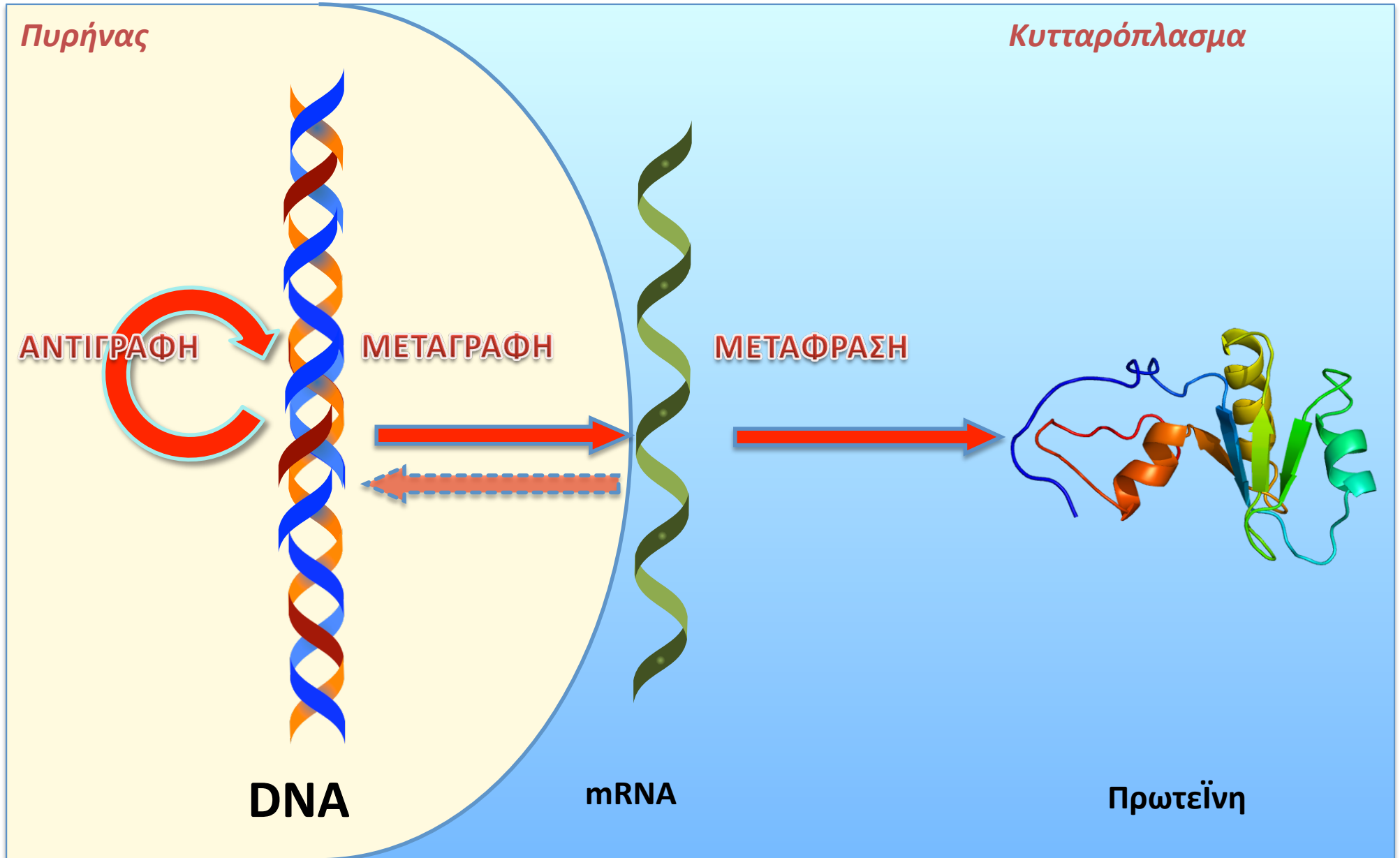
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



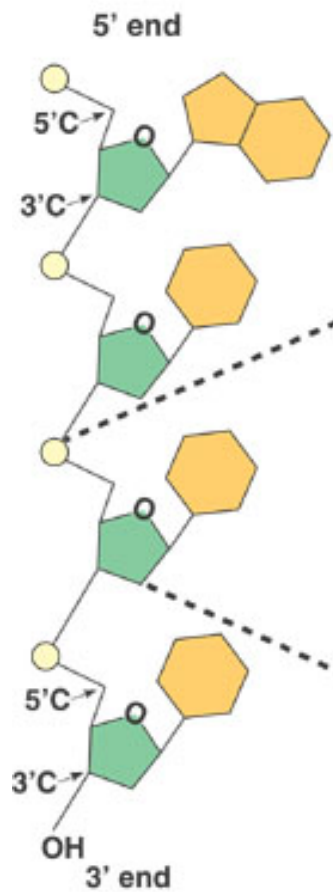
1. Η αντιγραφή του DNA

Νικόλαος Μπαλατσός

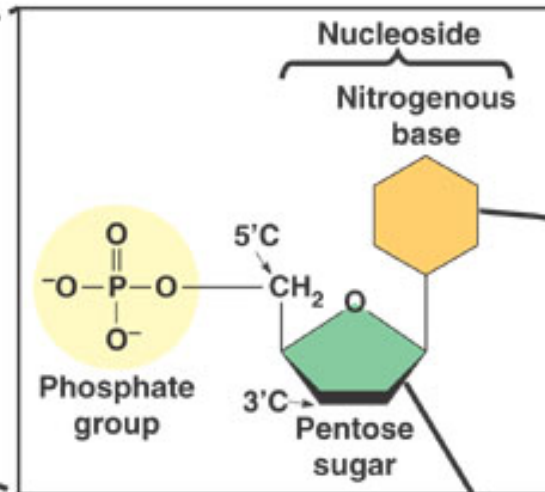
Το κεντρικό δόγμα



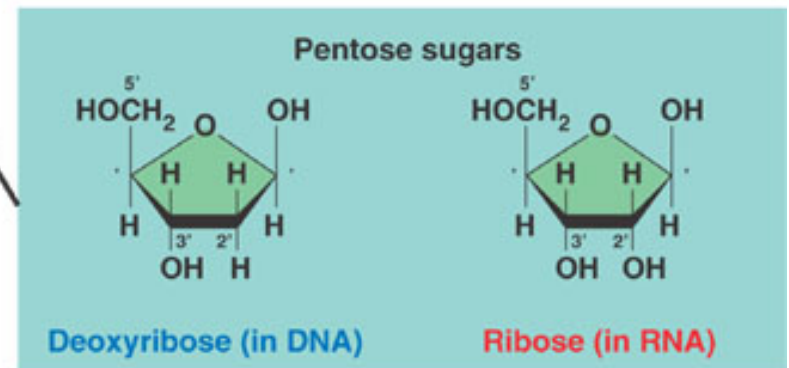
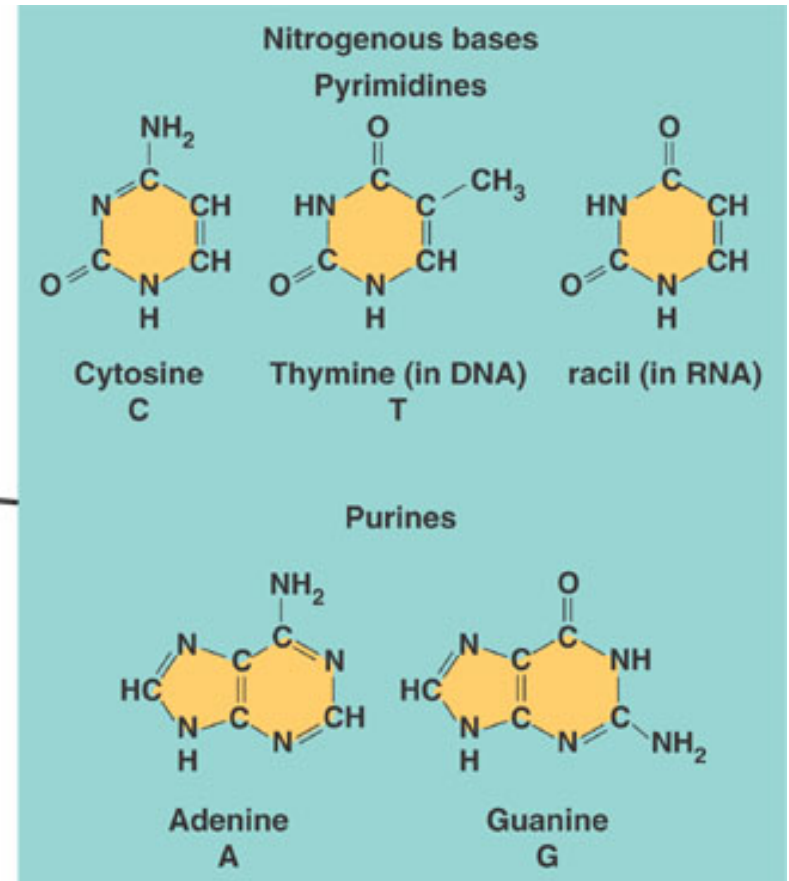
Τα συστατικά των νουκλεϊκών οξέων είναι ίδια σε όλους τους οργανισμούς



(a) Polynucleotide, or nucleic acid

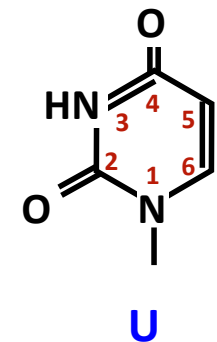
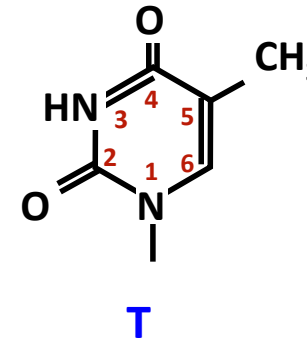
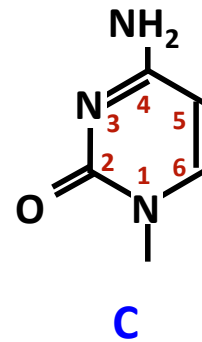
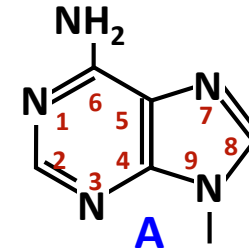
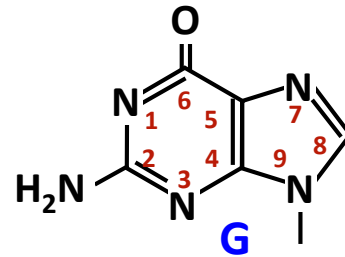
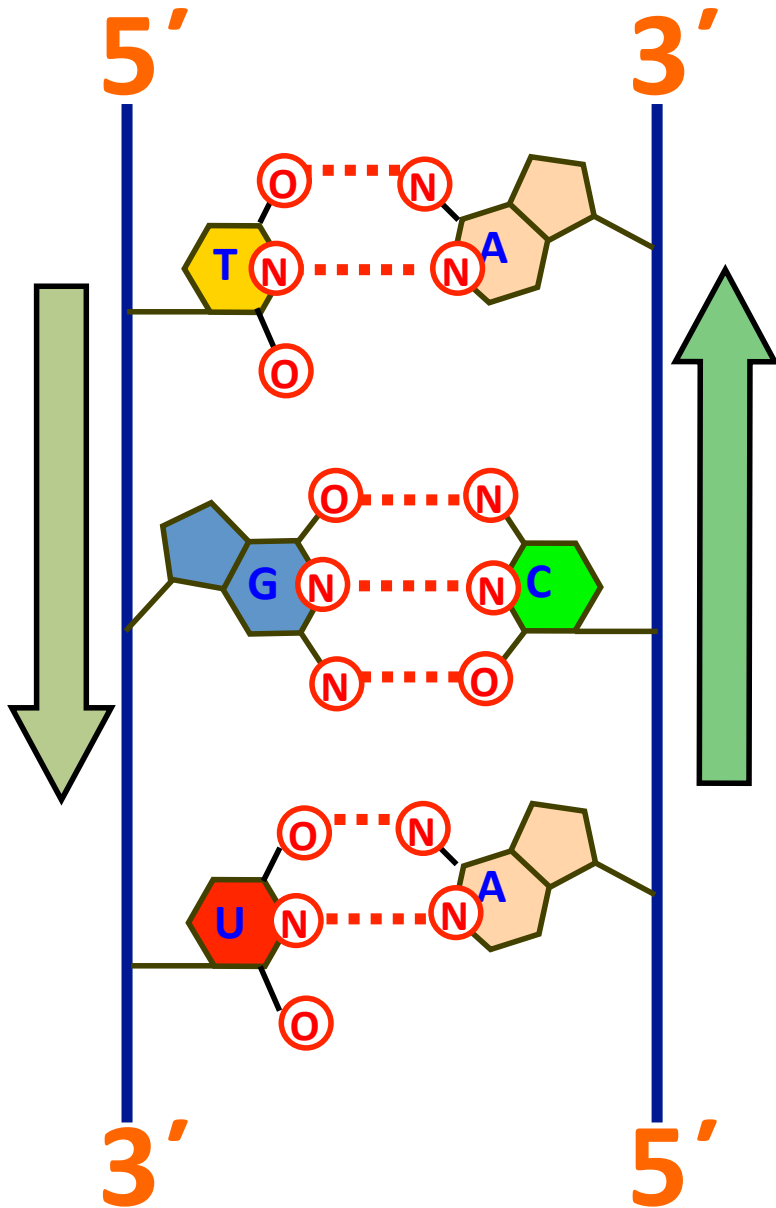


(b) Nucleotide

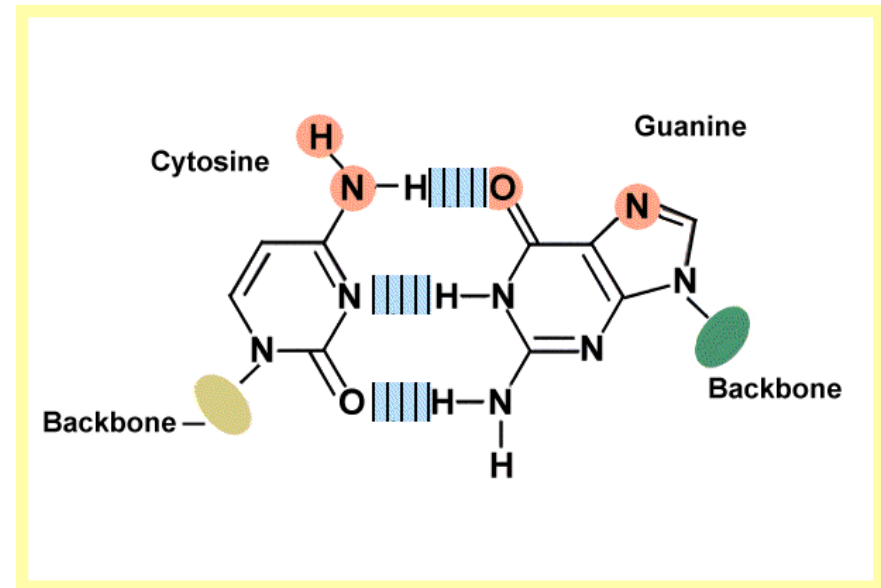
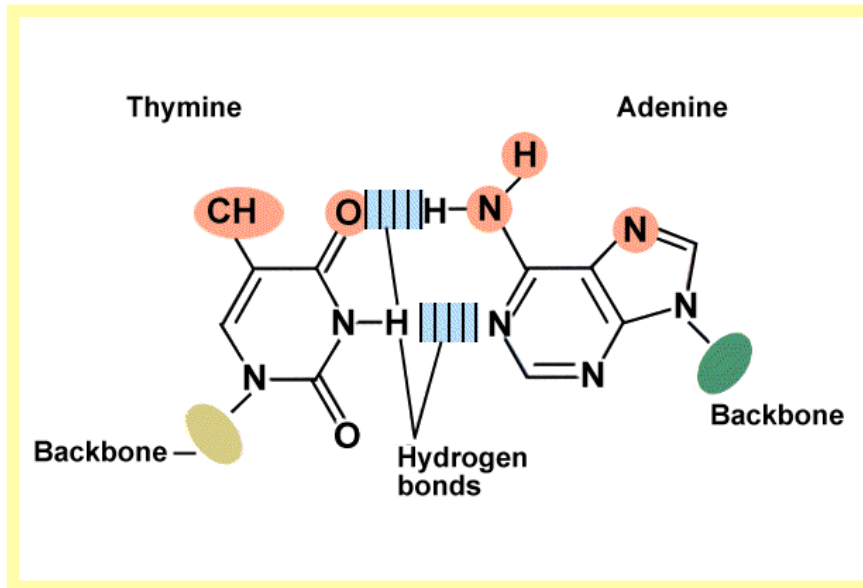


(c) Nucleoside components

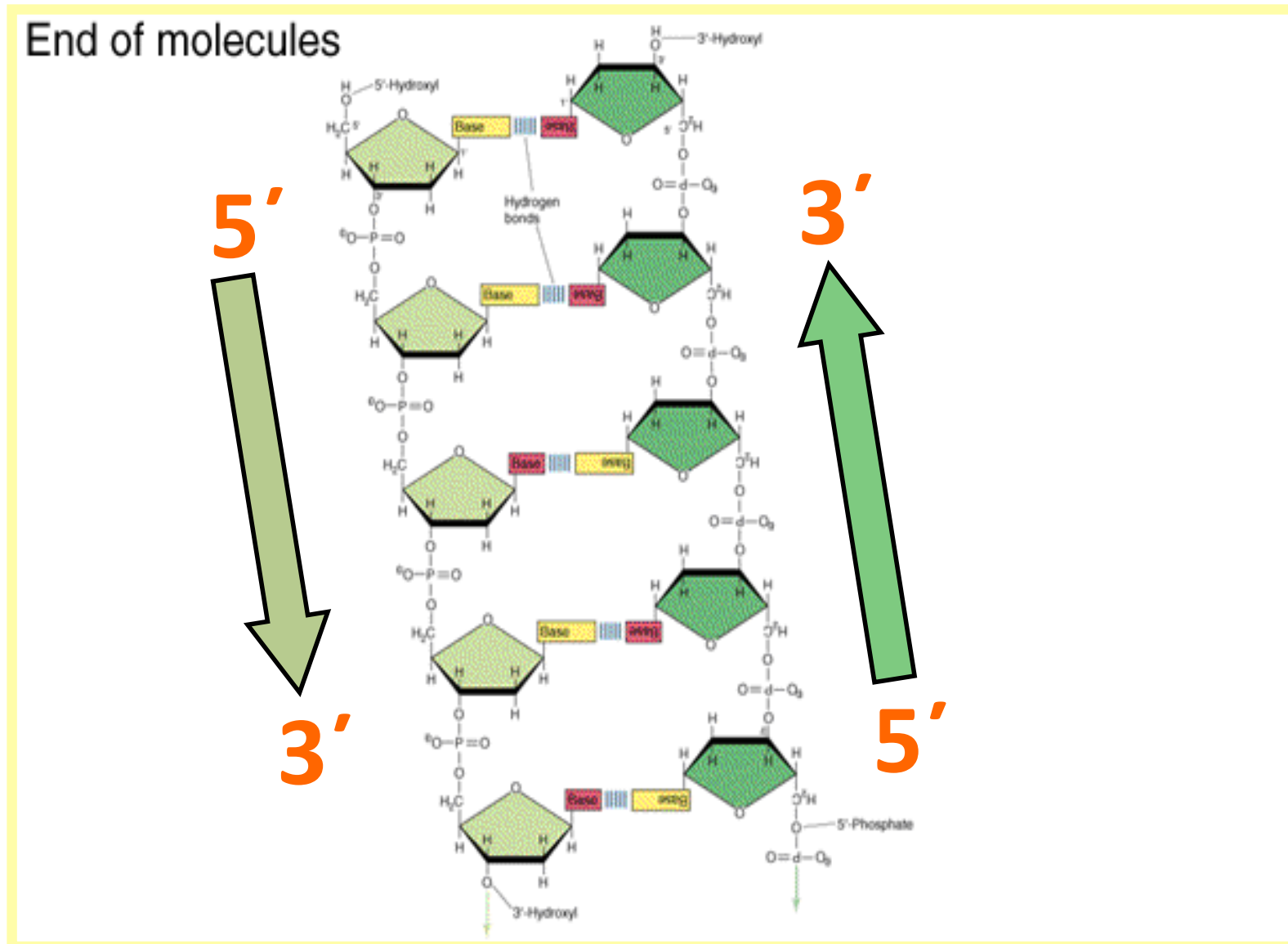
Οι δύο αλυσίδες του DNA είναι συμπληρωματικές και έχουν αντιπαράλληλη φορά



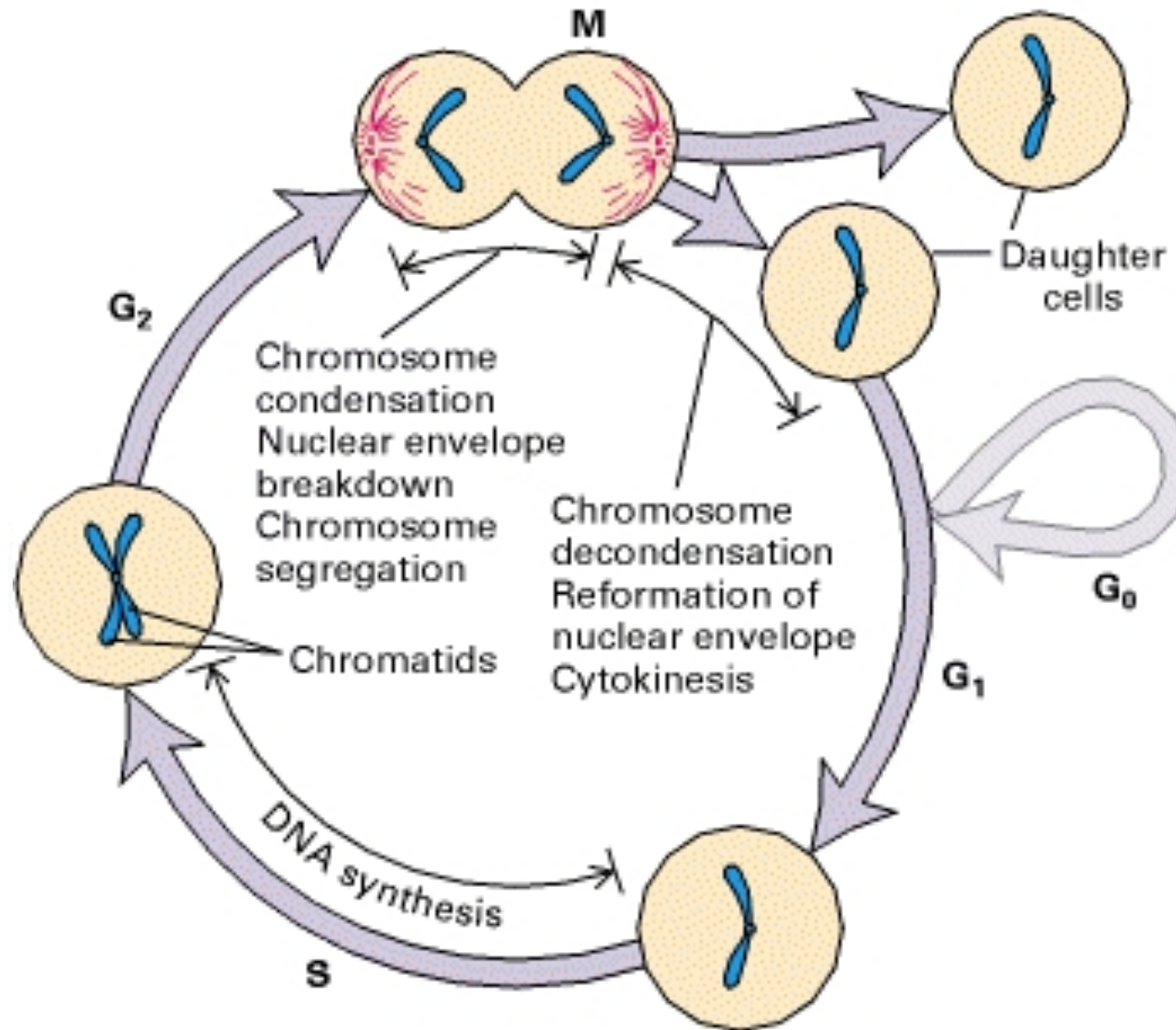
Οι βάσεις συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου (Ζεύγη βάσεων κατά Watson-Crick)



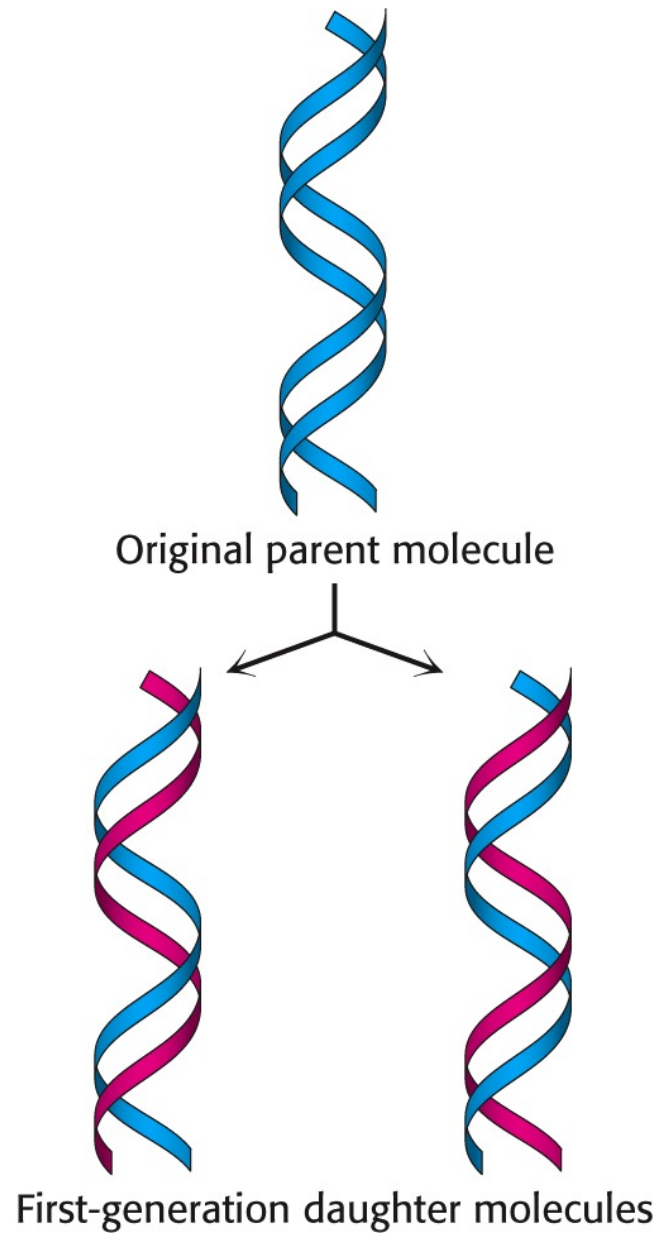
Οι δύο αλυσίδες του DNA είναι συμπληρωματικές
και έχουν αντιπαράλληλη φορά



Γιατί αντιγράφεται το DNA



Η αντιγραφή του DNA



Η έναρξη της αντιγραφής

Τα τρία στάδια της έναρξης της αντιγραφής του DNA

- Αναγνώριση περιοχής DNA έναρξης
- «λιώσιμο» διπλής έλικας (σπάσιμο δεσμών H)
- Δέσμευση ελικάσης
(διάσπαση δεσμών H, απομάκρυνση κλώνων)

Η περιοχή έναρξης της αντιγραφής

- Εναρξη από συγκεκριμένες -μη τυχαίες- περιοχές του χρωμοσώματος
- Προκαρυωτικά χρωμοσώματα (κυκλικά): περιοχή έναρξης αντιγραφής
- Ευκαρυωτικά χρωμοσώματα: πολλαπλές περιοχές
- Οι περιοχές αναγνωρίζονται από ειδικές πρωτεΐνες (**εναρκτήριες**)
- **Ρεπλικόνιο**: Κάθε μονάδα αντιγραφής (το σύνολο της περιοχής DNA που αντιγράφεται υπό τον έλεγχο μιας και μόνης περιοχής έναρξης)

Εναρξη της αντιγραφής

🌈 Εναρκτήριες πρωτεΐνες:

- αναγνωρίζουν εναρκτήριες περιοχές,
- εξουδετερώνουν δεσμούς υδρογόνου (δ -H) στην περιοχή του DNA όπου δεσμεύονται
- τοπικό «λιώσιμο» δομής DNA

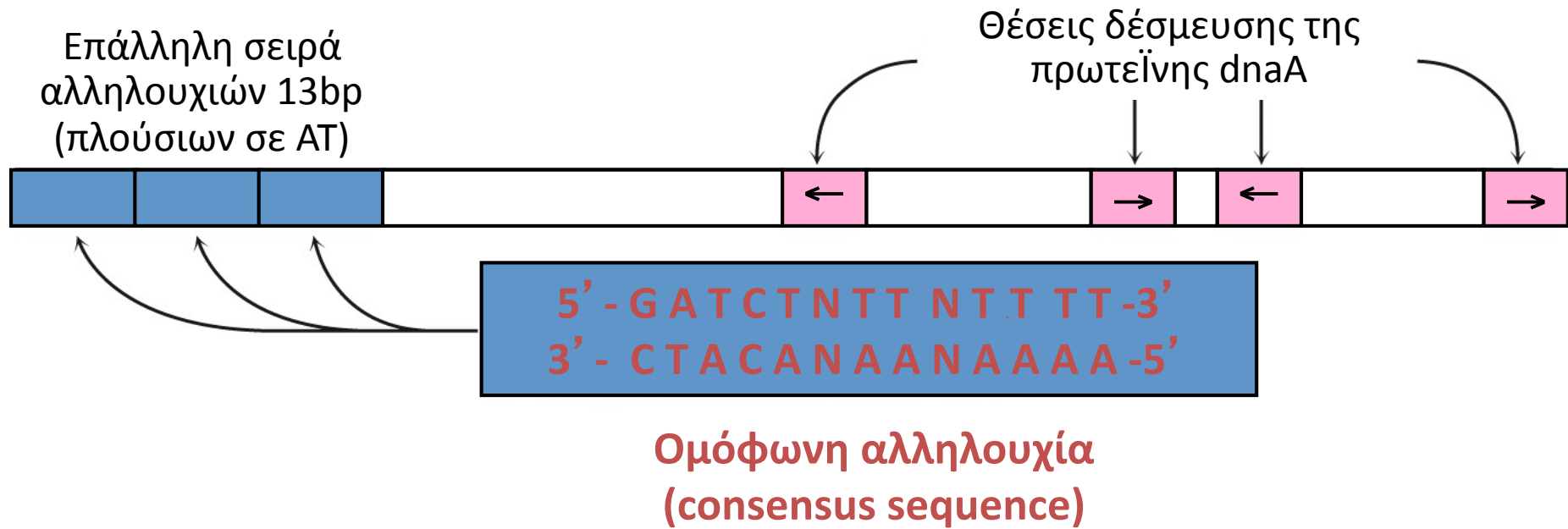
🌈 Ελικάση: Κινείται στη δίκλωνη περιοχή διασπώντας δ -H

- εξειδίκευση ως προς τη φορά των κλώνων
(διαφορετικές ελικάσες δεσμεύονται στον $5' \rightarrow 3'$ και $3' \rightarrow 5'$ κλώνο)

🌈 Ενέργεια από υδρόλυση ATP

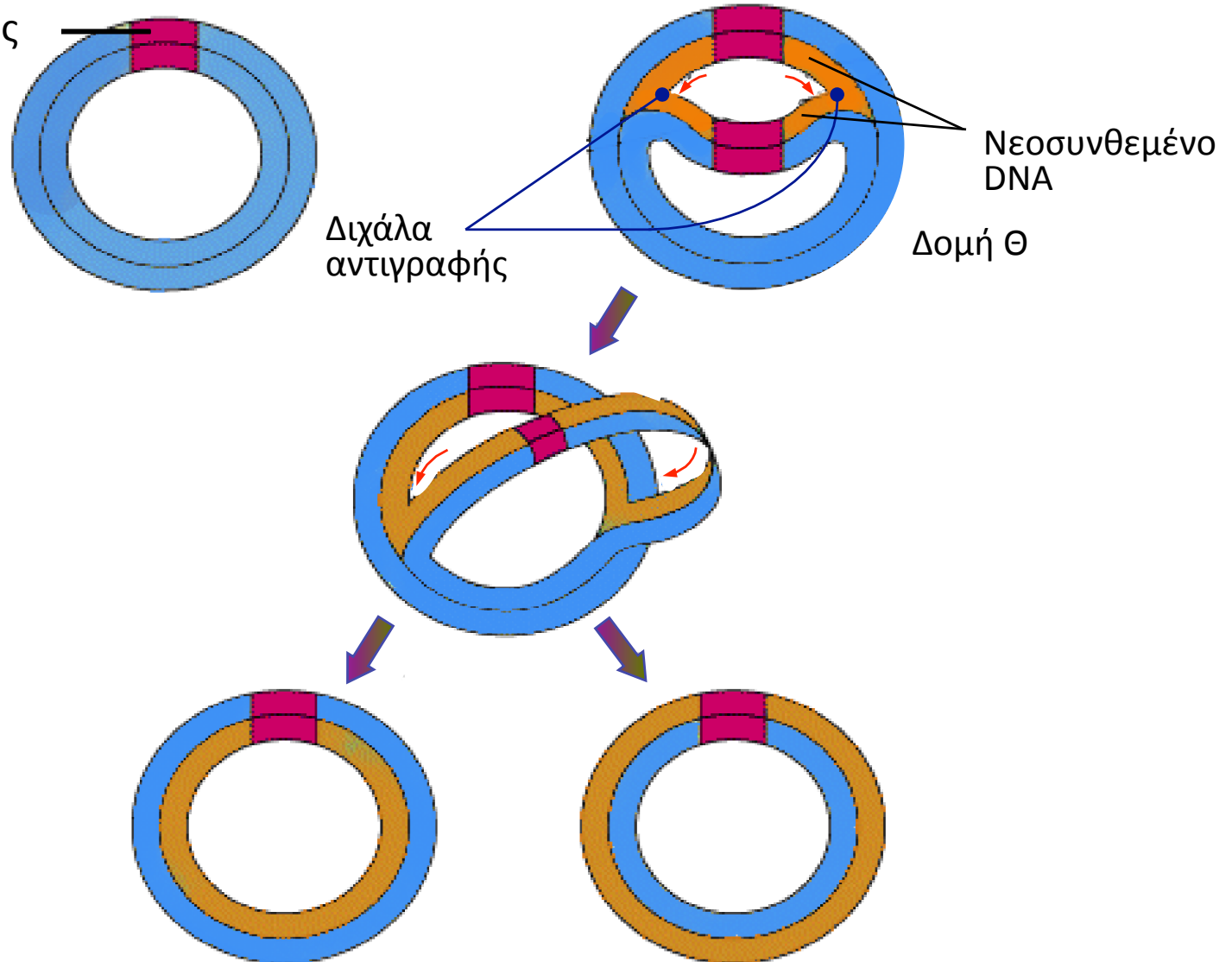
Περιοχή έναρξης της αντιγραφής

Escherichia coli

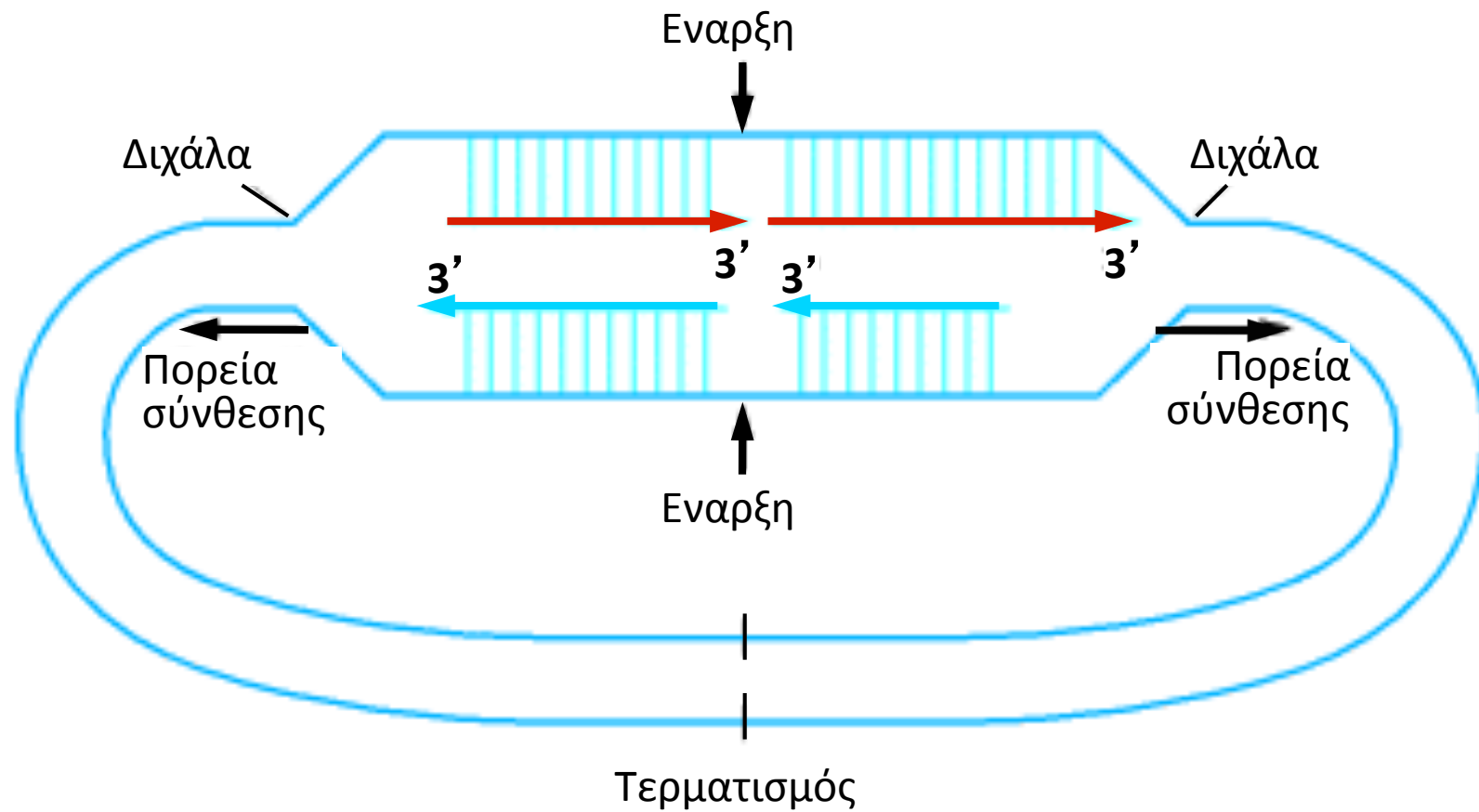


Η αντιγραφή αρχίζει σε ειδική θέση: έναρξη της αντιγραφής (origin of replication)

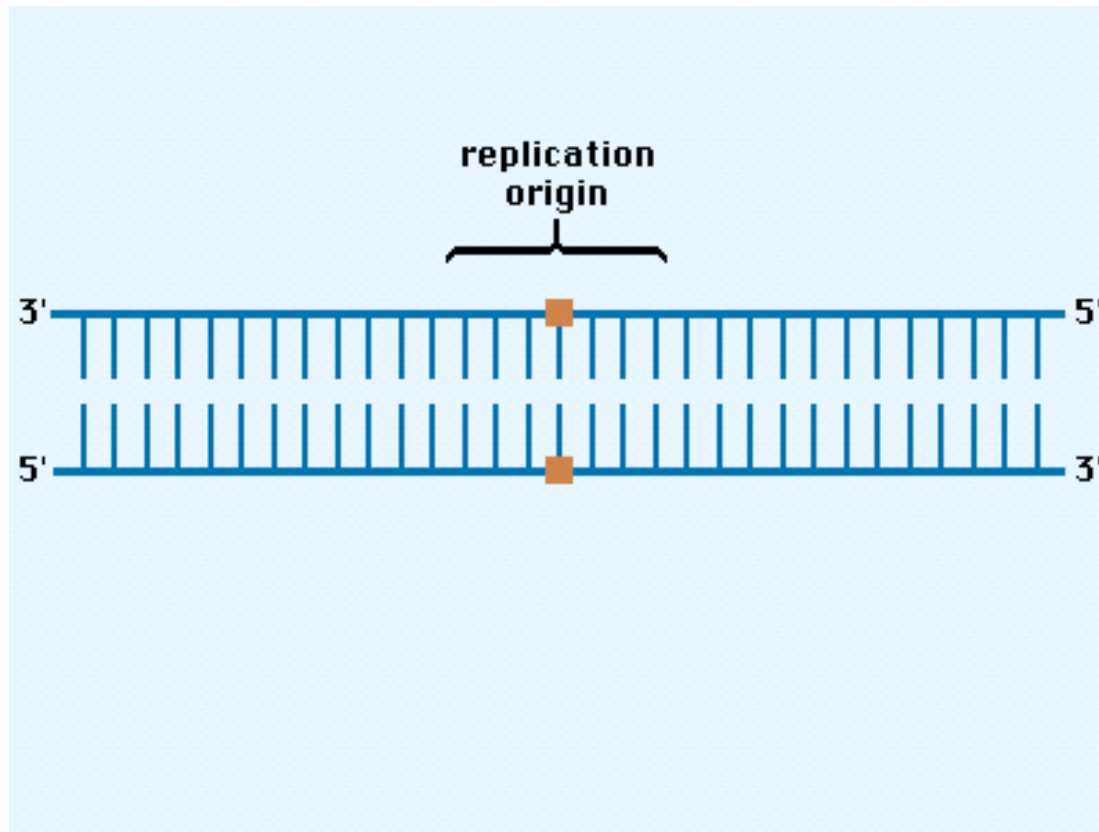
Εναρξη αντιγραφής



Η αντιγραφή προχωρά προς τις δύο κατευθύνσεις σχηματίζοντας τις δομές Θ

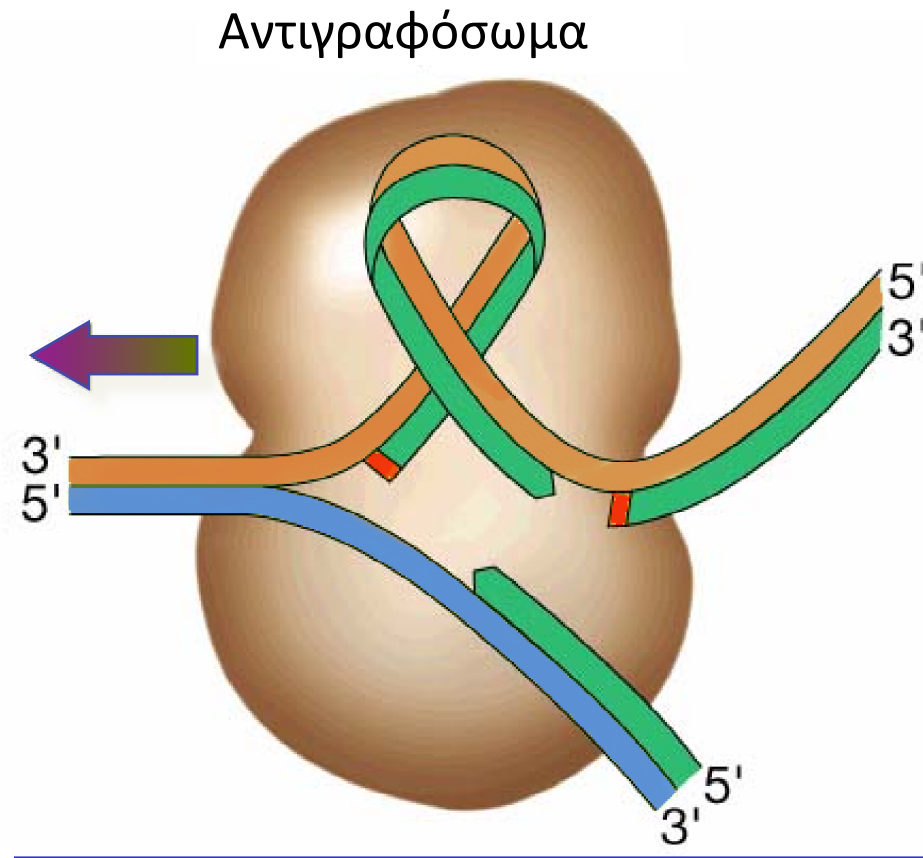


Η έναρξη της αντιγραφής

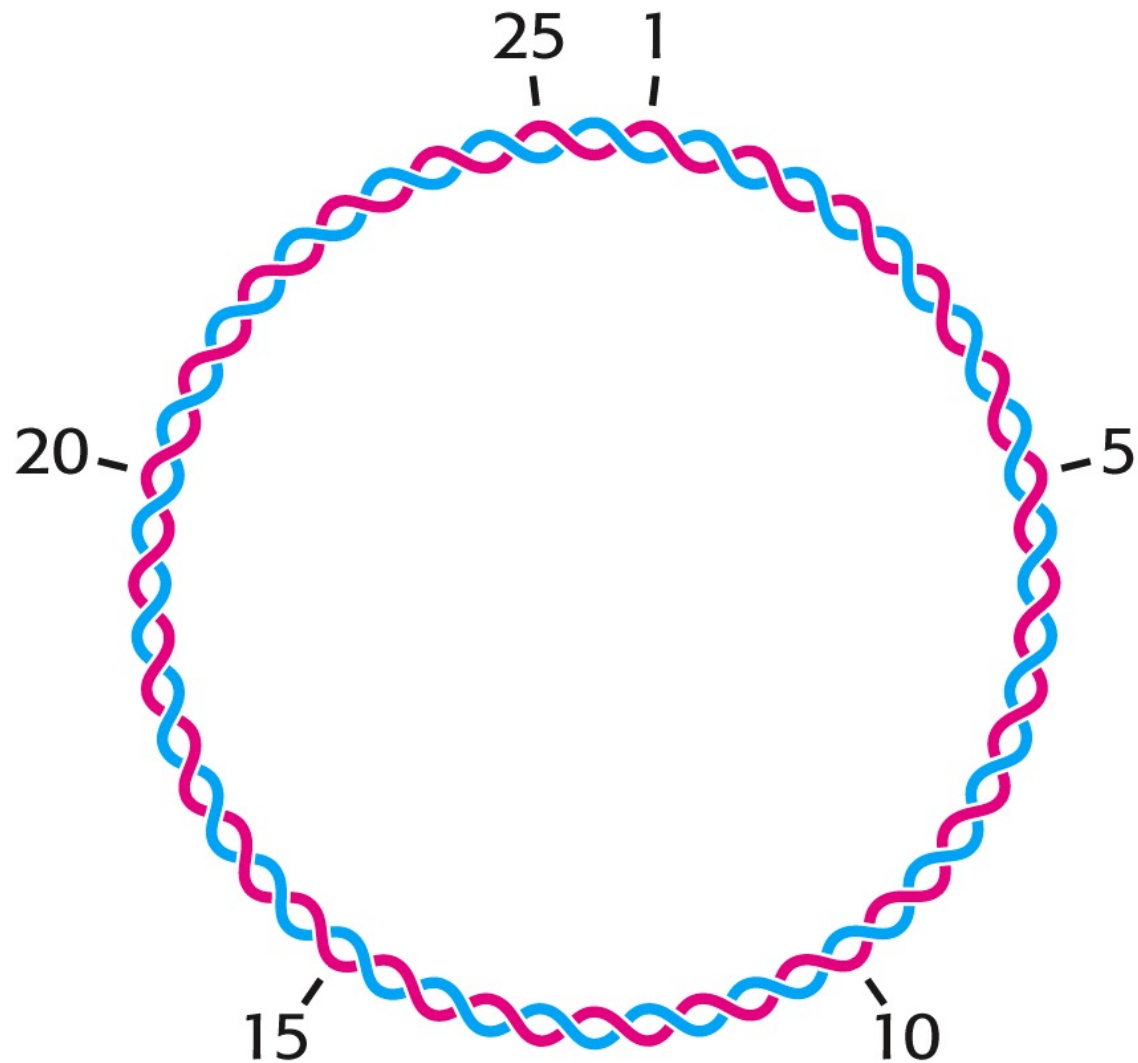


Molecular Cell Biology, 4th Edition

Αντιγραφώσωμα (Replisome ή replication factory)



Ο ρυθμός αντιγραφής στα βακτήρια είναι 750-1000 βάσεις / sec

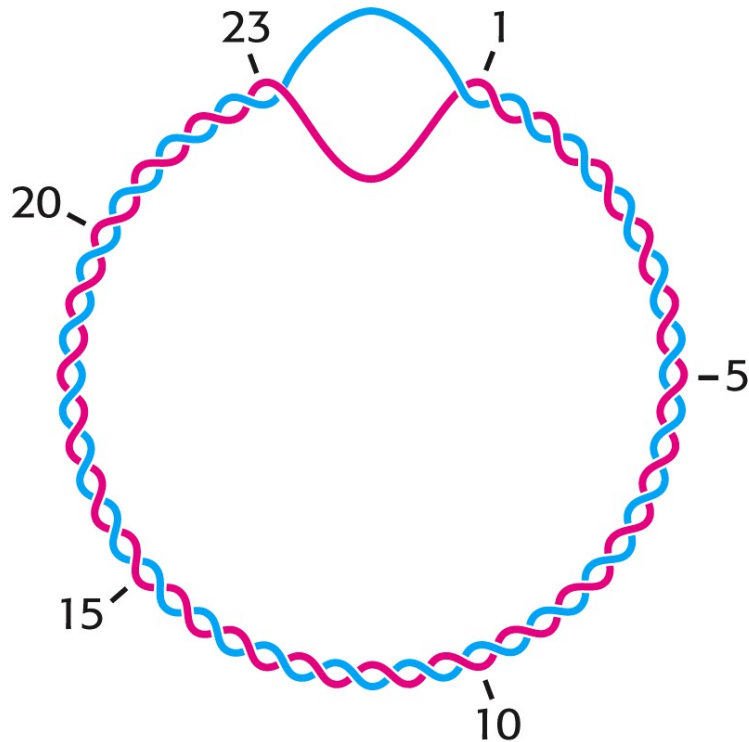


(B) $Lk = 25, Tw = 25, Wr = 0$
Relaxed Circle

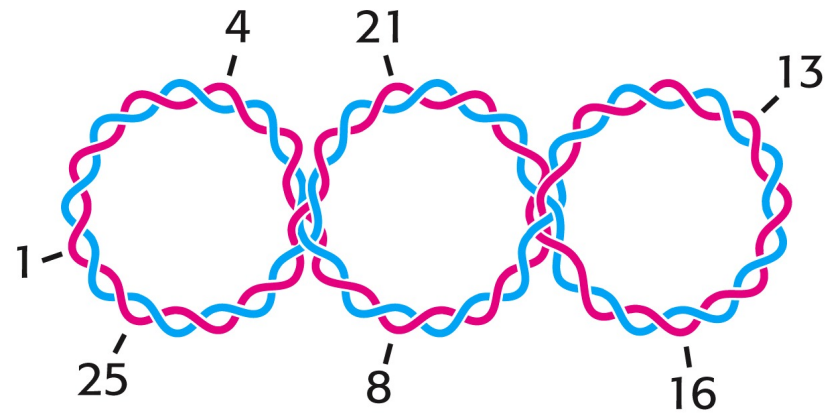
Στρέψη DNA



(C) Γραμμικό DNA εκτυλιγμένο κατά δύο πλήρεις δεξιές στροφές

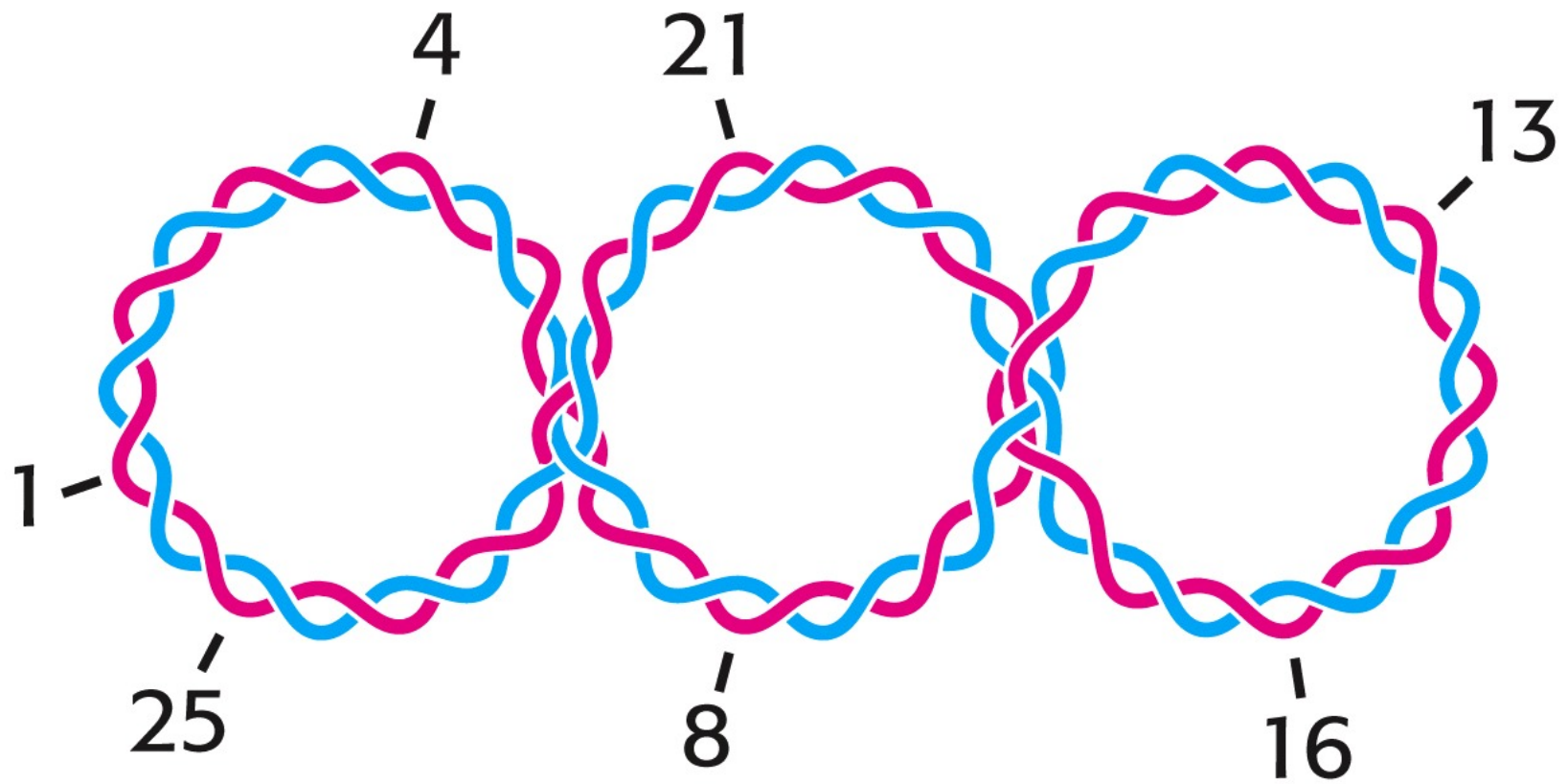


(D) $Lk = 23, Tw \sim 23, Wr \sim 0$
Εκτυλιγμένος κύκλος

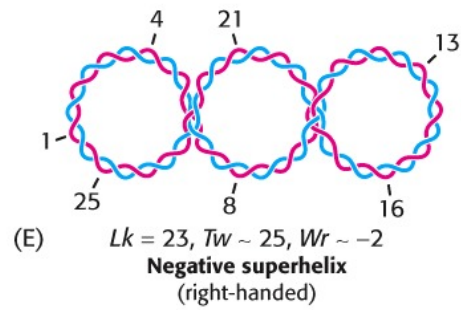
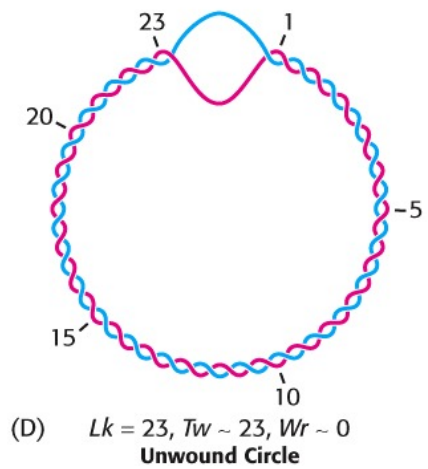
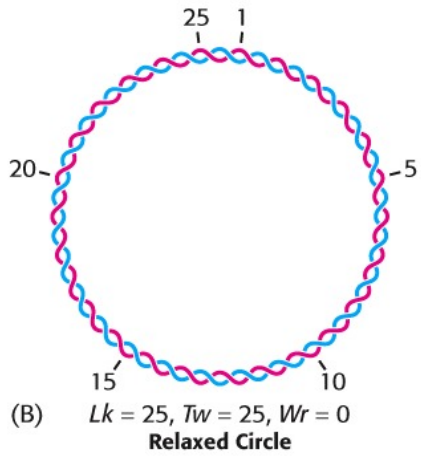


