

# **Syntéza a postranskripční úpravy RNA**

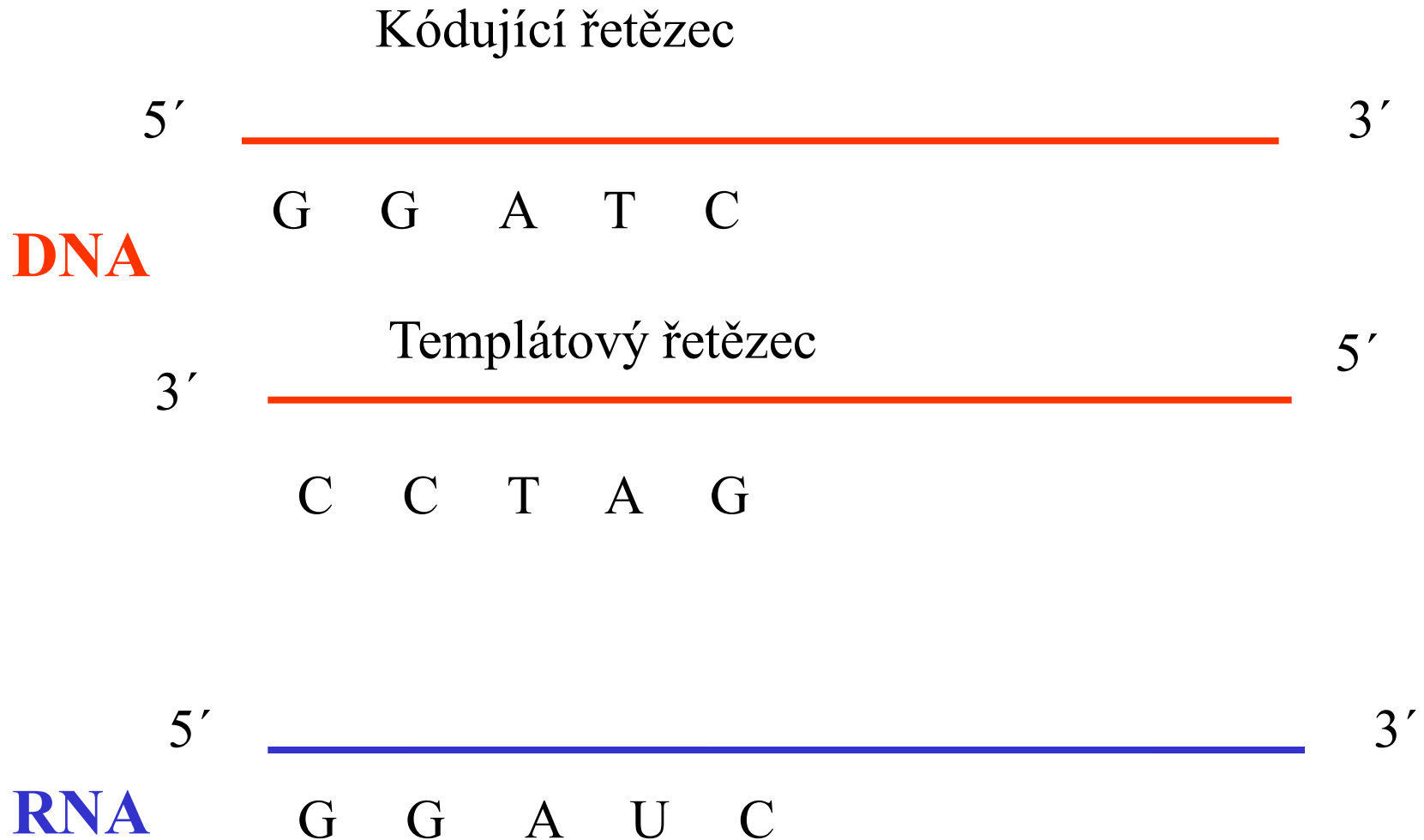
**2016**

# 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)



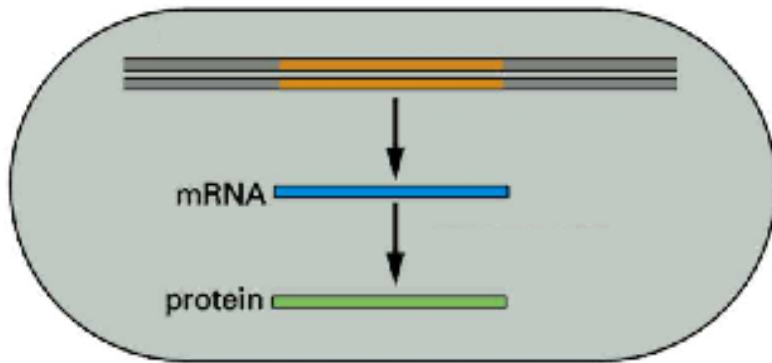
Syntéza RNA probíhá opět ve směru 5' → 3'

