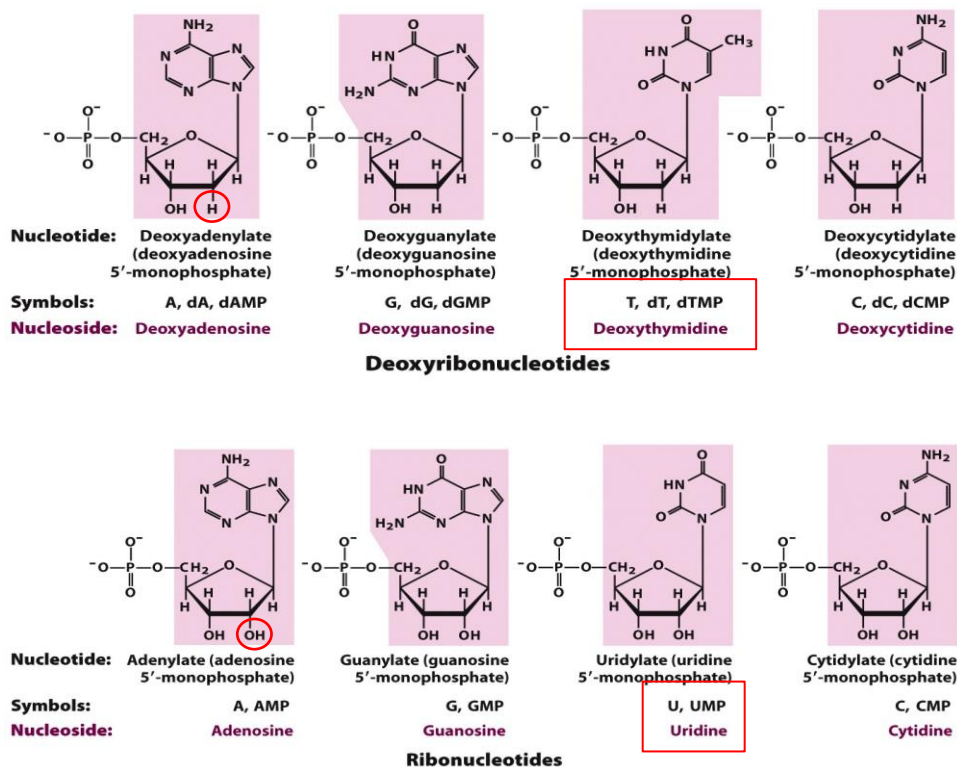
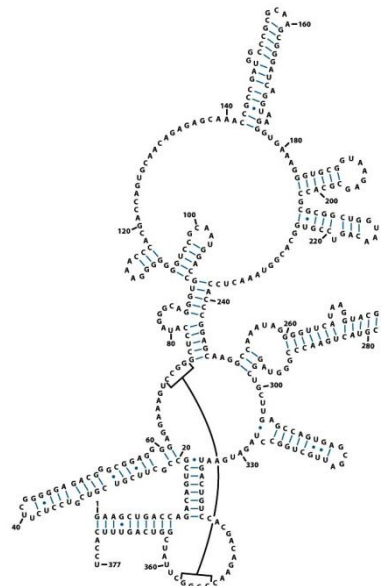
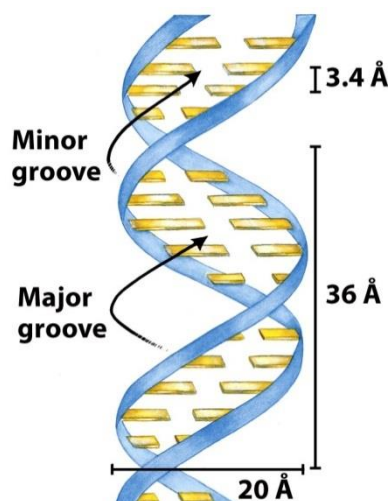


Chapter 26	
教師:柯博元	日期:2013/6/4
撰稿組:黃志凱、張家瑋、趙祥元、林幕雲	審稿組:

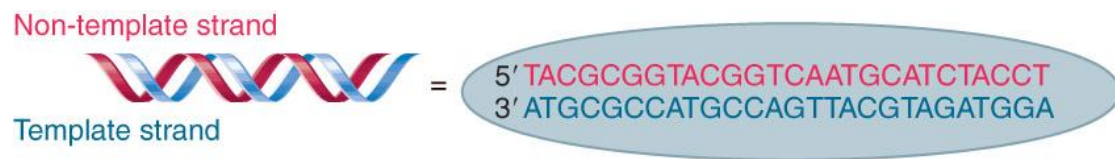
Differences between DNA & RNA



1. 在五碳糖 2'的地方 RNA: -OH group , DNA: -H group
2. RNA : AUCG , DNA:ATGC
3. DNA: double-stranded; RNA: single stranded
4. 因為 RNA 單股沒有那麼緊實(DNA 彼此之間用氫鍵連接)，會形成 secondary structure(stem loop)
5. RNA 為單股且較為多樣化，具有催化的功能



二、DNA → RNA (transcription)[具 SELECTIVITY]



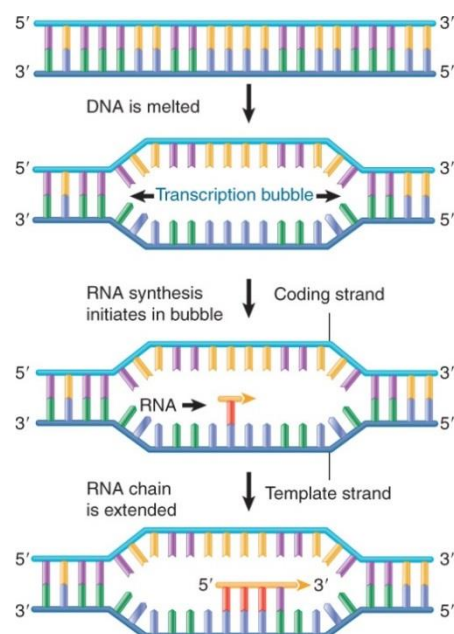
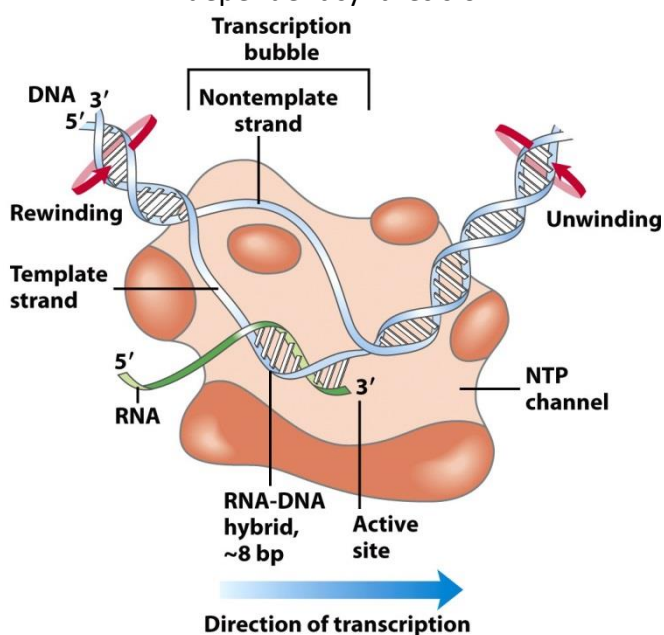
TRANSCRIPTION RNA sequence is
complementary to template strand
identical to coding strand

