
بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمان

رونویسی



دکتر آسیه صادقی

دانشگاه علوم پزشکی کرمان

گروه بیوشیمی

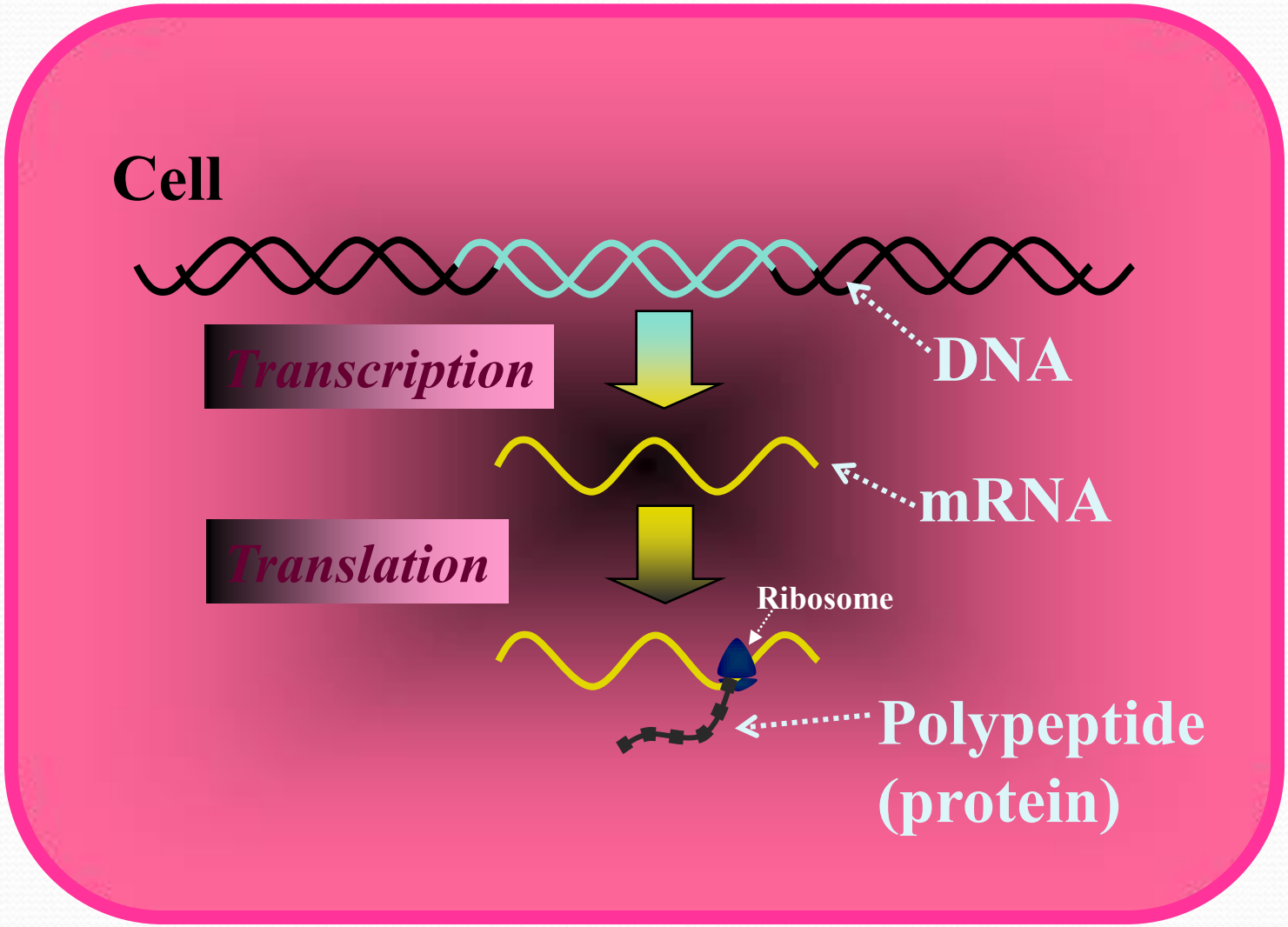
متابولیسم RNA

- کلیات رونویسی
- رونویسی در باکتریها
- رونویسی در یوکاریوتها
- پردازش رونوشت های اولیه

قسمت اول

کلیات رونویسی

بیان ژن


Cell
Transcription
DNA
mRNA
Translation
Ribosome
Polypeptide
(protein)

شباهت های رونویسی و همانندسازی

۱. هر دو فرآیند شامل پلیمریزاسیون نوکلئوتیدها با ایجاد پیوند فسفودی استری هستند
۲. انتخاب نوکلئوتید صحیح براساس ایجاد جفت باز واتسون–کریک است
۳. هر دو فرآیند همراه با پلیمریزاسیون ′۵ به ′۳ هستند
۴. اطلاعات مورد نیاز برای پلیمریزاسیون نوکلئوتیدها در هر دو فرایند با استفاده از یک رشته الگوی DNA فراهم می‌گردد
۵. هر دو فرایند نیاز به نوکلئوزید تری‌فسفات‌ها و یون Mg^{2+} دارند
۶. هر دو فرآیند نیاز به توپوایزومراز دارند

تفاوت های رونویسی و همانندسازی

۱. در همانندسازی هر دو رشته DNA نسخه‌برداری می‌شوند، ولی در رونویسی تنها یک رشته نسخه‌برداری می‌گردد

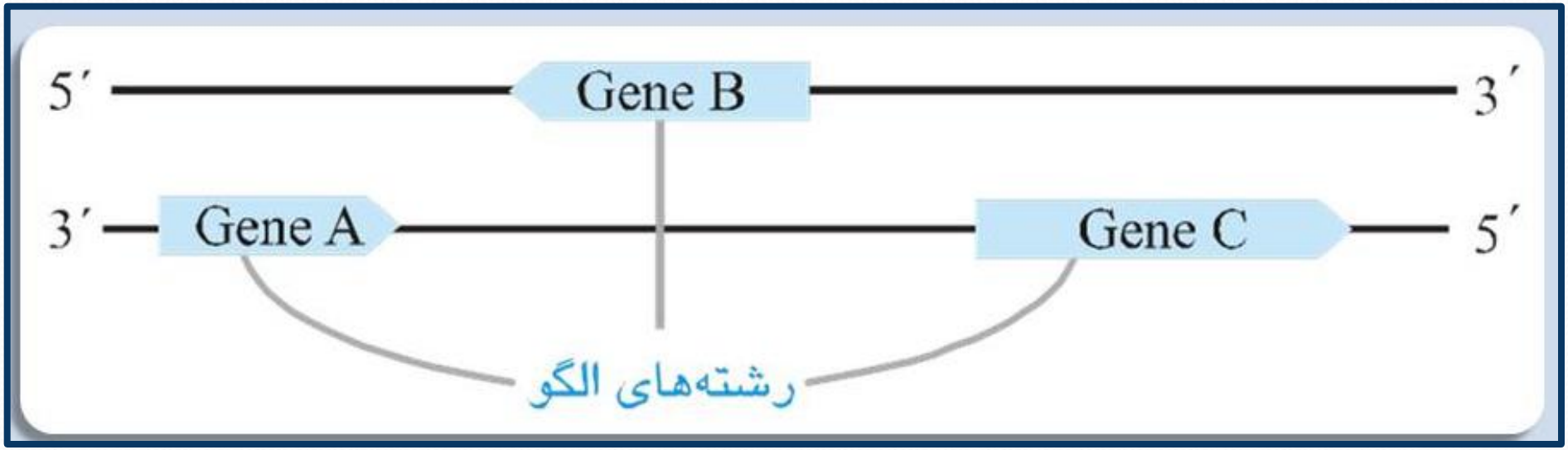
۲. در همانندسازی پیشرفت در دو جهت است، ولی فرایند رونویسی در یک جهت پیشرفت می‌کند

۳. در همانندسازی کل ژنوم نسخه‌برداری می‌شود، ولی در رونویسی تنها بخشی از رشته الگو (توالی ژنی) نسخه‌برداری می‌گردد

۴. در فرایند همانندسازی، نسخه‌برداری یکبار انجام می‌شود، ولی در فرایند رونویسی چندین بار تکرار می‌شود

۵. در فرایند رونویسی نیازی به فعالیت‌های مجزای پرایمازی و هلیکازی نیست

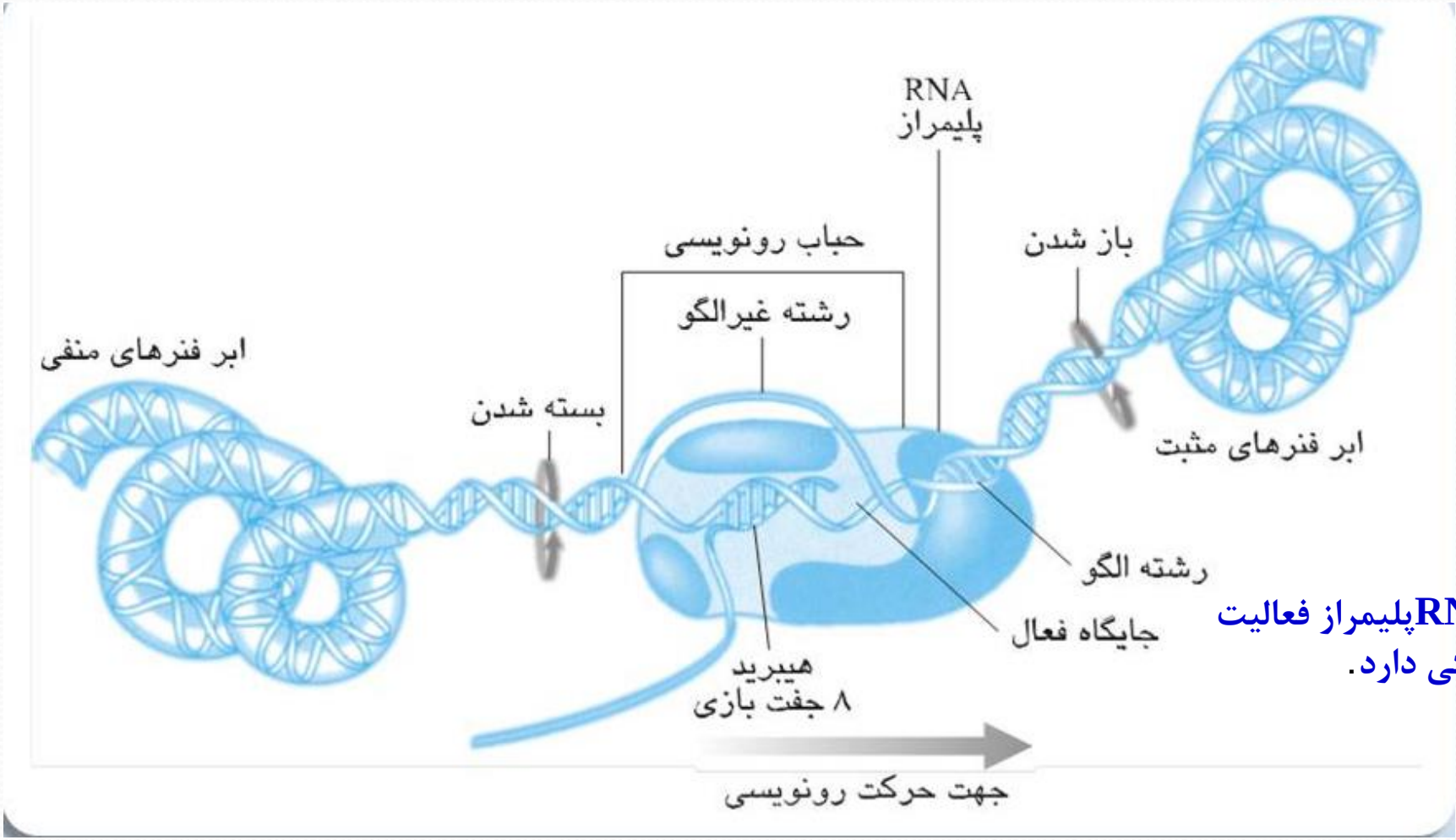
الگوی رونویسی



رشته های الگو و کد کننده

(5′)	CGCTATAGCGTTT	(3′)	رشته کدکننده (غیرالگو)
(3′)	GCGATATCGCAAA	(5′)	رشته الگو (غیر کدکننده)
(5′)	CGCUAUAGCGUUU	(3′)	رونوشت RNA

حباب رونویسی



خود RNAپلیمراز فعالیت بازکنندگی دارد.

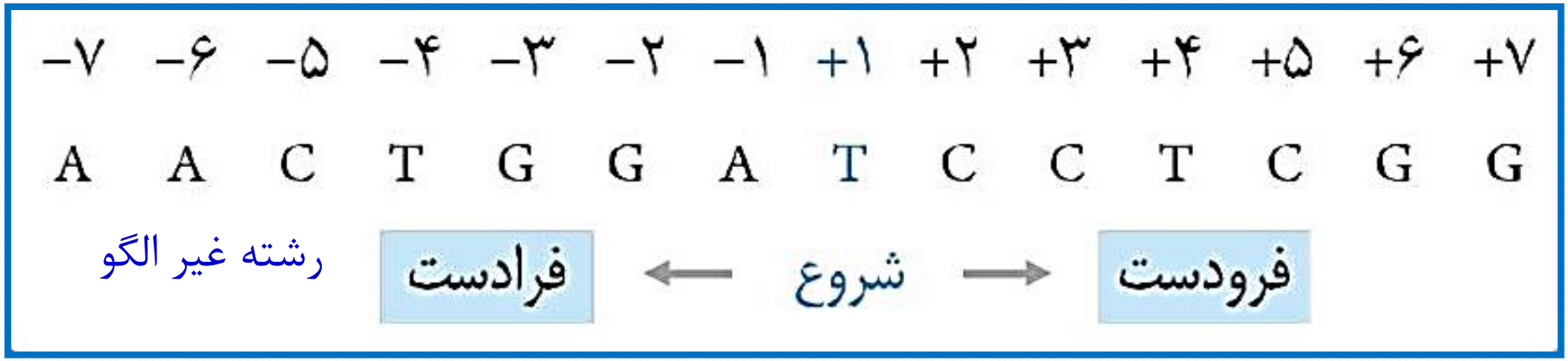
تفاوت RNA پلیمراز با DNA پلیمراز

- هر دو فعالیت پلیمرازی ۵←۳
- RNAپلیمرازها نیاز به پریماز ندارند
- RNAپلیمراز خاصیت پیشروندگی بالا دارند
- صحت رونویسی پایین
- RNA پلیمرازی ها فاقد فعالیت غلط گیری ۳←۵ می باشند
- هر دو برای سنتز نیاز به چهارنوکلئوتید تری فسفاته به همراه Mg^{2+} (ایجاد هر پیوند فسفودی استر نیازمند دو پیوند پر انرژی)

جایگاههای مرتبط با رونویسی

- جایگاه شروع
- جایگاه پروموتری
- جایگاه خاتمه
- جایگاههای تنظیمی

جایگاه شروع و توالی های فرداست و فرودست



محل شروع: اولین نوکلئوتید موجود در رشته که رونویسی می شود

پروموتر: معمولا در فرا دست محل شروع می باشد و در شروع صحیح رونویسی نقش دارد

هر ژن در یوکاریوتها دارای یک پروموتر می باشد اما در باکتریها چند ژن مرتبط ممکنه یک پروموتر داشته باشند

قسمت دوم

رونویسی در پروکاریوتها

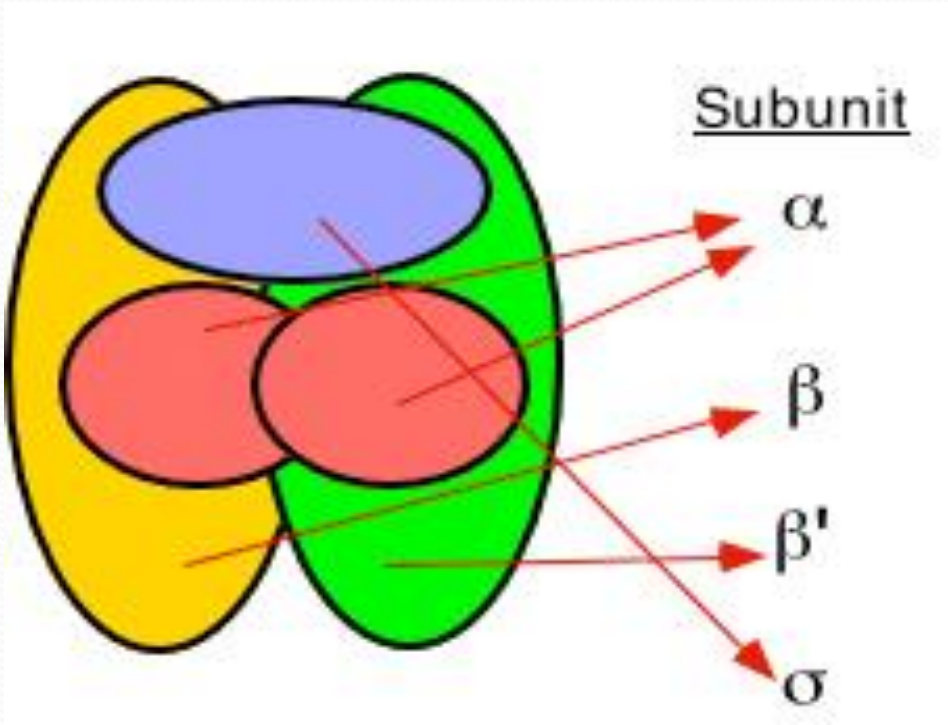
زیرواحدهای RNAپلیمراز

زیرواحد	عملکردها
α	ایجاد داربست، تعامل با پروتئین های تنظیمی و عناصر تنظیمی فردست
β	اتصال به DNA، مرکز کاتالیتیک در شروع و طویل سازی نقش دارد
β'	اتصال به رشته الگوی DNA
ω	(?)
σ^{70}	شناسایی پروموتر، افزایش تمایل RNAP به پروموتر، تنظیم رونویسی

در پروکاریوتها تنهای یک RNA پلیمراز رونویسی همه ژنها را انجام می دهد

RNAپلیمراز پروکاریوتها

- هولوآنزیم: $\alpha 2\beta\ \beta'\omega\sigma$ (برای آغاز رونویسی)
- هسته آنزیم: $\alpha 2\beta\ \beta'\omega$ (برای طویل شدن)، به تنهایی قادر به شروع رونویسی از محل اختصاصی نمی باشد.

