

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 25 : Το καταλυτικό RNA



Genes VIII - Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2004

## Με το μάτισμα απομακρύνονται ιντρόνια

Εξόνιο 1    Ιντρόνιο    Εξόνιο 2

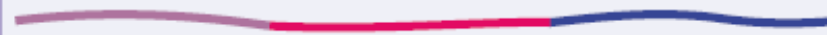


Μεταγραφή



Ηλεκτροφόρηση

35S RNA



Μάτισμα



Κυκλοποίηση



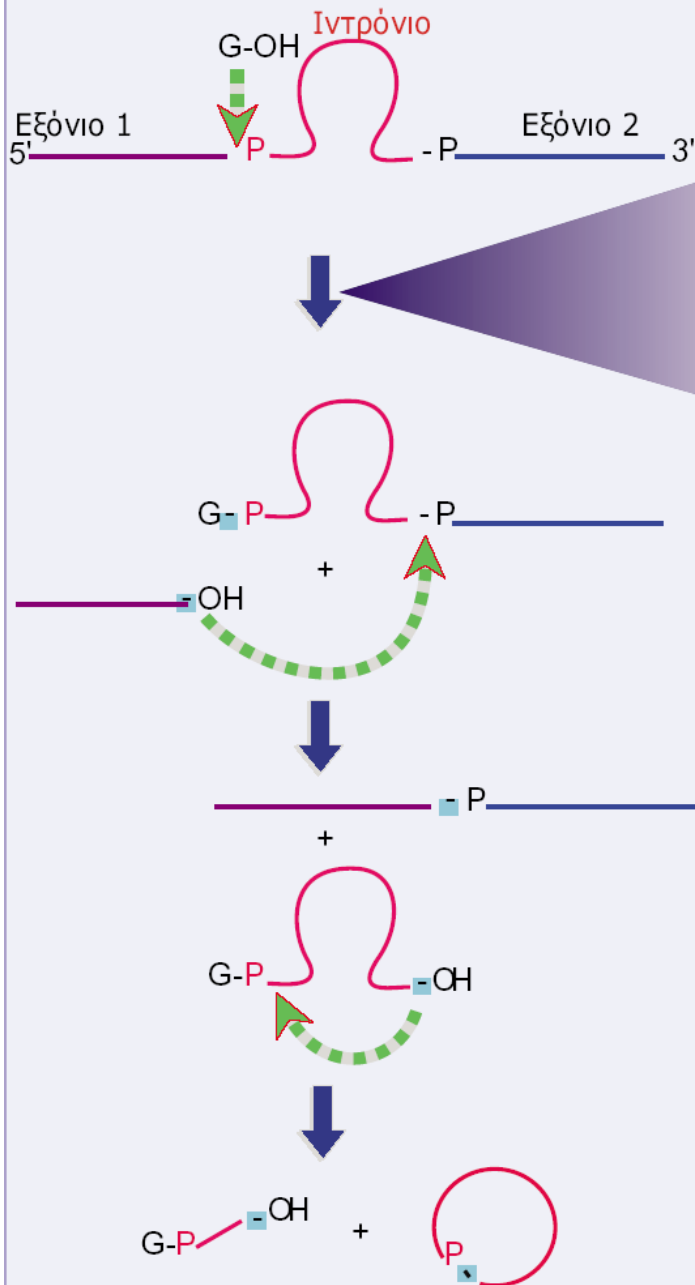
Κυκλικό ιντρόνιο

Γραμμικό ιντρόνιο

©virtualtext www.ergito.com

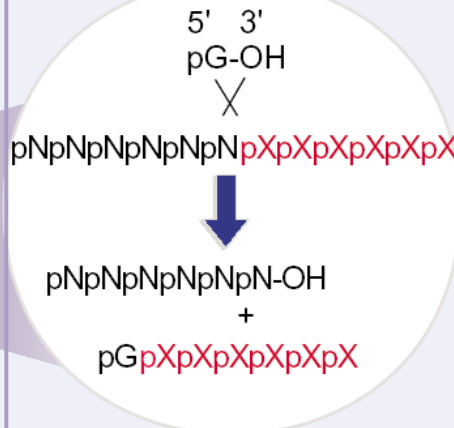
**Εικόνα 25.1** Το αυτο-μάτισμα του πρώιμου rRNA 35S της *Tetrahymena thermophila* μπορεί να μελετηθεί με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα. Το αποδεσμευμένο ιντρόνιο σχηματίζει δύο ζώνες, οι οποίες αντιστοιχούν στην κυκλική και στη γραμμική μορφή του.

**Το αυτο-μάτισμα λαμβάνει χώρα μέσω διαδοχικών αντιδράσεων μετεστεροποίησης**



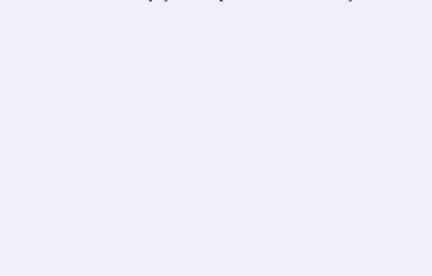
**Πρώτη μεταφορά**

Το 3'-OH του νουκλεοτιδίου G προσβάλλει την 5' θέση συνένωσης ιντρονίου-εξονίου



**Δεύτερη μεταφορά**

Το 3'-OH του εξονίου 1 προσβάλλει την 3' θέση συνένωσης ιντρονίου-εξονίου



**Τρίτη μεταφορά**

Το 3'-OH του ιντρονίου προσβάλλει έναν εσωτερικό δεσμό 15 βάσεις από το 5' άκρο του



**Εικόνα 25.2** Το αυτο-μάτισμα επιτυγχάνεται μέσω αντιδράσεων μετεστεροποίησης, κατά τις οποίες χημικοί δεσμοί ανταλλάσσονται άμεσα. Οι δεσμοί που δημιουργούνται υποδεικνύονται με γαλάζια πλαίσια.

**Το αποδεδεμεμένο ιντρόνιο έχει καταλυτικές ιδιότητες**

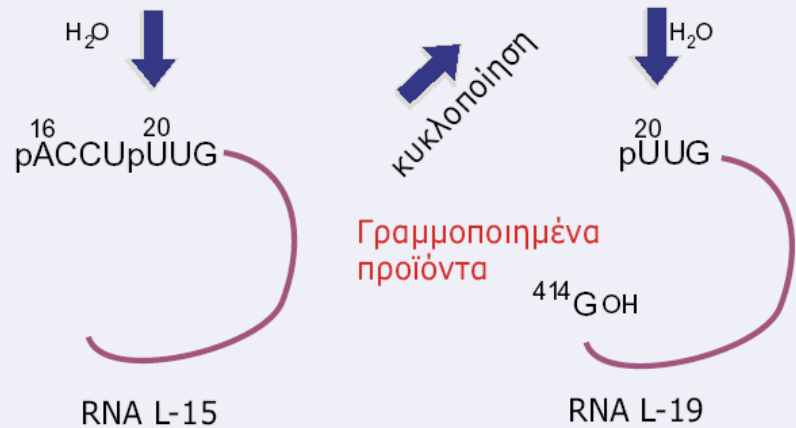
Το 3'-OH του G<sup>414</sup> προσβάλλει τον pA<sup>16</sup> ή τον pU<sup>20</sup>



