

RNA-syntes och processning

Dagens föreläsning

- Basala mekanismer vid transkription
- Tre huvudsakliga RNA-polymeraser – I, II, III
- Föreläsningen täcker bl.a.:
 - Initiering, elongering och terminering av transcription
 - 5'-capping
 - 3'-polyadenylering
 - Splicing
 - Spliceosomen

Bakterier har ingen kärna – konsekvenser för genexpression

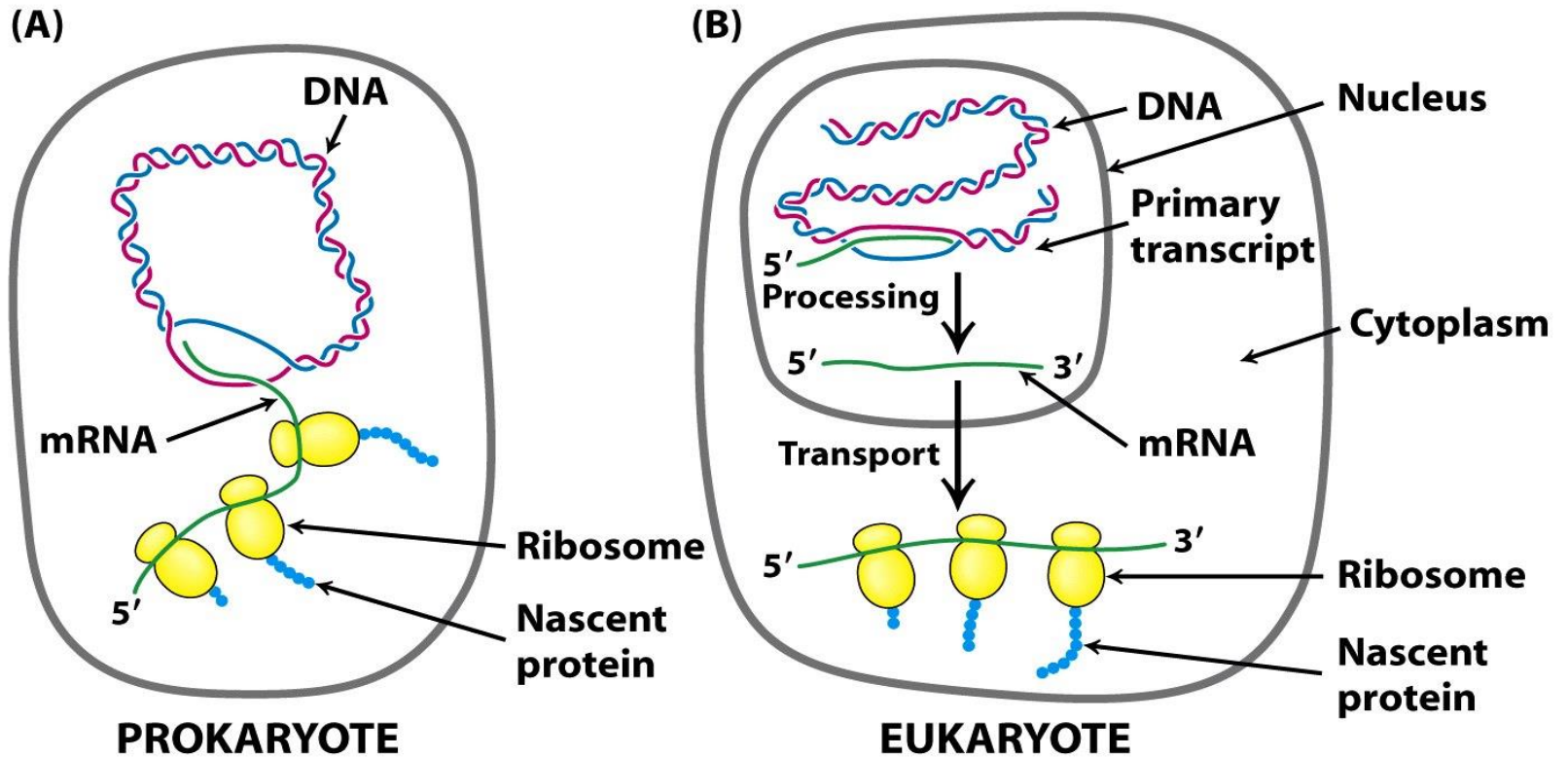


Figure 29-15
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

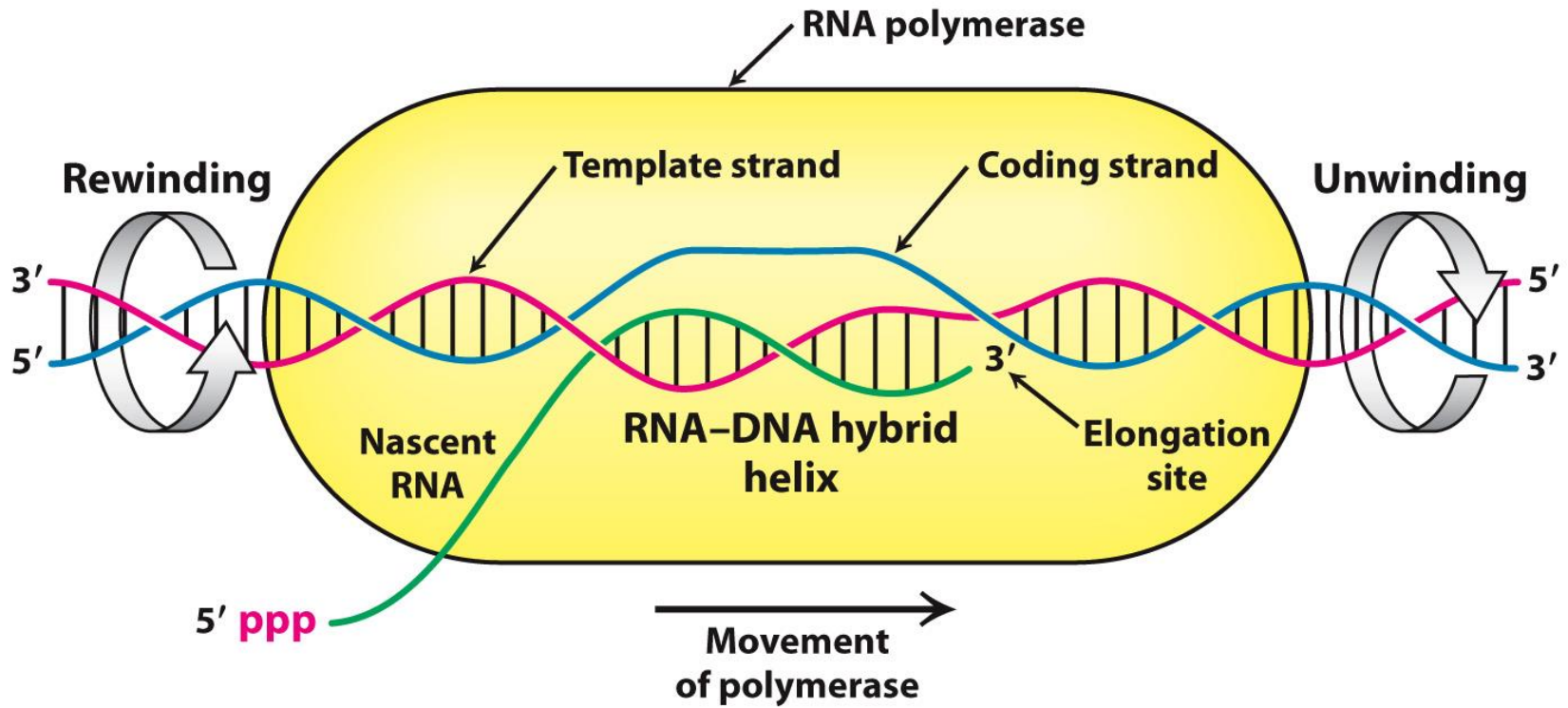
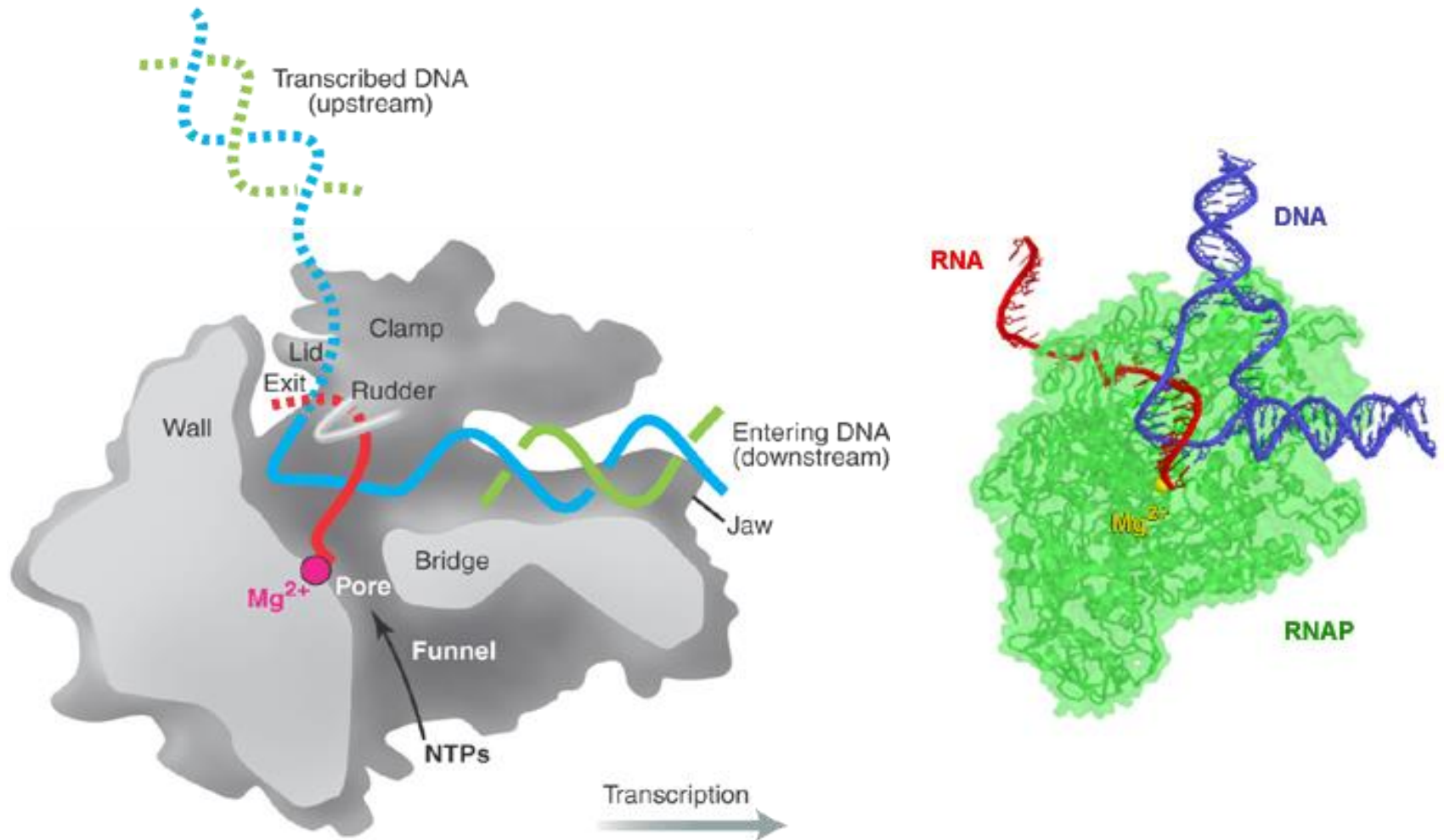


Figure 29.13
Biochemistry, Eighth Edition
 © 2015 Macmillan Education

Elongerande RNA polymeras II i genoms kärning. Nukleotider sugs in genom en öppning och används för att skapa RNA vid enzymets aktiva säte.



