



## **Regulace (kontrola) genové exprese**

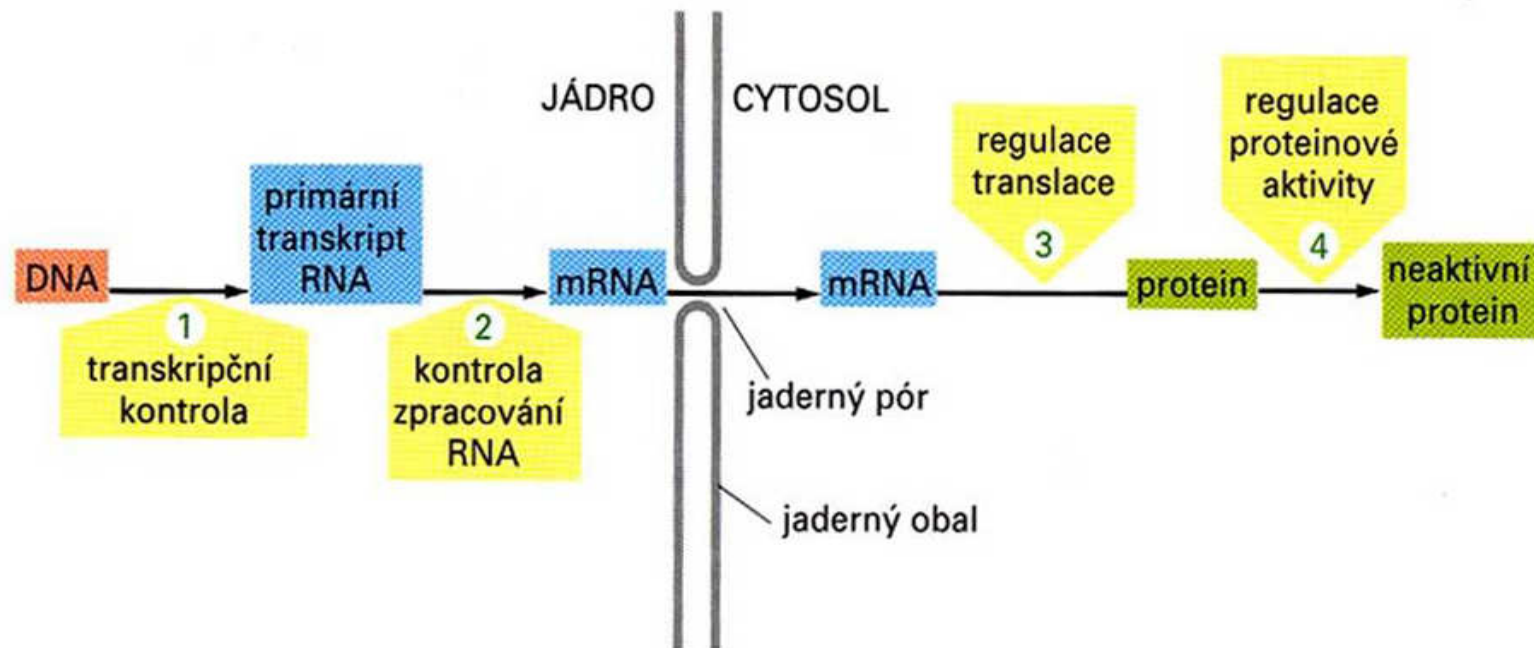
**Mechanismy, zajišťující expresi genů ve správnou dobu a na správném místě (časoprostorová regulace).**

**Odpovědi na signály z prostředí nebo signály z jiných buněk, tkání a orgánů**

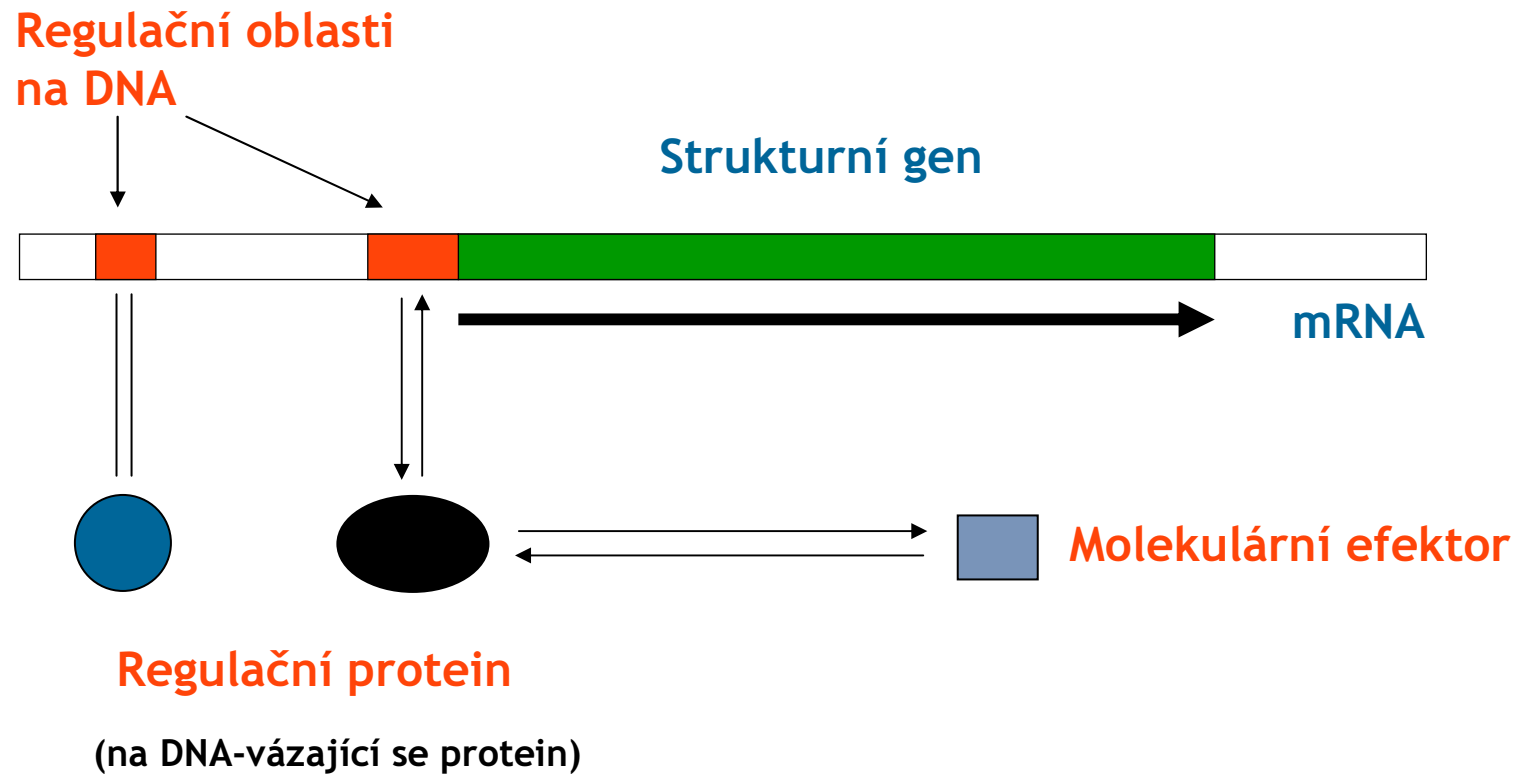
# Roviny kontroly genové exprese

1. Kde a jak často je daný gen transkribován (**transkripční kontrola**)
2. Jak je primární transkript sestřižen (**kontrola posttranskripční - sestřihová**)
3. Výběr RNA, které budou transportovány z jádra do cytoplazmy (**kontrola transportu RNA**)
4. Výběr mRNA, které budou překládány na ribozomech (**translační kontrola**)
5. Selektivní destabilizace určitých mRNA v cytoplazmě (**degradace mRNA**)
6. Selektivní aktivace, inaktivace a kompartmentizace specifických proteinů poté, co byly nasyntetizovány (**kontrola proteinové aktivity - posttranslační kontrola, transport**)

# Úrovně kontroly exprese genů u eukaryot



# Regulace genové exprese na úrovni transkripce



Regulace je zprostředkována interakcemi regulačních proteinů s regulačními sekvencemi na DNA

# Vazba regulačního proteinu na DNA

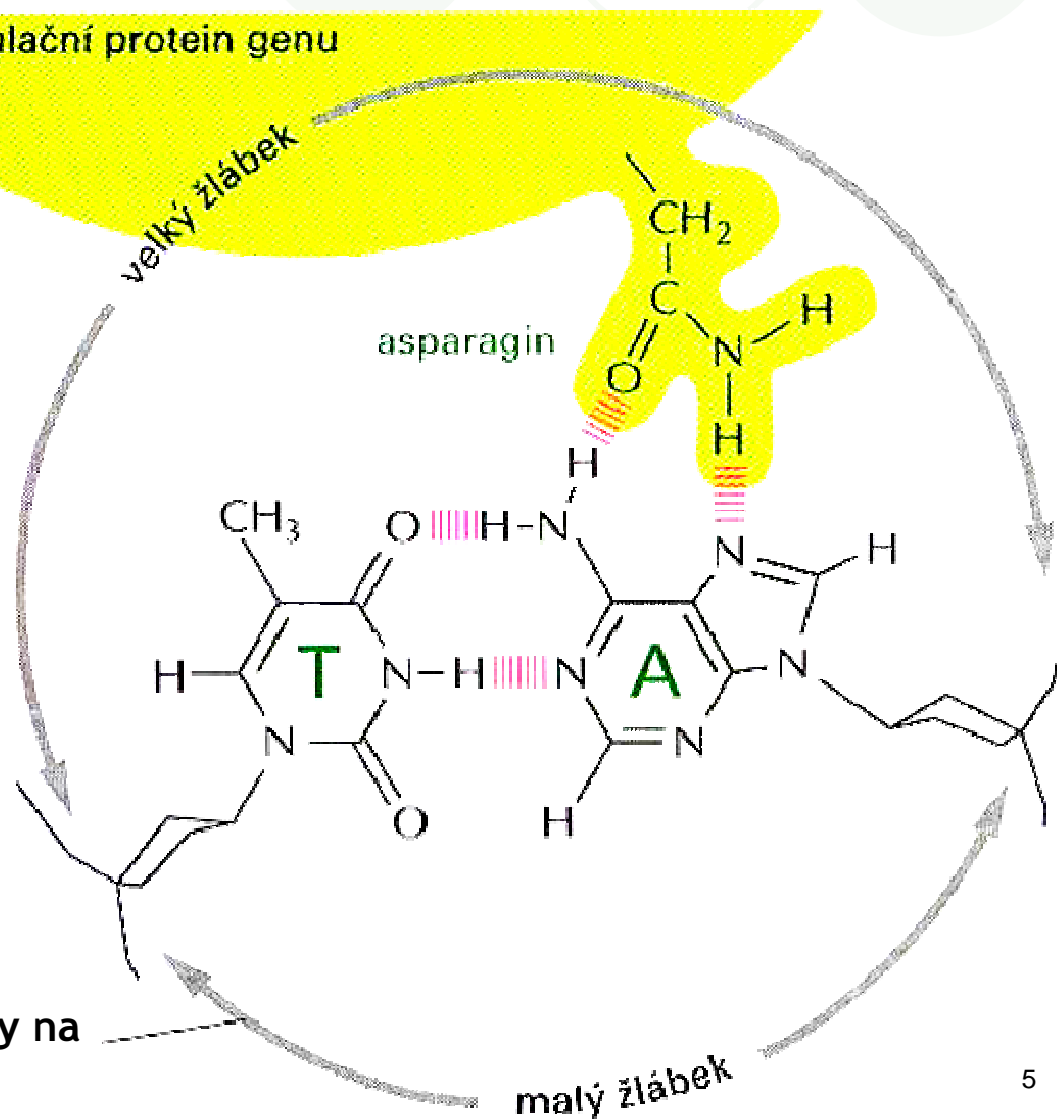
Interakce proteinu s DNA probíhá prostřednictvím 10-20 kontaktů mezi různými aminokyselinami a funkčními skupinami bází

vnější mez cukr-fosfátové kostry na vnější straně dvojšroubovice

regulační protein genu

velký žlábek

asparagin

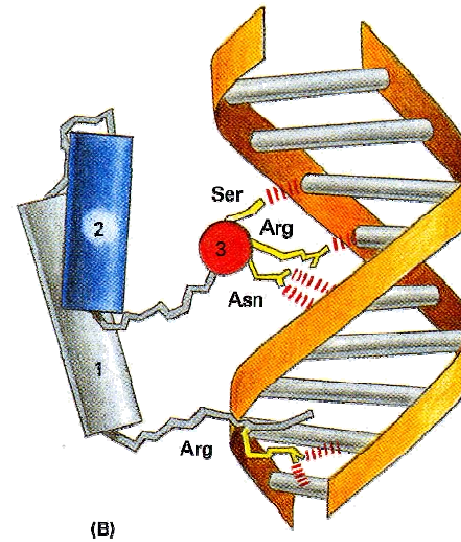
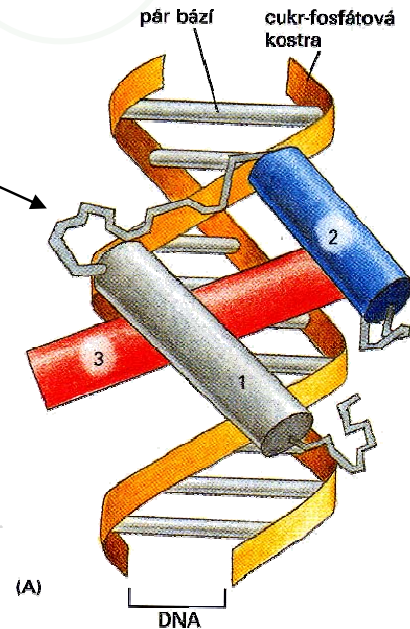


malý žlábek

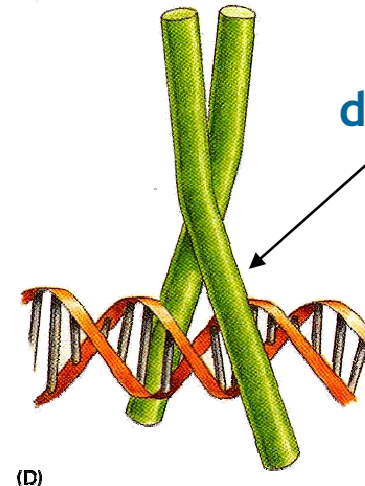
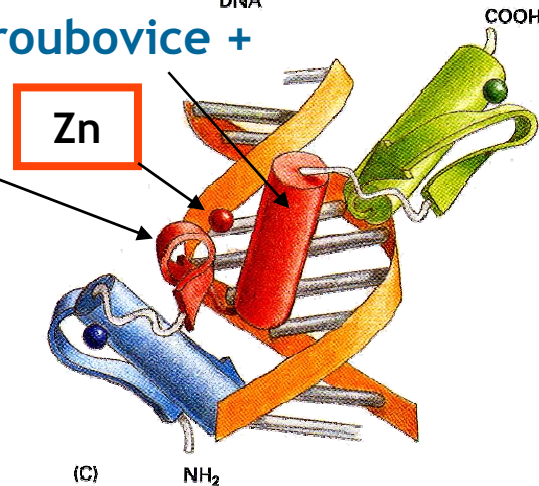
# DNA-vazebné motivy proteinů (DBD domény)

Homeodoména  
- tři spojené  
 $\alpha$ -šroubovice

Vazba proteinu  
do velkého  
žlábků DNA



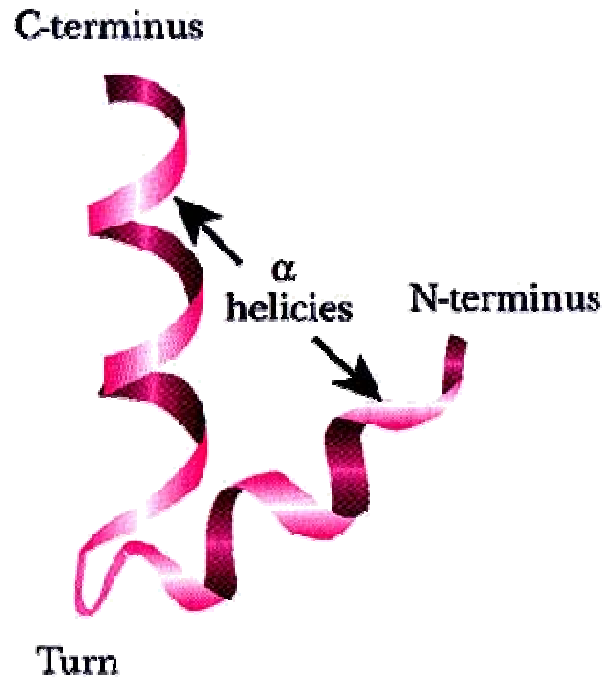
Zinkový prst  $\alpha$ -šroubovice +  
 $\beta$ -struktura



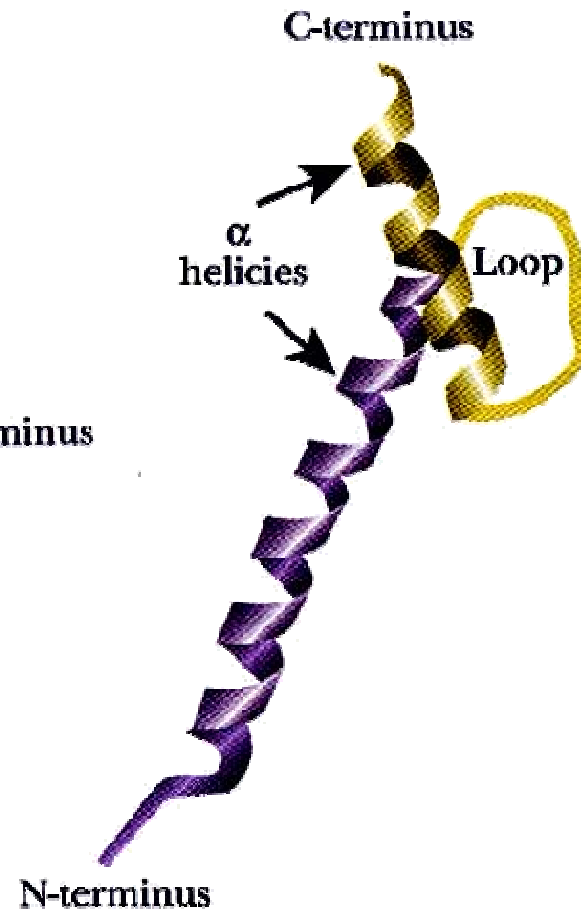
Leucinový zip  
dvě  $\alpha$ -šroubovice

# Motivy regulačních proteinů

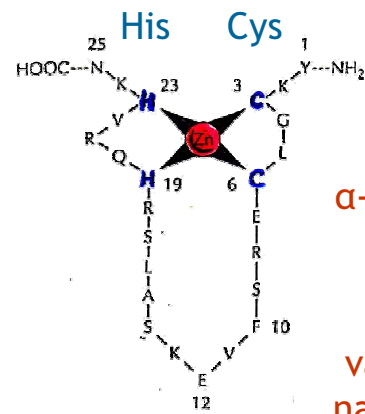
Helix-otáčka-helix  
(HTH)



Helix-smyčka-helix (HLH)

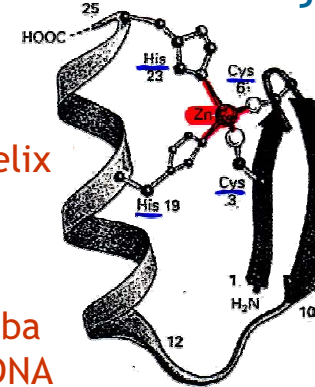


# Proteiny s motivem zinkových prstů



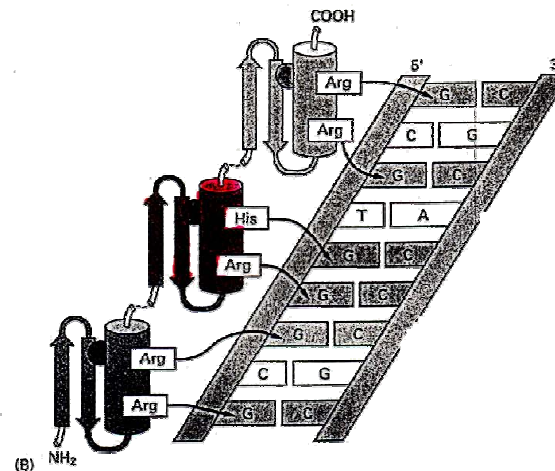
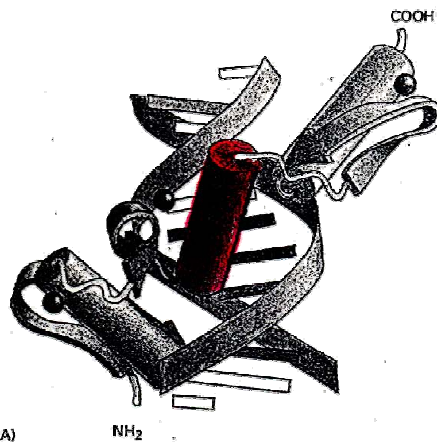
trojrozměrná struktura

α-helix  
↓  
vazba na DNA



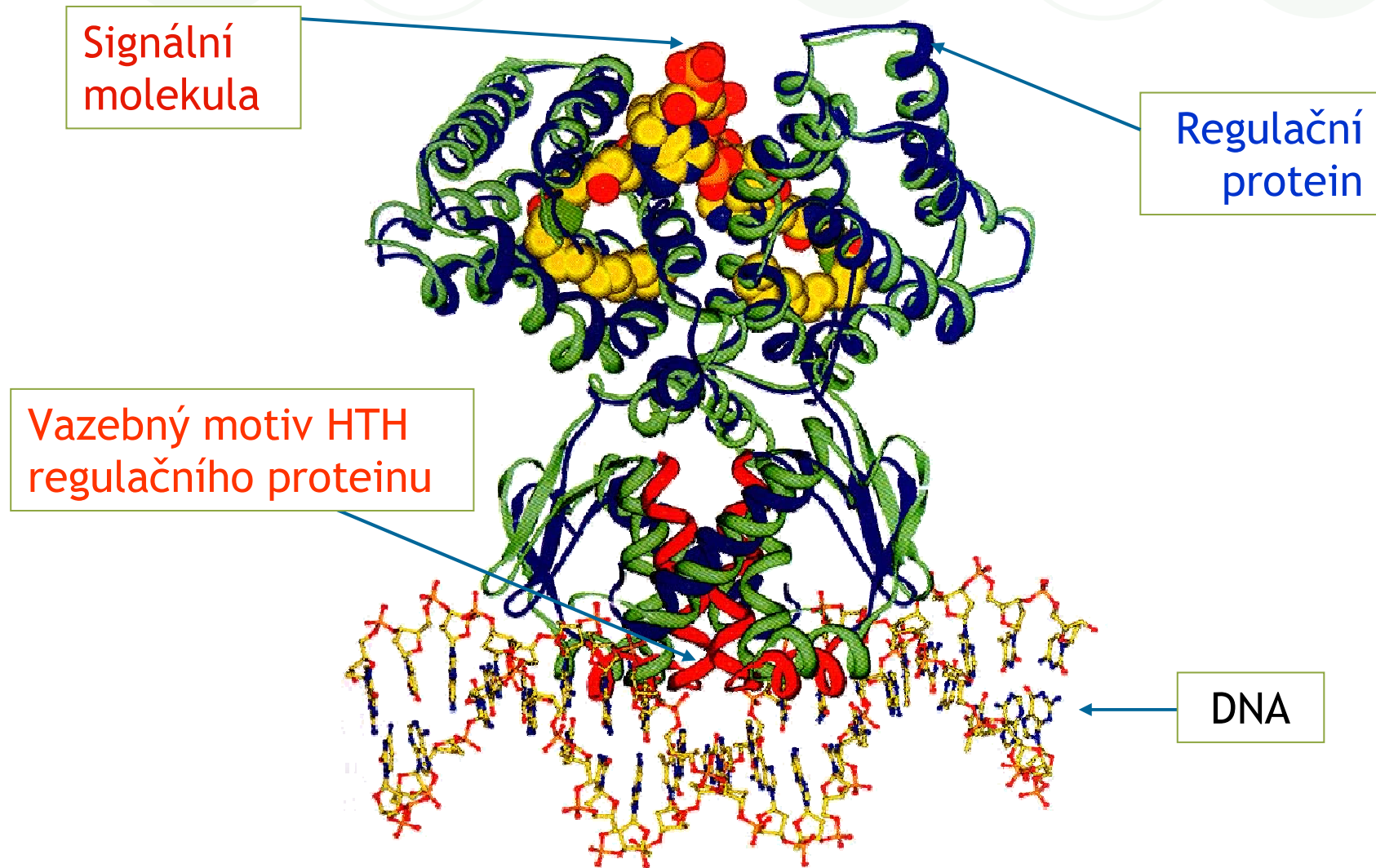
antiparalelní  
β-struktura

vazba proteinu na DNA

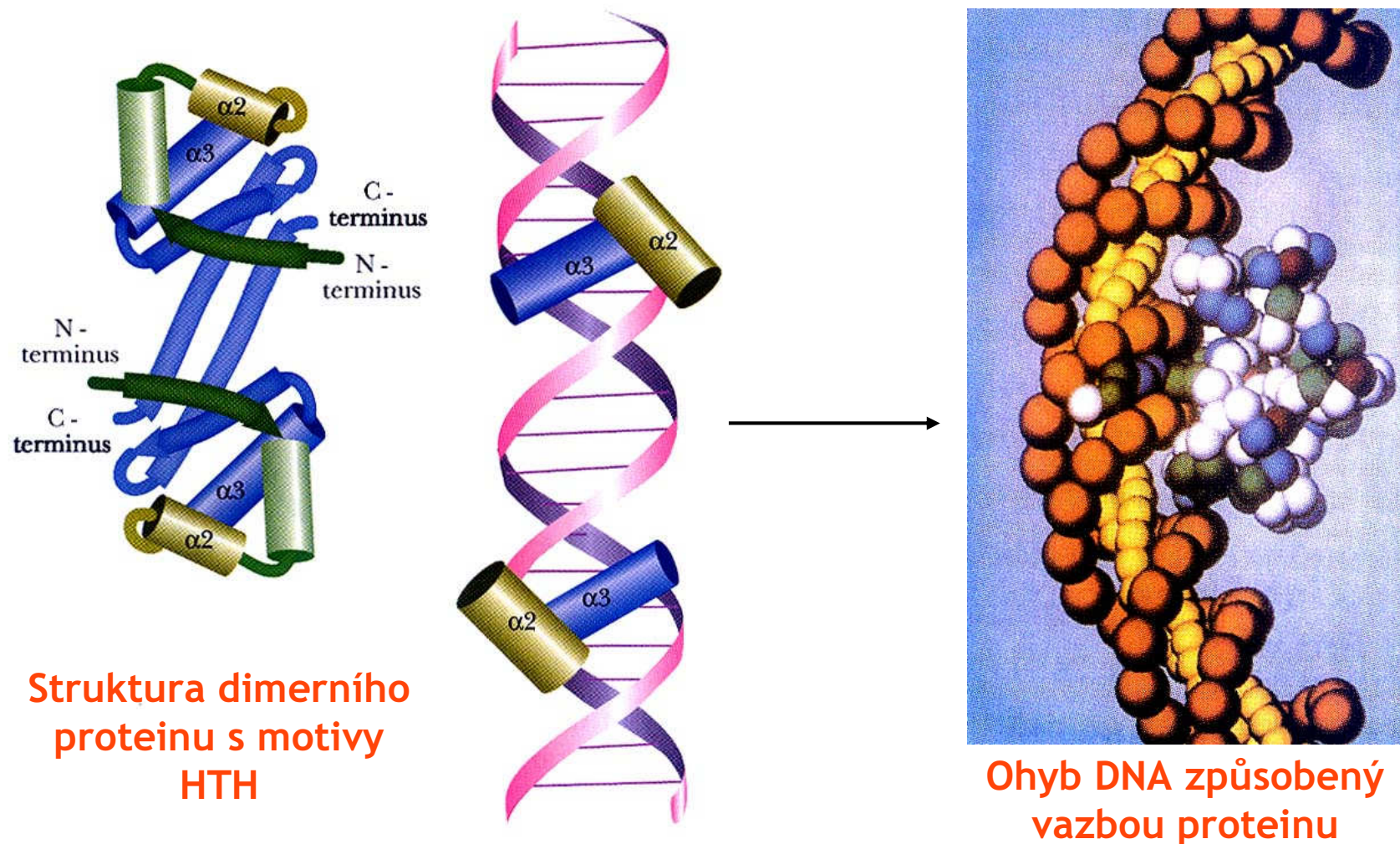




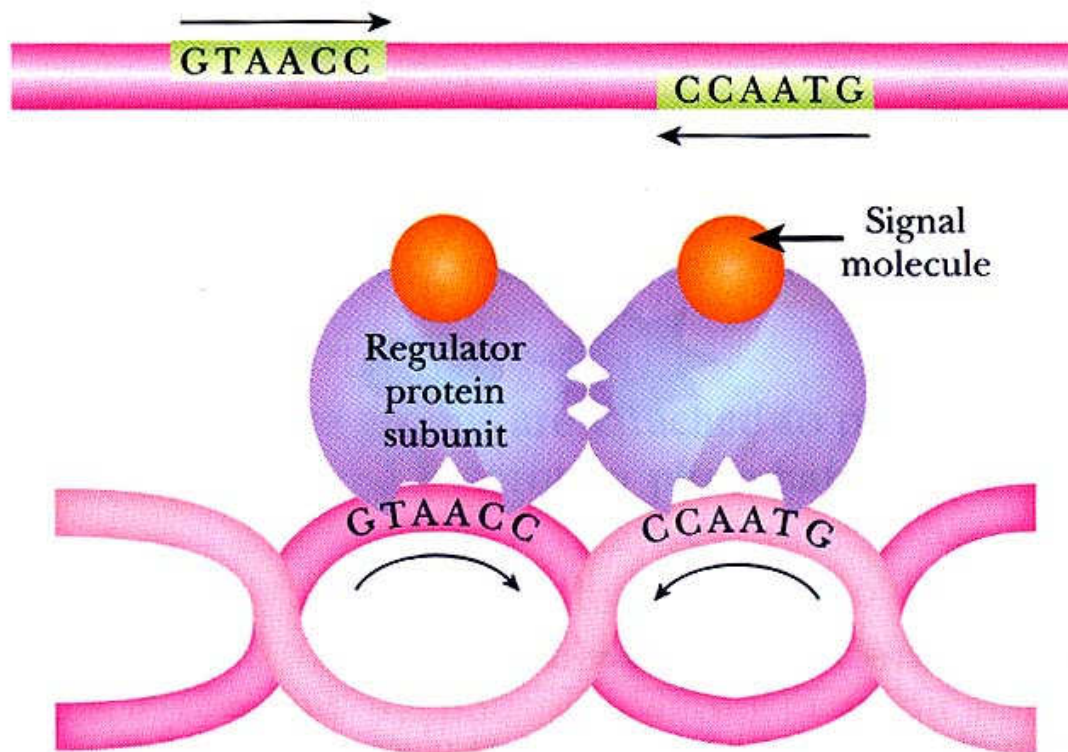
# Vazba aktivovaného regulačného proteínu na DNA



# Vazba regulačního proteinu na DNA



# Vazba regulačních proteinů na obrácená opakování (repetice) na DNA



Regulační oblast  
DNA obsahující  
obrácená  
opakování

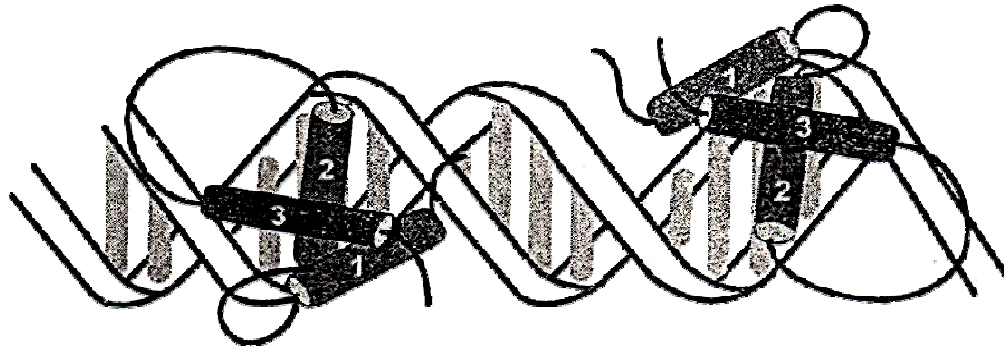
Po vazbě signální  
molekuly se regulační  
protein váže na  
regulační oblast

## Příklad vazby regulačního proteinu na regulační oblast DNA

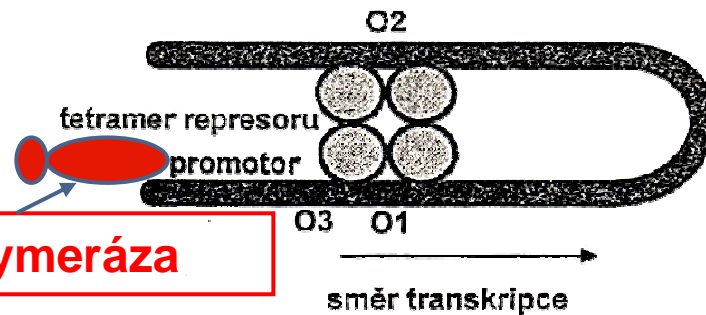


Šipkami je zvýrazněný přibližný palindrom.  
Podobnost v palindromu se snižuje ve sledu:  
O1 > O2 > O3.

