

# Molekulární biologie

## 4. Transkripce

*Transkripce (přepis) genetické informace z DNA do RNA*

### Osnova

1. Transkripce (prokaryotického) bakteriálního genomu
2. Transkripce eukaryotického genomu
3. Posttranskripční úpravy RNA a mechanismy sestřihu

### **Hlavní zdroje:**

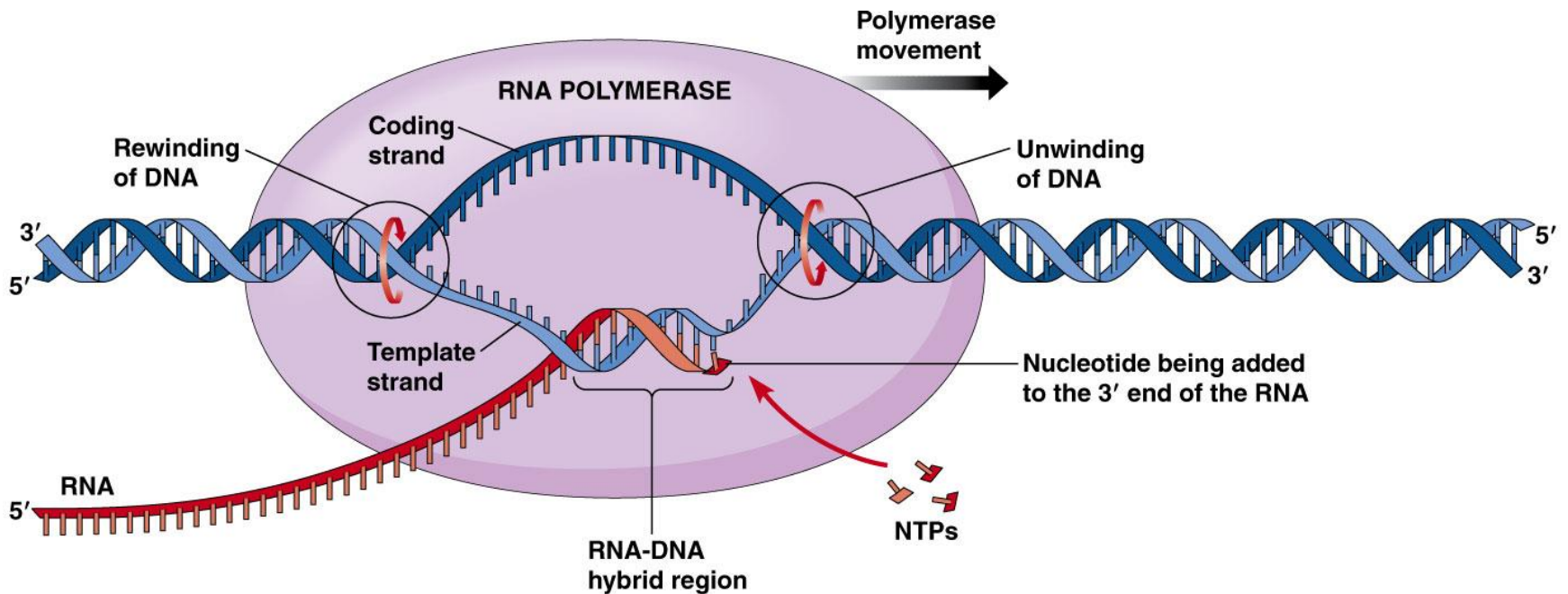
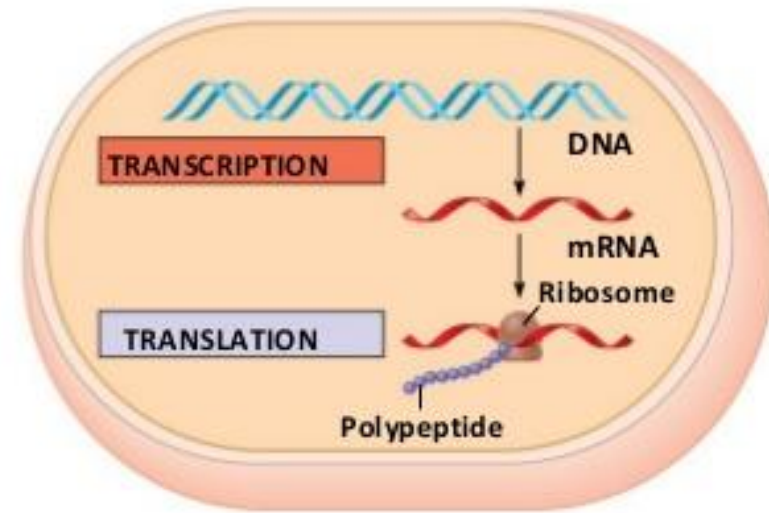
*S. Rosypal, Úvod do molekulární biologie 1-4  
Masarykova Universita Brno  
ISBN 80-902562*

*B. Staveley, Principles of Cell Biology  
Memorial University of Newfoundland  
<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CBhome.html>*

*M. Muller, Biology of Cells and Organisms  
University of Illinois, Chicago  
<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/summer2010/lecturesm10.htm>*

# Transkripce

Informace z DNA se nepřekládá do proteinu přímo, ale přes prostředníka - **mRNA** (messenger; mediátorová)



# Část první: Bakteriální transkripce

Transkripce (přepis) genetické informace z DNA (chromozomové a plazmidové) do RNA pomocí enzymu RNA-polymerázy

## RNA-polymeráza (transkriptáza)

- váže se na **promotor**
- katalyzuje syntézu dlouhých primárních transkriptů
- u bakterií stejná RNA-polymeráza pro všechny typy RNA

## Primární transkripty:

Většinou obsahují přepisy více genů (polygenní/polycistronní).

Na DNA: promotor - geny - terminátor

### 3 hlavní skupiny RNA

#### 1. mRNA (mediátorová)

matrice pro syntézu polypeptidů. U bakterií nepodléhá posttranskripčnímu sestřihu

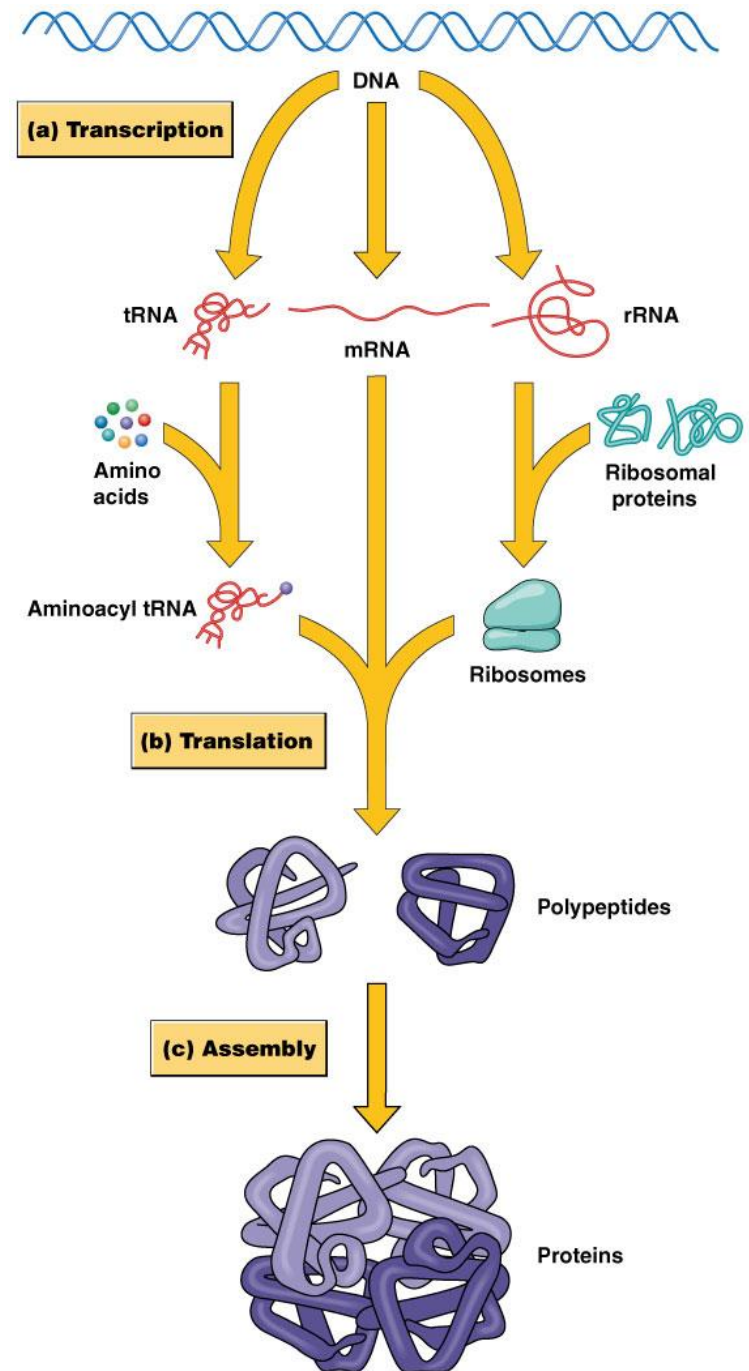
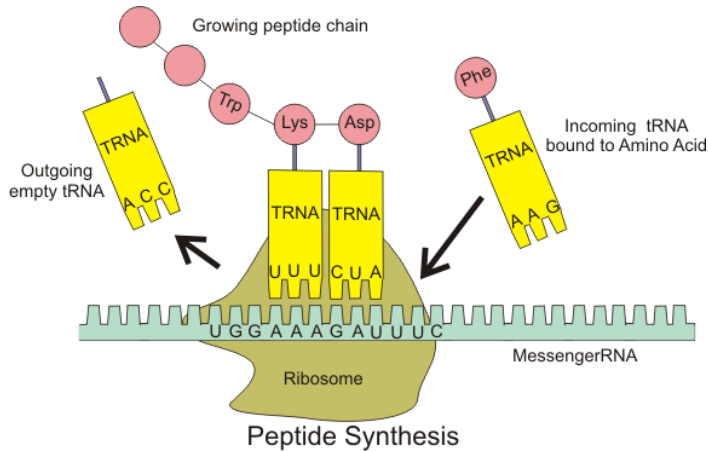
#### 2. rRNA (ribozomová)

posttranskripčně upravována z pre-rRNA

#### 3. tRNA (transferová)

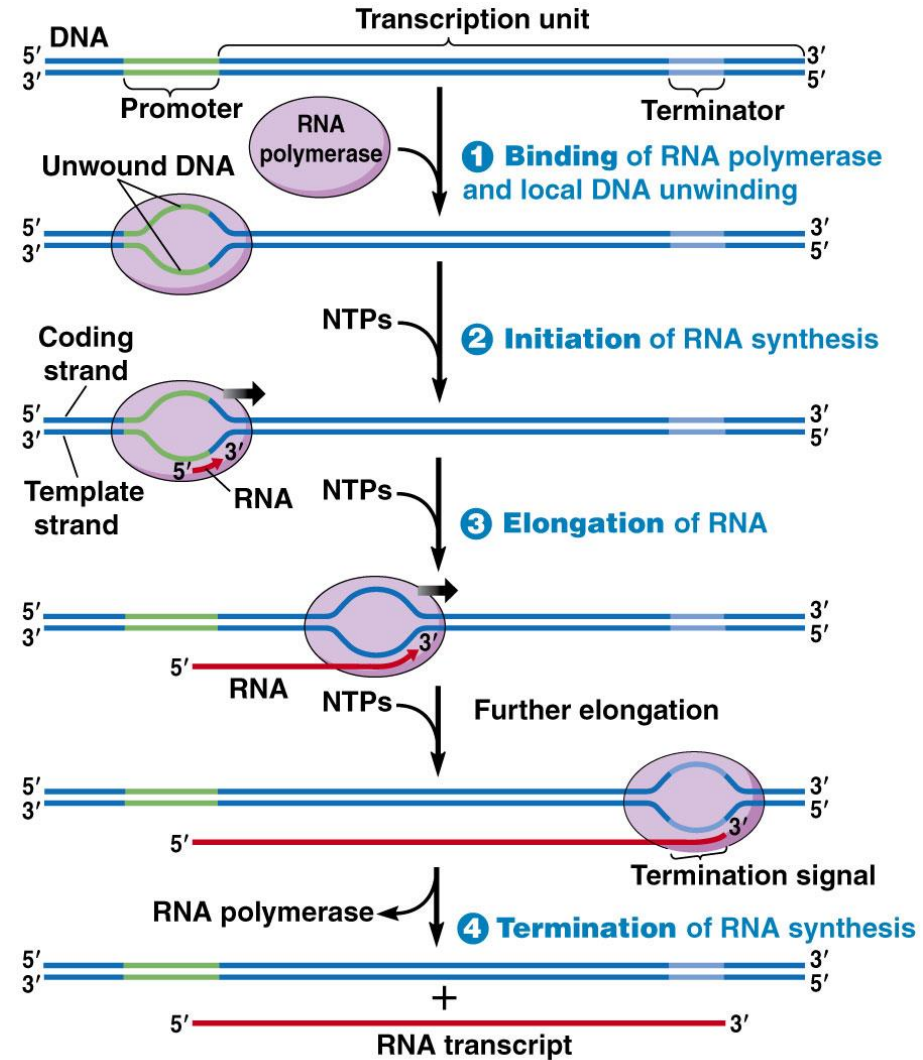
posttranskripčně upravována z pre-tRNA

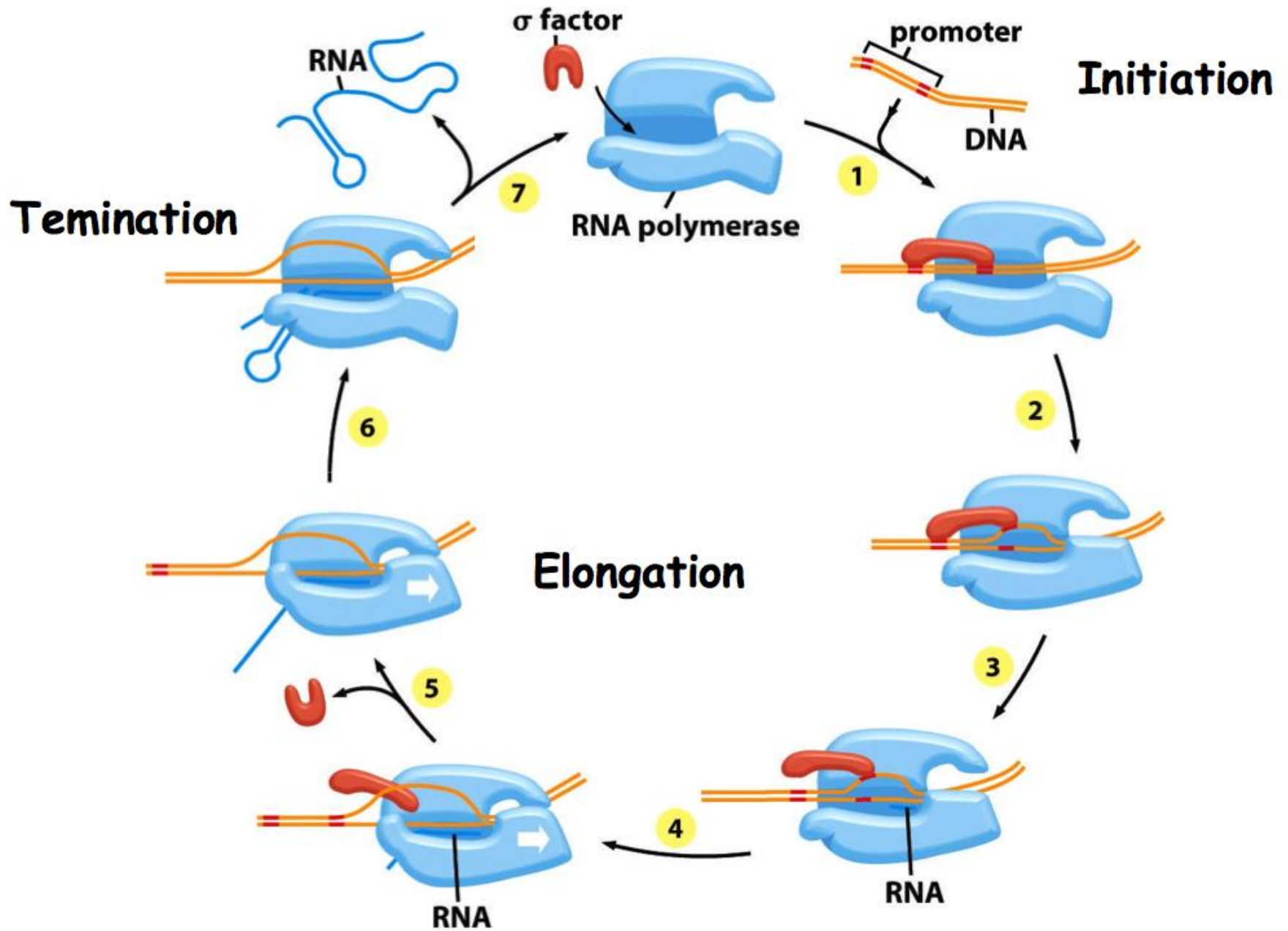
Váže se na ni aminokyselina, obsahuje antikodon



# Fáze transkripce

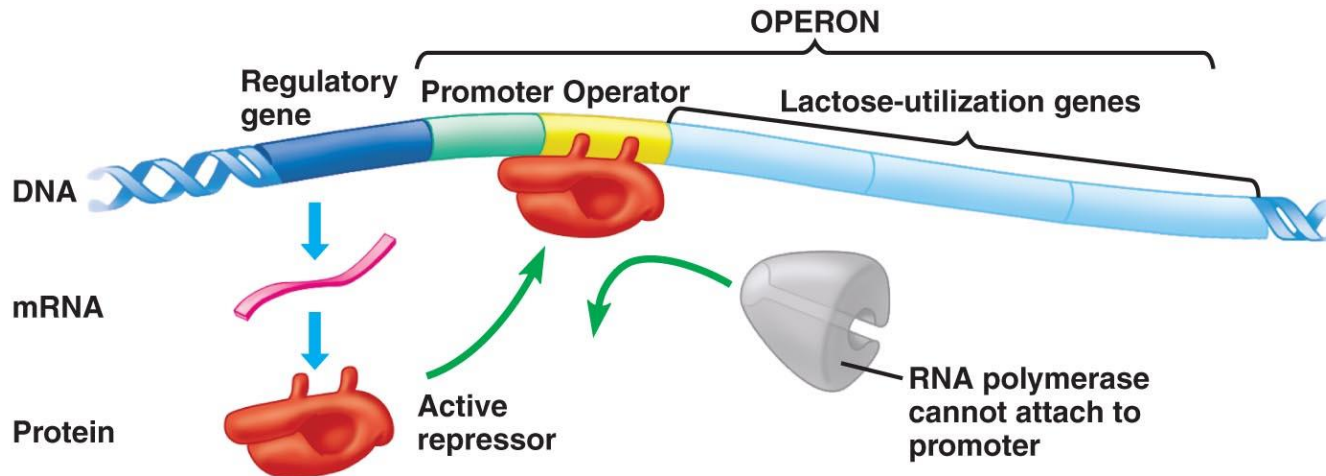
- 1. Iniclace:** Navázání RNA-polymerázy na promotor a zahájení syntézy
- 2. Elongace:** Připojování nukleozid-5'-monofosfátu k 3'-konci RNA řetězce podle matricového řetězce
- 3. Terminace:** Zastavení elongace na terminátoru a uvolnění z matricového řetězce





## Operon:

- Transkripční jednotka, která je spolu s promotorem řízena také operátorem
- Mezi promotorem a startovacím nukleotidem se nachází regulační oblast - OPERÁTOR.
- Na operátor se může vázat regulační protein - REPRESOR. Ten zastavuje transkripci



**Operon turned off (lactose absent)**

Copyright © 2009 Pearson Education, Inc.

