

Chương 4

Quá trình Phiên mã ở Prokaryote

24/03/2016 2:57:55 SA 1 Nguyễn Hữu Trí

Monocistronic vs Polycistronic mRNA

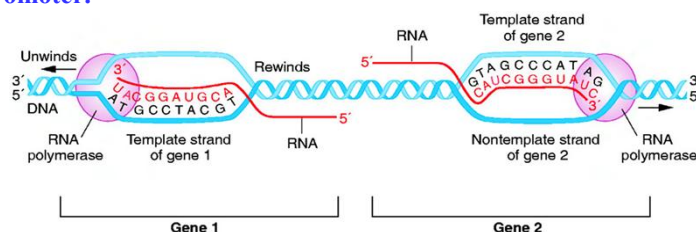
<p>EUKARYOTES</p> <p>DNA Promoter Structural gene</p> <p>↓ TRANSCRIPTION</p> <p>Monocistronic mRNA</p> <p>↓ TRANSLATION</p> <p>Single protein</p>	<p>PROKARYOTES</p> <p>DNA Promoter Structural genes</p> <p style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">Operon</p> <p>↓ TRANSCRIPTION</p> <p>Polycistronic mRNA</p> <p>↓ TRANSLATION</p> <p>Several proteins</p>
--	--

24/03/2016 2:57:55 SA 2 Nguyễn Hữu Trí



Quá trình phiên mã ở Prokaryote

- Được tiến hành bởi RNA polymerase
 - Không cần primer.
 - Không có khả năng đọc ngược (proofreading).
 - Đọc trên khuôn DNA (DNA template) theo chiều 3'-5' tổng hợp RNA transcript theo chiều 5'-3'.
 - Chỉ có 1 mạch đơn của phân tử DNA được dùng làm khuôn.
 - RNA polymerase quyết định việc chọn mạch khuôn bằng cách gắn vào 1 trình tự đặc biệt trên mạch được chọn làm khuôn, trình tự đó là promoter.



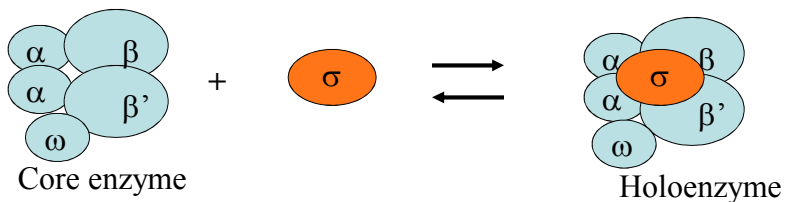
24/03/2016 2:57:55 SA

Nguyễn Hữu Trí



RNA polymerase

là một phức hợp của enzyme, được gọi là holoenzyme, gồm enzyme lõi (Core enzyme) và nhân tố σ .



Core enzyme: Gồm nhiều tiểu đơn vị :

2 tiểu đơn vị α : có vai trò gắn kết các tiểu đơn vị

β, β' : trung tâm xúc tác của RNA polymerase, β liên kết với DNA khuôn, RNA đang tổng hợp và ribonucleotide

Tiểu đơn vị thứ 5 ω không cần thiết cho sự phiên mã nhưng nó giúp ổn định enzyme và hỗ trợ cho quá trình gắn kết các tiểu đơn vị.

Nhân tố σ : đảm bảo tính đặc hiệu promoter: giảm ái lực giữa RNA pol và trình tự DNA bất kỳ, tăng ái lực giữa RNA pol và promoter.

24/03/2016 2:57:55 SA

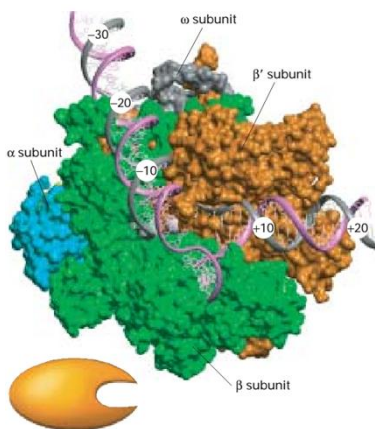
4

Nguyễn Hữu Trí





RNA polymerase



24/03/2016 2:57:55 SA

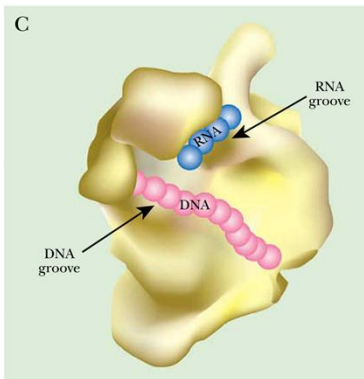
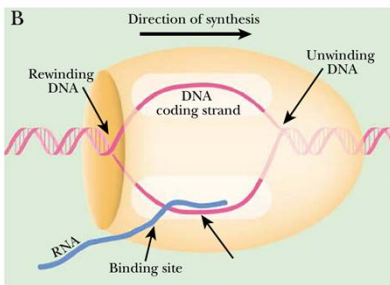
5