O1: A A T T G T G A G G G G A T A A C A A T T  
T T A A C A C T C G C C T A T T G T T A A



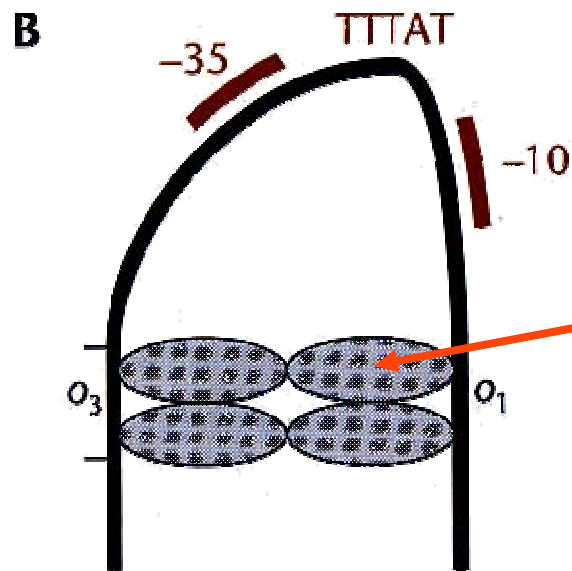
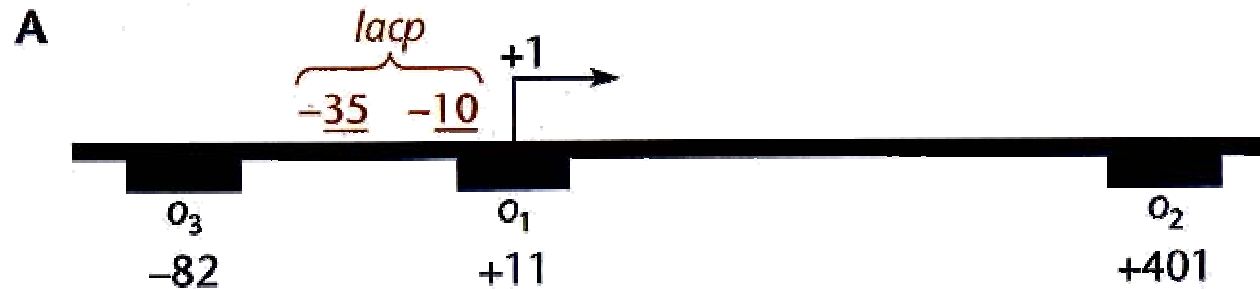
Vazba dimeru represoru laktózoového operonu na palindromatickou sekvenci operátorové podjednotky O1



**RNA-polymeráza**

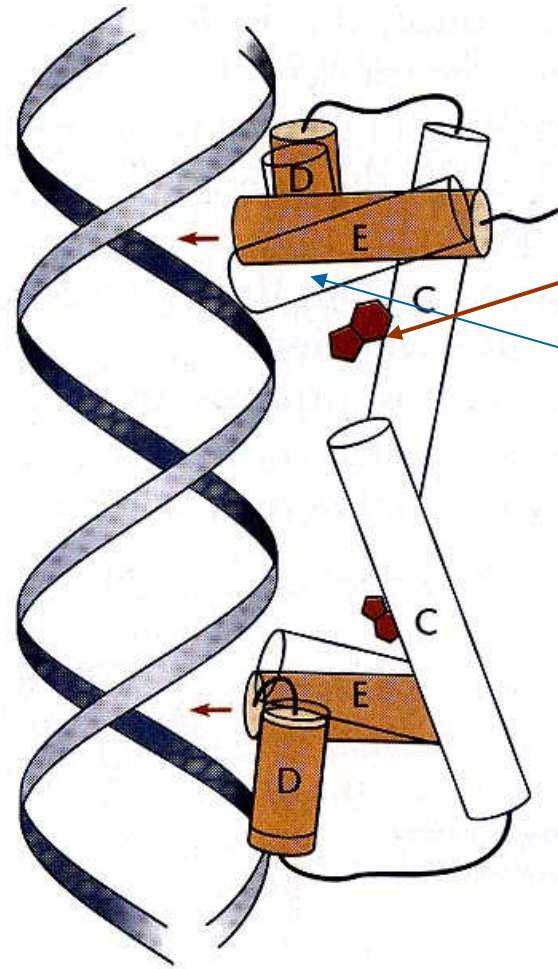
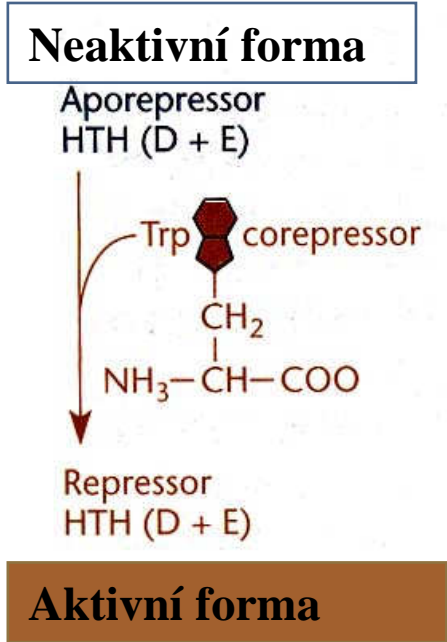
Vytvoření DNA-smyčky mezi dvěma podjednotkami operátoru

# Vazba represoru LacI na sekvence operátorů lac operonu



Represor ve formě tetrameru se váže k operátorům O1 a O3 (nebo O2 a O3), tím navodí ohyb DNA a znepřístupní promotor RNA-polymeráze

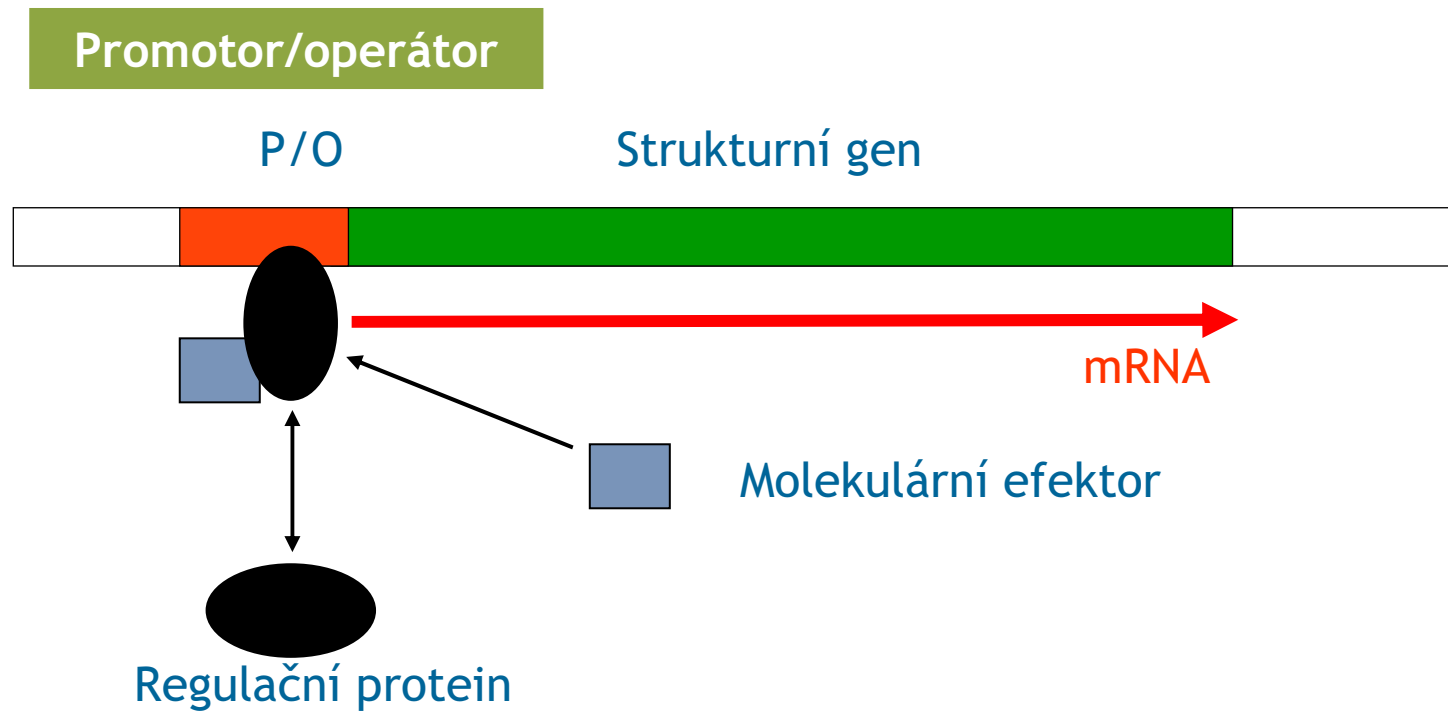
# Konverze aporepresoru (neaktivního represoru) na represor po vazbě korepresoru (tryptofan)



tryptofan

Konformační změna vyvolaná vazbou tryptofanu (korepresoru) umožní vazbu represoru na DNA

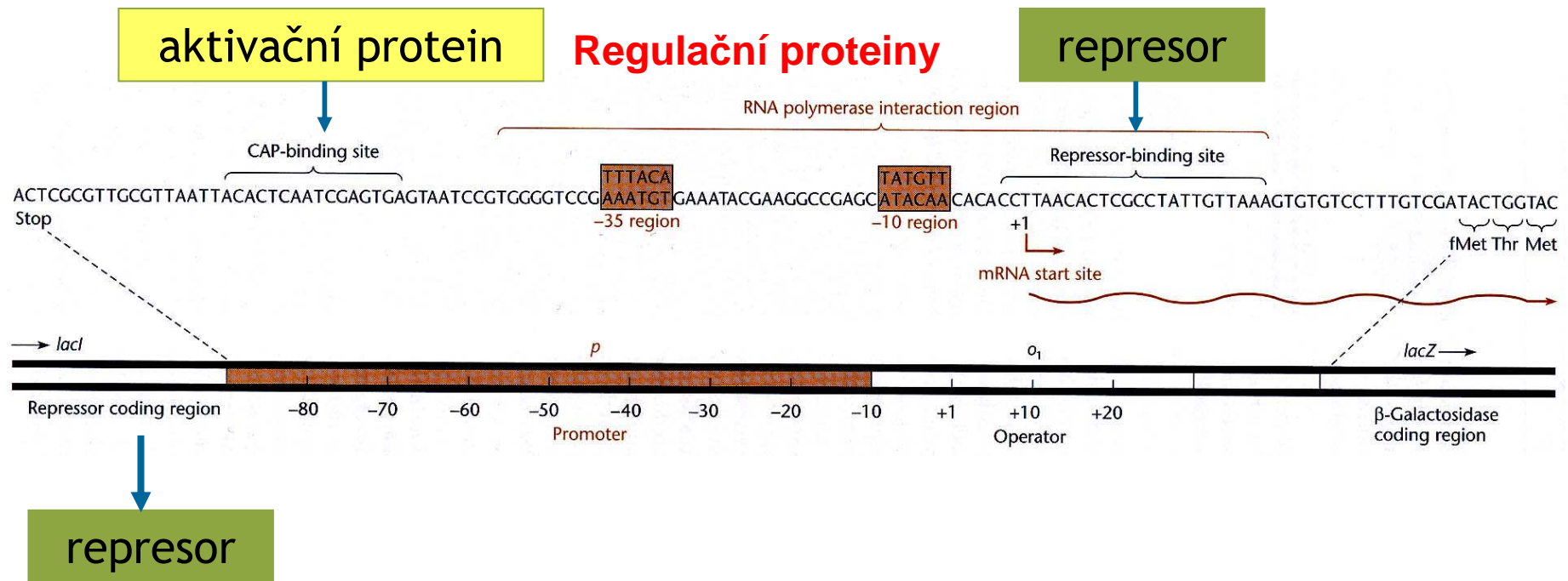
# Regulace genové exprese na úrovni transkripce u prokaryot



# Oblast promotoru a operátoru laktózového operonu

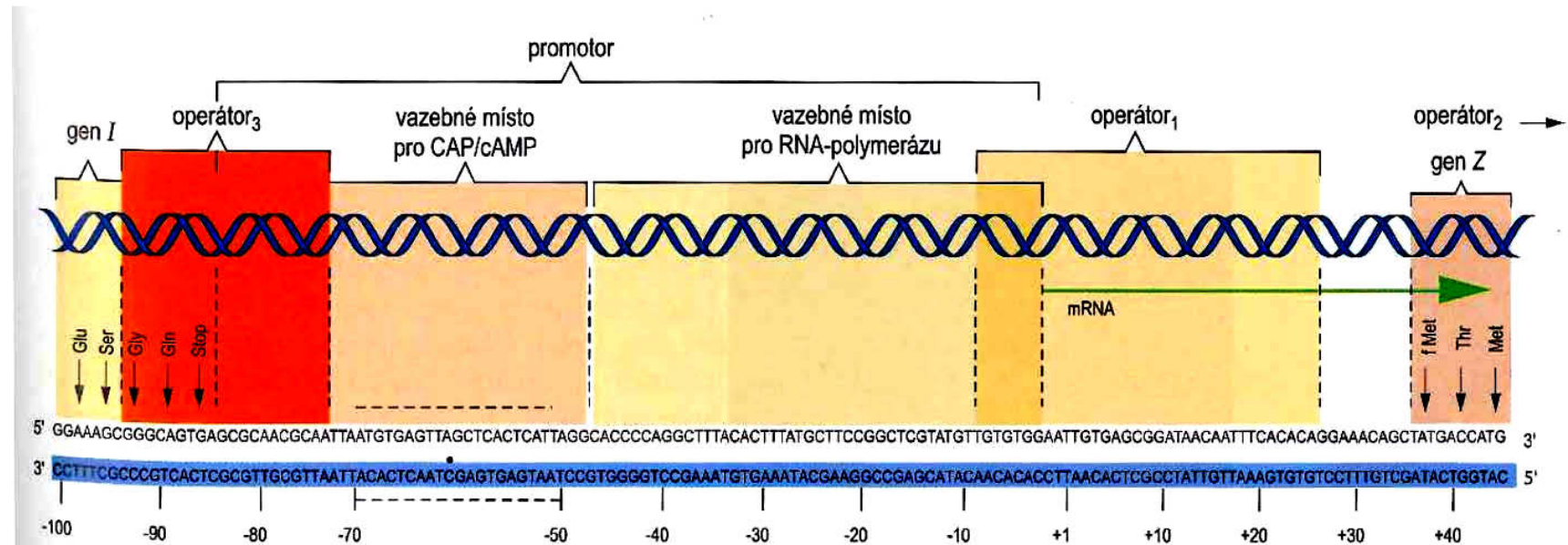
vazba proti směru transkripce

vazba po směru transkripce



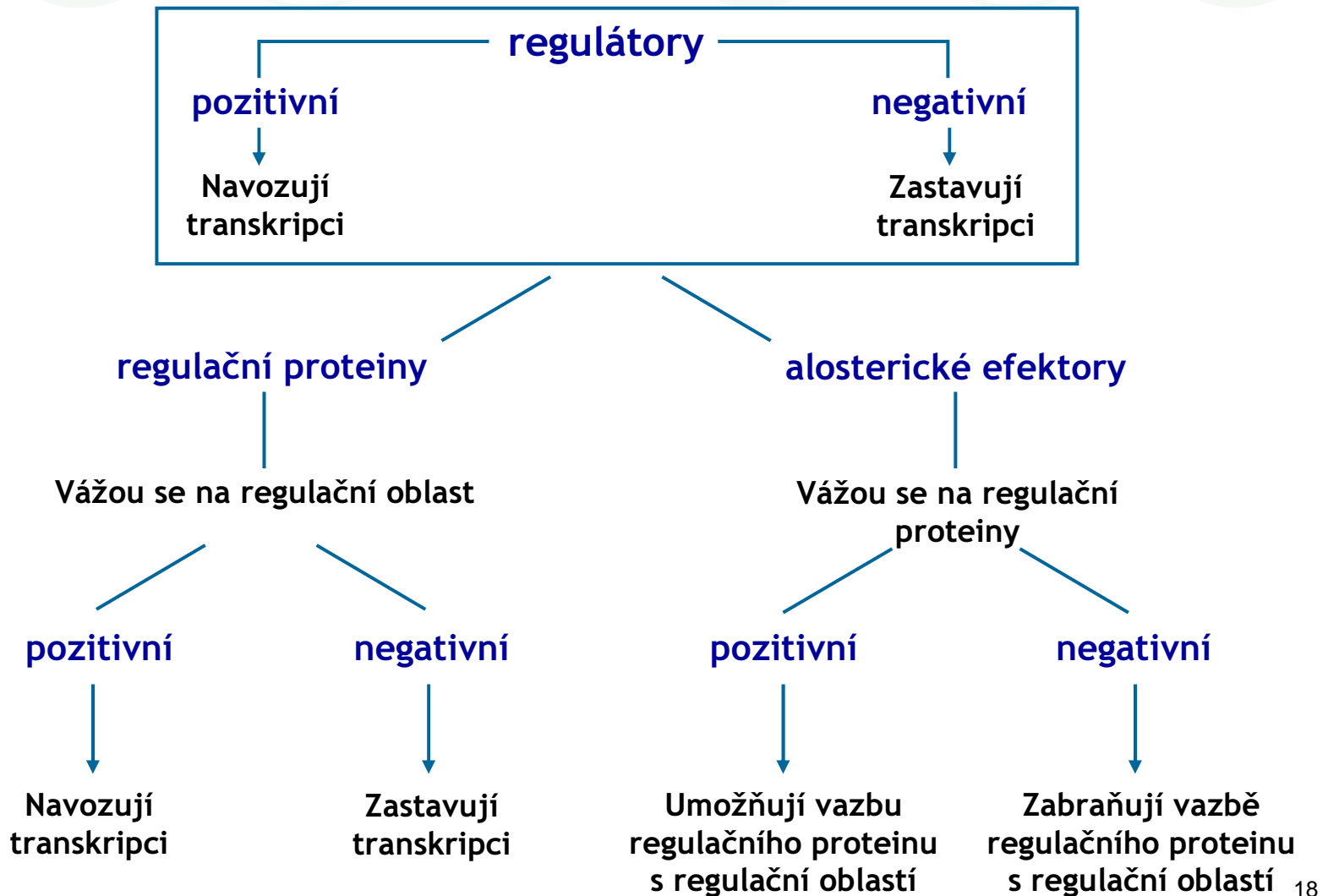


# Oblast promotoru a operátoru laktóзовého operonu



**Obr. 17.10** Organizace oblasti promotor-operátor *lac*-operonu. Promotor sestává ze dvou komponent: (1) místa, které váže komplex CAP/cAMP a (2) vazebného místa pro RNA-polymerázu. Jsou znázorněny rovněž přilehlé segmenty obsahující geny *lacI* (repressor) a *lacZ* ( $\beta$ -galaktozidáza). Vodorovná čára u mRNA znázorňuje polohy, v nichž začíná transkripce operonu (5'-konec *lac*-mRNA). Čísla dole uvádějí vzdálenosti v bp od místa iniciace transkripce (poloha +1). Bod mezi oběma nukleotidovými řetězci označuje střed symetrie nedokonalého palindromu.

# Klasifikace regulátorů



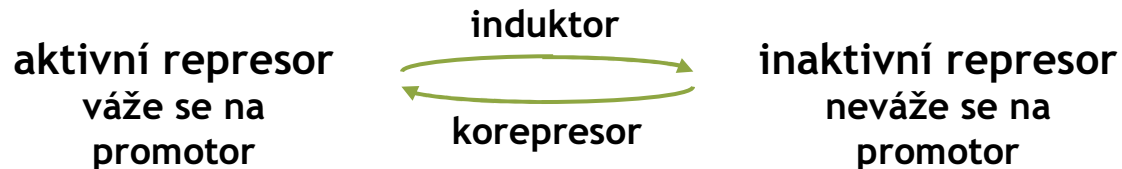
# Negativní a pozitivní kontrola transkripce regulace

## Negativní kontrola

Aktivní regulační protein vypíná transkripci

Regulační protein = transkripční represor

Promotor je funkční po odstranění represoru

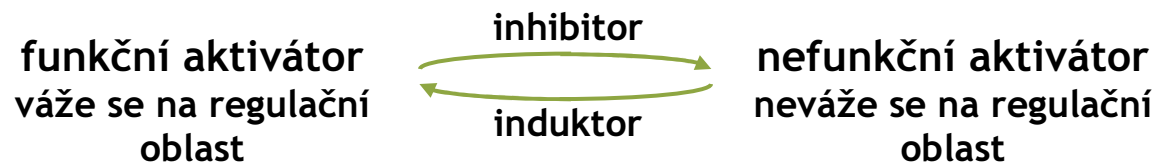


## Pozitivní kontrola

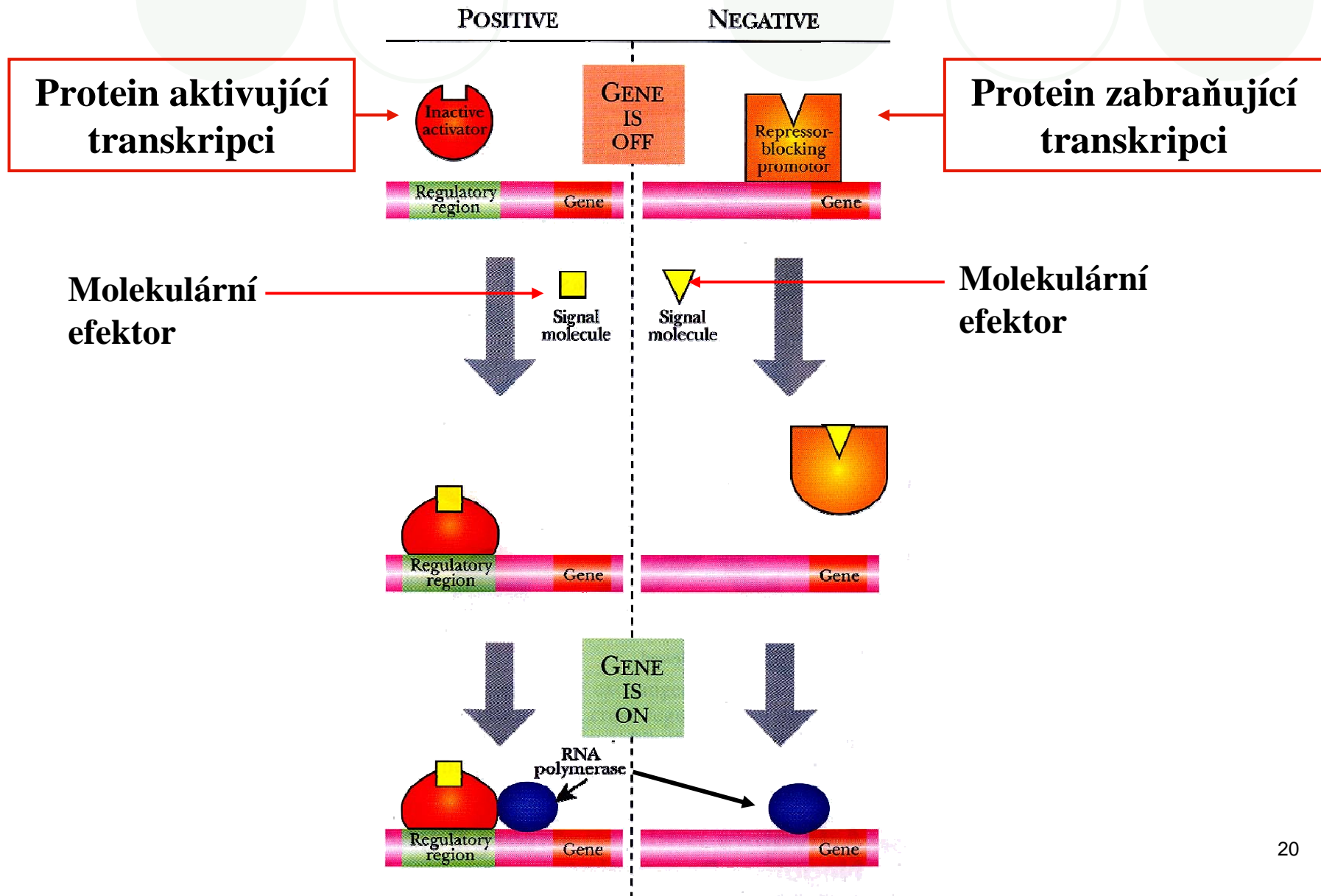
Aktivní regulační protein zapíná transkripci

Regulační protein = aktivátor transkripce

Promotor je funkční pouze po aktivaci, která umožní zahájit transkripci

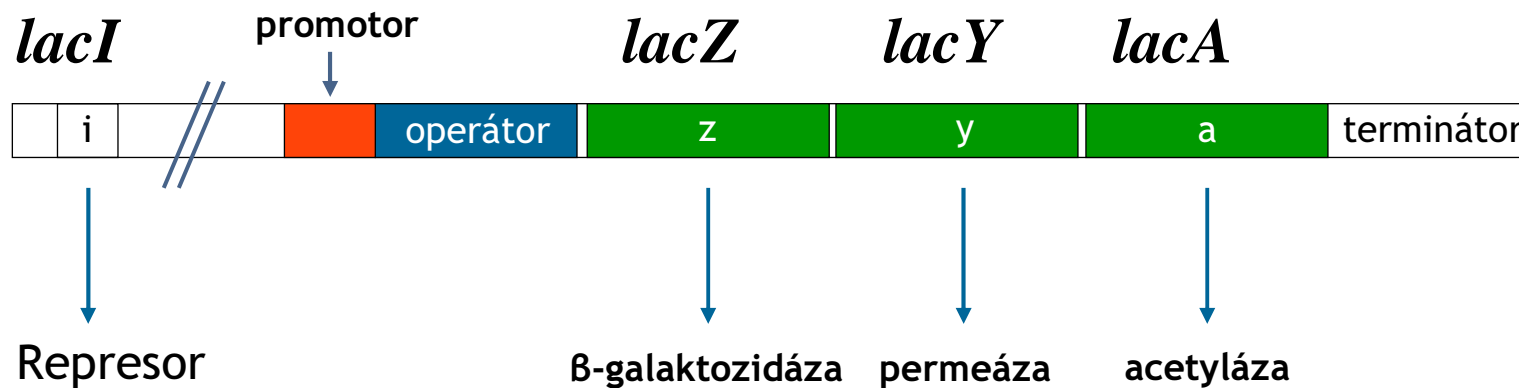


# Princip pozitivní a negativní regulace transkripce



# Příklad regulovatelného operonu

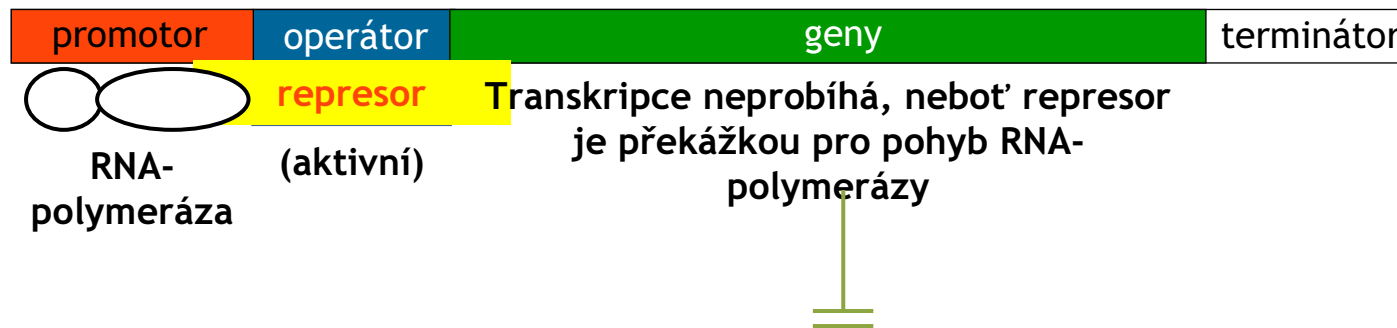
## Laktozový operon *Escherichia coli*



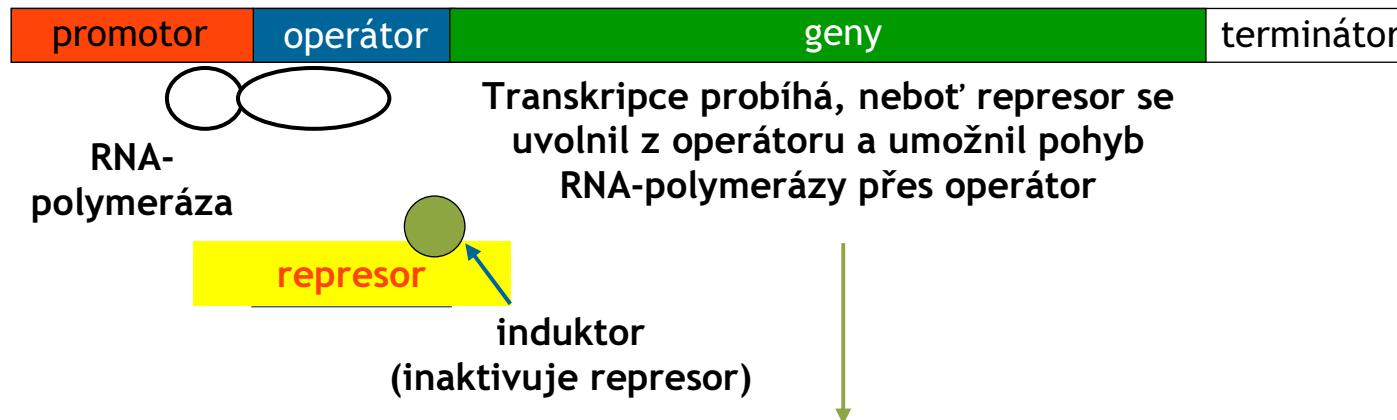
Všechny enzymy jsou indukovatelné laktózou (alolaktózou)

$\beta$ -galaktozidáza konvertuje laktózu na alolaktózu, která působí jako induktor

