

Lecture6: Genetics, Genes and Central Dogma in Molecular Biology

Honor Biology學生 陳俊鴻

1. 本週所學、思考、問題與解答

所學一：

DNA作為生物的遺傳分子，DNA replication在將DNA遺傳至子代上具有非常重大的意義。DNA replication必須先由DNA primase先製造小片段的RNA配對股，再由DNA polymerase繼續複製。除此之外，由於DNA replication具有方向性，而且作為複製模板的DNA只有在解旋酶解開後才得以複製，因此出現了leading strand和lagging strand的差別。

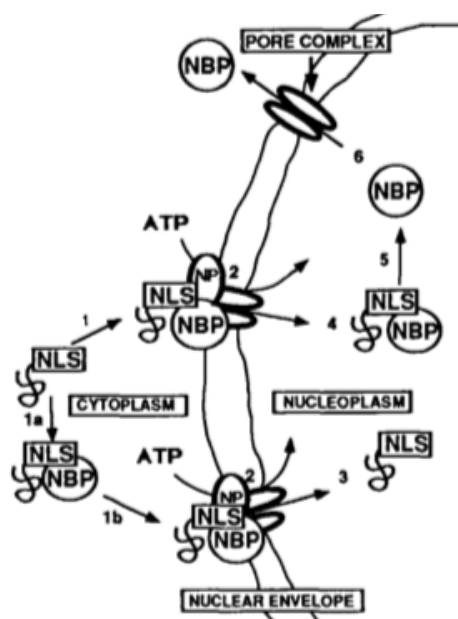
Arthur Kornberg在1959年所發現的Kornberg enzyme原以為是作為*E. coli* 中負責DNA replication的DNA polymerase，但後來才發現原來Kornberg enzyme是作為DNA replication後進行修復變異的DNA polymerase。

問題一：

我們知道，蛋白質的合成必然是在細胞核之外(主要在ER或是cytosol)，那麼在細胞核內工作的酵素是來自何處？其中的機轉又是如何？

解答一：

任何material含有NLS都會被importins送入細胞核。至於任何cargo含有nuclear localization signal(NLS)都會透過pore快速且有效率地被傳送入細胞核。其機制如圖一。[1]



圖一 NSL及pore對物質的運輸機制

所學二：

在bacteria中，由於RNA polymerase(core)沒有主動尋找、辨識transcription start site的能力，因此需要與 σ factor結合成為holoenzyme才能達成。至於不同的 σ factor則是透過自身被展開後兩個可辨識promoter的domains來協助core enzyme到不同的基因上進行transcription。在eukaryotes中，transcription的機制則又複雜許多，比方說其單一基因的promoter就比bacteria多許多。

此外，在eukaryotes中，post-transcription的修飾也是與prokaryotes相當的不同，在premature mRNA會形成特定的二級結構，以吸引一些進行修飾的蛋白質作用，比方說在5' UTR會進行translation control的修飾、在3' UTR會進行subcellular localization, stability的修飾。除了在3' UTR, 5' UTR外，premature mRNA也會在中間進行修飾，這也就是intron和exon的區別，然而並非所有被轉錄出來的exon都會被表現在轉譯，在剪接體的作用下，有些exon仍然會如intron一樣被剪接出mRNA，這也就是alternative splicing，也是DNA上單一基因可以表現出不同蛋白質的原因。