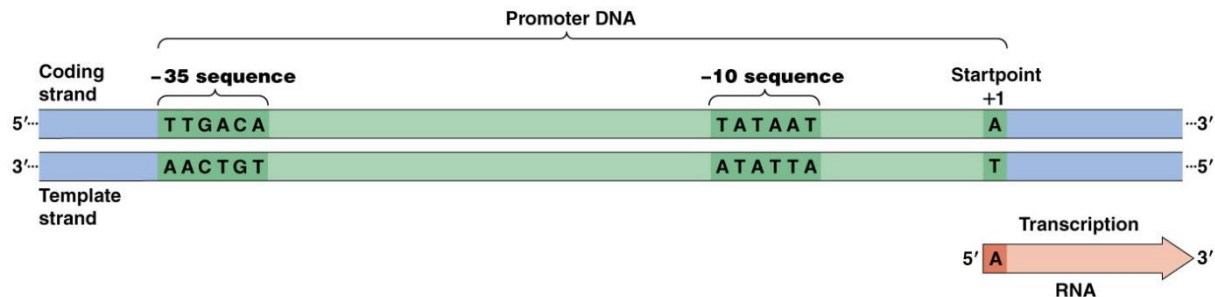
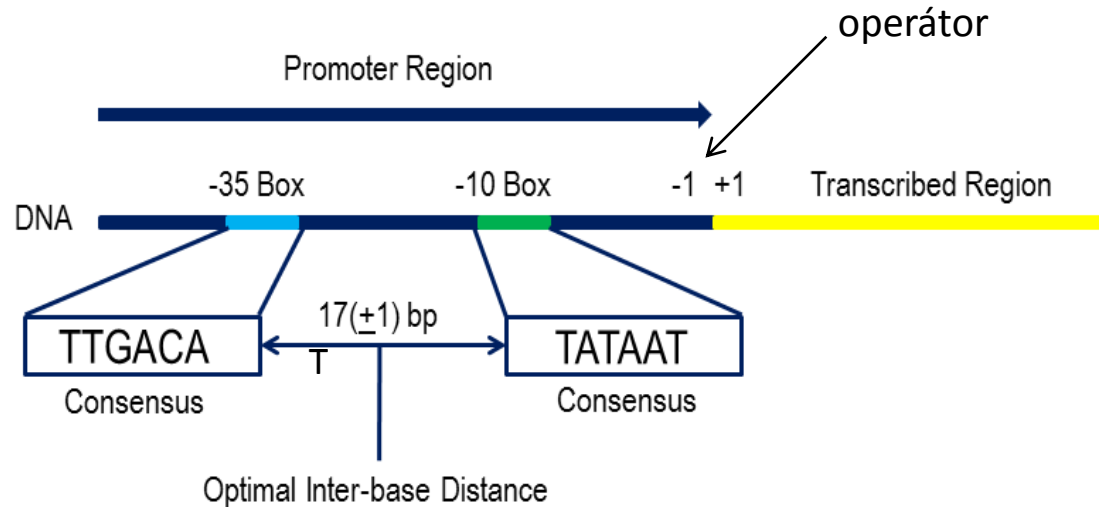
*Operon: transkripční jednotka řízená promotorem a operátorem  
Operátor: regulační oblast na DNA, na níž se může vázat represor  
Transkripční jednotka: oblast na DNA, která se přepisuje do mRNA*

## Promotor:

Sekvence na DNA před transkripční jednotkou, nasedá na něj RNA-polymeráza

- Podobné u všech transkripčních jednotek, ale ne totožné. Liší se mírou afinity k RNA-polymeráze.
- Silný/slabý promotor - vysoká/nízká frekvence iniciace transkripce
- Silnější promotor se více blíží konvenční sekvenci v místech:

- a) kolem nukleotidu -35: 5' TTGACAT 3'
- b) Pribnowův box\* (-10): 5' TATAAT 3'

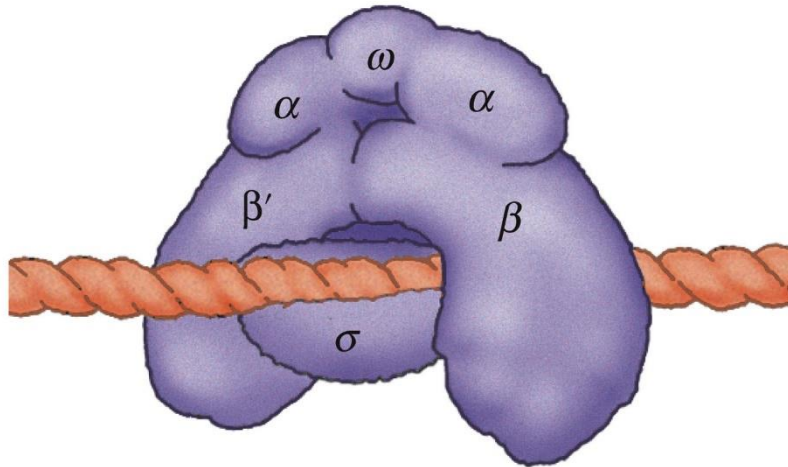


\*Podobný TATA boxu u eukaryot



## Bakteriální RNA-polymeráza

- Rozeznává promotory všech transkripčních jednotek
- Složena z podjednotek (holoenzym):
  - 2  $\alpha$ : udržují stabilitu molekuly
  - 1  $\beta$ : umožňuje vazbu ribonukleotidů na polymerázu
  - 1  $\beta'$ : umožňuje spojení polymerázy s matricovým DNA řetězcem
  - 1  $\omega$  (omega) stabilizuje molekulu
  - 1  $\sigma$  (sigma faktor): podmiňuje vazbu RNAP na **promotor**. Nemá katalytickou funkci, bez ní polymeráza funguje, ale začíná na libovolném místě



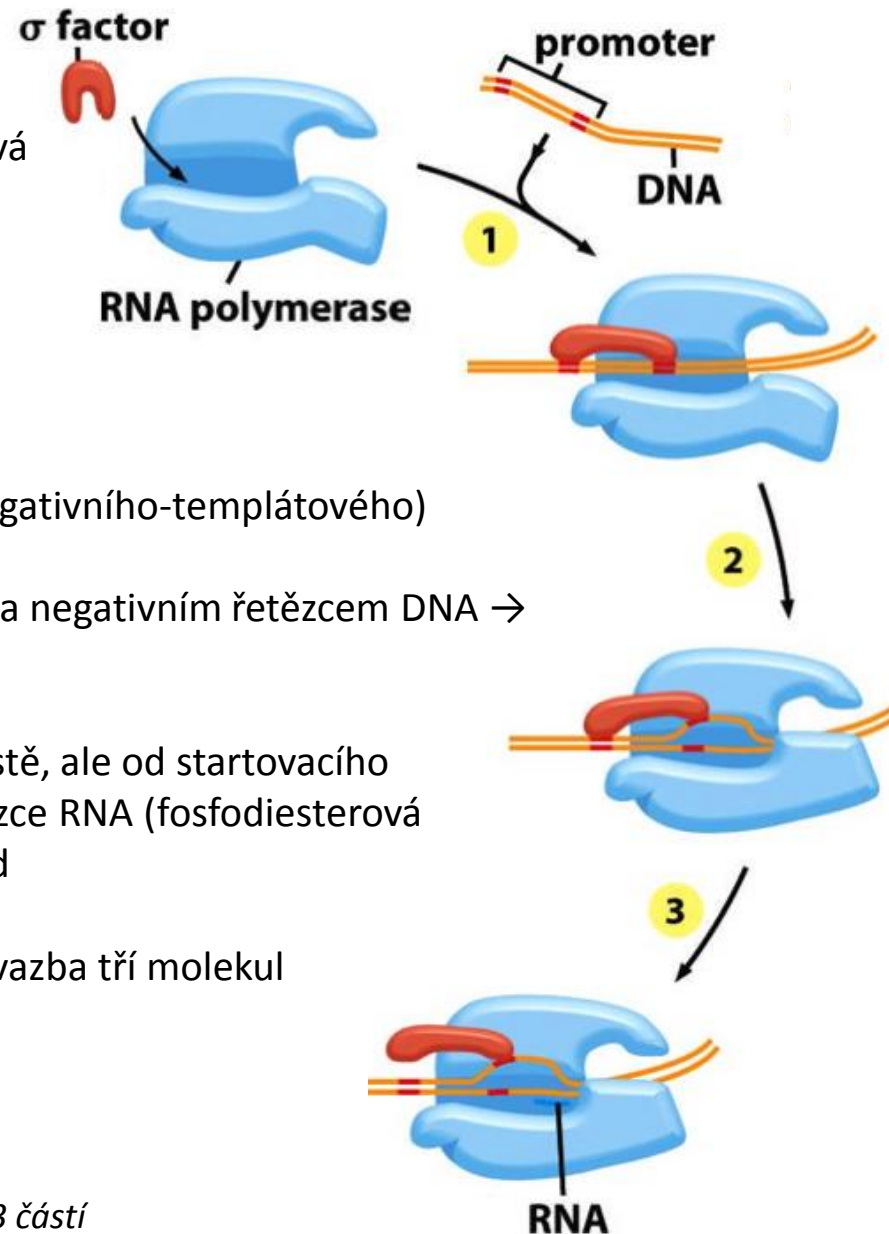
THE CELL, Fourth Edition, Figure 7.1 © 2006 ASM Press and Sinauer Associates, Inc.

*Holoenzym: enzym se všemi kofaktory (podjednotkami) nutnými k jeho funkci; úplný enzym*  
*Apoenzym: enzym, který vyžaduje kofaktory pro svoji funkci, ale nemá je; momentálně nefunkční*

## 1. Inicie

### Navázání RNA-polymerázy (sigma faktoru) na promotorové sekvence -35 (roznávací) a Pribnowův box (otevřít binární komplex)

- tvorba "Uzavřeného transkripčního binárního komplexu" (holoenzym RNA-polymerázy + promotorová oblast dsDNA) - řetězce dsDNA ještě nejsou rozvinuty
- RNA-polymeráza v komplexu mění konformaci, prodlužuje se a pokrývá gen v rozsahu -50 až +20 bp
- RNA-polymeráza se váže na oba řetězce DNA, ale pevněji na pozitivní-kódující (přepisuje se podle negativního-templátového)
- V Pribnowově boxu se uvolňují vazby mezi pozitivním a negativním řetězcem DNA → otevřený binární komplex
- Při iniciaci transkripce zůstává RNA-polymeráza na místě, ale od startovacího nukleotidu (+1) začíná katalyzovat tvorbu nového řetězce RNA (fosfodiesterová vazba mezi dvěma ribonukleotidy) → první dinukleotid
- Otevřený transkripční ternární (ze tří částí) komplex = vazba tří molekul (1. DNA, 2. RNA-polymeráza, 3. RNA)

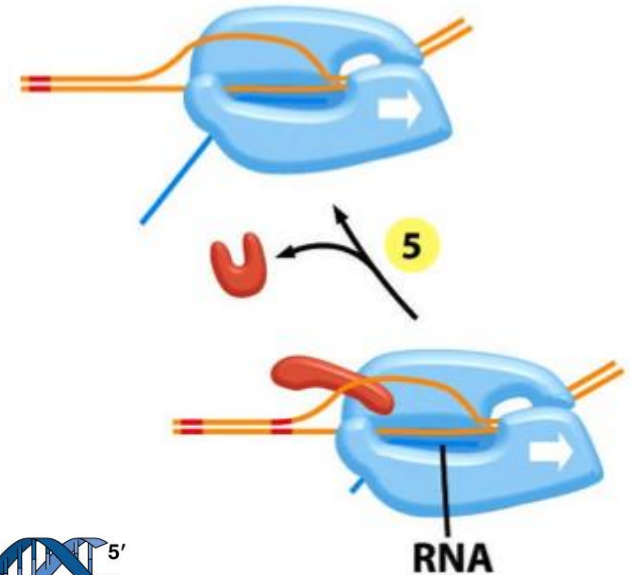
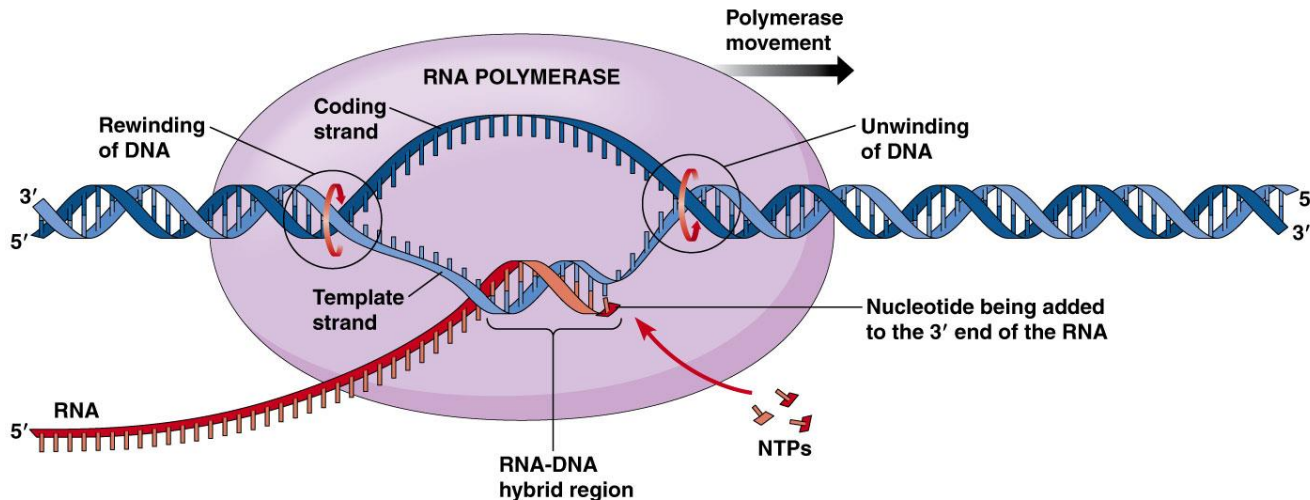


Latinsky: "binarius" = složený ze 2 částí; "ternarius" = složený ze 3 částí

## 2. Elongace

### Prodlužování RNA

- Katalyzována RNA-polymerázou bez Sigma-faktoru (uvolňuje se po vytvoření počátečního fragmentu RNA a je nahrazen NusA-proteinem)
- RNA-polymeráza se posunuje po negativním řetězci DNA (40 nukleotidů/sek; 37°C) směrem od 3' → 5'-konci DNA
- cca 18bp dlouhá rozvinutá oblast DNA; hybrid RNA-DNA dlouhý cca 2-5bp
- RNA v hybridní dvojšroubovici se pevněji váže k RNA-polymeráze než k DNA
- Syntéza RNA řetězce směrem od 5' → 3'-konci
- S NusA proteinem dorazí RNA-polymeráza až k terminátoru