I cellkärnan finns tre olika RNA polymeraser

TABLE 29.2 Eukaryotic RNA polymerases

Type	Location	Cellular transcripts	Effects of α -amanitin
I	Nucleolus	18S, 5.8S, and 28S rRNA	Insensitive
II	Nucleoplasm	mRNA precursors and snRNA	Strongly inhibited
III	Nucleoplasm	tRNA and 5S rRNA	Inhibited by high concentrations

Table 29.2

Biochemistry, Eighth Edition
© 2015 Macmillan Education

Specialiserade RNA polymeraser, som endast läser av specifika klasser av gener!

snRNA – small nuclear RNA

Det finns även ett mitokondriellt RNA polymeras!

Transfer RNA (tRNA) och ribosomalt RNA (rRNA)

Ungefär 2/3 av ribosomens massa utgörs av rRNA

rRNA spelar en avgörande roll för den katalytiska mekanismen.

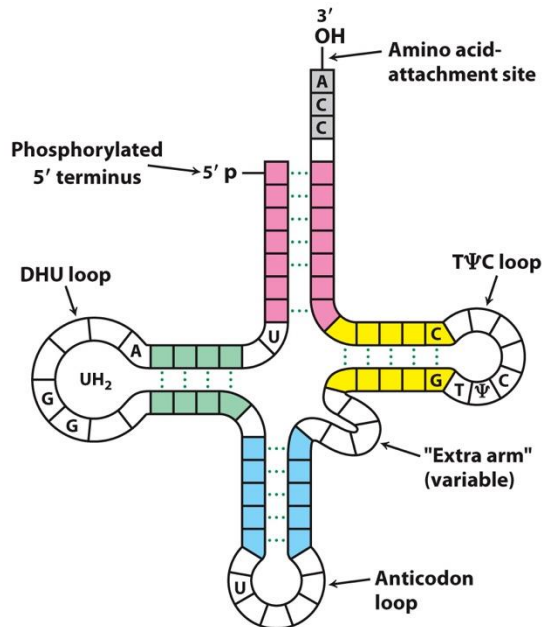
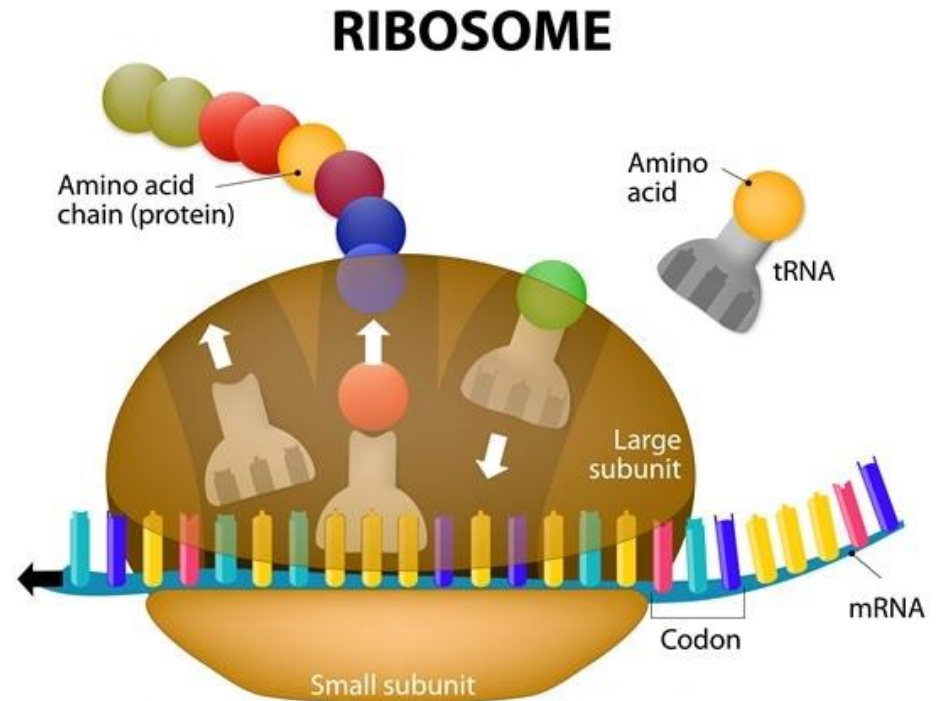
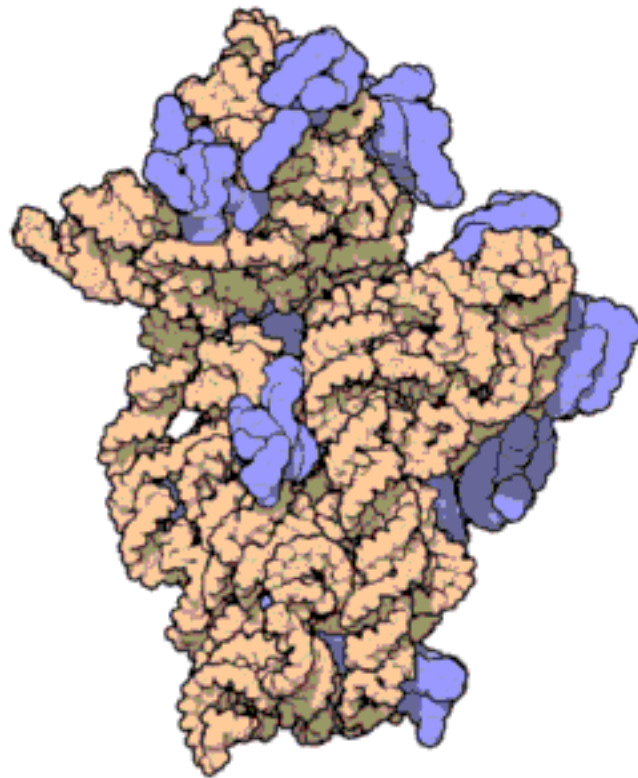
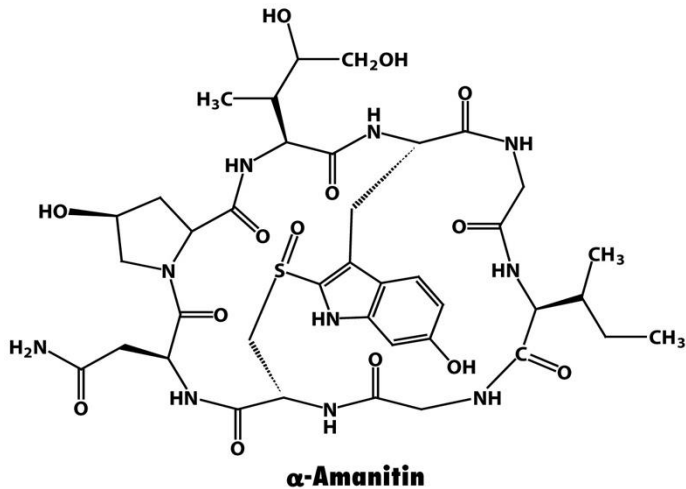


Figure 30.3
Biochemistry, Eighth Edition
© 2015 Macmillan Education



Lilla subenheten på ribosomen -
blått – proteiner
orange – 16 S rRNA





Unnumbered figure pg 835
Biochemistry, Sixth Edition
 © 2007 W. H. Freeman and Company

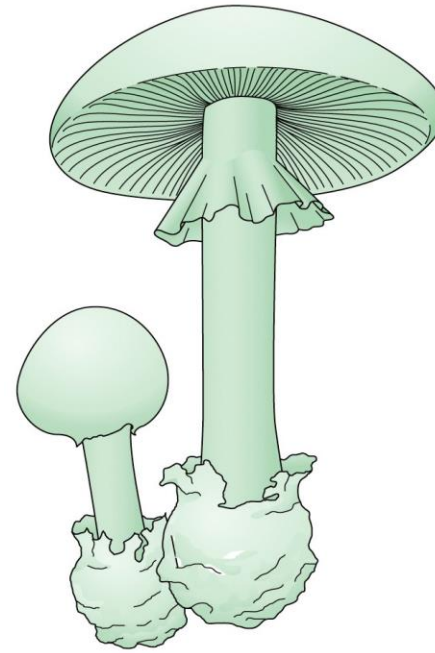


Figure 29-16
Biochemistry, Sixth Edition
 © 2007 W. H. Freeman and Company

Den lömska flugsvampen finns i mellersta och södra Sverige. Ger svåra förgiftningssymptom. Dödsfall inte helt ovanliga, framförallt i södra Europa. alfa-Amanitin blockerar funktionen hos f.f.a. RNA polymeras II.

Under den latent fasen (6 – 24 timmar) förstörs lever och njurar, men inga tydlig symptom. Sen följer magkramper, våldsamma kräkningar och blodiga diarréer.

Endast en liten del av kromosomalt DNA kodar för proteiner

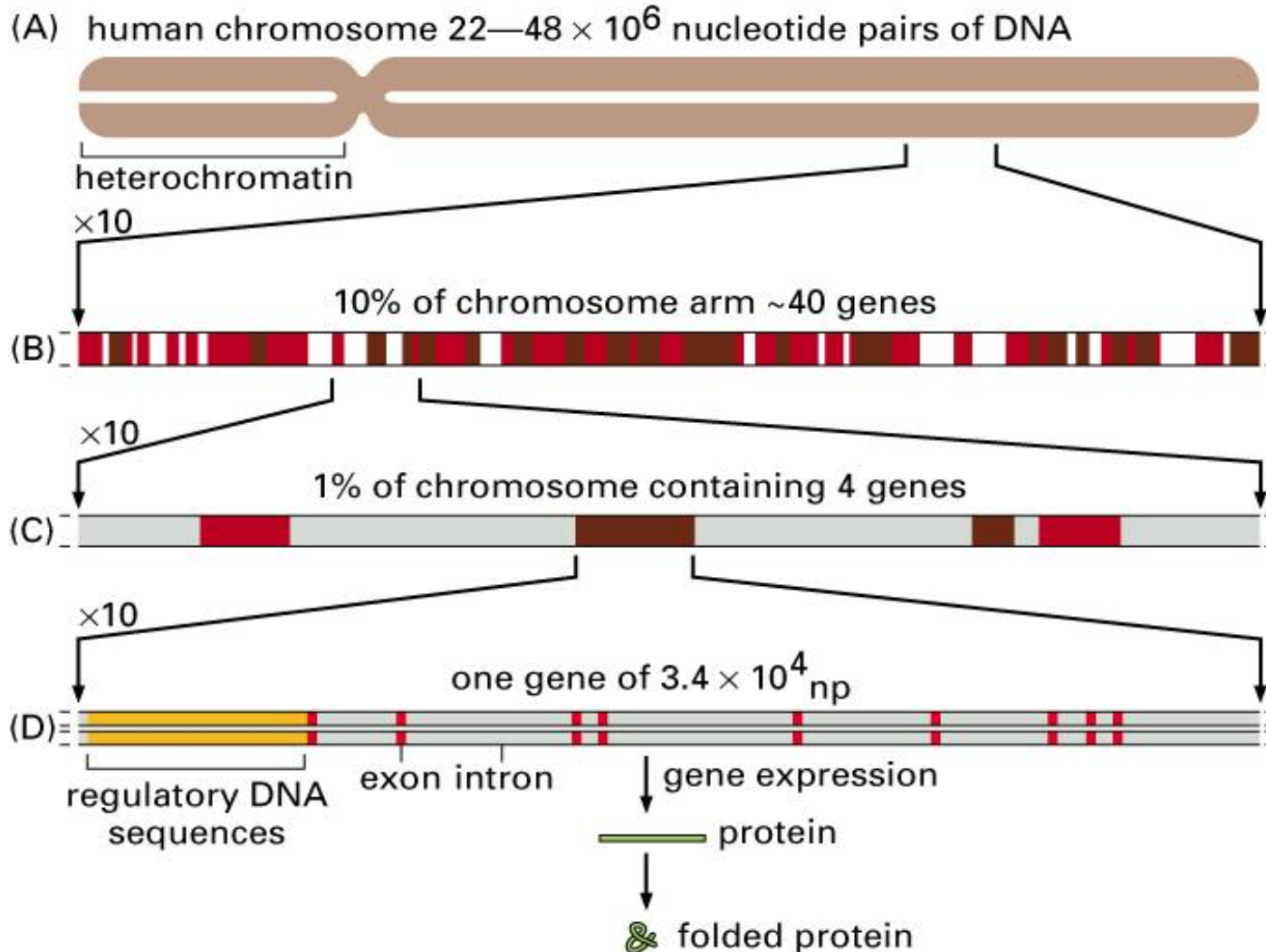
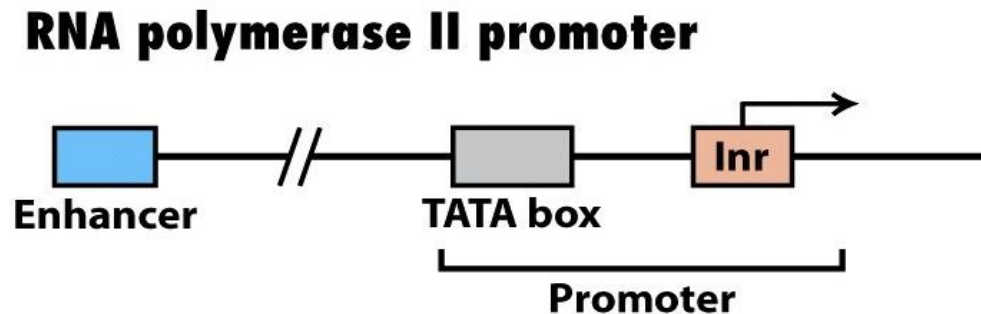


Figure 4–15. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

RNA pol II promotor



Promotorn = Den region dit RNA polymeras II binder vid initiering av transkription.