Nguyễn Hữu Trí



GENE NAME	SUBUNIT	FUNCTION
<i>rpoA</i>	2 α subunits (40 kD each)	-assembles enzyme -recognizes promoter -binds some activators
<i>rpoB</i>	β subunit (155 kD)	} enzymatically promotes RNA synthesis
<i>rpoC</i>	β' subunit (160 kD)	
<i>rpoD</i>	σ subunit (32-90 kD)	recognizes promoter

RNA polymerase



24/03/2016 2:57:55 SA

6

Nguyễn Hữu Trí





Cấu trúc của Holoenzyme

- RNA polymerase holoenzyme cho thấy có một vùng tiếp xúc rộng giữa σ và tiểu đơn vị β - và β' -của core.
- Cấu trúc cũng cho thấy vùng σ giúp cho việc mở kênh chính của enzyme để nhận vào dsDNA template để hình thành phức hợp đóng promoter.
- Sau khi giúp mở kênh, σ sẽ bị đẩy ra khỏi kênh chính khi kênh này bị thu hẹp khi bao quanh DNA bị tách mạch của phức hợp mở promoter.

24/03/2016 2:57:55 SA

7

Nguyễn Hữu Trí



Chức năng của yếu tố σ

- Gene được chọn phiên mã nhờ có σ làm cho RNA polymerase xác định đúng và gắn chặt lên promoter.
- Sự gắn chặt phụ thuộc vào vị trí tách mạch của DNA để cho phép hình thành phức hợp mở promoter.
- Sự tách σ ra khỏi core sau khi đã đảm bảo cho việc gắn chặt giữa polymerase-promoter

24/03/2016 2:57:55 SA

8

Nguyễn Hữu Trí



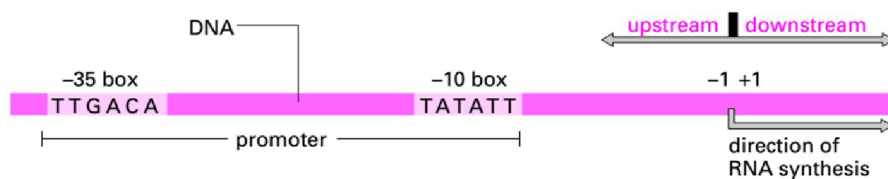


Promoter

Promoter là một trình tự điều hòa trên phân tử DNA, nơi RNA polymerase gắn vào để khởi động phiên mã.

Promoter có hai đặc điểm:

- + nằm ngay trước vùng gen mã hóa
- + hoạt động theo đúng chiều (-35, -10, +1)



24/03/2016 2:57:55 SA

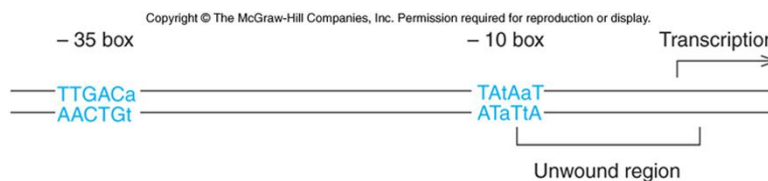
9

Nguyễn Hữu Trí



Promoter

- Có một vùng trong các promoter của vi khuẩn có tính chất rất chuyên biệt cho sự khởi động phiên mã gồm 6-7 bp tập trung ở 10 bp đầu nguồn (upstream) từ vị trí +1 (vị trí bắt đầu phiên mã) = vùng -10 (-10 box, hay còn gọi là Pribnow box, TATA box) là 5'-TATAAT-3'.
- Một trình tự ngắn khác tập trung ở 35 bp đầu nguồn (upstream) được gọi là vùng -35 (-35 box) là 5'-TTGACA-3'
- Các trình tự này là trình tự thỏa hiệp được đưa ra khi so sánh trên hàng ngàn promoter khác nhau.



24/03/2016 2:57:55 SA

10

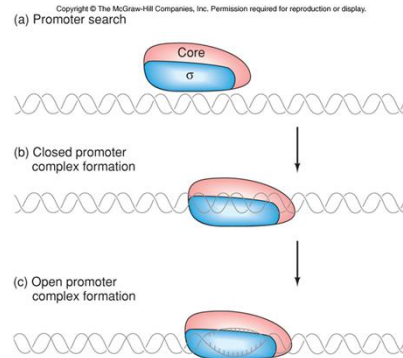
Nguyễn Hữu Trí





Sự gắn RNA Polymerase

- Đầu tiên holoenzyme gắn vào DNA một cách lỏng lẻo.
- Phức hợp lỏng lẻo liên kết tại promoter = phức hợp đóng promoter (closed promoter complex), DNA ở dạng mạch kép khép kín.
- Holoenzyme tách mạch DNA tại promoter hình thành phức hợp mở promoter (open promoter complex) với polymerase gắn chặt vào DNA.



