

9. Transzkripció pro- és eukariótákban

2015. november 12.

Lippai Mónika
lippai@elte.hu

Az információátadás módja

1961. Már tudják, hogy a DNS az örökítő anyag.

De mi közvetíti az információt a DNS és a fehérje között?

Valami olyasminek kell lennie, ami kijön a sejtmagból, és a citoszolban működő riboszómákhoz viszi az „üzenetet”. Akkor már tudtak a riboszómákban található riboszomális RNS-ek létezéséről (stabil, jól izolálható RNS). Lehet, hogy rRNS a közvetítő?

A kísérletek során kihasználták, hogy a virulens fágokkal fertőzött baktériumok azonnal leállítják saját fehérjéik termelését, és rögtön fágfehérjék tömegét szintetizálják.

Mi közvetíti az információt a DNS és a fehérje között?

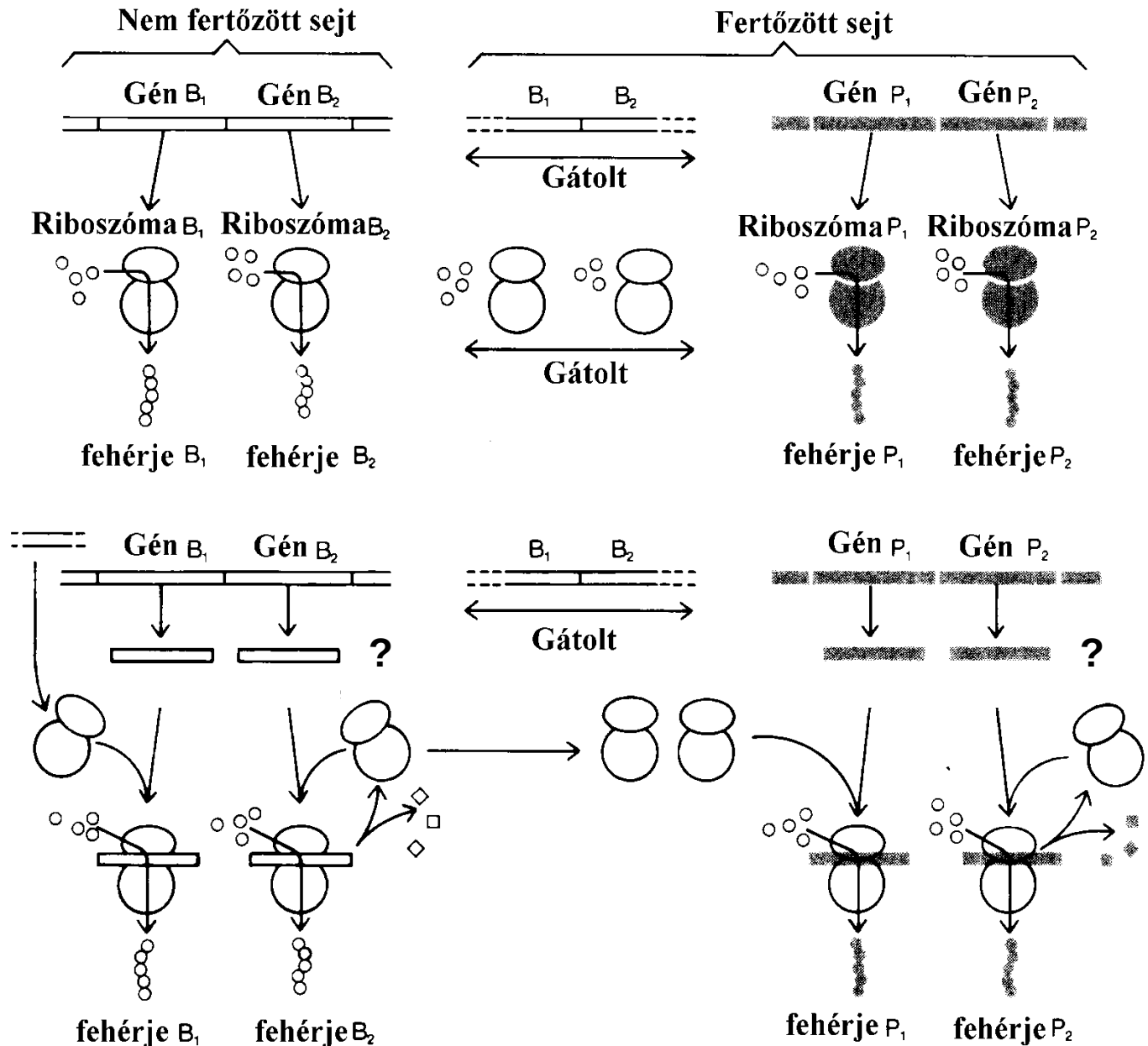
1. modell: a riboszómákban az rRNS-ek:

minden új fehérjét frissen szintetizálódt, új rRNS-tartalmú riboszóma állít elő

2. modell: valami más

A riboszómák állandóak, az üzenetet más hozza

B1, B2: baktériumgén,
riboszóma, fehérje
P1, P2: fággén,
riboszóma, fehérje



Mi közvetíti az információt a DNS és a fehérje között?

Sydney Brenner, Francis Jacob és Matthew Meselson, 1961:

Nehéz N- és C-izotópokat tartalmazó tápoldatban tartott , majd a fertőzéssel egyidőben könnyű izotópos közegbe áttett baktériumok vizsgálatával a 2. modell igazolódott be.

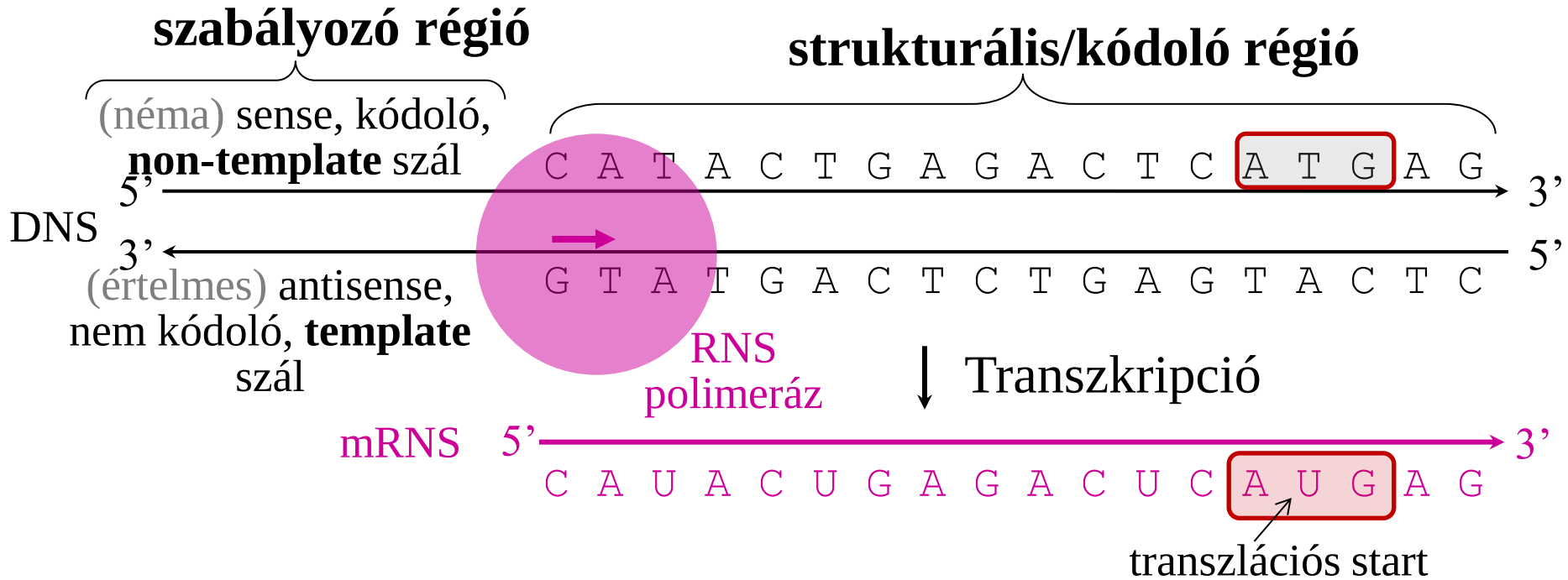
A nagyon gyorsan megjelenő új fágfehérjék „régik”, még nehéz izotópokat tartalmazó riboszómákra keletkeznek – tehát **nem** riboszomális RNS kódolja az új fehérjéket!

Újabb kísérletek eredménye: az információt egy másik, RNS-természetű, de kevésbé stabil molekula továbbítja a riboszómákhoz: ezt nevezték el **messenger RNS –nek**.

Egy adott gén esetében a DNS mindkét, vagy csak az egyik száláról képződik mRNS?

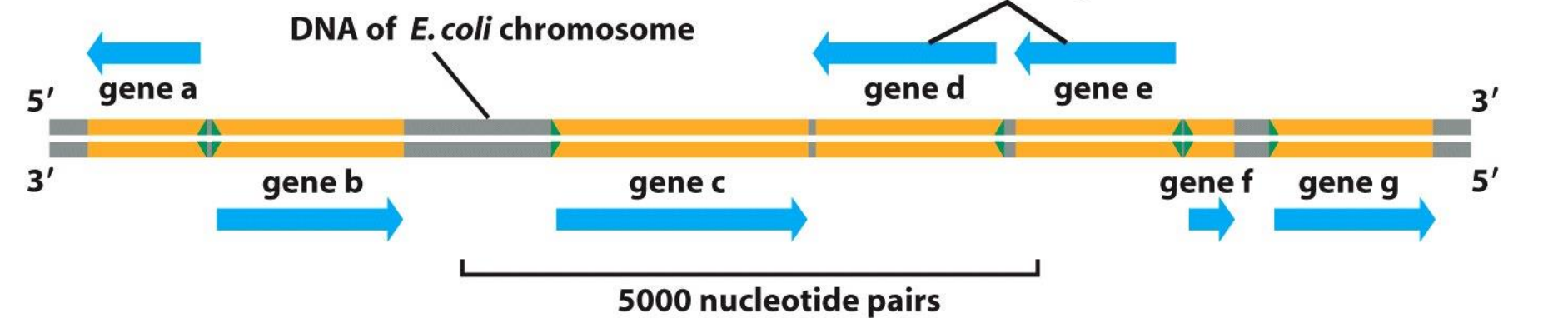
Válasz: csak az egyik szálról (de ez különböző gének esetében nem feltétlenül ugyanaz a szál!)

A transzkripció mechanizmusa (és a nevezéktan...)

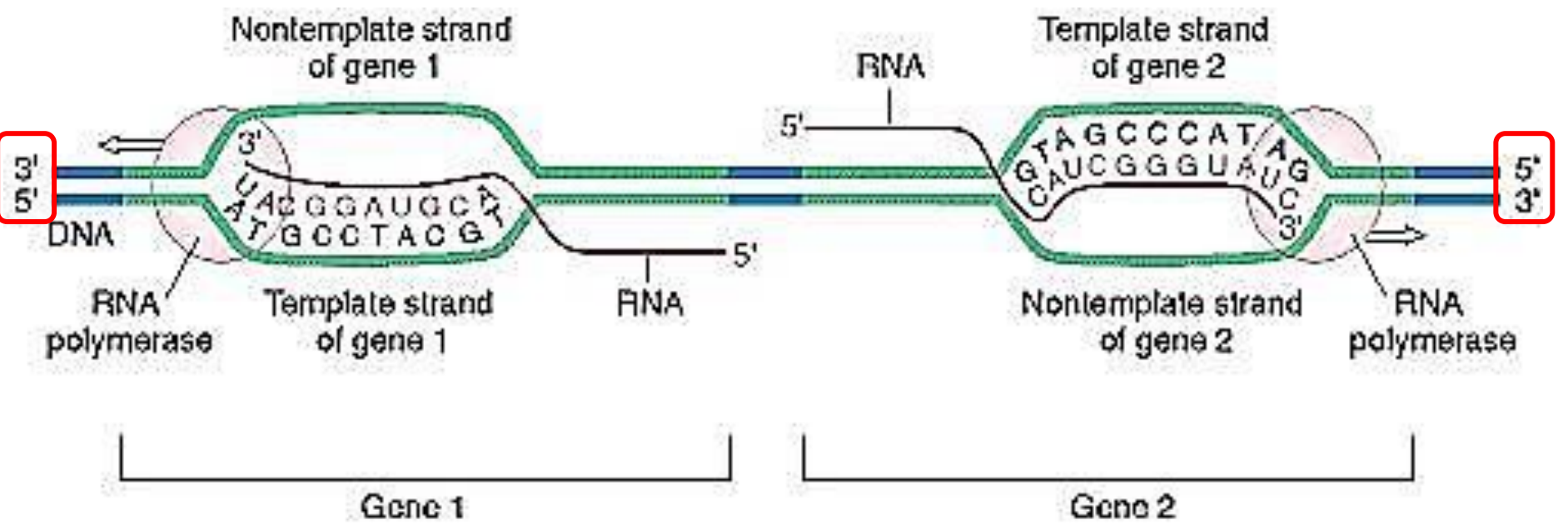


- Az RNS-polimeráz **mindig 5'→3' irányban** készíti az RNS szálát
- Mintaként a DNS 3'→5' irányultságú templát szála szolgál, az itt található bázisok komplementerei kerülnek bele az új RNS-be
- Az RNS bázissorrendje megegyezik a DNS 5'→3' irányultságú (nem-templát, kódoló) száláéval, kivéve: timin helyett uracil épül be
- Ha *fehérjekódoló* génről van szó, az *mRNS* 5' vége utáni első AUG lesz a transzláció kezdetének helye

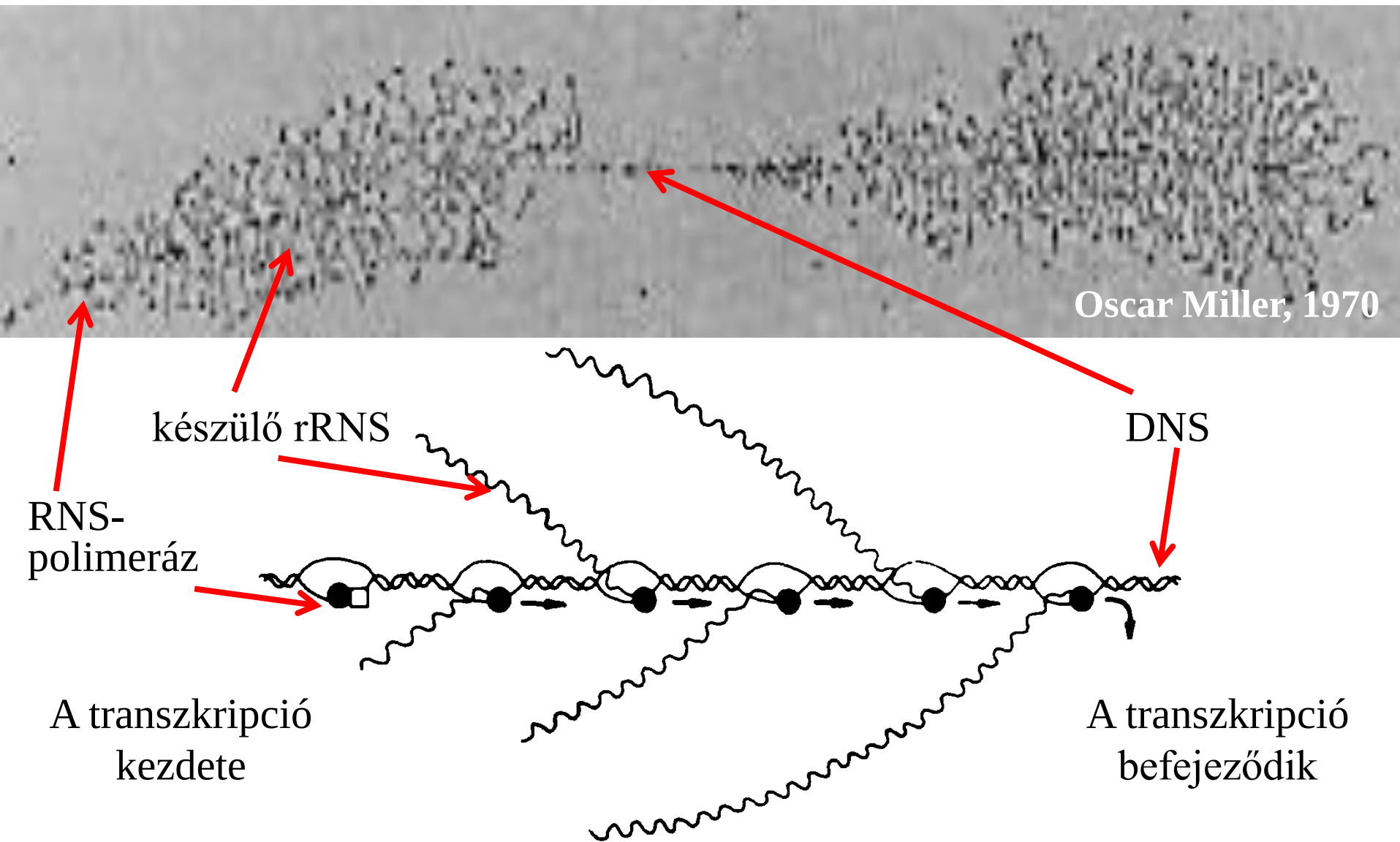
A DNS-nek mindkét szála lehet értelmes – különböző gének esetében



A két szálon az átírás ellentétes irányba halad (mert mindig 5' → 3')