Promotor-sekvensen och det omkringliggande DNA:t kan se lite olika ut, men följande element brukar återfinnas:

1. I humana celler ligger TATA boxen kring position -25 to -30 .
2. Kring platsen där transkription startar (TSS) återfinns ofta ett initiator element (Inr).
 - otydlig sekvenskonservering (C/T)(C/T)AN(A/T)(C/T)(C/T)
3. Det finns även element som stimulerar promotorns aktivitet, s.k. Enhancers. Dessa kan ligga på långa avstånd från promotorn (mer än 1000 bp).

Basala transkriptionsfaktorer

- RNA polymeras II behöver hjälp av följande faktorer för att igenkänna promotorn och initiera transkription
 - 6 basala faktorer
 - TFIIA
 - TFIIB
 - TFIID
 - TATA-binding protein (TBP)
 - TBP associated factors (TAFs)
 - TFIIE
 - TFIIF
 - TFIIH
 - Uppbyggt av 10 subenheter, bl.a. ett proteinkinas och ett DNA helikas.

Kinaser är enzymer som kan överföra en fosfatgrupp (t.ex. från ATP) till proteiner eller andra molekyler.

TBP

Första steget vid initiering av transkription tas när det TATA-bindande proteinet (TBP) binder in till promotorns TATA-box.

TBP binder till minor groove och inducerar en kraftig böj i DNA – 90°

TBP ingår i ett större komplex, som kallas TFIID

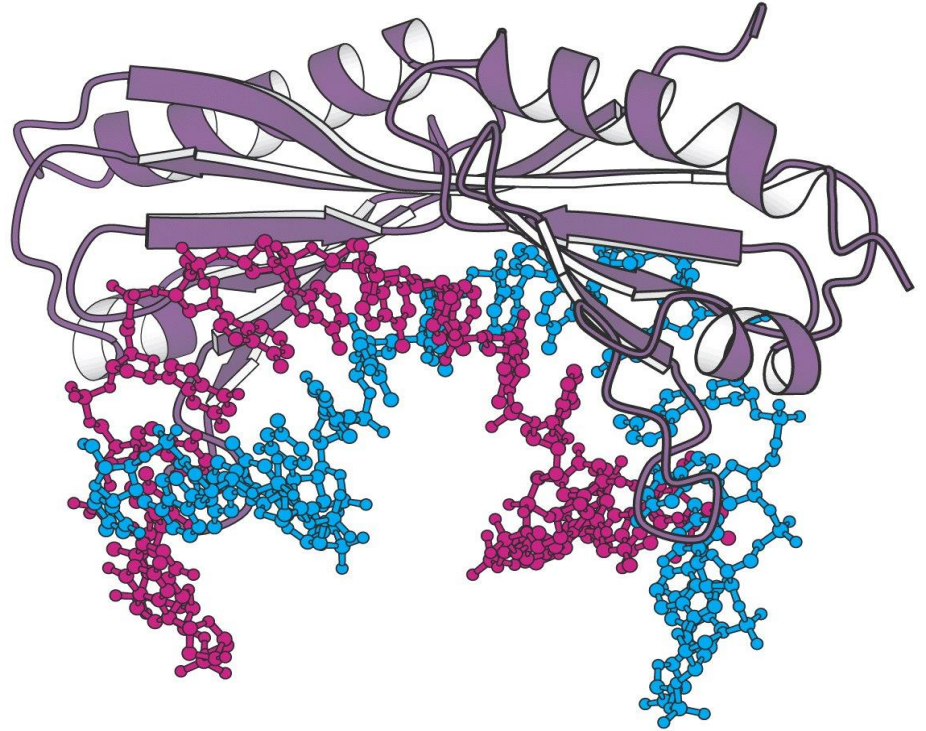
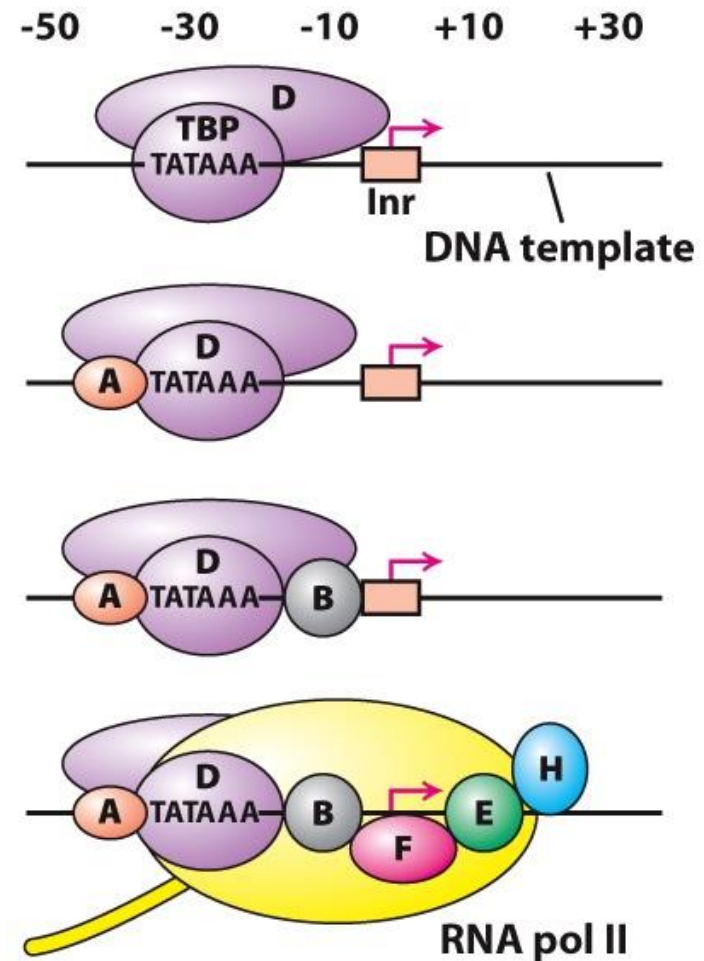


Figure 29-21
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W.H. Freeman and Company

Preinitieringskomplexet.

1. TFIID binder till TATA boxen via TBP-subenheten. TFIID interagerar också med Inr.
2. TFIIA binder in till TFIID.
3. TFIIB binder in.
4. RNA pol II binder tillsammans med TFIIF. Till sist kommer TFIIH och TFIIIE.



Två enzymatiska aktiviteter hos TFIIF startar transkription:

a. En DNA helias-aktivitet smälter promotor DNA och skapar ett enkelsträngat templat.

a. En kinas-aktivitet fosforylerar CTD på RNA pol II.

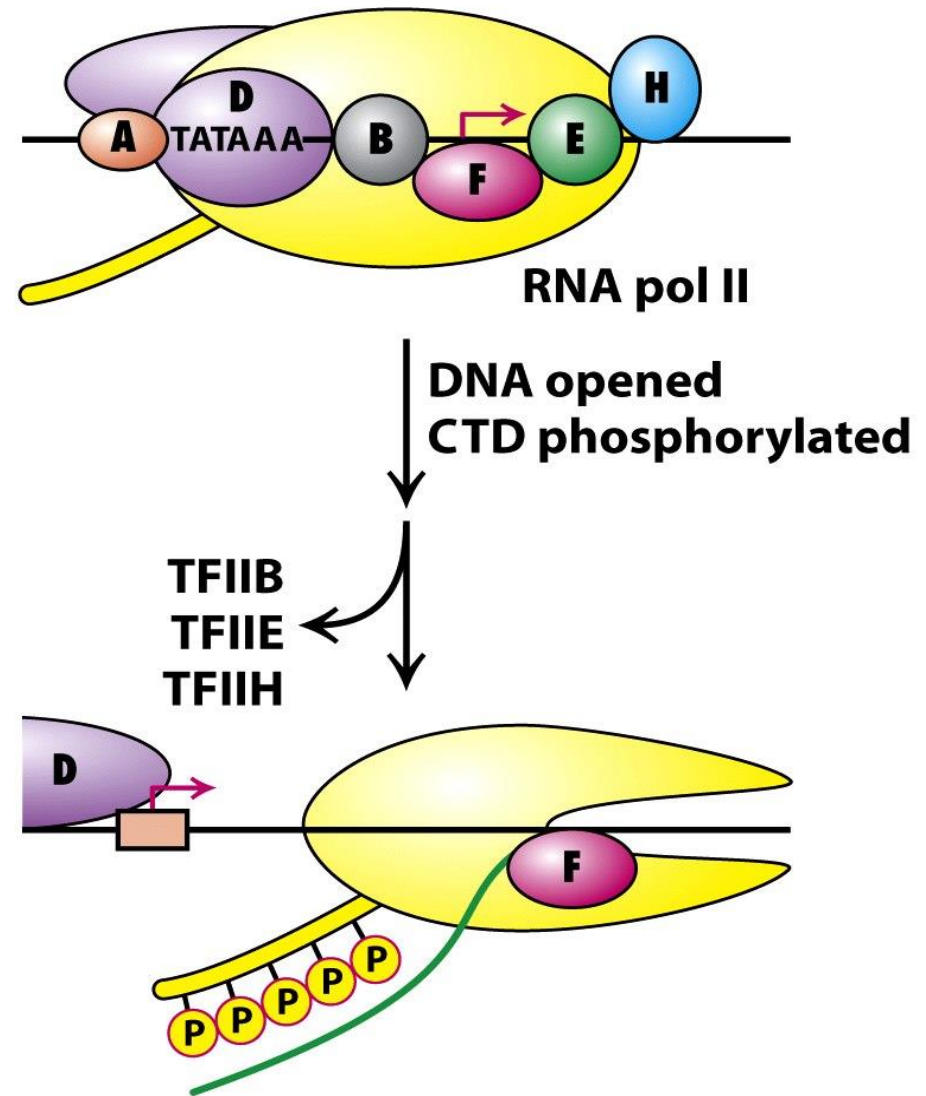
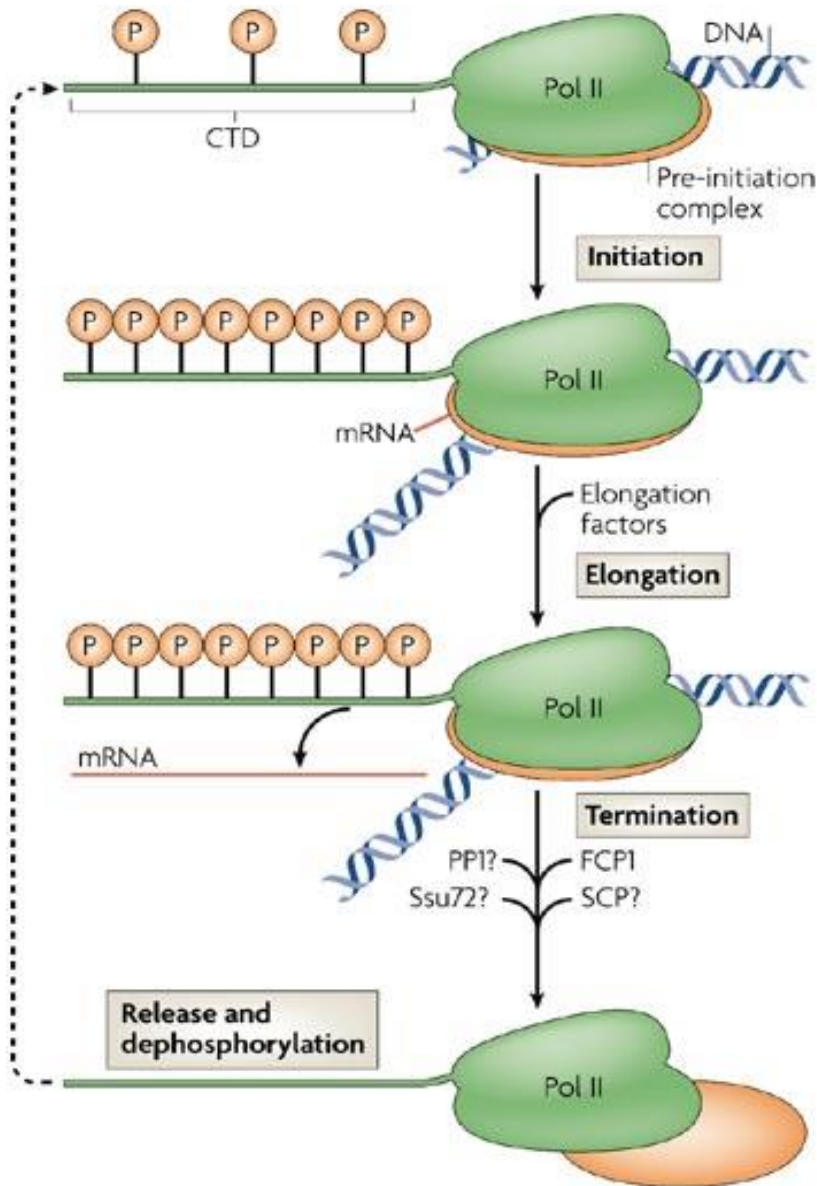


