

Chapter 27	
教師:柯博元	日期:2014/6/12
撰稿組:大衛、愍吉、聖修、柏辰	審稿組:神龍、985、琛為、傑森

I. Alternative splicing of pre-mRNA:

A. Alternative splicing: 初步轉錄的 RNA 經過選擇性地保留不同的 Exon、Intron，使同一段基因能表現出不同的蛋白質。常出現在同一段基因在不同組織、同一段基因在細胞不同部位、light chain 與 heavy chain 的產生，而有同一基因卻不同表現的情形。

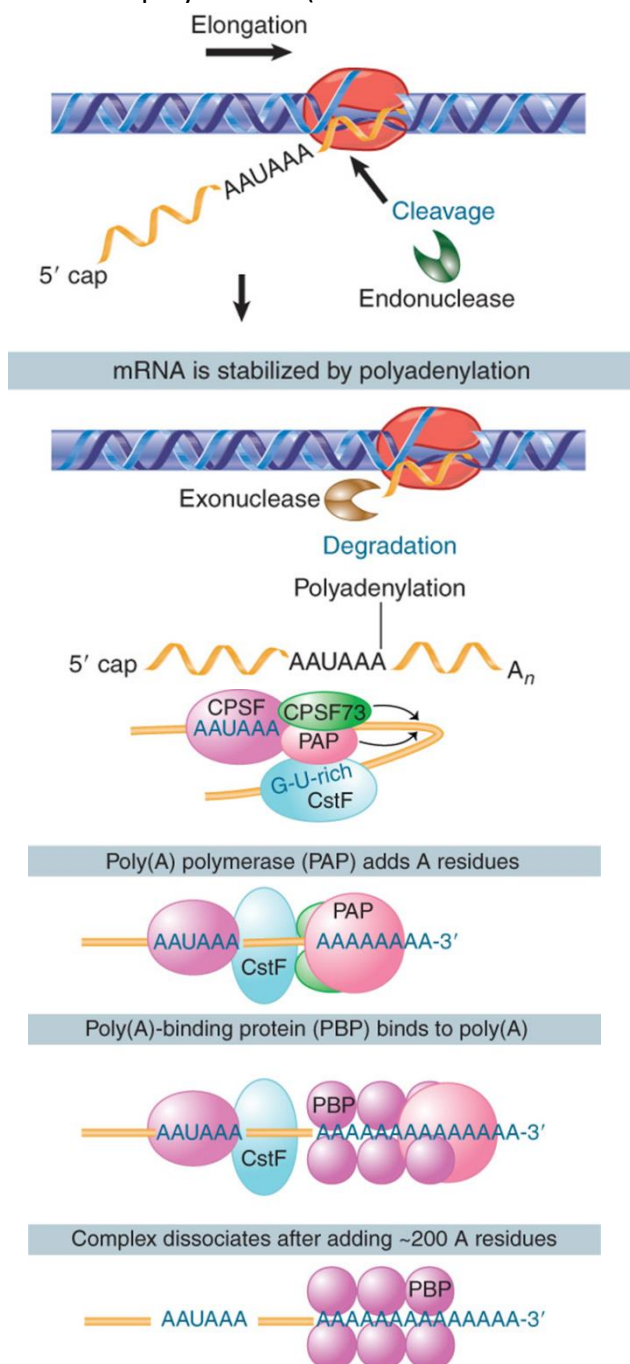
B. 加 poly-A tail 的位置選擇是產生 Alternative splicing 的一個原因

1. Addition of the poly-A tail:

AAUAAA is a signal for cleavage

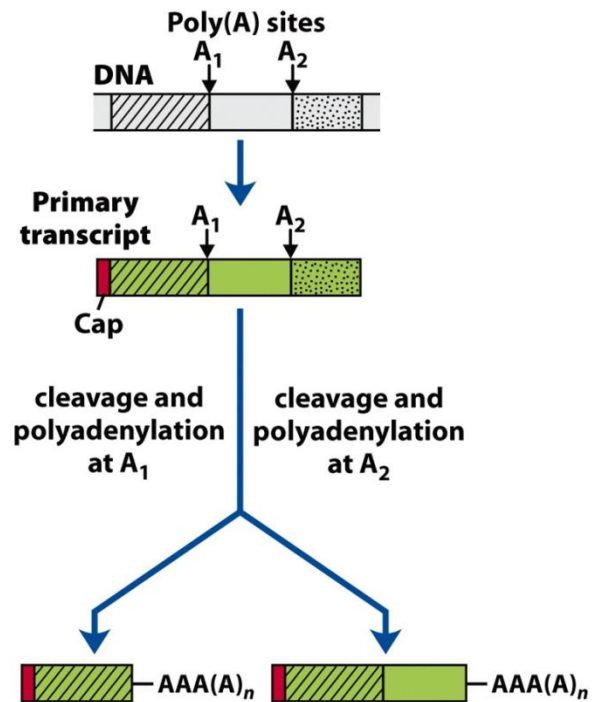
→Endonuclease cleavage at AAUAAA

→Add poly-A tail (Protects mRNAs from degradation)

