



Transkripce

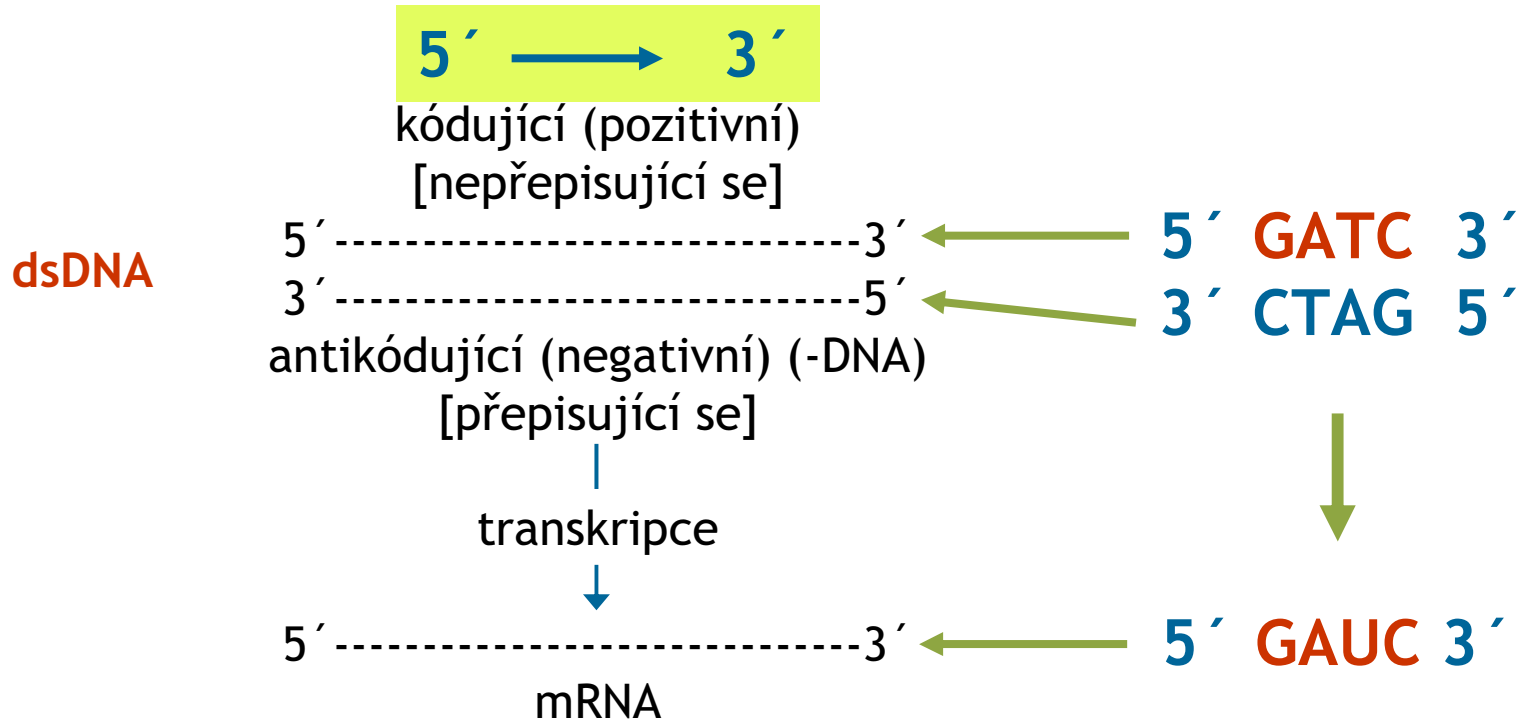
přepis genetické informace z DNA do RNA, při které DNA slouží jako matrice pro syntézu RNA. Reakci katalyzuje RNA-polymeráza (transkriptáza)

Zpětná transkripce (RT) - přepis genetické informace z RNA do DNA. Reakci katalyzuje zpětná (reverzní) transkriptáza

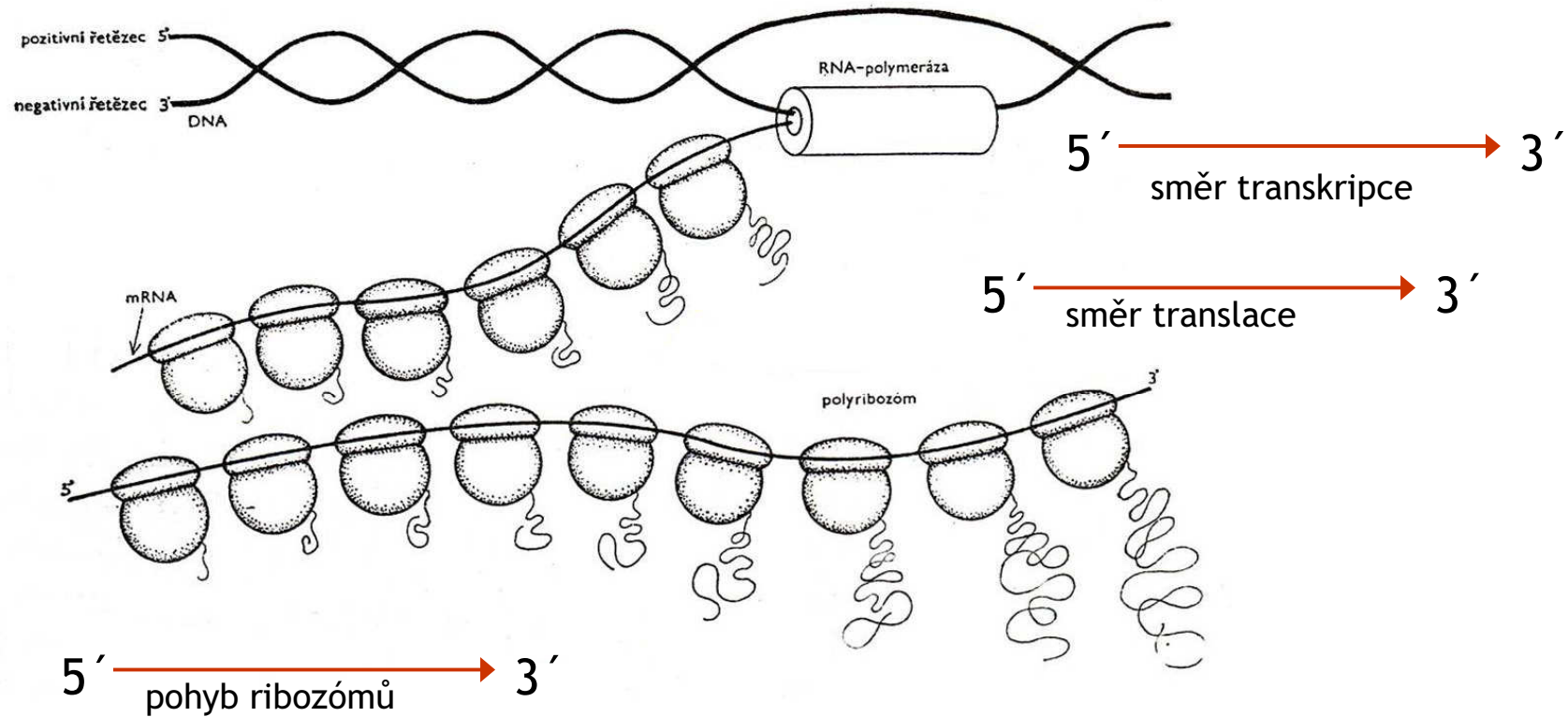
Transkripcje DNA do RNA



Značení řetězců DNA podle jejich funkce



Směr syntézy mRNA při transkripci, směr translace mRNA a směr syntézy polypeptidů

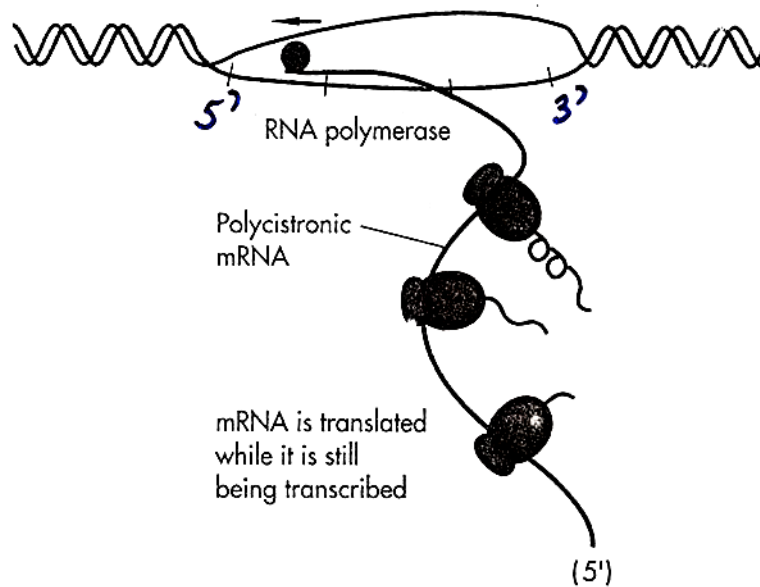


Syntéza polypeptidů
N-konec C-konec

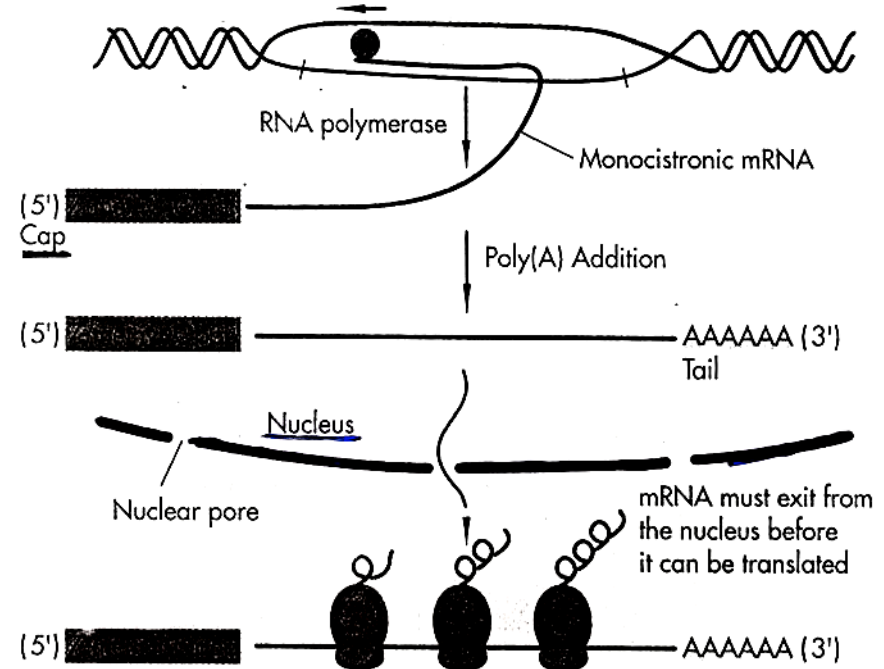


Transkripce u prokaryot je spřažena s translací, u eukaryot jsou tyto procesy odděleny

Prokaryota

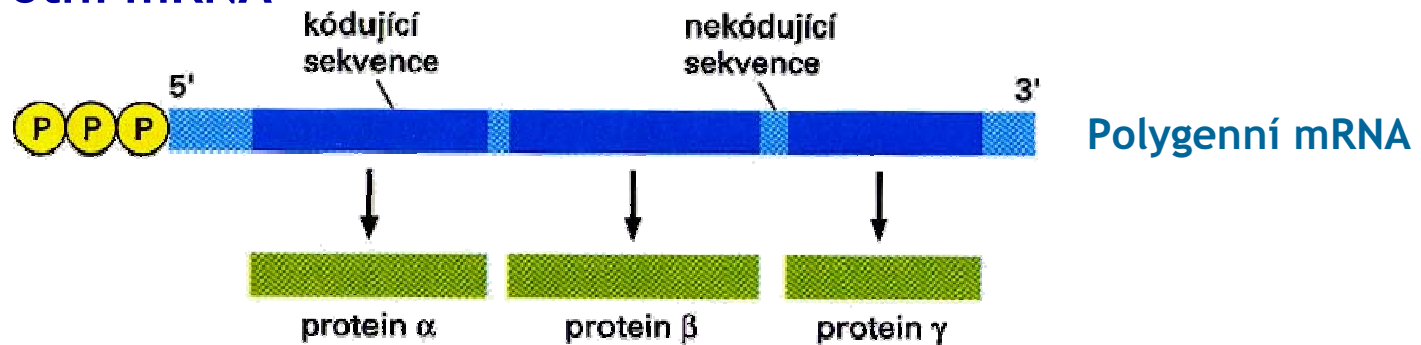


Eukaryota

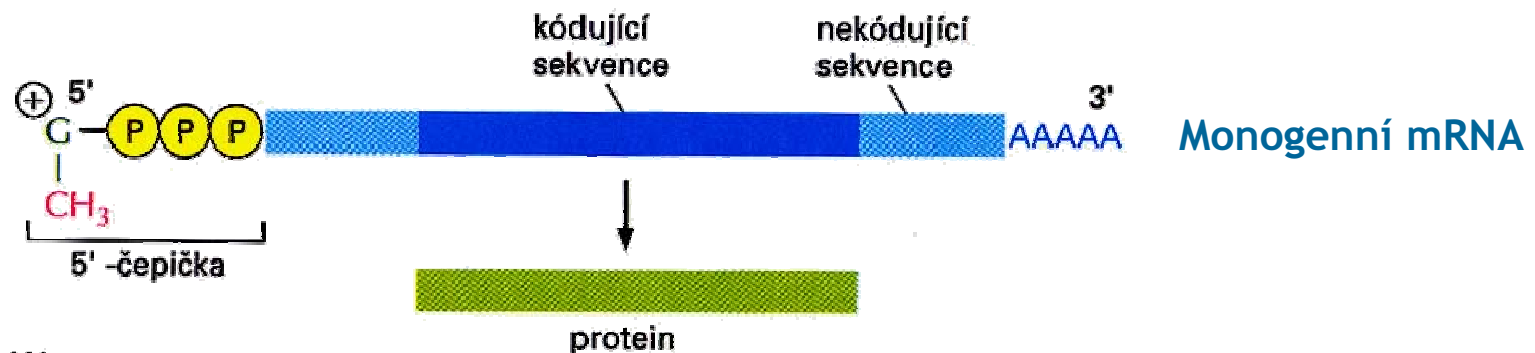


Srovnání prokaryotické a eukaryotické mRNA

Prokaryotní mRNA

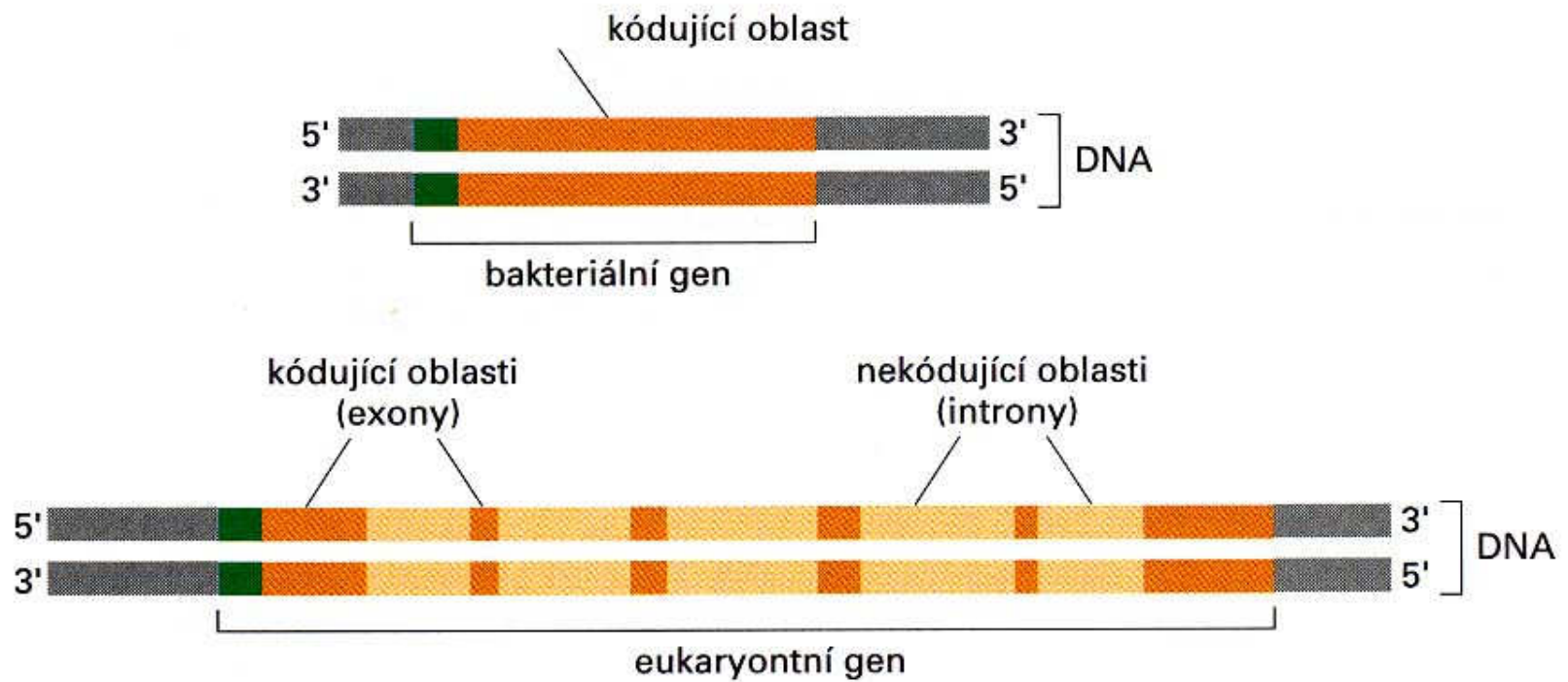


Eukaryotní mRNA

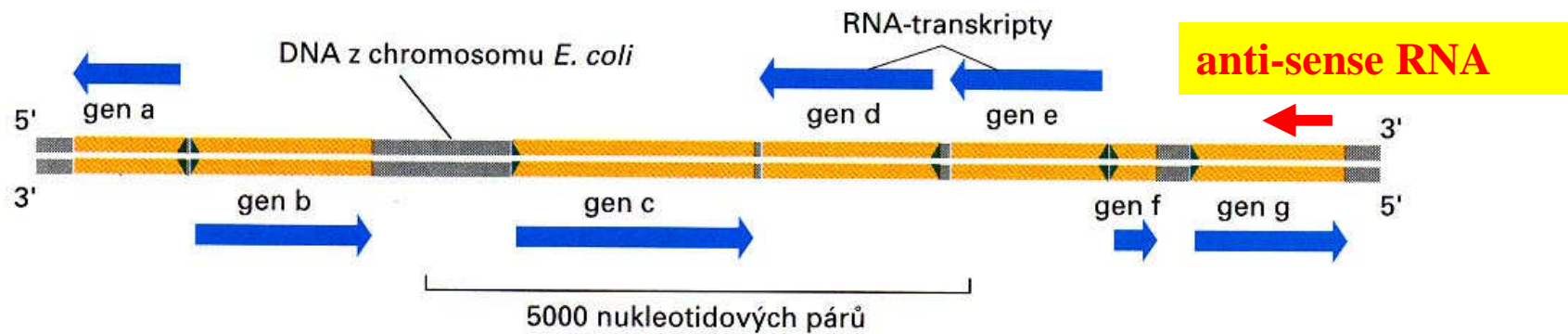


(A)

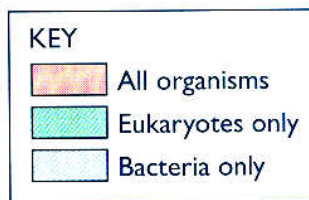
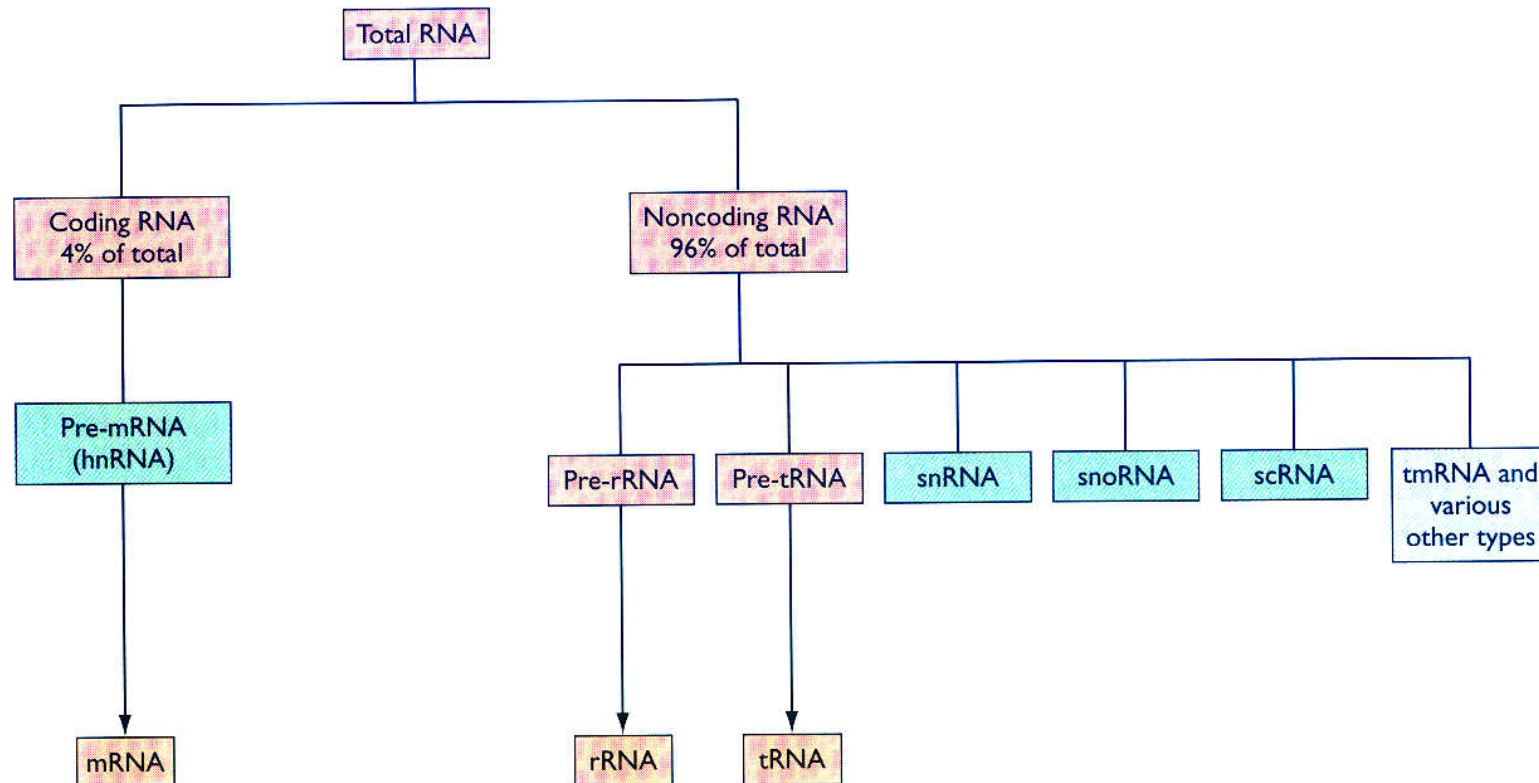
Srovnání prokaryotických (jednoduchých) strukturních genů s eukaryotickými (složenými) geny



Geny mohou být transkribovány z obou řetězců; jako templát je na daném úseku DNA využíván obvykle jen jeden z řetězců



Typy RNA vznikající při transkripci u různých typů organismů



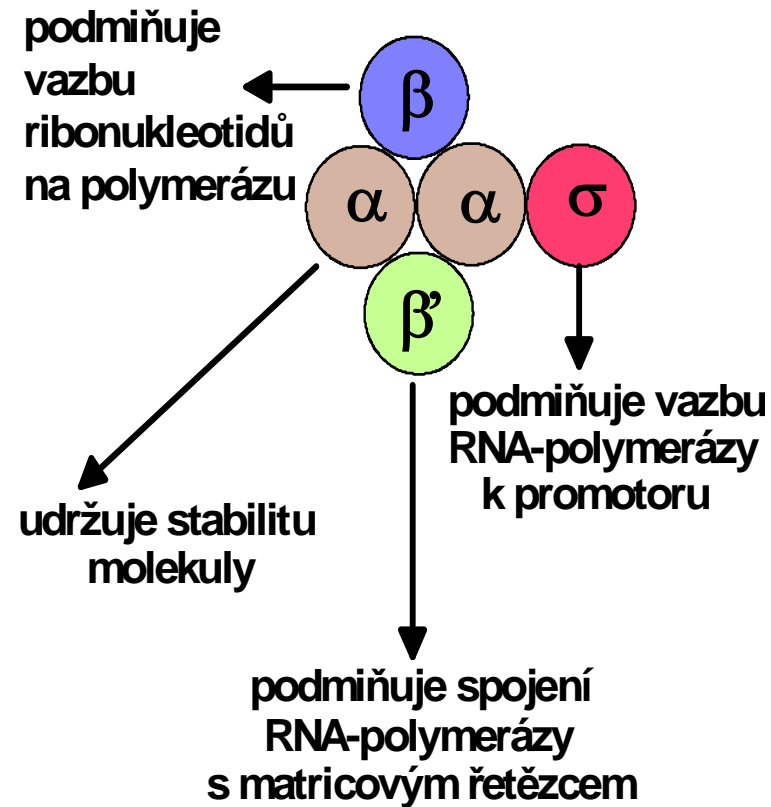
Enzymy katalyzující transkripci

- A. DNA-dependentní RNA-polymeráza (RNA-polymeráza, transkriptáza)
matricí je řetězec DNA (prokaryota, eukaryota, DNA-viry)
- B. RNA-dependentní DNA-polymeráza (zpětná/reverzní transkriptáza)
matricí je řetězec RNA (retroviry, retrotranspozony, retroelementy)

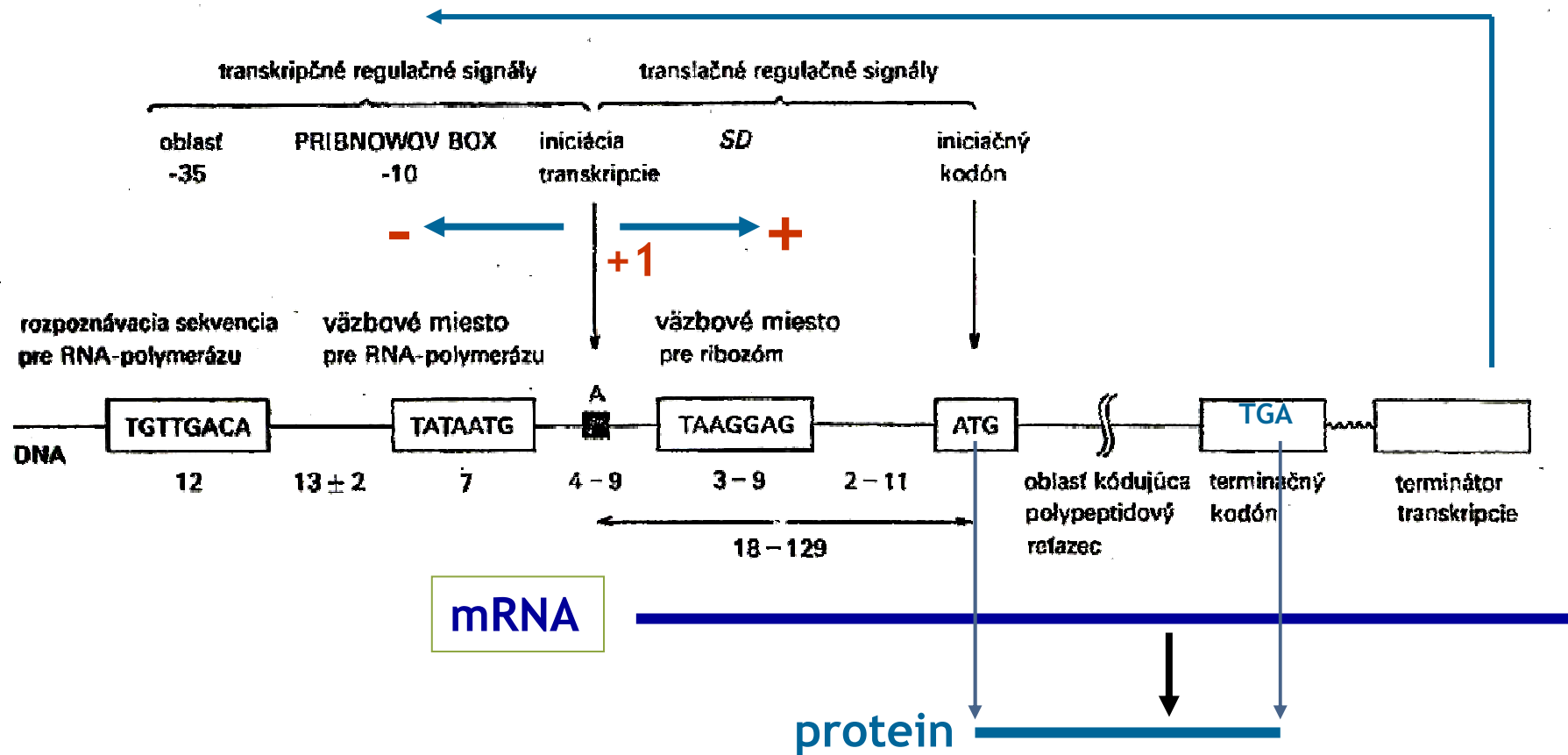
Primární transkripty tvořené na řetězci DNA

- přepisy strukturních genů (mRNA, pre-mRNA/hnRNA)
- přepisy genů pro funkční typy RNA
 - pre-rRNA
 - pre-tRNA
 - malé RNA (snRNA, snoRNA, scRNA, miRNA, ...)

