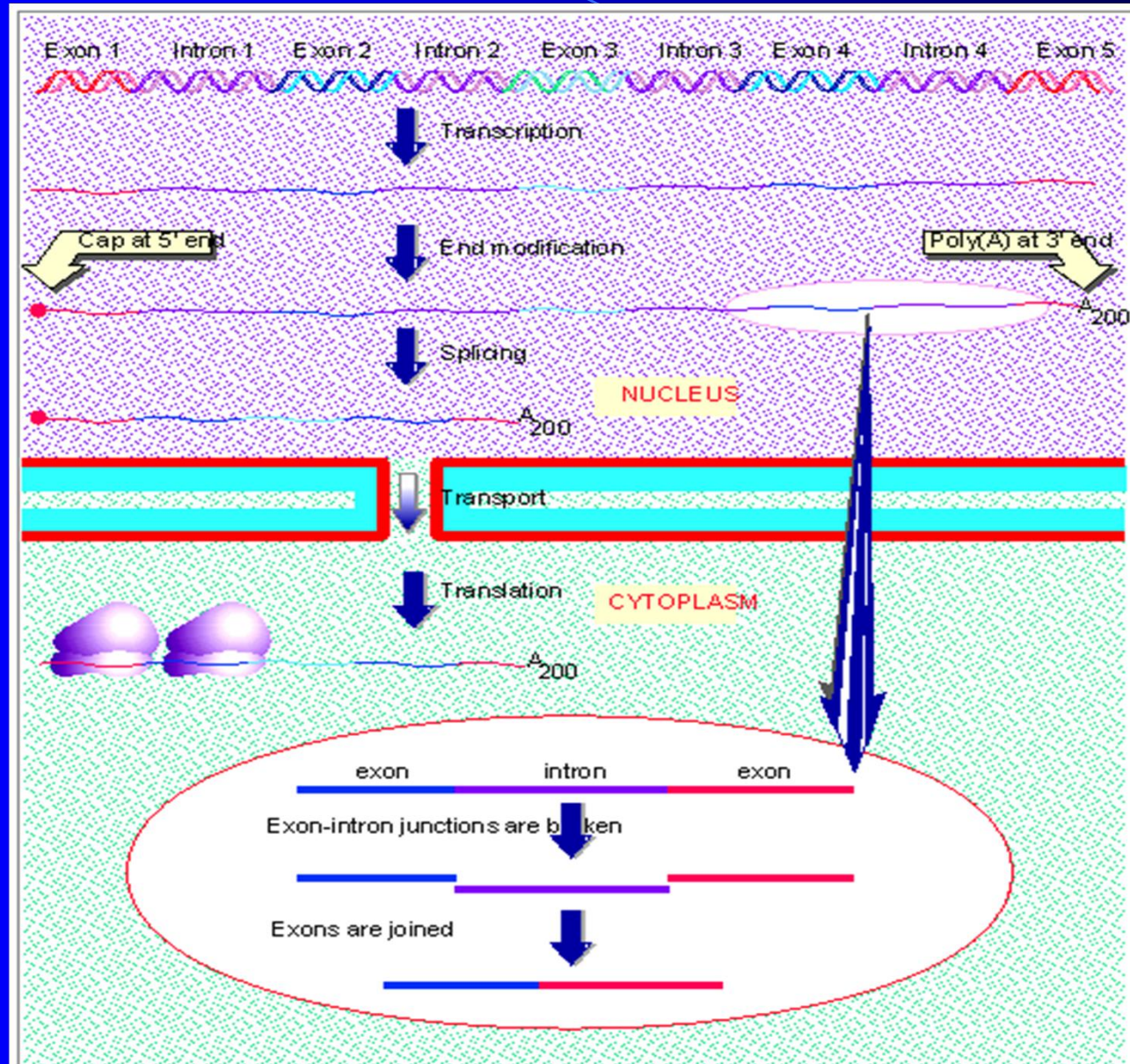


RNA转录后加工 ?

- ❖ 加工后的5' 端都是单磷酸
- ❖ 加工后分子比初始转录物小
- ❖ tRNA含有特殊的碱基
- ❖ mRNA有cap, polyA 等

RNA 转录后加工



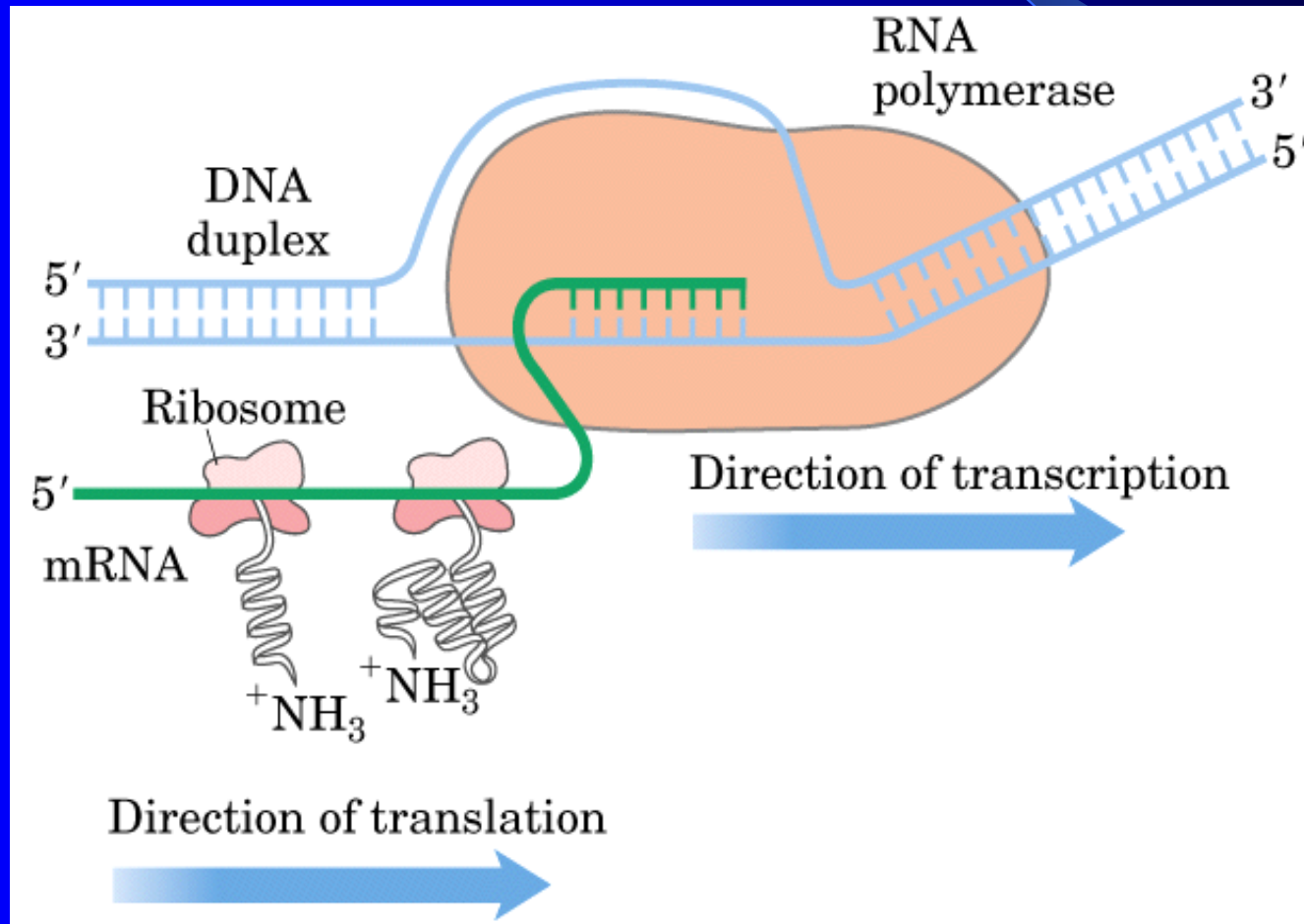
RNA 转录后加工

- ❖ mRNA加工的分子机制
- ❖ tRNA加工的分子机制
- ❖ rRNA加工的分子机制
- ❖ 核酶



mRNA加工的分子机制

- ❖ 转录出来的RNA必须加工成为成熟的mRNA ??
- ❖ 原核的mRNA一般不经过加工



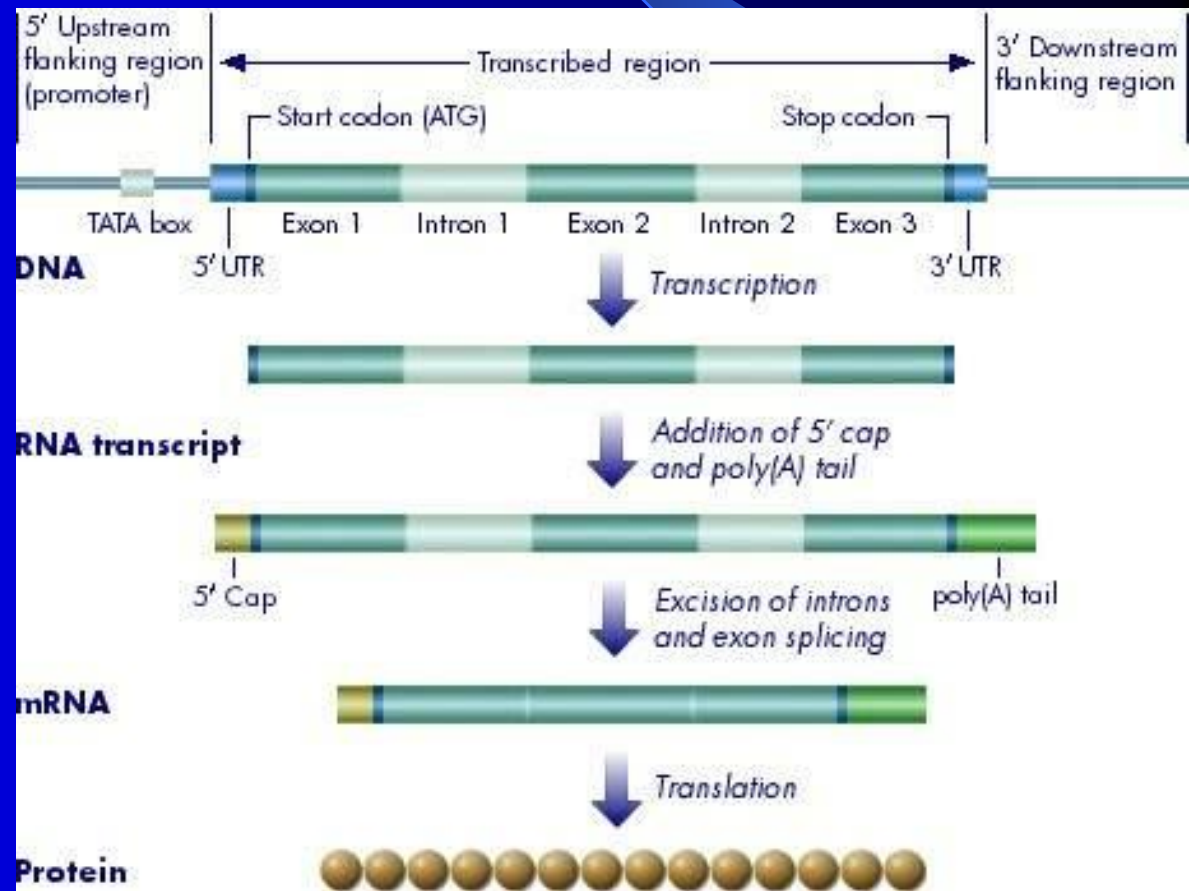
真核mRNA前体分子的加工

mRNA的前体是分子较大的hnRNA (heterogeneous nuclear RNA, 核内不均一RNA), 与蛋白质结合形成核糖核蛋白hnRNP), 加工在hnRNP上进行

❖ 5' -端帽子结构
(capping)

❖ 3' -端接多聚腺苷
(polyA)

❖ mRNA前体
剪接、修饰



帽子的类型

- ❖ 真核细胞中的hnRNA 5' 端要连上一个甲基化的鸟嘌呤，这就是mRNA的5' 端帽子
- ❖ Cap 0:
5' 末端鸟苷的第7位上甲基化
- ❖ cap 1:
5' 末端第二个核苷酸的核糖上的2' -OH位点上甲基化
- ❖ Cap 2:
5' 末端第三个核苷酸的核糖上2' -OH位点甲基化

Present in all caps

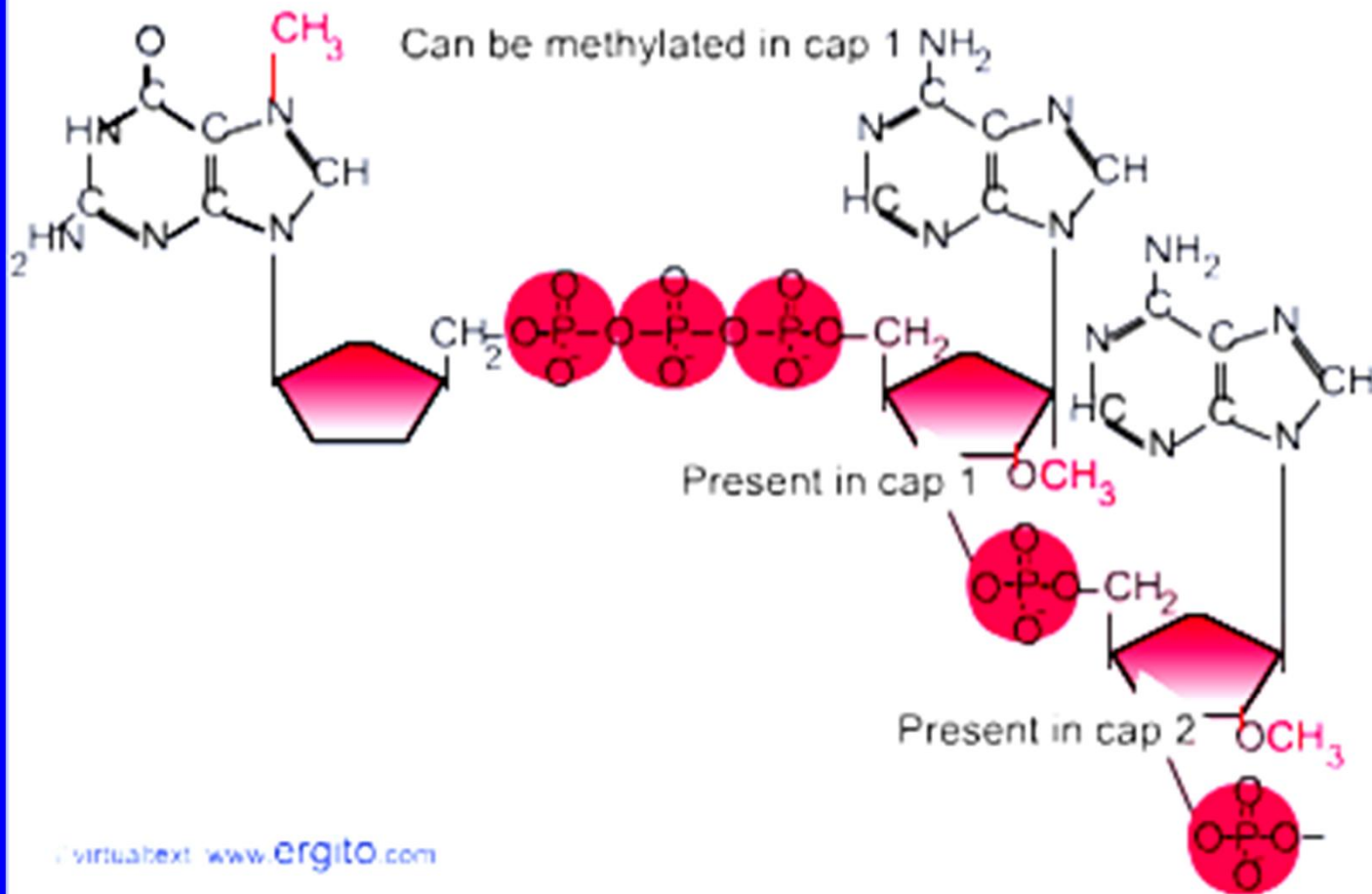
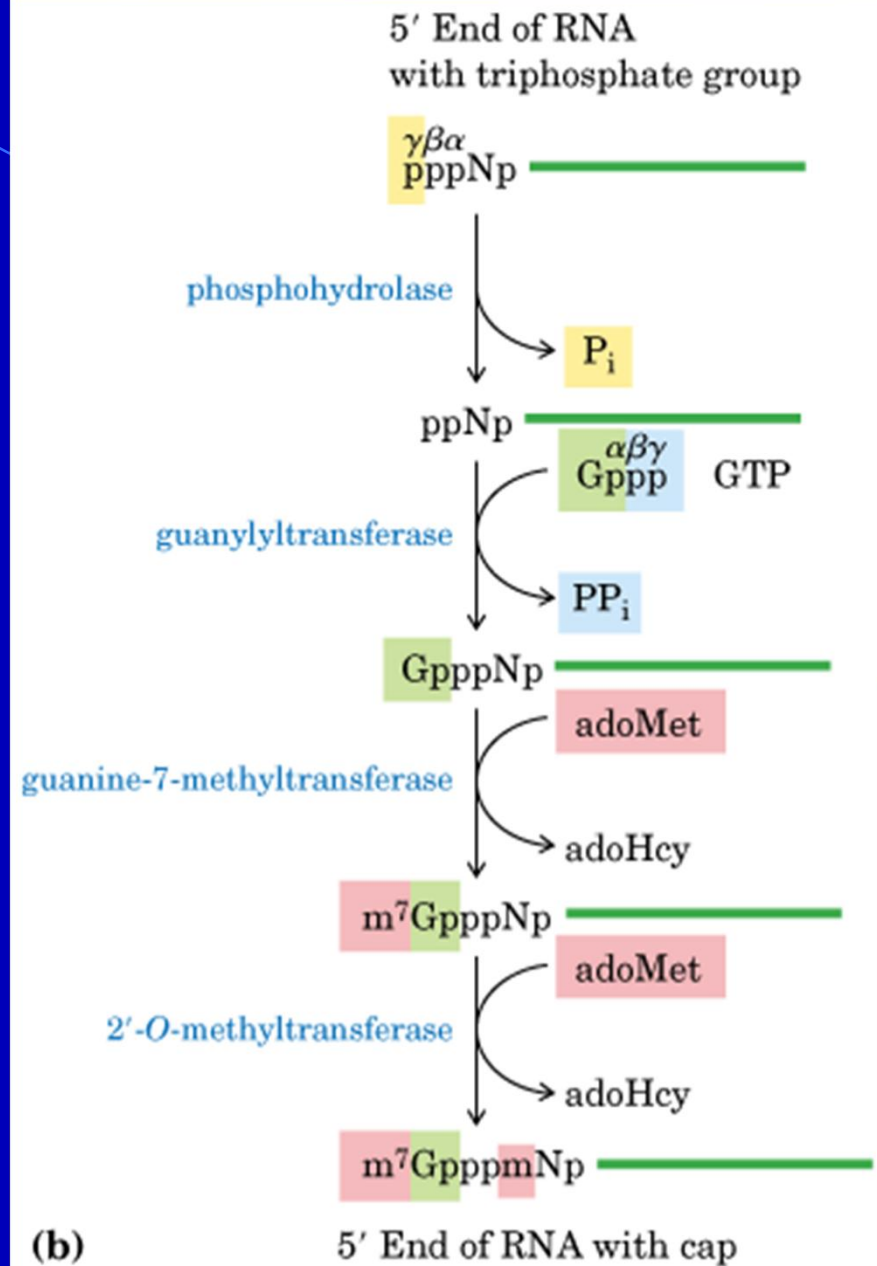
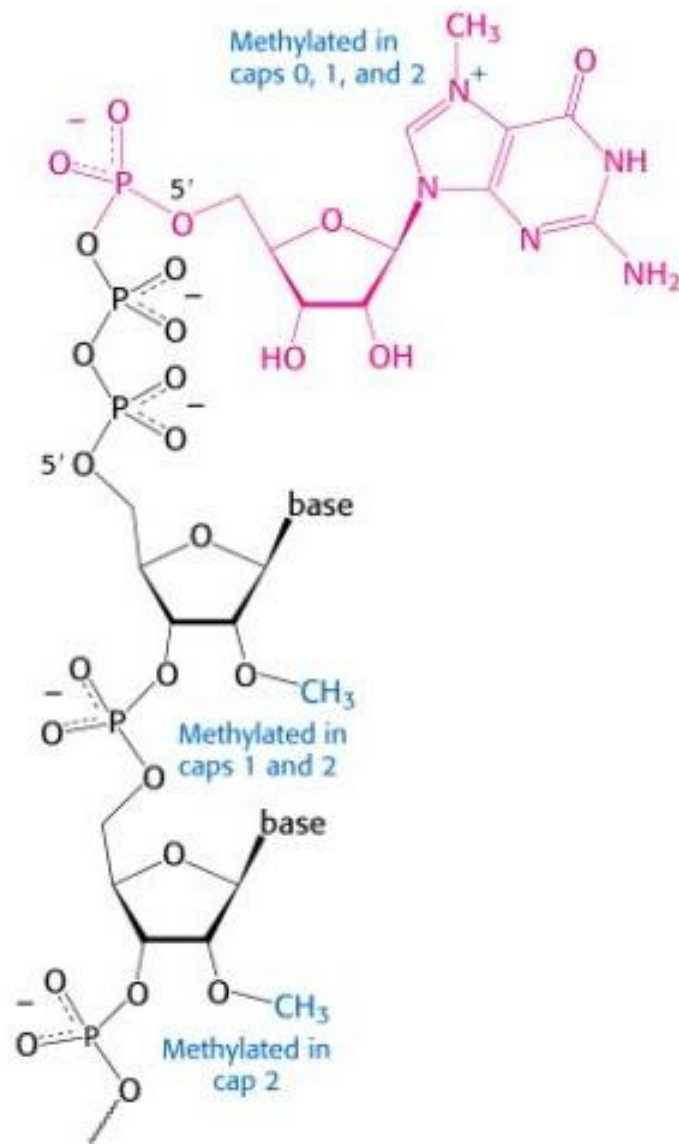


Figure 5.18

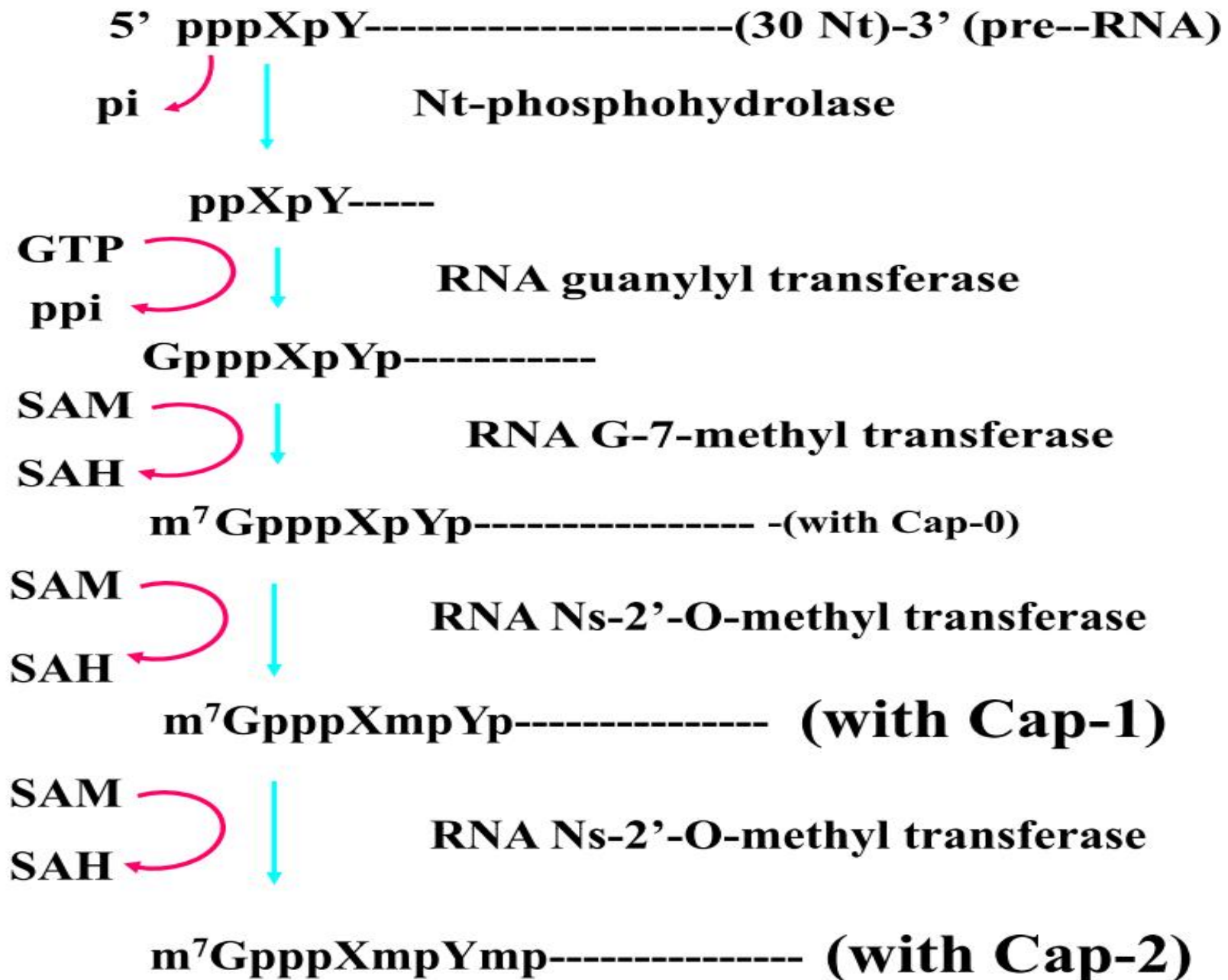
The cap blocks the 5' end of mRNA and may be methylated at several positions.

帽子连接方式 5' - 5'

甲基化位置？意义？



After 30 ± Nt transcribed, pre-RNA capping start



帽子结构的功能

- ❖ 有助于mRNA越过核膜
- ❖ 保护5' 不被酶降解
- ❖ 帽子结构对mRNA前体第一个内含子剪接必需（实验）
- ❖ 使mRNA与核糖体小亚基结合并被蛋白质合成起始因子识别

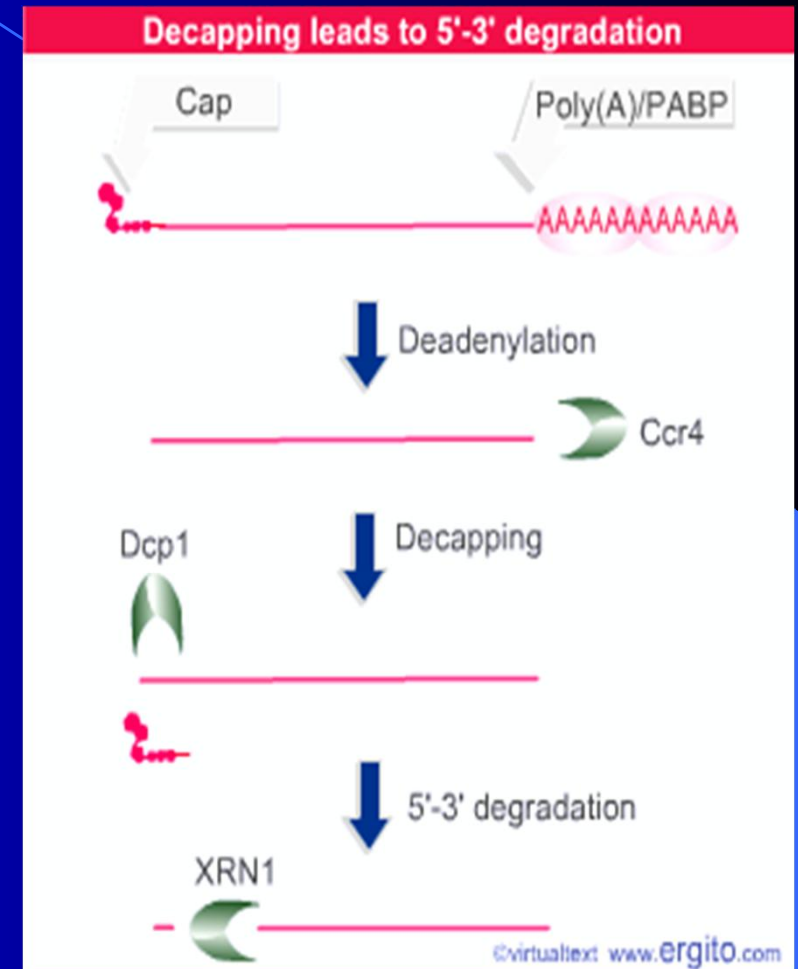
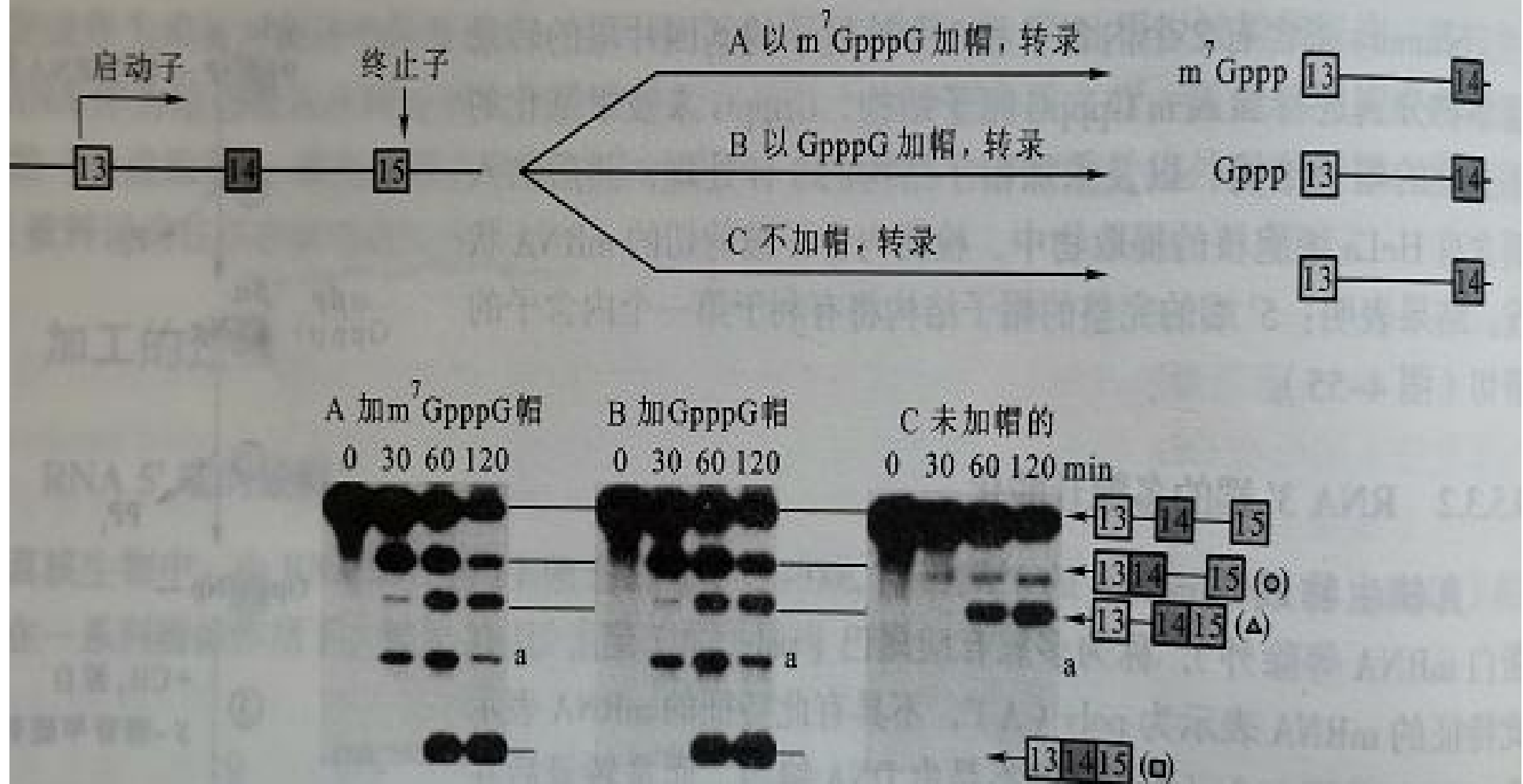


Figure 5.24 Deadenylation allows decapping to occur, which leads to endonucleolytic cleavage from the 5' end.

