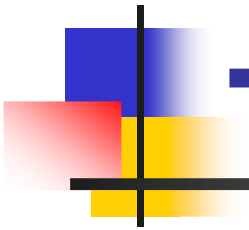
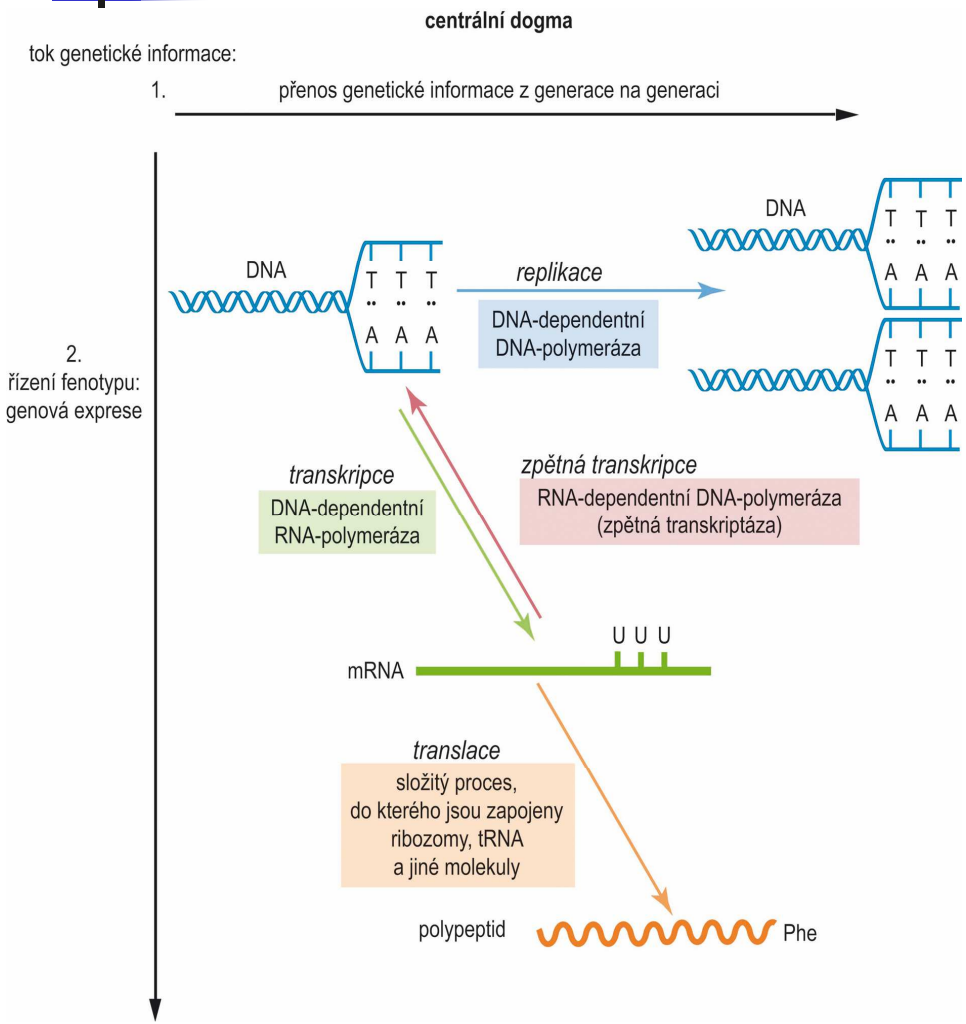


Transkripce DNA a sestřih

Jan Šmarda
Ústav experimentální biologie, PřF MU

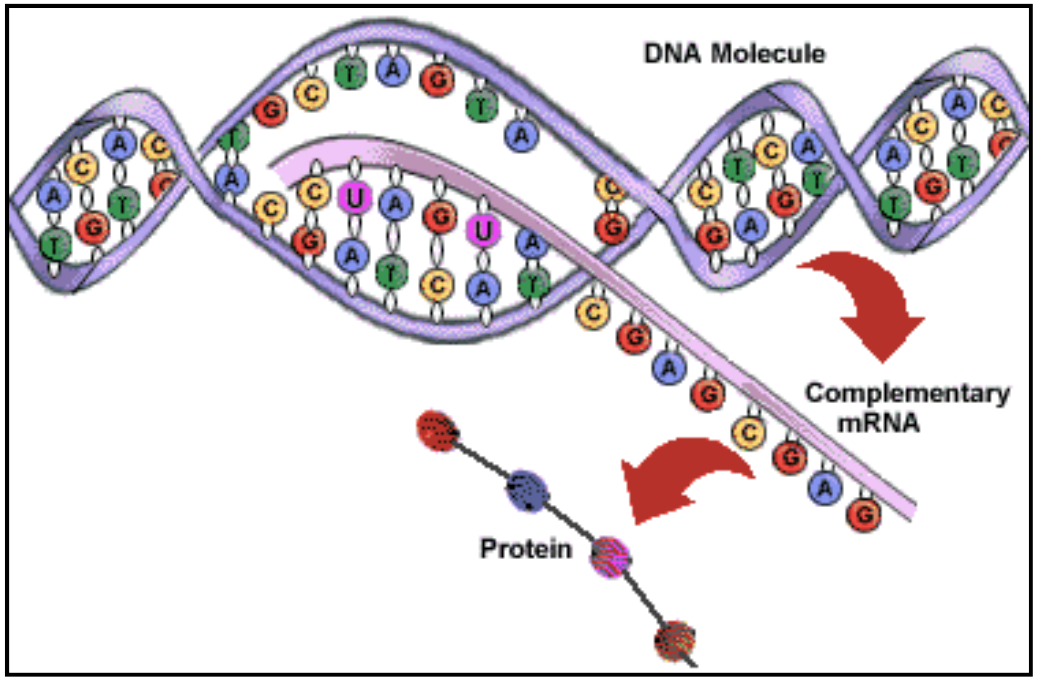
Cesta od DNA k RNA a proteinu



- fenotyp je výsledkem funkce enzymů, tj. proteinů
- proteiny jsou syntetizovány podle genetické informace: transkripcí a translací
- každá porucha toku informace se může projevit defektem v tvorbě proteinu a fenotypovou změnou

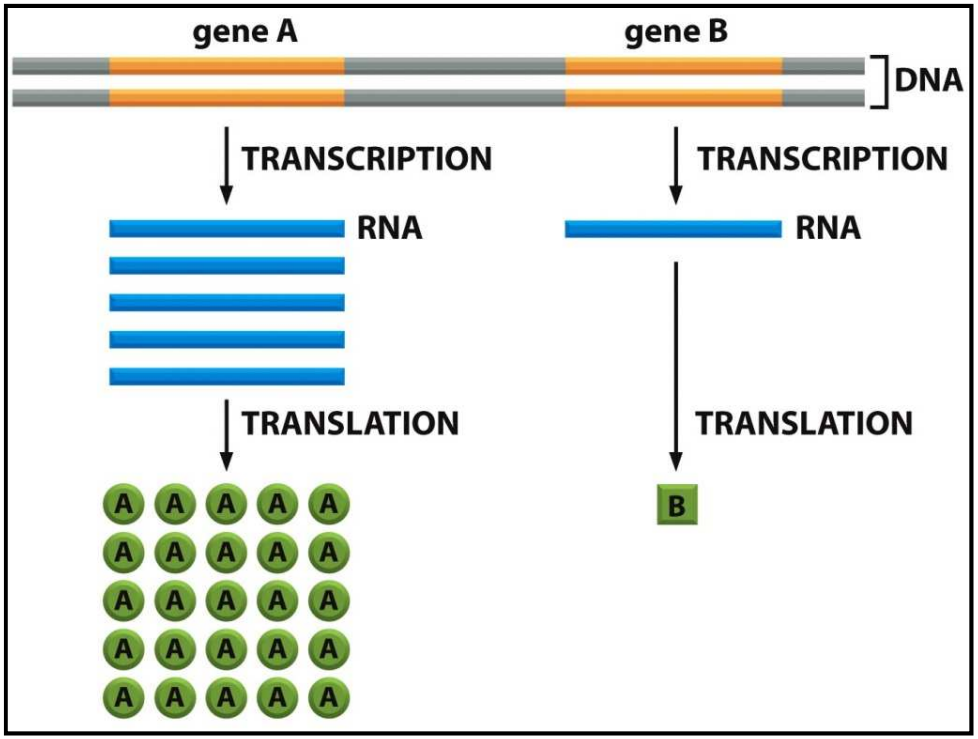
Přepis z DNA do RNA: transkripce

- převedení informace ze sekvence deoxyribonukleotidů jednoho z vláken DNA do sekvence ribonukleotidů v RNA (transkriptu)
- informace si v RNA udržuje podobnou chemickou povahu jako v DNA
- kóduje-li transkript protein, podrobí se **translaci** v ribozomech, tj. informace se převede ze sekvence ribonukleotidů do pořadí aminokyselin v proteinech

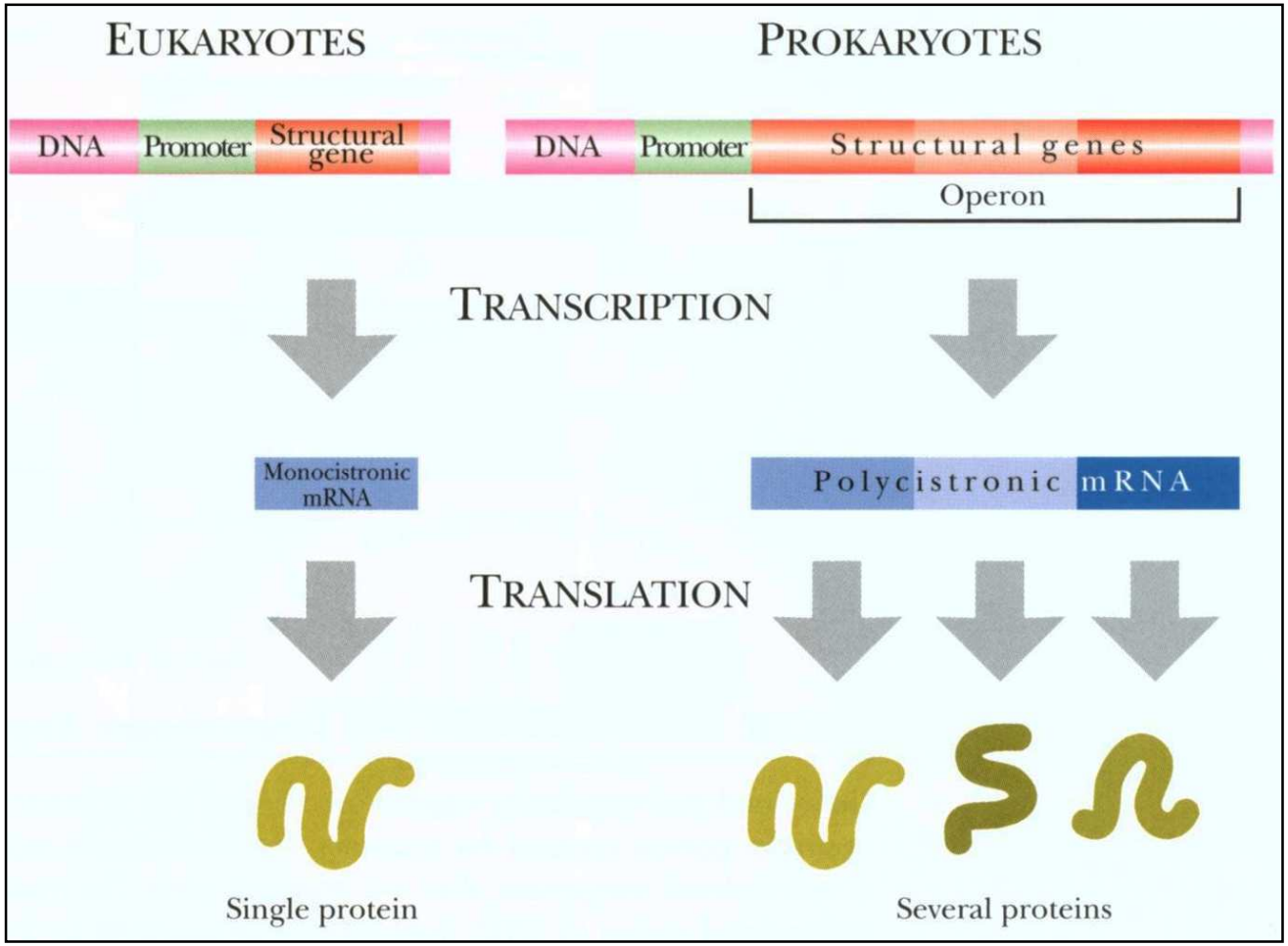


Transkripce a regulace genové exprese

- geny mohou být podrobeny transkripci a translaci s různou účinností
- provozní („housekeeping“) geny se exprimují trvale
- většina genů se exprimuje jen, když je potřeba

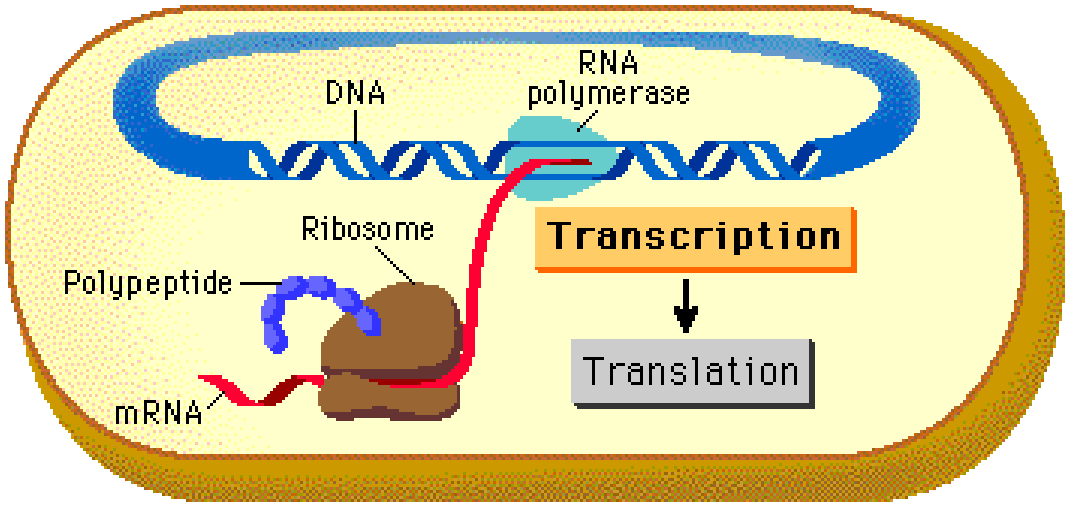


Transkripce u prokaryot a eukaryot

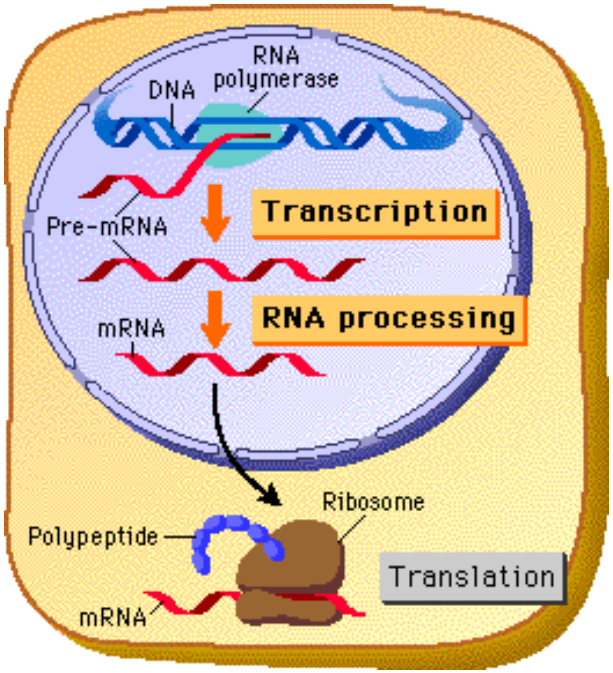


Transkripce a translace u prokaryot

- **primární transkript** je ekvivalentní molekule **mRNA**
- mRNA se podrobuje translaci v ribozomech, které jsou díky absenci jaderné membrány snadno dostupné



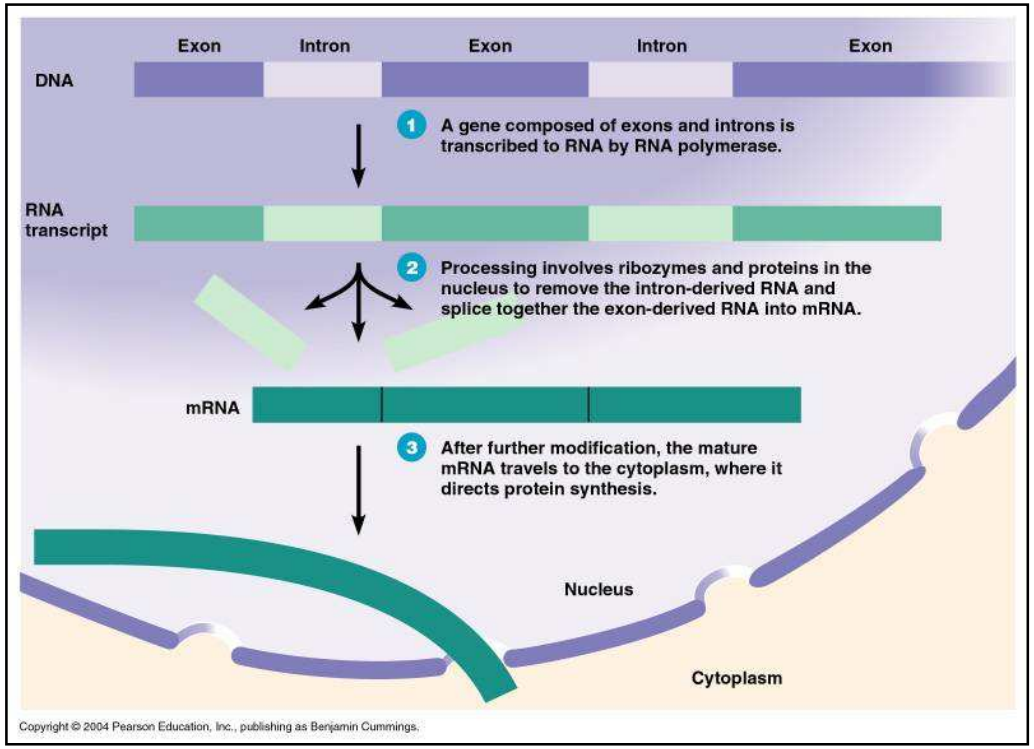
Transkripce a translace u eukaryot



- transkripce a translace jsou prostorově i časově odděleny
- v jádře vzniká primární transkript (pre-mRNA) obsahující přepisy exonů i intronů
- pre-mRNA se na obou koncích modifikuje a zbavuje přepisů intronů
- po úpravách se mRNA exportuje do cytoplazmy, kde se podrobí translaci