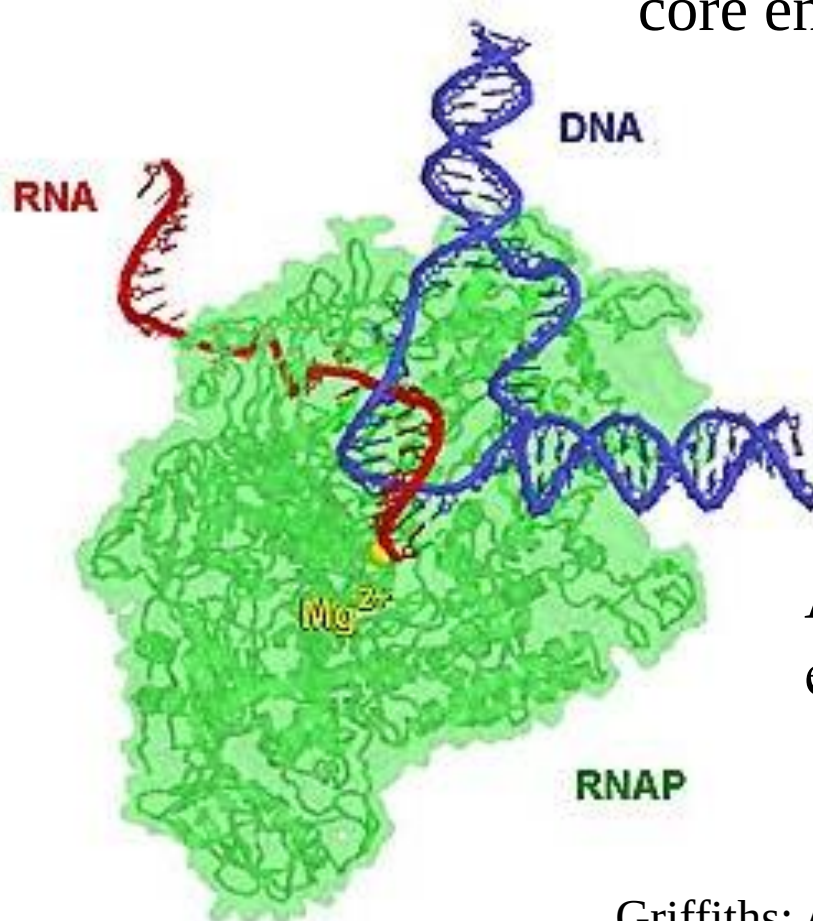
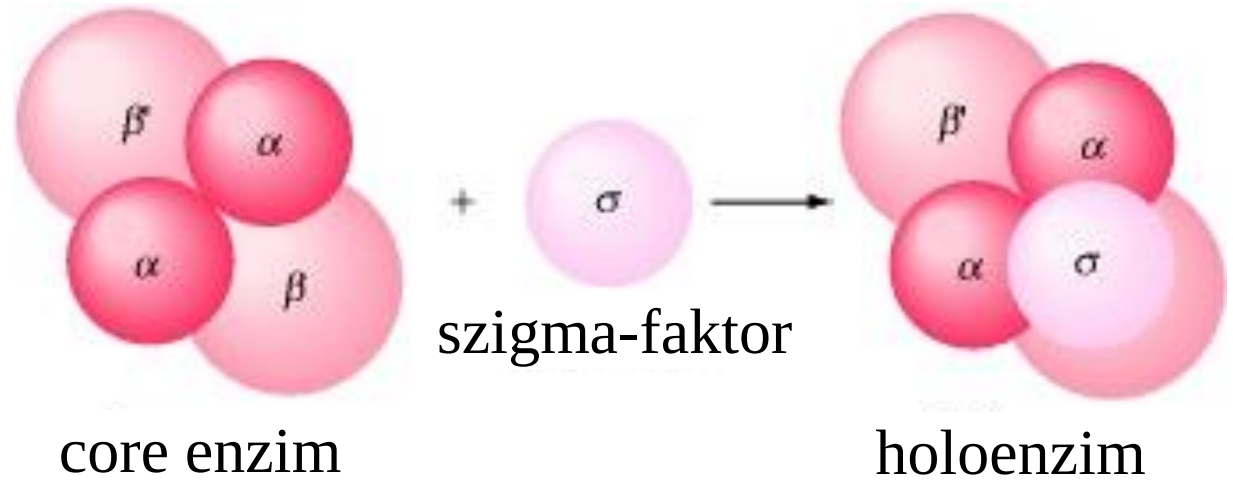


A transzkripciónak van „eleje” és „vége”. Egy génen egyszerre több RNS-polimeráz is működhet, ugyanabban az irányban haladva.



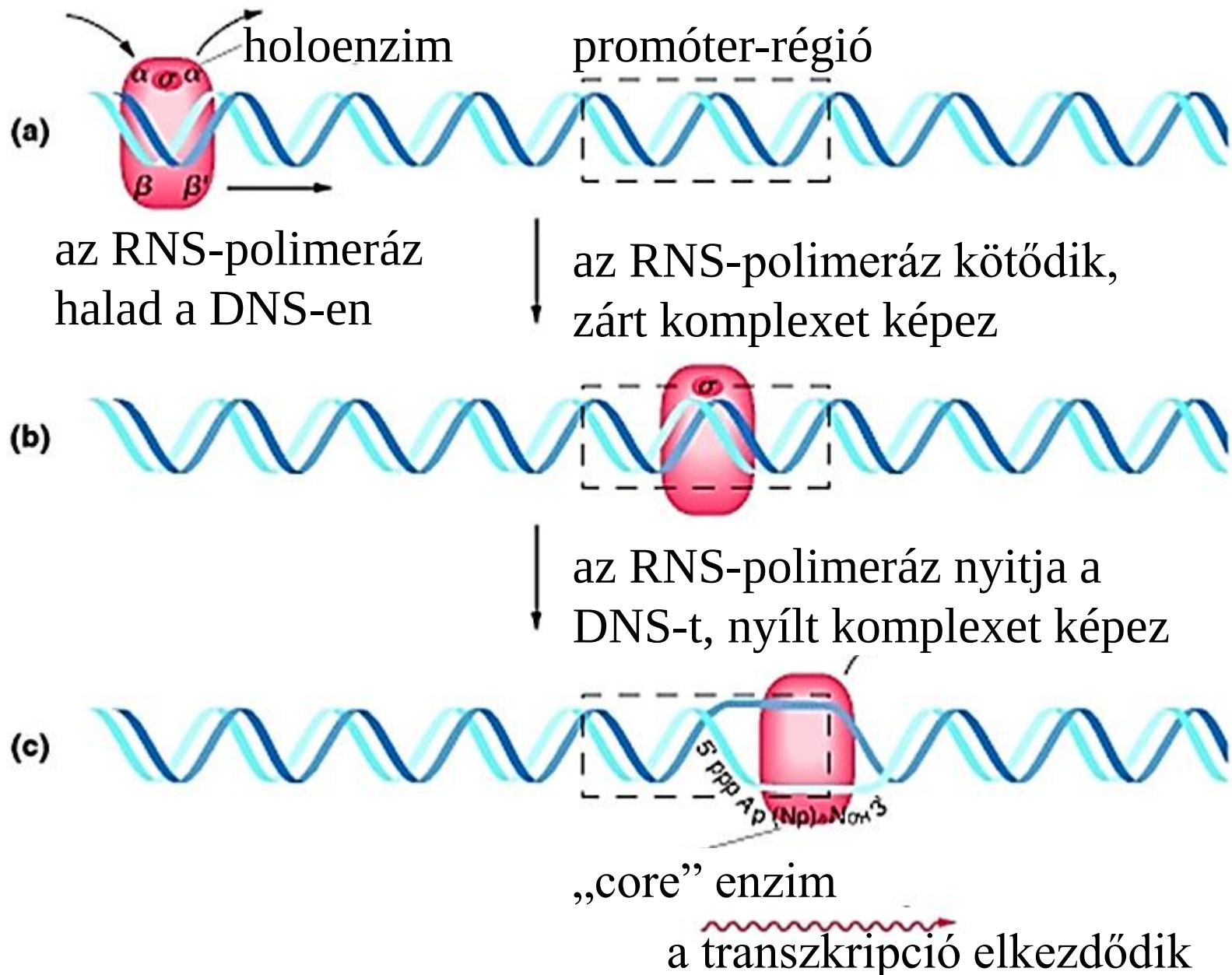
Az erősen kifejeződő gének elektronmikroszkópos „karácsonyfa” képe

A prokarióta RNS-polimeráz

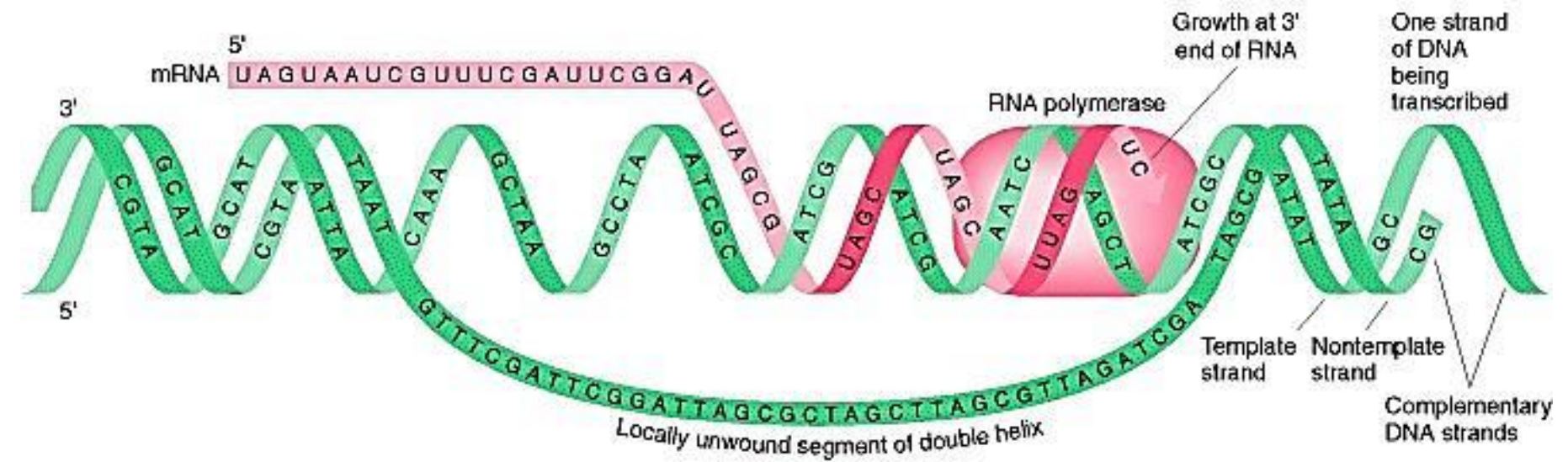


Az RNS-polimeráz, a DNS és a születő mRNS együttese

A prokarióta RNS-polimeráz működése és a σ faktor szerepe



A nyílt komplex



Hol kezdődik el a transzkripció
prokariótákban?

A prokarióta promóter



Első átírt nukleotid

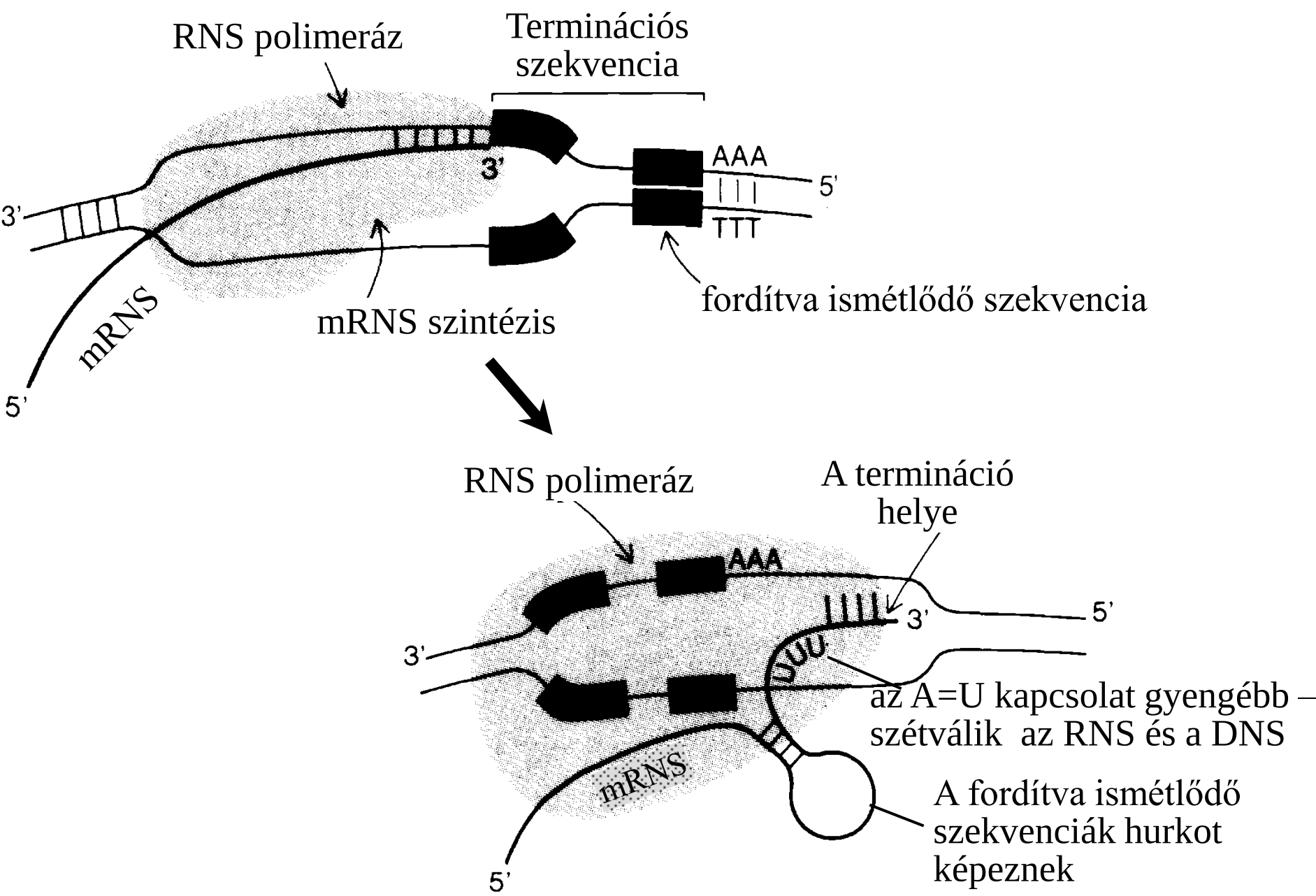
tyr tRNA	TCTCAACGTAACAC	TTTACAG	CGGCG • •	CGTCATTTGA	TATGAT	GC • GCCCC	G	CTTCCCGATAAGGG
rrn D1	GATCAAAAAAATAC	TTGTGCA	AAAAA • •	TTGGGATCCC	TATAAT	GCGCCTCC	G	TTGAGACGACAACG
rrn X1	ATGCATTTTTCCGC	TTGTCTT	CCTGA • •	GCCGACTCCC	TATAAT	GCGCCTCC	A	TCGACACGGCGGAT
rrn (DXE) ₂	CCTGAAATTCAGGG	TTGACTC	TGAAA • •	GAGGAAAGCG	TAATAT	AC • GCCAC	C	TCGCGACAGTGAGC
rrn E1	CTGCAATTTTTCTA	TTGCGGC	CTGCG • •	GAGAACTCCC	TATAAT	GCGCCTCC	A	TCGACACGGCGGAT
rrn A1	TTTTAAATTTCTCT	TTGTCAG	GCCGG • •	AATAACTCCC	TATAAT	GCGCCACC	A	CTGACACGGAACAA
rrn A2	GCAAAAATAAATGC	TTGACTC	TGTAG • •	CGGGAAGGCG	TATTAT	GC • ACACC	C	CGCGCCGCTGAGAA
λ P _R	TAACACCGTGCGTG	TTGACTA	TTTTA • •	CCTCTGGCGGT	GATAAT	GG • • TTGC	A	TGTACTAAGGAGGT
λ P _L	TATCTCTGGCGGTG	TTGACAT	AAATA • •	CCACTGGCGGT	GATACT	GA • • GCAC	A	TCAGCAGGACGCAC
T7 A3	GTGAAACAAAACGG	TTGACAA	CATGA • •	AGTAAACACGG	TACGAT	GT • ACCAC	A	TGAAACGACAGTGA
T7 A1	TATCAAAAAGAGTA	TTGACTT	AAAGT • •	CTAACCTATAG	GATACT	TA • CAGCC	A	TCGAGAGGGACACG
T7 A2	ACGAAAAACAGGTA	TTGACAA	CATGAAGTAACATGCAG	TAAGAT	AC • AAATC	G	G	CTAGGTAACACTAG
fd VIII	GATACAAATCTCCG	TTGTACT	TTGTT • •	TCGCGCTTGG	TATAAT	CG • CTGGG	G	GTCAAAGATGAGTG

Konszenzus
szekvencia: 5'TTGACAT3'

5'TATAAT3' = **TATA-box**

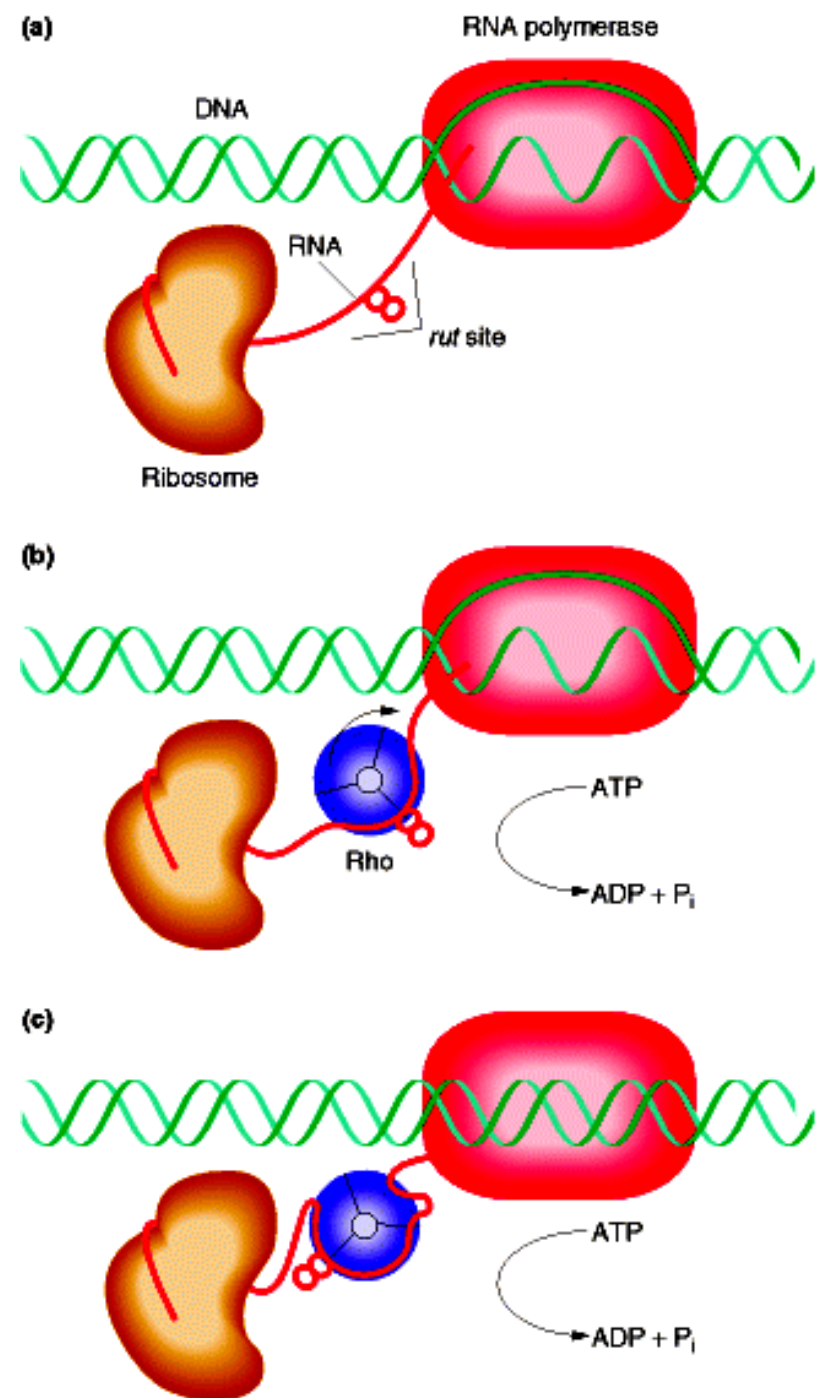
A TATA-box elhelyezkedése határozza meg, melyik szál és merre íródik át. A TATA-box mindig a nem-templát (=kódoló), 5'→3' irányú szálon értelmezendő!

