

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:

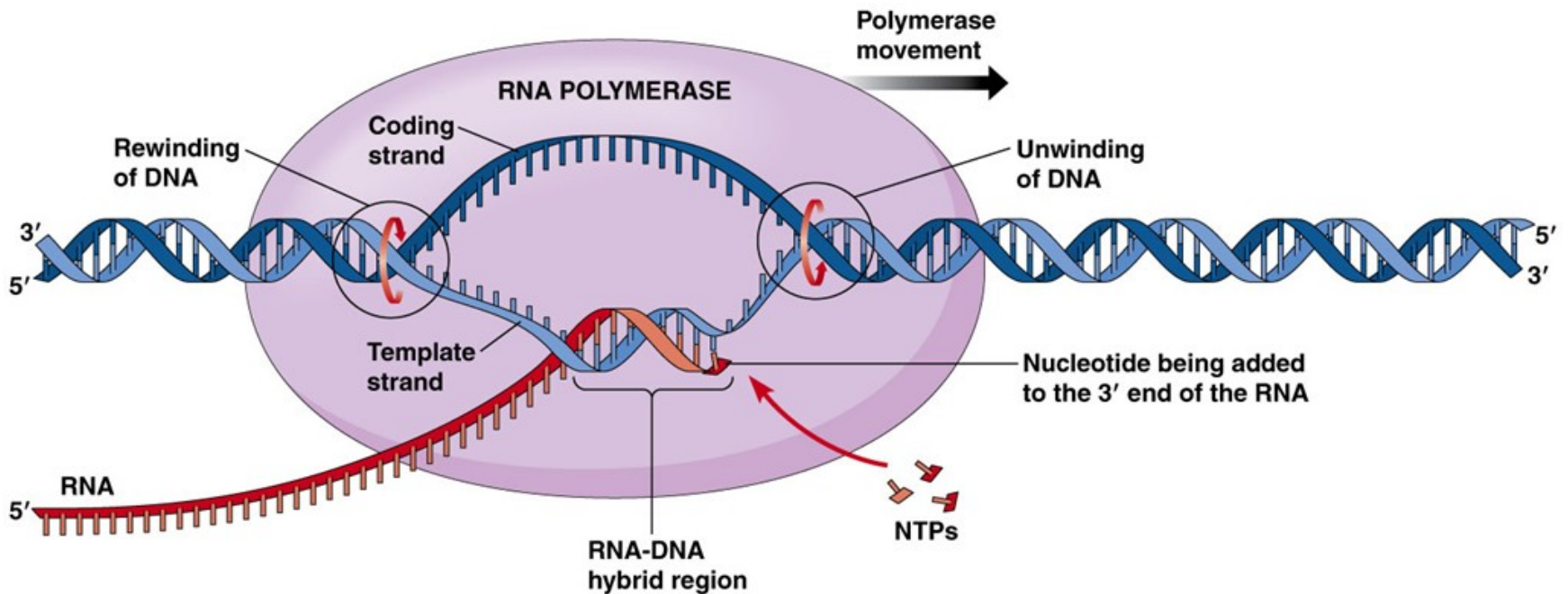
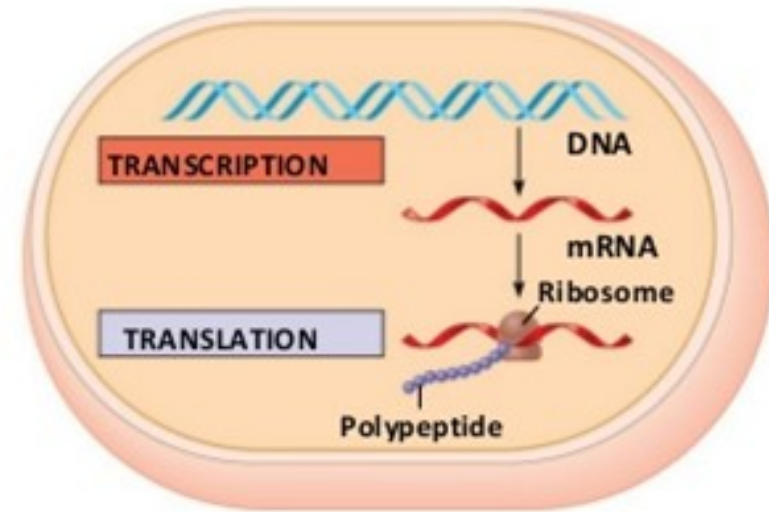
*S. Rosypal, Úvod do molekulární biologie 1-4
Masarykova Universita Brno
ISBN 80-902562*

*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; messenger)

matrice pro syntézu polypeptidů. U bakterií nepodléhá posttranskripčnímu sestřihu

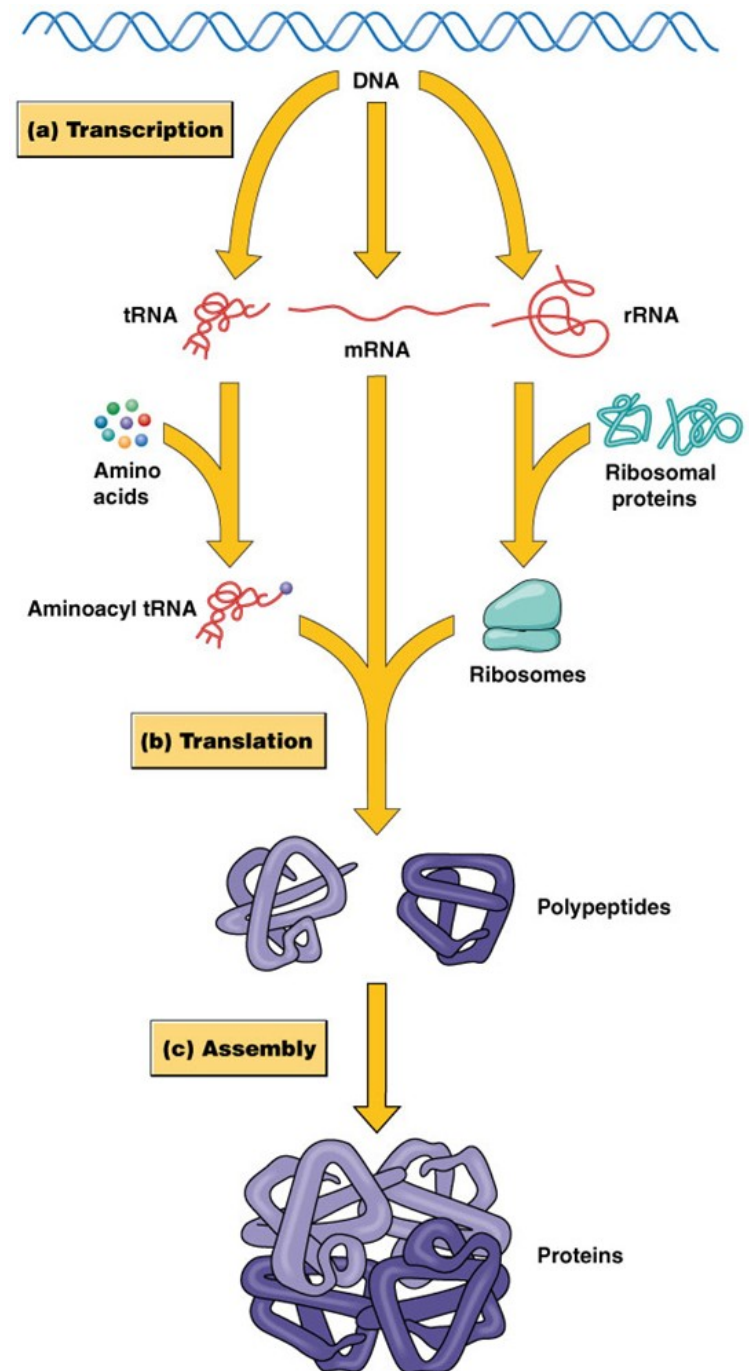
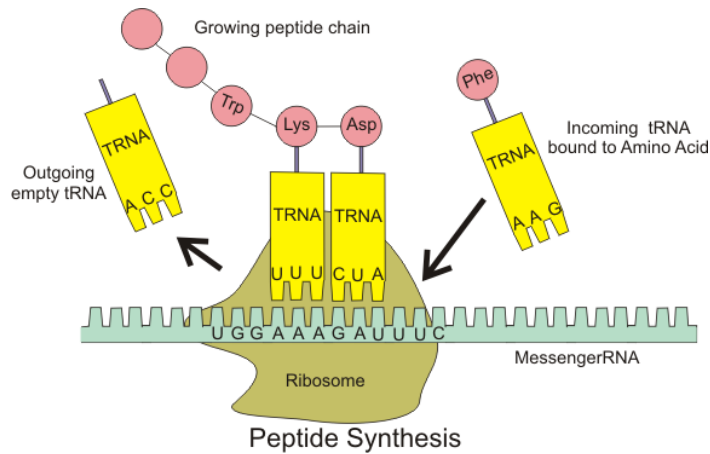
2. rRNA (ribozomová)

posttranskripčně upravována z pre-rRNA

3. tRNA (transferová)

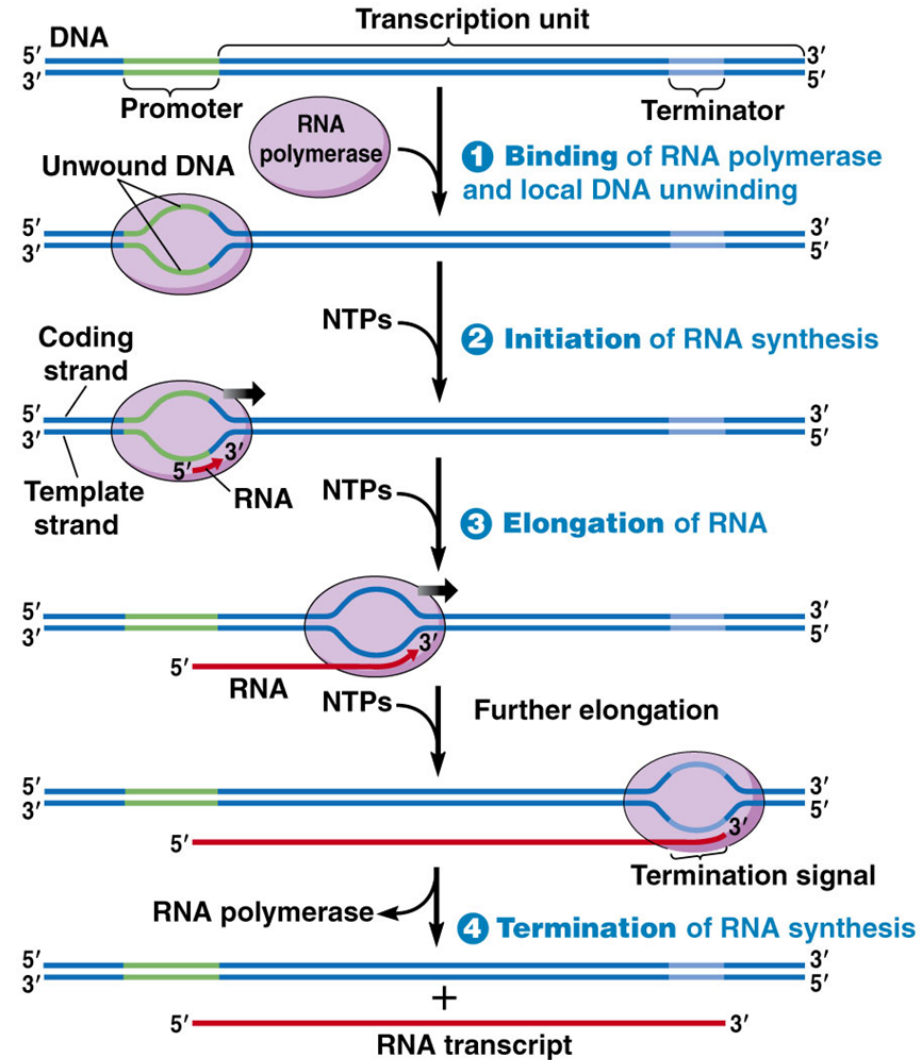
posttranskripčně upravována z pre-tRNA

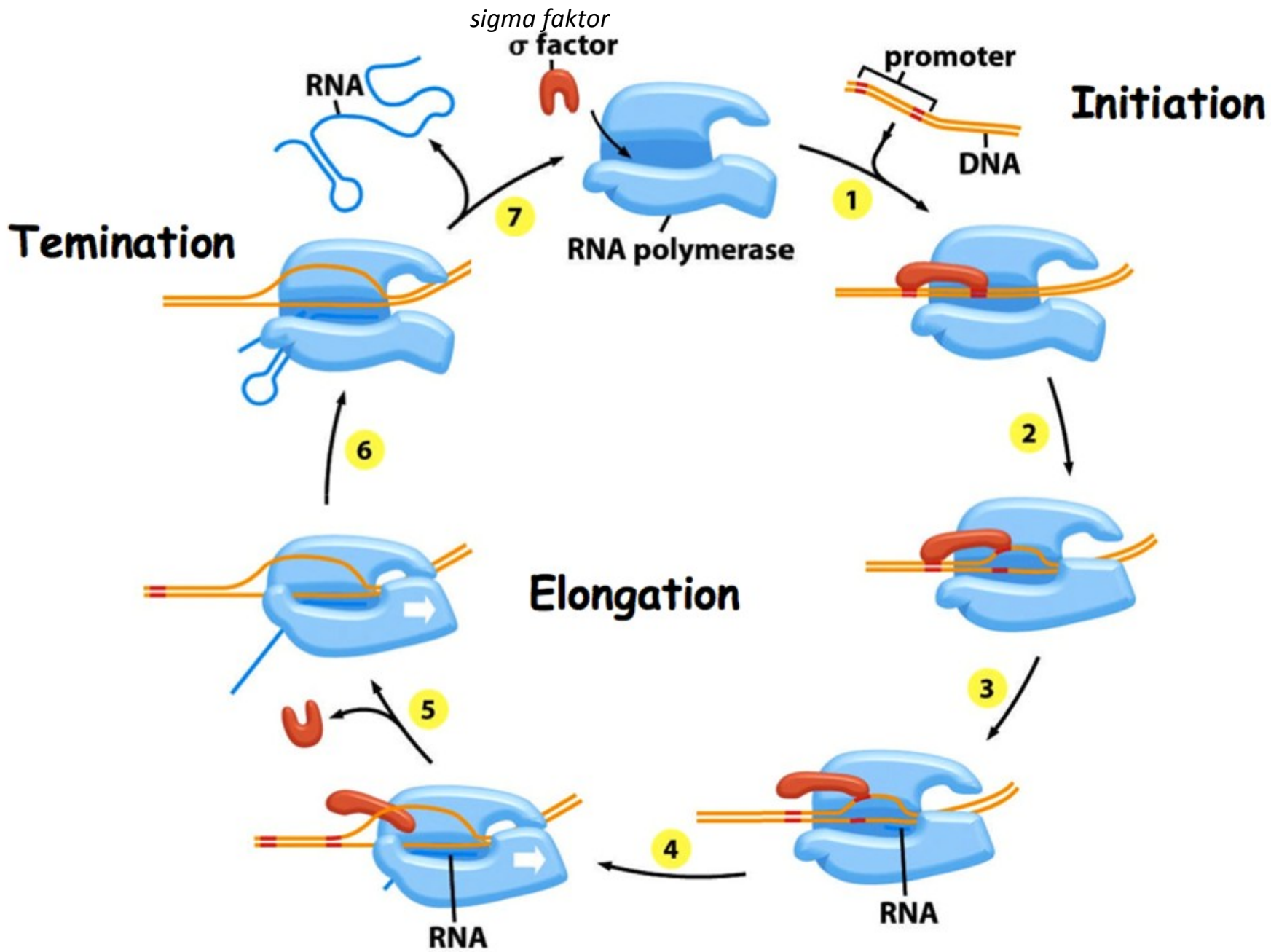
Váže se na ni aminokyselina, obsahuje antikodon