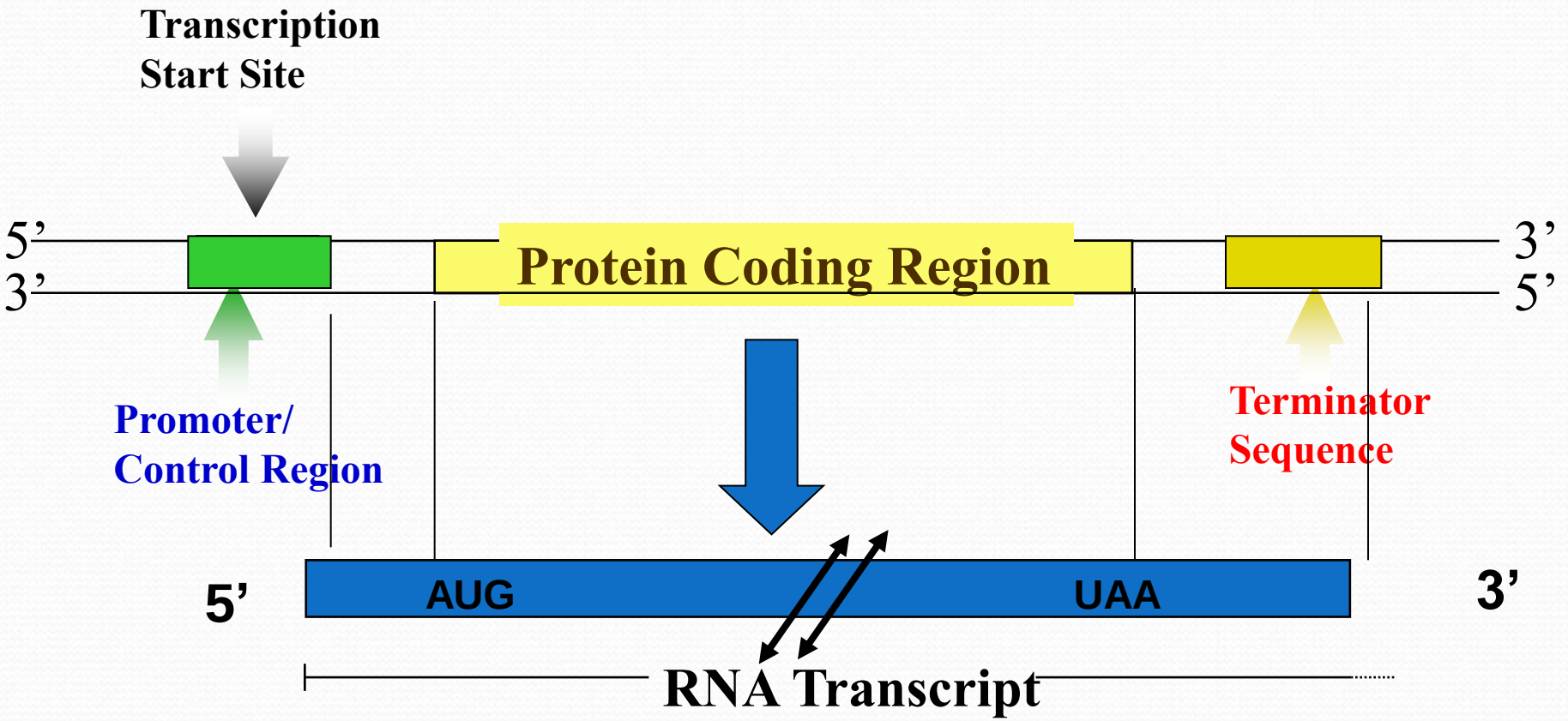


زیرواحدهای سیگمای متفاوت RNAپلیمراز را به سمت پرومترهای خاص هدایت می کند

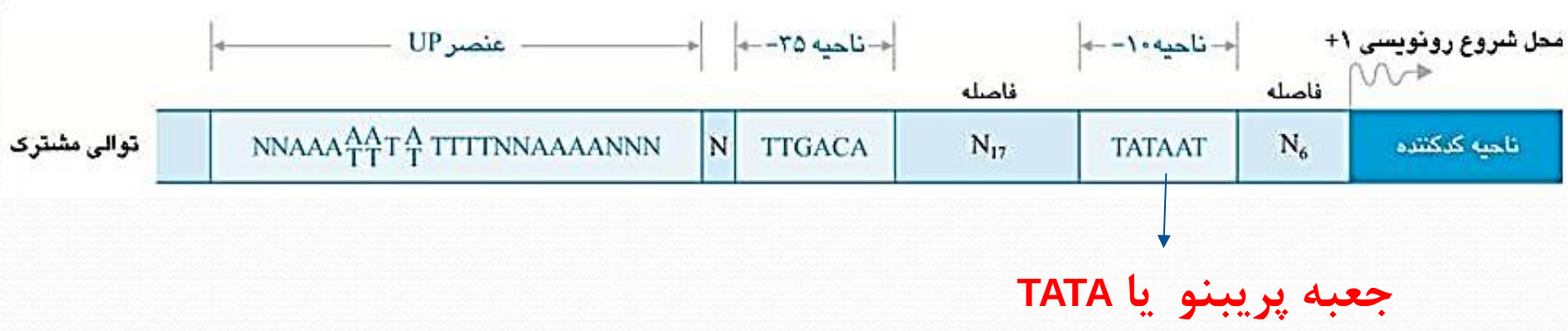
Q70: برای بسیاری از ژنهای باکتری

Q32: برای ژنهای شوک حرارتی

یک ژن پروکاریوتی ساده

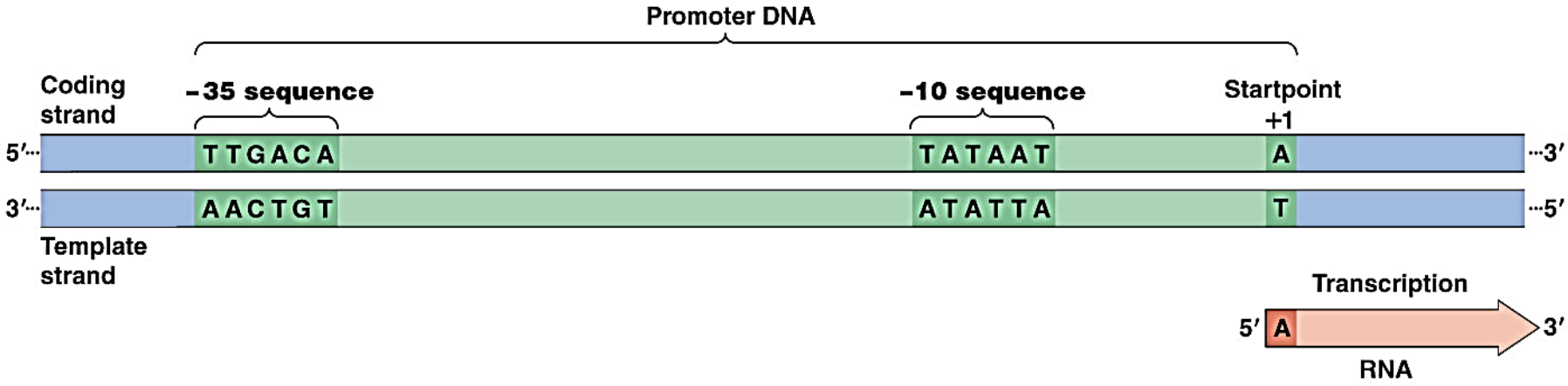


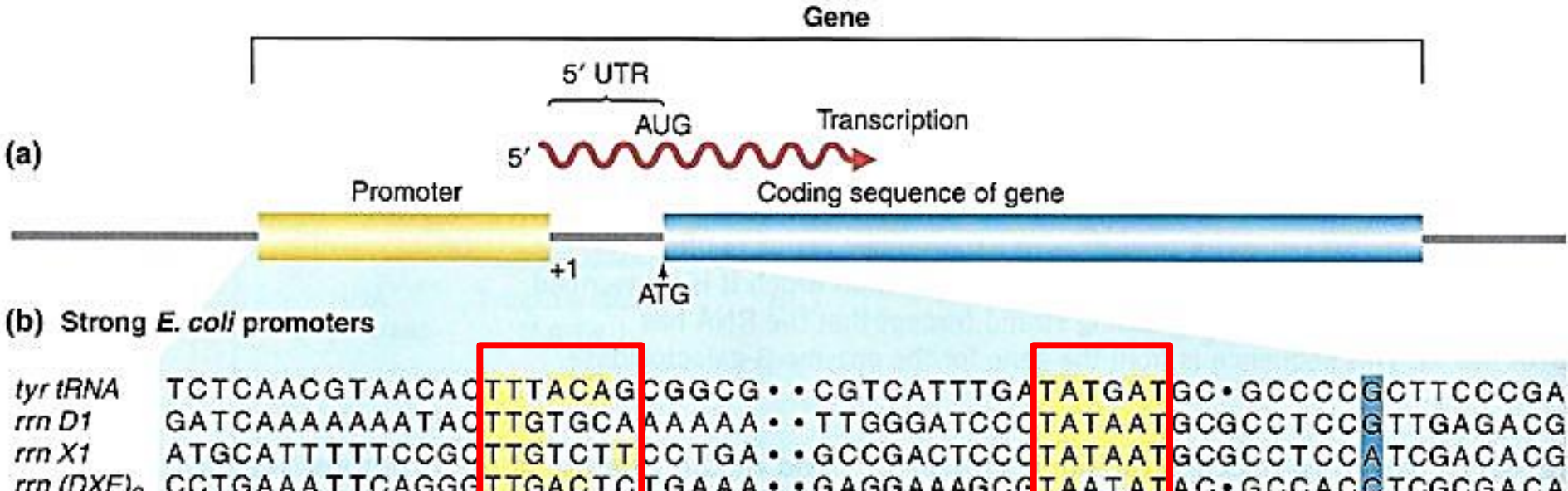
پروموتر مربوط به σ^{70} در E.Coli



- اتصال RNA پلیمراز در ناحیه ای به طول ۷۰ جفت باز قبل از نقطه شروع رونویسی تا حدود ۳۰جفت باز بعد از این نقطه صورت می گیرد
- هر چه توالی پروموتر ژن به توالی مشترک نزدیک باشد بیان آن بیشتر است و برعکس

