


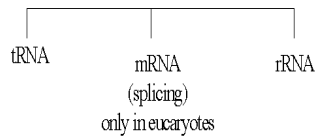
MOLEKÜLER BİYOLOJİ II B208

Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU

RNA TRANSKRİPTİNİN İŞLENMESİ

- **RNA'NIN İŞLENMESİ** primary (precursor) transkriptin (pre-RNA) mature RNA olmasına olanak sağlayan moleküler olayları tanımlamak için kullanılan bir terimdir.
- Pre-RNA  mature-RNA

Processing of rRNA and tRNA



POST TRANSKRİPSİYONEL MODİFİKASYONLAR

RNA TRANSKRİPTİNİN İŞLENMESİ

A) Uçları yaratmak için kesme ve kırma:

- Uzun pre-RNA üzerinde belirli bölgelerde kesim yapmak için **endonükleazlar** kullanılır
- Mature ürünü elde etmek amacıyla yeni oluşan uçlardan kırmak için **eksonükleazlar** kullanılır
- *Bu işlem prokaryot ve ökaryotlarda tüm RNA tipleri için kullanılır.*

B) Kovalent Modifikasyon:

- pre-mRNA transkriptine kep ve poly(A) kuyruk eklenmesi
- mRNA ve rRNA moleküllerindeki riboz şekerinin 2'-OH ine metil grubu eklenmesi
- tRNA bazlarında kapsamlı değişiklikler

C) Splicing

- Farklı mekanizmalarla pre-rRNA, pre-mRNA, pre-tRNA

RNA TRANSKRİPTİNİN İŞLENMESİ

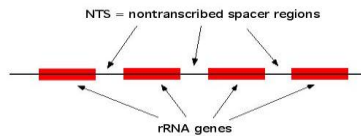
RiboNükleoProtein (RNP)

- Hücrelerdeki RNA molekülleri proteinlerle kompleks oluşturmuş şekilde mevcuttur (**RNA-protein kompleksi = RNP**)
- Spesifik proteinler spesifik RNA moleküllerine bağlanırlar
- **RİBOZOMLAR** en büyük ve en kompleks RNP'lerdir

1

rRNA transkriptinin işlenmesi

- rRNA, hücredeki toplam RNA moleküllerinin %95'ini oluşturmaktadır.
- Bazı sekanslara tüm hücrelerde büyük miktarlarda ihtiyaç vardır bu yüzden **rRNA genleri** genom üzerinde **çoklu kopyalar** halinde bulunur, bu genler **NTS** olarak isimlendirilen bölgelerle birbirlerinden ayrılır ve nucleolus'da görev yapan **RNA polimeraz I** tarafından transkripsiyona uğrar.
- rRNA gen kopya sayıları (Mayalar: 100-200; Memeliler: 100 binlerce; Bakteriler: Tekrar yok ancak bazen çoklu rRNA genlerine sahiptirler)



1

rRNA TRANSKRİPTİNİN İŞLENMESİ

1

rRNA transkriptinin işlenmesi

- Hem ökaryot hem de prokaryotlardaki **rRNA genleri** transkripsiyon neticesinde uzun bir **precursor rRNA** olarak sentezlenir ve **pre-rRNA** transkriptleri **mature rRNA** transkriptini oluşturmak için çeşitli modifikasyonlara uğrar
 - Birçok farklı rRNA molekülü uzun olan öncül molekülde yer alır ve her birinin **KESİLMESİ** gerekmektedir
 - rRNA daha sonra belli bölgelerden **METİLYASYONA** uğramak suretiyle modifiye edilir

1

rRNA transkriptinin işlenmesi

- **Pre-rRNA** transkriptinin büyüklüğü organizmalar arasında farklılık göstermektedir (maya: 7000 nt; memeliler 13500 nt), ve pre-mRNA molekülünün işlenmesinde, organizmalar arasında biraz farklılık göstermektedir
- Benzer şekilde, **mature-rRNA** ların gerçek büyüklükleri bir türden diğerine değişiklik gösterir ve mature rRNA, ribozomal proteinler ile bir araya gelerek sitoplazmik boşluğa eksport edilecek olan ribozomları oluşturur

1

rRNA transkriptinin işlenmesi

- rRNA molekülleri "S" (Svedberg) değerlerine göre isimlendirilir.
- "S" değeri ultrasantrifüjde sedimentasyon hızlarıdır
- "S" değeri ne kadar büyükse, rRNA o kadar büyüktür.