Fáze transkripce

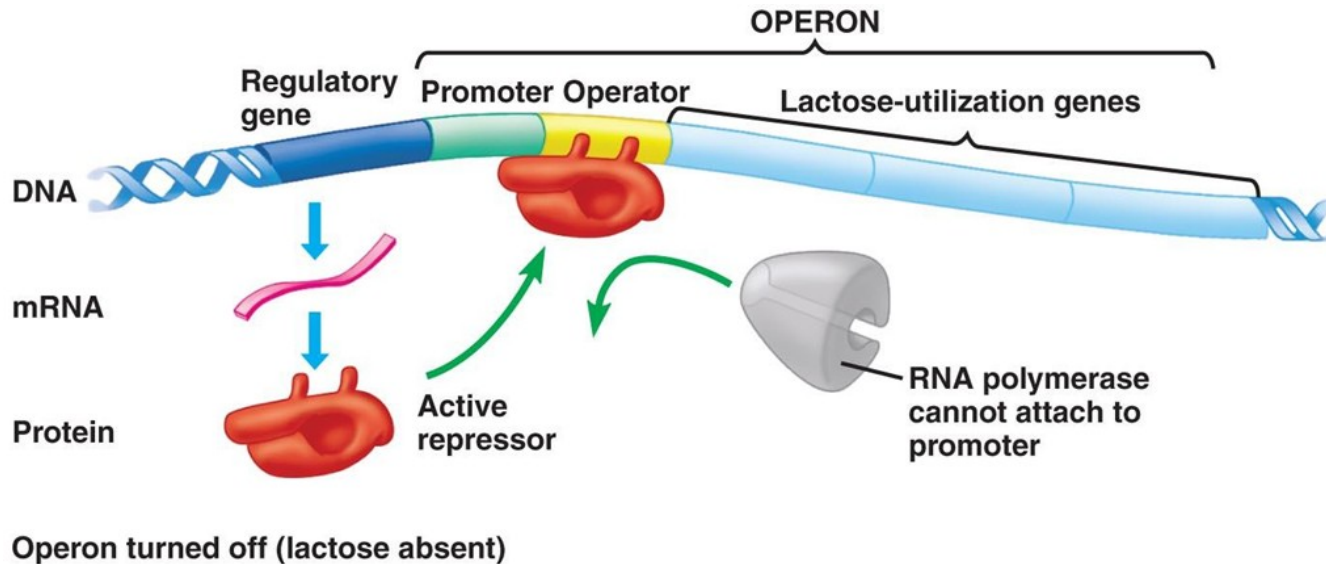
- 1. Inicace:** Navázání RNA-polymerázy na promotor a zahájení syntézy
- 2. Elongace:** Připojování nukleozid-5'-monofosfátu k 3'-konci RNA řetězce podle matricového řetězce
- 3. Terminace:** Zastavení elongace na terminátoru a uvolnění z matricového řetězce





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



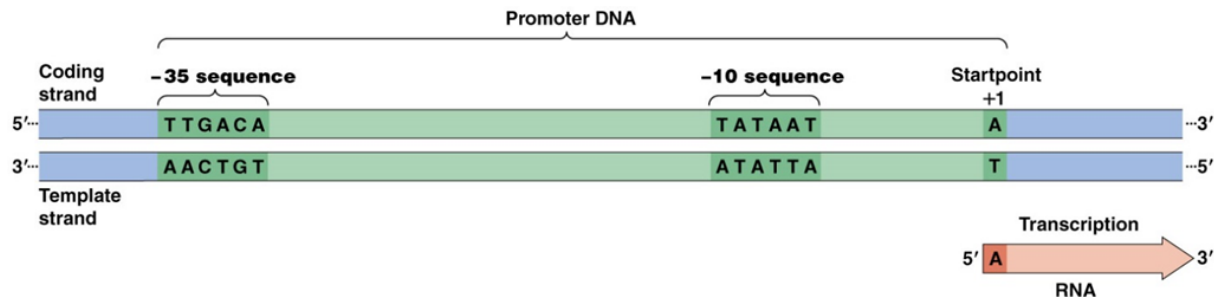
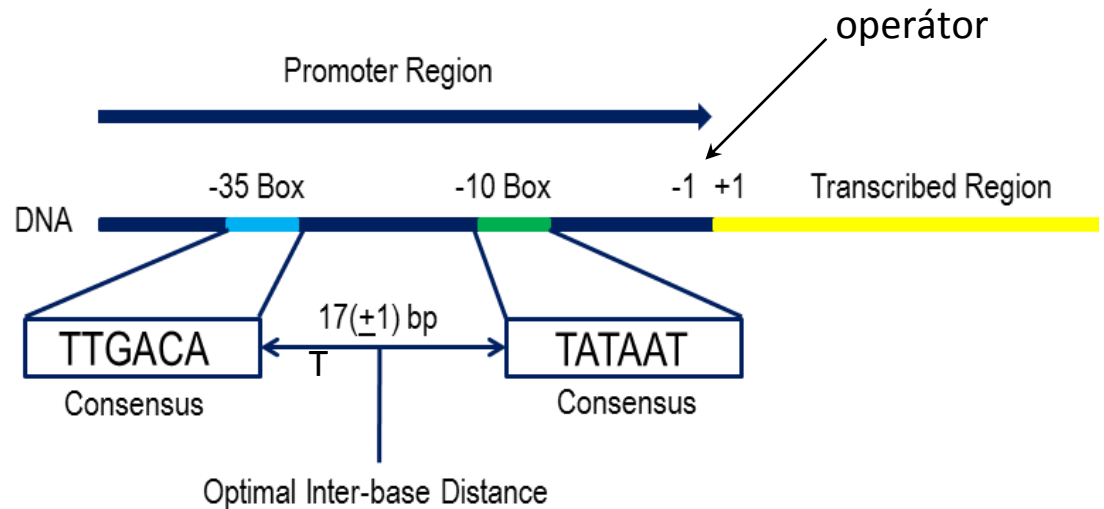
Operon: transkripční jednotka řízená promotorem a operátorem
Operátor: regulační oblast na DNA, na níž se může vázat represor
Transkripční jednotka: oblast na DNA, která se přepisuje do mRNA

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:

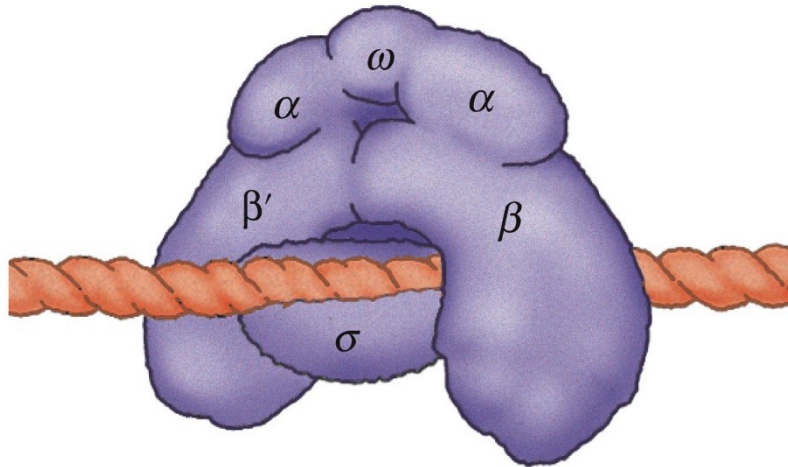
- a) kolem nukleotidu -35: 5' TTGACAT 3'
b) Pribnowův box* (-10): 5' TATAAT 3'



**Podobný TATA boxu u eukaryot*

Bakteriální RNA-polymeráza

- Rozeznává promotory všech transkripčních jednotek
- Složena z podjednotek (holoenzym):
 - 2 α : udržují stabilitu molekuly
 - 1 β : umožňuje vazbu ribonukleotidů na polymerázu
 - 1 β' : umožňuje spojení polymerázy s matricovým DNA řetězcem
 - 1 ω (omega) stabilizuje molekulu
 - 1 σ (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 © 2005 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. Iniclace

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

a) tvorba "Uzavřeného transkripčního binárního komplexu" (holoenzym RNA-polymerázy + promotorová oblast dsDNA) - řetězce dsDNA ještě nejsou rozvinuty

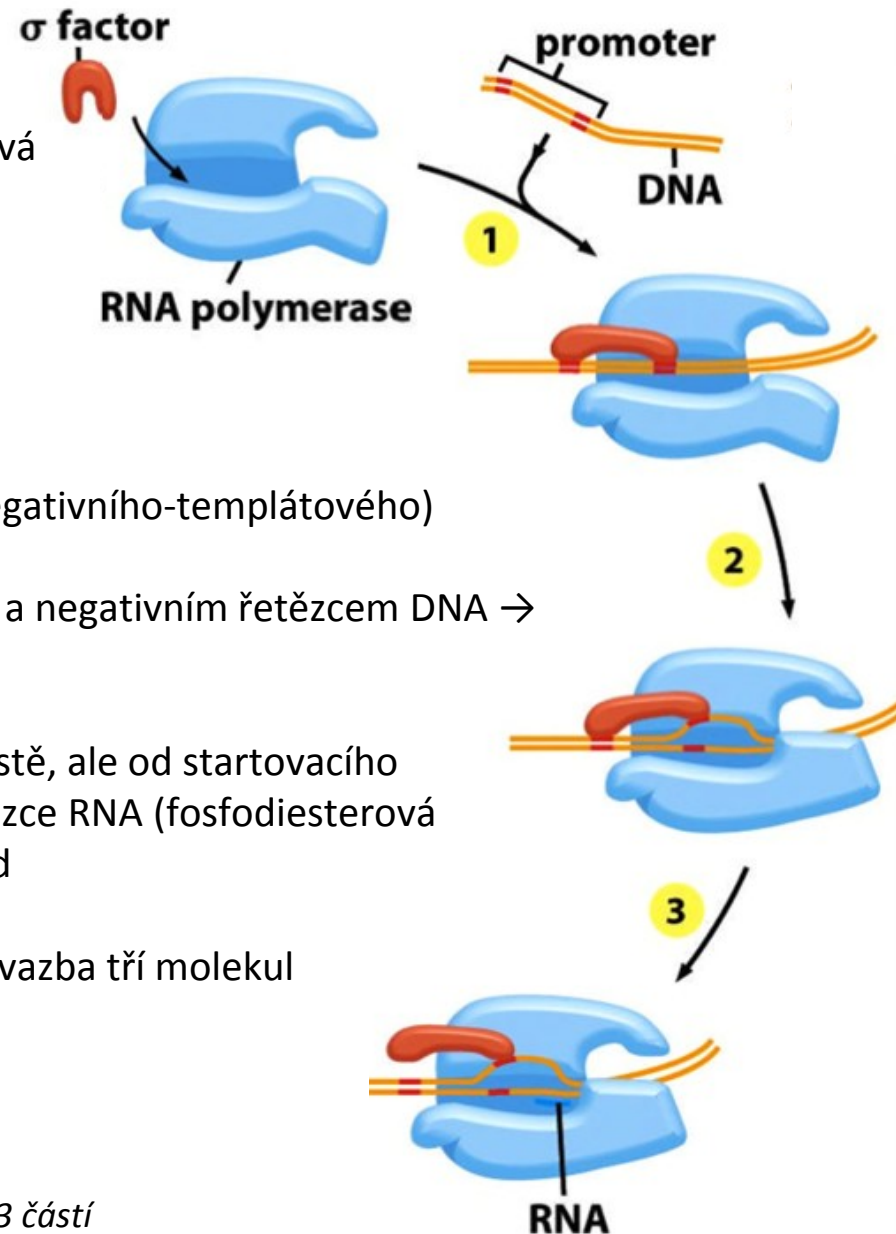
b) RNA-polymeráza v komplexu mění konformaci, prodlužuje se a pokrývá gen v rozsahu -50 až +20 bp

c) RNA-polymeráza se váže na oba řetězce DNA, ale pevněji na pozitivní-kódující (přepisuje se podle negativního-templátového)

d) V Pribnowově boxu se uvolňují vazby mezi pozitivním a negativním řetězcem DNA → otevřený binární komplex

e) 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

f) Otevřený transkripční ternární (ze tří částí) komplex = vazba tří molekul (1. DNA, 2. RNA-polymeráza, 3. RNA)

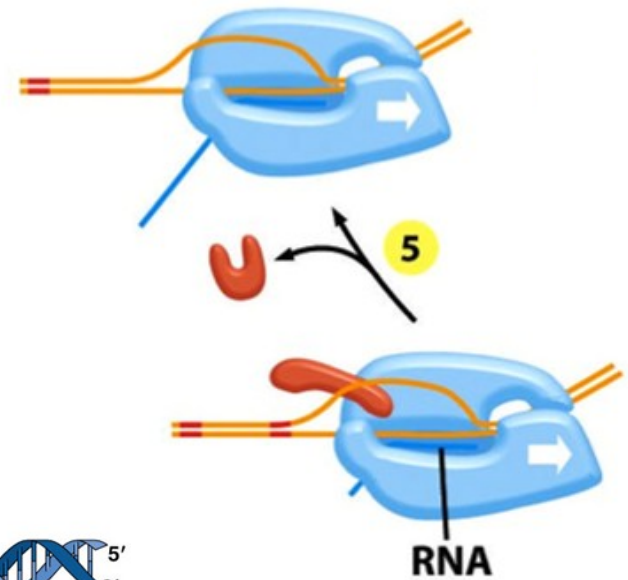
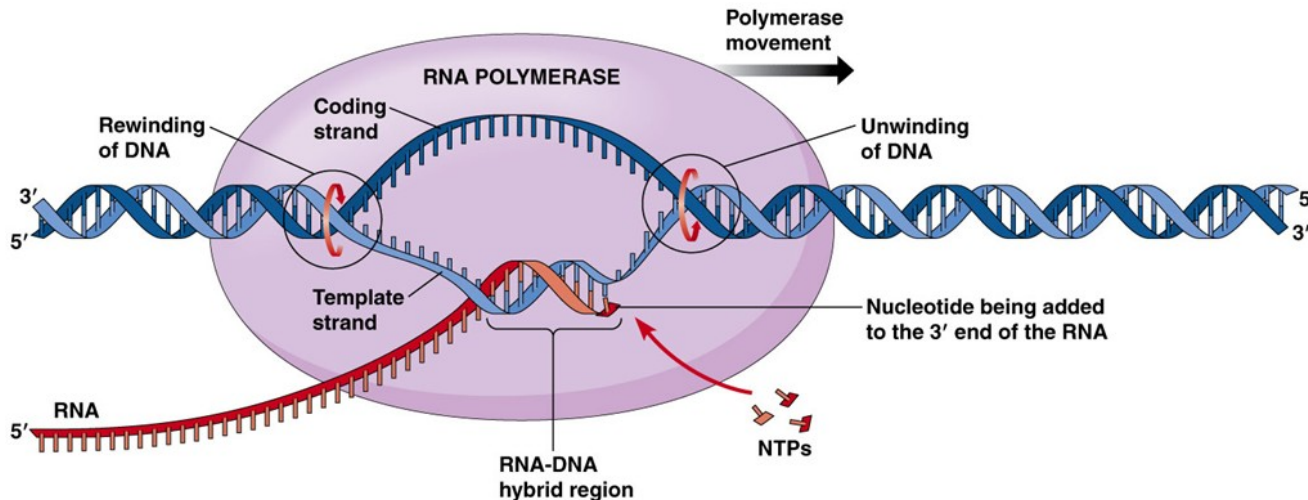