پروموتر و توالی های حفظ شده آن

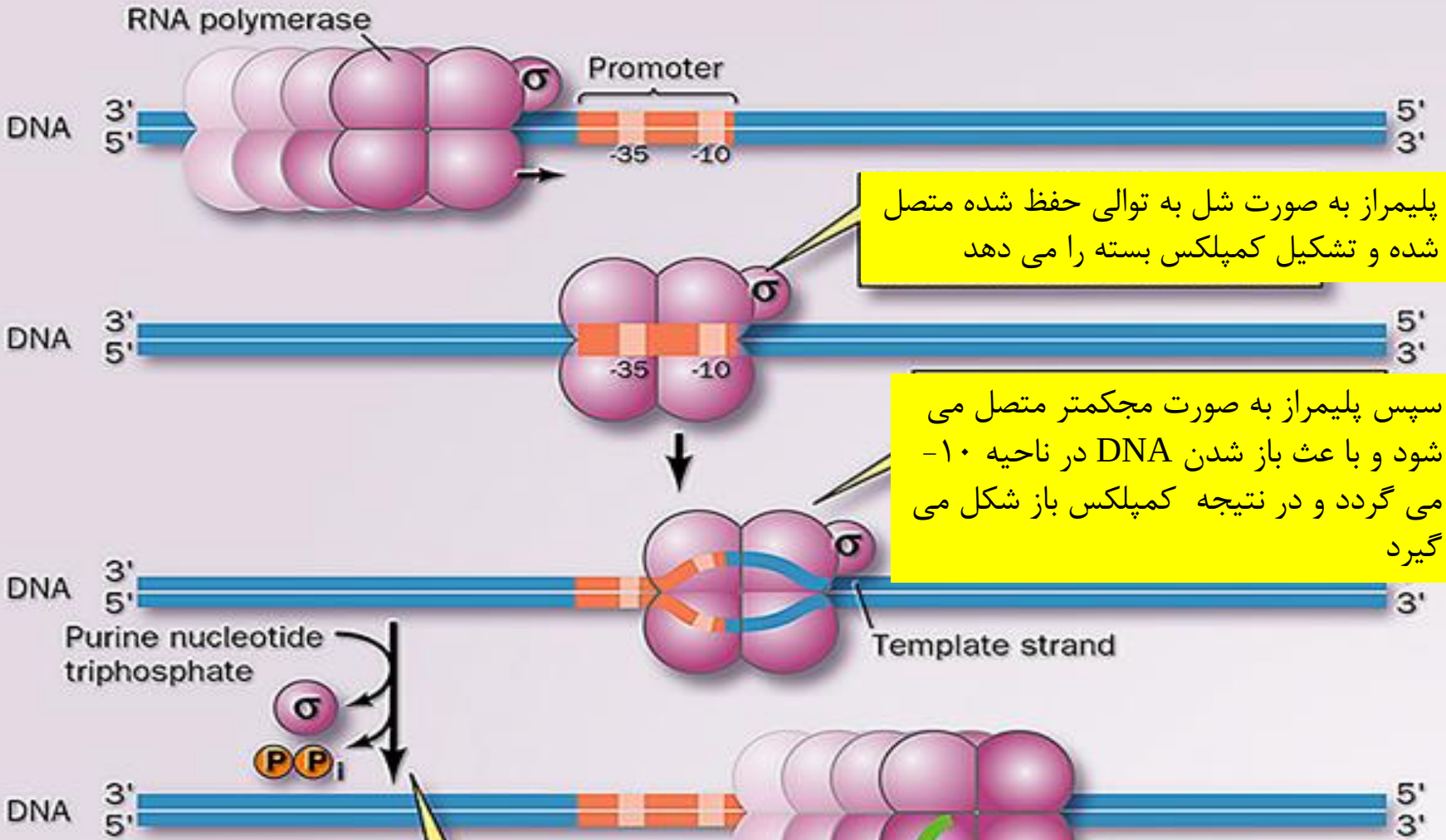




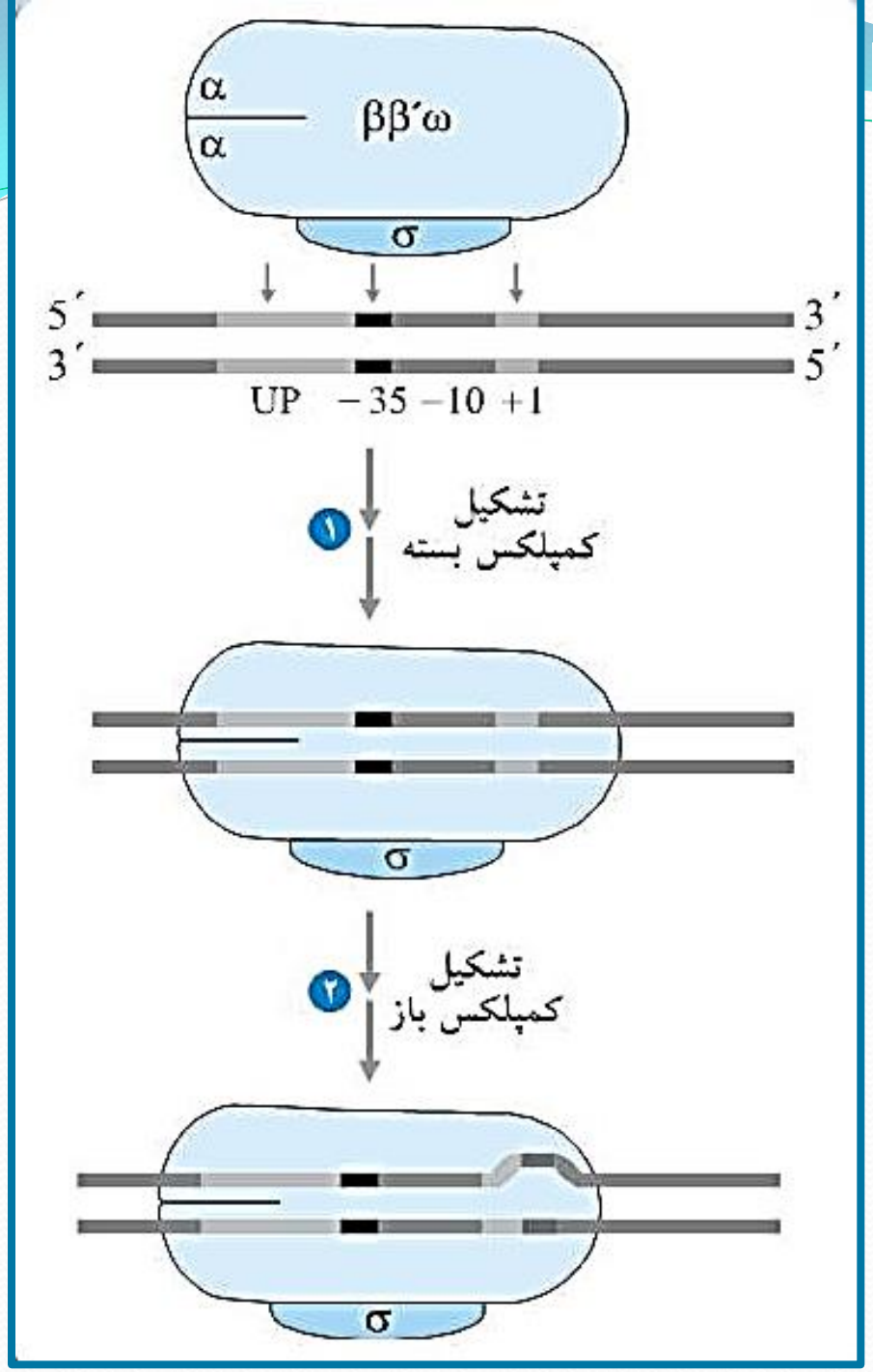
مراحل متفاوت رونویسی

- شناسایی و آغاز
- طویل سازی
- ختم

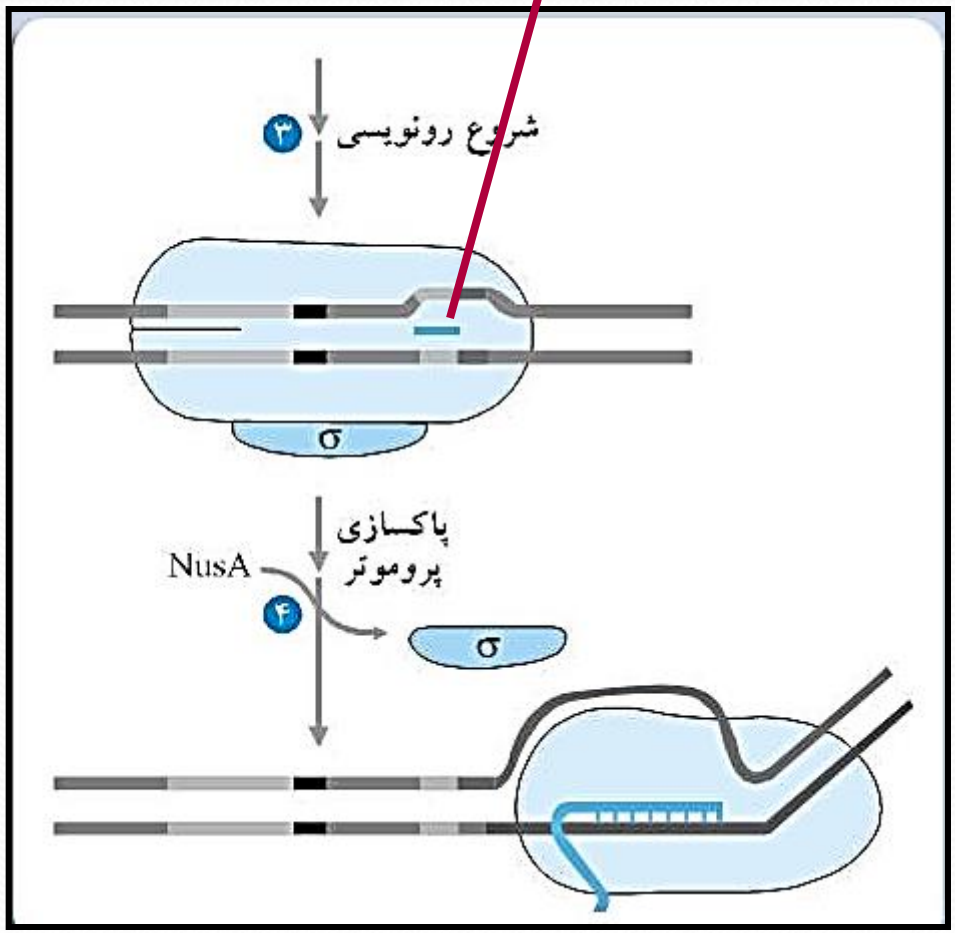
آغاز رونویسی: کمپلکس باز و بسته



مرحله شروع رونویسی



قطعه حدود ۸ یا ۹ نوکلئوتیدی

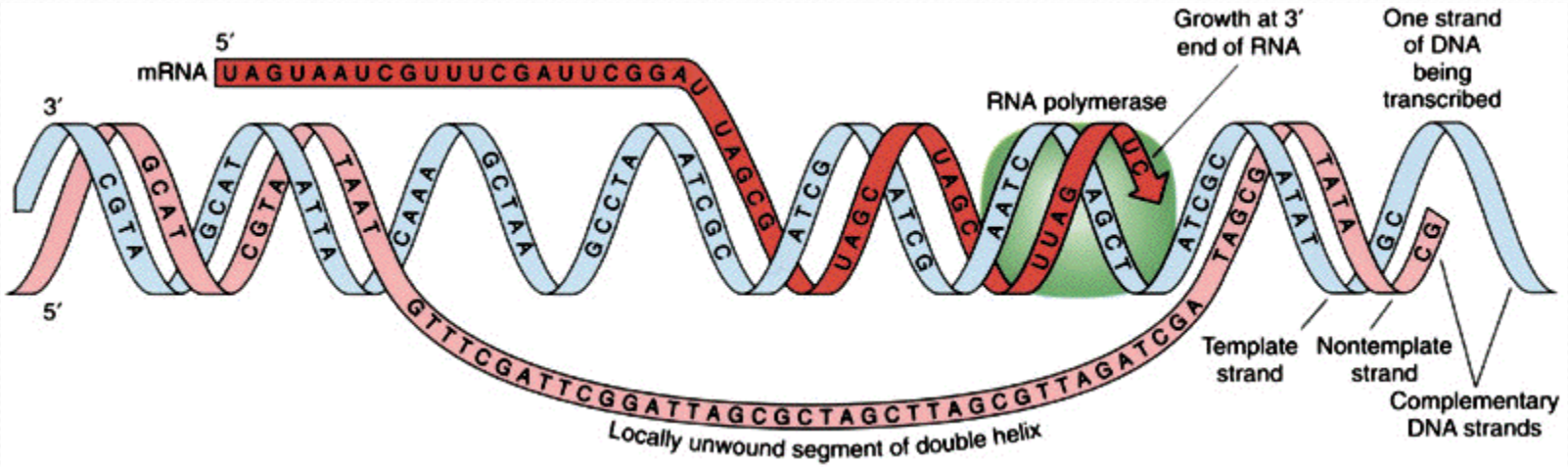


فازهای شروع رونویسی

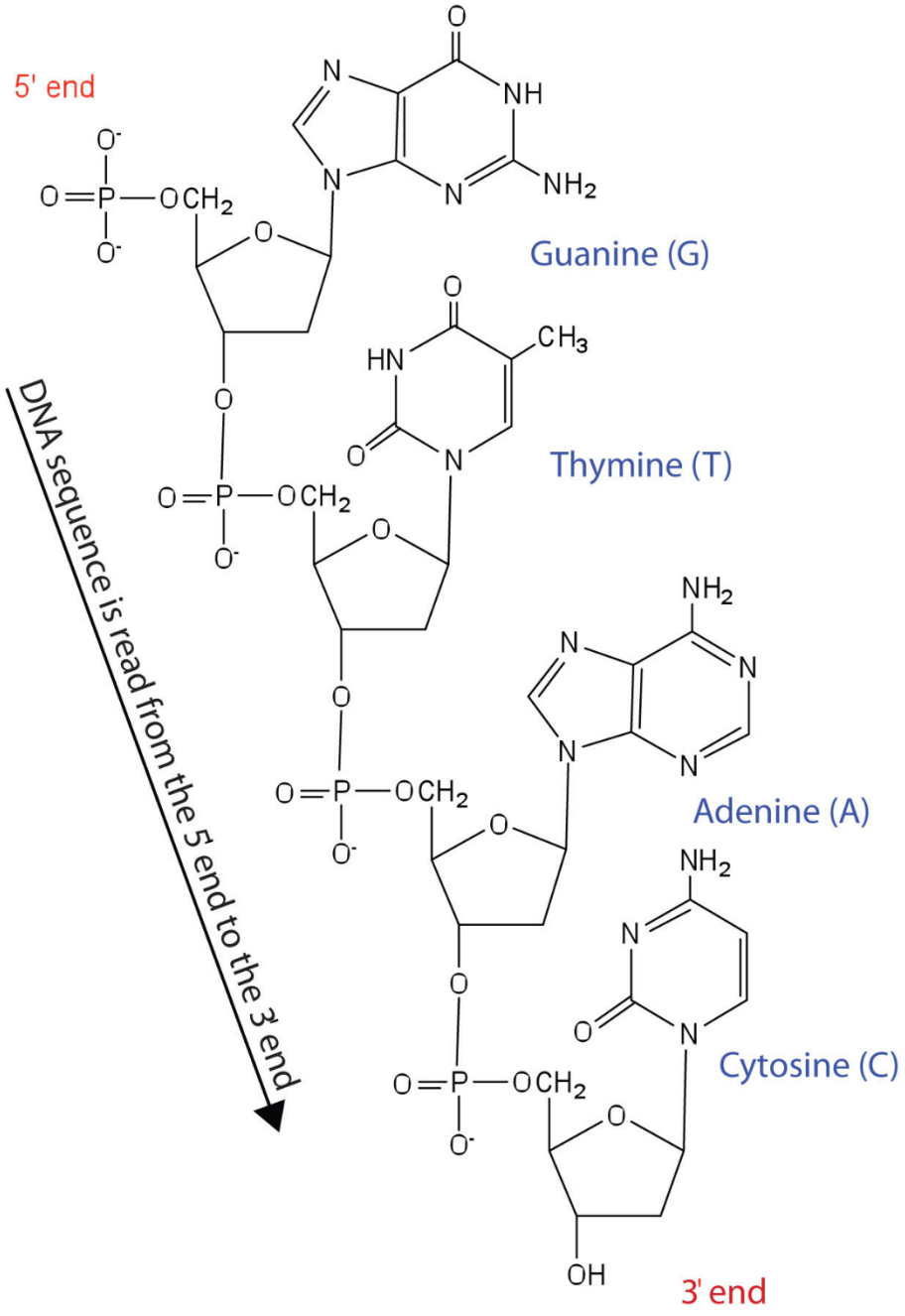
- ۱- اتصال هولوآنزیم RNAپلیمراز به پروموتر و ایجاد کمپلکس بسته
- ۲- باز شدن مارپیچ دو رشته و ایجاد کمپلکس باز
- ۳- سنتز قطعه کوتاه RNA
- ۴- جدا شدن RNAپلیمراز از پروموتر (پاکسازی پروموتر)

پلیمر شدن RNA قطبی است:

آنزیم نوکلئوتیدها را به هیدروکسیل ´۳ انتهای آزاد زنجیره در حال رشد اضافه می کند.

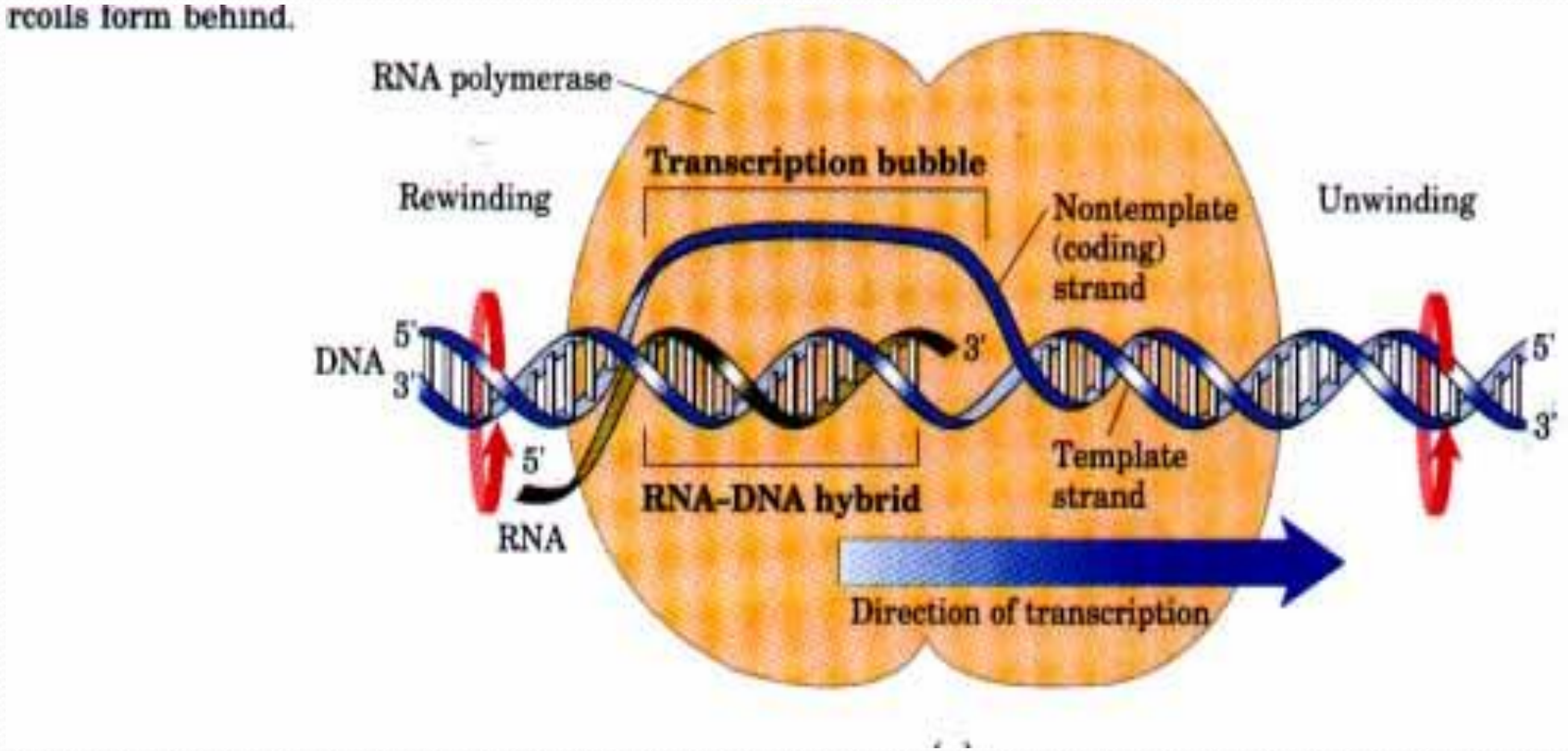


اولین نوکلئوزید تری فسفاته که انتهای 5 مولکول RNA را تشکیل می دهد هیدرولیز پیوند فسفوانیدریدی را انجام نمی دهد


5' end
Guanine (G)
Thymine (T)
Adenine (A)
Cytosine (C)
3' end
DNA sequence is read from the 5' end to the 3' end

طویل سازی

بعد از شروع رونویسی، زیرواحد سیگما از هسته پلیمراز جدا می گردد. این پدیده تمایل RNAپلیمراز را برای DNA تک رشته ای افزایش داده که تضمین می کند پلیمراز زودهنگام از DNA جدا نشود



ختم زنجیره RNA

پایان رونویسی در توالی خاتمه دهنده رخ می دهد:

۱- مستقل از Rho:

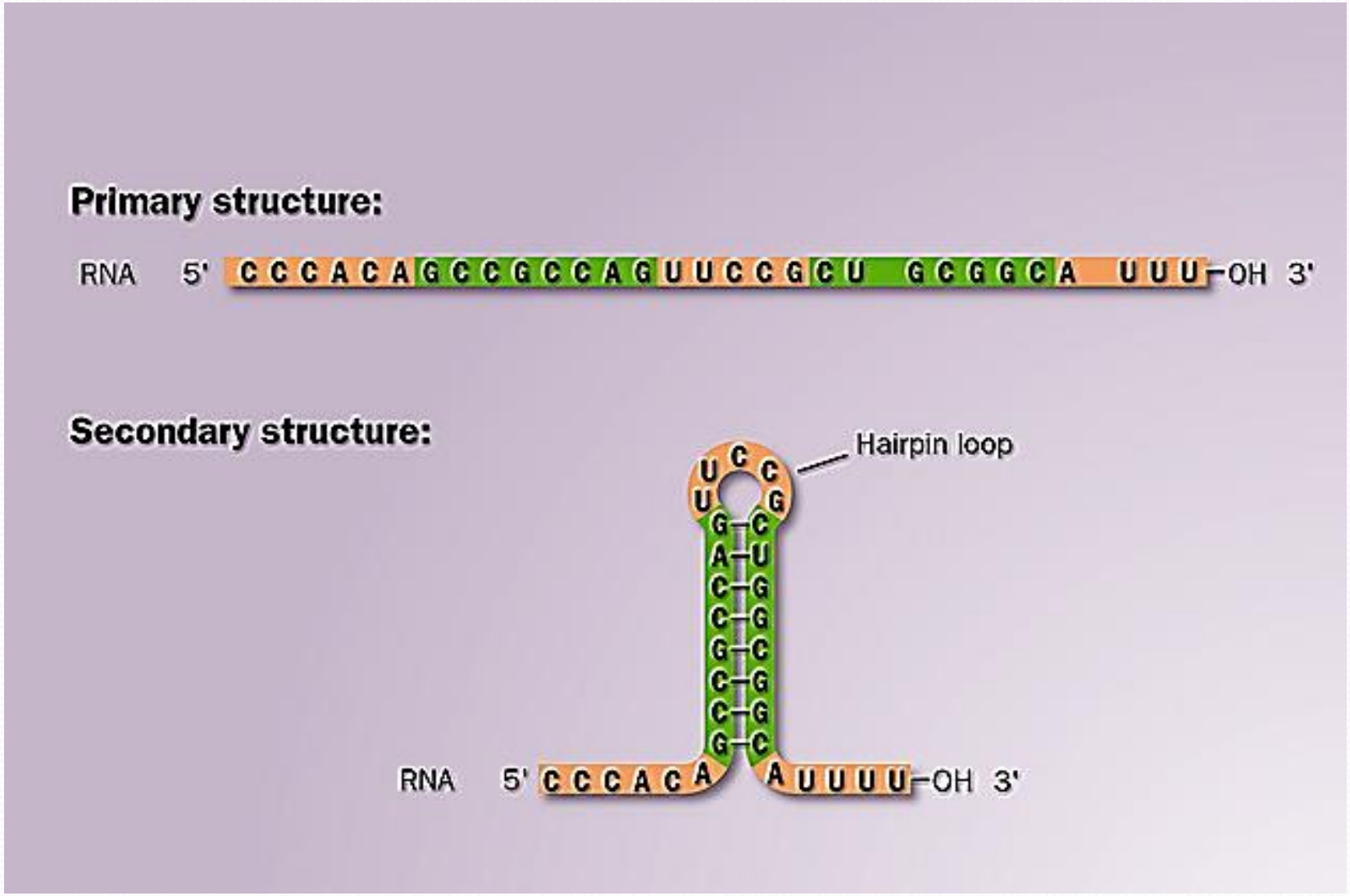
شایعترین پیام توقف: توالی های پالیندرومی غنی از GC، تشکیل ساختار ساقه-حلقه