A transzkripció terminációja fordítva ismétlődő szekvencia alapján



A transzkripció terminációja Rho faktor segítségével

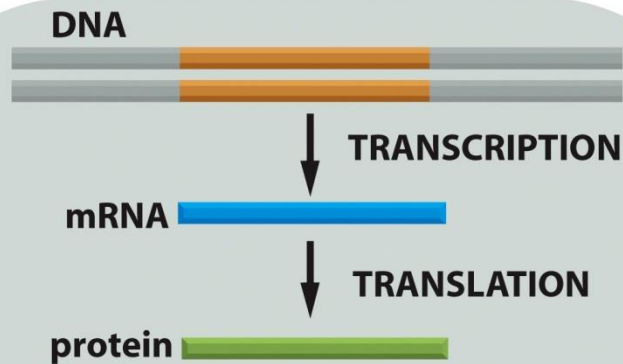
A **rho faktor** az átírt RNS specifikus szekvenciáihoz (rut helyek) kapcsolódik és onnan haladva, ATP-t hidrolizálva kihúzza az új RNS-szálat a transzkripciós komplexből



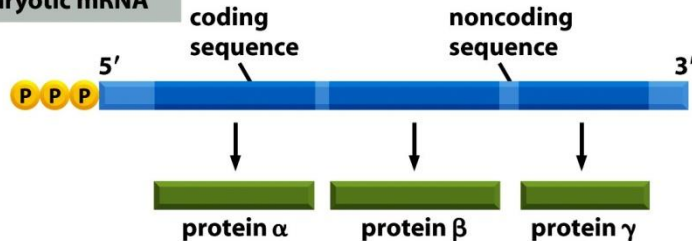
Az eukarióta transzkripció

Prokarióta ↔ eukarióta transzkripció

PROCARYOTES



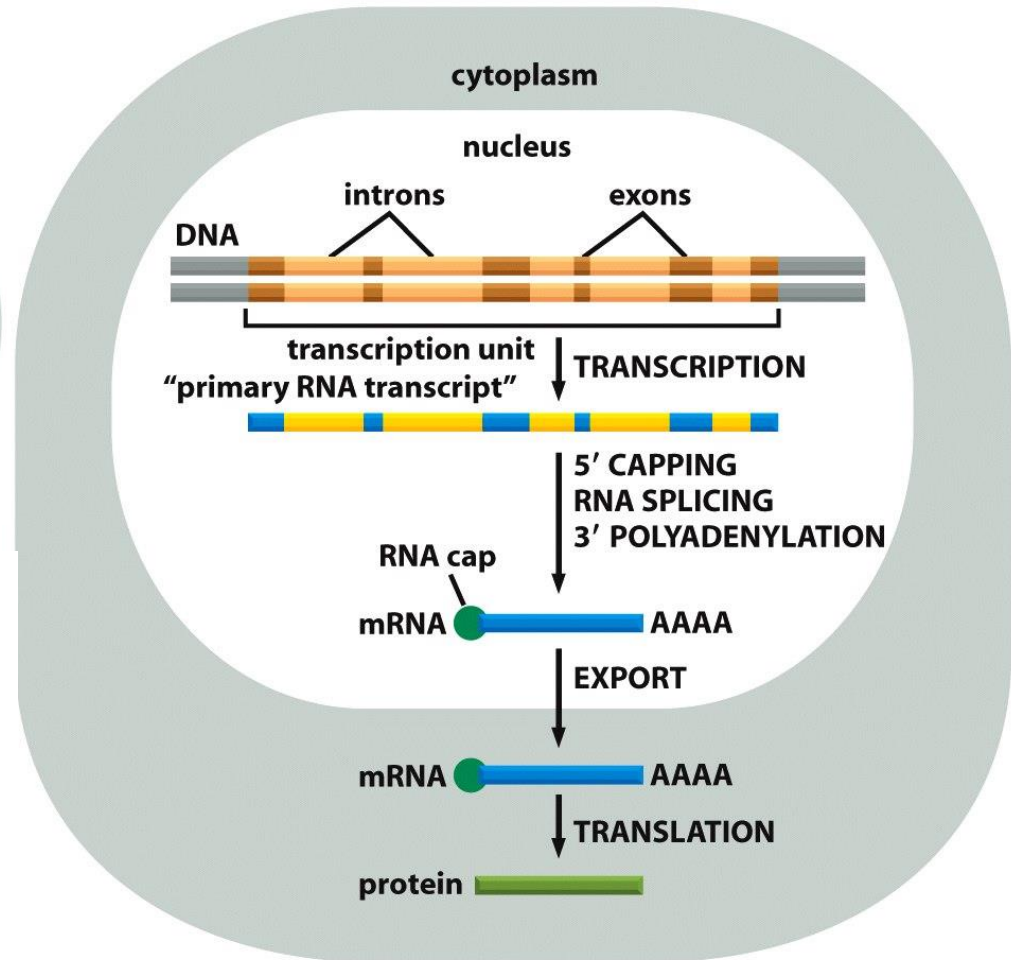
procaryotic mRNA



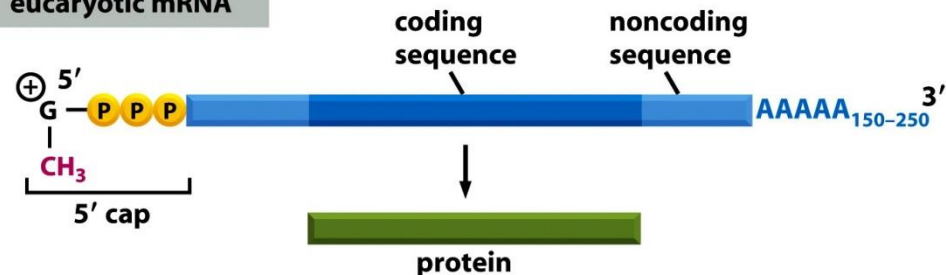
Prokariótákban:

- Egy térben a transzlációval
- Az átíródott mRNS nem módosul
- Egy mRNS több teljesen különböző fehérjét kódolhat (policisztronos mRNS)

EUCARYOTES



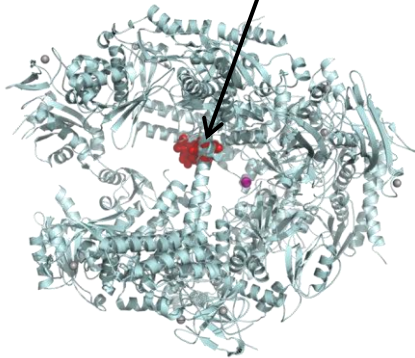
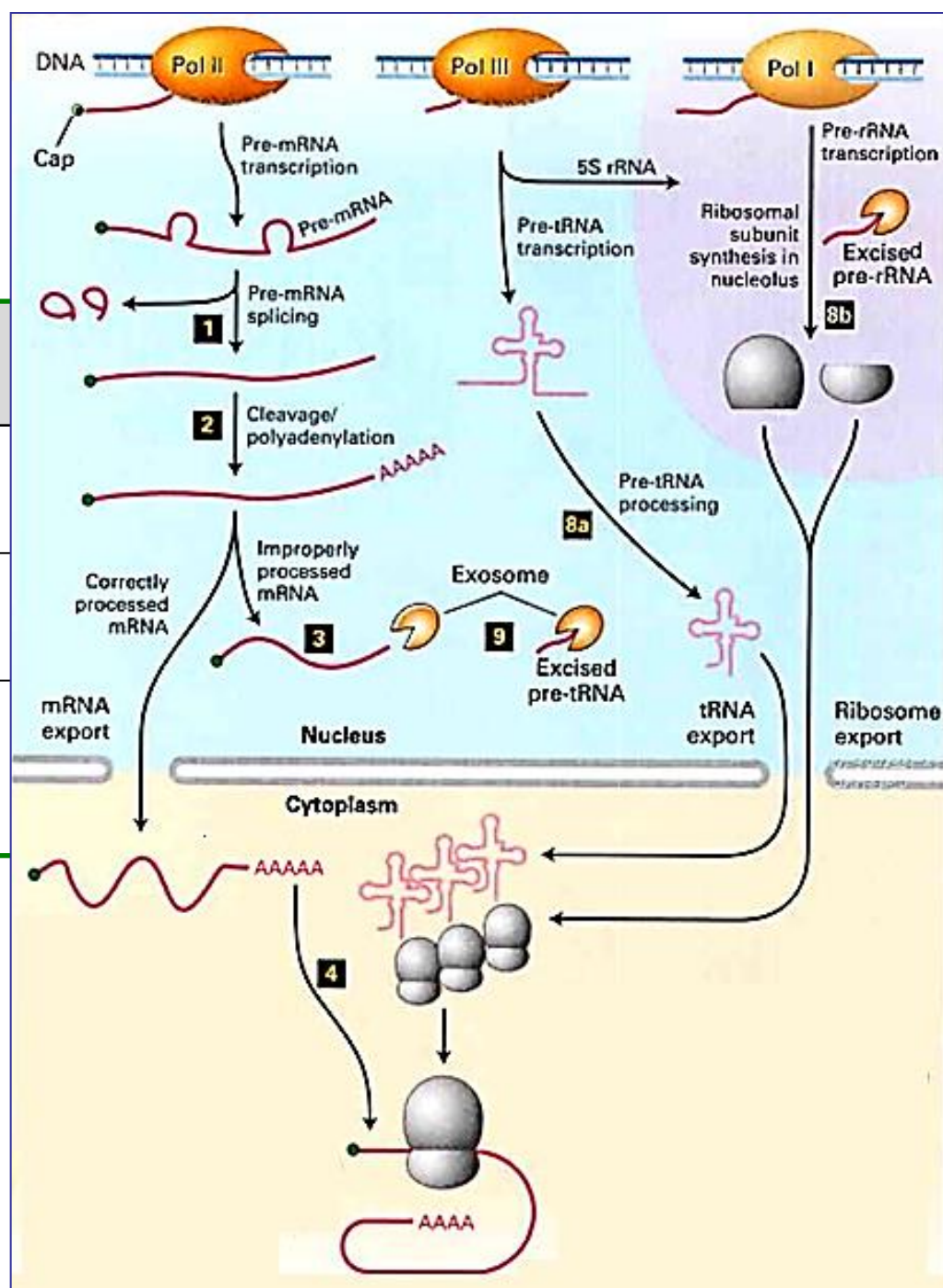
eucaryotic mRNA



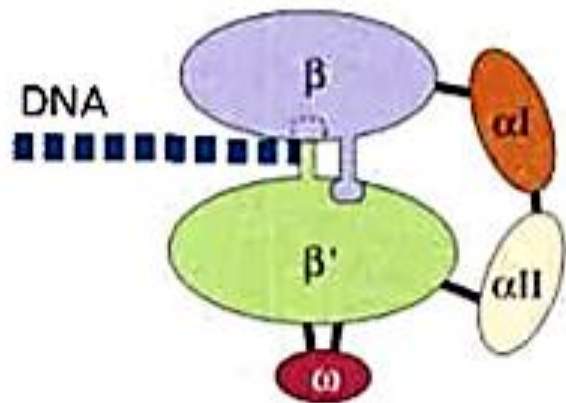
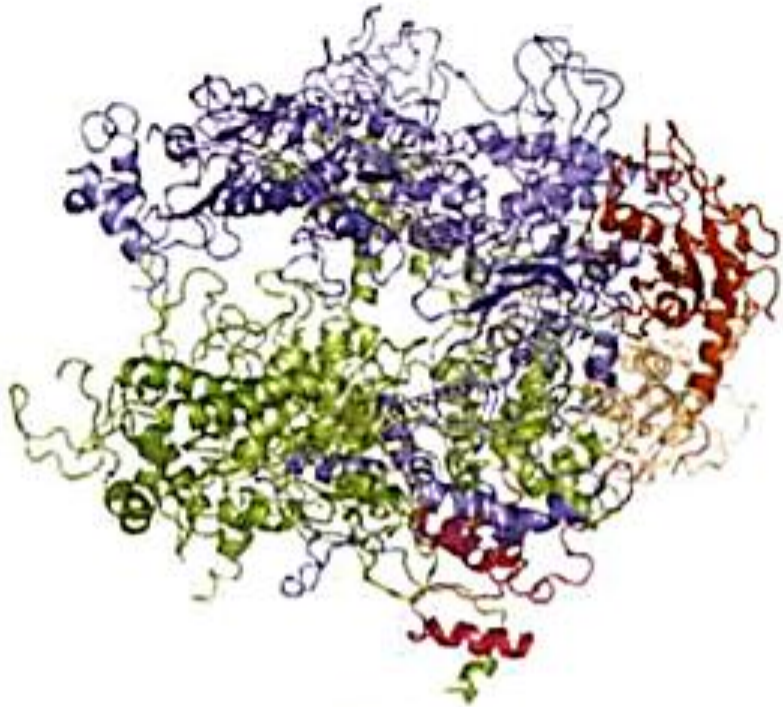
Az eukariótákban háromféle RNS-polimeráz van

RNS polimeráz	A szintetizált RNS típusa	α -amanitin* érzékenység
I. (= a)	Riboszomális RNS	Nem érzékeny
II. (= b)	mRNS + snRNS-ek	Nagyon érzékeny
III. (= c)	transzfer RNS és 5S rRNS	Mérsékelten érzékeny

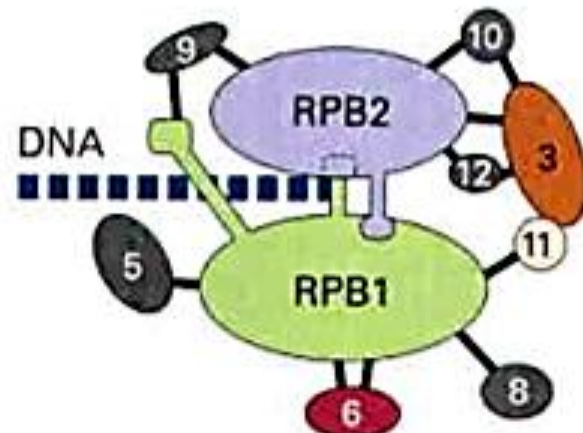
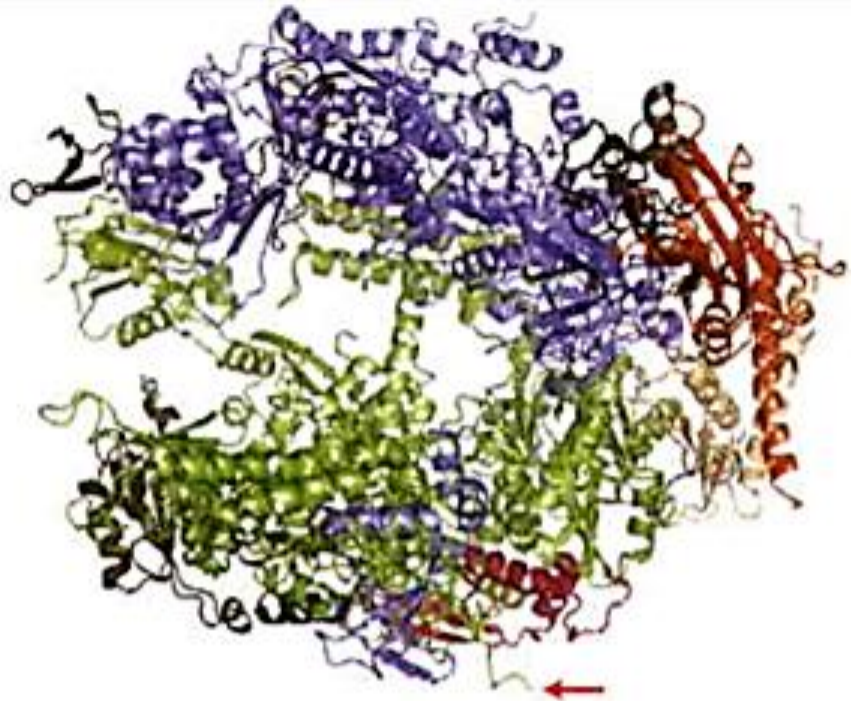
*a gyilkos galóca (*Amanita phalloides*) alkaloidja.