1

rRNA transkriptinin işlenmesi

- rRNA'lar **nontranscribed spacers (NTSs)** olarak adlandırılan bölgelere birbirlerinden ayrılmıştır.
- **Transcribed spacers** olarak adlandırılan bölgeler (rRNA öncülünün bir parçası olarak transkripsiyona uğrayan gen bölgeleri) öncül molekülün mature rRNA türüne dönüşümü esnasında uzaklaştırılır

PROKARYOTİK

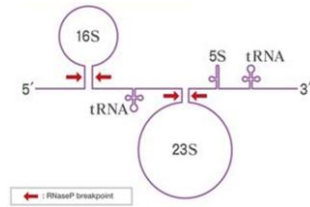
rRNA TRANSKRİPTİNİN İŞLENMESİ

1. rRNA da genom boyunca dağılım gösteren **7 farklı operon** vardır.
2. Her bir **operon** 16S, 23S ve 5S rRNA sekanslarının her birine ait bir kopya taşımaktadır. Bu rRNA operonlarında rRNA molekülleri için yaklaşık 1-4 kodlama sekansı da mevcuttur
3. Bakteriyal rRNA'lar (16S, 23S, 5S) uzun tek bir molekül olarak transkripsiyona uğrar ve yeni sentezlenen bu rRNA öncülleri (30S pre-rRNA) bir seri işleme tabi tutulmaktadır (Kesim ve kırılma)
4. İlk transkript 30S (6000 nt) sedimentasyon katsayısına sahiptir ve normal olarak çok kısa ömürlüdür

PROKARYOTİK rRNA TRANSKRİPTİNİN İŞLENMESİ

Step 1 (RNA katlanması):

Transkripsiyon esnasında ya da hemen transkripsiyona müteakip, birbirine tamamlayıcı zincirler arasında baz çifti oluşturmak suretiyle rRNA molekülü **stem-loop** şeklinde katlanmalara uğrar



PROKARYOTİK rRNA TRANSKRİPTİNİN İŞLENMESİ

Step 4:

RNase III ve diğer bazı ribonükleazlar (**RNase M5, M16 ve M23**) **pre-rRNA** transkripti kesilir

RNase III: rRNA modifikasyonunun ilk basamağında tek tek rRNA moleküllerini birbirinden ayırarak kesim işlemlerinin ikinci gerçekleştiren enzim

RNase M5, M16 ve M23: öncül molekülden 5S rRNA molekülünün ayrılmasından sorumlu olan diğer ribonükleaz enzimi. rRNA modifikasyonunun ikinci basamağında gereklidir

PROKARYOTİK rRNA TRANSKRİPTİNİN İŞLENMESİ

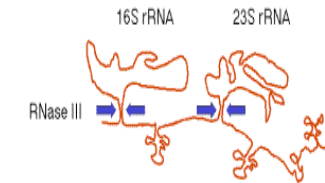
Step 2 (RNP kompleks oluşumu):

Gövde ve halkaya ait bu tip bir ikincil yapının oluşumu bazı proteinlerin rRNA molekülüne bağlanarak **RNP kompleks** oluşturmaya olanak sağlar ve ribozomun bir parçası olur

Step 3:

Proteinler bağlandıktan sonra, **nükleotid modifikasyonları** gerçekleşir. Örneğin *S-Adenosylmethionine (SAM)* metilasyon ajanı aracılığı ile adenin bazının metilasyonu

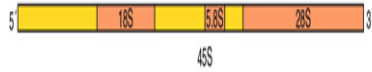
PROKARYOTİK rRNA TRANSKRİPTİNİN İŞLENMESİ



No apparent primary sequence specificity - perhaps RNase III recognizes a particular stem structure.