(E) $Lk = 23, Tw \sim 25, Wr \sim -2$

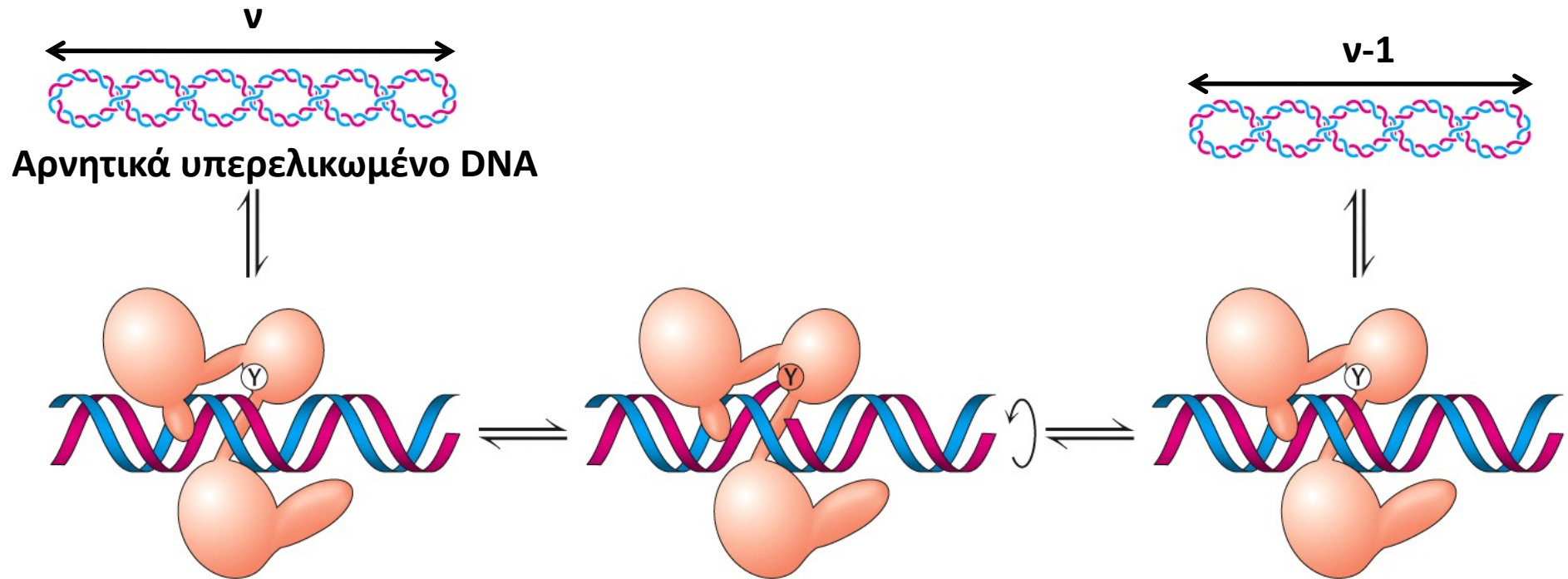
Αρνητική υπερέλικα
(δεξιόστροφη)



(E) $Lk = 23, Tw \sim 25, Wr \sim -2$
Negative superhelix
 (right-handed)

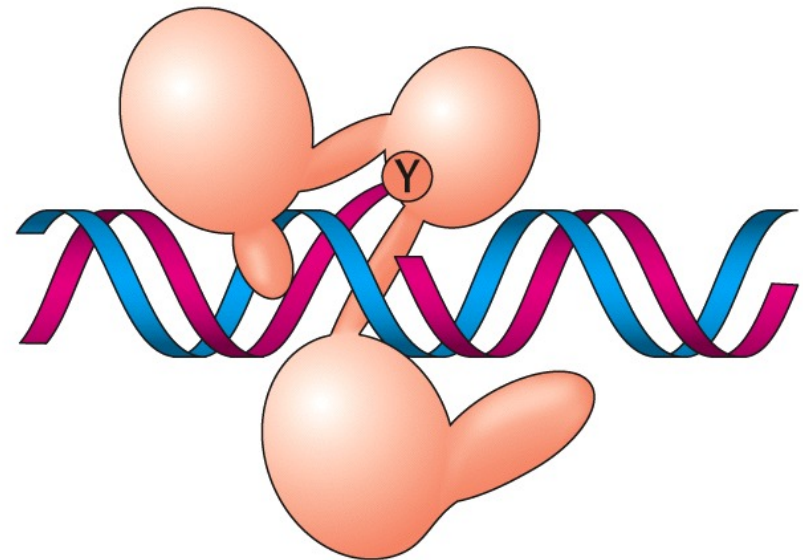
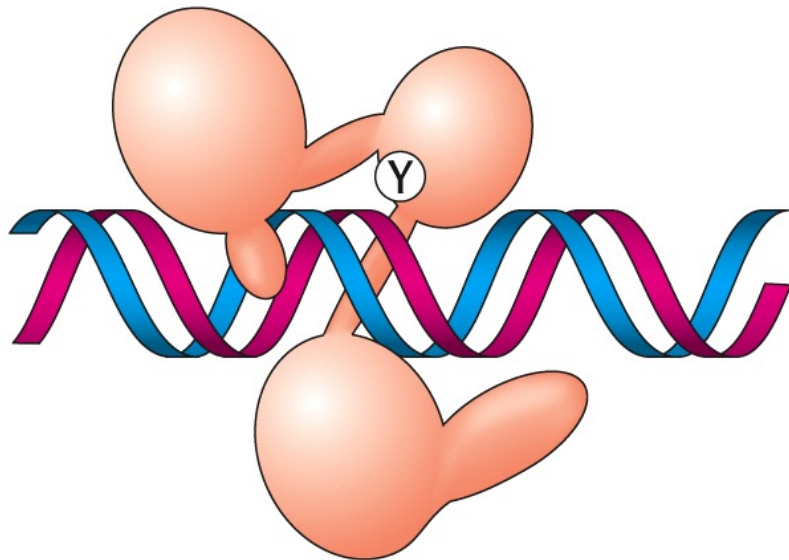


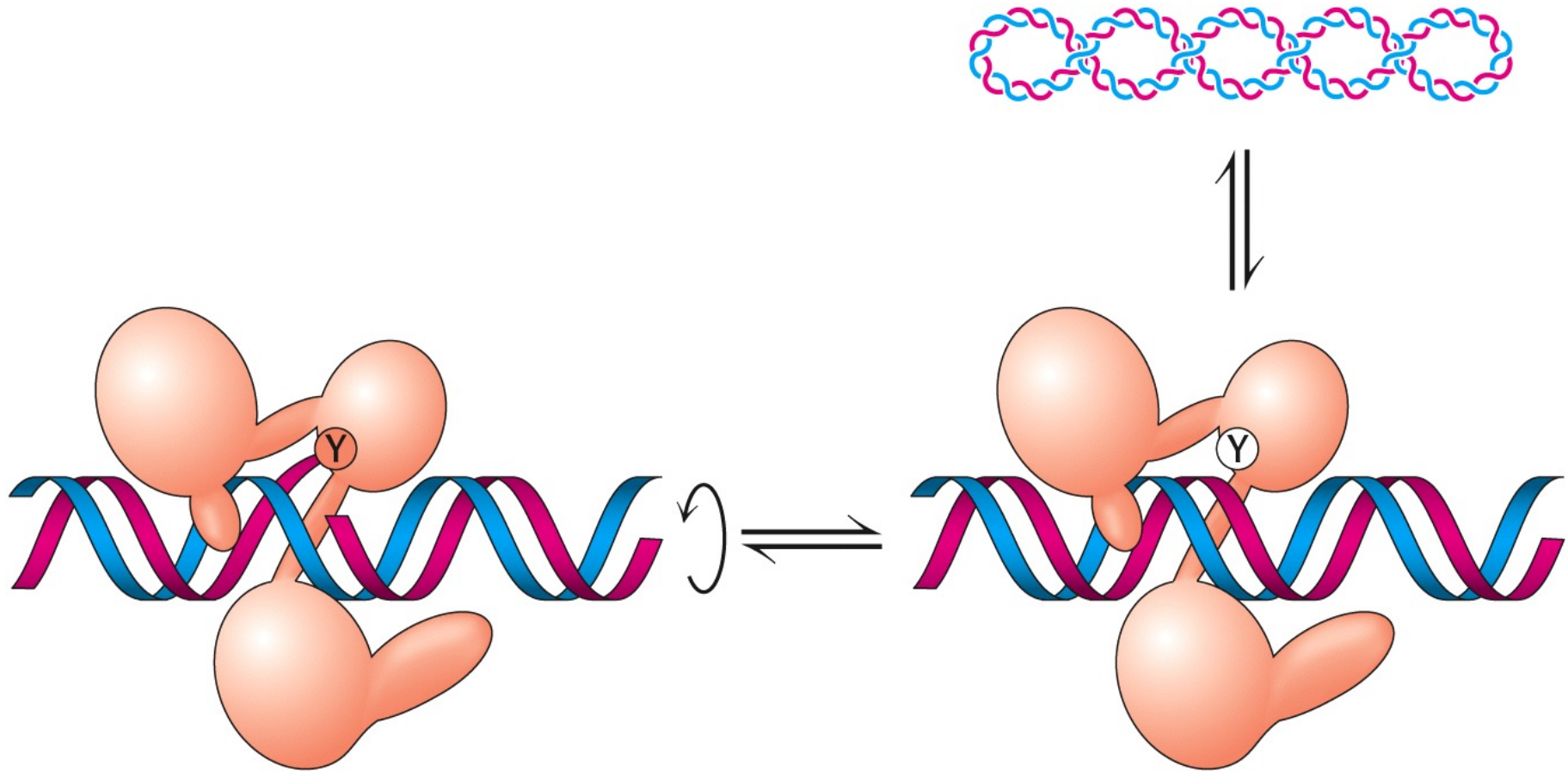
Τοποϊσομεράση I



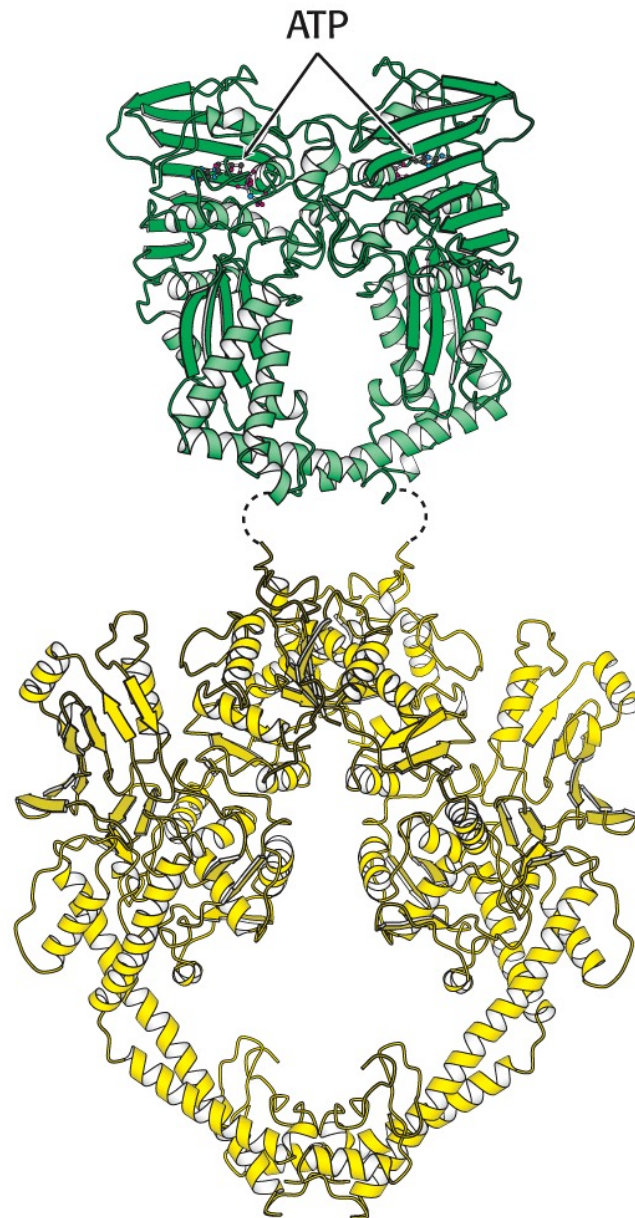


Αρνητικά υπερελικωμένο DNA





Τοποϊσομεράση τύπου II



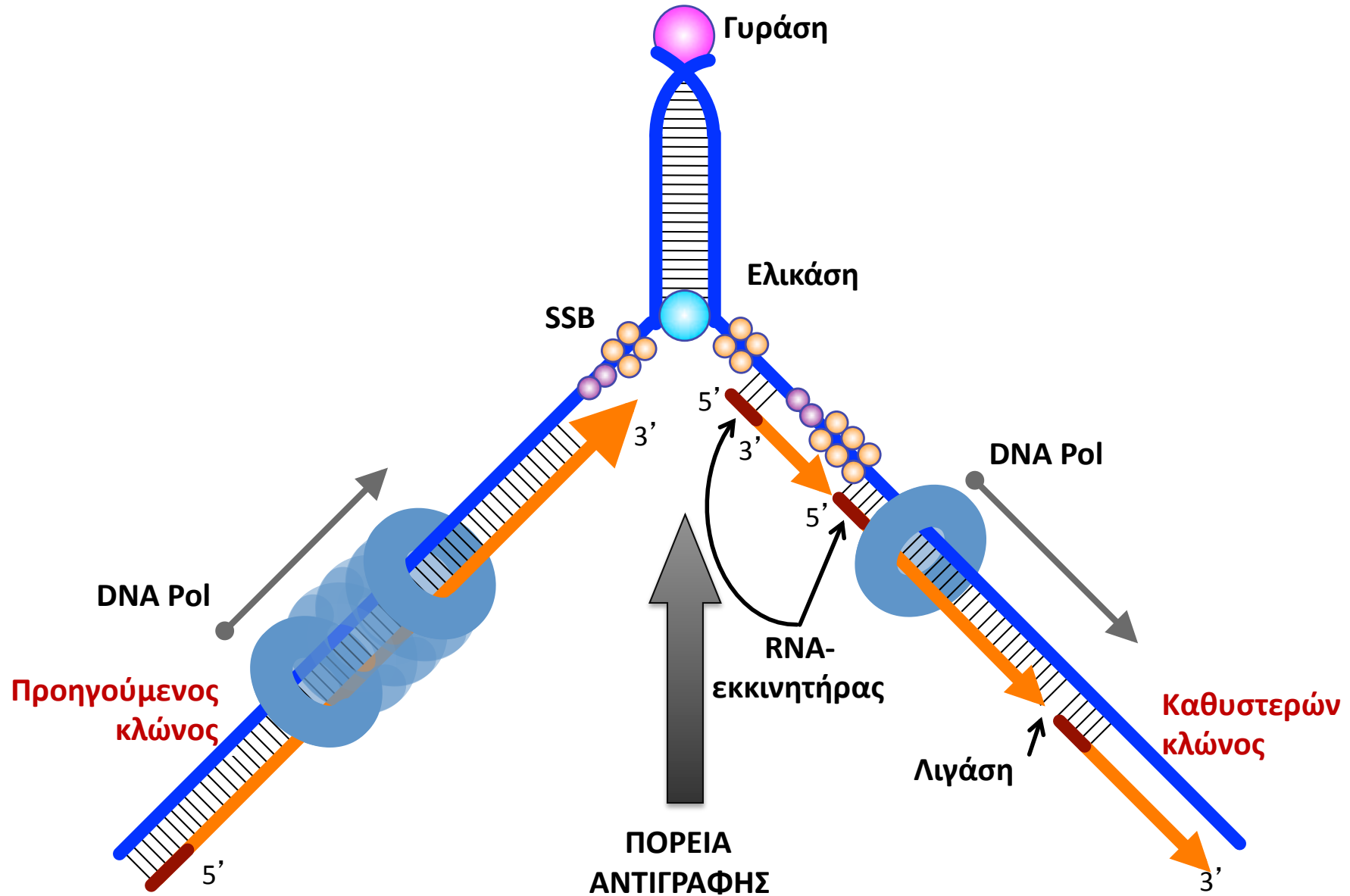
- DNA γυράση
- Κόβει και τους δύο κλώνους και εισάγει αρνητικές υπερελικώσεις (με κατανάλωση ATP)

Τοποϊσομεράσες

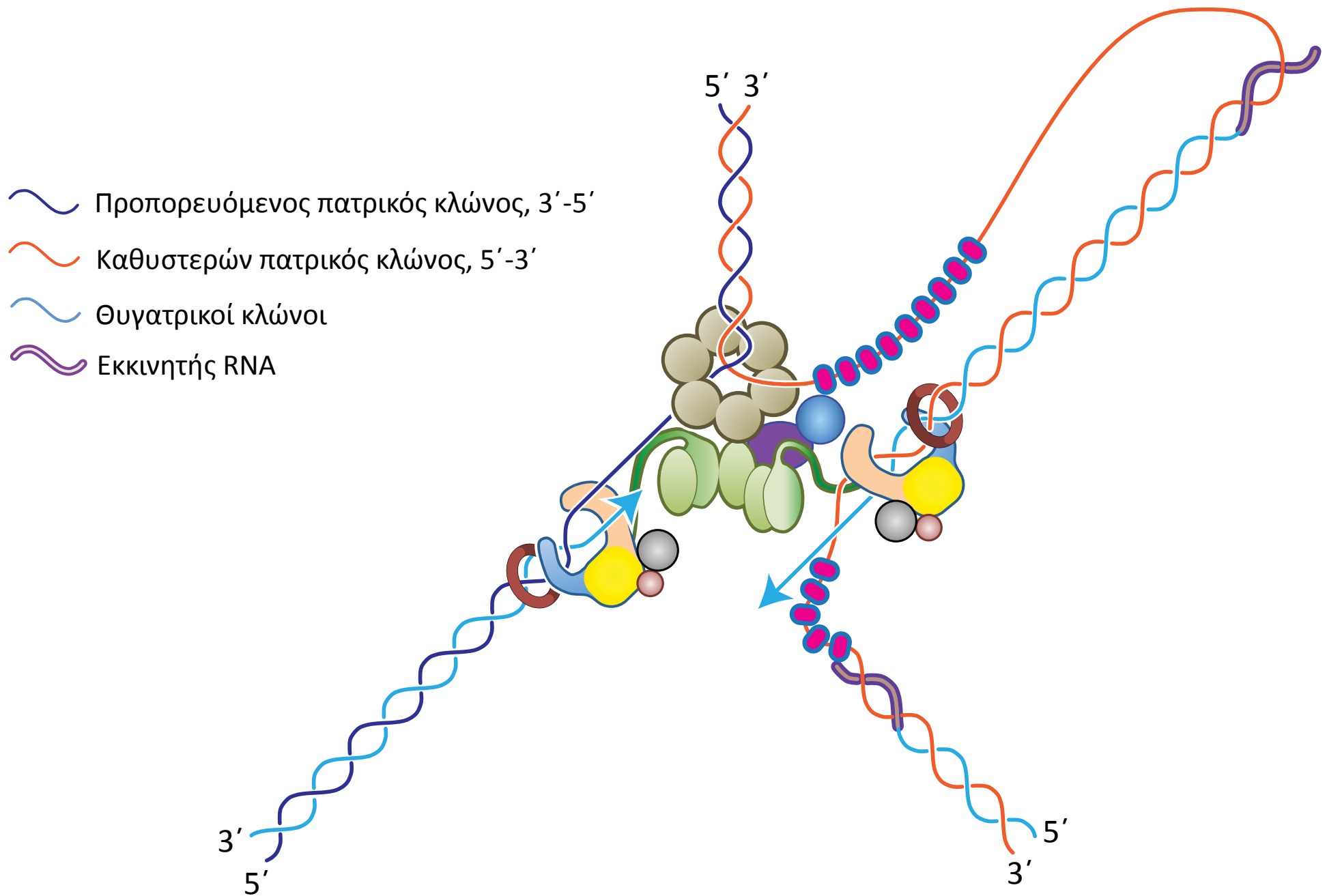


<https://www.youtube.com/watch?v=3QWA-tFdGN8>

Σχηματική αναπαράσταση των γεγονότων σε μια διχάλα αντιγραφής



Η αντιγραφή των δύο κλώνων



Το ολοένζυμο της Πολυμεράσης III του DNA, pol III

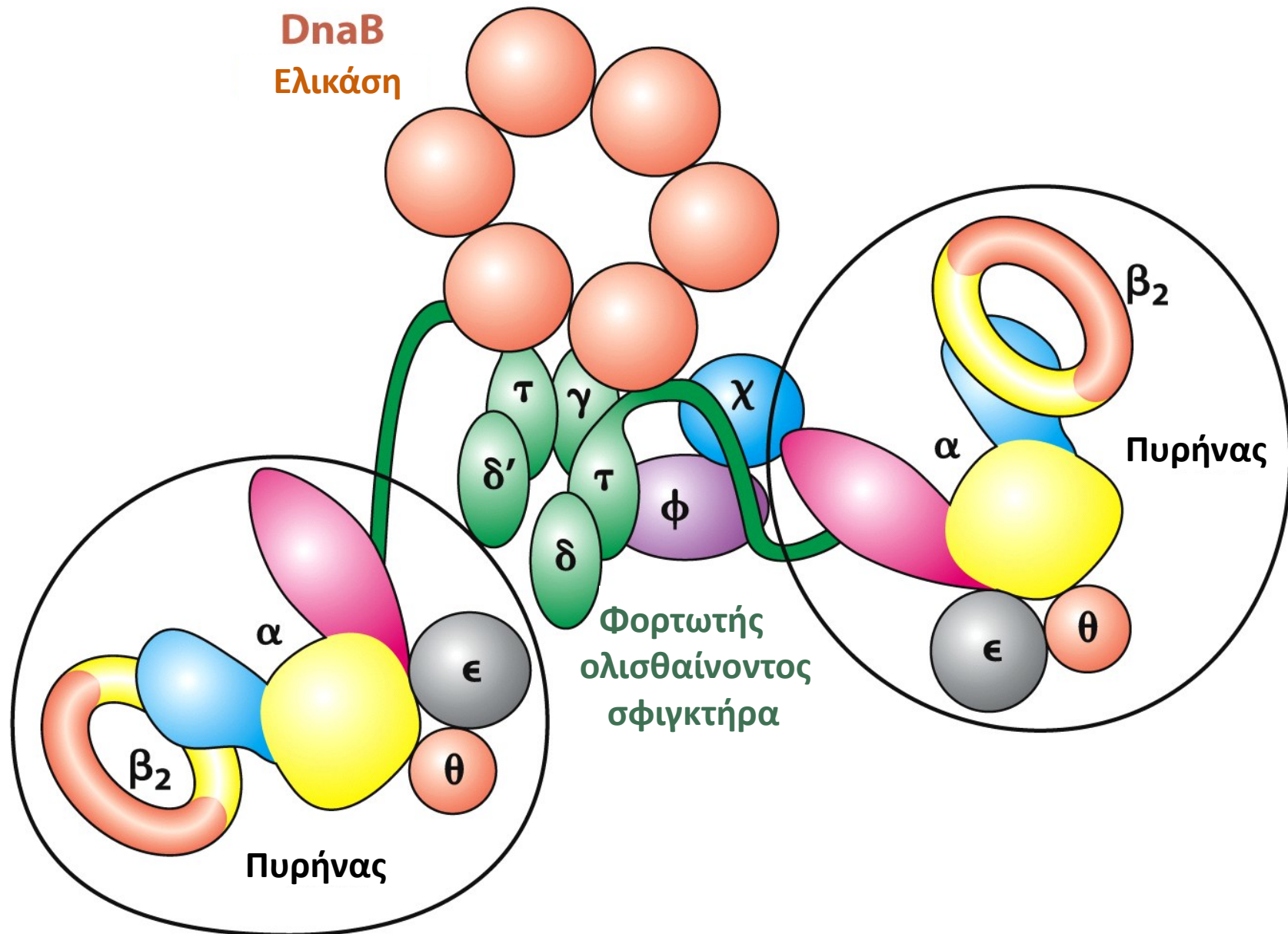
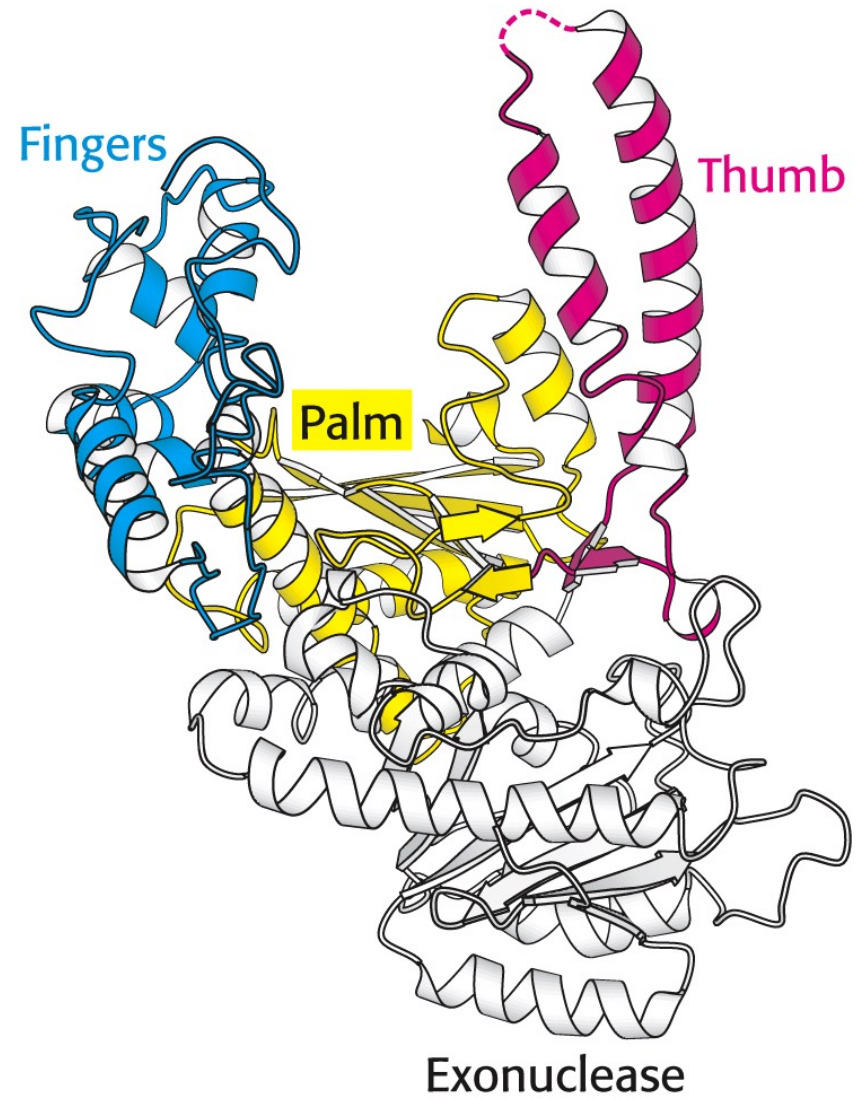
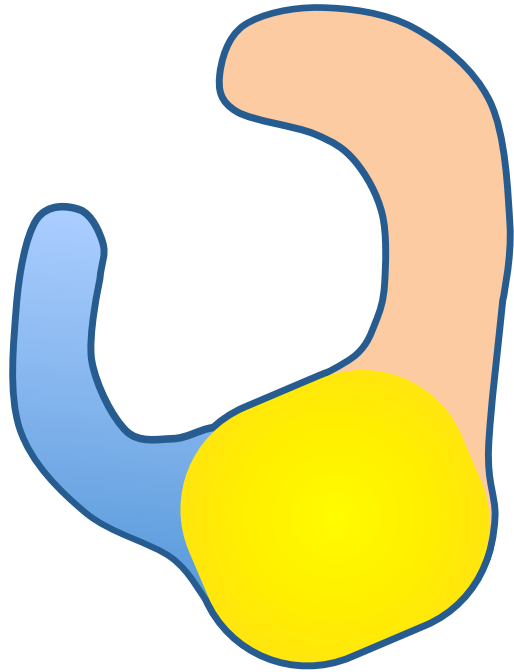


Figure 28.22
Biochemistry, Seventh Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company

Οι αντιγραφικές πολυμεράσες του DNA



Οικογένειες πολυμερασών DNA

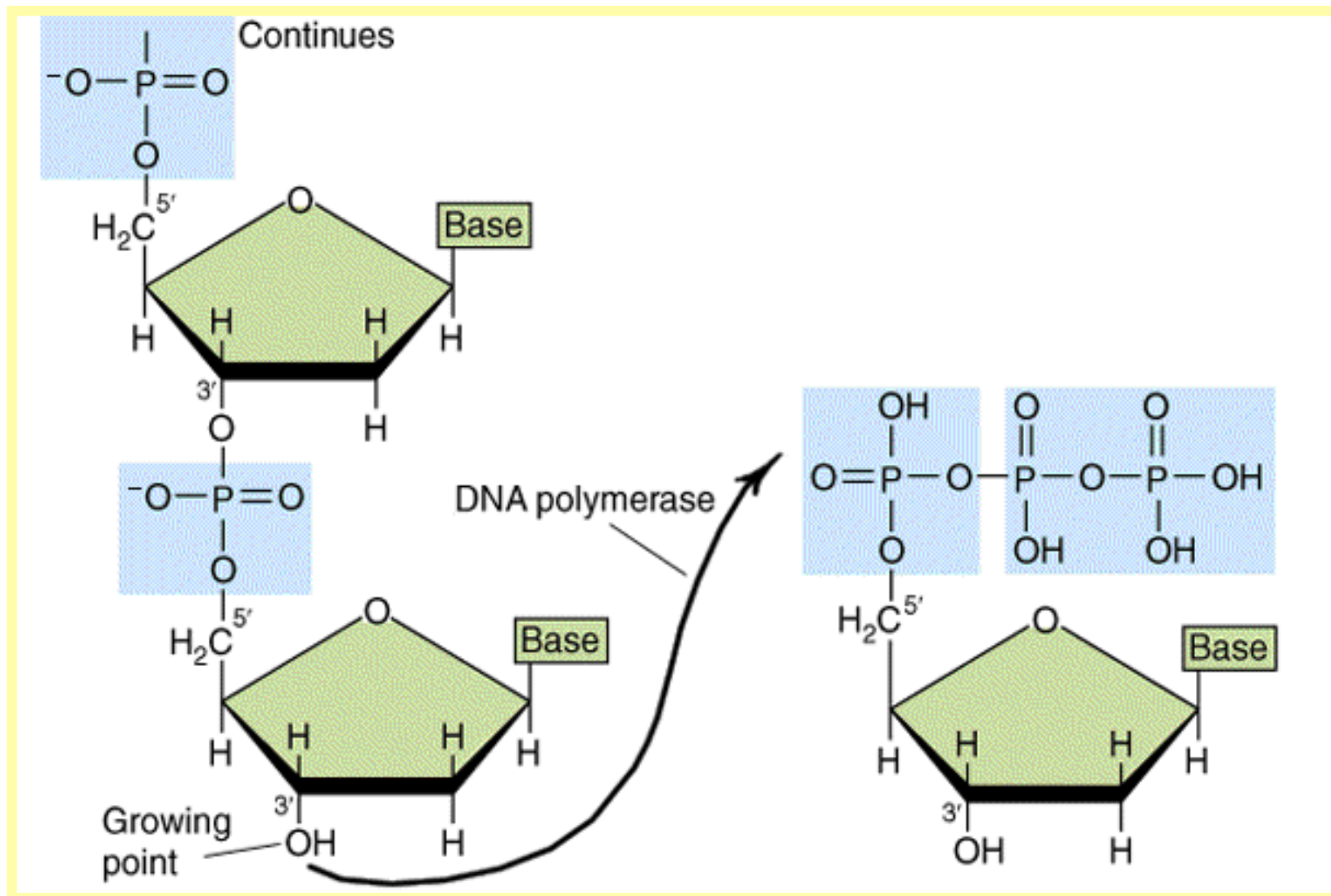
Οικογένεια	Τύπος πολυμεράσης DNA	Είδος*	Παραδείγματα
A	Αντιγραφική και Επιδιορθωτική	Ε, Π	T7 πολυμεράση, Pol I, γ, θ
B	Αντιγραφική και Επιδιορθωτική	Ε, Π	Pol II, Pol B, Pol ζ, α, δ, ε
C	Αντιγραφική	Π	Pol III
D	Αντιγραφική	Ευρυαρχαιότα	Ελλιπής χαρακτηρισμός
X	Αντιγραφική και Επιδιορθωτική	Ε	Pol β, σ, λ, μ, Τελική μεταφοράση δεοξυνουκλεοτιδίων
Y	Αντιγραφική και Επιδιορθωτική	Ε, Π	Pol ι, κ, Pol IV, Pol V
RT	Αντιγραφική και Επιδιορθωτική	Ιοί, Ρετροϊοί, Ε	Τελομεράση, Ιός Ηπατίτιδας Β

* Ε, Ευκαρυωτικοί οργανισμοί. Π, προκαρυωτικοί οργανισμοί

Πολυμεράσες του DNA

Όνομασία ενζύμου	Λειτουργία	Ταχύτητα
Πολυμεράσες προκαρυωτικών		
Πολυμεράση I του DNA	Απομάκρυνση εκκινητών Συμπλήρωση κενών σε καθυστερών κλώνο	15-20 nt/s
Πολυμεράση II του DNA	Επιδιόρθωση του DNA	
Πολυμεράση III του DNA	Το κύριο ένζυμο σύνθεσης του DNA	~1000 nt/s
Πολυμεράσες ευκαρυωτικών		
Πολυμεράση α του DNA Υπομονάδα εκκινητάσης Μονάδα πολυμεράσης DNA	Πολυμεράση εκκίνησης Συνθέτει εκκινητές RNA Προσθέτει στους εκκινητές τμήματα μήκους περίπου 20 νουκλεοτιδίων	
Πολυμεράση β του DNA (πολυμεράση επιρρεπής σε σφάλματα)	Επιδιόρθωση DNA	
Πολυμεράση δ του DNA	Το κύριο ένζυμο σύνθεσης του DNA	

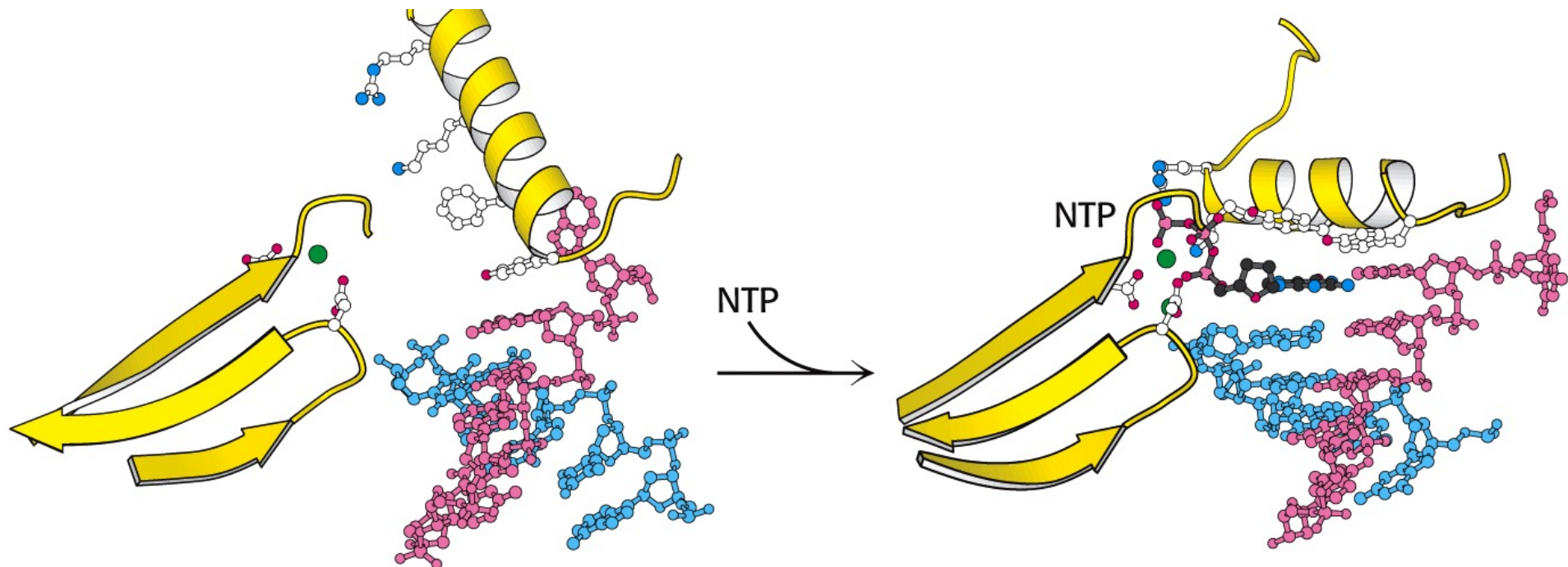
Φωσφοδιεστερικός δεσμός –
Η αλυσίδα του DNA αυξάνεται πάντα 5'→3'

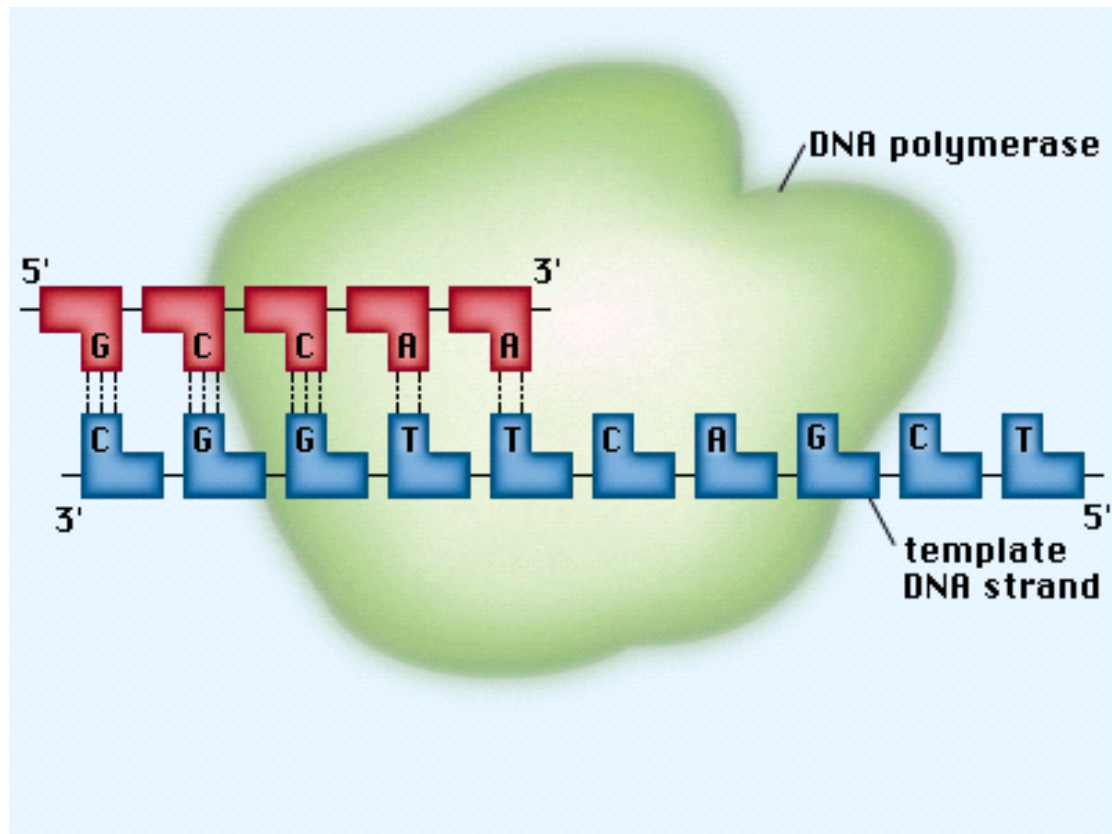


Επιλογή μέσω σχήματος

Η δέσμευση ενός νεοεισερχόμενου NTP στο ένζυμο, επάγει αλλαγή στην διαμόρφωσή του δημιουργώντας μια εσοχή για το νέο ζεύγος βάσεων.

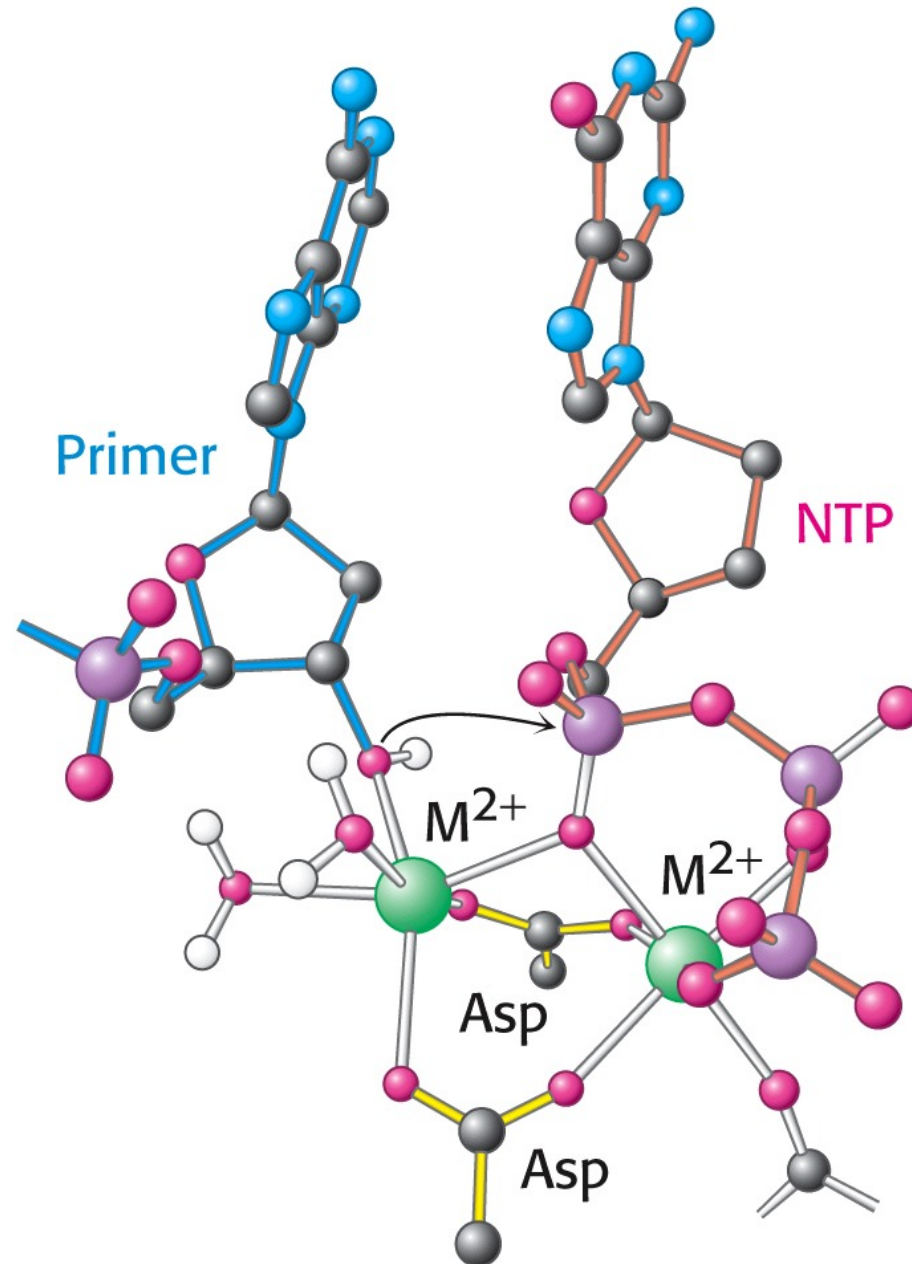
Τέτοια αλλαγή διαμόρφωσης είναι δυνατή μόνο όταν το νέο ζεύγος που θα σχηματισθεί μπορεί να ταιριάξει στερεοχημικά



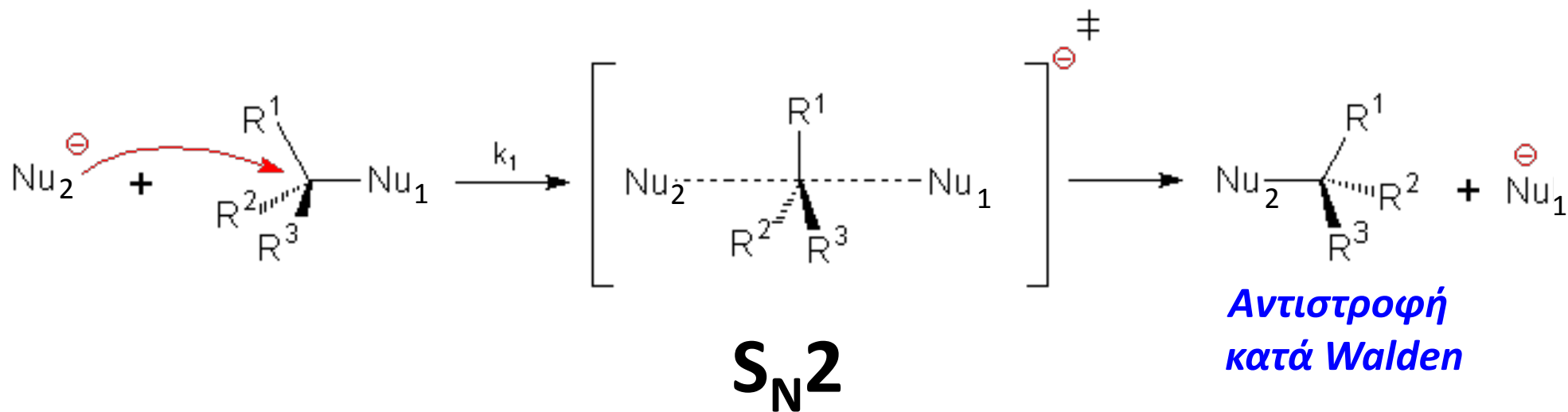
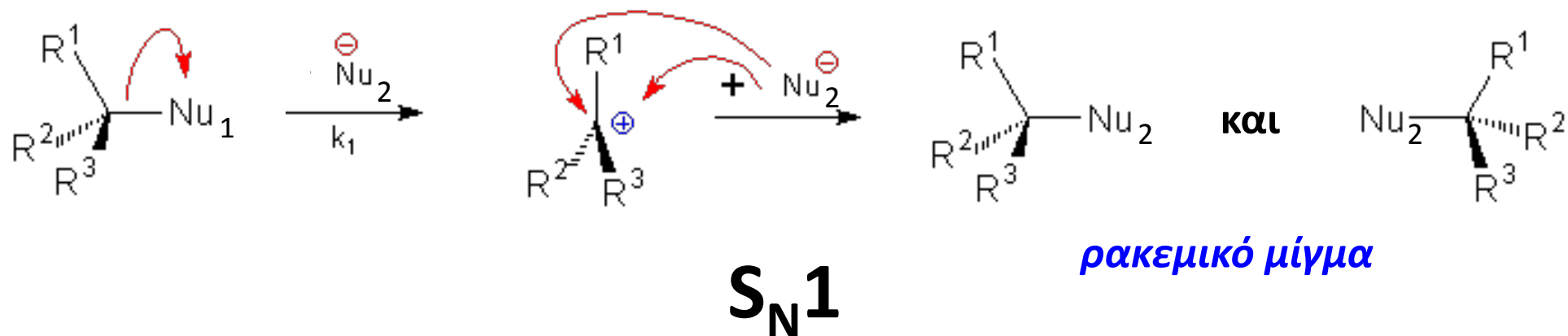


Molecular Cell Biology, 4th Edition

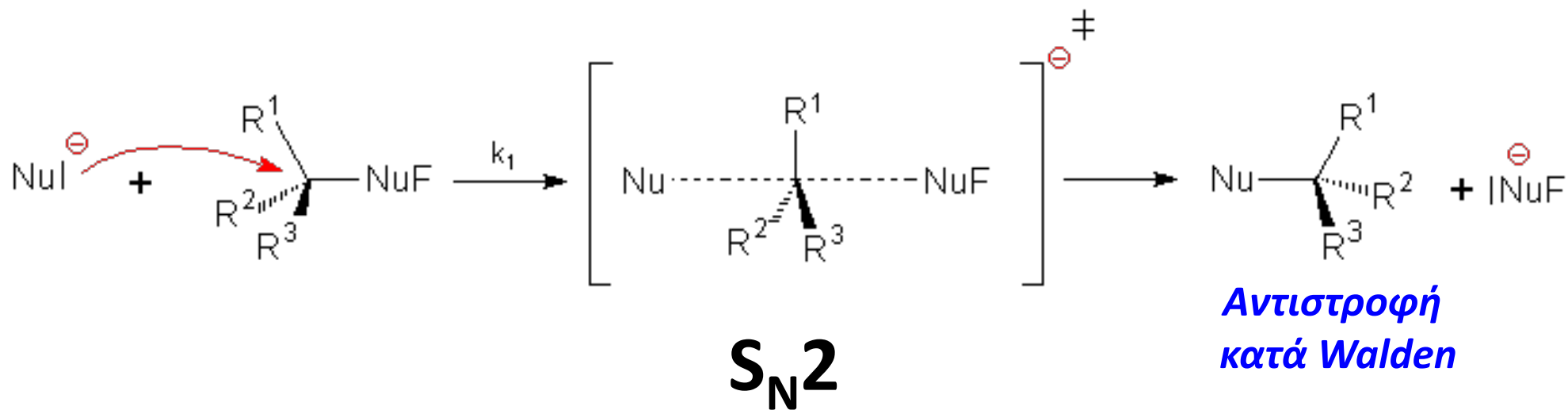
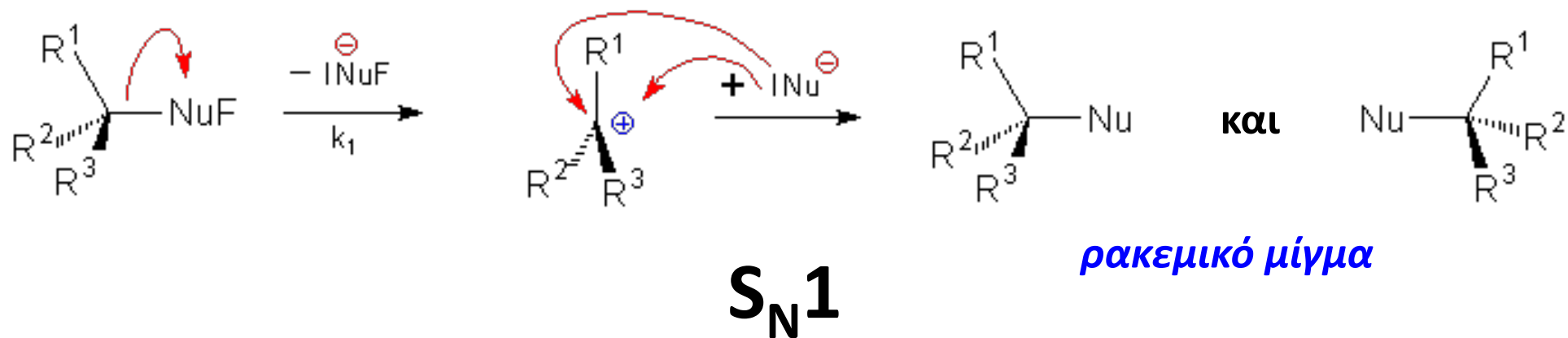
Μηχανισμός της πολυμεράσης του DNA



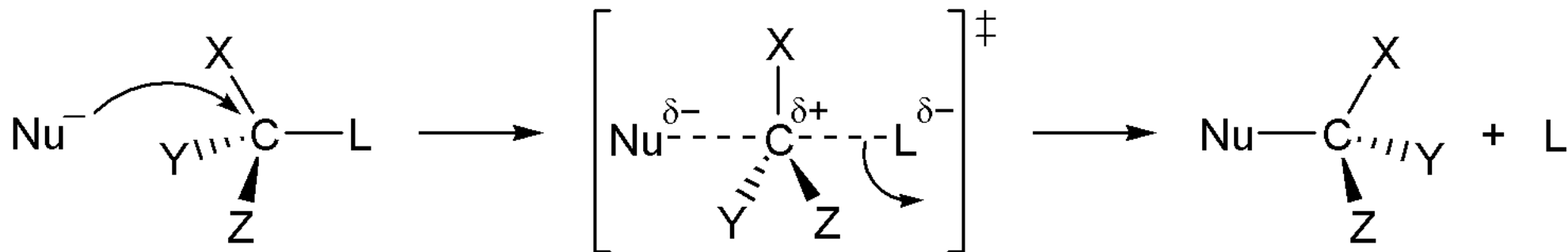
Πυρηνόφιλη υποκατάσταση S_N1 και S_N2



Πυρηνόφιλη υποκατάσταση S_N1 και S_N2



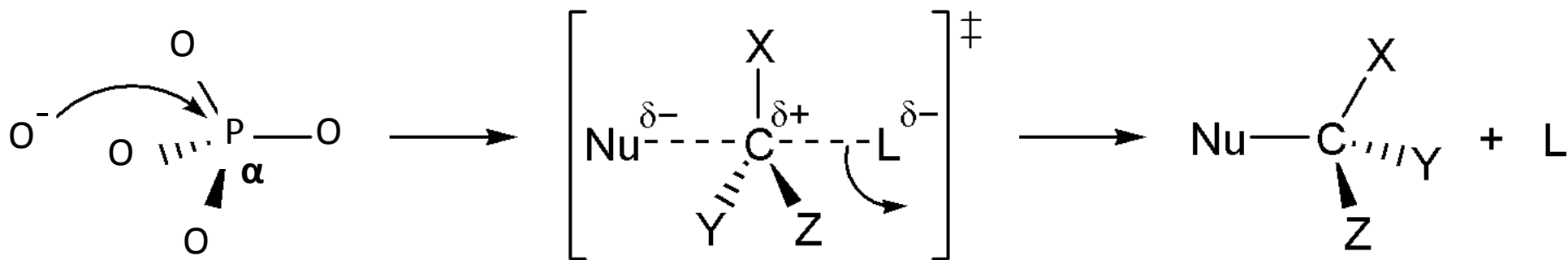
Μηχανισμός της DNA πολυμεράσης



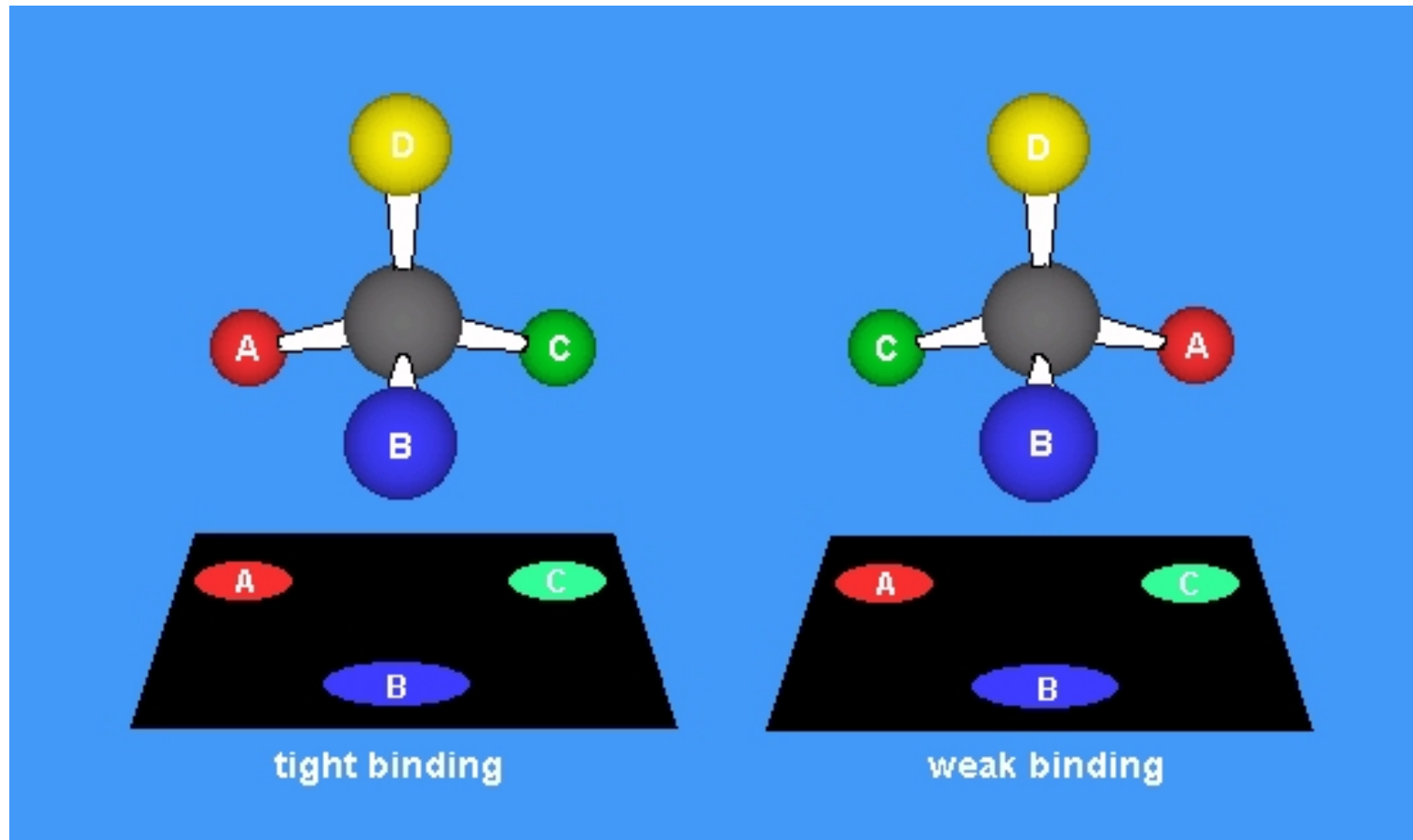
S_N2

Πυρηνόφιλη υποκατάσταση

Αντιστροφή κατά Walden

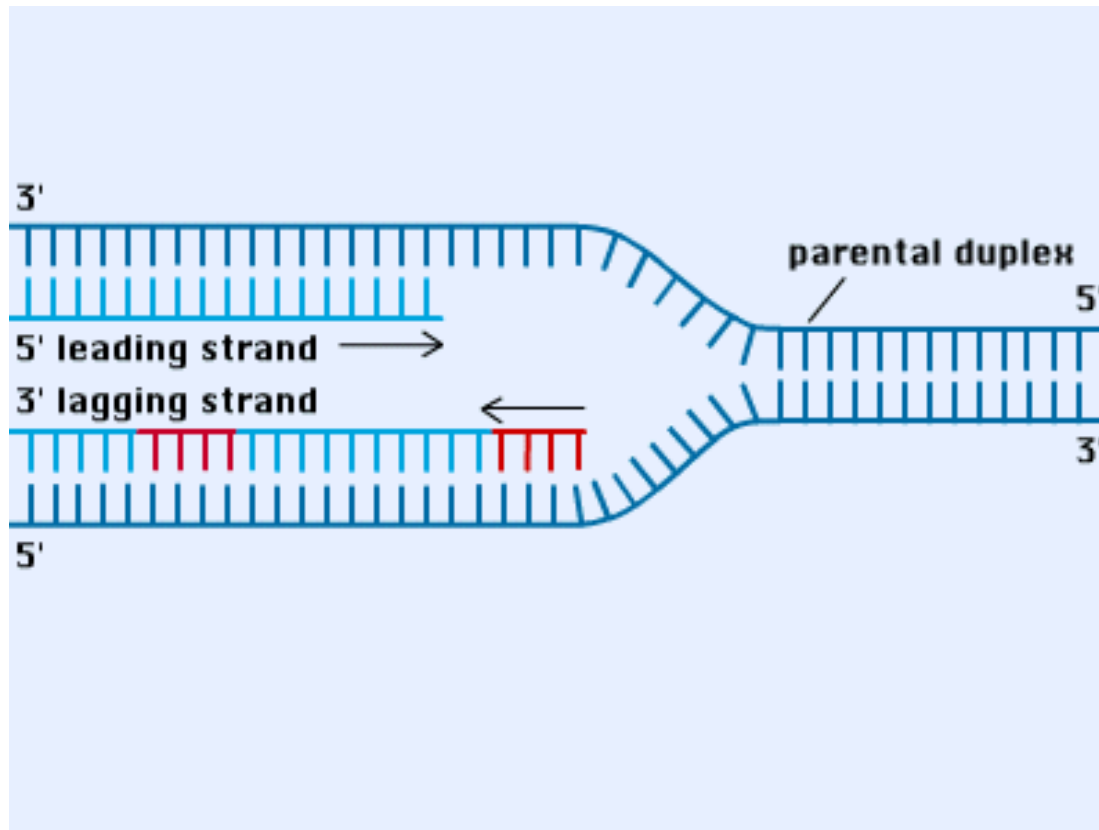


Γιατί είναι σημαντικό πως η αντίδραση που καταλύει η DNAP ροί γίνεται με το μηχανισμό S_N2



