

FARKLILAŐMANIN MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ

Hücre farklılaşma mekanizmaları

RNA Polimeraz ve Promotordaki Trans-Düzenleyici Faktörler

- Transkripsiyon için, RNA polimeraz ile promotor DNA'sının interaksyonu gereklidir.
- Ökaryotik hücrelerde, 3 farklı tipte RNA polimeraz vardır; herbiri özel fonksiyonlara ve özelliklere sahiptir.
- **RNA polimeraz I** nükleusun nükleolar bölgesinde bulunur ve büyük ribozomal RNA'ların transkripsiyonundan sorumludur;
- **RNA polimeraz II** mRNA öncülerini kopyalar;
- **RNA polimeraz III** transfer RNA, 5S ribozomal RNA ve diğer küçük DNA dizileri gibi küçük RNA'ları transkribe eder.
- Ökaryotik RNA polimerazların hiçbiri DNA'ya etkili bir şekilde bağlanamaz. Bunun yerine, DNA'ya ilk olarak bağlanan "DNA-bağlayıcı protein aileleri" vardır ve bir kez bağlanınca RNA sentezini başlatmak için RNA polimerazla interaksiyona girerler.

TATA Elementi ve RNA Polimeraz II

- Transkripsiyonun klasik diyagramı gösterir ki; DNA, RNA polimeraz ve ribonükleozid trifosfatların varlığında RNA moleküllerine transkribe edilir.
- Fakat bu basit şema
- (1) RNA'nın doğru yerde start almasını ve
- (2) belirli bir genin transkripsiyonunun, sadece belirli hücre tiplerinde ve belirli zamanlarda gerçekleşmesi gibi zorlukların sebebini açıklamaz.
- RNA polimerazı sadece belirli genlerin promotorlarına bağlayabilen faktörler olmalıdır.
- Burada biz RNA polimerazı promotor bölgesine yerleştiren bu proteinleri ve DNA dizilerini tartışacağız.

- mRNA'ların transkripsiyonundan sorumlu enzim RNA polimeraz II'dir.
- Buna karşın, in vitro klonlanmış genlerin doğru transkripsiyonu, eğer genler saflaştırılmış RNA polimeraz II ve nükleozid trifosfatlarla inkübe edilirse gerçekleşmeyecektir.
- Transkripsiyonu başlatmak için nükleer ekstraktlar eklenmelidir.
- Transkripsiyonun başlamasını sağlayan bu faktörler nelerdir?
- RNA polimeraz II ile uygun transkripsiyonun başlaması için en az 6 nükleer proteinin gerekli olduğu gösterilmiştir

TFIID ve TFIIA

- **TF** transkripsiyon faktörünün kısaltmasıdır;
- **II** RNA polimeraz II için gerekli olduğu bulunan ilk faktördür;
- **harfler** ise fosfoşelülaz kolonlardaki aktiviteye sahip fraksiyonları gösterir.

- mRNA transkripsiyonunun ilk basamağında, TFIID kompleksi TATA kutusuna bağlanır.
- Bu “DNaz protection” denemeleriyle gösterilmiştir; bu denemede, TFIID klonlanmış genlere ilave edilmiştir ve DNA sonra DNaz ile parçalanmıştır. DNA’yı parçalanmaktan “kurtaran” tek yol TFIID’nin DNA’ya bağlanmasıdır, bu sayede DNaz’ın ona ulaşması engellenir.
- Bu deneme ile araştırmacılar, TFIID’nin özellikle genlerin TATA bölgesine bağlandığını göstermişlerdir.

- TFIID multimerik bir proteindir,
- bunun komponentlerinden biri (**TATA bağlayıcı protein, TBP**) doğrudan TATA dizisinin minör oluşuna bağlanır.
- TFIID kompleksi bir kaç aktiviteye sahiptir;
- (1) birincisi TATA dizisine bağlanması ve transkripsiyonal kompleks için temel olarak iş görmesidir.
- (2) TFIID'nin diğer rolü, promotor bölgesindeki nükleozomların stabilizasyonunu engellemektir.
- Promotor-içeren DNA nükleozom içine dahil olduğu zaman, bu genler, TFIID, RNA polimeraz II ve diğer faktörler daha sonra ilave edildiği zaman, transkribe olamazlar.
- Bununla beraber, nükleozom oluşumu sırasında veya daha önce genlere TFIID ilave edildiği zaman, oluşan kromatin transkripsiyonel olarak aktiftir.
- Nükleozom oluşumunu bloke etmede, TFIID'nin Histon H₁'e antagonistik olarak etki ettiği açıktır.