ÖKARYOTİK rRNA TRANSKRİPTİNİN İŞLENMESİ

- rRNA transkriptleri *ökaryotik nükleus*'da **45S pre-rRNA** olarak sentezlenir ve bir seri işlemle (*kimyasal olarak modifiye* edilir ve *enzimatik olarak parçalanarak* daha küçük fragmanların oluşumu) **mature-rRNA** oluşturulur.
- Nükleus'taki 45S transcript 3 tip rRNA'nın öncüsüdür (18S, 5.8S, 28S rRNA) (RNA polimeraz I).



ÖKARYOTİK rRNA TRANSKRİPTİNİN İŞLENMESİ snoRNA(small nucleolar RNA)

snoRNA'lar yardımı ile:

- Pre-rRNA molekülündeki **uracil'ler pseudouracil'lere dönüştürülür.**
- 45S pre-rRNA molekülü pek çok bölgede 2'-O-methylribose oluşturmak için metilasyona uğrar (**rRNA moleküllerindeki riboz şekerinin 2' OH grubuna metil grubu takılması**).
 - Bu modifikasyonların gerçek amacı *fonksiyonel ribozomu oluşturmak için bir şekilde rRNA alt ünitelerine kılavuzluk etmenin* dışında net olarak bilinmemektedir
- snoRNA'lar yardımıyla 18S, 5.8S and 28S rRNA arasındaki spacer sekanslar **kesip çıkarılarak** degrede edilir

ÖKARYOTİK rRNA TRANSKRİPTİNİN İŞLENMESİ snoRNA(small nucleolar RNA)

- Ökaryotik pre-rRNA molekülünün işlenmesinde snoRNA (**small nucleolar RNA**)'lar yardımcı olurlar

ÖKARYOTİK rRNA TRANSKRİPTİNİN İŞLENMESİ snoRNA(small nucleolar RNA)

- snoRNA'lar **proteinlerle** paketlenerek **snoRNP** (small nucleolar ribonucleoproteins) leri oluşturur
- **snoRNP**ler tamamen transkripsiyona uğramadan önce **pre-rRNA** ile birleşirler

2

tRNA TRANSKRİPTİNİN İŞLENMESİ

RNaseP ve RİBOZİMLER

- Birçok tRNA yoğun bir şekilde PTMye uğrar, özellikle mitokondri ve kloroplastta bulunanlar.
- tRNA genleri, genom boyunca **tekrarlanan kopyalar** şeklinde bulunmaktadır ve **intronlar** içerebilir.

2

tRNA transkriptinin işlenmesi

- Her bir tRNA (uzunluğu 75-90 nt), farklı bir amino asidi bağlayan farklı sekansa sahiptir.
- tRNA'lar birbirine tamamlayıcı olan baz çiftleri arasında bağ oluşturarak yonca yaprağı şeklinde yapıyı oluşturur. Loop #2 **antikodon** içerir.
- tRNA molekülün en temel görevi mRNA sekansının amino asit sekansına translasyonunu sağlamaktır (Antikodon, translasyon esnasında mRNA üzerindeki kodonları tanıır)

2

tRNA transkriptinin işlenmesi

2

tRNA transkriptinin işlenmesi

Uzun **pre-tRNA transkript** işleme uğrayarak (2 basamaklı) **mature tRNA** lar oluşur

1. tRNA uzun precursor bir molekül olarak transkripsiyona uğrar ve bu precursor'da birbirlerine bağlı olan değişik tRNA'lar yer almaktadır ve molekülün her iki ucundaki RNA'nın kesilip uzaklaştırılması gerekmektedir

2

tRNA transkriptinin işlenmesi

1. Rnase D, E, F ve P ile gerçekleştirilen spesifik ekzo- ve endonükleolitik kesim)

- *5' ve 3' uçtan kesim*
- *3' uca CCA ilave edilmesi*
- *Intronların kesilmesi*

2

tRNA transkriptinin işlenmesi

SIRA DIŞI BAZLARIN FONKSİYONLARI

- Transkripsiyon sonrası oluşturulur
- Amaç bazen karmaşık baz-eşlemesine izin vermektir: antikodonun 1. 'wobble' pozisyonundaki inosine 3. U, C veya A bazına bağlanabilir
- Bu da daha az farklı tRNA'nın gerekli olacağı anlamına gelmektedir
- Diğerleri yapısal fonksiyonlara sahiptir.

