

Nukleové kyseliny

© Biochemický ústav LF MU (E.T.) 2007

Polynukleotidy

– nukleotidy spojené fosfodiesterovou vazbou

Oligonukleotidy ≤ 50 nukleotidů

Polynukleotidy > 50 nukleotidů

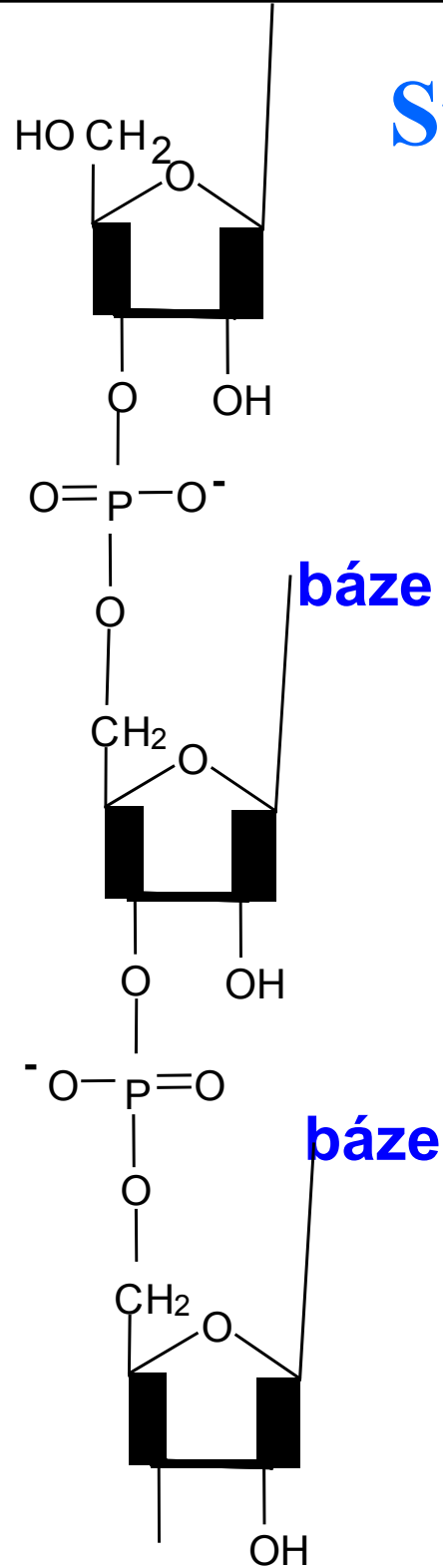
Struktura polynukleotidu

- kovalentní páteř:
pentosa...kys.fosforečná

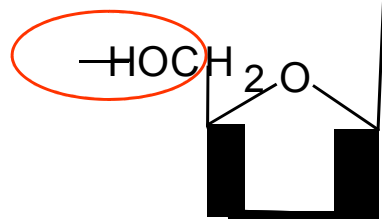
- postranní řetězce:

báze připojené na
pentosové zbytky N –
glykosidovou vazbou

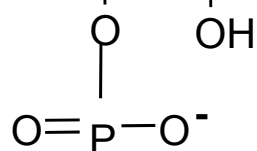
Fosfodiesterová
vazba



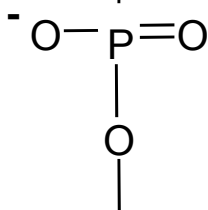
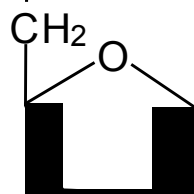
5' -konec



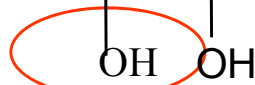
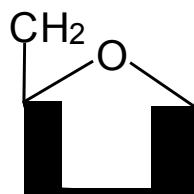
Polarita řetězce



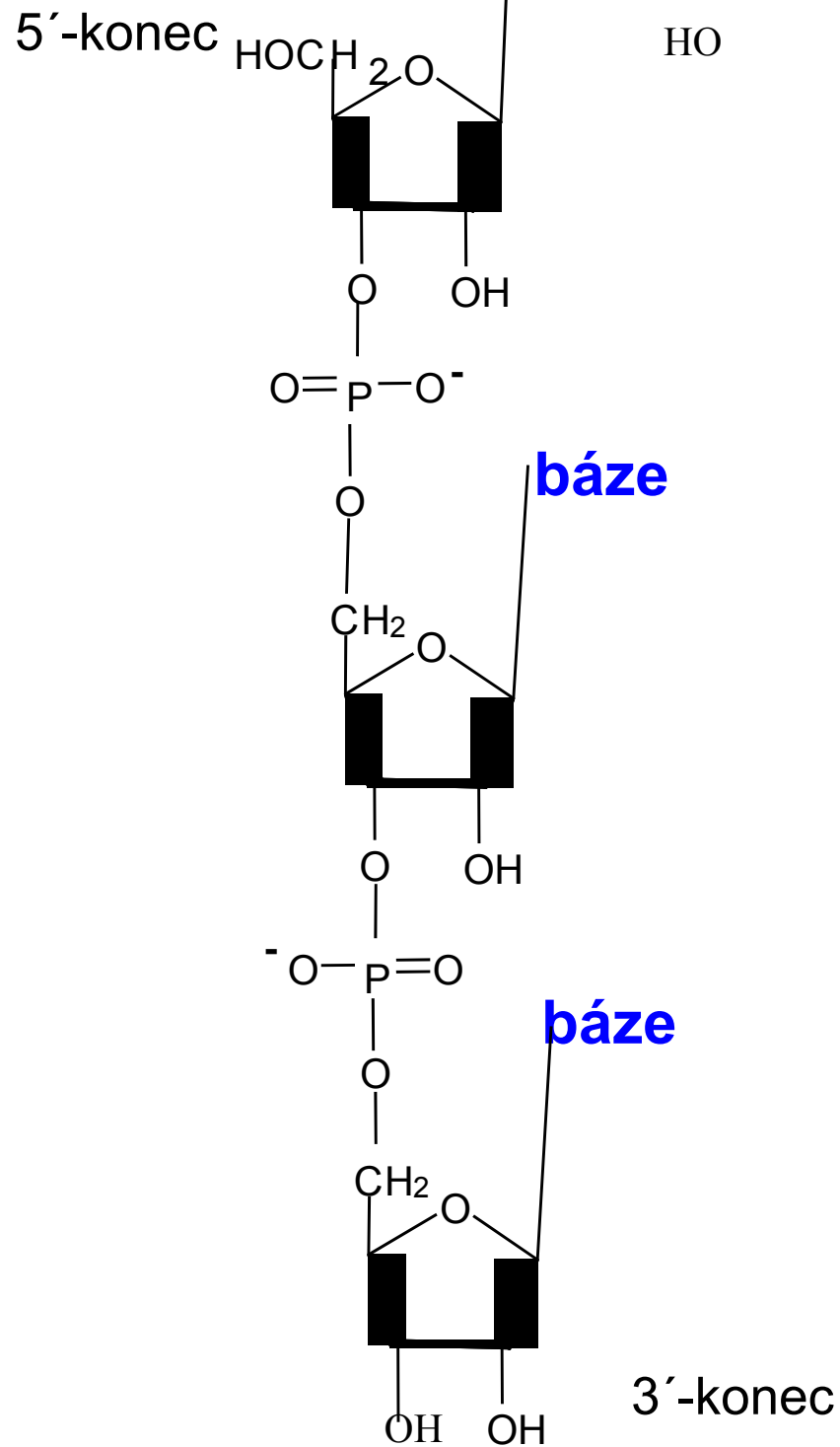
báze



báze

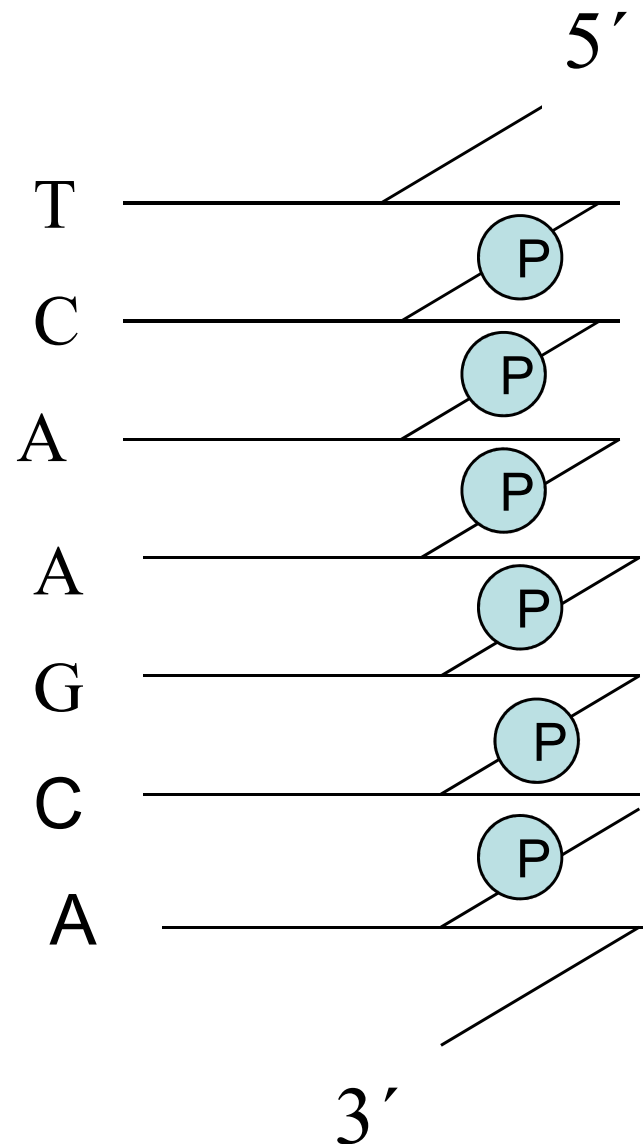


3' -konec



- **Primární struktura:**
pořadí nukleotidových zbytků ve směru 5' → 3'
(v tomto směru probíhá vždy syntéza)

Primární struktura (symbolický zápis)



Zkrácený zápis: 5'-TCAAGCA-3' nebo
TCAAGCA

Typy nukleových kyselin

	DNA	RNA
Pentosa:	deoxyribosa	ribosa
Báze:	A,G,C,T	A,G,C,U

DNA

- DNA je nositelem genetické informace
- trojice bází (triplet) v DNA kóduje jednu aminokyselinu
- úsek DNA nesoucí informaci o syntéze jednoho polypeptidového řetězce - **strukturní gen**
- u eukaryontů je DNA organizována v chromatinu (chromosomech)
- převážná část DNA v jádře, (mitochondrie $\approx 1\%$)

Velikost molekul

Molekuly DNA jsou největší kovalentní molekuly v organismu.