Latinsky: "binarius" = složený ze 2 částí; "ternarius" = složený ze 3 částí

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

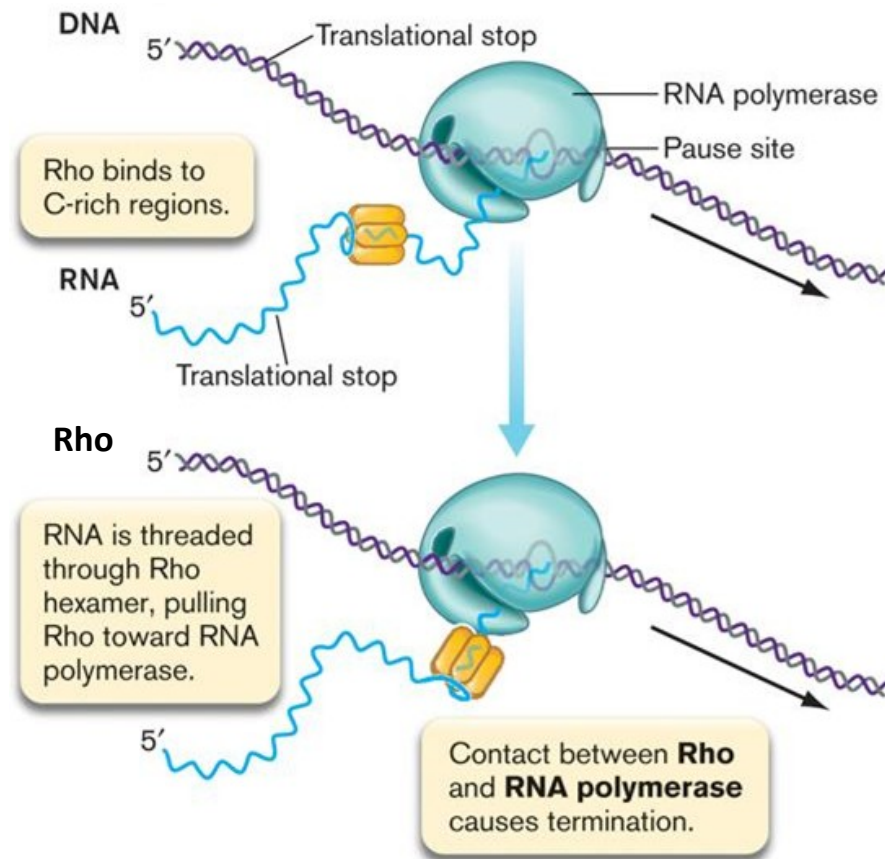
Zastavení pohybu RNA-polymerázy - uvolnění hotové RNA - uvolnění RNA-polymerázy

- 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

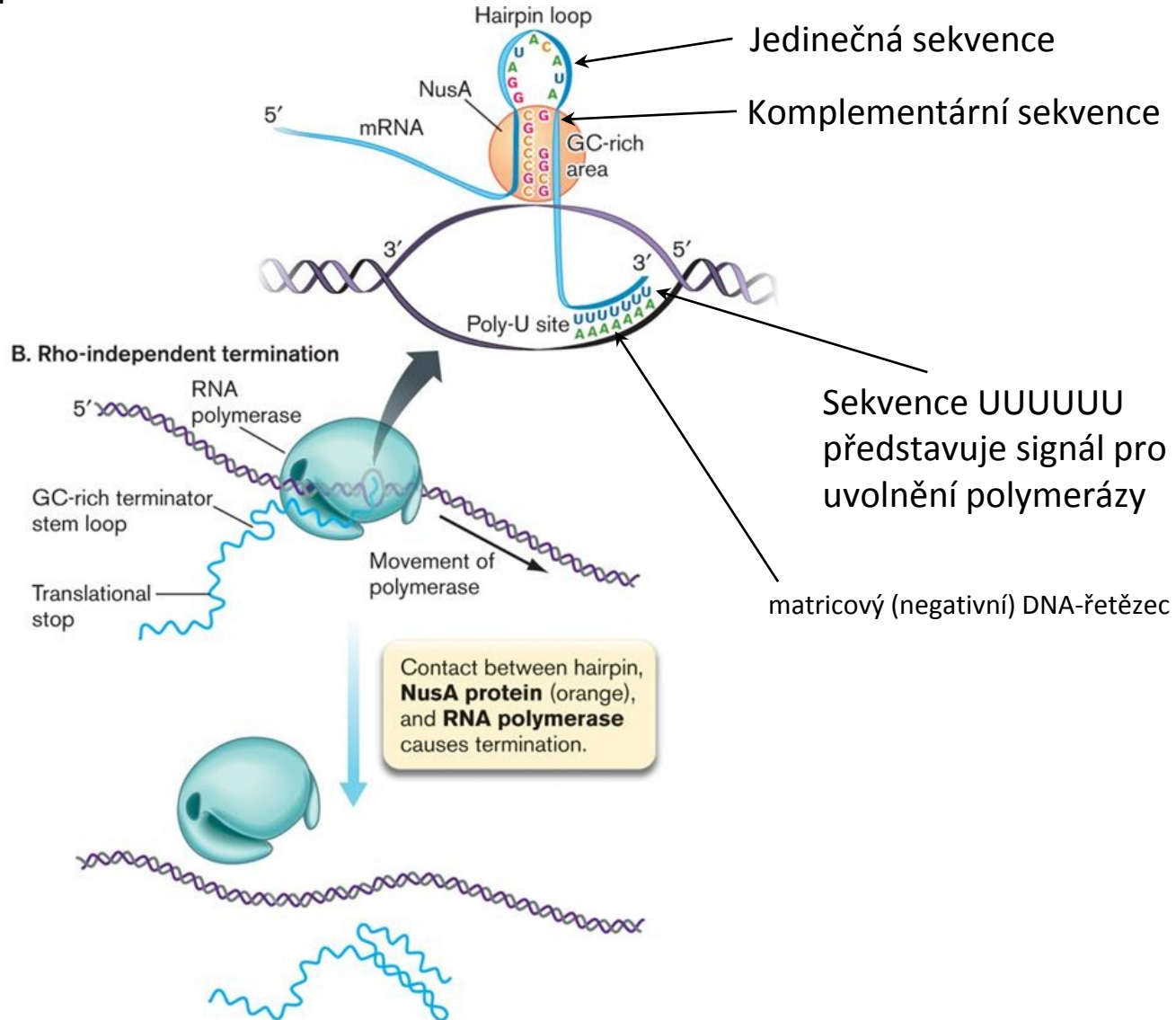
- Rho protein aktivní ve formě hexameru
- váže se během transkripce na 5'-konec mRNA a pohybuje se za RNA-polymerázou
- v terminátoru se RNA-polymeráza zastaví, rho-faktor ji dostihne
- Rho-faktor katalyzuje uvolnění mRNA z DNA-řetězce a uvolnění RNA-polymerázy (za spotřeby ATP)



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.

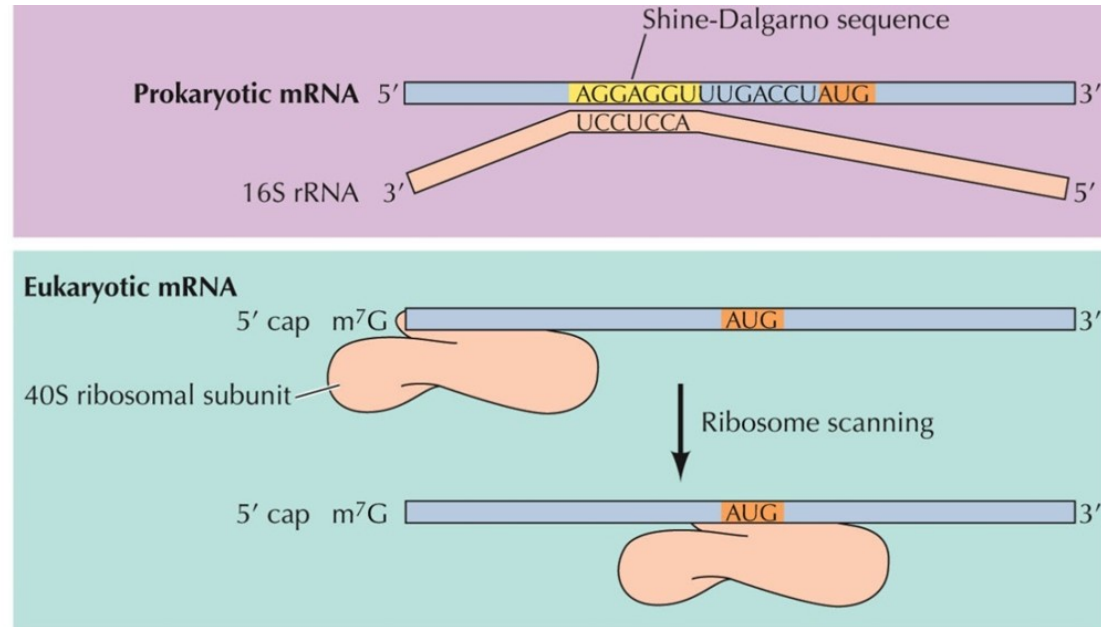
Shineova-Dalgarno sekvence v mRNA:

5' AGGA 3'

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

3' UCCU 5'

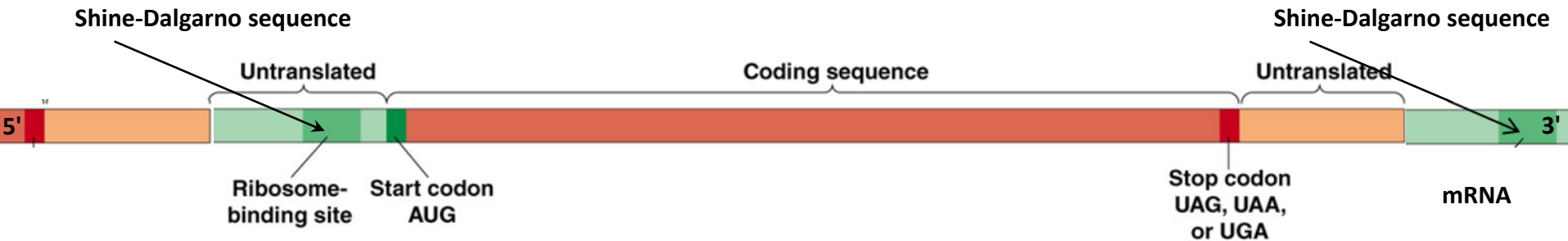
- pokud primární transkript neobsahuje Shineovu-Dalgrinovu sekvenci, nemůže se vázat k ribozomu a nepůsobí jako funkční RNA



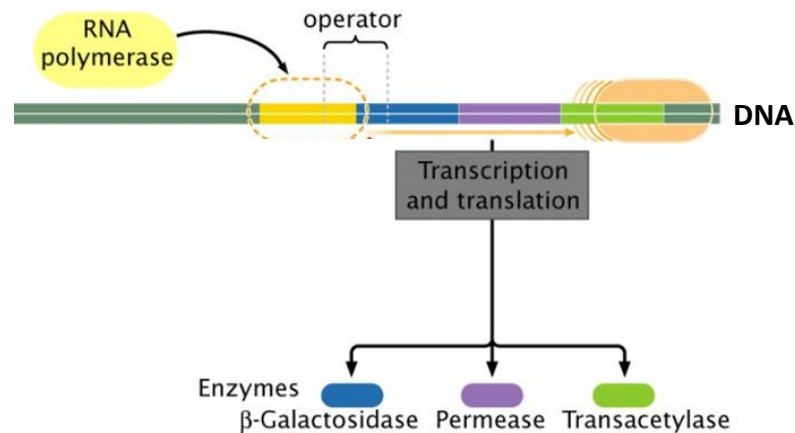
Funkční RNA: RNA, které nejsou určeny k translaci (tRNA, rRNA, miRNA, siRNA)

mRNA se strukturálními geny

- Na 5'-konci obsahuje prepis vedoucí sekvence s Shineovou-Dalgarnovou sekvencí, nepřekládá se
 - Na 3'-konci za stop-kodonem obsahuje nepřekládanou sekvenci
 - Jeden strukturální 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 start a stop kodon a svou Shine-Dalgarno sekvenci
- pro vazbu ribozomu
- na DNA mají jeden společný promotor a jednu terminační sekvenci na 3'-konci. Promotor není součástí transkripční jednotky.

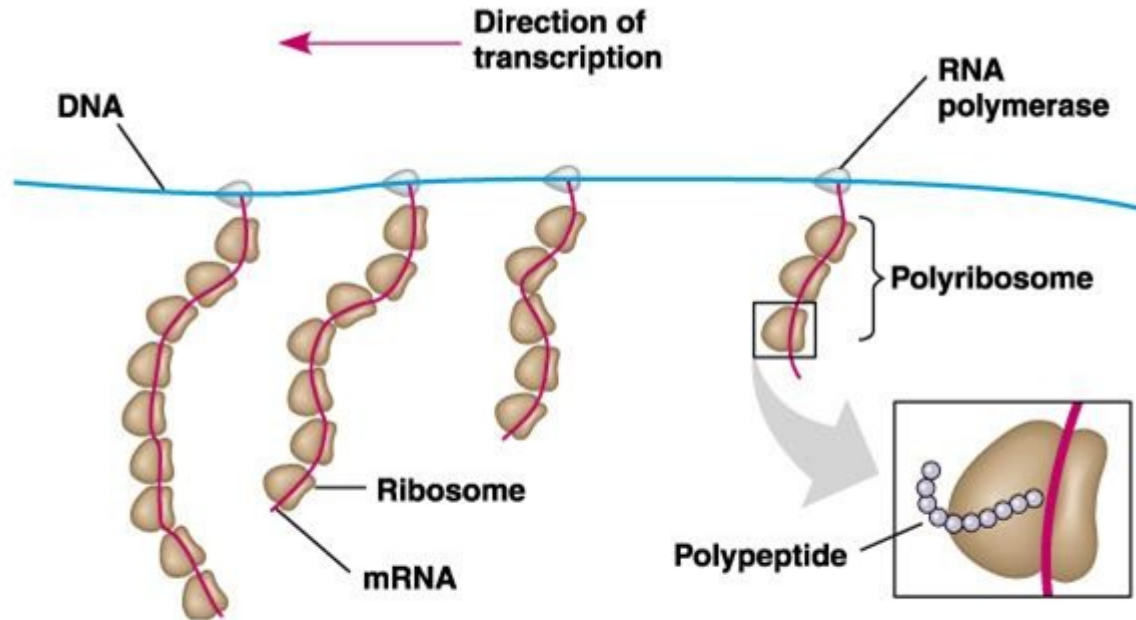


(a) Bacterial mRNA



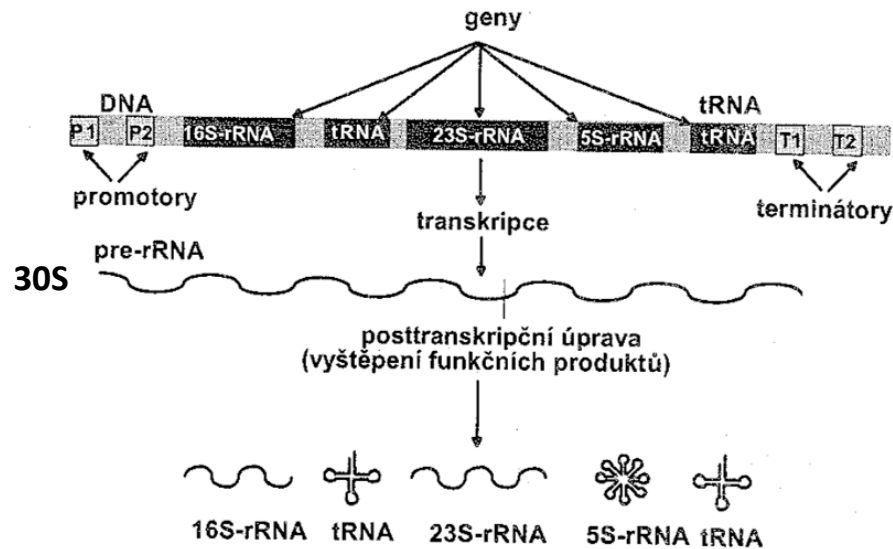
Bakteriální mRNA

- **posttranskripčně se neupravuje** 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)



