

Moleküler Hücre Biyolojisi I

Hafta 6: Hücreler genomları nasıl okur? Transkripsiyon

Dr Arzu ATALAY

**DNA'dan proteine giden yolak
(santral dogma)
DNA-RNA-Protein**

Genler farklı verimlilikle ifade edilebilir

RNA'nın kimyasal yapısı

RNA özgün yapılara katlanabilir

DNA'nın yazılımı sonucunda DNA'nın bir ipliğine tamamlayıcı olan tek iplikli RNA molekülü üretilir

DNA, RNA polimeraz enzimi aracılığı ile yazılır

RNA polimeraz kalıp bağımlı nükleotid polimerizasyonu gerçekleştirir

Katalitik bölgelerinde kritik bir Mg^{2+} iyonu taşımaları haricinde DNA ve RNA polimerazların ortak yönü yoktur. Farklı evrimleşmişlerdir, bir kısım modern DNA polimeraz ve ters transkriptaza evrimleşirken, diğerleri RNA polimeraza evrimleşmişlerdir.

Hücreler çeşitli RNA türleri yapar:

mRNA, rRNA, tRNA, snRNA, snoRNA, scaRNA, miRNA, siRNA

Bakteri RNA polimerazın yazılım döngüsü

- 1) RNA polimeraz holoenzimi oluşur ve promotora yerleşir
- 2) Polimeraz yazılımın başlayacağı noktada DNAyı açar
- 3) Yazılım başlar
- 4) İlk 10 nt sentezi nispeten verimsizdir, ardından sigma etmeni gevşer, polimeraz bir dizi değişiklik geçirir, RNA çıkış kanalına yerleşir
- 5) Uzama aşaması
- 6) Sonlanma kodonu ile karşılaşıncaya polimeraz DNA kalıbını terkeder

Bakteride tüm RNA molekülleri tek tip RNA polimeraz tarafından sentezlenir. Şekildeki döngü hem katalitik hem de işlevsel mRNAlar için geçerlidir

***E.coli* promotorlarının ana grubundaki uzlaşma dizileri:**

300 promotor kıyaslanarak -35 ve -10 heksamerlerinde dört nükleotidin sıklığı gösterilmektedir. Bakteride her biri farklı promotor tanıyan minör sigma etmenleri vardır

RNA polimerazda yönelmenin önemi:

Promotor dizileri asimetriktir, iplerden her biri kalıp olarak kullanılabilir. Kalıp işlevi gören DNA ipliği 3'-5' yönünde harekete izin verir. Hangi ipliğin kalıp olacağına RNA polimerazın hareket yönü belirler.

Bir bakteri kromozomunun kısa bir parçası boyunca yazılımın yönleri:

E.coli kromozomunun yaklaşık %0.2'si görülmektedir. Soldan sağa doğru yazılan genler kalıp olarak alttaki DNA ipliğini, sağdan sola yazılan genler ise kalıp olarak üstteki ipliği kullanırlar

Ökaryotlarda yazılımın başlaması için pek çok protein gereklidir.

Ökaryotik RNA polimeraz II ile bakteriyel RNA polimerazın benzeyen yapısal yönleri:

Ökaryotik polimeraz daha büyüktür (12 altbirim-5 altbirim). Yapısal bileşen olarak Zn ve polimerizasyon bölgesinde Mg atomunu bulunur

Ökaryotik RNA polimeraz II ile bakteriyel RNA polimerazın işlev açısından farkları:

- 1) Bakteri RNA polimerazı altbirimlerinden biri olan sigma etmeni ile herhangi bir ilave protein yardımı olmadan yazılımı başlatabilir. Ökaryotik polimerazlar genel yazılım etmenleri olarak adlandırılan proteinlere ihtiyaç duyar. Yazılımın olması için bunların promotorda polimeraz ile bir araya gelmeleri gerekir
- 2) Ökaryotlarda yazılımın başlaması, DNA'nın nükleozomlara paketlenmesi ve katlanarak yüksek kromatin yapısını oluşturması ile bağlantılıdır

Ökaryotik RNA polimeraz II başlangıç yerinin yakınında uzlaşma dizileri bulunur

Birçok RNA pol II'nin yazılıma başlama noktası bu 4 diziden sadece 2-3 tanesini içerir

RNA polimeraz II tarafından yazılımın başlatılması:

Yazılım etmenleri (TFs) TFIIA, TFIIB vd.