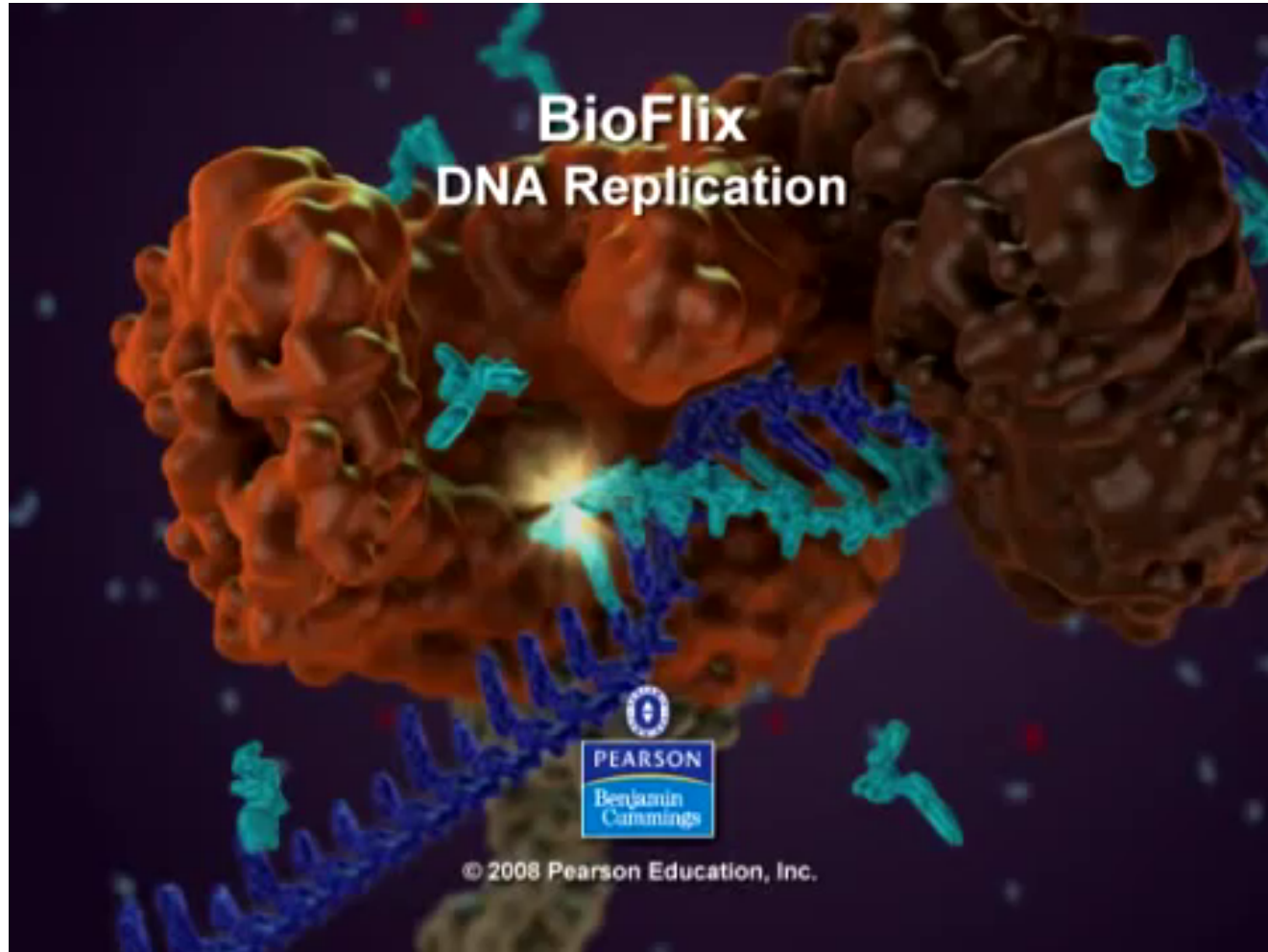
Αν γινόταν με τον S_N1 , η DNA ροί θα έπρεπε να αναγνωρίζει ταυτόχρονα δύο διαμορφώσεις

Επιμήκυνση της αντιγραφής

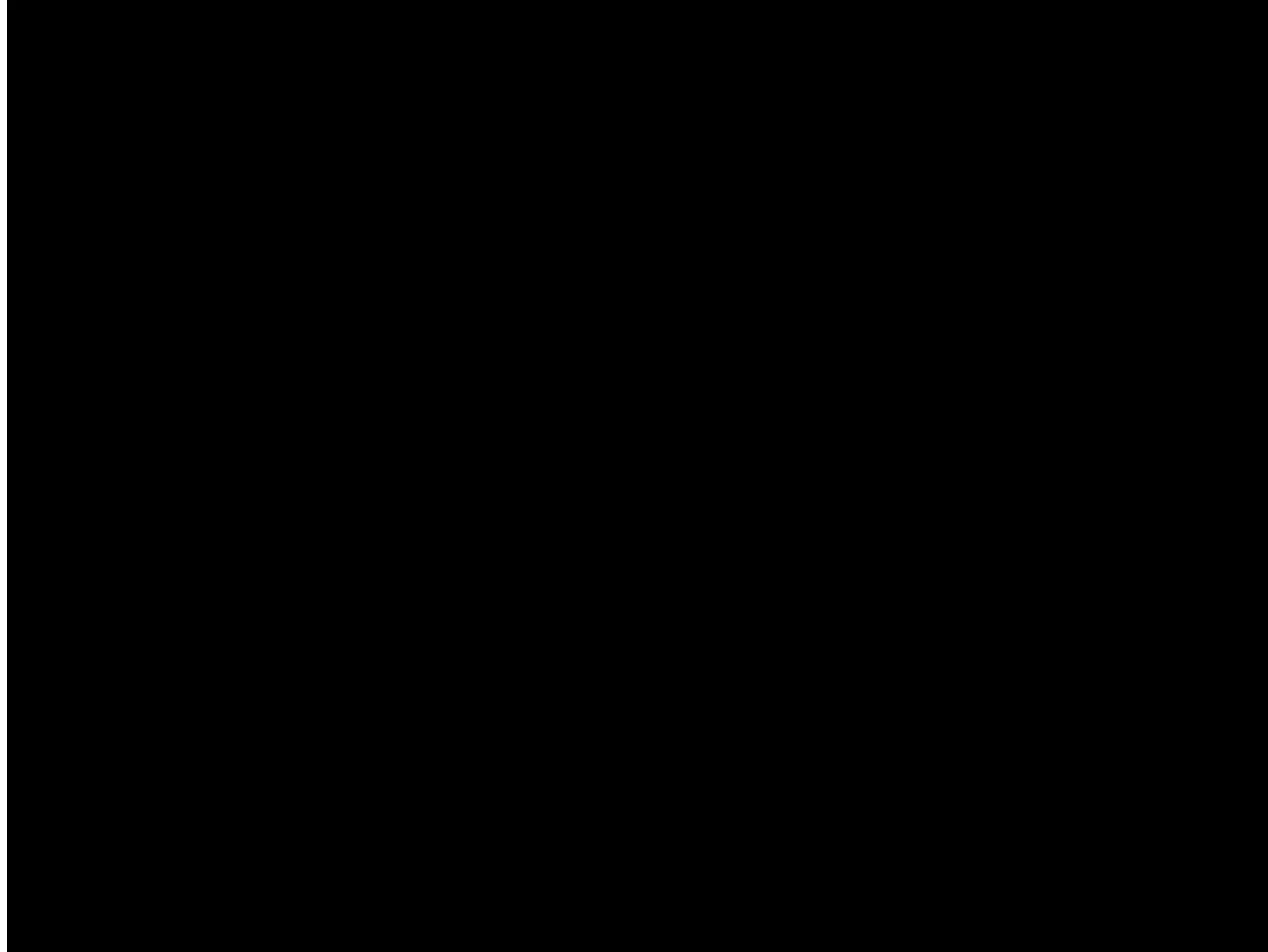


Molecular Cell Biology, 4th Edition

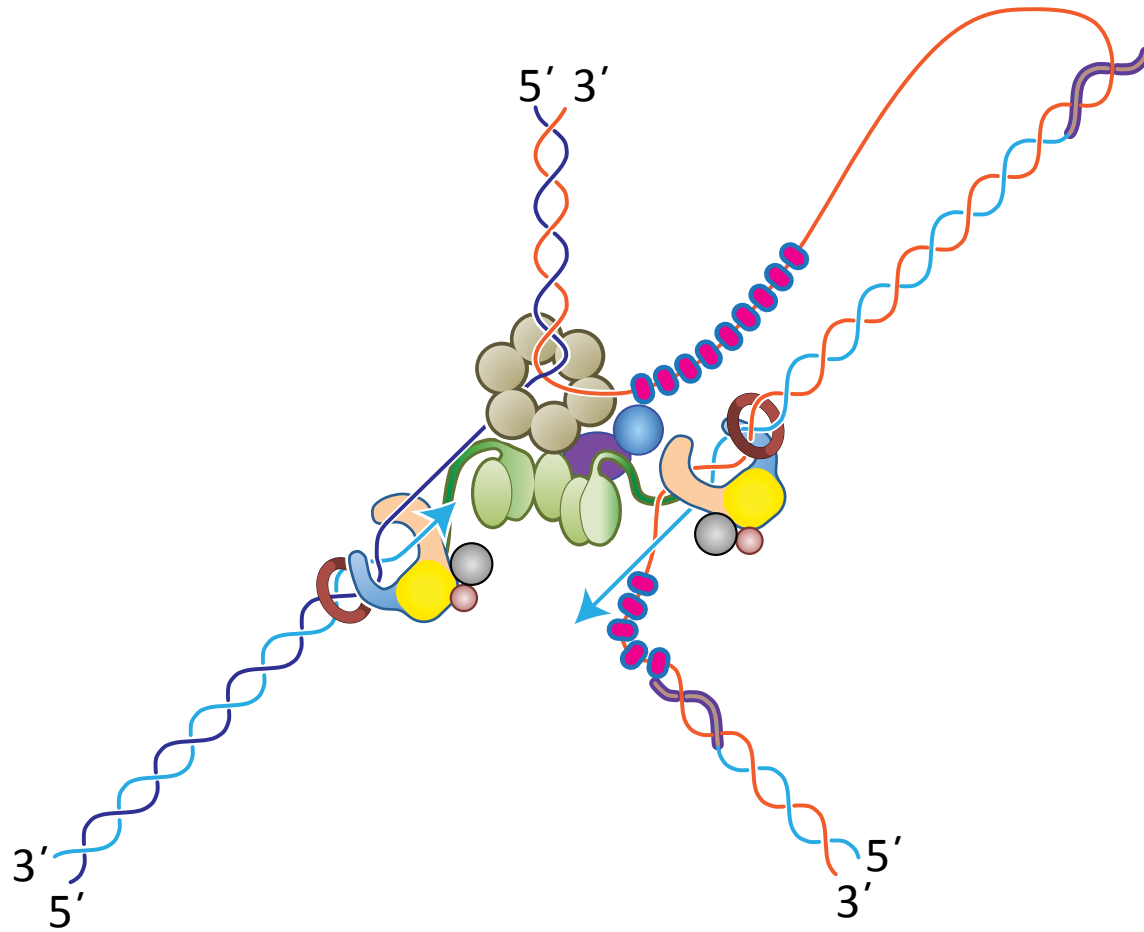
Η Αντιγραφή του DNA



**Η αντιγραφή των δύο κλώνων
σε (σχεδόν) πραγματικό χρόνο**



Η αντιγραφή των δύο κλώνων – το μοντέλο του «τρομπονιού»

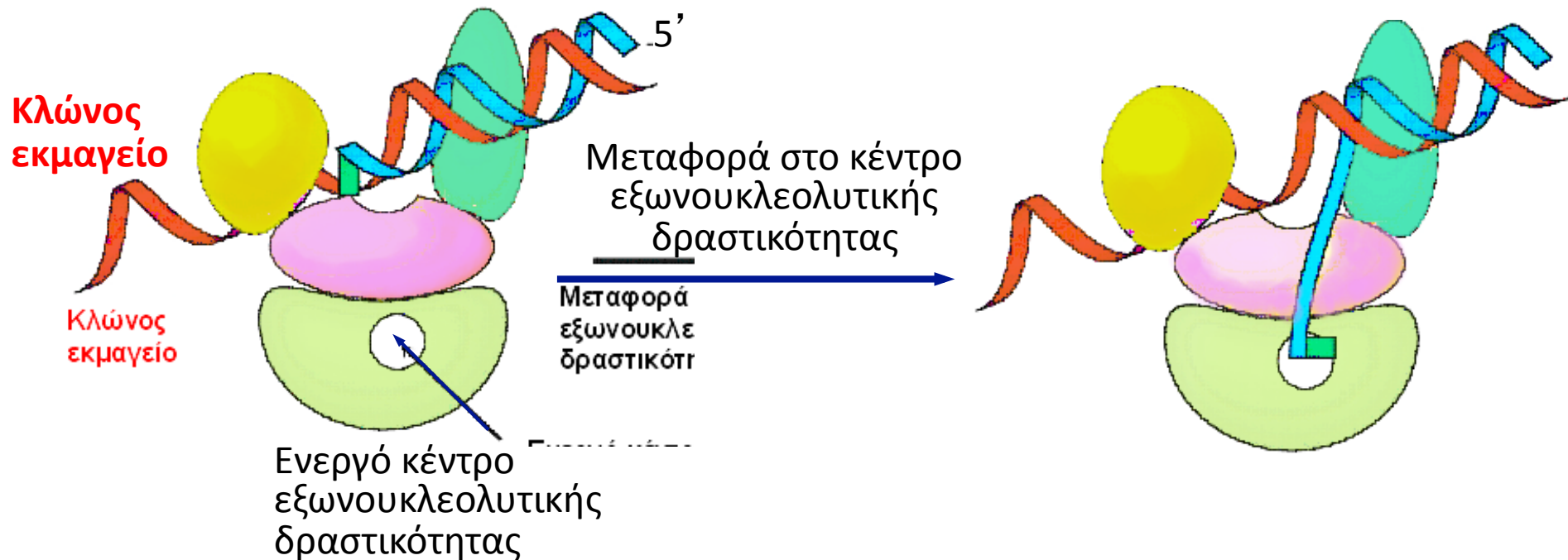


Η pol I έχει πολλές δράσεις

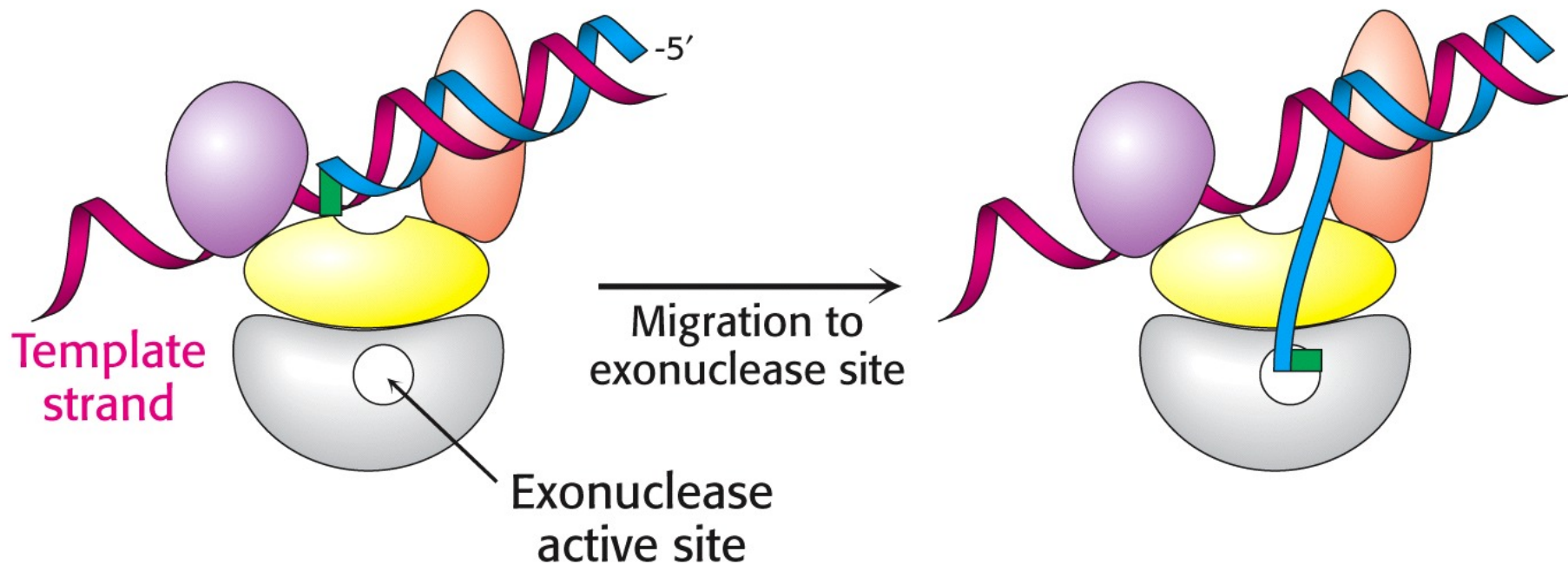
Η pol I έχει δράση

- πολυμεράσης και
- 3'-5' εξωνουκλεολυτικής δράσης (θραύσμα Klenow)
- 5'-3' εξωνουκλεολυτική δράση

Η τελευταία δράση είναι υπεύθυνη κυρίως για την απομάκρυνση λανθασμένων βάσεων



Ανάγνωση και διόρθωση

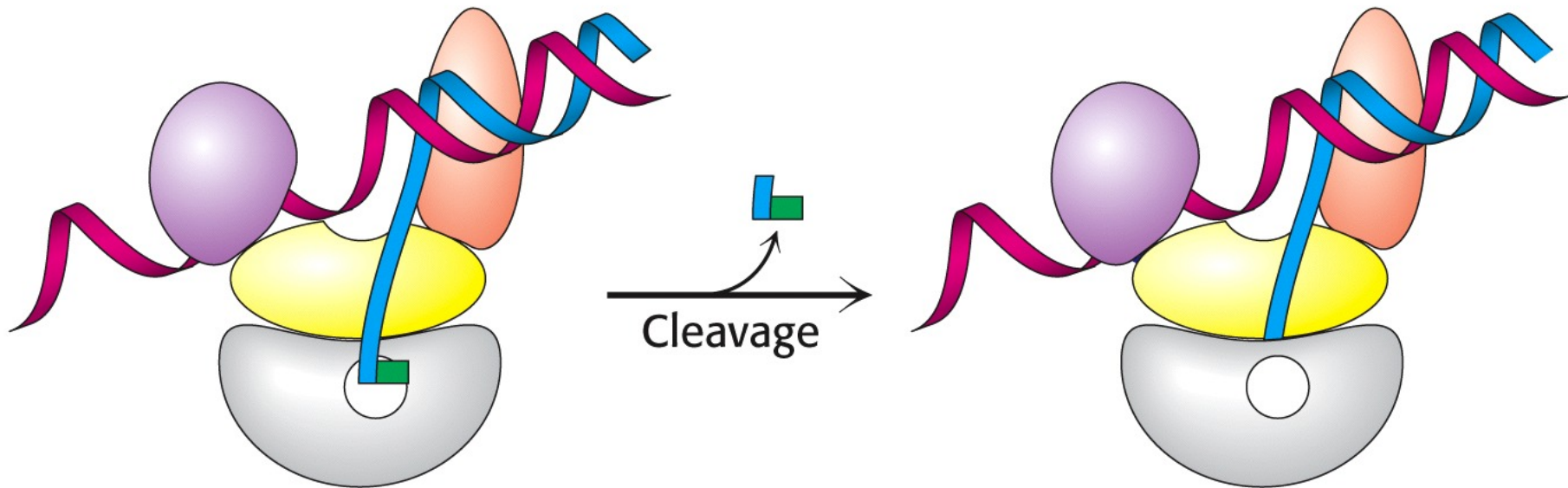


Η DNA πολυμεράση I έχει δράσεις:

1. Πολυμεράσης
2. 3'-5' εξωνουκλεολυτικής δράσης (Klenow fragment), και
3. 5'-3' εξωνουκλεολυτική δράσης

Η περιοχή αυτή είναι υπεύθυνη κυρίως για απομάκρυνση λανθασμένων βάσεων

Ανάγνωση και διόρθωση πώς αντιλαμβάνεται το ένζυμο τα λάθη;



1. Μέγεθος και σχήμα νεοεισερχόμενων νουκλεοτιδίων
2. Αταίριαστο ζευγάρι
3. Διαφορετική αλληλεπίδραση με το εκμαγείο

Η απομάκρυνση είναι ενεργειακά πολυέξοδη,
αλλά βελτιώνει σημαντικά την ποιότητα των νεοσυντιθέμενων αλυσίδων

Τερματισμός της αντιγραφής

Τερματισμός της αντιγραφής

- Δεν υπάρχει συγκεκριμένη στρατηγική
- Ο τερματισμός της αντιγραφής ενός κυκλικού χρωμοσώματος τελειώνει με διαφορετικό τρόπο από ένα ευθύγραμμο

Τερματισμός της αντιγραφής κυκλικού μορίου DNA

Τερματισμός της αντιγραφής κυκλικού DNA

- Με συνάντηση των δύο ρεπλισωμάτων που ξεκινούν από την περιοχή έναρξη με αντίθετες φορές.
- Όταν τα ρεπλισώματα φτάσουν σε μία περιοχή τερματισμού (που αποτελείται από συγκεκτριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων)

**Ο τερματισμός της αντιγραφής στους
ευκαρυωτικούς οργανισμούς**

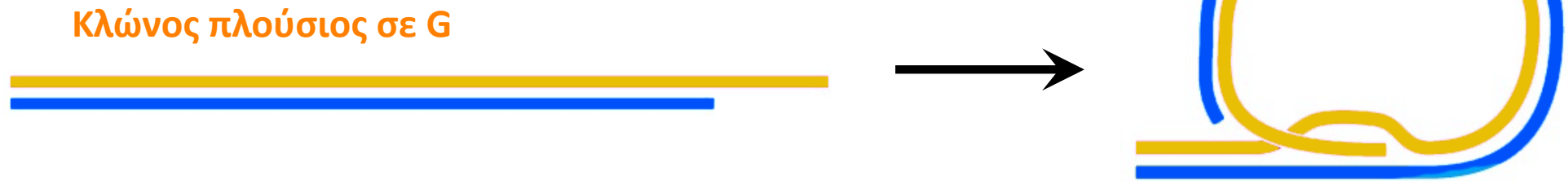
Το πρόβλημα του τερματισμού της αντιγραφής στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς

- Όταν ολοκληρωθεί η σύνθεση του κλώνου που προηγείται (κλώνος $5' \rightarrow 3'$) δεν μπορεί να ολοκληρωθεί η σύνθεση του καθυστερώντος κλώνου ($3' \rightarrow 5'$)
- Αυτό γιατί δεν θα υπάρχει DNA να λειτουργήσει ως εκμαγείου για τη σύνθεση του RNA-εκκινητήρα για τη σύνθεση του τελευταίου τεμαχίου Okazaki
- Η λύση του προβλήματος είναι τα τελομερή

Τελομερή

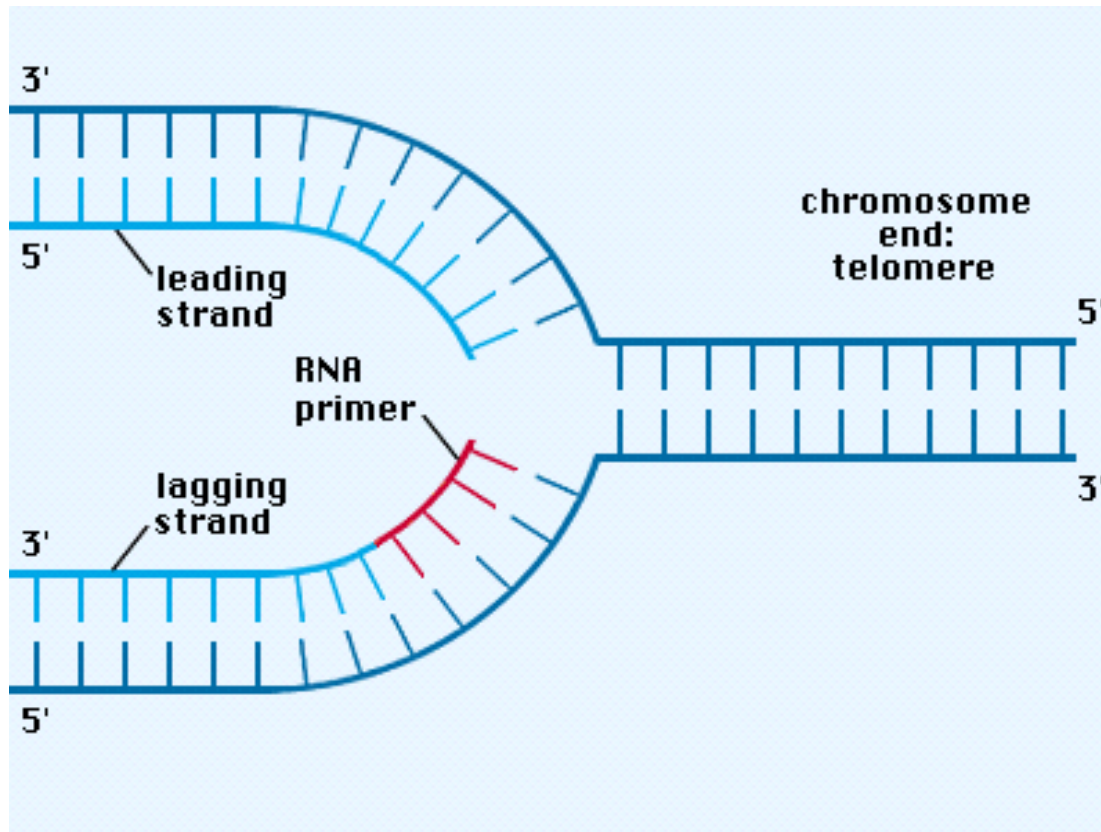
- Ανάλυση και μελέτη της αλληλουχίας των άκρων των χρωμοσωμάτων (Τελομερή).
- Αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες εξανουκλεοτιδίων (στον άνθρωπο: AGGGTT)
- Ενας από τους δύο κλώνους είναι πλούσιος σε G
- Τα τελομερή αντιγράφονται από το ένζυμο τελομεράση

Προτεινόμενο μοντέλο για τα τελομερή



Ενα τμήμα του κλώνου πλούσιου σε G προεξέχει από το άκρο του τελομερούς.
Η μονόκλωνη αυτή περιοχή διεισδύει στη δίκλωνη περιοχή.
Σχηματίζεται έτσι μια δίκλωνη θηλειά.

Τελομερή - Τελομεράση



Molecular Cell Biology, 4th Edition



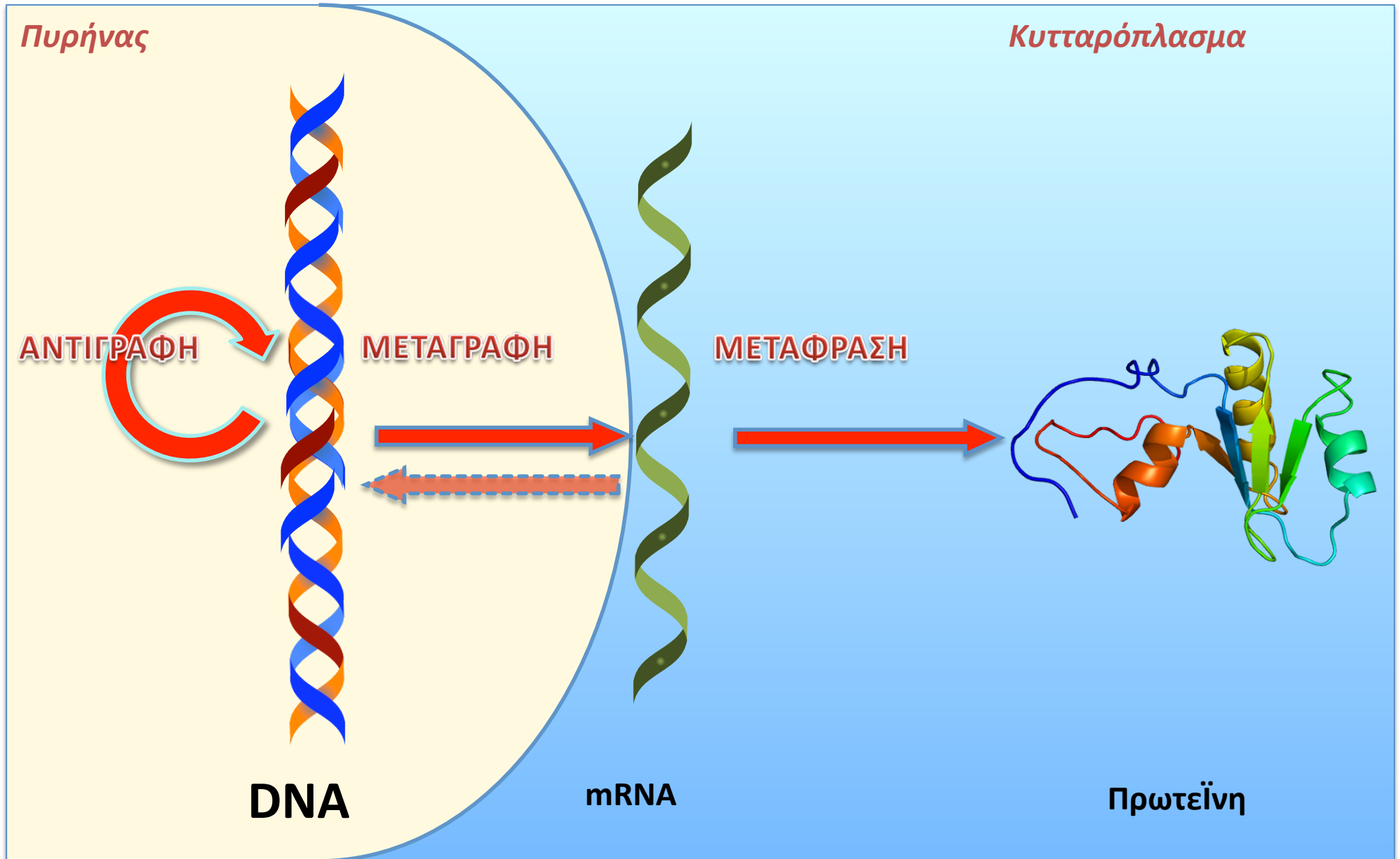
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



2. Μεταγραφή ή Η σύνθεση του RNA

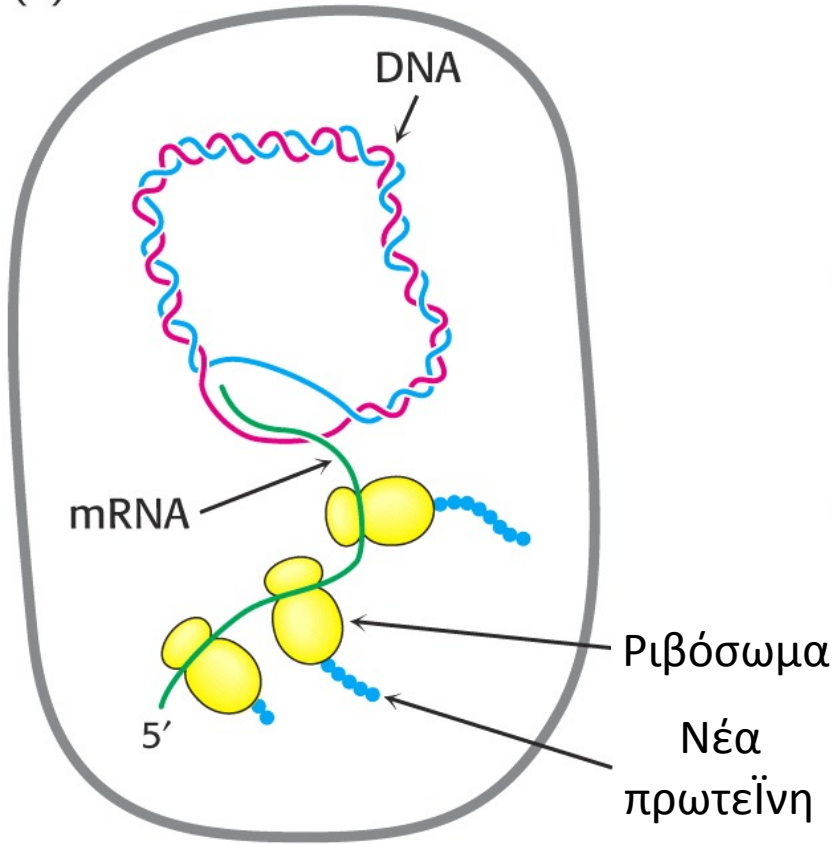
Νικόλαος Μπαλατσός

Το κεντρικό δόγμα



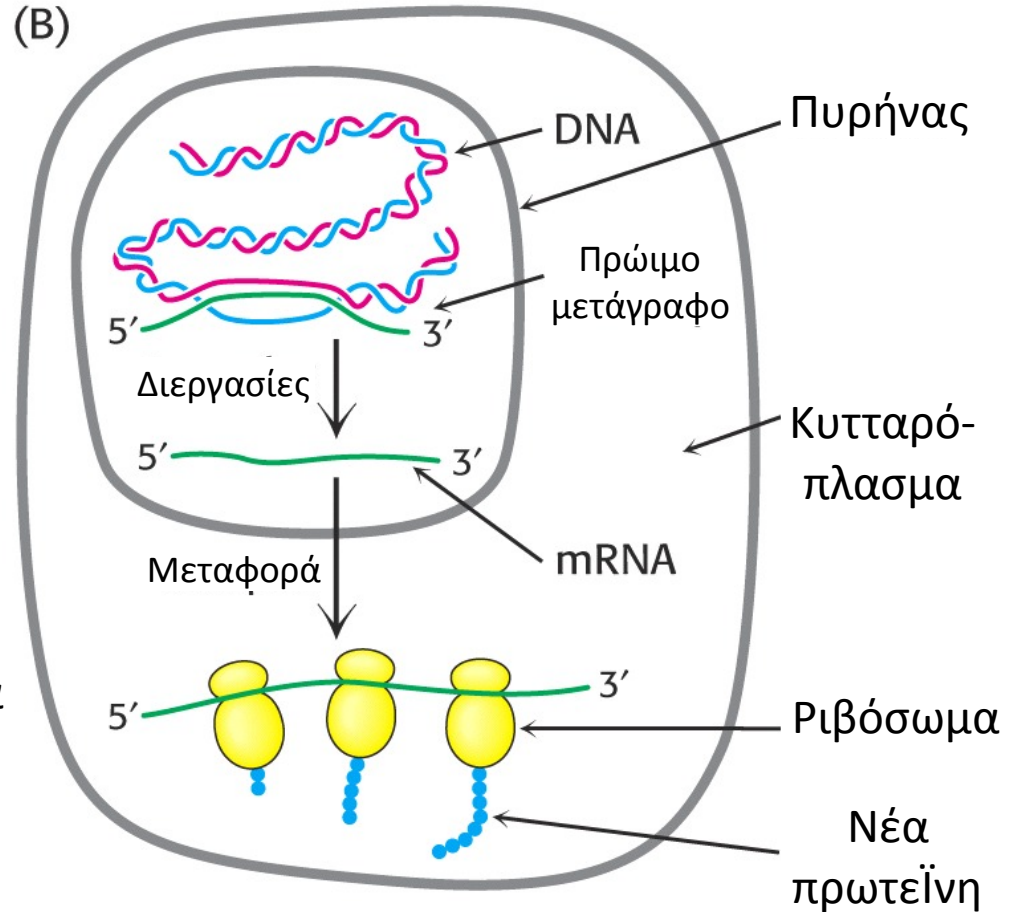
Διαφορές προκαρυωτικών - ευκαρυωτικών οργανισμών

(A)



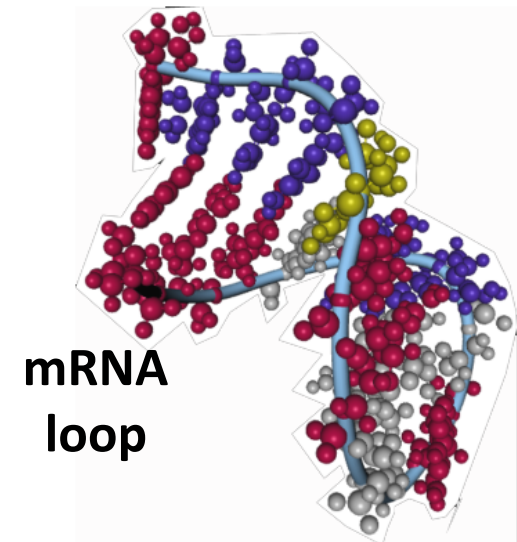
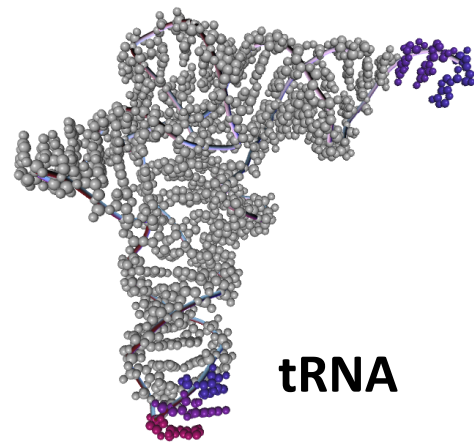
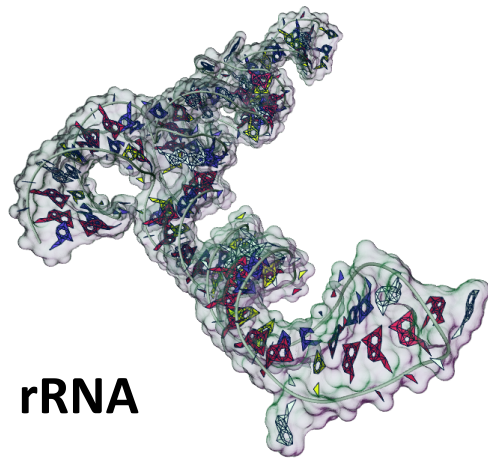
Προκαρυωτικό
κύτταρο

(B)

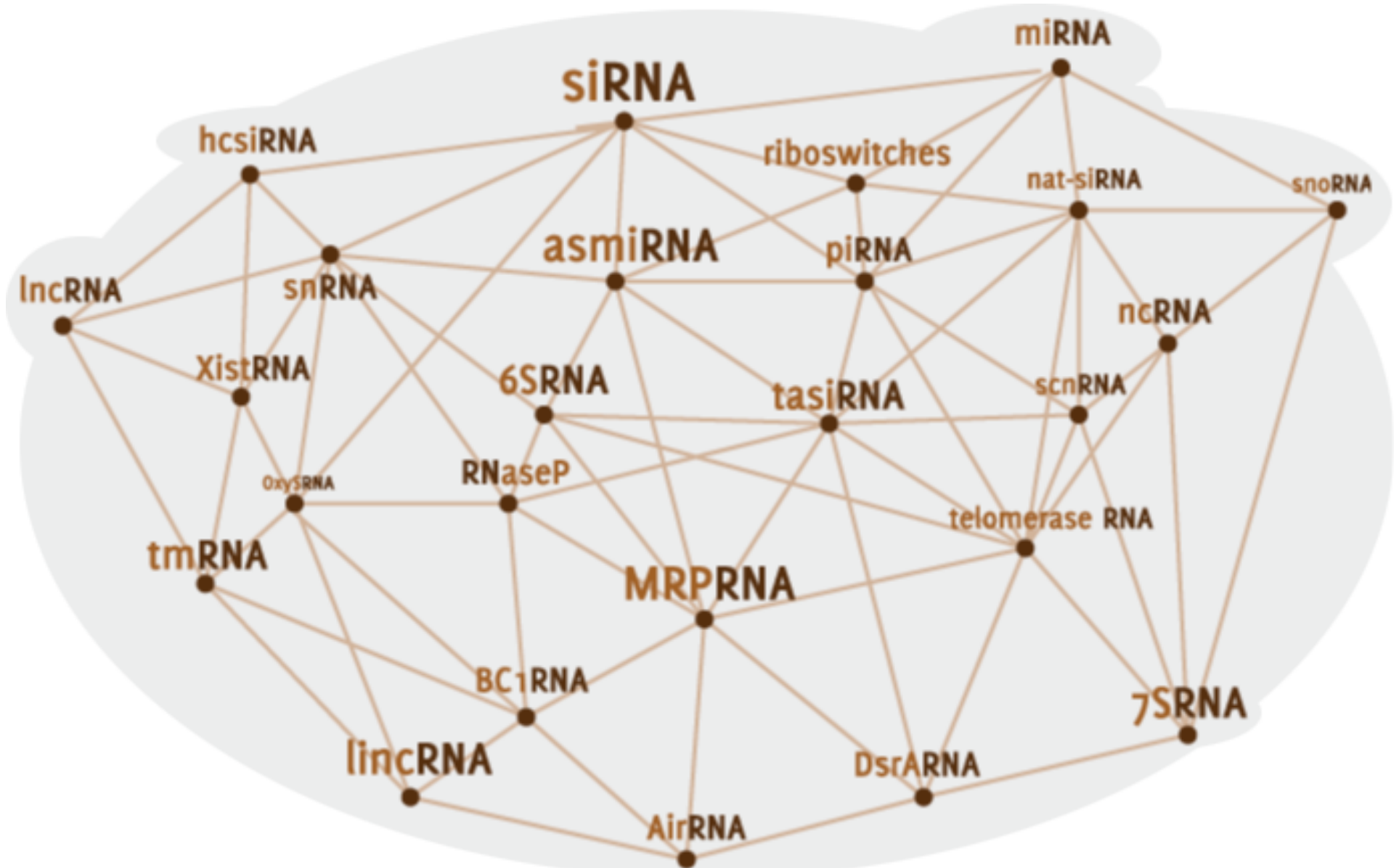


Ευκαρυωτικό
κύτταρο

RNA



Ρυθμιστικά RNAs



Γονίδιο

Η φυσική και λειτουργική μονάδα της γενετικής πληροφορίας που μπορεί να εκφραστεί

ή

Μια περιοχή του DNA που λειτουργεί ως μήτρα ή εκμαγείο για παραγωγή ενός ή περισσότερων προϊόντων (που μπορεί να είναι RNA είτε πεπτίδια)

Στους περισσότερους οργανισμούς το μεγαλύτερο ποσοστό του DNA δεν αποτελείται από γονίδια

Η γονιδιακή έκφραση γίνεται σε διάφορα στάδια ή επίπεδα

- Προετοιμασία του γονιδίου
- Μεταγραφή του γονιδίου
- Επεξεργασία μορίων RNA
- Εξοδος μορίων RNA στο κυτταρόπλασμα
- Ανακύκλωση (turnover) μορίων mRNA
- Σύνθεση πρωτεϊνών
- Ολοκλήρωση δομής πρωτεϊνών,
μετακίνησή τους στο κατάλληλο κυτταρικό
διαμέρισμα και
ανακύκλωση των πρωτεϊνών

Μονάδα μεταγραφής (transcription unit)

- **Μονάδα μεταγραφής:**
Η περιοχή του DNA που μεταγράφεται σε RNA
- **Προκαρυωτικοί οργανισμοί:**
Περιλαμβάνει περισσότερα από ένα γονίδια (οπερόνιο)
- **Ευκαρυωτικοί οργανισμοί:**
Μια μονάδα μεταγραφής περιλαμβάνει ένα μόνο γονίδιο (εκτός ορισμένων rRNA και tRNA)

Το αγγελιαφόρο RNA (mRNA) είναι το κεντρικό μόριο της μεταγραφής

- Το DNA βρίσκεται στον πυρήνα
- Η μετάφραση (πρωτεϊνοσύνθεση) γίνεται στο κυτταρόπλασμα από τα ριβοσώματα
- Αυτό σημαίνει πως υπάρχει ενός μορίου όπου μεταφέρει την πληροφορία από το DNA στην μεταφραστική μηχανή
- Το μόριο αυτό είναι το αγγελιοφόρο RNA (messenger RNA ή mRNA)
- Γενικά ως μεταγραφή εννοείται η σύνθεση τόσο mRNA, όσο και ριβοσωμικού RNA (rRNA) και μεταφορικού RNA (tRNA)

Cis-δραστικά στοιχεία, *Trans*-δραστικοί παράγοντες

- 🌈 *Cis*-δραστικά στοιχεία (*cis*-acting elements)

Αλληλουχίες νουκλεοτιδίων (είτε στο DNA είτε στο RNA)

- 🌈 *Trans*-δραστικοί παράγοντες (*trans*-acting factors)

Μόρια (πρωτεΐνες αλλά και μόρια RNA) που αλληλεπιδρούν με το DNA και ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων.

Οι *trans*-δραστικοί παράγοντες που ρυθμίζουν τη μεταγραφή ονομάζονται **μεταγραφικοί παράγοντες (transcription factors)**.