Funkce podjednotek RNA-polymerázy u *E. coli*

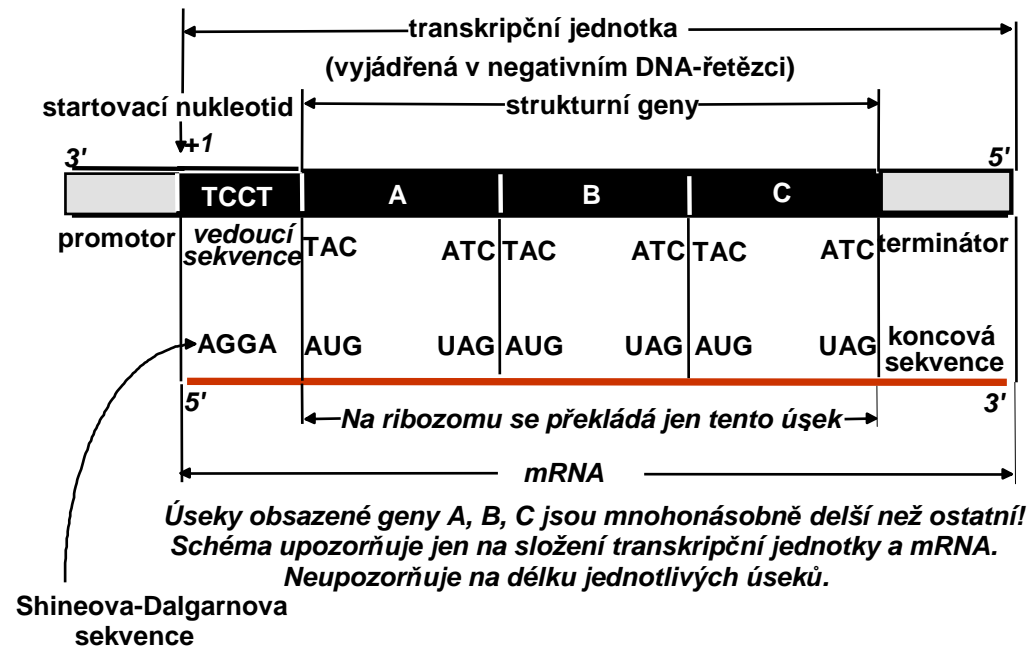


Strukturní gen prokaryot s vyznačením signálů pro transkripci a translaci



Transkripce strukturních genů

Schéma bakteriální mRNA a transkripční jednotky obsahující strukturní geny



mRNA je multigenní

Slouží bezprostředně jako matrice pro syntézu proteinů
velmi rychle se rozkládá ribonukleázou (1-2 min)

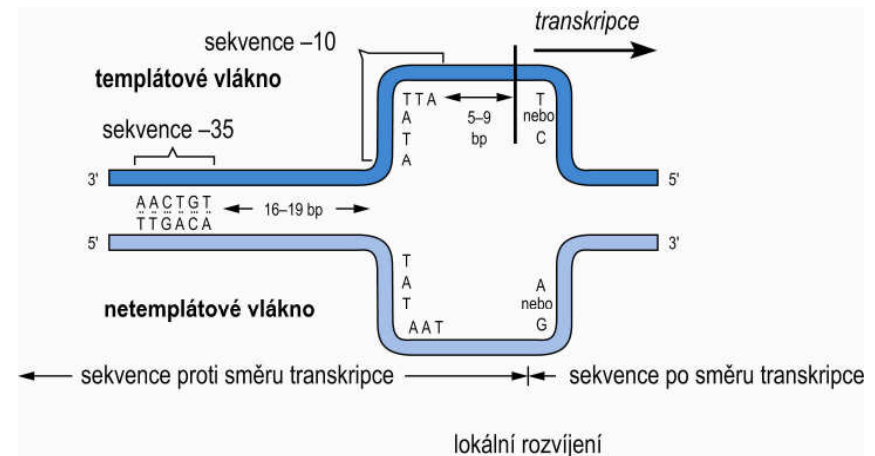
Funkční elementy bakteriálního promotoru



promotor
 ↗ silný
 ↘ slabý

Pribnowův box startovací nukleotid

box = krátká sekvence o stejné funkci



Sekvence přirozených a hybridních promotorů

	-35 Region									17 bp							-10 Region																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20																
CONSENSUS	•	•	•	T	T	G	A	C	A	•	•	•	•	•	•	•	•	T	A	T	A	A	T	•	•											
<i>lac</i>	G	G	C	T	T	T	A	C	A	C	T	T	T	A	T	G	C	T	T	C	C	G	G	C	T	C	G	T	A	T	A	T	T	G	T	
<i>trp</i>	C	T	G	T	T	G	A	C	A	A	T	T	A	A	T	C	A	T	C	G	A	A	C	T	A	G	T	T	A	A	C	T	A	G		
λP_L	G	T	G	T	T	G	A	C	A	T	A	A	A	T	A	C	C	A	C	T	G	G	C	G	G	T	G	A	T	A	C	T	G	A		
<i>rec A</i>	C	A	C	T	T	G	A	T	A	C	T	G	T	A	T	G	A	A	G	C	A	T	A	C	A	G	T	A	T	A	A	T	T	G		
<i>tacI</i>	C	T	G	T	T	G	A	C	A	A	T	T	A	A	T	C	A	T	C	G	G	C	T	C	G	T	A	T	A	A	T	T	G			
<i>tacII</i>	C	T	G	T	T	G	A	C	A	A	T	T	A	A	T	C	A	T	C	G	A	A	C	T	A	G	T	T	T	A	A	T	T	G		

Hybridní promotory $tac = lac \times trp$

Základní schéma typů transkripčních jednotek bakteriálního genomu

Neoperonová transkripční jednotka a operony

NEOPERONOVÁ TRANSKRIPČNÍ JEDNOTKA



↑
promotor
operátor

OPERONY



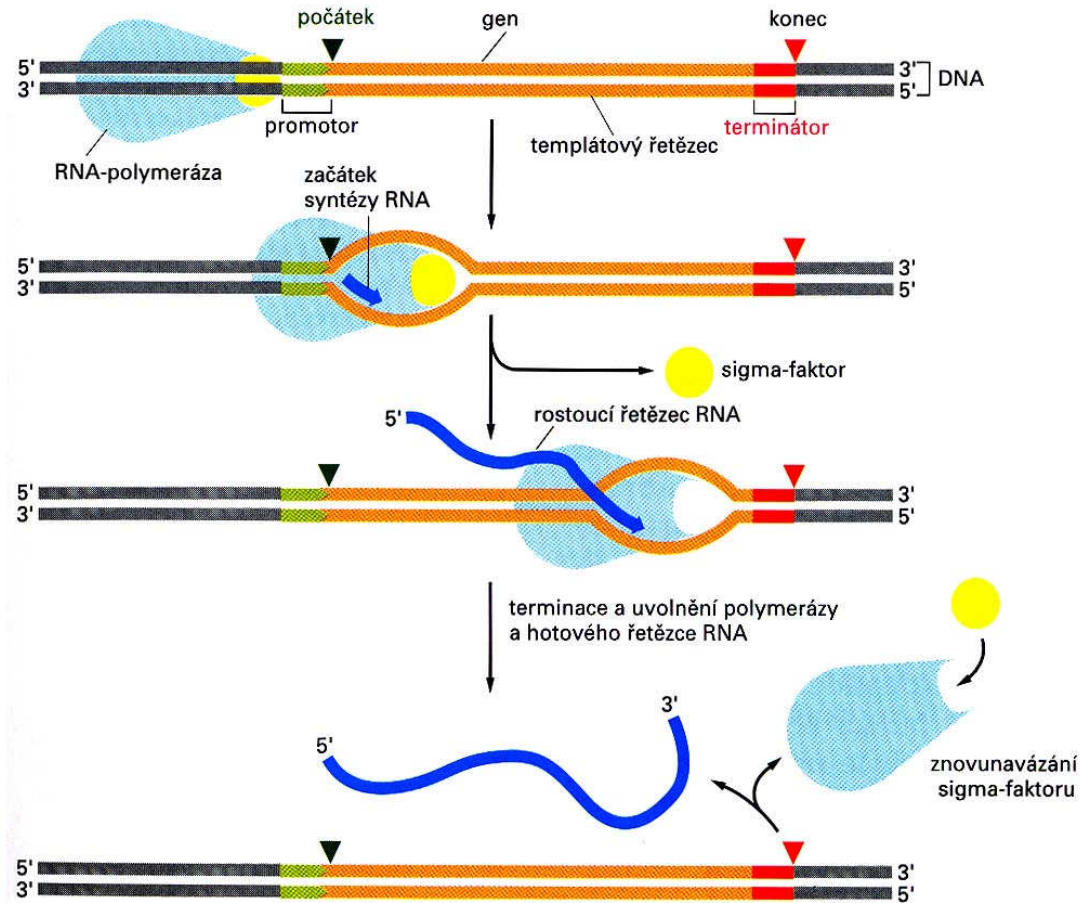
↑
operátor
překrývající se
s promotorem

Transkripce bakteriálního genu RNA-polymerázou

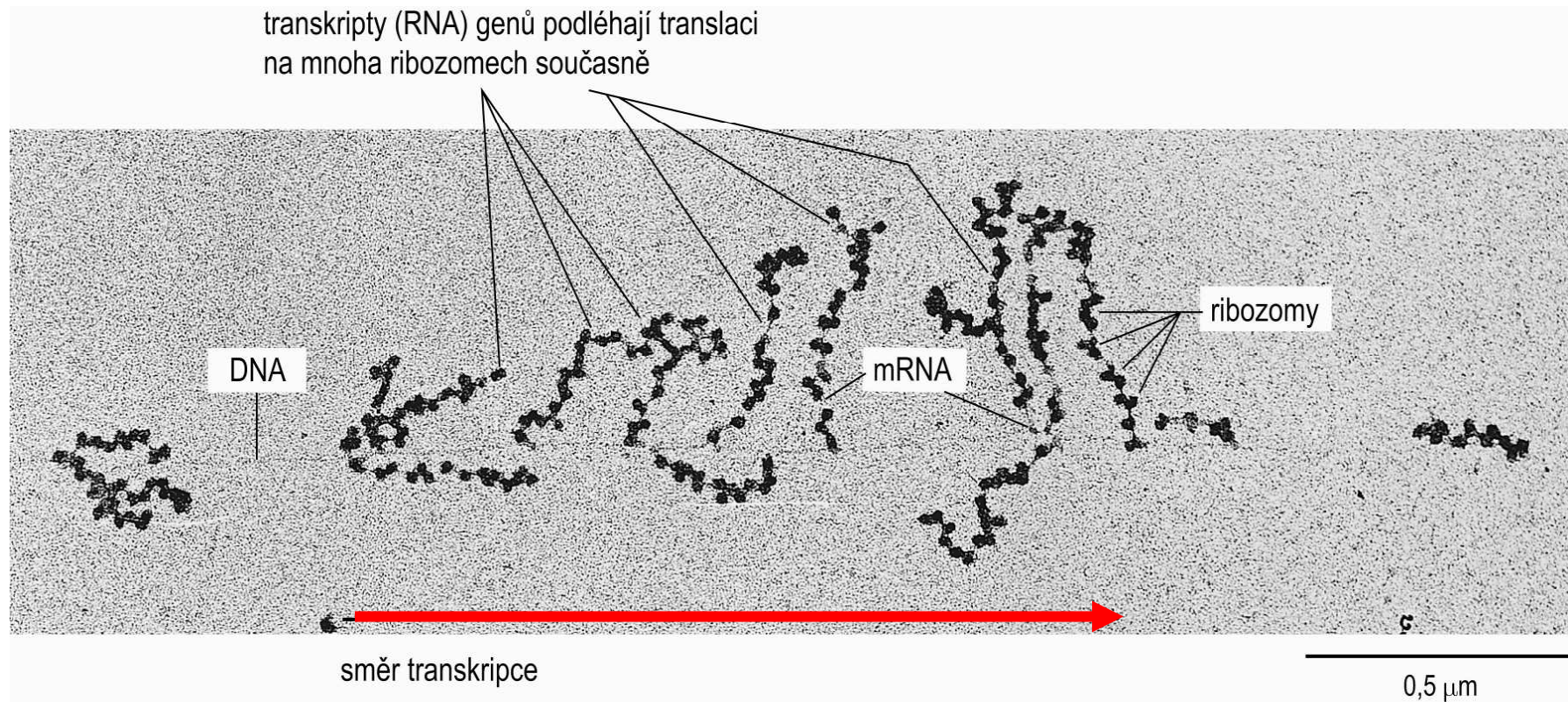
1. iniciace

2. elongace

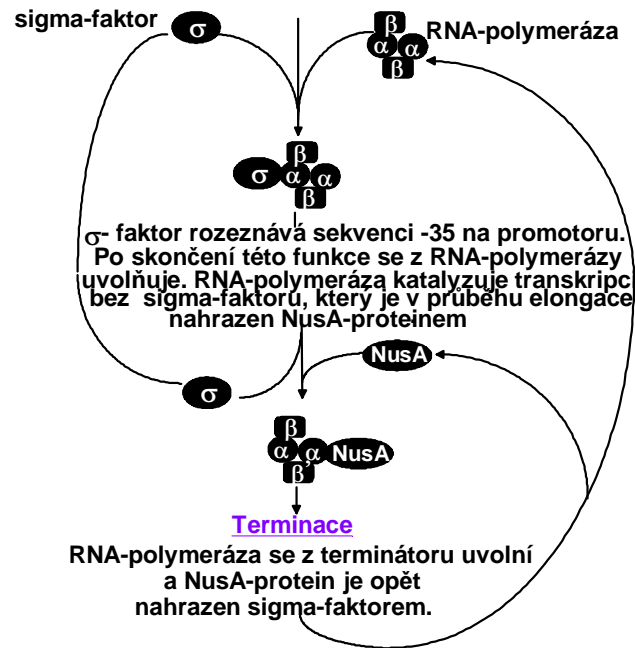
3. terminace



Vytváření molekul mRNA na prokaryotické transkripční jednotce a spřažení transkripce a translace u prokaryot



Výměna podjednotek vázajících se na RNA-polymerázu v průběhu transkripce



Obr. 148

Vzájemné výměny sigma-faktoru a NusA-proteinu na RNA-polymeráze

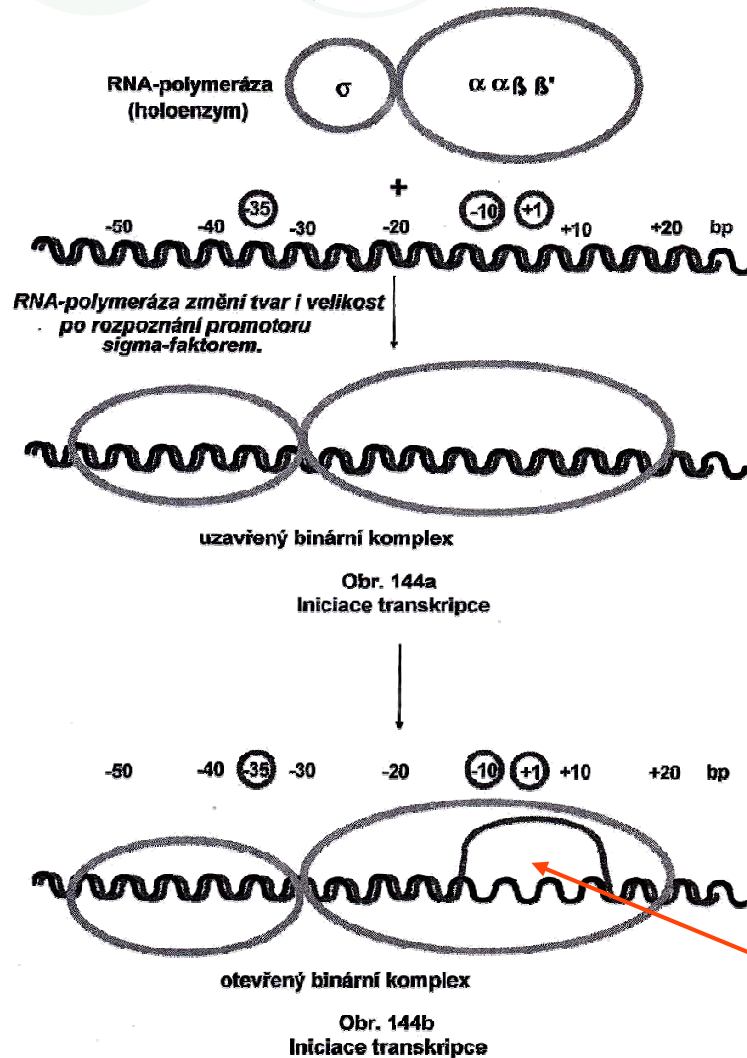
Terminace transkripce nezávislá na Ró-faktoru

Zastavení pohybu RNA-polymerázy

Uvolnění hotové RNA

Uvolnění RNA-polymerázy z DNA

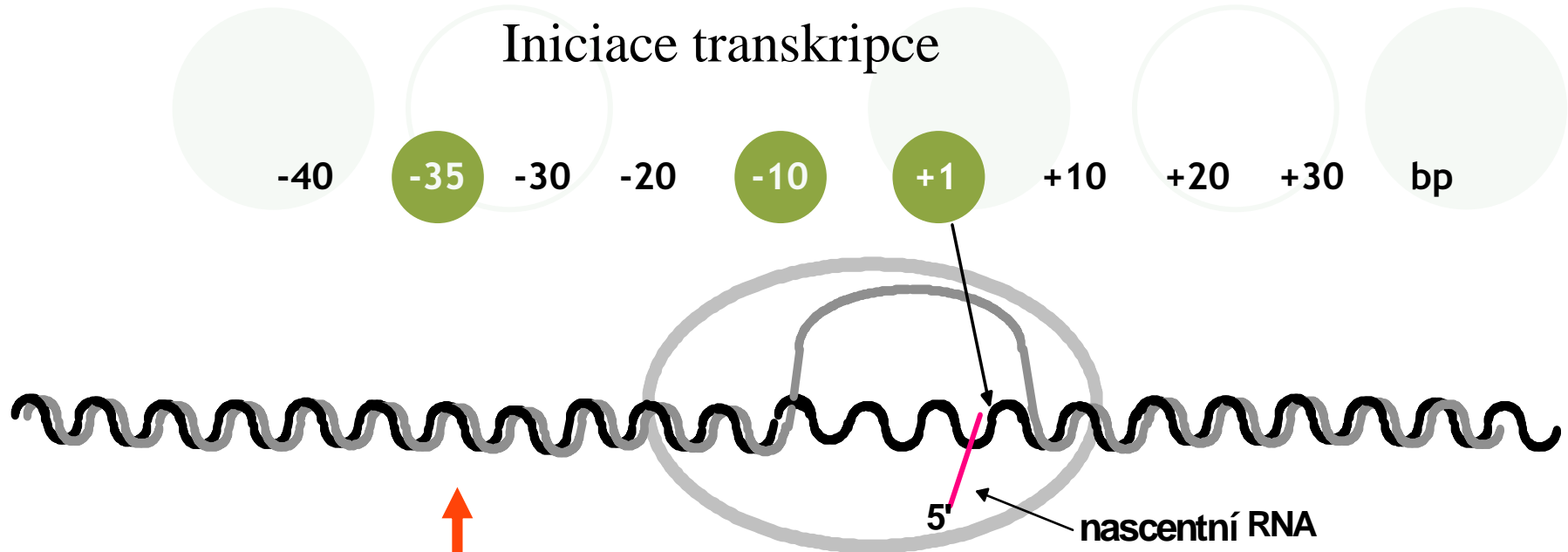
Vazba prokaryotické RNA-polymerázy na promotor



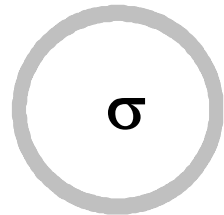
- α - stabilita holoenzymu
- β - vazba rNTP na polymerázu
- β' - spojení s matricovým řetězcem
- σ - vazba k promotoru

Denaturace v oblasti +1

Iniciace transkripce

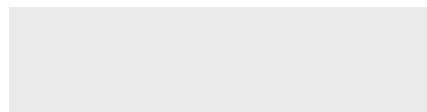


*vazba sigma-faktoru
na -35*



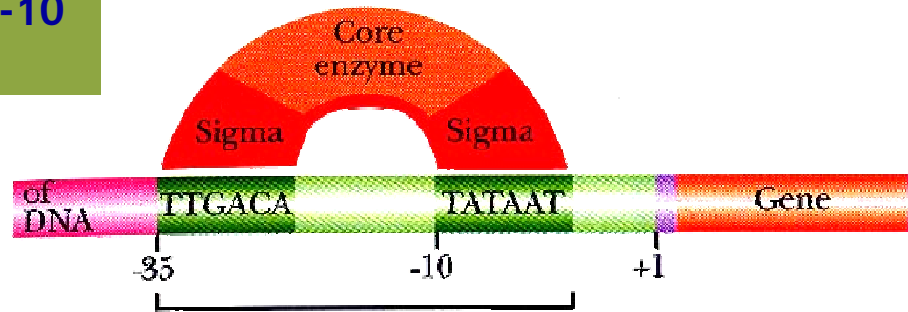
*Sigma-faktor se uvolňuje
z RNA-polymerázy.*

*Při zakončení fáze iniciace a vstupu do
fáze elongace mění sigma-faktor i
RNA-polymeráza svou konformaci, což
se projevuje změnou v její velikosti i
tvaru.*



