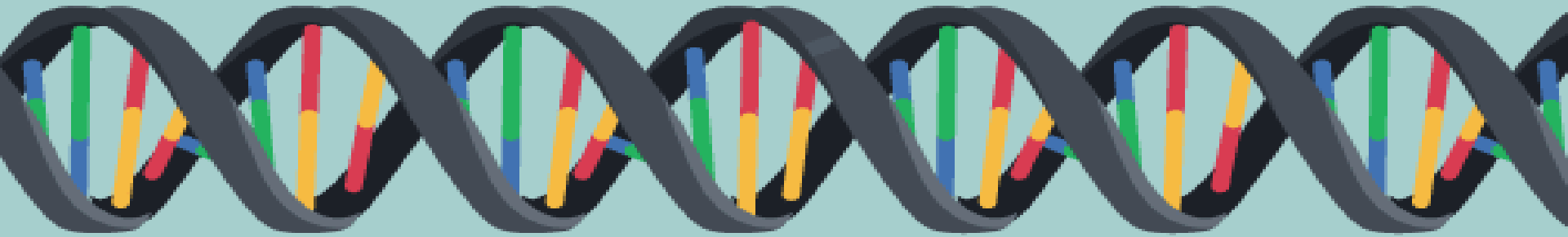
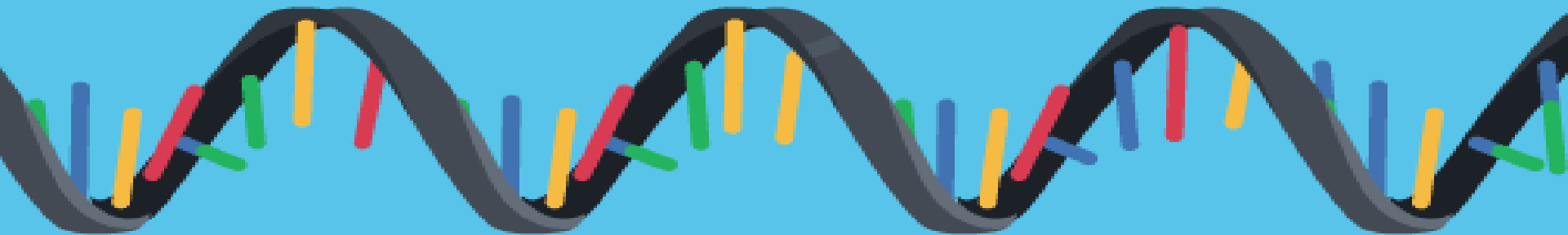


Molekulární biologie



4. Transkripce

Transkripce (přepis) genetické informace z DNA do RNA



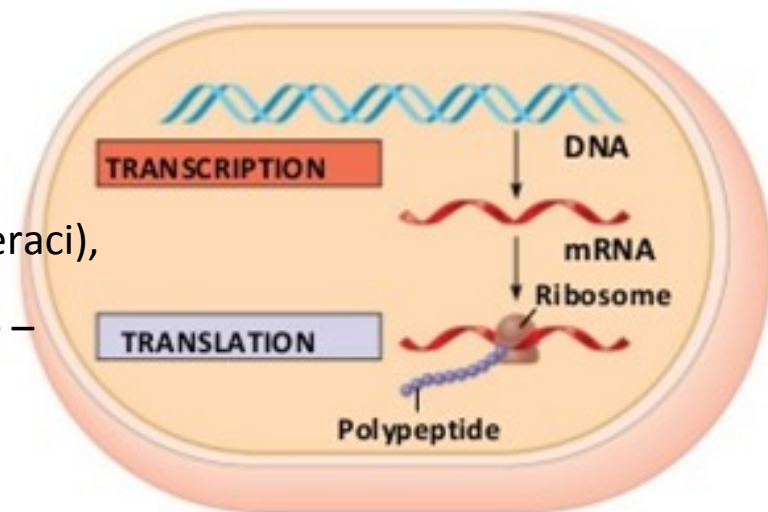
Osnova

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

Replikace vs. genová exprese

Přenos genetické informace:

- **replikace** (přenos z DNA do DNA, z generaci na generaci),
- **z DNA do proteinu** (2 kroky: **transkripce** a **translace** – exprese genetické informace/**genová exprese**).



Replikace vs. transkripce

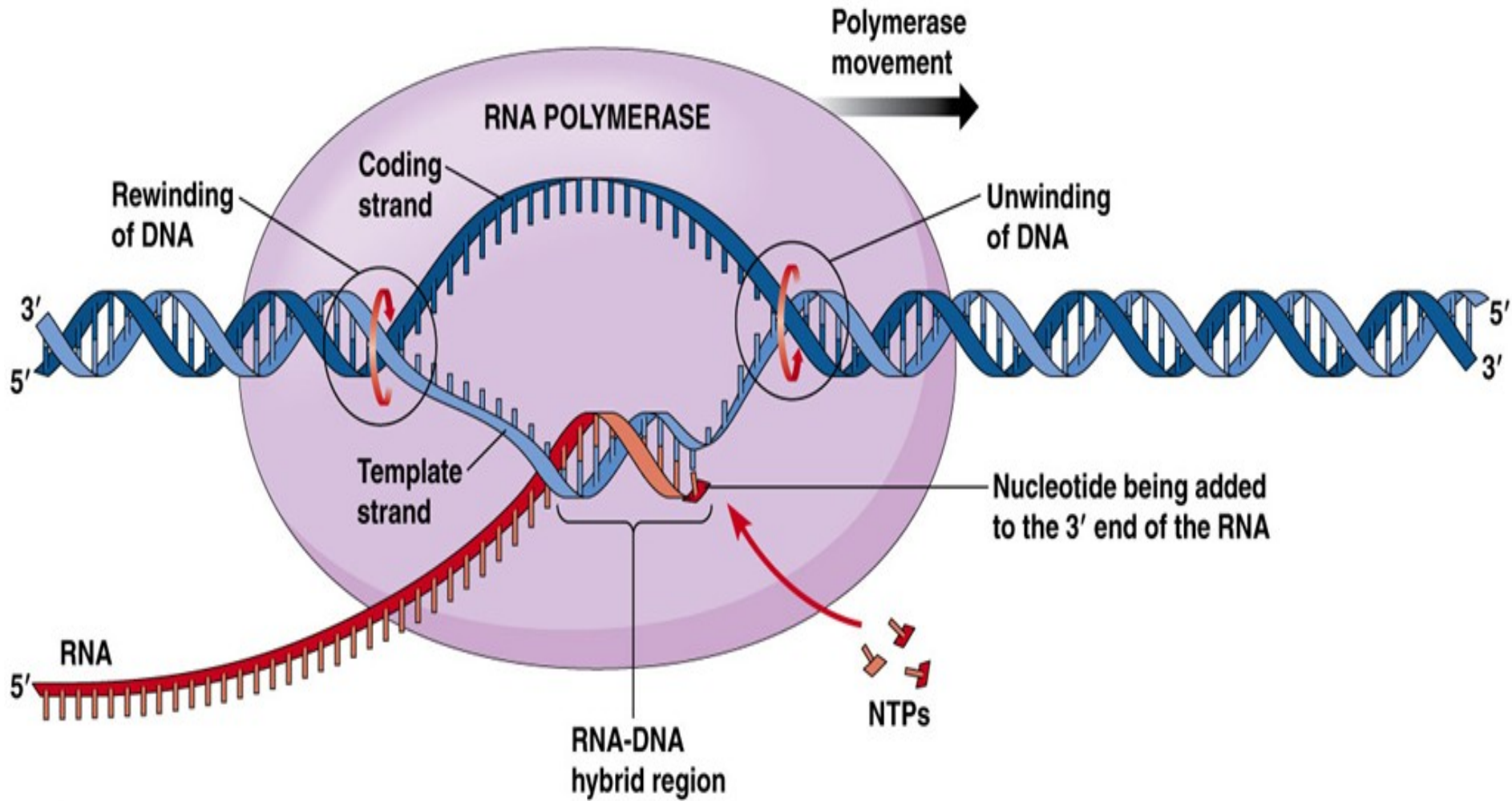
Transkripce (syntéza RNA) katalyzována RNA polymerázou je v mnoha ohledech podobná syntéze DNA (**replikaci**).