Specialita genů eukaryot: introny

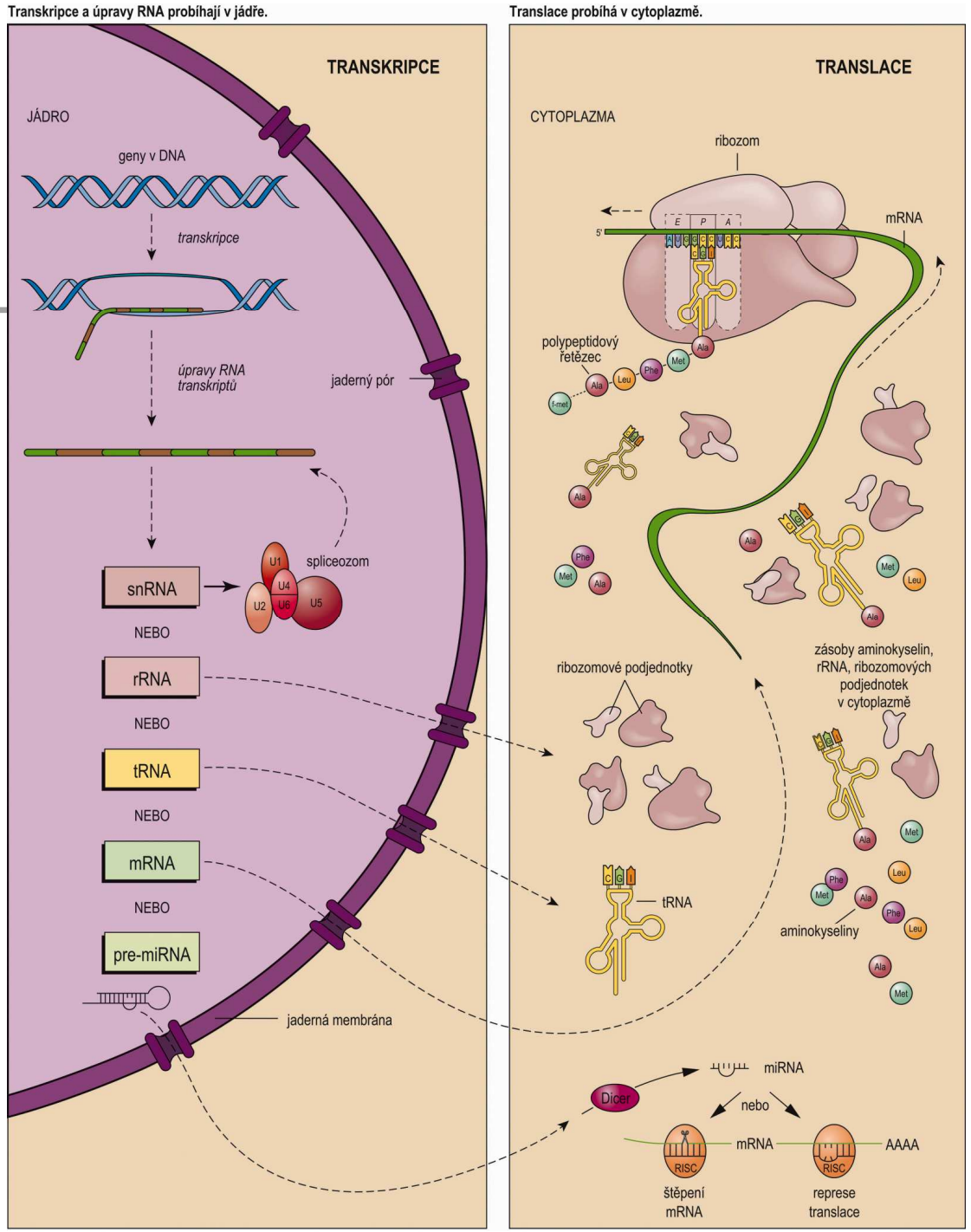
- **introny:** nekódující sekvence
- **exony:** exprimované sekvence
- objeveny v roce 1977 díky rozvoji sekvenačních technik
- sekvence zahrnující **introny** i **exony** se přepisují do **pre-mRNA**
- nekódující sekvence se následně vyštěpují **sestřihem** ("splicing") ve speciálních komplexech **spliceozomech**



Eukaryota

- jaderná membrána odděluje prostor pro transkripci a sestřih (jádro) od prostoru translace (cytoplazmy)

- existuje několik typů RNA, většinou se uplatňují mimo jádro, nutný export jadernými póry



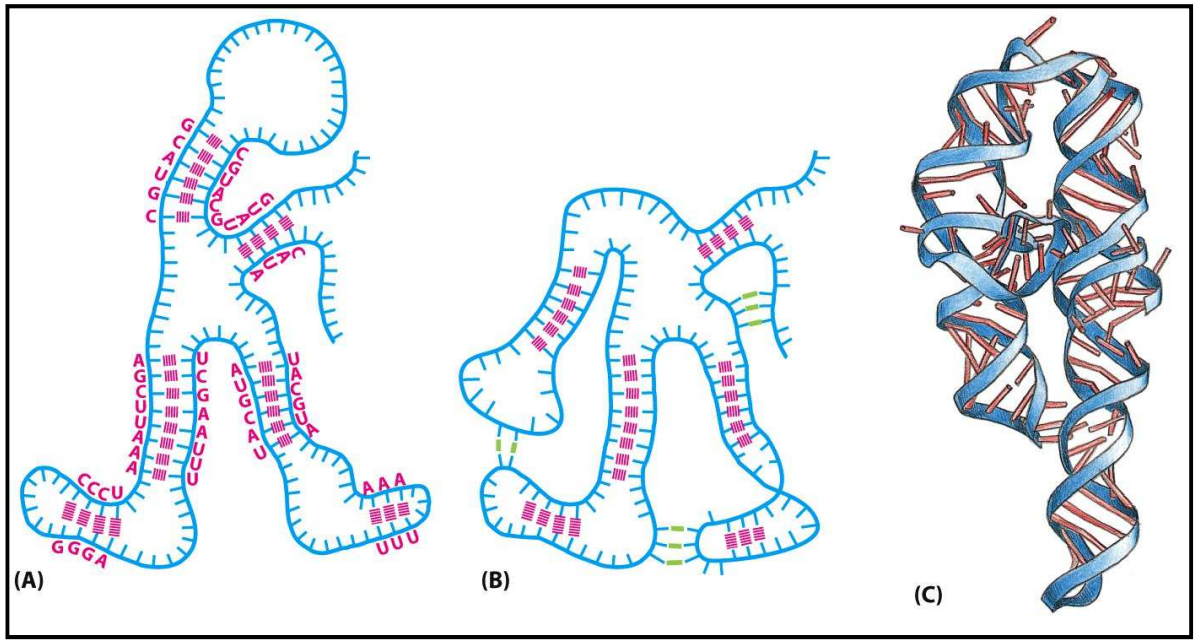
Funkce molekul RNA

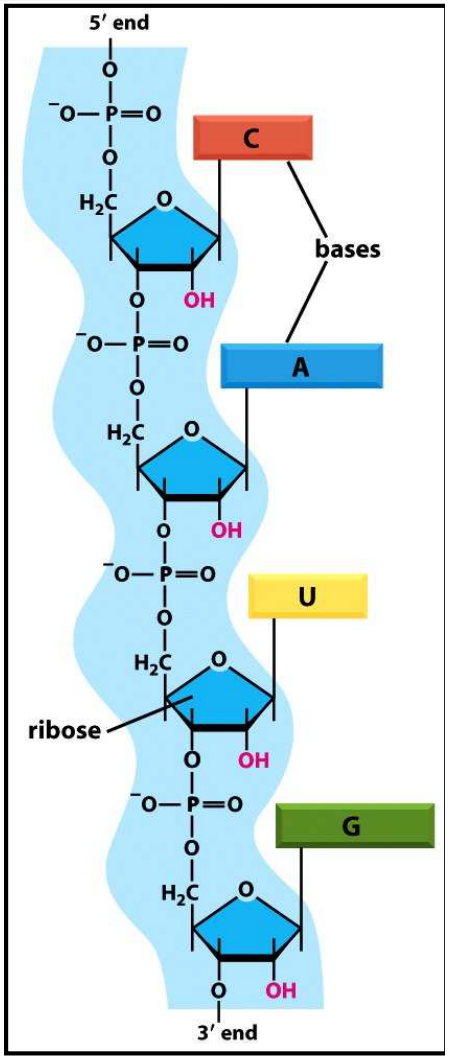
všechny zapojeny do genové exprese:

- **mediátorová** RNA **(mRNA)**—přenáší genetickou informaci z DNA do ribozomů
- **transferová** RNA **(tRNA)**—adaptér spojující aminokyseliny a kodóny v mRNA
- **ribozomová** RNA **(rRNA)**—strukturní a katalytická složka ribozomů
- **malé jaderné** RNA **(snRNA)**—strukturní složky spliceozomů, účast na sestřihu pre-mRNA
- **micro** RNA **(miRNA)**—krátké jednořetězcové RNA, které blokují translaci komplementárních mRNA
- **small interfering** RNA (**siRNA**)—krátké dvouřetězcové RNA, které selektivně rozkládají komplementární mRNA a tak znemožňují jejich translaci
- další nekódující RNA (různé funkce, např. složka telomerázy)

RNA

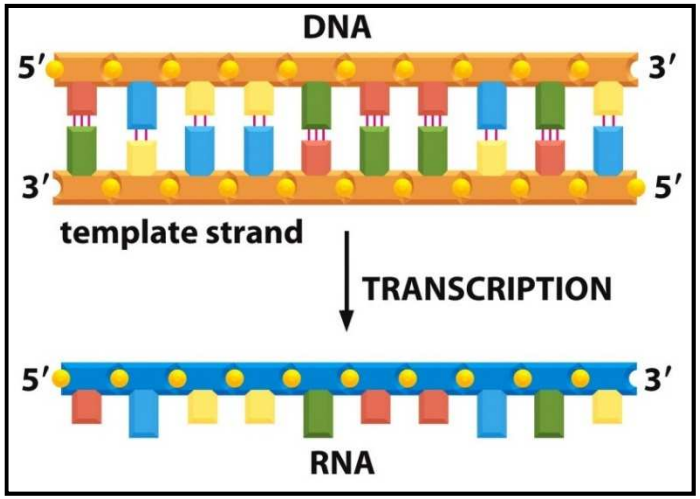
- **jednořetězcová** molekula
- skládá se do specifického tvaru (párováním bází uvnitř téže molekuly) podobně jako polypeptidový řetězec proteinu
- je méně stabilní než DNA (atom kyslíku v ribóze zvyšuje její reaktivitu)





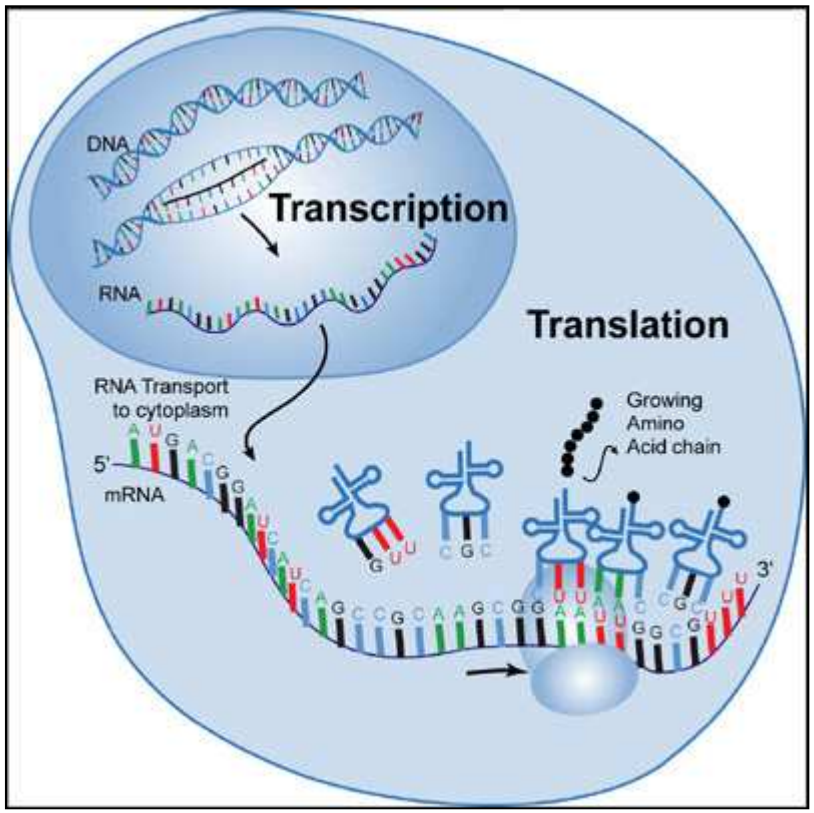
Transkripce má několik stejných rysů jako replikace DNA

- začíná **rozvolněním** malé oblasti **dvoušroubovice** DNA: obnažení několika bází obou řetězců
- jeden z řetězců DNA slouží jako **templát** pro syntézu komplementárního vlákna (RNA)
- výběr začleňovaného nukleotidu vyplývá z principu **párování komplementárních bází**
- nový nukleotid je do rostoucího vlákna začleněn **kovalentní vazbou**
- vzniklá RNA je přesnou komplementární verzí templátového řetězce
- syntéza RNA probíhá ve směru 5'➔3'



Odlišnosti transkripce a replikace

- prekurzory jsou **ribonukleozidtrifosfáty** a ne deoxyribonukleozidtrifosfáty
- přepisuje se jen **jedno vlákno DNA**
- syntéza RNA iniciována ***de novo***
- vzniklý řetězec RNA nezůstává připojen vodíkovými vazbami k DNA, ale **odvíjí se** od něj, čímž umožňuje obnovení ds struktury DNA
- transkripty se z templátu uvolňují jako **jednořetězce**
- velikost transkriptů je podstatně menší než velikost genomu
- transkripci zajišťuje DNA-dependentní **RNA-polymeráza**, zatímco replikaci katalyzuje DNA-dependentní **DNA-polymeráza**

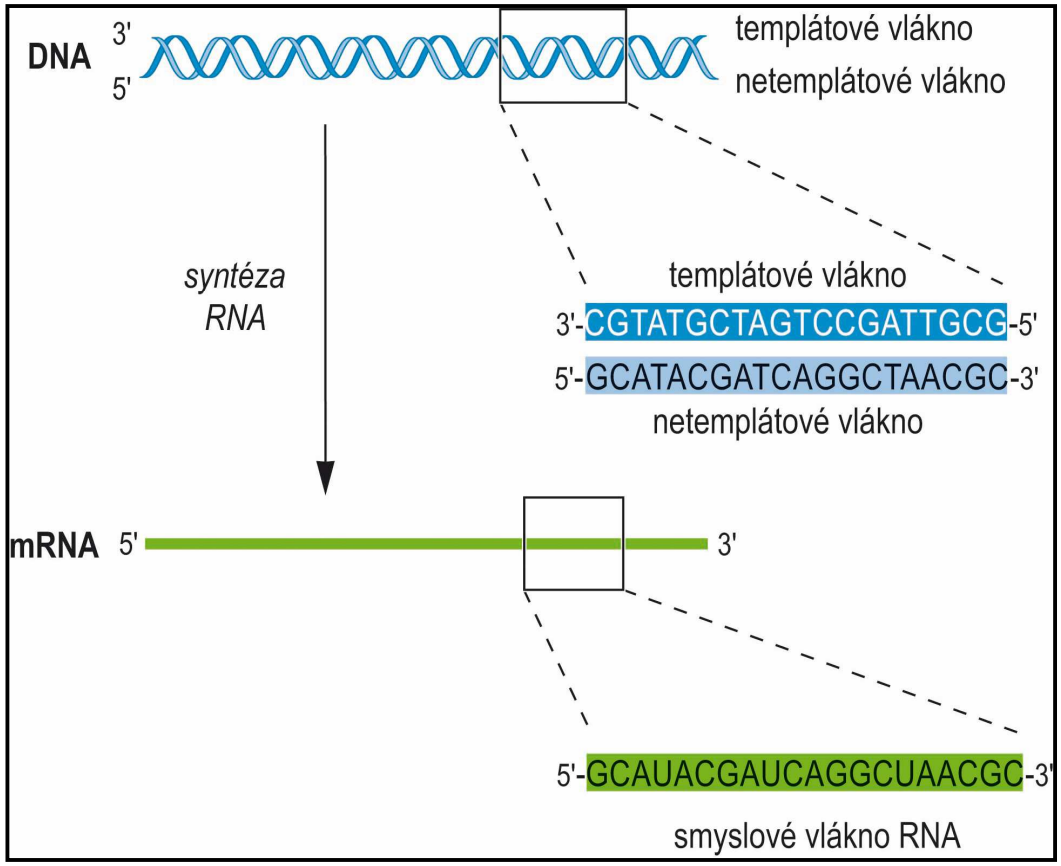


Odlišnosti RNA- a DNA-polymeráz

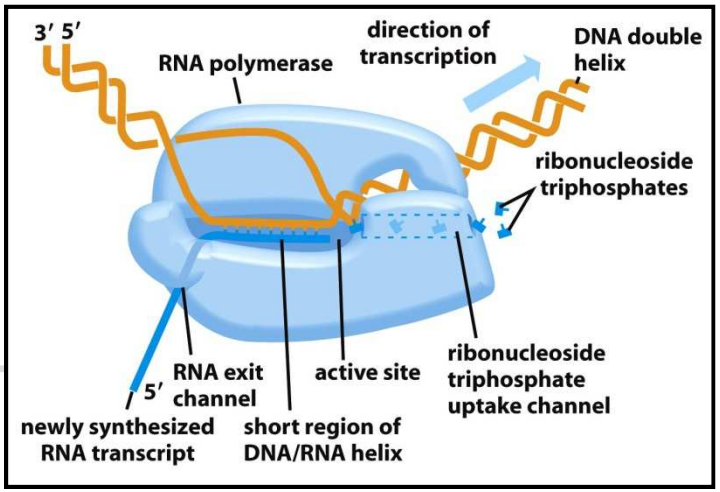
- odlišná chemická povaha substrátů a produktů reakce
- RNA-polymerázy mohou katalyzovat tvorbu RNA za nepřítomnosti primeru
- RNA-polymerázy jsou méně přesné než DNA-polymerázy