# Průběh transkripce bakteriálního genomu

## 3. Terminace

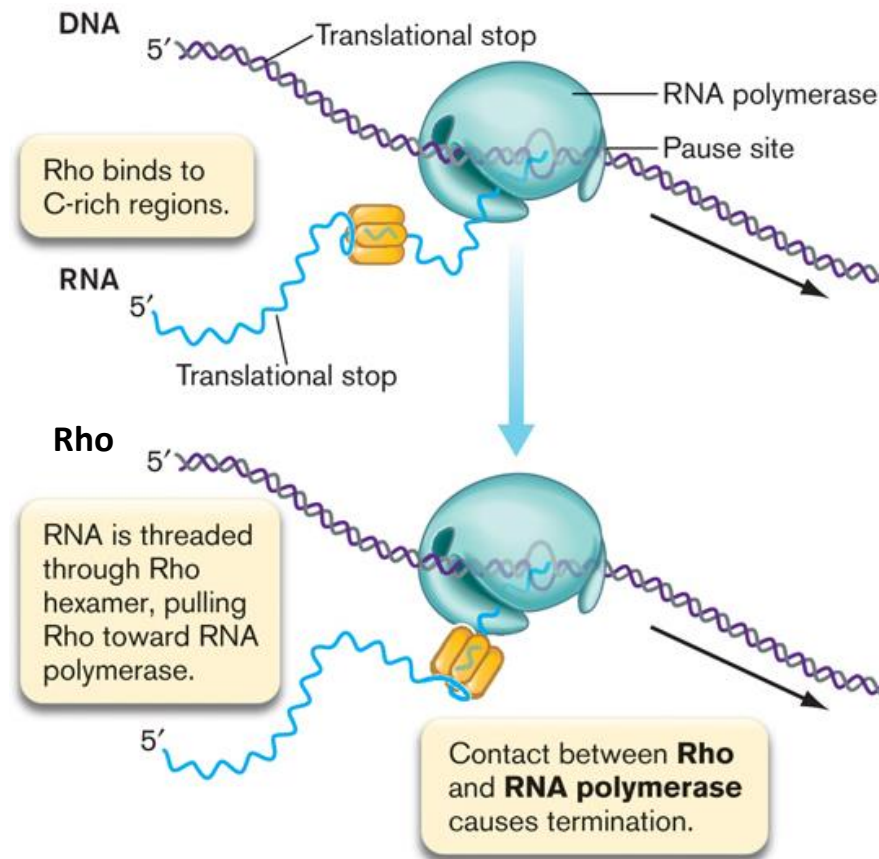
**Zastavení pohybu RNA-polymerázy - uvolnění hotové RNA - uvolnění RNA-polymerázy**

- A) závislá na Rho-faktoru
- B) nezávislá na Rho-faktoru

*Rho-faktor: protein katalyzující uvolnění dokončeného RNA-řetězce z templátového (negativního) DNA-řetězce*

### 3A) Terminace závislá na Rho-faktoru

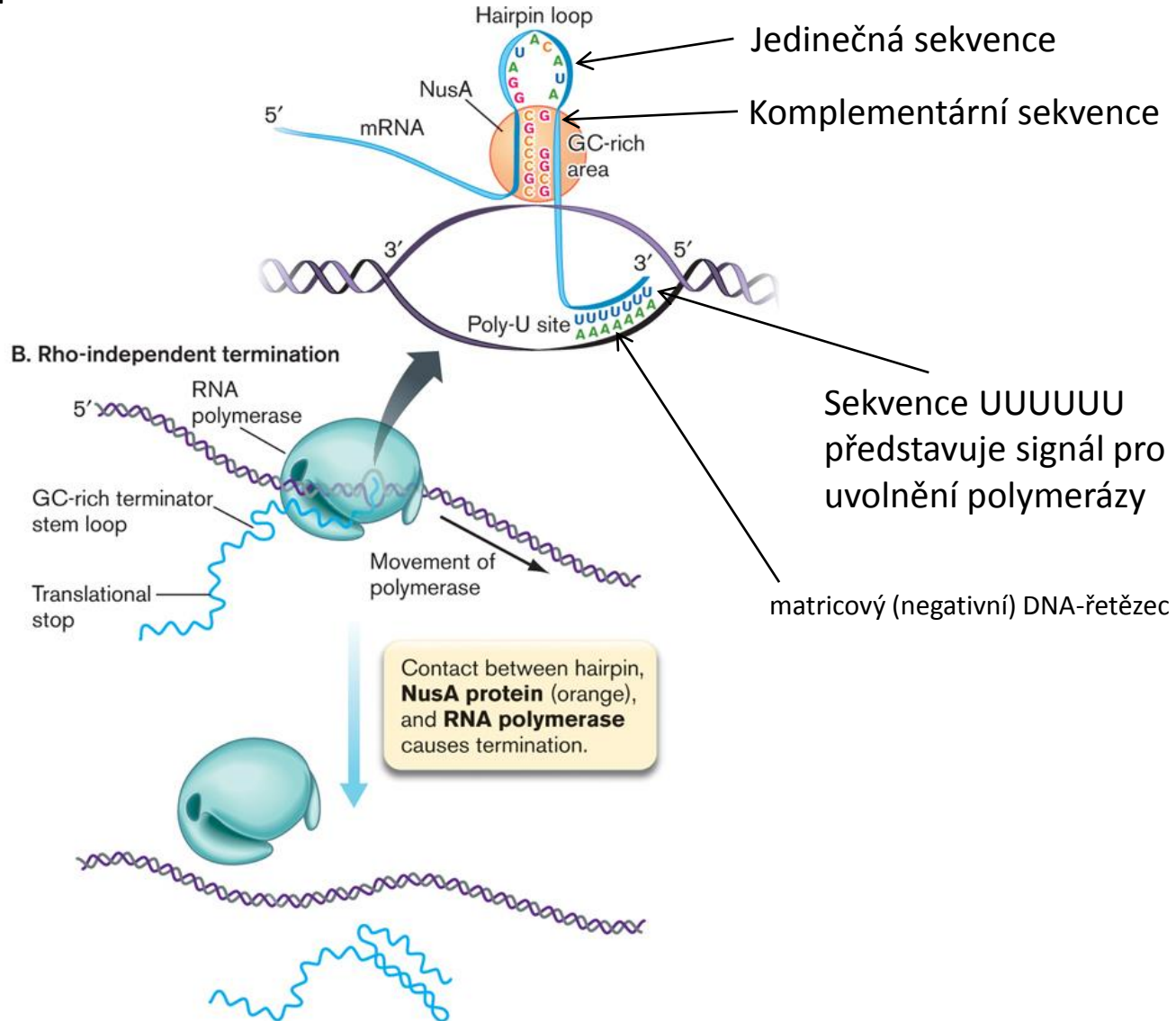
- Rho protein aktivní ve formě hexameru
- váže se během transkripce na 5'-konec mRNA a pohybuje se za RNA-polymerázou
- v terminátoru se RNA-polymeráza zastaví, rho-faktor ji dostihne
- Rho-faktor katalyzuje uvolnění mRNA z DNA-řetězce a uvolnění RNA-polymerázy (za spotřeby ATP)



*Rho-faktor: protein katalyzující uvolnění dokončeného RNA-řetězce z matricového (negativního) DNA-řetězce*

### 3B) Terminace nezávislá na Rho-faktoru

- Tvorba vlásenky na RNA, na konci se sekvencí UUUUUU - nestabilní hybrid DNA-RNA → rozpad
- Uvolnění NusA-proteinu



## Strukturní geny – mRNA

*Překládají se do polypeptidu*

- Transkripcí transkripční jednotky obsahující **strukturní geny** vzniká **mRNA**

- mezi promotorem (popř. za operátorem) a prvním strukturním genem leží **vedoucí sekvence s Shineovou-Dalgarno sekvencí**, která zajišťuje vazbu na ribozom a nepřekládá se.

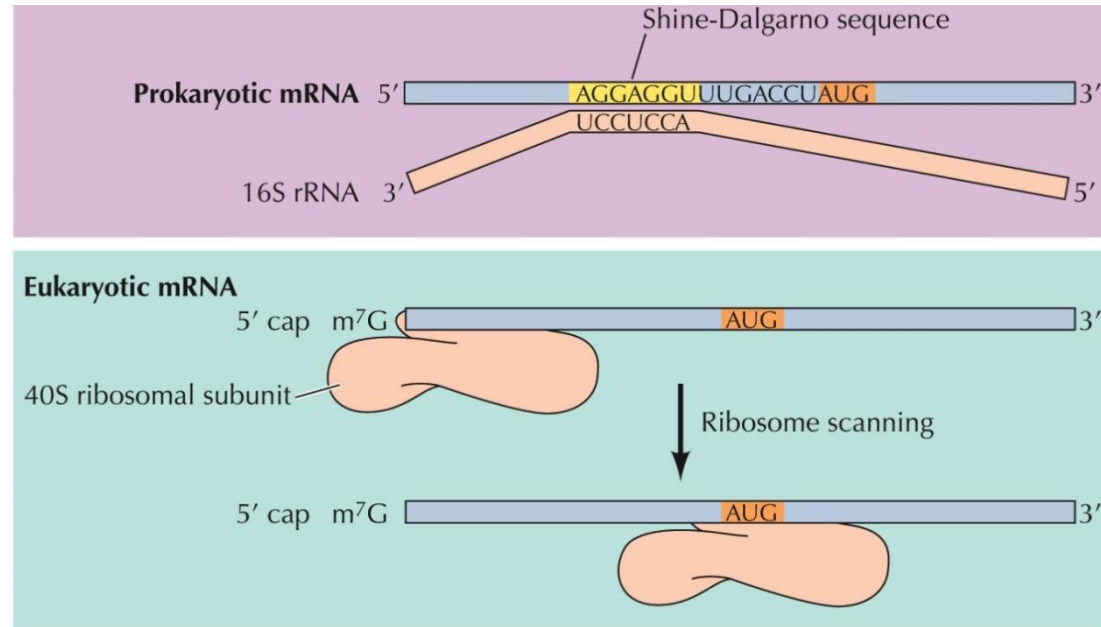
**Shineova-Dalgarno** sekvence v mRNA:

**5' AGGA 3'**

- vazba na ribozom (k 16 S-rRNA podjednotky 30S):

**3' UCCU 5'**

- pokud primární transkript neobsahuje Shineovu-Dalgrinovu sekvenci, nemůže se vázat k ribozomu a působí jako funkční RNA

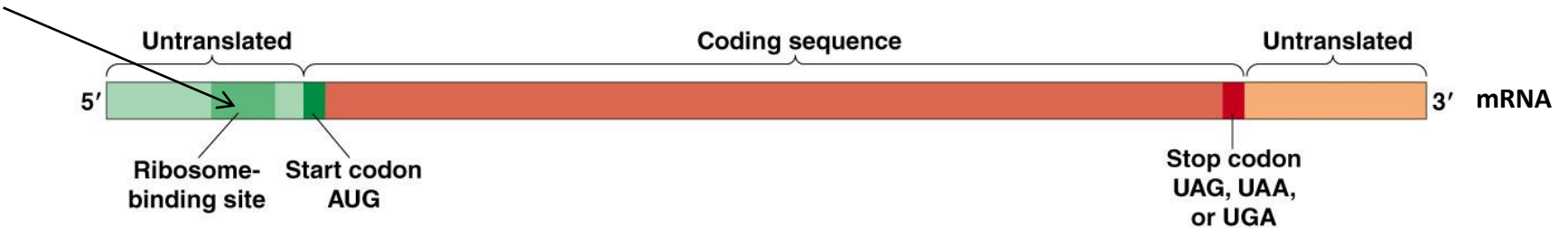


*Funkční RNA: RNA, které nejsou určeny k translaci (tRNA, rRNA, miRNA, siRNA)*

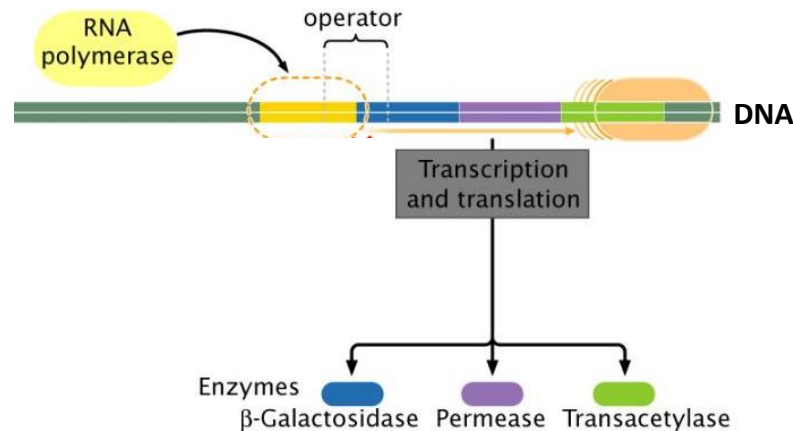
## mRNA se strukturními geny

- Na 5'-konci obsahuje přepis vedoucí sekvence s Shineovou-Dalgarnovou sekvencí, nepřekládá se
- Na 3'-konci za stop-kodonem obsahuje nepřekládanou sekvenci
- Jeden strukturní gen se překládá do jedné molekuly polypeptidového řetězce
- U prokaryot jsou geny polycistronní (více genů na jednom transkriptu mRNA)
  - každý gen na transkriptu obsahuje svůj iniciační a terminační kodon a svou Shine-Dalgarno sekvenci pro vazbu ribozomu
  - na DNA mají jeden společný promotor (u operonů i operátor) a jednu terminační sekvenci na 3'-konci. Promotor není součástí transkripční jednotky.

### Shine-Dalgarno sequence



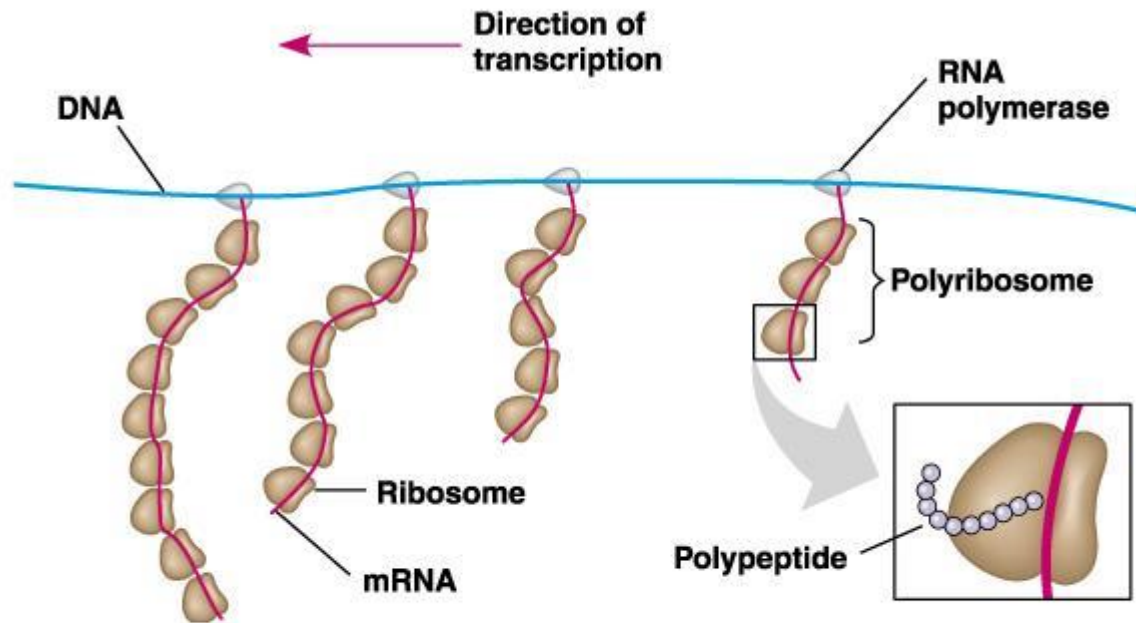
(a) Bacterial mRNA





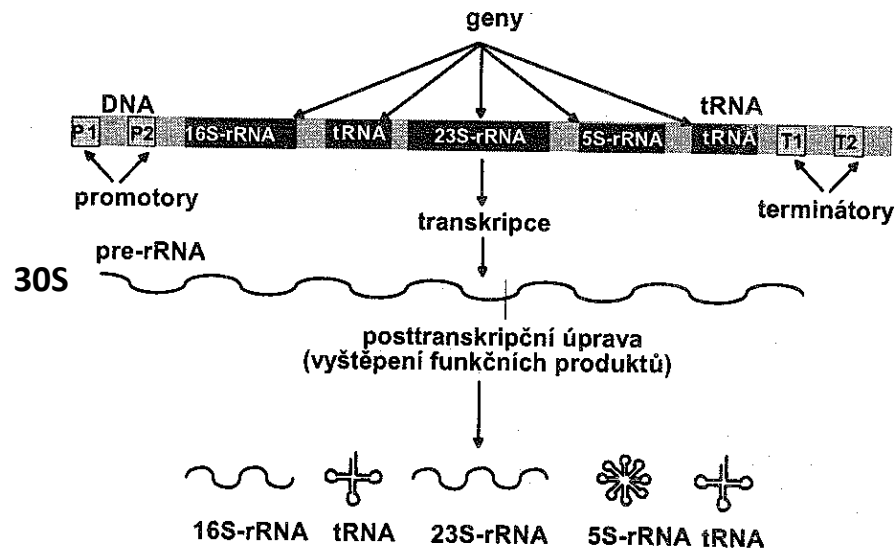
## Bakteriální mRNA

- **posttranskripčně se nepravuje** a slouží přímo pro tvorbu polypeptidu
- rozpad během několika minut účinkem ribonukleázy (RNázy) ve směru 5' → 3'
- **translace** molekuly mRNA na ribozomu probíhá **současně s její transkripcí**. Polypeptidový řetězec se začne syntetizovat ještě před ukončením transkripce
- rychlosti: 40 nukleotidů za sekundu; 13 aminokyselin za sekundu; až 15 iniciací transkripce za minutu u jedné transkripční jednotky
- **Polyribosom**: více ribozomů na jedné mRNA urychluje transkripci
- **Spojení transkripce s translací** umožňuje efektivní syntézu proteinů (např: 15 molekul mRNA, každá pokryta 30 ribozomy, na každé 30 polypeptidových řetězců)



## Bakteriální rRNA

- geny pro rRNA na chromozomu v 5-9 kopiích
- každá transkripční jednotka má 2 promotory (P1, P2) a 2 terminátory (T1, T2)
- mezi některými geny jsou vmezeřeny geny pro tRNA
- nejprve přepis do pre-rRNA: sedimentační koeficient 30S
- 30S jsou štěpeny RNázou III na sekvence 5S, 16S a 23S