2

tRNA transkriptinin işlenmesi

Uzun **pre-tRNA transkript** işleme uğrayarak (2 basamaklı) **mature tRNA** lar oluşur

2. Diğer modifikasyonlar arasında **dihydrouridine (D)**, **pseudouridine (Y)**, **inosine (I)** gibi bazı sıra dışı rezidülerin oluşumu yer almaktadır (Her bir tRNA tipine spesifik baz modifikasyonları)

- Inosine kodon tanınması işleminde önemli role sahiptir.
- Bu modifikasyonlara ilave olarak, birkaç **nükleosid metile** olur.

tRNA transkriptinin işlenmesi

RIBONUCLEASE P (RNase P)**Ribonuclease P (RNase P)**

tRNA molekülünün işlenmesinde görev alan ve mature tRNA oluşturmak için pre-tRNA molekülünden 5' leader sekansı kesip çıkararak bir enzimdir

tRNA transkriptinin işlenmesi

RIBONUCLEASE P (RNase P)

- **RNase P** yaşamın tüm domain'lerinde (hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda), aynı zamanda mitokondri ve kloroplast organellerinde de mevcuttur.
- **RNase P** ilginç bir enzimdir çünkü yapısında hem RNA hem de protein vardır ve katalitik aktiviteden (RNase aktivitesi) sorumlu olan kısım RNA'dır.
- Bilim adamlarının ribozimleri (katalitik aktiviteye sahip RNA) keşfetmesine sebep olan enzimdir
- Bakterilerden ve ökaryotik nuclei'den elde edilen RNase P, M1 RNA olarak isimlendirilen katalitik RNA alt ünitesine sahiptir

tRNA transkriptinin işlenmesi

RİBOZİM

- **RİBOZİMLER** belirli biyokimyasal reaksiyonları katalize eden *katalitik RNA molekülleridir*.
- RNA enzim olarak hareket eder ve kendi replikasyonunda dahil olmak üzere çeşitli reaksiyonları katalize eder
- 1980'lerde keşfedildi (Cech & Altman, Nobel Prize 1989)
- Bazı RNA moleküllerinin katalitik reaksiyonları gerçekleştirilebilir özellikler, «Tüm enzimler proteindir» tanımlamasını bozmuştur
- **RNaseP RNA** molekülü bir ribozim'dir.
- **Ribozom (23S rRNA)** bir ribozim'dir

tRNA transkriptinin işlenmesi

RIBONUCLEASE P (RNase P)

- *E. coli*'de, **RNaseP**:
 - 377 nükleotit uzunluğunda RNA
 - 13.7 kDA lık küçük bazık bir protein içerir
- RNA bileşeni *in vitro* koşullarda proteinlerin yokluğunda pre-tRNA ları katalize eder. Dolayısıyla, **RNaseP RNA'sı katalitik bir RNA** ya da **RİBOZİM** dir
- Tüm **RNaseP** RNA molekülleri ortak sekans ve yapılarla sahiplerdir

PROKARYOTİK

tRNA TRANSKRİPTİNİN İŞLENMESİ

Birden fazla tRNA içeren **bakteriyal pre-tRNA** transkriptinin modifikasyonunda

1. İlk basamak, her birinde sadece tek bir tRNA yer alacak şekilde precursor molekülü fragmanlarına ayırmaktır
 - İki veya daha fazla tRNAya sahip precursor molekülde *tRNAlar arasından kesim yapmak*
 - Precursor'larda *tRNAlar ve rRNAlar arasından kesim yapmak*

**PROKARYOTİK
tRNA TRANSKRİPTİNİN İŞLENMESİ**

1. RNase II ve polinükleotit fosforilaz (PNPase) beraber hareket ederler ve pre-tRNA molekülünün ucunda yer alan ekstra nükleotitlerin çoğunu kesip çıkarırlar

**PROKARYOTİK
tRNA TRANSKRİPTİNİN İŞLENMESİ**

2. Ekstra nükleotitler pre-tRNA molekülünün 3' ucundan RNaseP tarafından katalizlenen tek basamaklı endonükleolitik kesim işlemi ile ayrılır