Hlavní rozdíly:

1. *Prekurzory jsou ribonukleozidtrifosfáty místo deoxyribonukleozidtrifosfátů.*
2. *RNA polymeráza místo DNA polymerázy.*
3. *Pouze 1 vlákno DNA (transkript) slouží jako templát (předloha) pro syntézu komplementárního vlákna RNA.*
4. *Transkripce začíná navázáním RNA-polymerázy na specifickou sekvenci - promotor (replikace začíná nasednutím primeru).*

Transkripce obecně

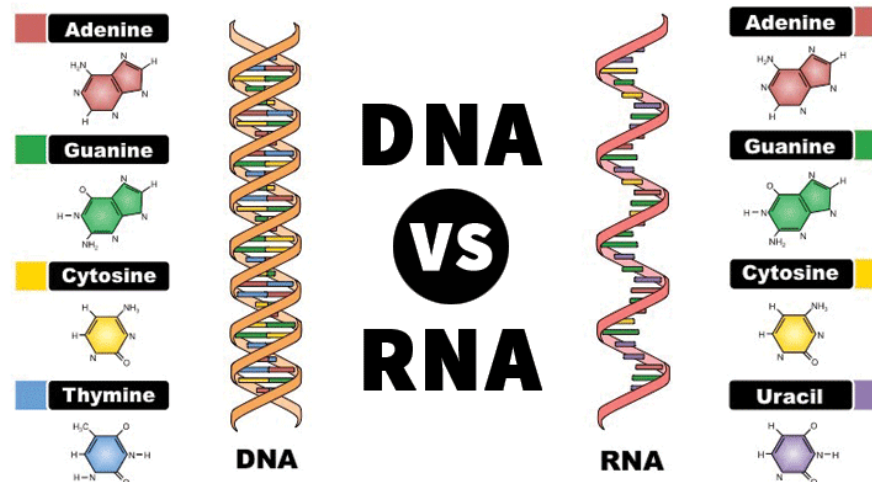
- **Transkripce je přenos genetické informace z DNA do RNA;** translace je přenos z RNA do proteinu.
- **Pouze 1 vlákno DNA (transkript) slouží jako templát (předloha)** pro syntézu komplementárního vlákna RNA pomocí enzymu **RNA-polymeráza**.
- **RNA-polymeráza se váže na specifickou sekvenci (promotor – počátek transkripce)** spolu s transkripčními faktory. Vzniká **transkripční bublina**: lokální rozvinutí DNA pomocí RNA-polymerázy.
- **Syntéza RNA probíhá v směru 5' → 3'** z promotoru připájením ribonukleozidtrifosfátů na základě komplementarity: pravidla o párování bází.
- Pravidla o párování bází jsou stejné jako při replikaci až na jeden rozdíl: v RNA se adenin páruje s uracilem (v DNA se adenin páruje s thyminem).
- Vzniklá molekula **RNA je komplementární k templátové DNA**.



RNA

(ribonukleová kyselina)

- 5 hlavních typů RNA: **mRNA (messengerová; mediátorová)**, **rRNA (ribozomová)**, **tRNA (transferová)**, snRNA (malá jaderná), miRNA (mikroRNA).
- **Jenom mRNA podléhá translaci do proteinů.** Ostatní typy RNA jsou již konečné funkční produkty.
- Transkripcí **strukturních genů** vzniká mRNA.
- **Funkce mRNA:** fungují jako spojky přenášející genetickou informaci z DNA do ribozomů, kde probíhá proteosyntéza (samotný vznik proteinů).



Transkripce prokaryot versus eukaryot

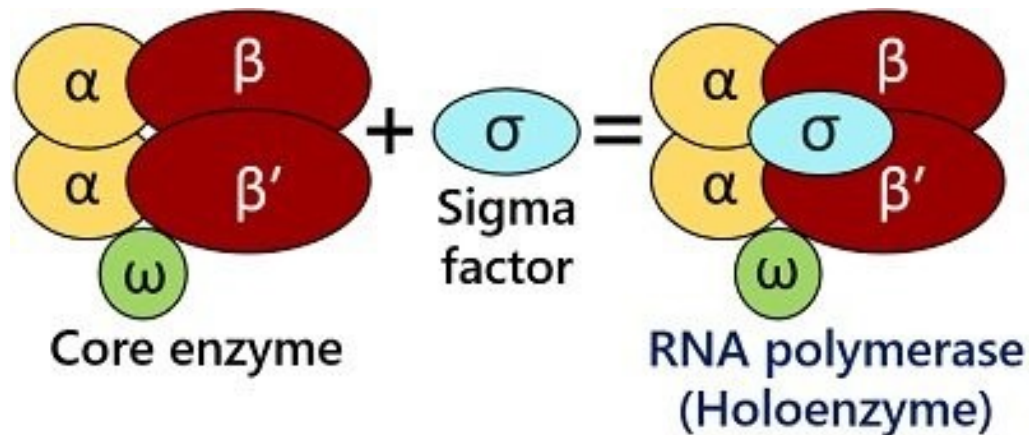
Základní rysy transkripce jsou stejné, ale v mnoha detailech se liší.

Prokaryota	Eukaryota
Místo transkripce: v cytoplazmě.	Místo transkripce: v jádru.
Simultánní transkripce a translace.	Transkripce a translace jsou odděleny časově i místně.
mRNA je přímo přepisována z templátu DNA bez úprav .	Z templátu DNA jsou vytvořeny pre-mRNA, které jsou dále upravovány .
RNA-polymeráza se skládá z 5 podjednotek. Jen jeden typ polymerázy .	RNA-polymeráza se skládá z 10-17 podjednotek. 5 typů polymeráz .
RNA-polymeráza spolu se sigma faktorem se přímo vážou na promotor.	RNA-polymeráza rozpoznává promotor pomocí transkripčních faktorů.

Transkripce prokaryot

Transkripce prokaryot

- Část DNA přepisována do RNA se označuje jako **transkripční jednotka** – může zahrnovat až několik genů.
- Vzniklá RNA je tzv. **primární transkript**, který je často **polygenní/polycistronní** (typické pro bakterie).
- **3 fáze transkripce**: (1.) **iniciace** nového řetězce RNA, (2.) **elongace** řetězce a (3.) **terminace** transkripce uvolněním vzniklé RNA.
- Kompletní RNA-polymeráza (**holoenzym**) – jeden typ s 5 podjednotkami.

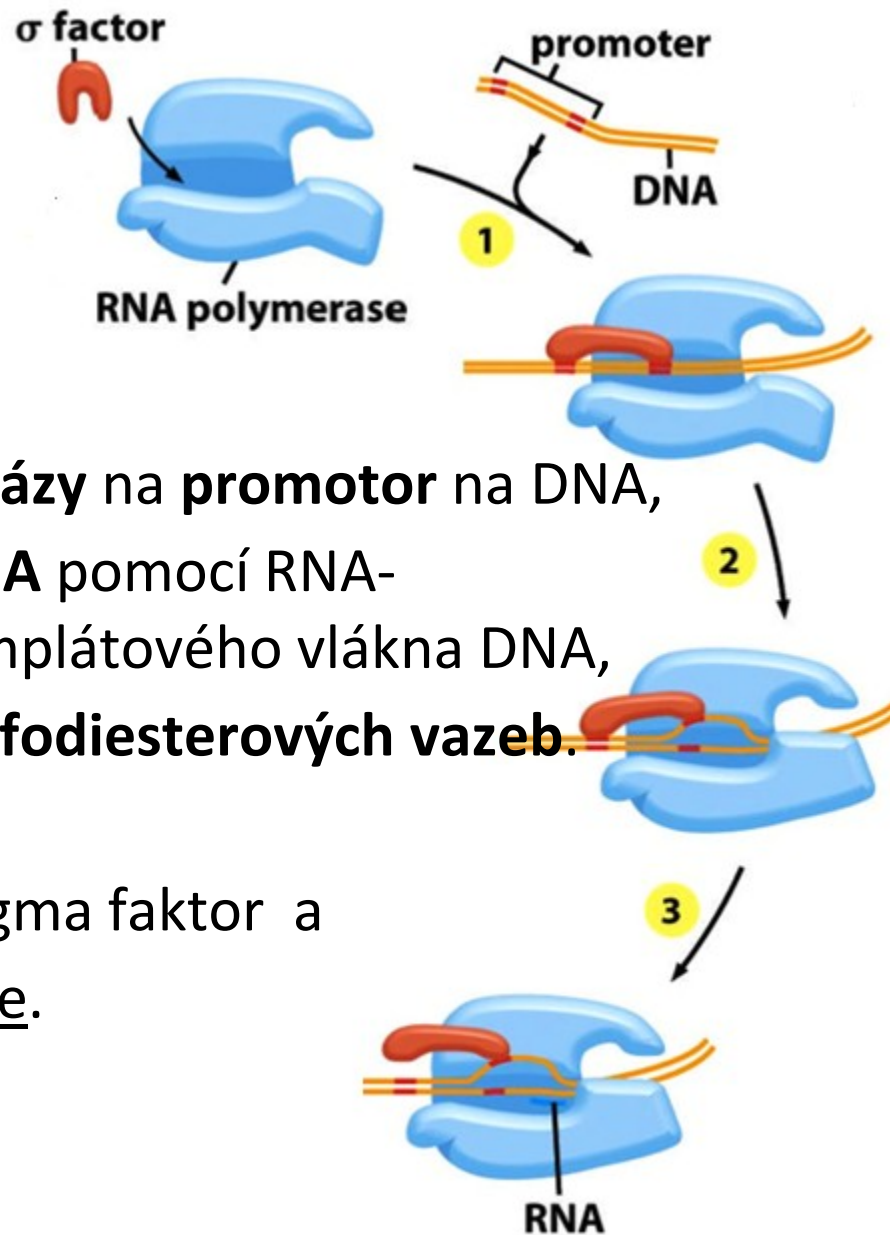


1. Iniclace

3 fáze iniciace:

1. **vazba holoenzymu RNA polymerázy na promotor na DNA,**
2. **lokální rozvinutí obou vláken DNA pomocí RNA-polymerázy – vznik volného templátového vlákna DNA,**
3. **tvorba prvních osmi až devíti fosfodiesterových vazeb.**

Po 3. kroku iniciace se pak uvolní sigma faktor a RNA-polymeráza zahájí fázi elongace.