Η μεταγραφή γίνεται σε τρία στάδια

- Εναρξη της μεταγραφής
- Επιμήκυνση της αλυσίδας RNA
- Τερματισμός μεταγραφής

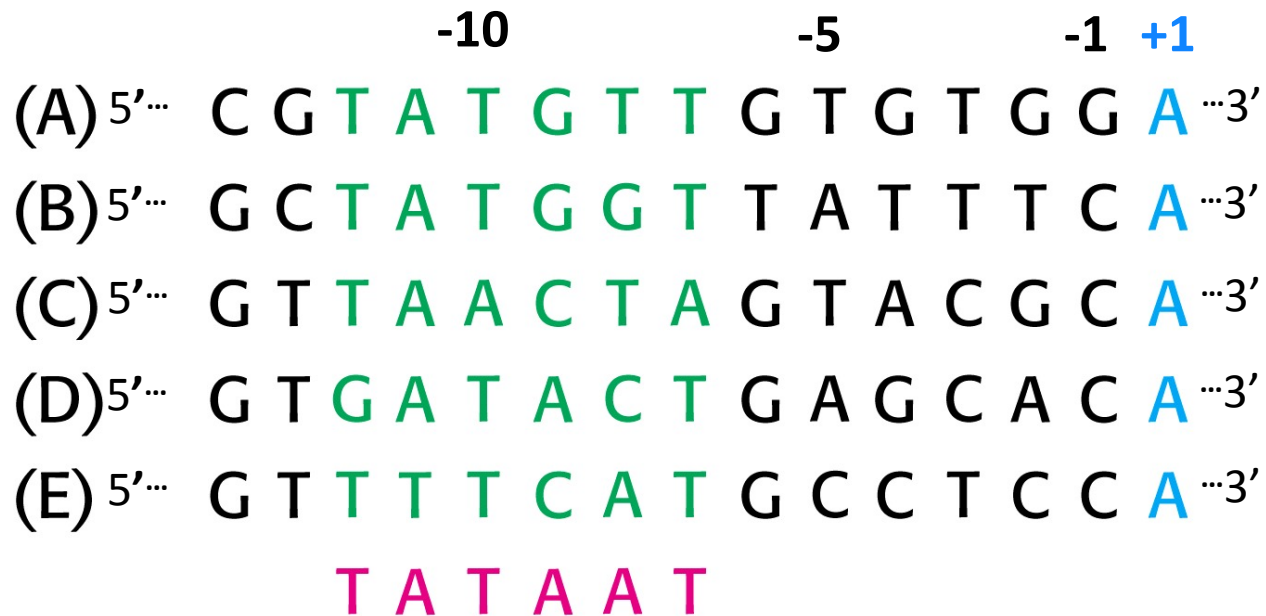
Η έναρξη της μεταγραφής

Η μεταγραφή ξεκινά σε προαγωγείς στο DNA



Πλαίσιο Prinbow

Εναρξη
μεταγραφής



Η πολυμεράση του RNA (RNA πολυμεράση, RNAP) είναι το ένζυμο-κλειδί της μεταγραφής

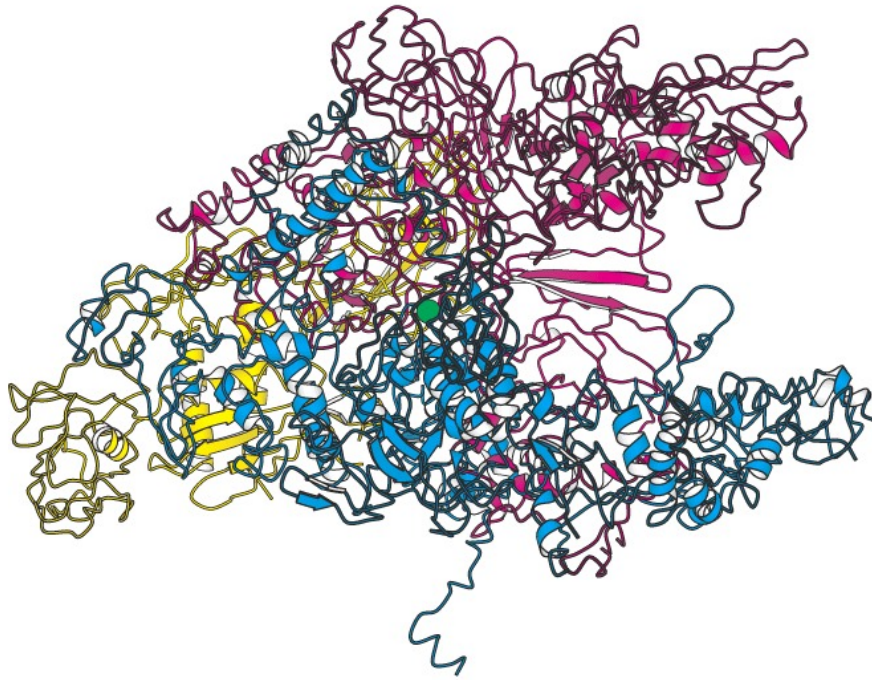
- Καταλύουν την ίδια αντίδραση



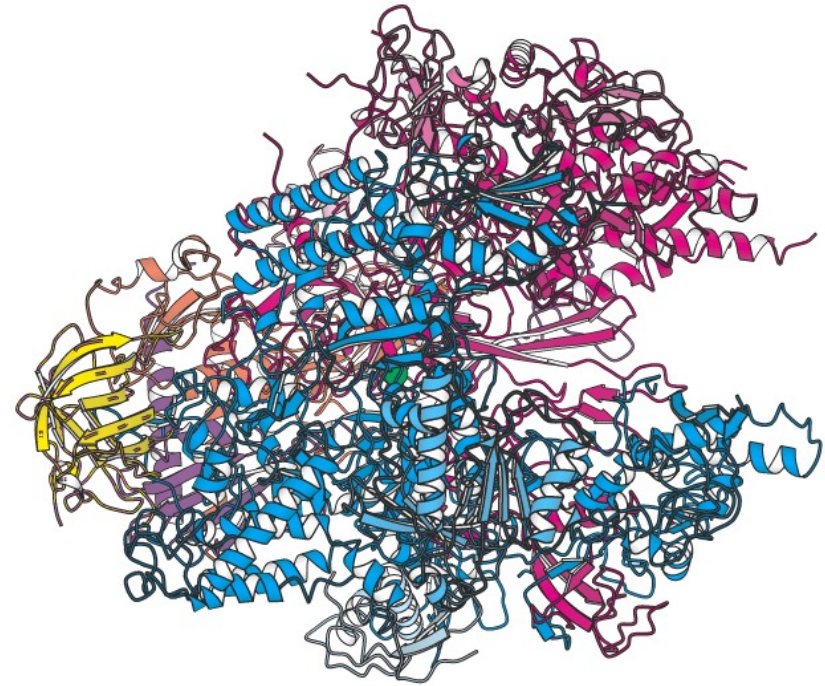
- NTP ο πρώτος τριφωσφορικός νουκλεοζίτης ενσωματώνεται ολόκληρος, XTP οποιοσδήποτε τριφωσφορικός νουκλεοζίτης
- Τα ATP, GTP, CTP, UTP είναι τα υποστρώματα των RNAP
- Συνθέτουν από την αρχή και επιμηκύνουν μια αλυσίδα RNA

Διαφορές RNA και DNA πολυμερασών

	RNAP	PοI (DNAP)
Σύνθεση νέου κλώνου από την αρχή	ΝΑΙ	ΟΧΙ (μόνο σε προϋπάρχοντα μόρια RNA ή DNA)
Επιδιορθωτική ικανότητα	ΟΧΙ	ΝΑΙ



Prokaryotic RNA polymerase



Eukaryotic RNA polymerase

Η RNA πολυμεράση της *E.coli*

Υπομονάδα	Γονίδιο	Αριθμός	Μάζα (kDa)
α	<i>rpoA</i>	2	37
β	<i>rpoB</i>	1	151
β'	<i>rpoC</i>	1	155
σ (σ ⁷⁰)	<i>rpoD</i>	1	70

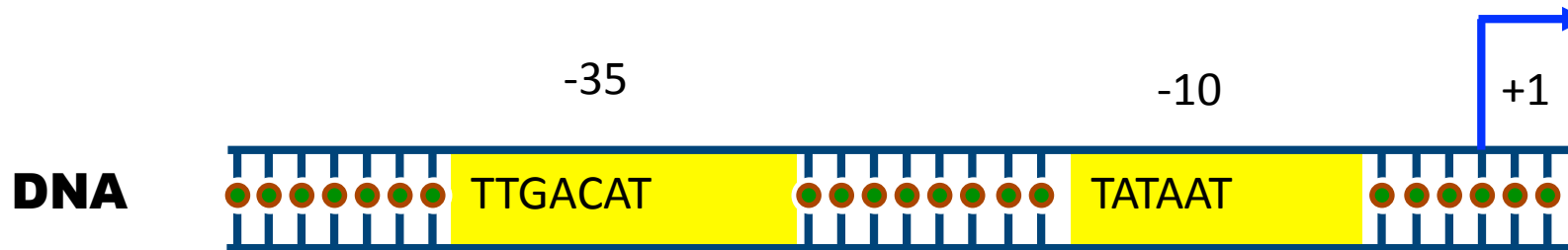
Τετραμερής πρωτεΐνη α₂ββ'

Ο παράγοντας σ αναγνωρίζει τον προαγωγό

Ολοένζυμο: το σύμπλοκο α₂ββ'σ

Ο παράγοντας σ αναγνωρίζει δύο περιοχές

5' ⁻³⁵ T T G A C A ⁻¹⁰ T A T A A T ⁺¹ Θέση έναρξης
Pribnow



Η μεταγραφή στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς

Ευκαρυωτικές RNA πολυμεράσες

• Σύνθετα ένζυμα (αποτελούνται από πολλές υπομονάδες)

• Καταλύουν την ίδια αντίδραση



• Όλα τα προϊόντα του συντίθενται ως πρόδρομα μόρια που κατόπιν ωριμάζουν και δίνουν το τελικό προϊόν

• Δεν περιέχουν υπομονάδα ανάλογη του παράγοντα σ. Αρα χρειάζονται βοηθητικούς παράγοντες, οι οποίοι αναγνωρίζουν τον κατάλληλο προαγωγό

• Τα πρόδρομα RNA υφίστανται τροποποιήσεις τόσο κατά όσο και μετά τη μεταγραφή και έτσι **ωριμάζουν** δίνοντας το τελικό προϊόν

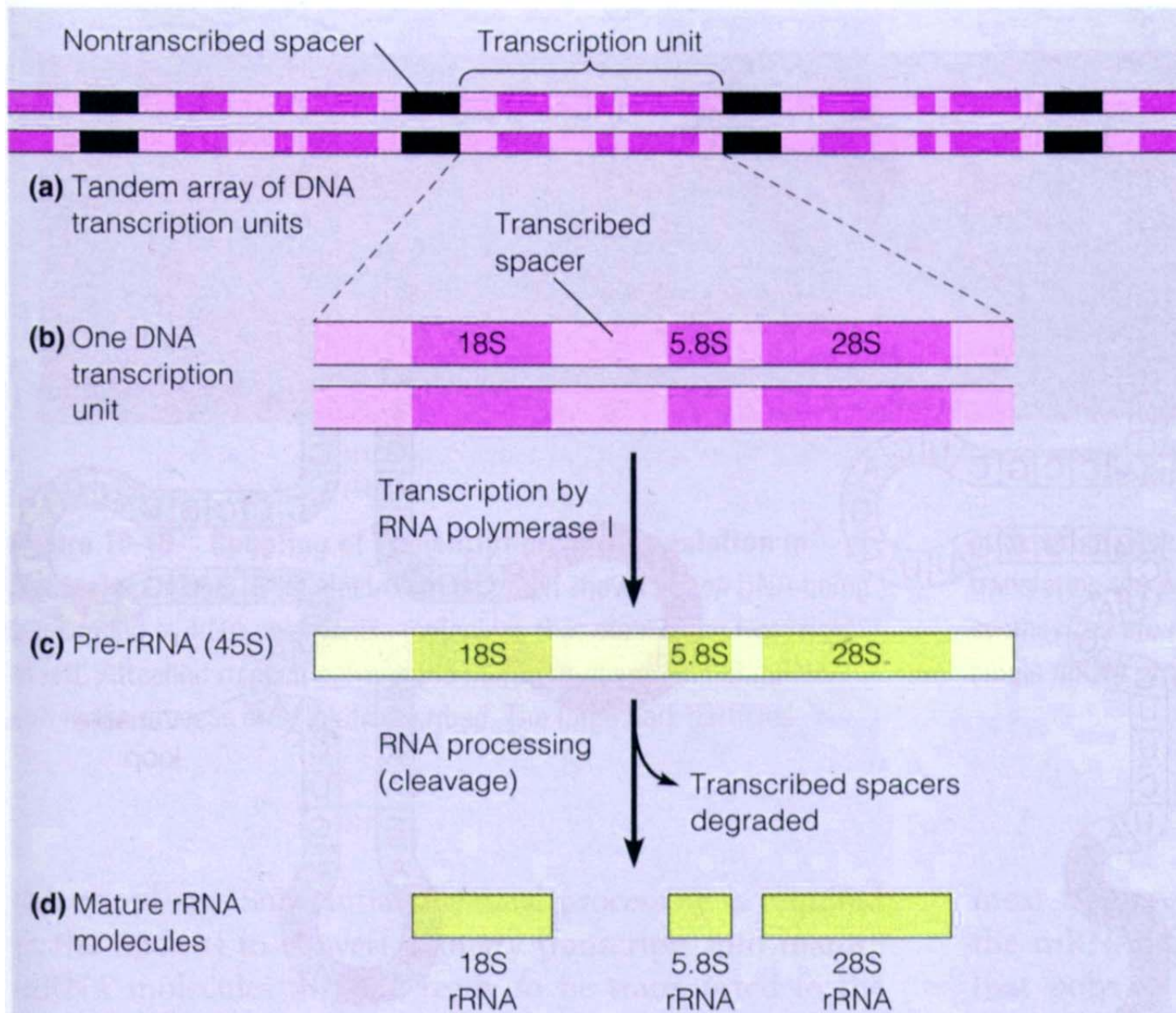
RNA πολυμεράσες ευκαρυωτικών οργανισμών

Τύπος	Εντοπισμός	Κυτταρικά μετάγραφα
I	Πυρηνίσκος	18S, 5.8S και 28S rRNA
II	Πυρηνόπλασμα	πρόδρομα mRNA και snRNA
III	Πυρηνόπλασμα	tRNA και 5S rRNA

RNA πολυμεράση I

- Ριβοσωμικό RNA (rRNA) ~ 80% συνολικού RNA
- Η μεταγραφή του γίνεται στον πυρηνίσκο
- Η RNAP I συνθέτει τα:
 - 5,8S και 28S rRNA (μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα)
 - 18S rRNA (μικρή ριβοσωμική υπομονάδα)

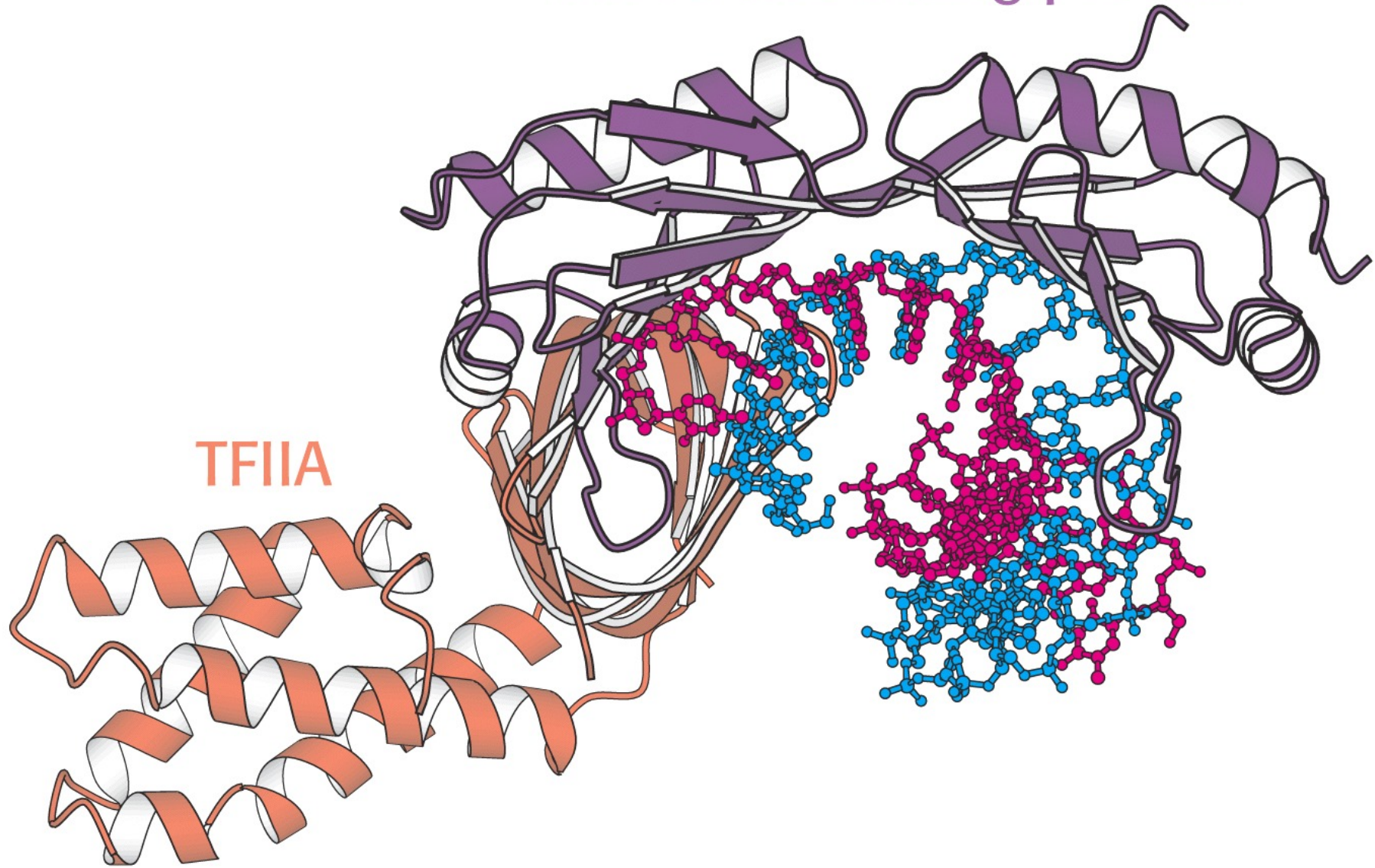
RNA πολυμεράση I



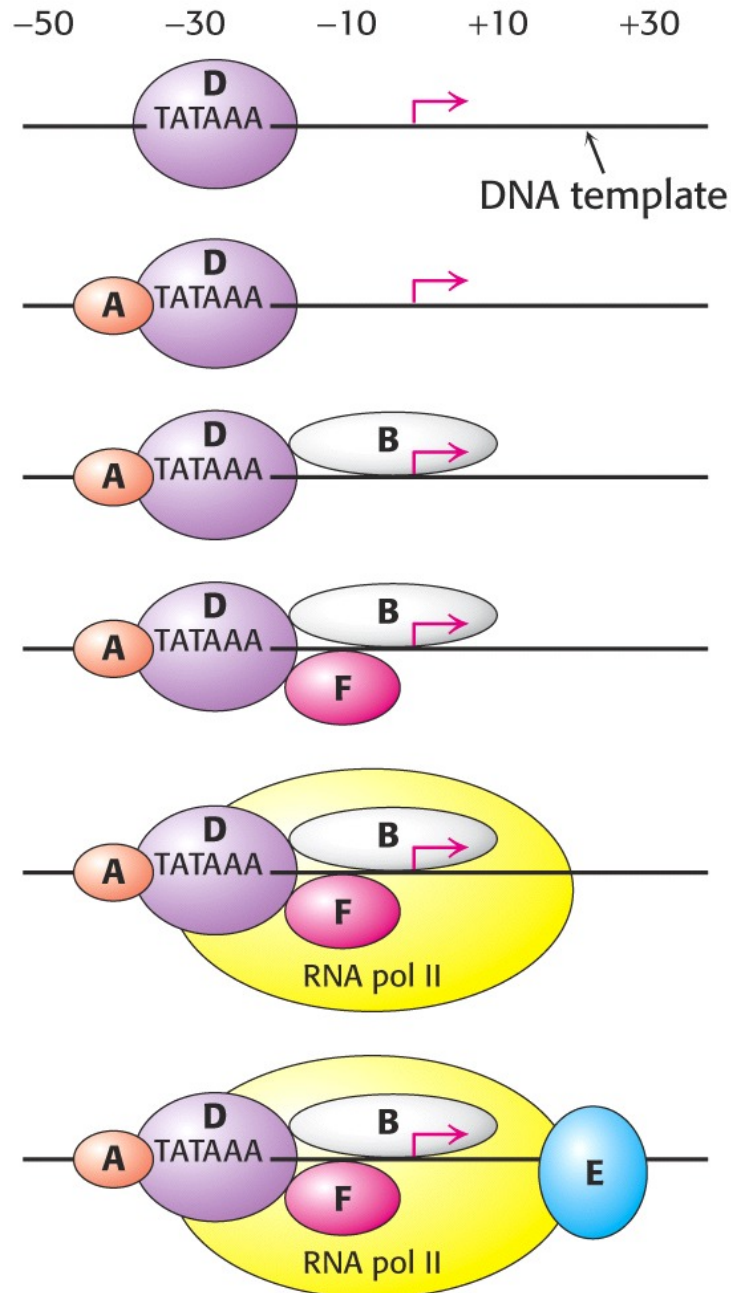
RNA πολυμεράση II

- Συνθέτει (μεταγράφει) τα πρόδρομα μόρια mRNA (pre-mRNA)
- Μεταγράφει μεγάλη ποικιλία γονιδίων, άρα
- Η δέσμευσή της στο εκμαγείο ελέγχεται:
 - από μεγάλο αριθμό *cis*-δραστικών στοιχείων (εκτός του βασικού προαγωγού)
 - από σημαντικό αριθμό *trans*-παραγόντων μεταγραφής)

TATA-box-binding protein



Μεταγραφικοί παράγοντες



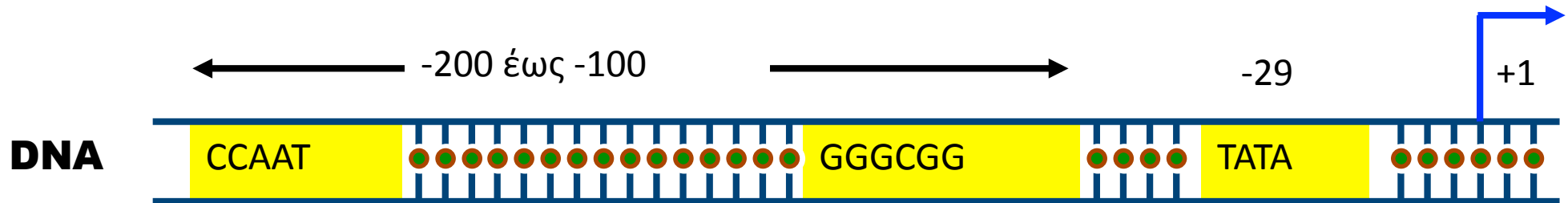
Πάνω σε αυτές τις αλληλουχίες δεσμεύονται πολλοί πρωτεϊνικοί παράγοντες οι οποίοι καλούνται **παράγοντες μεταγραφής (transcription factors)**

Οι παράγοντες αυτοί διευκολύνουν την δέσμευση της RNA πολυμεράσης και την αναγνώριση των προαγωγέων για την έναρξη της μεταγραφής

Ρόλος *cis*-δραστικών στοιχείων

- Βρίσκονται πάντα ανοδικά (upstream) κατά εκατοντάδες ή και χιλιάδες βάσεις μακριά από τη θέση έναρξης
- Ενισχυτές (enhancers): ενεργοποιούν τη μεταγραφή
- Σιγαστήρες (αποσιωποητές, silencers): παρεμποδίζουν τη μεταγραφή
- Υπάρχουν προαγωγοί και **μέσα** (downstream) στο γονίδιο (RNAP III)

Στοιχεία προαγωγού ευκαρυωτικής RNAP II

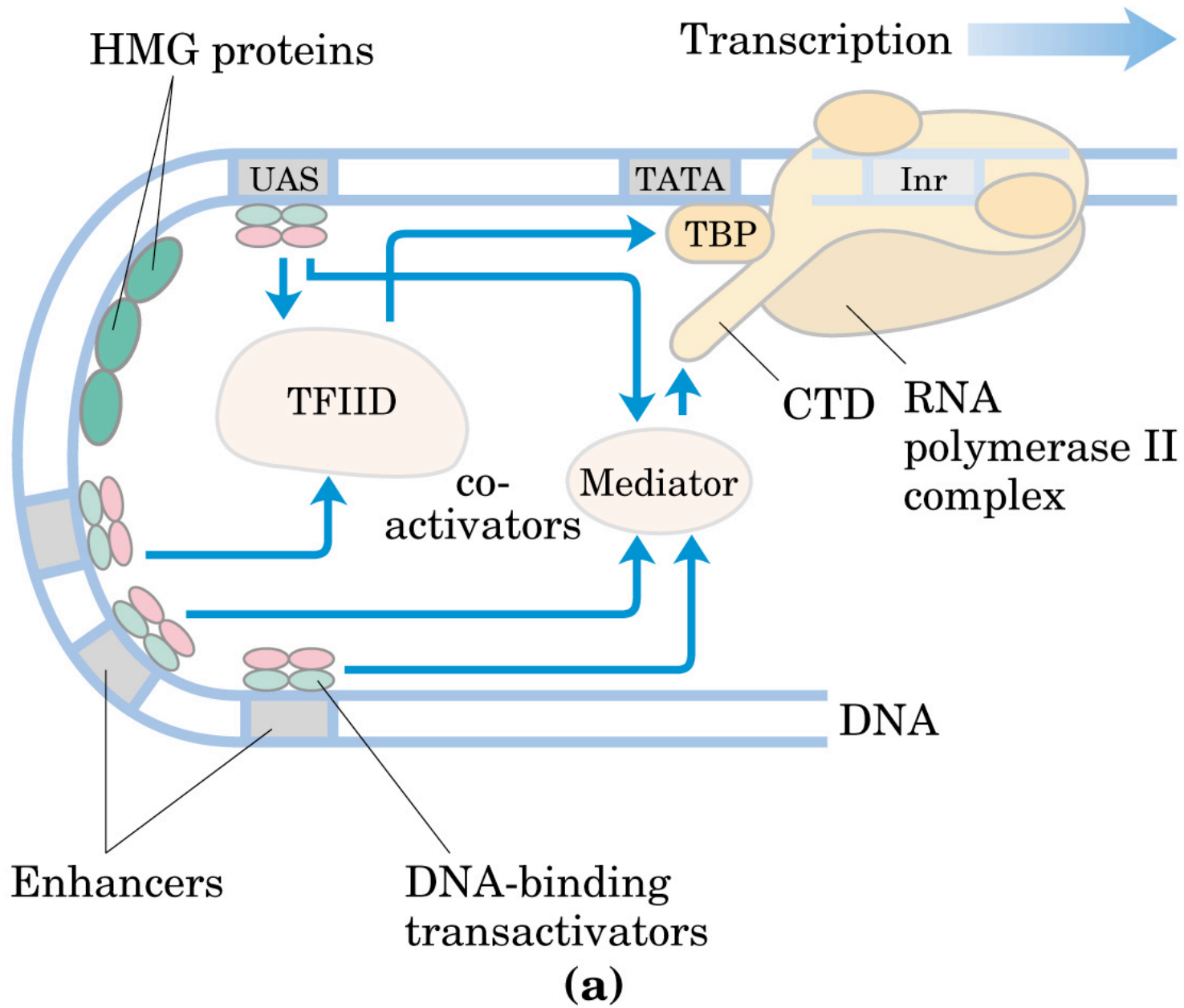


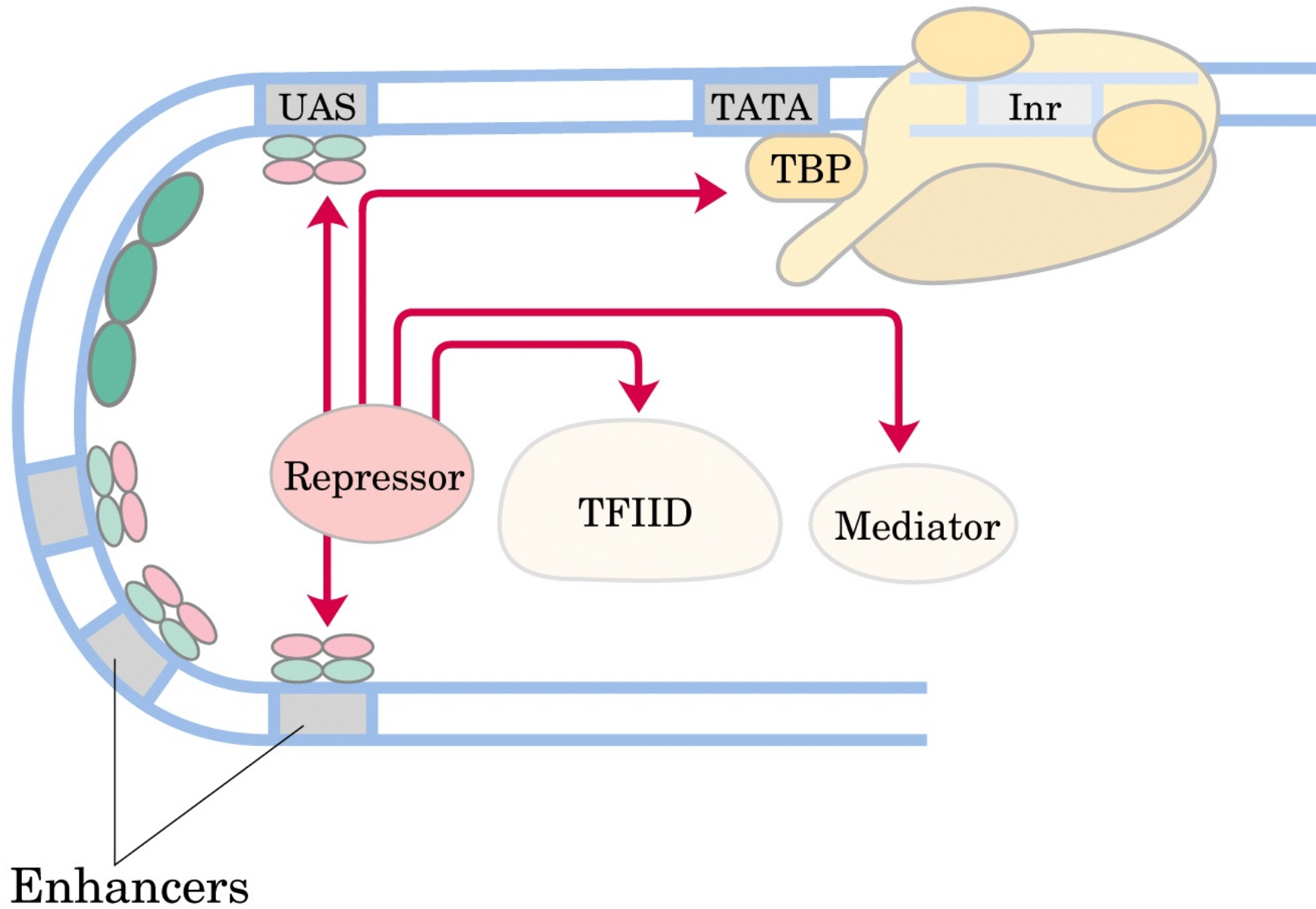
5' G G N C A A T C T 3'

CAAT box

5' G G G C G G 3'

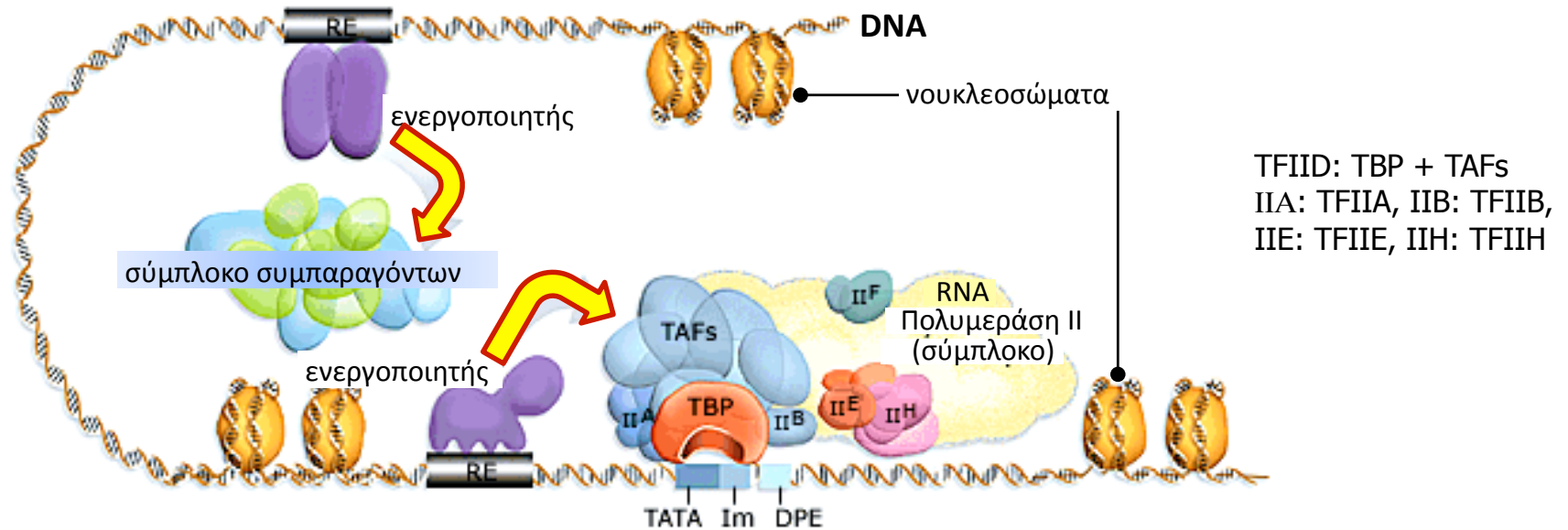
GC box





(b)

RNA πολυμεράση II και μεταγραφή



Η περιοχή έναρξης περιλαμβάνει τη συναινετική αλληλουχία (consensus sequence):



όπου Y=πυριμιδίνη, N= οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο

RNA πολυμεράση III

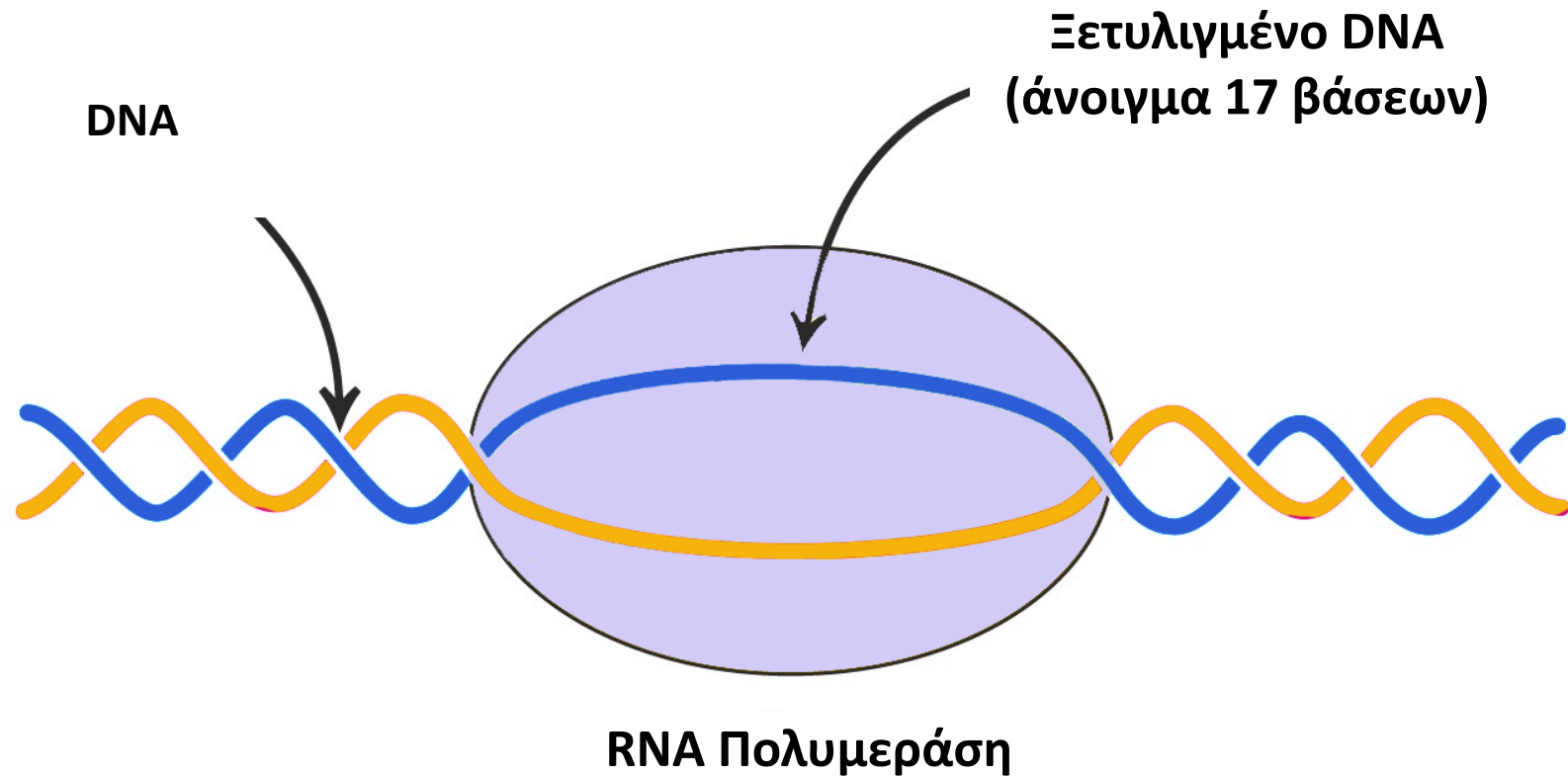
- Συνθέτει 5S rRNA (ένα γονίδιο)
tRNA (τα γονίδιά τους περιέχουν ιντρόνια)
snRNAs (τροποποιήσεις σε βάσεις, κυρίως U)
- Τρεις κατηγορίες προαγωγών
καθοδικά από το σημείο έναρξης
- Η διαδικασία ελέγχεται από γενικούς παράγοντες
μεταγραφής (TFIIIA, B, C, κλπ)
- Τερματισμός ανάλογος με προκαρυωτική RNAP

Η επιμήκυνση της μεταγραφής

Επιμήκυνση μεταγραφής

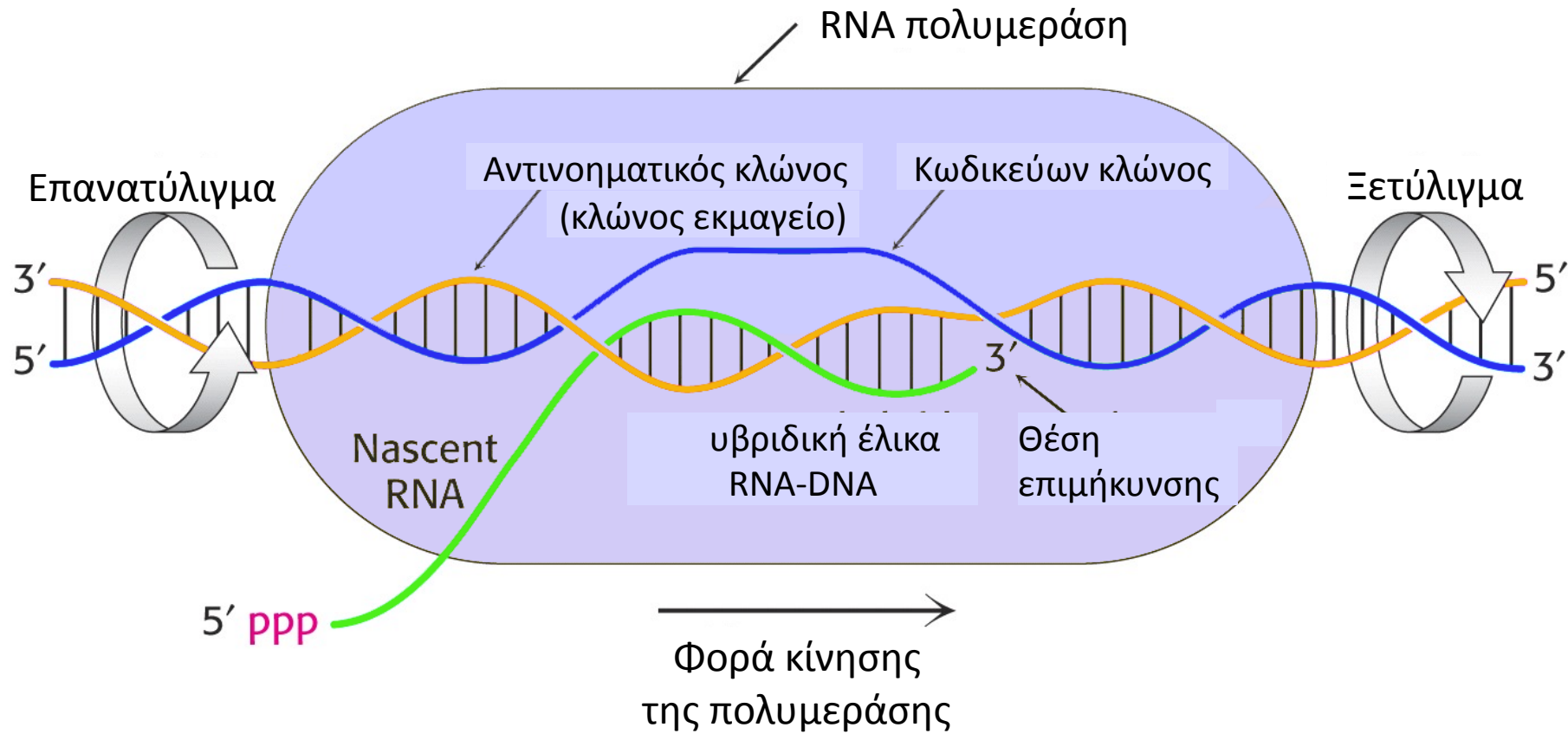


Φυσαλίδα μεταγραφής: ξετύλιγμα του DNA



Η RNA πολυμεράση ξεδιπλώνει το DNA κατά περίπου 2 στροφές πριν αρχίσει η σύνθεση του RNA

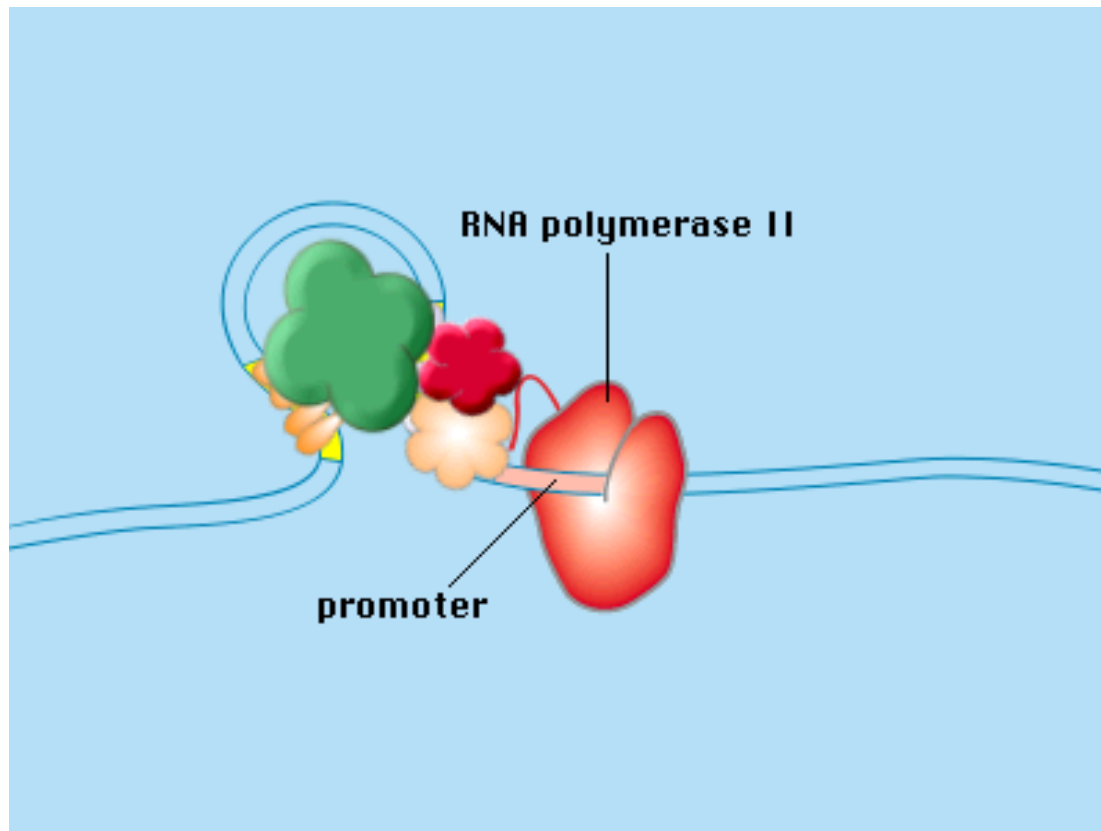
**Φυσαλίδα μεταγραφής (Transcription bubble):
Η RNA πολυμεράση συνθέτει RNA με φορά 5'→3'**



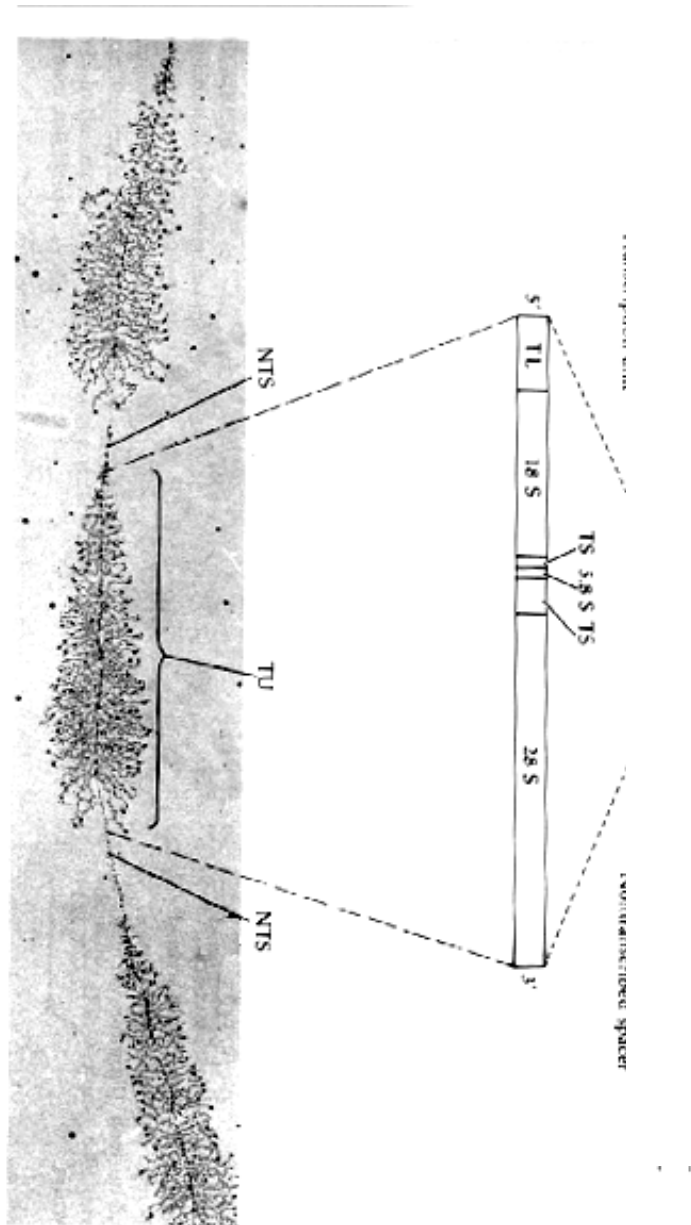
Οι αλυσίδες του RNA αρχίζουν με pppG ή pppA

Διεργασίες κατά την επιμήκυνση του RNA

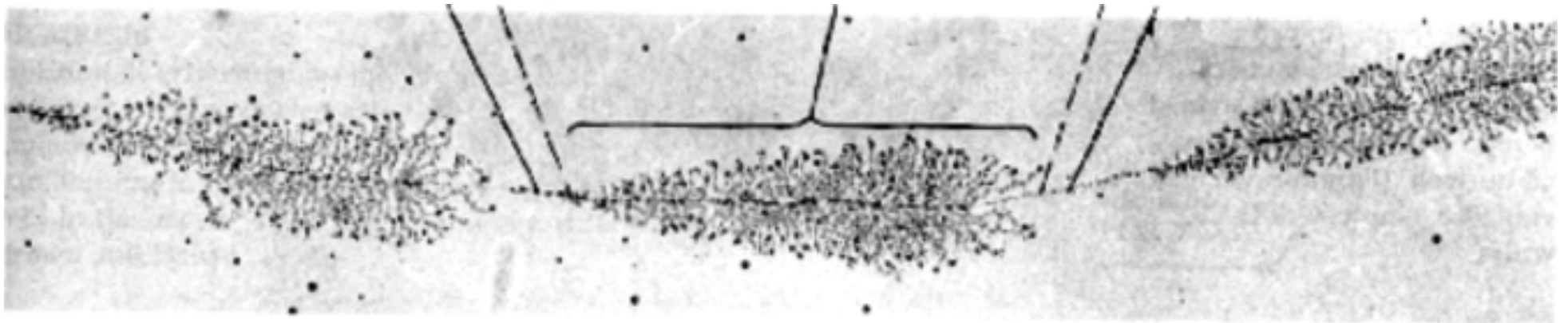
- Επιλογή από την RNAP του κατάλληλου (συμπληρωματικού) τριφωσφορικού ριβονουκλεοτιδίου βάσει της αλληλουχίας του αντισηματικού κλώνου.
- Ενσωμάτωση του επιλεγμένου ριβονουκλεοτιδίου στην υπό σύνθεση αλυσίδα
- Μετακίνηση της RNAP στο επόμενο ζεύγος βάσεων του εκμαγείου
- αποκατάσταση των δεσμών H των βάσεων DNA που πλέον βρίσκονται έξω (πίσω) από τη φυσαλίδα μεταγραφής λόγω μετακίνησης της RNAP



Η σύνθεση του RNA, *live*



Η σύνθεση του RNA, *live*



- DNA;
- Φορά σύνθεσης;
- Αρχή, τέλος;
- Κλαδια;
- Αριθμός ενζύμων;

Ο τερματισμός της μεταγραφής

Ο τερματισμός της μεταγραφής

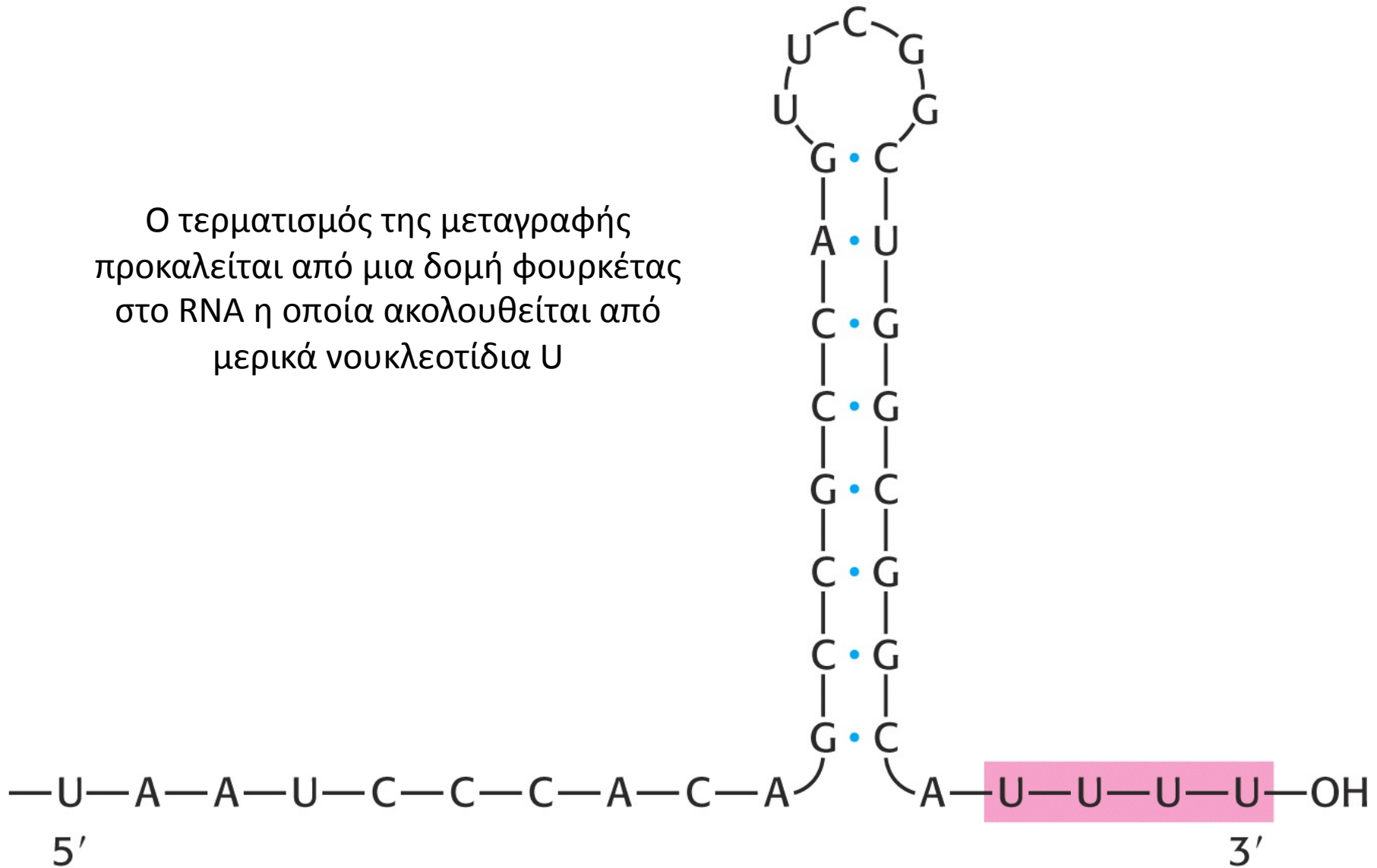
- Αναστολή λόγω δευτεροταγών διαμορφώσεων
- Παρουσία σημάτων τερματισμού στο εκμαγείο
- Αποκοπή μεταγραφήματος

Ο τερματισμός της μεταγραφής στους προκαρυωτικούς μηχανισμούς

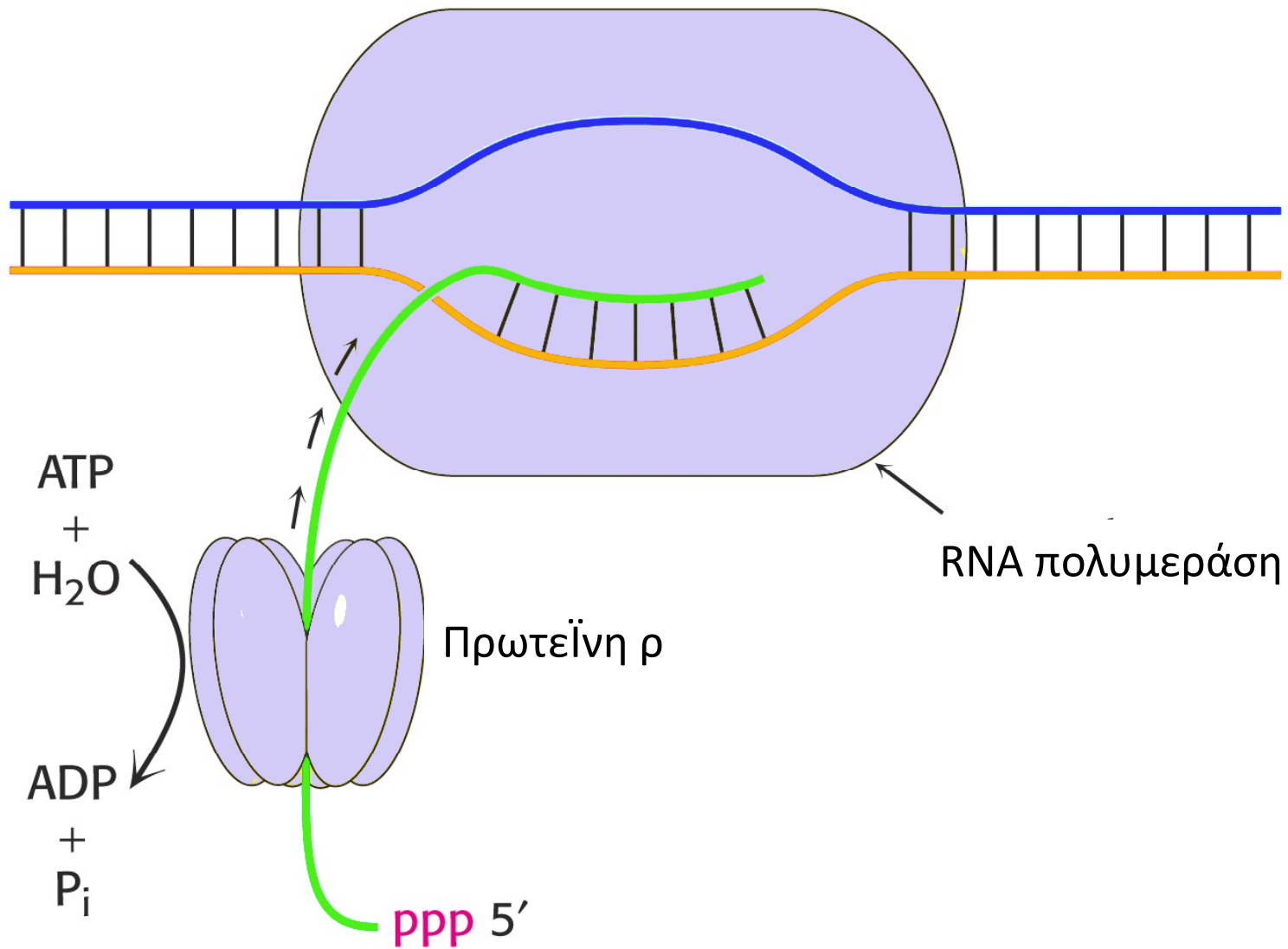
- Αναστολή λόγω δευτεροταγών διαμορφώσεων
- Παρουσία σημάτων τερματισμού στο εκμαγείο

Ο τερματισμός της μεταγραφής

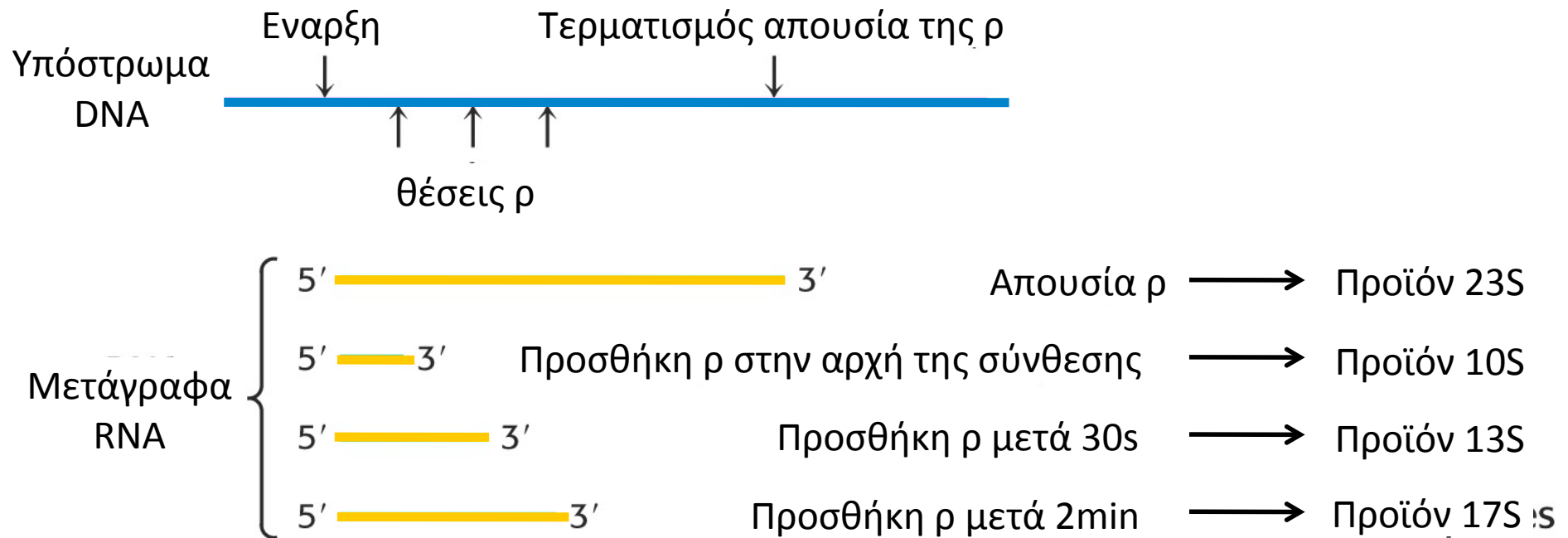
Ο τερματισμός της μεταγραφής προκαλείται από μια δομή φουρκέτας στο RNA η οποία ακολουθείται από μερικά νουκλεοτίδια U



Ο τερματισμός της μεταγραφής από την πρωτεΐνη ρ



Η πρωτεΐνη ρ (RHO) βοηθά στον τερματισμό της μεταγραφής ορισμένων γονιδίων



Βασικές διαφορές μεταγραφής μεταξύ προκαρυωτικών - ευκαρυωτικών οργανισμών

Προκαρυωτικοί

Μία RNA πολυμεράση

Απευθείας δέσμευση της
πολυμεράσης στον προαγωγό

Οπερόνια

Απλή σχετικά δομή προαγωγών

Ευκαρυωτικοί

Τρεις RNA πολυμεράσες (RNAP)
RNAP I, RNAP II, RNAP III

Σύνδεση RNAP στον προαγωγό μέσω
ενός μεγάλου αριθμού μεταγραφικών
παραγόντων.