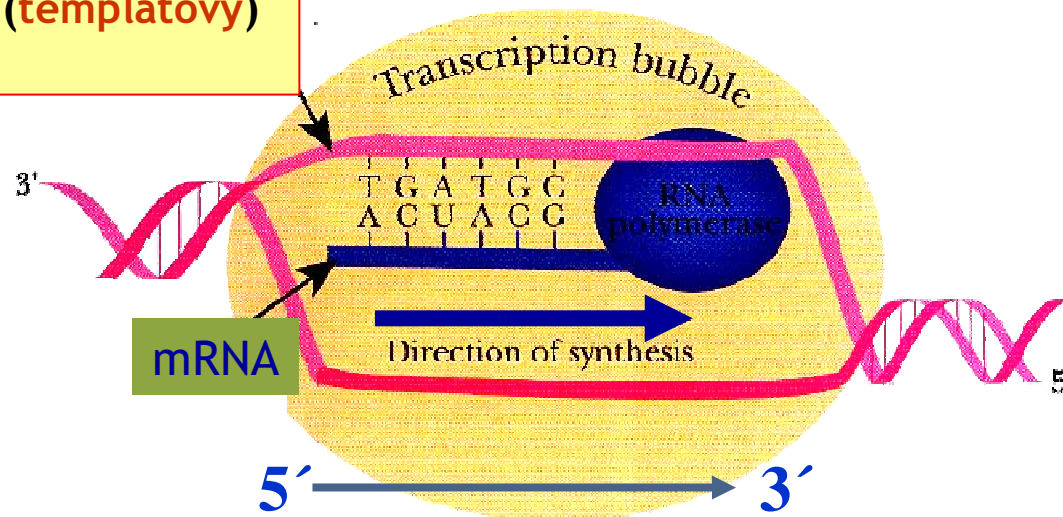
Iniciační fáze transkripce u prokaryot

Rozpoznání sekvenční -10 a -35 sigma faktorem

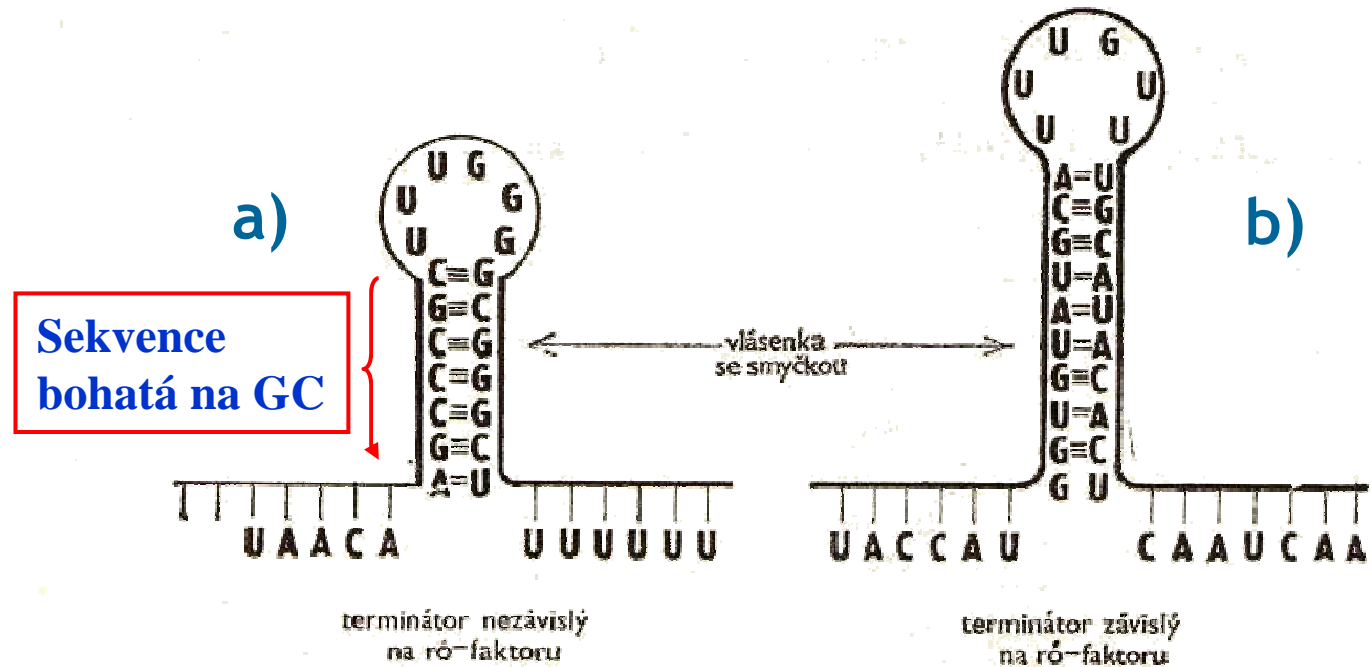


negativní (templátový) řetězec

Prodlužování mRNA

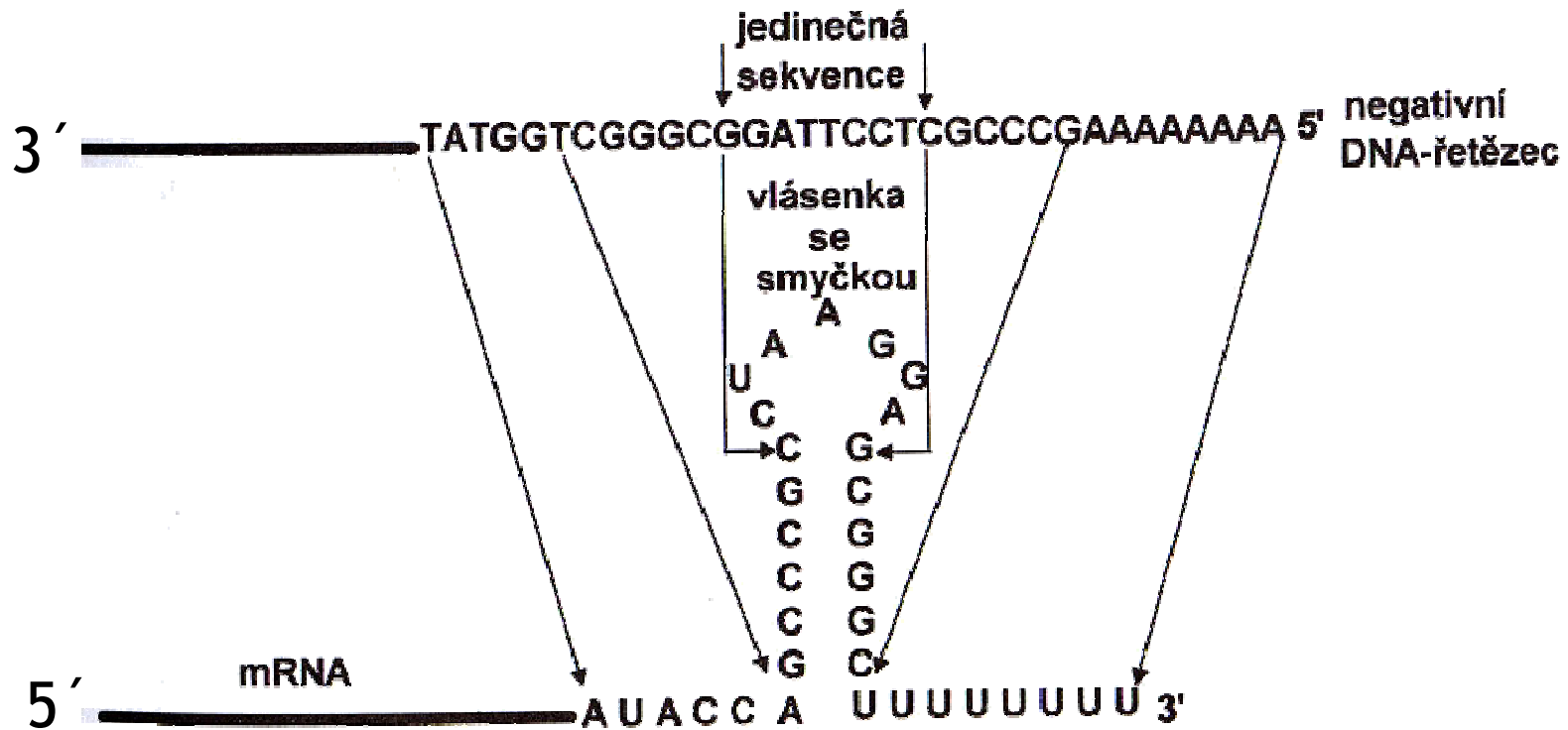


Typy terminátorů transkripce u prokaryot

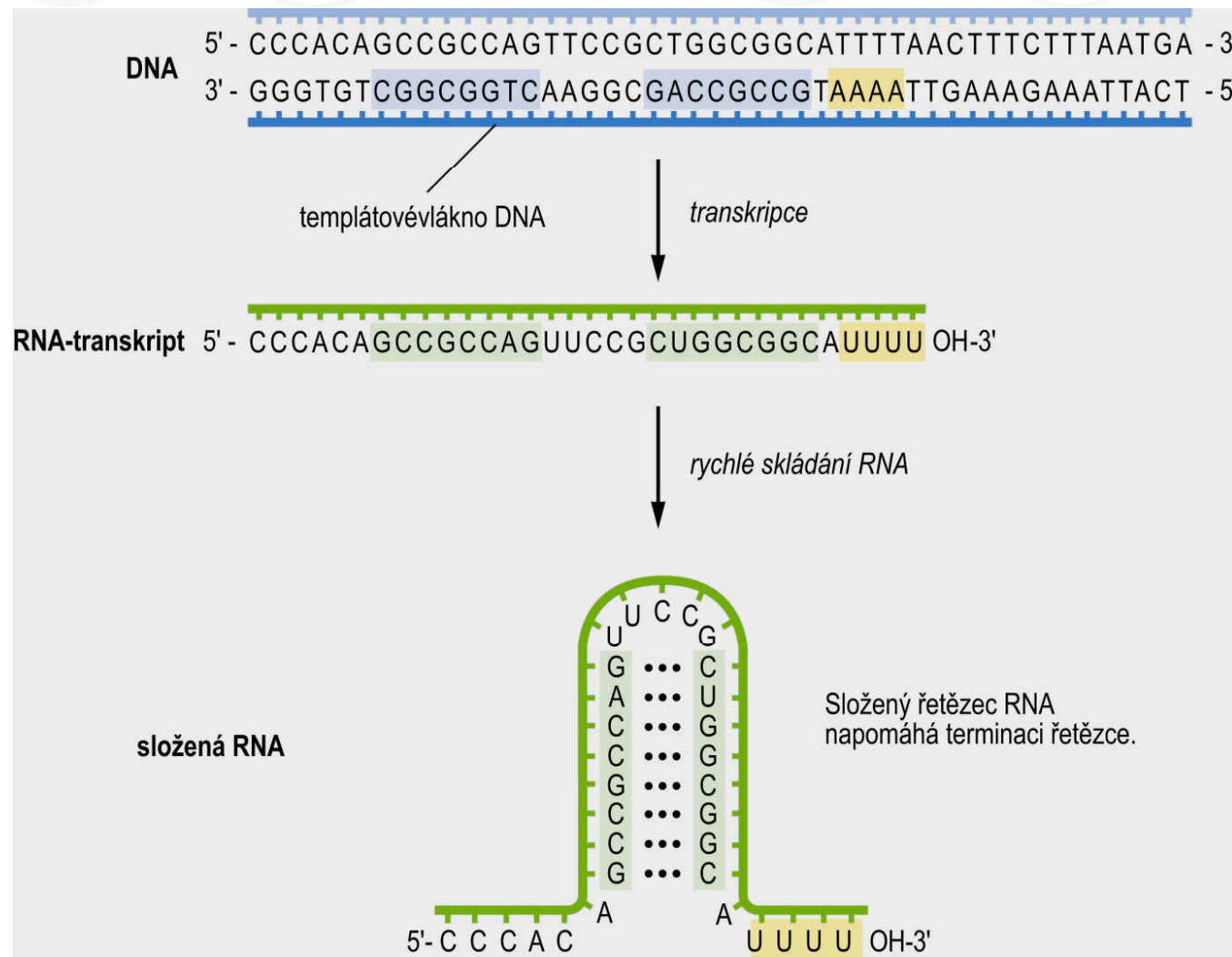


Strukturní rozdíly mezi dvěma typy prokaryotických terminátorů (jejich transkriptů)

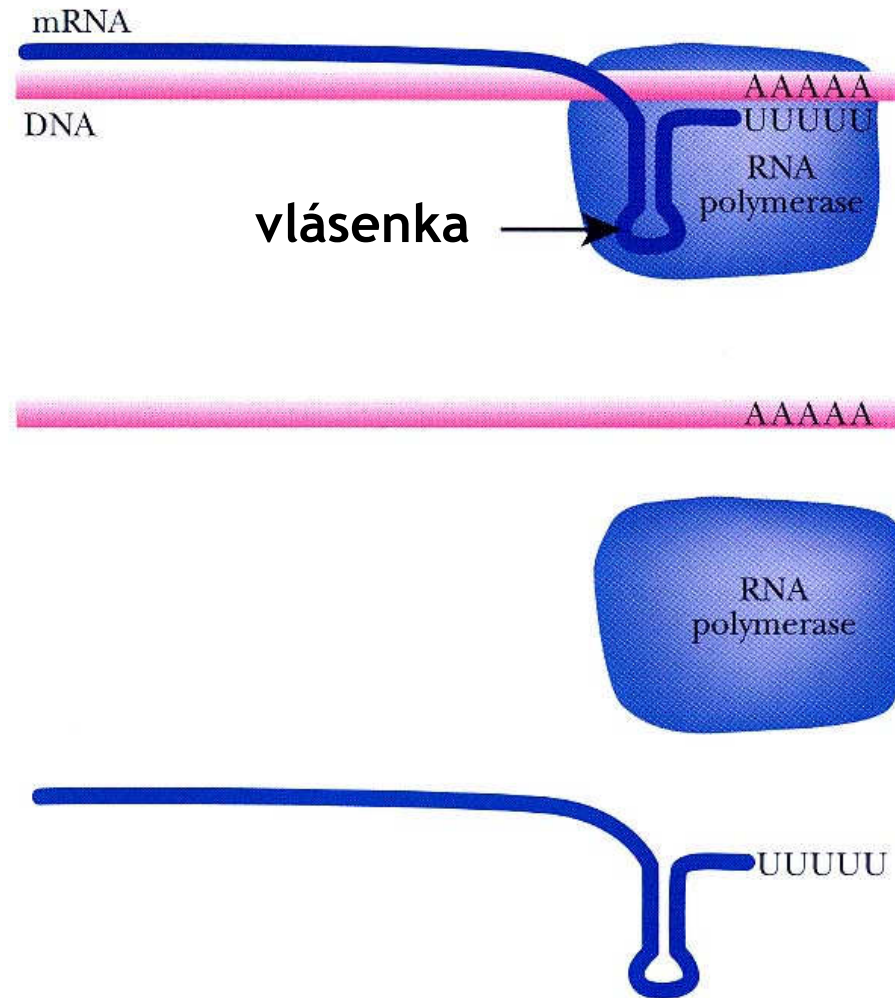
Struktura terminátorů nezávislých na ró-faktoru a jejich přepis do mRNA



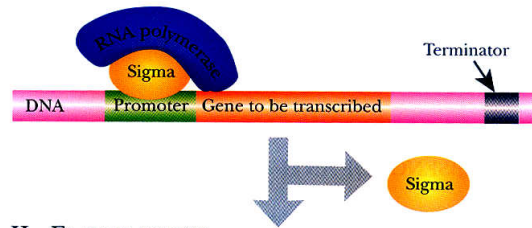
Struktura transkripčního terminátoru nezávislého na rho faktoru



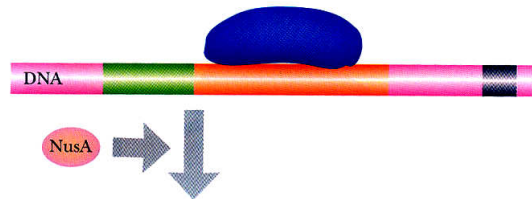
Terminace transkripce mRNA



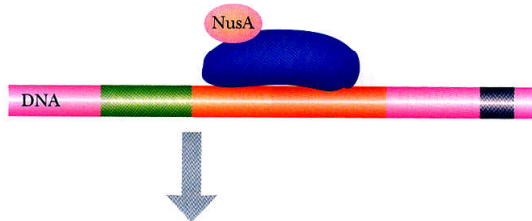
I. RECOGNITION



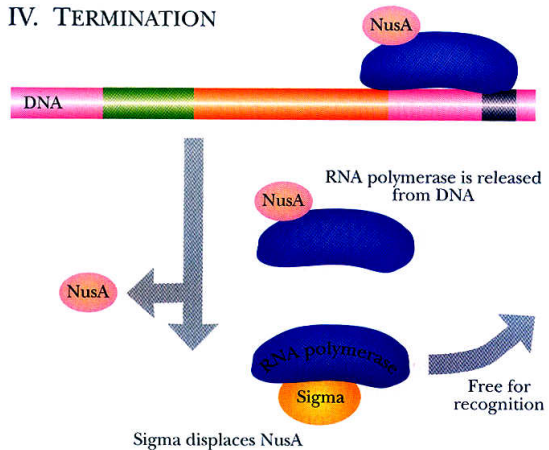
II. ELONGATION SIGMA IS RELEASED



III. NusA IS PICKED UP



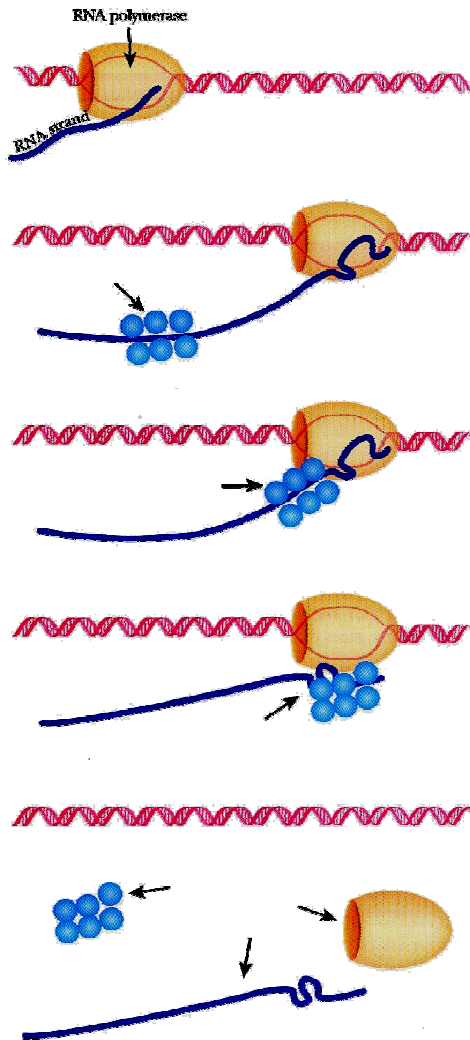
IV. TERMINATION



Výměna sigma faktoru a NusA proteinu na RNA-polymeráze

- Sigma faktor: iniciace
- NusA protein - terminace

Terminace transkripce za účasti Rho faktoru



Elongační fáze transkripce

Připojení Rho-faktoru a jeho pohyb po mRNA

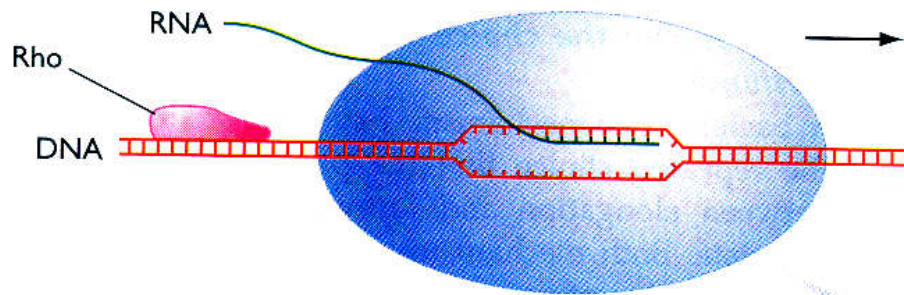
Připojení Rho-faktoru k sekvenci terminátoru

Rho faktor rozmotává hybridní DNA-RNA

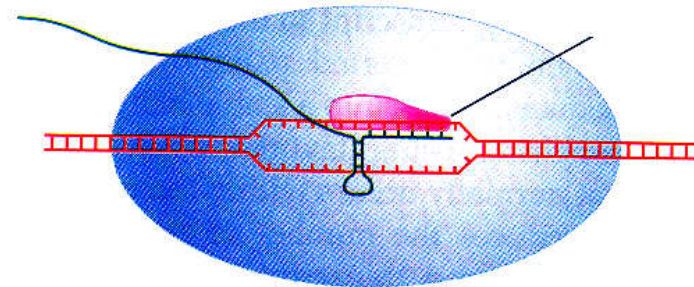
Uvolnění Rho-faktoru, RNA-polymerázy a mRNA

Terminace transkripce závislá na Rho-faktoru

Elongační fáze



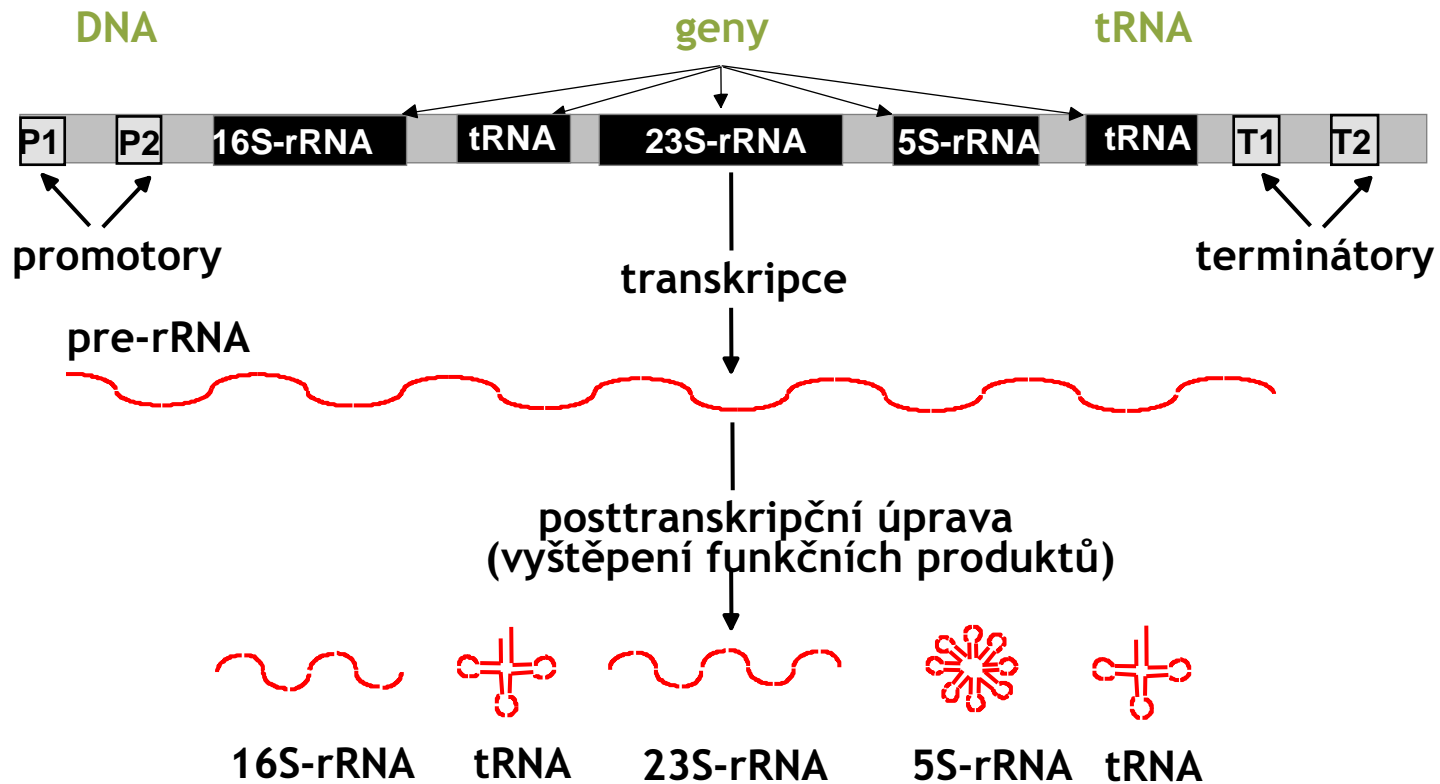
Rho-faktor se pohybuje za RNA-polymerázou



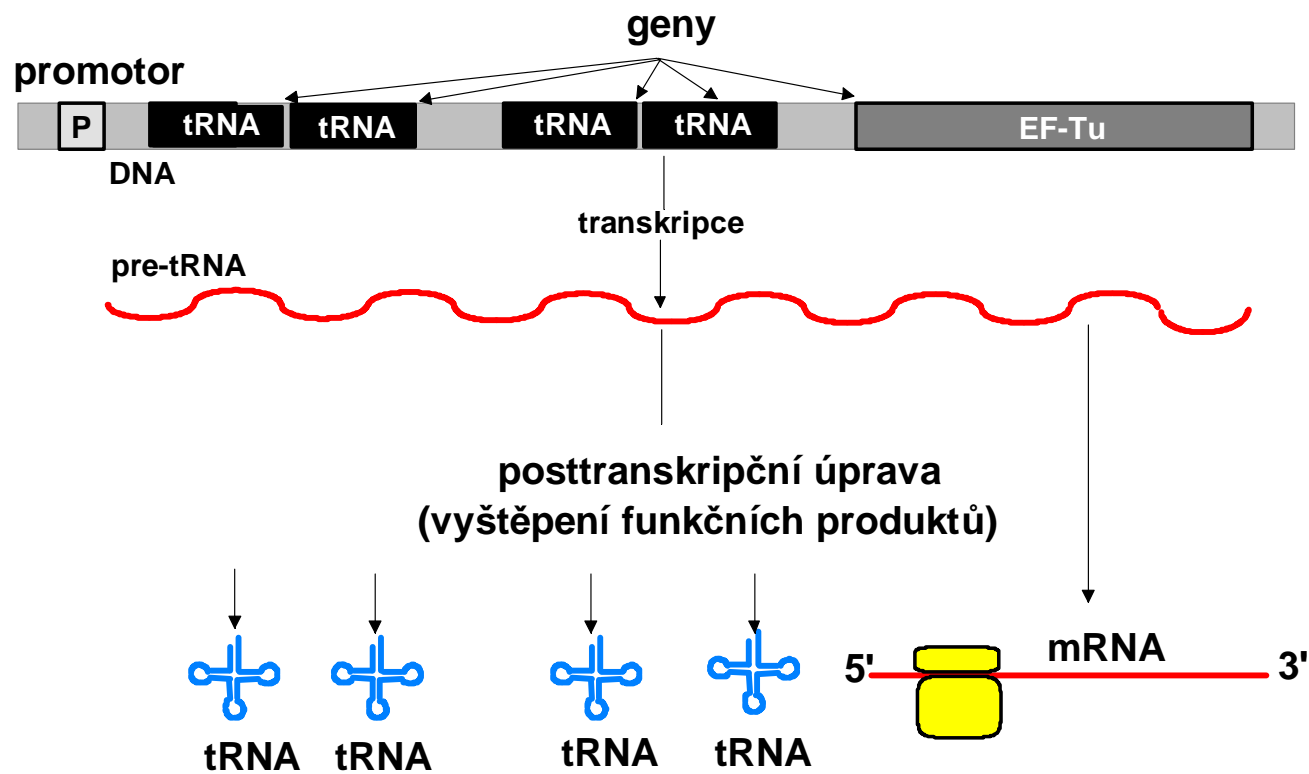
Jakmile se RNA-polymeráza zastaví na terminátorové vlásence, Rho-faktor ji dostihne a oddělí RNA od DNA (Rho = helikáza)

- Rho-faktor je rozeznáván NusA-proteinem, který je přechodnou součástí RNA-polymerázy. Rho-faktor katalyzuje po vazbě na tento protein odvíjení mRNA z DNA-řetězce a uvolnění RNA-polymerázy. K tomu je zapotřebí ATP, který je hydrolyzován Rho-faktorem vyznačujícím se aktivitou ATPázy.