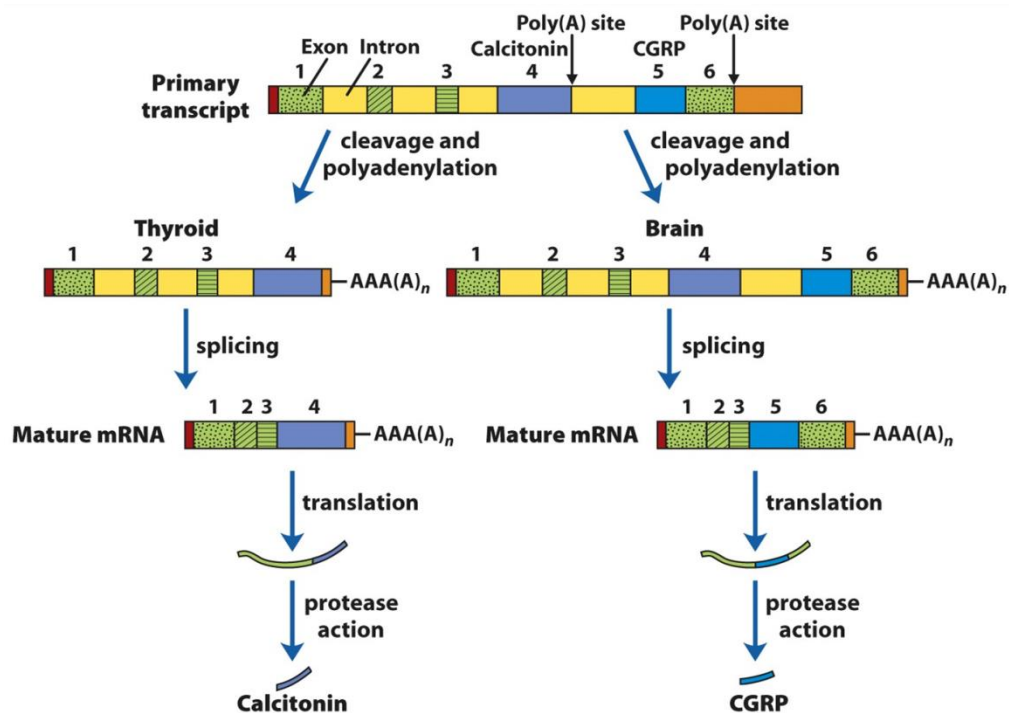


C. Multiple gene products by alternative cleavage and polyadenylation:

1. Immunoglobulin
light chain, heavy
chain:



2. Calcitonin gene-related product

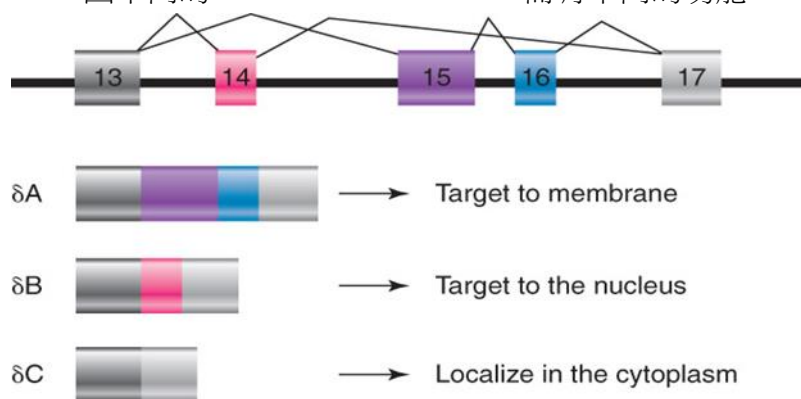


3. MKII (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II)控制細胞內的 localization

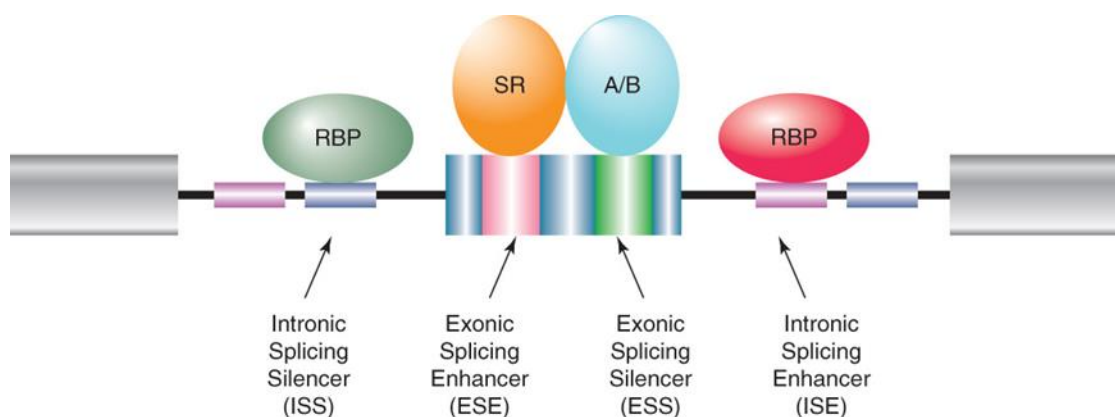
a. 經 alternative splicing 形成不同 isoform，在 C 端有相異的 subcellular localization signal，使它們 localize 位置不同，而有不同的功能。

b. δA 片段最長，在膜上
 δB 長度中等，在細胞核
 δC 片段最短，在細胞質

→因不同的 subcellular localization 而有不同的功能。



* mRNA 之 intron, exon 上有特定 splicing enhancer sequences 或 splicing silencer sequences，來結合些特定蛋白質，以活化或抑制 splicing (AAUAAA 的例外)



II. Ribosomal RNAs and tRNAs Also Undergo Processing

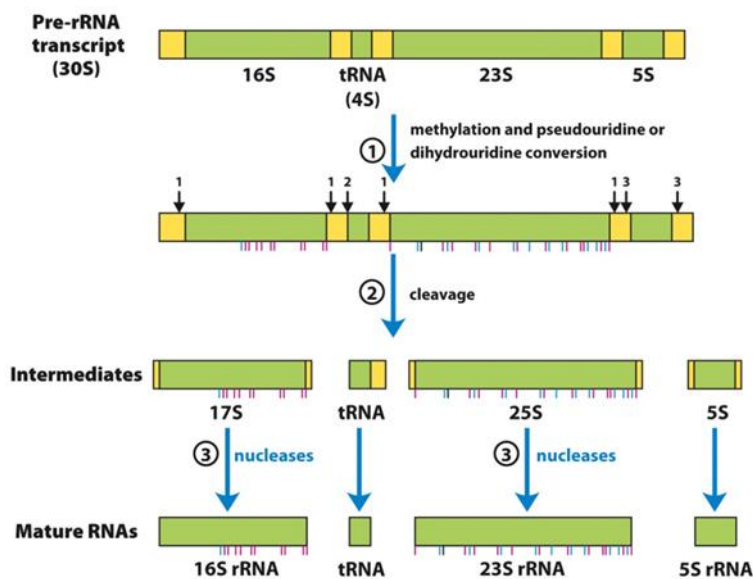
A. rRNA, tRNA modification:

1. rRNA 和 tRNA 的 modification 較簡單，主要作用在鹼基上，甲基化或接上 S。

B. 功能：

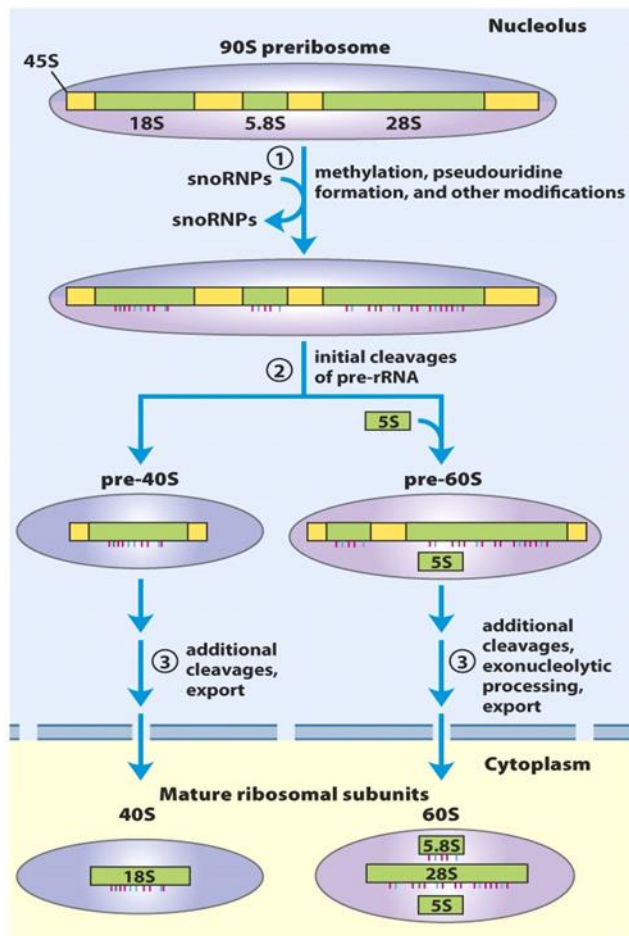
1. 穩定這些 small RNA
2. 也保護使之不易分解
3. 較容易形成二級結構

C. 細菌的 pre-rRNA 經一連串的 cleavage 和 processing 形成 mature rRNA 及 tRNA，由下圖可見其機制和真核細胞的 mRNA splicing 很類似。



D. 脊椎動物的 rRNA 和 tRNA processing(較複雜)

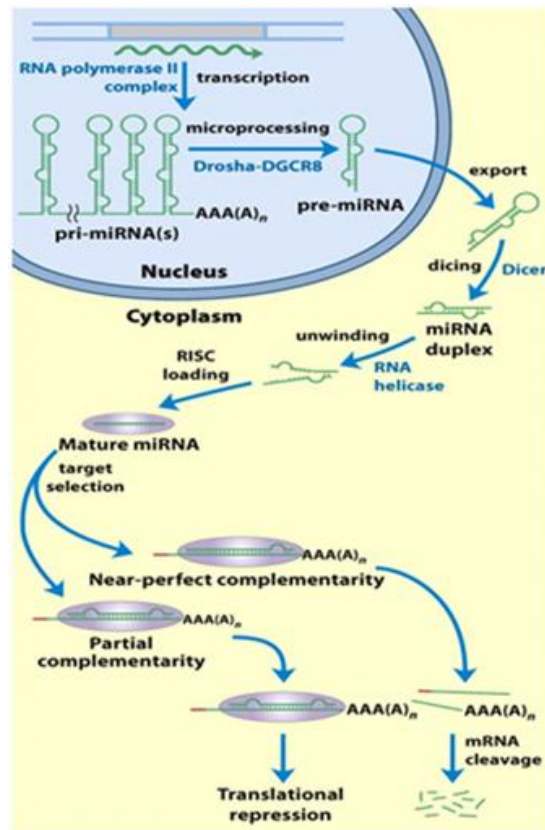
1. 從一個很長的 pre-rRNA 片段，在細胞核行 cleavage 後形成 pre-40S 和 pre-60S 的 rRNA
2. 再送到細胞質進行 further cleavage
3. 不同的 small RNA 在細胞核或細胞質進行 processing，是決定於酵素之 specific subcellular localization。
4. 不論在何處，都執行類似 mRNA splicing 的機制。



* Processing of pre-rRNA transcripts in vertebrates

E. micro RNAs (miRNAs)

- 這幾年才被發現的一種 small RNA，約由 22 個核苷酸組成（很小）
- 會結合 mRNA 3' 端 region 或 internal region，但不完全與 mRNA 互補
- 功能：
 - 使 RNA 不穩定，enhance 分解作用
 - 藉由 mRNA cleavage 使 mRNA 不被轉譯調節基因表現
- 人類有超過一萬種 miRNAs，大部分由 noncoding region 所轉錄出來。
- 某些 virus 有 miRNA，演化結果為用來抑制 host cell 的 cellular gene translation。



III. RNA STABILITY

- A. RNA 很容易被 ribonuclease 分解。

* ribonuclease 簡稱 RNase，differ in their substrate preference and mode of attack，可分為兩種：

endonuclease: 切 RNA internal site(s)

exonuclease: 切 RNA terminal nucleotides

- B. RNase 有多種 5' → 3' 或 3' → 5' 的 exonuclease，所以 5' capping 和 poly(A) tail 都有保護 RNA 不被分解的作用。

RNA 不穩定：單股，易被 ribonuclease 分解，half-life 不長而歧異度大，在做 RNA study 時需特別保護。

- C. 透過 RNA 和許多蛋白質的結合，它們稱作 RNA-binding protein (RBPs)，可活化基因進行轉譯，或保護 RNA 不被分解，調控 mRNA abundance。
- D. mRNA decay – mRNA degradation, assuming that the degradation process is stochastic.
- E. 細菌也有 RNase，但只有 3'→5' 的 exonuclease。先移除 5 端的焦磷酸，endonucleolytic cleavages，然後 3' to 5' digestion
- F. 真核細胞欲分解 RNA，必須去除 5' capping 和 poly(A) tail。
先由 Catalyzed by Poly(A) nuclease 解除 poly(A) 的保護再進行 decapping

