



Regulace (kontrola) genové exprese

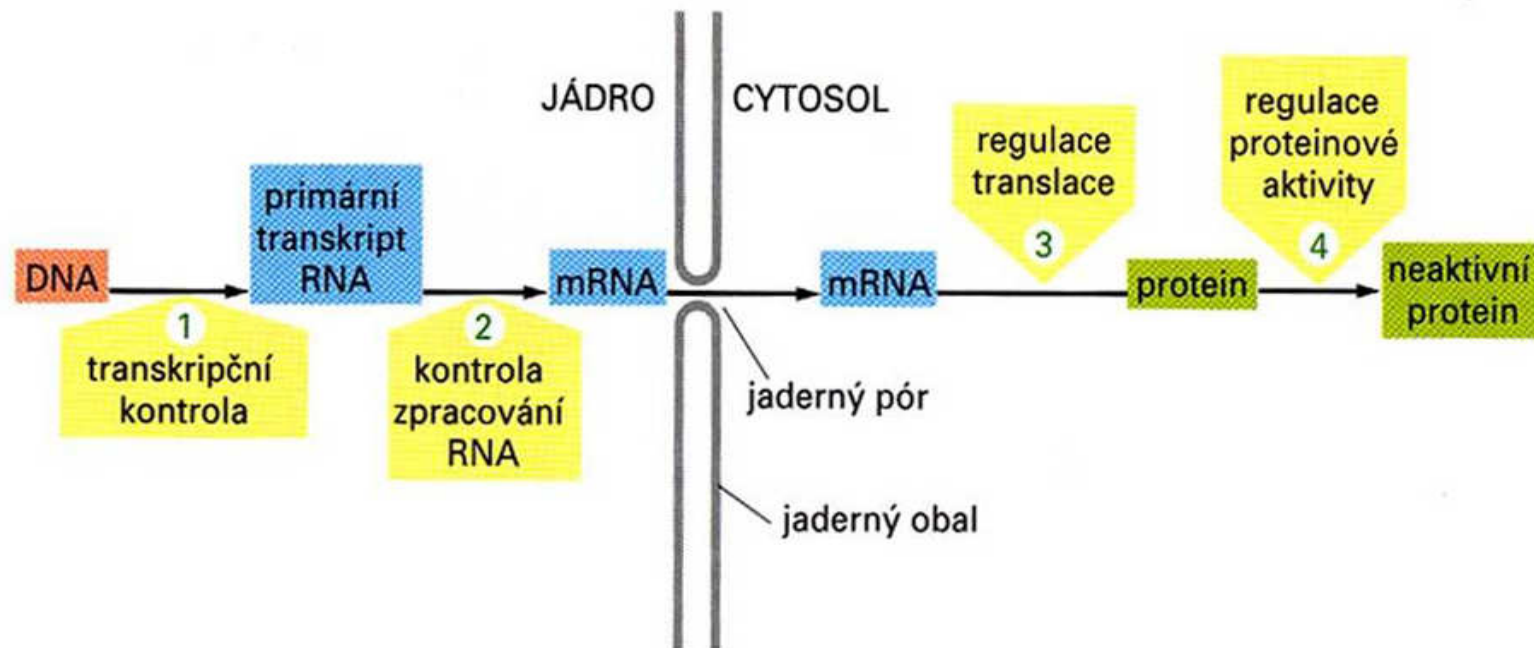
Mechanismy, zajišťující expresi genů ve správnou dobu a na správném místě (časoprostorová regulace).

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

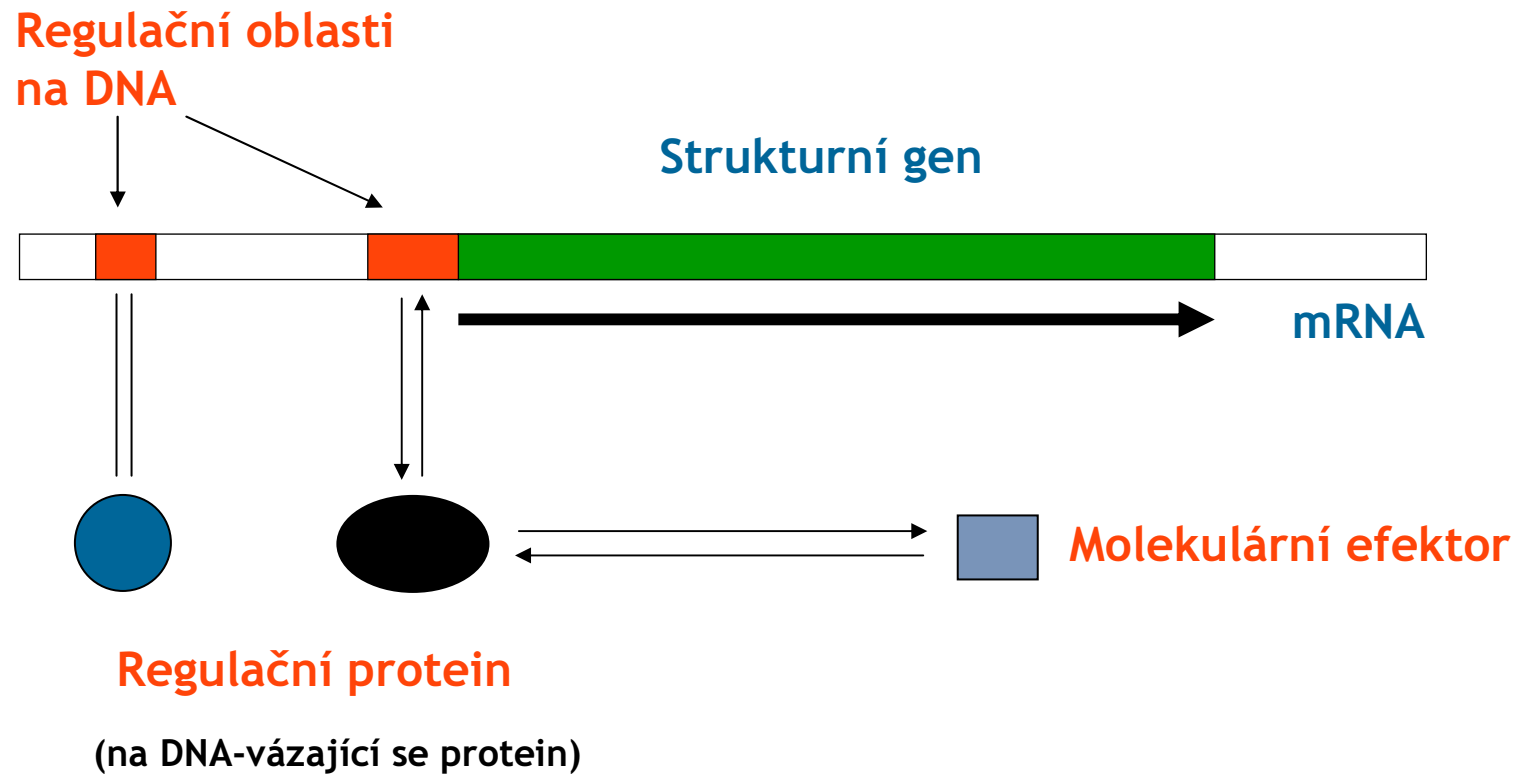
Roviny kontroly genové exprese

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

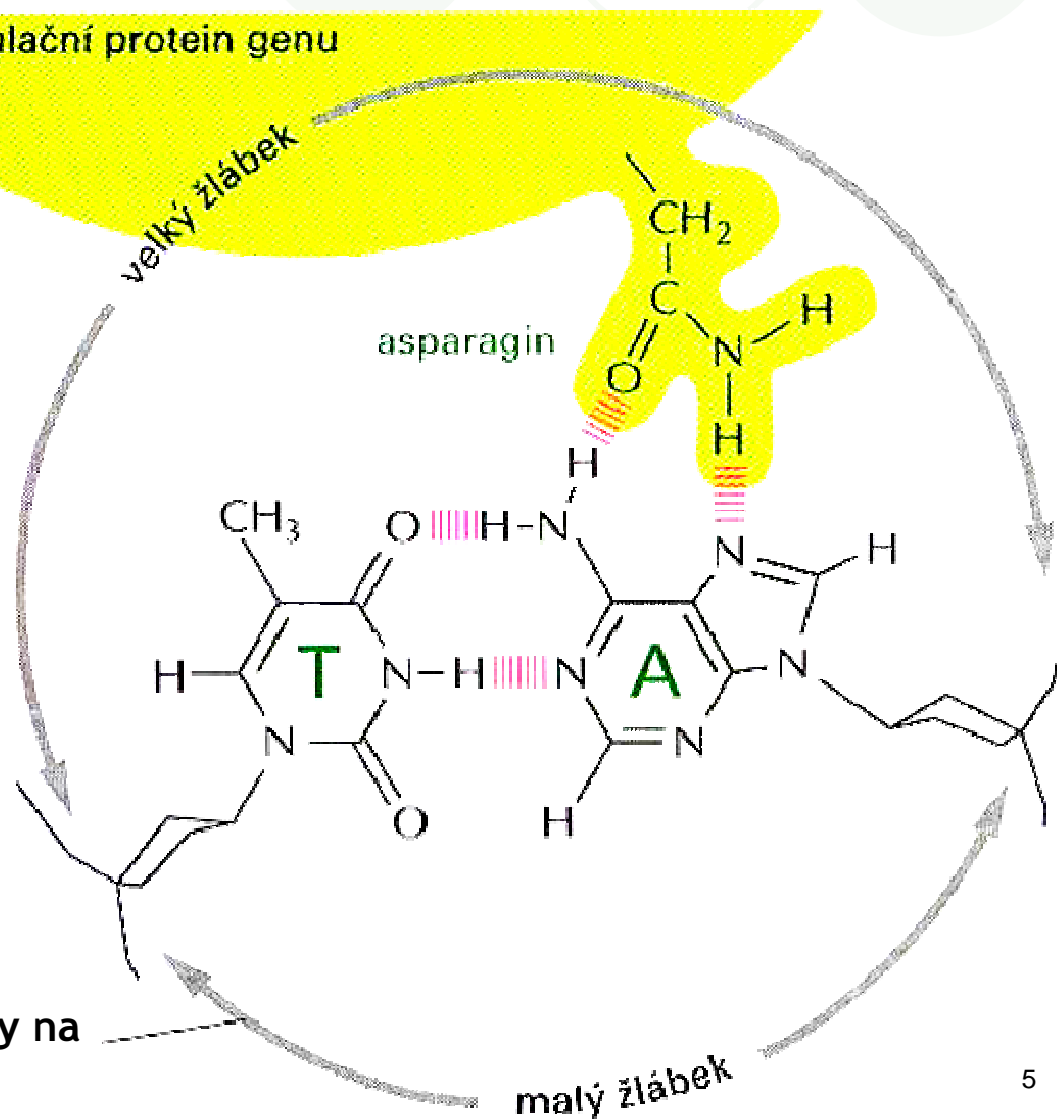
Interakce proteinu s DNA probíhá prostřednictvím 10-20 kontaktů mezi různými aminokyselinami a funkčními skupinami bází

vnější mez cukr-fosfátové kostry na vnější straně dvojšroubovice

regulační protein genu

velký žlábek

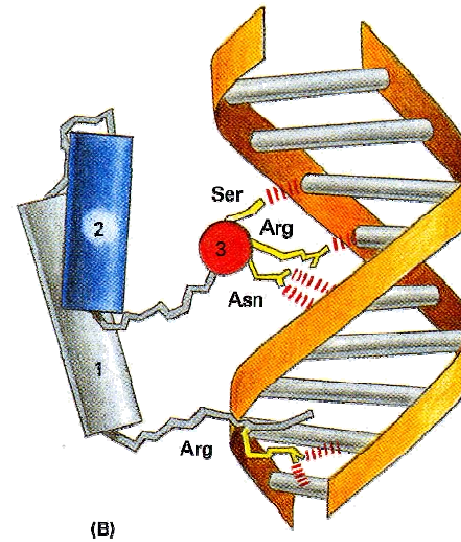
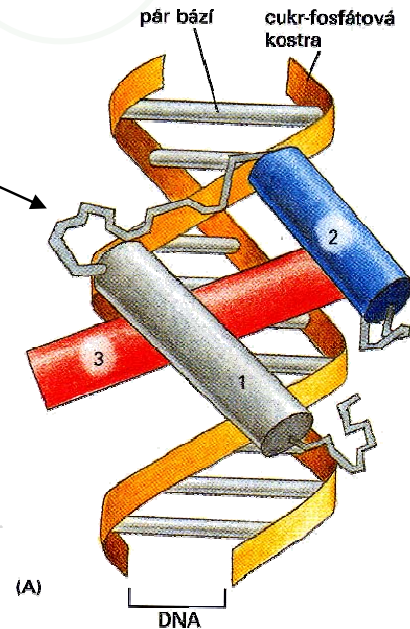
asparagin



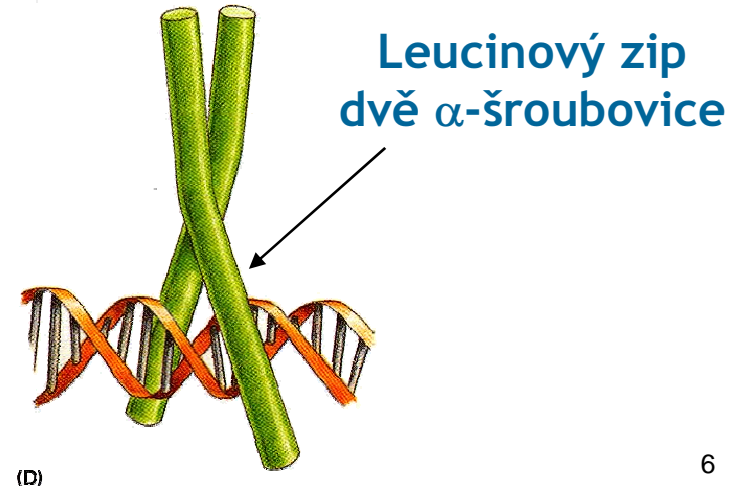
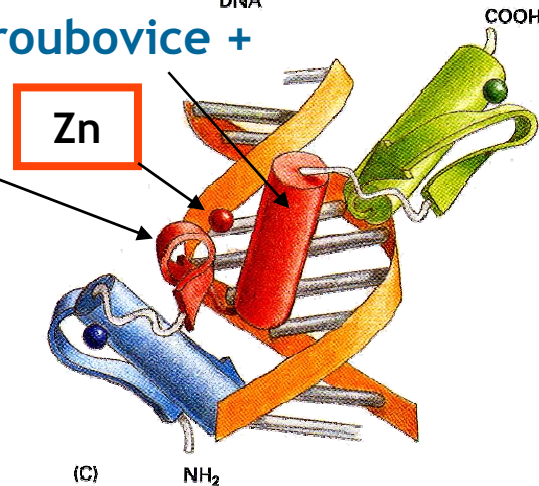
DNA-vazebné motivy proteinů (DBD domény)

Homeodoména
- tři spojené
 α -šroubovice

Vazba proteinu
do velkého
žlábků DNA

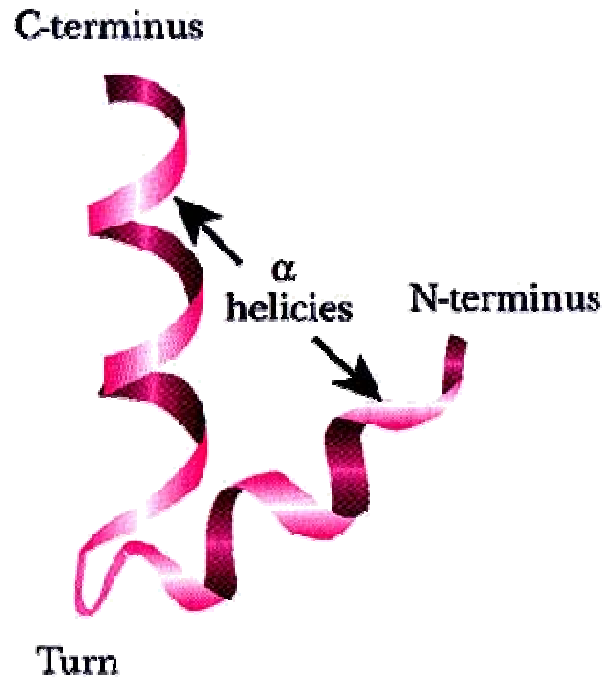


Zinkový prst α -šroubovice +
 β -struktura

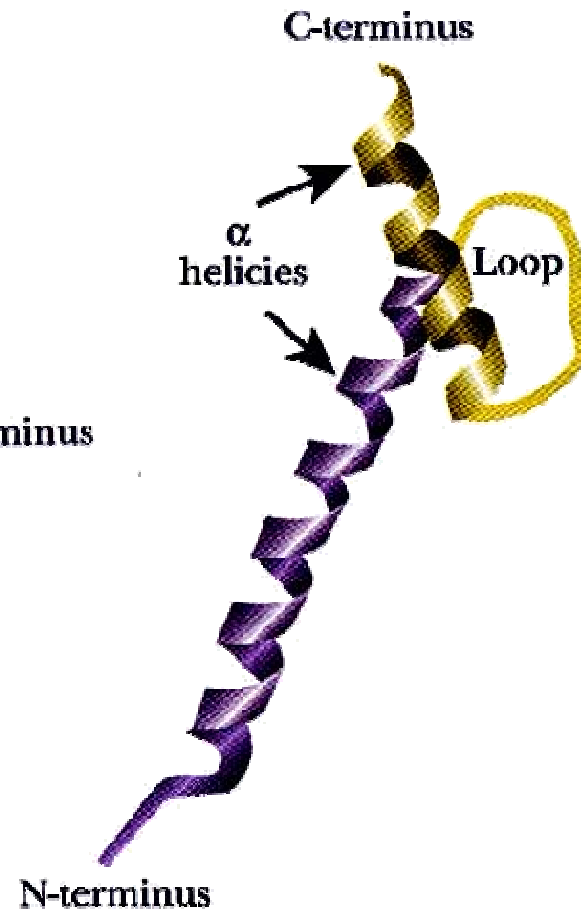


Motivy regulačních proteinů

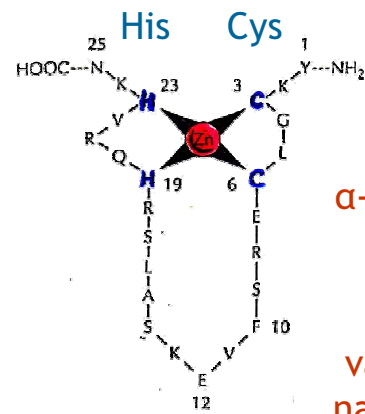
Helix-otáčka-helix
(HTH)



Helix-smyčka-helix (HLH)

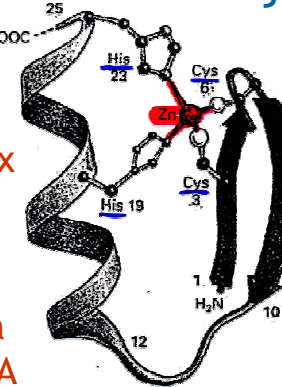


Proteiny s motivem zinkových prstů



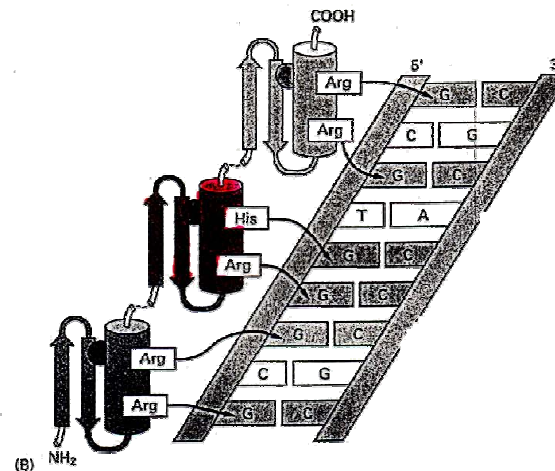
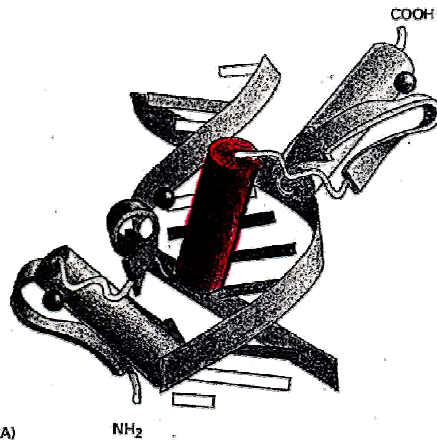
trojrozměrná struktura

α-helix
↓
vazba na DNA

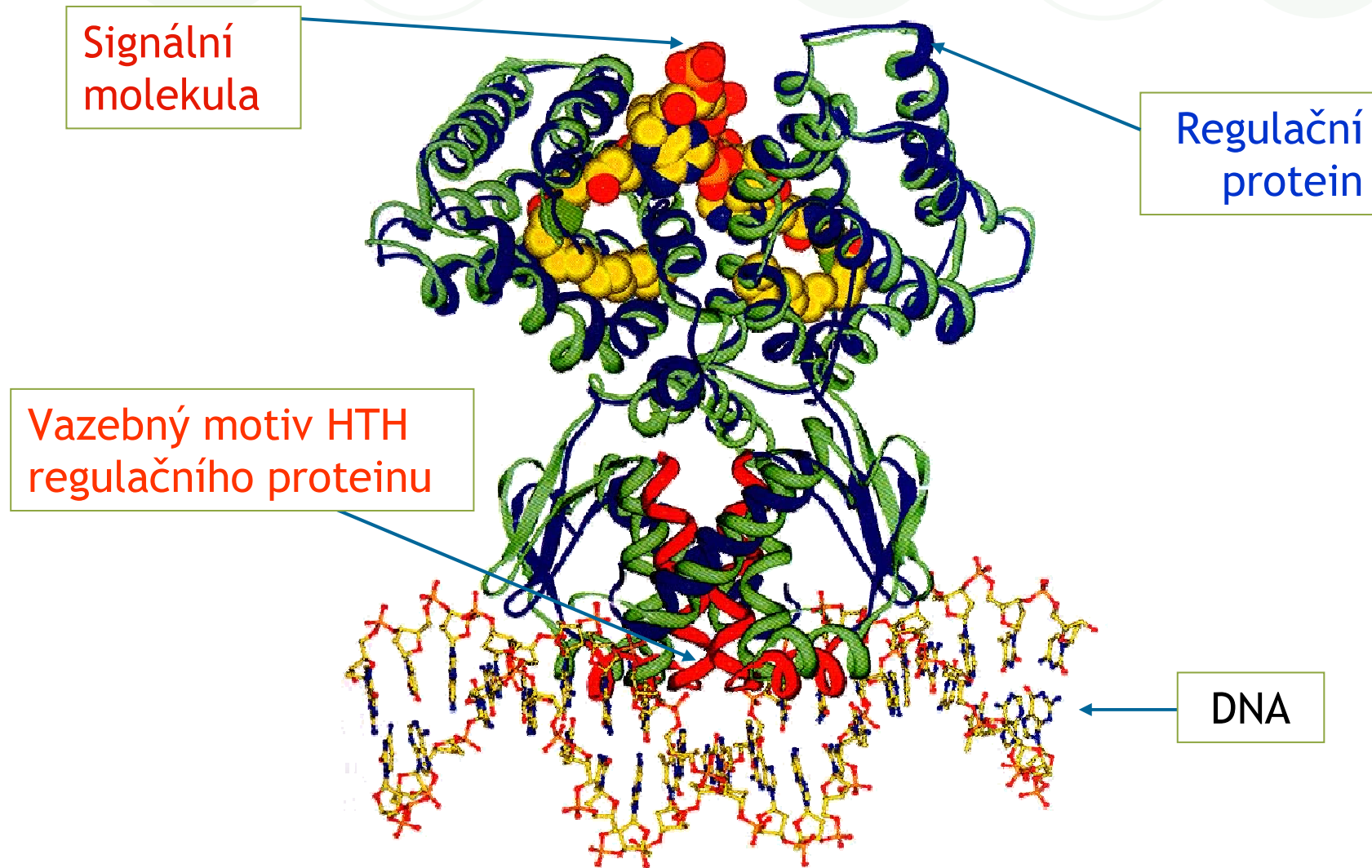


antiparalelní
β-struktura

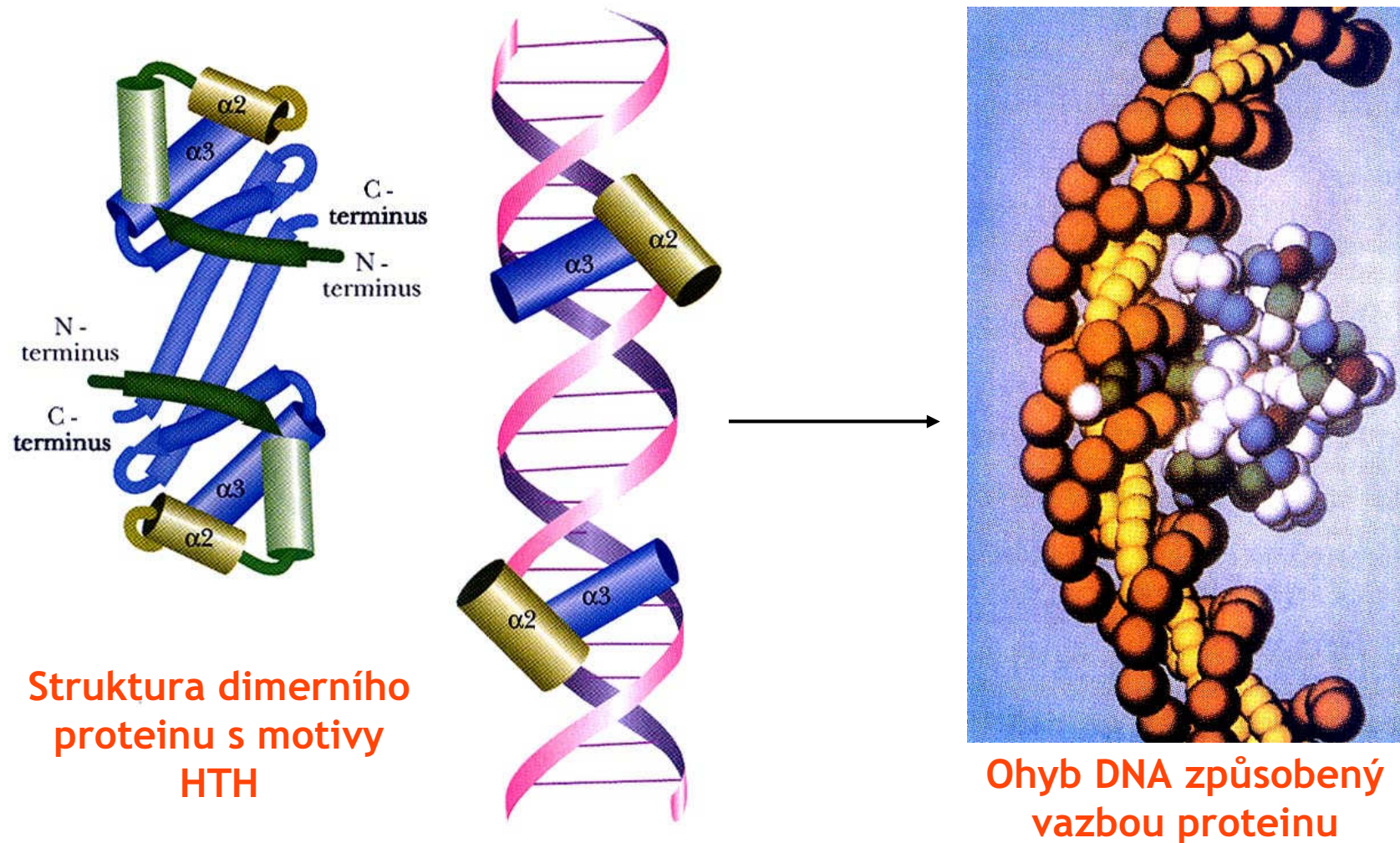
vazba proteinu na DNA



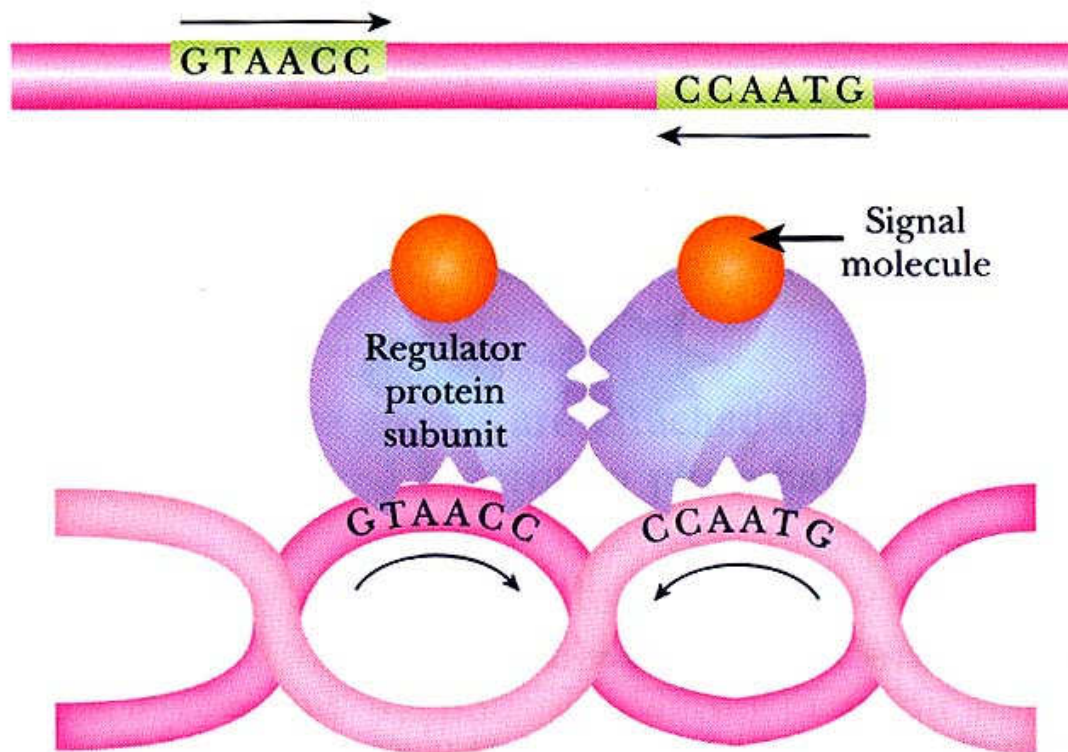
Vazba aktivovaného regulačného proteínu na DNA



Vazba regulačního proteinu na DNA



Vazba regulačních proteinů na obrácená opakování (repetice) na DNA



Regulační oblast
DNA obsahující
obrácená
opakování

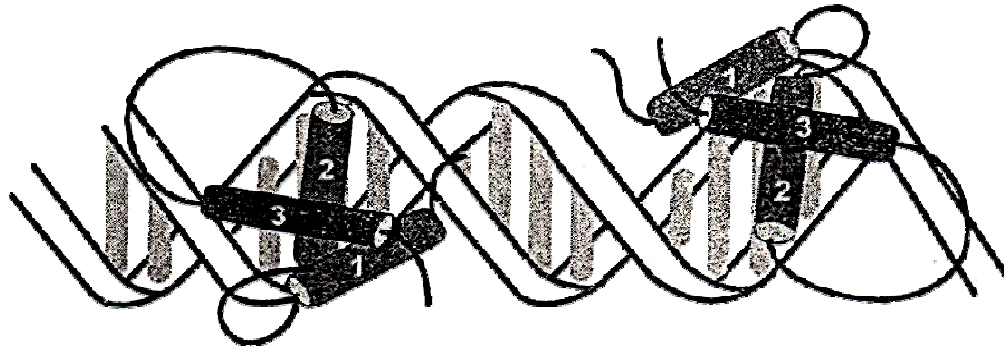
Po vazbě signální
molekuly se regulační
protein váže na
regulační oblast

Příklad vazby regulačního proteinu na regulační oblast DNA

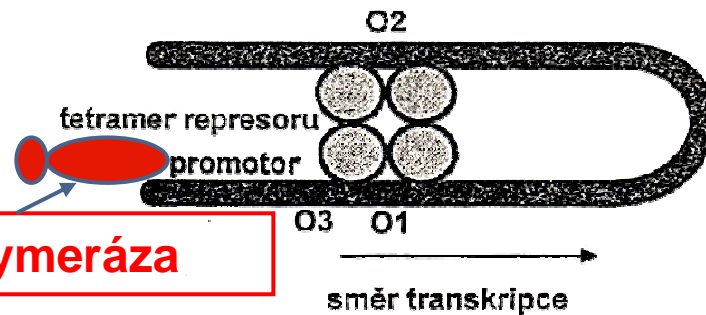


Šipkami je zvýrazněný přibližný palindrom.
Podobnost v palindromu se snižuje ve sledu:
O1 > O2 > O3.