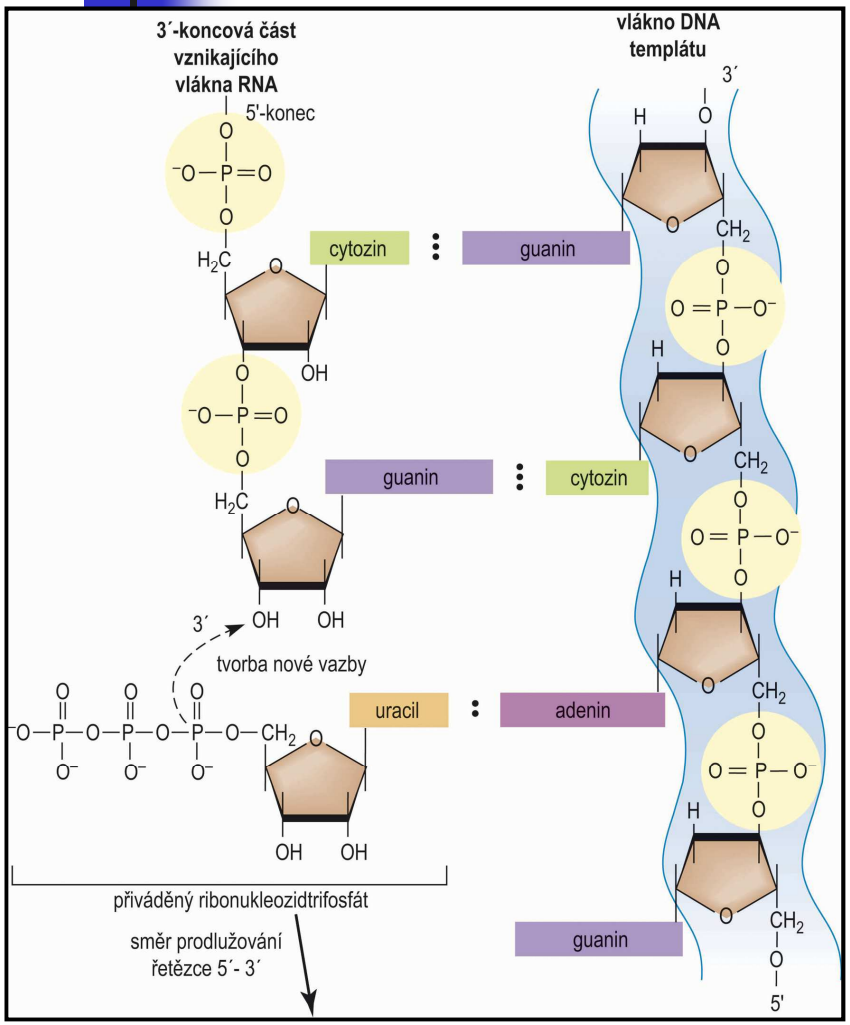
Pro transkripci se využívá jen jedno vlákno DNA

které vlákno je templátové určují signální sekvence (promotory)



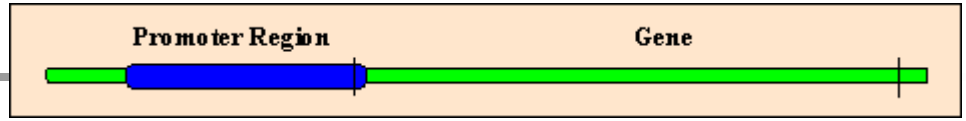
RNA-polymerázy



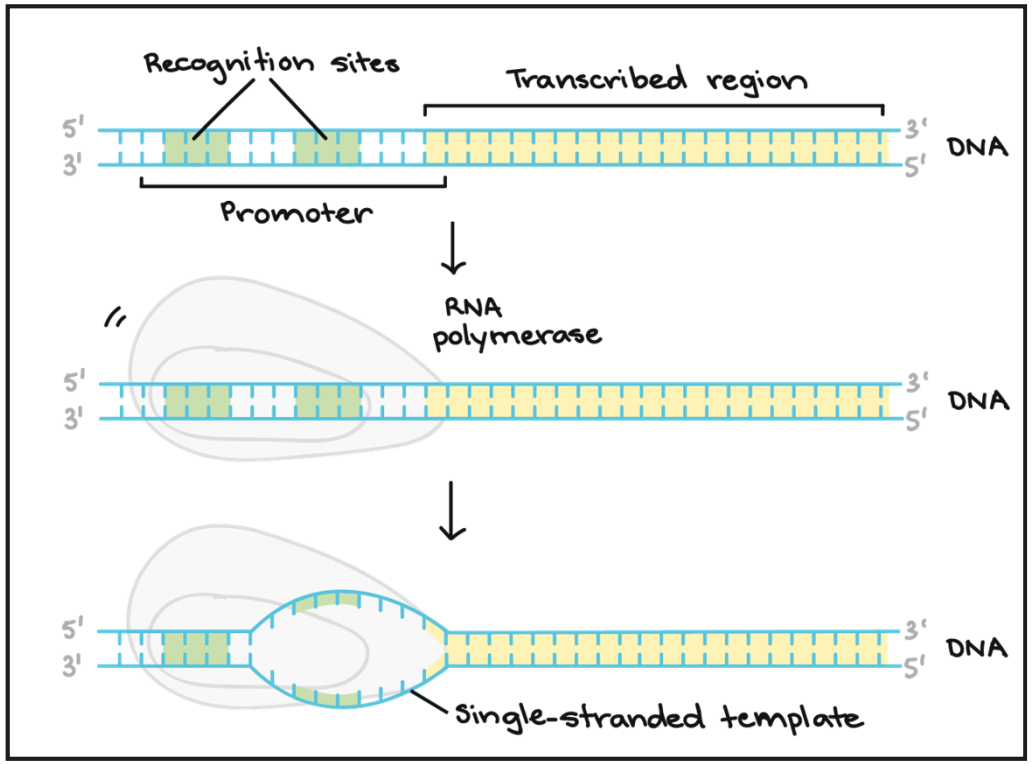


- katalyzují tvorbu fosfodiesterových vazeb mezi nukleotidy a vytvářejí tak lineární řetězec
- pohybují se podél DNA, postupně rozvíjejí dvoušroubovici, obnažují templátový řetězec pro párování s komplementárními bázemi
- vznikající řetězec RNA se prodlužuje ve směru 5´-3´
- substráty polymerace jsou nukleozidtrifosfáty ATP, CTP, UTP a GTP
- nutnou energii poskytuje hydrolýza makroergických vazeb

Průběh transkripce - stručný přehled

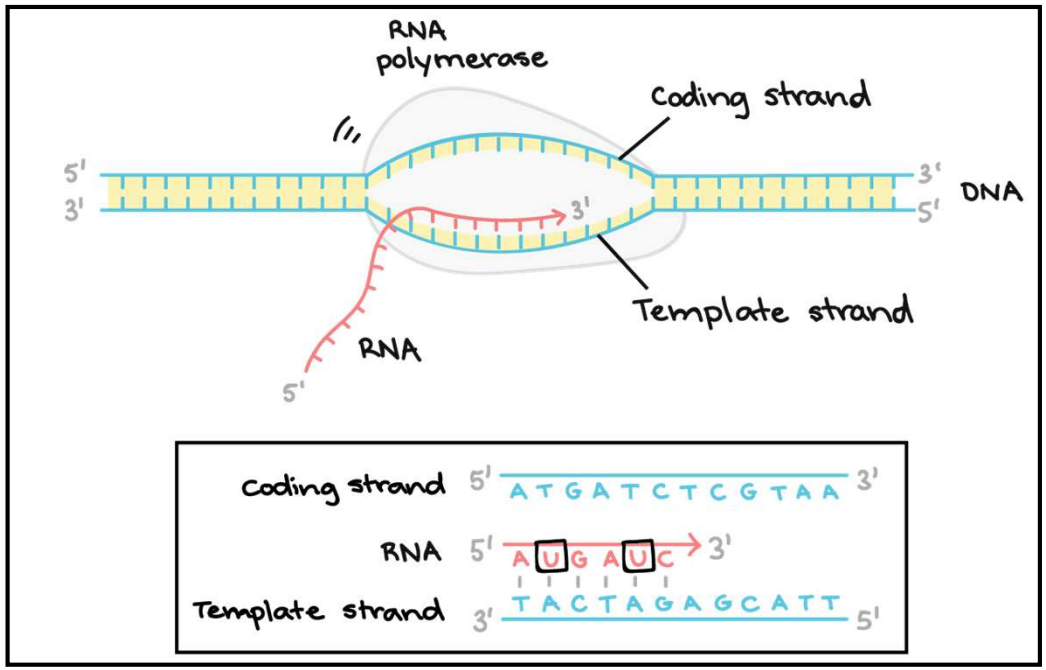


- RNA-polymeráza se váže na specifickou nukleotidovou sekvenci DNA, tzv. **promotor**



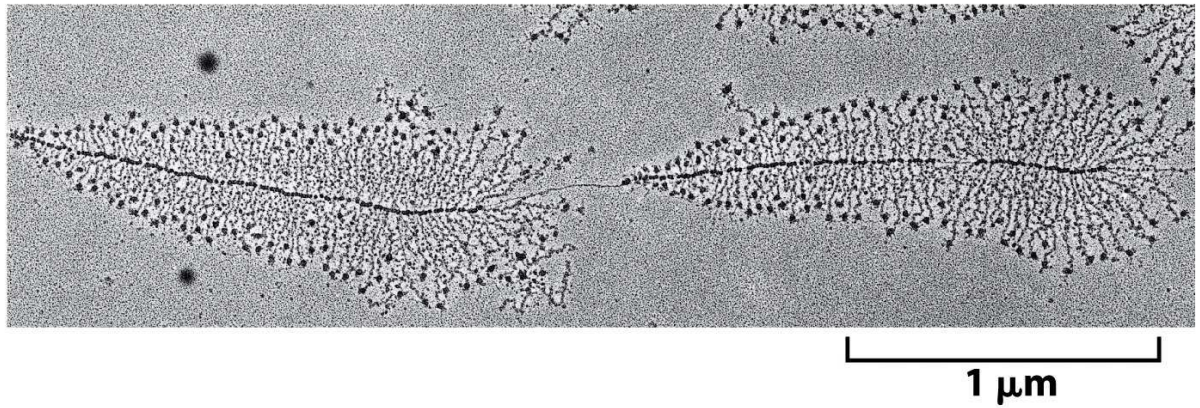
Průběh transkripce - stručný přehled

- první báze transkriptu neodpovídá první bázi kódující sekvence
- součástí transkriptu je krátká 5´-nekódující oblast
- RNA transkript je komplementární **templátovému vláknu** a má analogickou sekvenci jako **kódující vlákno**



Proces transkripce je rychlý

- vzniklá RNA se rychle uvolňuje z templátu
- transkripce téhož genu může být zahájena ještě před dokončením transkripce předchozí
- stejný gen může být podroben často opakované transkripci
- RNA-polymeráza se pohybuje rychlostí 20 nukleotidů za sekundu (u eukaryot), resp. 40 nukleotidů za sekundu (u prokaryot)
- za hodinu se může vytvořit více než 1000 transkriptů téhož genu



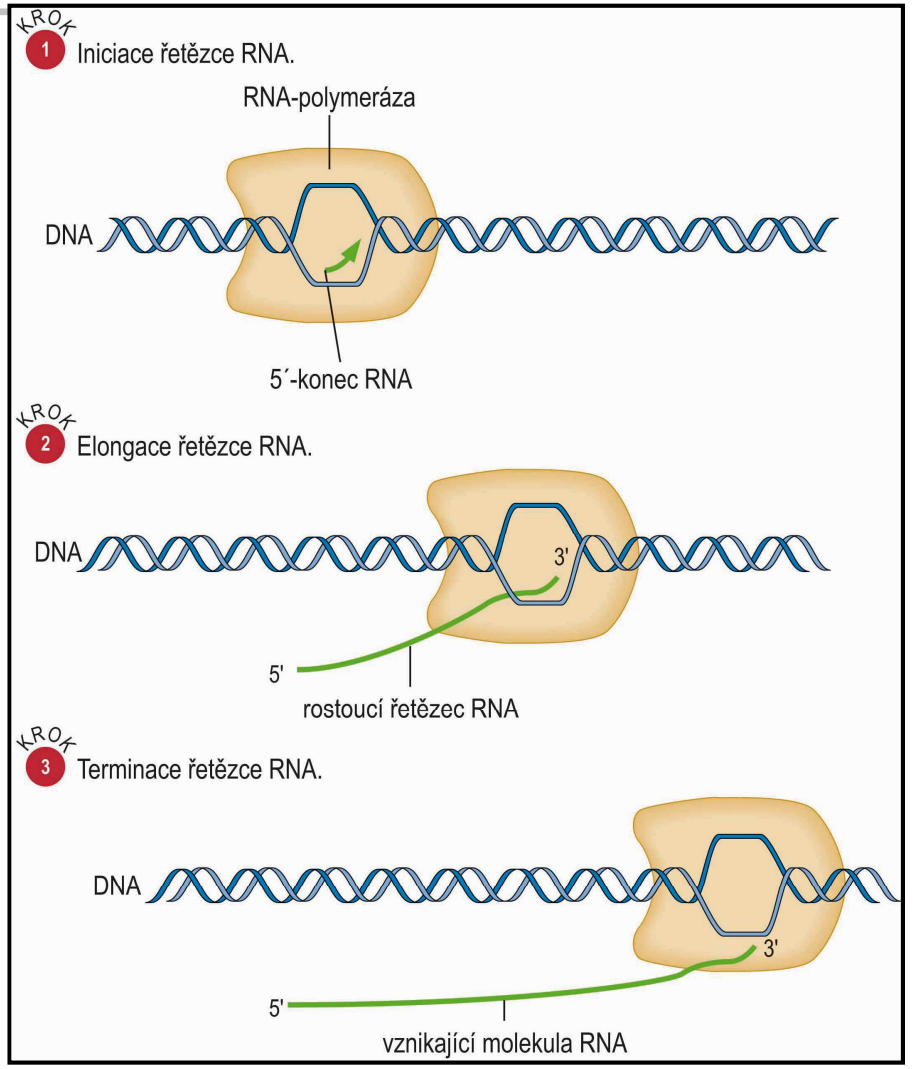
vznik molekul rRNA a jejich spojení s ribozomovými proteiny

Fáze transkripce

- **iniciace:** rozeznání promotoru RNA-polymerázou, vazba na DNA, rozvinutí dvoušroubovice v místě startu transkripce, zahájení syntézy RNA

- **elongace:** pokračování v syntéze transkriptu podle informace v DNA-templátu

- **terminace:** ukončení syntézy transkriptu, uvolnění RNA-polymerázy z templátu

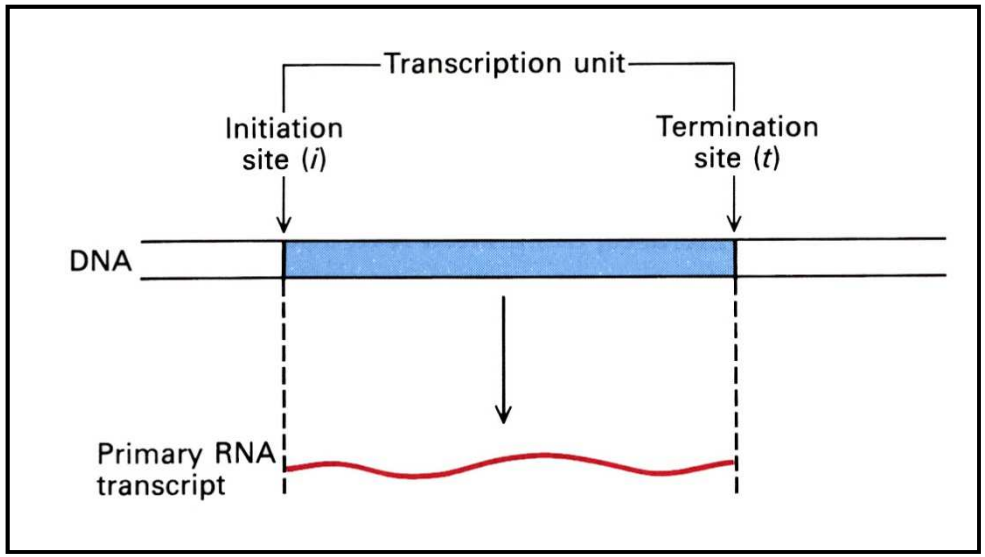


Terminologie transkripce

Transkripční jednotka

- úsek DNA, který začíná prvním a končí posledním přepisovaným nukleotidem

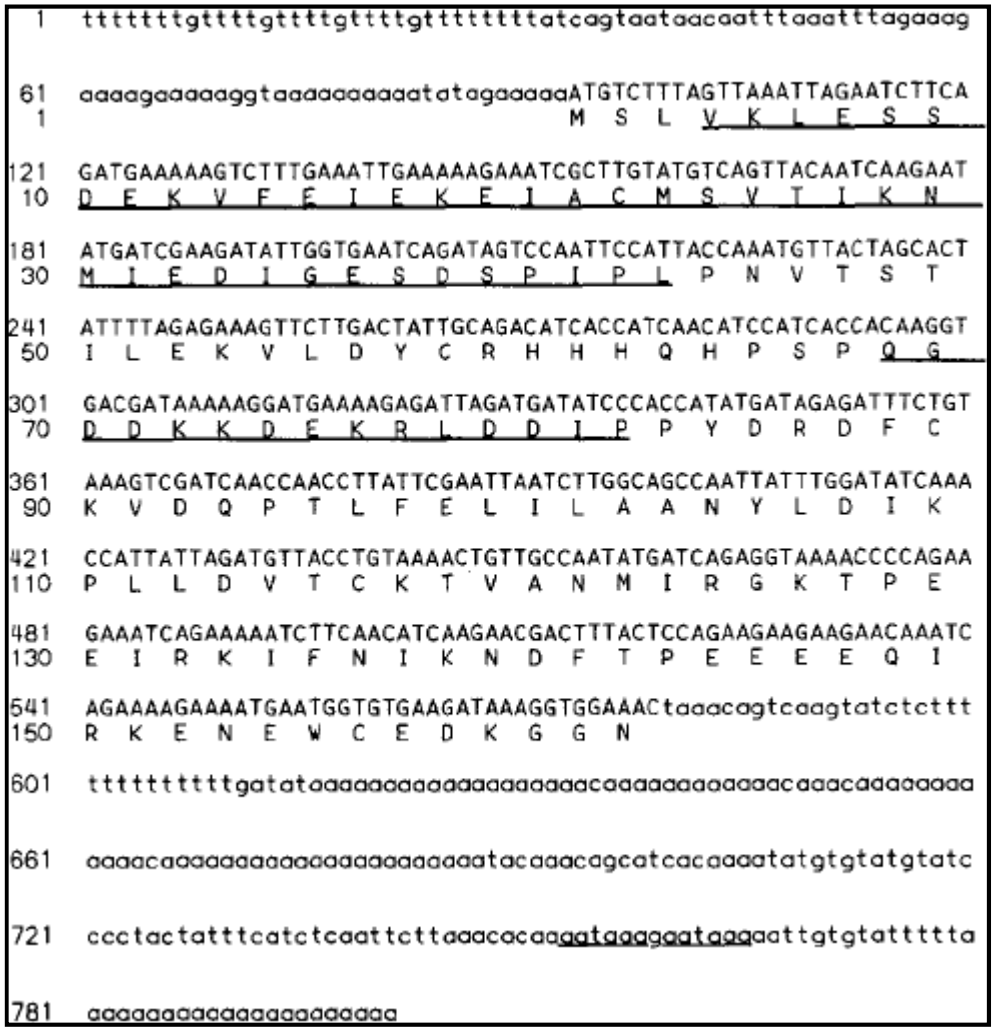
- může a nemusí být ekvivalentní genu (u prokaryot běžně zahrnuje několik genů)