↓



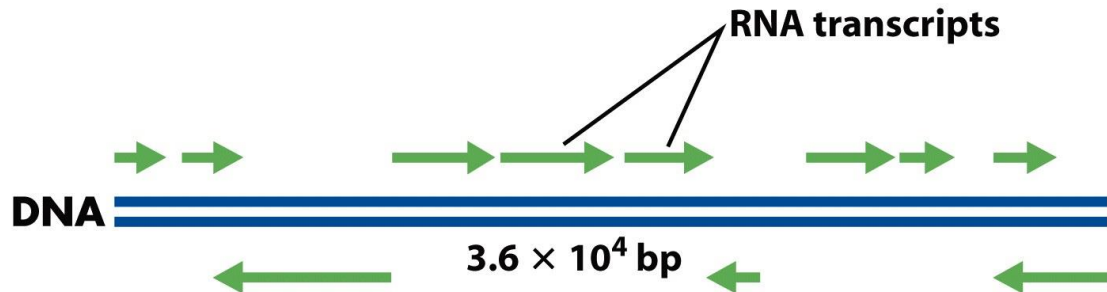
1. Non-template strand: 為 coding strand(sense)[與 RNA 序列互相對應]
2. Template strand 為 non-coding strand(nonsense)
3. 轉錄出來的 RNA 有 3 個 form
 - (1) Messenger RNA (mRNA)
a template for translation
 - (2) Transfer RNA (tRNA)[把胺基酸帶到 mRNA]
to read the information of mRNA
 - (3) Ribosomal RNA (rRNA)
a machinery for synthesizing protein

DNA-dependent synthesis of RNA



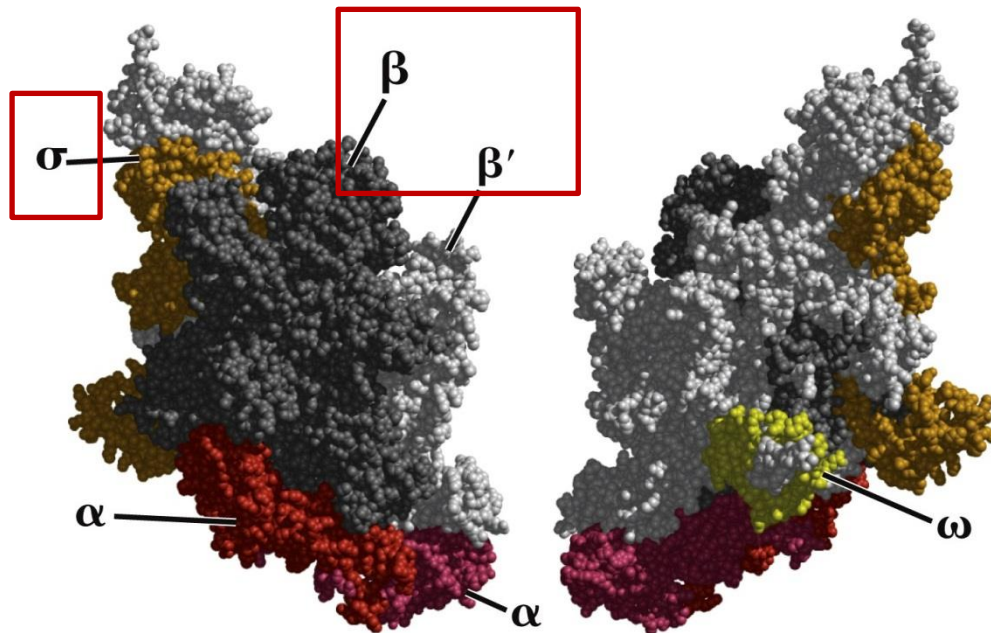
(1) DNA-dependent RNA polymerase 作用需要 DNA 當模板、ATP, GTP, CTP,UTP 還有鎂離子(當 cofactor)的作用

(2) 轉錄的方向是 5'→3'



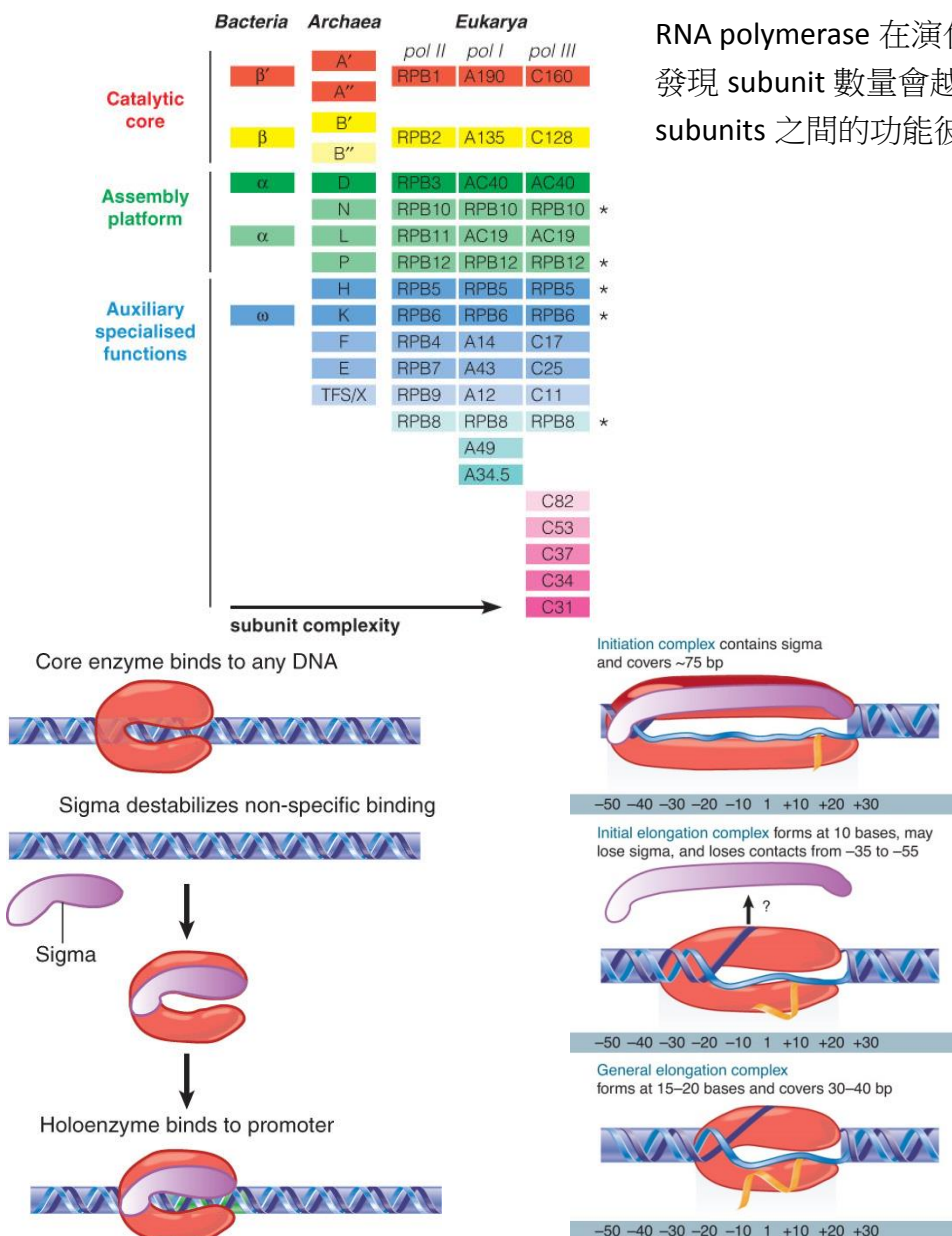
雙股 DNA 病毒中，兩條 DNA 都可以當作 template strand

DNA-dependent RNA polymerase(E.Coli)