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



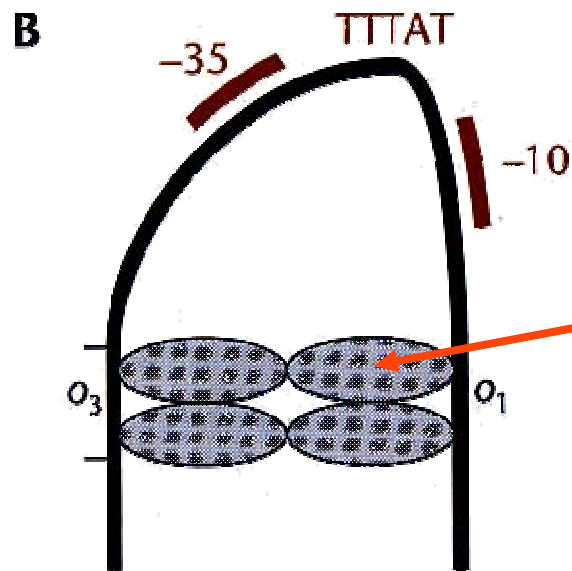
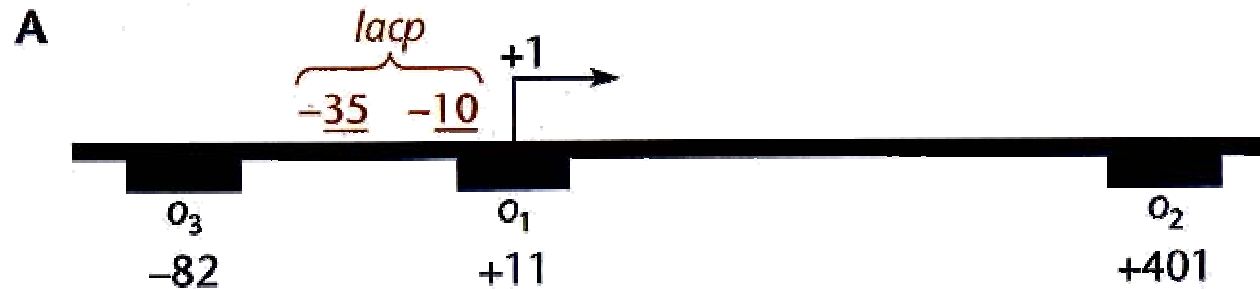
Vazba dimeru represoru laktózoového operonu na palindromatickou sekvenci operátorové podjednotky O1



RNA-polymeráza

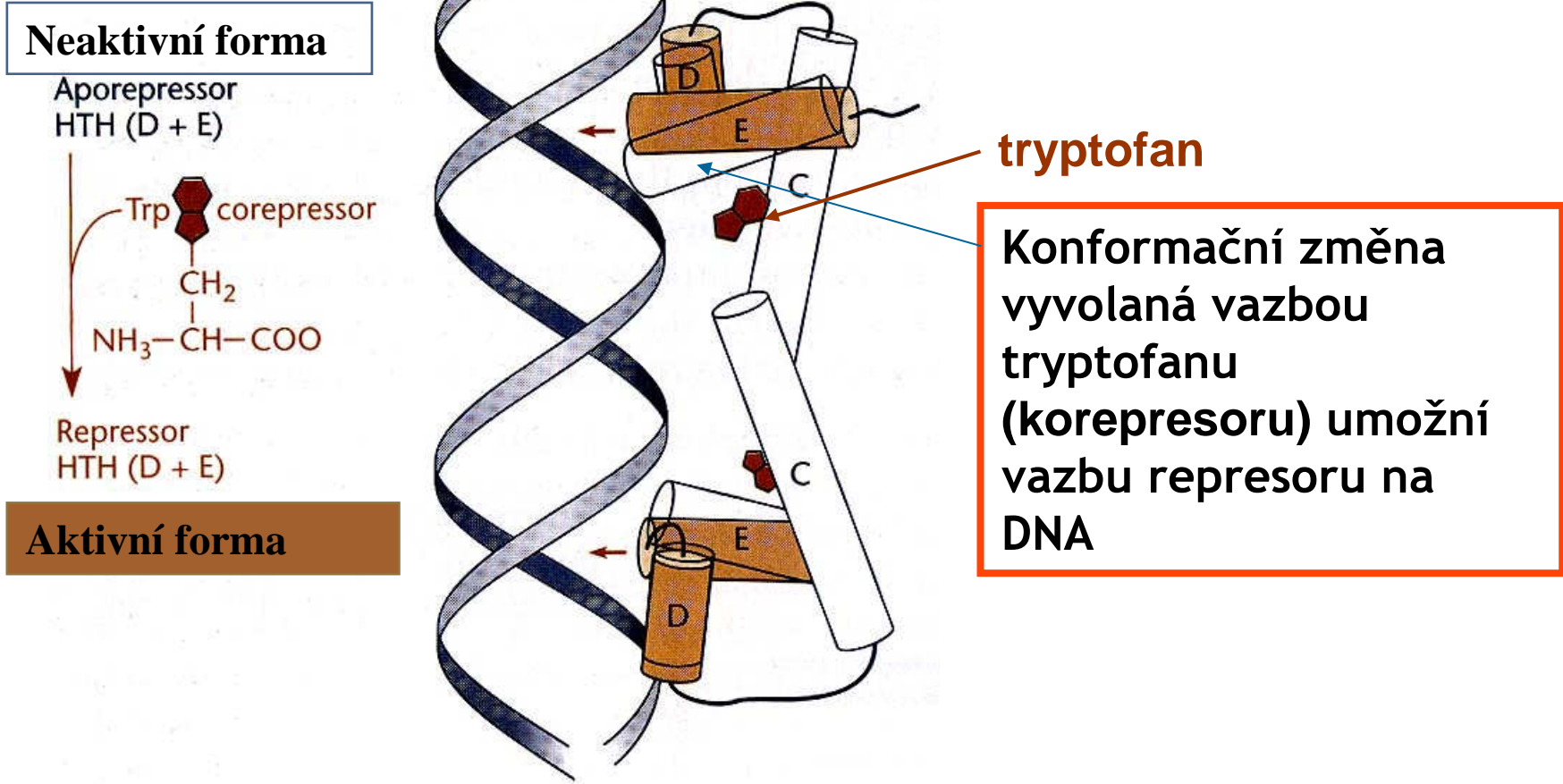
Vytvoření DNA-smyčky mezi dvěma podjednotkami operátoru

Vazba represoru LacI na sekvence operátorů lac operonu

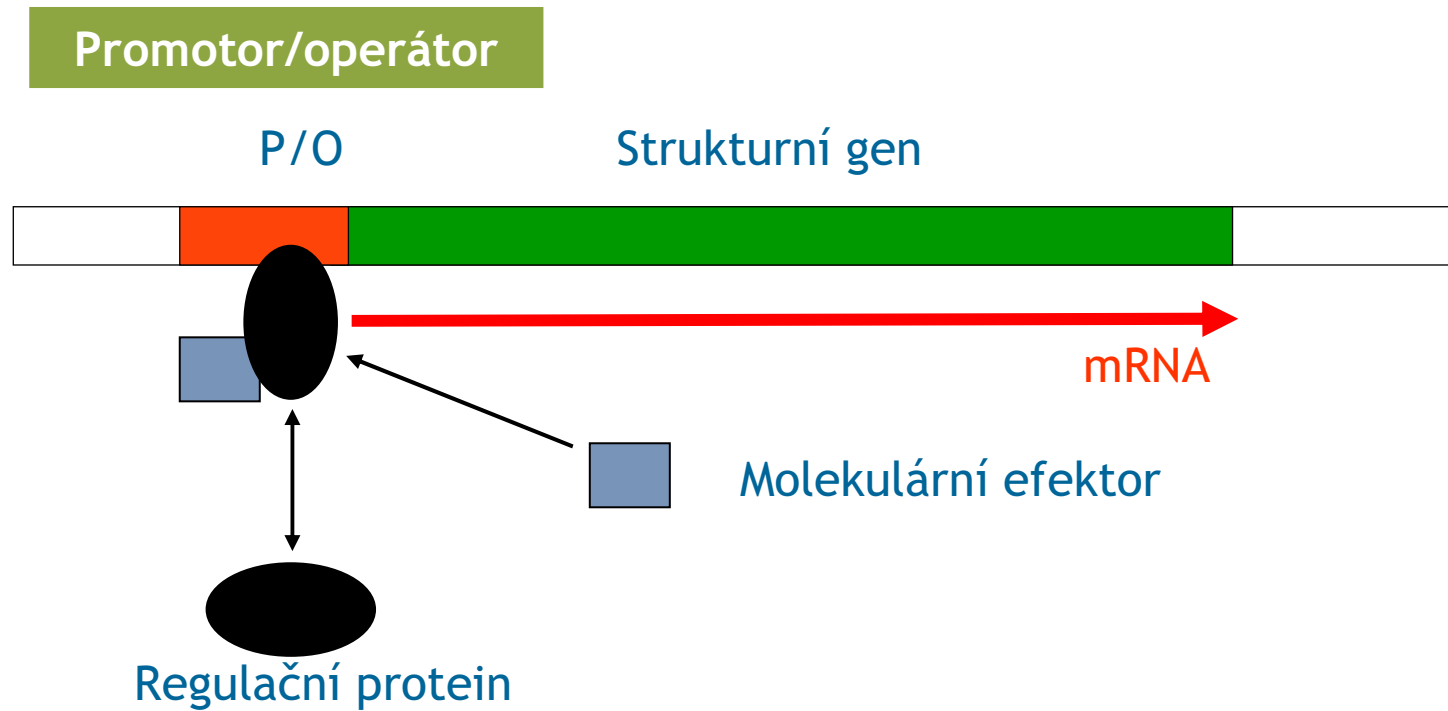


Represor ve formě tetrameru se váže k operátorům O1 a O3 (nebo O2 a O3), tím navodí ohyb DNA a znepřístupní promotor RNA-polymeráze

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



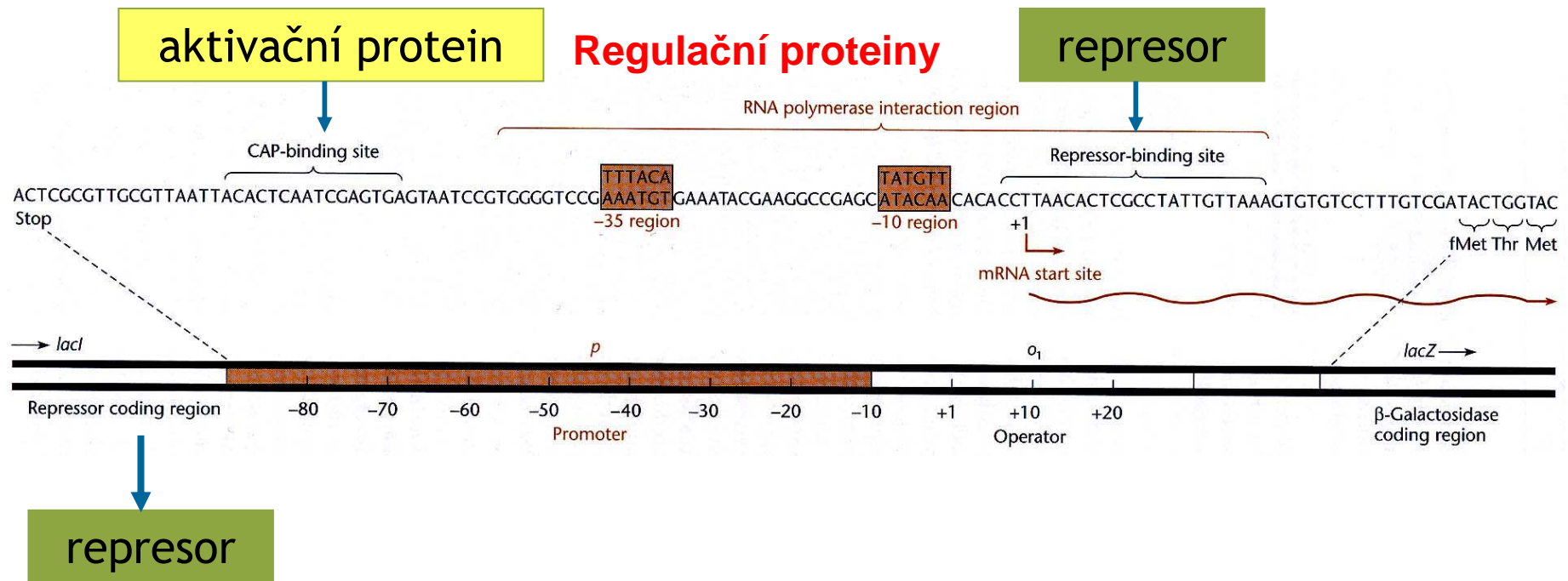
Regulace genové exprese na úrovni transkripce u prokaryot



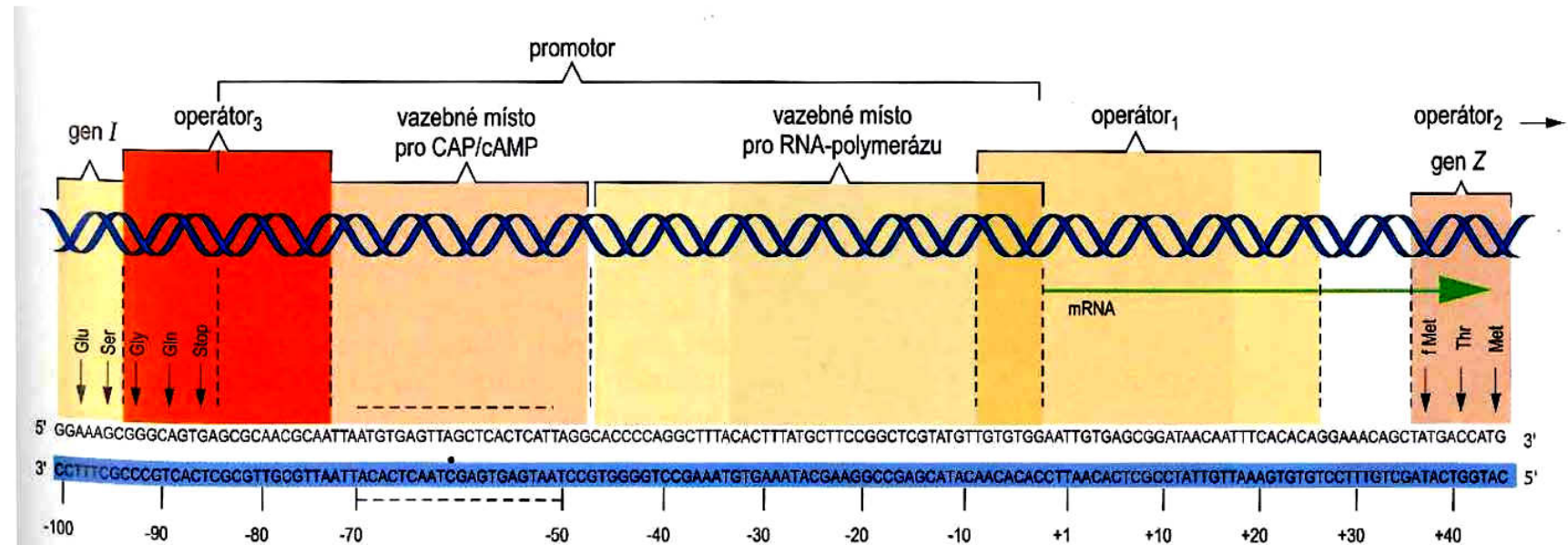
Oblast promotoru a operátoru laktózového operonu

vazba proti směru transkripce

vazba po směru transkripce

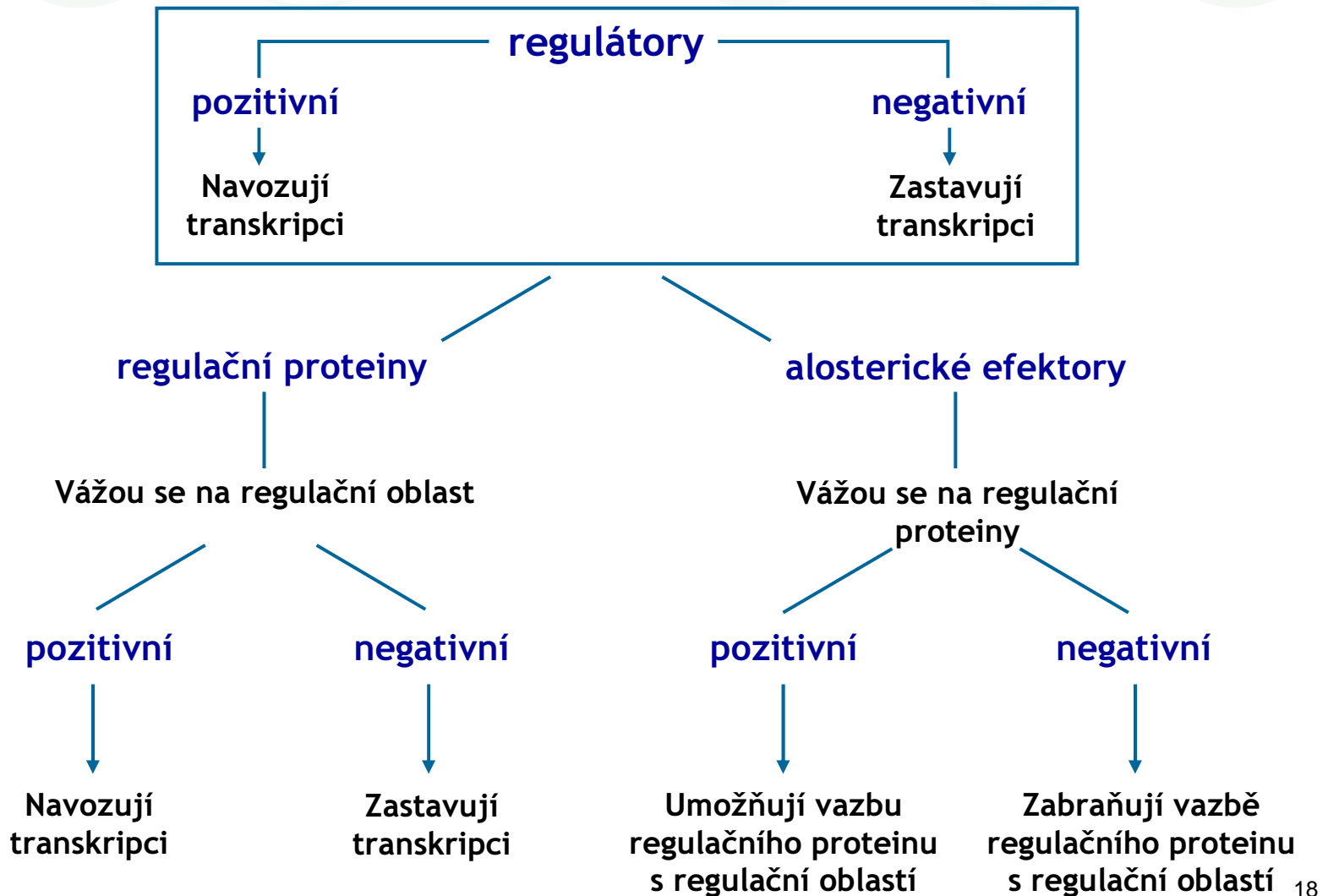


Oblast promotoru a operátoru laktóзовého operonu



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* (β -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



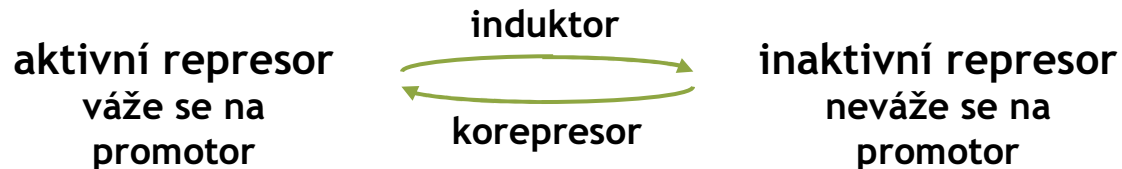
Negativní a pozitivní kontrola transkripce regulace

Negativní kontrola

Aktivní regulační protein vypíná transkripci

Regulační protein = transkripční represor

Promotor je funkční po odstranění represoru

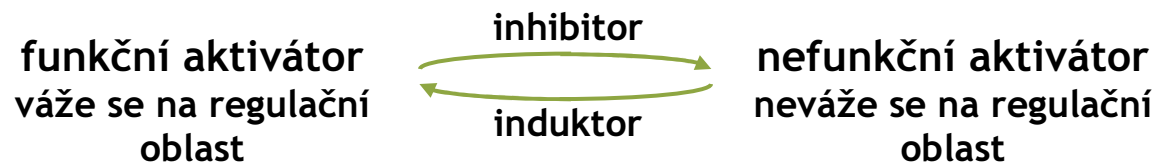


Pozitivní kontrola

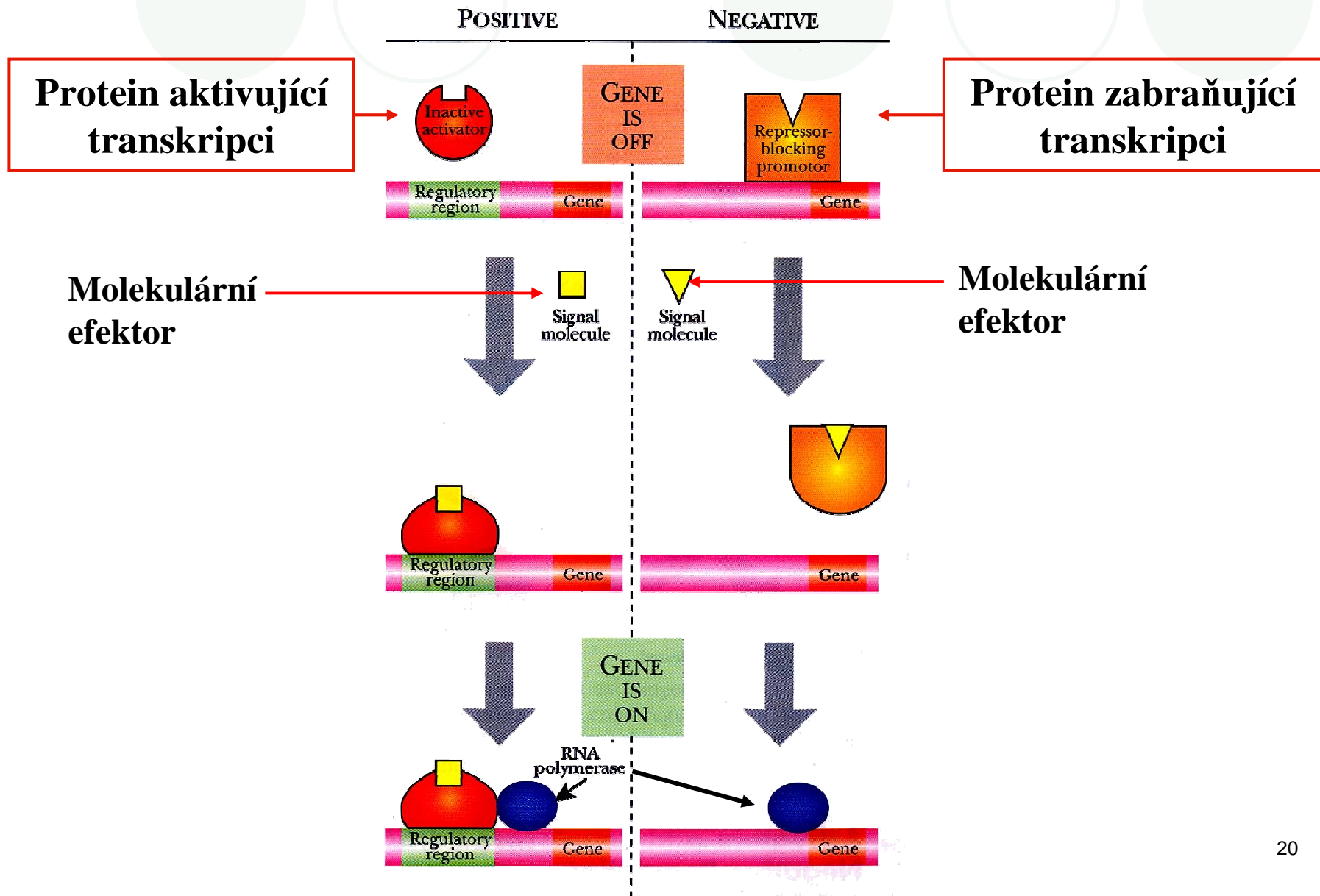
Aktivní regulační protein zapíná transkripci

Regulační protein = aktivátor transkripce

Promotor je funkční pouze po aktivaci, která umožní zahájit transkripci

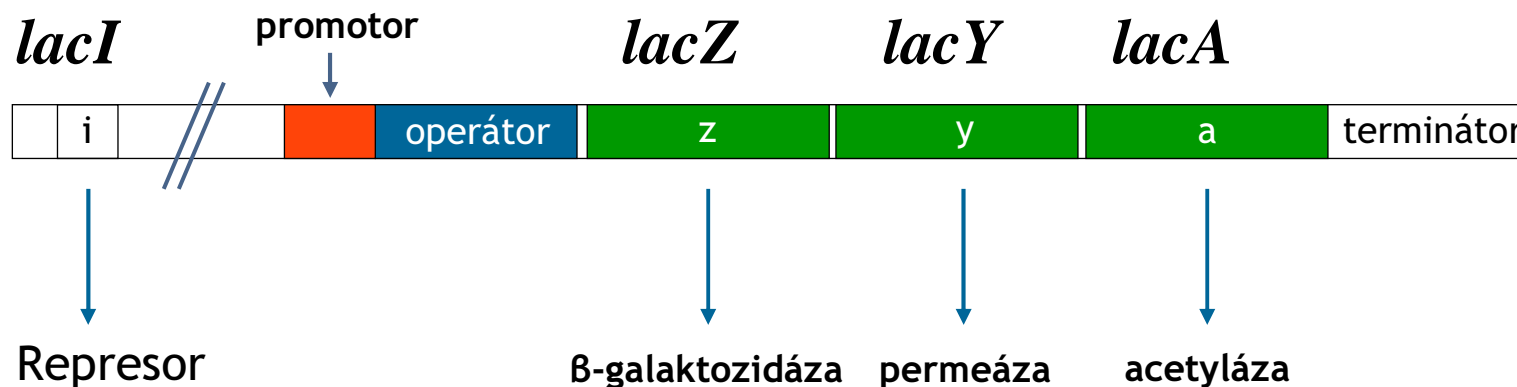


Princip pozitivní a negativní regulace transkripce



Příklad regulovatelného operonu

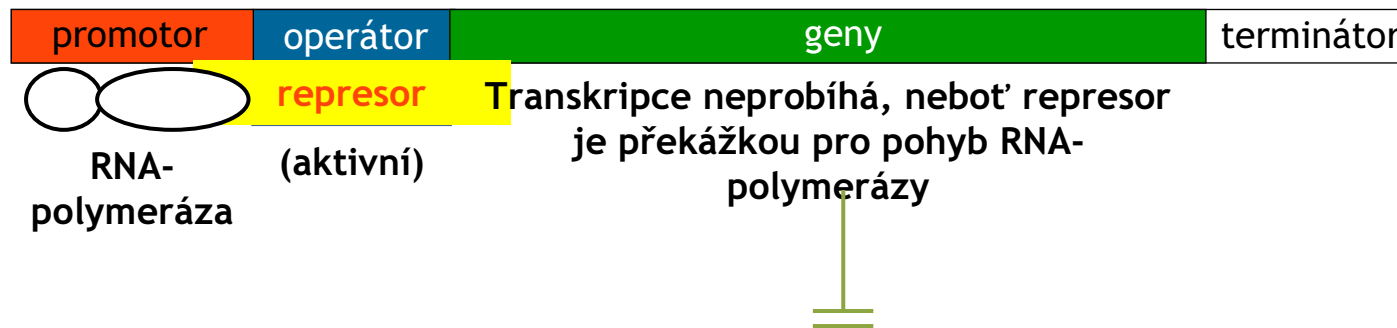
Laktozový operon *Escherichia coli*



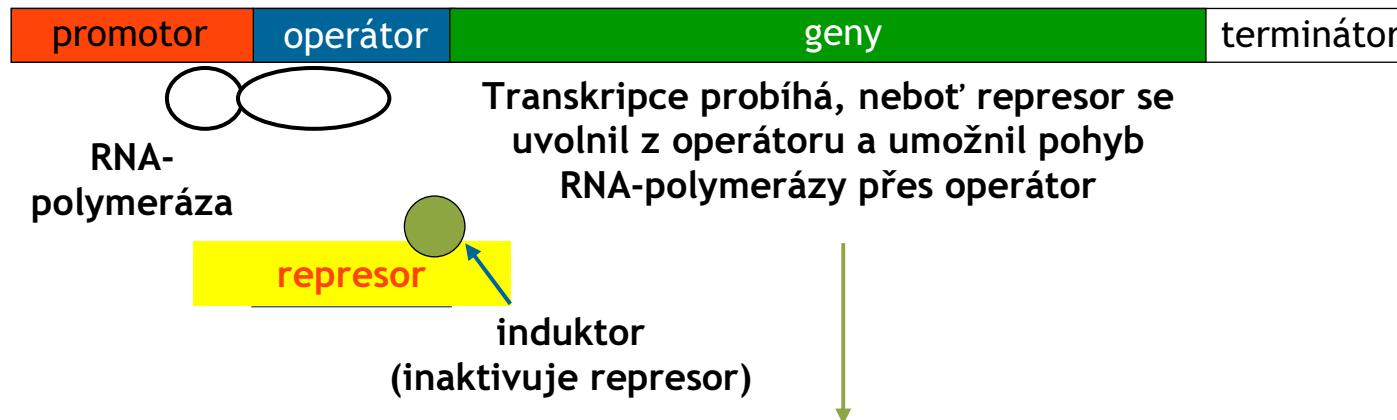
Všechny enzymy jsou indukovatelné laktózou (alolaktózou)