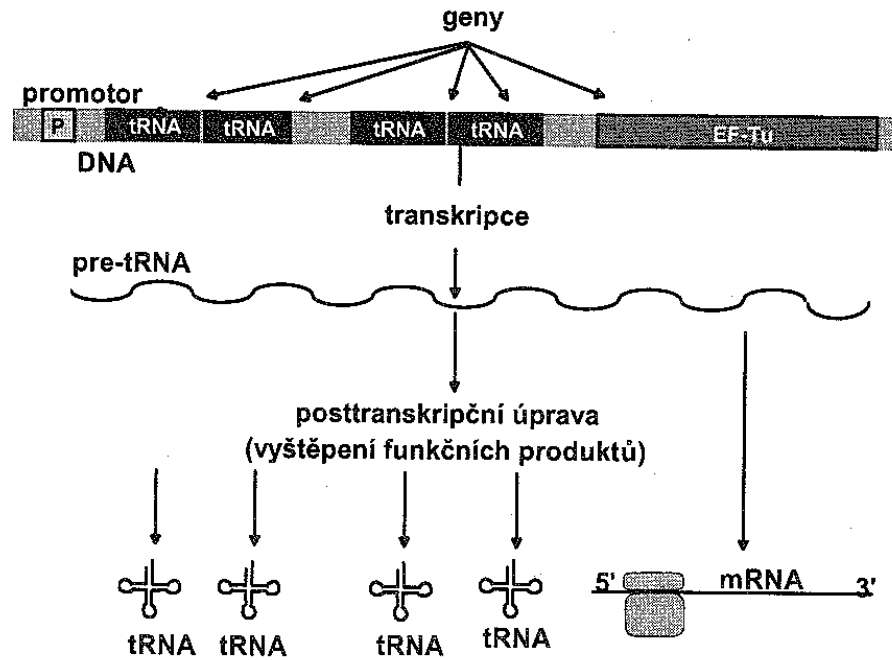


*Jednotka S (Svedberg) - sedimentační koeficient*

*(veličina udává čas, za který proběhne sedimentace dané makromolekuly při její ultracentrifugaci)*

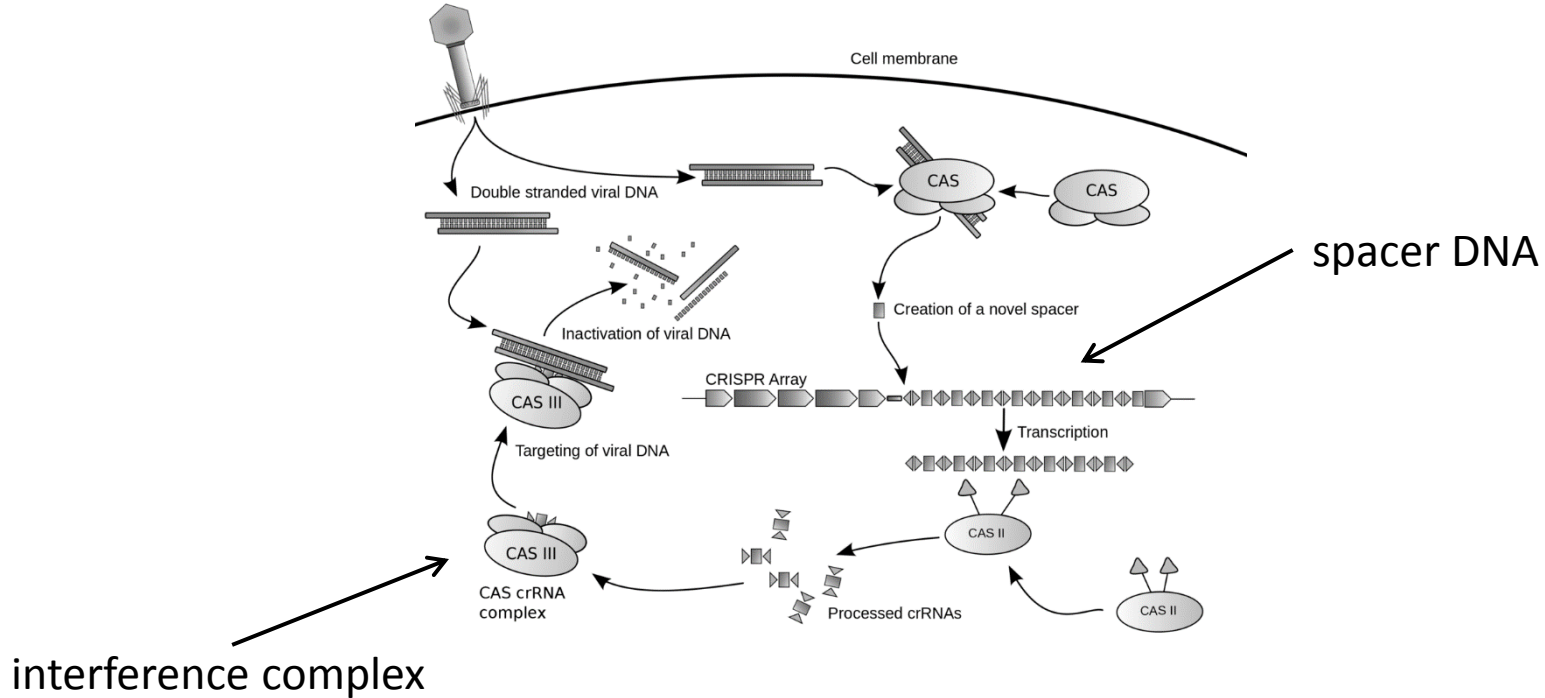
## Bakteriální tRNA

- u E coli 2 multigenní transkripční jednotky s geny pro tRNA
- jen jeden promotor, poslední gen je strukturální (např. pro elongační faktor EF-Tu)
- strukturální gen umožňuje vazbu na ribozom, protože obsahuje Shineovu-Dalgarnovu sekvenci



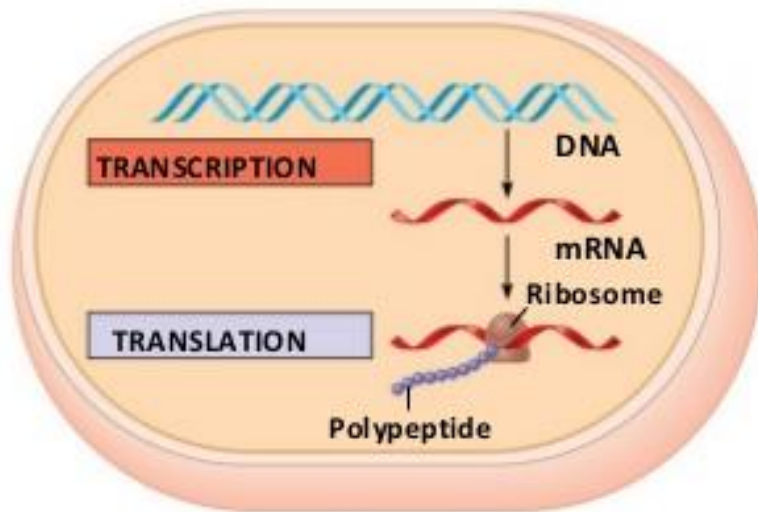
## CRISPR (Clustered regularly-interspaced short palindromic repeats)

- adaptivní (získaná) imunita bakterií - obrana cizímu genetickému materiálu (např. virální DNA)
- segment prokaryotické DNA se "**spacer DNA**" obsahujícími části DNA virů z předešlých infekcí
- při nové infekci je třeba vytvořit novou "spacer DNA"
- **Transkripce do crRNA (CRISPR RNA)**, komplementární s virovou DNA, spolu s CAS (crispr-associated) proteiny
- crRNA s CAS proteiny tvoří "**interference komplexy**"
- párování s odpovídající sekvencí virové DNA a její inaktivace



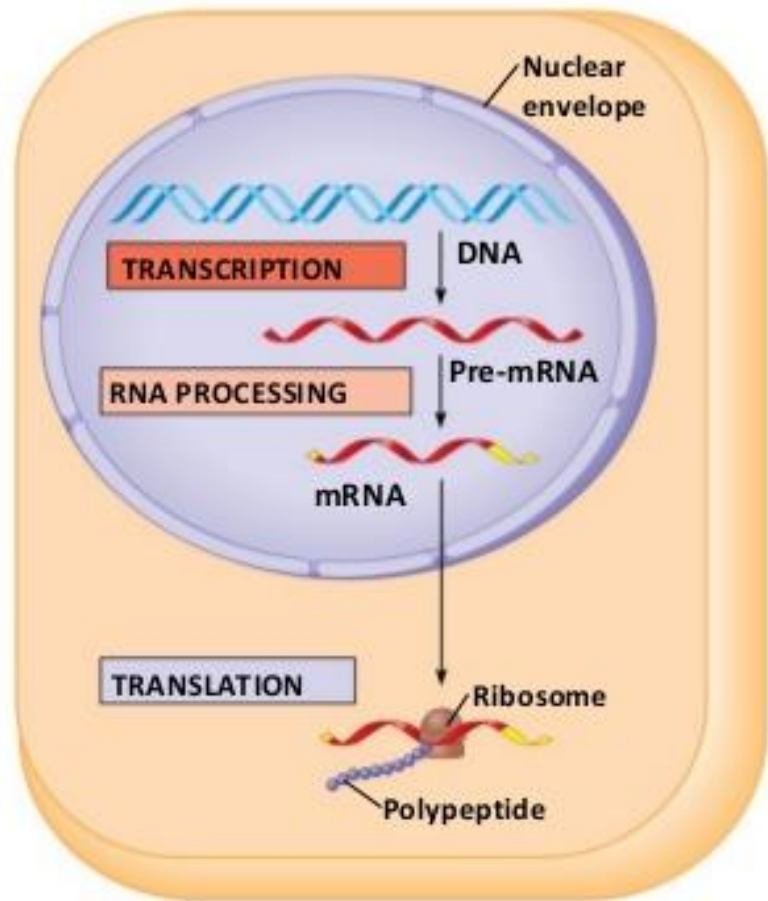
*Velké uplatnění v editaci lidského genomu: vhodná guide RNA + Cas9 protein štěpí DNA ve zvoleném místě (inaktivace nebo vložení jiné sekvence)*

## **2. Transkripce eukaryotického genomu**



(a) Bacterial cell

© 2011 Pearson Education, Inc.



(b) Eukaryotic cell

Rozlišujeme transkripci jadernou, mitochondriální a chloroplastovou.

## Transkripce jaderné složky

- jaderné geny jsou na chromozomech
- tvoří primární transkripty

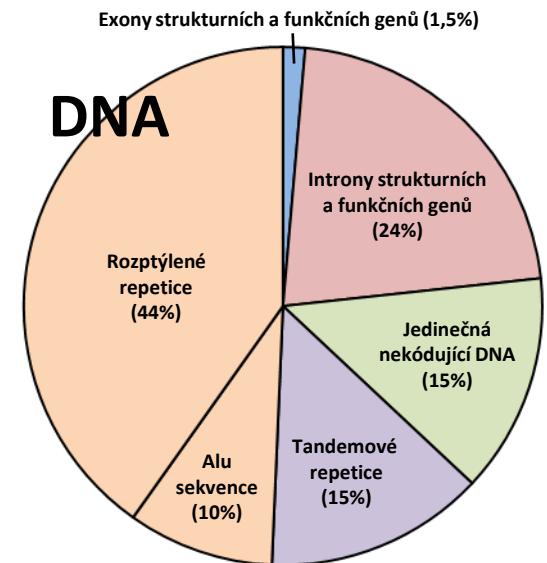
## Typy RNA

### 1. Kódující RNA

- informace z DNA je přenesena mRNA do ribozomu, kde je přeložena do sekvence aminokyselin tvořících proteiny
- asi jen 3% všech transkriptů

### 2. Nekódující RNA

- cca 97% transkriptů
- zejm. introny vystřižené z mRNA, rRNA, tRNA a regulační RNA



*Alu sekvence - transpozonální DNA (schopná měnit pozici), funkce větš. neznámá, hraje roli při buň. dělení*

## Polycistronní vs. monocistronní mRNA

*Narozdí od prokaryot mají eukaryota pouze monocistronní mRNA*

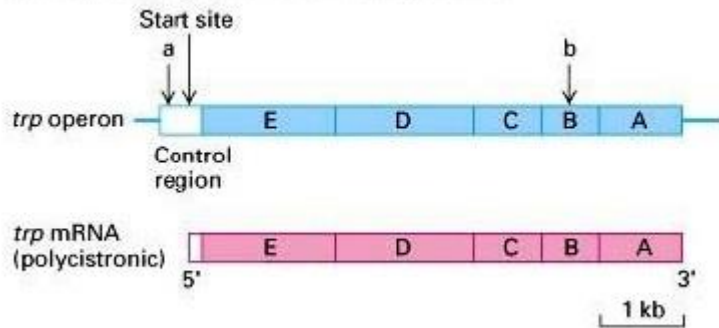
### Eukaryotická mRNA

- obsahuje kódující sekvenci pouze pro jeden polypeptid (monocistronní)
- jeden iniciační a jeden terminační kodon

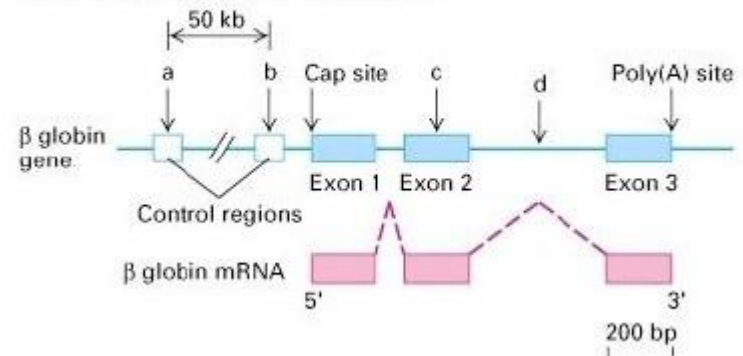
### Prokaryotická mRNA

- obsahuje kódující sekvenci pro několik genů, většinou jedné metabolické dráhy
- mRNA transkript obsahuje hodně iniciačních a terminačních kodonů

(a) Prokaryotic polycistronic transcription unit



(b) Eukaryotic simple transcription unit





# Typy RNA

## 1. Kódující RNA

- **pre-mRNA: prekurzorová mRNA (též hnRNA - heterogenní jaderná RNA)**
  - primární transkript obsahující přepisy strukturních genů
  - je upravován do mRNA

## 2. Nekódující RNA

### - pre-rRNA: prekurzorová ribozomová RNA

- posttranskripční úpravou se štěpí na

a) 5,8S-rRNA, 18S-rRNA a 28S-rRNA u savců

b) 5,8S-rRNA, 16S-rRNA a 25S-rRNA u rostlin

### - pre-tRNA: prekurzorová transférová RNA

- štěpí se na různé druhy tRNA

### - 5S-rRNA: tvoří se transkripcí genů pro 5S-rRNA

### - Malé RNA: Nízkomolekulární stabilní RNA (80-300 nukleotidů)

- řídí sestřih a posttranskripční úpravy pre-RNA (katalyzovány RNA-polymerázami II a III)
  - a) malé jaderné RNA (snRNA)
  - b) malé jadéřkové RNA (snoRNA)
  - c) malé cytoplazmatické RNA (scRNA)
  - d) regulační RNA (miRNA a siRNA)

## **Transkripční faktory (TF)**

- regulační proteiny
- vážou se na regulační oblasti promotoru nebo zesilovače (enhancer) transkripce
- nutné pro zahájení transkripce
- působí ve skupině, nasednou na promotor a na ně se váže RNA-polymeráza

Typy TF:

1. Obecné TF: ve většině eukaryot, geny potřebné pro základní funkce všech buněk
2. Speciální TF: vyskytují se v určitých tkáních v určitý čas

**Transkripční aktivita = rychlost syntézy RNA: počet primárních transkriptů za minutu**

1. Bazální transkripční faktory:

- nízká aktivita, minimální požadavky buňky
- umožňují zahájení transkripce

2. Konstitutivní transkripční faktory:

- zvýšená aktivita
- konstitutivní TF se přidávají k bazálním TF

3. Indukovatelné transkripční faktory:

- úprava transkripční aktivity v reakci na vnější podmínky
- význam při diferenciaci

## Eukaryotické DNA-dependentní RNA-polymerázy

Každá má svůj specifický promotor (bakterie jeden typ RNA-polymerázy a jeden typ promotoru)

### 1. RNA-polymeráza I

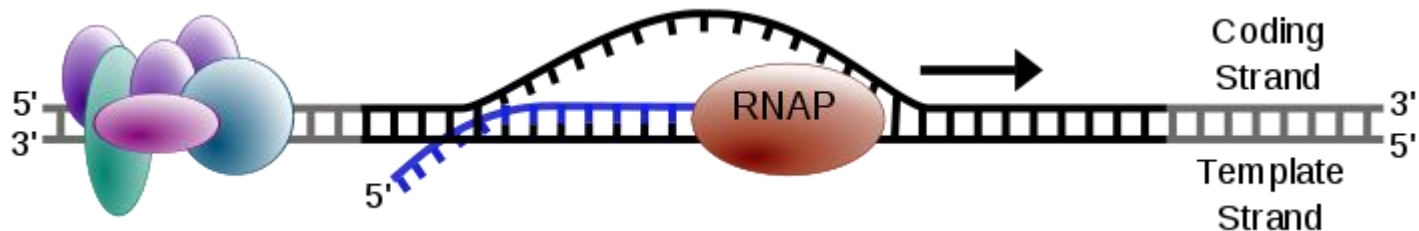
- katalyzuje syntézu pre-rRNA
- pouze v jadérku\*