24/03/2016 2:57:55 SA

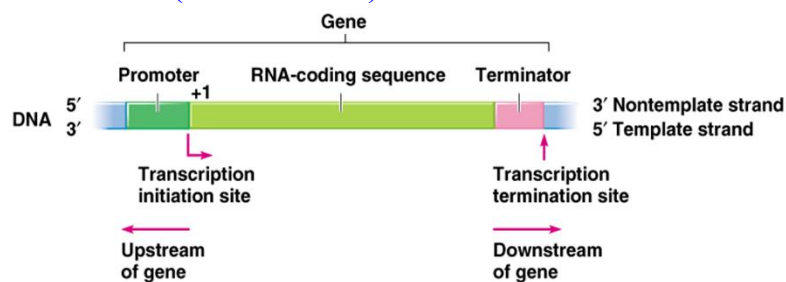
11

Nguyễn Hữu Trí



Quá trình phiên mã ở Prokaryote

- Các bước của quá trình phiên mã (transcription)
 - Khởi đầu (Initiation)
 - Kéo dài (Elongation)
 - Kết thúc (Termination)



24/03/2016 2:57:55 SA

12

Nguyễn Hữu Trí





Khởi đầu phiên mã (Initiation)

- Quá trình khởi đầu phiên mã không phải là khi RNA polymerase hình thành liên kết phosphodiester đầu tiên.
- Carpousis và Gralla chỉ ra rằng có một đoạn oligonucleotide (dài 2-6 nt) được tổng hợp khi mà RNA polymerase chưa rời đi trên DNA.
- Quá trình phiên mã có thể thất bại khi mà chuỗi oligonucleotide khoảng 10 nt được tổng hợp.

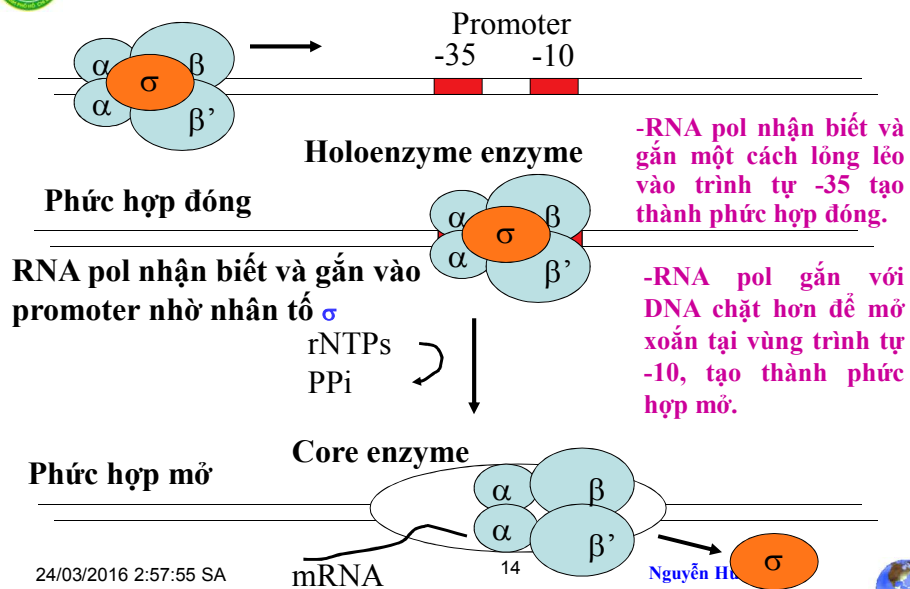
24/03/2016 2:57:55 SA

13

Nguyễn Hữu Trí



Khởi đầu phiên mã (Initiation)



Khởi đầu phiên mã (Initiation)

(a)

(b)

24/03/2016 2:57:55 SA
15
Nguyễn Hữu Trí

Kéo dài (Elongation)

Khi phân tử RNA đạt chiều dài khoảng 8 nucleotide thì nhân tố σ tách khỏi phức hợp RNA pol. Sự tách rời này cần thiết cho quá trình kéo dài chuỗi RNA.

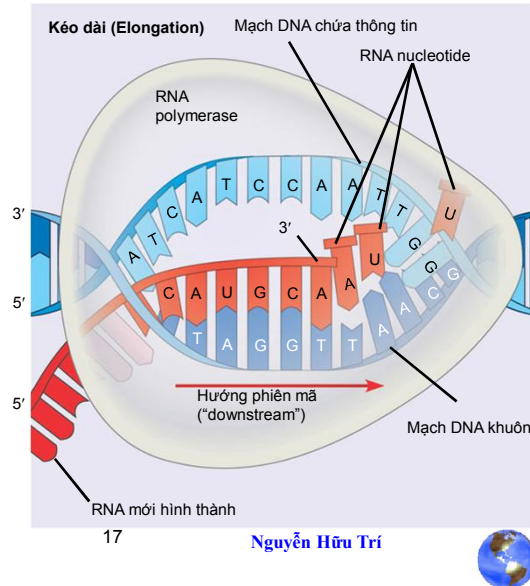
RNAP trượt tiếp tục trên sợi DNA, tháo xoắn liên tục phân tử DNA, vùng DNA được tháo xoắn gọi là **transcription bubble** dịch chuyển trên DNA cùng với RNA polymerase.