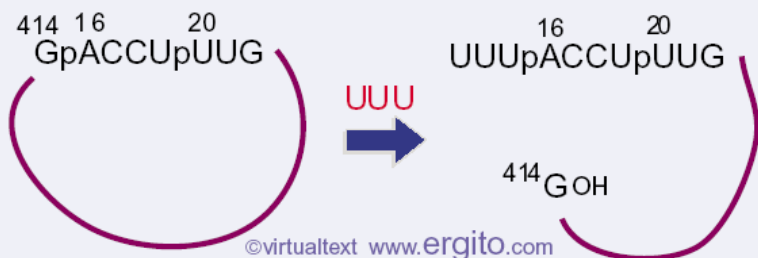
Κυκλοποίηση



Αντίστροφη κυκλοποίηση: γραμμοποίηση

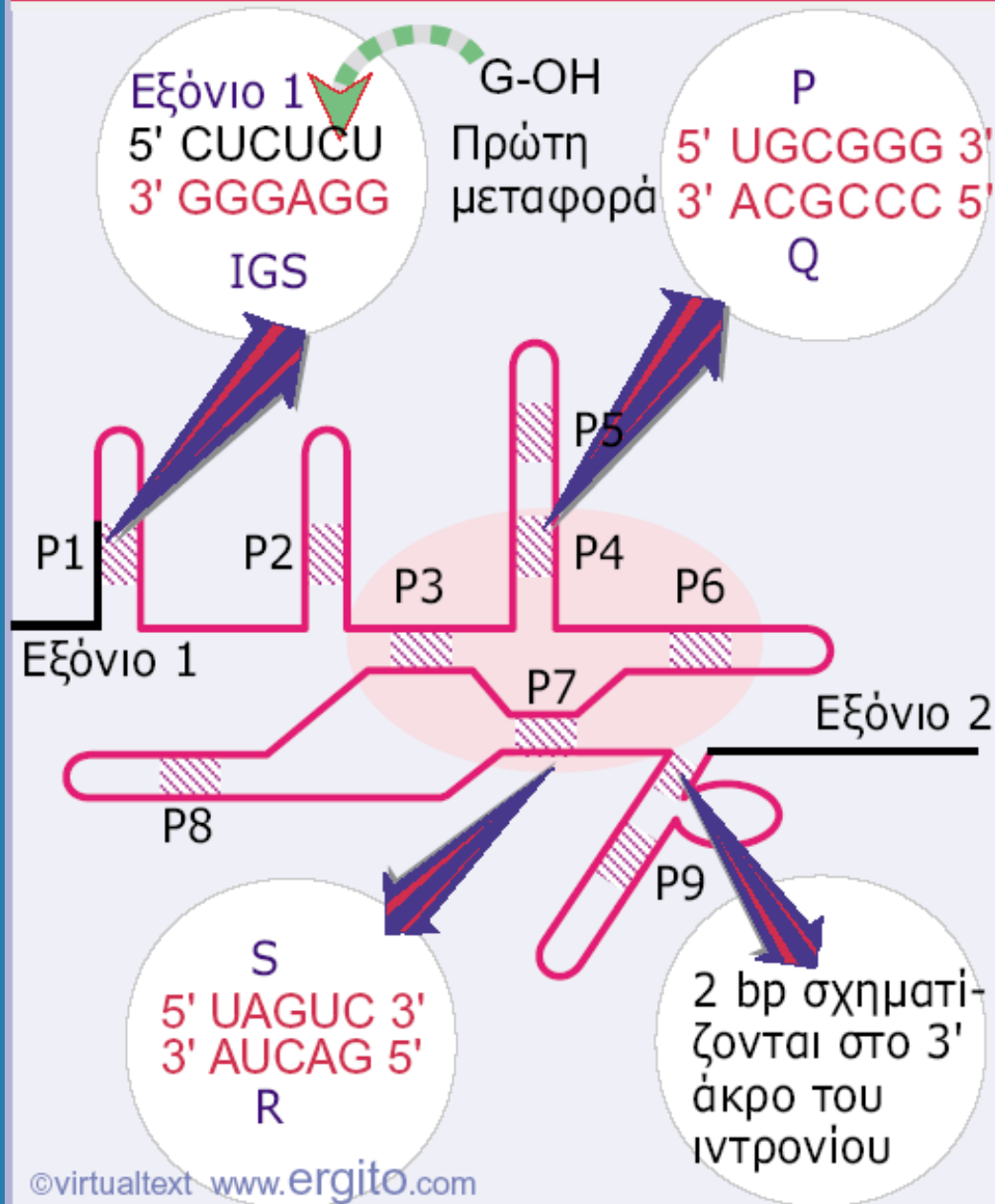


Διαμοριακή αντίδραση



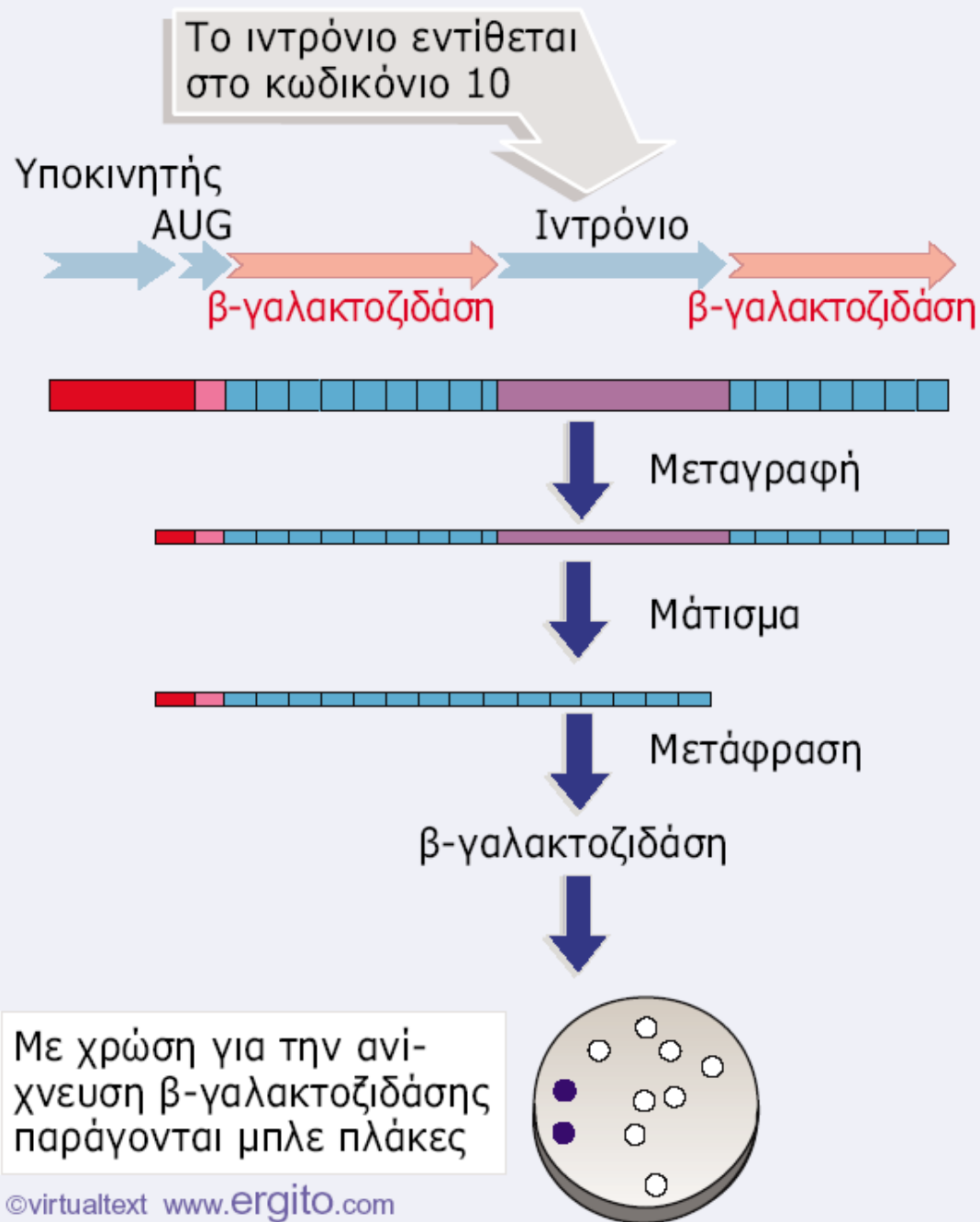
**Εικόνα 25.3** Το αποδεδεμεμένο ιντρόνιο κυκλοποιείται όταν το ακραίο 3' νουκλεοτίδιο G προσβάλλει ένα φωσφοδιεστερικό δεσμό σε μία από τις δύο εσωτερικές θέσεις-στόχους (A<sup>16</sup> και U<sup>20</sup>) που βρίσκονται κοντά στο 5' άκρο του. Τα κυκλικά μόρια που σχηματίζονται μπορούν να αντιδράσουν με νερό ή με ολιγονουκλεοτίδια και να γραμμοποιηθούν ξανά.

