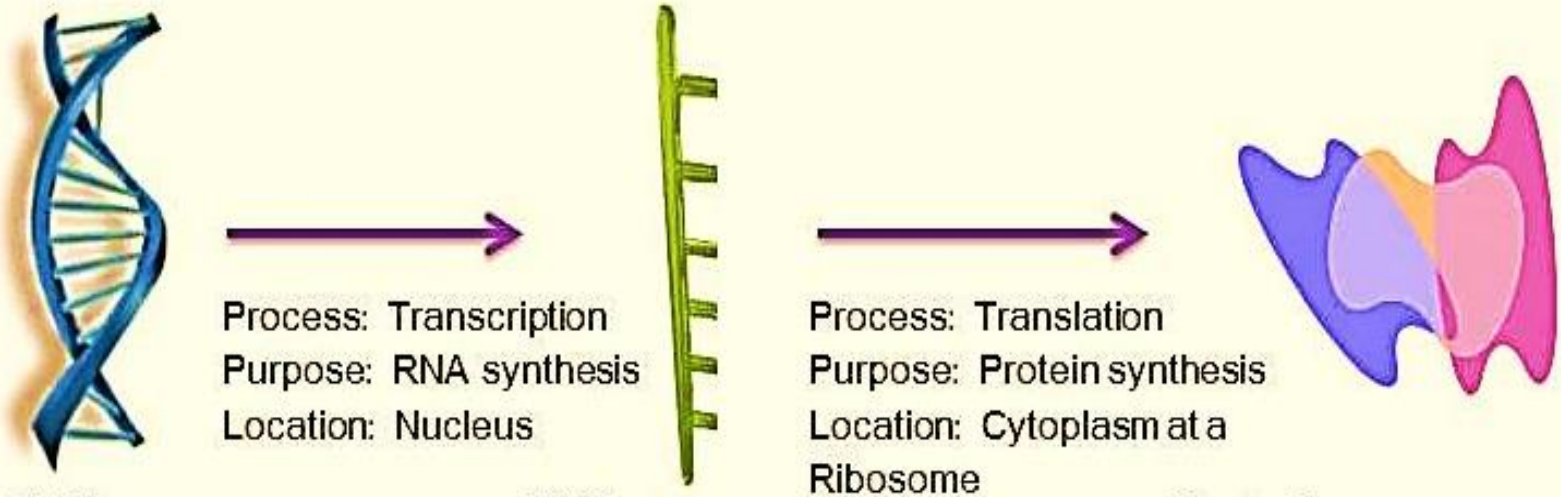
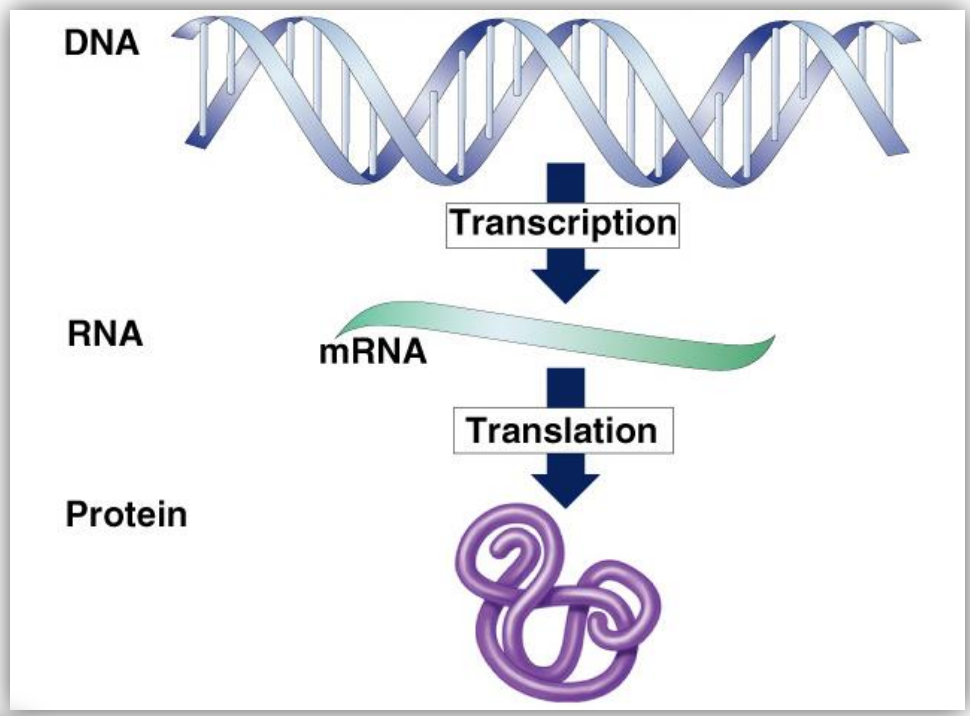
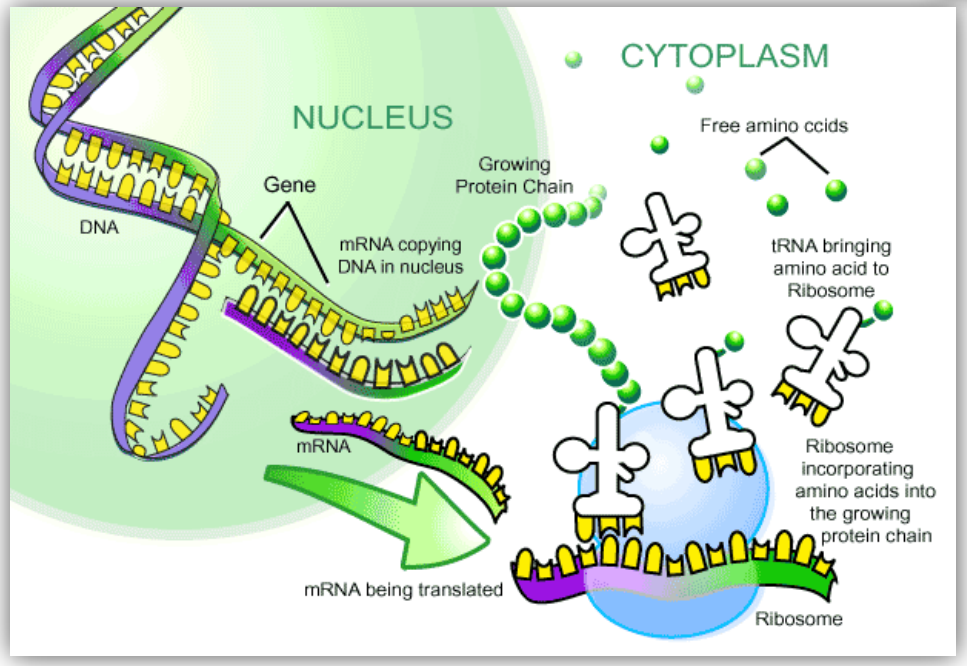
The Central Dogma



DNA contains the original codes for making the proteins that living cells need. mRNA is a copy of a gene located on the DNA molecule. mRNA will leave the nucleus of the cell and the ribosome will read its coding sequences and put the appropriate amino acids together.

FROM GENE





TO PROTEIN

Metabolism Teaches us about Genes

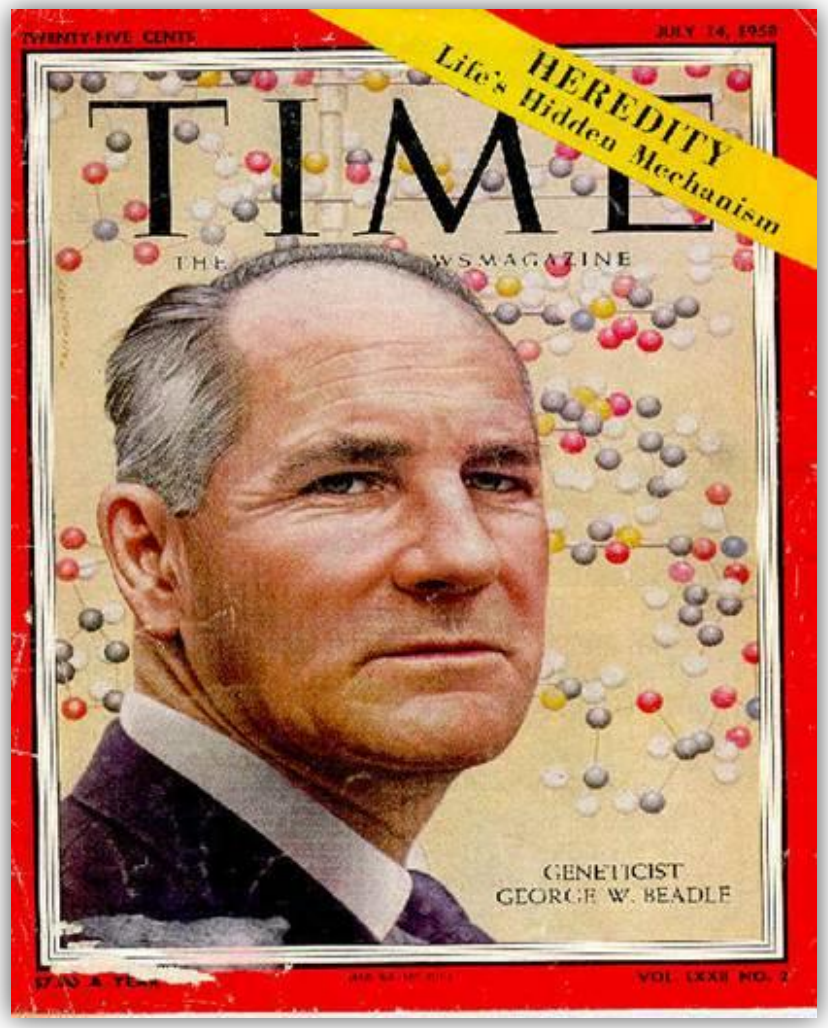
- Metabolic defects
  - studying metabolic diseases suggested that genes specified proteins
    - alkaptonuria (black urine from alkapton)
    - PKU (phenylketonuria)
  - each disease is caused by non-functional enzyme

1 GENE – 1 ENZYME HYPOTHESIS

- **Beadle & Tatum**
  - Compared mutants of bread mold, Neurospora fungus
    - created mutations by X-ray treatments
      - X-rays break DNA
      - inactivate a gene
    - wild type grows on "minimal" media
      - sugars + required precursor nutrient to synthesize essential amino acids
    - mutants require added amino acids
      - each type of mutant lacks a certain enzyme needed to produce a certain amino acid
      - non-functional enzyme = broken gene

Beadle & Tatum

1941 | 1958



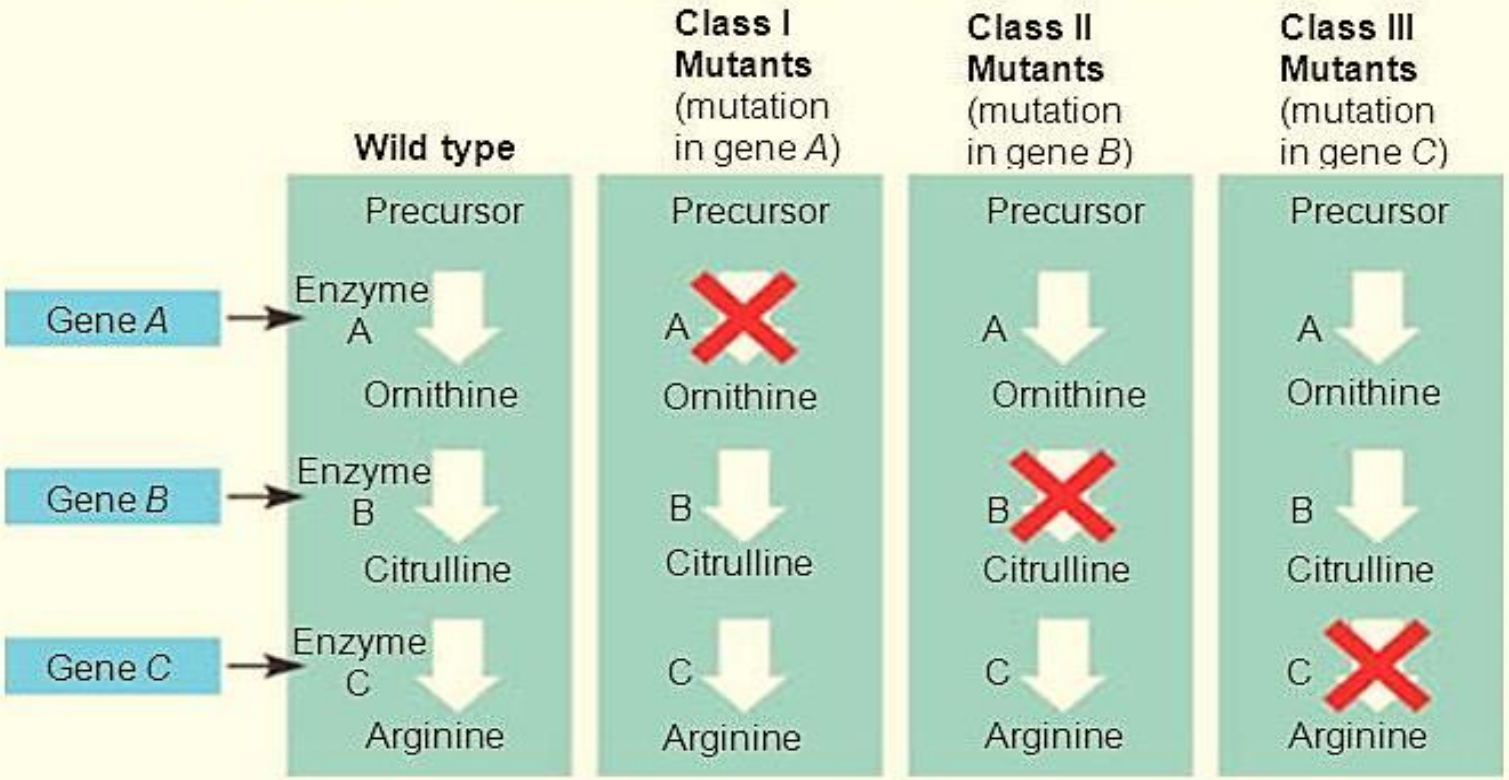
George Beadle

Edward Tatum

Beadle & Tatum's Experiment: Conclusions

CONCLuSION

Because each of their mutants was mutated in a single gene, Beadle & Tatum concluded that <u>each mutated gene</u> must normally dictate the production of <u>one enzyme</u>. (Notice that a mutant can grow only if supplied with a compound made *after* the defective step.)