و وجود توالی A بعد از توالی پالیندرومی،در نتیجه ضعیف شدن هیبرید RNA-DNA

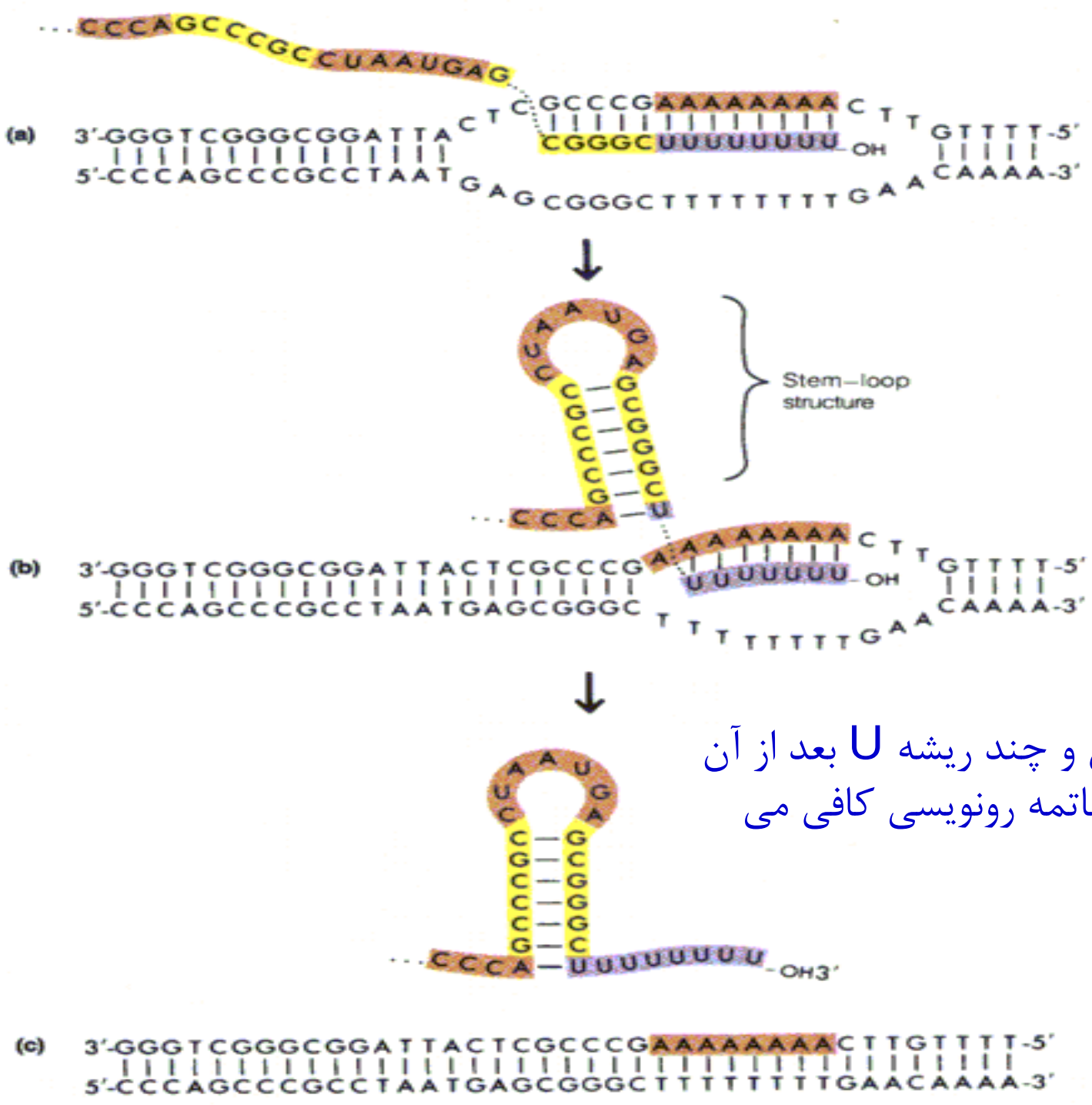
۲- پایان وابسته به Rho:

RNA اطراف هگزامر Rho می پیچد و رونویسی متوقف می شود.

توالی پایان


Primary structure:
RNA 5' C C C A C A G C C G C C A G U U C C G C U G C G G C A U U U OH 3'
Secondary structure:
Hairpin loop
RNA 5' C C C A C A A U U U U OH 3'

پایان رونویسی / مستقل از ρ

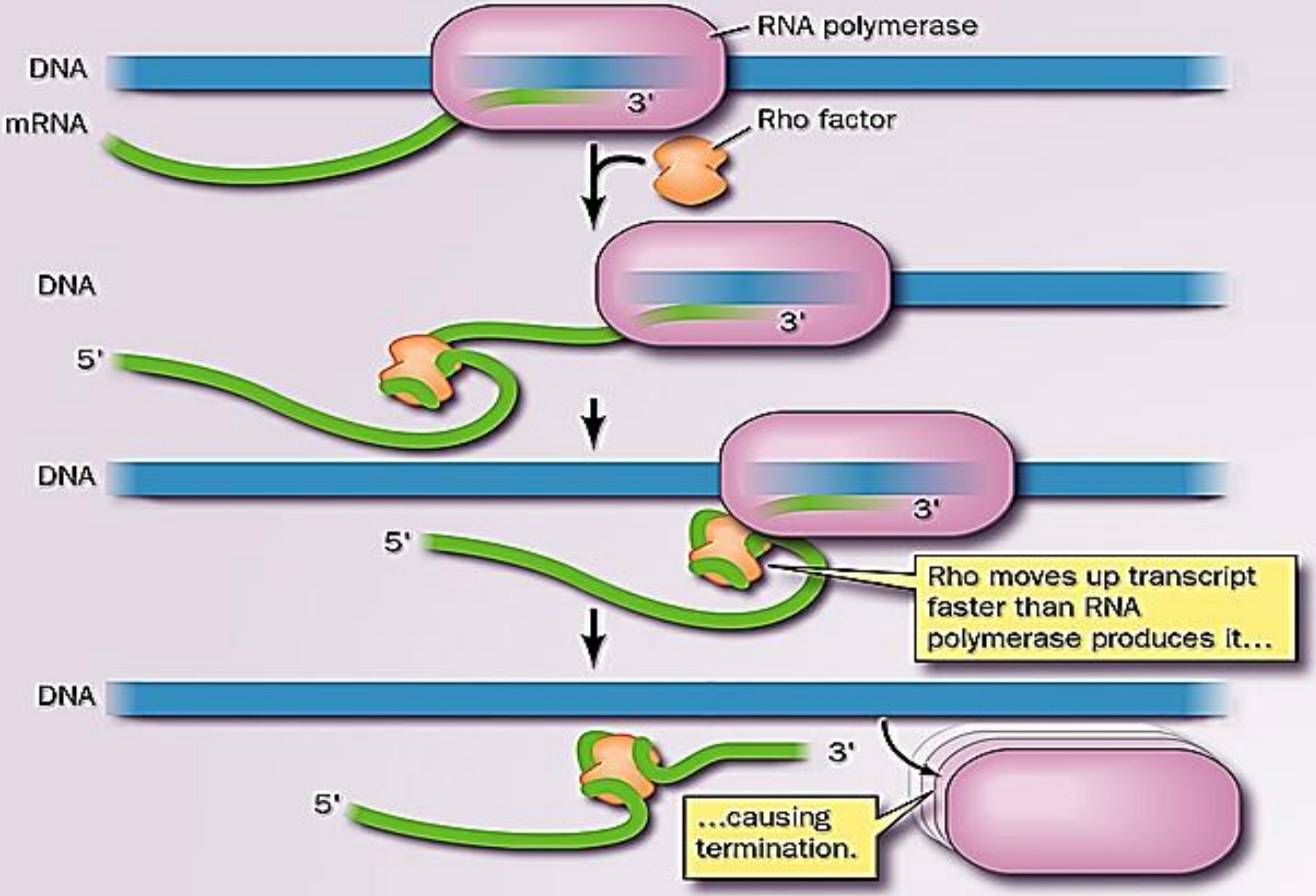


سنجاق و چند ریشه U بعد از آن برای خاتمه رونویسی کافی می باشد

پایان رونویسی / وابسته به فاکتور ρ

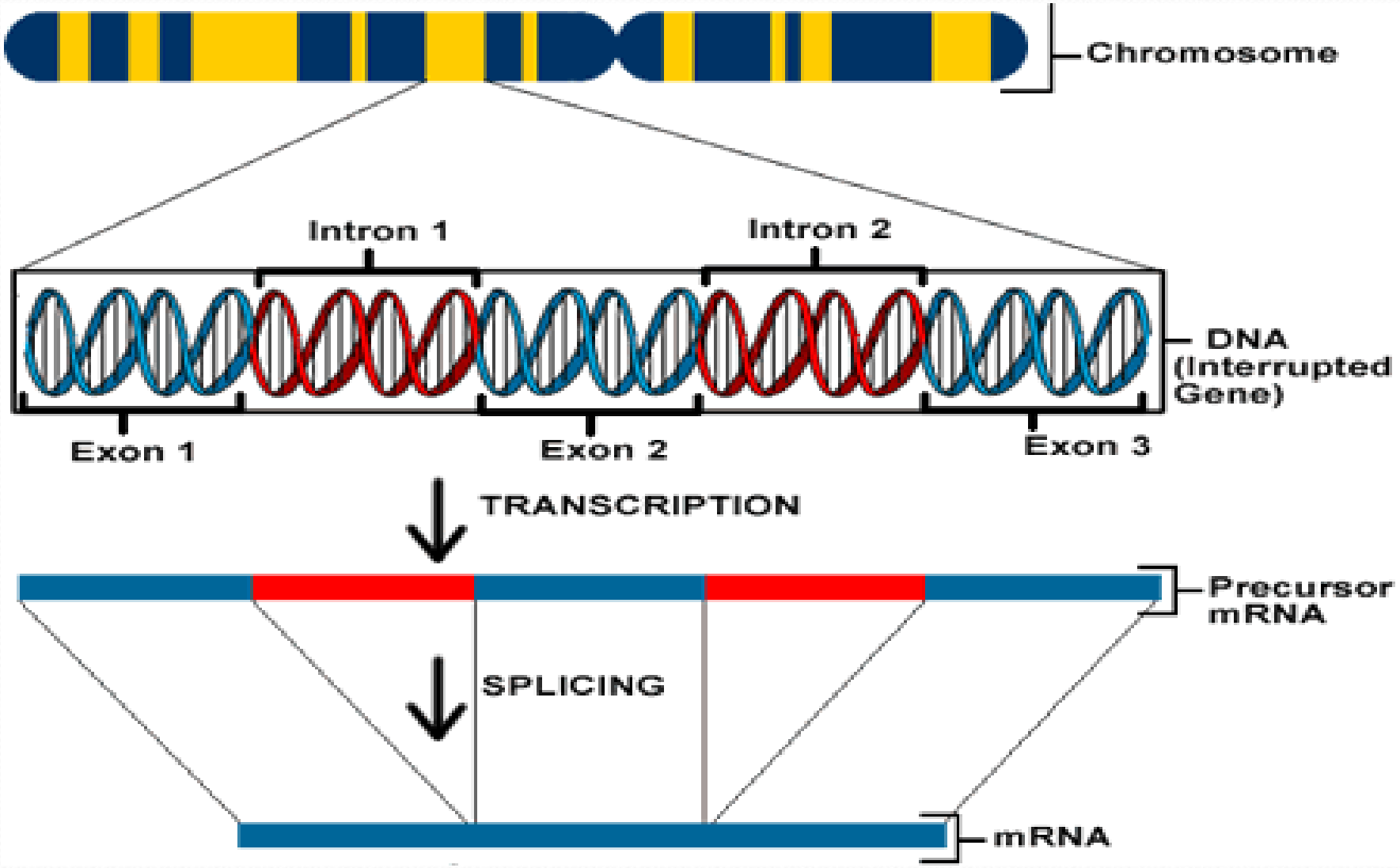
- توالی های خاتمه غنی از C
- پروتئین ρ دارای فعالیت ATPase و DNA-RNA هلیکازی می باشد
- به محل های اختصاصی خود بر روی RNA متصل شده و در جهت ۵ به ۳ حرکت می کند
- وقتی به کمپلکس رنویسی متوقف شده رسید RNA را ازDNA جدا می کند

پایان وابسته به Rho

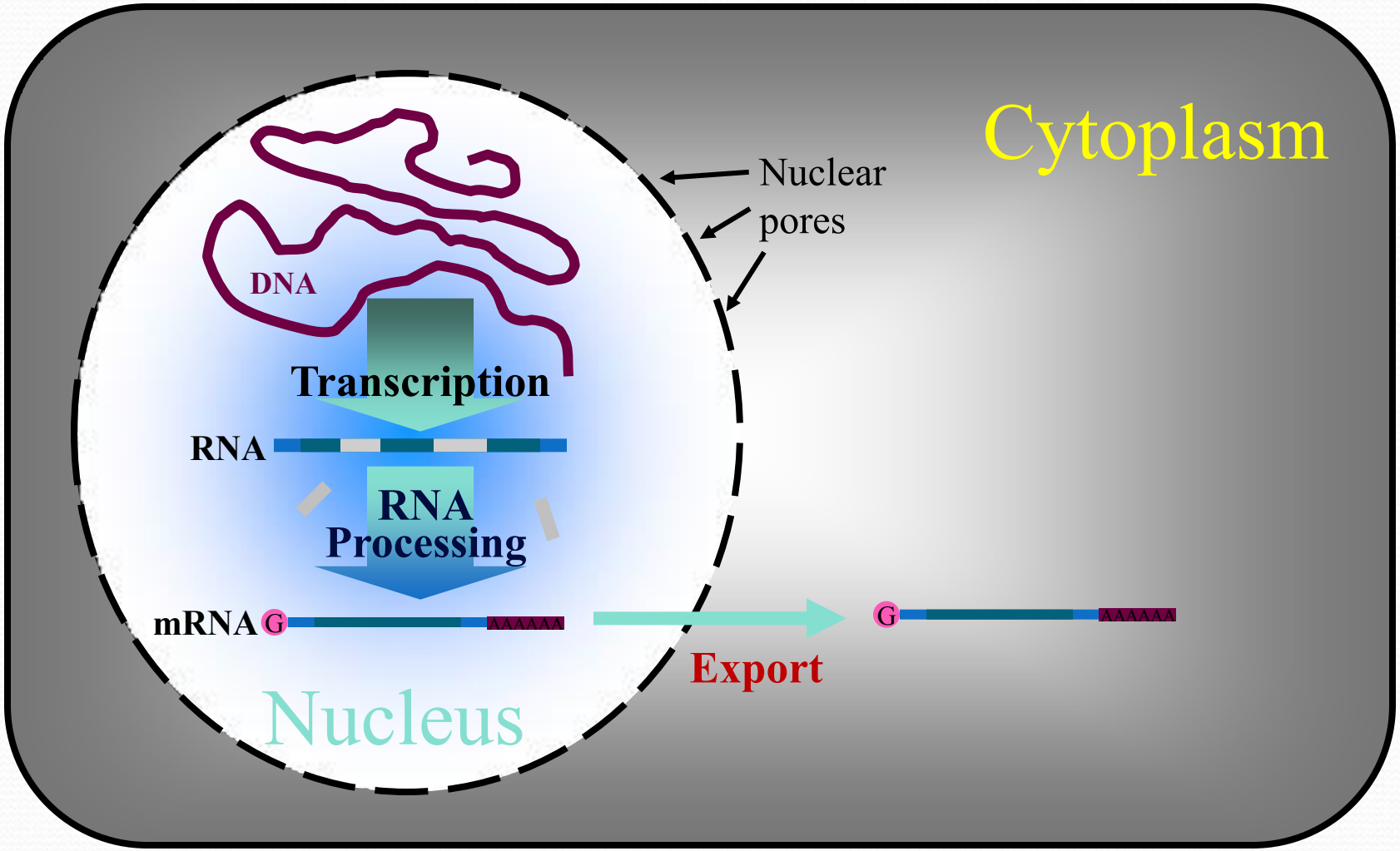


رونویسی در یوکاریوتها

یک ژن یوکاریوتی ساده



ژن یوکاریوتی



RNAپلیمرازهای یوکاریوتی مختلف

اساس طبقه بندی

۱- بر اساس خروجشان در طی کروماتوگرافی تعویض یونی در غلظت های مختلف نمک

۲- حساسیت به آلفا آمانتین

Pol I: غیر حساس به آلفا آمانتین، مسئول سنتز pre-rRNA (28S, 5.8S, 18S). ۵۰ تا ۷۰ درصد فعالیت پلیمراز سلول

Pol II: خیلی حساس به آلفا آمانتین، مسئول رونویسی از همه ژنهای کد کننده پروتئین و snRNA. ۲۰ تا ۴۰ درصد فعالیت پلیمراز سلول

Pol III: حساسیت متوسط به آلفا آمانتین. مسئول رونویسی ژنهای tRNA، 5srRNA، U6 و جزء RNA مولکول SRP . 10 درصد فعالیت پلیمرازی سلول

انواع RNA پلیمرازهای یوکاریوتی

پلیمراز	موقعیت	محصولات
RNA پلیمراز I	هستک	۴۵ S pre-rRNA
RNA پلیمراز II	نوکلئوپلاسم	پیش‌سازهای mRNA، U1، U2، U4 و U5 snRNA
RNA پلیمراز III	نوکلئوپلاسم	پیش‌سازهای tRNA، 5S rRNA، U6 snRNA، 7S RNA و سایر مولکول‌های کوچک RNA
RNA پلیمراز میتوکندریایی	میتوکندری	محصولات تمامی ژن‌های میتوکندریایی

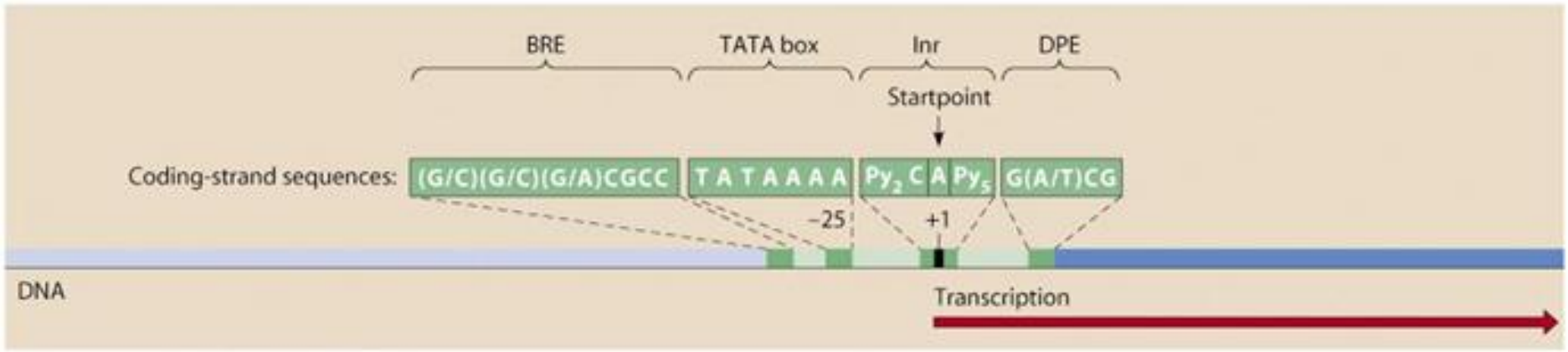
پروموترهای RNAپلیمراز II

- تنوع بسیار زیادی در پروموترهای این پلیمراز (در مقایسه با RNAپلیمراز III و I) وجود دارد.
- **جعبه TATA**: توالی حفظ شده ای در ۲۵-۳۵ نوکلئوتید بالادست جایگاه شروع.
- جعبه TATA در ژنهایی که رونویسی سریع دارند شایع تر می باشد.
- جعبه TATA پلیمراز را درمحل نوکلئوتیدهای صحیح هدایت می کند.

