

Transkripce

© Biochemický ústav LF MU (E.T.)
2012

Transkripce

Proces tvorby RNA na podkladu struktury DNA

Je přepisován pouze jeden řetězec dvoušroubovice DNA –
templátový řetězec

Druhý řetězec se nazývá **kódující** (jeho sekvence bází odpovídá transkriptu, pouze místo U je T)

Terminologie

Kódující řetězec



Templátový řetězec



transkripce



Syntéza RNA probíhá opět ve směru 5' → 3'

K transkripci jsou nezbytné:

Dvouvláknová DNA

RNA-polymerasa

ATP,GTP,CTP,UTP

Mg²⁺ ionty

Enzym zodpovědný za transkripci je DNA-dependentní RNA polymerasa (transkriptasa)

Prokaryonty:

jedna polymerasa

(5 podjednotek plus sigma faktor, který se zapojuje pouze do iniciace)

Přepisuje všechny formy RNA

Eukaryonty

čtyři různé RNA polymerasy:

RNA pol I – syntéza rRNA (v jadérku)

RNA pol II – syntéza mRNA (jádro)

RNA pol III – syntéza tRNA, 5S RNA (jádro)

RNA pol IV - syntéza mitochondriální RNA

Mají stejný mechanismus účinku, rozlišují různé promotory.

Většina genů u eukaryontů je přepisována RNA-polymerasou II

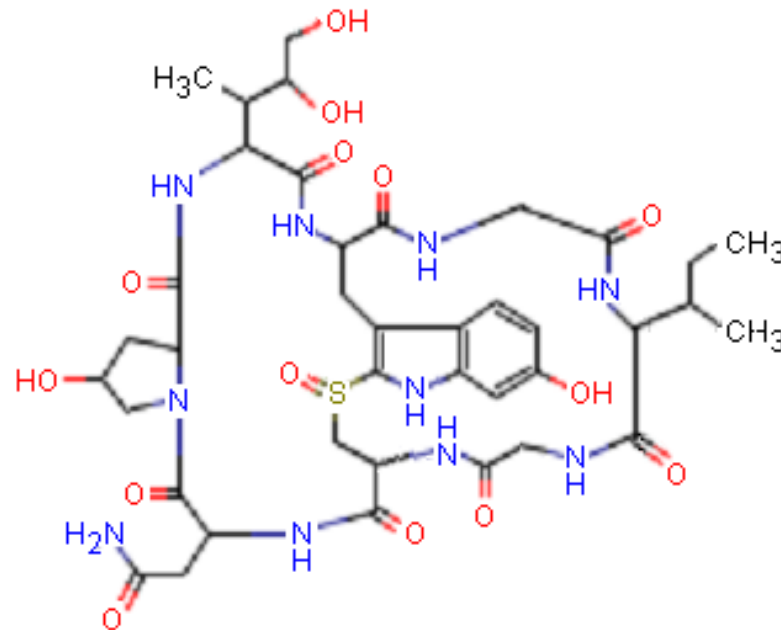
Amanitin – cyklický oktapeptid s neobvyklými aminokyselinami



