Molekulární biologie

4. Transkripce

Transkripce (přepis) genetické informace z DNA do RNA

Osnova

1. Transkripce (prokaryotického) bakteriálního genomu
2. Transkripce eukaryotického genomu
3. Posttranskripční úpravy RNA a mechanizmy sestřihu

Hlavní zdroje:

S. Rosypal, Úvod do molekulární biologie 1-4
Masarykova Universita Brno
ISBN 80-902562

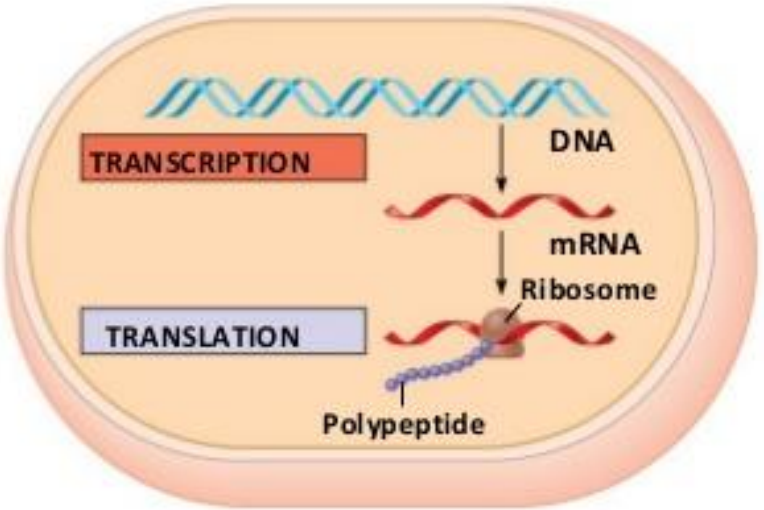
B. Staveley, Principles of Cell Biology
Memorial University of Newfoundland
http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CBhome.html

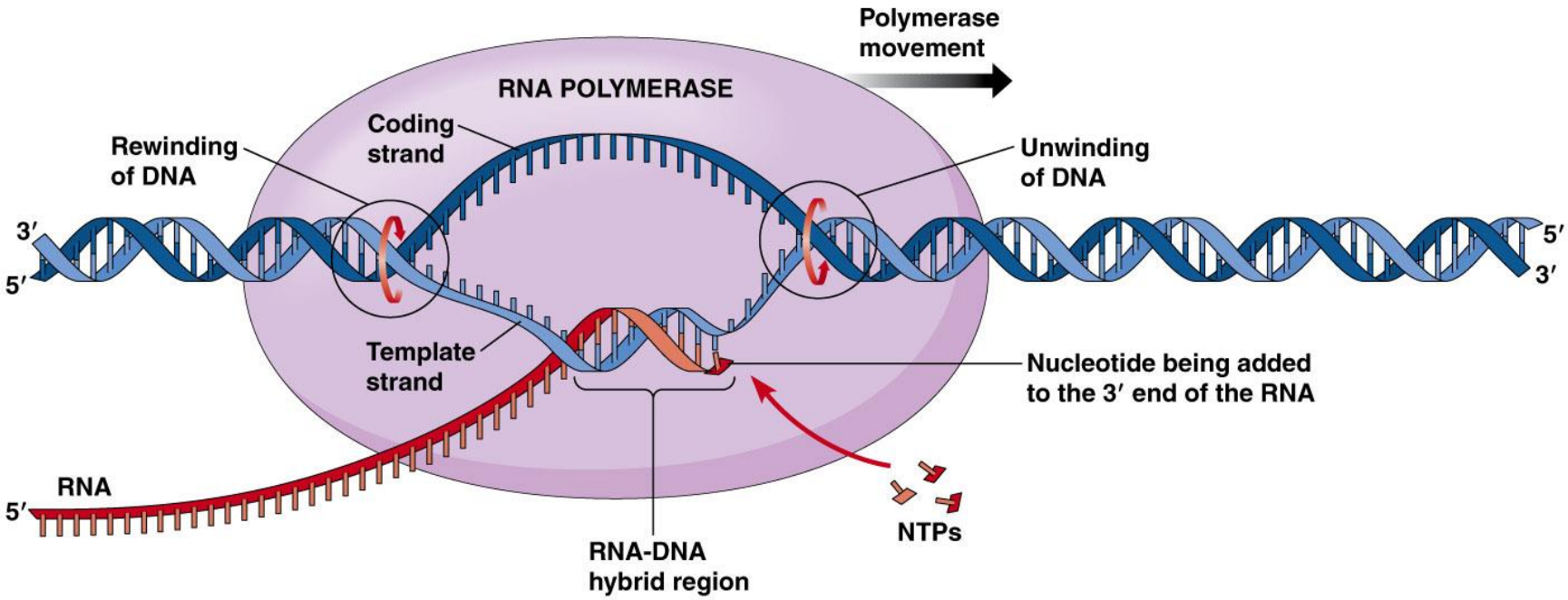
M. Muller, Biology of Cells and Organisms
University of Illinios, Chicago
http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/summer2010/lecturesm10.htm

Wikipedia

Transkripce

Informace z DNA se nepřekládá do proteinu přímo, ale přes prostředníka - **mRNA** (messenger; mediátorová)





Část první: Bakteriální transkripce

Transkripce (přepis) genetické informace z DNA (chromozomové a plazmidové) do RNA pomocí enzymu RNA-polymerázy

RNA-polymeráza (transkriptáza)

- váže se na **promotor**
- katalyzuje syntézu dlouhých primárních transkriptů
- u bakterií stejná RNA-polymeráza pro všechny typy RNA

Primární transkripty:

Většinou obsahují přepisy více genů (polygenní/polycistronní).

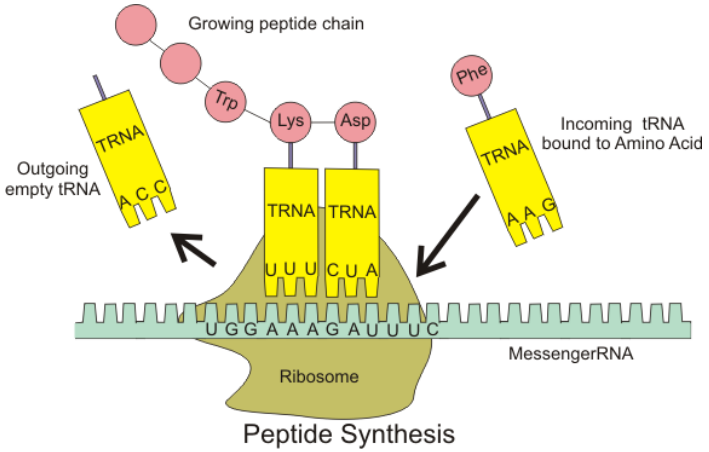
Na DNA: promotor - geny - terminátor

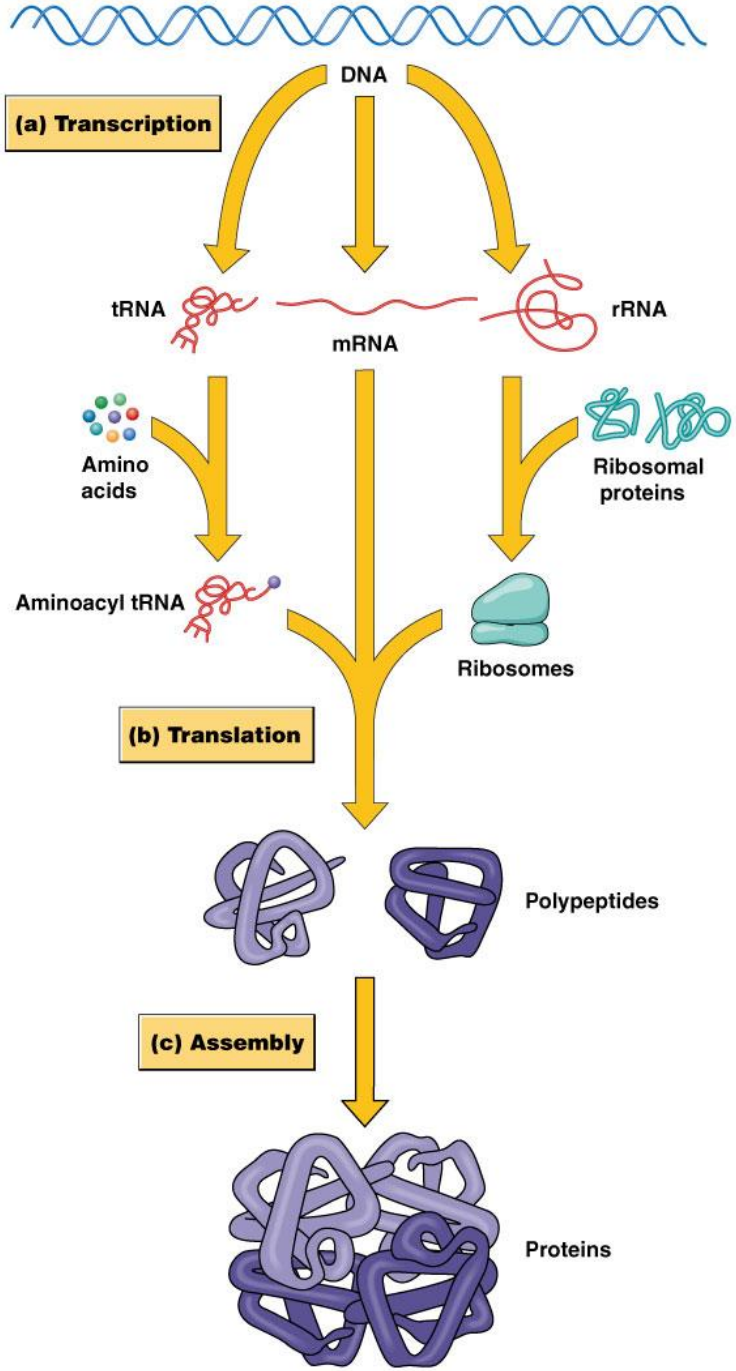
3 hlavní skupiny RNA

1. mRNA (mediátorová; messenger)
matrice pro syntézu polypeptidů. U bakterií nepodléhá posttranskripčnímu sestřihu

2. rRNA (ribozomová)
posttranskripčně upravována z pre-rRNA

3. tRNA (transferová)
posttranskripčně upravována z pre-tRNA
Váže se na ni aminokyselina, obsahuje antikodon





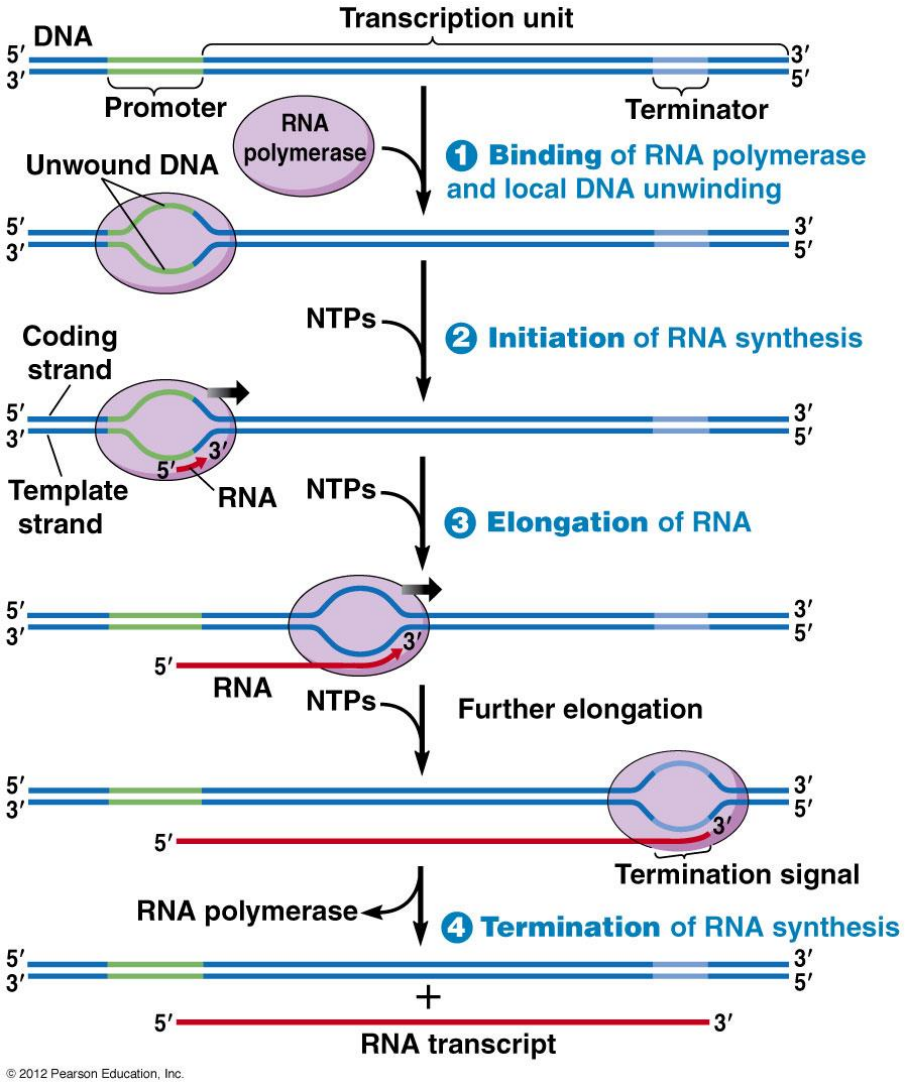
B. Staveley, Principles of Cell Biology
Memorial University of Newfoundland
http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CBhome.html

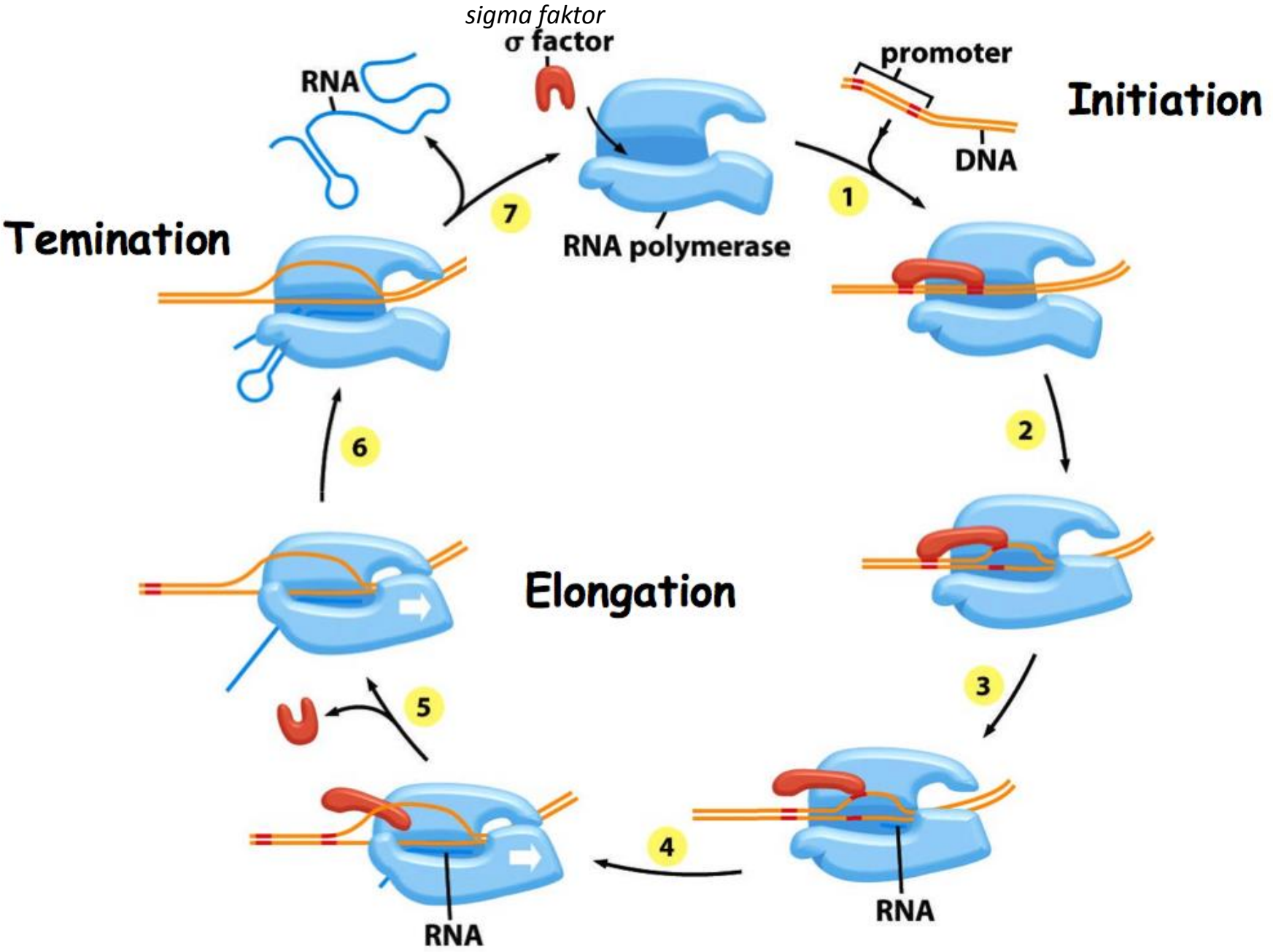
Fáze transkripce

1. Iniciace: Navázání RNA-polymerázy na promotor a zahájení syntézy

2. Elongace: Připojování nukleozid-5'-monofosfátu k 3'-konci RNA řetězce podle matricového řetězce

3. Terminace: Zastavení elongace na terminátoru a uvolnění z matricového řetězce





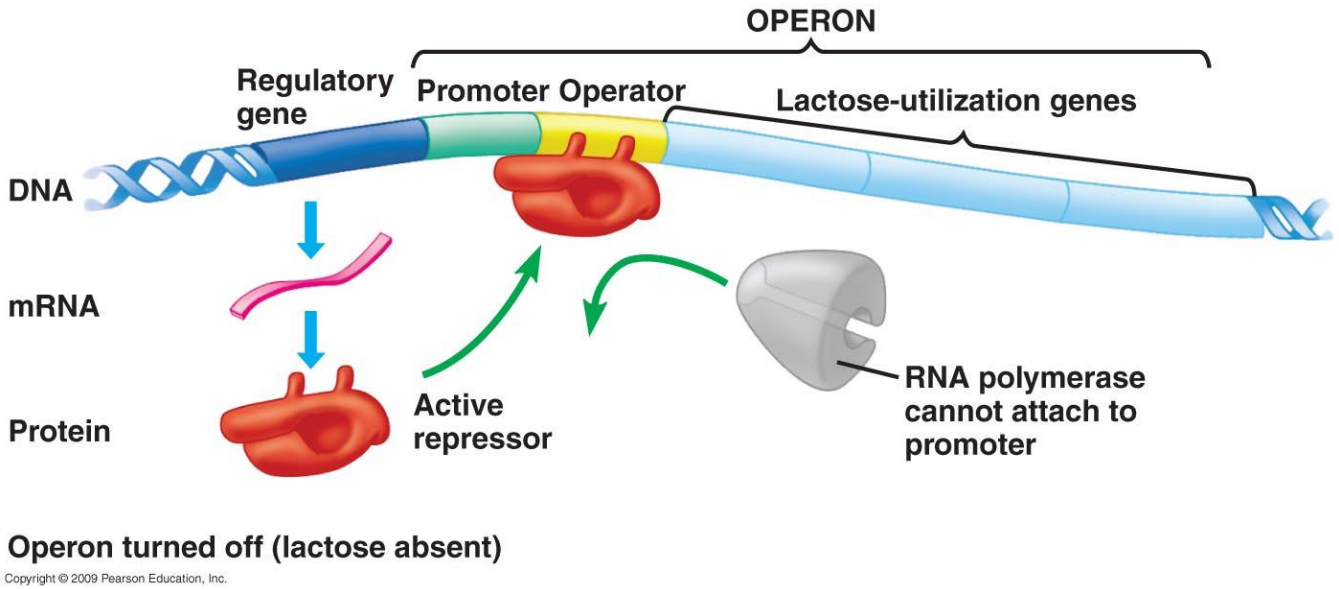
amolecularmatter.tumblr.com

Operon:

- Transkripční jednotka, která je spolu s promotorem řízena také operátorem

- Mezi promotorem a startovacím nukleotidem se nachází regulační oblast - OPERÁTOR.

