

CURS 3

Transcripția

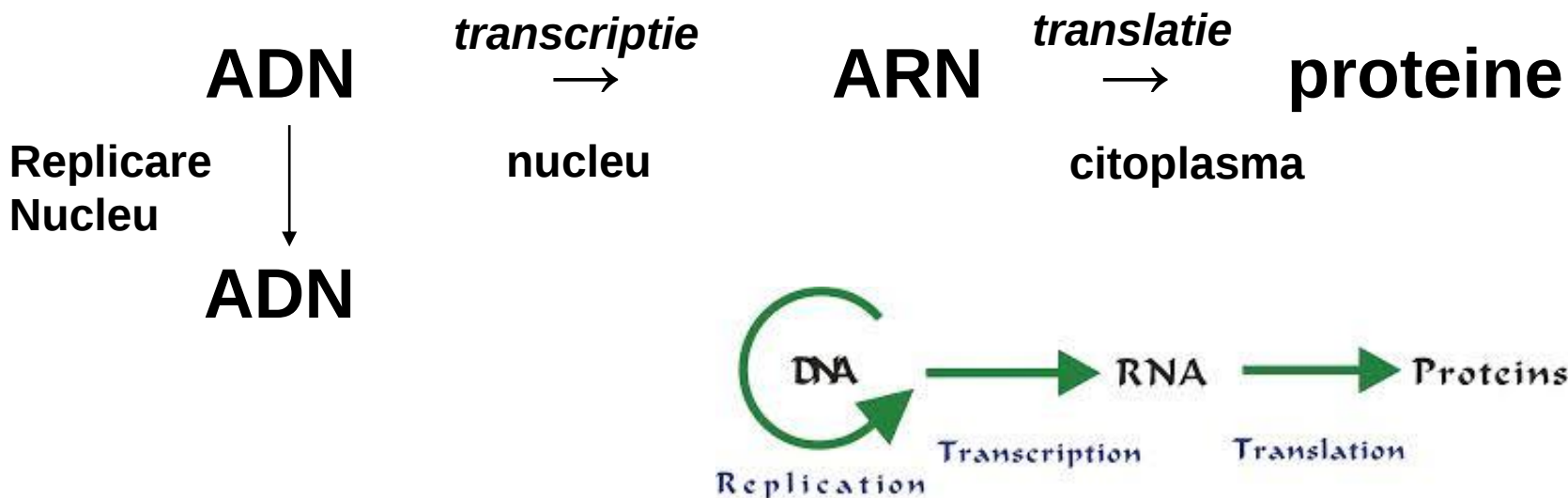
Maturarea ARNm precursor

Translația

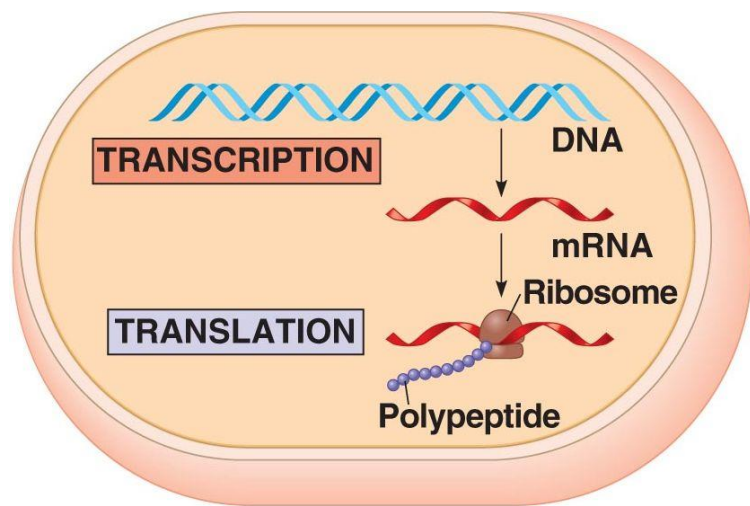
Reglarea expresiei genelor

MECANISMELE MOLECULARE ALE EXPRESIEI GENICE

Dogma centrală a geneticii/biologiei moleculare :

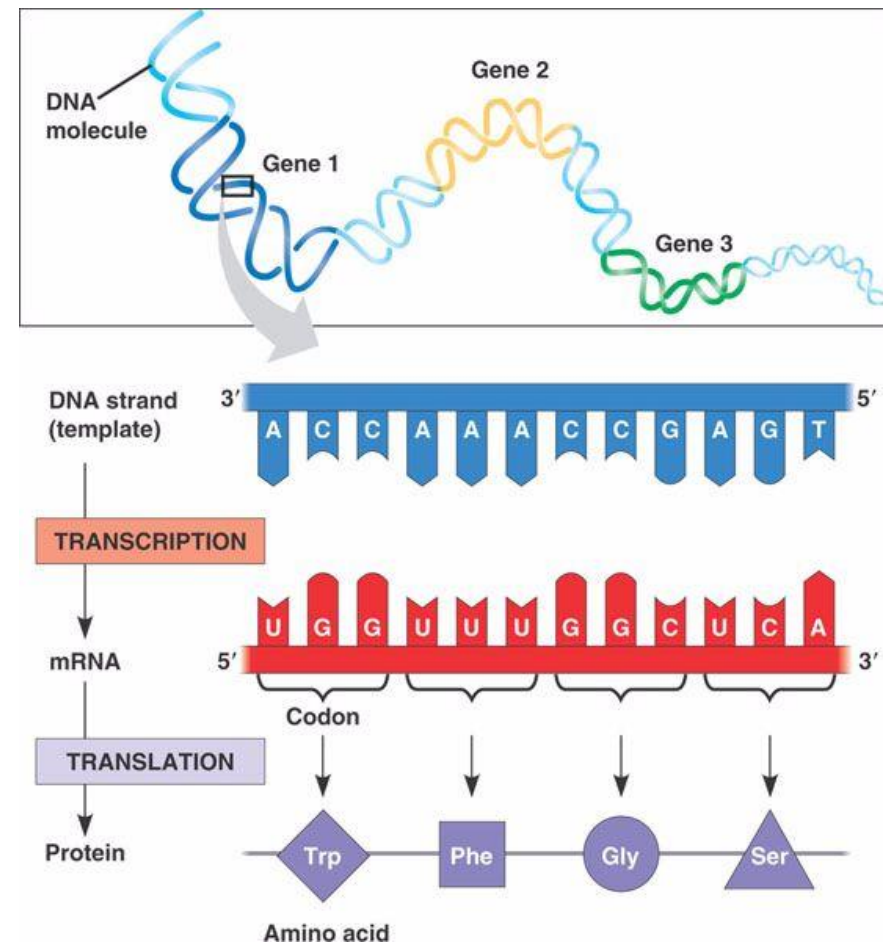


Expresia informației genetice se realizează în toate celulele pe baza unui flux informațional, considerat unidirecțional și universal, care se conformează dogmei centrale a geneticii: **ADN → ARNm → polipeptid (proteină).**

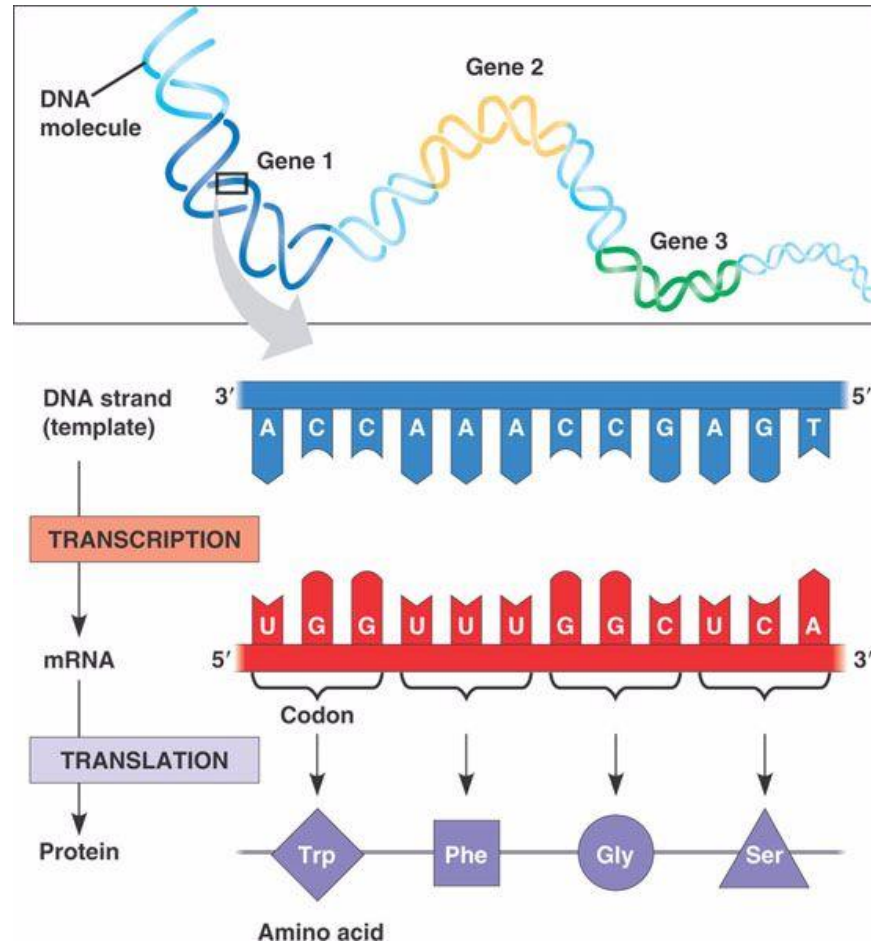


Transcripția este prima etapă a expresiei informației ereditare și constă în copierea informației din ADN într-o moleculă de ARN mesager; această etapă are loc în nucleu și mitocondrii.

Translația este a doua etapă și constă în sinteza unui polipetid, prin decodificarea (traducerea) informației din ARNm într-o anumită secvență de aminoacizi; acest proces are loc în citoplasmă, pe ribozomi.



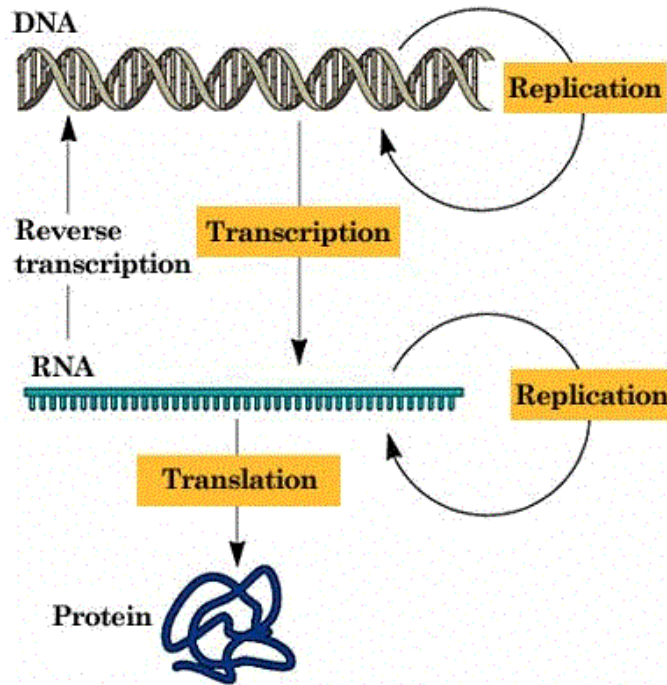
Realizarea expresiei ereditare se bazează pe principiul coliniarității: o secvență liniară de nucleotide din ADN este copiată (complementar) într-o secvență liniară de nucleotide în ARN; apoi ea este decodificată (prin citire în grupe de trei nucleotide numite codoni) într-o secvență, de asemenea liniară, de aminoacizi ce formează un polipeptid.