- Histon H₁ nükleozomları stabilize eder ve bağlandığı bölgedeki transkripsiyonu engeller.
- H₁'in ilavesi TFIID'nin TATA bölgesini bulmasını engeller ve transkripsiyonu önler;
- buna karşın, önce TFIID ilave edilirse bu inhibisyonun üstesinden gelinir.
- TFIID'nin bağlanması transkripsiyon faktörü TFIIA tarafından kolaylaştırılır ve stabilize edilir.
- Birçok transkripsiyon faktörü, TFIID'leri biraraya getirerek ve TFIID transkripsiyon kompleksinin diğer üyelerine bağlanabildiği için onu "aktive ederek" transkripsiyon fonksiyonunu aktive eder.
- Yani, belirli bir genin transkribe olup olmayacağını kararı genellikle inhibitör faktörlere (histonlarda olduğu gibi) ve TFIID ile TFIIA arasındaki dengeye bağlıdır.

TFIIB ve RNA Polimeraz II

- TFIID/TFIIA kompleksi RNA polimeraz II ile doğrudan stabil bir kompleks oluşturamaz.
- Bunun yerine, TFIID TFIIB faktörüne bağlanır.
- TFIIB'nin TFIID'ye bağlanması çok sayıdaki genin transkripsiyonunda anahtar olan hız-sınırlayıcı basamak olduğu açıktır.
- Bu hız, “promotor- ve enhancer-bağlayıcı transkripsiyon faktörleri”nin yakınlıklarıyla dramatik olarak arttırılabilir.
- Bu transkripsiyon faktörleri diziye özgüdür ve hangi genin transkribe edileceğini düzenleyebilir.

- Bu transkripsiyon faktörlerinin **aktivatör bölgesi** doğrudan TFIIIB'ye bağlanır ve onun TFIID ile biraraya gelmesini kolaylaştırır.
- TFIIIB bir kez yerleşince RNA polimeraz II ona bağlanabilir.
- RNA polimerazın büyük bir kısmı, TFIIIB ile interaksiyonu sonucu yerini bulabilir, fakat RNA polimeraz II'nin büyük altünitesinin karboksi terminal kuyruğu doğrudan TFIID ile temas eder. Böylece, RNA polimeraz II promotorda yerini alır.

TFII E/ F ve TFII H

- TFII B'ye bağlanmadan önce veya bağlanma sırasında RNA polimeraz II, TFII F ve TFII E ile ilişki kurar.
- **TFIIF** DNA heliksini çözmek için gerekli olan enzimatik aktiviteye sahiptir.
- **TFIIE** DNA'ya bağlı bir ATPaz'dır ve muhtemelen transkripsiyon için enerji oluşturmak adına gereklidir.
- Fakat RNA polimerazın TATA kutusu üzerindeki bu komplekse bağlı kalıp kalmaması neye yarar?
- Transkripsiyonun gerçekleşmesi için, RNA polimeraz promotor bölgesinden ayrılmalıdır. Bu serbest bırakma aktivitesinin TFII H'nin fonksiyonu olduğu açıktır.

TFII H

- RNA polimeraz, karboksi terminal bölgesi ile (CTD) TFII D'ye sıkıca bağlanmıştır.
- Buna karşın TFIID, CTD'nin sadece fosforlanmamış formunu bağlayacaktır.
- Memelilerde CTD, 7 aminositten oluşan bir dizinin (YSPTSPS) 52 tekrarını içerir.
- Başlama kompleksi oluştuğu zaman, tamamlanmış kompleks, TFII H'nin serin/treonin protein kinaz aktivitesini uyarır.
- TFII H sonra 52 tekrarın herbirini fosforile eder.
- TFII D yoğun olarak fosforlanmış bu bölgeye bağlanamaz ve RNA polimerazı serbest bırakır.
- Birinci fosfodiester bağı CTD'nin fosforilasyonu olmaksızın yapılabilirken, bu fosforilasyonun mRNA'nın sonraki transkripsiyonu için temel olduğu açıktır.

Aktif ökaryotik başlama kompleksinin oluşumu

Transkripsiyon faktörleri ve RNA polimeraz II ile TATA box üzerinde oluşan kompleksler

- A) TFIID kompleksi, TATA kutusuna TBP altünitesi aracılığı ile bağlanır.
- B) TFIID, TFIIA tarafından sabitlenir.
- C) TFIIIE ve TFIIIF RNA polimeraz II ile bağlanırken, TFIIIB ve TFIIH TATA kutusu üzerindeki komplekse bağlanır.
- D) RNA polimeraz, TFIIIB üzerine yerleşir, ve onun karboksi terminal bölgesi (CTD), TFIID tarafından bağlanır.
- E) CTD, TFIIH tarafından fosforile edilir ve TFIID tarafından serbest bırakılır. RNA polimeraz II artık, genden mRNA tercüme etmeye hazırdır.