A prokarióta és az eukarióta RNS-polimeráz szerkezete hasonló



prokarióta

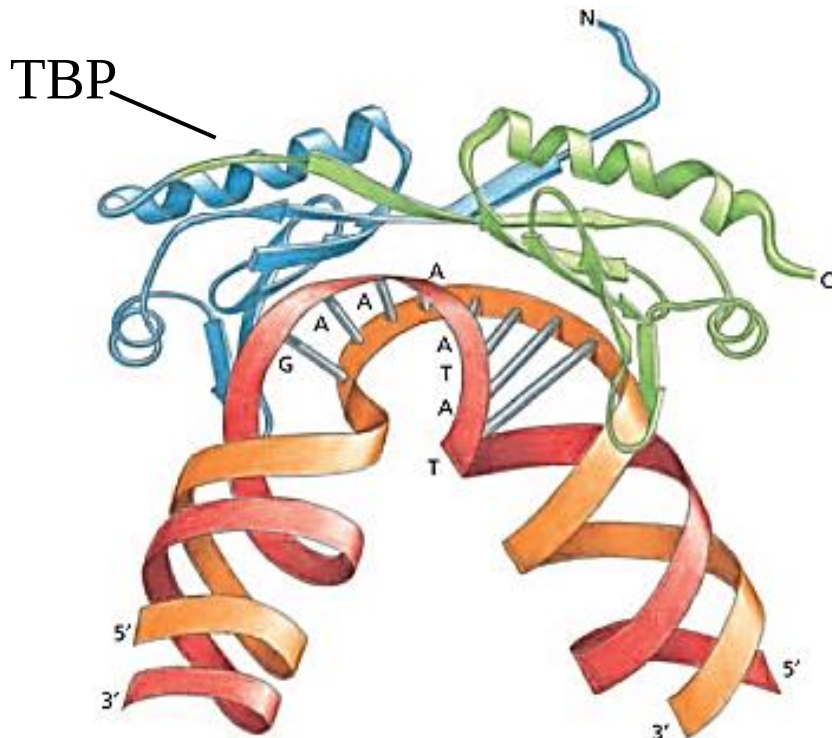


eukarióta

Hol kezdődik el a transzkripció
eukariótákban?

Az eukarióta TATA box (~ -30 bp)

Zsákaifola RNA box (50 bp)														+1
														→
A bázisok gyakorisága	A	17	22	13	7	97	7	85	63	89	50	33	18	mRNS
	T	17	27	11	82	2	93	10	37	10	33	12	16	
	C	50	38	53	1	1	0	0	0	0	13	38	48	
	G	16	13	23	10	0	0	5	0	1	4	17	18	
Konszenzus szekvencia					T	A	T	A	A/T	A				

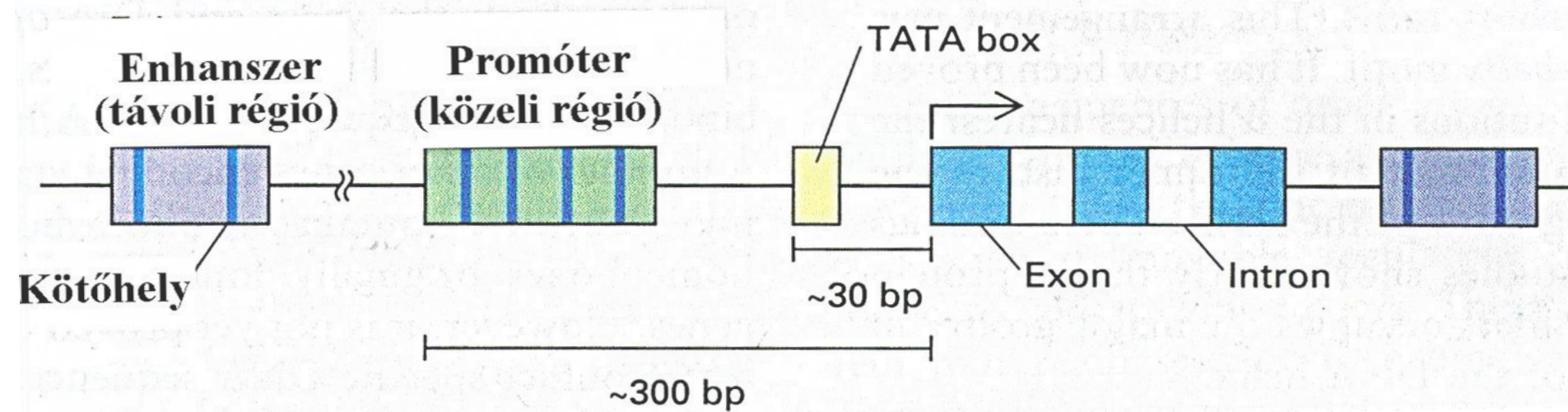


David Hogness

A TATA-boxot felismerő fehérje (TBP) a TFIID transzkripció faktor része, görbíti a DNS-t

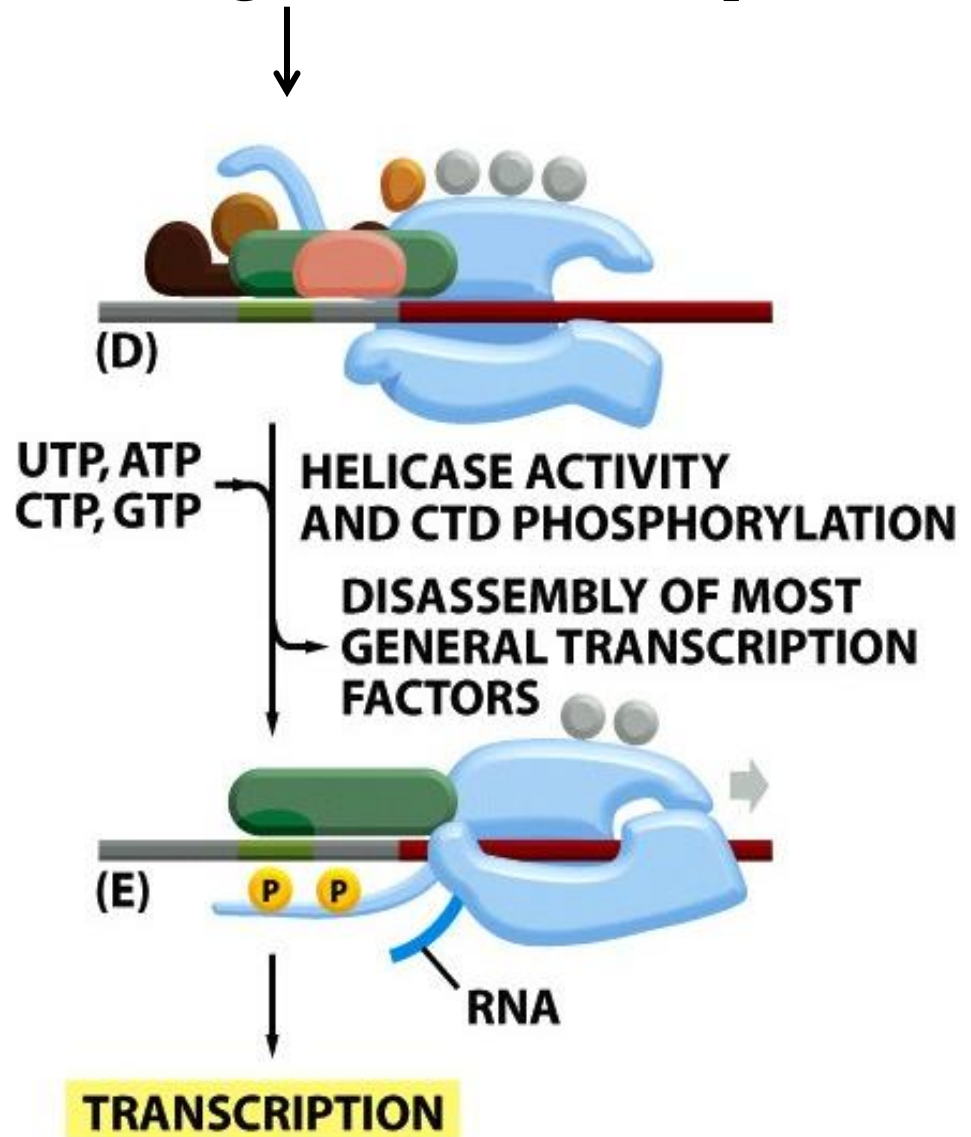
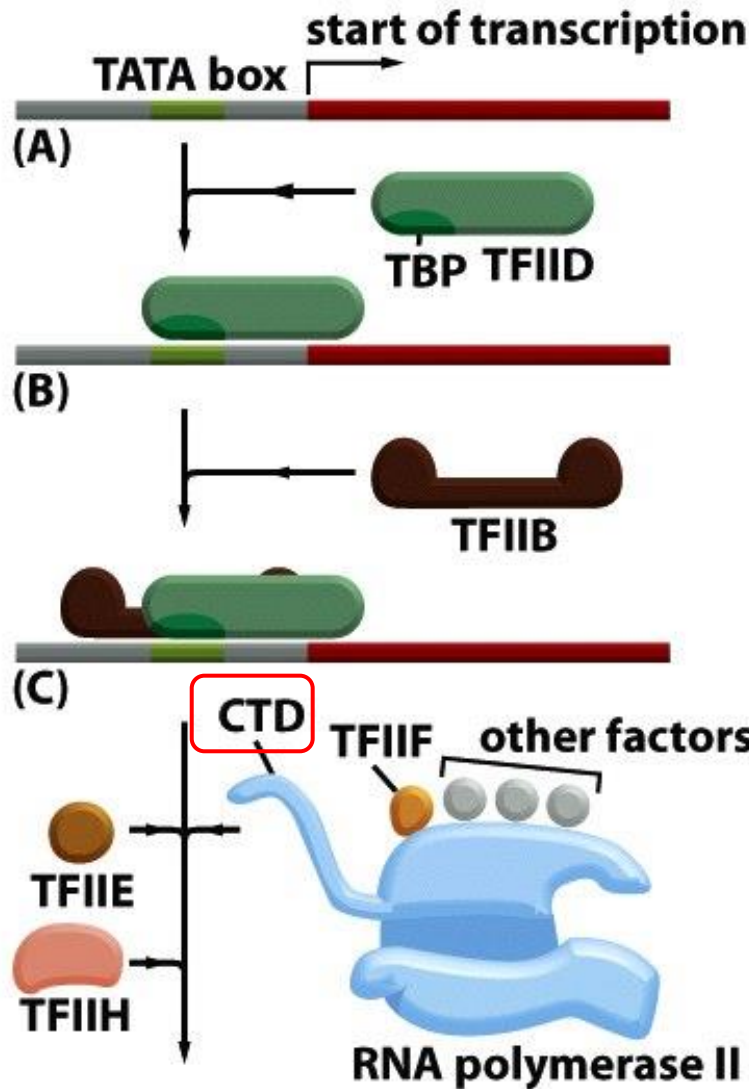
Az eukarióta gének expresszióját szabályozó szekvenciák

(b) Soksejtű élőlény



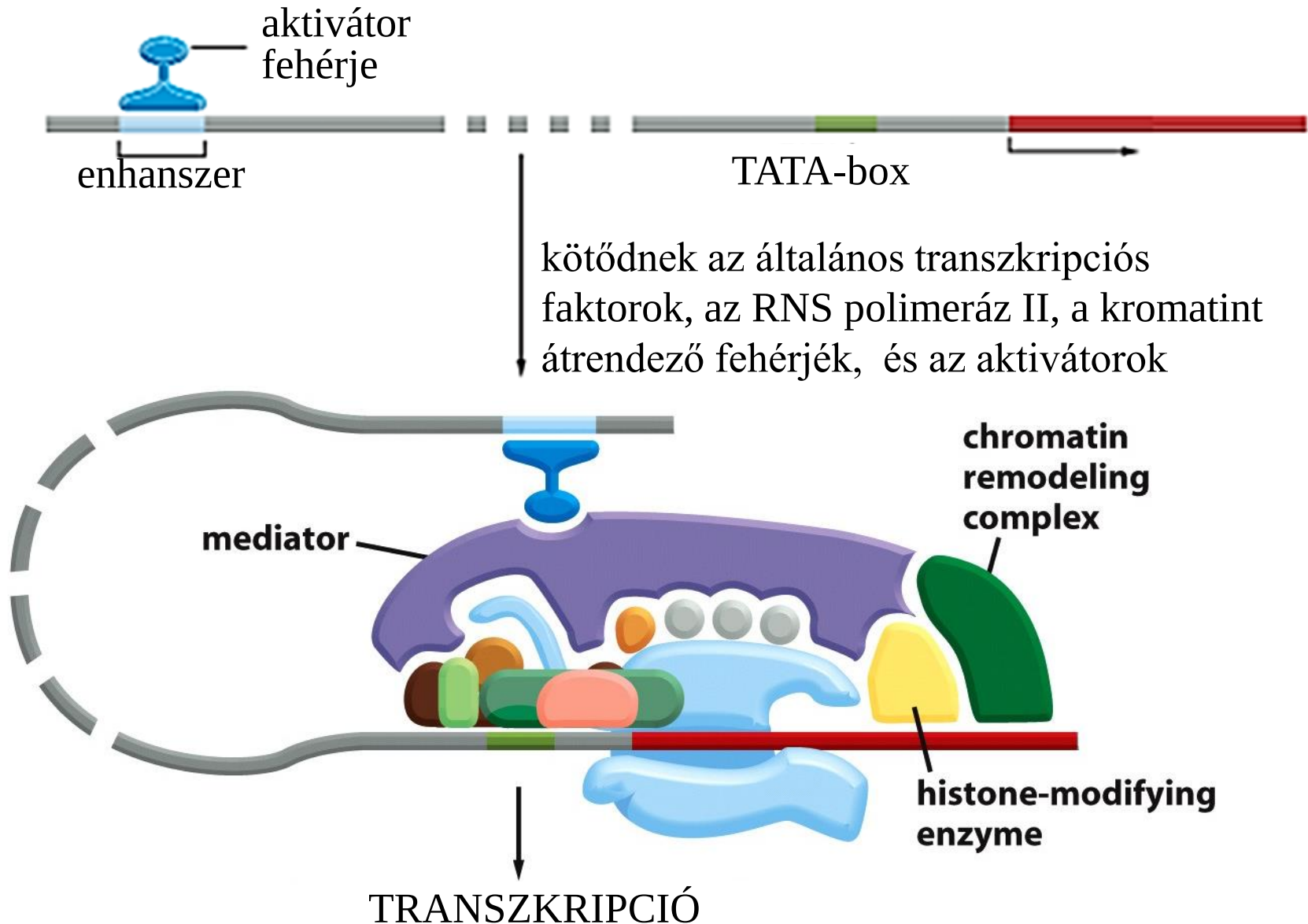
- Az eukariótákban is **van TATA-box**, csak kicsit távolabb (~-30 bp a transzkripció start előtt)
- Van itt is egy közeli szabályozó régió, a **promóter**, ahová az úgynevezett **transzkripció faktorok** kötődnek.
- Ugyanakkor fontos szerepük van a géntől esetleg egészen messze található szabályozó szekvenciáknak is, ezek az **enhanszerek (szilenszerek)**.
- Az ábra bemutatja az eukarióta gének átíró részének szerkezetét is: **exonokból és intronokból** áll

Az eukarióta RNS-polimeráz II működésének megkezdéséhez általános transzkripciós faktorok szükségesek. A transzkripciót megelőző lépések:



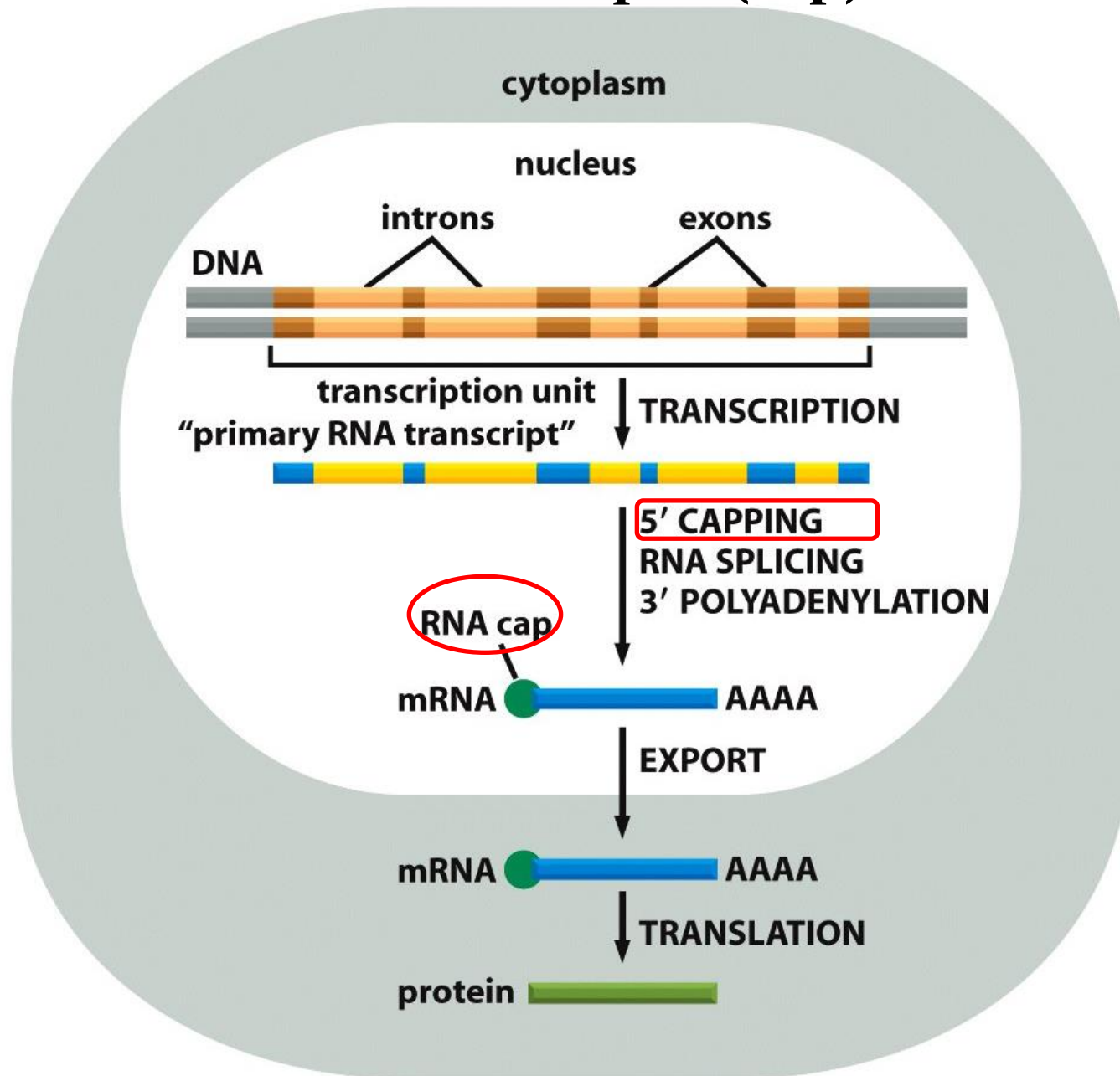
CTD: az RNS-polimeráz C-terminális doménje