În realitate, fluxul informațional nu este exclusiv unidirecțional și universal:

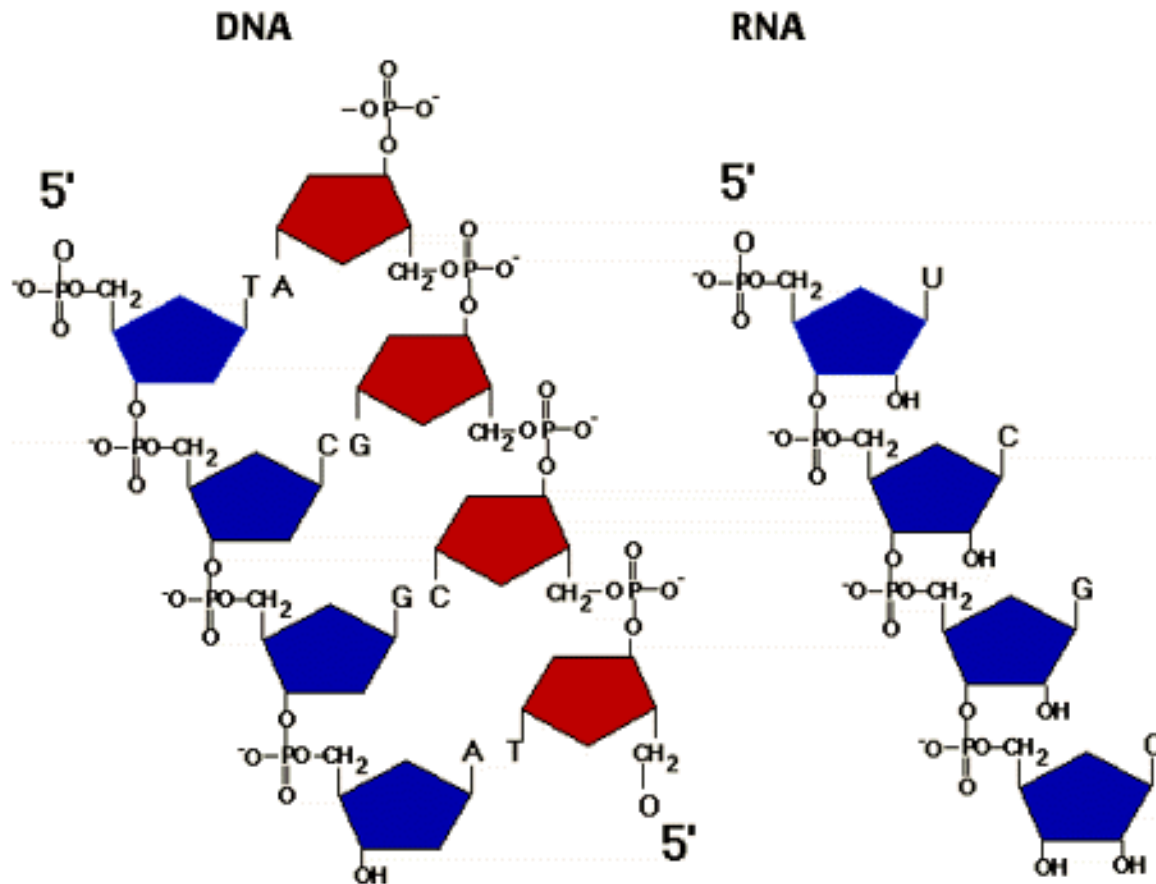
- este posibilă trecerea informației și de la ARN la ADN prin reverstranscripție (retrotranspozoni și retrovirusuri)

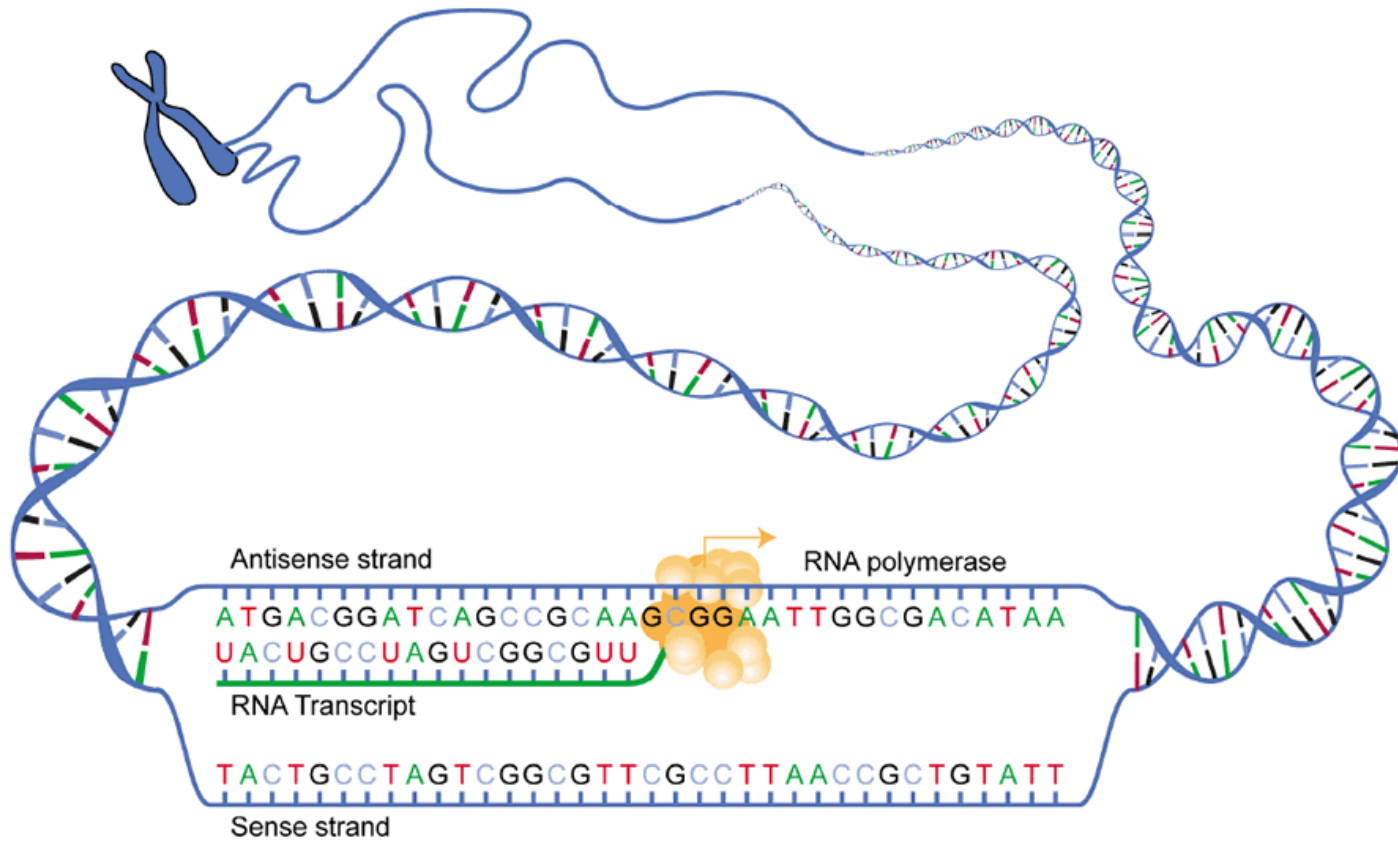
DNA↔RNA→Protein



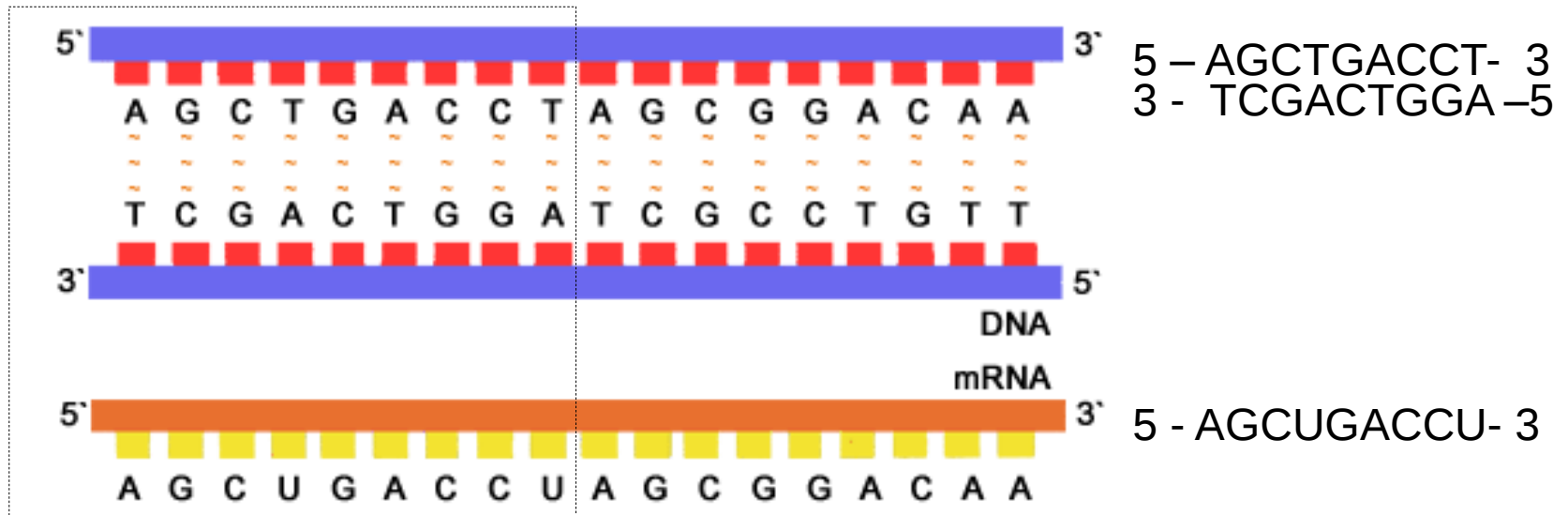
TRANSCRIȚIA

Transcripția = procesul de copiere a informației genetice din ADN (a unei gene) sub formă codificată, complementară și antiparalelă într-o moleculă de ARN; se desfășoară în nucleu.





Elemente necesare transcripției

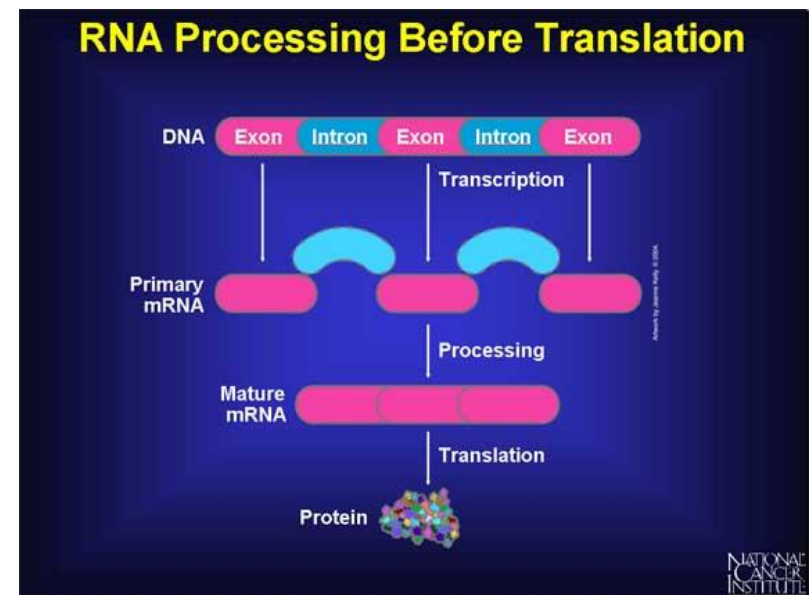
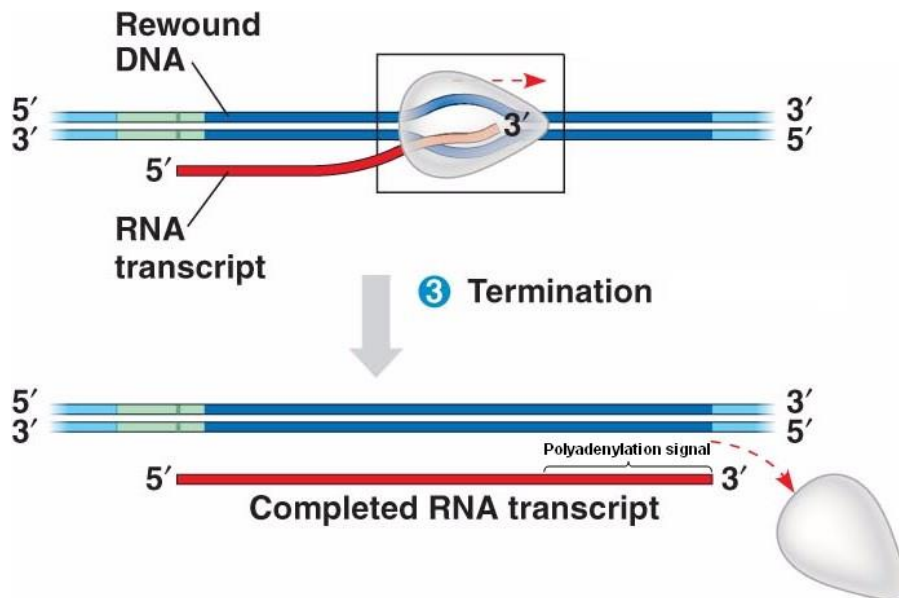


- Catena transcrisă 3' → 5' = catena antisens
- ARN pol II
- TF
- Mediatorul
- Ribonucleotide

Promotorul + ARN pol II + TF = **complexul de inițiere al transcripției**

ETAPELE TRANSCRIPTIEI:

- 1) formarea ARN mesager precursor (preARNm), prin transcripția integrală a genei (exoni și introni)
- 2) maturarea preARN → ARNm, printr-o serie de modificări din care rezultă ARNm matur, ce va trece în citoplasmă