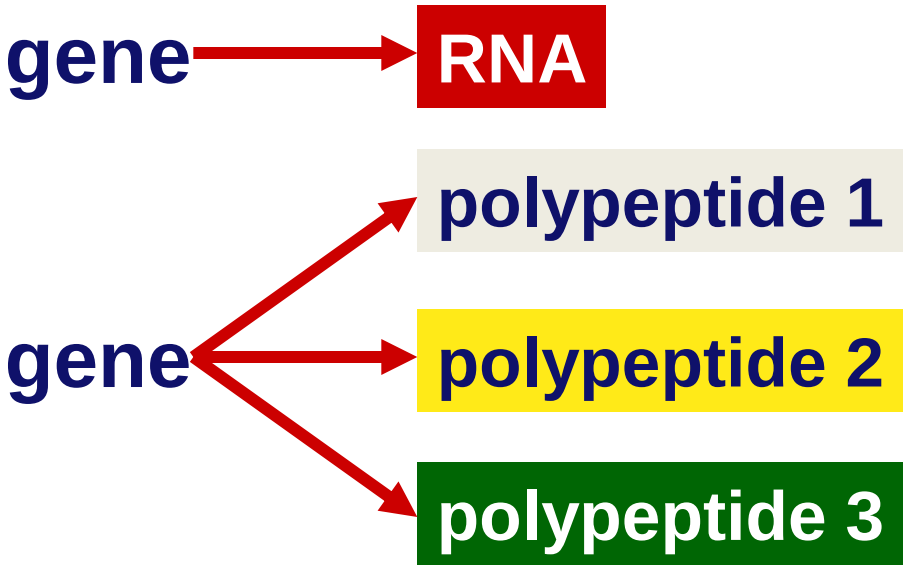
So… What is a gene?

- ONE GENE ONE ENZYME
  - but not all proteins are enzymes
  - but all proteins are coded by genes
- ONE GENE ONE PROTEIN
  - but many proteins are composed of several polypeptides
  - but each polypeptide has its own gene
- ONE GENE ONE POLYPEPTIDE
  - but many genes only code for RNA
- ONE GENE ONE PRODUCT
  - but many genes code for <u>more</u> than one product …

Defining a gene…

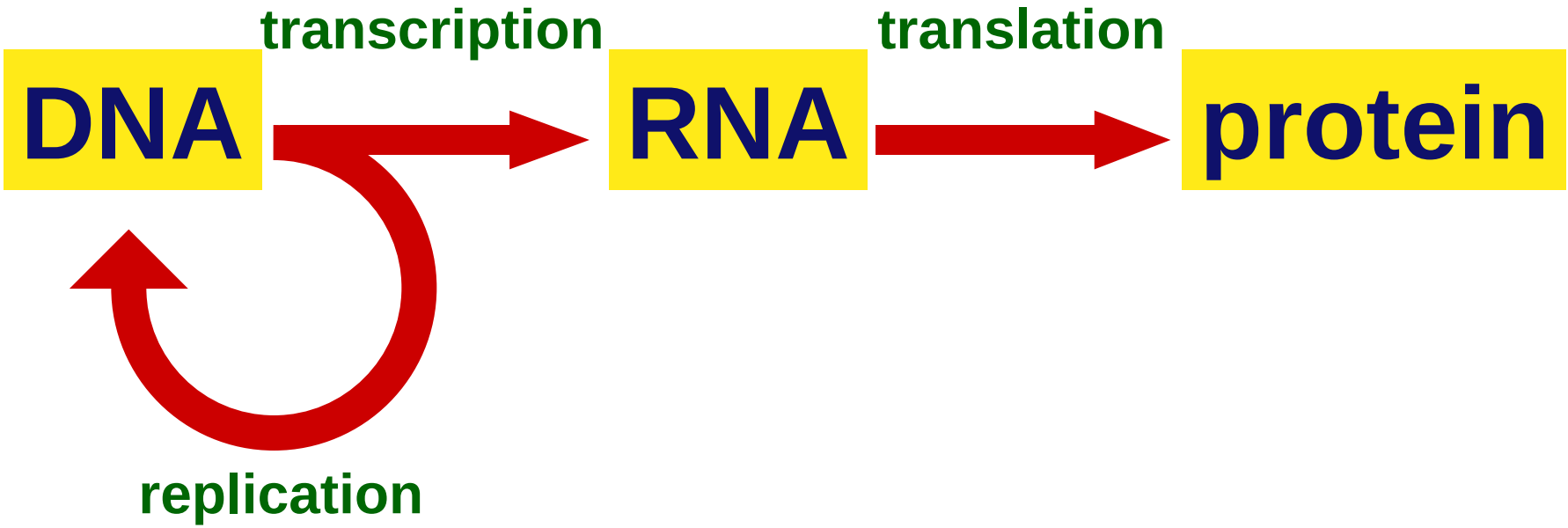
"Defining a gene is problematic because… one gene can code for several protein products, some genes code only for RNA, two genes can overlap, and there are many other complications."

– Elizabeth Pennisi, Science 2003



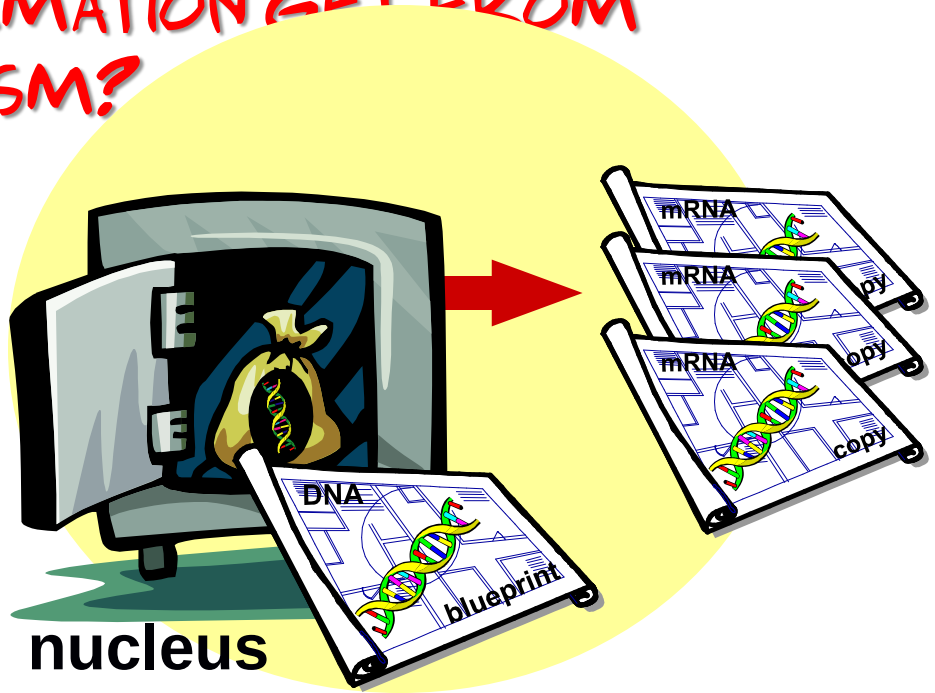
The “Central Dogma”

How do we move information from DNA to proteins?



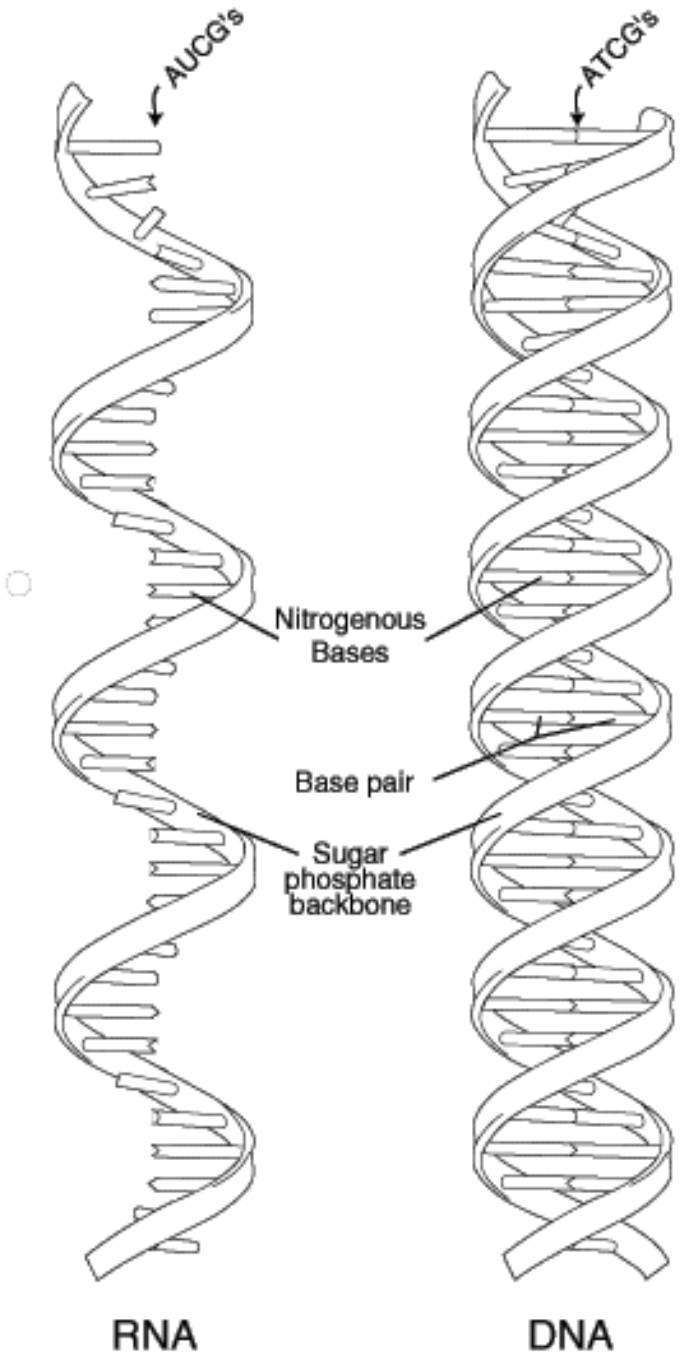
From nucleus to cytoplasm…

- WHERE ARE THE GENES?
  - genes are on chromosomes in nucleus
- WHERE ARE PROTEINS SYNTHESIZED?
  - proteins made in cytoplasm by ribosomes
- HOW DOES THE INFORMATION GET FROM NUCLEUS TO CYTOPLASM?
  - messenger RNA



RNA

- ribose sugar
- N-bases
  - uracil instead of thymine
  - U : A
  - C : G
- single stranded
- mRNA, rRNA, tRNA, siRNA….



DNA → **RNA**

transcription

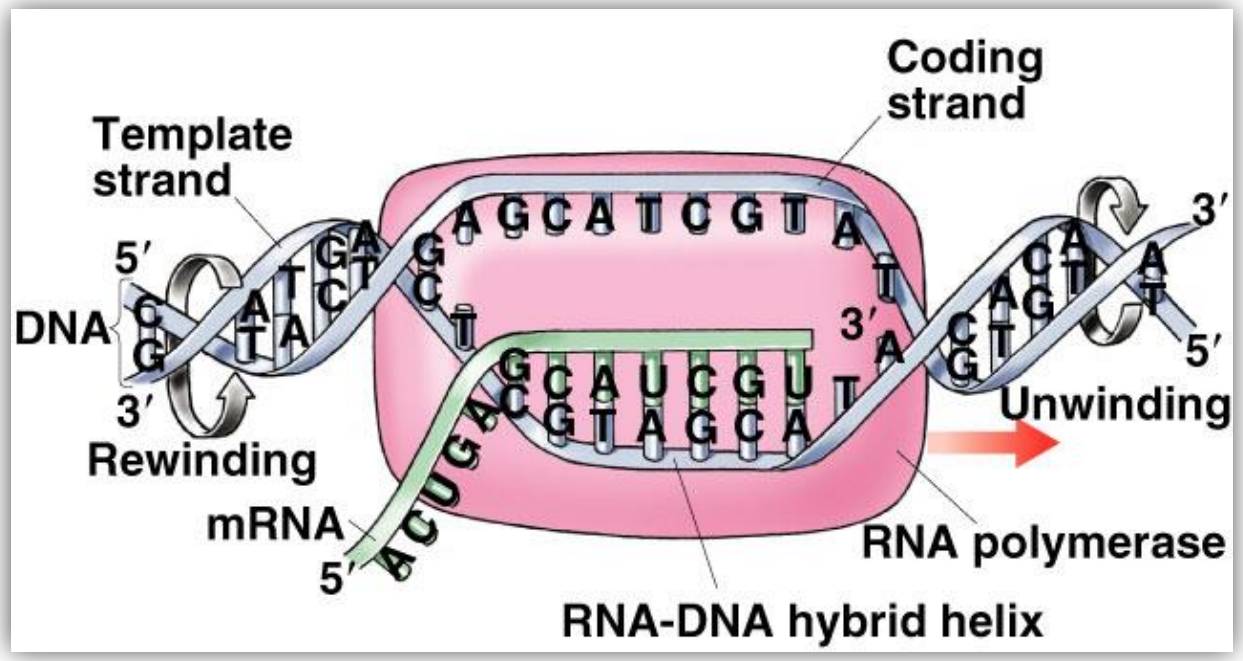
2005-2006

TRANSCRIPTION

- 5' to 3' direction
- Sense Strand (coding)
  - Same base sequence as mRNA
  - Uracil instead of Thymine
- Antisense strand (template)
  - Transcribed