Decapping 兩個機制：

1. decapping enzyme

endonuclease(Dcp1, Lsm1-7, Xrn1)由 3' \rightarrow 5' digest 5' capping

2. exosome:

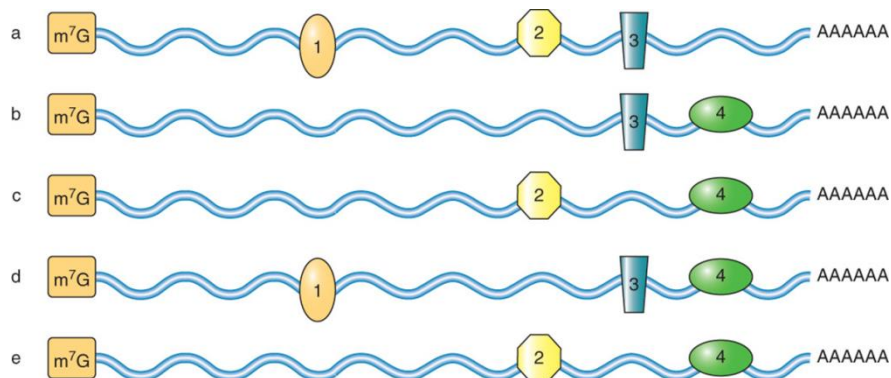
然後 Exosome 結合 RNA，使 RNA 從 5' \rightarrow 3' 被 exonuclease digest。

3. RNA sequence 上面有特定序列，透過 recruit 特定蛋白質 (stabilization factor or machinery)來調控 mRNA stability、調控分解速率：

destabilizing elements (DEs)：recruit degradation machinery 使 mRNA 分解。

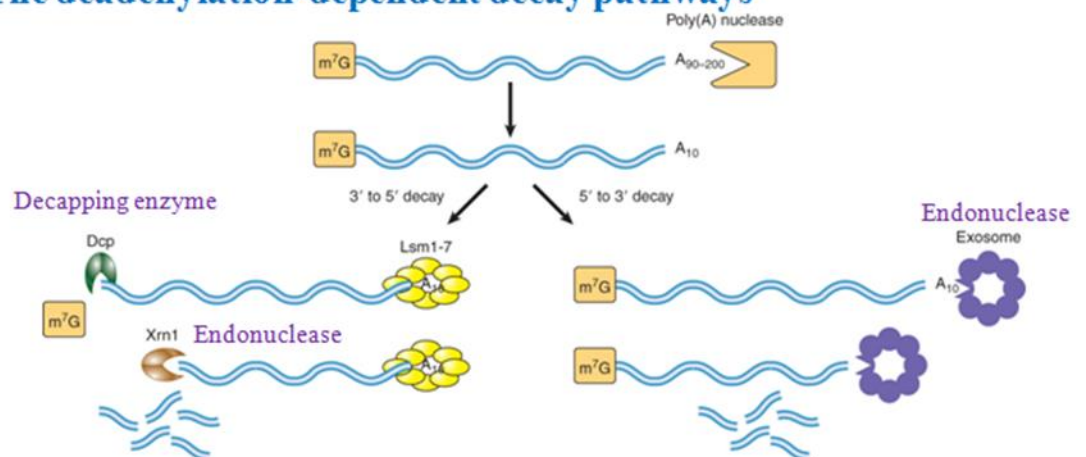
stabilizing elements (SEs)：抑制 destabilizing protein 這些 RBP 的結合，穩定 RNA，使之不被分解。

concept of an RNA regulation



Degradation of eukaryotic mRNA

The deadenylation-dependent decay pathways



Example: Transferrin mRNA

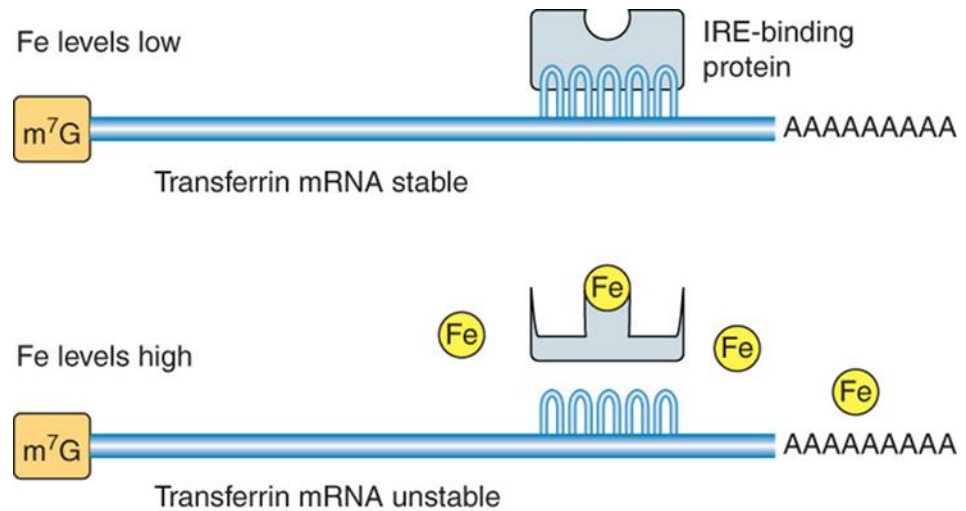
只有在有鐵的時候會被大量表現

鐵濃度低時，鐵不與 IRE-binding protein 結合，使得 IRE binding

protein 與 IRE 結合，使 mRNA 穩定，抑制轉譯作用。

* Iron-response element (IRE)：在特定 mRNA 中的 cis sequence，其 stability 和轉譯受到細胞的鐵濃度調控。

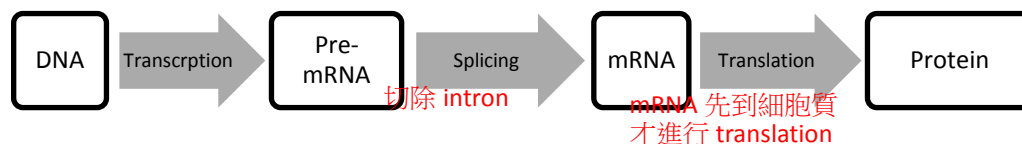
鐵濃度高時，IRE-binding protein 與 Fe 結合，使得 IRE-binding protein 不結合在 mRNA 而使之不穩定，解除轉譯限制。