# Negativní regulace laktóзовého operonu v rámci enzymové indukce

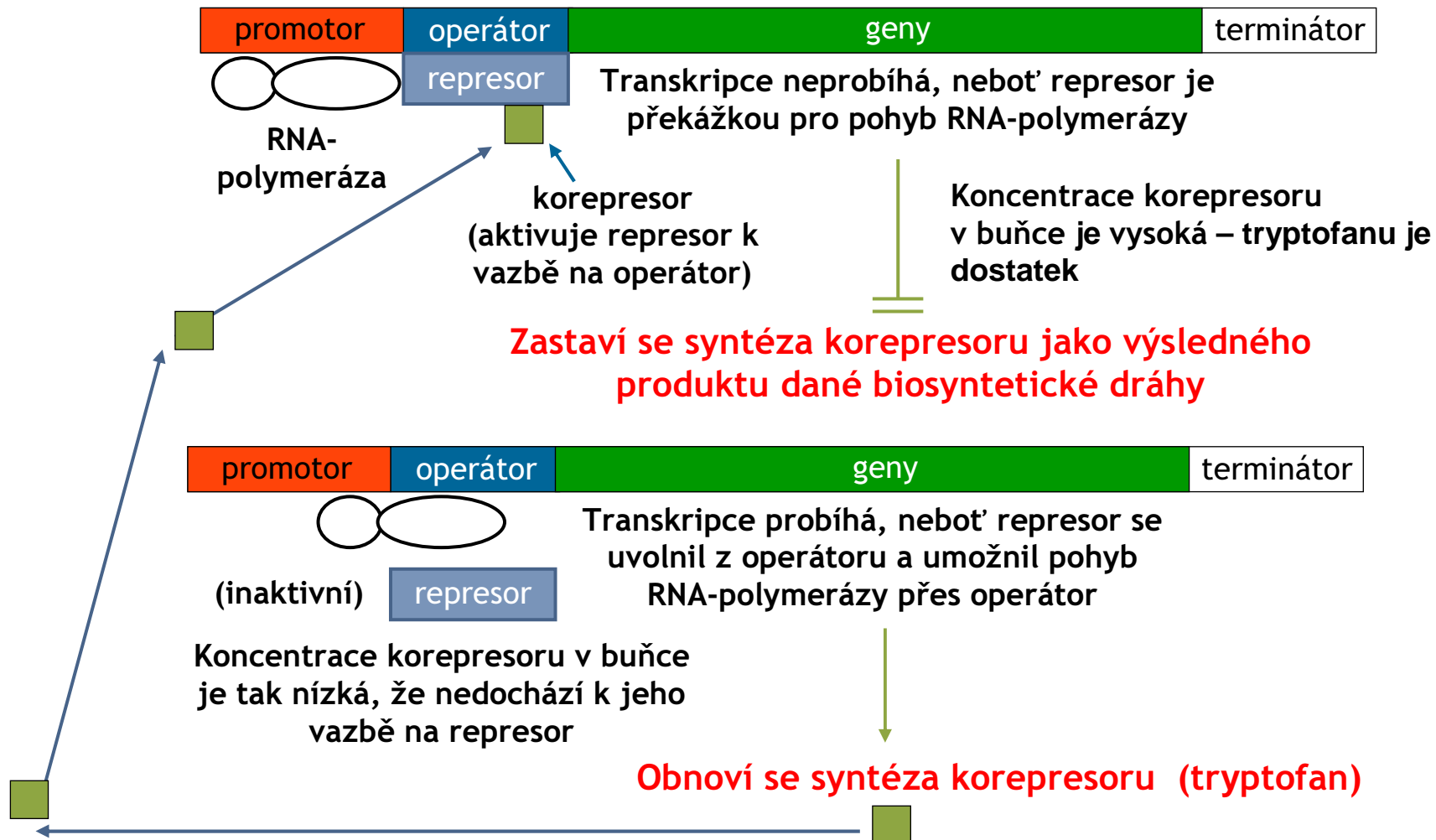


Netvoří se indukovatelné enzymy

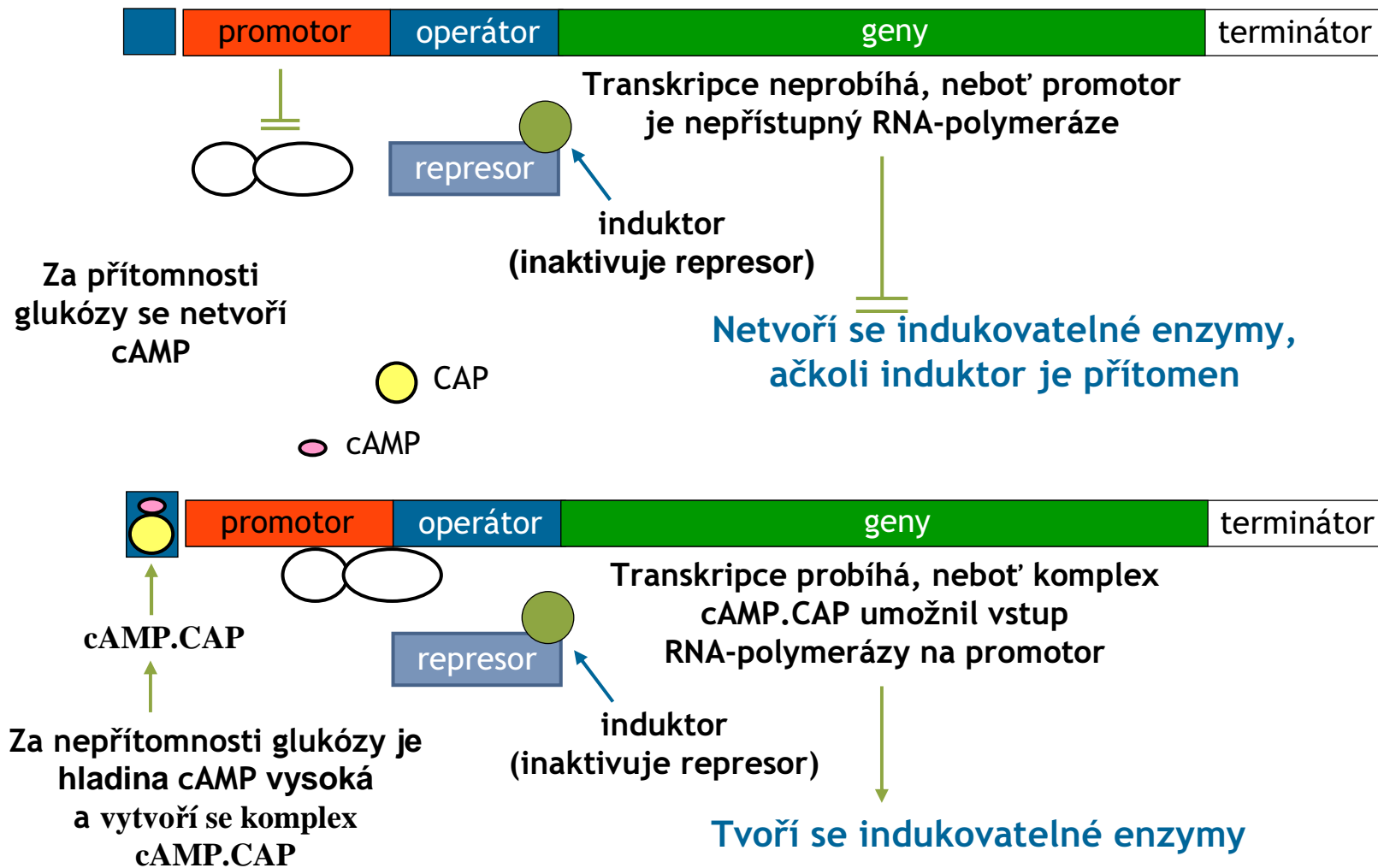


Tvoří se indukovatelné enzymy

# Negativní regulace operonu (např. tryptofanového) v rámci enzymové represe



# Pozitivní regulace operonu

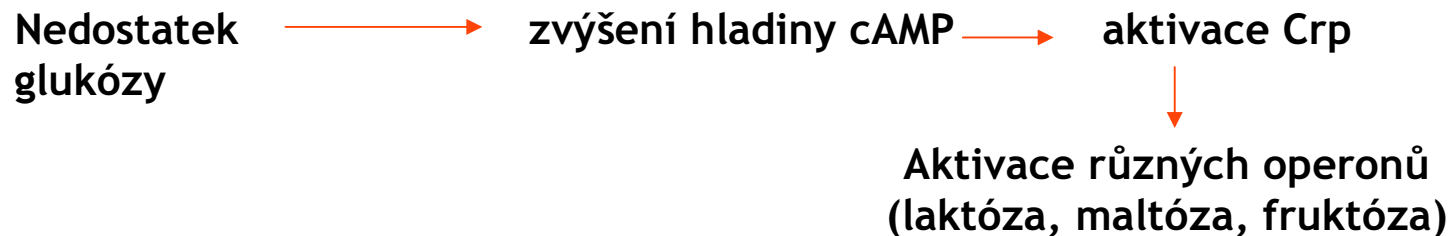




# Klasifikace regulátorů

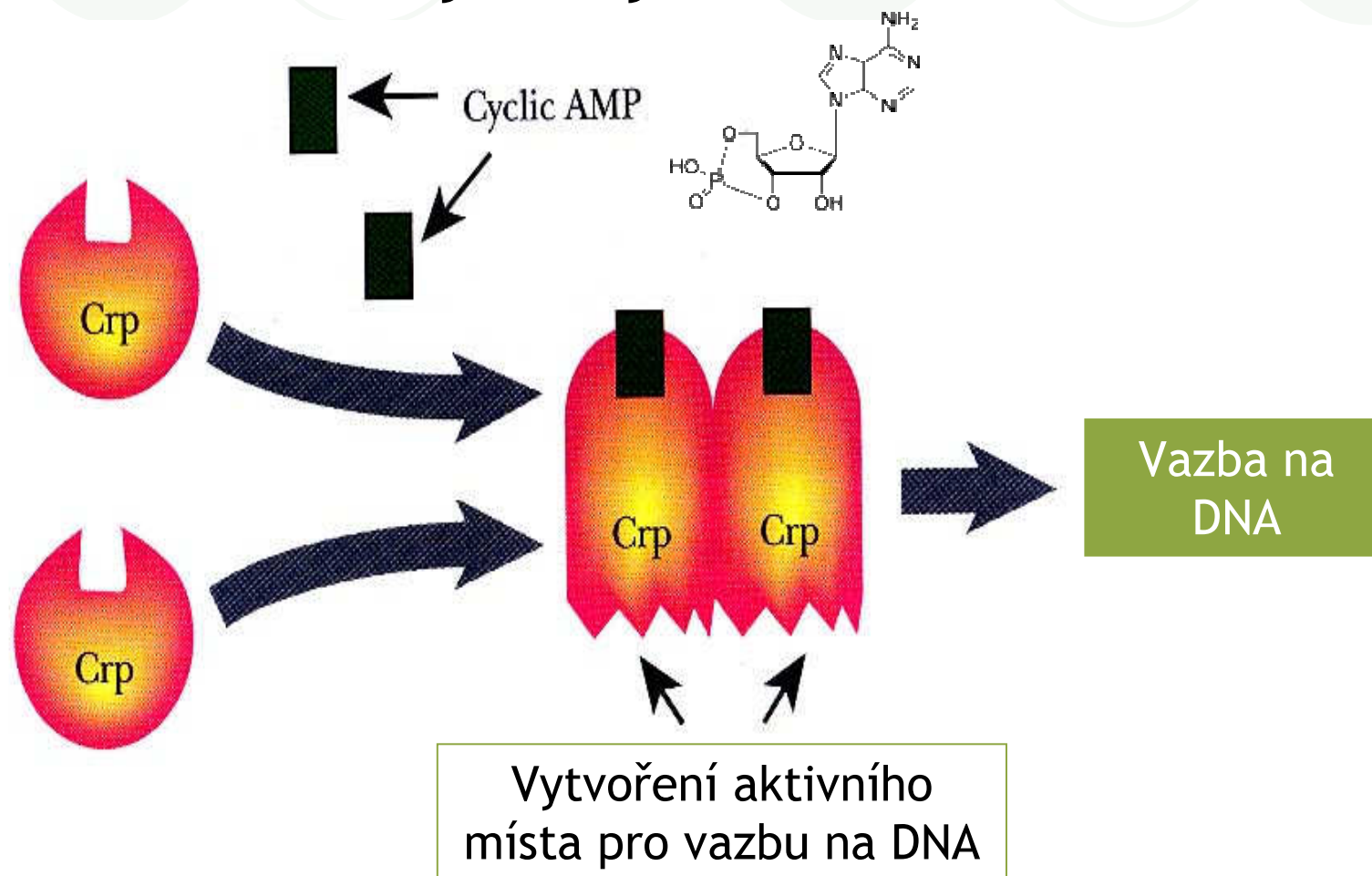
**Specifický regulátor** = reguluje expresi jednoho nebo mála genů  
(např. laktózový represor)

**Globální regulátor** = regulační protein, který reguluje větší počet genů po aktivaci signálem  
(např. Crp (n. CAP), cAMP-receptorový protein)



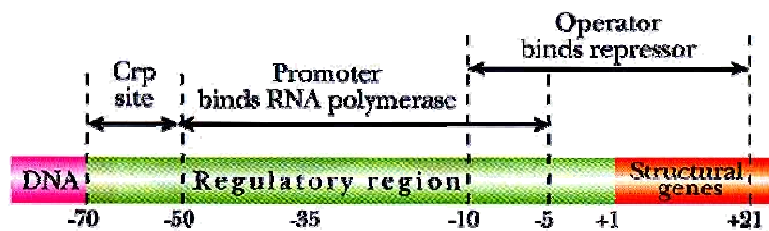
**REGULON** = skupina genů nebo operonů regulovaná stejným regulačním proteinem

# Aktivace globálního regulátoru CAP (Crp) cyklickým AMP

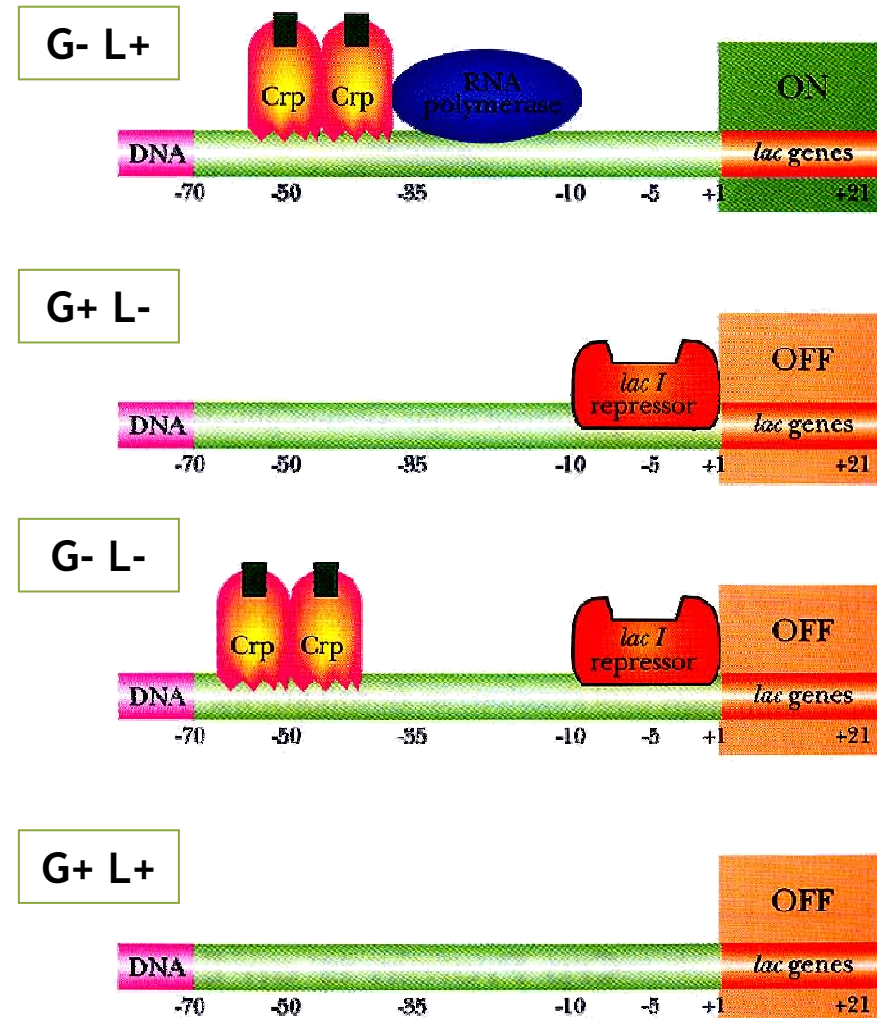


**Crp** = Cyclic AMP Receptor Protein (CAP)

# Regulace laktózového operonu



Přehled vazebných míst pro regulační proteiny a pro RNA-polymerázu



# Vztahy mezi induktorem, korepresorem, represorem a cAMP.CAP

**Induktor** = negativní alosterický efektor = pozitivní regulátor

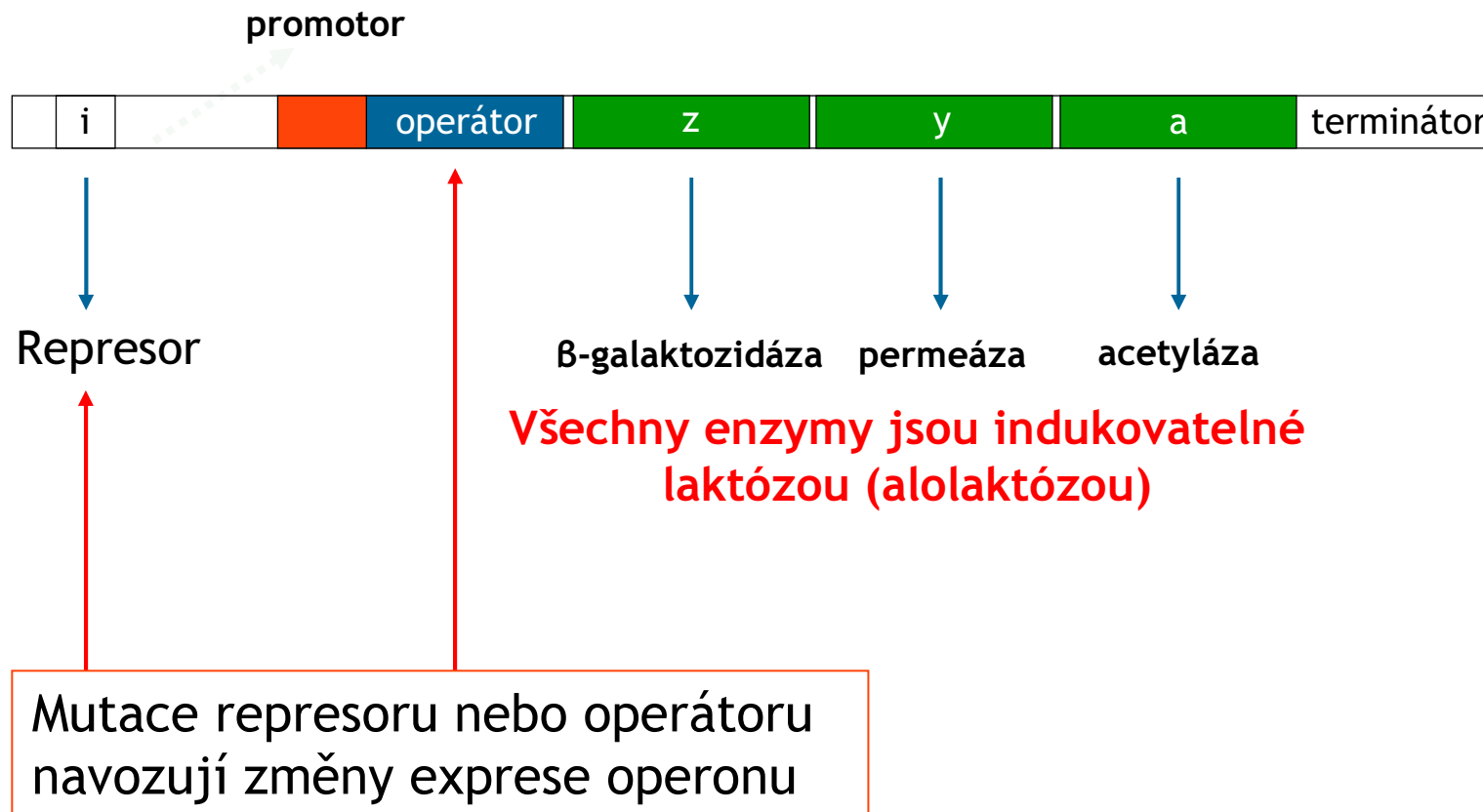
**Korepresor** = pozitivní alosterický efektor = negativní regulátor

**Represor** = negativní regulační protein = negativní regulátor

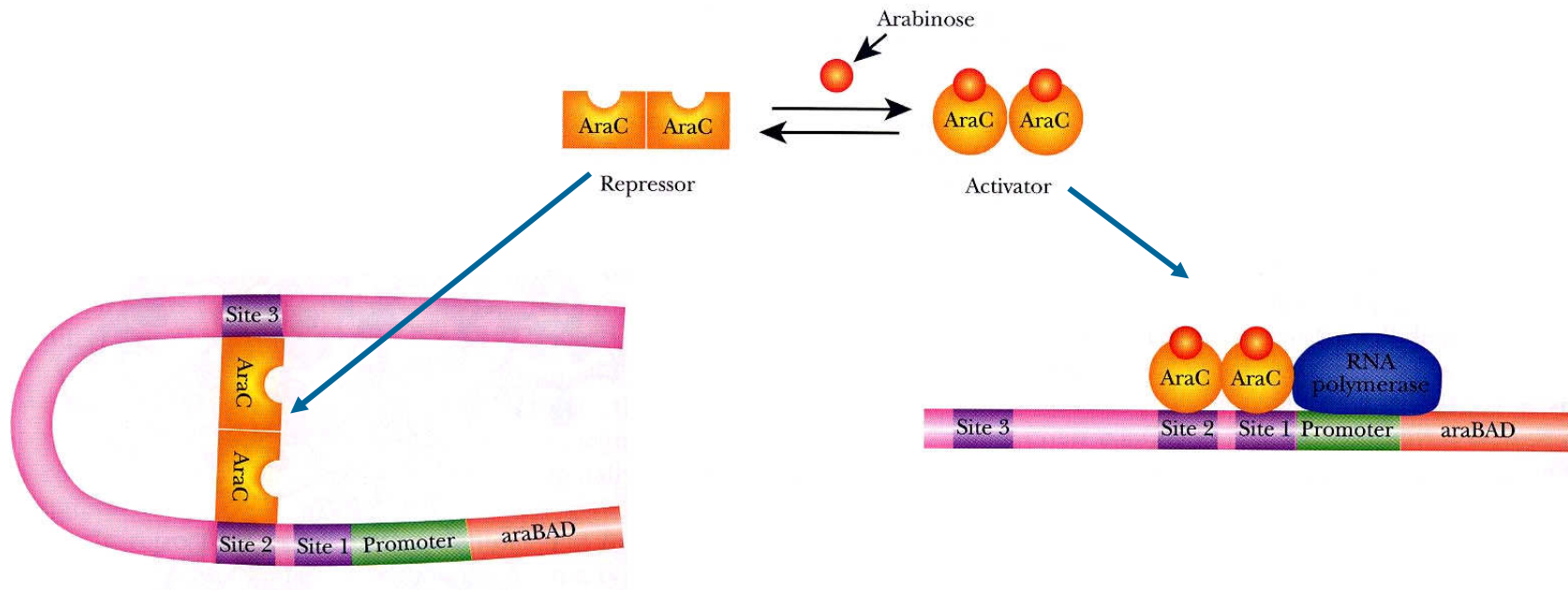
**CAP** = pozitivní regulační protein = pozitivní regulátor

**cAMP** = pozitivní alosterický efektor = pozitivní regulátor

# Aktivita laktóзовého operonu ovlivněná mutacemi



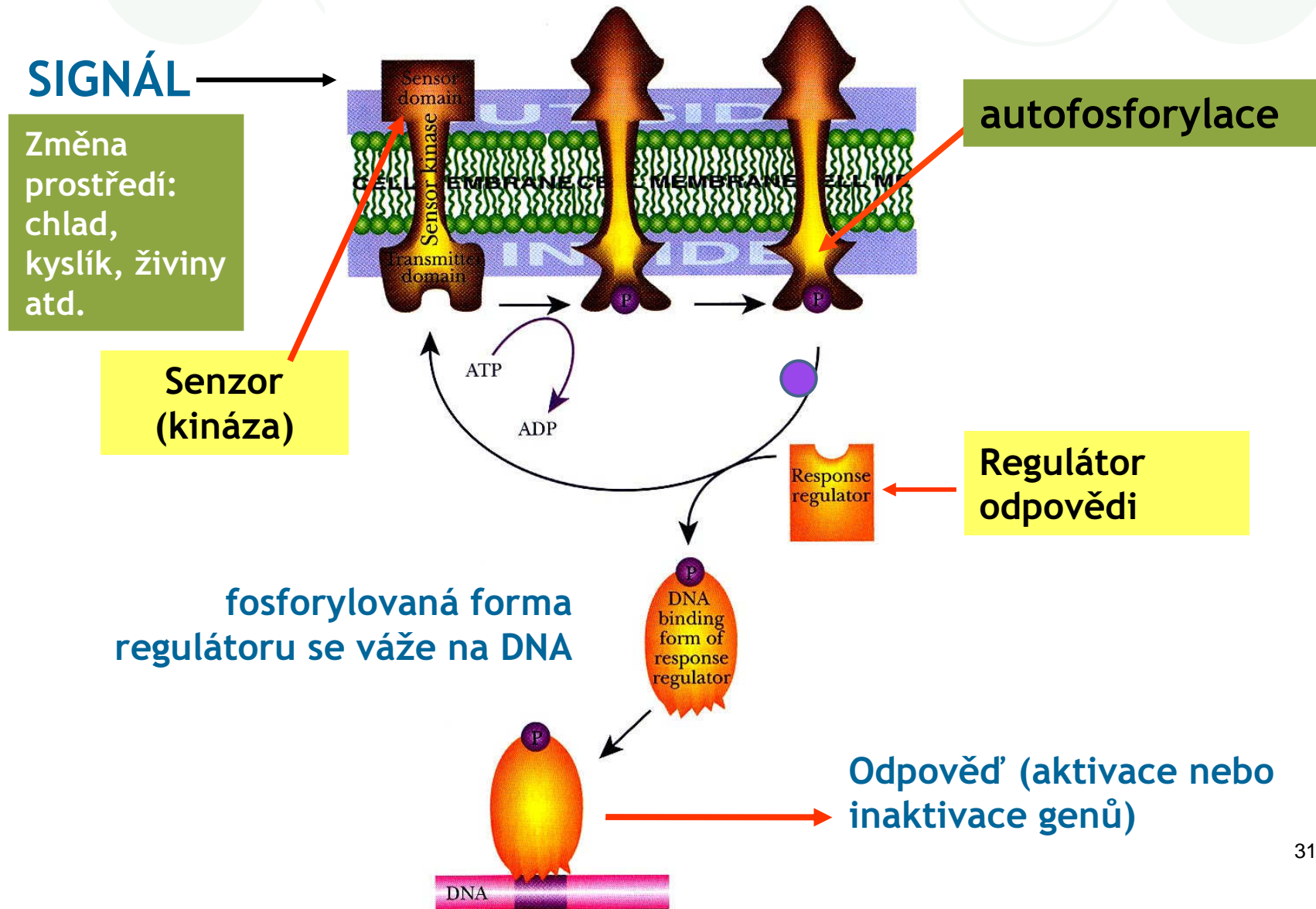
# Působení regulačního proteinu AraC jako represoru nebo aktivátoru



Bez přítomnosti arabinózy se AraC váže na DNA v místech 2 a 3 a brání transkripci operonu araBAD

V přítomnosti arabinózy se AraC váže na DNA v místech 1 a 2 a umožní vazbu RNA-polymerázy na promotor

# Dvoukomponentní regulační systém

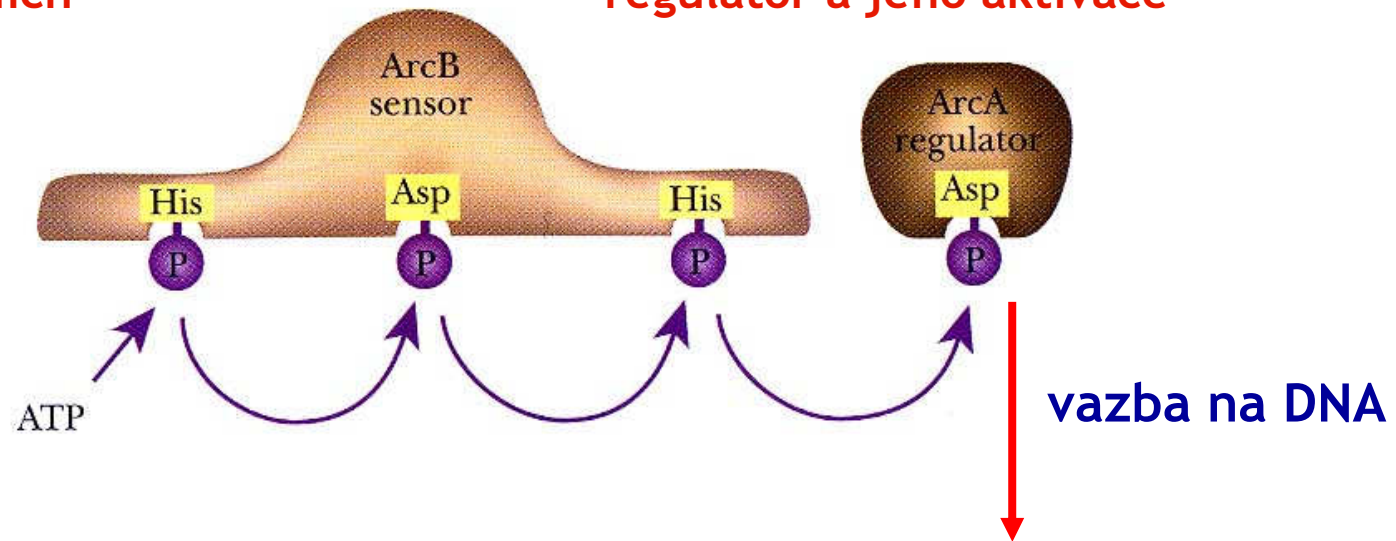


# Fungování dvoukomponentního regulačního systému ArcAB

System ArcAB rozpoznává anaerobní nebo aerobní podmínky v prostředí buněk

1. Fosforylace senzoru za anaerobních podmínek

2. Přenos fosfátu ze senzoru na regulátor a jeho aktivace



3. Represe asi 20 genů vyžadovaných pro aerobní metabolismus, zapnutí asi 6 genů vyžadovaných pro anaerobní metabolismus

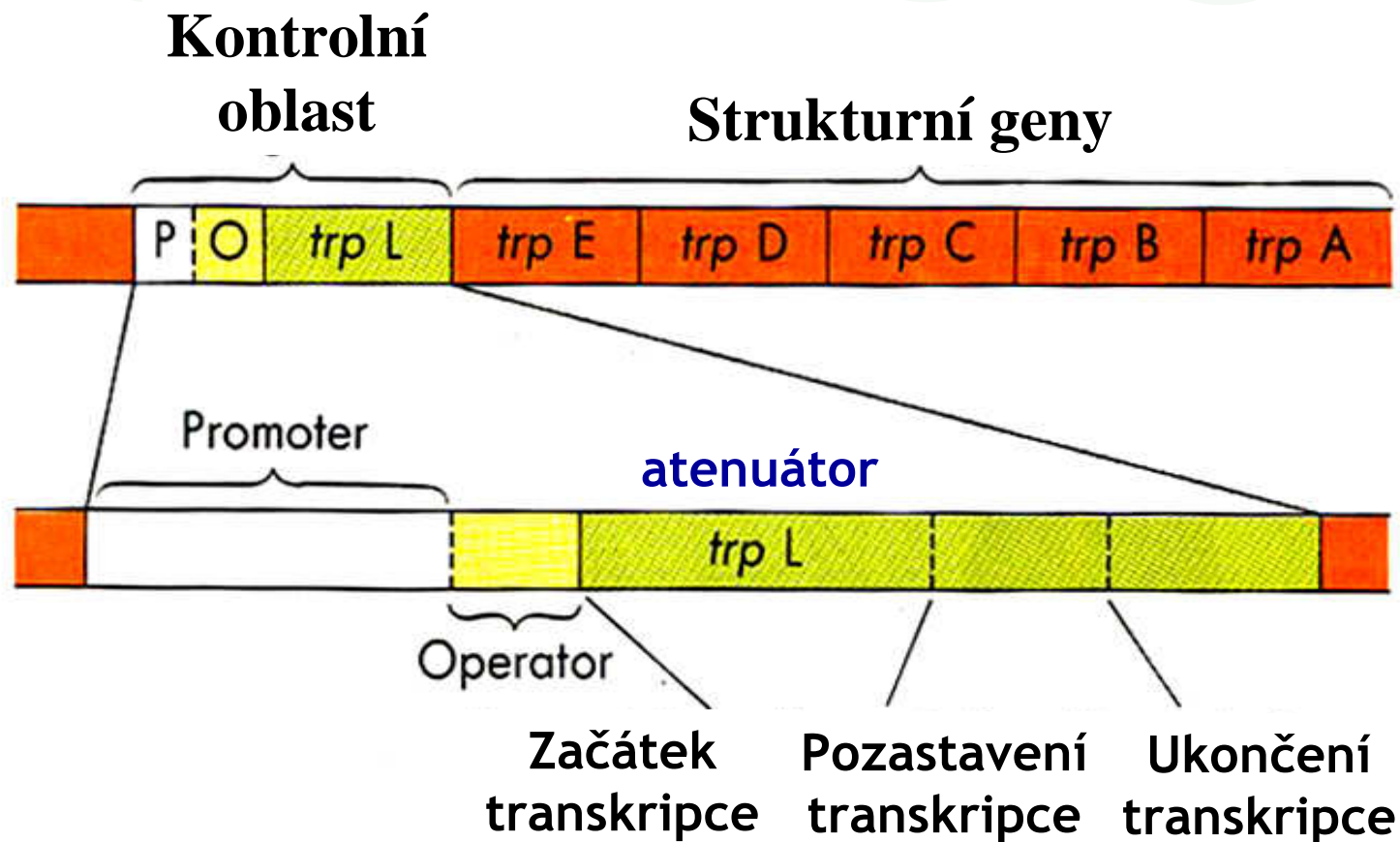




## Dvoukomponentní regulační systémy u *E. coli*

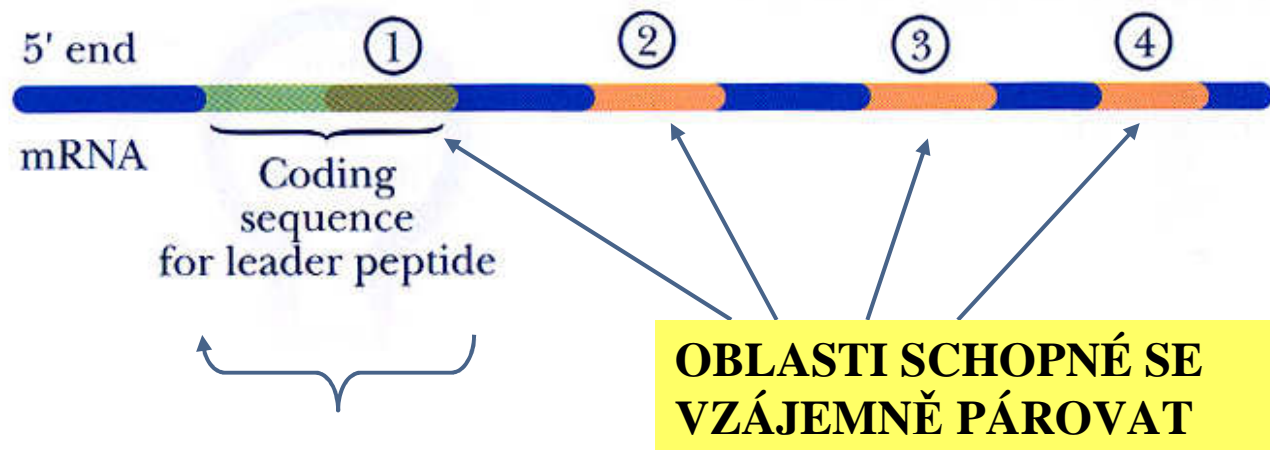
<b>Stimul/funkce</b>	<b>Sensor</b>	<b>Regulator</b>
Nedostatek kyslíku	ArcB	ArcA
Osmolarita/obalové proteiny	EnvZ	OmpR
Osmolarita, transport K	KdpD	KdpE
Nedostatek fosforu	PhoR	PhoB
Metabolismus dusíku	NtrB	NtrC
Respirace nitrátů	NarX	NarL
Respirace nitrátů a nitritů	NarQ	NarP

# Tryptofanový operon *E. coli*



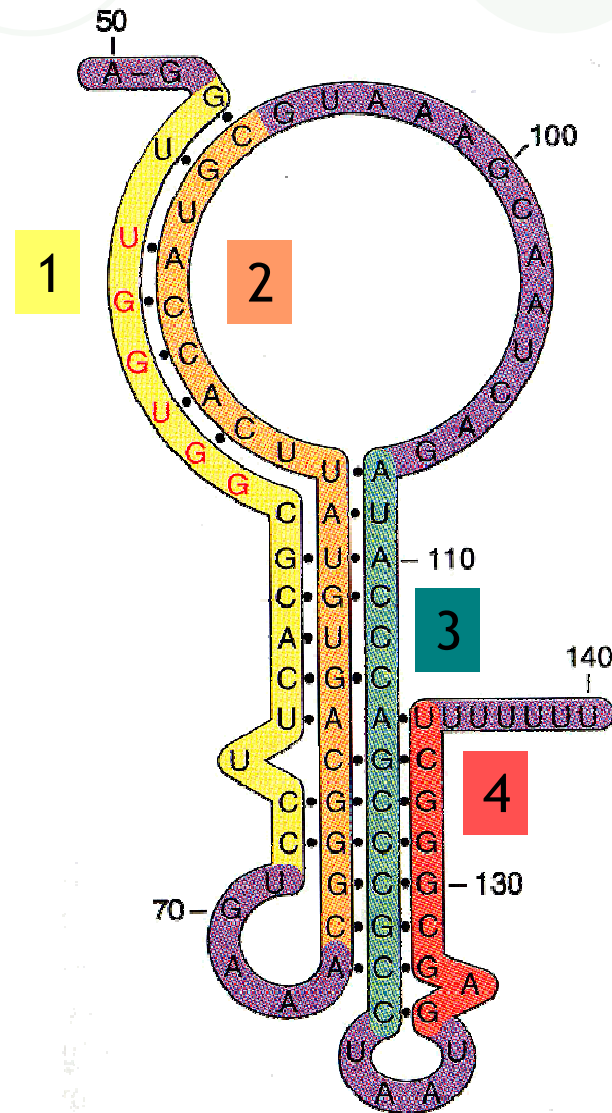
# Atenuace - umístění atenuátorové sekvence v tryptofanovém operonu

## Polohy sekvencí v atenuátoru



oblast vedoucí sekvence

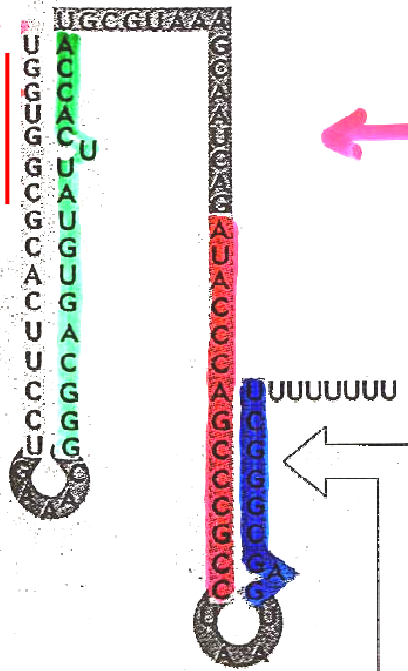
# Sekundární struktura přepisu (RNA) vedoucí oblasti tryptofanového operonu



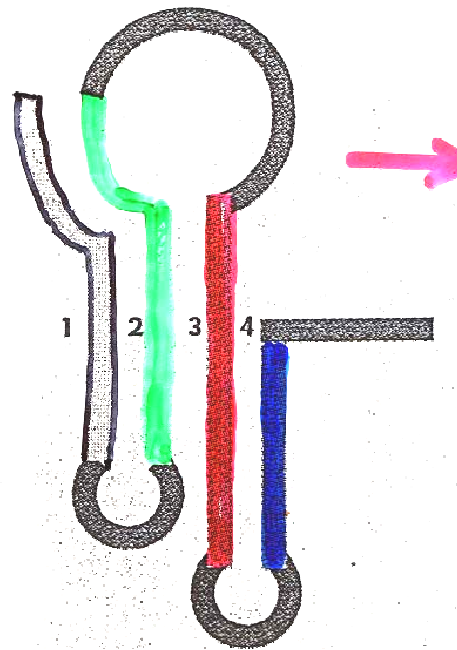
# Možnosti alternativního párování sekvencí 1, 2, 3 a 4 za vzniku vlásenek

The *trp* leader region can exist in alternative base-paired conformations. The center shows the four regions that can base pair. Region 1 is complementary to region 2, which is complementary to region 3, which is complementary to region 4. On the left is the conformation produced when region 1 pairs with region 2, and region 3 pairs with region 4. On the right is the conformation when region 2 pairs with region 3, leaving regions 1 and 4 unpaired.