# Replikace x transkripce

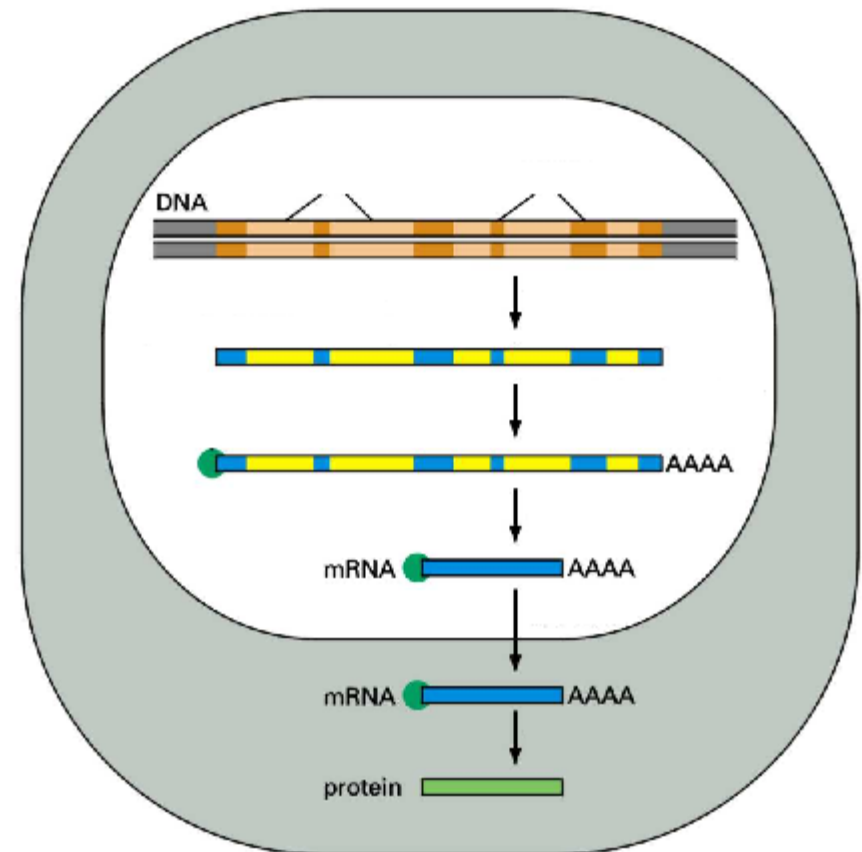
	Replikace	Transkripce
Enzymy:	DNA-polymerasy	RNA-polymerasy
Kde probíhá:	na chromosomu v S fázi	vybraný segment DNA
Zahájení:	vyžaduje RNA primer	nevyžaduje primer
Průběh:	kopírována obě vlákna	kopírováno pouze jedno vlákno
Kontrola:	polymerasa má zpětnou kontrolu správného zařazení posledního nukleotidu	polymerasa nemá zpětnou kontrolu správného zařazení posledního nukleotidu
Nukleotidy:	dATP, dGTP, dCTP, dTTP	ATP, GTP, UTP, CTP

# Transkripce u prokaryontů a eukaryontů

## Prokaryonty



## Eukaryonty



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

Prokaryonty:

5 podjednotek plus sigma faktor.

Přepisuje všechny formy RNA

Eukaryonty

4 různé RNA polymerasy

## RNA polymerasy u eukaryontů

RNA pol I – syntéza r RNA (v jadérku)

RNA pol II – syntéza mRNA (jádro)

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

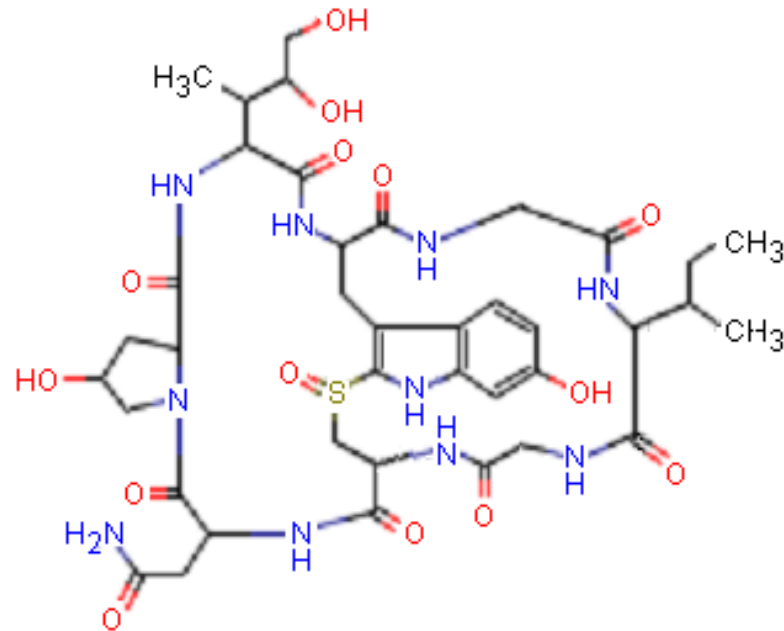
RNA pol IV - syntéza mitochondriální RNA

Mají stejný mechanismus účinku, rozlišují různé promotory

# Amanitin



Inhibitor eukaryotních RNA polymeras (hlavně typu II)