- (A) Promotorda -25'de TATA kutusu bulunmaktadır
- (B) Yazılım etmeni TFIID TATA kutusunu tanır ve ona bağlanır
- (C) TFIIDnin bağlanması ile DNA'nın yapısı bozulur
- (D) RNA polimeraz ve diğer yazılım etmenleri de promotor üzerinde yapılırlar
- (E) Yazılımın başlamasını sağlamak üzere TFIIF ATP kullanarak DNA çift sarmalını açar, RNA Pol II'yi de fosforilleyerek şeklini değiştirir. Böylece polimeraz yazılım etmenlerinden ayrılarak uzama aşamasını başlatır. Fosforillenme yeri polimeraz molekülünden dışarı uzayan polipeptidin C ucudur (CTD).

Genel yazılım etmenlerinin hücrede promotor üzerinde yapılanma sırası tam olarak bilinmemektedir

RNA polimeraz II etkinleştirici, aracı ve kromatin değiştirici proteinlere de ihtiyaç duyar

DNA üstbükülümlemesine neden olan DNA'daki üst sarmal gerilimi

Pozitif üstsarmal gerilim DNA'nın açılmasını zorlaştırırken, nükleozom yapısındaki DNA'nın çözünmesini kolaylaştırır, histon nüvesinden DNA'nın ayrılması artı yönde üstsarmal geriliminin azalmasına yardımcı olur. Ökaryotik DNA topoizomeraz, prokaryotik DNA gyrase

Ökaryot ve prokaryotlarda genden proteine geçiş aşamaları arasında farklılıklar vardır

5'-metil kep yapısı ökaryotik mRNAların 5' ucunu simgeler. RNA pol I ve III'ün CTD kuyrukları olmadığından bunlar aracılığıyla yapılan yazılım sonucu kepsiz mRNA oluşturulur. Çekirdekte kep CBC (Cap binding complex) içindedir ve mRNA'nın doğru işlenmesi ve çekirdekten taşınmasını sağlar

RNA kırılması intron dizilerini yeni yazılmış olan öncül mRNA'lardan uzaklaştırır

Transesterleşme reaksiyonu sonunda fosfat bağı sayısı aynı kalır, nükleozid trifosfat hidrolizi olmaz, ATP hidrolize edilir.

Kırılma düzeneği 5 RNA molekülü ve 50'nin üzerinde proteinden oluşur

Kırılmanın nerede olacağını uzlaşısı (consensus) dizileri belirler

Öncül mRNA kırılması süresince splisozomda pek çok yeniden düzenlenme olur

RNA kırılmasını splisozomlar yapar

U1 snRNP 5'kırılma bölgesi ile baz eşleşmesi yapar ve BBP (branch point binding protein) ve U2AF yardımcı protein dallanma noktasını tanır

U2 snRNP BBP ve U2AFyi uzaklaştırır ve dallanma noktası uzlaşma dizisi ile eşleşir

U4/U6-U5 üçlü snRNP reaksiyona girer , U4 ve U6 baz çifti etkileşimi ile bir arada tutulur, U5 daha gevşek bağlanır. Takip eden düzenlenmeler splizosom için aktif bölge oluşturur ve ilk fosforiltransferaz reaksiyonu için öncül substrat hazır olur

U4/U6 baz eşleşmesini ayıracak RNA-RNA düzenlenmeleri sonucu U6 snRNP kırılma kavşağında olan U1'i yerinden çıkarır. Böylece ikinci fosforil transferaz reaksiyonu için aktif bölge oluşmuş olur

Öncül mRNAdaki sıralama etkileri doğru kırpılma yerlerinin nasıl seçildiğini açıklar:

- 1) İlk başta daha ileri bölgeler sentezlenmediği için 5'kırpılma yerlerindeki snRNPLerin tek bir 3' kırpılma yeri vardır
- 2) Ekson tanımlama hipotezine göre ekzon boyutları intron boylarından daha az değişkendir. Yazılım devam ederken serin ve arjinince zengin bölgelere SR proteinleri bağlanarak RNA'nın 5' ucundan başlayarak tüm kırpılma yerlerini işaretlediği düşünülmektedir

RNA kırpılması şaşırtıcı şekilde esnektir:

Tek bir mutasyon yeni bir kırpılma modeli yaratabilir

Splisozomların katalizlediği kırpılma muhtemelen kendi kendine kırpılma mekanizmasından gelişmiştir:

Kendini kırpın intron dizilerinin bilinen iki sınıfı görülmektedir. Tetrahymena, T4 faji gibi nadir örneklerde rastlanır. Ökaryot hücrelerdeki kırpılma reaksiyonu çoğunlukla splisozomlarca gerçekleştirilir

