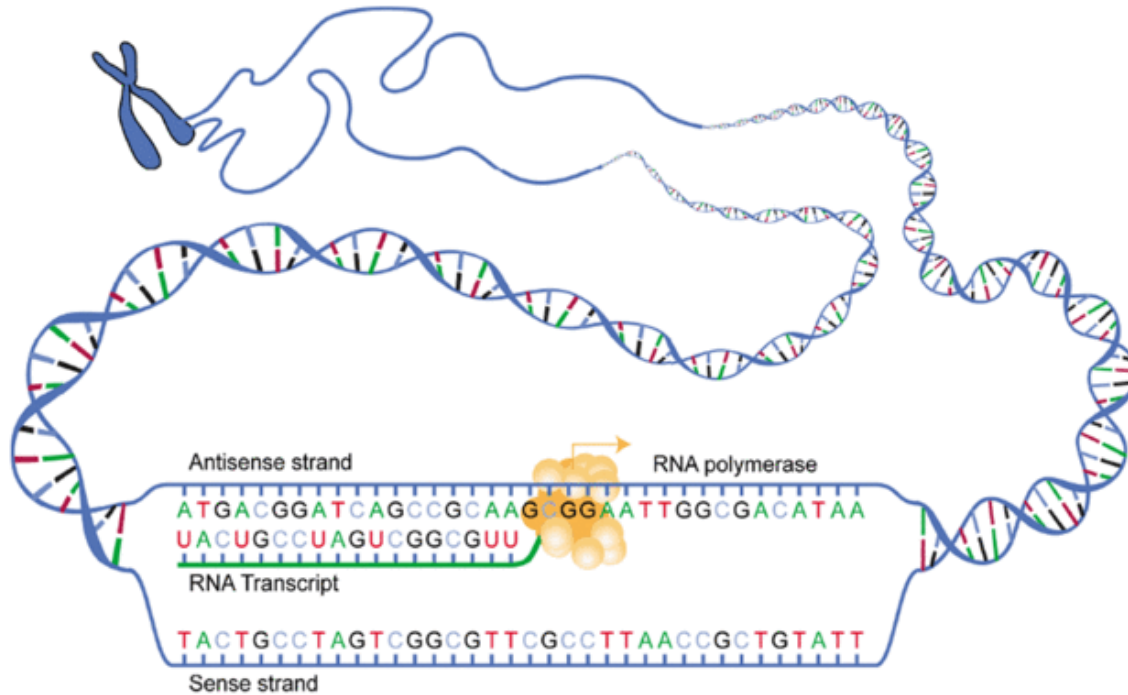


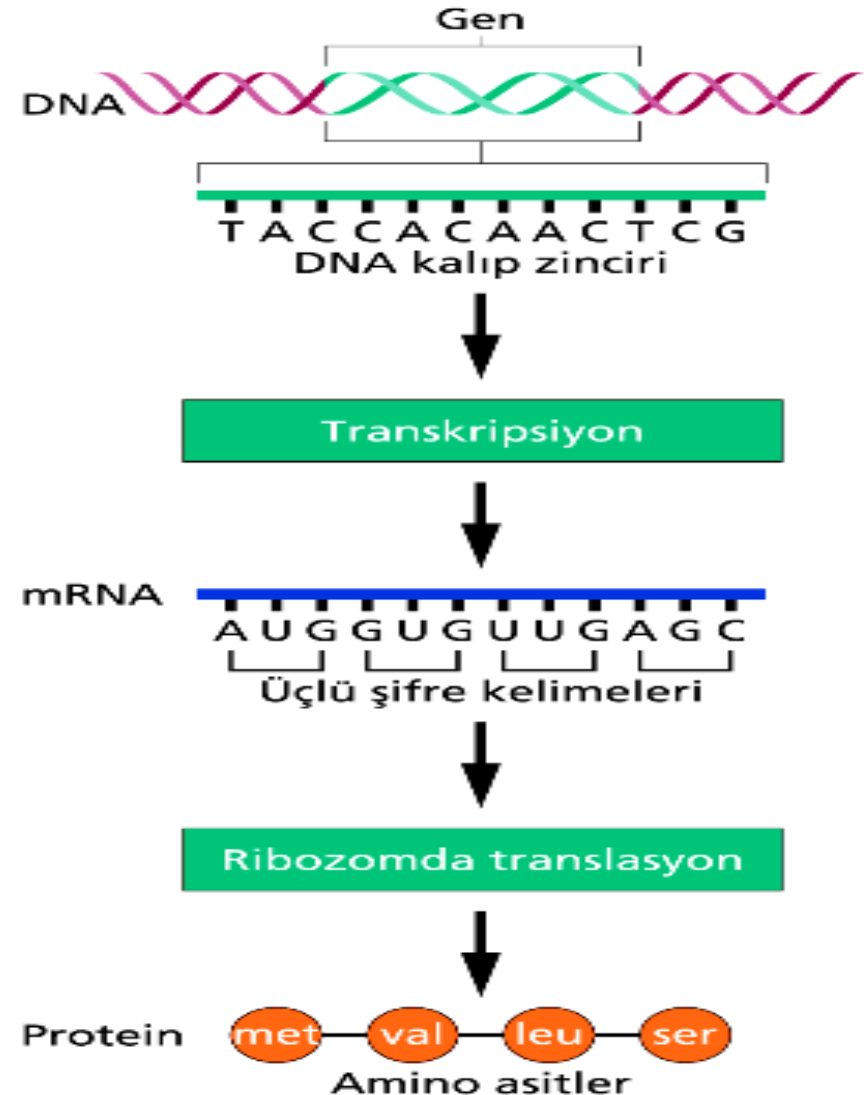
Transkripsiyon (RNA Sentezi)



Dr. Mahmut Çerkez Ergören

Transkripsiyon

- **Transkripsiyon** DNA molekülündeki bilginin RNA nükleotid dizisi haline çevrilmesi işlemidir. (DNA'dan RNA sentezlenmesi)
- Hücre içi genetik bilgi akışının (gen ekspresyonu) ilk basamağıdır.



Transkripsiyon sonucunda, ikili sarmal DNA'nın bir dizisinin karşılığı olan mRNA molekülü sentezlenir.

- Transkripsiyon, DNA çift sarmalının kısa bir bölgesinin açılması ile başlar.
- DNA ipliklerinden biri RNA sentezi için **Kalıp iplik** ödevi görür.
- DNA replikasyonundaki gibi sentezin temeli **komplementer baz eşleşmelerine** dayanır.
- Transkript her defasında bir nükleotid boyu kadar uzatılarak elongasyon (uzama) devam eder.

Replikasyon-Transkripsiyon Karşılaştırma

- Her ikisinde de sentez yönü 5-3 yönündedir.
- Replikasyon sırasında tüm kromozom kopyalanır, fakat transkripsiyonda sadece bir gen bölgesi kopyalanabilir.
- Replikasyon hücre döngüsünün S fazında gerçekleşir. Transkripsiyon düzeyi organizmanın o andaki protein ihtiyacına bağlı olarak değişir. Her dokuda aynı anda farklı genlerin transkripsiyonu olur.
- Transkripsiyon replikasyonda olduğu gibi bir primer'e ihtiyaç duymaz. Transkripsiyon için sadece bir DNA zinciri kalıp olarak iş görür.

Transkripsiyon

- RNA sentezi, RNA polimeraz enzimi tarafından katalizlenir.
- RNA polimeraz, genin başlangıcında yer alan **promotör** bölgesine bağlanınca o genin transkripsiyonu başlar.
- RNA transkripsiyonunun başladığı ilk baza **başlama noktası** adı verilir.
- RNA polimeraz **sonlandırma dizisine (terminatör)** gelinceye kadar senteze devam eder.
- Promotörden terminatöre kadar olan kalıp DNA dizisi **transkripsiyon birimi** olarak adlandırılır.
 - Bir transkripsiyon birimi birden fazla gen içerebilir.
- Başlama noktasından önceki diziler **upstream**, sonraki diziler **downstream** olarak adlandırılır.

- Başlama noktasından sonraki ilk baz: (+1)
 - Bu değer downstream'e doğru artar.
- Başlama noktasından önceki ilk baz: (-1)
 - Upstream'e doğru negatif değer olarak artar.
- Transkripsiyonda ilk oluşan ürün: **primer transkript**
 - Promotörden terminatöre kadar uzanan RNA
 - Stabil değildir. Olgun RNA'ların öncü molekülüdür.

Transkripsiyon için;

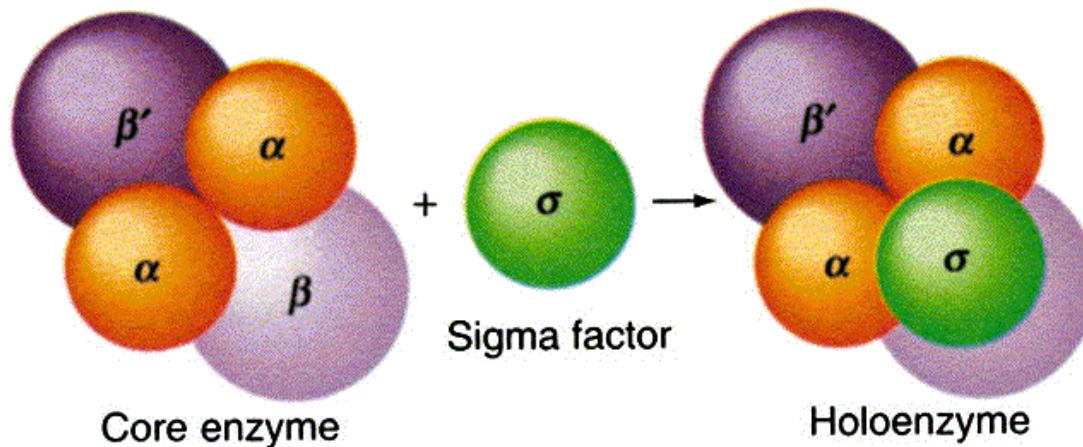
- RNA polimeraz enzimi
- DNA kalıbı (sadece bir DNA zinciri kalıp olarak iş görür)
- NTP (ATP, GTP, UTP ve CTP) (dNTP değil !!!)
- Mg^{2+}
gereklidir.

RNA Polimeraz

- DNA yı tarar ve promotör bölgeleri tespit eder.
- Promotörlere bağlanır.
- Transkripsiyonu başlatır.
- RNA zincirini uzatır.
- Transkripsiyonu sonlandırır.
- Aktivatör ve represör proteinlerle etkileşim halindedir.

Prokaryotik RNA polimeraz

- Prokaryotlarda, RNA polimeraz kompleks tek bir enzimdir. Kompleks $\alpha_2\beta\beta'$ ve promotör bölgesini tanıyan ***Sigma* (σ) faktörü** nden oluşur. ***RNA polimeraz***, sigma faktörü ile birlikte holoenzim (enzimin aktif formu) oluşturur.
- ***Sigma* (σ) faktörü** DNA üzerinde bulunan promotör bölgeyi tanıyarak RNA polimerazın DNA'ya bağlanmasını sağlar.
- β ve β' katalitik bölgelerdir ve transkripsiyon için aktif merkezi oluştururlar.