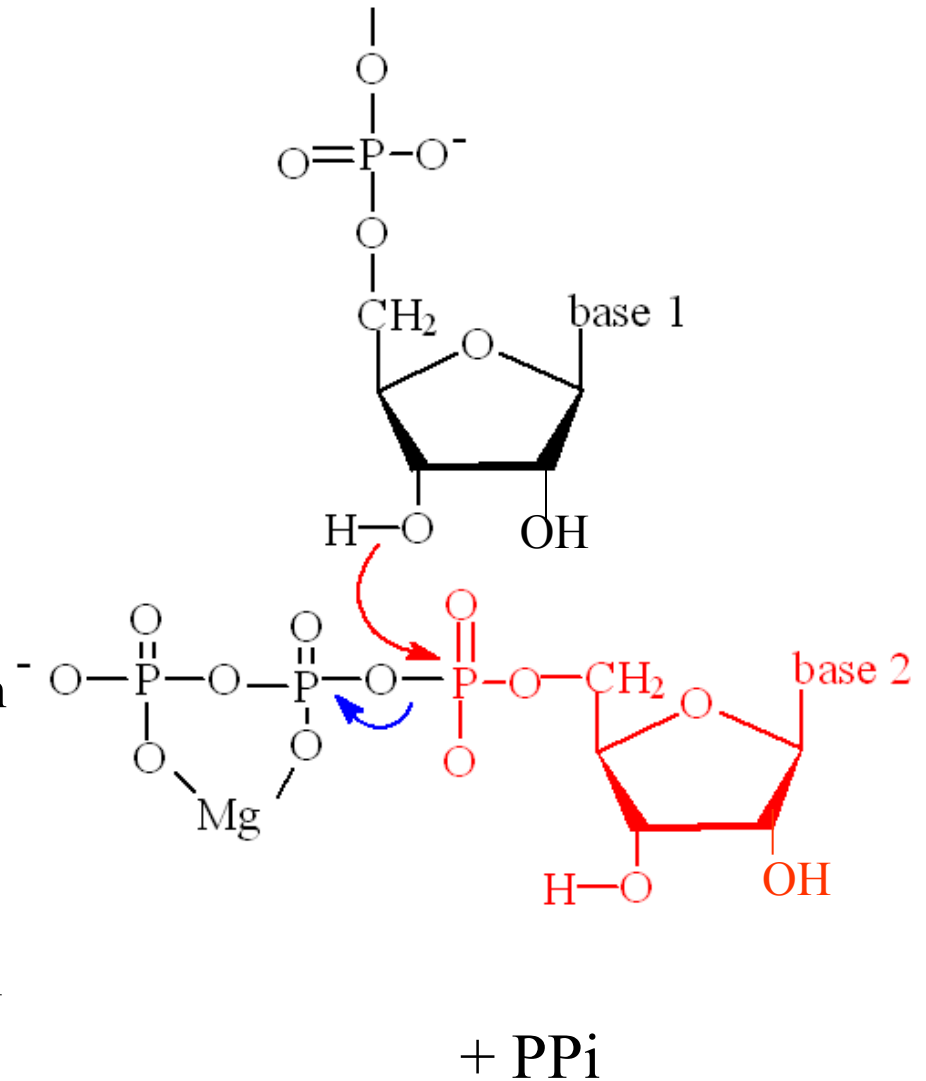


## 3 fáze transkripce

- iniciace
- elongace
- terminace

# Účinek RNA polymeras

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



# Rozpoznání templátu

- RNA polymerasa (RNAP) vytvoří stabilní komplex s templátovou DNA v místě promotoru

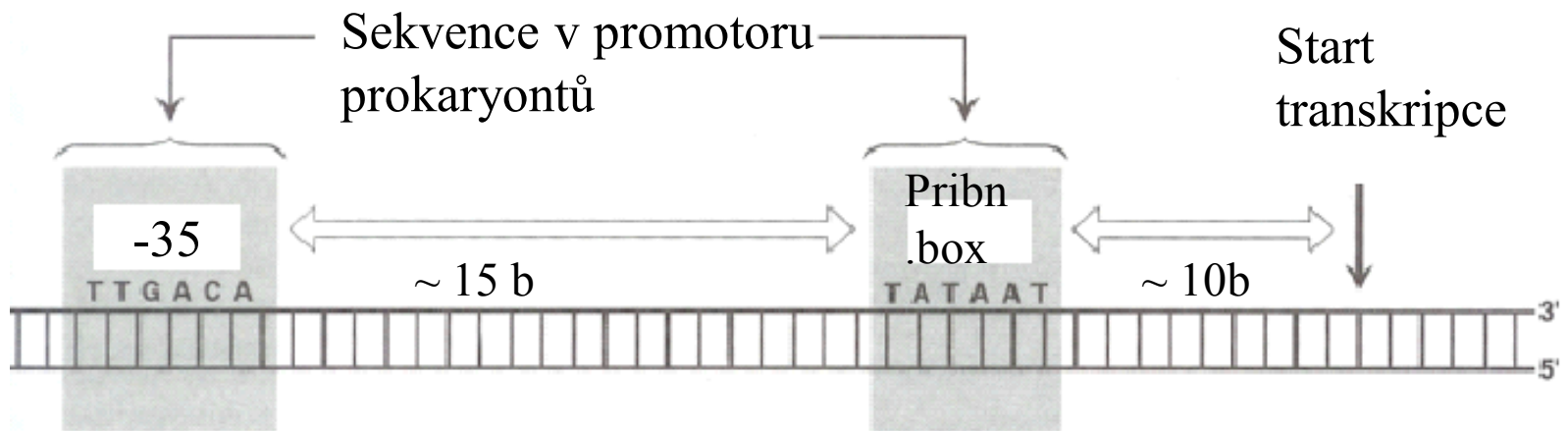
V místě promotoru se nachází **konvenční sekvence** (sekvence, které se obecně najdou v určité oblasti mnoha zkoumaných genů)

# Promotor u prokaryontů

V pozici ~ -10 obsahuje Pribnowův box TATAAT

V pozici ~ -35 další sekvence TTGACA

Tyto sekvence jsou rozeznány  $\sigma$  -faktorem prokaryotické RNA polymerasy



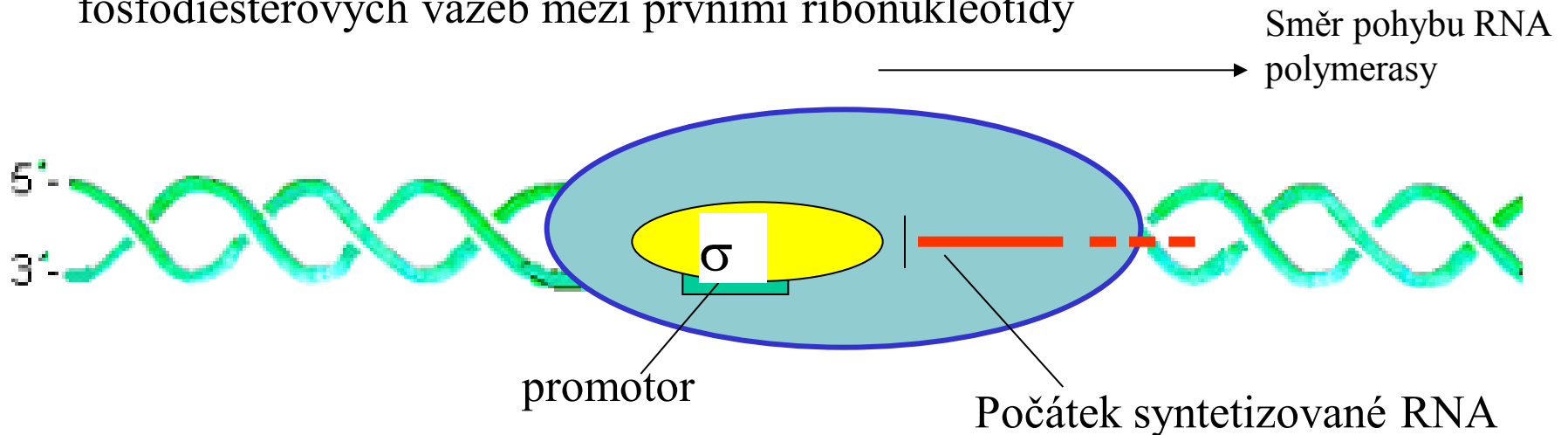
# Transkripce u prokaryontů

## Iniciace:

Vazba RNA-polymerasy do promotorové oblasti DNA prostřednictvím sigma podjednotky