- Na operátor se může vázat regulační protein - REPRESOR. Ten zastavuje transkripci

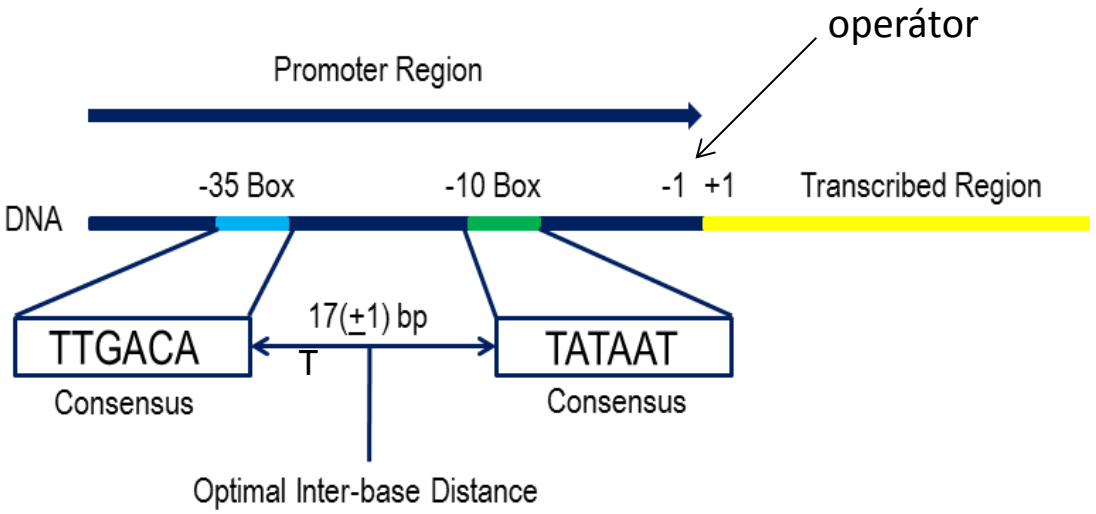


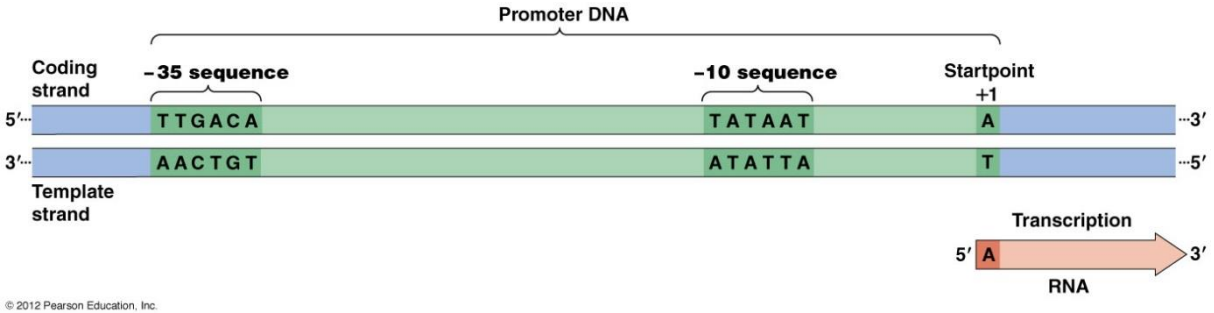
Operon: transkripční jednotka řízená promotorem a operátorem
Oprerátor: regulační oblast na DNA, na níž se může vázat represor
Transkripční jednotka: oblast na DNA, která se přepisuje do mRNA

Promotor:
Sekvence na DNA před transkripční jednotkou, nasedá na něj RNA-polymeráza

- Podobné u všech transkripčních jednotek, ale ne totožné. Liší se mírou afinity k RNA-polymeráze.
- Silný/slabý promotor - vysoká/nízká frekvence iniciace transkripce
- Silnější promotor se více blíží konvenční sekvenci v místech:

a) kolem nukleotidu -35: 5' TTGACAT 3'
b) Pribnowův box* (-10): 5' TATAAT 3'

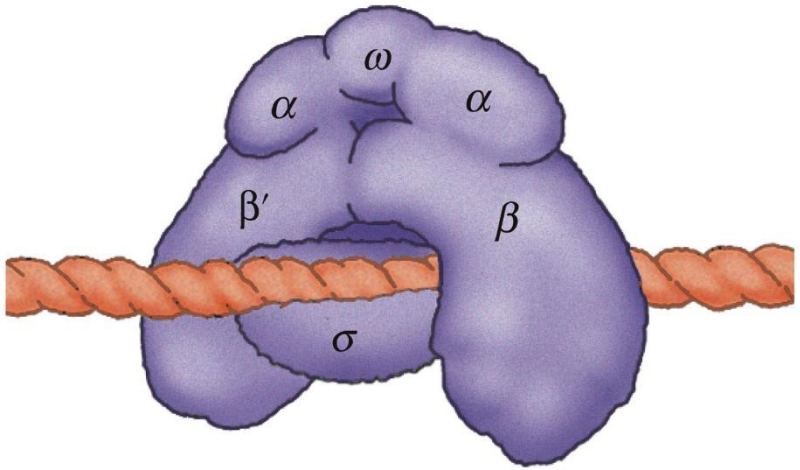




**Podobný TATA boxu u eukaryot*

Bakteriální RNA-polymeráza

- Rozeznává promotory všech transkripčních jednotek
- Složena z podjednotek (holoenzym):
    - 2 α: udržují stabilitu molekuly
    - 1 β: umožňuje vazbu ribonukleotidů na polymerázu
    - 1 β': umožňuje spojení polymerázy s matricovým DNA řetězcem
    - 1 ω (omega) stabilizuje molekulu
    - 1 σ (sigma faktor): podmiňuje vazbu RNAP na **promotor**. Nemá katalytickou funkci, bez ní polymeráza funguje, ale začíná na libovolném místě



THE CELL, Fourth Edition, Figure 7.1 © 2006 ASM Press and Sinauer Associates, Inc.

Holoenzym: enzym se všemi kofaktory (podjednotkami) nutnými k jeho funkci; úplný enzym
Apoenzym: enzym, který vyžaduje kofaktory pro svoji funkci, ale nemá je; momentálně nefunkční

1. Iniciace

Navázání RNA-polymerázy (sigma faktoru) na promotorové sekvence -35 (rozpoznávací) a Pribnowův box (otevírá binární komplex)

a) tvorba "Uzavřeného transkripčního binárního komplexu" (holoenzym RNA-polymerázy + promotorová oblast dsDNA) - řetězce dsDNA ještě nejsou rozvinuty

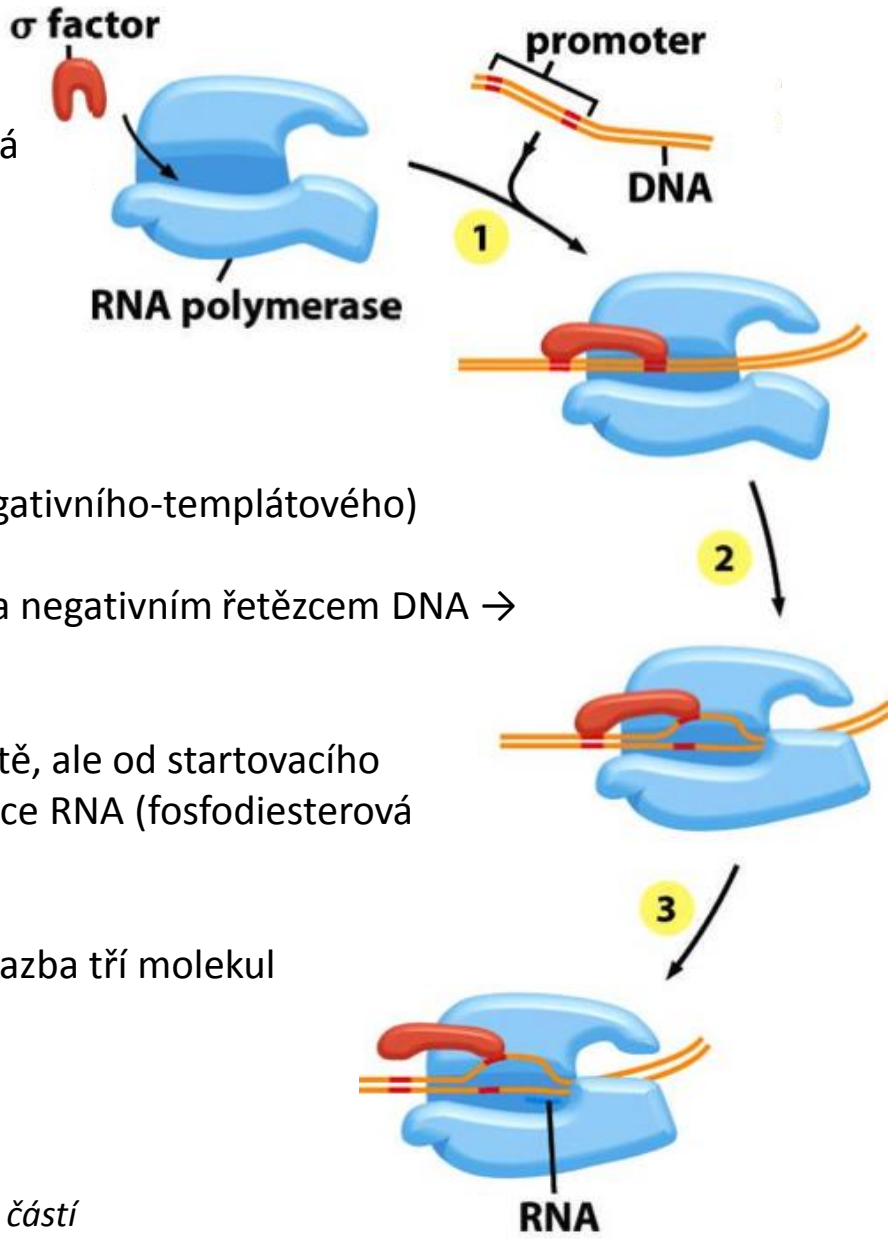
b) RNA-polymeráza v komplexu mění konformaci, prodlužuje se a pokrývá gen v rozsahu -50 až +20 bp

c) RNA-polymeráza se váže na oba řetězce DNA, ale pevněji na pozitivní-kódující (přepisuje se podle negativního-templátového)

d) V Pribnowově boxu se uvolňují vazby mezi pozitivním a negativním řetězcem DNA → otevřený binární komplex

e) Při iniciaci transkripce zůstává RNA-polymeráza na místě, ale od startovacího nukleotidu (+1) začíná katalyzovat tvorbu nového řetězce RNA (fosfodiesterová vazba mezi dvěma ribonukleotidy) → první dinukleotid

f) Otevřený transkripční ternární (ze tří částí) komplex = vazba tří molekul (1. DNA, 2. RNA-polymeráza, 3. RNA)

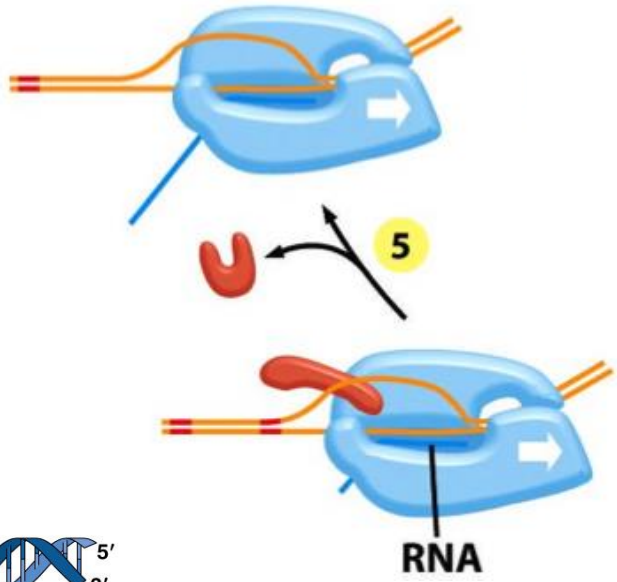


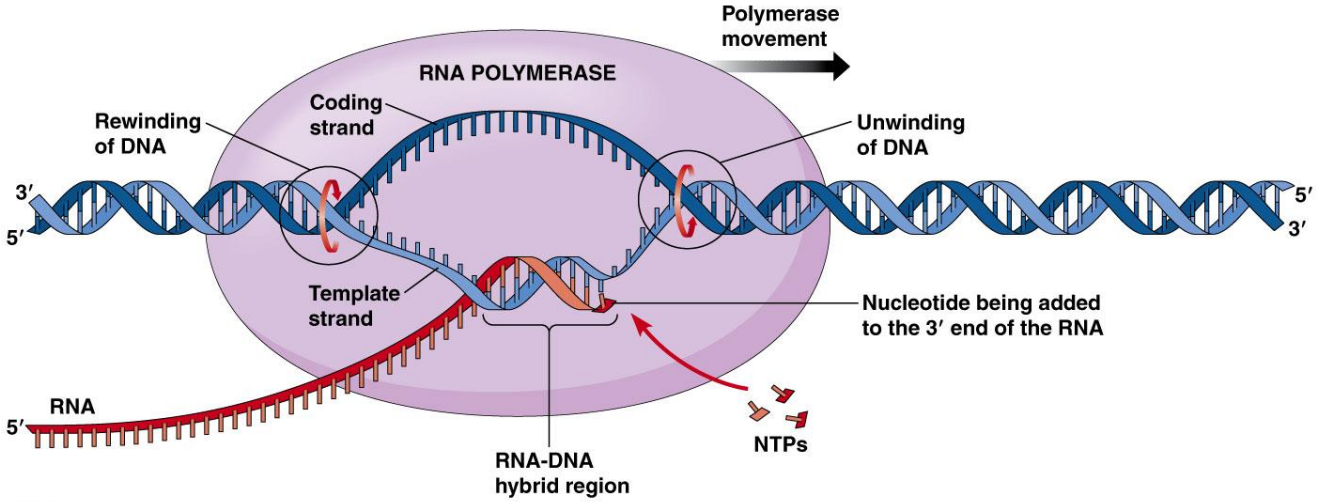
Latinsky: "binarius" = složený ze 2 částí; "ternarius" = složený ze 3 částí

2. Elongace

Prodlužování RNA

- Katalyzována RNA-polymerázou bez Sigma-faktoru (uvolňuje se po vytvoření počátečního fragmentu RNA a je nahrazen NusA-proteinem)
- RNA-polymeráza se posunuje po negativním řetězci DNA (40 nukleotidů/sek; 37°C) směrem od 3' → 5'-konci DNA
- cca 18bp dlouhá rozvinutá oblast DNA; hybrid RNA-DNA dlouhý cca 2-5bp
- RNA v hybridní dvojšroubovici se pevněji váže k RNA-polymeráze než k DNA
- Syntéza RNA řetězce směrem od 5' → 3'-konci
- S NusA proteinem dorazí RNA-polymeráza až k terminátoru





Průběh transkripce bakteriálního genomu

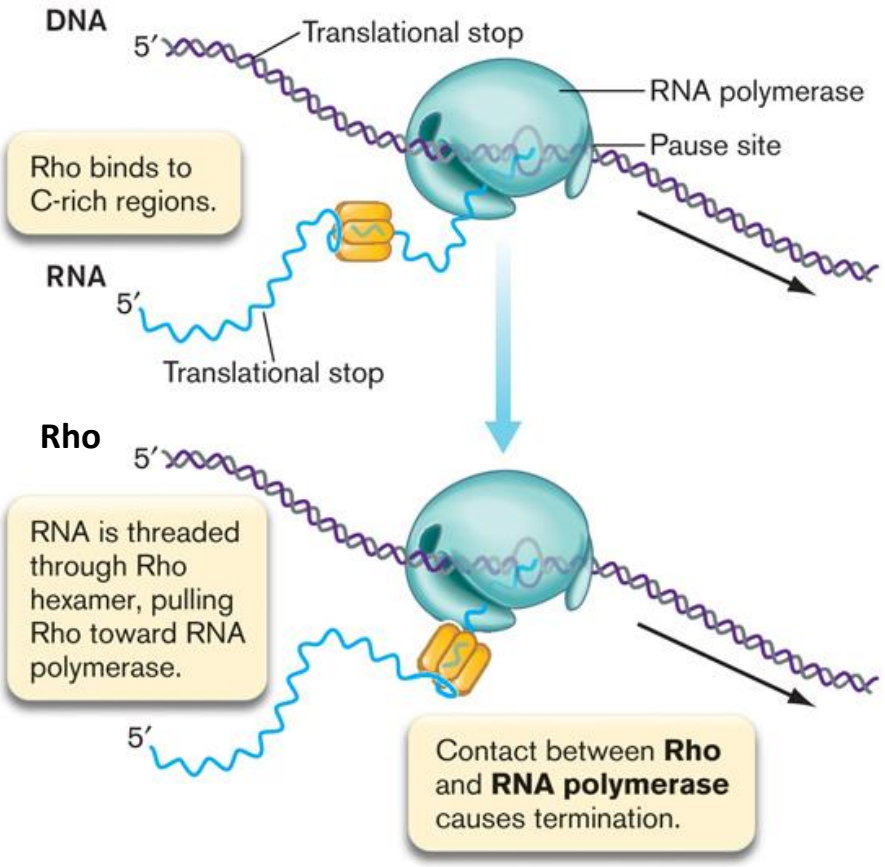
3. Terminace
Zastavení pohybu RNA-polymerázy - uvolnění hotové RNA - uvolnění RNA-polymerázy