Terminologie transkripce

"Upstream" (proti směru)
a **"downstream" (po směru)**

- oblasti transkriptu RNA, které jsou umístěny směrem k 5´-konci (upstream, mínus) nebo 3´-konci (downstream, plus) vzhledem k určitému referenčnímu bodu
- termíny se používají i pro ekvivalentní sekvence DNA
- místo iniciace transkripce se značí +1

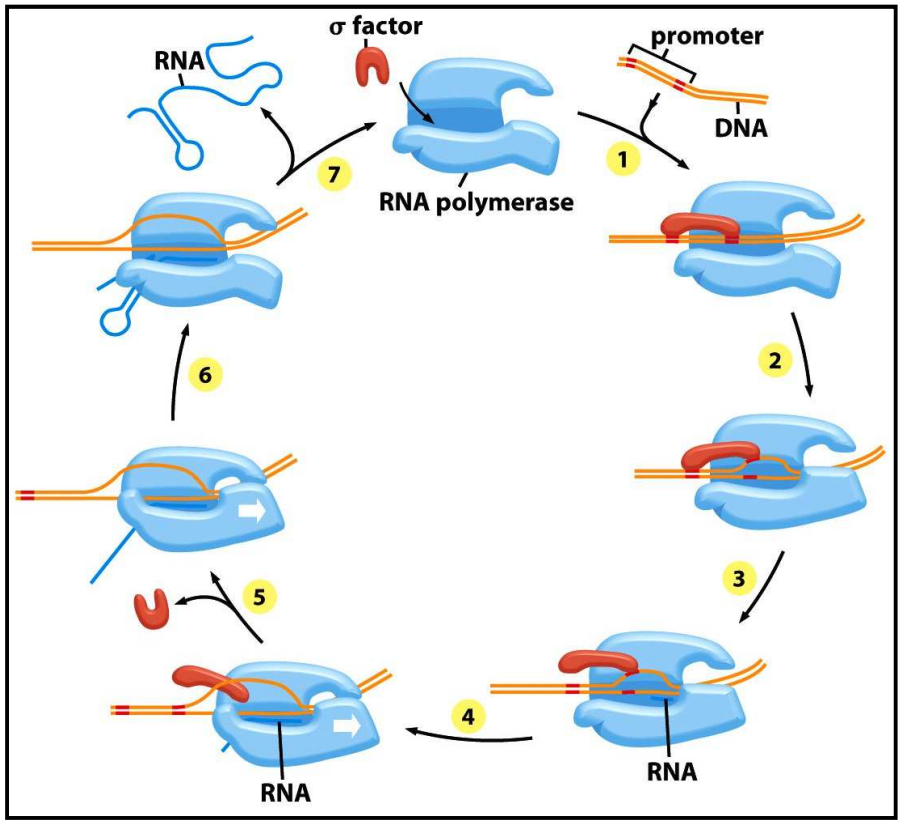


Transkripce u prokaryot: RNA-polymeráza

- vícepodjednotkový proteinový komplex (5 polypeptidů, z toho dva jsou identické) – kompletní enzym = tzv. **holoenzym**
- jádro enzymu obsahuje podjednotky α2, ß, ß´
- **podjednotky α** napomáhají sestavení jádra RNA-polymerázy
- **podjednotka ß** obsahuje vazebné místo pro rinobukleozidtrifosfáty
- **podjednotka ß´**obsahuje vazebné místo pro templátovou DNA
- **podjednotka σ (sigma faktor)** se účastní iniciace transkripce (po dokončení iniciace a zahájení elongace se z komplexu uvolňuje) - zajišťuje **specifickou vazbu RNA-polymerázy na promotor**

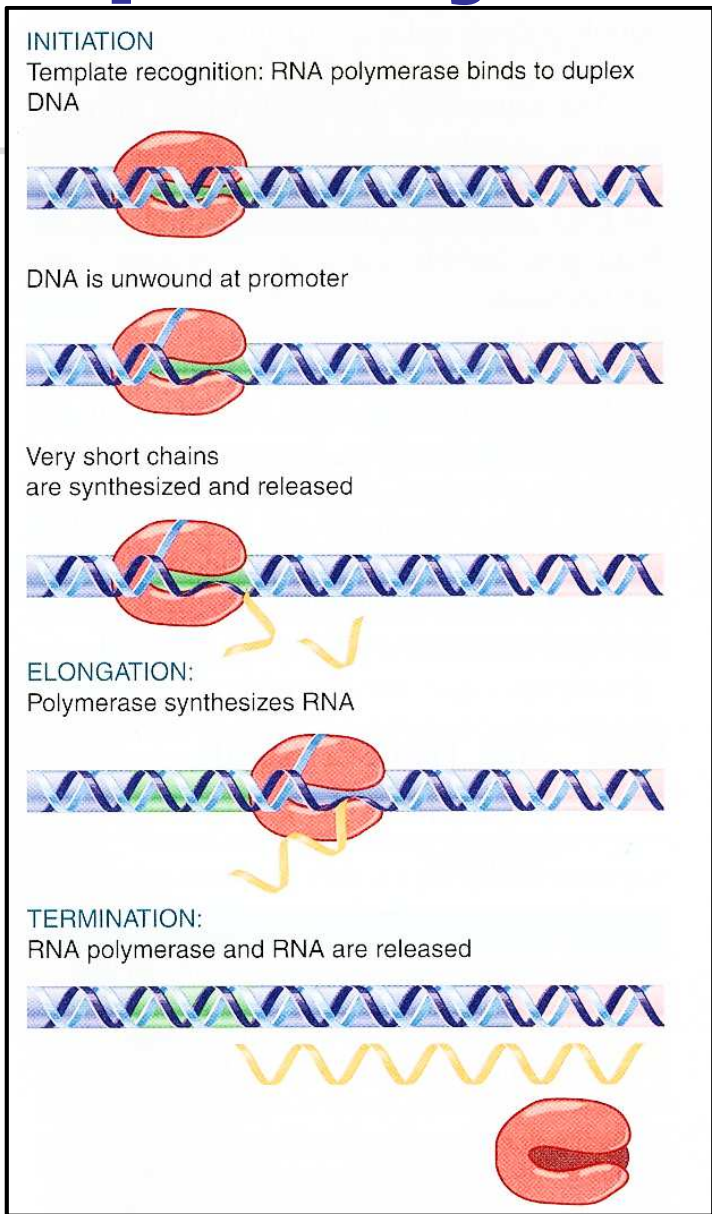
Iniciace transkripce prokaryot

- k jádru enzymu se připojuje **sigma faktor** a vzniká tak holoenzym RNA-polymerázy
- komplex klouže po molekule DNA
- pokud při pohybu po DNA narazí na promotor, naváže se na něj pevněji
- promotor představuje startovní bod transkripce
- za rozeznání promotoru zodpovídá sigma faktor RNA-polymerázy, který vytváří specifické kontakty s bázemi promotoru



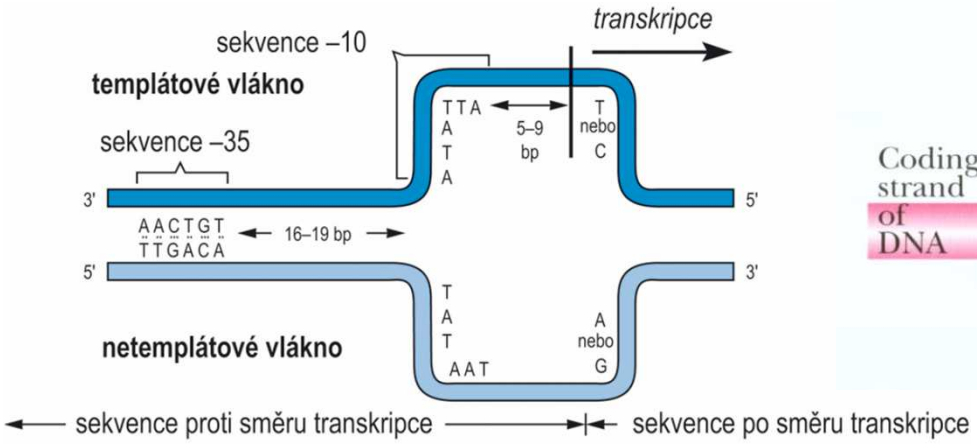
Iniciace transkripce prokaryot: 3 kroky

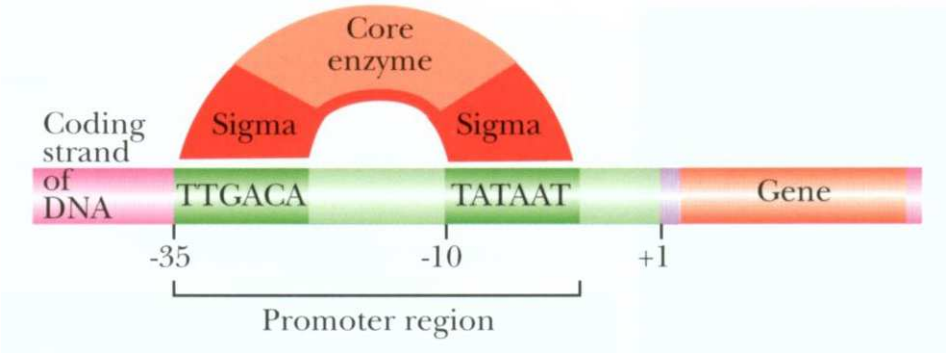
- **vazba** holoenzymu RNA-polymerázy do promotorové oblasti DNA (**uzavřený komplex**)
- **lokální rozvinutí** vláken DNA, obnažení bází templátu v promotoru (včetně místa startu transkripce), aby se mohly párovat s volnými ribonukleotidy (**otevřený komplex**)
- RNA-polymeráza katalyzuje tvorbu fosfodiesterových vazeb mezi několika prvními nukleotidy vznikajícího vlákna RNA
- po **spojení cca 10 prvních nukleotidů** se oslabuje vazba mezi RNA-polymerázou a promotorem a mezi jádrem enzymu a sigma faktorem, iniciace končí, začíná elongace



Struktura prokaryotických promotorů

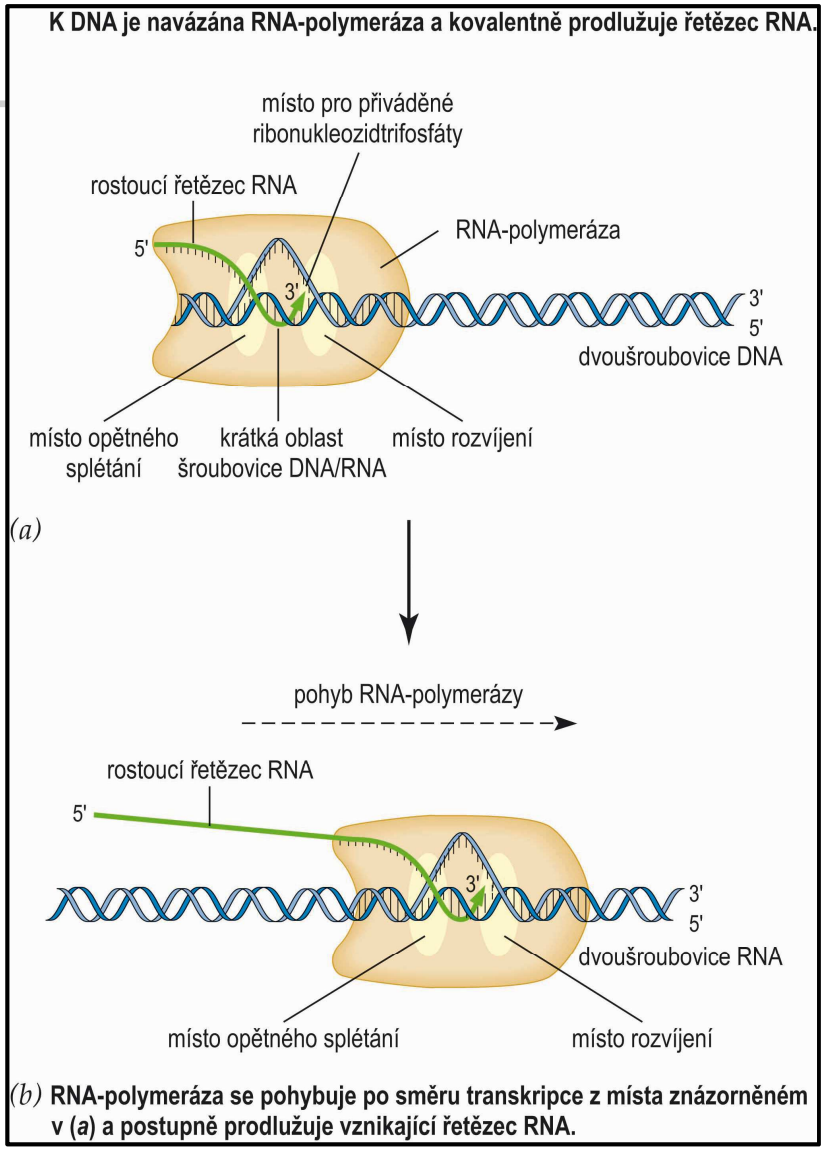
- krátké konzervativní sekvence vzdálené 35 a 10 nukleotidů proti směru transkripce od místa startu pro vazbu sigma faktoru
- sekvence -35: TTGACA
- sekvence -10: TATAAT (Pribnowův box, bohaté zastoupení AT, místo prvotního rozvíjení dvoušroubovice)





Elongace transkripce u prokaryot

- katalyzována RNA-polymerázou po uvolnění σ faktoru
- prodlužování RNA tvorbou kovalentních vazeb mezi ribonukleotidy
- RNA-polymeráza se pohybuje po templátu a postupně rozvíjí DNA
- za polymerázou se obnovuje dvoušroubovice DNA, tím se vytěsňuje vznikající vlákno RNA
- oblast přechodného párování mezi DNA a RNA je velmi krátká (cca 3 páry bází)
- rychlost: 40 ribonukleotidů za sekundu



Terminace transkripce u prokaryot

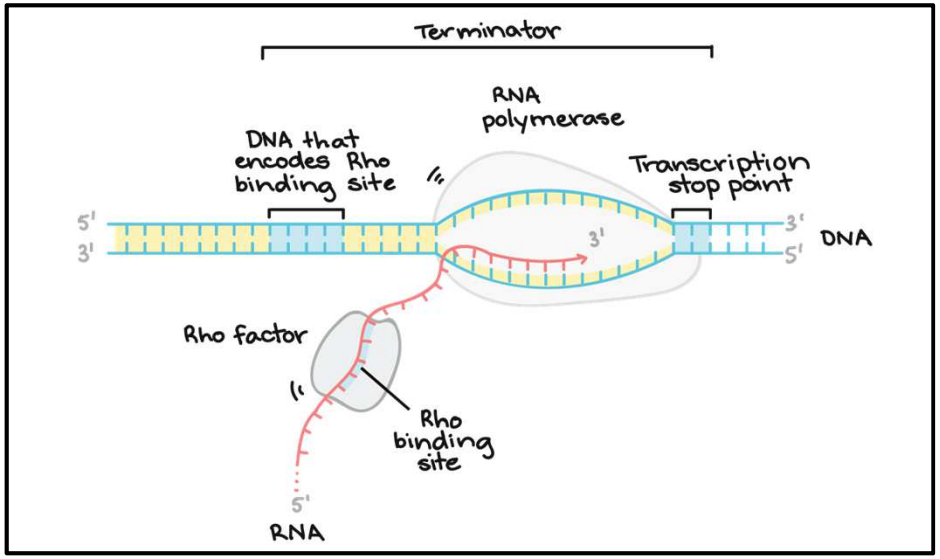
- elongace transkripce pokračuje dokud enzym nezaznamená ve struktuře DNA **terminační signál (terminátor)**
- v místě terminátoru se pohyb RNA-polymerázy zastaví, přeruší se vodíkové vazby mezi DNA a RNA a transkripční komplex se rozpadá
- dojde k uvolnění řetězce RNA
- uvolněná RNA-polymeráza může znovu asociovat se sigma faktorem a opět zahájit transkripci

Typy bakteriálních terminátorů

- terminátory závislé na ρ (Rho) - vyžadují spoluúčast proteinu
- terminátory nezávislé na Rho - fungují bez účasti proteinů

Terminátory závislé na Rho

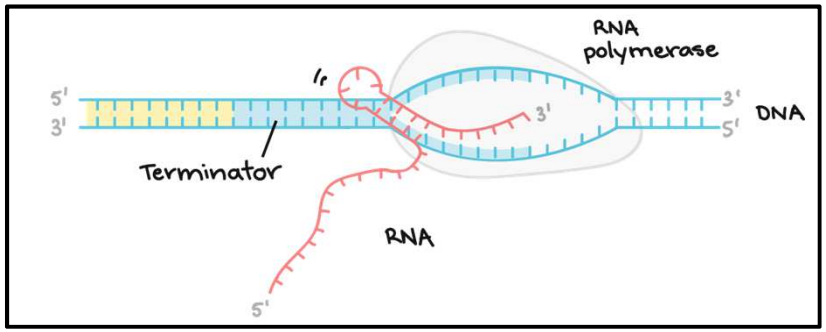
- protein Rho se váže k syntetizované RNA ve specifickém místě umístěném proti proudu transkripce od terminátoru a pohybuje se po ní ve směru 5´- 3´

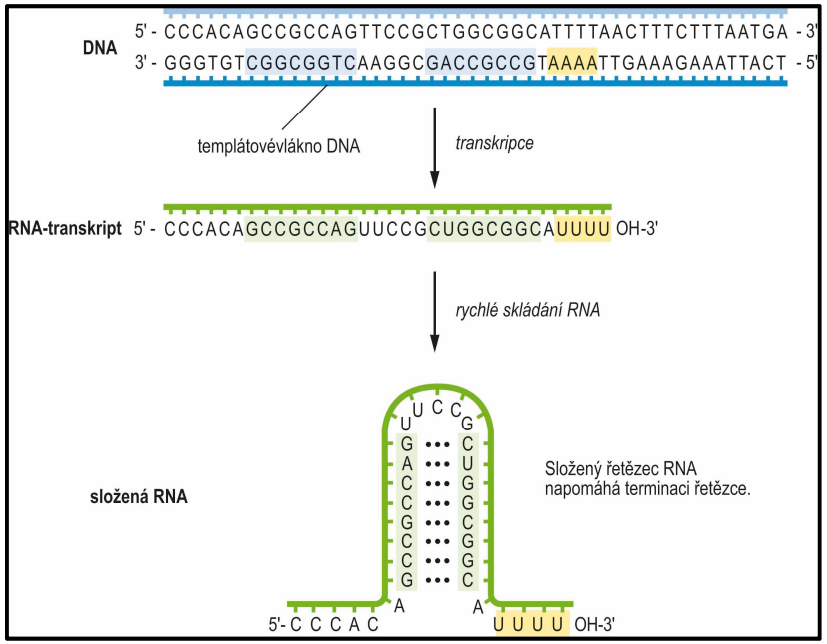


- na terminátoru se pohyb RNA-polymerázy zpomalí, protein **Rho ji dostihne a zajistí uvolnění vlákna RNA**