## Η δομή των ιντρονίων της ομάδας I είναι συντηρημένη



**Εικόνα 25.4** Η δευτεροταγής δομή των ιντρονίων της ομάδας I είναι συντηρημένη και χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη 9 δίκλωνων περιοχών. Οι αλληλουχίες των περιοχών P4 και P7 είναι συντηρημένες και περιλαμβάνουν τις πρότυπες αλληλουχίες P, Q, R και S. Η περιοχή P1 δημιουργείται με το ζευγάρισμα μεταξύ του 3' άκρου του αριστερού εξονίου και της αλληλουχίας IGS του ιντρονίου. Μια περιοχή που βρίσκεται μεταξύ των P7 και P9 ζευγαρώνει με το 3' άκρο του ιντρονίου.

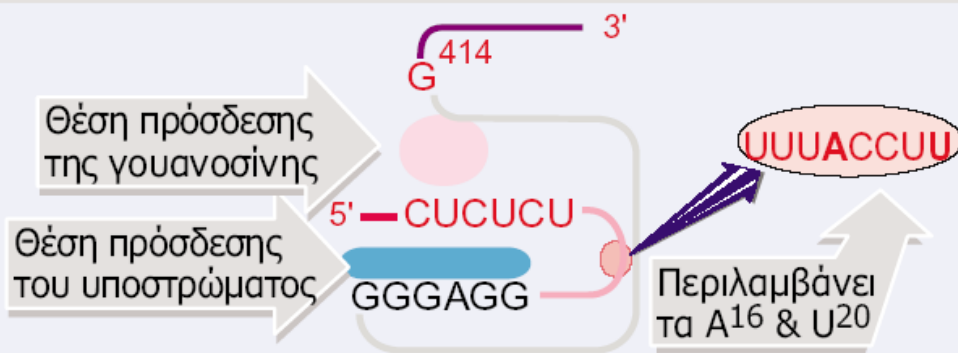
## Το ιντρόνιο του rRNA της *Tetrahymena* μπορεί να ματιστεί στην *E. coli*



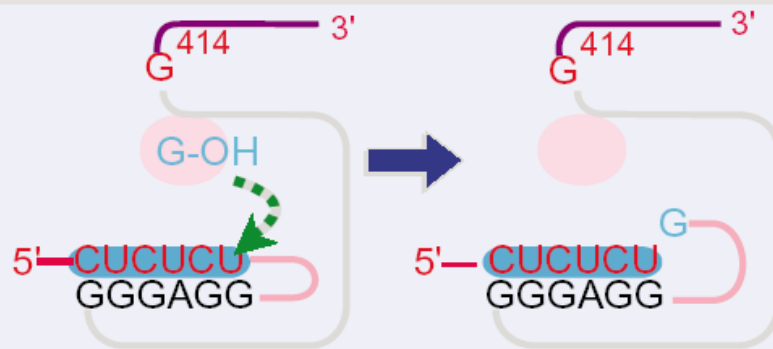
**Εικόνα 25.5** Μια κατασκευή στην οποία το ιντρόνιο του rRNA της *Tetrahymena* έχει ενσωματωθεί στην κωδική αλληλουχία του γονιδίου της β-γαλακτοζιδάσης (β-gal) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη του αυτο-ματίσματος στην *E. coli*. Σε ένα τέτοιο σύστημα, η σύνθεση της β-gal ελέγχεται με τη χρήση μιας ουσίας η οποία διασπάται από τη β-gal σε δύο προϊόντα, ένα από τα οποία έχει χαρακτηριστικό μπλε χρώμα. Εφόσον το ιντρόνιο έχει ενσωματωθεί στην κωδική αλληλουχία, η σύνθεση της β-gal μπορεί να επιτευχθεί μόνο αν απομακρυνθεί επιτυχώς το ιντρόνιο. Στην Εικόνα, η κατασκευή έχει γίνει σε φορέα βακτηριοφάγο και η παρουσία μπλε πλάκων (που περιέχουν τα λυμένα βακτήρια) υποδεικνύει επιτυχές αυτο-μάτισμα.

## Για την κατάλυση μέσω RNA χρησιμοποιούνται δύο θέσεις

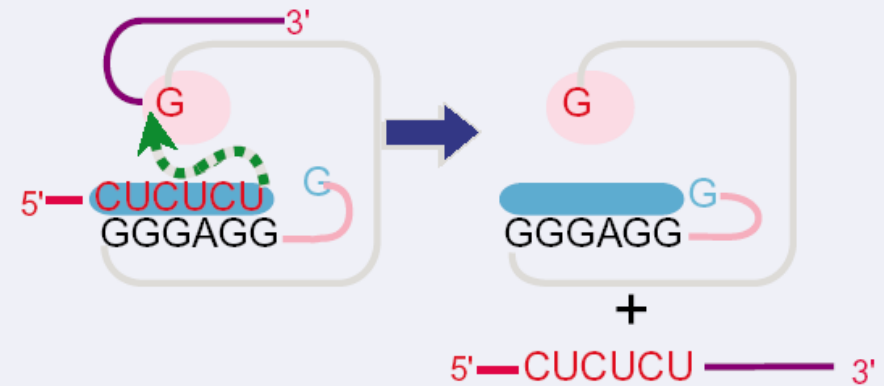
Το καταλυτικό RNA φέρει μία θέση πρόσδεσης γουανοσίνης και μία θέση πρόσδεσης του υποστρώματος



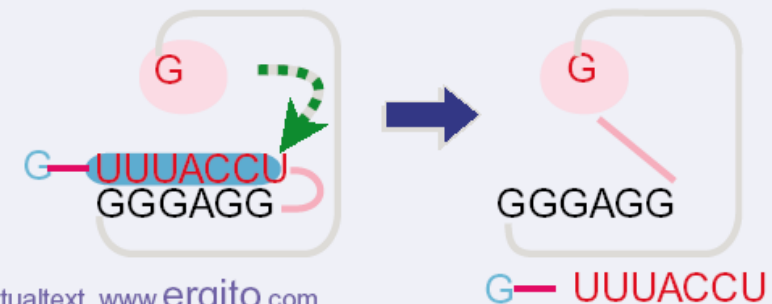
**Πρώτη μεταφορά** Το G-OH καταλαμβάνει τη θέση πρόσδεσης της γουανοσίνης, ενώ το αριστερό εξόνιο καταλαμβάνει τη θέση πρόσδεσης του υποστρώματος



**Δεύτερη μεταφορά** Η G<sup>414</sup> βρίσκεται στη θέση πρόσδεσης της γουανοσίνης, ενώ το αριστερό εξόνιο βρίσκεται στη θέση πρόσδεσης του υποστρώματος



**Τρίτη μεταφορά** Η G<sup>414</sup> βρίσκεται στη θέση πρόσδεσης της γουανοσίνης, ενώ το αριστερό άκρο του ιντρονίου βρίσκεται στη θέση πρόσδεσης του υποστρώματος