Muchomůrka
zelená

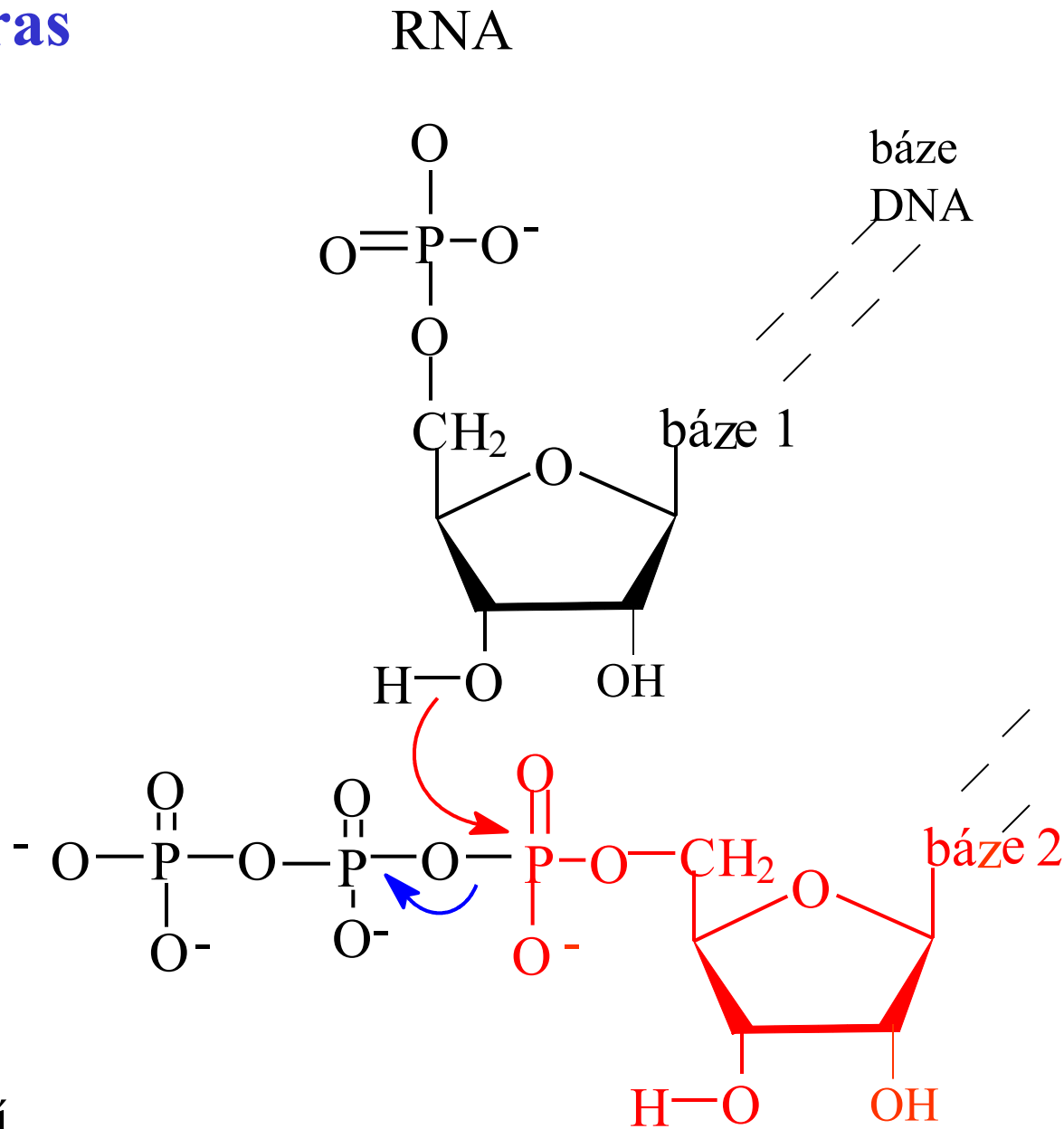
(*Amanita
phalloides*)

Inhibitor některých eukaryotních
RNA polymeras (hlavně typu II)



Účinek RNA polymeras

- Syntéza nové RNA probíhá ve směru $5' \rightarrow 3'$
- K syntéze jsou potřebné NTP: ATP, GTP, CTP, UTP
- Každý nukleotid se páruje s komplementární bází na templátovém vlákně DNA
- Polymerasa tvoří fosfoesterovou vazbu mezi 3'-OH ribosy na rostoucím RNA vlákně a α -fosfátem navázaným na 5'-OH ribosy vstupujícího nukleotidu
- energie polymerace je kryta štěpením NTP
- neexistuje zpětná kontrola řazení bází



Transkripce

Tři fáze transkripce:

- Iniclace
- Elongace
- terminace

Iniciace transkripce

Společný rys pro eukaryonty a prokaryonty:
RNA polymerasy se vážou na specifické
nukleotidové sekvence - **promotory**

V místě promotoru se nachází **konvenční sekvence**

(sekvence, které se obecně najdou v určité oblasti
mnoha zkoumaných genů)