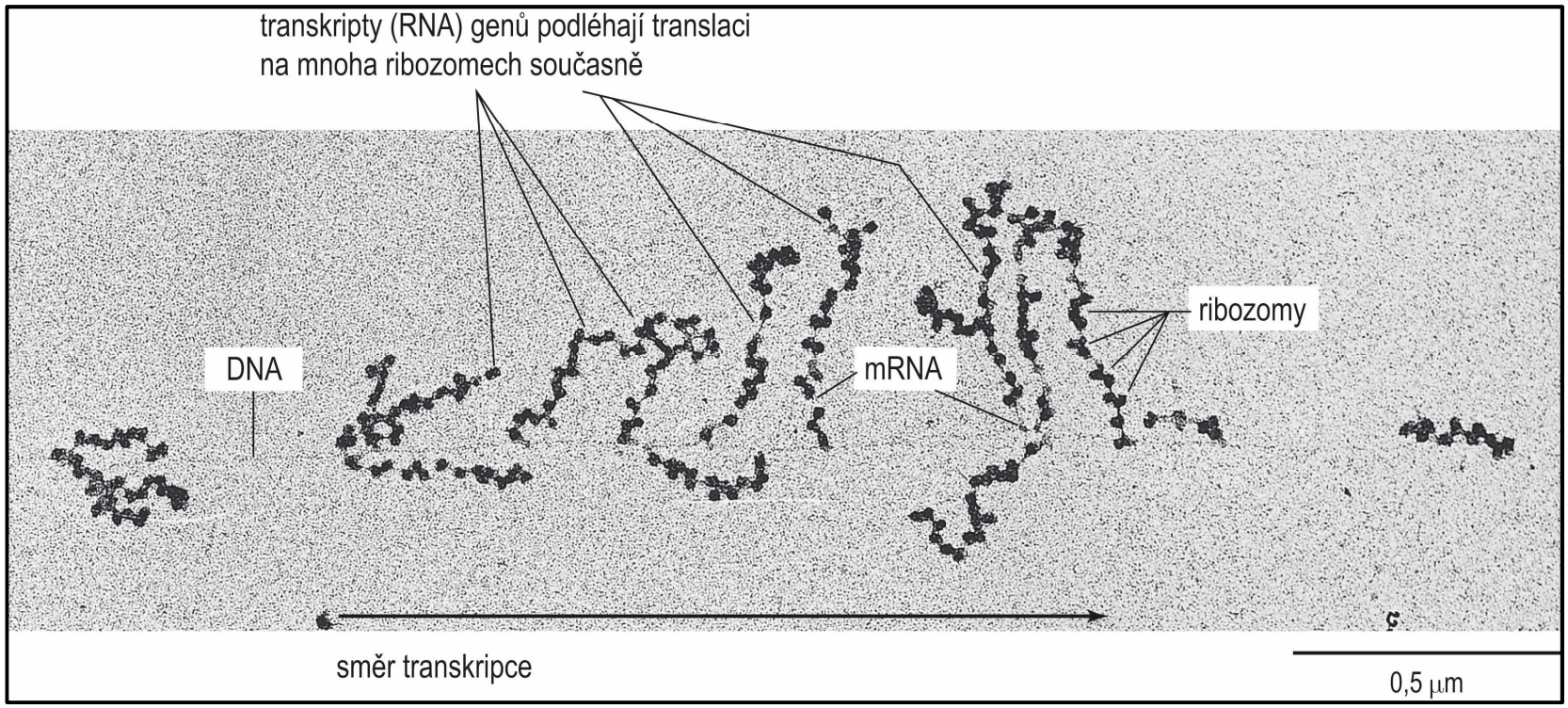
Terminátory nezávislé na Rho

- obsahují sekvence bohaté na GC, po kterých následuje šest nebo více párů AT
- po přepisu do RNA v důsledku intramolekulárního párování bází GC vzniká vlásenka
- tato vlásenka zpomaluje pohyb RNA-polymerázy, což vede k terminaci transkripce v přilehlé oblasti AU a uvolnění transkriptu





U prokaryot translace navazuje na transkripci



Take home message

- syntéza RNA probíhá ve třech fázích : iniciace, elongace a terminace
- RNA-polymerázy jsou složité vícepodjednotkové proteiny, které katalyzují syntézu vlákna RNA komplementárního templátovému vláknu DNA
- kovalentní prodlužování řetězců RNA probíhá uvnitř oblastí lokálního rozvinutí DNA
- elongace končí v místech, kde RNA-polymeráza zaznamená signál pro terminaci transkripce

Transkripce a úpravy RNA u eukaryot

odlišnosti od prokaryot:

- RNA je syntetizovaná v **jádře**, ale proteiny v cytoplazmě
- transkripty jsou **monogenní**
- populace primárních transkriptů obsahujících přepisy intronů a exonů se označuje **heterogenní jaderná RNA (hnRNA, pre-mRNA)**

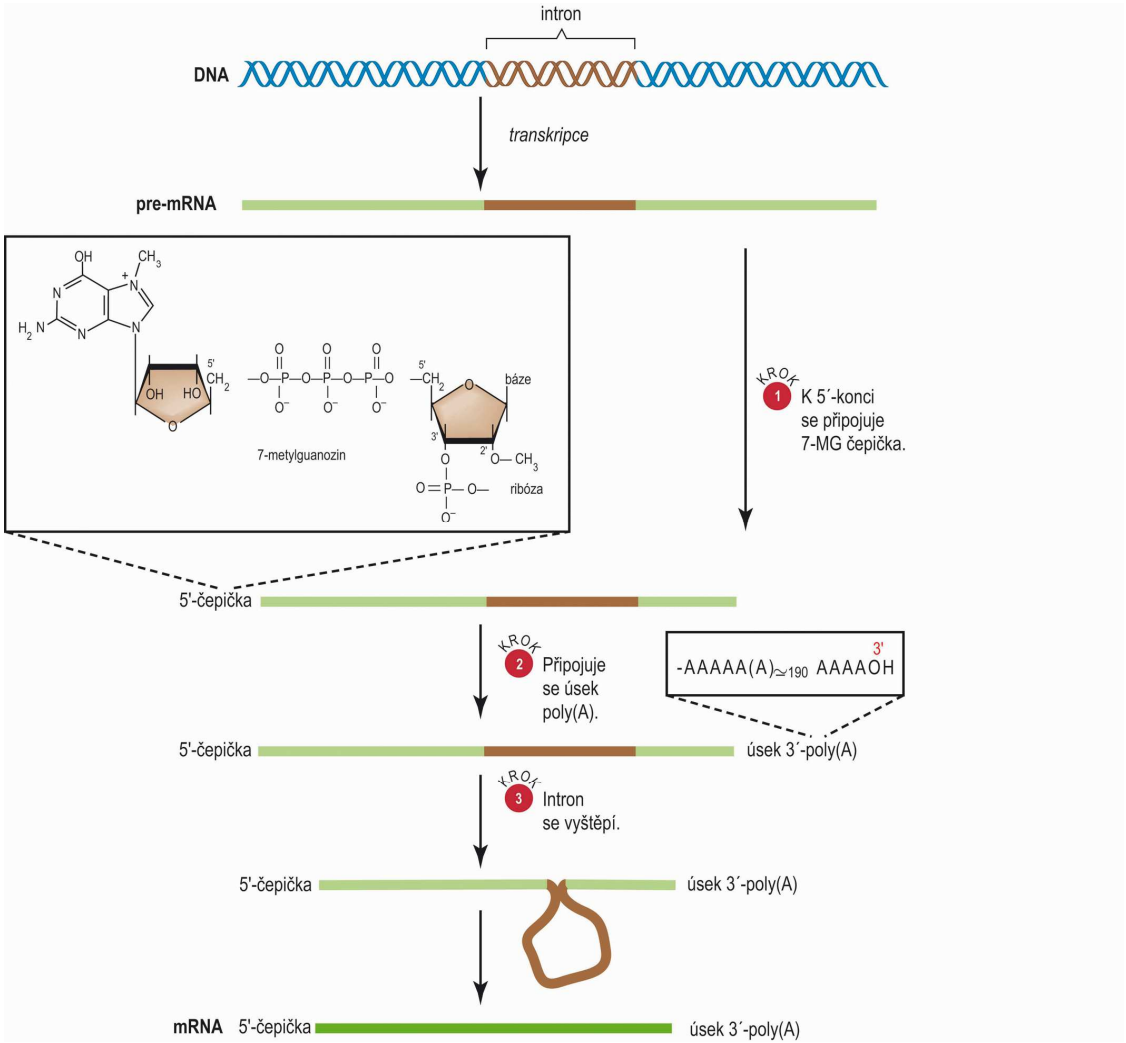
Transkripce a úpravy RNA u eukaryot

odlišnosti od prokaryot:

- **3 typy RNA-polymeráz** (I, II, III), které jsou strukturně podobné, ale přepisují různé typy genů

- primární transkripty genů kódujících polypeptidy podléhají před transportem do cytoplazmy třem **modifikacím**:
  - na 5´-konce primárních transkriptů se váže **7-metylguanozinová čepička**
  - na 3´-konce primárních transkriptů se vážou úseky **poly(A)** (tj. sekvence 20 - 200 A)
  - z primárních transkriptů se před translací **vystřihují introny**

Modifikace eukaryotických transkriptů



Tři typy RNA-polymeráz eukaryot

odlišnost v typu přepisovaných genů:

- **RNA-polymeráza I**: geny kódující rRNA (5,8S, 18S a 28S)
- **RNA-polymeráza II**: geny kódující mRNA (proteiny), miRNA, siRNA a většinu snRNA
- **RNA-polymeráza III**: geny kódující tRNA, rRNA (5S), některé snRNA a další malé RNA

TABLE 11.1

Characteristics of the Three RNA Polymerases of Eukaryotes

Enzyme	Location	Products	Sensitivity to α-Amanitin
RNA polymerase I	Nucleolus	Ribosomal RNAs, excluding 5S rRNA	No sensitivity
RNA polymerase II	Nucleus	Nuclear pre-mRNAs	Complete sensitivity
RNA polymerase III	Nucleus	tRNAs, 5S rRNA, and other small nuclear RNAs	Intermediate sensitivity

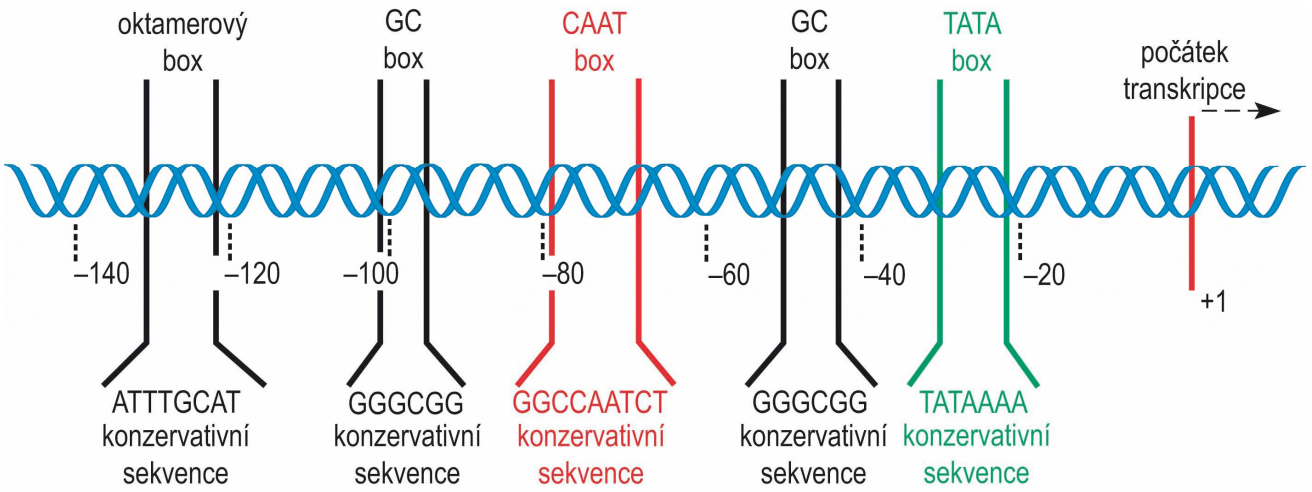
Vlastnosti eukaryotických RNA-polymeráz

- obsahují 10 nebo více podjednotek
- pro správnou funkci nutná pomoc většího počtu transkripčních faktorů
- jednotlivé typy se liší citlivostí k houbovému jedu α-amanitinu, který funguje jako inhibitor RNA polymerázy II a III
- producentem α-amanitinu je několik muchomůrek (*Amanita)*:
  - RNA-polymeráza I je zcela rezistentní
  - RNA-polymeráza II je citlivá i k nízkým koncentracím
  - RNA-polymeráza III je citlivá k vyšším koncentracím

Iniciace transkripce eukaryot

- na rozdíl od prokaryot závislá na pomocných proteinech, které se vážou na promotory a účastní se tvorby iniciačního komplexu
- teprve následně se k DNA připojuje RNA-polymeráza
- RNA-polymerázy I, II a III používají různé promotory

TATA box a **CAAT box** jsou přítomny u promotorů většiny genů RNA-pol II



Hlavní složky eukaryotických promotorů RNA-pol II

2 hlavní konzervativní elementy:

TATA box:

- konzervativní sekvence TATAAAA v netemplátovém vlákně
- umístěn v oblasti -30
- důležitý pro správné umístění transkripčních faktorů vzhledem k počátku transkripce

CAAT box:

- konzervativní sekvence GGCCAATCT v netemplátovém vlákně
- umístěn v oblasti -80
- ovlivňuje účinnost iniciace transkripce

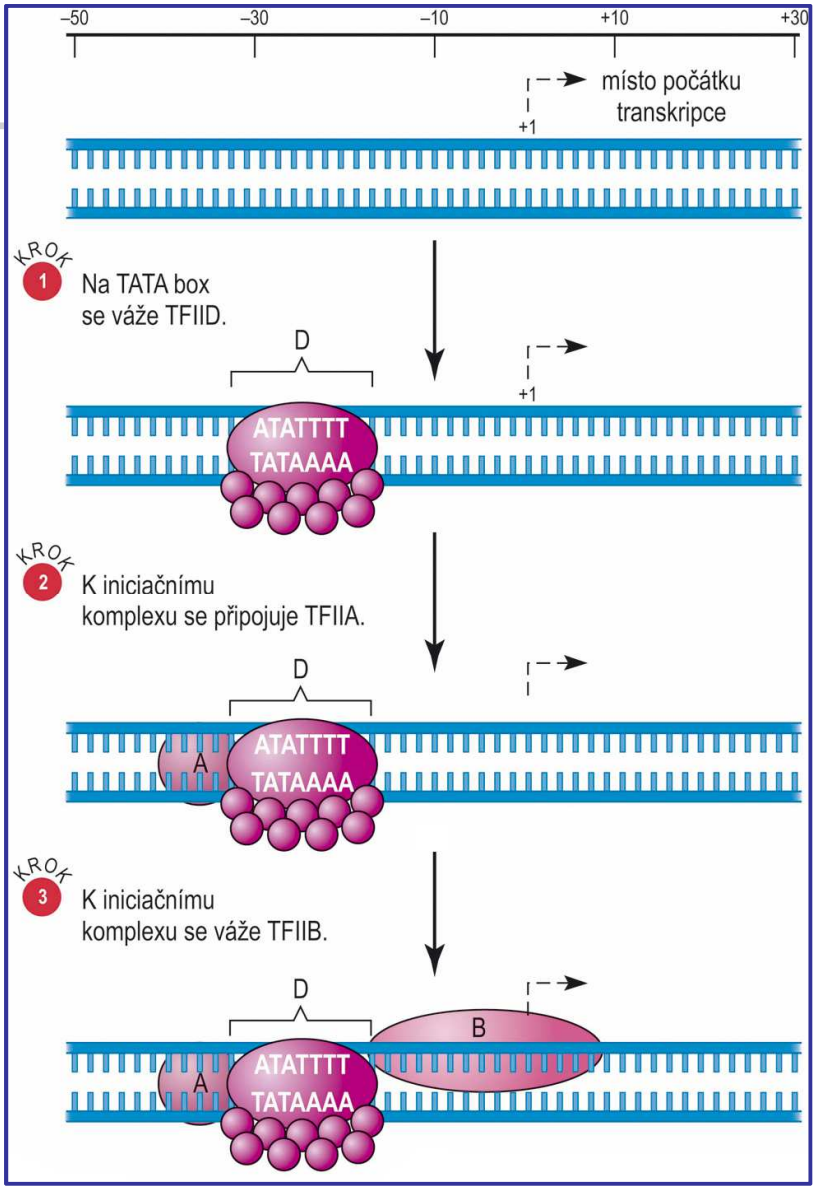
Základní transkripční faktory

- uvádějí RNA-polymerázu přesně na promotor a ke startovacímu nukleotidu
- podílejí se na rozvolnění řetězců DNA před začátkem transkripce
- uvolňují RNA-polymerázu z promotoru při přechodu z iniciace do elongace
- fungují na téměř všech promotorech RNA-polymerázy II
- označují se **TFIIX** (**T**ranscription **F**actor for Polymerase **II**, kde **X** je písmeno specifické pro daný faktor)