β -galaktozidáza konvertuje laktózu na alolaktózu, která působí jako induktor

Negativní regulace laktóзовého operonu v rámci enzymové indukce

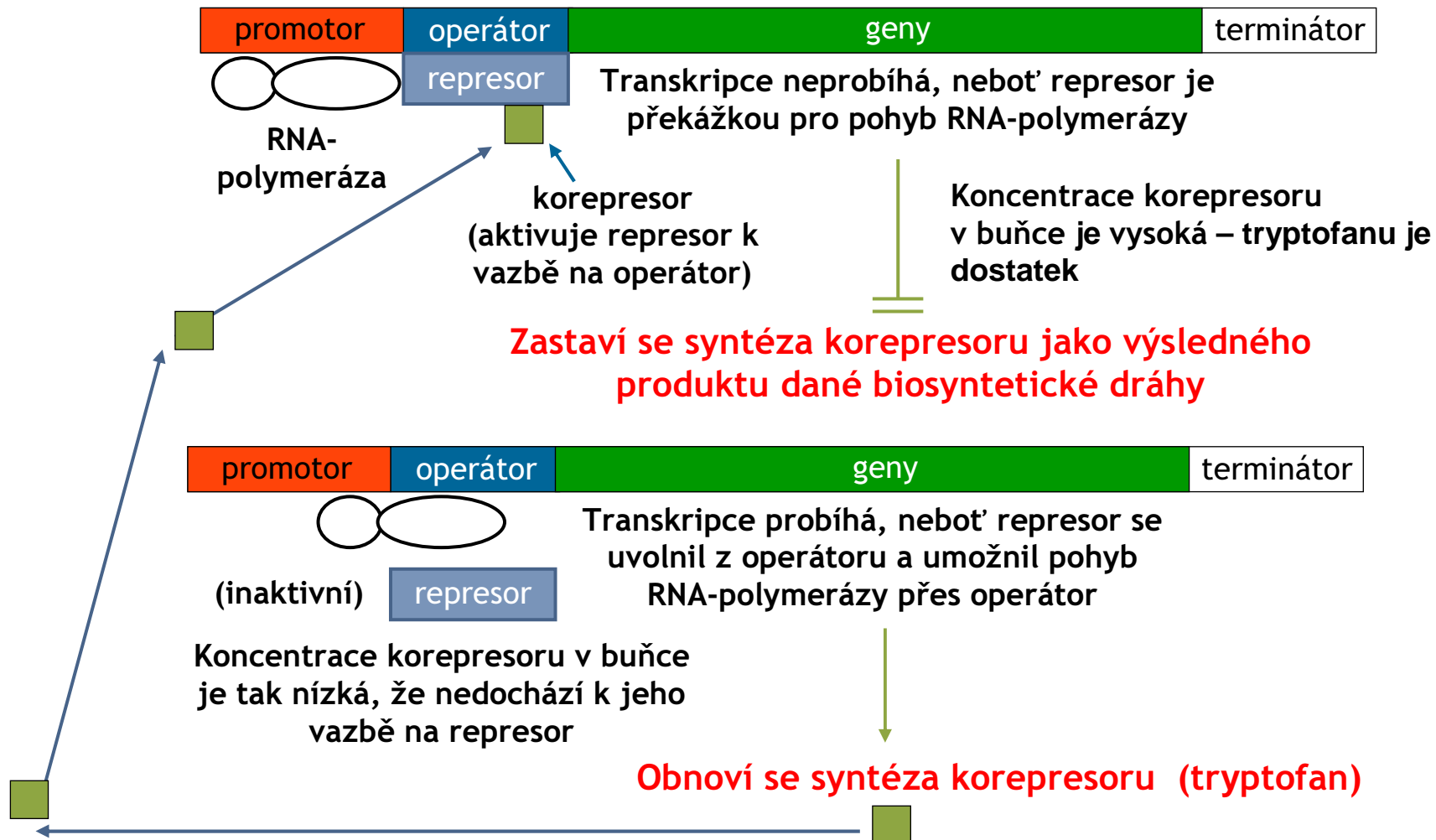


Netvoří se indukovatelné enzymy

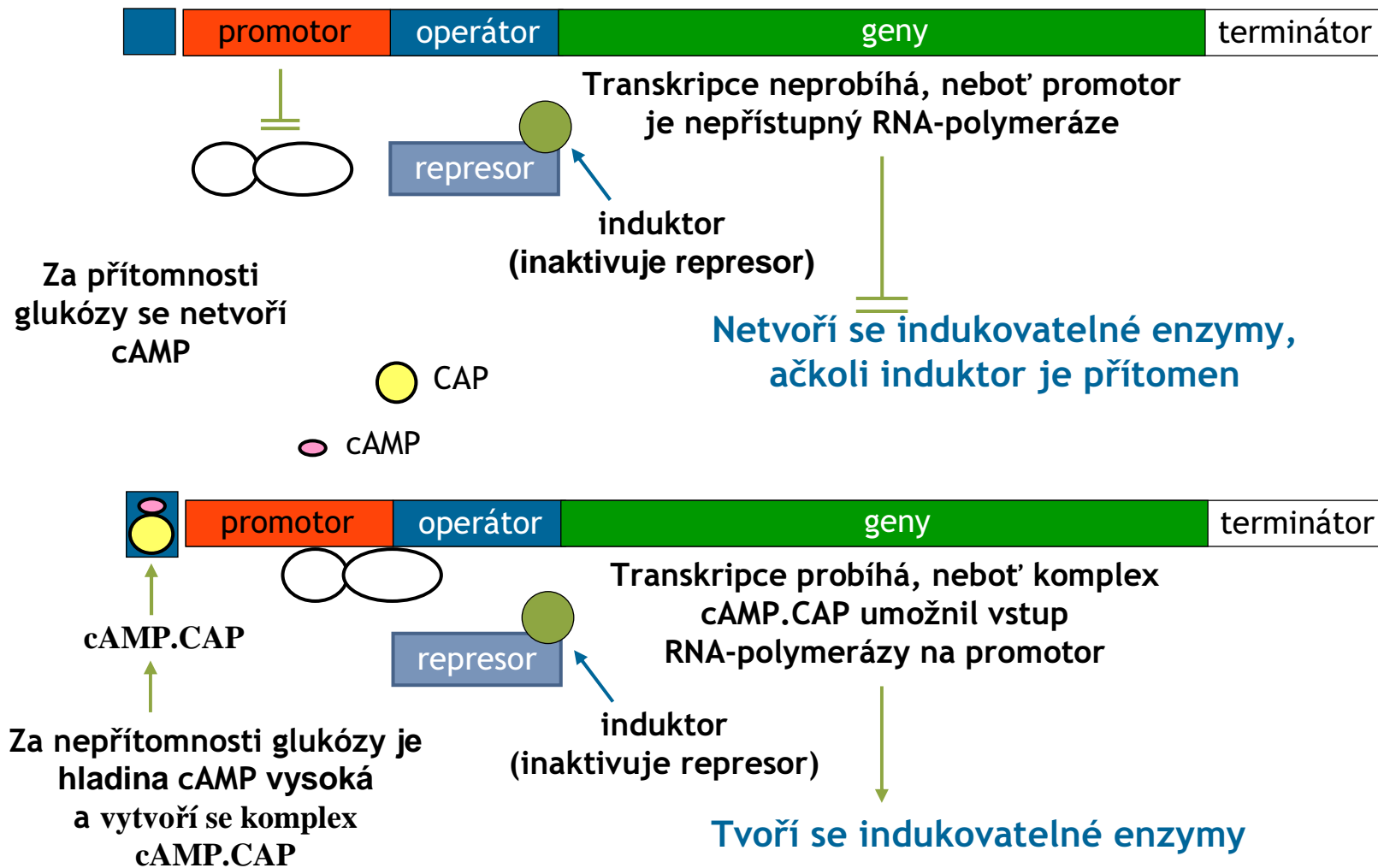


Tvoří se indukovatelné enzymy

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



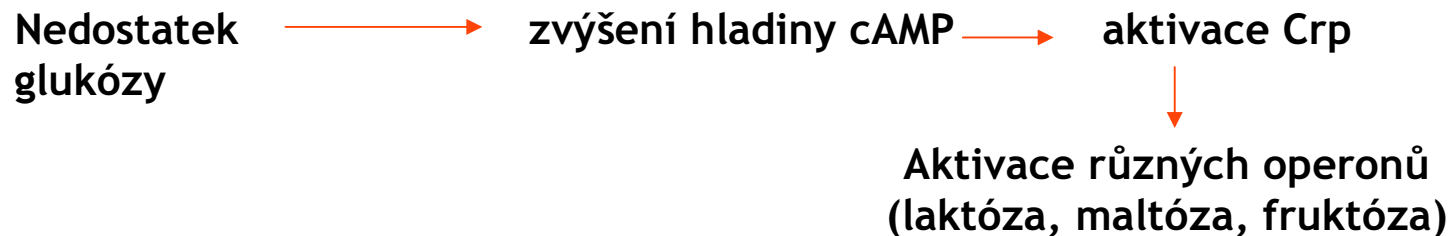
Pozitivní regulace operonu



Klasifikace regulátorů

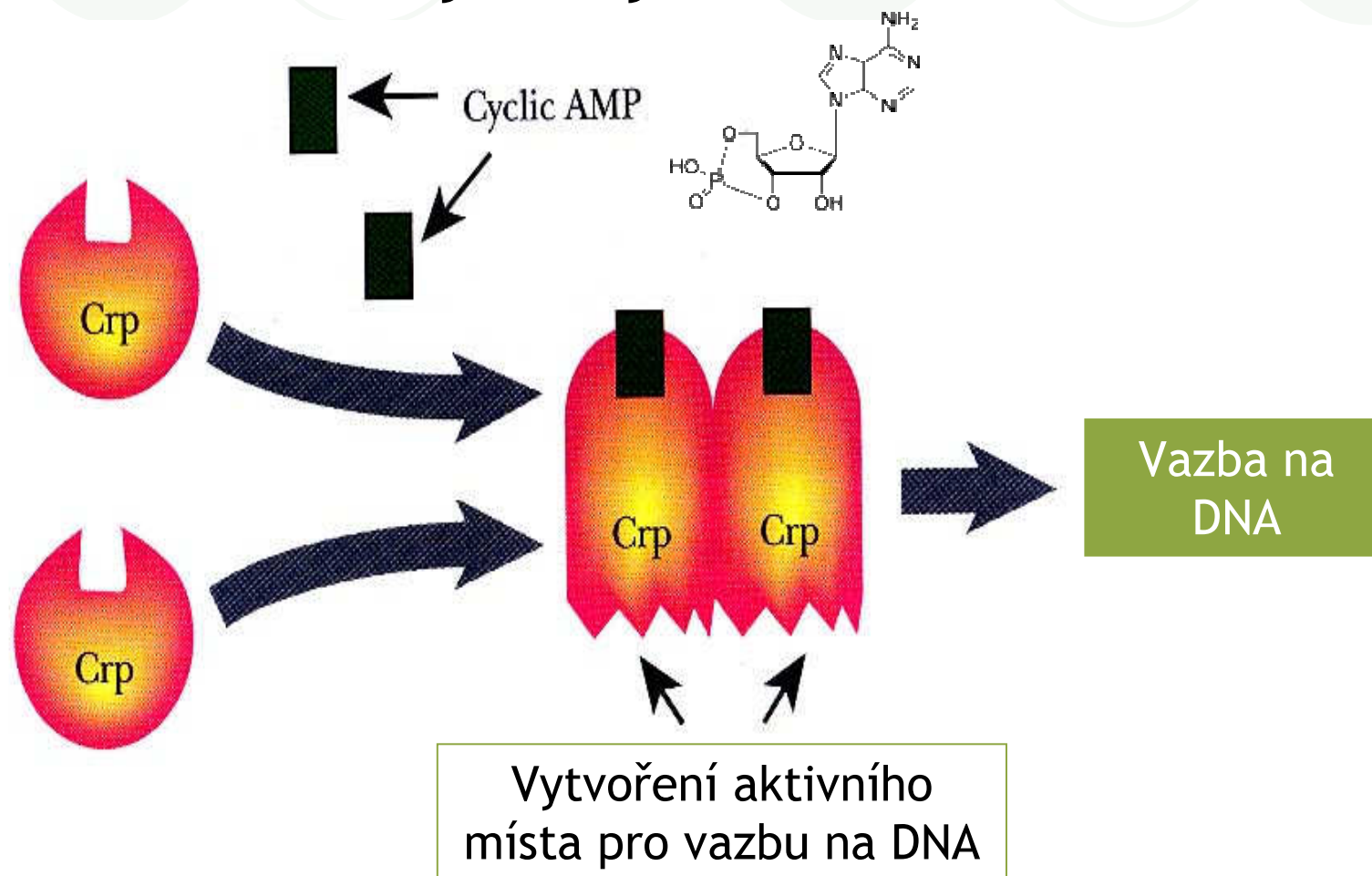
Specifický regulátor = reguluje expresi jednoho nebo mála genů
(např. laktózový represor)

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



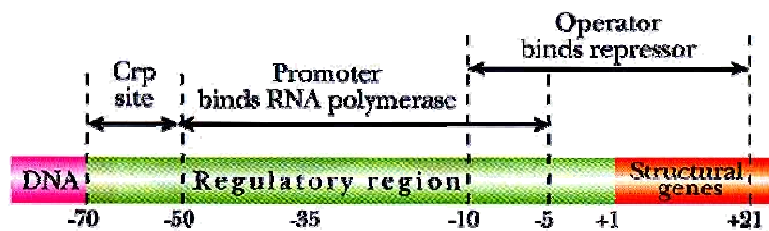
REGULON = skupina genů nebo operonů regulovaná stejným regulačním proteinem

Aktivace globálního regulátoru CAP (Crp) cyklickým AMP

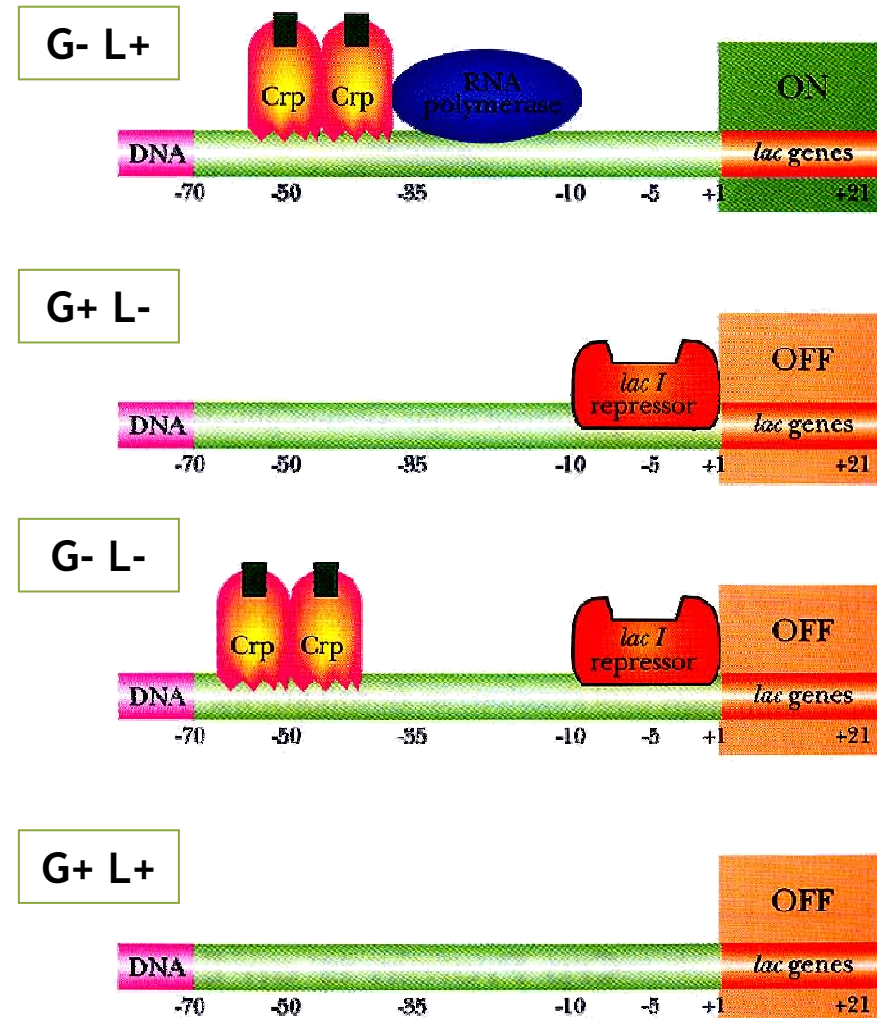


Crp = Cyclic AMP Receptor Protein (CAP)

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

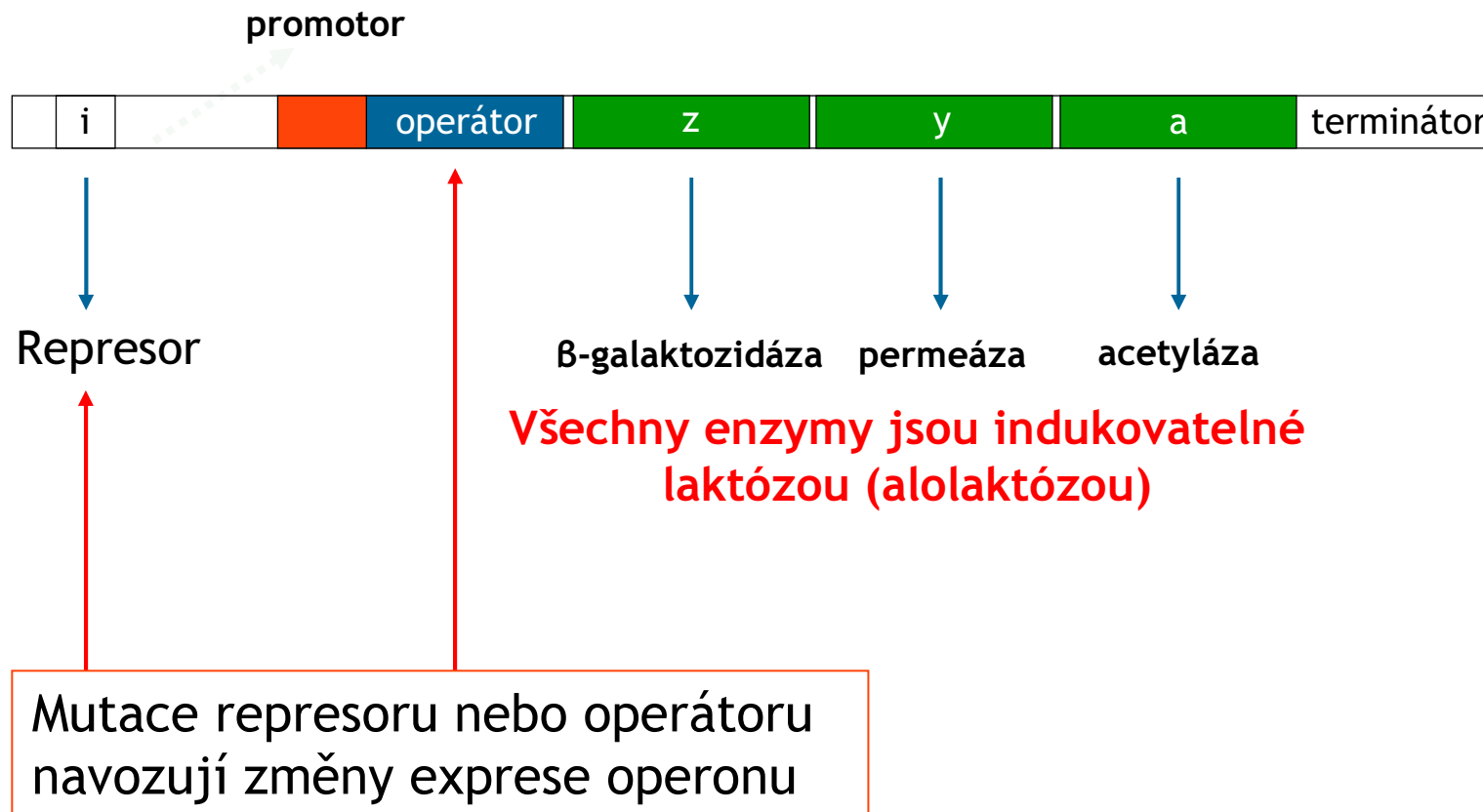
Korepresor = pozitivní alosterický efektor = negativní regulátor

Represor = negativní regulační protein = negativní regulátor

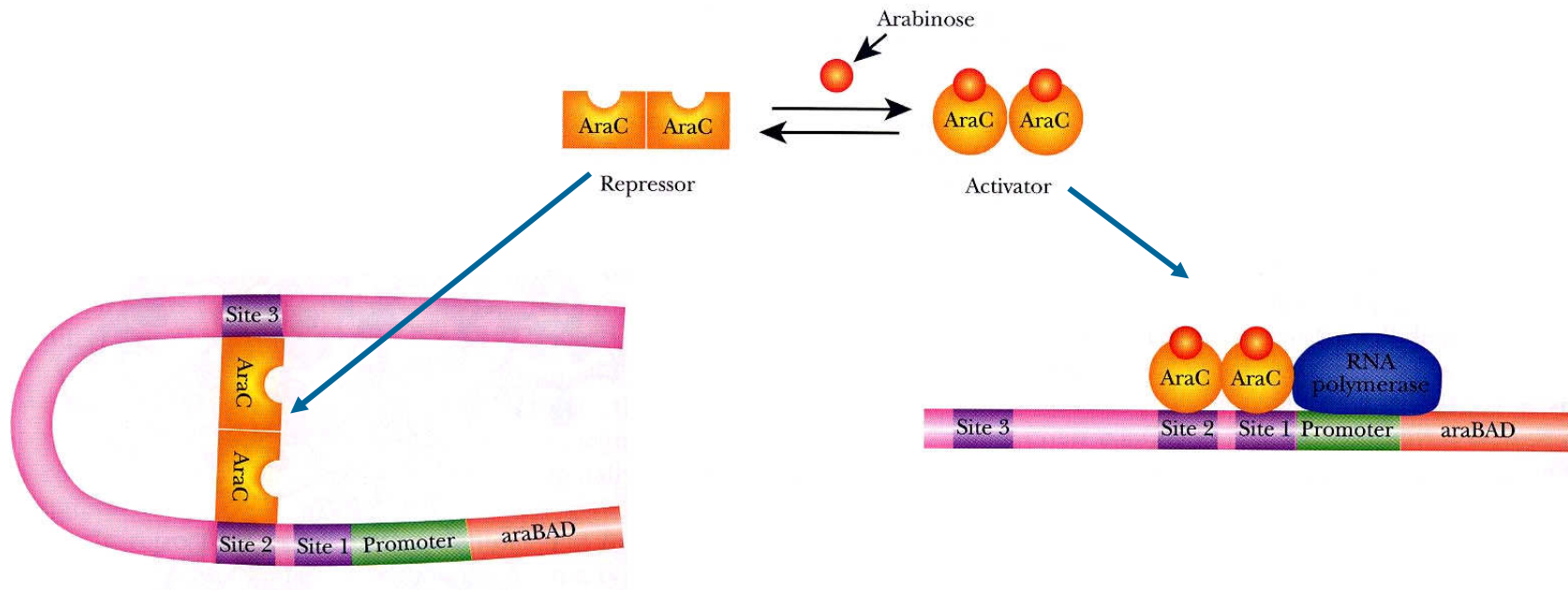
CAP = pozitivní regulační protein = pozitivní regulátor

cAMP = pozitivní alosterický efektor = pozitivní regulátor

Aktivita laktóзовého operonu ovlivněná mutacemi



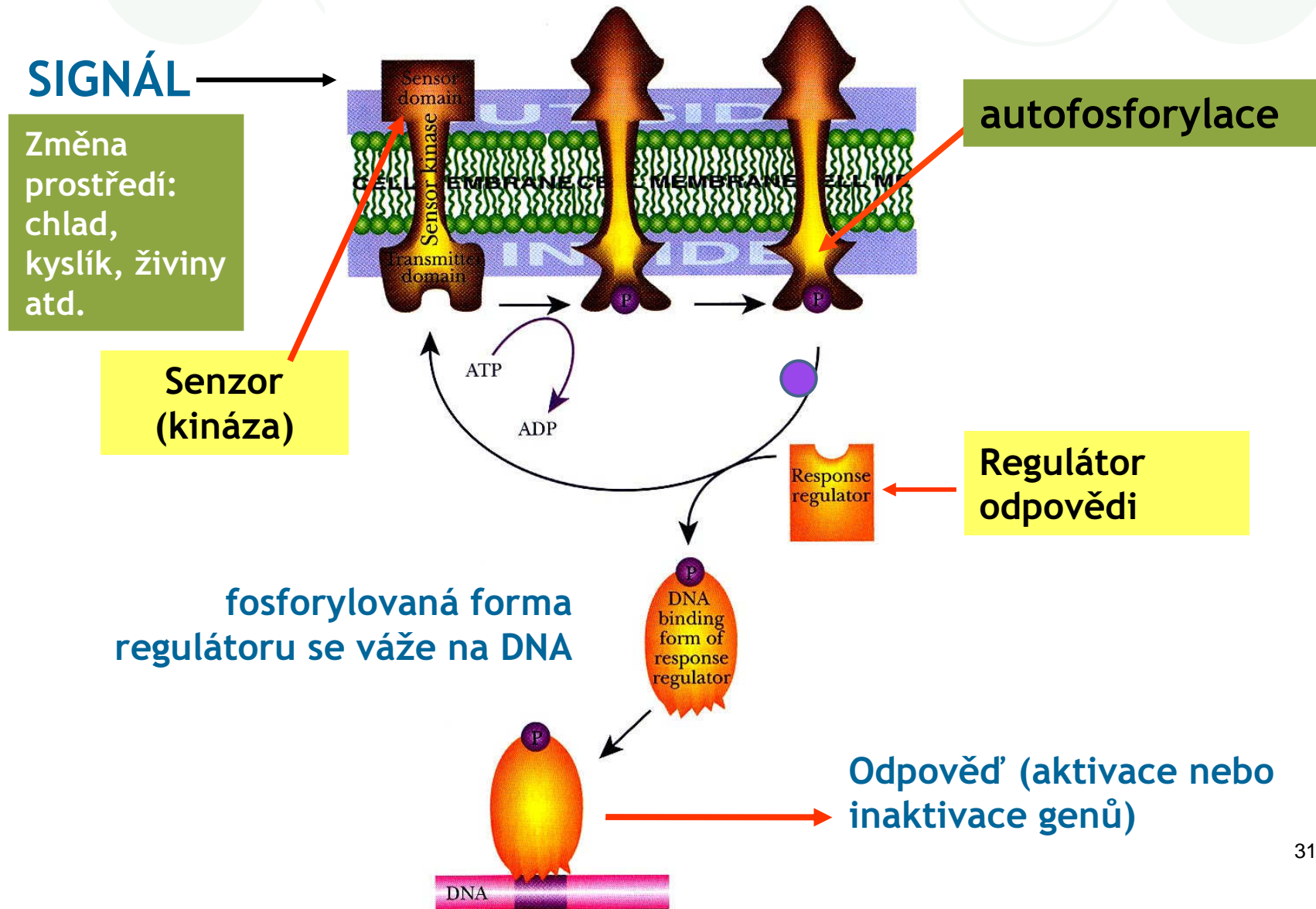
Působení regulačního proteinu AraC jako represoru nebo aktivátoru



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

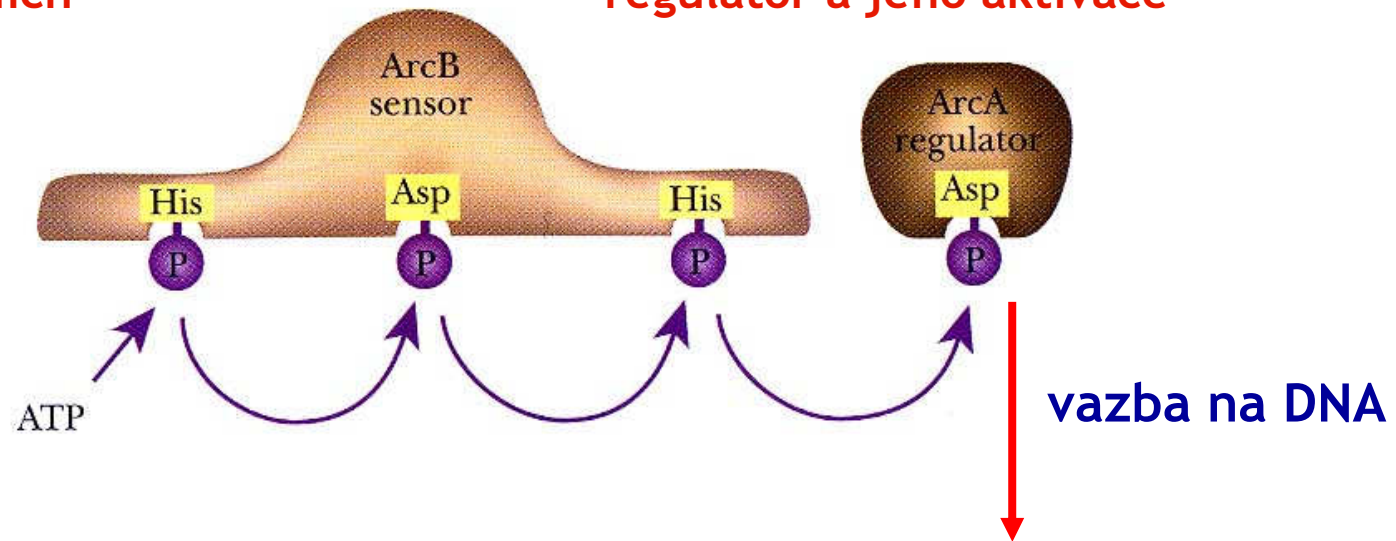


Fungování dvoukomponentního regulačního systému ArcAB

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



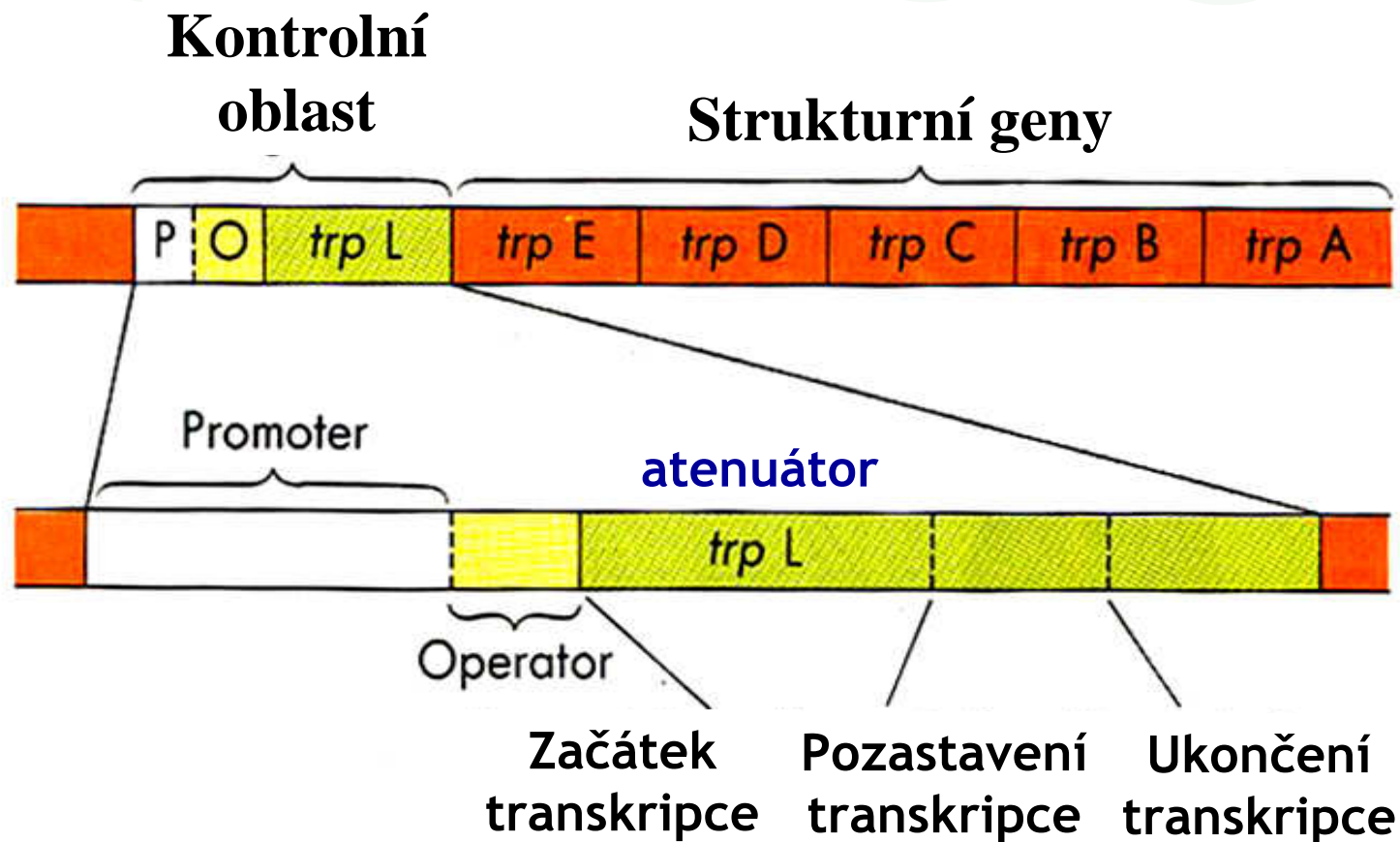
3. Represe asi 20 genů vyžadovaných pro aerobní metabolismus, zapnutí asi 6 genů vyžadovaných pro anaerobní metabolismus



Dvoukomponentní regulační systémy u *E. coli*

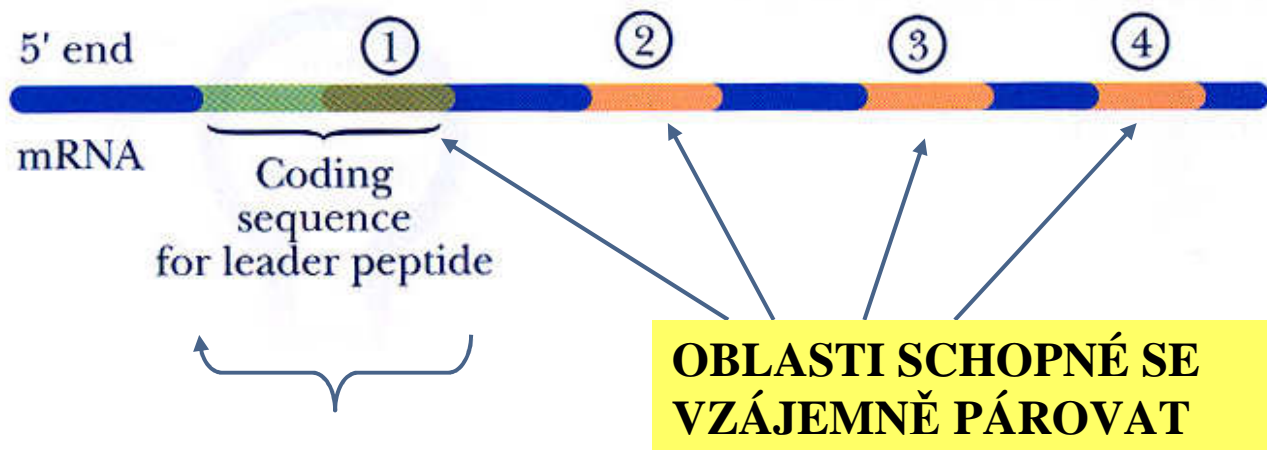
| Stimul/funkce | Sensor | Regulator |
|-----------------------------|---------------|------------------|
| Nedostatek kyslíku | ArcB | ArcA |
| Osmolarita/obalové proteiny | EnvZ | OmpR |
| Osmolarita, transport K | KdpD | KdpE |
| Nedostatek fosforu | PhoR | PhoB |
| Metabolismus dusíku | NtrB | NtrC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

Tryptofanový operon *E. coli*



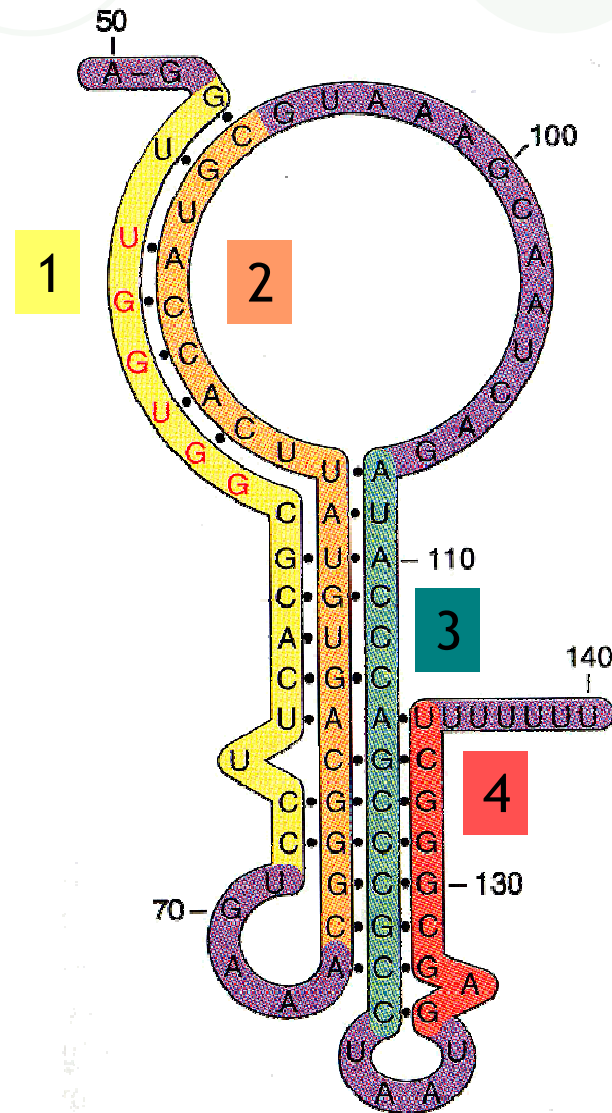
Atenuace - umístění atenuátorové sekvence v tryptofanovém operonu

Polohy sekvencí v atenuátoru



oblast vedoucí sekvence

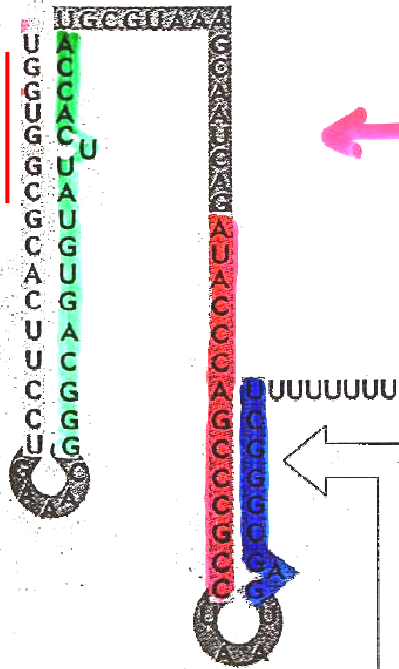
Sekundární struktura přepisu (RNA) vedoucí oblasti tryptofanového operonu



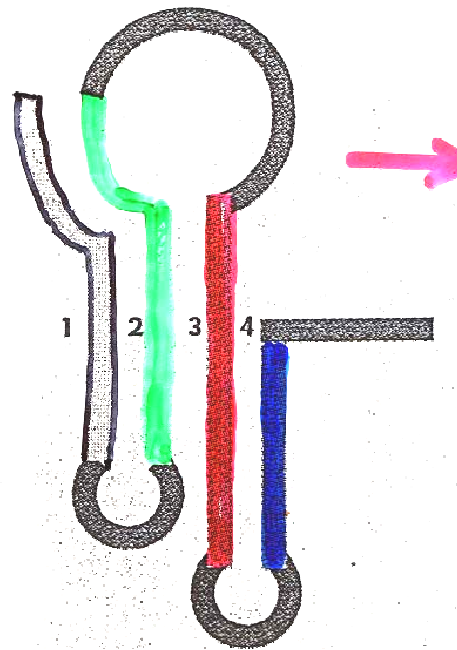
Možnosti alternativního párování sekvencí 1, 2, 3 a 4 za vzniku vlásenek

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

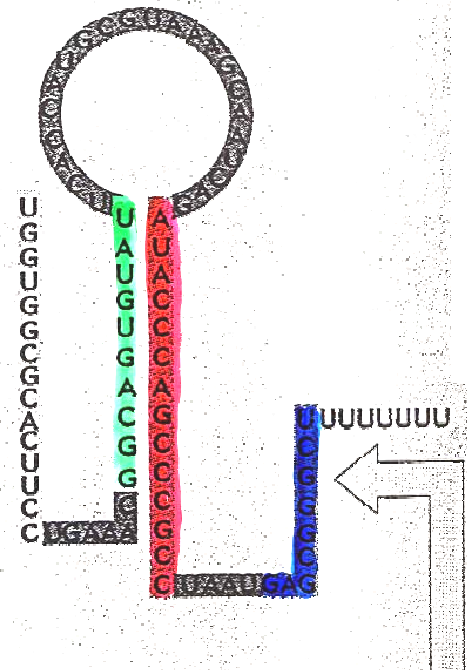


Vytvoření terminátorové vlásenky párováním sekvencí 3 a 4.