A) závislá na Rho-faktoru
B) nezávislá na Rho-faktoru

Rho-faktor: protein katalyzující uvolnění dokončeného RNA-řetězce z templátového (negativního) DNA-řetězce

3A) Terminace závislá na Rho-faktoru

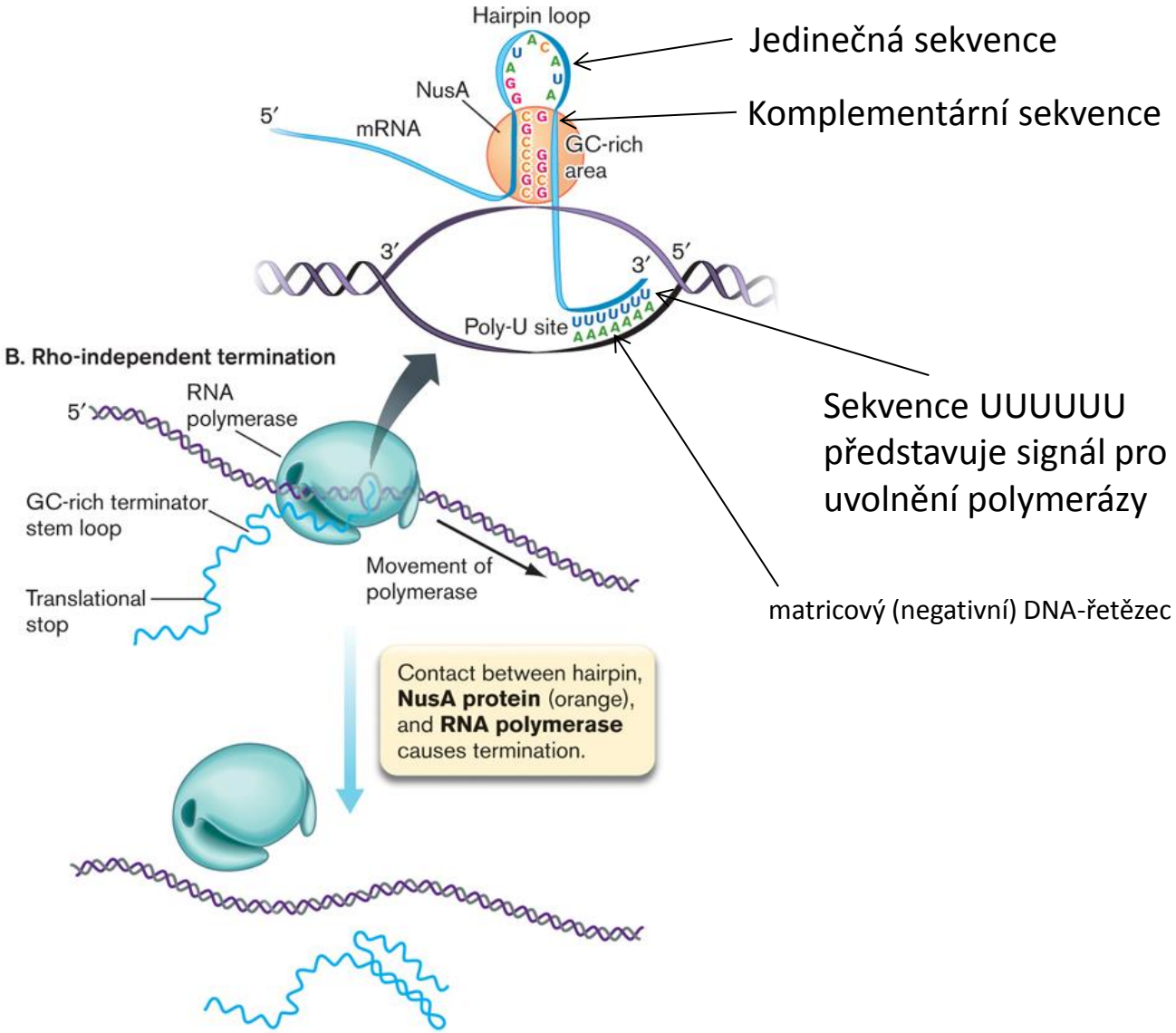
- Rho protein aktivní ve formě hexameru
- váže se během transkripce na 5'-konec mRNA a pohybuje se za RNA-polymerázou
- v terminátoru se RNA-polymeráza zastaví, rho-faktor ji dostihne
- Rho-faktor katalyzuje uvolnění mRNA z DNA-řetězce a uvolnění RNA-polymerázy (za spotřeby ATP)



Rho-faktor: protein katalyzující uvolnění dokončeného RNA-řetězce z matricového (negativního) DNA-řetězce

3B) Terminace nezávislá na Rho-faktoru

- Tvorba vlásenky na RNA, na konci se sekvencí UUUUUU - nestabilní hybrid DNA-RNA → rozpad
- Uvolnění NusA-proteinu



Strukturní geny – mRNA

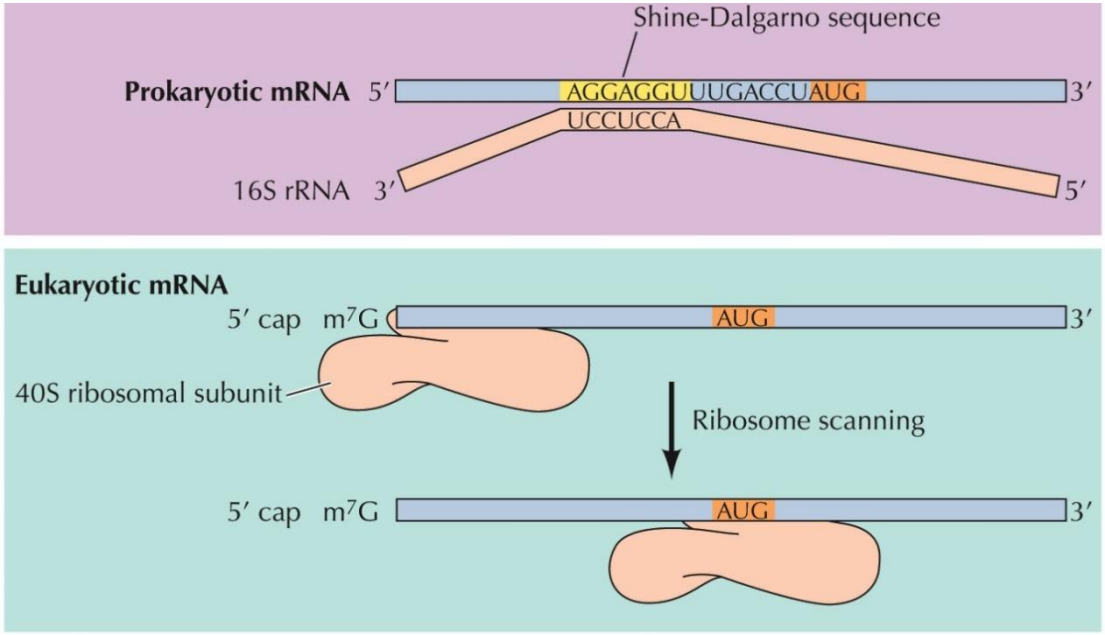
Překládají se do polypeptidu

- Transkripcí transkripční jednotky obsahující **strukturní geny** vzniká **mRNA**

- mezi promotorem (popř. za operátorem) a prvním strukturním genem leží **vedoucí sekvence s Shineovou-Dalgarno sekvencí**, která zajišťuje vazbu na ribozom a nepřekládá se.

Shineova-Dalgarno sekvence v mRNA: **5' AGGA 3'**
- vazba na ribozom (k 16 S-rRNA podjednotky 30S): 3' UCCU 5'

- pokud primární transkript neobsahuje Shineovu-Dalgrinovu sekvenci, nemůže se vázat k ribozomu a působí jako funkční RNA

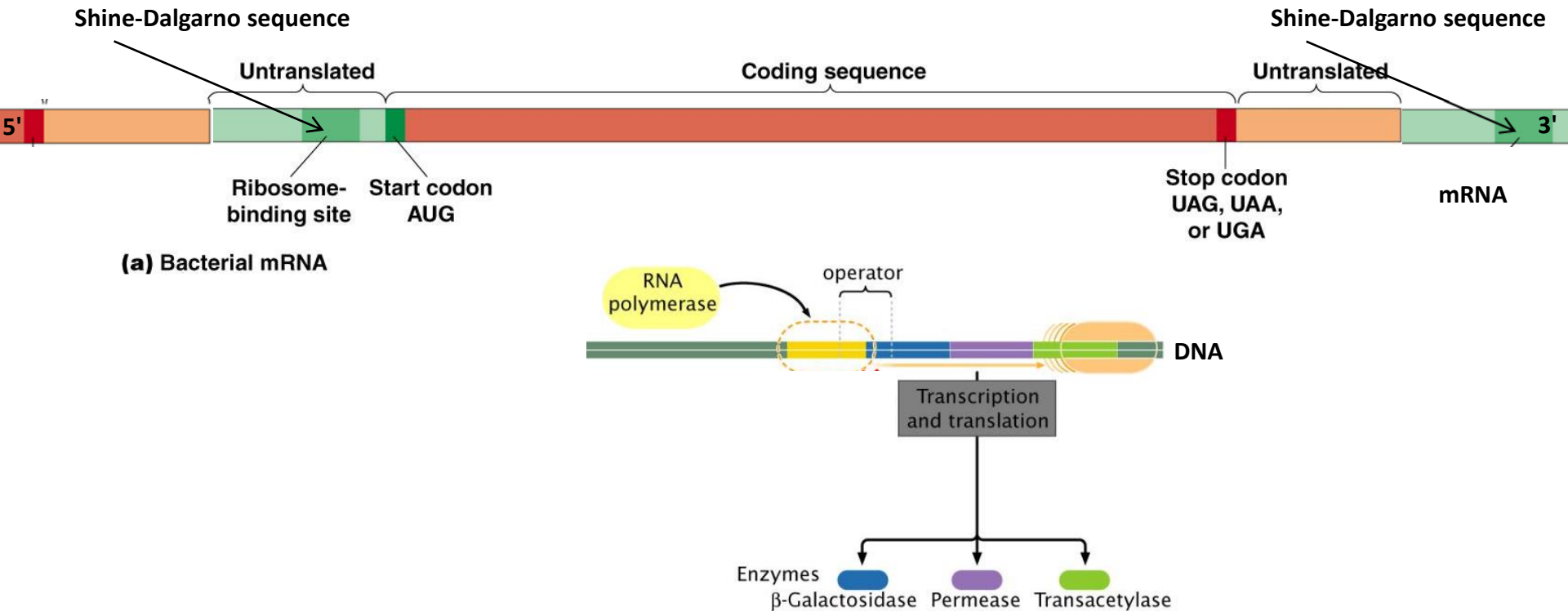


Funkční RNA: RNA, které nejsou určeny k translaci (tRNA, rRNA, miRNA, siRNA)

THE CELL, Fourth Edition, Figure 8.8 © 2006 ASM Press and Sinauer Associates, Inc.

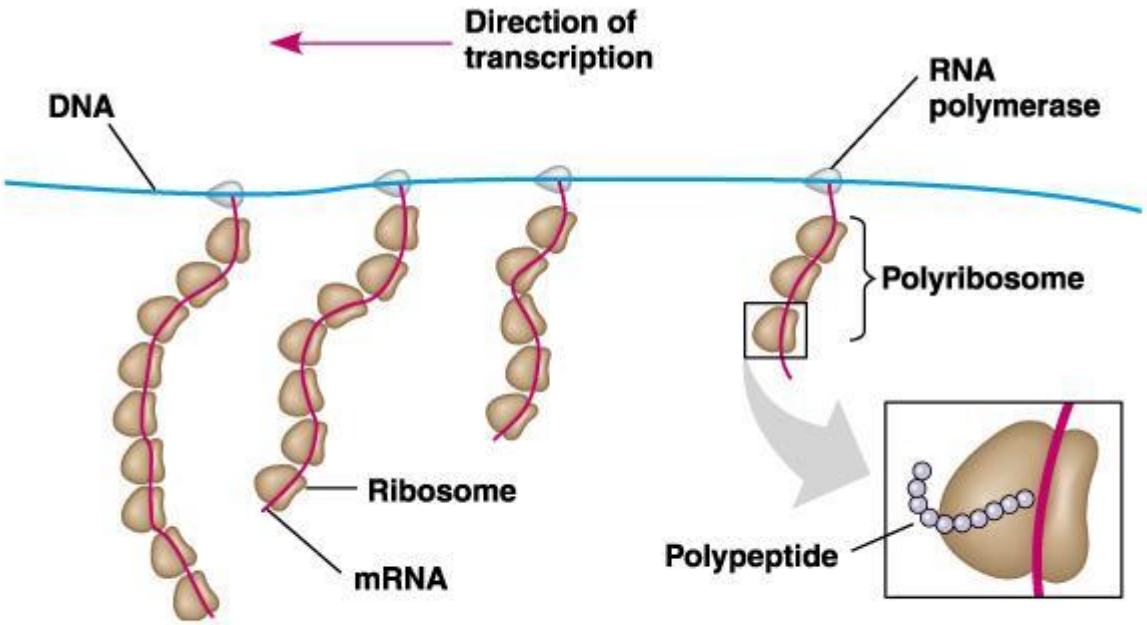
mRNA se strukturními geny

- Na 5'-konci obsahuje přepis vedoucí sekvence s Shineovou-Dalgarnovou sekvencí, nepřekládá se
- Na 3‘-konci za stop-kodonem obsahuje nepřekládanou sekvenci
- Jeden strukturní gen se překládá do jedné molekuly polypeptidového řetězce
- U prokaryot jsou geny polycistronní (více genů na jednom transkriptu mRNA)
    - každý gen na transkriptu obsahuje svůj start a stop kodon a svou Shine-Dalgarno sekvenci pro vazbu ribozomu
    - na DNA mají jeden společný promotor a jednu terminační sekvenci na 3‘-konci. Promotor není součástí transkripční jednotky.



Bakteriální mRNA

- **posttranskripčně se neupravuje** a slouží přímo pro tvorbu polypeptidu
- rozpad během několika minut účinkem ribonukleázy (RNázy) ve směru 5' → 3'
- **translace** molekuly mRNA na ribozomu probíhá **současně s** její **transkripcí**. Polypeptidový řetězec se začne syntetizovat ještě před ukončením transkripce
- rychlosti: 40 nukleotidů za sekundu; 13 aminokyselin za sekundu; až 15 iniciací transkripce za minutu u jedné transkripční jednotky
- **Polyribozom:** více ribozomů na jedné mRNA urychluje transkripci
- **Spojení transkripce s translací** umožňuje efektivní syntézu proteinů (např: 15 molekul mRNA, každá pokryta 30 ribozomy)



Reprinted with permission from O. L. Miller , Jr., B. A. Hamkalo, and C. A. Thomas, Jr., Science 169 (1970):392. Copyright © 1970 American Association for the Advancement of Science.
©1999 Addison Wesley Longman, Inc.

Bakteriální rRNA

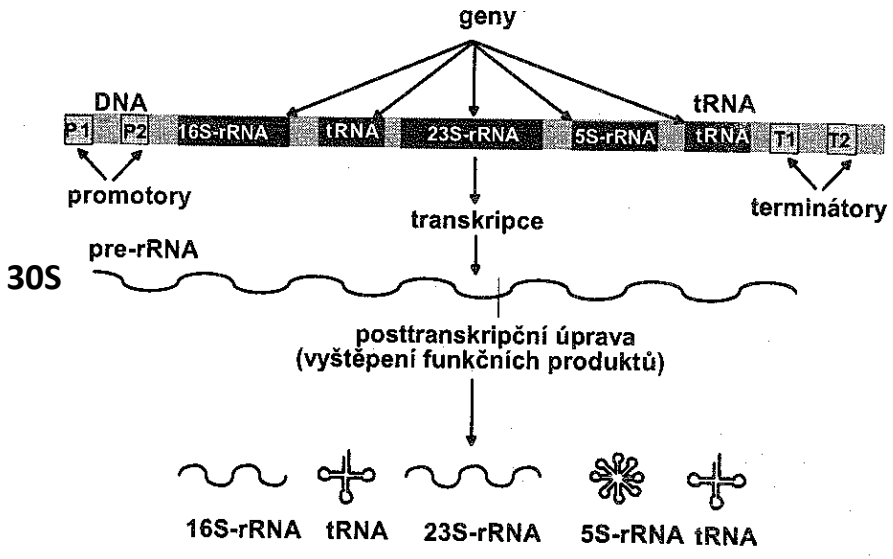
- geny pro rRNA na chromozomu v 5-9 kopiích

- každá transkripční jednotka má 2 promotory (P1, P2) a 2 terminátory (T1, T2)

- mezi některými geny jsou vmezeřeny geny pro tRNA

- nejprve přepis do pre-rRNA: sedimentační koeficient 30S

- 30S jsou štěpeny RNázou III na sekvence 5S, 16S a 23S



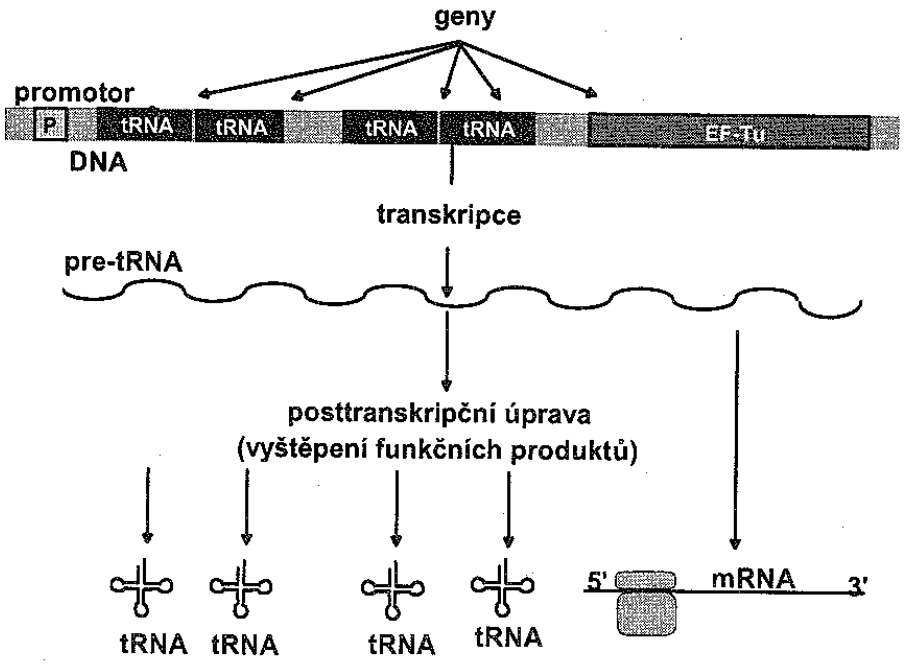
Jednotka S (Svedberg) - sedimentační koeficient
(veličina udává čas, za který proběhne sedimentace dané makromolekuly při její ultracentrifugaci)