帽子结构对mRNA前体第一个内含子剪接的影响

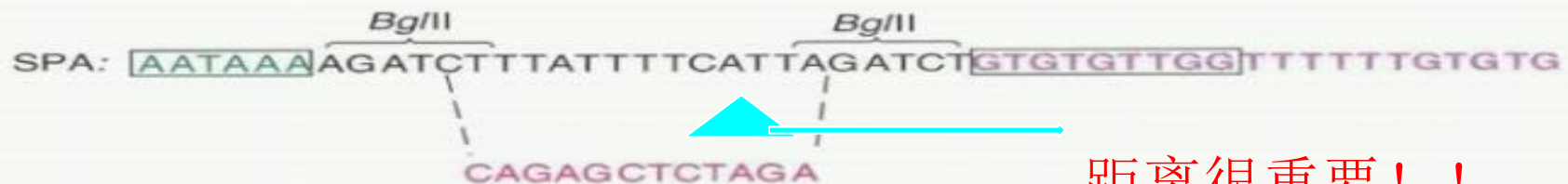
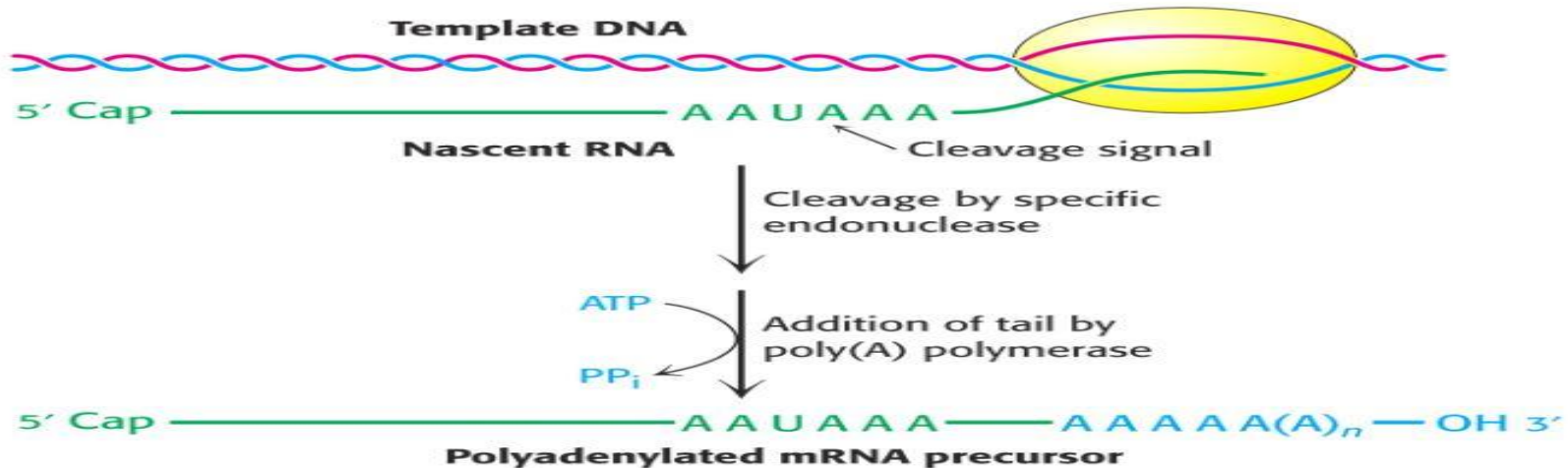


将三种处理的含有两个内含子和三个外显子前体转录物加入到HeLa

加尾

如何判断加尾？

- ❖ 有关蛋白因子识别AAUAAA
- ❖ 在加尾信号 AAUAAA下游11—30nt 处剪切RNA
- ❖ 末端腺苷转移酶合成 poly(A)至一定长度



距离很重要！！

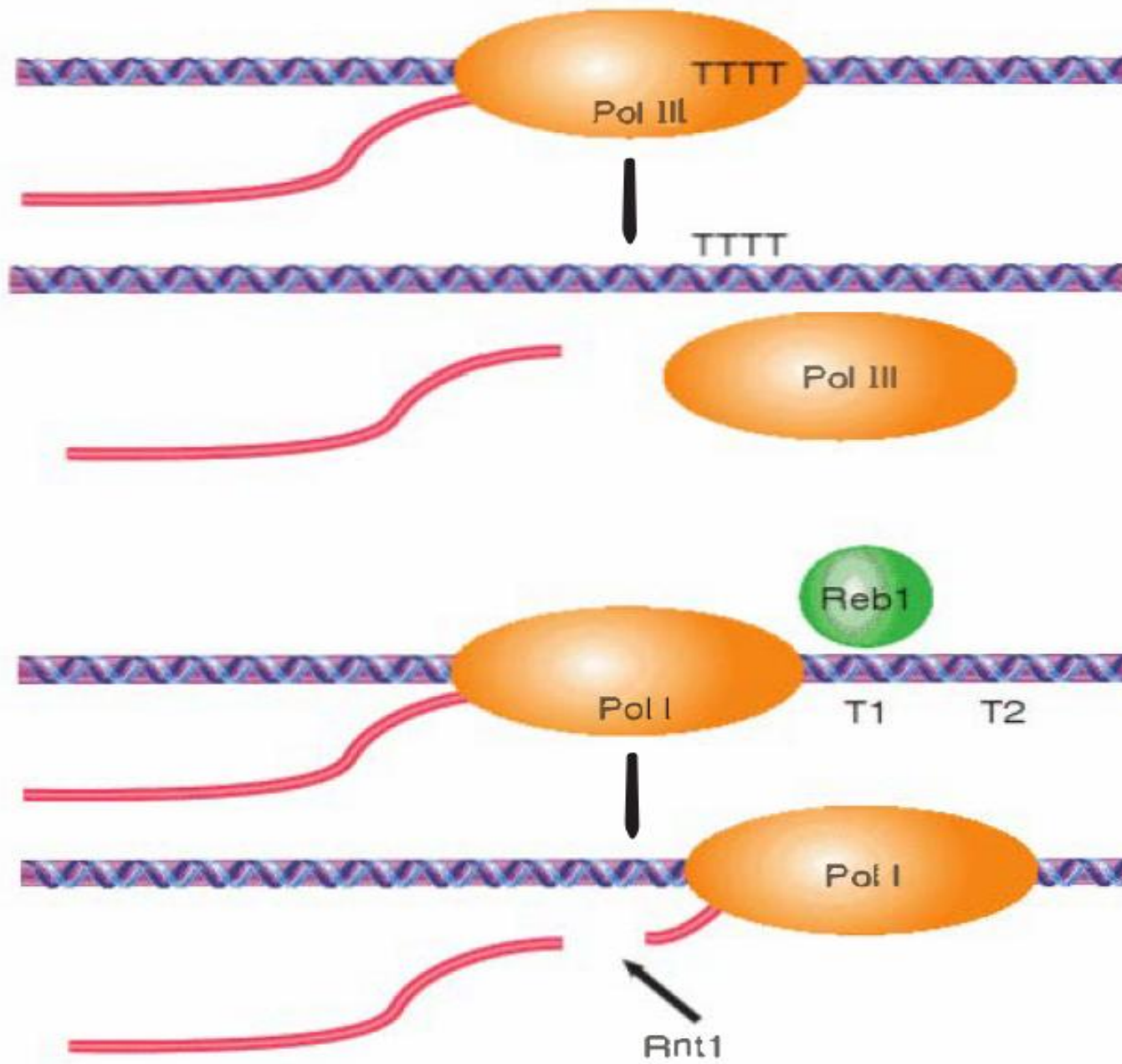
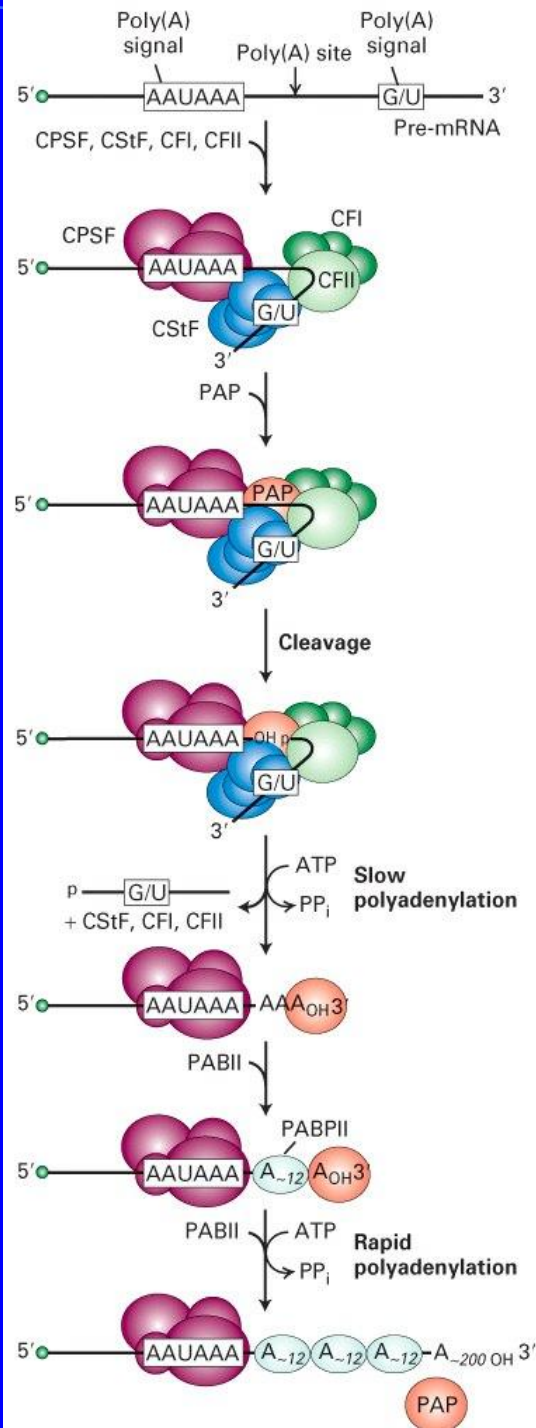


FIGURE 21.31 Transcription by Pol III and Pol I uses specific terminators to end transcription.



pre-mRNAs 的切割和多聚

多亚基复合物(CPSF) :

Cleavage and polyadenylation specificity factor binds to the upstream **AAUAAA poly(A) signal**.

促进切割因子CStF:

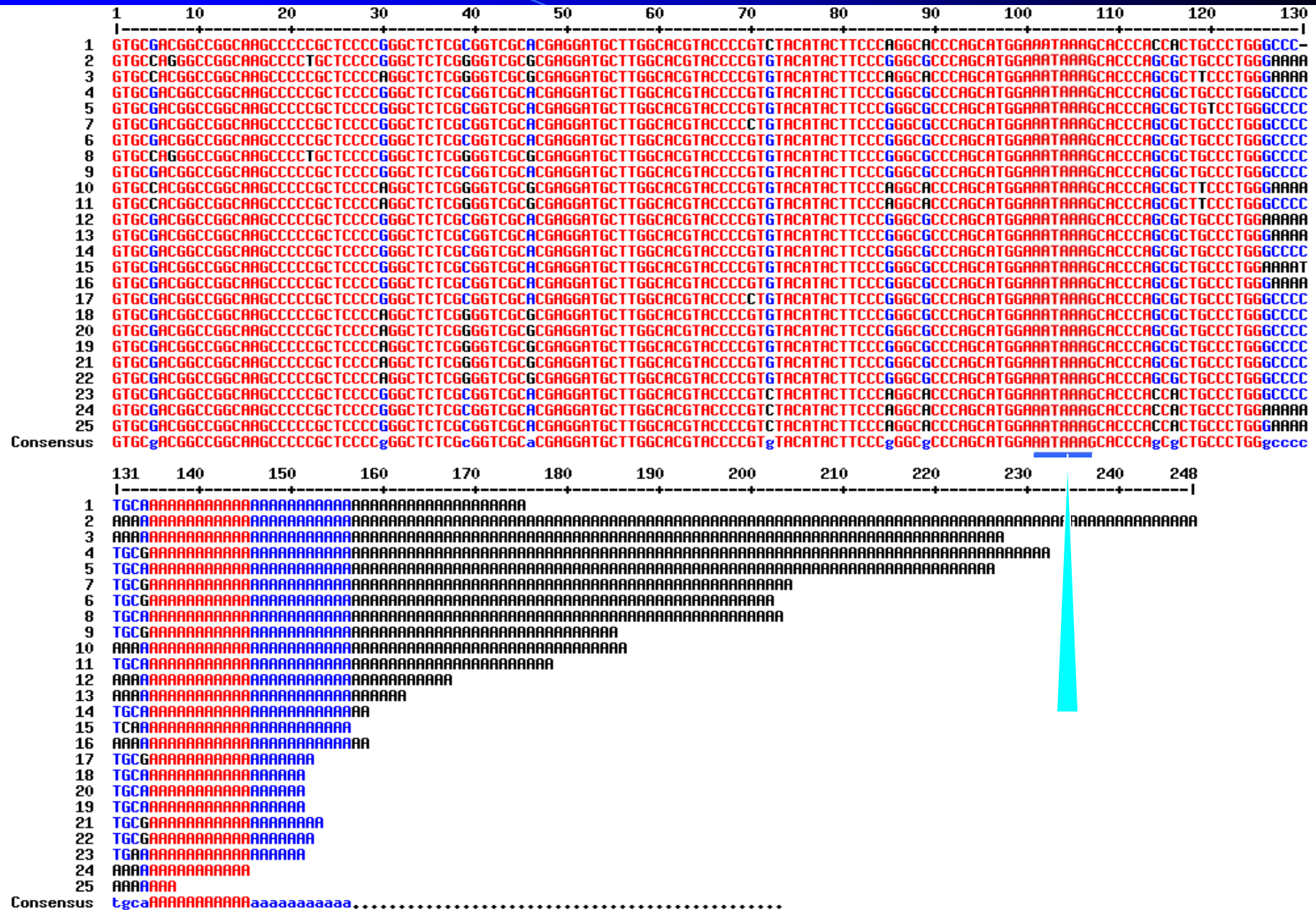
cleavage stimulation factor interacts with a downstream **GU- or U-rich** sequence and with bound CPSF, forming a loop in the RNA.

Binding of CFI and CFII help to stabilize the complex. **Poly(A) polymerase** (PAP) cleaves the RNA at the poly(A) site which is 10~30 bps downstream of the poly(A) signal and the initial ~12A residues are added.

Binding of **poly(A)-binding protein II** (PABPII) to the initial short poly(A) tail accelerate the rate of addition of As by PAP

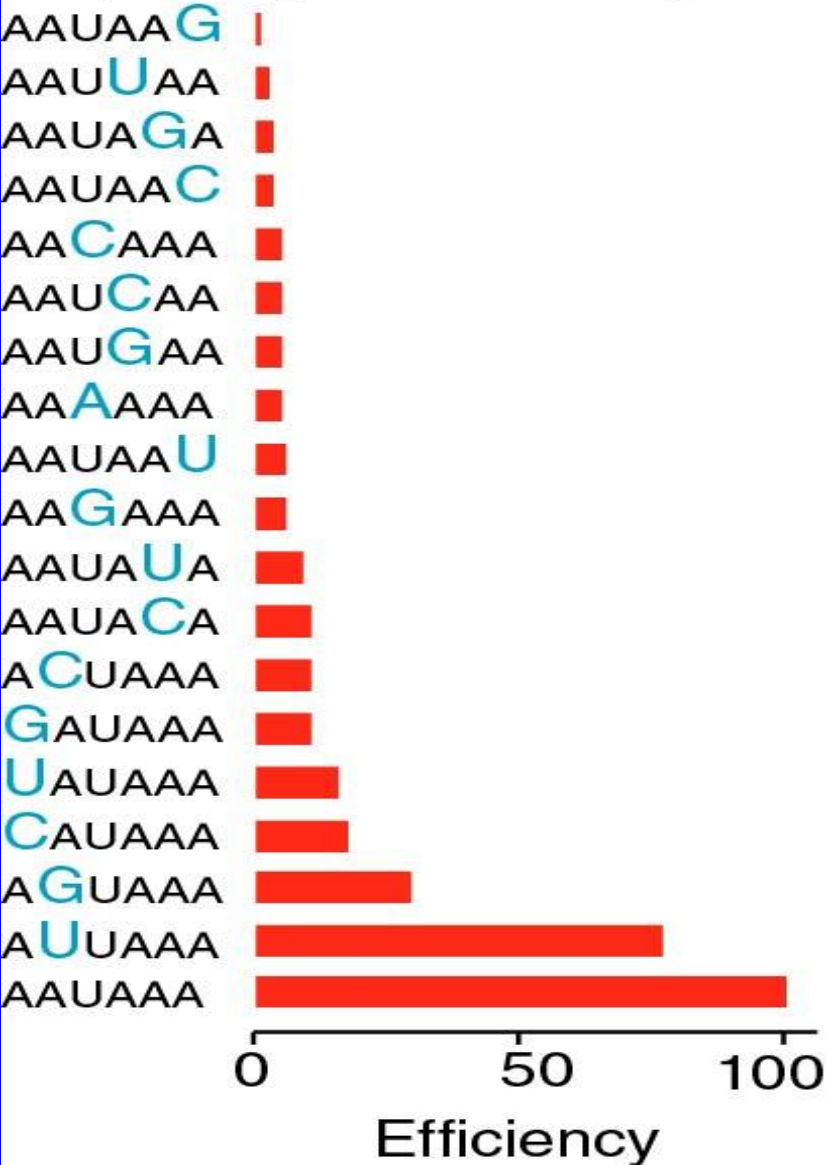
PolyA末端封闭

3' end UTRs of human IgG1 cDNAs to show that polyadenylation starts ~20 bps downstream of the AATAAA site



A₉₈A₈₆U₉₈A₉₈A₉₅A₉₆
U₁₂

Polyadenylation activity



AAUAAA对加尾的影响

Above: consensus polyadenylation signal

Below: polyadenylation efficiency of each variants

TIBS, 1990, July

Some genes have more than one polyadenylation sites

SV40 polyadenylation signal has two AATAAA motif (sequence from pcDNA3.1 vector):

```
ATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCCGGCTATGAATGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCC
GCCGTGTTCCGGCTGTCAAGCAGGGGGCGCCGGTTCTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAAGTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCG
TGGCTGGCCACGACGGGCGTTCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGTATTTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTC
CTGTCACTCTCACCTTGCTCCTGCGGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGCTACCTGCCCATTCGACCACCAA
GCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTAATCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGAGGCTCGCGCCAGCCGAAGT
TTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGCTGGAAAATGGCCGCTTTTCT
GGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGSCGAATGGGCTGAC
CGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTGCGAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGGACTCTGGGGTTCGAAA
TGACCGACCAAGCGACGCCCCAACCTGCCATCAGGAGATTTTCGATTCCACCGCCGCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCT
GGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCCACCCCAACTTGTTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAGCAATAGCATCACAA
ATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTG
```

Comparing more than 4000 EST sequences with genomic sequences reveals that more than 20% of the genes contain more than one poly (A) sites:

Number of mRNAs with Alternative Poly(A) Sites				
Number of poly(A) sites per mRNA	1	2	3	4+
Number of mRNAs	3377	724	182	61

加尾的功能

- ❖ 提高mRNA在细胞质中稳定性
- ❖ 协助mRNA进入细胞质定位，影响翻译效率
- ❖ 影响内含子剪切（参见书）

加尾的平台？

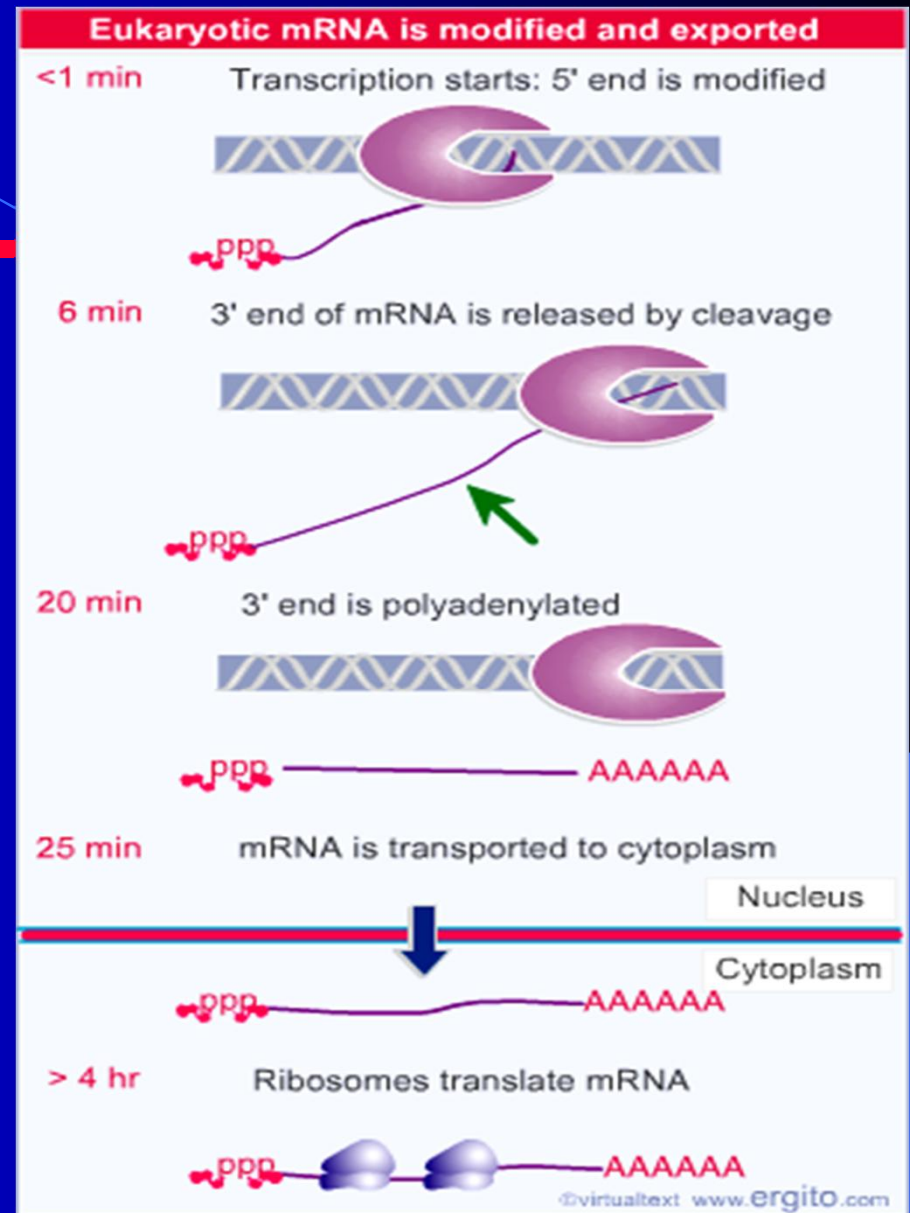
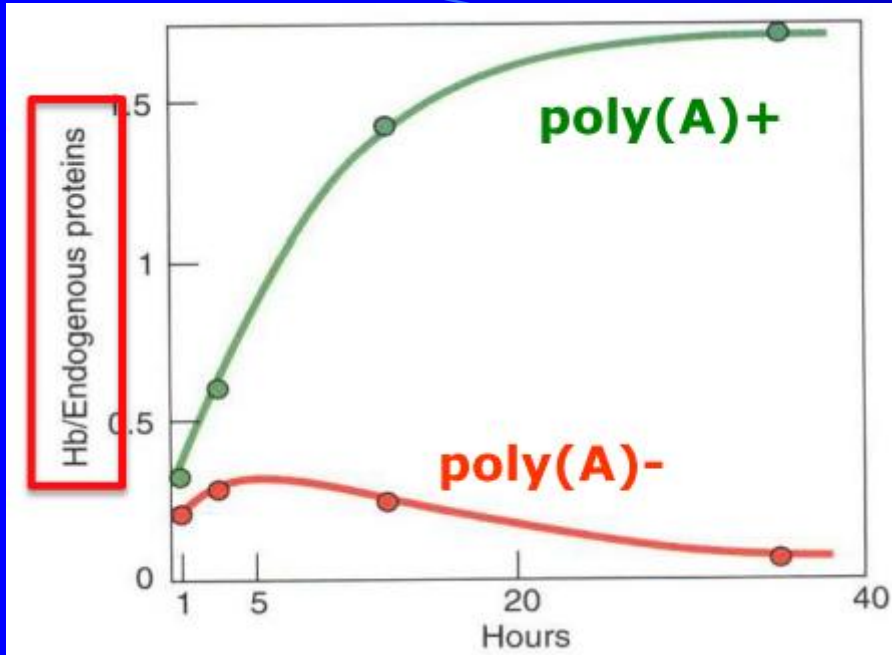
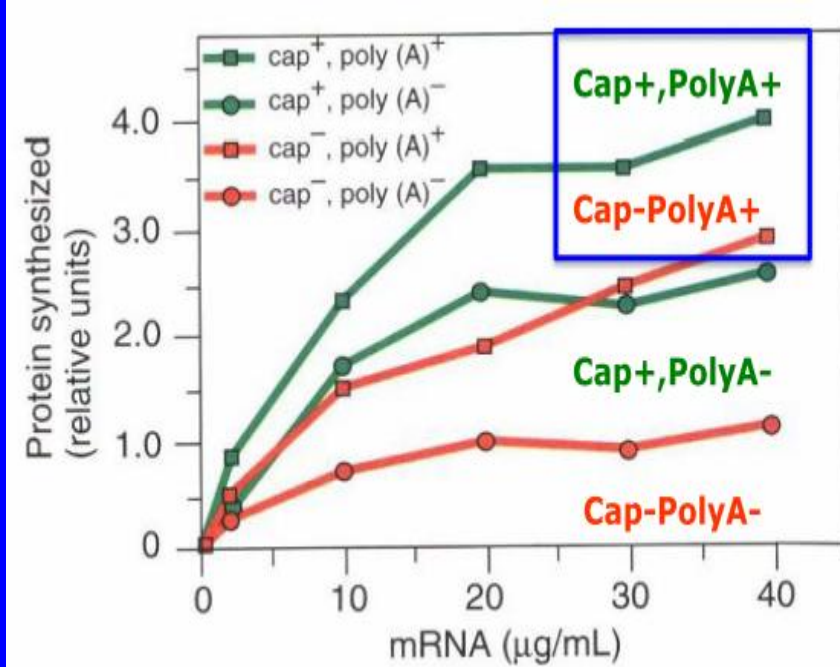


Figure 5.17

Overview: expression of mRNA in animal cells requires transcription, modification, processing, nucleocytoplasmic transport, and translation.



poly(A)- mRNA 对
Hb翻译影响



Cap+poly(A)
对mRNA分子
稳定性影响

很多不稳定的mRNA3' 非翻译区含有 AUUUA

GMCSF: UAAUAUUUAUAUAUUUAUAUUUUUAAAAUAUUUAUUUAUUUAUUUAA

IFN-beta: UUGAAAUUUUUUAUUAAAUAUGAGUUAUUUUUAUUUAUUUAUUUUUUUU

IFN-gamma: UAAAUCUAUUUAUUAAUAUUUAACAUAUUUAUAU

IL-1: UUAUUUUUUUAAUUAUUUUUAUAUAUGUAUUUAUAAAUAUAUUUAAGAUAA

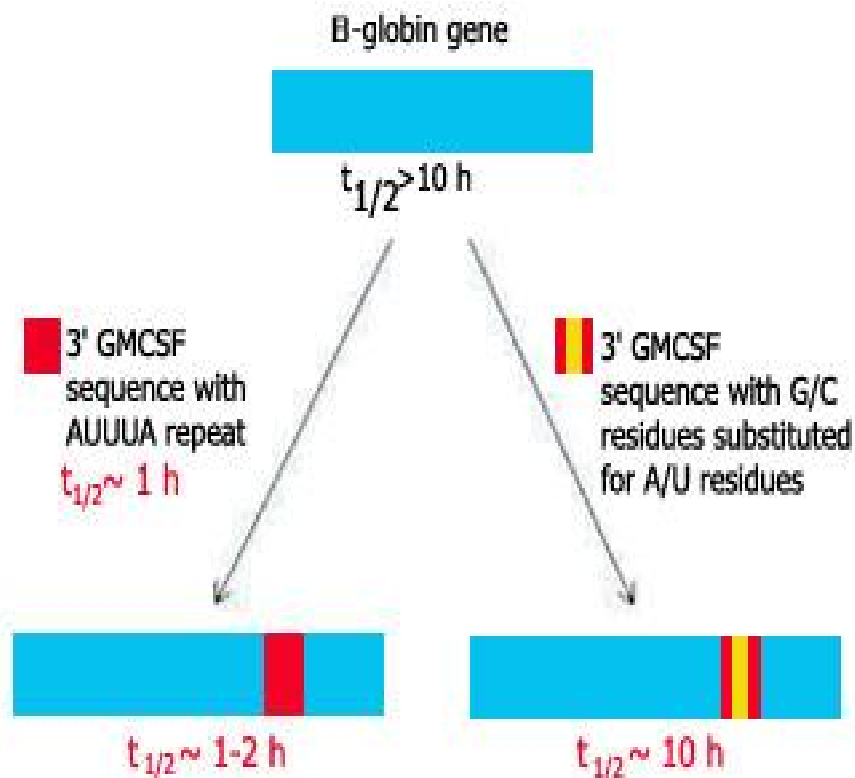
IL-2: UUCUAUUUAUUUAUUUAUUUAUUUUUAUAUUUAUUGUU

TNF: AUUAUUUAUUUUUAUUUAUUUAUUUAUUUAUUUA

IFNA2: AUUAUCUAUUUAUUUAUUUUUUAAAAUAUUUAUUUAACUAUUUAUAAAA

IFNA4: UCUAUUUUAUUUAUUUAUUUAUUUUUUAAAUUUAUUUAUUUUUU

AUUUA 序列对mRNA半衰期的影响



- β -globin mRNA 半衰期 10 H
- 将 GMCSF 的 AUUUA 插入, 半衰期 1-2 hours
- 插入同样的 GMCSF 区域, 但 G/C 代替 A/U, β -globin mRNA 半衰期不变

Shaw & Kamen, *Cell*. 1986, 46:659-67.