Alternativní možnosti párování sekvencí 1, 2, 3 a 4

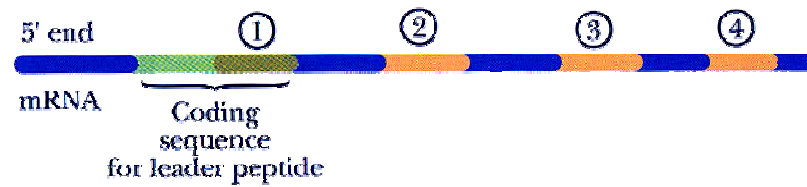
Sekvence 2 se může párovat se sekvencí 1 nebo 3, sekvence 3 se může párovat se sekvencí 2 nebo 4



Párují se sekvence 2 a 3, terminátorová vlásenka nevzniká

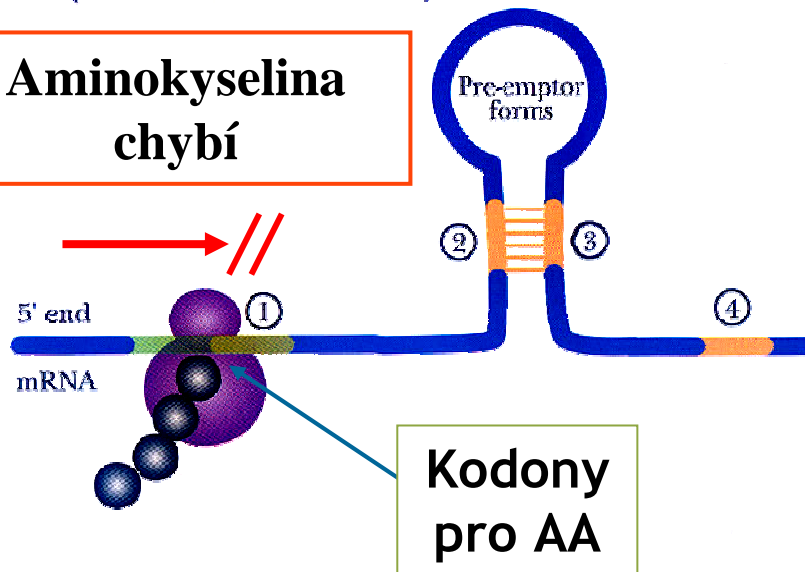
Mechanismus atenuace

A. SEQUENCE LAYOUT



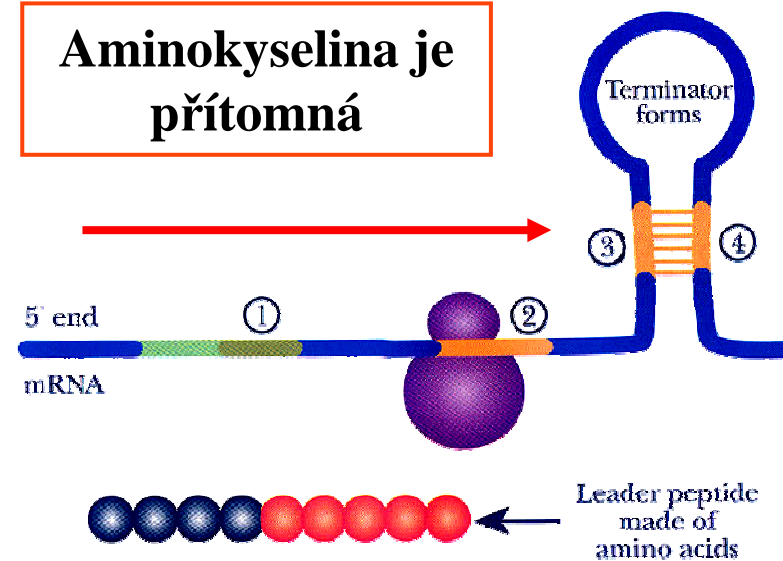
B. GENE ON (No critical amino acids)

Aminokyselina chybí



C. GENE OFF (Critical amino acid present)

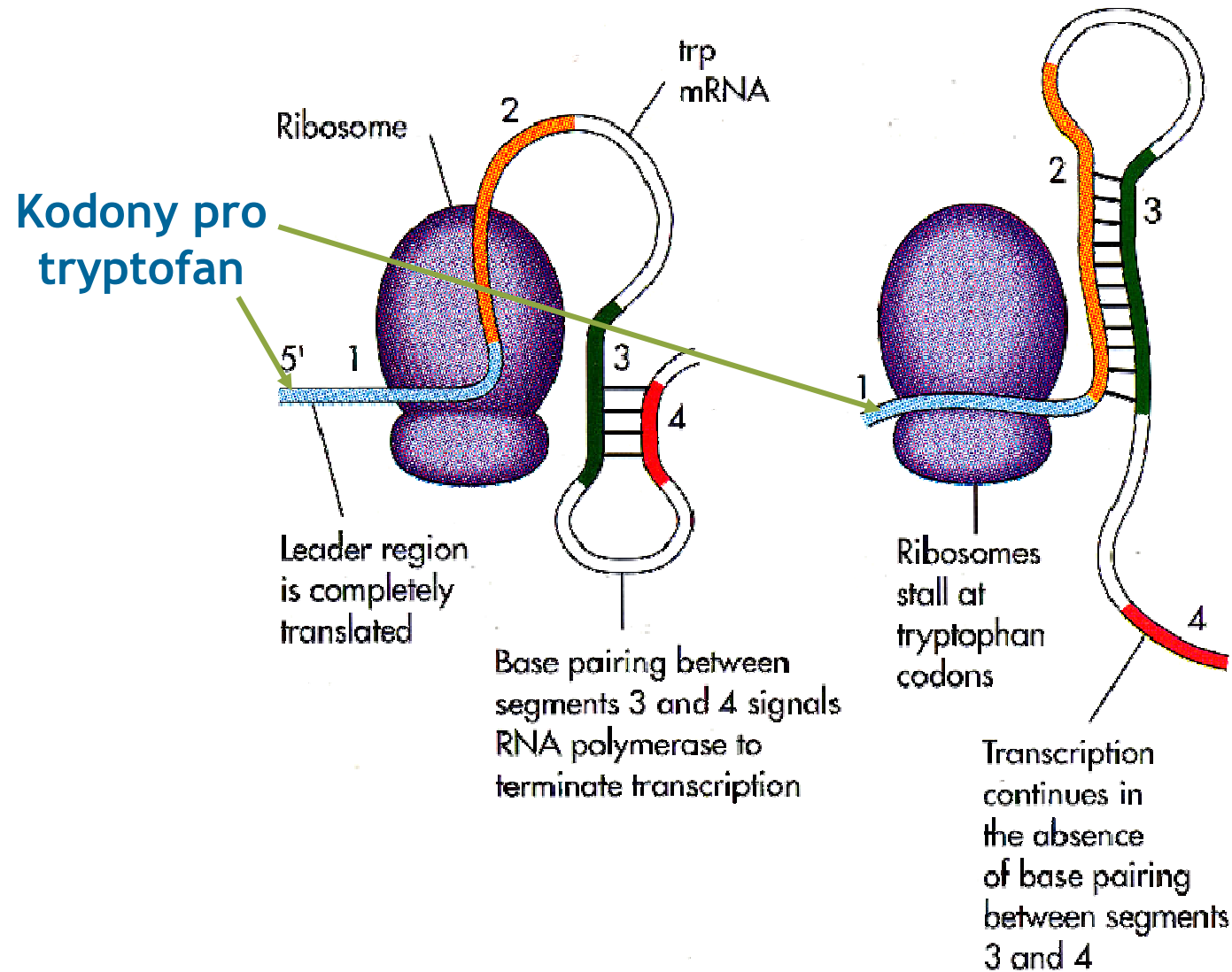
Aminokyselina je přítomná

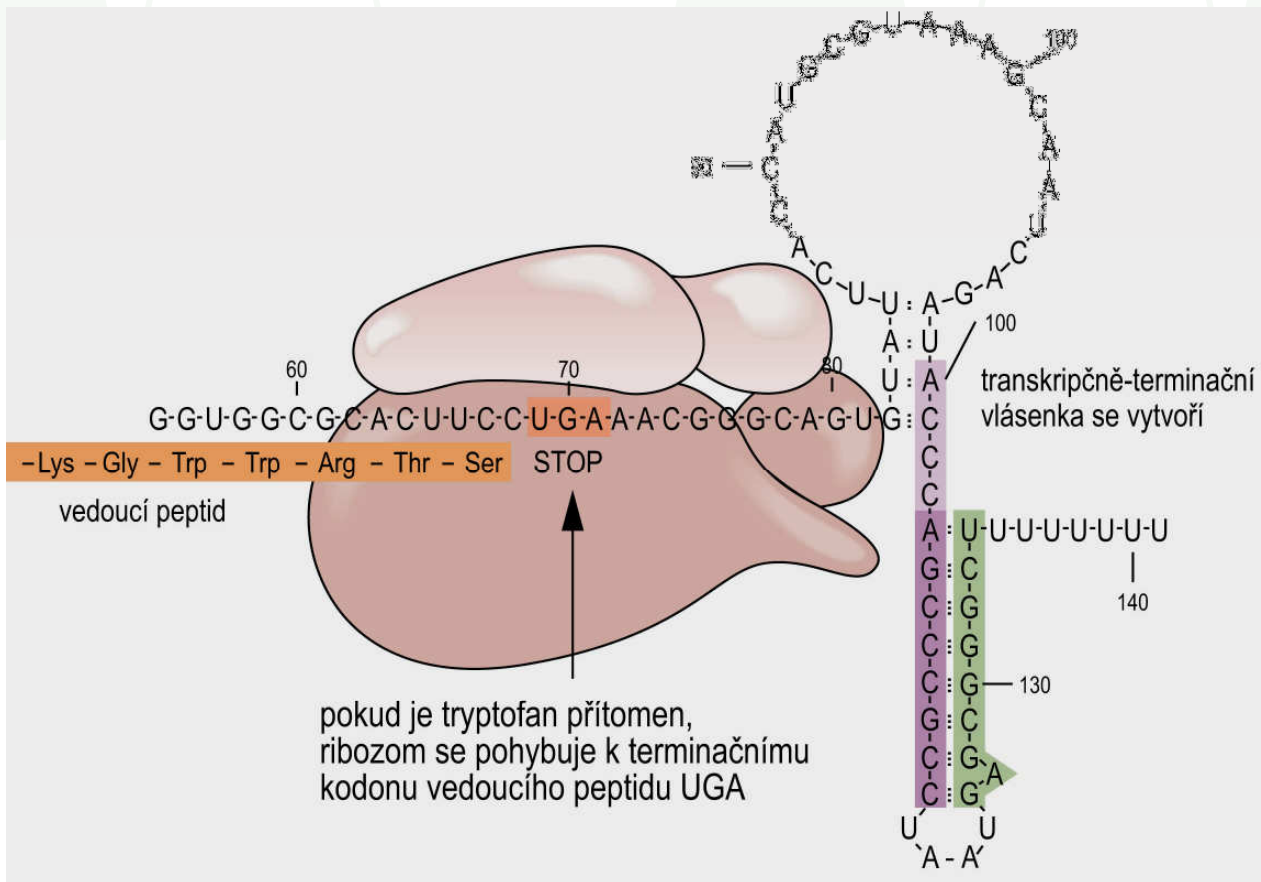


Průběh atenuace tryptofanového operonu

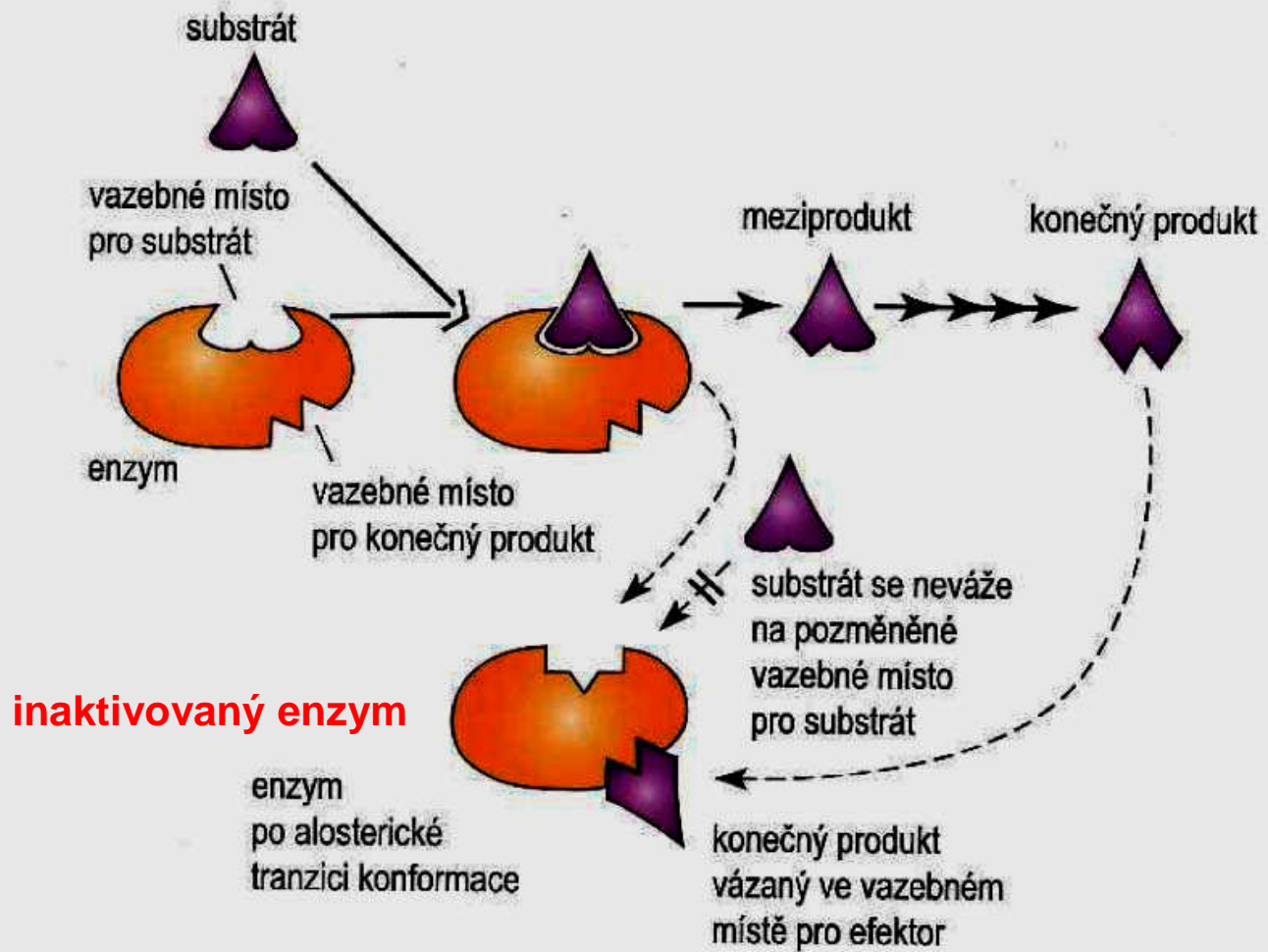
a. Vysoká koncentrace tryptofanu

b. Nízká koncentrace tryptofanu





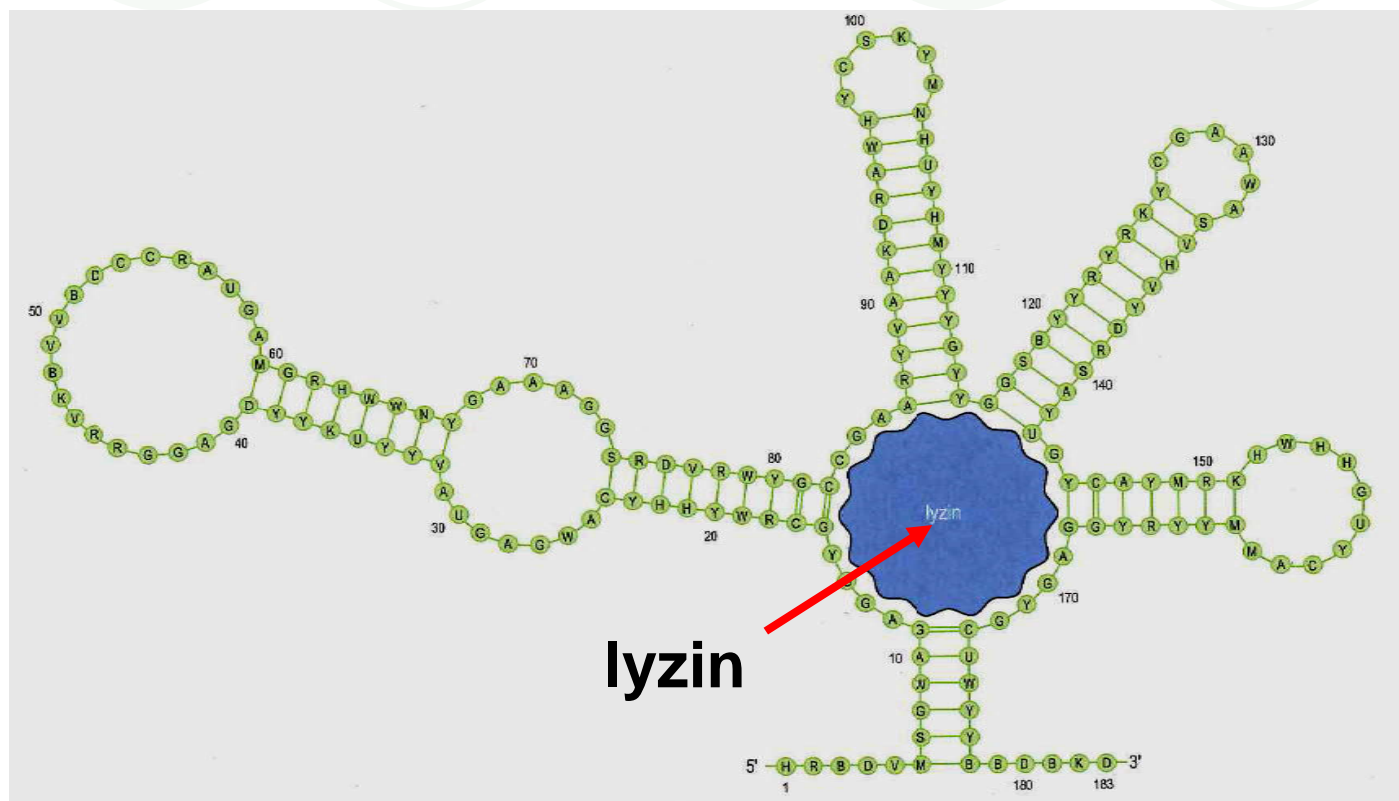
(c) Za přítomnosti dostatečného množství tryptofanu pokračuje translace přes Trp-kodony až k terminačnímu kodonu, a ruší tím párování bází mezi vedoucími oblastmi 2 a 3. Oblast 3 tak zůstává volná a může se párovat s oblastí 4 za vzniku transkripčně-terminační vlásenky, která na atenuátorové sekvenci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



inaktivovaný enzym

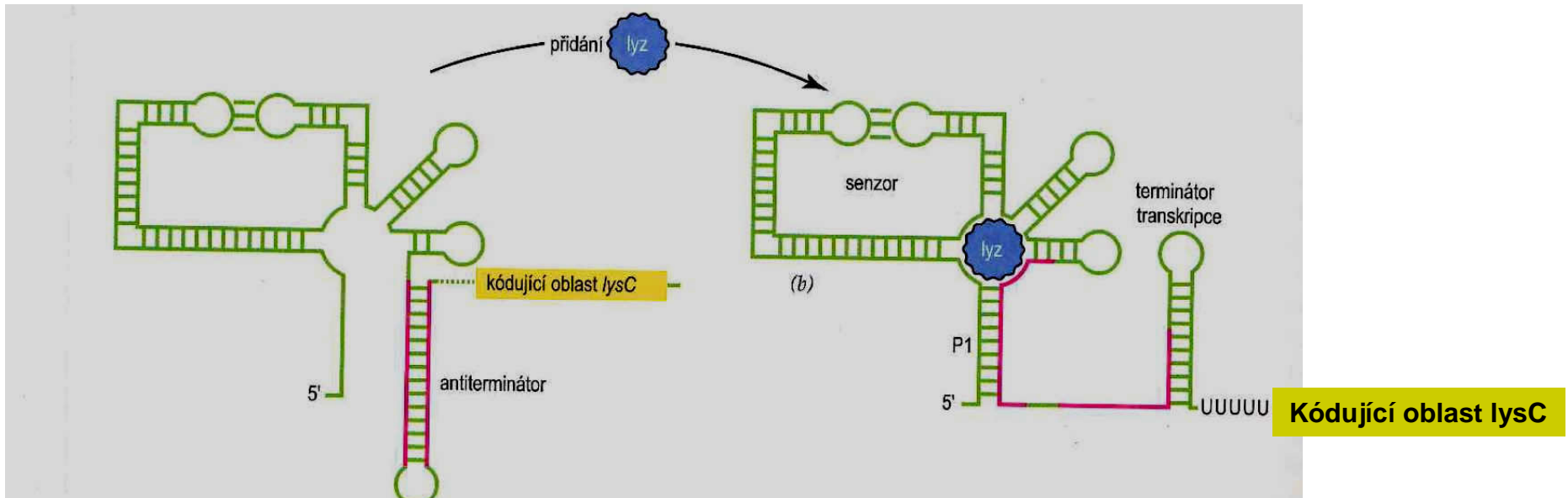
■ **Obr. 17.16** Inhibice aktivity genového produktu zpětnou vazbou. Konecový produkt biosyntetické dráhy se často váže k prvnímu enzymu této dráhy a inhibuje jeho aktivitu, čímž velmi rychle zastaví syntézu sebe sama.

Struktura lyzin-vázající domény lyzinového riboswitchu



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

Lyzinový riboswitch

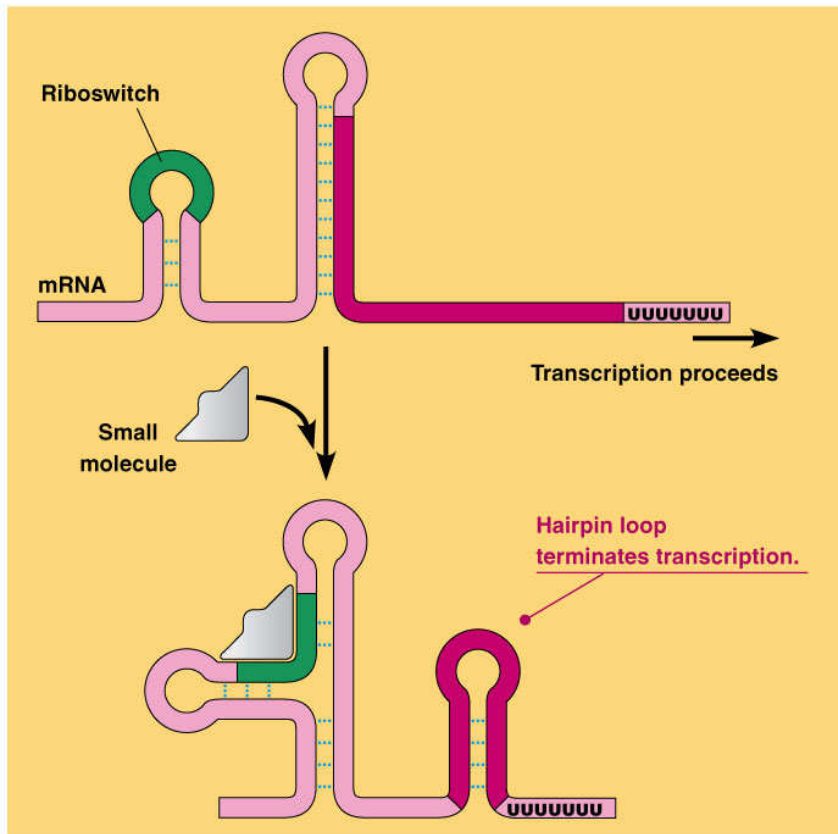


Lyzin není přítomen,
gen *lysC* je přepisován

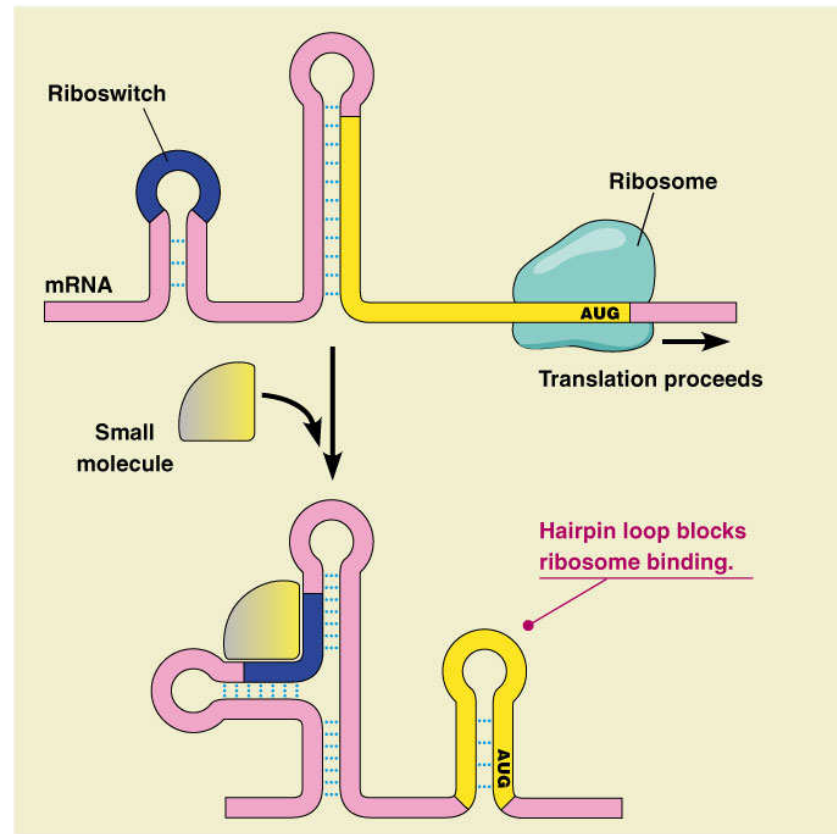
Lyzin je přítomen,
transkripce genu *lysC*
je ukončena

Mechanismus působení sekvence riboswitch na mRNA

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



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



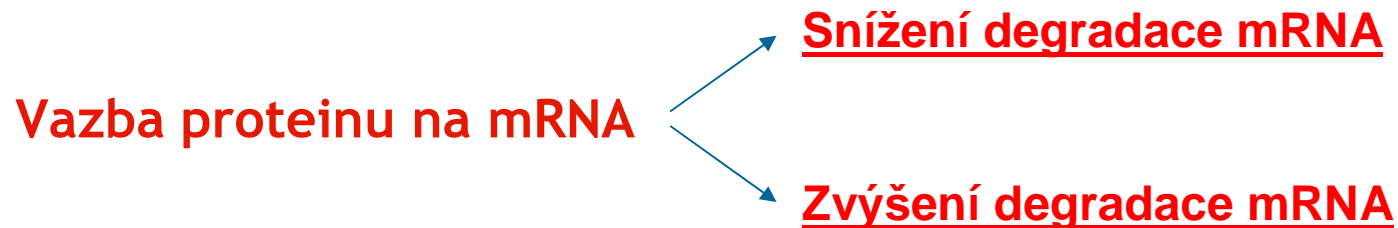
Regulace na úrovni RNA - translační kontrola

- 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

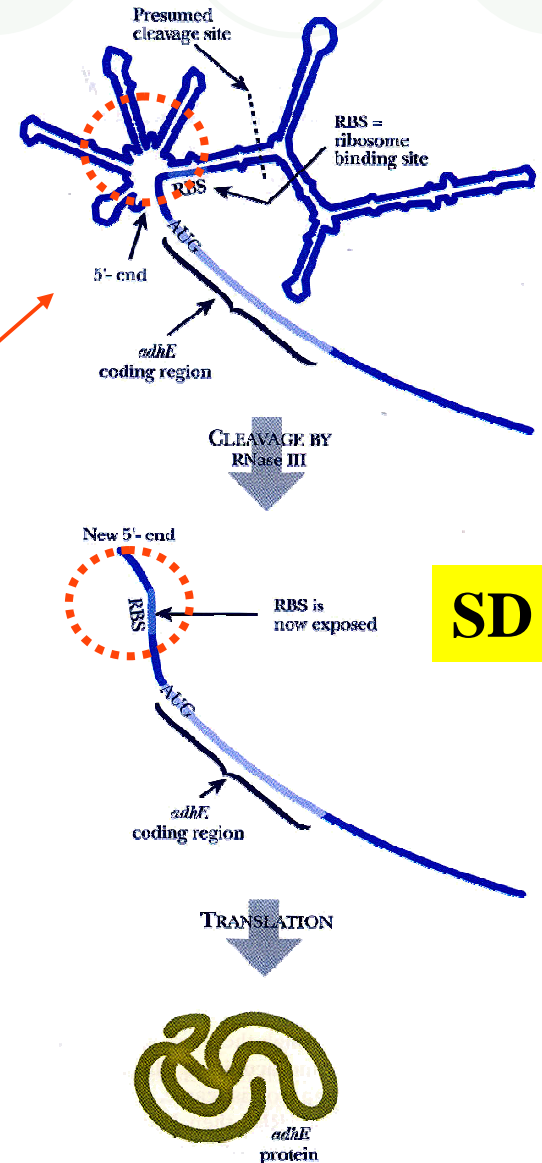
Původní molekula mRNA („pre-mRNA“) genu *adhE* (kóduje alkoholdehydrogenázu u *E. coli*) má sekundární strukturu, v níž jsou RBS a AUG nepřístupny