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

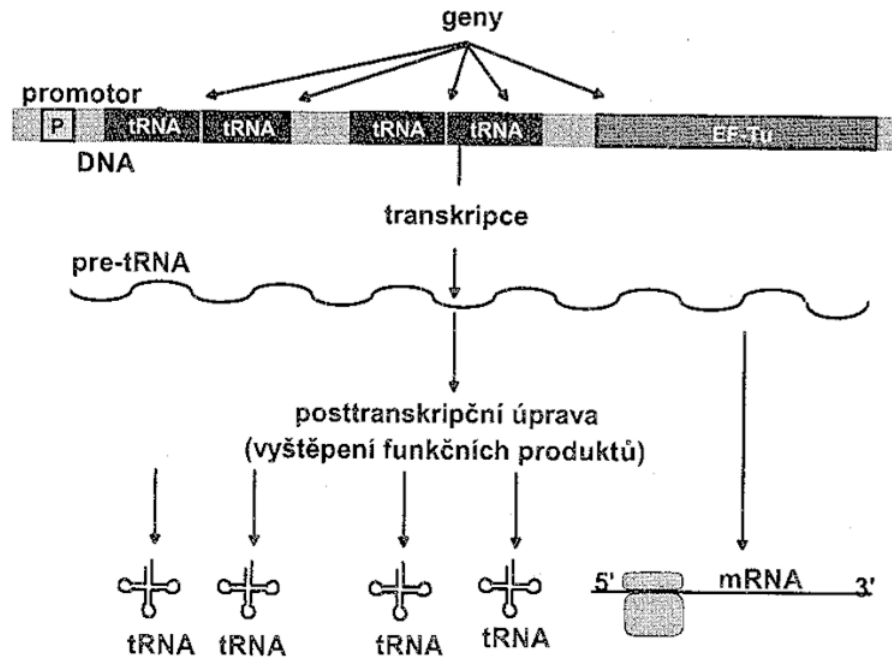


Jednotka S (Svedberg) - sedimentační koeficient

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

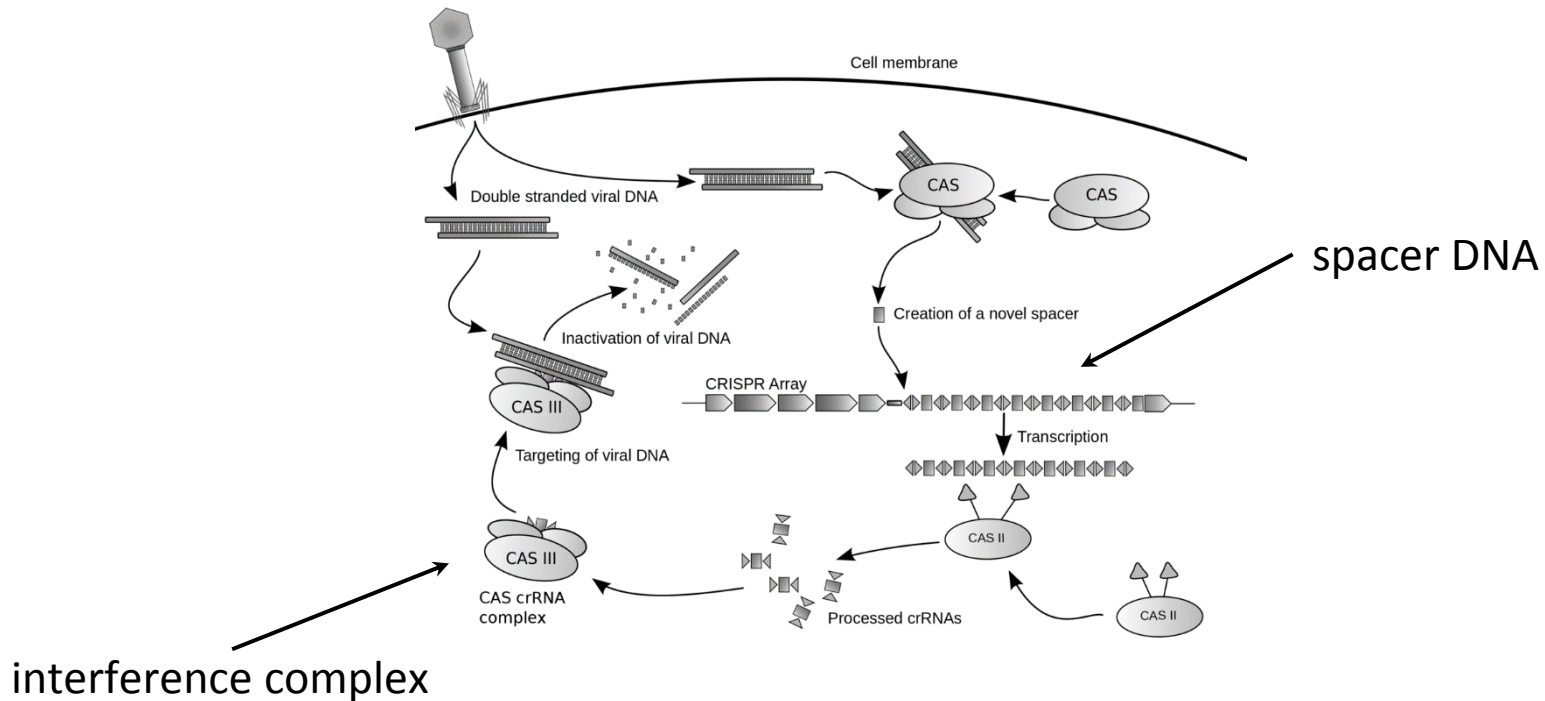
Bakteriální tRNA

- 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



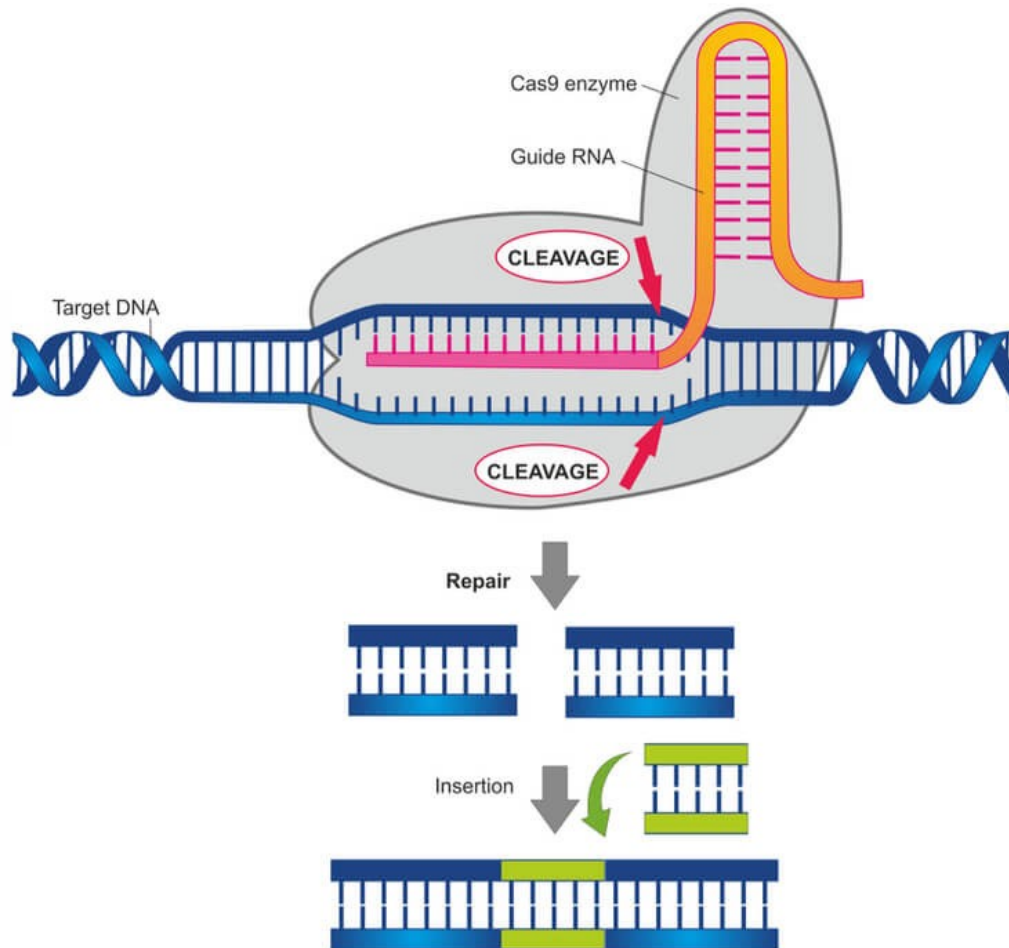
CRISPR (Clustered regularly-interspaced short palindromic repeats)

- 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

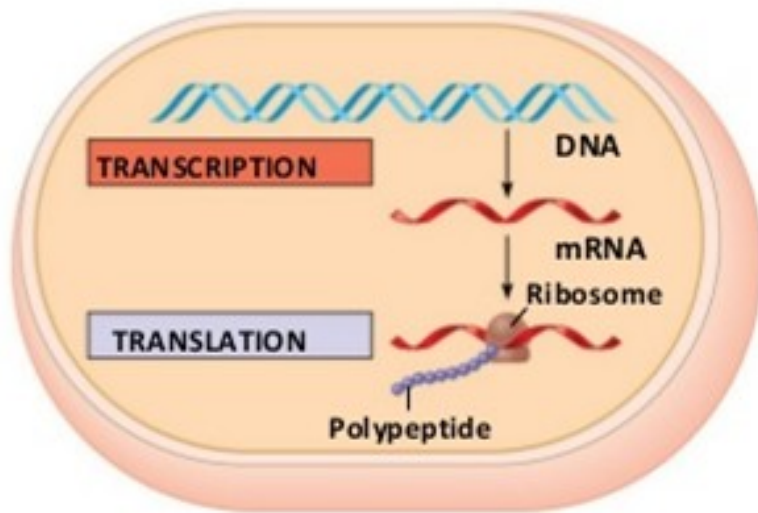


CRISPR-Cas9

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

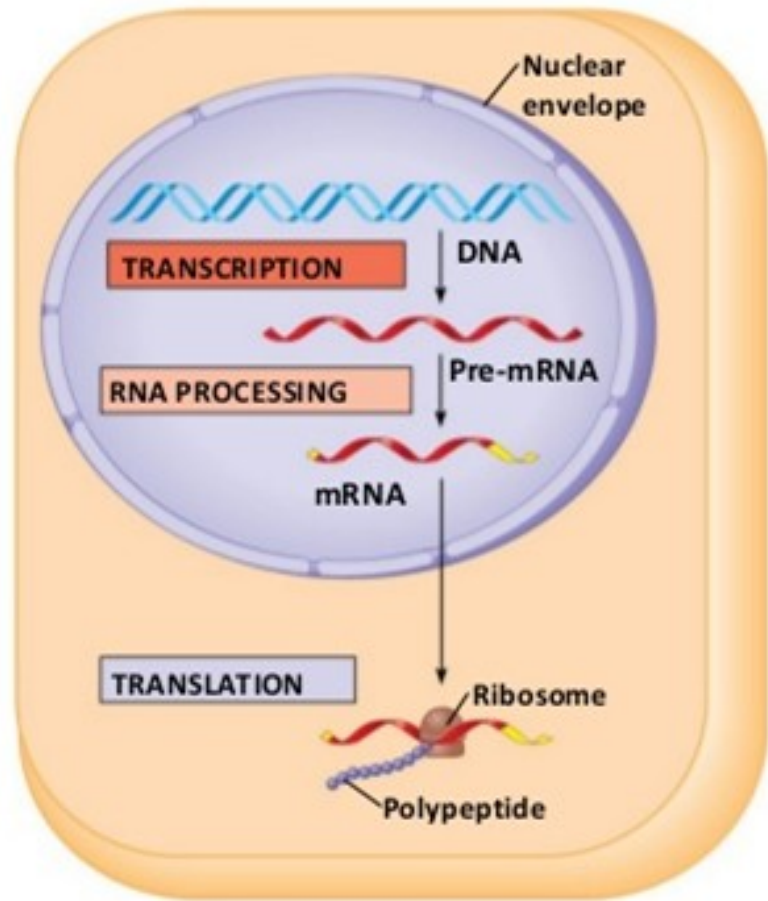


2. Transkripce eukaryotického genomu



(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

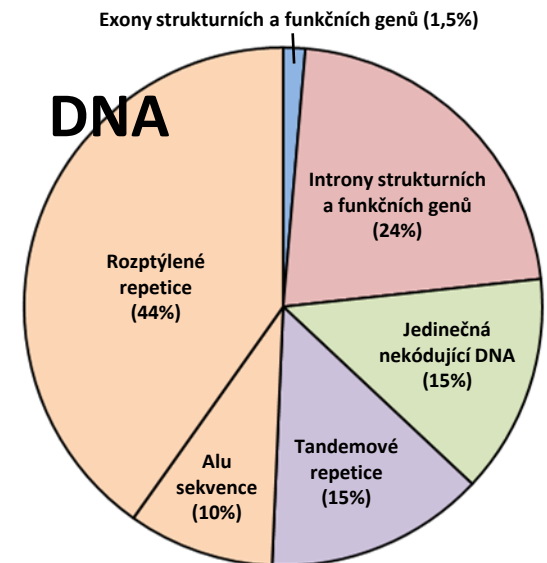
Typy RNA

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

Na rozdíl od prokaryot mají eukaryota pouze monocistronní mRNA

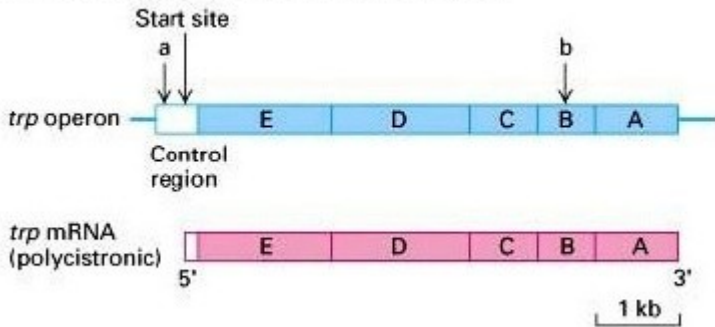
Eukaryotická mRNA

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

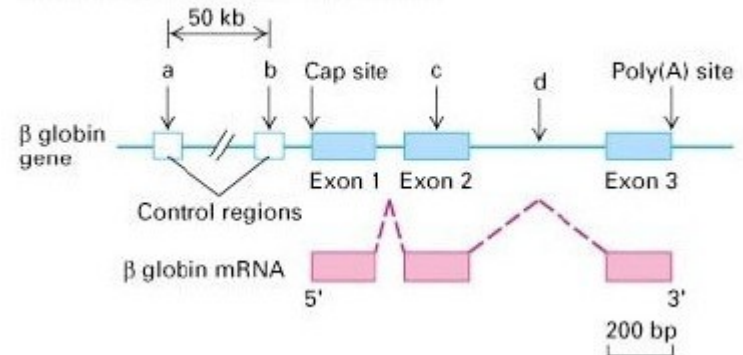
Prokaryotická mRNA

- 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 strukturálních 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 jadérkové RNA (snoRNA)
 - c) malé cytoplazmatické RNA (scRNA)
 - d) regulační RNA (miRNA a siRNA)