Bakteriální tRNA

- u E coli 2 multigenní transkripční jednotky s geny pro tRNA

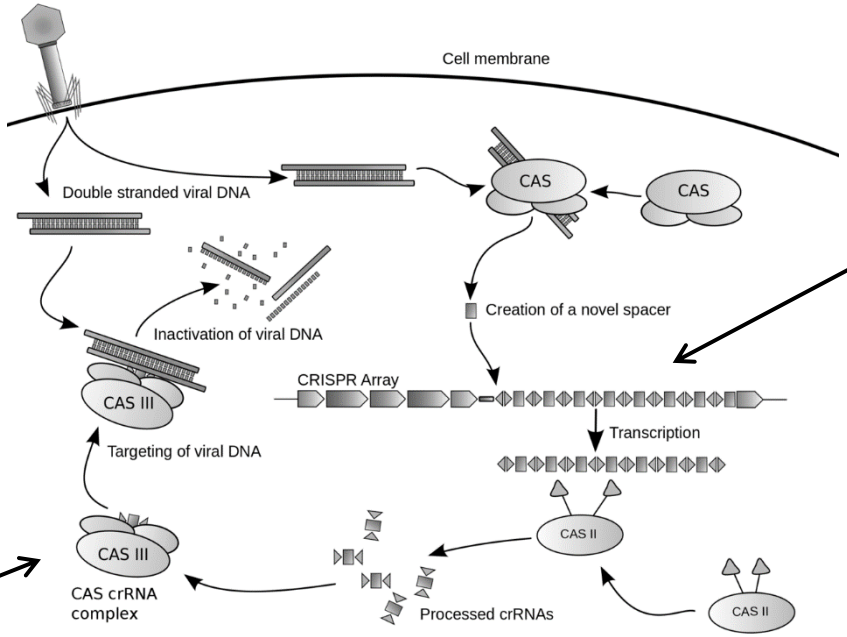
- jen jeden promotor, poslední gen je strukturní (např. pro elongační faktor EF-Tu)

- strukturní gen umožňuje vazbu na ribozom, protože obsahuje Shineovu-Dalgarnovu sekvenci



CRISPR (Clustered regularly-interspaced short palindromic repeats)

- adaptivní (získaná) imunita bakterií - obrana cizímu genetickému materiálu (např. virální DNA)
- segment prokaryotické DNA se "**spacer DNA**" obsahujícími části DNA virů z předešlých infekcí
- při nové infekci je třeba vytvořit novou "spacer DNA"
- **Transkripce do crRNA (CRISPR RNA)**, komplementární s virovou DNA, spolu s CAS (crispr-associated) proteiny
- crRNA s CAS proteiny tvoří "**interference komplexy**"
- párování s odpovídající sekvencí virové DNA a její inaktivace

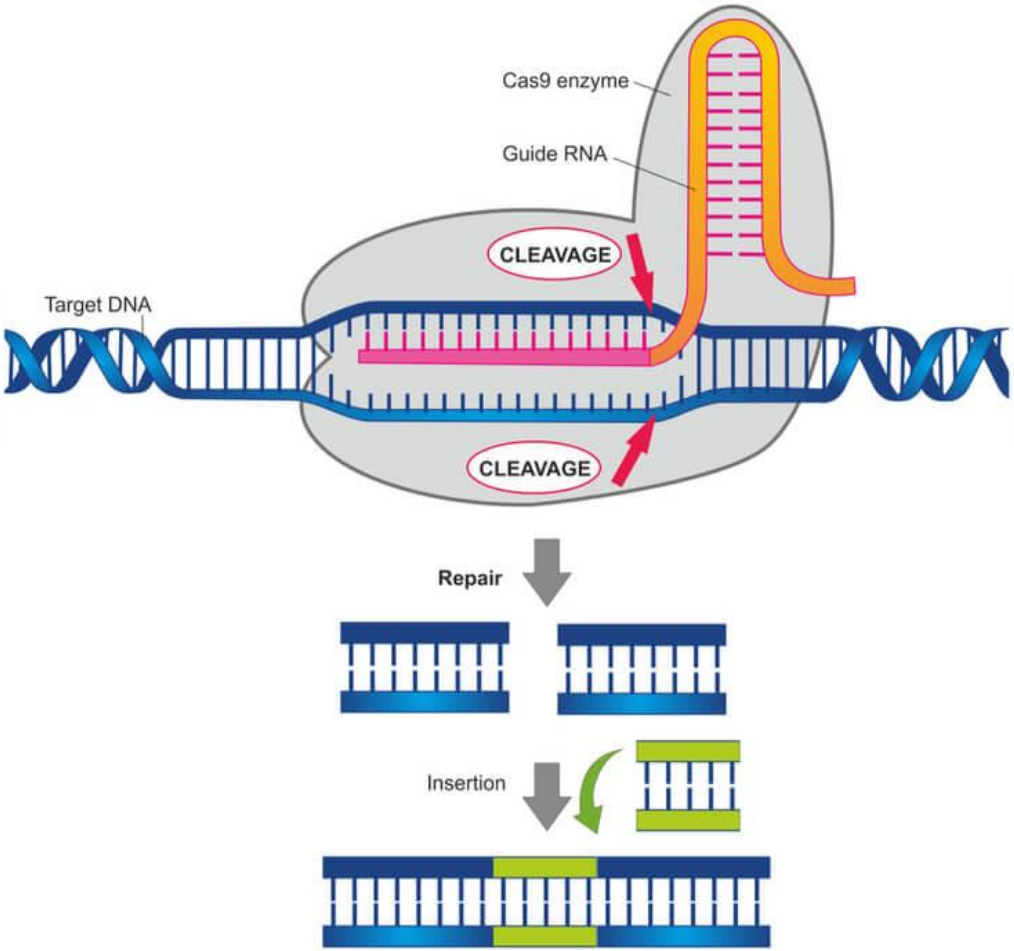


spacer DNA

interference complex

CRISPR-Cas9

Velké uplatnění v editaci lidského genomu: vhodná guide RNA + Cas9 protein štěpí DNA ve zvoleném místě (inaktivace nebo vložení jiné sekvence)



MENDEL LECTURES

21st March 2019
at 5 PM

CRISPR-Cas9: a Bacterial Immune System Repurposed as a Transformative Genome Engineering Technology

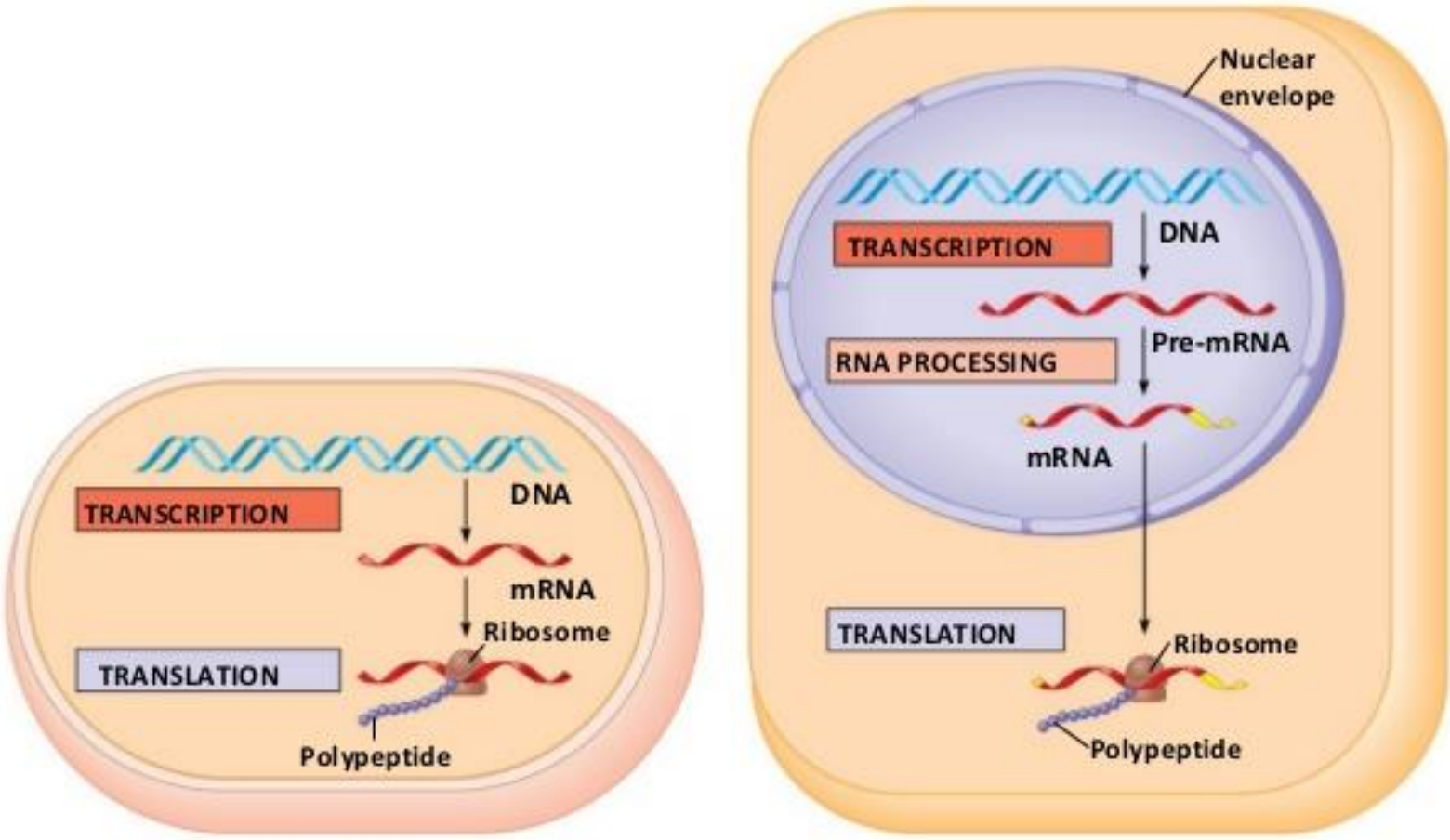
by Emmanuelle Charpentier
(Max Planck Institute for Infection Biology, Berlin, Germany)

Professor Charpentier is best known for her role in deciphering the molecular mechanisms of the bacterial **CRISPR/Cas9** immune system and repurposing it into a **tool for genome editing**. In collaboration with Jennifer Doudna's laboratory, Charpentier's laboratory showed that Cas9 could be used to make cuts in any DNA sequence desired

Emmanuelle Marie Charpentier (born 11 December 1968) is a French professor and researcher

Mendelův refraktář, Mendelovo muzeum

2. Transkripce eukaryotického genomu



(a) Bacterial cell

(b) Eukaryotic cell

© 2011 Pearson Education, Inc.

Rozlišujeme transkripci jadernou, mitochondriální a chloroplastovou.

Transkripce jaderné složky

- jaderné geny jsou na chromozomech
- tvoří primární transkripty

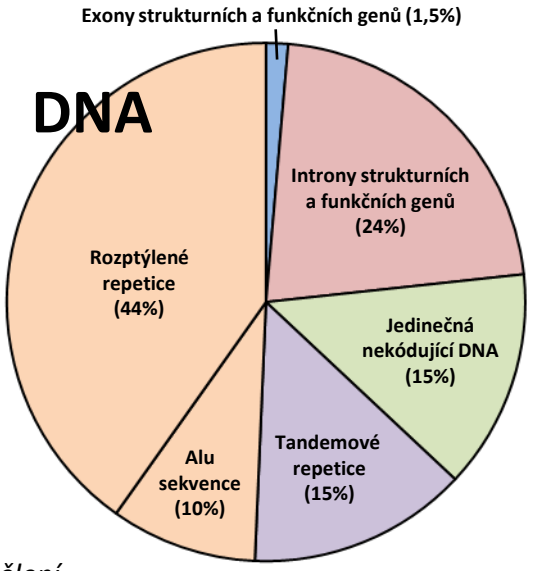
Typy RNA

1. Kódující RNA

- informace z DNA je přenesena mRNA do ribozomu, kde je přeložena do sekvence aminokyselin tvořících proteiny
- asi jen 3% všech transkriptů

2. Nekódující RNA

- cca 97% transkriptů
- zejm. introny vystřižené z mRNA, rRNA, tRNA a regulační RNA



Alu sekvence - transpozonální DNA (schopná měnit pozici), funkce větš. neznámá, hraje roli při buň. dělení

Polycistronní vs. monocistronní mRNA

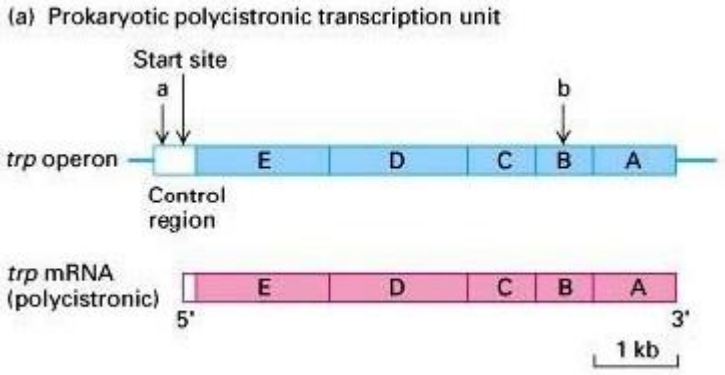
Na rozdíl od prokaryot mají eukaryota pouze monocistronní mRNA

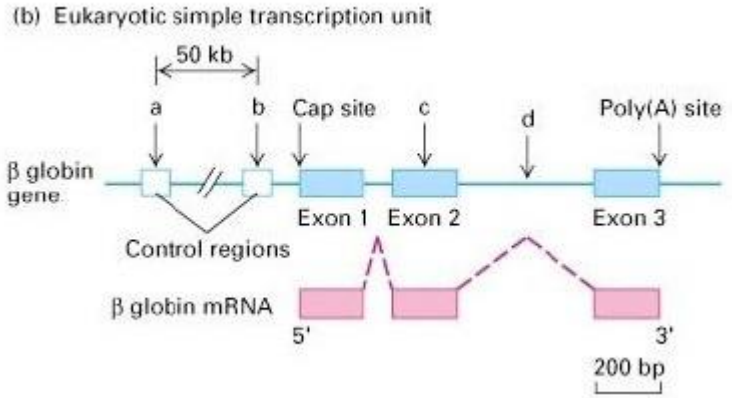
Eukaryotická mRNA

- obsahuje kódující sekvenci pouze pro jeden polypeptid (monocistronní)
- jeden iniciační a jeden terminační kodon

Prokaryotická mRNA

- obsahuje kódující sekvenci pro několik genů, většinou jedné metabolické dráhy
- mRNA transkript obsahuje hodně iniciačních a terminačních kodonů





http://www.majordifferences.com/

Typy RNA

1. Kódující RNA

- pre-mRNA: prekurzorová mRNA (též hnRNA - heterogenní jaderná RNA)

- primární transkript obsahující přepisy strukturních genů
- je upravován do mRNA

2. Nekódující RNA

- pre-rRNA: prekurzorová ribozomová RNA

- posttranskripční úpravou se štěpí na
  a) 5,8S-rRNA, 18S-rRNA a 28S-rRNA u savců
  b) 5,8S-rRNA, 16S-rRNA a 25S-rRNA u rostlin

- pre-tRNA: prekurzorová transférová RNA

- štěpí se na různé druhy tRNA

- 5S-rRNA: tvoří se transkripcí genů pro 5S-rRNA

- Malé RNA: Nízkomolekulární stabilní RNA (80-300 nukleotidů)

- řídí sestřih a posttranskripční úpravy pre-RNA (katalyzovány RNA-polymerázami II a III)
  a) malé jaderné RNA (snRNA)
  b) malé jadérkové RNA (snoRNA)
  c) malé cytoplazmatické RNA (scRNA)
  d) regulační RNA (miRNA a siRNA)

snRNA se účastní sestřihu pre-mRNA ve spliceazomu

Transkripční faktory (TF)
- regulační proteiny
- vážou se na regulační oblasti promotoru nebo zesilovače (enhancer) transkripce
- nutné pro zahájení transkripce
- působí ve skupině, nasednou na promotor a na ně se váže RNA-polymeráza

Typy TF:
1. Obecné TF: ve většině eukaryot, geny potřebné pro základní funkce všech buněk
2. Speciální TF: vyskytují se v určitých tkáních v určitý čas

Transkripční aktivita = rychlost syntézy RNA: počet primárních transkriptů za minutu

1. Bazální transkripční faktory:
    - nízká aktivita, minimální požadavky buňky
    - umožňují zahájení transkripce

2. Konstitutivní transkripční faktory:
    - zvýšená aktivita
    - konstitutivní TF se přidávají k bazálním TF

3. Indukovatelné transkripční faktory:
    - úprava transkripční aktivity v reakci na vnější podmínky
    - význam při diferenciaci

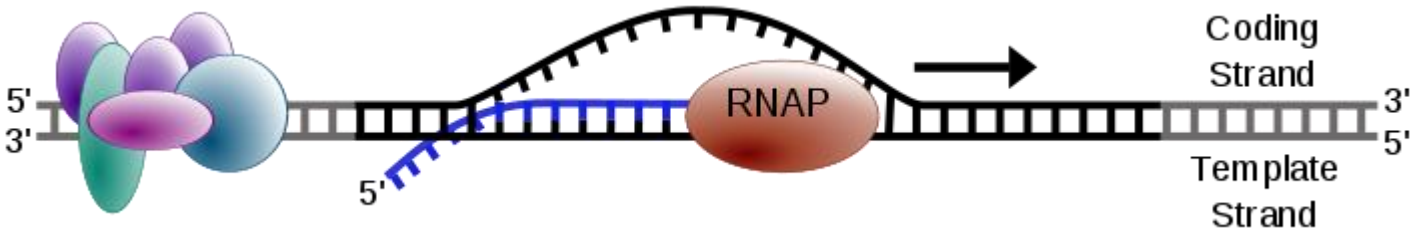
Eukaryotické DNA-dependentní RNA-polymerázy

Každá má svůj specifický promotor (bakterie jeden typ RNA-polymerázy a jeden typ promotoru)

1. RNA-polymeráza I
   - katalyzuje syntézu pre-rRNA
   - pouze v jadérku*

2. RNA-polymeráza II
   - syntéza mRNA (strukturní geny) a malých RNA
   - v jádře

3. RNA-polymeráza III
   - syntéza pre-tRNA, 5S-rRNA a malých RNA
   - v jádře



**v jadérku se skládají ribozomy z proteinů a rRNA*

Promotor pro RNA-polymerázu II obsahuje krátké sekvence

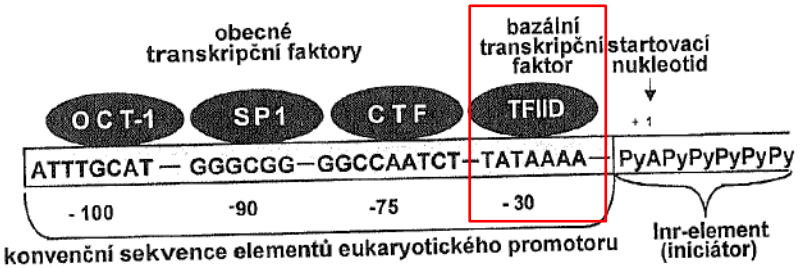
1. TATA-box (též Hognessův box): T A T A A A A

-34 až -26 od startovacího nukleotidu

- vazba TF **TFIID** - specificky rozeznáván RNA-polymerázou II

2. CAAT-box: G G C C A A T C T

- nukleotidy -75 až -80
- vazba TF **CTF/NF1**, zvyšuje sílu promotoru (enhancer)



Promotory různých genů se liší počtem, umístěním a kombinací těchto elementů. Všechny promotory však musí obsahovat jeden nebo více elementů, aby mohly zahájit bazální transkripci.