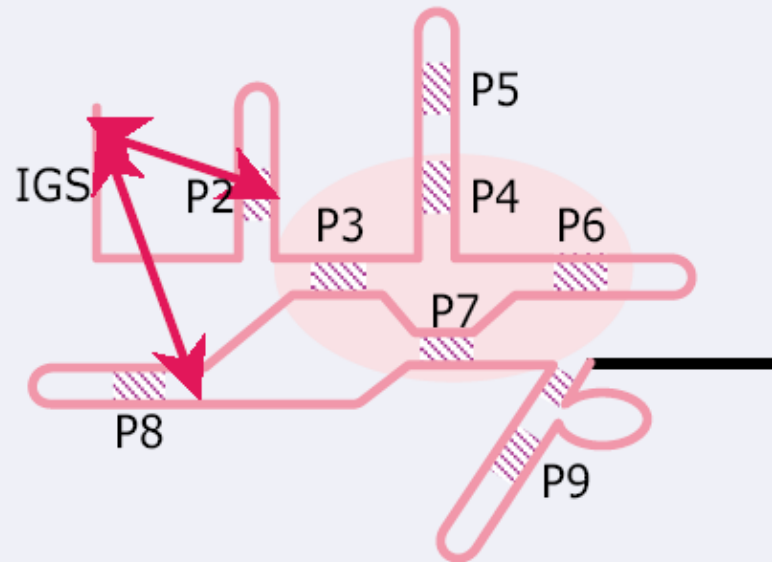


©virtualtext www.ergito.com

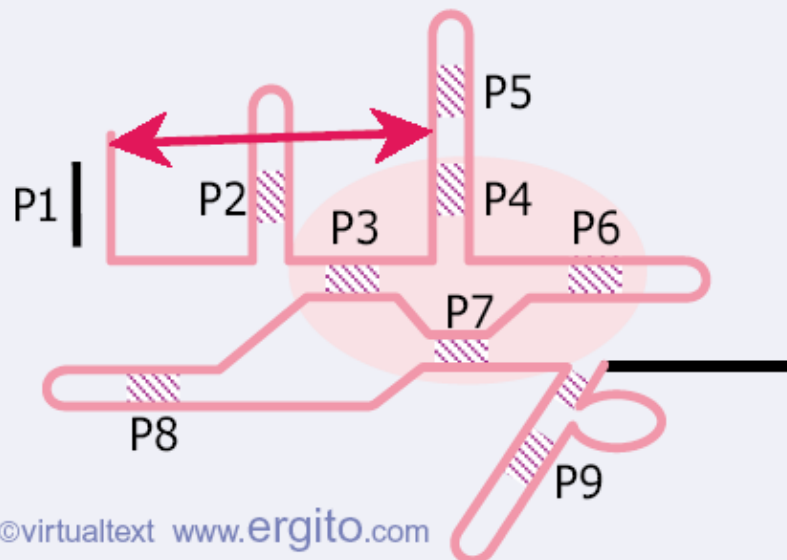
**Εικόνα 25.6** Η απομάκρυνση των ιντρονίων της ομάδας I από το rRNA της *Tetrahymena* συμβαίνει μέσω διαδοχικών αντιδράσεων μεταξύ του συμπαραγόνα που καταλαμβάνει τη θέση πρόσδεσης της γουανοσίνης και της αλληλουχίας που δεσμεύεται στη θέση πρόσδεσης του υποστρώματος. Το αριστερό εξόνιο υποδεικνύεται με κόκκινο ενώ το δεξί με μοβ χρώμα.

## Με την πρόσδεση του υποστρώματος αλλάζει η δομή του ιντρονίου

Επαφές πριν την πρόσδεση του υποστρώματος



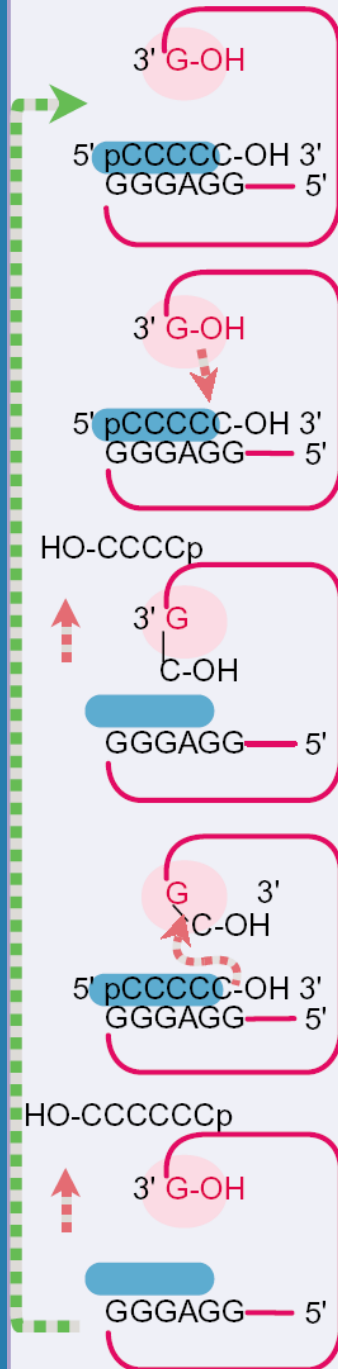
Επαφές μετά την πρόσδεση του υποστρώματος



**Εικόνα 25.7** Η θέση της αλληλουχίας IGS στην τριτοταγή δομή αλλάζει όταν, λόγω της πρόσδεσης του υποστρώματος, σχηματίζεται η δίκλωνη περιοχή P1.



**Το RNA L-19 μπορεί να καταλύσει την επιμήκυνση ολιγονουκλεοτιδίων**



Ένα ολιγονουκλεοτιδίο C<sub>5</sub> ζευγαρώνει με τη θέση IGS κοντά στο 5' άκρο του RNA L-19

Το 3' -OH της G<sup>414</sup> προσβάλλει ένα δεσμό CrC

Ένα C μεταφέρεται στο G<sup>414</sup>, ενώ ελευθερώνεται ένα ολιγονουκλεοτιδίο C<sub>4</sub>

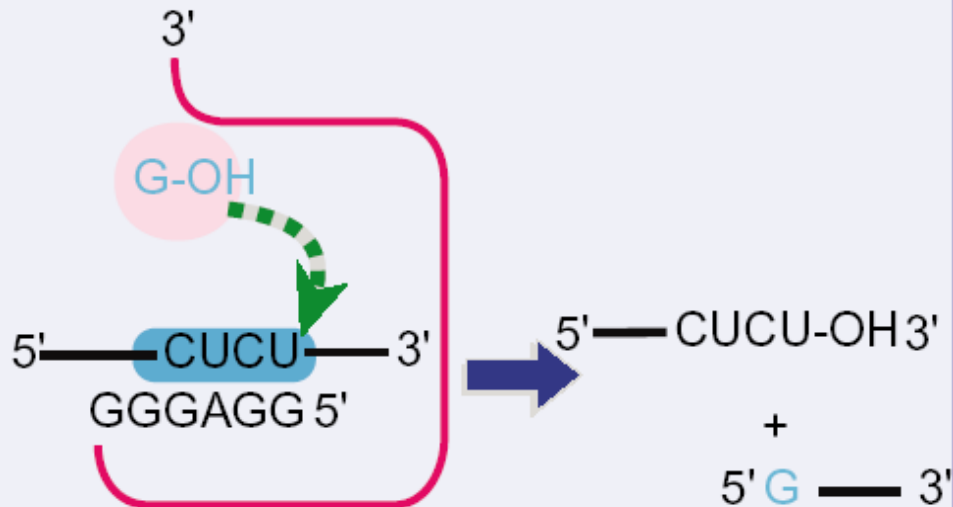
Ένα νέο ολιγονουκλεοτιδίο C<sub>5</sub> προσδένεται και η αντίδραση της μεταφοράς αντιστρέφεται

Το RNA L-19 αναγεννάται με παράλληλη ελευθέρωση ενός ολιγονουκλεοτιδίου C<sub>6</sub>

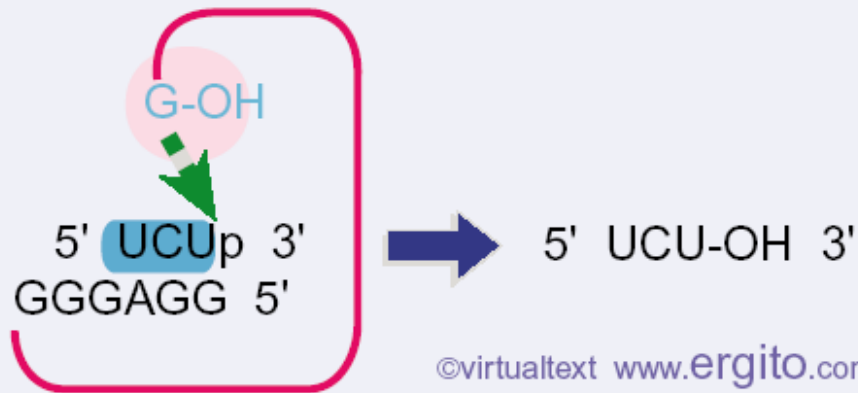
**Εικόνα 25.8** Το γραμμικό RNA L-19 καταλύει την επιμήκυνση ενός ολιγονουκλεοτιδίου. Ένα ολιγονουκλεοτιδίο C<sub>5</sub> συνδέεται στη θέση πρόσδεσης του υποστρώματος, ενώ το κατάλοιπο G<sup>414</sup> του ιντρονίου καταλαμβάνει τη θέση πρόσδεσης της γουανοσίνης και καταλύει τις αντιδράσεις μεταφοράς που μετατρέπουν δύο ολιγονουκλεοτιδία C<sub>5</sub> σε ένα ολιγονουκλεοτιδίο C<sub>4</sub> και ένα ολιγονουκλεοτιδίο C<sub>6</sub>.