σ決定 specificity，與 promoter 結合→recognition

β以及β'形成 catalytic site，具與 DNA 結合的能力

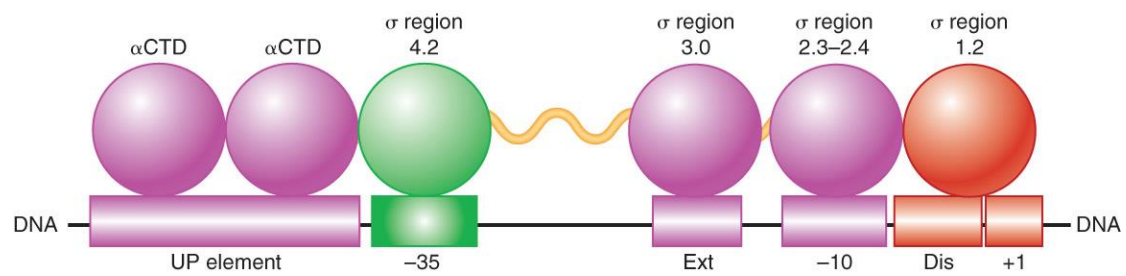


Core enzyme 的 β' 與 DNA 可以進 no specificity 的 binding

當 σ (可決定 specificity) 與 core enzyme 結合後形成 holoenzyme

當 σ 與 promoter 結合後 (initiation)，會離開 RNA polymerase，使 RNA polymerase 開始以 DNA 為模板轉錄形成 RNA (elongation → termination)

	UP element	-35 Region	Spacer	-10 Region	Spacer	RNA start
Consensus sequence	NNAAA ^{AA-A} _{TT-T} TTTTNNA ^A ANNN ⁺ N	TTGACA	N ₁₇	TATAAT	N ₆	+1
rrnB P1	AGAAAATTATTTTAAATTCCT	GTGTCA	N ₁₆	TATAAT	N ₈	A



在 promoter 中存在 consensus sequence，與 σ 結合

(注意:TATA box[所含氫鍵數較少]於-10 的位置；Hexamer 於-35 的位置，

六、原核細胞的 transcription

1. transcription 前期可分為三個 state

(1) binding(close form)

(2) initiation(close form \rightarrow open form)(尚未 unwinding) \rightarrow rate-limiting step

(3) elongation(開始 unwinding)

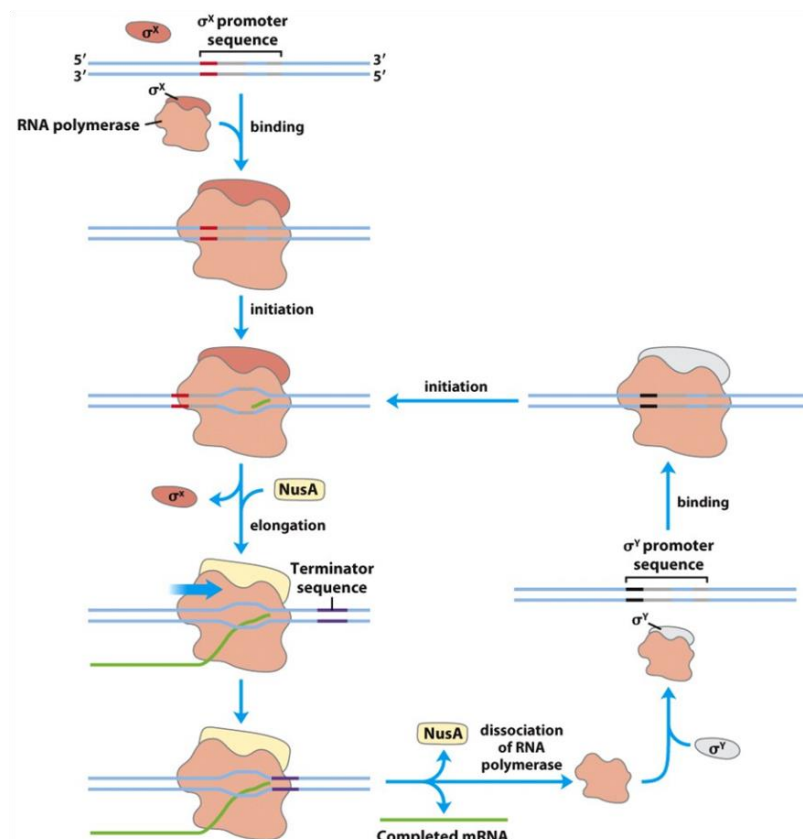
前兩個部份需要 σ subunit

2. σ cycle：利用到 competitive binding 機制

(1) NusA 在 elongation 時會把 σ subunit 趕離 RNA polymerase 並 bind 在 σ 的結合位上

(2) transcription 結束後 NusA 會隨著 RNA polymerase 一起脫離 DNA

(3) RNA polymerase 又可以跟 σ subunit (不一定是原來那個)結合，繼續進行 transcription



σ subunit 離開後為什麼不會 bind 在其他 promoter 上？

- (1) 在 DNA 中與特殊的 promoter 有專一性，且 promoter 較不常見
- (2) σ subunit 上演化出 autoinhibitory region：其 C-terminal 是一個 DNA-binding region，在 free σ subunit 中，其 N-terminal 與 C-terminal 產生 interaction，使 σ subunit 沒辦法跟 DNA 結合

3. DNA 轉錄成 RNA 可經由下面兩種階段決定 specificity

(1) promoter sequence

(2) σ factor

4. 如何藉 transcription 控制基因表現

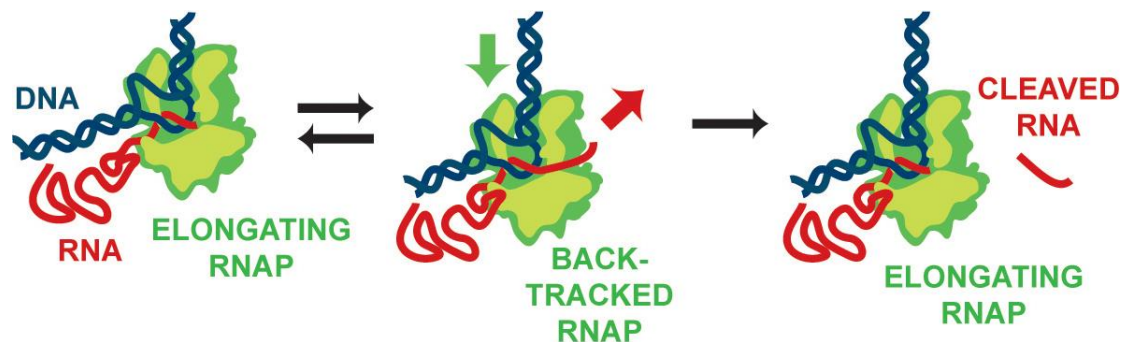
(1) regulate σ factor 的 synthesis 和 degradation

(2) 透過某些蛋白質讓 gene 在 active/inactive form 間轉換

(3) σ factor 和 promoter 間的 affinity

(4) backtracking in the elongation complex

當 RNA polymerase 辨識到特定的序列(對細胞無益)，會將已轉錄的 mRNA



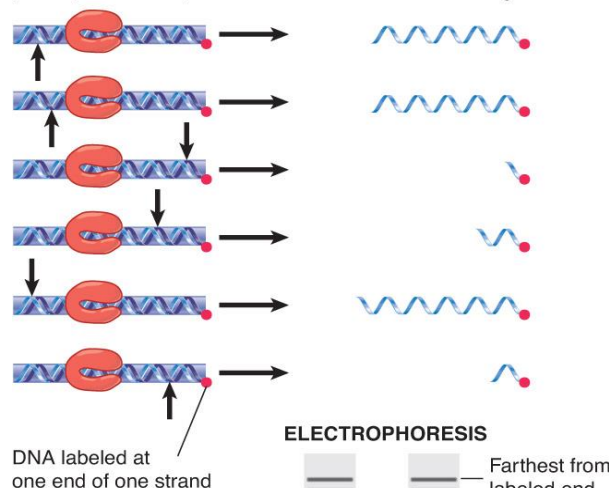
進行 backtracking，將特定序列切除

5. Footprinting：找出 RNA polymerase 和 DNA 結合的 region

(1) 在 DNA terminal region 用同位素標定並和 RNA polymerase 一起 incubate

(2) 用 DNase 將標定過且有 RNA polymerase 結合的 DNA 切割

RNA polymerase-promoter complex partially attacked by DNase I



ELECTROPHORESIS

EXPERIMENTAL GEL

Missing bands identify binding site

CONTROL GEL

DNA not bound to polymerase has bands at positions corresponding to breakage of every bond