Az eukarióta gének expresszióját szabályozó szekvenciák

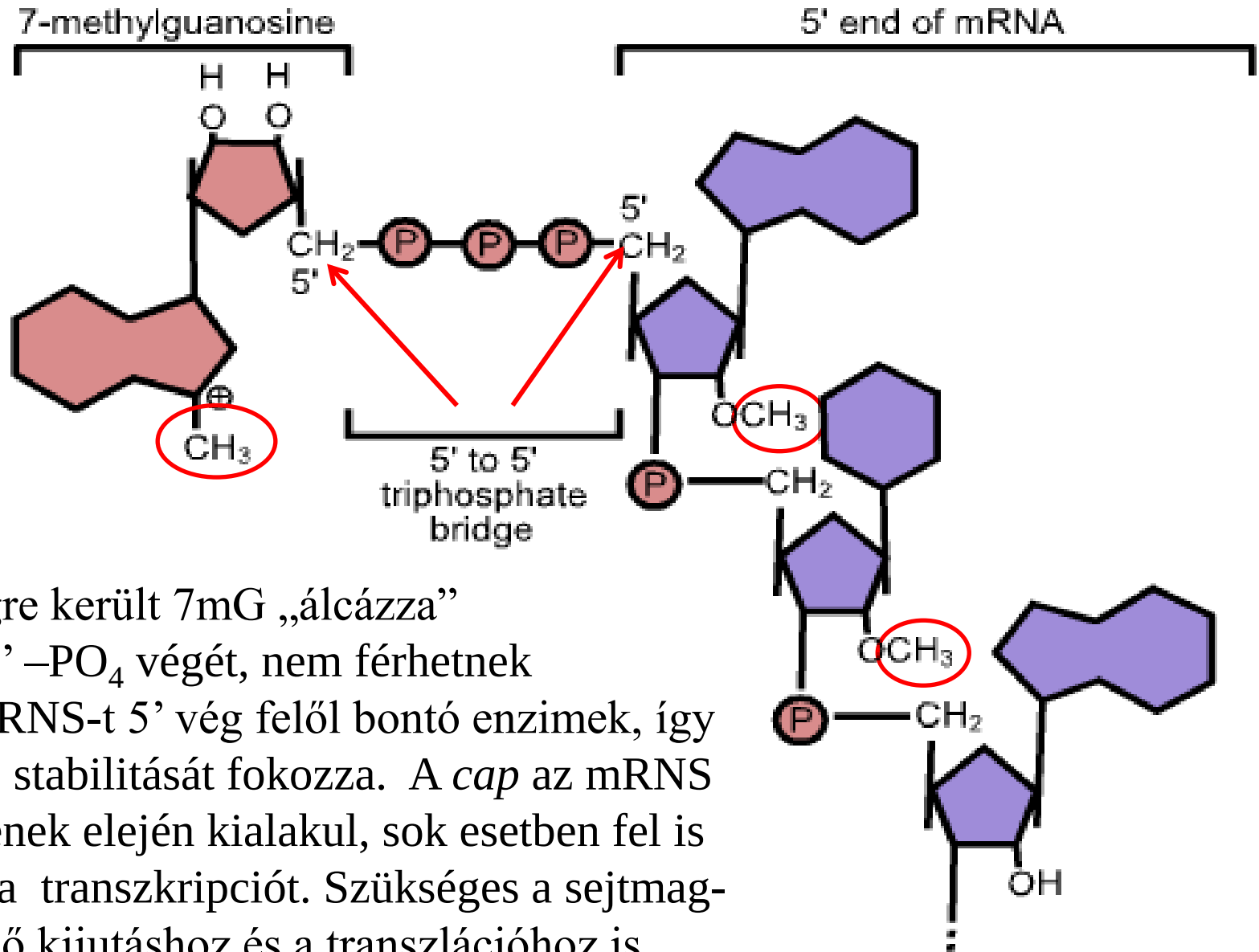


Az eukarióta mRNS érése

Az eukarióta mRNS érése: a sapka (cap) kialakulása

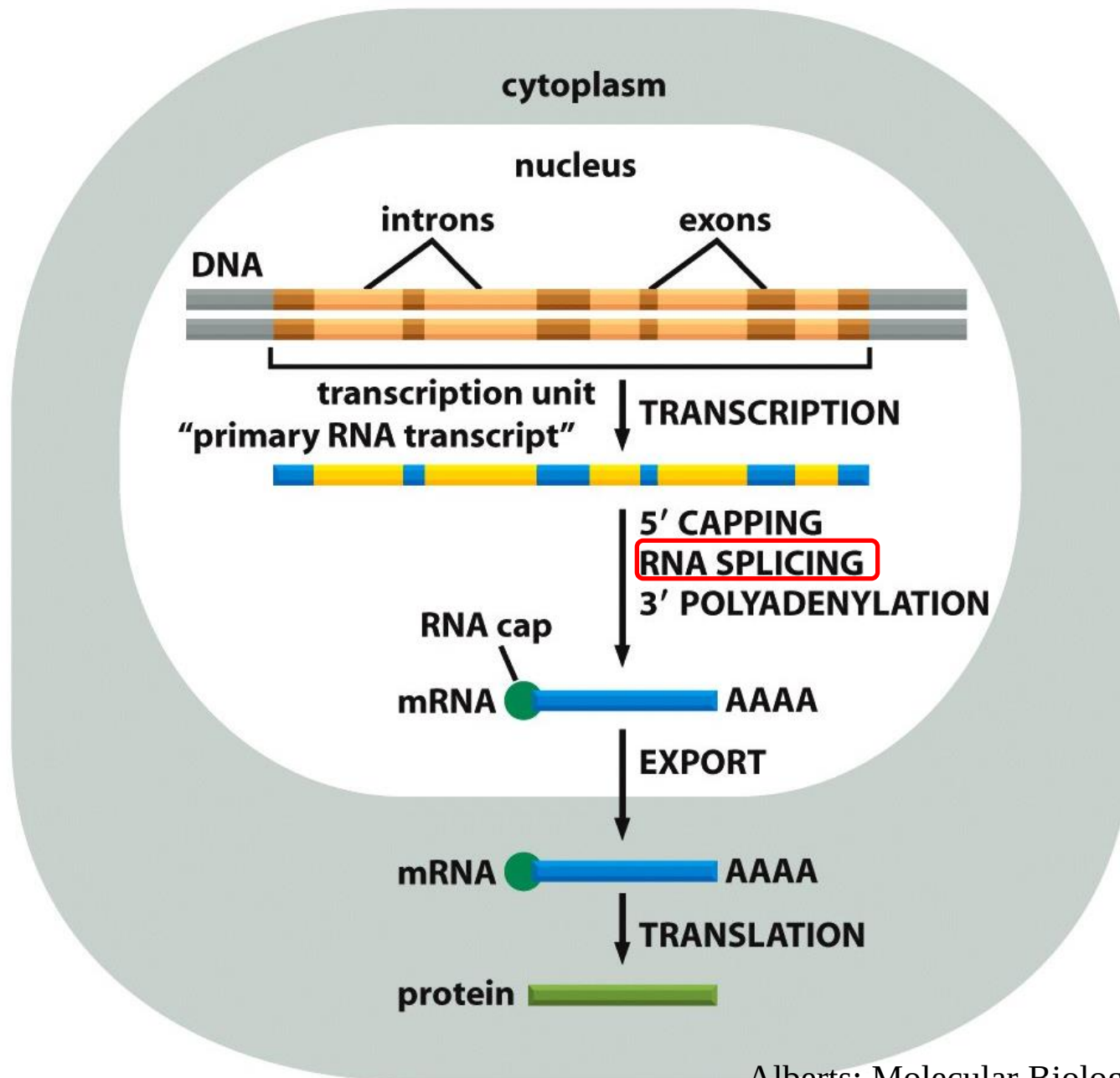


A „sapka”, a cap szerkezete az eukarióta mRNS-ek 5' végén

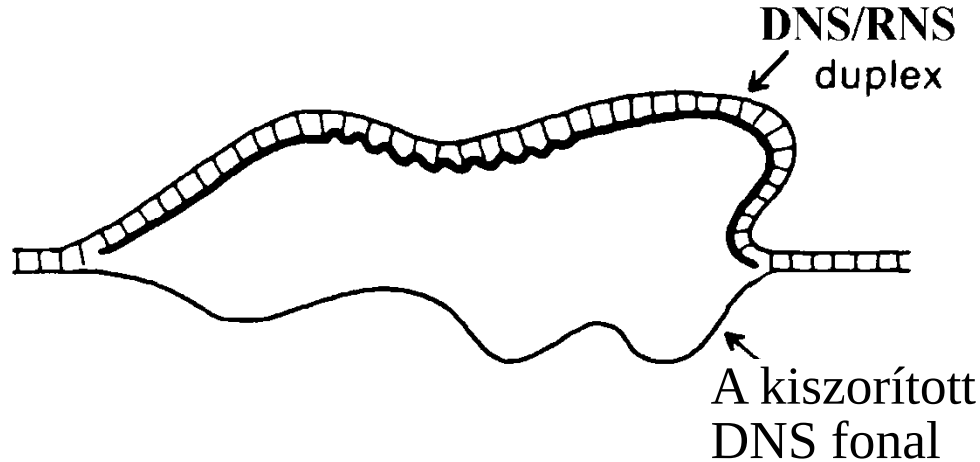


Az 5' végre került 7mG „álcázza” az RNS 5' –PO₄ végét, nem férhetnek hozzá az RNS-t 5' vég felől bontó enzimek, így az mRNS stabilitását fokozza. A *cap* az mRNS szintézisének elején kialakul, sok esetben fel is gyorsítja a transzkripciót. Szükséges a sejtmagból történő kijutáshoz és a transzlációhoz is.

Az eukarióta mRNS érése: a **kivágódás (splicing)**

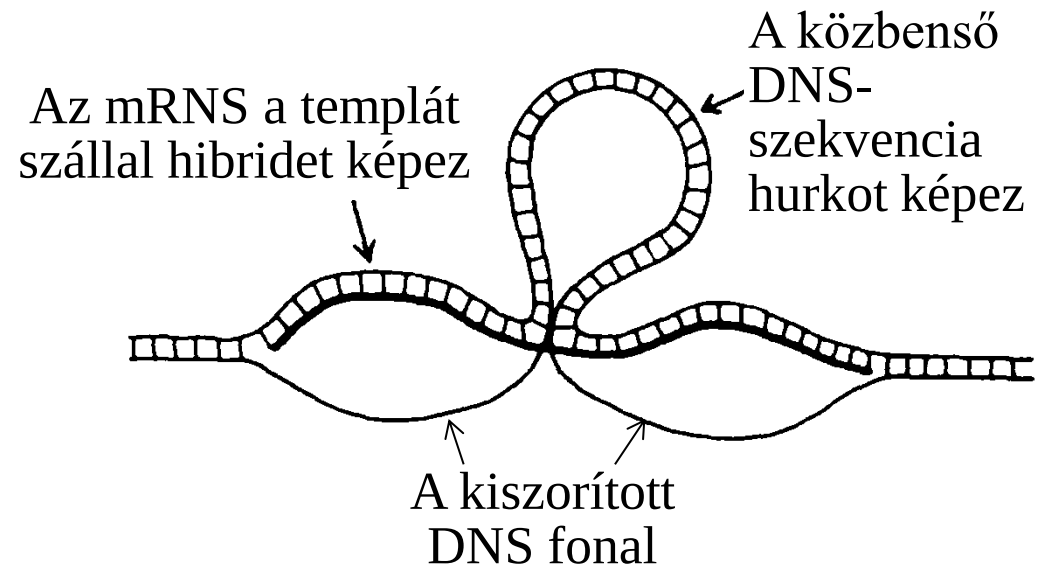


Az eukarióta mRNS érése: a kivágódás (splicing)



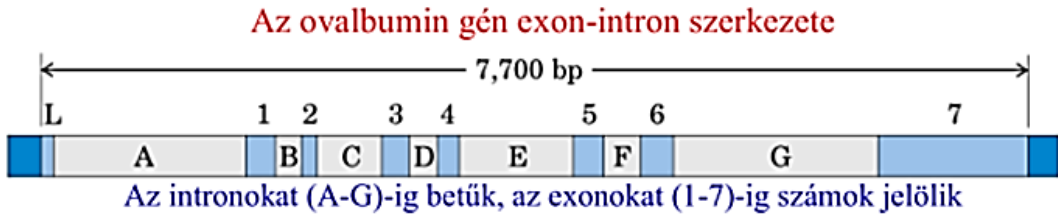
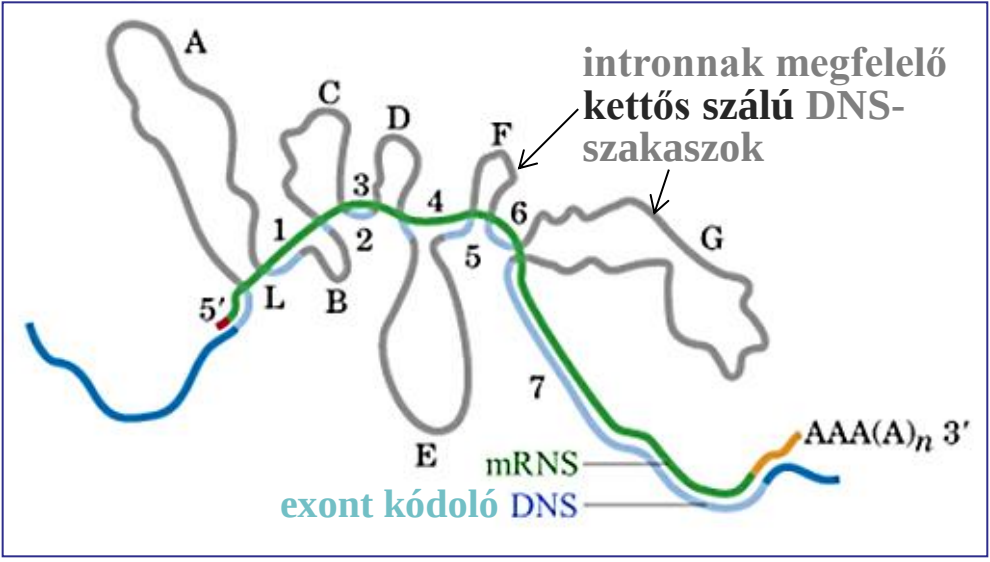
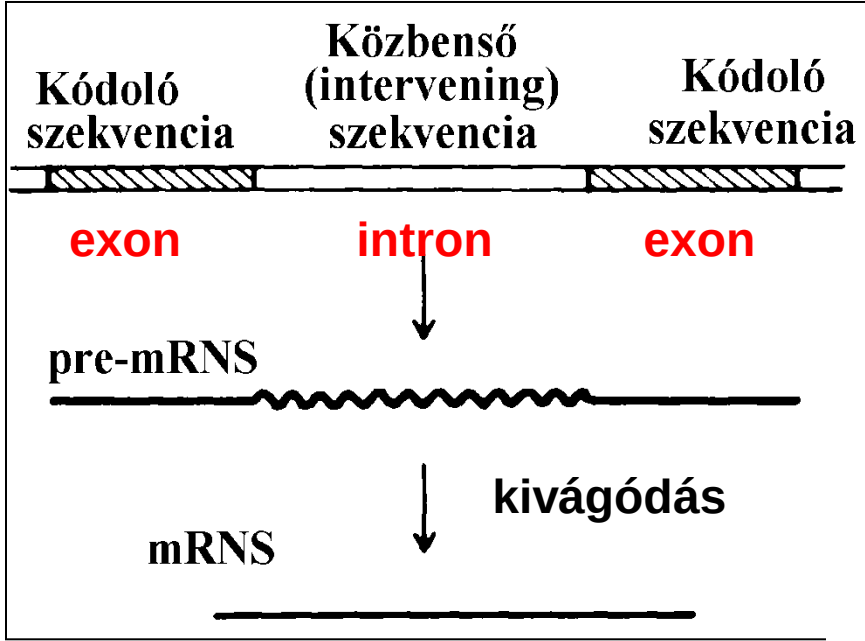
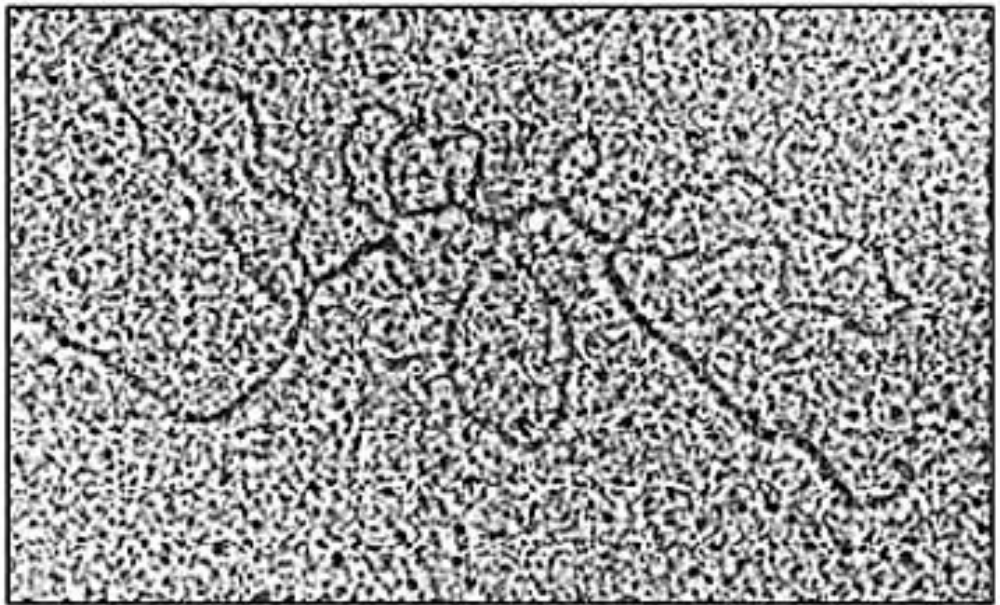
A pre-mRNS-sel a teljes DNS-templát hibridizál