Transkripce transkripční jednotky pro rRNA (*rrn* operony)



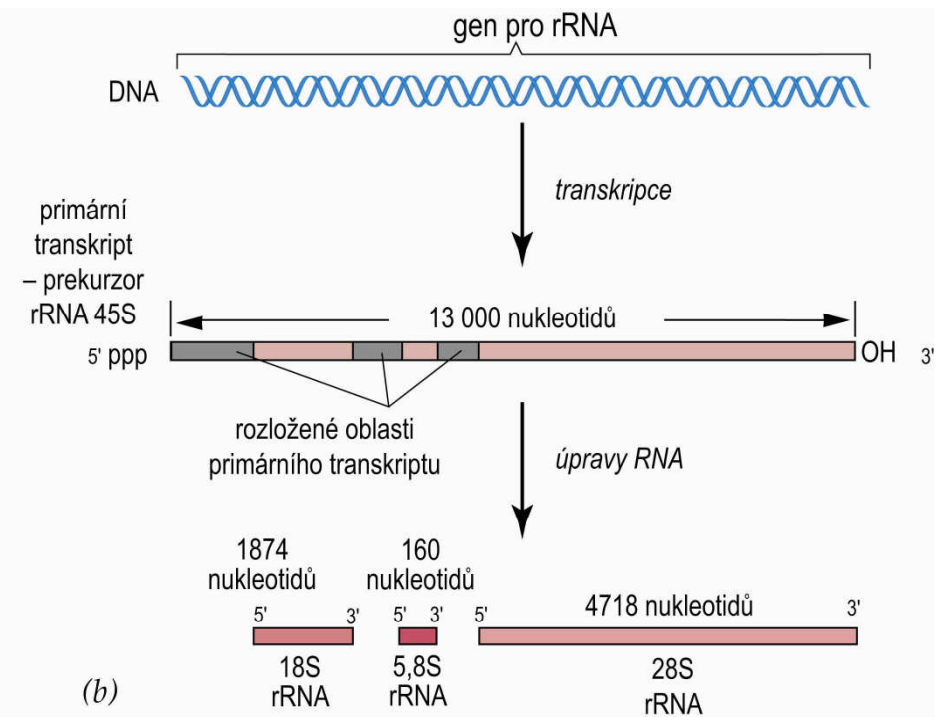
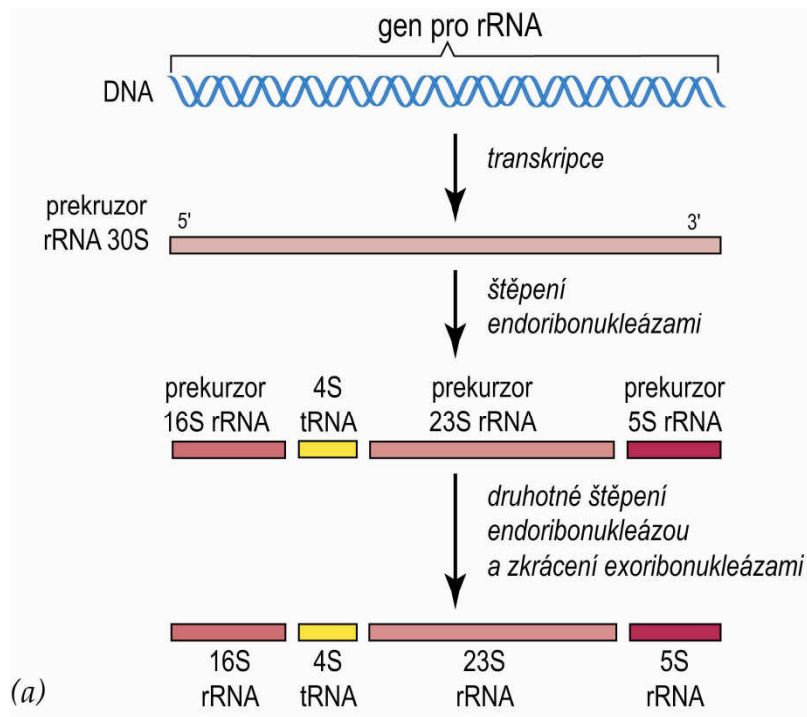
Transkripce transkripční jednotky pro tRNA



Transkripce a úprava genů pro rRNA u bakterií a savců

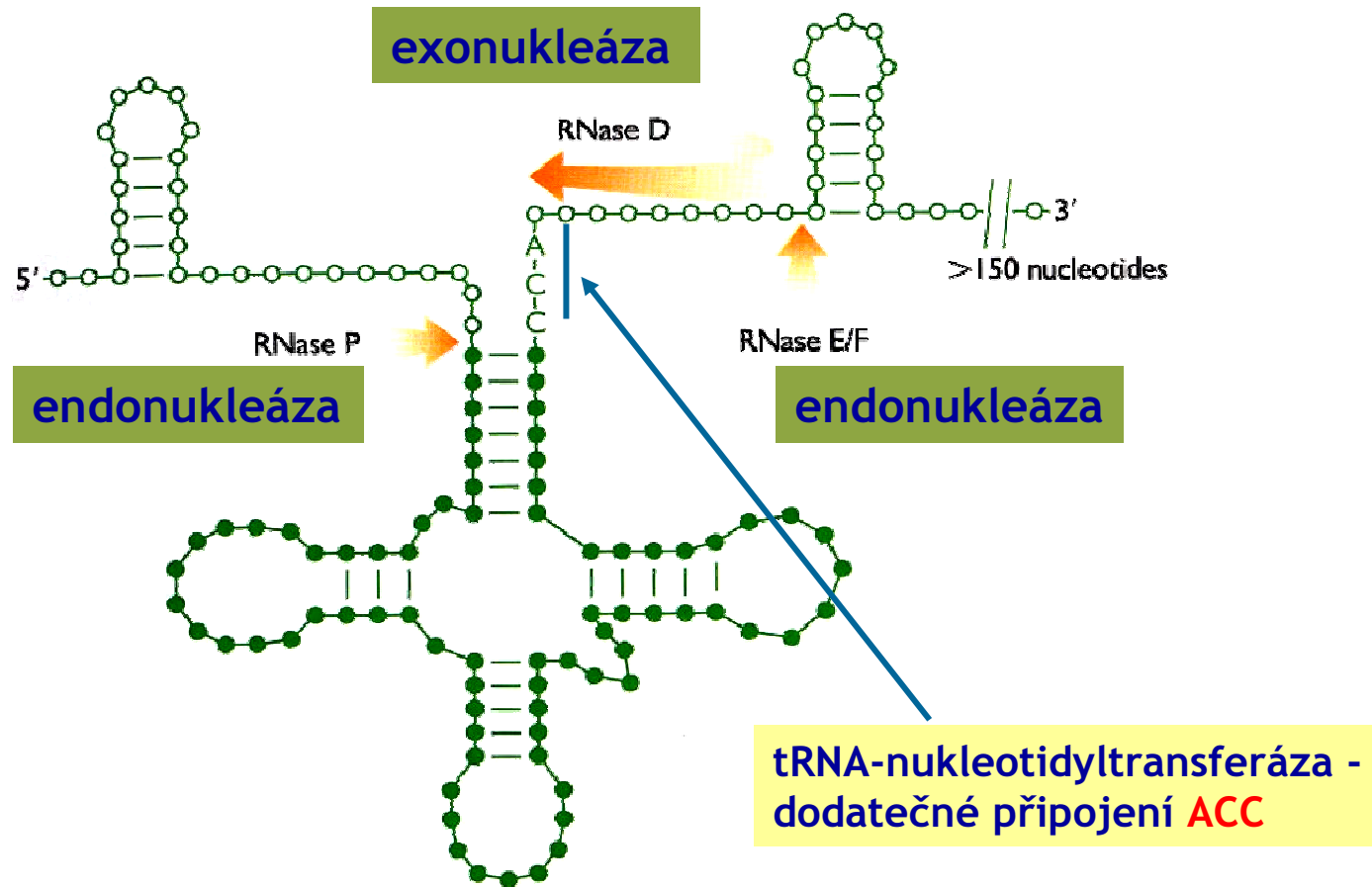
Bakterie

Savci

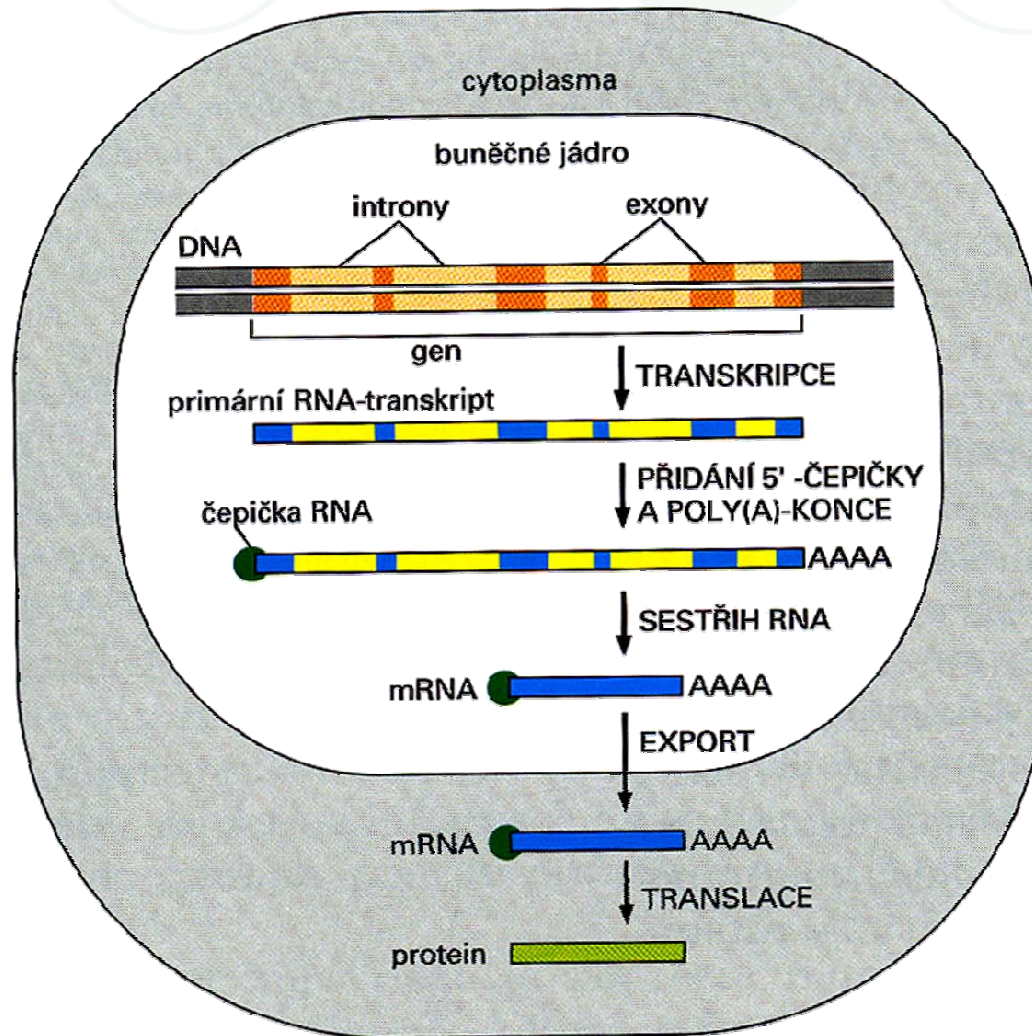


Úprava pre-tRNA u *E. coli*

* probíhá působením enzymů



Transkripce u eukaryot



Eukaryotické DNA-dependentní RNA-polymerázy

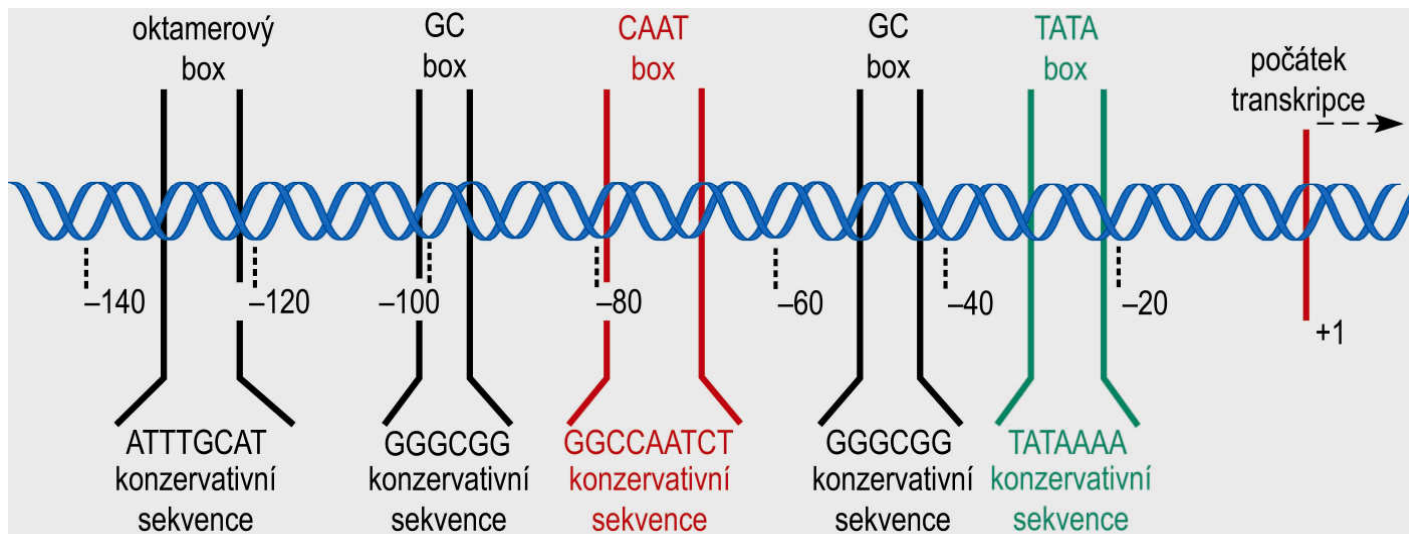
Matricí pro syntézu RNA je u všech těchto polymeráz negativní DNA-řetězec. Existují tři druhy těchto RNA-polymeráz:

- **RNA-polymeráza I**, která katalyzuje syntézu pre-rRNA. Nachází se v jádru a není citlivá k α -amanitinu **Geny I. třídy**
- **RNA-polymeráza II**, která katalyzuje syntézu hnRNA a některých malých rRNA. Je citlivá k α -amanitinu. Vyskytuje se v karyoplazmě. Sestává přibližně z 10 protomerů, z *nichž tři největší jsou homologické s protomery α , β a β' prokaryotické RNA-polymerázy*. Protomer β váže volné ribonukleotidy, β' se váže k DNA a α spojuje protomery navzájem. Ostatní protomery se neliší od protomerů polymeráz I a III. **Geny II. třídy**
- **RNA-polymeráza III**, která katalyzuje syntézu pre-tRNA, 5S-rRNA a některých malých RNA. Citlivost k α -amanitinu je druhově specifická. Vyskytuje se v karyoplazmě. **Geny III. třídy**

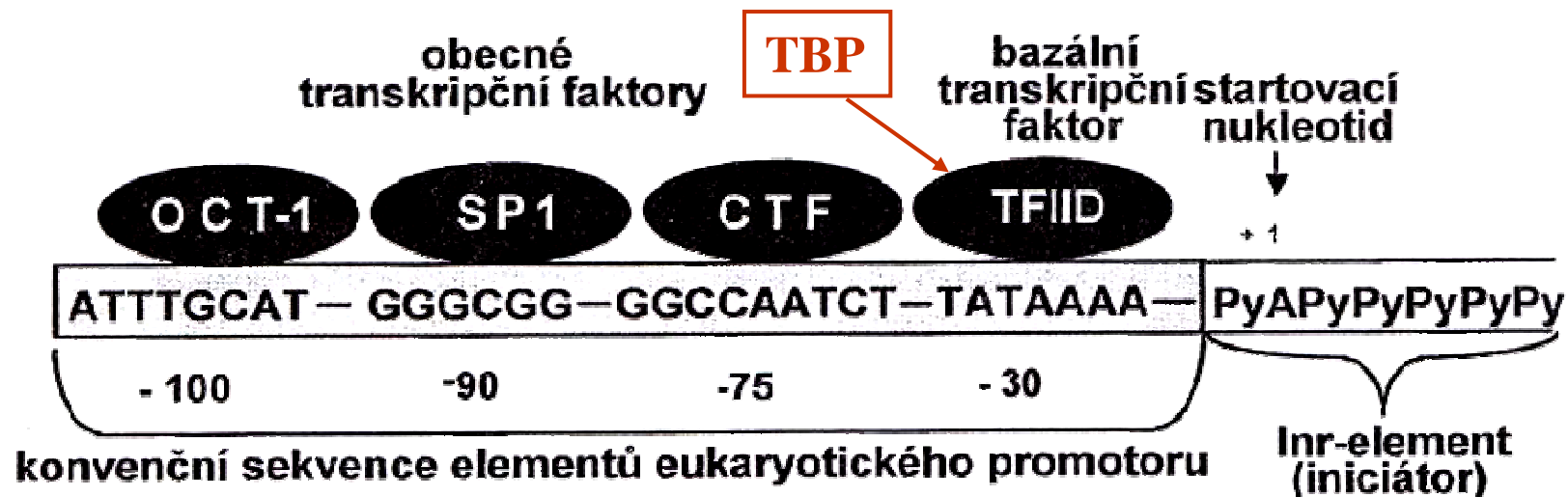
Každá z uvedených tří RNA-polymeráz vyžaduje svůj specifický promotor, na který se váže. To je rozdíl proti prokaryotům, která mají jen jeden typ RNA-polymerázy a jeden typ promotoru

Elementy eukaryotického promotoru (Pol II)

- +1 (startovací nukleotid + Inr-element) - **iniciátor**
 - TATA-box (Hognessův b.) -34 až -26 - **TATA-box**
 - CAAT-box -75 až -80
 - GC-box -90
 - Oktamer ATTTGCAT
- Elementy proti směru transkripce (upstream elements)



Struktura promotoru RNA-polymerázy II

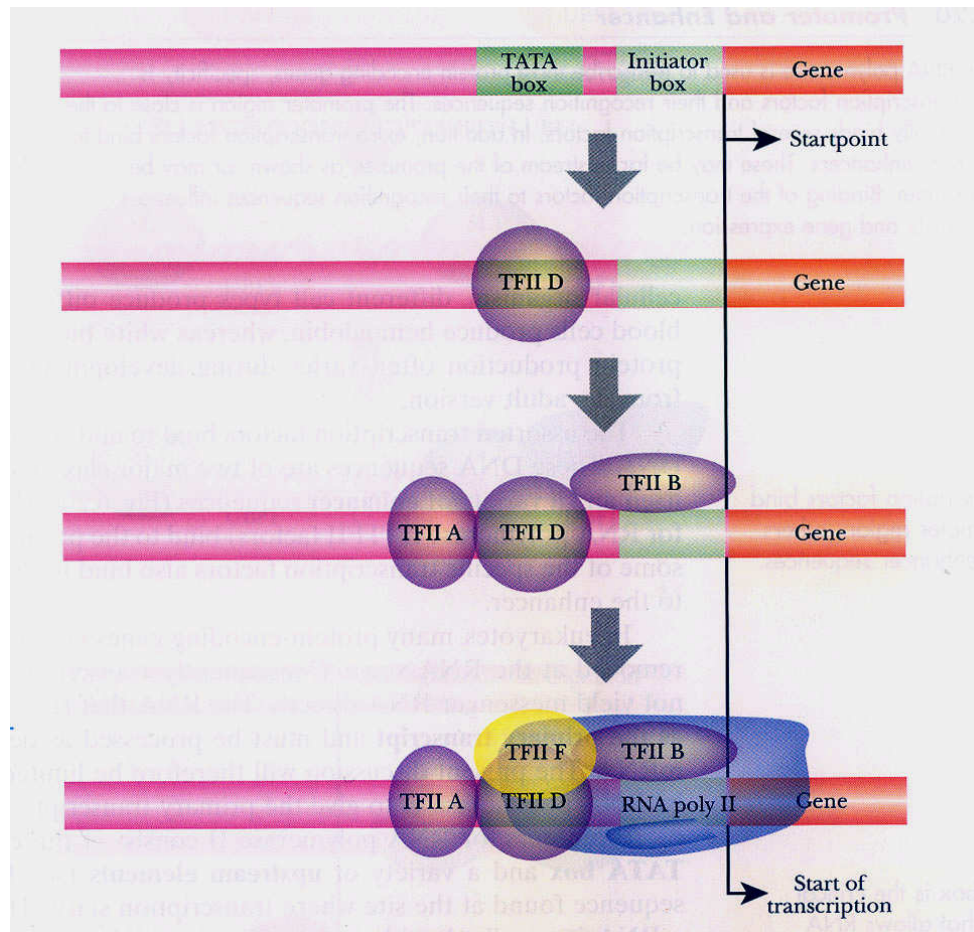
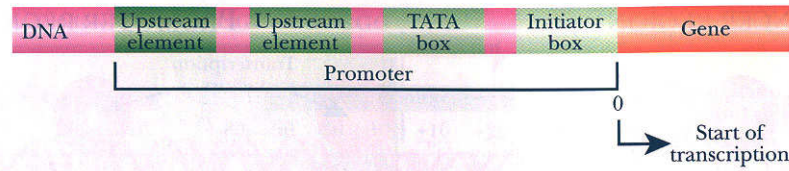


Promotory různých genů se liší počtem, umístěním a kombinací těchto elementů. Všechny promotory však musí obsahovat jeden nebo více elementů, aby mohly zahájit bazální transkripci.

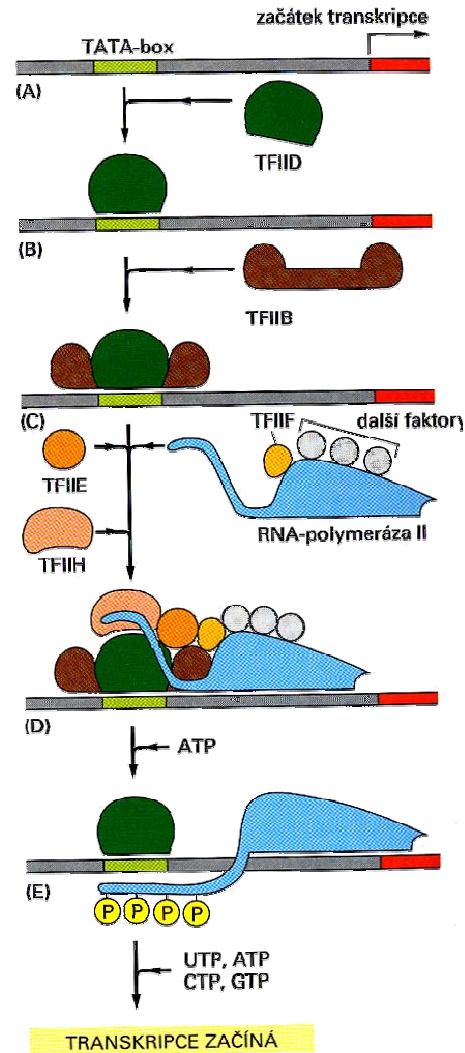
Provozní geny mají jen Inr-element bez TATA-boxu (Hognessův box).

Poznámka
Promotory RNA-polymerázy II u některých genů nemají ani TATA-box ani Inr-element. Transkripce těchto genů může začít z různých míst seřazených za sebou.

Vazebná místa eukaryotického promotoru pro RNA-polymerázu II



Iniciace transkripce eukaryotních genů RNA-polymerázou II za účasti obecných transkripčních faktorů



**pro zahájení transkripce
je nutné navazání TF
na TATA-box a na
RNA-polymerázu**

**RNA-polymeráza je
fosforylována TFIIH
(+ATP), mění konformaci
a zahajuje transkripci**

Posttranskripční úpravy hnRNA

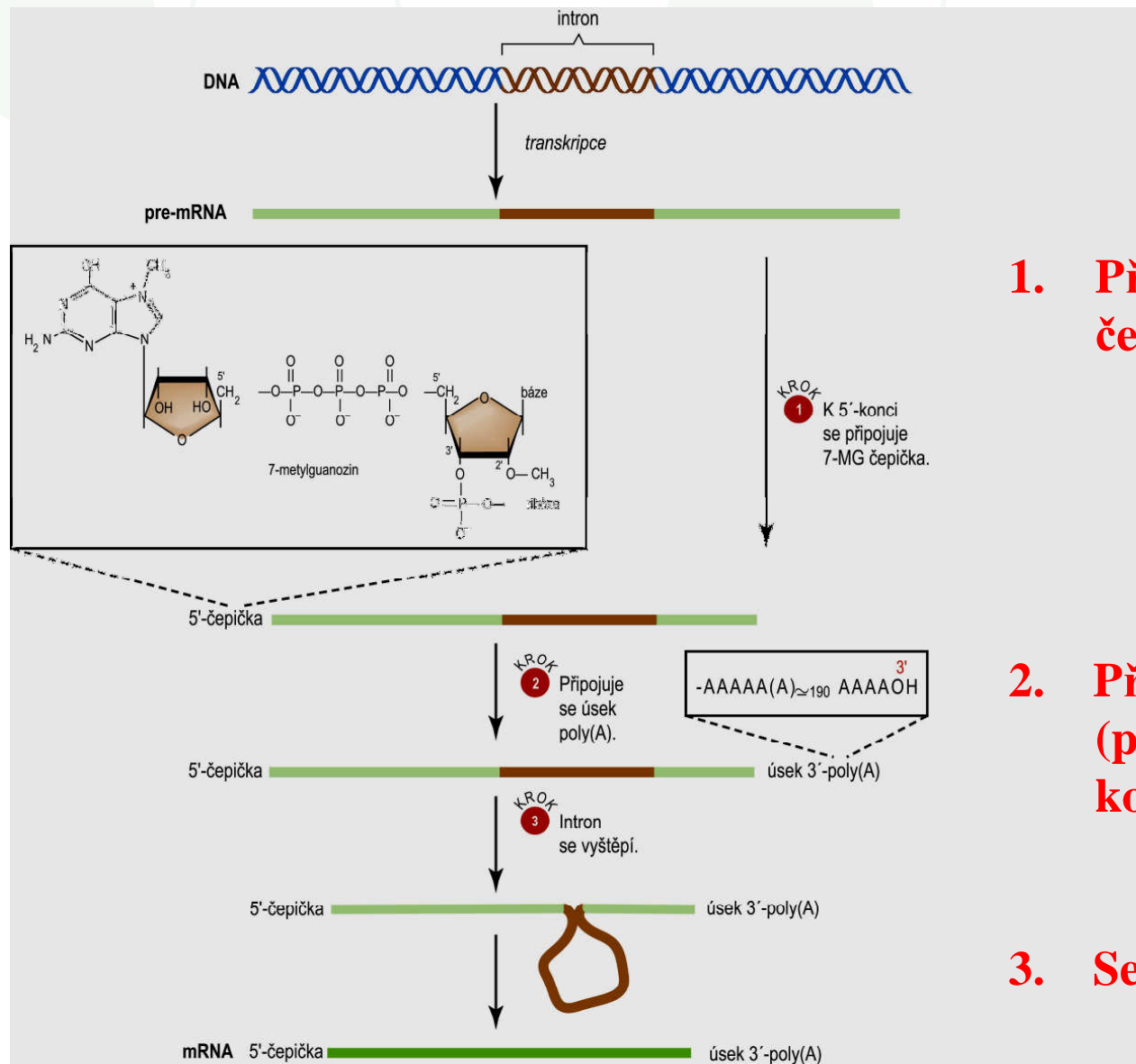
Úpravy konců

- 5' -konec: připojení čepičky (*angl. cap*)
- 3' -konec: polyadenylace

Úpravy vnitřní sekvence

- Methylace
- Sestřih
- Editace (redakční úprava)