snRNA se účastní sestřihu pre-mRNA ve spliceozomu

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

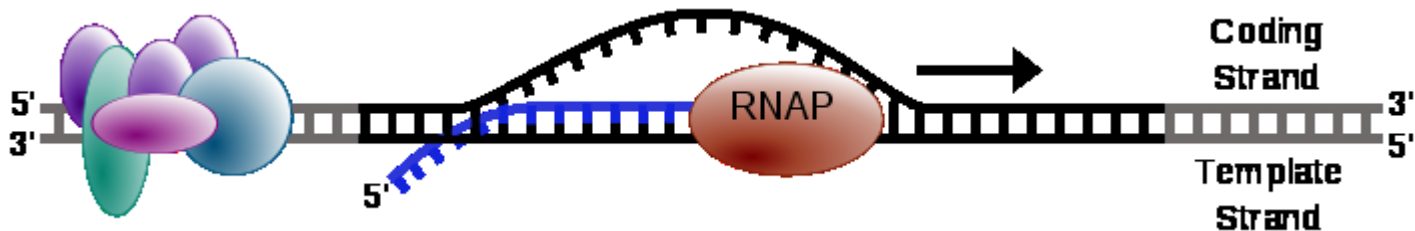
- katalyzuje syntézu pre-rRNA
- pouze v jadérku*

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

-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

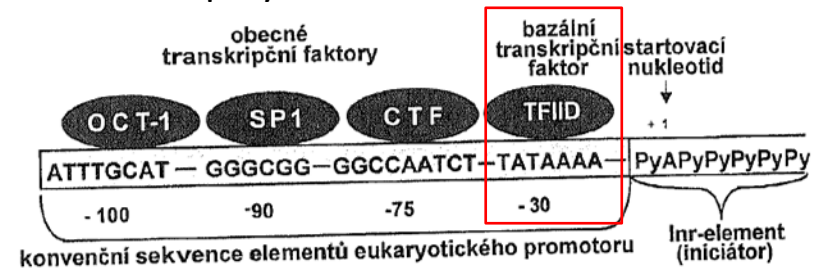
- umožňuje vazbu TFIID na TATA-box

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

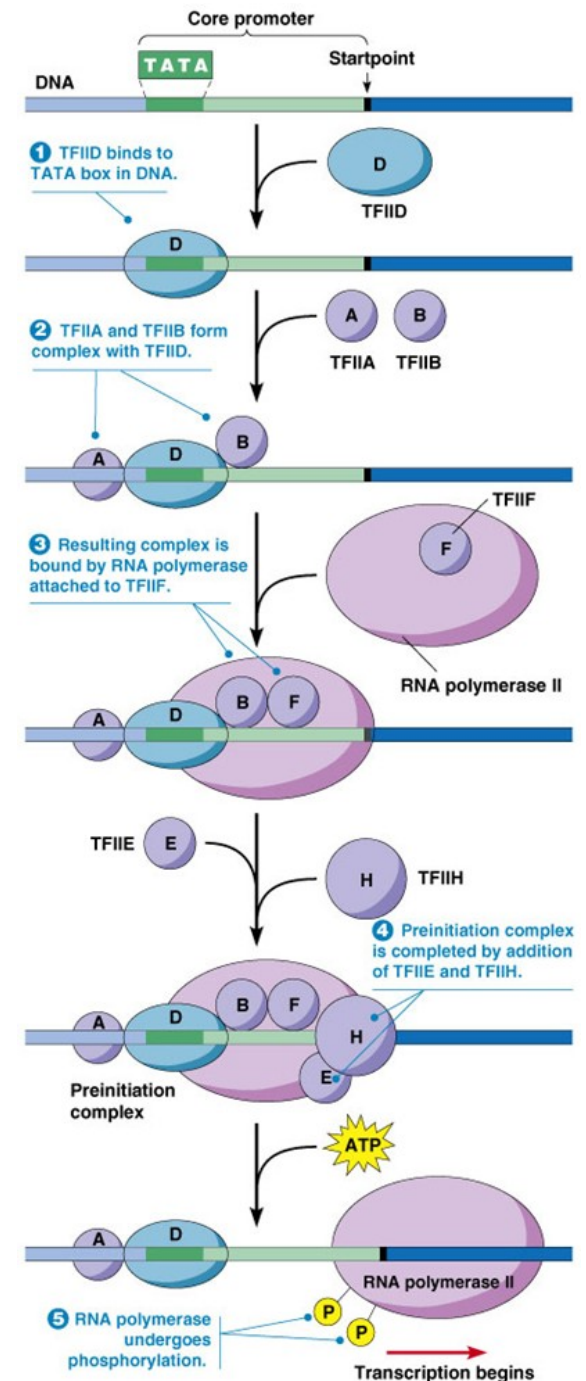
Iniciace transkripce polymerázou II

- 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."

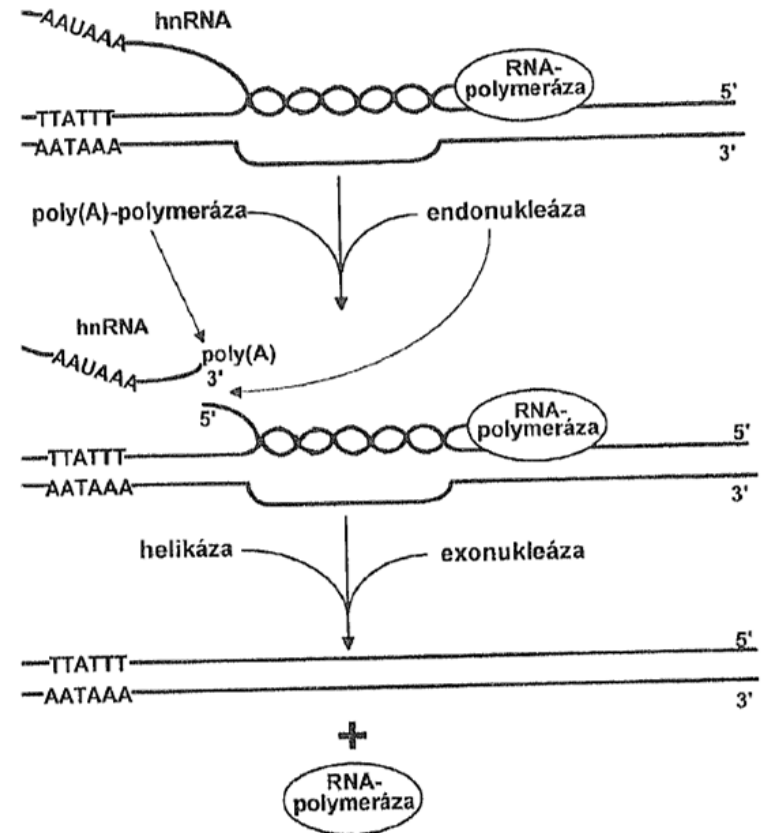
Pokud promotor nemá TATA-box, začíná transkripce na Inr-elementu



Terminace transkripce polymerázou II

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

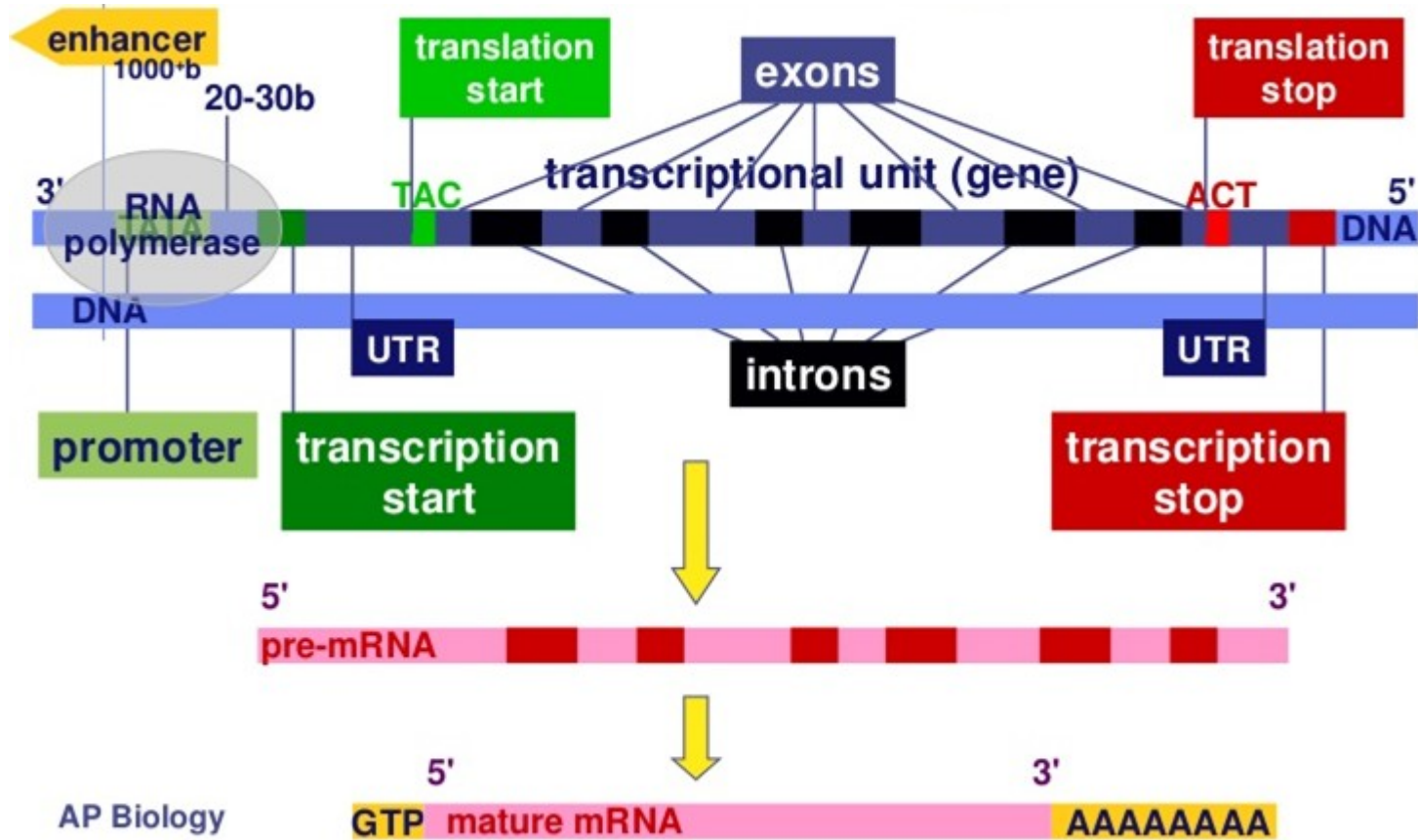
- do pre-mRNA přepsán jako A A U A A A
- označuje terminaci transkripce
- sekvence je rozeznána endonukleázou - štěpí 10-30 nukleotidů za signálem
- poly(A)-polymeráza katalyzuje polyadenylaci 3'-konce
- helikáza rozdělí zbytek hybridní DNA-RNA a zbytková RNA je rozštěpena exonukleázou



Exonukleáza: štěpí nukleotidy od krajů

Endonukleáza: štěpí nukleotidy od prostředku

Helikáza: oddaluje řetězce DNA nebo RNA



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)

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

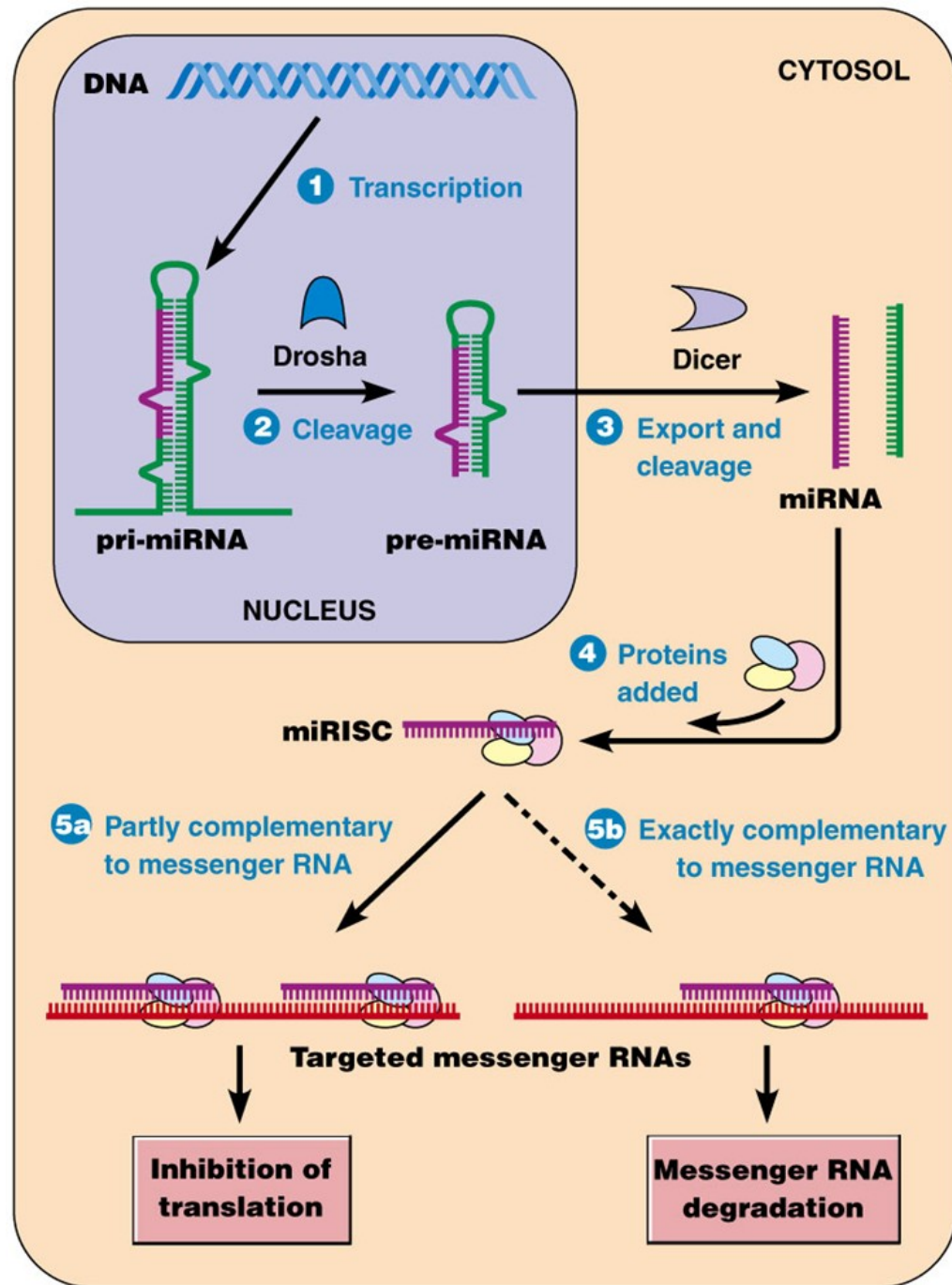


Photo: J. Mottern
Craig C. Mello
Prize share: 1/2

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)