Nearest to labeled end

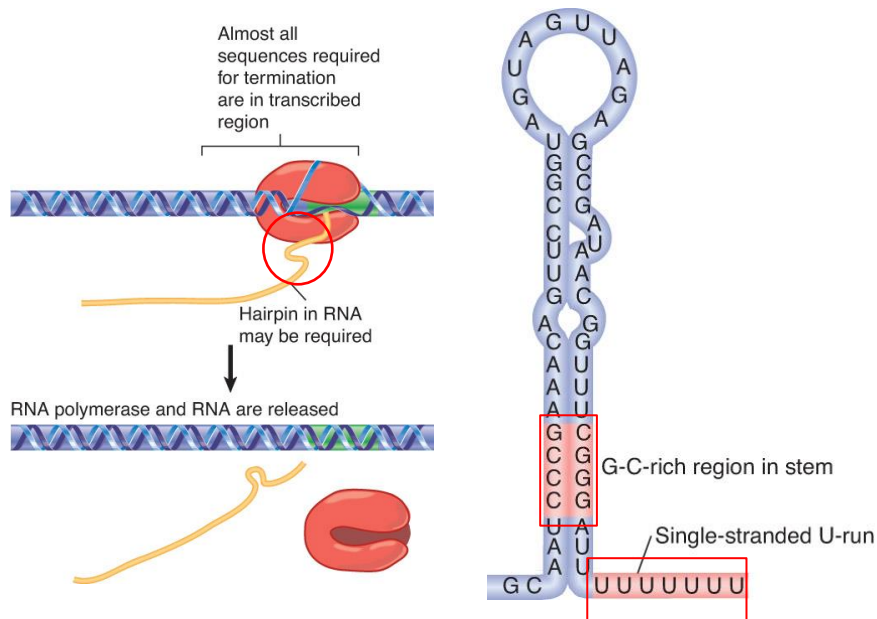
6. 跑電泳：沒有 RNA polymerase binding 的區域 band 是連續的，而有 RNA polymerase bind 在上

面的區域，因為 RNA polymerase 阻擋了 DNase 的作用，而沒辦法切割，藉此可以確定哪些區域被 RNA polymerase 占據(promoter sequence)

7. 原核 termination 有兩種調控方式：

(1) intrinsic terminator：

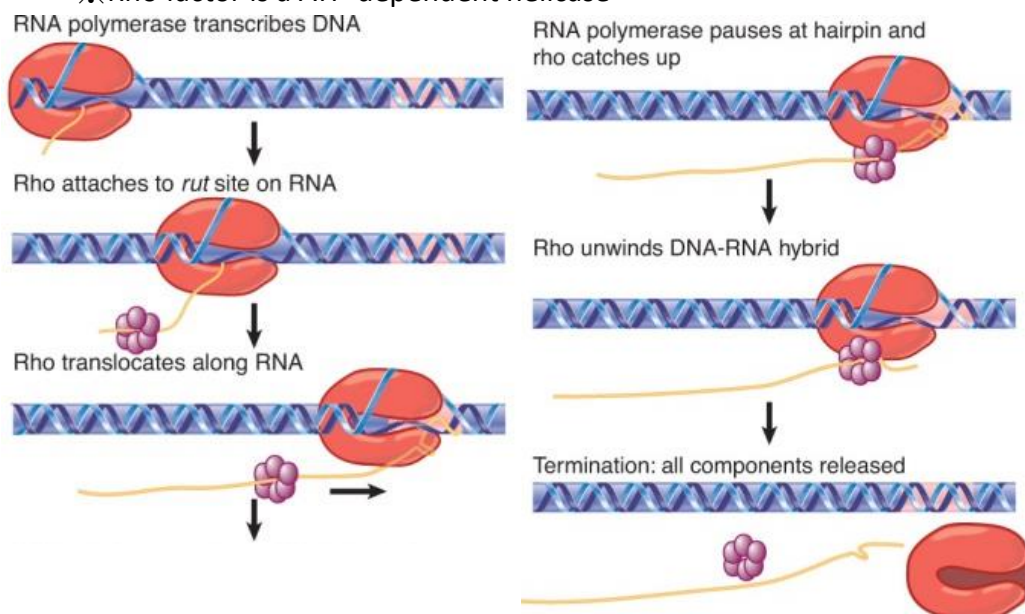
- 可在 RNA 上發現許多 CG rich & poly U 片段
- 這些片段會形成 hairpin loop(stem-loop)的結構(secondary structure)→ 終止 transcription



(2) extrinsic terminator：Rho factor-mediated mechanism

Rho factor 會 bind 到 RNA 上的 rut sequence(其上 C 較多約占 RNA 的 40~50%)形成一個複雜的 secondary structure 以終止 transcription
兩種原理都是將 RNA 形成 secondary structure 以中斷 transcription

※Rho factor is a ATP-dependent helicase



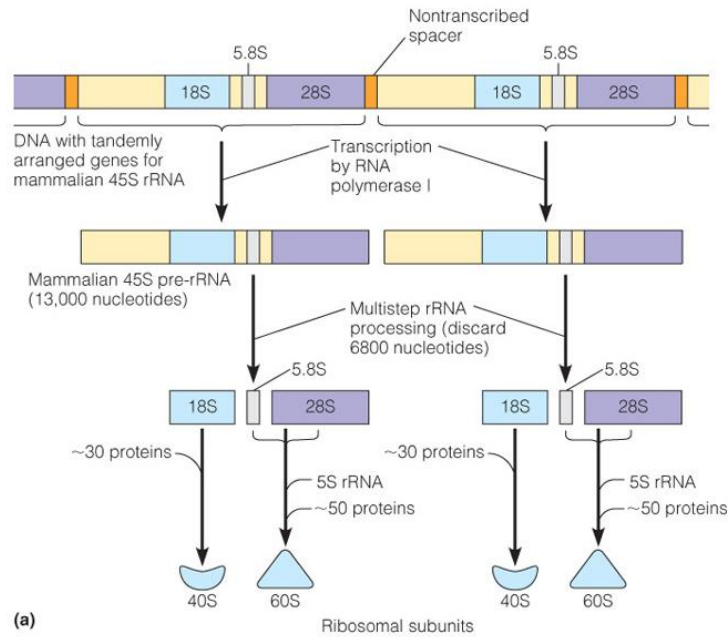
七、真核細胞的 transcription

1. 真核細胞中的 RNA polymerase 可分為 Pol I、Pol II、Pol III

2. Pol I

(1) 在核仁參與 pre-rRNA 合成

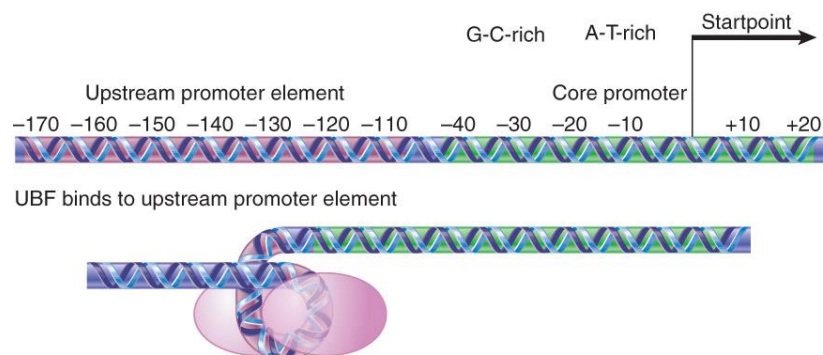
(2) Tandem repeat 使 rRNA 合成快(需求大)



Copyright © 2013 Pearson Canada Inc.