Az érett mRNS-sel a DNS-templát nem mindenhol hibridizál

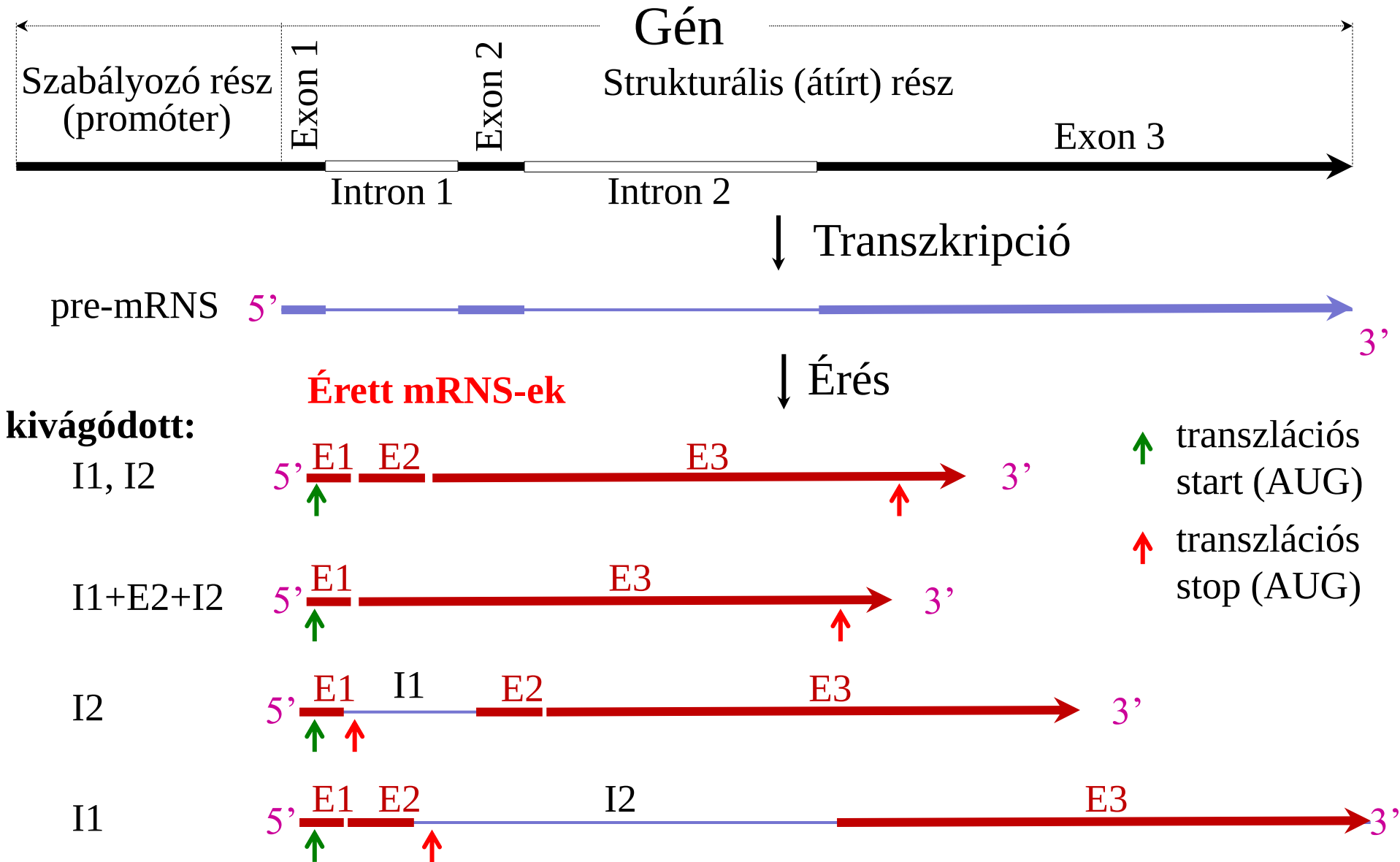


Az eukarióta mRNS érése: a kivágódás (splicing)

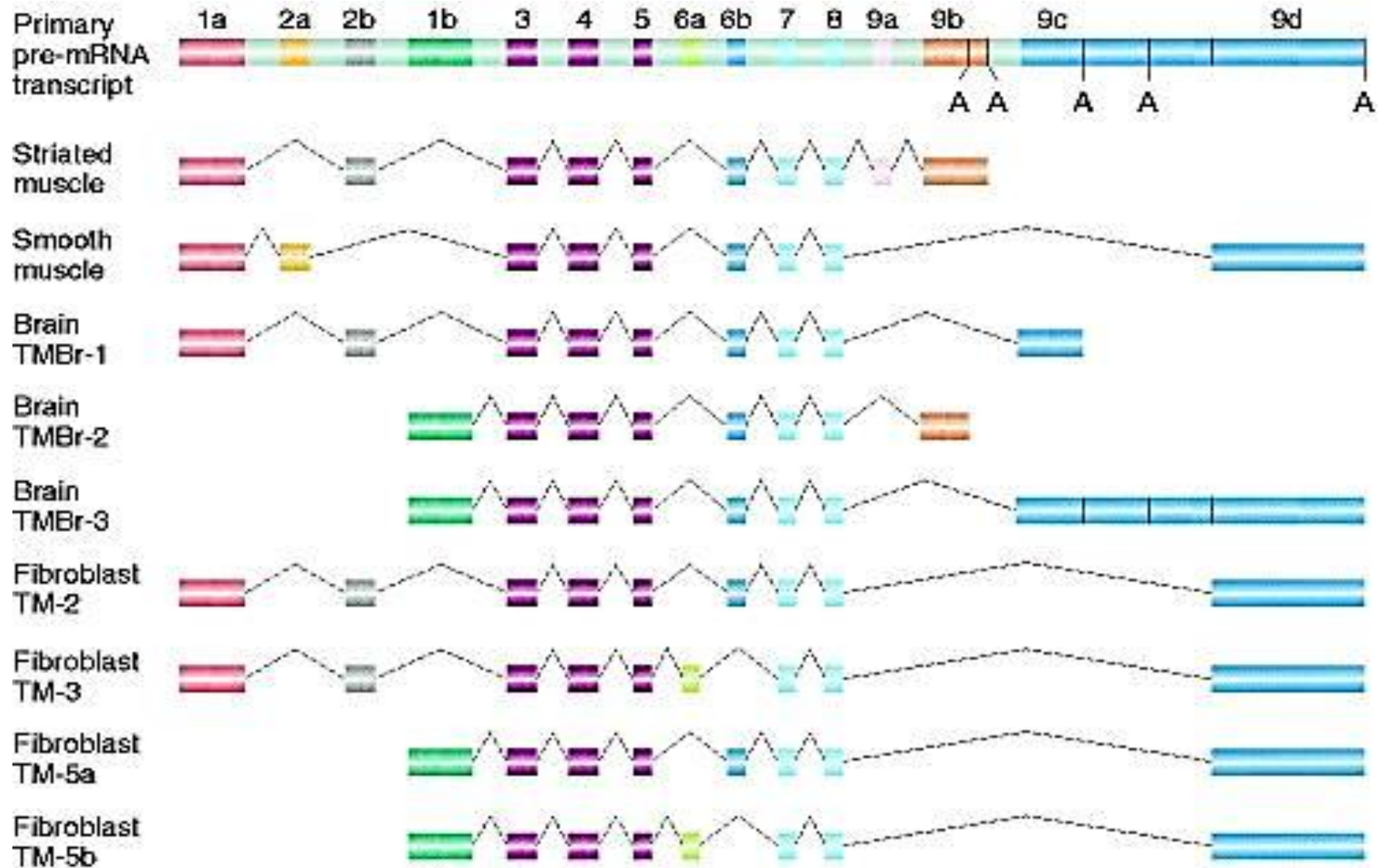
A kivágódás felfedezése:
ovalbumin DNS-mRNS hibrid,
elektronmikroszkópos kép
(A felvételen a “kitúrt” egyszálú
DNS nem jól látszik)



A splicing „értelme”: Az exonok különböző kombinációjával egy génről több eltérő fehérje képződhet: „alternatív splicing”



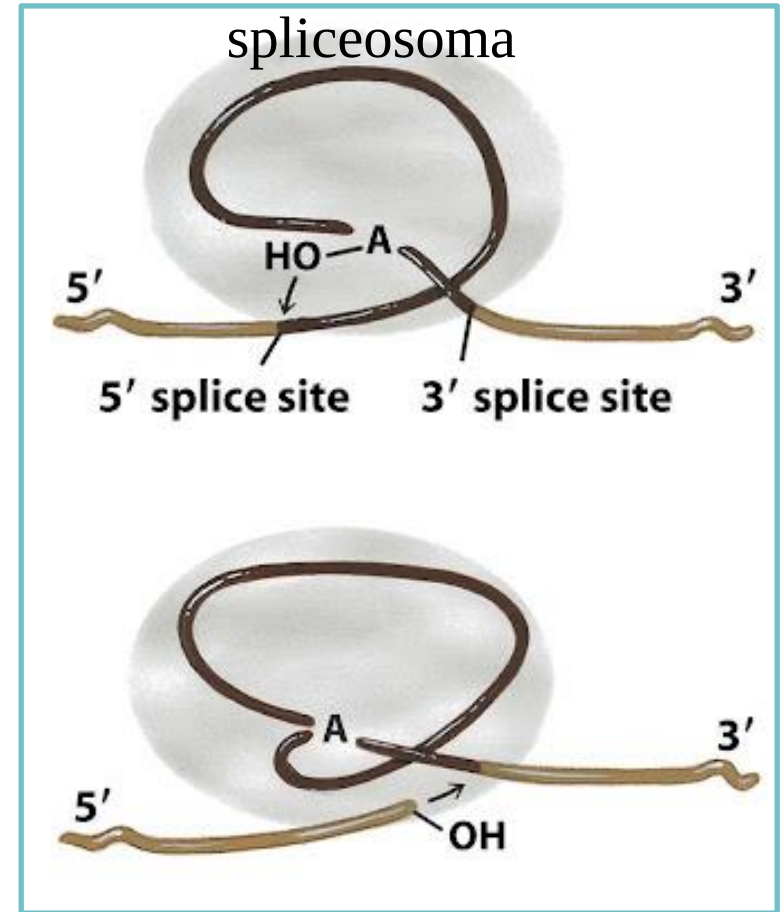
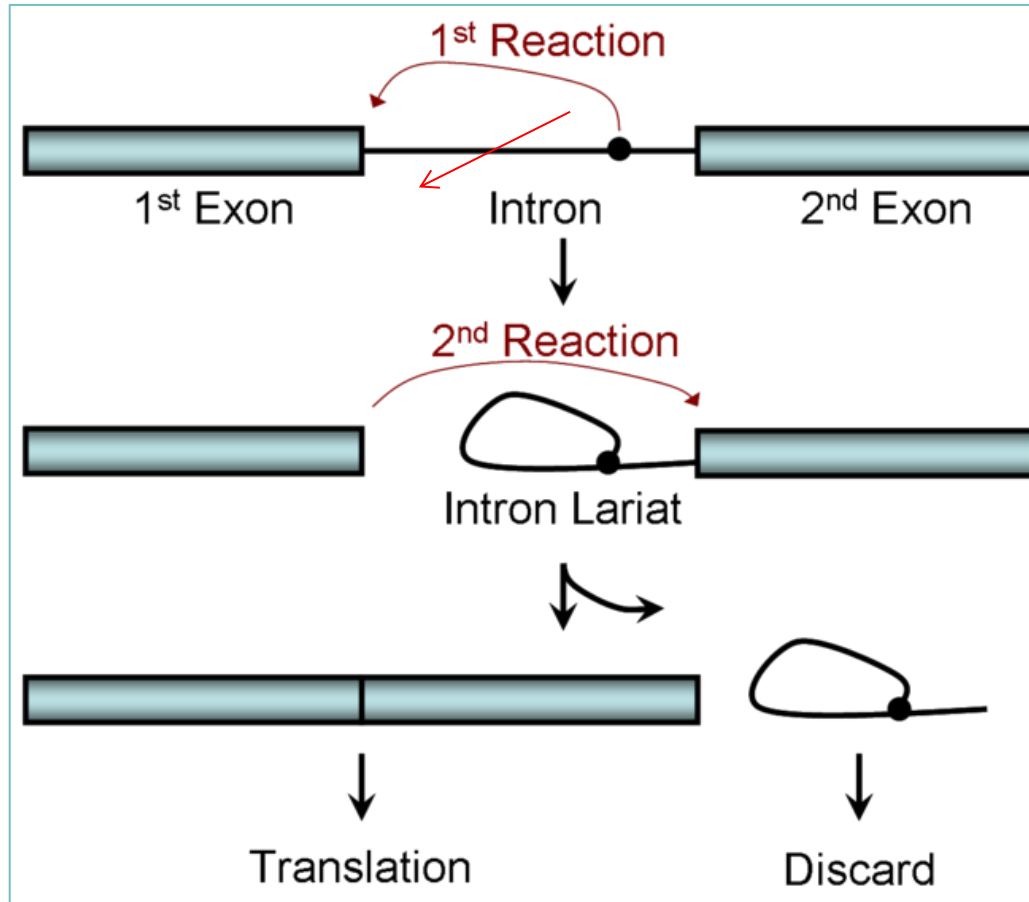
A splicing „értelme”: egy génről többféle hasonló, de nem ugyanolyan fehérje képződhet



Az α -tropomiozin génről alternatív splicinggal átíródó fehérjék

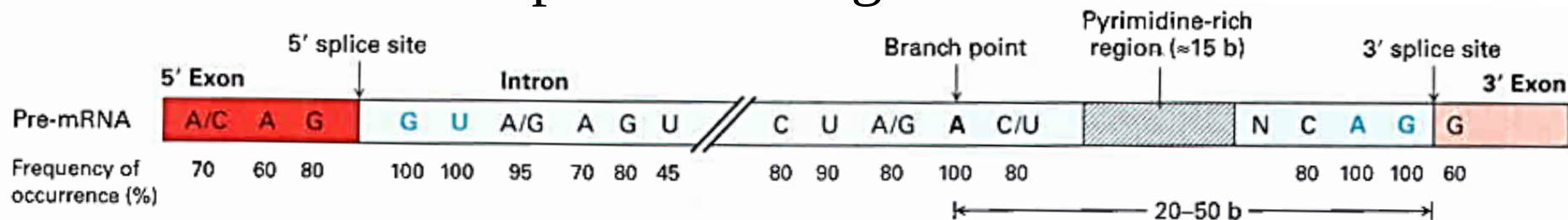
Griffiths: An Introduction to Genetic Analysis, 7th edition, 2000.

A kivágódás mechanizmusa



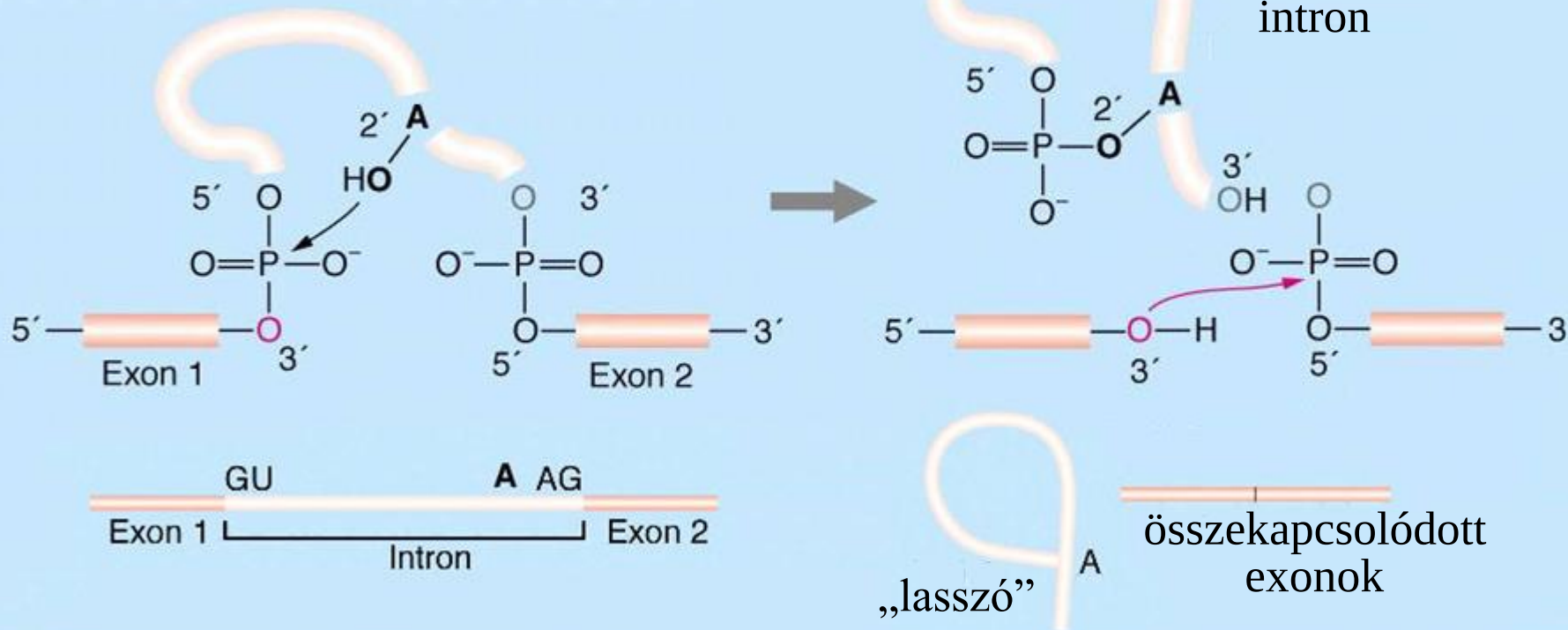
A kivágódást a több RNS- és fehérjemolekulából álló **spliceosoma** végzi. Két transz-észterifikációs lépés során lasszószerű struktúra formájában vágódik ki az intron

