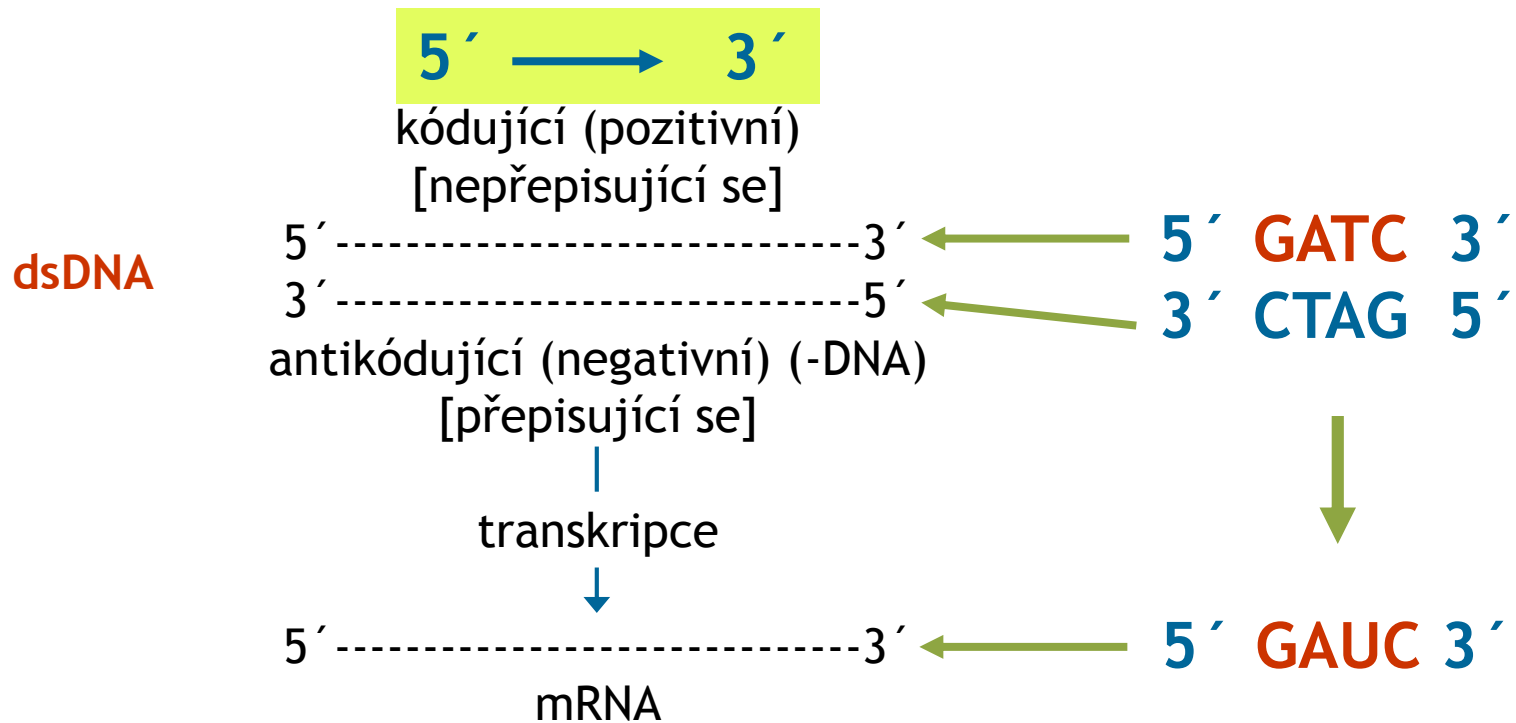


Transkripce

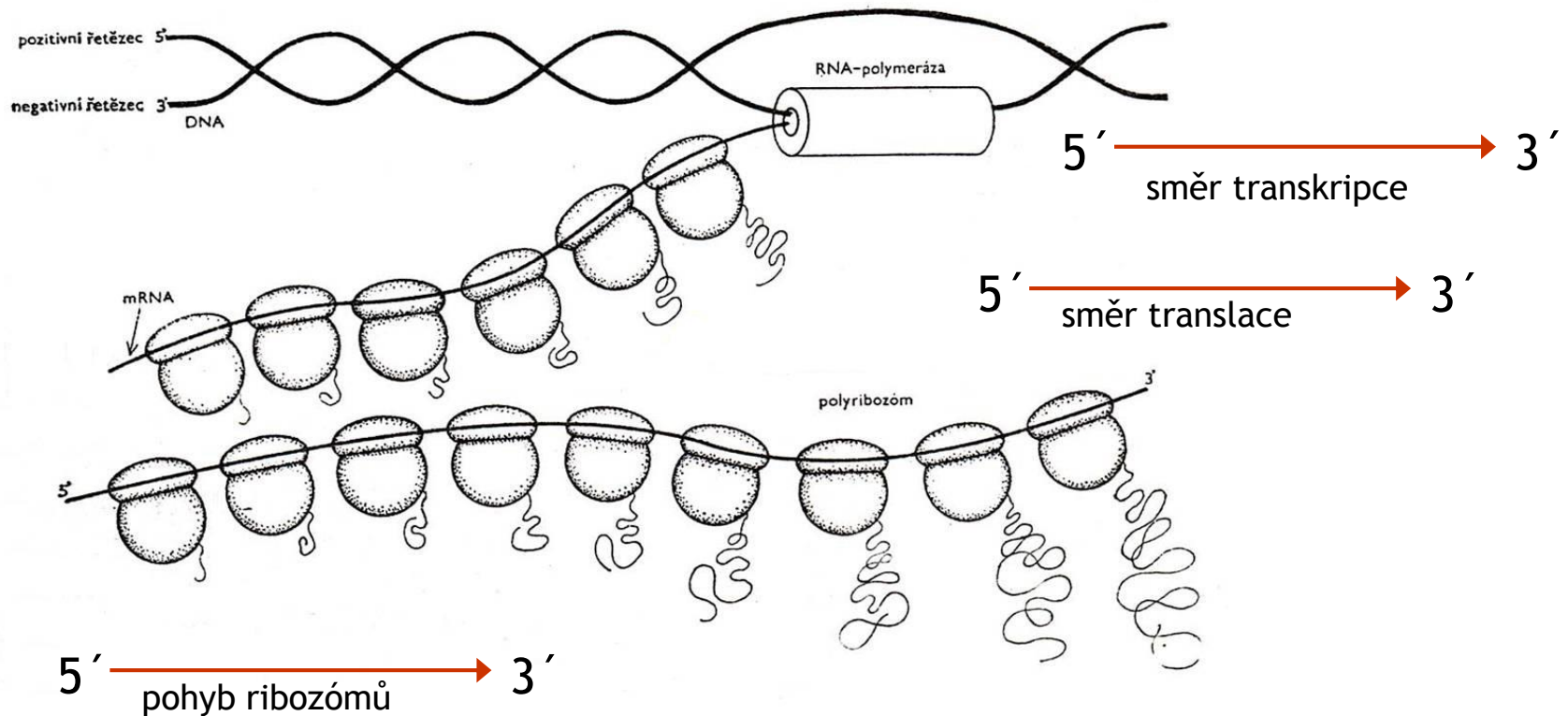
přepis genetické informace z DNA do RNA, při které DNA slouží jako matrice pro syntézu RNA. Reakci katalyzuje RNA-polymeráza (transkriptáza)

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

Značení řetězců DNA podle jejich funkce



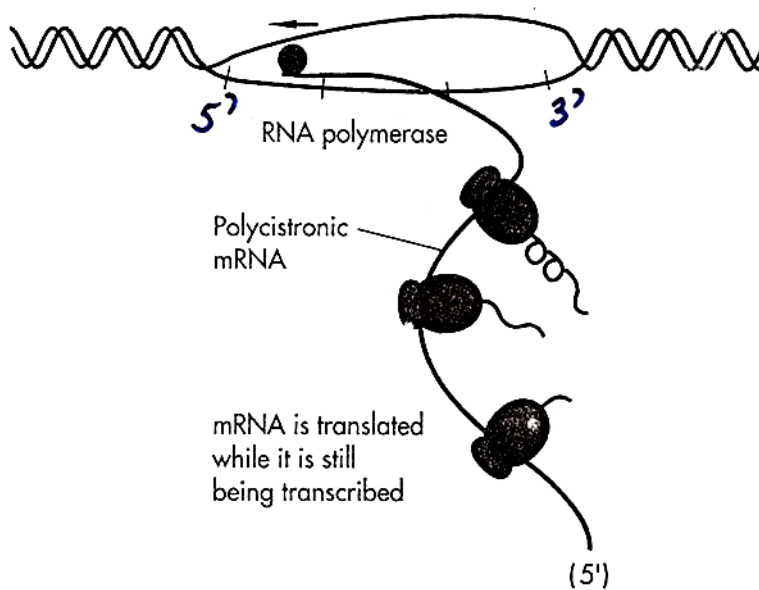
Směr syntézy mRNA při transkripci, směr translace mRNA a směr syntézy polypeptidů



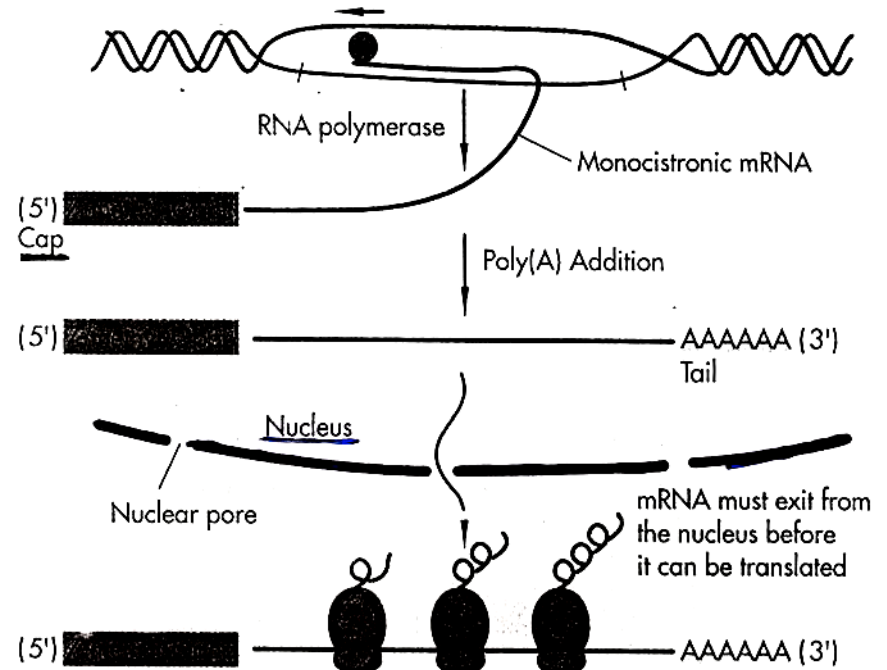
**Syntéza polypeptidů
N-konec C-konec**

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

Prokaryota

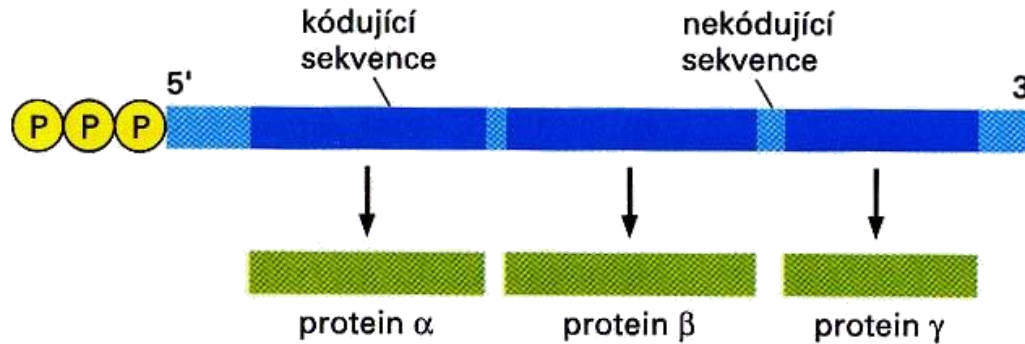


Eukaryota



Srovnání prokaryotické a eukaryotické mRNA

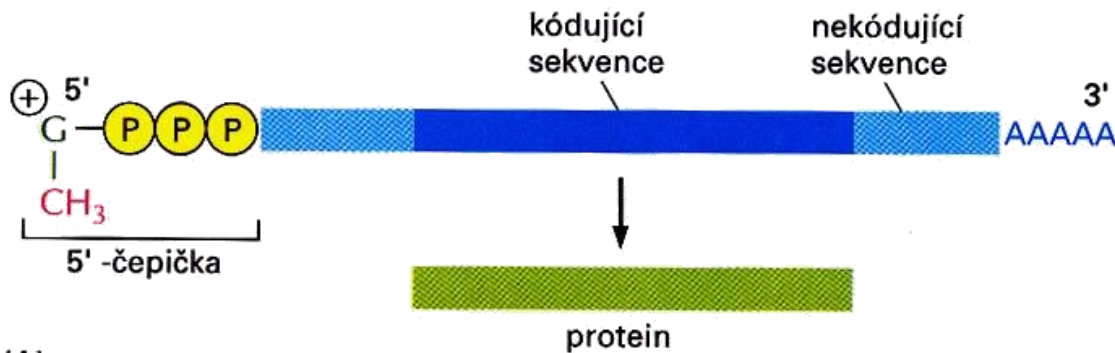
Prokaryotní mRNA



Polygenní mRNA

operony

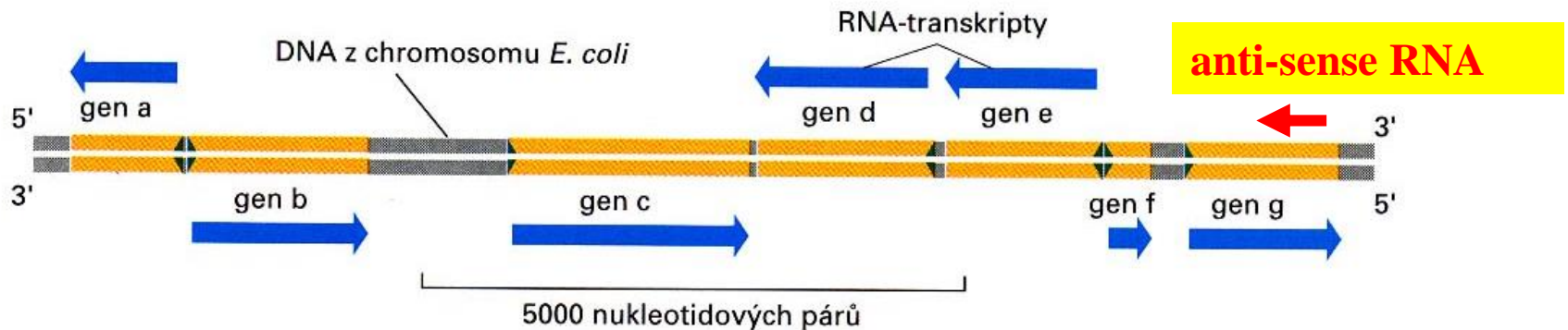
Eukaryotní mRNA



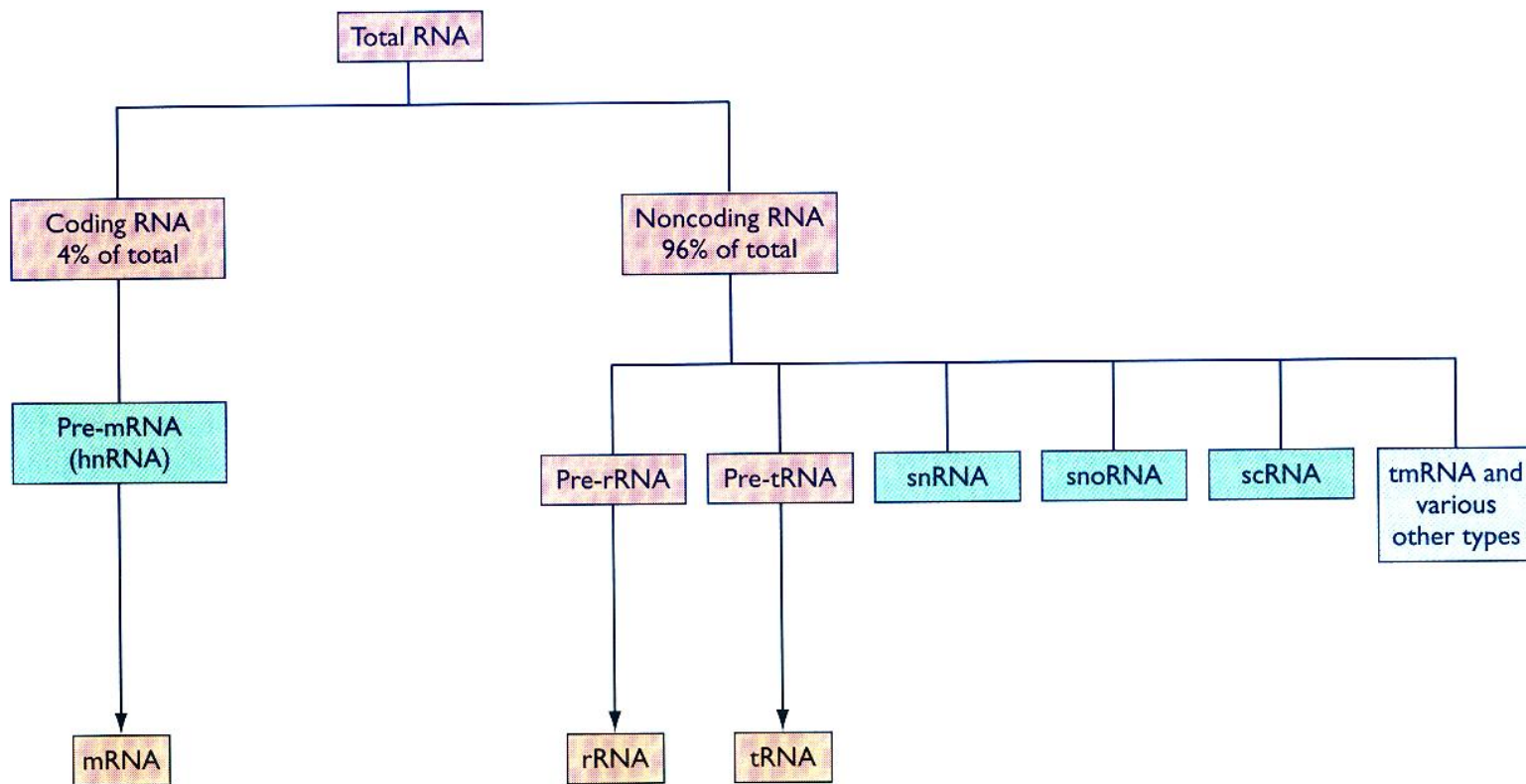
Monogenní mRNA

(A)

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



Typy RNA vznikající při transkripci u různých typů organismů



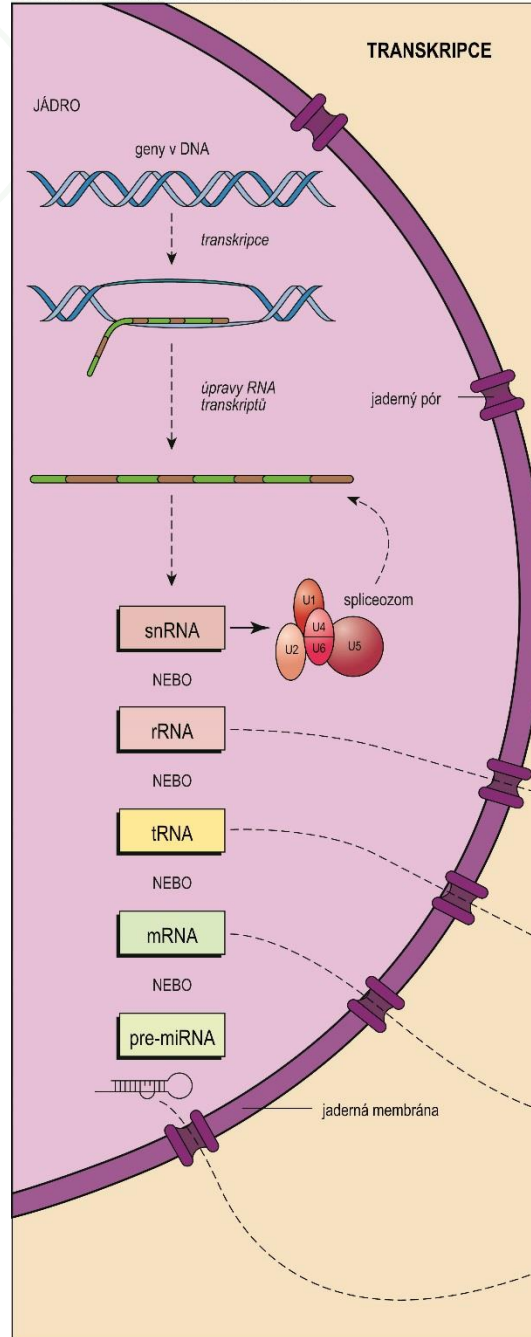
V lidském genomu je přepisováno ~75% sekvencí, v buňkách různých tkání max. 57%

KEY

- All organisms
- Eukaryotes only
- Bacteria only

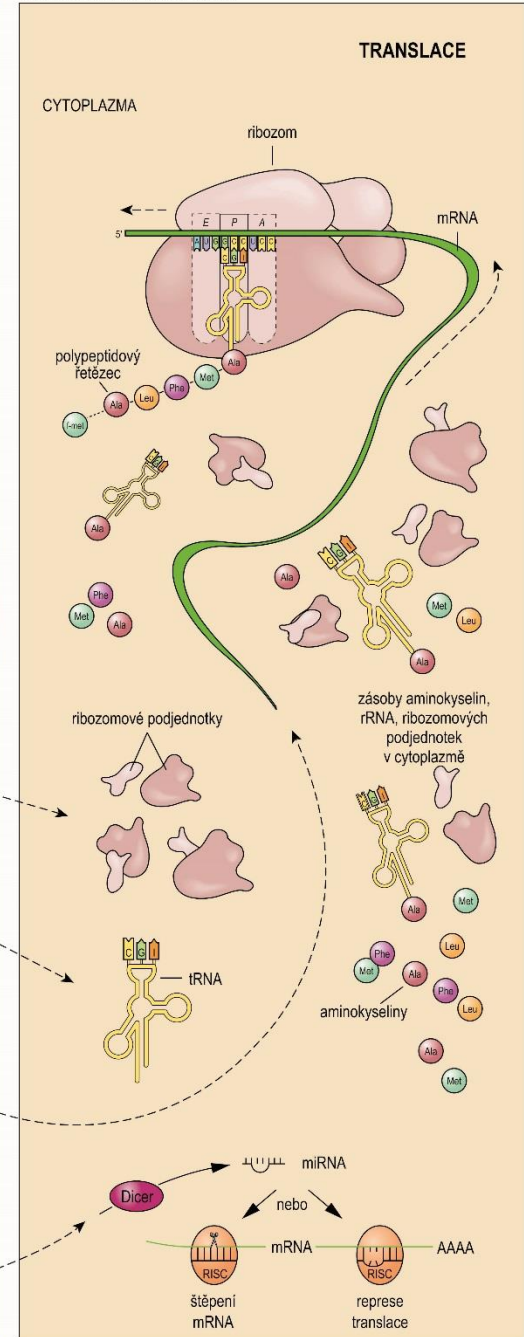
Molekulární druhy molekul RNA vytvářené transkripcí u eukaryot

Transkripce a úpravy RNA probíhají v jádře.