TAF'ler ve Bazal Transkripsiyonun Aktivasyonu

- TFII D multimerik bir proteindir, onun altünitesinden sadece biri gerçekten TATA dizisine bağlanır.
- Diğer altünitelerin bazısına TATA bağlayıcı proteinle-birleşen faktörler (TAF'ler: TATA-binding protein-Associated Factors) adı verilir.
- İnsan ve *Drosophila*'nın TFIID'lerinden TAF'lerin saflaştırılması göstermiştir ki; onlar benzer protein setinden oluşmuştur.
- Bu TAF'lerin iki fonksiyonda iş gördüğü düşünülmüştür:
 - 1-Bunlar TFII D'nin promotörde kalıp kalmayacağını belirleyebilir,
 - 2-Bunlar enhancer-bağlayıcı proteinleri, protein-protein interaksyonu ile transkripsiyon kompleksine bağlayan koaktivatörler olarak fonksiyon yapabilir.

Transkripsiyonu aktive etmek için farklı transkripsiyon faktörleri ile etkileşime giren farklı TAF'ler

- (A) TBP ve bir TAF'nin minimal kompleksi transkripsiyonu aktive etmede başarısız. (Sp1 ve NTF, TBP ile birleşemez)
- (B) p150 ve p60 TAF'nin ilavesi NTF ile transkripsiyonel aktivasyona izin verir, fakat Sp1 ile vermez.
- (C) p110 ve p 150 TAF'nin ilavesi hem NTF hem de Sp1 ile aktivasyonu sağlar.
- (D) Holo-TFIID çok sayıda faktörle aktivasyonu destekler ve diğer aktivasyon proteinlerinin transkripsiyonel komplekse ulaşmasını sağlar.

- TATA bağlayıcı proteinin, promotor üzerinde kalıp kalmayacağı bir gen için çok önemlidir.
- Eğer o ayrılmazsa, gen transkribe olmayacaktır.
- 250 ve 150 kD TAF'lerin TBP'nin TATA kutusuna bağlı kalıp kalmayacağını belirlemede kritik olduğu gösterilmiştir.
- Bu TAF'ler promotorun upstream elemanlarını tanır, eğer varsa promotordaki TBP'yi stabilize veya destabilize eder.
- Bu, bazı promotorların transkribe edilmek için intrinzik olarak daha “zor” olduğu ve bazı faktörlerin bu promotorları transkribe edilebilir yapmak için mevcut olmak zorunda olabileceği anlamına gelir.
- Daha sonra göreceğimiz gibi bazı promotorlar (insan interferon- β için olduğu gibi) ancak onların kıvrılması, onların bükülmesiyle yerleştirilmesi ve frajil transkripsiyon kompleksinin kuvvetlendirilmesi gibi çok büyük çabalardan sonra transkribe edilirler.

- TBP' nin farklı TAF'lerle birliği, transkripsiyon kompleksinin enhancer ve promotor bölgelerinin upstream'indeki bağlı proteinler tarafından aktive edilmesini sağlar.
- Üstelik, farklı TAF'ler farklı trans faktörler ile birlikte harekete geçebilir.
- Örneđin, en yaygın transkripsiyon faktörlerinden biri Sp1'dir.
- Bu non-TAF proteini, promotora veya enhancerin GGGCGG dizisine karboksil ucuyla bağlanır, fakat transkripsiyonal aktiviteyi amino terminali ile düzenler.
- Bu faktör muhtemelen tüm hücrelerde bulunur ve bu yüzden, differansiyel gen ekspresyonunu düzenleyemez.
- Bununla beraber, bunun belirli hücrelerde belirli genlerin differansiyel transkripsiyonuyla sonuçlanan yollarda promotor bölge ve enhancer bölge arasındaki interaksyonlarla ilgili olduğu açıktır.
- Sp1, transkripsiyon kompleksinin aktivasyonu için 110kD'luk TAF'ye bađlanmaya gereksinim duyar.

- Böylece, bu TAF, Sp1 ve TBP arasında köprü kurar, DNA'da bir ilmek oluşturur.
- TAF'ler DNA'nın ilmeklenmesini yapabilecektir. Yani; enhancer'deki Sp1 elemanları, promotördeki TFIID proteini ile birleşebilecektir.
- Bicoid transkripsiyon faktörü 110kD ve 60kD'luk TAF'lere bağlanır ve bu TAF'lerin herhangi birindeki mutasyonlar *Drosophila* embriyolarında Bicoid'e-bağlı transkripsiyonu azaltır.
- Benzer olarak, *Drosophila* NTF1 transkripsiyon faktörü hem 60kD hem de 150kD'luk TAF'lere bağlanır ve insanlarda, östrojen reseptörüyle transkripsiyonal aktivasyon onun 30kD'luk bir TAF'ye bağlanmasıyla gerçekleştirilir.