成熟的人TNF2 mRNA

[illegible]

PolyA的应用

分离纯化 mRNA

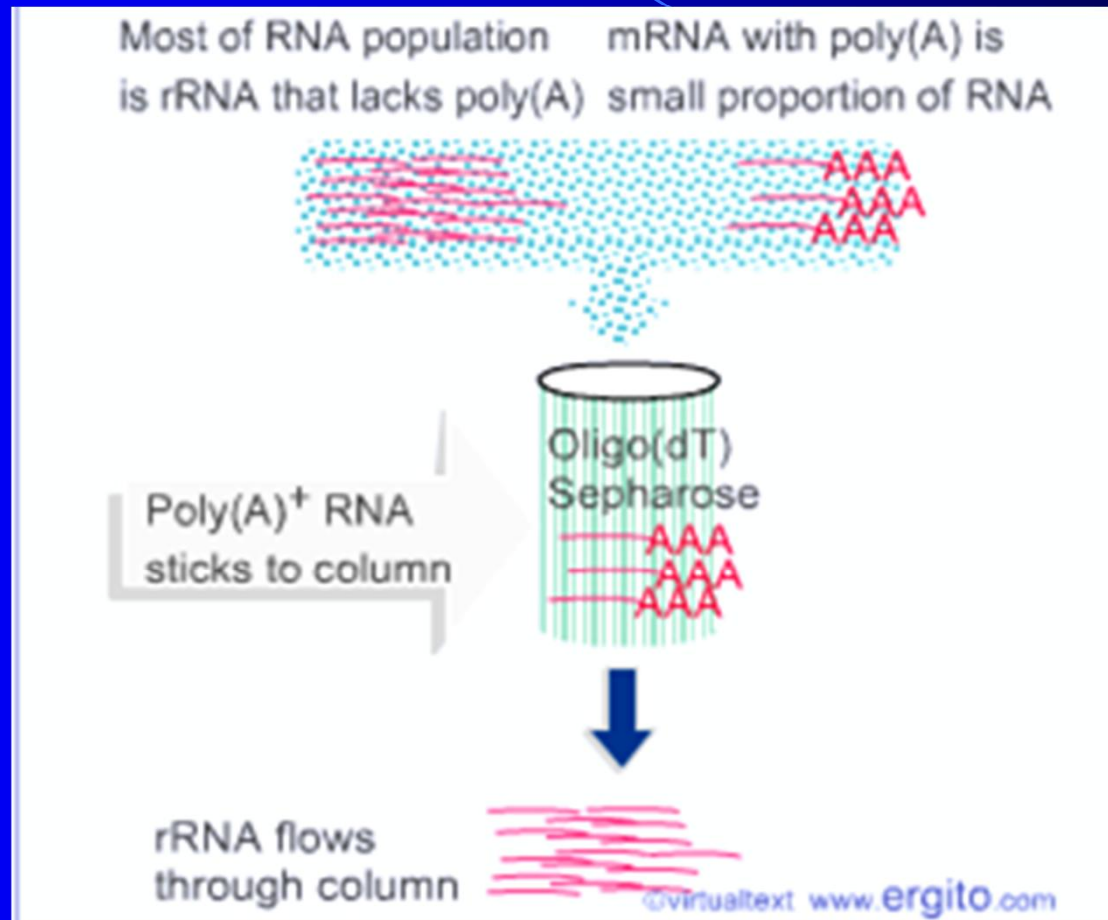
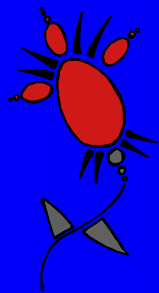
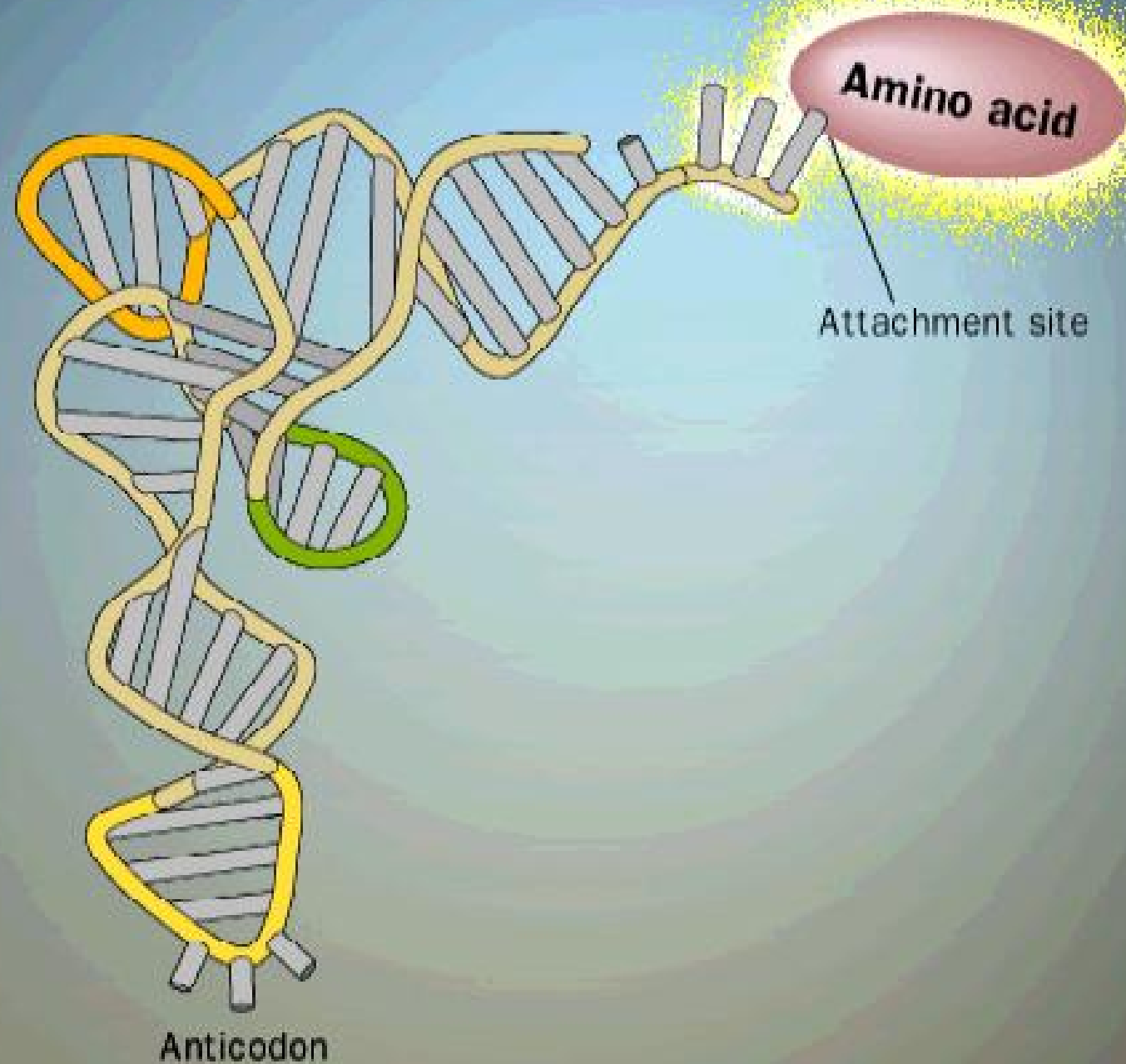


Figure 5.19

Poly(A)⁺ RNA can be separated from other RNAs by fractionation on Sepharose-oligo(dT).

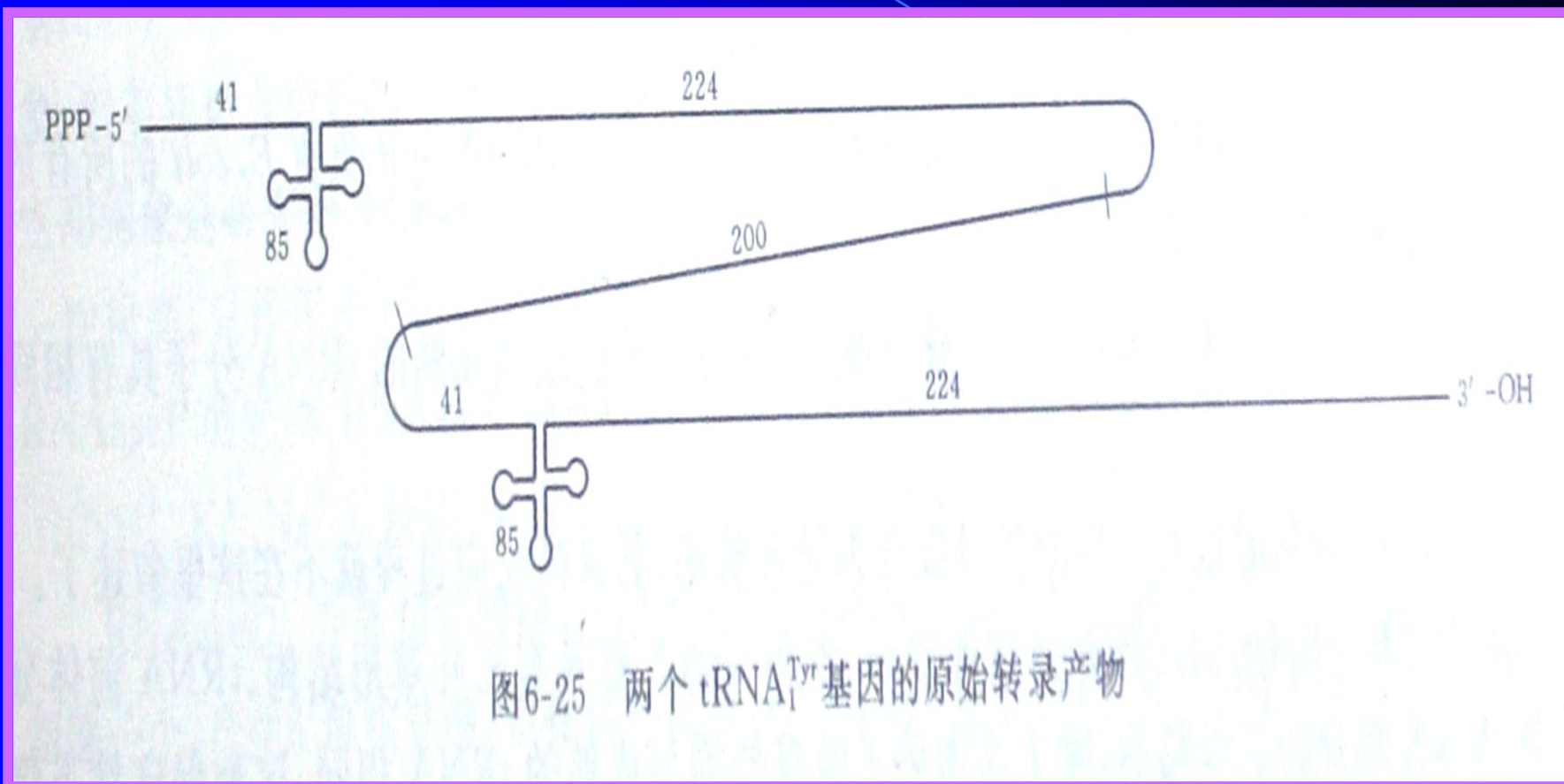


Charged tRNA





E. coli 的 tRNA^{Tyr}



原核生物tRNA转录单位一般为多基因转录

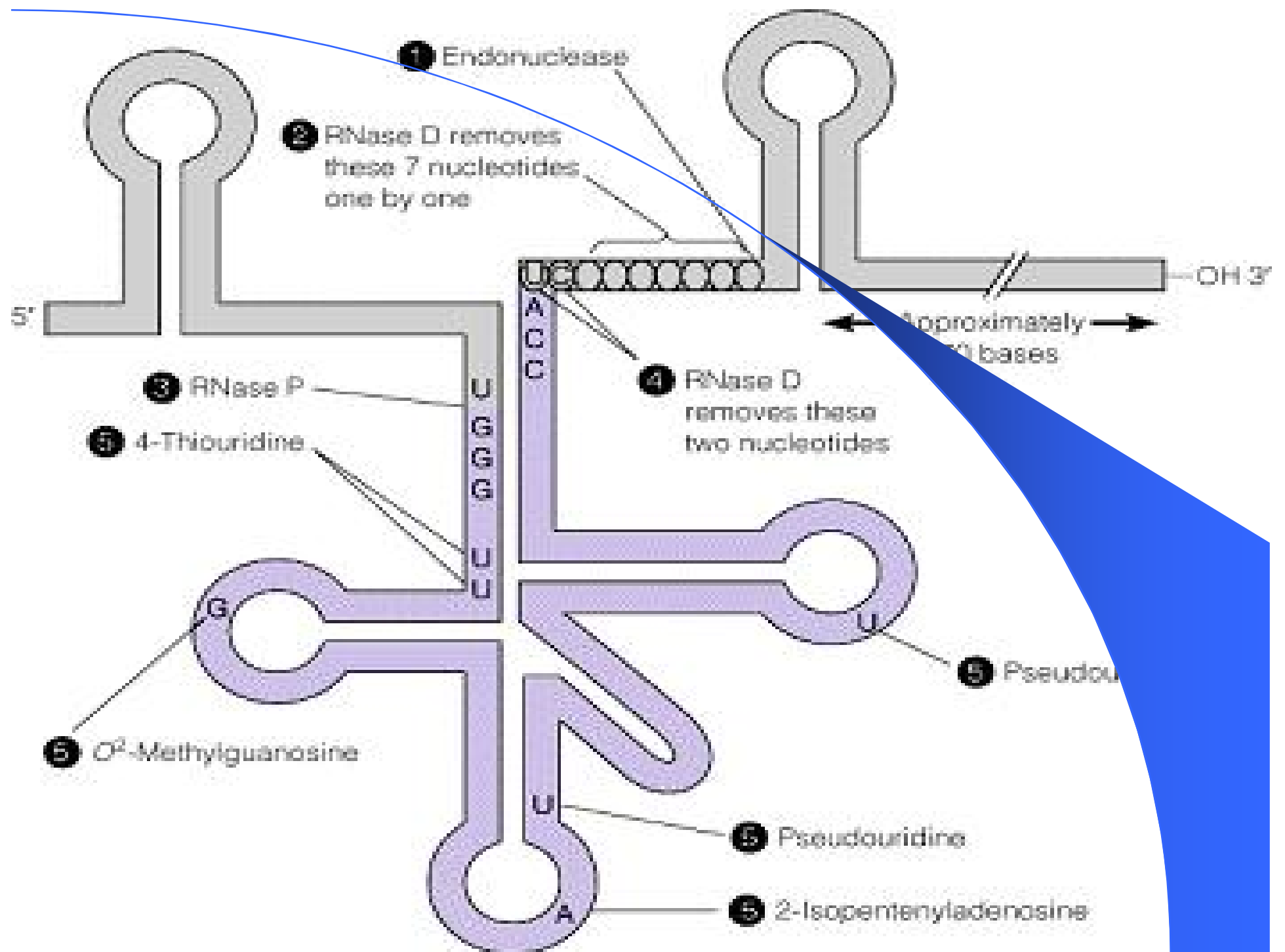
tRNA的加工

tRNA的加工分成3个阶段

- ❖ “掐头”，形成5' 末端；
- ❖ “去尾”，形成3' -OH末端

缺-CCA的tRNA要用tRNA核酸转移酶加-CCA

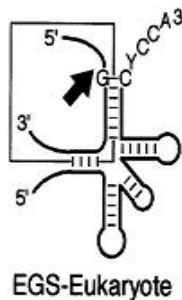
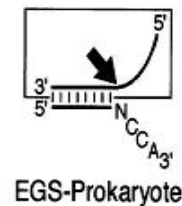
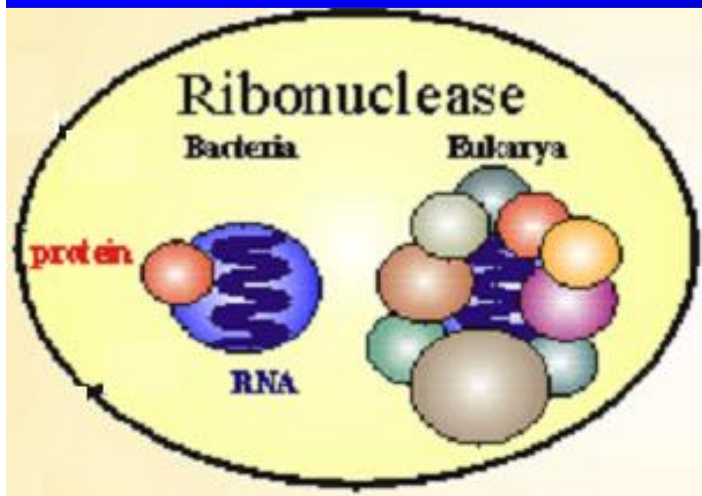
- ❖ 修饰：形成稀有碱基，如
二氢尿嘧啶，假尿苷（ ψ ）等



Rnase P 核酶

- 真核生物刚转录生成的tRNA前体一般无活性，需要进行：
 - 5' 端和3' 端的剪切拼接
 - 碱基修饰
 - 3' 端连接ACC结构

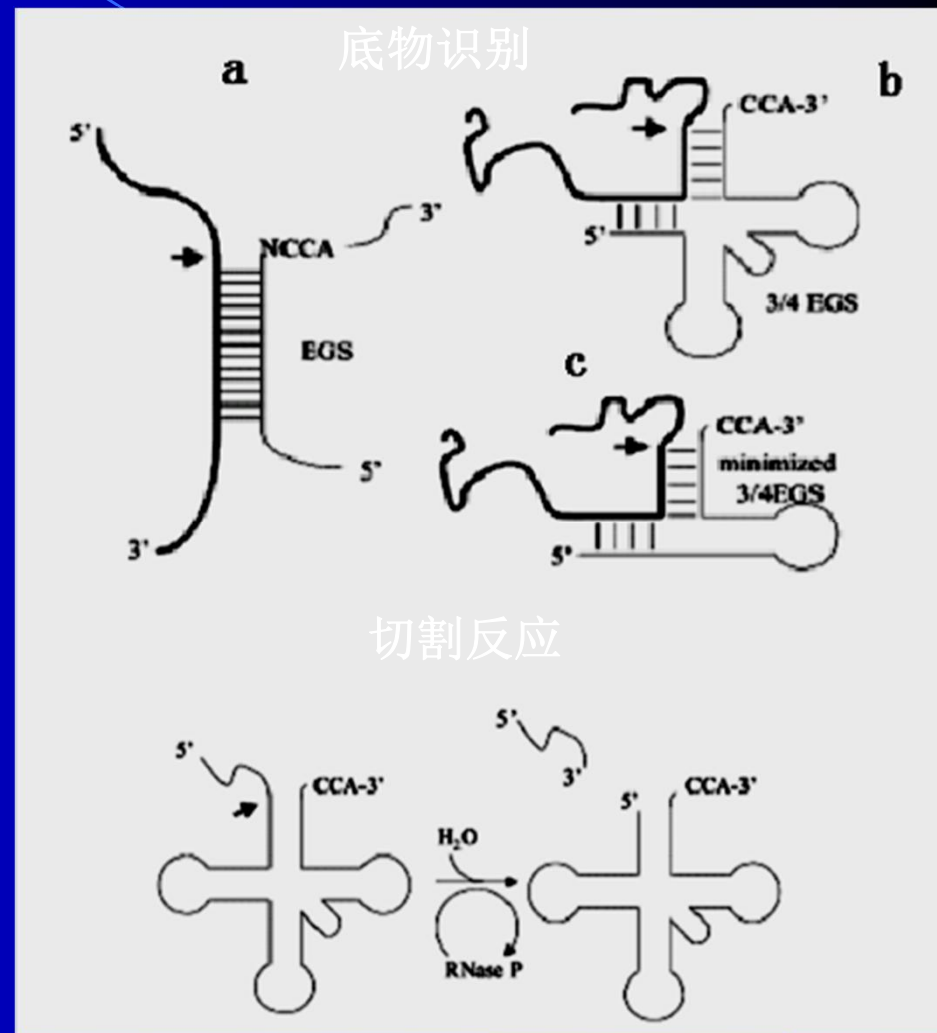
- Rnase P负责tRNA前体5' 端的成熟，由蛋白质和RNA两种亚单位组成
- 不同物种Rnase P中蛋白比例：
细菌Rnase P中蛋白占全酶的10%，真核生物Rnase P中的蛋白在70%以上
- 在体外，细菌的Rnase P中的400nt左右RNA分子单独存在时可催化反应进行



ribonucleic acid+enzyme

RNase P 核酶的催化机理

- 位点识别：
 - 3' 末端的CCA序列
 - 外部引导序列(EGS)
 - 依赖于底物的三级结构
- 反应机理：
 - 水作为亲核试剂切割磷酸二酯键。
 - 需要二价阳离子(如 Mg^{2+} 或 Mn^{2+})和一价阳离子(如 K^+ 或 NH_4^+)共同参与。一价离子主要稳定结构，二价离子不仅稳定结构，而且对于切割是必需的。
 - 蛋白组分可以减少细菌RNase P的RNA在体外有活性所需的离子