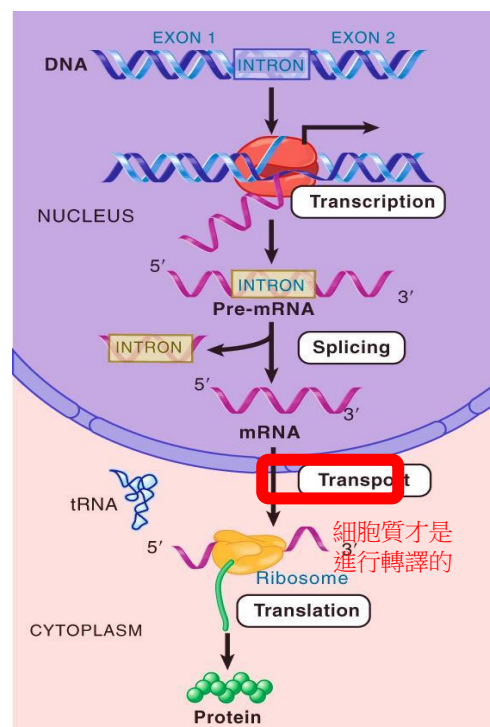
Chapter 28	
教師:柯博元	日期:2014/6/12
撰稿組:大衛、愍吉、聖修、柏辰	審稿組:神龍、985、琛為、傑森

I. An Overview of Translation in Eukaryotes :

A. 從 DNA 到 Protein 的簡易流程圖：



B. 真核生物的基因含有外顯子(exons)和內插子(introns)(原核生物的DNA不含有Introns,所以可以藉此區別真核與原核細胞)。Introns 是一段不會在轉譯到蛋白質時表現的基因片段。其會由DNA上轉錄到Pre-mRNA上,但在**RNA Splicing**時會被切掉;而在成熟mRNA被保留下來的基因部分被稱為exons。

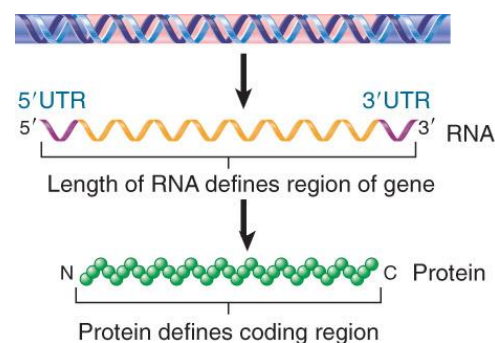


C. 參與轉譯的RNA的主要種類及功能：

1. Messenger RNA (mRNA)：當作轉譯讀碼的模板(template)
2. Transfer RNA (tRNA)：讀取 mRNA 上的訊息並攜帶胺基酸來進行合成
3. Ribosomal RNA (rRNA)：合成蛋白質

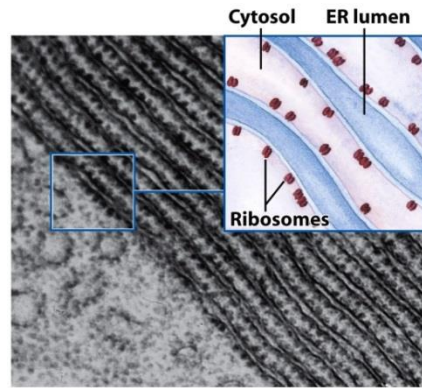
D. 在每個 mRNA 分子的兩端都有一段 **UTR (Untranslated Regions)**，非翻譯區)，是 mRNA 分子中非編碼的片段。

1. **5'-UTR** 從 mRNA 起點的 methylated cap 延伸至 AUG 起始密碼子(start codon)
2. **3'-UTR** 從編碼區末端的終止密碼子(stop codon)延伸至 poly-A tail 的末端
3. 5'-UTR 和 3'-UTR 之間的 **coding regions**(又稱作"open reading frame")由 exons 組成, mRNA 上這個區域攜帶其轉譯成蛋白質的基因訊息。



E. Translation 在哪裡進行？

1. **Ribosome** : rRNA 和 proteins 組合而成的巨大複合物，在電子顯微鏡下電子雲密度很深，易於觀察到。
2. 細胞質中內質網(ER)的外膜上(面向細胞質的那一面)一顆一顆黑黑的 Ribosome，即為 mRNA 進行 translation 製造出 protein 的地方。



II. Genetic code 的編碼

A. 兩個 or 三個編一碼？！

→ 目前已知為三個 nucleotides 組成的 codon 決定一個 amino acid

推理方法：

二、 $4^2 = 16 < 20$ (ATCG/AUCG)→

X

三、 $4^3 = 64 > 20$ (ATCG/AUCG)→

生物體內含有 20 種 amino acids 與 4 種 RNA nucleotides (A, U, C, G)。2 個 nucleotides 配對決定一種 amino acids 的排列組合最多只能決定 16 種 amino acids，而 3 個配對的 64 種排列組合則足以決定體內的 20 種 amino acids。

B. Overlapping or Non-overlapping

→ 目前已知為 **Non-overlapping & Triplet**

1. 三種假設：

Diagram illustrating three hypotheses for the genetic code:

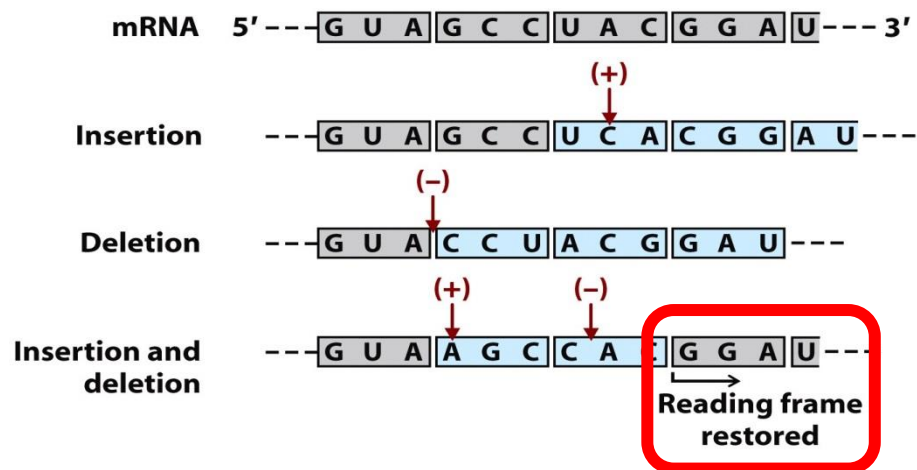
(a) Overlapping code. There will be statistical regularities between adjacent amino acid residues. Point mutations (magenta) will be able to change two amino acid residues.