Provozní geny mají jen Inr-element bez TATA-boxu (Hognessův box).

3. GC-box: G G G C G G

- nukleotid -90
- vazba TF **SP1**, zvyšuje sílu promotoru (enhancer)
- je fosforylován proteinkinázou vázanou na DNA - stimulace tvorby přediniciačního komplexu
- umožňuje vazbu TFIID na TATA-box

4. Oktamer: A T T T G C A T

- váže se na konstitutivní TF **OCT-1**

5. Startovací nukleotid: Iniciátor (Inr-element)

- obvykle **A** uvnitř úseku s pyrimidinovými bazemi (C nebo T)

Tyto se vyskytují ve většině promotorů RNA-polymerázy II

Iniciace transkripce polymerázou II

- Transkripční faktor **TFIIF** umožňuje umístnění RNA-polymerázy na promotor (3.)

- Uzavřený transkripční komplex je ještě inaktivní (3.)

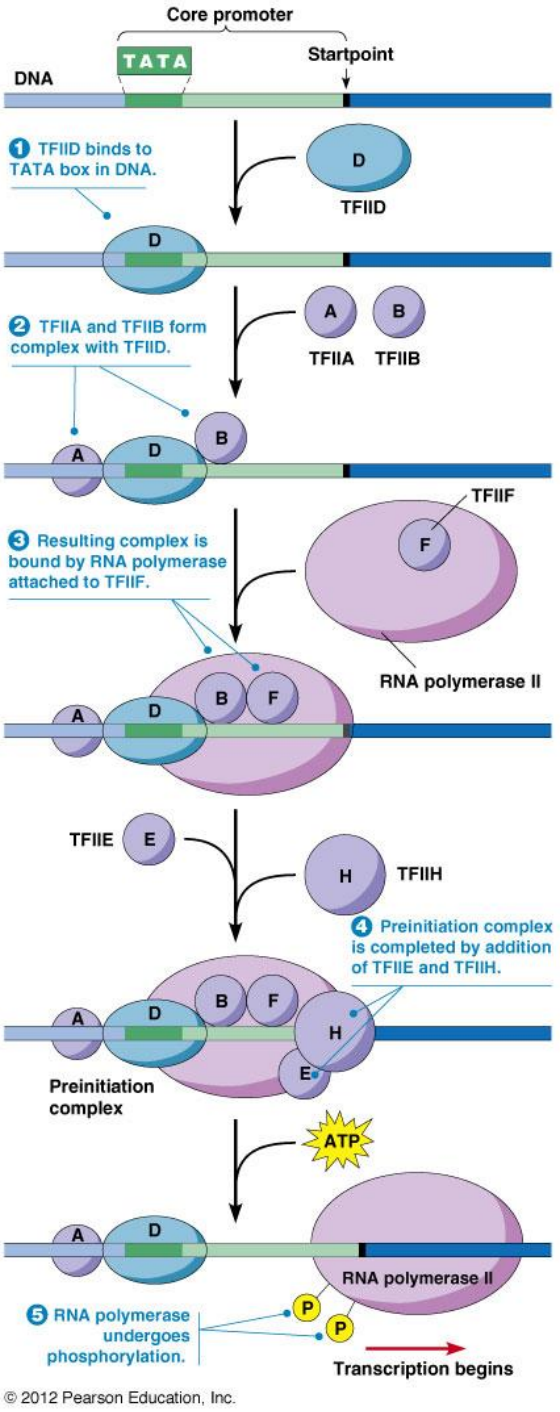
- Transkripční komplex je aktivován až **TFIIH** tak, že fosforyluje RNA-polymerázu (4, 5)

- Všechny TF kromě TFIID a TFIIA se uvolní a aktivní RNA-polymeráza elonguje pre-mRNA (hnRNA) (5.)

Význam transkripčních faktorů:

"Umožňují rozeznat místa, kam se má navázat RNA-polymeráza II a aktivují ji."

Pokud promotor nemá TATA-box, začíná transkripce na Inr-elementu



Terminace transkripce polymerázou II

Polyadenylační signál: T T A T T T na negativním řetězci DNA

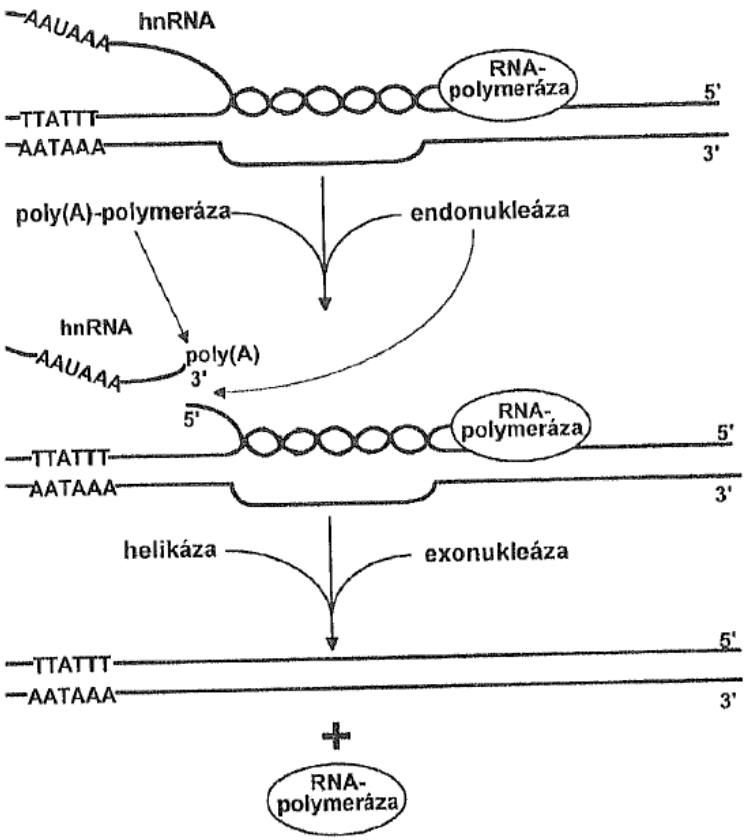
- do pre-mRNA přepsán jako A A U A A A

- označuje terminaci transkripce

- sekvence je rozeznána endonukleázou - štěpí 10-30 nukleotidů za signálem

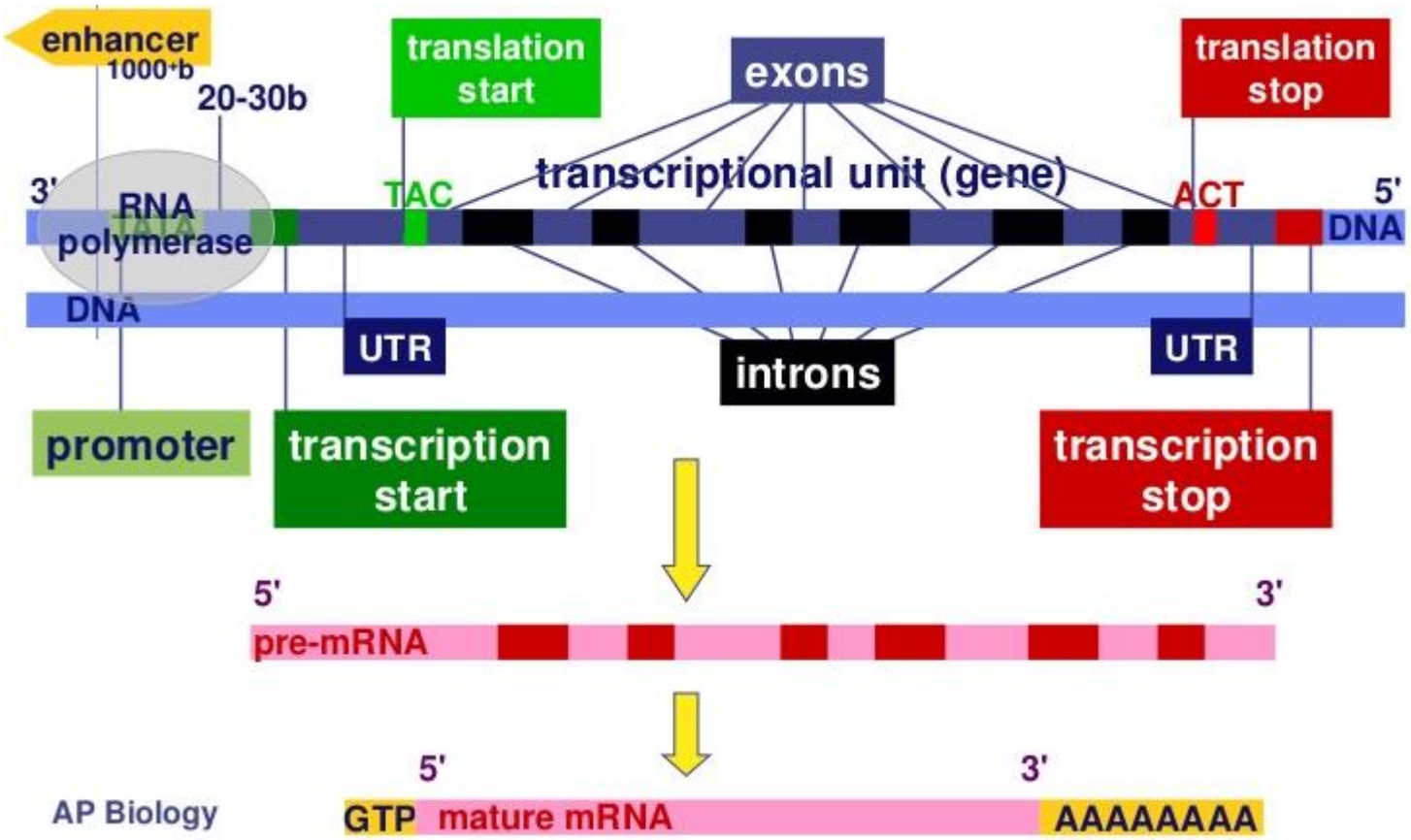
- poly(A)-polymeráza katalyzuje polyadenylaci 3'-konce

- helikáza rozdělí zbytek hybridní DNA-RNA a zbytková RNA je rozštěpena exonukleázou



Video: Eukaryotická transkripce

Exonukleáza: štěpí nukleotidy od krajů
Endonukleáza: štěpí nukleotidy od prostředku
Helikáza: oddaluje řetězce DNA nebo RNA



RNA polymeráza nasedá na TATA box
UTR - untranslated region
Eukaryotické mRNA jsou monocistronní - obsahují kodující sekvenci pouze pro jeden polypeptid

Translace:
- *začíná na mRNA na* "sekvenci Kozakové" CAAA**AUG** (což na DNA odpovídá sekvenci TAC)
- *končí na mRNA na stop kodonech* UAG (Amber), UGA (Opal), UAA(Ochre) - na DNA odpovídá (ATC, ACT, ATT)

Regulační RNA

- krátké molekuly RNA se sekvencí komplementární k určitým částem mRNA nebo DNA
- působí mechanismem **RNA interference** (RNAi)
    - typicky inhibují genovou expresi vazbou na mRNA
    - 2006 Nobelova cena za fyziologii a medicínu pro A. Fire a C. Mello za výzkum RNAi
    - epigenetická **posttranskripční regulace** exprese a též **obrana buněk** proti parazitickým nukleotidovým sekvencím (např. RNA virům)
    - hrají roli též ve vývoji
    - s tzv. Argonaute proteiny tvoří komplex zvaný RISC (RNA-induced silencing complex)
    - využívána ve výzkumu pro supresi exprese specifických genů

1. miRNA (microRNA; 22 nukleotidů)
    - endogenní původ, transkripcí genomové DNA

2. siRNA (small inhibitory RNA; 20-25 nukleotidů)
    - exogenní původ (např. virový)

siRNA a miRNA jsou si velmi podobné
Epigenetická regulace genové exprese

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006

Photo: L. Cicero
Andrew Z. Fire
Prize share: 1/2

Photo: J. Mottern
Craig C. Mello
Prize share: 1/2

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006 was awarded jointly to Andrew Z. Fire and Craig C. Mello *"for their discovery of RNA interference - gene silencing by double-stranded RNA"*

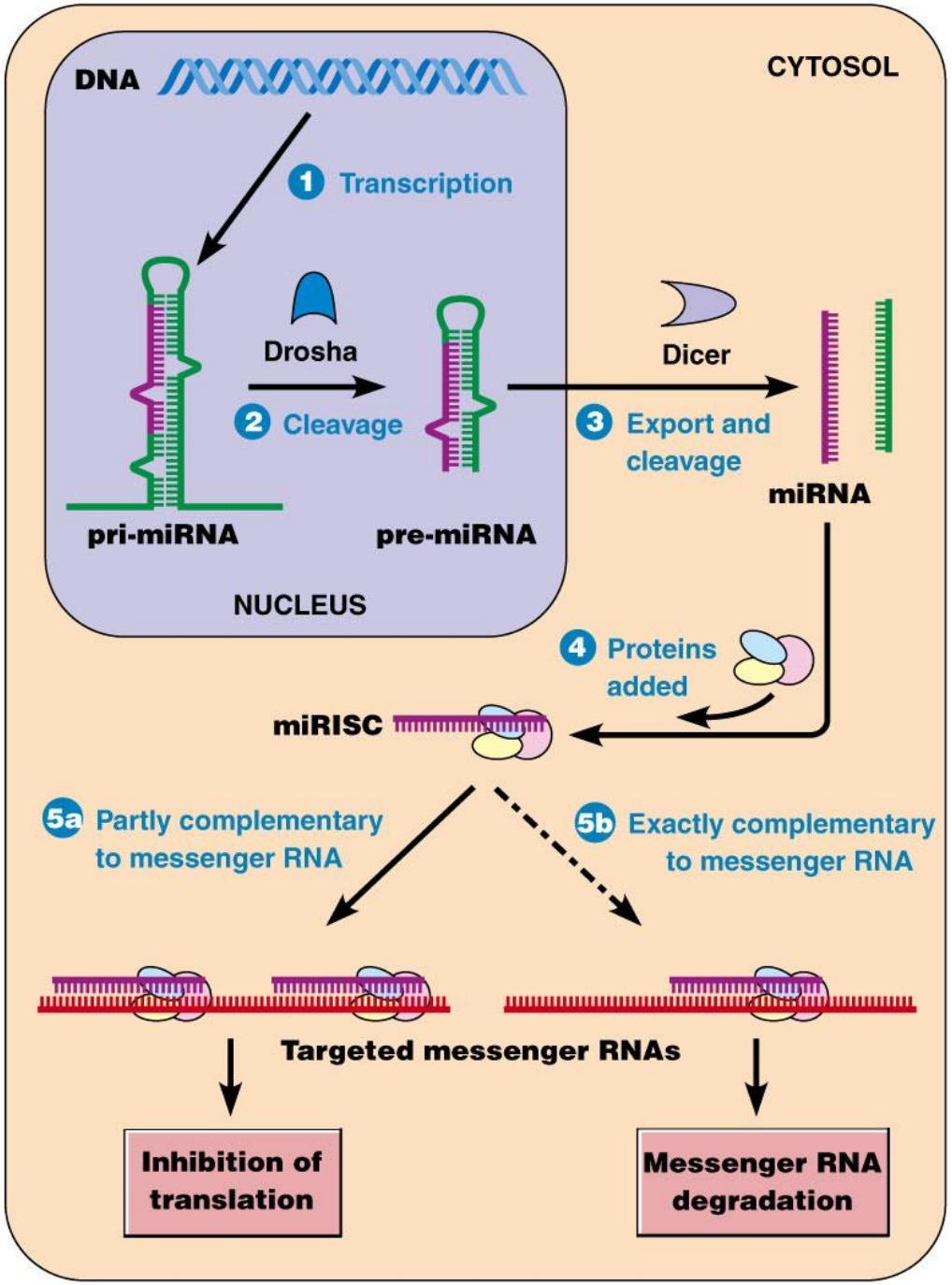
Photos: Copyright © The Nobel Foundation

1. miRNA (microRNA; 21-22 nukleotidů)

- vlásenka pri-miRNA je štěpena RNAázou "Drosha" na pre-miRNA (70 nukleotidů)

- export pre-miRNA do cytoplasmy - štěpení Dicerem na miRNA 21-22 nukleotidů

- spolu s proteiny tvoří tzv. miRISC (miRNA-induced silencing complex)



© 2012 Pearson Education, Inc.