**PROKARYOTİK
tRNA TRANSKRİPTİNİN İŞLENMESİ**

3. RNases PH ve T RNA üzerinden son iki nükleotidin çıkarılmasında son derece aktiftir
 - RNase T en son nükleotidin çıkarılmasında temel etkindir

**PROKARYOTİK
tRNA TRANSKRİPTİNİN İŞLENMESİ**

3. tRNAların 3' ucunda CCA sekansı vardır ki bu sekansın bazıları kesim işleminden sonra eklenmiştir (bazıları DNA da kodlanmış sekanslara sahiptir). *Bu ekleme özel bir enzim yardımıyla yapılmaktadır*
 - CCA önemli bir sekanstır çünkü amino asitler bu noktadan bağlanırlar
 - tRNA moleküllerinde *pseudouracils gibi bazların bazıları bu aşamada modifiye edilmektedir*

ÖKARYOTİK tRNA TRANSKRİPTİNİN İŞLENMESİ

pre-tRNA sentezlendiğinde yapısında şunlar bulunur:

1. 16 nt 5'-leader,
2. 14 nt intron
3. İki ekstra 3'-nucleotides.

ÖKARYOTİK tRNA TRANSKRİPTİNİN İŞLENMESİ

1. Pre-tRNAlar endonükleazlar tarafından tanınan ikincil yapıyı oluştururlar
2. 5' leader ve 3' ekstra nükleotitler çıkarılır
3. **tRNA nucleotidy1 transferase** enzimi mature 3' uç yaratmak için mevcut 3' uca 5'-CCA-3' ekler
4. Intron çıkarılır, bazı bazlarda modifikasyonlar yapılır

3

mRNA TRANSKRİPTİNİN İŞLENMESİ

hnRNP ve snRNP

3

mRNA transkriptinin işlenmesi

Ökaryotik mRNA' üzerinde 3 temel kısım vardır:

- a. 5' lider sekans veya 5' translyasyona uğramayan bölge (5' UTR), uzunluğu değişir.
- b. Translasyon sırasında üretilcek proteinin amino asit dizisini belirleyen kodlama sekansı. Kodladığı proteinin büyüklüğüne göre uzunluk olarak değişir.
- c. trailer sekansı veya 3'translyasyona uğramayan bölge (3' UTR), uzunluk olarak değişir ve mRNA'nın stabilitesini etkileyen bilgileri içerir.

3

mRNA transkriptinin işlenmesi

Ökaryotlar ve prokaryotlar, mRNA'ları biraz farklı üretirler.

- Prokaryotlar, RNA transkriptini modifikasyon olmaksızın direkt mRNA olarak kullanır. Transkripsiyon ve çeviri birlikte sitoplazmada gerçekleşir. Mesajlar **polistronik** olabilir.
- Ökaryotlar, RNA processing başlığı altında gerçekleşen işlemlerle pre-RNA'yı mRNA'ya modifiye eder. İşlenmiş mRNA, translasyondan önce nükleustan sitoplazmaya geçer. Mesajlar daima **monosistroniktir**.

i. mRNA'nın 5' ucuna kep takılması

Yeni oluşturulan mRNA molekülünün

5' ucu keplenmek suretiyle
modifiye edilir

3

mRNA transkriptinin işlenmesi
pre mRNA'dan mRNA eldesi

- RNA polimeraz II tarafından genin transkripsiyonu.
- 5' cap ilave edilmesi
- 3' ucuna poly(A) kuyruk ilave edilmesi.
- İntronların açığa çıkarılması için Splicing

i. mRNA'nın 5' ucuna kep takılması

Kepleme
transkripsiyonun başlangıç aşamasından hemen sonra,
ko-transkripsiyonel olarak gerçekleşir

i. mRNA'nın 5' ucuna kep takılması

1

- Kep takma işleminden sorumlu enzim, **GUANİLTRANSFERAZ**.....
- Bu enzim molekülün 5' ucuna *5'-5' fosfodiester bağı* yapmak suretiyle guanin (purin halkasının 7.ci pozisyonundan metilasyona uğramış Guanine (m7G)) ekler.