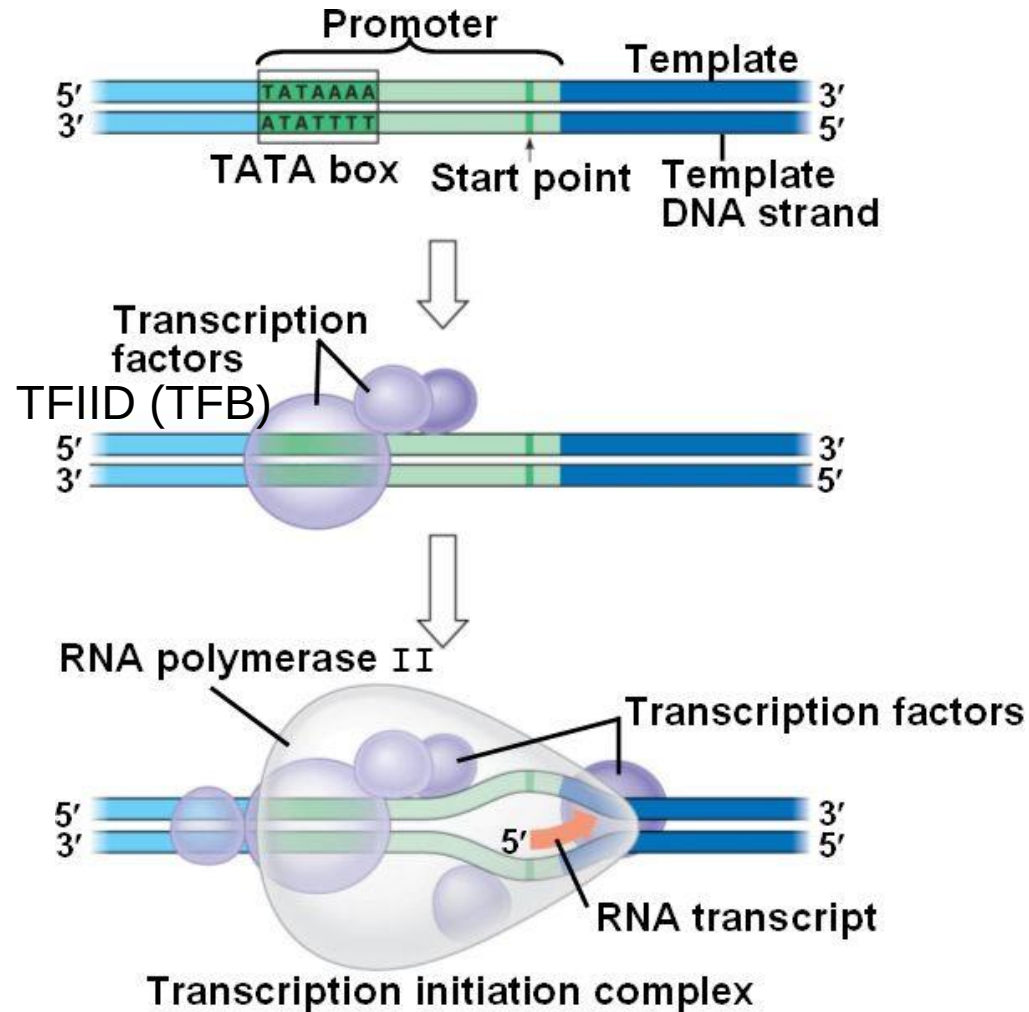


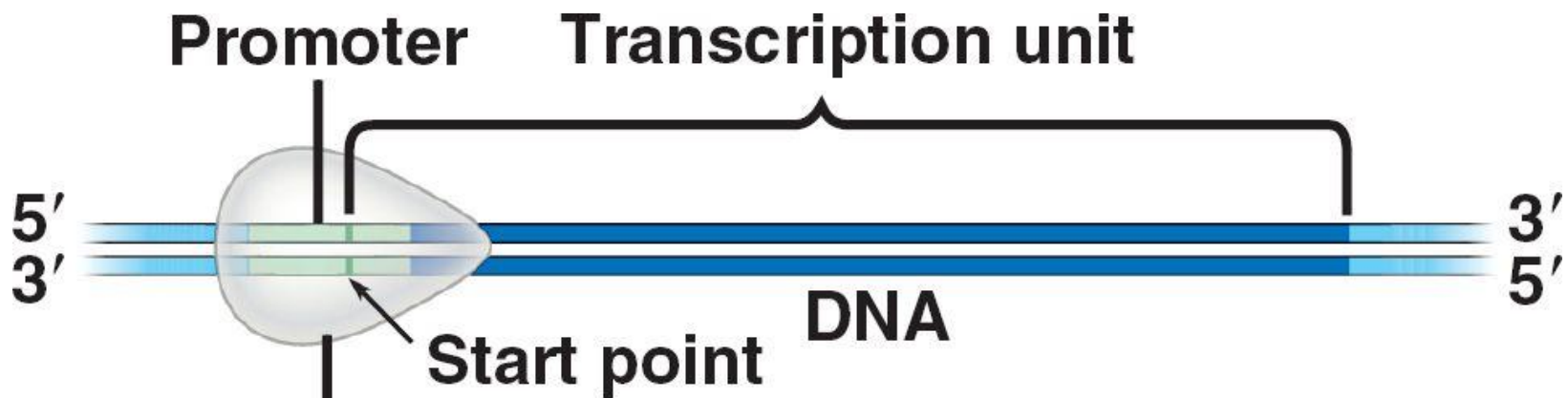
1) Etape formarea ARN mesager precursor (preARNm)

Inițiere

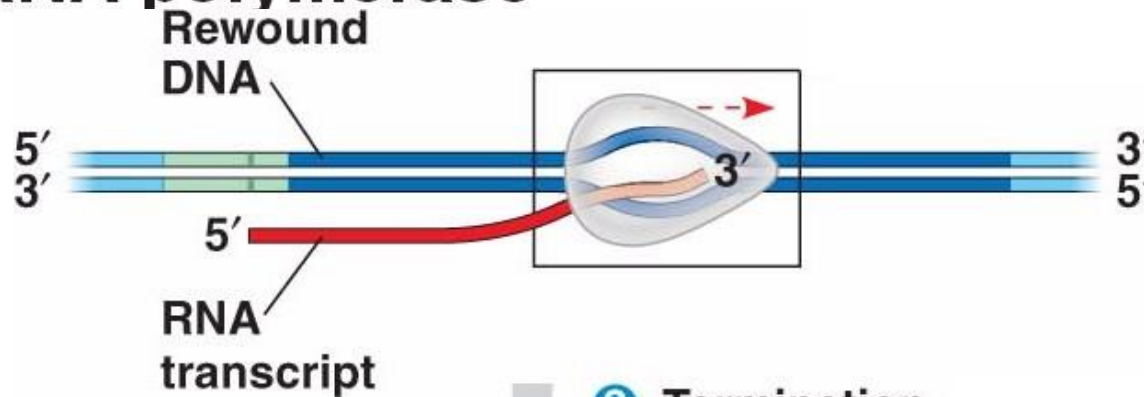
- fixarea și poziționarea ARN-polimerazei în regiunea promotor prin intermediul factorilor de transcripție (TFIID)

- ARN polimeraza nu poate recunoaște direct promotorul și nici nu poate iniția singură transcripția





RNA polymerase



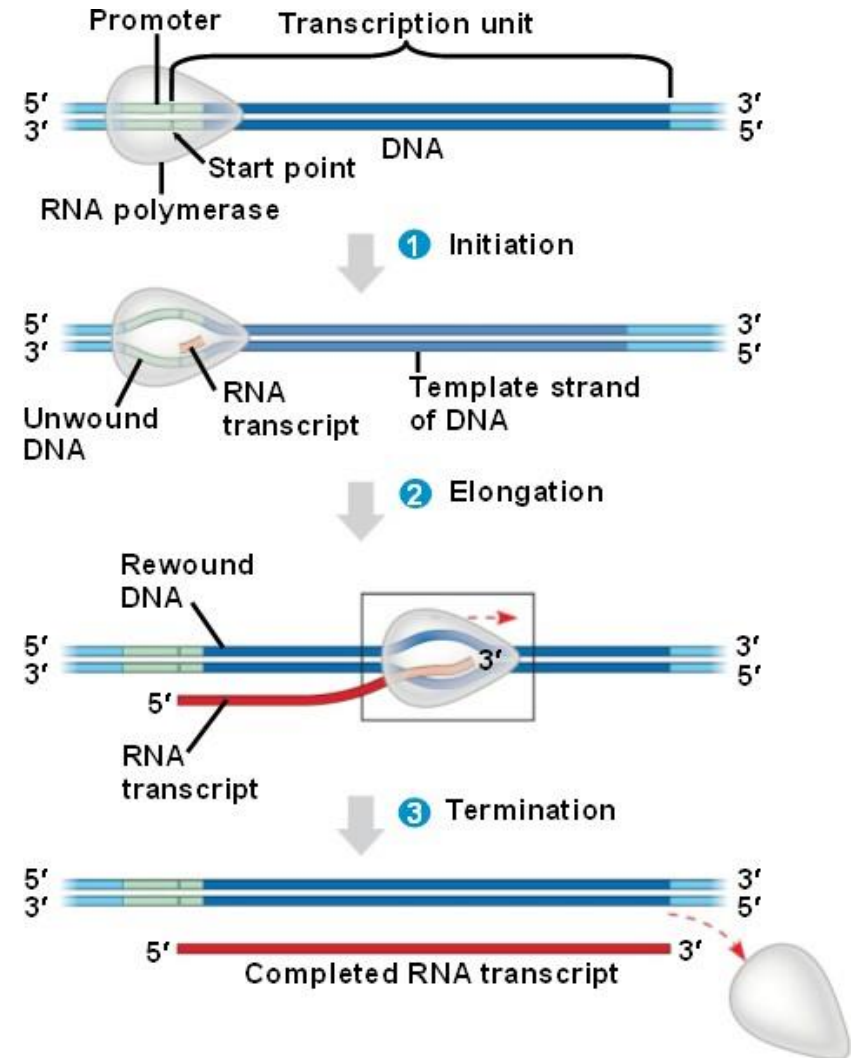
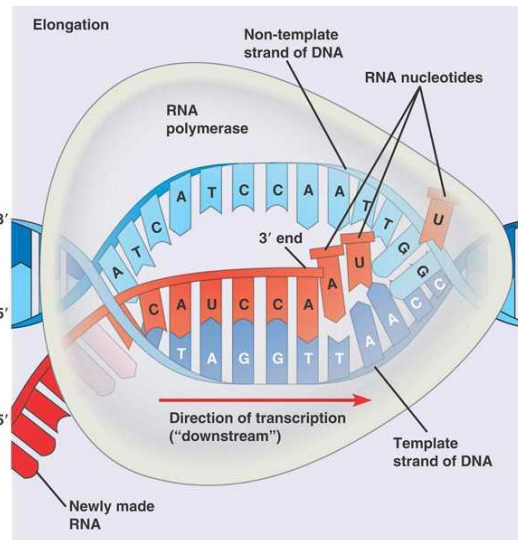
③ Termination



Etape formarea ARN mesager precursor (preARNm)

Elongare

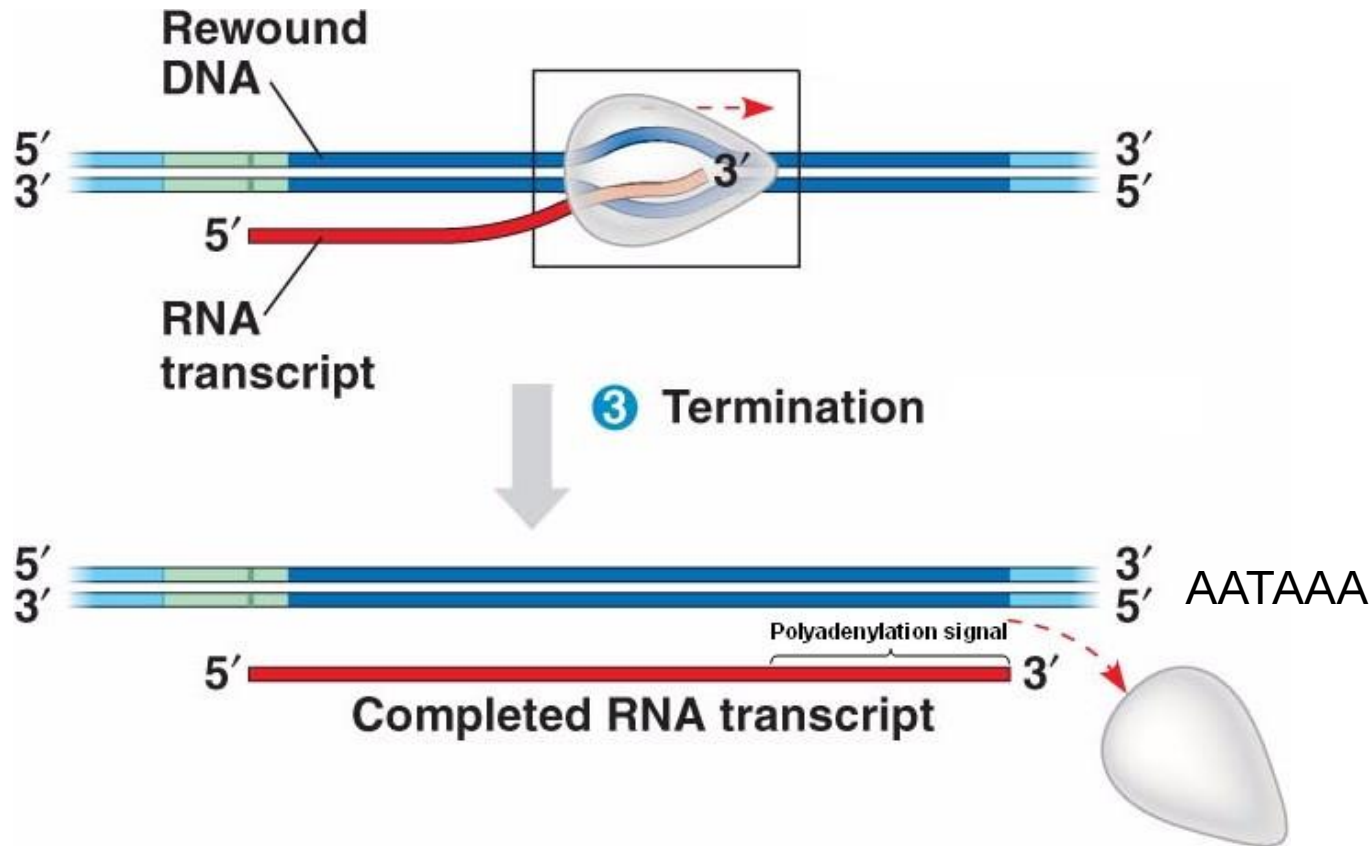
- TFIH (acțiune de helicază) separă cele două catene ADN, eliberând catena transcrisă 3'→5'
- ARN polimeraza II polimerizează ribonucleotidele activate aranjate secvențial și complementar
- transcripția se desfășoară numai în direcția 5 → 3