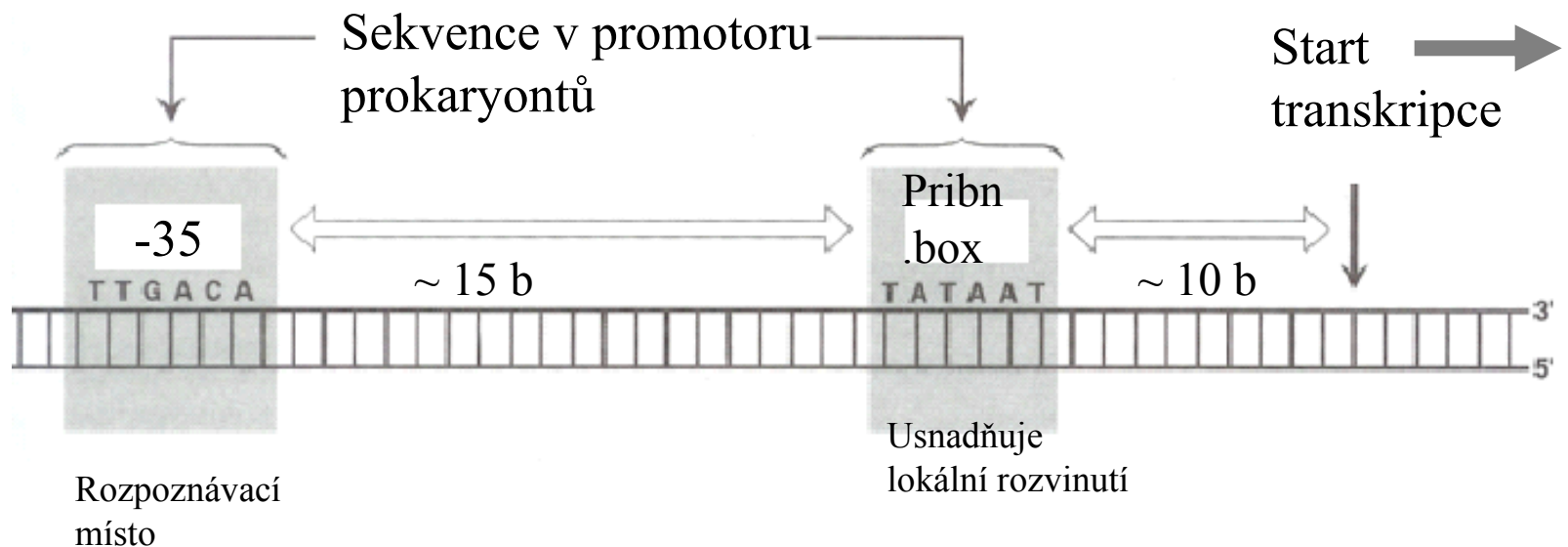
Promotory u eukaryot jsou složitější než u prokaryot.

Promotor u prokaryontů

V pozici cca -10 obsahuje Pribnowův box TATAAT

V pozici cca -35 další sekvence TTGACA

Tyto sekvence jsou rozeznány σ -faktorem prokaryotické RNA polymerasy



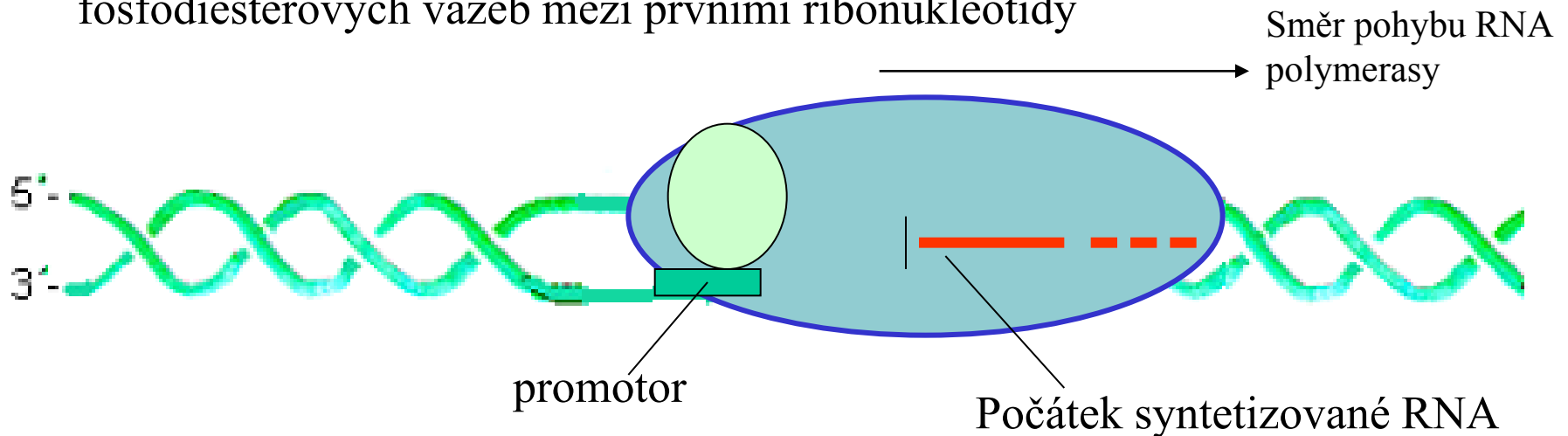
Transkripce u prokaryontů

Iniciace:

Vazba RNA-polymerasy do promotorové oblasti DNA prostřednictvím sigma podjednotky

Lokální rozvinutí vláken DNA účinkem RNA polymerasy

Párování bází z ribonukleotidů s templátovým vláknem a tvorba fosfodiesterových vazeb mezi prvními ribonukleotidy



Antibiotikum rifampicin inhibuje bakteriální RNA polymerasu

Promotor u eukaryontů (RNA polymerasa II)

Transkripce eukaryontních genů je mnohem komplikovanější

Je zapojena řada transkripčních faktorů (proteinů), které se vážou k různým úsekům DNA, transkripci ovlivňuje stav DNA a histonů v nukleosomech.