24/03/2016 2:57:55 SA
16
Nguyễn Hữu Trí



Transcription bubble

- Các nucleotide thêm vào tuần tự từng nucleotide đây gọi là quá trình kéo dài.
- Kích thước vùng được tháo xoắn luôn duy trì không đổi khoảng 17 cặp base, và xoắn lại RNA-DNA có chiều dài khoảng 12 cặp base.



24/03/2016 2:57:55 SA

Nguyễn Hữu Trí



Kéo dài (Elongation)

- Sự kéo dài phiên mã bao gồm quá trình polymer hóa của các nucleotide khi RNA polymerase di chuyển dọc theo khuôn DNA (template DNA)
- Polymerase duy trì một vùng ngắn của DNA khuôn bị tách mạch.
- DNA bị tháo xoắn ở phía trước polymerase và đóng lại ở phía sau.
- Mạch template DNA được tháo xoắn nhờ các enzyme topoisomerase.

24/03/2016 2:57:55 SA

18

Nguyễn Hữu Trí





Kết thúc phiên mã (Termination)

- Khi polymerase tiến tới một terminator tại điểm cuối của gene nó sẽ tách ra khỏi template và giải phóng RNA
- Có hai cơ chế kết thúc (terminator)
 - Chức năng kết thúc nội tại (Intrinsic) với chính RNA polymerase không có sự giúp đỡ của các protein khác
 - Kết thúc phiên mã phụ thuộc vào một protein rho

24/03/2016 2:57:55 SA

19

Nguyễn Hữu Trí



Kết thúc phiên mã không phụ thuộc Rho

Intrinsic termination = Rho-independent termination

- Kết thúc nội tại hay không phụ thuộc rho phụ thuộc vào hai yếu tố kết thúc:
 - Một trình tự lặp đảo giàu GC theo sau ngay một vùng giàu A trên mạch khuôn (template) của gene
- Trình tự lặp đảo mở đường cho phân tử transcript hình thành một cấu trúc kẹp tóc (hairpin structure).

24/03/2016 2:57:55 SA

20

Nguyễn Hữu Trí

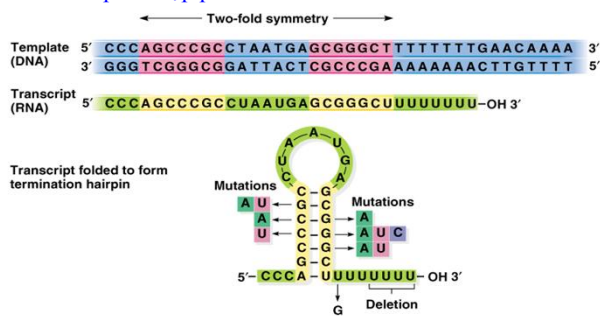




Kiểu hoạt động của Intrinsic Termination

Terminator vi khuẩn hoạt động dựa vào sự bất cặp bổ sung không bền giữa lai RNA-DNA

- o 2 trình tự đối xứng bổ sung giàu GC, khi phiên mã sẽ tạo thành cấu trúc kẹp tóc (hairpin), cấu trúc này ổn định và ngăn không cho RNA pol tiếp tục tổng hợp.
- o Nguyên nhân chính dẫn tới ngừng quá trình phiên mã là chuỗi giàu U nằm ở downstream của hairpin, làm giảm ái lực của RNA với DNA mạch gốc. Do đó RNA tách khỏi phức hợp phiên mã.



24/03/2016 2:57:55 SA

21

Nguyễn Hữu Trí



Kiểu hoạt động của Intrinsic Termination

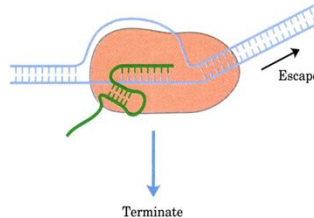
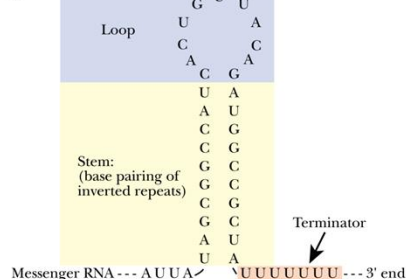
A

DNA: Inverted
 Coding strand NNNN-TAGCGGCCATG-NNNNNNNNN-GATGGCCGCTA-TTTTTTT
 Template strand NNNN-ATCGGGGTAG-NNNNNNNNN-CTACCGCGGAT-AAAAAAA
 (N = any base) Repeats

TRANSCRIPTION

Messenger RNA NNNN-UAGCGGCCAUC-NNNNNNNNN-GAUGGCCGCUA-UUUUUUU

B



24/03/2016 2:57:55 SA

22

Nguyễn Hữu Trí



transcription bubble

5' AAUGAGAGGCCGAUAUGGCCUUUUU 3'

3' CCGGAAAA 5'

(a)