(b) Punctuated code. Deletions of four nucleotides (or multiples thereof) will restore the reading frame. Punctuate : 中斷

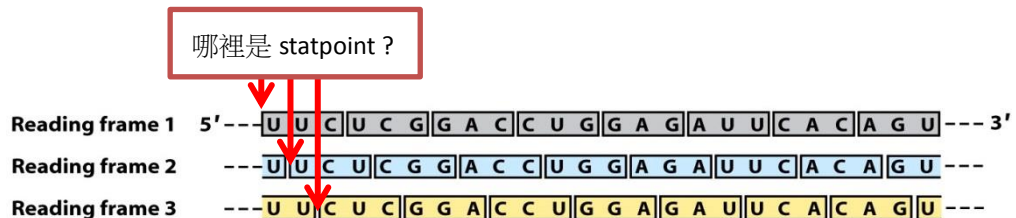
(c) Unpunctuated code. Deletions of three nucleotides (or multiples thereof) will restore the reading frame. This is the actual form of the code.

2. 證明方法：

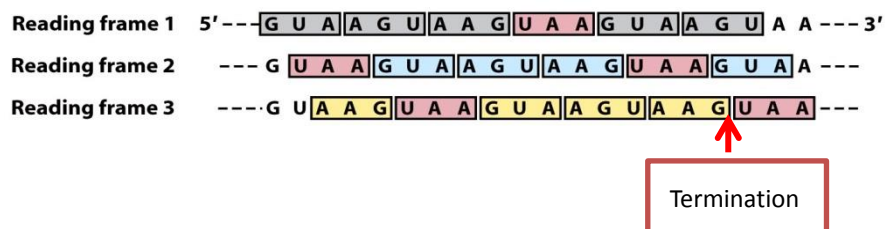
實驗顯示在 mRNA 上加入一個 nucleotide (insertion)，後面的 reading frame 都將因此而發生改變，這個情況也發生在從此 mRNA 移除一個 nucleotide (deletion) 時。然而，當 insertion 和 deletion 同時發生在同一個 mRNA 上時，即從同一個 mRNA 加入並移除一個 nucleotide，則發現後面的 reading frame 可以被 restored。



C. 要從哪裡開始轉譯？要從哪裡結束轉譯？



↑ 如上圖，不同的起始解讀位置會組成不同的 reading frame，轉譯出來的 polypeptides 也不一樣。



→ 有 codons 可以當作 translation 的 Startpoint & Termination 的 signal：

- Start codon：AUG（轉譯出 Methionine）
- Stop codon：UAA，UAG，UGA（不會轉譯出 amino acids）

D. "Dictionary" of amino acid code words in mRNAs

First letter of codon (5' end)
Second letter of codon

	U	C	A	G
U	UUU Phe UUC Phe UUA Leu UUG Leu	UCU Ser UCC Ser UCA Ser UCG Ser	UAU Tyr UAC Tyr UAA Stop UAG Stop	UGU Cys UGC Cys UGA Stop UGG Trp
C	CUU Leu CUC Leu CUA Leu CUG Leu	CCU Pro CCC Pro CCA Pro CCG Pro	CAU His CAC His CAA Gln CAG Gln	CGU Arg CGC Arg CGA Arg CGG Arg
A	AUU Ile AUC Ile AUA Ile AUG Met	ACU Thr ACC Thr ACA Thr ACG Thr	AAU Asn AAC Asn AAA Lys AAG Lys	AGU Ser AGC Ser AGA Arg AGG Arg
G	GUU Val GUC Val GUA Val GUG Val	GCU Ala GCC Ala GCA Ala GCG Ala	GAU Asp GAC Asp GAA Glu GAG Glu	GGU Gly GGC Gly GGA Gly GGG Gly

Amino acid	Number of codons	Amino acid	Number of codons
Met	1	Tyr	2
Trp	1	Ile	3
Asn	2	Ala	4
Asp	2	Gly	4
Cys	2	Pro	4
Gln	2	Thr	4
Glu	2	Val	4
His	2	Arg	6
Lys	2	Leu	6
Phe	2	Ser	6

1. Met 和 Trp 只有一個對應的 codon；Arg, Leu, Ser 有 6 種 codons。
2. 每個 codon 的前兩個 nucleotides 決定要對應到哪個胺基酸
3. 不同物種 codon 對應的氨基酸不一定一樣！見下圖✓

TABLE 28.1 Modifications of the genetic code

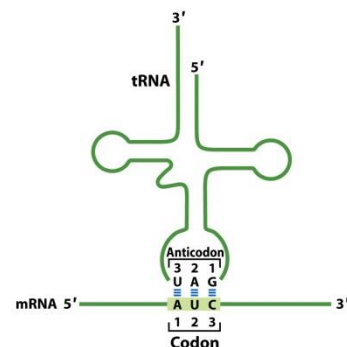
Codon	Usual Use	Alternate Use	Where Alternate Use Occurs
AGA	Arg	Stop, Ser	Some animal mitochondria, some protozoans
AGG			
AUA	Ile	Met	Mitochondria
CGG	Arg	Trp	Plant mitochondria
CUU	Leu	Thr	Yeast mitochondria
CUC			
CUA			
CUG			
AUU	Ile	Start (N-fMet)	Some prokaryotes ^a
GUG	Val		
UUG	Leu		
UAA	Stop	Glu	Some protozoans
UAG	Stop	Pyrrolysine Glu	Various archaea Some protozoans
UGA	Stop	Trp Selenocysteine Selenocysteine and Cys	Mitochondria, mycoplasmas Widespread ^a <i>Euplotes</i>