Velikost se udává počtem párů bází (bp)

<u>Organismus</u>	<u>Počet párů bází (bp)</u>
Borrelia burgdorferi (bakterie)	946 000
Escherichia coli (bakterie)	4 639 221
Saccharomyces cerevisiae (kvasinka)	12 070 521
Člověk	3 000 000 000



Bufo bufo 6 900 000 000 bp



Amoeba proteus 290 000 000 000 bp

Velikost genomu však nekoresponduje s počtem genů

Druh	Velikost genomu (bp)	Počet genů
Homo sapiens	3 000 000 000	~25 000
Drosophila melanogaster	120 000 000	13 600
Sacharomyces cerevisiae	12 000 000	6 275
Escherichia coli	4 600 000	4 800
Arabidopsis thaliana	125 000 000	25 000

Struktura DNA

2 April 1953

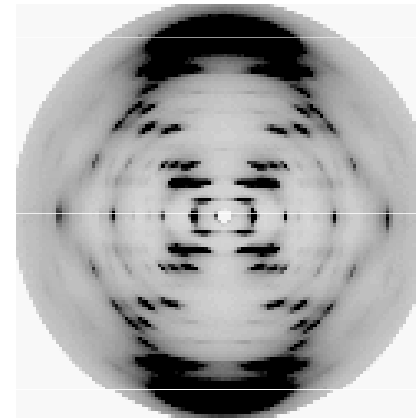
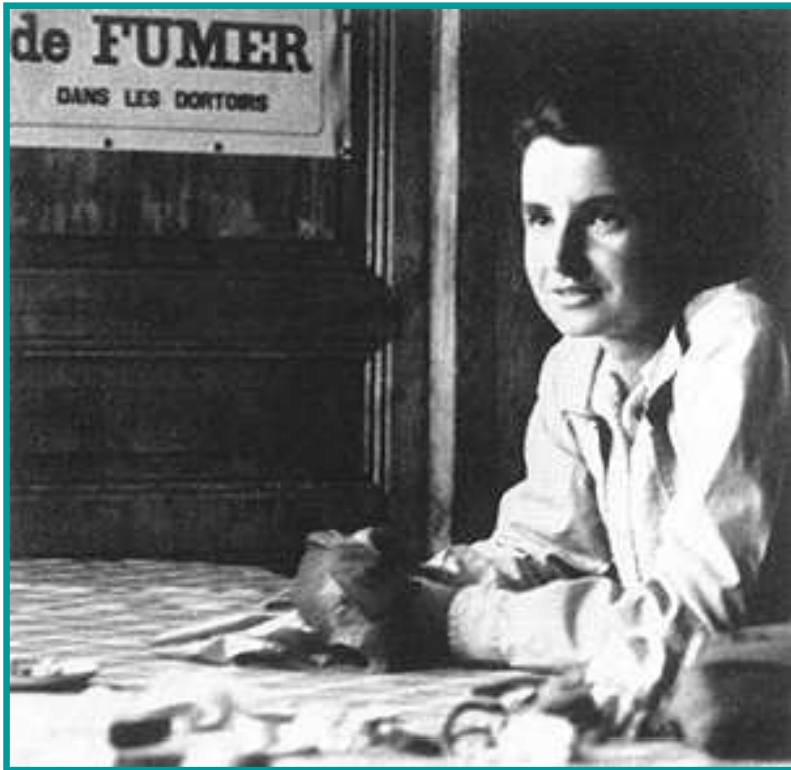
Molecular Structure of Nucleic Acids

J. D. WATSON, F. H. C. CRICK

NATURE, VOL. 171, page 737, 1953



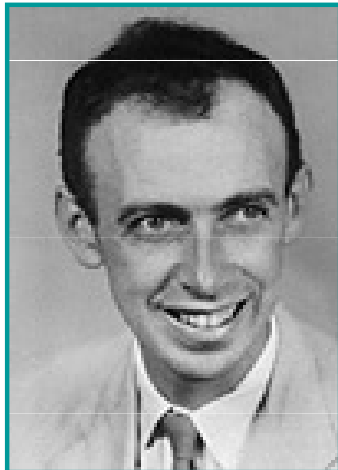
Rosalind E. Franklin 1920–1958



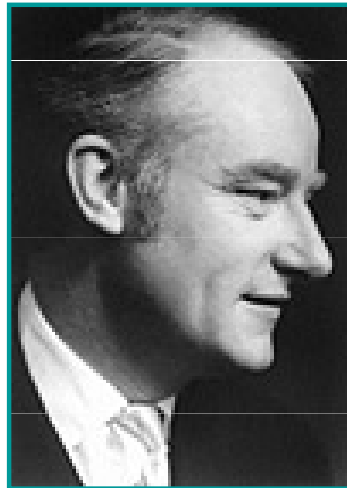
Struktura DNA byla určena pomocí metody rentgenové difrakce. Většina dat byla naměřena Rosalindou Franklinovou. Watson a Crick je interpretovali a zkombinovali s ostatními známými fakty.

1962 Nobel Prize for Medicine

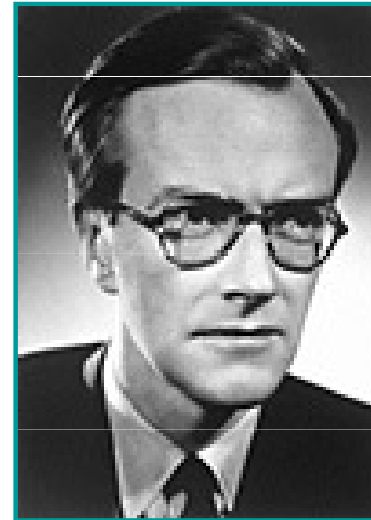
“... for their discoveries concerning the molecular structure of nucleic acids and its significance for information transfer in living material ...”



J.D. Watson
(1928)

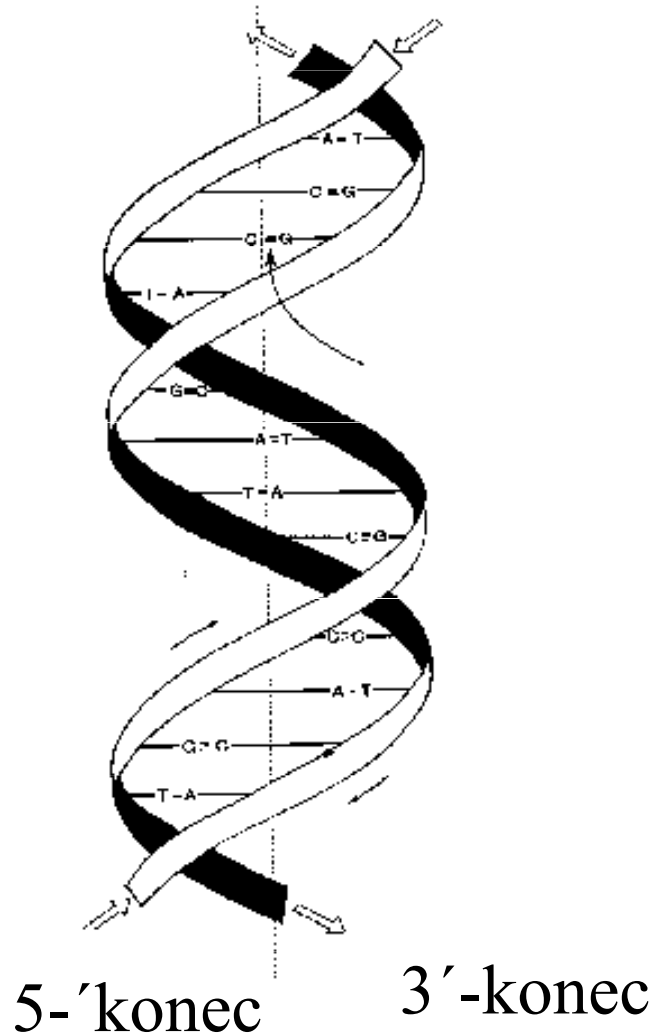


F.H.C. Crick
(1916-2004)



M.H.F. Wilkins
1916-2004)

osa symetrie



Sekundární struktura DNA

nejčastěji dvouvláknová, pravotočivá šroubovice

- řetězce uspořádány kolem společné osy

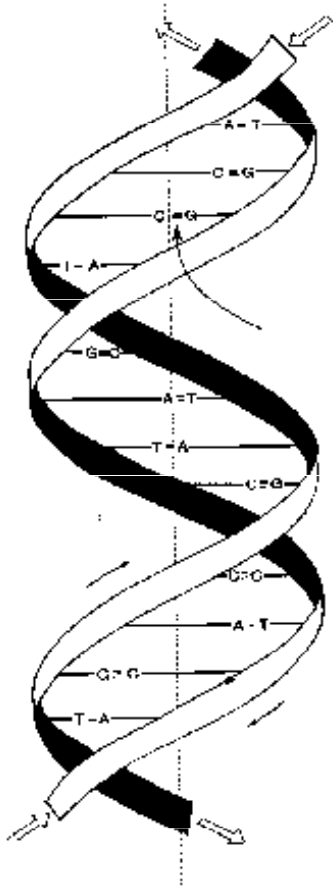
vlákna mají opačnou polaritu

vlákna jsou komplementární

A=T, G = C (Chargaffovo pravidlo)

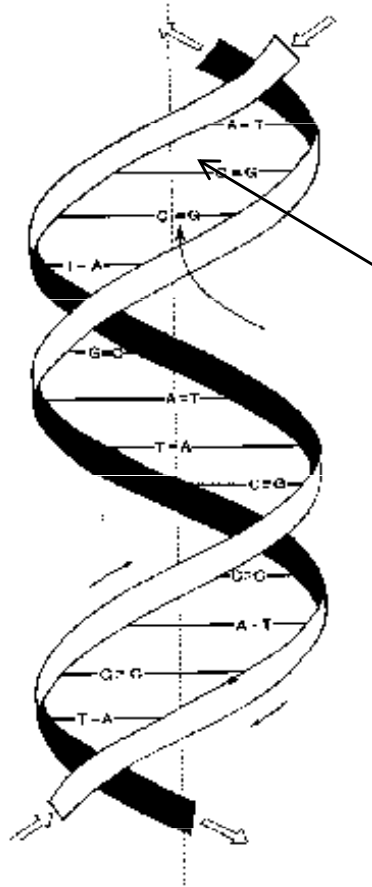
poměr dAMP+dTMP / dGMP+dCMP
charakteristický pro každou DNA