آغاز کننده ها: توالی با C در ۱- و A در ۱+.

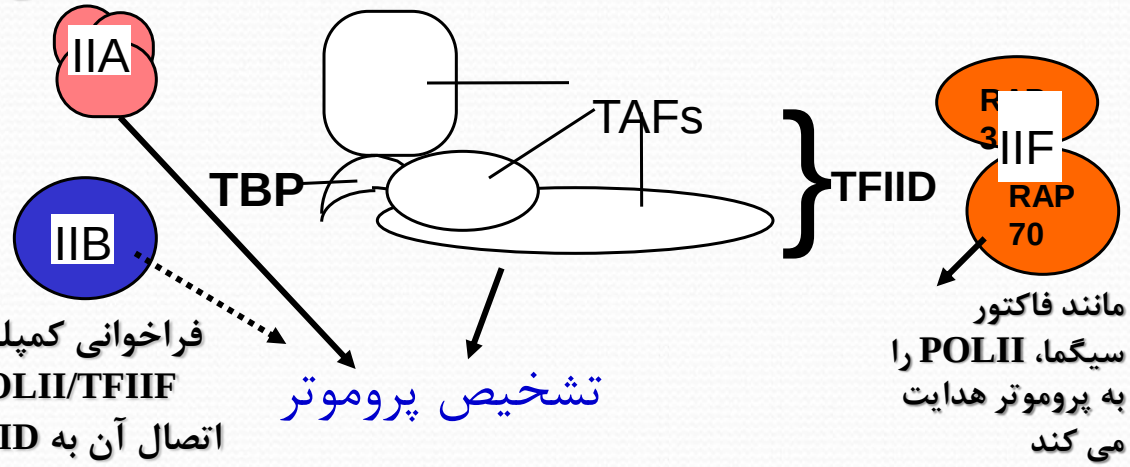
- **جزایر CpG**: توالی های ۲۰-۵۰ نوکلئوتیدی غنی از CG در ۱۰۰ نوکلئوتید بالادست جایگاه شروع.
- ژنها با این پروموتر با سرعت کم رونویسی می شوند نظیر ژنهای خانه دار (housekeeping)

پروموترهای RNAپلیمراز II

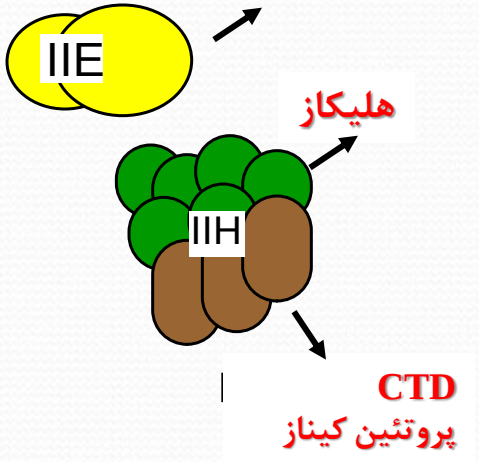


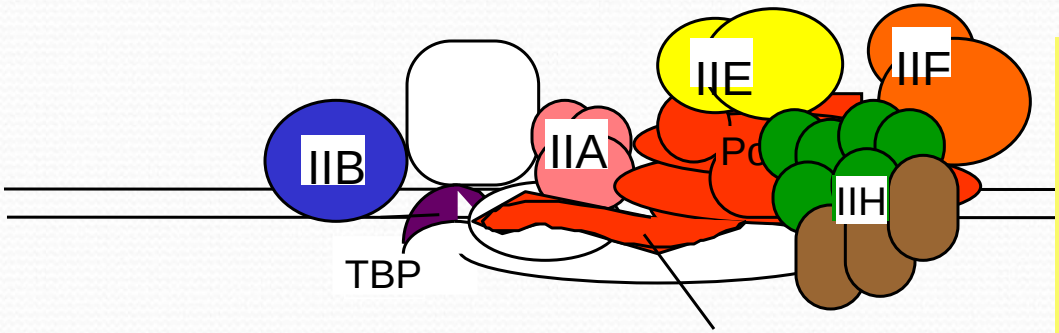
فاکتورهای رونویسی لازم برای RNAپلیمراز II

به TBP متصل می شود



هلیکاز را تنظیم می کند. بعد از اینکه POL/TFIIF به کمپلکس پیش آغازی متصل شد، اتصال می یابد



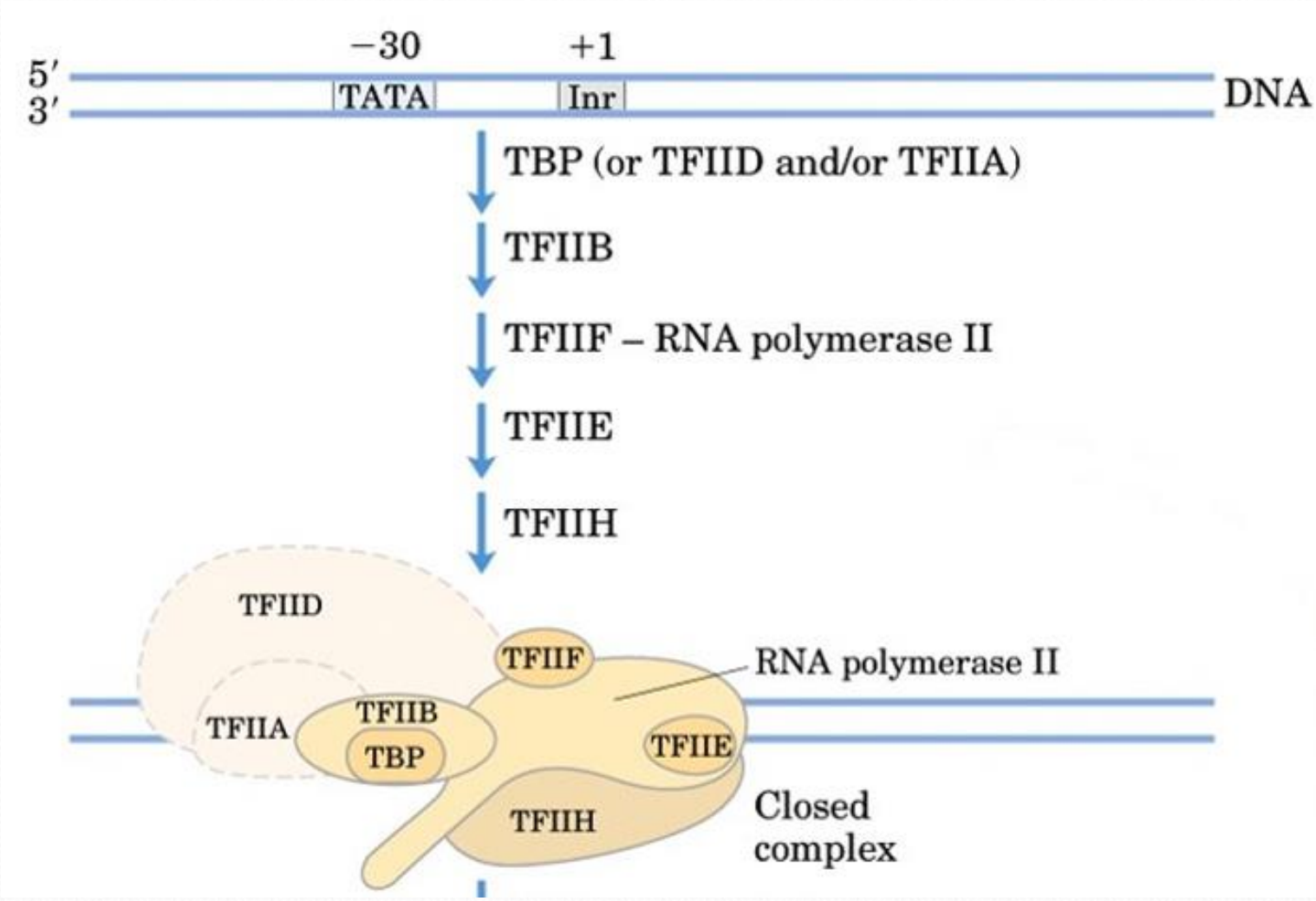


CTD of large subunit of Pol II

بعد از پلیمر شدن چند نوکلئوتید اول و فسفریله شدن دمین CTD پلیمراز، پاکسازی پروموتر (Promoter clearance) رخ می دهد. TFIIB، TFIIE، TFII جدا می شوند، POL/TFIIF طویل سازی را انجام می دهندو TFIIA و TFIID در محل TATA باقی می مانند.

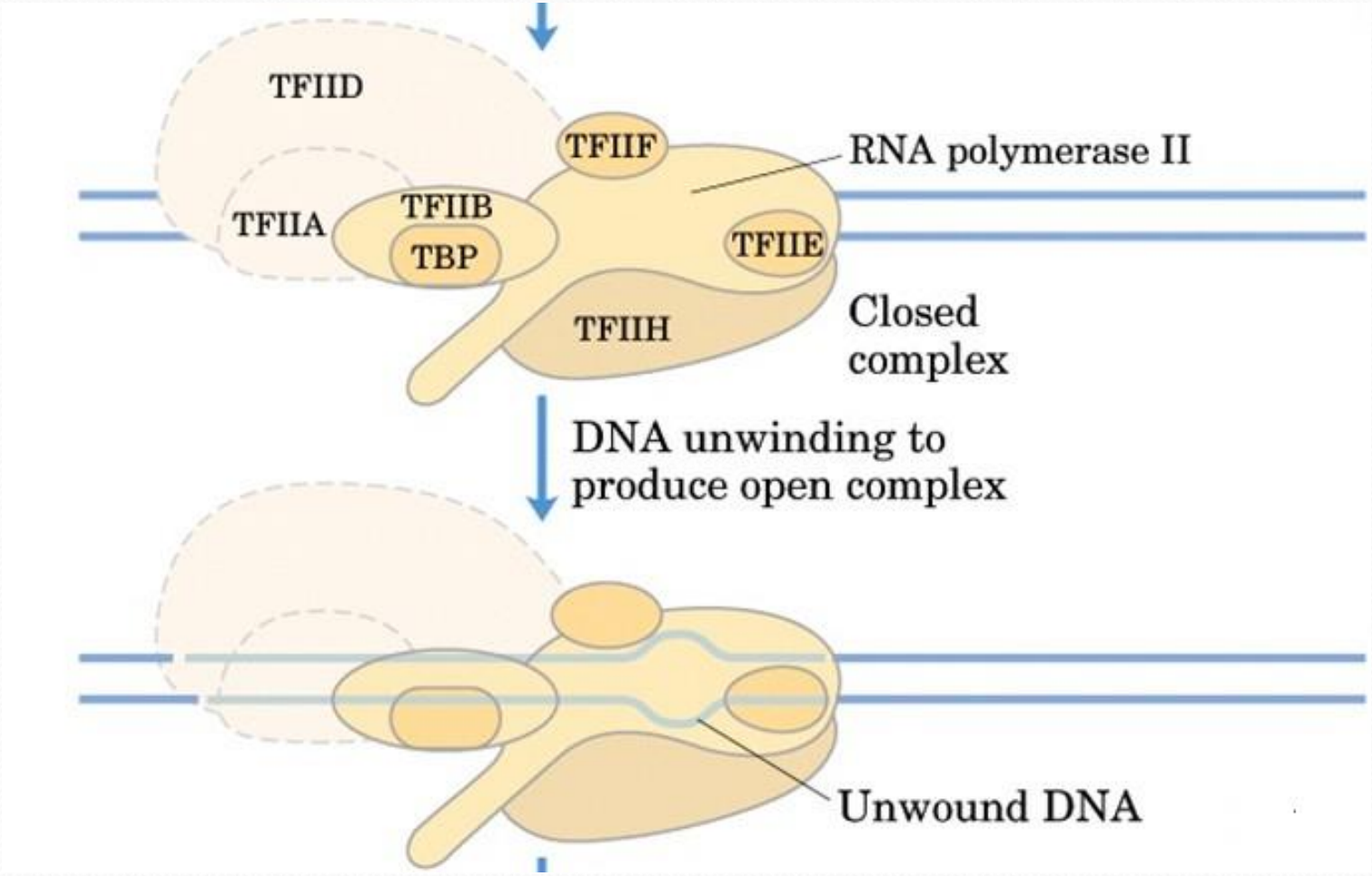
TBP: TATA binding protein
TAF: TBP associated factors

رونویسی توسط RNAپلیمراز II

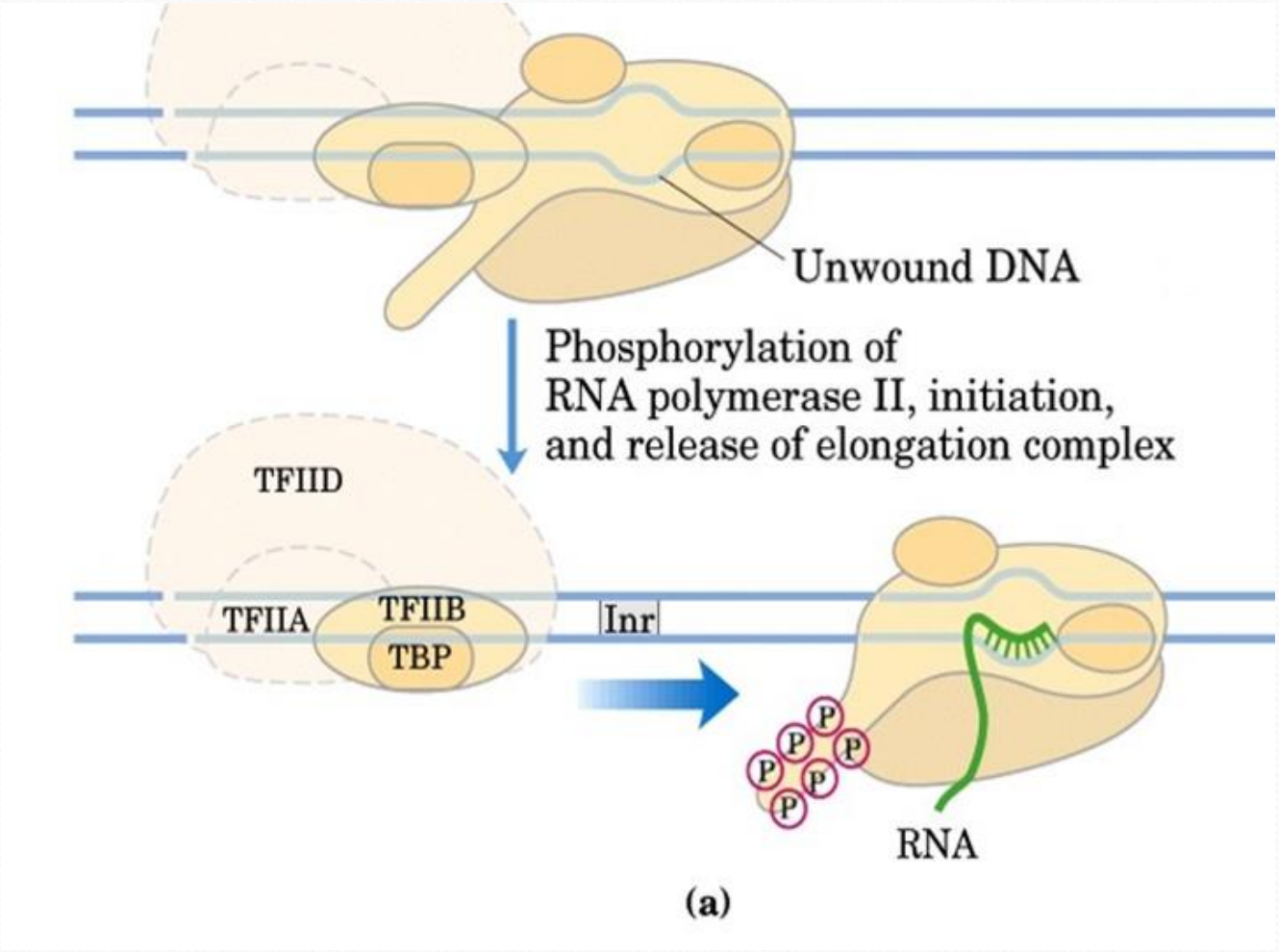


رونویسی توسط RNAپلیمراز II

(تبدیل کمپلکس بسته به کمپلکس باز)



رونویسی توسط RNAپلیمراز II
(پاکسازی پروموتر)



فاکتورهای رونویسی

تعریف:

پروتئین هایی به جز زیرواحدهای RNAپلیمراز که در آغاز، طویل سازی یا ختم رونویسی نقش دارند.