✧ 不同物種的 codon using 不同，例如：

1. UGA→一般對應到 Stop，但在粒線體則對應到 Trp...
2. CUU→一般對應到 Leu，但在酵母菌粒線體中則對應到 Thr

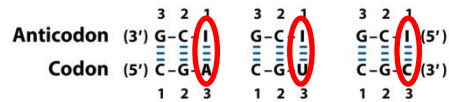
E. tRNA & Wobble Base Pairing 假說

1. tRNA 本身會有一個 anticodon 的序列，去和 mRNA 上的序列做配對，並且攜帶一個特定的胺基酸過去已進行蛋白質的合成。根據剛剛的數據可以知道一共有 64 個密

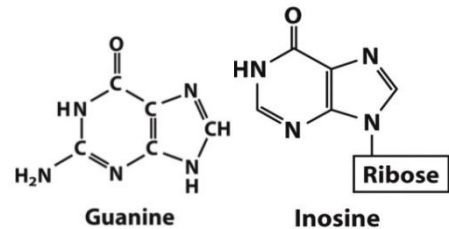


碼子，所以照理說，應該也會有對應的 61 種 tRNA（扣掉 stop codon 3 個），但事實上通常生物體中 tRNA 的種類只有約 45 種。

- 以 Alanine 來說，mRNA 上的 codon 為 CGA、CGU、CGC 和 CGG 四種時即可轉錄出 Alanine，可是可以攜帶來 Alanine 的 tRNA 上只有出現兩種 Anticodon：GCI 和 GCG。



- I = Inosinate \rightleftharpoons Guanosine，可以和 A、U、C 互補，這是一個 modified ribose nucleotide 的重要角色，讓辨認的過程當中通用性變大。



- Wobble Base Pairing Hypothesis :

- mRNA 3'（第三鹼基）的密碼子和 tRNA 5'端的反密碼不是按照「A 配 U、C 配 G」的規則完美的互補，例如原本 G 是以三鍵和 C 來結合，改成用 I 以雙鍵和 C 結合。這種鹼基規則鬆綁的假說稱為搖擺（Wobble Base Pairing）假說。
- 功用：可以提高 pairing 的多樣性
- 兩種發生形式：

(1) Two codons recognized :

- Anticodon 是 U 時配 A、G
- Anticodon 是 G 時配 C、U

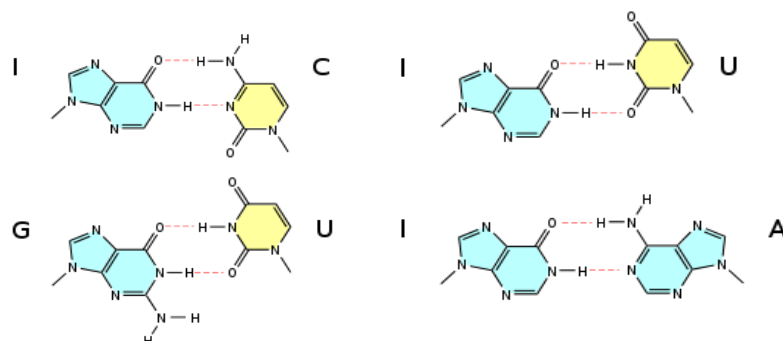
(2) Three codons recognized :

- Anticodon 是 I 時配 A、U、C

TABLE 28.2 Base-pairing capabilities in wobble pairs

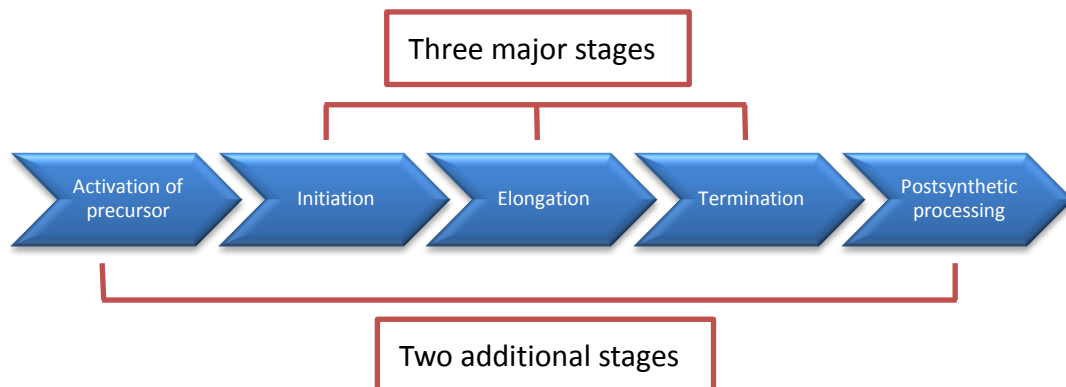
Base at 5' Position in Anticodon		Base at 3' Position in Codon
G	pairs with	C or U
C	pairs with	G
A	pairs with	U
U	pairs with	A or G
I	pairs with	A, U, or C

只在特定的結合中發生，且不導致 genetic code 所傳達的訊息變模糊。



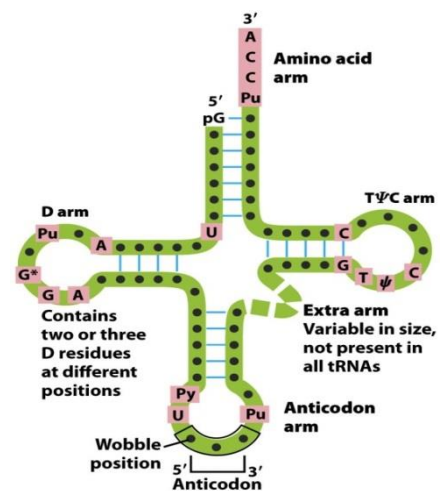
III. 形成蛋白質

A. 簡圖



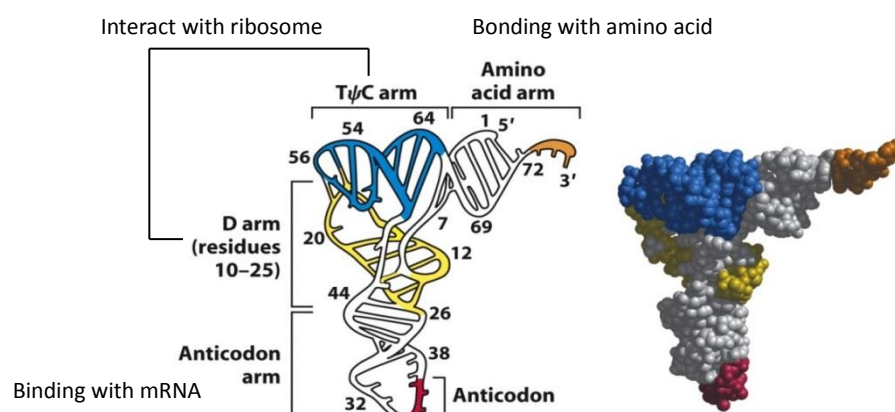
B. tRNA

1. 單股 RNA
2. 特異 secondary structure 可形成 4 arms
3. 73-93 nucleotide residues
4. 生物體有>32 種 tRNA
5. N-terminus 有 3'-ACC-5' sequence