Kodony pro Trp

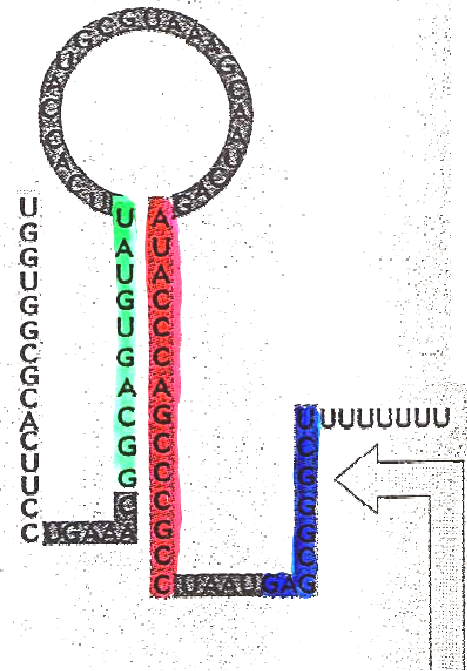


Vytvoření terminátorové vlásenky párováním sekvencí 3 a 4.



Alternativní možnosti párování sekvencí 1, 2, 3 a 4

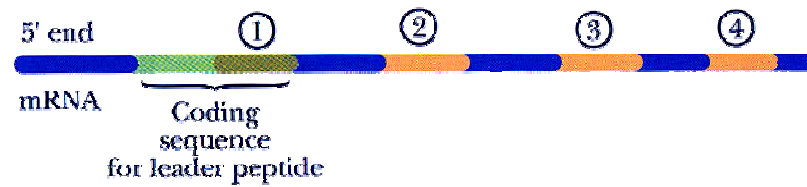
Sekvence 2 se může párovat se sekvencí 1 nebo 3, sekvence 3 se může párovat se sekvencí 2 nebo 4



Párují se sekvence 2 a 3, terminátorová vlásenka nevzniká

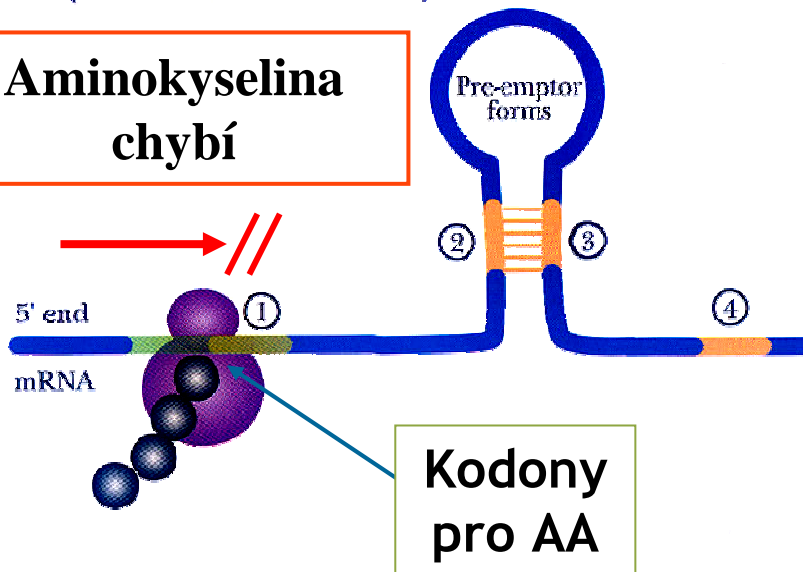
# Mechanismus atenuace

## A. SEQUENCE LAYOUT



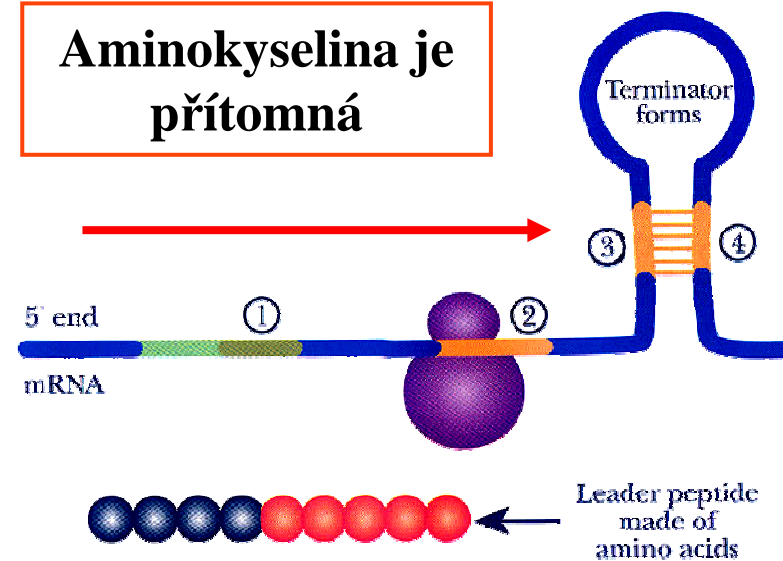
## B. GENE ON (No critical amino acids)

Aminokyselina chybí



## C. GENE OFF (Critical amino acid present)

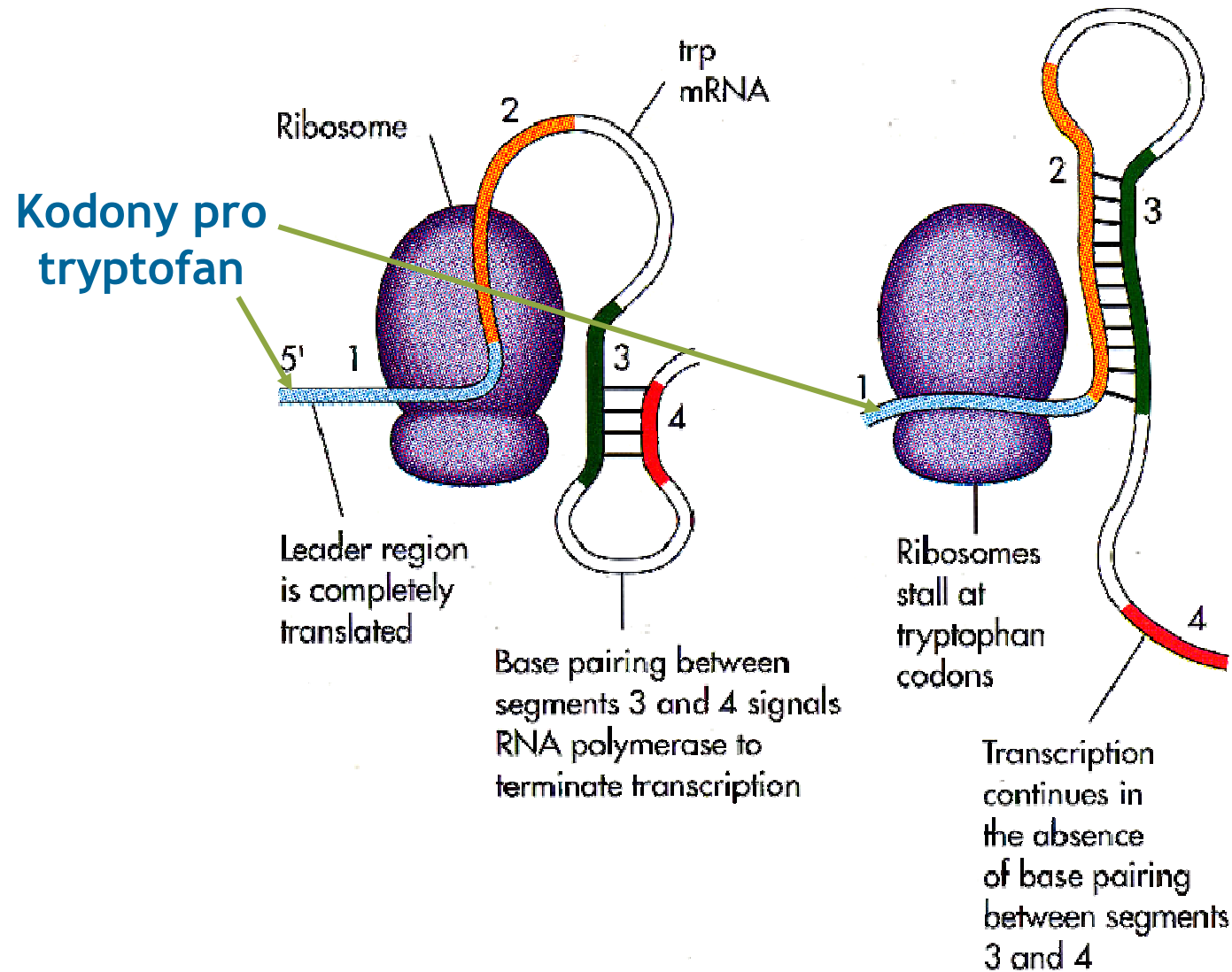
Aminokyselina je přítomná

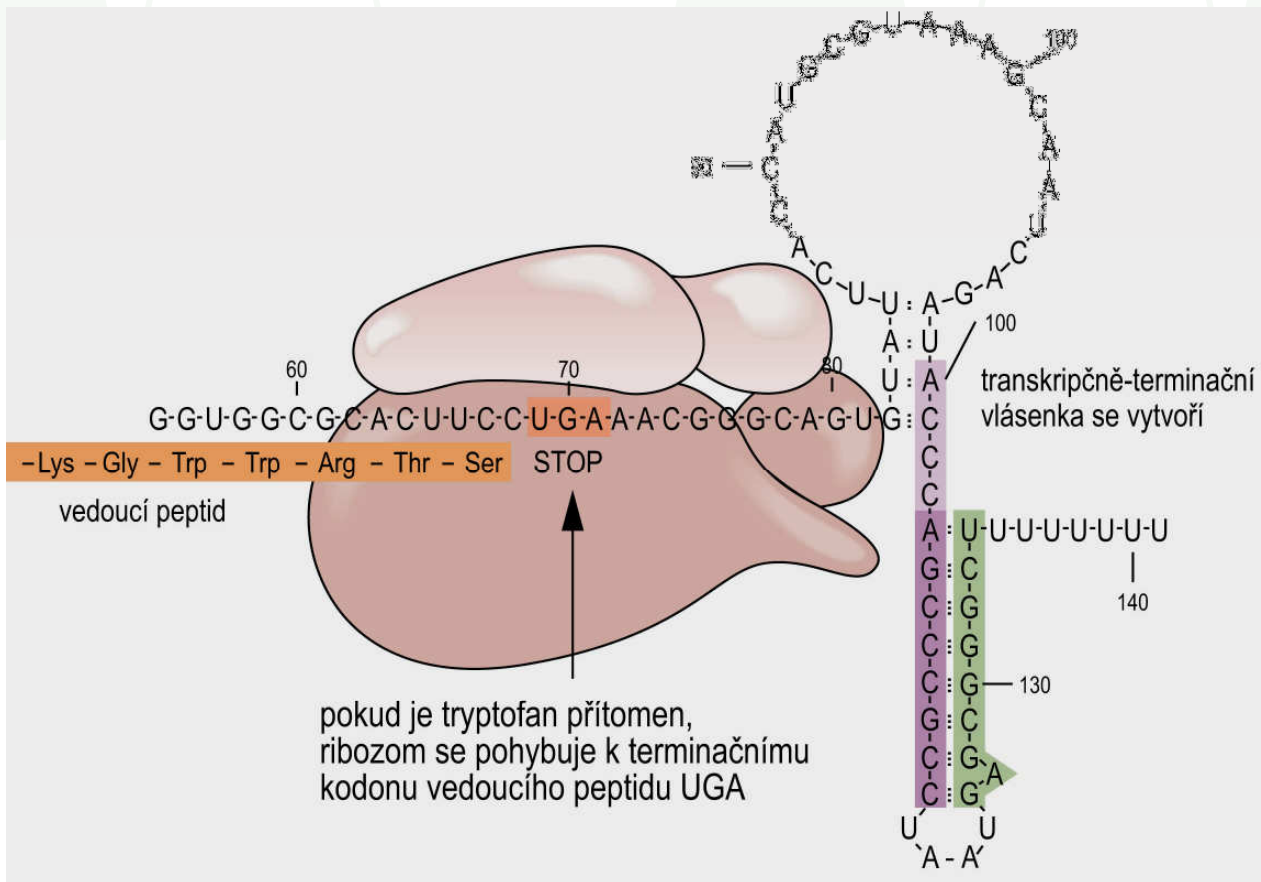


# Průběh atenuace tryptofanového operonu

a. Vysoká koncentrace tryptofanu

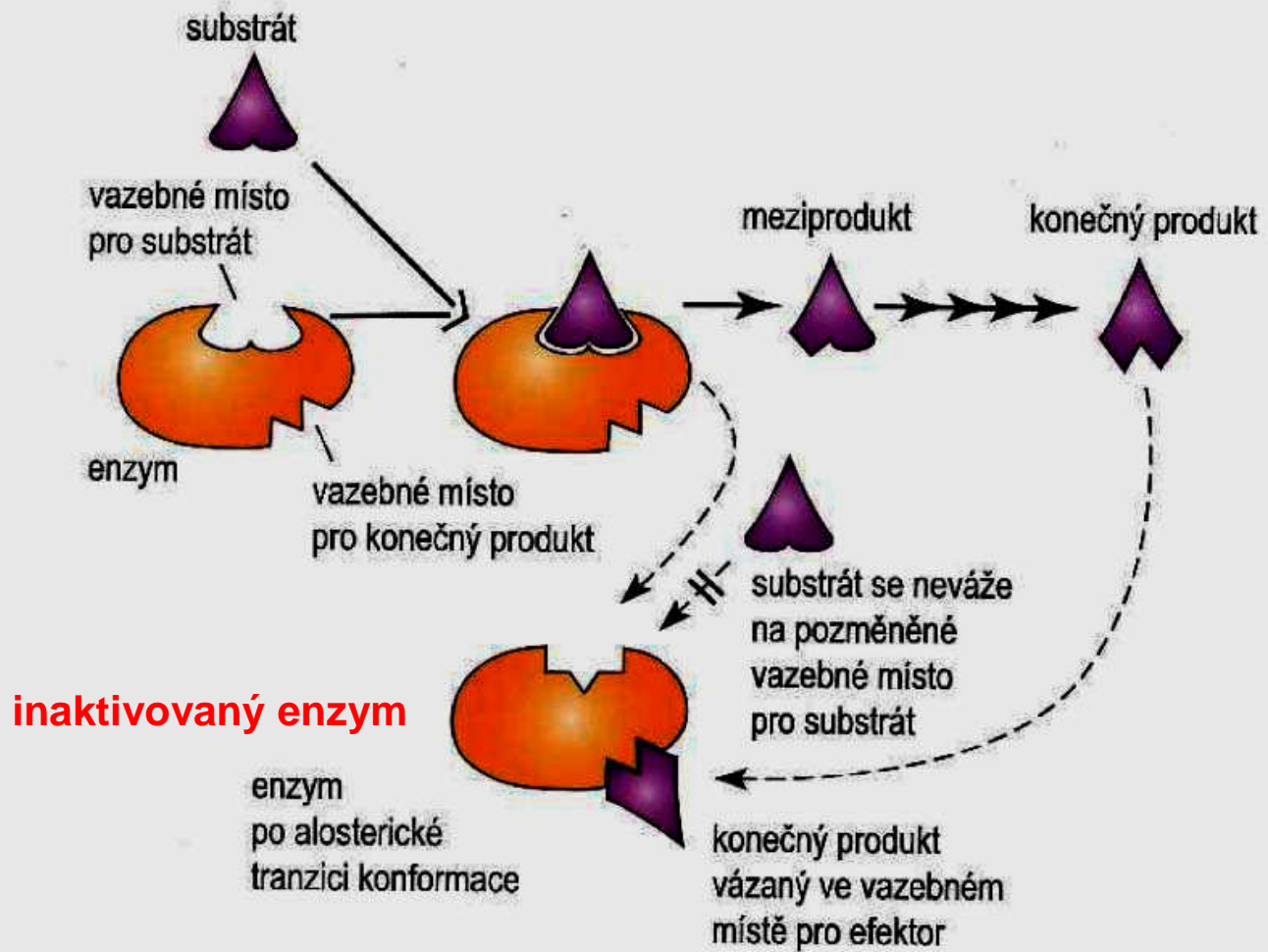
b. Nízká koncentrace tryptofanu





(c) Za přítomnosti dostatečného množství tryptofanu pokračuje translace přes Trp-kodony až k terminačnímu kodonu, a ruší tím párování bází mezi vedoucími oblastmi 2 a 3. Oblast 3 tak zůstává volná a může se párovat s oblastí 4 za vzniku transkripčně-terminační vlásenky, která na atenuátorové sekvenci zastavuje transkripci.

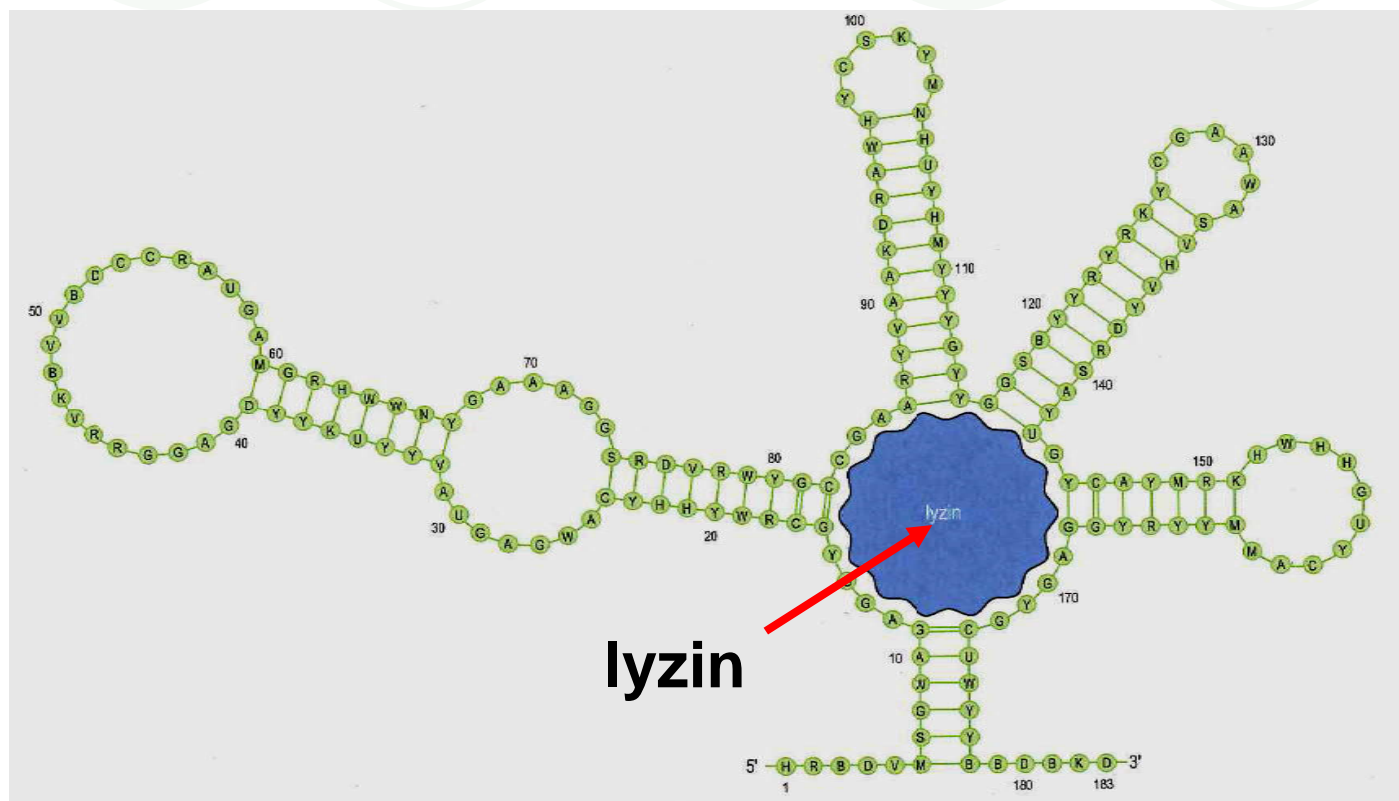




**inaktivovaný enzym**

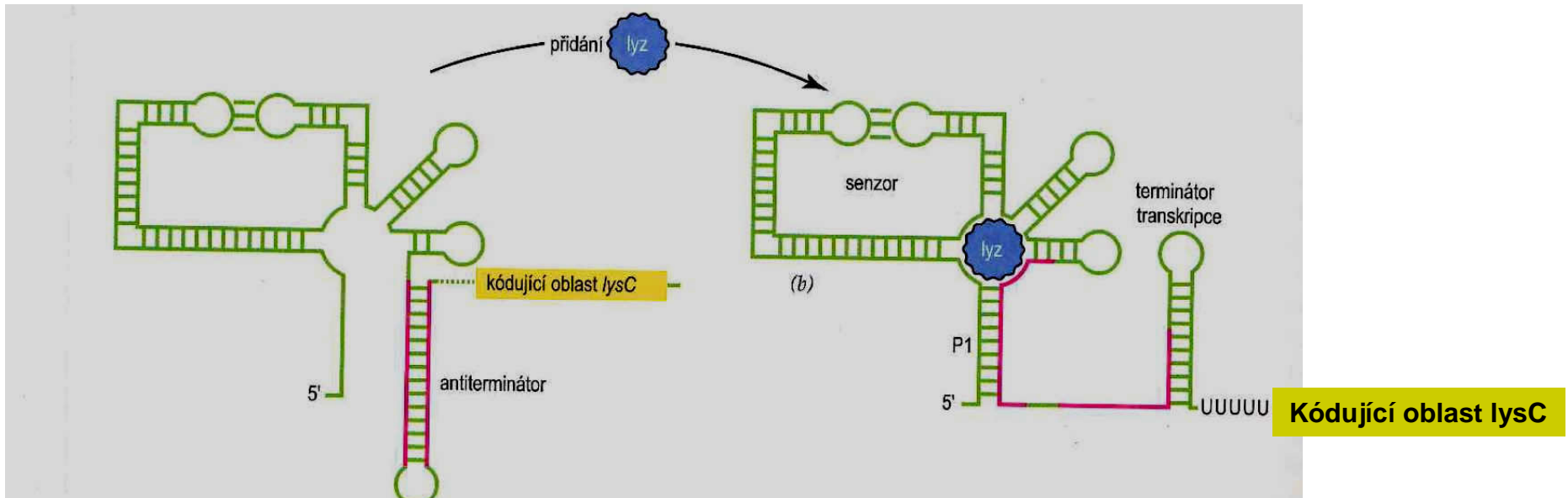
■ **Obr. 17.16** Inhibice aktivity genového produktu zpětnou vazbou. Konečný produkt biosyntetické dráhy se často váže k prvnímu enzymu této dráhy a inhibuje jeho aktivitu, čímž velmi rychle zastaví syntézu sebe sama.

# Struktura lyzin-vázající domény lyzinového riboswitchu



Riboswitch – doména (úsek) molekuly RNA vázající metabolity a mění svou konformaci, čímž ovlivňují (+/-) transkripci nebo translaci

# Lyzinový riboswitch

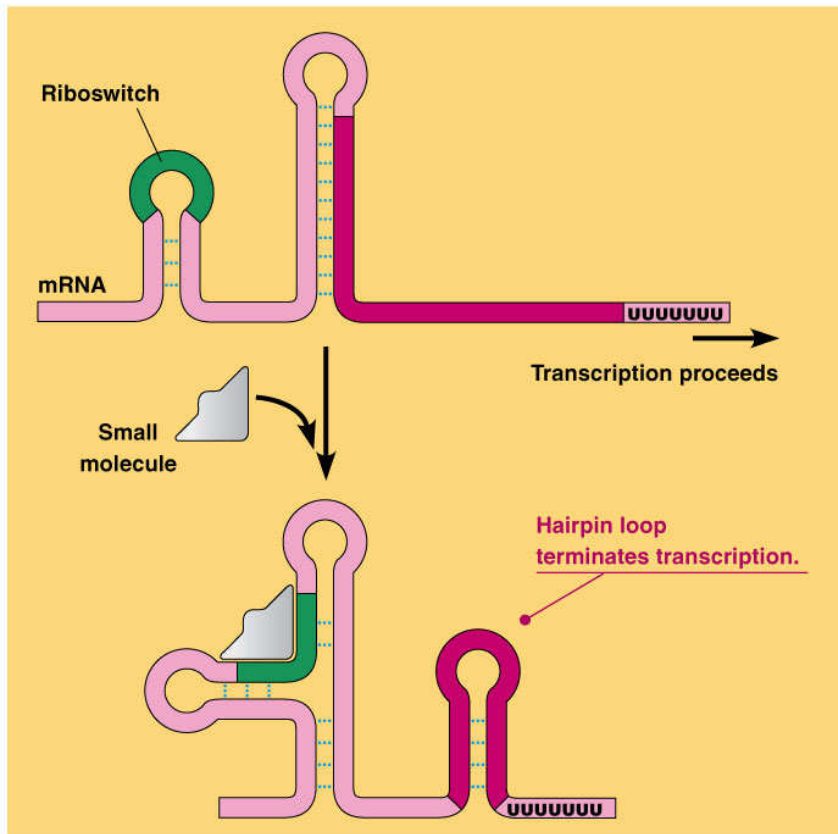


**Lyzin není přítomen,  
gen *lysC* je přepisován**

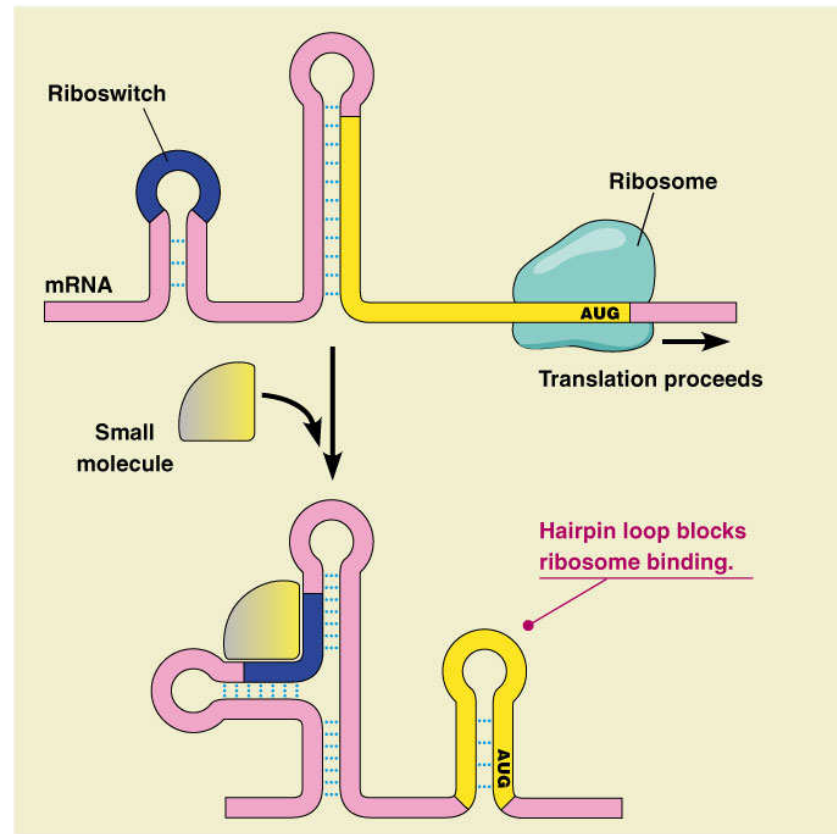
**Lyzin je přítomen,  
transkripce genu *lysC*  
je ukončena**

## Mechanismus působení sekvence riboswitch na mRNA

a) Terminace transkripce. Vazba malé molekuly na riboswitch ve vedoucí sekvenci mRNA navodí vytvoření vlásečkové smyčky, která ukončí transkripci.



a) Inicijace translace. Vazba malé molekuly na riboswitch navodí vytvoření vlásečkové smyčky, v níž se nachází RBS. Ribozom se nenaváže a translace nezačne.