Figure 29-20 part 2
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company



Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser

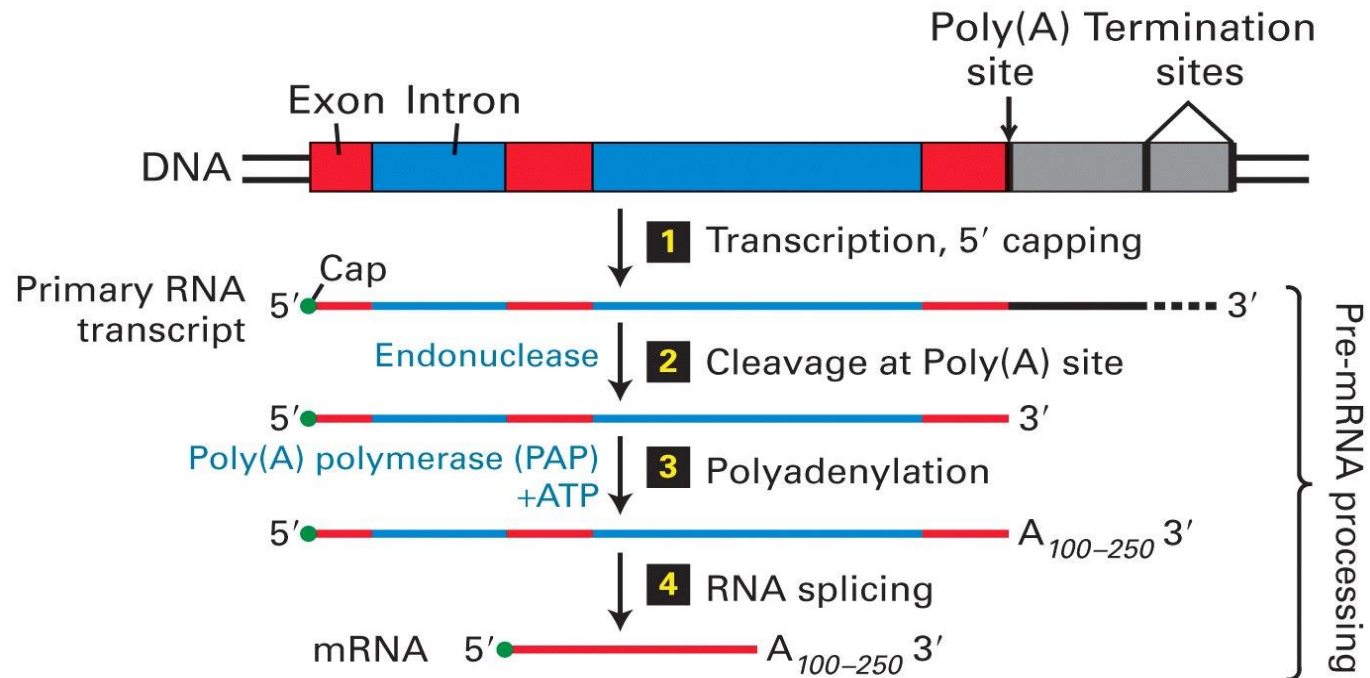
-Repeteras 52 gånger i humana RNA polymeras II

-Den ofosforylerade formen binder till preinitieringskomplet.

-CTD fosforyleras när transkription initieras.

-CTD defosforyleras efter transkriptionell terminering.

Hur primärt RNA modifieras i eukaryoter: Transkription är bara början.



Exon - en del av en gen som skall återfinnas i den mogna RNA molekylen.

Intron – en del av en gen som redigeras bort när den mogna RNA molekylen bildas.

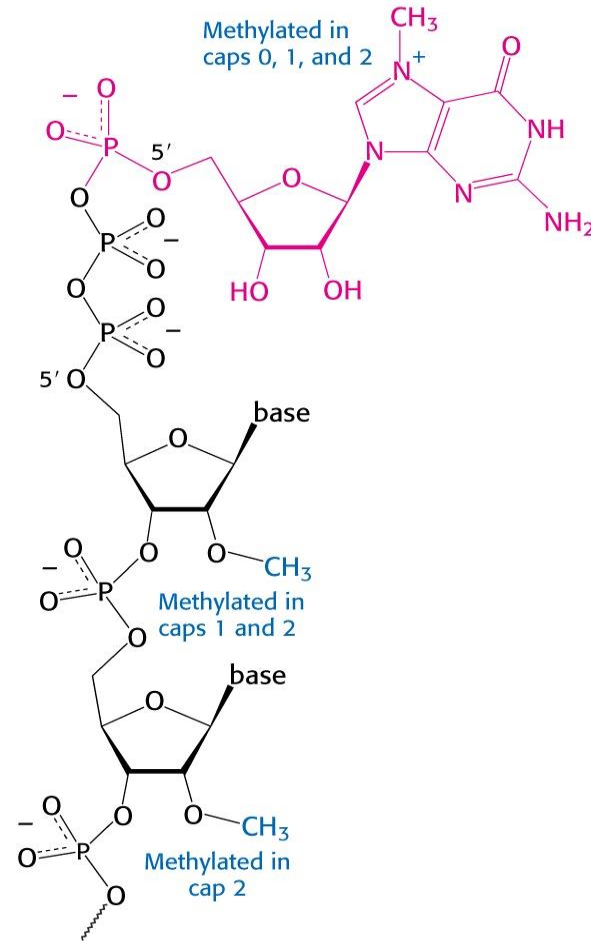
Modifiering av 5'ändan: Capping

Guaninmolekyl
bunden till RNA via
en 5' - 5' bindning.

Trifosfatbro

Modifiering sker
samtidigt med
transkription (efter
ung. 25 nt)

Skyddar mRNA från
degradering samt har
en stimulerande effekt
vid proteinsyntesen
(translation)



Poly(A)-svansen

Repeterad A sekvens.

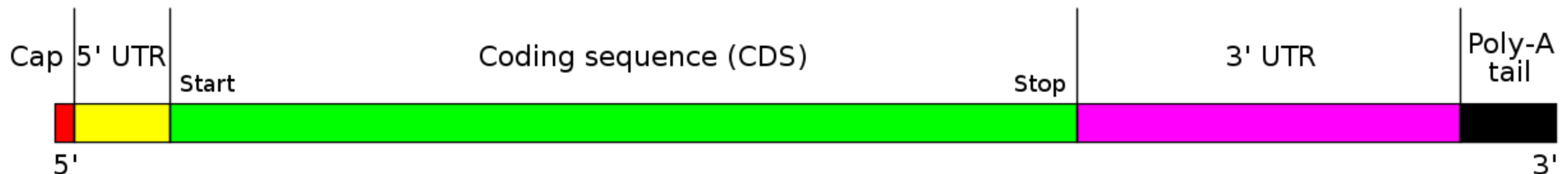
60 – 250 nt lång

Påverkar mRNA transkriptets livslängd i cytosolen.

Poly(A)-bindande proteinet (PABP) – stimulerar nukleär translation och stabiliserar mRNA.

Svansen blir allt kortare över tiden och när den är för kort bryts mRNA molekylen ner.

The structure of a typical human protein coding mRNA including the untranslated regions (UTRs)



Terminering av transkription är kopplad till poly-adenylering av primärtranskriptet.