ARNm se desprinde treptat de pe catena transcrisă (rămânând fixat temporar numai la capătul 3')

Terminarea transcripției

- ARN-polimeraza întâlnește situsul de terminare a transcripției secvența AATAAA, care semnalează clivarea 3' a transcriptului primar



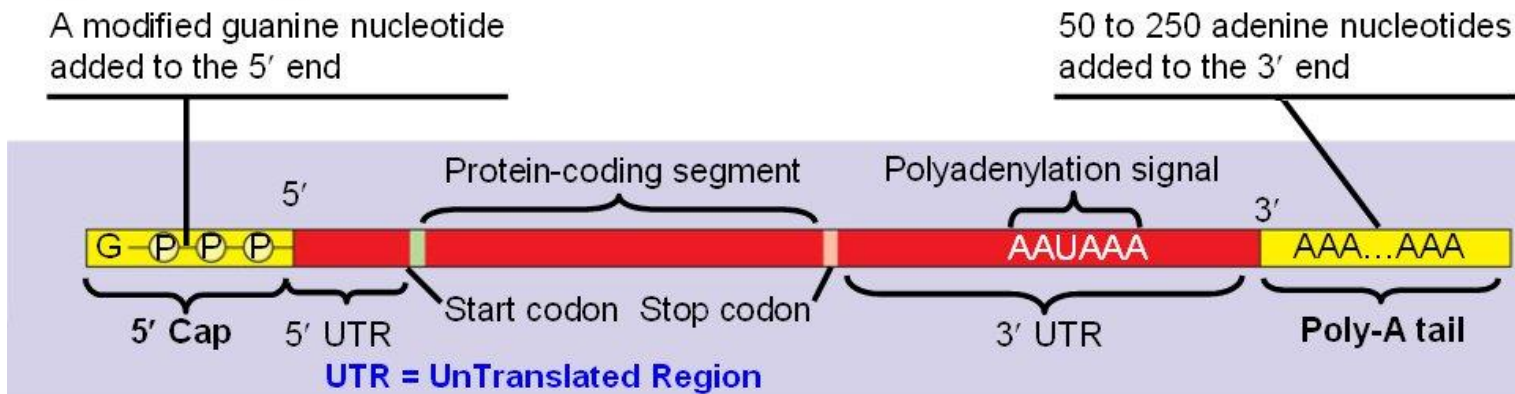
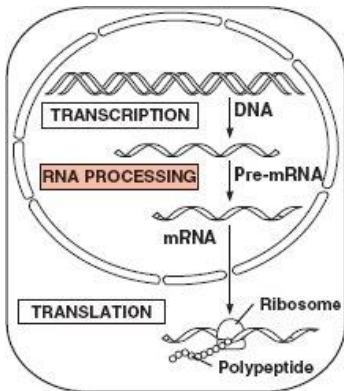
Secționarea pre ARNm sintetizat are loc (sub acțiunea unei exonucleaze) la 15-30 nucleotide în aval de situsul de poliadenilare.

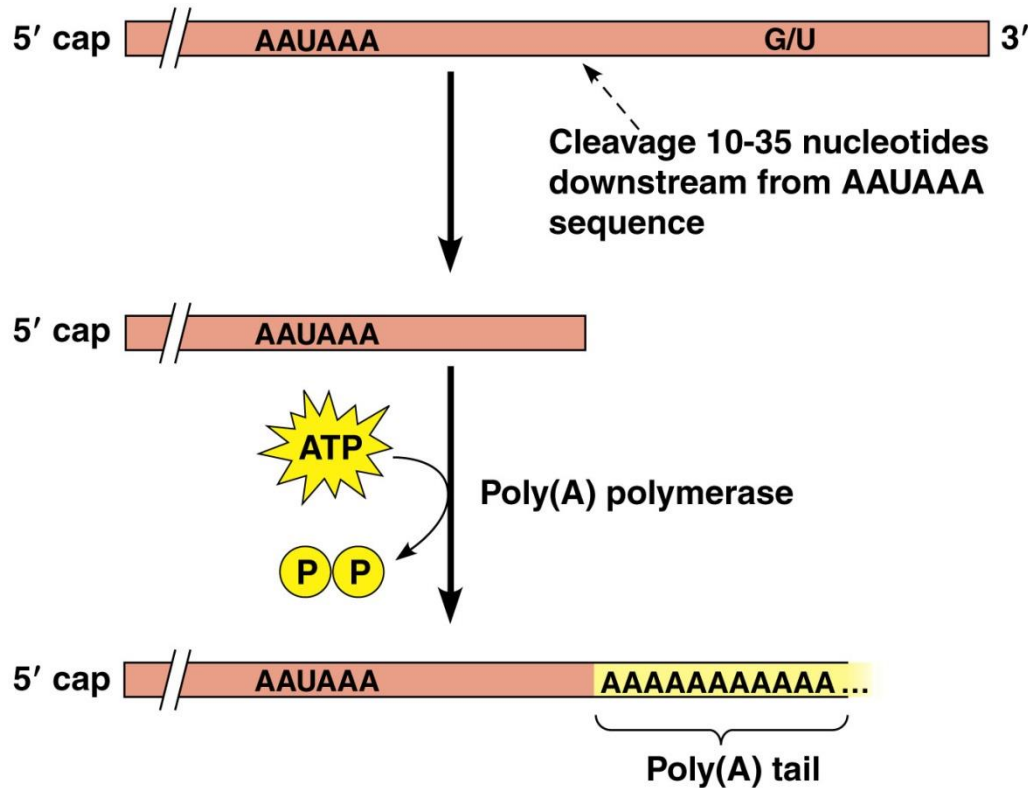
2) MATURAREA ARNm PRECURSOR

(MODIFICAREA EXTREMITĂȚILOR ȘI PROCESAREA ARNm PRECURSOR)

Modificarea extremităților ARNm precursor

- la capătul 5' - o moleculă de 7-metil-guanozină
- la capatul 3' - se adaugă (prin acțiunea unei poli-A polimeraze) o serie de 50-200 de nucleotide cu adenină, formând o coadă poliadenilică.





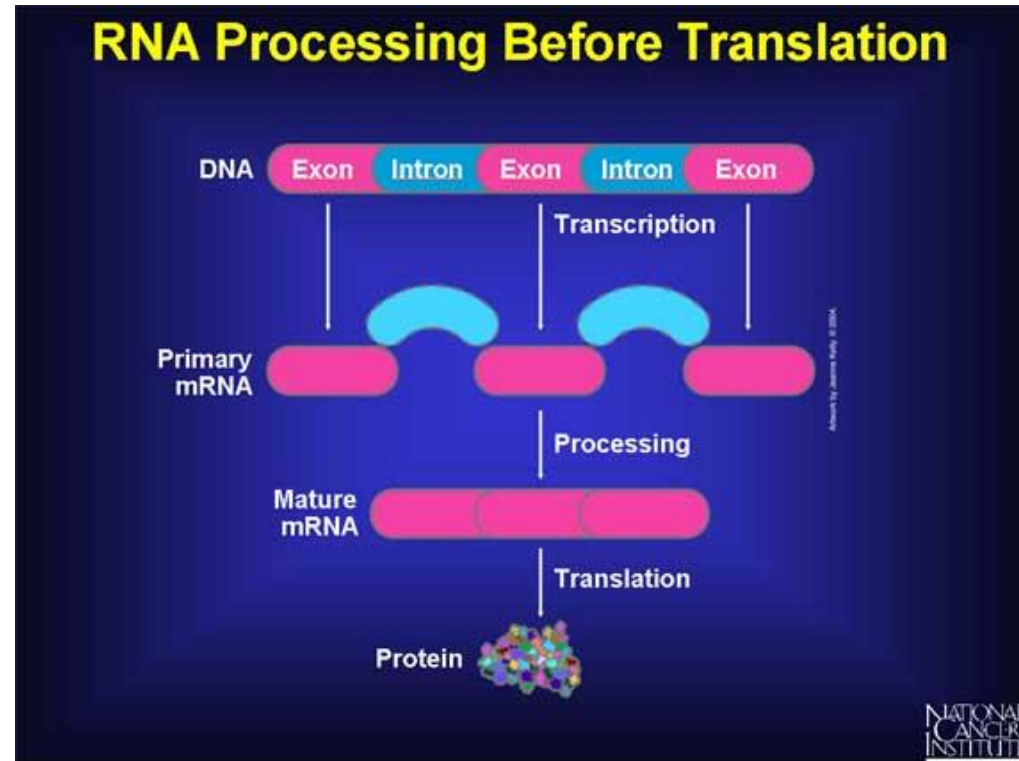
© 2012 Pearson Education, Inc.

Modificarea extremităților ARNm precursor determină creșterea stabilității sale (protecție la degradarea de către endonucleaze) și facilitează transportul în citoplasmă, precum și recunoașterea și fixarea sa la subunitatea 40S a ribozomului.

PROCESAREA ARNm PRECURSOR

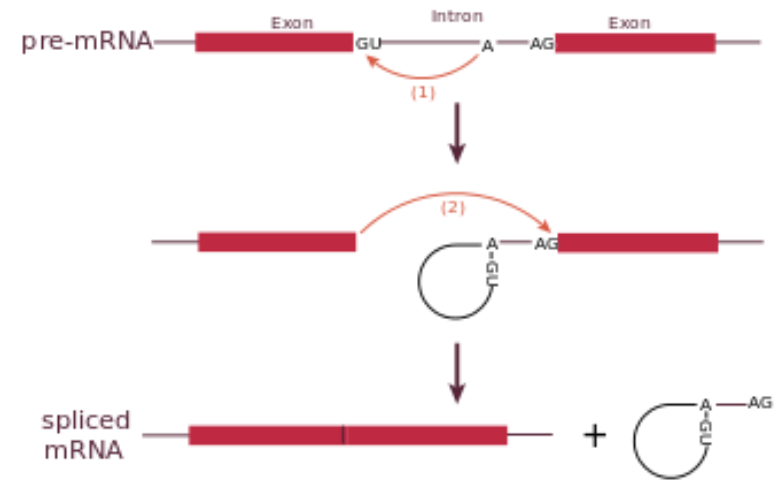
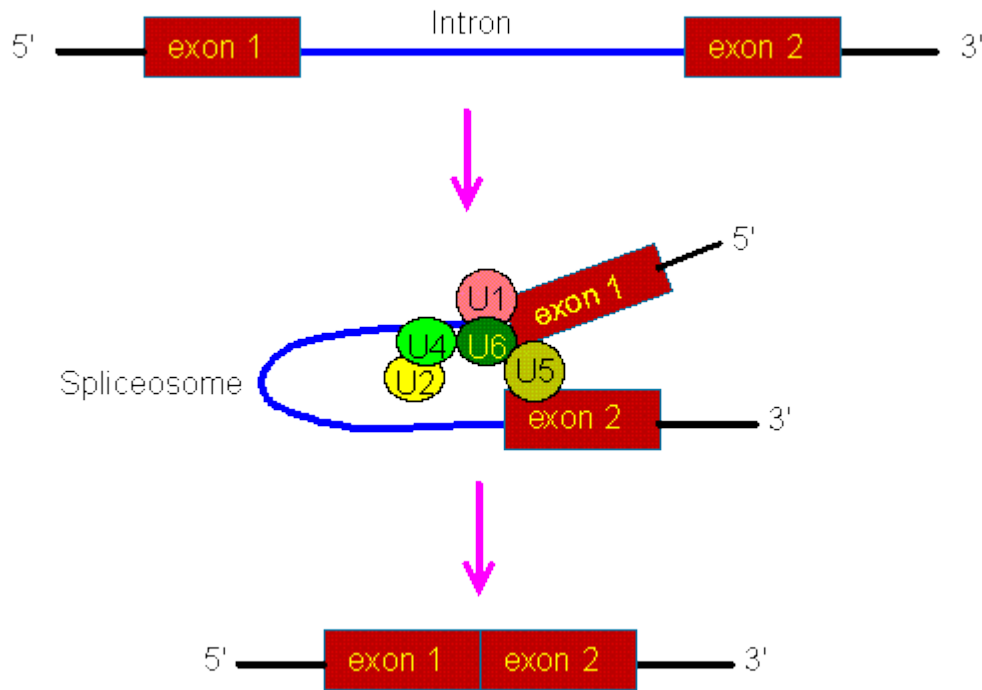
Transcriptul ARN primar suferă o procesare complexă ce constă în decuparea și eliminarea intronilor și unirea exonilor, formându-se ARNm matur, alcătuit dintr-o serie continuă și contiguă de exoni.