Posttranskripční úprava transkriptů strukturálních genů eukaryot

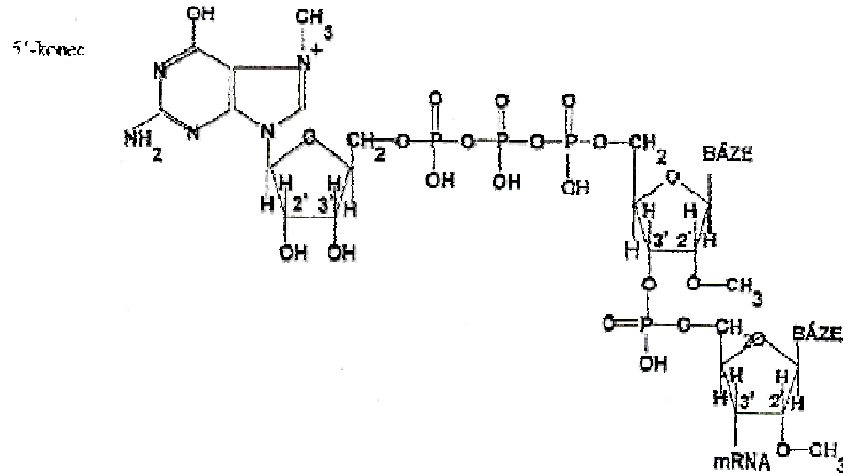


1. Připojení čepičky

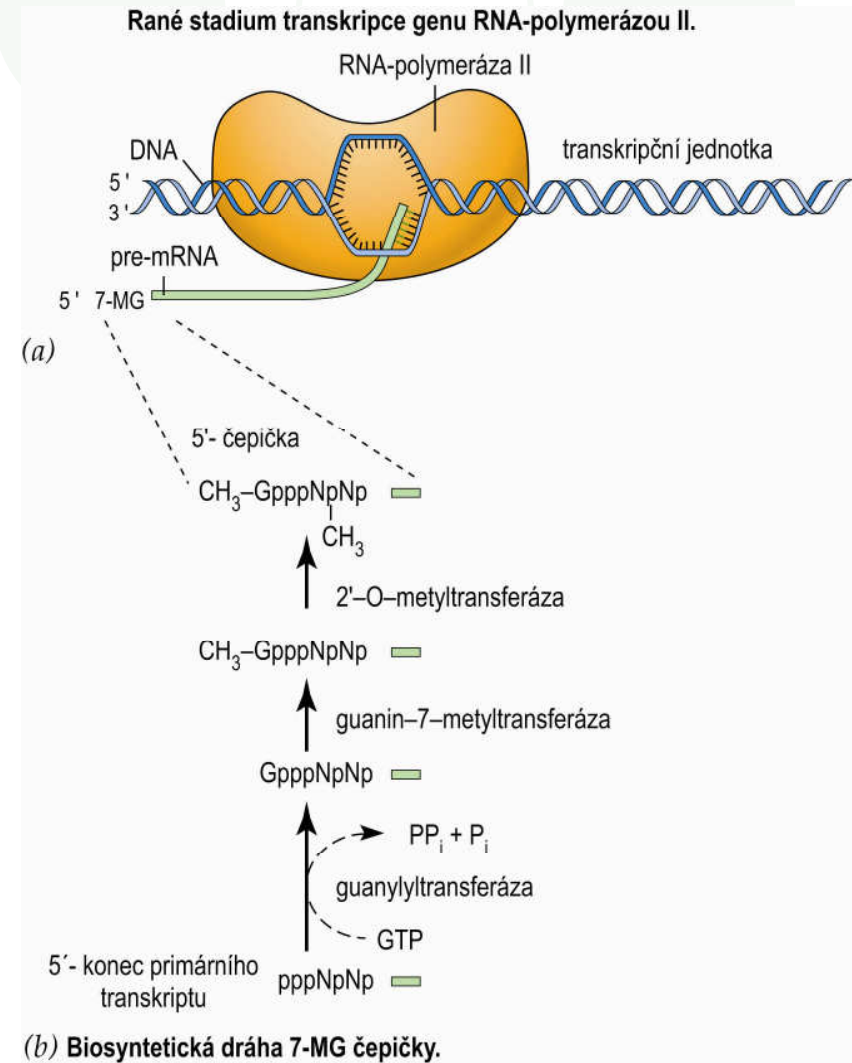
2. Připojení (poly)A konce

3. Sestřih

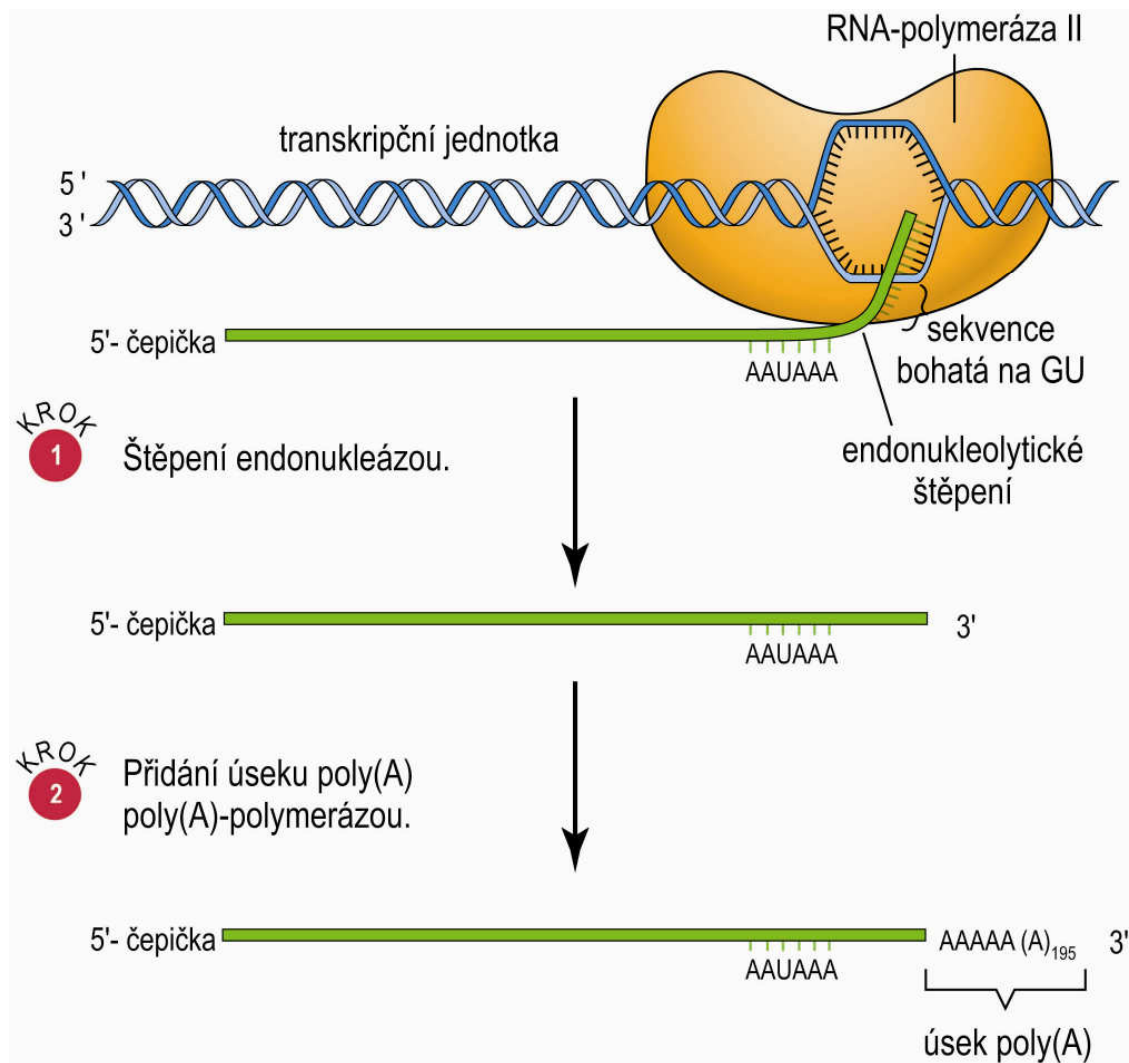
Struktura čepičky



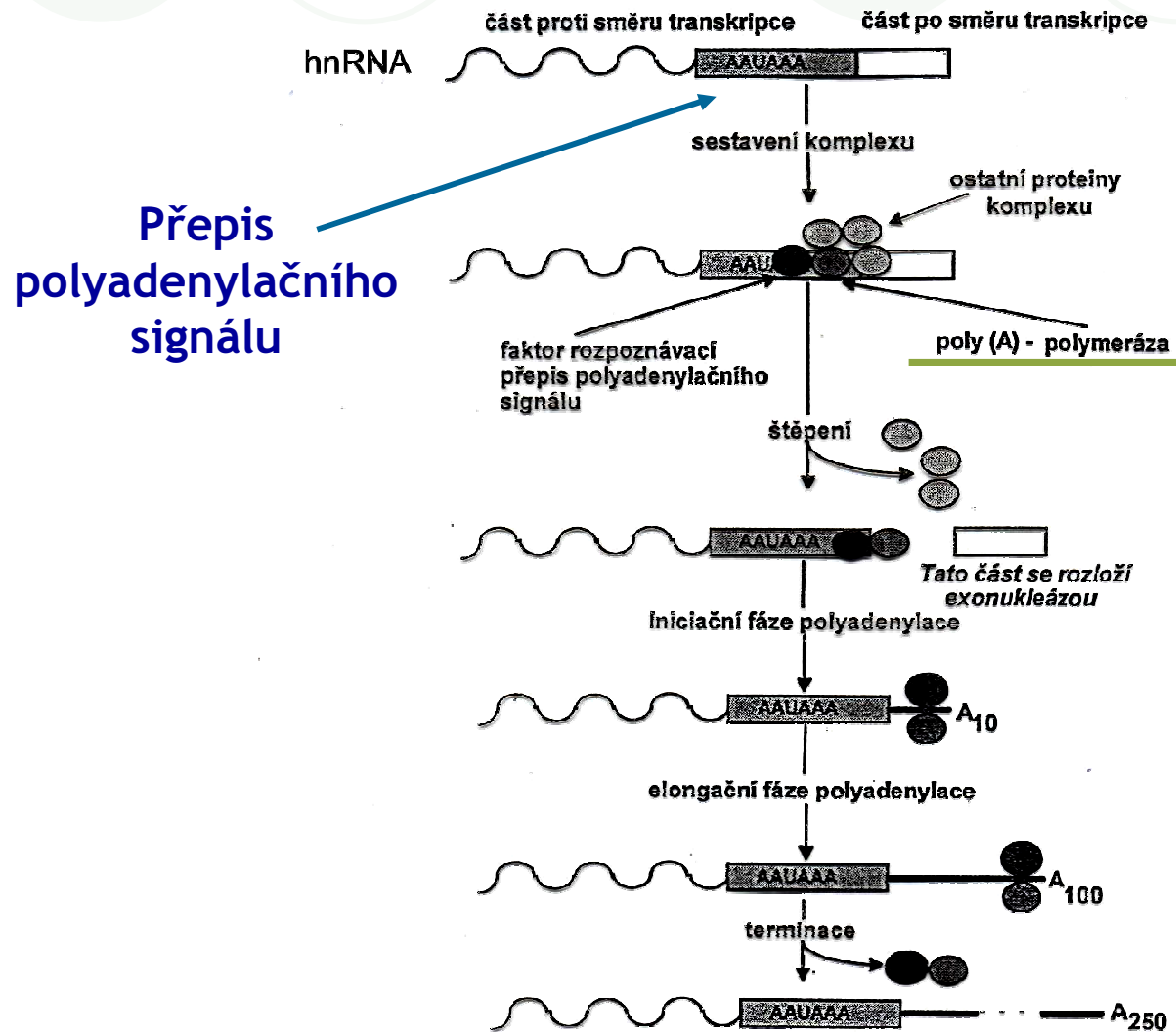
$m^7G^{5'} ppp^{5'}\text{-mRNA}$



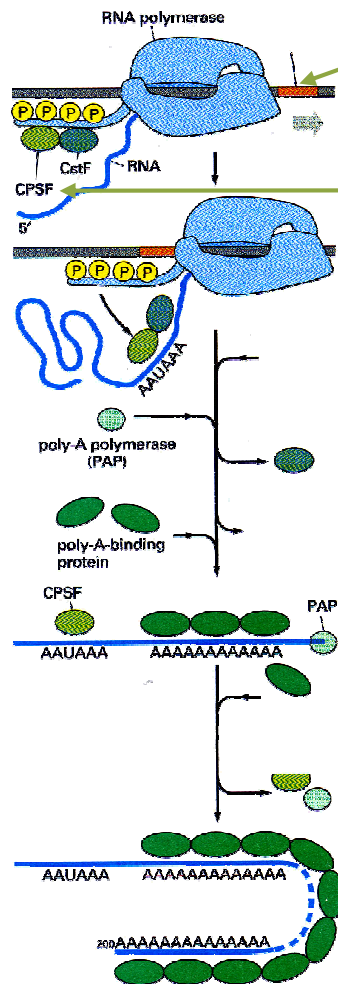
Připojení sekvence poly(A) k 3' konci mRNA



Schema polyadenylace 3'-konce hnRNA



Proces vytváření polyA konce na mRNA



Signály na DNA pro uvolnění mRNA a připojení polyA konce

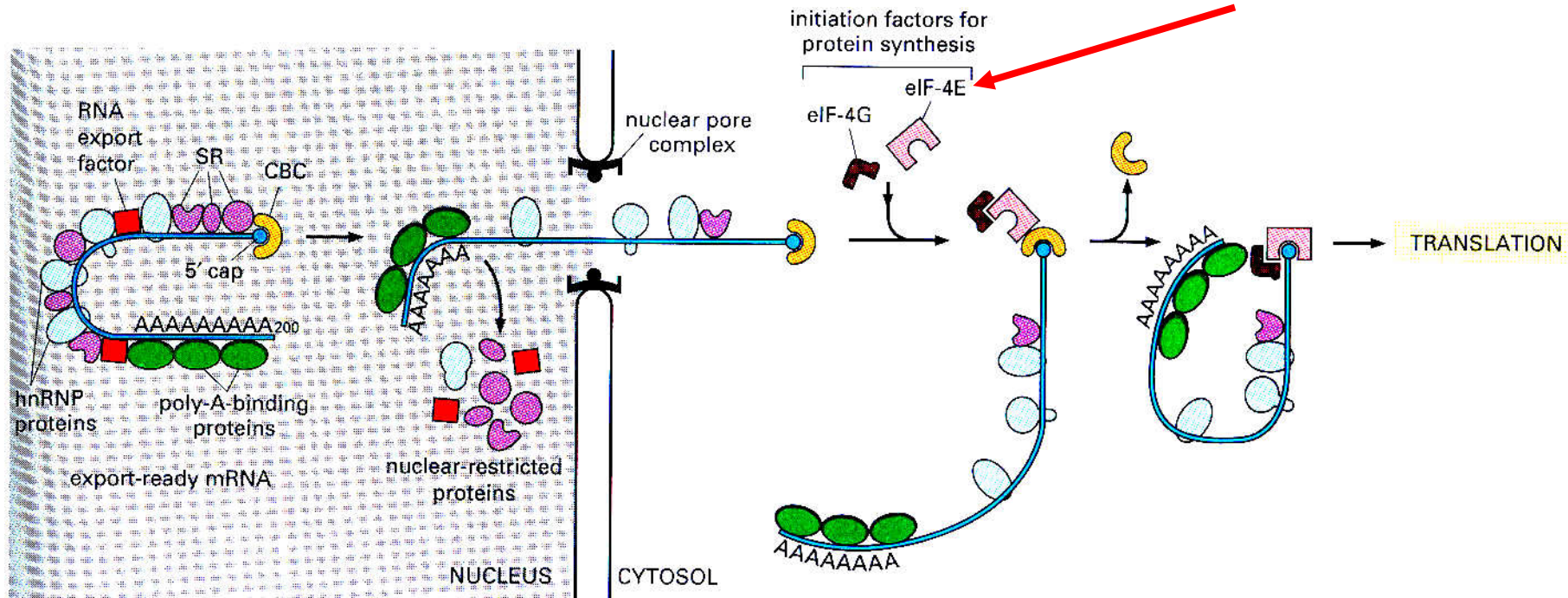
CstF - cleavage stimulation factor F
CPSF - cleavage and polyadenylation specificity factor

Připojení dalších faktorů, uvolnění mRNA

Připojení dalších proteinů vázajících se na polyA

Hotový 3' - konec mRNA

Transport hotové eukaryotické mRNA z jádra do cytoplazmy



Některé z proteinů zůstávají v jádře, jiné jsou transportovány spolu s mRNA do cytoplazmy a zajišťují její stabilitu a iniciaci translace

Sestřih (splicing) – proces, při němž jsou odstraňovány introny

Objev:

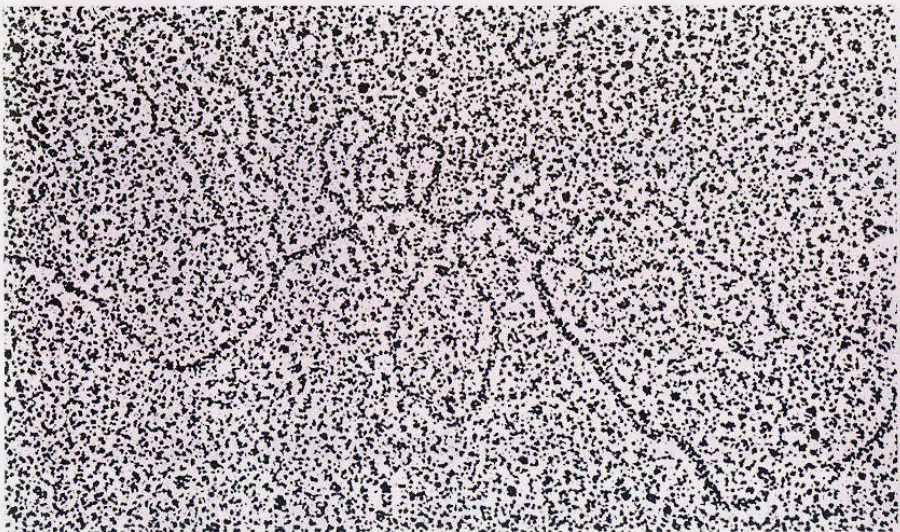
1977: v genu adenovirů

1978: β -globin, imunoglobulin, ovalbumin, tRNA and rRNA.

Známé typy intronů

Intron type	Where found
GU–AG introns	Eukaryotic nuclear pre-mRNA
AU–AC introns	Eukaryotic nuclear pre-mRNA
Group I	Eukaryotic nuclear pre-rRNA, organelle RNAs, few bacterial RNAs
Group II	Organelle RNAs, some prokaryotic RNAs
Group III	Organelle RNAs
Twintrons	Organelle RNAs
Pre-tRNA introns	Eukaryotic nuclear pre-tRNA
Archael introns	Various RNAs

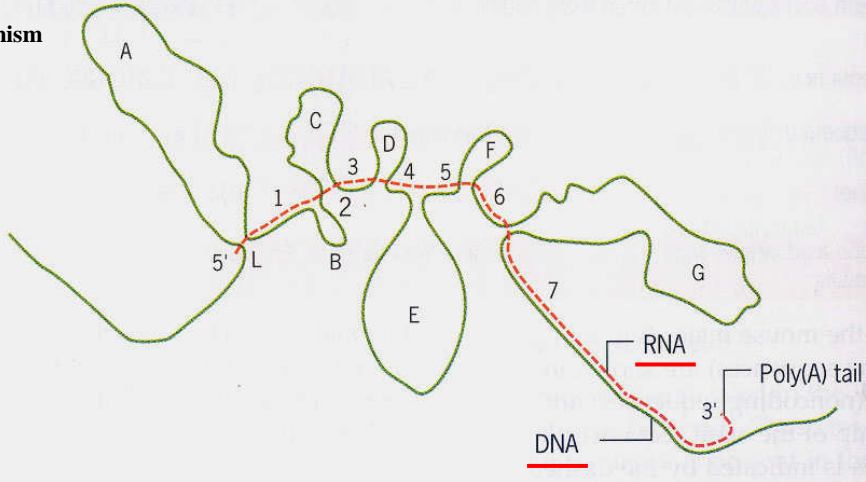
Důkaz přítomnosti intronů v genu pro ovalbumin



(a) Electron micrograph of ovalbumin DNA-mRNA heteroduplex.