(a)

Translace probíhá v cytoplazmě.



(b)

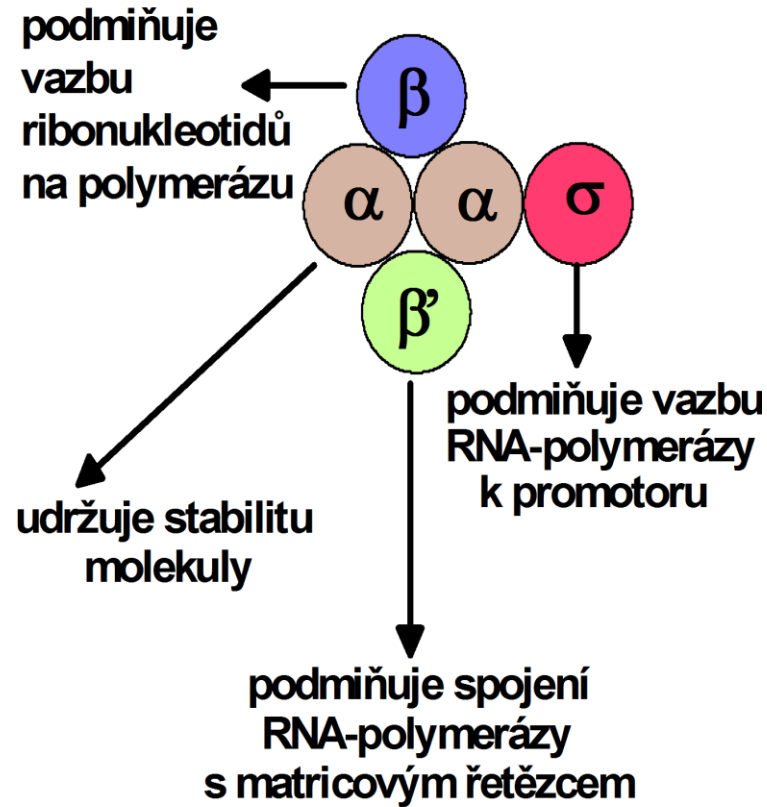
Enzymy katalyzující transkripci

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

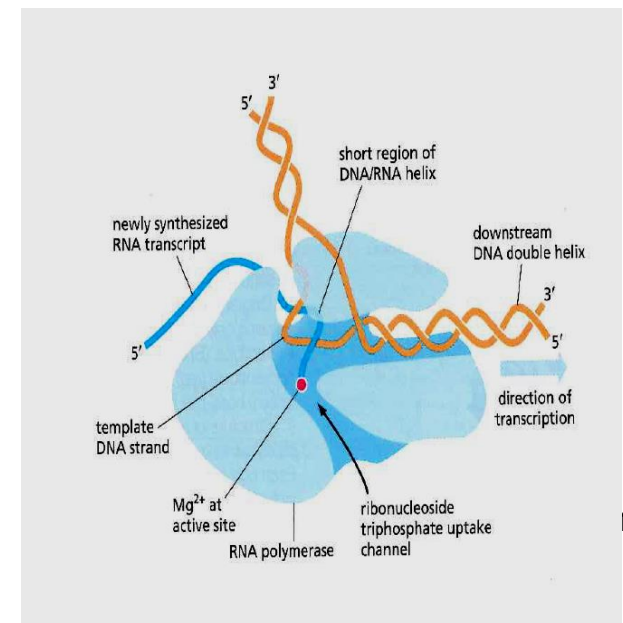
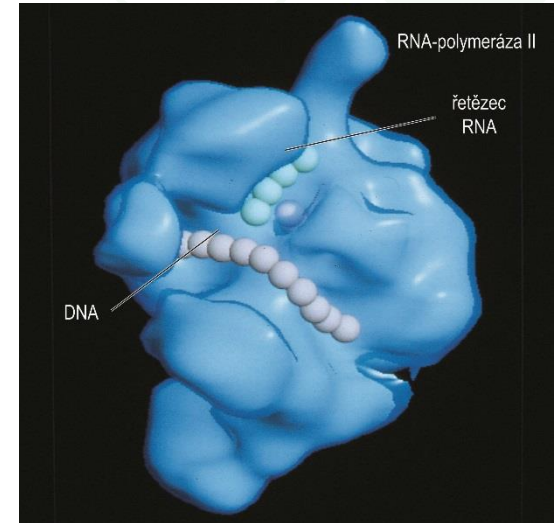
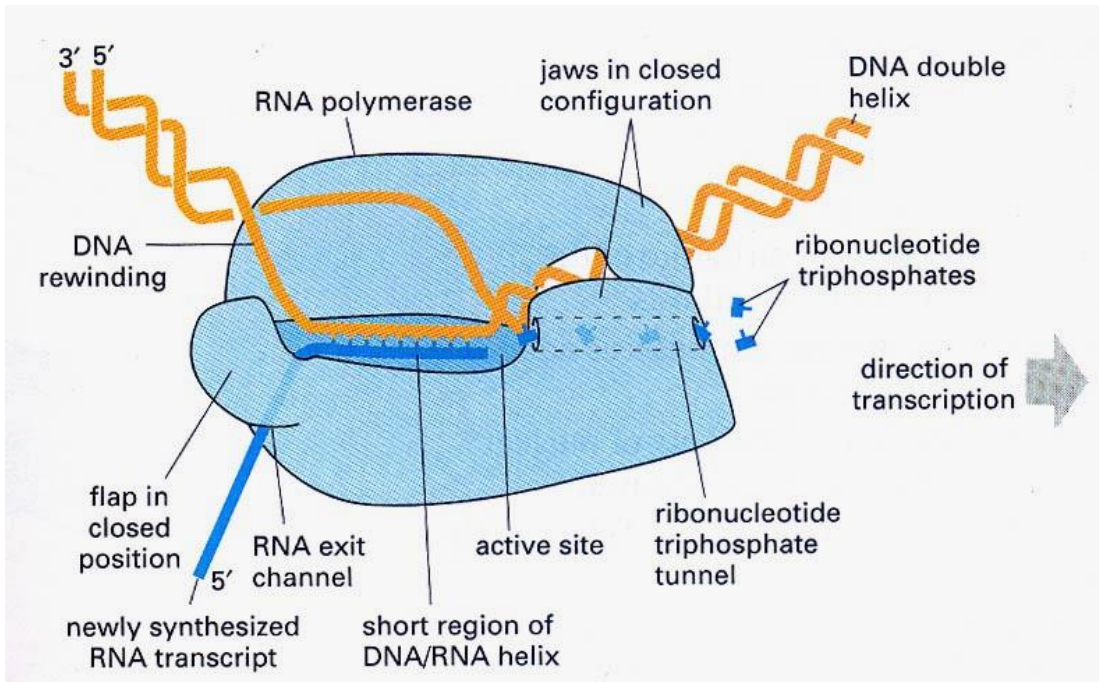
Primární transkripty tvořené na řetězci DNA

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

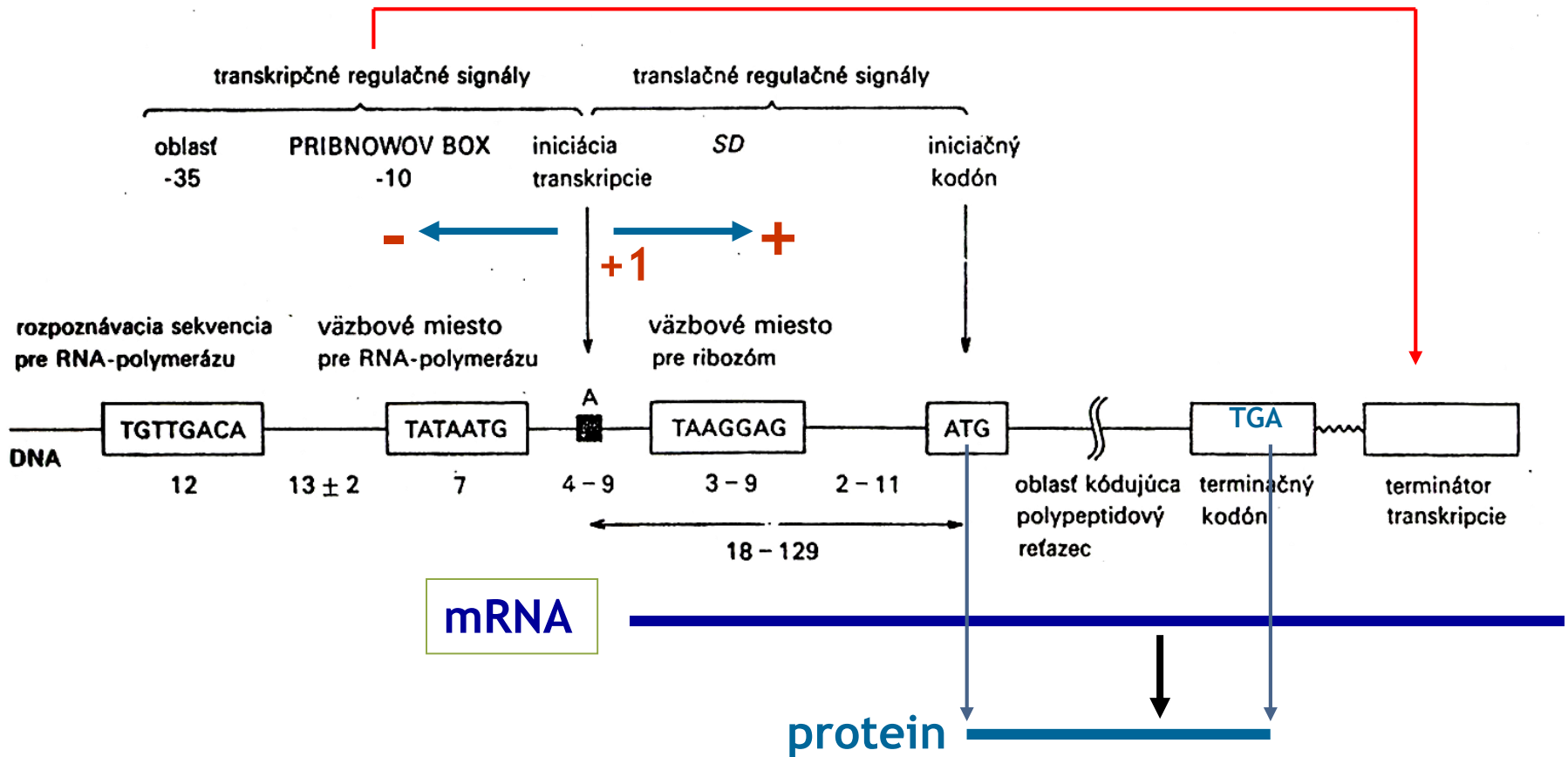
Funkce podjednotek RNA-polymerázy u *E. coli*



Struktura RNA-polymerázy



Strukturní gen prokaryot s vyznačením signálů pro transkripci a translaci



Sekvence po směru transkripce (downstream) a proti směru transkripce (upstream)



Funkční elementy bakteriálního promotoru

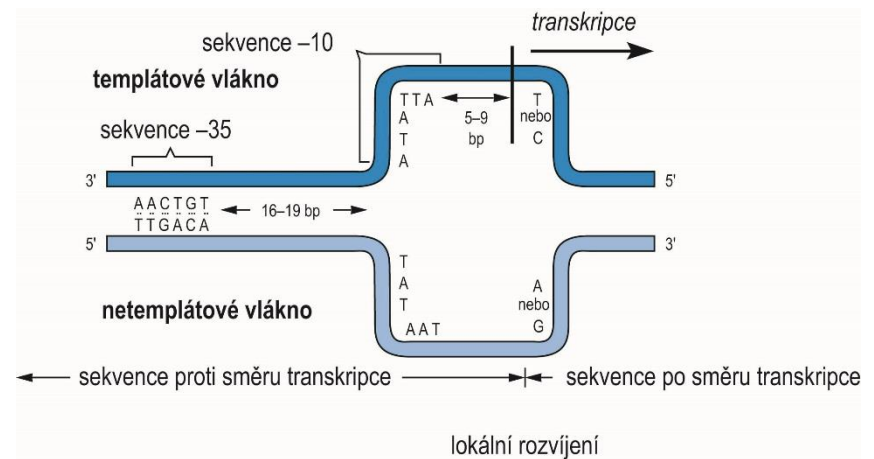


promotor

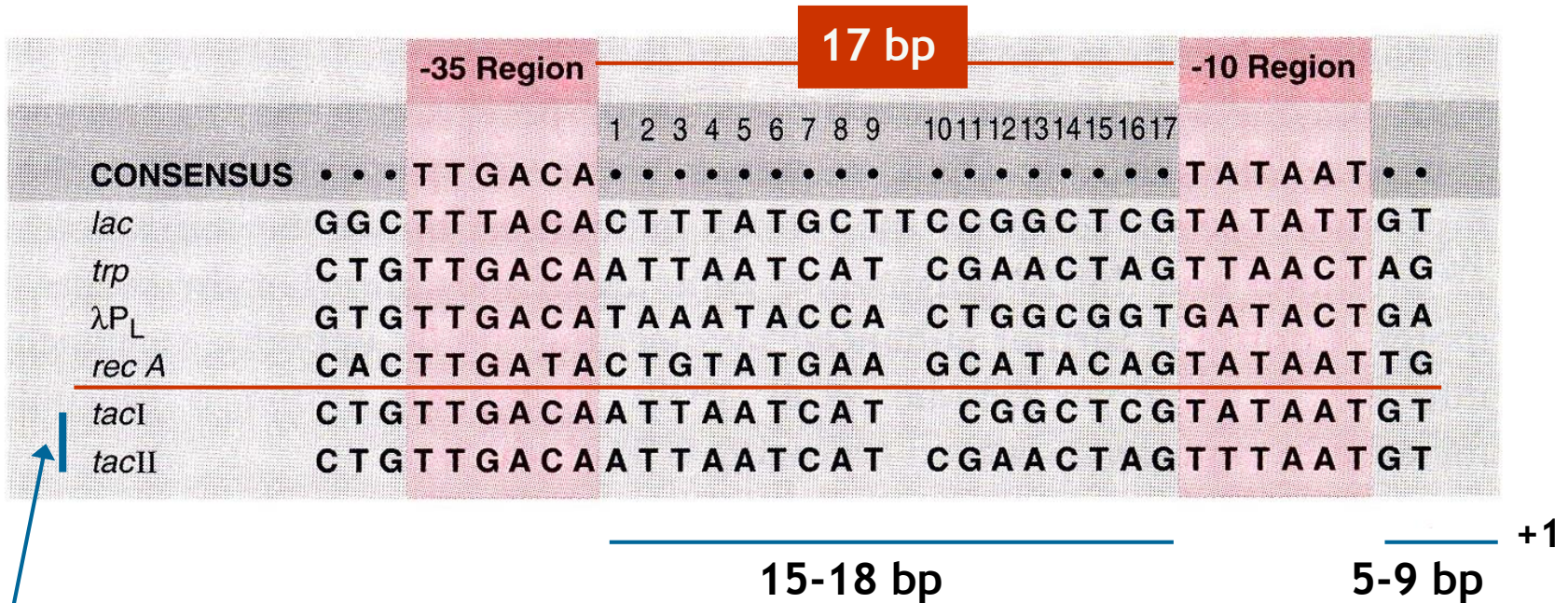
- silný
- slabý

Pribnowův box startovací nukleotid

box = krátká sekvence o stejné funkci



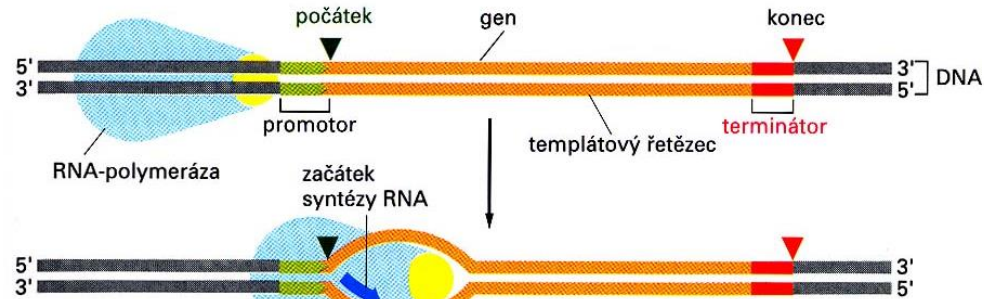
Sekvence přirozených a hybridních promotorů



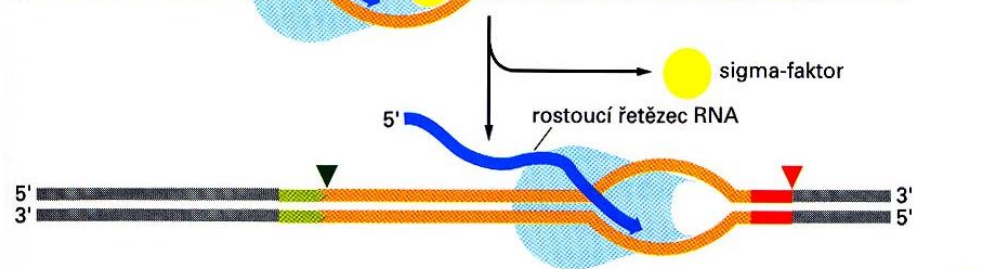
Hybridní promotory tac = lac x trp

Transkripce bakteriálního genu RNA-polymerázou

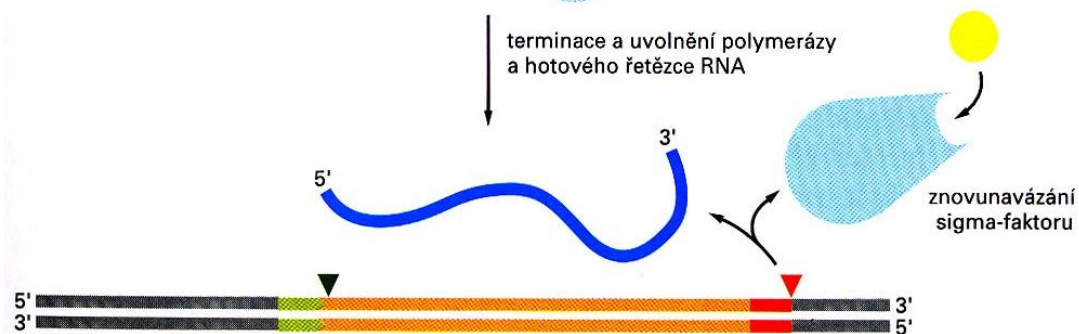
1. iniciace



2. elongace

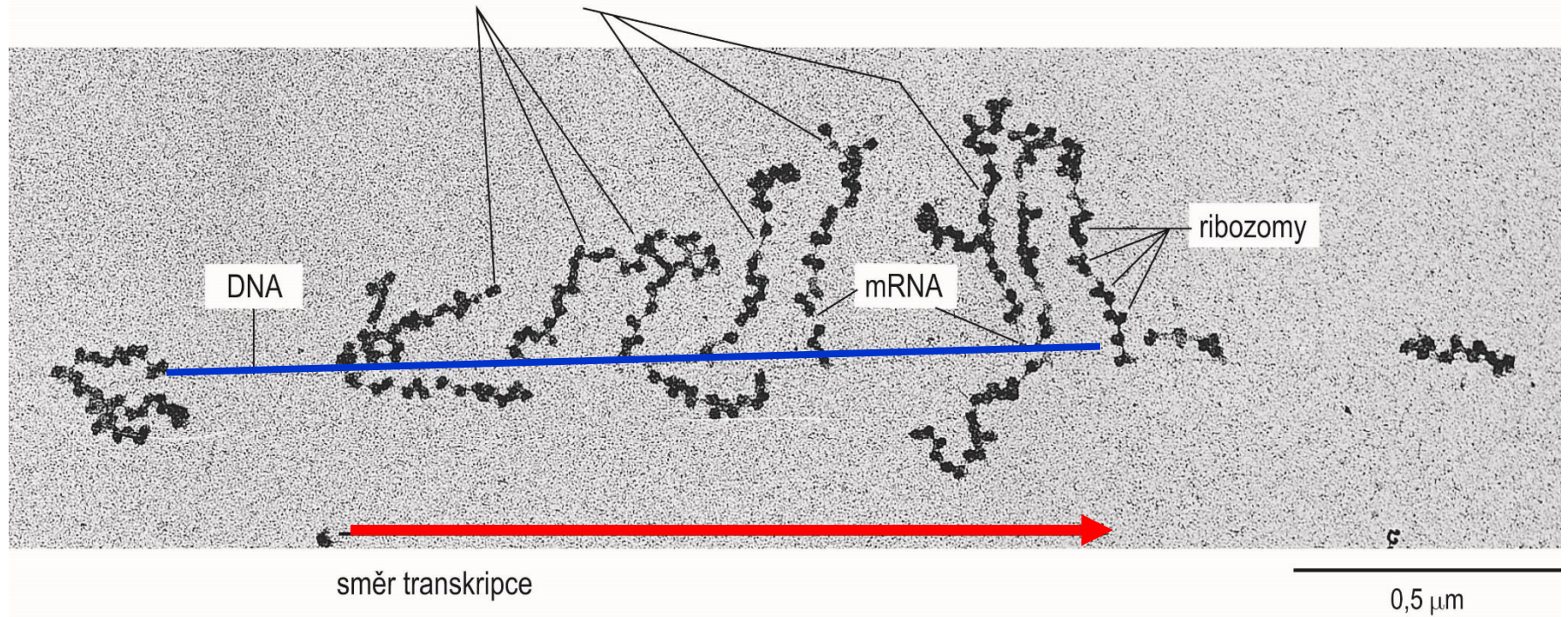


3. terminace

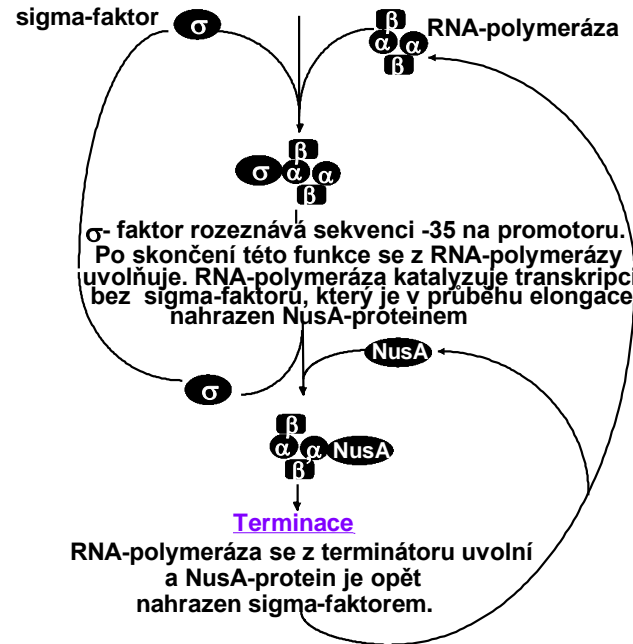


Vytváření molekul mRNA na prokaryotické transkripční jednotce a spřažení transkripce a translace u prokaryot

transkripty (RNA) genů podléhají translaci na mnoha ribozomech současně



Výměna podjednotek vázajících se na RNA-polymerázu v průběhu transkripce



***B. subtilis* má více sigma faktorů**

Obr. 148

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

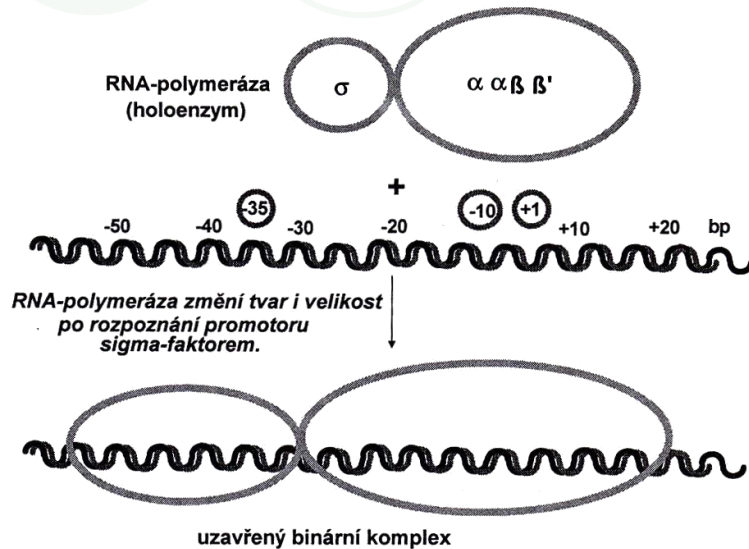
Terminace transkripce nezávislá na Ró-faktoru