1. miRNA (microRNA; 21-22 nukleotidů)

- Funkce: RNA silencing a posttranskripční regulace genové exprese
- párování s komplementárními sekvencemi mRNA (nemusí být 100% komplementární)
- mechanismy silencingu:
    a) štěpení řetězce mRNA na dva kusy (endonukleázami)
    b) destabilizace mRNA zkracením poly(A) konce (dřívější degradace exonukleázami)
    c) snížení účinnosti translace do proteinu na ribozomu (fyzicky blokuje)
- vyskytuje se nejprve ve formě shRNA (short hairpin RNA) - štěpena enzymem zvaným "**Dicer**"
- lidský genom kóduje přes 1000 miRNAs - evolučně konzervované

2. siRNA (small inhibitory RNA; 20-25 nukleotidů)

- Funkce: posttranskripční RNA silencing

- dvojřetězec (štěpena také enzymem Dicerem)

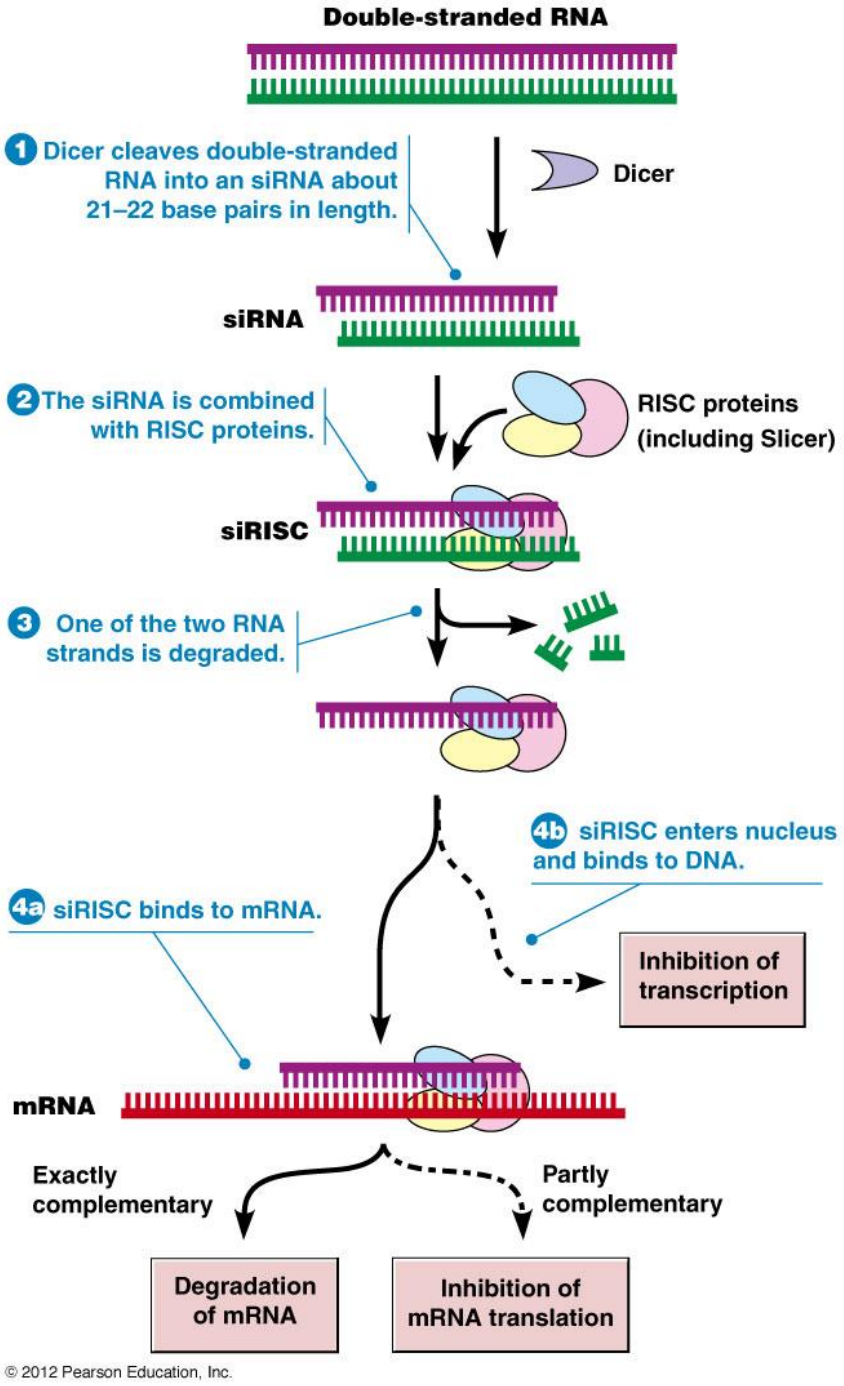
- exogenní původ

- spolu s proteiny tvoří tzv. siRISC (siRNA-induced silencing complex)

- jeden řetězec degradován

- vazba siRISC na cílovou mRNA

- při 100% párování s cílovou sekvencí se mRNA štěpí



3. Posttranskripční úpravy RNA a mechanizmy sestřihu

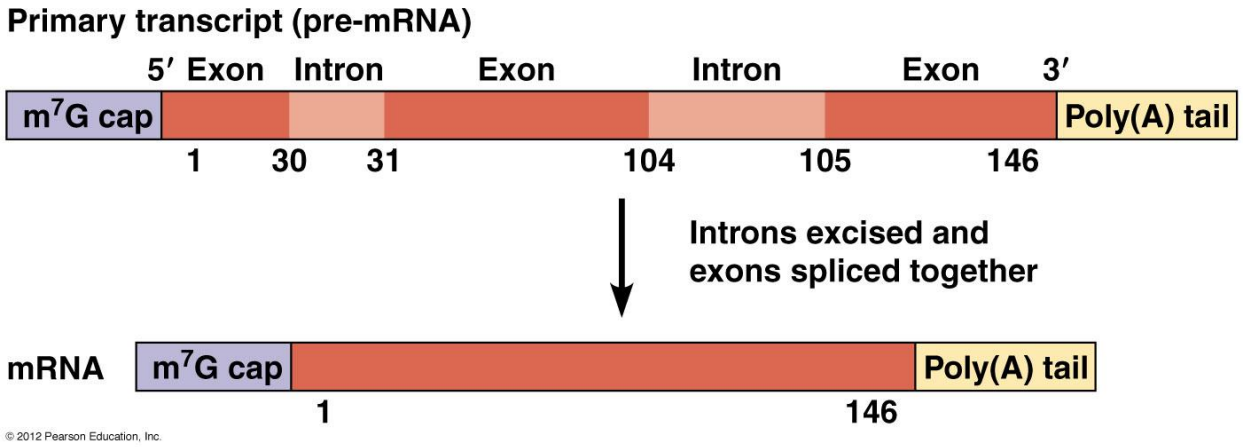
Posttranskripční úpravy

Primární transkripty jsou dlouhé molekuly a musí být zkráceny, aby mohly být transportovány z jádra do cytoplasmy

a) modifikace, které neovlivňují primární strukturu

- tvorba komplexů jaderné pre-mRNA s proteiny
- úprava 5'-konce pre-mRNA tzv. čepičkou
- polyadenylace 3'-konce pre-mRNA

b) úprava primární struktury (sestřih; editace; vystřižení intronů)



Intron (intragenic region): nekódující sekvence RNA uvnitř genu, která je vystřižena
Exon (expressed regions): kódující sekvence RNA, přeložená do proteinů

Modifikace, které neovlivňují primární strukturu

Tvorba komplexů jaderné pre-mRNA s proteiny

- proteiny, které se vážou na pre-mRNA se označují RNP-proteiny

- komplex RNA s RNP-proteiny nazýváme spliceozom

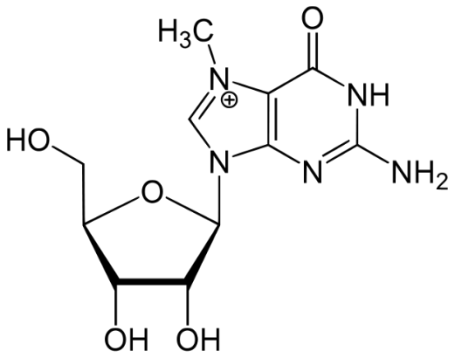
Funkce: RNA-proteiny uvádějí RNA do stavu přístupného k posttranskripčním úpravám

Úprava 5'-konce čepičkou

- čepička: **m^7G**

- 7-metylguanozin se váže na mRNA ve směru 5' - 5'

Funkce: čepička váže proteiny nezbytné pro iniciaci translace



7-Methylguanosine

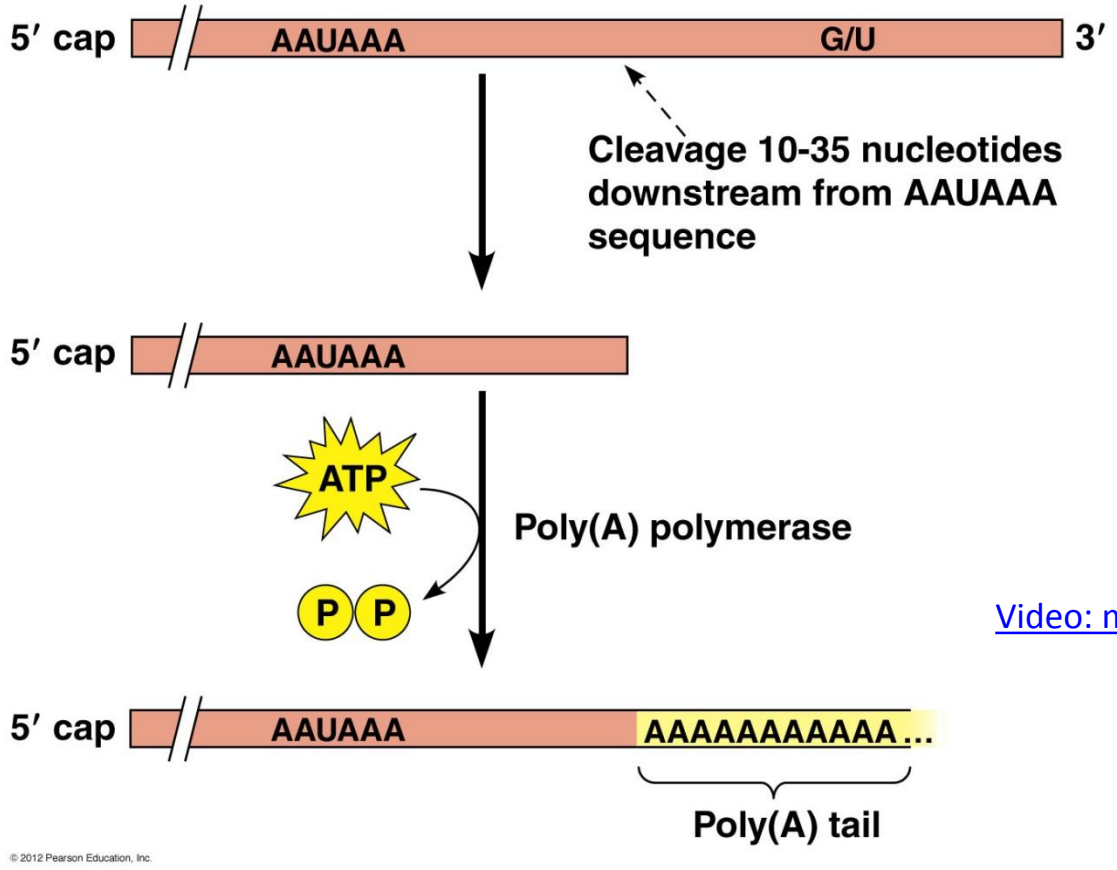
hnRNA (heterogenous nuclear RNA) je synonymum pro pre-mRNA
RNP - ribonucleoprotein

Modifikace, které neovlivňují primární strukturu

Polyadenylace 3'-konce

- K polyadenylačním signálu AAUAAA na 3'-konci pre-RNA se připojí sekvence 50 - 250 nukleotidů (A)
- katalyzována poly(A)-polymerázou

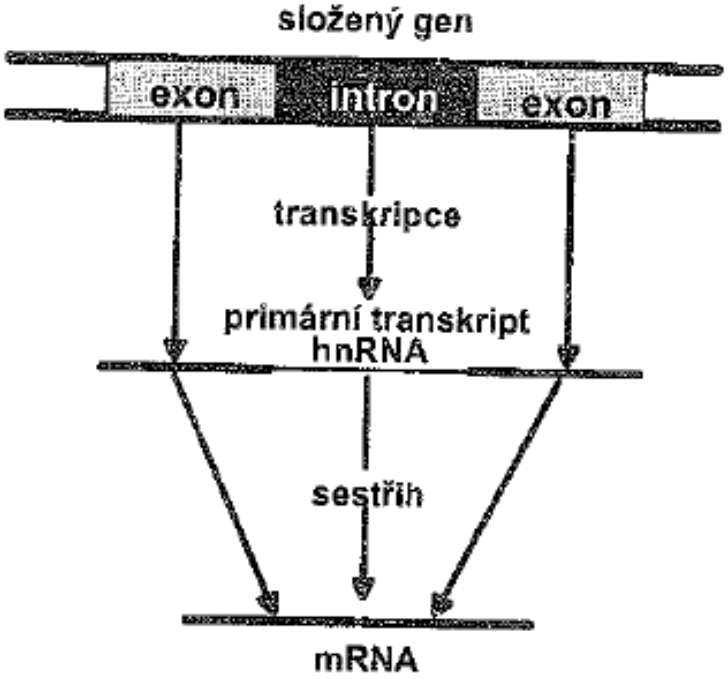
Funkce: ochrana proti účinku exonukleáz (dýl trvá než se dostanou přes AAAA ke kódující sekvenci)



Video: m7G a polyadenylace

Sestřih pre-mRNA (hnRNA) → mRNA

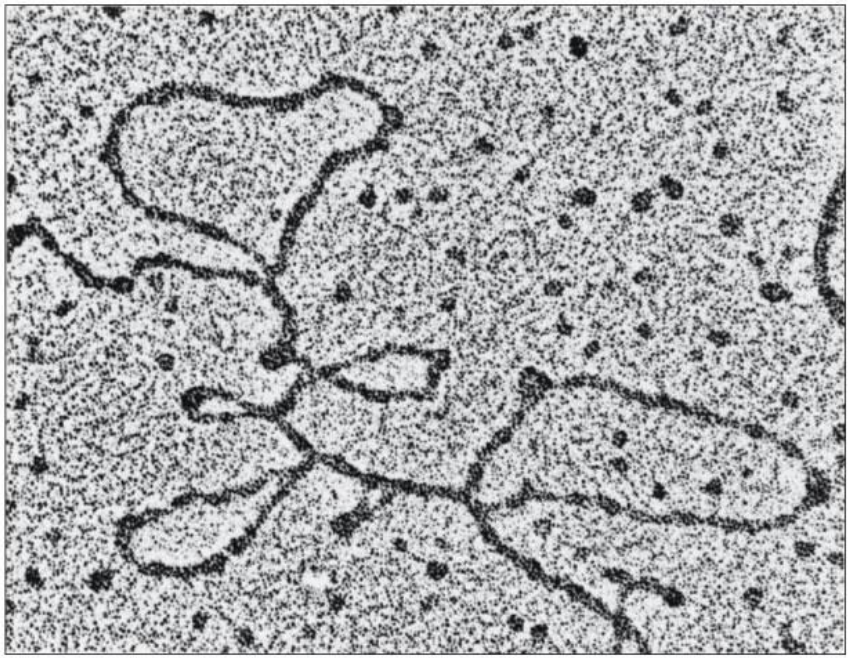
- Úprava primární struktury RNA

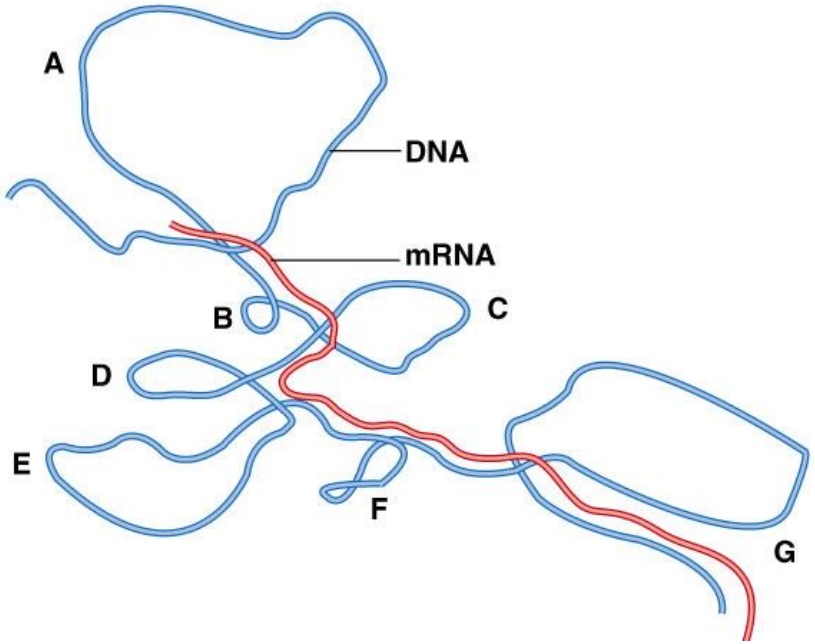


Intron (intragenic region): nekódující sekvence RNA uvnitř genu, která je vystřižena
Exon (expressed regions): kódující sekvence RNA, přeložená do proteinů

Sestřih pre-mRNA → mRNA

Objev intronů:
- při hybridizaci DNA s mRNA pod elektronovým mikroskopem
- určité části na DNA přebývaly (introny)
- tvorba smyček DNA (na obr. A až F)





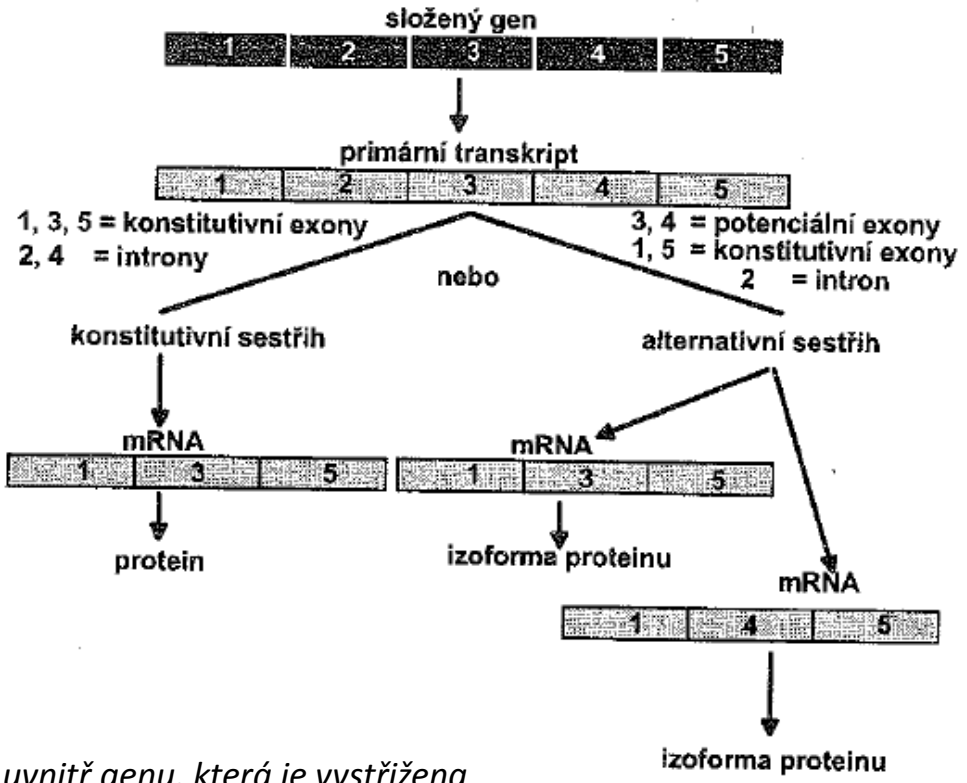
Intron (intragenic region): nekódující sekvence RNA uvnitř genu, která je vystřižena
Exon (expressed regions): kódující sekvence RNA, přeložená do proteinů