### 2. RNA-polymeráza II

- syntéza mRNA (strukturní geny) a malých RNA
- v jádře

### 3. RNA-polymeráza III

- syntéza pre-tRNA, 5S-rRNA a malých RNA
- v jádře



\*v jadérku se skládají ribozomy z proteinů a rRNA

## Promotor pro RNA-polymerázu II obsahuje krátké sekvence

### 1. TATA-box (též Hognessův box): T A T A A A A

-34 až -26 od startovacího nukleotidu

- vazba TF **TFIID** - specificky rozeznáván RNA-polymerázou II

### 2. CAAT-box: G G C C A A T C T

- nukleotidy -75 až -80

- vazba TF **CTF/NF1**, zvyšuje sílu promotoru (enhancer)

### 3. GC-box: G G G C G G

- nukleotid -90

- vazba TF **SP1**, zvyšuje sílu promotoru (enhancer)

- je fosforylován proteinkinázou vázanou na DNA - stimulace tvorby přediniciačního komplexu

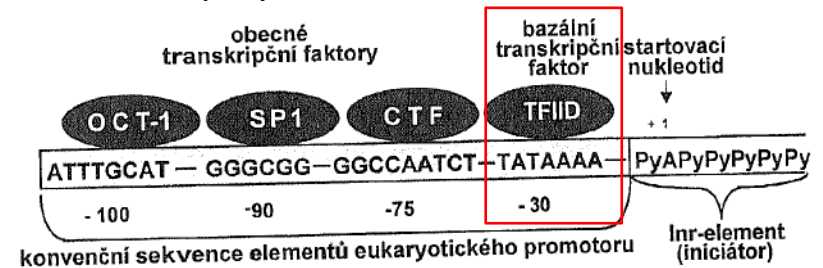
- umožňuje vazbu TFIID na TATA-box

### 4. Oktamer: A T T T G C A T

- váže se na konstitutivní TF **OCT-1**

### 5. Startovací nukleotid: Iniciátor (Inr-element)

- obvykle **A** uvnitř úseku s pyrimidinovými bazemi (C nebo T)



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

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

*Tyto se vyskytují ve většině promotorů RNA-polymerázy II*

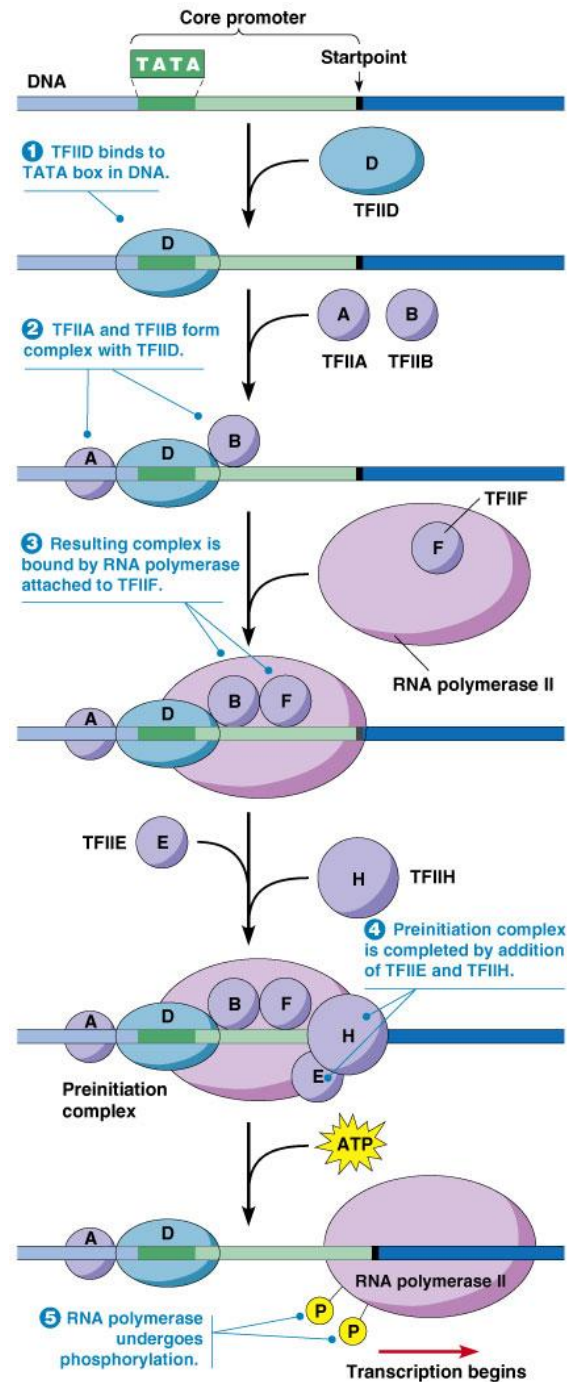
## Iniciace transkripce polymerázou II

- Transkripční faktor **TFIIF** umožňuje umístění RNA-polymerázy na promotor (3.)
- Uzavřený transkripční komplex je ještě inaktivní (3.)
- Transkripční komplex je aktivován až **TFIIH** tak, že fosforyluje RNA-polymerázu (4, 5)
- Všechny TF kromě TFIID a TFIIA se uvolní a aktivní RNA-polymeráza elonguje pre-mRNA (hnRNA) (5.)

### Význam transkripčních faktorů:

*"Umožňují rozeznat místa, kam se má navázat RNA-polymeráza II a aktivují ji."*

*Pokud promotor nemá TATA-box, začíná transkripce na Inr-elementu*

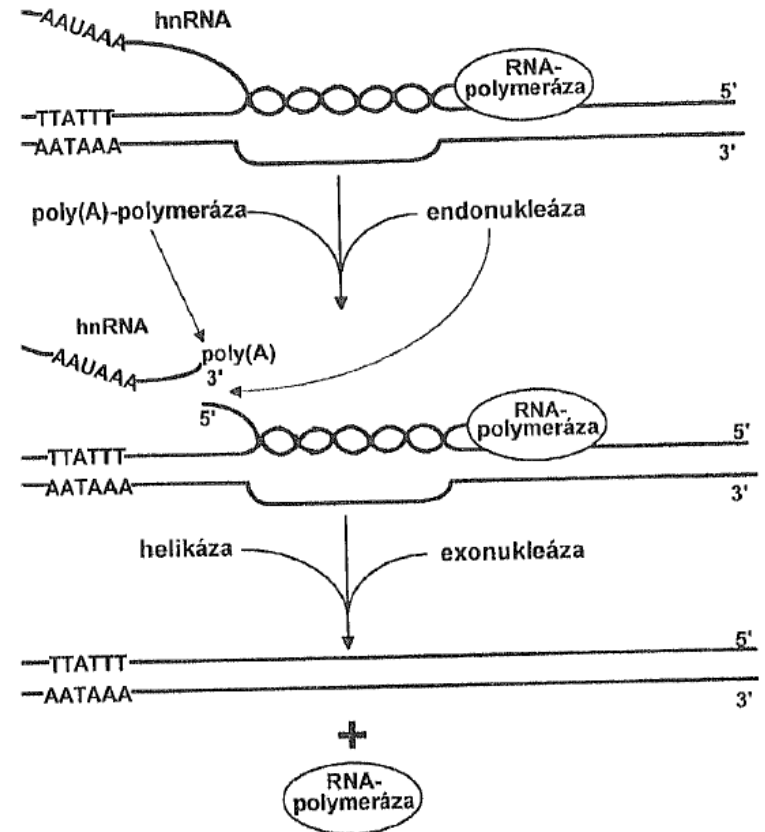


## Terminace transkripce polymerázou II

### Polyadenylační signál: T T A T T T na negativním řetězci DNA

- do pre-mRNA přepsán jako A A U A A A
- označuje terminaci transkripce
- sekvence je rozeznána endonukleázou - štěpí 10-30 nukleotidů za signálem
- poly(A)-polymeráza katalyzuje polyadenylaci 3'-konce
- helikáza rozdělí zbytek hybridní DNA-RNA a zbytková RNA je rozštěpena exonukleázou

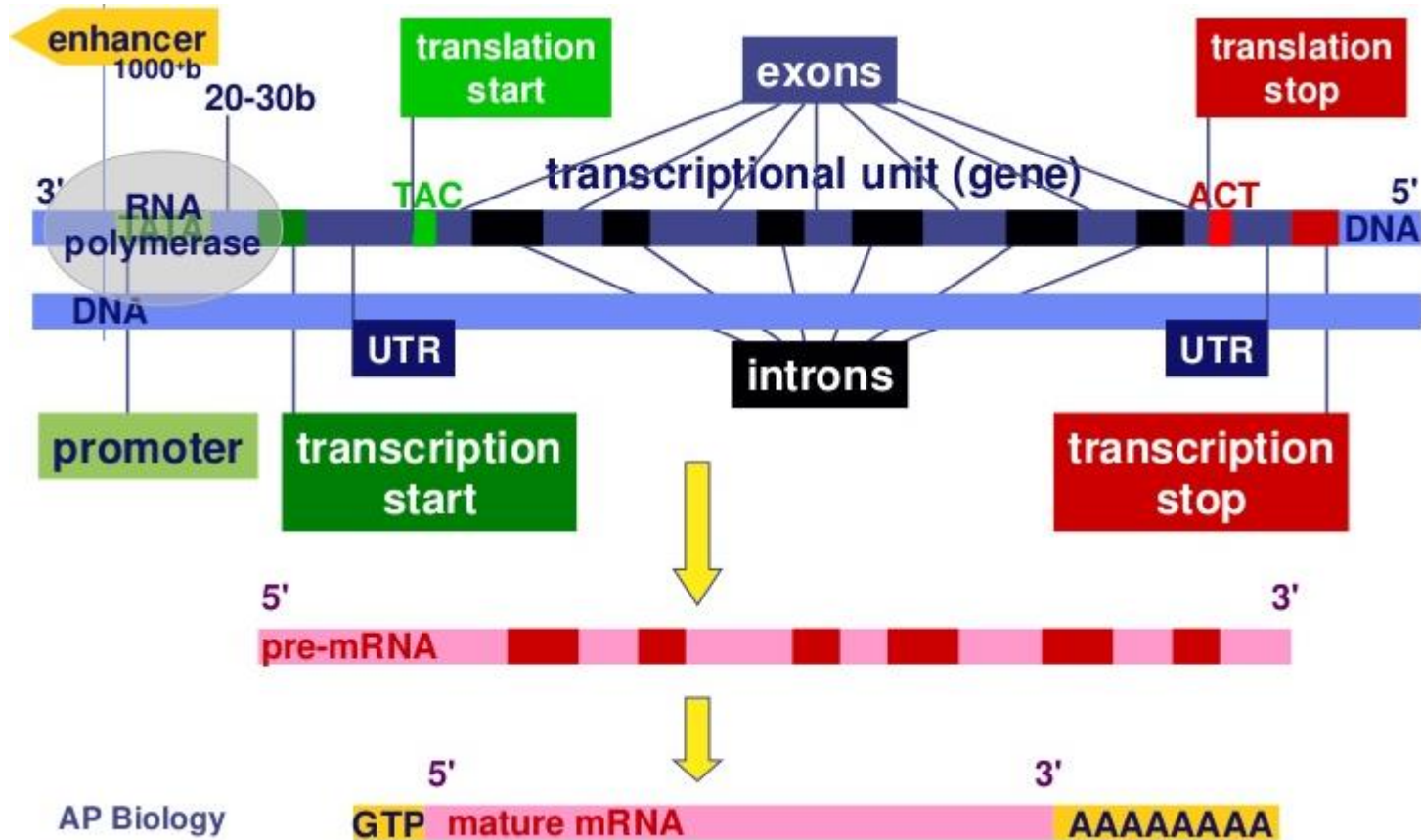
[Video: Eukaryotická transkripce](#)



*Exonukleáza: štěpí nukleotidy od krajů*

*Endonukleáza: štěpí nukleotidy od prostředku*

*Helikáza: oddaluje řetězce DNA nebo RNA*



AP Biology

RNA polymeráza nasedá na TATA box

UTR - untranslated region

Eukaryotické mRNA jsou monocistronní - obsahují kodující sekvenci pouze pro jeden polypeptid

### Translace:

- začíná na mRNA na "sekvenci Kozakové" CAAAAUG (což na DNA odpovídá sekvenci TAC)

- končí na mRNA na stop kodonech UAG (Amber), UGA (Opal), UAA(Ochre) - na DNA odpovídá (ATC, ACT, ATT)

## **Transkripce RNA-polymerázou I**

- přepisuje geny pro 5,8S-rRNA, 18S-rRNA a 28S-rRNA
- promotor má 2 části (neobsahuje TATA-box):
  - a) Základní: obsahuje startovací nukleotid
  - b) Regulační: zvyšuje účinnost
- na promotor se váže TF UBF a SL1



## Transkripce RNA-polymerázou III

- má 3 typy promotorů:

1. transkripce 5S-rRNA
2. transkripce tRNA a 7SL-snRNA
3. transkripce U6 a 7SK-snRNA

- končí sekvencí T T T T

## **Transkripce mitochondriového genoforu**

- 3 transkripční jednotky
- jejich přepisem se vytvoří mRNA, funkční molekuly tRNA a rRNA

## **Transkripce chloroplastového genoforu**

- promotory strukturních genů mají podobnou strukturu jako bakteriální promotory

## Regulační RNA

- krátké molekuly RNA se sekvencí komplementární k určitým částem mRNA nebo DNA
- působí mechanismem **RNA interference** (RNAi)
  - typicky inhibují genovou expresi vazbou na mRNA
  - 2006 Nobelova cena za fyziologii a medicínu pro A. Fire a C. Mello za výzkum RNAi
  - epigenetická posttranskripční regulace exprese a též obrana buněk proti parazitickým nukleotidovým sekvencím (např. RNA virům)
  - hrají roli též ve vývoji
  - s tzv. Argonaute proteiny tvoří komplex zvaný RISC (RNA-induced silencing complex)
  - využívána ve výzkumu pro supresi exprese specifických genů

1. miRNA (microRNA; 22 nukleotidů)
  - endogenní původ, transkripcí genomové DNA
2. siRNA (small inhibitory RNA; 20-25 nukleotidů)
  - exogenní původ (např. virový)

*siRNA a miRNA jsou si velmi podobné*  
*Epigenetická regulace genové exprese*

## The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006



Photo: L. Cicero  
**Andrew Z. Fire**  
Prize share: 1/2

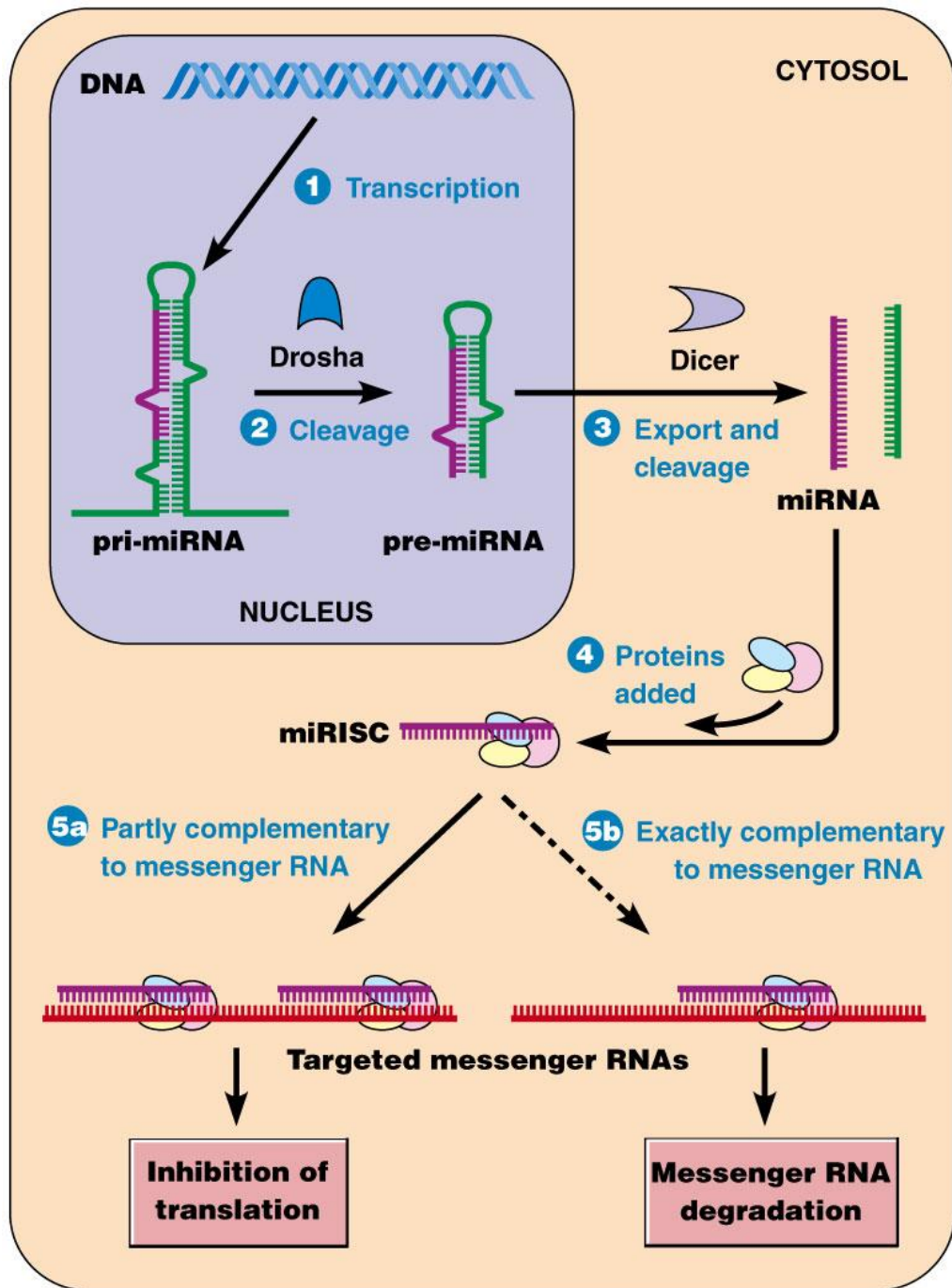


Photo: J. Mottern  
**Craig C. Mello**  
Prize share: 1/2

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006 was awarded jointly to Andrew Z. Fire and Craig C. Mello "for their discovery of RNA interference - gene silencing by double-stranded RNA"