Zastavení pohybu RNA-polymerázy

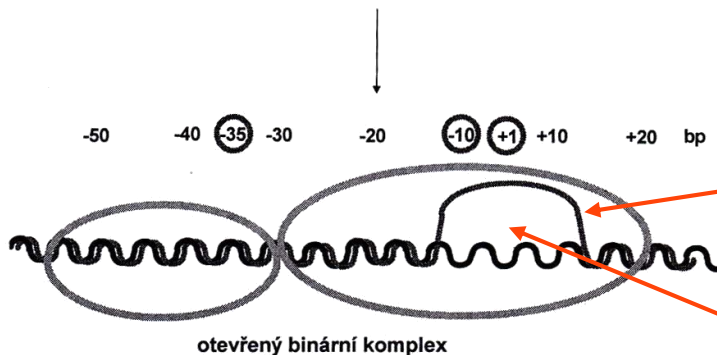
Uvolnění hotové RNA

Uvolnění RNA-polymerázy z DNA

Vazba prokaryotické RNA-polymerázy na promotor



Obr. 144a
Iniciace transkripce



Obr. 144b
Iniciace transkripce

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

Velikost replikační bubliny je cca 18 bp

Denaturace v oblasti +1

oblast bohatá na páry A:T

Iniciace transkripce

-40

-35

-30

-20

-10

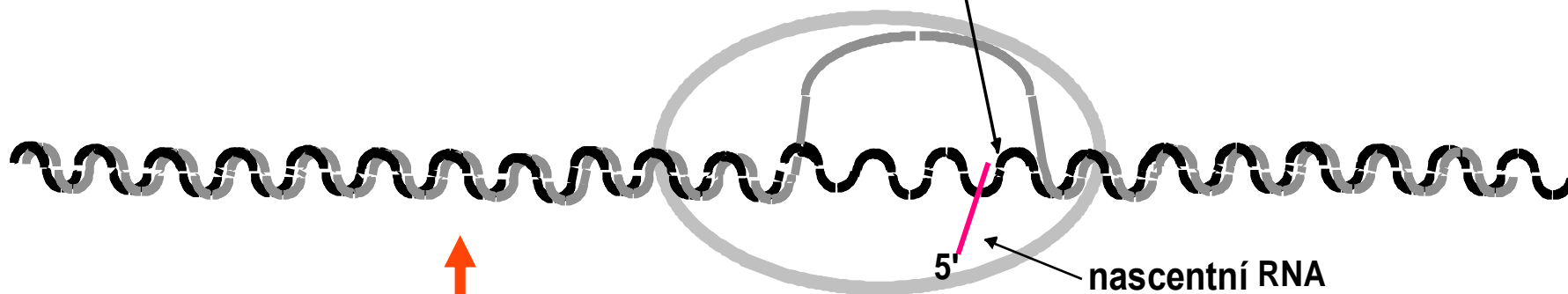
+1

+10

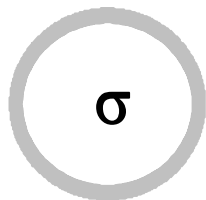
+20

+30

bp

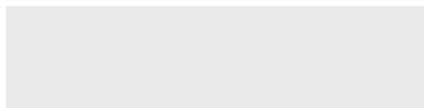


*vazba sigma-faktoru
na -35*



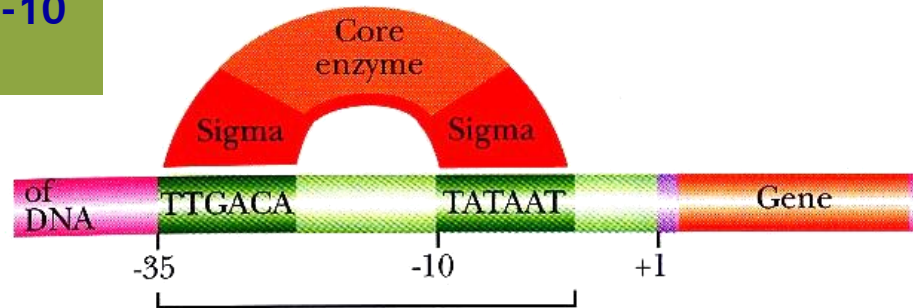
*Sigma-faktor se uvolňuje
z RNA-polymerázy.*

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



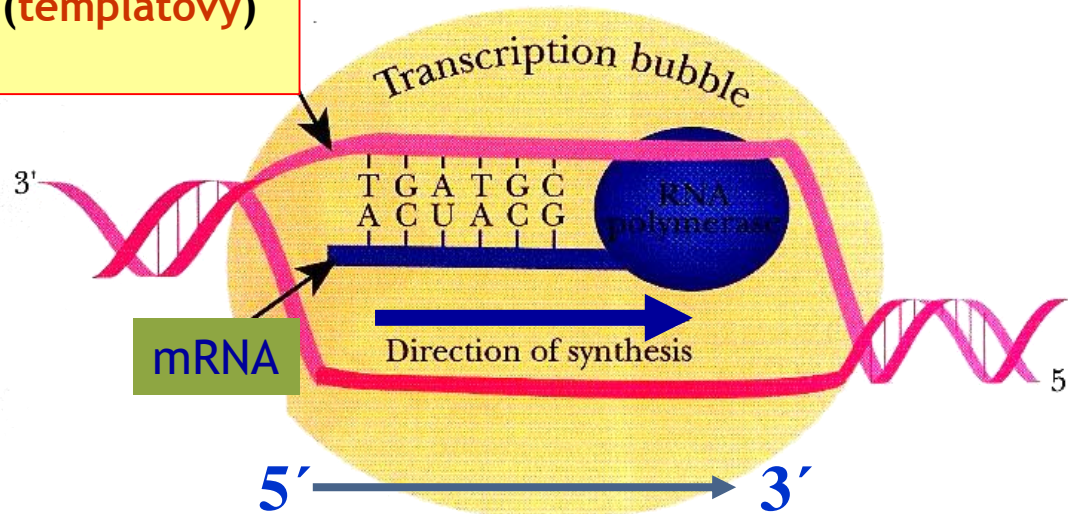
Iniciační fáze transkripce u prokaryot

Rozpoznání sekvence -10 a -35 sigma faktorem



negativní (templátový) řetězec

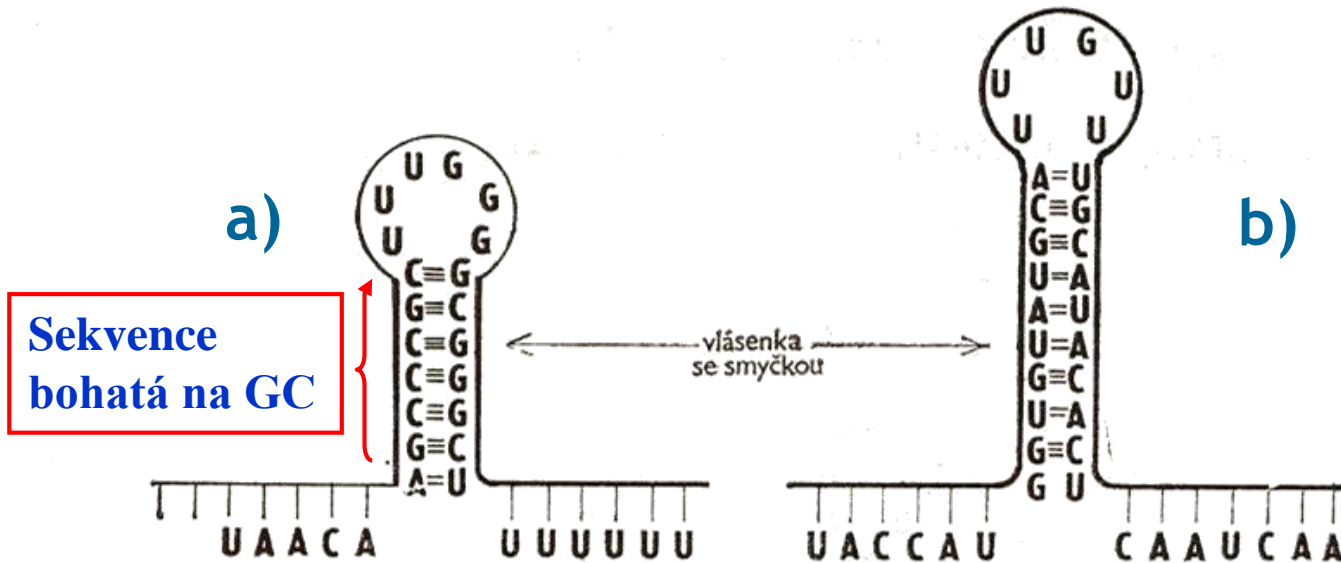
Prodlužování mRNA



Rychlost syntézy mRNA u *E. coli* je 40 nt/sec

Typy terminátorů transkripce u prokaryot

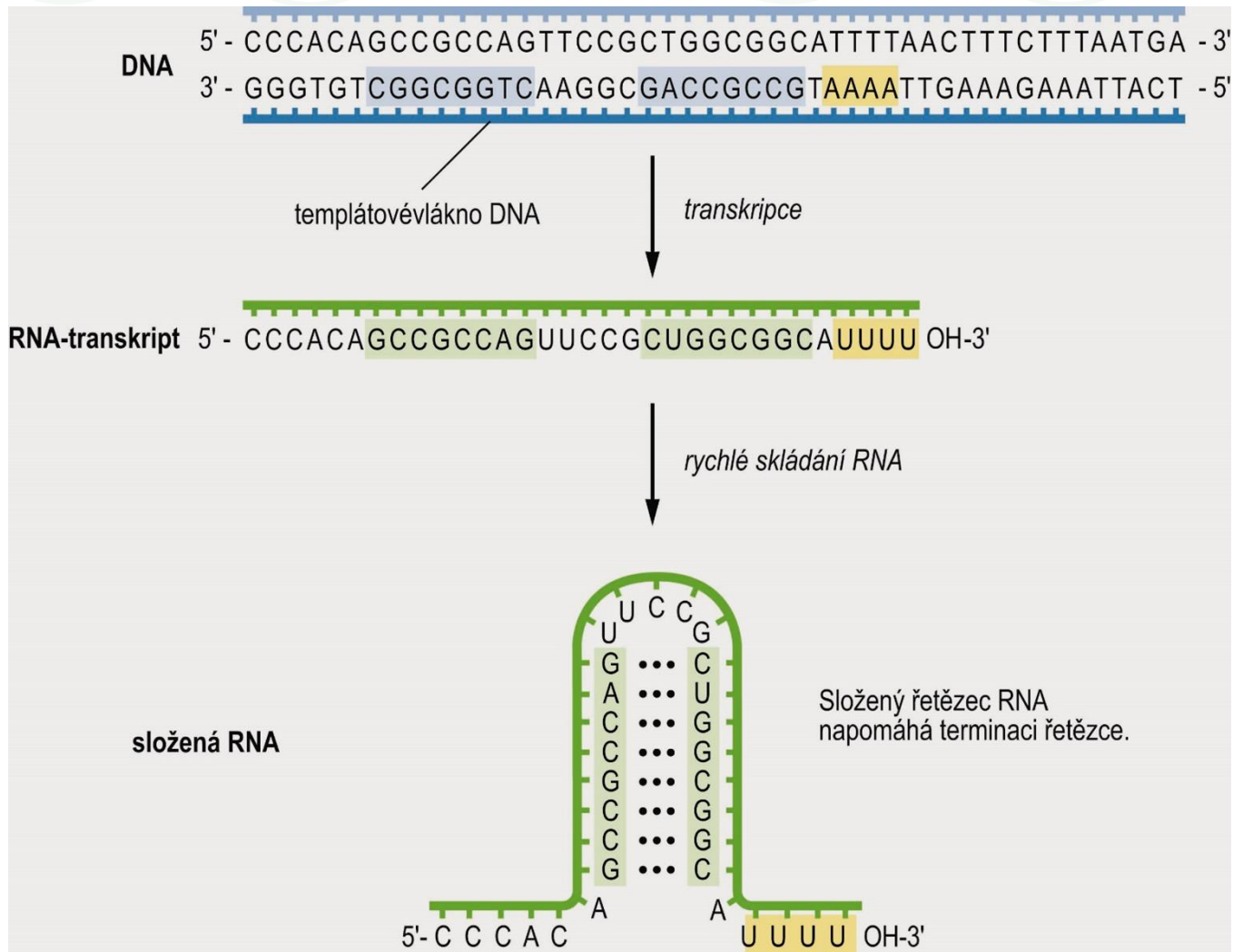
sekvence terminátorů přepsané do mRNA



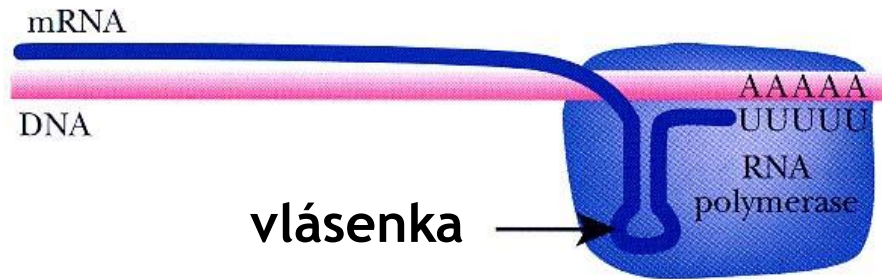
Terminátory: a) nezávislý na rho faktoru b) závislý na rho

Strukturní rozdíly mezi dvěma typy prokaryotických terminátorů (jejich transkriptů)

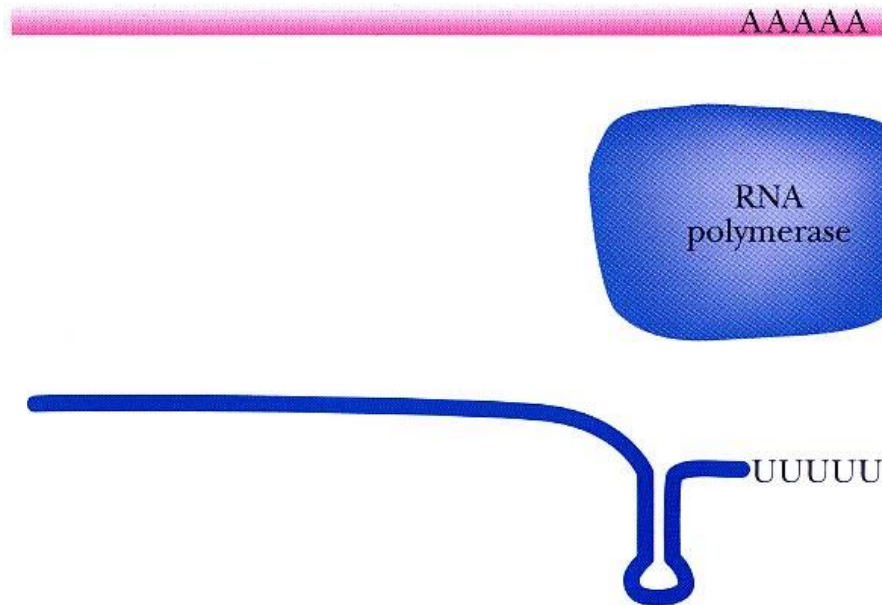
Struktura transkripčního terminátoru nezávislého na rho faktoru



Terminace transkripce mRNA



**párování A:U
napomáhá
uvolnění RNA**



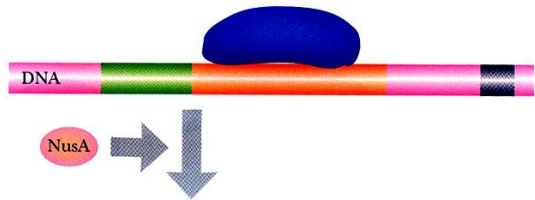
I. RECOGNITION

RNA-polymeráza

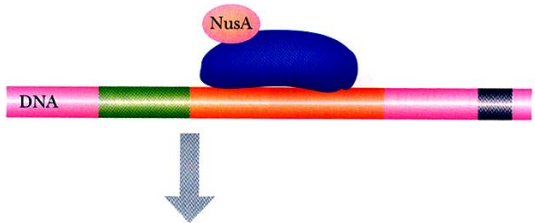


II. ELONGATION

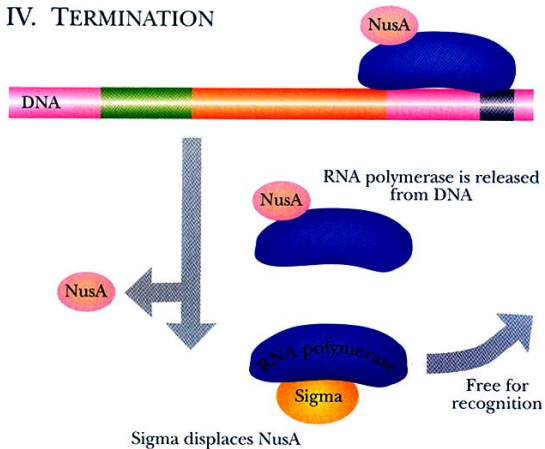
SIGMA IS RELEASED



III. NusA IS PICKED UP



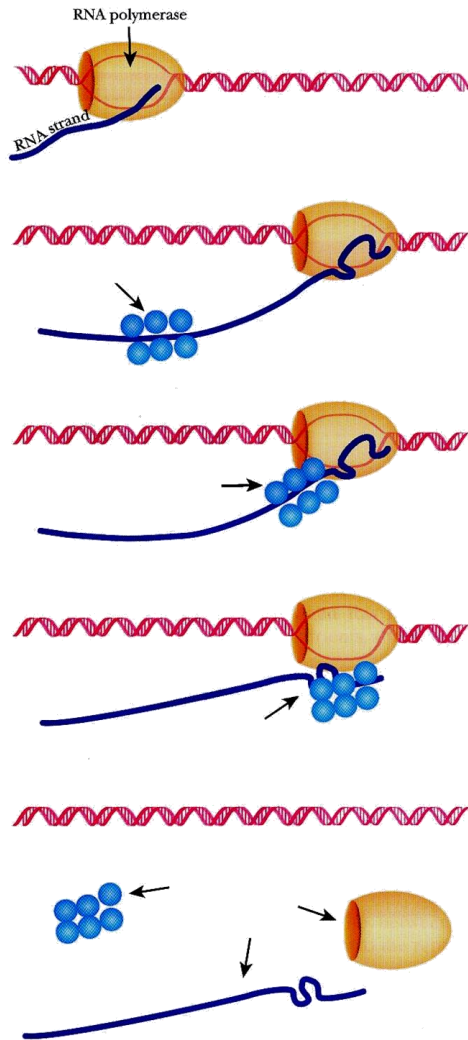
IV. TERMINATION



Výměna sigma faktoru a NusA proteinu na RNA-polymeráze

- Sigma faktor: iniciace
- NusA protein - terminace

Terminace transkripce za účasti Rho faktoru



Elongační fáze transkripce

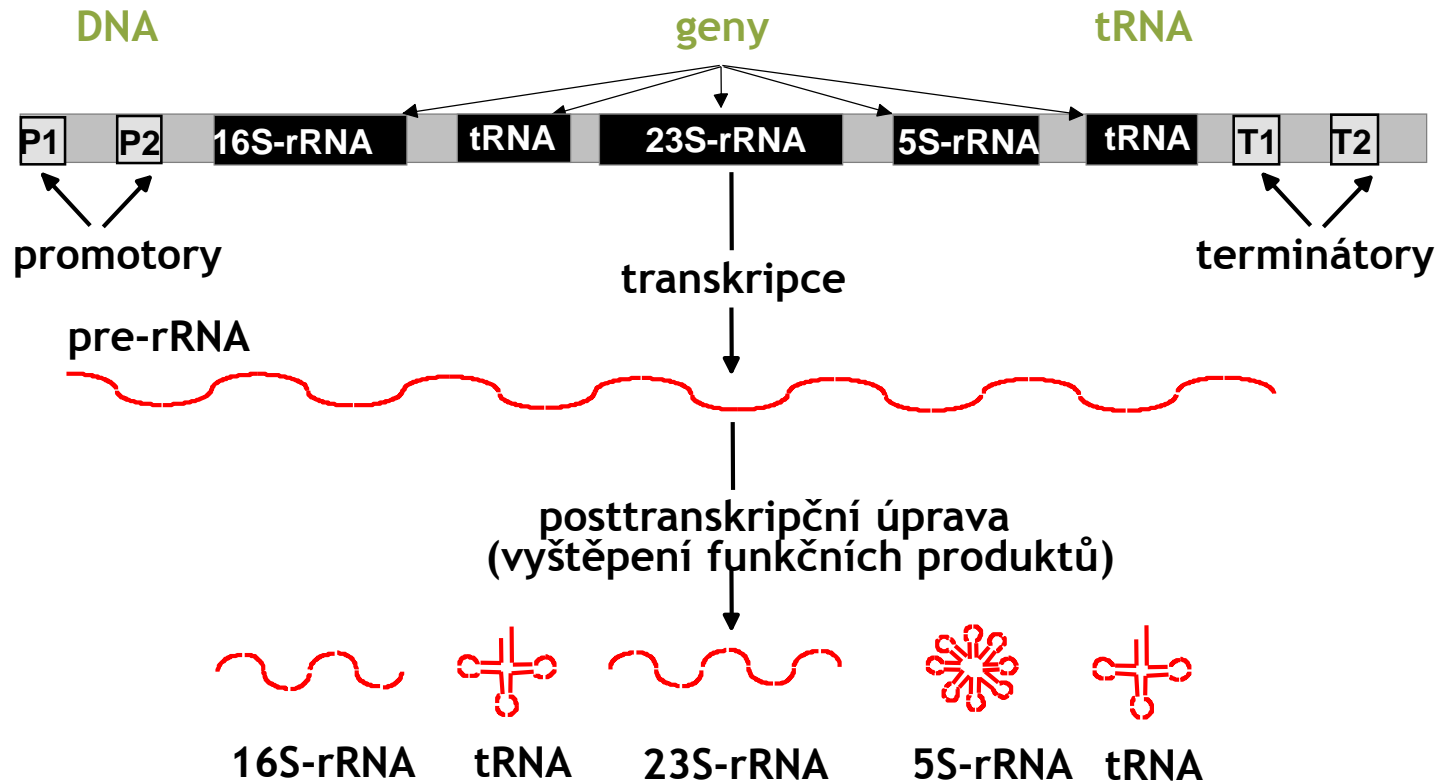
Připojení Rho-faktoru a jeho pohyb po mRNA