Konstitutivní vs. alternativní sestřih

a) Konstitutivní: po sestřihu vždy stejná molekula mRNA → stejný protein

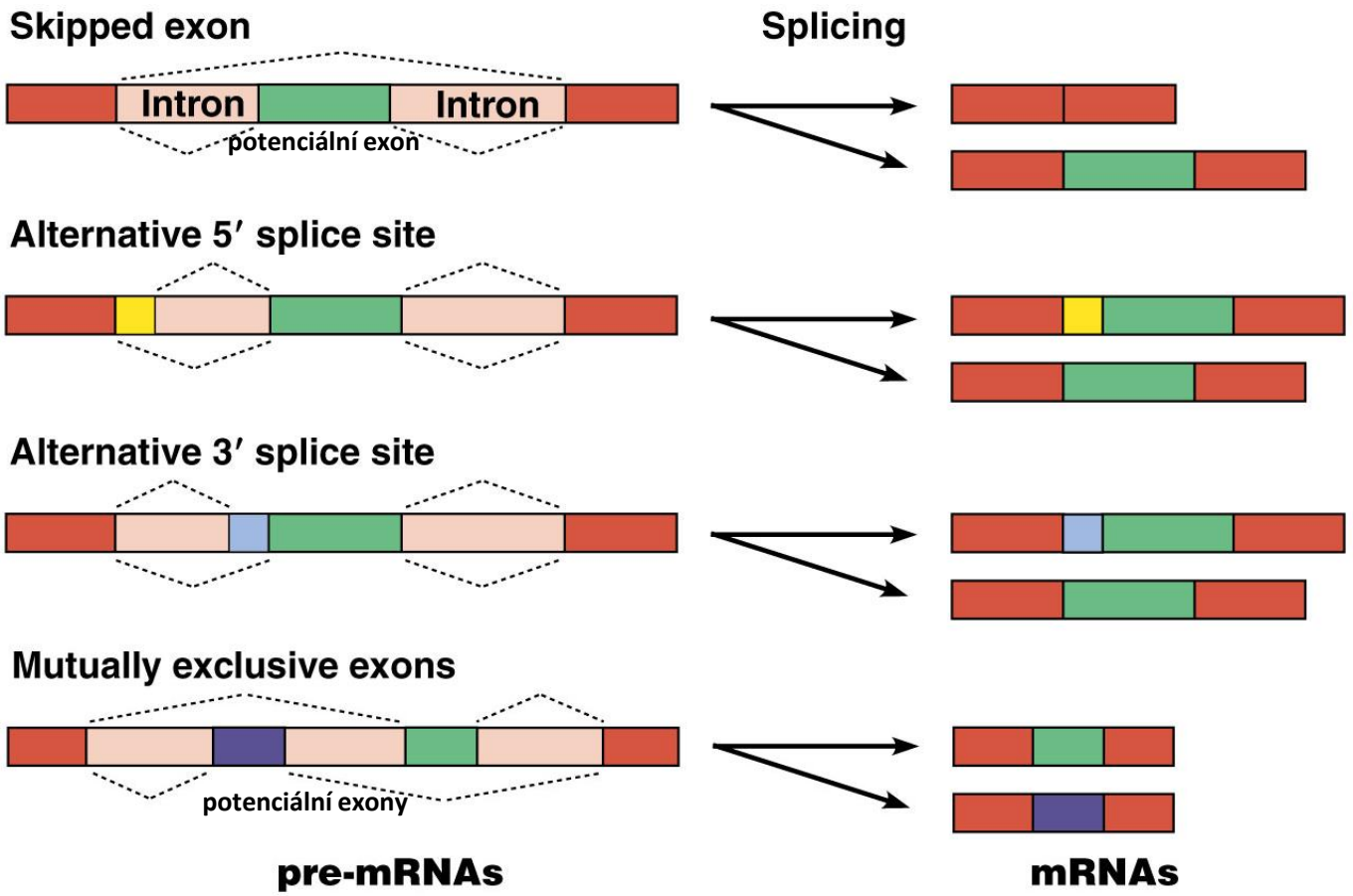
b) Alternativní: vzniká více druhů molekul mRNA → různé izoformy proteinů

- regulace exprese
- regulace poměrů izoforem



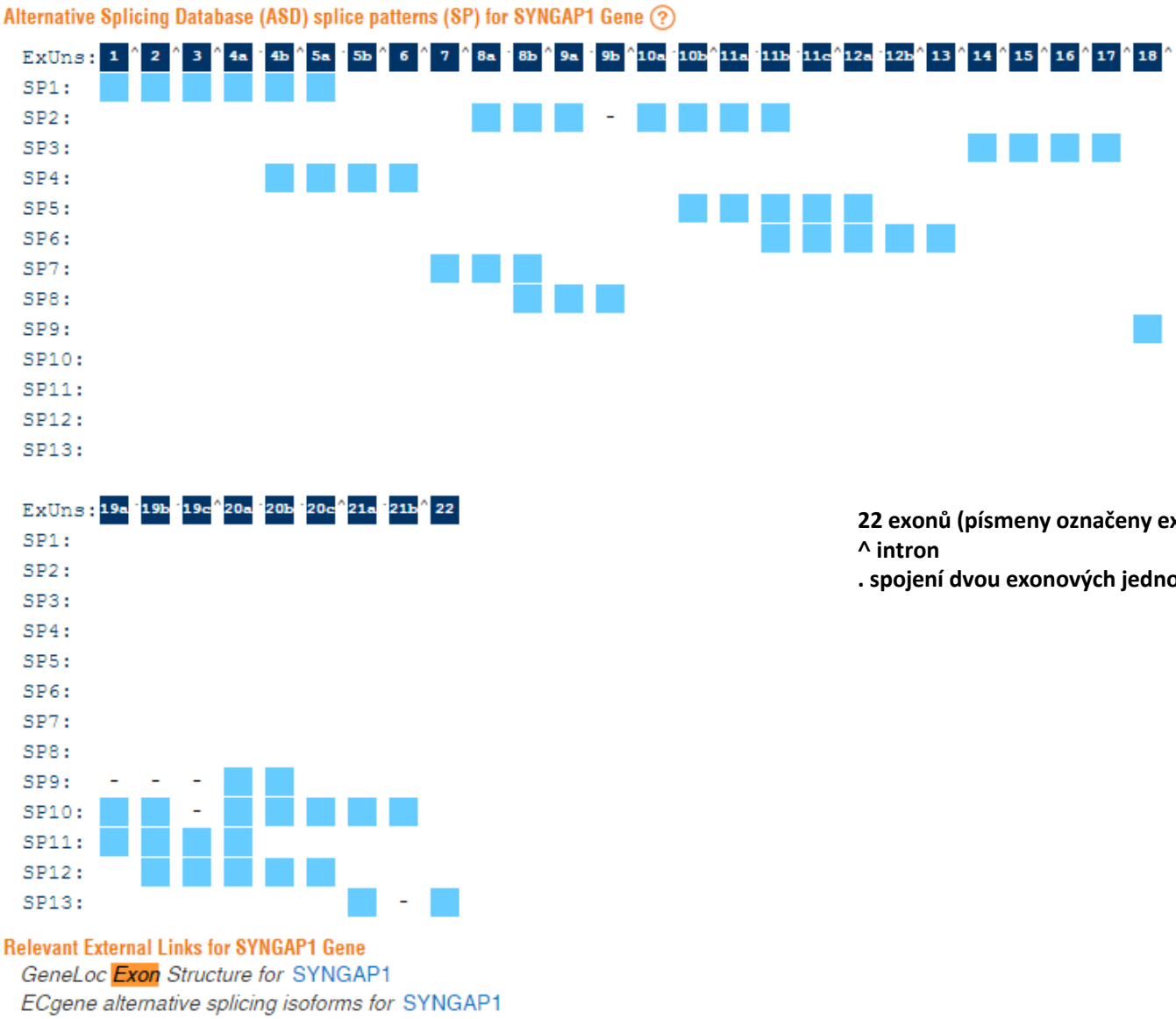
Intron (intragenic region): nekódující sekvence RNA uvnitř genu, která je vystřižena
Exon (expressed regions): kódující sekvence RNA, přeložená do proteinů
- konstitutivní exon: při všech posttranskripčních úpravách působí jako exon
- potenciální exon: při některých posttranskripčních úpravách působí jako exon, jindy jako intron
Izoformy proteinů: funkčně příbuzné proteiny, liší se v primární struktuře

Alternativní sestřih



© 2012 Pearson Education, Inc.

13 variant alternativního sestřihu u genu SYNGAP1



22 exonů (písmeny označeny exonové jednotky)
^ intron
. spojení dvou exonových jednotek

Mechanismus sestřihu mRNA

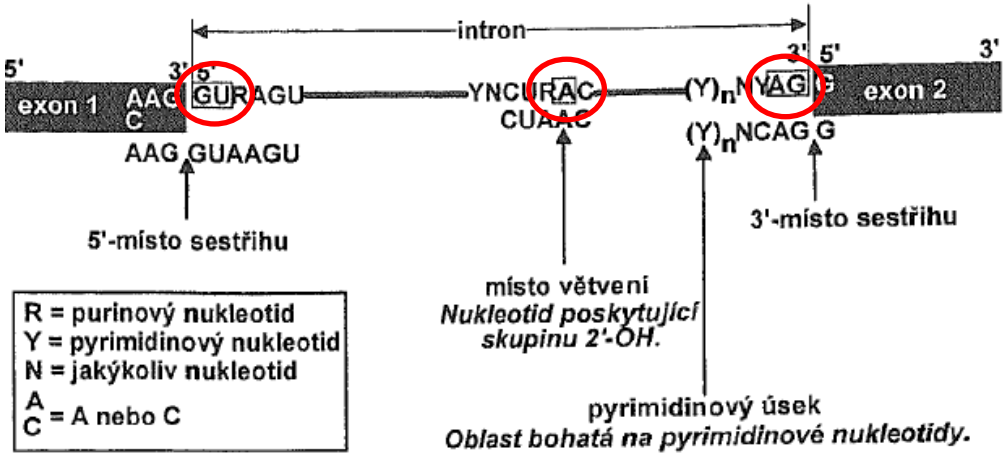
- Úprava primární struktury mRNA - pouze za účasti spliceozomu

- Proces řídí snRNP částice (komplex snRNA- a proteinů) - tvoří spliceozom

- primární struktura intronu určuje místo sestřihu: **GU-AG**

- Intron: 5'-konec **GU**; 3'-konec **AG**; uprostřed místo větvení **A**

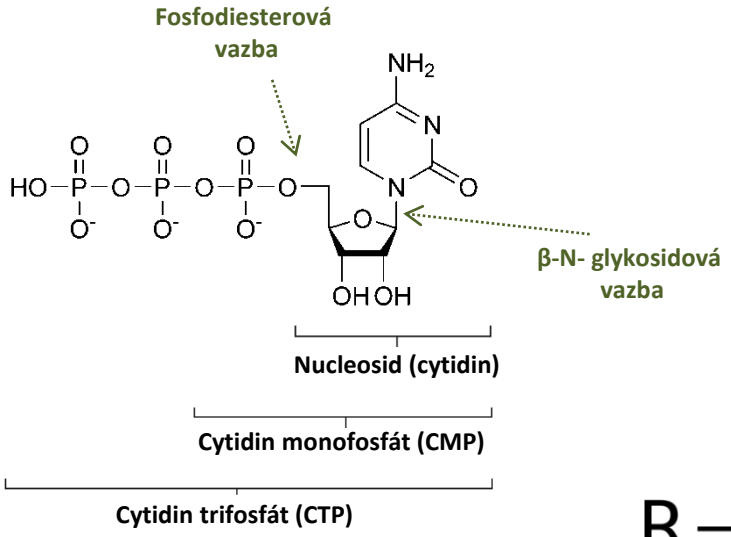
- Vlastní sestřih probíhá pomocí chemické reakce: **Transesterifikace**

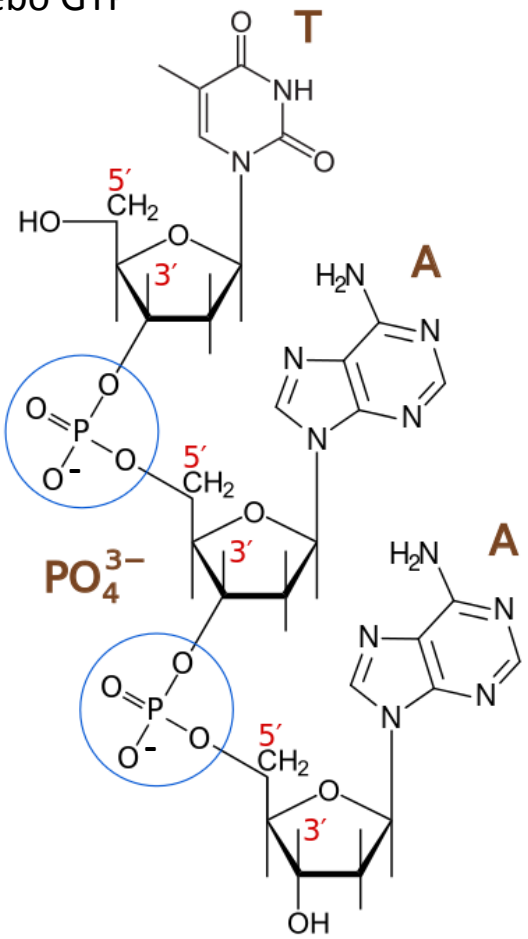


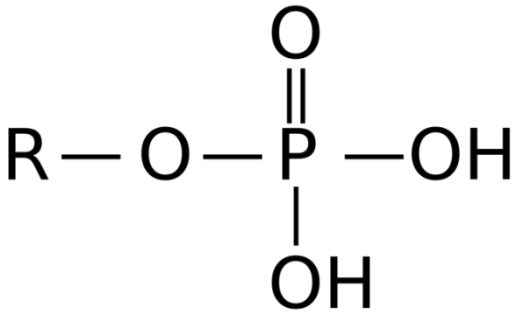
Sekvence a nukleotidy zakreslené do šedého rámečku jsou vysoce konzervativní (četnost 100 %). Ostatní sekvence se vyskytují v četnosti 70 - 95 %. Sekvence uvedené pod schématem intronu a exonu jsou sekvence, které byly zjištěny u savců.

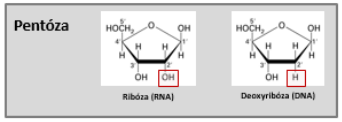
Transesterifikace v sestřihu pre-mRNA → mRNA

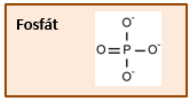
- přeměna fosfátového esteru v jiný bez hydrolýzy za nepřítomnosti ATP nebo GTP
- energie fosfodiesterové vazby zůstává zachována

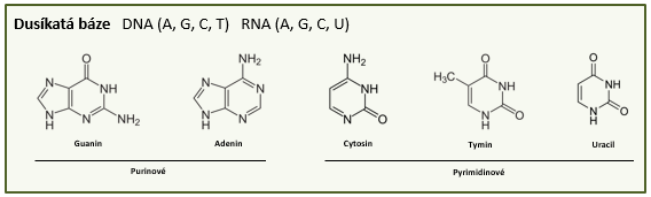












Estery: organické sloučeniny, ve kterých je -OH skupina nahrazena organickým zbytkem vzniklým z alkoholu po odštěpení vodíku.