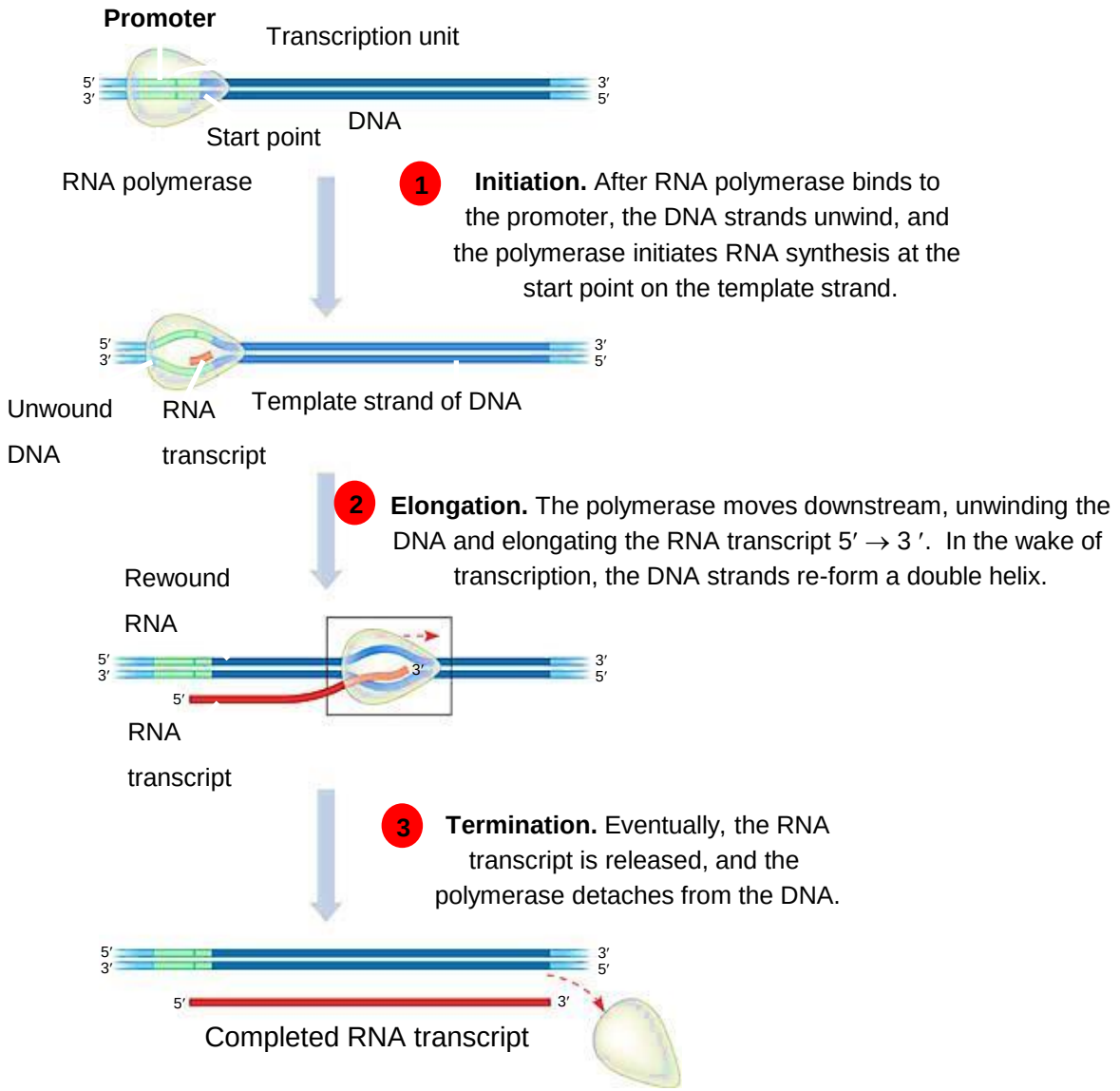
TRANSCRIPTION

- Transcribed DNA strand = template strand
  - untranscribed DNA strand = coding strand
- Synthesis of complementary RNA strand
  - transcription bubble
- Enzyme
  - RNA polymerase



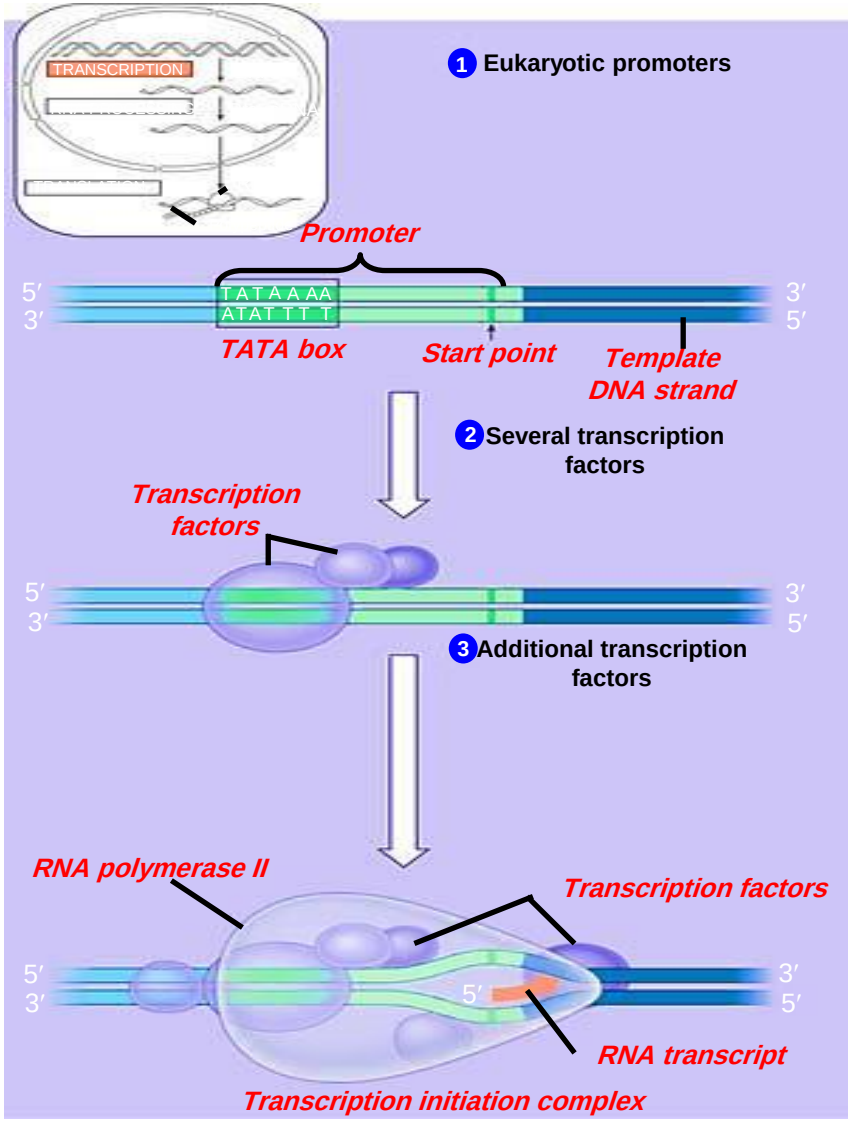
Synthesis Of an RNA Transcript

- *The stages of transcription are*
  - *Initiation*
  - *Elongation*
  - *Termination*



TRANSCRIPTION IN PROKARYOTES

- ***Initiation***
  - RNA polymerase binds to promoter sequence on DNA



ROLE OF PROMOTER

1. *Where to start reading*

= starting point

2. Which strand to read

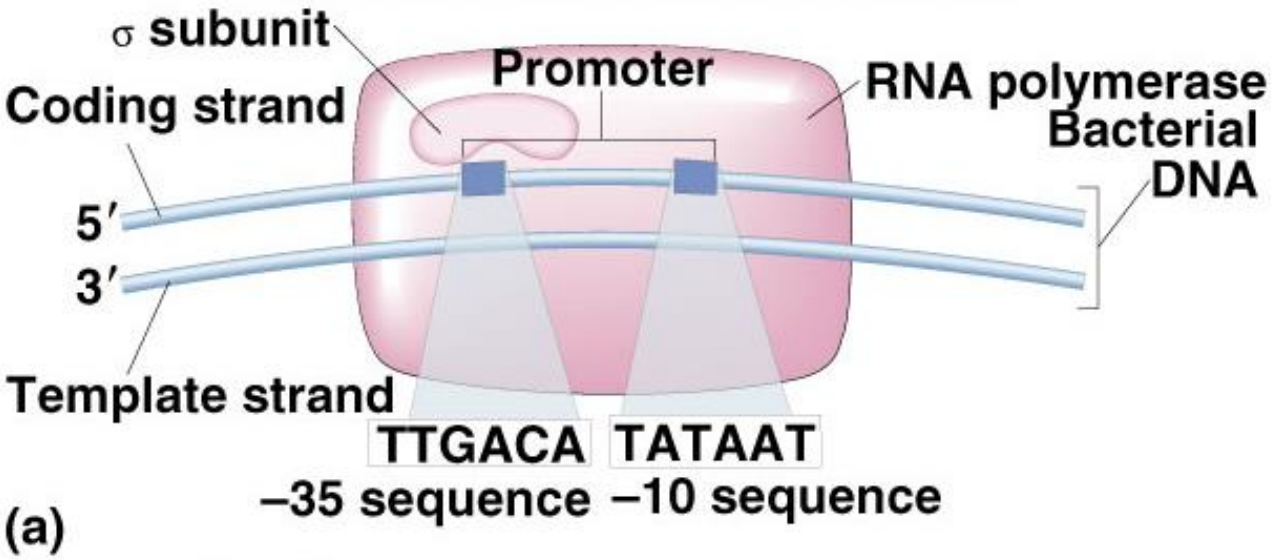
= template strand

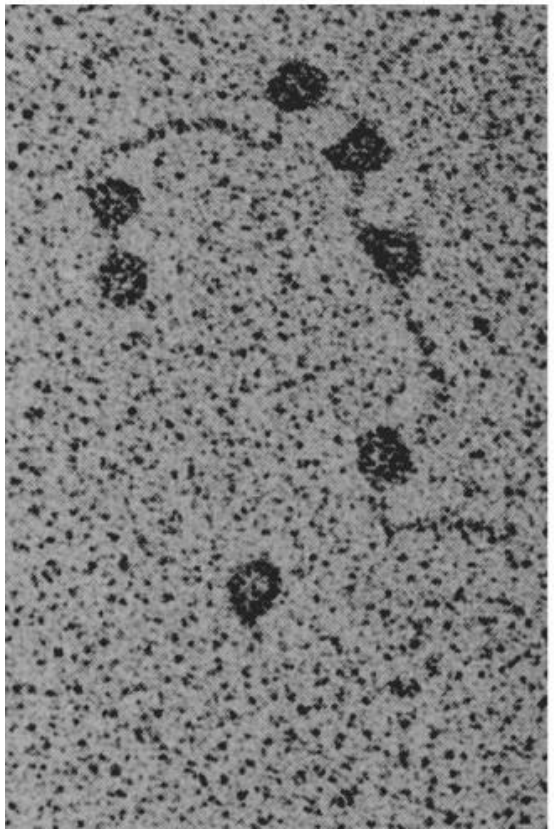
3. Direction on DNA

= always reads DNA 3'→5'

Transcription in Prokaryotes

- Promoter sequences





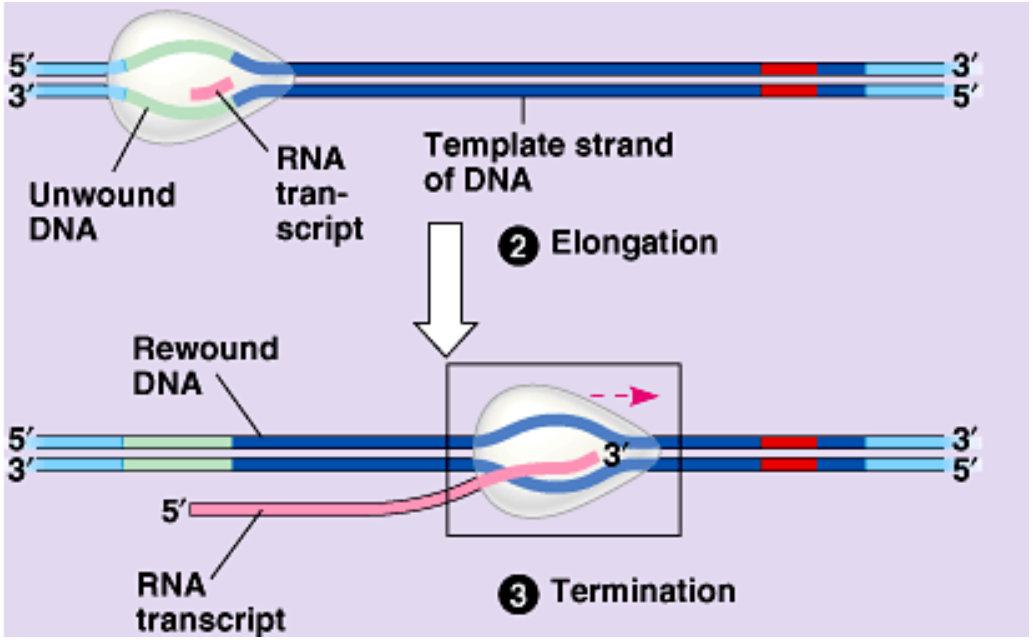
RNA polymerase molecules bound to bacterial DNA

Transcription in Prokaryotes

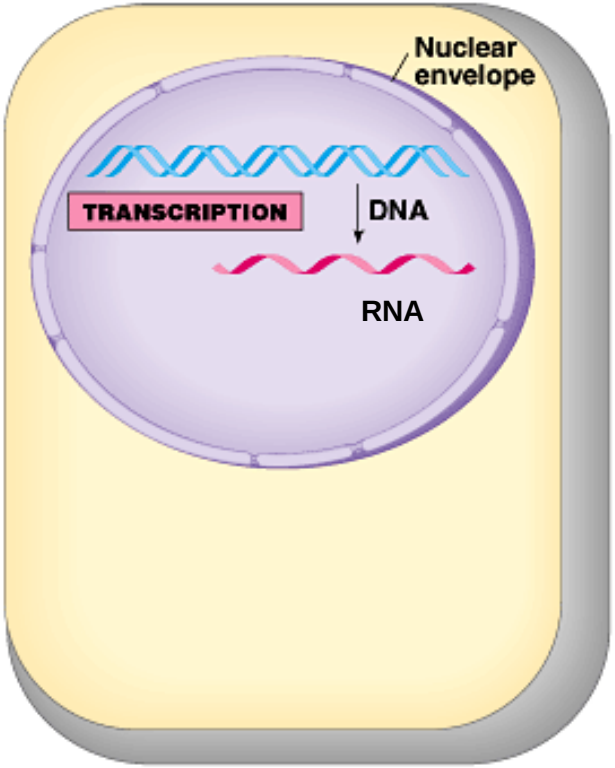
- ***Elongation***
  - RNA polymerase unwinds DNA
    ~20 base pairs at a time
  - reads DNA 3'→5'
  - builds RNA 5'→3' (the energy governs the synthesis!)