Procesul este denumit splicing.



Splicing - decuparea precisă și eliminarea ARN intronic + legarea ARN exonic

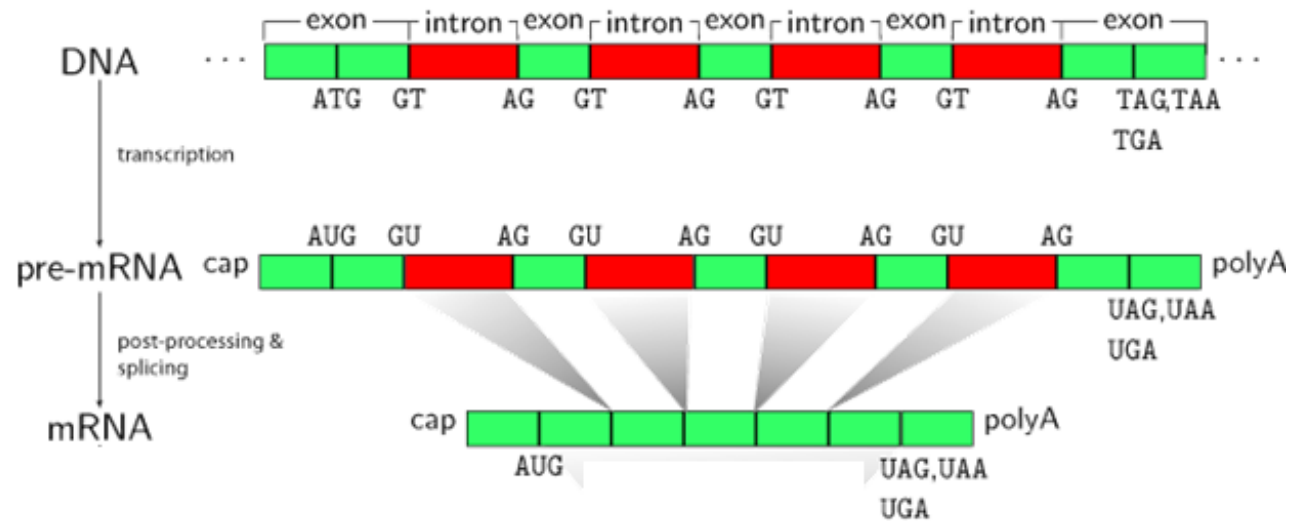
Mecanismul de decupare



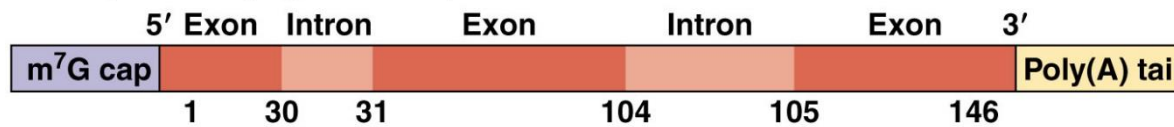
Spliceosom – ARNsn-proteine

Procesul este dependent de existența unor secvențe nucleotidice-semnal situate la granița exoni-introni: 5'GT sau situs donor și 3'AG sau situs acceptor; o altă secvență importantă situată foarte aproape de capătul 3 al intronului este situsul de conexiune sau de legătură (branch site), ce conține nucleotidul A.

MATURAREA ARNm PRECURSOR



Primary transcript (pre-mRNA)



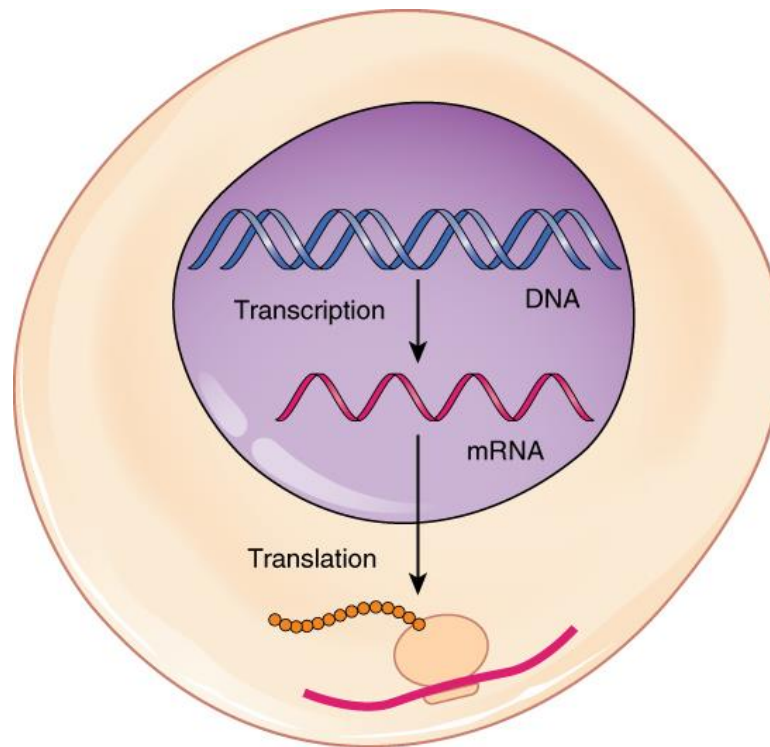
Introns excised and
exons spliced together



PABP

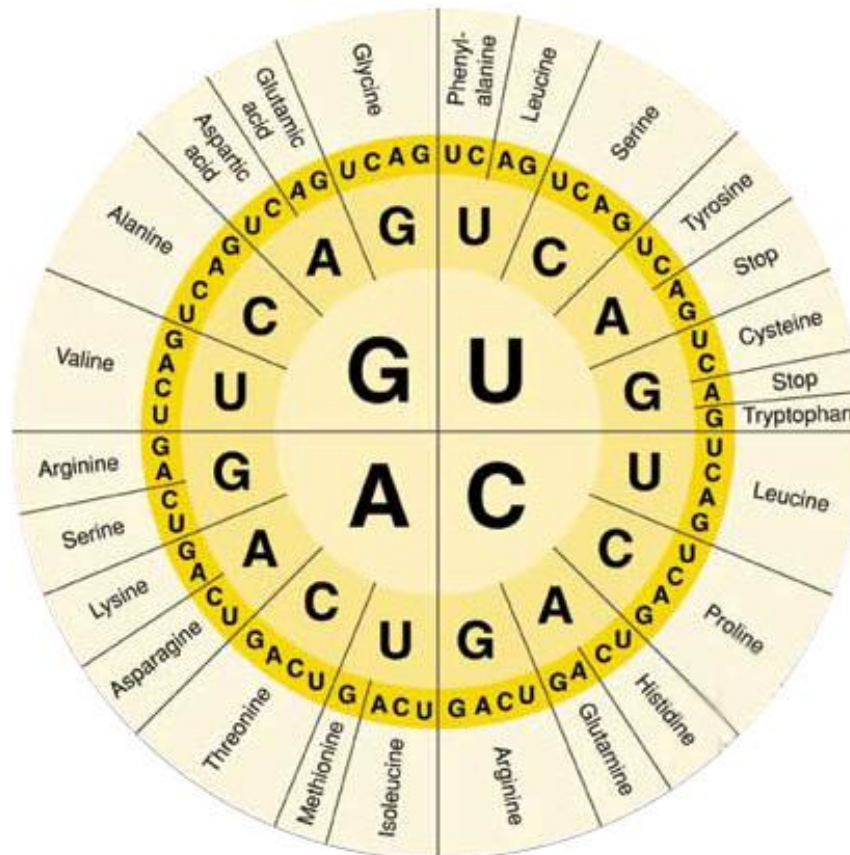
TRANSLATIA

- procesul de decodificare a informației genetice din ARNm într-o secvență specifică de AA ce formează un polipetid, care va suferi o serie de modificări - proteină activă; se desfășoară în citoplasmă
- are la bază codul genetic



CODUL GENETIC

= un sistem de corespondențe între o anumită secvență de trei nucleotide numită codon și un anumit aminoacid



PROPRIETĂȚILE CODULUI GENETIC

- codul genetic este triplet
- are un codon initiator (AUG) și trei codoni stop (UAA, UAG, UGA)
- codul genetic este degenerat - mai mulți codoni semnifică același aminoacid, cu excepția metioninei și triptofanului
- codul genetic este nesuperpozabil și fără virgule
- codul genetic este lipsit de ambiguitate - un codon semnifică întotdeauna un anumit aminoacid
- este universal

		Second Letter								
		T		C		A		G		
First Letter	T	TTT } TTC } Phe TTA } TTG } Leu	TCT } TCC } TCA } Ser TCG }	TAT } TAC } Tyr TAA Stop TAG Stop	TGT } TGC } Cys TGA Stop TGG Trp	T	C	A	G	
	C	CTT } CTC } Leu CTA } CTG }	CCT } CCC } CCA } Pro CCG }	CAT } CAC } His CAA } Gln CAG }	CGT } CGC } Arg CGA } CGG }	C	T	C	A	G
	A	ATT } ATC } Ile ATA } ATG Met	ACT } ACC } Thr ACA } ACG }	AAT } AAC } Asn AAA } Lys AAG }	AGT } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	A	T	C	A	G
	G	GTT } GTC } Val GTA } GTG }	GCT } GCC } Ala GCA } GCG }	GAT } GAC } Asp GAA } Glu GAG }	GGT } GGC } Gly GGA } GGG }	G	T	C	A	G

CODUL GENETIC

		Second nucleotide base					
		U	C	A	G		
First nucleotide base (5' position)	U	UUU } Phenylalanine (Phe)	UCU } Serine (Ser)	UAU } Tyrosine (Tyr)	UGU } Cysteine (Cys)	U C A G	Third nucleotide base (3' position)
		UUC }	UCC }	UAC }	UGC }		
		UUA } Leucine (Leu)	UCA }	UAA STOP	UGA STOP Selenocysteine (SeCys)		
		UUG }	UCG }	UAG STOP*	UGG Tryptophan (Trp)		
	C	CUU } Leucine (Leu)	CCU } Proline (Pro)	CAU } Histidine (His)	CGU } Arginine (Arg)	U C A G	
		CUC }	CCC }	CAC }	CGC }		
		CUA }	CCA }	CAA } Glutamine (Gln)	CGA }		
		CUG }	CCG }	CAG }	CGG }		
	A	AUU } Isoleucine (Ile)	ACU } Threonine (Thr)	AAU } Asparagine (Asn)	AGU } Serine (Ser)	U C A G	
		AUC }	ACC }	AAC }	AGC }		
		AUA }	ACA }	AAA } Lysine (Lys)	AGA } Arginine (Agn)		
		AUG START Methionine (Met); (fMet in prokaryotes)	ACG }	AAG }	AGG }		
	G	GUU } Valine (Val)	GCU } Alanine (Ala)	GAU } Aspartic acid (Asp)	GGU } Glycine (Gly)	U C A G	
		GUC }	GCC }	GAC }	GGC }		
		GUA }	GCA }	GAA } Glutamic acid (Glu)	GGA }		
		GUG }	GCG }	GAG }	GGG }		

*also codes for a 22nd amino acid, pyrrolysine, in some prokaryotes.