5'UTR, 3'UTR

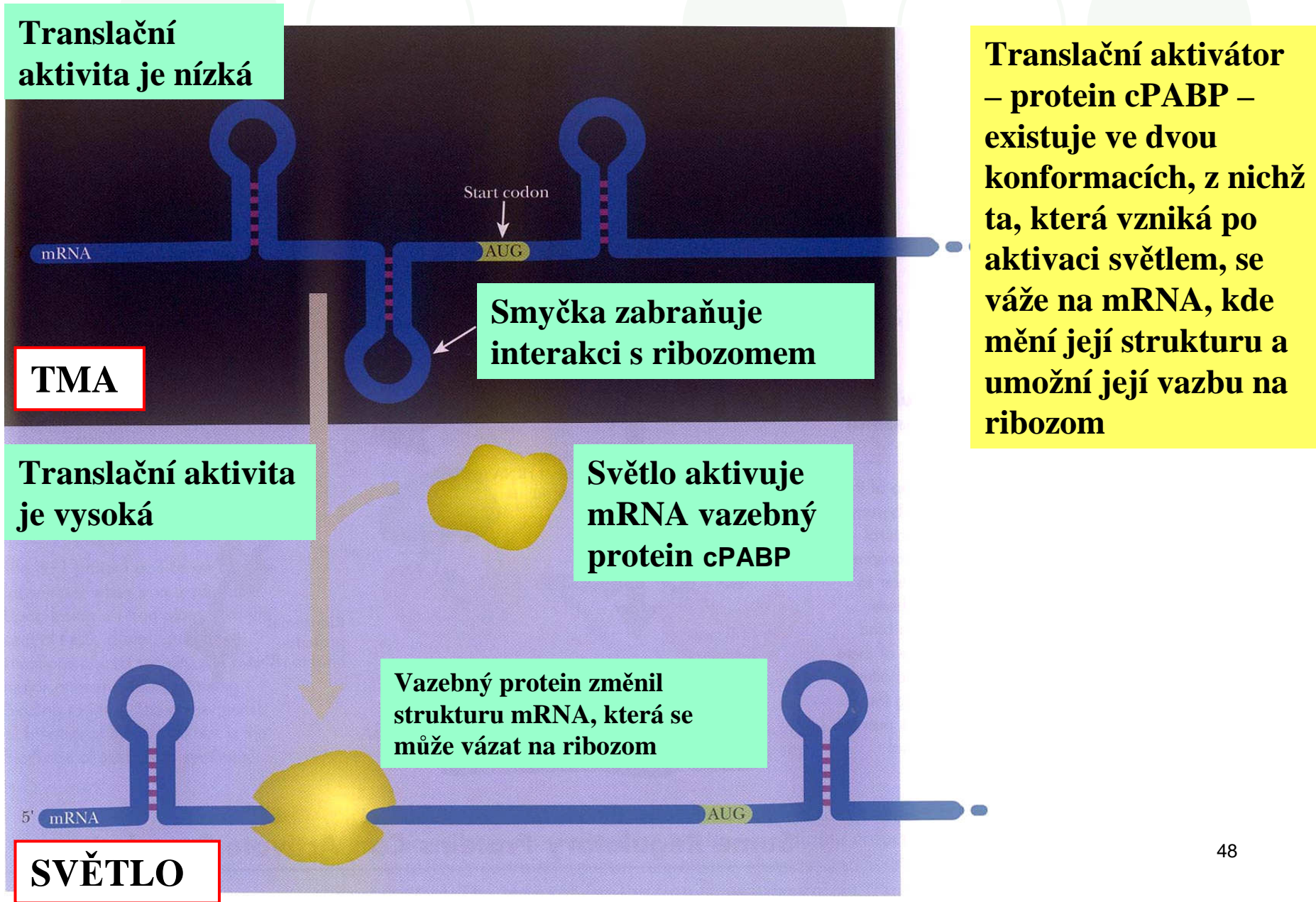
Štěpení mRNA RNázou III před RBS zpřístupní obě místa, takže jsou na ribozomu rozpoznána

RNáza III provádí posttranskripční úpravy tRNA a rRNA

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

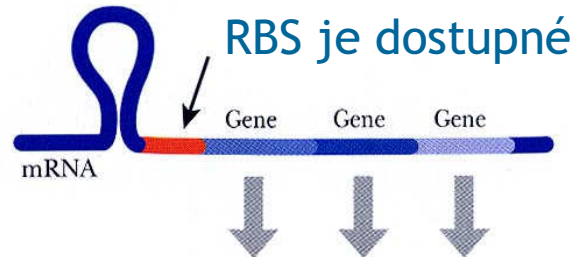


Aktivace translace chloroplastové mRNA – geny fotosyntézy



Regulace syntézy ribozomálních proteinů u bakterií (translační úroveň)

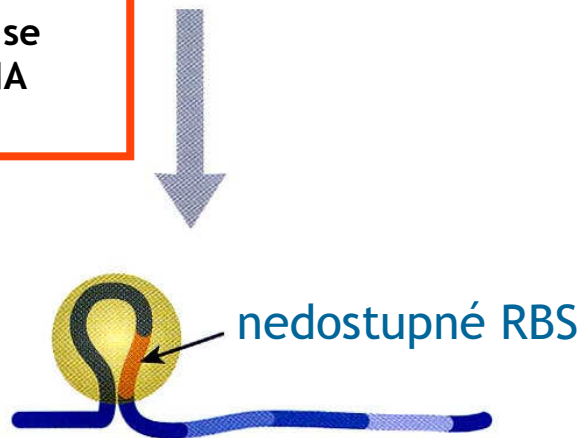
Multigenní mRNA nesoucí geny pro ribozomové proteiny



Dostatek molekul rRNA

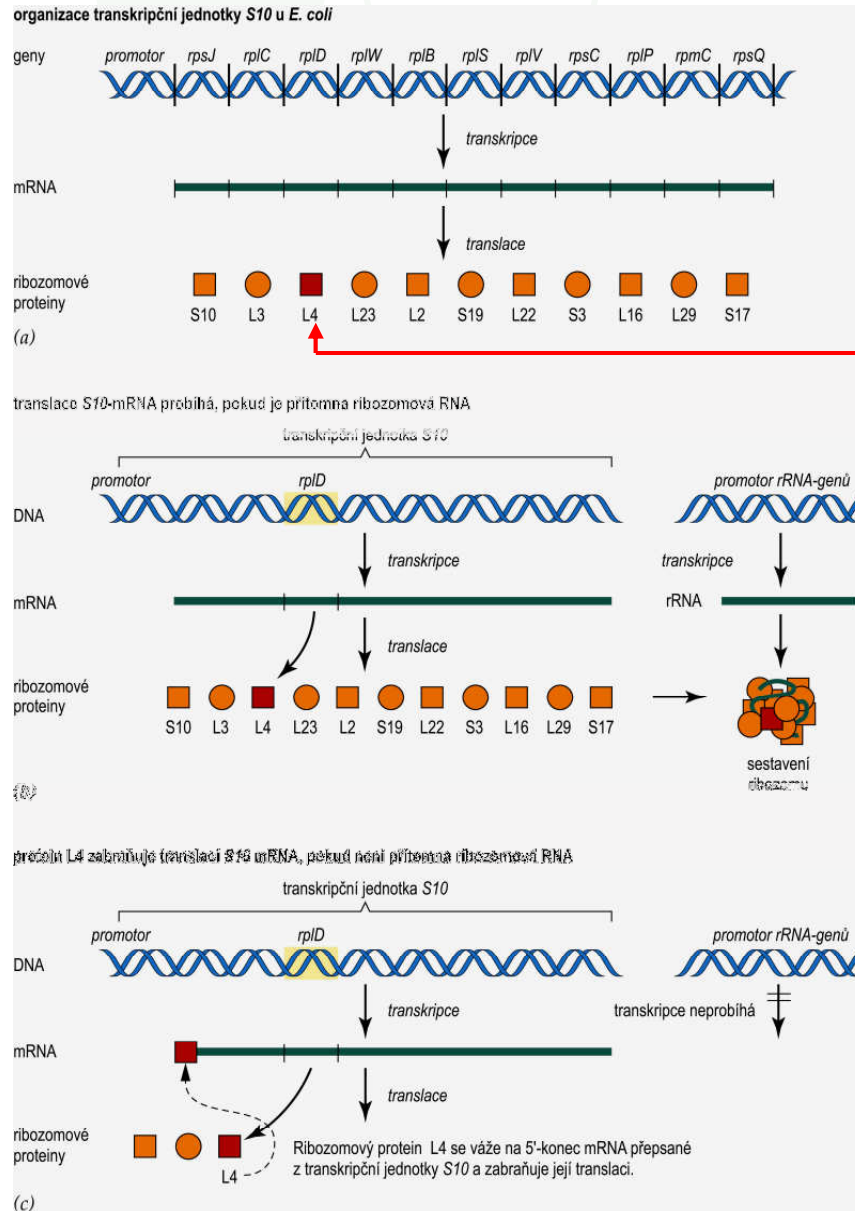
Preferenční vazba

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*

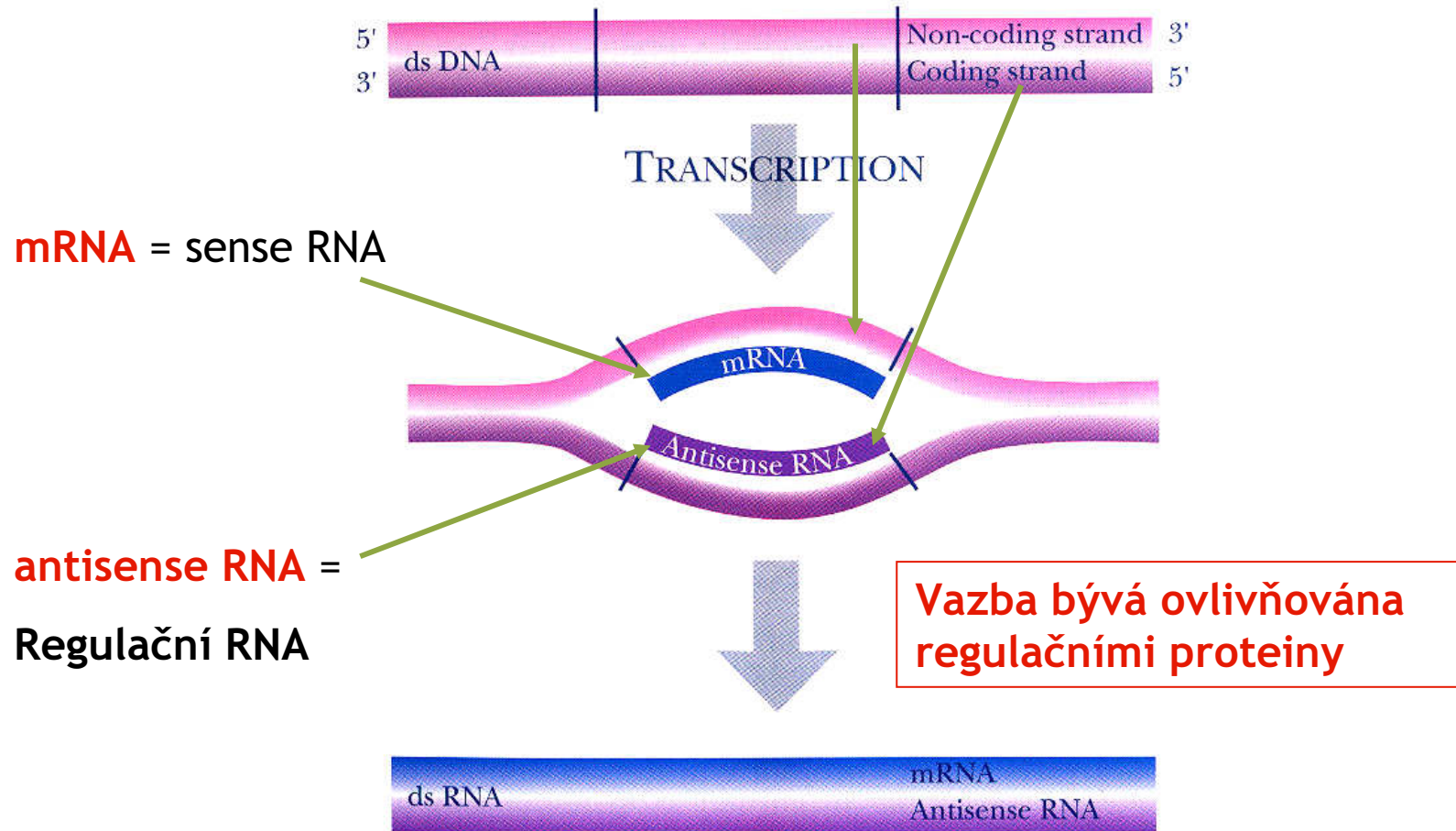


protein s regulační funkcí

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

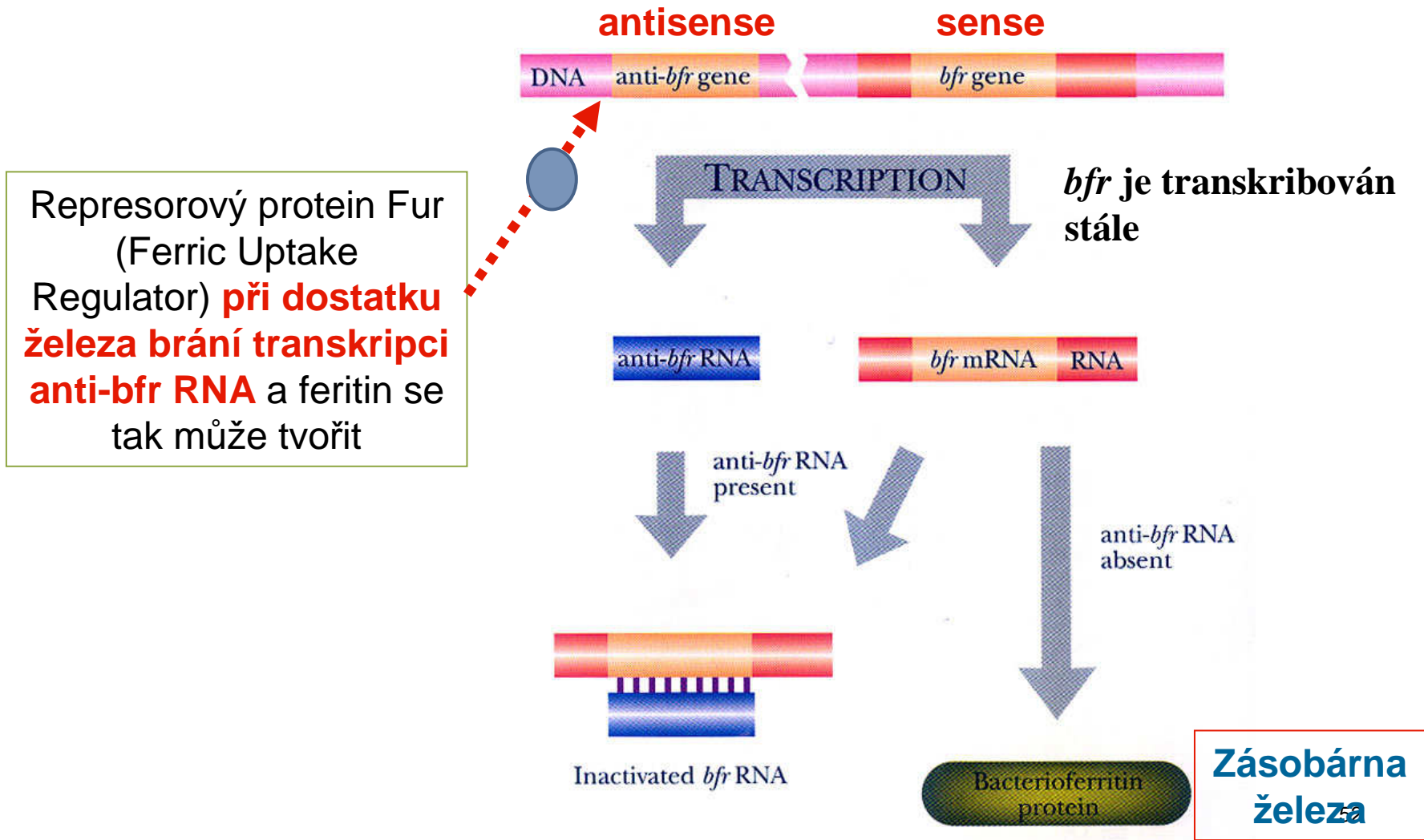
Za nepřítomnosti rRNA se protein L4 váže na mRNA a zabraňuje její translaci

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



Represorový protein Fur (Ferric Uptake Regulator) **při dostatku železa brání transkripci anti-bfr RNA** a feritin se tak může tvořit

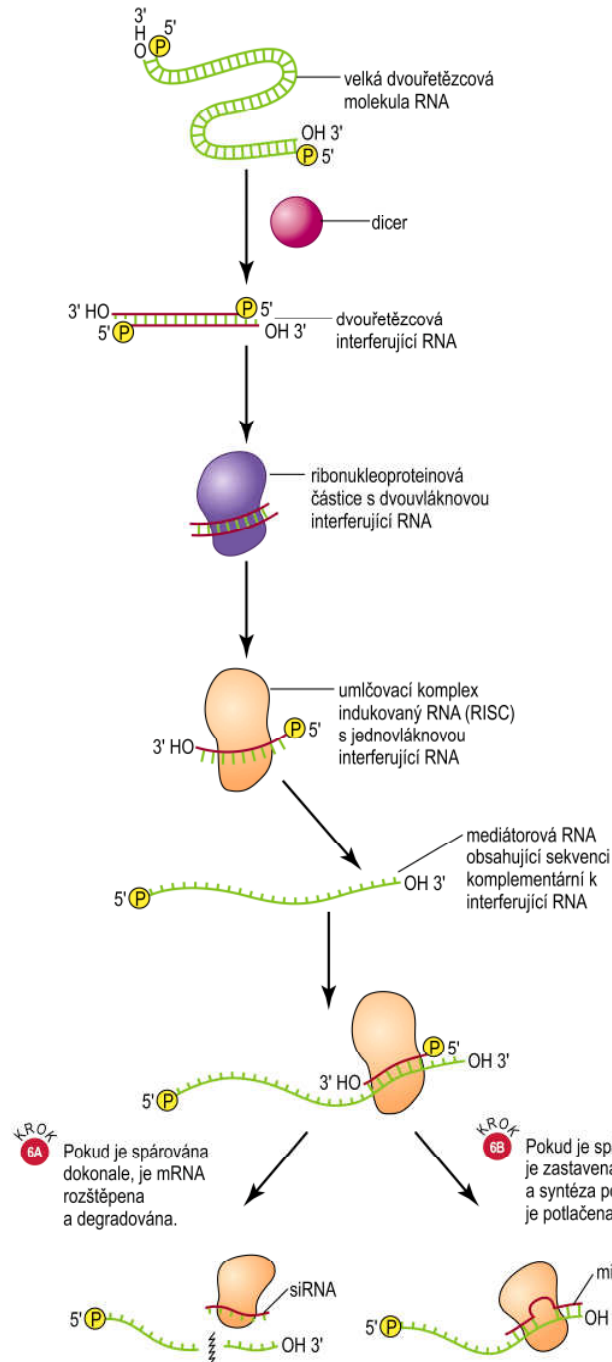
Zásobárna železa

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).

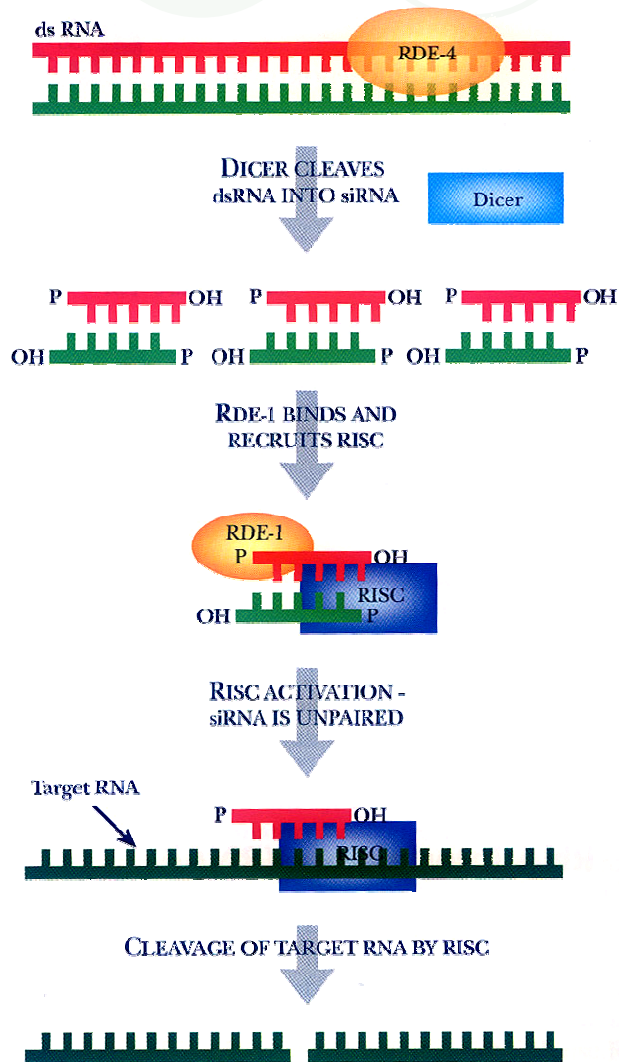
KROK 4 RISC si vybírá za cíl sekvenci v mediátorové RNA, která je komplementární k interferující RNA.

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

KROK 6A Pokud je spárována dokonale, je mRNA rozštěpena a degradována.

KROK 6B Pokud je spárována nedokonale, je zastavena translace mRNA a syntéza polypeptidů z mRNA je potlačena.

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

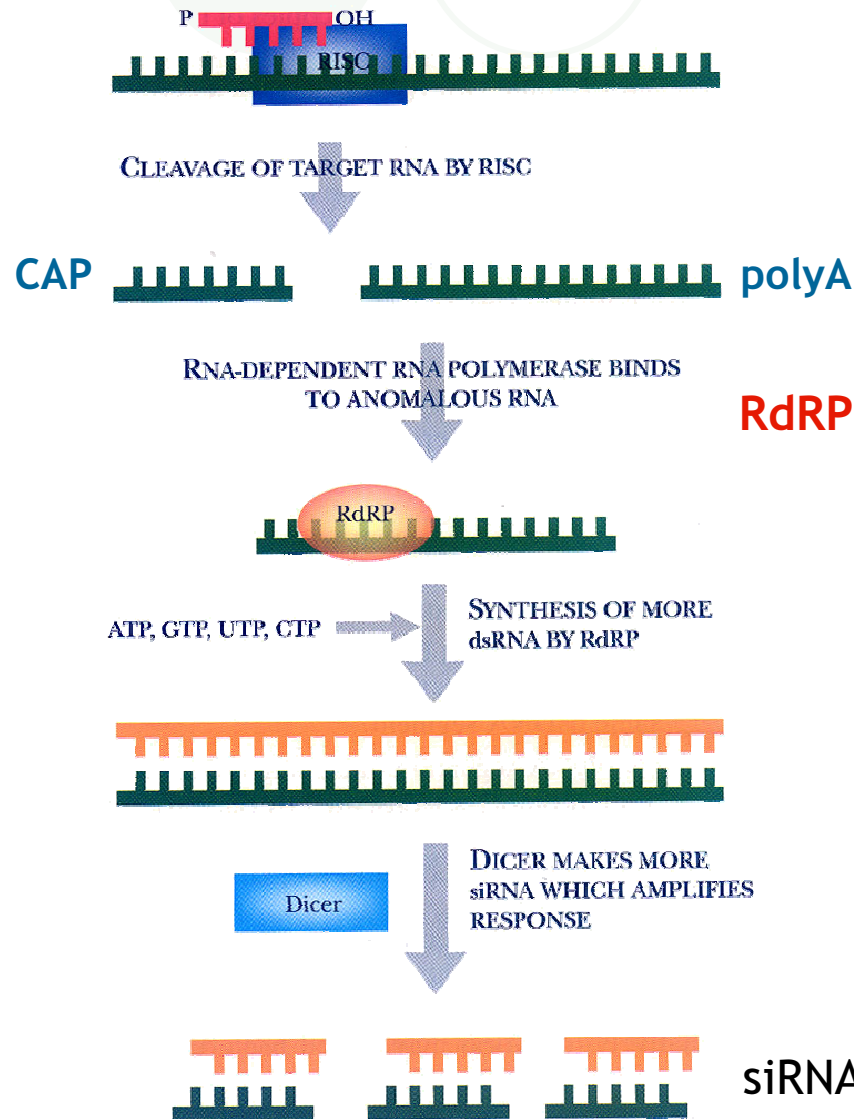
na siRNA se váže další protein, který umožní vazbu a aktivaci RISC komplexu

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

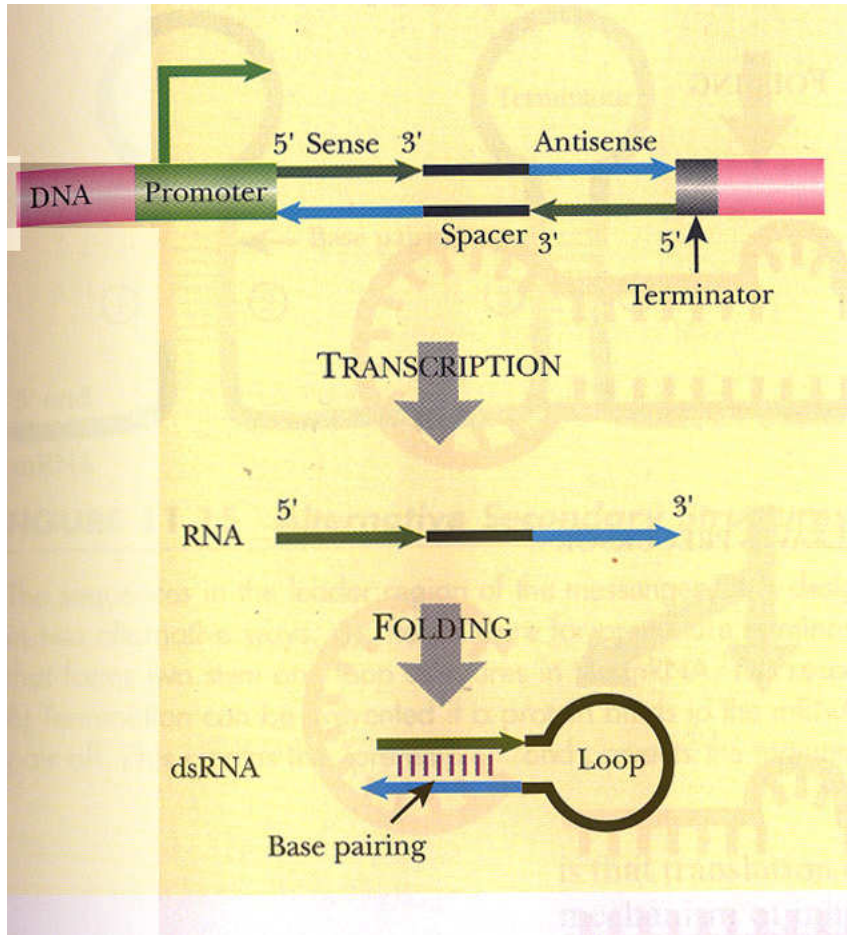
RdRP = RNA-dependentní RNA-polymeráza

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

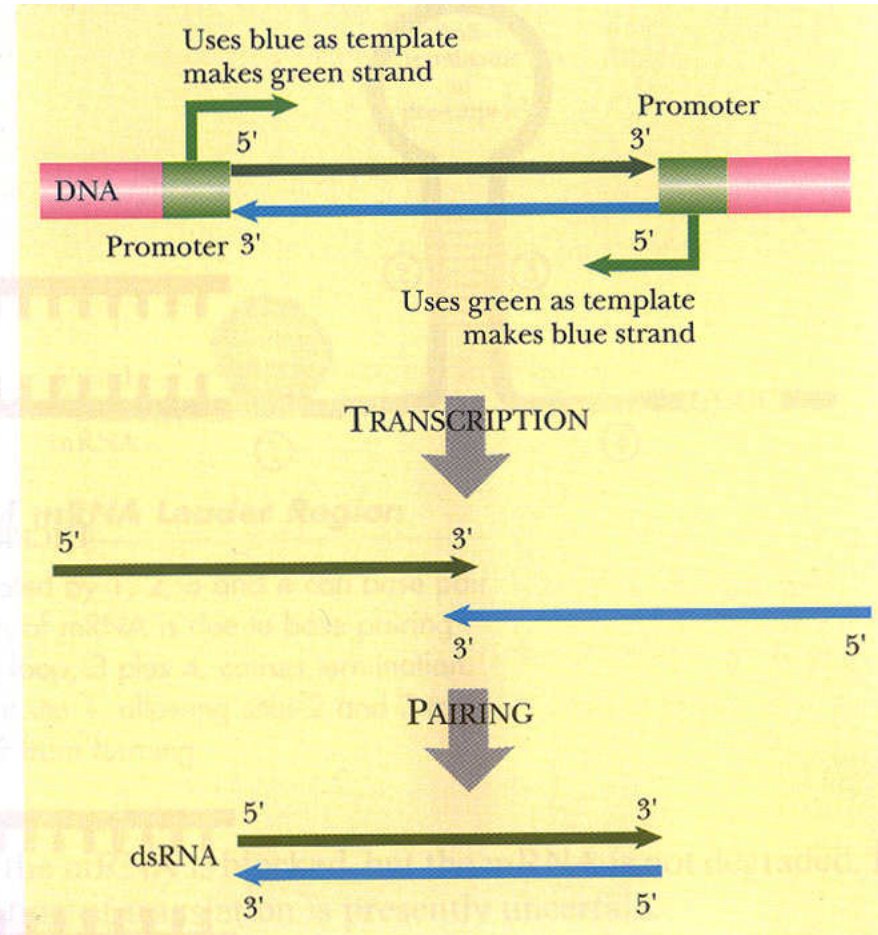
siRNA → Vazba RISC-k. → Štěpení dalších RNA⁵⁶

Experimentální navození RNA interference (vytvoření dsRNA)

Vytvoření sense/antisense vláseňky



Použití konstruktů se dvěma promotory



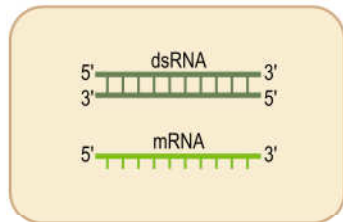
Dva postupy pro vyvolání RNAi pomocí dsRNA

zabíjení RNAi syntézou a injekcí dsRNA

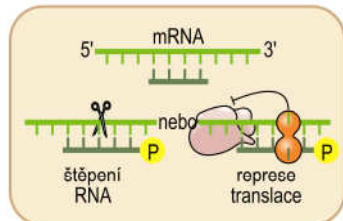
KROK 1 Dvouřetězcová RNA obsahující požadovanou sekvenci je syntetizována *in vitro*.



KROK 2 dsRNA je mikroinjekcí vnesena do organismu.



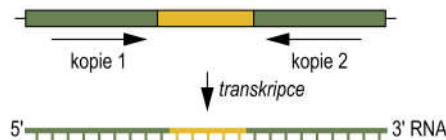
KROK 3 Degradace mRNA nebo represe její translace pomocí umlčovacího komplexu indukovaného RNA (RISC).



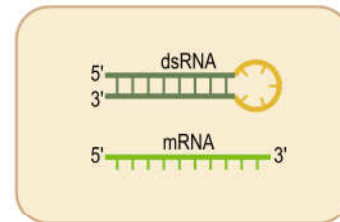
(a)

zabíjení RNAi vnesením transgeneračně dědičného komplexovaného RNA

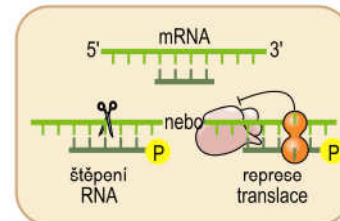
KROK 1 Expresní genová kazeta nesoucí dvě kopie požadované sekvence v obrácené orientaci je vnesena do genomu.