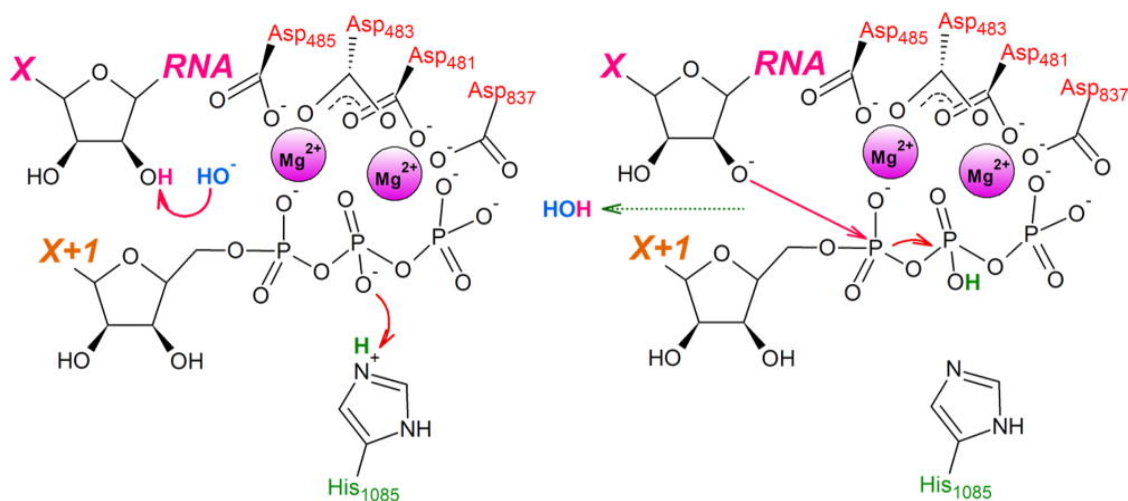
所學三：

以往的「一基因，一酵素，一功用」的想法在發現alternative splicing後被打破了「一基因，一酵素」的部分，那「一酵素，一功用」的部分呢？這個想法也確實被打破了，在發現到T cell致使單核球分化為macrophage的分泌物時，也同時發現這個分泌物與負責glycolysis一部分的酵素非常相似，這才確定了一個蛋白質確實可能具有複數個催化的能力，因為它具有複數個活化位與不同的結構、型態。

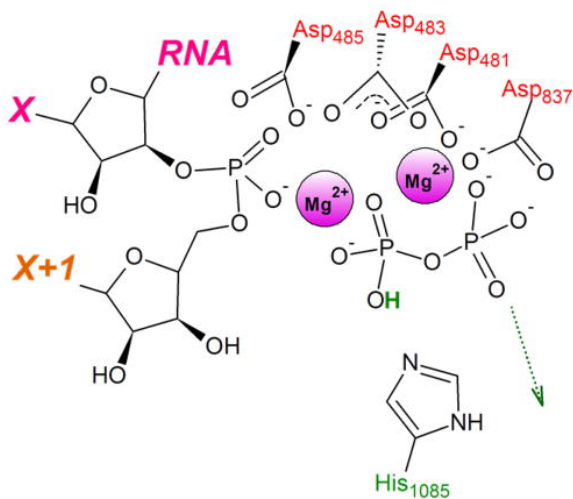
2. Answer to quiz

(1) Why DNA polymerase 一定要 primer but RNA polymerase 不用? How about primase? What you learn from these 3 enzymes?