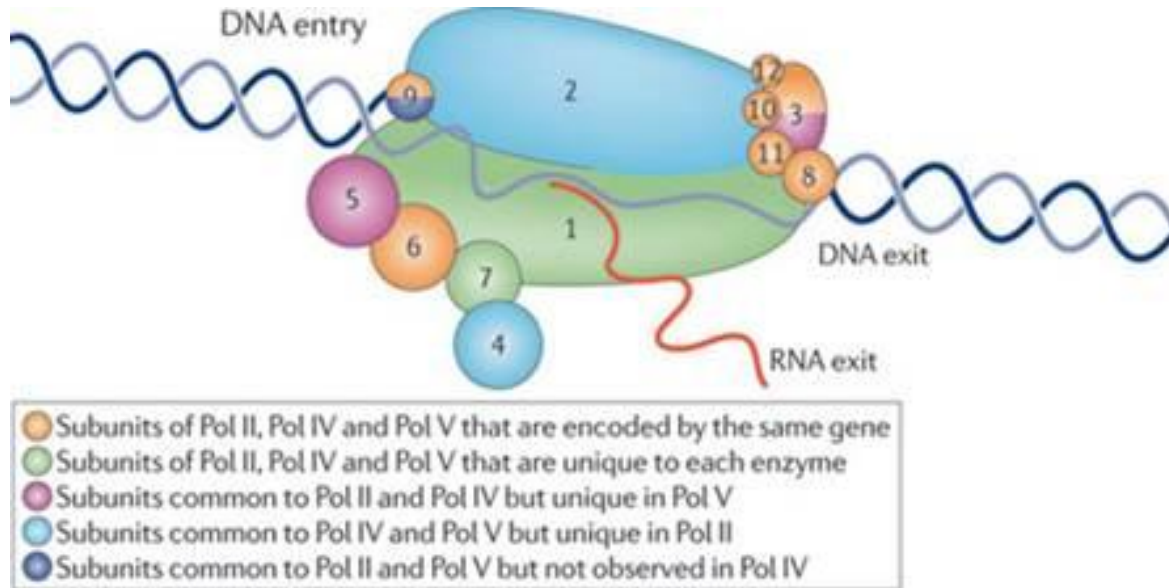
Ökaryotik RNA polimeraz

Ökaryotlarda, 3 farklı tiptedir:

RNA polimeraz I, II, III

- **RNA polimeraz I (Pol I)** tek tip RNA sentezinden (preribozomal RNA) sorumludur. Bu RNA 18 S, 5.8 S ve 28 S rRNA'lar için prekürsördür.
- **RNA polimeraz II (Pol II)**'nin temel fonksiyonu mRNA ve bazı spesifik RNA'ların sentezidir. Bu enzim binlerce farklı RNA bölgesini tanıyabilir.
- **RNA polimeraz III (Pol III)**; tRNA, 5 S rRNA ve bazı küçük özel RNA'ları sentezler.

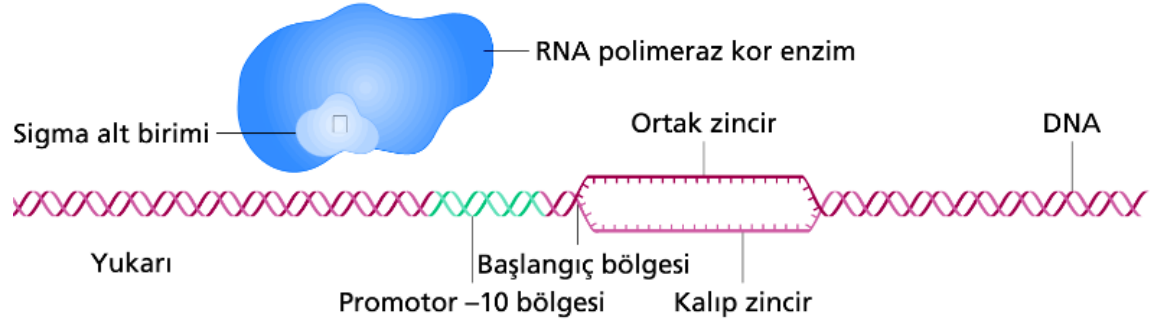
Polimeraz Türü	Ürünleri
RNA polimeraz I	5.8S, 18S, and 28S rRNA
RNA polimeraz II	Tüm protein üreten genler, snoRNA genleri ve bazı snRNA genleri
RNA polimeraz III	tRNA genleri, 5S rRNA genleri, bazı snRNA genleri ve diğer küçük RNAlar için olan genler



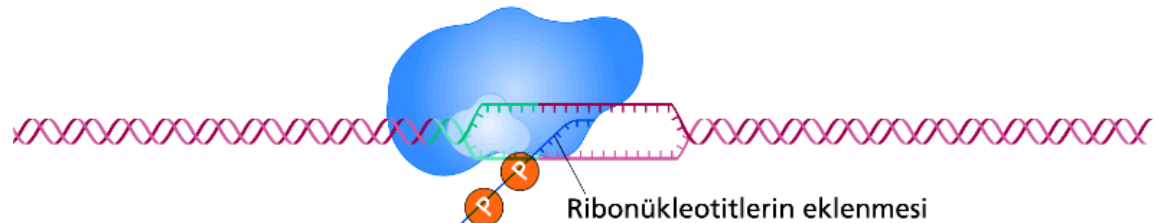
Transkripsiyon Basamakları

- Kalıba bağlanma
- Başlama
- Zincir uzaması
- Sonlanma

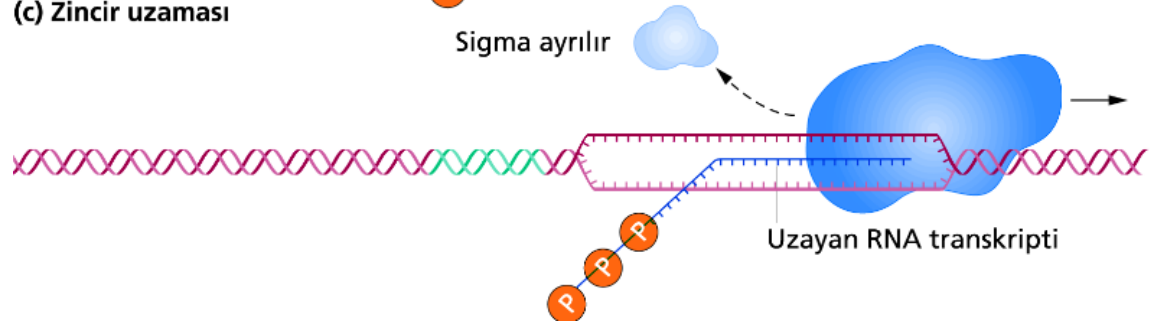
(a) Transkripsiyonun bileşenleri



(b) Kalıba bağlanma ve transkripsiyonun başlaması



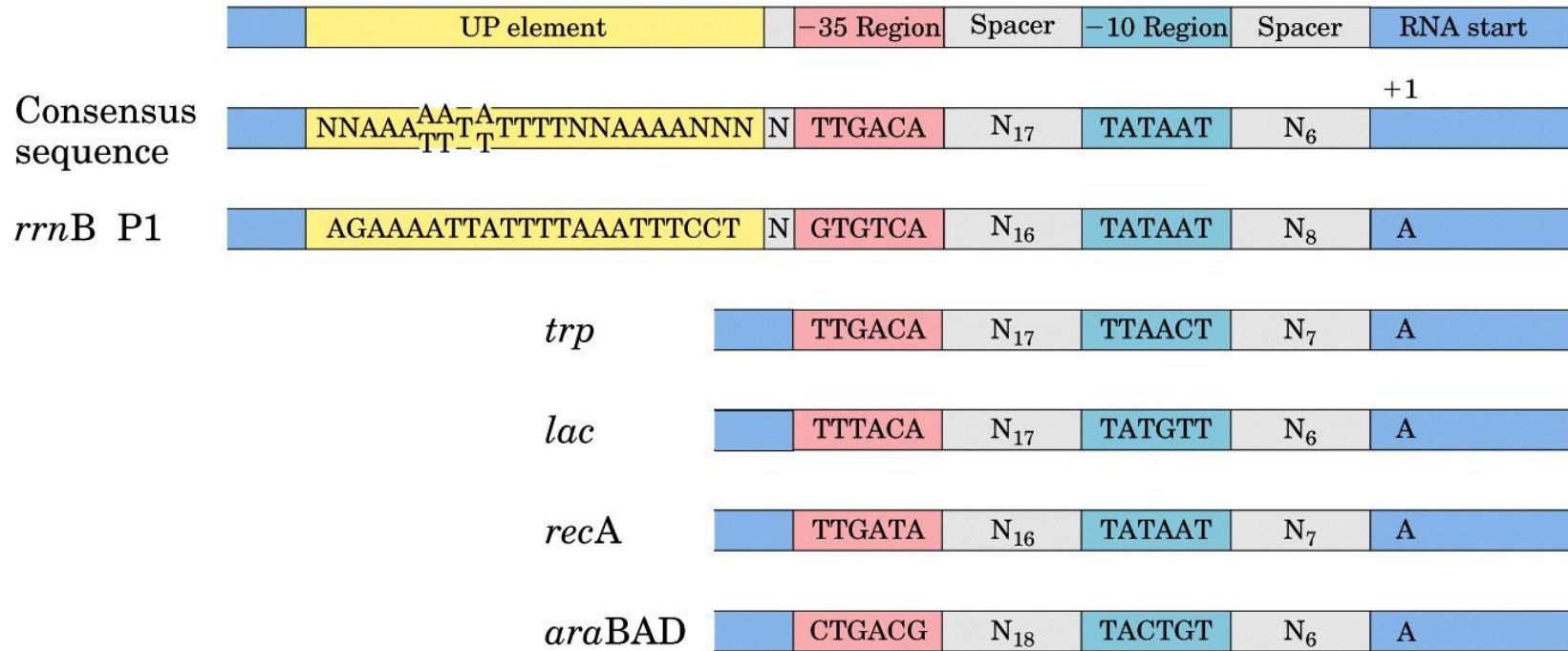
(c) Zincir uzaması



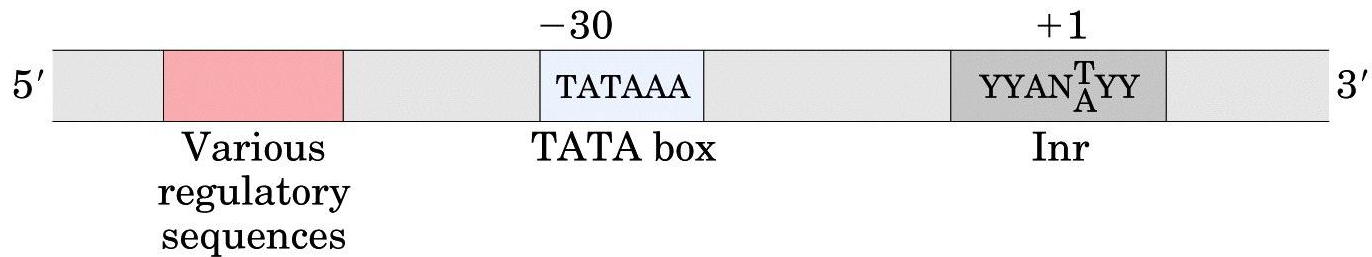
Kalıba bağlanma

- Kalıba bağlanma, RNA polimerazın DNA'daki promotör dizisine bağlanması ile gerçekleşir.
- Promotor, RNA polimerazın transkripsiyonu başlatmak üzere DNA'ya bağlandığı özel bölgelerdir.
- Promotorlarda, türler arasında korunmuş konsensüs diziler vardır.
- Bakteriyel promotorlarda -10 ve -35 olmak üzere iki konsensüs dizi bulunmuştur.
- Ökaryotik promotorlarda da -10 dizisine benzer konsensüs diziler bulunmuştur (**TATA kutusu**).
- Farklı sigma alt birimleri, farklı promotorlara bağlanarak transkripsiyon özgülüğü sağlar.

Prokaryotik promotor



Ökaryotik promotor



- RNA sentezi bir transkripsiyon kabarcığı (bubble) içinde gerçekleşir.
- Bu kabarcıkta DNA sarmalı geçici olarak dallarına ayrılır ve bu dallardan birisi kalıp olarak kullanılır.