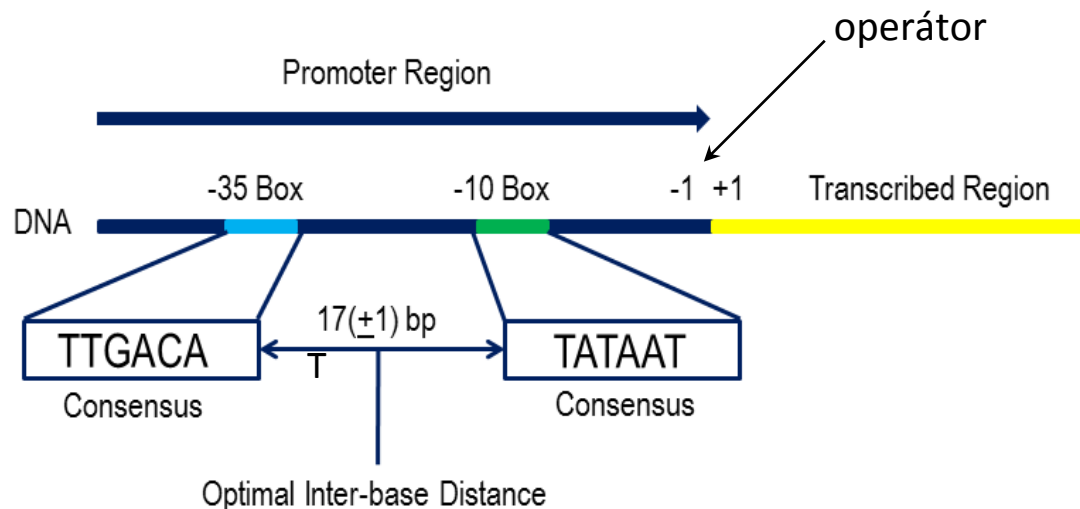


Promotor je specifická sekvence DNA, která je součástí transkripční jednotky, nasedá na něj RNA-polymeráza.

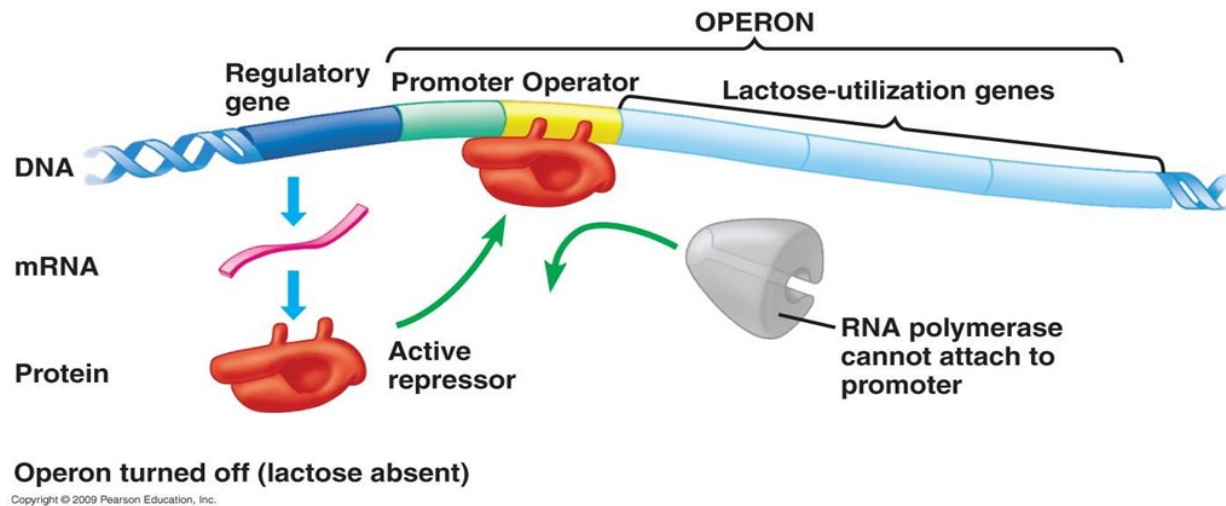
- Liší se určitými specifickými sekvencemi, co **ovlivňuje míru afinity k RNA-polymeráze**.
- **Silný/slabý promotor** - vysoká/nízká frekvence iniciace transkripce.
- Silnější promotor se více blíží konvenční sekvenci v místech:

a) kolem nukleotidu -35: 5' TTGACAT 3'

b) Pribnowův box* (-10): 5' TATAAT 3'



- **Transkripční jednotka (operon)** je část DNA přepisována do RNA složená z promotoru, operatoru a genů. Je řízena promotorem a také regulační oblastí – **operátorem**.
- Na operátor se může vázat regulační protein **represor**, který zastavuje transkripci.



Shineova-Dalgarnova sekvence

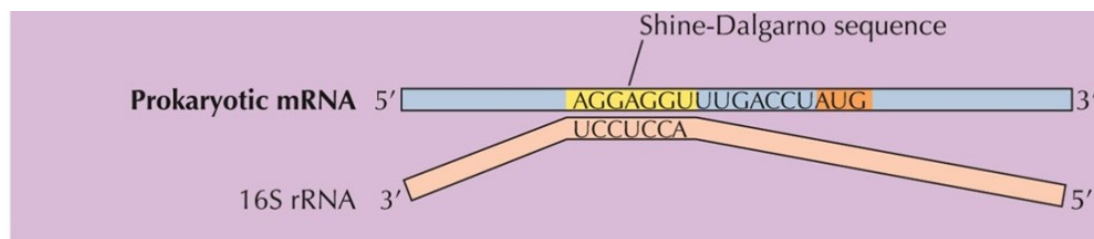
- Je konzervativní sekvence v prokaryotických mRNA, která je komplementární k sekvenci v blízkosti 5' konce 16S rRNA.
- Nachází se mezi promotorem (popř. za operátorem) a prvním strukturálním genem.
- **Zajišťuje vazbu na ribozom a nepřekládá se.**

Shineova-Dalgarnova sekvence: 5' AGGA 3'

Sekvence na ribozomu:

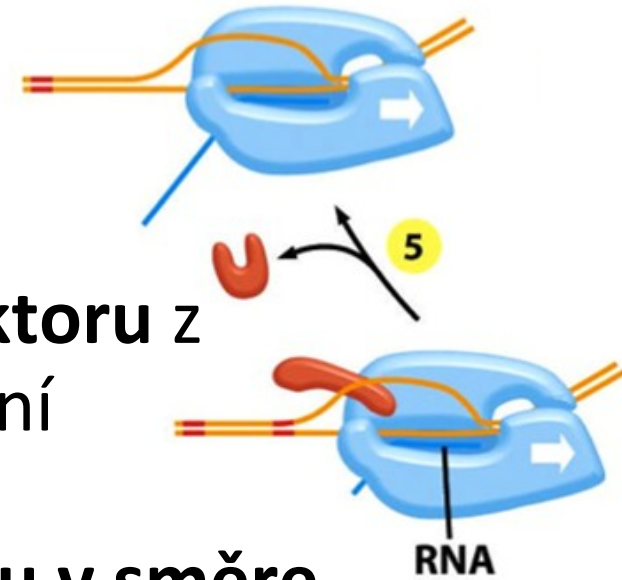
3' UCCU 5'

- Pokud primární transkript neobsahuje S-D sekvenci, nemůže se vázat k ribozomu a působí jako funkční RNA.



2. Elongace

- Elongace (prodlužování) řetězce RNA nastává **po uvolnění sigma faktoru** z RNA-polymerázy v místě transkripční bubliny.
- RNA-polymeráza při svém **pohybu v směre 5' → 3'** po DNA průběžně rozvíjí DNA a po přepise obnovuje její vinutí.
- Vznikající RNA řetězec je vytěsňován z templátového DNA vlákna.
- Oblast přechodného párování bází mezi rostoucím řetězcem a templátem DNA je krátká, pouze tři páry bází.