Připojení Rho-faktoru k sekvenci terminátoru

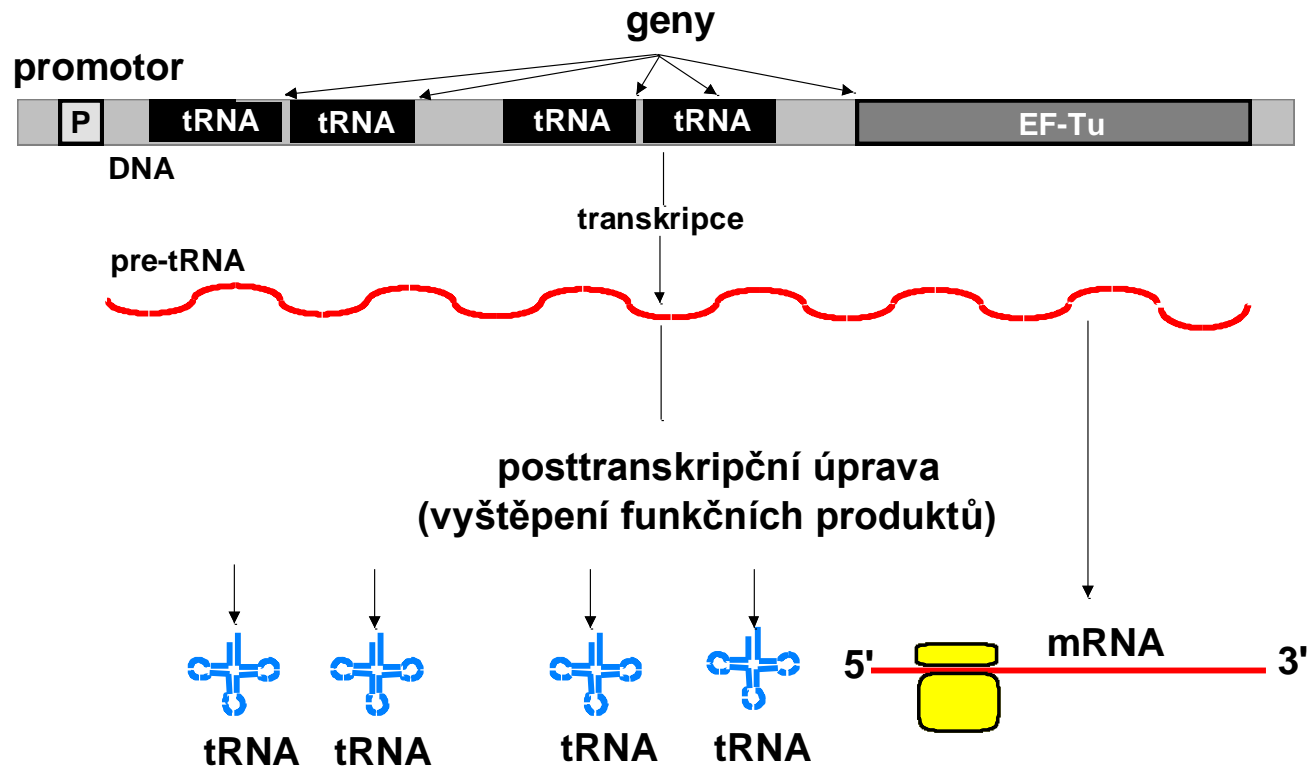
Rho faktor rozmotává hybridní DNA-RNA

Uvolnění Rho-faktoru, RNA-polymerázy a mRNA

Transkripce transkripční jednotky pro rRNA (*rrn* operony)

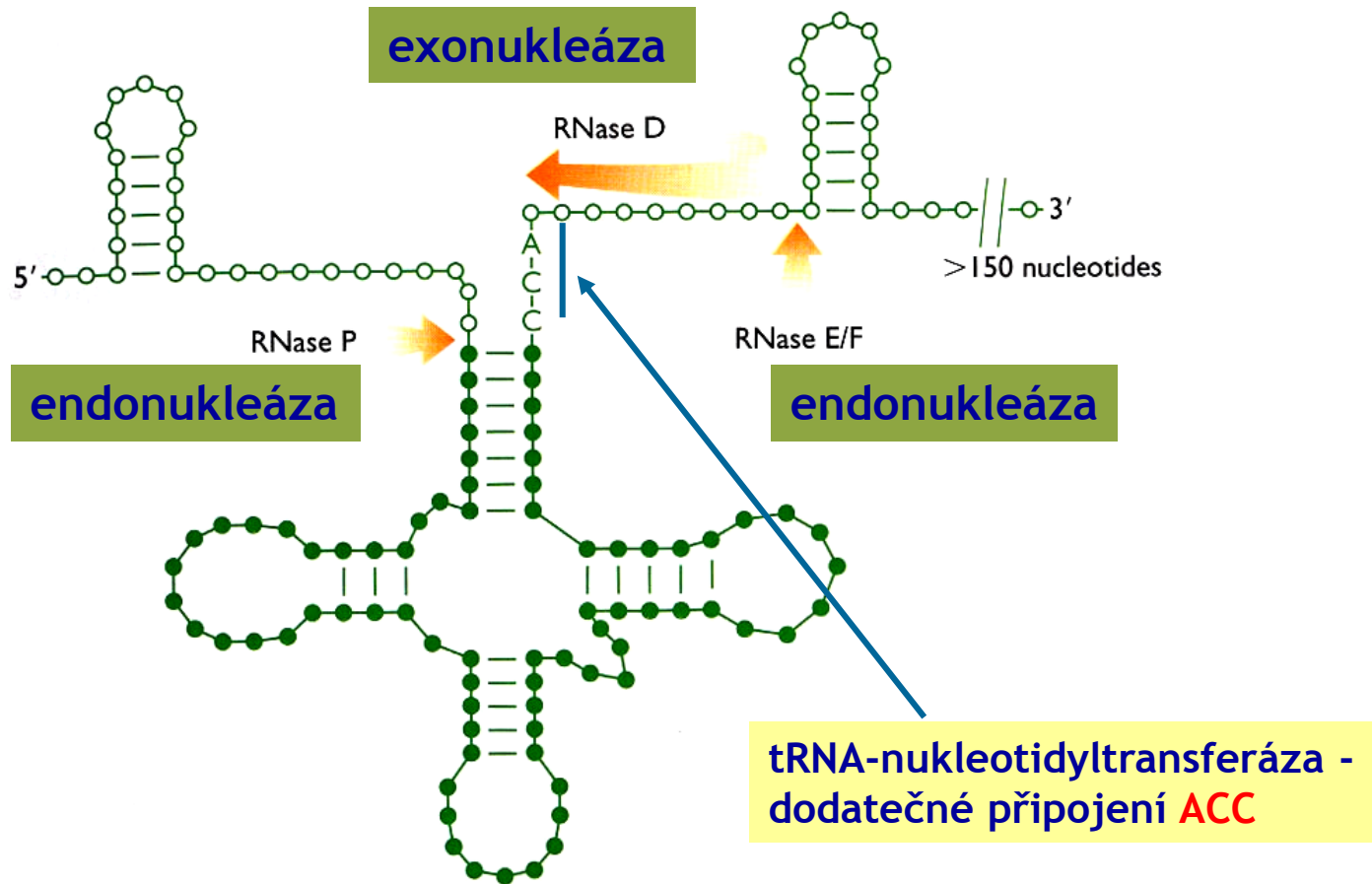


Transkripce transkripční jednotky pro tRNA

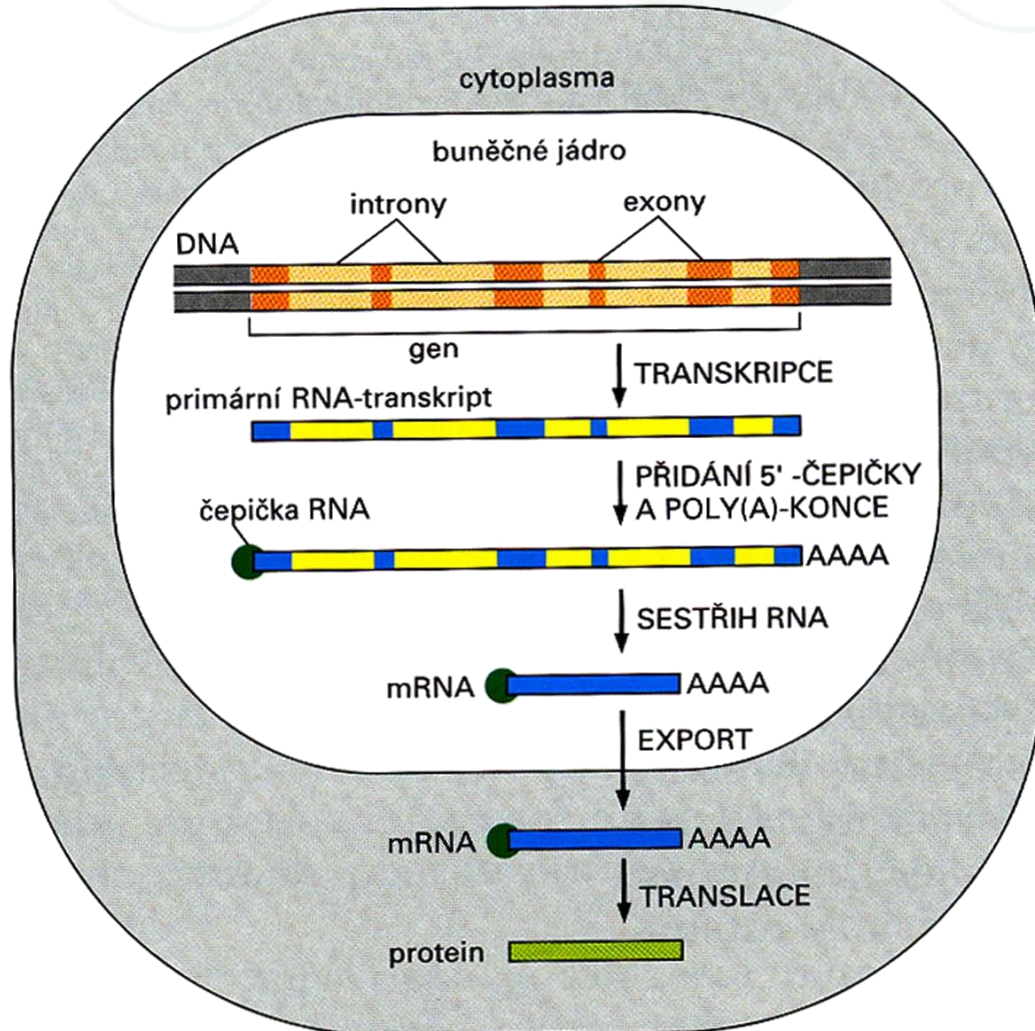


Úprava pre-tRNA u *E. coli*

* probíhá působením enzymů



Transkripce u eukaryot



Eukaryotické DNA-dependentní RNA-polymerázy

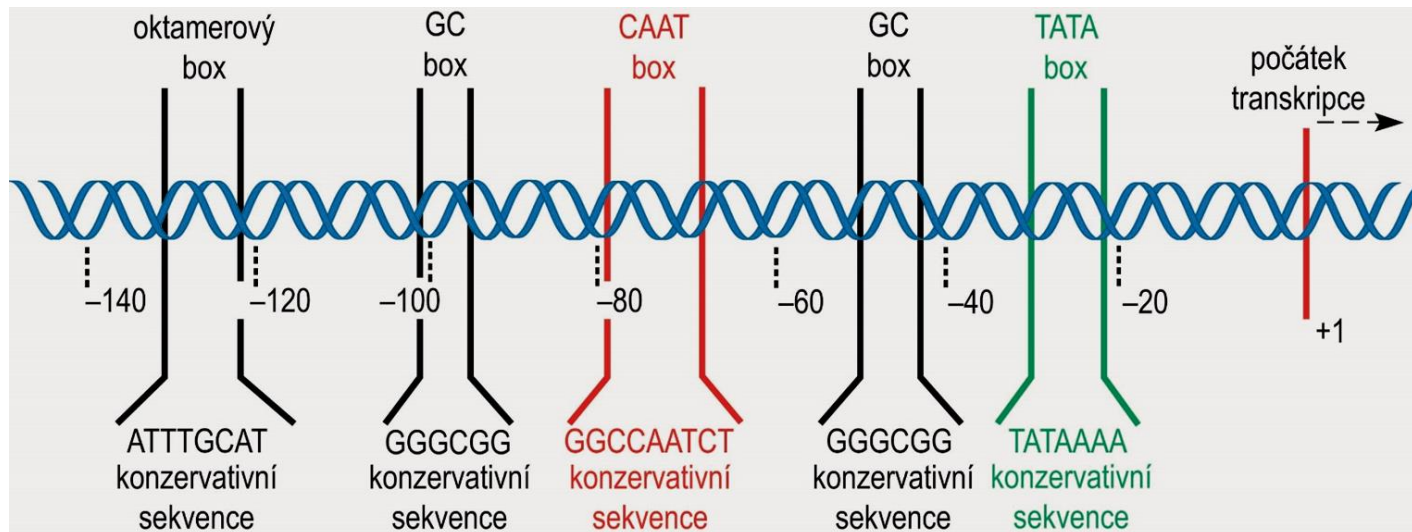
Matricí pro syntézu RNA je u všech těchto polymeráz negativní DNA-řetězec. Existují tři druhy těchto RNA-polymeráz:

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

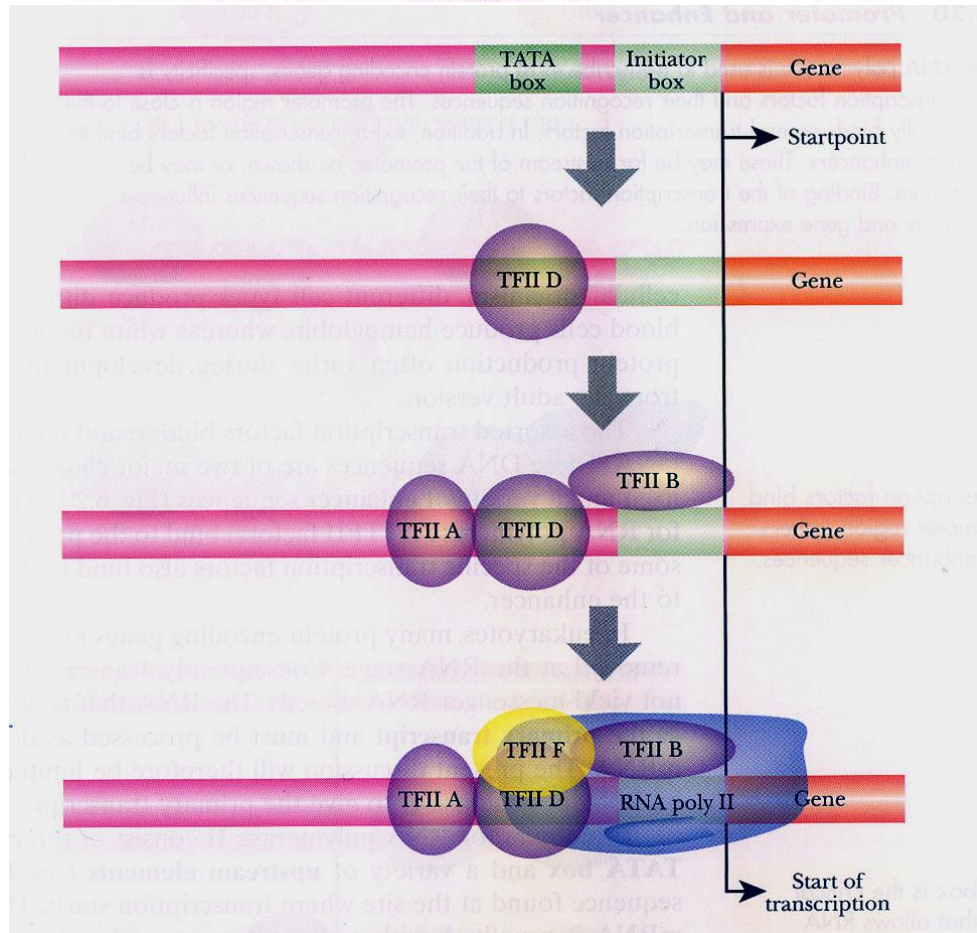
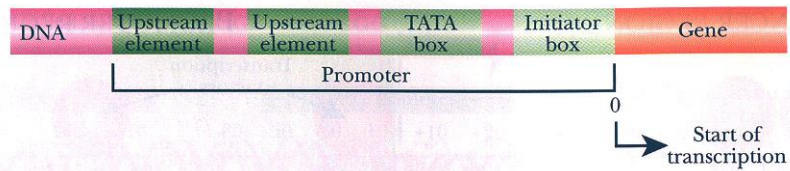
Každá z uvedených tří RNA-polymeráz vyžaduje svůj specifický promotor, na který se váže. To je rozdíl proti prokaryotům, která mají jen jeden typ RNA-polymerázy (a jeden typ promotoru)

Elementy eukaryotického promotoru (Pol II)

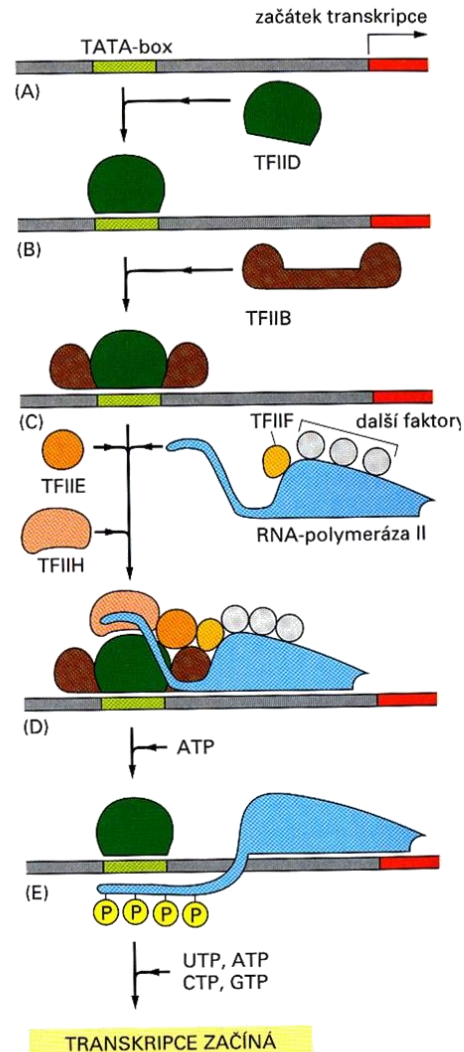
- +1 (startovací nukleotid + Inr-element) - **iniciátor**
 - TATA-box (Hognessův b.) -34 až -26 - **TATA-box**
 - CAAT-box -75 až -80
 - GC-box -90
 - Oktamer ATTTGCAT
- Elementy proti směru transkripce (upstream elements)



Vazebná místa eukaryotického promotoru pro RNA-polymerázu II



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



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

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

Posttranskripční úpravy hnRNA

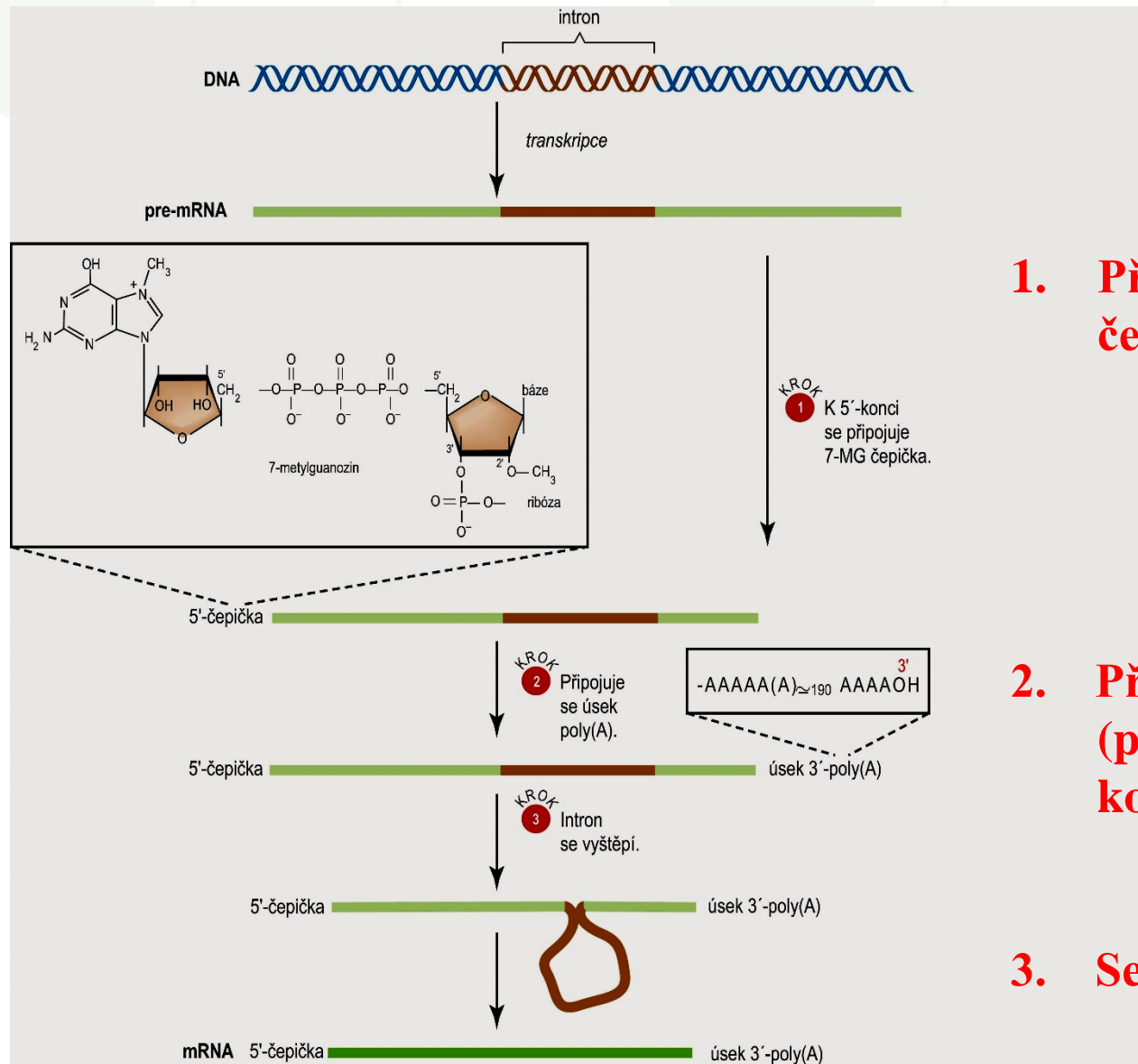
Úpravy konců

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

Úpravy vnitřní sekvence

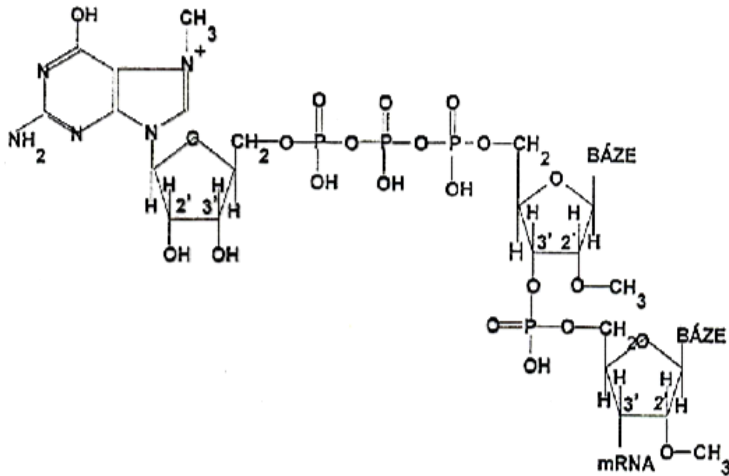
- Metylace
- Sestřih
- Editace (redakční úprava)

