

Syntéza a postranskripční úpravy RNA

© Biochemický ústav LF MU (ET, JG) 2018

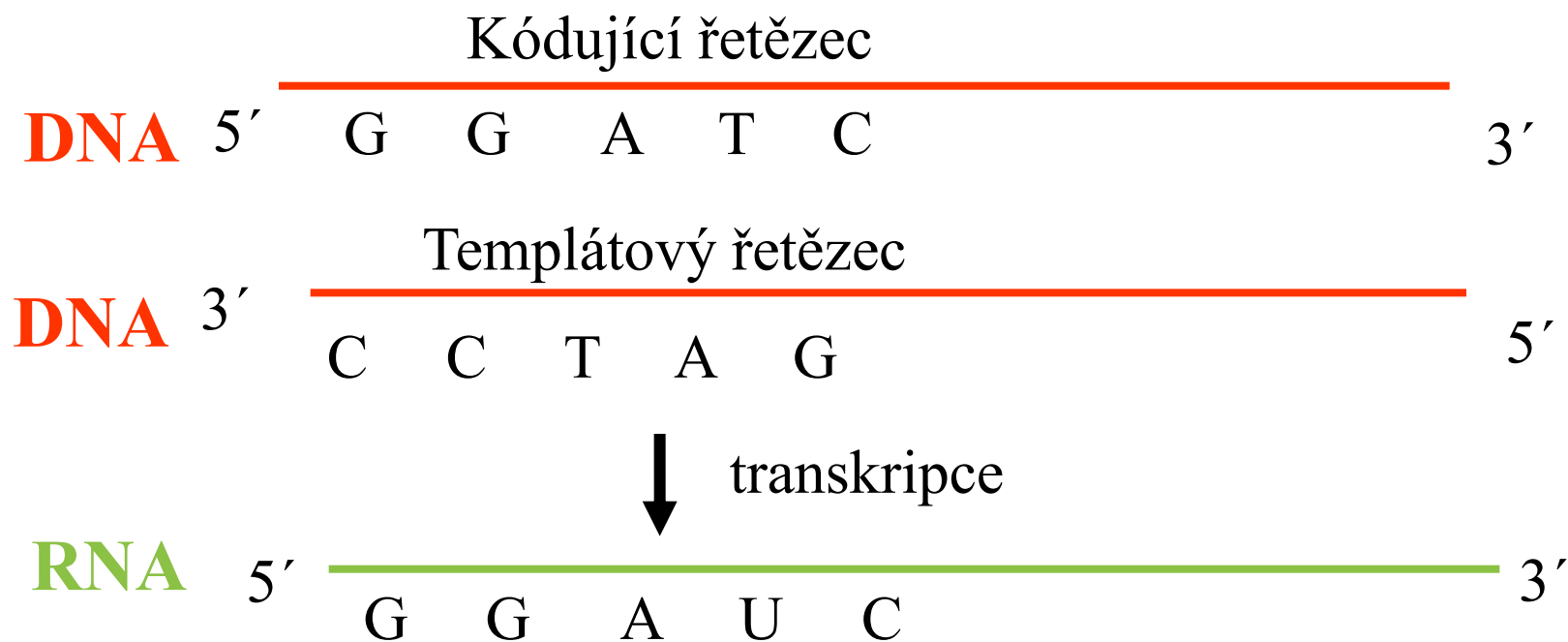
Transkripce

Proces tvorby RNA na podkladu struktury DNA

Je přepisován pouze jeden řetězec dvoušroubovice DNA – **templátový řetězec**

Druhý řetězec se nazývá **kódující** (jeho sekvence bází odpovídá transkriptu, pouze místo U je T)

Syntéza RNA probíhá opět ve směru 5' → 3'



K transkripci jsou nezbytné:

- ✓ Dvouvláknová DNA
- ✓ RNA-polymeráza
- ✓ ATP, GTP, CTP, UTP
- ✓ Mg²⁺ ionty

Transkripce má tři fáze:

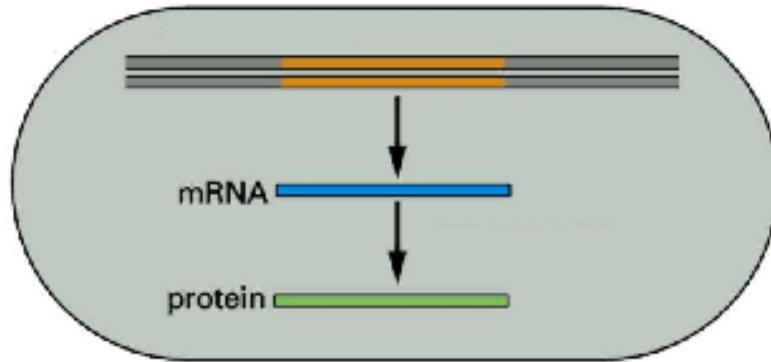
- ✓ Iniclace
- ✓ Elongace
- ✓ Terminace

Replikace x transkripce

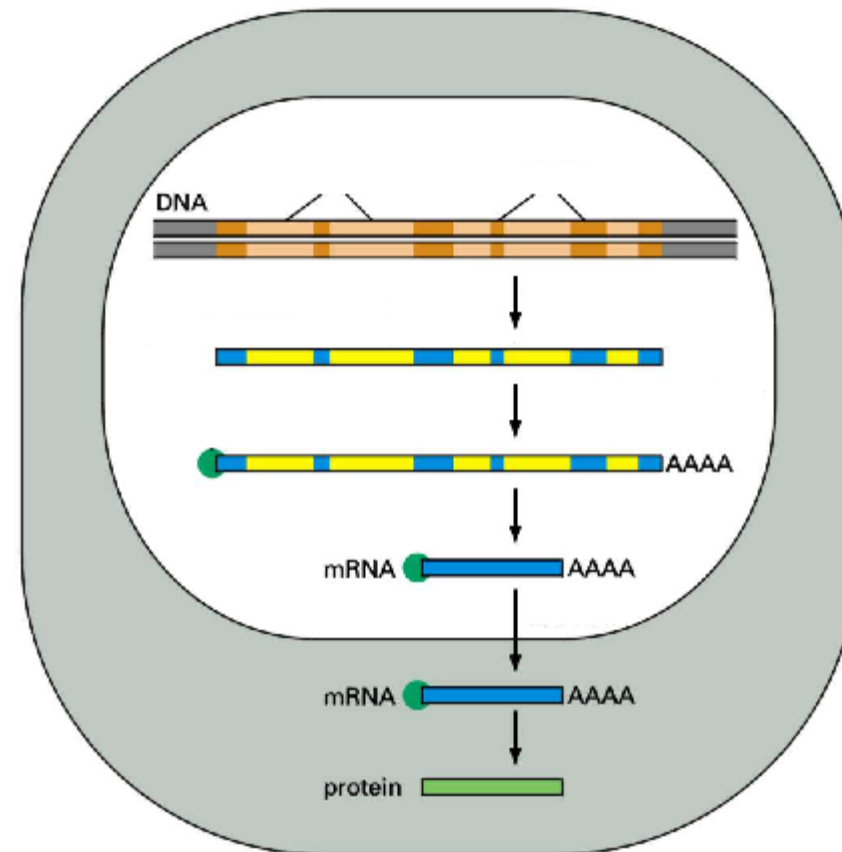
	Replikace	Transkripce
Enzymy	DNA-polymerázy	RNA-polymerázy
Lokalizace	na chromosomu v S fázi	vybraný segment DNA
Zahájení	vyžaduje RNA primer	nevyžaduje primer
Průběh	kopírována obě vlákna	kopírováno pouze jedno vlákno
Kontrola	polymeráza má zpětnou kontrolu správného zařazení posledního nukleotidu	polymeráza nemá zpětnou kontrolu správného zařazení posledního nukleotidu
Nukleotidy	dATP, dGTP, dCTP, dTTP	ATP, GTP, UTP, CTP