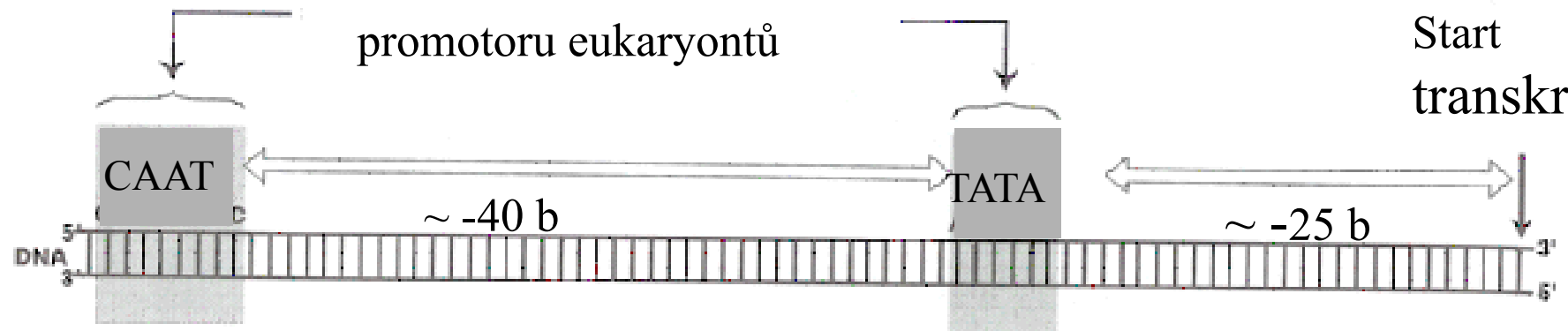
Promotor obsahuje TATA box (Hognessův box) (sekvence TATAAAAG ve směru 5' → 3' na netemplátovém řetězci) analogický Pribnowově sekvenci (TATAAT) – určuje pravděpodobně místo startu – vazba **bazálních transkripčních faktorů**

V pozici -100 až 200 jsou 1-2 další regulační sekvence (CAAT box, GC box) – určuje pravděpodobně frekvenci startu (promotorové proximální sekvence)

Vzdálené regulační sekvence (mimo promotor) – vážou **specifické** transkripční faktory (proteiny)

Některé sekvence v
promotoru eukaryontů

Start
transkripce



Bazální transkripční faktory jsou regulační proteiny

Musí být navázány na RNA polymerasu před startem transkripce a jsou současně asociovány s promotorovými sekvencemi

Samotná RNA-polymerasa nemůže zahájit transkripci

Jsou nezbytné pro rozpoznání promotoru a místa startu

Bazální = jsou potřebné pro transkripci **všech** genů

Existuje řada genů, které neobsahují ani TATA ani CCAAT box – jedná se většinou o geny vyskytující se v každé buňce = **housekeeping genes**

Jejich exprese probíhá konstantní rychlostí

Bazální transkripční faktory

Označují se TFII_X,
kde X je písmeno
označující konkrétní
faktor

TFIID – největší z bazálních faktorů transkripce

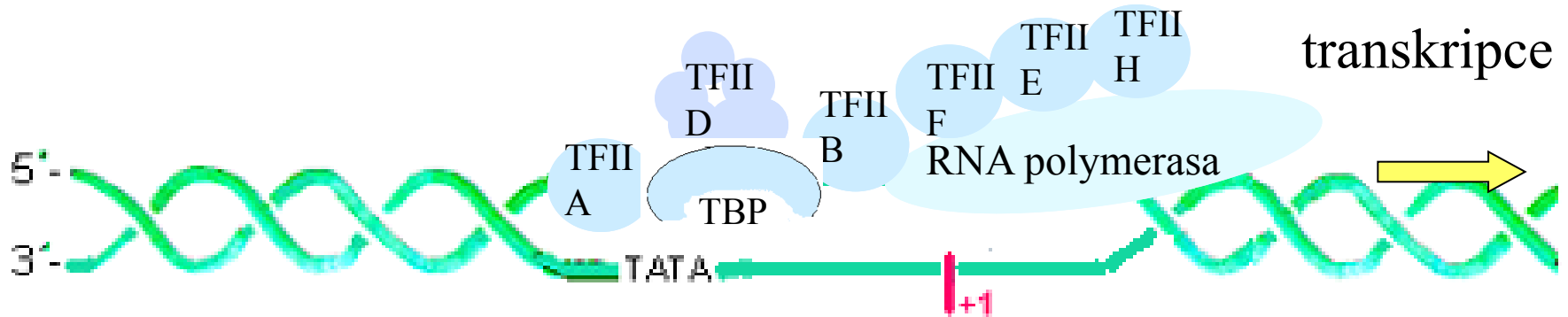
Má celkem 11 podjednotek

Jednou podjednotkou je TBP (TATA box binding protein).