tRNA分子的加工

❖ RNaseP : 5' 端加工

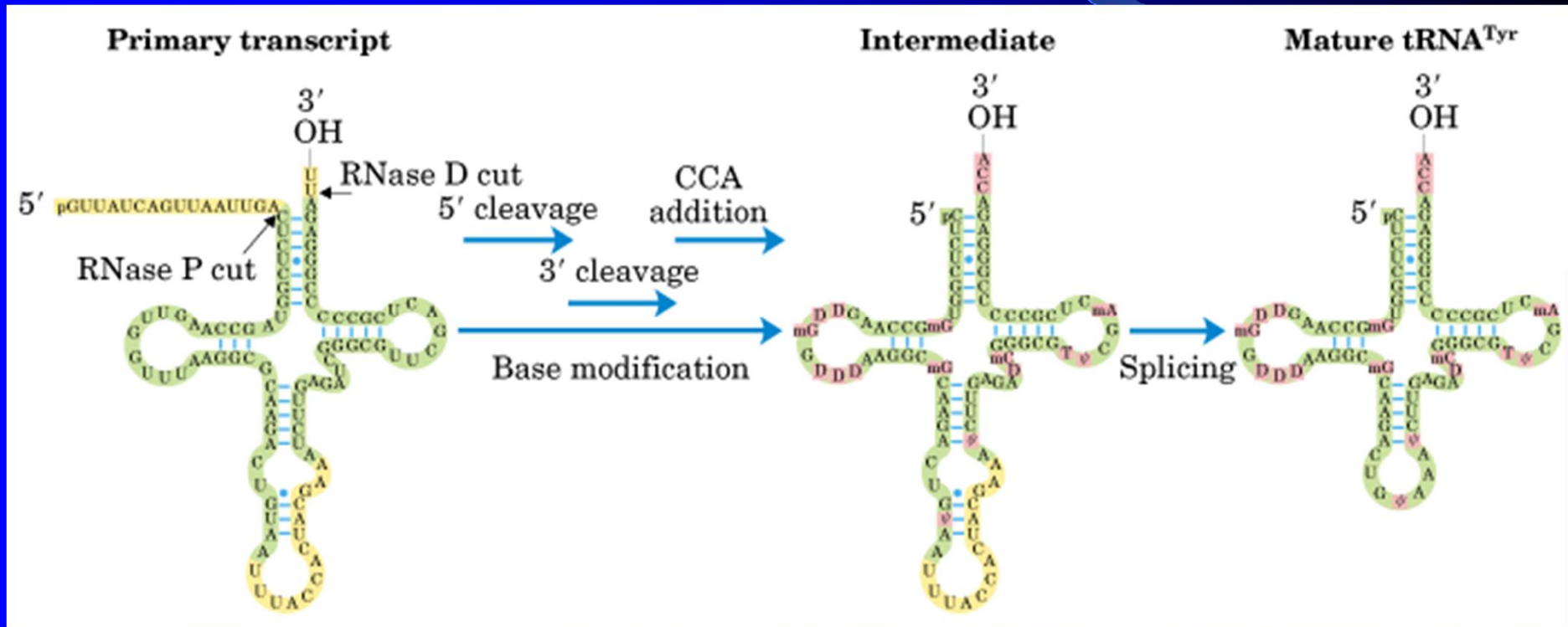
❖ CCA: I型 原核
 II型 少数原核 大部分真核

真核tRNA基因特点

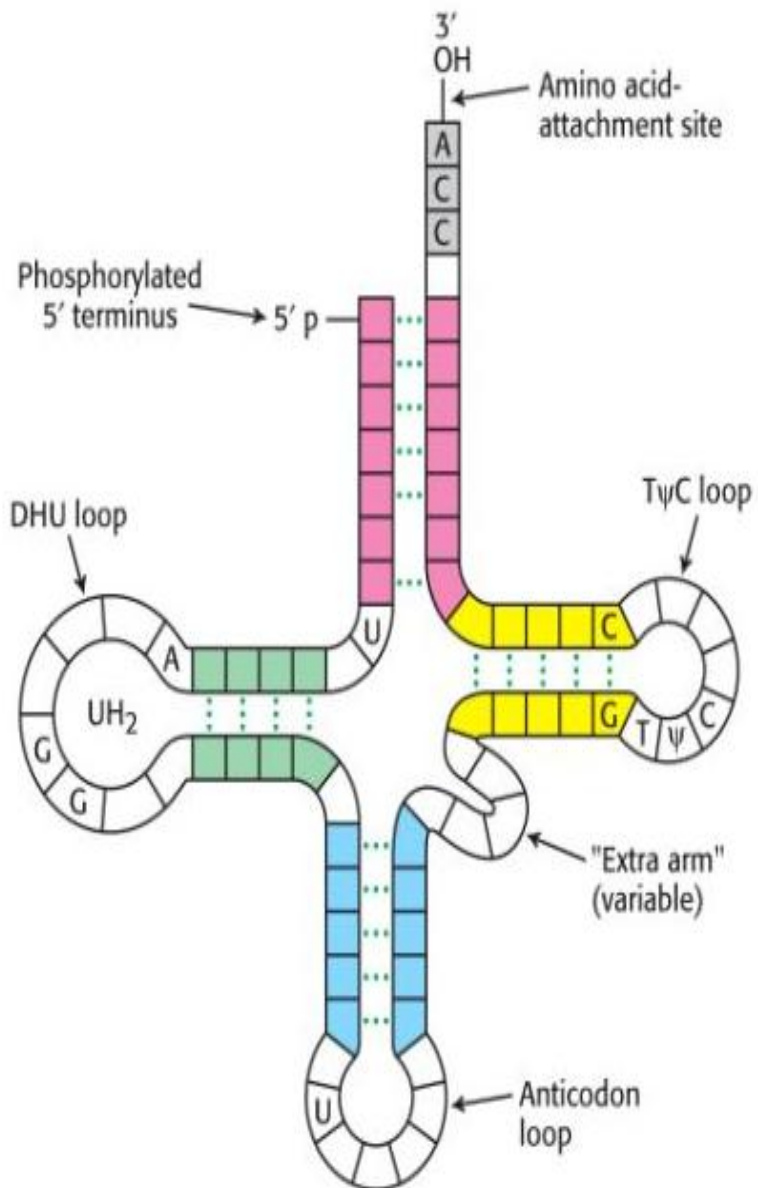
❖ 有些tRNA的前体分子中含有内含子

❖ 加工后3' 末端都要加CCA

酵母 tRNA^{Phe} 加工过程

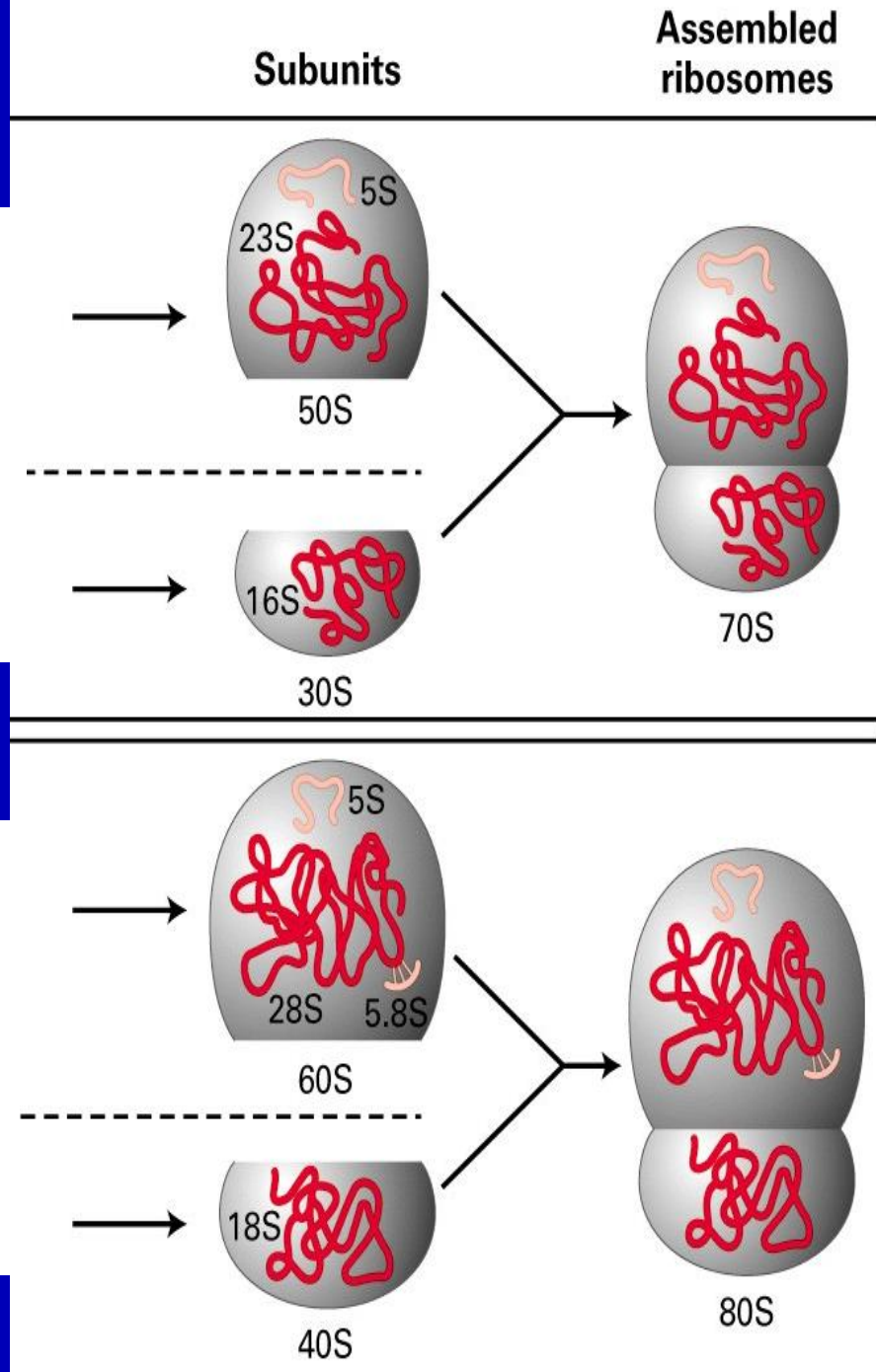


tRNA分子



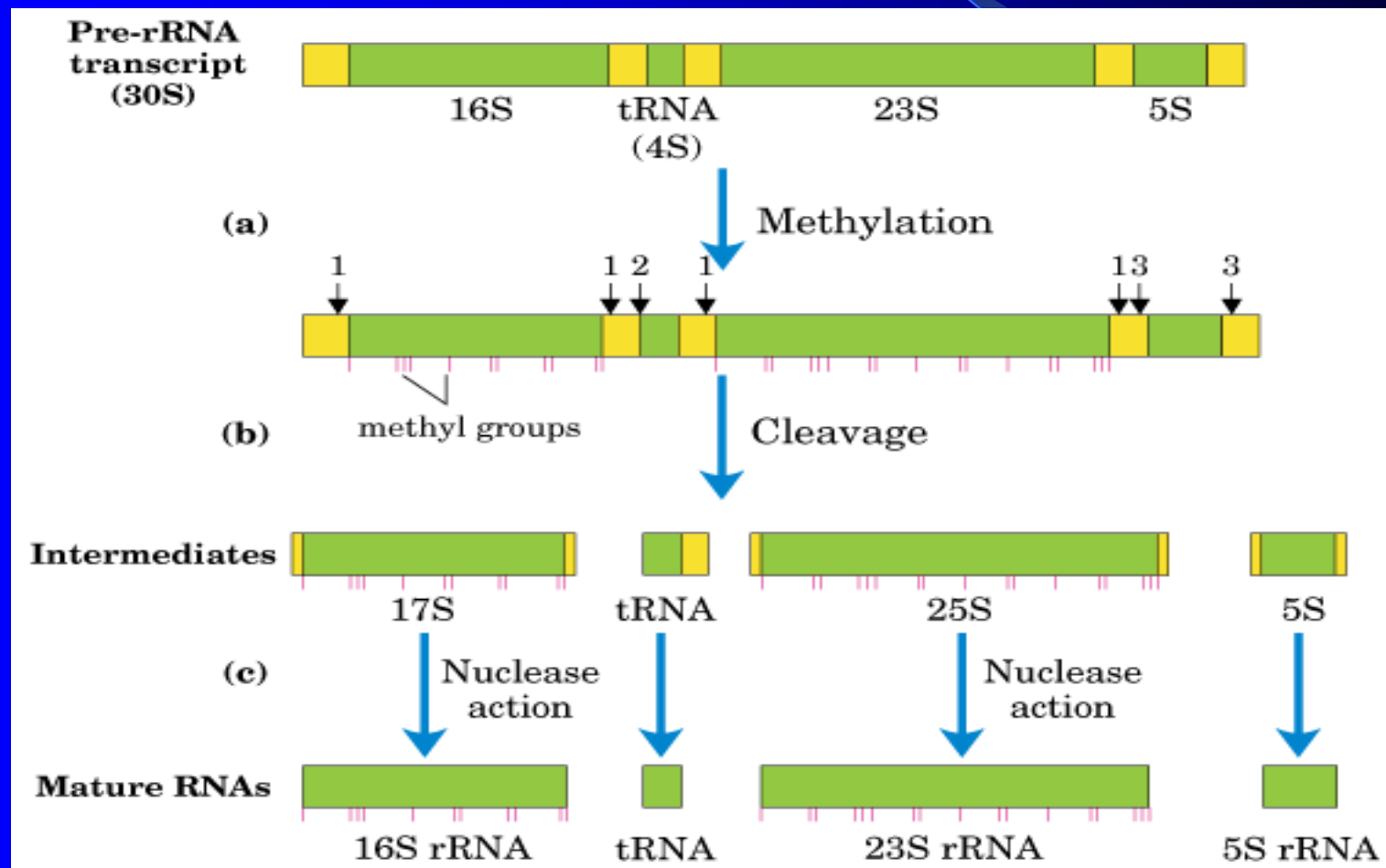
原核生物核糖体

真核生物核糖体

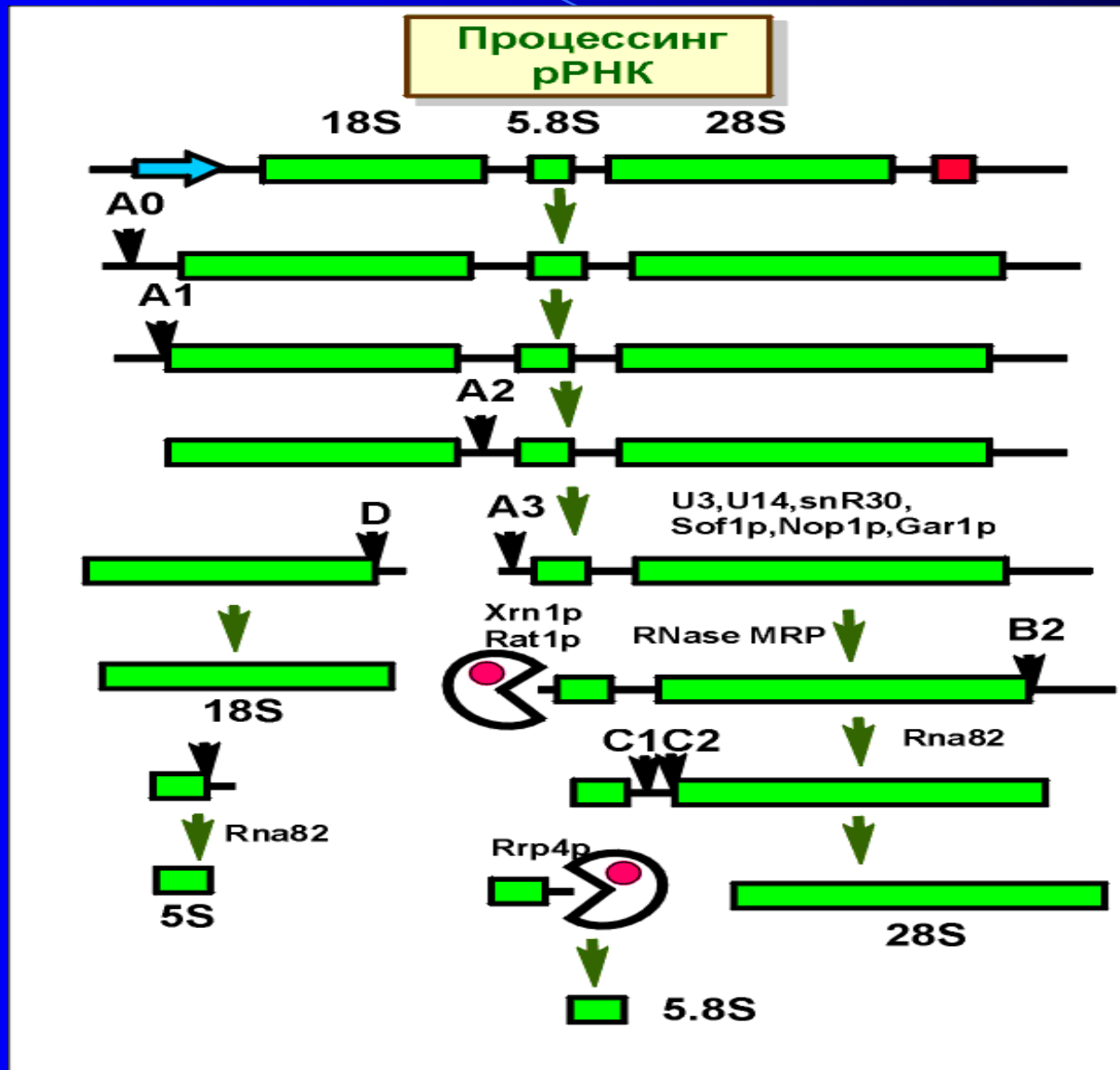


rRNA的加工途径

原核 30SrRNA的加工过程:



真核rRNA加工过程



内含子的剪接

- ❖ 1981年，美国Colorado大学Cech等人研究四膜虫rRNA时，首次发现rRNA中I型内含子具有自我剪接的功能--Selfsplice
- ❖ 酶的化学本质是蛋白质？



Cech T.R

RNA auto-splicing as Ribizyme

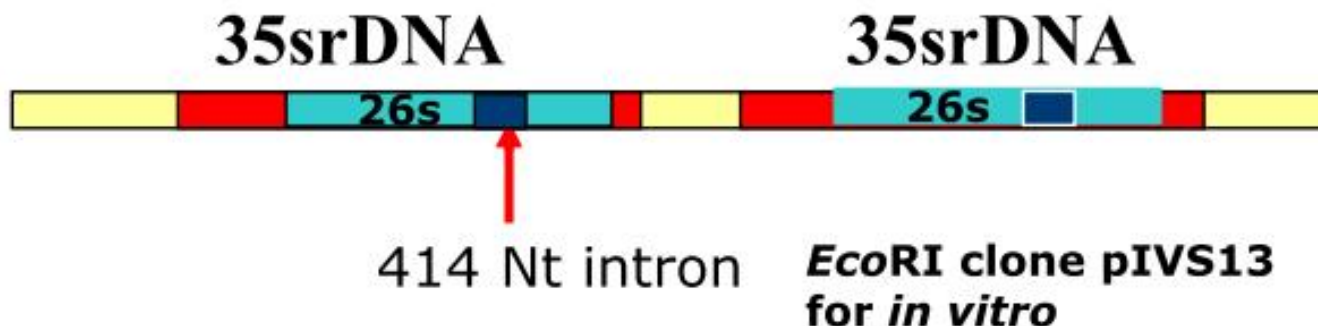
Thomas Cech Univ. of Colorado 1989 Nobel prize

**One of the most stunning discovered
in molecular biology**

1981 Thomas Cech *tetrahymena thermophila*

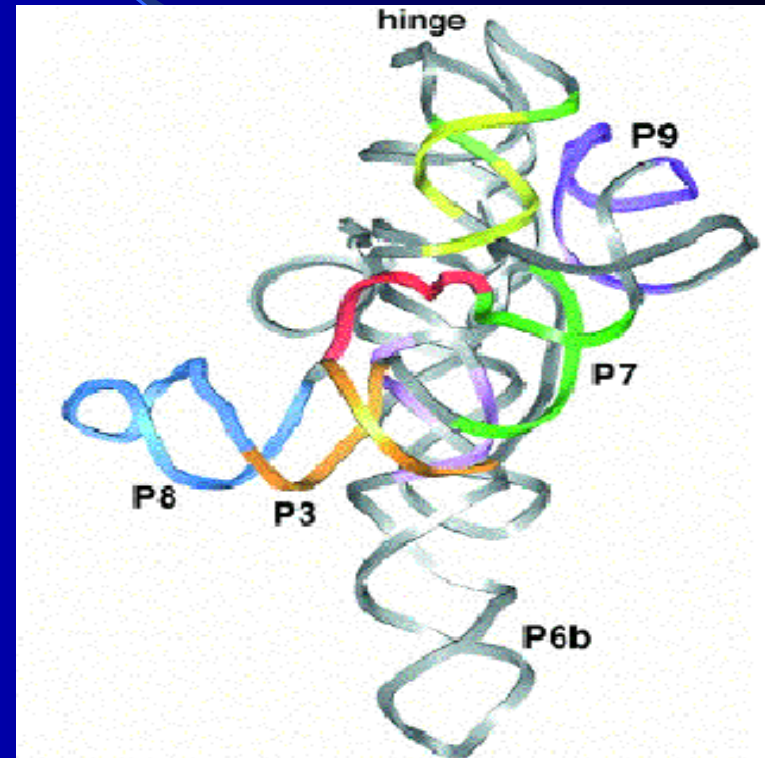
染色质结构对基因表达的影响

linear rDNA-dimer including two of 35s rRNA seq.



I型内含子

- 分布：原生生物、真菌、叶绿体和线粒体基因组中发现1000多种
- 经典模型：四膜虫rRNA前体
- 特征：
 - 拼接点序列为5' U.....G3'
 - 中心核心结构
 - 内部引导序列 (IGS)
 - 剪切通过转酯反应进行



Tetrahymena group I introns

I型内含子一级结构

❖ 拼接点序列:

I型内含子的拼接点序列绝大部分为
5' U.....G3' 。

Sc COB3	5' GUU	UAAUA	UAAAU G	CUC3'
Sc COB4	5' GGU	CAAAA	UAAAAG	CAU3'
Sc COB5	5' UAU	UGAUA	AAAUUG	UGU3'
Sc OX3	5' GGU	AACCA	AAAAUG	AAC3'
Sc OX4	5' GGU	CAAAC	AACAAG	CAC3'
Sc OX5 α	5' AUU	AAUAA	UAAAAG	AGC3'
Sc OX5 β	5' GAU	AUUAA	UUUAUG	ACU3'
Sc rRNA	5' GAU	AAUUU	AAUUUG	AAC3'
Ti rRNA	5' UCU	AAAU A	UACUC G	UAA3'

部分第 I 类内元的拼接点序列

I型内含子的二级结构

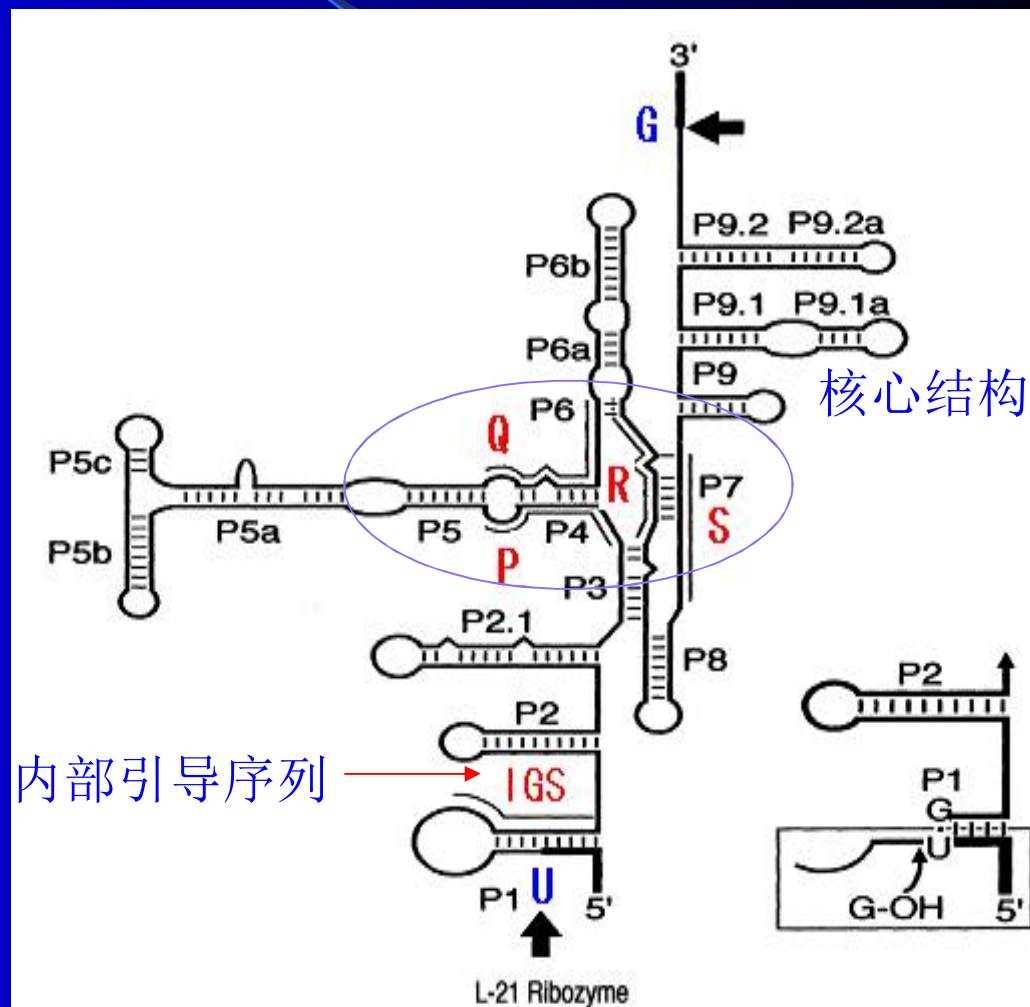
❖保守核心结构序列:

保守的四种10-12核苷酸的序列，P与Q互补，R与S互补，形成一个所谓**中部核心结构**

❖内部引导序列:

P1的3' 链完全来自于内含子，称为**内部引导序(IGS)**

位于P1 5' 的剪接位点U
5' P暴露在催化中心亲核基团的附近，特异性分子内部切割



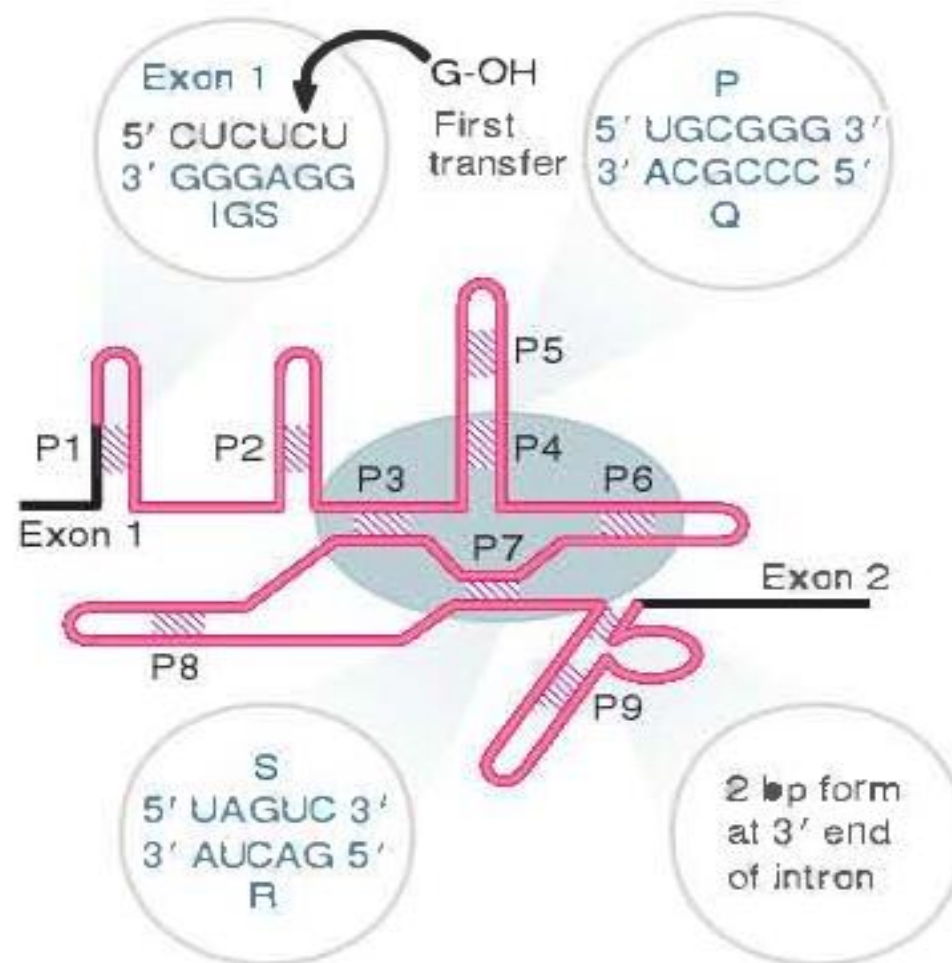
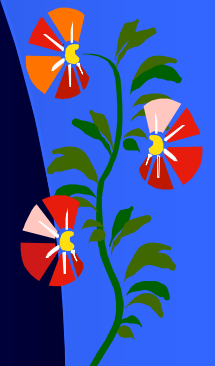
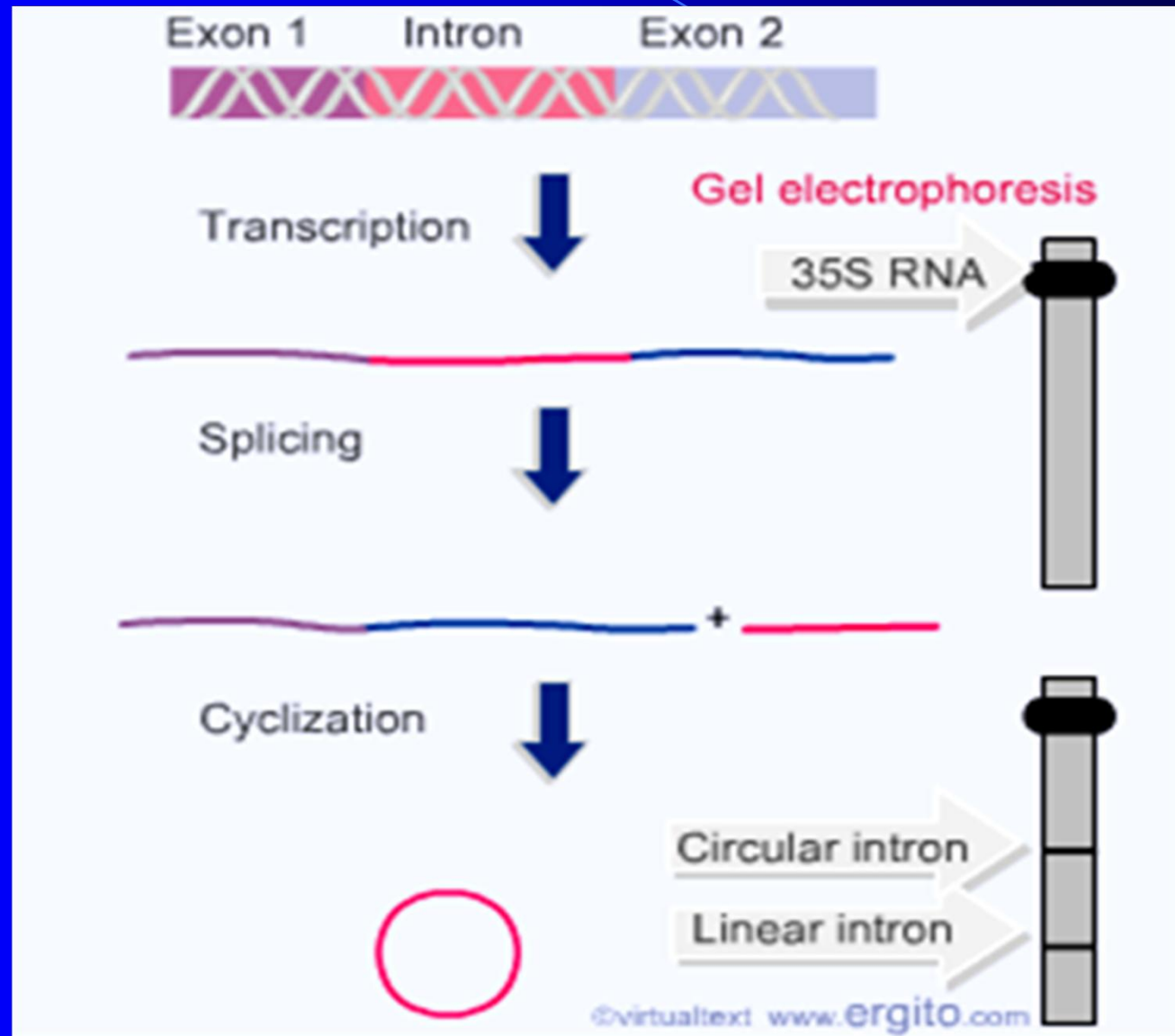


FIGURE 23.4 Group I introns have a common secondary structure that is formed by nine base-paired regions. The sequences of regions P4 and P7 are conserved and identify the individual sequence elements P, Q, R, and S. P1 is created by pairing between the end of the left exon and the IGS of the intron; a region between P7 and P9 pairs with the 3' end of the intron. The intron core is shaded in gray.

I型内含子的剪接

- ❖ Cech等1981年用四膜虫分离得到了35S的前体rRNA，含有一个长413bp的内含子
- ❖ 该35S rRNA在阳离子及GTP存在下在体外释放出413bp的线性的内含子
- ❖ 若继续保温，那么线形内含子又可形成环状的RNA分子
- ❖ 说明35S RNA在GTP的存在下可以自我剪接

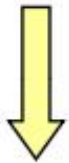
I型内含子的剪接实验



in vivo
Nuclear



incubation

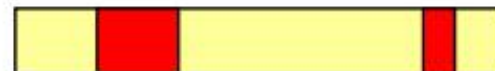


**continue
incubation**



35s rRNA

(no any enzyme & energy)



**414Nt
(linear RNA)**



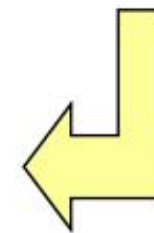
**414 Nt
(circle RNA)**

in vitro

pre-35s rRNA



GTP / GDP/ GMP



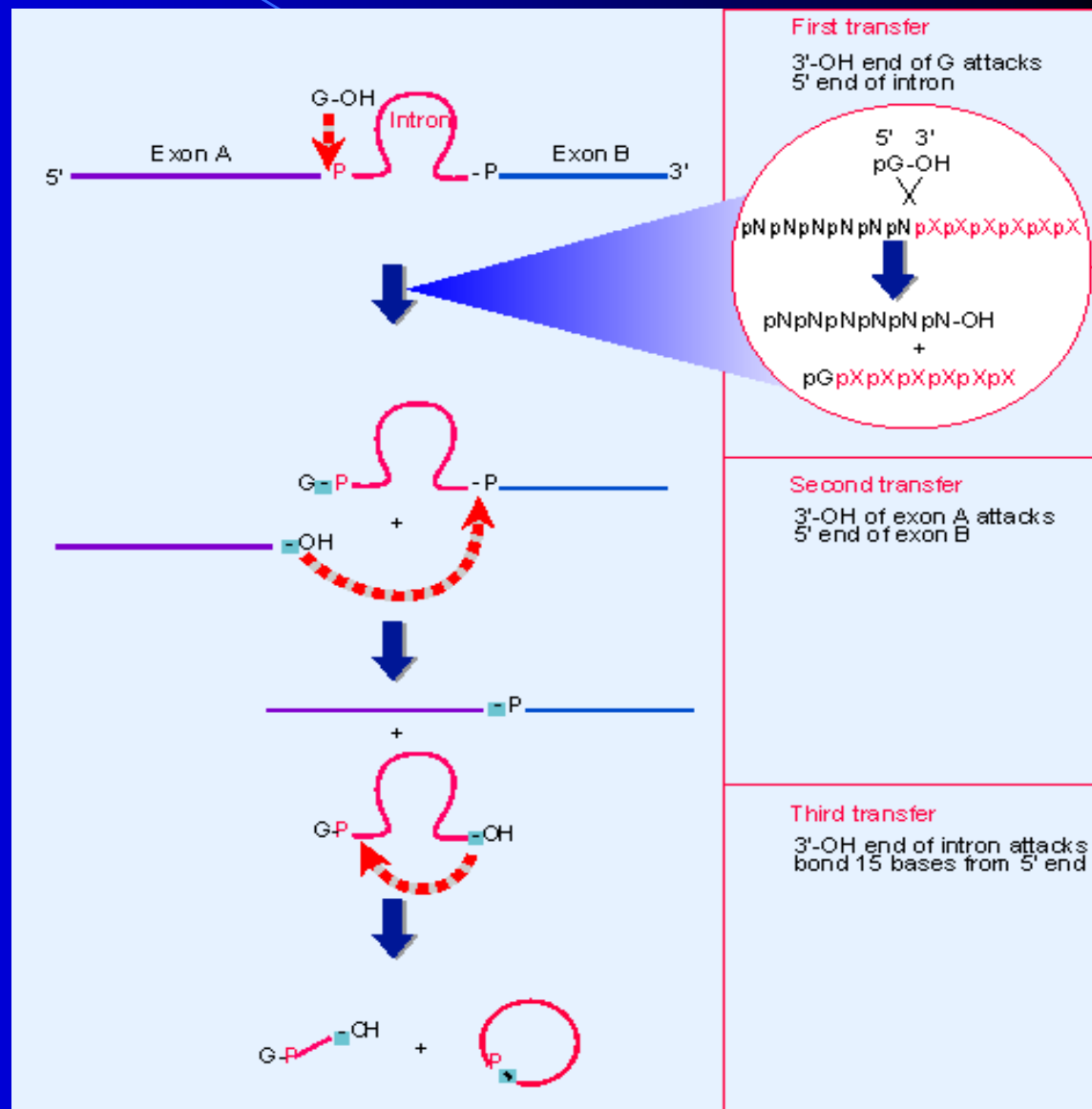
**same
results**

Group I 内含子自我剪接

❖ G3' -OH 进攻第一个外显子与内含子之间的磷酸二酯键，使原有的磷酸二酯键断裂，同时在与内含子序列的5' 端形成新的磷酸二酯键，并在第一个外显子3' 末端生成-OH