Transkripce u prokaryontů a eukaryontů

Prokaryonty



Eukaryonty



Enzym zodpovědný za transkripci je DNA-dependentní RNA polymerasa (transkriptasa – RNAPol)

Prokaryonty:

- ✓ Jedna polymeráza
 - ✓ (5 podjednotek plus sigma faktor, který se zapojuje pouze do iniciace)
- ✓ Přepisuje všechny formy RNA

Eukaryonty

- ✓ Čtyři různé RNA polymerázy:
 - ✓ RNA pol I – syntéza rRNA (45 S RNA v jadérku)
 - ✓ RNA pol II – syntéza mRNA, sn RNA (jádro)
 - ✓ RNA pol III – syntéza tRNA, 5S RNA (jádro)

Mají stejný mechanismus účinku, rozlišují různé promotory.

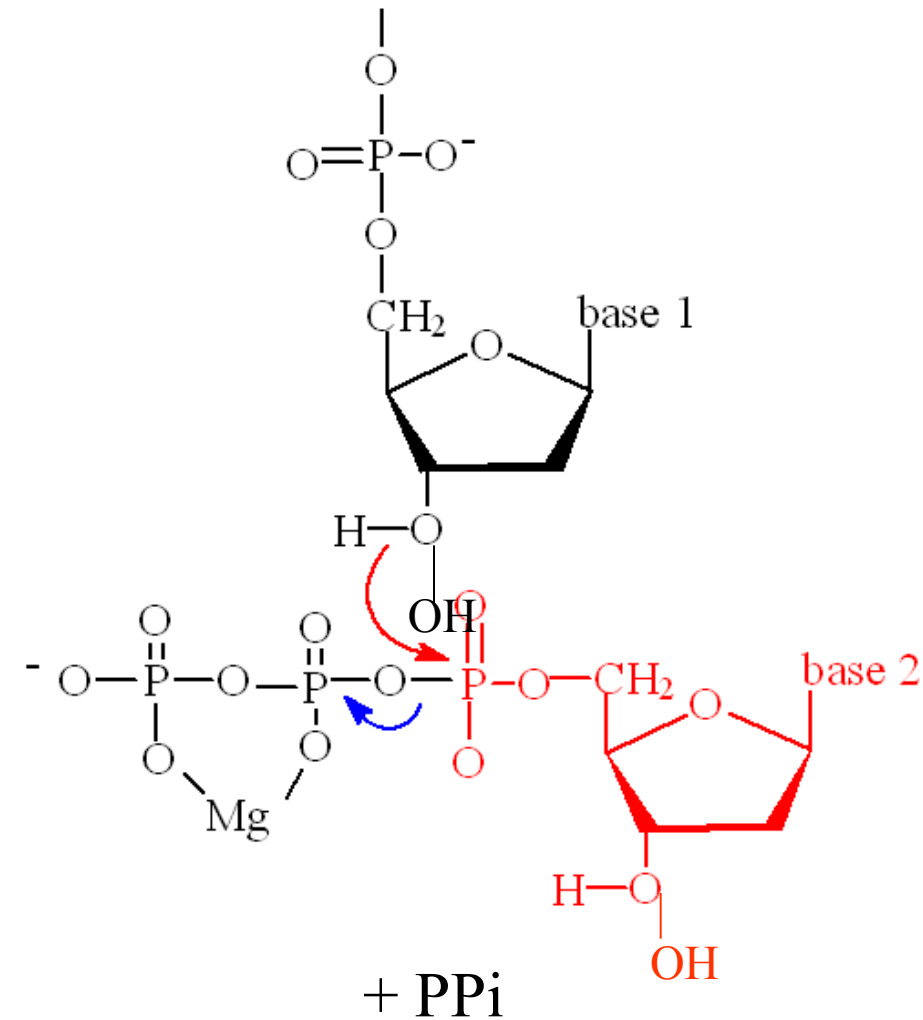
Většina genů u eukaryontů je přepisována RNA-polymerázou II

3 fáze transkripce

- ✓ Inicijace
- ✓ Elongace
- ✓ Terminace

Účinek RNA polymeráz

- ✓ Syntéza nové RNA probíhá ve směru 5'→3
- ✓ K syntéze jsou potřebné ATP, GTP, CTP, UTP
- ✓ Každý nukleotid se páruje s komplementární bází na templátovém vlákně
- ✓ Polymeráza tvoří fosfoesterovou vazbu mezi 3 - OH ribózy na rostoucím RNA vlákně a α -fosfátem navázaným na 5' OH ribózy vstupujícího nukleotidu
- ✓ Energie polymerace je kryta štěpením NTP
- ✓ Neexistuje zpětná kontrola řazení bází