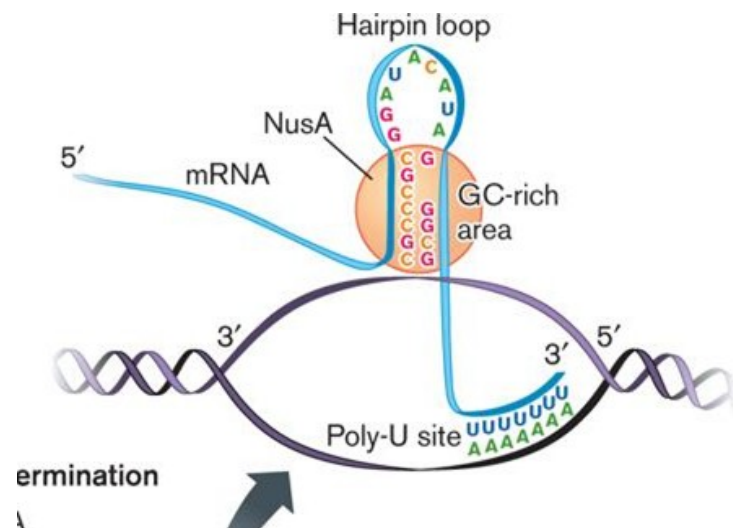


3. Terminace

- Nastává v okamžiku, kdy RNA-polymeráza zachytí **terminační signál** → rozpad transkripčního komplexu, uvolnění vzniklé RNA.
- 2 typy terminátorů transkripce:
A) nezávislé na rho-faktoru,
B) závislé na rho-faktoru.

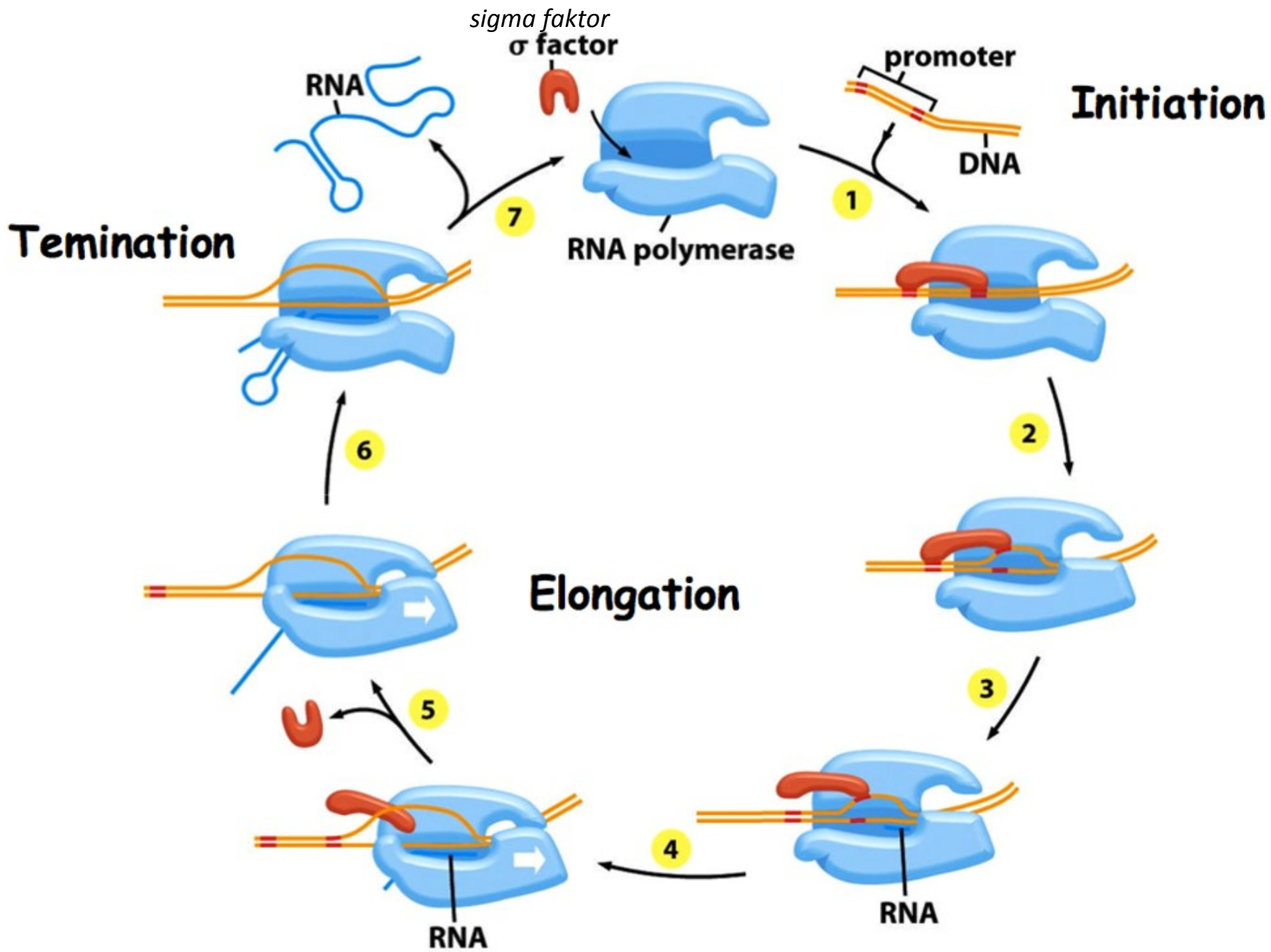
A) Terminátory nezávislé na rho

- Tento typ terminátoru obsahuje oblast bohatou na GC, za kterou následuje šest a více párů bází AT (oblast slabých vodíkových vazeb).
- Oblasti bohaté na GC obsahují invertované repetice, které se po transkripci párují na základě komplementarity a vytvářejí **vlásenkové struktury**.
- **Vlásenky zpomalují pohyb RNA-polymerázy po DNA – prodlužování je přerušeno.**



B) Terminátory závislé na rho

- **Součástí je rovněž tvorba vlásenkové struktury**, která zastavuje RNA-polymerázu.
- Terminátory závislé na rho navíc obsahují **sekvenci *rut*** (*rho utilisation*) **v blízkosti 3' konce transkriptu**, zajišťující vazebné místo pro protein rho.
- Rho se naváže na sekvenci *rut* a pohybuje se s RNA-polymerázou.
- Když RNA-polymeráza narazí na vlásenku, zastaví se a protein rho projede vlásenkou a svou helikázovou aktivitou uvolní párování mezi bázemi DNA a RNA (za spotřeby ATP) → uvolení transkriptu.

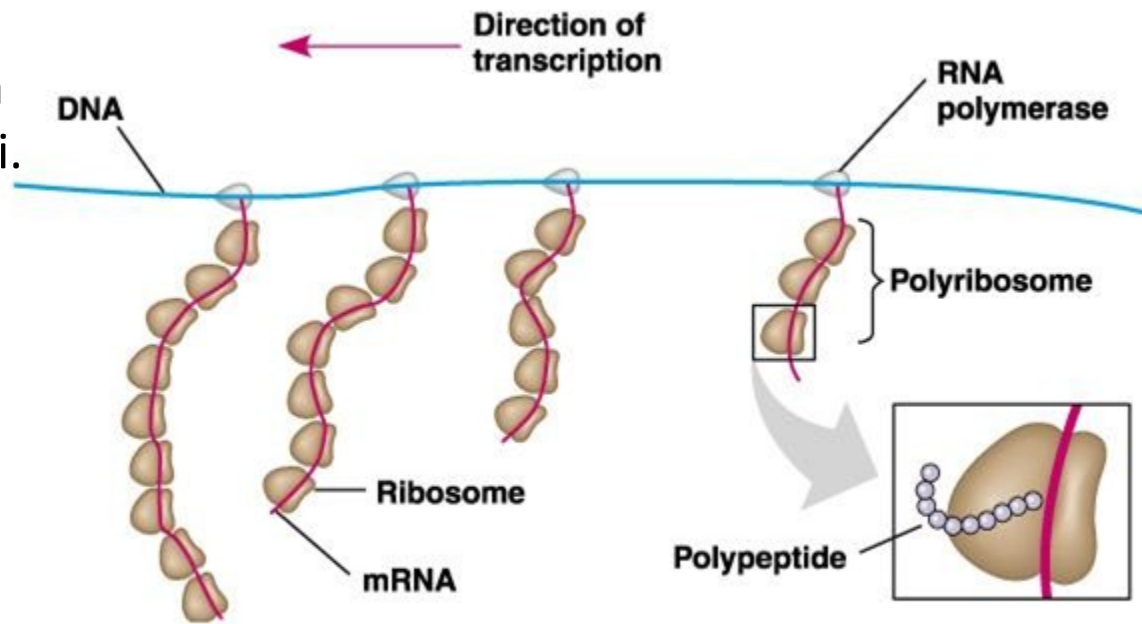


Prokaryotická mRNA

- **posttranskripčně se neupravuje** a slouží přímo pro tvorbu polypeptidu.
- U prokaryot jsou geny polycistronní (více genů na jednom transkriptu mRNA).
- Rozpad během několika minut účinkem ribonukleázy (RNázy) ve směru 5' → 3'.
- **Translace 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.