24/03/2016 2:57:55 SA 23 Nguyễn Hữu Trí

RNA hairpin loop

5' UAGCGGC 3'

3' AACGGC 5'


5' AAUGAGAGGCCGAUAUGGCCUUUUU 3'

3' CCGGAAAA 5'

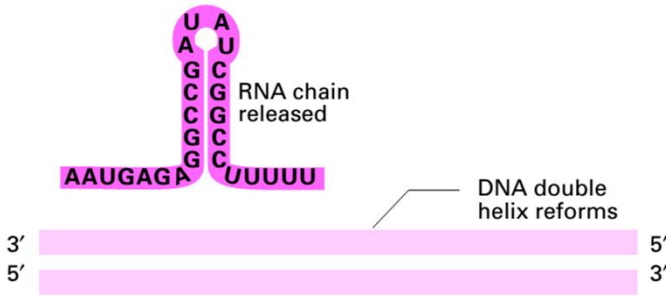
transcription bubble shortens

(b)


24/03/2016 2:57:55 SA 24 Nguyễn Hữu Trí




Intrinsic Termination



(c)

24/03/2016 2:57:55 SA 25 Nguyễn Hữu Trí 



Kết thúc phiên mã phụ thuộc Rho Rho-Dependent Termination

Rho là một protein gồm 6 tiểu đơn vị, có 2 domain
Rho là nguyên nhân làm suy giảm khả năng phiên mã của RNA polymerase trong in vitro. Sự suy giảm này là do Rho làm kết thúc phiên mã. Sau khi kết thúc phiên mã, polymerase sẽ tái khởi đầu lại quá trình phiên mã.

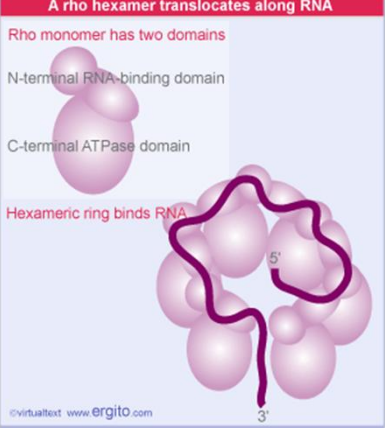
A rho hexamer translocates along RNA


Rho monomer has two domains

- N-terminal RNA-binding domain
- C-terminal ATPase domain

Hexameric ring binds RNA

©virtualtext www.ergito.com

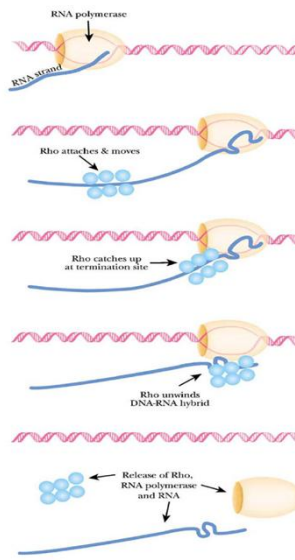


24/03/2016 2:57:55 SA 26 Nguyễn Hữu Trí 



Kết thúc phiên mã phụ thuộc nhân tố rho

- Rho nhận diện một vùng trên RNA gọi là “rut” (gồm 50-90 bp nằm phía trước trình tự kết thúc, giàu C và ít G)
- Rho thủy phân ATP để dịch chuyển trên RNA với tốc độ cao hơn RNA pol. Khi đó Rho phân tách liên kết RNA-DNA nhờ hoạt tính helicase. Quá trình phiên mã kết thúc.



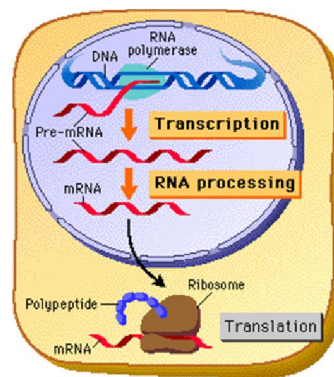
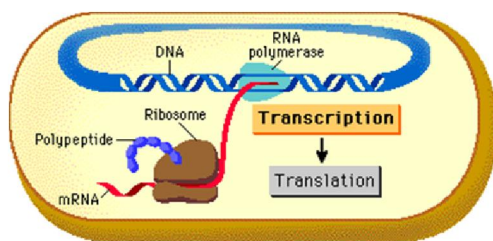
24/03/2016 2:57:55 SA

27

Nguyễn Hữu Trí



PHIÊN MÃ VÀ DỊCH MÃ Ở PROKARYOTE & EUKARYOTE



RNA Polymerase ở Eukaryote

- RNA Pol I: phiên mã các RNA của ribosome (28S, 18S, 5.8S)
- RNA Pol II: phiên mã mRNA
- RNA Pol III: phiên mã tRNA, rRNA 5S và các RNA nhỏ khác.