Lokální rozvinutí vláken DNA RNA polymerasou

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



# Transkripce u prokaryontů

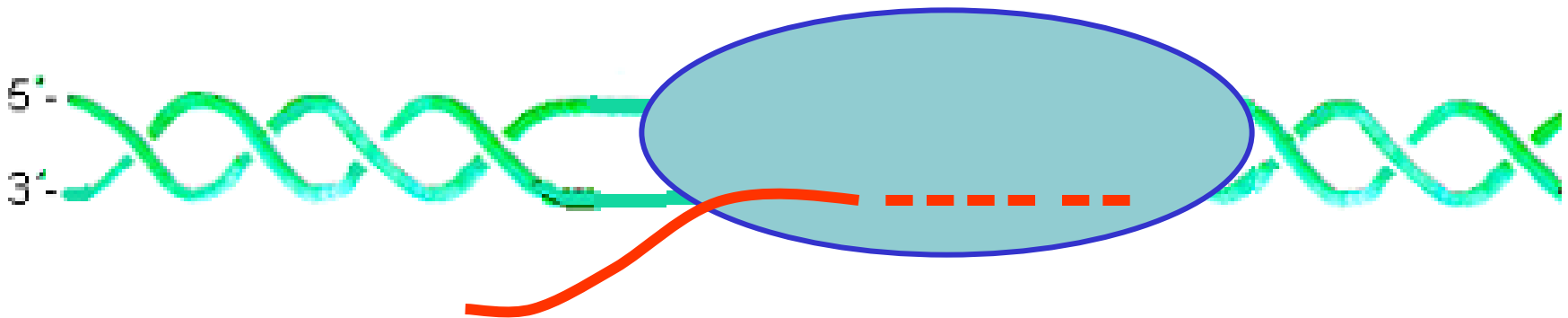
## Elongace:

Uvolnění podjednotky sigma z RNA polymerasy

pohyb RNA polymerasy podél DNA ve směru transkripce, rozvíjení dvoušroubovice i opětné svinování (vytváření transkripční bubliny)

Tvorba kovalentních vazeb mezi nukleotidy

Vznikající RNA je vytěsňována z templátového vlákna



Terminační signál – ukončení elongace

# Promotor u eukaryontů (RNA polymerasa II)

Transkripce eukaryontních genů je mnohem komplikovanější

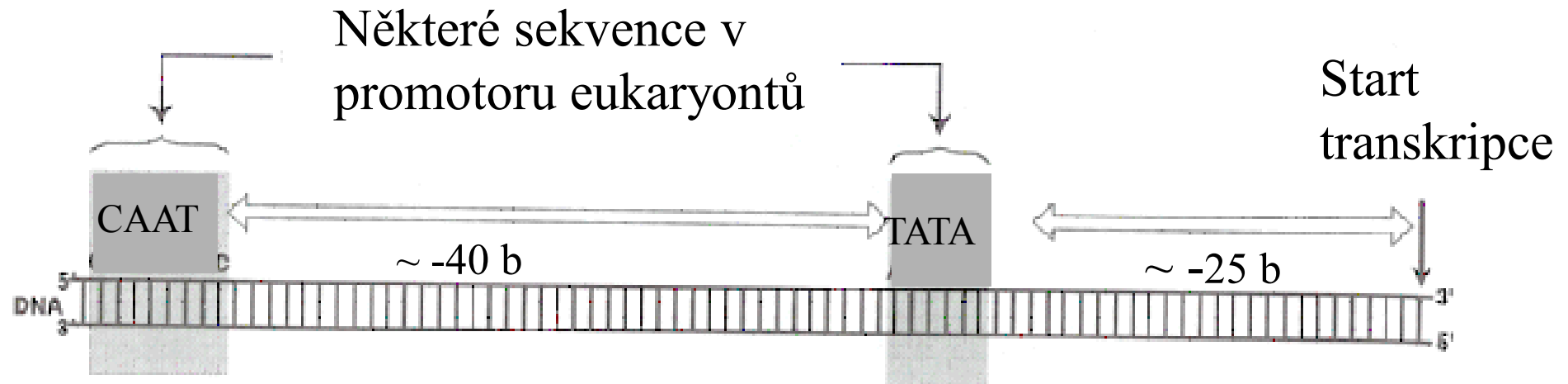
Je zapojena řada transkripčních faktorů, které se váží k různým úsekům DNA

Promotor obsahuje TATA box analogický Pribnowově sekvenci (ATATAA) – určuje pravděpodobně místo startu – vazba **bazálních transkripčních faktorů**