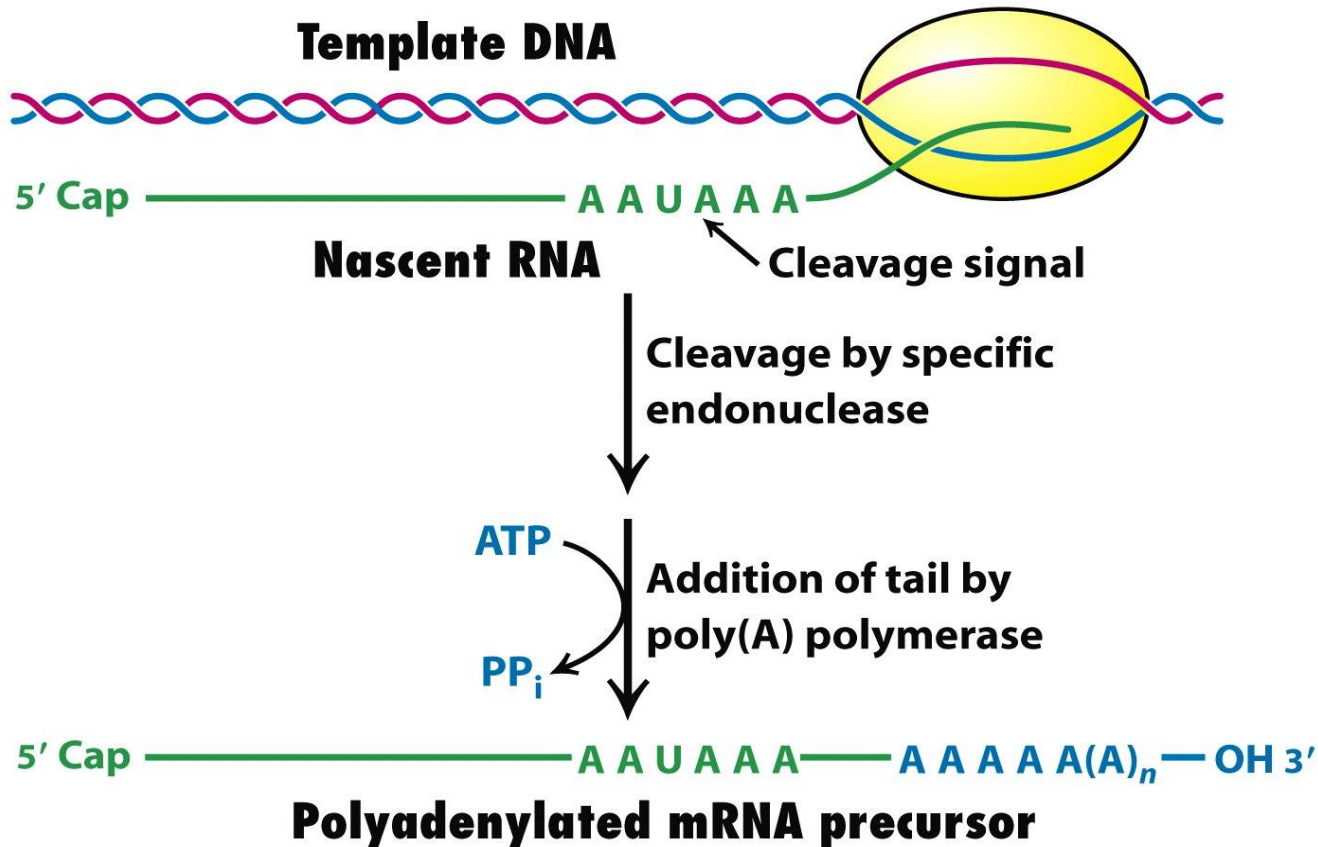
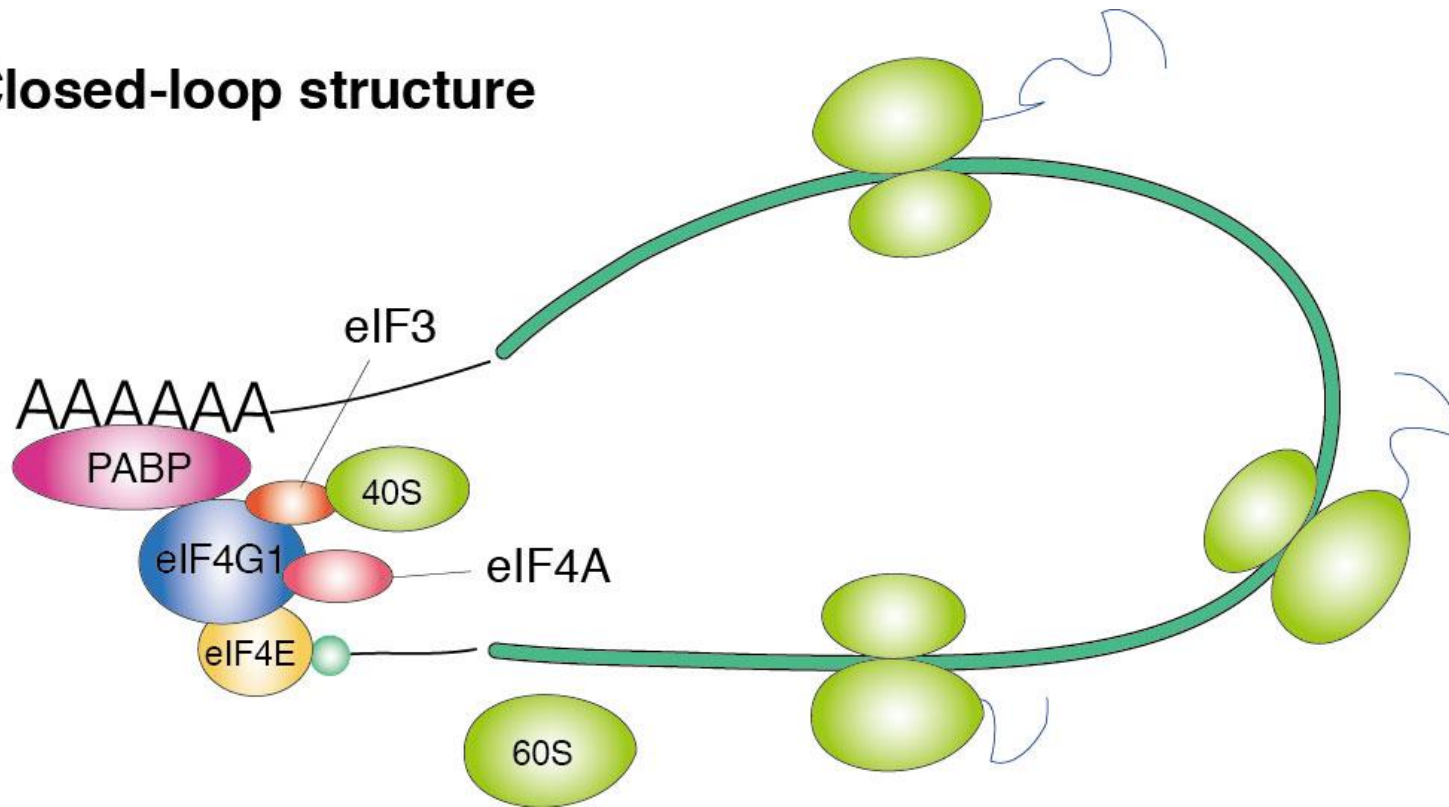


Figure 29-27
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

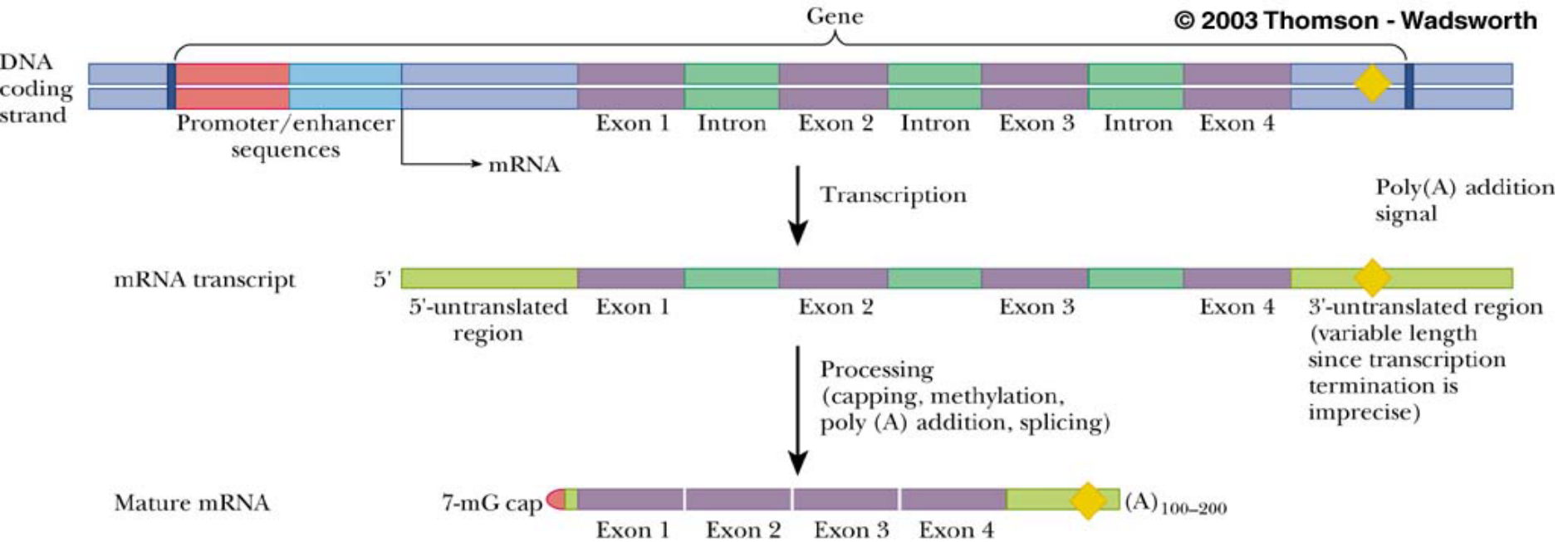
Closed-loop structure



5'-cap och Poly(A)-svansen i 3'-änden samverkar för att stimulera translation! En "closed-loop"-struktur bildas.

Säkerställer att det ribosomerna arbetar på ett intakt mRNA!

Splicing



Exon - en del av en gen som skall återfinnas i den mogna RNA molekylen.

Intron – en del av en gen som redigeras bort när den mogna RNA molekylen bildas.

Splice sites

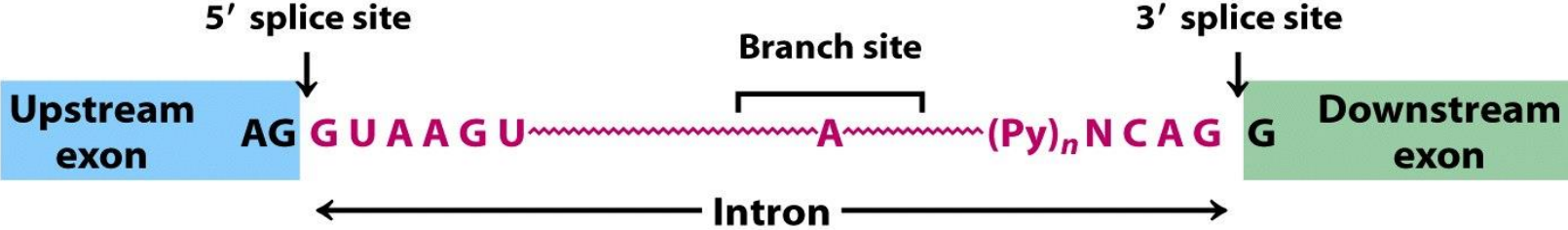


Figure 29-29
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

(pre-mRNA)

Talassemi är en ärftlig sjukdom – abnormalt hemoglobin. Blodkropparna blir därigenom mer känsliga för mekaniska skador. Skyddar mot malaria

Symptom:

blodbrist,
förstoring av lever och mjälte,
dålig tillväxt,
benskörhet och hjärtsvikt.

Benmärgen expanderar



Talassemi kan orsakas av att ett nytt splice-site skapas genom en punktmutation

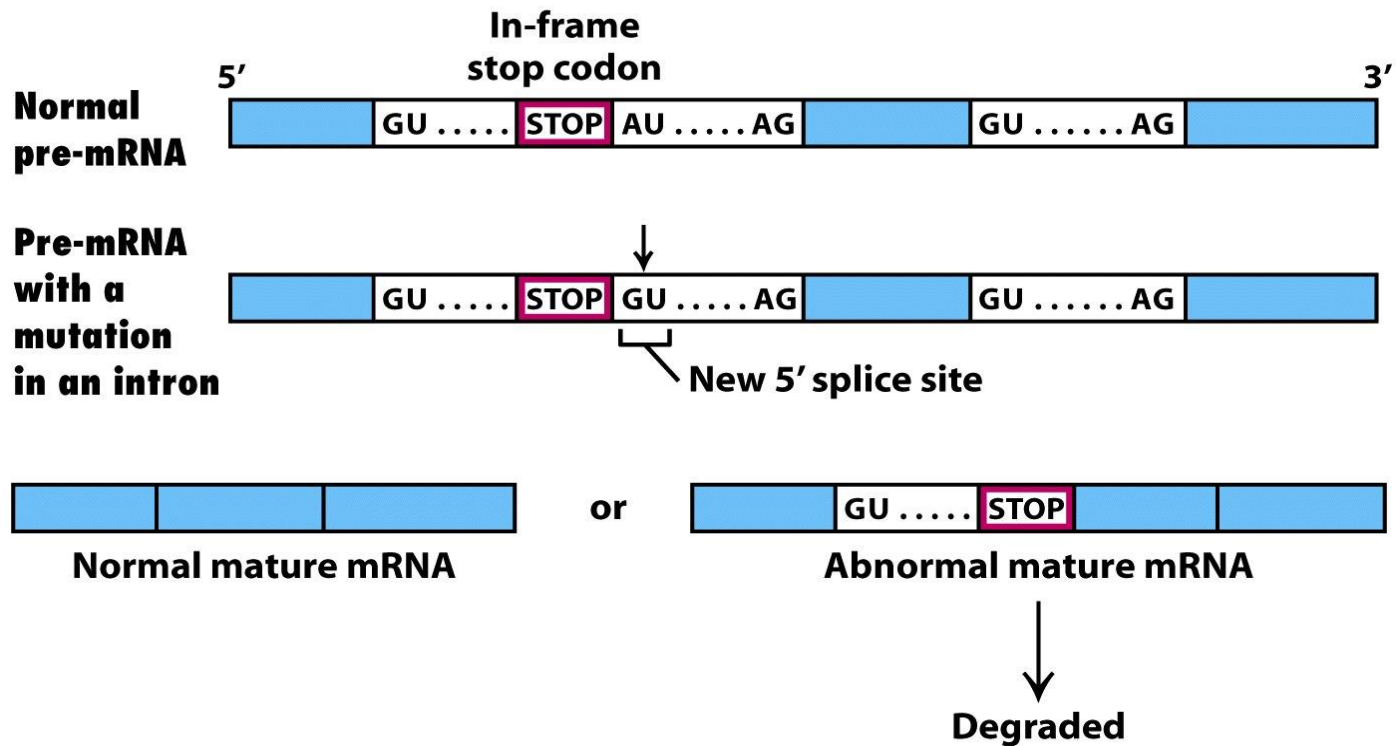


Figure 29-35
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W.H. Freeman and Company