Az exon-intron határ pontosan meghatározott



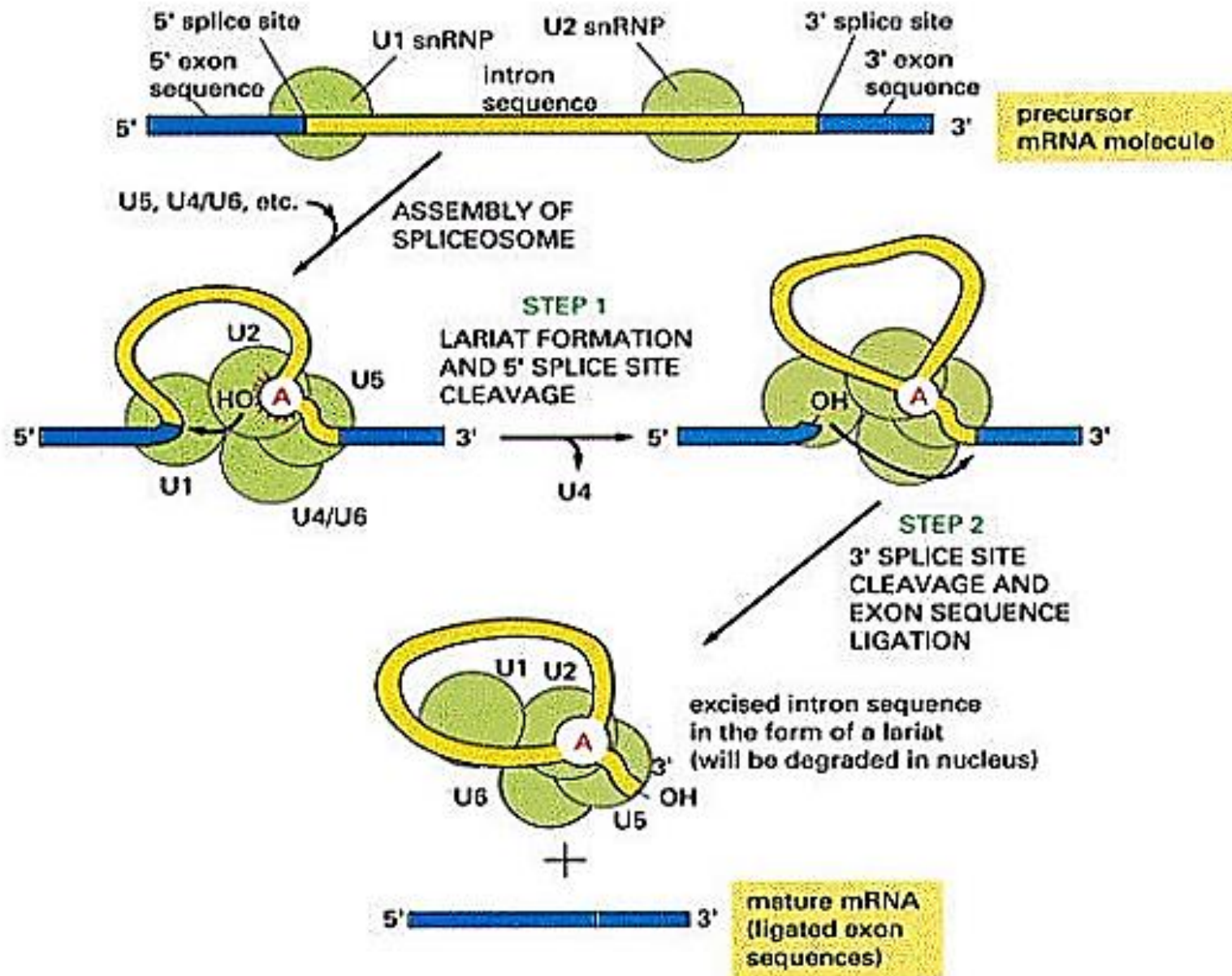
2. átészterezés

1. átészterezés

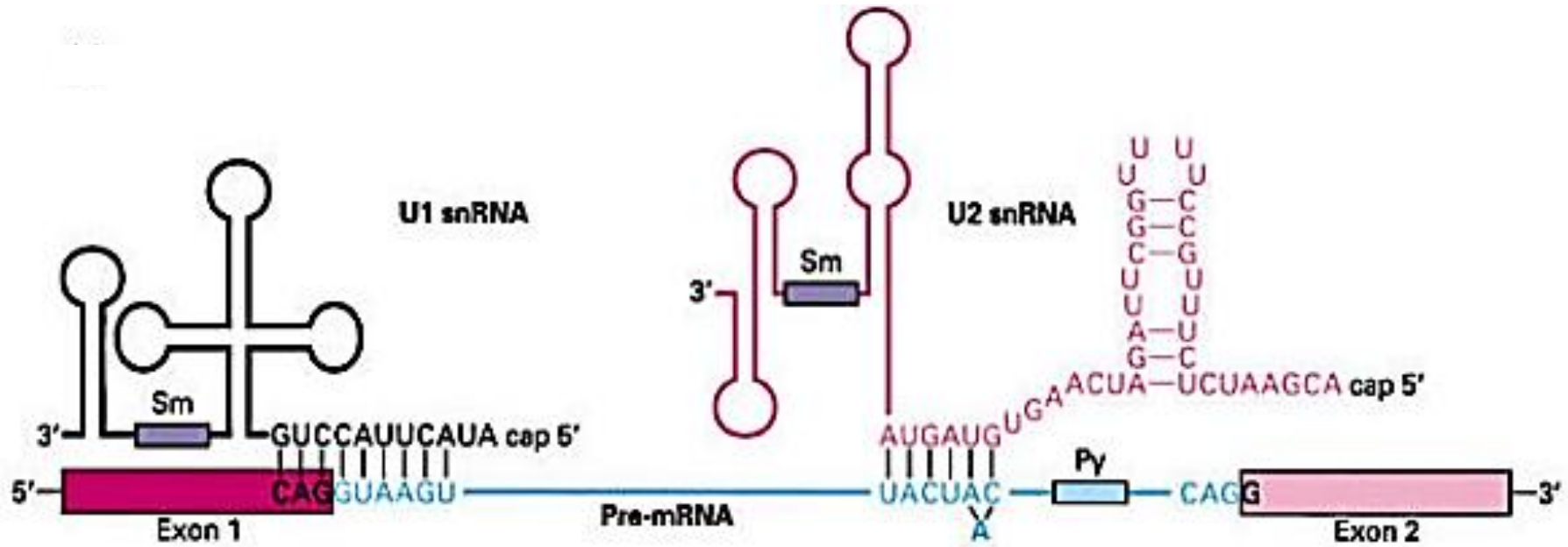


Az intron külső energia-befektetés nélkül, két átészterezéssel vágódik ki.

A legtöbb kivágódást RNS-ből (snRNS) és fehérjékből álló komplexek, snRNP-k végzik

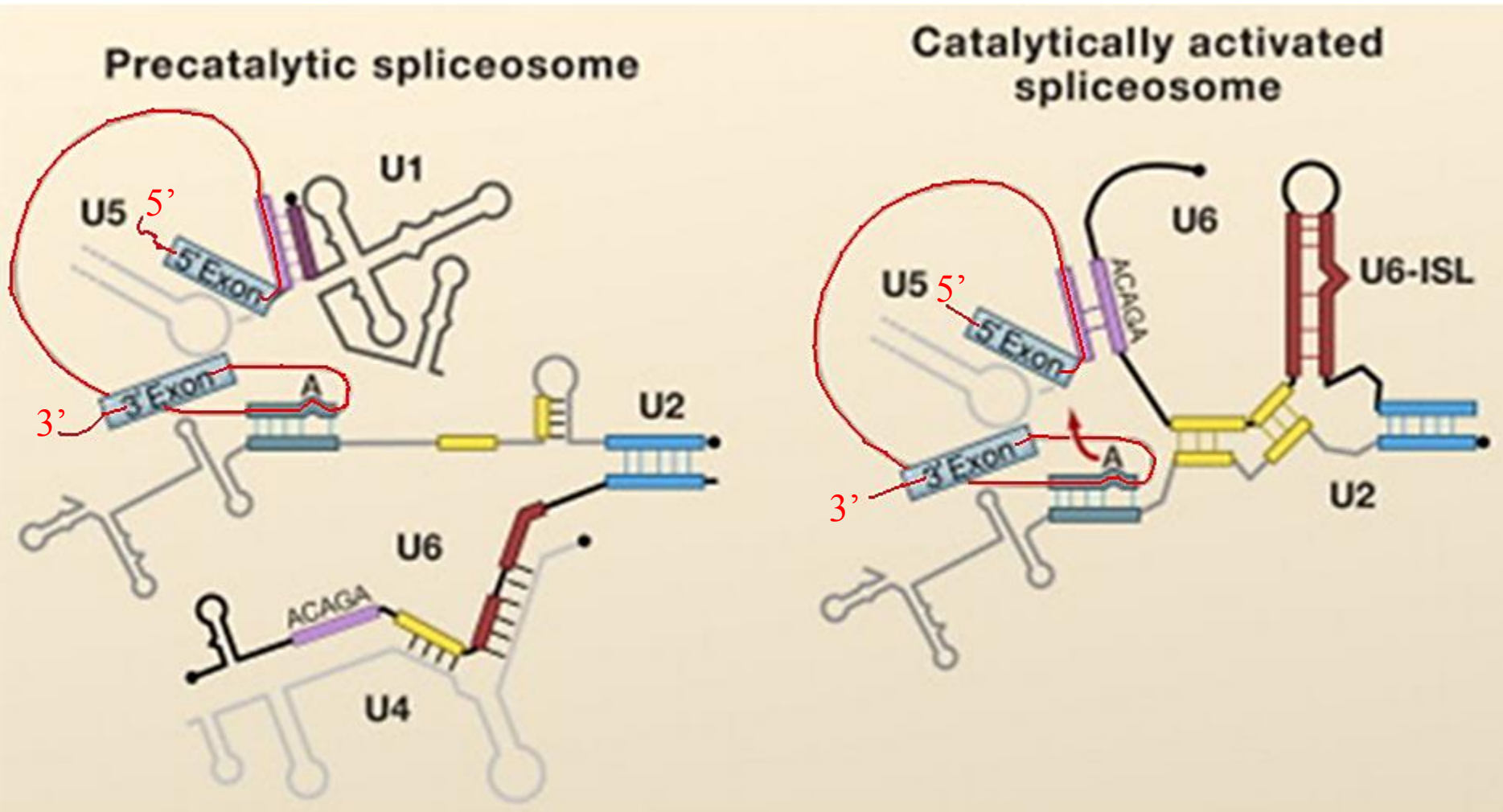


A kivágódás során a kitüntetett helyeket a spliceosomához tartozó snRNS-ek hibridizálódással azonosítják



A folyamatot szintén az snRNS-ek katalizálják, a fehérje-komponenseknek stabilizáló szerepe van

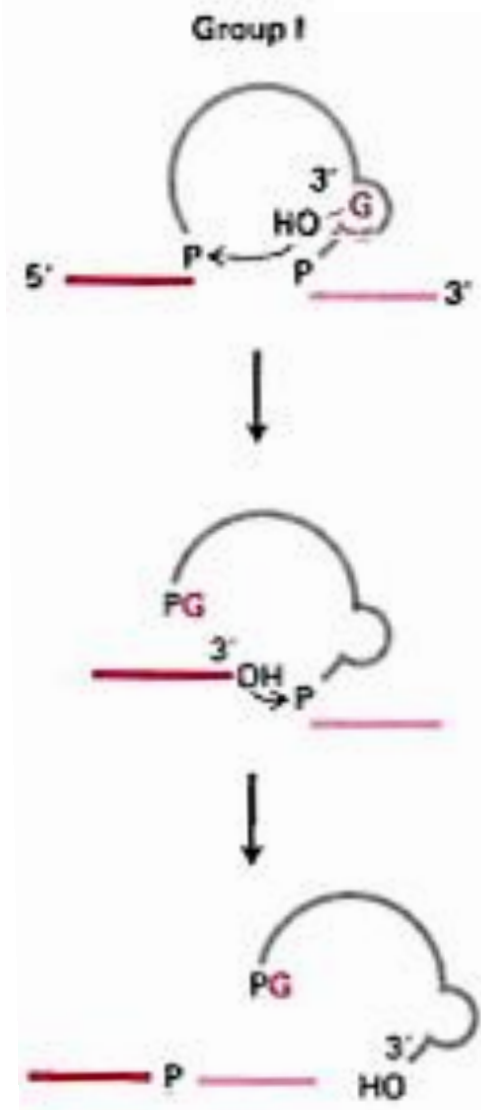
— : az éretlen mRNS egy szakasza



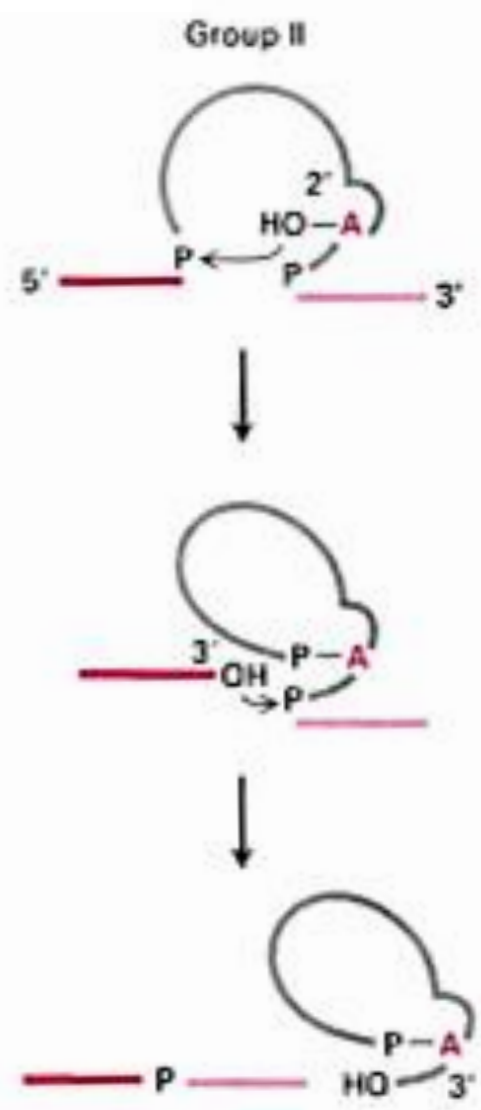
Egyes sejtílésegekben önkivágó RNS-ek működnek

önkivágó intronok

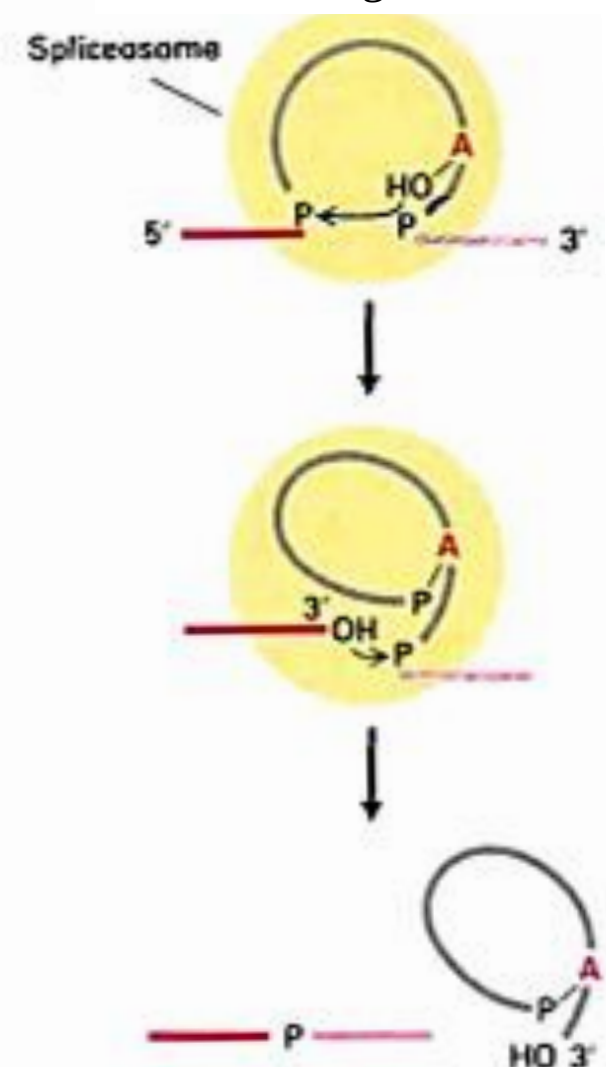
spliceosome-katalizált
kivágás



egysejtű, mitokondrium
és kloroplaszt rRNS



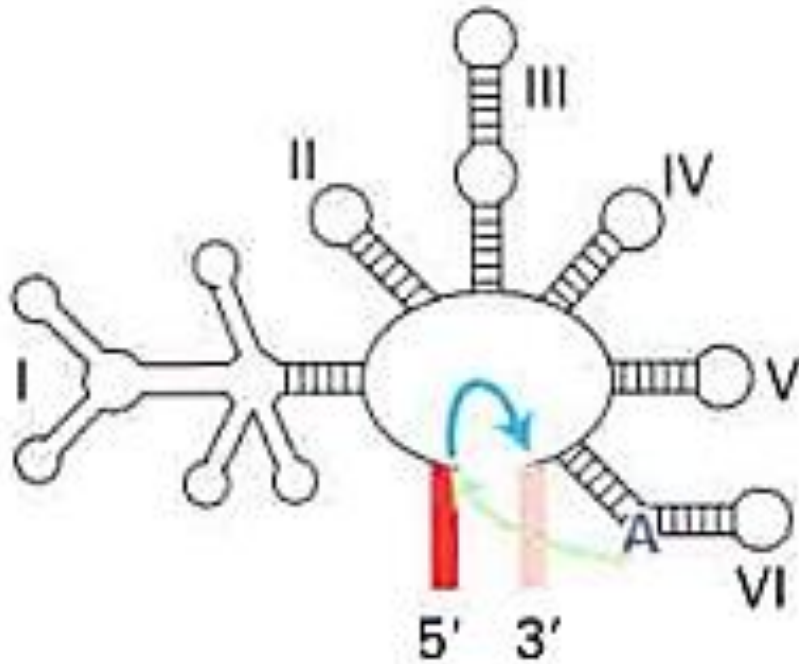
növényi mitokondrium és
kloroplaszt tRNS, mRNS