Μονοκιστρονικά μόρια mRNA

Πολύπλοκη δομή προαγωγών/
cis-δραστικών στοιχείων

Αλληλουχία TATA (θέση -29)

Αλληλουχίες GGGCGG/CCAAT

Ωρίμανση RNA



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

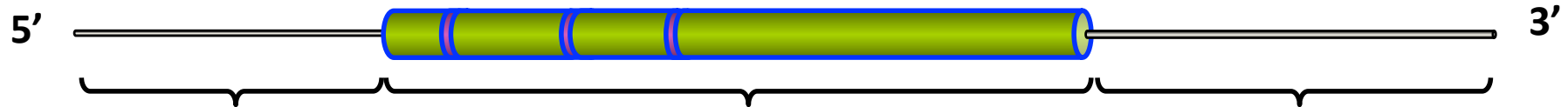


3. Η ωρίμανση των RNAs

Νικόλαος Μπαλατσός

ΩΡΙΜΑΝΣΗ mRNA

Μετάγραφα γονιδίων



5' μη μεταφραζόμενη περιοχή
(5' untranslated region, 5'UTR)

Παίζει ρυθμιστικό ρόλο

Κωδικεύουσα περιοχή
(coding region)
ή
Ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης

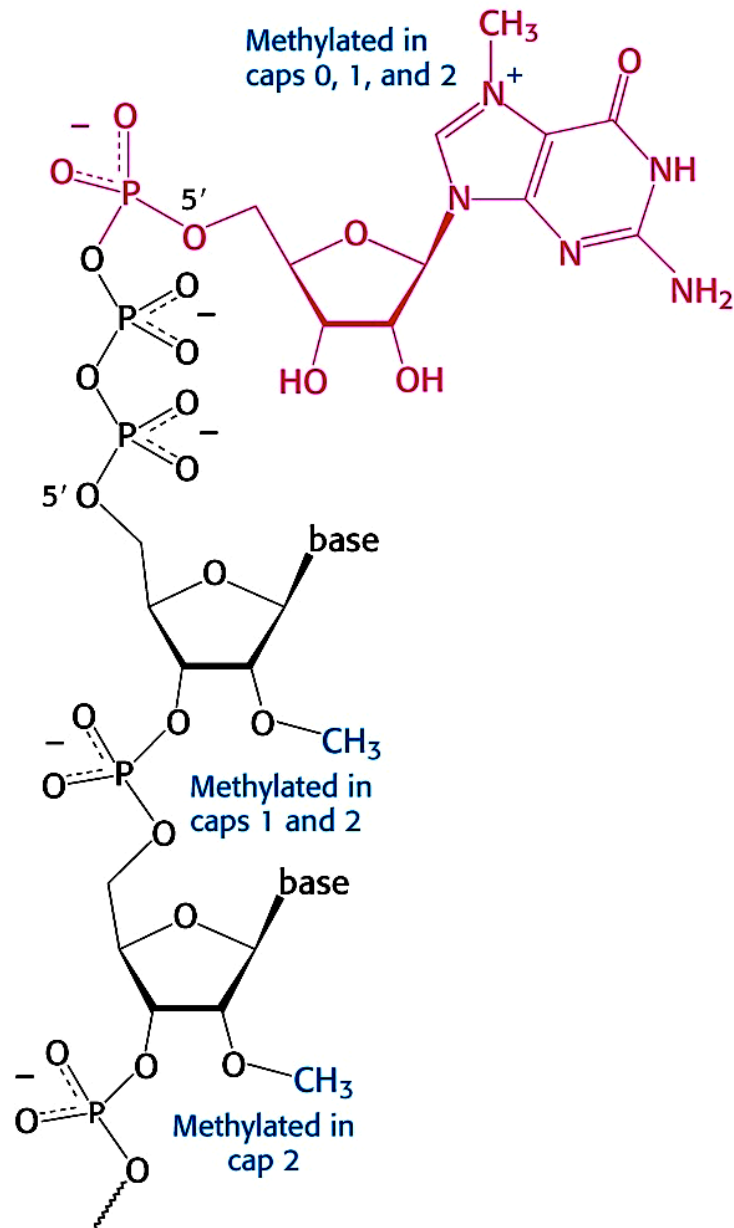
(open reading frame)

Η περιοχή αυτή μεταφράζεται σε πρωτεΐνη

3' μη μεταφραζόμενη περιοχή
(3' untranslated region, 3'UTR)

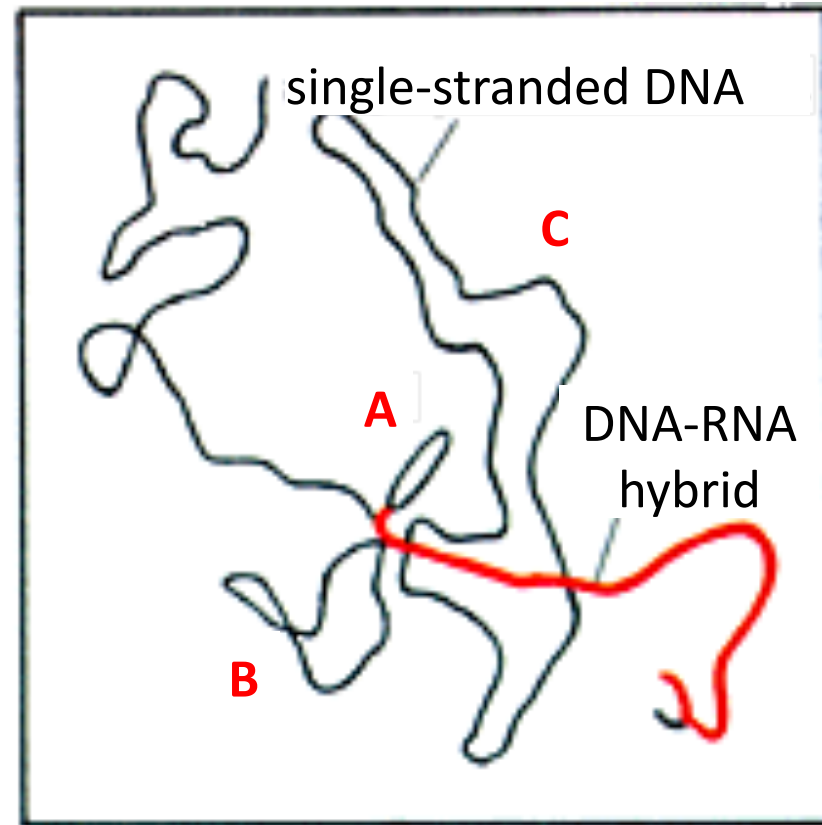
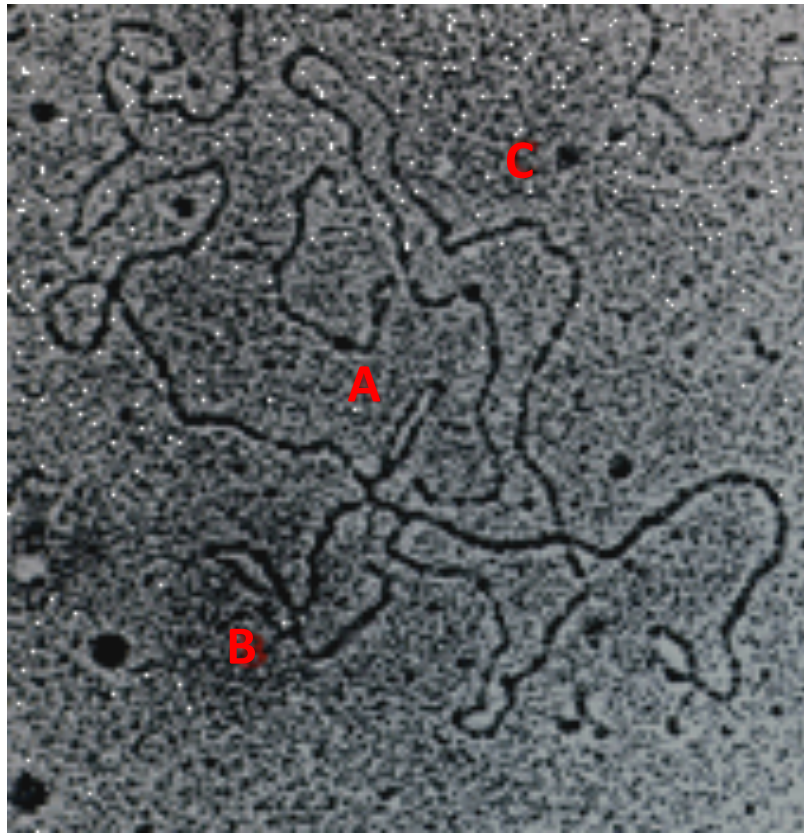
Παίζει ρυθμιστικό ρόλο

5' κάλυμμα (cap)

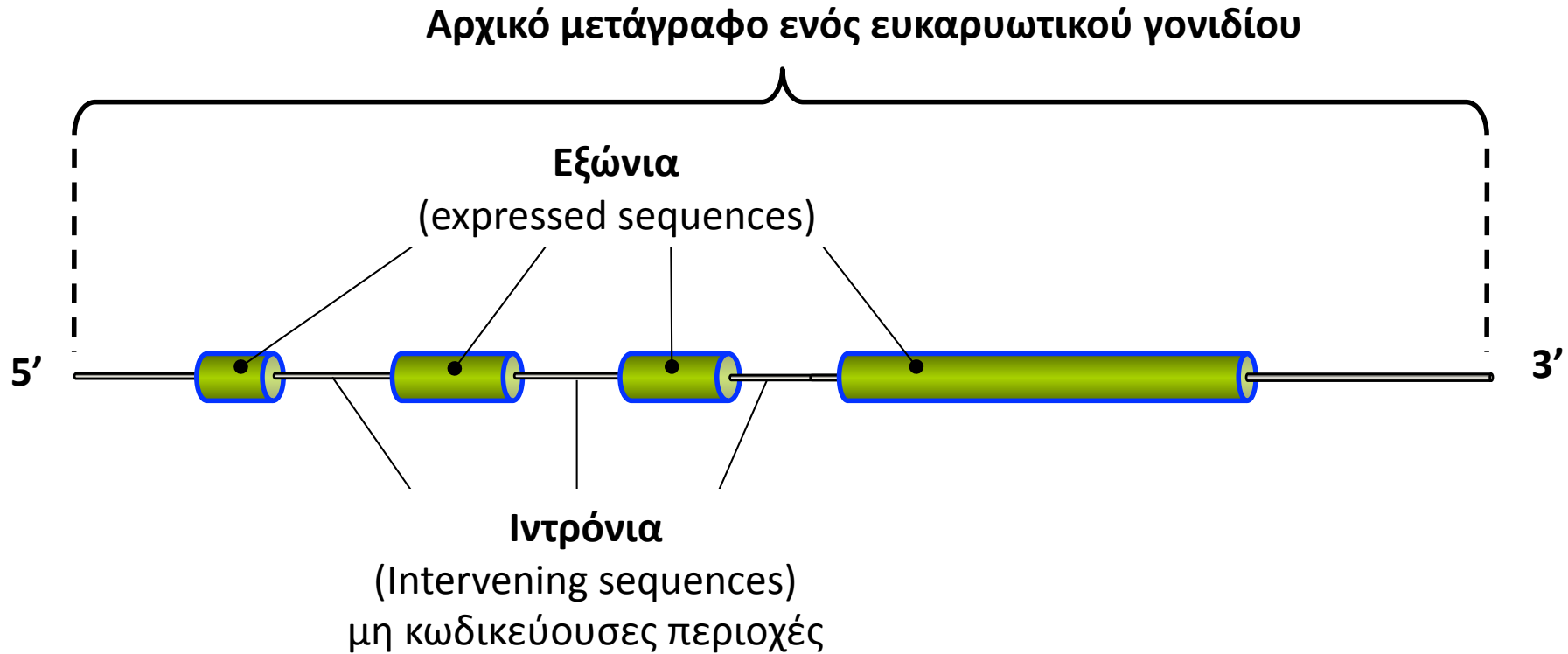


- Προστασία από αποικοδόμηση
- Συμμετοχή στο μάτισμα
- Εξοδος στο κυτταρόπλασμα
- Προώθηση μετάφρασης
- Συμμετοχή σε μηχανισμούς αποικοδόμησης

Ασυνεχή γονίδια (split genes) ευκαρυωτικών οργανισμών



Μονάδα μεταγραφής ευκαρυωτικών γονιδίων



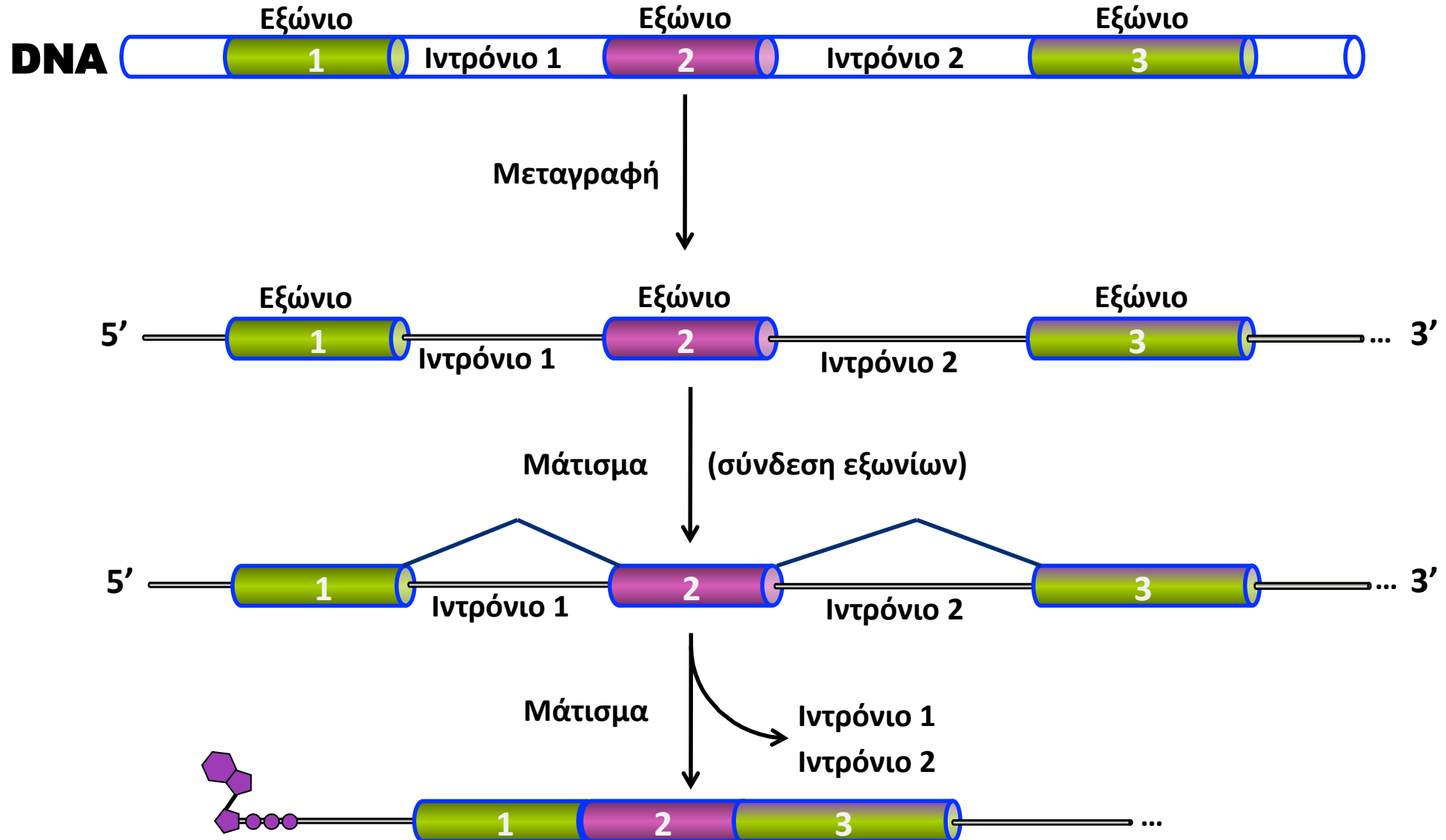
Σε γονίδια ανθρώπου:

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

Εξώνια μήκους ~1500 βάσεων

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.



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

Η σύνθεση του RNA στη *Drosophila*, live

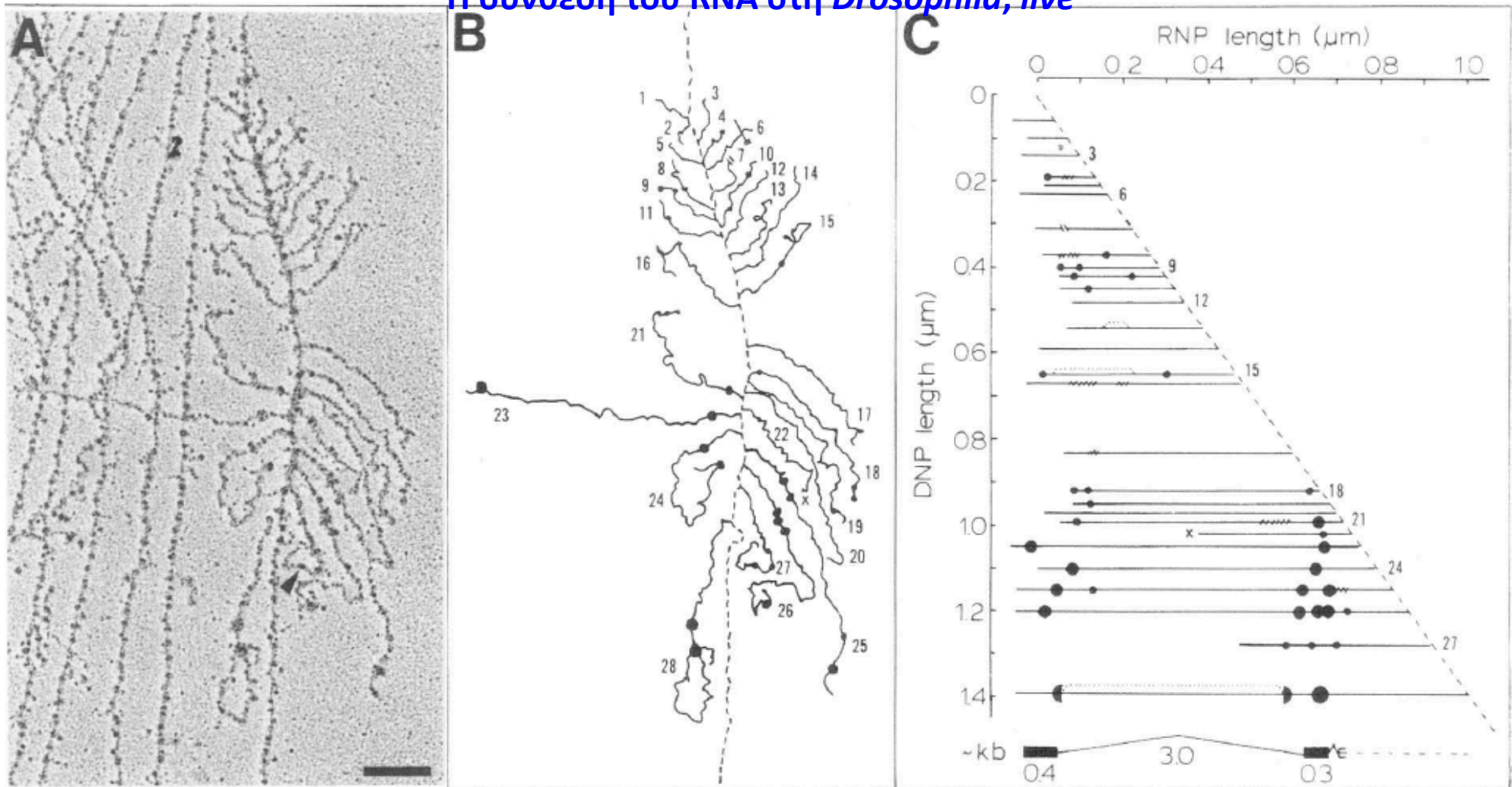


Figure 1. General phenomenon of loop formation and removal. (A) Electron micrograph of a *Drosophila* embryo transcription unit. Arrowhead indicates possible small particle at site of proposed intron excision. Bar represents 0.2 μm . (B) Interpretive tracing of micrograph. (---) Template chromatin; (—) RNP fibrils; (●) RNP particles; (x) 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*

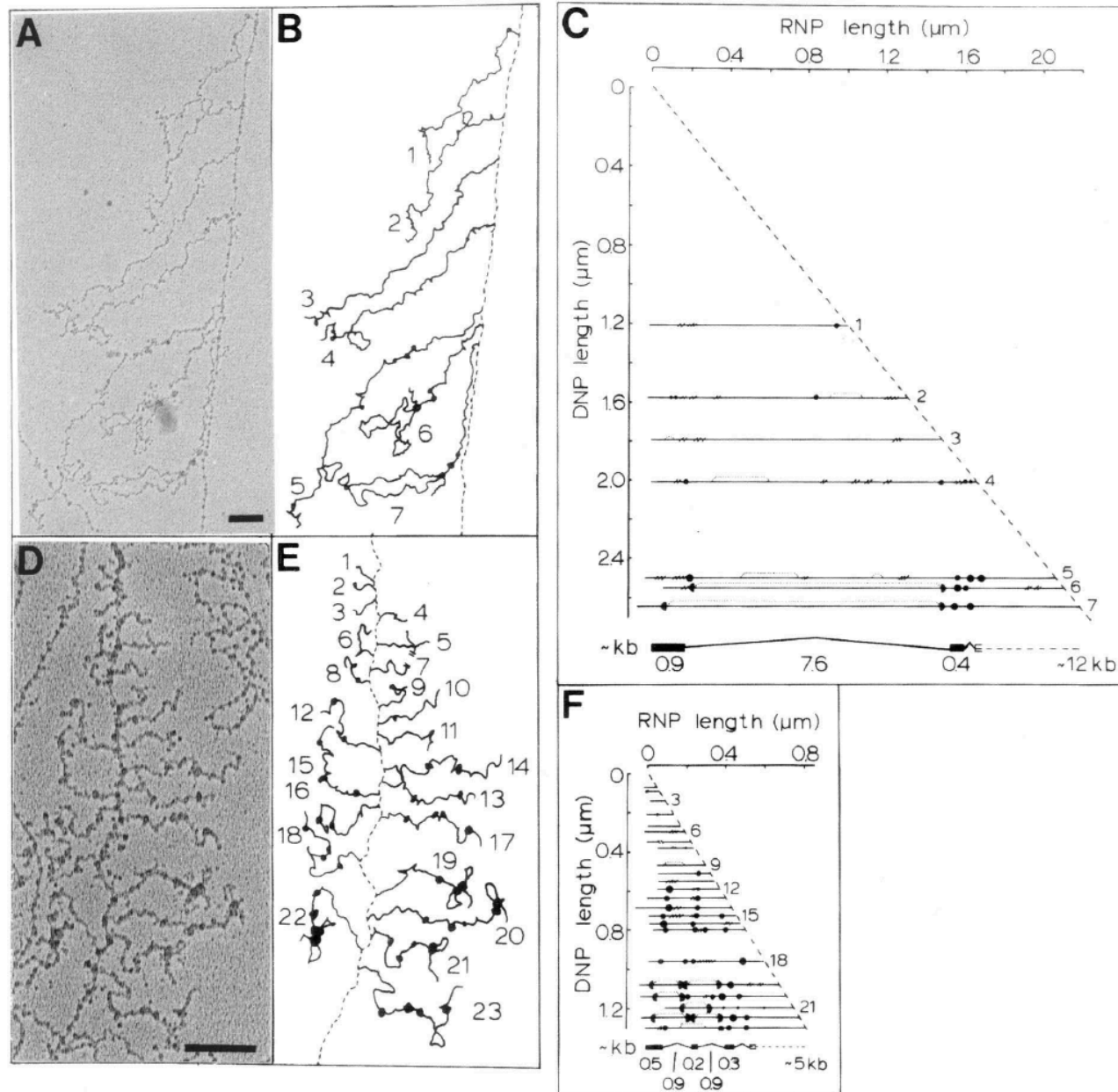


Figure 2. RNP particle deposition at splice junction regions follows 3' splice site synthesis for both long and short introns. (A,D) Electron micrographs of two different *Drosophila* embryo transcription units. Bars represent 0.2 μm. (B,E) Interpretive tracing of EMs in A and D, respectively. (C,F)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

Εναλλακτικό μάτισμα (alternative splicing)

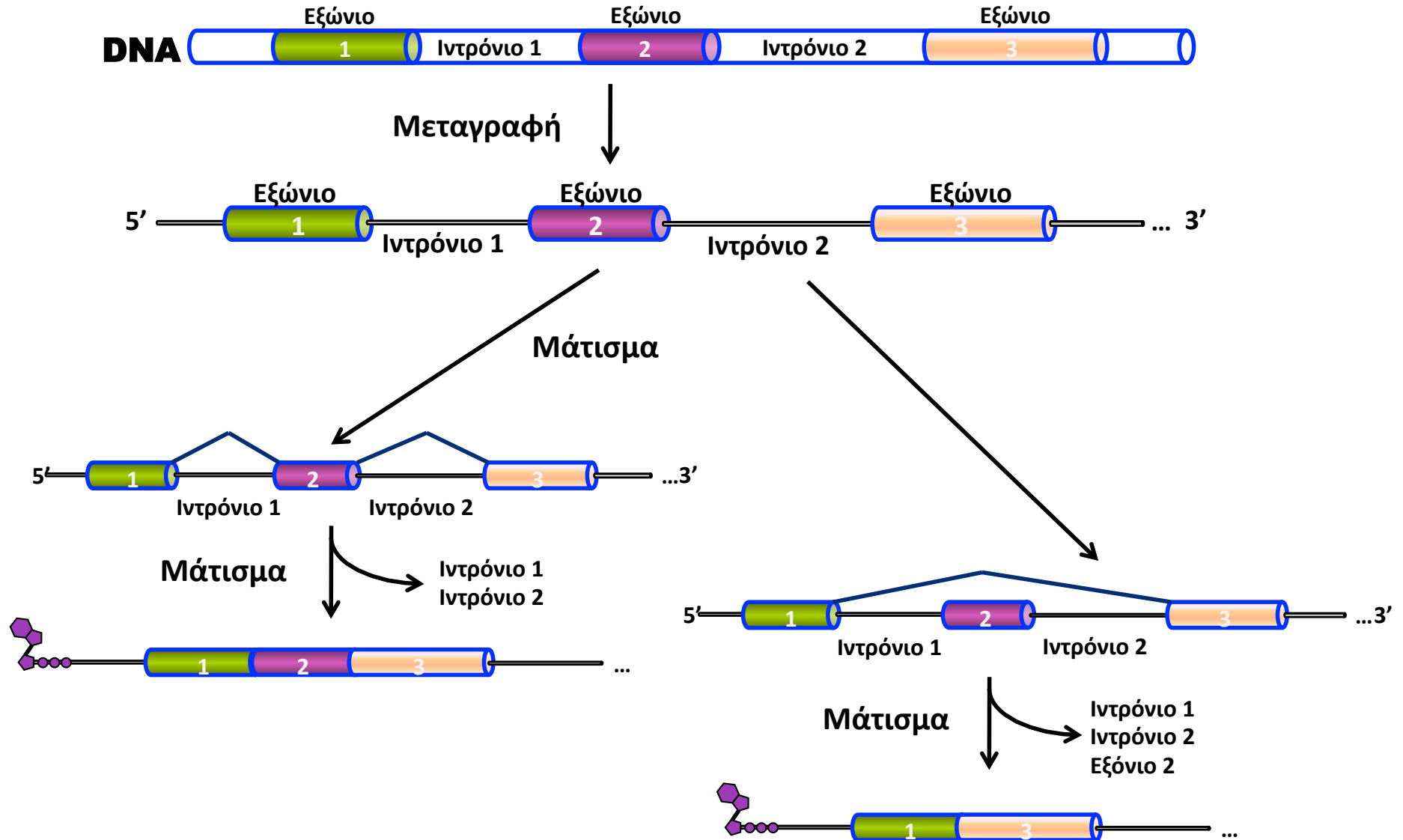
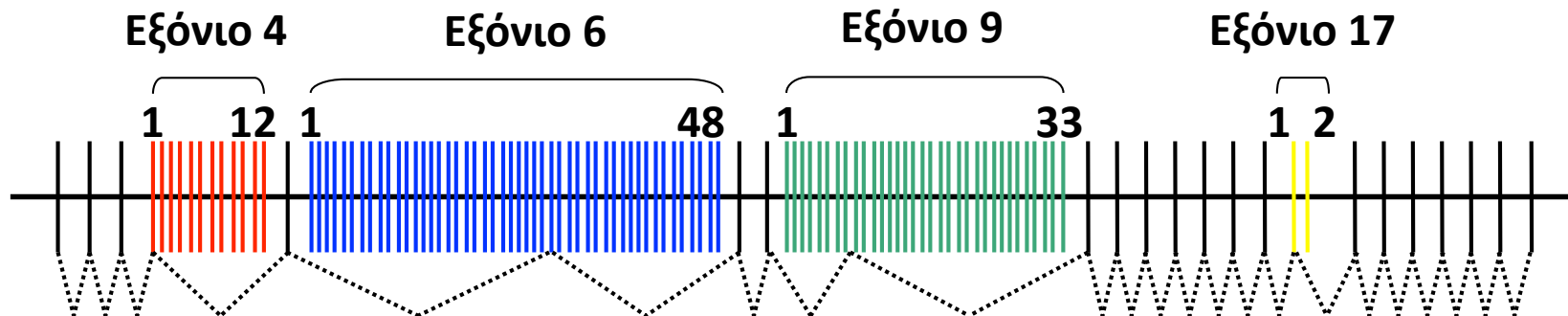
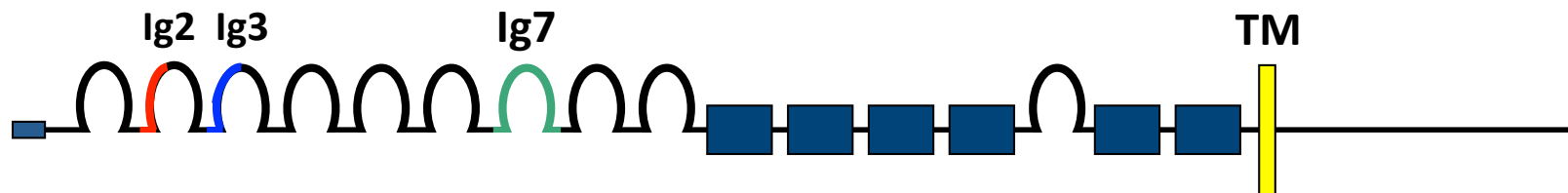
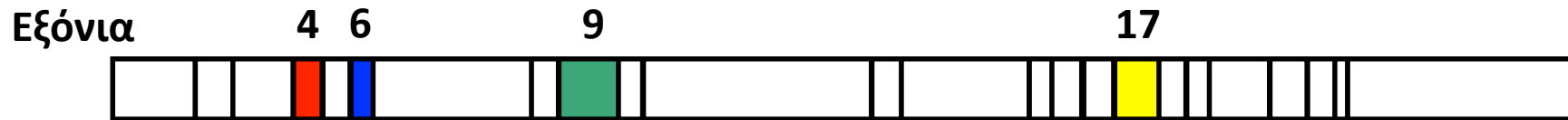


TABLE 28.4 Selected proteins exhibiting alternative RNA splicing

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*



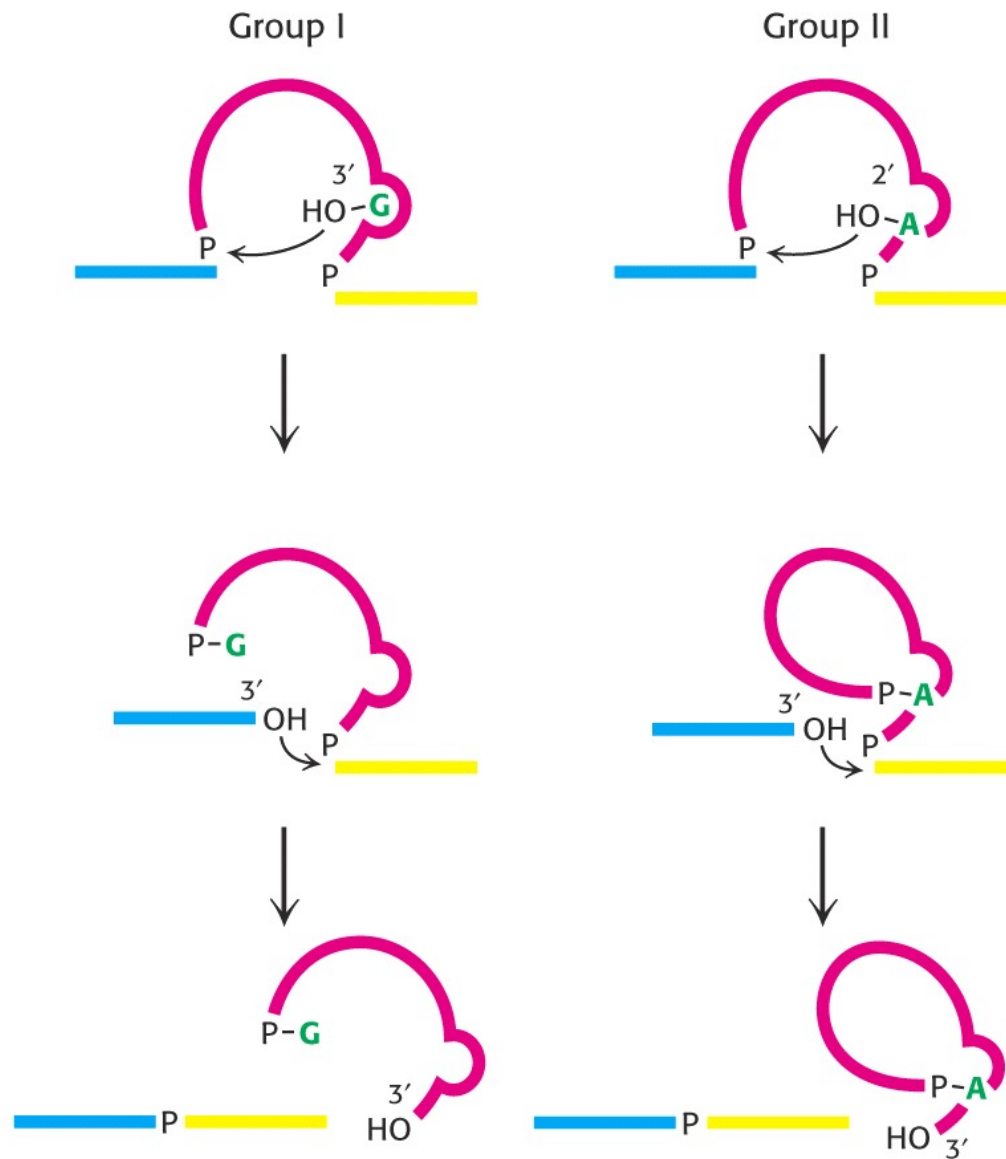
Schmucker et al. *Cell* 2000; 101: 671-684

$12 \times 48 \times 33 \times 2 = 38.016$ mRNAs/πρωτεΐνες (!)

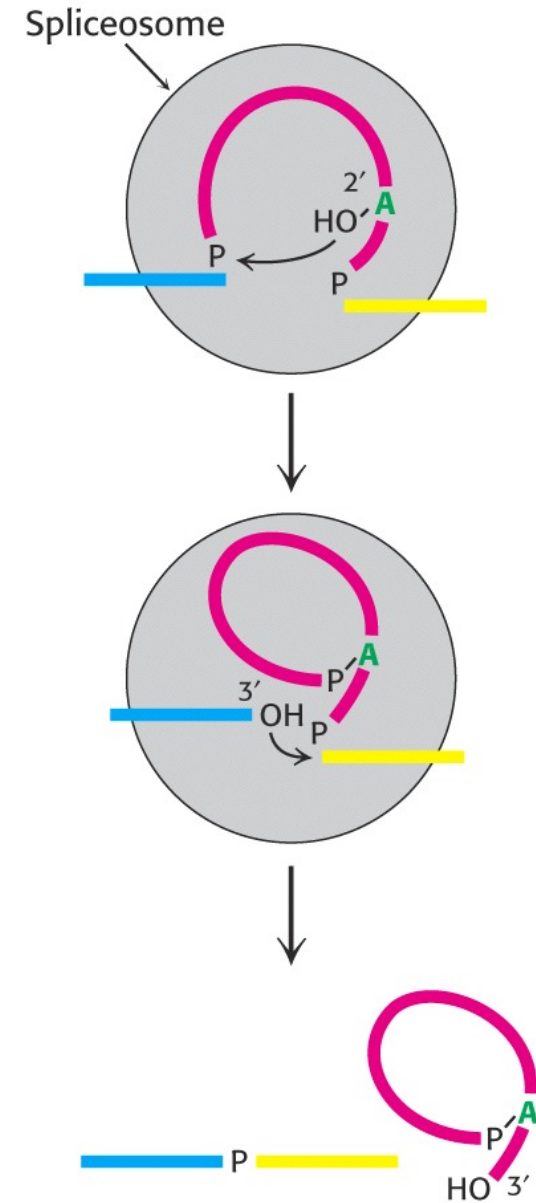
(TM: Διαμεμβρανική περιοχή (TransMembrane region))

Σύγκριση πορειών ματίσματος

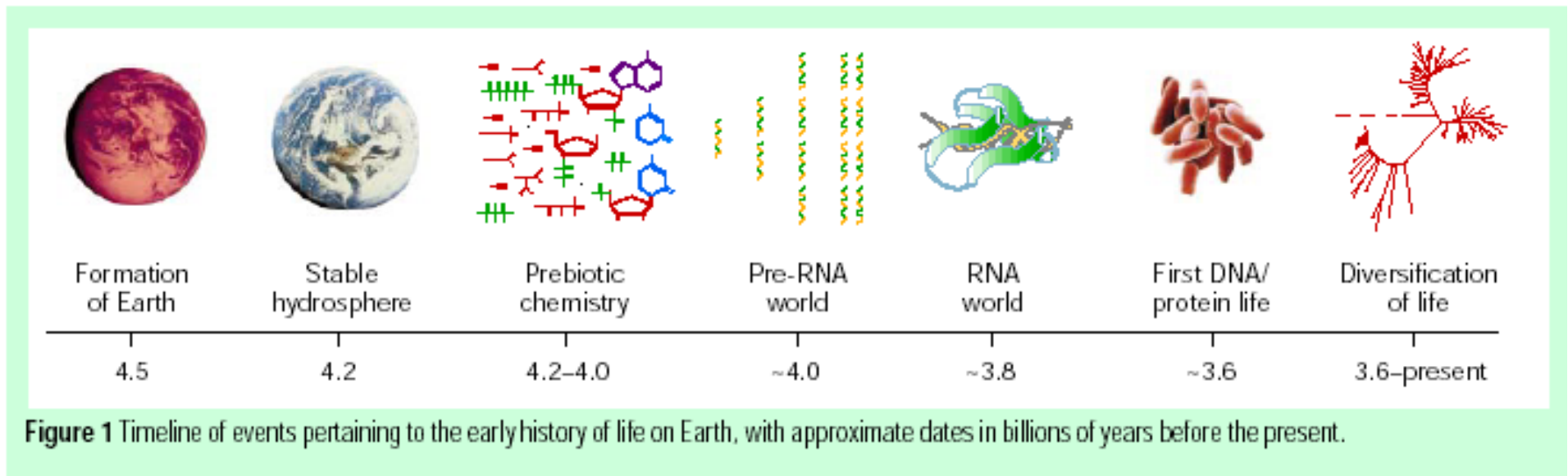
SELF-SPLICING INTRONS



SPLICEOSOME-CATALYZED SPLICING OF NUCLEAR mRNA

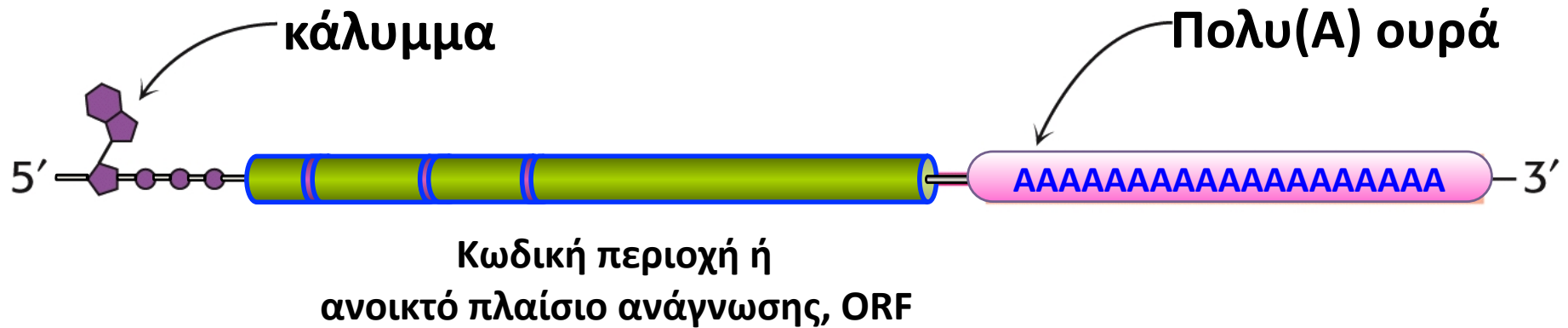


Ο κόσμος του RNA (RNA World)



5' κάλυμμα – 3' πολυ(A) ουρά

5'cap - 3'poly(A) tail



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

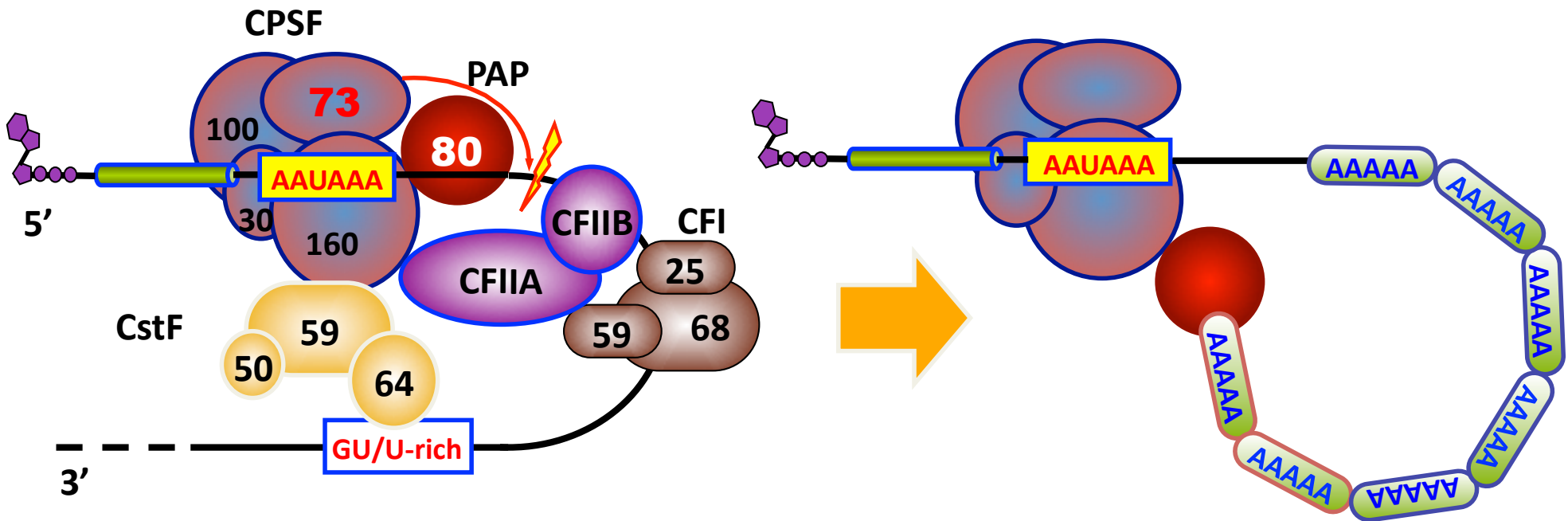
- Προσθήκη μιας αλληλουχίας νουκλεοτιδίων αδενίνης στο 3' άκρο των mRNAs, γνωστής ως πολυ(A) ουρά.
- Η αλληλουχία αυτή ΔΕΝ είναι κωδικοποιημένη στο DNA (δηλ. δεν υπάρχουν αλληλουχίες μήκους ~ 300 βάσεων θυμίνης στο DNA)
- Μήκος ουράς: ~70 νουκλεοτίδια αδενίνης (A) σε κατώτερους ευκαρυωτικούς
250-300 (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. Πολυαδεφυλίωση [Polyadenylation, Προσθήκη πολυ(A) ουράς]

3'-end processing

cleavage



polyadenylation



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

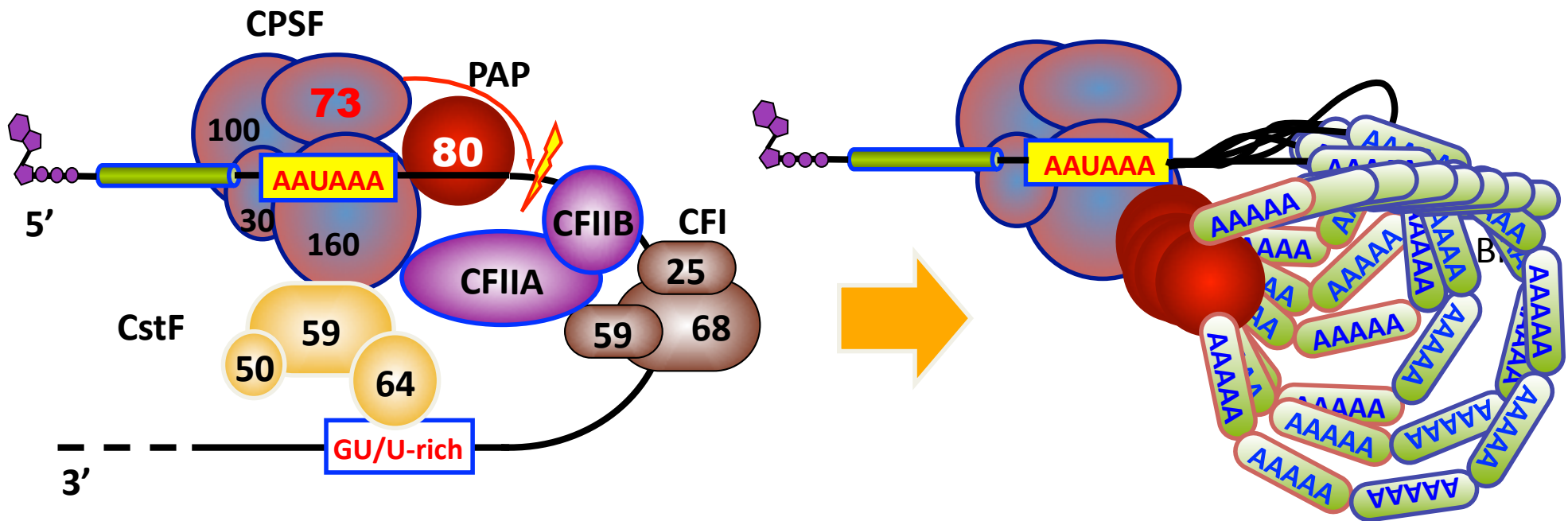

PABP II

3'-end processing

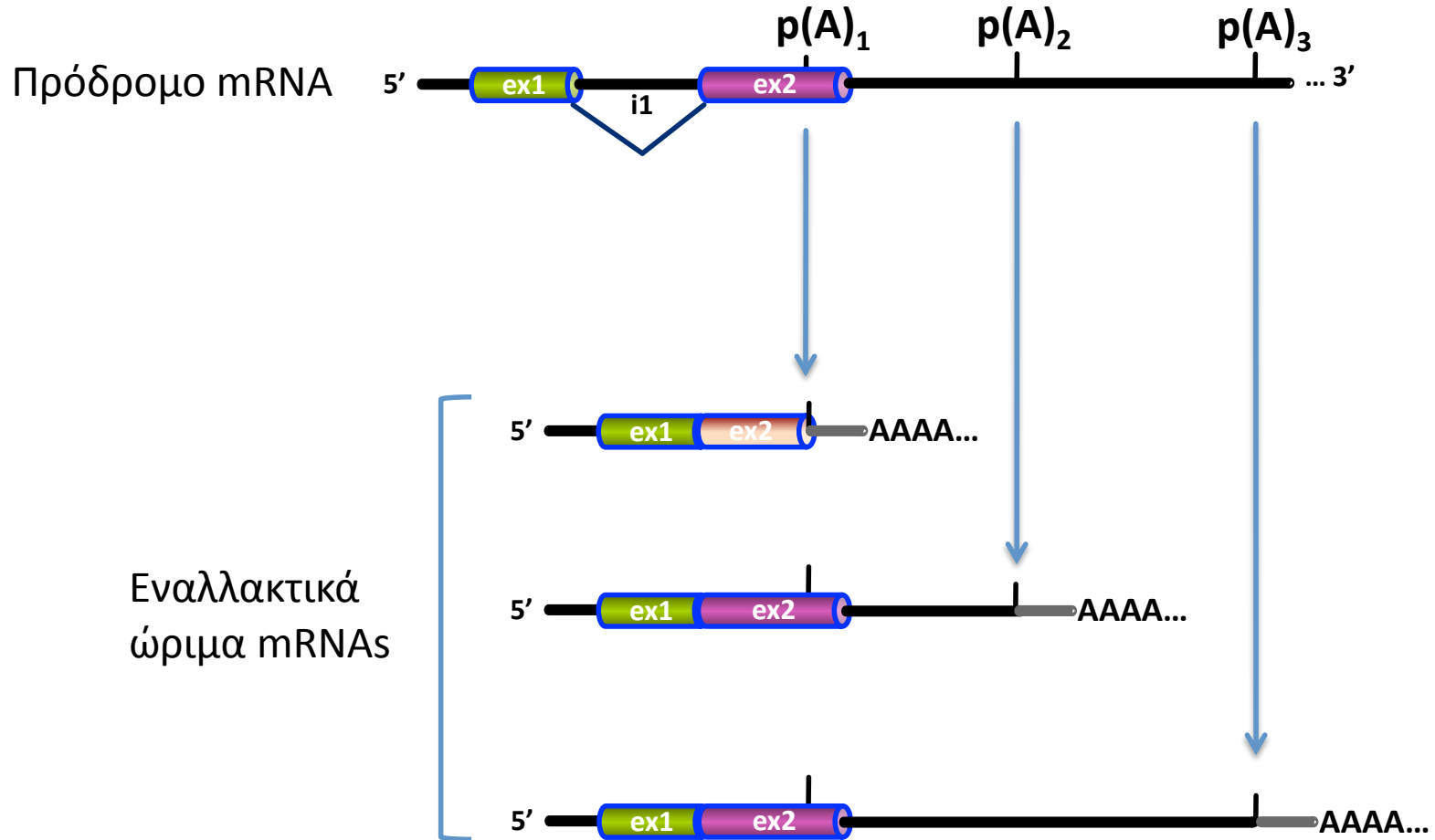
cleavage



polyadenylation



Η εναλλακτική πολυαδενυλίωση

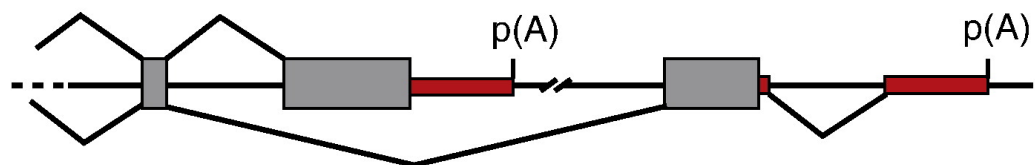


p(A): θέση πολυαδενυλίωσης • **AAAA...**: πολυ(A) ουρά • **ex**, εξόνιο • **i**, ιντρόνιο

Η εναλλακτική πολυαδενυλίωση (και το εναλλακτικό μάτισμα)