❖ 第一个外显子的3' -OH进攻内含子与第二个外显子之间的磷酸二酯键，结果两个外显子序列连接起来

❖注意：反应可逆！



L-19RNA分子的形成

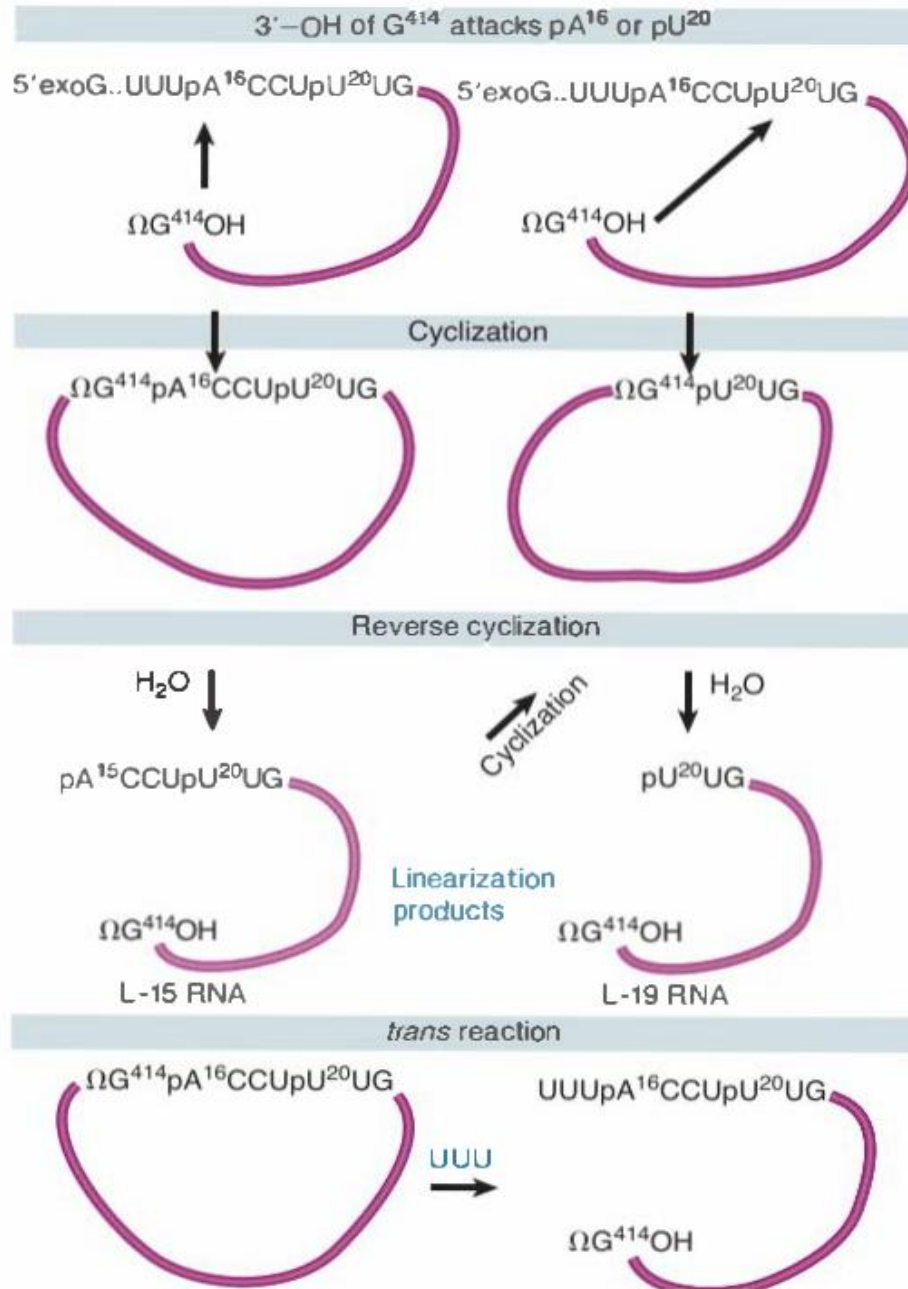
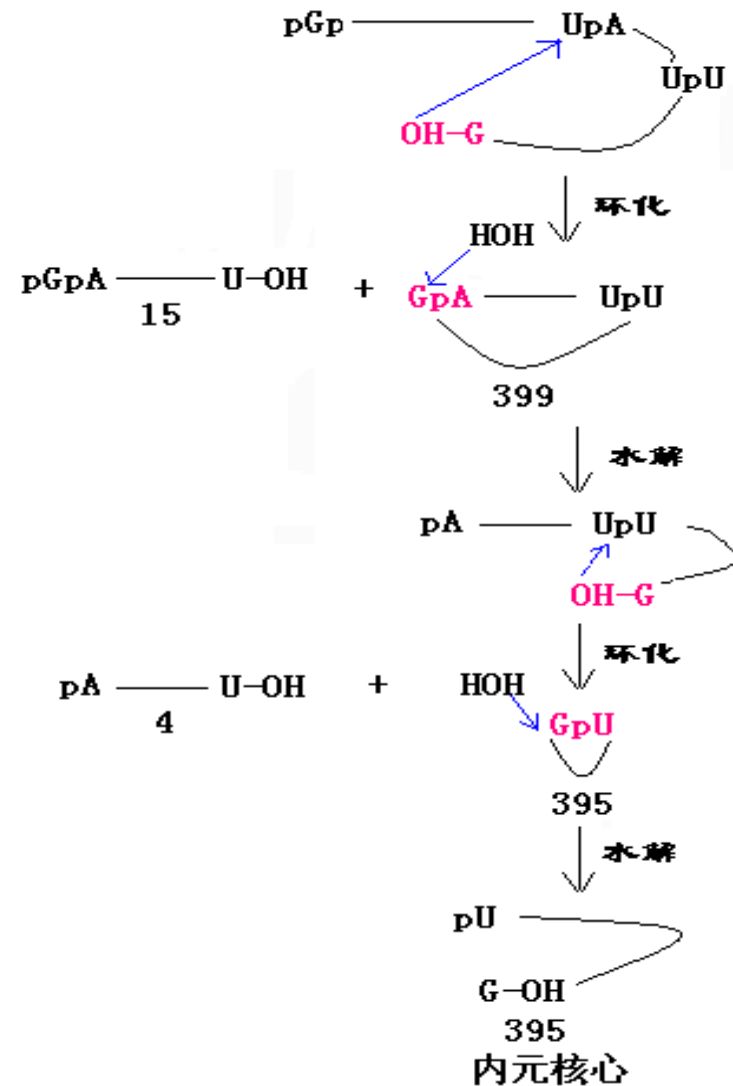
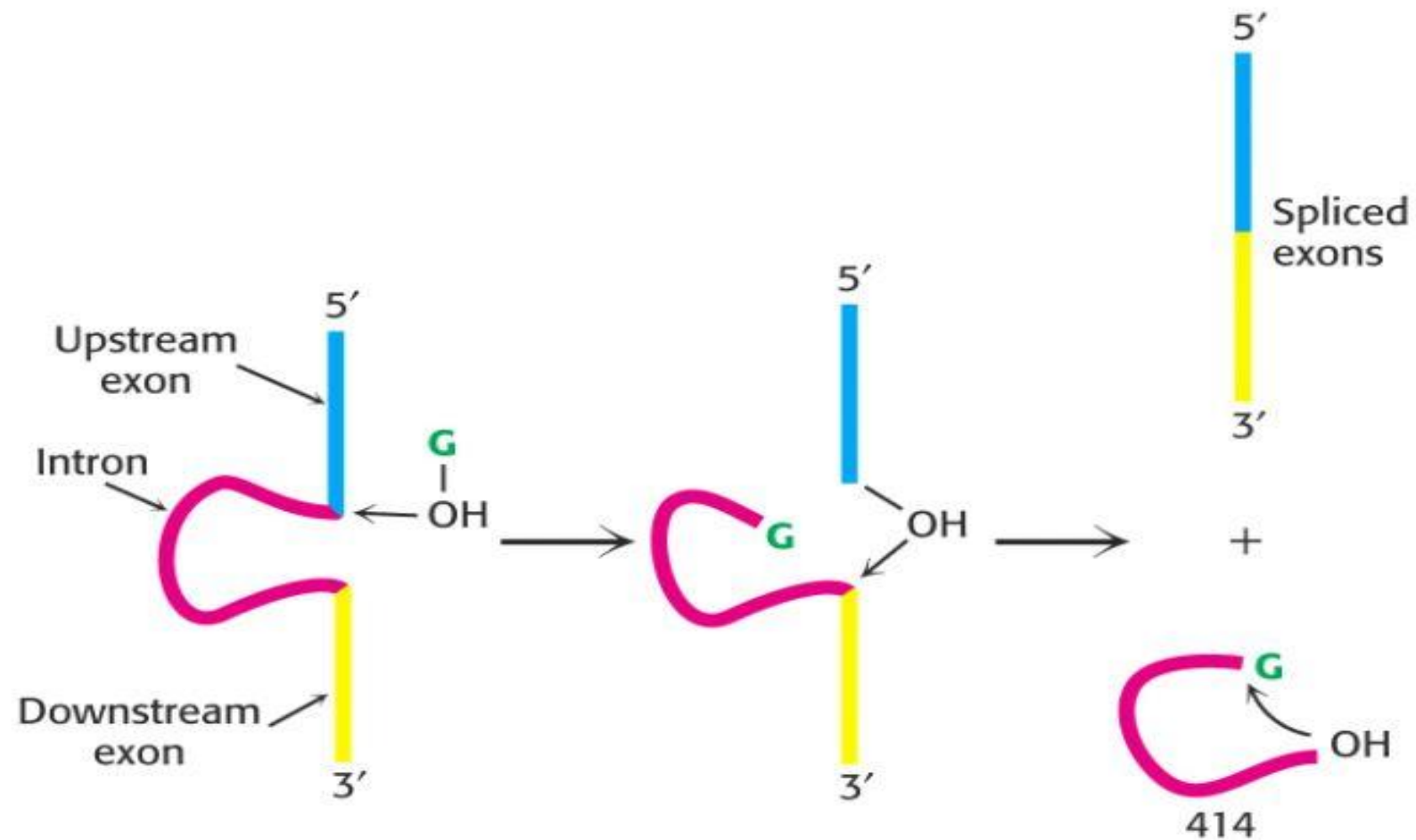


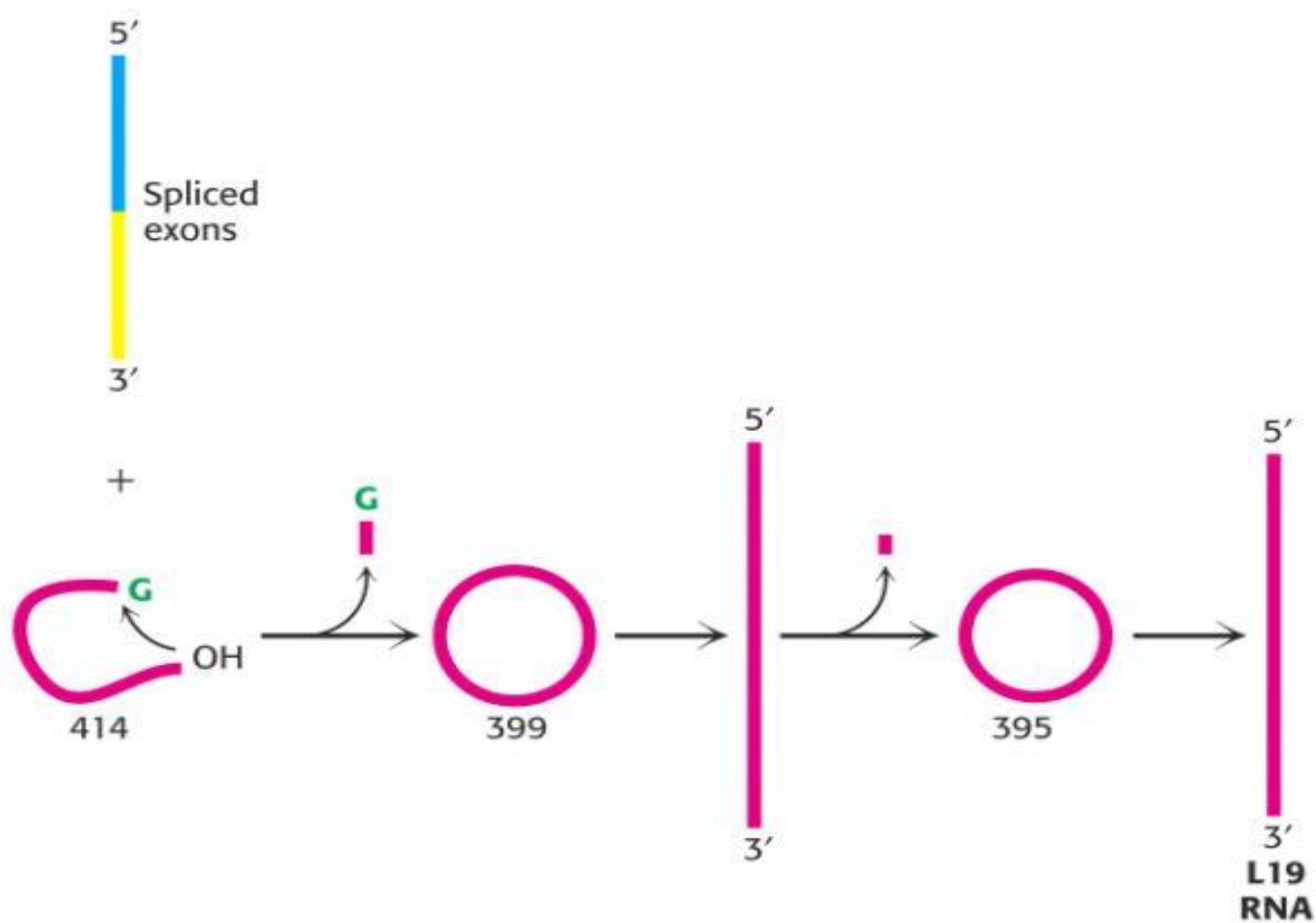
FIGURE 23.3 The excised intron can form circles by using either of two internal sites for reaction with the 5' end and can reopen the circles by reaction with water or oligonucleotides.



剪接: 转酯反应过程一



转酯反应过程二



in vitro pre-35s rRNA



GTP_{α}^{32}

$\text{GMP}^{32} \sim 414\text{Nt intron}$



$\text{GMP}^{32} \sim 15\text{Nt} + 399\text{Nt circle intron}$

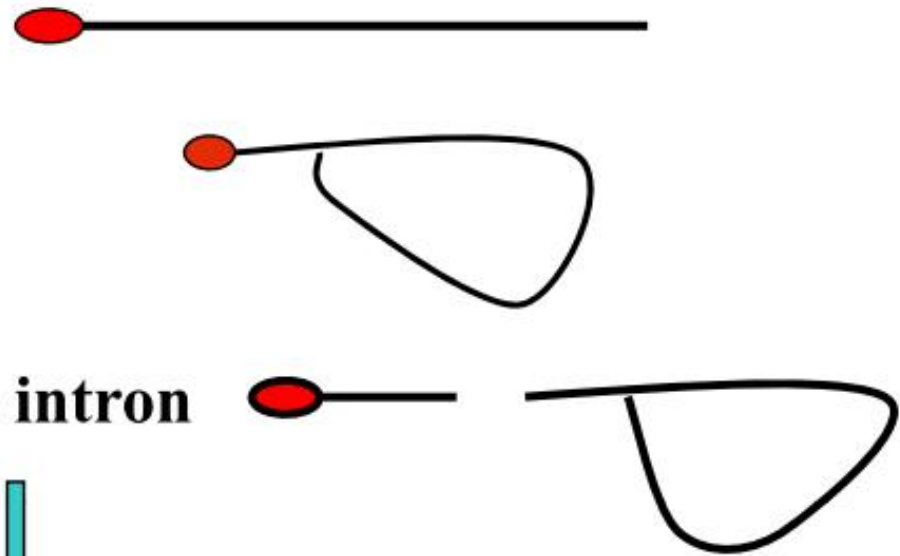


Lose 19 Nt

4Nt + 395Nt linear intron

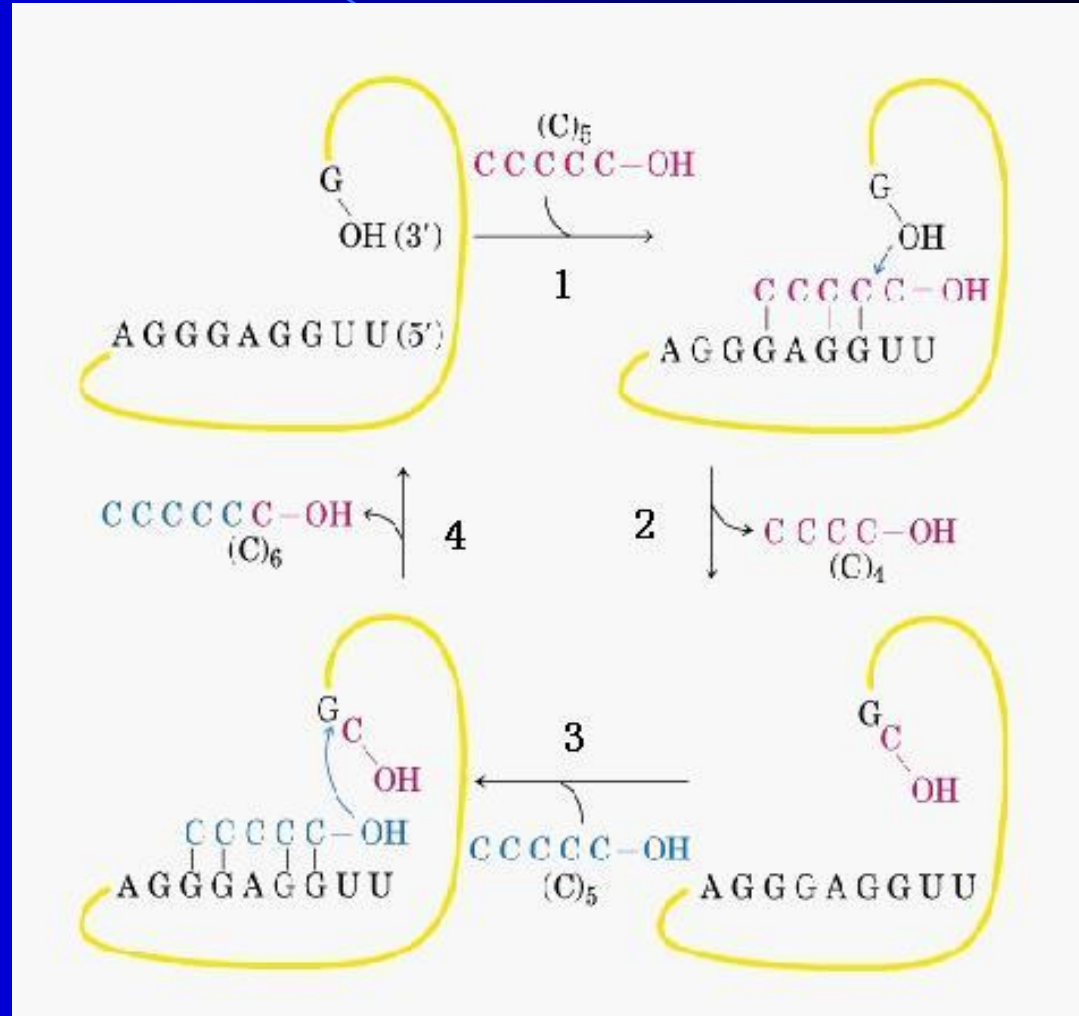
(L19)

重要推测



L-19 RNA是酶么？

- I型内含子的剪接是分子内反应，且酶不可再生，不能再次催化rRNA前体的自剪接反应
- Cech等人一方面他们阐明了四膜虫35S RNA的剪接机制，另一方面证明L-19分子具有polyC聚合酶活性
- 当L-19分子与oligoC保温时，L-19能够催化polyC的生成

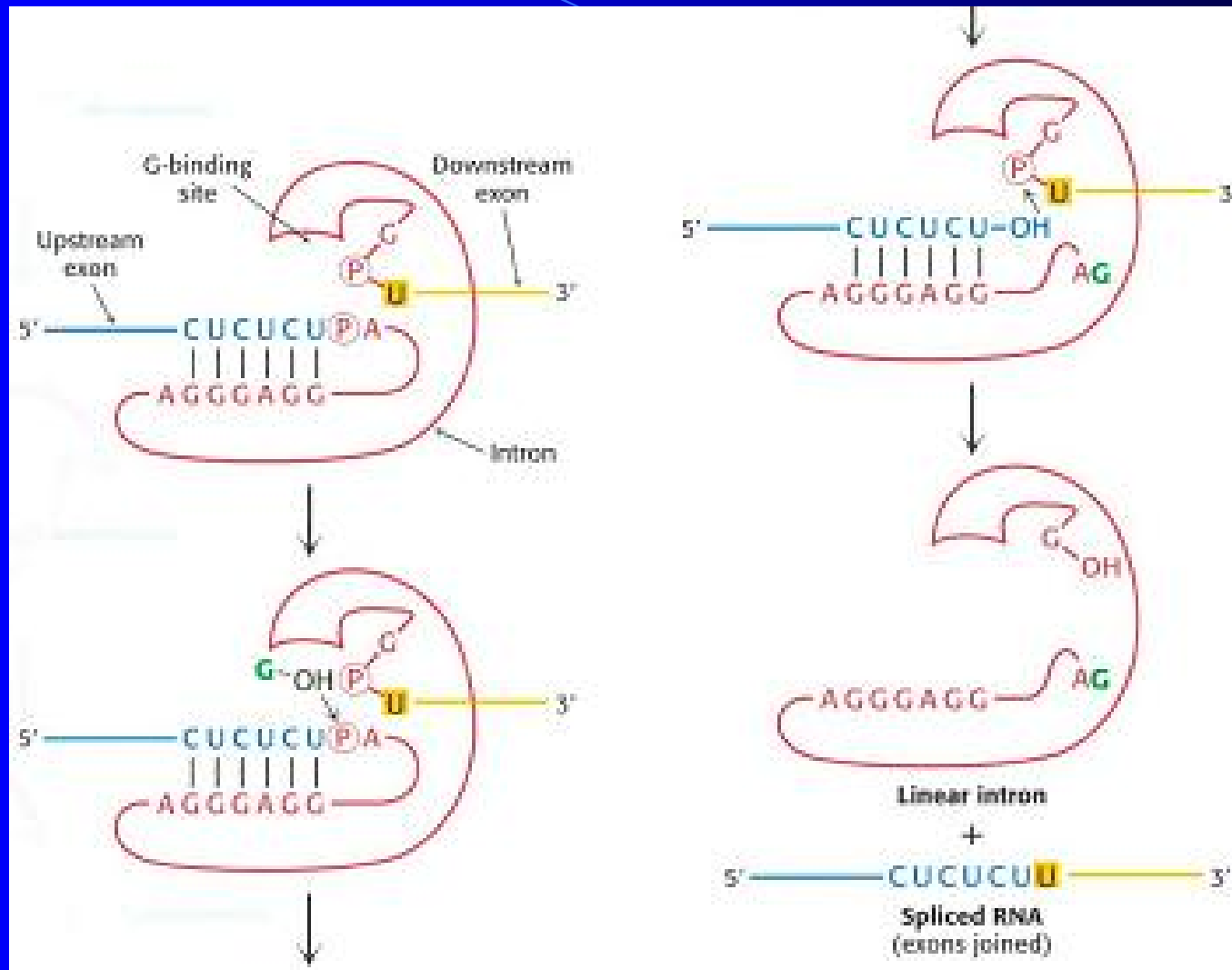


L19-IVS的polyC聚合酶活性

L19-IVS具有酶的性质

- L19具有经典酶的特征：
 - 加快反应速率
 - L19反应前后不变
 - 底物专一性
 - 服从米氏动力学规律
- L19-IVS催化RNA类型
 - 聚合作用（连接酶）
 - 水解作用（水解酶）
 - 转核苷酸作用（转移酶）
 - 转磷酸作用（转移酶）
 - 去磷酸作用（裂解酶）
 - RNA限制性内切酶（裂解酶）

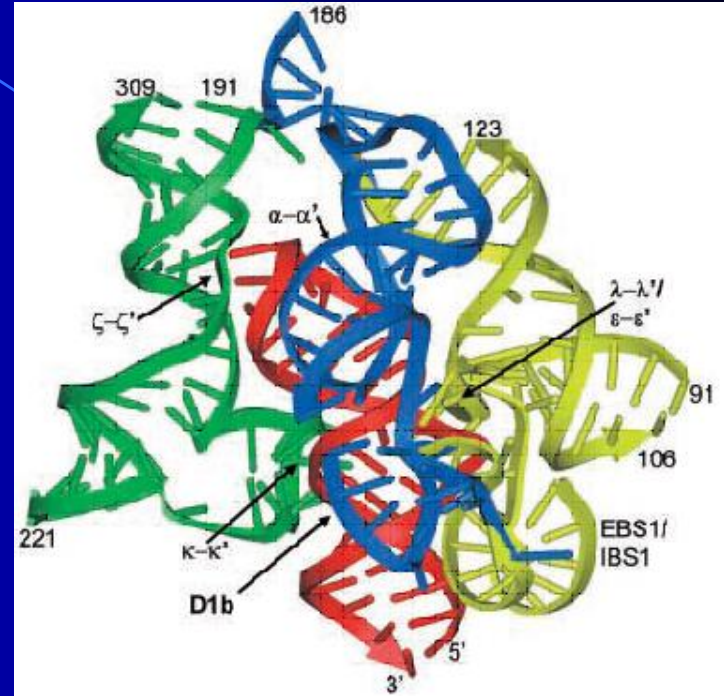
Group I 内含子催化的空间结构



内含子序列折叠为一定的空间结构，其内部
引导序列又与边界处的外显子序列配对

Group II 肉含子

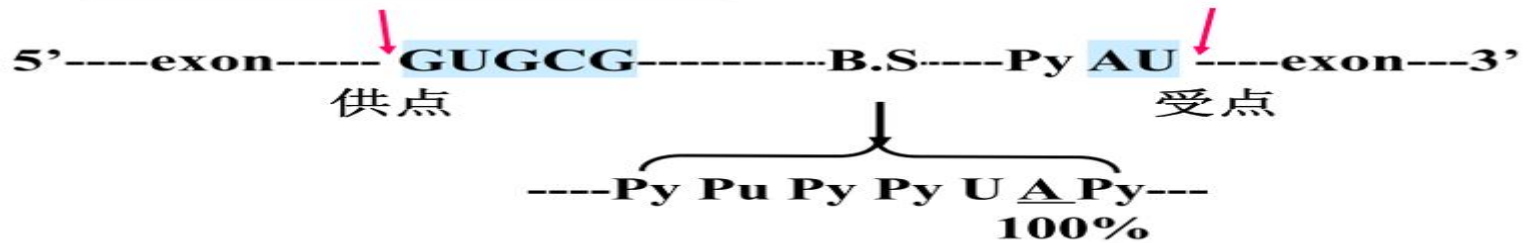
- ❖ 分布：原生生物、真菌、植物中发现100多种
- ❖ 经典模型：酵母线粒体细胞色素氧化酶mRNA前体
- ❖ 无需鸟苷的辅助，仍然需镁离子以及边界序列



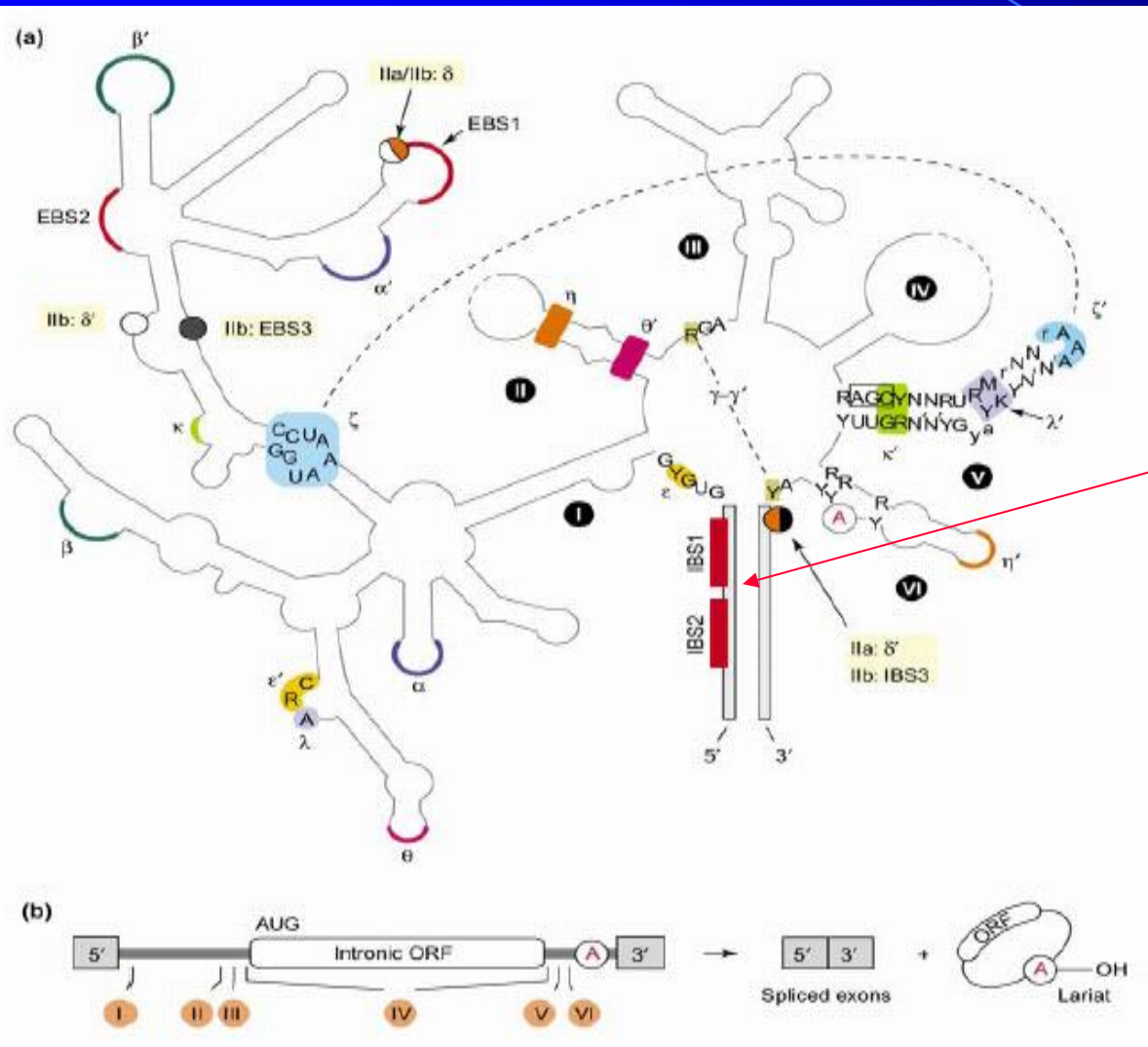
II型内含子的三级结构

Group II splicing model (Michel 1982)