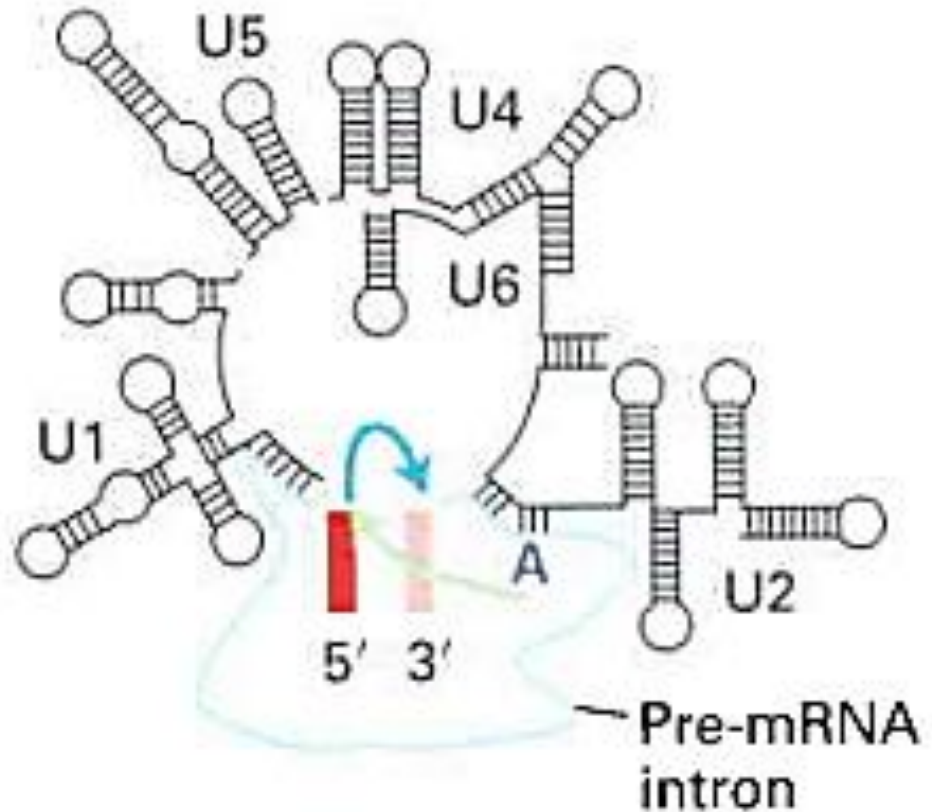
legtöbb eukarióta sejt

Az snRNS-ek valószínűleg önkivágódó intronokból származnak

(a) Group II intron



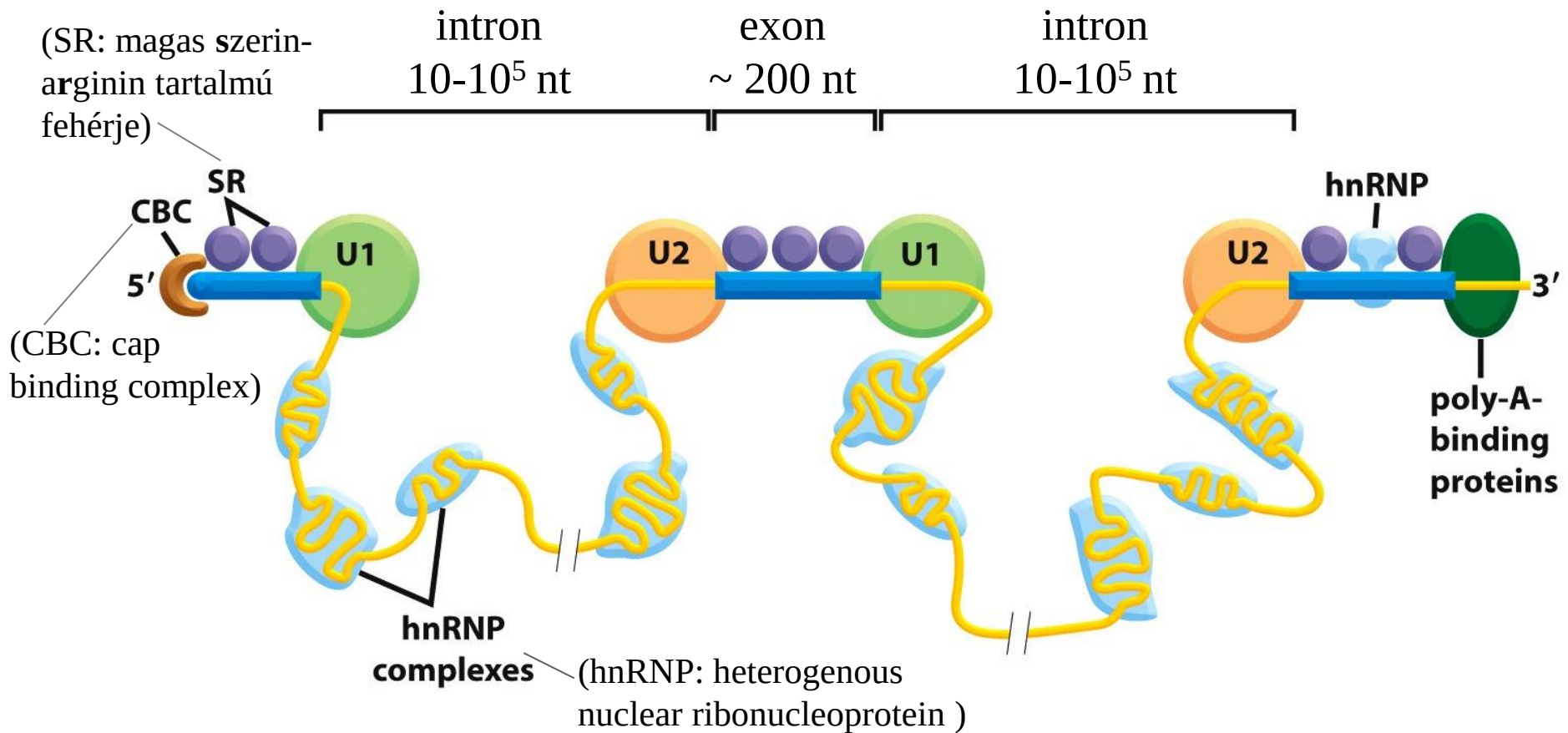
(b) U snRNAs in spliceosome



A II. csoportba tartozó önkivágó intronok másodlagos szerkezete nagyon hasonlít a spliceosomát alkotó snRNS-ek együttes struktúrájára.

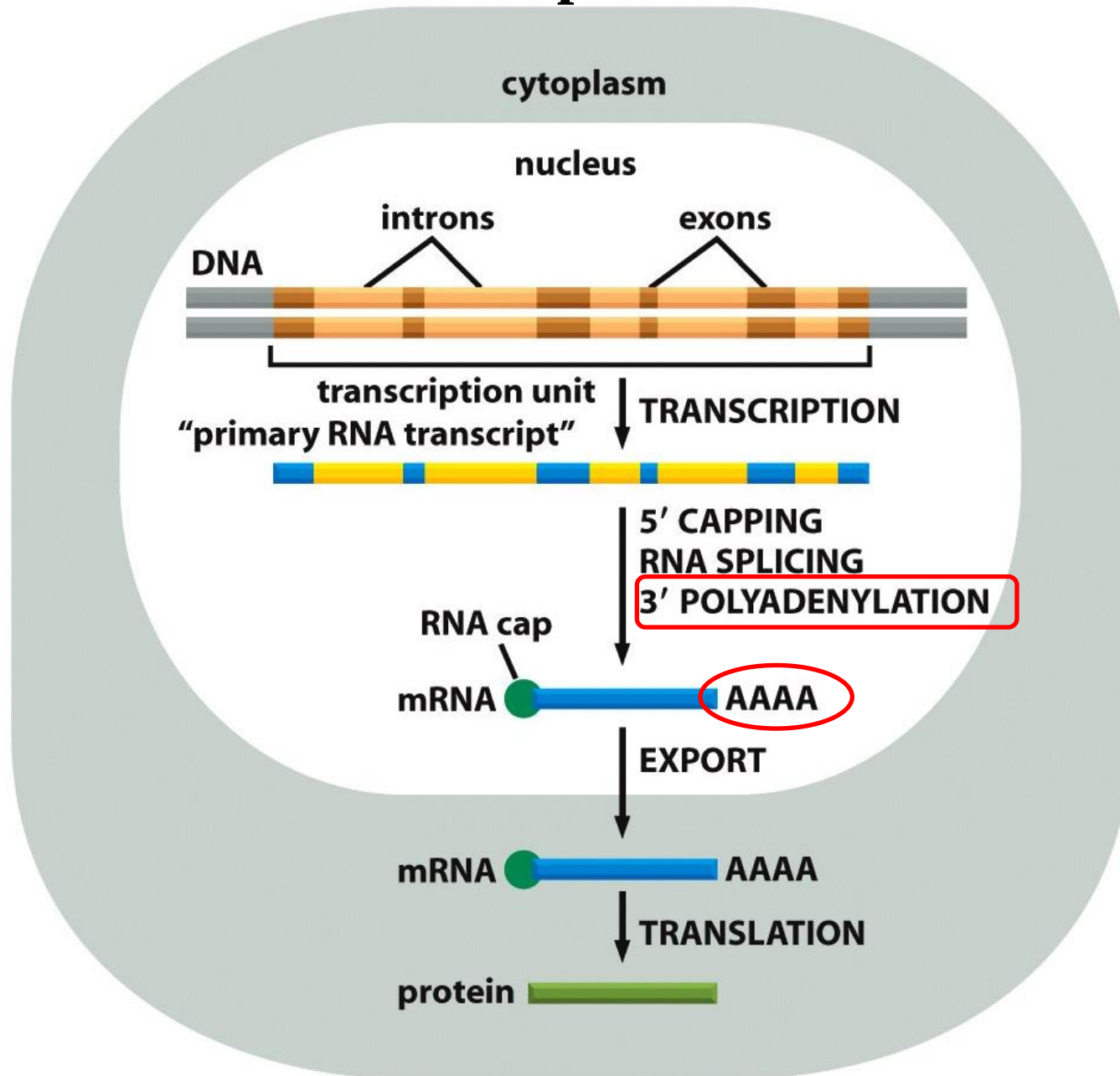
Evolúciós jelentőség: az intronok szekvenciájának nagy része ezután szabadon változhatott – rekombinációk!

Hogyan találja meg a spliceosoma a megfelelő exon-intron határt? Az exon-definíció elmélete

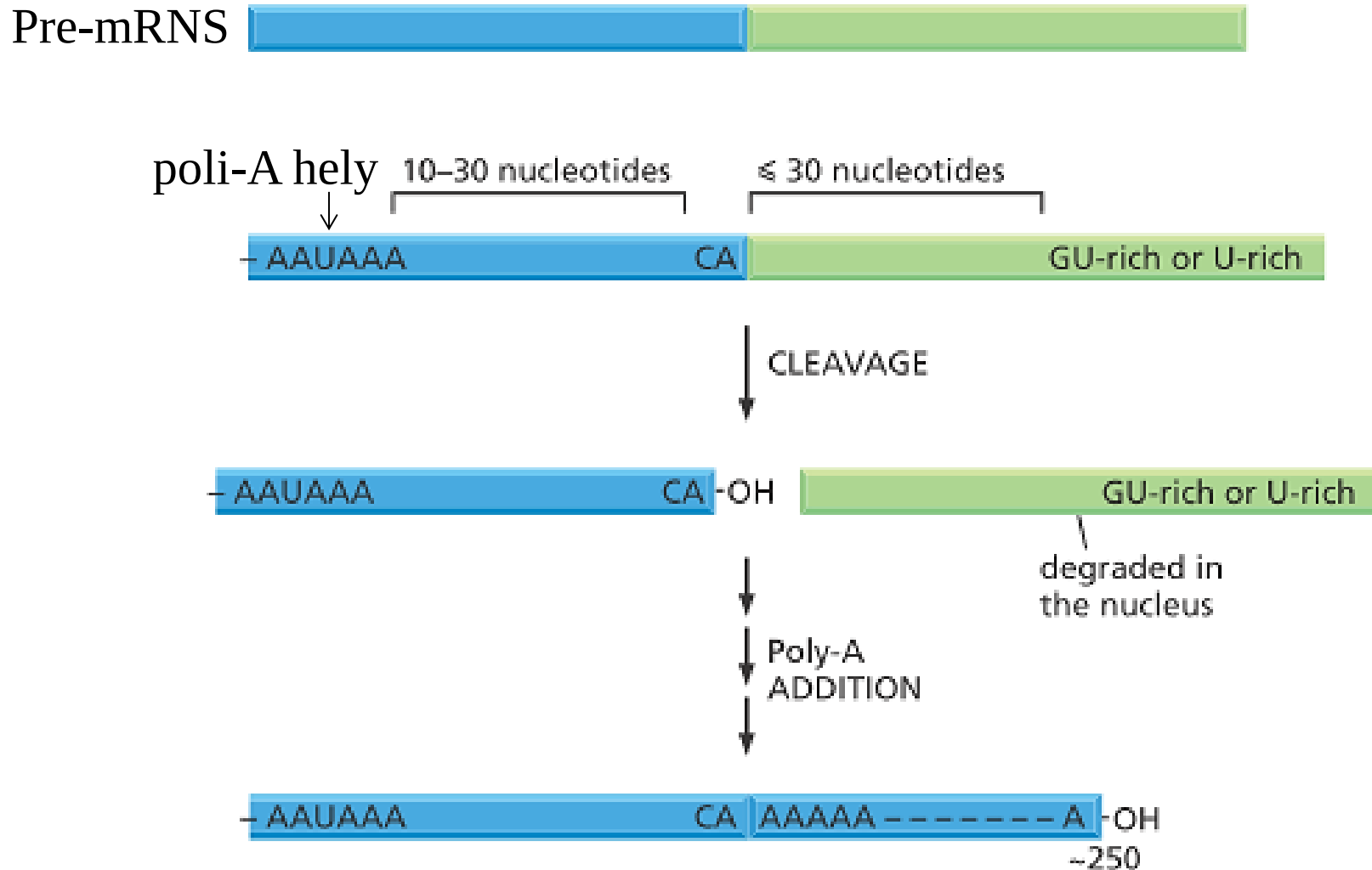


Az intronok legtöbbször nagyságrendekkel hosszabbak az exonoknál, az exon-intron határnak a hosszú intronon belül pedig sok szekvencia megfelelhet. Az exonokban speciális szekvenciák, ESE-k (exon splicing enhancer) vannak, amikhez SR-fehérjék kötődnek, még a transzkripció során. Ezek segítik az U1/U2 snRNP-k kötődését.

Az eukarióta mRNS érése: a poli-A farok kialakulása



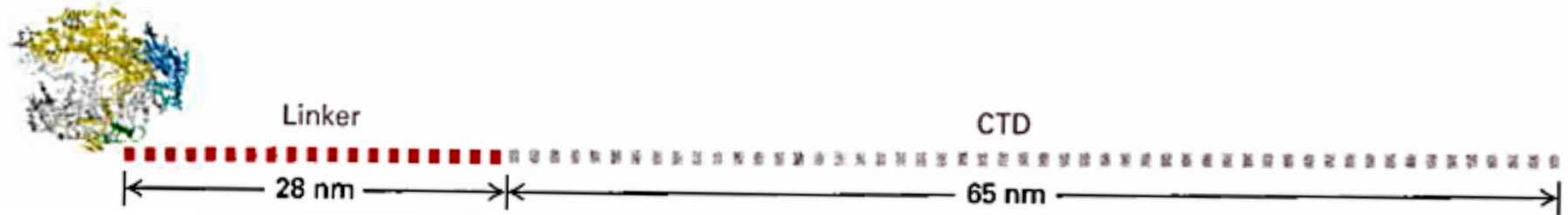
Poli-A farok képződése



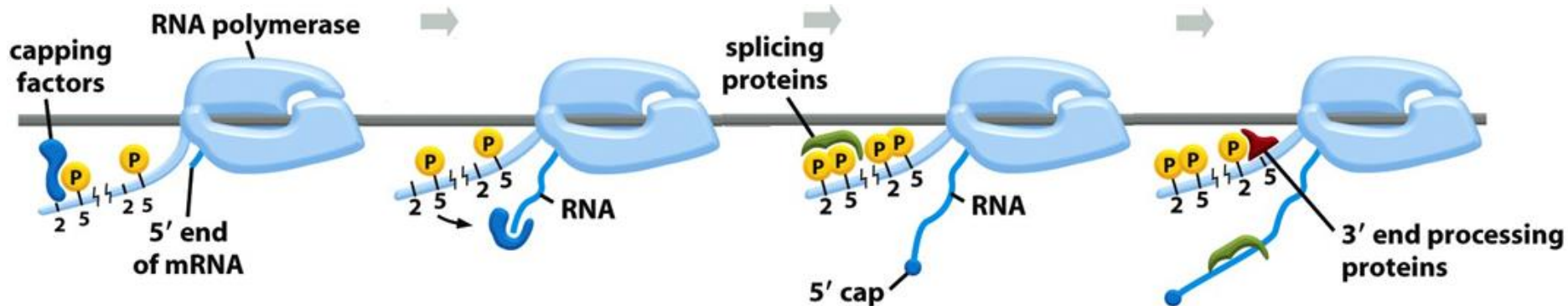
A polyA-farok az mRNS exportját, stabilitását, **élethosszát** is befolyásolja.

Az RNS polimeráz II C-terminális vége (CTD) összegyűjti az mRNS processzálasában szerepet játszó enzimeket

RNA polymerase II



A CTD nagyon hosszú az RNS polimeráz II méretéhez képest



Az mRNS érése már a transzkripció közben zajlik. A 3' vég még azalatt levágódik, míg az RNS-polimeráz a DNS-en van. Ezután a mRNS elhagyja az RNS polimeráz II-t, az RNS-polimeráz II pedig leválik a DNS-ről.

A sejtmagból egy fehérjékkel sűrűn telepakolódott mRNP-komplex jut ki