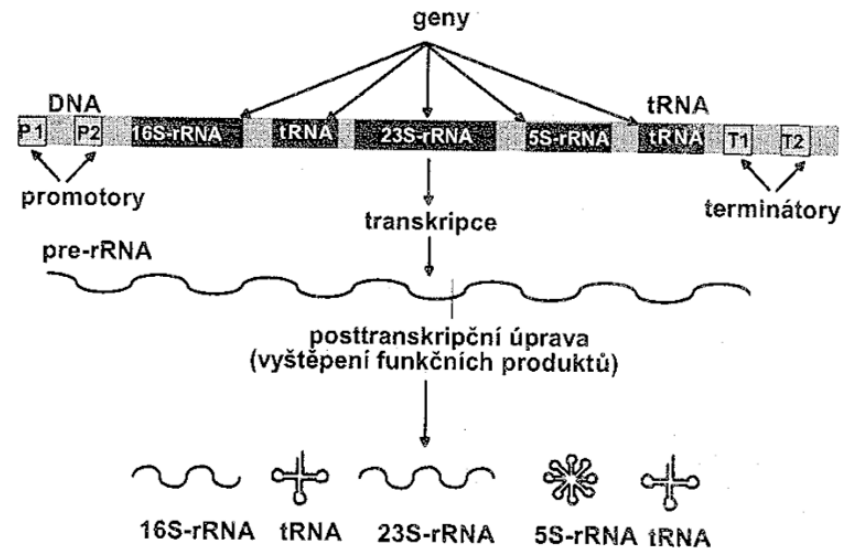
Polyribosom: více ribozomů na jedné mRNA urychluje translaci.

Spojení transkripce s translací umožňuje efektivní syntézu proteinů (např: 15 molekul mRNA, každá pokryta 30 ribozomy).



Prokaryotická rRNA

- Vytváří spolu se specifickými bílkovinami buněčnou strukturu – ribozom.
- 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



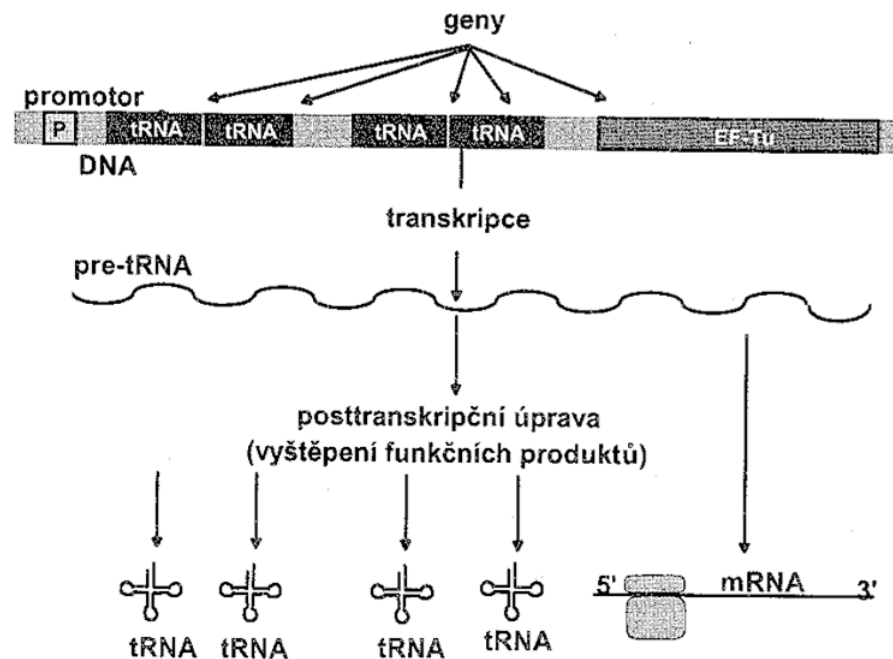
Jednotka S (Svedberg) - sedimentační koeficient

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

Prokaryotická tRNA

• Zajišťuje přenos aminokyselin pro začlenění do polypeptidového řetězce při translaci.

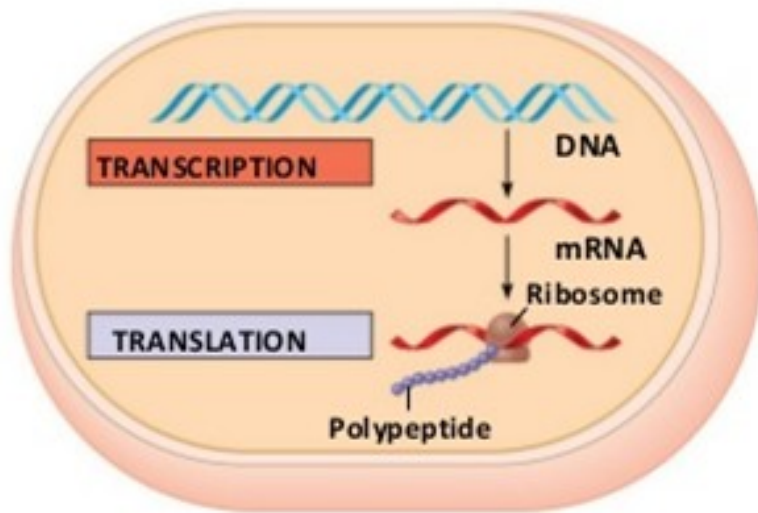
- jen jeden promotor, poslední gen je strukturní (např. pro elongační faktor EF-Tu)
- strukturní gen umožňuje vazbu na ribozom, protože obsahuje Shineovu-Dalgarnovu sekvenci



Transkripce eukaryot

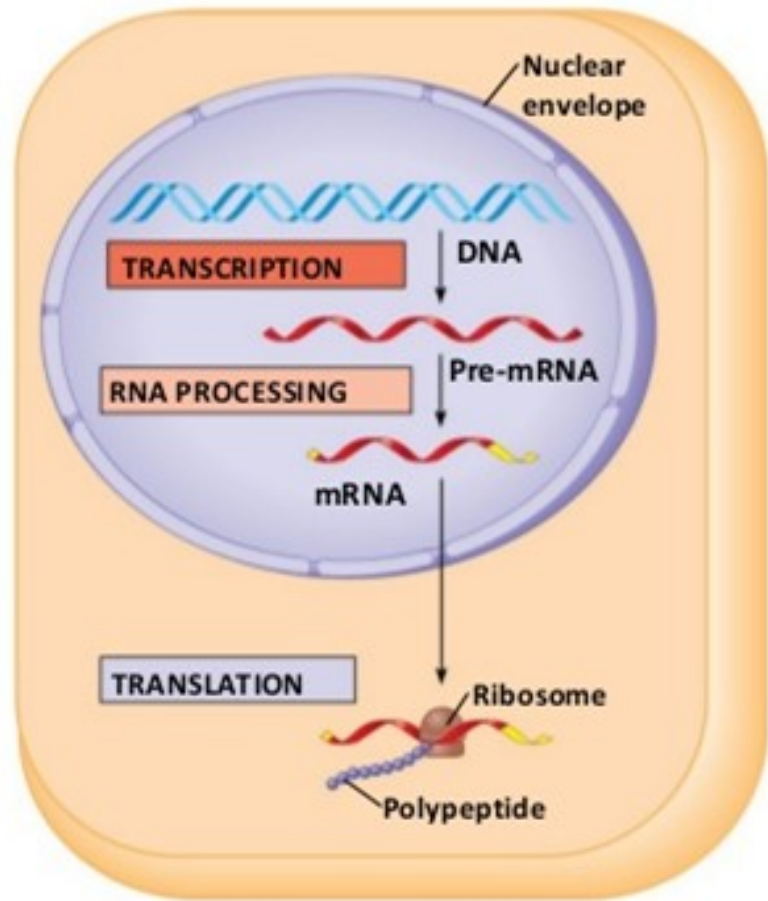
Transkripce eukaryot

- **Složitější** – RNA se syntetizuje v jádře – vznik primárních transkriptů → mRNA se musí přenést k ribozomům do cytoplazmy.
- Každá molekula eukaryotické mRNA obsahuje oblast **pouze 1 genu** (jsou monogenní) → ***monocistronní mRNA*** (u prokaryot polycistronní).
- 5 různých RNA polymeráz.
- Pre-mRNA podléhá **3 základním post-transkripčním modifikacím**.
- Soubor primárních transkriptů v jádře se nazývá **heterogenní jaderná RNA (hnRNA)**.
- RNA-transkripty už během syntézy pokrývají RNA-vazebné proteiny, které jich chrání během úprav a transportu před ribonukleázami.
- Poločas rozpadu eukaryotické RNA: cca 5 hodin, u prokaryotické RNA: cca 5 minut.