Esterifikace: chemická reakce, při které ester vzniká

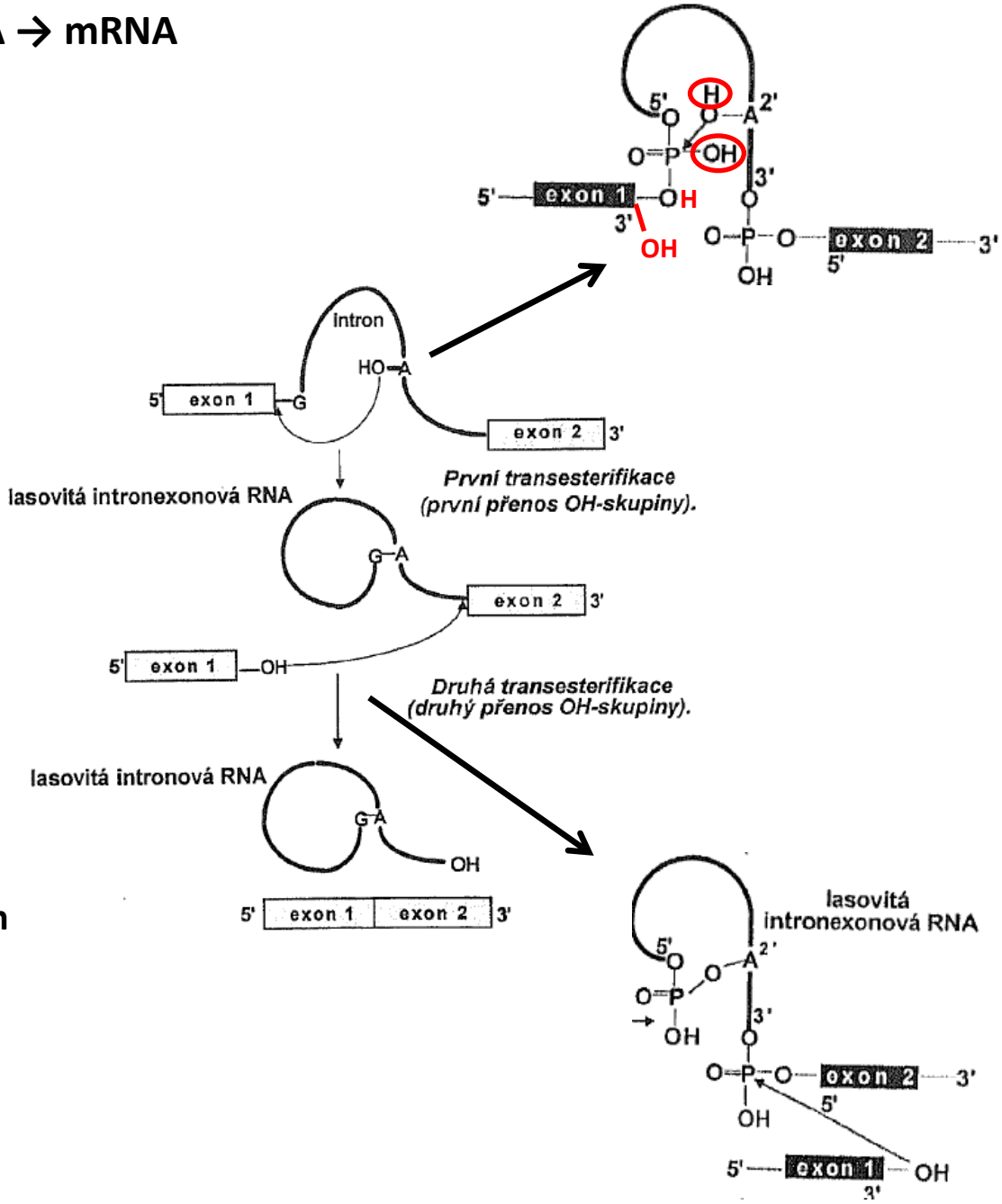
*Nukleové kyseliny jsou polymery: vlákno nukleotidů navzájem spojených **fosfodiesterovou** vazbou. Dusíkatá báze (A, T/U, C, G) + cukr – pentoza (ribóza/deoxyribóza) + fosfát (mono- v řetězci, tri- volně)*

Transesterifikace v sestřihu pre-RNA → mRNA

První transesterifikace:
- spojení exonu1 a intronu přes OH-skupiny
- odpad z vazby (H_2O) je použit na zakončení 3'-konce exonu 1 (OH) a zakončení 5'-konce intronu (H)

Druhá transesterifikace:
- spojení obou exonů do výsledné mRNA
- intron se odpojí ve formě lasovité RNA

Sekvence pro transesterifikaci jsou rozeznávány snRNP-částicemi a tvoří komplexy katalyzující sestřih - **Spliceozom**



Spliceozom

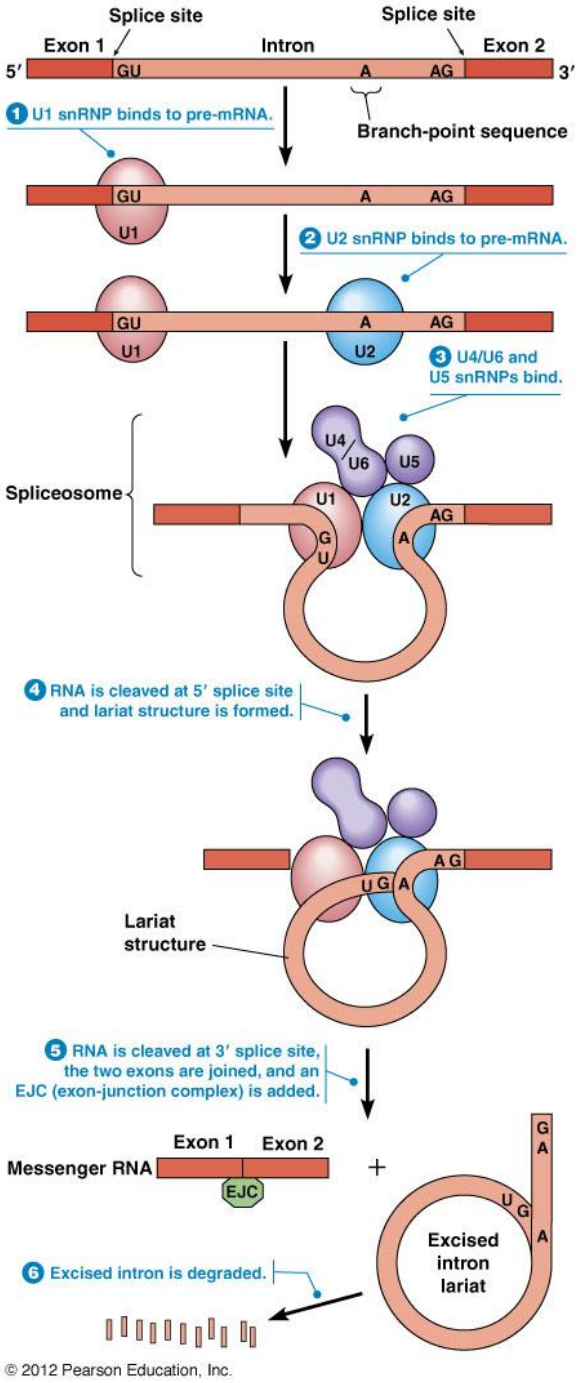
- velká elipsoidní částice, sedimentační koeficient 60S

- uvnitř jádra

- funkce: odstraňuje introny z pre-mRNA (katalyzuje sestřih mRNA)

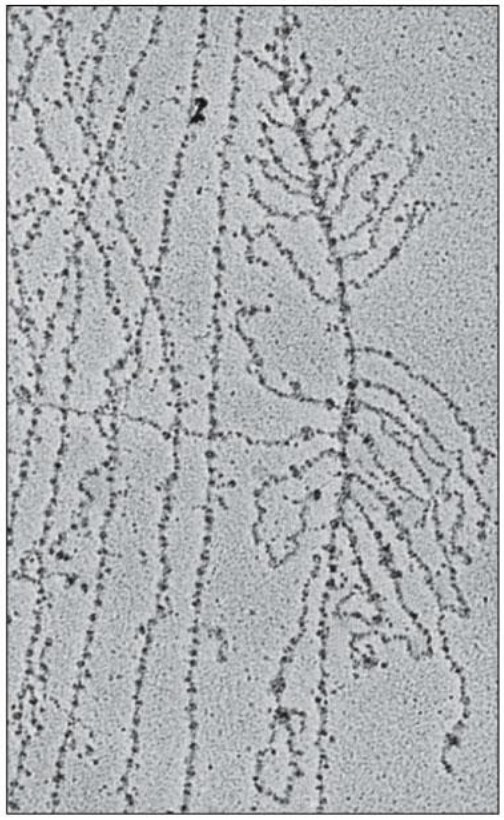
- tvořen komplexem **5 snRNA** (U1, U2, U4, U5, U6) a různými **proteiny**

- složitostí podobný ribozomům, pozorovatelný elektronovým mikroskopem

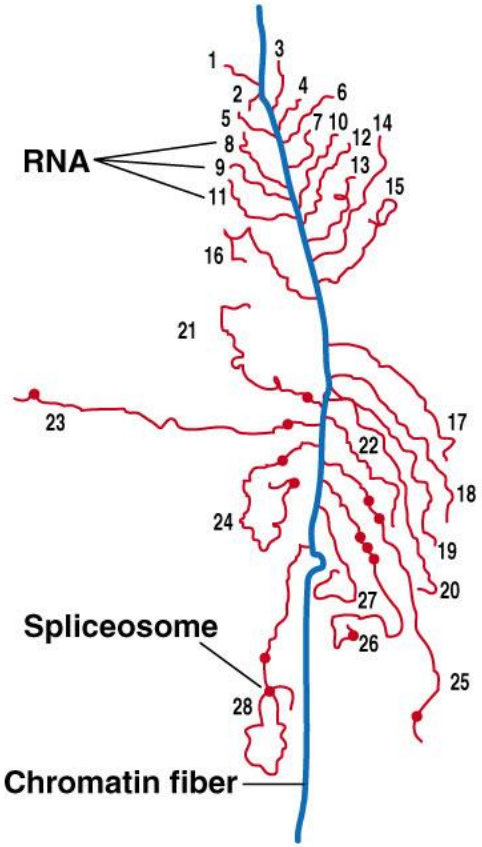


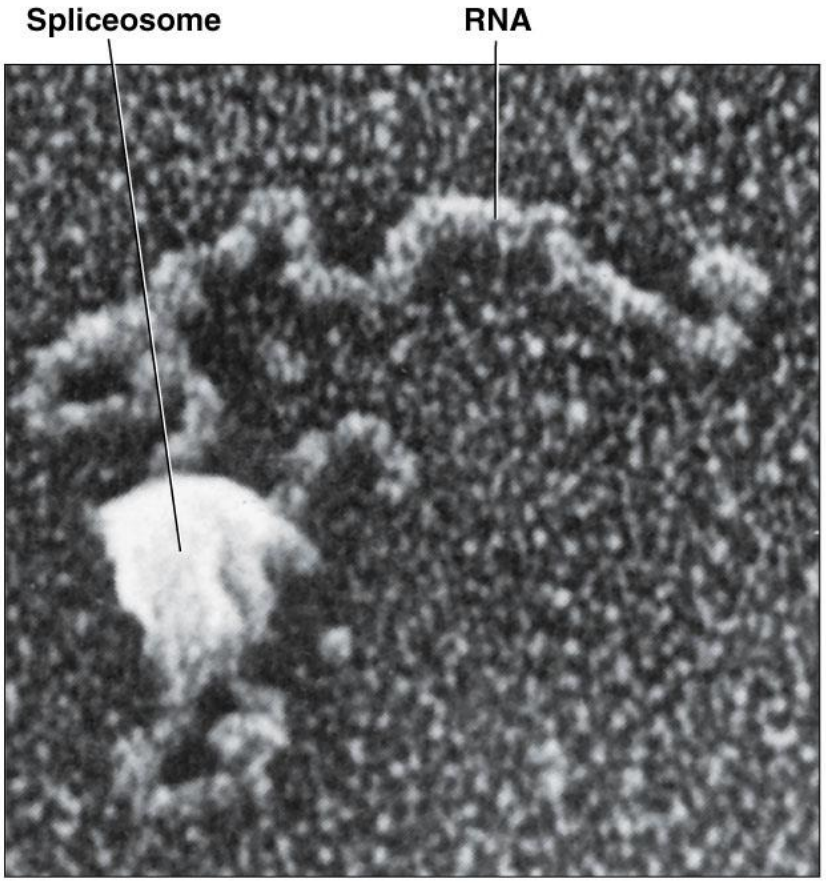
Lariat - laso

Spliceozom



0.2 μm





10 nm

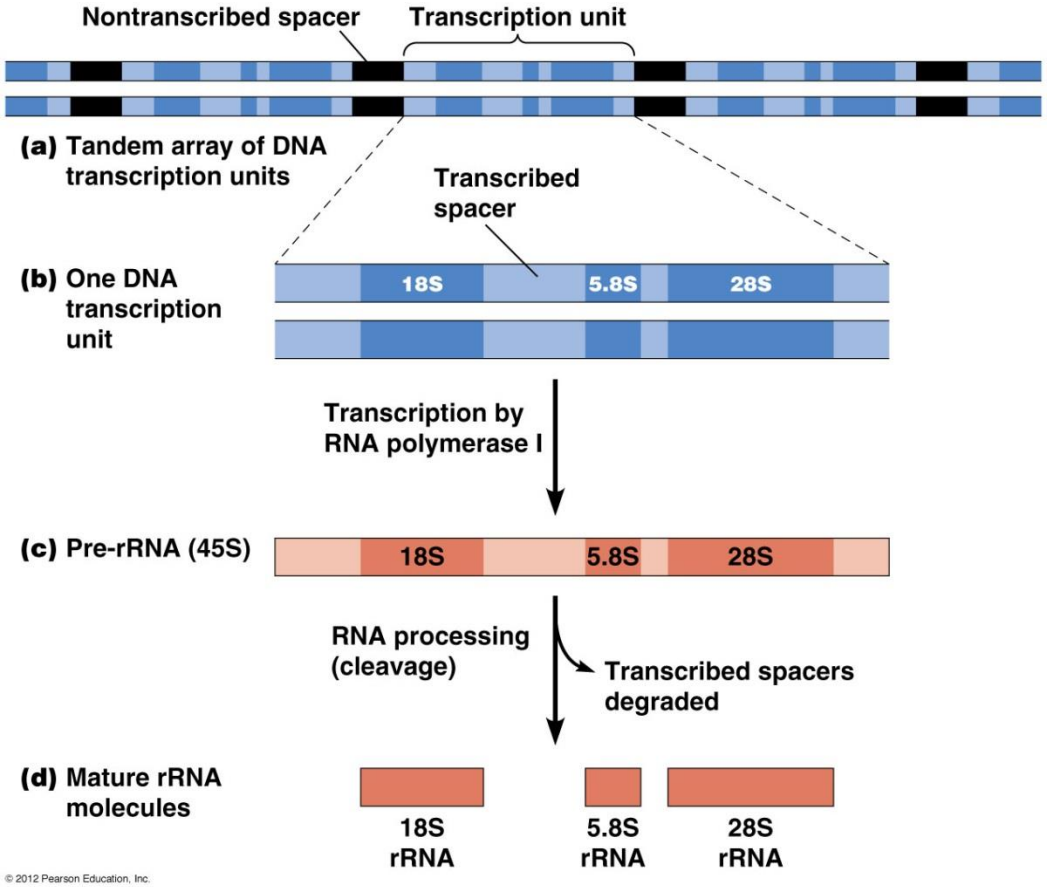
© 2012 Pearson Education, Inc.

mRNA je výsledkem spojení exonů na stejné molekule primárního transkriptu (výjimečně dvou různých molekul - bimolekulární sestřih)

Video: mRNA sestřih (splicing)

Posttranskripční úpravy pre-rRNA

- transkripce RNA polymerázou I
- pre-rRNA obsahuje přepisy genů pro **5,8S, 18S** a **28S** rRNA
- geny jsou lokalizovány v DNA jadérka, kde probíhá též jejich transkripce do pre-rRNA
- introny jsou vyštěpeny, ale **<u>exony se nespojují</u>**
- štěpení pomocí endonukleáz
- 3 jednotky rRNA jsou využity ke stavbě ribozomů spolu s ribozomovými proteiny



Posttranskripční úpravy pre-tRNA

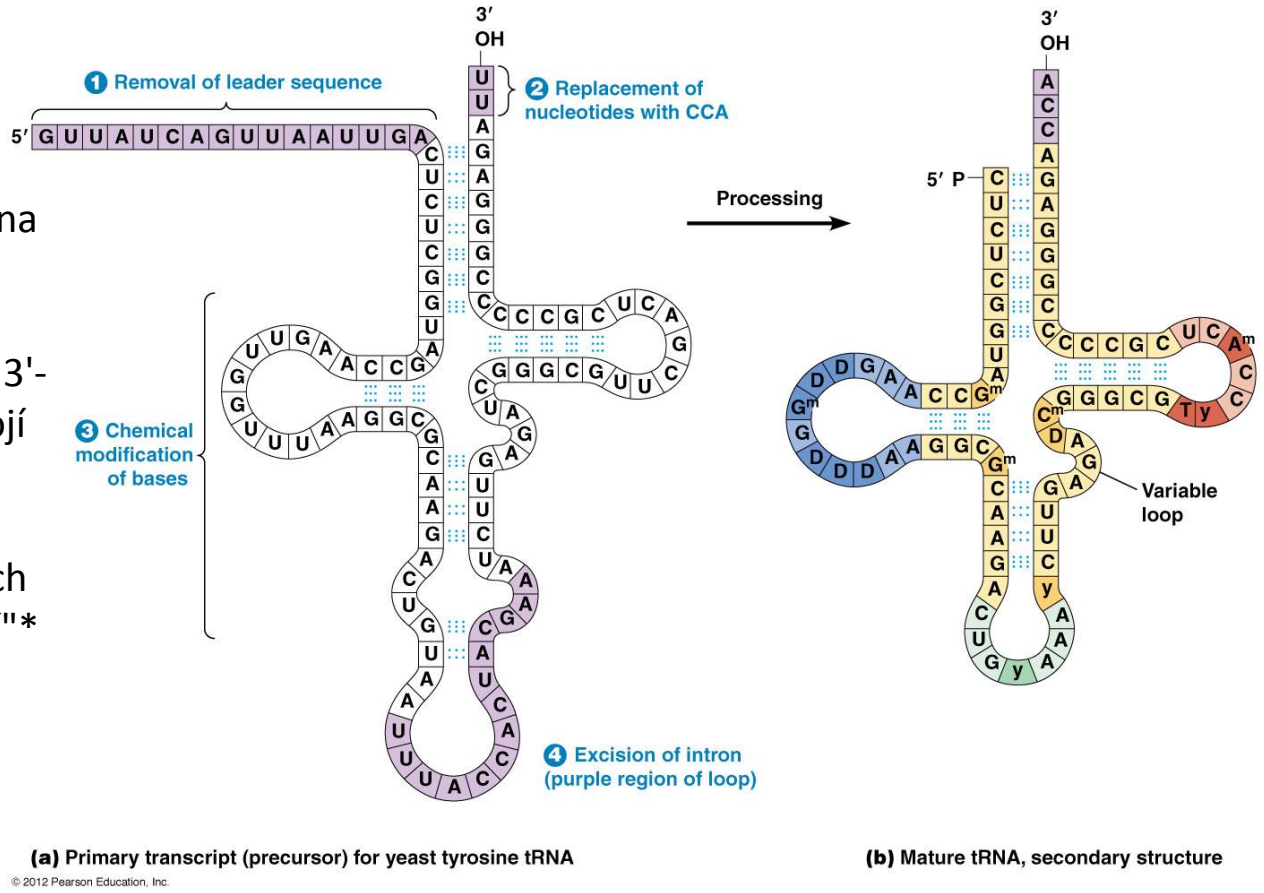
jednotlivé tRNA uskutečňují přenos jednotlivých aminokyselin

1. Odstranění vedoucí sekvence na 5'-konci

2. nahrazení dvou nukleotidů na 3'-konci sekvencí CCA (tam se připojí AMK)

3. chemická modifikace vybraných bazí → tvorba "neobvyklých bazí"*

4. vystřižení intronů



© 2012 Pearson Education, Inc.

*neobvyklé báze zpřesňují syntézu proteinů (4-thiouridin, dihydrouridin, 1-methylguanozin...)

Posttranskripční úpravy genoforu mitochondrií

- nepodléhají úpravě 5'-konce čepičkou
- začínají vedoucím kodonem AUG
- nejdůležitější úpravou je polyadenylace

Editace RNA

- probíhá v mitochondriích trypanzom, vyšších rostlin a v genu pro apolipoprotein savců
- cílena inzerce, delece nebo substituce nukleotidu mRNA s cílem pozměnit výsledný protein
- Kryptogen: strukturní gen s možností editace mRNA
- proces regulován tzv. gRNA (guide RNA)

Zajímavosti o RNA

- většina molekul mRNA rychle degraduje

- bakteriální mRNA má poločas rozpadu v řádu minut

- eukaryotická mRNA má poločas rozpadu v řádu hodin až dní

- tRNA a rRNA jsou stabilnější než mRNA

- transkripce umožňuje amplifikaci genetické informace díky množství kopií mRNA