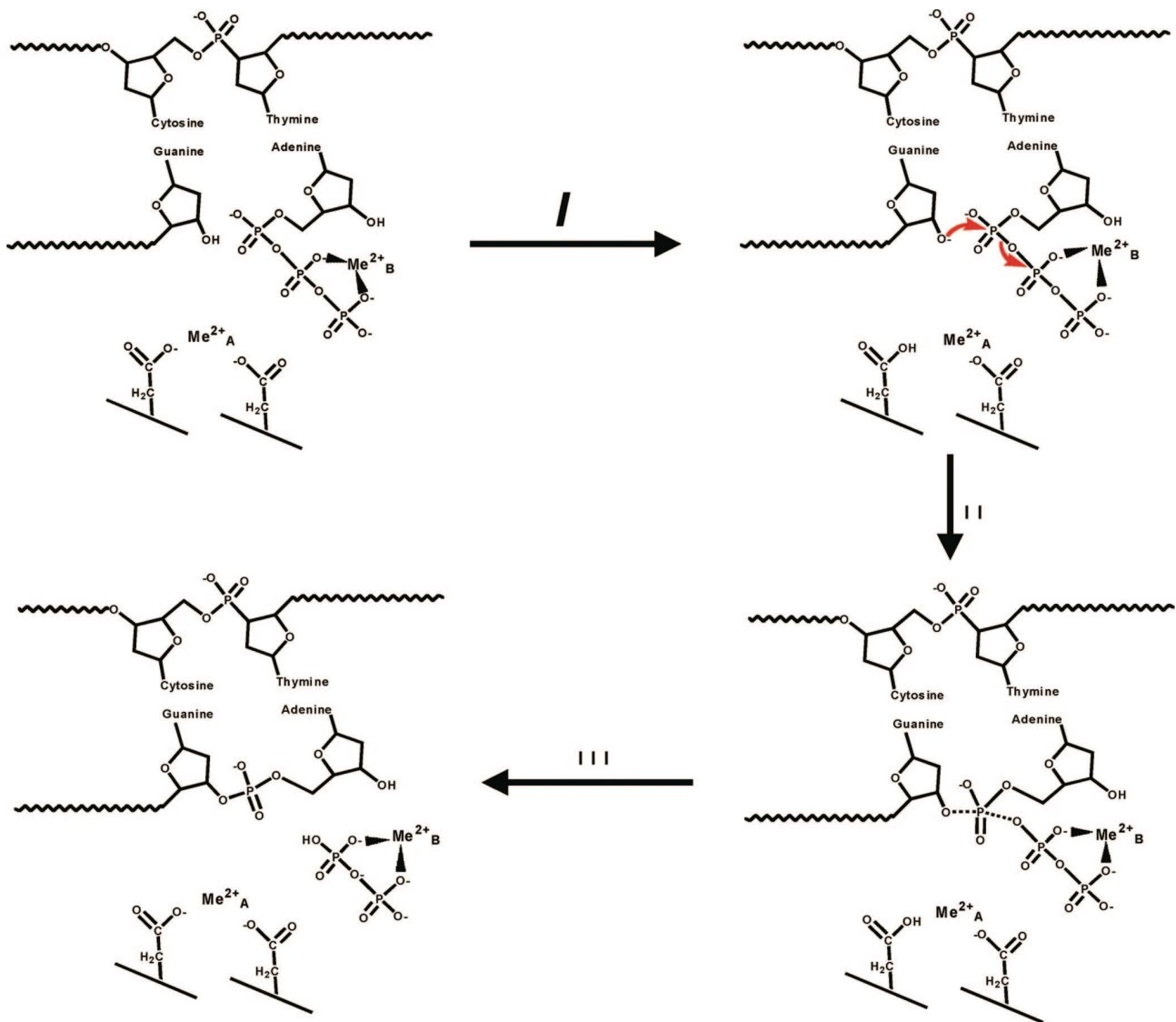
雖然查不到直接討論的文獻，但我猜這很可能和演化時原始DNA polymerase, RNA polymerase所採取的反應機構、途徑與演化的偶然性所致，見圖二、圖三、圖四[2]、圖五[3]。



圖二 RNA polymerase反應機構之一 圖三 RNA polymerase反應機構之二



圖四 RNA polymerase反應機構三



圖五 DNA polymerase反應機構

(2) Telomerase是靠什麼來延長 DNA 的端點？

在DNA replication時, DNA polymerase能完整地複製leading strand，但在複製lagging strand時會有一個RNA primer在chromosome的一端。在降解RNA primer後，部分的DNA會因此而變成單股並且會在之後的細胞分裂中丟失。為了要保護丟失的這段遺傳資訊，自己擁有一段RNA的端粒酶會以RNA作為模板來延長DNA。接著RNA primase會合成一段新的primer在這段延伸的DNA上，讓原先變成單股的DNA會被完整地複製。

(3) “研究人員篩選出Pol I、Pol II及Pol III的mutant，而最終發現僅Pol III缺失的E. coli是無法存活的，因此推斷Pol III是負責DNA複製的關鍵酵素”

How to isolate pol III mutant if it is essential for cell survival?