# 1. miRNA (microRNA; 21-22 nukleotidů)

- vlásenka pri-miRNA je štěpena RNAázou "Drosha" na pre-miRNA (70 nukleotidů)
- export pre-miRNA do cytoplasmy - štěpení Dicerem na miRNA 21-22 nukleotidů
- spolu s proteiny tvoří tzv. miRISC (miRNA-induced silencing complex)

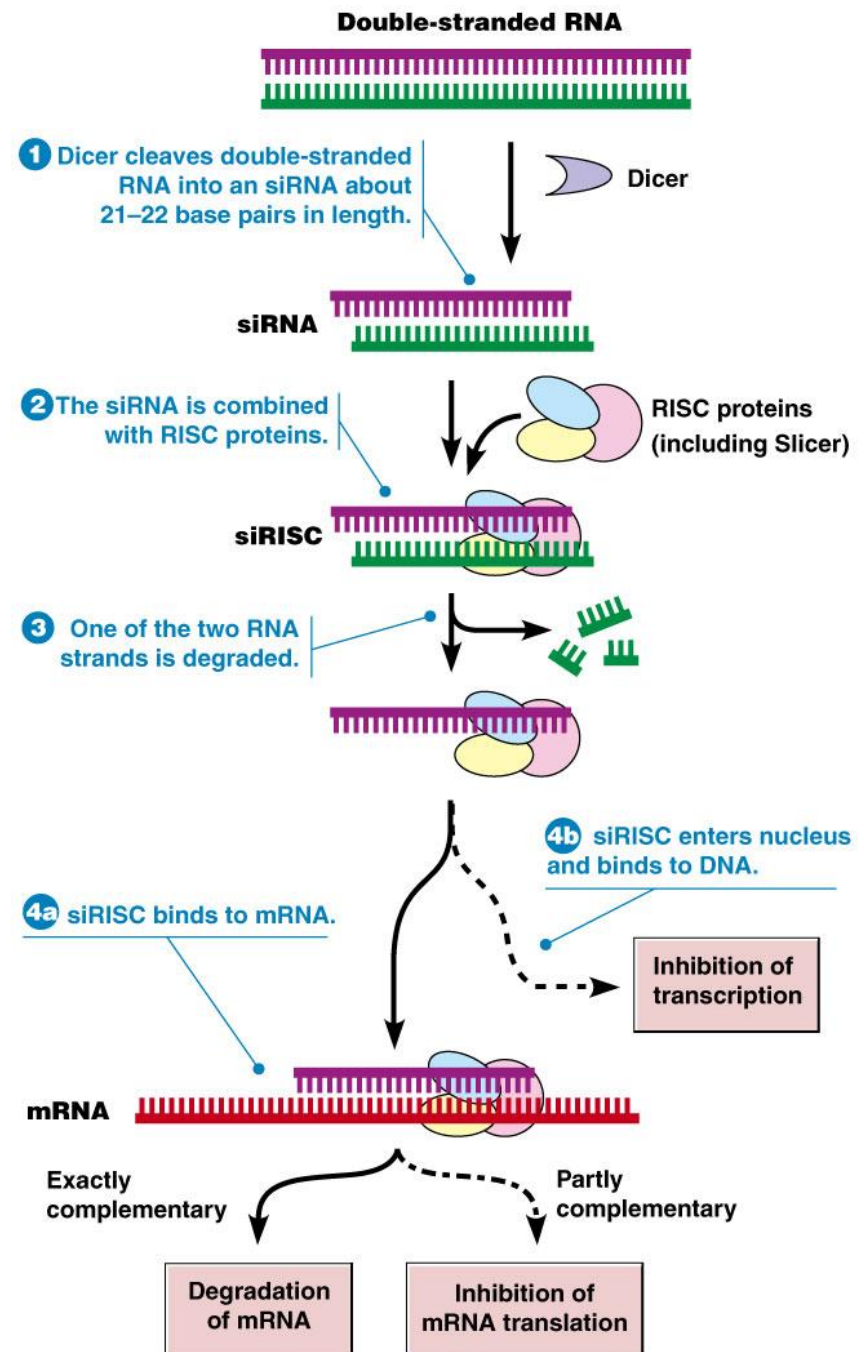


## 1. miRNA (microRNA; 21-22 nukleotidů)

- Funkce: RNA silencing a posttranskripční regulace genové exprese
- párování s komplementárními sekvencemi mRNA (nemusí být 100% komplementární)
- mechanismy silencingu:
  - a) štěpení řetězce mRNA na dva kusy (endonukleázami)
  - b) destabilizace mRNA zkrácením poly(A) konce (dřívější degradace exonukleázami)
  - c) snížení účinnosti translace do proteinu na ribozomu (fyzicky blokuje)
- vyskytuje se nejprve ve formě shRNA (short hairpin RNA) - štěpena enzymem zvaným "**Dicer**"
- lidský genom kóduje přes 1000 miRNAs - evolučně konzervované

## 2. siRNA (small inhibitory RNA; 20-25 nukleotidů)

- Funkce: posttranskripční RNA silencing
- dvojřetězec (štěpena také enzymem Dicerem)
- exogenní původ
- spolu s proteiny tvoří tzv. siRISC (siRNA-induced silencing complex)
- jeden řetězec degradován
- vazba siRISC na cílovou mRNA
- při 100% párování s cílovou sekvencí se mRNA štěpí



### **3. Posttranskripční úpravy RNA a mechanismy sestřihu**

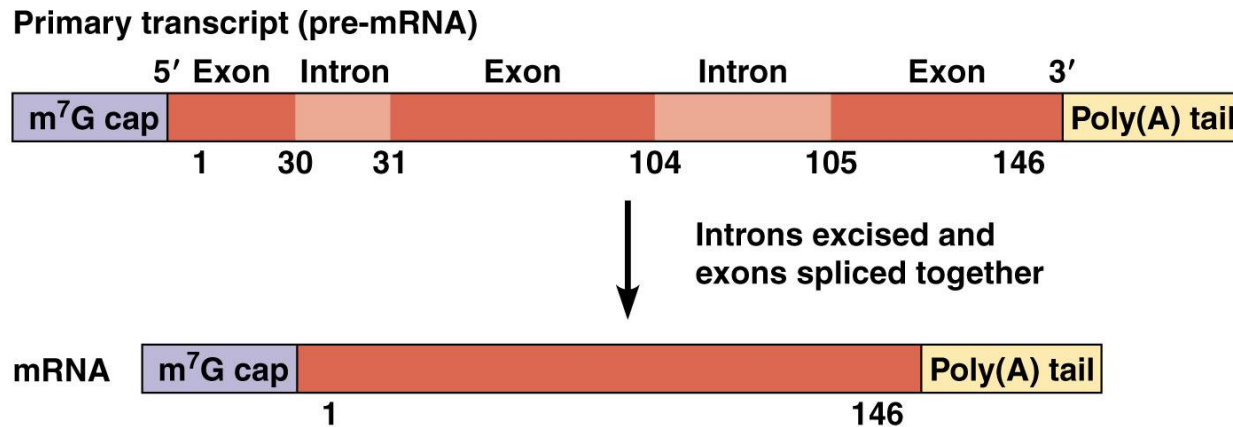
## Posttranskripční úpravy

Primární transkripty jsou dlouhé molekuly a musí být zkráceny, aby mohly být transportovány z jádra do cytoplasmy

a) modifikace, které neovlivňují primární strukturu

- tvorba komplexů jaderné pre-mRNA s proteiny
- úprava 5'-konce pre-mRNA tzv. čepičkou
- polyadenylace 3'-konce pre-mRNA

b) úprava primární struktury (sestřih; editace; vystřížení intronů)



*Intron (intra-genic region): nekódující sekvence RNA uvnitř genu, která je vystřížena*  
*Exon (expressed regions): kódující sekvence RNA, přeložená do proteinů*



## Modifikace, které neovlivňují primární strukturu

### Tvorba komplexů jaderné pre-mRNA s proteiny

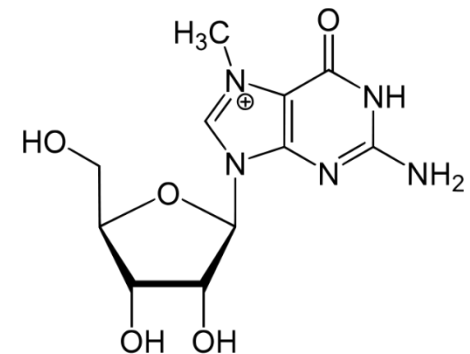
- proteiny, které se vážou na pre-mRNA se označují RNP-proteiny
- komplex RNA s RNP-proteiny nazýváme spliceozom

**Funkce:** RNA-proteiny uvádějí RNA do stavu přístupného k posttranskripčním úpravám

### Úprava 5'-konce čepičkou

- čepička: **m<sup>7</sup>G**
- 7-metylguanozin se váže na mRNA ve směru 5' - 5'

**Funkce:** čepička váže proteiny nezbytné pro iniciaci translace



7-Methylguanosine

*hnRNA (heterogenous nuclear RNA) je synonymum pro pre-mRNA*

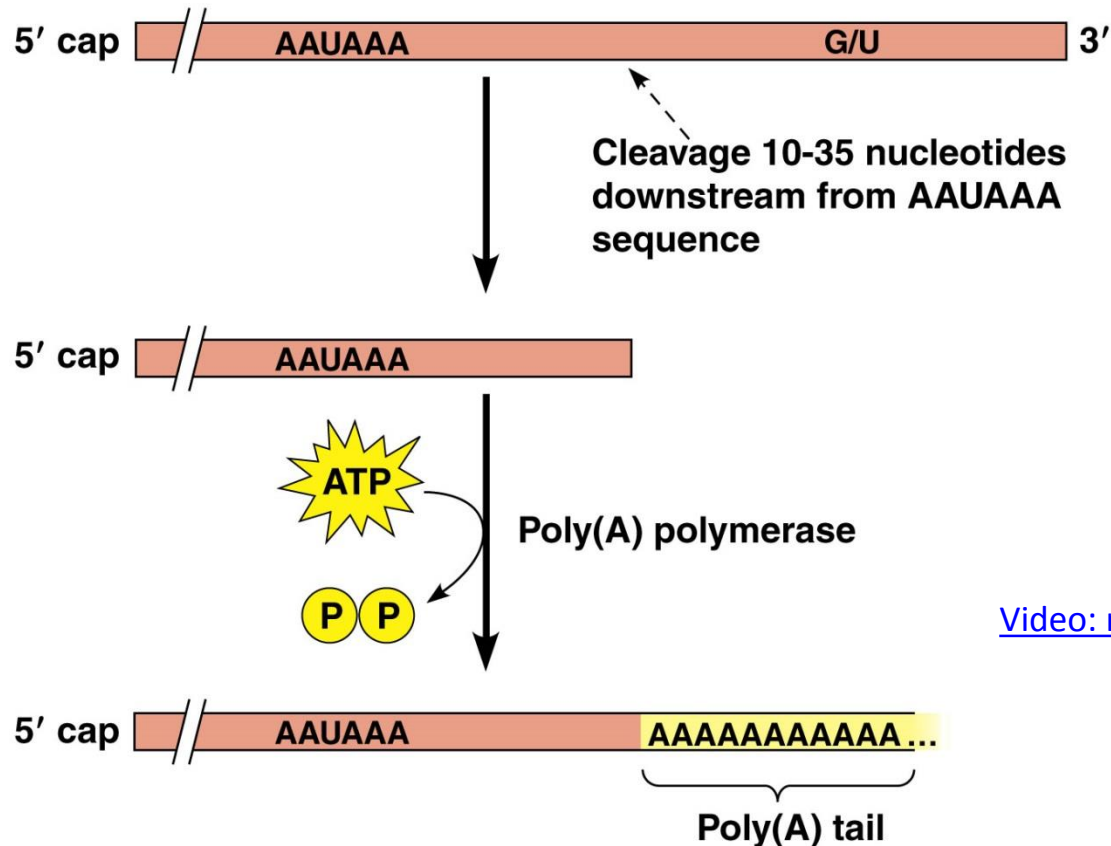
*RNP - ribonucleoprotein*

## Modifikace, které neovlivňují primární strukturu

### Polyadenylace 3'-konce

- K polyadenylačním signálu AAUAAA na 3'-konci hnRNA se připojí sekvence 50 - 250 nukleotidů (A)
- katalyzována poly(A)-polymerázou

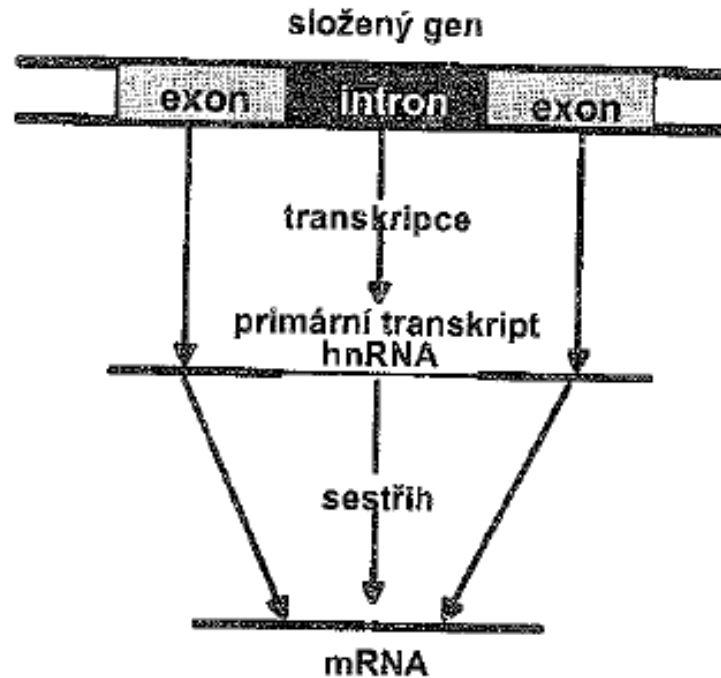
**Funkce:** ochrana proti účinku exonukleáz (dél trvá než se dostanou přes AAAA ke kódující sekvenci)



[Video: m7G a polyadenylace](#)

## Sestřih pre-mRNA (hnRNA) → mRNA

- Úprava primární struktury RNA

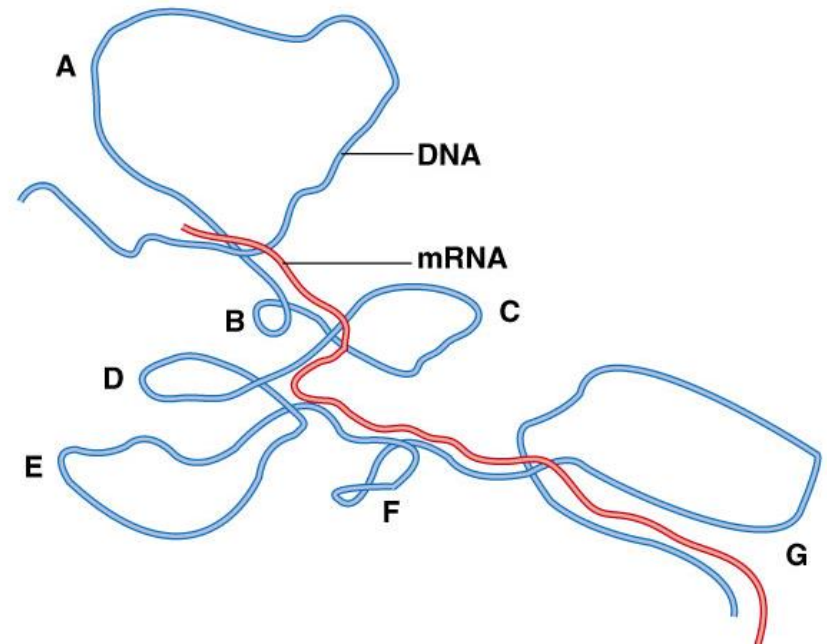
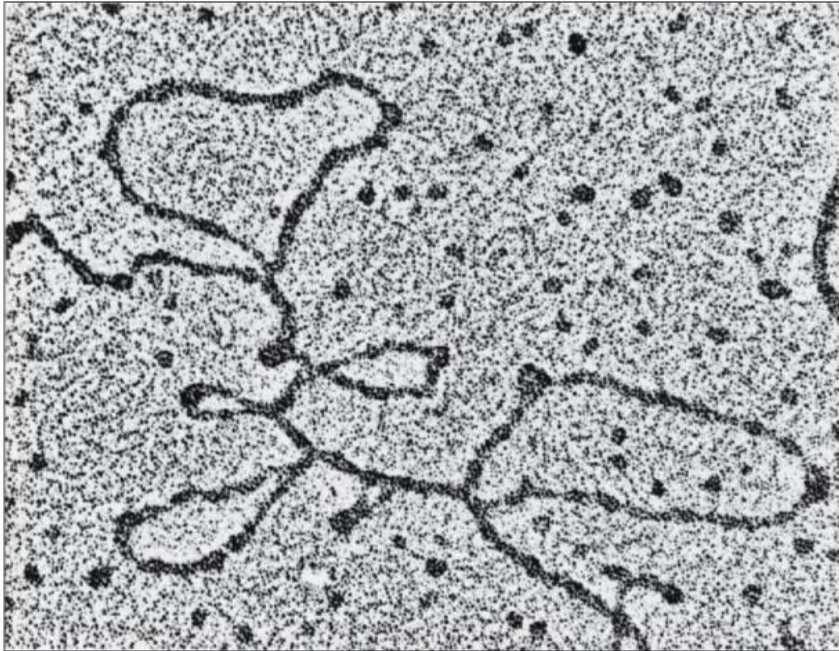