V pozici ~ -100-200 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

# Promotor u eukaryontů





## Bazální transkripční faktory u eukaryontů

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

# Bazální transkripční faktory

TFIID – největší z bazálních faktorů transkripce

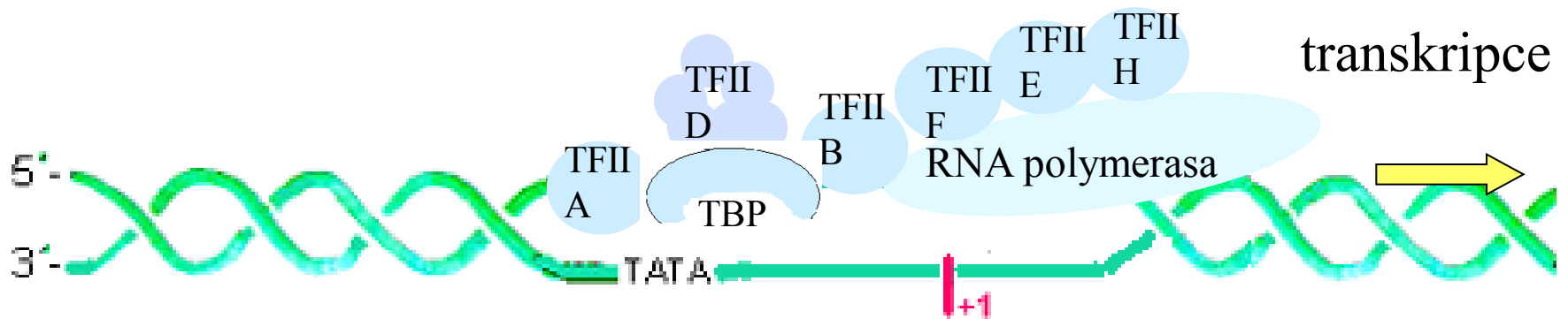
Má celkem 11 podjednotek

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

# Bazální transkripční faktory



# 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.

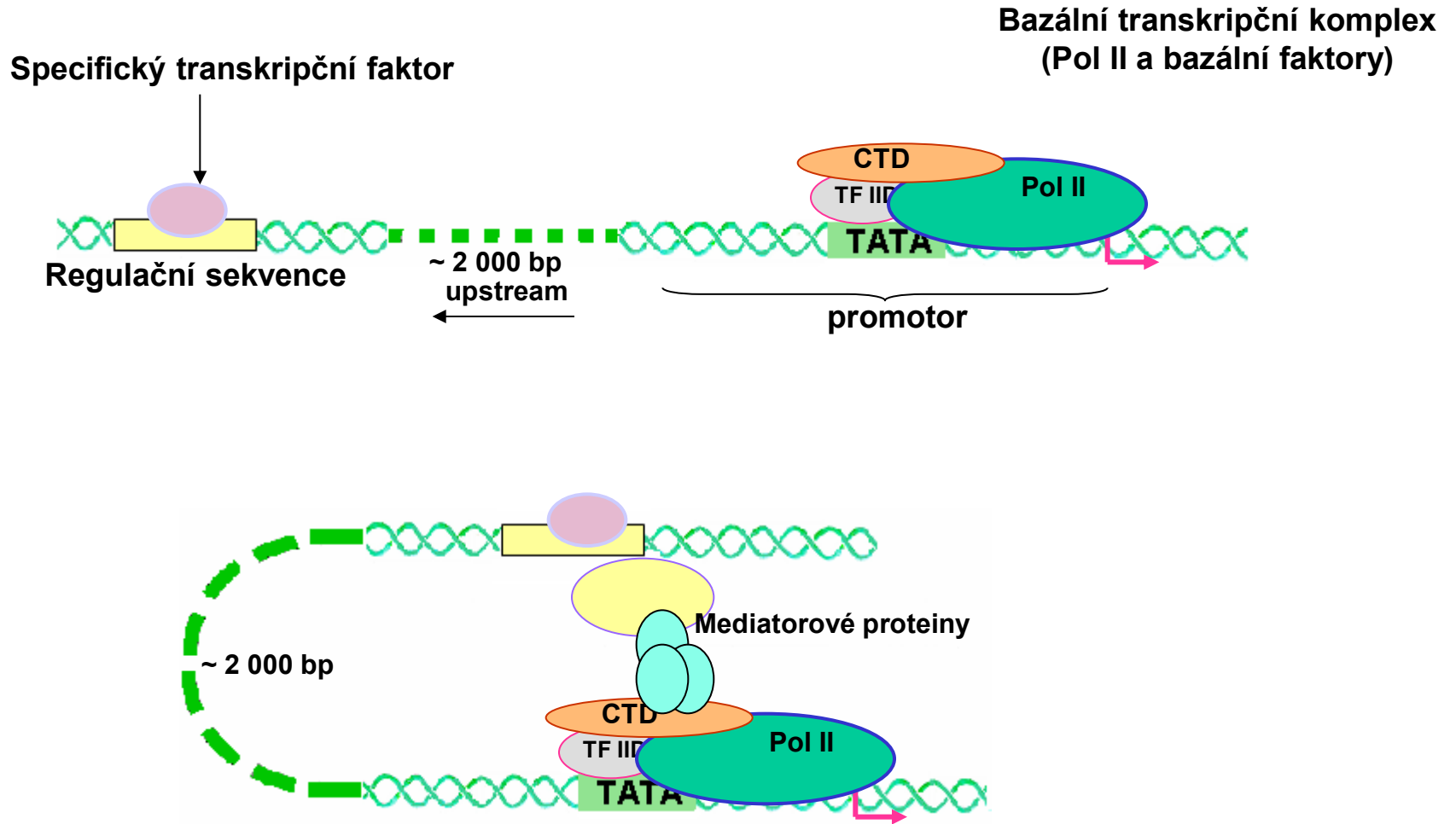
Specifické transkripční faktory interagují s mediátorovými proteiny (koaktivátory, korepresory), které jsou v kontaktu s bazálními transkripčními faktory.

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

## Specifické regulační sekvence (enhancery, silencers, HRE, HSRE)

- jsou na stejném chromosomu jako daný gen
- ale mohou být vzdáleny „upstream“ nebo „downstream“ od místa transkripce
- mohou blízko promotoru, ale také několik tisíc bází vzdáleny