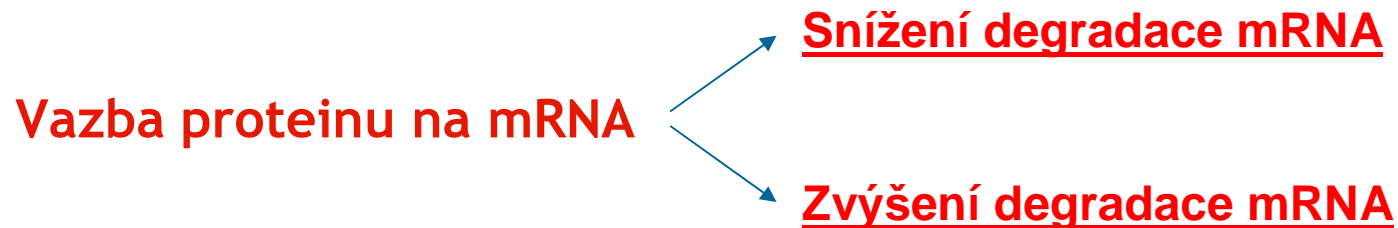
# Regulace na úrovni RNA - translační kontrola

- Kontrola rychlosti degradace mRNA vazbou proteinů
- Úprava mRNA do translatovatelné podoby
- Kontrola translace mRNA regulačními proteiny
  - pozitivní nebo negativní působení
- Regulace translace prostřednictvím antisense RNA
- RNA interference
- mikroRNA (miRNA)

**Regulační protein → DNA - - - regulace transkripce**

**Regulační protein → RNA - - - regulace translace**

## Působení regulačních proteinů na stabilitu molekul mRNA (ovlivnění rychlosti degradace mRNA ribonukleázami)



### Principy ovlivnění stability mRNA po vazbě regulačního proteinu:

1. Protein po vazbě na mRNA přímo ovlivňuje citlivost k ribonukleázám
2. Protein po vazbě na mRNA zesiluje nebo zeslabuje její vazbu na ribozom, což ovlivňuje rychlost její translace a nepřímo poločas její degradace (**vazba mRNA na ribozom ji chrání před degradací**)

**Poločas rozpadu molekul mRNA u *E. coli* = 2-3 min**

# Některé molekuly mRNA musí být před translací nejdříve upraveny

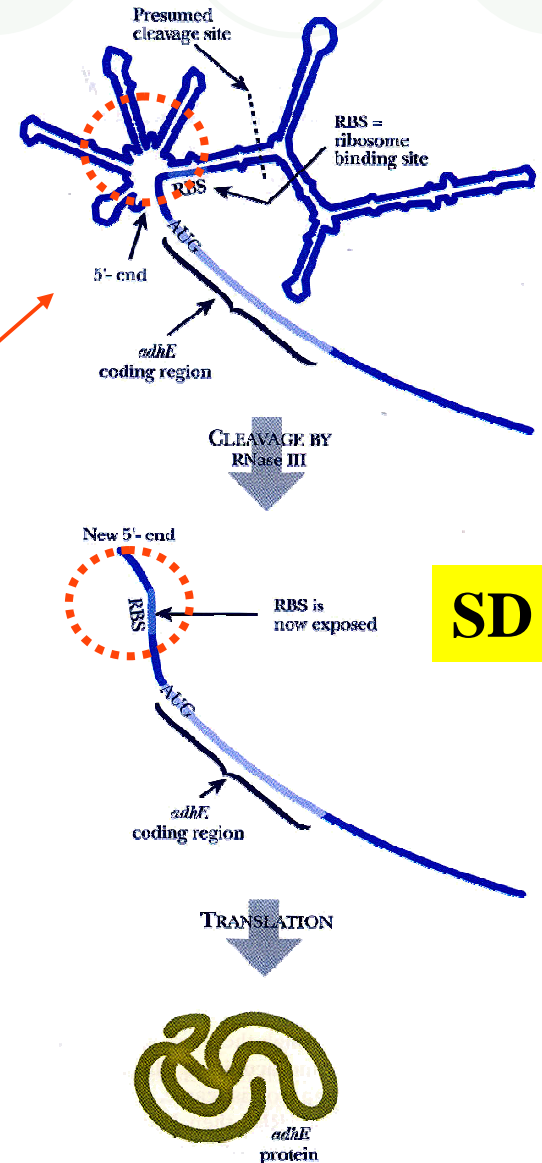
Původní molekula mRNA („pre-mRNA“) genu *adhE* (kóduje alkoholdehydrogenázu u *E. coli*) má sekundární strukturu, v níž jsou RBS a AUG nepřístupny

**5'UTR, 3'UTR**

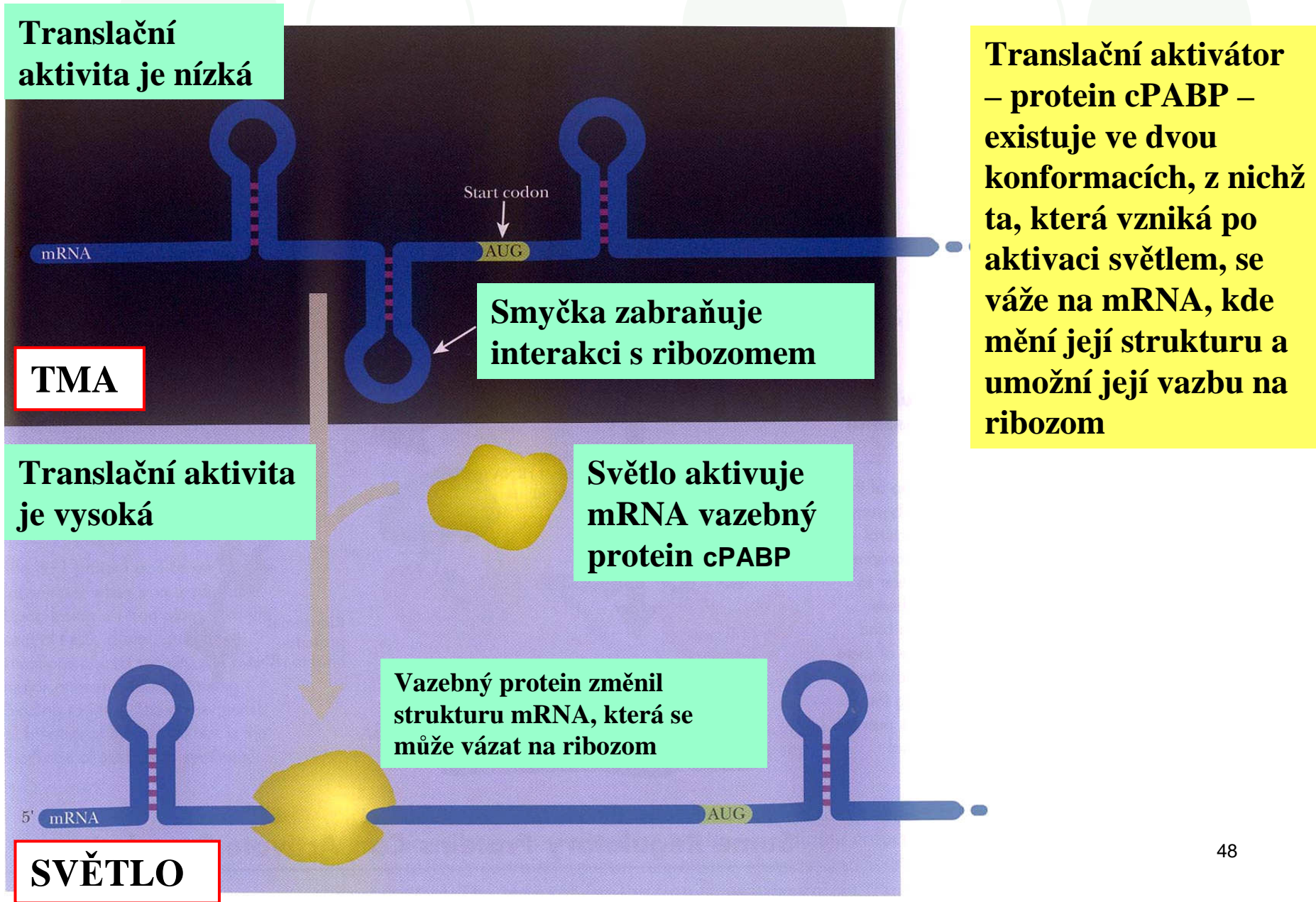
Štěpení mRNA RNázou III před RBS zpřístupní obě místa, takže jsou na ribozomu rozpoznána

RNáza III provádí posttranskripční úpravy tRNA a rRNA

U mutant postrádajících RNázu III není *adhE* mRNA translatována a buňky nejsou schopny růst anaerobně (fermentovat)



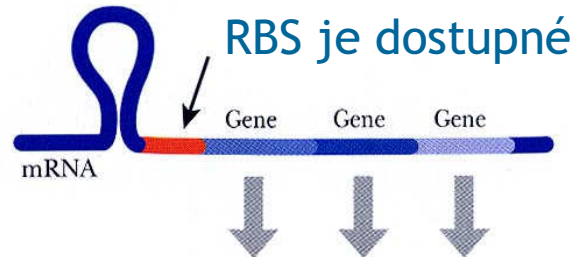
# Aktivace translace chloroplastové mRNA – geny fotosyntézy





# Regulace syntézy ribozomálních proteinů u bakterií (translační úroveň)

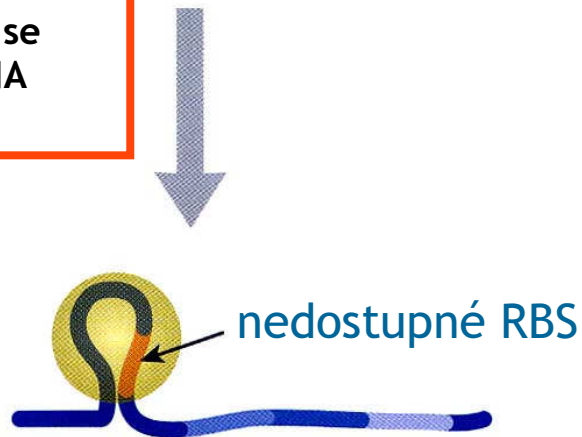
Multigenní mRNA nesoucí geny pro ribozomové proteiny



Dostatek molekul rRNA

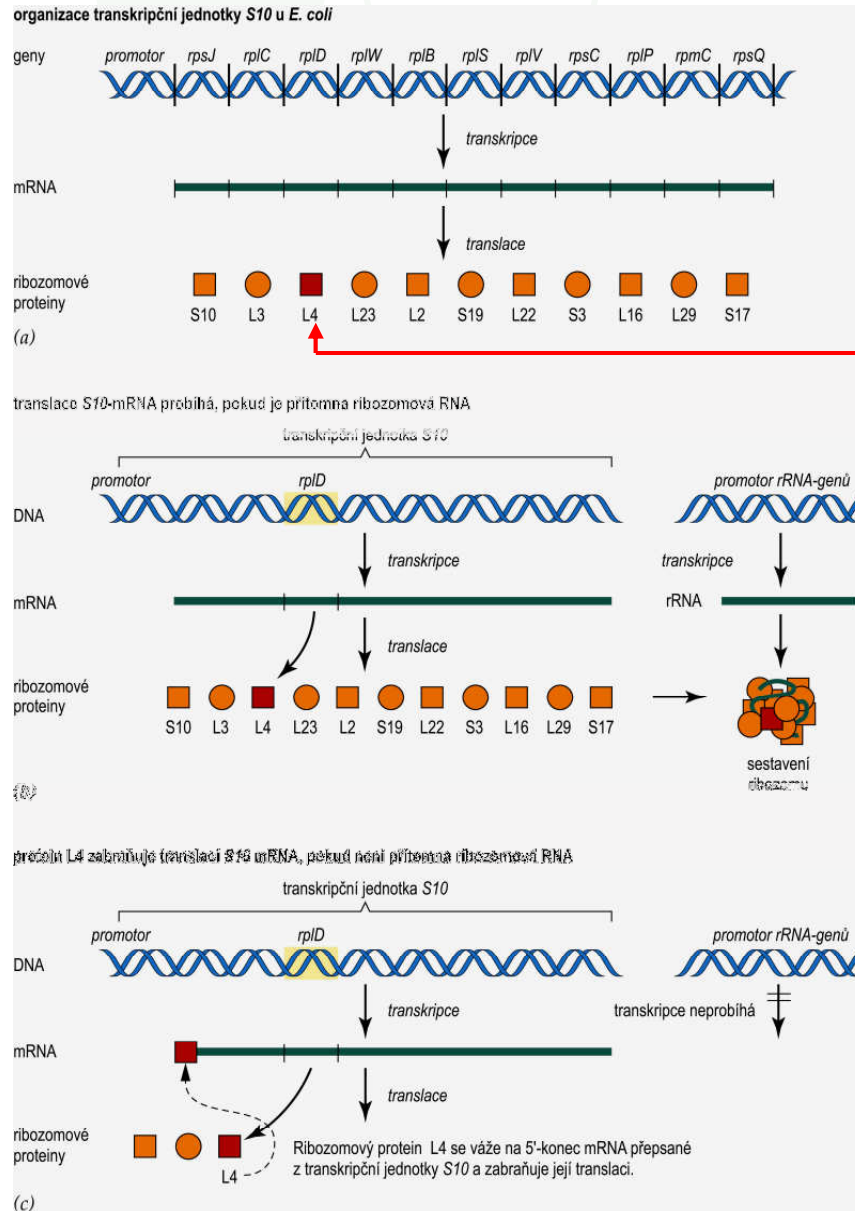
Preferenční vazba

Při nedostatku rRNA se protein váže na mRNA (autoregulace)



Ribozomální proteiny se netvoří

# Regulace transkripční jednotky S10 obsahující 11 genů kódujících ribozomové proteiny u *E. coli*

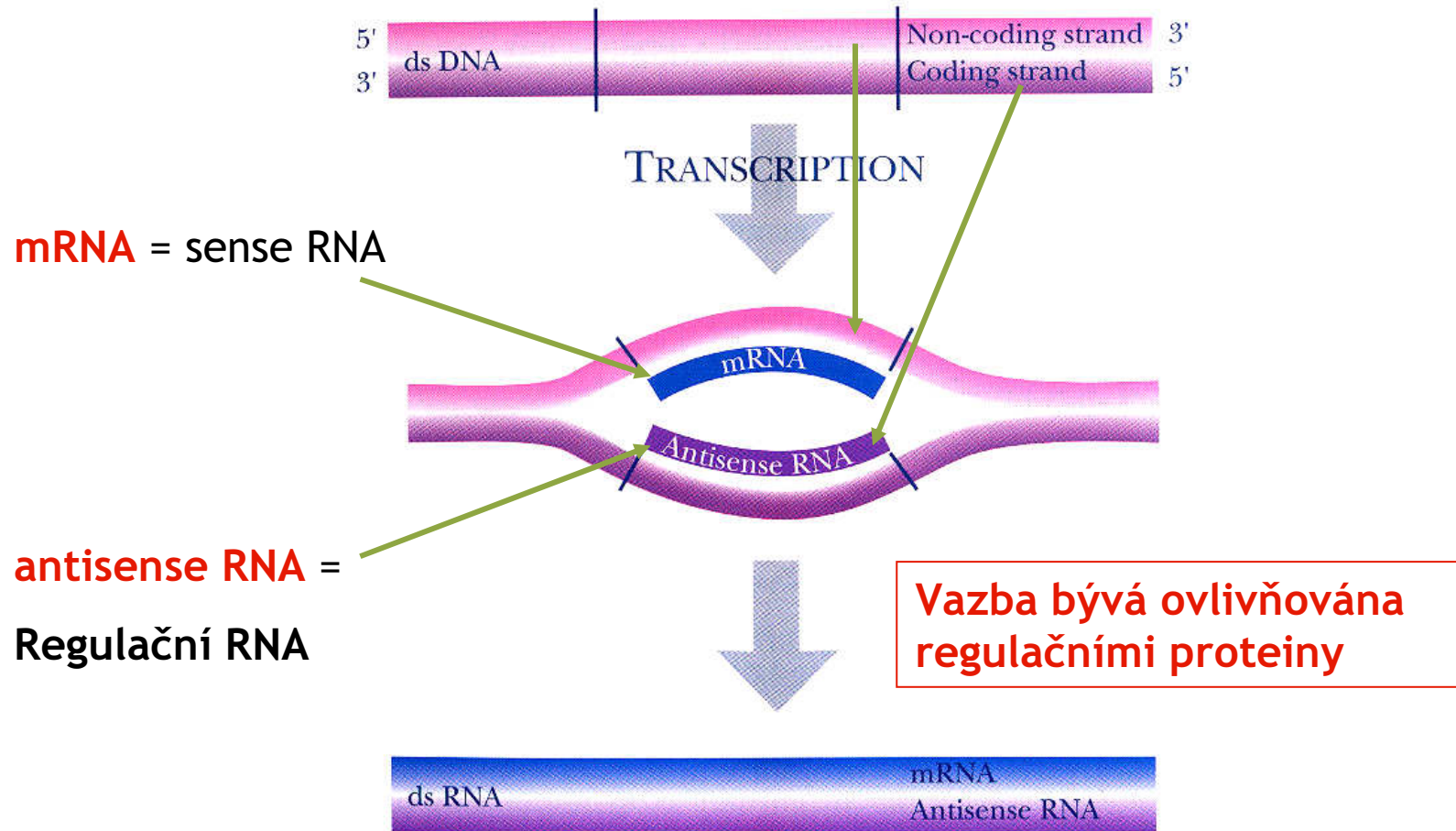


**protein s regulační funkcí**

**Za přítomnosti rRNA se k ní všechny proteiny vážou a vytváří ribozom**

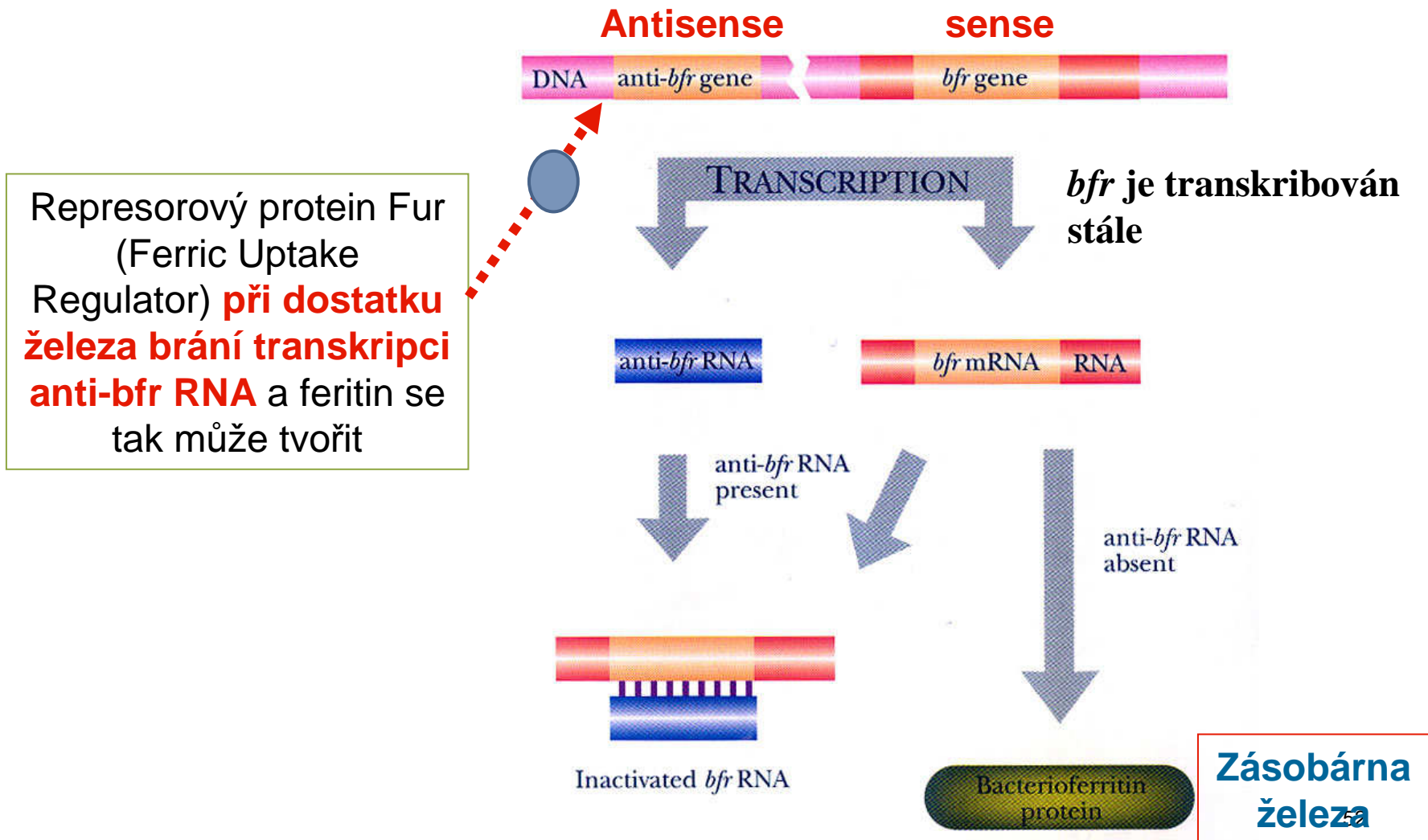
**Za nepřítomnosti rRNA se protein L4 váže na mRNA a zabraňuje její translaci**

# Regulace translace zprostředkovaná protismyslnou mRNA (antisense RNA)



mRNA komplementárně vázaná antisense RNA se nemůže překládat

# Antisense mRNA reguluje syntézu bakterioferitinu – antisense mRNA je přepisována ze samostatného genu

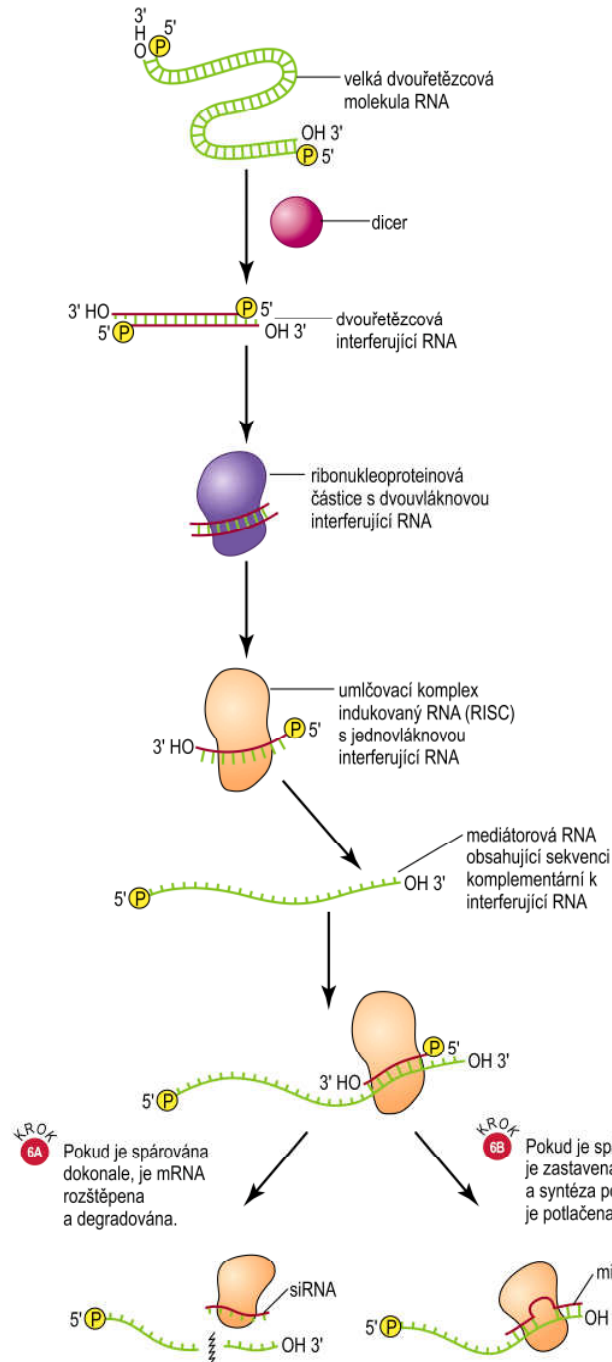


## **RNA interference (RNAi)** = mechanismus umlčování genů, které je indukováno přítomností dvouřetězcové RNA (dsRNA)

- je sekvenčně specifická, dochází k degradaci jak dsRNA tak ssRNA (především mRNA), které jsou homologické s dsRNA, která odpověď vyvolala
- mechanismus patrně vznikl jako obrana proti virům (ssRNA a dsRNA virům) a transpozonům - v průběhu pomnožování virů vznikají replikativní intermediáty (dsRNA), které jsou signálem pro antivirovou odpověď buňky
- RNAi je vyvolána plně komplementární dsRNA o délce alespoň 21-23 bp, delší dsRNA jsou nejdříve štěpeny na fragmenty o délce 21-28 bp nukleázou „**Dicer**“ - tyto fragmenty RNA se označují jako **siRNA (short interfering RNA, silencing RNA)** a jsou vázány proteiny komplexu **RISC (RNA-induced silencing complex)**
- RISC komplex rozmotá a separuje řetězce siRNA, následně se páruje s cílovou RNA a degraduje ssRNA (mRNA), jejichž sekvence je stejná jako u siRNA.
- nukleázová aktivita RISC komplexu (označovaná jako „**Slicer**“) - degraduje cílovou RNA.

Mechanismy podobné RNAi umlčují transkripci cílových genů změnou struktury chromatinu a navozením metylace DNA

# Průběh RNA interference



**KROK 1** Velká dvouřetězcová molekula RNA je rozkrájena na malé, dvouřetězcové interferující RNA dlouhé 21–28 párů bází.

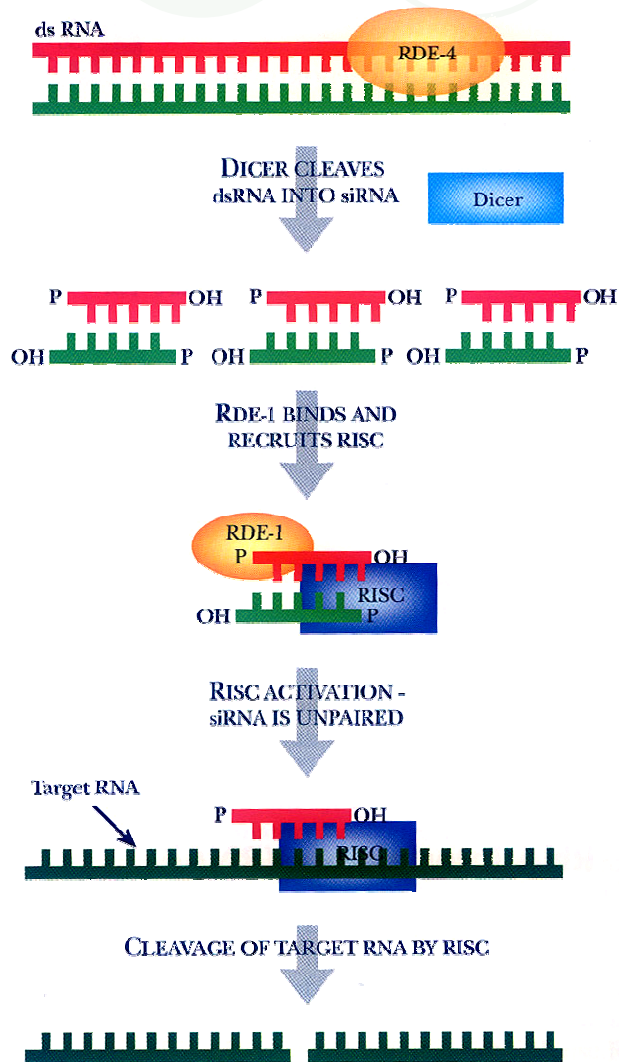
**KROK 2** Malé interferující RNA a proteiny se spojují do ribonukleoproteinových částic.

**KROK 3** Malá interferující RNA je v ribonukleoproteinové částici rozpletena, aby mohla vytvořit umličovací komplex indukovaný RNA (RISC).

**KROK 4** RISC si vybírá za cíl sekvenci v mediátorové RNA, která je komplementární k interferující RNA.

**KROK 5** Interferující RNA v RISC páruje báze se svou cílovou oblastí v mediátorové RNA.

# Mechanismus RNA interference



Rozpoznání dsRNA specifickými proteiny

**Dicer** rozštěpí dsRNA na **siRNA** o délce 21-23 bp s jedno- až dvoubázovými přesahy

**siRNA = short interfering RNA**

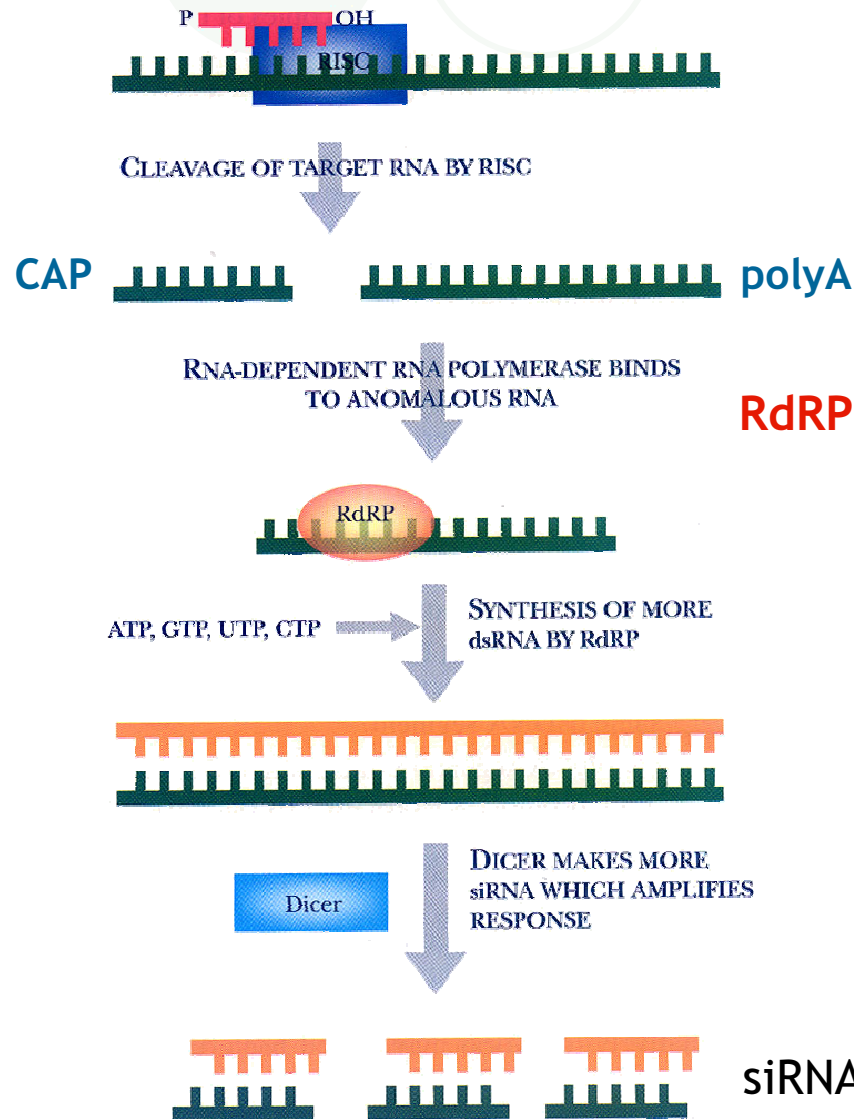
na siRNA se váže další protein, který umožní vazbu a aktivaci RISC komplexu

**RISC = RNA-induced silencing complex**

RISC komplex odděluje řetězce siRNA

RISC se váže na cílovou RNA a štěpí ji  
**Slicer** = nukleázová aktivita RISC komplexu

# Amplifikace RNA interference a její šíření



Slicer štěpí cílovou mRNA

Vznik abnormálních RNA

**RdRP = RNA-dependentní RNA-polymeráza**

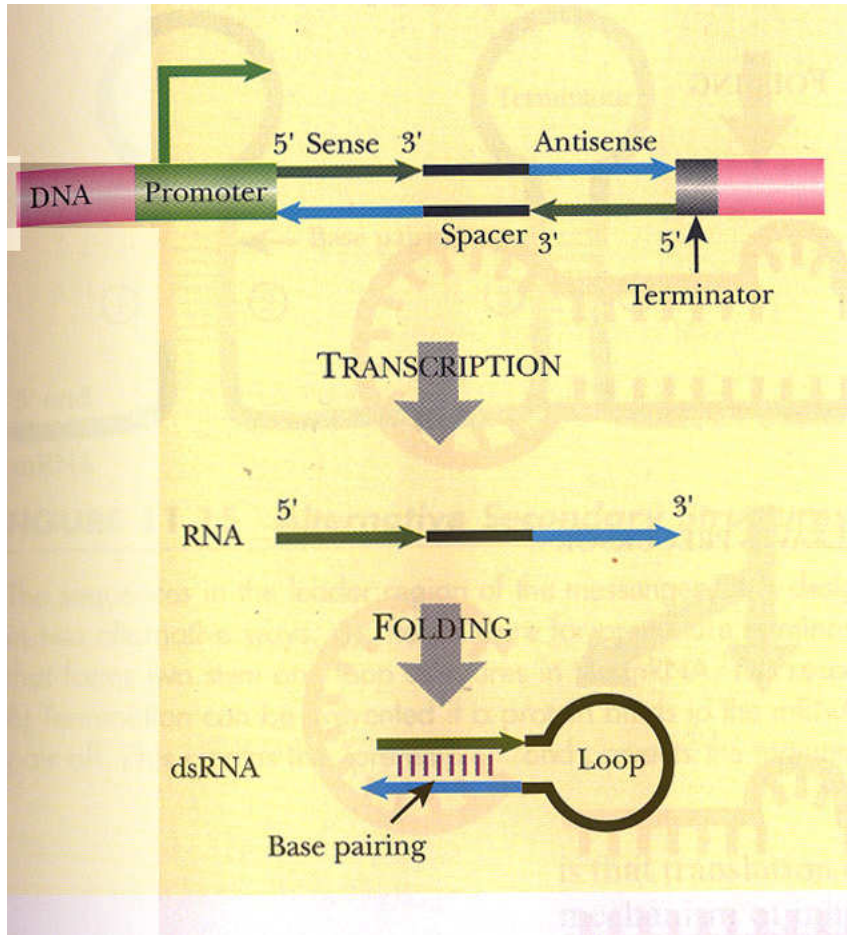
Abnormální RNA slouží jako templát pro RdRP, která pak vytváří mnoho molekul dsRNA, které jsou pak konvertovány dicerem na velký počet molekul siRNA

siRNA → Vazba RISC-k. → Štěpení dalších RNA<sup>56</sup>

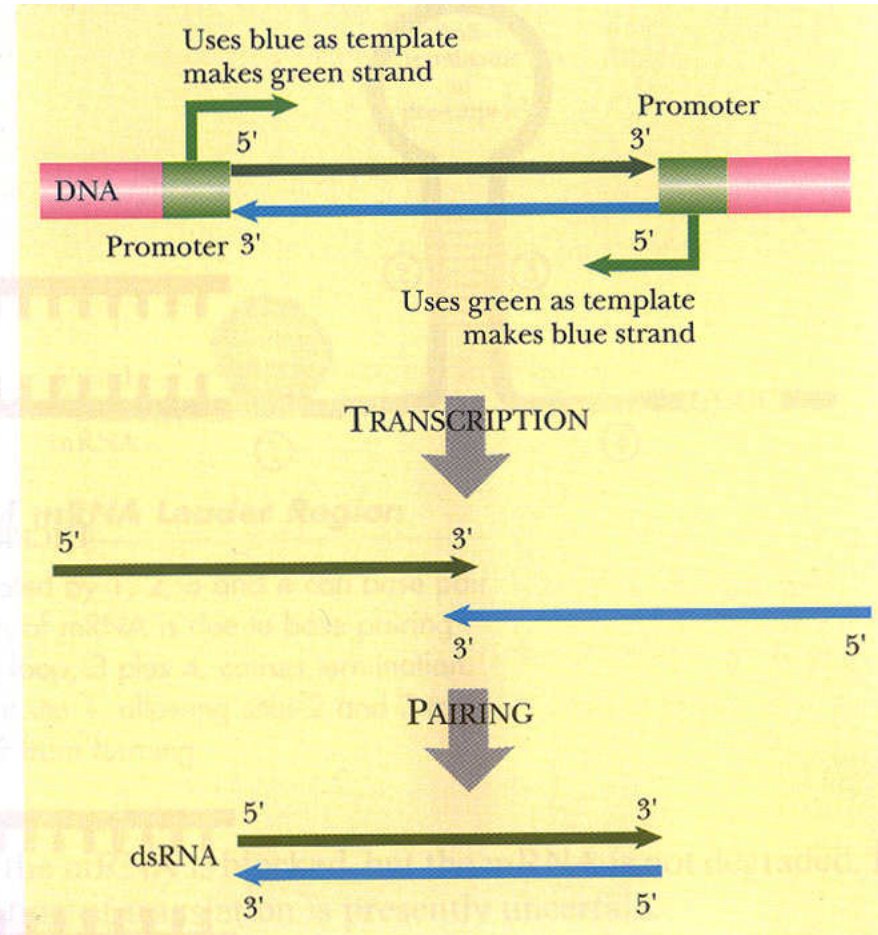


# Experimentální navození RNA interference (vytvoření dsRNA)

## Vytvoření sense/antisense vláseňky



## Použití konstruktů se dvěma promotory



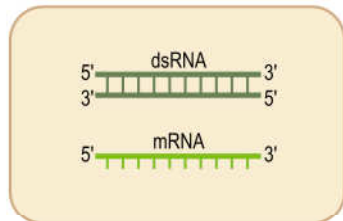
# Dva postupy pro vyvolání RNAi pomocí dsRNA

zabíjení RNAi vyvoláno v mikroinjekcí dsRNA

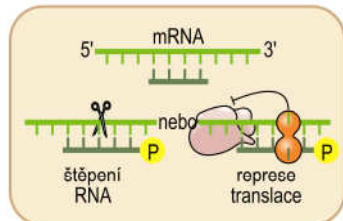
**KROK 1** Dvouřetězcová RNA obsahující požadovanou sekvenci je syntetizována *in vitro*.