طبقه بندی:

االف: فاکتورهای کلی رونویسی

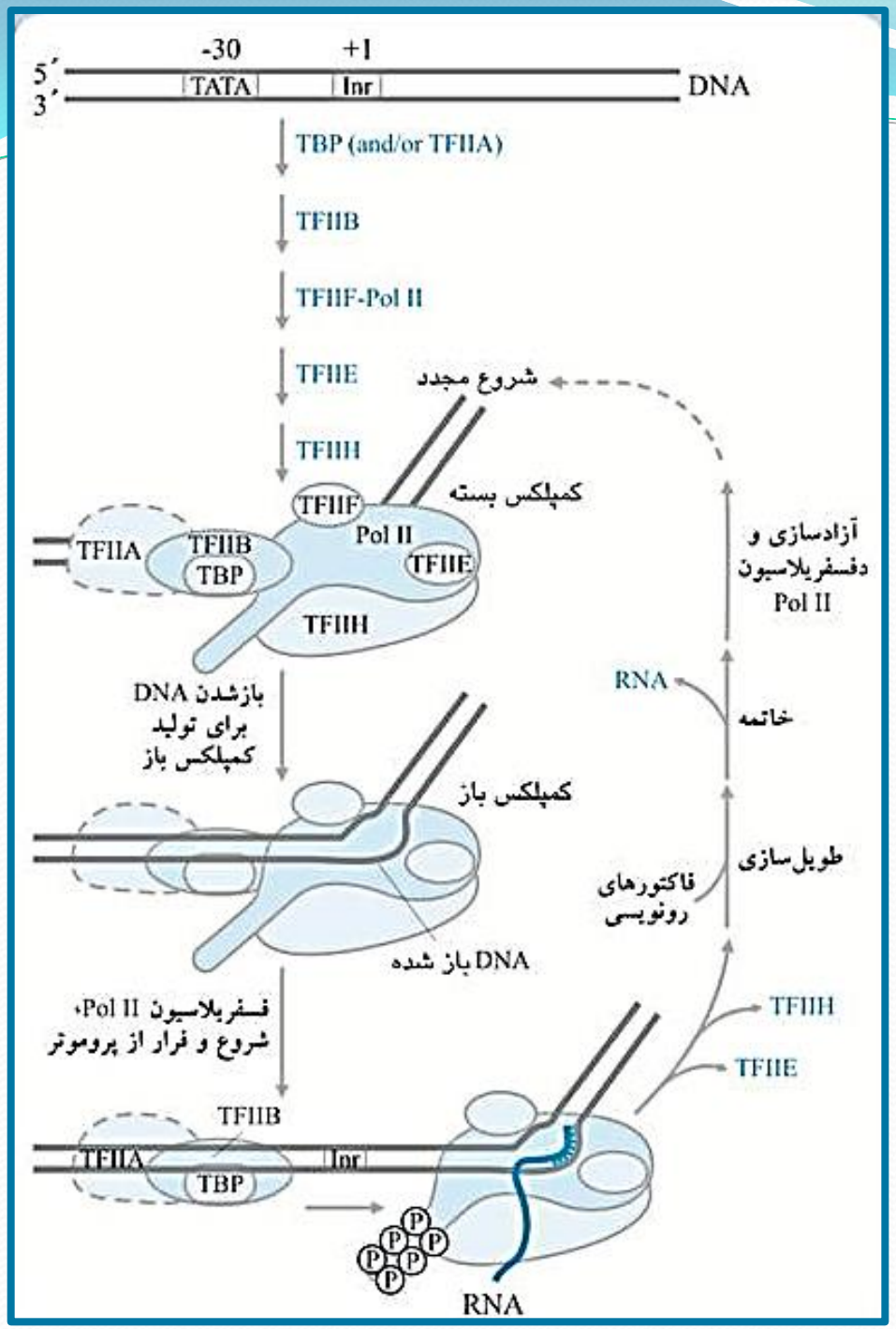
به طور کلی برای بیان ژن نیاز می باشند

برای اتصال اختصاصی RNAپلیمراز نیاز می باشند

این فاکتورها برای RNAپلیمراز II شامل TFIIA، TFIIB، TFIID و .. می باشد.

ب: فاکتورهای رونویسی اختصاصی

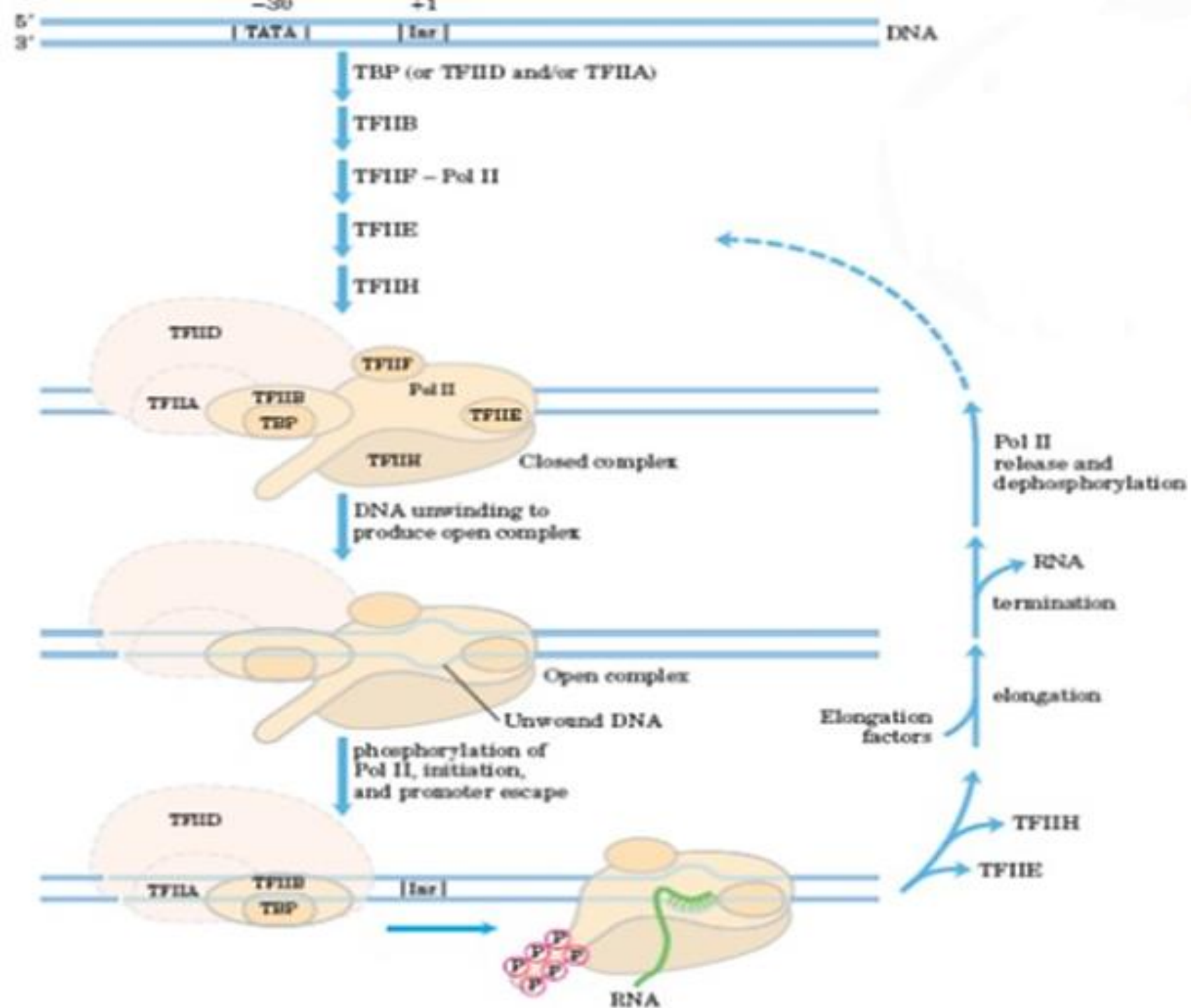
آنها برای کنترل ظریف بیان ژنهای خاص استفاده می شوند.



رونویسی توسط RNA پلیمراز II:

TFIIH خاصیت ATPase، هلیکازی و کینازی دارد. با خاصیت ATPase مارپیچ دو رشت را در محل شروع باز می کند

در مرحله طویل سازی TFIIF با PolII باقی می ماند


−30
+1
5′
3′
TATA
Inr
DNA
TBP (or TFIID and/or TFIIA)
TFIIB
TFIIF – Pol II
TFIIE
TFIIH
TFIID
TFIIF
Pol II
TFIIA
TFIIB
TBP
TFIIE
TFIIH
Closed complex
DNA unwinding to
produce open complex
Open complex
Unwound DNA
phosphorylation of
Pol II, initiation,
and promoter escape
TFIID
TFIIA
TFIIB
TBP
Inr
P
RNA
Pol II
release and
dephosphorylation
RNA
termination
elongation
Elongation
factors
TFIIH
TFIIE

پردازش mRNA پس از رونویسی

در **پروکاریوتها** mRNA پس از رونویسی **پردازش نمی شود** اما در یوکاریوتها پردازش های وسیعی بر روی یک پیش ساز بزرگ به نام روی hnRNA انجام می شود .

این تغییرات بر روی mRNA با عث خروج آن از هسته و همچنین افزایش طول عمر آن در سیتوپلاسم می شود.

این تغییرات شامل:

۱-کلاهک ′5 : گوانین تغییر یافته، جایگاه تشخیصی برای ریبوزوم.

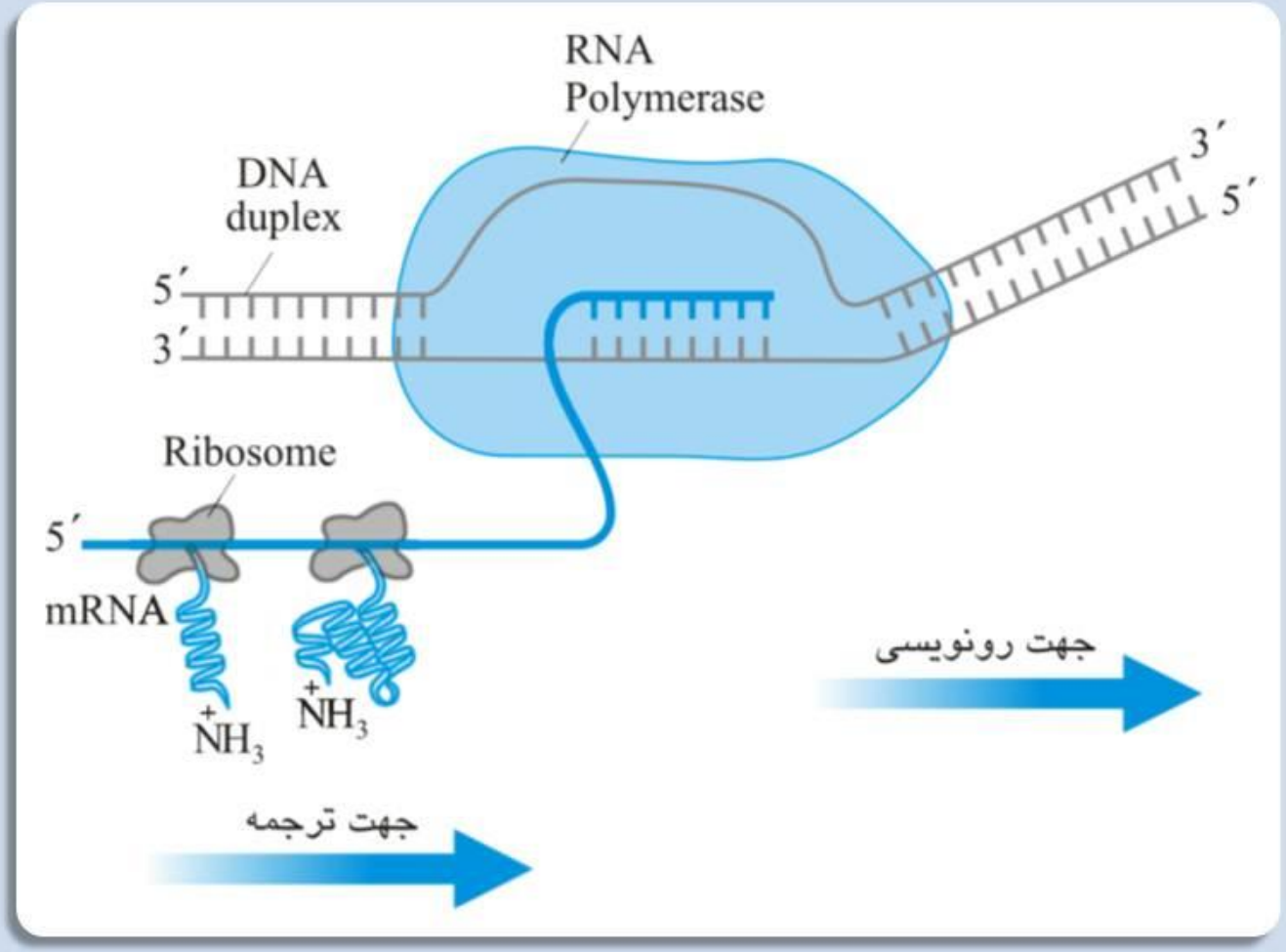
۲- دم پلی A (آدنین) در انتهای ′3

۲-پیرایش RNA (RNA Splicing): اگزونها (توالی های بیان شده) حفظ می شوند، اینترونها (تای های مداخله گر حذف می شوند.

۳- پردازش متناوب (Alternative Splicing)

۴- ویرایش RNA

عدم پردازش رونوشت mRNA در باکتری‌ها



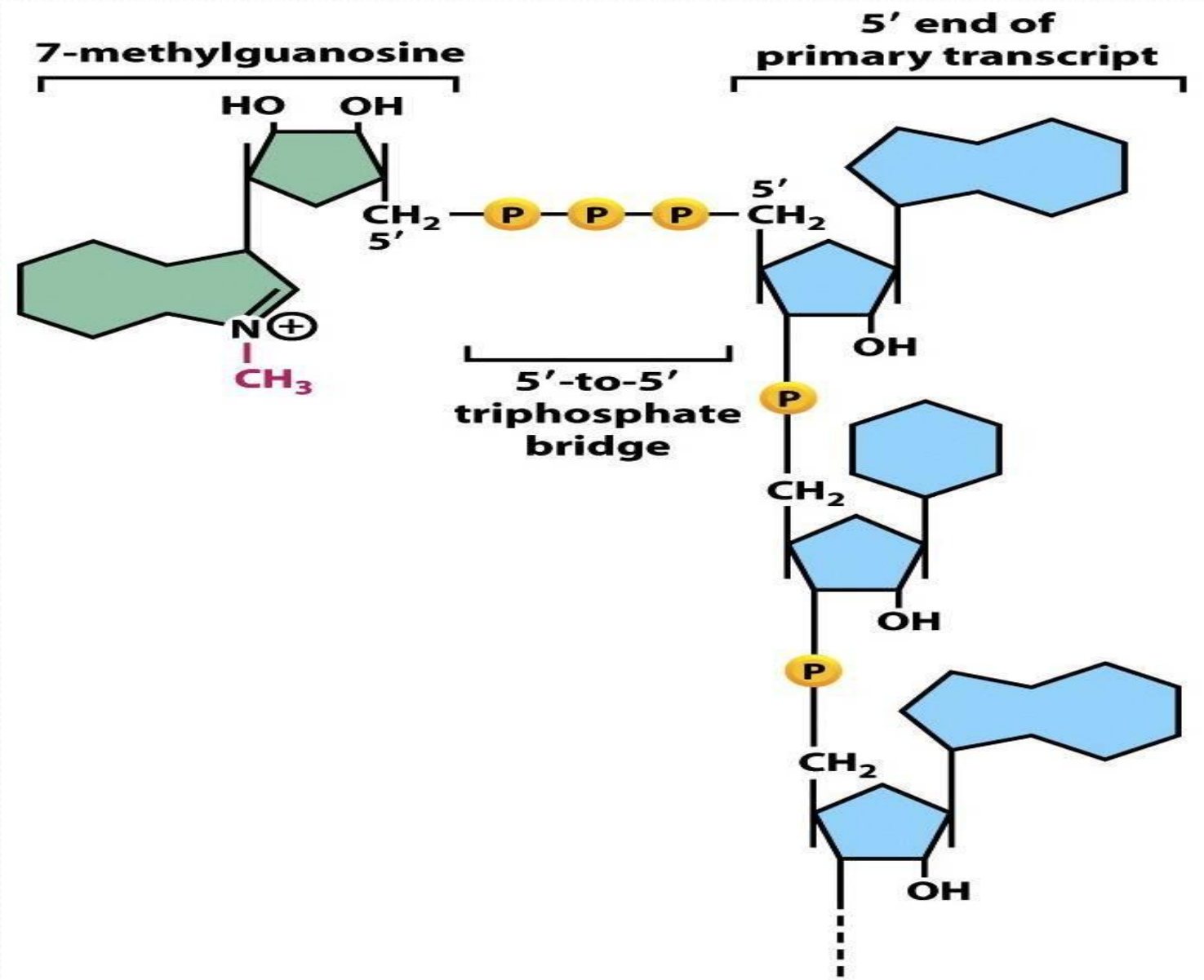
۱-کلاهک ´5

- **کلاهک:**
- انتهای ´۵ mRNAپروکاریوتها یک PPPG یا PPPA بدون تغییر
- انتهای ´۵ mRNA یوکاریوتها ساختار کلاهک وجود دارد

- **ساختار:** ۷-متیل گوانیلات با اتصال ´۵ به ´۵ تری فسفات

- **وظایف کلاهک:** ۱-کارایی بیشتر ترجمه
- ۲- محافظت از انتهای ´۵ mRNA در مقابل ریبونوکلئازها