*Intron (intragenic region): nekódující sekvence RNA uvnitř genu, která je vystřižena*  
*Exon (expressed regions): kódující sekvence RNA, přeložená do proteinů*

## Sestřih pre-mRNA → mRNA

Objev intronů:

- při hybridizaci DNA s mRNA pod elektronovým mikroskopem
- určité části na DNA přebývaly (introny)
- tvorba smyček DNA (na obr. A až F)



*Intron (intragenic region): nekódující sekvence RNA uvnitř genu, která je vystřižena*

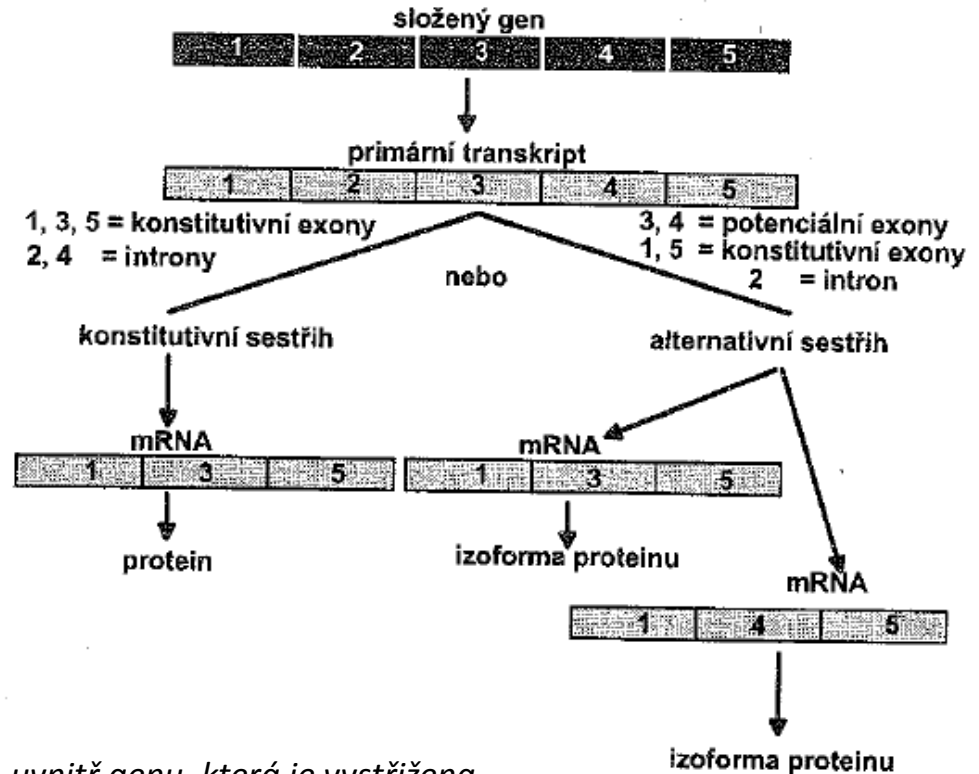
*Exon (expressed regions): kódující sekvence RNA, přeložená do proteinů*

## Konstitutivní vs. alternativní sestřih

a) Konstitutivní: po sestřihu vždy stejná molekula mRNA → stejný protein

b) Alternativní: vzniká více druhů molekul mRNA → různé izoformy proteinů

- regulace exprese
- regulace poměrů izoformem



*Intron (intragenic region): nekódující sekvence RNA uvnitř genu, která je vystřižena*

*Exon (expressed regions): kódující sekvence RNA, přeložená do proteinů*

*- konstitutivní exon: při všech posttranskripčních úpravách působí jako exon*

*- potenciální exon: při některých posttranskripčních úpravách působí jako exon, jindy jako intron*

*Izoformy proteinů: funkčně příbuzné proteiny, liší se v primární struktuře*

# Alternativní sestřih

## Skipped exon



## Splicing



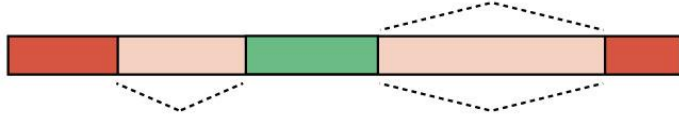
## Alternative 5' splice site



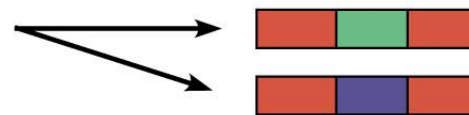
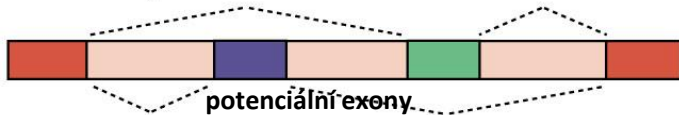
## Alternative 3' splice site



## Retained intron (výjimečně)



## Mutually exclusive exons

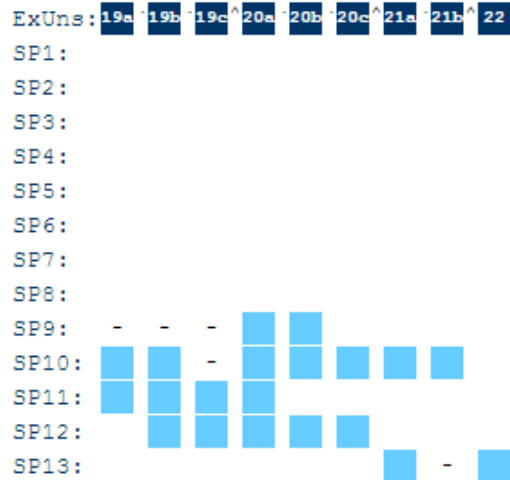
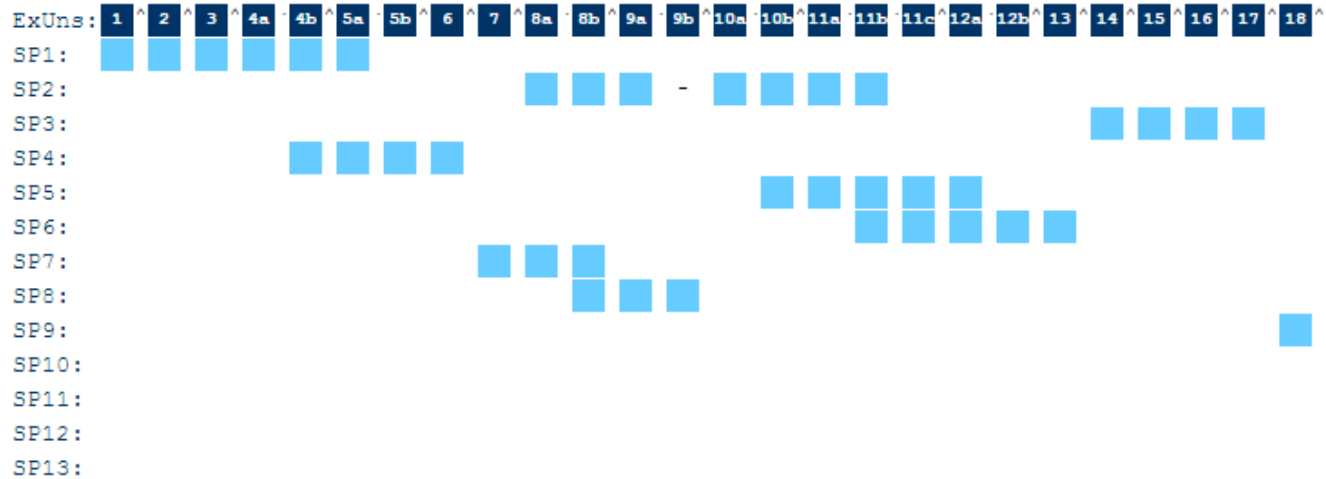


**pre-mRNAs**

**mRNAs**

# 13 variant alternativního sestřihu u genu SYNGAP1

## Alternative Splicing Database (ASD) splice patterns (SP) for SYNGAP1 Gene



22 exonů (písmeny označeny exonové jednotky)

^ intron

. spojení dvou exonových jednotek

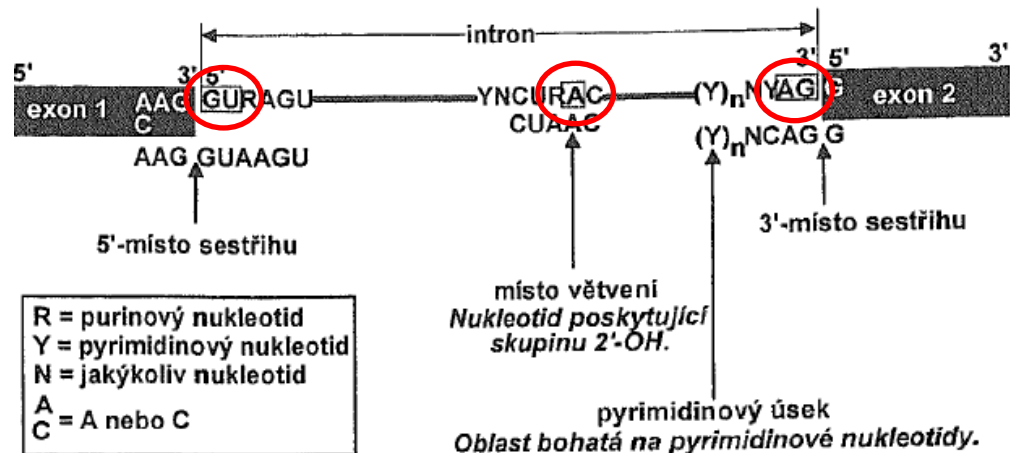
## Relevant External Links for SYNGAP1 Gene

[GeneLoc Exon Structure for SYNGAP1](#)

[ECgene alternative splicing isoforms for SYNGAP1](#)

## Mechanismus sestřihu mRNA

- Úprava primární struktury mRNA - pouze za účasti spliceozomu
- Proces řídí snRNP částice (komplex snRNA- a proteinů) - tvoří spliceozom
- primární struktura intronu určuje místo sestřihu: **GU-AG**
- **Intron:** 5'-konec **GU**; 3'-konec **AG**; uprostřed místo větvení **A**
- Vlastní sestřih probíhá pomocí chemické reakce: **Transesterifikace**

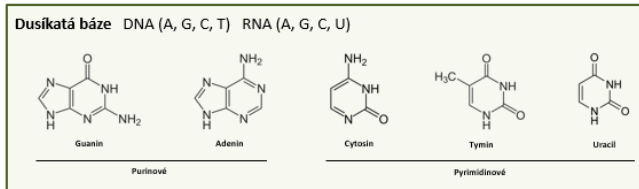
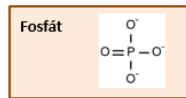
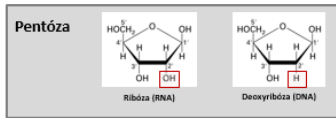
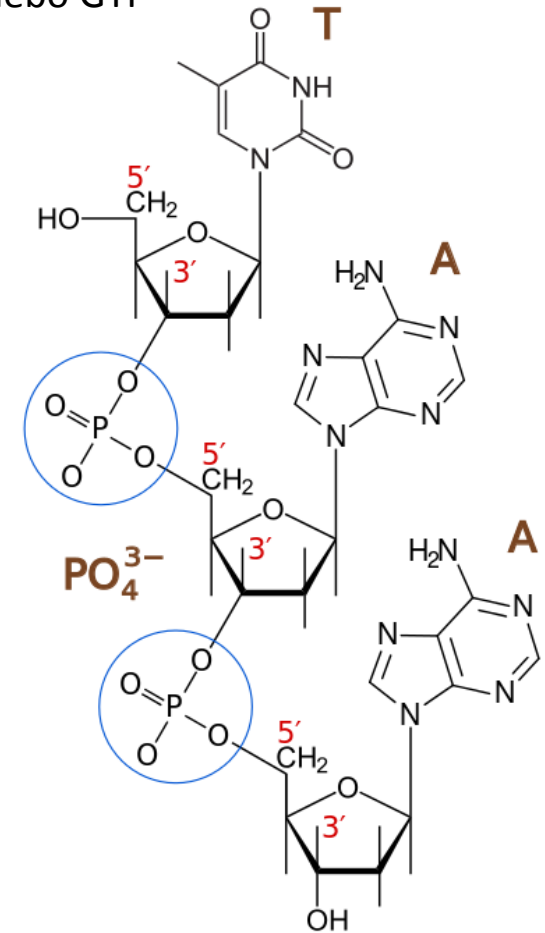
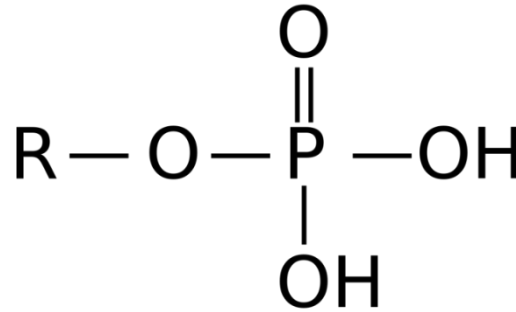
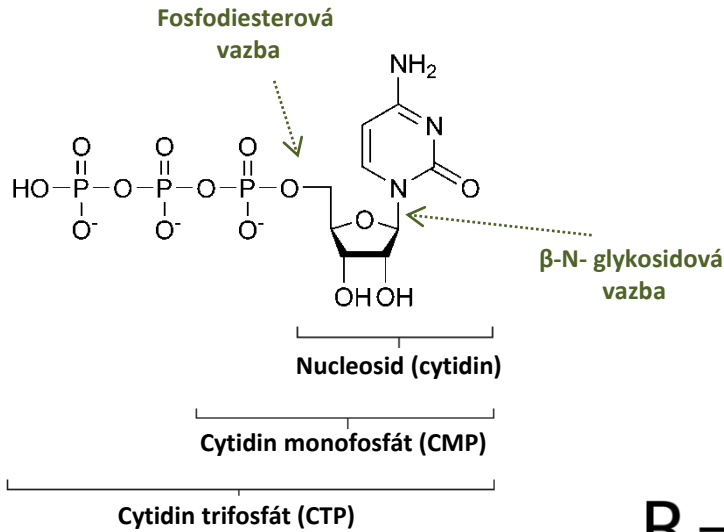


Sekvence a nukleotidy zakreslené do šedého rámečku jsou vysoce konzervativní (četnost 100 %).  
Ostatní sekvence se vyskytují v četnosti 70 - 95 %.  
Sekvence uvedené pod schématem intronu a exonu jsou sekvence, které byly zjištěny u savců.



## Transesterifikace v sestřihu pre-mRNA → mRNA

- přeměna fosfátového esteru v jiný bez hydrolyzy za nepřítomnosti ATP nebo GTP
- energie fosfodiesterové vazby zůstává zachována



*Estery: organické sloučeniny, ve kterých je -OH skupina nahrazena organickým zbytkem vzniklým z alkoholu po odštěpení vodíku.*

*Esterifikace: chemická reakce, při které ester vzniká*

*Nukleové kyseliny jsou polymery: vlákno nukleotidů navzájem spojených **fosfodiesterovou** vazbou. Dusíkatá báze (A, T/U, C, G) + cukr – pentóza (ribóza/deoxyribóza) + fosfát (mono- v řetězci, tri- volně)*

# Transesterifikace v sestřihu pre-RNA → mRNA

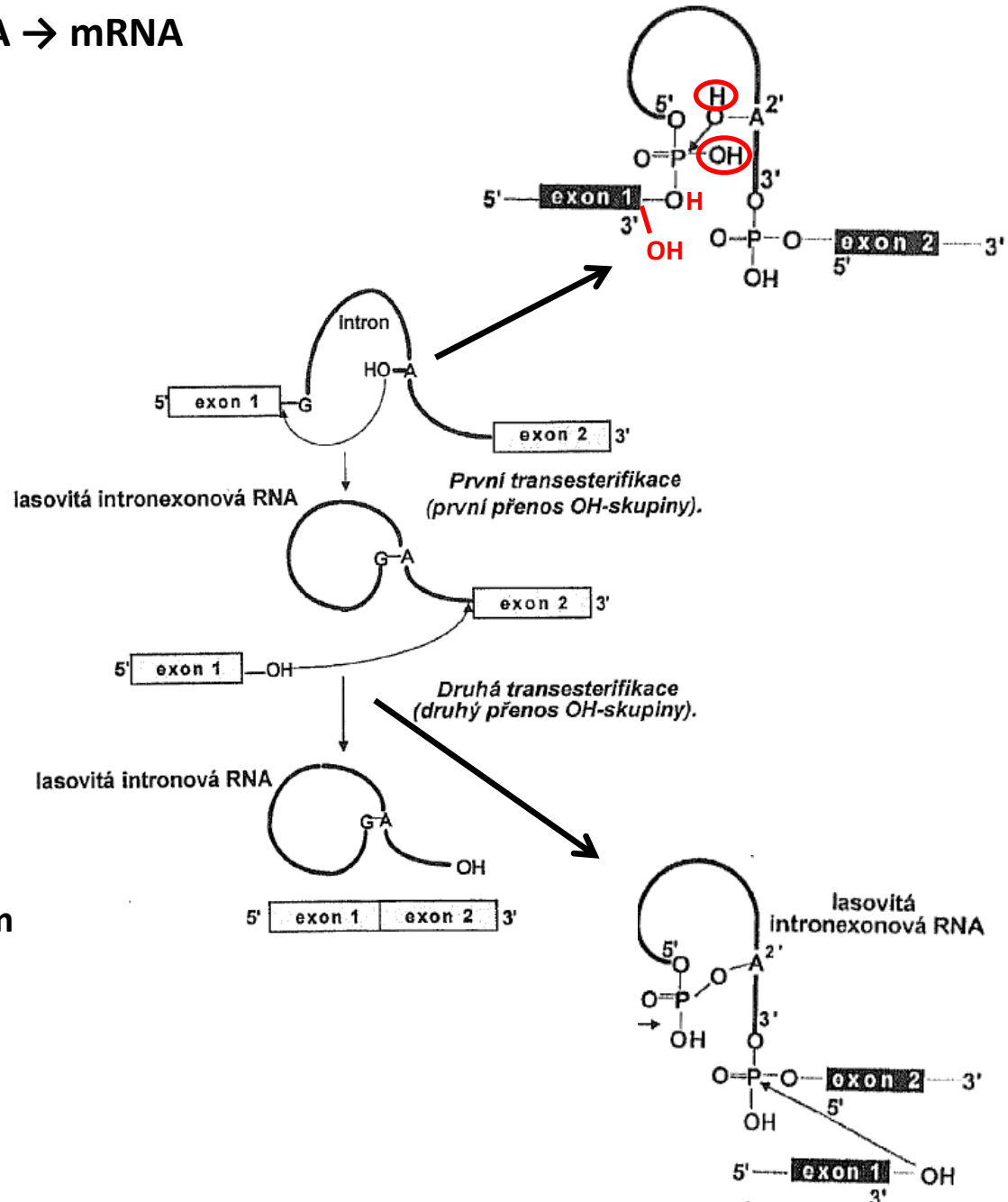
## První transesterifikace:

- spojení exonu 1 a intronu přes OH-skupiny
- odpad z vazby ( $H_2O$ ) je použit na zakončení 3'-konce exonu 1 (OH) a zakončení 5'-konce intronu (H)

## Druhá transesterifikace:

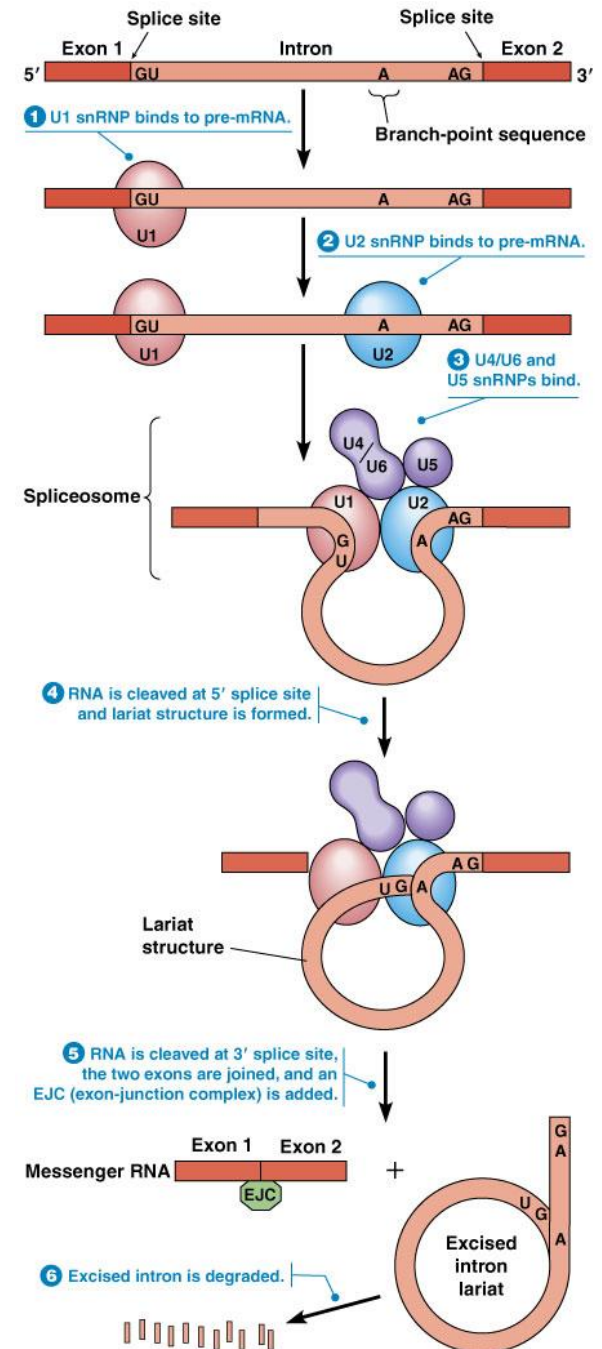
- spojení obou exonů do výsledné mRNA
- intron se odpojí ve formě lasovité RNA

Sekvence pro transesterifikaci jsou rozeznávány snRNP-částicemi a tvoří komplexy katalyzující sestřih - **Spliceozom**



# Spliceozom

- velká elipsoidní částice, sedimentační koeficient 60S
- **funkce:** odstraňuje introny z pre-mRNA (katalyzuje sestřih mRNA)
- tvořen komplexem **5 snRNA** (U1, U2, U4, U5, U6) a různými **proteiny**
- složitostí podobný ribozomům, pozorovatelný elektronovým mikroskopem

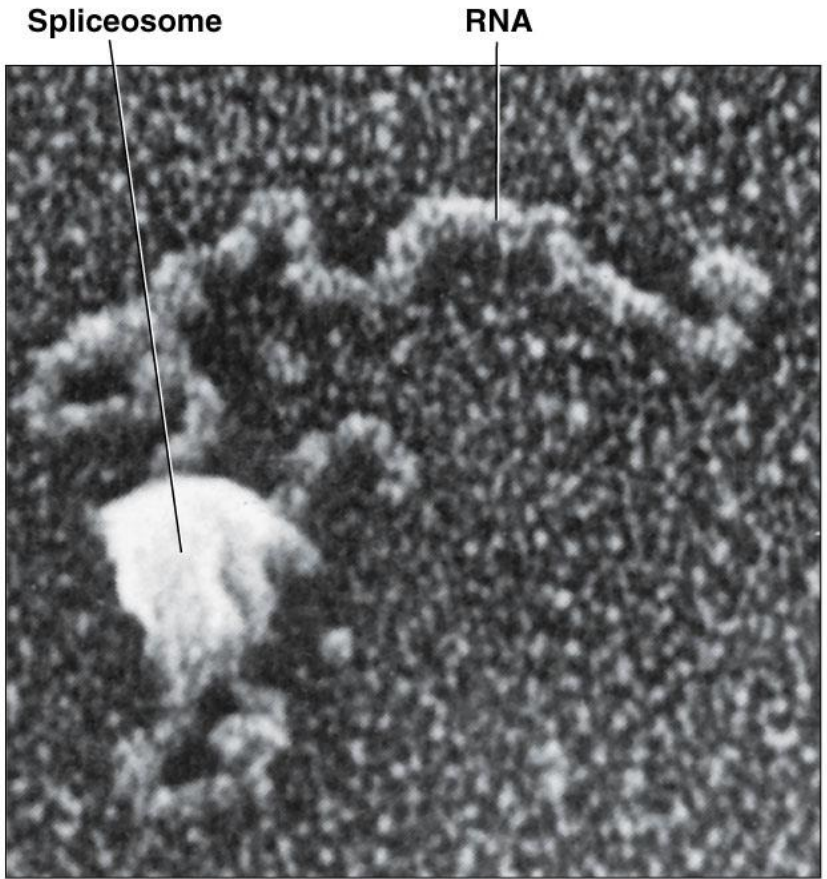
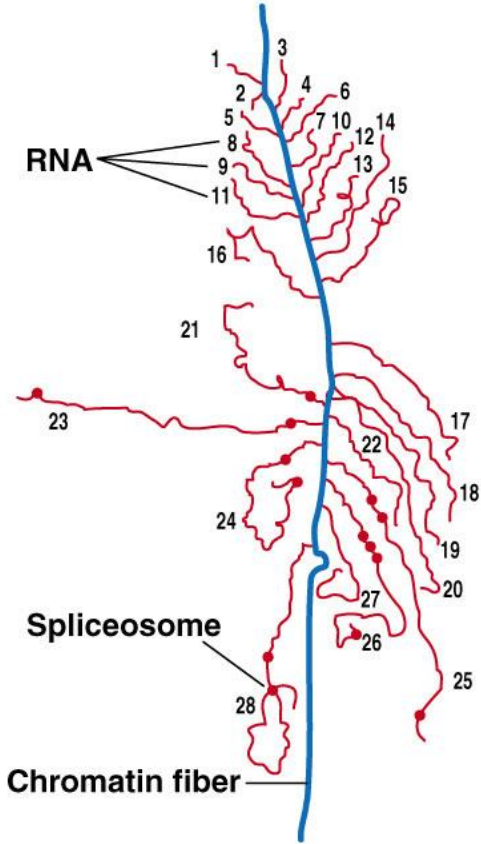


Lariat - laso

# Spliceozom



0.2  $\mu\text{m}$



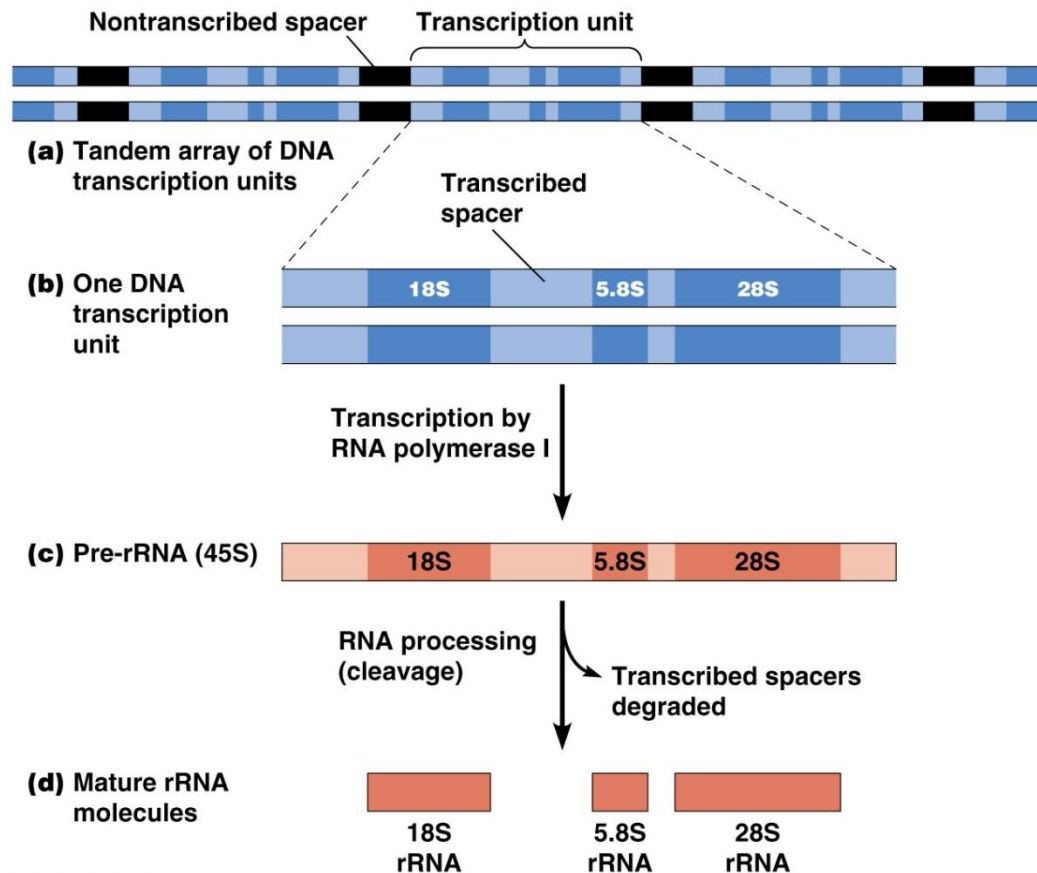
10 nm

*mRNA je výsledkem spojení exonů na stejné molekule primárního transkriptu (výjimečně  
dvou různých molekul - bimolekulární sestřih)*

[Video: mRNA sestřih \(splicing\)](#)

## Posttranskripční úpravy pre-rRNA

- transkripce RNA polymerázou I
- pre-rRNA obsahuje přepisy genů pro **5,8S**, **18S** a **28S** rRNA
- geny jsou lokalizovány v DNA jadérka, kde probíhá též jejich transkripce do pre-rRNA
- introny jsou vyštěpeny, ale **exony se nespojují**
- štěpení pomocí endonukleáz
- 3 jednotky rRNA jsou využity ke stavbě ribozomů spolu s ribozomovými proteiny



## Posttranskripční úpravy pre-tRNA

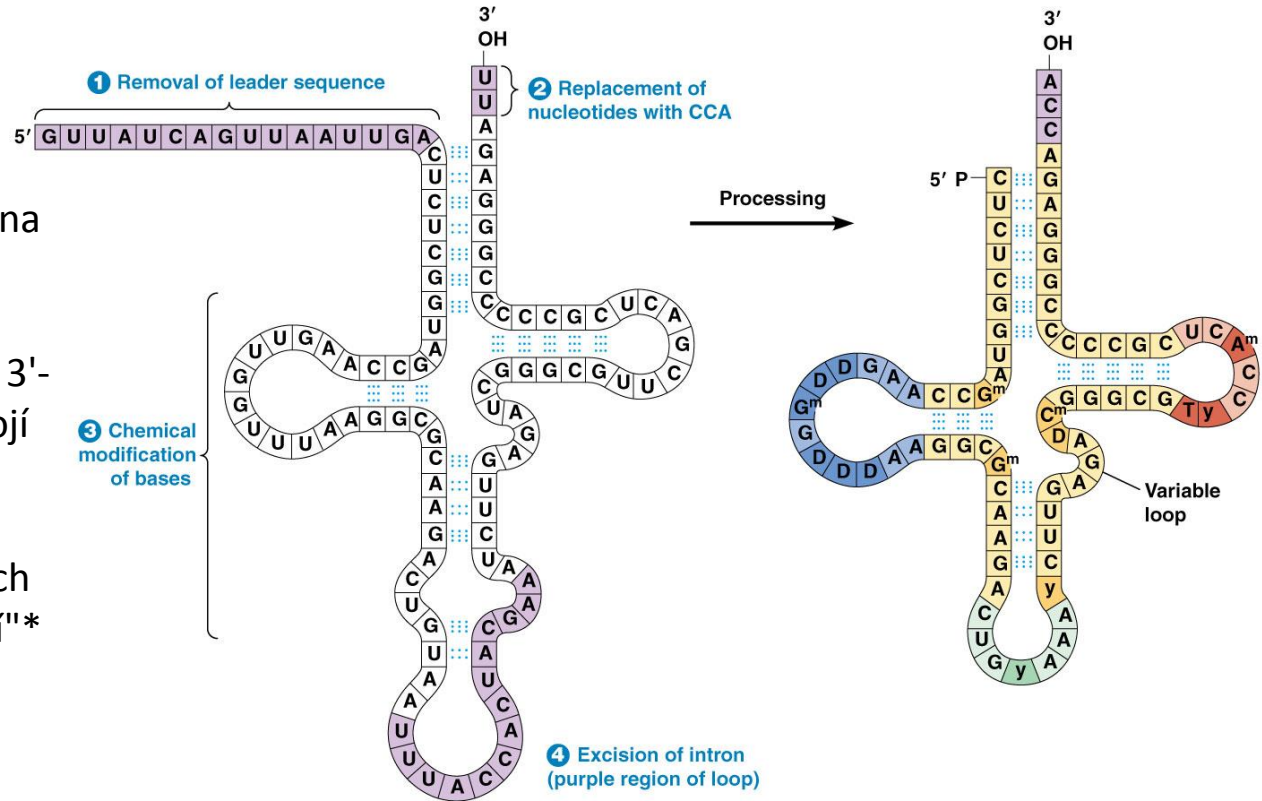
*jednotlivé tRNA uskutečňují přenos jednotlivých aminokyselin*

1. Odstranění vedoucí sekvence na 5'-konci

2. nahrazení dvou nukleotidů na 3'-konci sekvencí CCA (tam se připojí AMK)

3. chemická modifikace vybraných bází → tvorba "neobvyklých bází"\*

4. vystřížení intronů



**(a) Primary transcript (precursor) for yeast tyrosine tRNA**

© 2012 Pearson Education, Inc.

**(b) Mature tRNA, secondary structure**

\*neobvyklé báze zpřesňují syntézu proteinů (4-thiouridin, dihydrouridin, 1-methylguanozin...)

## **Posttranskripční úpravy genoforu mitochondrií**

- nepodléhají úpravě 5'-konce čepičkou
- začínají vedoucím kodonem AUG
- nejdůležitější úpravou je polyadenylace

## **Editace RNA**

- probíhá v mitochondriích trypanozom, vyšších rostlin a v genu pro apolipoprotein savců
- cílena inserce, delece nebo substituce nukleotidu mRNA s cílem pozměnit výsledný protein
- Kryptogen: strukturní gen s možností editace mRNA
- proces regulován tzv. gRNA (guide RNA)

## **Samosestřih**

- sestřih bez účasti proteinů (spliceozomu)
- Rybozym: RNA schopná samosestřihu



## Zajímavosti o RNA

- většina molekul mRNA rychle degraduje
- bakteriální mRNA má poločas rozpadu v řádu minut
- eukaryotická mRNA má poločas rozpadu v řádu hodin až dní
- tRNA a rRNA jsou stabilnější než mRNA
- transkripce umožňuje amplifikaci genetické informace díky množství kopií mRNA