(a) Bacterial cell

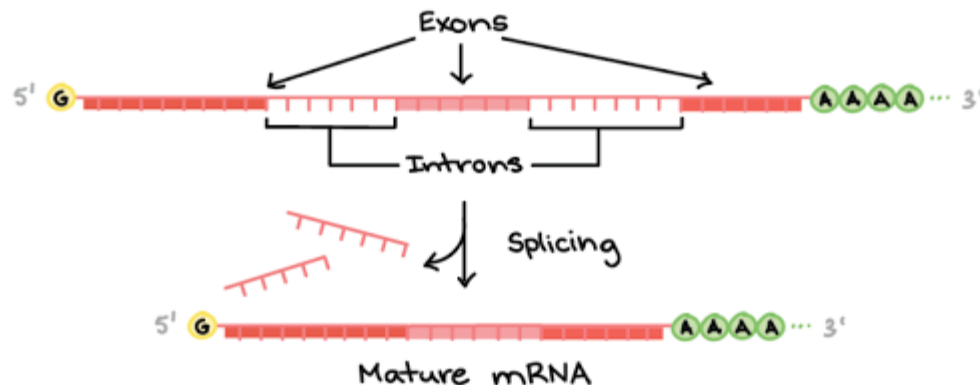
© 2011 Pearson Education, Inc.



(b) Eukaryotic cell

3 modifikace RNA

1. K **5'-koncům** primárních transkriptů se připojují **7-metylguanozinové čepičky**.
2. Ke **3'-koncům** se připojují úseky **poly(A)** – polyadenilací vznikají **polyadenozinové ocásky** (20-200 nukleotidů).
3. Pokud jsou přítomny **introny**, probíhá jejich **vyštěpení**.



Typy RNA

Kódující RNA

- Informace z DNA je přenesena pomocí mRNA do ribozomu, kde je přeložena do sekvence aminokyselin tvořících proteiny.
- Tvoří asi jen 3% všech transkriptů.
- **Patří sem exony v pre-mRNA**: prekurzorová mRNA (též hnRNA).

Nekódující RNA

- Cca 97% transkriptů – regulační funkce.
- Tvoří ji zejména **introny** vystřižené z mRNA, rRNA, tRNA a **regulační RNA** (snRNA, miRNA, siRNA atd.).

Regulační RNA

Jsou to krátké molekuly RNA se sekvencí komplementární k určitým částem mRNA nebo DNA.

- Mají schopnost inhibovat genovou expresi vazbou na mRNA.
- Působí mechanismem **RNA interference (RNAi)** – dvouvláknová RNA brání expresi genu, který je alespoň částečně homologní s touto RNA.

• Patří sem:

– **miRNA** (microRNA)

– **siRNA** (small inhibitory RNA)

} *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

miRNA

- Krátké interferující RNA, 21-22 nukleotidů, vzniká z pre-miRNA.
- Funkce: **RNA silencing a post-transkripční regulace genové exprese.**
 - **RNA silencing:** štěpení řetězce mRNA na dva kusy (endonukleázami), destabilizace mRNA zkrácením poly(A) konce (dřívější degradace exonukleázami).
 - **Post-transkripční regulace genové exprese:** párování s komplementárními sekvencemi mRNA – snížení účinnosti translace do proteinu na ribozomu (fyzicky blokuje).

siRNA

- Malá inhibiční RNA, 20-25 nukleotidů.
- Funkce: **post-transkripční RNA silencing.**

5 typů RNA-polymeráz

- Složitější, pro zahájení transkripce vyžadují pomoc proteinů: **transkripčních faktorů**.
- Každá má svůj **specifický promotor** (bakterie: jeden typ RNA-polymerázy a jeden typ promotoru)

Enzym	Umístnění	Produkty
RNA-polymeráza I	Jadérko	rRNA, kromě 5S rRNA
RNA-polymeráza II	Jádro	Jaderné pre-mRNA
RNA-polymeráza III	Jádro	tRNA, 5S rRNA a další snRNA
RNA-polymeráza IV	Jádro (rostlina)	Malé interferující RNA (siRNA)
RNA-polymeráza V	Jádro (rostlina)	Některé siRNA + nekodující transkripty siRNA

1. Iniclace (RNA-polymeráza II)

Navázání transkripčního faktoru (TF) na promotor DNA → vytvoření iniciačního komplexu pro navázání RNA-pol. II.

Transkripční faktory

- Vyžaduje **spoluúčast několika základních (bazálních) transkripčních faktorů (TF)**.
- Účinnost iniciace ovlivňují další TF a regulační sekvence **zesilovače** (enhancers) a **tlumiče** (silencers).
- Pro efektivní iniciaci musí základní TF interagovat s promotory ve správním pořadí.
- Všechny základní TF se označují **TFII**.

Promotory (RNA-pol. II)

Konzervativní krátké sekvence na DNA rozpoznávány TF.

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

- Nejblíže k místu začátku transkripce (nuleotid +1).
- Má důležitou úlohu při začátku transkripce: vazba 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

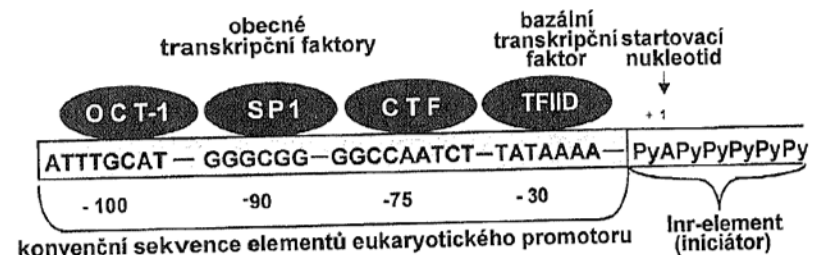
- nukleotid -90.
- vazba TF **SP1**, zvyšuje sílu promotoru (enhancer).
- je fosforylován proteinkinázou vázanou na DNA - stimulace tvorby přediniciačního komplexu
- umožňuje vazbu TFIID na TATA-box.

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.

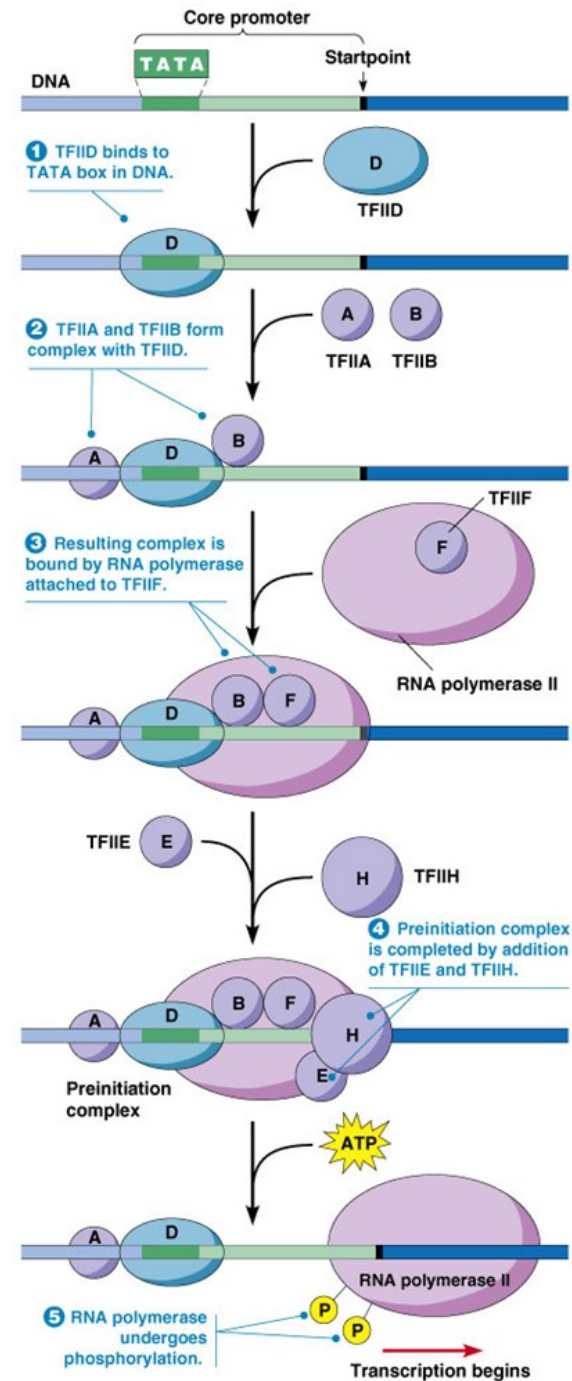
Provozní geny mají jen Inr-element bez TATA-boxu (Hognessův box).