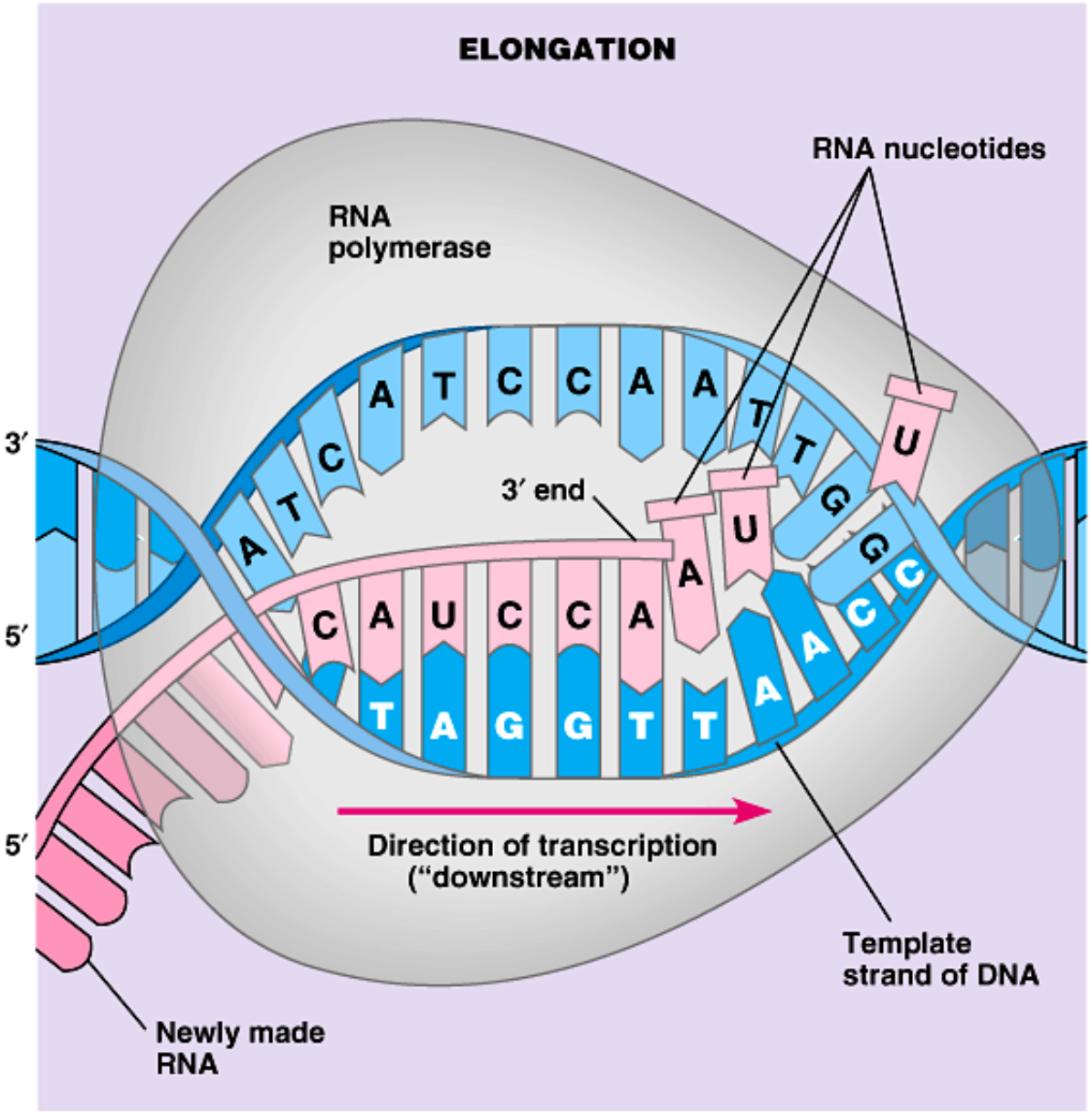
No proofreading

- **1 error/10^5 bases**
- **many copies**
- **short life**
- **not worth it*!***



TRANSCRIPTION

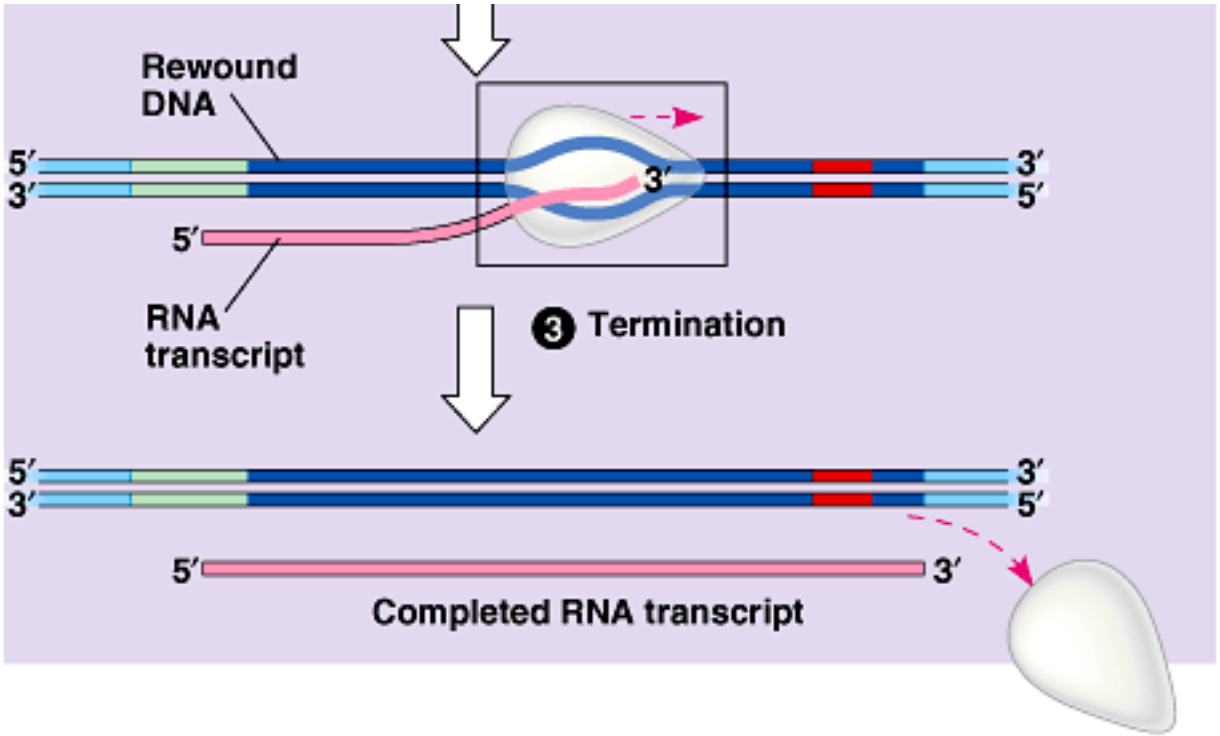


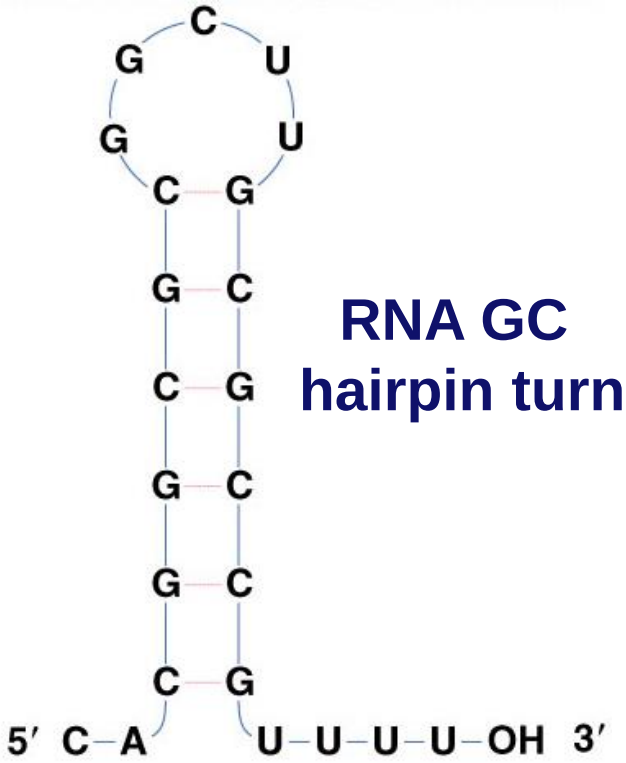


2005-2006

Transcription in Prokaryotes

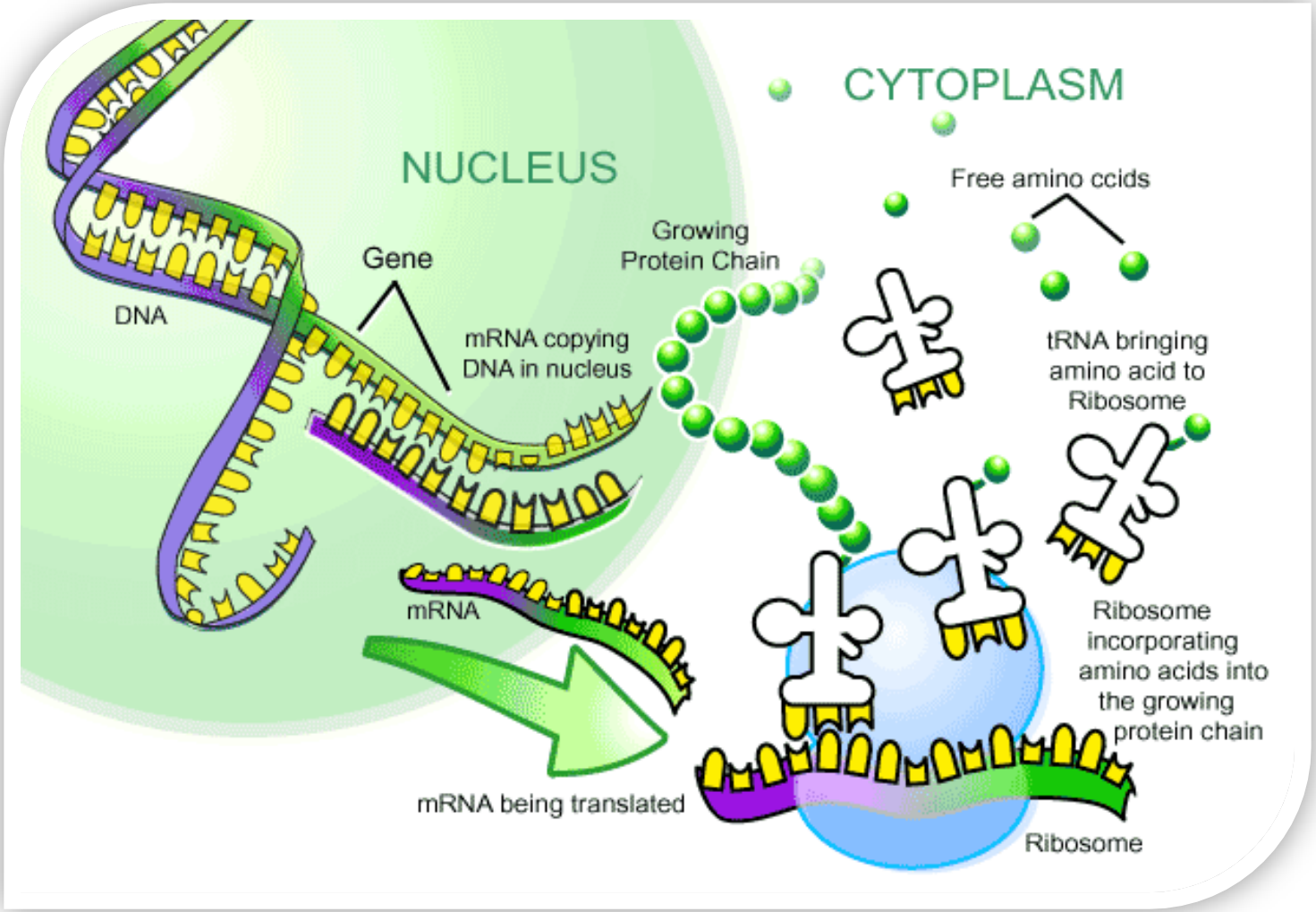
- ***Termination***
  - RNA polymerase stops at termination sequence
  - mRNA leaves nucleus through pores





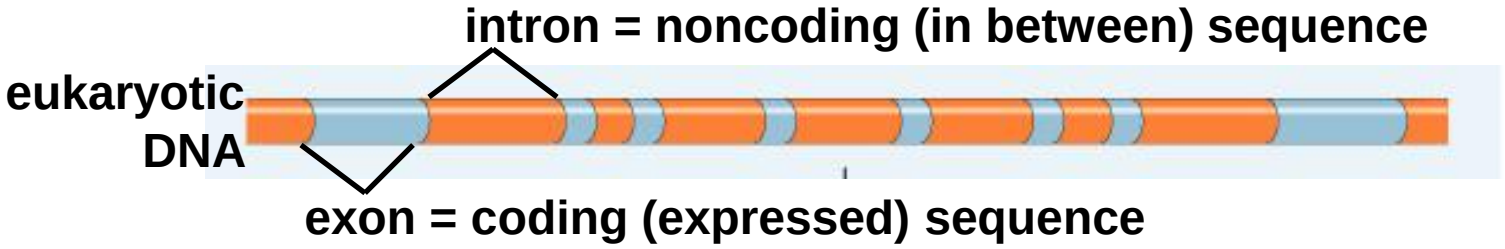
RNA GC hairpin turn

TRANSCRIPTION IN EUKARYOTES



Prokaryote vs. Eukaryote Genes

- **Prokaryotes**
  - DNA in cytoplasm
  - circular chromosome
  - naked DNA
  - no introns
- **Eukaryotes**
  - DNA in nucleus
  - linear chromosomes
  - DNA wound on histone proteins
  - introns vs. exons