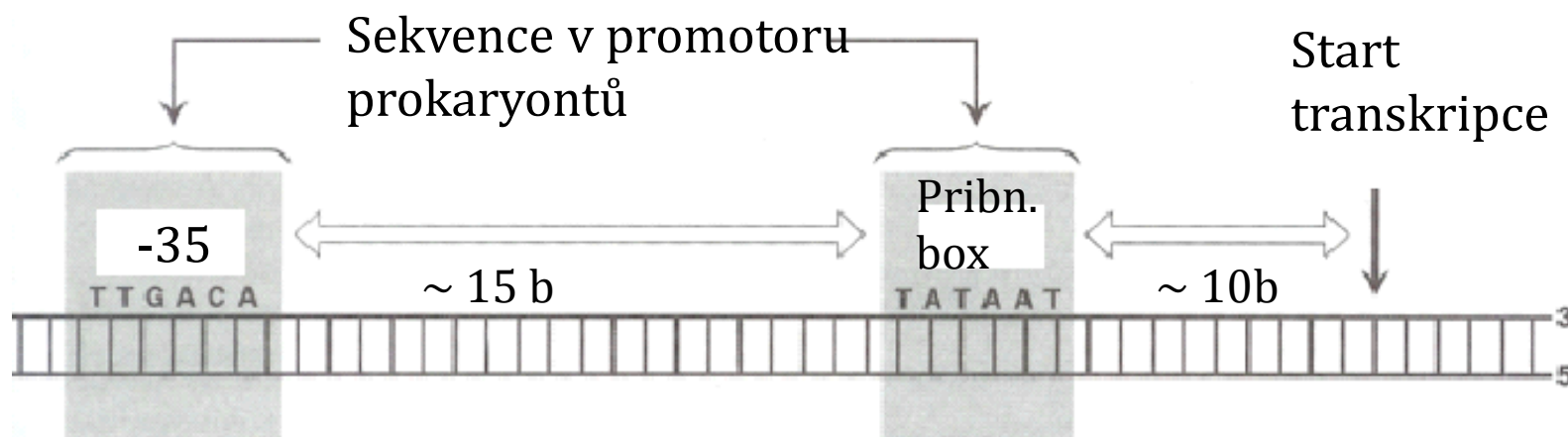


Rozpoznání templátu

- ✓ RNA polymeráza (RNAP) vytvoří stabilní komplex s templátovou DNA v místě promotoru
- ✓ V místě promotoru se nachází **konvenční sekvence**
 - ✓ (sekvence, které se obecně najdou v určité oblasti mnoha zkoumaných genů)

Promotor u prokaryontů

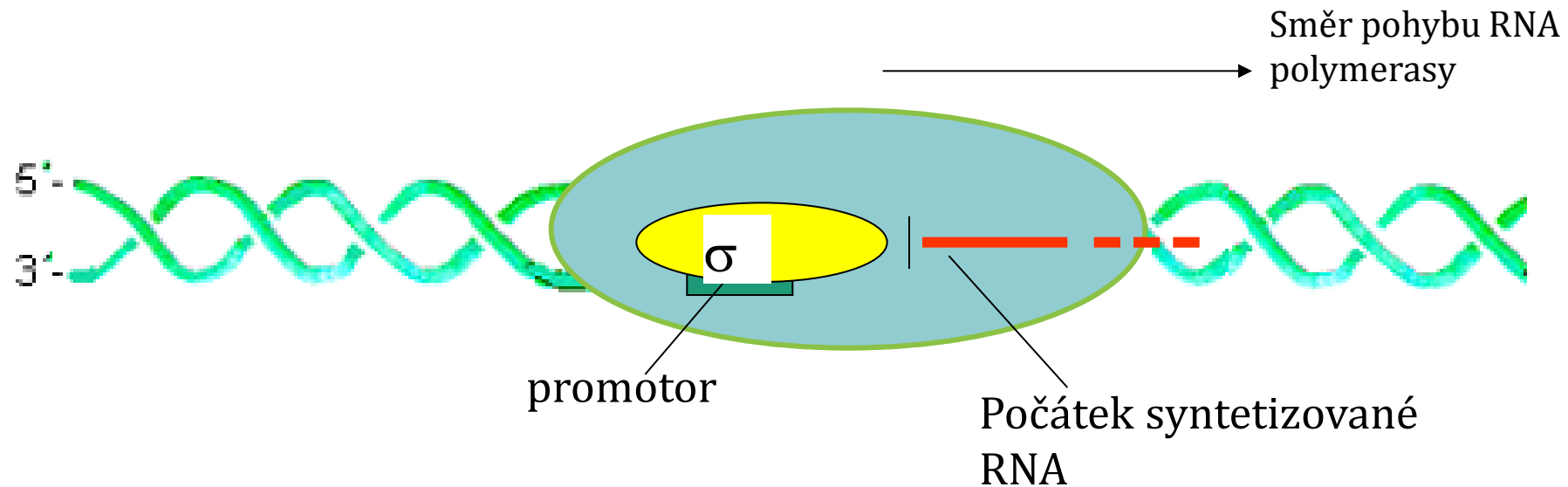
- ✓ V pozici asi -10 b obsahuje Pribnowův box TATAAT
- ✓ V pozici asi -35 b další sekvence TTGACA
- ✓ Tyto sekvence jsou rozeznány σ -faktorem prokaryotické RNA polymerázy



Transkripce u prokaryontů

Iniciace:

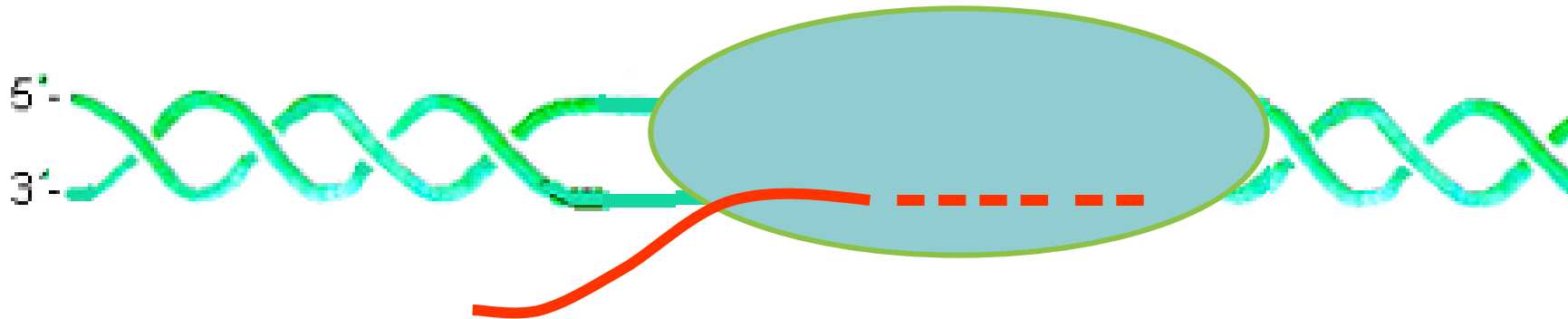
- ✓ Vazba RNA-polymerázy do promotorové oblasti DNA prostřednictvím sigma podjednotky
- ✓ Lokální rozvinutí vláken DNA RNA-polymerázou
- ✓ Párování bází z ribonukleotidů s templátovým vláknem a tvorba fosfodiesterových vazeb mezi prvními ribonukleotidy