## Τα ριβοένζυμα καταλύουν αντιδράσεις μετεστεροποίησης

Ενδοριβονουκλεάση που αναγνωρίζει συγκεκριμένη αλληλουχία



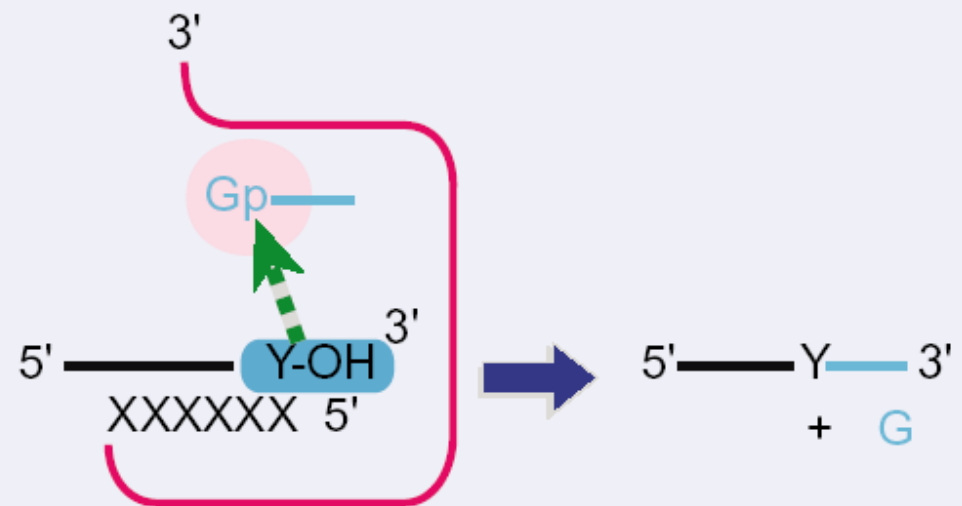
Φωσφατάση



©virtualtext www.ergito.com

**Εικόνα 25.9** Οι αντιδράσεις που καταλύονται από τα ριβοένζυμα περιλαμβάνουν μετεστεροποιήσεις οι οποίες λαμβάνουν χώρα μεταξύ μιας ομάδας που δεσμεύεται στη θέση πρόσδεσης του υποστρώματος και μιας ομάδας που δεσμεύεται στη θέση πρόσδεσης γουανωσίνης.

RNA λιγάση



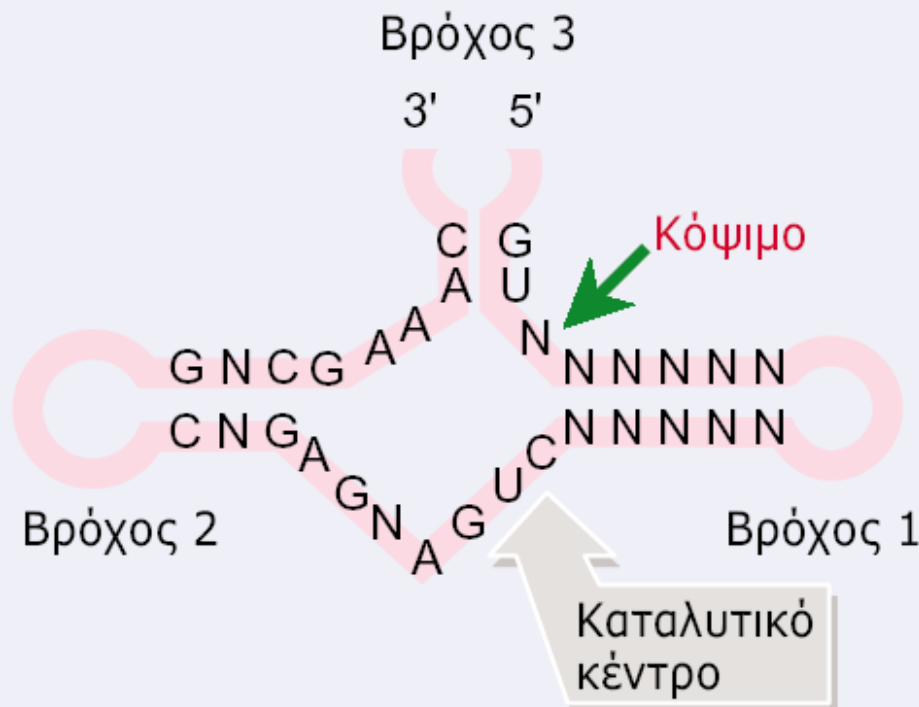
Οι αντιδράσεις που καταλύονται από RNA είναι ενζυματικές			
Ένζυμο	Υπόστρωμα	$K_M$ (mM)	Ανακύκλωση (/min)
Ιοειδικό RNA (19 βάσεις)	RNA 24 βάσεων	0,0006	0,5
Ιντρόνιο L-19	CCCCCC	0,04	1,7
RNA της RNAάσης P	προ-tRNA	0,00003	0,4
Πλήρης RNAάσης P	προ-tRNA	0,00003	29
RNAάση T1	GpA	0,05	5.700
β-γαλακτοζιδάση	λακτόζη	4,0	12.500

©virtualtext [www.ergito.com](http://www.ergito.com)

**Εικόνα 25.10** Οι αντιδράσεις που καταλύονται από RNA έχουν κοινά γνωρίσματα με τις αντιδράσεις που καταλύονται από πρωτεϊνικά ένζυμα, αν και ο ρυθμός κατάλυσης είναι χαμηλότερος στην περίπτωση των ριβοενζύμων. Η  $K_M$  ορίζεται ως η συγκέντρωση του υποστρώματος στην οποία η ταχύτητα της αντίδρασης φτάνει το ήμισυ της μέγιστης τιμής της και είναι αντιστρόφως ανάλογη με τη συγγένεια του ενζύμου για το υπόστρωμά του. Ο ρυθμός ανακύκλωσης περιγράφει τον αριθμό των μορίων του υποστρώματος που μετατρέπονται σε προϊόντα στη μονάδα χρόνου από μία μόνο θέση κατάλυσης.

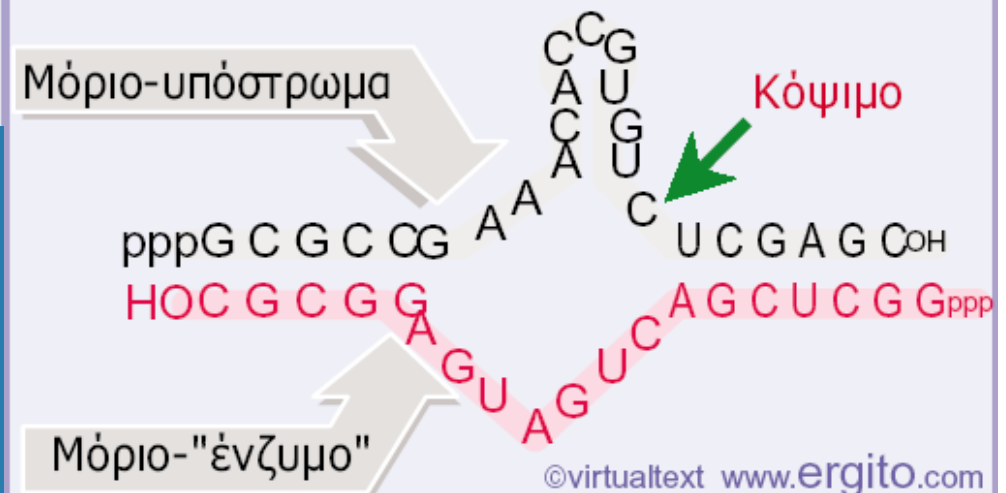
## Τα ιοειδή και τα ιοειδικά RNA φέρουν μια καταλυτική περιοχή με σφυροειδές σχήμα