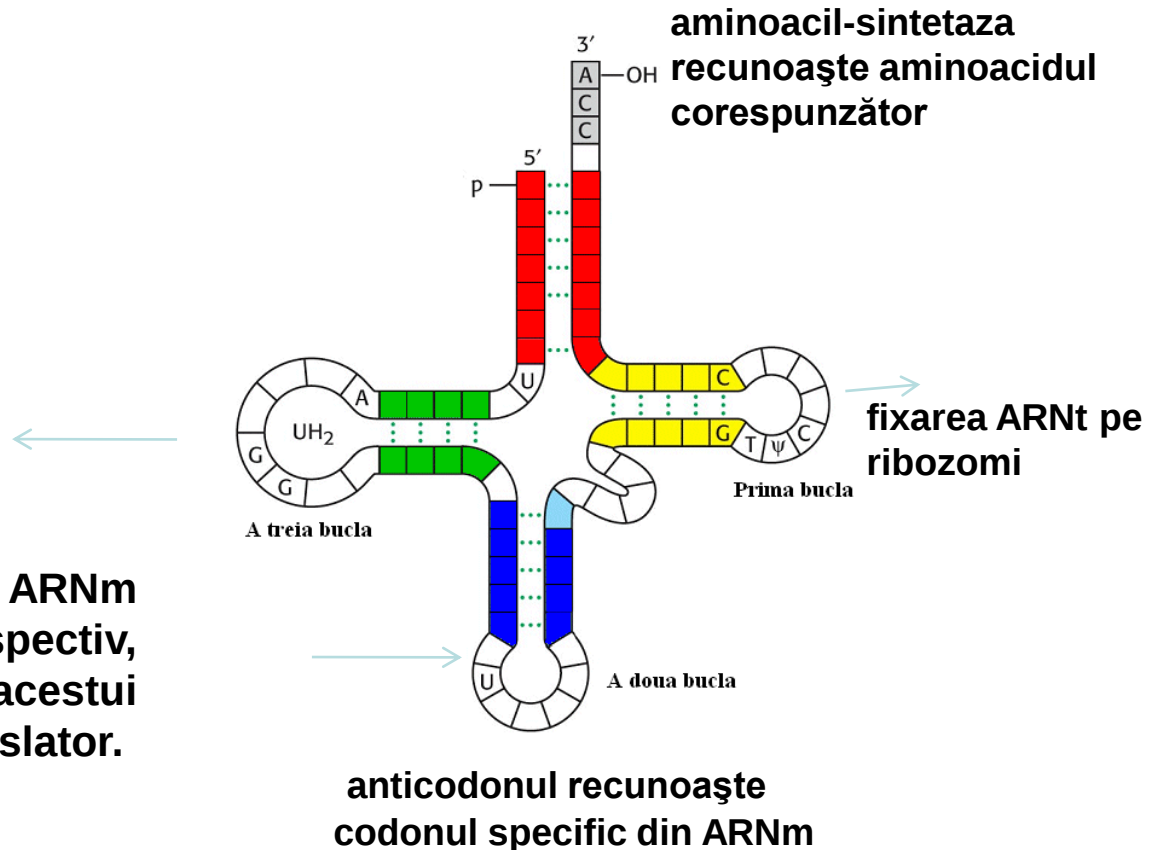
Aparatul translațional

- **ARNm** - conține informația ce va fi tradusă într-o secvență de aminoacizi

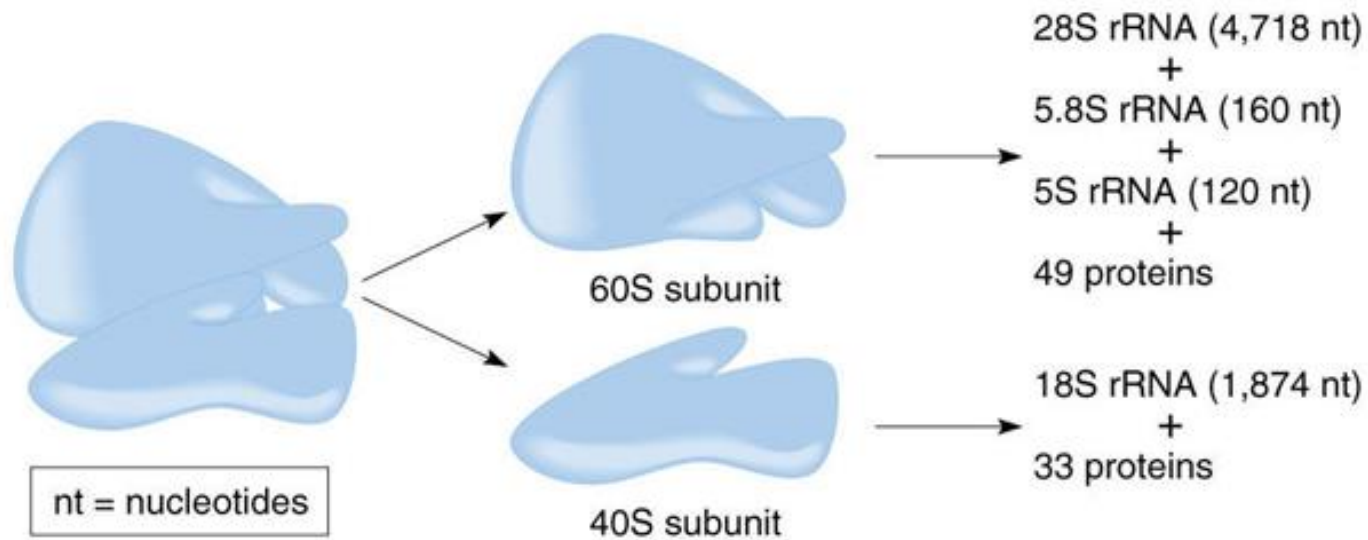


- **ARNt** - ARN de transfer (ARNt) transportă aminoacizii din citoplasmă la ribozomi, locul sintezei proteice.

ARNt recunoaște codonul din ARNm corespunzător aminoacidului respectiv, pe care îl poziționează în dreptul acestui codon; deci ARNt are rolul de translator.



Ribozomi



© 2010 Pearson Education, Inc.

Ribozomii sunt veritabile platforme de asamblare a aminoacizilor în proteine, pe baza instrucțiunilor ARNm.

Ribozomii eucariotelor sunt alcătuiți din două subunități inegale (40S și 60S) ; ele sunt de obicei disociate și libere în citoplasmă; ele se reunesc la începutul translației pentru a forma ribozomul activ.

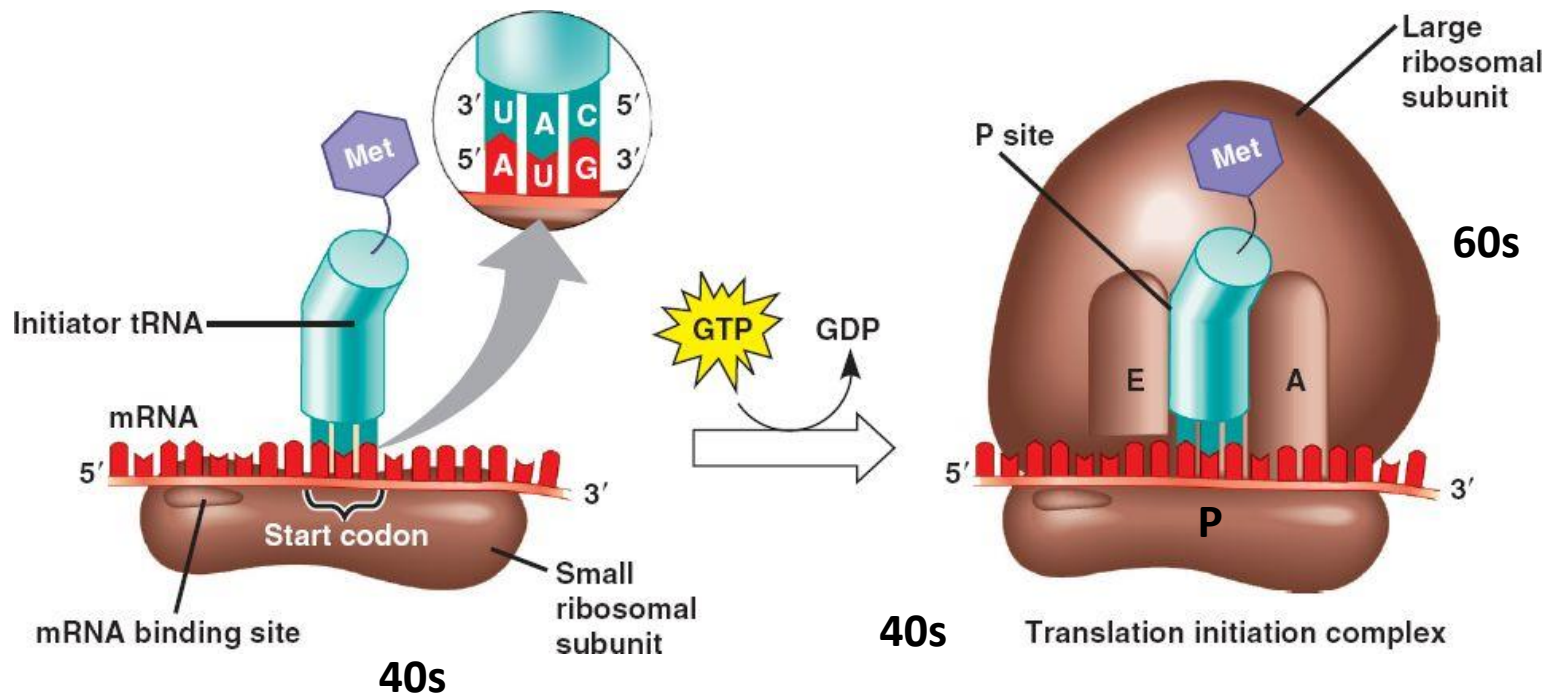
Fiecare subunitate este alcătuită din ARN ribozomal și proteine.

TRANSLAȚIE - etape

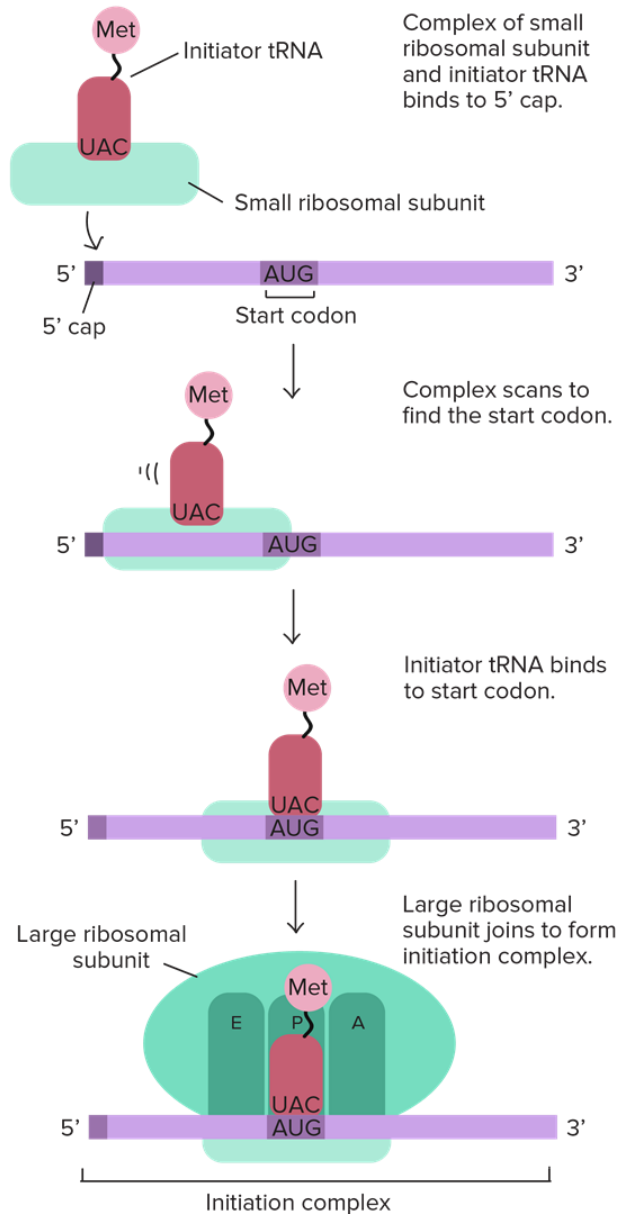
Inițiere

Inițierea translației este o etapă complexă care va plasa primul aminoacid (AA-1) al proteinei în dreptul codonului inițiator AUG din ARNm, ce corespunde metioninei.