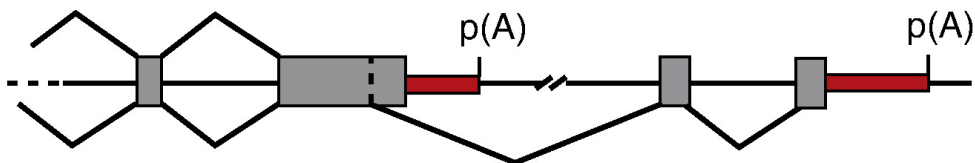
Skipped – exon associated

A Calcitonin/CGRP



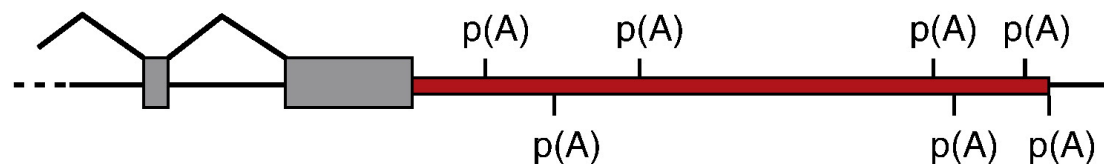
Composite exons associated

B Immunoglobulin μ heavy chain



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

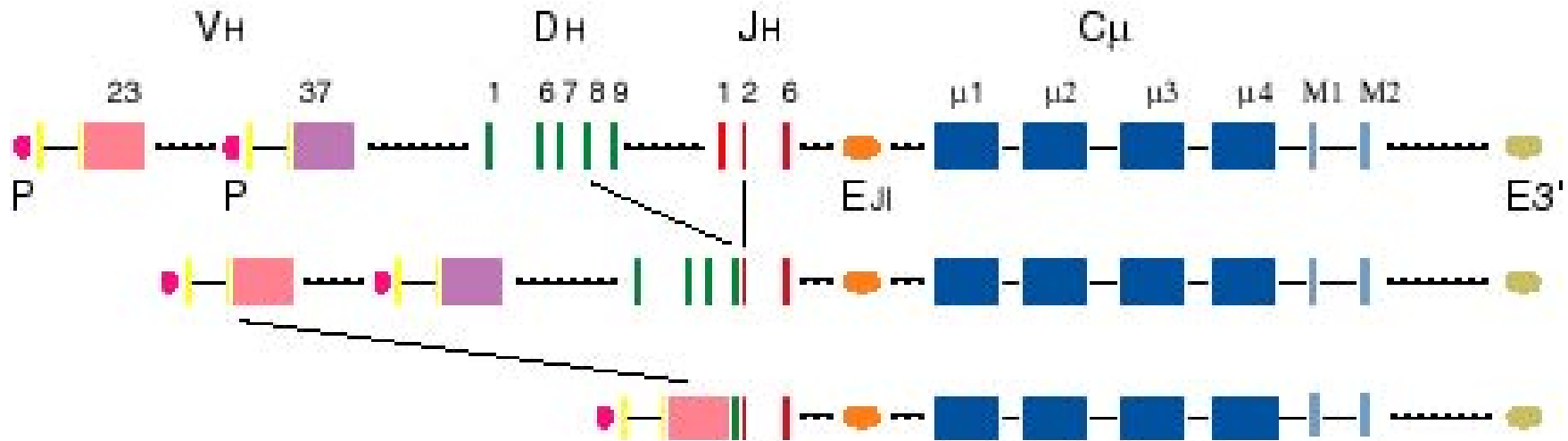
C Dihydrofolate reductase



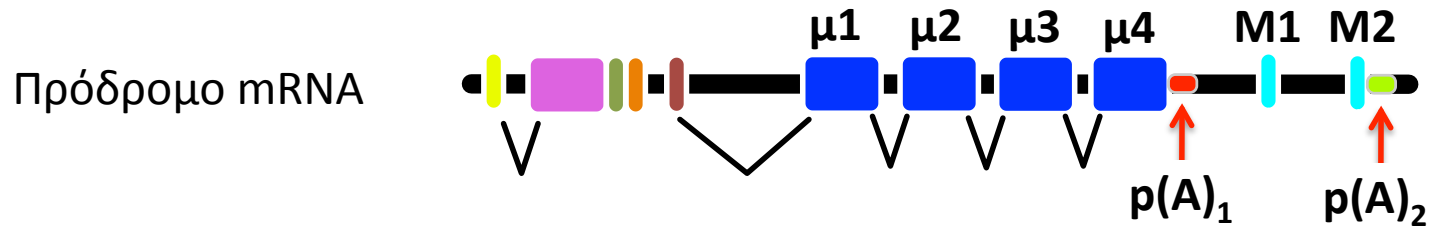
■ Coding regions
■ 3' Untranslated regions

p(A): θέσεις πολυαδενυλίωσης

Η εναλλακτική πολυαδενυλίωση I



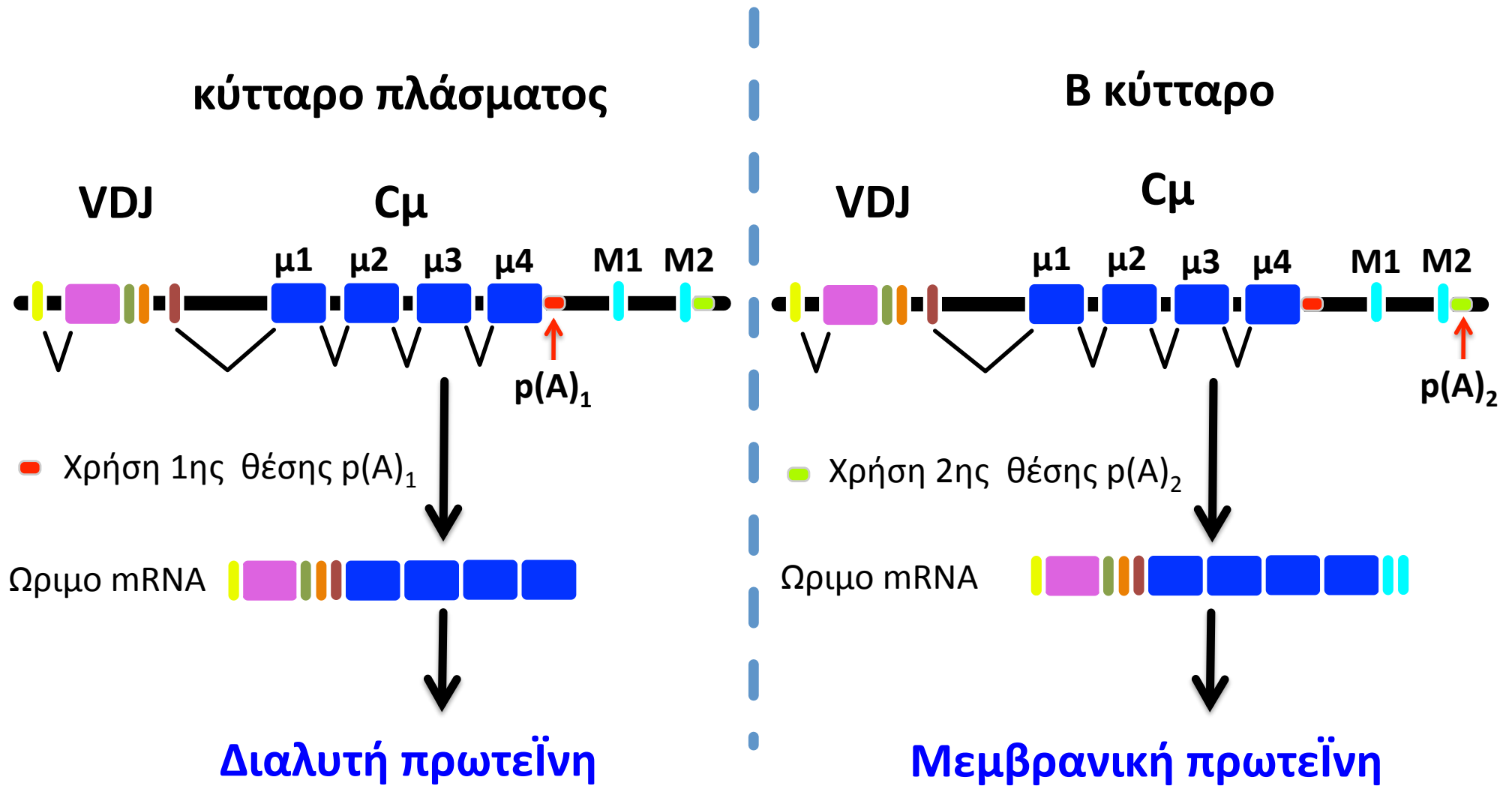
VDJ recombination



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

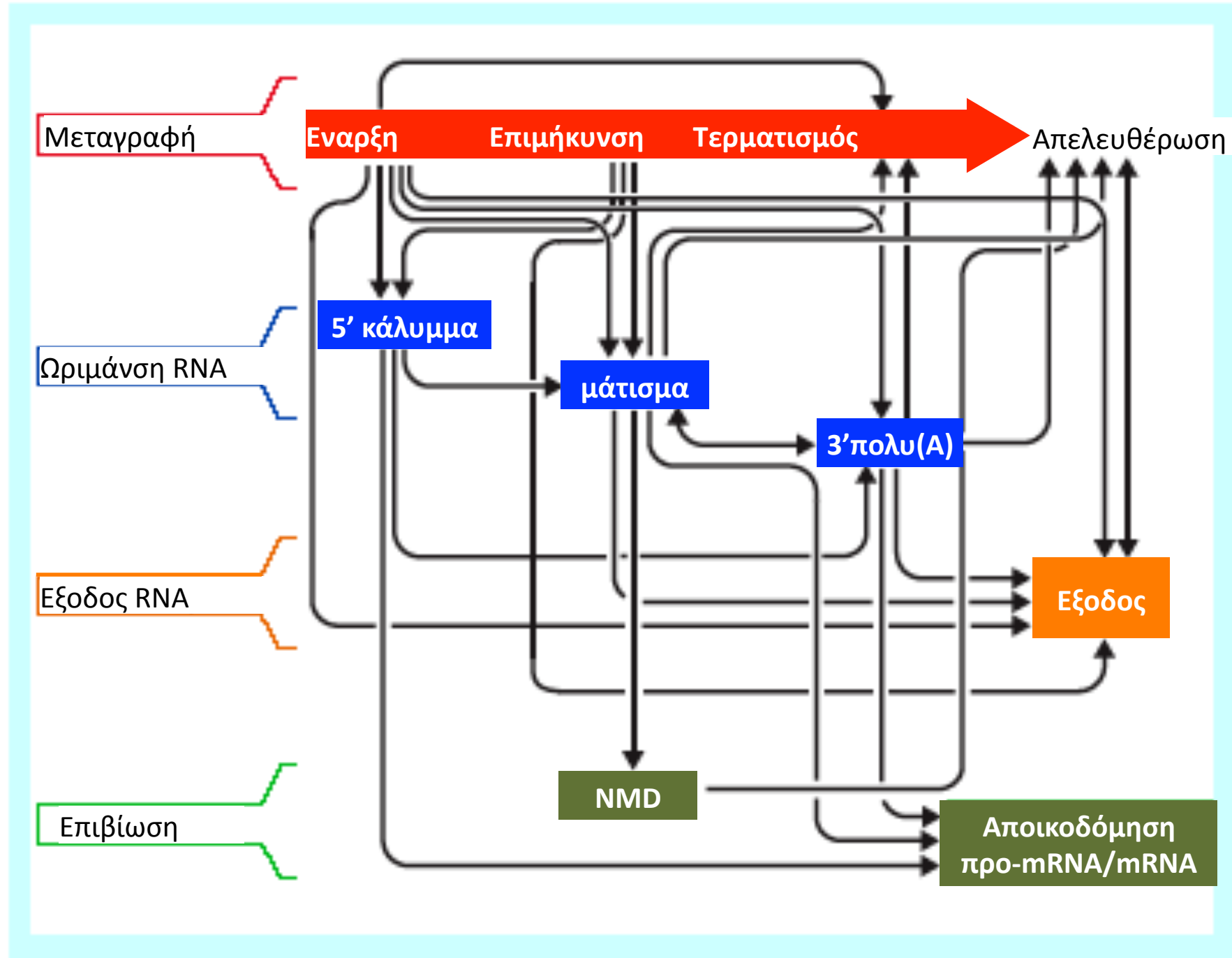
Η εναλλακτική πολυαδενυλίωση II

Η μεμβρανική και η διαλυτή μορφή της IgM

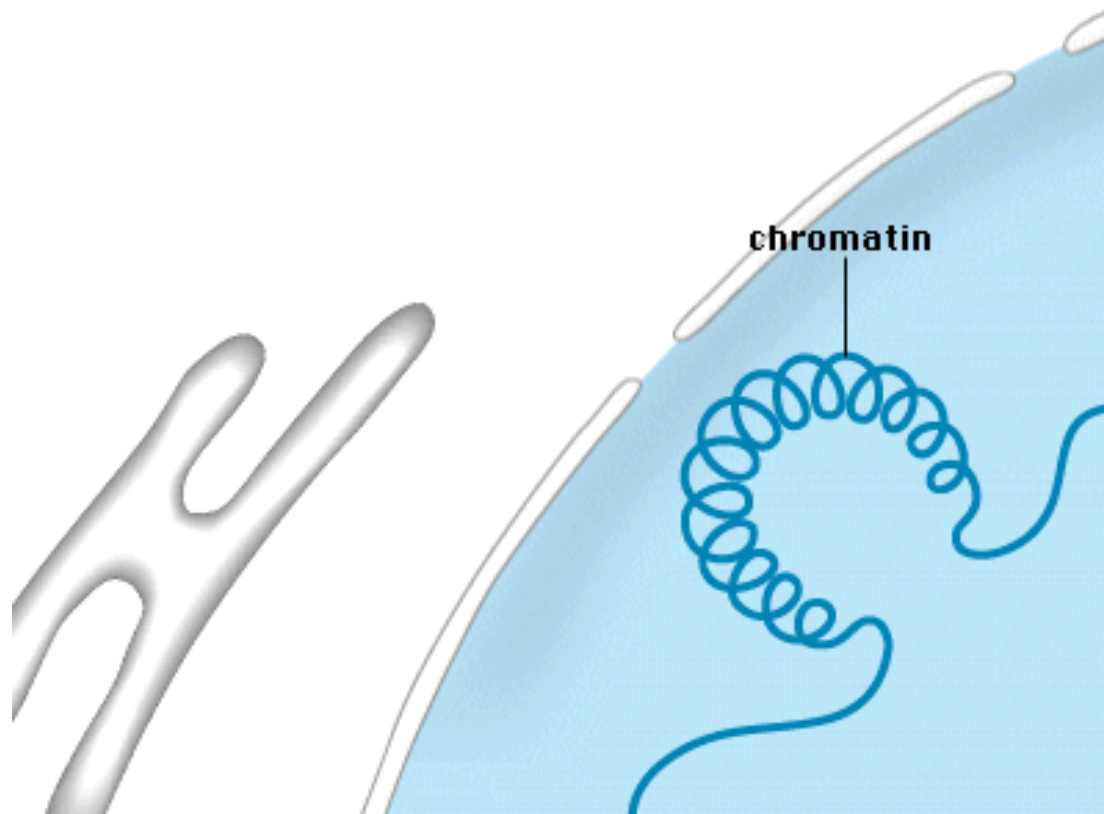


Ο μηχανισμός αφορά στα ~25% των ανθρώπινων γονιδίων

Οι διεργασίες της γονιδιακής έκφρασης είναι συζευγμένες



mRNA lifecycle





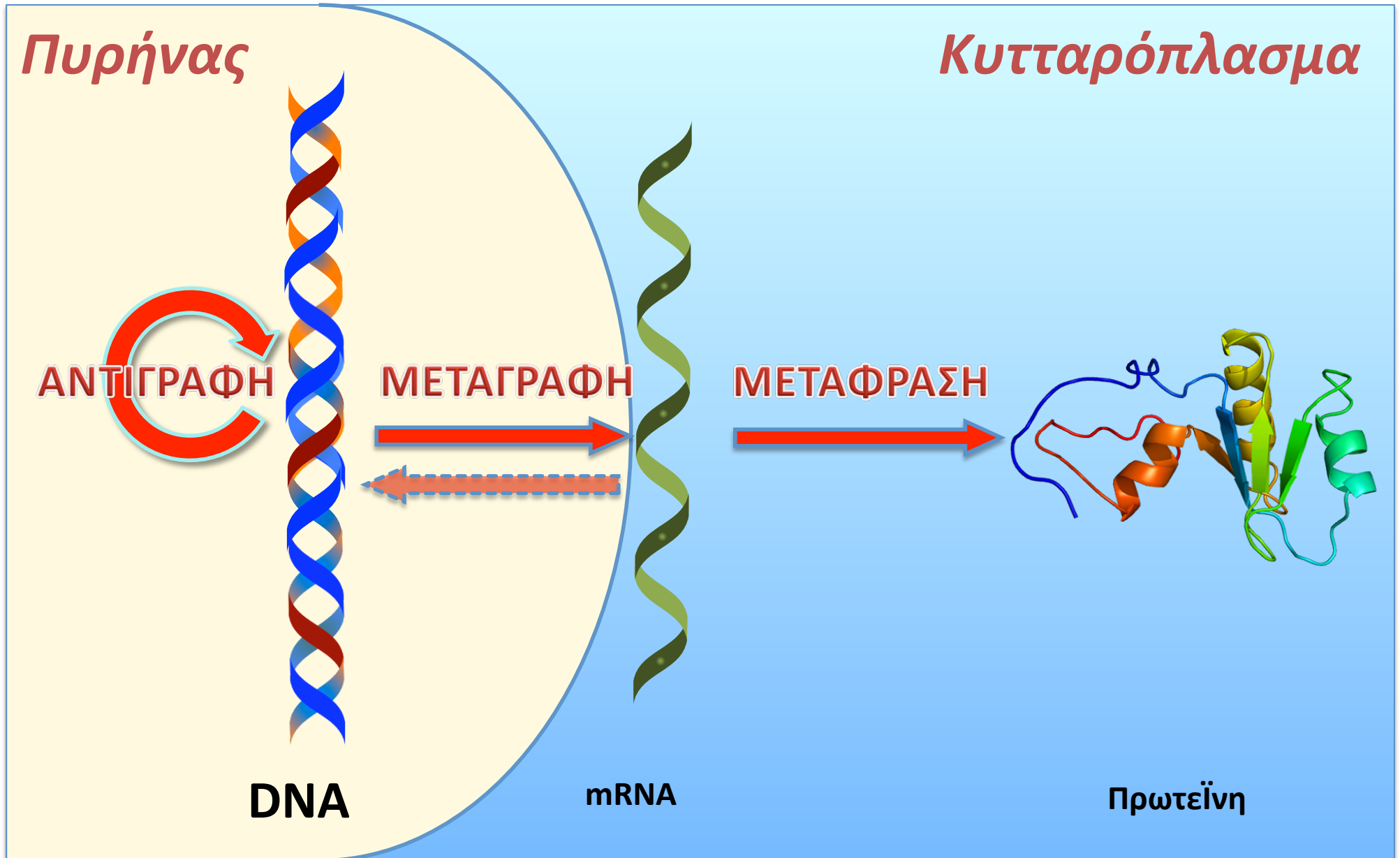
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



4. Η βιοσύνθεση των πρωτεϊνών

Νικόλαος Μπαλατσός

Το κεντρικό δόγμα

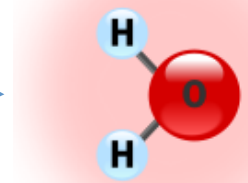
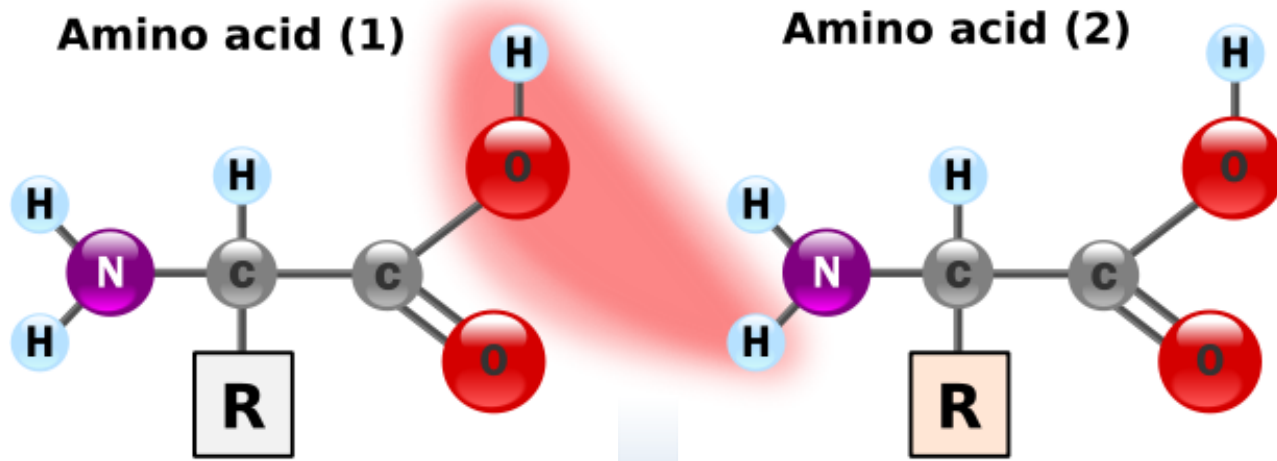


Πεπτιδικός ή αμιδικός δεσμός (κατανάλωση ενέργειας)

Η ισορροπία της αντίδρασης βρίσκεται στην πλευρά της υδρόλυσης και όχι της σύνθεσης

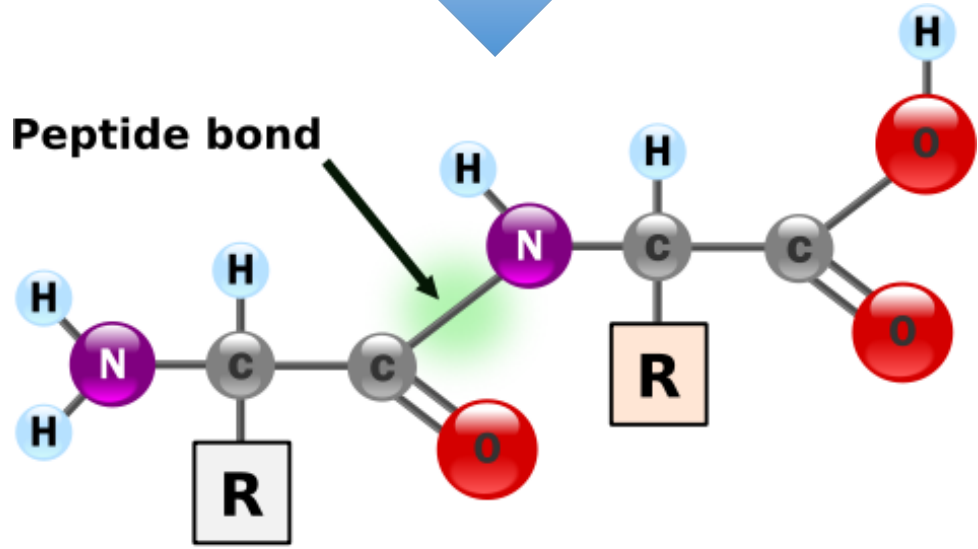
Μια ομάδα αμινοξέος σε ένα πολυπεπτίδιο λέγεται κατάλοιπο αμινοξέος (amino acid residue).

Κατεύθυνση από το N-τελικό άκρο προς το C-τελικό άκρο



Water

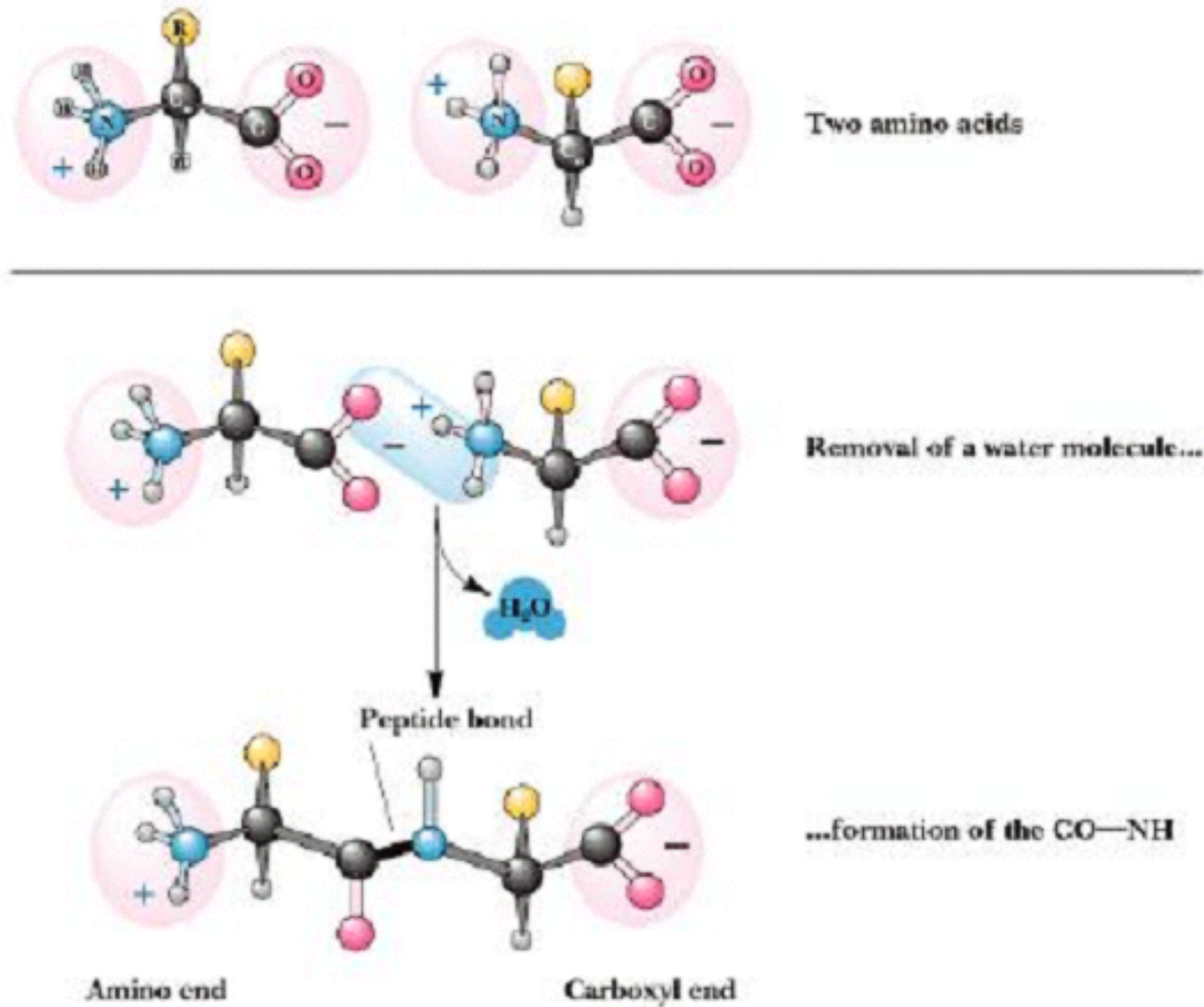
Καρβόξυ – άκρο
ή
C - (τελικό) άκρο



Dipeptide

Αμινο – άκρο
ή
N- (τελικό) άκρο

Τα αμινοξέα ενώνονται με πεπτιδικούς δεσμούς και σχηματίζουν πολυπεπτιδικές αλυσίδες



Αμινοξύ, κατάλοιπο αμινοξέος, residue

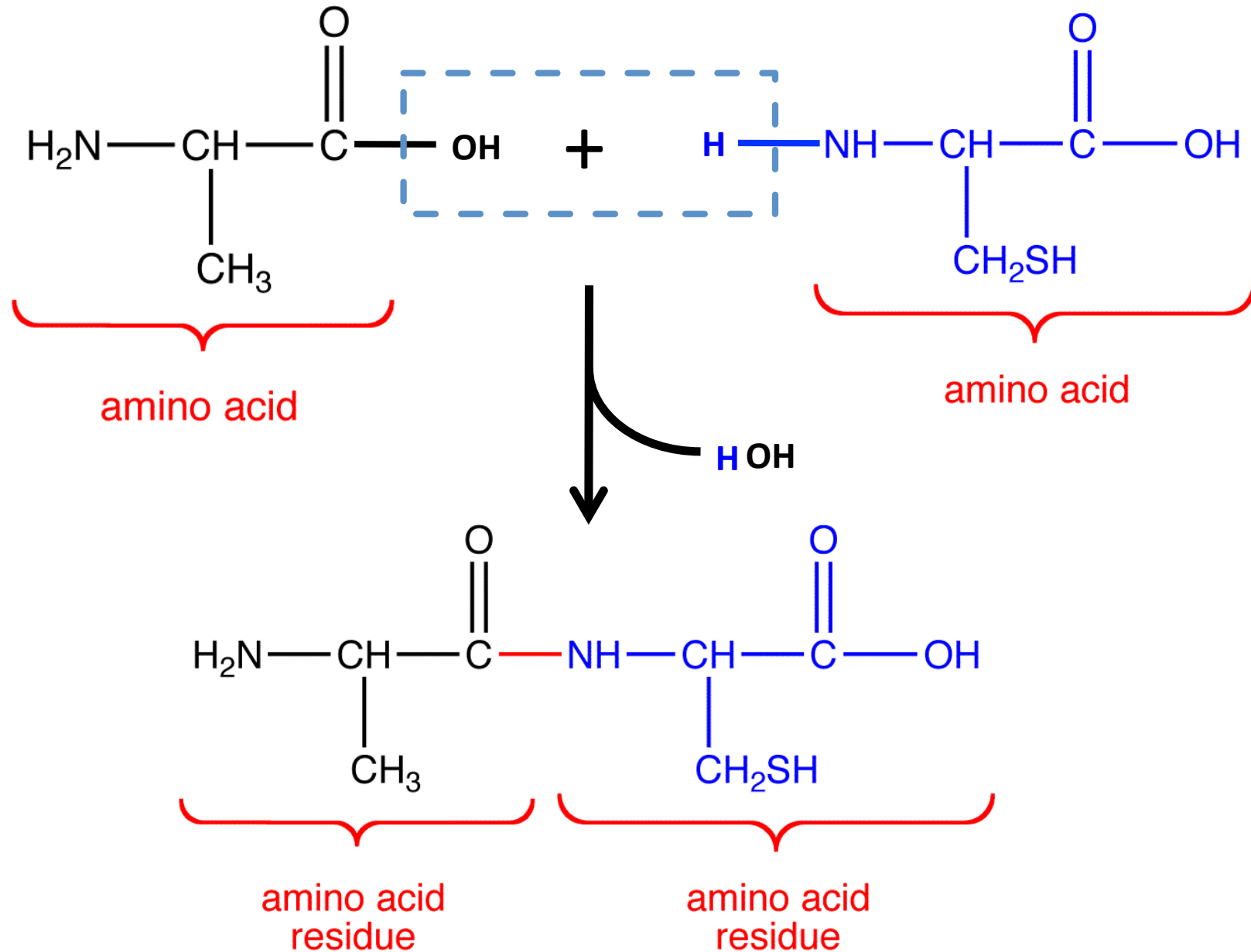
amino-acid residue (in a polypeptide)

When two or more amino acids combine to form a *peptide*, the elements of water are removed, and what remains of each amino acid is called an amino-acid residue. α -Amino-acid residues are therefore structures that lack a hydrogen atom of the amino group ($-\text{NH}-\text{CHR}-\text{COOH}$), or the hydroxyl moiety of the carboxyl group ($\text{NH}_2-\text{CHR}-\text{CO}-$), or both ($-\text{NH}-\text{CHR}-\text{CO}-$); all units of a peptide chain are therefore amino-acid residues. (Residues of amino acids that contain two amino groups or two carboxyl groups may be joined by *isopeptide bonds*, and so may not have the formulas shown.)

The residue in a peptide that has an amino group that is free, or at least not acylated by another amino-acid residue (it may, for example, be acylated or formylated), is called N-terminal; it is at the N-terminus. The residue that has a free carboxyl group, or at least does not acylate another amino-acid residue, (it may, for example, acylate ammonia to give $-\text{NH}-\text{CHR}-\text{CO}-\text{NH}_2$), is called C-terminal.

W.B. 48

Αμινοξύ, κατάλοιπο αμινοξέος, residue



- Όλα τα μακρομόρια (π.χ. αμινοξέα, υδατάνθρακες) είναι ίδια μεταξύ των έμβιων όντων
- Όλα τα νουκλεϊνικά όξέα (DNA, RNA) και όλες οι πρωτεΐνες διαφέρουν από είδος σε είδος
- Η αλληλουχία των βάσεων των νουκλεοτιδίων στα γονίδια καθορίζει την αλληλουχία των αμινοξέων στις πρωτεΐνες του είδους

- Όλα τα μακρομόρια (π.χ. αμινοξέα, υδατάνθρακες) είναι ίδια μεταξύ των έμβιων όντων
- Όλα τα νουκλεϊνικά όξέα (DNA, RNA) και όλες οι πρωτεΐνες διαφέρουν από είδος σε είδος
- Η αλληλουχία των βάσεων των νουκλεοτιδίων στα γονίδια καθορίζει την αλληλουχία των αμινοξέων στις πρωτεΐνες του είδους

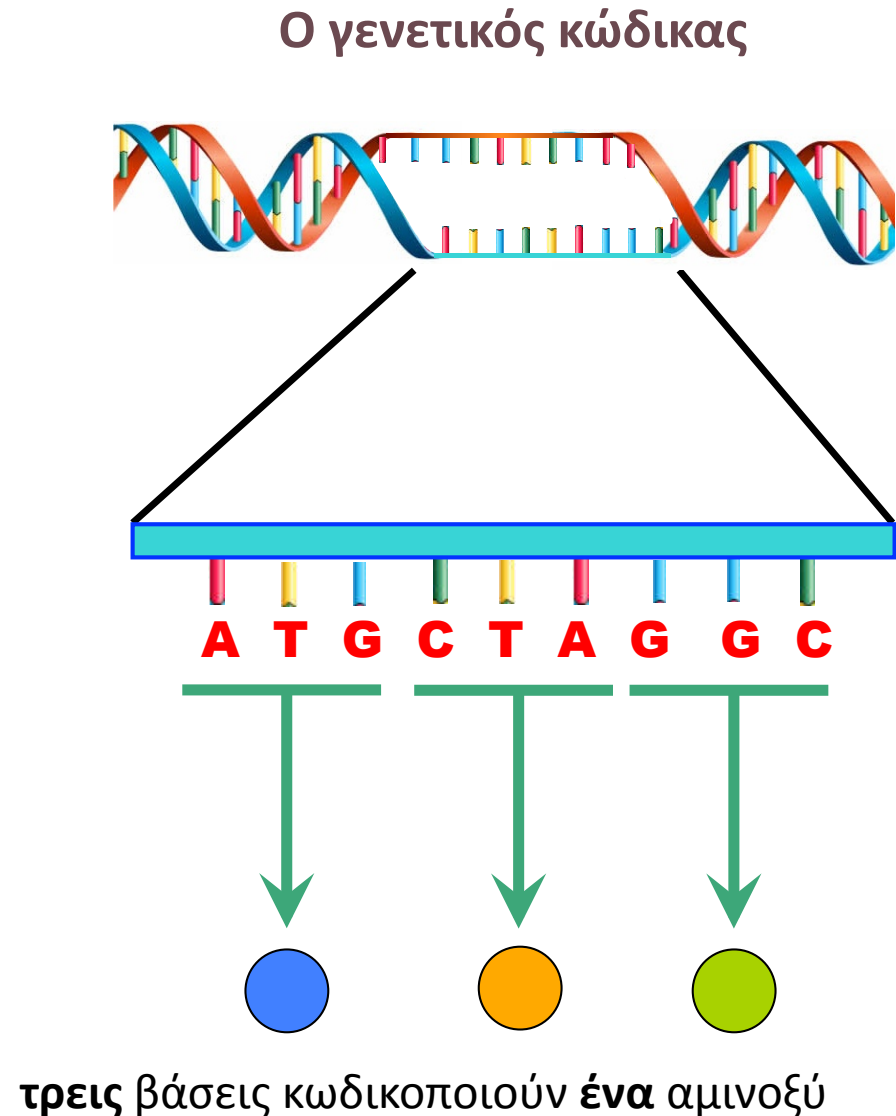
3 βάσεις DNA κωδικοποιούν 1 αμινοξύ

4 βάσεις (A,T,G,C) DNA
κωδικοποιούν για
21 αμινοξέα (αα)

● Αν 1 βάση κωδικοποιούσε 1 αα
τότε θα ενσωματώνονταν μόνο 4 αα

● Αν 2 βάσεις κωδικοποιούσαν 1 αα
τότε θα ενσωματώνωνταν 16 αα
 $4^2=16$ συνδυασμοί
ή $(4 \text{ βάσεις})^2 = 16$ αα

● Αν 3 βάσεις κωδικοποιούσαν 1 αα
τότε
 $4^3=64$ συνδυασμοί



Ο γενετικός κώδικας

Δεύτερο γράμμα

		Δεύτερο γράμμα					
		U	C	A	G		
Πρώτο γράμμα	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA Stop UAG Stop	UGU } Cys UGC } UGA Stop UGG Trp	U C A G	
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G	
	A	AUU } AUC } Ile AUA } AUG Met	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G	
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G	

Τρίτο γράμμα

Χαρακτηριστικά του γενετικού κώδικα

- Ο κώδικας είναι καθολικός
- Κάθε αμινοξύ κωδικεύεται από τουλάχιστο 2 κωδικόνια (εκτός των Met και Trp που κωδικεύονται από 1 κωδικόνιο)
- Συνώνυμα κωδικόνια μοιάζουν δομικά μεταξύ τους
- Κωδικόνια που κωδικεύουν δομικά συγγενή αμινοξέα (π.χ. Ile - Val) μοιάζουν δομικά και μεταξύ τους
- Κάθε κωδικόνιο είναι μια αυτόνομη λειτουργική μονάδα
αλληλουχία: AUGCUUUGC
ανάγνωση ως: AUG CUU UGC
και όχι ως: AUG UGC GCU CUU UUU UUG UGC
- Κάθε κωδικόνιο κωδικεύει ένα μόνο αμινοξύ
- Δεν υπάρχουν κενά μεταξύ των κωδικονίων

Κωδικόνια και αμινοξέα

61 κωδικόνια κωδικοποιούν για **21 αμινοξέα**

35 με 50 διαφορετικά tRNA σε προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς, αντίστοιχα.

- 1 tRNA μπορεί να αναγνωρίσει περισσότερα από 1 κωδικόνια
- 1 αμινοξύ αναγνωρίζεται από περισσότερα του ενός tRNA (**ισοδεκτικά**)

Τα συστατικά του μεταφραστικού μηχανισμού

mRNA

ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης, περιοχή δέσμευσης ριβοσώματος

Ριβοσώματα

Σε αυτά γίνεται η πρωτεϊνοσύνθεση

Αποτελούνται από δύο ριβοσωμικές υπομονάδες οι οποίες αποτελούνται από rRNA και πρωτεΐνες.

Περιέχουν καταλυτικές περιοχές, και περιοχές αναγνώρισης mRNA, tRNA και πρωτεϊνικών παραγόντων

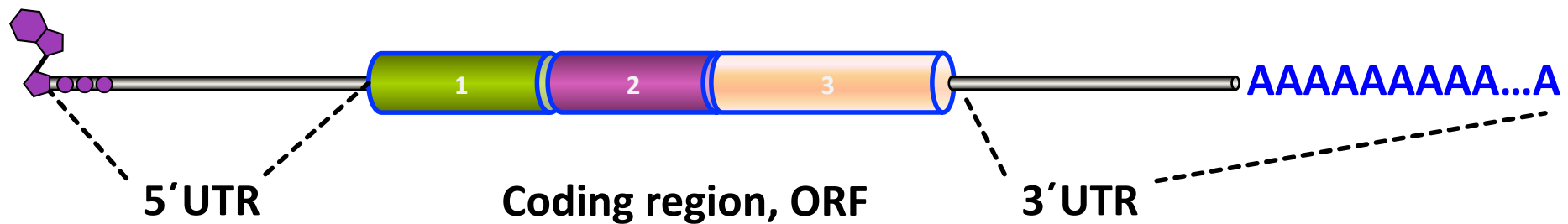
Οι καταλυτικές περιοχές δημιουργούνται με την αλληλεπίδραση των rRNAs με τις ριβοσωμικές πρωτεΐνες.

tRNA

Μεταφέρει το αμινοξύ στο ριβόσωμα προκειμένου να ενσωματωθεί στην πρωτεΐνη.

Πρωτεϊνικοί παράγοντες (έναρξης, επιμήκυνσης, τερματισμού)

Μεταφραζόμενη και μη-μεταφραζόμενες περιοχές mRNA

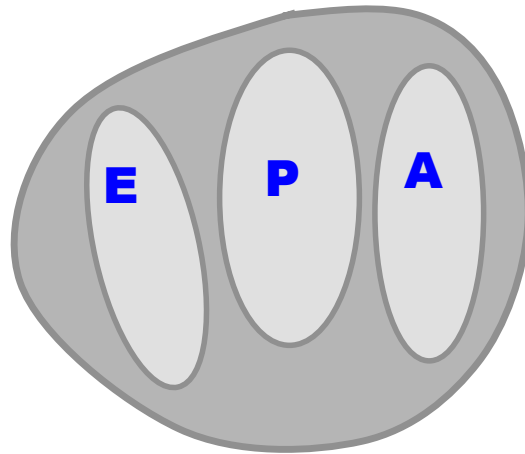


- Coding region, ORF (Open Reading Frame), περιοχή που θα μεταφραστεί σε πρωτεΐνη
- UTR, untranslated region, μη μεταφραζόμενη περιοχή, δεν δίνει πρωτεΐνη
- Περιοχή Shine-Dalgarno (προκαρυωτικοί), Kozak box (ευκαρυωτικοί)

Ριβόσωμα

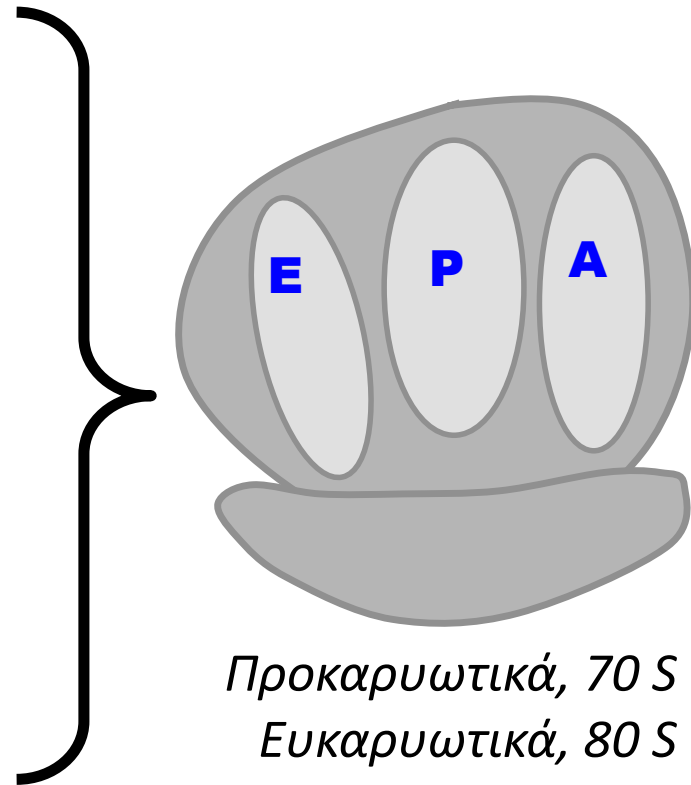
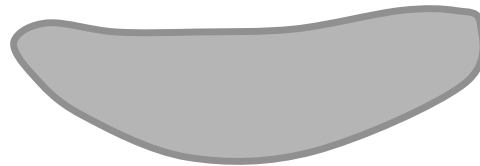
Μεγάλη Υπομονάδα

Προκαρυωτικά, 50 S
Ευκαρυωτικά, 60 S



Μικρή Υπομονάδα

Προκαρυωτικά, 30 S
Ευκαρυωτικά, 40 S

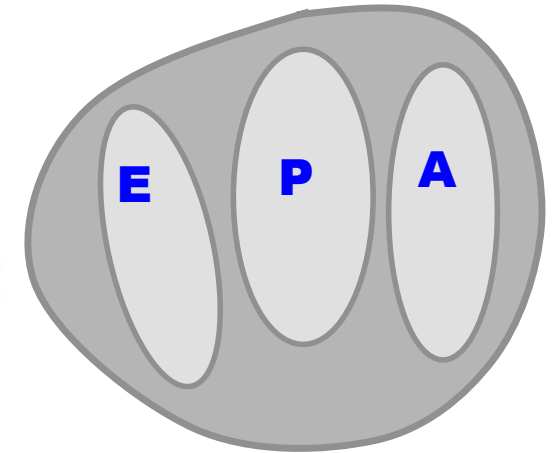
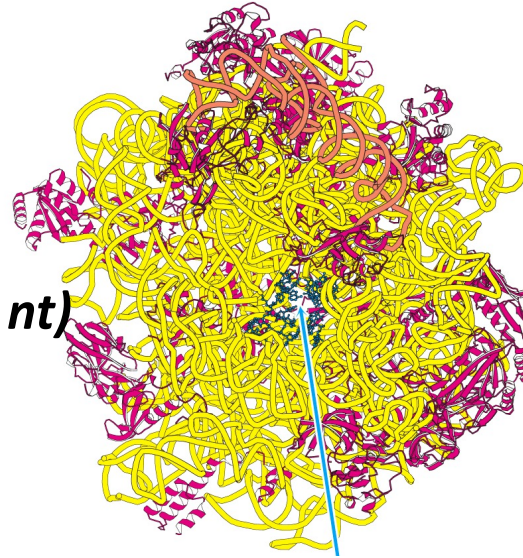


Προκαρυωτικά, 70 S
Ευκαρυωτικά, 80 S

Ριβόσωμα προκαρυωτικών οργανισμών

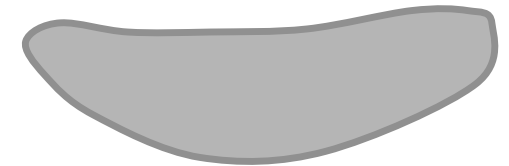
Μεγάλη Υπομονάδα, 50 S

- 5 S ριβοσωμική υπομονάδα (120 nt)
- 23 S* ριβοσωμική υπομονάδα (2900 nt)
- 31 πρωτεΐνες



Μικρή Υπομονάδα, 30 S

- 16 S ριβοσωμική υπομονάδα (1540 nt)
- 21 πρωτεΐνες

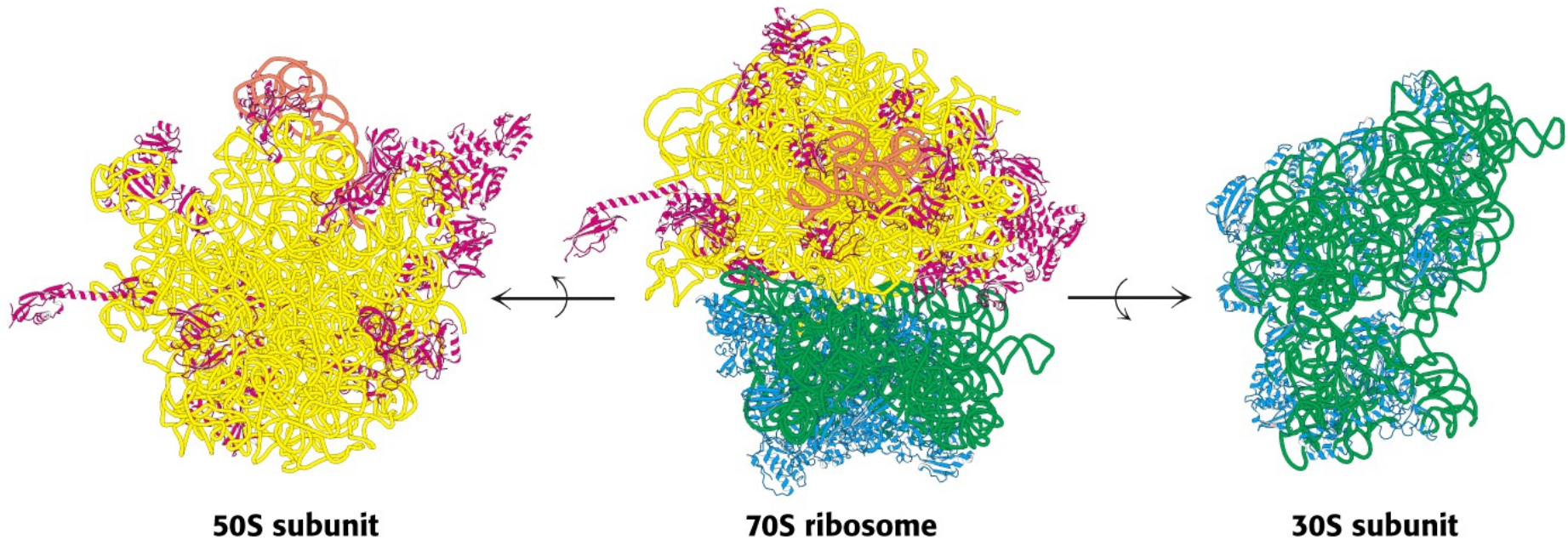


* καταλυτική υπομονάδα

Τα ριβοσώματα είναι σωμάτια ριβονουκλεοπρωτεΐνης που αποτελούνται από μικρές και μεγάλες υπομονάδες

50S: 34 πρωτεΐνες 23S, 5S

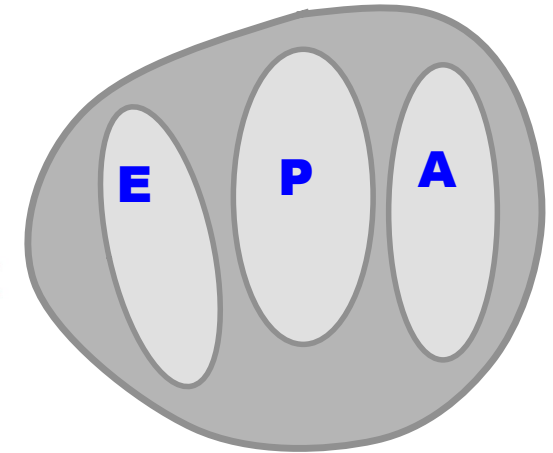
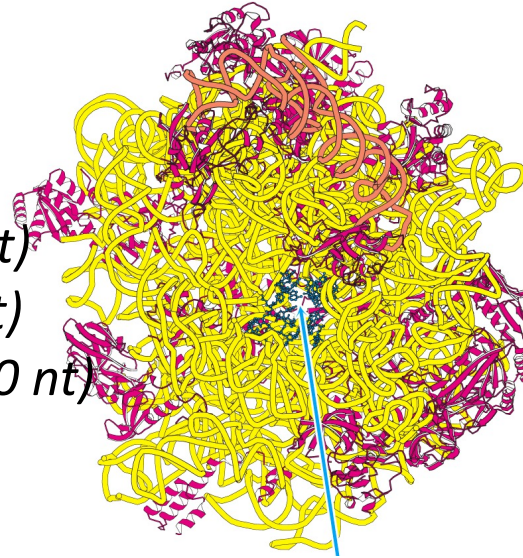
30S: 21 πρωτεΐνες 16S



Ριβόσωμα ευκαρυωτικών οργανισμών

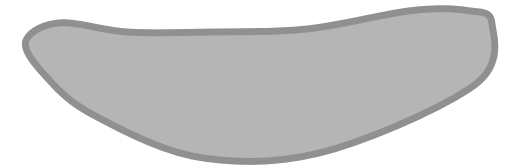
Μεγάλη Υπομονάδα, 60 S

- 5 S ριβοσωμική υπομονάδα (120 nt)
- 5.8 S ριβοσωμική υπομονάδα (160 nt)
- 28 S* ριβοσωμική υπομονάδα (4700 nt)
- 46 πρωτεΐνες



Μικρή Υπομονάδα, 40 S

- 18 S ριβοσωμική υπομονάδα (1900 nt)
- 33 πρωτεΐνες



* καταλυτική υπομονάδα



RNA, the first macromolecular catalyst: the ribosome is a ribozyme

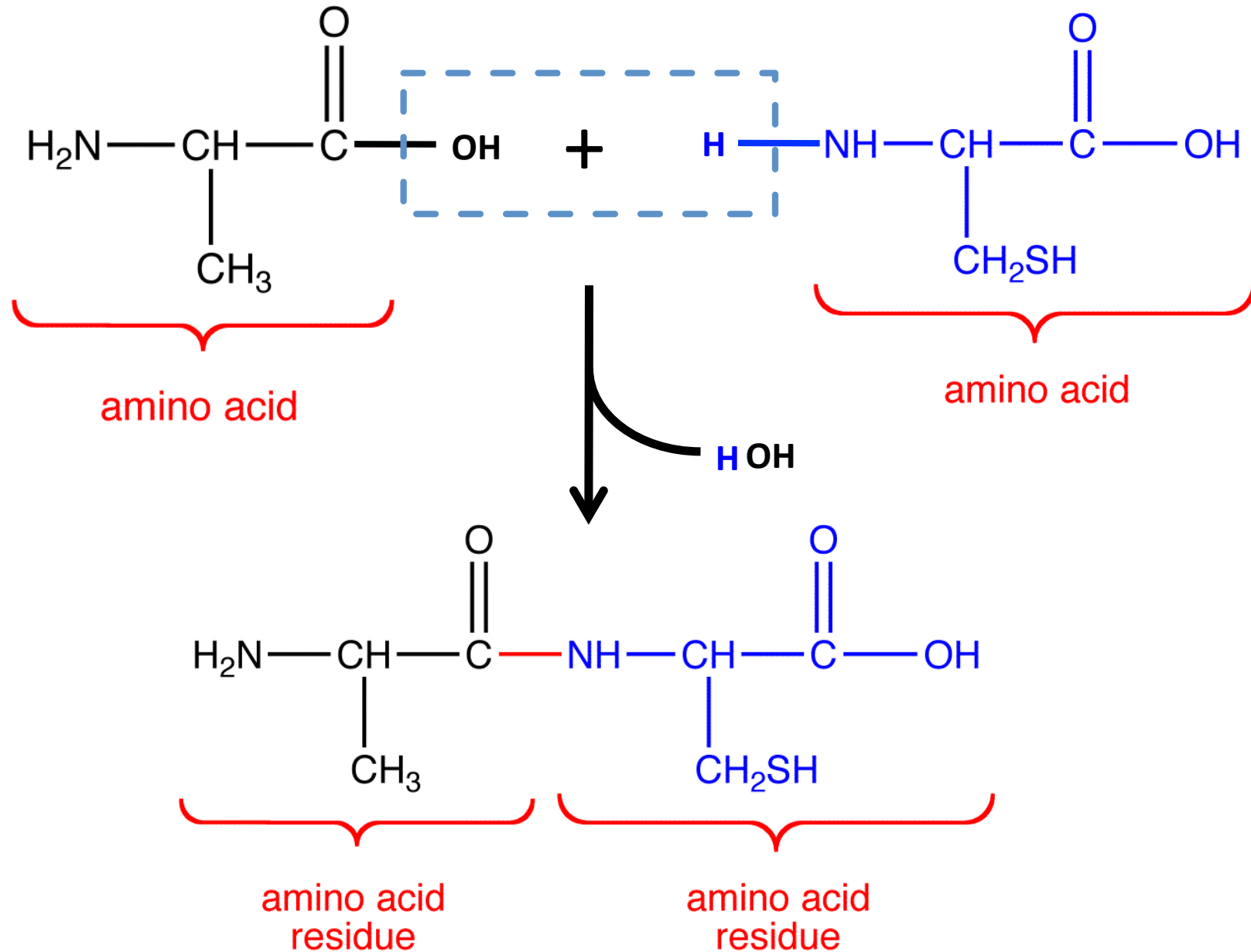
Thomas A. Steitz^{1,2,3} and Peter B. Moore^{1,2}

¹Department of Molecular Biophysics and Biochemistry, Yale University, New Haven, CT 06520, USA

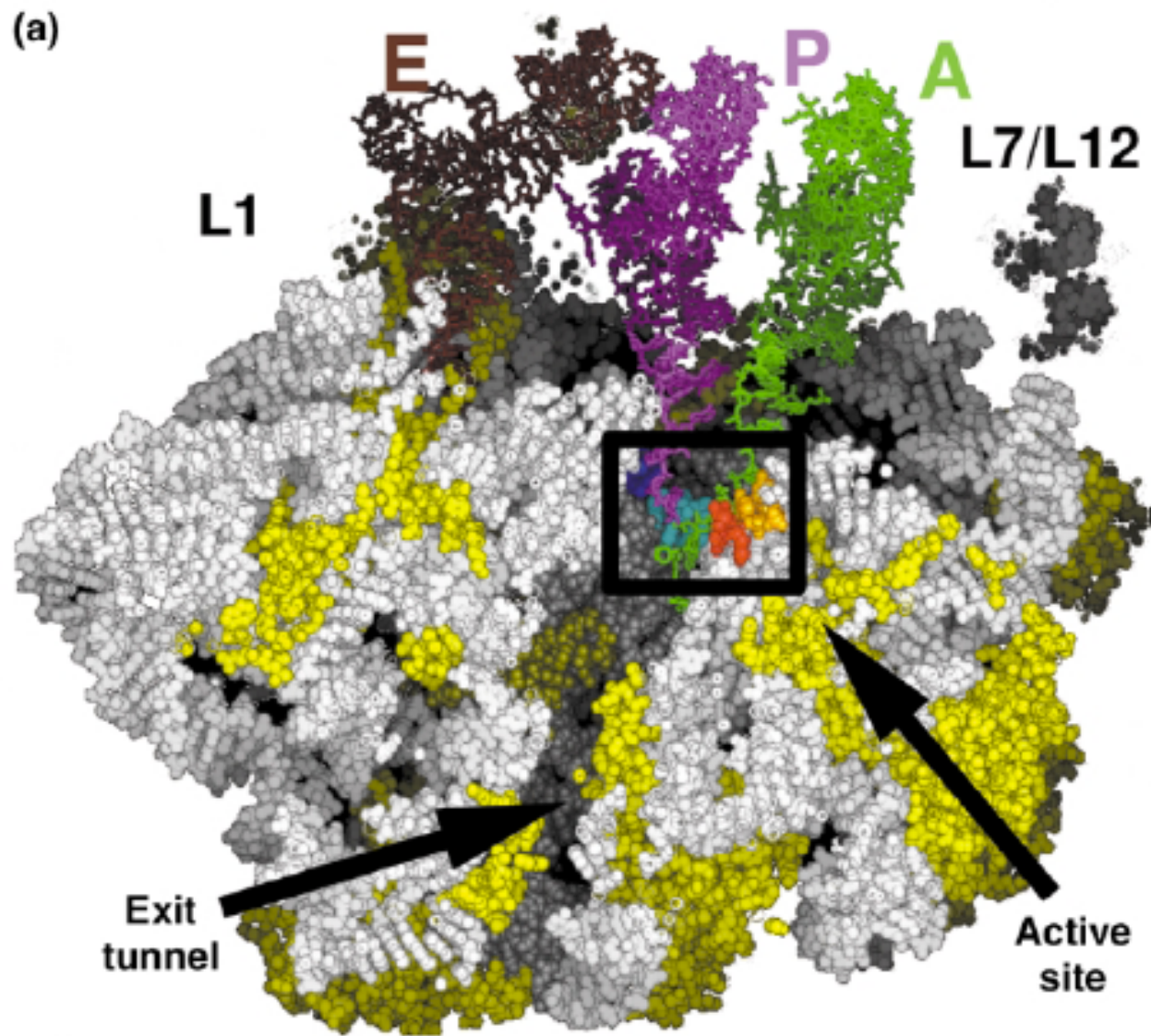
²Department of Chemistry, Yale University, New Haven, CT 06520, USA