**KROK 2** dsRNA je mikroinjekcí vnesena do organismu.



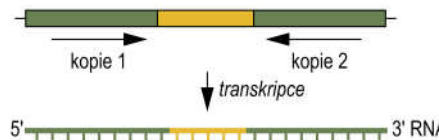
**KROK 3** Degradace mRNA nebo represe její translace pomocí umlčovacího komplexu indukovaného RNA (RISC).



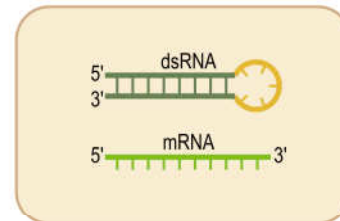
(a)

zabíjení RNAi vyvoláno transkripcí kópního komplementárního RNA

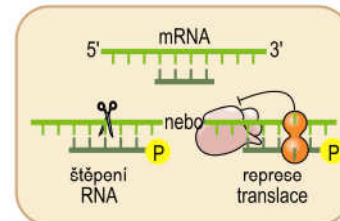
**KROK 1** Expresní genová kazeta nesoucí dvě kopie požadované sekvence v obrácené orientaci je vnesena do genomu.



**KROK 2** Komplementární sekvence v mRNA se párují a vytvářejí částečně dvouřetězcovou „vlášenkovou“ strukturu.



**KROK 3** Degradace mRNA nebo represe její translace pomocí umlčovacího komplexu indukovaného RNA (RISC).



(b)

**Reverzní genetika:**

**-Antisense RNA**

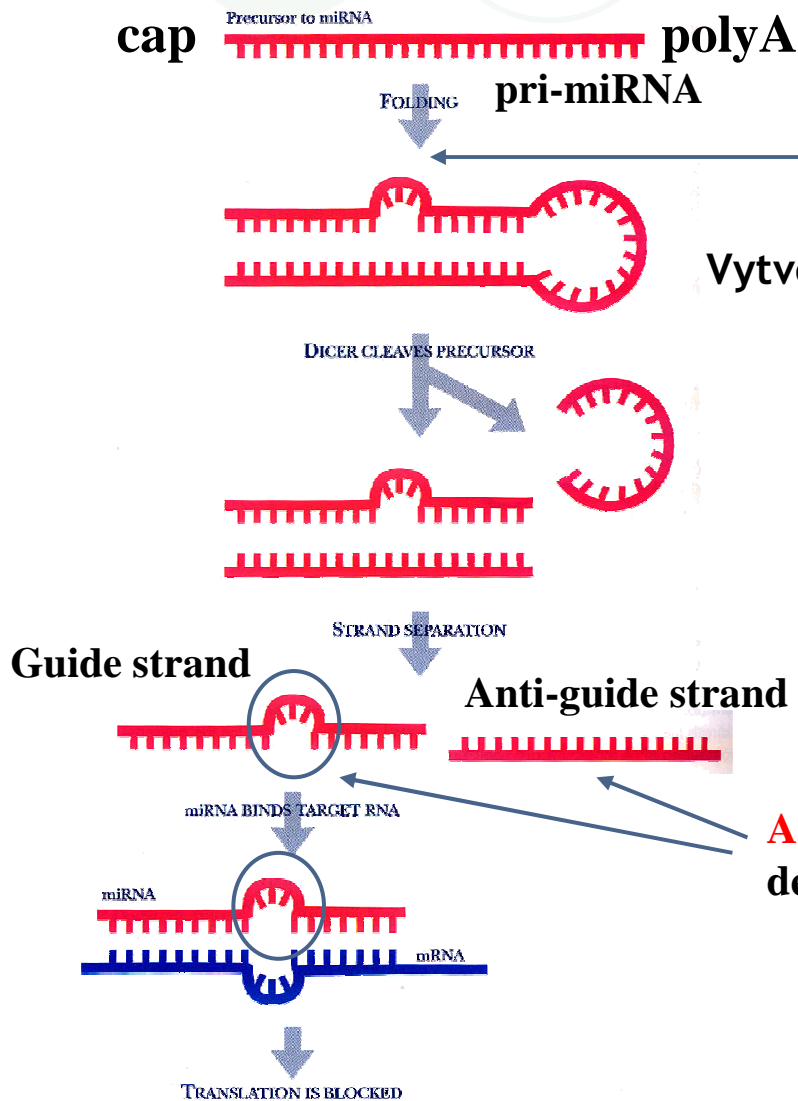
**-- inzerční inaktivace genů**

**-RNAi**

# microRNA (miRNA)

- **microRNA (miRNA)** - krátké jednořetězcové molekuly RNA o délce 21-23 nt, které regulují expresi genů blokováním translace mRNA (příp. indukují její degradaci podobně jako u siRNA)) - vážou se především na 3' -nepřekládanou oblast (u rostlin na kódující oblasti mRNA nebo 5' -nepřekládané oblasti)
- Jsou vytvářeny geny **mir**, které jsou transkribovány, ale nepřekládají se. **Geny bývají v intronech nebo exonech nebo polycistronických jednotkách, z nichž jsou upravovány jednotlivé miRNA.** Byla zjištěna u červů, hmyzu, savců a rostlin, objevena poprvé u *Caenorhabditis elegans* v r. 1990 (small temporal RNA, stRNA), kde řídila časovou posloupnost vývoje během přeměny larvy v imago.
- Řada miRNA se účastní regulace vývoje, cílem působení jsou mRNA kódující transkripční faktory regulující expresi dalších genů, některé miRNA mají vztah k buněčnému dělení a rakovině. **U člověka až několik tisíc genů.**

# Micro RNA (miRNA)



Prekurzor miRNA (pri-miRNA, ~ 70 nt)  
vytvořený transkripcí chromozomových  
genů **v jádře** (možný přepis obou řetězců)

nukleáza Drosha + protein Pasha váže  
dsRNA („microprocessor complex“)  
Vytvoření neúplné vlásenky se smyčkou: pre-miRNA

Štěpení vlásenky dicerem (**v cytoplazmě**)

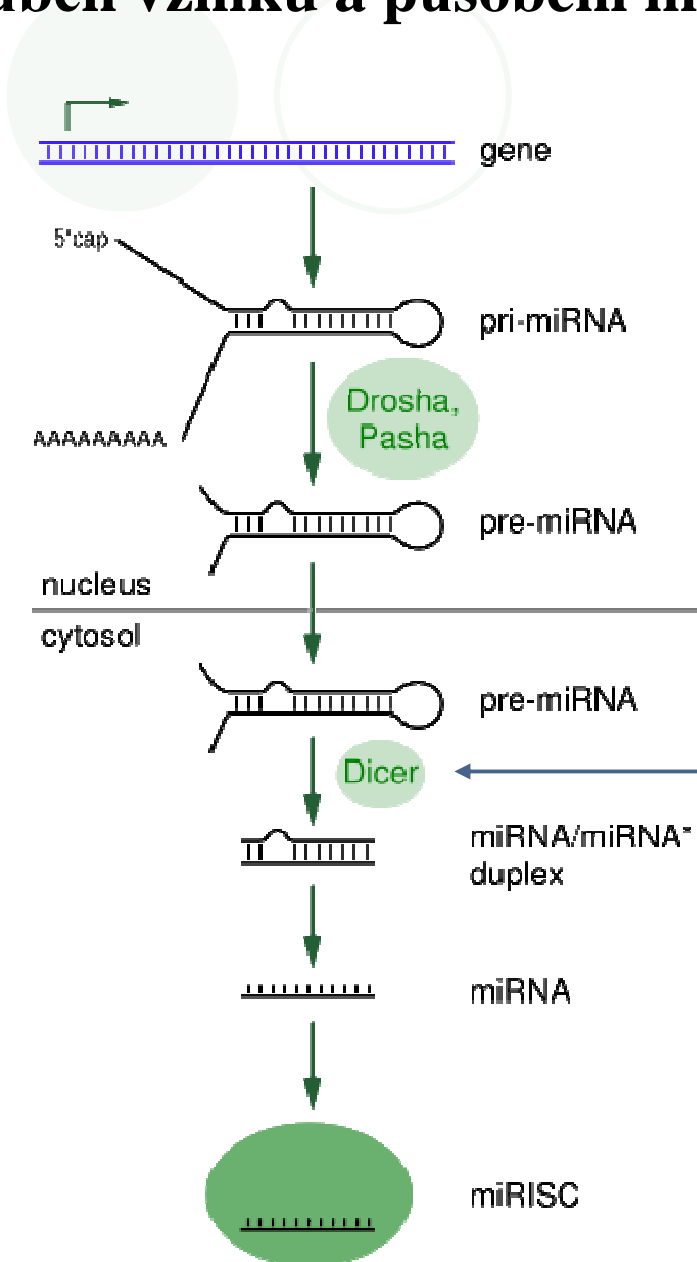
Vazba specifického proteinu

Separace řetězců a vznik miRISC

**Argonaute** protein – součást RISC - RNáza  
degradující druhý řetězec

Jeden z řetězců miRNA se váže na  
cílovou (komplementární – i jen  
částečně) mRNA a tím blokuje její  
translaci nebo navodí její rozklad

# Průběh vzniku a působení miRNA - animace



Může obsahovat více prekurzorů miRNA

Pre-miRNA (asi 16%) mohou být upravovány editací RNA (A → Inosin)

Dicer- endonukleáza RNAIII

miRISC = RISC komplex s navázanou miRNA)

## Úloha miRNA v medicíně

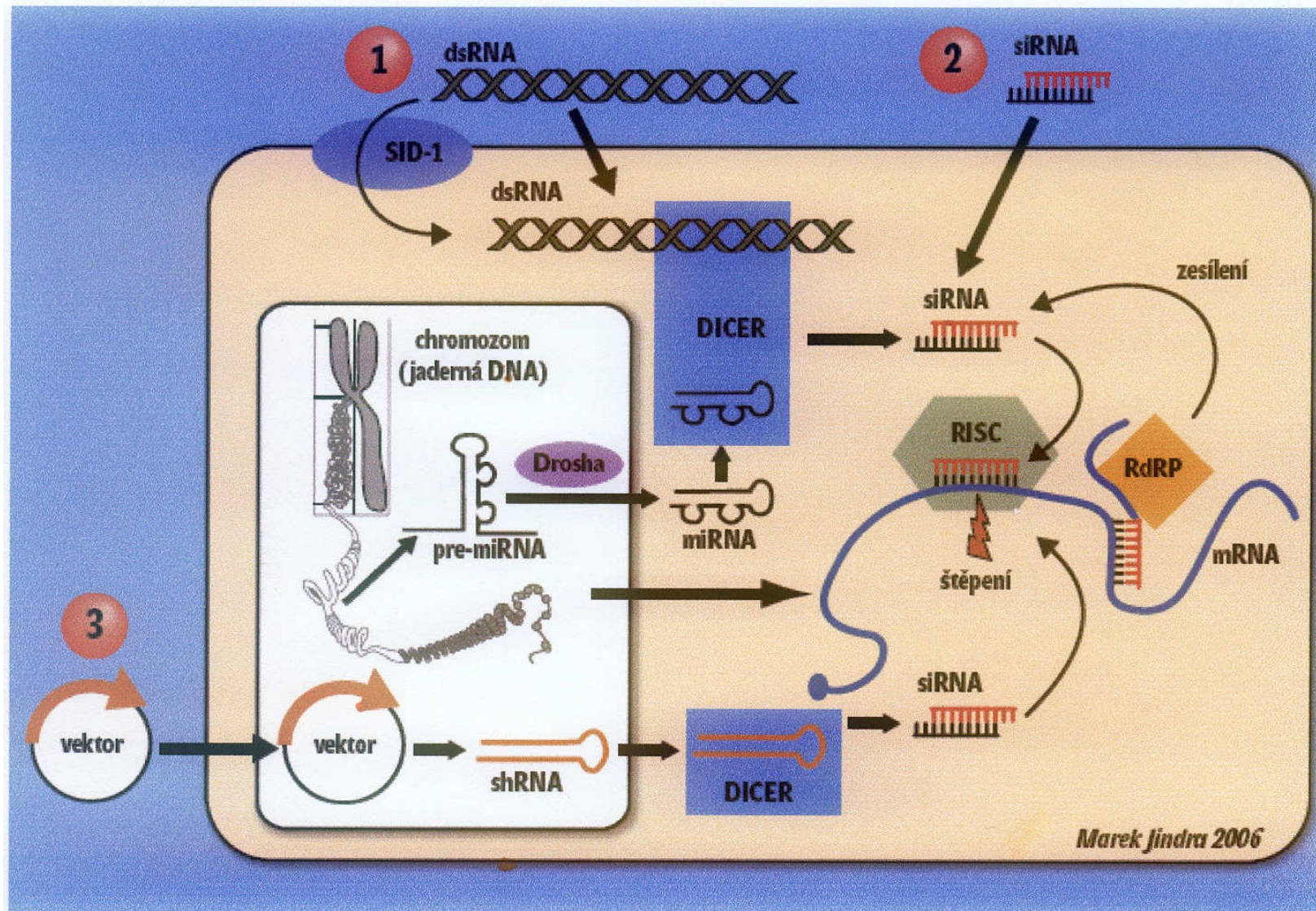
V lidském genomu je zhruba 5 000 genů pro miRNA, které ovlivňují více než 60% genů

- Jedna miRNA se může vázat na stovky sekvencí v mRNA,
- Určitá mRNA může být regulována mnoha různými miRNA
- V různých buněčných typech a tkáních jsou různé sady miRNA

### Poruchy ve fungování miRNA vedou k vážným chorobám

- rakovina (možnosti diagnostiky různých forem) – diagnostika a prognostika (např. kolorektální karcinom) na základě profilování miRNA (miRNA jako biomarkery)
- kardiovaskulární a nervové choroby
- miRNA jsou testovány jako léky  
(vztah k různým chorobám: alkoholismus, obezita, diabetes aj).

# RNA interference – možné zdroje siRNA



# Charakteristika genomu a proteomu eukaryot

- Počet genů u savců = 20 000 - 25 000 (**současný odhad: 21 000 kódujících genů a 9 000 nekódujících RNA genů**) – **typická lidská buňka exprimuje jen 30-60% genů, ale s různou intenzitou**
- Všechny buňky mají stejnou genetickou výbavu (**stejný genom**)
- 200-250 typů buněk, obsahujících 20 000 různých proteinů, z nichž okolo 6 000 je tkáňově specifických
- 2 000 běžných proteinů vyskytujících se ve všech buňkách (produkty asi **3000- 6000 provozních genů**)
- jednotlivé buněčné typy vytvářejí okolo 100 pro něj charakteristických bílkovin, které se nenacházejí v jiných buněčných typech

**Diferenciace** = výsledek zapínání a vypínání různých genů

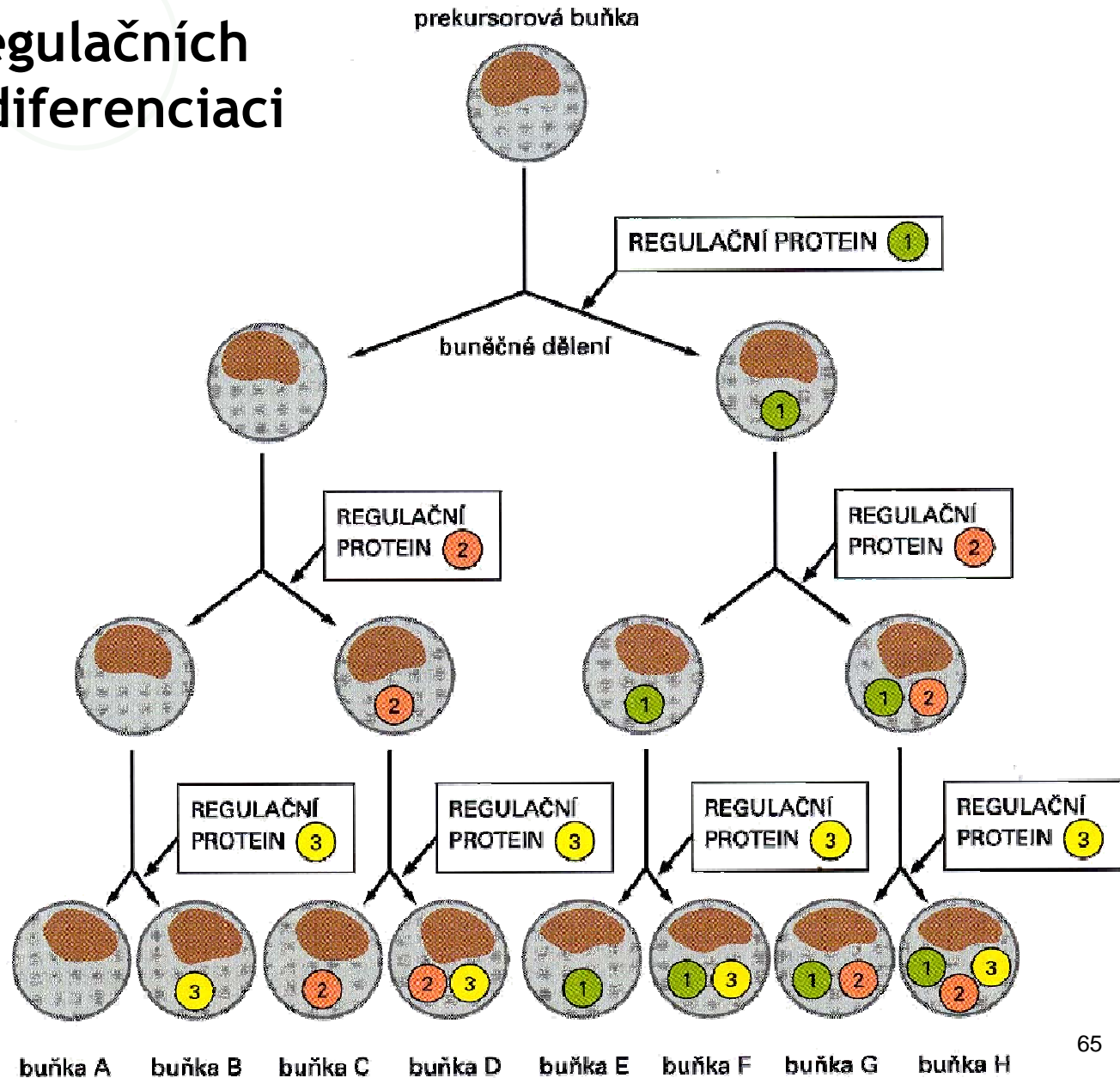


# Kombinace regulačních proteinů při diferenciaci buněk

3 regulační proteiny



8 buněčných typů



# Transkripční aktivita eukaryotické buňky

1. **Bazální transkripce** - za účasti bazálních TF, minimální úroveň transkripce
2. **Konstitutivní transkripce** - za účasti bazálních a konstitutivních TF, umožňujících odlišnou rychlost transkripce různých genů

Obecné TF = bazální + konstitutivní → aktivují provozní geny

3. **Indukovaná transkripce** - transkripce regulovaná indukovatelnými specifickými TF, jejichž aktivita je ovlivněna podněty z vnějšího prostředí.

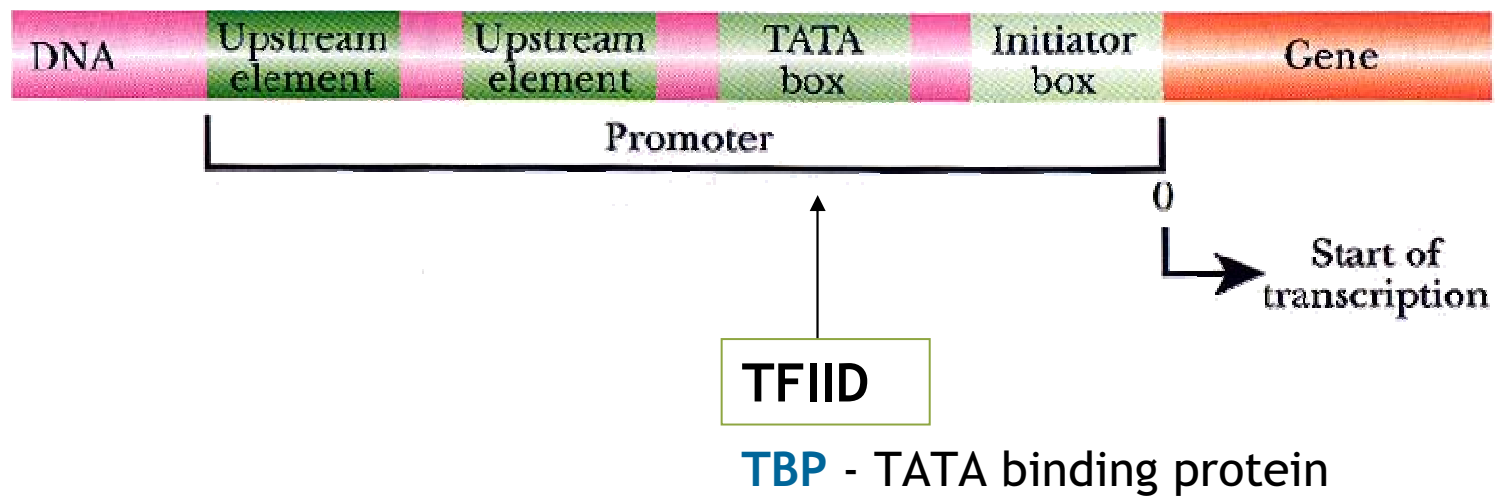
**Specifické TF = buněčně a časově specifické regulační proteiny**

# Podmínky pro zahájení transkripce u eukaryot

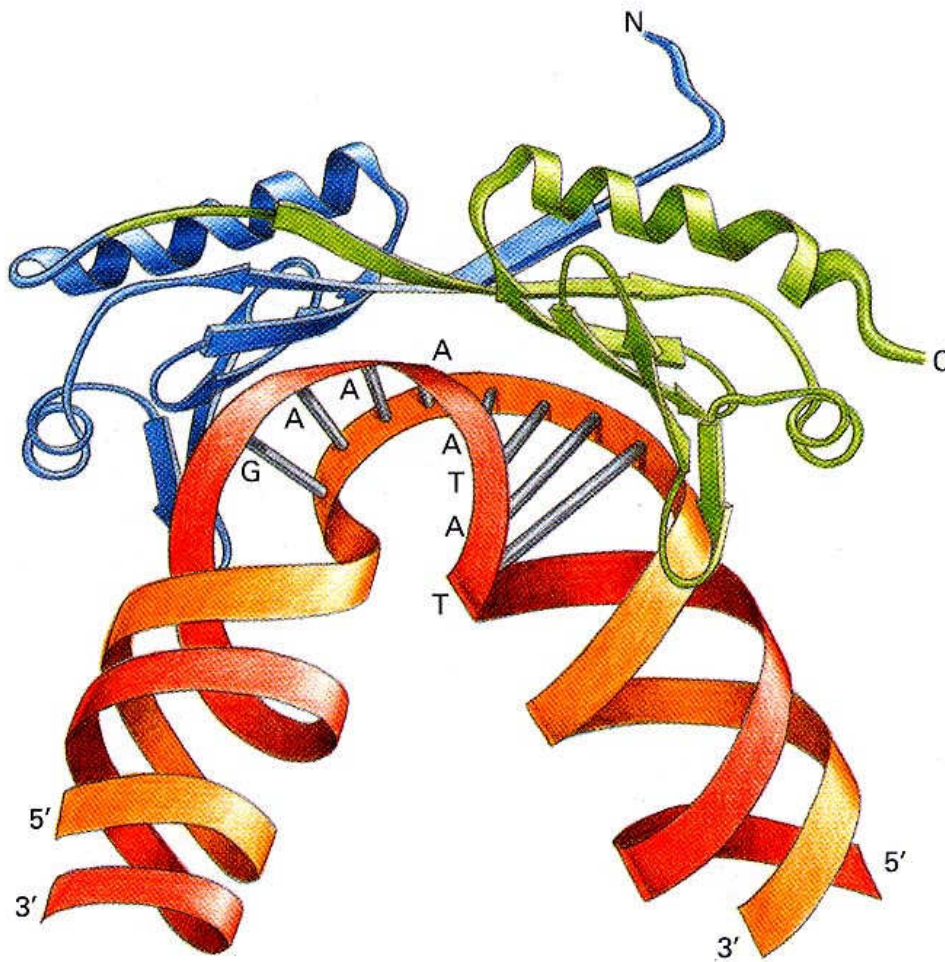
## Uvedení RNA-polymerázy do aktivního stavu

- vazba TF na promotor (za účasti aktivátorů a koaktivátorů, nezbytných pro vytvoření přediniciačního komplexu)
- vazba specifických (indukovatelných) TF na zesilovače transkripce (více TF na více RE)
- vzájemná interakce TF umožňující interakci promotoru a zesilovače transkripce → **aktivní stav RNA polymerázy**

# Složky eukaryotického promotoru pro RNA-polymerázu II

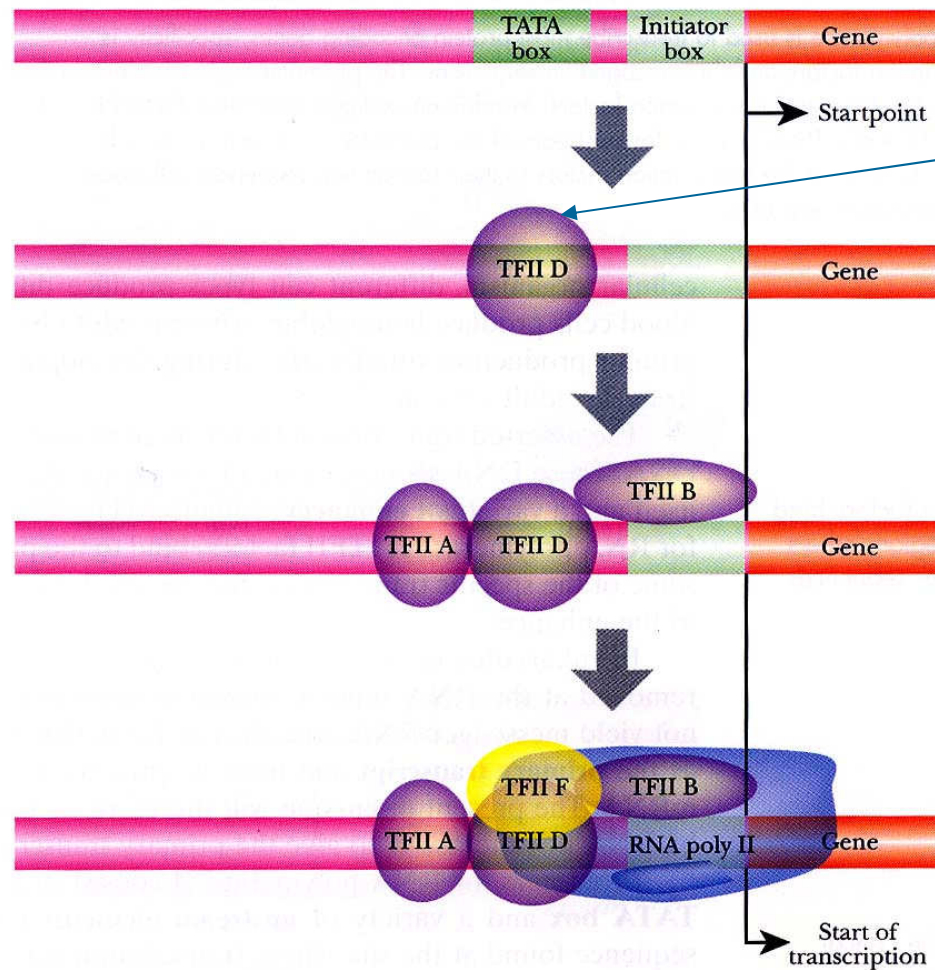


# Trojrozměrná struktura TBP navázaného na TATA-box



**Obrázek 8-24** Trojrozměrná struktura TBP navázaného na TATA-box. TBP (TATA-vazebný protein) je podjednotkou obecného transkripčního faktoru TFIID, který je zodpovědný za rozpoznání a navázání se na sekvenci TATA-boxu v DNA (červeně). Unikátní ohnutí způsobené proteinem TBP – dvě smyčky dvojšroubovice oddělené částečně rozvinutou DNA – může sloužit jako označení promotorové sekvence pro další obecné transkripční faktory. TBP tvoří jeden polypeptidový řetězec sbalený do dvou velice si podobných domén (modře a zeleně).

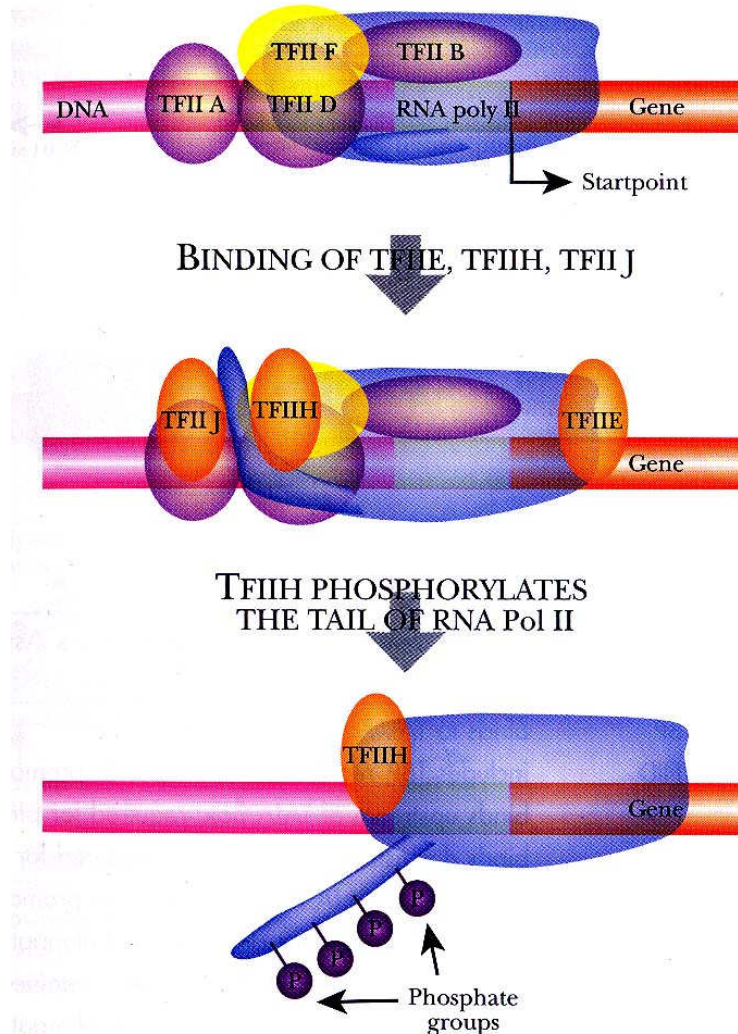
# Iniciační fáze transkripce u eukaryot - navázání RNA-polymerázy na promotor



+TBP (TATA vazebný protein)

RNA-polymeráza je schopná zahájit syntézu RNA

# Zahájení transkripce RNA-polymerázou



Vytvoření iniciačního komplexu obsahujícího přes 20 polypeptidů

Fosforylace C-konce (CTD – C terminální domény) RNA-polymerázy transkripčním faktorem TFIIH

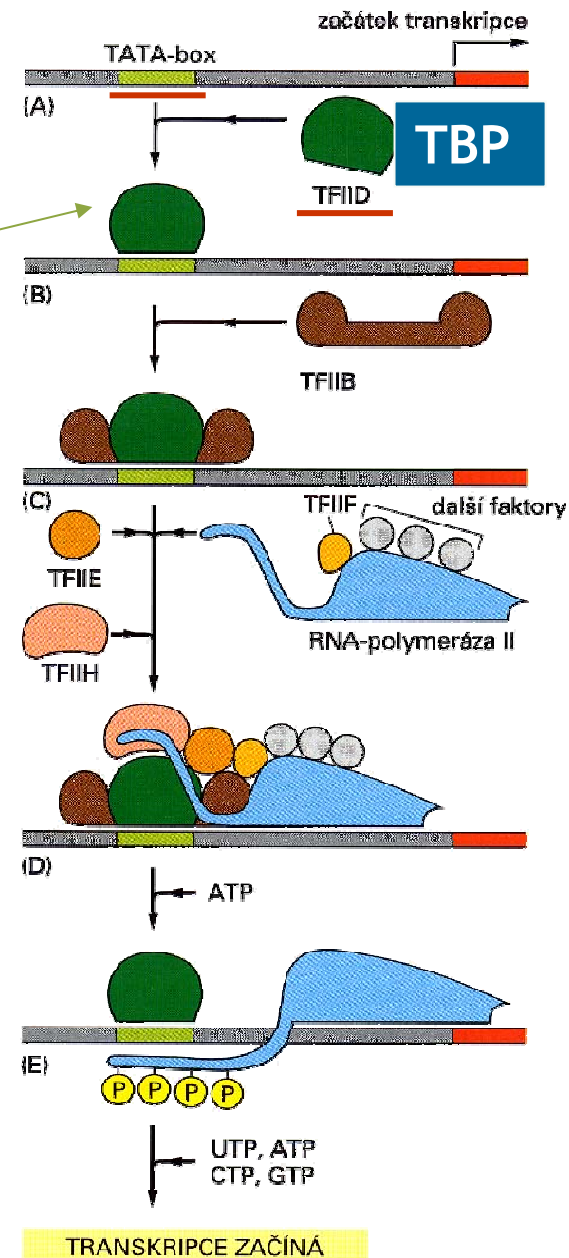
Uvolnění všech TFII vyjma TFIIH, zahájení transkripce