Η σφυροειδής δομή σχηματίζεται από τρεις δομές στελέχους-βρόχου και από 13 συντηρημένα νουκλεοτίδια

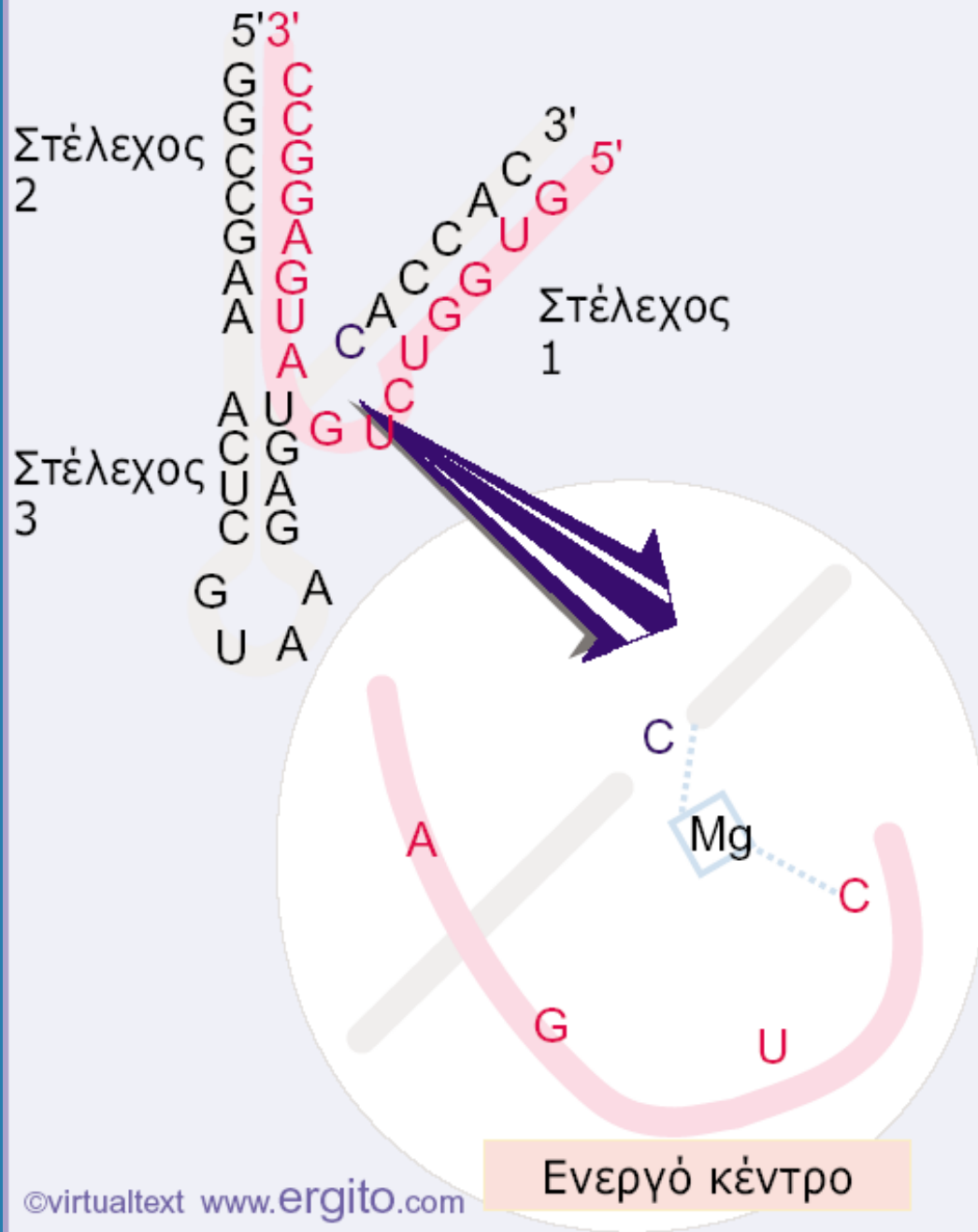


**Εικόνα 25.13** Τα ιοειδή και τα ιοειδικά RNA περιέχουν μια πρότυπη αλληλουχία και σχηματίζουν, μέσω ενδομοριακού ζευγαρώματος, χαρακτηριστικές σφυροειδείς δομές. Ανάλογες σφυροειδείς δομές μπορούν επίσης να δημιουργηθούν με ζευγάρωμα μεταξύ δύο ανεξάρτητων μορίων RNA.

Μια σφυροειδής δομή μπορεί να σχηματιστεί και με αλληλεπίδραση μεταξύ δύο συμπληρωματικών μορίων RNA



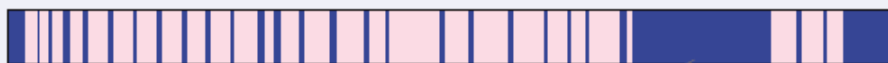
## Το $Mg^{++}$ ξεκινά την κατάλυση



**Εικόνα 25.14** Τα ριβοένζυμα που φέρουν μια σφυροειδή δομή έχουν στο χώρο σχήμα V. Το στέλεχος II βρίσκεται πάνω από το στέλεχος III και το ενεργό κέντρο εντοπίζεται ανάμεσα στα στελέχη II-III και στο στέλεχος I. Στη δομή συμμετέχει και ένα ιόν μαγνησίου, το οποίο πυροδοτεί την αντίδραση της υδρόλυσης.

## Κατά τη στοιχειοθεσία του mRNA, ένα CAA μετατρέπεται σε UAA

Το γονίδιο της απολιποπρωτεΐνης Β έχει 29 εξόνια



CAA Το κωδικόνιο 2.153 κωδικοποιεί για γλουταμίνη



CAA

Στοιχειοθεσία

UAA



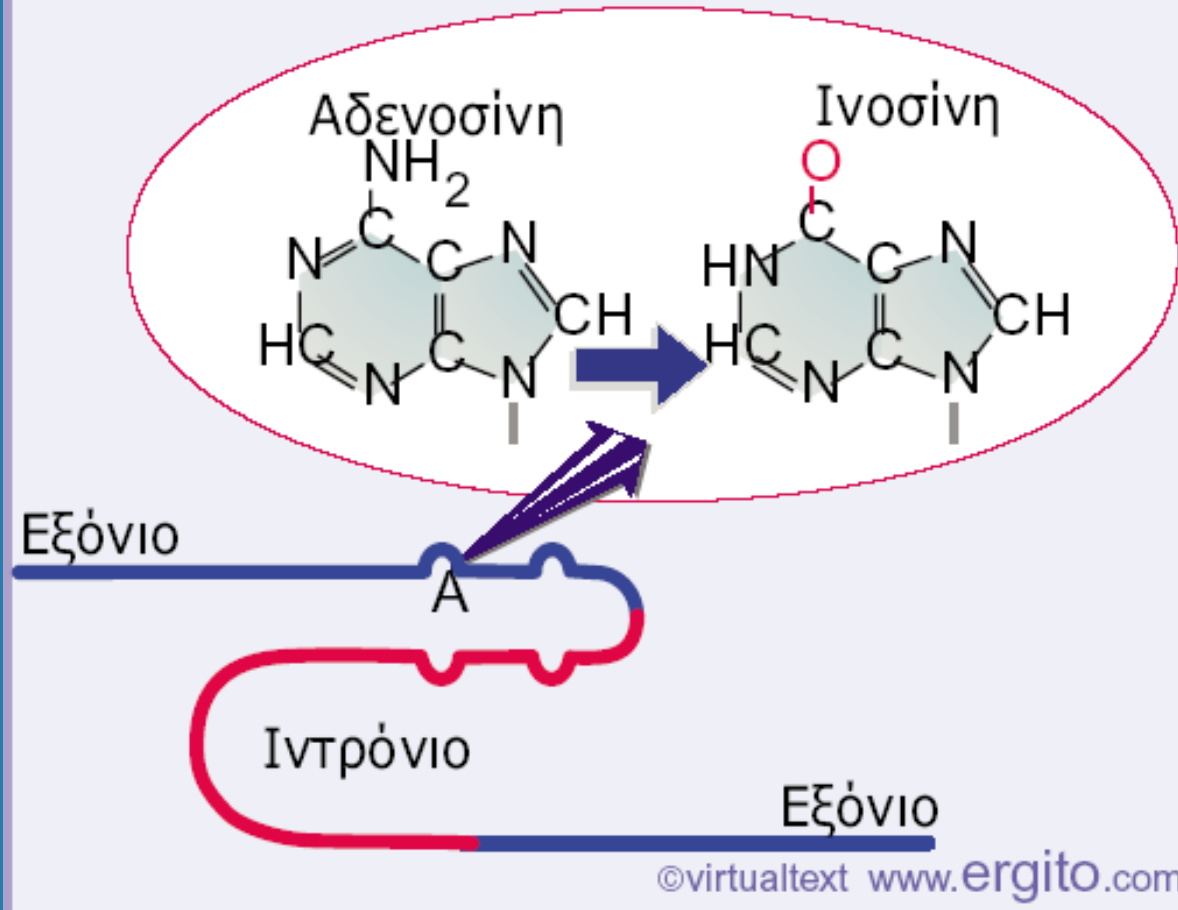
Το mRNA στο ήπαρ κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 4.563 αμινοξέων