TBP se váže k TATA boxu, na ni nasedají další podjednotky TFIID.

Po té se navazují další TF (TFIIA, B, F, E, H) a RNA polymerasa

TFIIH má helikasovou aktivitu



Genově specifické regulační proteiny

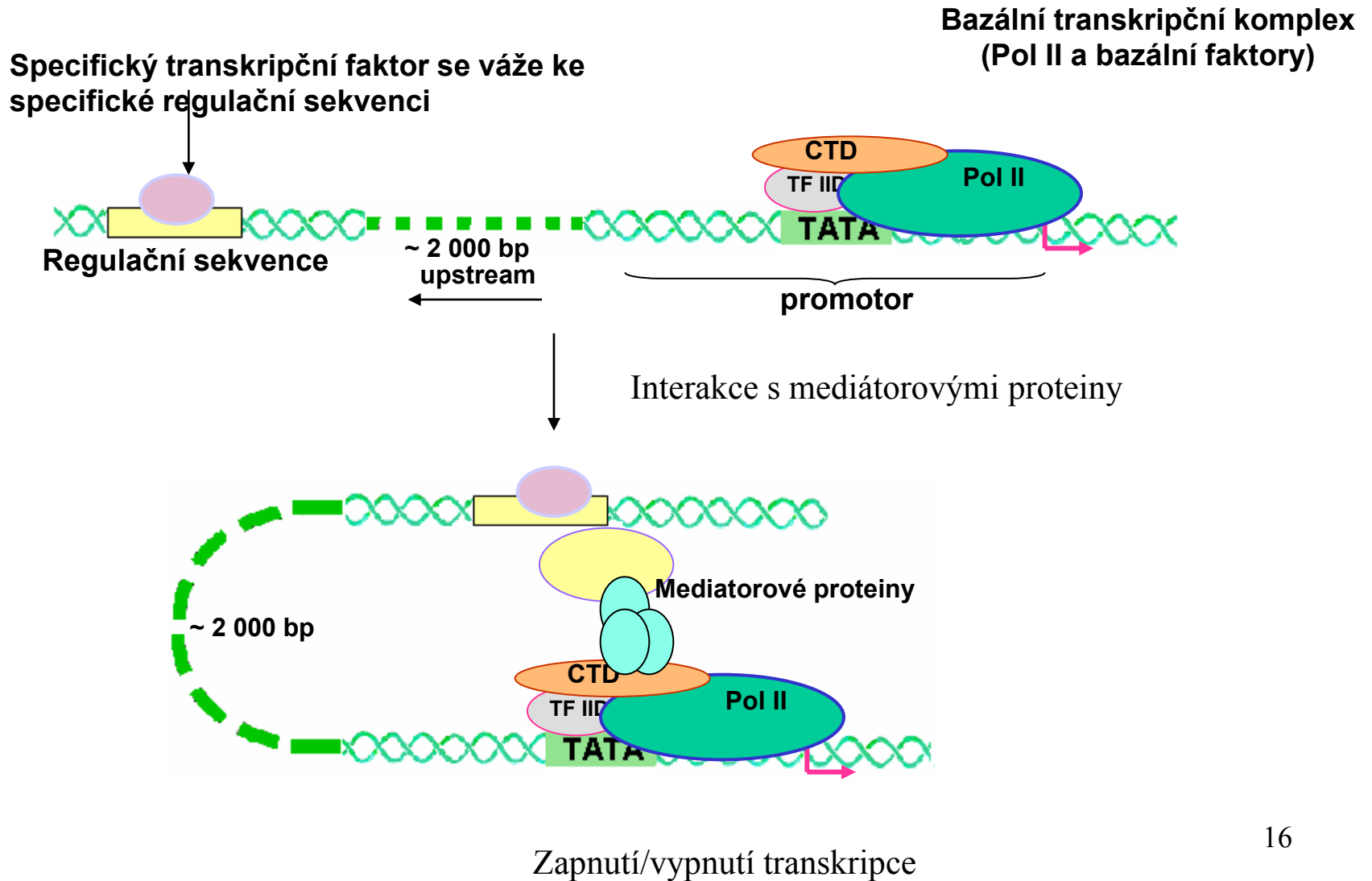
Specifické transkripční faktory - proteiny, které se vážou v regulačních sekvencích mimo promotor, často velmi vzdálených.