Transkripce u prokaryontů

Elongace:

- ✓ Uvolnění podjednotky sigma z RNA-polymerázy
- ✓ Pohyb RNA-polymerázy podél DNA ve směru transkripce, rozvíjení dvoušroubovice i opětné svinování (vytváření transkripční bubliny)
- ✓ Tvorba kovalentních vazeb mezi nukleotidy
- ✓ Vznikající RNA je vytěsňována z templátového vlákna



Terminační signál – ukončení elongace

Transkripce u eukaryontů

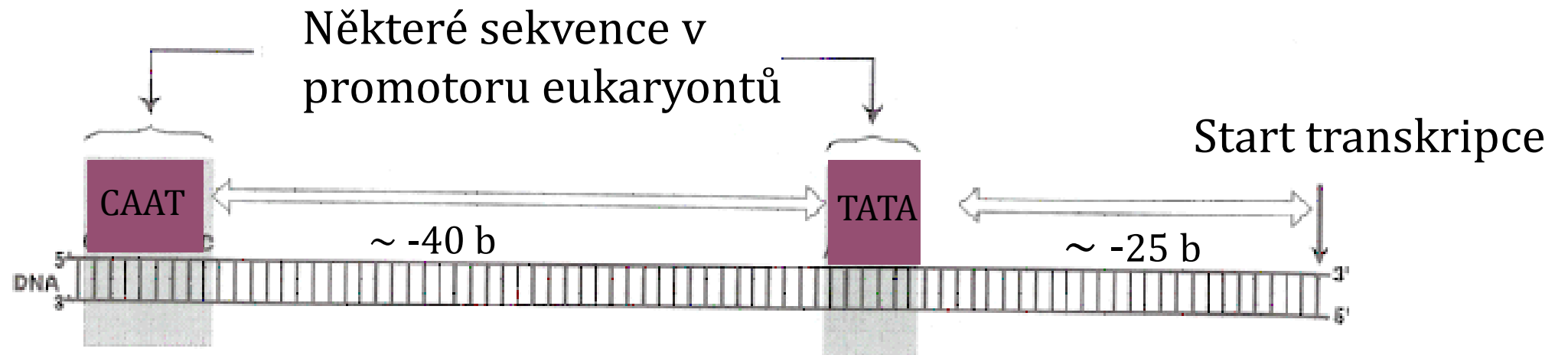
- ✓ Mnohem složitější
- ✓ Více RNA polymeráz
- ✓ Velké množství transkripčních faktorů
- ✓ Struktura chromatinu musí být před transkripcí rozvolněna – euchromatin

Promotor u eukaryontů (RNA polymerasa II)

- ✓ Transkripce eukaryontních genů je mnohem komplikovanější
- ✓ Je zapojena řada transkripčních faktorů, které se váží k různým úsekům DNA

- ✓ Promotor obsahuje TATA box analogický Pribnowově sekvenci (ATATAA) – určuje pravděpodobně místo startu – vazba **bazálních transkripčních faktorů**
- ✓ V pozici asi -100–200 jsou 1–2 další regulační sekvence (CAAT box, GC box) – určuje pravděpodobně frekvenci startu (promotorové proximální sekvence)
- ✓ Vzdálené regulační sekvence (mimo promotor) – vážou **specifické** transkripční faktory

Promotor u eukaryontů

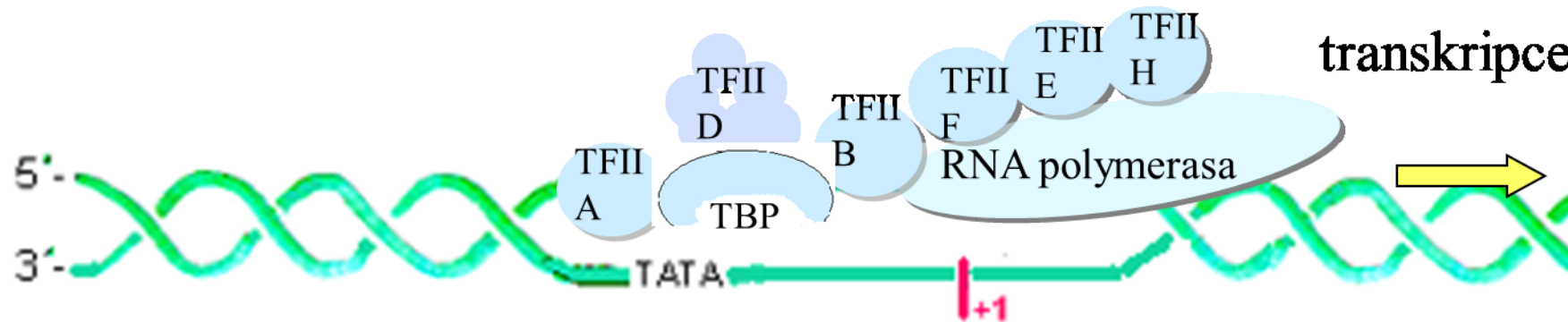


Bazální transkripční faktory u eukaryontů

- ✓ Musí být navázány na RNA-polymerázu před startem transkripce a jsou současně asociovány s promotorovými sekvencemi
- ✓ Samotná RNA-polymeráza nemůže zahájit transkripci
- ✓ Jsou nezbytné pro rozpoznání promotoru a místa startu
- ✓ Bazální = jsou potřebné pro transkripci všech genů

Bazální transkripční faktory

- ✓ TFIID – největší z bazálních faktorů transkripce
- ✓ Má celkem 11 podjednotek
- ✓ Jednou podjednotkou je TBP (TATA box binding protein)
- ✓ TBP se váže k TATA boxu, na ni nasedají další podjednotky TFIID
- ✓ Po té se navazují další TF (TFIIA,B,F,E,H) a RNA-polymeráza