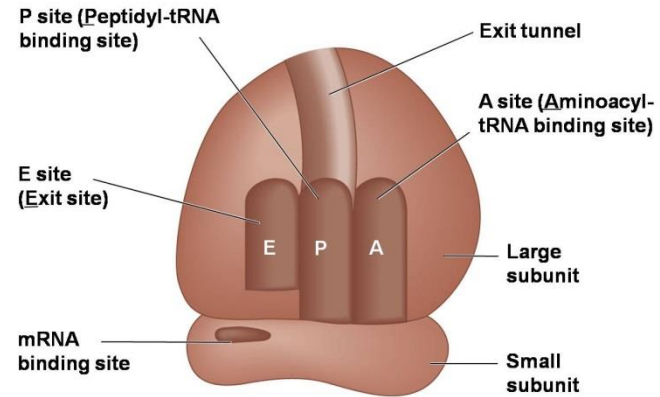
Are loc formarea complexului de inițiere
metionină-ARNt-40S-ARNm-60S



Eukaryotic translation initiation



Schematic model showing binding sites



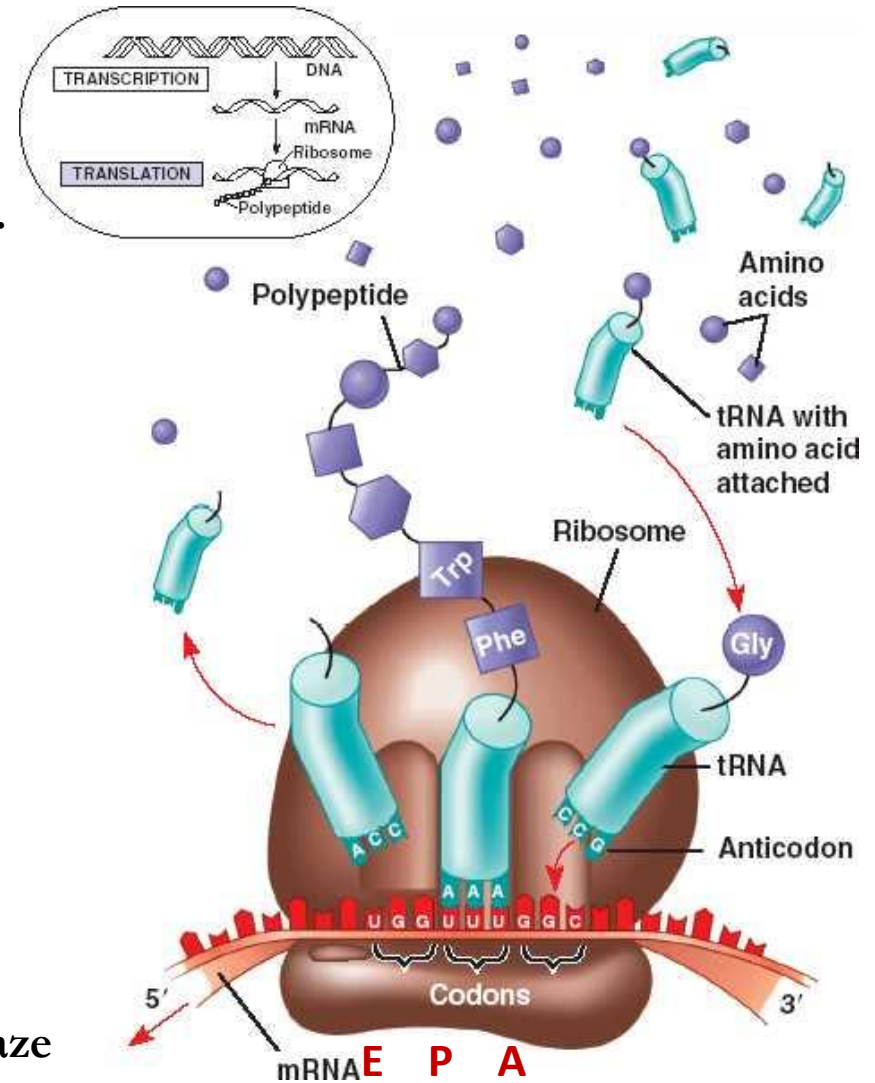
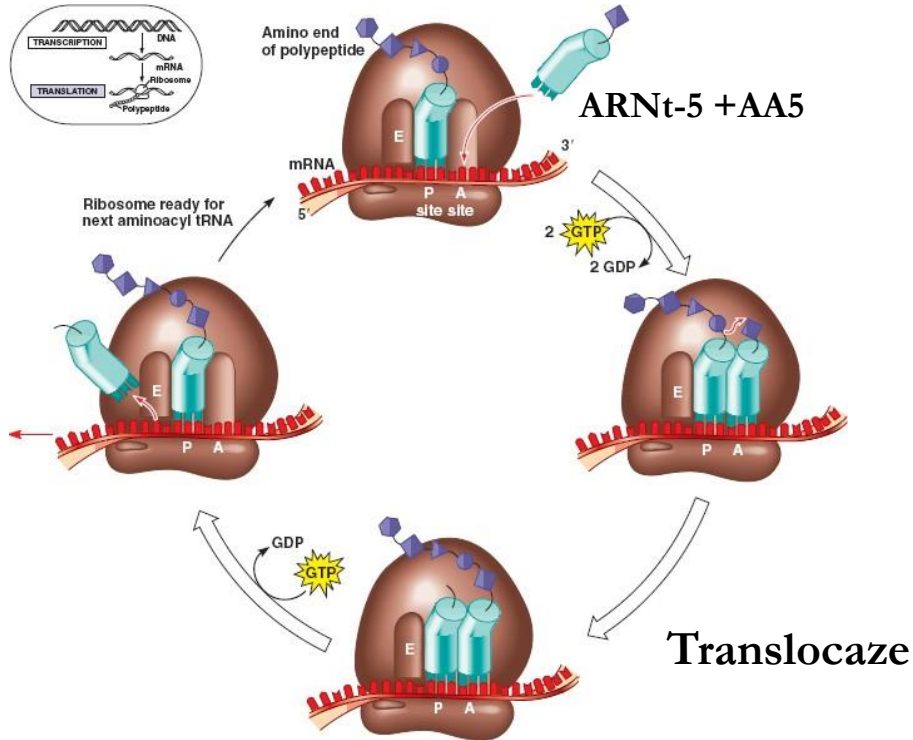
© 2011 Pearson Education, Inc.

Ribozomii prezintă patru situsuri funcționale:

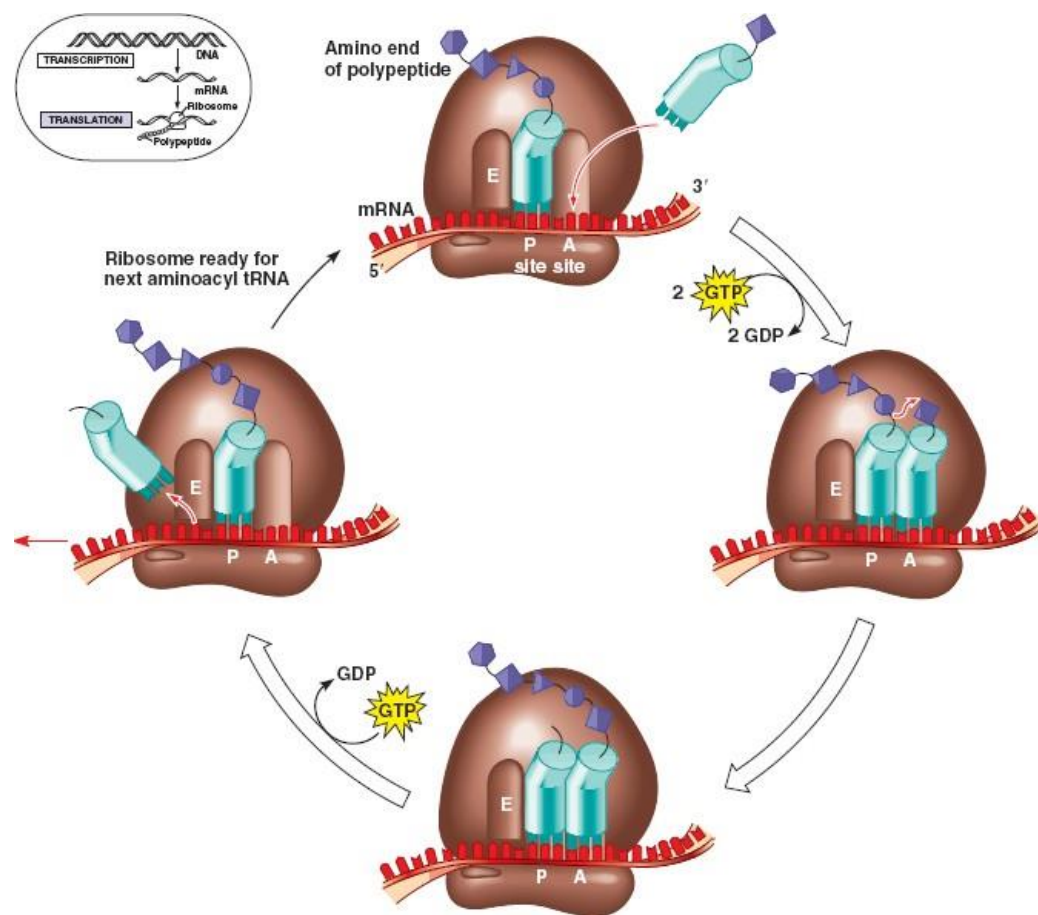
- pe subunitatea mică se află **situsul de fixare al extremității 5' a ARNm**
- pe subunitatea mare: **situsul P (peptidil) și A (aminoacil) unde se fixează moleculele de ARNt cuplate cu aminoacizii lor specifici, precum și situsul de ieșire (E de la exit).**

Elongație

Etapa în care se realizează legături peptidice între aminoacizi prin intermediul enzimei **peptidil-transferaza**.



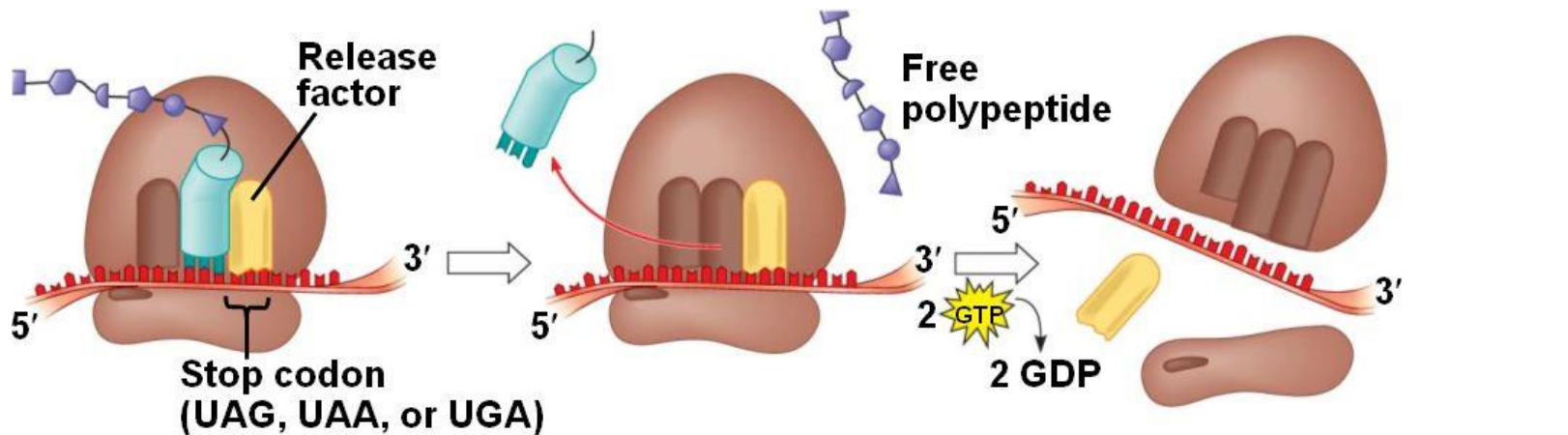
Elongația este o etapă repetată succesiv, în cursul căreia se formează legături peptidice (enzima peptidil-transferaza) între aminoacizii așezați secvențial pe baza ordinii codonilor din ARNm.



Deplasarea ribozomului se face prin intermediul unei translocaze.

Terminare

- ribozomul ajunge la un codon stop



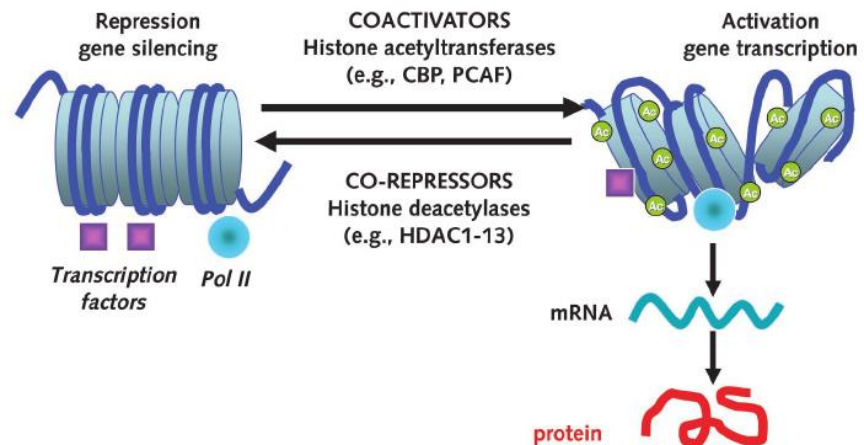
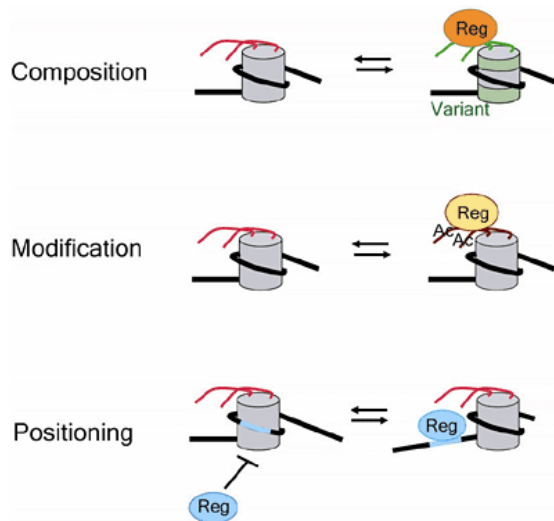
Când ribozomul ajunge la un codon stop, se produce dezasamblarea complexului ribozom-ARNm-polipectid (prin intervenția unui factor proteic, RF) și polipectidul este eliberat din ribozom.