Posttranskripční úprava transkriptů strukturních genů eukaryot



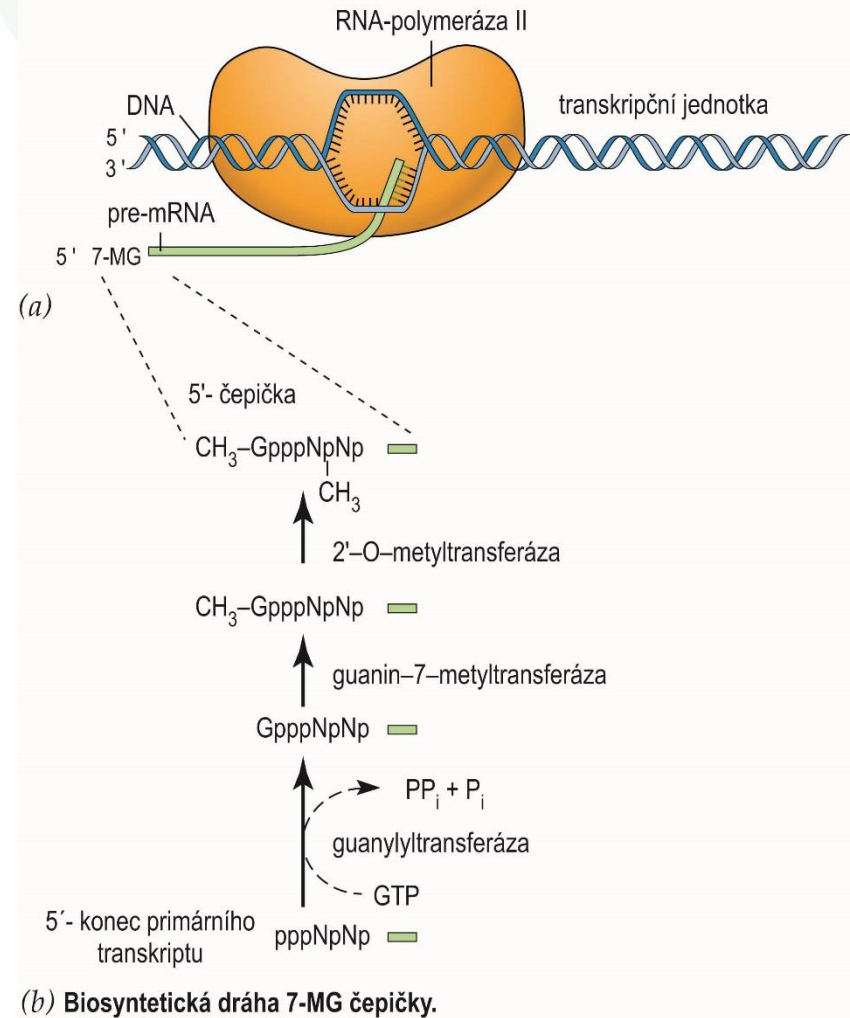
Struktura čepičky

5'-konec

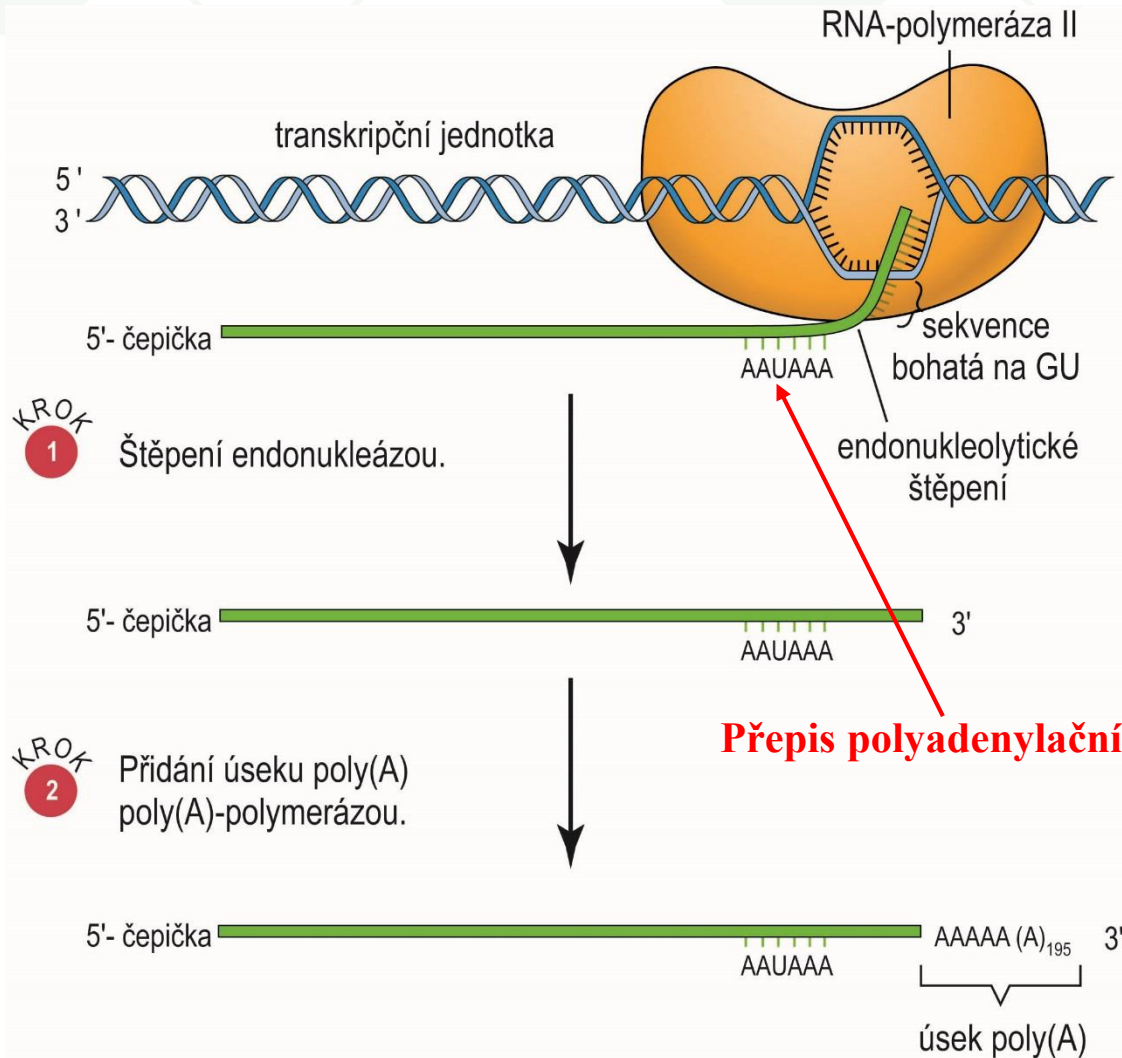


$m^7G^{5'} ppp^{5'} -mRNA$

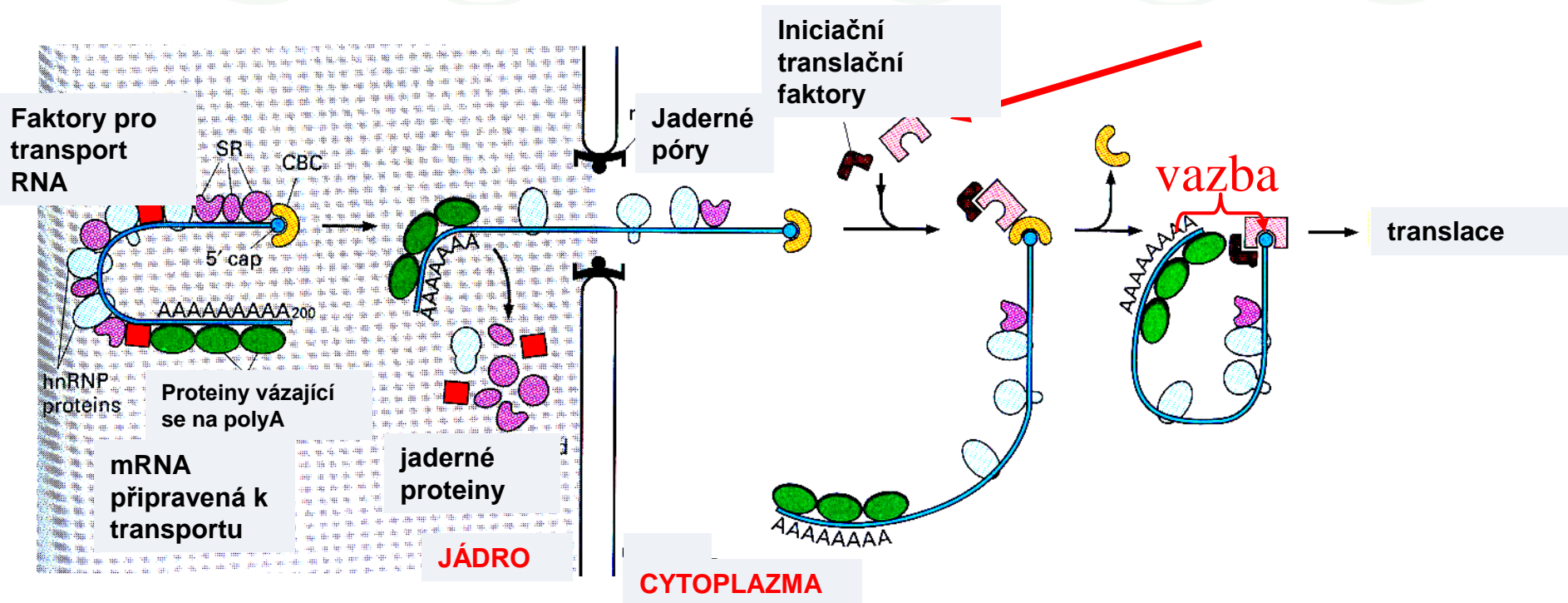
Rané stadium transkripce genu RNA-polymerázou II.



Připojení sekvence poly(A) k 3' konci mRNA



Transport hotové eukaryotické mRNA z jádra do cytoplazmy



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

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

Intron: nekódující sekvence uvnitř genu

Objev:

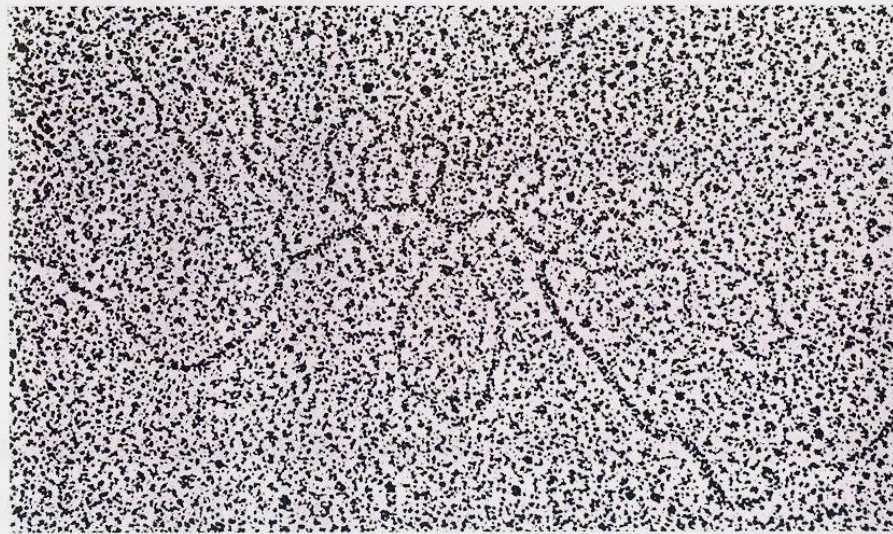
1977: v genu adenovirů

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

Známé typy intronů

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

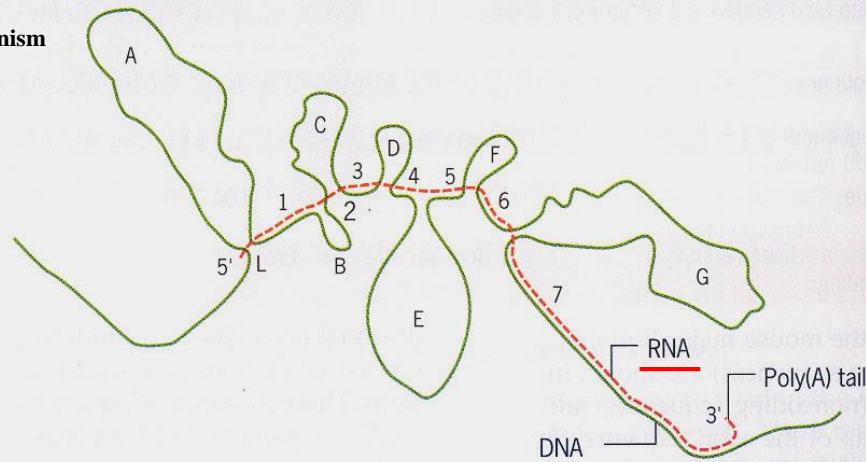
Důkaz přítomnosti intronů v genu pro ovalbumin



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

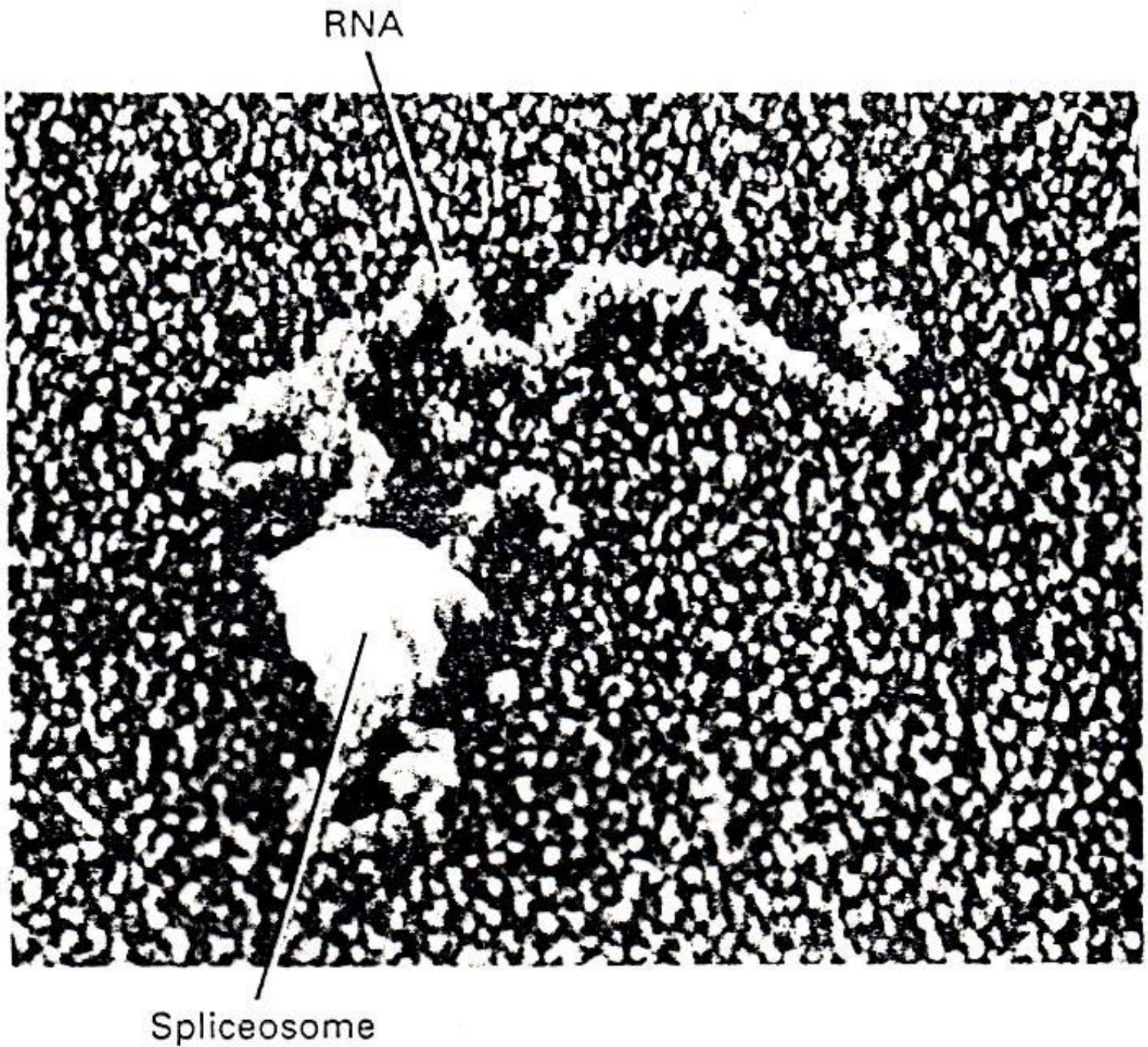
Splicing diversity

[edit] Biochemical mechanism



intron





RNA

Spliceosome

Schéma intronu s vyznačením konzervativních sekvencí

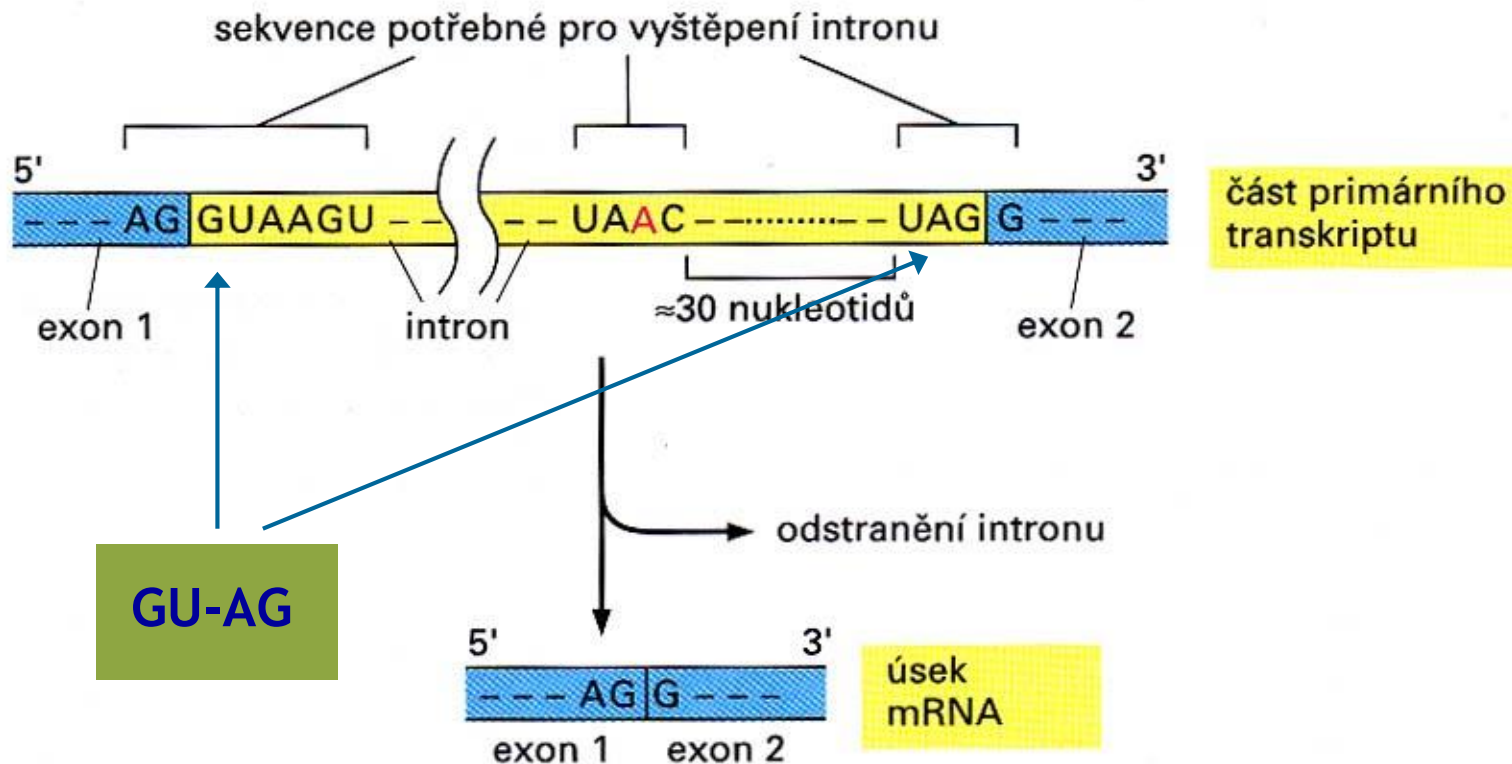
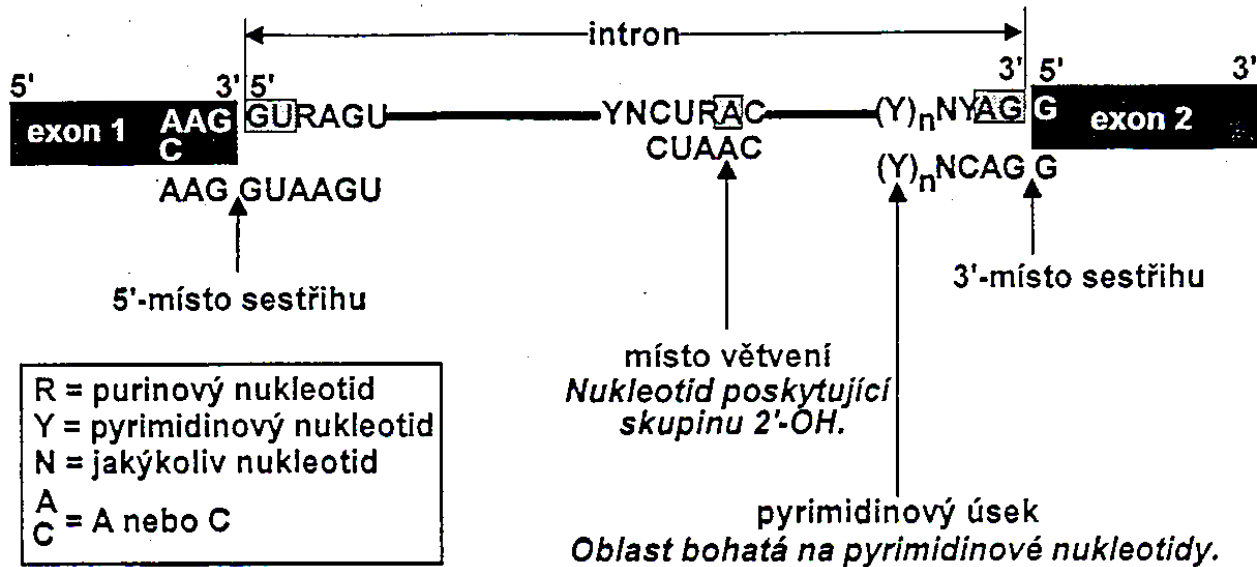
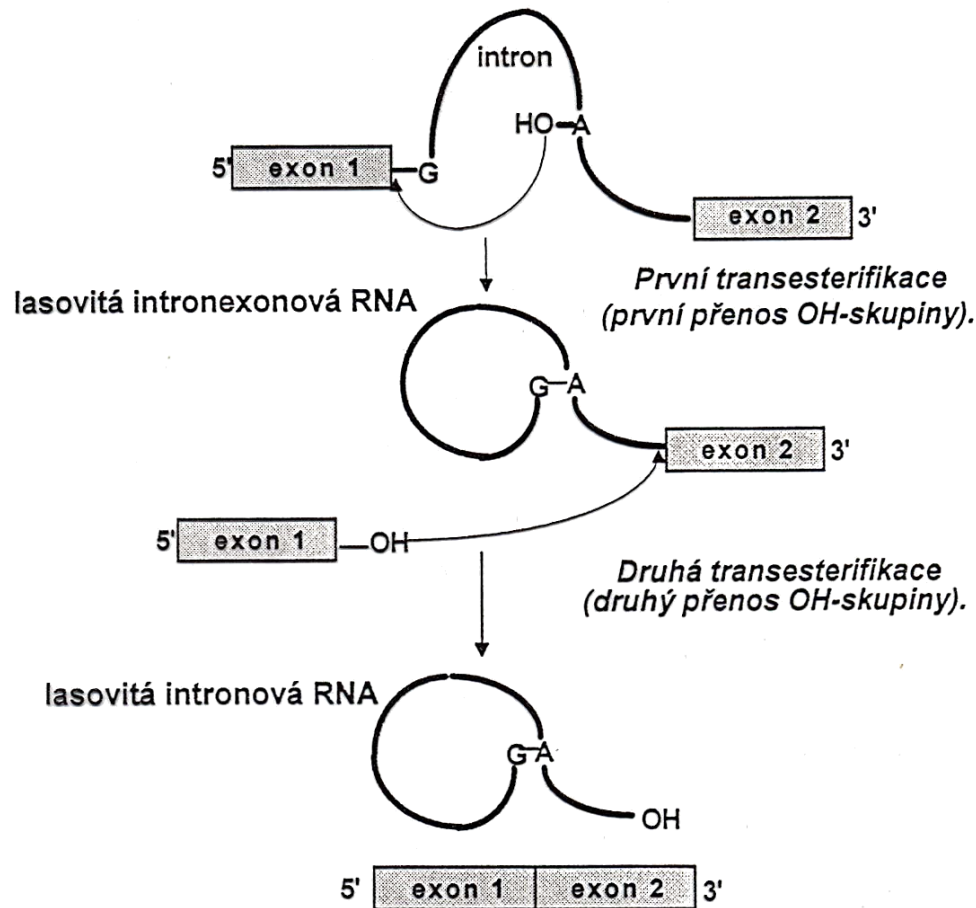