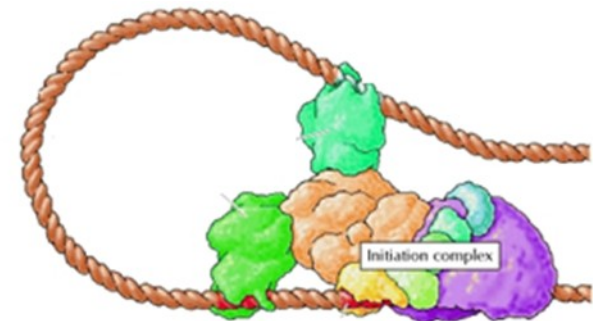


Genově specifické regulační proteiny

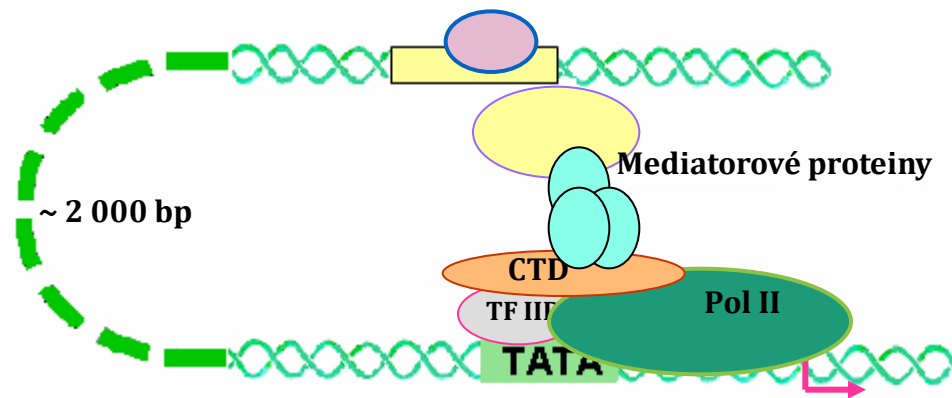
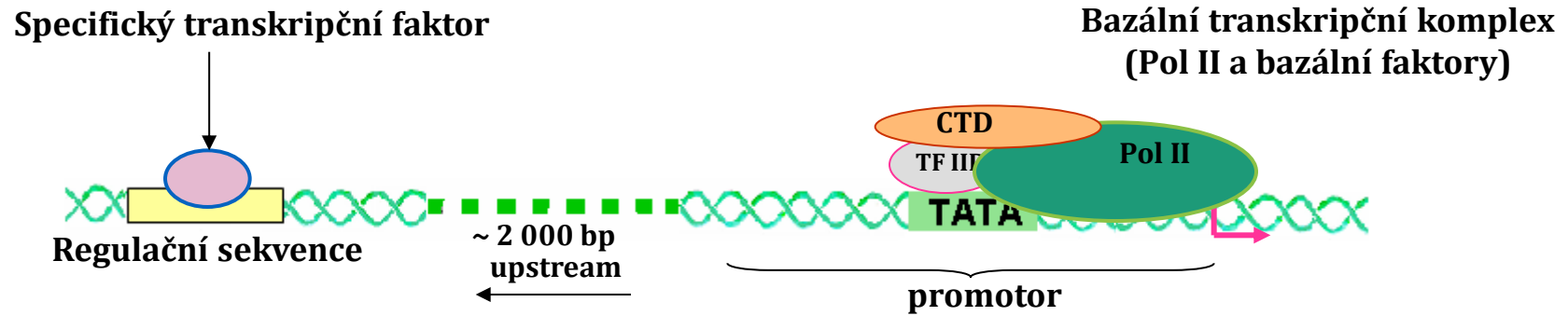
- ✓ **Specifické transkripční faktory** jsou proteiny, které se vážou v regulačních sekvencích mimo promotor, často velmi vzdálených.
- ✓ Působí jako aktivátory nebo represory transkripce příslušného genu.
- ✓ Specifické transkripční faktory interagují s mediátorovými proteiny (koaktivátory, korepresory), které jsou v kontaktu s bazálními transkripčními faktory.
- ✓ Typický gen kódující syntézu proteinu u eukaryontů má na DNA vazebná místa pro řadu specifických transkripčních faktorů

Specifické regulační sekvence (enhancery, silencers, HRE, HSRE)

- ✓ Jsou na stejném chromosomu jako daný gen
- ✓ Ale mohou být vzdáleny „upstream“ nebo „downstream“ od místa transkripce
- ✓ Mohou blízko promotoru, ale také několik tisíc bází vzdáleny
- ✓ K interakci mezi transkripčními faktory vážícími se ve vzdálené oblasti a bazálními transkripčními faktory dochází díky tvorbě smyček ve struktuře DNA a účinku mediátorových proteinů



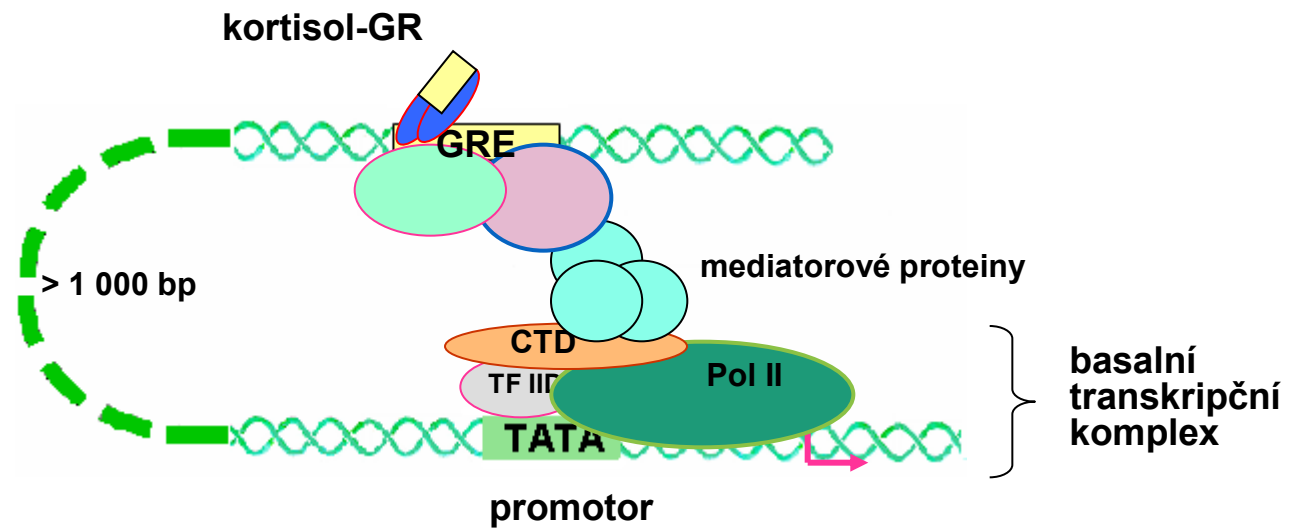
Specifické transkripční faktory



Jaderné receptory hormonů jsou specifické transkripční faktory

- ✓ Receptory hormonů se nachází v neaktivní formě v jádře nebo v cytoplazmě.
- ✓ V neaktivní formě vážou inhibiční protein (např. heat shock protein).
- ✓ Hormon pronikne cytoplazmatickou membránou do buňky a specificky se váže k receptoru v cytoplazmě nebo jádře.
- ✓ Inhibiční protein se oddělí, vzniká komplex hormon-receptor, konformace receptorové bílkoviny se mění.
- ✓ Cytoplazmatický komplex hormon receptor je translokován do jádra.
- ✓ V jádře působí komplex hormon-receptor jako specifický transkripční faktor a váže se na DNA v místě specifické regulační sekvence (= hormon response element HRE)
- ✓ Receptor s hormonem navázaný na DNA reaguje rovněž s koaktivátorem (mediátorový protein), který je v kontaktu s bazálním transkripčním komplexem. Tím se vypíná nebo zapíná proces transkripce.