Iniciace transkripce RNA-pol. II

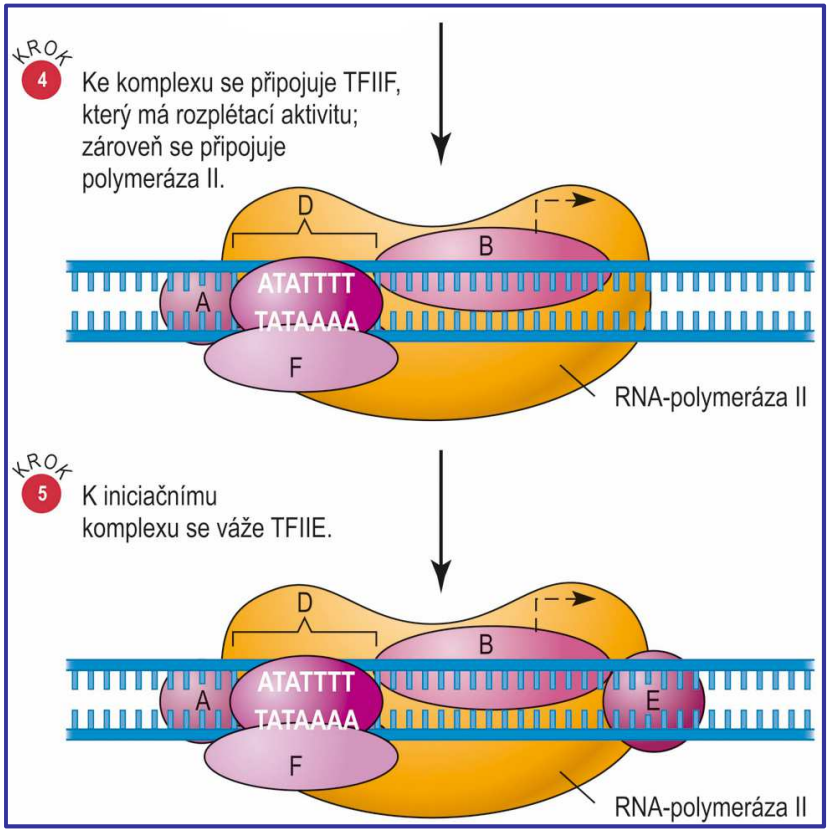
základní TF musí s promotory reagovat ve správném pořadí:

- **TFIID** (a několik malých proteinů) rozeznává a váže TATA box
- následuje vazba **TFIIA** a po něm **TFIIB**



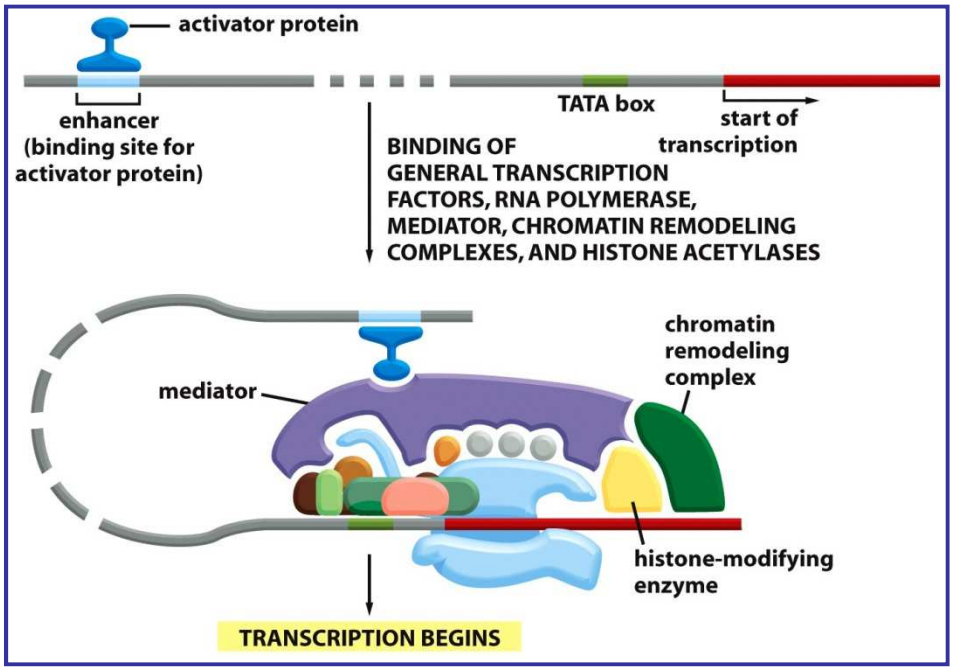
Iniciace transkripce RNA- pol. II

- **TFIIF** se nejdříve spojí s RNA-pol II a společně se připojují k iniciačnímu komplexu
- TFIIF má schopnost lokálně rozvinout DNA (podmínka iniciace)
- připojuje se **TFIIE**
- k TFIIE se pak připojují **TFIIH** a **TFIIJ**
- TFIIH má helikázovou aktivitu a pohybuje se během elongace podél DNA s RNA-polymerázou II – tvoří transkripční bubliny
- TFIIH rovněž fosforyluje RNA-polymerázu II, čímž mění její konformaci, uvolňují se základní transkripční faktory a začíná elongace



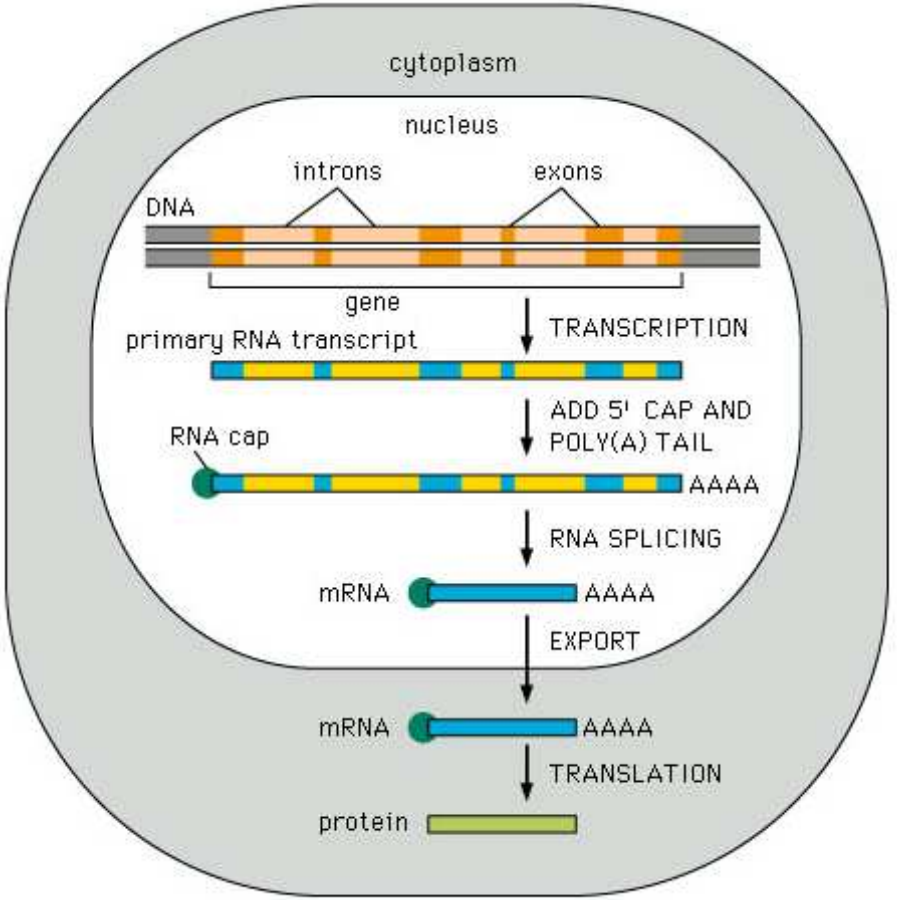
RNA-pol. II spolupracuje s dalšími proteiny

- **aktivátory transkripce:** vážou se do specifického místa DNA („enhancer“) a přitahují RNA-polymerázu II k promotoru
- **mediátorový komplex**: zprostředkovává interakce mezi aktivátory, RNA-polymerázou II a základními transkripčními faktory
- **chromatin remodelující komplexy a enzymy**: usnadňují přístup DNA v chromatinu



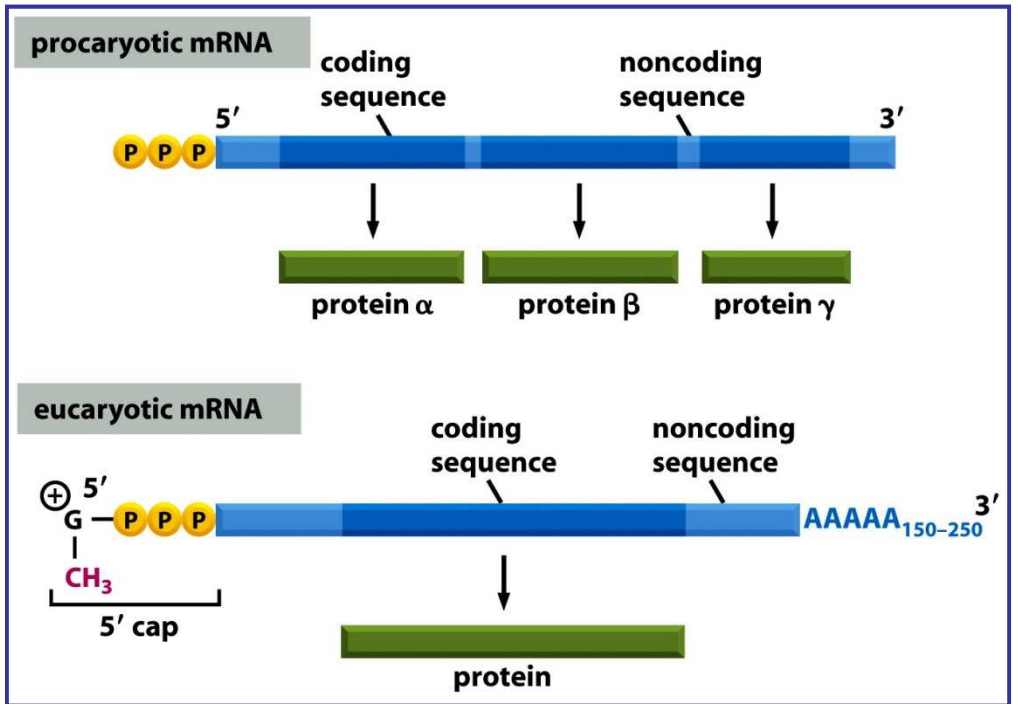
Při elongaci transkripce eukaryot se RNA upravuje

- nastává po **uvolnění iniciačních faktorů**, RNA-pol II se uvolňuje z iniciačního komplexu
- C-koncová doména RNA-pol II se **fosforyluje** a tím mění konformaci a mění se spektrum proteinů, se kterými interaguje
- RNA-polymeráza II se spojuje s elongačními faktory
- v rané fázi elongace se modifikuje 5´-konec transkriptu čepičkou



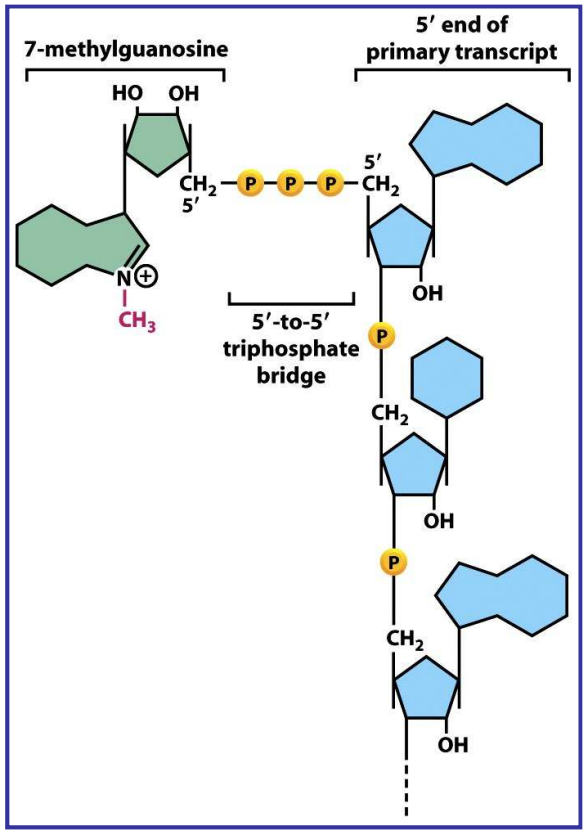
Modifikace konců transkriptů

- připojení čepičky na 5´-konec („capping“)
- připojení polyadenylačního signálu na 3´-konec
- umožňují buňce vyhodnotit, že jsou oba konce k dispozici a že transkript je intaktní před svým transportem z jádra do cytoplazmy



Modifikace 5´-konců transkriptů

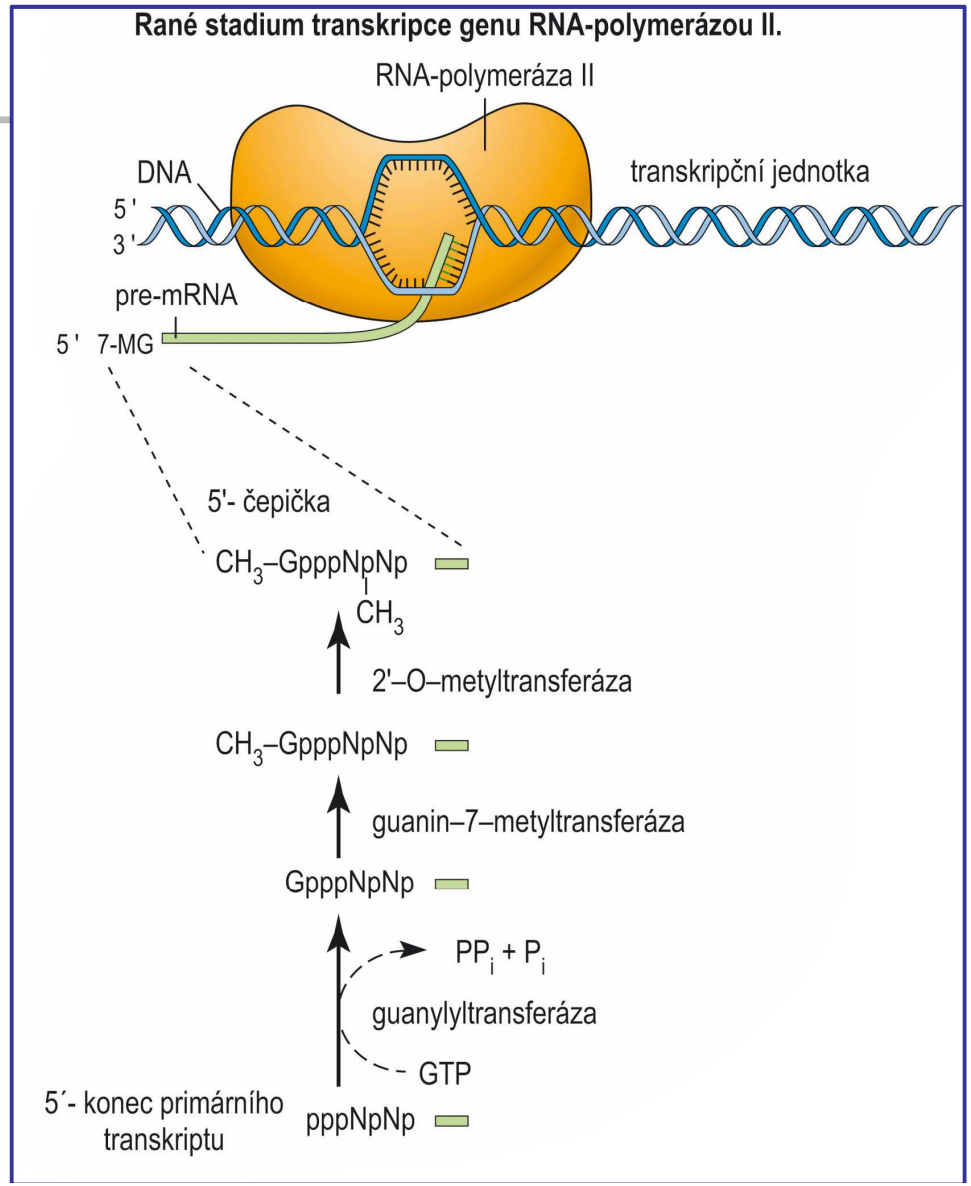
- nastává po syntéze prvních cca 25-30 nukleotidů mRNA
- připojení 7-metylguanosinu (čepičky) na 5´-konec



Modifikace 5´-konců transkriptů

- probíhá ve 3 navazujících krocích:

- **fosfatáza** odstraňuje fosfát z 5´-konce vznikajícího transkriptu
- **guanylyltransferáza** na konec naváže GTP (vazba 5´-5´)
- **metyltransferáza** na guanozin naváže metylovou skupinu



K čemu je dobrá čepička?

Čepička („cap“)

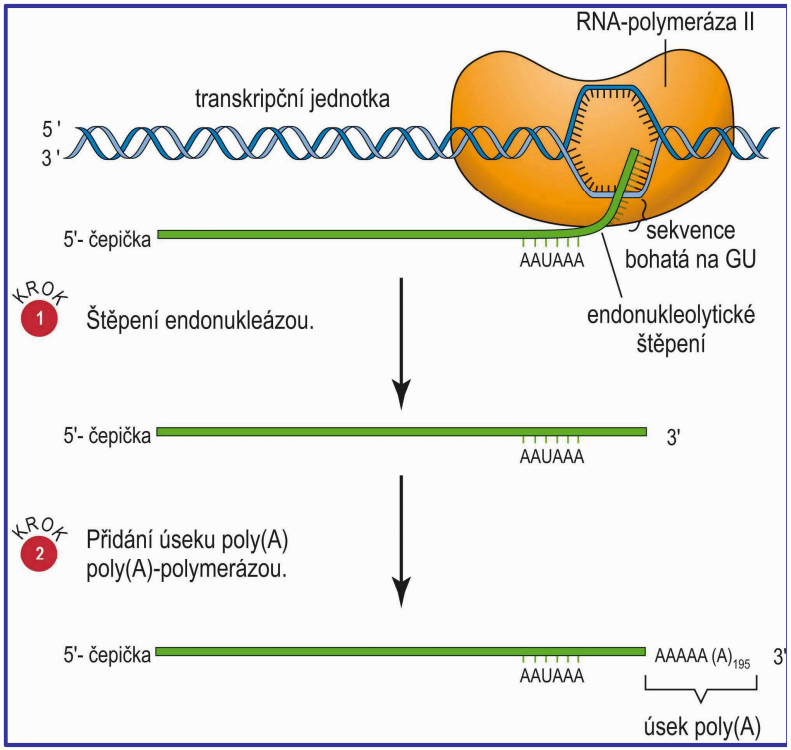
- pomáhá buňce odlišit mRNA od jiných typů RNA
- představuje vazebné místo pro „cap-binding complex“, který napomáhá sestřihu a exportu transkriptu z jádra
- účast na iniciaci translace – rozeznávána iniciačními proteiny
- ochrana transkriptů před nukleázami

Terminace transkripce a přidání poly(A)

- transkripce probíhá za místo, které se stane 3´-koncem transkriptu
- v místě vzdáleném 10-30 nukleotidů po proudu transkripce od konzervativní sekvence AAUAAA dochází k endonukleolytickému štěpení
- po rozštěpení RNA se připojuje k 3´-konci transkriptu úsek cca 200 adenozinmonofosfátových zbytků - poly(A); katalyzováno **poly(A)-polymerázou**

Význam polyadenylace:

- zvýšení stability transkriptu
- účast na transportu transkriptu do cytoplazmy

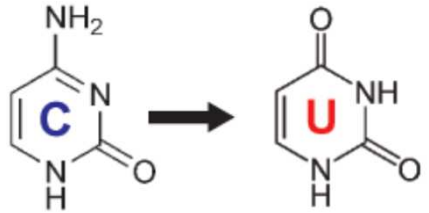


Editace RNA

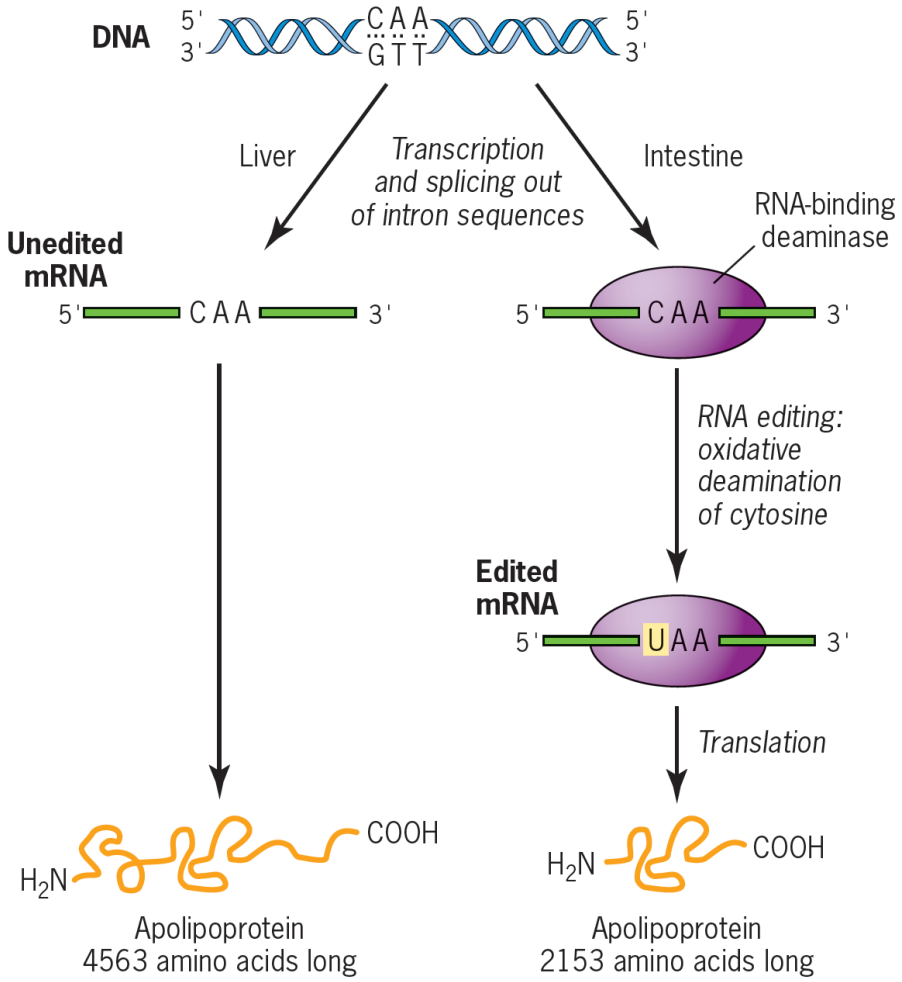
- posttranskripční úpravy mRNA
- výjimka z pravidla, že se genetická informace v průběhu exprese nemění
- změna informace v transkriptu:
  - v důsledku změny struktury jednotlivých bází
  - inzercí nebo delecí zbytků uridinmonofosfátu

Editace RNA změnou bází

- vzácná, objevena při studiu exprese genu pro apolipoprotein
- apolipoproteiny zajišťují transport některých tuků v krvi
- v játrech mRNA apoB kóduje velký protein (4563 AK)
- ve střevě mRNA apoB kóduje menší protein (2153 AK)
- důsledek přeměny C na U vedoucí k terminačnímu kodonu UAA uvnitř pre-mRNA apoB
- přeměna C na U katalyzována sekvenčně specifickým proteinem, který zajišťuje oxidativní deaminaci cytozinu



Editace RNA změnou bází



Editace inzercí nebo delecí zbytků uridinmonofosfátu

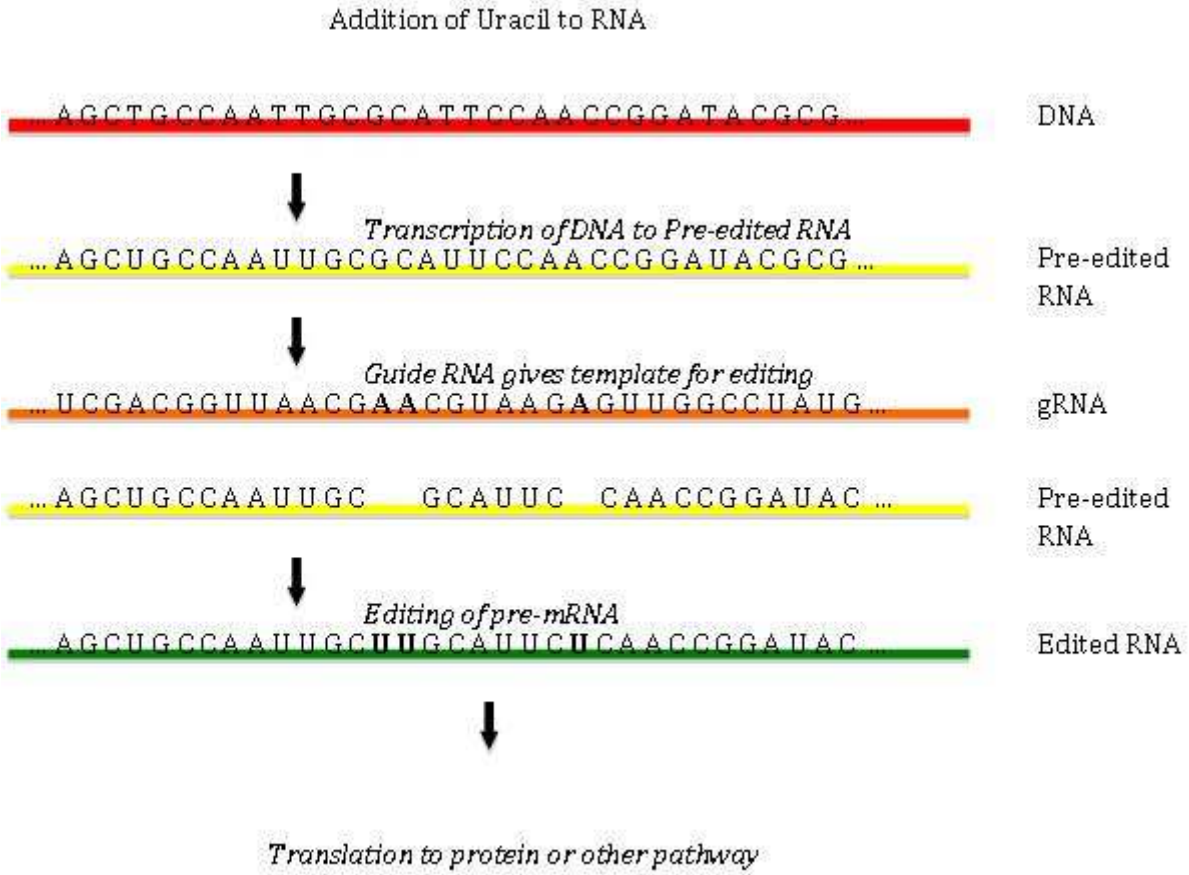
- popsána u mitochondrií Trypanosom (původců spavé nemoci)

Editace inzercí nebo delecí zbytků uridinmonofosfátu

- transkripty se pozměňují inzercí (vzácněji delecí) zbytků uridinmonofosfátu
- následkem je změna kódujícího smyslu transkriptu
- zprostředkováno **vedoucími (guide) gRNA**, což jsou produkty transkripce specifických mitochondriálních genů
- určitá komplementarita mezi vedoucími RNA a úseky pre-mRNA, které mají být editovány umožňuje jejich částečné párování
- některé báze A v gRNA zůstávají po vazbě na pre-mRNA nespárovány
- editaci katalyzuje multiproteinový komplex: **editozom**, který se pohybuje po částečně dvouřetězcovém hybridu pre-mRNA-gRNA
- když narazí na nespárované nukleotidy (A), gRNA slouží jako templát, podle kterého se do pre-mRNA začleňují U (komplementární k nespárovaným A v gRNA)

- pozůstatek dávného světa RNA?
- primitivní způsob regulace genové exprese?

Editace inzercí nebo delecí zbytků uridinmonofosfátu



Přerušované geny eukaryot

- 1977: objev nekódujících sekvencí – **intronů** („intervening sequences“) - které přerušují sekvence s kódující funkcí - **exony** (exprimované úseky)

Phillip Allen Sharp (*1944)

spoluzakladatel firmy biotechnologické firmy Biogen Idec

Nobelova cena za fyziologii a medicínu v roce 1993

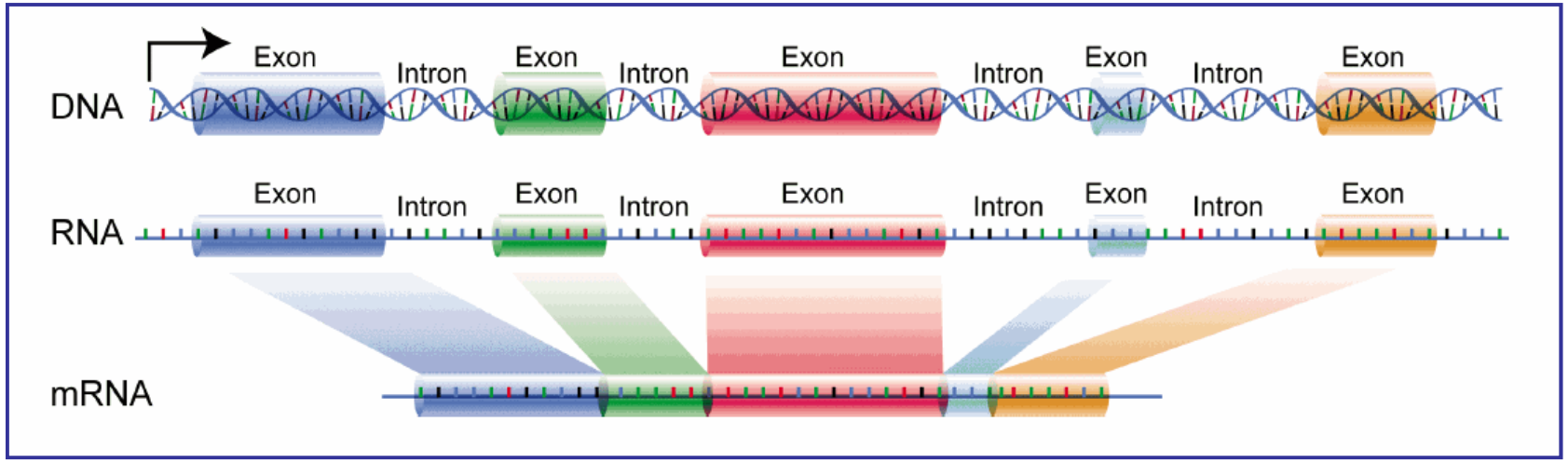
Richard J. Roberts (*1943)

NEW ENGLAND BioLabs®

vedoucí pracovník biotechnologické firmy New England Biolabs

Přerušované geny eukaryot

- počet intronů a jejich délka u různých genů značně kolísá
- exony i introny jsou podrobeny transkripci za vzniku hnRNA
- přepisy intronů jsou následně z hnRNA odstraněny sestřihem za vzniku zralé mRNA
- teprve zralá mRNA se transportuje do cytoplazmy, aby se podrobila translaci



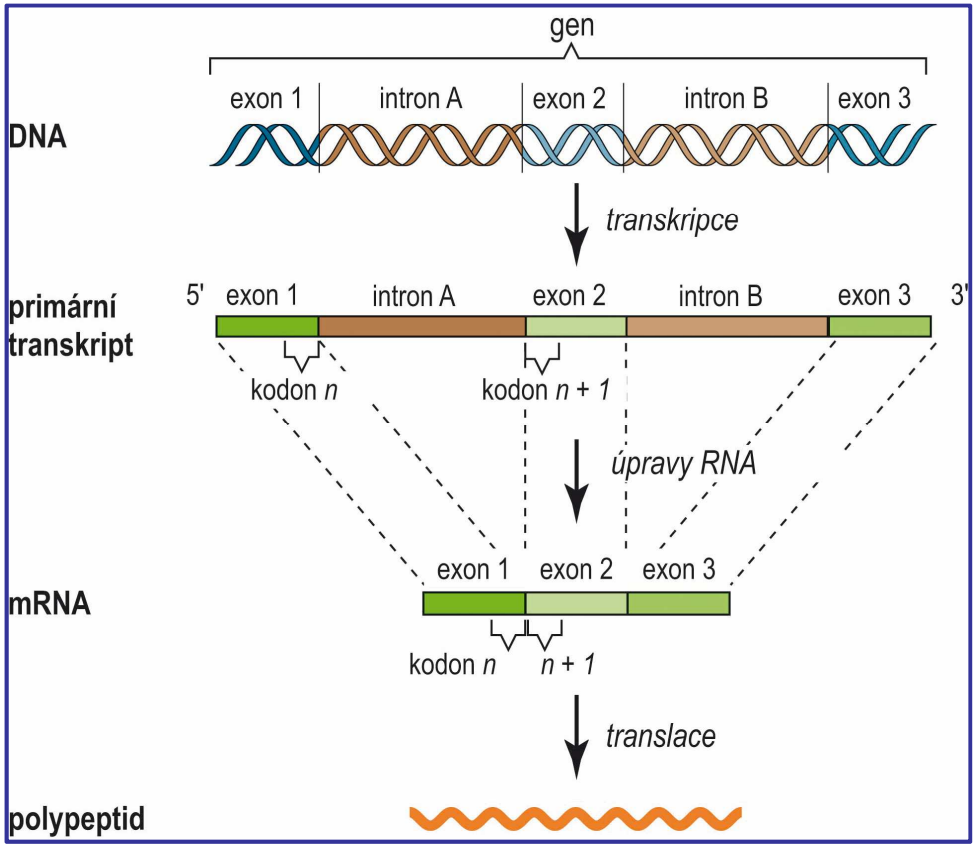
Biologický význam intronů

- vliv na genovou expresi (vazebná místa pro regulátory)
- poskytují evoluční výhodu zvýšením rychlosti,
  se kterou se mohou exony přeskupovat rekombinací
- podíl na alternativním sestřihu
- zdroj regulačních RNA

Odstranění intronů: sestřih („splicing“) RNA

- požadavek vysoké přesnosti (na 1 nukleotid)
- na hranicích intron/exon jsou konzervativní sekvence:

exon-GU....intron....AG-exon



Typy intronů

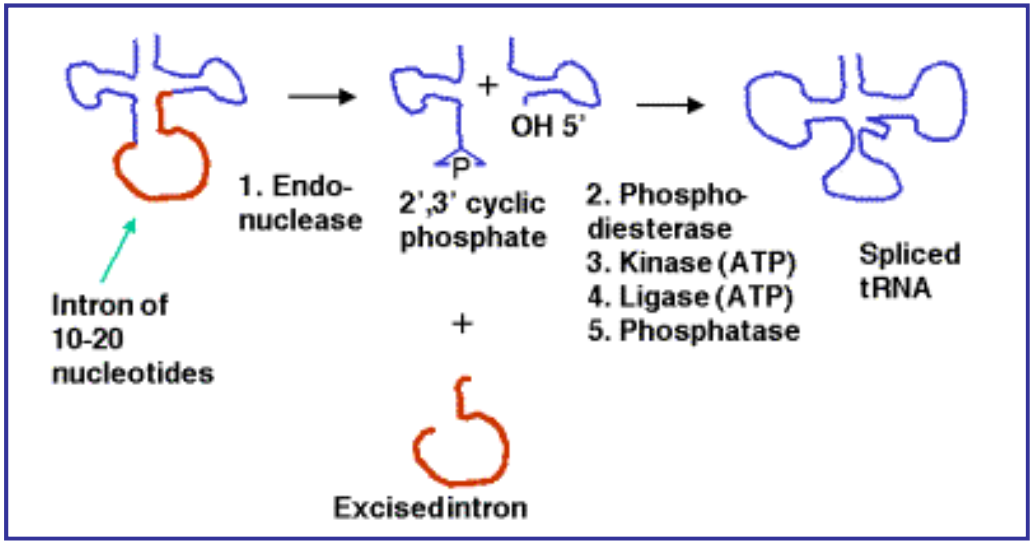
- introny jaderné pre-mRNA
  - typické dinukleotidy na hranicích intron/exon
  - konzervativní sekvence v blízkosti 3´-konce
  - netvoří žádnou charakteristickou sekundární strukturu
  - vyštěpují se pomocí spliceozomů

- introny v organelách (mitochondrie, chloroplasty)
  vyštěpují se z RNA autokatalyticky („auto-splicing“, „self-splicing“, samosestřih)
  - nepožadují proteinovou enzymovou aktivitu

Odstranění intronů: tři různé mechanismy

- introny prekurzorů **tRNA** se vyštěpují přesným endonukleolytickým **štěpením**, po kterém následuje **ligace**
- introny některých prekurzorů rRNA se vyštěpují **autokatalyticky** (bez účasti proteinů)
- introny prekurzorů jaderných **mRNA** se vyštěpují dvoufázovou reakcí, kterou zajišťují ribonukleoproteinové částice **spliceozomů**

Sestřih prekurzorů tRNA



fáze 1:

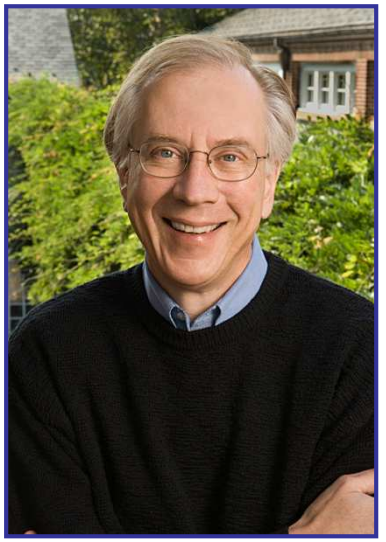
- **sestřihová endonukleáza** navázaná k jaderné membráně přeruší prekurzorovou tRNA přesně na koncích intronu
- na specifitě reakce se podílí trojrozměrná struktura RNA

fáze 2:

- **sestřihová ligáza** spojí příslušné dva fragmenty tRNA k sobě za vzniku zralé tRNA

Autokatalytický sestřih prekurzorů rRNA (samosestřih)