Το mRNA στο έντερο φέρει ένα κωδικόνιο λήξης UAA στο κωδικόνιο 2.153

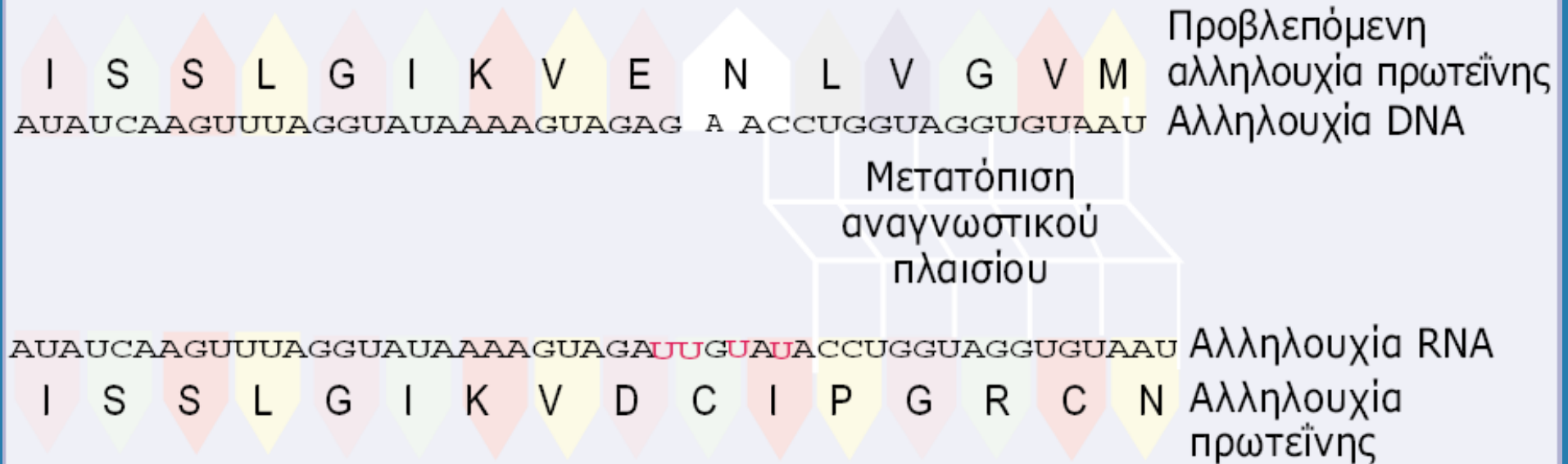
**Εικόνα 25.15** Η αλληλουχία του γονιδίου *apo-B* είναι ίδια στο έντερο και στο ήπαρ. Ωστόσο, η αλληλουχία του RNA που μεταγράφεται από το *apo-B* στο έντερο τροποποιείται με την αλλαγή μιας βάσης, η οποία δημιουργεί ένα κωδικόνιο τερματισμού.

## Στα θηλαστικά, η στοιχειοθεσία καταλύεται από απαμινάσες



**Εικόνα 25.16** Μια δίκλωνη δομή η οποία σχηματίζεται ανάμεσα στην περιοχή που θα στοιχειοθετηθεί και σε μια συμπληρωματική της αλληλουχία που απαντάται καθοδικά μέσα στο επόμενο ιντρόνιο είναι απαραίτητη για τη διεκπεραίωση της στοιχειοθεσίας του mRNA. Στην περίπτωση αυτή, η αναγνώριση από την απαμινάση επιτυγχάνεται χάρη στο λανθασμένο ζευγάρισμα μεταξύ ορισμένων βάσεων της δίκλωνης περιοχής.

## Οι προσθήκες U δημιουργούν στο mRNA μετατόπιση του αναγνωστικού πλαισίου

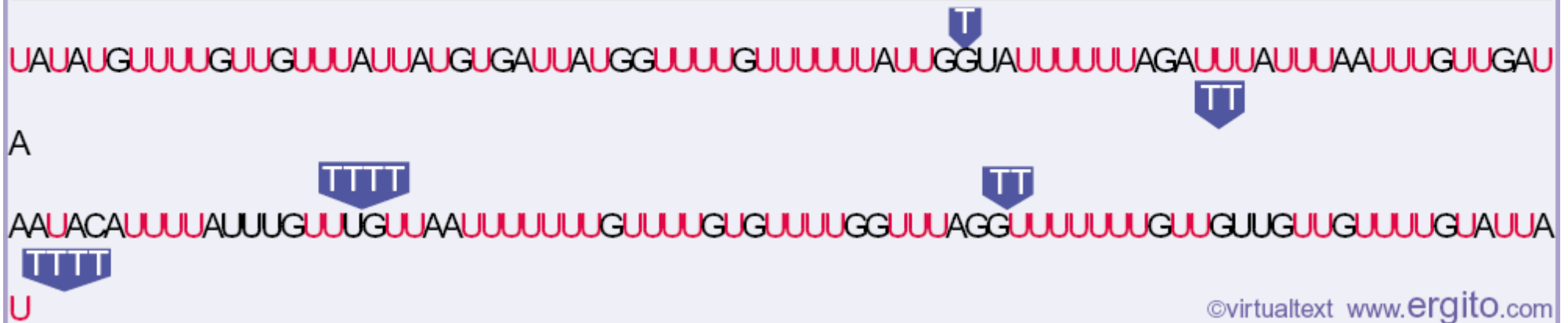


©virtualtext [www.ergito.com](http://www.ergito.com)

**Εικόνα 25.17** Στο *Trypanosoma*, το mRNA *coxII* παρουσιάζει μια μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης σε σχέση με αυτό του γονιδίου: το ορθό αναγνωστικό πλαίσιο δημιουργείται μετά από στοιχειοθεσία του RNA με την προσθήκη τεσσάρων καταλοίπων U.



**Το mRNA του *coxIII* υφίσταται εκτεταμένη στοιχειοθεσία, που συνίσταται τόσο στην προσθήκη όσο και στην απομάκρυνση καταλοίπων U**



©virtualtext www.ergito.com

**Εικόνα 25.18** Τμήμα του mRNA *coxIII*, του *T. brucei*, το οποίο εμφανίζει πολλές διαφορές με την αλληλουχία του γονιδίου από το οποίο μεταγράφεται. Τα κατάλοιπα U, που δεν κωδικοποιούνται στο DNA, αλλά προστίθενται με στοιχειοθεσία του RNA, επισημαίνονται με κόκκινο και τα κατάλοιπα που υπάρχουν στο DNA και αφαιρούνται με στοιχειοθεσία από το RNA υποδεικνύονται με T.