i. mRNA'nın 5' ucuna kep takılması

- RNA molekülünün 5' ucuna atak yapan nuclease enzimleri tarafından gerçekleştirilen degradesyona engel olup molekülü koruyarak mRNA molekülünün stabilitesine katkıda bulunur
- Nucleus'dan sitoplazmaya transportun verimliliğini artırır
- Translasyonun verimliliğini artırır
- Kep, aynı zamanda mRNA molekülünün ribozom üzerinde pozisyon almasında (translasyon işleminin başlaması için) önemli rol oynamaktadır

i. mRNA'nın 5' ucuna kep takılması

Kendisini, RNA molekülünün 5' ucuna bilindik 3'→5' bağın aksine 5'→5' bağıyla bağlamaktadır

Kepleme işleminin bir parçası olarak, RNA zincirindeki ilk nükleotitin riboz halkası (bazen ikinci halkası da) metillenir **METİLTRANSFERAZLAR** (nuclear ve cytoplasmic) 5' terminal G rezidüsüne ve daha sonraki birbirine komşu olan iki nükleotiddeki riboz şekerinin 2' pozisyonlarına metil grupları ekler

ii. mRNA'nın 3' ucuna polyA takılması

Bakteri hücrelerinde spesifik terminasyon sekansı vardır (RNA polimeraz enziminin terminasyona uğrayacağı sekans) ve bu sekans yeni oluşmakta olan mRNA molekülünün 3' ucunda transkripsiyona son verilmesinin sinyalini verir.

ii. mRNA'nın 3' ucuna polyA takılması

Bununla beraber,
ökaryotik pre-mRNA molekülünde
terminasyon sekansı yoktur
ve
ökaryotik pre-mRNA moleküllerinin transkripsiyonu,
mRNA moleküllerinin 3' ucu olması beklenen
noktadan yüzlerce hatta binlerce nükleotit ileriye
devam eder

ii. mRNA'nın 3' ucuna polyA takılması

- Pre-mRNA moleküllerinin transkripsiyonu, mRNA moleküllerinin 3' ucu olması beklenen noktadan **yüzlerce nükleotit ileriye** devam eder

Polyadenylation signal sequence
Ribonükleaz, AAUAAA
konsensus sekansının 10-35
nükleotit aşğısından kesim yapar

Poly(A) polimeraz bu noktadan bağlanır
ve molekülün 3' ucuna A nükleotitleri
(~50-250) ekleyebilmek için ATP
molekülünü substrat olarak kullanır

ii. mRNA'nın 3' ucuna polyA takılması

5' ucun keplenmesine ilaveten,
ökaryotik pre-mRNA moleküllerinin çoğunun
3' ucu kesime uğrayarak polyA kuyruk eklenir
(50-250 nükleotit uzunluğunda) ve
pre-mRNA molekülünün 3' ucuna poly(A) eklenmesi
ökaryotik mRNA'nın 3' ucunu yaratan
işlemin bir parçası olarak kabul edilir...

2

ii. mRNA'nın 3' ucuna polyA takılması

- mRNA'nın transkripsiyonu, poli (A) konsensus sekansı (AAUAAA) boyunca devam eder
- Bir grup protein RNA'ya bağlanarak **kesim işlemini** gerçekleştirir
 - **CPSF** (cleavage and polyadenylation specificity factor)
 - **CstF** (cleavage stimulation factor)
 - **CFI** ve **CFII**

ii. mRNA'nın 3' ucuna polyA takılması

- Kesimden sonra, poly(A) polimeraz (PAP) enzimi ATP yi substrat olarak kullanarak RNA molekülünün 3' ucuna A nükleotidlerini ekler. İşlem boyunca PAP enzimi CPSP'ye bağlı kalır