# Iniciace transkripce RNA-polymerázou II

Nastává ohyb DNA

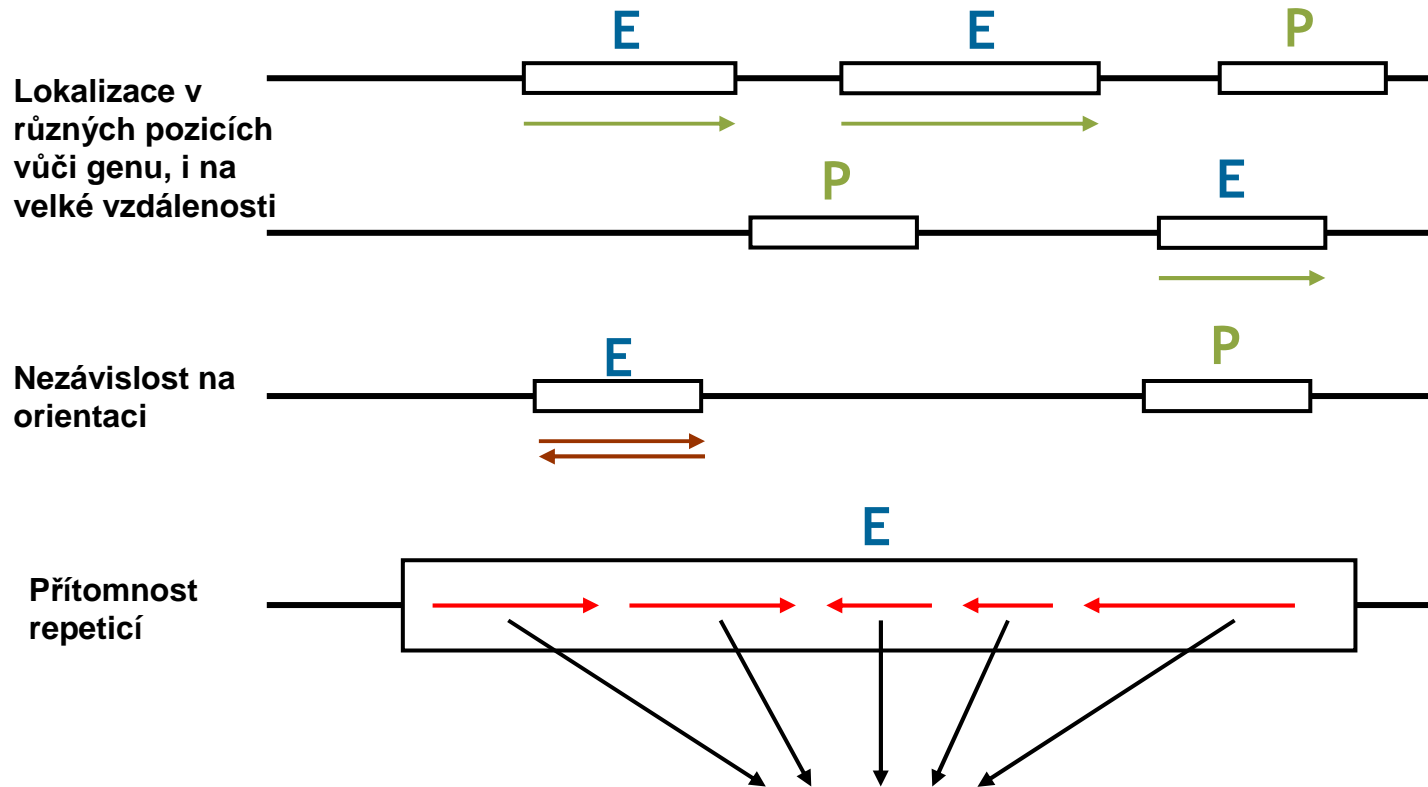
Vznik transkripčního iniciačního komplexu

Fosforylace polymerázy, její uvolnění z komplexu a zahájení transkripce



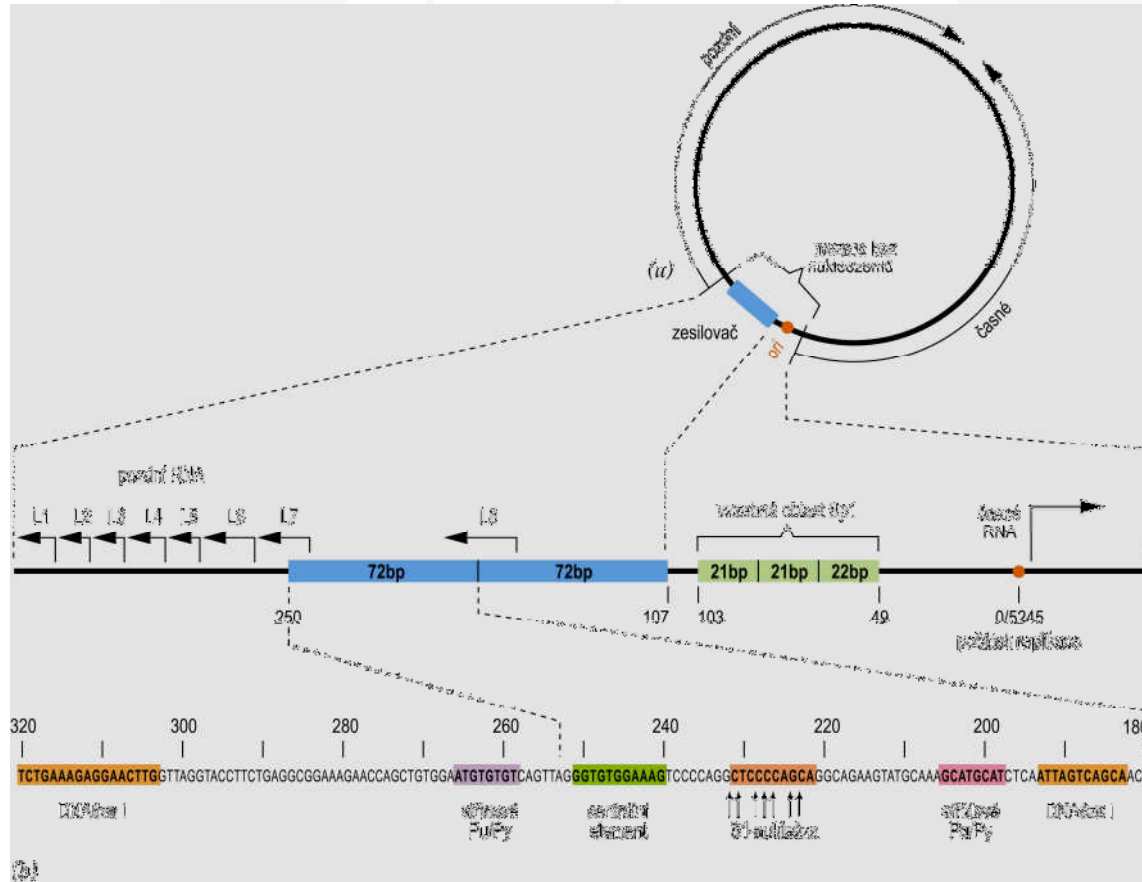


# Vlastnosti zesilovače transkripce

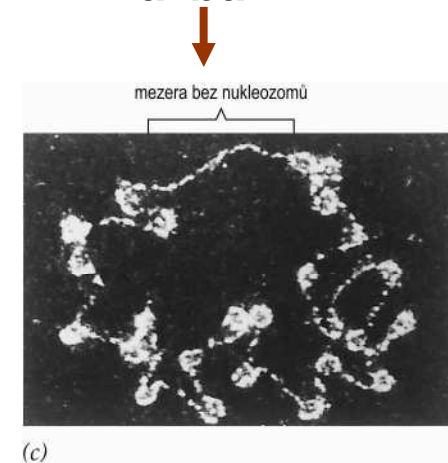


**Sekvenční motivy (RE), na něž se vážou regulační proteiny (transkripční faktory)**

# Struktura zesilovače transkripce viru SV40

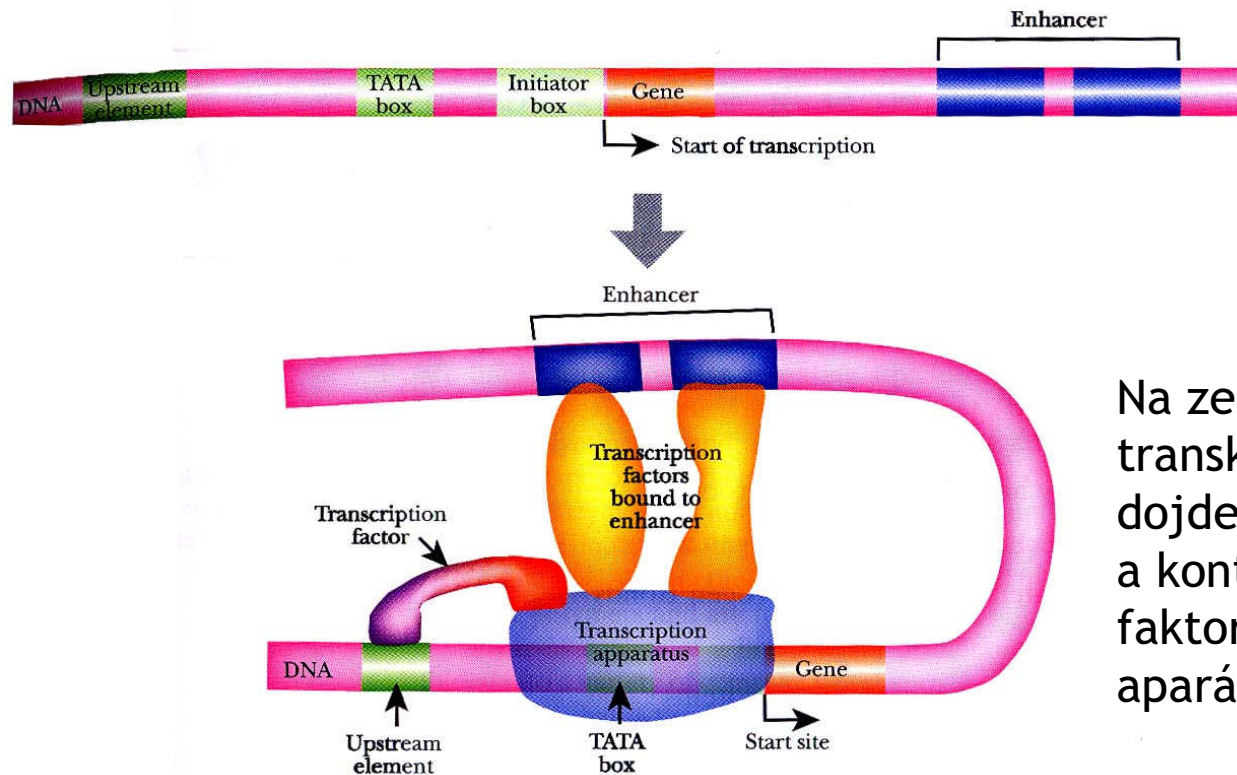


sekvence zesilovače –  
vazba TF



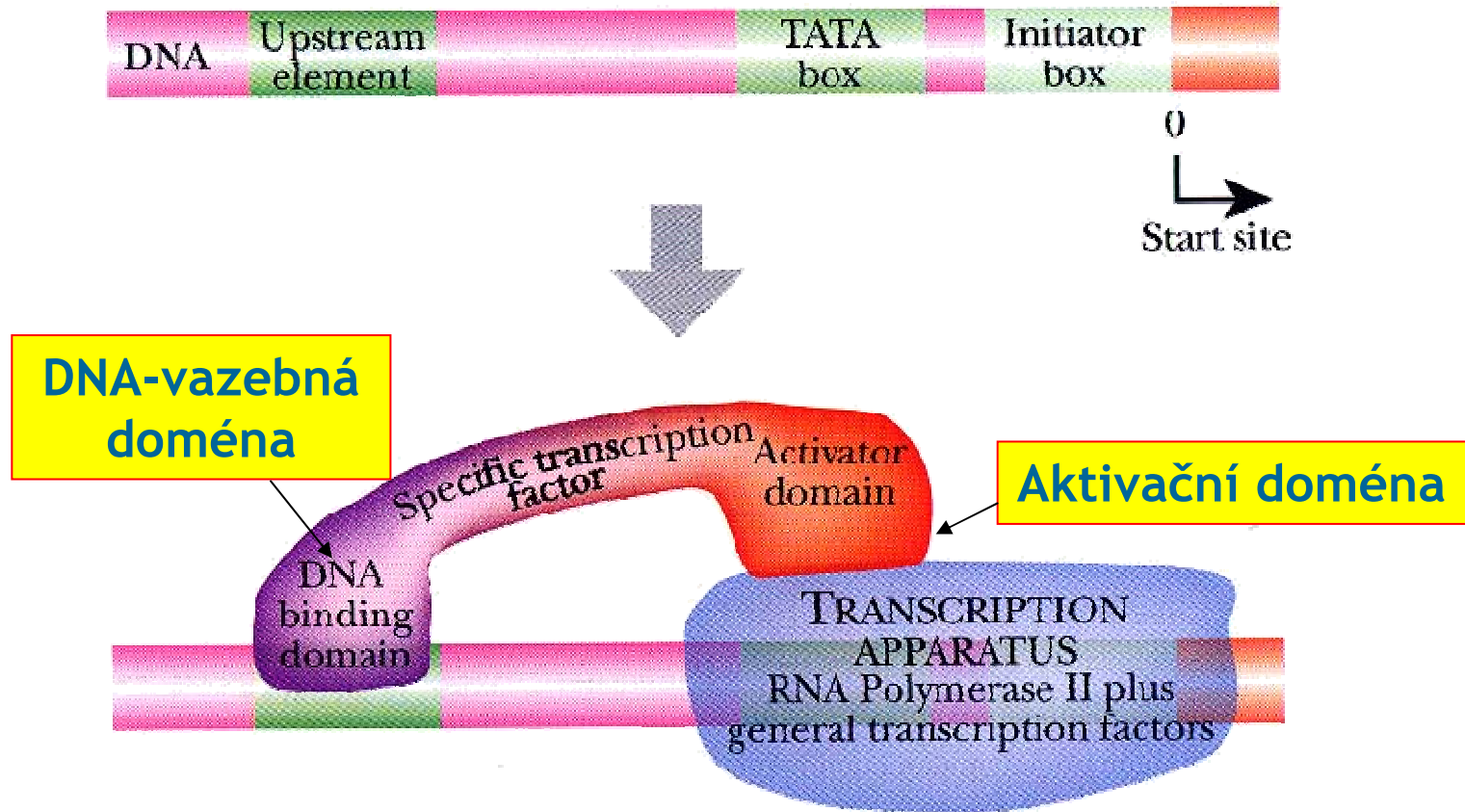
*Využití zesilovačů v expresních vektorech*

# Působení zesilovačů transkripce na velké vzdálenosti



Na zesilovač se navážou transkripční faktory, dojde k ohybu DNA a kontaktu transkripčních faktorů s transkripčním aparátem

# Vzájemné interakce transkripčních faktorů

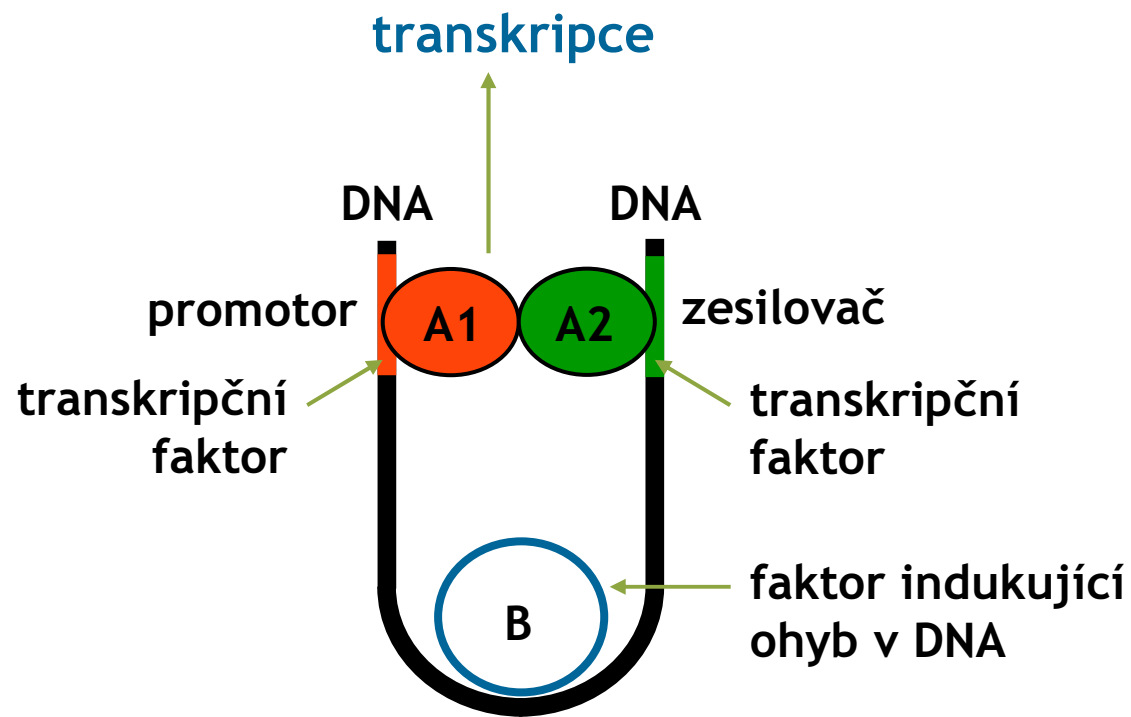


**Hybridní proteiny: aktivační doména + DNA-vazebná doména**

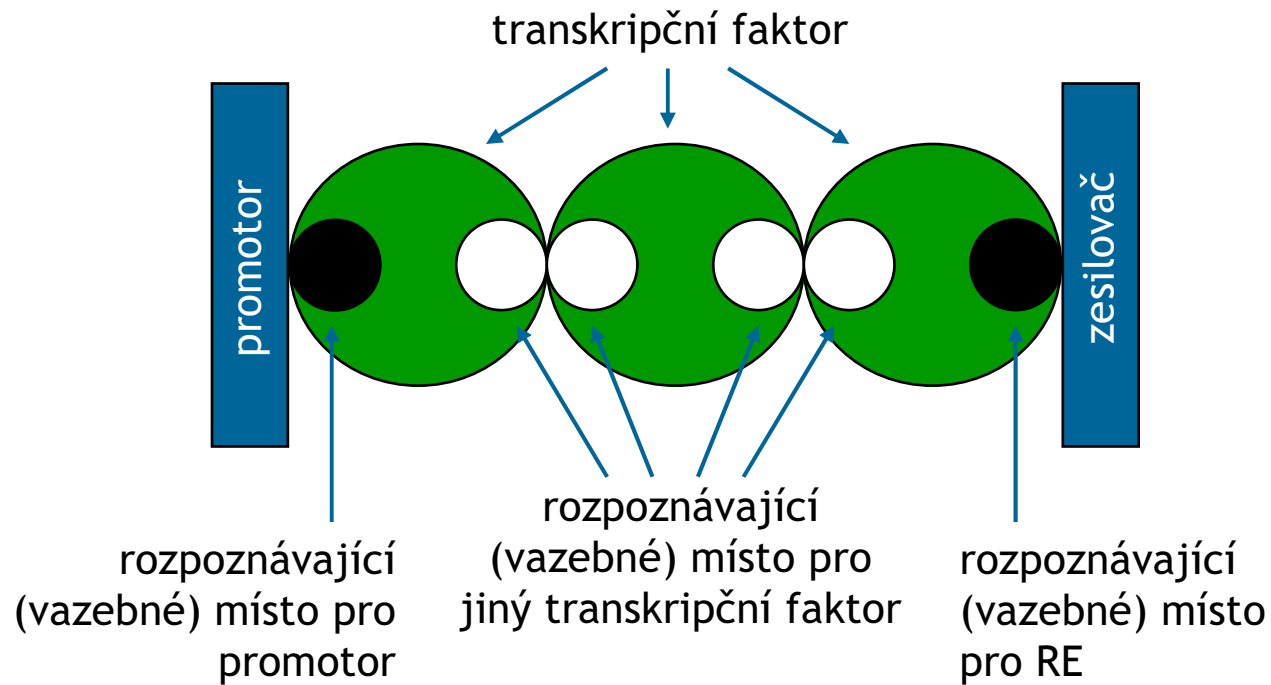
# Základní rysy specifických transkripčních faktorů

1. Zajišťují odpověď na podněty signalizující nezbytnost zapnutí jednoho nebo několika genů
2. Na rozdíl od většiny proteinů jsou schopné vstoupit do jádra
3. Rozpoznávají specifické sekvence na DNA a vážou se na ně
4. Vytvářejí kontakt s transkripčním aparátem, buď přímo nebo zprostředkovaně

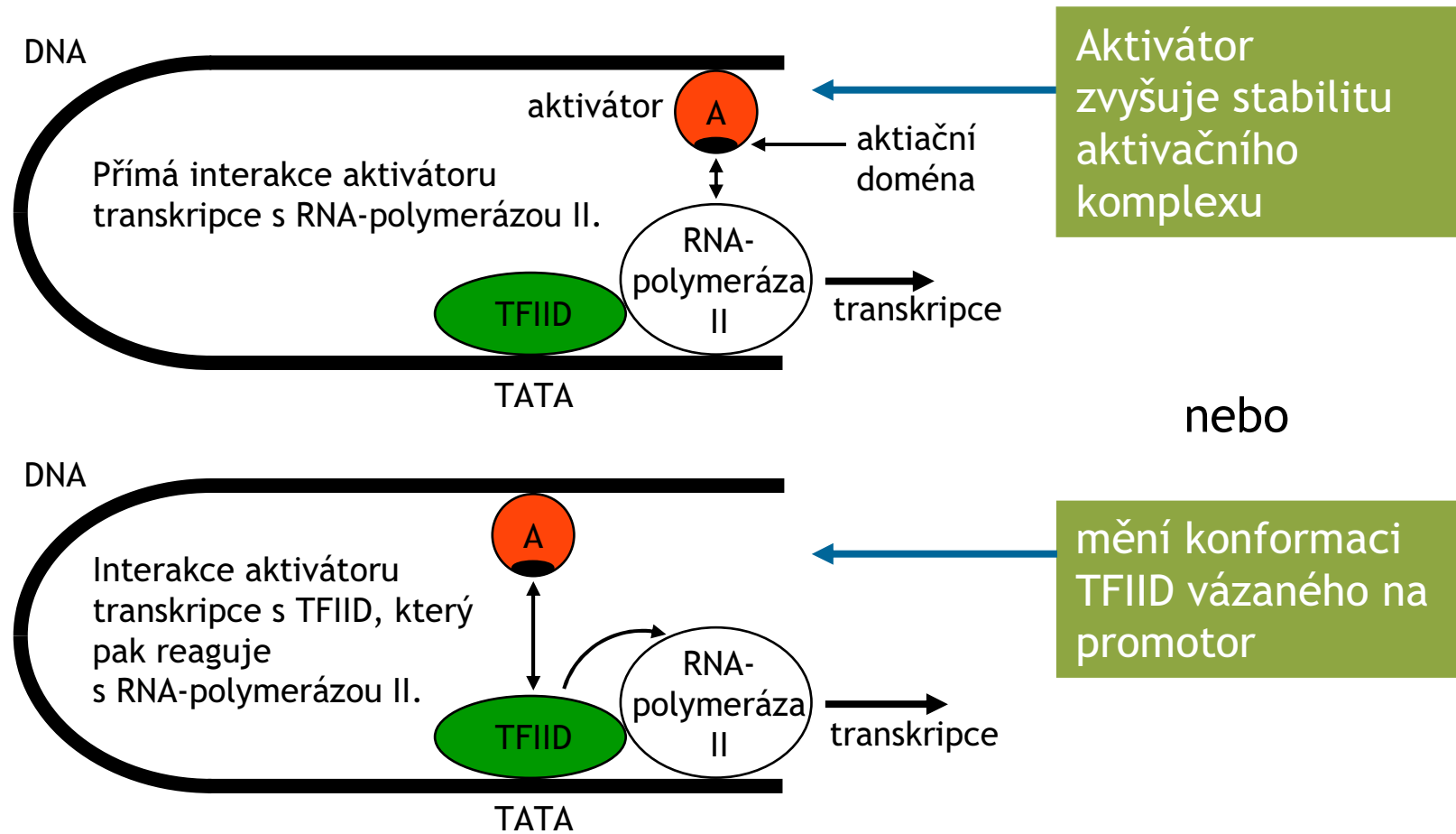
# Schéma navození fyzikálního kontaktu promotoru se zesilovačem transkripce



# Vazebná místa transkripčních faktorů a jejich interakce

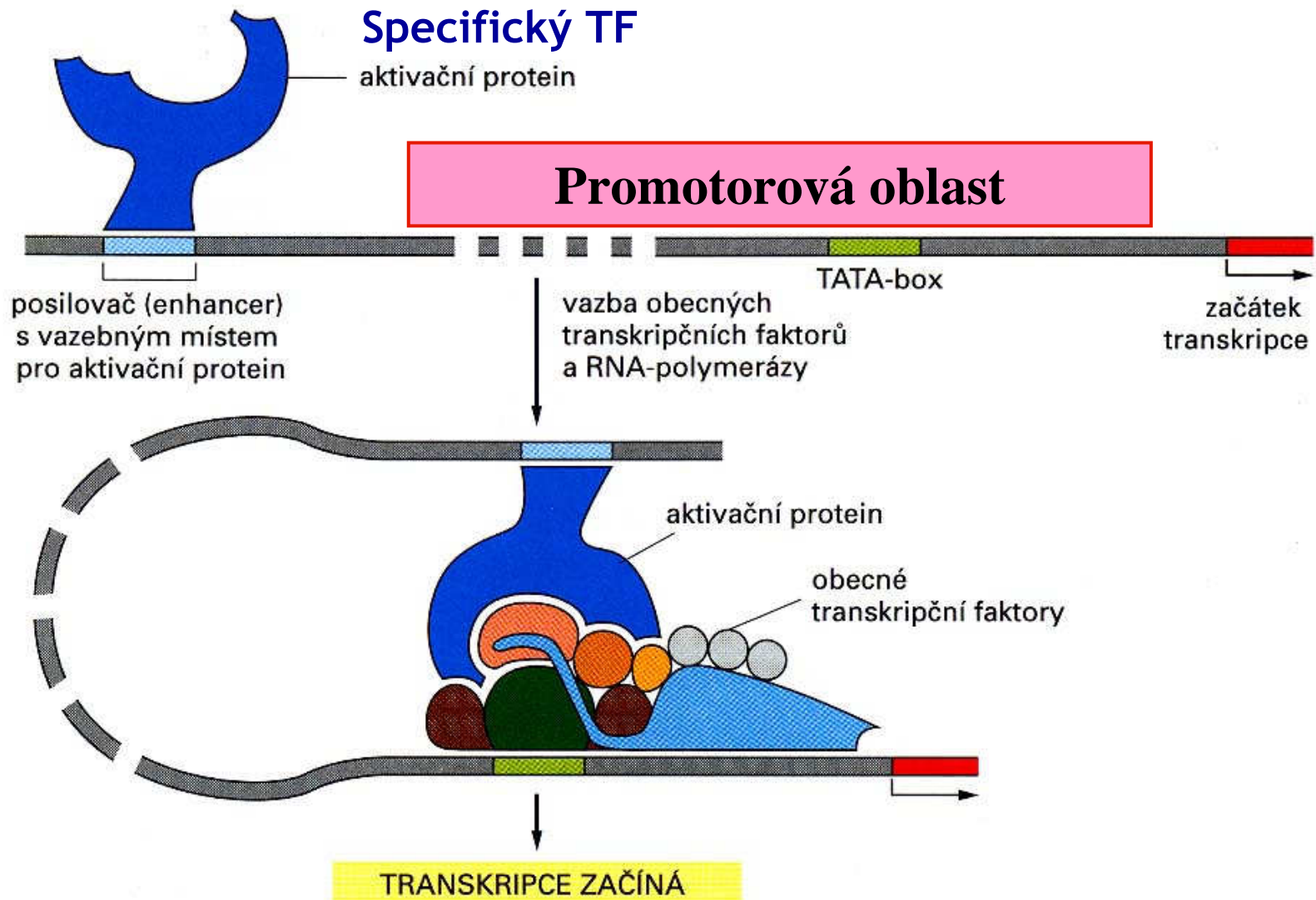


# Schéma přímé a nepřímé interakce aktivátoru transkripce s RNA-polymerázou II

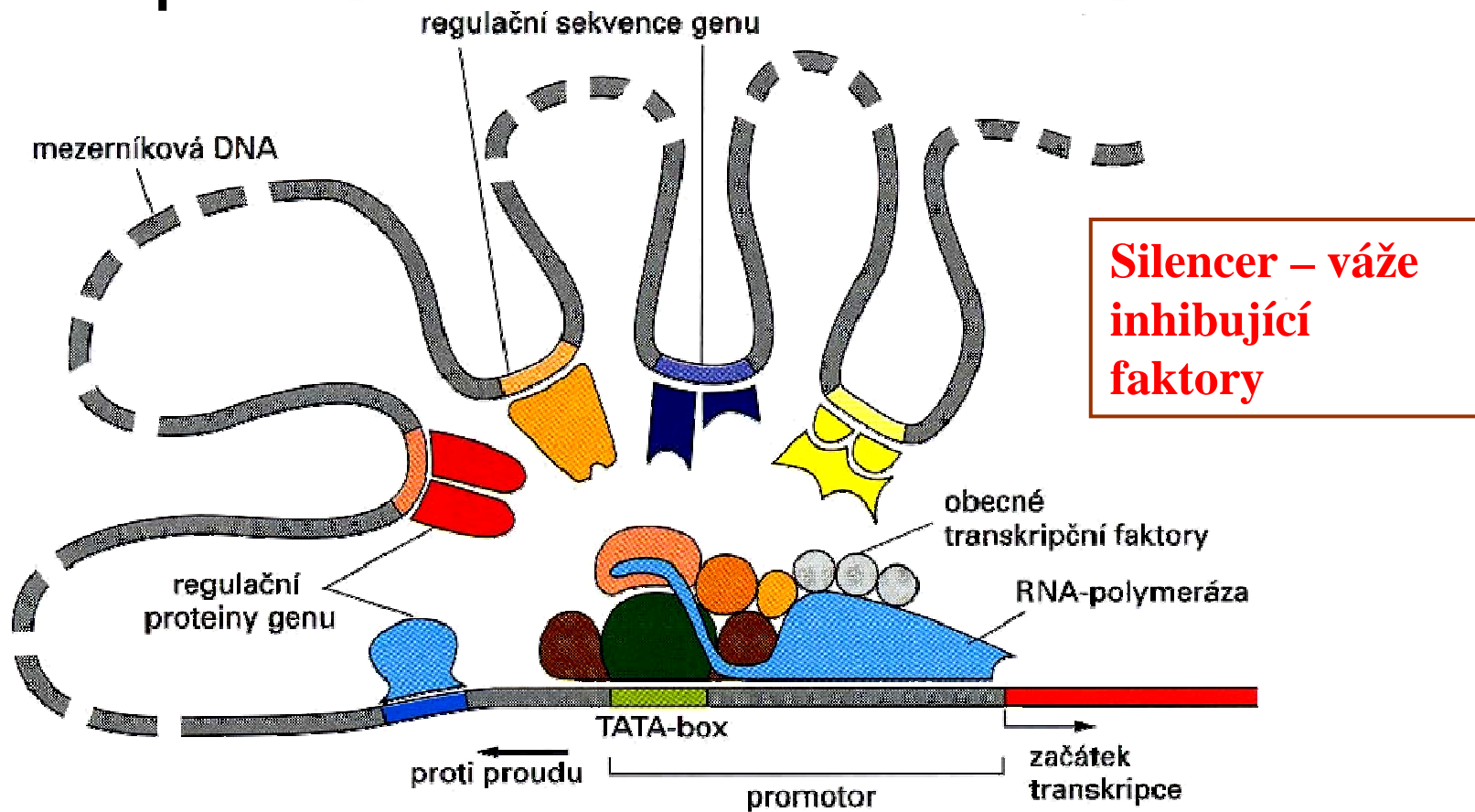




# Model aktivace genů na dálku



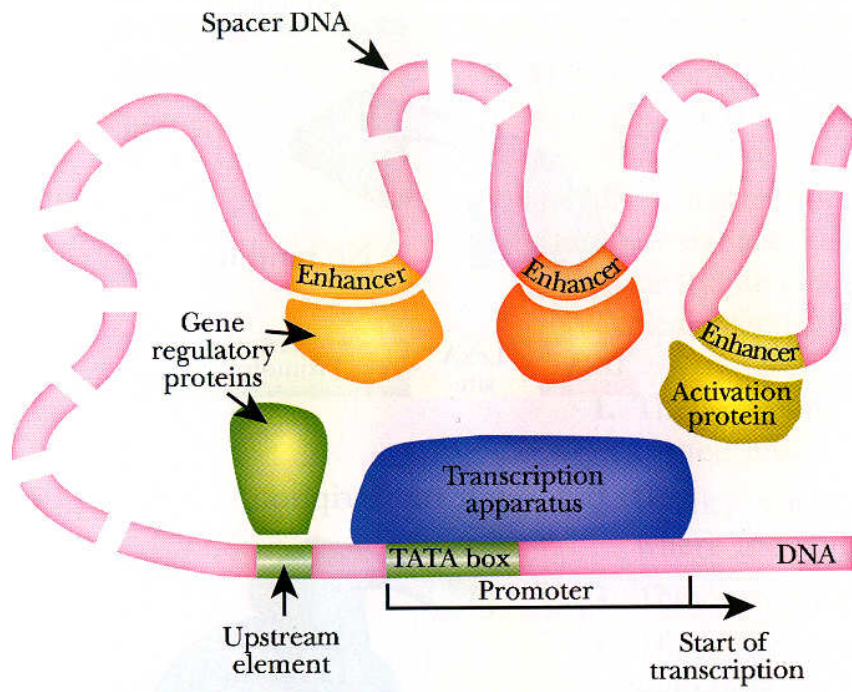
# Interakce TF a vliv jejich kombinace na zahájení transkripce