³Howard Hughes Medical Institute, New Haven, CT 06520, USA

Αμινοξύ, κατάλοιπο αμινοξέος, residue



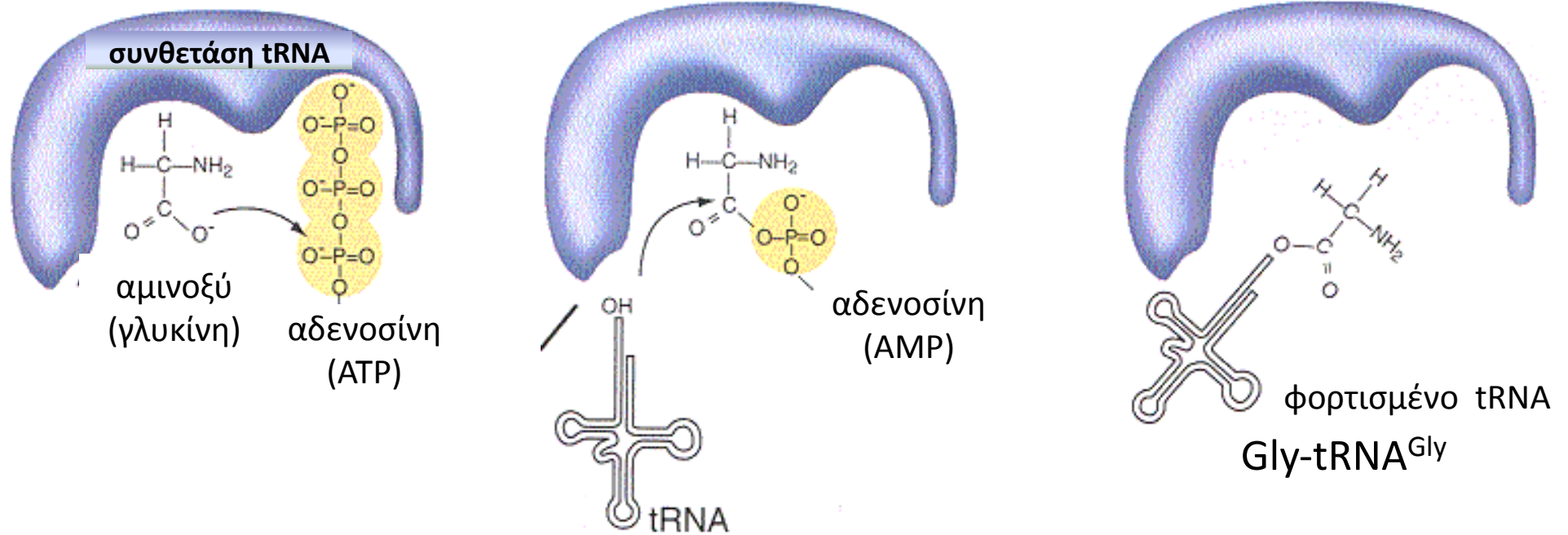
Ο σχηματισμός του πεπτιδικού δεσμού





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

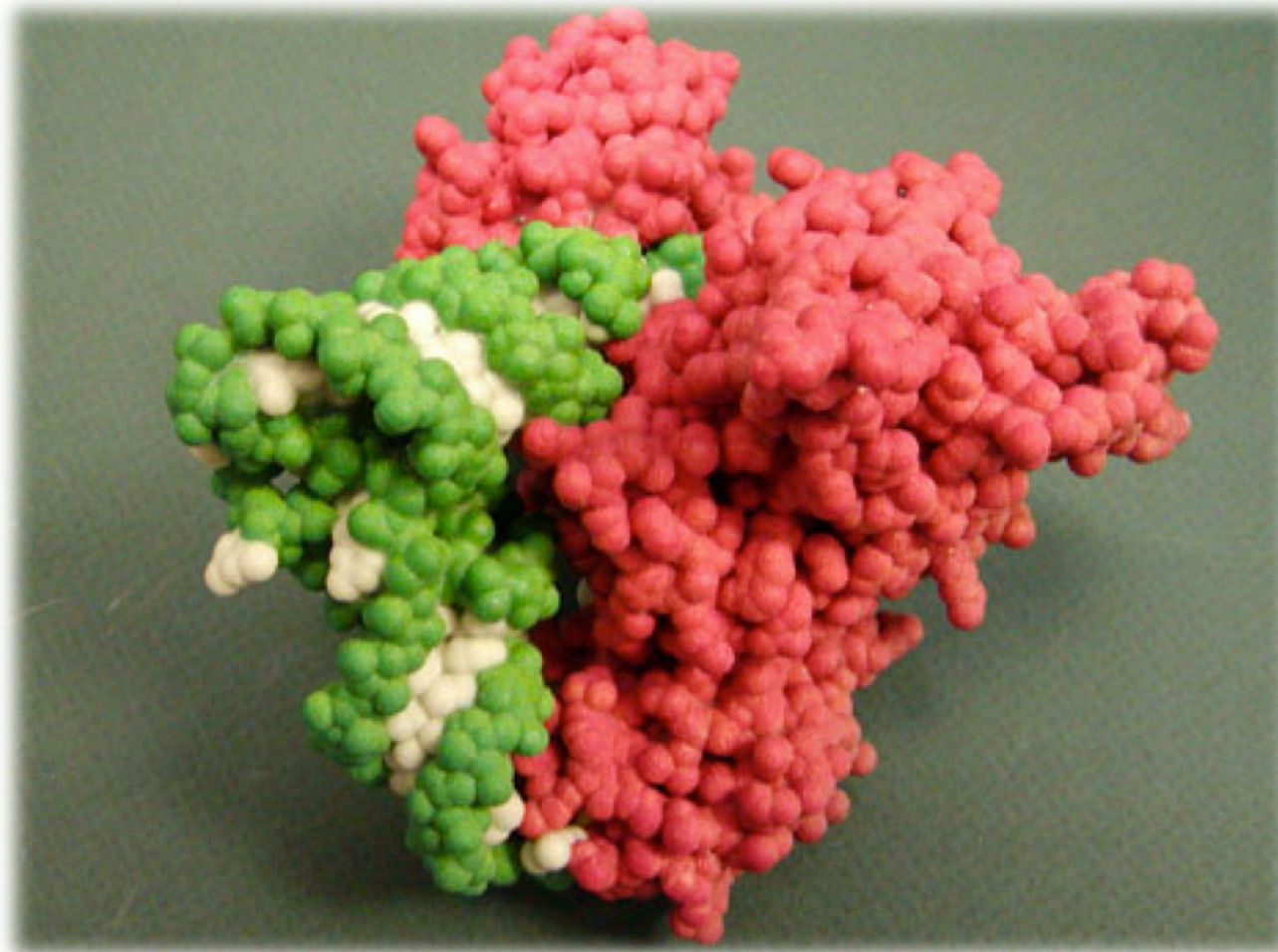
Συνθετάσες των αμινοακυλ-tRNA (aminoacyl-tRNA synthetases, AARS)



Στάδιο
ενεργοποίησης
αμινοξέος

Στάδιο
μεταφοράς

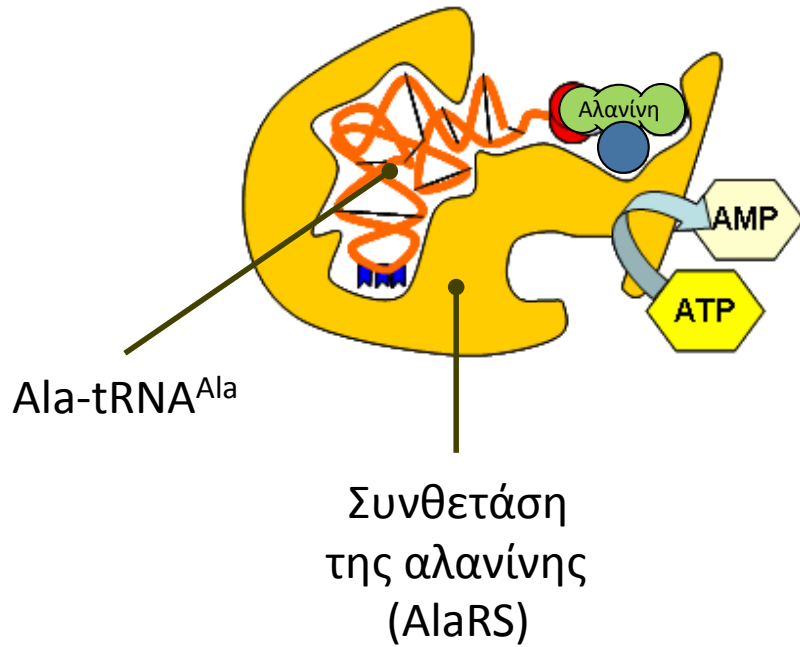
tRNA - συνθετάσες των αμινοακυλ-tRNA



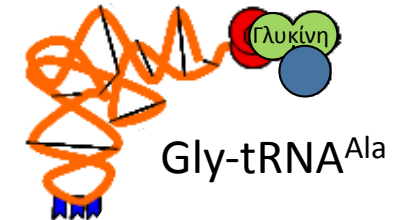
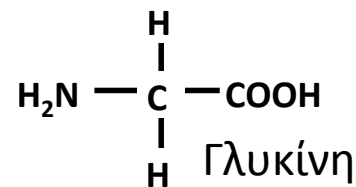
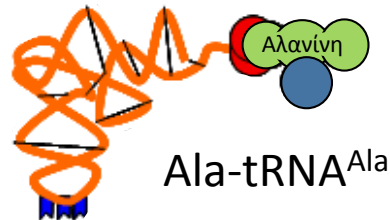
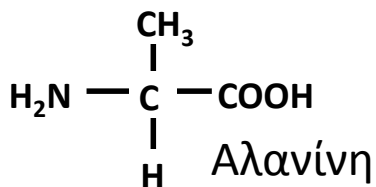
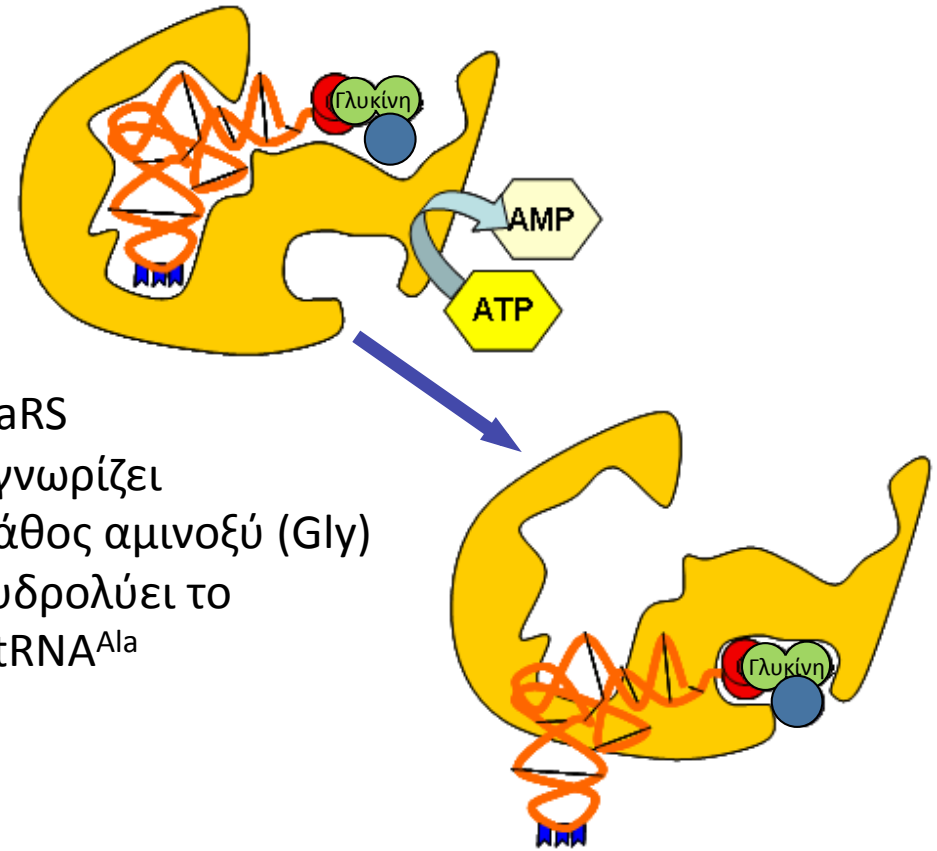
tRNA

AARS
(Aspartyl-tRNA synthetase)

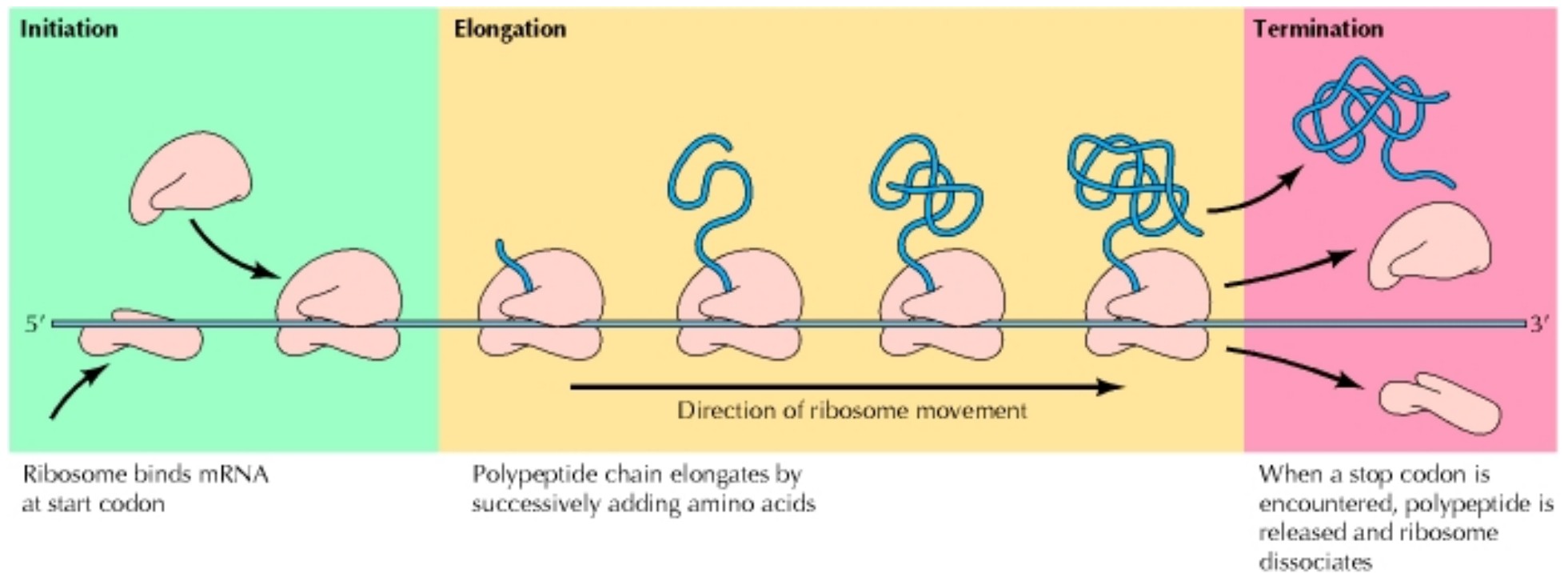
Οι AARS ελέγχουν και διορθώνουν την ενσωμάτωση του σωστού αμινοξέος



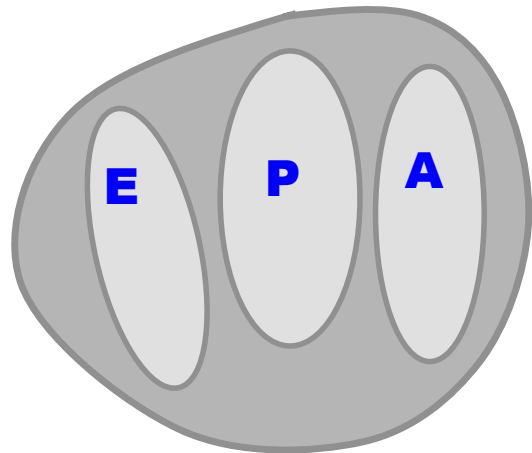
Η AlaRS αναγνωρίζει το λάθος αμινοξύ (Gly) και υδρολύει το Gly-tRNA^{Ala}



Γενική στρατηγική της μετάφρασης- στάδια

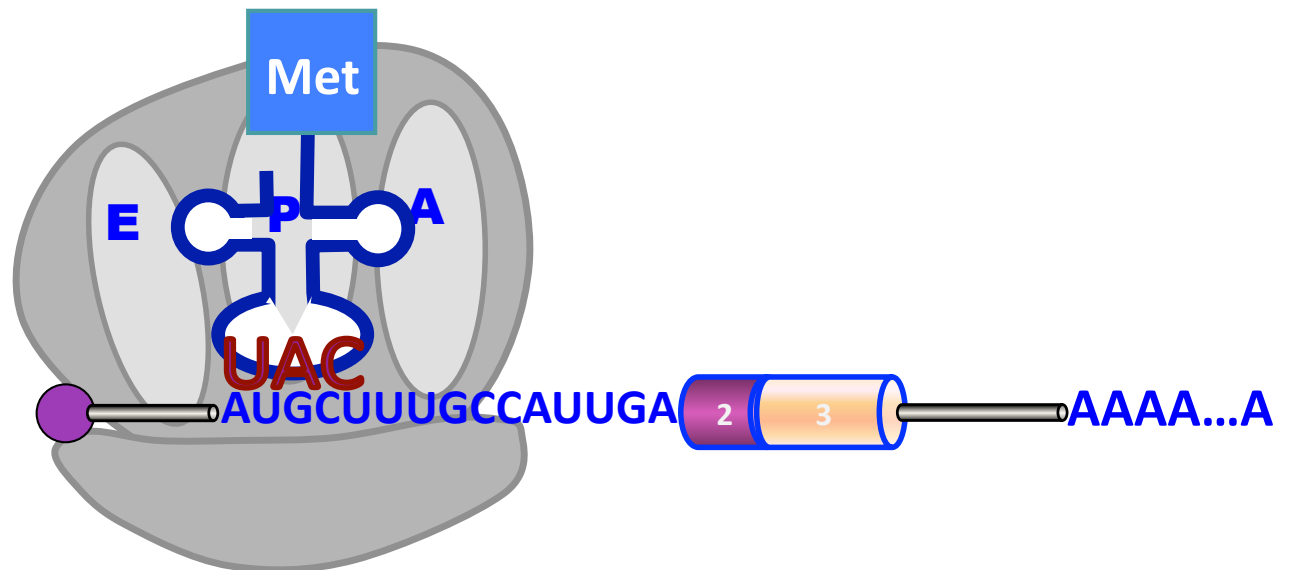
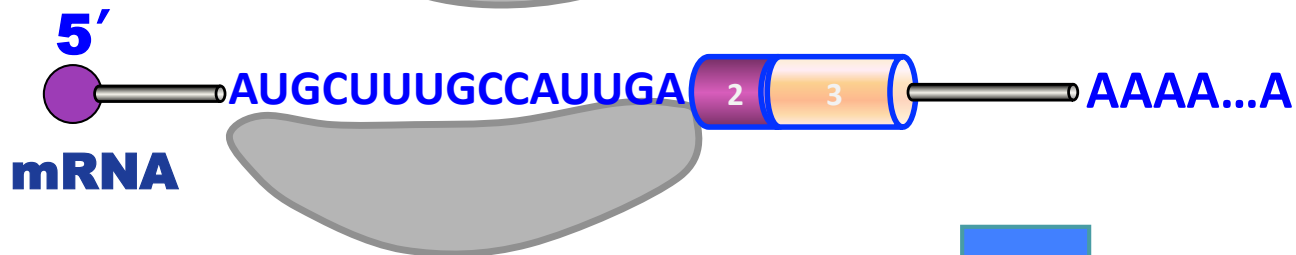


Γενική στρατηγική της μετάφρασης: ΕΝΑΡΞΗ



Ολοκλήρωση ΕΝΑΡΞΗΣ

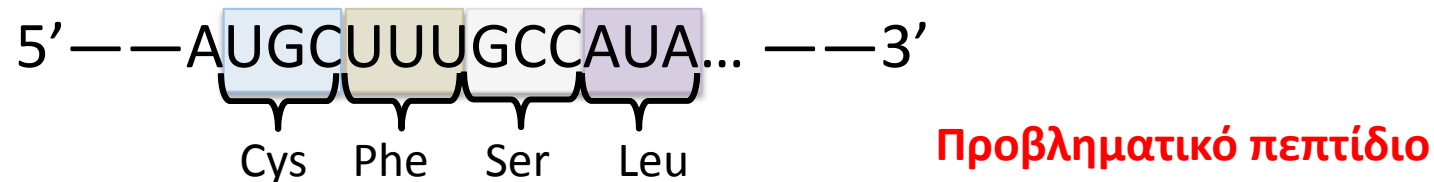
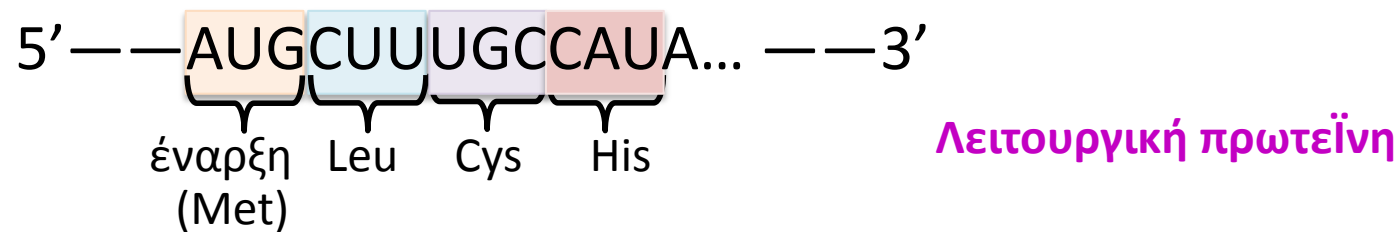
- συγκρότηση πλήρους ριβοσώματος
- δέσμευση mRNA
- δέσμευση tRNA στην περιοχή (peptide)



Γενική στρατηγική της μετάφρασης: ΕΝΑΡΞΗ

🌈 Αργό στάδιο

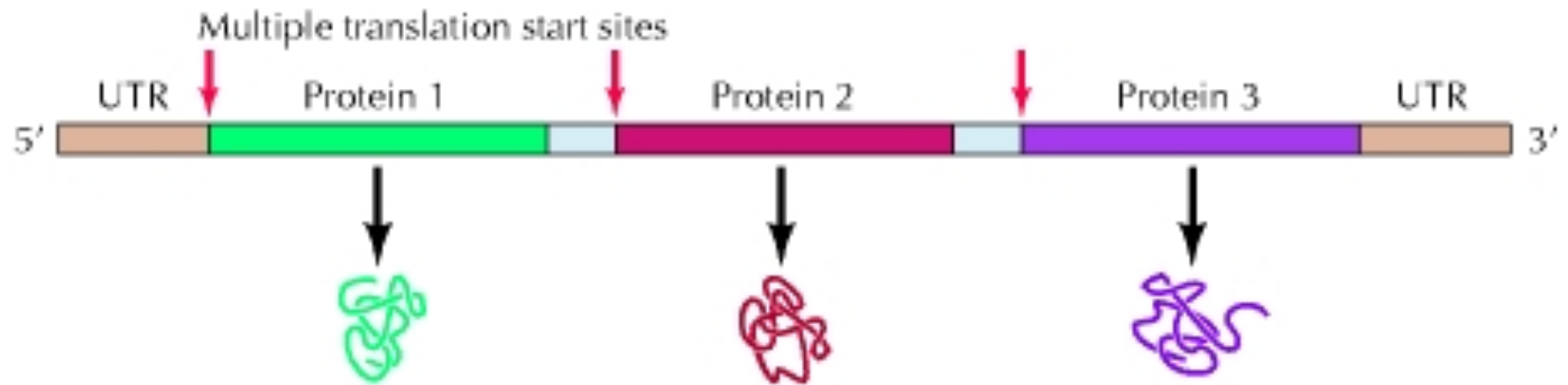
🌈 Καθορίζει τη χρησιμότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης



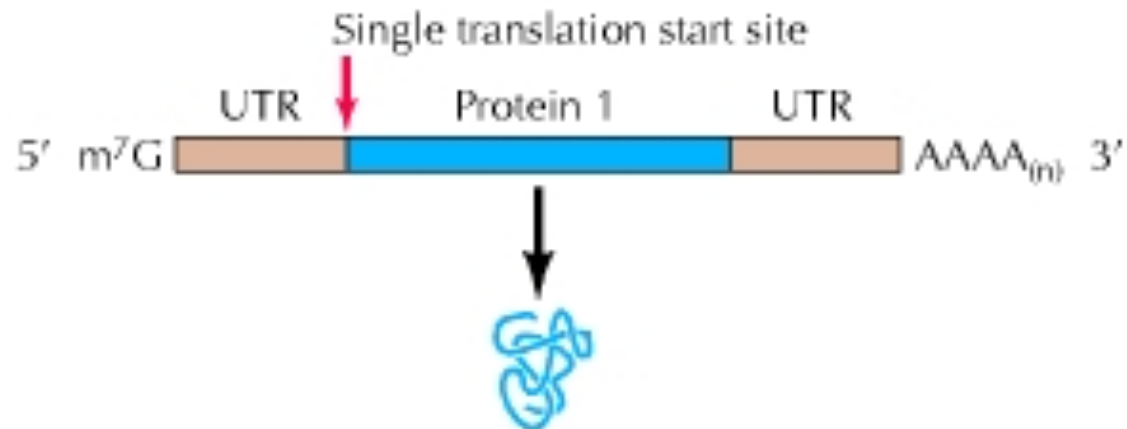
🌈 Τοποθέτηση του εναρκτήριου κωδικονίου (AUG)

στη μικρή ριβοσωμική υπομονάδα

Prokaryotic mRNA



Eukaryotic mRNA

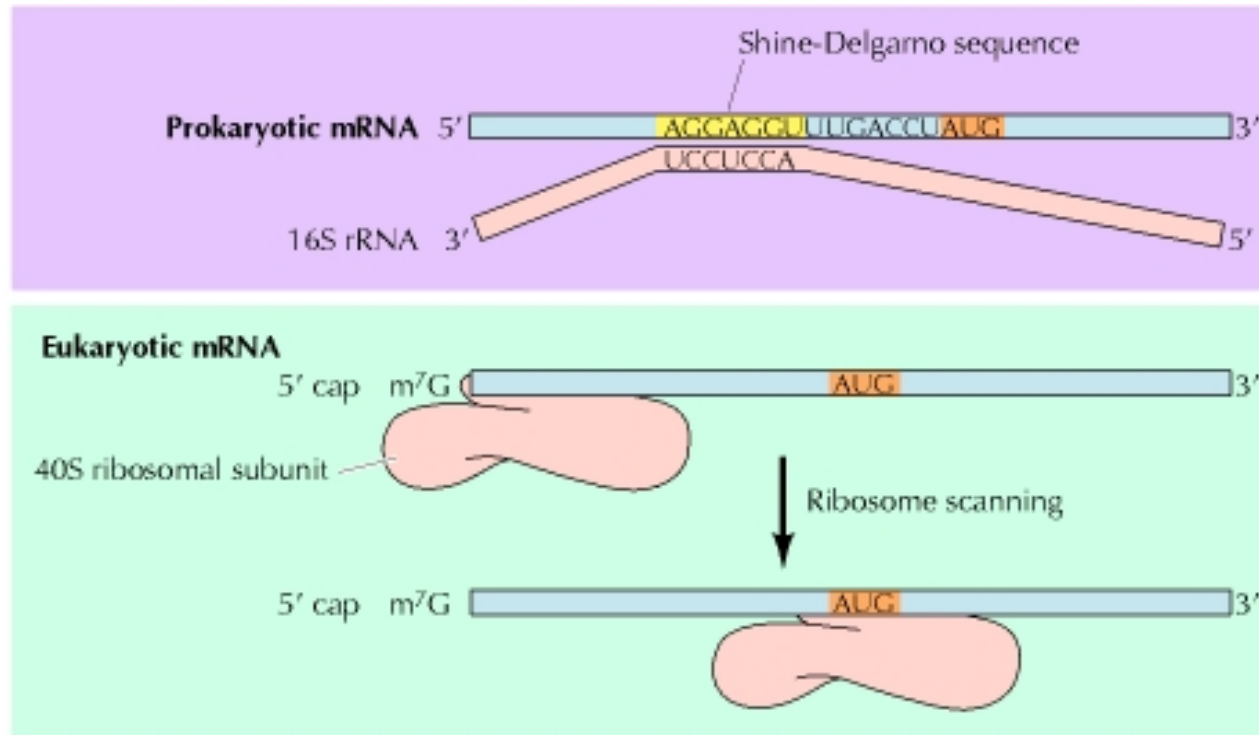


Παράγοντες μετάφρασης

Ρόλος	Προκαρυωτικοί	Ευκαρυωτικοί
ΕΝΑΡΞΗ	IF-1, IF-2, IF-3	eIF-1, eIF-1A, eIF-2, eIF-2B, eIF-3, eIF-4A, eIF-4B, eIF-4E, eIF-4G, eIF-5
ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗ	EF-Tu, EF-Ts, EF-G	eEF-1α, eEF-1βγ, eEF-2
ΤΕΡΜΑΤΙΣΜΟΣ	RF-1, RF-2, RF-3	eRF-1, eRF-3

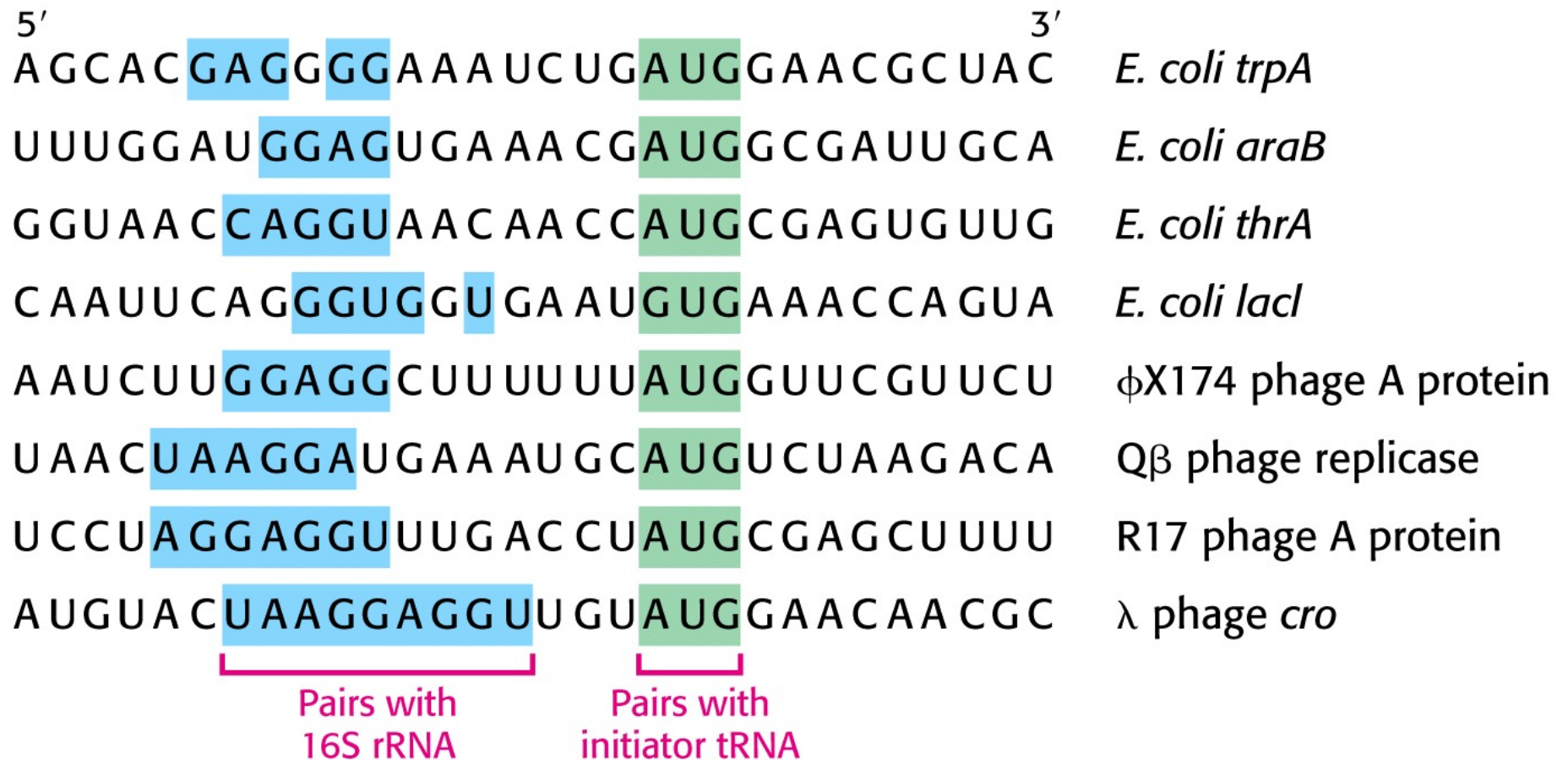
ΕΝΑΡΞΗ: αλληλουχίες για έναρξη μετάφρασης

Signals for translation initiation

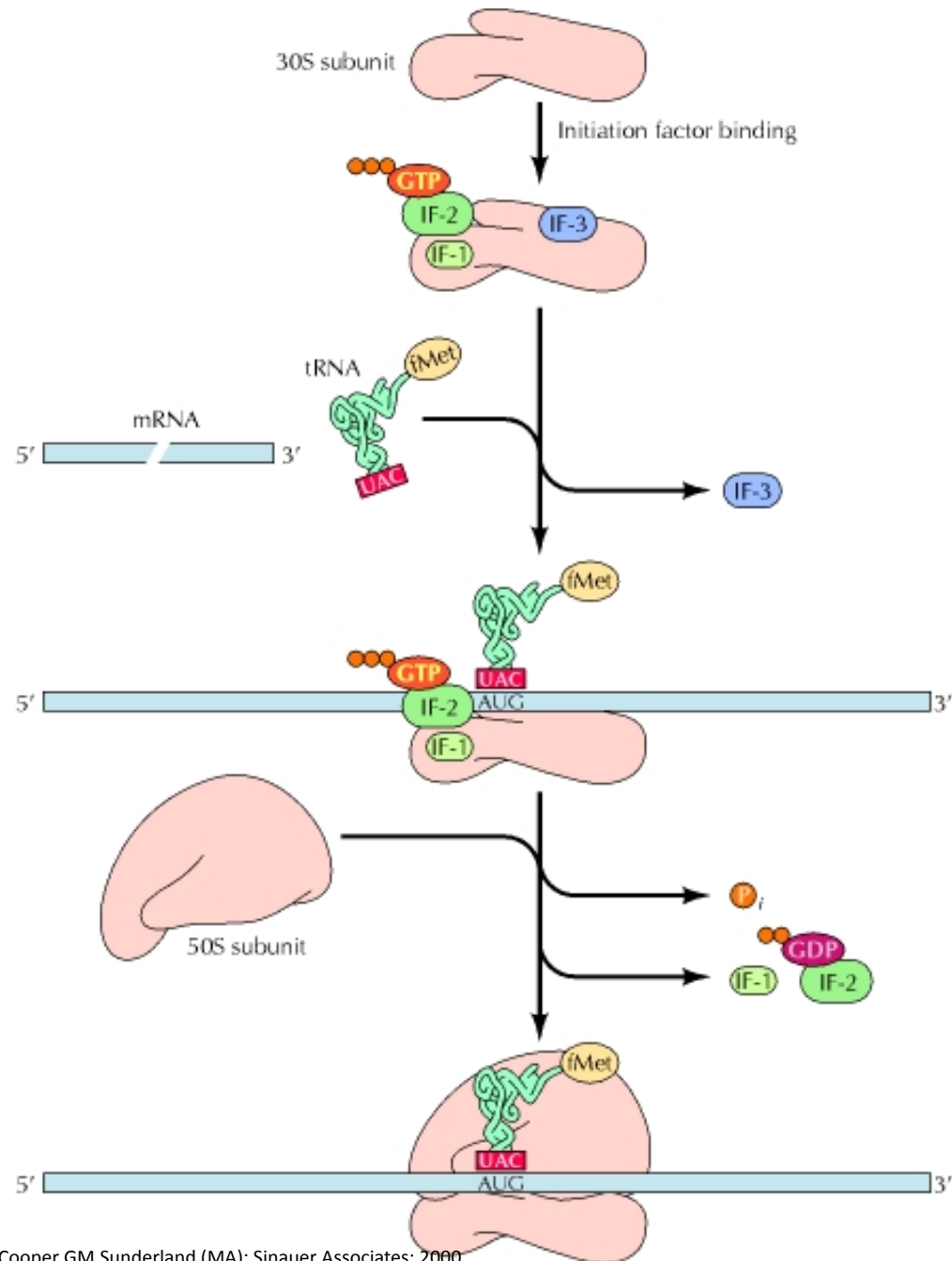


Η σύνθεση των πρωτεϊνών ξεκινά από το αμινο-τελικό άκρο

- 🌈 Το mRNA μεταφράζεται από το 5' προς το 3' άκρο
- 🌈 Το αρχικό σήμα είναι AUG (ή GUG) αμέσως μετά από αλληλουχίες οι οποίες ζευγαρώνουν με το 16S rRNA



Η έναρξη στους προκαρυωτικούς οργανισμούς

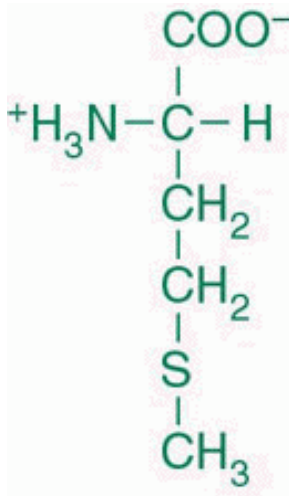


Δύο διαφορετικά tRNAs αναγνωρίζουν το εναρκτήριο κωδικόνιο AUG

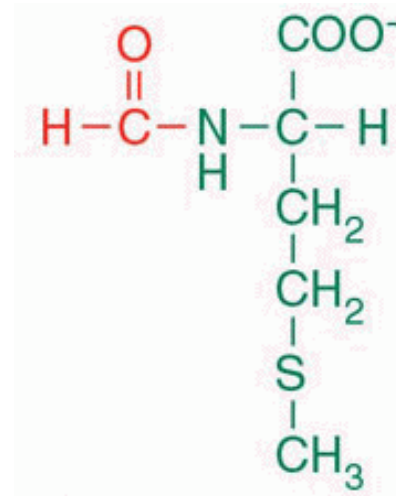
Το πρώτο αμινοξύ της πρωτεϊνοσύνθεσης είναι **πάντα** Met.

Εναρκτήριο tRNA: tRNA_f^{Met} (προκαρυωτικοί) ή tRNA_i^{Met} (ευκαρυωτικοί)

Ενδιάμεσο tRNA: tRNA_m^{Met}



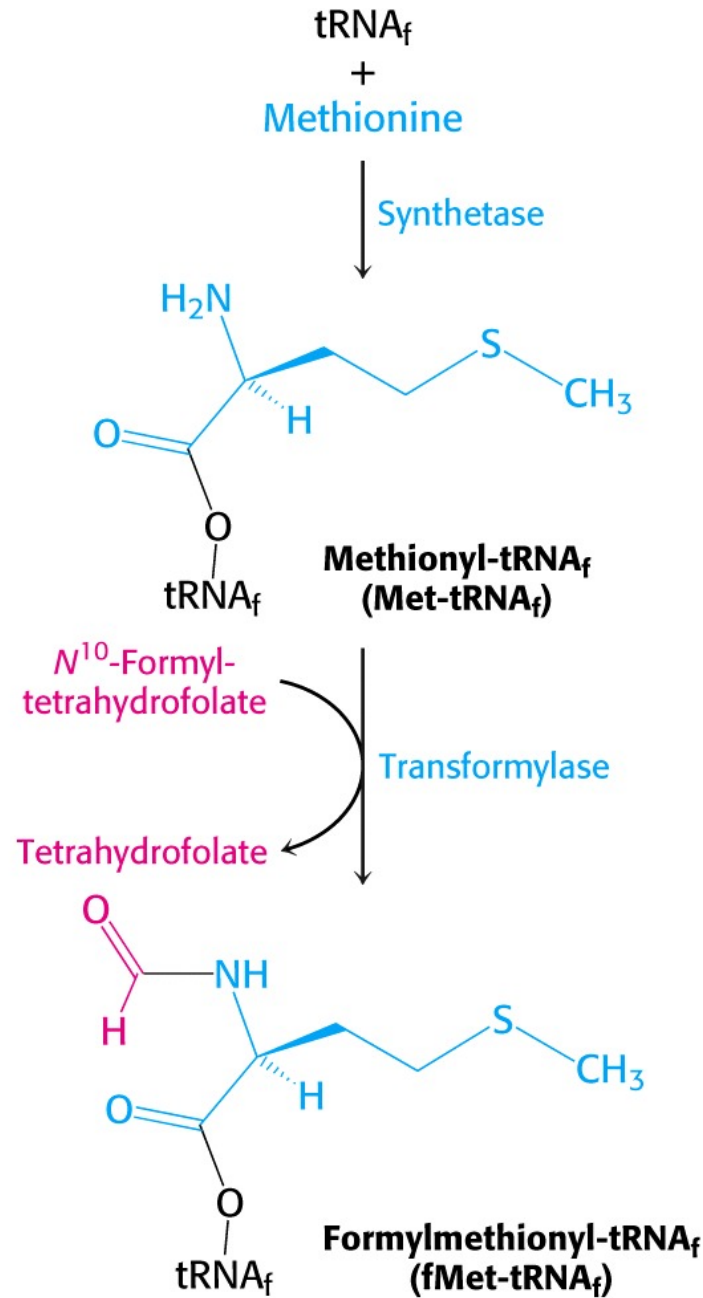
Μεθειονίνη, Met



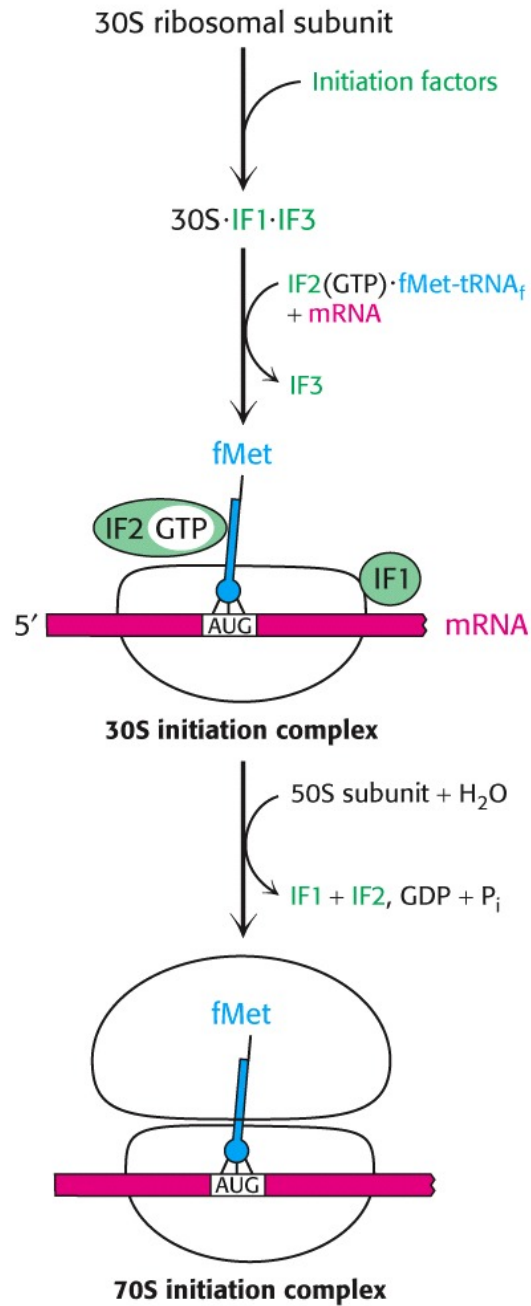
Φορμυλομεθειονίνη, fMet

Η προσθήκη της φορμυλο-ομάδας στην αμινομάδα την καθιστά χημικά αδρανή, οπότε η επιμήκυνση της πεπτιδικής αλυσίδας θα γίνει από την καρβόξυλομάδα

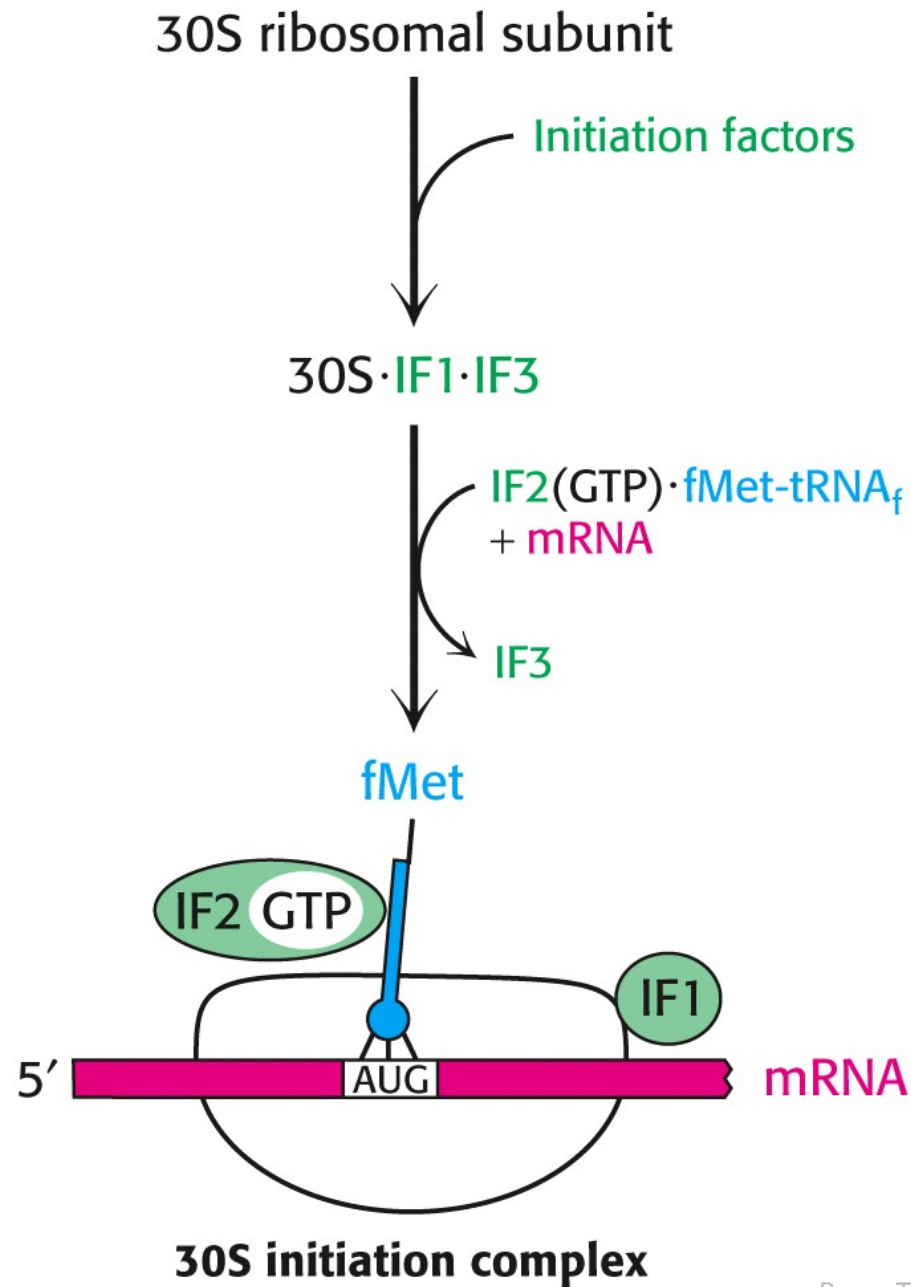
Σύνθεση fMet-tRNA_f (εναρκτήριο αμινοξύ προκαρυωτικών)



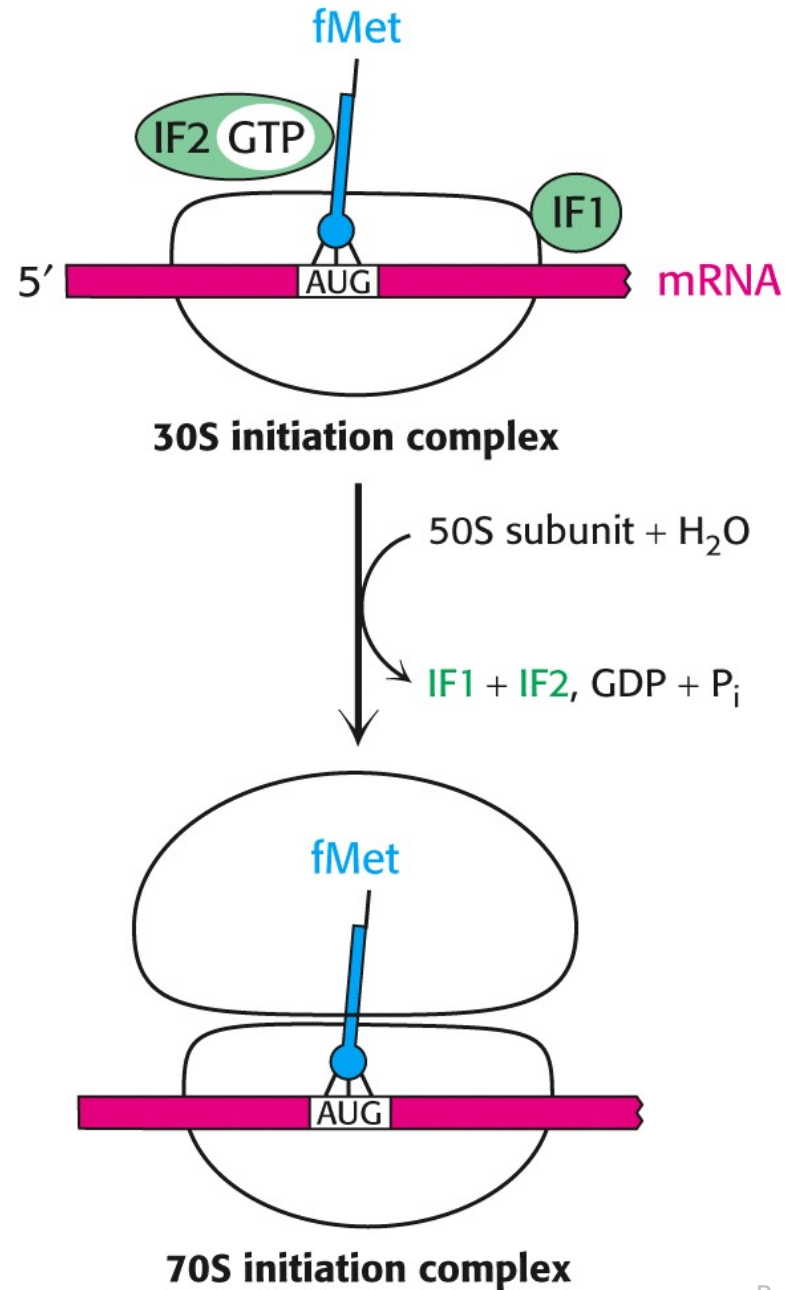
Η έναρξη στους προκαρυωτικούς οργανισμούς



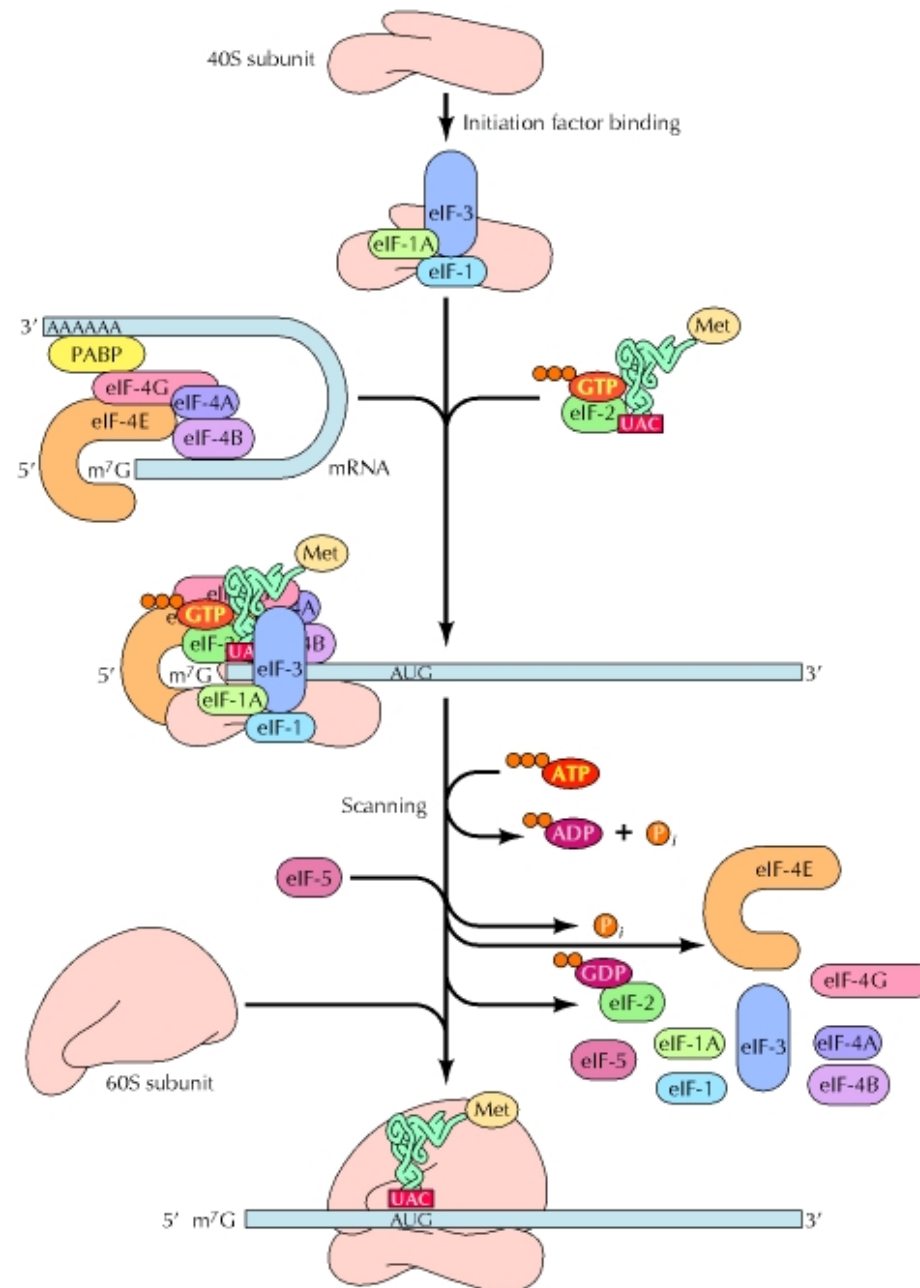
Η έναρξη στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, I



Η έναρξη στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, II



Η έναρξη στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς



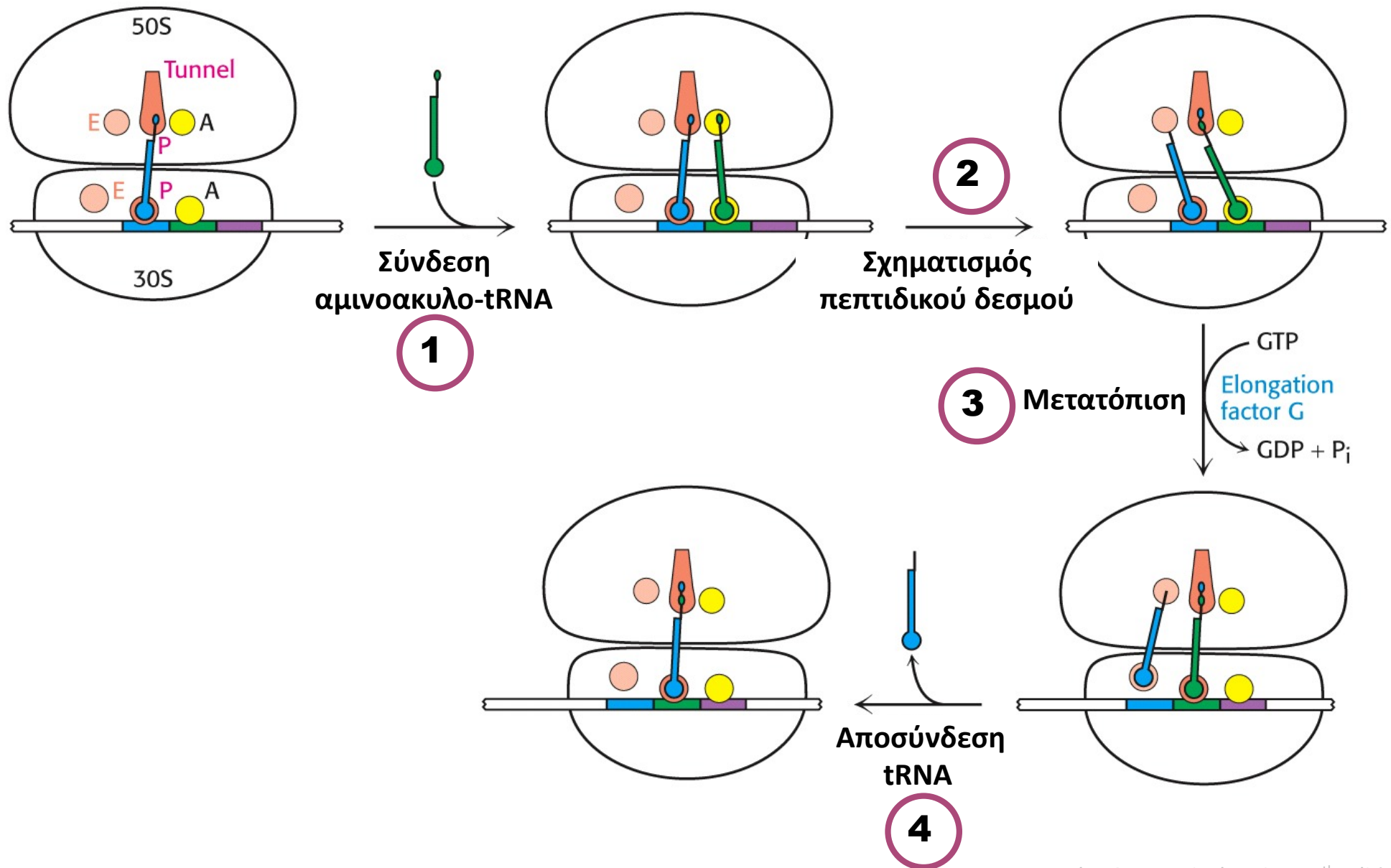
Γενική στρατηγική της μετάφρασης- στάδια