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

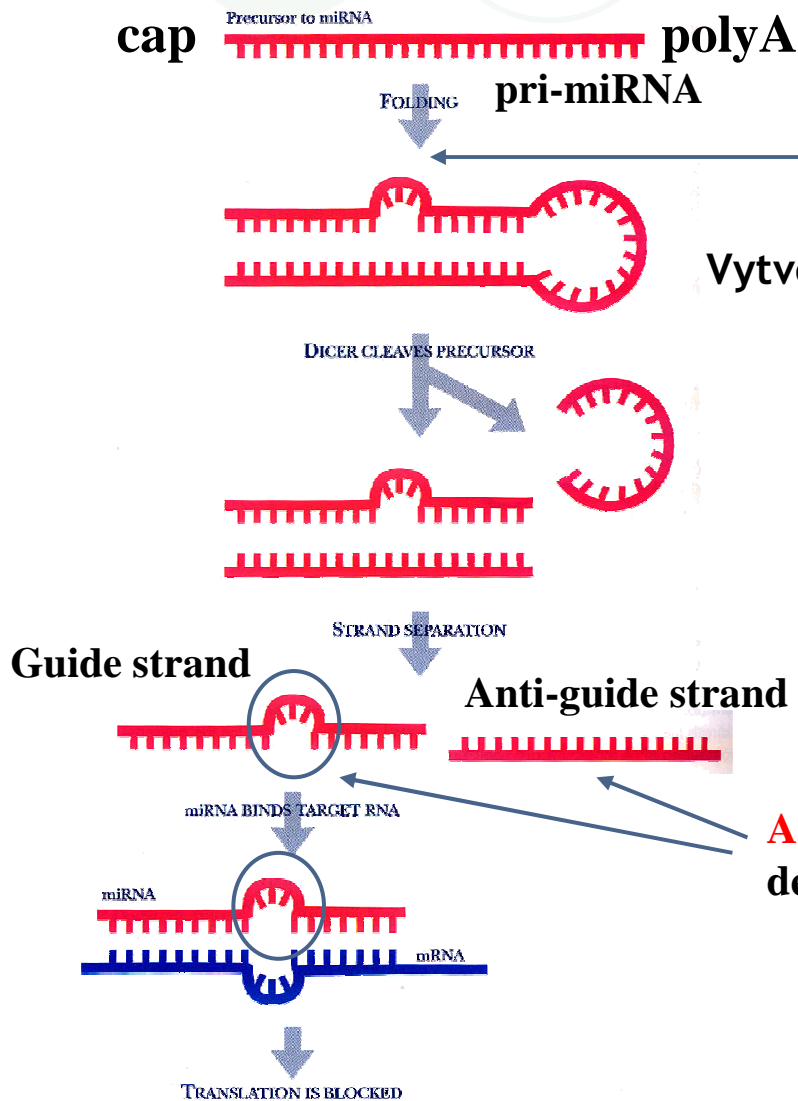
-- inzerční inaktivace genů

-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

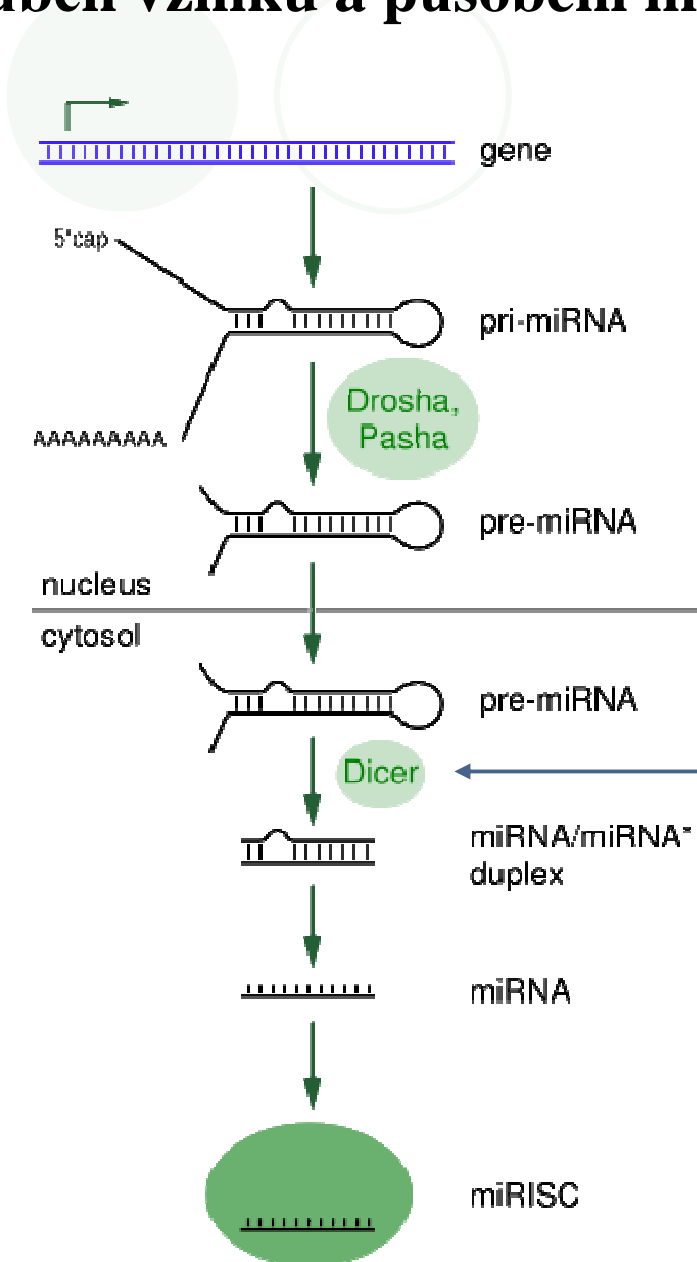
Štěpení vlásenky dicerem (**v cytoplazmě**)

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

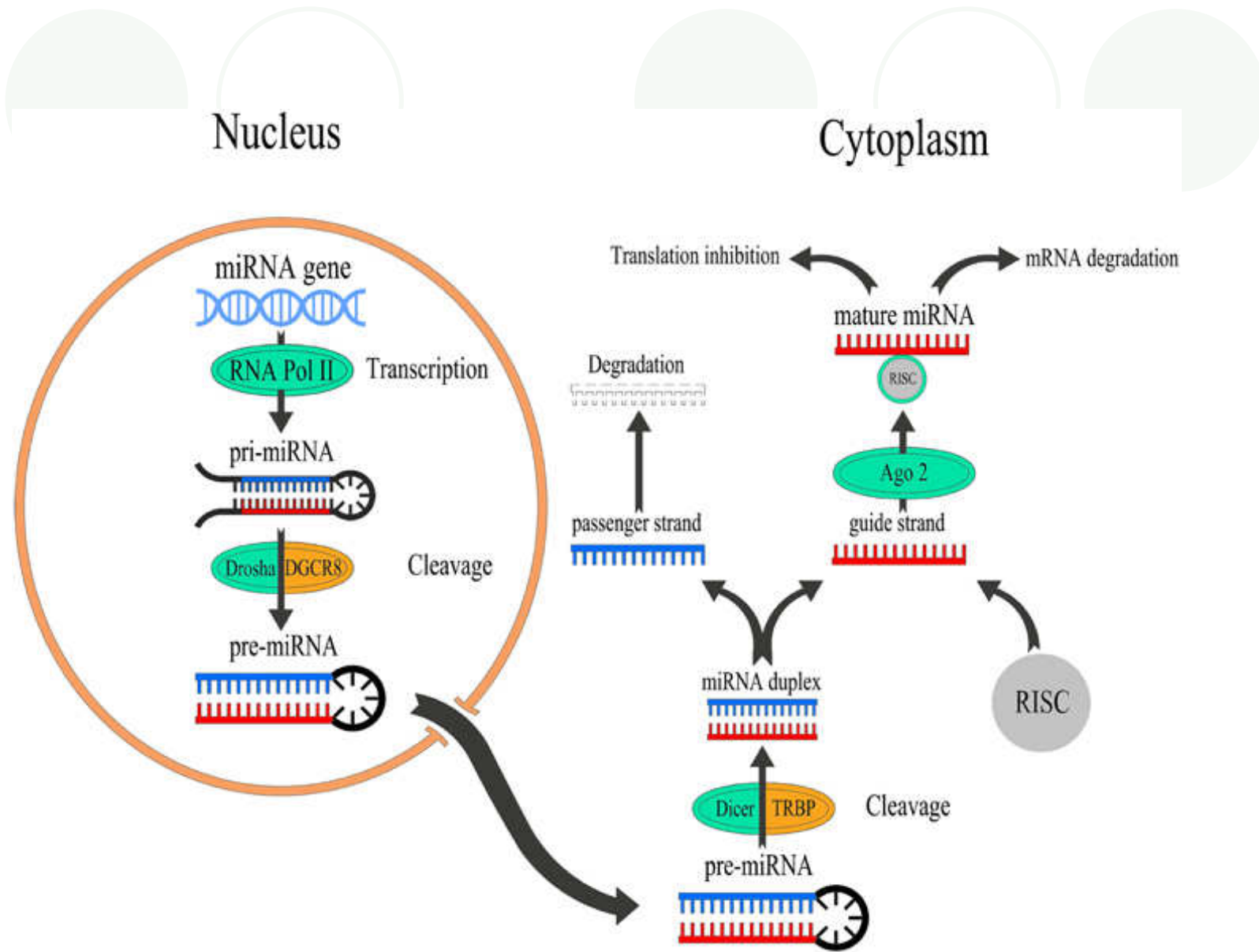


Může obsahovat více prekurzorů miRNA

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

Dicer- endonukleáza RNAIII

miRISC = RISC komplex s navázanou miRNA)



Úloha miRNA v medicíně

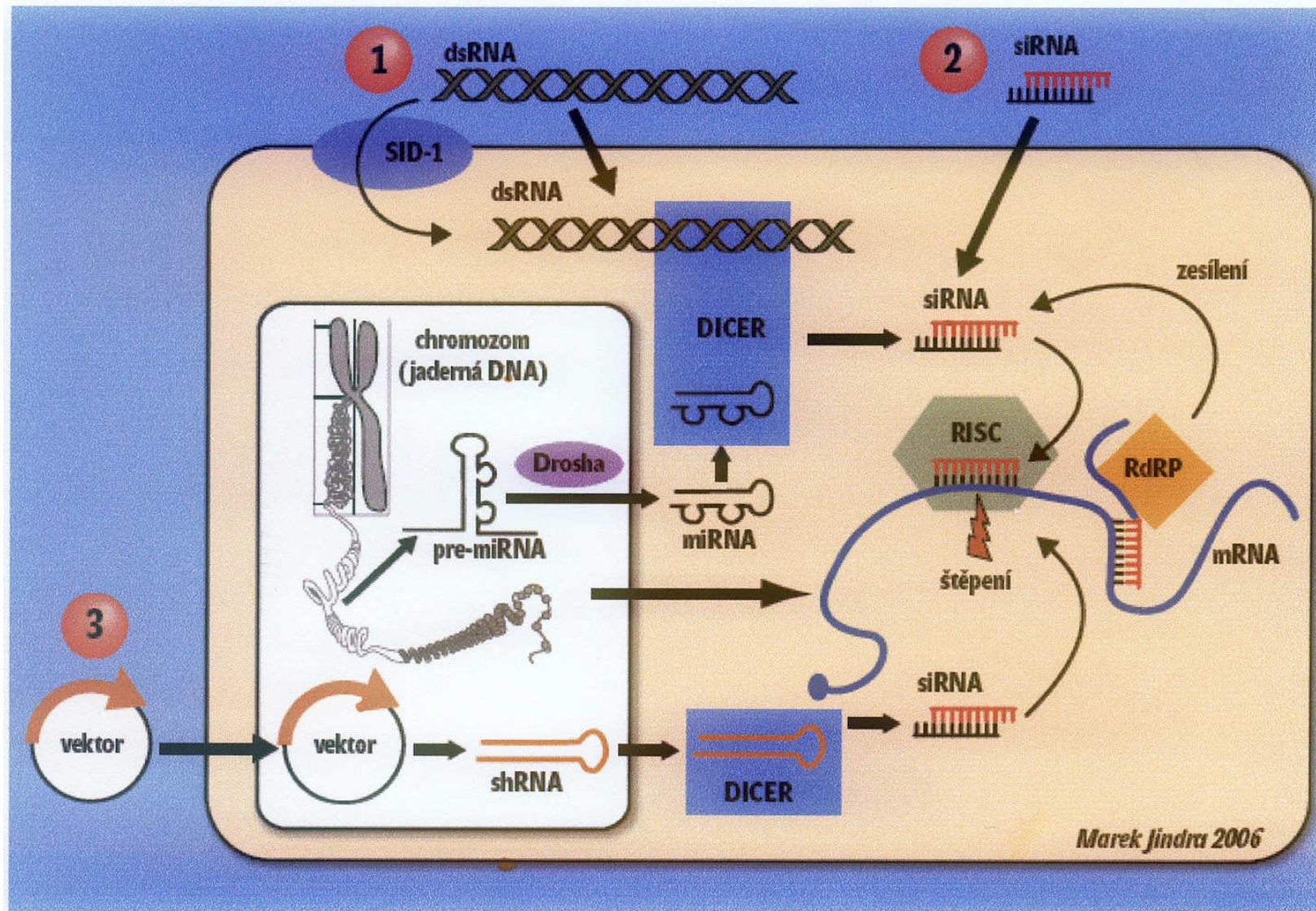
V lidském genomu je zhruba 5 000 genů pro miRNA, které ovlivňují více než 60% genů

- 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

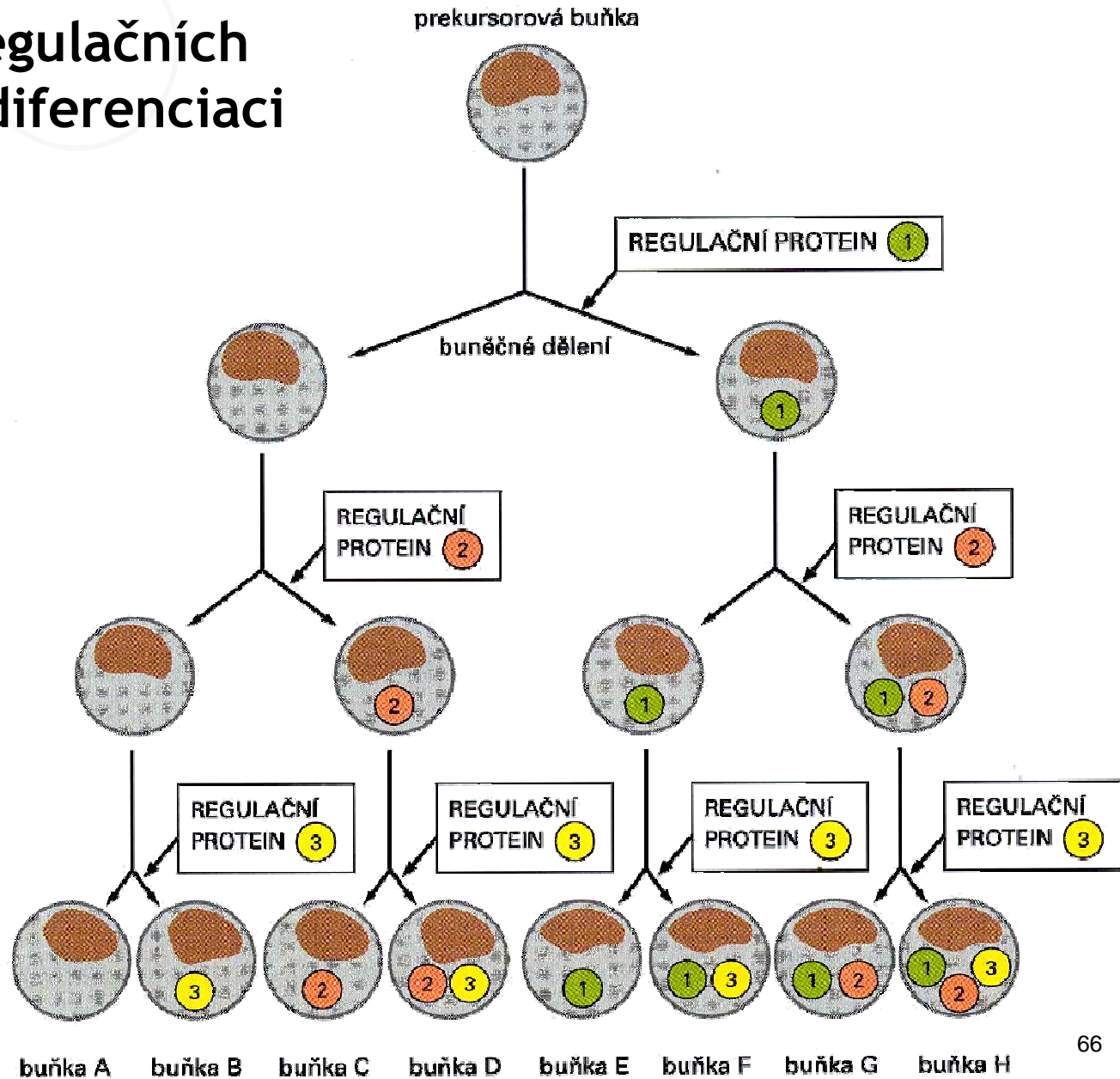
- Počet genů u savců = 20 000 - 25 000 (**současný odhad: 21 000 kódujících genů a desetitisíce nekódujících RNA genů**) – **typická lidská buňka exprimuje jen 30-60% genů, ale s různou intenzitou**
- Všechny buňky mají stejnou genetickou výbavu (**stejný genom**)
- 200-250 typů buněk, obsahujících 20 000 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.

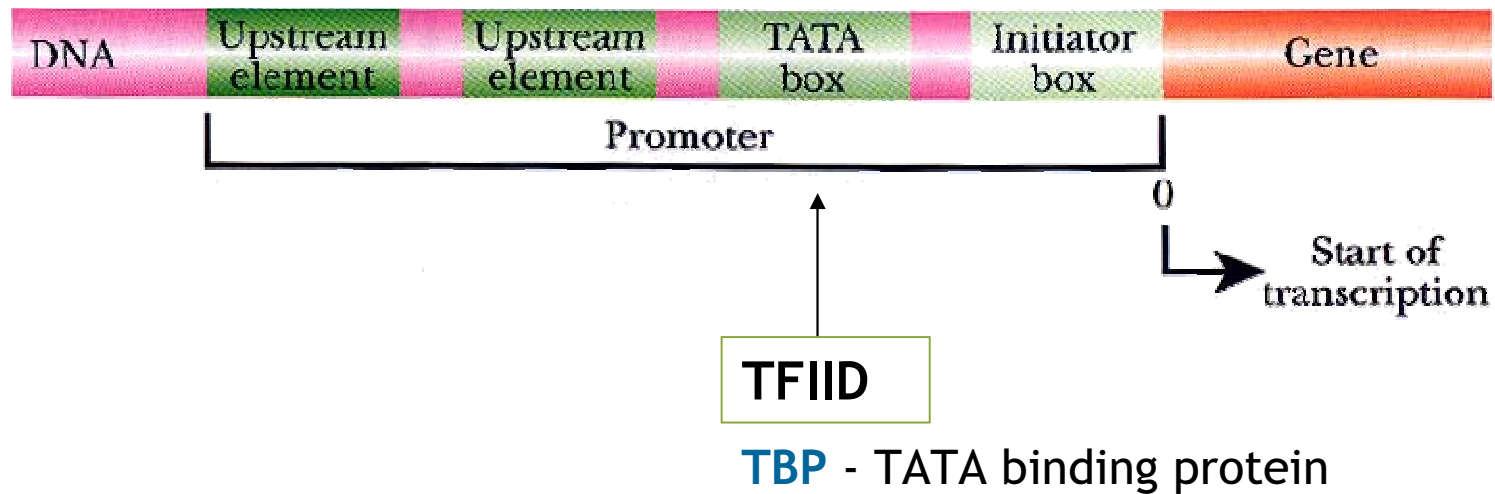
Specifické TF = buněčně a časově specifické regulační proteiny

Podmínky pro zahájení transkripce u eukaryot

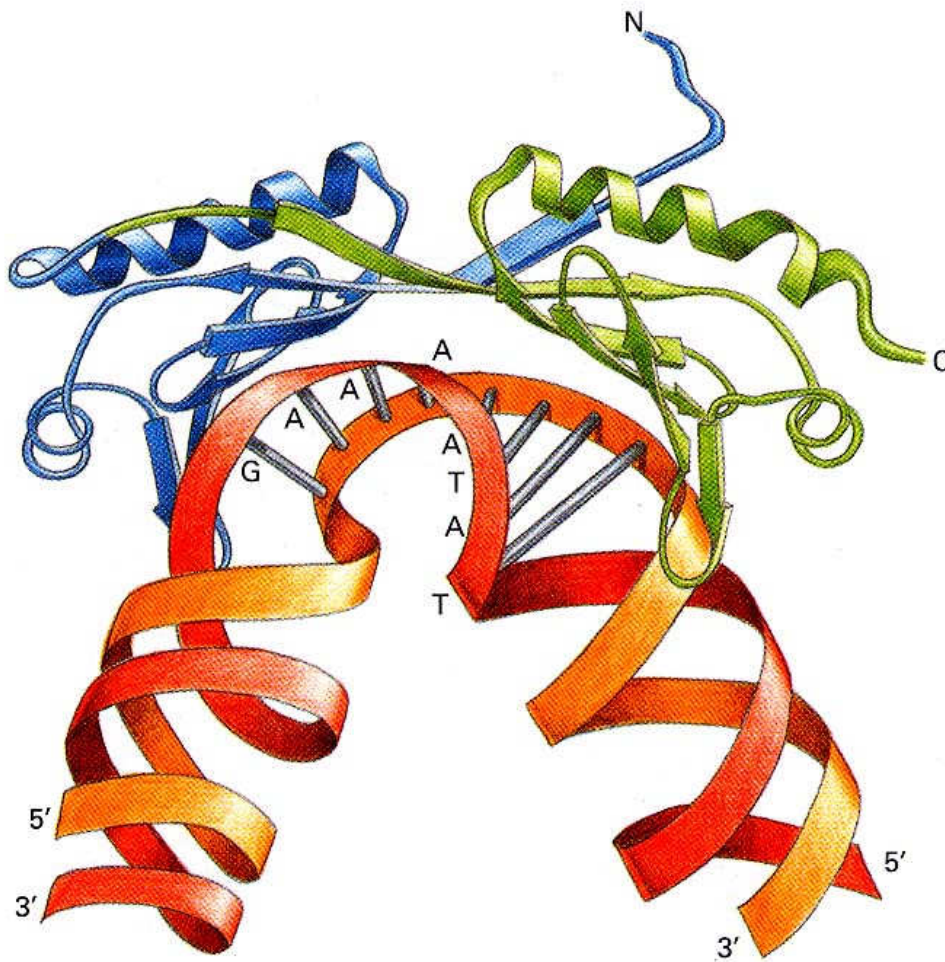
Uvedení RNA-polymerázy do aktivního stavu

- 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

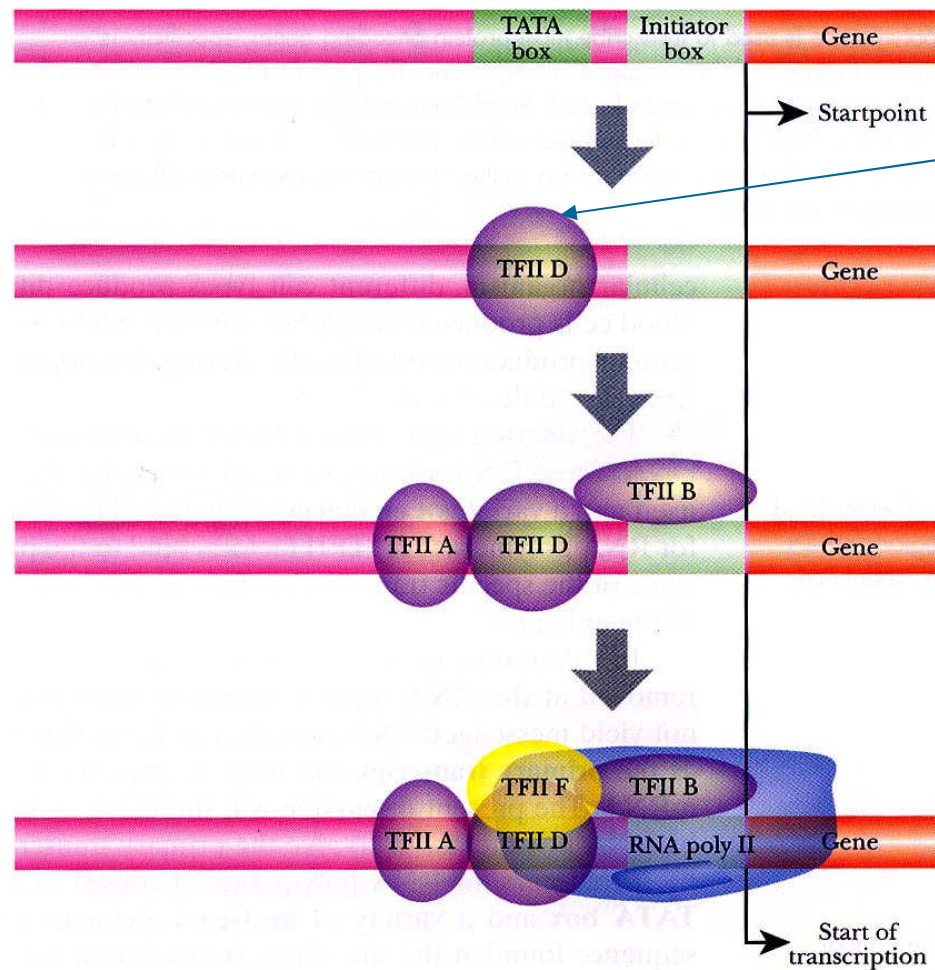


Trojrozměrná struktura TBP navázaného na TATA-box



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*).

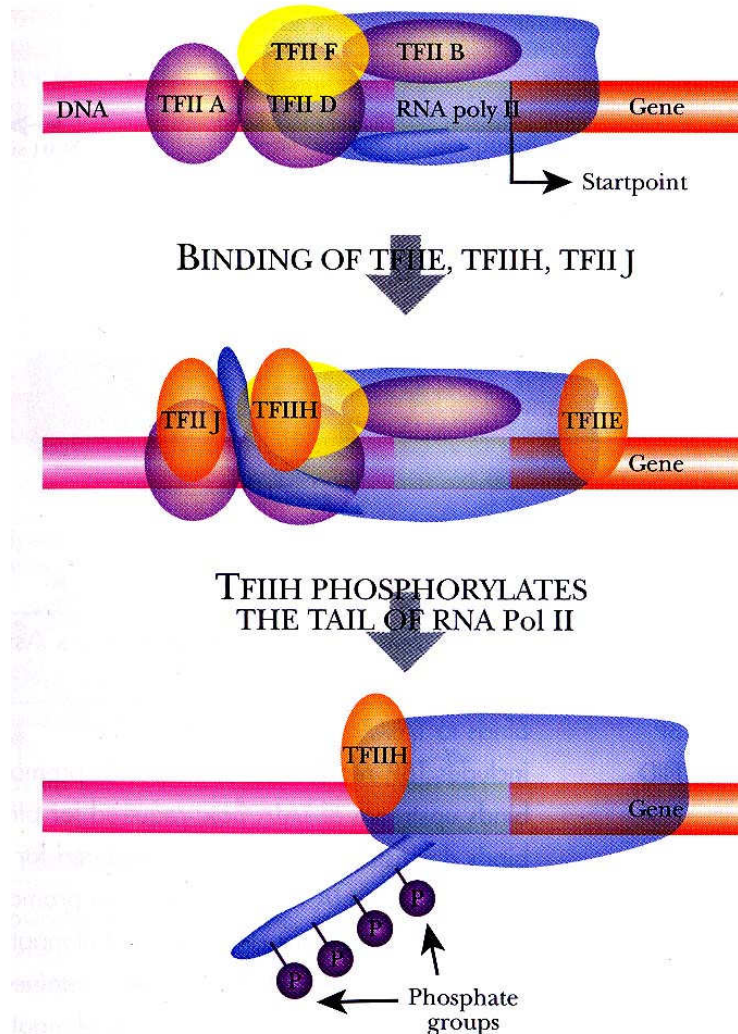
Iniciační fáze transkripce u eukaryot - navázání RNA-polymerázy na promotor



+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 TFII H

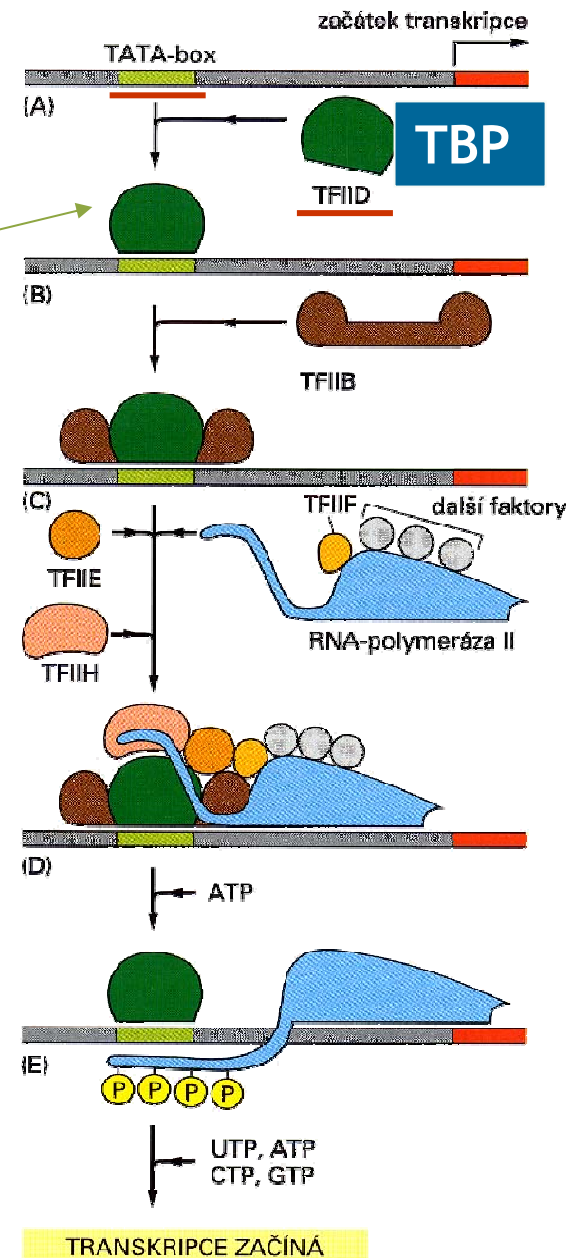
Uvolnění všech TFII vyjma TFII H, zahájení transkripce

Iniciace transkripce RNA-polymerázou II

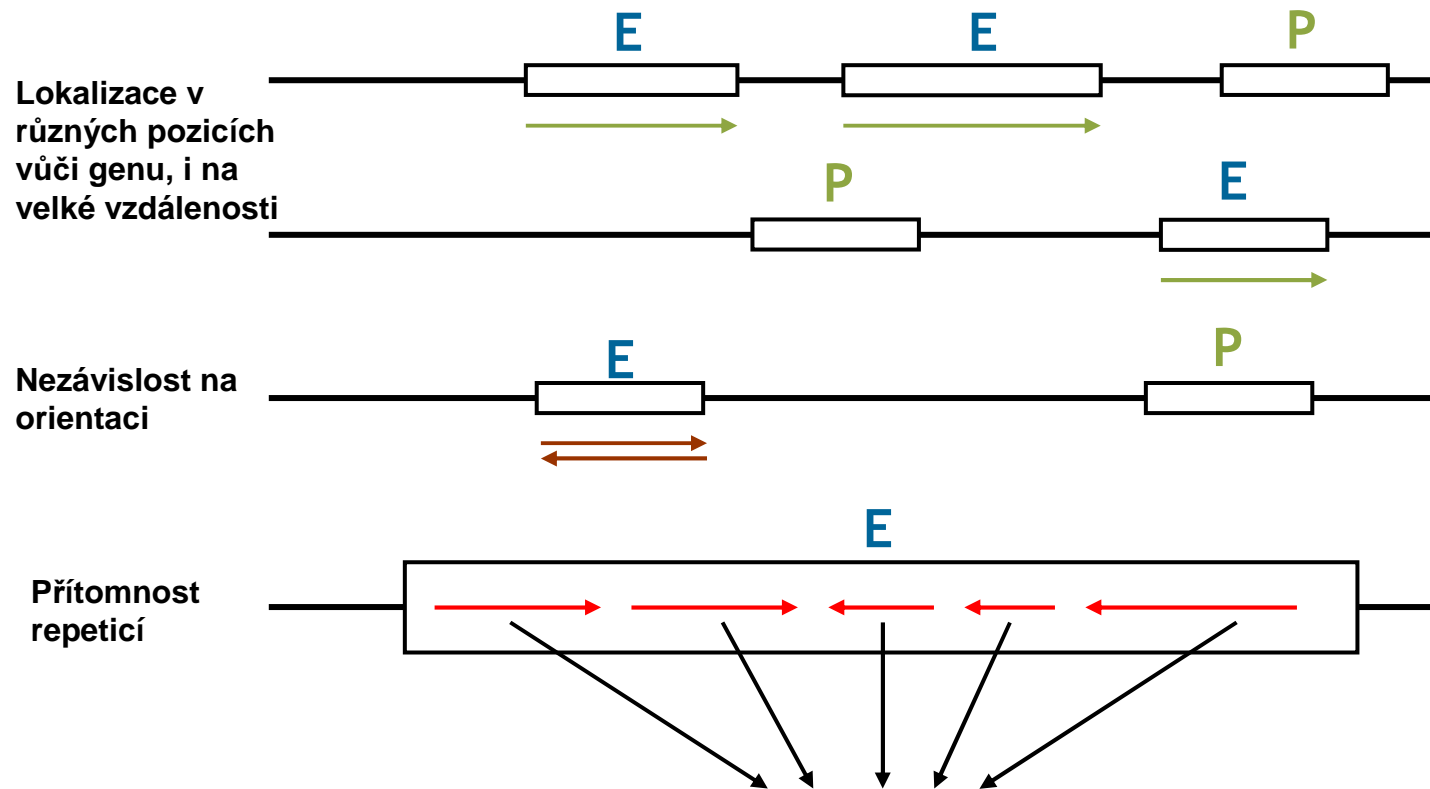
Nastává ohyb DNA

Vznik transkripčního iniciačního komplexu

Fosforylace polymerázy, její uvolnění z komplexu a zahájení transkripce

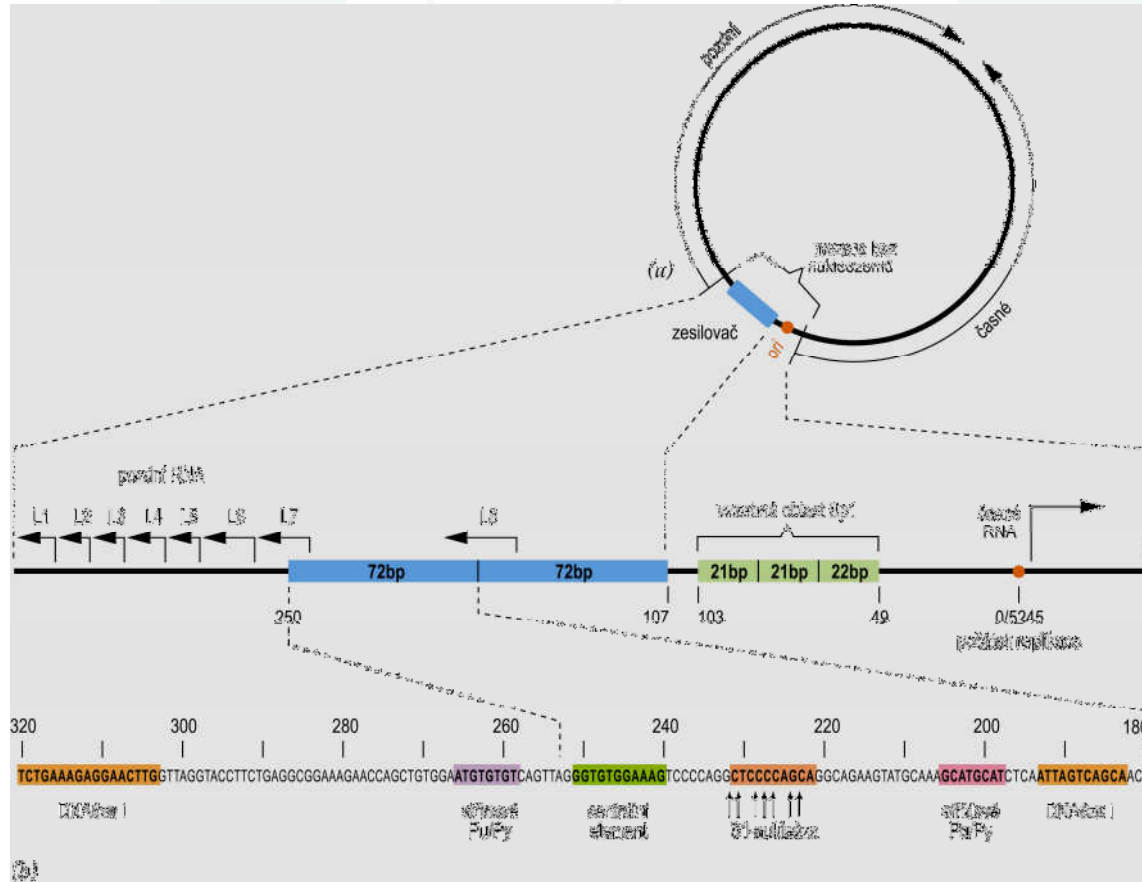


Vlastnosti zesilovače transkripce

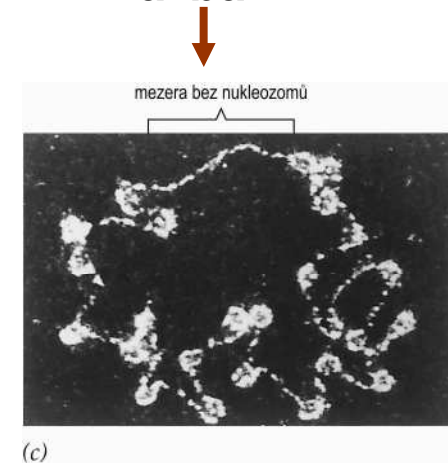


Sekvenční motivy (RE), na něž se vážou regulační proteiny (transkripční faktory)