6. 4 arms:
 - a. Amino acid arm: 可 conjugate 對應的 amino acids
 - b. Anticodon arm: 可辨認 mRNA 上的 codons, 且 anticodon 第三個位置是 wobble position
 - c. D arm: 有 2~3 D modified residues
 - d. TψC arm: 有 ribothymidine 和 pseudouridine 的 modified bases

C. Twisted L form of 3-D tRNA



D. Aminoacylation of tRNA by aminoacyl-tRNA synthetases

1. Formation of aminoacyl adenylate:

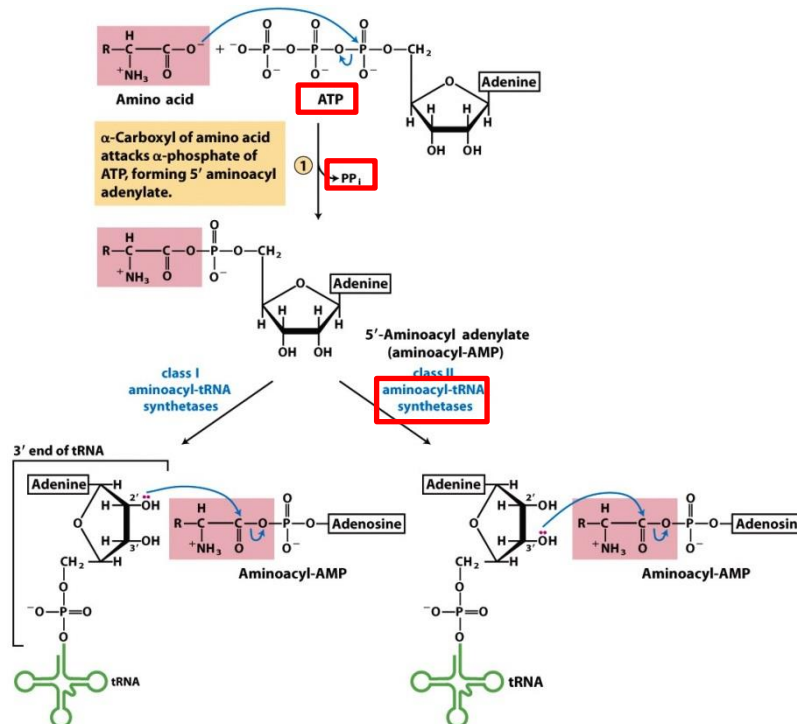


Figure 27-19 part 1
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

aminoacyl-tRNA synthetase , ATP 以及 Mg^{2+} 讓 amino acids 結合到 tRNA

2. Transfer of aminoacyl group to tRNA:

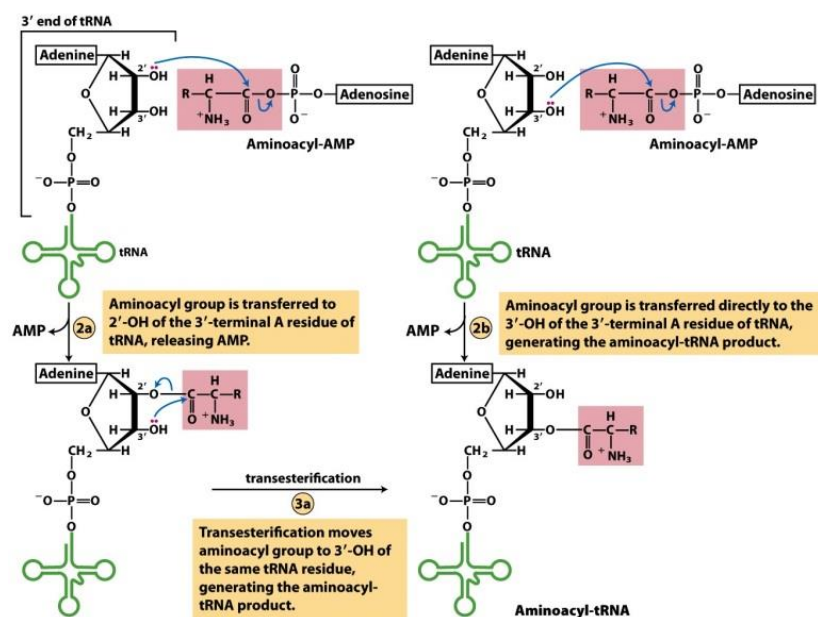


Figure 27-19 part 2
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

- a. Aminoacyl group 先被 **class I** aminoacyl-tRNA synthetase transferred 到 tRNA 上 3'-terminal A residue 的 **2'-OH** , 再通過 transesterification 把 aminoacyl group 轉移到 3'-OH 上
- b. Aminoacyl group 直接被 **class II** aminoacyl-tRNA synthetase transferred 到 tRNA 上 3'-terminal A residue 的 **3'-OH** 形成 aminoacyl-tRNA product
- c. $1 \rightarrow 2 \rightarrow 3$ $2 \rightarrow 3$ (小小背法)

E. tRNAs are selectively paired with amino acids by aminoacyl-tRNA synthetases

1. Synthetase 有三個 binding sites : ATP site 、 amino acid site 以及 tRNA site
2. Amino acid 與 ATP 會先進入 synthetase 形成 aminoacyl-AMP
3. tRNA 才會與 aminoacyl-AMP 進行 interaction 形成 aminoacyl-tRNA product