Transcription in Eukaryotes

- 3 RNA polymerase enzymes

– *RNA polymerase I*
  - only transcribes rRNA genes

– *RNA polymerase II*
  - transcribes genes into mRNA

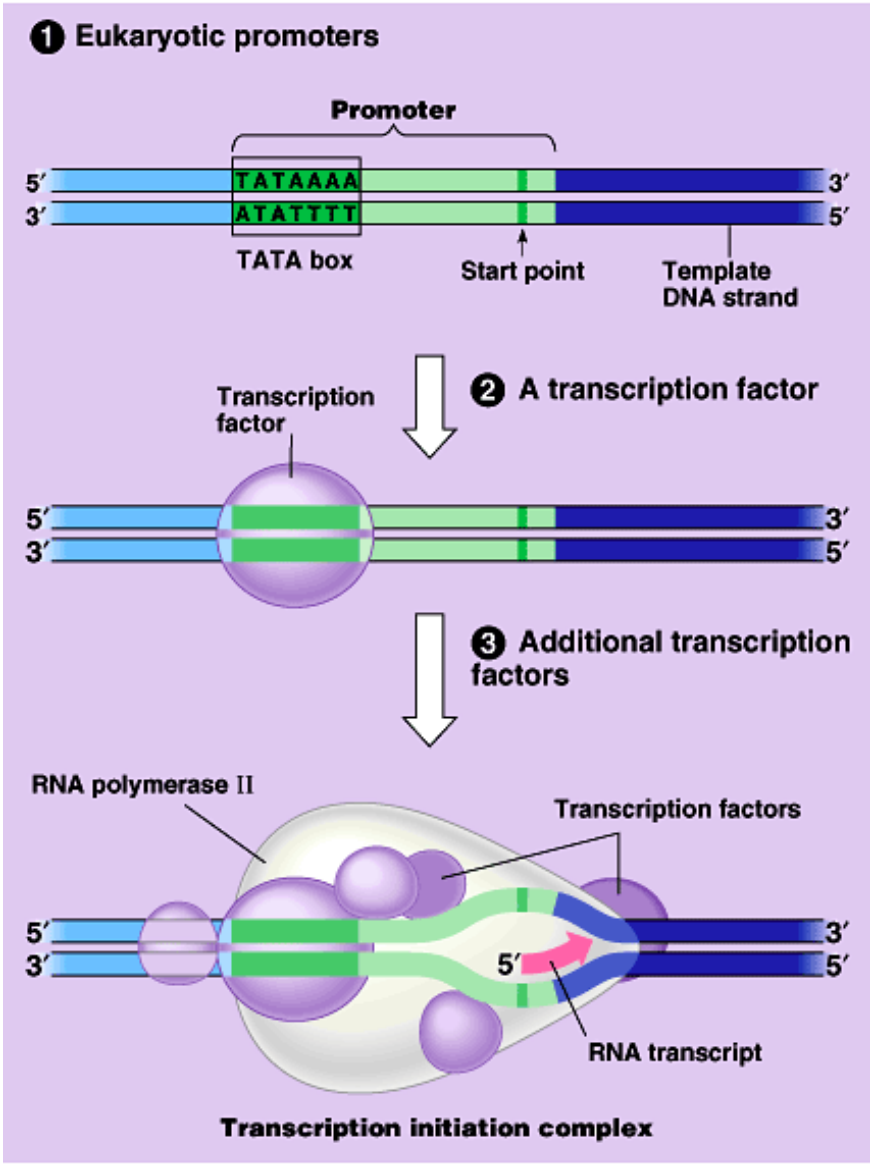
– *RNA polymerase III*
  - only transcribes rRNA genes

each has a specific promoter sequence it recognizes

TRANSCRIPTION IN EUKARYOTES

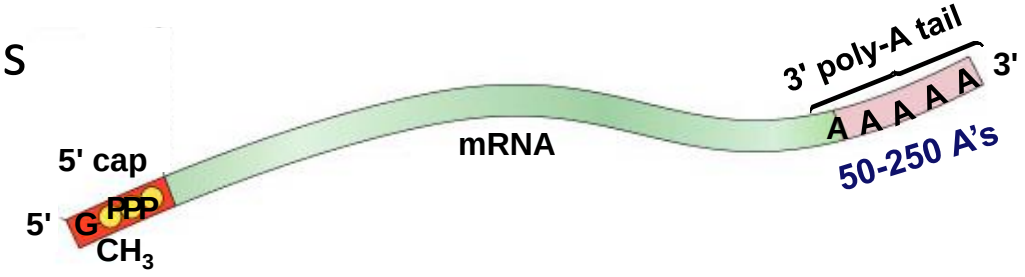
- **INITIATION COMPLEX**

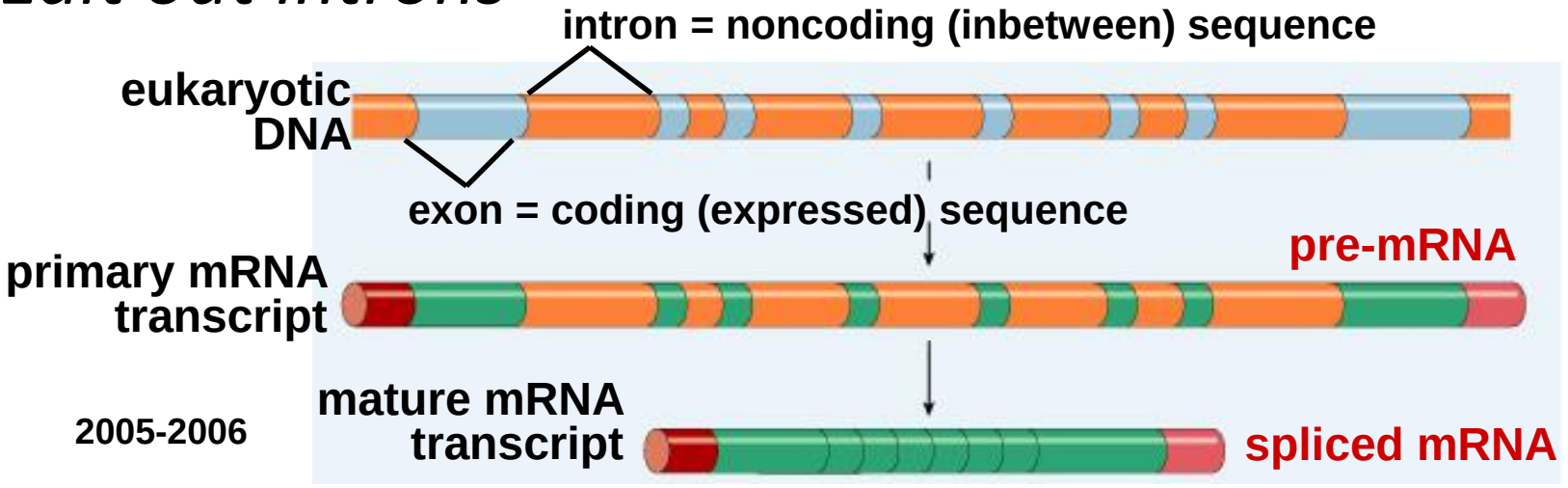
  - transcription factors bind to promoter region upstream of gene
    - proteins which bind to DNA & turn on or off transcription
    - TATA box binding site
  - only then does RNA polymerase bind to DNA



POST-TRANSCRIPTIONAL PROCESSING

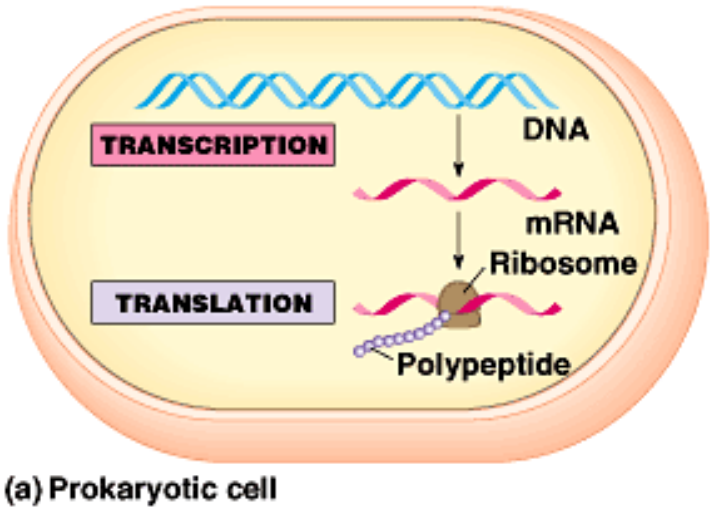
- *Primary transcript*
  - eukaryotic mRNA needs work after transcription
- *Protect mRNA*
  - from RNase enzymes
    - add 5' cap
    - add polyA tail
- *Edit out introns*



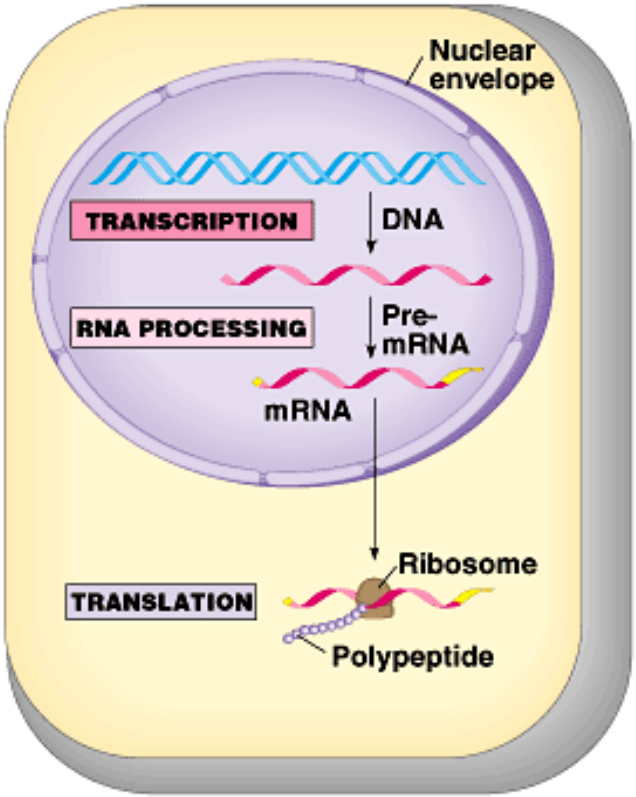


Transcription to Translation

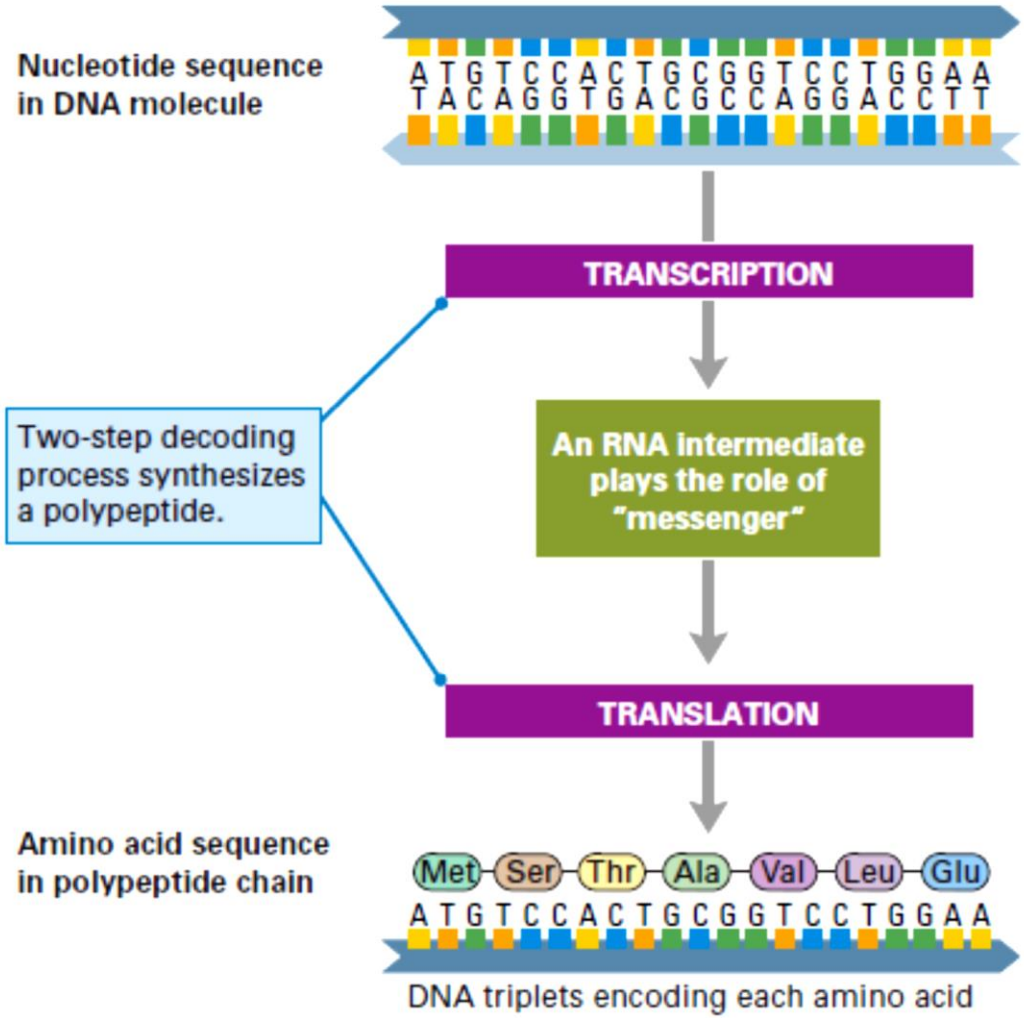
- *Differences between prokaryotes & eukaryotes*
  - Time & physical separation between processes
  - RNA processing



(a) Prokaryotic cell



(b) Eukaryotic cell



تعتبر العملية التي يتم فيها بناء الـ RNA من احد شريطي الـ DNA استنساخا لقالب DNA وتسمى هده العمليه بـ الاستنساخ transcription.

ان عملية تنظيم بناء الـ RNA في خلايا الكائنات حقيقية النواة مختلف عن بدائية النواة، ولكن عملية الاستنساخ transcription في بدائية النواة تكون قابله للتطبيق على خلايا حقيقية النواة مع اختلاف الإنزيمات المنظمة لعملية الاستنساخ.

- الإنزيم الأساسي المسؤول عن عملية الاستنساخ يدعى RNA polymerase أو DNA dependent RNA polymerase هو إنزيم مسؤول عن بلمرة الـ ribonucleotides إلى تسلسل مكمل للشريط المشفر في الجين.
- يرتبط الإنزيم بمناطق متخصصة تعرف بـ المهدات Promoter، والواقعة على الشريط المشفر.
- يتبع هذا ببدء تخليق الـ RNA عند نقطة بدء الاستنساخ transcription starting point ، وتستمر العملية حتى يتم الوصول إلى تسلسل الانتهاء termination sequence.
- تعرف وحدة الاستنساخ transcription unit بأنها المنطقة التي تمتد بين المهدات Promoter والمنهيات Terminator.
- ان الـ RNA الناتج، والذي يخلق بالاتجاه من 5 إلى 3 يدعى بالمستنسخ الأولي primary transcript .
- في الكائنات بدائية النواة، فان هذا المنتج الأولي يمثل ناتج عدة جينات، بينما في خلايا حقيقية النواة، فانه يمثل عادة ناتج جين مفرد.