24/03/2016 2:57:55 SA

28

Nguyễn Hữu Trí





Kết thúc phiên mã

- Cơ chế của sự kết thúc
 - Có sự khác nhau giữa prokaryote và eukaryote
- Tế bào Eukaryote biến đổi RNA sau khi dịch mã
- Enzyme trong nhân của eukaryote
 - Biến đổi pre-mRNA trước khi tín hiệu di truyền rời nhân và đi vào tế bào chất.

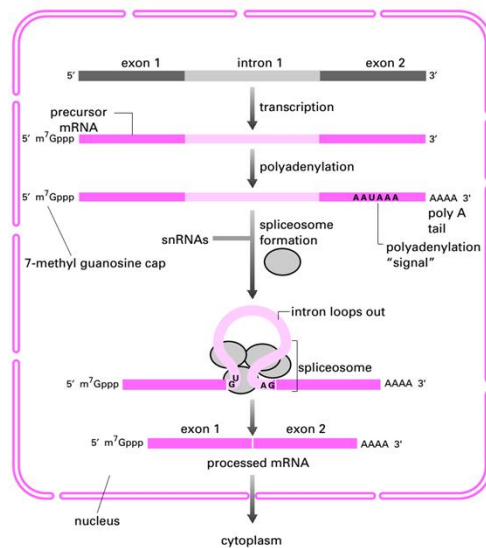
24/03/2016 2:57:55 SA

29

Nguyễn Hữu Trí



RNA processing



24/03/2016 2:57:55 SA

30

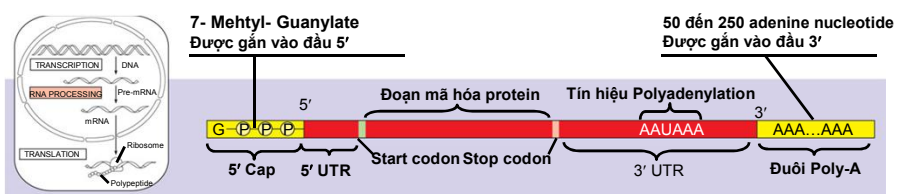
Nguyễn Hữu Trí





Sự biến đổi mRNA

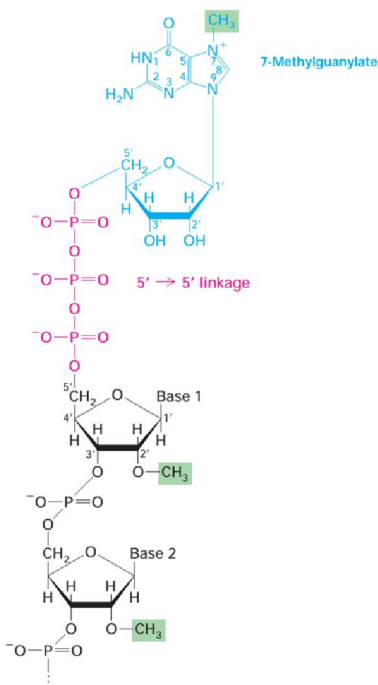
- Mỗi đầu cuối của phân tử pre-mRNA được biến đổi (modified) theo các cách khác nhau
 - Đầu 5' được gắn chóp (cap) 7- Methyl- Guanylate.
 - Đầu 3' nhận đuôi poly-A dài khoảng 50-250 nu



24/03/2016 2:57:55 SA

31

Nguyễn Hữu Trí



24/03/2016 2:57:5

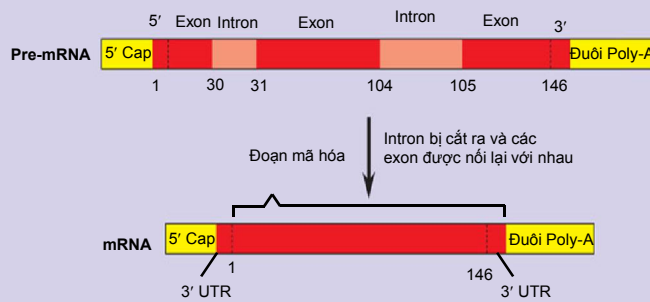
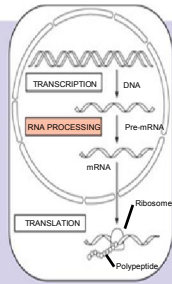
Nguyễn Hữu Trí





Gene gián đoạn và RNA splicing

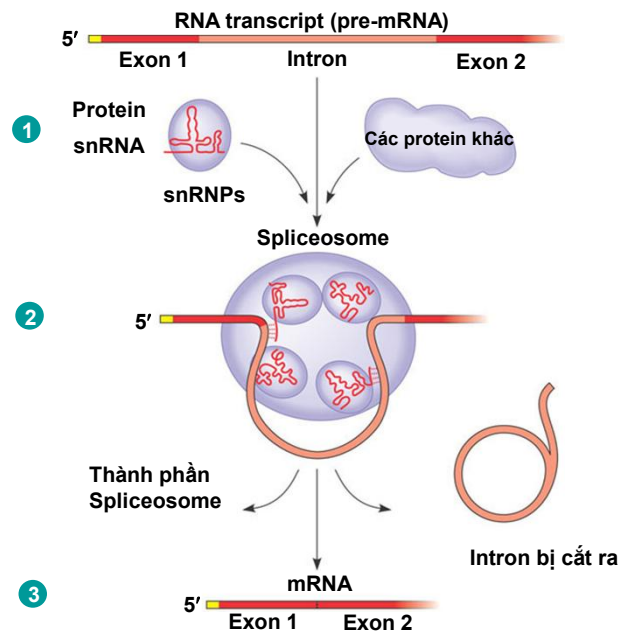
- RNA splicing
 - Loại bỏ các intron và nối exon lại