 Εναρξη

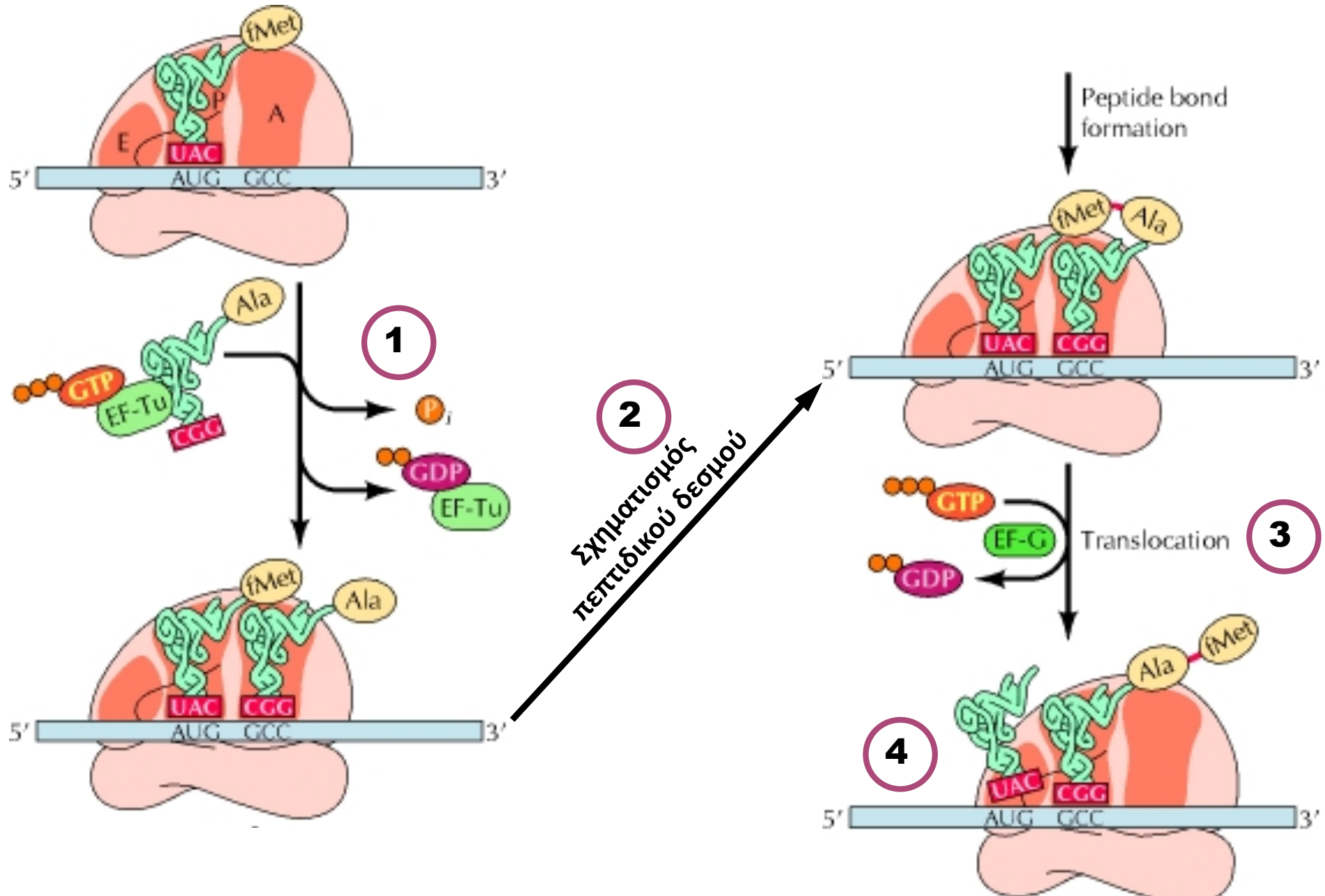
 **Επιμήκυνση**

 Τερματισμός

Η επιμήκυνση της βιοσύνθεσης των πρωτεϊνών

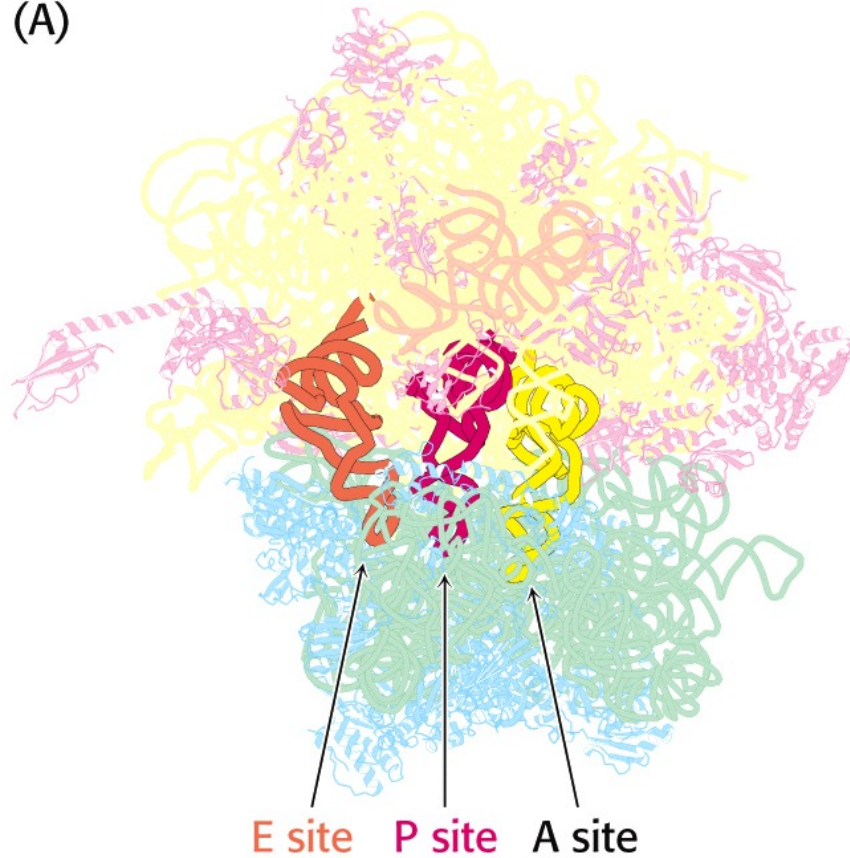


Η επιμήκυνση της βιοσύνθεσης των πρωτεϊνών

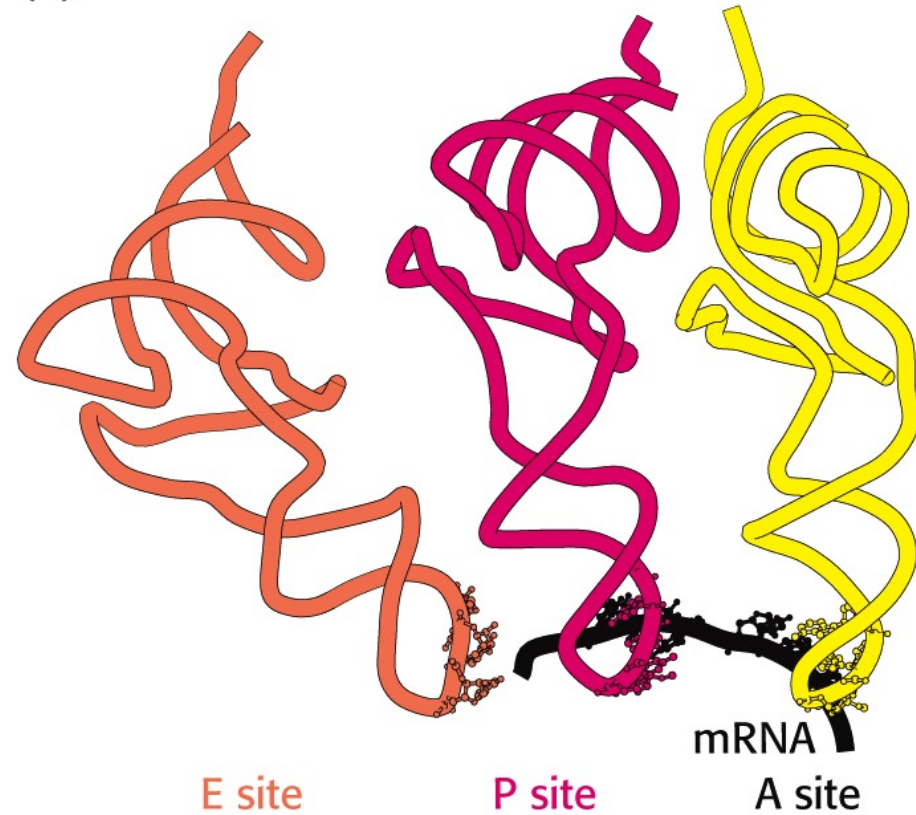


Ο προσανατολισμός των tRNAs μέσα στο ριβόσωμα

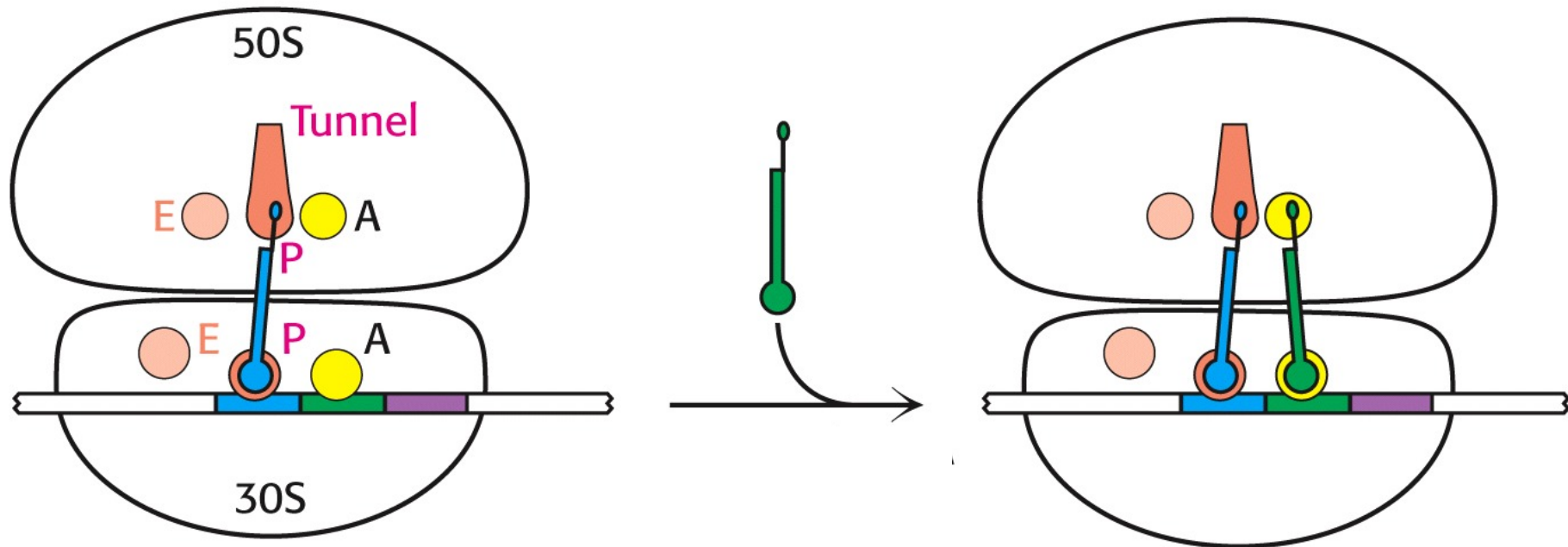
(A)



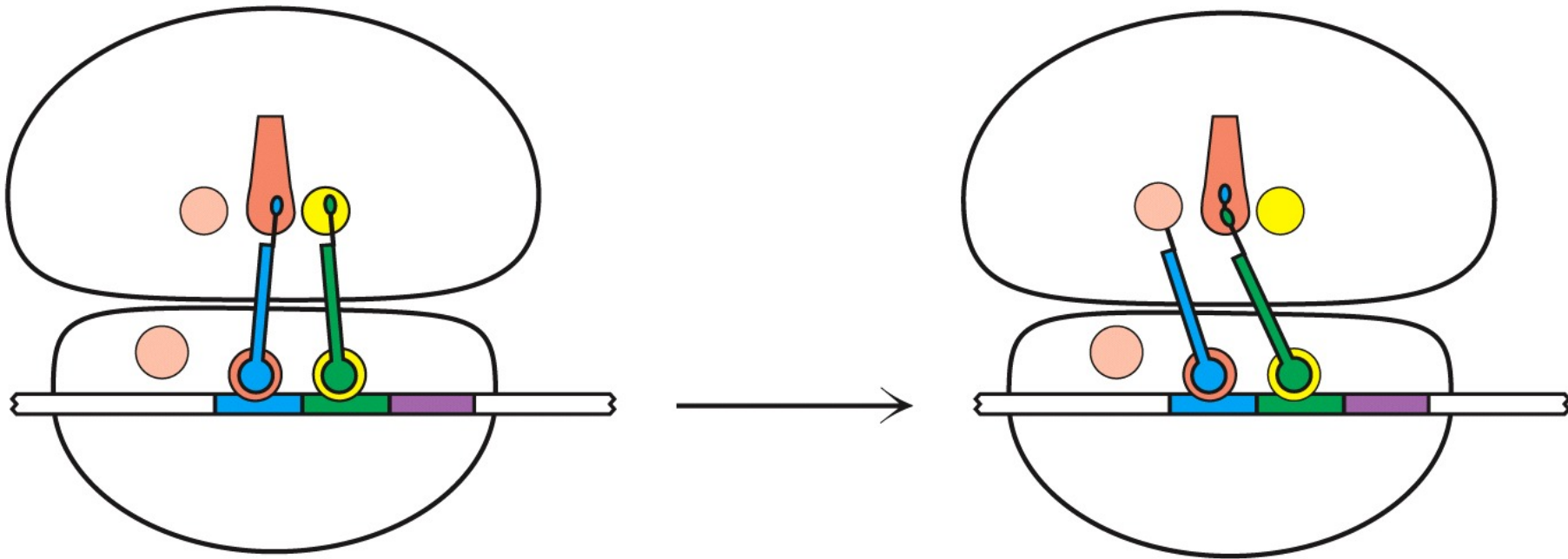
(B)



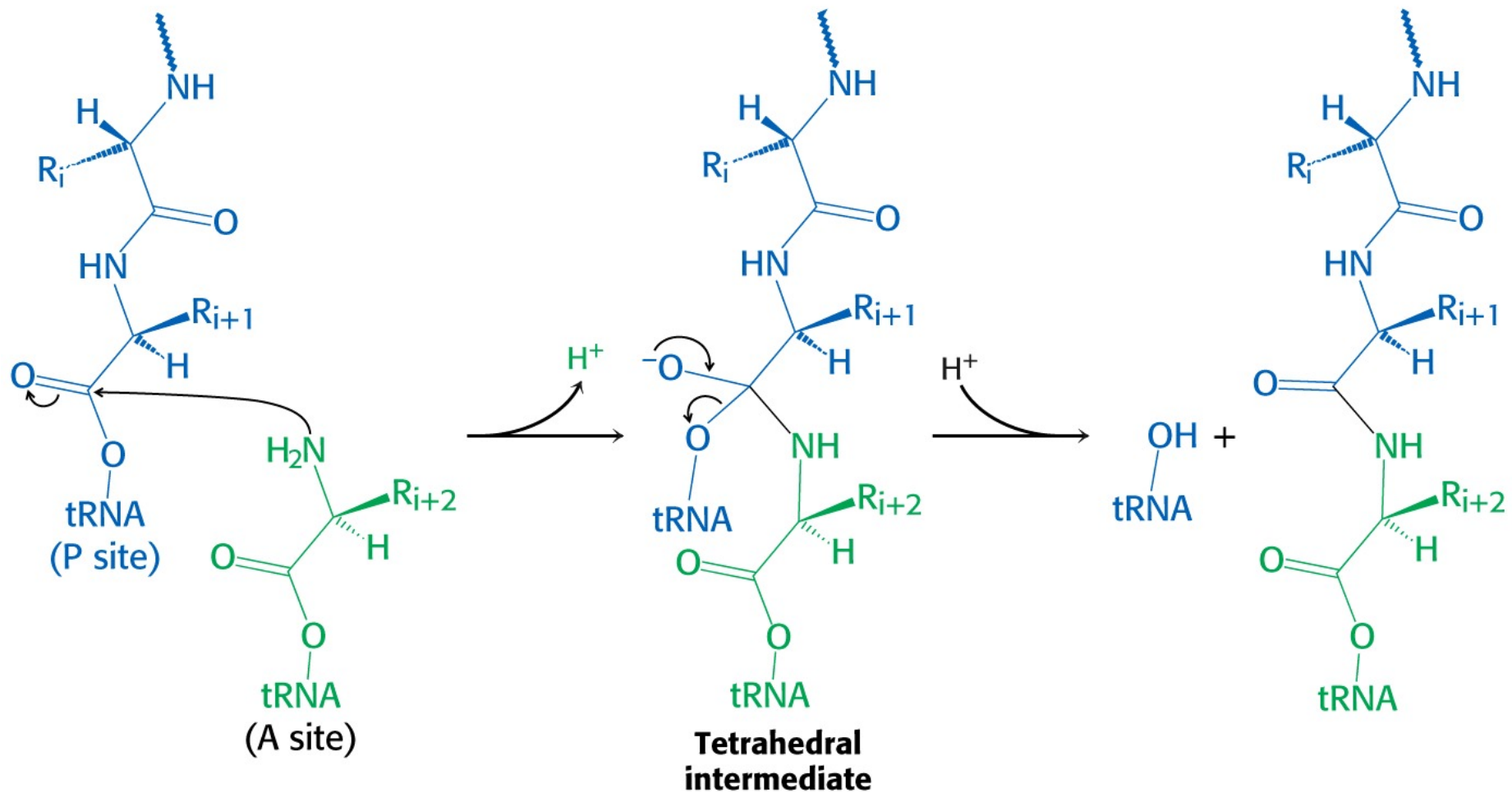
Η σύνδεση του αμινοακυλο-tRNA



Ο σχηματισμός του πεπτιδικού δεσμού

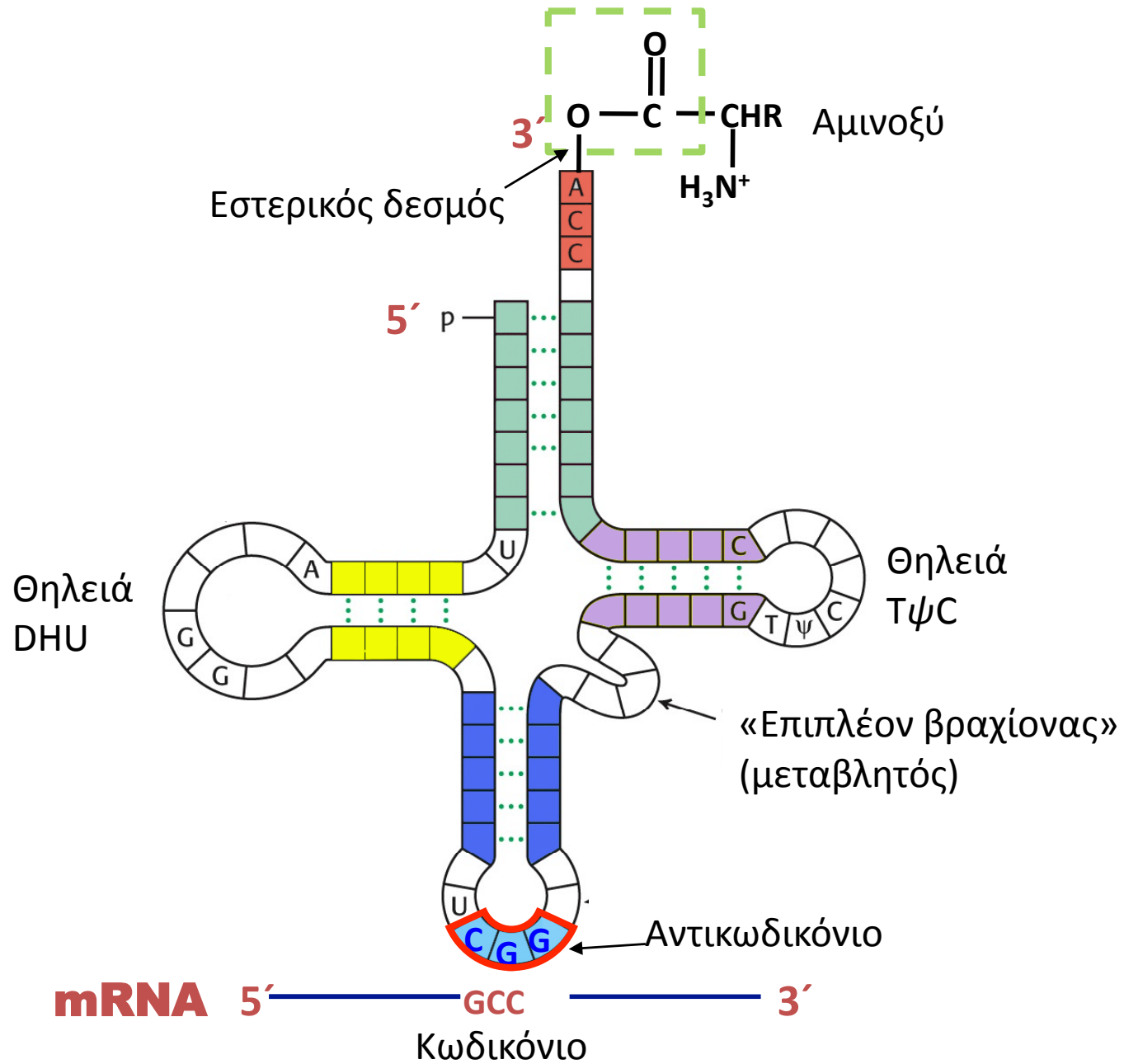


Ο σχηματισμός του πεπτιδικού δεσμού



Η κατεύθυνση της σύνθεσης των πρωτεϊνών είναι από το άμινο- προς το καρβόξυ- τελικό τους άκρο (N- προς C- άκρο)

tRNA



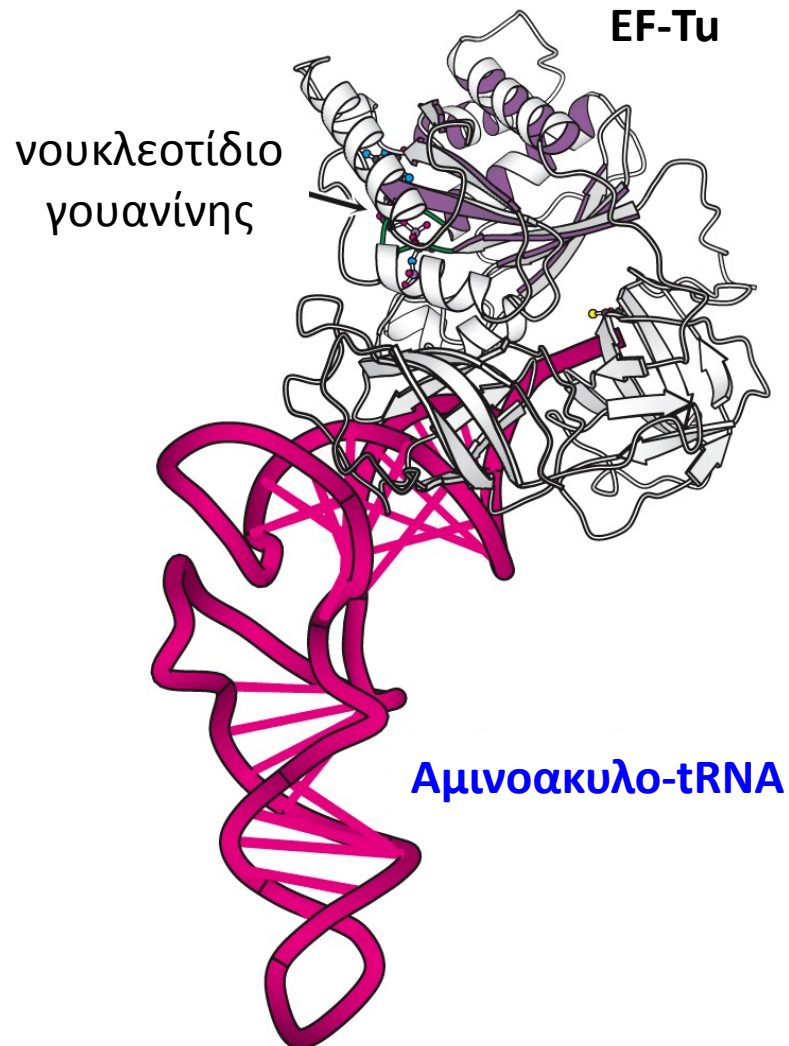
Πεπτιδικός ή αμιδικός δεσμός (κατανάλωση ενέργειας)

Η ισορροπία της αντίδρασης βρίσκεται στην πλευρά της υδρόλυσης και όχι της σύνθεσης

Μια ομάδα αμινοξέος σε ένα πολυπεπτίδιο λέγεται κατάλοιπο αμινοξέος (amino acid residue).

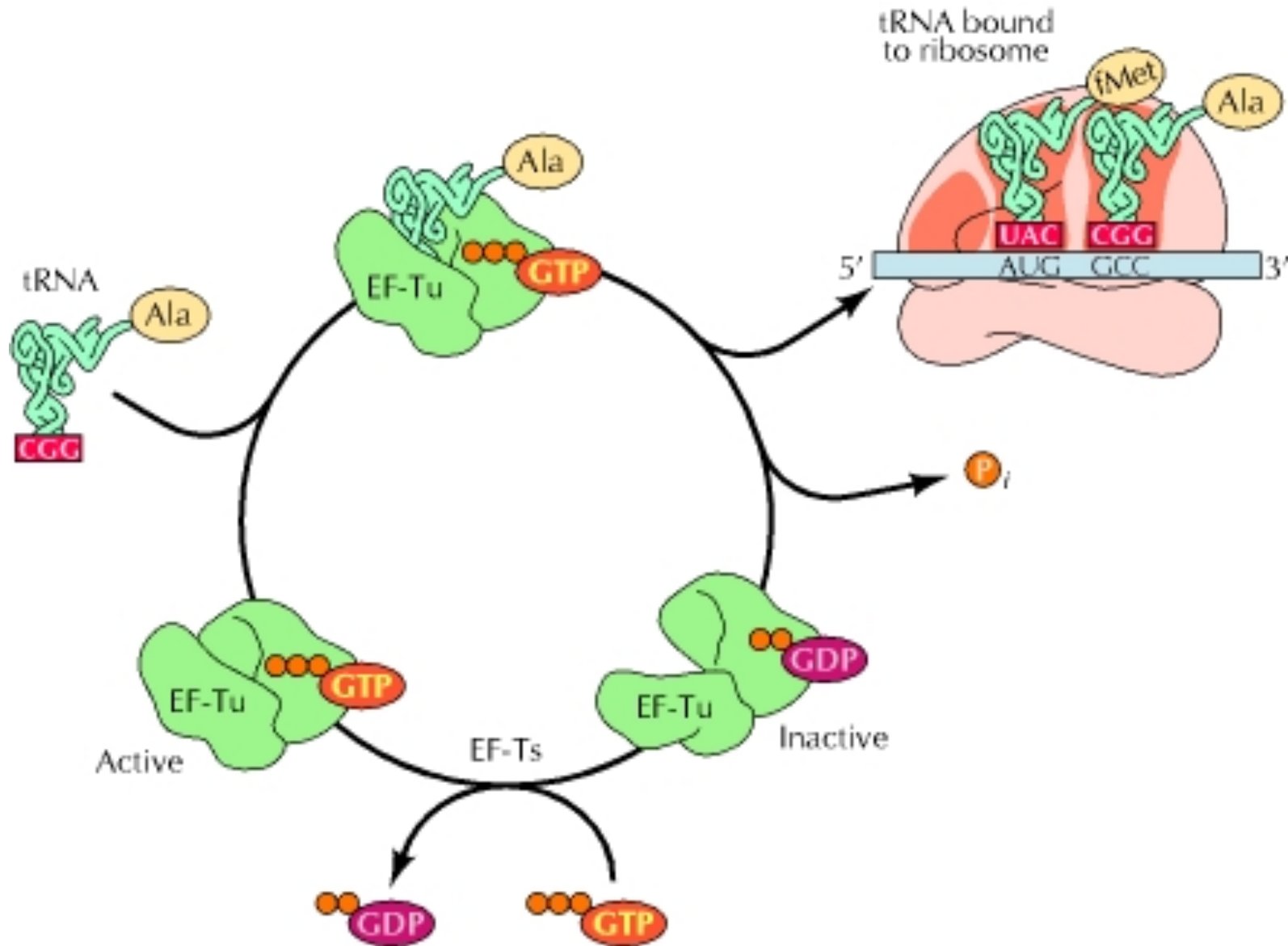
Κατεύθυνση από το N-τελικό άκρο προς το C-τελικό άκρο

Ο ρόλος του παράγοντα επιμήκυνσης EF-Tu (Elongation Factor -Tu)

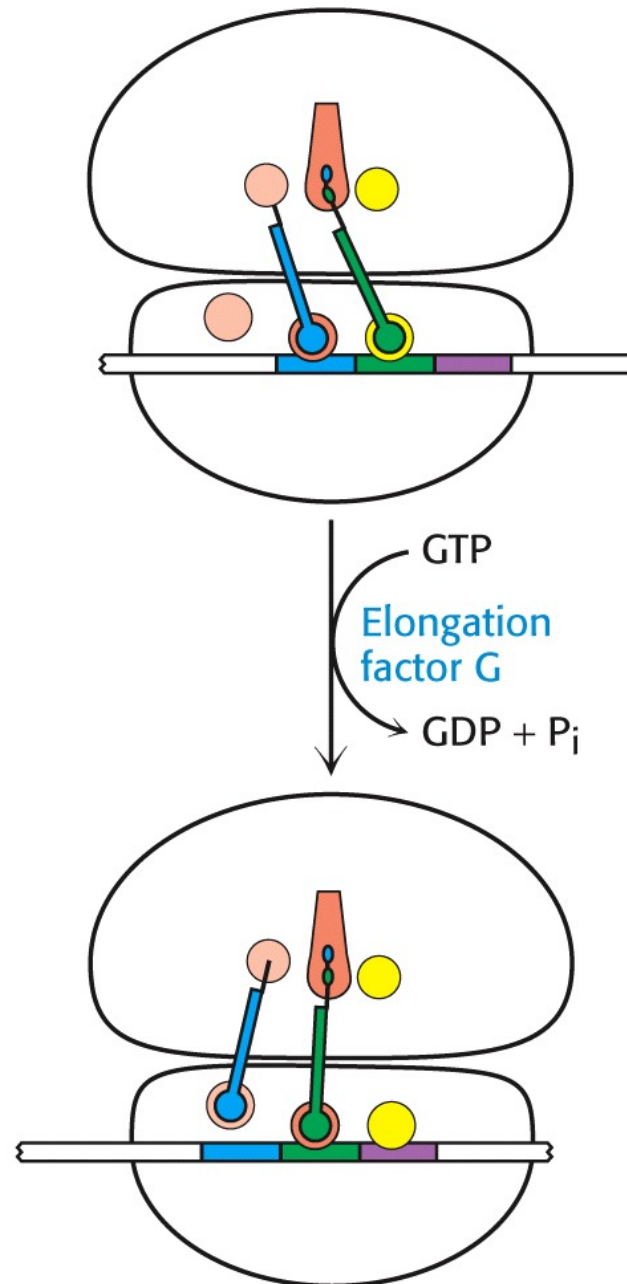


- Δέσμευση 2^{ου} αμινοάκυλ-tRNA
- Δεσμεύει ένα μόριο GTP
- Έλεγχος δέσμευσης σωστού-λανθασμένου αμινοάκυλ-tRNA (proofreading)
Το σύμπλοκο EF-Tu-GTP υδρολύεται ~10000 φορές γρηγορότερα όταν δεσμεύεται το σωστό αμινοάκυλ-tRNA από ότι ένα λανθασμένο

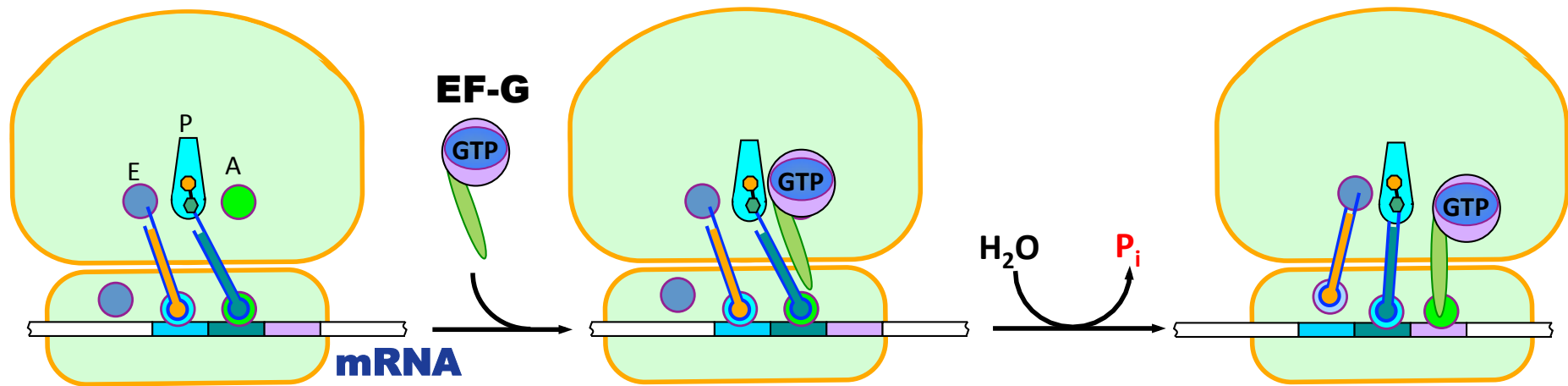
Η αναγέννηση του EF-Tu/GTP

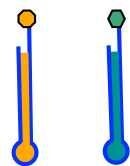


Η μετατόπιση (translocation) του tRNA και mRNA



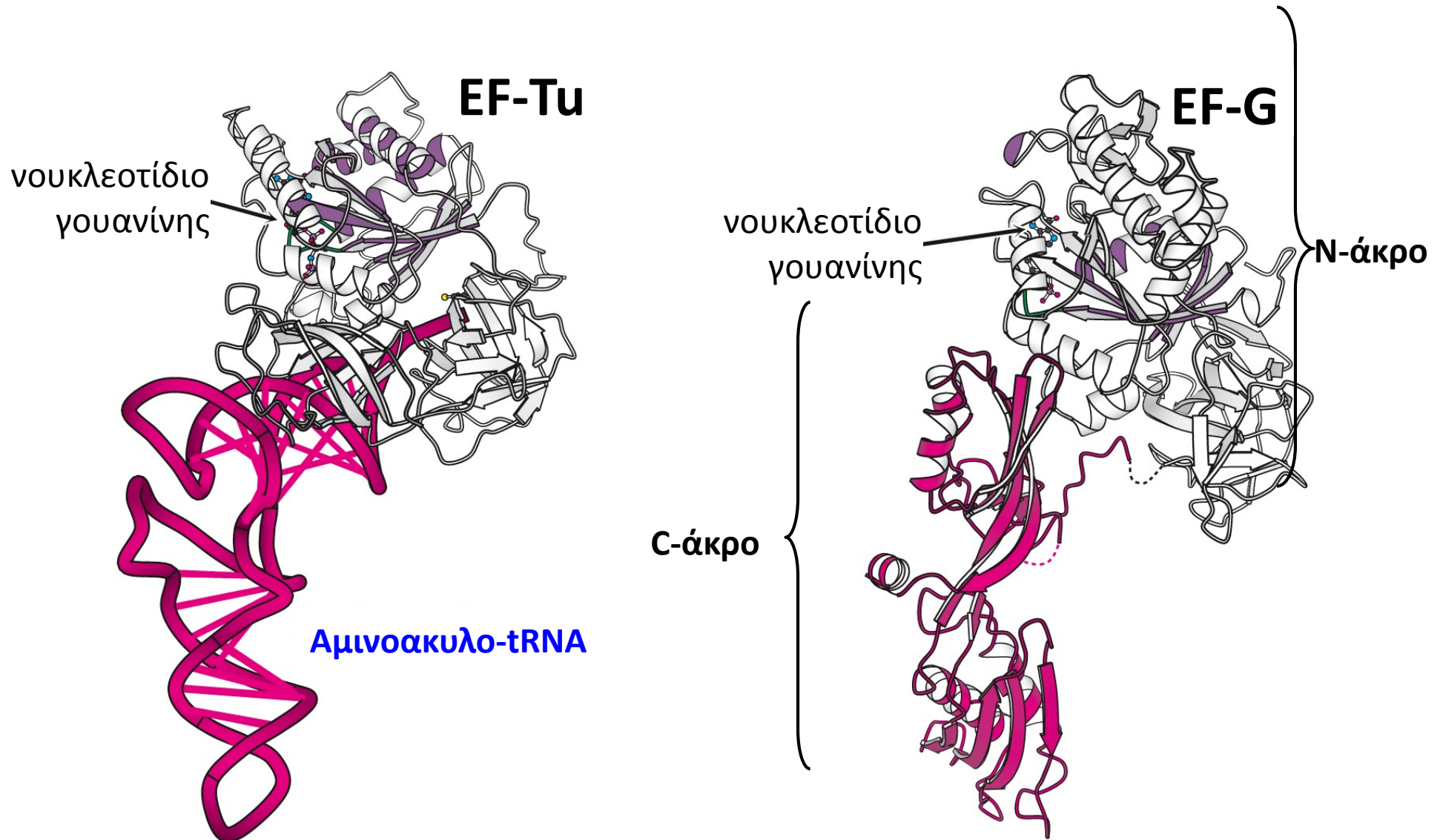
Η μετατόπιση (translocation) του tRNA και mRNA



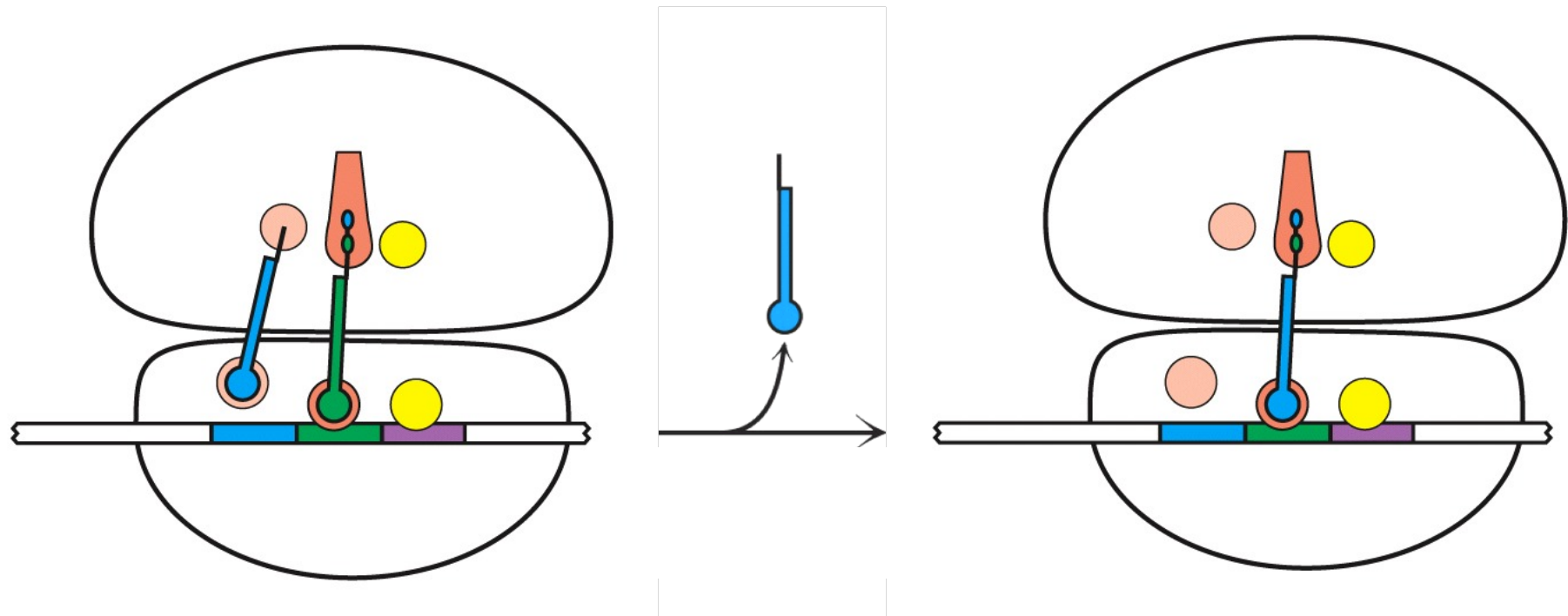
 αμινοάκυλο-tRNAs

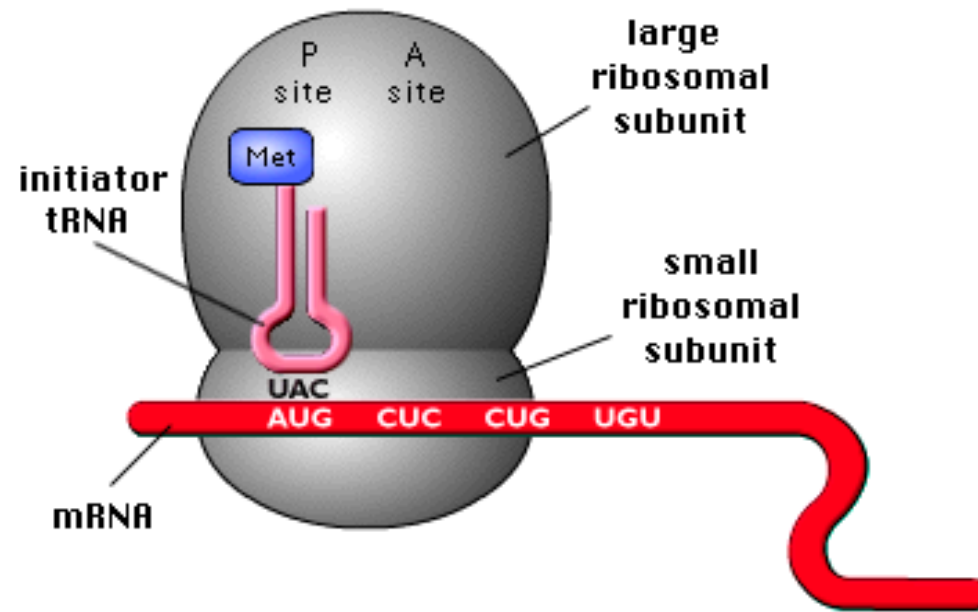
Η μετατόπιση διεκπεραιώνεται από τον παράγοντα επιμήκυνσης EF-G

Μοριακή απομίμηση: ο παράγοντας EF-G μιμείται το σύμπλοκο EF-Tu - tRNA

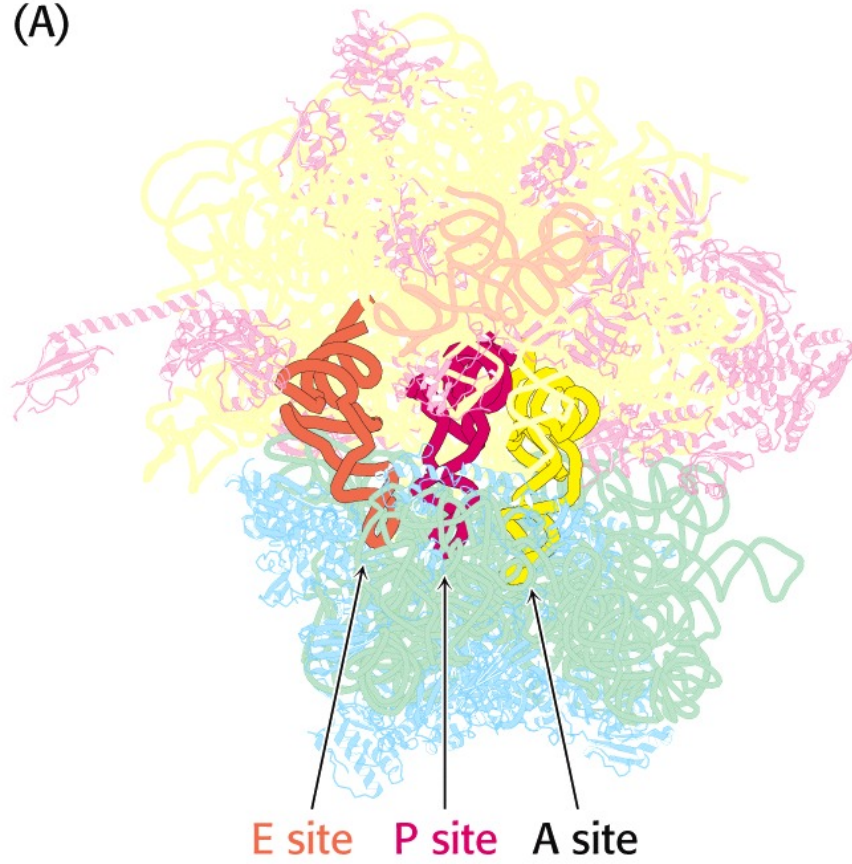


Η αποσύνδεση του tRNA

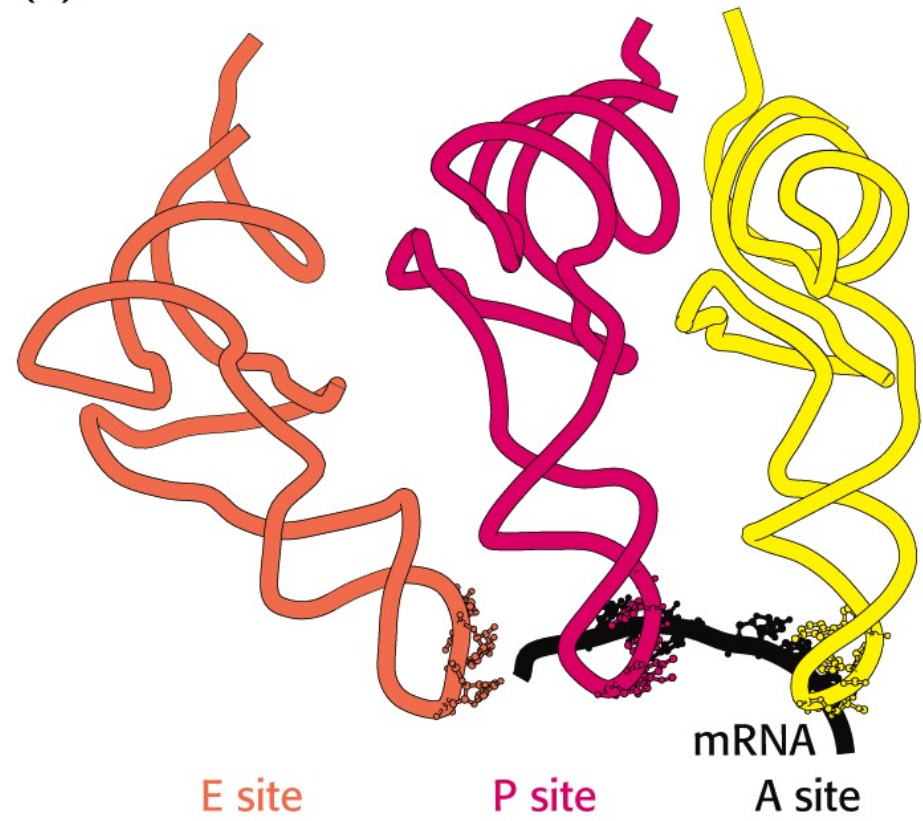




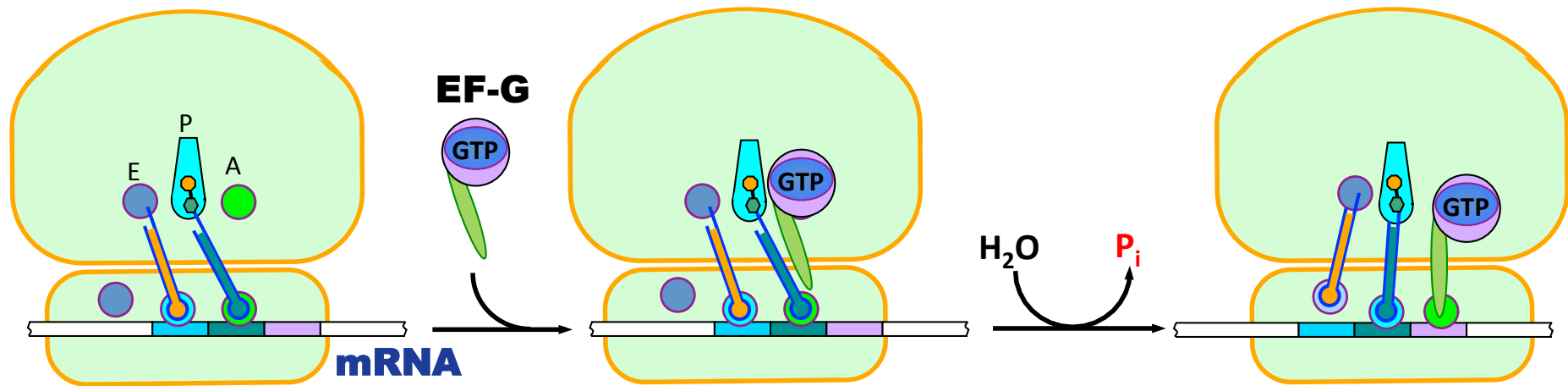
(A)

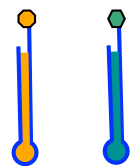


(B)



Η μετατόπιση (translocation) του tRNA και mRNA



 αμινοάκυλο-tRNAs

Η μετατόπιση διεκπεραιώνεται από τον παράγοντα επιμήκυνσης EF-G

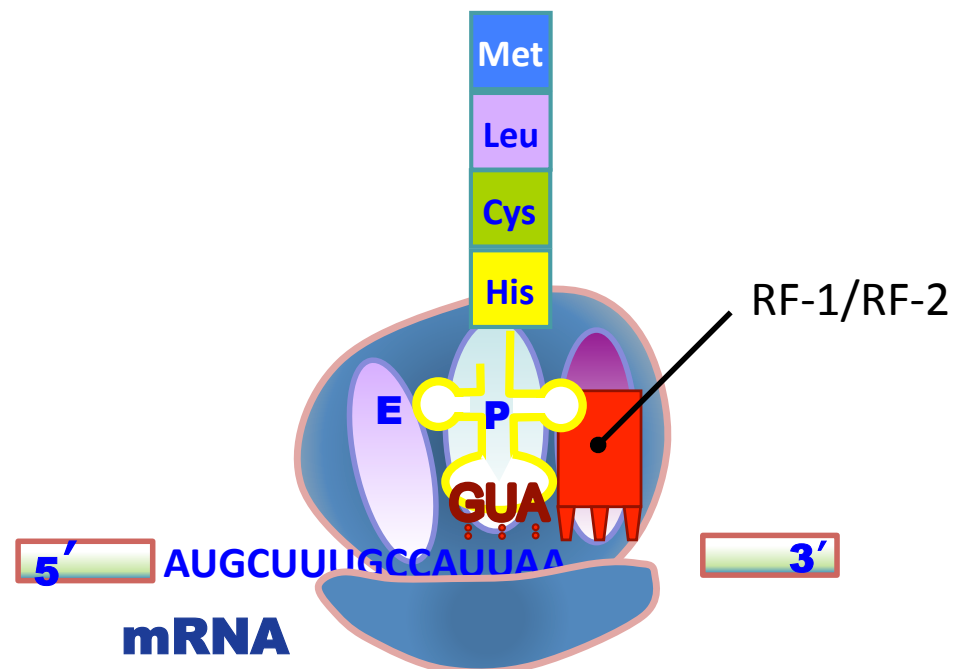
Ο τερματισμός της μετάφρασης στους προκαρυωτικούς οργανισμούς

RF-1, RF-2: Παράγοντες απελευθέρωσης (Release Factors), που αναγνωρίζουν τα κωδικόνια τερματισμού

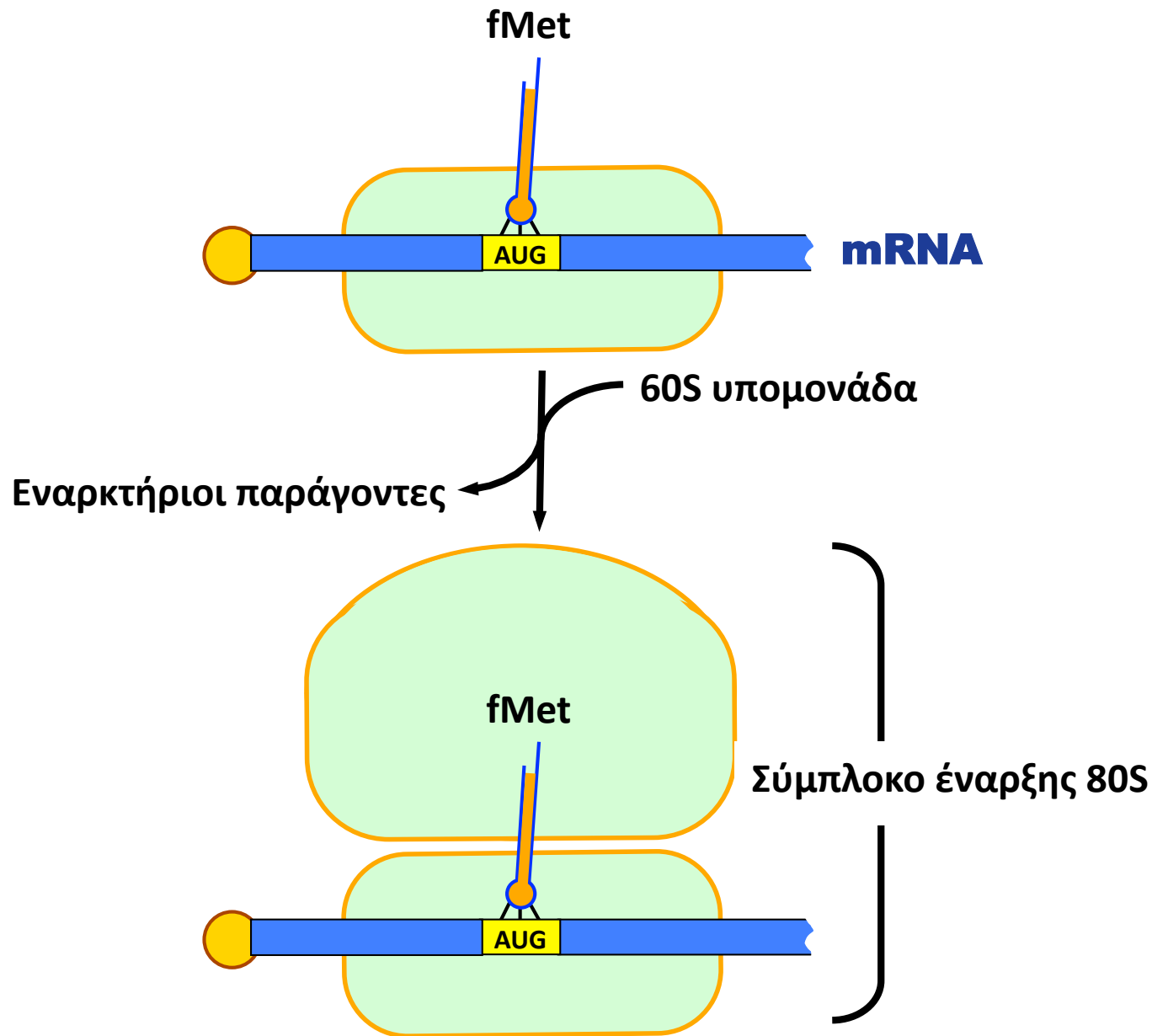
RF-1: Αναγνώριση των κωδικονίων UAA, UAG

RF-2: Αναγνώριση των κωδικονίων UAA, UGA

RF-3: Υποβοήθηση των RF-1 και RF-2.



Η μετάφραση στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς



Η μετάφραση στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς

🌈 Επιμήκυνση

- Ομοια με προκαρυωτικούς
eEF-1α αντί του EF-Tu
ο eEF-1α συνδέεται με GTP
- Δεν υπάρχει ανάλογο του EF-Ts
- Στη μετατόπιση συμμετέχει ο
eEF-2 (που συνδέεται με GTP)

🌈 Τερματισμός

- Παράγοντας τερματισμού (eRF)
(αναγνωρίζει και τα τρία
κωδικόνια τερματισμού)
- Ο eRF συνδέεται με GTP

TABLE 29.4 Antibiotic inhibitors of protein synthesis

Antibiotic	Action
Streptomycin and other aminoglycosides	Inhibit initiation and cause misreading of mRNA (prokaryotes)
Tetracycline	Binds to the 30S subunit and inhibits binding of aminoacyl-tRNAs (prokaryotes)
Chloramphenicol	Inhibits the peptidyl transferase activity of the 50S ribosomal subunit (prokaryotes)
Cycloheximide	Inhibits the peptidyl transferase activity of the 60S ribosomal subunit (eukaryotes)
Erythromycin	Binds to the 50S subunit and inhibits translocation (prokaryotes)
Puromycin	Causes premature chain termination by acting as an analog of aminoacyl-tRNA (prokaryotes and eukaryotes)

Μεταγραφή – Μετάφραση, σε πραγματικό χρόνο



http://www.youtube.com/watch?v=41_Ne5mS2ls

http://www.youtube.com/watch?v=41_Ne5mS2Is