Fosfátové zbytky, ribosa



- tvoří vnější část šroubovice („páteř“)
- hydrofilní charakter
- fosfátové zbytky mají při fyziologickém pH záporný náboj - vážou kationty z roztoku nebo kladně nabitě zbytky proteinů

Báze

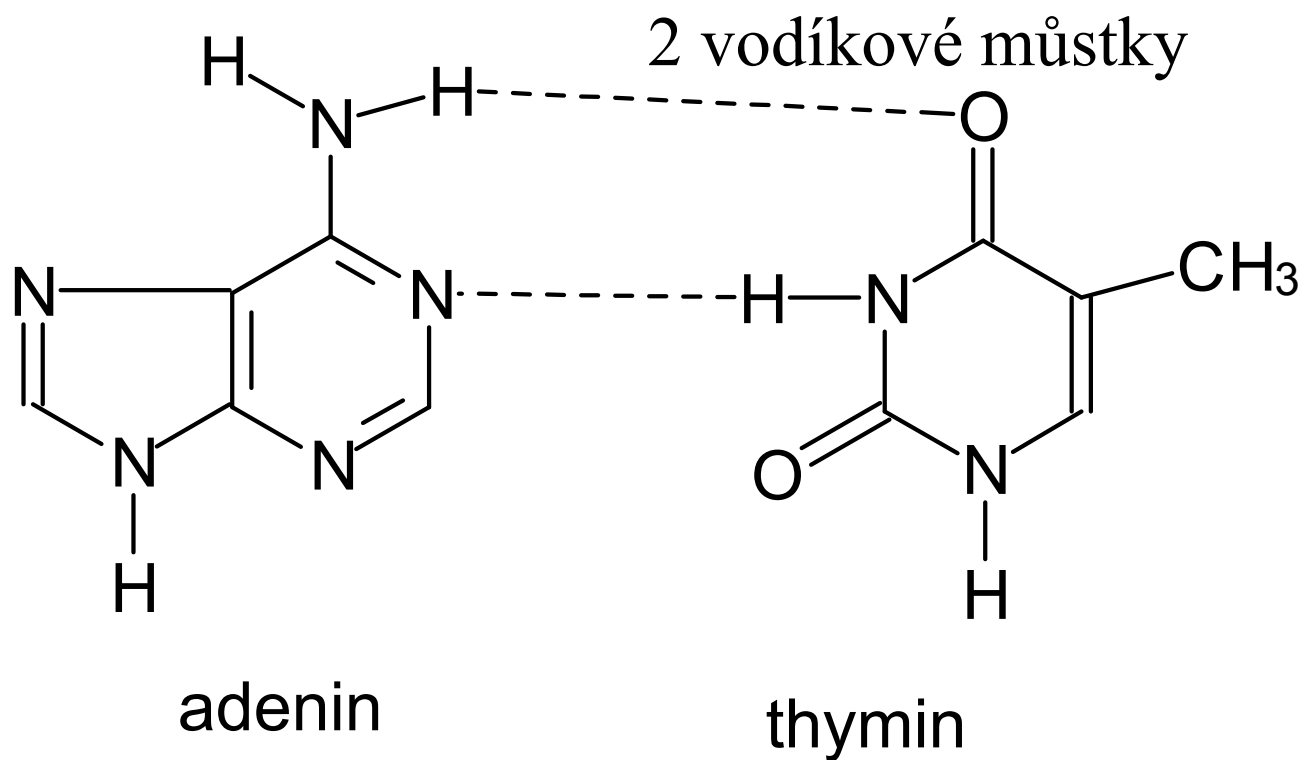


báze

- leží uvnitř dvoušroubovice
- jsou navzájem rovnoběžné (stohování bází)
- komplementární báze se vážou vodíkovými můstky

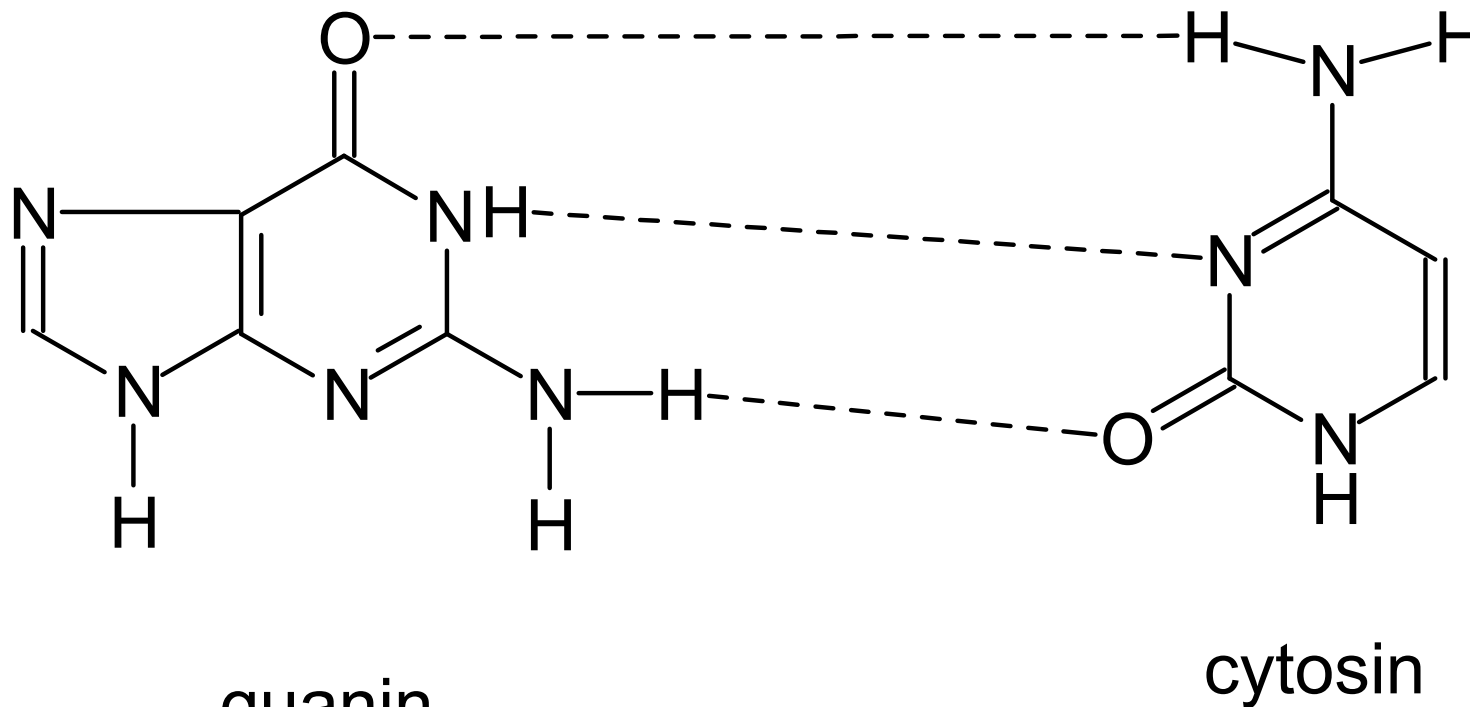
Párování bází - princip komplementarity

A=T



3 vodíkové můstky

G \equiv **C**



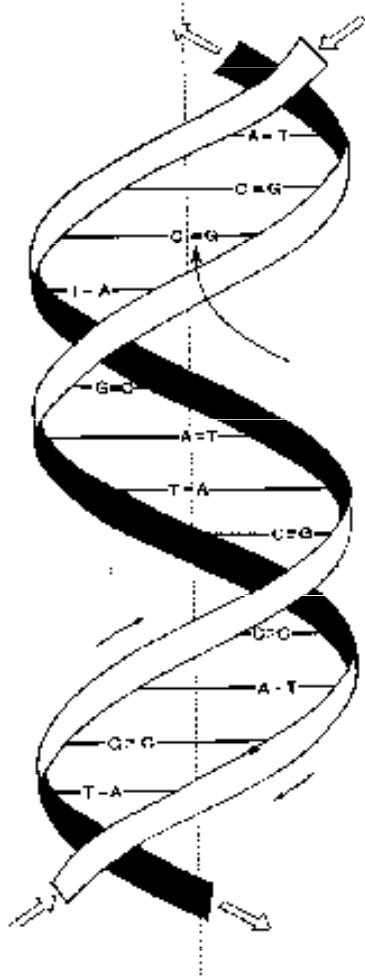
pro párování jsou významné laktamové formy bází

Párování bází je neenzymová, spontánní reakce

Umožňuje párům bází zaujmout energeticky nejvýhodnější konformaci v rámci dvojšroubovice