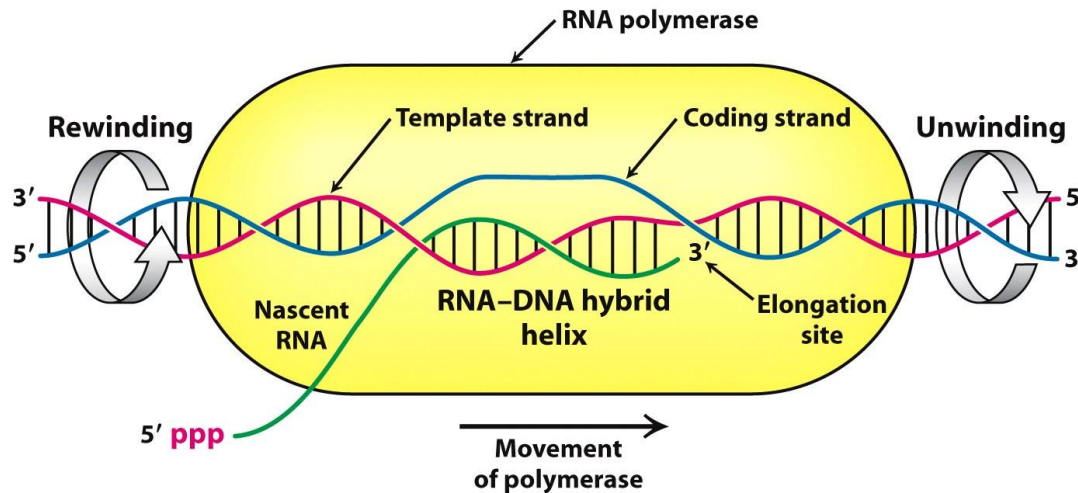
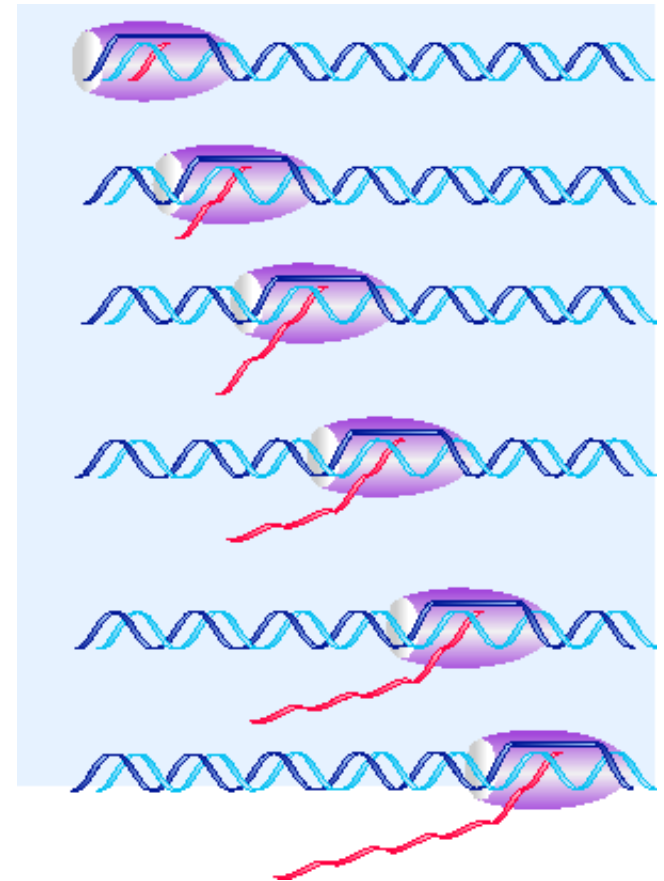


Figure 29.13
Biochemistry, Seventh Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company

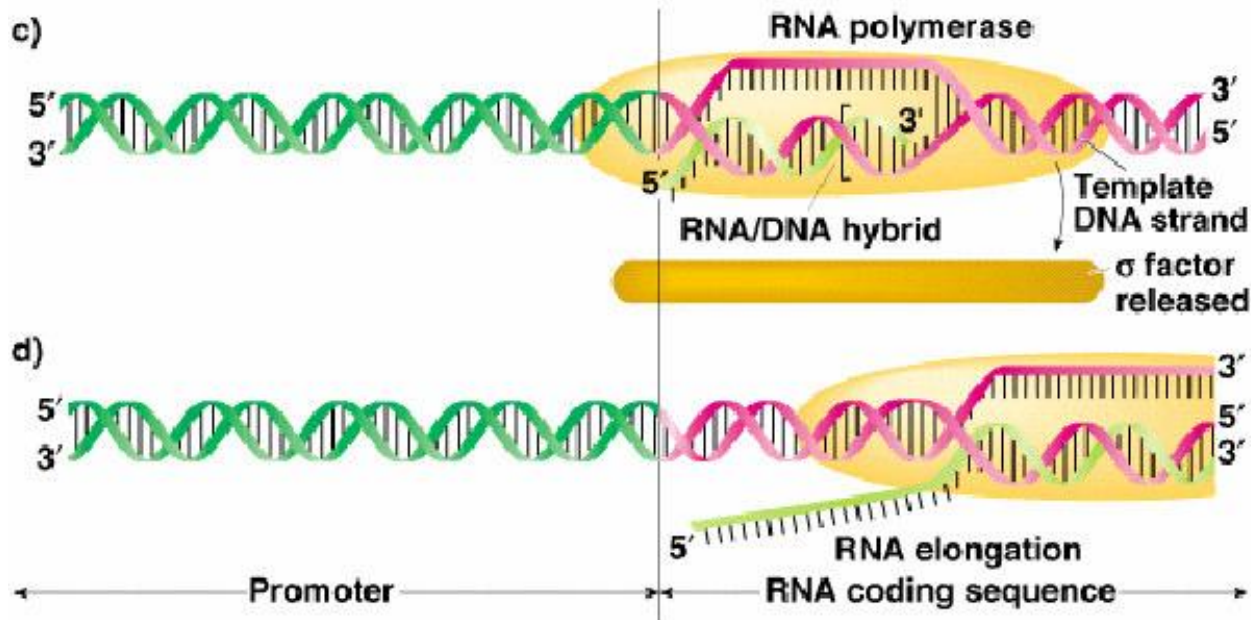


Uzama

- Holoenzimin bir kez promotor bölgeyi tanıyıp bağlanmasından sonra transkripsiyona başlar ve sigma alt birimi enzimden ayrılır.
- RNA polimeraz, DNA polimeraz gibi bir primere gereksinim göstermez. Ayrıca RNA polimerazın endo ve ekzonükleaz aktivitesi yoktur. Bu nedenle DNA polimeraz gibi hataları onarmaz.

Uzama

- DNA sarmalı hızlı şekilde çözülür ve enzim bölgedeki sentezi tamamlayınca hemen sarmal eski haline çevrilir.
- Yeni RNA zinciri kısmı olarak DNA-RNA hibridi şeklindedir, fakat büyük kısmı tek zincirli serbest formdadır.



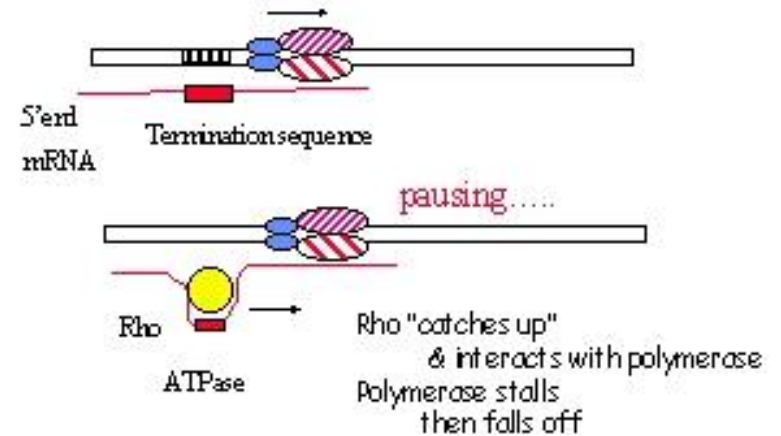
Sonlanma

- Uzama işlemi sonlanma sinyaline kadar devam eder.
- Prokaryotlarda terminasyon dizileri iki tiptir:
 - Rho faktörü bağımsız
 - Rho faktörü bağımlı

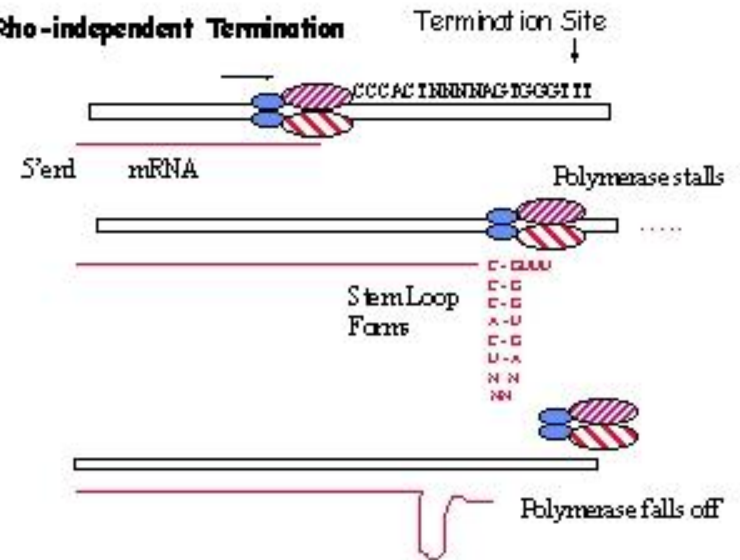
Sonlanma

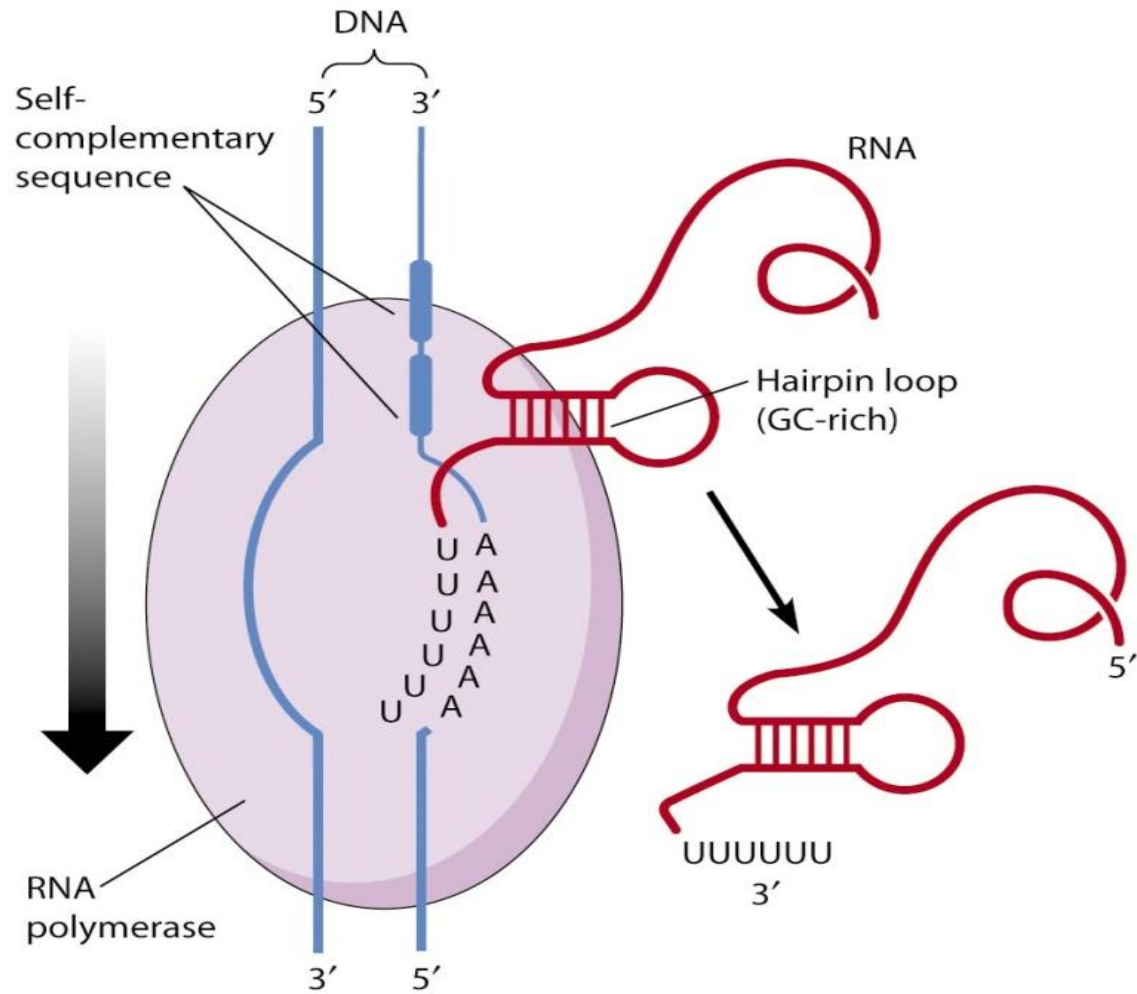
- **Rho-faktörü bağımsız:** Palindromik bir bölgenin okunması sonucunda oluşan RNA tekrar dizilerinin kendi kendisiyle baz eşleşmesi yapmasıyla saç tokası gibi bir şekil oluşur. Bu yapı GC'den zengindir ve uçta kalan U'den zengin bölgedeki zayıf bağlar nedeniyle DNA-RNA hibridi kararsız hale gelir ve sentez sonlandırılır.
- **Rho-faktörü bağımlı:** GC zengin saç tokası yapısı oluşmadığı durumlarda rho proteini sentezi sonlandırır.