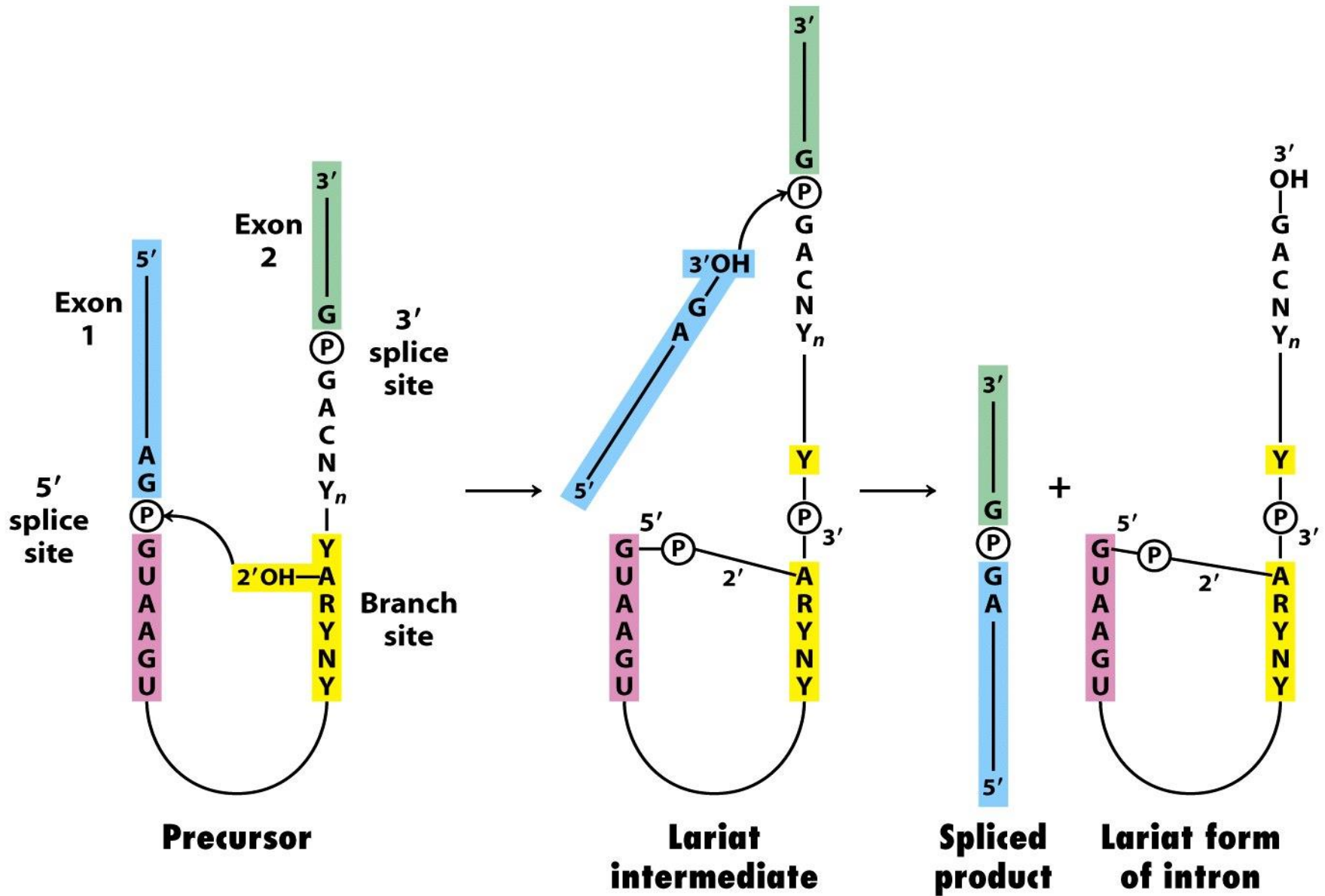


Figure 29-30
Biochemistry, Sixth Edition
 © 2007 W. H. Freeman and Company

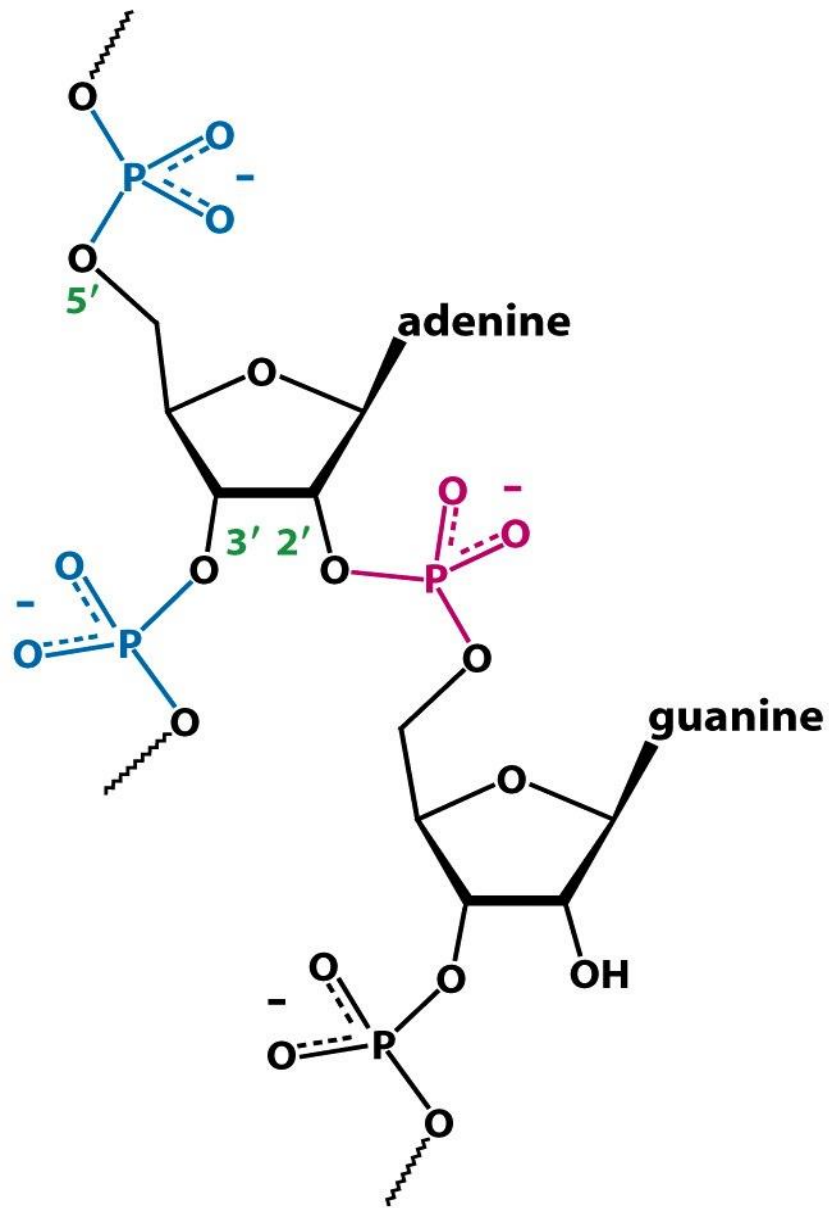


Figure 29-31
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

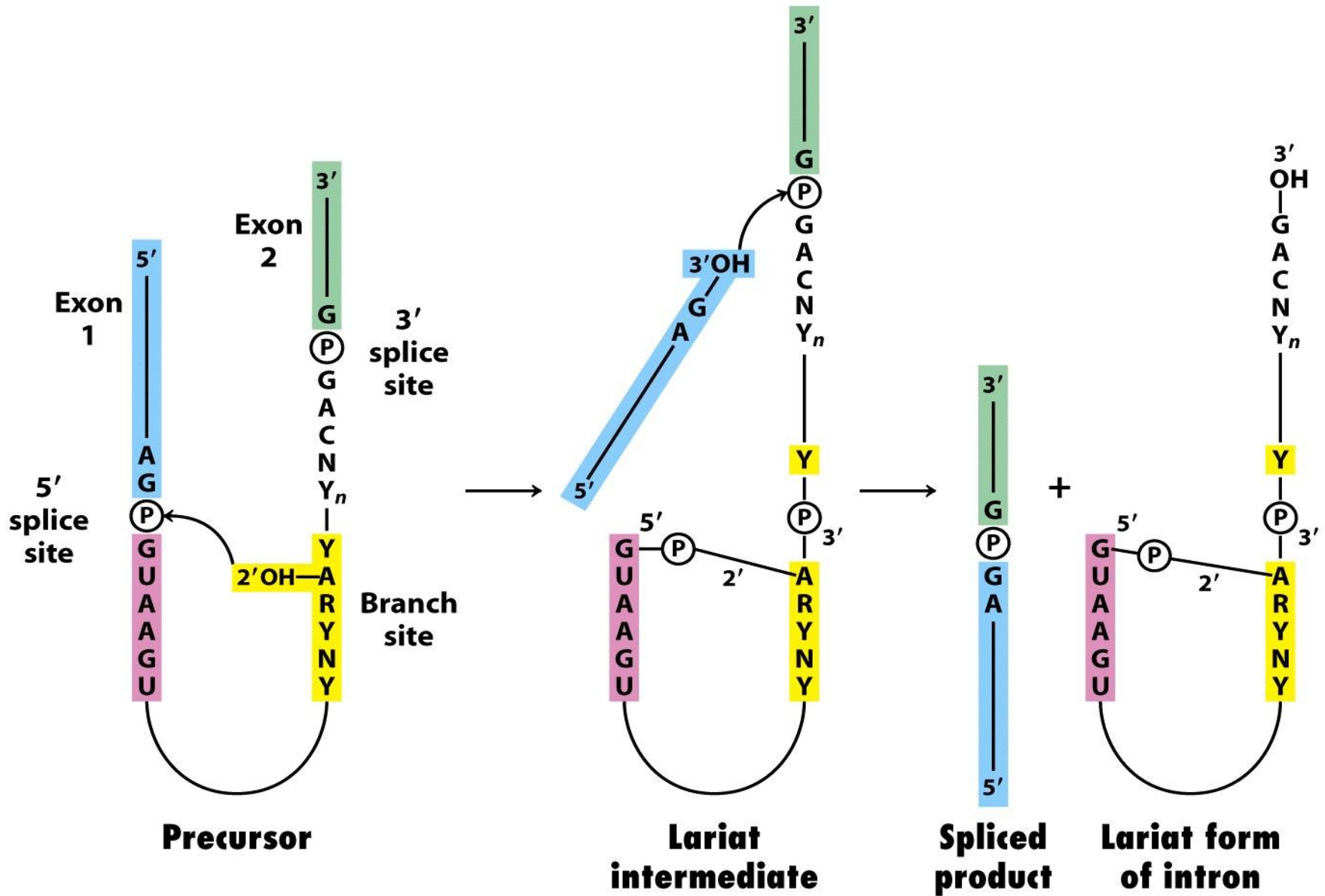
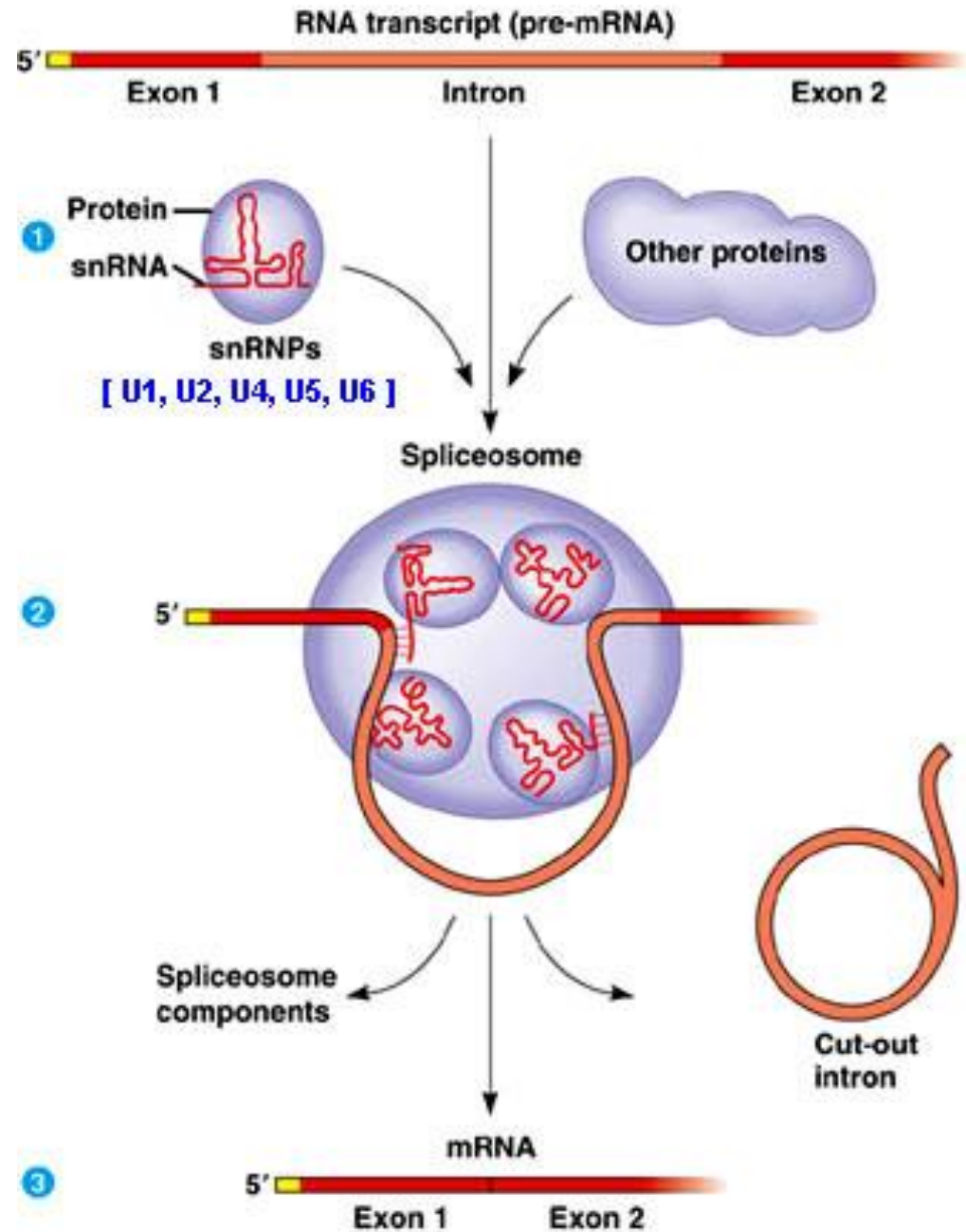