24/03/2016 2:57:55 SA

33

Nguyễn Hữu Trí



24/03/2016 2:57:55 SA

34

Nguyễn Hữu Trí





Chức năng và sự tiến hóa quan trọng của Intron

- Hiện diện trong intron
 - Cho phép có khả năng biến đổi quá trình RNA splicing

24/03/2016 2:57:55 SA

35

Nguyễn Hữu Trí



Các loại RNA chủ yếu

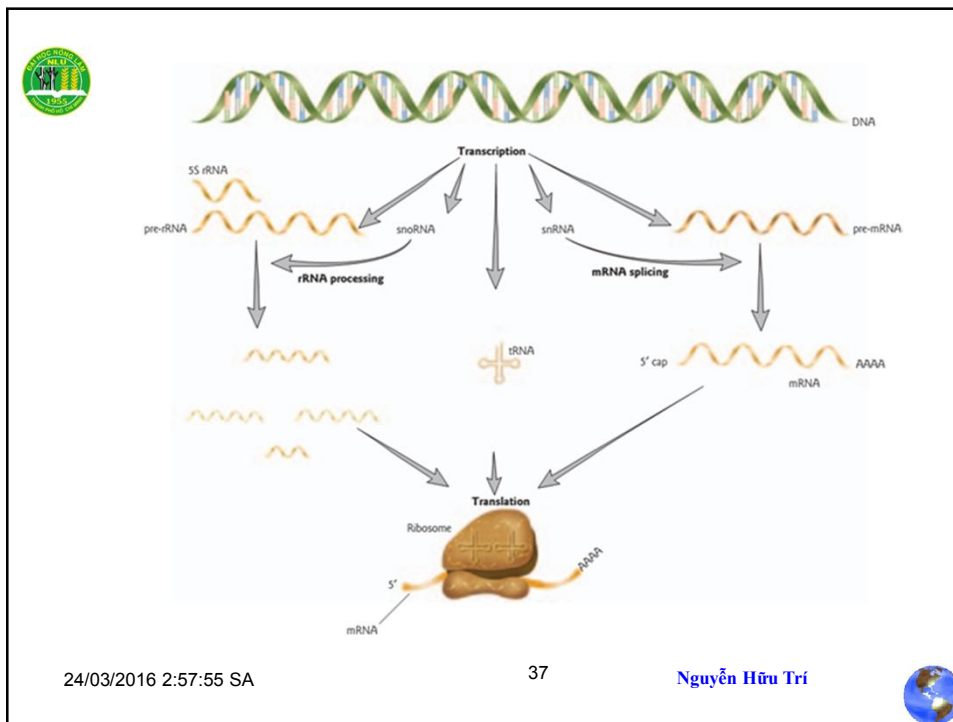
- Có 5 loại RNA chủ yếu đóng vai trò quan trọng trong việc trung gian cho việc biểu hiện gene.
 - Ribosomal RNA (rRNA) là thành phần cần thiết của ribosome.
 - Messenger RNA (mRNA) là copy của trình tự DNA mã hóa cho protein.
 - Transfer RNA (tRNA) vận chuyển aminoacid đến ribosome.
 - Small nuclear RNA (snRNA) có vai trò trong pre-mRNA splicing,
 - Small nucleolar RNA (snoRNA) có vai trò trong rRNA processing.

24/03/2016 2:57:55 SA

36

Nguyễn Hữu Trí






Ribonucleoprotein (RNP)

RNP	Point in pathway of gene expression	Function of RNP	Composition of RNP	Role of RNA component
Telomerase	DNA replication	Adds telomeric repeats to the ends of chromosomes during DNA replication	Telomerase RNA + protein (reverse transcriptase)	Template for reverse transcriptase
RNase MRP (ribonuclease mitochondrial RNA processing)	DNA replication and RNA processing	Cleaves RNA primer in mtDNA replication; role in processing 5.8S ribosomal RNA in the nucleolus	7-2 RNA + proteins	Catalytic RNP
Spliceosome	RNA processing	Removal of introns from nuclear pre-mRNA	snRNAs + ~200 proteins	Strong evidence that U6 and U2 snRNA catalyze splicing
RNase P	RNA processing	Generates 5' end of mature tRNAs	<i>E. coli</i> : M1 RNA + C5 protein Human: H1 RNA + ~10 proteins	<i>E. coli</i> : catalytic RNA Human: catalytic RNP
Ribosome	Translation	Protein synthesis machinery	Four rRNAs + > 50 ribosomal proteins	23S rRNA catalyzes peptide bond formation
Signal recognition particle (SRP)	Protein targeting	Mediates protein targeting to the endoplasmic reticulum	7S RNA + six proteins	RNA serves as a scaffold for organized binding of proteins