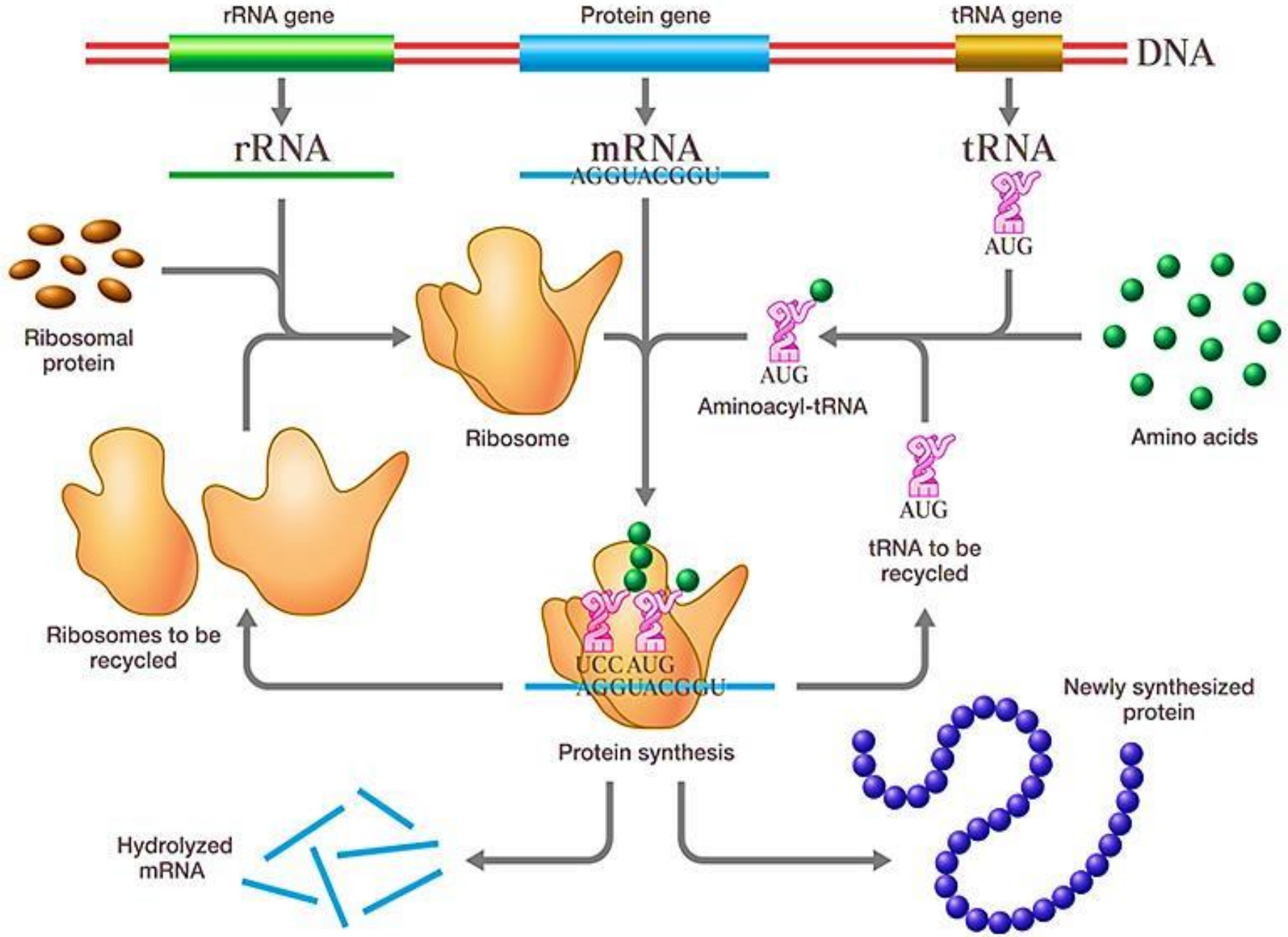
ان إنزيم RNA polymerase في بكتريا القولون يحفّز على تصنيع كل أنواع الـ RNA، والتي تشمل:

mRNA وهو مختصر لـ messenger RNA

tRNA وهو مختصر لـ transfer RNA

rRNA وهو مختصر لـ ribosomal RNA

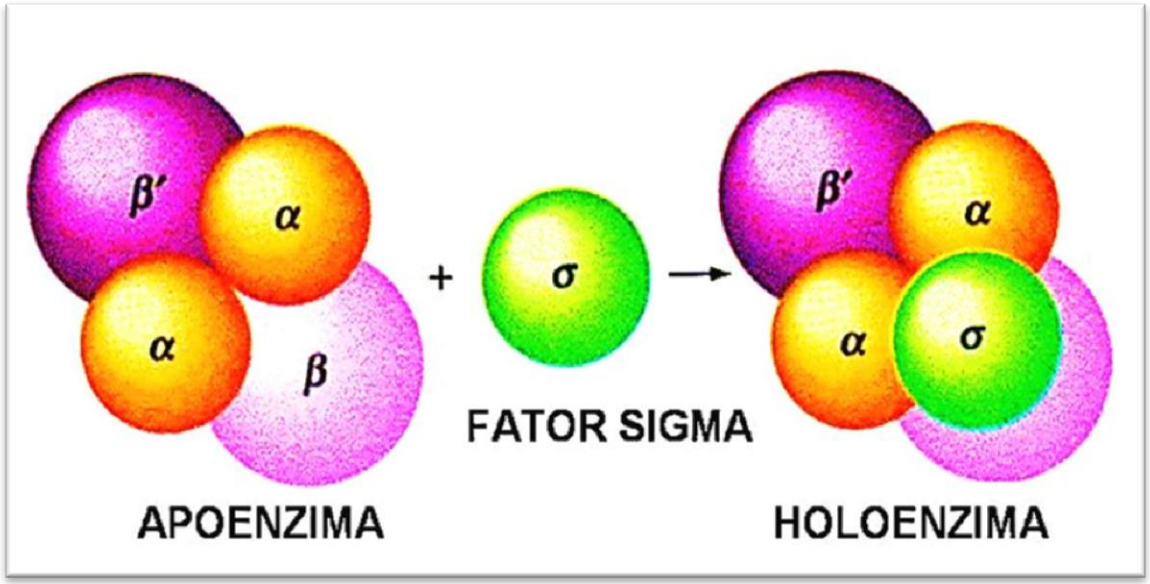
يستثنى من ذلك البادىء RNA primer والذي يرتبط عند النهاية 5′ لقطع أوكازاكي حيث انه يصنع بواسطة نوع مختلف من إنزيمات RNA polymerasesيطلق عليه RNA Primase.


rRNA gene
Protein gene
tRNA gene
DNA
rRNA
mRNA
AGGUACGGU
tRNA
AUG
Ribosomal protein
Ribosome
AUG
Aminoacyl-tRNA
Amino acids
AUG
tRNA to be recycled
Ribosomes to be recycled
UCC AUG
AGGUACGGU
Protein synthesis
Newly synthesized protein
Hydrolyzed mRNA

يتألف إنزيم بوليمريز RNA الكامل RNA polymerase holoenzyme في بدائية النواة من خمسة وحدات ثانوية:

Holoenzyme = $\alpha 2\beta\beta'$ core + σ sigma factor

ان كل من وحدتي بيتا هما βوβ' حيث انهما وحدتان كبيرتان. أما وحدتي $\alpha\alpha$ فهما وحدتان متماثلتان. ويطلق على الوحدات التي تؤلف الإنزيم الصميمي core enzyme بالوحدات الدائمة permanent subunits والتي يحتاجها الإنزيم ولا يستغني عنها في كل مراحل الاستنساخ الثلاثة (مرحلة البدء والإطالة والنهاية)، وهذا يختلف بالنسبة للعامل σ حيث يحتاجه الإنزيم في مرحلة البدء فقط

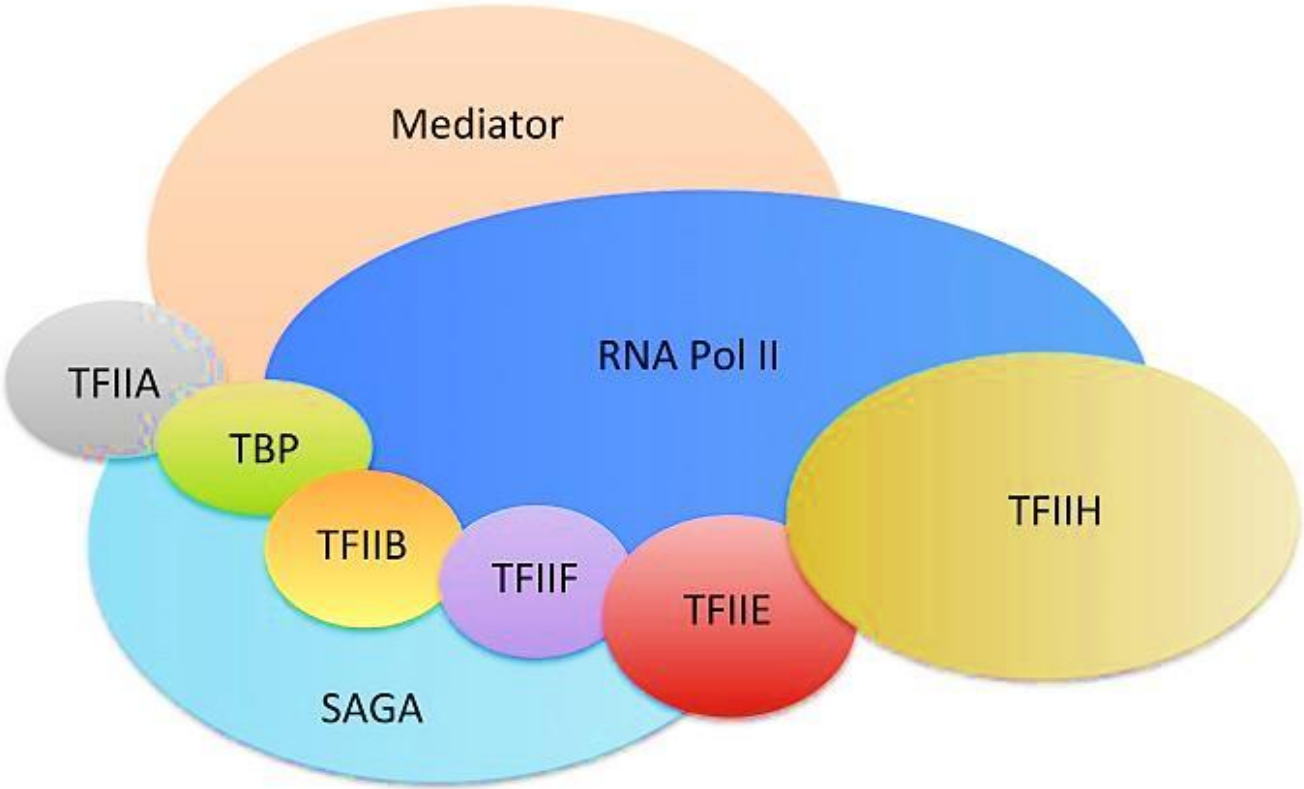


في الكائنات حقيقية النواة، تبدو المسألة أكثر تعقيدا، حيث يوجد هنالك بالإضافة إلى إنزيم RNA polymeraseالتابع للمايتوكوندريا، وهذه الأصناف هي كالآتي:

إنزيم RNA polymerase I والذي يقوم باستنساخ rRNA.

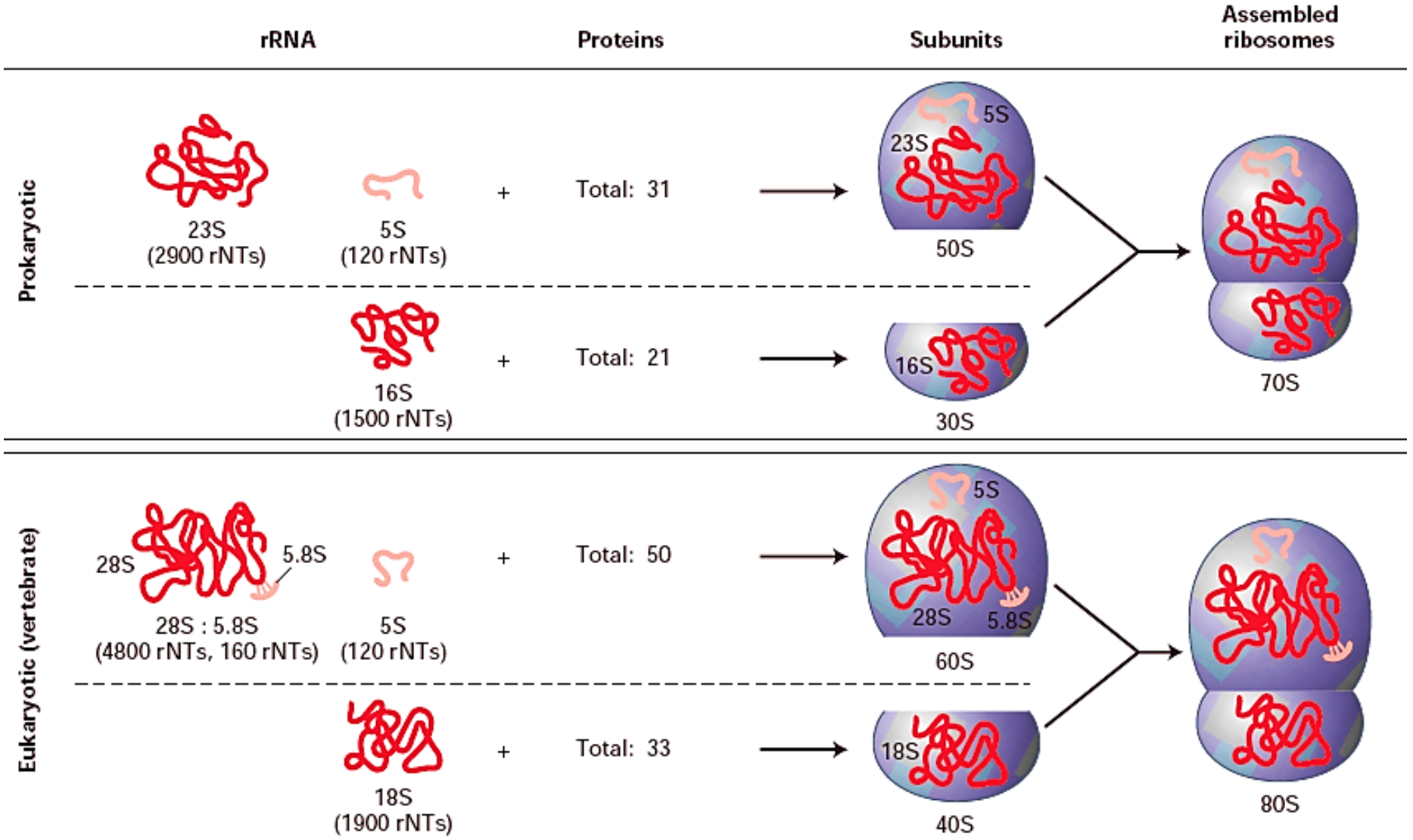
إنزيم RNA polymerase IIوالذي يقوم باستنساخ mRNA.

إنزيمRNA polymerase III والذي يقوم باستنساخ tRNA.