(3) Pol I 對 DNA 的 specificity 由以下兩個 sequence 共同決定

- 110 ~ -170 有 UP element 會跟 Pol I 中的 UBF(UP element binding factor)結合
- transcription stop site 前 G-C-rich 和 A-T-rich 的部分



3. Pol II

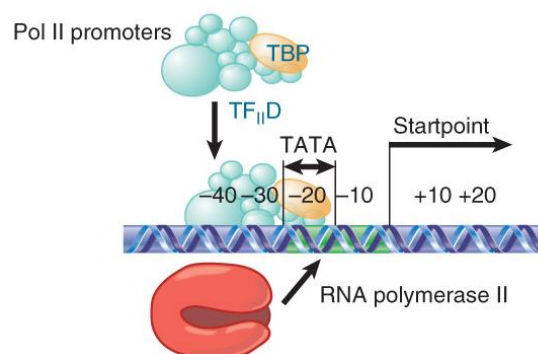
- (1) 在核質中參與 mRNA 合成
- (2) 跟 bacterium 的 RNA polymerase 最像(因為都參與 mRNA 的合成), 會 bind 在 -30 的 TATA box(在 bacteria 中, TATA box 位在 -10)和 +1 的 Inr sequence (initiation sequence)
- (3) 參與 miRNA 的合成

4. Pol III

- (1) 在核質中參與 5S rRNA & small RNA 合成
- (2) 與 Pol I 和 Pol II 不一樣的地方在於其 promoter sequence 有時位於基因裡面, 而非位於 upstream
 - a. 有三種, type1 和 type2 的 promoter 在 gene 中, 稱為 internal promoter
 - b. type3 的 promoter 在 upstream, 稱為 upstream promoter
- (3) 可用來製造一些較不 regular 的 RNA, 這些 RNA 常常會 cover 後半段 Pol II 的 transcription site, 為 regulatory RNA

5. 真核細胞 polymerase 以 Pol II 為例, 有一些與原核 RNA polymerase 一樣的特性

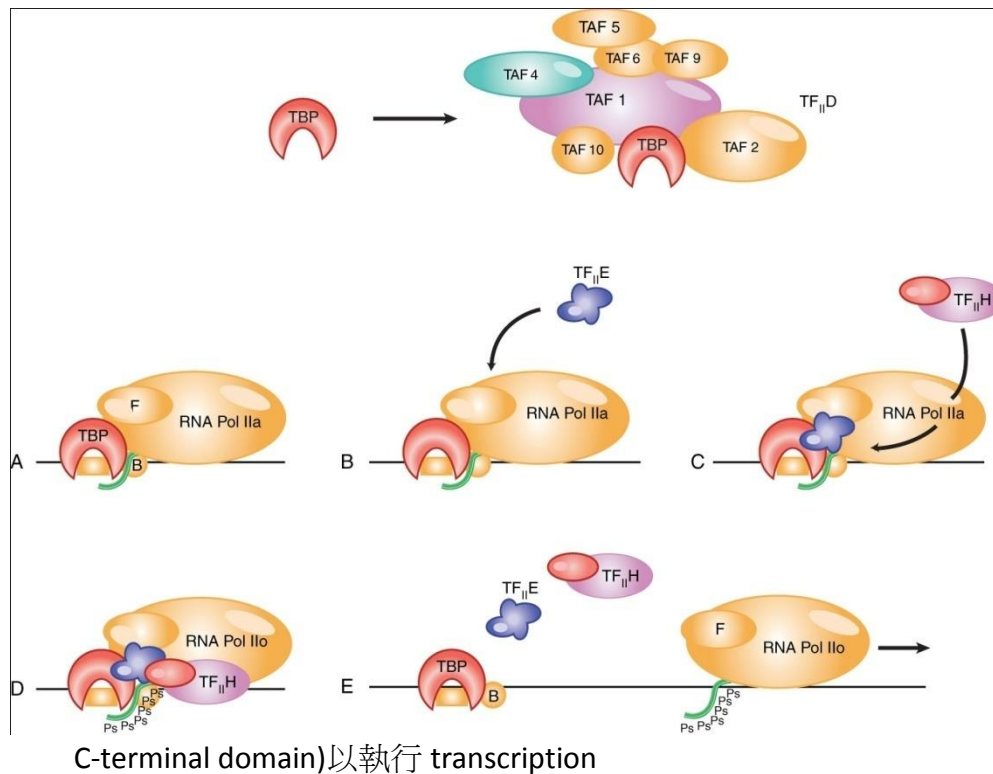
- (1) 都要有 TATA-box binding protein 來決定 promoter sequence
 - a. 原核中: σ factor
 - b. 真核中: TBP(TATA-box binding protein)除了 TATA box 外, 也有一些特定的序列會使 RNA polymerase binding, 如: HSE(heat shock factor)、GRE(glucocorticoid receptor)。
- (2) 都有可以 bind 上 activator 的 region
 - a. 原核中: α factor
 - b. 真核中: UBP(bind 到 UPE) & SL1(bind 到 start point)來輔助 transcription promotion
- (3) 真核中還有 TF_{II}D 可以跟 TBP 作用, 來 stabilize protein binding to promoter sequence



6. Transcription of RNA Pol II (binding & initiation):

- (1) TBP 和 TF_{II}B 先座落在 promoter sequence

- (2) TF_{II}F 會幫助 Pol II(TF_{II}D=TBP+14TAF(core enzyme))bind 到 promoter
- (3) TF_{II}E/TF_{II}H 穩固整個 DNA complex
- (4) TF_{II}H 會 unwind DNA 並且 phosphorylates Pol II 的 C-terminal region(CTD,



C-terminal domain)以執行 transcription

小結：bind 時(形成 closed complex)的 protein 有 TBP、TF_{II}B、TF_{II}E、TF_{II}H→initiation 時(形成 open complex)有 TFIIH→elongation
此外，RNA polymerase 需要 Mg²⁺來 stabilize enzyme 的 reaction

整理 TF_{II}H 的 function

- (1)unwinding DNA(有 DNA helicase 的 function)
- (2)phosphorylates Pol II 的 C-terminal region 以執行 transcription

以上重要的只有 TBP、TF_{II}D、TF_{II}H

7.elongation 可以 stabilize 整個 transcription complex 使其可以往前 move on 生物體內還有一些 elongation 的 factors 可以 phosphorylate C-terminal region(CTD)雖然有多少 elongation factor 還不清楚，但有很多 elongation factor 可以藉由 bind 在 Pol II 來 stabilize elongation complex

8.終止 transcription

原核：terminator sequence & Rho factor

真核：其 RNA polymerase 的 C-terminal region(CTD)會受到 phosphorylation (由 TFIIH 執行)調控，因此可以藉由 Pol II 的 dephosphorylation 來 inactivate