Účinek kortizolu



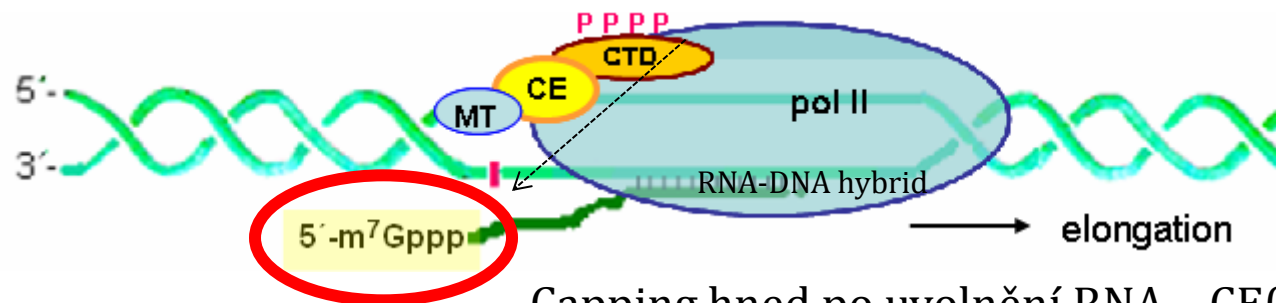
GRE – glukokortikoid response element

Transkripční faktory a zahájení transkripce u eukaryontů

- ✓ Transkripce je zahájena teprve po navázání všech transkripčních faktorů
- ✓ RNA-polymeráza se váže k transkripčním faktorům a DNA
- ✓ Dvojitý helix DNA se rozvíjí a polymeráza je „sunuta“ k místu startu
- ✓ Je zahájena transkripce
- ✓ Po zahájení transkripce se většina transkripčních faktorů oddělí

Elongace a terminace

- ✓ RNA-polymeráza se pohybuje po DNA, rozvíjí dvoušroubovicovou strukturu
- ✓ Vznikající RNA nezůstává spojena s DNA vodíkovými můstky
- ✓ Hned za místem, kde byl přidán nový nukleotid dochází k obnovení dvoušroubovice a vytěsnění vlákna RNA
- ✓ Uvolňování RNA z templátového řetězce umožňuje vznik dalších kopií ještě před ukončením syntézy první RNA
- ✓ Podle jednoho genu může být současně transkribováno několik tisíc molekul RNA

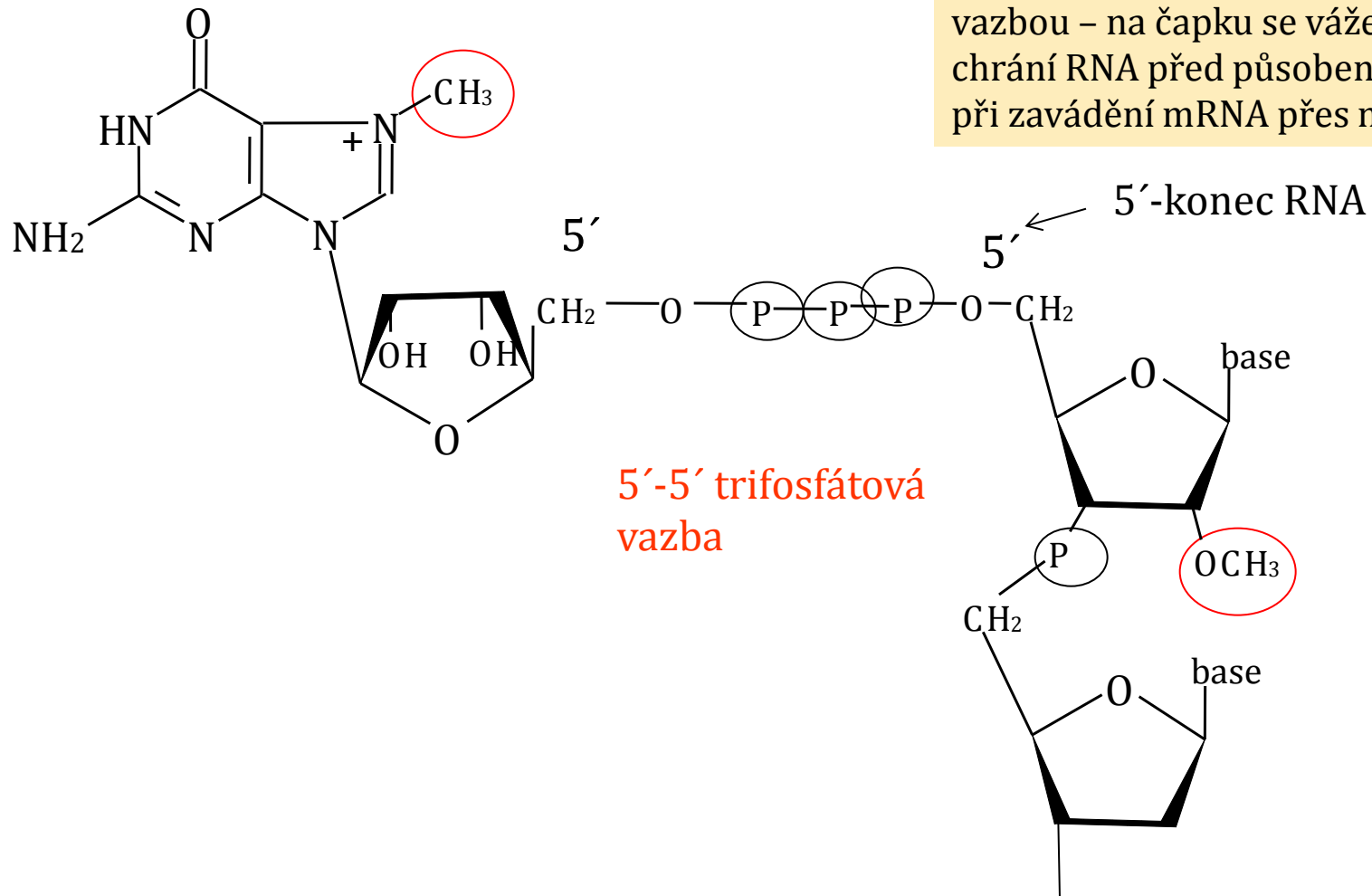


Capping hned po uvolnění RNA – CE(capping enzyme),
MT-methyltransferase

- ✓ O terminaci u eukaryontů je známo jen velmi málo.