Vazba $G \equiv C$ je silnější než vazba $A=T$

Nevazebné interakce ve dvoušroubovici



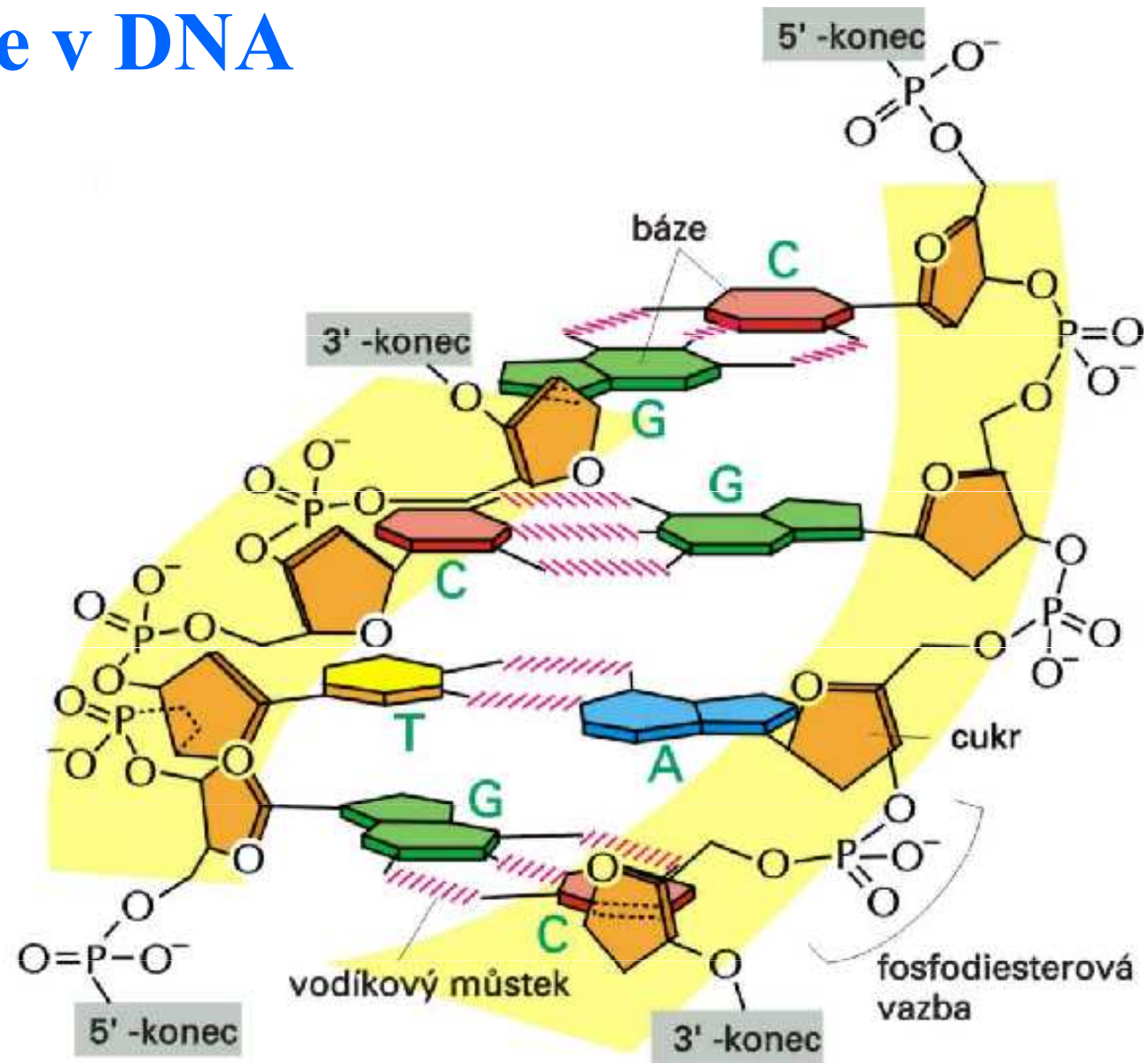
Přitažlivé:

- vodíkové můstky mezi bázemi
- π - π interakce mezi bázemi
- hydrofobní interakce mezi bázemi

Odpudivé

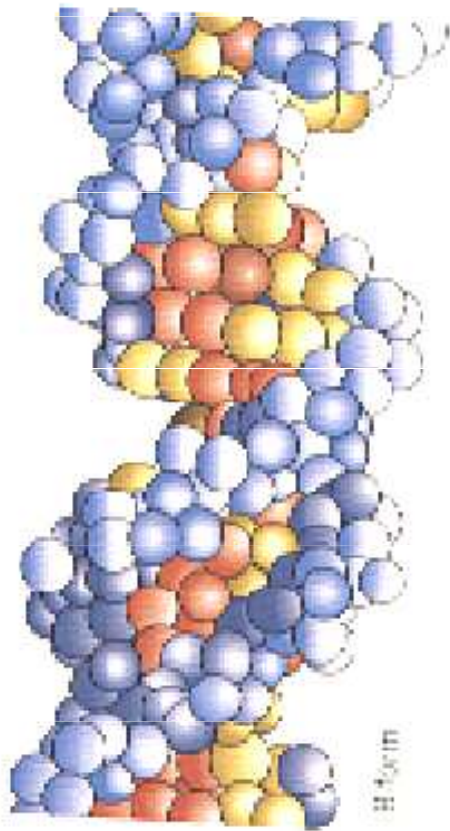
- repulse mezi fosfáty

Interakce v DNA

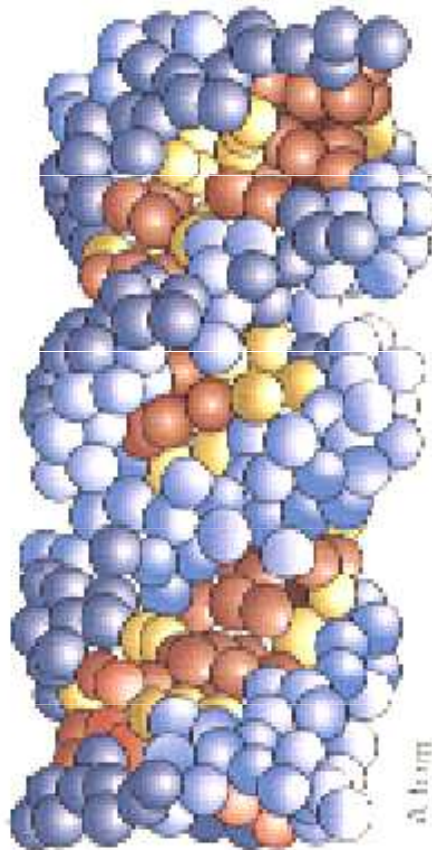


Konformační formy DNA

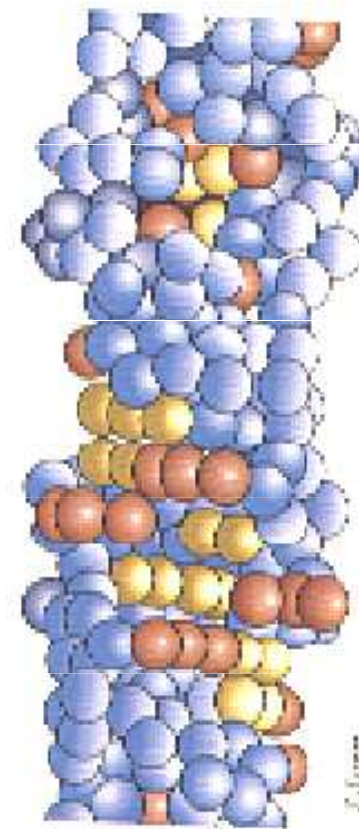
liší se hustotou závitů, mírou hydratace, směrem otáčení šroubovice



B-forma



A-forma



Z-forma

Konformace = prostorové uspořádání biomakromolekuly do struktury, která je za daných podmínek nejvýhodnější

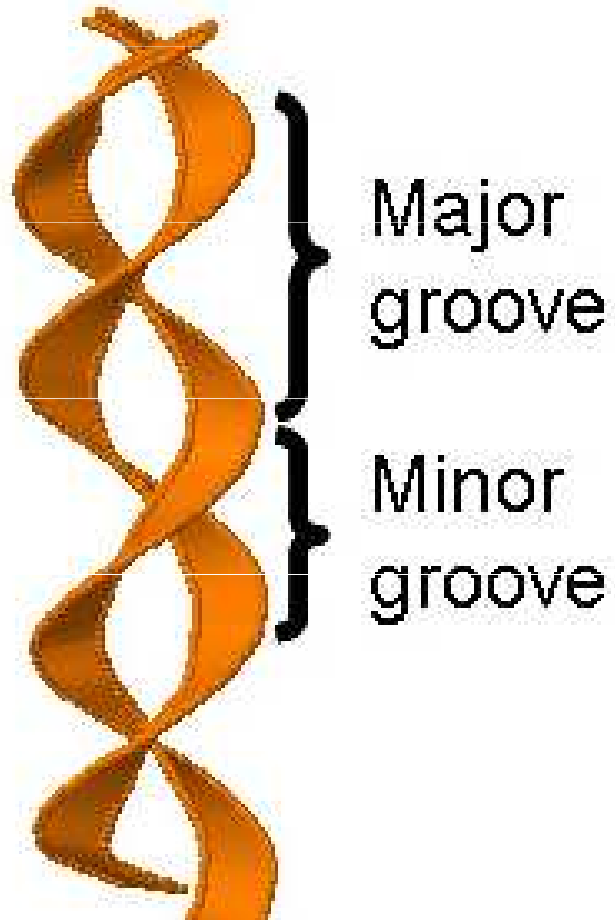
Konformace DNA závisí na

- nukleotidové sekvenci
- obsahu vody v prostředí
- iontové síle prostředí

B-forma (nejběžnější, Watson, Crick)

- v buňkách a v roztoku za běžných podmínek
- pravotočivá šroubovice, 10 bází na 360°.
- „páteř”: **deoxyribosa-fosfát**
- **báze** směřují dovnitř, kolmo na osu šroubovice,
- spojení vodíkovými vazbami
- na povrchu dvě rýhy - žlábků nestejně velikosti
(major, minor groove)

Žlábký (groove) ve struktuře DNA

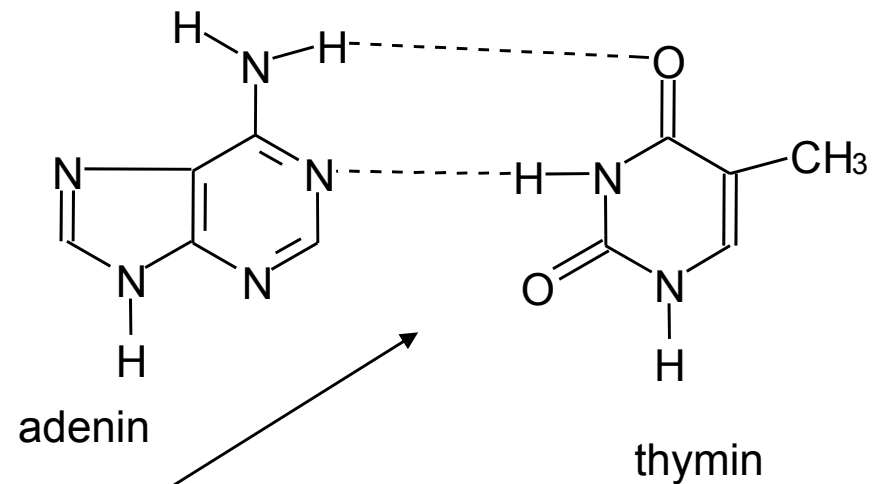
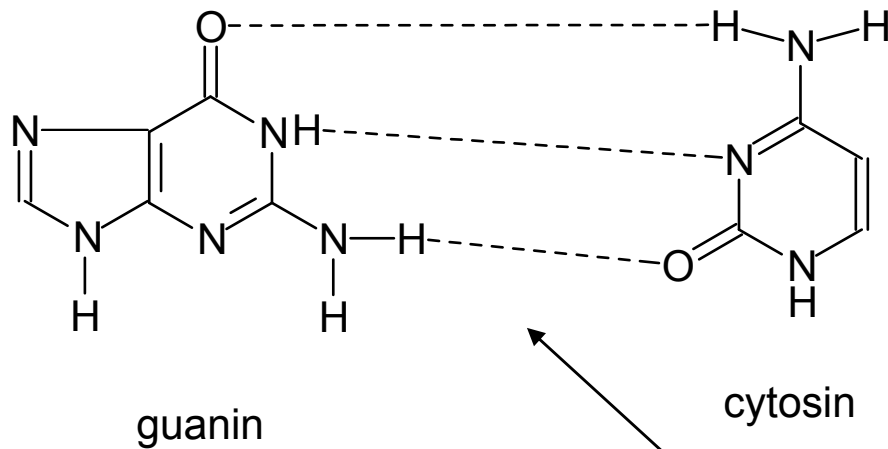