Figure 29-30
Biochemistry, Sixth Edition
 © 2007 W. H. Freeman and Company

Splicing katalyseras av ett komplex med både RNA och proteiner
- "SPLICEOSOMEN"



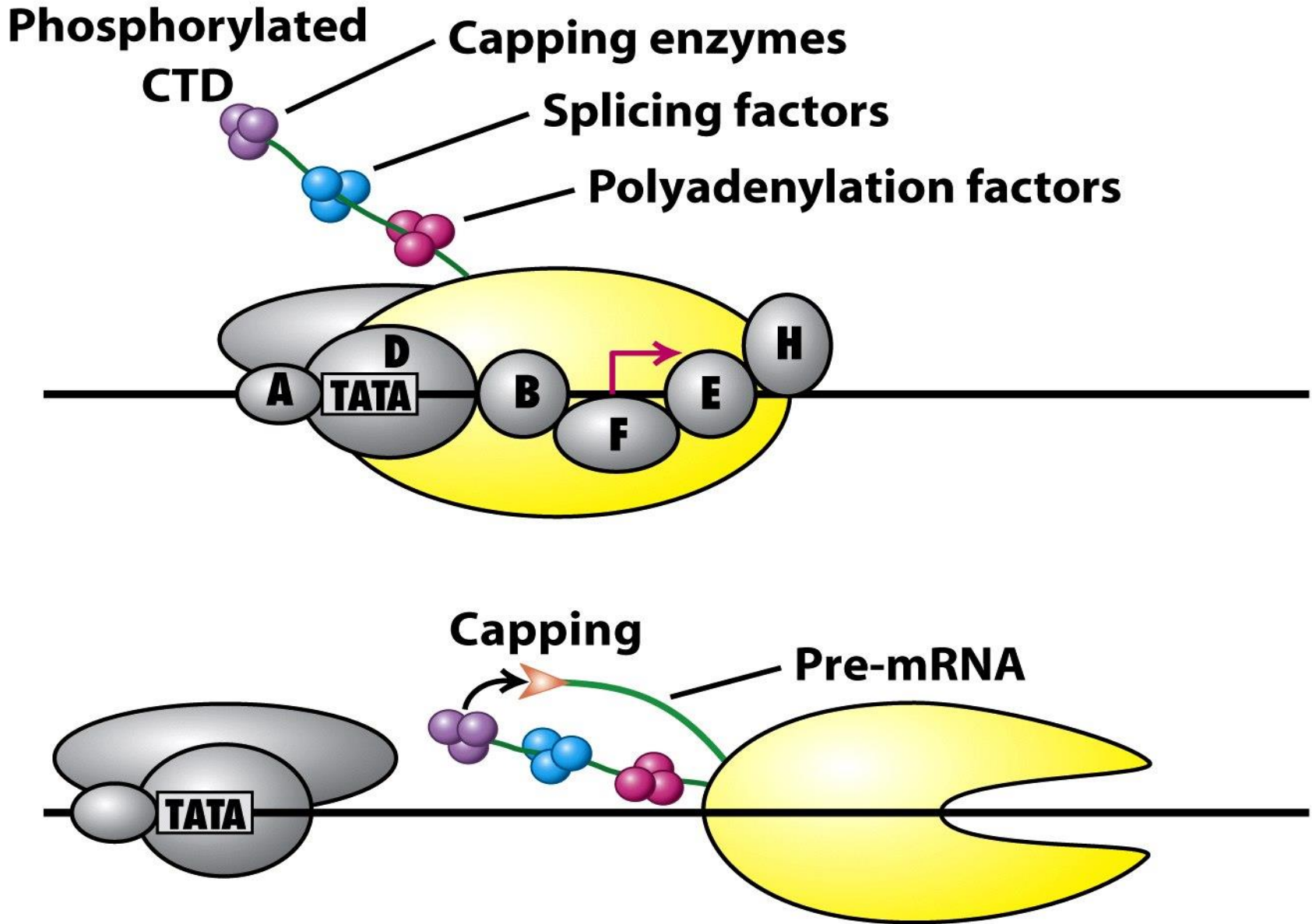


Figure 29-34 part 1
Biochemistry, Sixth Edition
 © 2007 W. H. Freeman and Company

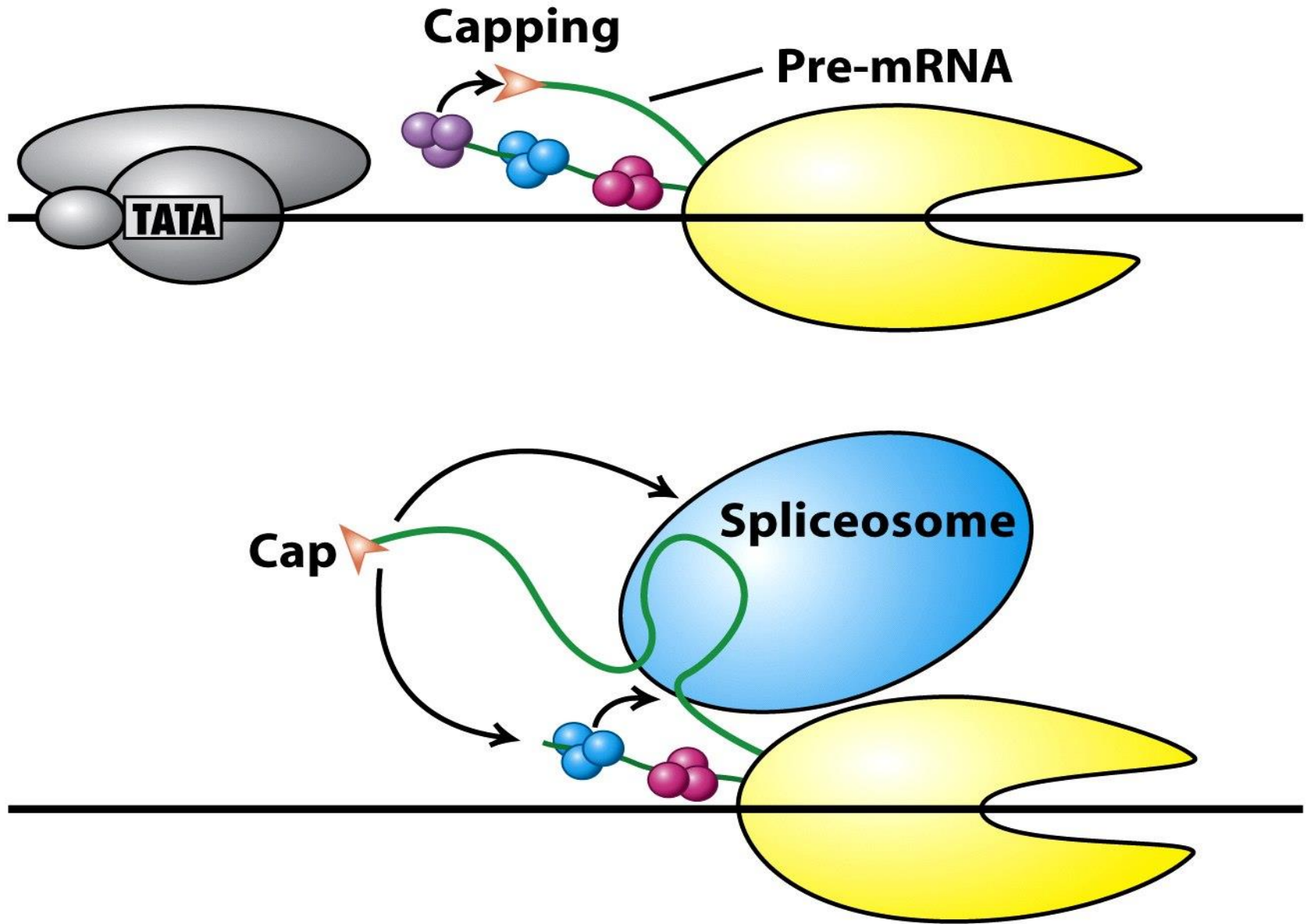


Figure 29-34 part 2
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W.H. Freeman and Company