Tvorba čepičky u hnRNA- capping

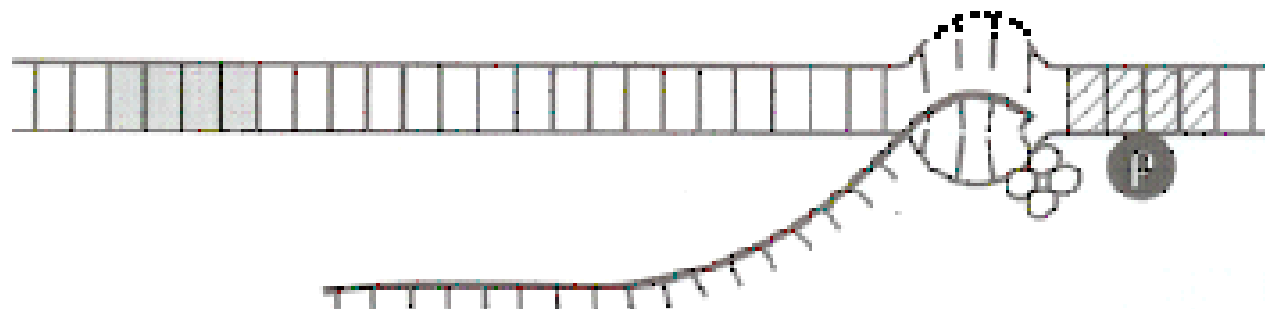
- ✓ Probíhá hned na počátku elongace na 5'-konci pomocí specifických enzymů.
- ✓ Čapka i polyA sekvence jsou důležité pro zahájení translace v cytoplasmě.



Navázání 7-methylguanositinu (z GTP) 5'-5'fosfátovou vazbou – na čapku se váže komplex proteinů, které chrání RNA před působením 5'-exonukleáz a pomáhají při zavádění mRNA přes nukleární póry do cytoplazmy

Terminace

- ✓ Proces elongace je ukončen při dosažení terminačního signálu.
- ✓ Transkripční komplex se rozpadá a uvolňuje vzniklou molekulu BNA
- ✓ U prokaryontů je terminace
 - ✓ závislá na ρ faktoru
 - ✓ nezávislá na ρ faktoru
- ✓ U eukaryontů je o terminaci málo známo



U transkripce chybí proofreading

Syntéza DNA - 1chyba/10¹⁰ nukleotidů

Syntéza RNA – 1 chyba/10⁴ nukleotidů

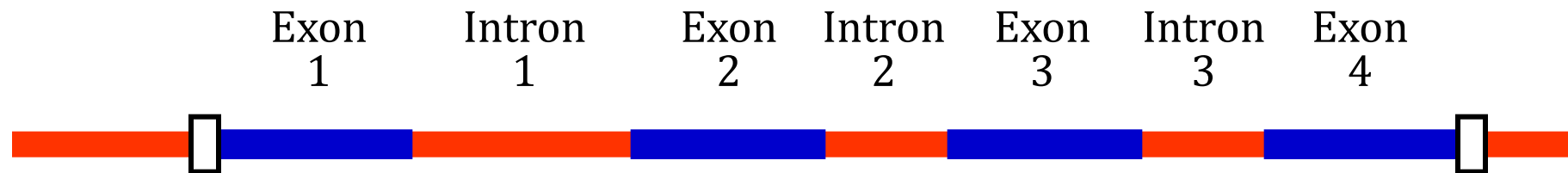
- ✓ **RNA polymerázy** nevlastní nukleolytickou korigující (proofreading) aktivitu.
- ✓ Toto chybění korekce (proofreading) odráží skutečnost, že transkripce nemusí být tak přesná jako DNA replikace, protože RNA není používána jako trvalá zásobní forma genetické informace.

Úprava primárních transkriptů

- ✓ Primární transkript je přesnou kopií transkripční jednotky
- ✓ Primární transkripty tRNA a rRNA u prokaryontů i eukaryontů jsou posttranskripčně modifikovány ribonukleázami
- ✓ Prokaryontní mRNA je prakticky identická s primárním transkriptem (k translaci slouží ještě před ukončením syntézy)
- ✓ Eukaryontní RNA podléhá rozsáhlým následným modifikacím – probíhají kotranskripčně

Úprava eukaryontní mRNA

- ✓ Primární transkript je hnRNA
- ✓ Je prepisem strukturního genu, v němž jsou kódující sekvence (exony) střídány sekvencemi nekódujícími (introny nebo intervenujícími sekvencemi)



- ✓ nekódující sekvence musí být odstraněny z primární RNA během úprav (processingu)

Úprava hnRNA v jádře

- ✓ Chemická modifikace (navázání 7-methylguanosu 5'-5'fosfátovou vazbou)
 - ✓ na ni se váže komplex proteinů, které chrání před působením 5' exonukleáz a pomáhají při zavádění RNA přes nukleární póry do cytoplasmy
- ✓ Sestřih (odstranění sekvencí odpovídajících intronům)
- ✓ Polyadenylace (adice 3' polyA) – brání účinku 3' exonukleáz