Působí jako aktivátory nebo represory transkripce příslušného genu.

Specifické transkripční faktory interagují s mediátorovými proteiny (koaktivátory, korepresory), které jsou v kontaktu s bazálními transkripčními faktory.

Typický gen kódující syntézu proteinu u eukaryontů má na DNA vazebná místa pro řadu specifických transkripčních faktorů

Specifické transkripční faktory



Iniciace transkripce mRNA u eukaryontů - shrnutí

Transkripce je zahájena teprve po navázání **všech transkripčních faktorů**.

Každá RNA polymerasa má své transkripční faktory.

RNA polymerasa se váže k transkripčním faktorům a DNA

Dvojitý helix DNA se rozvíjí a polymerasa je „sunuta“ k místu startu

Většina transkripčních faktorů se oddělí.

Následuje elongace.

Elongace a terminace

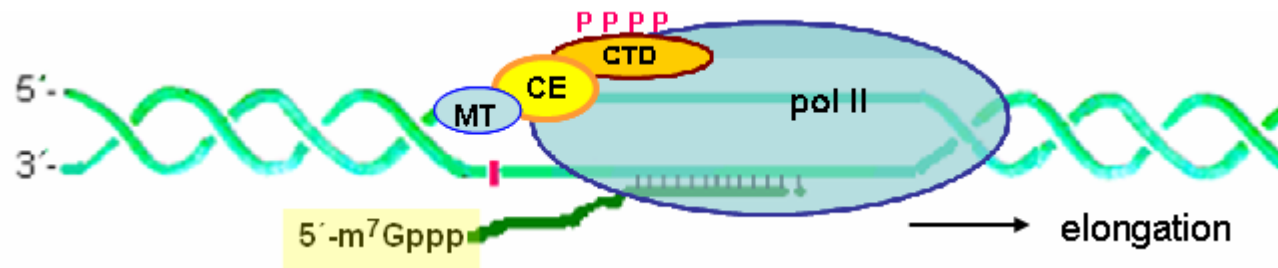
RNA polymerasa se pohybuje po DNA, rozvíjí dvoušroubovicovou strukturu

Vznikající RNA nezůstává spojena s DNA vodíkovými můstky

Hned za místem, kde byl přidán nový nukleotid dochází k obnovení dvoušroubovice a vytěsnění vlákna RNA

Uvolňování RNA z templátového řetězce umožňuje vznik dalších kopií ještě před ukončením syntézy první RNA