Rho-dependent Termination



Rho-independent Termination



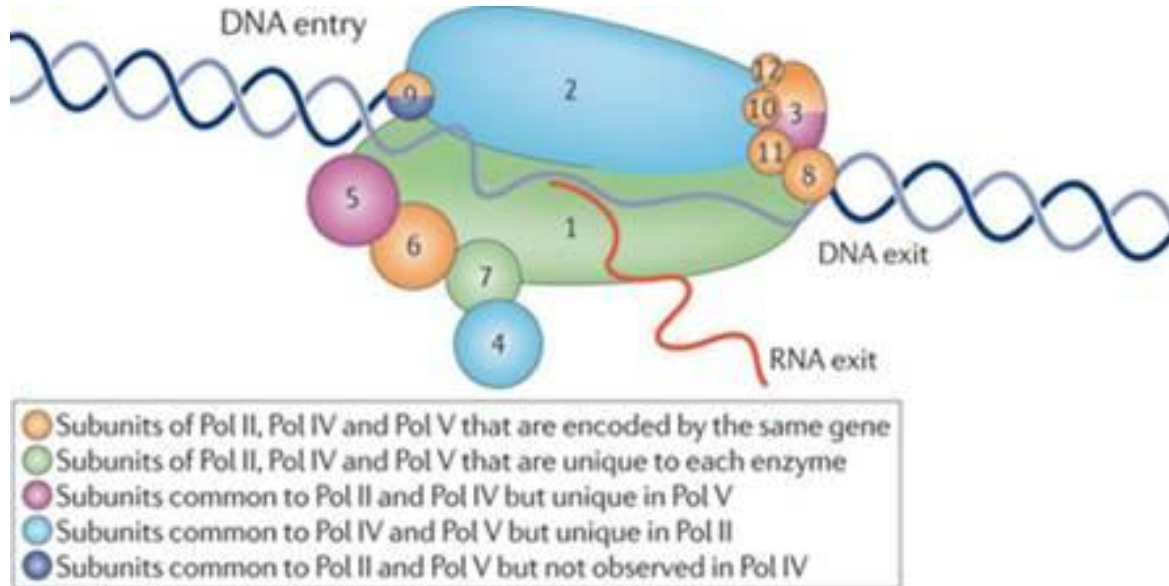


Ökaryotlarda Transkripsiyon

Prokaryotlardaki transkripsiyona benzer, ancak daha komplikedir.

- Ökaryotlarda transkripsiyon çekirdekte, translasyon sitoplazmada birbirinden tamamen ayrı olarak gerçekleşir.
- Transkripsiyonda 3 farklı RNA polimeraz görev alır. Her biri farklı bir RNA sınıfını sentezler.

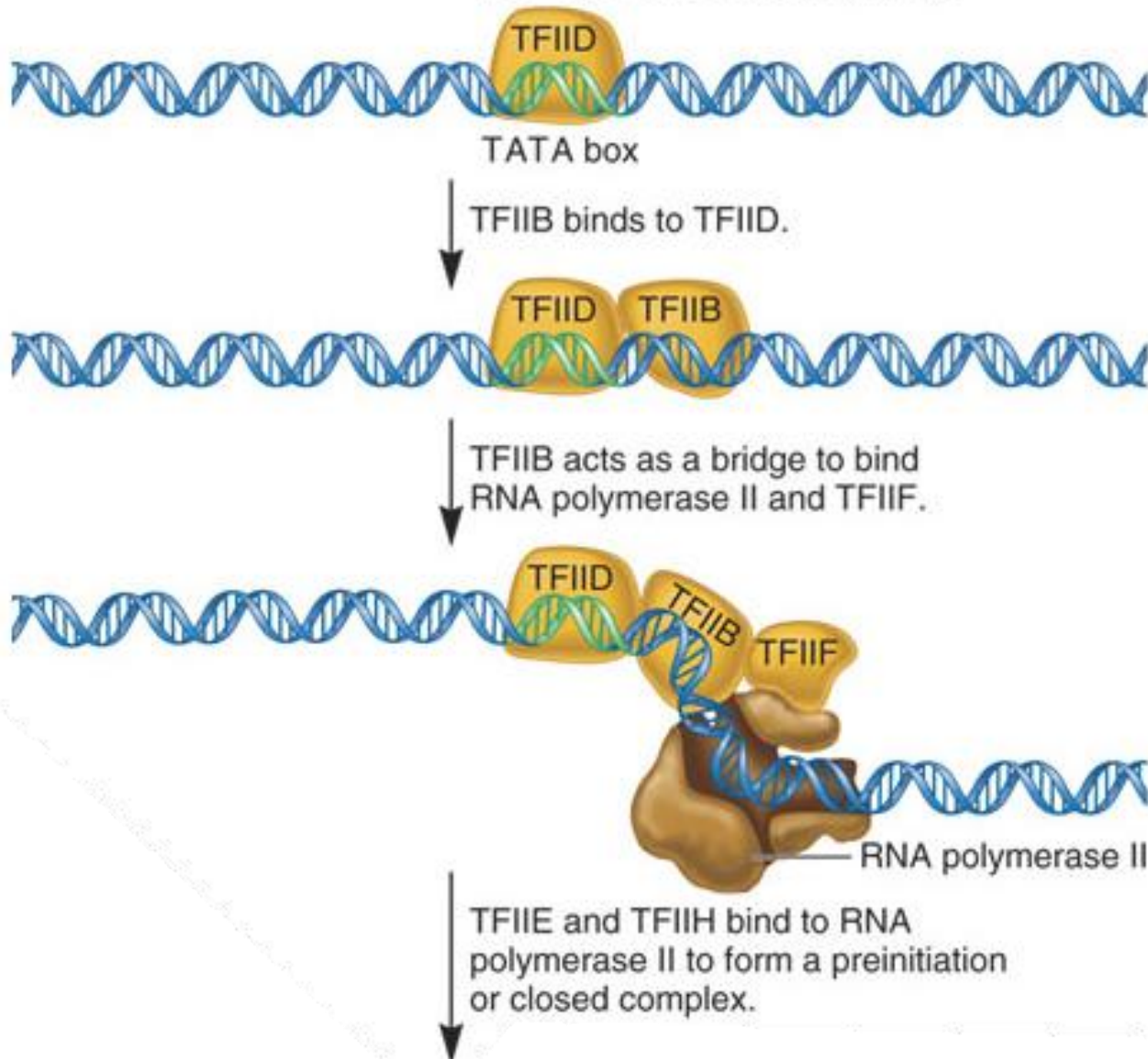
Polimeraz Türü	Ürünleri
RNA polimeraz I	5.8S, 18S, and 28S rRNA
RNA polimeraz II	Tüm protein üreten genler, snoRNA genleri ve bazı snRNA genleri
RNA polimeraz III	tRNA genleri, 5S rRNA genleri, bazı snRNA genleri ve diğer küçük RNAlar için olan genler

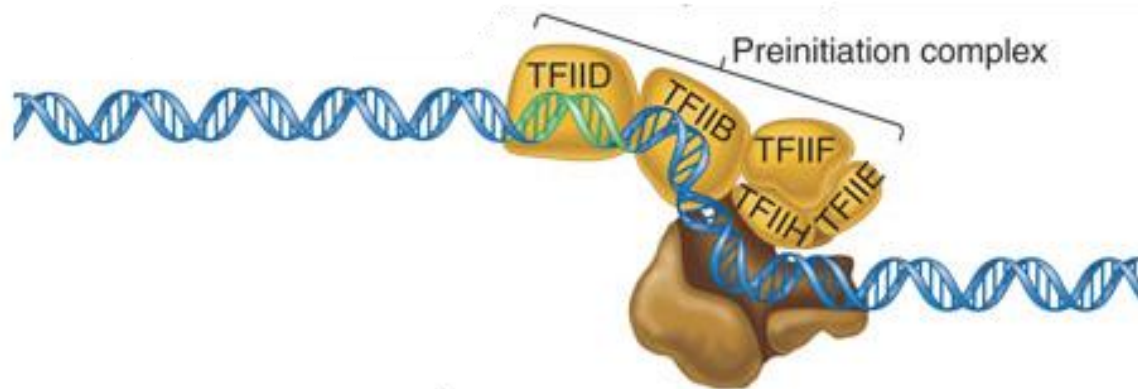


Ökaryotlarda Transkripsiyon

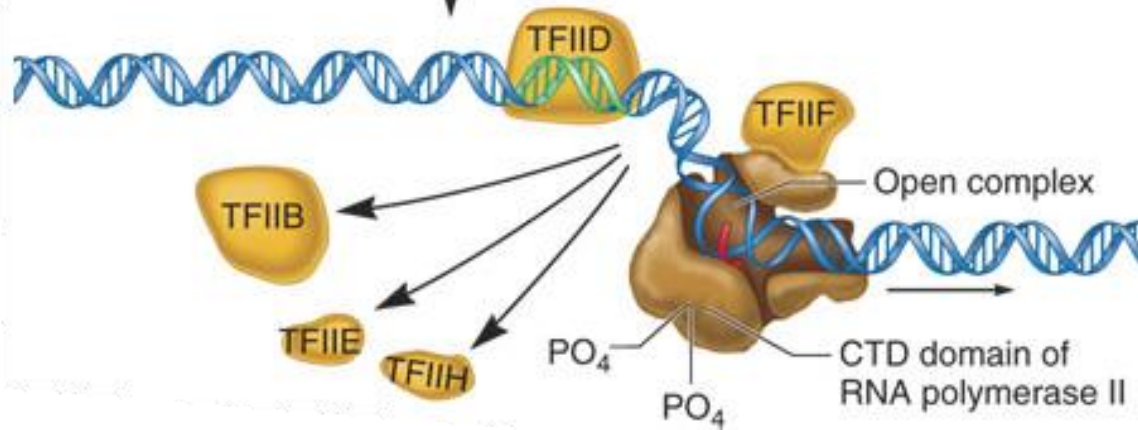
- Ökaryotlardaki promotörler farklı ve daha değişkendir.
- Yapısal genlerin promotörlerinde farklı özel bölgeler mevcuttur.
 - Regulator elemanlar
 - TATA kutusu (genlerimizin ~%20'sinde) ve TATA-promotörlerinde aynı fonksiyona sahip diğer kısa diziler)
 - Transkripsiyon başlama bölgesi
- RNA polimerazların DNA'ya bağlanması için transkripsiyon faktörü adı verilen bazı proteinlerin katılımı gereklidir. Ökaryotlarda transkripsiyonun spesifikliğini belirleyen transkripsiyon faktörleridir.

TFIID binds to the TATA box. TFIID is a complex of proteins that includes the TATA-binding protein (TBP) and several TBP-associated factors (TAFs).