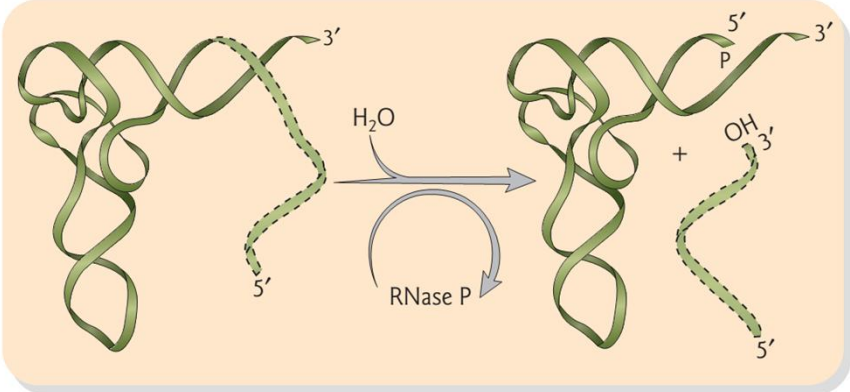
24/03/2016 2:57:55 SA

38

Nguyễn Hữu Trí




Ribozyme




24/03/2016 2:57:55 SA

39

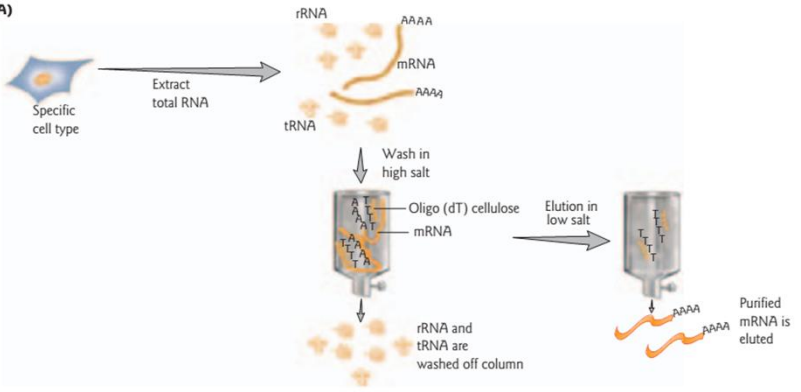
Nguyễn Hữu Trí





Phiên mã ngược


(A)



24/03/2016 2:57:55 SA

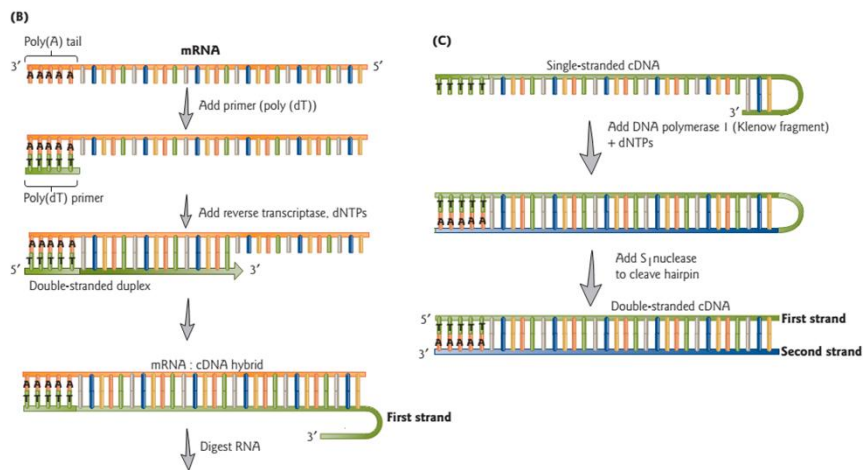
40

Nguyễn Hữu Trí





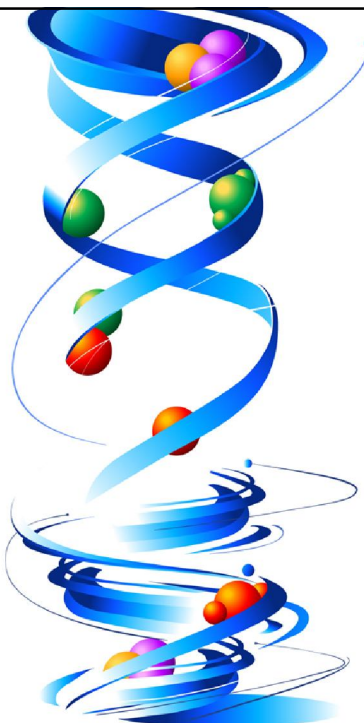
Phiên mã ngược



24/03/2016 2:57:55 SA

41

Nguyễn Hữu Trí



24/03/2016 2:57 SA

Nguyễn Hữu Trí