Podle jednoho genu může být současně transkribováno několik tisíc molekul RNA

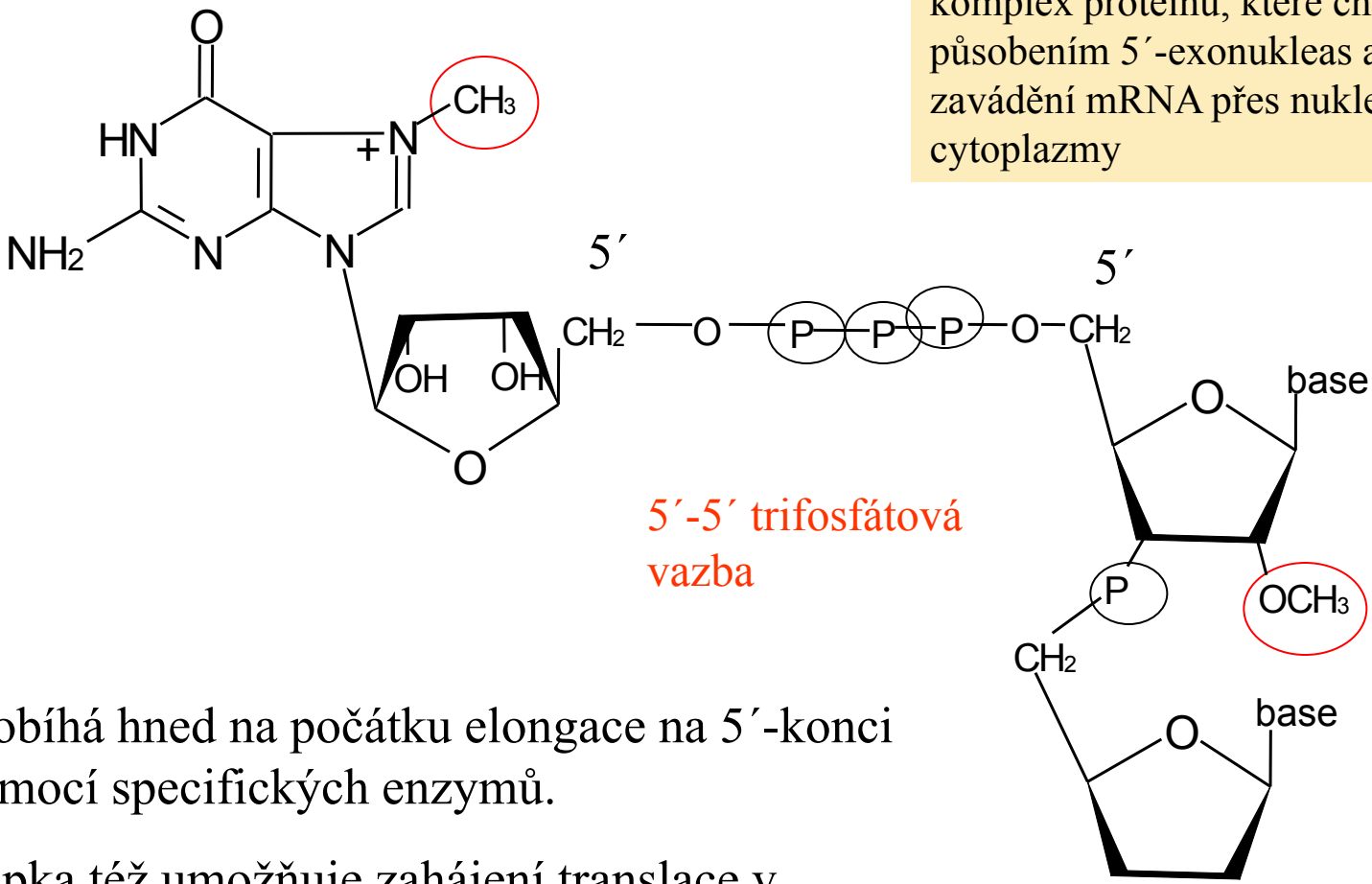


Capping hned po uvolnění RNA –
CE(capping enzyme), MT-methyltransferase

O terminaci u eukaryontů je známo jen velmi málo.

Tvorba čepičky u mRNA- capping

Navázání 7-methylguanosinu 5'-5' fosfátovou vazbou – na čapku se váže komplex proteinů, které chrání RNA před působením 5'-exonukleas a pomáhají při zavádění mRNA přes nukleární póry do cytoplazmy



Probíhá hned na počátku elongace na 5'-konci pomocí specifických enzymů.

Čapka též umožňuje zahájení translace v cytoplazmě. mRNA bez čapky nemůže vstoupit do translace

Polyadenylace na 3'-konci

Většina eukaryontní mRNA má k 3'-konci připojen řetězec 40-200 poly-A

Je připojen posttranskripčně pomocí polyadenylátpolymerasy

Mezi jednotlivými nukleotidy vznikají běžné 5'-3' vazby, jako při transkripci, ale není potřeba žádný templát

Poly(A) konec zvyšuje stabilitu mRNA (dokud má RNA poly(A) konec, není zpravidla degradována) a napomáhá transportu z jádra do cytoplazmy

U transkripce chybí proofreading

Syntéza DNA - 1chyba/10¹⁰ nukleotidů

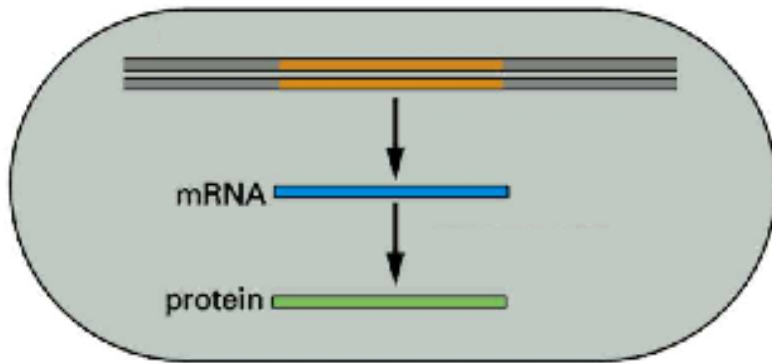
Syntéza RNA – 1 chyba/10⁴ nukleotidů

RNA polymerázy nevlastní nukleolytickou korigující (proofreading) aktivitu.