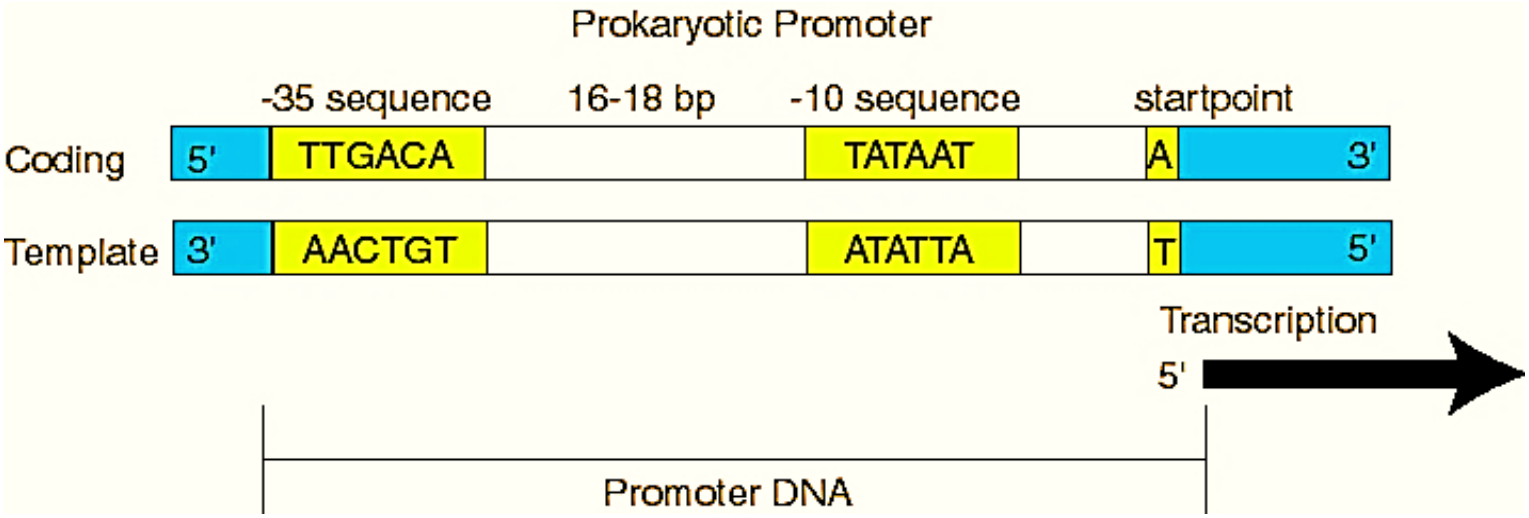
تسمية وخواص إنزيمات RNA polymerases الموجودة في أنوية اللبائن

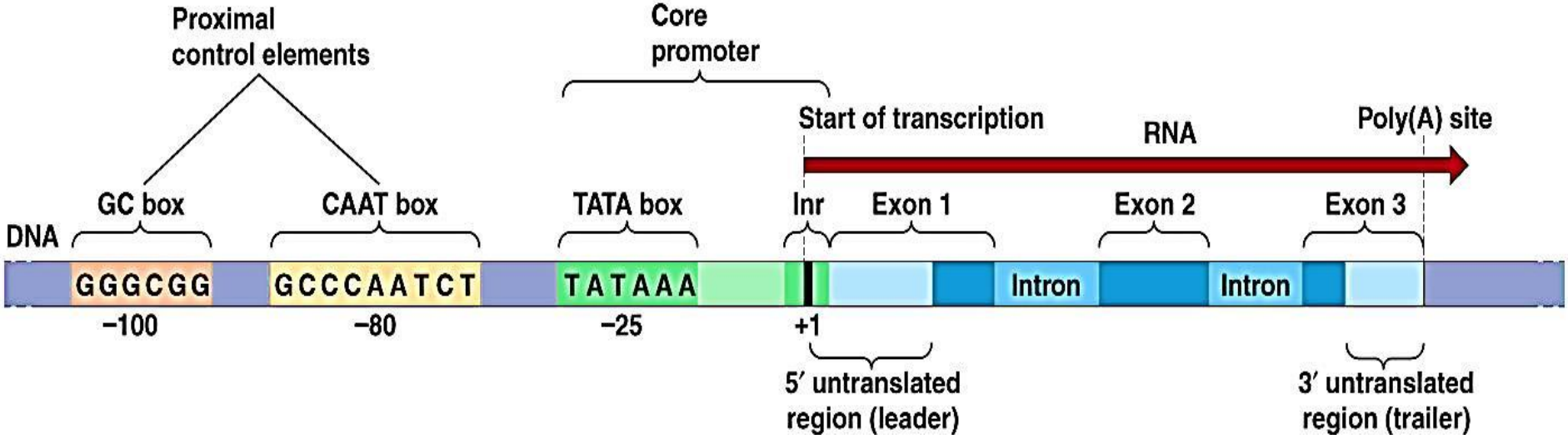
Type of RNA synthesized	RNA Polymerase
5.8S ; 18S ; 28S	I
mRNA	II
5S ; tRNA ; rRNA	III
snRNA and scRNA	II AND III
Mitochondrial genes	Mitochondrial
Chloroplast genes	Chloroplast


rRNA
Proteins
Subunits
Assembled ribosomes
Prokaryotic
23S
(2900 rNTs)
5S
(120 rNTs)
+
Total: 31
5S
23S
50S
16S
(1500 rNTs)
+
Total: 21
16S
30S
70S
Eukaryotic (vertebrate)
28S
5.8S
28S : 5.8S
(4800 rNTs, 160 rNTs)
5S
(120 rNTs)
+
Total: 50
5S
28S
5.8S
60S
18S
(1900 rNTs)
+
Total: 33
18S
40S
80S

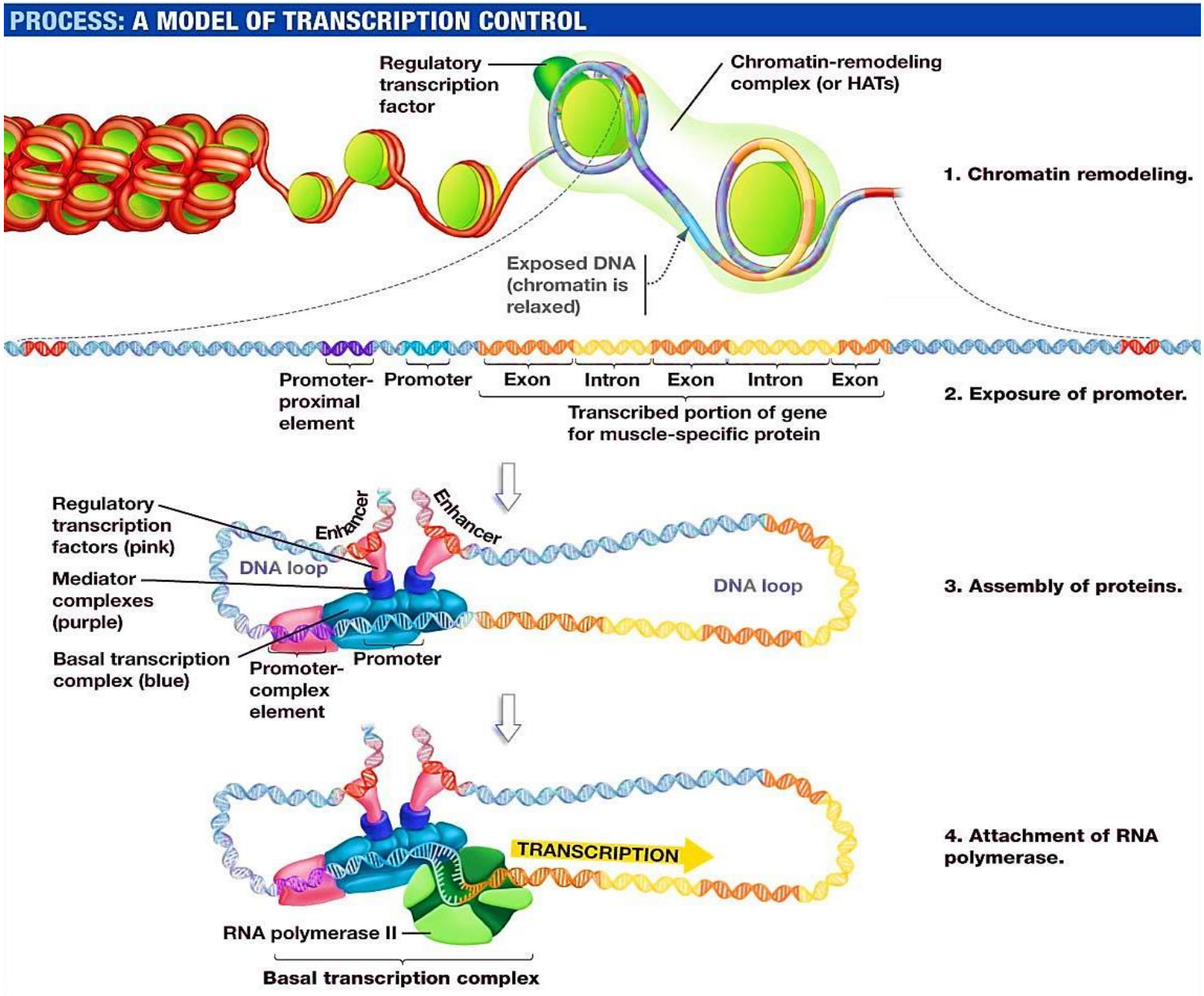
الممهدات Promoters

- مناطق من تواليات تحوي تسلسل قصير تقع أمام التوالي (upstream) المراد استنساخه {نقطة بداية الاستنساخ} وهذه المناطق لا تستنسخ وإنما يتم التعرف عليها في الخلايا بدائية النواة .
- تتم عملية التعرف باستعمال العامل سيكما (δ) الذي يرتبط الى إنزيم النسخ RNA Polymerase (RNAP/RNA pol)المكون من 4 وحدات ثانوية ويوجهه الى المكان المراد استنساخه الذي في العادة يشمل عدة جينات (اوبرون).
- ان استبدال قاعدة مفردة بصندوق TATA (وهو من أهم تسلسلات الممهد) يعمل كطفرات قوية قاتلة.
- ان منطقة الممهد تحتوي على المعلومة التي تخبر إنزيم RNA polymeraseبدأ الاستنساخ، وكم مرة يصنع سلسلة الـ RNA ، وكيف يرتبط بعناية.


Prokaryotic Promoter
-35 sequence
16-18 bp
-10 sequence
startpoint
Coding
5'
TTGACA
TATAAT
A
3'
Template
3'
AACTGT
ATATTA
T
5'
Transcription
5'
Promoter DNA


Proximal
control elements
Core
promoter
Start of transcription
RNA
Poly(A) site
GC box
CAAT box
TATA box
Inr
Exon 1
Exon 2
Exon 3
DNA
GGGCGG
GCCCAATCT
TATAAA
Intron
Intron
−100
−80
−25
+1
5′ untranslated
region (leader)
3′ untranslated
region (trailer)

TRANSCRIPTION PROCESS عملية الاستنساخ



مرحلة البدء Initiation Stage

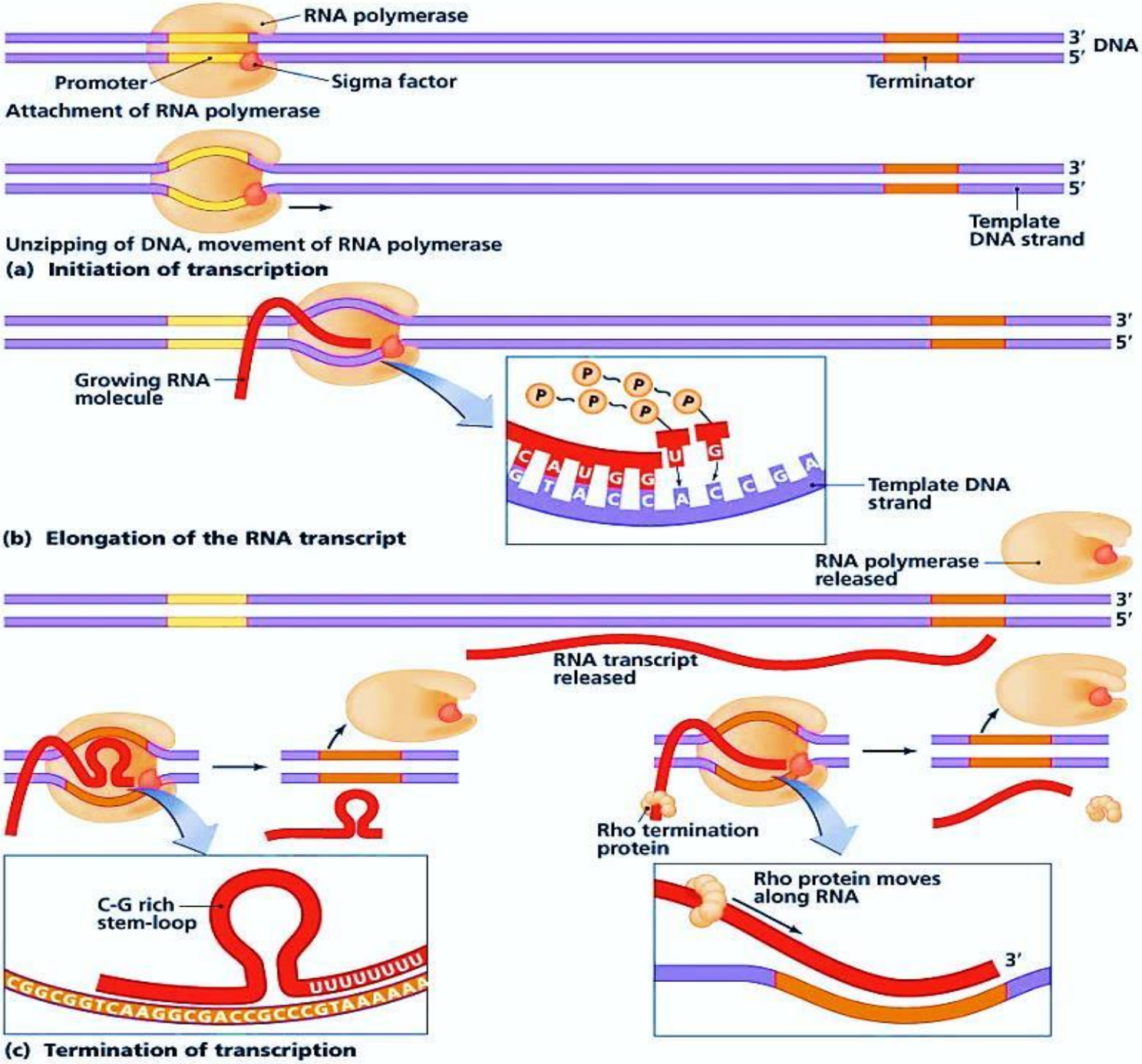
- يبدأ الاستنساخ عندما يرتبط الإنزيم RNA polymerase مع عامل "سكما" لكي ينتج الإنزيم الكامل holoenzyme. يسمح عامل "سكما" لإنزيم RNA polymerase من أن يرتبط بشكل متخصص بتسلسل البروموتر للجين.
- يكون الارتباط بشكل متخصص بتسلسلات البروموتر 10- و 35- وهذا يؤدي إلى بدء عملية الاستنساخ عند بداية الجين.
- يبدأ إنزيم RNA polymerase holoenzyme بفتح التفاف الحلزون المزدوج بمعدل 15 زوج قاعدي حول منطقة بداية الاستنساخ ليكون معقد البروموتر المفتوح open promoter complex.