Junction sequence



group II introns 二级结构



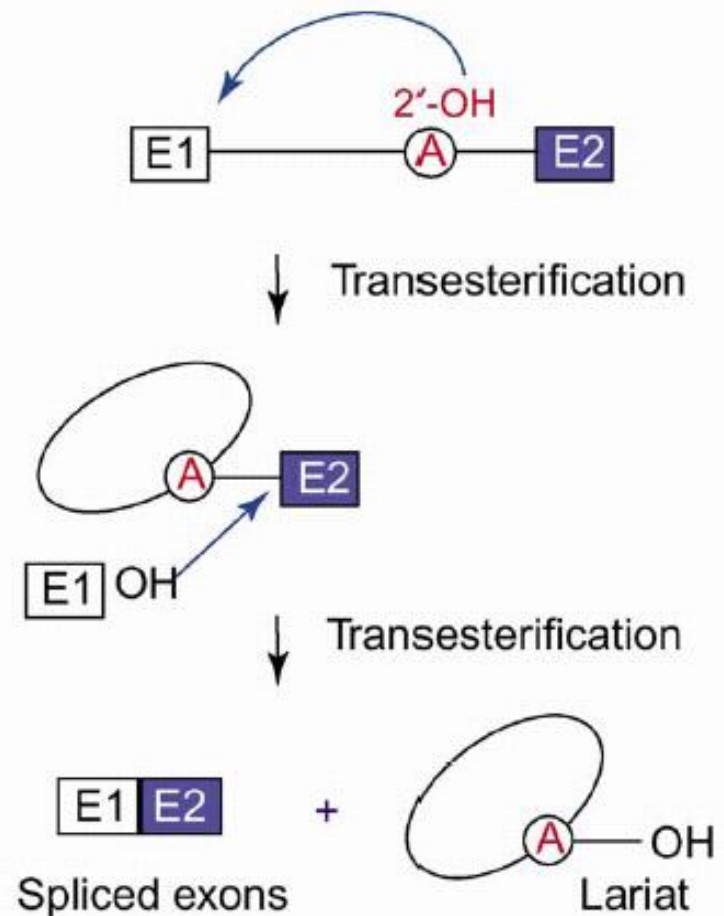
二级结构由六个螺旋组成，并产生了一个中心domain

A是来自于螺旋6

group II introns剪接过程

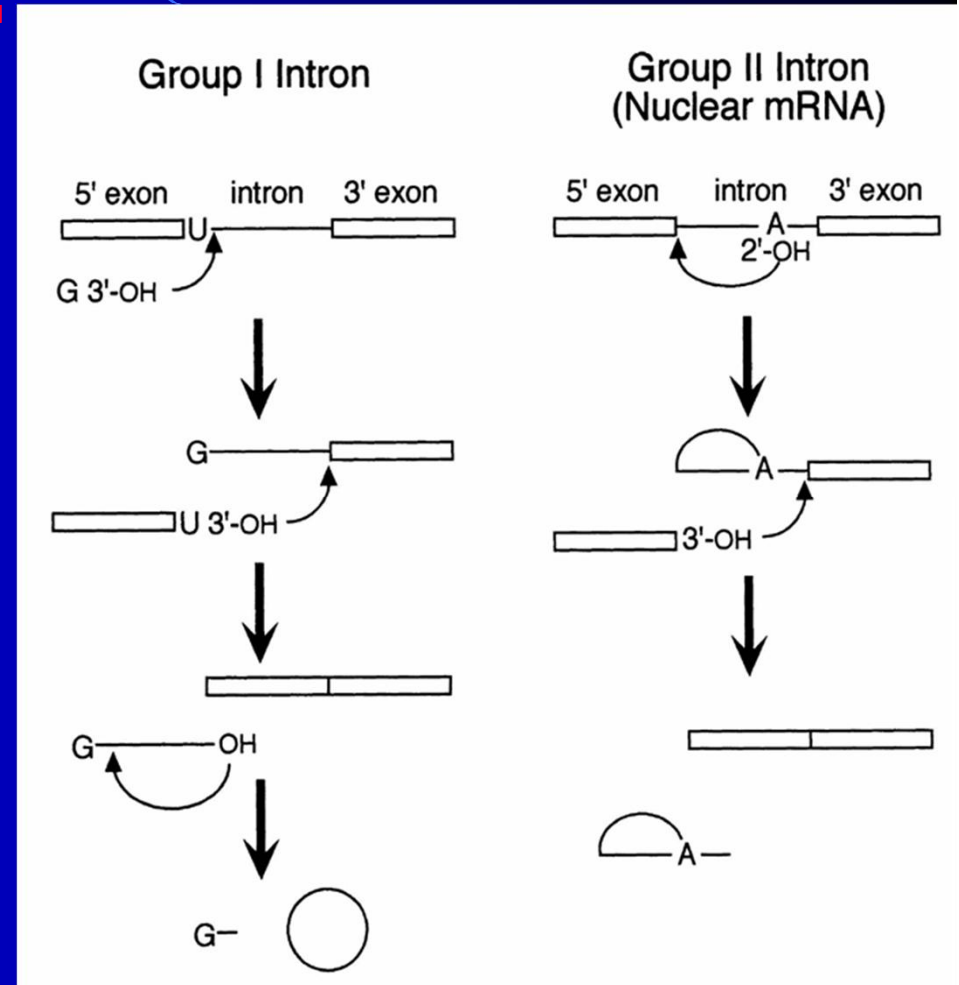
- ❖ $A2'$ -OH进攻第一个外显子与内含子之间的磷酸二酯键，原有的磷酸二酯键断裂，同时与内含子序列的5'端生成新的磷酸二酯键，从而形成了套索结构
- ❖ 第一个外显子的3' -OH进攻内含子与第二个外显子之间的磷酸二酯键，外显子连接
- ❖ 释放套索结构的内含子

(a) Main pathway



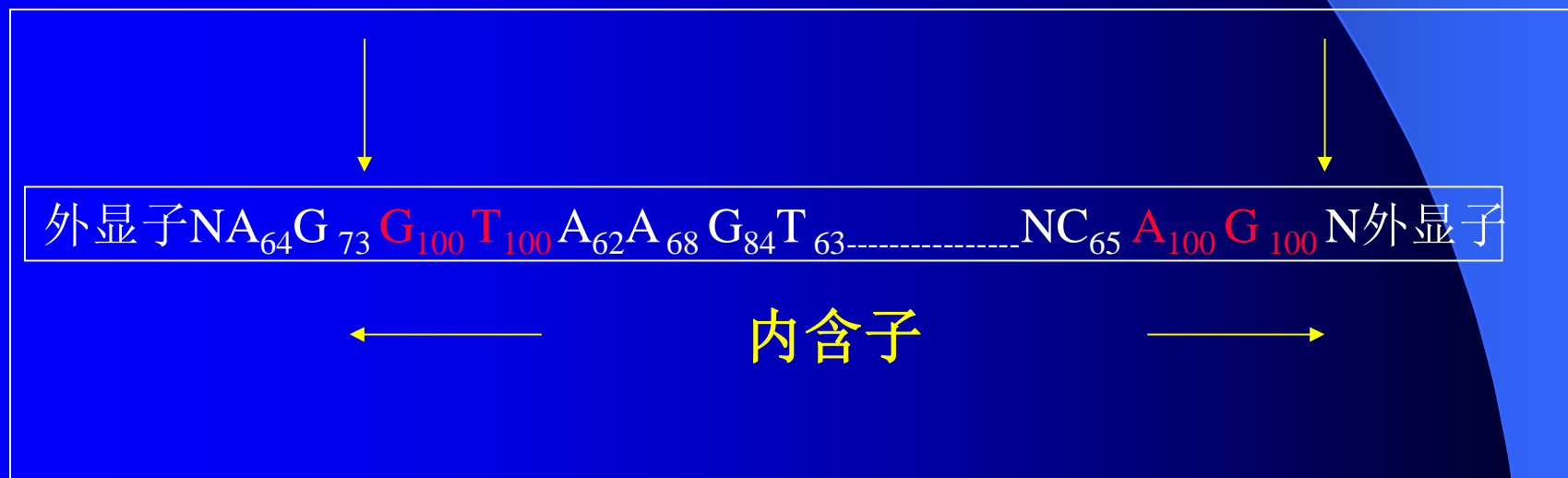
I、II型内含子剪接模式对比

- I型内含子催化需要G-3' OH存在
- II型内含子不要需G辅助，但需要 Mg^{2+}
- 二价金属离子对于II型内含子折叠和催化作用是必需的



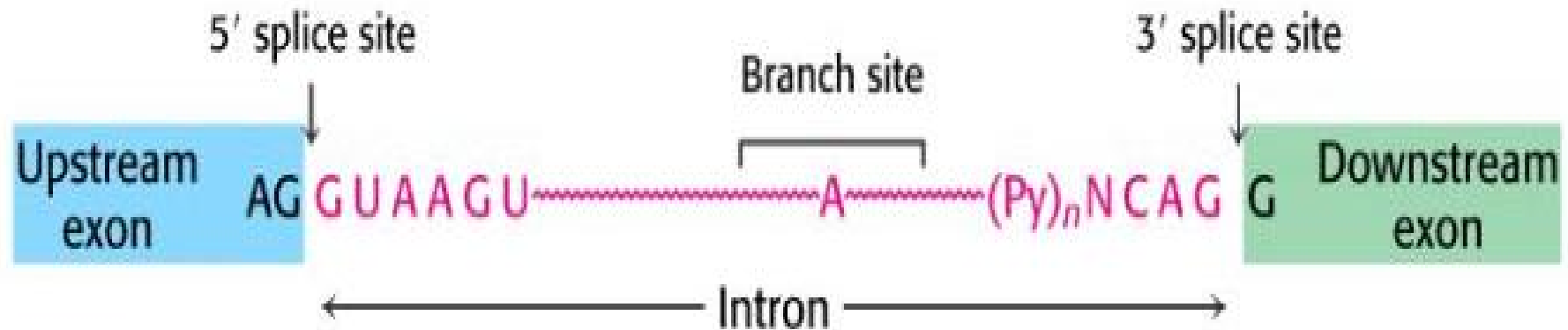
内含子切割位点特点

- ❖ 剪接点具有很短的保守序列，称为边界顺序
- ❖ 其规律称为 GT-AG 法则 (GT-AG rule) 或 Chambon 法则。



真核mRNA内含子的剪接

- ❖ 真核内含子总是由GU开始，以AG结束，边界顺序: GU-AG
- ❖ 分枝点顺序: 为 $\text{Py}_{80}\text{NPy}_{87}\text{Pu}_{75}\text{A}\text{Py}_{95}$ 其中 **A**具有2'-OH
- ❖ 内含子5' 端有保守序列与U1snRNA 5' 端的保守顺序互补



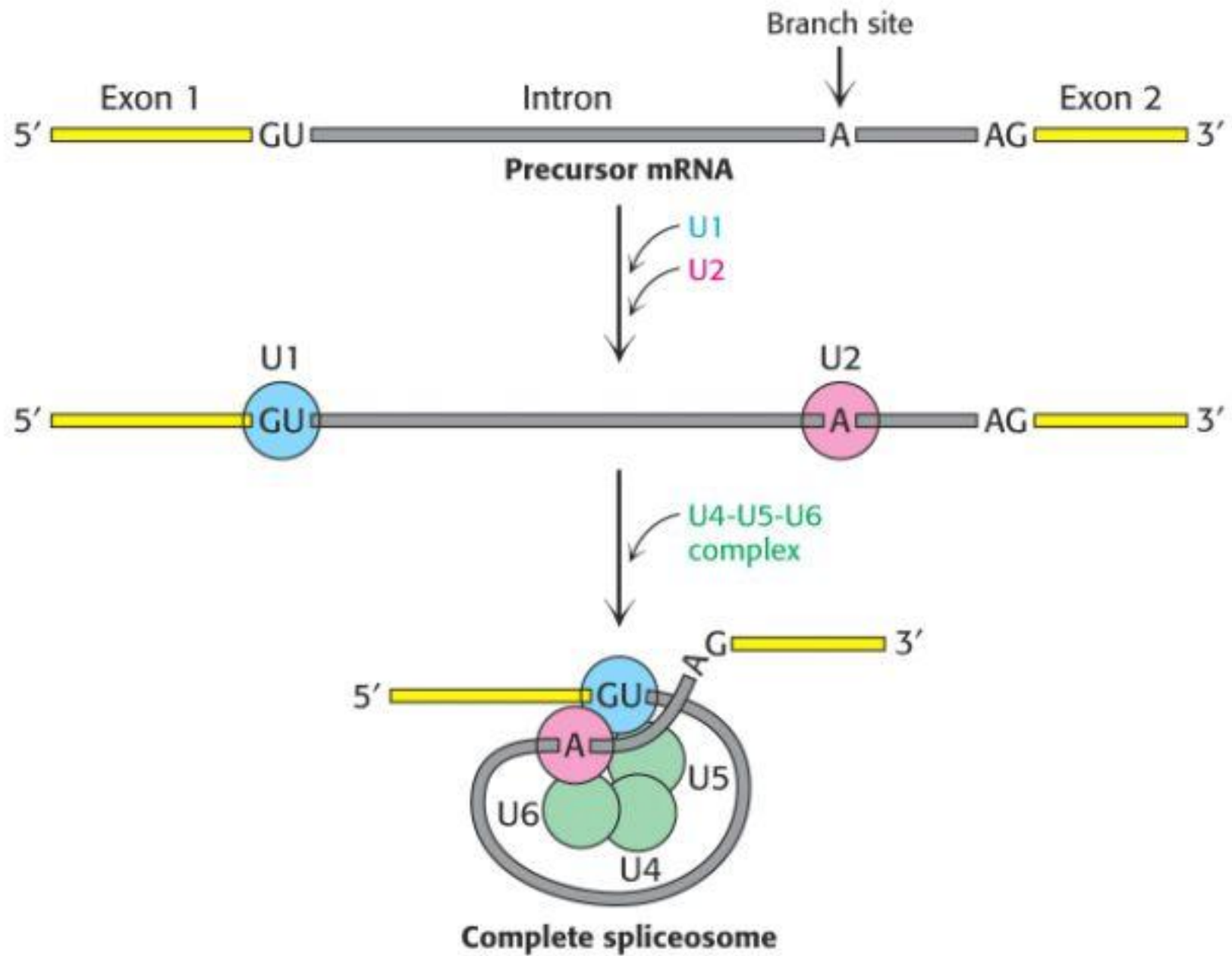
5'---*E1*---AAUAGGUGA-----*I1*-----UACAGGUUG---*E2*--
 ---*E2*--CUCAGGUACA-----*I2*-----UCAGGUUG---*E3*--
 ---*E3*-----CCAGUAA-----*I3*-----UACAGGGAA-----*E4*--
 ---*E4*-----AUGGUAA-----*I4*-----AAAGGU-----*E5*--
 ---*E5*-----GAGGUAUAU---*I5*-----CCAGCAA-----*E6*--
 ---*E6*-----GCAGGUAUGG---*I6*-----GCAGCUU-----*E7*---3'

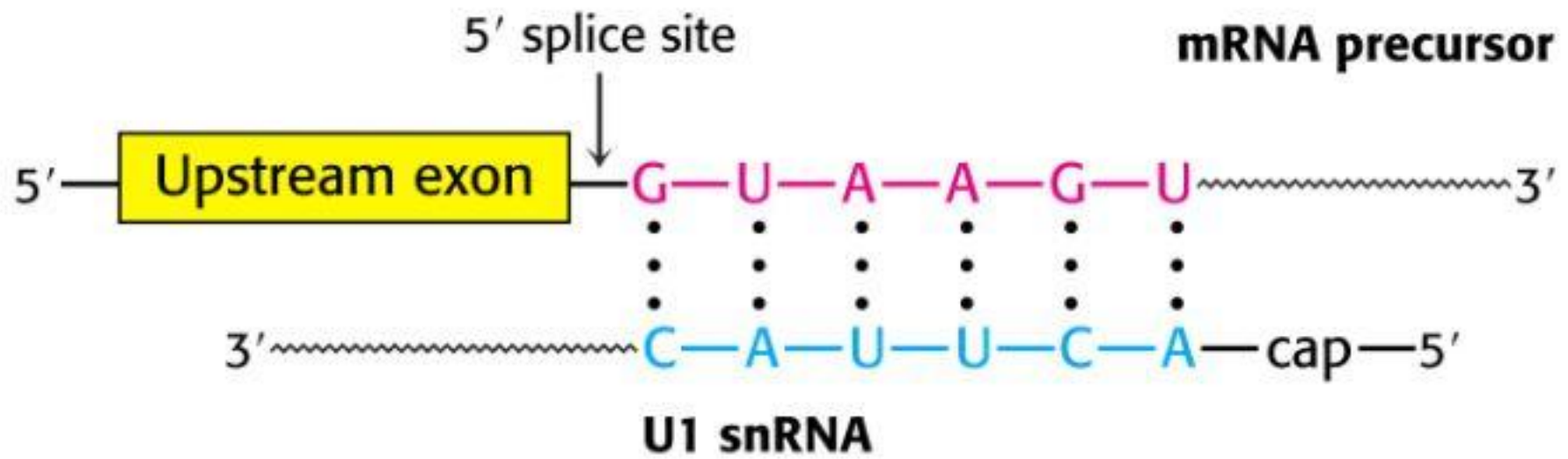
Chambon rule

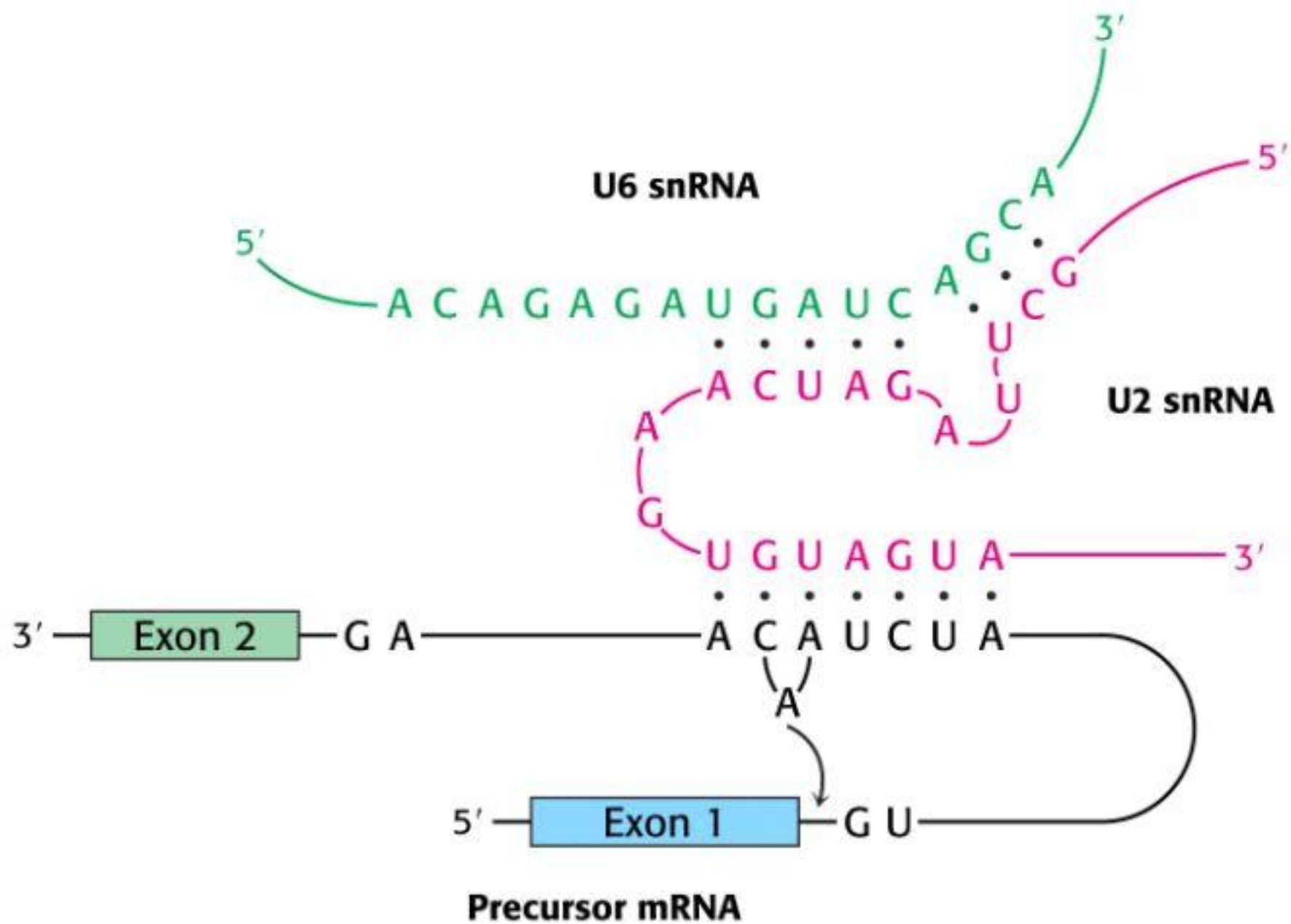
SnRNP组成

- ❖ 细胞核内的SnRNA(一般 ≤ 300 碱基)包括U1—U6等与特异的蛋白质形成复合物-SnRNP
 - ❖ 剪接体是mRNA前体与snRNP形成的复合物
 - ❖ mRNA前体的剪接通过剪接体进行
- U2, U6, U4 / U6 SnRNP等是活性剪接体的主要成份

snRNP	Size of snRNA (nucleotides)	Role
U1	165	Binds the 5' splice site and then the 3' splice site
U2	185	Binds the branch site and forms part of the catalytic center
U5	116	Binds the 5' splice site
U4	145	Masks the catalytic activity of U6
U6	106	Catalyzes splicing







Splicing mechanism (Sharp. P.A. Cell. 1994. 77; p805-815)

- **SnRNA (or ScRNA) 与junction seq or Branch site间存在互补区域并参与剪接, 形成 spliceosome。**
- **Spliceosome 逐级组装, SnRNA 分步替代**
- **RNProt.在spliceosome中, 参与转酯, 剪接反应**
- **5' of Intron 剪切与lariat 的形成同步**
- **3' of intron 剪切与lariat 切除, exons连接同步**
- **spliceosome 解体与lariat降解同步**

剪接的调控

- 对供点或受点的选择 剪接的准确与否
- 对受点序列的选择 $\text{CAG} = \text{UAG} > \text{AAG} > \text{GAG}$
- 剪接类型;

组成型剪接 (**constitutive splicing**)

cutting each intron in one by one

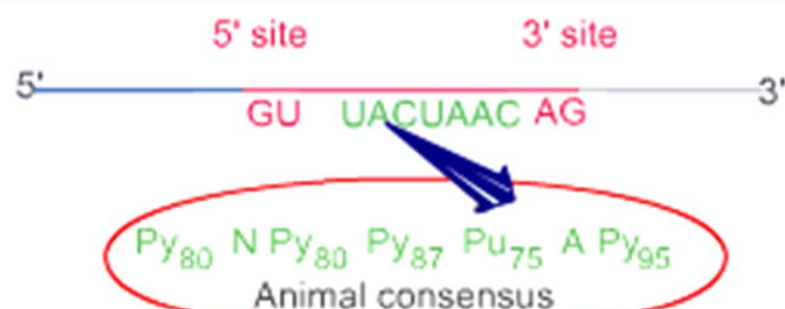
选择性剪接 (**alternative splicing**)

create isoform protein

>5% gene in mammal

个体发育, 细胞分化

Splicing proceeds through a lariat



Cut at 5' site & form lariat by 5'-2' bond connecting the intron 5'-G to the 2' of A at the branch site



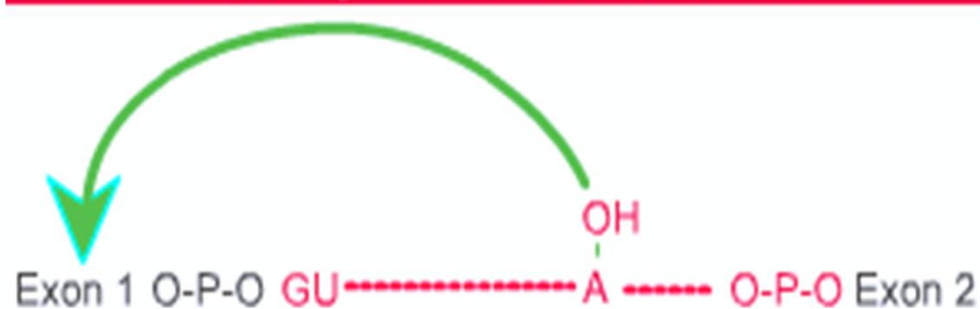
Cut at 3' site and join exons; intron released as lariat