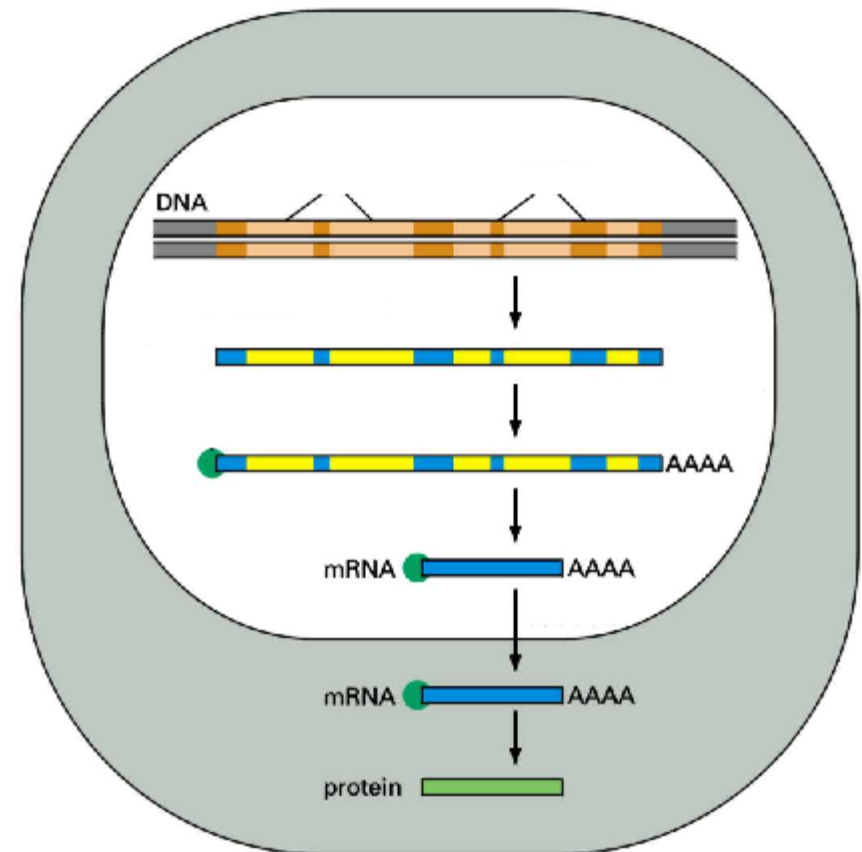
Toto chybění korekce (proofreading) odráží skutečnost, že transkripce nemusí být tak přesná jako DNA replikace, protože RNA není používána jako trvalá zásobní forma genetické informace.

Souhrn procesů od genu k proteinu

Prokaryonty



Eukaryonty



Úpravy primárních transkriptů

- Primární transkripty jsou přesnou kopií transkripční jednotky
- Primární transkripty tRNA a rRNA u prokaryontů i eukaryontů jsou posttranskripčně modifikovány ribonukleasami
- Prokaryontní mRNA je prakticky identická s primárním transkriptem (k translaci slouží ještě před ukončením syntézy)
- Eukaryontní RNA podléhá rozsáhlým následným modifikacím – probíhají kotranskripčně

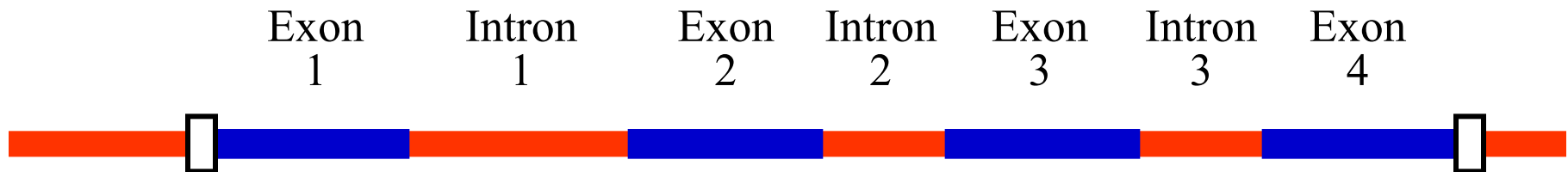
Úprava eukaryontní mRNA

Primární transkript je hnRNA

Je prepisem strukturního genu, v němž jsou kódující sekvence (exony) střídány sekvencemi nekódujícími (introny nebo intervenujícími sekvencemi)

Na 5'konci je čapka (snímek 30), na 3'konci proběhne polyadenylace.

Nekódující sekvence musí být odstraněny z primární RNA během úprav (processingu)



Alternativní sestřih

Při typickém sestřihu jsou všechny exony primárního RNA transkriptu spojeny dohromady za vzniku mRNA pro syntézu specifického proteinu

Alternativní sestřih – různé skupiny exonů z jednoho genu tvoří různé mRNA vedoucí k syntéze různých proteinů