ii. mRNA'nın 3' ucuna polyA takılması

- PABII (poly(A) binding protein II) oluşmakta olan poly (A) kuyruğa bağlanır

ii. mRNA'nın 3' ucuna polyA takılması

2

- Poly (A) kuyruğunun çok çeşitli fonksiyonları vardır
- mRNA molekülünü nuclease atağından korur ve sonuç olarak poly (A) kuyruğunun uzunluğu mRNA molekülünün stabilitesini etkiler
- Poly (A) kuyruğu; mRNA molekülünün nucleus dan sitoplazmaya aktarılması esnasında gerekli olan spesifik proteinler tarafından tanınır ve ribozomun mRNA molekülünü translasyon için tanımasını sağlar ve translasyon işleminin verimliliğini artırır

iii. mRNA'dan intronların çıkarılması

- Ökaryotik pre-mRNAların çoğu **İNTRON** içermektedir
- **Intronlar** protein kodlayan ökaryotik genlerin çoğunda bulunmakta olup (*histone ve interferon mRNA'larında intronlar yoktur*), prokaryotlarda sadece tRNA ve rRNA yapısında bulunurlar (*bazı bakteriyofaj genleri de intron içermektedir*)

3

iii. mRNA'dan intronların çıkarılması

- **Intronlar**, gende mesaj kodlayan (**exon**) bölgelerin arasına girerek bu bölgelerin birbirleri ile devam eden ilişkilerini bozar, ilk transkripte yer alır ancak fonksiyonel mRNA molekülünde bulunmazlar
- Dolayısıyla bakterilerde gözlemlenen ve polipeptit zincirindeki amino asitle bu polipeptidi kodlayan DNA molekülündeki nükleotitler arasındaki direkt ilişki ökaryotlarda söz konusu değildir!!!!

iii. mRNA'dan intronların çıkarılması

- Bazı **intronlar**, hangi kodlama sekanslarının ekspres olacağını ve nasıl splicing işlemine tabi tutulacağını belirlemek için geri besleme yapmak suretiyle gen ekspresyonunu regüle edebilmektedir
- **Intronlar** "eski kod" ya da bir zamanlar proteinlere dönüştürülmüş ama daha sonra inaktif olmuş gen kısımları içerebilir.
- Genellikle, balsi geçen introna ait sekansın hiçbir biyolojik fonksiyona sahip olmayan **junk DNA** olduğu düşünülürdü.
- Ancak son zamanlarda bu varsayım tartışma konusu yaratmaktadır, çünkü örneğin, *TPH1 insan genindeki intron 7 de meydana gelen bir mutasyon psikiyatrik bir bozukluk olan **şizofreni** ile ilişkilendirilmiştir*

iii. mRNA'dan intronların çıkarılması

- **Intronların** sayısı ve büyüklükleri *türler arasında* ve *aynı türün genleri arasında* oldukça değişkenlerdir.
- Bununla beraber **ekzonlar** büyüklük bakımından birbirlerine benzerlik gösterirler
 - Fungi gibi bazı ökaryotların genomları birkaç intronun varlığı ile gelişmiş, evrimleşmişken diğer pek çok ökaryot genomları intronlar bakımından oldukça zengindir (gen başına pek çok sayıda bulunmaktadır).

iii. mRNA'dan intronların çıkarılması

- **ALTERNATİF SPLICING (mRNA splicing)** yüksek ökaryotlarda çok yaygın bir olgudur. *Pre-mRNA üzerinden intronların alınması ve mesaj kodlayan exon'ların tekrar bir araya getirilmesi olarak tanımlanır.*
- Bu işlem mature mRNA sitoplazmaya ihraç edilmeden önce nucleus'da gerçekleşir
- Bu, aynı genin üzerinden birden fazla protein ürünü elde etmek ve hücrelerde gen ifadesini kontrol etmek için bir yoldur.
- RNA splicing işlemi kusursuz olmalıdır çünkü tek bir nükleotit hatası mRNA molekülünün okuma çerçevesini değiştirerek onu kullanılmaz hale getirebilir

iii. mRNA'dan intronların çıkarılması

- Değişik intron'lar üzerinde yapılan çalışmalar intronun 5' ucunun **GT sekansı** ile başlayıp 3' ucunun **AG sekansı** ile bittiğini göstermiştir
- **GT-AG kuralı** bu sabit dinükleotidlerin nükleer genlerdeki intronların ilk iki ve son iki pozisyonundaki mevcudiyetini tanımlamaktadır