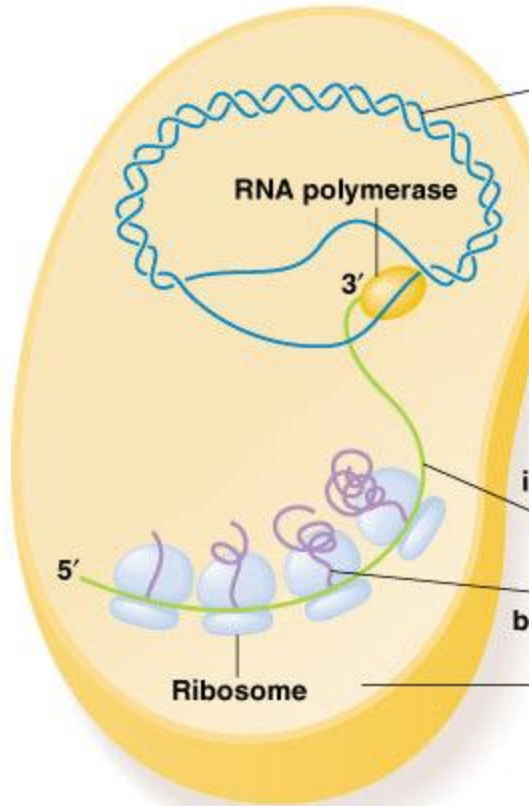




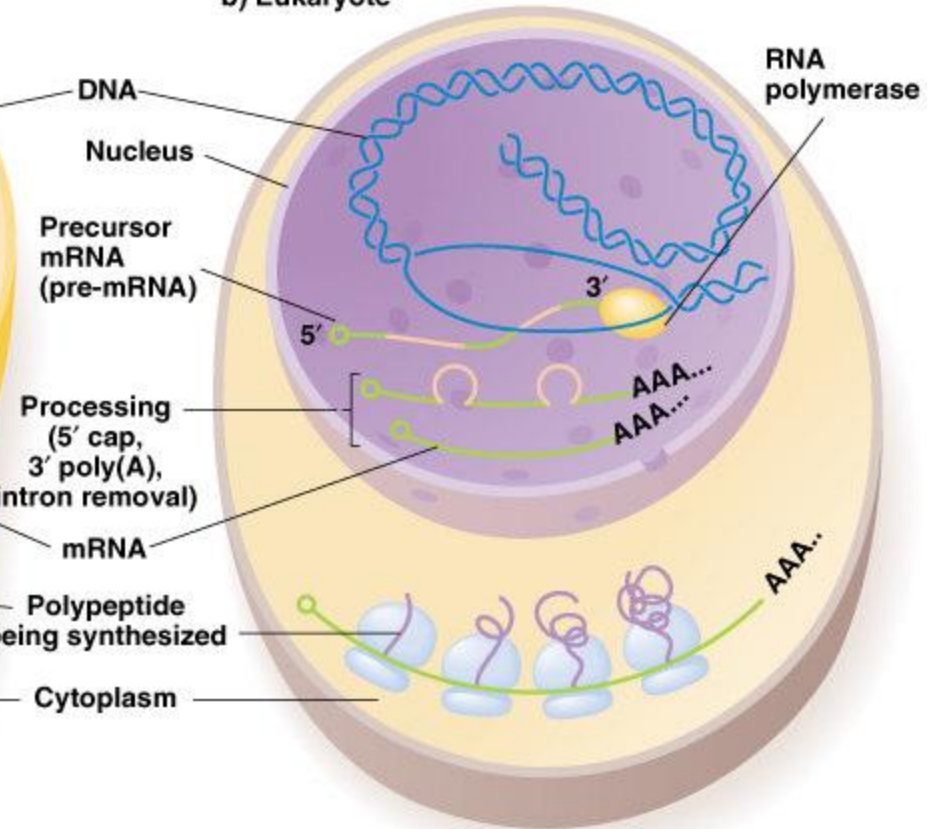
TFIIH acts as a helicase to form an open complex. TFIIH also phosphorylates the CTD domain of RNA polymerase II. CTD phosphorylation breaks the contact between TFIIB and RNA polymerase II. TFIIB, TFIIIE, and TFIIH are released.



a) Prokaryote



b) Eukaryote



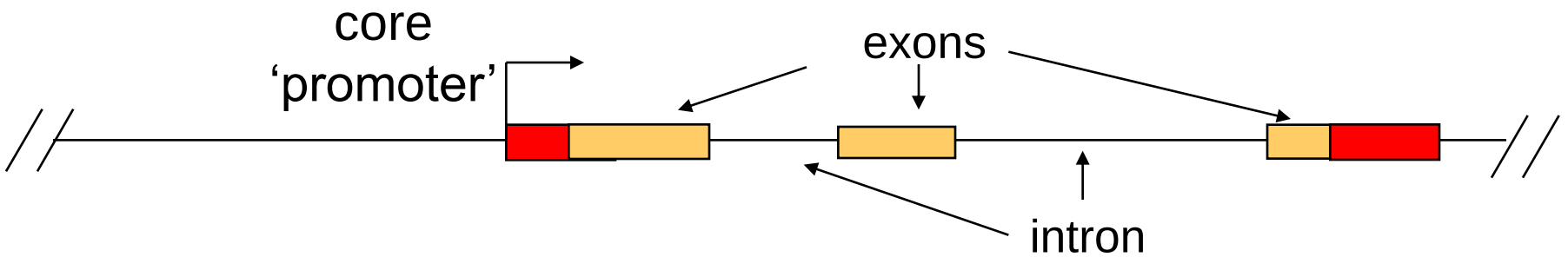
Ökaryotlarda Transkripsiyon

- Sentezlenen ilk RNA kopyası, olgun ökaryotik mRNA'ya dönüşmek için bir dizi işleme basamağından geçer.
- Prokaryotik mRNA'lar mRNA modifikasyona uğramadan translasyonda kullanılır.
 - Prokaryotlar nükleus içermediğinden, mRNA transkripsiyon tamamlanmadan ribozomlara bağlanarak aynı anda translasyona da katılır.
- Prokaryotlarda mRNA'lar **polisistronik** yapıdadır: Birbirine bitişik bir seri gen birlikte transkribe edilir.
- Ökaryotlarda her bir transkripsiyon birimi sadece bir gene ait bilgiyi taşır: **monosistronik**.

prokaryot



- *ökaryot*



Transkripsiyon Sonrası Modifikasyonlar

RNA'nın Transkripsiyon Sonrası Modifikasyonu

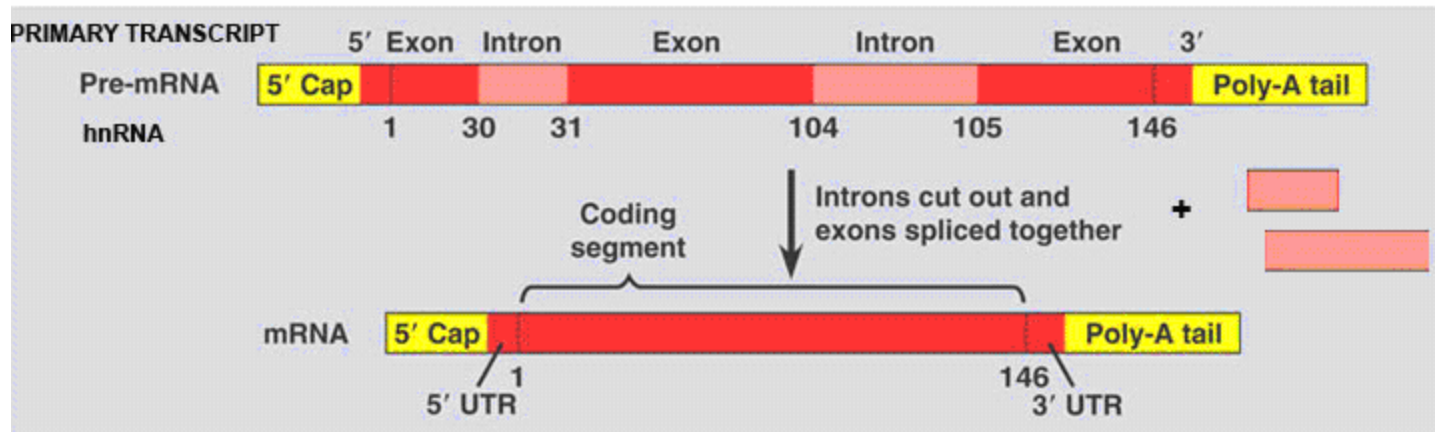
- Transkripsiyon sonunda oluşan RNA'lar primer RNA'lar diye adlandırılırlar ve genellikle hemen kullanılmazlar; *RNA işlenmesi* diye tanımlanan bazı işlemlerden geçtikten sonra işlev görebilecek olgun RNA'lar haline gelirler

mRNA İşlenmesi

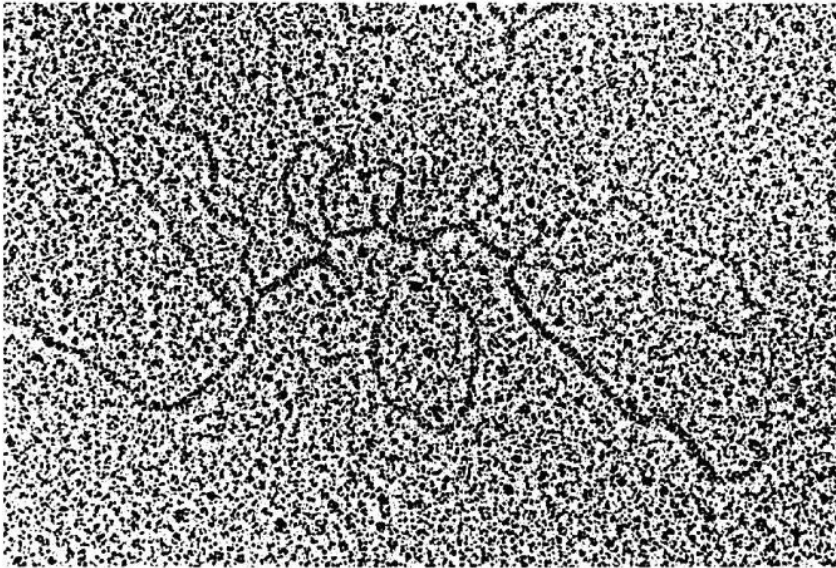
- Primer mRNA transkripti heterojen nüklear RNA (hn mRNA) adını alır. Hn mRNA RNA polimeraz II tarafından sentezlenir ve ökaryotlarda translasyondan önce bazı modifikasyonlara uğrar:
 - Eksonların uzaklaştırılıp, intronların birleştirilmesi
 - 5' ucuna başlık takılması (7 metil guanozin)
 - 3' ucuna Poly A kuyruğu eklenmesi

İntronların çıkarılması

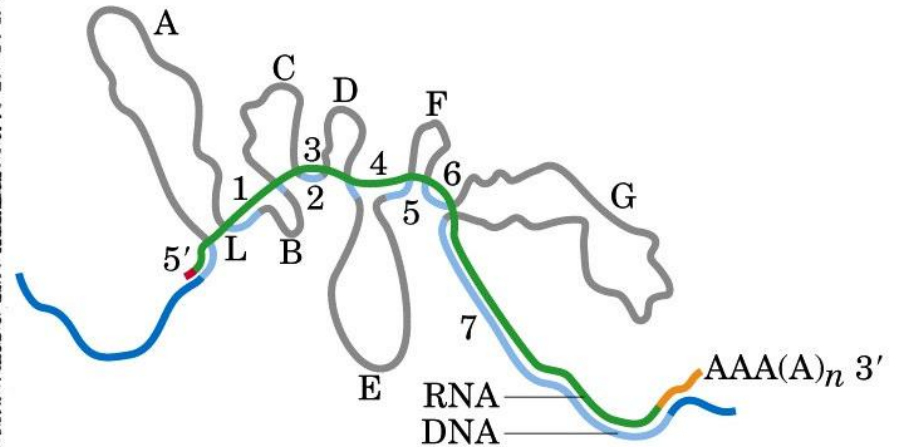
- Ökaryotik öncü (pre) mRNA'lar genellikle intron içerirler (ve bazı virüsler).
 - **Intron** = ekzon bölgeleri arasında kalan kodlamayan DNA dizileri,
 - **Ekson** = a.a kodlayan DNA dizileridir.