抱歉，查不到相關的文獻。

(4) 解釋sigma factor的作用是什麼？

σ factor與RNA polymerase結合後，會將其結構展開，並且外露的兩個部分可以用來偵測promoter的DNA序列，當確定偵測到後便會活化RNA polymerase從promoter旁邊的start site進行transcription。

(5) 1969年（Paula的亂槍打鳥實驗）怎麼知道一段有幾個鹼基對？

抱歉，我已經看完了整篇論文[4]，但我還是不太明白老師問的「一段有幾個鹼基對」是指什麼。

(6) How to use protein as primer in adenovirus 's DNA replication?

Adenovirus的DNA replication是由三個病毒蛋白共同合作完成的，分別是precursor terminal protein (pTP)、adenovirus DNA polymerase (Adpol)和DNA binding protein(DBP)。其中pTP和Adpol在宿主細胞中通常表現出pTP/Adpol heterodimer(pTP/pol)的型態，在DNA replication開始前，pTP/pol上pTP的 β -OH group會與病毒基因體末端dCTP上的 α -phosphoryl group形成共價鍵，並形成pTP/dCMP complex，該complex會接著作為DNA replication的primer [5]。

(7) protein有很多domain進行不同反應，怎麼知道哪個domain for 哪個反應？

我查到的資料好像想表達可以透過比對不同的蛋白質間domain功用的異同，還有用一些物理從分子動力的角度計算親和力等等。但我其實真的完全看不懂他在說什麼，因此這題我真的回答不出來。我參考的Wikipedia段落是Domains and protein flexibility和Domain definition from structural coordinates[6], [7]。

(8) 細菌對tetracyclin產生resistance的機制是什麼？

目前已發現的機制主要有三種策略：

- a. 限制tetracycline接觸ribosome的途徑。比方說，透過產生針對tetracycline的幫浦蛋白。
- b. 改變ribosome以預防tetracycline與之形成鍵結。比方說，透過製造tetracycline的競爭性抑制物。
- c. 製造將tetracycline去活化的蛋白質[8]。

(9) rRNA除了形成ribosome外還有什麼功能？

Ribosome RNA的前驅物(pre-ribosomal RNA)參與了某種特定miRNA的形成，該miRNA會在細胞受到機械壓力時誘發inflammation和cardiac disease [9]。

(10) Translation releasing factor是個什麼樣的蛋白質？

它是一個形似aminoacyl-tRNA的蛋白質，他會進入核糖體的A site和stop codons結合，並在肽鏈上添加一個水分子致使肽鏈與tRNA的鍵結斷裂。隨後，肽鏈經由large subunit的exit tunnel離開，而核糖體也隨之拆解。

(11) Does single cell like yeast also have prion?

有[10]。

(12) 請以具體的例子來解釋negative dominant mutation、intragenic suppression、intergenic suppression。

Dominant negative mutation: 其基因產物會被改變，並與野生型等位基因拮抗。這些突變通常導致分子功能改變，並以顯性或半顯性表現。

Intragenic suppression: 源自於與原始突變基因相同的抑制子突變。

Intergenic suppression: 是透過基因體其他地方的突變而減輕了一個突變基因的影響，故第二個突變與原始突變不在同一個基因上。

3. 參考資料

- [1] [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90233-O](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90233-O)
- [2] <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.bbagrm.2012.08.009>
- [3] <https://doi.org/10.1021/cr800530b>
- [4] <https://doi.org/10.1038/2241164a0>
- [5] https://doi.org/10.1007/978-3-662-05597-7_7
- [6] <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.bpj.2009.03.051>
- [7] https://en.wikipedia.org/wiki/Protein_domain
- [8] <https://doi.org/10.1128/cmr.54.387>
- [9] <https://dx.doi.org/10.1038%2Fnmcomms4000>
- [10] <https://dx.doi.org/10.1534%2Fgenetics.111.137760>

(老師，恕我直言，這次的take home quiz不僅份量較大、難度較高，而且時間間距又較平時短，實在很難產出充實、高品質的報告，也較難有脈絡地深入思考及探索，說實話我覺得這個禮拜的學習特別不充實、效率也相當低，因為我花了數十小時試著讀懂題目相關的論文，耗時長卻還是一無所獲，也許這種學習方法不是一個好的模式)