Žlábký – místo vazby regulačních molekul

Major groove

Major groove

Vazba proteinů



Minor groove

Minor groove

Vazba malých molekul

A-forma

- částečnou dehydratací B
- pravotočivá šroubovice, 11 bází na otočku, roviny bází vychýleny o 20°
- vyskytuje se u hybridních DNA-RNA struktur, nebo zdvojených RNA struktur

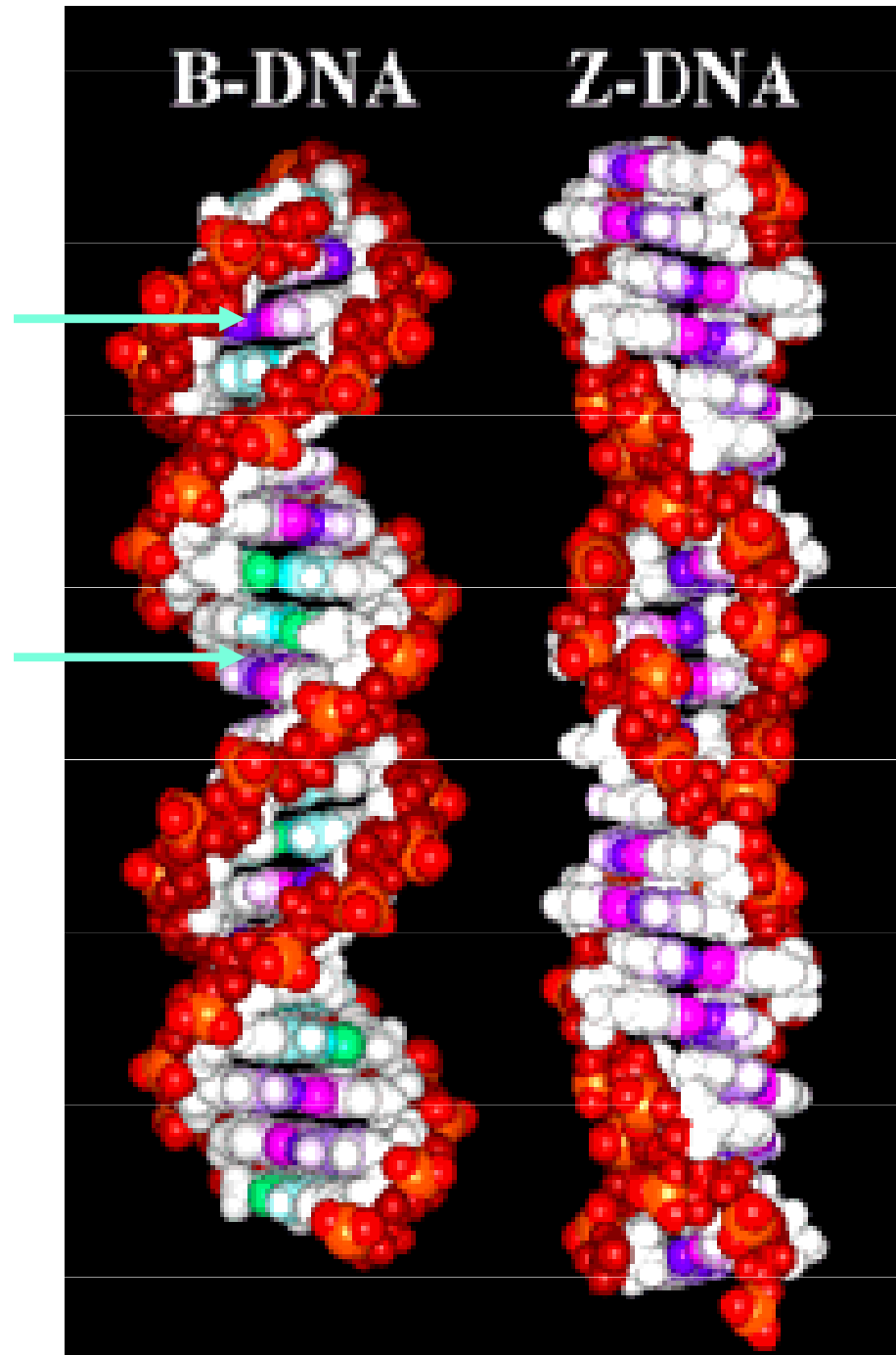
Z-forma

- **levotočivá šroubovice**

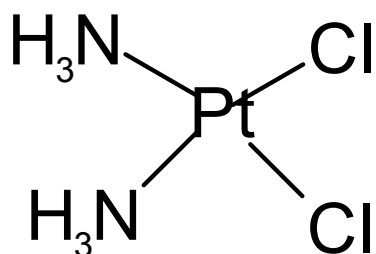
- 12 zbytků na závit,
- „páteř“ zik-zak
- jediný hluboký žlábek
- vznik při vyšší iontové síle nebo methyloci bází (kontrola a regulace genové exprese methylocí)
- vyskytuje se vždy pouze v určitém úseku DNA
- tvorba Z-formy z B formy vede k rozvíjení dvojitého helixu

Minor Groove

Major Groove



Protinádorové léky mohou měnit tvar DNA



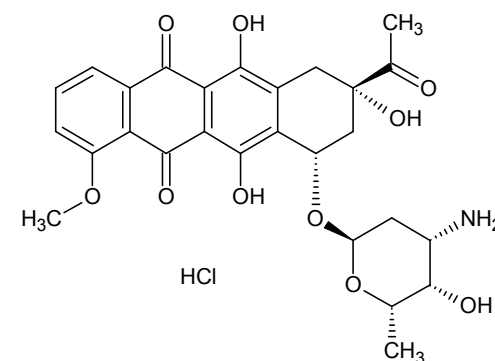
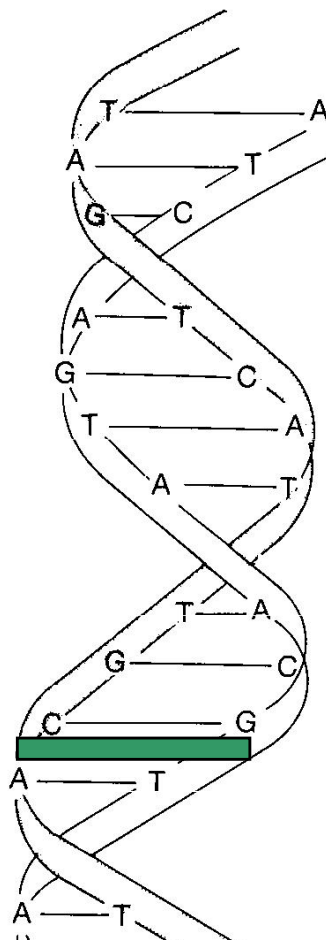
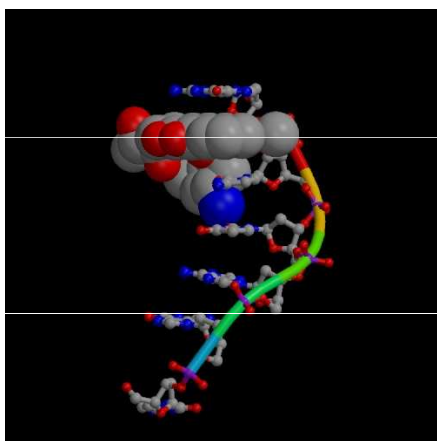
Cis-platina

(cis-diammin-dichloroplatina (II))

Atomy chloru jsou nahrazeny dusíky bází, lék se váže na DNA, mění její prostorovou strukturu

Interkalace

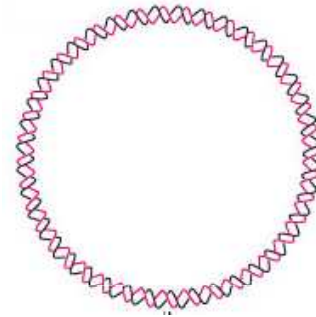
- vmezeření mezi báze DNA



daunorubicin

Interkalace cytostatika (zeleně) do dvojité šroubovice DNA. Struktura DNA je tím narušena a dochází k poruchám při transkripci a replikaci. (např. doxorubicin, daunorubicin – protinádorové léky)

Kružnicová DNA



- viry, plasmidy, prokaryontní chromosomy, chromosomy mitochondrií
- dvoušroubovice a opačná polarita řetězců jsou zachovány, nejsou volné 3' - a 5' - OH skupiny
- často superstáčení
- může být i jednovláknová