- RNA-DNA hibridizasyonu ile tavuk ovalbumin genindeki kodlayıcı olmayan dizelerin gösterilmesi



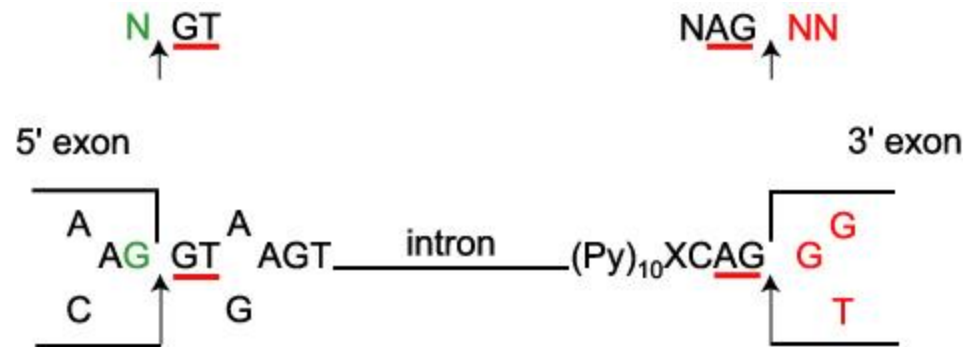
(a)



(b)

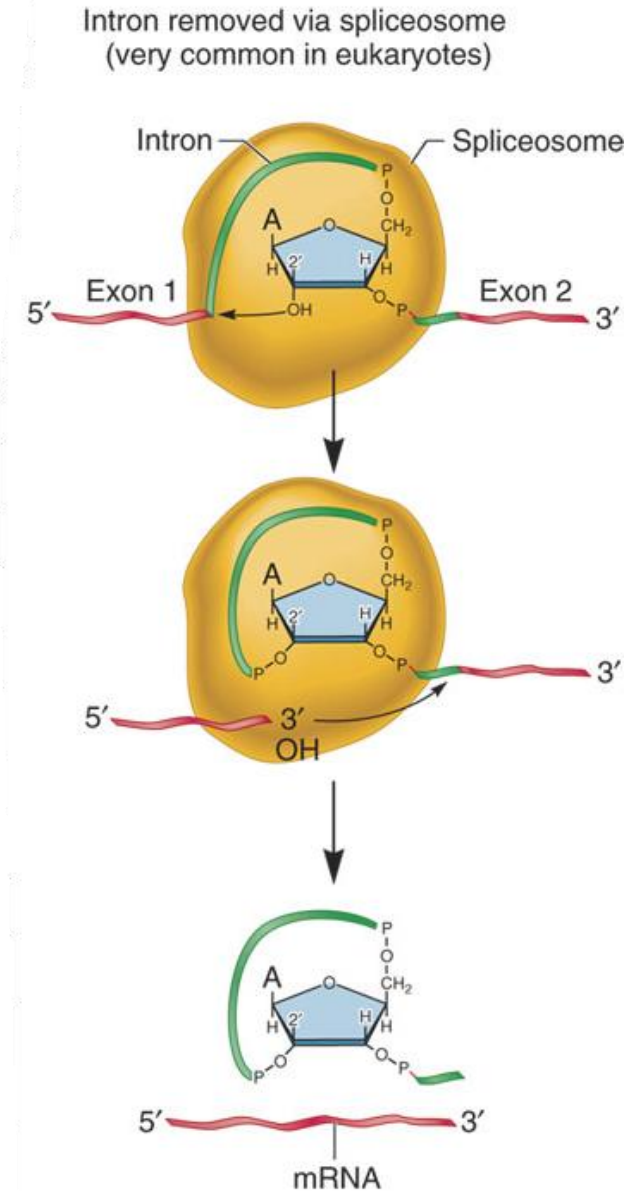
- Öncü mRNA yapısındaki, proteine dönüşmeyecek bölgeler (intronlar) çıkartılarak proteine dönüşecek bölgeler (eksonlar) birleştirilir. Bu işleme **splicing (kesip birleştirme)** denir.
- Splicing ökaryotlarda görünen bir özelliktir.
- Bazen bakterilerde de görülebilir.

- İntron-ekson sınırlarında korunmuş kısa diziler tanımlanmıştır. Bu diziler splicing için tanıma bölgelerini oluştururlar.
- Tüm intronlar 5'-GT(U) dizisi ile başlar ve AG-3' dizisi ile biter.(Splicing için anahtar dizi) (GT-AG kuralı)



RNA işlenmesi

- Splicing işlemi, çok bileşenli bir yapı olan **spliceosome** tarafından gerçekleştirilir.
- Spliceosome büyük bir komplekstir ve öncü mRNA'yı kesip birleştirir.
- SnRNP (**s**mall **n**uclear **r**ibonucleo**p**rotein) alt birimlerinden oluşur.
 - U1,U2,U4,U5,U6

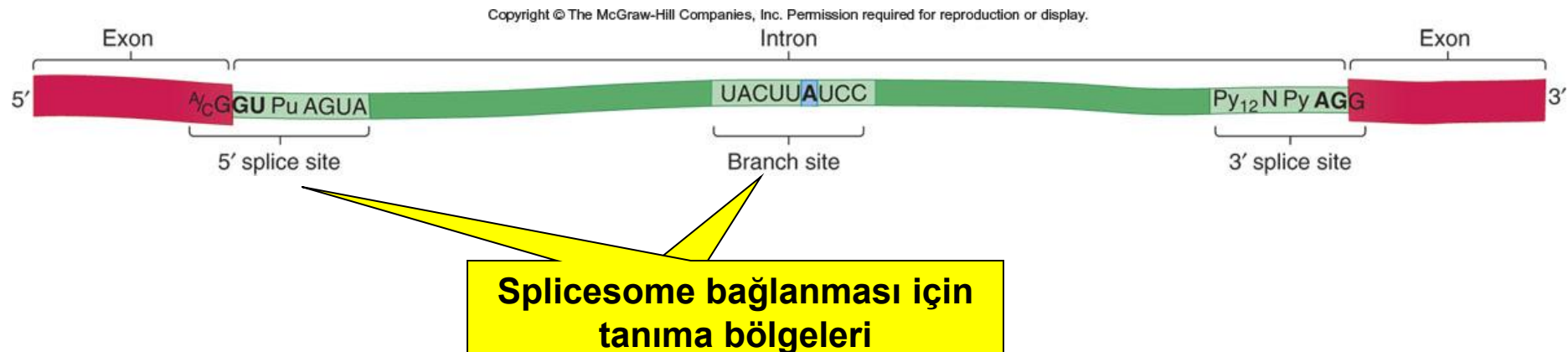


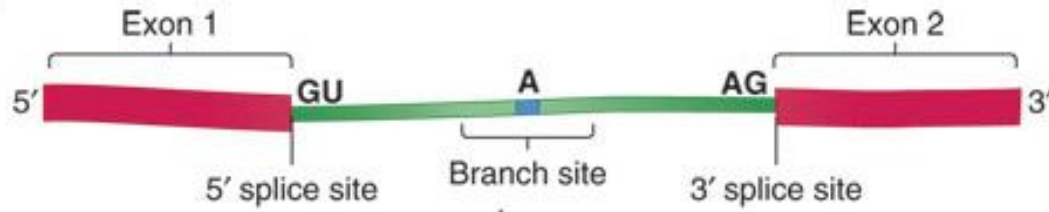
(c) Pre-mRNA

Splicesome alt ünitelerinin görevleri

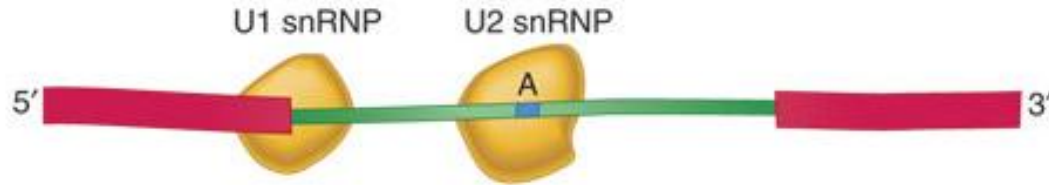
- İntron dizisine bağlanır ve intron-ekson sınırlarını tanır.
- Öncü mRNA'nın yapısını korur.
- İntronların çıkarılması ve eksonların birleştirilmesindeki kimyasal reaksiyonları katalizler.

- Splicesome bağlanması için tanıma bölgeleri:
 - 5' kesim bölgesi
 - Dallanma noktası (branch point)

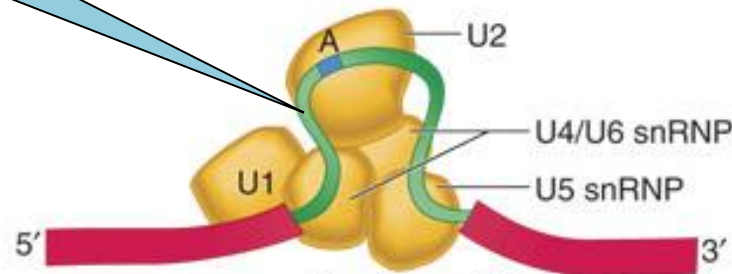




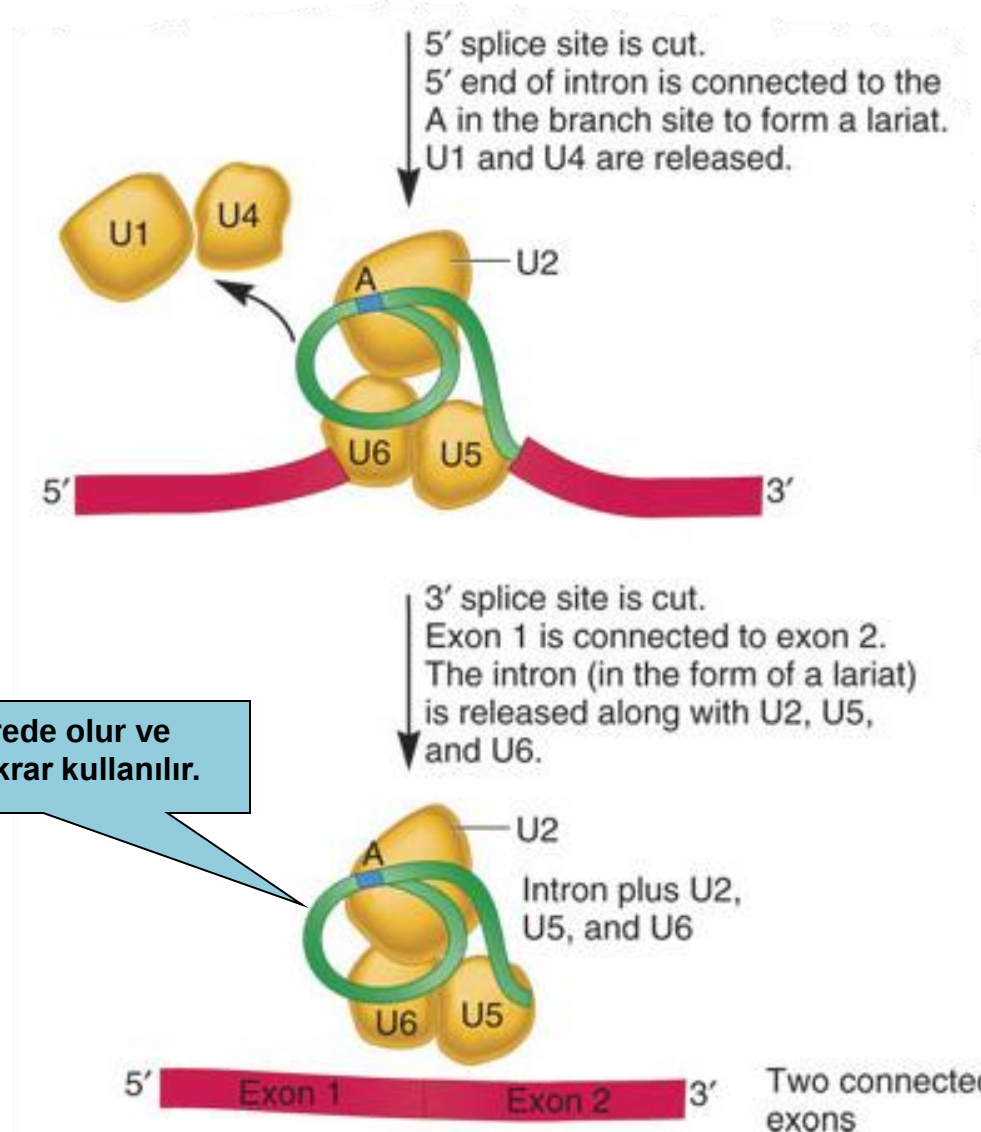
U1 binds to 5' splice site.
U2 binds to branch site.



U4/U6 and U5 trimer binds



İntron ilmeği çıkarılır ve
eksonlar birbirine
yaklaştırılır.



İntron degrede olur ve
snRNPlar tekrar kullanılır.