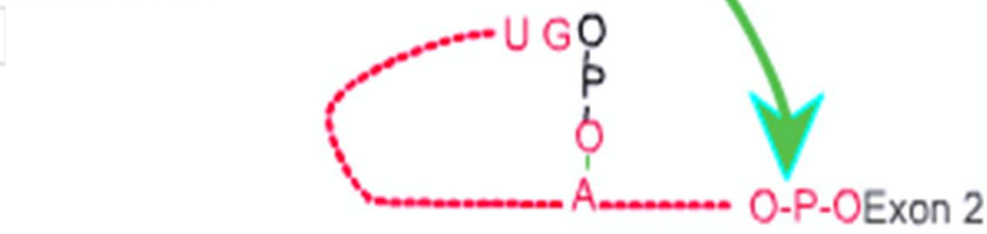
Debranch intron



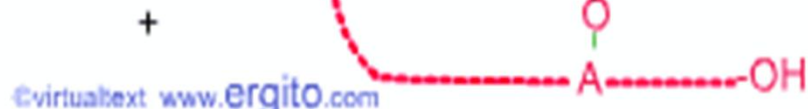
Splicing uses transesterification



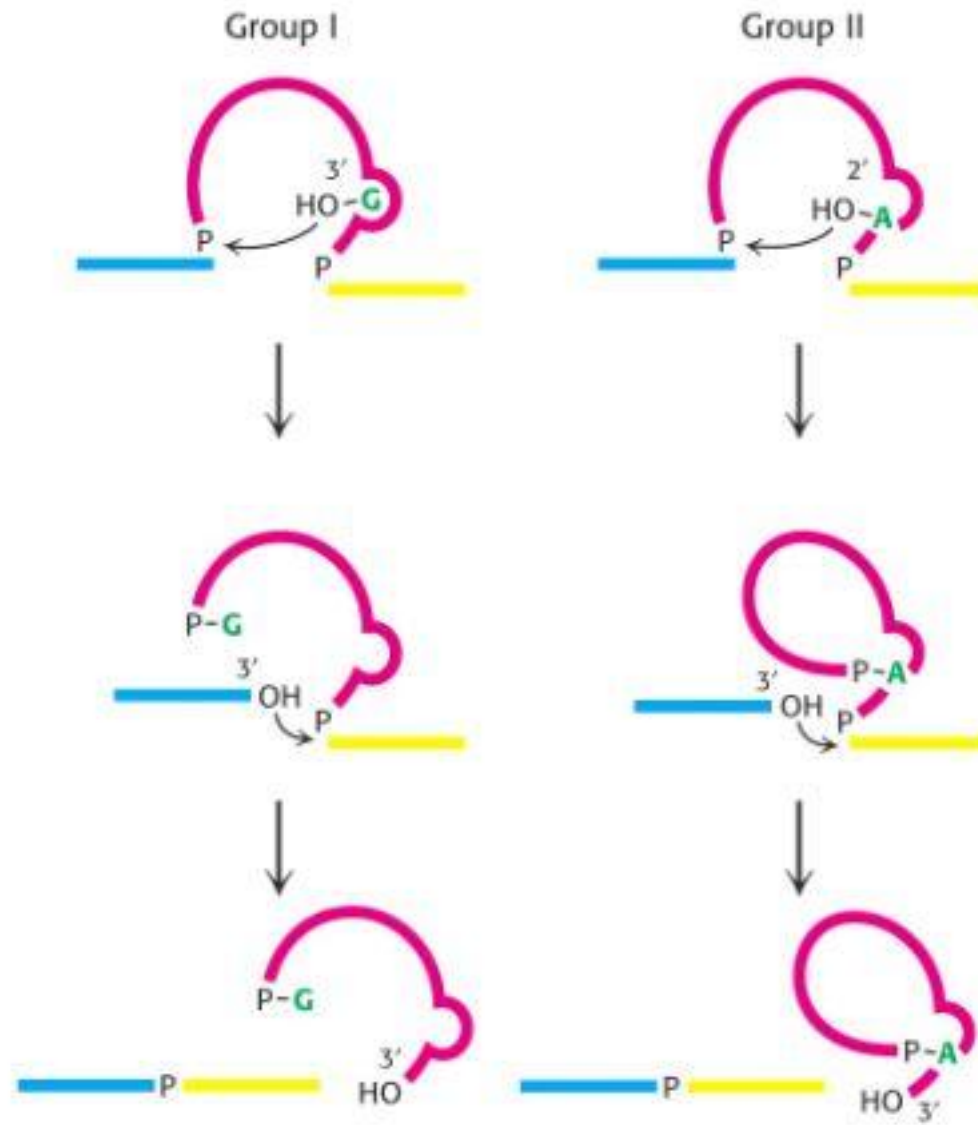
Exon 1-OH



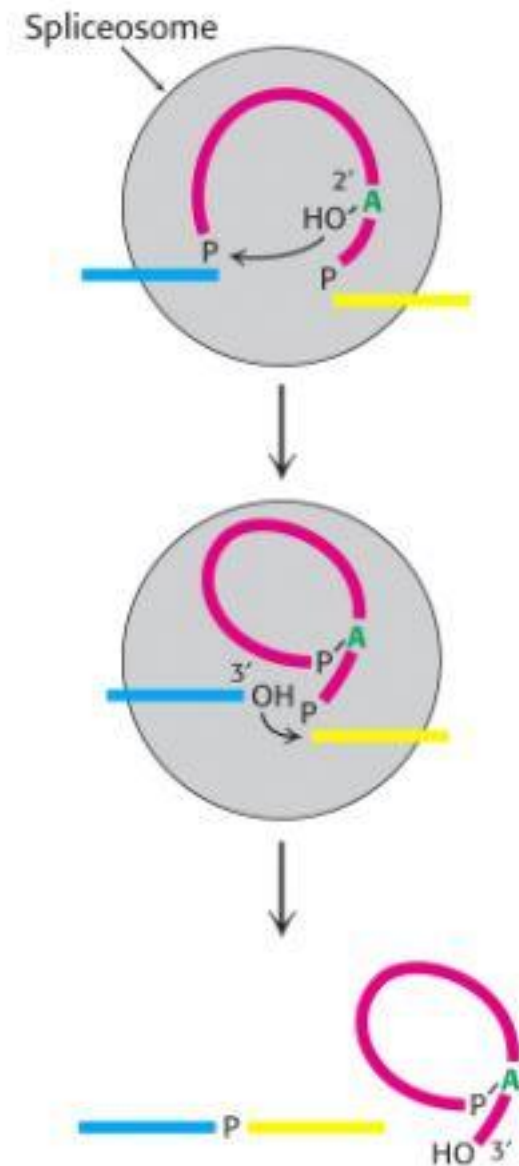
Exon 1 O-P-O Exon 2



SELF-SPICING INTRONS



SPICEOSOME-CATALYZED SPICING OF NUCLEAR mNRA

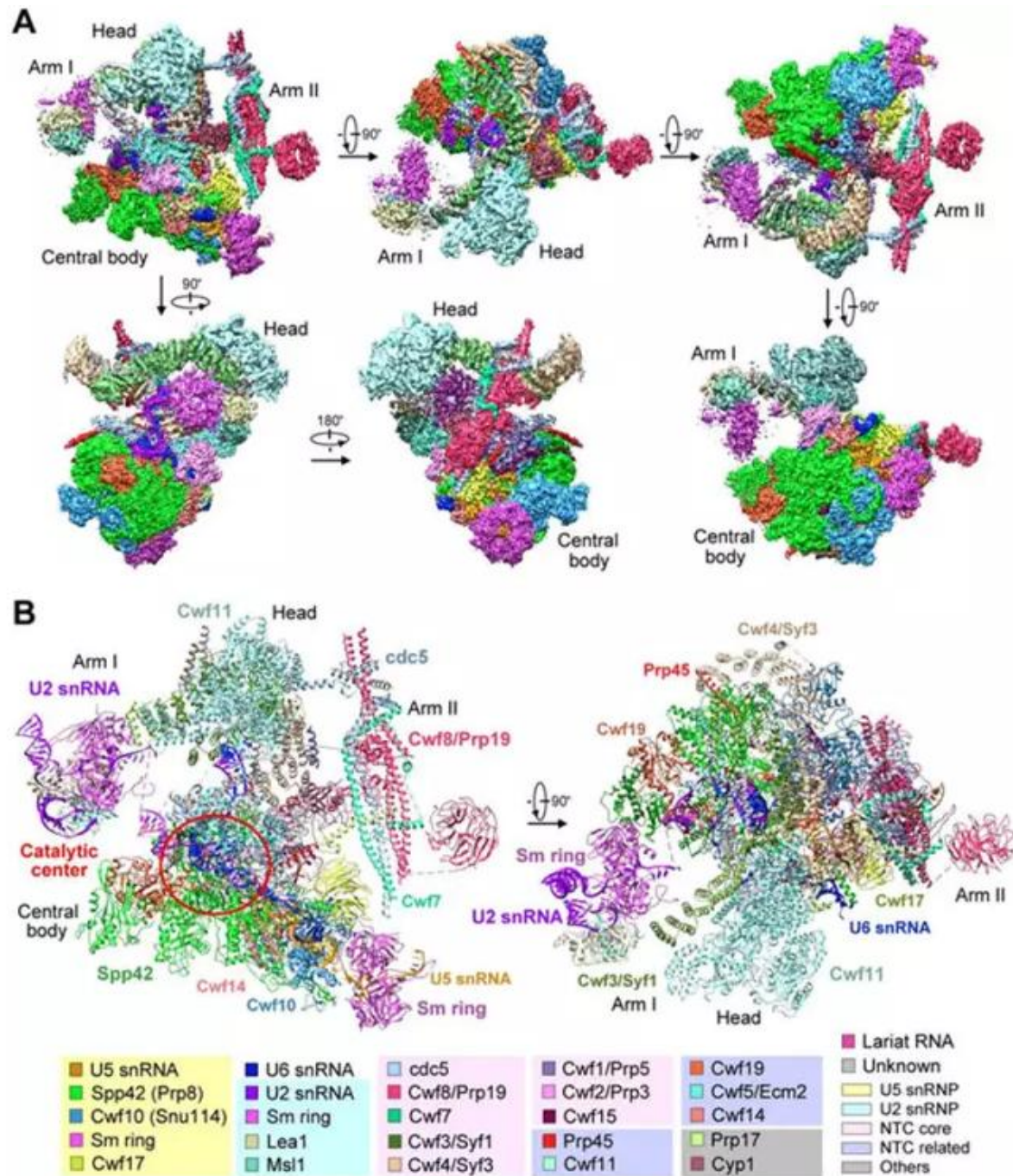


里程碑实验

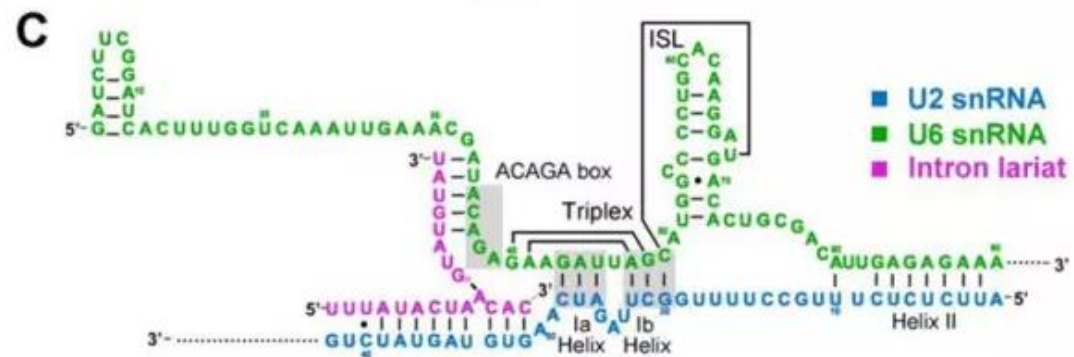
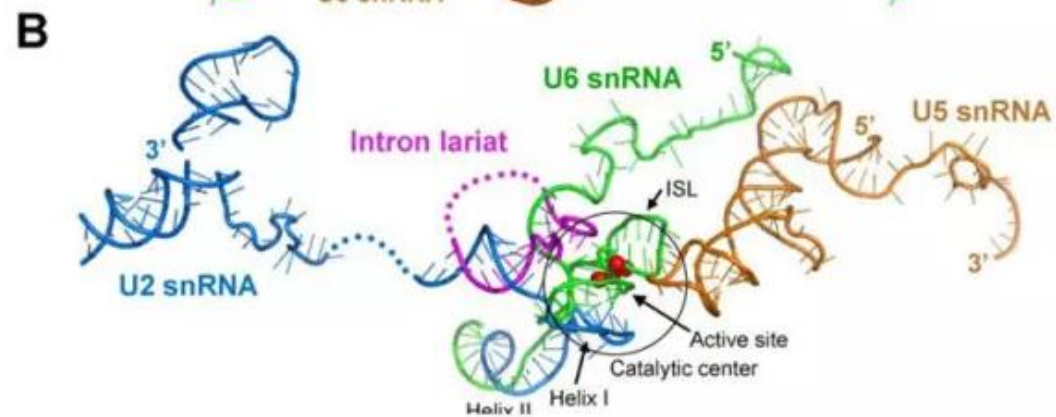
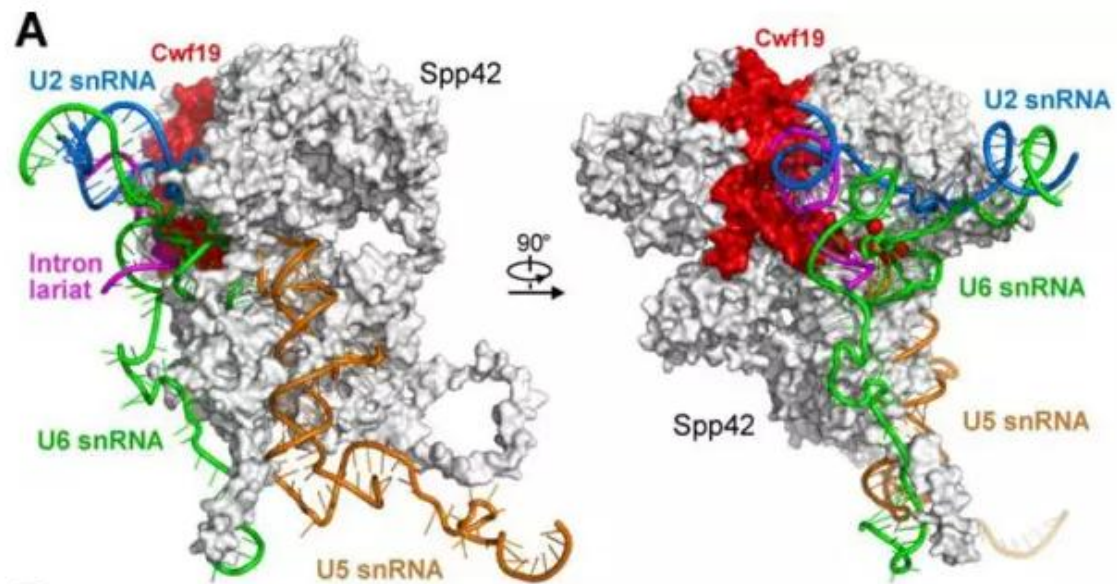
- 8月21日，清华大学生命科学学院施一公教授研究组在国际顶级期刊《科学》（Science）同时在线发表了两篇研究长文，题目分别为“3.6埃的酵母剪接体结构”和“前体信使RNA剪接的结构基础”
- 将精度从5.9埃提高到了3.6埃，可以清楚看到氨基酸的细节！
- 将分子生物学的“中心法则”在分子机理的研究上大幅度向前推进

研究内容

- 这两篇文章的题目分别为“3.6埃的酵母剪接体结构 (Structure of a Yeast Spliceosome at 3.6 Angstrom Resolution)”和“前体信使RNA剪接的结构基础 (Structural Basis of Pre-mRNA Splicing)”
- 第一篇文章报道了通过单颗粒冷冻电子显微镜（冷冻电镜）方法解析的酵母细胞剪接体近原子水平分辨率的三维结构
- 第二篇文章在此结构的基础上进行了详细的分析，阐述了剪接体对前体信使RNA执行剪接的基本工作机理



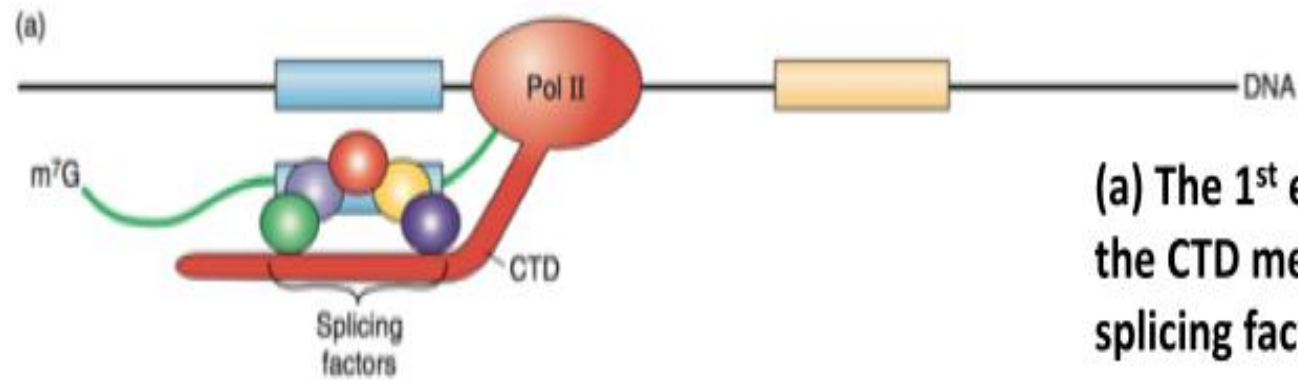
施一公团队获得的剪接体高分辨率的三维结构



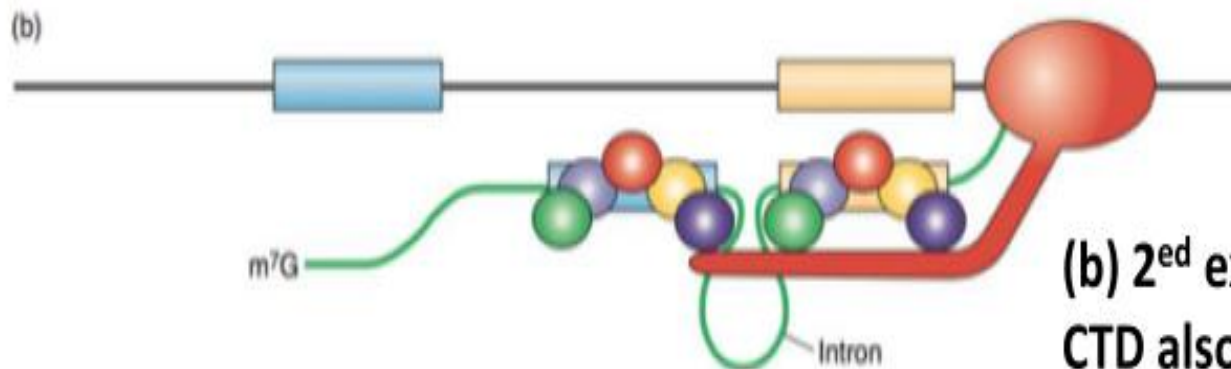
完善分子生物学中心法则

- 在所有真核细胞中，基因表达分三步进行，分别由RNA聚合酶(RNA polymerase)、剪接体(Spliceosome)、和核糖体(Ribosome)执行
- RNA聚合酶和核糖体的结构解析曾分别获得2006年和2009年的诺贝尔化学奖
- 剪接体是一个巨大而又复杂的动态分子机器，其结构解析的难度被普遍认为高于RNA聚合酶和核糖体，是世界结构生物学公认的两大难题之一

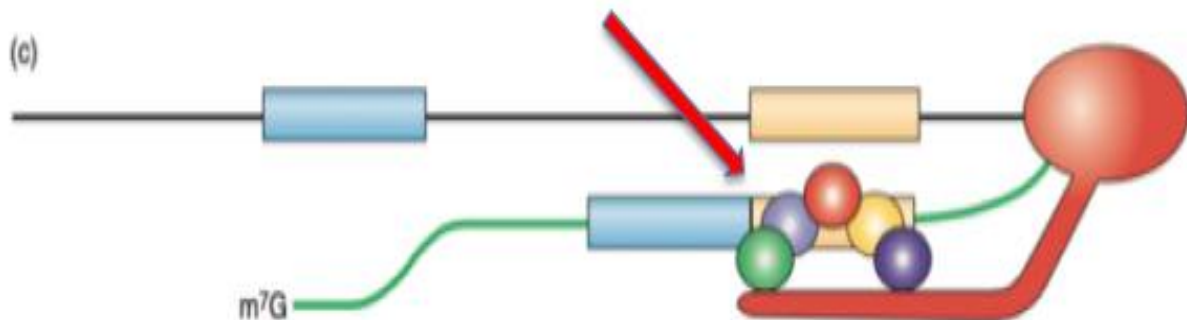
Model for participation of CTD in exon definition



(a) The 1st exon has been transcribed, the CTD mediates the assembly of splicing factors defining the exon.

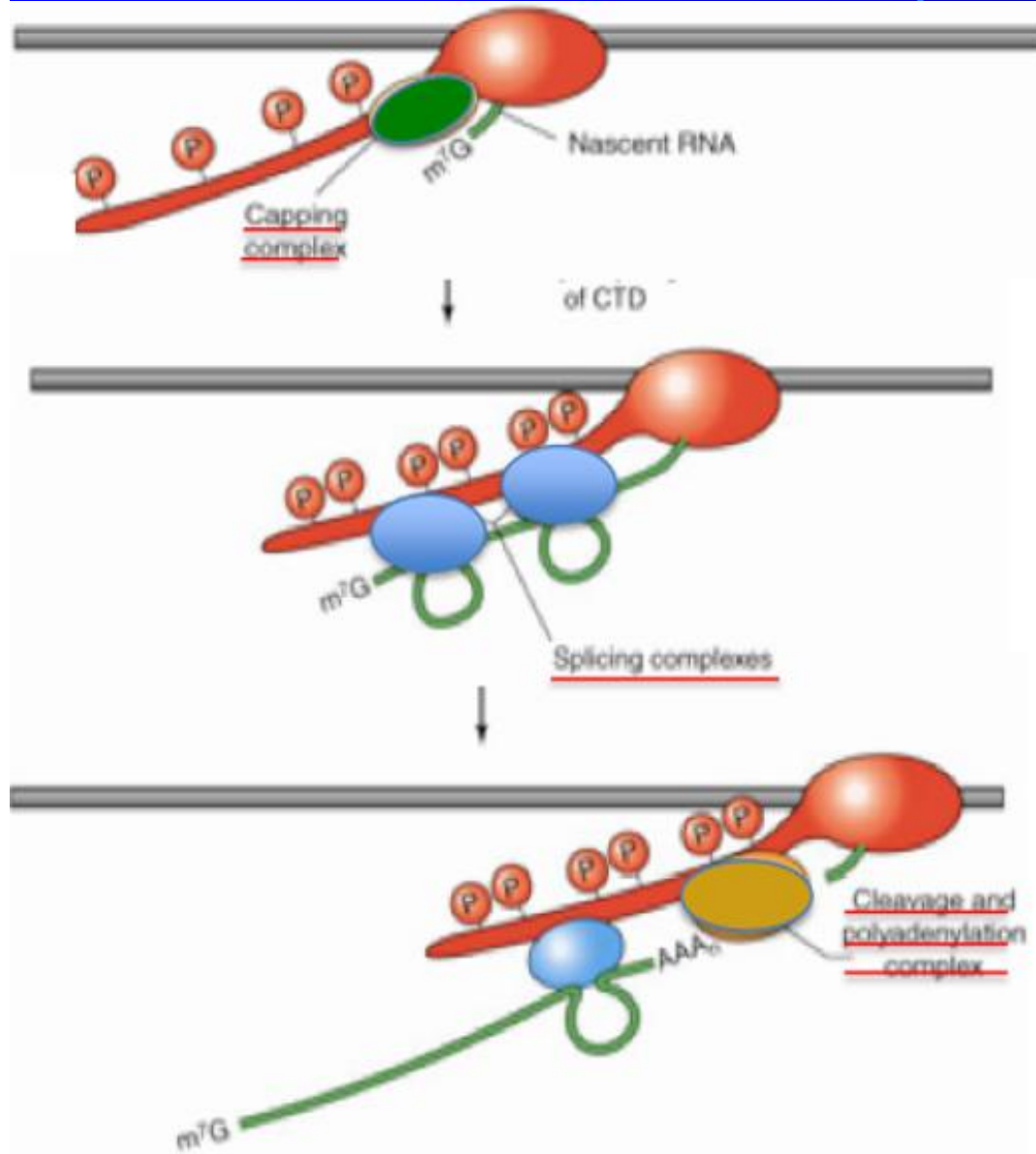


(b) 2^{ed} exon has been transcribed, The CTD also positions the two exons close



(c) The two exons have been spliced together

CTD is very important for pre-RNA capping, splicing and poly-Adenylation



(a) RNA polymerase synthesizing a RNA . The partially **phosphorylated CTD** attracted capping.

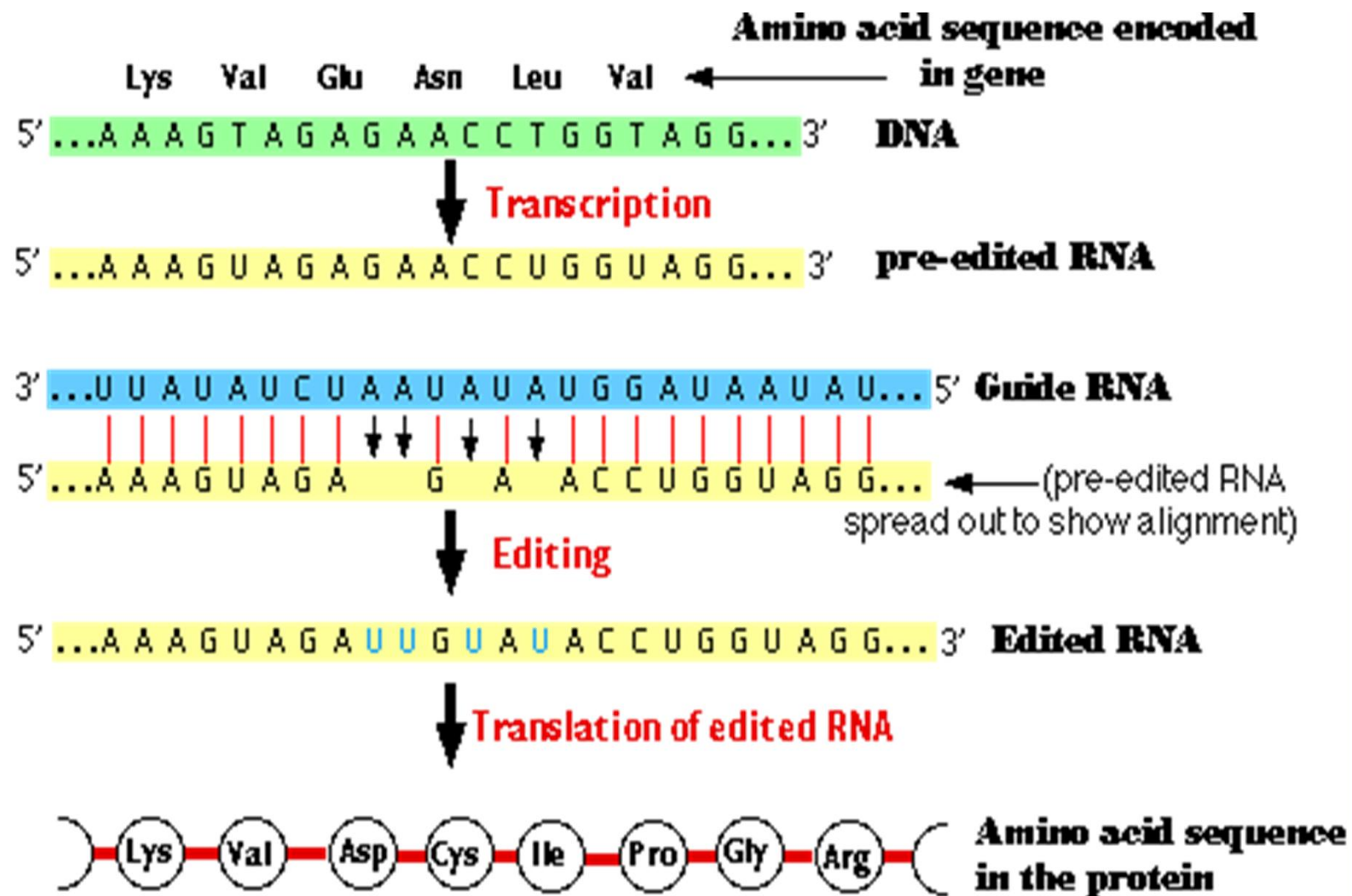
(b) **CTD** has further phosphorylated and has splicing exons –introns

(c) **CTD** is associated with the cleavage and poly(A) complex

Model of RNA splicing and PolyA
ORGANNIZED by CTD of RNAPol II

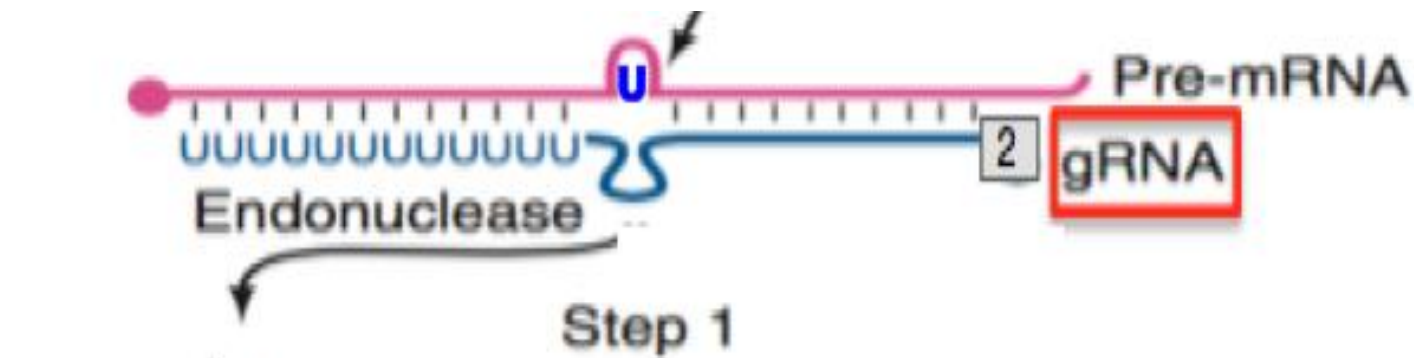
RNA编辑

- ❖ 编辑 (editing) :
转录后的RNA在编码区发生碱基的加入, 丢失或转换等现象
- ❖ 现象:
1986. R. Benne在研究锥虫线粒体mRNA转录加工时发现mRNA的多个编码位置上C→U替换
- ❖ 意义:
修正及扩充遗传信息
- ❖ 调控翻译

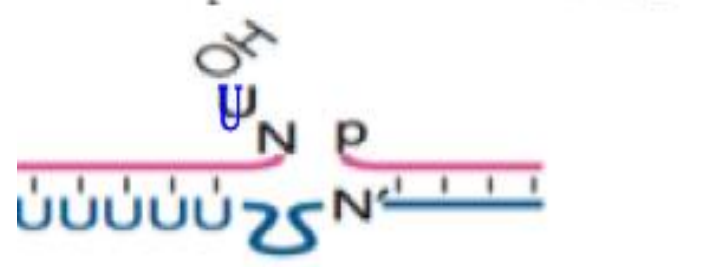


RNA编辑示意图

U deletion

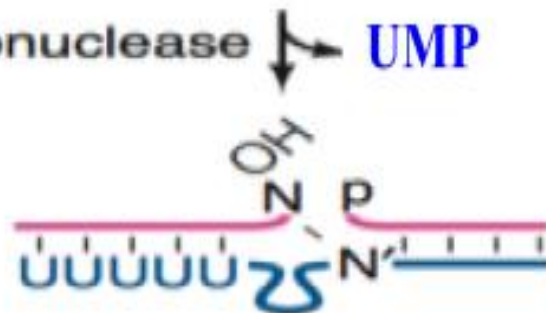


endonuclease clips pre-mRNA just to 3'-side of U to be deleted.



Step 2

exonuclease removes UMP at end. Base pairing occurs btw. base N in pre-mRNA and base N' in gRNA.



Step 3
Ligase

RNA ligase puts two halves of pre-mRNA back together.