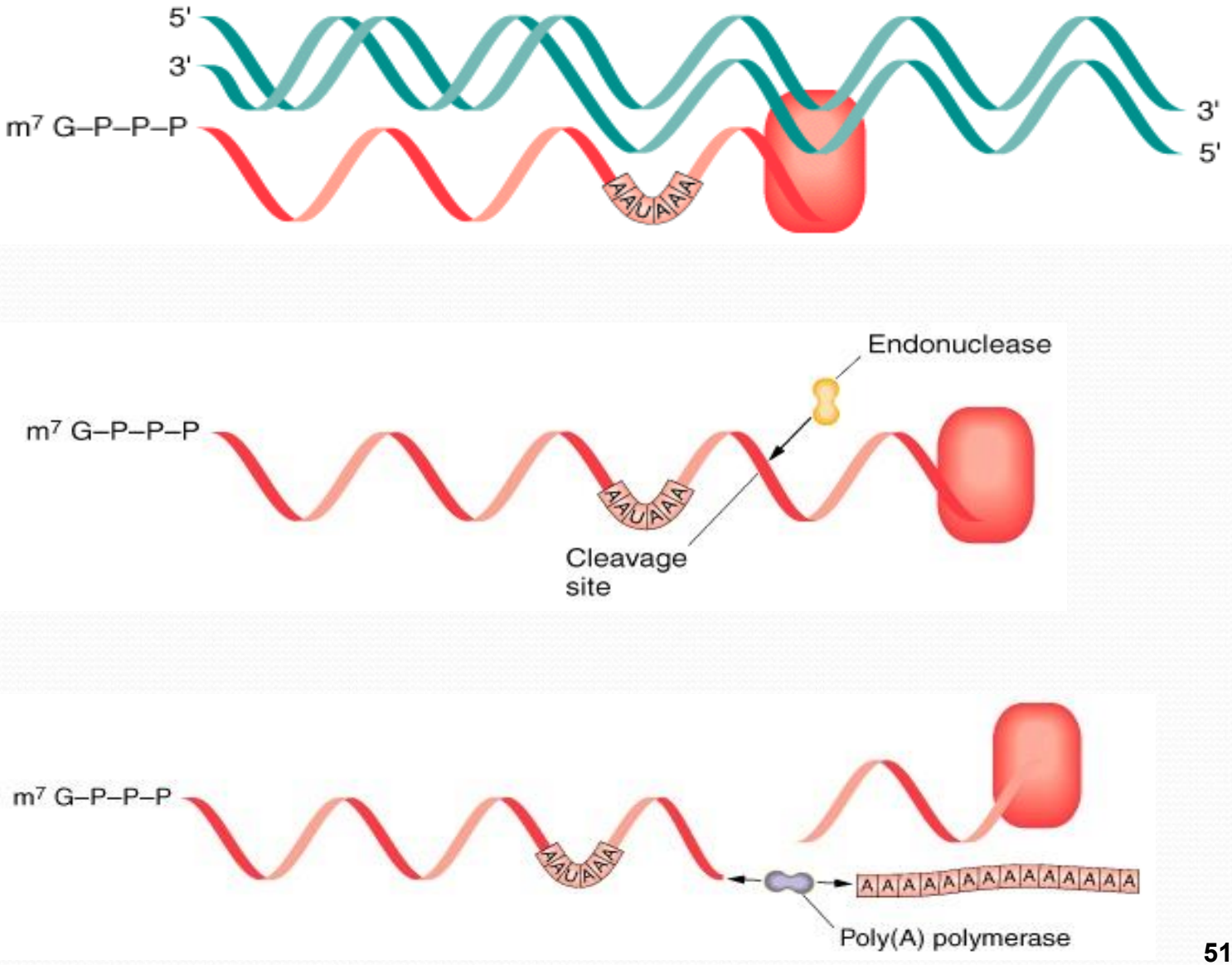
ساختار کلاهک

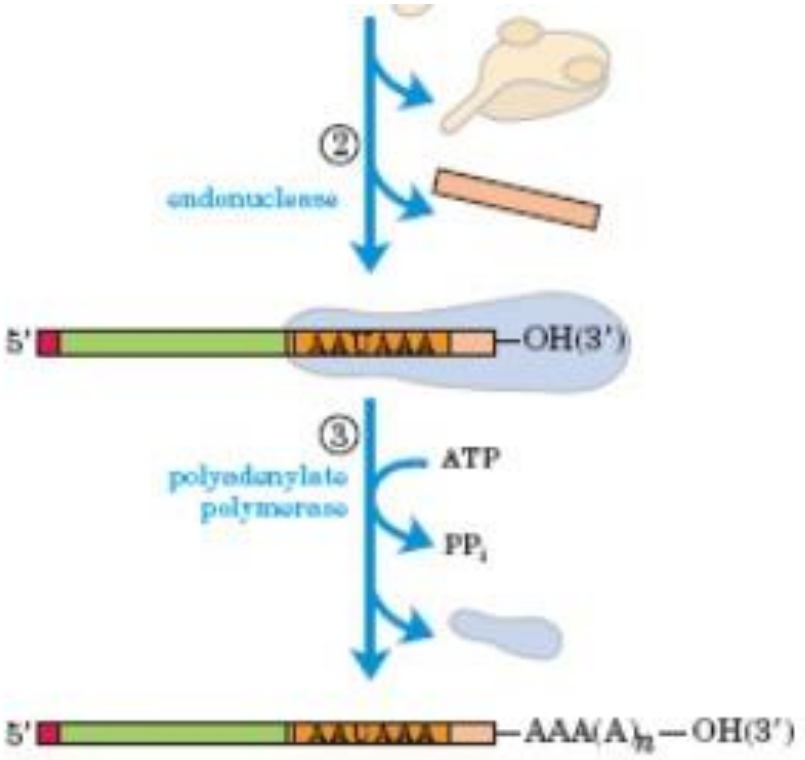


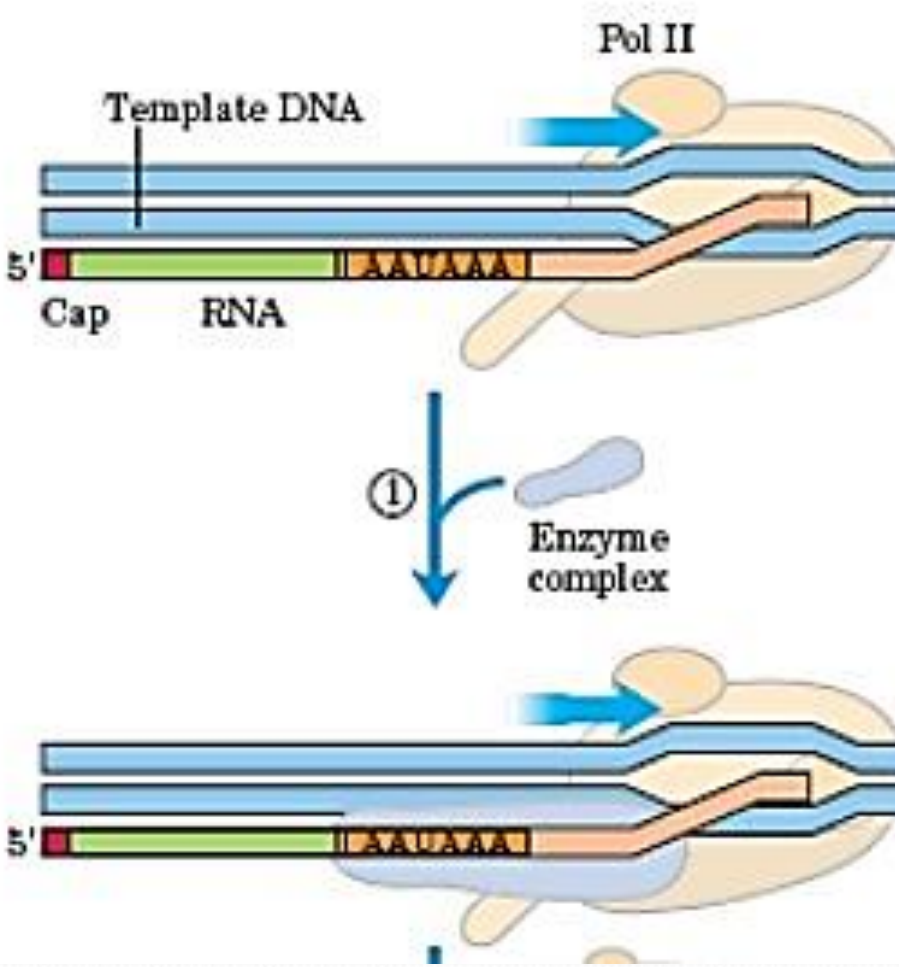
پلی آدنیله شدن

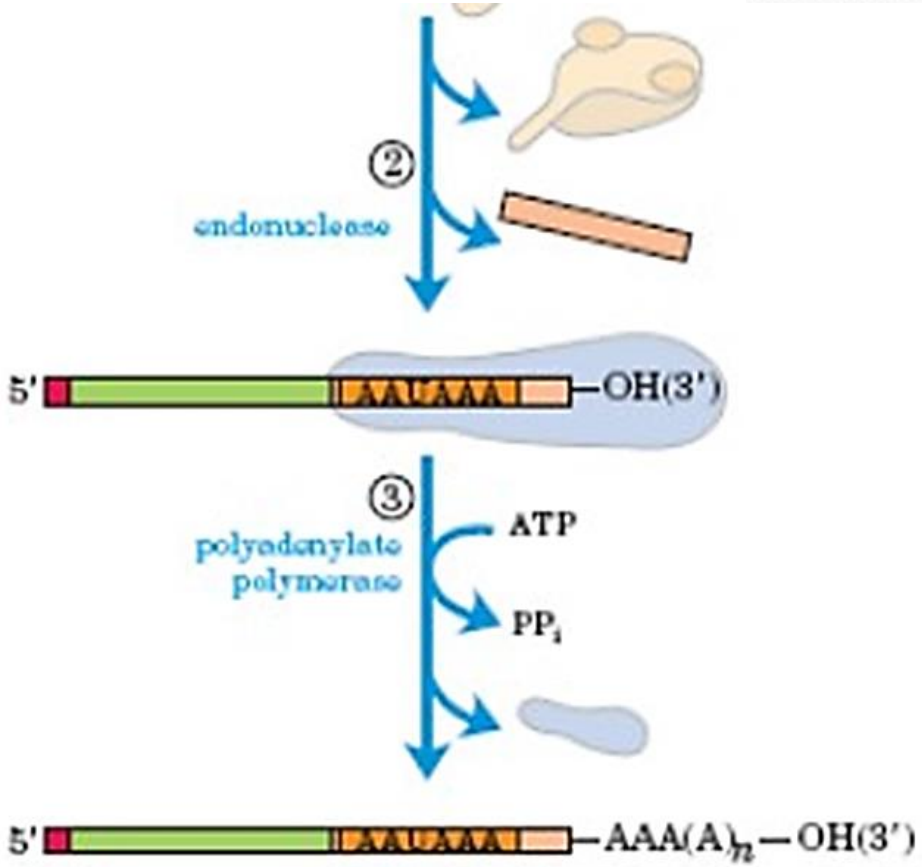
- **ساختار:** پلیمری از ۲۰۰ تا ۳۰۰ نوکلئوتید آدنیلات که با پیوند فسفودی استر بهم متصلند.
- **تشکیل:** غیر وابسته به الگوی DNA
- علامت محل پلی آدنیله شدن در درون RNA قرار دارد.
- پایان رونویسی در پایین دست محل پلی آدنیله شدن
- محل پلی آدنیلاسیون توسط مجموعه ای از پروتئین ها شناسایی شده و برش اندونوکلئولیتیک را سبب می شوند.
- آنزیم پلی A پلیمراز پلیمریزاسیون واحدهای آدنیلات را به انتهای آزاد ´۳ محل برش کاتالیز می کند.
- وظیفه: پایداری mRNA

پایان رونویسی RNA پلیمراز II/ پلی آدنیلاسیون

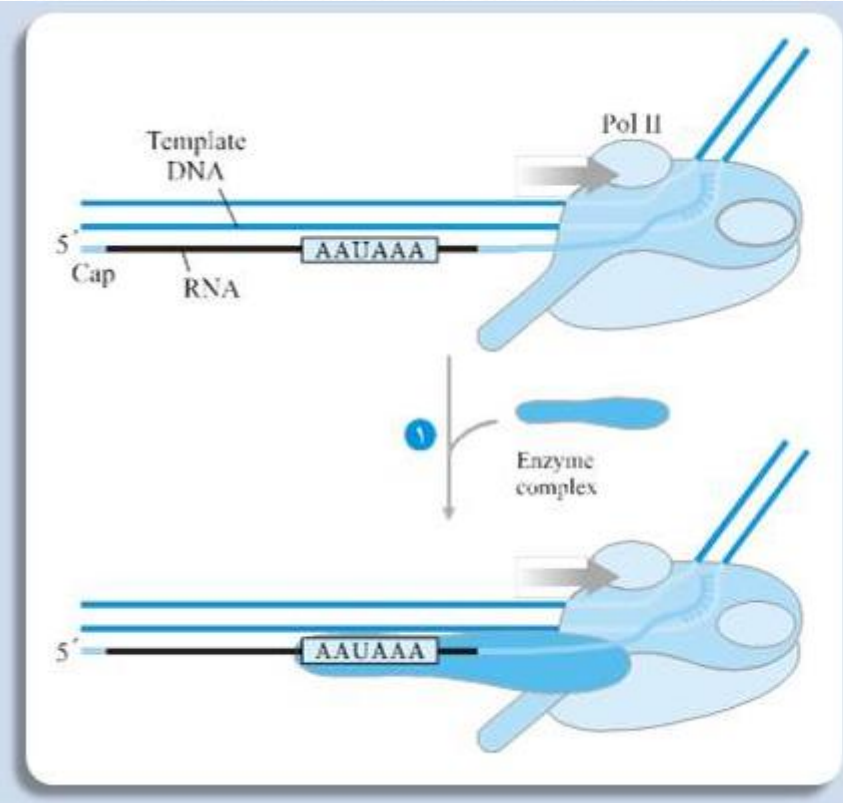


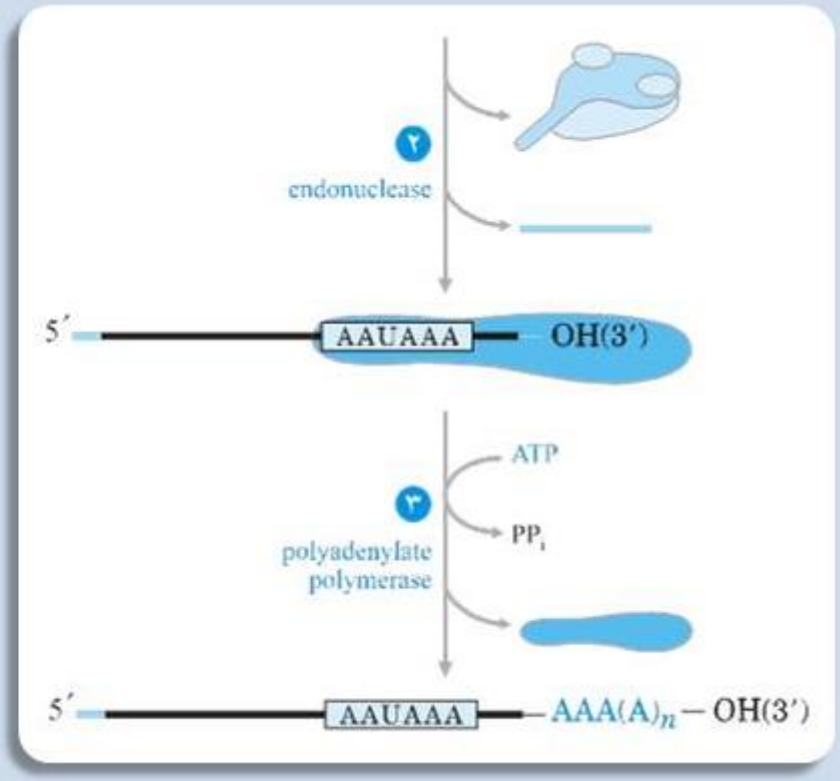

②
endonuclease
5'
AAUAAA
OH(3')
③
polyadenylate
polymerase
ATP
PPi
5'
AAUAAA
AAA(A)n
OH(3')

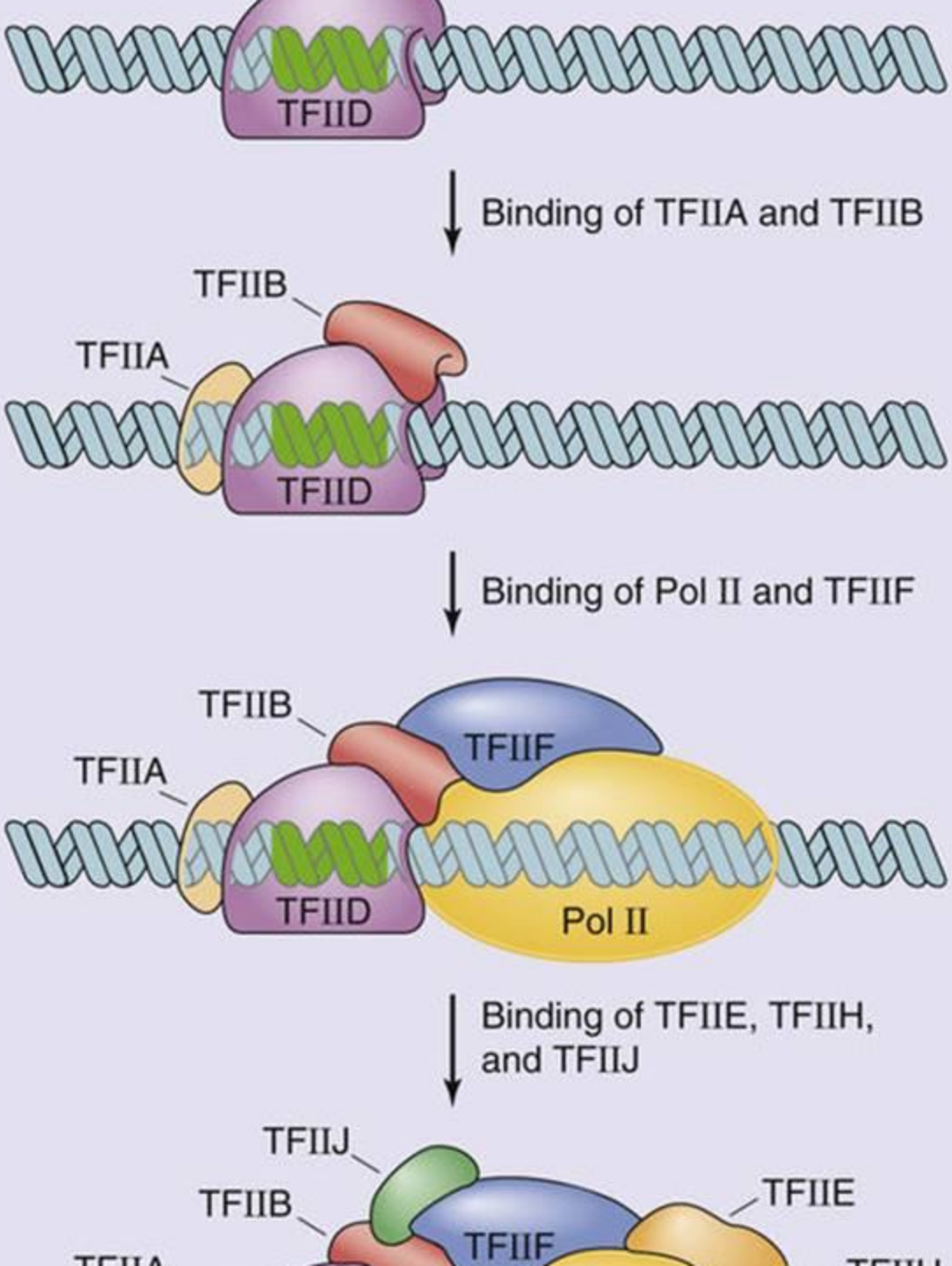

Pol II
Template DNA
5'
AAUAAA
Cap
RNA
①
Enzyme
complex
5'
AAUAAA


②
endonuclease
5'
AAUAAA
OH(3')
③
polyadenylate
polymerase
ATP
PPi
5'
AAUAAA
AAA(A)n—OH(3')