1. Iniciacce (RNA-polymeráza II)

1. Navázání TFIIID na promotor v místě TATA-boxu.
2. Postupné navazování dalších TF (TFIIA+B+D+F+E+H).
3. Vytvoření **iniciačního transkripčního komplexu**: začátek elongace pre-mRNA.

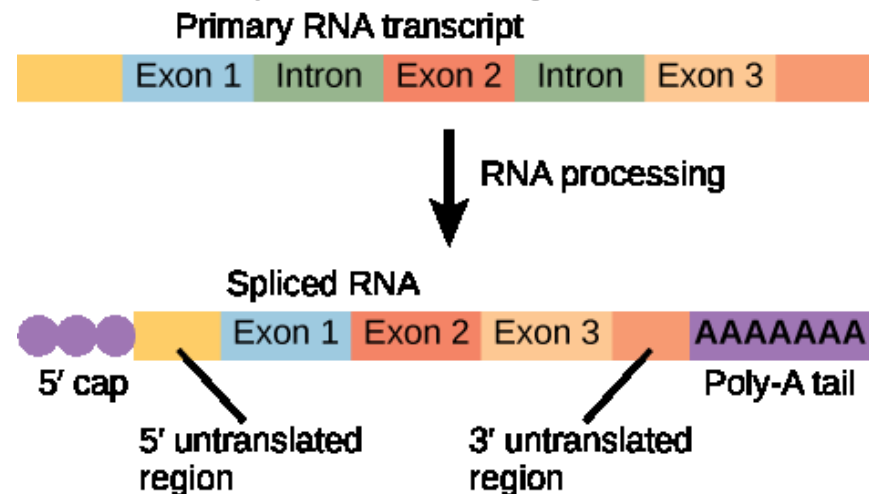
Význam transkripčních faktorů:

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



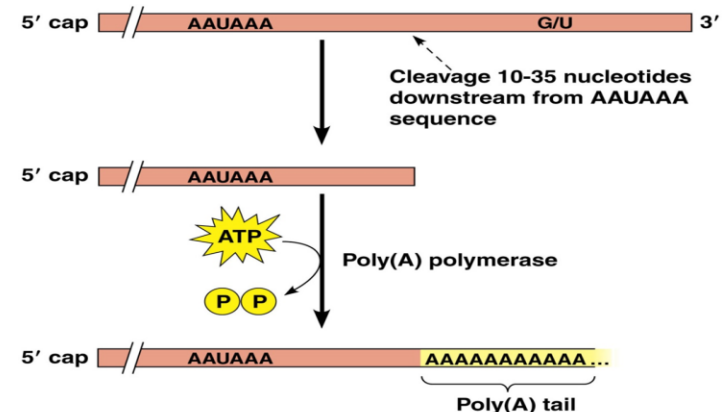
2. Elongace a připojení čepičky na 5' konec RNA

- **RNA-polymeráza II** elonguje řetězec RNA stejným mechanismem jako u prokaryot.
- Na počátku elongace se modifikují **5' konce** pre-mRNA přidáním **7-metylguanozinové čepičky**.
- **Funkce čepičky:** ochrana před degradací a iniciace translace.



3. Terminace a přidání poly(A) na 3' konec RNA

- **3' konec RNA vzniká endonukleázovým štěpením** primárního transkriptu (nikoli terminací transkripce):
 - Po směru v místě vzdáleném 11-30 nukleotidů od polyadenylačního signálu (AAUAAA).
 - Proti směru v místě bohaté na GC na konci transkripční jednotky.
- Po vytvoření 3' konce RNA: **poly(A)-polymeráza** přidává na 3' konec až 200 zbytků adenosinmonofosfátu → **polyadenylace**.
- **Funkce poly(A) konce:**
ochrana před degradací, export z jádra do cytoplazmy.
- Vznik pre-mRNA.



Post-transkripční úpravy RNA a mechanizmy sestřihu

Post-transkripční úpravy RNA

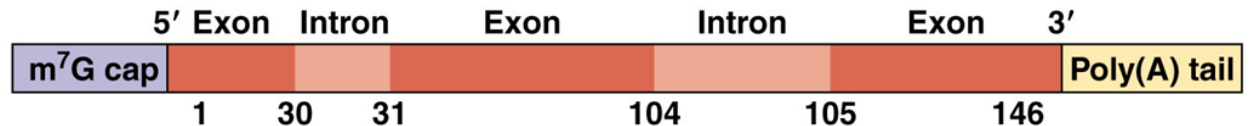
Primární transkripty jsou dlouhé molekuly a musí být zkráceny, aby mohly být transportovány z jádra do cytoplasmy.

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** (vystřížení intronů); editace.

Primary transcript (pre-mRNA)



Introns excised and exons spliced together



Intron (intra-genic region): nekódující sekvence RNA uvnitř genu, která je vystřížena

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

Sestřih RNA

3 mechanismy sestřihu:

1. **Introny pre-tRNA** se vyštepují přesným endonukleázovým štěpením → ligace.
2. **Introny pre-rRNA** se vyštepují autokatalytickou reakcí samotní molekulou RNA.
3. **Introny pre-mRNA (hnRNA)** se odstraňují pomocí spliceozomov v jádře.

Sekvenční signály pro sestřihy se nacházejí na koncích intronů.

Sestřih pre-tRNA

2 fáze:

1. Transkript se sestřihne na konci intronu sestřihovou endonukleázou vázanou na jaderní membráně.
2. Sestřihová ligáza spojí dvě části tRNA, vzniká zralá forma tRNA bez intronu.

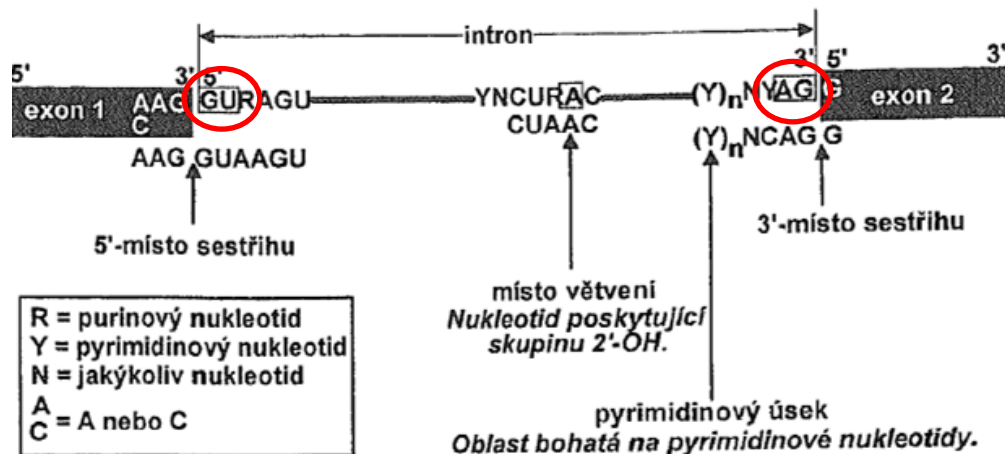
Specifita reakcí je dána v trojrozměrné struktuře pre-tRNA, ne v sekvenci.

Sestřih pre-rRNA

Intron se vyštěpuje bez účasti enzymu – **autokatalytický sestřih (samosestřih)**.

Sestřih pre-mRNA

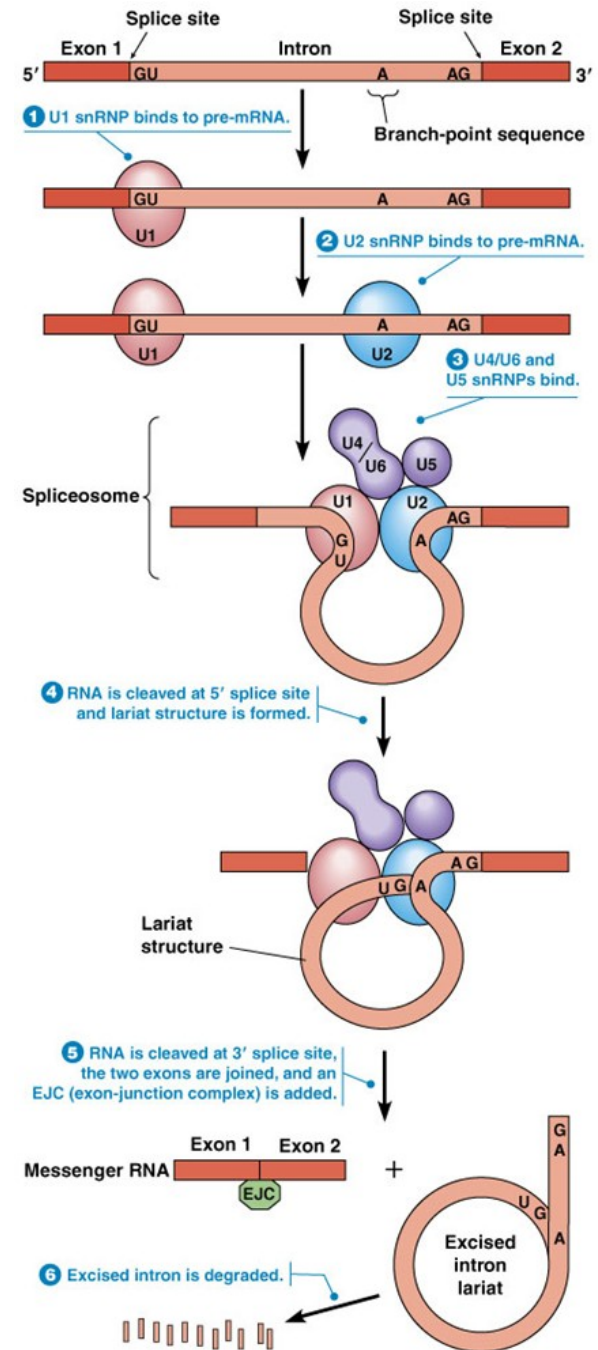
- Sestřih pomocí **komplexů RNA (snRNA) a proteinů** – částice snRNP, které tvoří **spliceozomy**.
- Primární struktura **intronu určuje místo sestřihu**.
- Vlastní sestřih probíhá pomocí chemické reakce: **transesterifikace** (přeměna fosfátového esteru v jiný bez hydrolýzy za nepřítomnosti ATP nebo GTP).