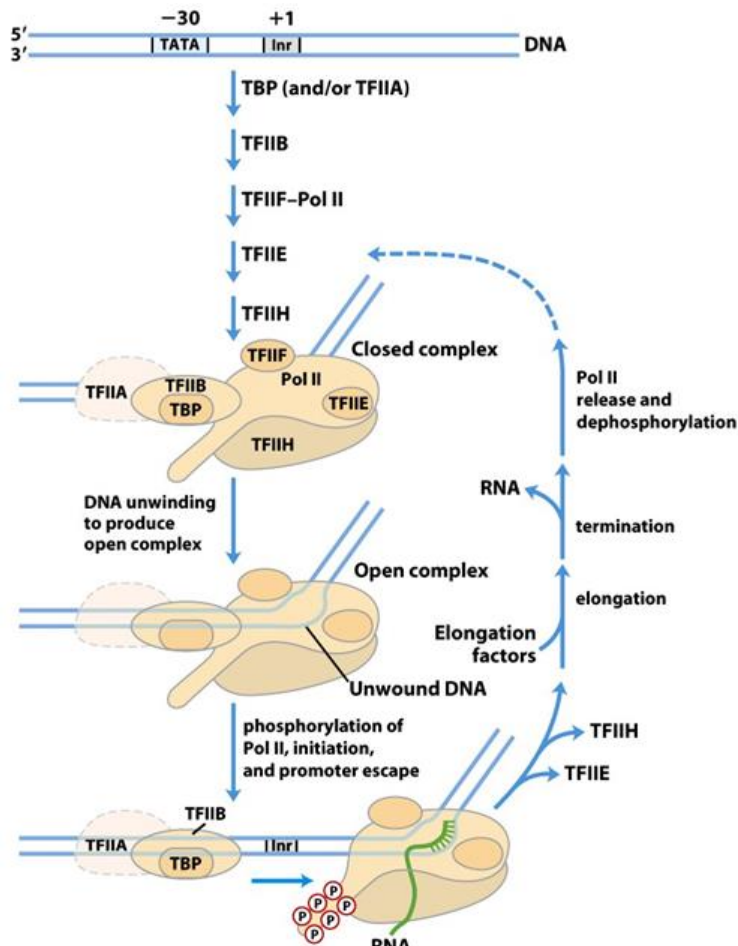


Figure 26-10a

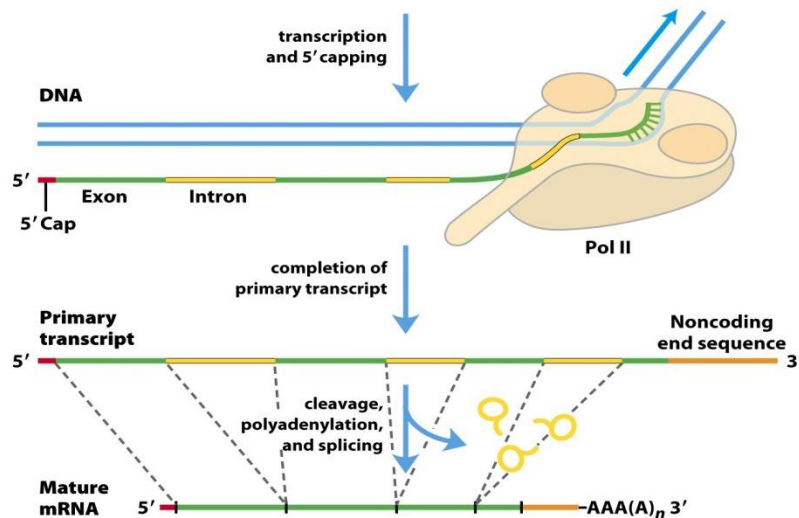
Elongation 完成，termination 是藉由去磷酸化 Polymerase II 的 C 端，使 protein complex 失去活性來達成。

☞ 真核與原核生物之轉錄機制很相似，但真核細胞多了 **RNA processing**。

26.2 RNA Processing

如下圖(FIG 26-12)所示，RNA processing 都在細胞核中進行，可分為三步驟：

1. 5'capping: 在 primary transcript 合成完成前加上 5' cap。
2. Alternative splicing: 把 noncoding region 切除，形成 mature RNA；可發生在 3' cleavage 和 polyadenylation 之前或之後。
3. 3'Poly(A) tail 之形成。



一、5' capping

1. 在轉錄前期(very early stage)，5' RNA 加上 5',5'- triphosphate linkage，接上 7-methylguanosine (m^7G)。
2. 功能：
 - a. G 特殊的甲基化，以及不易被打斷的三磷酸鍵結穩定 RNA 之作用，兩者都保護 RNA 不被分解。
 - b. 轉譯蛋白質之起始位置（第 27 章）。
3. Major mRNAs are mono-methylated; small noncoding RNAs are tri-methylated.

二、Alternative Splicing

1. 切掉(exclude) noncoding introns，而將 pre-mature RNA 轉換為 mature RNA 的步驟。大多數是轉錄、splicing 同時進行，以達到高效率。

*Exon: coding region，100 bp to 1 Kb，較短；

Intron: noncoding region，20 bp to 20 Kb，較長。

依基因長度不同，可能有 1 到 20 個不等的 exons。

☞ 在 **bacteria** 和大部分 **fungi yeast** 裡並沒有 **intron**（少數 yeast 有）；而大部分的真核細胞都有。

2. 大部分 introns 遵循 GU-AG rule：Intron, exon 交界點有 GU-AG region，在 5' site 有 GU signal，在 3' 有 AG signal，標示 RNA splicing 的作用點。少數 introns 遵循 AU-AC rule。

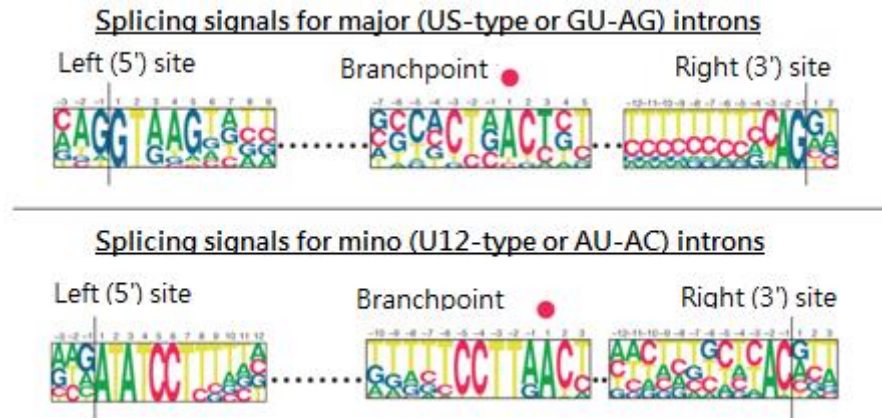


TABLE 27.5 Representative sequences at splice junctions

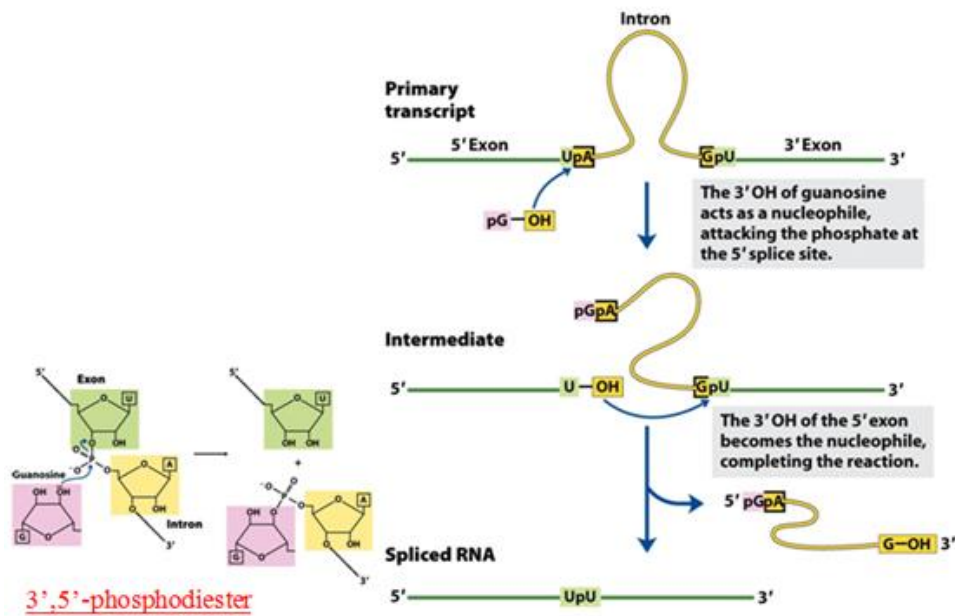
Protein, Intron	5' Splice Site Exon ↓	Branch Site Intron ↓	3' Splice Site ↓ Exon
Ovalbumin, intron 3	...UCAG	GUACAG...A...UGUAUUCAG	UGUG
β globin, human, intron 1	...CGAG	GUUGGU...A...CACCCUUCAG	GCUG
β globin, human, intron 2	...CAGG	GUGAGU...A...CCUCCACAG	CUCC
Immunoglobulin I, L-VI	...UCAG	GUCAGC...A...UGUUUCGAG	GGGC
Rat preproinsulin	...CAAG	GUAAGC...A...CCCUGGCAG	UGGC
Consensus sequences ^a	__AG	GURAGY...A...YYYYY__AG	_____