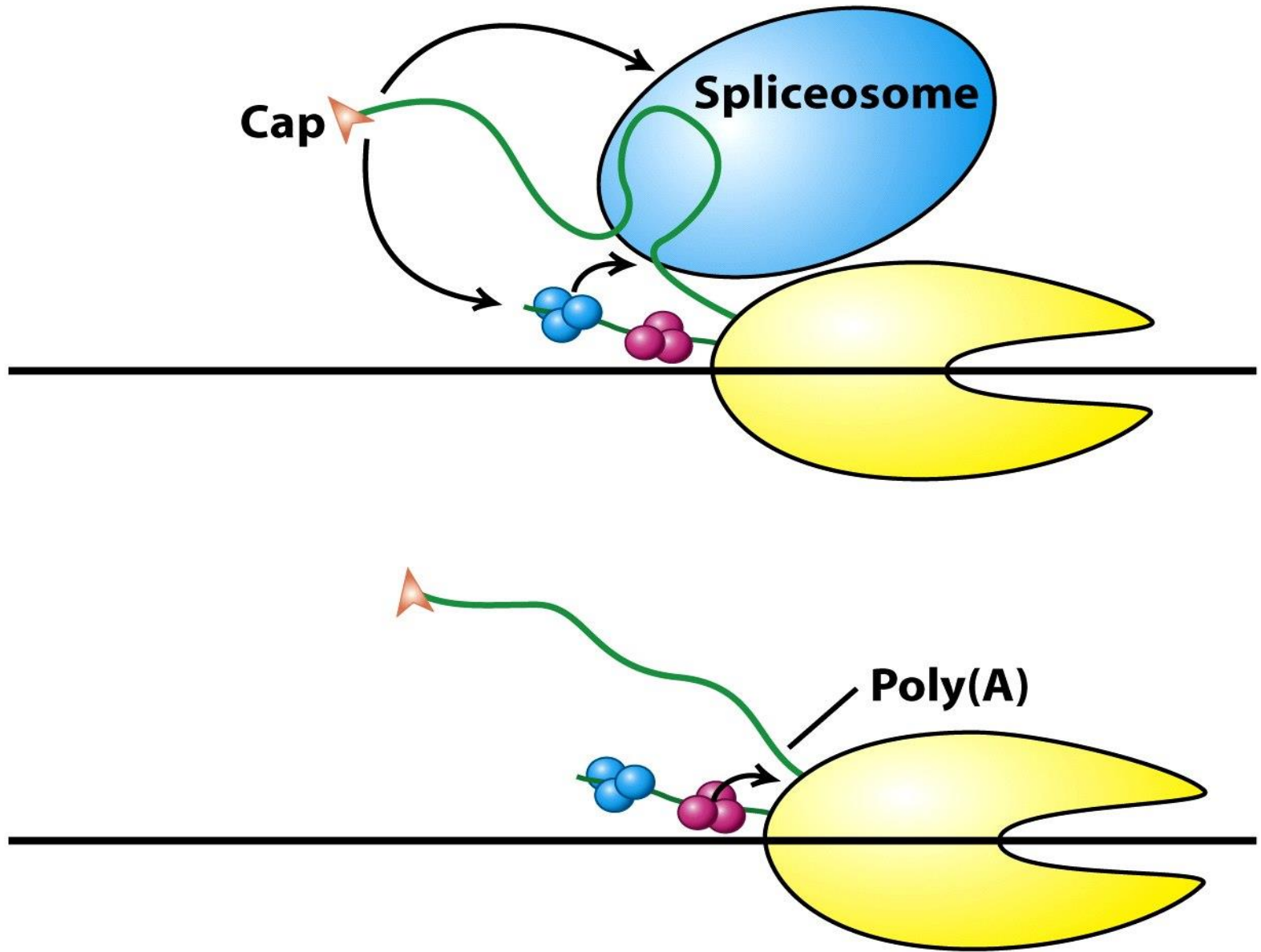
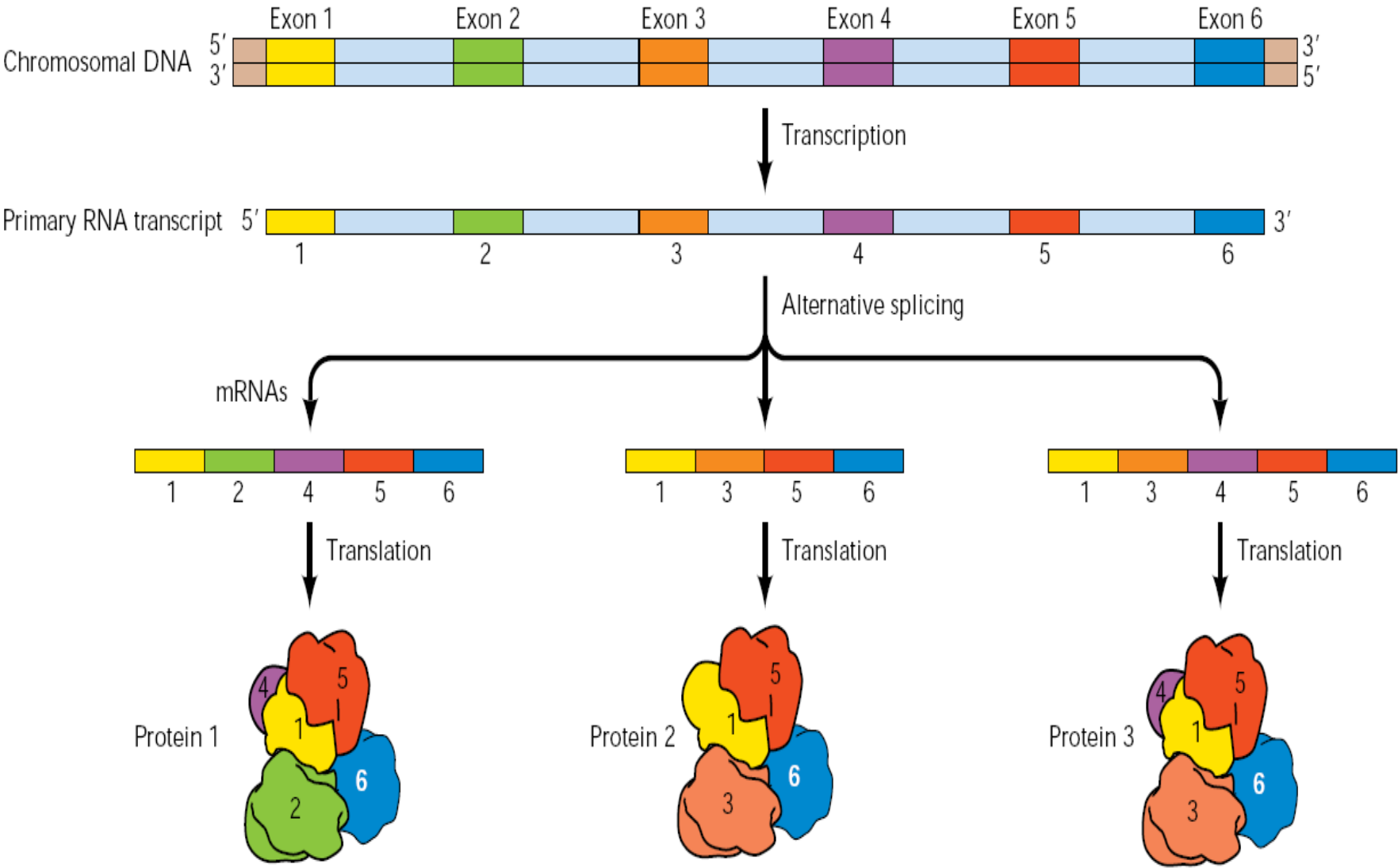


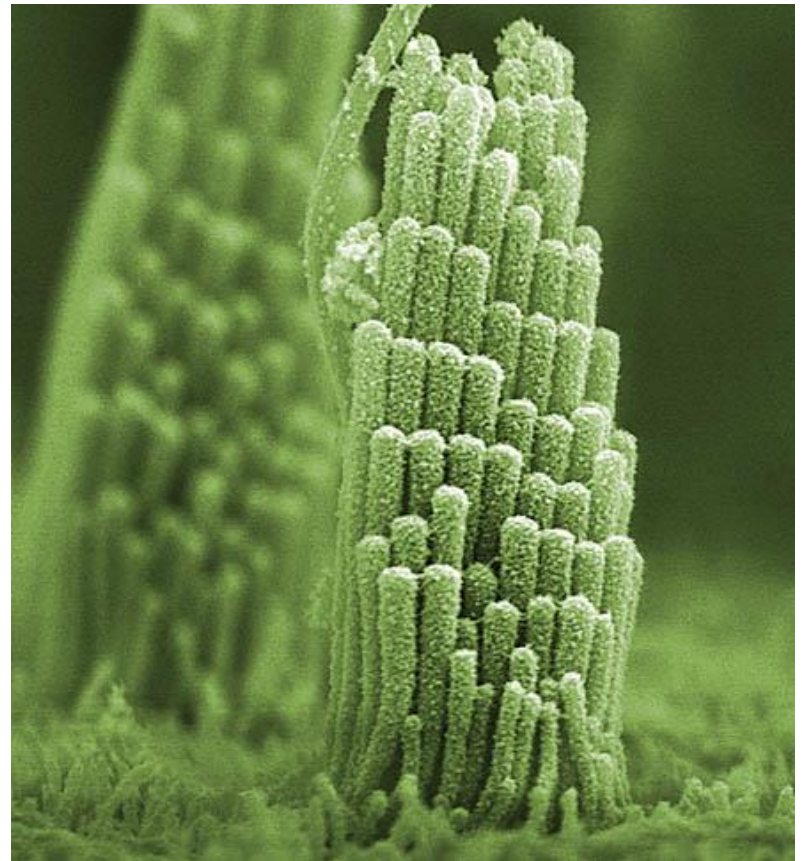
Figure 29-34 part 3
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Alternativ splicing ökar protein repertoaren



Vår hörsel och alternativ splicing

- Microscopic hair cells lining the inner ear vibrate when stimulated by sound. One of the proteins that plays a role in the hearing sensation is a calcium-activated potassium channel. The gene for this protein can generate more than 500 different mRNA variants through alternative splicing. The resulting proteins have slightly differing physiological properties. This is in part what tunes hair cells to different frequencies.



Två olika hormoner från samma gen genom alternativ "splicing"

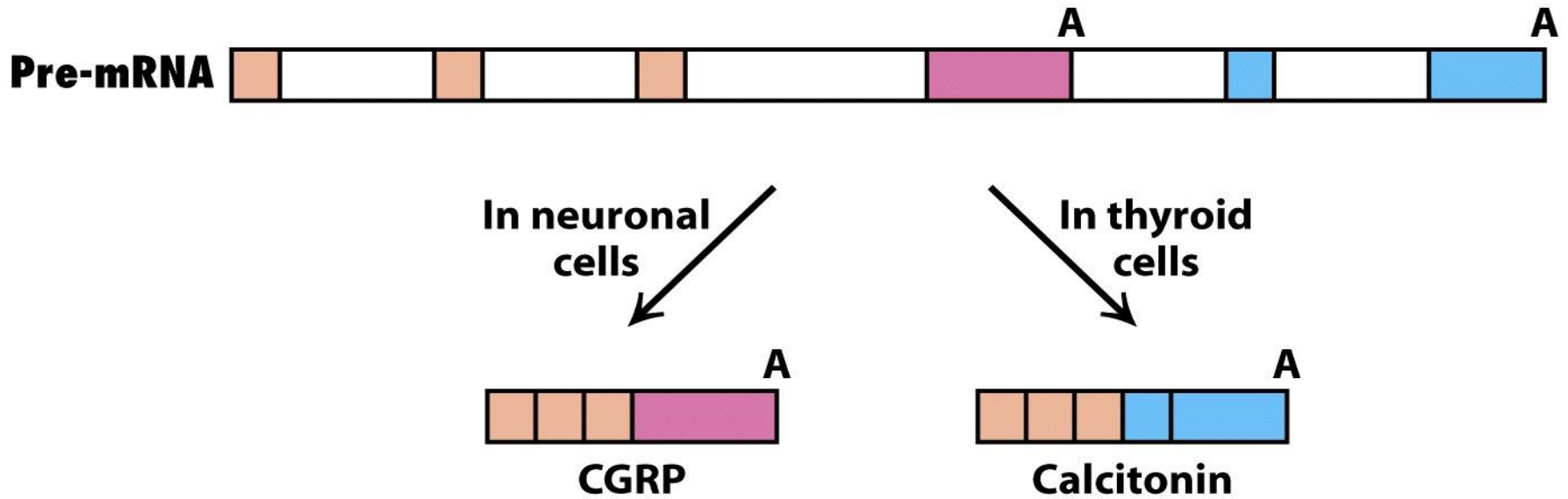


Figure 29-36
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

TABLE 29.4 Selected human diseases attributed to defects in alternative splicing

Disorder	Gene or its product
Acute intermittent porphyria	Porphobilinogen deaminase
Breast and ovarian cancer	<i>BRCA1</i>
Cystic fibrosis	<i>CFTR</i>
Frontotemporal dementia	τ protein
Hemophilia A	Factor VIII
HGPRT deficiency (Lesch–Nyhan syndrome)	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
Leigh encephalomyelopathy	Pyruvate dehydrogenase E1α
Severe combined immunodeficiency	Adenosine deaminase
Spinal muscle atrophy	<i>SMN1</i> or <i>SMN2</i>

Table 29-4

Biochemistry, Sixth Edition

© 2007 W.H. Freeman and Company