Struktura zesilovače transkripce viru SV40

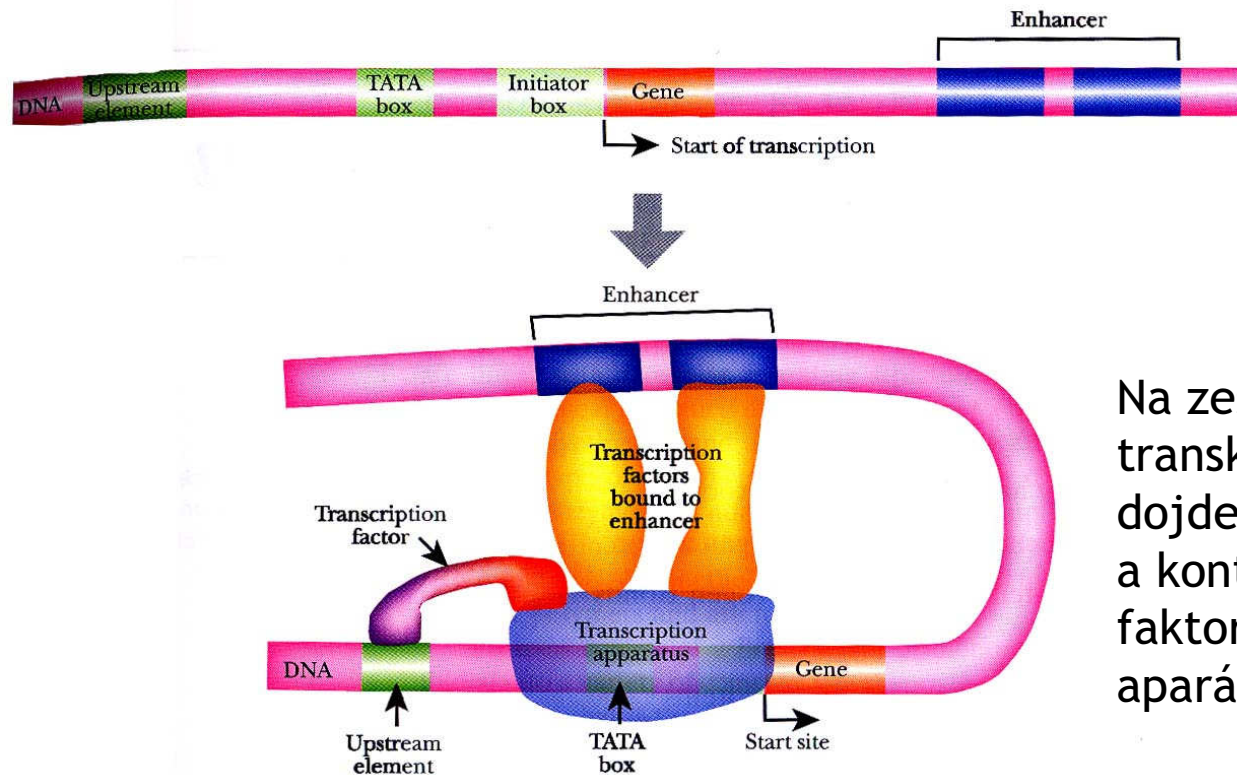


sekvence zesilovače –
vazba TF



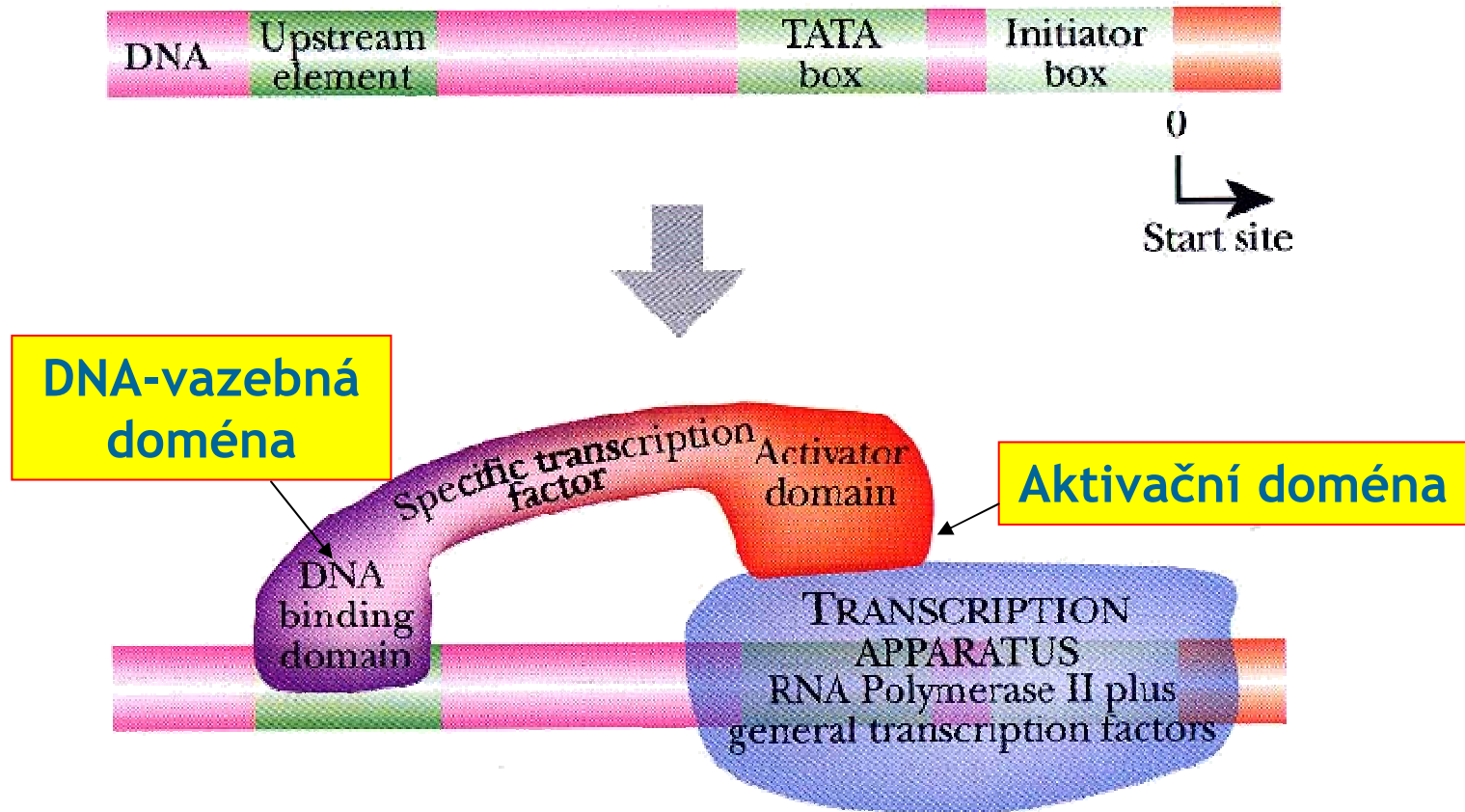
Využití zesilovačů v expresních vektorech

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

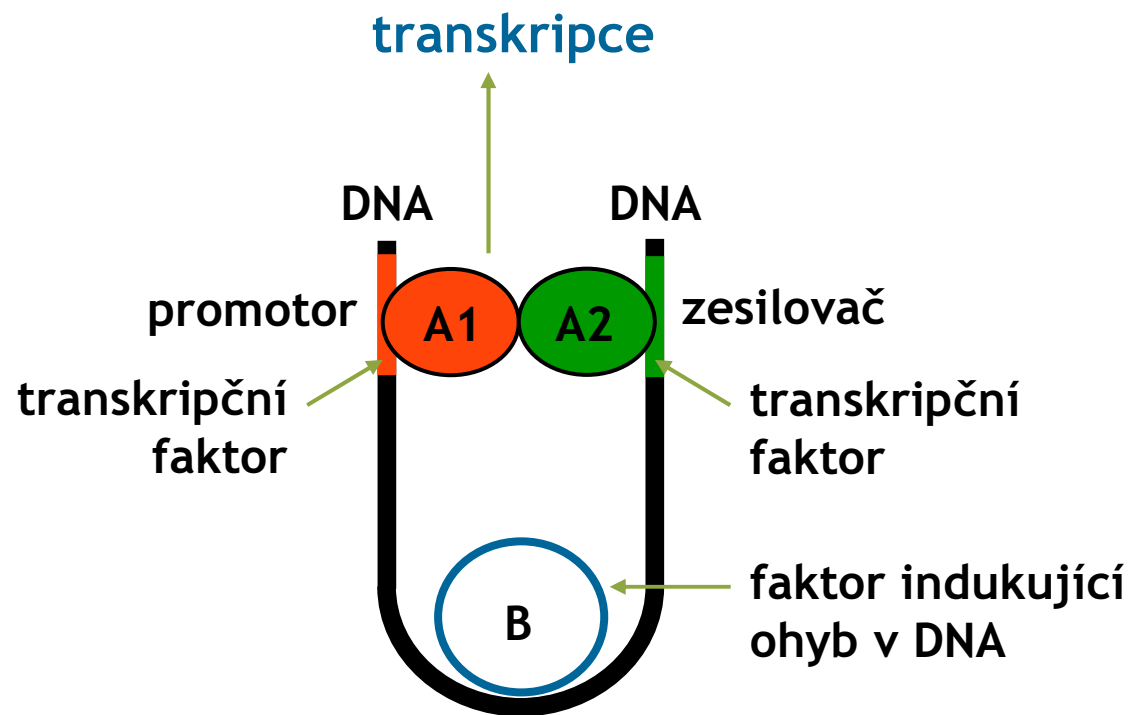


Hybridní proteiny: aktivační doména + DNA-vazebná doména

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

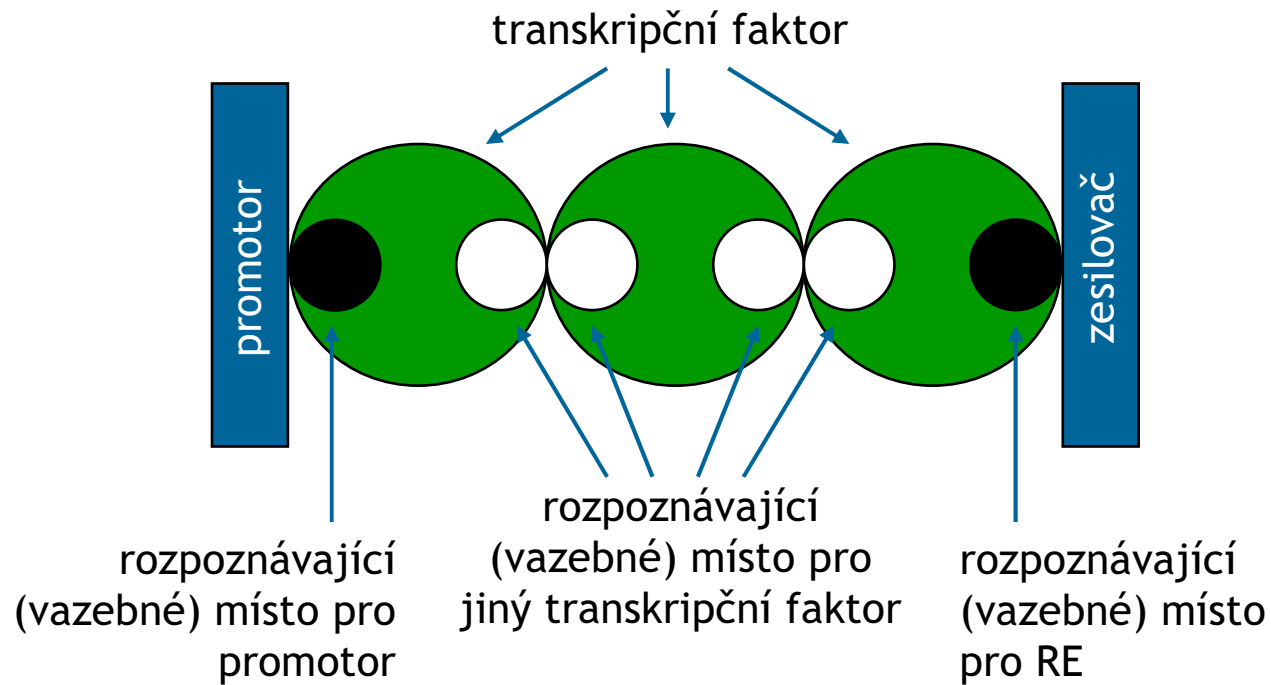
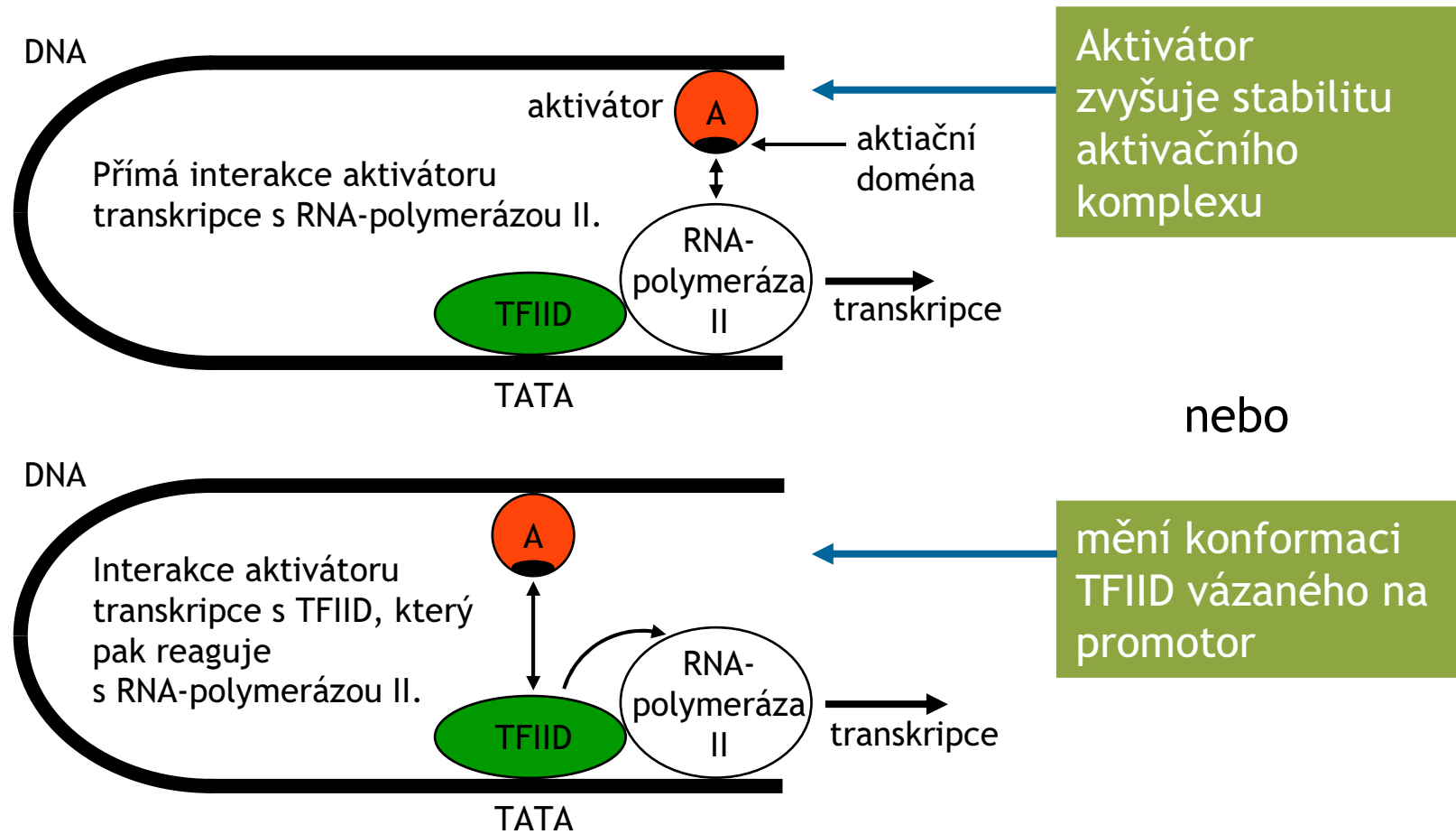
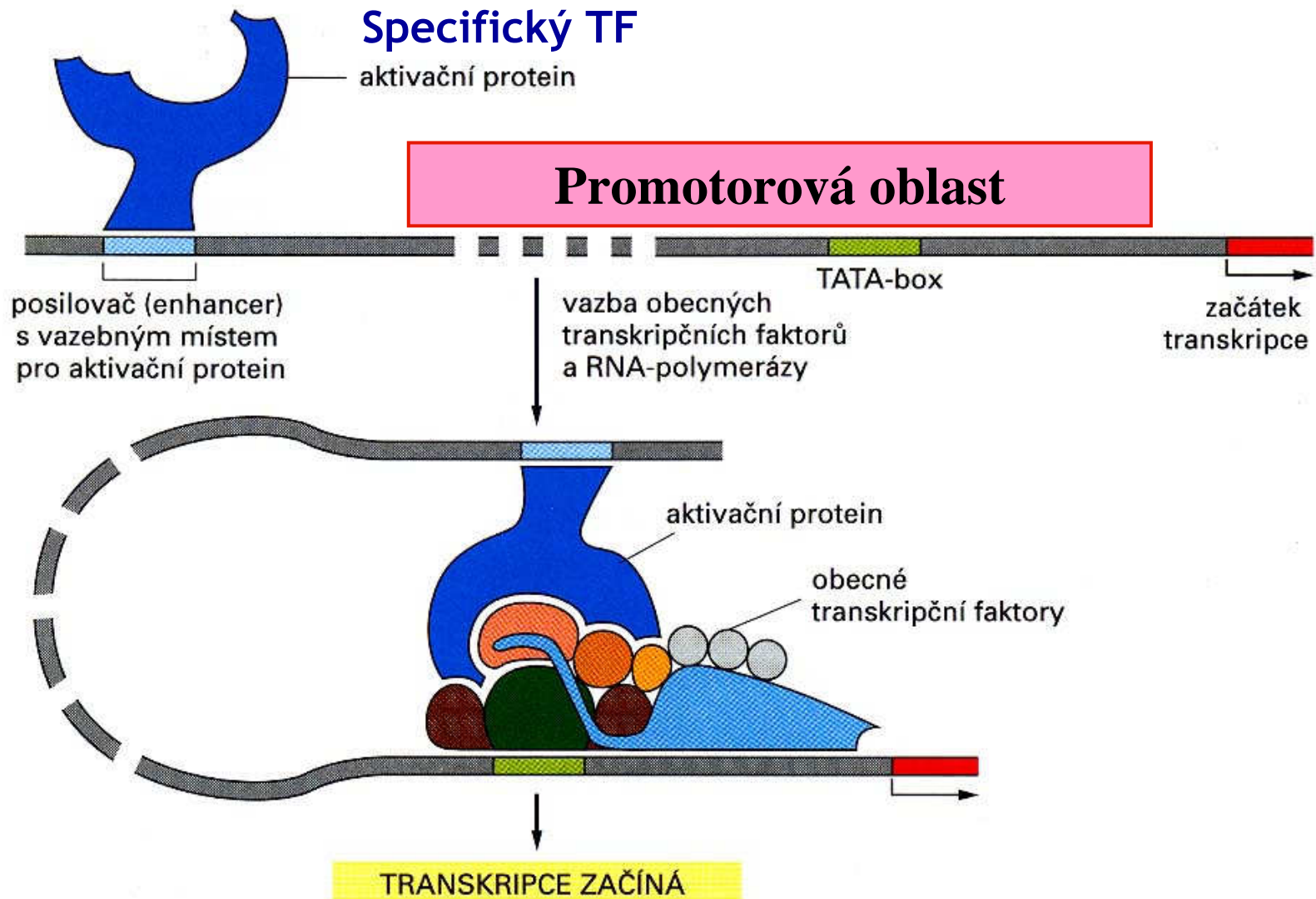


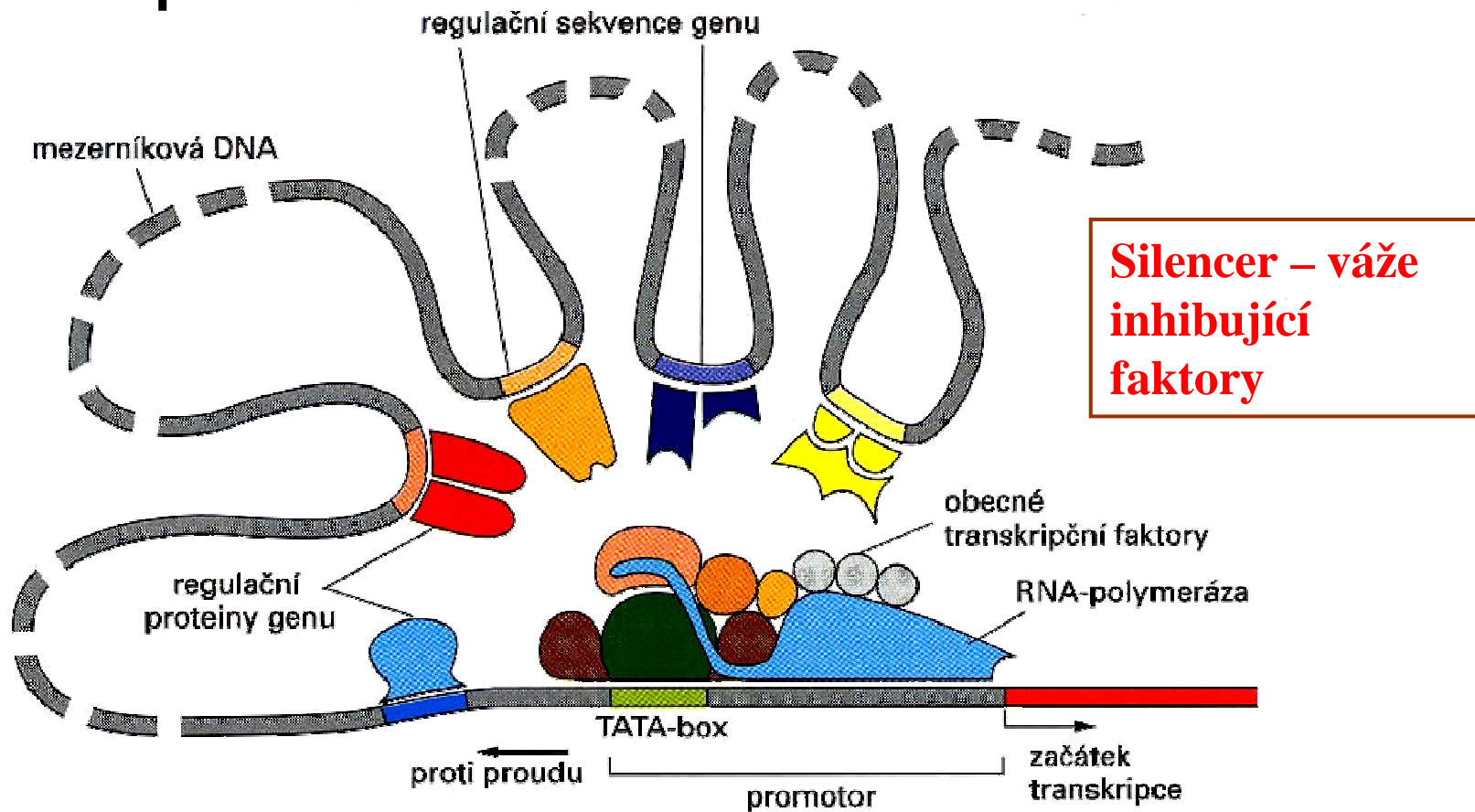
Schéma přímé a nepřímé interakce aktivátoru transkripce s RNA-polymerázou II



Model aktivace genů na dálku



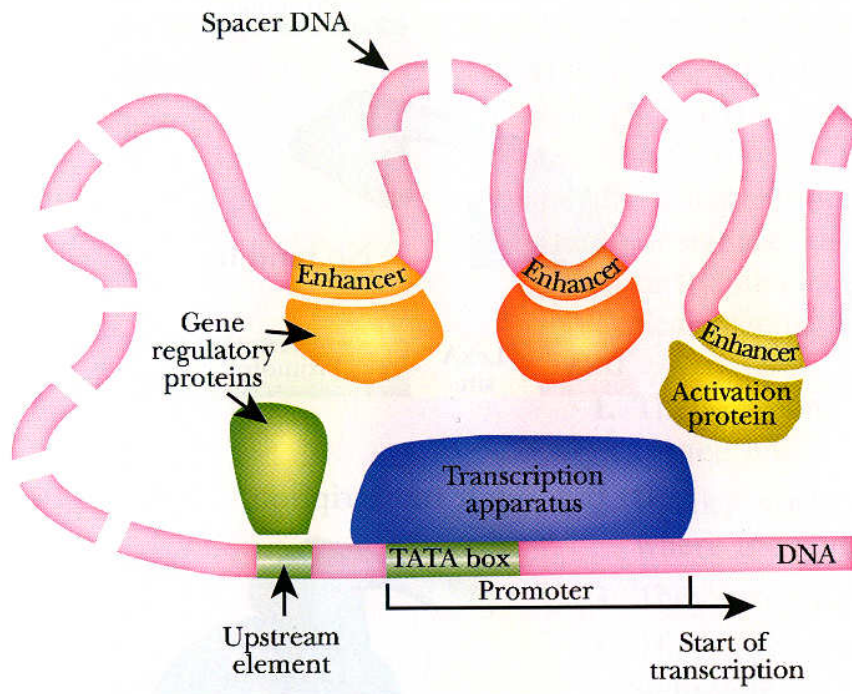
Interakce TF a vliv jejich kombinace na zahájení transkripce



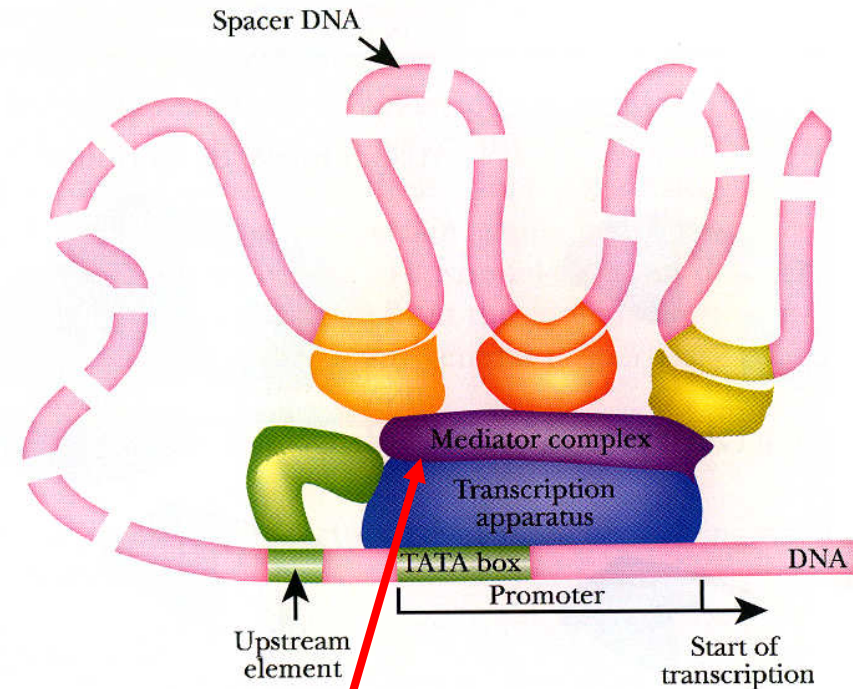
Jeden z regulačních proteinů má rozhodující vliv na zapnutí genu nebo jeho vypnutí (např. receptor pro hormon)

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

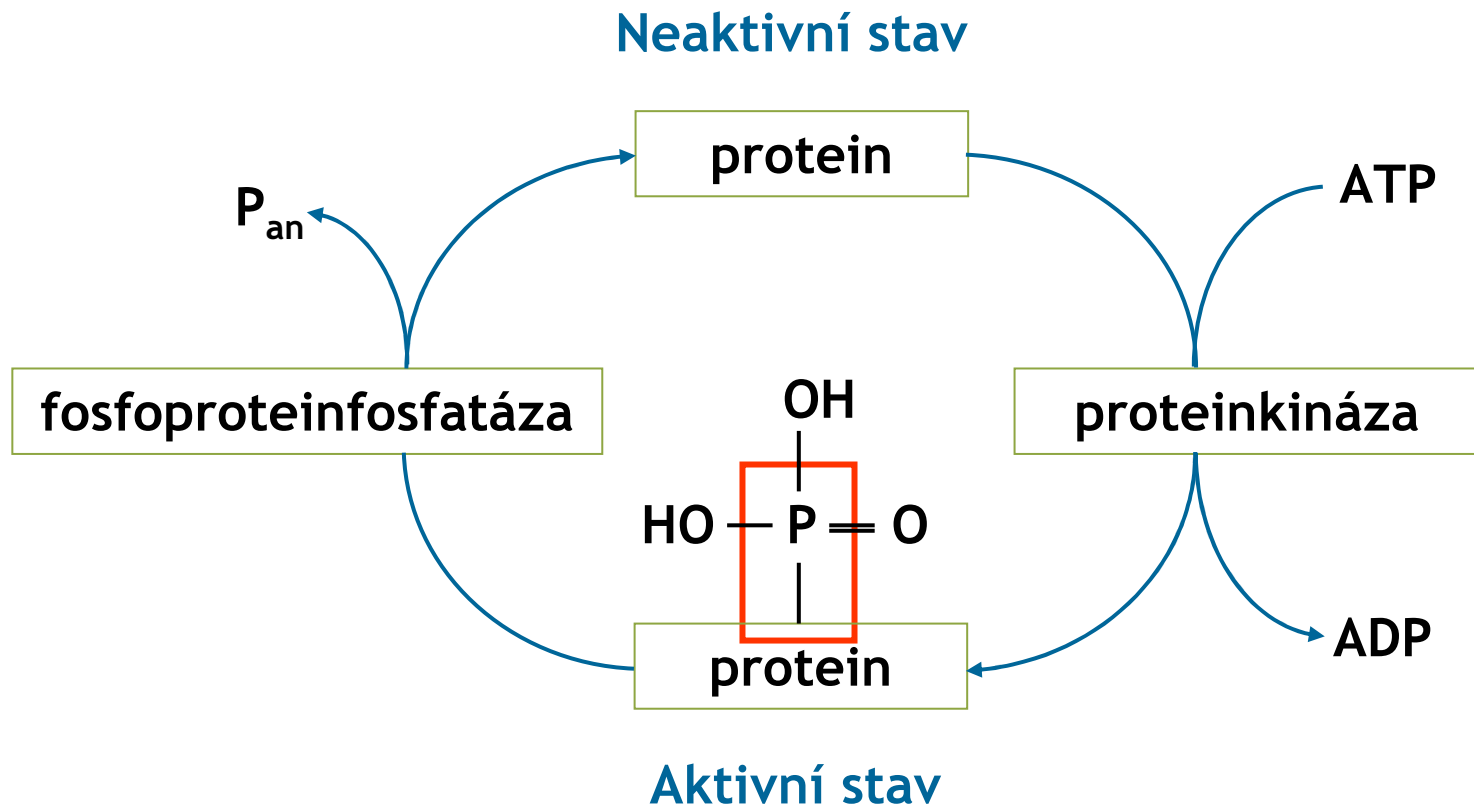
→ vazba TF na DNA, interakce TF s dalším TF

→ 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

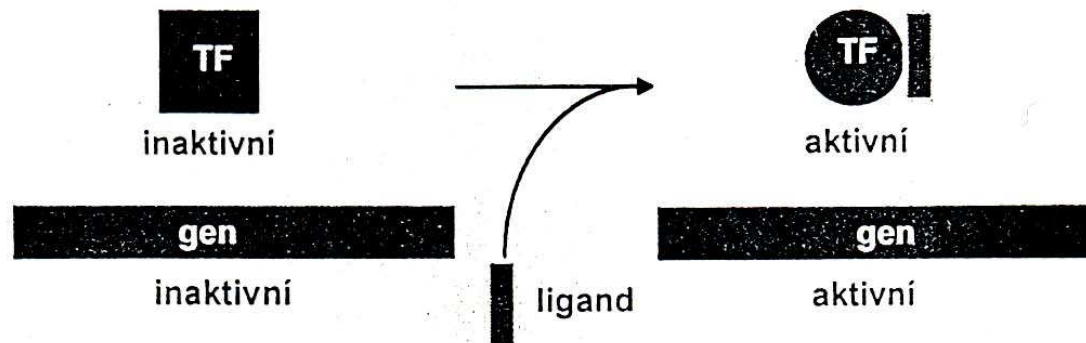
Enzymová katalýza fosforylace a defosforylace