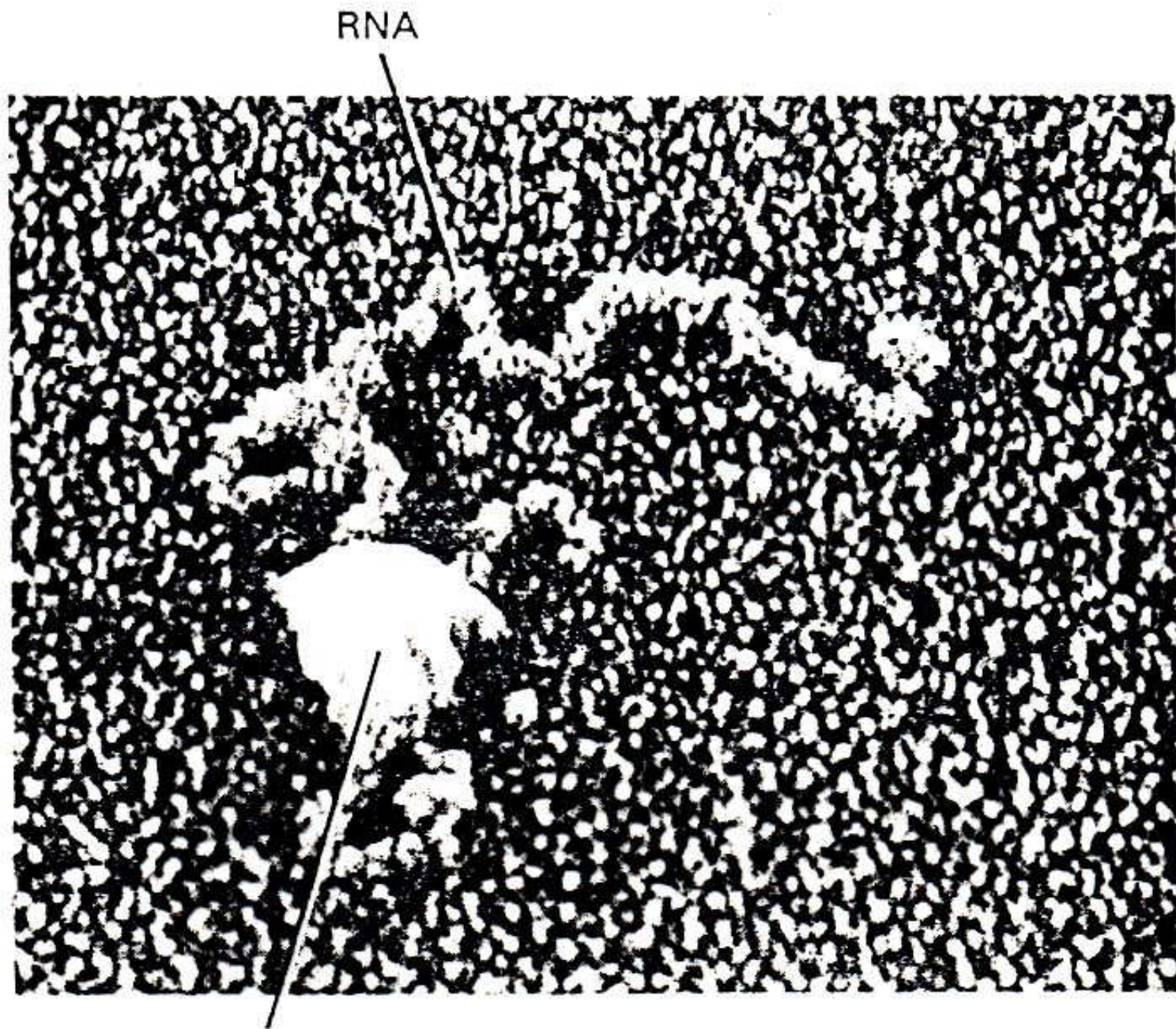
Splicing diversity

[edit] Biochemical mechanism



intron





RNA

Spliceosome

Schéma intronu s vyznačením konzervativních sekvencí

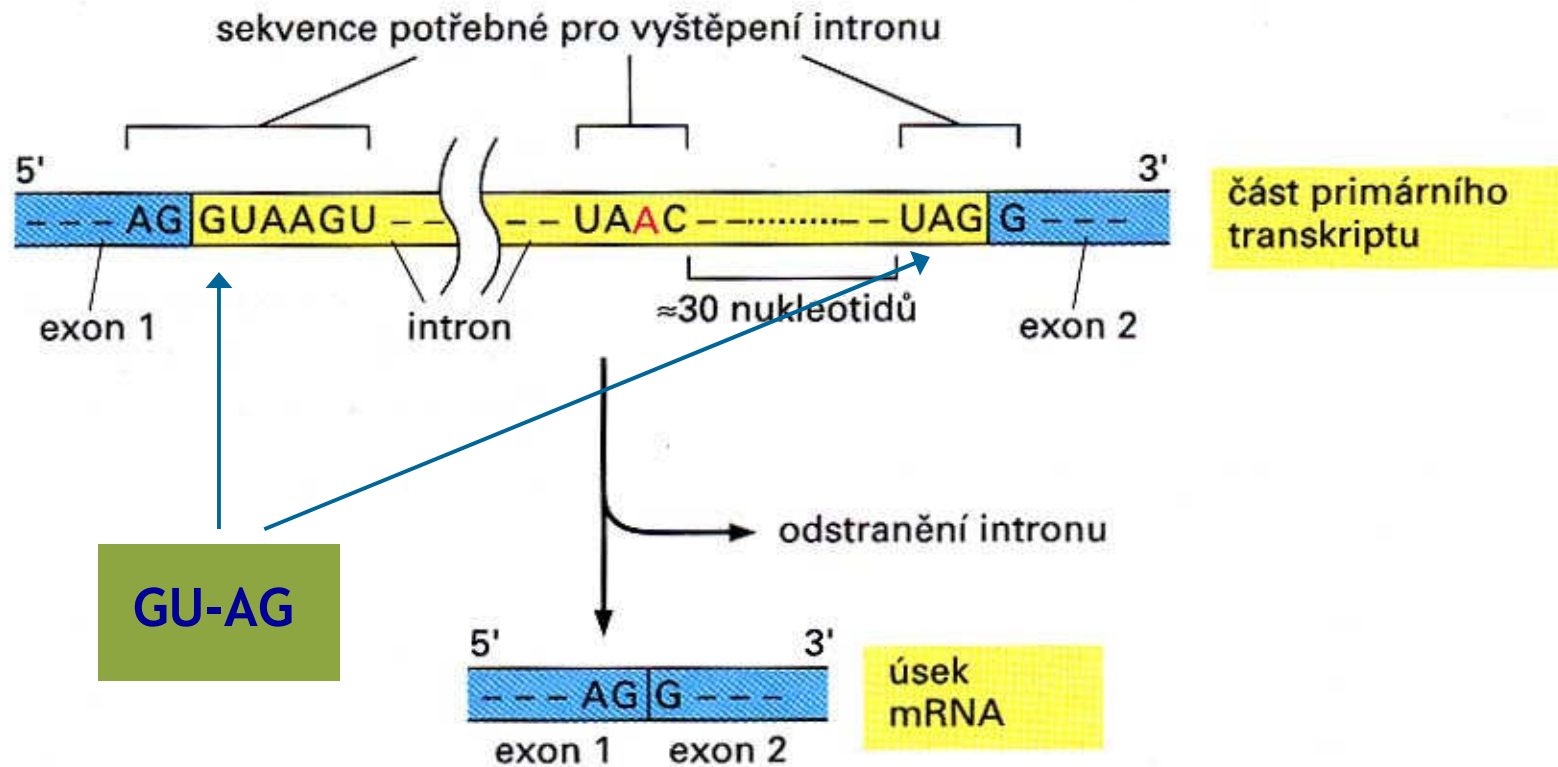
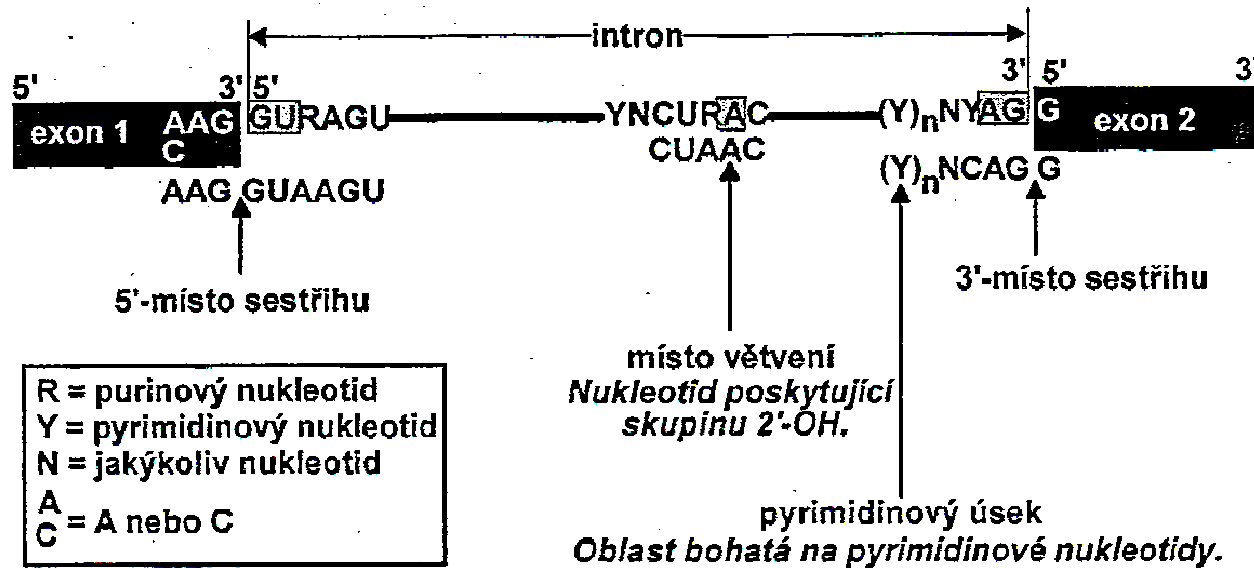
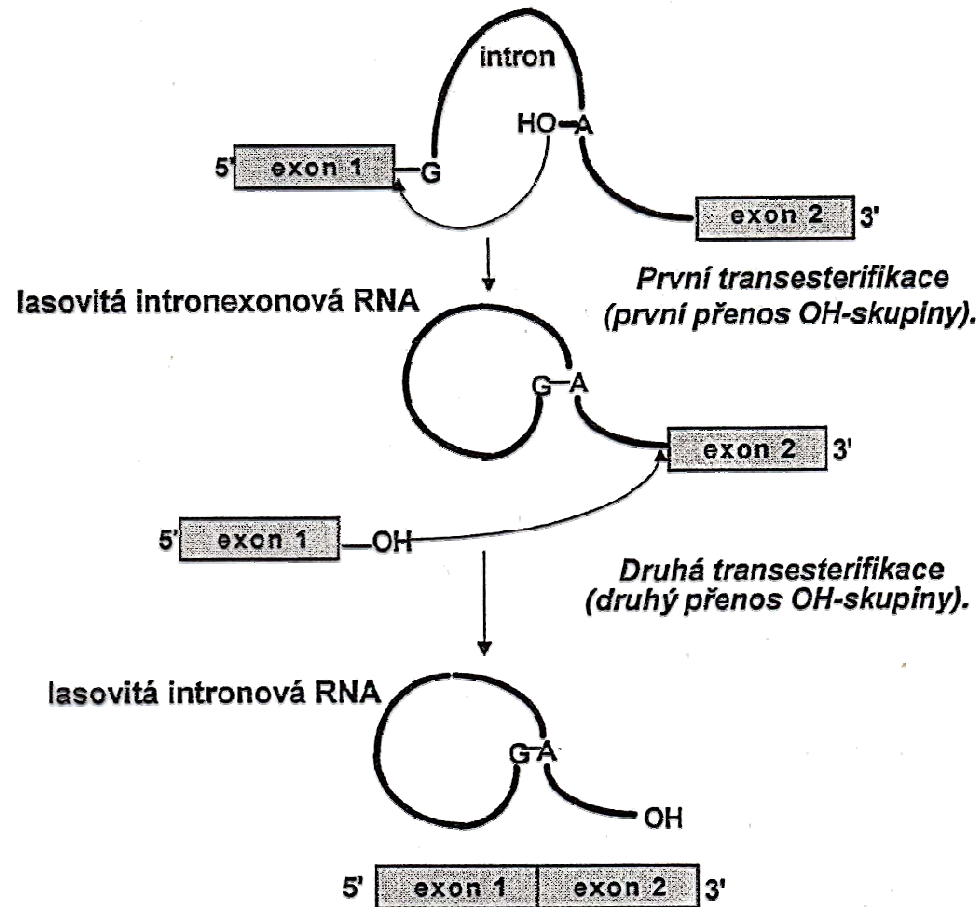


Schéma struktury intronu v hnRNA



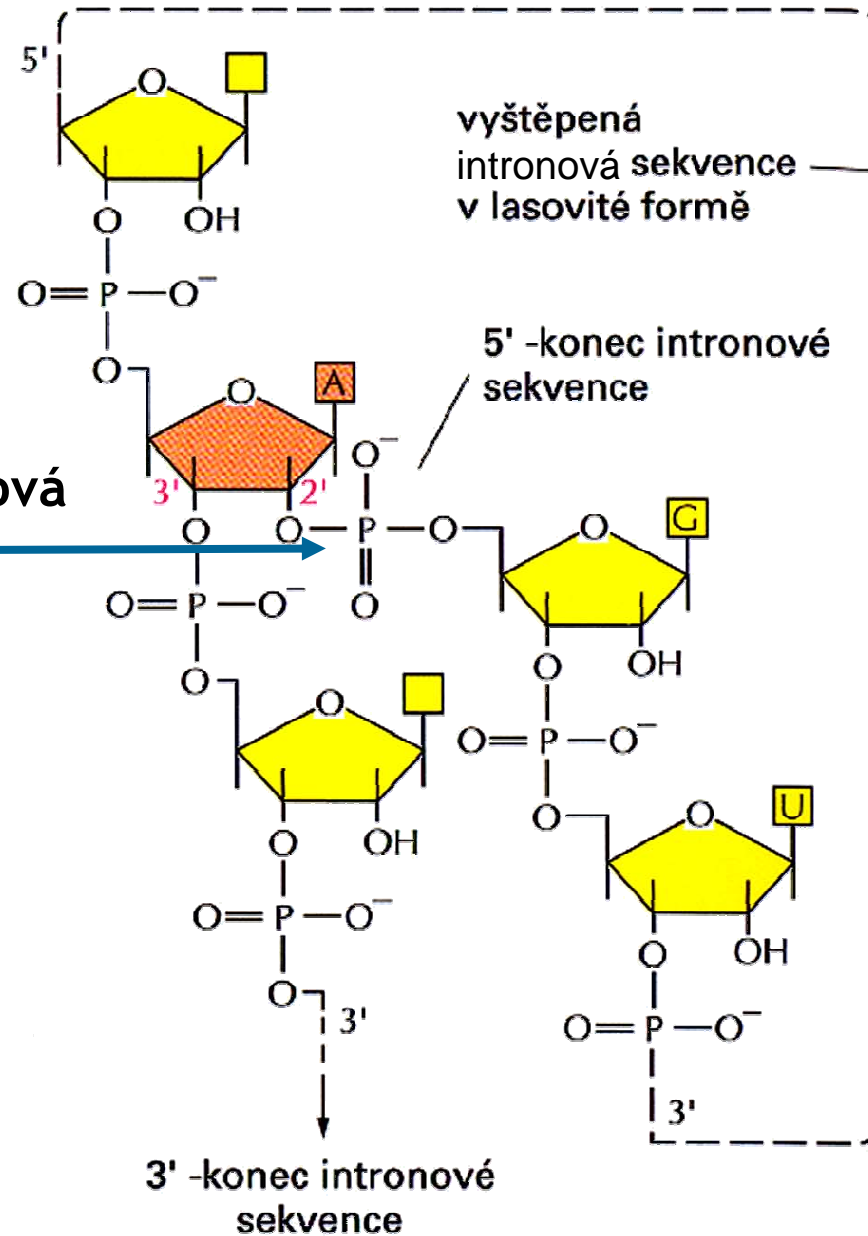
Sekvence a nukleotidy zakreslené do šedého rámečku jsou vysoce konzervativní (četnost 100 %).
 Ostatní sekvence se vyskytují v četnosti 70 - 95 %.
 Sekvence uvedené pod schématem intronu a exonu jsou sekvence, které byly zjištěny u savců.

Schéma transesterifikace při sestřihu hnRNA

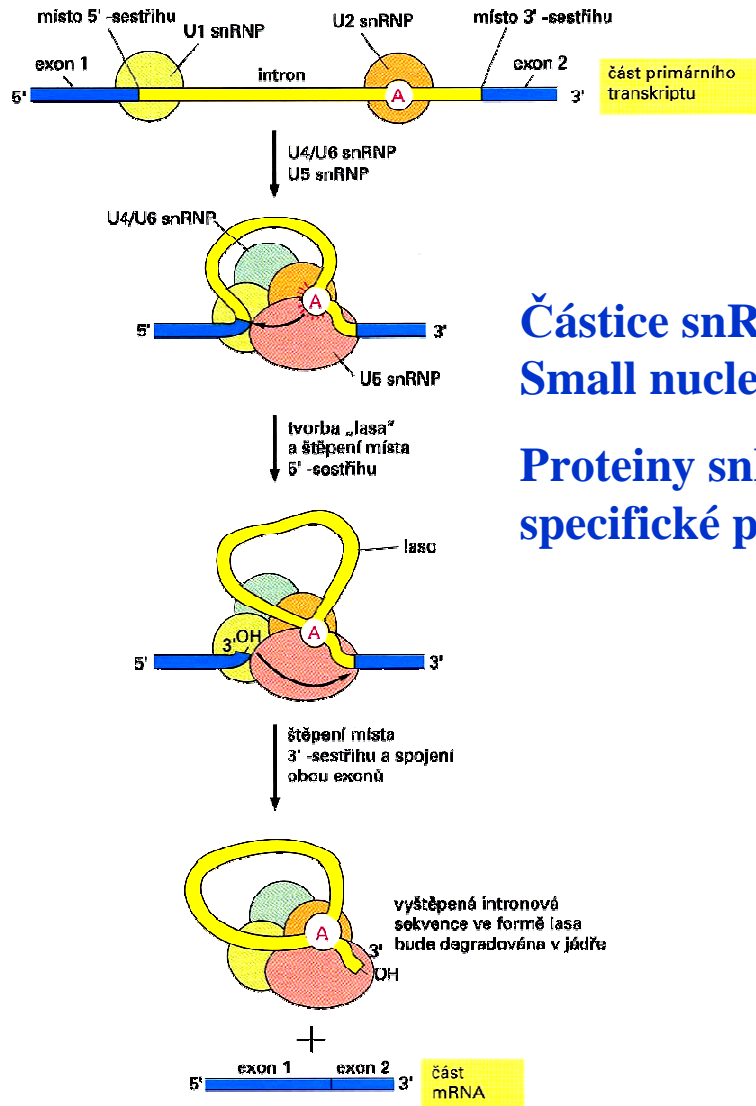


Transesterifikace
= přeměna jednoho
fosfátového esteru
v jiný probíhající
přenosem OH-
skupiny bez
hydrolyzy a za
nepřítomnosti ATP
n. GTP

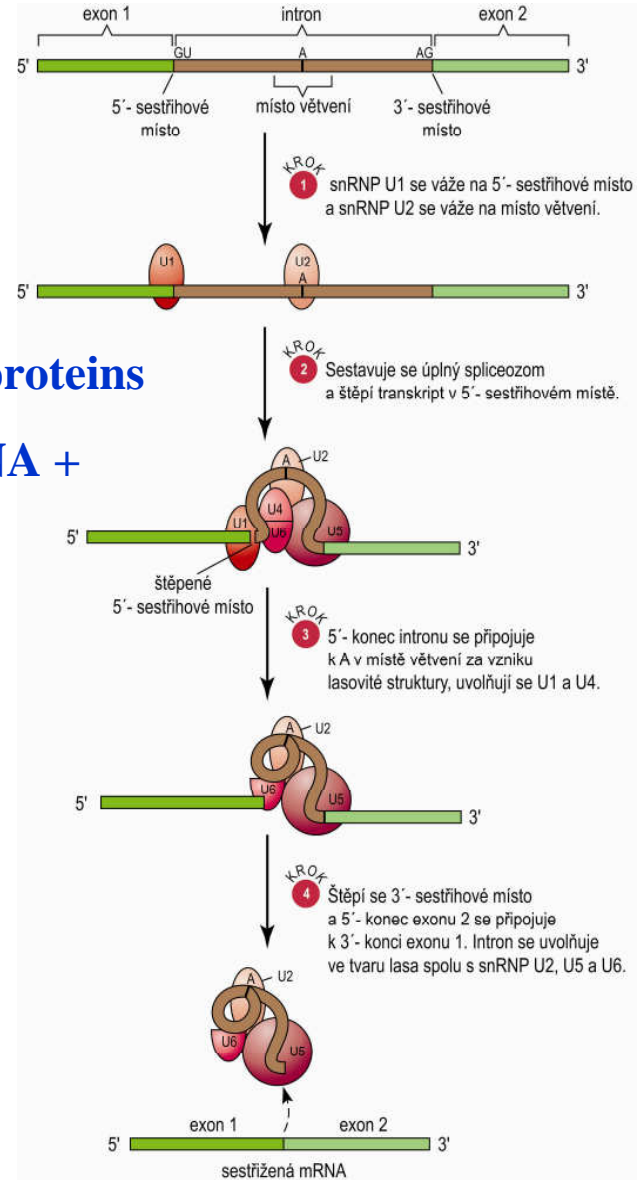
2',5' - fosfodiesterová
vazba



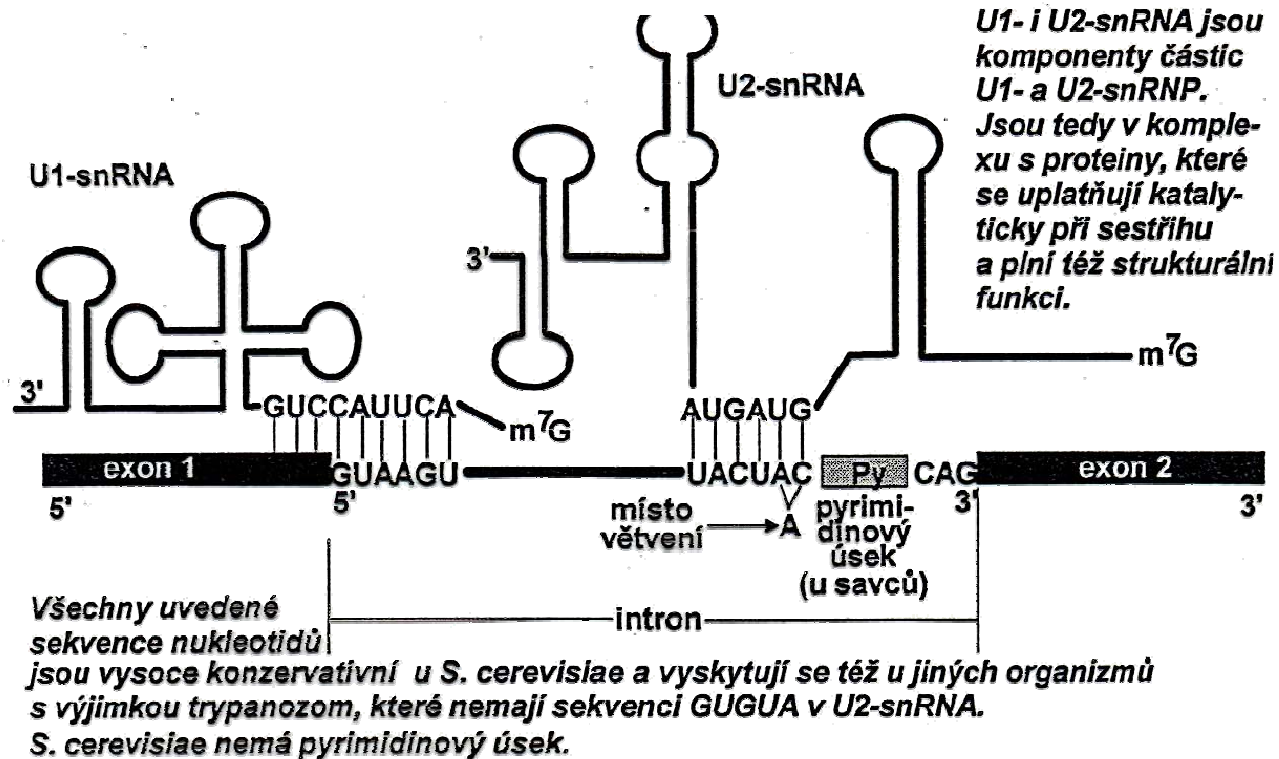
Průběh sestřihu strukturního genu – účast U snRNP



Částice snRNP
Small nuclear ribonucleoproteins
Proteiny snRNP + U snRNA +
specifické proteiny

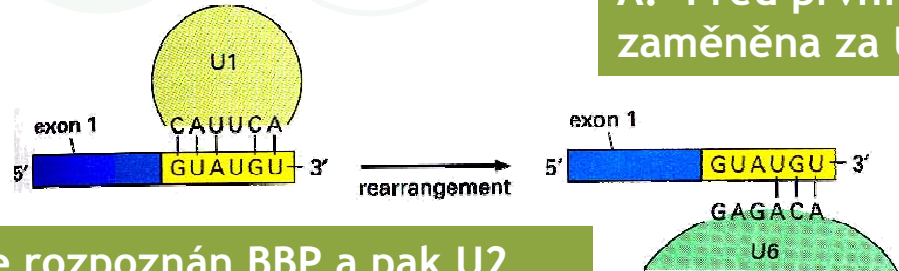


Rozeznávání 5´-místa sestřihu a místa větvení malými jadernými U1-snRNA a U2-snRNA

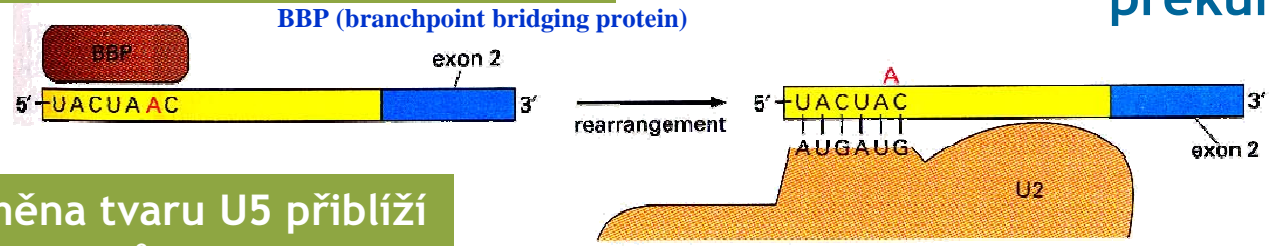


Průběh sestřihu ve spliceosomu během úpravy pre-mRNA

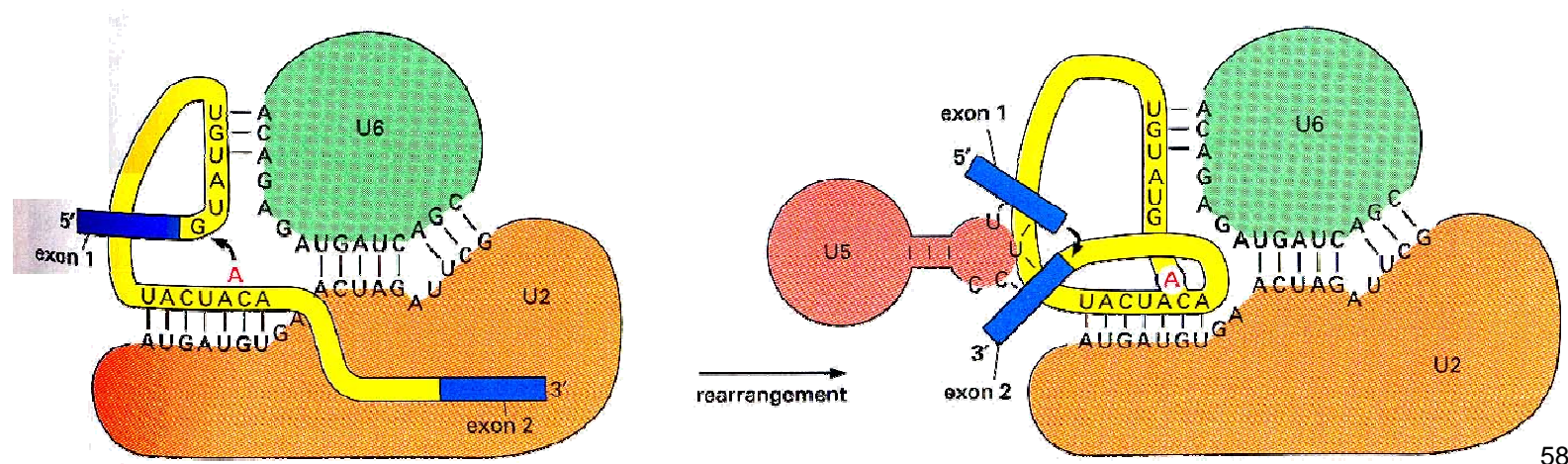
A. Před první transesterifikací je U1 snRNP zaměněna za U6 snRNP



B. A je rozpoznán BBP a pak U2

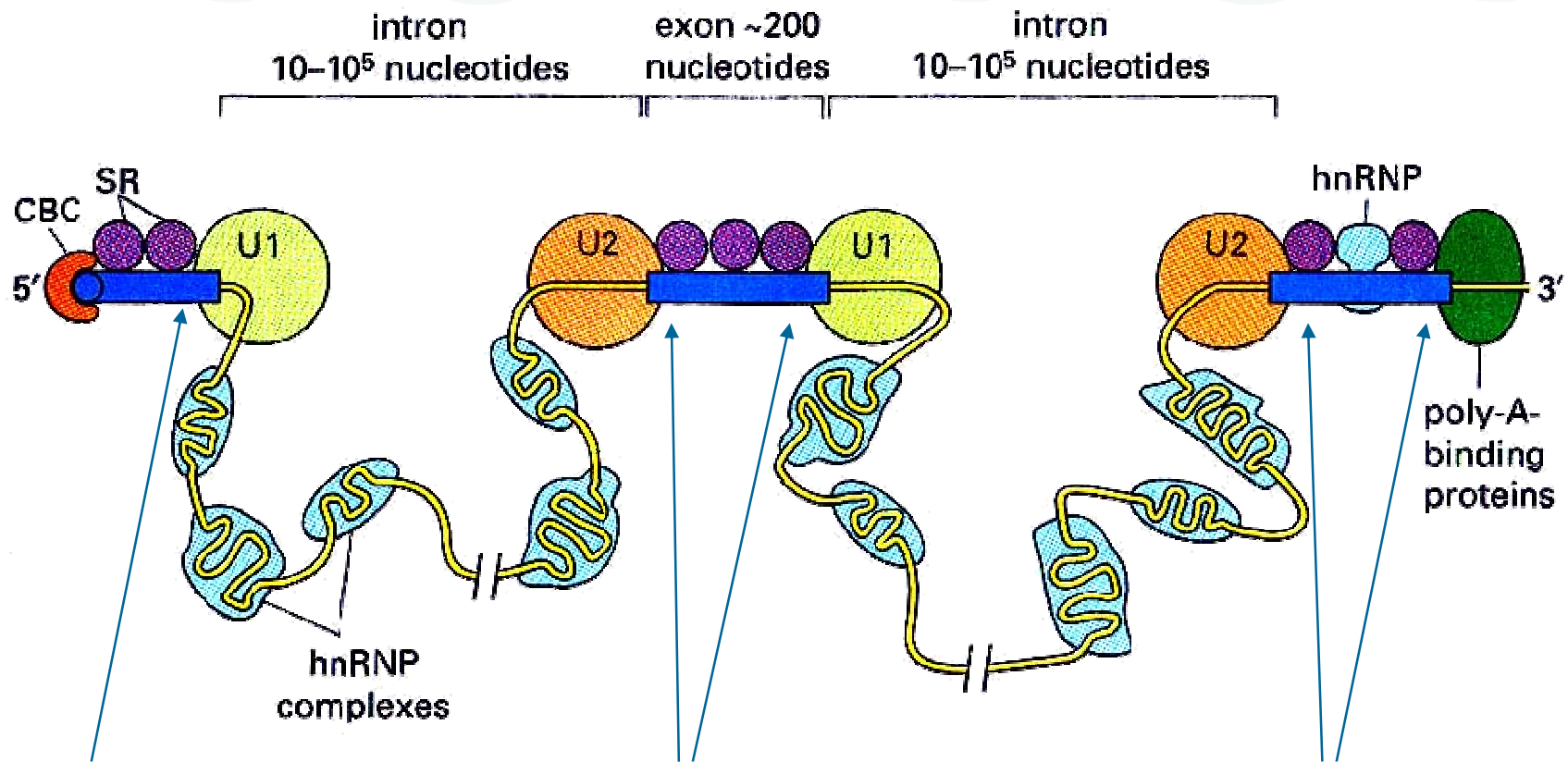


C. Změna tvaru U5 přiblíží konce exonů



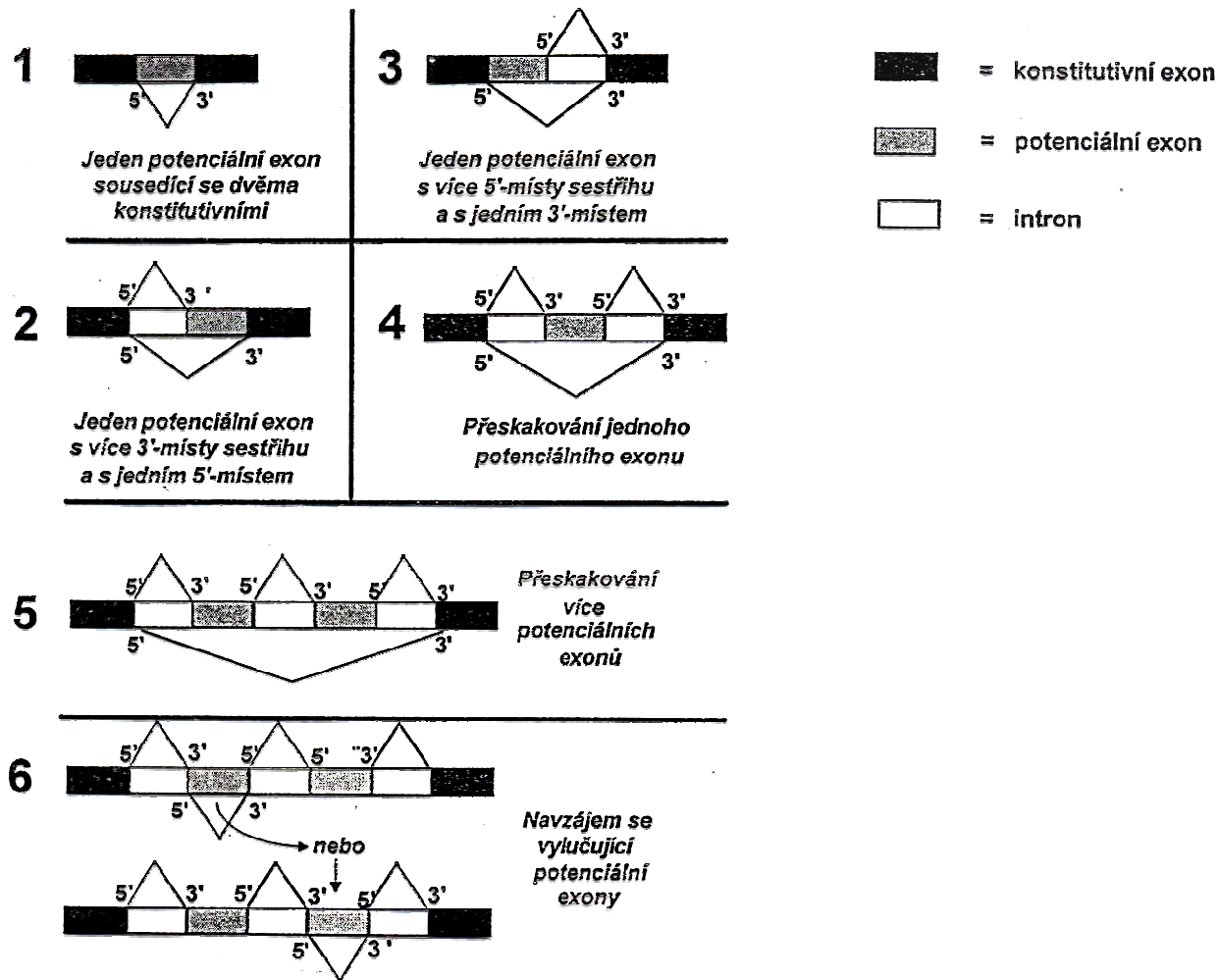
Účast PRP-proteinů (upravujících prekurzorovou RNA)