Ribozomul poate fi reciclat pentru o nouă sinteză, iar polipectidul suferă o serie de modificări conformaționale și biochimice devenind o proteină activă.

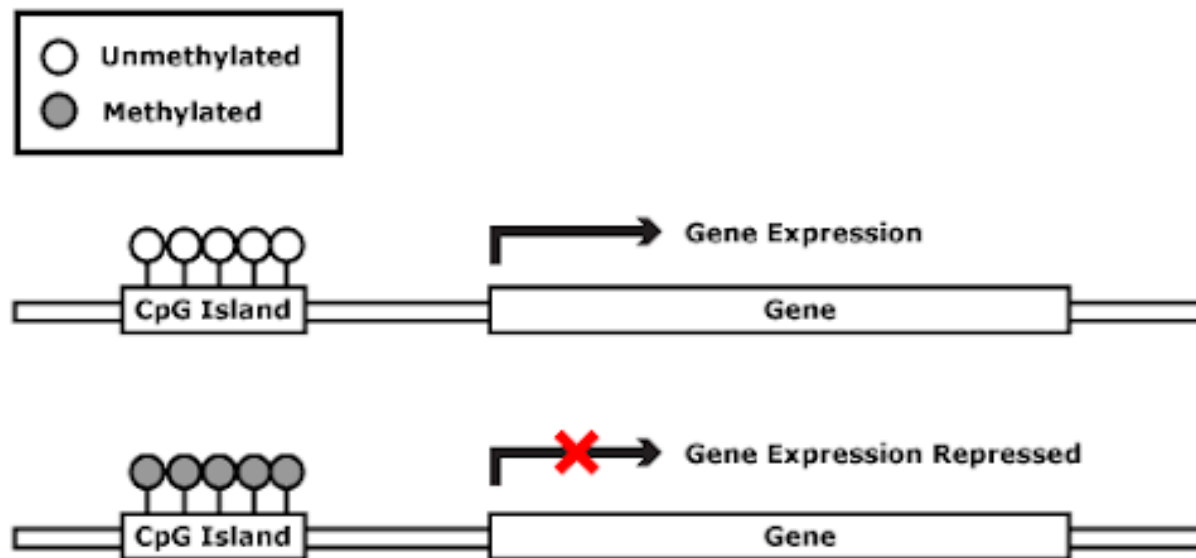
REGLAREA EXPRESIEI GENEICE

Activarea genelor

- presupune trecerea genelor dintr-o stare represată într-o stare favorabilă atașării la promotor (boxa TATA) a complexului transcripțional de bază și a factorilor transcripționali inductori
- se realizează prin intermediul proteinelor activatoare care sunt stimulate de semnale extra și intracelulare
- sunt mobilizate la nivelul genelor țintă proteine co-activatoare reprezentate complexe de remodelare stimulativă a cromatinei, histon acetil-transferaze (HAT) și demetilaze.



- sunt demetilate secvențele CpG de la nivelul promotorului genelor de către demetilaze care îndepărtează gruparea metil de la citozină. Demetilazele sunt activate de semnale fiziologice extracelulare, demetilarea favorizează atașarea factorilor transcripționali stimulatori (inductori) ai transcripției la promotorul genei.

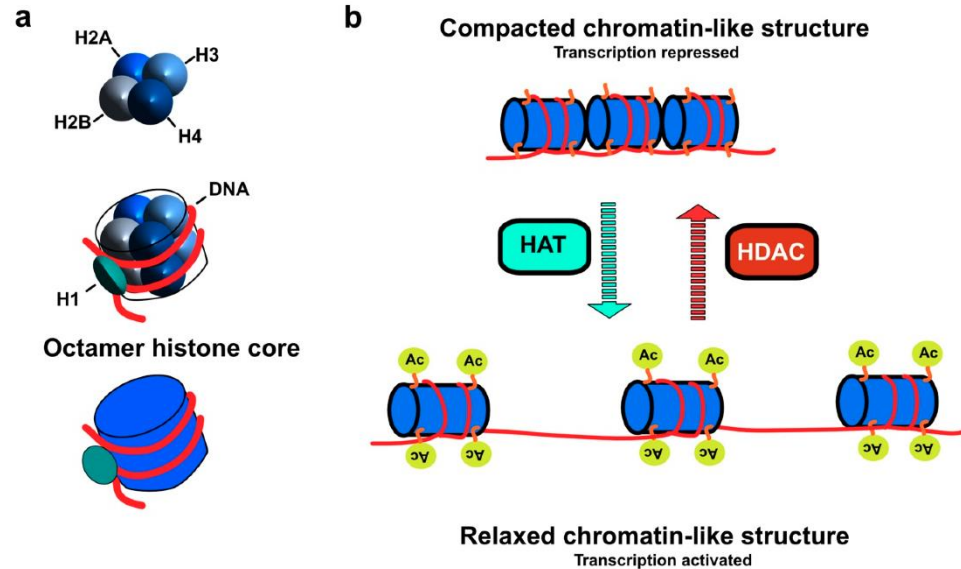


Represia genelor

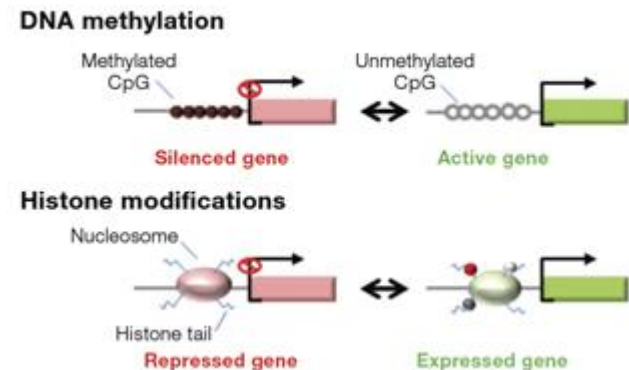
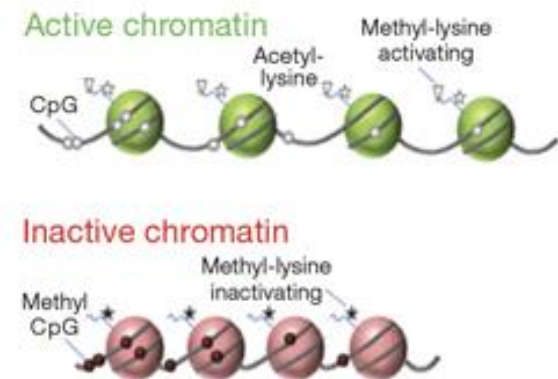
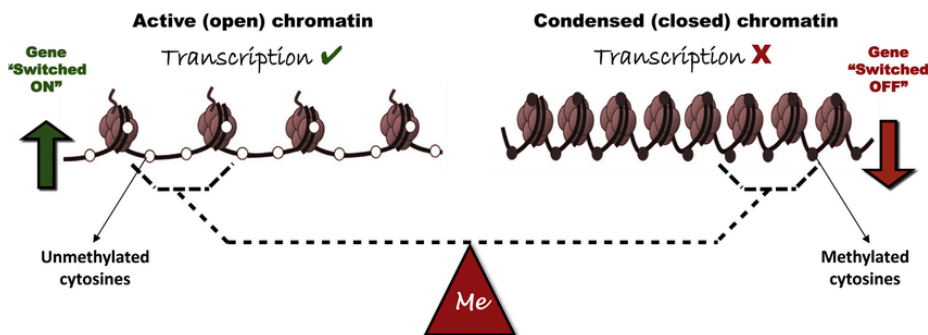
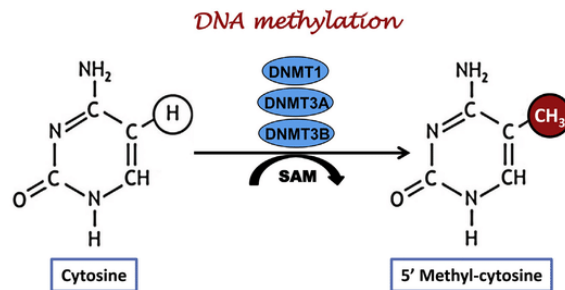
Trecerea unei gene din starea activă în starea silențioasă se realizează prin:

- inactivarea rapidă a activatorilor și a factorilor transcripționali
- activarea proteinelor represoare

- Inactivarea activatorilor se realizează prin procese de ubiquitinizare a proteinelor țintă, fosforilarea sau acetilarea factorilor transcripționali etc.
- Histon dezacetilazele îndepărtează gruparea acil de la capătul N-terminal al histonelor H3 și H4 și determină creșterea stabilității nucleozomale și scăderea accesibilității pentru proteinele activatoare și factori transcripționali.



Metilarea ADN este un proces esențial în reglarea expresie genice, producând represia genelor. Metilarea se produce are loc la nivelul citozinei din cadrul dinucleotidelor CpG, formând 5-metilcitozina care previne legarea factorilor transcripționali stimulatori. **Procesul de metilare și demetilare a citozinei este produs de către ADN-metiltransferaze și respectiv, ADN-demetilaze.** Histon-metiltransferazele metilează resturile de lizină și arginina din regiunea C-terminală a histonelor H3 și H4 producând restricția transcripțională.

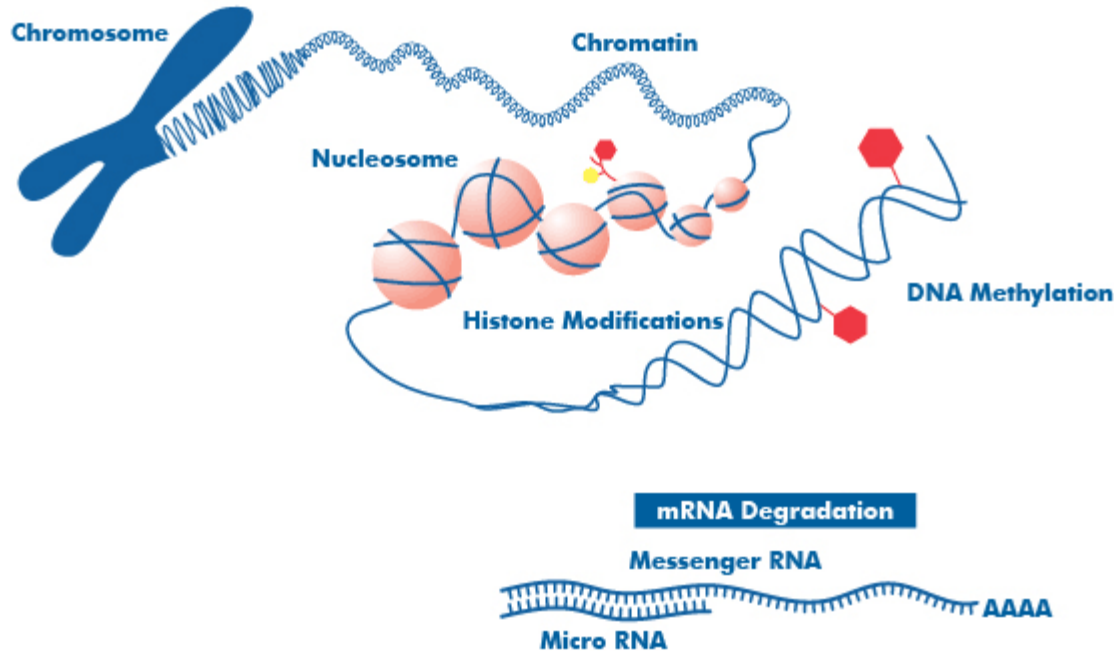


MECANISME EPIGENETICE

Epigenetică = modificări ale complexului nucleoproteic ce formează cromatina, care **nu implică modificări în secvența de nucleotide**, dar care influențează expresia temporală și/sau spațială agenelor.

Epigenom = stare epigenetică globală și particulară a unei celule, toate celule corpului au același genom, dar un anumit epigenom

Epimutații = modificări în structura epigenetică a celulei



Modificări epigenetice

a. Modificări post - translaționale ale histonelor nucleozomale

- modificări ale unor aminoacizi din structura histonelor nucleozomale (H3 și H4) au un rol important în reglarea expresiei genice
- acetilarea histonelor → activarea transcripției
- dezacetilarea → represiia transcripției
- metilarea (rez.arginina și lizina) → efecte diferite - activare/represie