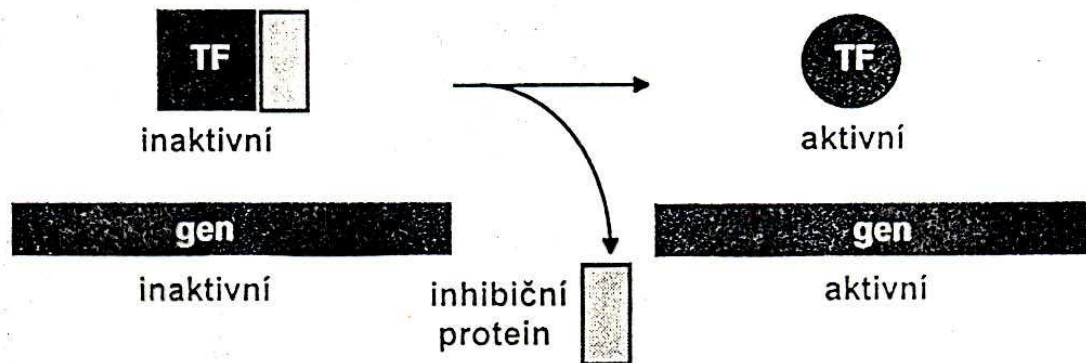
Kinom = soubor proteinkináz (~500 u člověka)

Způsoby aktivace transkripčních faktorů navozené indukčním agens 1, 2)

1. Konformační změna transkripčního faktoru způsobená ligandem.

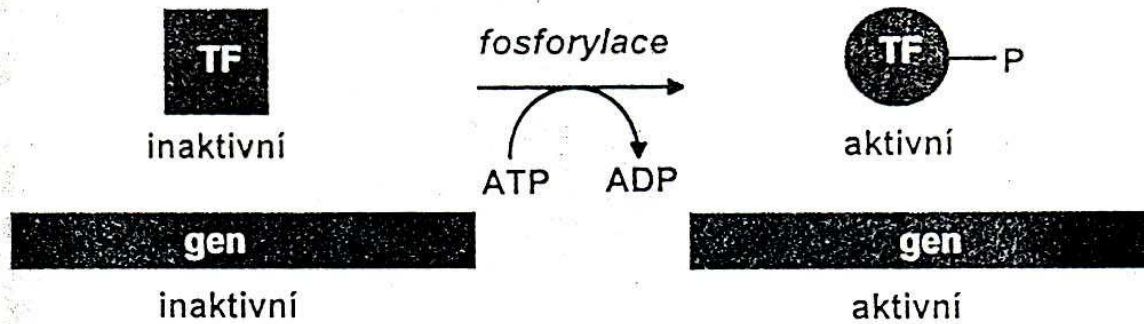


2. Konformační změna transkripčního faktoru způsobená odstraněním inhibičního proteinu.

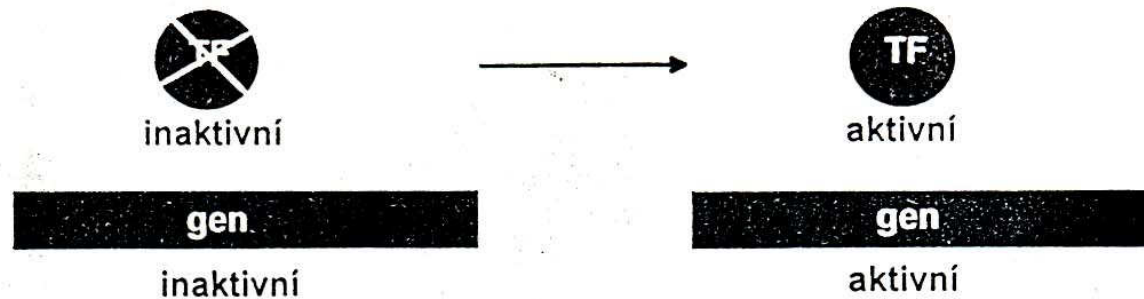


Způsoby aktivace transkripčních faktorů navozené indukčním agens (3, 4)

3. Konformační změna transkripčního faktoru způsobená fosforylací.

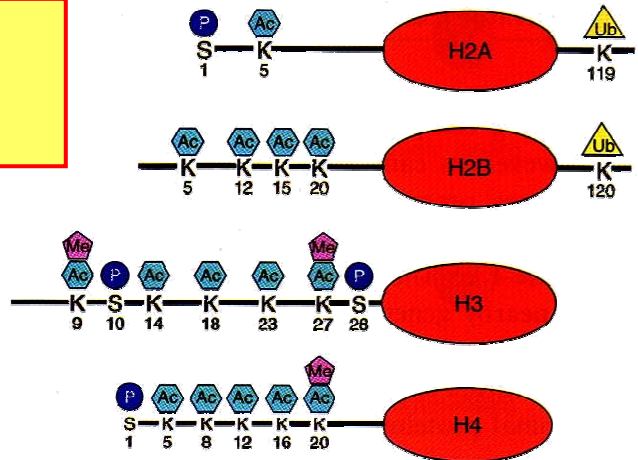


4. Stabilizace aktivní formy transkripčního faktoru proti jeho odbourání.

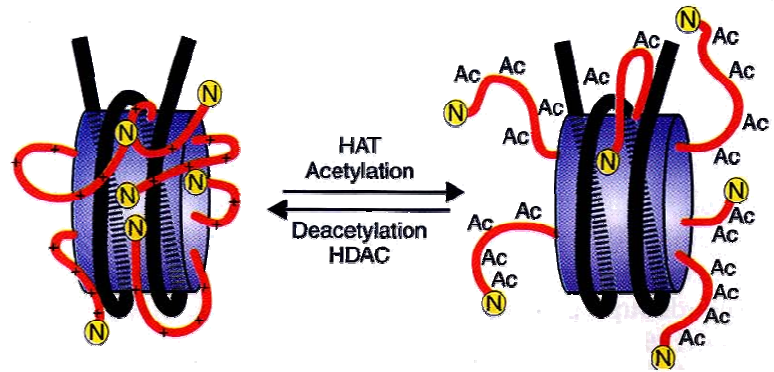
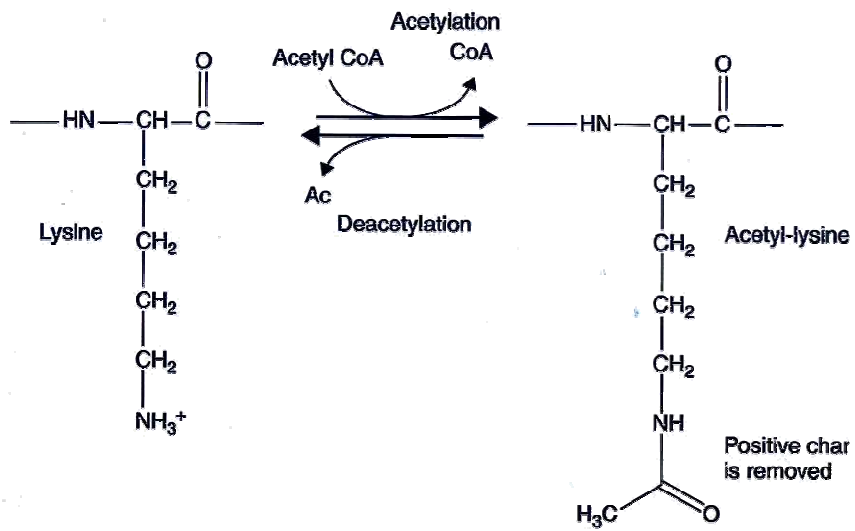


Modifikace lyzinu nebo serinu N-terminálních úseků histonů

S = serin
K = lyzin



P = fosforylace
Ac = acetylace
Me = metylace

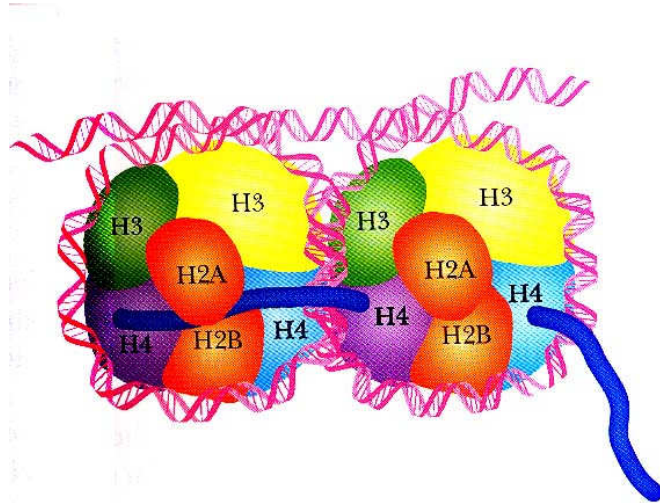


acetylace vede k rozvolnění komplexu DNA-histon

Acetylace konců histonů vede k rozvolnění nukleozomů = remodelace chromatinu

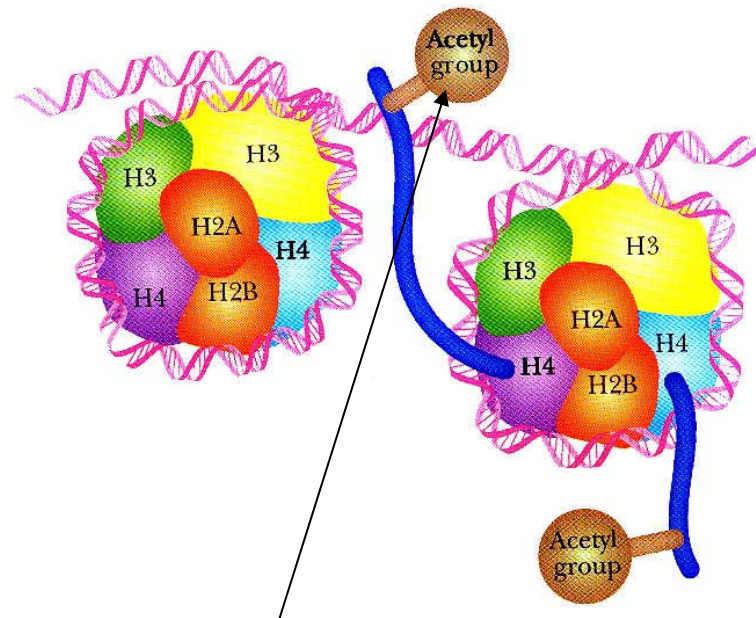
Agregovaná forma

Disagregovaná forma
nukleozomů



Histony těsně vázané
prostřednictvím svých N-konců

Heterochromatin

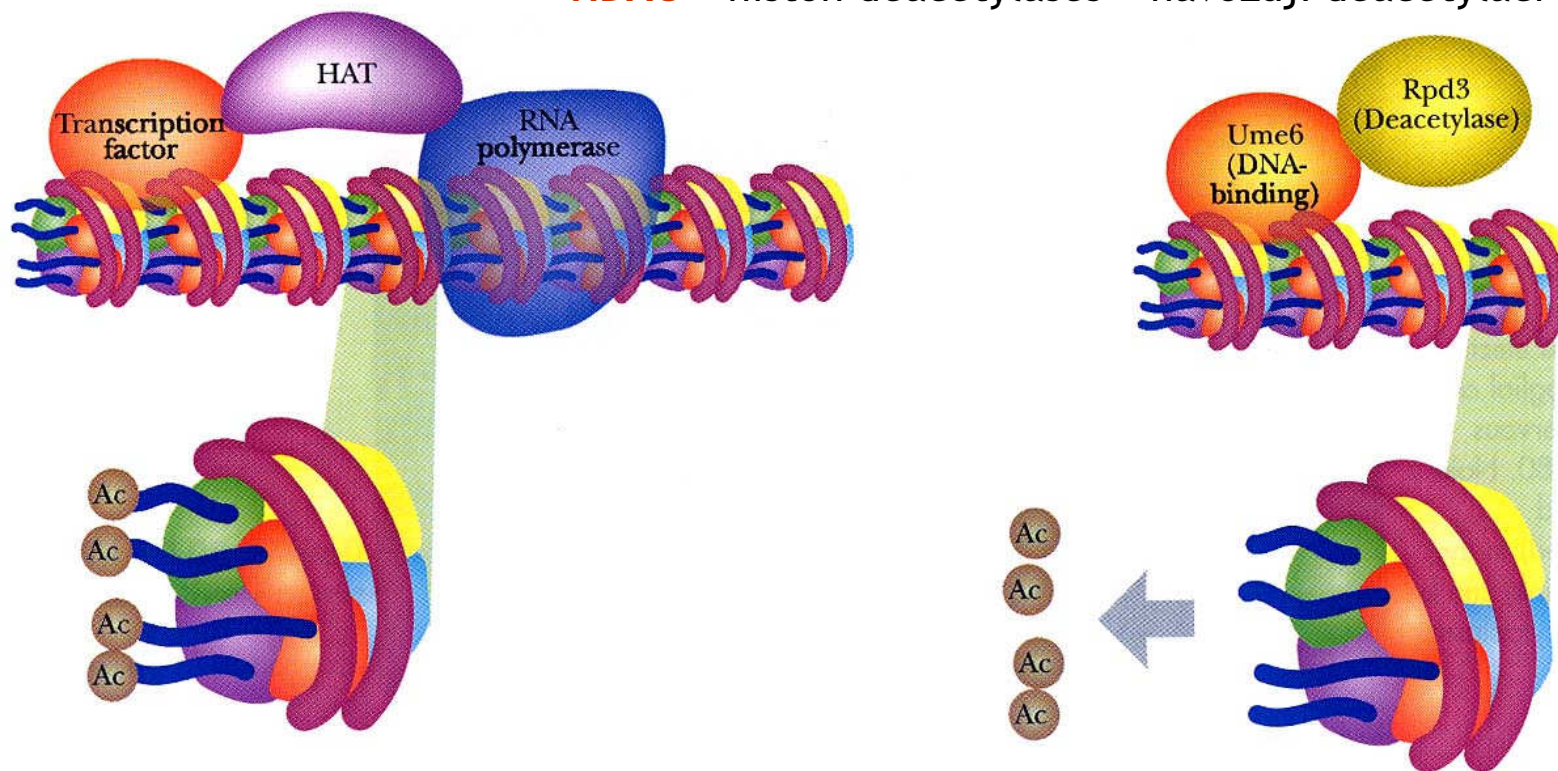


Rozvolnění nukleozomů po
acetylaci konce histonu H4

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

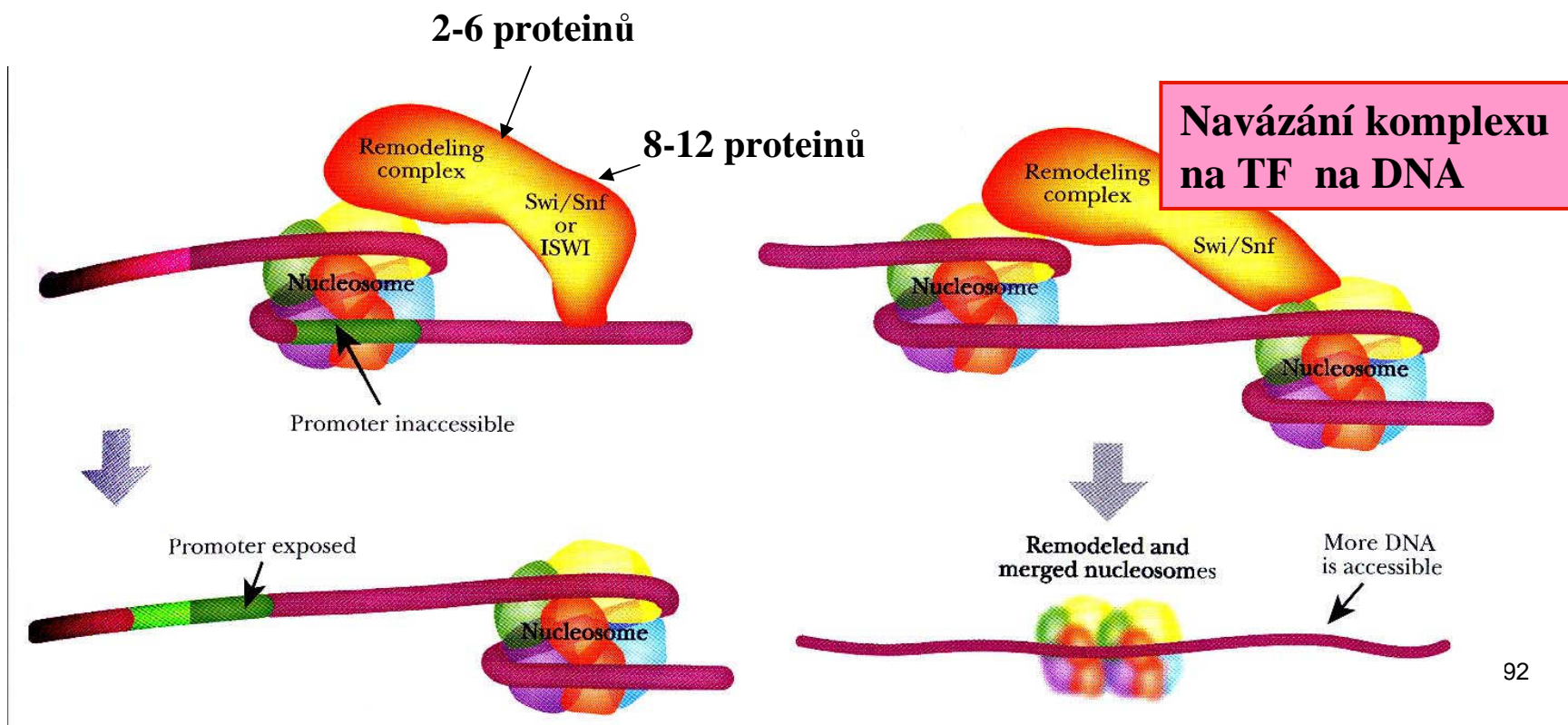
korepresor navozující deacetylaci

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

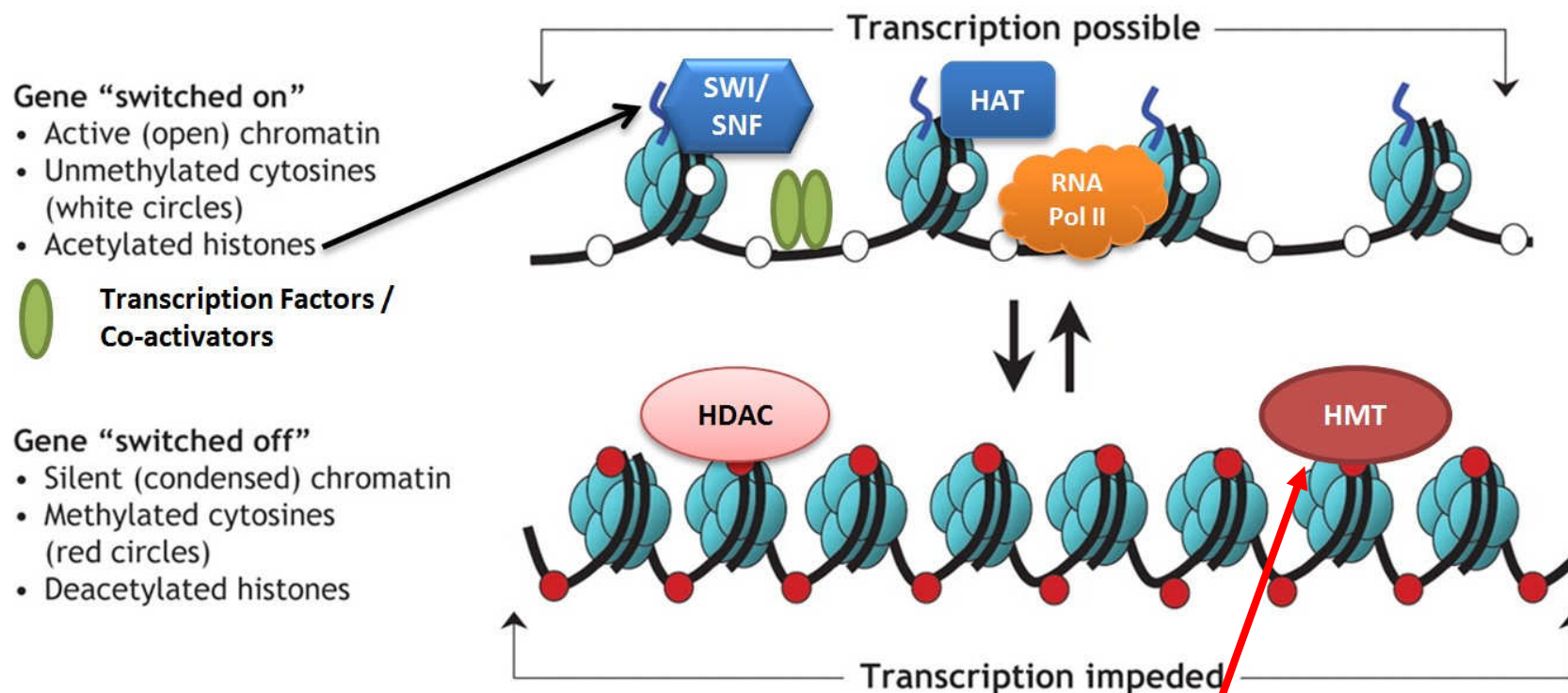
Působení komplexů remodelujících chromatin: dva způsoby remodelování nukleozómů

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

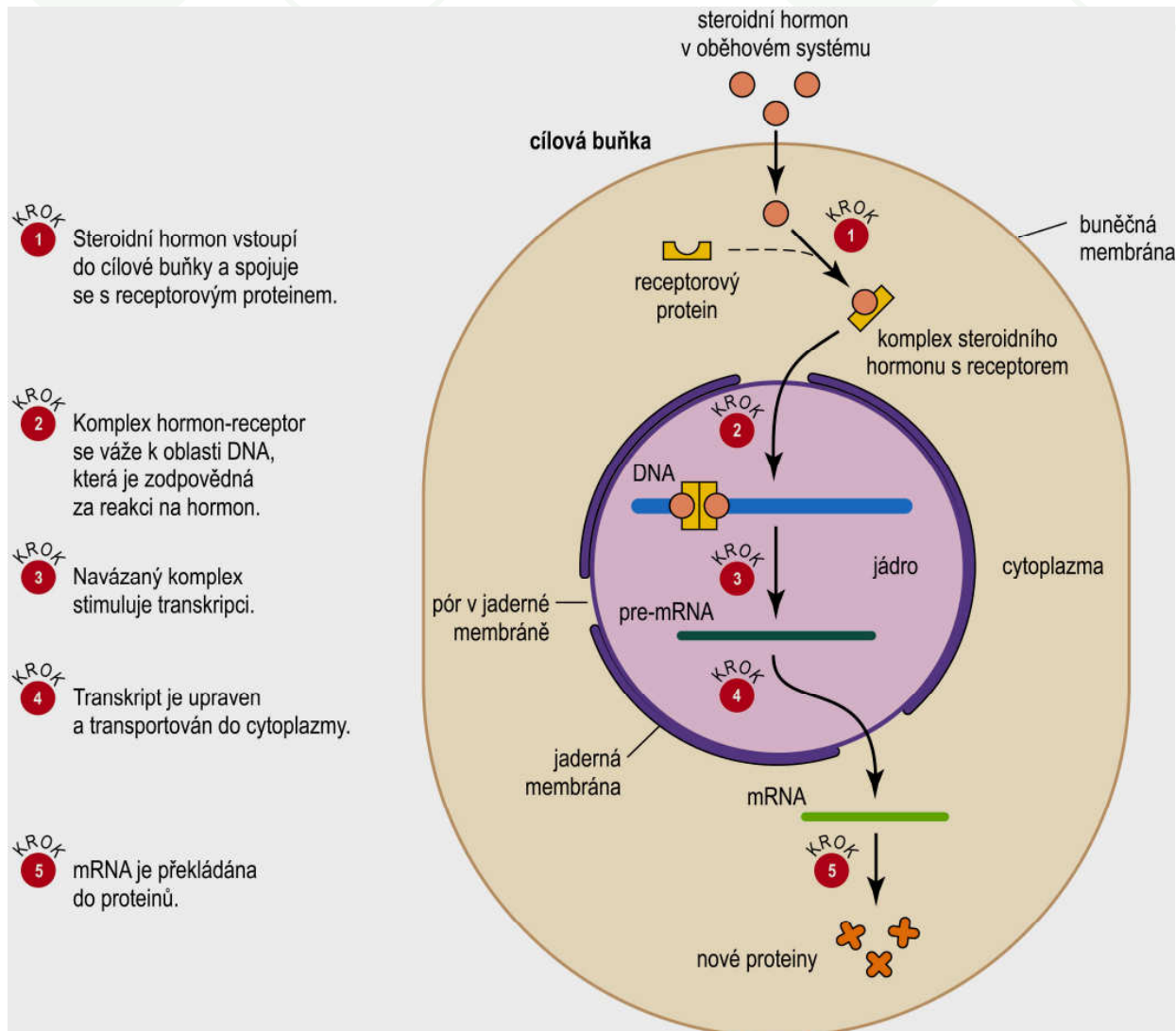


HMT = histonmetyltransferázy (navozuje epigenetické modifikace chromatinu a ovlivňuje řadu procesů v buňkách)

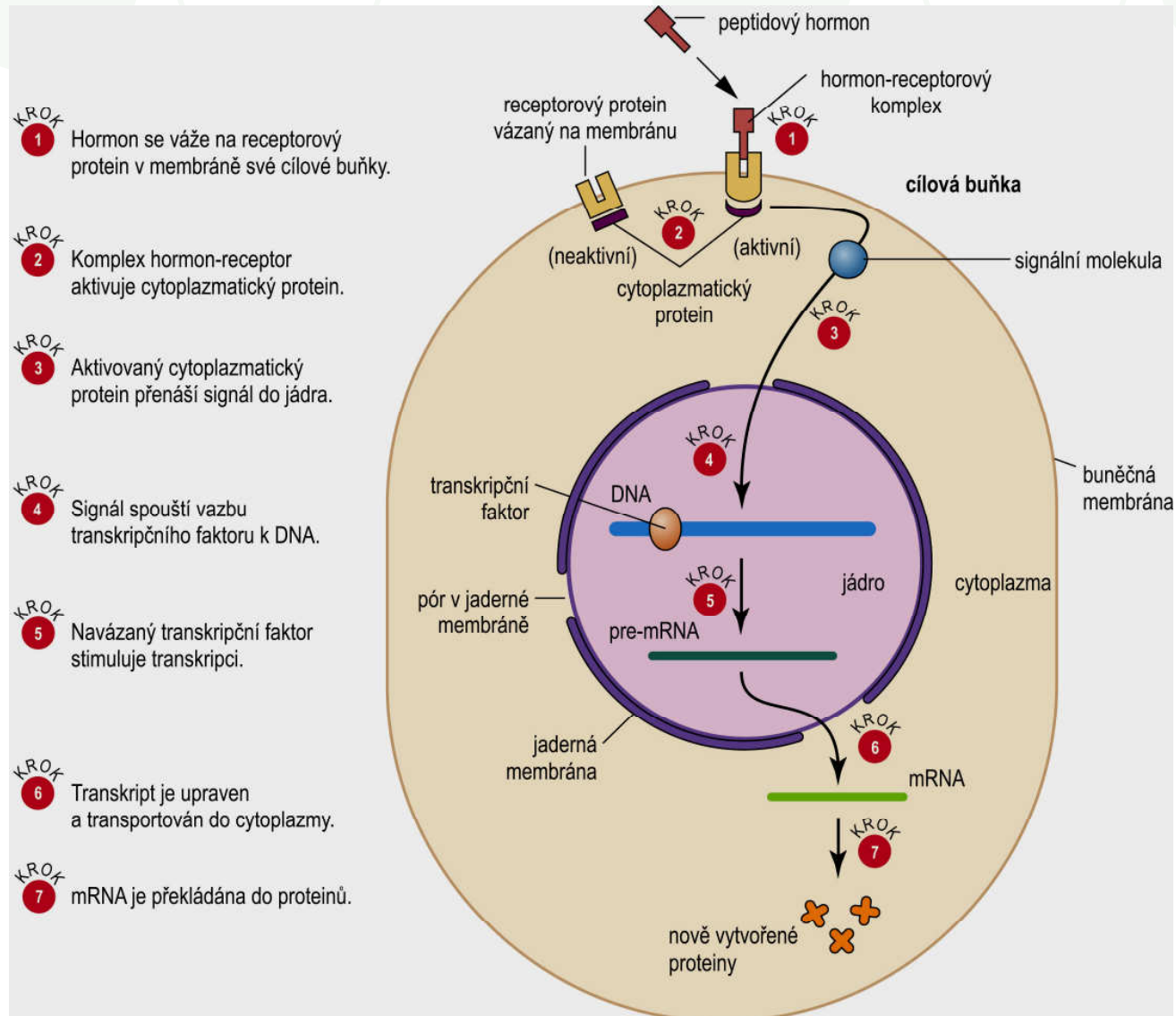
Sled událostí vedoucích k aktivaci eukaryotického genu

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

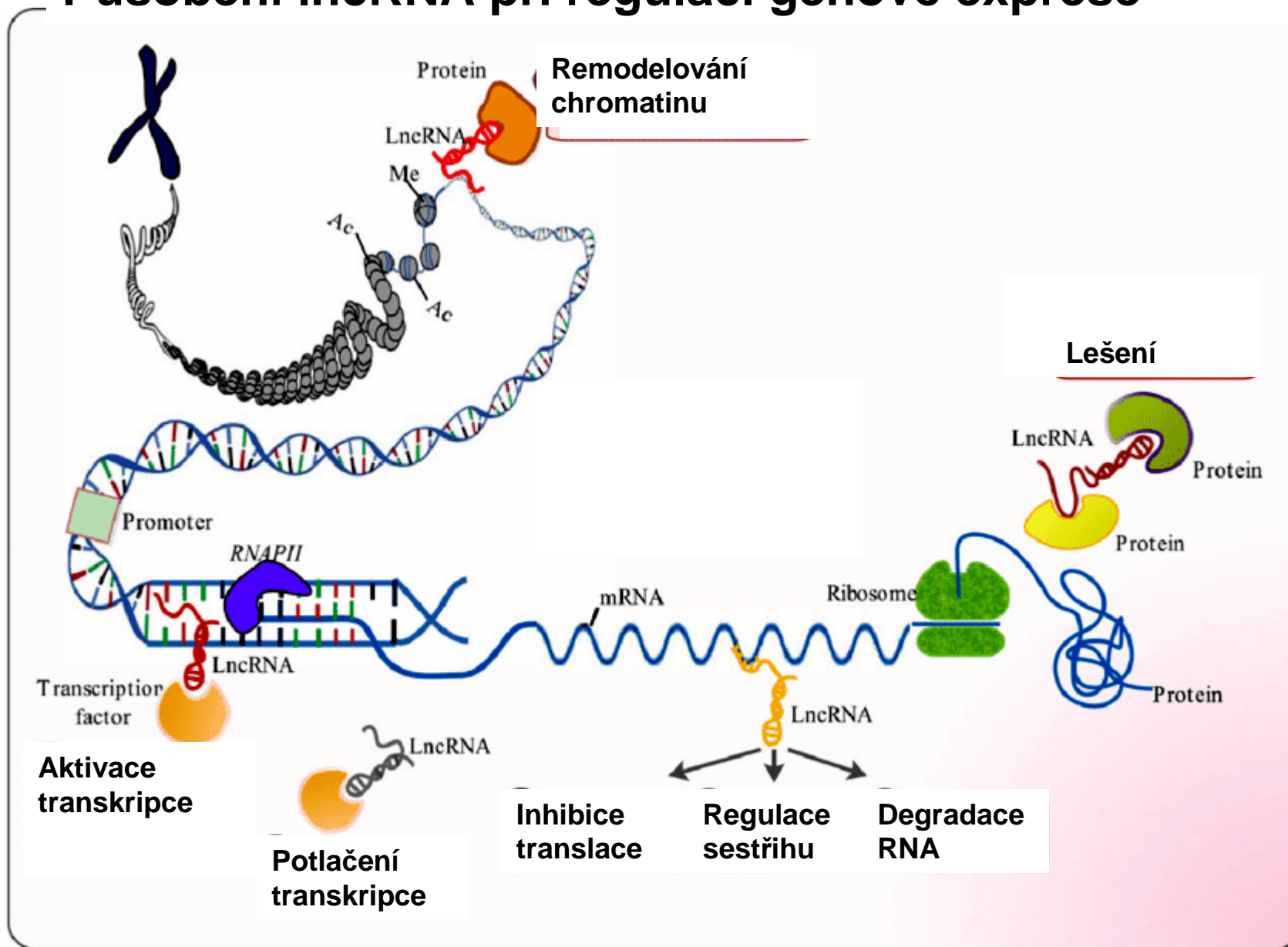
Regulace genové exprese steroidními hormony



Regulace genové exprese peptidovými hormony



Působení lncRNA při regulaci genové exprese



Charakteristika lncRNA (long non-coding RNA)

- delší než 200 nt (x small non-coding RNA (miRNA, siRNA, piRNA))
- většina je tkáňově specifických, často specifických pro vývojová stádia
- u člověka zjištěno 270 000 transkriptů lncRNA (2018), tisíce lokusů na chromozomech
- interagují s jinými molekulami RNA a nebo s proteiny. Regulují transkripci genů několika mechanismy (modifikují transkripční faktory, působí jako ko-regulátory, ko-aktivátory atp).
- některé lncRNA se komplementárně vážou na mRNA a brání jejich úpravě, sestřihu, transportu, translaci a degradaci
- vážou se na X-chromozom a inaktivují je
- objevují se při různých chorobách (rakovina, Alzheimerova ch., ateroskleróza aj), mohou sloužit jako markery