مرحلة الاستطالة Elongation Stage

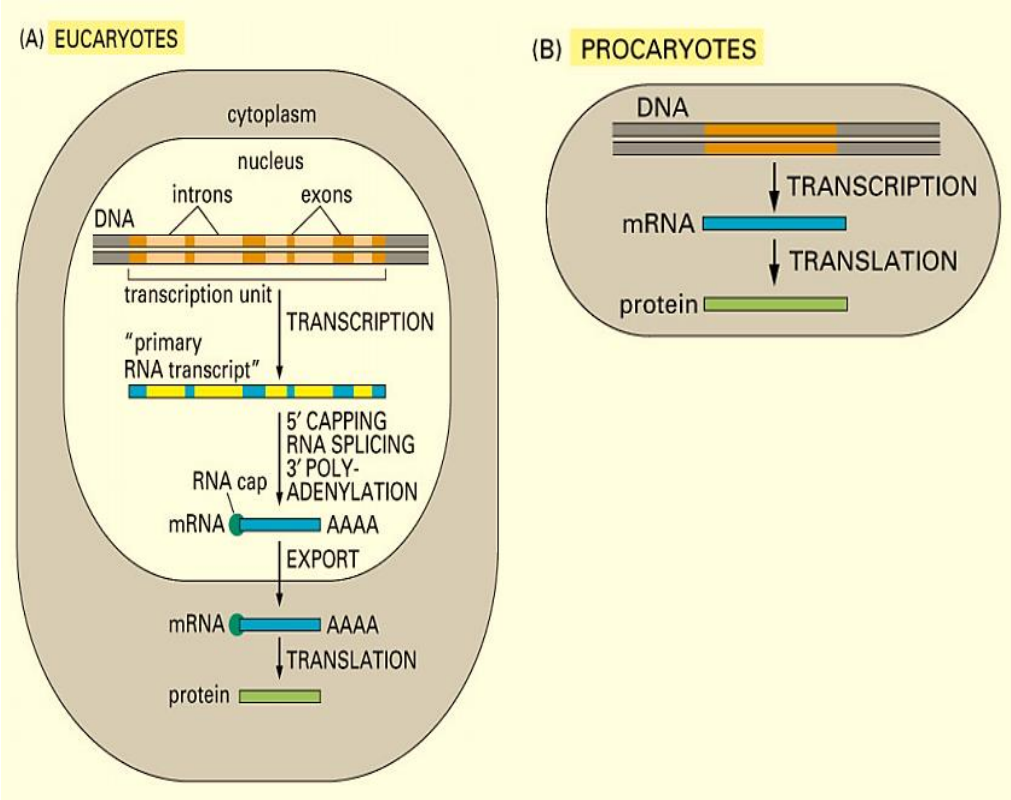
- تبدأ مرحلة الاستطالة عند تحرر عامل سكما.
- بعد إضافة أول نيوكليوسيدة ثلاثية الفوسفات (والتي تكون من نوع purine عادة)، يترك إنزيم RNA polymerase البروموتر ويتحرك إلى الأمام على طول شريط الـ DNA القالب ويستمر بإطالة سلسلة الـ RNA.
- عند حركته، يفتح إنزيم RNA polymerase التفاف unwind الحلزون المزدوج أمامه ويسد التفاف rewind الحلزون المزدوج خلفه. بينما تقوم إنزيمات topoisomerases وكما هو الحال في عملية التضاعف بتخفيف اللف الفائق الموجب المتولد أمام فقاعة الاستنساخ، وبتخفيف اللف الفائق السالب المتولد خلف فقاعة الاستنساخ.

مرحلة الانتهاء Termination Stage

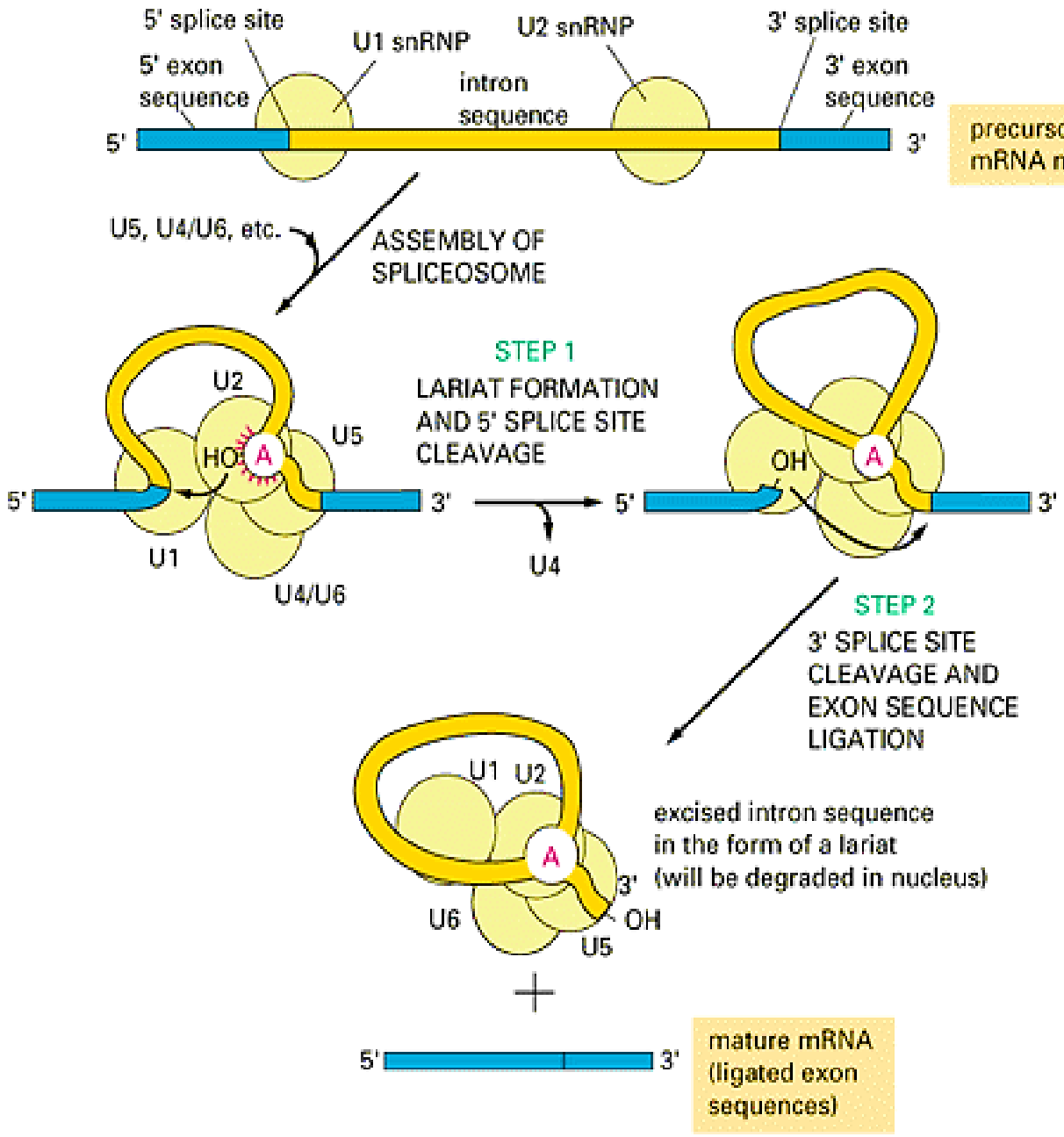
- إن آخر مرحلة في تخليق الـ RNA هي مرحلة إنهاء نمو السلسلة. ينتهي تخليق الـ RNA وذلك عند الوصول إلى أحد تسلسلي الإنهاء التابعين لشريط الـ DNA واللذان سيرد ذكرهما أدناه.
- إن تسلسلات الـ DNA المنهية والمعروفة بمنهيات الاستنساخ transcription terminators، أما أن تكون معتمدة على العامل رو rho-dependent (dependent) أو غير المعتمدة على العامل "رو" rho-independent. وفي كلتا الحالتين، يتكون ما يعرف بتركيب العروة والساق stem-loop structure أو بتركيب دبوس الشعر hairpin loop structure. ينتهي تخليق الـ RNA بعد تكوين هذا التركيب بقليل.


RNA polymerase
3′
5′
DNA
Promoter
Sigma factor
Terminator
Attachment of RNA polymerase
3′
5′
Template DNA strand
Unzipping of DNA, movement of RNA polymerase
(a) Initiation of transcription
3′
5′
Growing RNA molecule
P
C A U G G U G
G T A C C A C C G A
Template DNA strand
(b) Elongation of the RNA transcript
RNA polymerase released
3′
5′
RNA transcript released
Rho termination protein
Rho protein moves along RNA
3′
C-G rich stem-loop
UUUUUUUU
CGGCGGTCAAGGCGACCGCCCGTAAAAAA
(c) Termination of transcription

تحويرات نسخ RNA



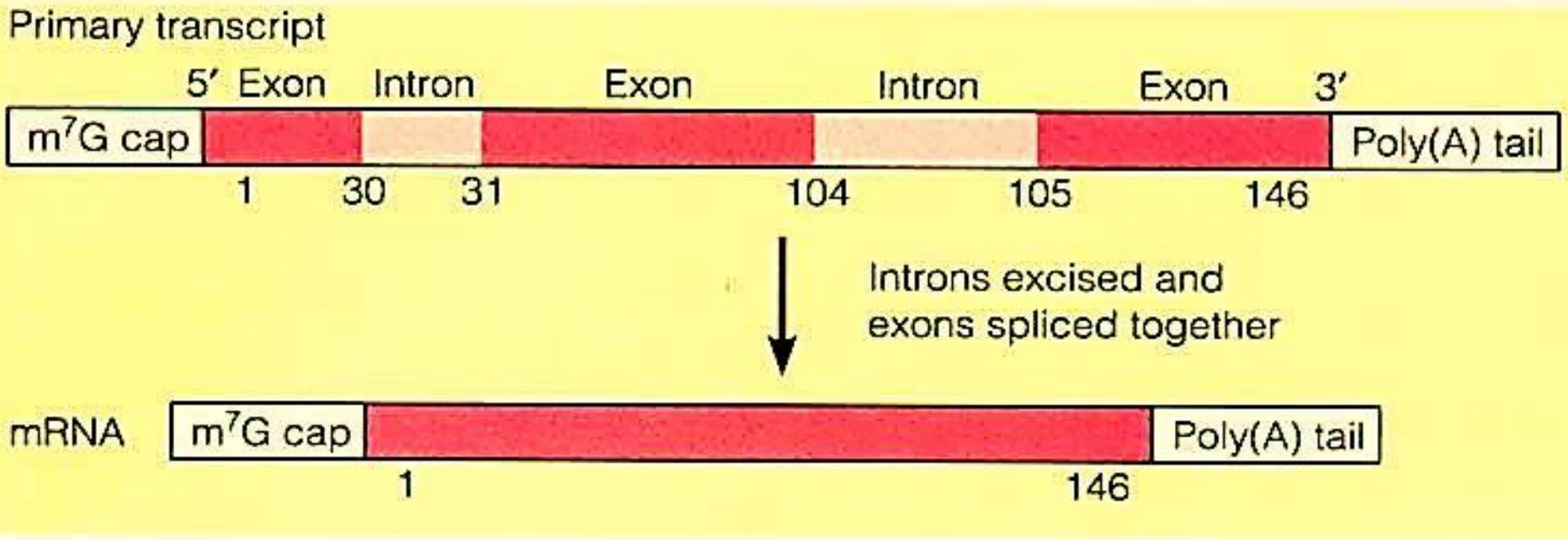
إن معظم جزيئات الـ RNA المخلقة حديثاً يجب أن تتحور بأساليب متغايرة لكي تتحول إلى أشكالها الوظيفية. ما عدا الـ mRNA البكتيري والذي يمثل استثناء لهذه القاعدة، حيث انه يستخدم فورا كقالب لتخليق البروتين بينما ماتزال عملية الاستنساخ جارية عليه. أما النسخ الأولية من tRNA و rRNA في خلايا الكائنات حقيقة وبدائية النواة يجب أن تعاني سلسلة من خطوات المعالجة (Processing). إن النسخ الأولية لـ mRNA حقيقية النواة يعاني أيضا تحويرات مكثفة، والتي تتضمن إزالة الانترونات بواسطة عملية وصل الأطراف بالتراكب Splicing. ثم تنتقل من النواة إلى السايتوبلازم لتعمل كقوالب لتخليق البروتين. وهنا سنركز على عمليات المعالجة الجارية في mRNA حقيقية النواة بدلا من tRNA و rRNA وذلك لكون جزيئة الـ mRNA هي التي تحمل المعلومات الوراثية الضرورية لترجمتها في عملية تخليق البروتين.



- إضافة غطاء Capping الى النهاية ´ 5 والتي تقوم مقام موقع الارتباط rbs في نسخ بدائية النواة.
- إضافة ذيل من الأدنين الى النهاية ` 3 Poly(A)tail
- إزالة الانترونات وما يحصل بها من تفاضل او معالجة جزيئات RNA.
- إجراء التصحيحات RNA editing.

EUKARYOTIC MRNA PROCESSING

- **5' end - RNA is capped by 7-methylguanosine**
  - Ribosome binding site during translation
- **3' end - poly-A tail (200-250 A's) is added**
  - Protects RNA from breakdown
  - A tag that allows passage through a nuclear pore
- **Introns are deleted**
  - Sliced by snRPS (small ribonucleic particles)
  - snRPS are part of the spliceosome
    - bring the intron ends together and loop it out of the gene
    - catalyze the excision and ligation of exon ends


Primary transcript
5′ Exon
Intron
Exon
Intron
Exon
3′
m7G cap
Poly(A) tail
1
30
31
104
105
146
Introns excised and
exons spliced together
mRNA
m7G cap
Poly(A) tail
1
146