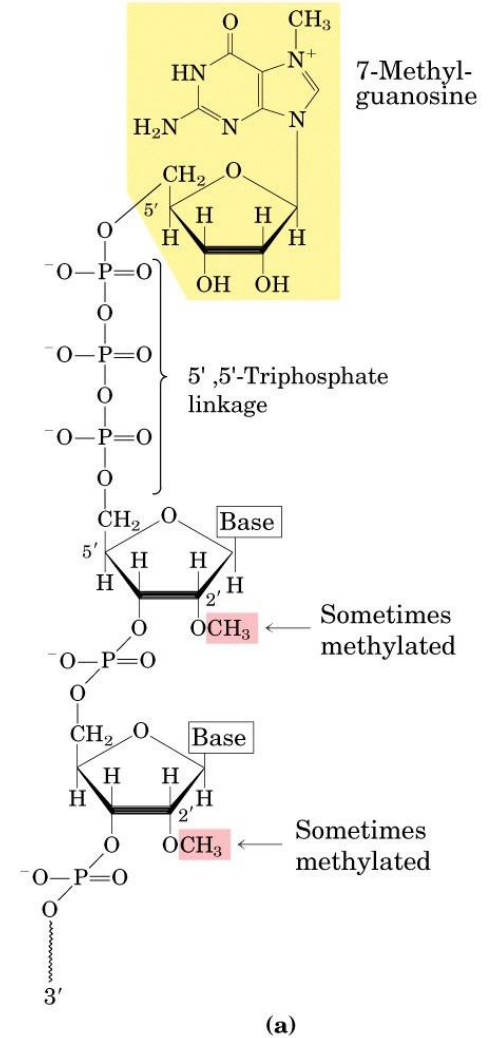
İntronların Sağladığı Avantaj

➤ Alternatif splicing

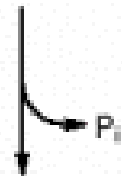
- Çok intronlu bir öncü mRNA, farklı yollardan splicing geçirebilir.
 - Bu, farklı kombinasyonlara sahip olgun mRNA'lar oluşmasına neden olur.
- Bu splicing çeşitliliği farklı hücre tiplerinde veya gelişimin farklı evrelerinde meydana gelebilir.
- **Alternative splicing**'in biyolojik avantajı tek bir genden iki (veya daha fazla) polipeptidin sentezlenebilmesidir.
- Bu da organizmaya genomunda daha az gen taşıma avantajı sağlar.

5' ucuna başlık takılması

- 20-30 nükleotidlik mRNA sentezinden sonra, mRNA'nın 5'- ucuna 7-metilguanozin 5'->5' trifosfat bağı ile eklenir.
- Bu yapı mRNA'nın ribozomlara bağlanmasında önemli role sahiptir.
- Başlık oluşumu protein sentezinin başlamasına yardımcı olur.
- Translasyonu hızlandırır. Başlığı olmayan ökaryotik m-RNA ların translasyonu verimli olmaz.



5' end of nascent RNA transcript



add methyl
group to base



add methyl
group to ribose
(only on some caps)

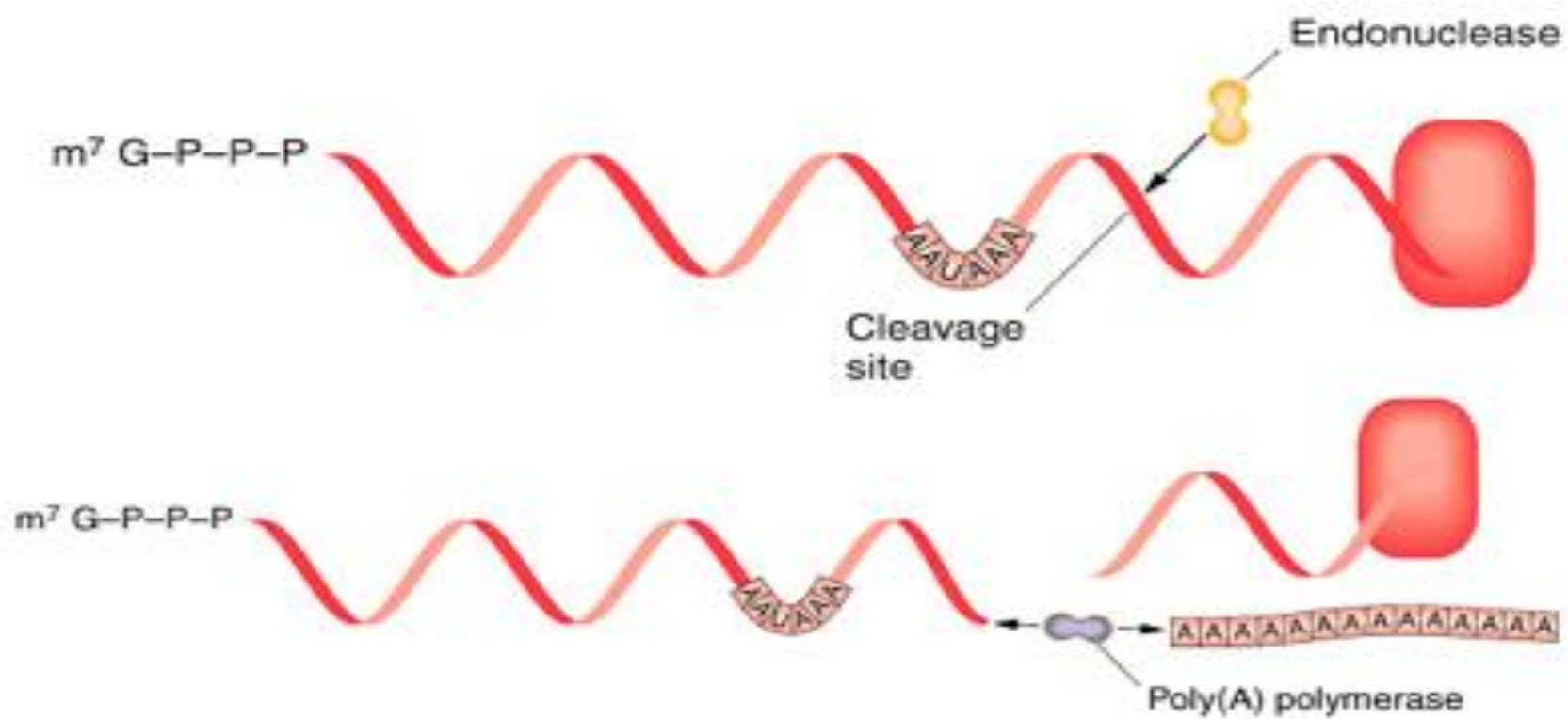


5' ucuna başlık takılması neden gereklidir?

- mRNA'nın 5'ucunu ribonükleaz aktivitesinden korur.
- mRNA'nın nükleustan transportuna yardım eder.
- mRNA'nın translasyonu başlatmak üzere ribozoma bağlanmasında görev alır.

mRNA'nın 3' ucuna poli A kuyruğu eklenmesi

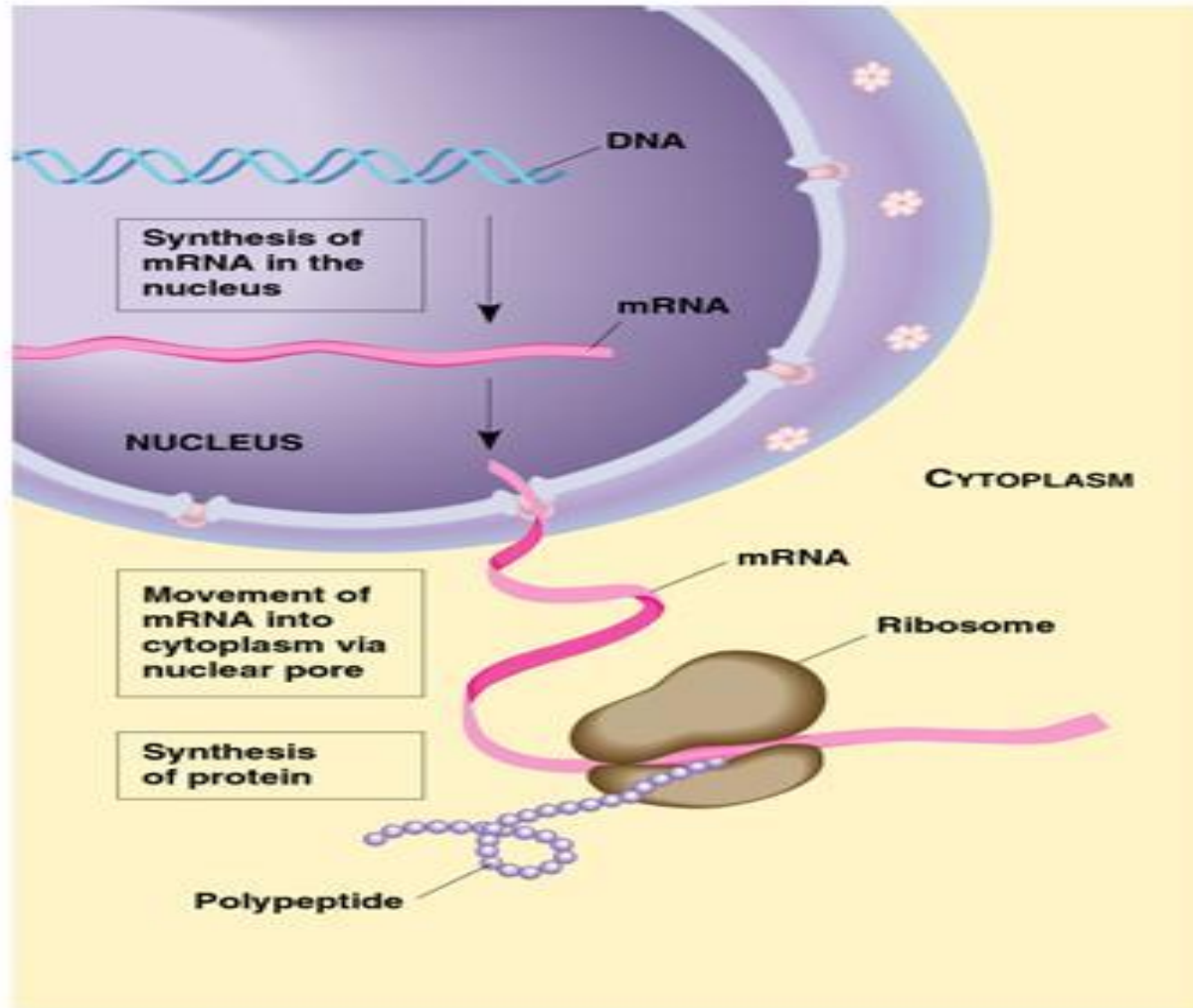
- Primer transkript içinde AAUAAA dizisi kesilerek serbest 3' OH ucuna **Poli A polimeraz** enzimi tarafından poli A kuyruğu eklenir
- 50-250 Adenin nükleotidi içerir.
- Bu yapı transkripsiyon sonlanması ve mRNA kararlılığı için esastır.
- mRNA dayanıklılığını ve çekirdekten çıkış hızını arttırır. Sitoplazmada zamanla kısalır.

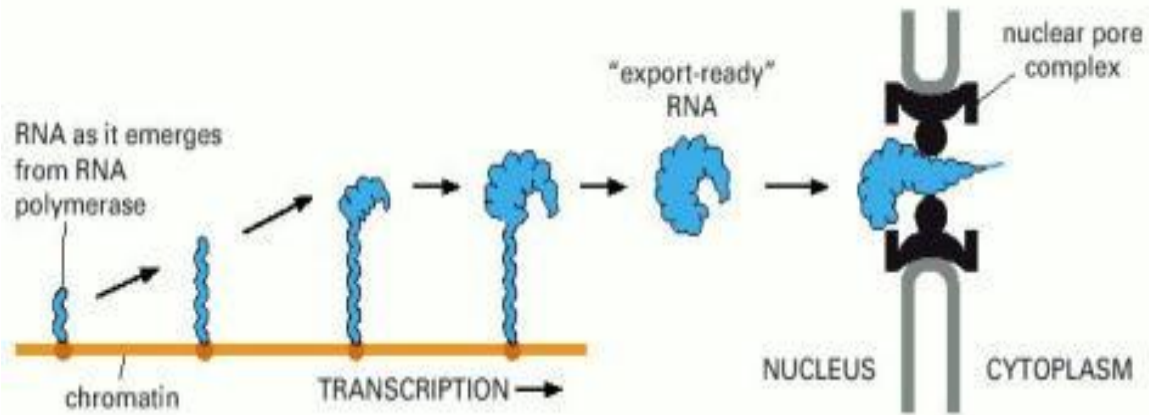


3'ucunun poliadenilasyonu neden gereklidir?