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.

Spliceozom

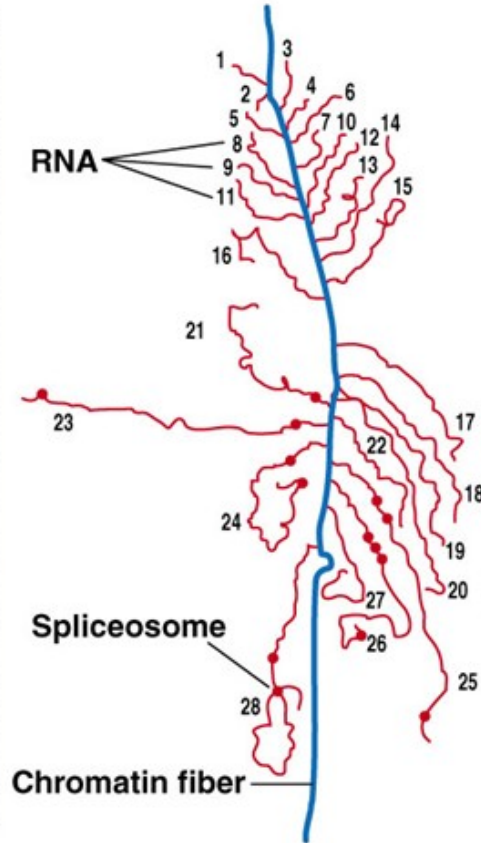
Komplex proteinů a RNA, který **katalyzuje sestřih intronů z primárních transkriptů (pre-mRNA) jaderných genů eukaryot.**



Spliceozom

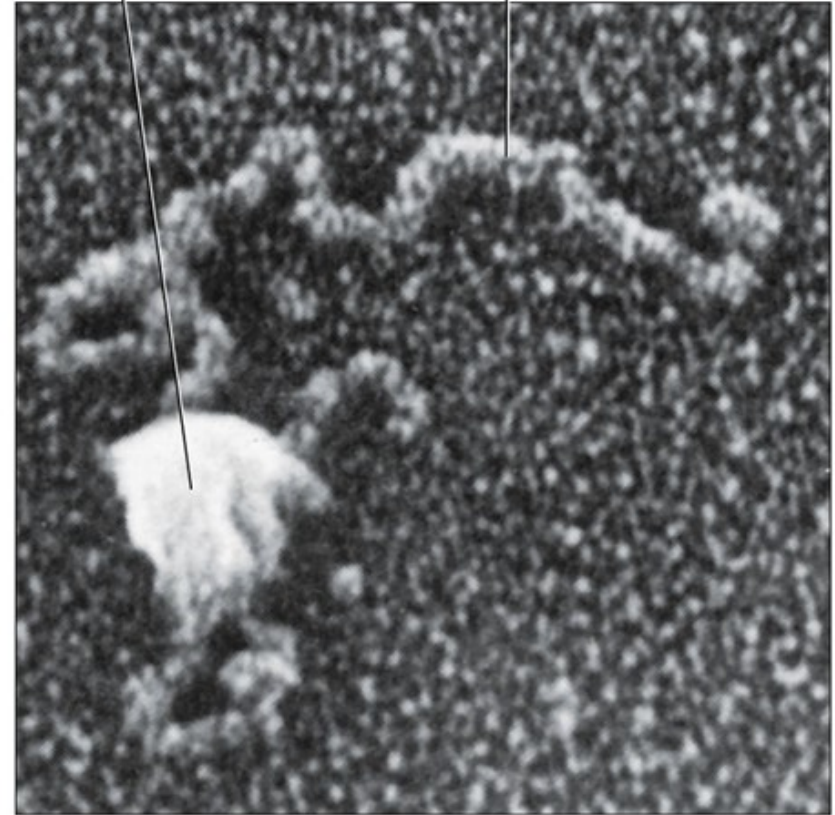


0.2 μm



Spliceosome

RNA



10 nm

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

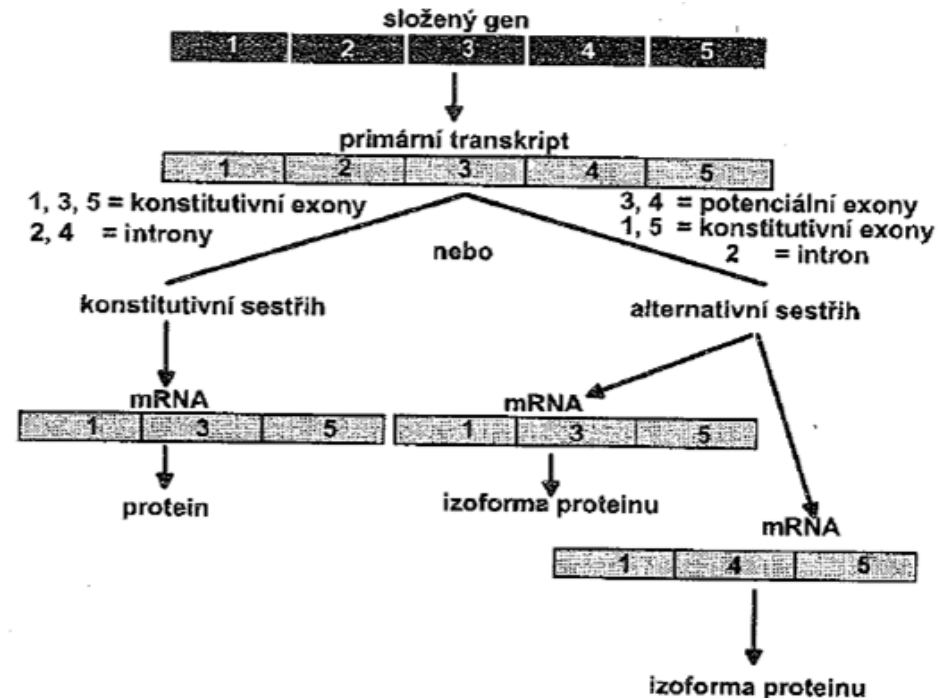
Konstitutivní vs. alternativní sestřih (splicing)

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

b) **Alternativní:** vzniká více druhů molekul mRNA → různé izoformy proteinů:
funkčně příbuzné proteiny, liší se v primární struktuře.

- regulace exprese,
- regulace poměrů izoformem.

Příklady genů podléhajících alternativnímu sestřihu:
imunoglobulinový gen, T-buněčné receptory.

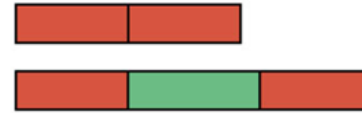


Alternativní sestřih

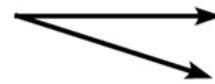
Skipped exon



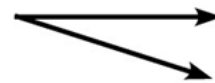
Splicing



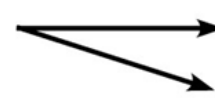
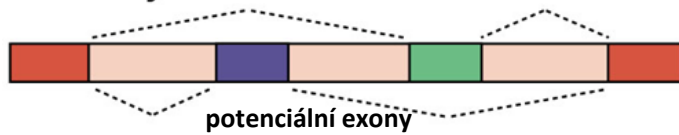
Alternative 5' splice site



Alternative 3' splice site



Mutually exclusive exons



pre-mRNAs

mRNAs

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).



Video – animace transkripce a translace:
<https://www.youtube.com/watch?v=4SlZ15yf-Qk>