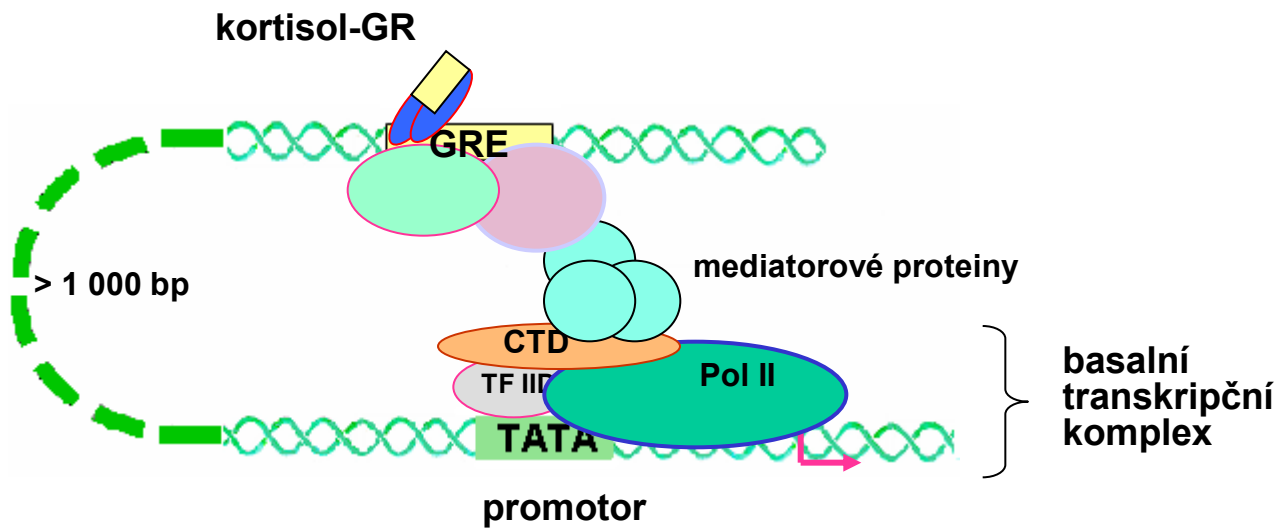
# Specifické transkripční faktory



# Jaderné receptory hormonů jsou specifické transkripční faktory

- receptory hormonů se nachází v neaktivní formě v jádře nebo v cytoplazmě. V neaktivní formě vážou inhibiční protein (např. heat shock protein).
- hormon pronikne cytoplazmatickou membánou do buňky a specificky se váže k receptoru v cytoplazmě nebo jádře
- inhibiční protein se oddělí, vzniká komplex hormon-receptor, konformace receptorové bálkoviny se mění
- cytoplazmatický komplex hormon receptor je translokován do jádra
- v jádře působí komplex hormon-receptor jako specifický transkripční faktor a váže se na DNA v místě specifické regulační sekvence (= hormon response element HRE)
- receptor s hormonem navázaný na DNA reaguje rovněž s koaktivátorem (mediátorový protein), který je v kontaktu s bazálním transkripčním komplexem. Tím se vypíná nebo zapíná proces transkripce

# Účinek kortizolu



GRE – glukokortikoid response element



# Transkripční faktory a zahájení transkripce u eukaryontů

Transkripce je zahájena teprve po navázání všech transkripčních faktorů

RNA polymerasa se váže k transkripčním faktorům a DNA

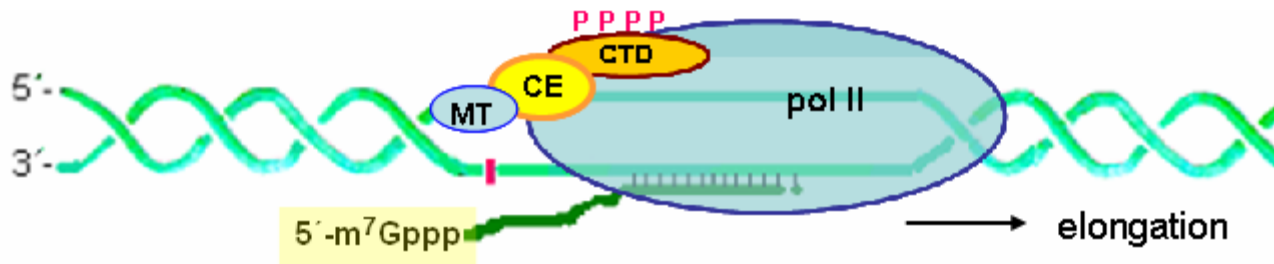
Dvojitý helix DNA se rozvíjí a polymerasa je „sunuta“ k místu startu

Je zahájena transkripce

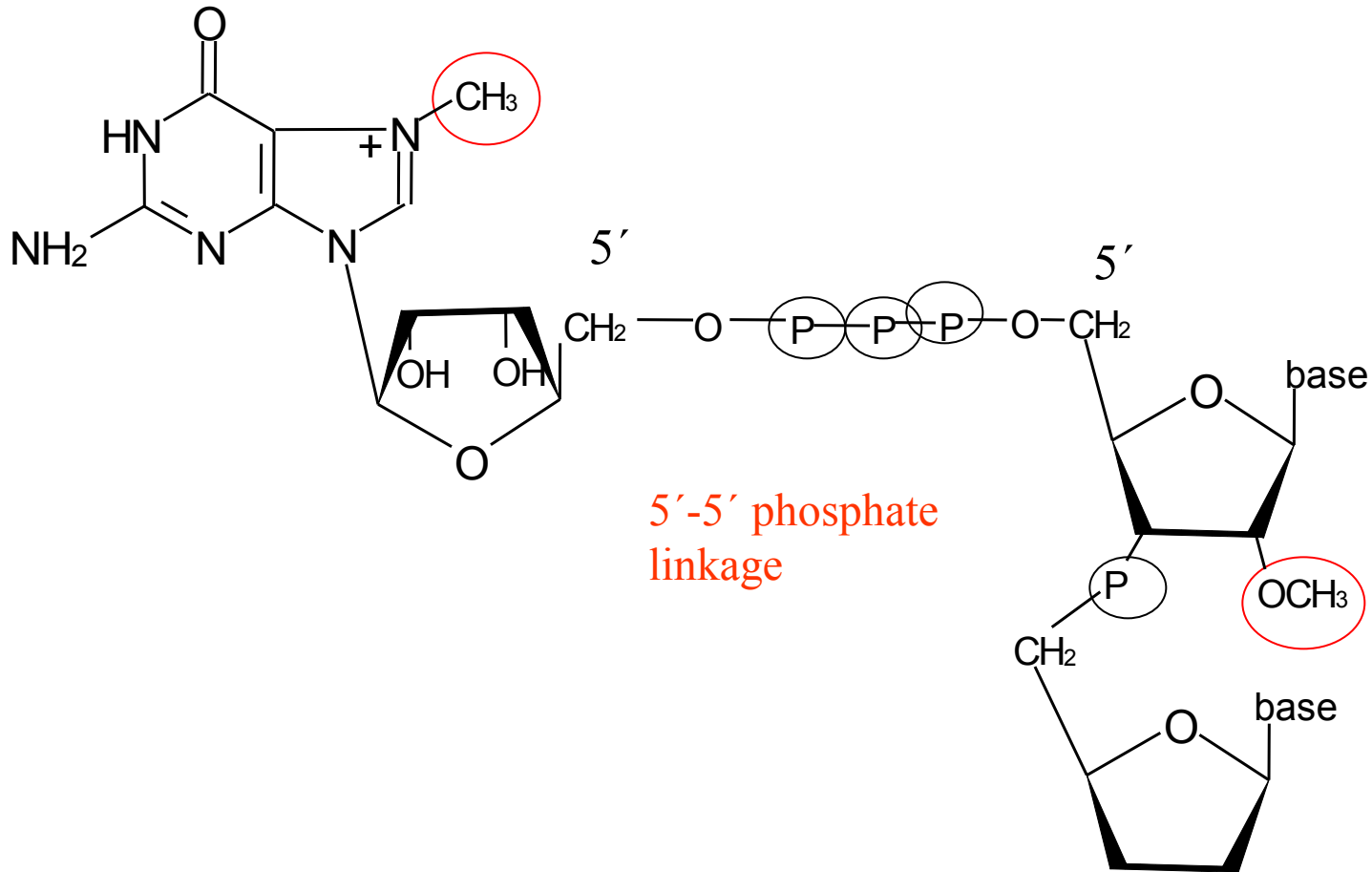
Po zahájení transkripce se většina transkripčních faktorů oddělí