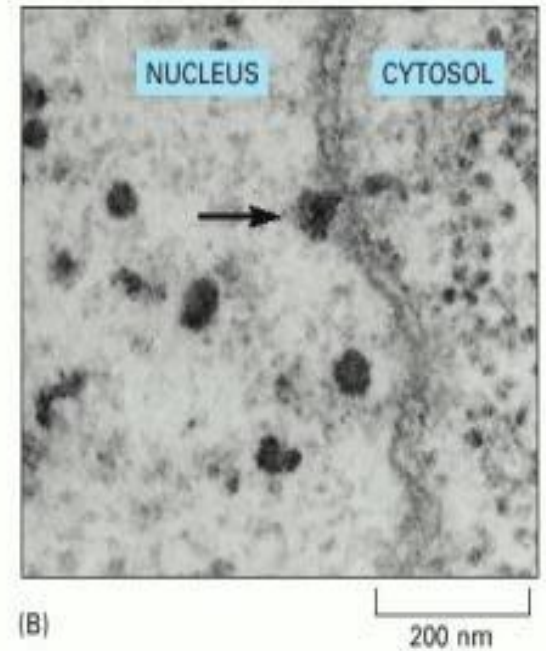
- Poli A kuyruğu 3'ucunu enzimatik degradasyondan korur.
- Kuyruk bir veya daha fazla spesifik proteine bağlanma bölgesi olarak görev yapar.
- Gelişimde önemli rolü vardır. Bu dönemde poli A uzunluğu translasyonu kontrol eder.

İşlenmesinin ardından olgun mRNA nüklear porlardan geçerek sitoplazmaya gider ve protein sentezine başlar.





(A)



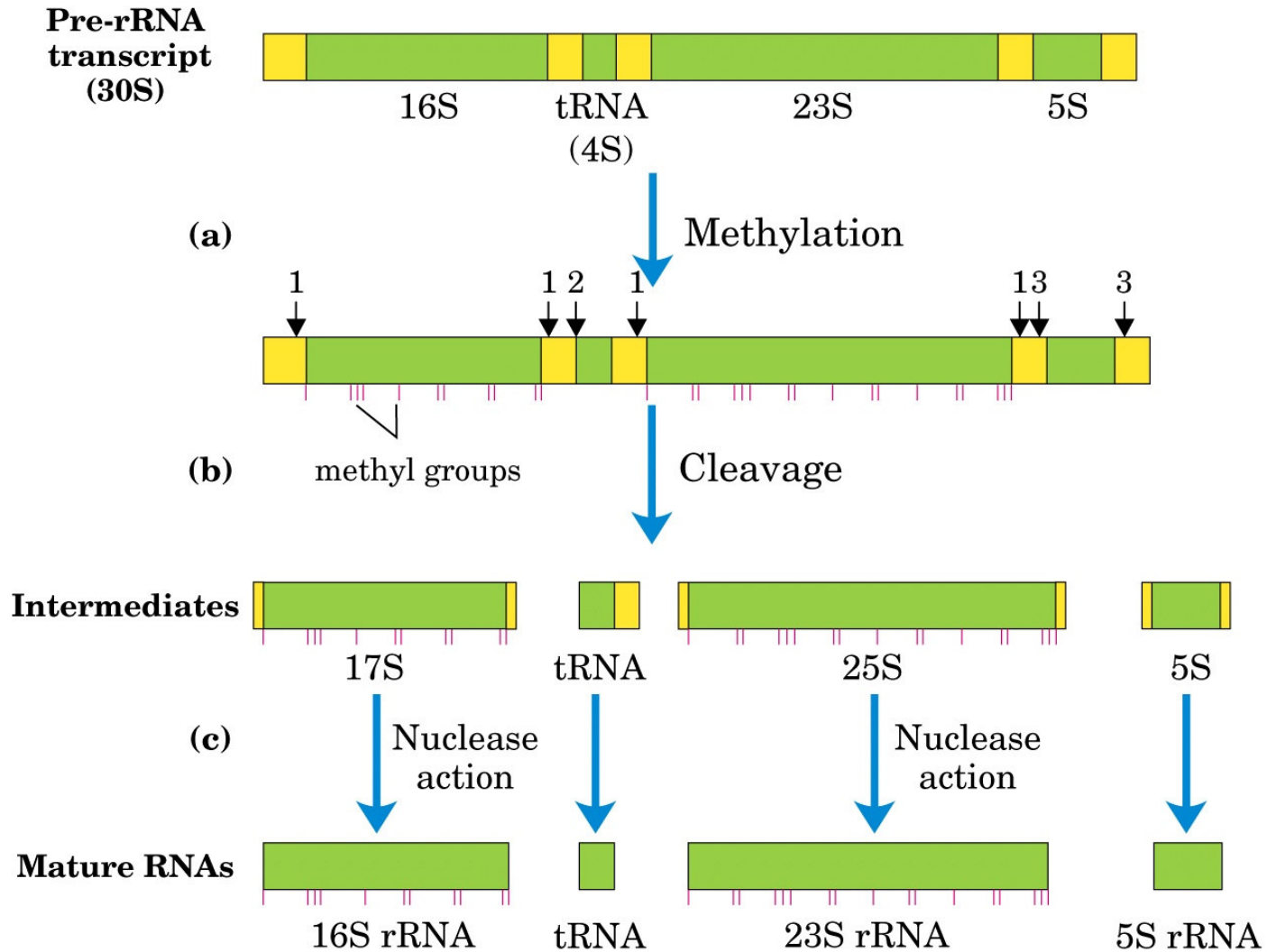
(B)

- **Ribozomal RNA ve tRNA'lar da işlenirler.**

Ribozomal RNA işlenmesi

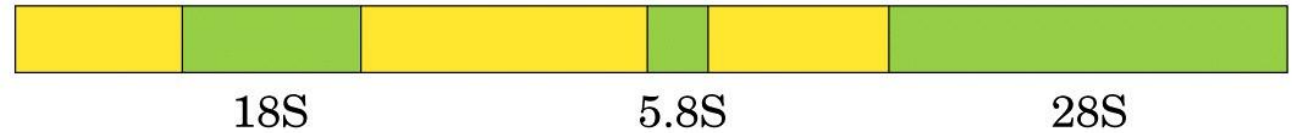
- Prokaryot ve ökaryotlarda ribozomal RNA öncü ribozomal (45S) RNA (preribozomal RNA) halinde sentezlenir.
- Öncü ribozomal RNA, RNAazlar ile kesilerek 28S, 18S ve 5.8S'lik ribozomal RNA kısımları oluşur.

Prokaryotlarda rRNA İşlenmesi



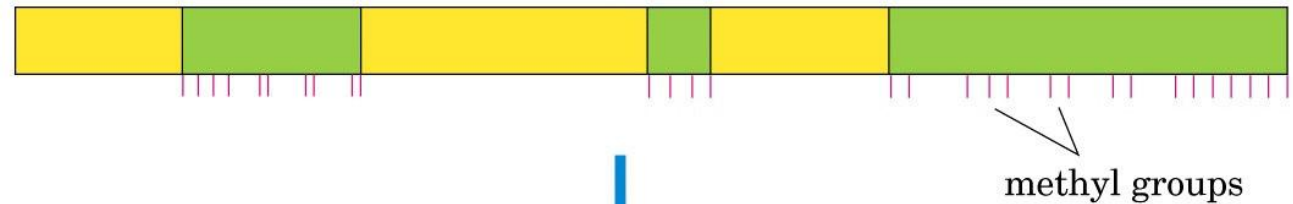
Ökaryotlarda rRNA işlenmesi

**Pre-rRNA
transcript
(45S)**



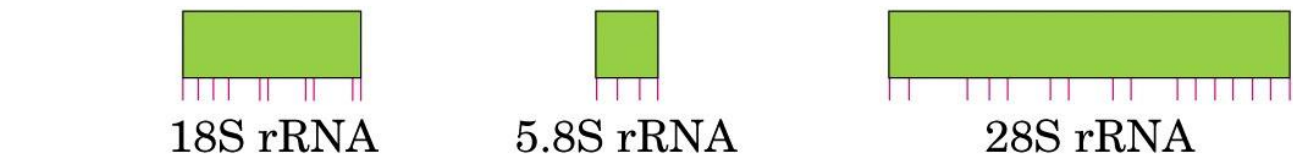
(a)

Methylation



(b)

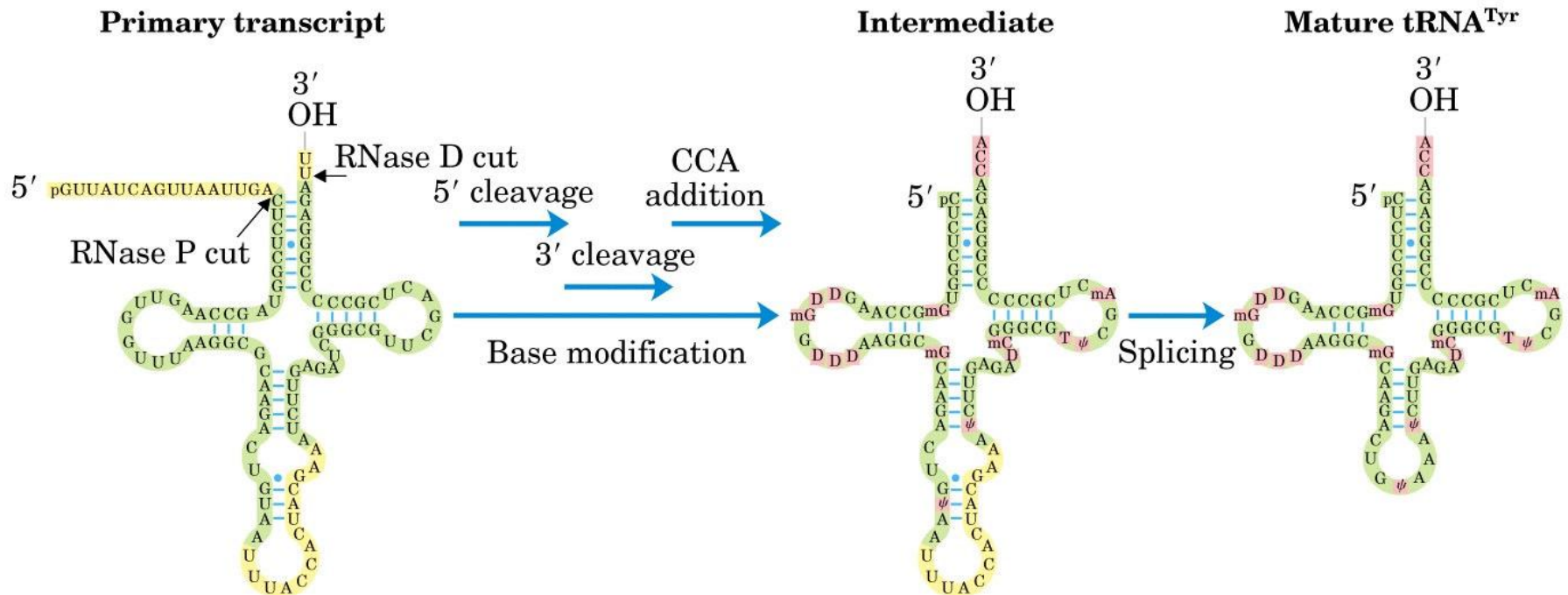
Cleavage



Mature rRNAs

tRNA'nın işlenmesi, prokaryotlarda ve ökaryotlarda birbirine benzer

- Uzun molekül halinde sentezlenir ve kısaltıldıktan sonra Nükleotidiltransferaz enzimi aracılığı ile 3' ucuna CCA dizini eklenir



Kanser tedavisinde kullanılan bazı antibiyotikler transkripsiyonu inhibe eder:

- **Actinomycin D**, prokaryotlarda ve ökaryotlarda, guanin bağlanması üzerine etkilidir.
- **Daudonomycin ve distamycin A**, prokaryotlarda ve ökaryotlarda, DNA üzerine etkilidirler
- **Rifampicin**, prokaryotlarda RNA polimeraz inhibitörüdür
- **α amanitin**, ökaryotlarda RNA polimeraz inhibitörüdür