Schéma struktury intronu v hnRNA



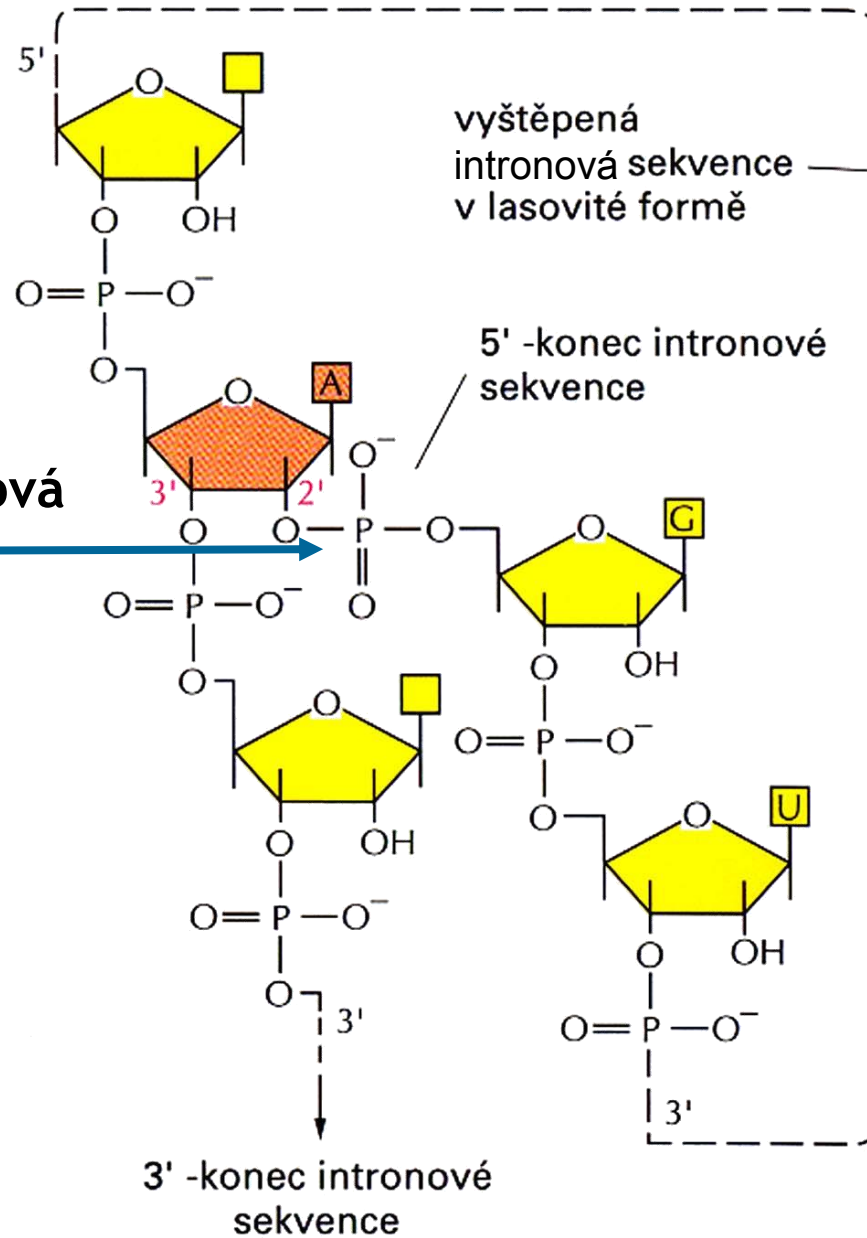
Sekvence a nukleotidy zakreslené do šedého rámečku jsou vysoce konzervativní (četnost 100 %).
 Ostatní sekvence se vyskytují v četnosti 70 - 95 %.
 Sekvence uvedené pod schématem intronu a exonu jsou sekvence, které byly zjištěny u savců.

Schéma transesterifikace při sestřihu hnRNA

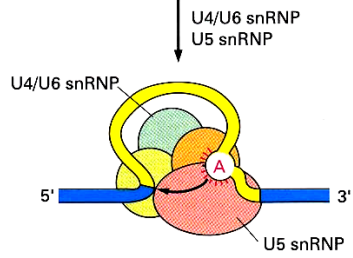
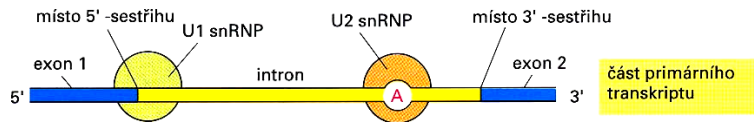


Transesterifikace = přeměna jednoho fosfátového esteru v jiný probíhající přenosem OH-skupiny bez hydrolyzy a za nepřítomnosti ATP n. GTP

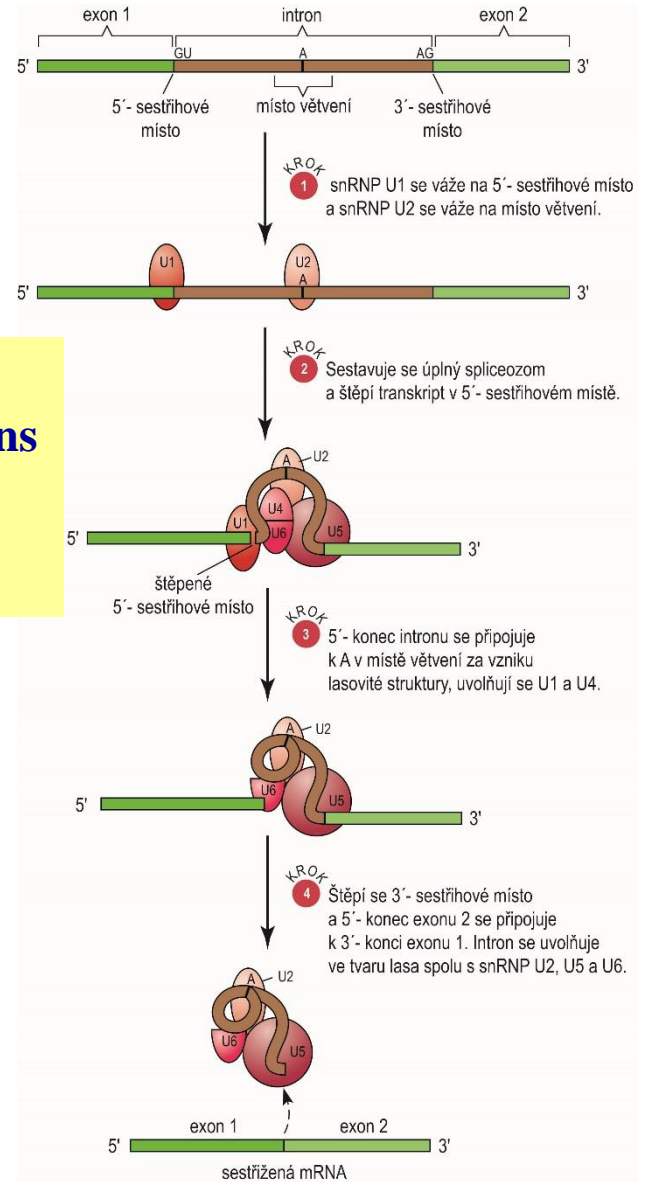
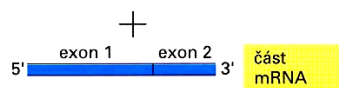
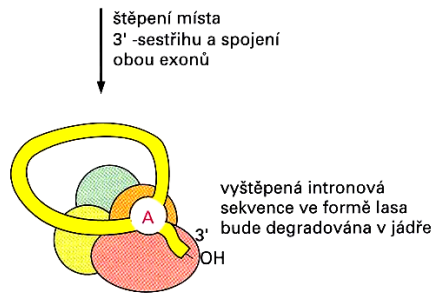
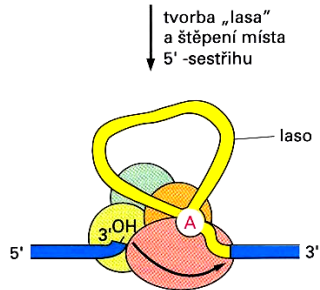
**2',5' - fosfodiesterová
vazba**



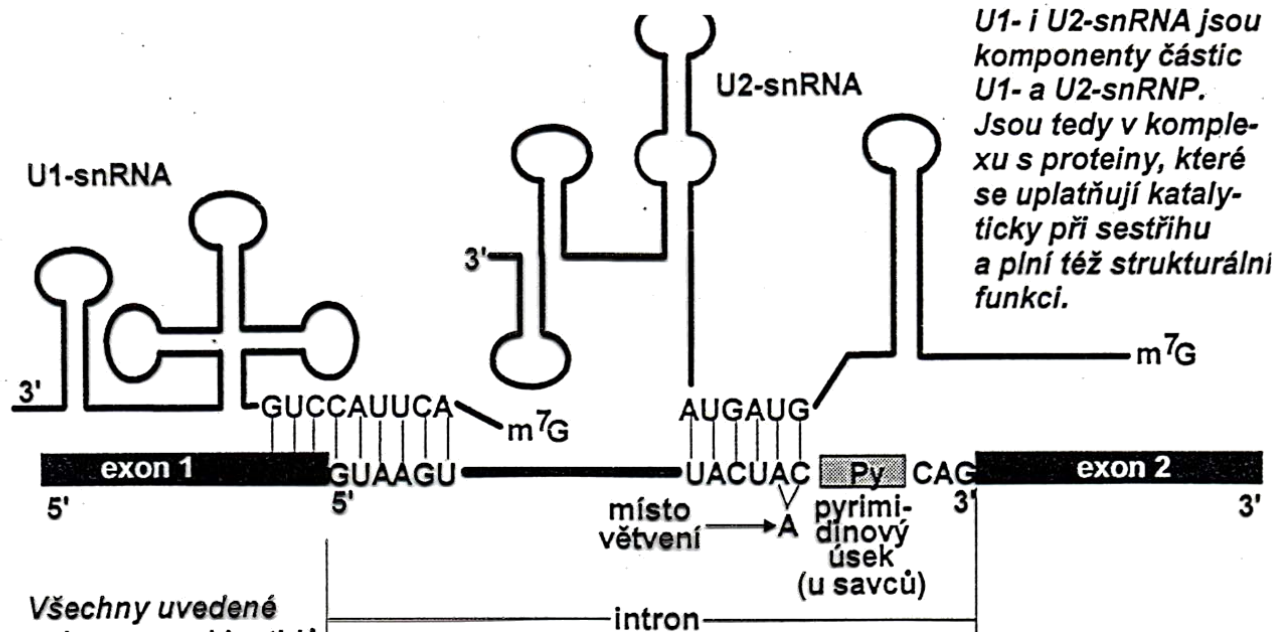
Průběh sestřihu strukturního genu – účast U snRNP



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



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

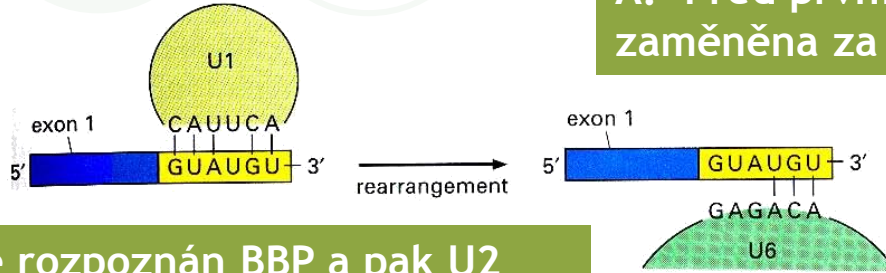


U1- i U2-snRNA jsou komponenty částic U1- a U2-snRNP. Jsou tedy v komplexu s proteiny, které se uplatňují katalyticky při sestřihu a plní též strukturální funkci.

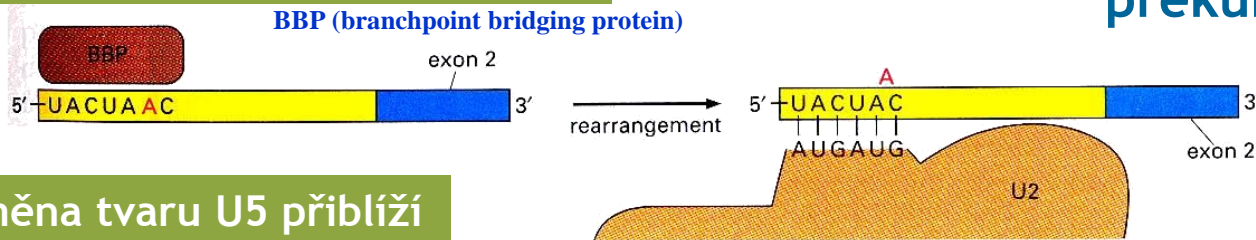
Všechny uvedené sekvence nukleotidů jsou vysoce konzervativní u *S. cerevisiae* a vyskytují se též u jiných organizmů s výjimkou trypanozom, které nemají sekvenci GUGUA v U2-snRNA. *S. cerevisiae* nemá pyrimidinový úsek.

Průběh sestřihu ve spliceosomu během úpravy pre-mRNA

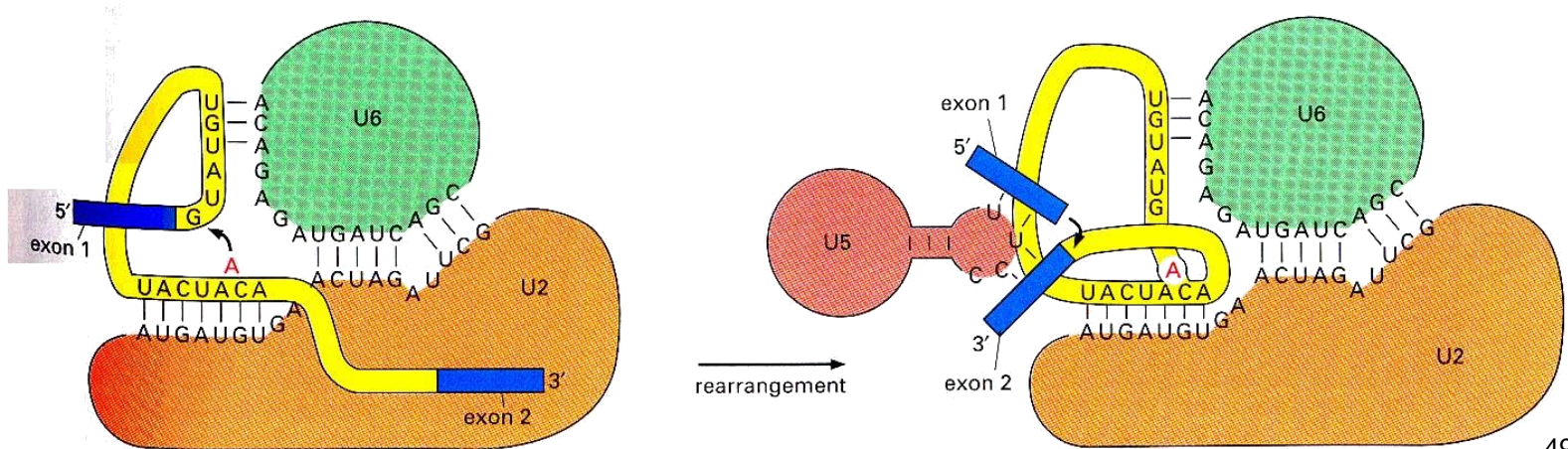
A. Před první transesterifikací je U1 snRNP zaměněna za U6 snRNP