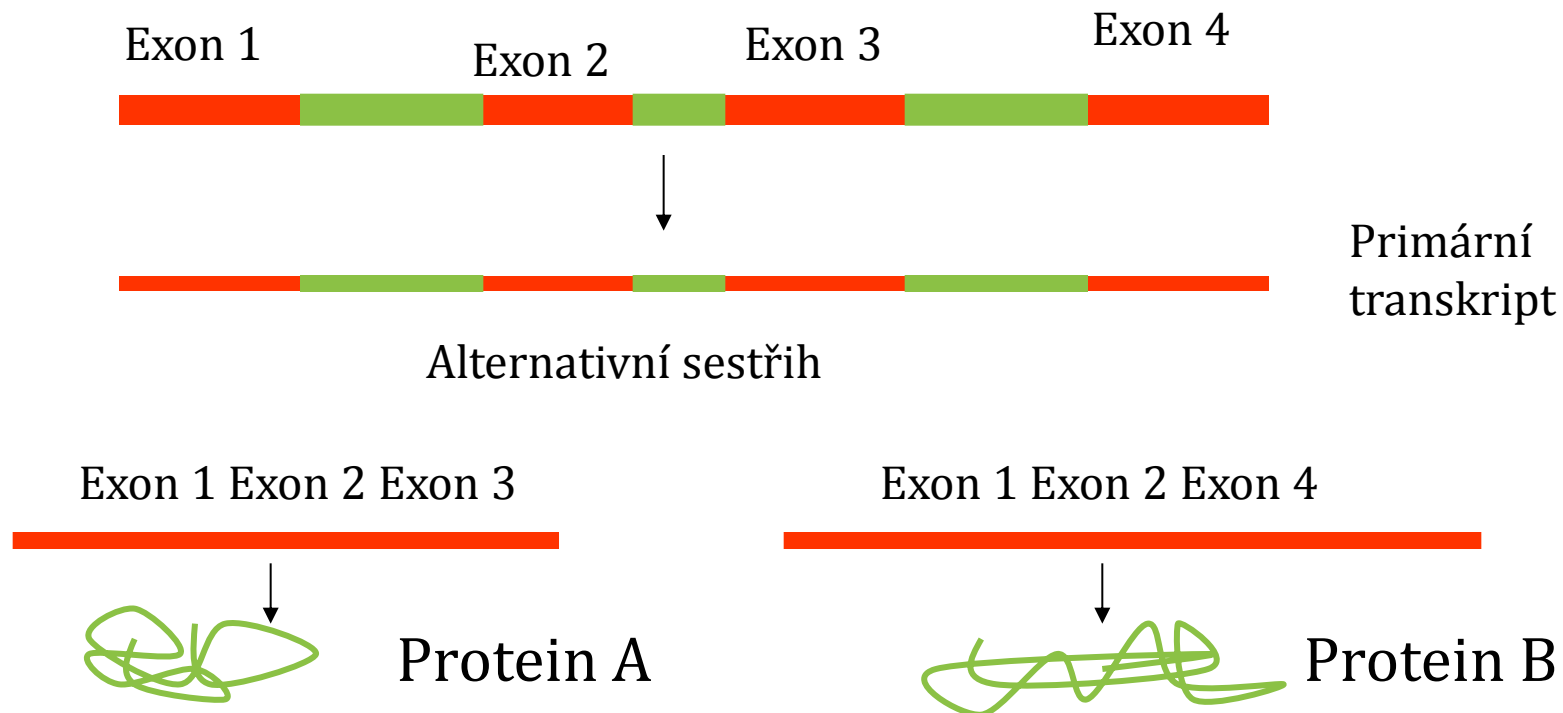
Sestřih hnRNA - splicing

- ✓ Probíhá působením jaderných enzymových komplexů – splicesomů
- ✓ Splicesomy obsahují pět malých RNA (U1, U2, U4, U5 a U6)
- ✓ Jsou asociovány s proteiny a tvoří snRNPs (small nuclear ribonucleoprotein particles).
- ✓ Sekvence AGGU určují hranice mezi intronem a exonem.
- ✓ Tyto sekvence jsou rozpoznány snRNPs.

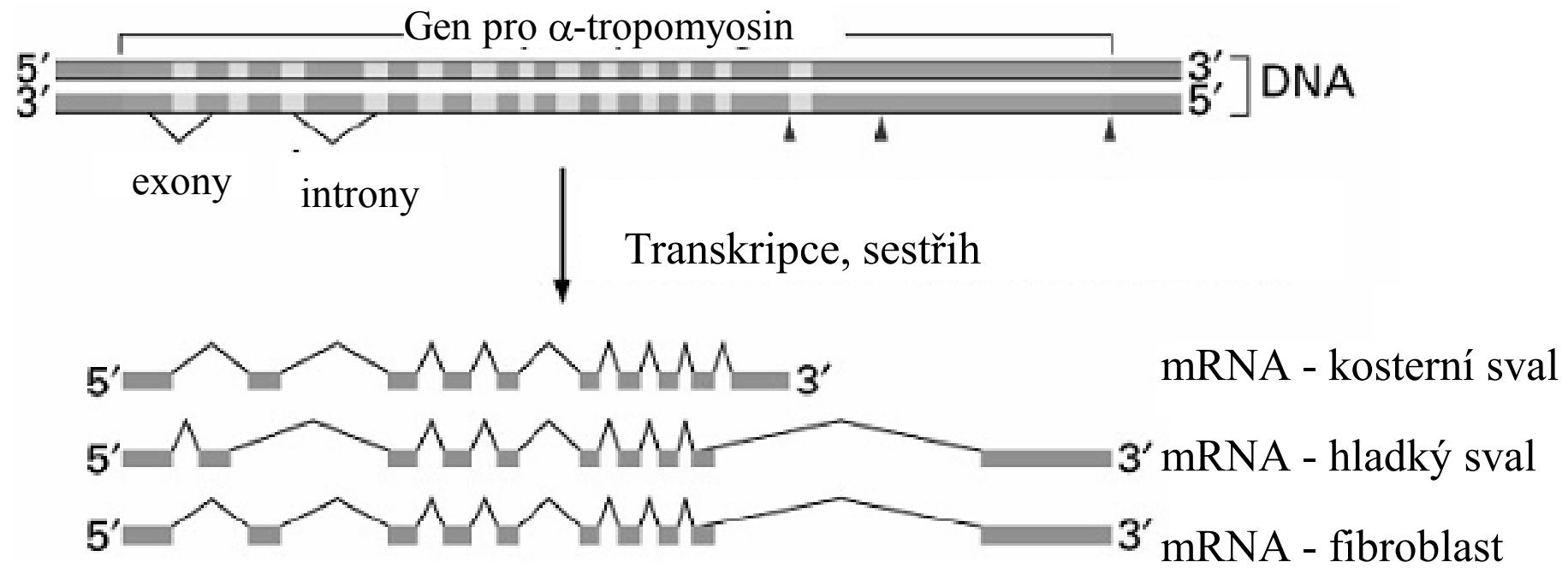


Alternativní sestřih

- ✓ Při typickém sestřihu jsou všechny exony primárního RNA transkriptu spojeny dohromady za vzniku mRNA pro syntézu specifického proteinu
- ✓ Alternativní sestřih – různé skupiny exonů z jednoho genu tvoří různé mRNA vedoucí k syntéze různých proteinů



Alternativní sestřih m RNA



Poruchy sestřihu

- ✓ Vedou ke genetickým chorobám
 - ✓ Příklad: β - thalasemie:
 - ✓ β -podjednotka hemoglobinu se netvoří v normálním množství
 - ✓ G na 5' sekvenci sestřihu je mutován na A a proto je primární transkript sestřižen nesprávně