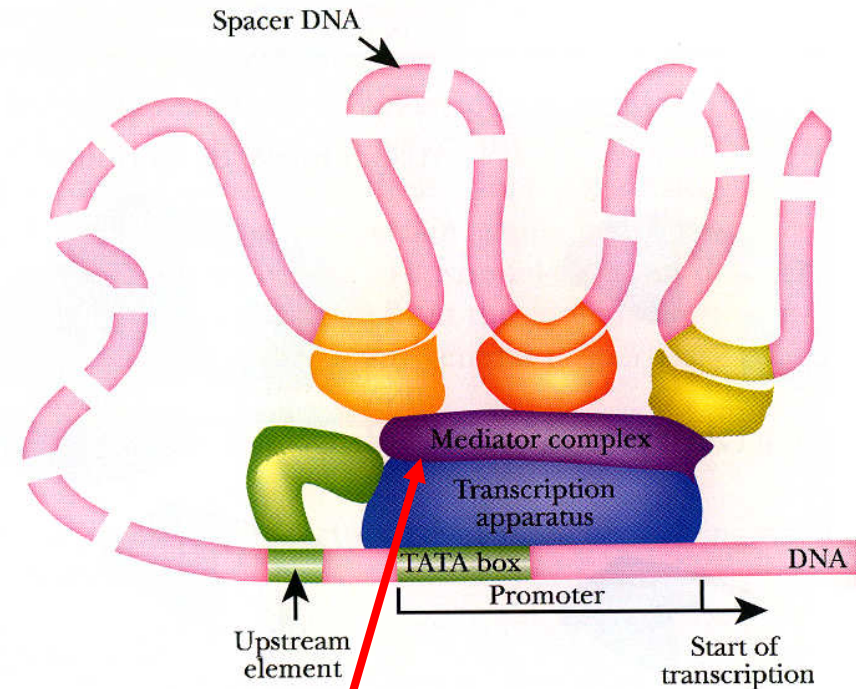
Jeden z regulačních proteinů má rozhodující vliv na zapnutí genu nebo jeho vypnutí (např. receptor pro hormon)

# Působení aktivačních proteinů a mediátorového komplexu

A) NO TRANSCRIPTION



B) TRANSCRIPTION PROCEEDS



**Mediátor** = proteinový komplex (~20 podjednotek) lokalizovaný na povrchu RNA polymerázy, kde zprostředkuje kontakt s regulačními proteiny (TF – aktivátory, represory) – tj. kombinuje signály



## Způsoby aktivace transkripčních faktorů

- fosforylace TF specifickými proteinkinázami
- vazba ligandu (signálu, např. hormonu)
- odstranění inhibitoru

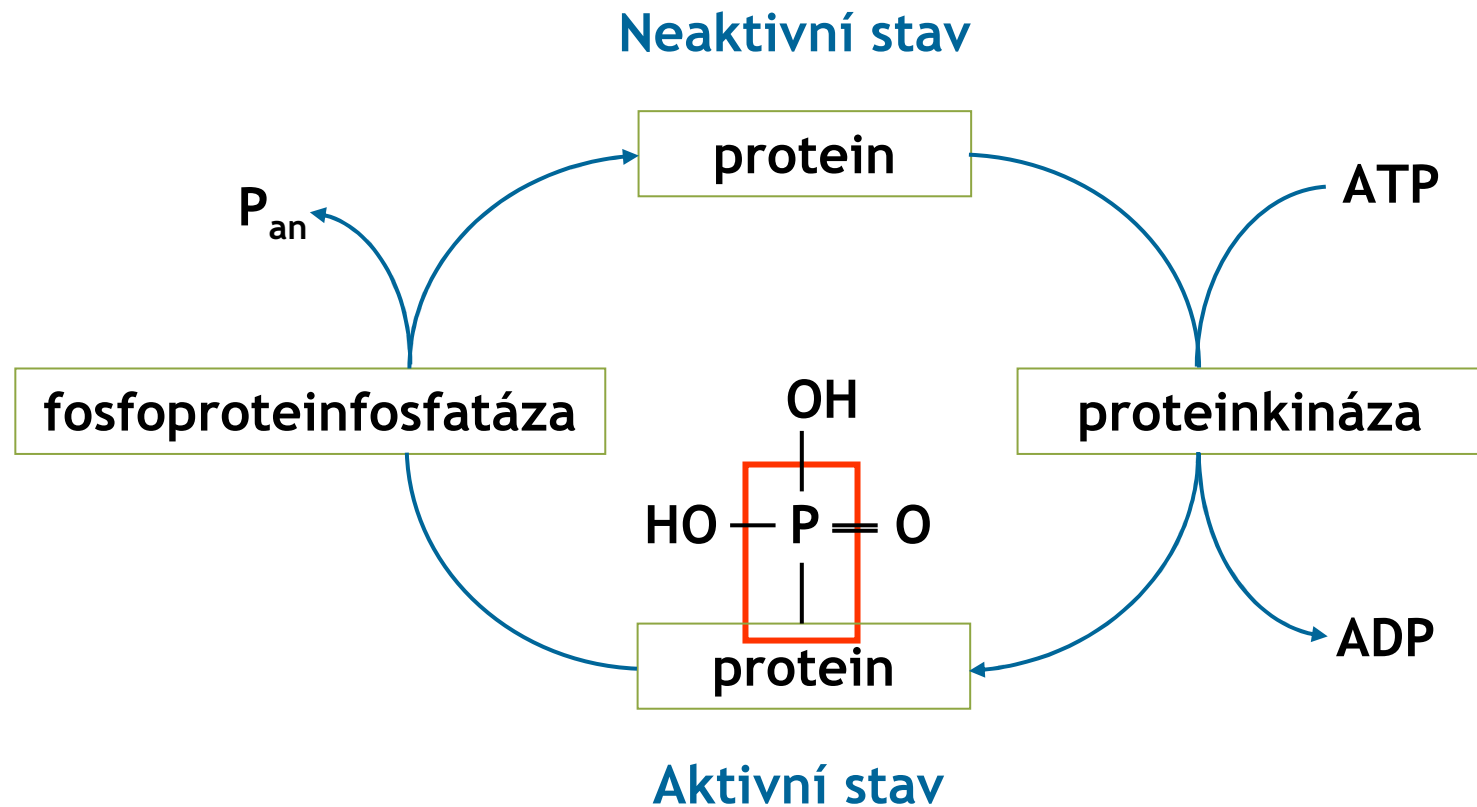
→ vazba TF na DNA, interakce TF s dalším TF

→ indukce transkripce

## Specifická aktivace genů

- aktivace specifického TF v buňkách určité tkáně po působení signálu
- indukce tvorby specifického TF v určité tkáni po aktivaci jeho genu působením signálu

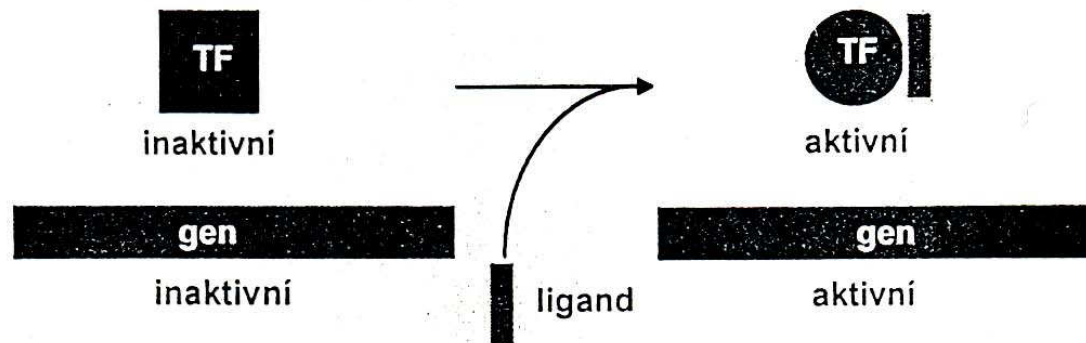
# Enzymová katalýza fosforylace a defosforylace



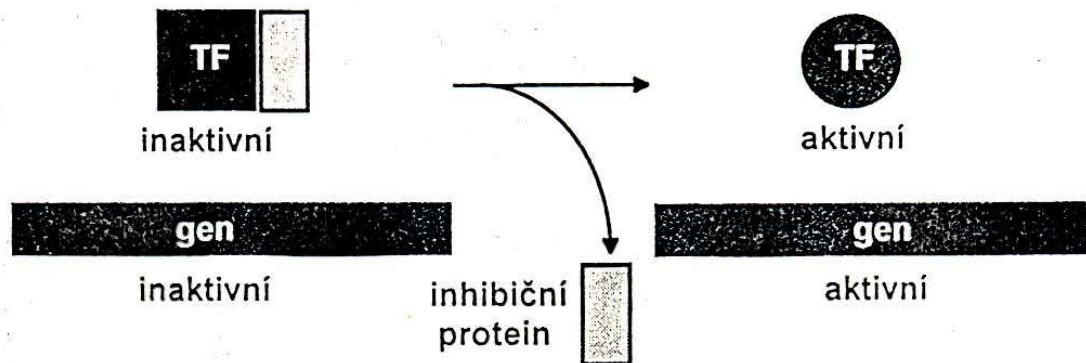
**Kinom = soubor proteinkináz (~500 u člověka)**

# Způsoby aktivace transkripčních faktorů navozené indukčním agens 1, 2)

1. Konformační změna transkripčního faktoru způsobená ligandem.

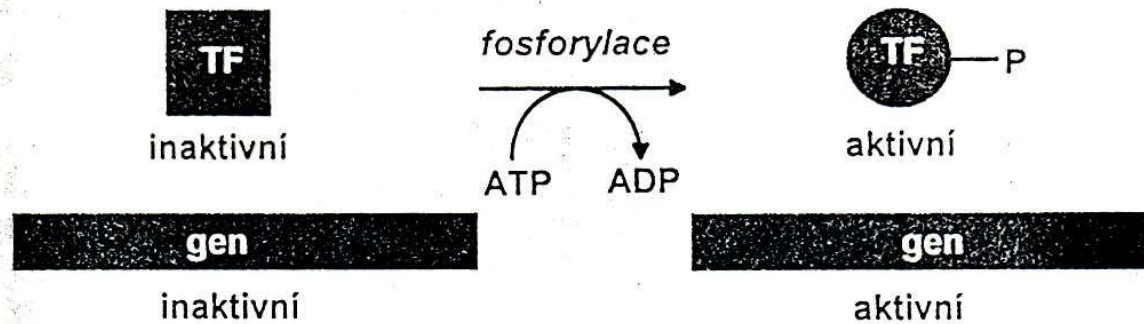


2. Konformační změna transkripčního faktoru způsobená odstraněním inhibičního proteinu.

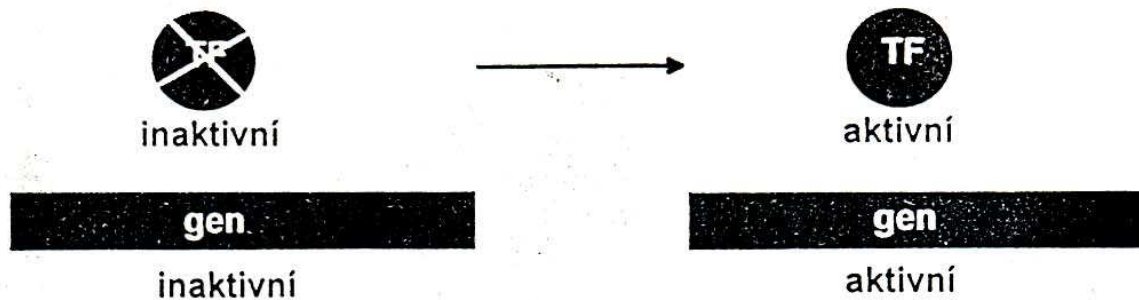


# Způsoby aktivace transkripčních faktorů navozené indukčním agens (3, 4)

3. Konformační změna transkripčního faktoru způsobená fosforylací.

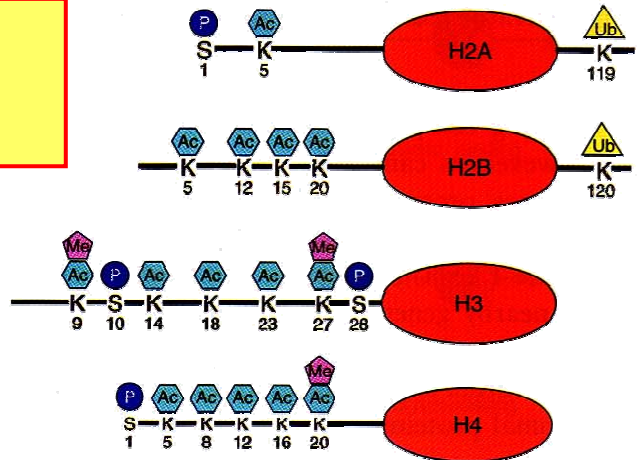


4. Stabilizace aktivní formy transkripčního faktoru proti jeho odbourání.

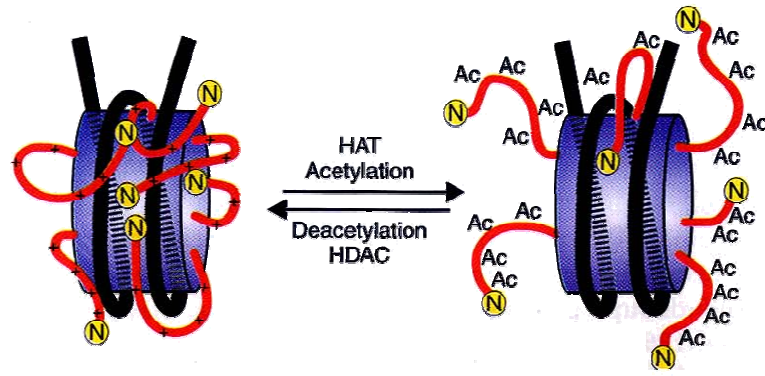
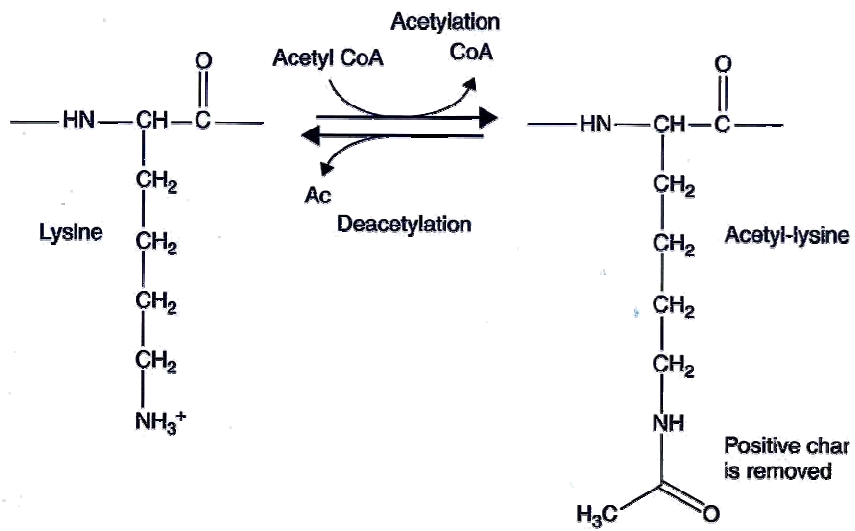


# Modifikace lyzinu nebo serinu N-terminálních úseků histonů

**S = serin**  
**K = lyzin**



**P** = fosforylace  
**Ac** = acetylace  
**Me** = metylace



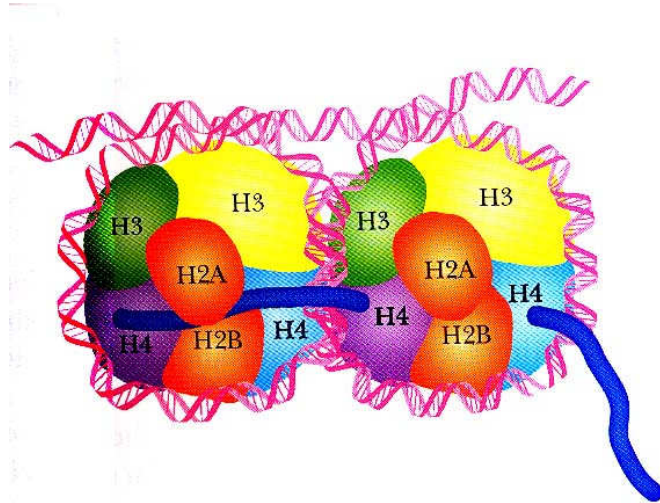
acetylace vede k rozvolnění komplexu DNA-histon



# Acetylace konců histonů vede k rozvolnění nukleozomů = remodelace chromatinu

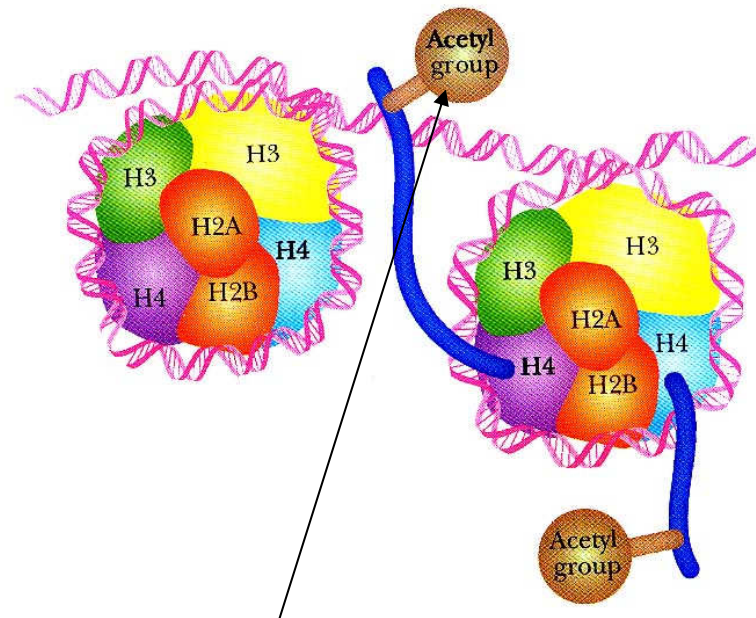
Agregovaná forma

Disagregovaná forma  
nukleozomů



Histony těsně vázané  
prostřednictvím svých N-konců

**Heterochromatin**

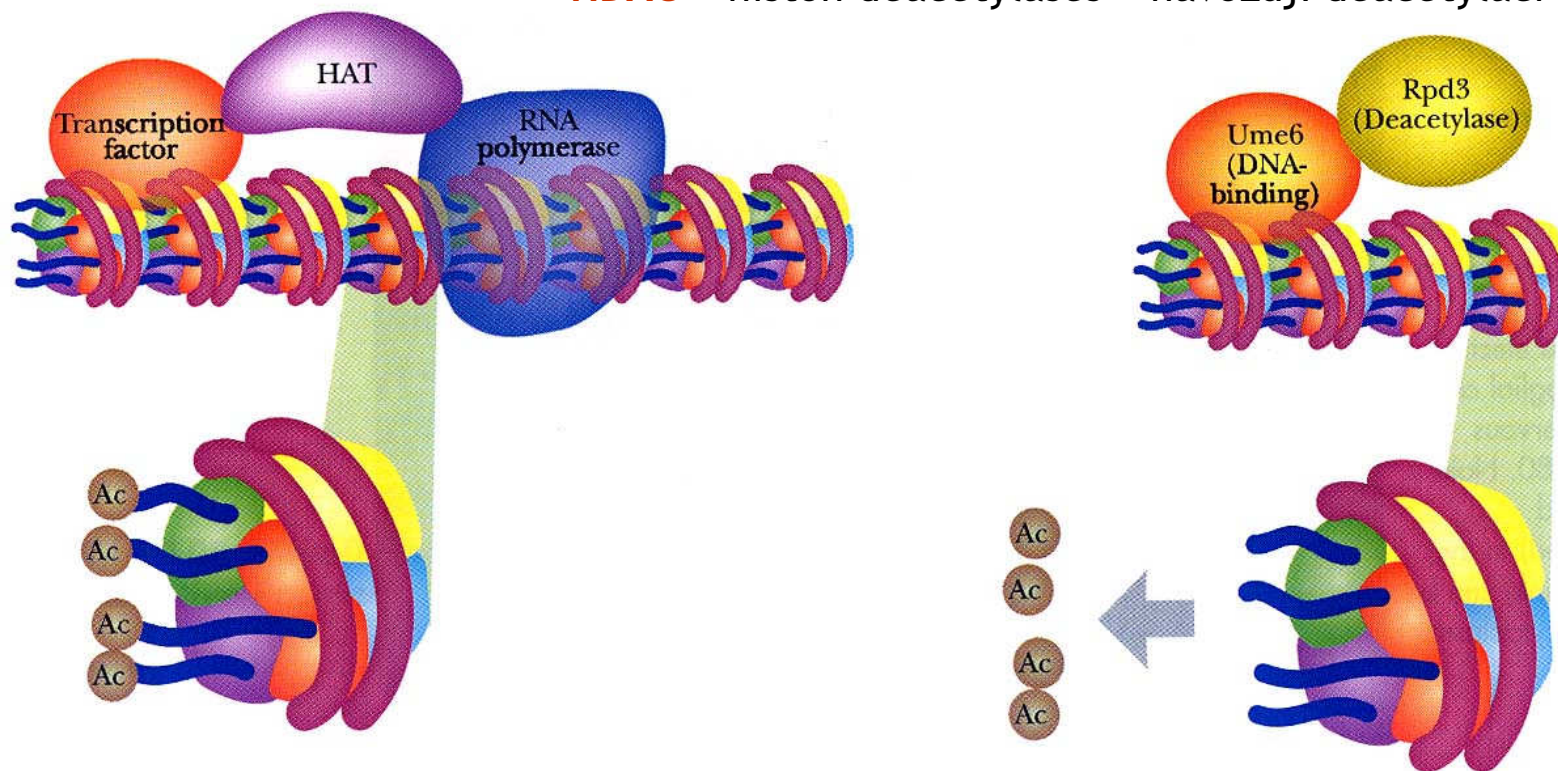


Rozvolnění nukleozomů po  
acetylaci konce histonu H4

**Euchromatin**

# Enzymy podílející se na acetylaci a deacetylaci histonů

**HAT** = histone acetyl transferases = navozují acetylaci  
**HDAC** = histon deacetylases = navozují deacetylaci



HAT působí jako  
koaktivátor transkripce

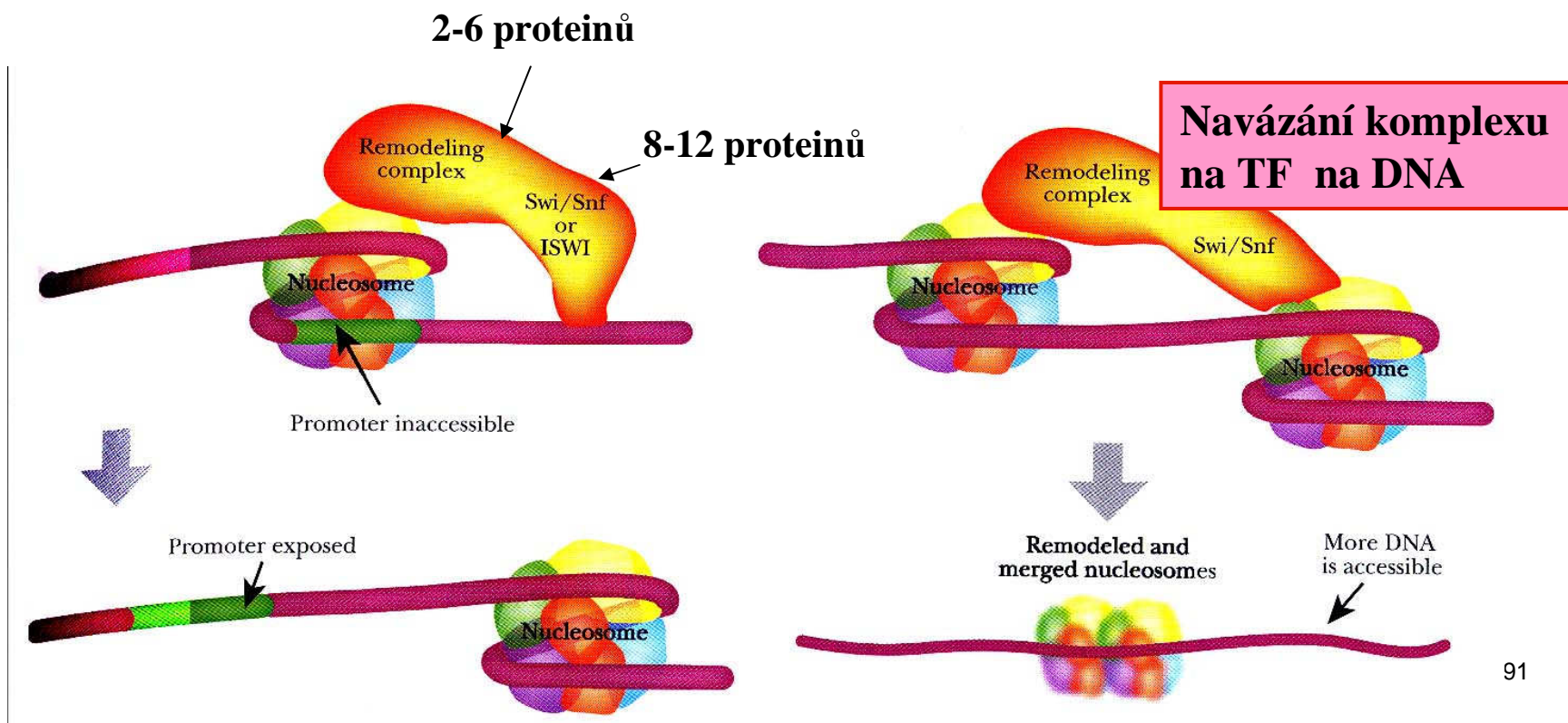
korepresor navozující deacetylaci

Koaktivátory a korepresory se na DNA nevážou přímo, ale prostřednictvím transkripčních faktorů vázaných na DNA

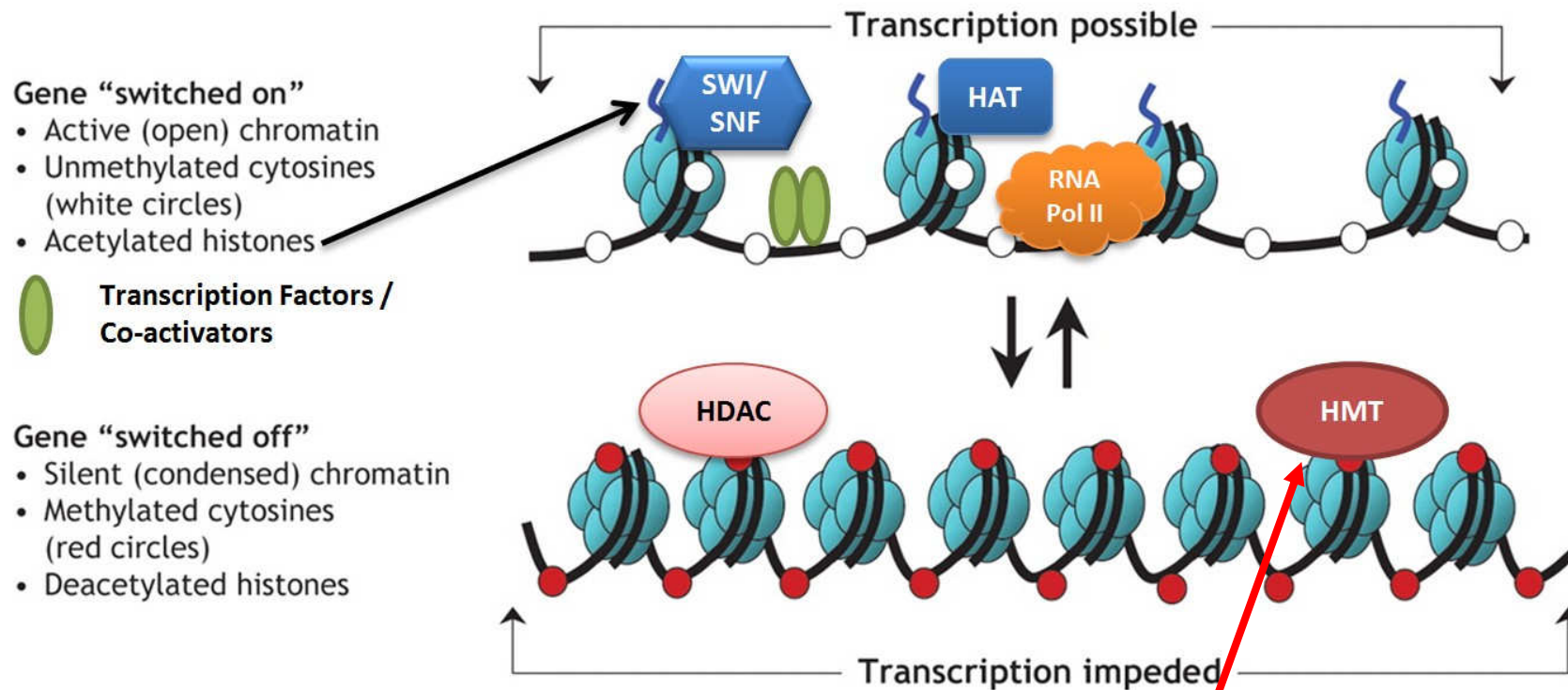
## Působení komplexů remodelujících chromatin: dva způsoby remodelování nukleozómů

1. Posunování („**sliding**“)  
nukleozómů - nukleozomy jsou  
posunuty, promotory se  
zpřístupní

2. „**Remodeling**“ - nukleozomy  
jsou posunuty (dva se spojují),  
DNA je zpřístupněna transkripci



# Přechod aktivního chromatinu na neaktivní

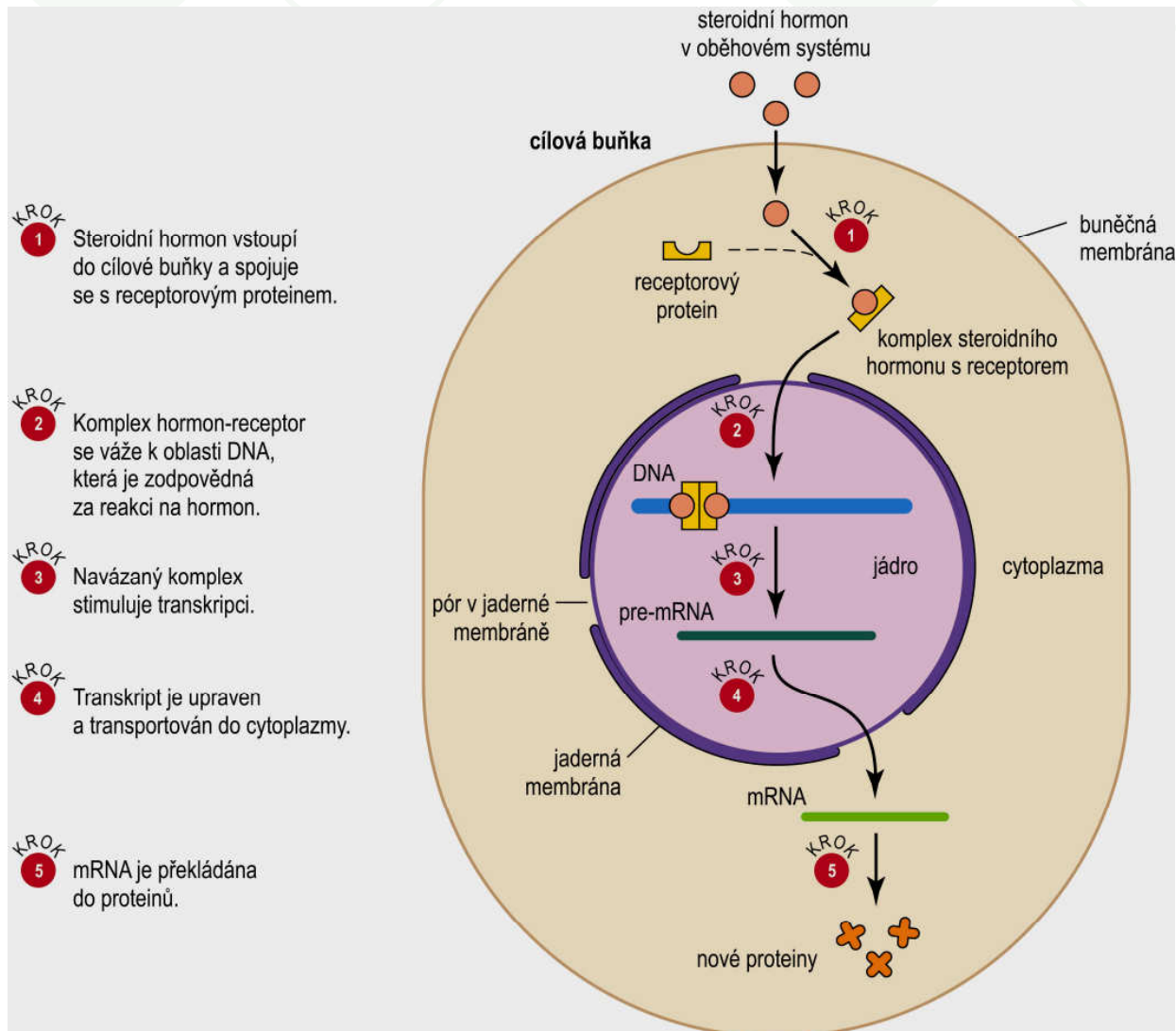


**HMT = histonmetyltransferázy (navozuje epigenetické modifikace chromatinu a ovlivňuje řadu procesů v buňkách)**

# Sled událostí vedoucích k aktivaci eukaryotického genu

1. TF se váže na DNA
2. Na TF se váže histon-acetyltransferáza (HAT)
3. HAT acetyluje histony v blízkosti místa svého navázání a dochází k rozvolnění nukleozomové struktury
4. Komplexy remodelující chromatin posunují nebo remodelují nukleozomy a zpřístupňují sekvence DNA
5. Na DNA se vážou další TF
6. Na DNA se váže RNA-polymeráza
7. K iniciaci transkripce je nutný pozitivní signál: specifické TF vázající se na mediátorový komplex na promotoru

# Regulace genové exprese steroidními hormony



# Regulace genové exprese peptidovými hormony