PS: 除了序列必須有 GU-AG 之外，GU-AG 之間也要含有 A 才能夠被裁切

3. Four classes of introns: type I~IV

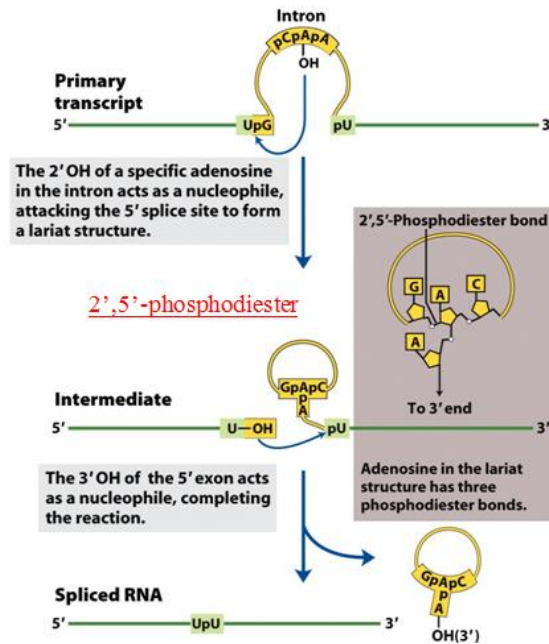
(1) Type I (group I introns):

- 不需 ATP，遵循 GU-AG rule
- 由 **guanosine** 的 **3' OH group** 作為 **nucleophile** 去 attack 5' splicing site 的 phosphate，打斷鍵結，G 和 intron 之 5'端形成 **3', 5'-phosphodiester bond**。
- (課本補充) 接上 5' exon 的 3' OH group 接著繼續做為 nucleophile，attack intron 之 3'端，將整段 intron 切出來。
- Orientation: 5'→3'**。



(2) Type II:

- 不需 ATP，遵循 GU-AG rule
- 和 Type I 機制很像，但 nucleophile 是位於 intron 內特定 **adenosine** 之 **2'-OH group**，attack 5' splicing site 的 phosphate，形成 **2', 5'-phosphodiester bond**。
- 中間產物：branched lariat structure。
- Oreintation: 5' → 3'。

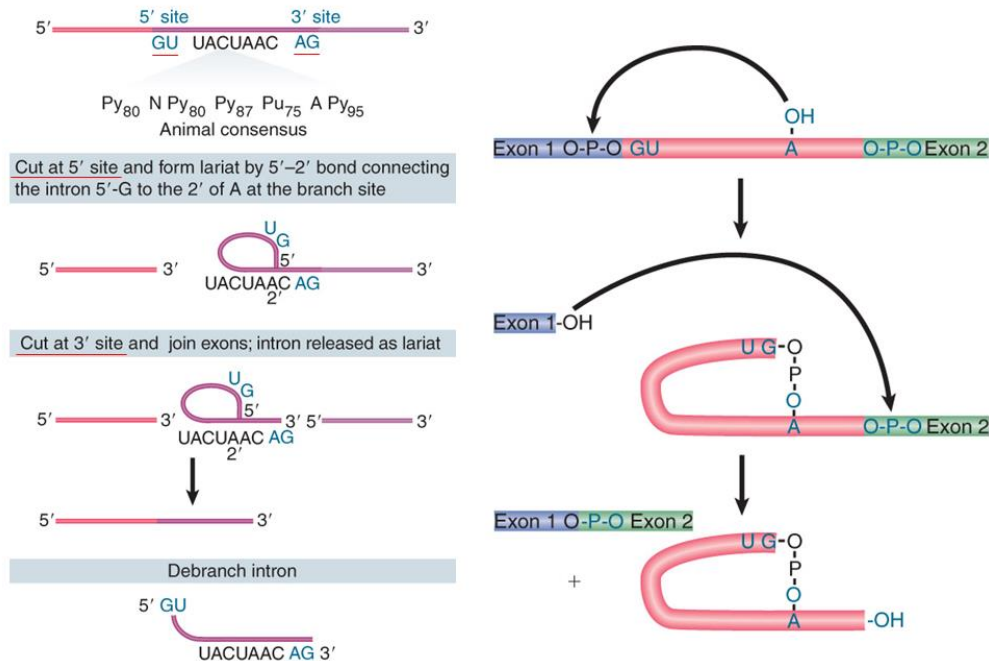


☞ Type I 和 Type II 相同點：

- （課本補充）self-splicing，不需 protein enzymes。

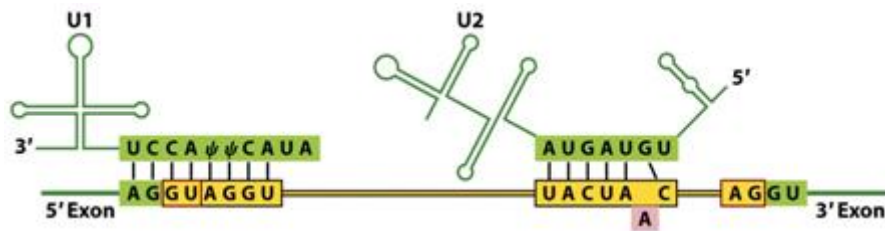
- 不需 ATP。
- 分為兩步驟：nucleophile 攻擊 intron 5'端，3'進行斷裂。
- 遵行 GU-AC rule 。

Splicing occurs at two stages



(3) Type III :

- 需 ATP，遵循 GU-AG rule
- 最常見的 splicing。
- 用於 mRNA 轉錄；因 mRNA 量很多，所以需要較大的 protein complex：spliceosome。
- Spliceosome 含 catalytic protein 及許多可和 RNA 結合的蛋白質，稱為 ribonucleoprotein；主要有五個 **small nuclear ribonucleoproteins (snRNP, often pronounced "snurps")**：U1, U2, U4, U5, and U6。
- 執行和 Type II 一樣之 lariat-forming mechanism，形成 **2', 5'-phosphodiester bond**。
- 兩個 snRNP 較重要：
 - U1 protein 會 **complementary binding** 5' intron splicing site
 - U2 protein 則結合 3' intron splicing site，需 ATP
 →兩者功能：告訴 spliceosome 在這裡進行 splicing。
- U1 protein 有 pseudopyrimidine，它們在某些 snRNP 是常見的，可和一般 mRNA 有所區別，使得 snRNP 有較好的結構，而不易被攻擊