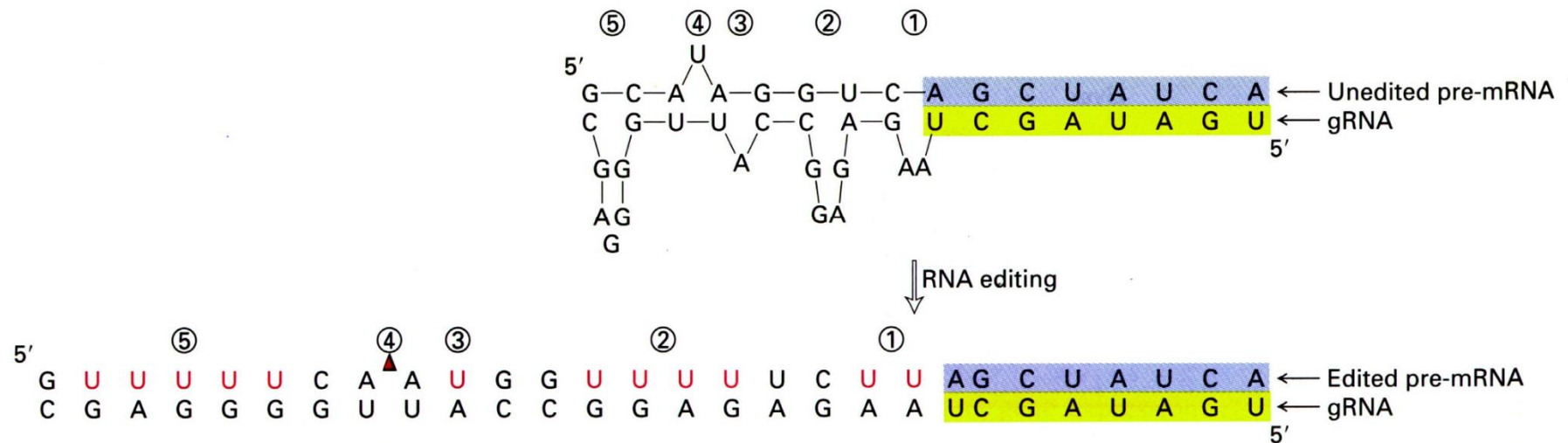


(a)

Deletion

gRNA作用机制

- ❖ gRNA 5' 锚定在未编辑的pre-mRNA上
- ❖ gRNA 3' 端作为编辑过程的模板
- ❖ 编辑过程从3' 端向5' 端反复进行
- ❖ 几种不同的 gRNAs 可以结合在部分编辑的RNA分子上
- ❖ RNA编辑可能是早期RNA世界的“分子化石”



反式剪接的现象

锥虫 可变表面糖蛋白 (VGS) 基因 (Van de Ploeg 1982)

- **mature mRNA**



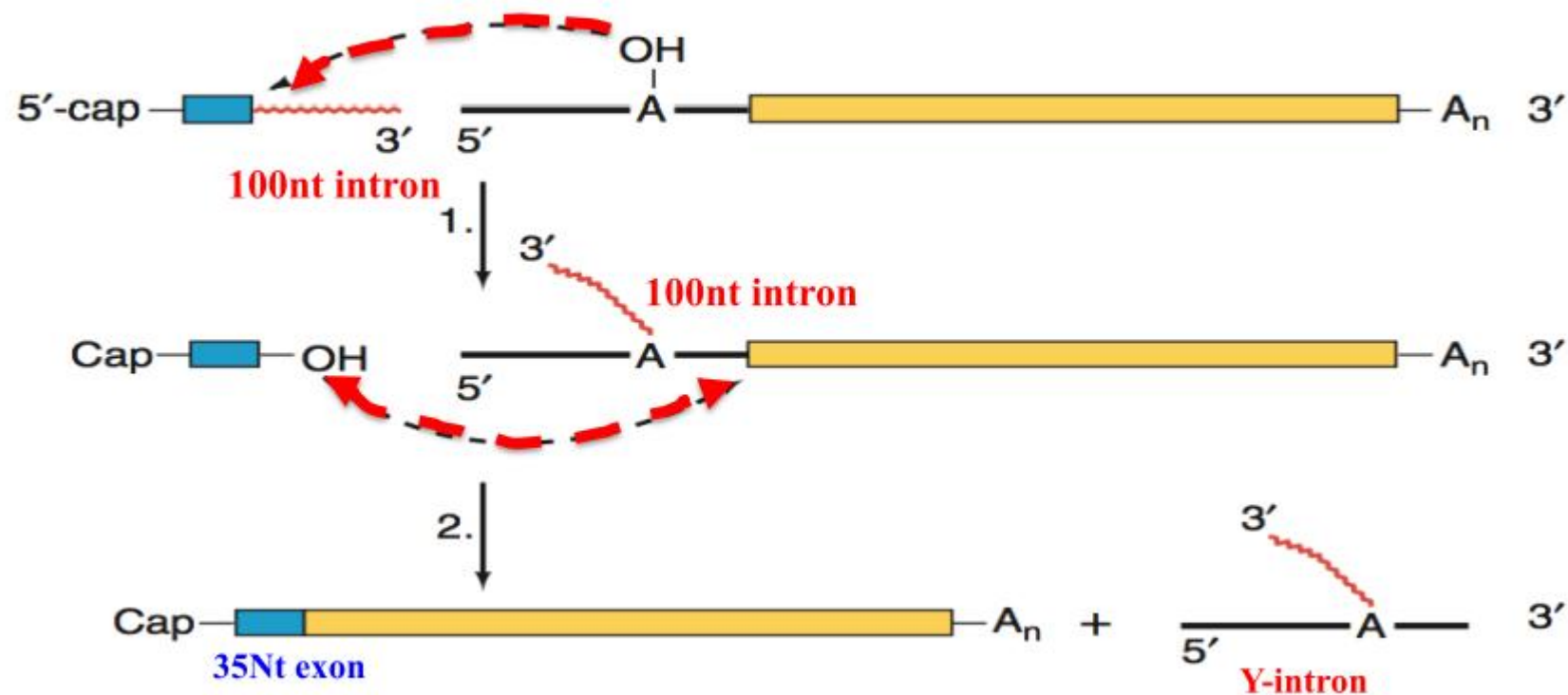
- 锥虫中几乎所有mRNA的5'-end

均有相同的 **35Nt seq. (mini-exon)**

包含有35Nt seq.在内的135Nt的重复序列
(约200个拷贝)



反式剪接的分子机制



pre-mRNA中AUG上游存在通用方式剪接的受点（5'AG）
与SL中GU供点以2'-5'磷酸酯键连接，形成Y-intron

A brief History

1982:Self-splicing in *Tetrahymena* pre-rRNA (group I intron)

Kruger et al, and Cech, Cell 31, 147-157 (1982)

1983:RNAse P is a ribozyme

Guerrier-Takada et al, and Altman, Cell, 35, 849-857 (1983)

Nobel Prize for Chemistry 1989



Cech T.R



Sidney Altman

揭示了内含子自我剪接的机理
为生命的起源和分子进化提供了新的思路

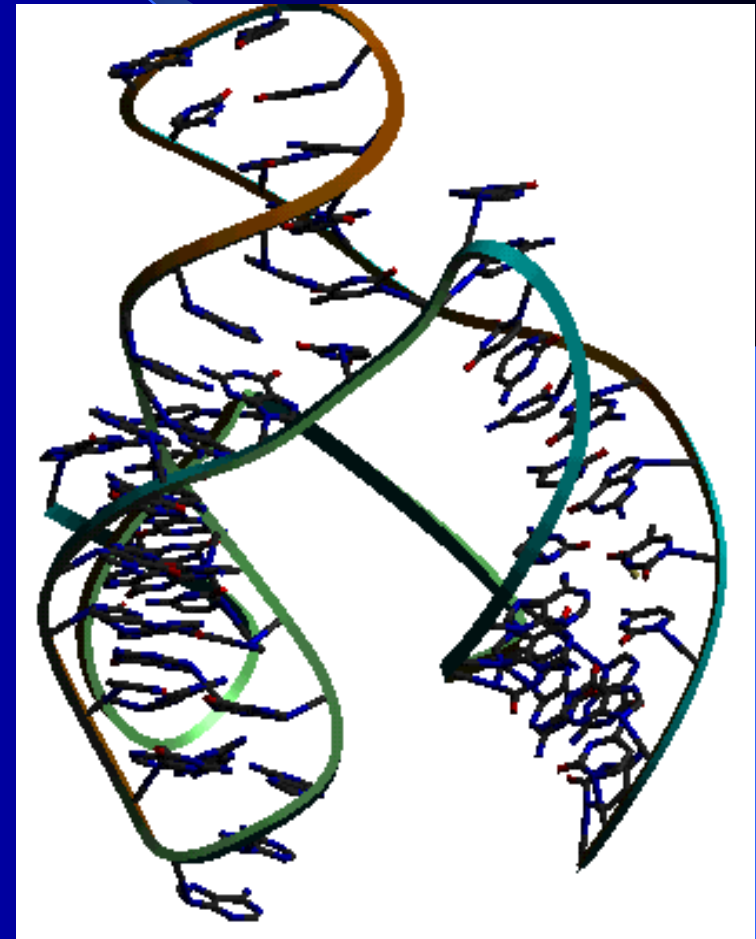
一个长期悬而未决的古老问题

- 究竟是先有DNA, RNA还是蛋白质?
- 核酶改变了只有蛋白质才具有催化功能的观念
- 不同种类的具有催化活性的RNA、gRNA、
新发现的核糖开关、mi RNA、si RNA、 RNP?
- 在进化上可能是RNA世界遗留的分子化石

锤头状（Hammerhead）核酶

- 发现：

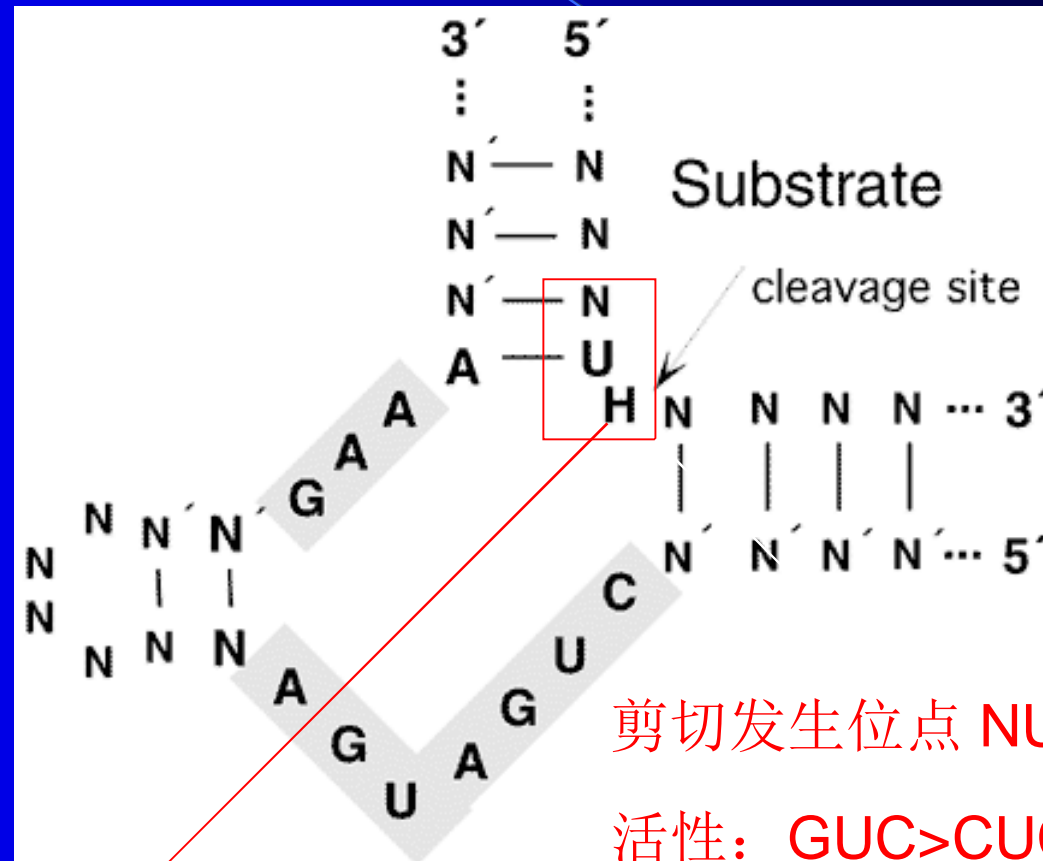
澳大利亚Adelaide大学Symons实验室研究类病毒、拟病毒和卫星RNA自我剪切方式，1986年提出锤头状核酶
- 特征：
 - 具有相似的二级和三级结构
 - 核心区域——10nt保守碱基
 - 保守碱基不形成传统碱基对



锤头状核酶

典型二级结构

- ❖ 催化部分
- ❖ 底物部分
- ❖ 10个保守nt核心
- ❖ 三个碱基NUH



剪切发生位点 NUH的3'端

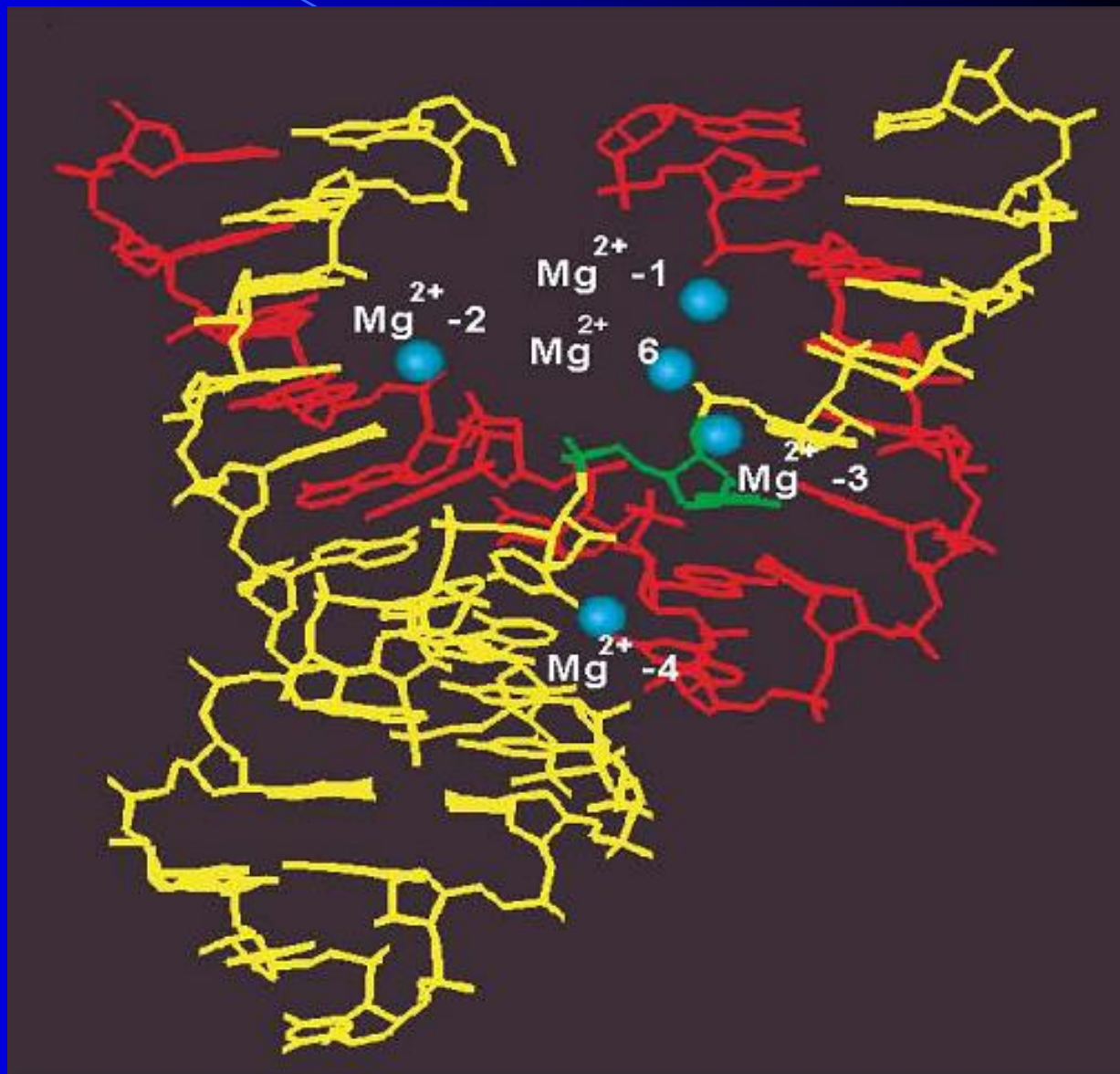
活性: GUC>CUC>UUC

GUU,AUA,AUC...

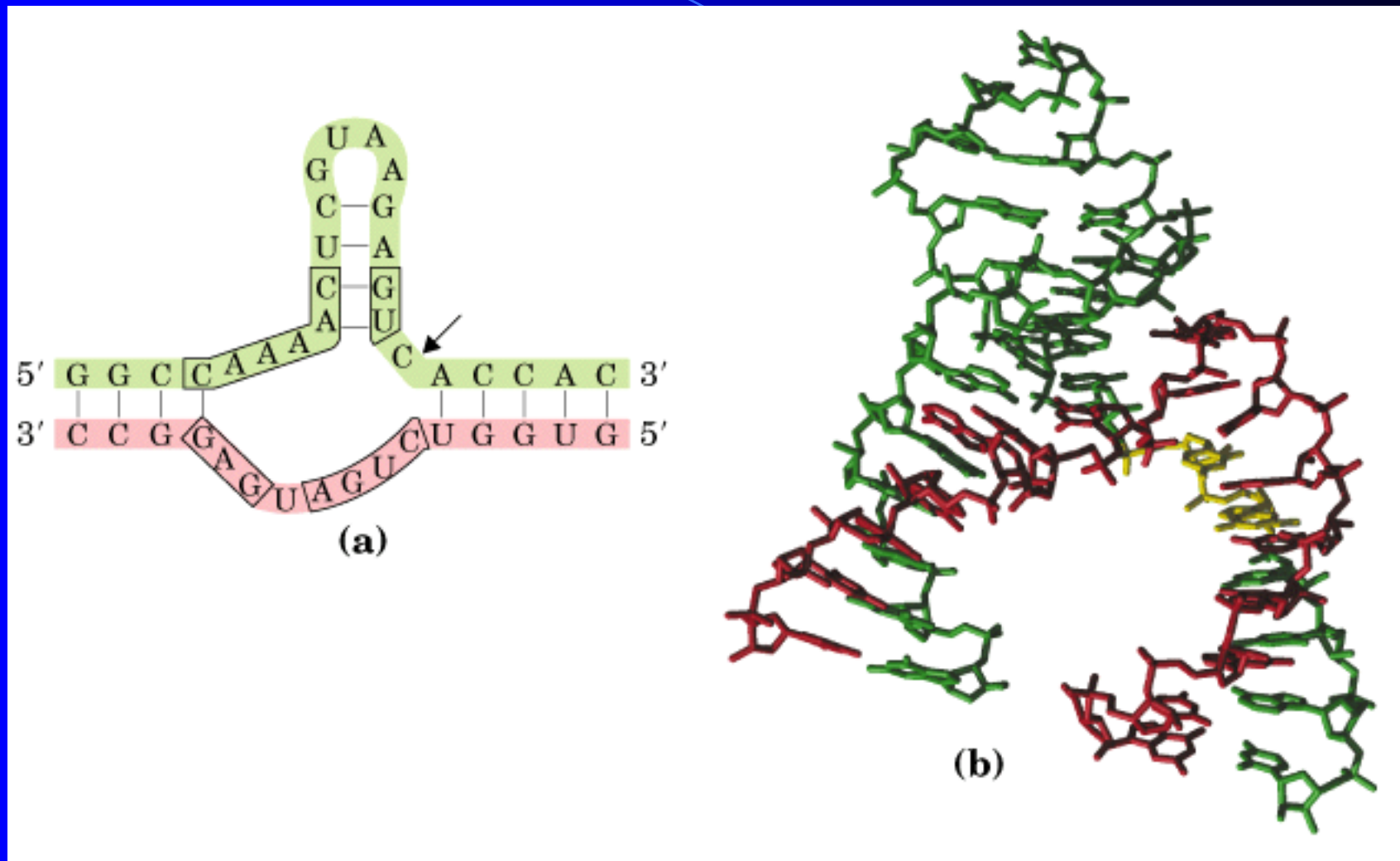
除G以外

锤头状核酶催化过程

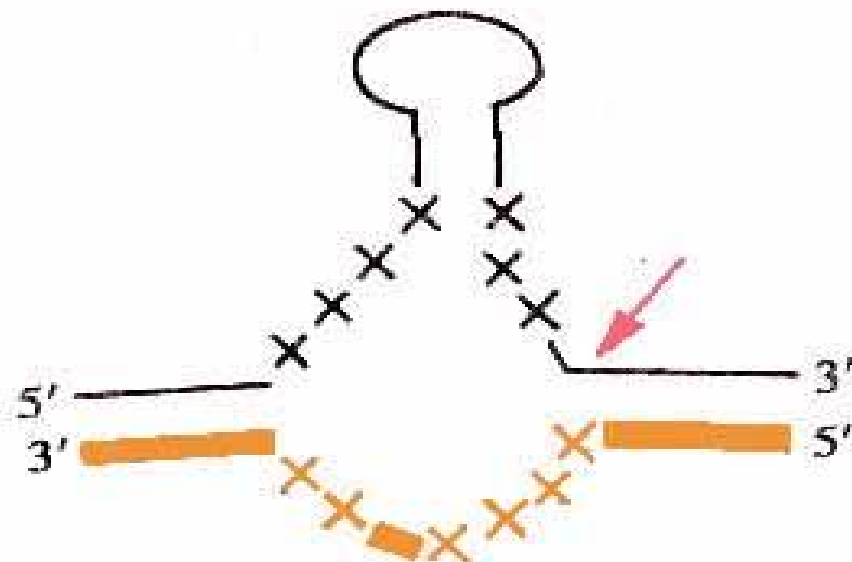
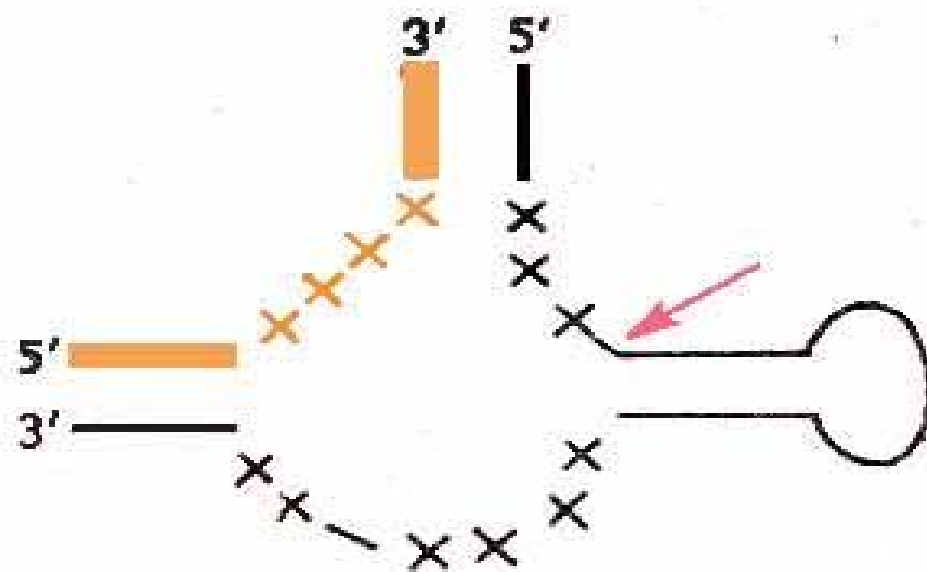
- ❖ 催化反应需要二价阳离子，如 Mg^{2+} 。
- ❖ 红色是酶分子
- ❖ 黄色是底物分子



两条互补的RNA相互作用也可形成锤头结构



底物链+催化链设计的核酶

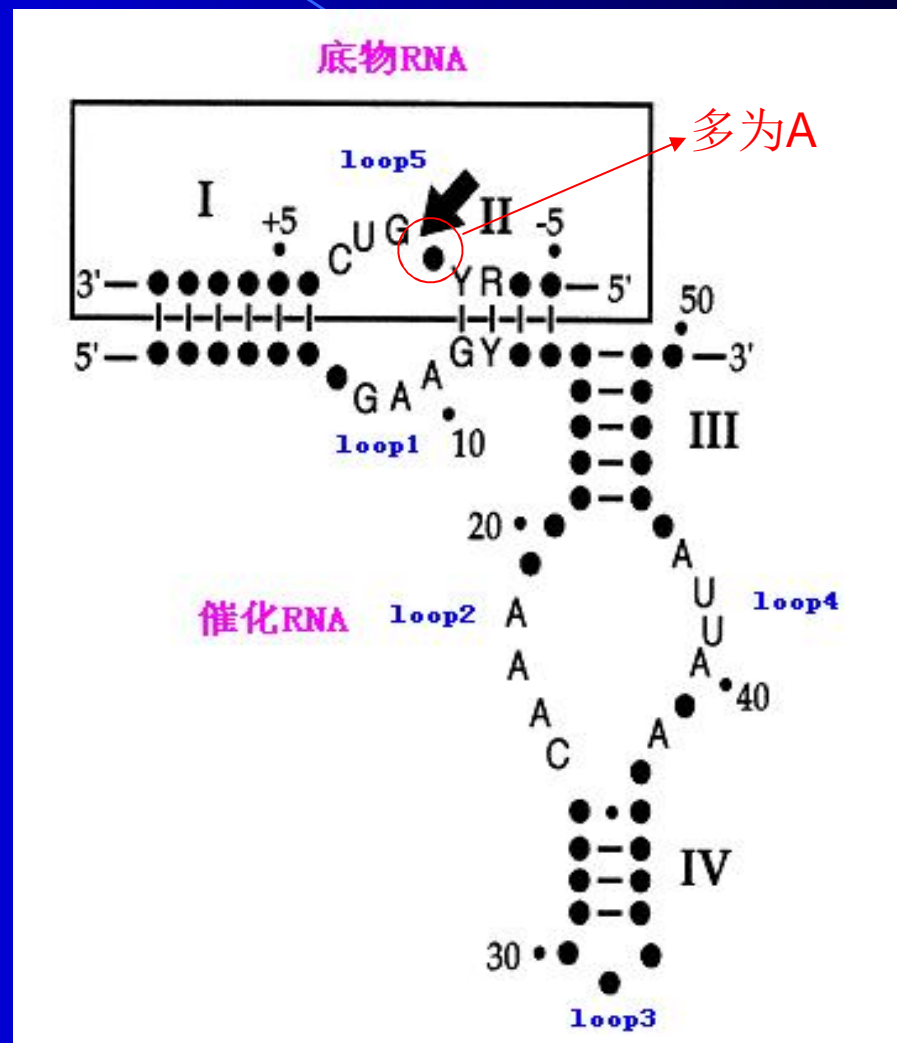


人工设计的核酶

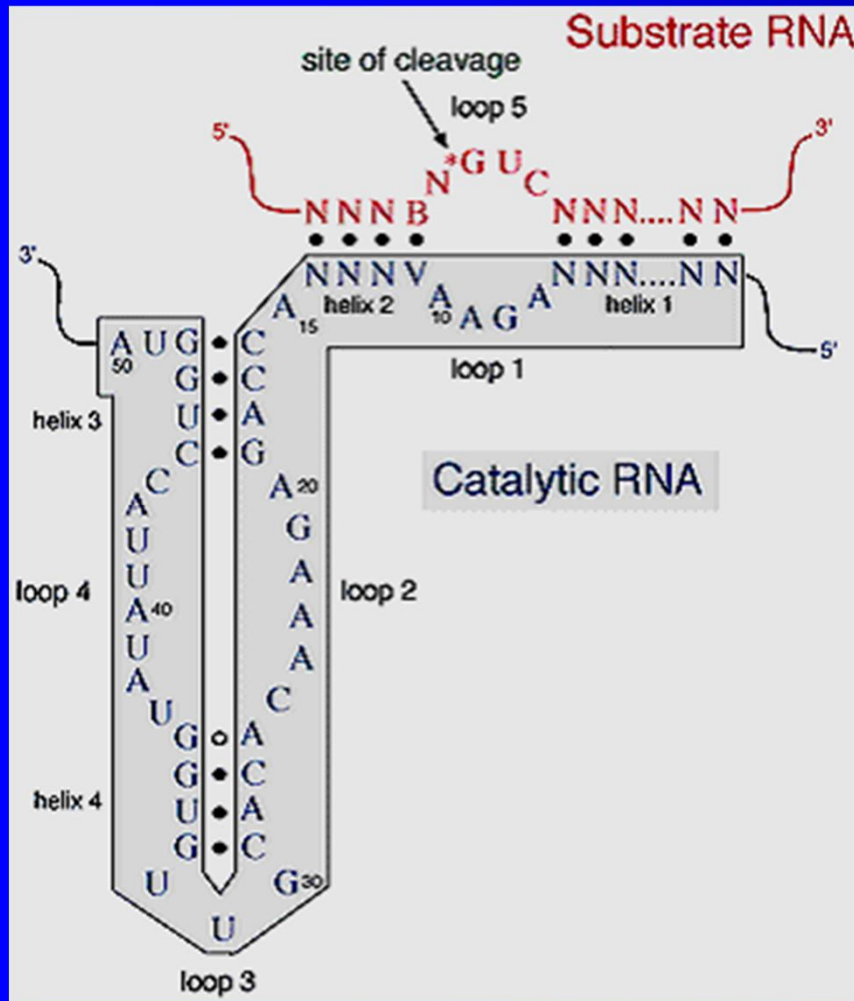
- 粗线表示合成的核酸分子
- 细线表示天然的核酸分子
- X 表示一致性序列
- 箭头表示切断点

发夹状核酶

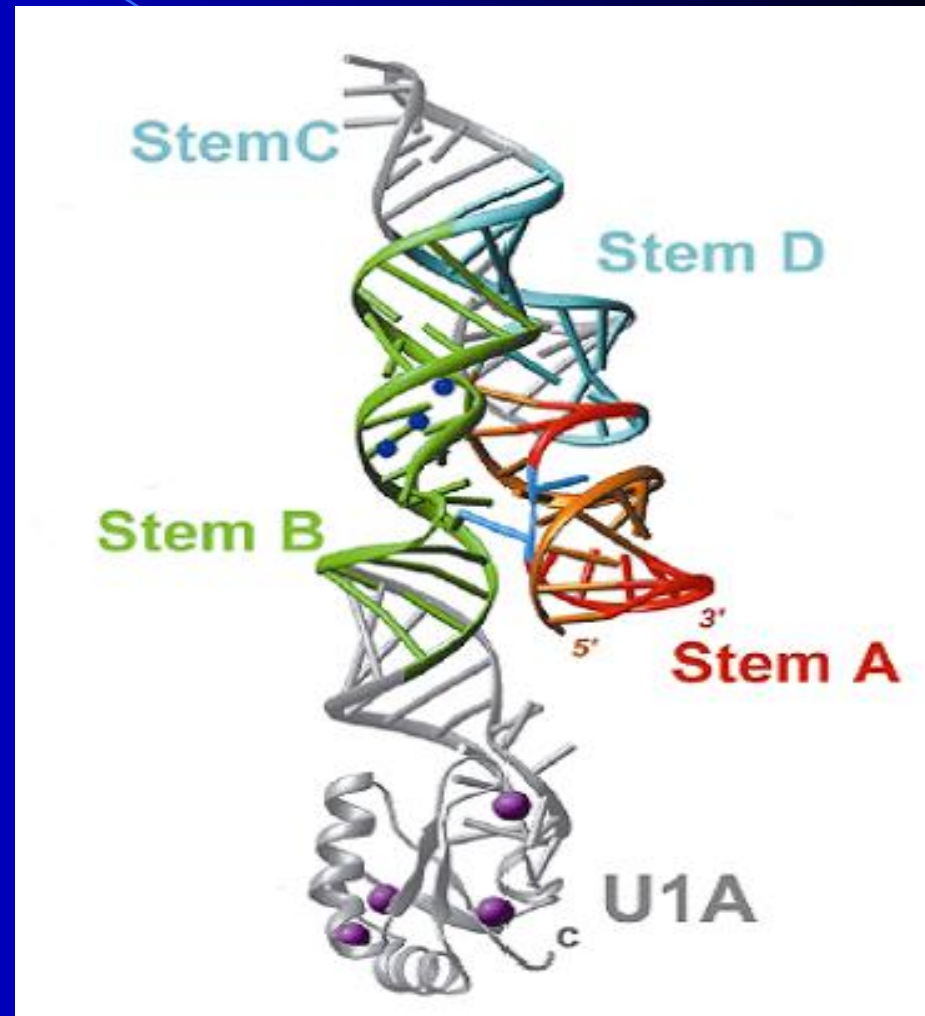
- ❖ 50个核糖核酸
- ❖ 两个结构域：螺旋-环-螺旋
- ❖ 4个螺旋，5个 loop



发夹状（Hairpin）核酶



发夹状核酶二级结构



发夹状核酶的三级结构

脱氧核酶的设计

- 自然界无天然脱氧核酶

脱氧核酶的发现：

- 1994年，Breaker实验室首次发现单链DNA分子可以使RNA磷酸二酯键的水解
- 1995年，Cuenoud等发现能够催化与它互补的两个DNA片段之间形成磷酸二酯键连接成一个DNA分子



本章知识要点

- ❖ 加帽、加尾的生物学意义
- ❖ Rnase P L19核酶
- ❖ 真核tRNA加工与原核的区别
- ❖ Group I、II及mRNA 内含子加工的区别
- ❖ RNA编辑