B. A je rozpoznán BBP a pak U2

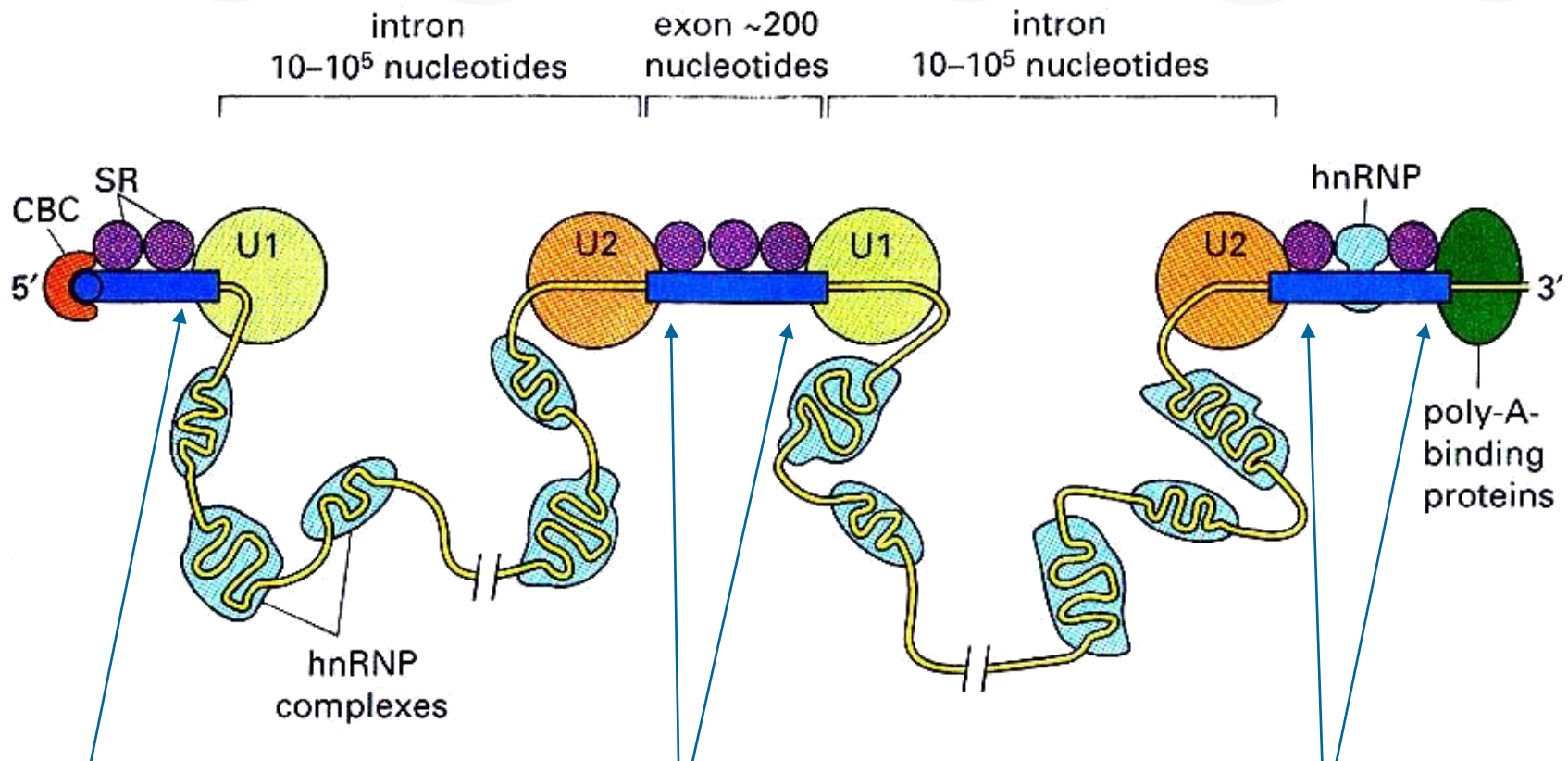


C. Změna tvaru U5 přiblíží konce exonů



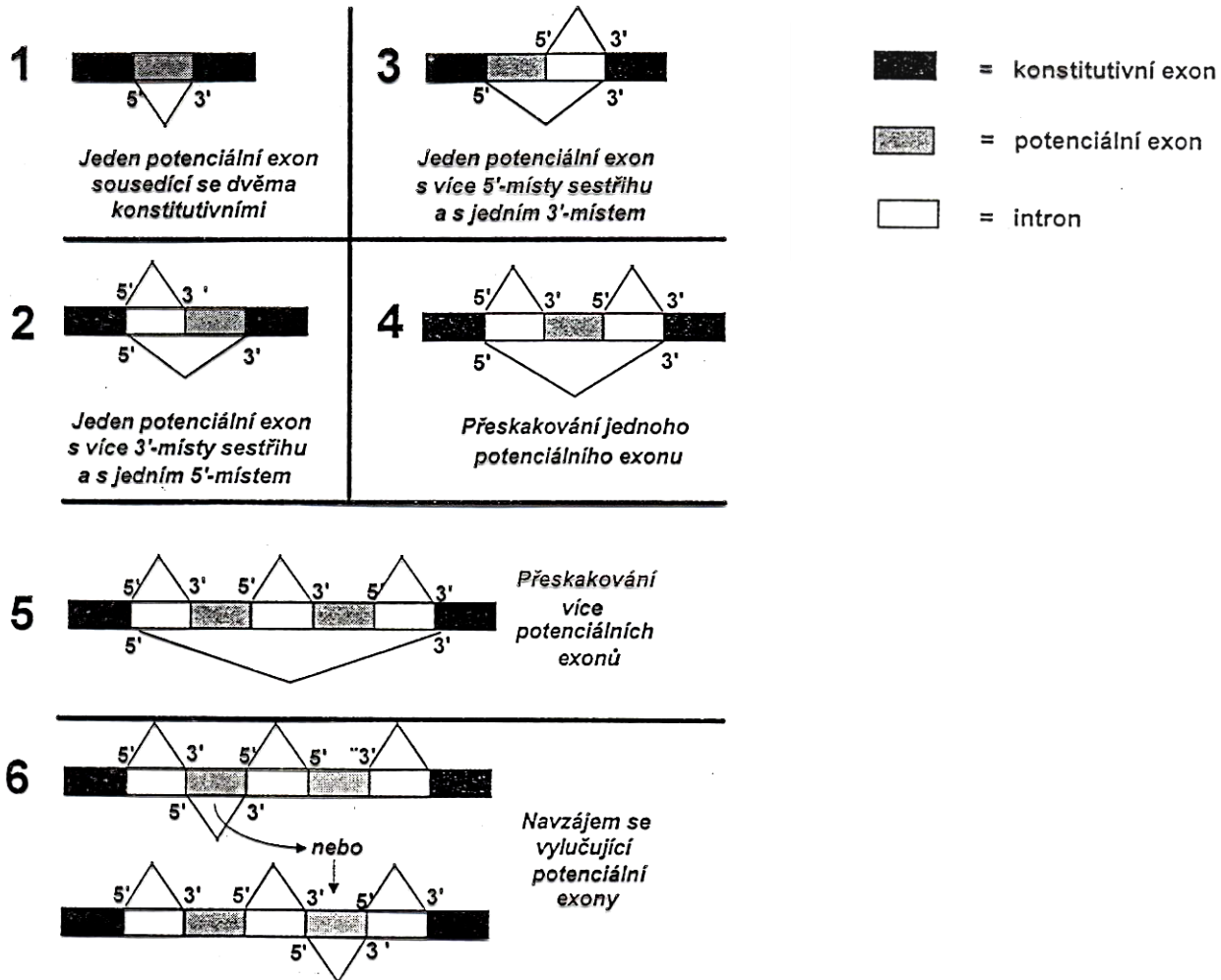
Účast PRP-proteinů (upravujících prekurzorovou RNA)

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



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

Způsoby alternativního sestřihu hnRNA



Příklady alternativního sestřihu molekul hnRNA vzniklých transkripcí překrývajícími se transkripčními jednotkami

Alternativní terminace transkripce

Transkripční jednotky nesoucí gen pro kalcitonin



hnRNA štítné žlázy



mRNA vzniklá naznačeným sestřihem se překládá do primární struktury kalcitoninu v buňkách štítné žlázy.

hnRNA v neuronech



mRNA vzniklá naznačeným sestřihem se v neuronech překládá do primární struktury CGRP (produkt podobný kalcitoninu).

Transkripční jednotky nesoucí gen pro α -amylázu u myši



hnRNA v buňkách slinných žláz



mRNA vzniklá naznačeným sestřihem se překládá do primární struktury alfa - amylázy.

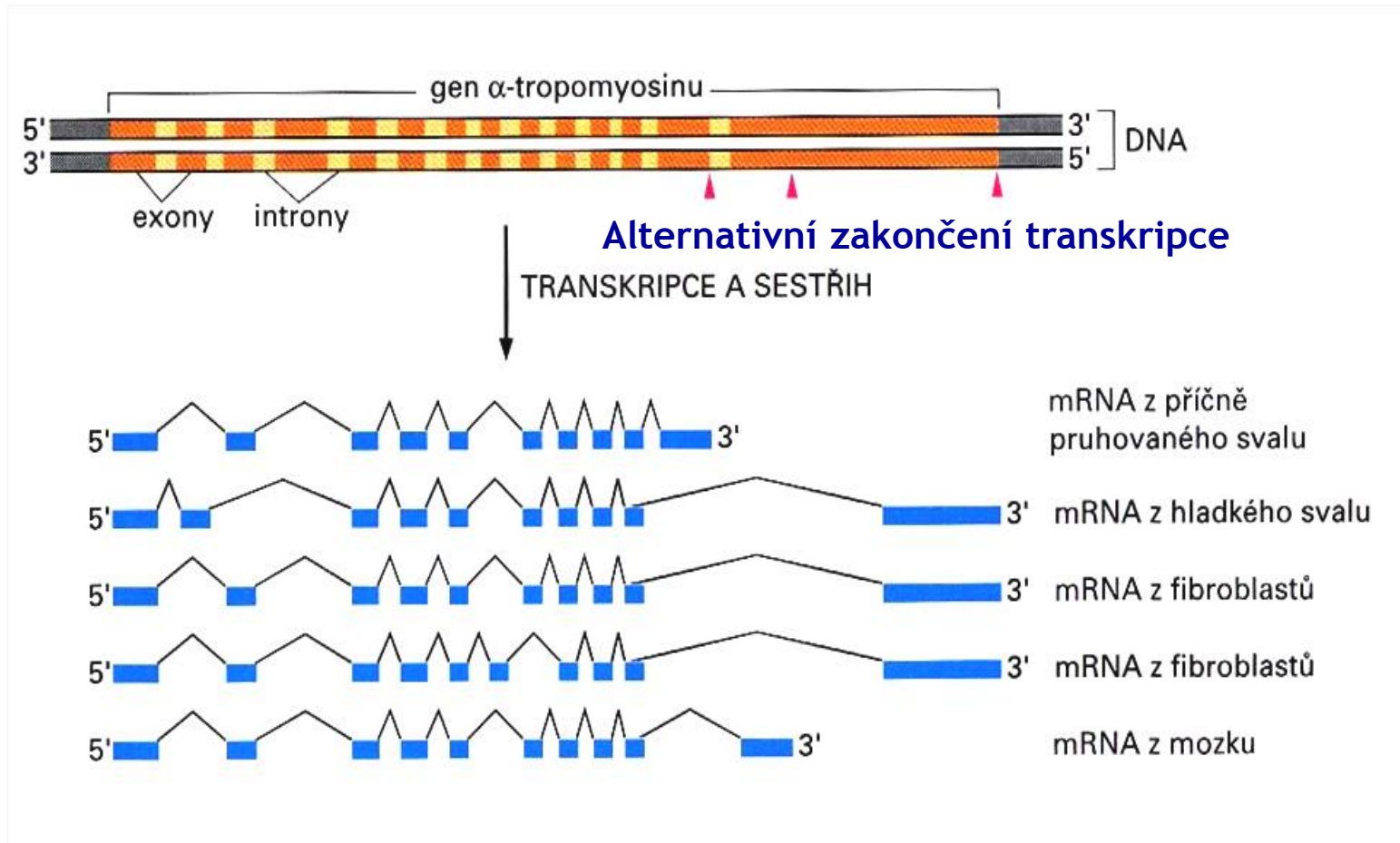
hnRNA v buňkách jater



Alternativní začátek transkripce

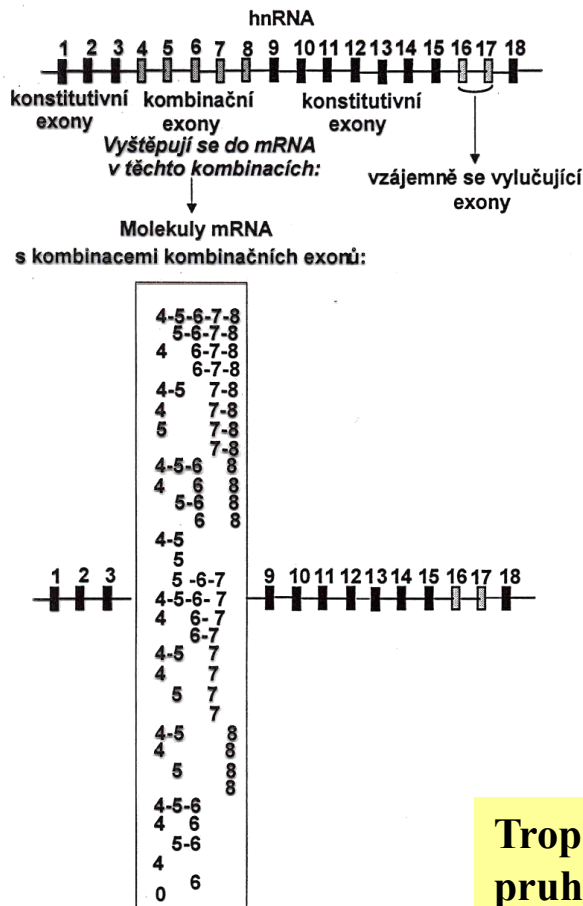
- = potenciální exon,
- = konstitutivní exon,
- +1 = startovací nukleotid,
- T = poly(A).

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



Faktory sestřihu - specifické proteiny aktivní jen v daném typu buňky

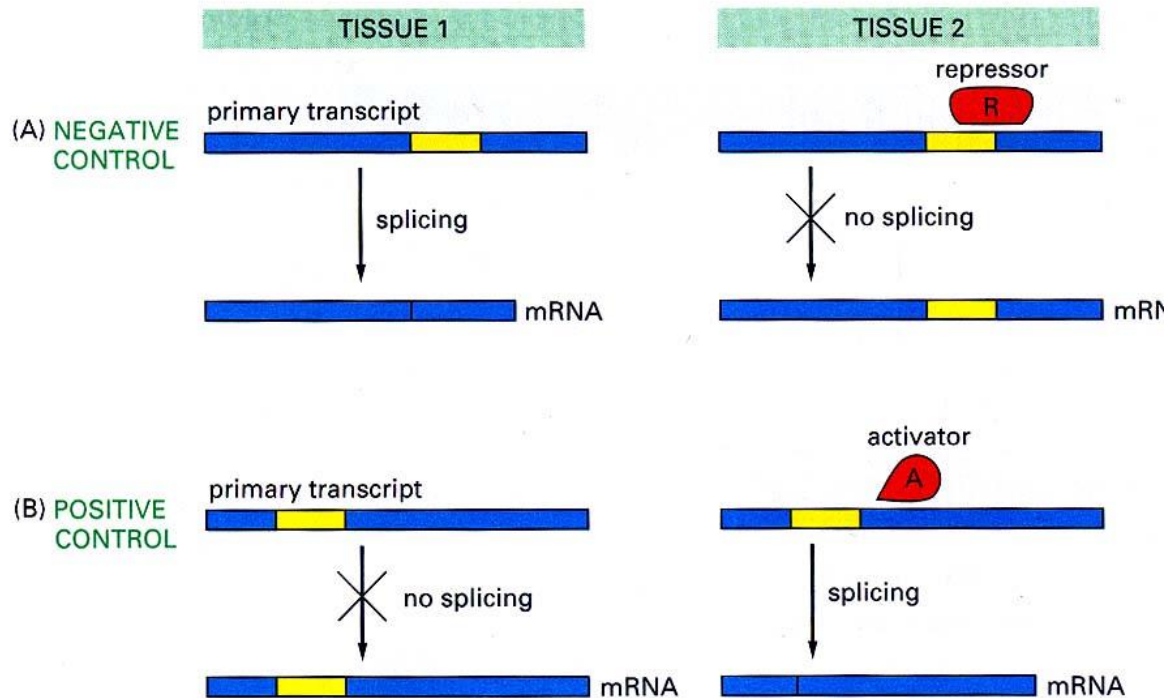
Sestřih kombinačních exonů hnRNA obsahující přepis genu kódujícího troponin T



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

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

Negativní a pozitivní regulace alternativního sestřihu



Represor se váže na RNA a brání v sestřihu

Sestřih probíhá jen po vazbě aktivátoru na RNA

Samosestřih

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

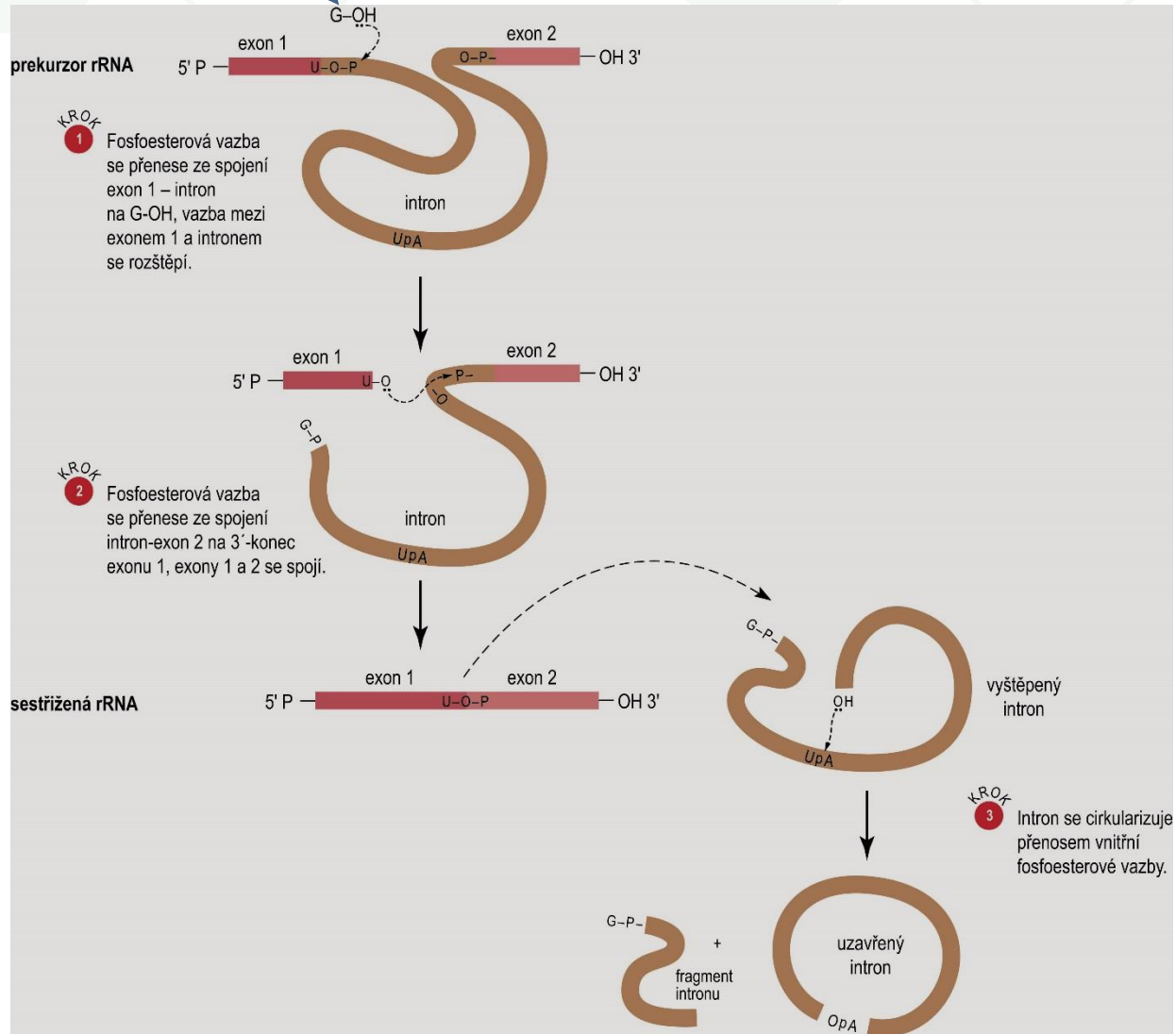
Autokatalytický proces sestřihu nevyžadující proteiny (in vitro)

RNA schopná samosestřihu = ribozym

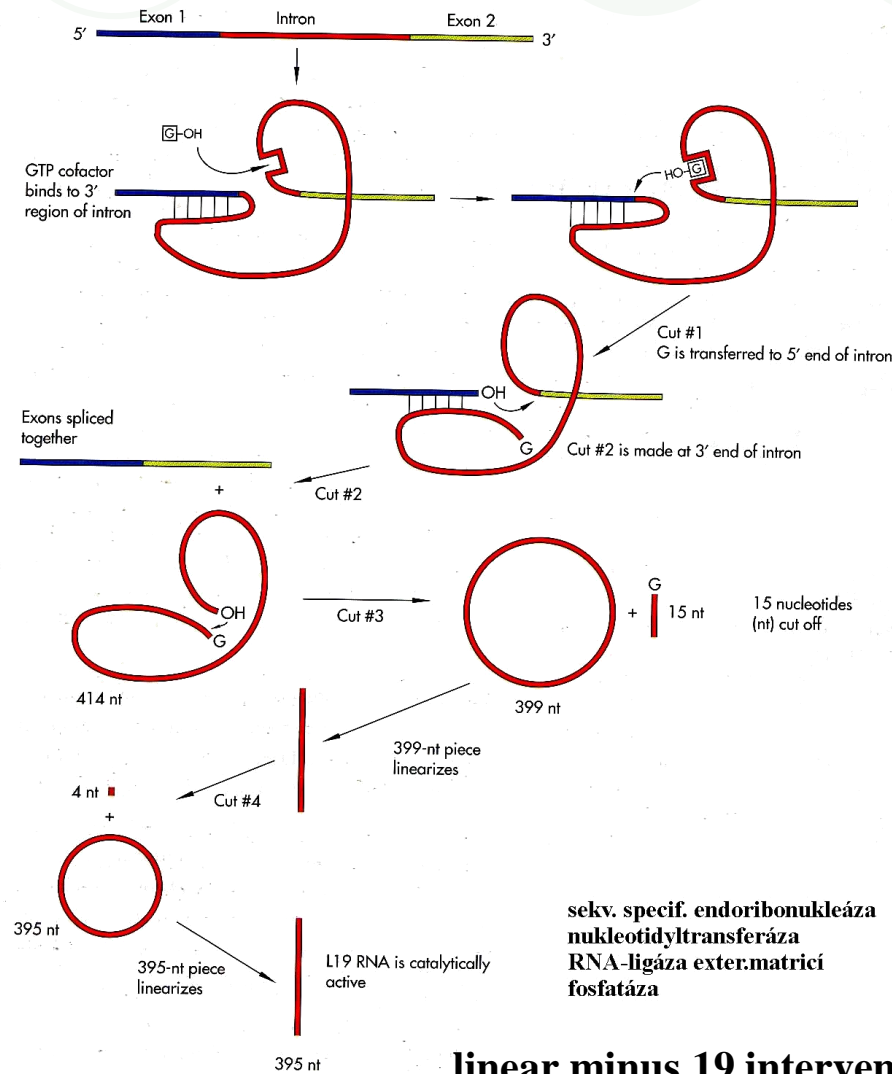
- introny první skupiny v genech přepisovaných do mRNA, tRNA a rRNA (mitochondrie, chloroplasty, nDNA eukaryot, bakteriofágy)
vyžadují externí G, *in vivo* nutná účast proteinů (maturáza)
- introny druhé skupiny v genech mitochondrií hub a v chloroplastech
nevyžadují externí G (ale interní A), *in vivo*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