# Tvorba čepičky - capping

Probíhá na počátku elongace pomocí specifických enzymů



# Čepička na 5'-konci



# Terminace

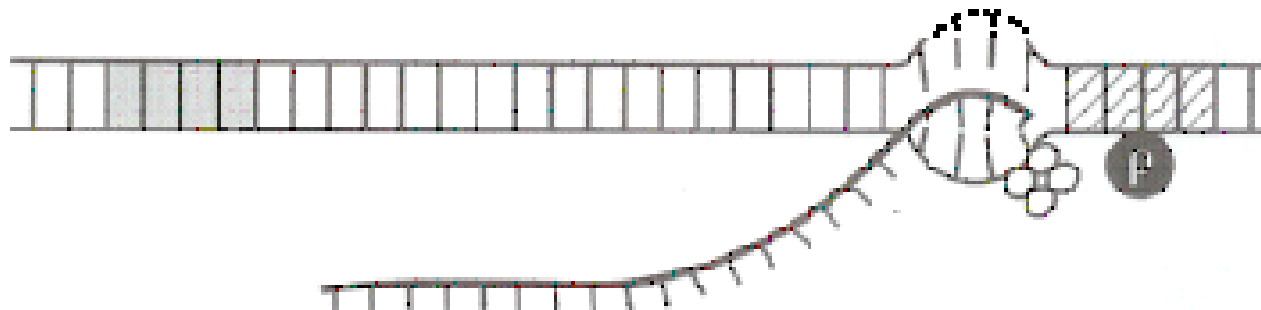
Proces elongace je ukončen při dosažení terminačního signálu. Transkripční komplex se rozpadá a uvolňuje vzniklou molekulu BNA

U prokaryontů je terminace

závislá na  $\rho$  faktoru

nezávislá na  $\rho$  faktoru

U eukaryontů je o terminaci málo známo



**RNA polymerázy dělají jednu chybu na  $10^4$  nukleotidů,**  
protože nevlastní nukleolytickou korigující (proofreading)  
aktivitu

(začínají řetězec RNA bez potřeby primeru)

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.

# Úprava primárních transkriptů

Primární transkript je přesnou kopií transkripční jednotky

Primární transkripty tRNA a rRNA u prokaryontů i eukaryontů jsou posttranskripčně modifikovány ribonukleasami

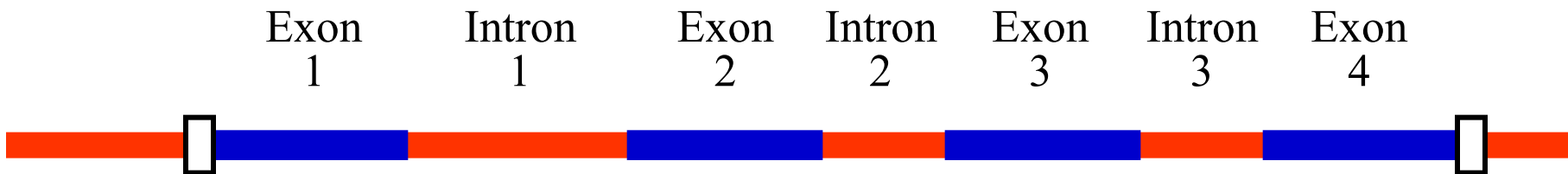
Prokaryontní mRNA je prakticky identická s primárním transkriptem (k translaci slouží ještě před ukončením syntézy)

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)



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

# Úprava hnRNA v jádře

- Chemická modifikace (navázání 7-methylquanosinu 5'-5' fosfátovou vazbou) – na ni se váže komplex proteinů, které chrání před působením 5' exonukleas a pomáhají při zavádění RNA přes nukleární póry do cytoplasmy
- Sestřih (odstranění sekvencí odpovídajících intronům)
- Polyadenylace (adice 3' polyA ) – brání účinku 3' exonukleas



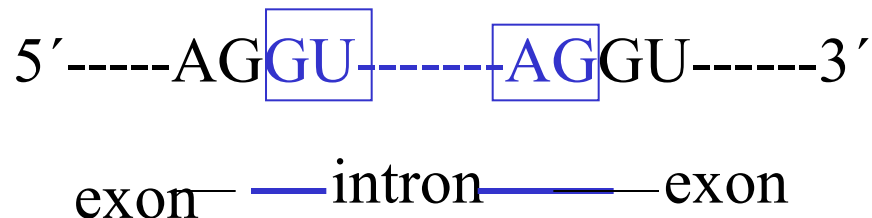
## Sestřih hnRNA - splicing

Probíhá působením jaderných enzymových komplexů – splicesomů

Splicesomy obsahují pět malých RNA (U1, U2, U4, U5 a U6)

Jsou asociovány s proteiny a tvoří snRNPs (small nuclear ribonucleoprotein particles).