iii. mRNA'dan intronların çıkarılması

- *Intronun 3' ucunun düzinelece nükleotit yukarısında bulunan A nükleotidi (branch point sekansı) incelenen tüm intronlar'da ortakur* (memelilerde sekans YNCURAY'dir, R: pürin, Y: pirimidin, N: herhangi bir baz ve A: adenin)

iii. mRNA'dan intronların çıkarılması

- 4 temel İNTRON tipi mevcuttur
- İtronlara ait bu 4 temel tip *splicing mekanizmaları ve/veya karakteristik sekansları* temel alınarak birbirlerinden ayırt edilebilir:
 1. **Group I intronlar:**
fungal mitochondrisi, plastidler, ve Tetrahymena pre-rRNA'sında (self-splicing)
 2. **Group II intronlar**
fungal mitochondrisi ve plastidler (self-splicing)
 3. **pre-mRNA molekülündeki intronlar (spliceosome mediated)**
 4. **pre-tRNA molekülündeki intronlar**

iii. mRNA'dan intronların çıkarılması

Grup III intron'ların gen üzerinden alınması **spliceosome** adı verilen ve **RNA-protein** yapısında olan bir kompleks tarafından katalize edilir

iii. mRNA'dan intronların çıkarılması

- Intron'ların pre-mRNA üzerinden alınması **SPLICEOSOME** adı verilen bir kompleks (**RNA-protein**) tarafından katalize edilir
- **Spliceosome**'lar, pre-mRNA'lar ile ilişkili küçük nükleer ribonükleoprotein (RNP) parçacıklarıdır (**snRNPs**)

snRNA (small nuclear RNA)

- **snRNA**lar = small nuclear RNAs
- (splicing işleminin katalitik mekanizmasında gerekli)
 - **snRNA**lar, snRNP leri oluşturmak için spesifik proteinler ile kompleks oluşturan **urasil bazı bakımından zengin** yapılardır
 - snRNA'lar **RNA polimeraz II** enzimi tarafından nucleus'da sentezlenir ve normal 5'-kep yapısına sahiptir.
 - Sitoplazmaya ihraç edilirler ve burada genel öz proteinleri ve diğer spesifik proteinlerle işbirliği yapar.
 - 5'-kep yapıları 2 metil grubu kazanır ve splicing işleminde fonksiyon gösterebilsin diye geri nucleus'a yollar

iii. mRNA'dan intronların çıkarılması

SPLICEOSOME molekülünün yapısında splicing işleminin katalitik mekanizmasında gerekli olan 5 adet **snRNP** (small nuclear ribonucleoprotein) (U1, U2, U4/U6 ve U5), diğer **splicing faktörleri** ve oluşmakta olan **pre-mRNA** vardır

snRNP (snurps)

(small nuclear ribonucleoproteins particles)

(snRNA + PROTEİN)

- **snRNP**ler splicing işleminde görev almaktadır
- En yaygın olan snRNP'ler pre-mRNA molekülünün splicing işleminde gerekli olanlardır: U1, U2, U4, U5 ve U6.
 - **5' splice site** ve **branch site**, bölgelerini tanırlar
 - Bu bölgeleri bir araya getirir
 - RNA kesim işlemini katalize eder veya katalize edilmesine yardım ederler
 - RNA-RNA, RNA-protein ve protein-protein etkileşimlerini splicing işleminde çok önemlidirler
- **snRNP**'lerin büyük bir kısmı, pre-rRNA molekülündeki metilasyon bölgelerini belirler

SPLICEOSOME

- snRNPler molekülleri aşamalı olarak bir araya gelerek spliceosome kompleksini oluştururlar.

- Intronun 5' splice site bölgesine U1 snRNP (ve baz çiftleri) bağlanır
- Branch site bölgesine U2 snRNP bağlanır (ve baz çiftleri)
- U4/U6 ve U5 snRNPler bağlanır

SPLICEOSOME

- Oluşum için ATP hidrolizi gereklidir
- Oluşuma aynı zamanda çeşitli yardımcı faktörler ve splicing faktörleri de katkıda bulunur.
- Exon 1 ve 2 birbirine bağlanınca snRNPler serbest kalır