DNA je matricí pro

transkripci (přepis)

replikaci

syntéza RNA

syntéza dceřinné molekuly

matricí je templátový *
řetězec

DNA

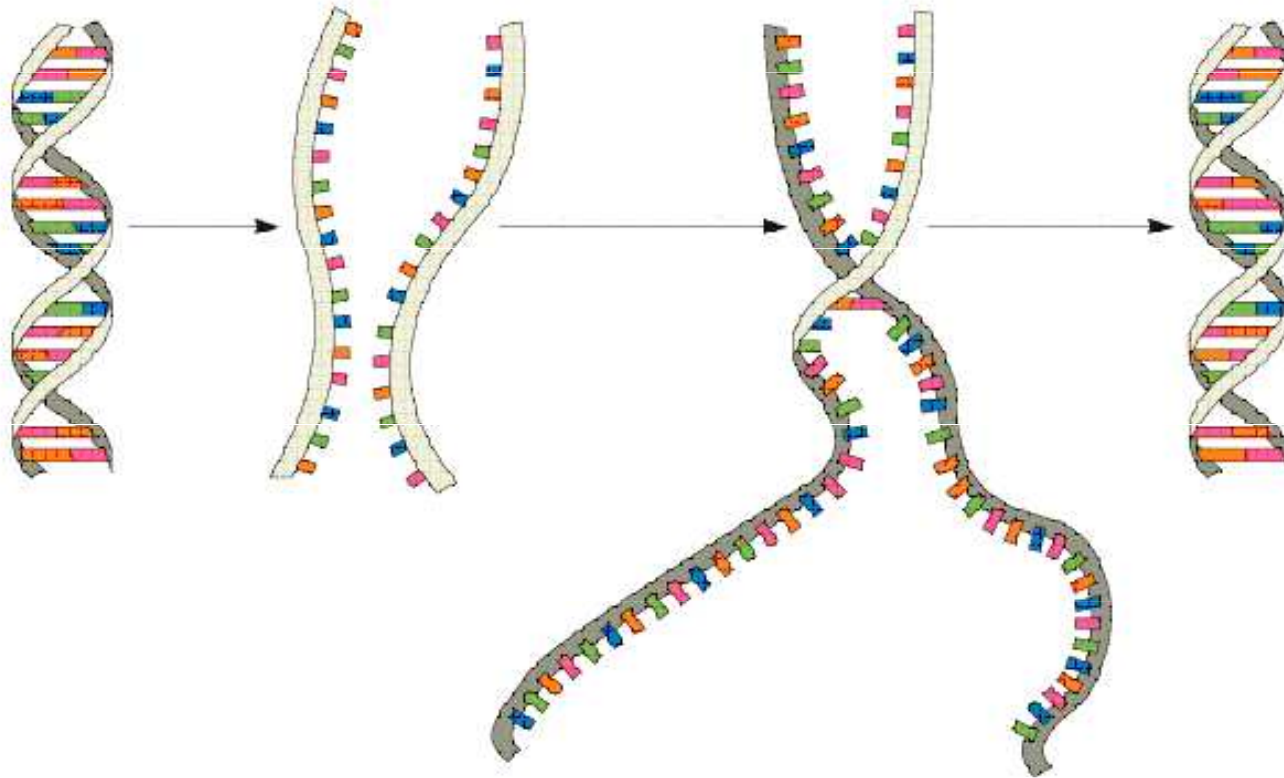
matricí jsou obě vlákna

*Z hlediska transkripce se rozlišuje ve dvojitém helixu DNA řetězec kódující (pozitivní, nepřepisuje se) a templátový (negativní – přepisuje se)

Denaturace a renaturace DNA

- Dvouvláknová DNA je nativní formou DNA
- Přeměna na jednovláknovou formu - **denaturace**
- Denaturace probíhá jen in vitro
- Zpětná přeměna jednovláknové DNA do dvoušroubovice - **renaturace**

Denaturace a renaturace DNA



Vlivy vyvolávající denaturaci (tání)

- vysoká teplota („tání“ vodíkových vazeb)
- nízká koncentrace solí (větší odpuzování fosfátových zbytků)
- změna pH („tání“ vodíkových můstků)
- dvouvláknová DNA s vyšším obsahem G≡C má vyšší odolnost vůči denaturaci

Teplota tání T_m – teplota při níž 50 % DNA je odděleno

Sledování denaturace DNA

- konjugované páry v bázích DNA vyvolávají absorpenci roztoku při 260 nm
- absorbance jednovláknové DNA je vyšší než dvouvláknové (hyperchromní posun)



- denaturace DNA může být sledována na základě měření absorbance při 260 nm

Renaturace

- při pomalém odstranění příčin denaturace dojde k obnovení vodíkových můstků mezi bázemi, obnoví se struktura dvoušroubovice (anelace)

Hybridizace – spojení částečně nebo úplně komplementárních řetězců z různých molekul DNA nebo RNA

In vitro metody hybridizace DNA - diagnostika genetických chorob

PCR metody (polymerase chain reaction)

- selektivní amplifikace malých úseků DNA
- využívají oligonukleotidové primery a speciální tepelně odolnou DNA polymerázu (Taq polymeráza), která byla izolována z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*
- opakování tří dějů - denaturace, hybridizace (anelace), polymerace
- probíhá v termocyklerech

Velikost DNA x velikost buňky

Eukaryotická buňka = 20 μm průměr

jádro = 5 – 10 μm

Lidská haploidní b. = 23 chromosomů = 3×10^9 párů bází

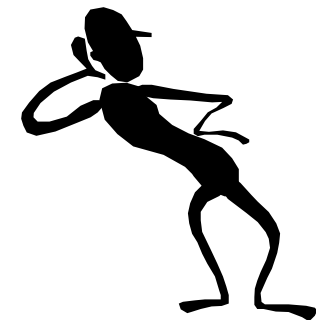
1.3×10^8 párů bází/ chromosom

1 pár bází v B formě - 0.34 nm \rightarrow 1 chromosom = 5 cm

23 chromosomů = 115 cm

Diploidní b. = 46 chromosomů = 2 m délka !!!

??? Jak se DNA může směstnat do jádra ? 10^{-5} m



Vyšší struktury DNA

Eukaryontní buňka:

- chromatin - komplex DNA (40 %) a proteinů (60 %)
- základní jednotkou chromatinu je nukleosom

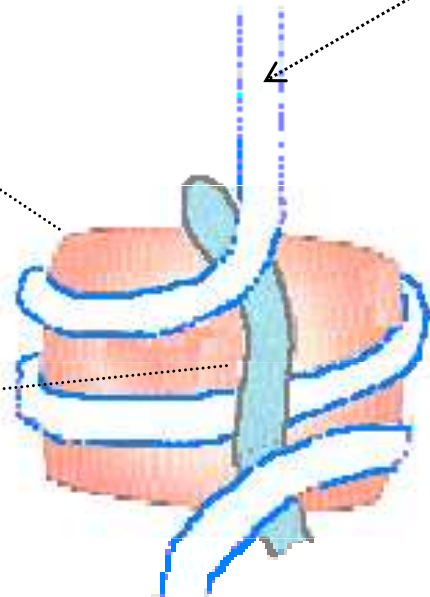
Nukleosomy

Stočení dvou závitů dihelixu DNA (≈ 140 bází) kolem oktameru histonu
zkrácení molekuly DNA na $1/3$

oktamer
histonů

H2A, H2B, H3 a
H4

histon
H1



spojovací úsek DNA (≈ 60 bází -
„volná DNA“ - linker DNA)

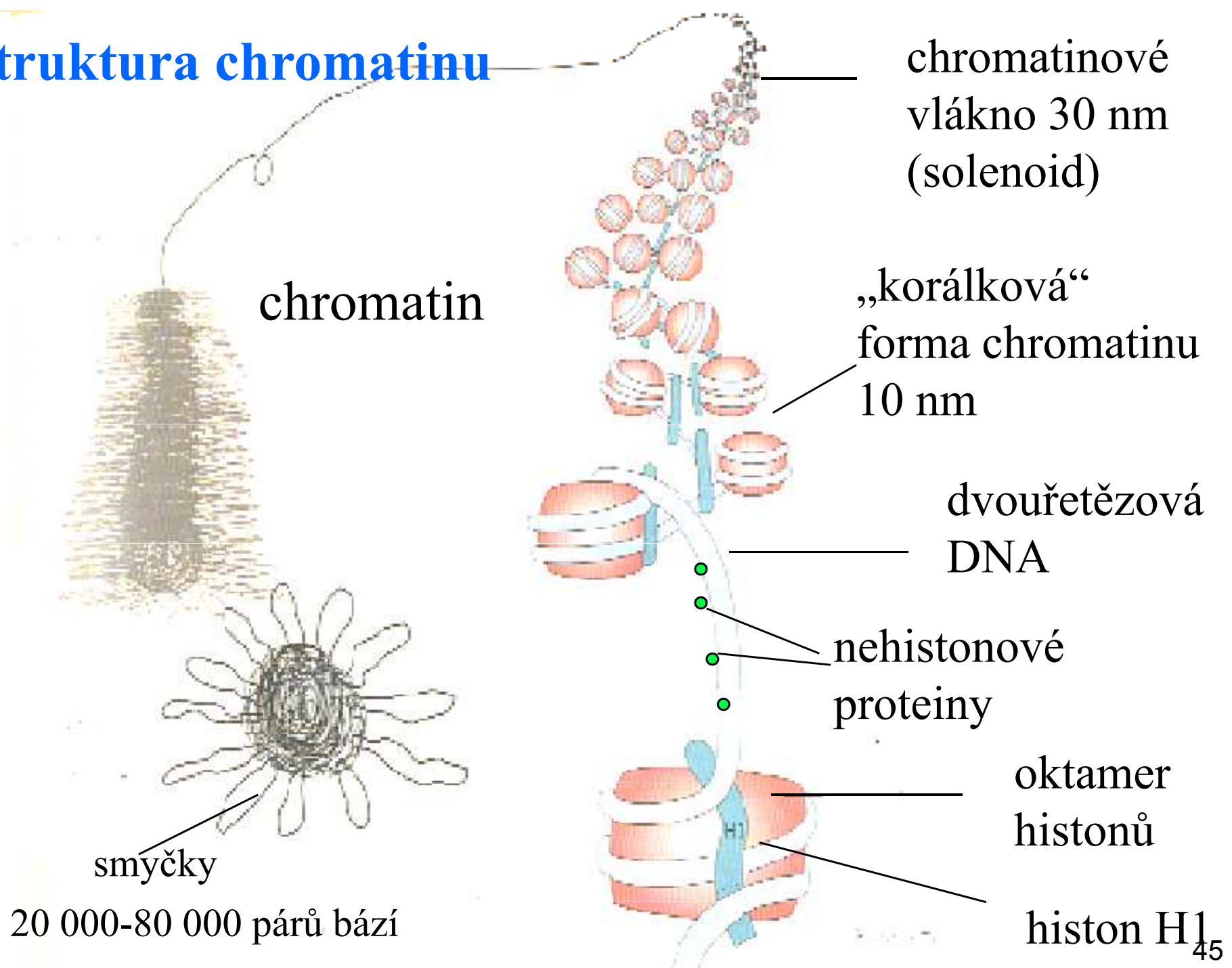
Histony:

bazické bílkoviny, vysoce
konzervovaná struktura

≈ 100 AK, 25% Lys a Arg

Typy: H1, H2A, H2B, H3 a H4

Struktura chromatinu



chromatinové vlákno 30 nm (solenoid)