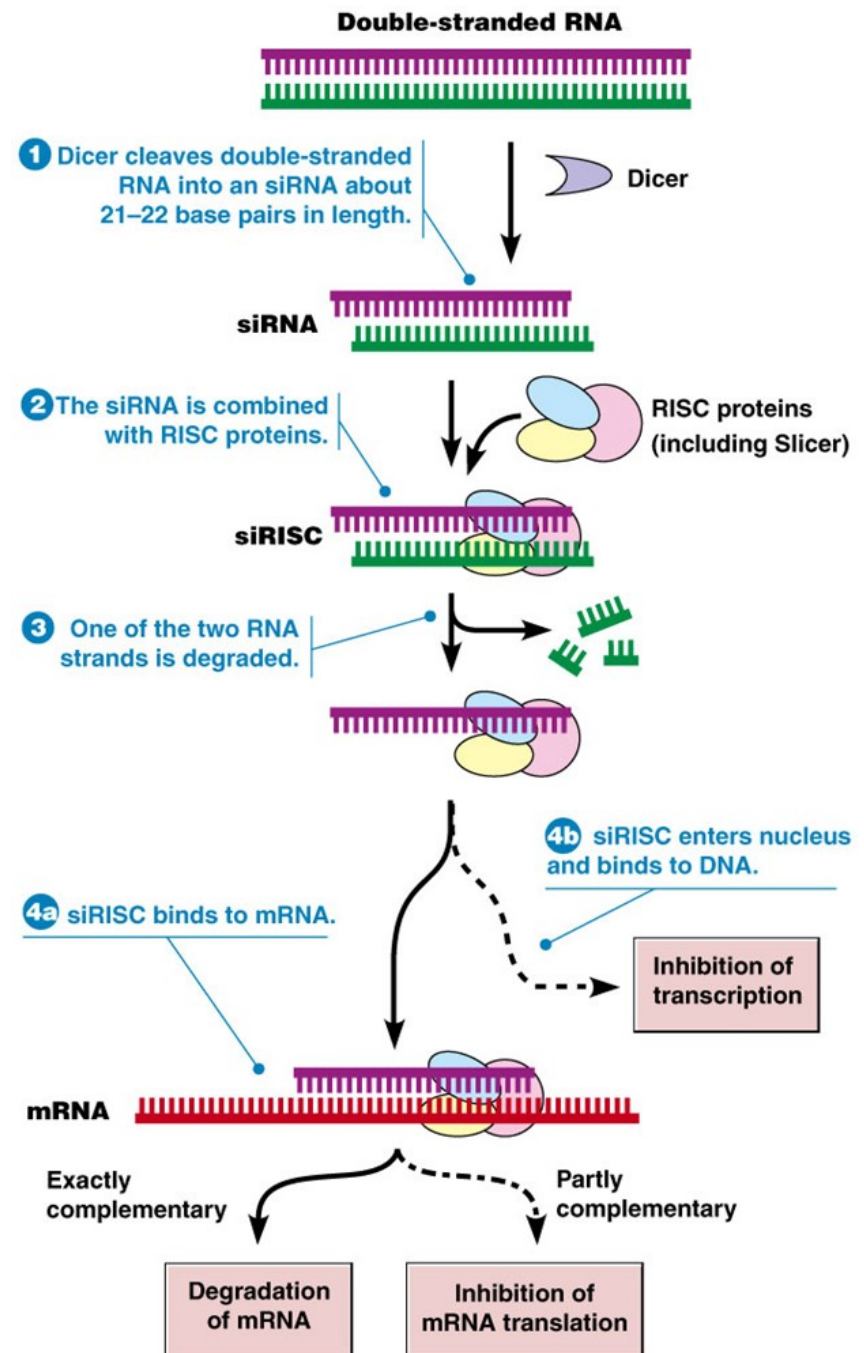


1. miRNA (microRNA; 21-22 nukleotidů)

- 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

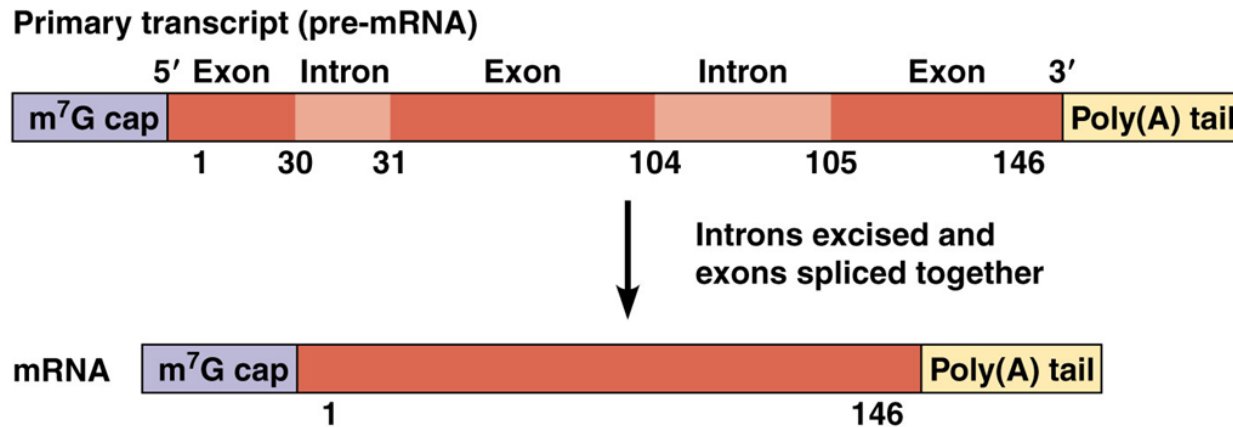
Posttranskripční úpravy

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

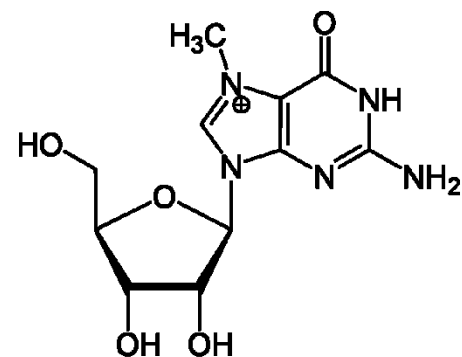
- proteiny, které se vážou na pre-mRNA se označují RNP-proteiny
- komplex RNA s RNP-proteiny nazýváme spliceozom

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

Úprava 5'-konce čepičkou

- čepička: m^7G
- 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

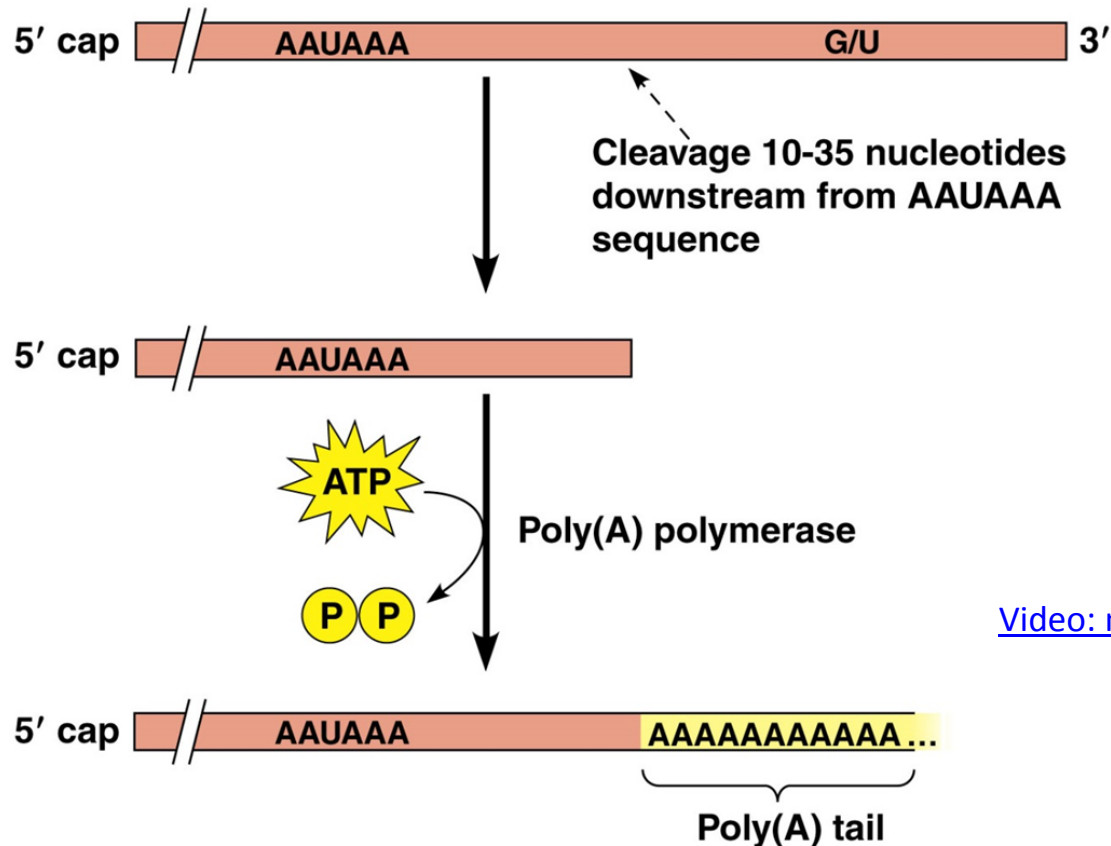
RNP - ribonucleoprotein

Modifikace, které neovlivňují primární strukturu

Polyadenylace 3'-konce

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

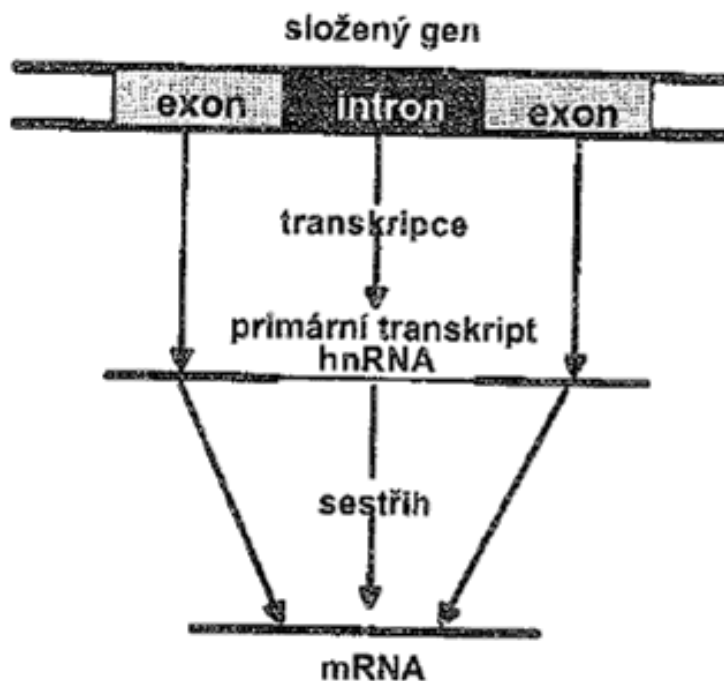
Funkce: ochrana proti účinku exonukleáz (dél trvá než se dostanou přes AAAA ke kódující sekvenci)



[Video: m7G a polyadenylace](#)

Sestřih pre-mRNA (hnRNA) → mRNA

- Úprava primární struktury RNA

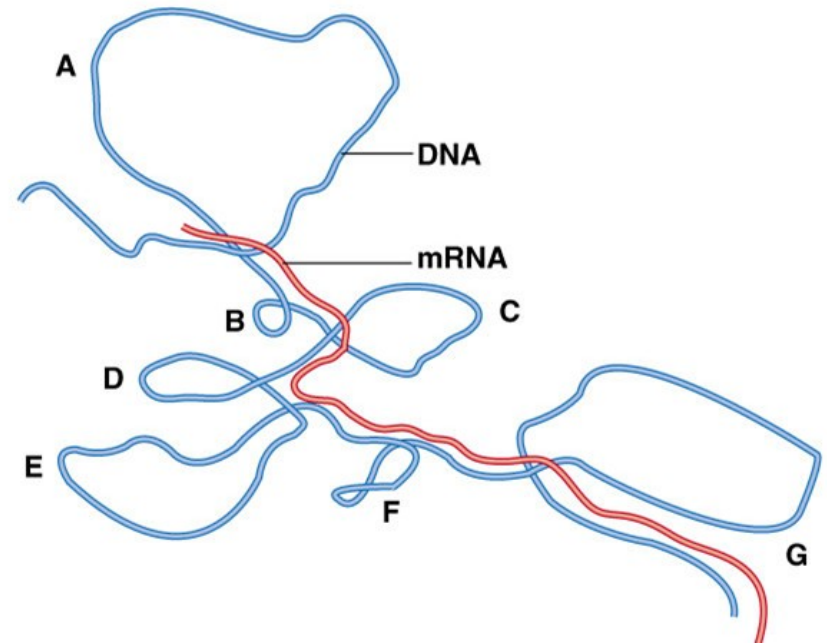
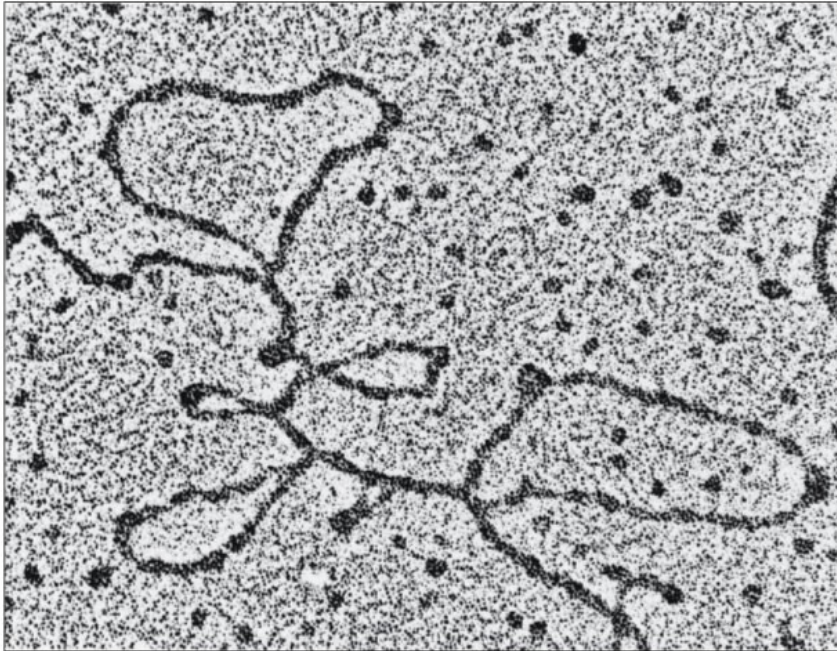