Ökaryot mRNAlarının 3' ucunu RNA işleme enzimleri oluşturur. Yarılma ve poliadenillenme için uzlaşma dizileri mevcuttur, buralara spesifik enzimler bağlanır

Ökaryot mRNAlarının 3' ucunu RNA işleme enzimleri oluşturur:

CstF (yarılma uyarıcı etmen)

CPSF (yarılma ve poliadenillenme özgünlüğü etmeni)

Ökaryotlarda bu işlem bakterinin aksine oldukça karışıktır

Olgun ökaryot mRNAlar çekirdekten seçici bir şekilde dışarıya atılır

Çekirdekte protein kodlamayan birçok RNA da sentezlenir ve işlenir

Hücrelerde en fazla RNA (hızlı bölünen hücrelerde RNAnın yaklaşık %80'i) ribozomal RNA'dır. rRNA geni E.coli hücrelerinde 7 kopya, insanda 5 farklı kromozom üzerinde 200 kopya, Xenopusta tek kromozom üzerinde 600 kopya halindedir.

Ökaryotik 45S öncül rRNA molekülü nükleolitik işleme ve kimyasal değişimle 3 ayrı rRNA'ya dönüşür:

S değeri ultrasantrifüjde çökme hızıdır

Öncül rRNA rehber RNA (küçük nükleolar RNA, snoRNA) aracılığı ile modifiye edilir:

13000 nt uzunluğundaki rRNA öncülünde nt şekerlerindeki 100 kadar 2'-OH grubu metillenir ve 100 üridin nt pseudoüridine izomerleşir. Bu değişimler snoRNAlar ile baz eşleşmesi olan kısımlarda gerçekleşir. snoRNAlar ribozomal proteinleri kodlayan genlerin intronlarında kodlanır ve RNA pol II tarafından sentezlenir

Çekirdekçik ribozom üreten bir fabrikadır:

Hücredeki diğer organellerin aksine çekirdekçik zar ile çevrili değildir, rRNA genlerini, öncül rRNAları, olgun rRNAları, rRNA işleyen enzimleri, snoRNPleri, ribozomal protein altbirimlerini ve kısmen yapılanmış ribozomlar gibi makromolekülleri içeren büyük topaklar halinde bulunur. Böylece ribozomlar hızlı ve sorunsuz şekilde çoğalır. Çekirdekçiğin boyutu hücrenin ürettiği ribozomların sayısını yansıtır. Hızlı bölünen hücrelerde çekirdek hacminin %25i kadar olabilir.

Hücre döngüsü boyunca insan hücreesindeki çekirdekçiğinde değişiklikler meydana gelir

Çekirdekçik kaynaşması

Mitozdan sonra rRNA gen kümelerini taşıyan 10 insan kromozomunun her biri minik bir çekirdekçik oluşturmaya başlar, fakat bunlar gelişirken interfaz hücrelerine özgü olan bir tek büyük çekirdekçik oluşturacak şekilde hızla birleşir

Ribozom ve telomeraz gibi ribonükleoproteinlerin sentezinde çekirdekçik işlev görür

Çekirdek değişik altyapılar içerir:

Cajal ve GEMS cisimcikleri, kromatin arası tanecik kümeleri muhtemelen gen ifadesinde yer alan makromoleküllerin sentezlenmesi, yapılanması ve depolanması görev alan protein ve RNA bileşenlerinin sıkı şekilde bir araya gelmesi ile ortaya çıkmıştır. Cajal ve GEMS cisimcikleri snRNA ve snoRNAların son değişimlerini geçirdikleri yerlerdir. Kromatin arası tanecik kümeleri ise öncül mRNAların kırılmasında görev alan kullanıma hazır tam olgun snRNP depoları olduğu öne sürülmüştür

Çekirdekaltı yapılar:

Tipik bir omurgalı çekirdeğinde snRNPLerin ve snoRNPLerin son değişimlerini geçirdikleri yer olduğu tahmin edilen pek çok Cajal cisimciği bulunur. Kromatinlerarası tanecik kümelerinin tam olgunlaşmış snRNPLerin depolandığı yer olduğu varsayılmaktadır. Tipik bir omurgalı çekirdeğinde 20-50 adet kromatinler arası tanecik kümesi bulunur.

Etkin yazılım ve kırılma yerleri (her omurgalı çekirdeğinde yaklaşık 2000-3000 yer bulunur)

“Perikromatin fibrilleri” üzerindedir