Mechanismus samosestřihu prekurzoru rRNA

externí G

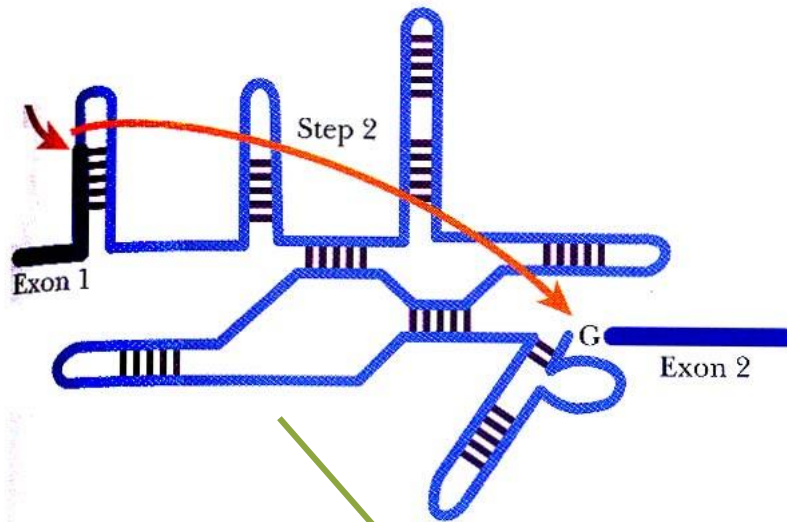


Průběh samosestřihu u intronů první skupiny

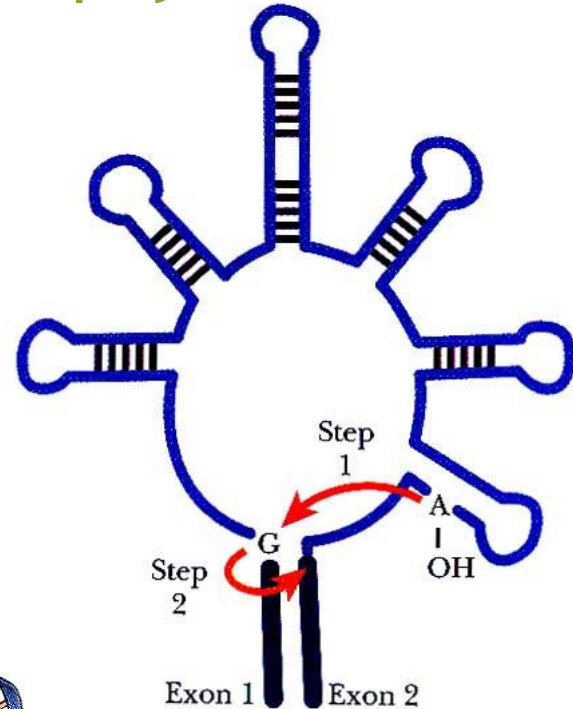


Reakce probíhající při samosestřihu intronů I a II

Introny skupiny I

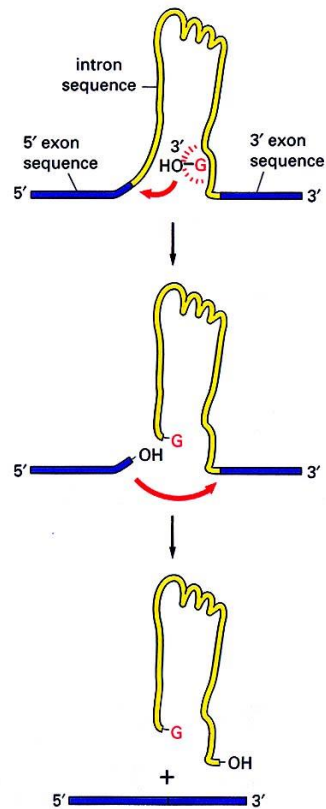


Introny skupiny II

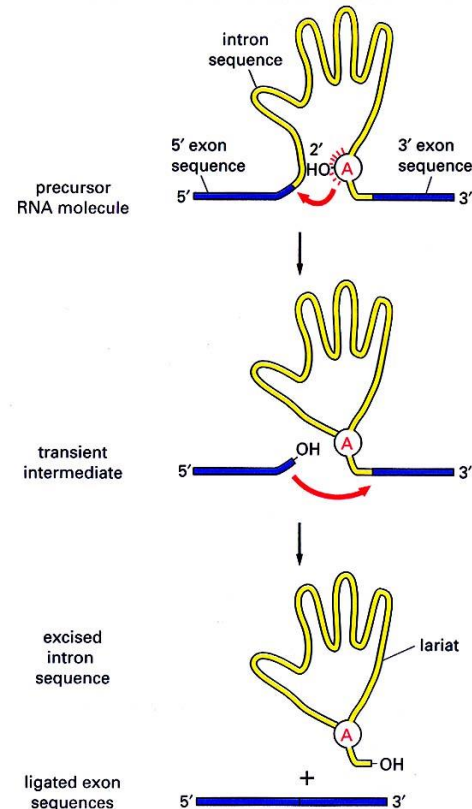


Srovnání samosestřihu intronů skupiny I a II

Skupina I



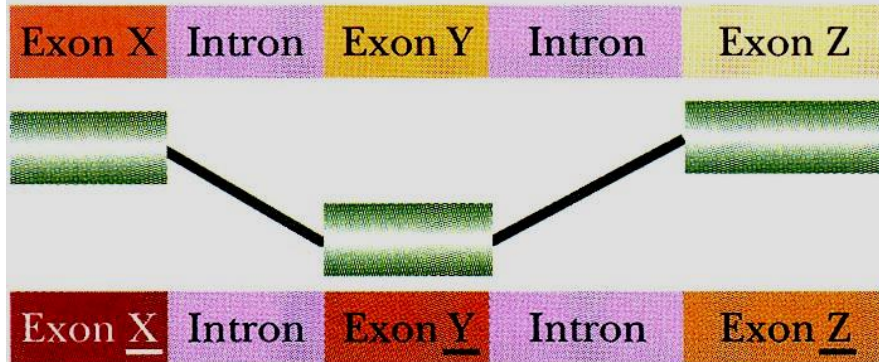
Skupina II



Bimolekulární sestřih (trans-splicing) mRNA u trypanozom

Primární transkript genu 1

způsob sestřihu



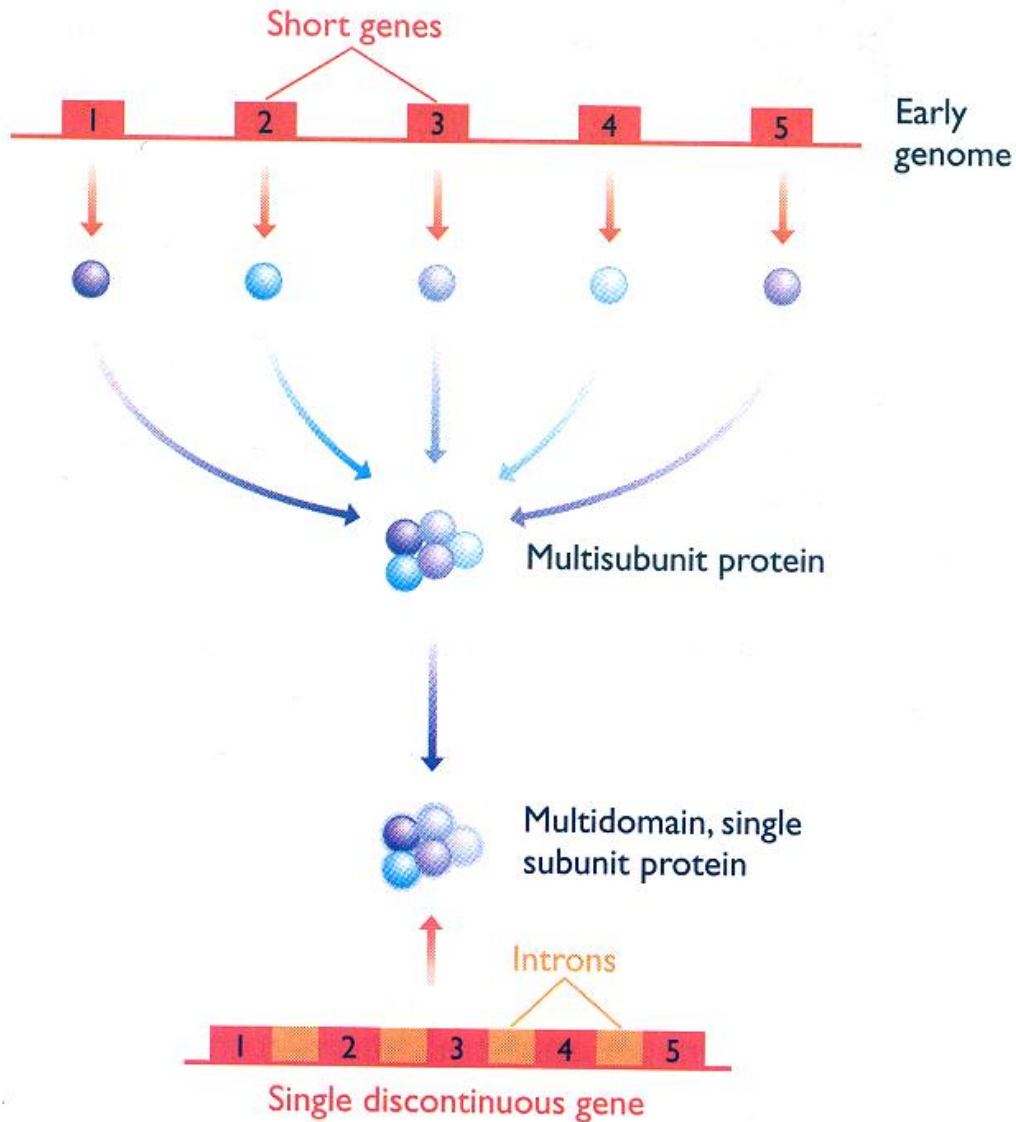
U prvoků – změny antigenních determinant

Další příklady: nematoda, chloroplasty

Twintron = intron uvnitř jiného intronu

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

Původ intronů. „Exon theory of genes“



Biologický význam intronů

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

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

Editace RNA

Editace RNA je jedna z posttranskripčních úprav, která byla zjištěna

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

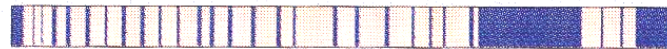
Editace RNA u různých organismů

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

Substituční způsob editace hnRNA genu pro apolipoprotein

The sequence of the apo-B gene is the same in intestine and liver, but the sequence of the mRNA is modified by a base change that creates a termination codon in intestine.

Apolipoprotein B gene has 29 exons



Codon 2153 codes for glutamine

CAA



CAA



Gln



Spliced mRNA in liver codes for protein of 4563 residues

cytidindeamináza

Editing



UAA

STOP



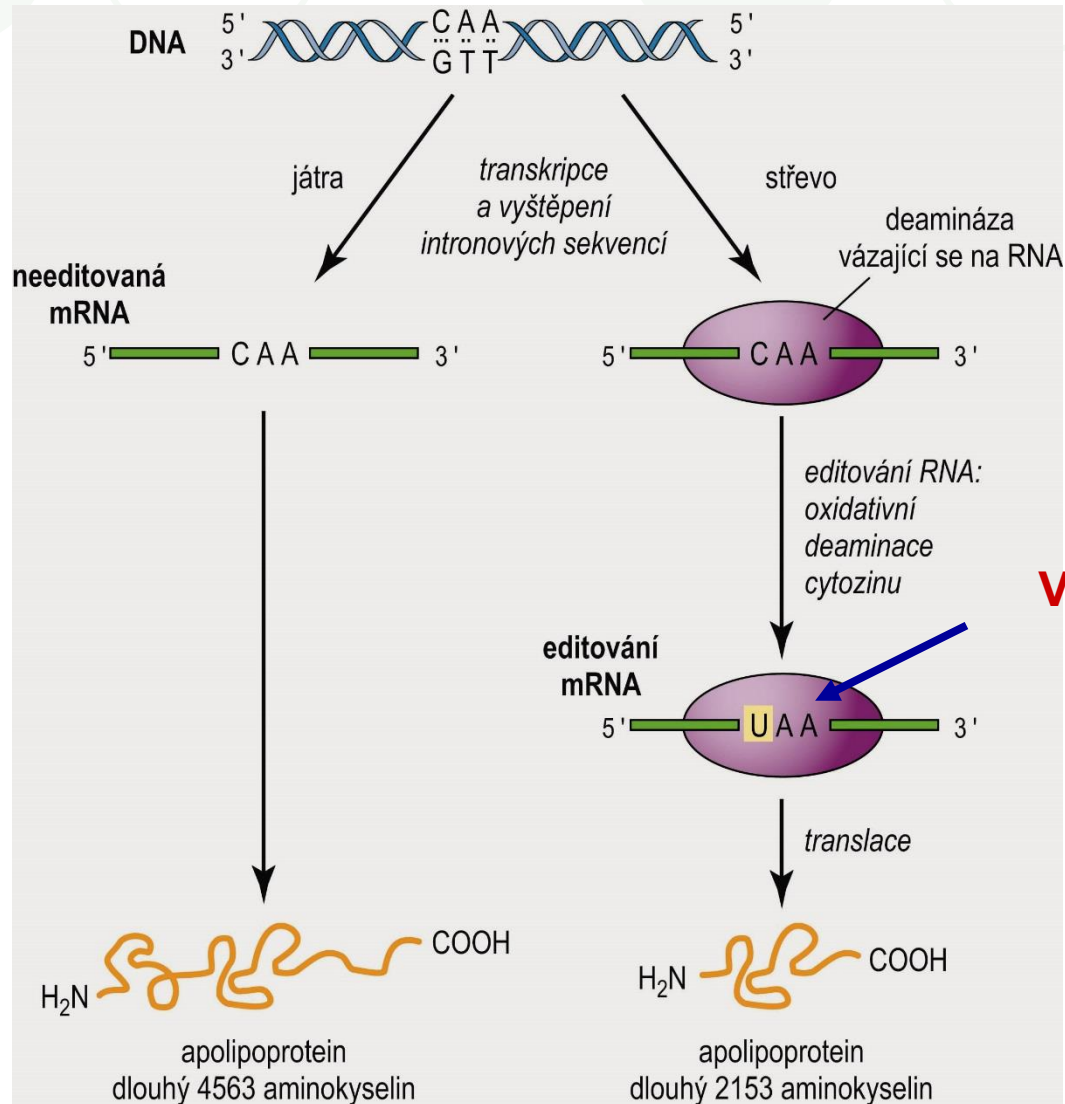
Intestine mRNA has UAA codon that terminates synthesis at 2153

C je deaminován na U

změna funkce produktu
ztrátou C-domény u
kratšího proteinu

Uvolňování
cholesterolu

Editace mRNA genu pro apolipoprotein B ve střevě savců



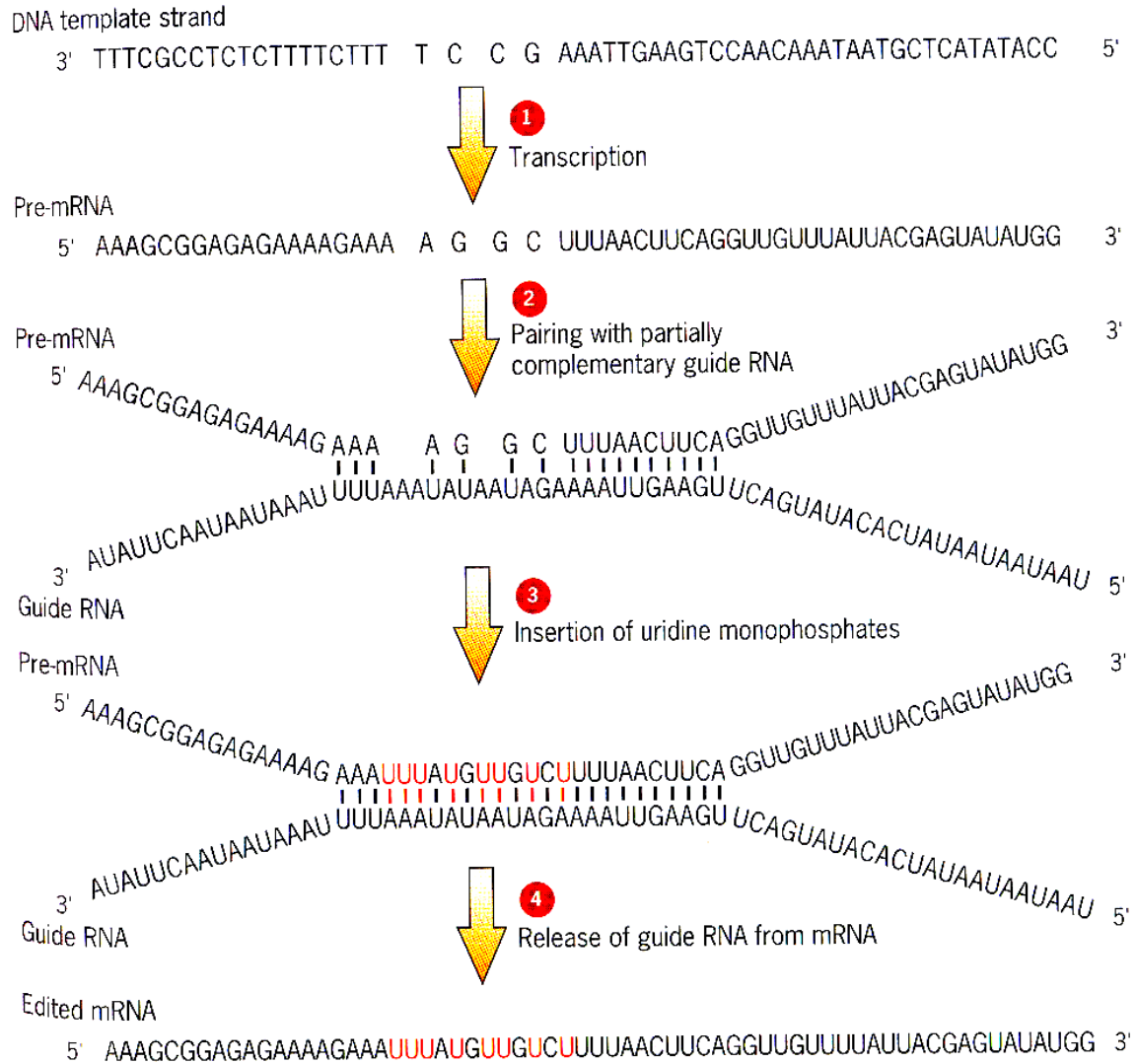
Vzniká STOP kodon

Příklady editace (redakčních úprav) mRNA - adice U a delece T (přítomen v DNA)

UUAUGUUUUUGUUGUUUAUUA UGUGAUUAUGGUUUUUGUUUUUUUAUU GGUAUUUUUUUAGAUUUUA
UUU AAUUUG UUGAUAAAUACA UUUUAUUUGUUUGUUAA UUUUUUUUGUUUUUGUUUUUUGGUU
UAGGUUUUUUUUGUUGUUG UUUUGUAUUAUGAUUGAGUUUGUUUGUUUGGUUUUUUUGUUUU
UUGUGAAACCAGUUAUGAGAGUUUGCAUUGUUA UUUUAUACA UUAAGUUGGUGUUUUUUGGUUC

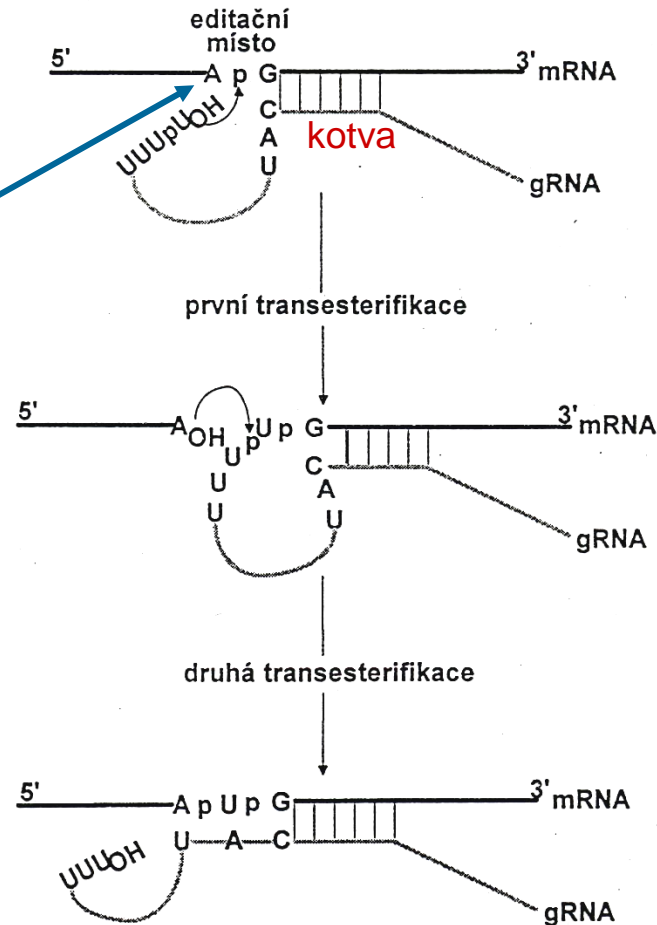
Part of the mRNA
sequence of *T. brucei*
coxIII shows many
uridines that are not
coded in the DNA (shown
in green) or that are
removed from the RNA
(shown as T).

Editace pre-mRNA genu cytochromu b u *Leishmania*



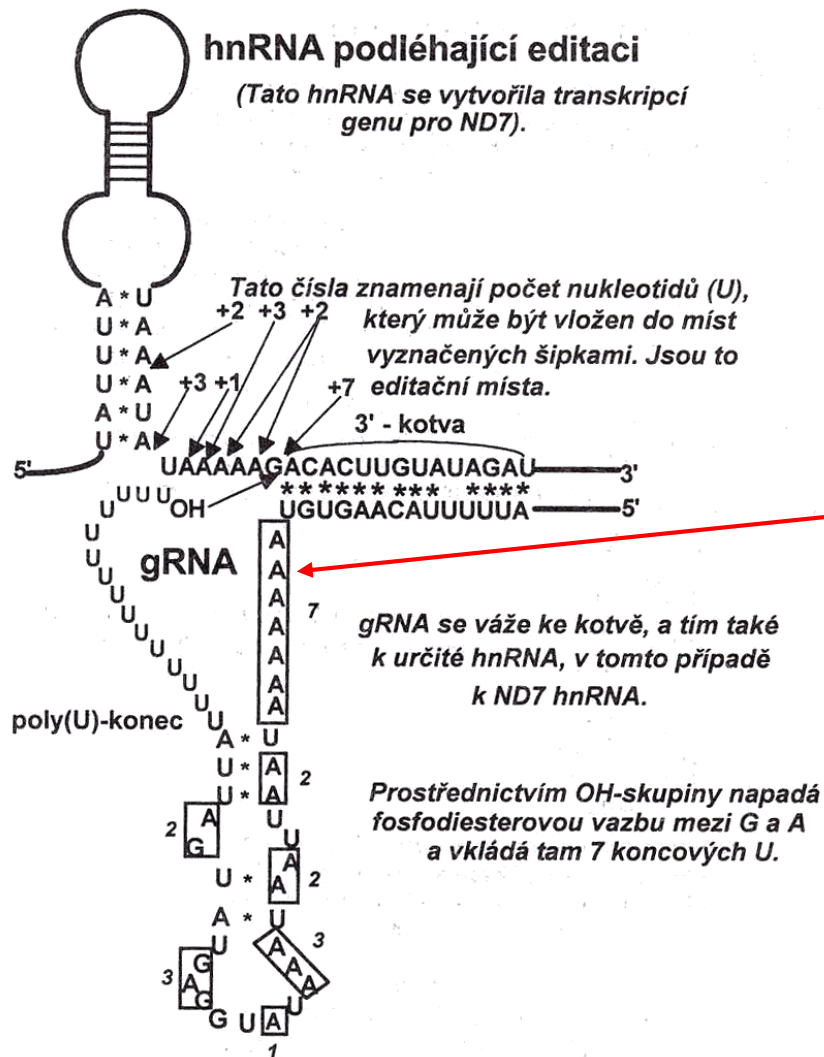
Vysvětlení editace na základě transesterifikačních reakcí

Nukleofilní atak fosfodiesterové vazby 3' OH skupinou



řídící RNA
(guide)

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



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

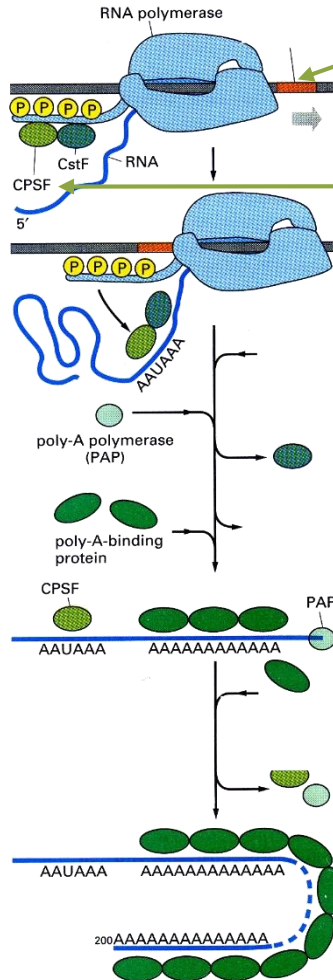
Hvězdičkami jsou vyjádřeny vodíkové vazby.



Proč probíhá editace?

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

Proces vytváření polyA konce na mRNA



Signály na DNA pro uvolnění mRNA a připojení polyA konce

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

Připojení dalších faktorů, uvolnění mRNA

Připojení dalších proteinů vázajících se na polyA

Hotový 3' - konec mRNA

Signály ovlivňující transkripci a translaci strukturního genu (bakterie *E. coli*)