Intron (intragenic region): nekódující sekvence RNA uvnitř genu, která je vystřižena
Exon (expressed regions): kódující sekvence RNA, přeložená do proteinů

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)



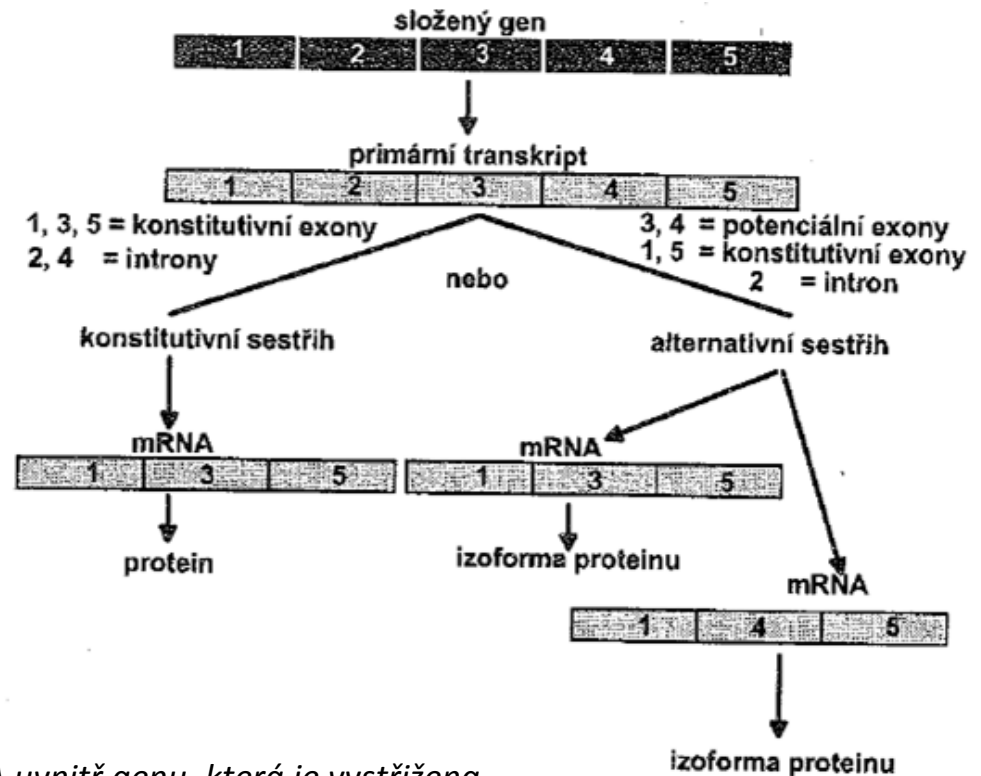
Intron (intrinsic region): nekódující sekvence RNA uvnitř genu, která je vystřižena
Exon (expressed regions): kódující sekvence RNA, přeložená do proteinů

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

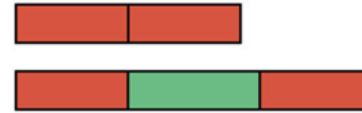
Izoformy proteinů: funkčně příbuzné proteiny, liší se v primární struktuře

Alternativní sestřih

Skipped exon



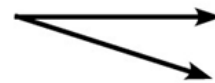
Splicing



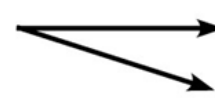
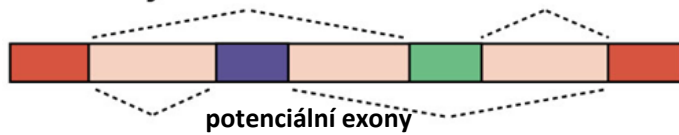
Alternative 5' splice site



Alternative 3' splice site



Mutually exclusive exons

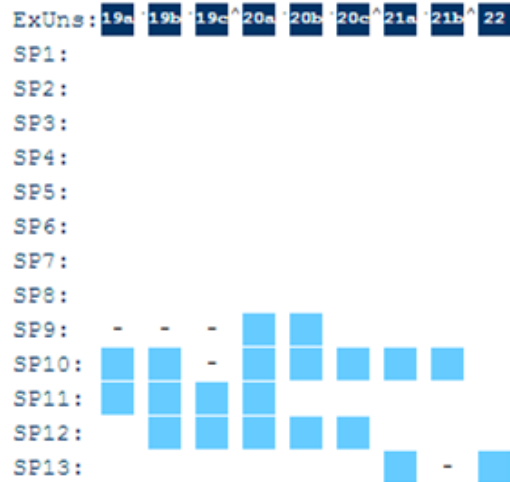
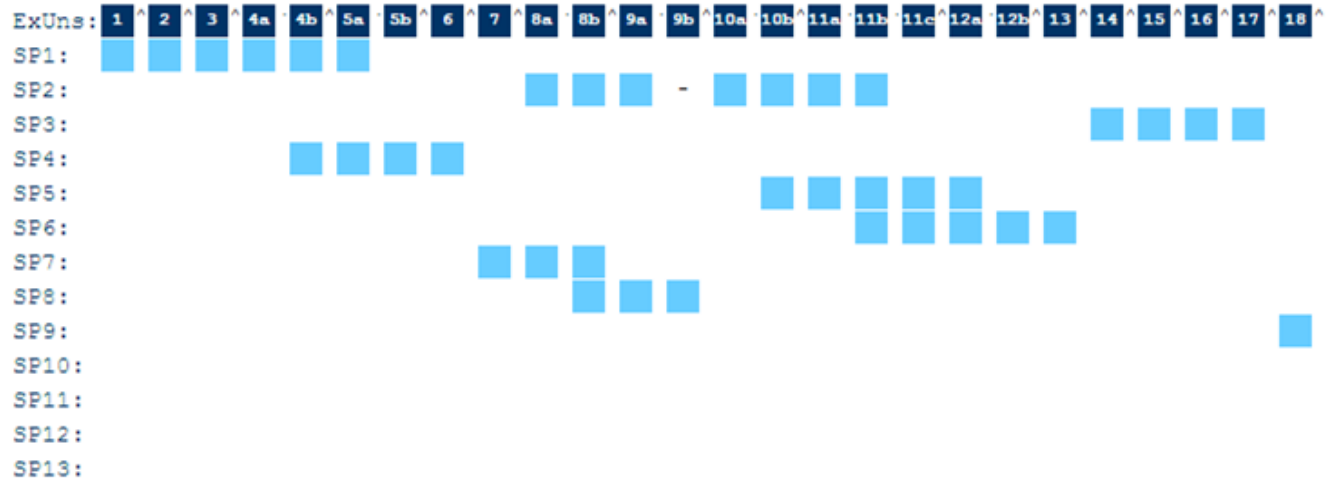


pre-mRNAs

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

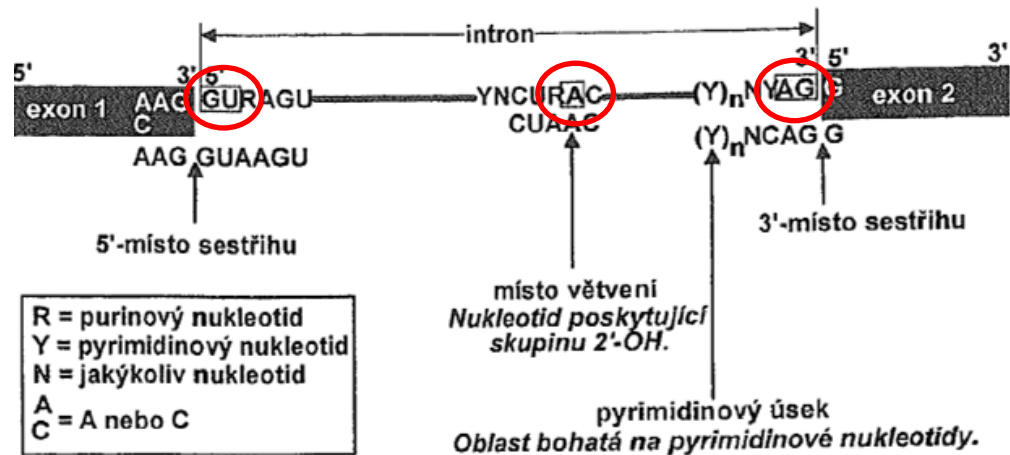
Relevant External Links for SYNGAP1 Gene

[GeneLoc Exon Structure for SYNGAP1](#)

[ECgene alternative splicing isoforms for SYNGAP1](#)

Mechanismus sestřihu mRNA

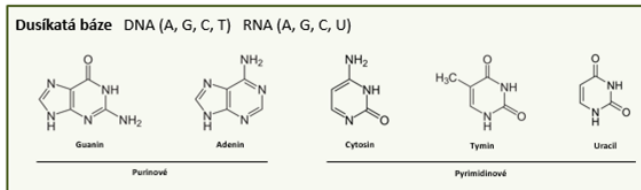
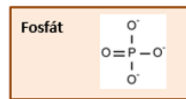
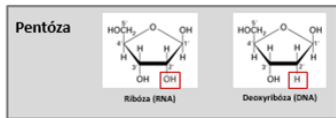
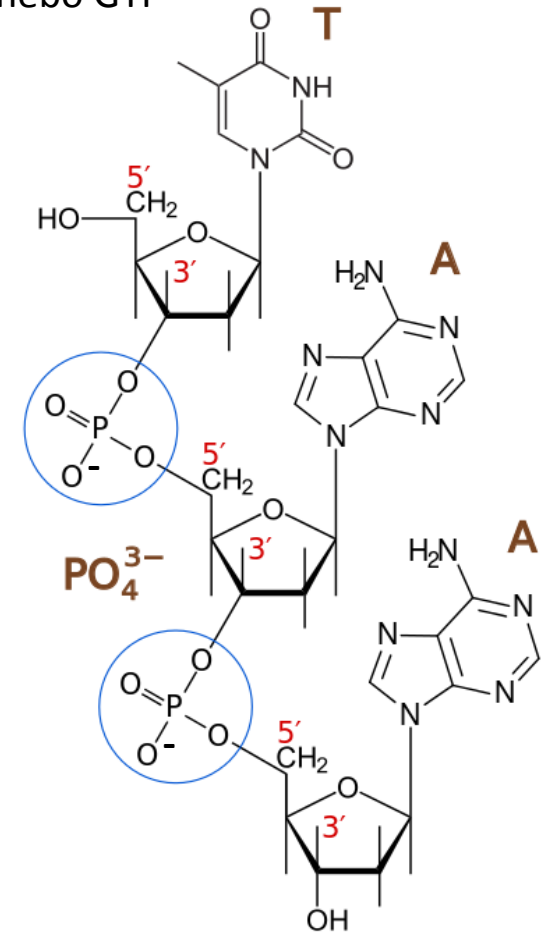
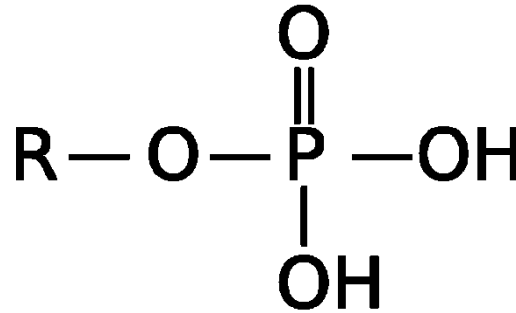
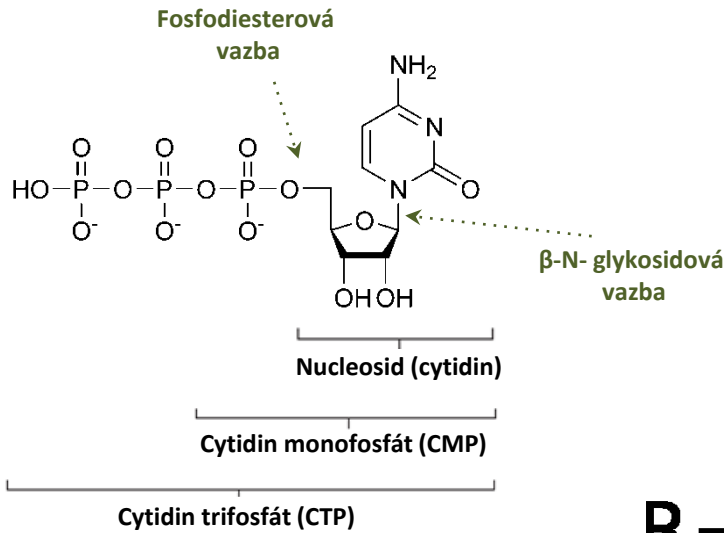
- Úprava primární struktury mRNA - pouze za účasti spliceozomu
- Proces řídí snRNP částice (komplex snRNA- a proteinů) - tvoří spliceozom
- primární struktura intronu určuje místo sestřihu: **GU-AG**
- **Intron:** 5'-konec **GU**; 3'-konec **AG**; uprostřed místo větvení **A**
- Vlastní sestřih probíhá 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 – pentoza (ribóza/deoxyribóza) + fosfát (mono- v řetězci, tri- volně)*

Transesterifikace v sestřihu pre-RNA → mRNA

První transesterifikace:

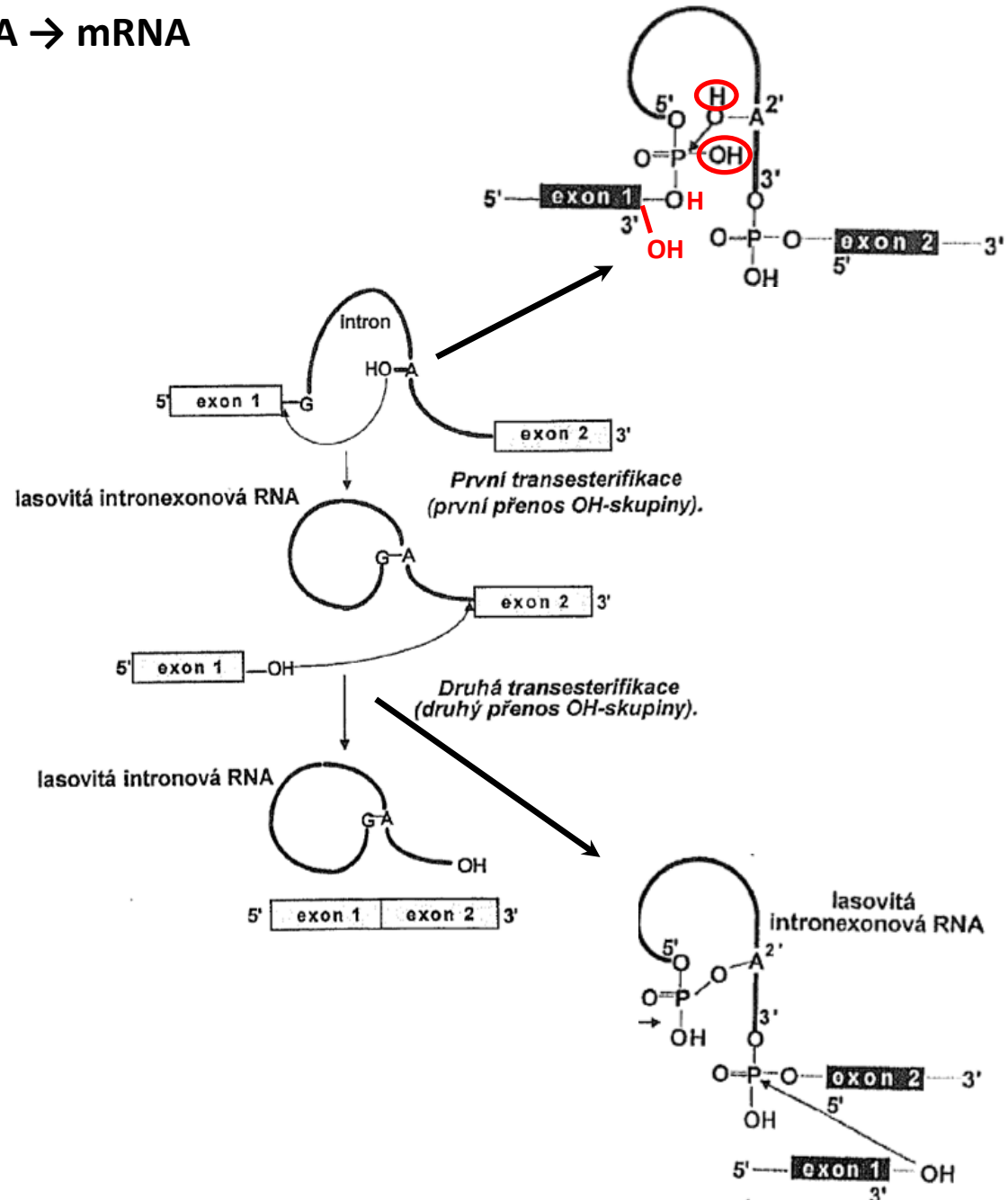
- spojení exonu 1 a intronu přes OH-skupiny
- odpad z vazby (H_2O) je použit na zakončení 3'-konce exonu 1 (OH) a zakončení 5'-konce intronu (H)

Druhá transesterifikace:

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

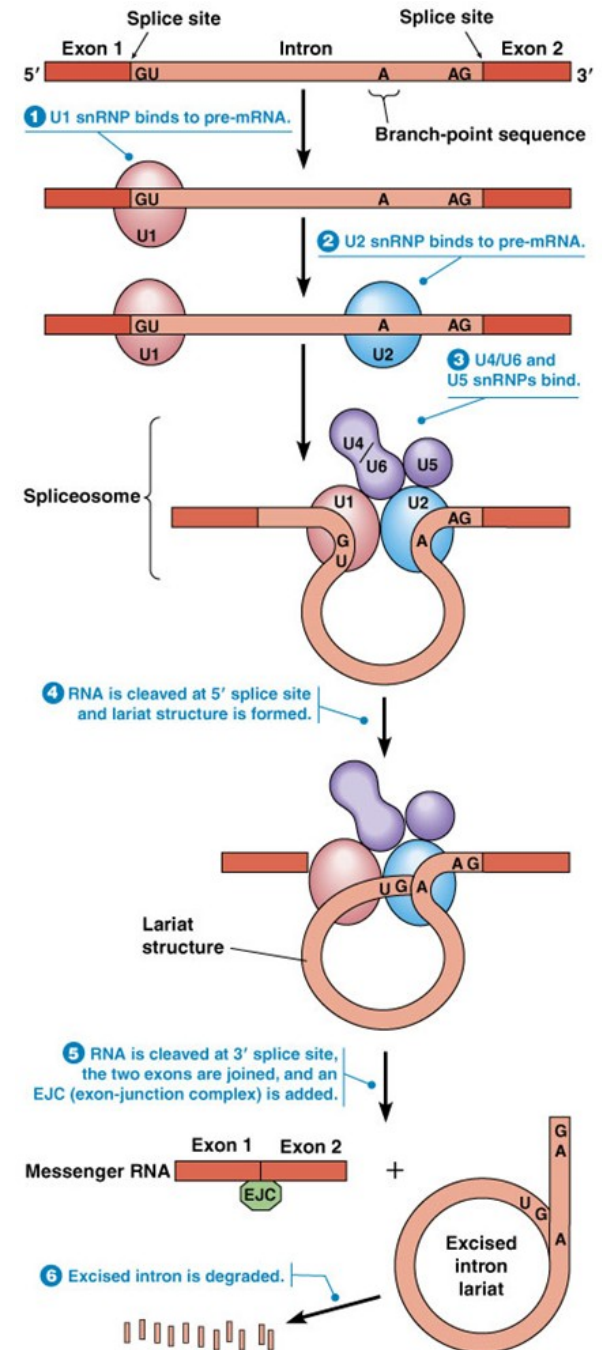
Sekvence pro transesterifikaci jsou rozeznávány snRNP-částicemi a tvoří komplexy katalyzující sestřih -

Spliceozom



Spliceozom

- velká elipsoidní částice, sedimentační koeficient 60S
- uvnitř jádra
- **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

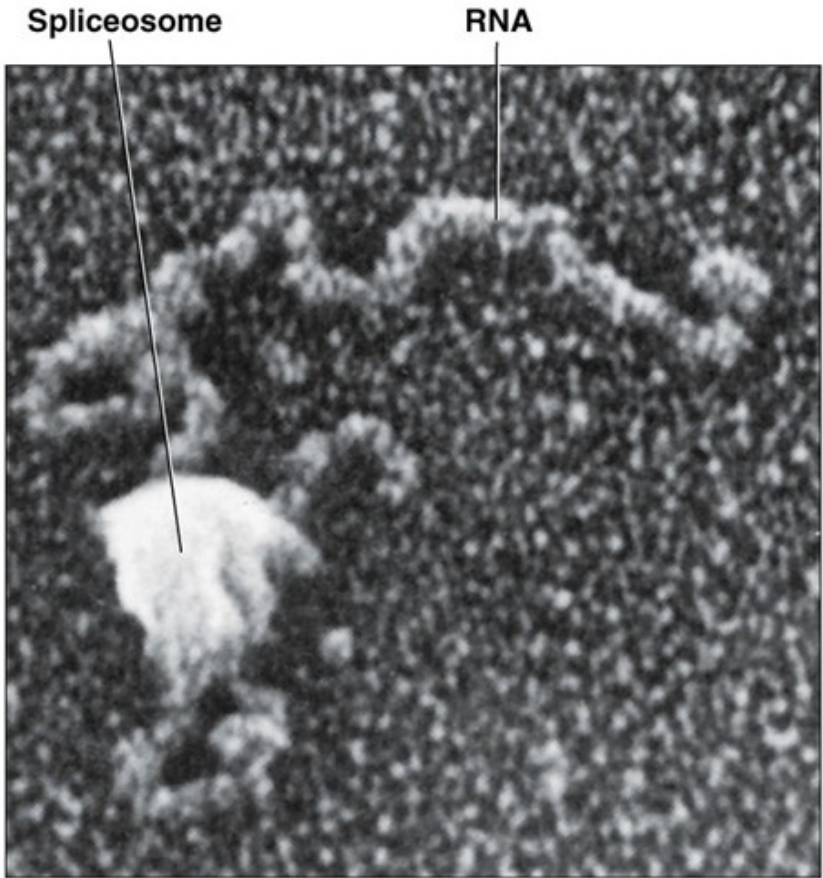
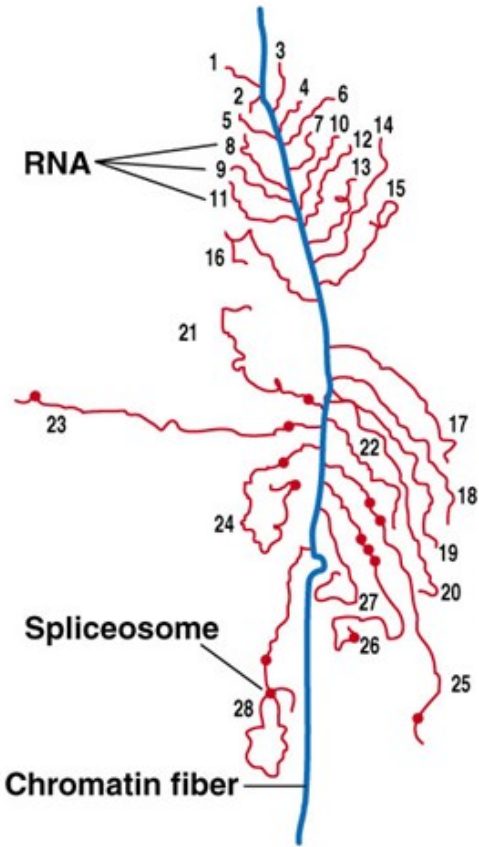


Lariat - laso

Spliceozom



0.2 μm



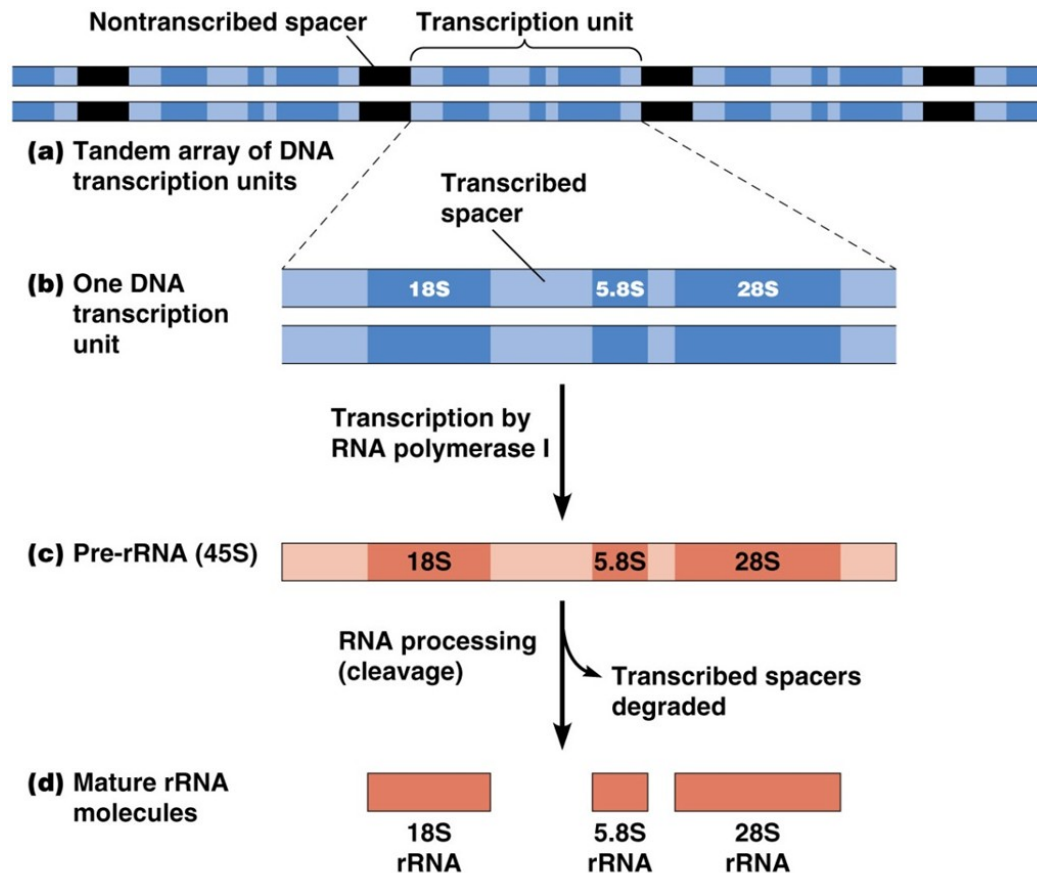
10 nm

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

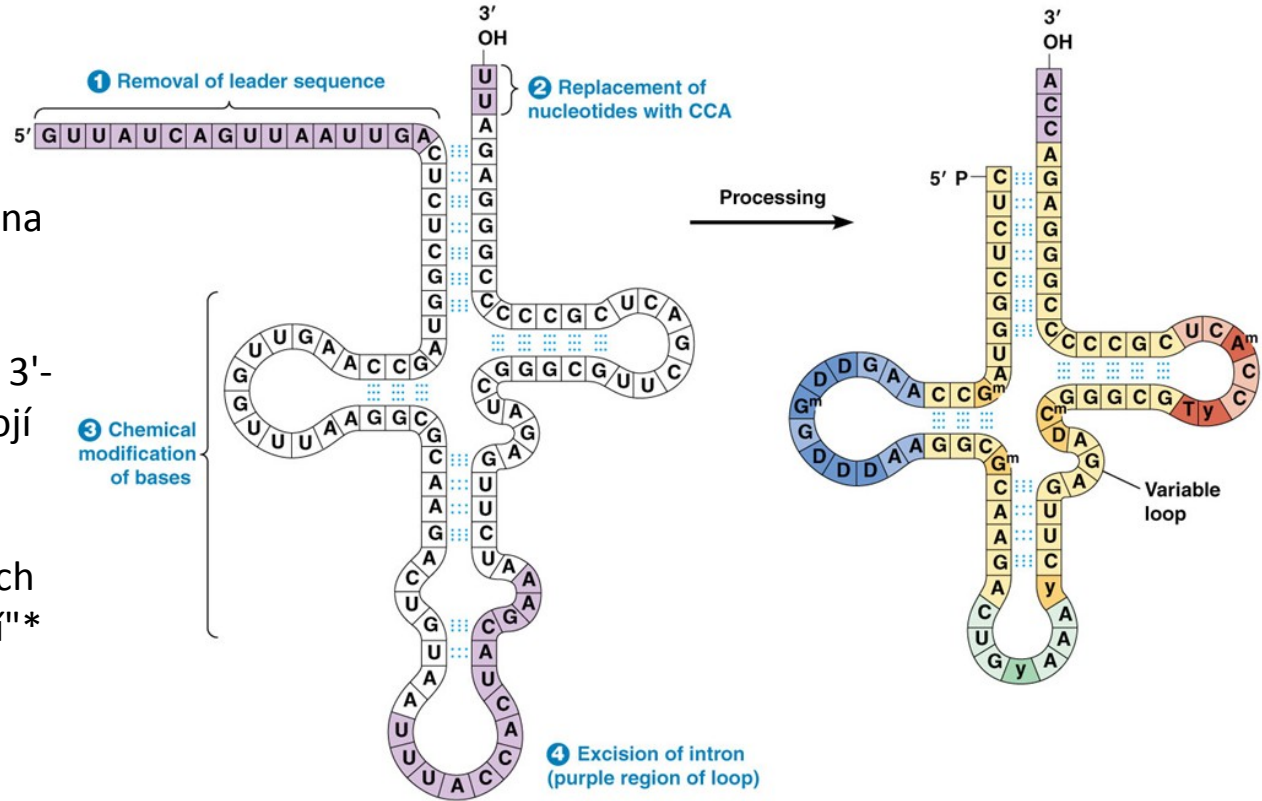
jednotlivé tRNA uskutečňují přenos jednotlivých aminokyselin

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

(b) Mature tRNA, secondary structure

© 2012 Pearson Education, Inc.

*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)

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