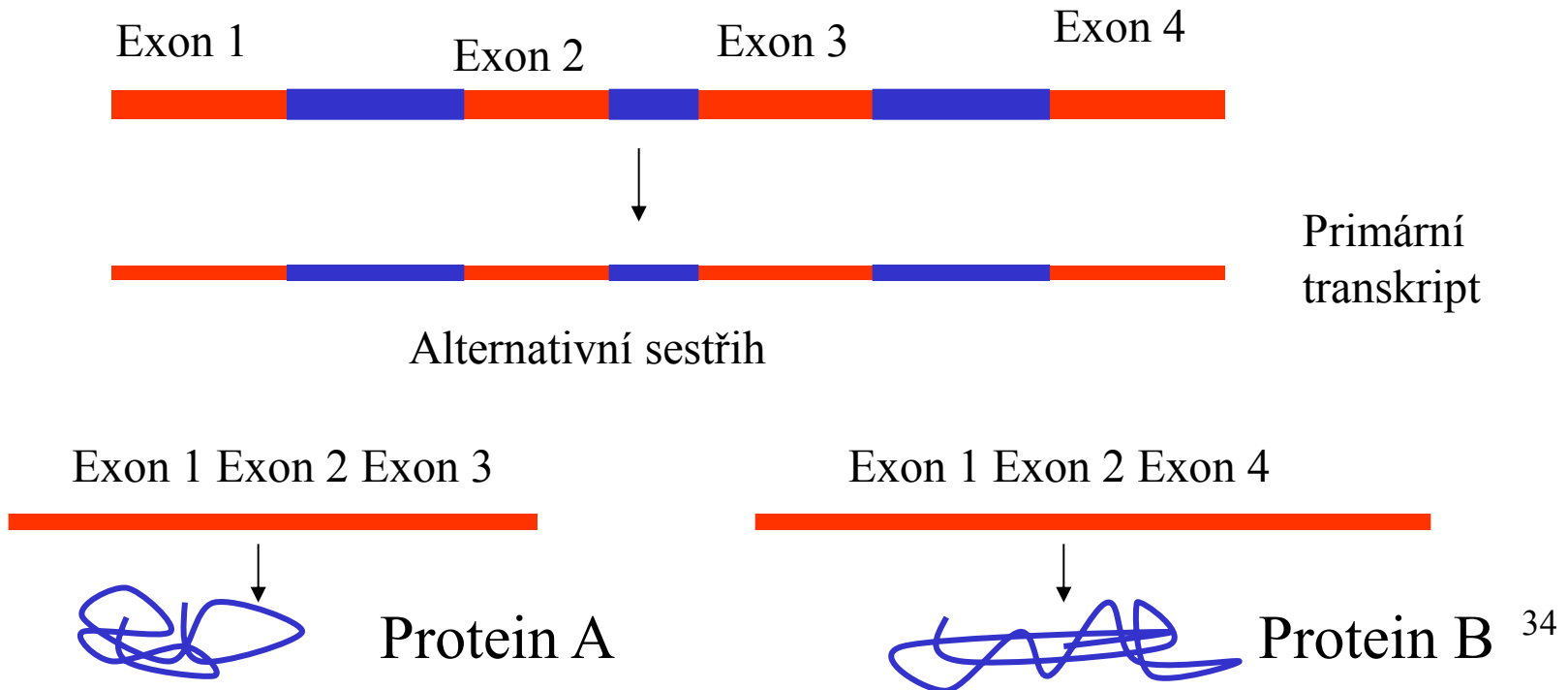
Sekvence AGGU určují hranice mezi intronem a exonem. Tyto sekvence jsou rozpoznány snRNPs.



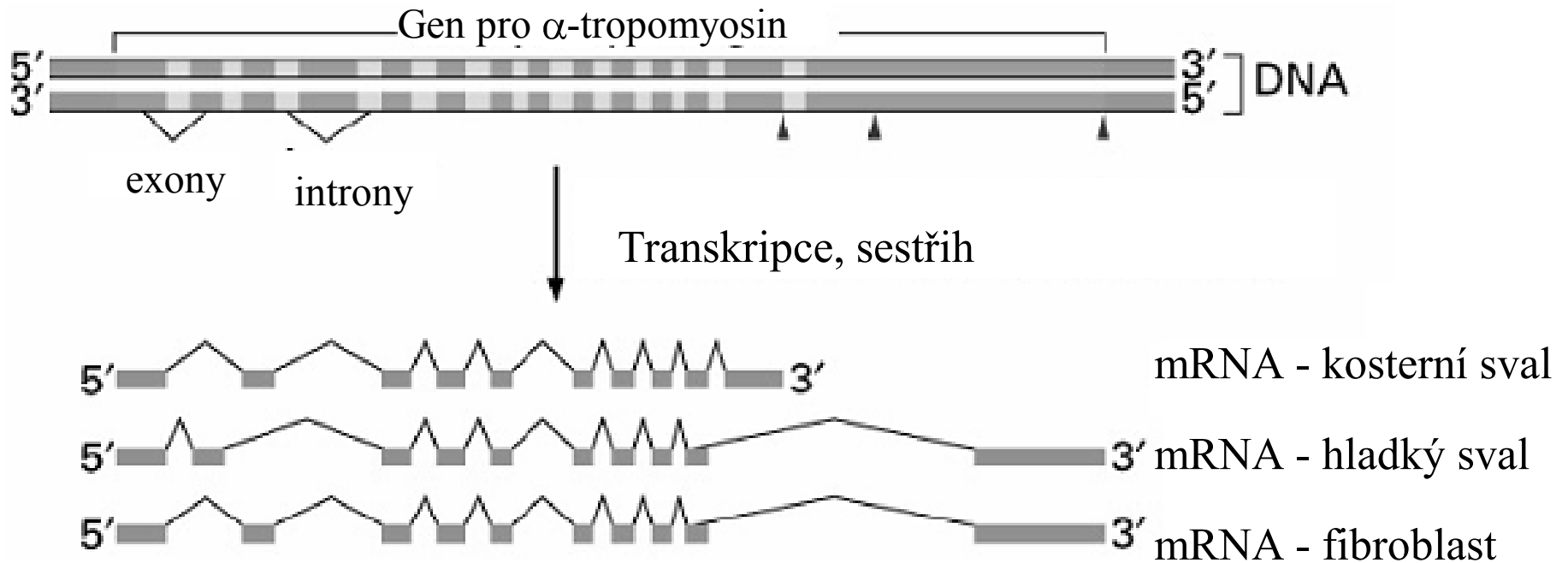
# Alternativní sestřih

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



# Alternativní sestřih m RNA



# Poruchy sestřihu

Vedou ke genetickým chorobám

Př.  $\beta$  - thalasemie:

$\beta$ -podjednotka hemoglobinu se netvoří v normálním množství

G na 5' sekvenci sestřihu je mutován na A a proto je primární transkript sestřižen nesprávně