Účast SR proteinů při rozpoznání míst sestřihu („exon definition hypothesis“)



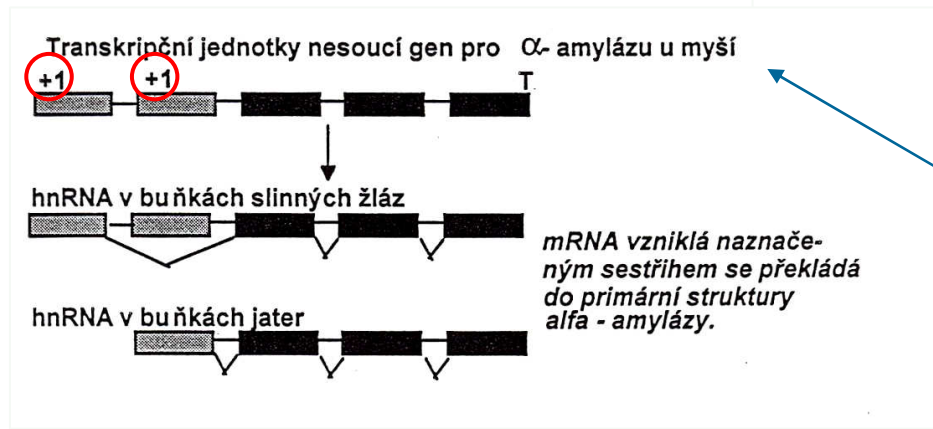
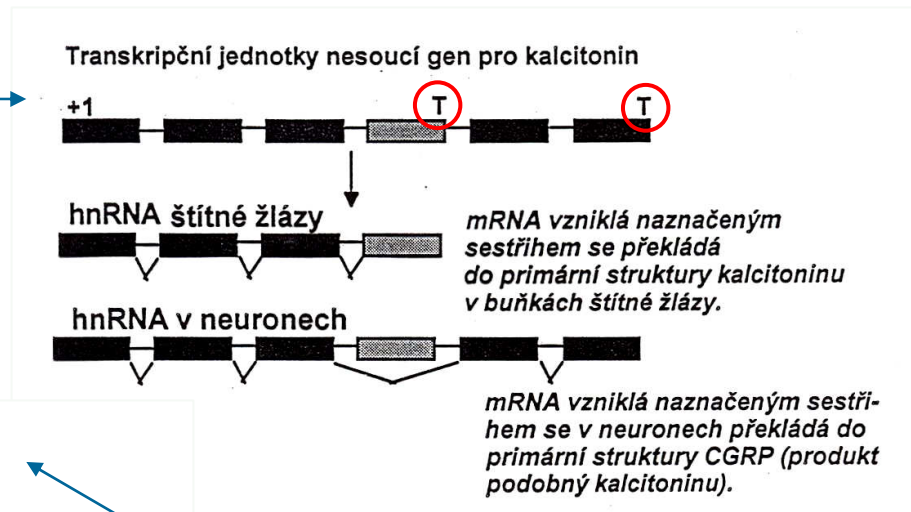
Proteiny SR (bohaté na serin a arginin) se během transkripce průběžně vážou na hranice exonů a pomáhají tak navádět částice snRNP do míst sestřihu

Způsoby alternativního sestřihu hnRNA



Příklady alternativního sestřihu sestřihu molekul hnRNA vzniklých transkripcí překrývajících se transkripčních jednotek

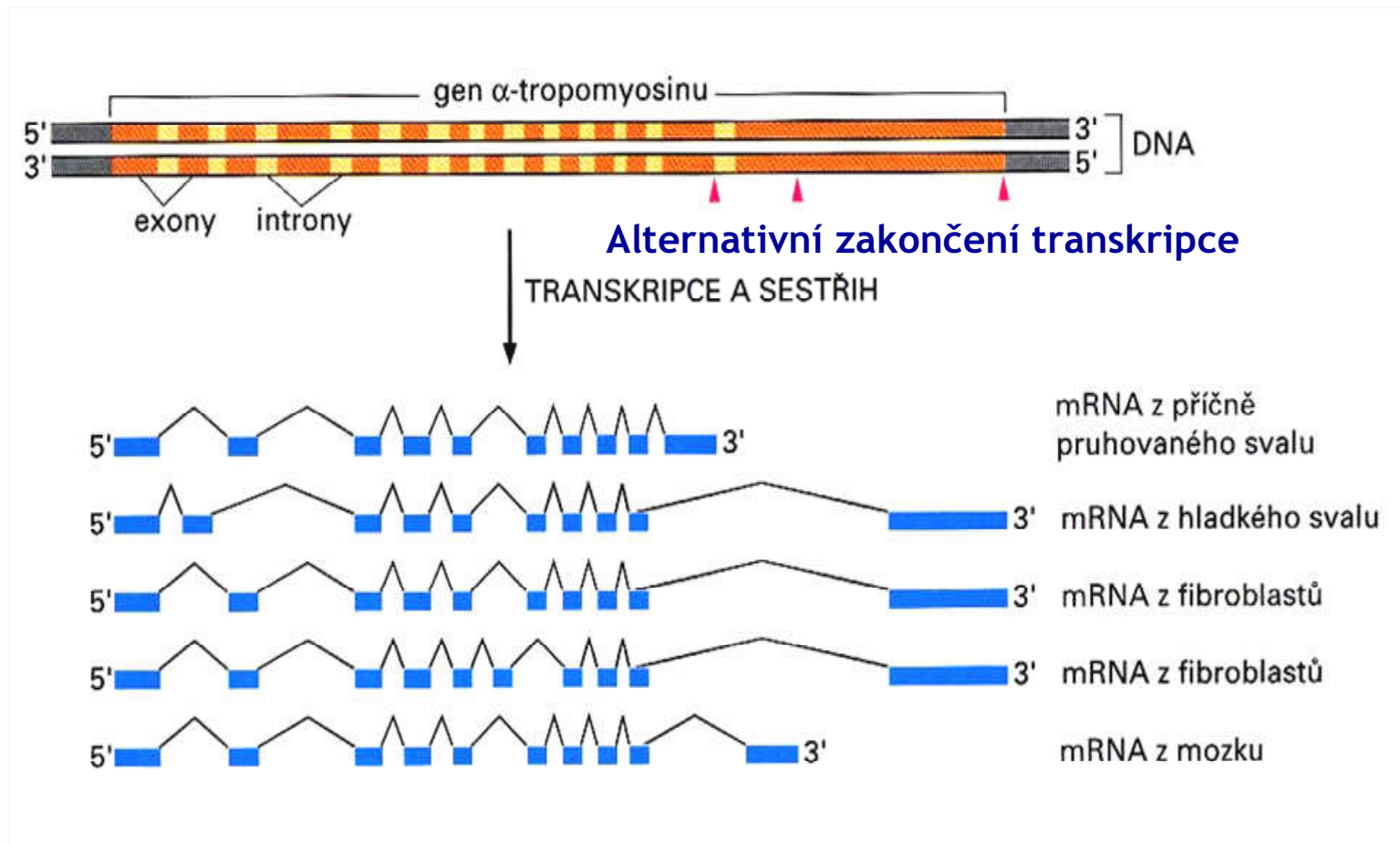
Alternativní terminace transkripce



Alternativní začátek transkripce

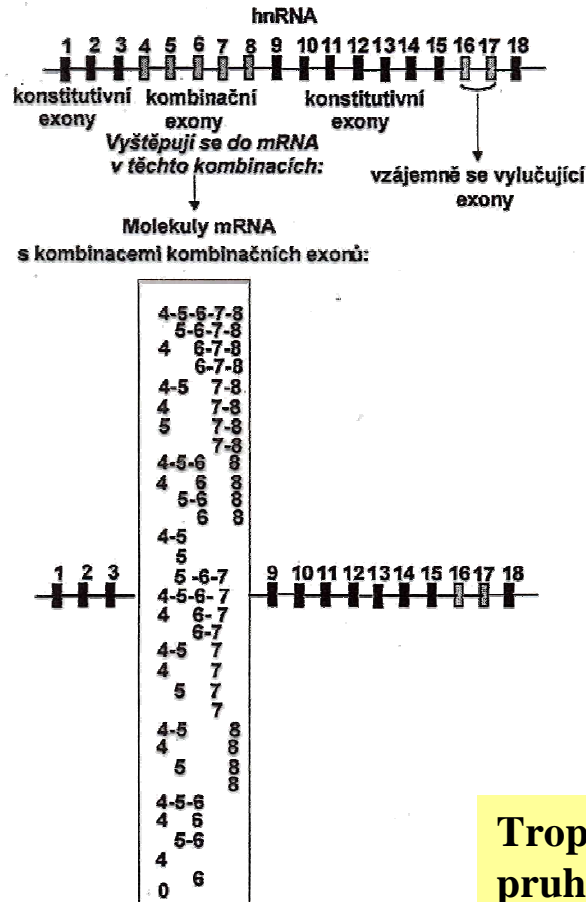
- = potenciální exon,
- = konstitutivní exon,
- +1 = startovací nukleotid,
- T = poly(A).

Alternativní sestřih genu pro alfa-tropomyozin u krysy (regulace kontrakce svalových buněk)



Faktory sestřihu - specifické proteiny aktivní jen v daném typu buňky

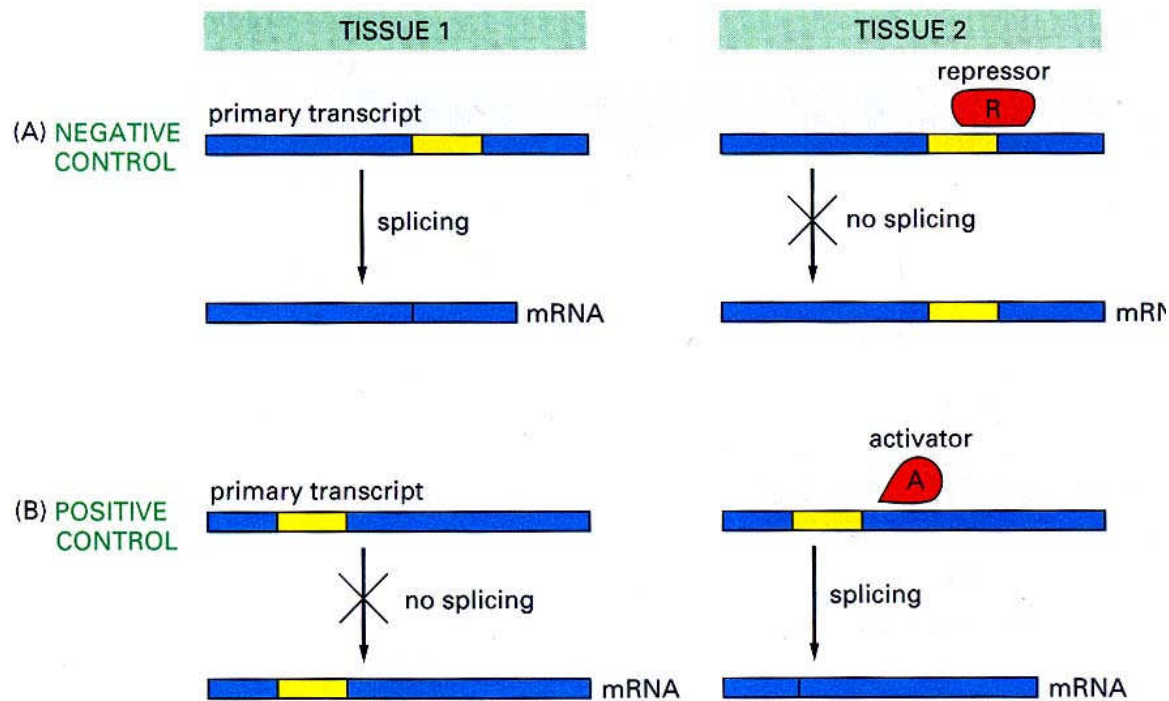
Sestřih kombinačních exonů hnRNA obsahující přepis genu kódujícího troponin T



Celkem se vytvoří 32 molekul mRNA, které se liší v části kódované kombinačními exony. Tyto kombinace jsou však ve vazbě vždy s jedním z dvojice vzájemně se vylučujících exonů. Proto celkově je možných 64 molekul mRNA lišících se v primární struktuře. Každá z nich se překládá do jedné izoformy troponinu T.

Troponiny jsou strukturní bílkoviny buněk příčně pruhovaného svalstva, jejich odlišné izoformy jsou u fetálních buněk a v buňkách dospělců

Negativní a pozitivní regulace alternativního sestřihu



Represor se váže na RNA a brání v sestřihu

Sestřih probíhá jen po vazbě aktivátoru na RNA

Samosestřih

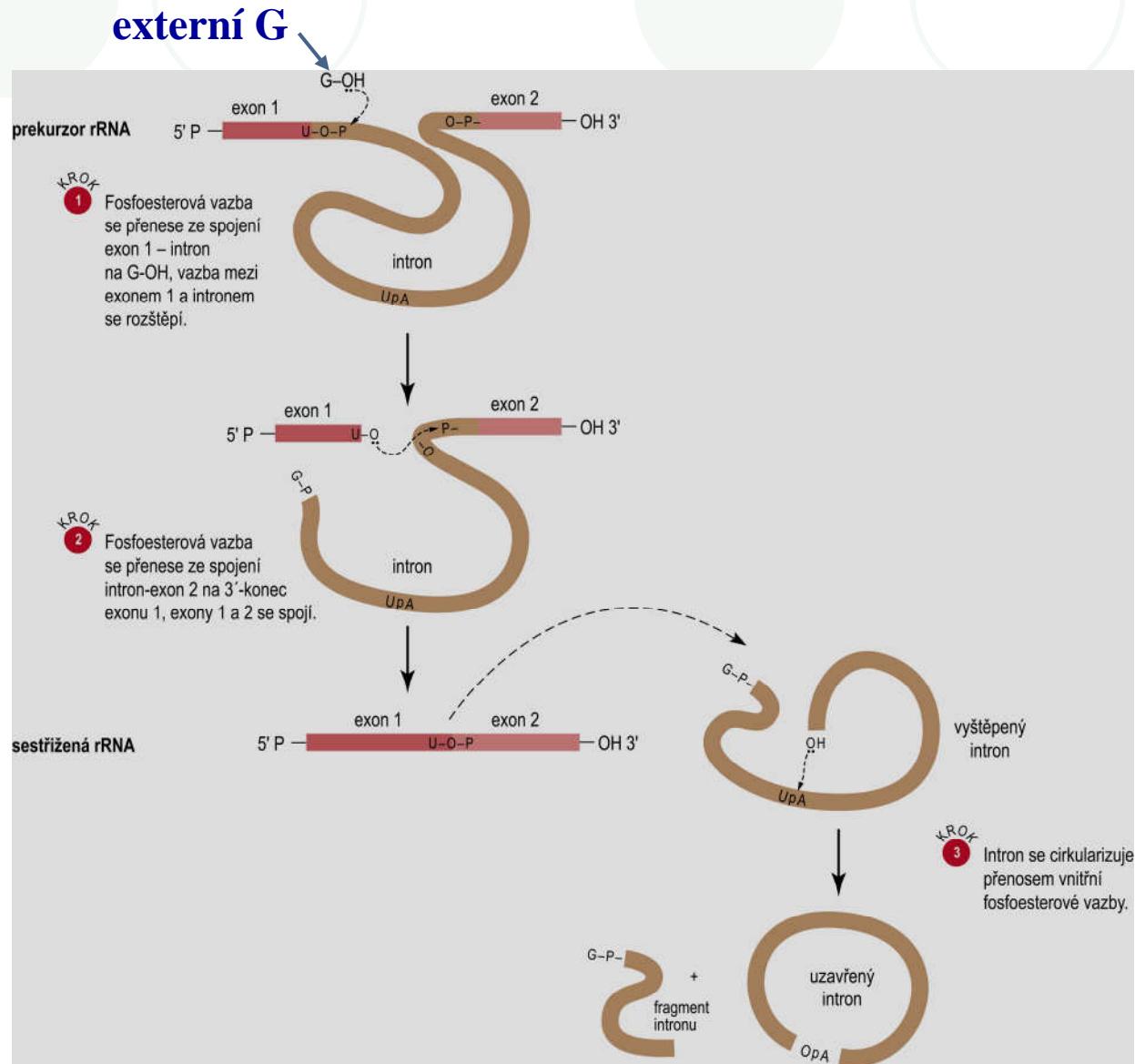
1982: T. R. Cech (26S rRNA Tetrahymena, S. Altmann (tRNA E. coli)- 1989
Nobelova cena

**Autokatalytický proces sestřihu nevyžadující proteiny
(in vitro)**

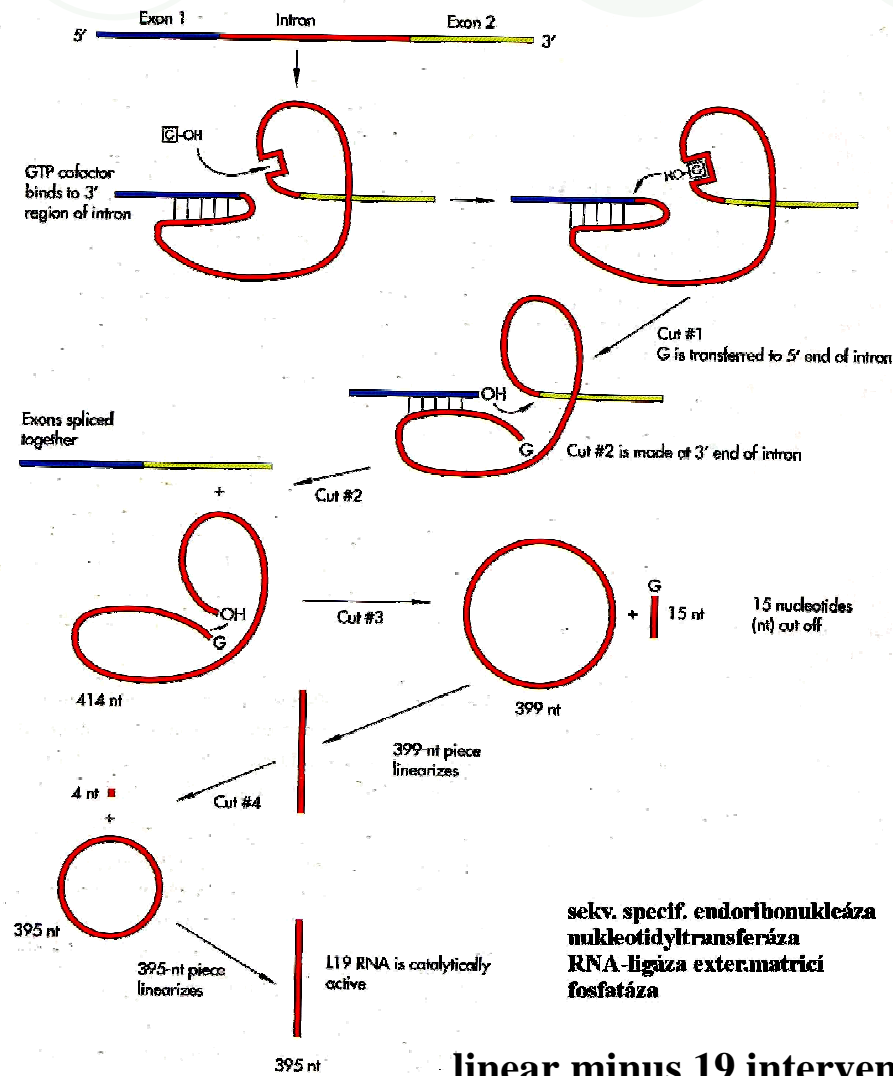
RNA schopná samosestřihu = ribozym

- introny první skupiny v genech přepisovaných do mRNA, tRNA a rRNA (mitochondrie, chloroplasty, nDNA eukaryot, bakteriofágy)
vyžadují externí G, *in vivo* nutná účast proteinů (maturáza)
- introny druhé skupiny v genech mitochondrií hub a v chloroplastech
nevyžadují externí G (ale interní A), *in vivo* nutná účast proteinů, podobnost se sestřihem hnRNA

Mechanismus samosestřihu prekurzoru rRNA

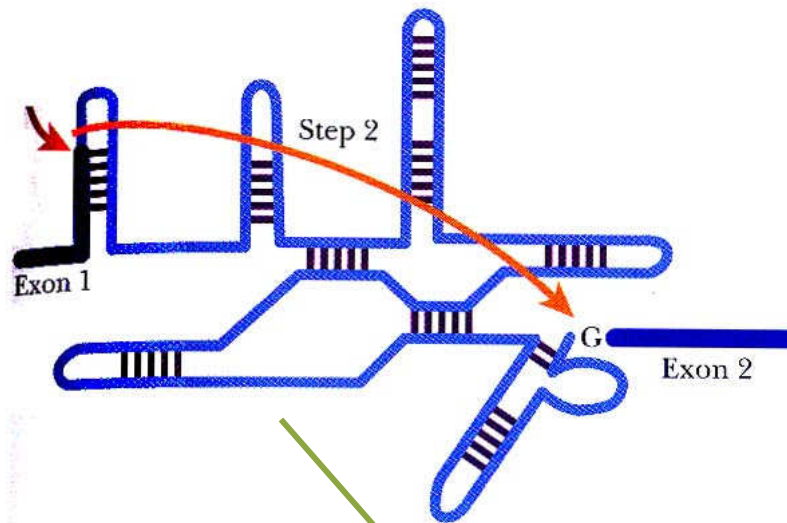


Průběh samosestřihu u intronů první skupiny

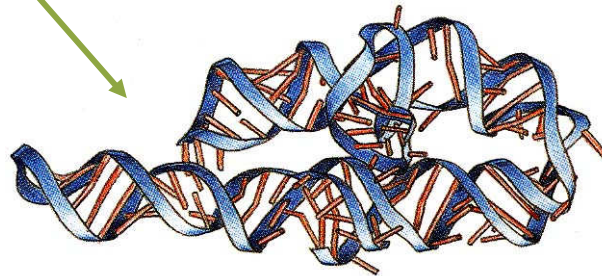
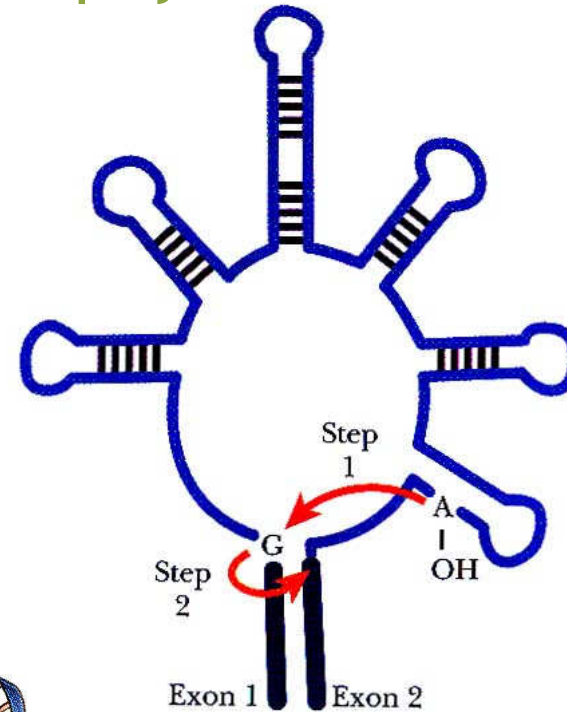