پلی آدنیله شدن






TFIID
Binding of TFIIA and TFIIB
TFIIB
TFIIA
TFIID
Binding of Pol II and TFIIF
TFIIB
TFIIF
TFIIA
TFIID
Pol II
Binding of TFIIE, TFIIH, and TFIIJ
TFIIJ
TFIIB
TFIIE
TFIIF

Poly A Tail

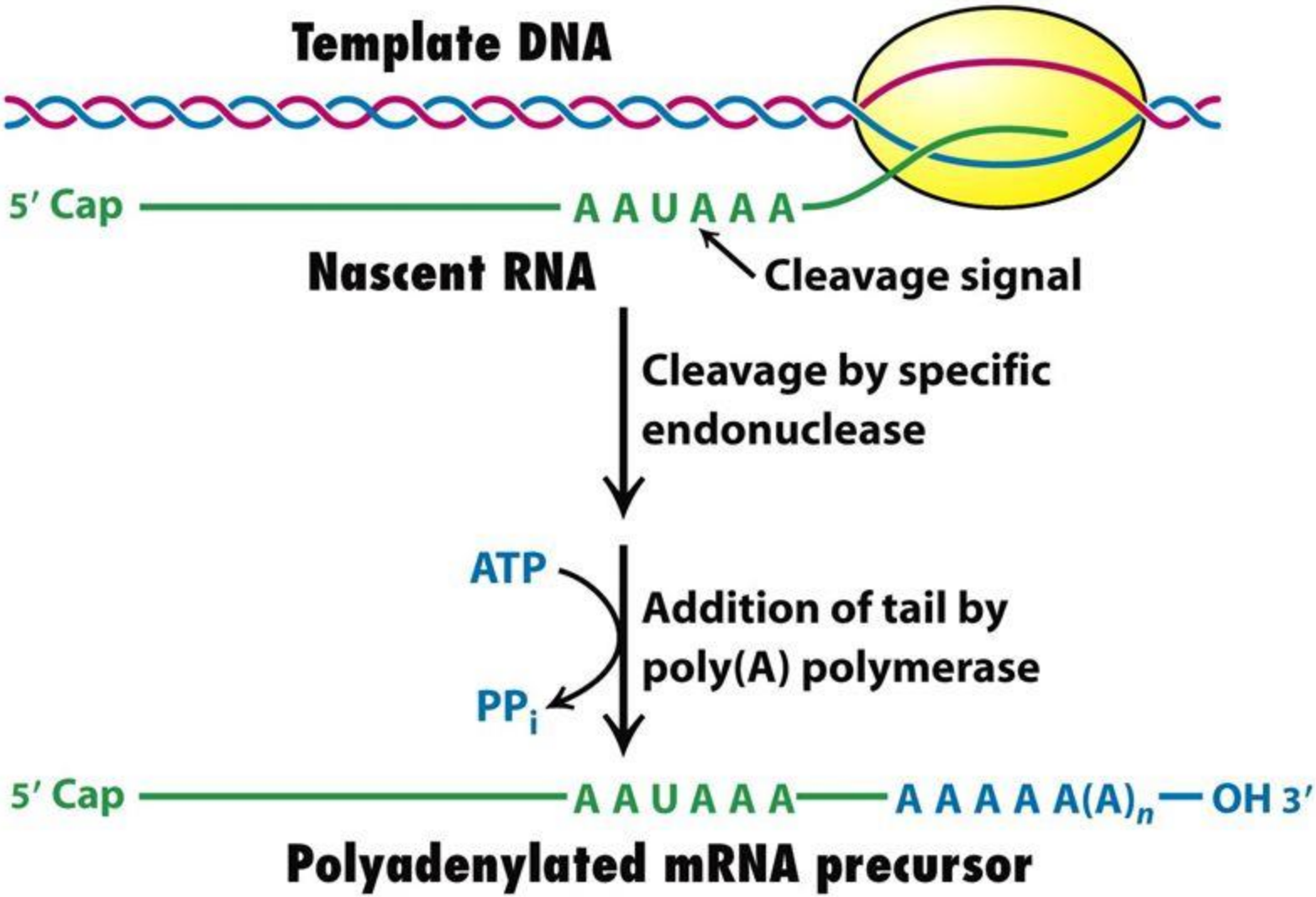
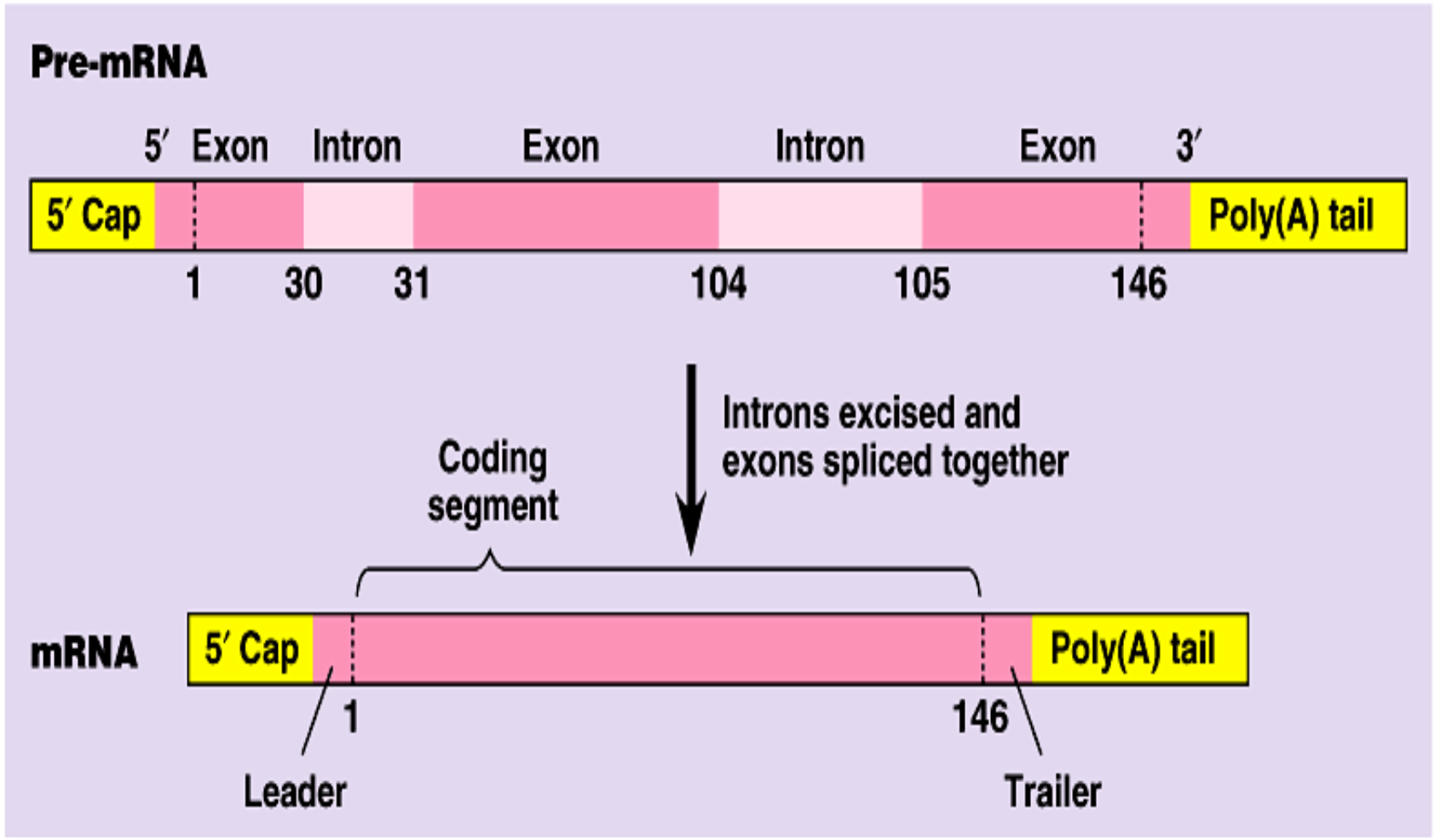


Figure 29-27
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W.H. Freeman and Company

پردازش mRNA پس از رونویسی



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

مکانیسم پیرایش RNA

- توالی های حفظ شده ای در محل اتصال اگزون و اینترون و داخل اینترونها وجود دارد
- تمامی اینترونهای hnRNA توالی GU در سمت ′5 و AG در سمت ′۳ دارند
- درون اینترونها یک توالی حفظ شده به نام محل انشعاب می باشد.

مکانیسم:

۱- self splicing

۲- وابسته به snRNP

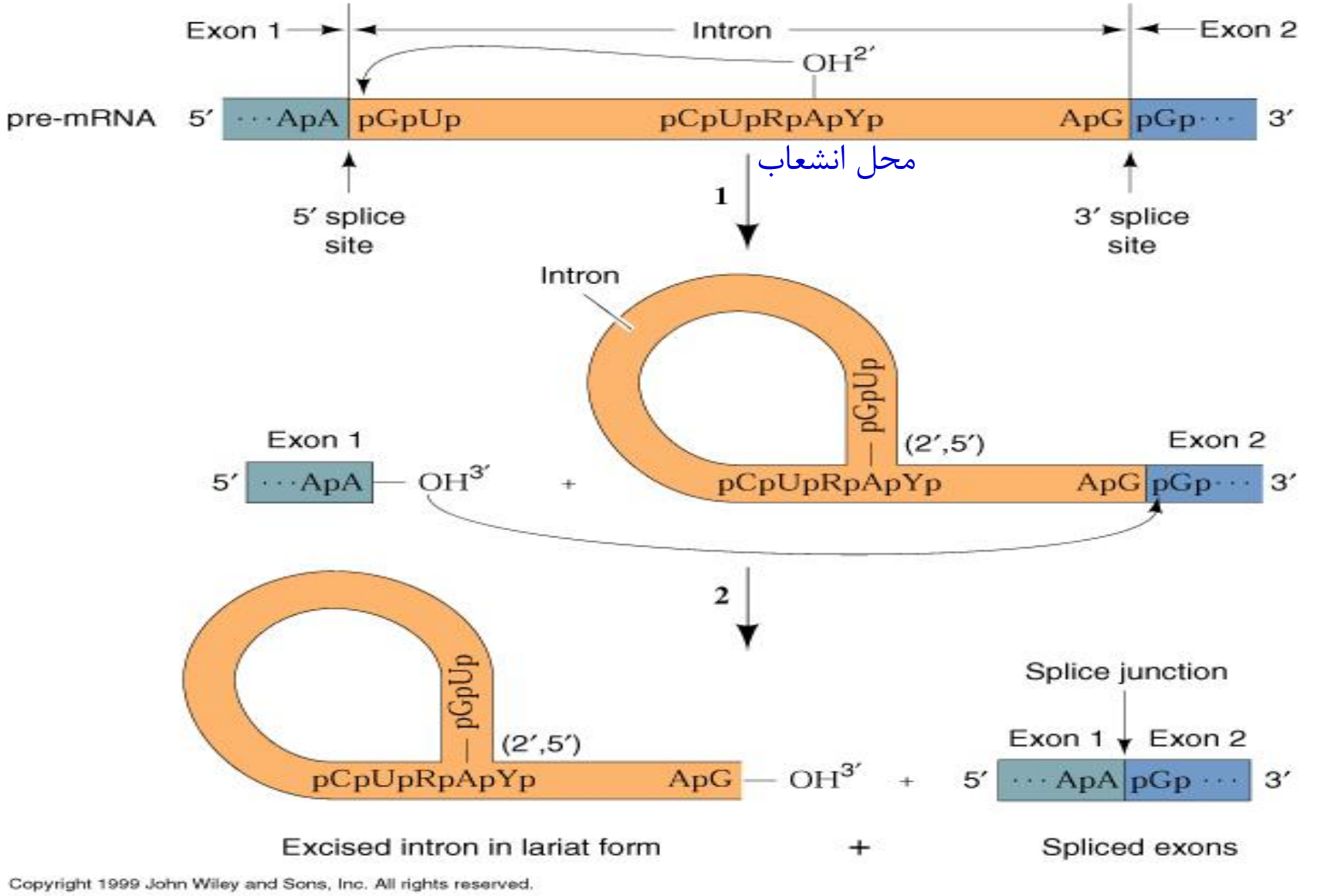
مکانیسم پیرایش RNA
(بدون نیاز به snRNA ها)

۱- OH2′ آدنوزین در محل انشعاب (Branch site) حمله نوکلئوفیلی به گوانیلات محل اتصال اینترون/ اگزون در سمت ۵′ می کند.

۲- بعد از اتصال بین این دو نقطه ساختار شلاقی مانندی شکل می گیرد

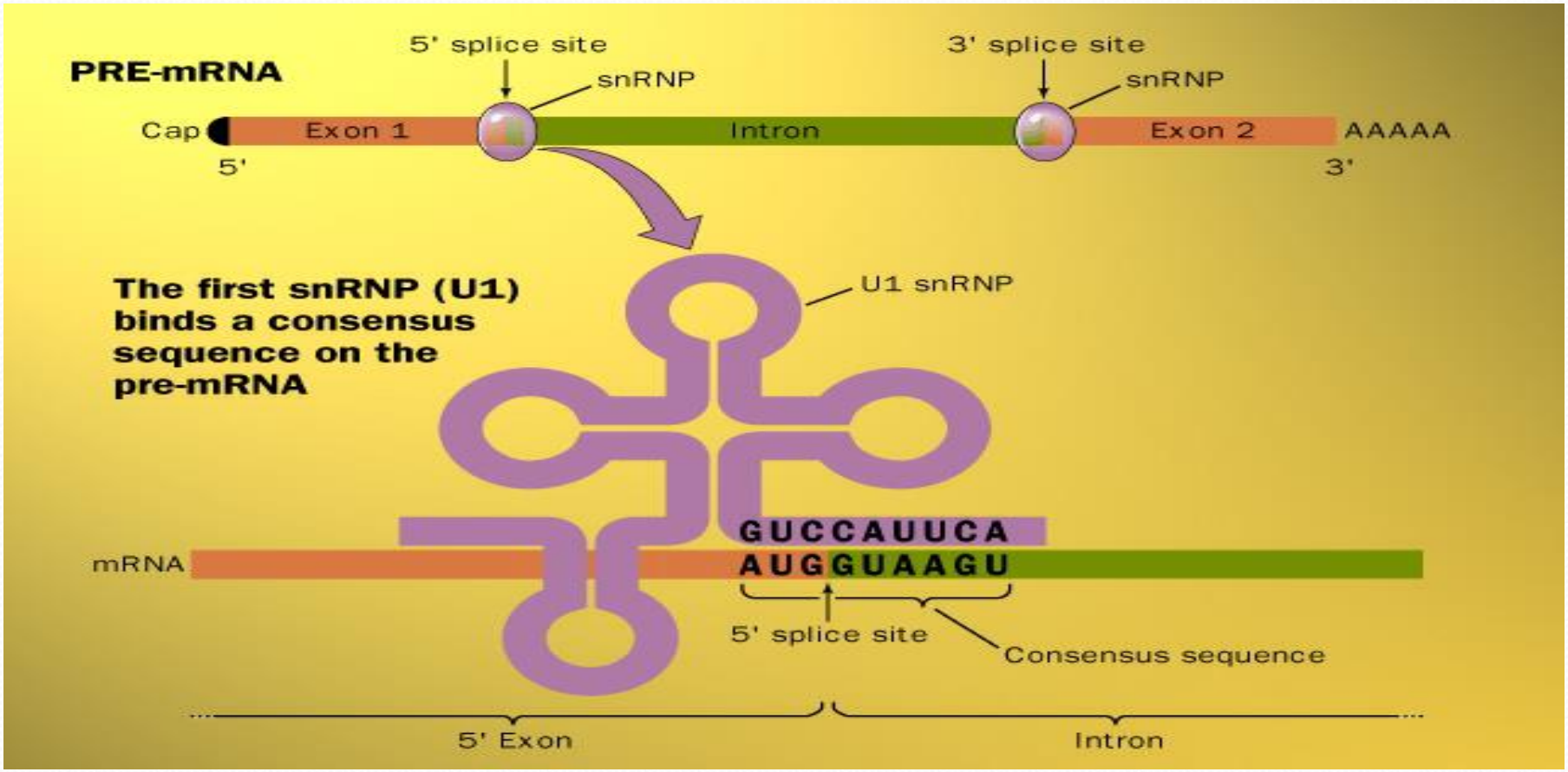
۳- OH3′ اگزون سمت ۵′ حمله نوکلئوفیلی به گوانیلات محل اتصال اینترون/ اگزون در سمت ۵′ می کند و واکنش تکمیل می شود.

مکانیسم پیرایش RNA
(بدون نیاز به snRNA ها)



Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.

مکانیسم پیرایش RNA
(وابسته به snRNA ها)



سموم و آنتی بیوتیکهایی که رونویسی را مهار می کنند

اکتینومایسین D: بین دو رشته DNA قرار می گیرد و مانع رونویسی از الگو می شود.

ریفامیسین D (ریفامپین): زیرواحد بتا RNAP را مهار می کند.

ریسین (Ricin): سمی که RNAP را در یوکاریوتها مهار می کند.

آمانیتین (Amanitin): سمی در قارچ که RNAP را در یوکاریوتها مهار می کند.

)