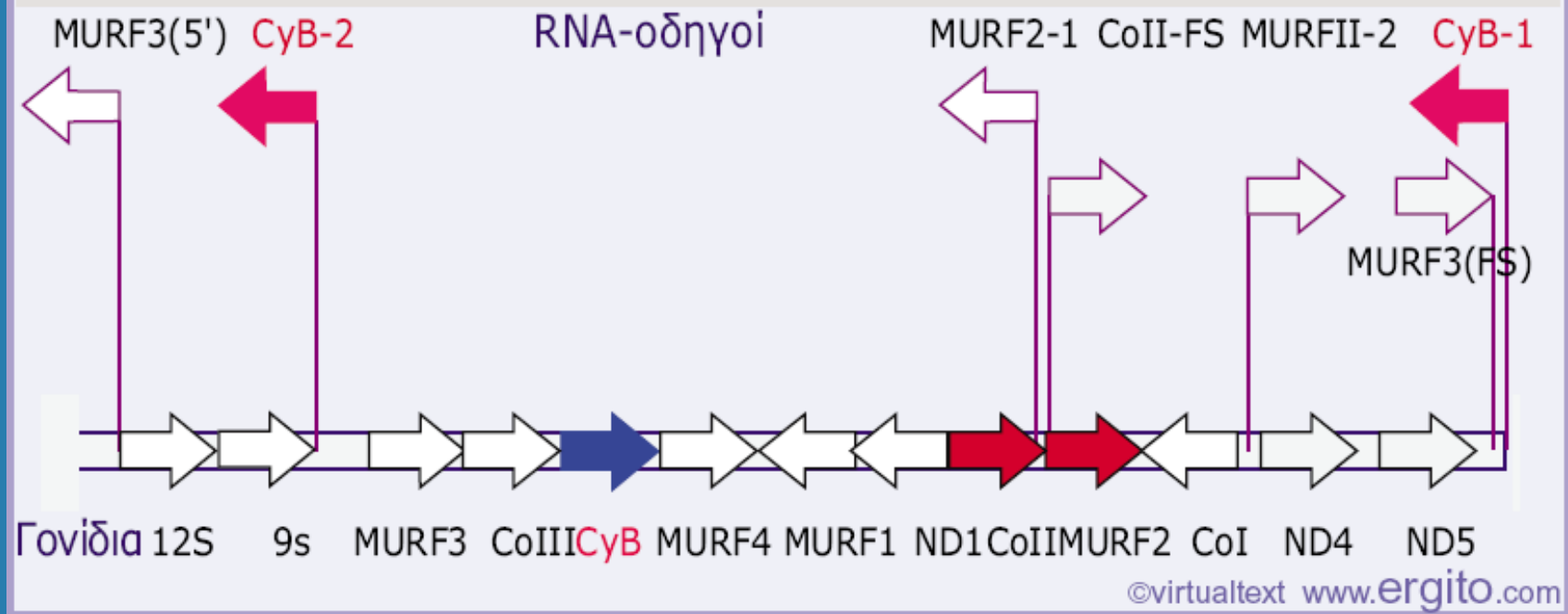
**Τα RNA-οδηγοί ζευγαρώνουν με το αρχικό RNA και παρέχουν τη μήτρα για τη στοιχειοθεσία**



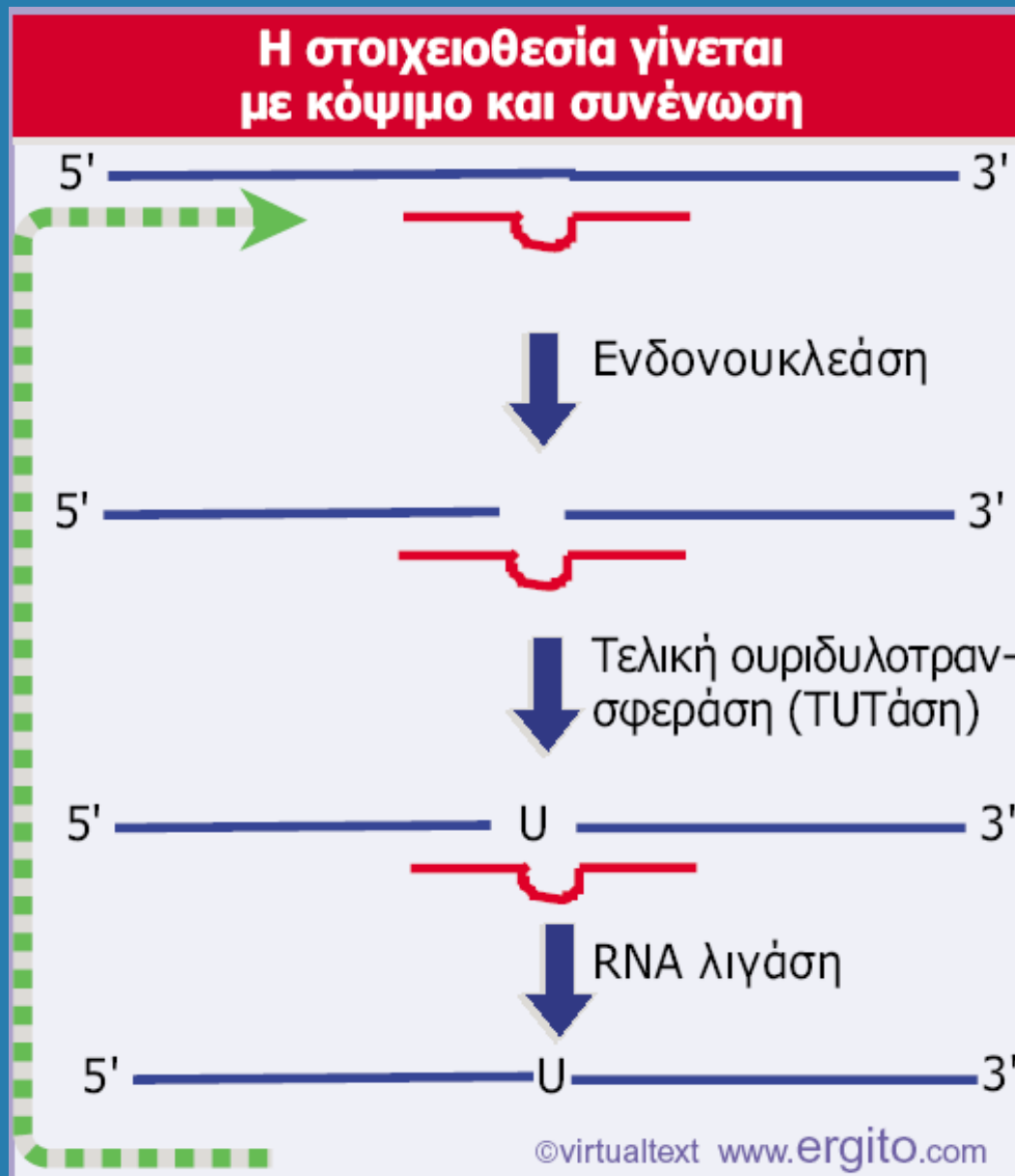
**Εικόνα 25.19**

Πριν από τη στοιχειοθεσία, το RNA ζευγαρώνει με ένα RNA-οδηγό που περιλαμβάνει τη θέση στην οποία θα γίνει η στοιχειοθεσία και αλληλουχίες εκατέρωθεν αυτής. Το RNA-οδηγός χρησιμοποιείται ως μήτρα για την ειδική προσθήκη καταλοίπων U. Το mRNA που παράγεται μετά τις προσθήκες είναι συμπληρωματικό με το RNA-οδηγό.

**Τα γονίδια των οποίων το RNA υφίσταται στοιχειοθεσία και αυτά των RNA-οδηγών τους, απαντώνται διασκορπισμένα στο μιτοχονδριακό DNA**



**Εικόνα 25.20** Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα της *Leishmania* περιέχει διασκορπισμένα τα γονίδια που κωδικοποιούν τα αρχικά RNA, καθώς και τις μονάδες οι οποίες κωδικοποιούν για τα RNA-οδηγούς που απαιτούνται για τη στοιχειοθεσία και τη δημιουργία της ορθής αλληλουχίας του mRNA. Μερικά γονίδια χρειάζονται για τη στοιχειοθεσία τους πολλά RNA-οδηγούς.



**Εικόνα 25.21** Η προσθήκη ή/και η απομάκρυνση καταλοίπων U συμβαίνουν με κοπή του RNA, που ακολουθείται από την προσθήκη ή την αφαίρεση U και την επανασύνδεση των άκρων. Οι αντιδράσεις καταλύονται από ένα ενζυμικό σύμπλοκο που καθοδηγείται από το RNA-οδηγό.