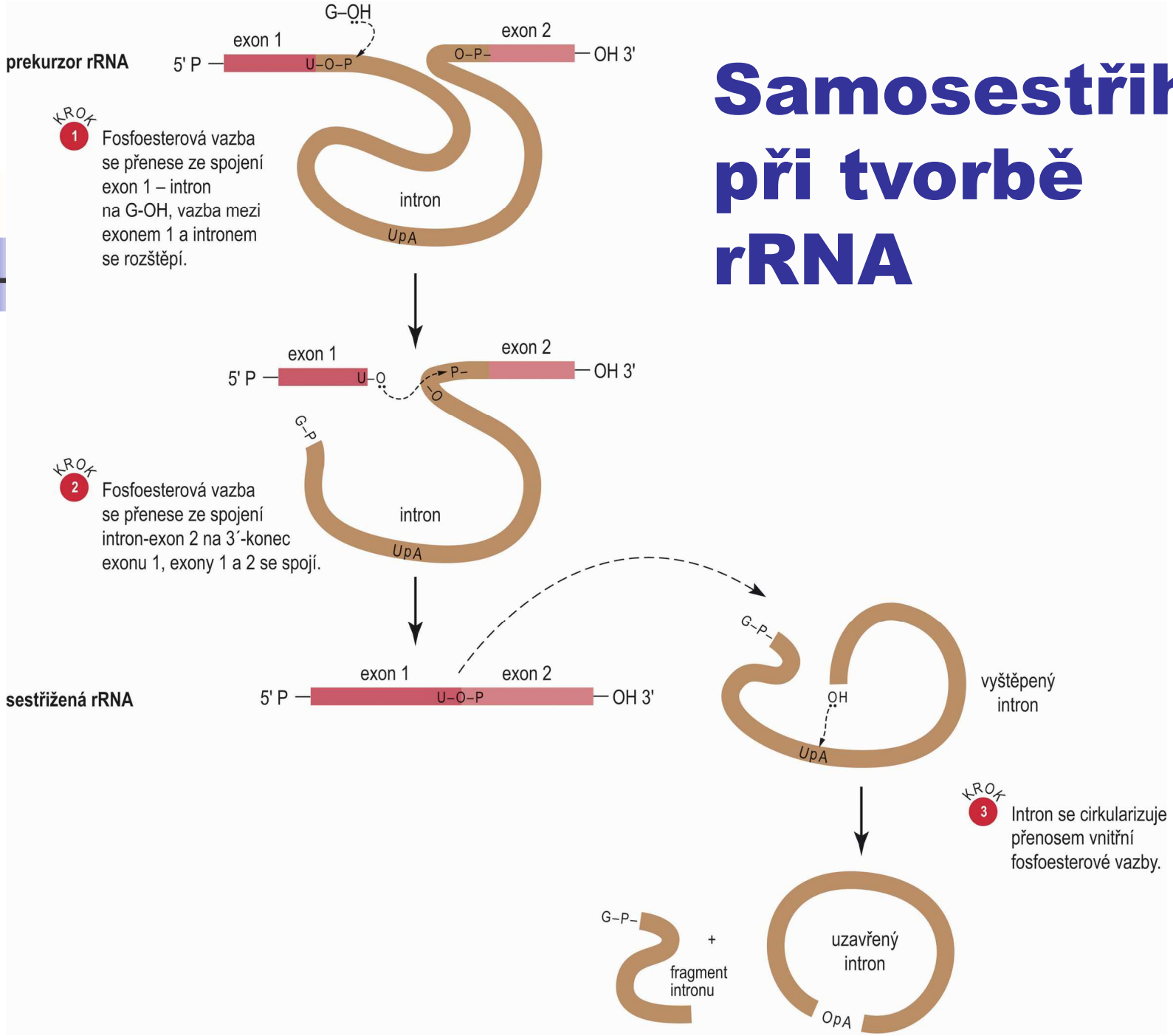
- nevyžaduje externí zdroj energie
- nevyžaduje katalytickou aktivitu proteinu
- probíhá formou sérií přenosů fosfoesterových vazeb; žádná nově nevzniká, ani nezaniká (transesterifikace)
- požadavek na guaninový nukleotid s volnou 3´-OH skupinou (GTP, GDP nebo GMP)
- intron se postupným přenosem fosfoesterových vazeb se zapojením volného G vyštěpuje a cirkularizuje (vzniká lasovitá struktura)
- sekundární struktura intronu zajistí požadovanou blízkost obou spojení intron-exon



Thomas R. Cech
(*1947)

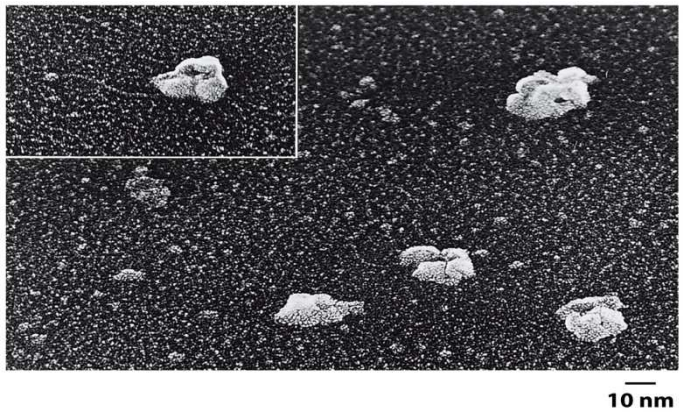
- mechanismus objeven u prekurozorů rRNA *Tetrahymena thermofila*, ale probíhá rovněž u dalších nižších eukaryot a u prekurzorů rRNA, tRNA a mRNA mitochondrií a chloroplastů různých druhů

Samosestřih při tvorbě rRNA



Sestřih pre-mRNA zajišťují spliceozomy

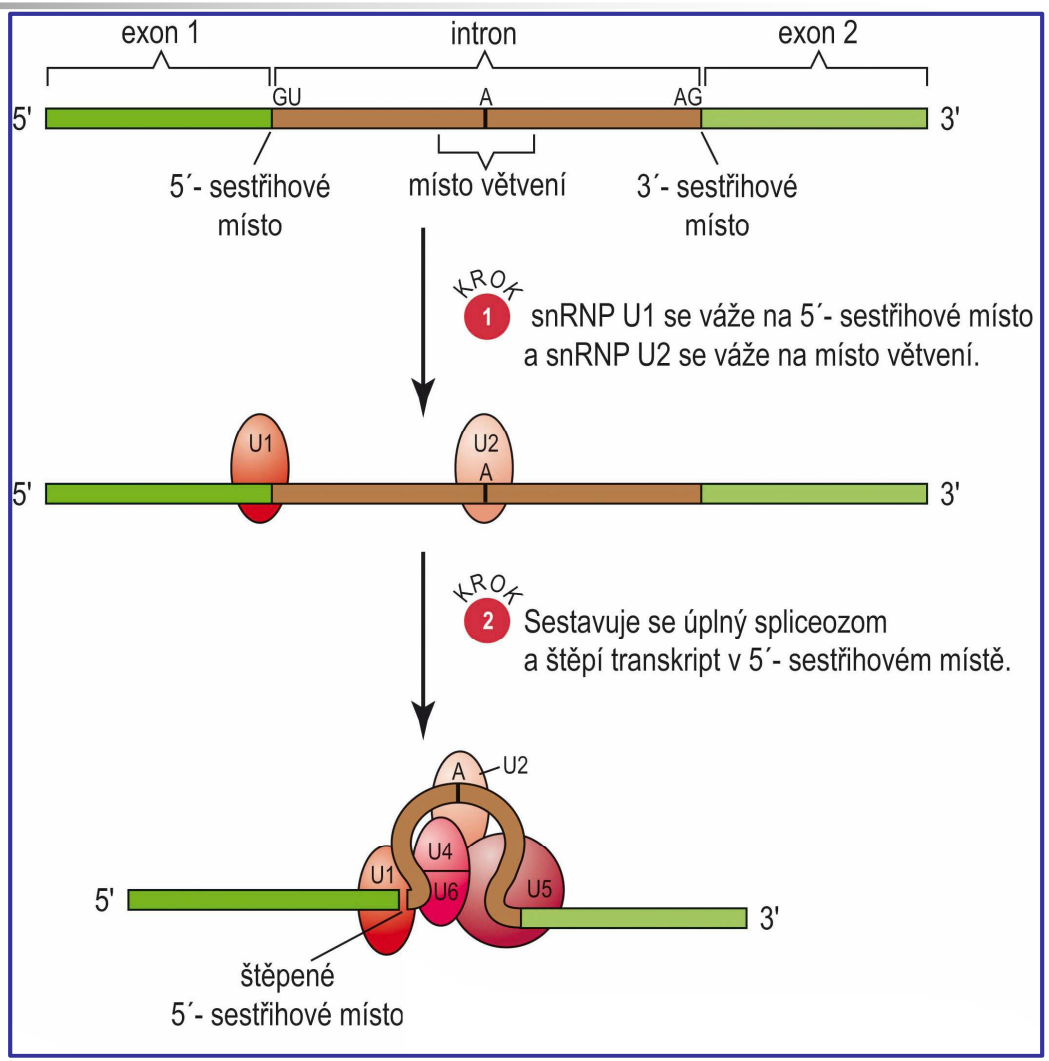
Spliceozom



- komplex cca **40 proteinů** a **RNA** připomínající ribozom
- obsahuje malé molekuly RNA, tzv. **snRNA** (U1, U2, U4, U5, U6)
- některé z nich se spojují s proteiny za vzniku **snRNP** (small nuclear ribonucleoproteins)

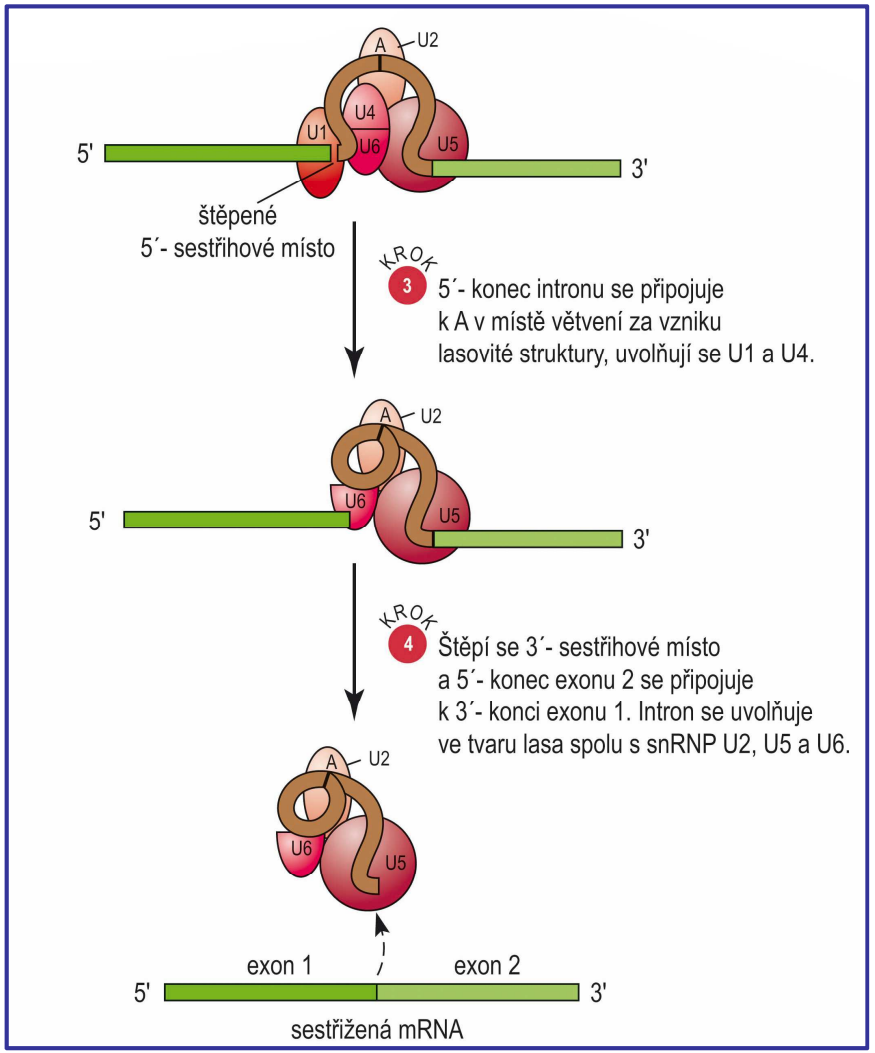
Funkce snRNP při sestřihu

- snRNP U1 a U2 se vážou na 5´-sestřihové místo (GU) a A uvnitř intronu v místě budoucího větvení
- podílejí se na sestavení spliceozomu, přerušení cukr-fosfátové kostry v 5´- sestřihovém místě

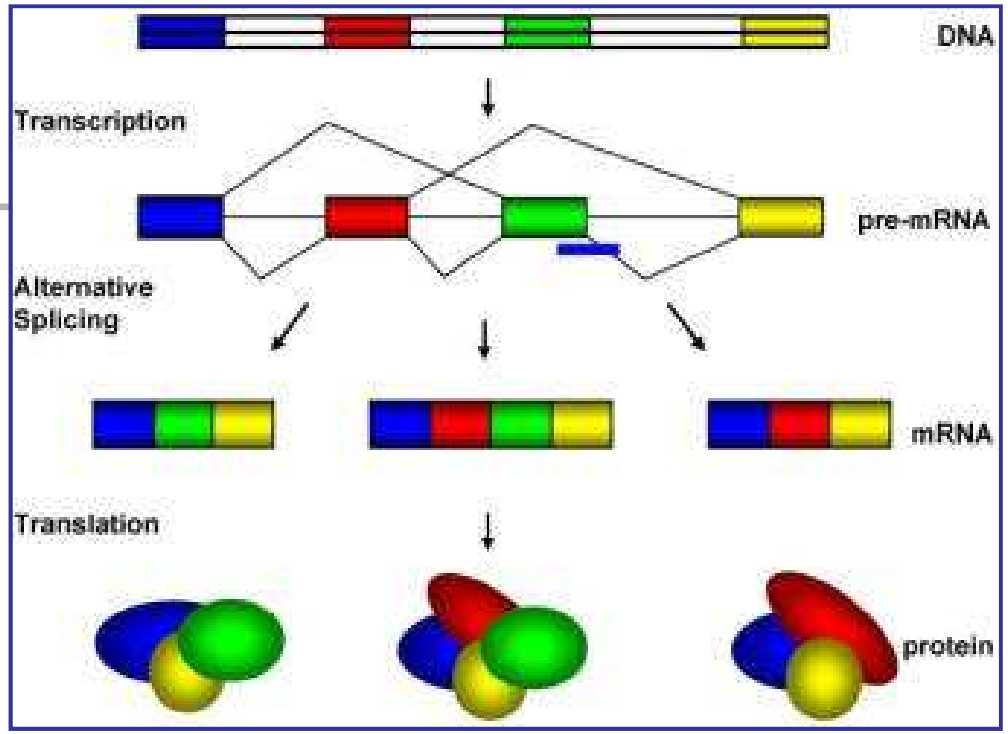


Funkce snRNP při sestřihu

- vytvoření vazby mezi koncovým G a vnitřním intronovým A
- vzniká lasovitá struktura
- ze spliceozomu se uvolňují U1 a U4
- štěpí se 3´-sestřihové místo, exony se spojí obvyklou 5´- 3´ fosfodiesterovou vazbou



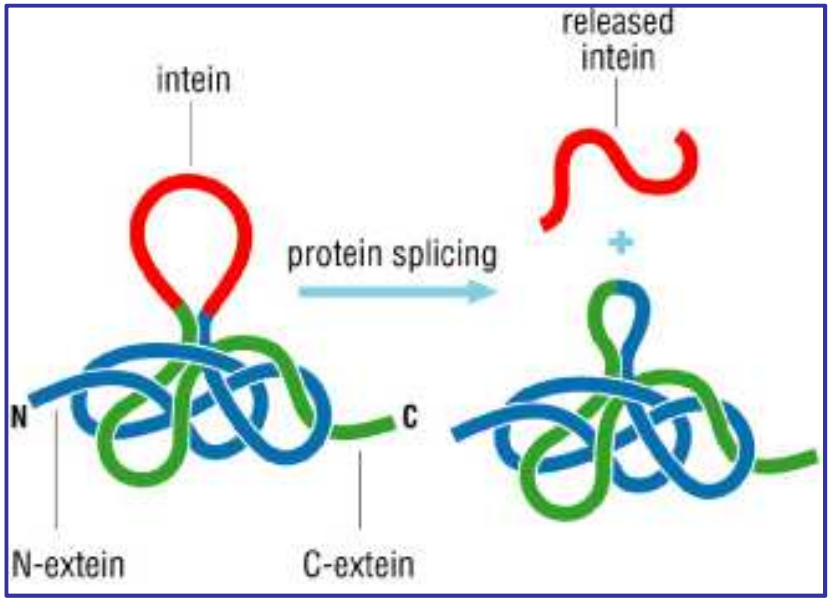
Alternativní sestřih

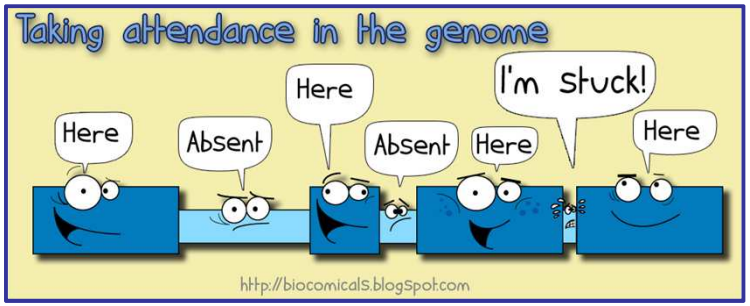


- různé spojování stejných exonů
- odhad: 95 % genů podléhá alternativnímu sestřihu
- zdroj rozmanitosti izoforem proteinů kódovaných stejnými geny (u člověka cca 20 000 genů, 150 000 proteinů)
- funkce proteinových izoforem se mohou podstatně lišit
- varianty sestřihu mohou být preferovány podle aktuálních podmínek, tkáňové specifity, apod.
- účast regulačních proteinů, které se vážou na DNA (enhancery, silencery) a napomáhají sestřihu v určité variantě

Sestřih proteinů

- objeven v roce 1990 (Anraku a Stevens)
- jiný mechanismus, stejný princip jako u sestřihu RNA
- vyštěpení vnitřní části proteinu (inteinu)
- fúze zbývajících částí proteinu (exteinů)
- popsán u bakterií, archeí, rostlin, kvasinek i člověka



Take home message

- intronové sekvence se vyštěpují z transkriptů RNA před transportem do cytoplazmy
- introny prekurzorů tRNA se vyštěpují postupným působením sestřihové endonukleázy a ligázy
- introny některých typů RNA podléhají autokatalytickému sestřihu
- introny jaderných pre-mRNA se vyštěpují působením ribonukleoproteinových struktur zvaných spliceozomy
- vyštěpení intronů musí být přesné na úrovni jednotlivých nukleotidů, aby bylo zajištěno správné čtení exonových kodonů při translaci
- variabilita produktů alternativního sestřihu zvyšuje četnost proteinových variant vytvořených expresí téže genetické informace