Reakce probíhající při samosestřihu intronů I a II

Introny skupiny I

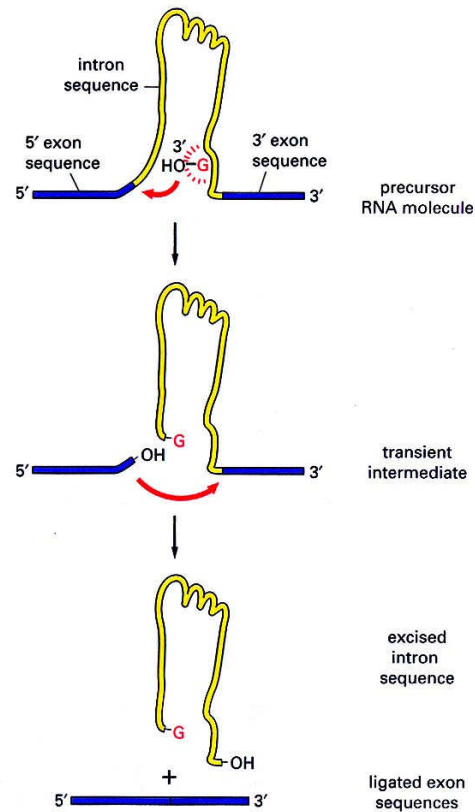


Introny skupiny II

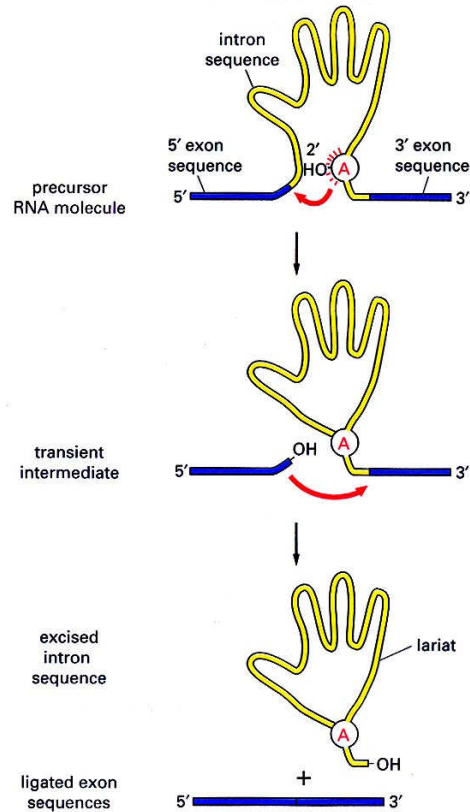


Srovnání samosestřihu intronů skupiny I a II

Skupina I



Skupina II

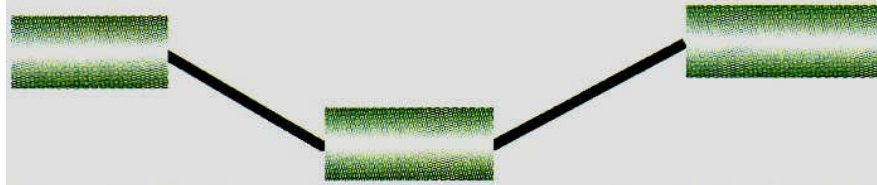


Bimolekulární sestřih (trans-splicing) mRNA u trypanozom

Primární transkript genu 1



způsob sestřihu



Primární transkript genu 2



TRANS-SPLICING



U prvoků – změny antigenních determinant

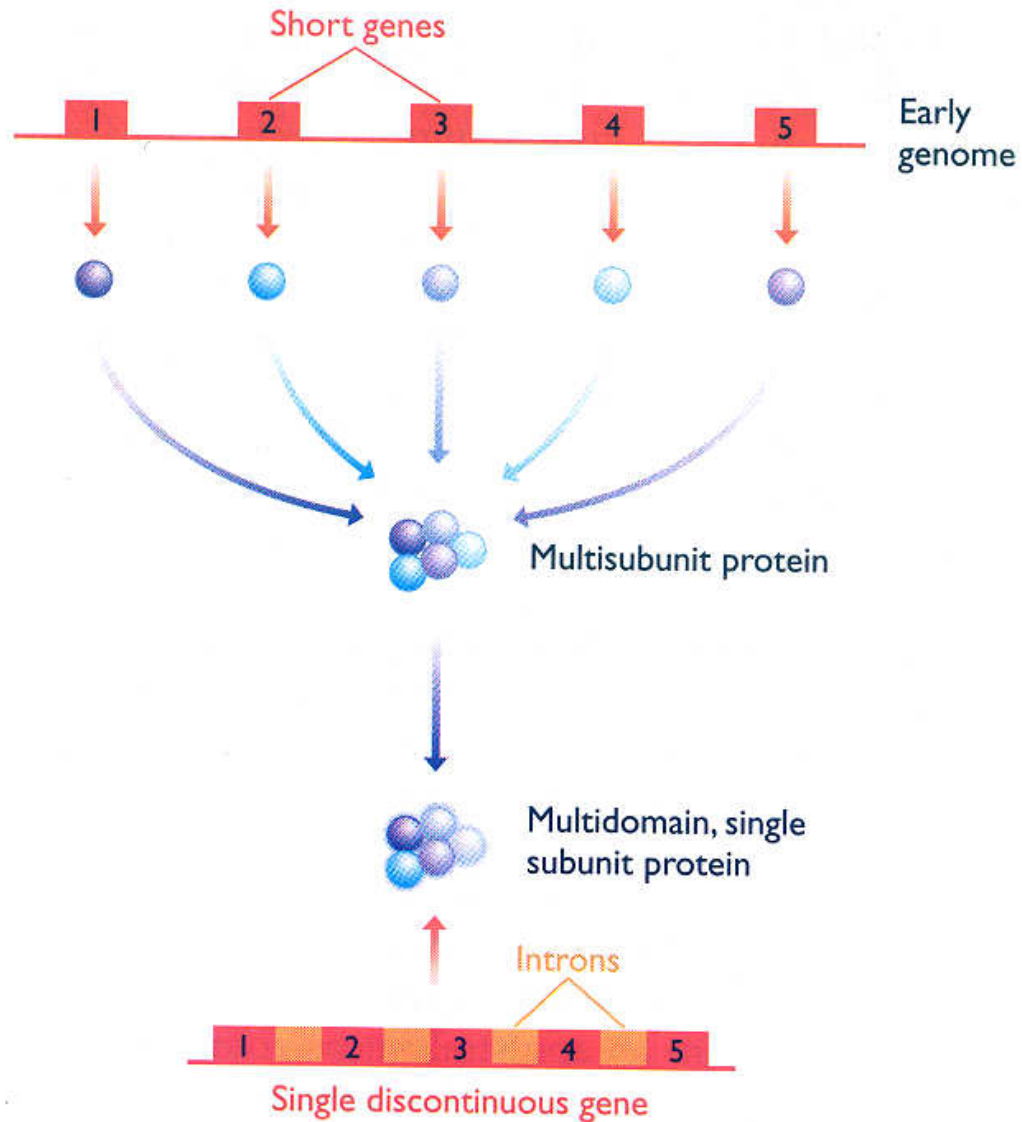


Další příklady: nematoda, chloroplasty

Twintron = intron uvnitř jiného intronu

- objeveny v chloroplastové DNA eugleny, později u kryptomonád, drosofily aj.
- vystřihování probíhá sekvenčně (nejdřív vnitřní pak vnější intron)
- v jednom intronu může být více twintronů

Původ intronů. „Exon theory of genes“



Biologický význam intronů

1. Regulace genové exprese (přítomnost dlouhých intronů zpomaluje transkripci a snižuje množství výsledného transkriptu).
2. Pozůstatek evoluce (různé exony v genu kódují různé funkční domény produktu – geny vznikaly fúzí exonů).
3. Zvýšení rychlosti rekombinace kódujících úseků různých genů – zrychlení procesu evoluce (proteiny / domény).
4. Alternativní sestřih: z jednoho genu více produktů.

Některé eukaryotické geny neobsahují introny, tj. introny nejsou nezbytné pro normální genovou expresi (klonování cDNA)

Editace RNA

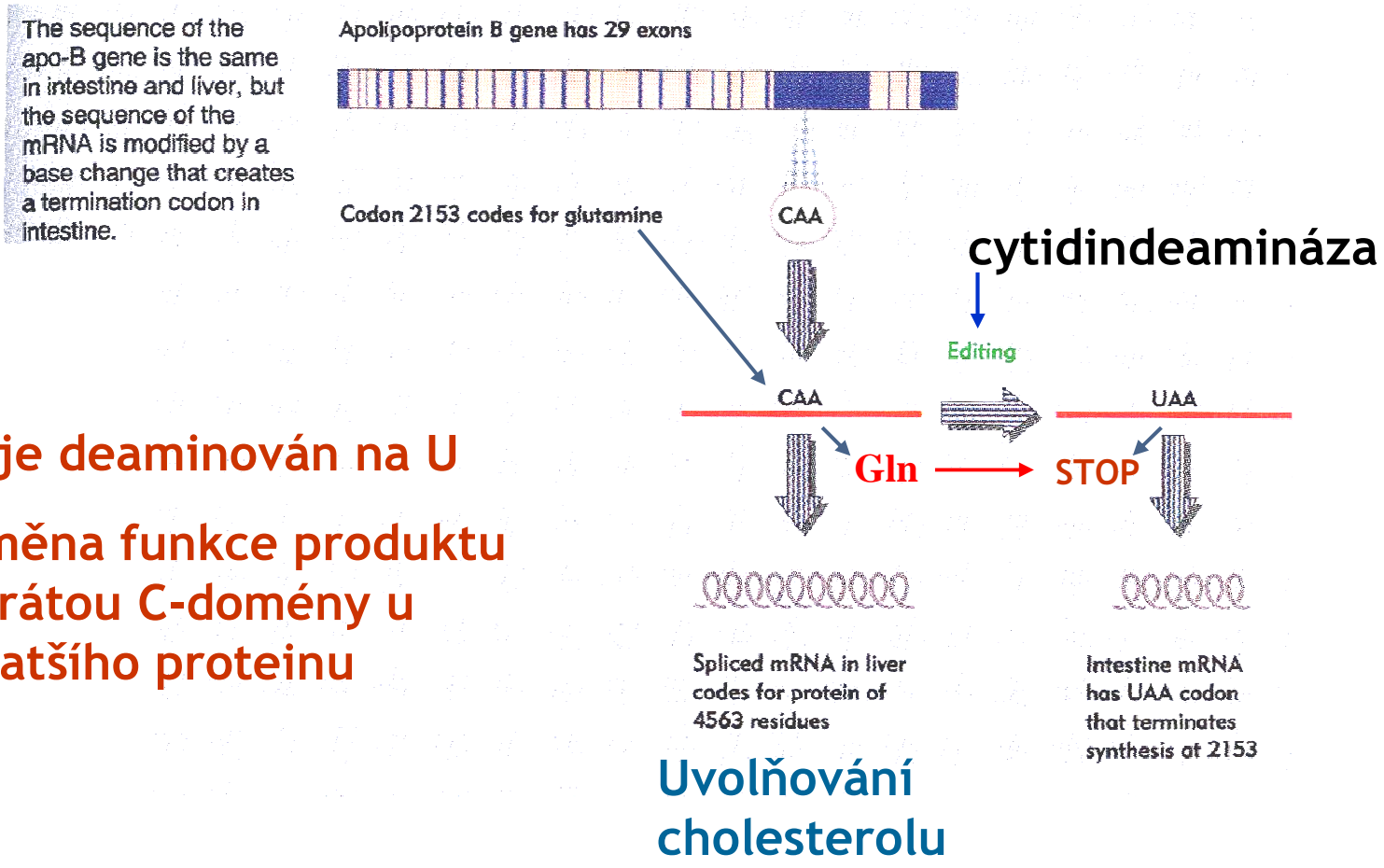
Editace RNA je jedna z posttranskripčních úprav, která byla zjištěna

- V mitochondriích trypanozom,
- V mitochondriích *Physarum polycephalum*
- V mitochondriích strunatců,
- V mitochondriích vyšších rostlin
- U genu pro apolipoprotein u savců

Editace RNA u různých organismů

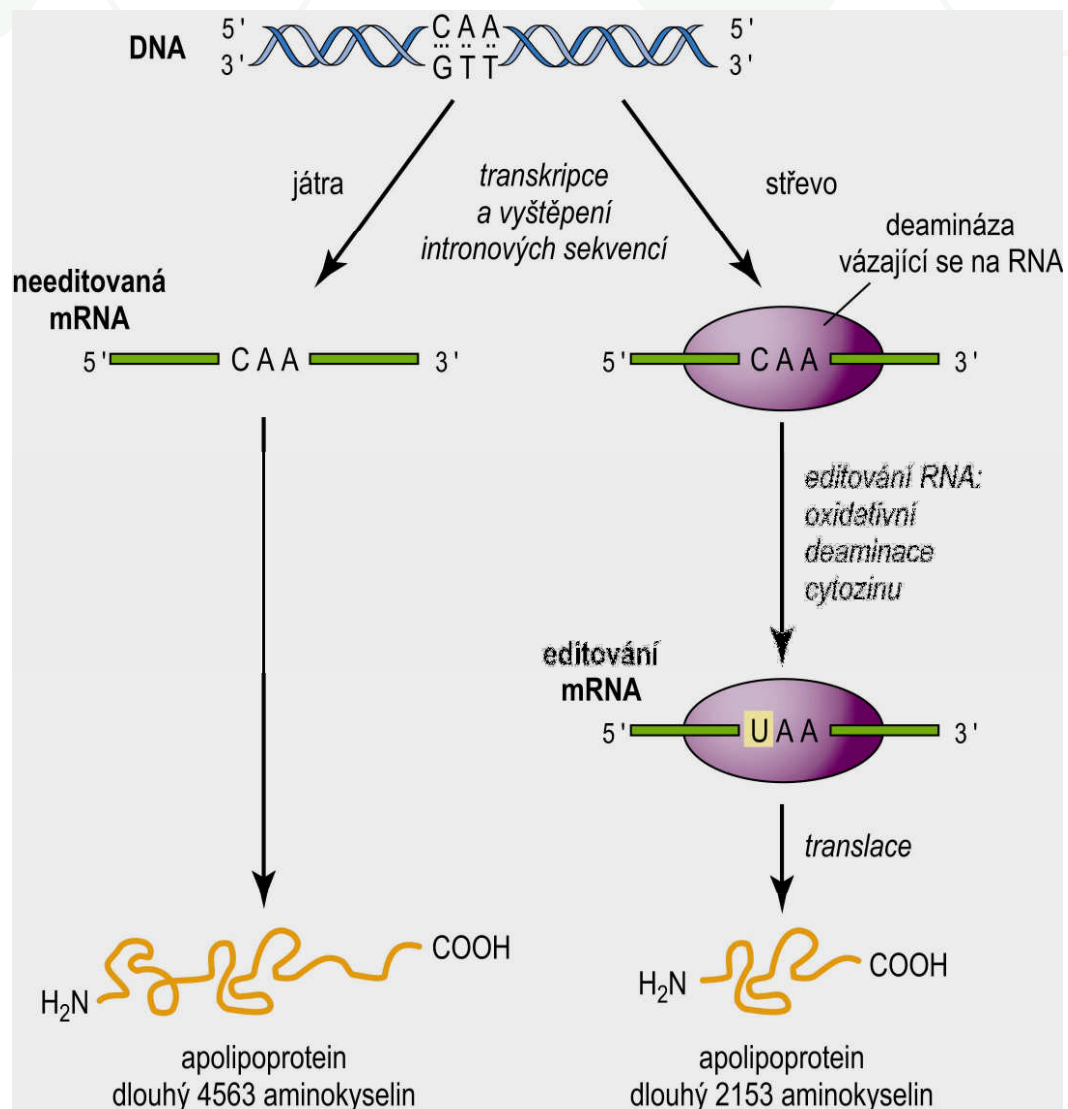
Organizmy	Organely	Způsob editace	Typ RNA
Trypanosoma Leishmania Crithidia	mitochondrie	inzerce U, delece U	mRNA
Rostliny	mitochondrie chloroplasty	substituce C za U, U za C substituce C za U	mRNA, rRNA
Savci	jádro	substituce C za U, A za G	mRNA

Substituční způsob editace hnRNA genu pro apolipoprotein

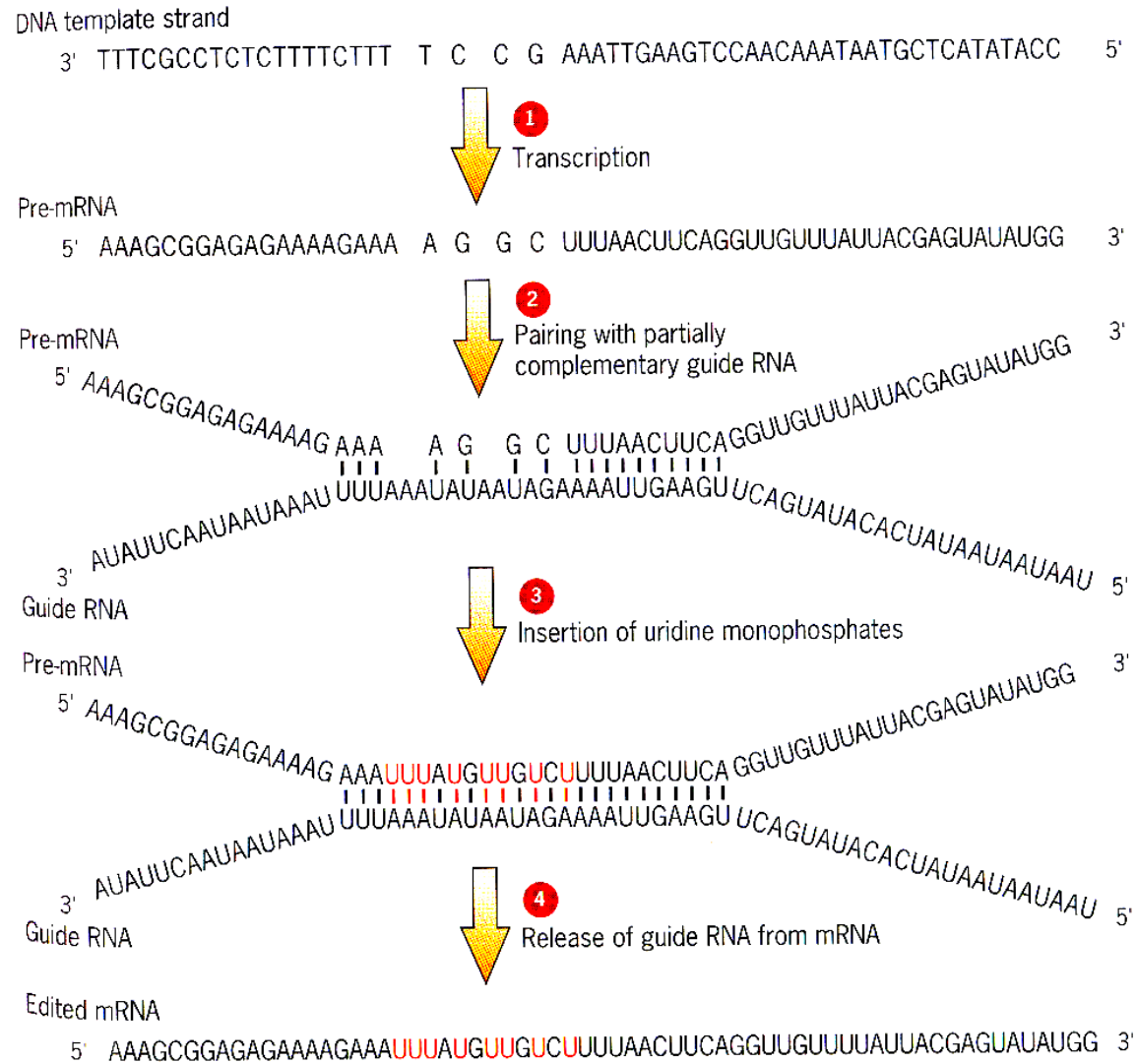


C je deaminován na U
změna funkce produktu
ztrátou C-domény u
kratšího proteinu

Editace mRNA genu pro apolipoprotein B ve střevě savců

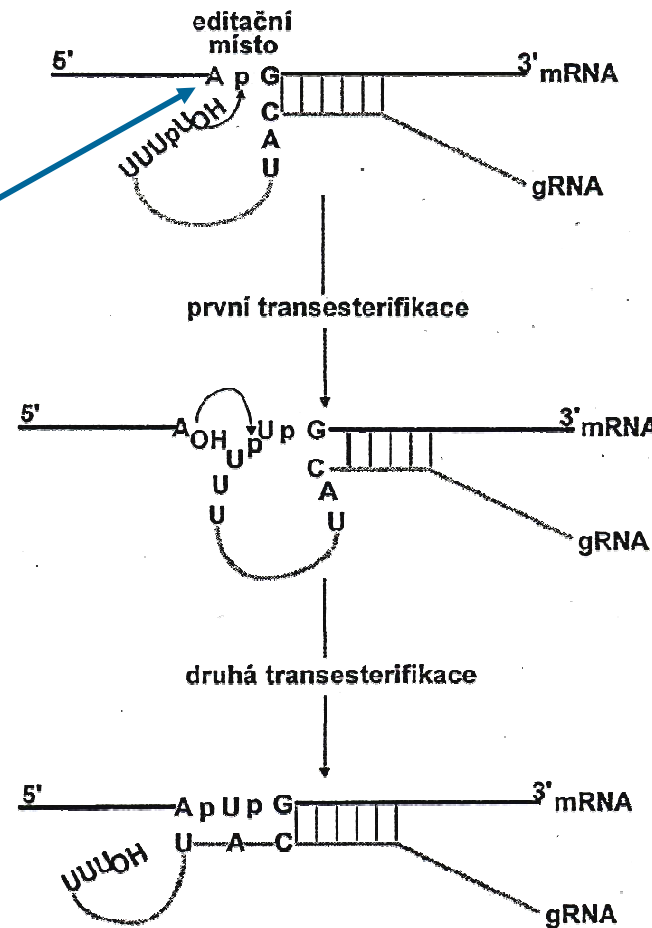


Editace pre-mRNA genu cytochromu b u *Leishmania*



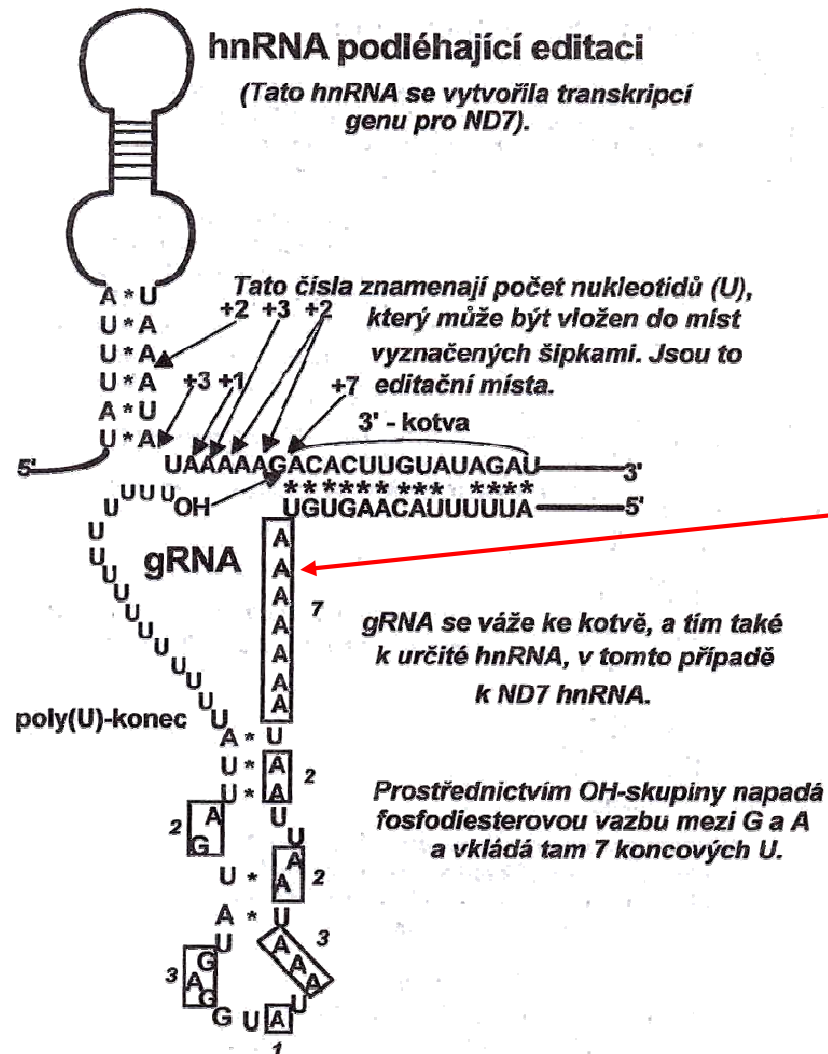
Vysvětlení editace na základě transesterifikačních reakcí

Nukleofilní atak fosfodiesterové vazby 3' OH skupinou



řídící RNA (guide)

Editace inserce nukleotidů do hnRNA u trypanozom řízená gRNA - první transesterifikace



Nukleotidy uvedené v rámečcích se postupně navážou komplementárně směrem k 3'-konci hnRNA. Čísla znamenají jejich počty, které odpovídají číslům uvedeným nahoře.

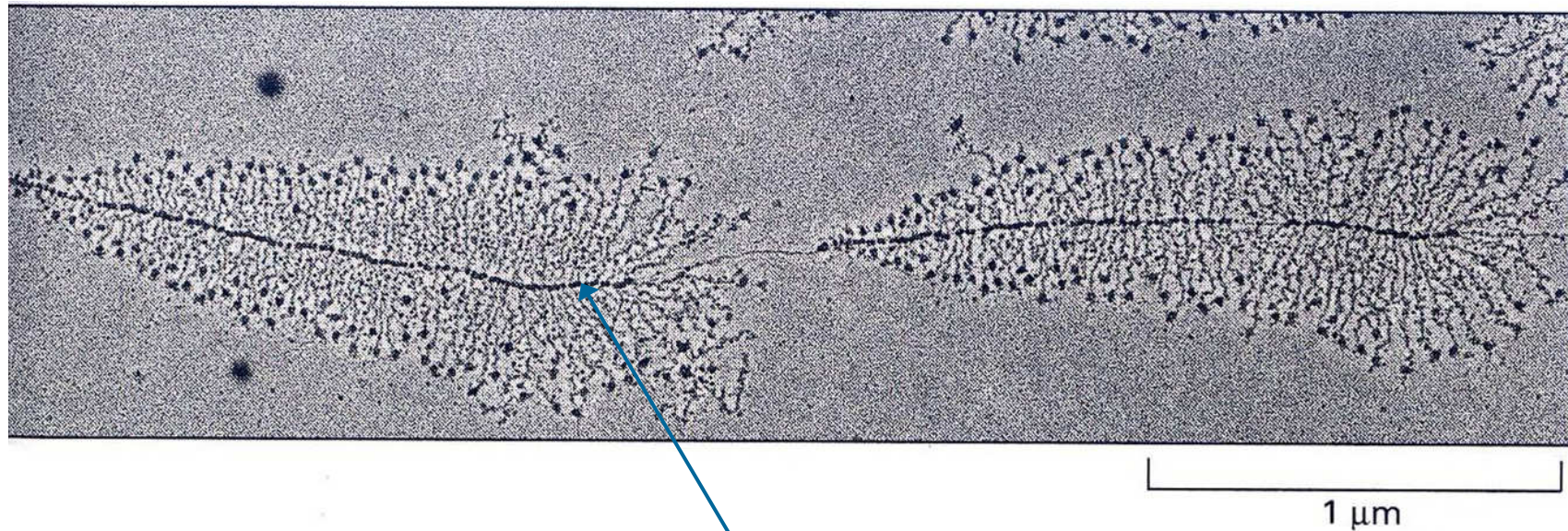
Hvězdičkami jsou vyjádřeny vodíkové vazby.



Proč probíhá editace?

- **Editace RNA byla běžná u prapůvodních buněk, u nichž byla řada reakcí katalyzována molekulami RNA a ne proteiny**
- **Primitivní mechanismus regulace genové exprese**

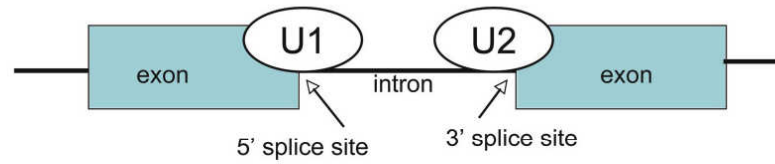
Transkripce dvou genů pro rRNA u prokaryot pozorovaná EM



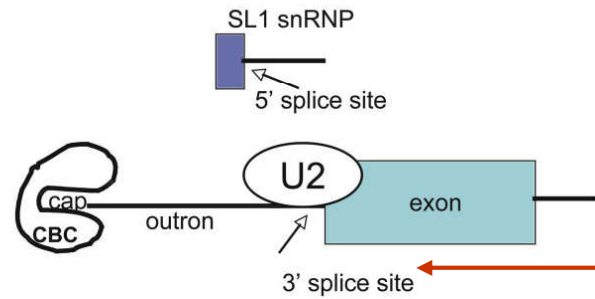
→
směr transkripce

DNA s navázanými
molekulami RNA-polymerázy

Cis-splicing



Trans-splicing



	Eukaryotes	Prokaryotes
Spliceosomalní sestřih	+	-
samosestřih	+	+
tRNA	+	+