chromatin

„koráلكová“ forma chromatinu 10 nm

dvouřetězová DNA

nehistonové proteiny

oktamer histonů

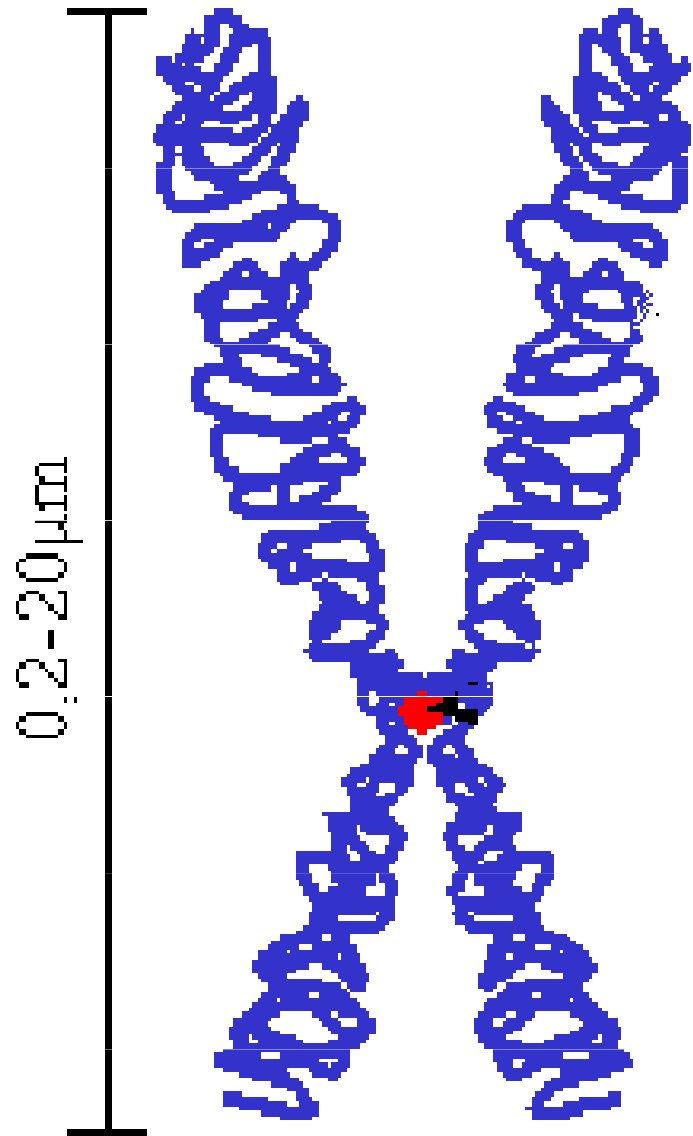
histon H1₄₅

smyčky

20 000-80 000 párů bází

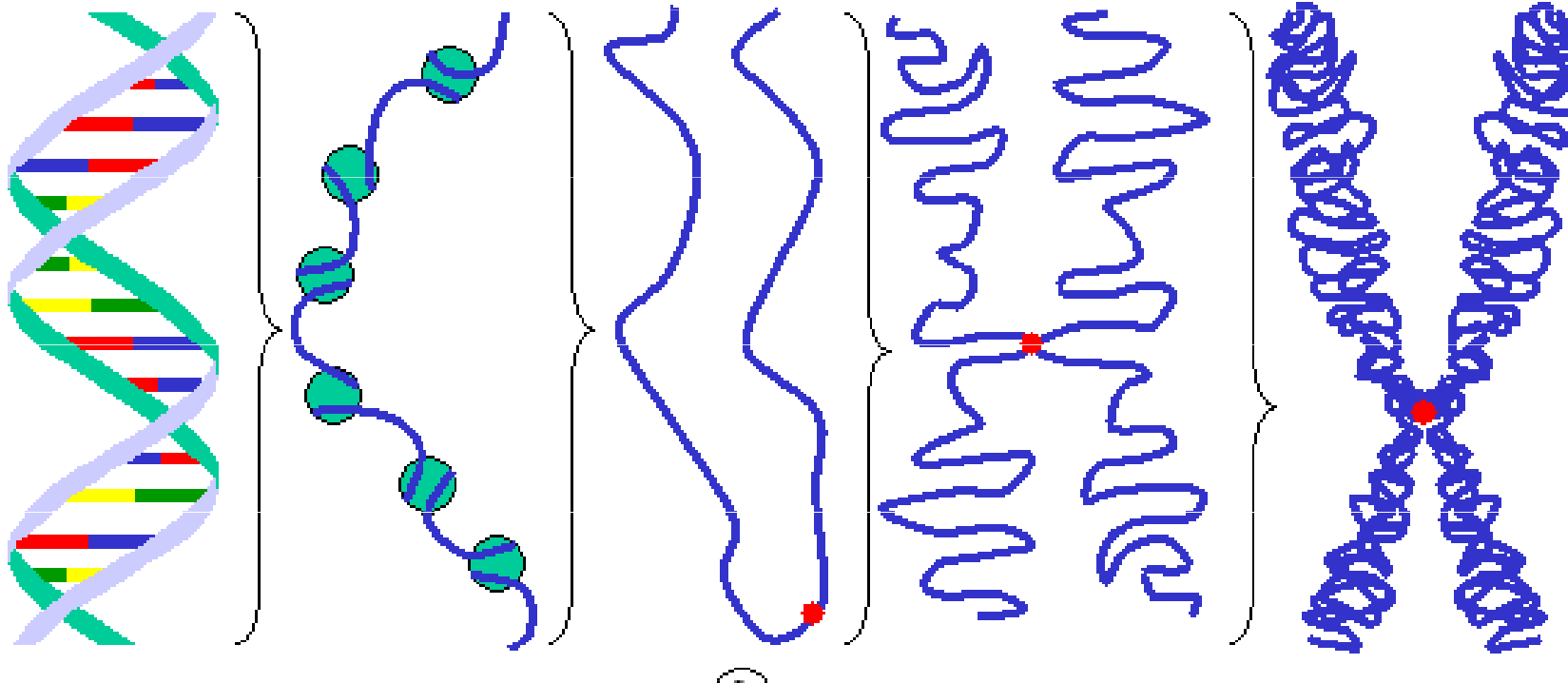
Úrovně kondenzace chromatinu

- dvoušroubovice DNA obtočená kolem nukleosomu - „korálková“ forma
- zkondenzované nukleosomy - vlákno 30 nm
- kondenzace vláken do smyček (tyčinky 700 nm)
 - Smyčky (20 000-80 000 párů bází) jsou v jádře zakotveny k podpůrné matrix (nebazické proteiny)



Kondenzace
chromozomů v metafázi

Úrovně struktury eukaryontní DNA - souhrně



Dvoušroubovice
DNA

Vlákno

10 nm

Vlákno

30 nm

Smyčky
chromatinu

300 nm

Chromozomy
v metafázi

Míra kondenzace DNA

Metafáze – maximální kondenzace chromozomů, funkčně inertní DNA

Interfáze* – funkční, méně kondenzovaná forma DNA
transkripčně aktivní euchromatin rozvolněn
heterochromatin zůstává kondenzován

*Interfáze – období existence buňky mezi dvěma mitózami (G1, S a G2 fáze)

Struktura chromatinu je regulována kovalentními modifikacemi histonů a DNA

- Acetylace lysinových řetězců v histonech – destabilizuje strukturu chromatinu a podporuje transkripci
- Methylace některých lysinových řetězců v histonech - podporuje kondenzaci chromatinu
- Methylace argininových a některých lysinových řetězců – destabilizuje strukturu chromatinu
- Fosforylace serinových řetězců v histonech - ? Je charakteristická pro mitosu a meiosu
- Methylace cytosinu v DNA podporuje kondenzaci

Eukaryontní jaderná DNA

DNA kódující proteiny (~3%)

Negenová DNA

introny

regulační sekvence

DNA kódující t- a r-RNA, histony

opakující se (repetitivní) DNA

*pseudogeny

*Pseudogeny – geny, které zmutovaly natolik, že nemohou být přepisovány, > 20 tisíc v genomu

Lidský genom

$\approx 3 \cdot 10^9$ párů bází (23 chromosomů)

průměrný gen – 3 tisíce nukleotidů

$\approx 20\text{-}25\ 000$ genů

Rozmístění genů v genomu není rovnoměrné

(chromosom 1 ~ 3000 genů, chromosom Y ~ 230 genů)

Nejdelší známý gen (dystrophin) je 2,4 milióny nukleotidů

$\approx 97\%$ lidské DNA je negenová DNA

Introny a exony v lidské DNA

Exony – úseky DNA kódující protein

Introny – nekódující úseky DNA mezi exony, které jsou přepsány do mRNA a po té vystřiženy (junk DNA)

V lidském genomu se nachází v průměru 8,8 exonů a 7,8 intronů na 1 gen (variabilní pro různé geny, 1-178 exonů)

Průměrná délka exonu 145 bp, introny podstatně delší

Tandemově zmnožené geny

Vícečetné kopie genů – zejména pro rRNA (~200 kopií), 5S DNA (~2000 kopií), histonové geny (20 kopií)

Jsou uskupeny v tandemech, přerušeny nekodujícími sekvencemi)

Genové rodiny

Skupina dvou nebo více genů, podobných, ale ne identických, ležících obvykle blízko na chromosomu

Evolučně pocházejí z jediného genu

Typicky kódují strukturně a funkčně podobné proteiny

Např. rodina genů pro globiny

Rodina na chromosomu 16 obsahuje geny kódující různé verze α -globinu.

Rodina na chromosomu 11 obsahuje geny kódující různé verze β -globinu.

Různé verze globinových genů jsou přepisovány v různých fázích embryonálního a fetálního vývoje.

Repetitivní DNA

Opakující se sekvence 2 – několik tisíc párů bází

Hlavně u eukaryontů

V závislosti na druhu 3-80% DNA, lidský genom 25-35%

Uspořádány buď za sebou (tandemové = satelitní repetice)

nebo rozptýleny (roztroušené, rozptýlené - interdispersed)

Podrobněji viz též předměty Biologie, Genetika, Pat.Fyziologie

Repetitivní DNA

Středně repetitivní sekvence (rozptýlené)

Cca 10^6 kopií v haploidním genomu

Neleží v klusterech, jsou rozptýleny

Mohou být přepisovány

Vysoce repetitivní sekvence (tandemové)

5-500 bp

Leží v klusterech

Přítomny v 1-10 milionech kopií haploidního genomu

Transkripčně neaktivní, přítomny v centromerách a telomerech, mají strukturní roli

Rozptýlené repetice - transposony

Vznikají procesem transpozice – „přeskočení“ segmentu DNA na jiné místo v genomu.