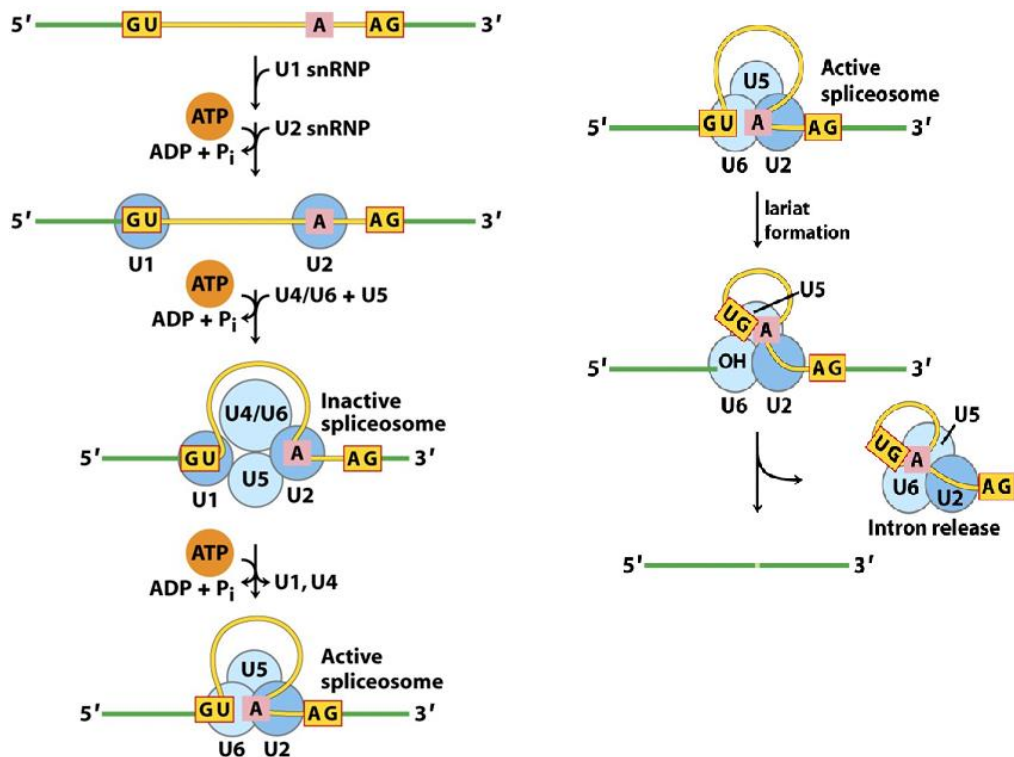
☞ 各 snRNP 功能：

- Binding : U1, U2
- enzyme reaction 執行者: U5, U6
- U4, U5, U6 都結合時，spliceosome 是 inactive，須由 U4 離開來活化整個 complex，所以 **U4** 是擔任活化 **spliceosome** 的角色。

☞ 需 ATP 之步驟：

- U2 protein 結合 3' intron splicing site
- core enzyme: U4, U5, U6 結合 splicing site 進行 catalytic function
- U1, U4 離開 complex，以活化 spliceosome。

→ 在這過程中需大量的 ATP，為四種 Splicing 唯一需 ATP 的機制。

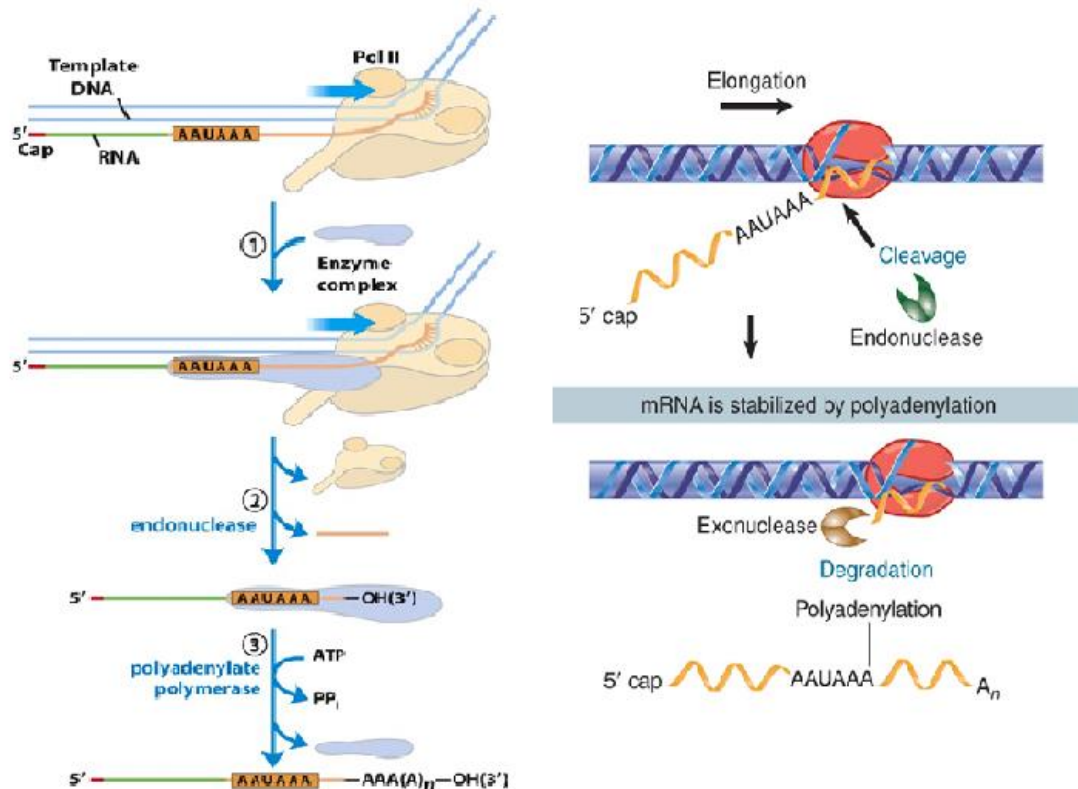


三、 Poly(A) Tail

- 在 RNA 3'端加上 80~250 個 A residues。
- 功能：
 - 位於端點，可保護 mRNAs 不易被 RNase 攻擊而分解。

b. 作為一些 RNA-specific protein 之結合位。

☞ 5' capping 和 3' poly(A) tail 的目標一致：保護 RNA 不被分解



3. 機制：

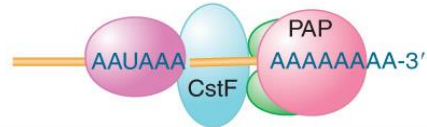
- 一個含有 endonuclease, polyadenylate polymerase 和一些 multisubunit proteins 的 enzyme complex 結合到 Recognition signal (cleavage signal sequences, 也是一 consensus sequence): AAUAAA, 告知該做 poly (A) tail 了。
- Endonuclease 把 AAUAAA downstream 的 10~30 個核苷酸之後的 RNA 切除。
- 由 polyadenylate polymerase 進行 polyadenylation, 將 80~250 個 A 加上 3'端。

4. Poly (A) tail 作為一些 RNA-specific protein 結合位的例子：

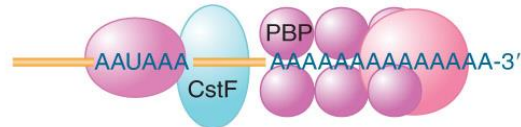
- polyadenylation 時, 藉 Poly (A)-binding protein (PBP or PABP)結合來穩定 Poly (A) tail
- 兩個重要的 PBP, 確認 polyadenylation 位置與穩定 poly(A) tail :
 - Cleavage and polyadenylation specific factor (CPSF) :
結合 AAUAAA
 - Cleavage stimulatory factor (CstF) :
結合 3'-untranslated region 內的 G-U rich region



Poly(A) polymerase (PAP) adds A residues



Poly(A)-binding protein (PBP) binds to poly(A)



Complex dissociates after adding ~200 A residues