- Transpozon = sekvence DNA, která se může přesunout z jednoho umístění na genomu do jiného

- DNA transpozony

princip „cut and paste“, enzym transpozáza vyštěpí transpozon, liguje volné konce DNA, uvolněný komplex transpozon-transpozáza se váže jinde v genomu (gen pro transpozázu leží v centru transpozonu)

- Retrotranspozony

(45 % lidského genomu) princip „copy and paste“ – pro skákání vyžadují buněčné RNA polymerázy (II nebo III). RNA kopie je reverzní transkriptázou přepsána do DNA, která je vložena v genomu na nové místo. Např: SINE (short interspersed nuclear elements), LINE (long interspersed nuclear elements)

Rodina Alu sekvencí

Nejznámější typ SINEs

Nachází se v genomu většiny primátů

Nejrozšířenější mobilní element v lidském genomu

≈300 bp

až 500 000 kopií /genom

Krátké úseky DNA získané štěpením Alu-restrikční endonukleázou (z *Arthrobacter luteus*)

≈10% celkové lidské DNA

Funkce transpozonů ?

Zatím nezjištěna – junk DNA

Mobilita retrotranspozonů může mít význam pro plasticitu genomu, mohou též ovlivnit genovou expresi.

Inzerce transpozonu do blízkosti nebo uvnitř genu může vyvolat mutaci

Objeveno několik genů přímo odvozených z retrotranspozonů.

????

Tandemové repetice (satelity)

Satelity: repetice až stovek bp, periodicky se opakují
nachází se v oblasti centromer a heterochromatinu
100 000-1000000 opakování

Minisatelity: kratší repetice, 100-100000 opakování
nachází se v okolí telomer

Mikrosatelity: 1-5 bp, opakované cca 50-100x

(často jako AC repetice vyskytující se 50 000-100 000 lokacích v genomu)

Mechanismus expanze tendemových repetit

- Nerovnoměrný crossing-over
- Chyby při syntéze DNA (klouzáni DNA polymerázy)

Podrobněji viz Biologie, Biochemie.

Choroby spojené s expanzí mikrosatelitů

Expandované tripletové repetice se nachází uvnitř genu nebo v jeho blízkosti

Choroba vzniká v důsledku nesprávného počtu repetic

Např. Huntingtonova choroba (neurologické onemocnění, demence s poruchou motoriky)

V genu na 4. lidském chromozómu kódována bílkovina huntingtin

V genu pro huntingtin je repetitivní sekvence (CAG)_n, která kóduje úsek bílkoviny tvořený zbytky glutaminu (polyglutaminový úsek, polyglutamine tract). Za normálních okolností se v bílkovině nachází méně než 20 glutaminů.

Při expanzi tripletů CAG se počet glutaminů zvýší nad 30 a vlastnosti huntingtinu se podstatně změní.

Fridrichsova ataxie, myotonická dystrofie ad. choroby

DNA u prokaryontů

DNA je v cytoplazmě.

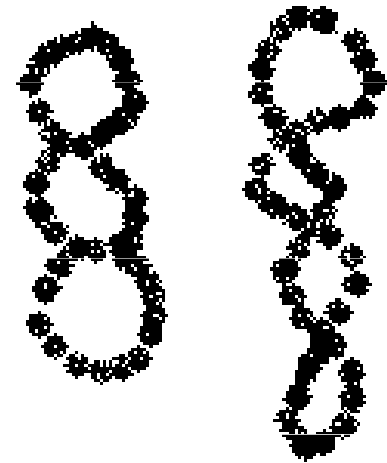
Jediný chromozom, nejsou histony

Dvouvláknová DNA je kruhová

Dochází k superstáčení DNA

– interakce s HU a H-NS proteiny, polyaminy, RNA a proteiny → nukleoid

Plasmidy – malé cirkulární chromosomy v bakteriích, kódují určitou vlastnost (není pro danou buňku zcela nezbytná) – např. rezistenci na antibiotika. Jsou replikovány separátně od chromozomální DNA.



Mitochondriální DNA (mtDNA)

- Malá cirkulární dvouřetězcová DNA. Cca 1% celkové DNA
- 16569 bp (člověk)
- Typicky 1000-10000 kopií v jedné buňce (2-10 v jedné mitochondrii)
- Koduje část mitochondriálních proteinů a RNA (ribosomální a transferová RNA, 13 proteinů dýchacího řetězce)
- Kromě regulační oblasti D-loop žádné nekódující sekvence
- Genetický kód se mírně liší

UGA – Trp

AGA, AGG – stop kodony

Ribonukleové kyseliny

Ribosomální

Transferové

Mediátorové

**Malé jaderné RNA (snRNAs
- součást snRNPs*)**

Malé stabilní RNA

primery pro DNA replikaci
apod.

(* snurps – small nuclear
ribonucleoproteins),

Složení RNA

- cukerná složka : ribosa
- báze: A,G,C,U

není obsažen thymín

častý výskyt modifikovaných bází

Příklady modifikovaných nukleosidů

1-methyladenosin

2-methyladenosin

7-methylguanosen

inosin

1-methylinosin

N⁶-(Δ^2 isopentenyl)adenosin

5-methylcytidin

3-methyluridin

2'-O-methyluridin

2'-O-methylcytidin

4-thiouridin

pseudouridin

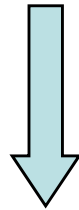
5,6-dihydrouridin

Primární struktura RNA

- sekvence nukleotidů je komplementární k templátovému řetězci DNA, ze kterého byla přepsána
- sekvence nukleotidů je po záměně U za T shodná se sekvencí kodujícího řetězce DNA

Stabilita DNA X RNA

Přítomnost OH v pozici 2' ribosy zvyšuje reaktivitu molekuly



DNA chemicky je stabilnější než RNA (např. zředěný NaOH rozkládá RNA, DNA zůstává stabilní)

význam pro uchování genetické informace v DNA

Sekundární struktura RNA

- molekuly jsou kratší
- zpravidla jednovláknové
poměr A/U \neq G/C
- výskyt dihelikálních struktur (stopky a smyčky)
- párování: A-U, C-G (U-G)- neperfektní párování

Syntéza RNA

- vznik transkripce DNA
- vznikají primární transkripty – prekursorové RNA
- úprava primárních transkriptů sestřihem a dalšími modifikacemi

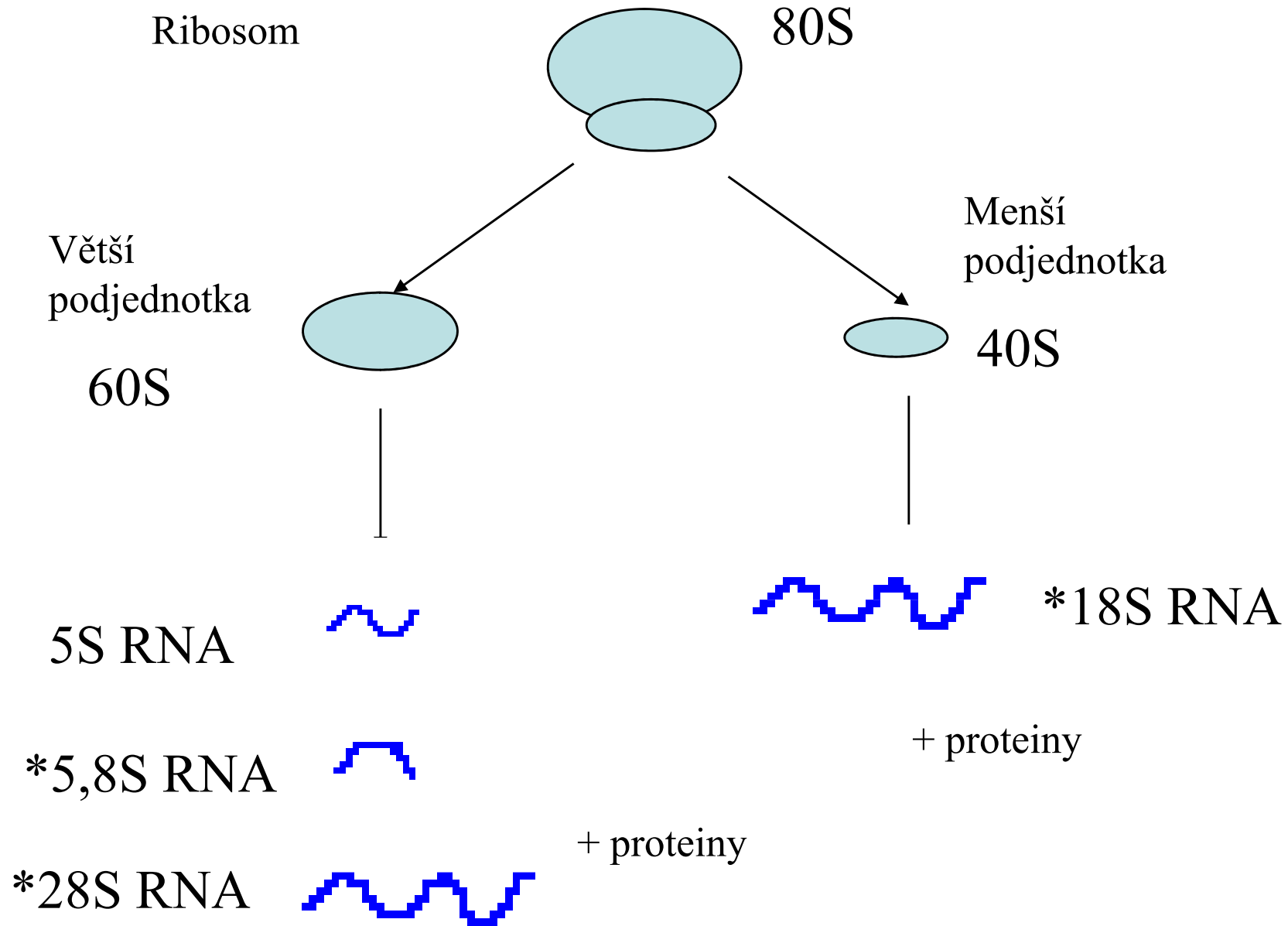
Ribosomová RNA

- součást ribosomů (komplexy proteinů a RNA)
- až 80 % celkové RNA
- 100-5000 nukleotidů, až 50 % helikální struktury
- typy ribosomů u eukaryontů a prokaryontů jsou rozdílné (k charakterizaci odlišností se používá hodnota sedimentačního koeficientu v jednotkách S)

Sedimentační koeficient s – míra rychlosti sedimentace makromolekul v centrifugačním poli s intenzitou $10^{-5}N$. Hodnota závisí na tvaru a velikosti molekuly.

S – Svedbergova jednotka = 10^{-13} s

Cytoplazmatická rRNA u eukaryontů



* Pochází z 45S RNA z jadérka

Transferové RNA

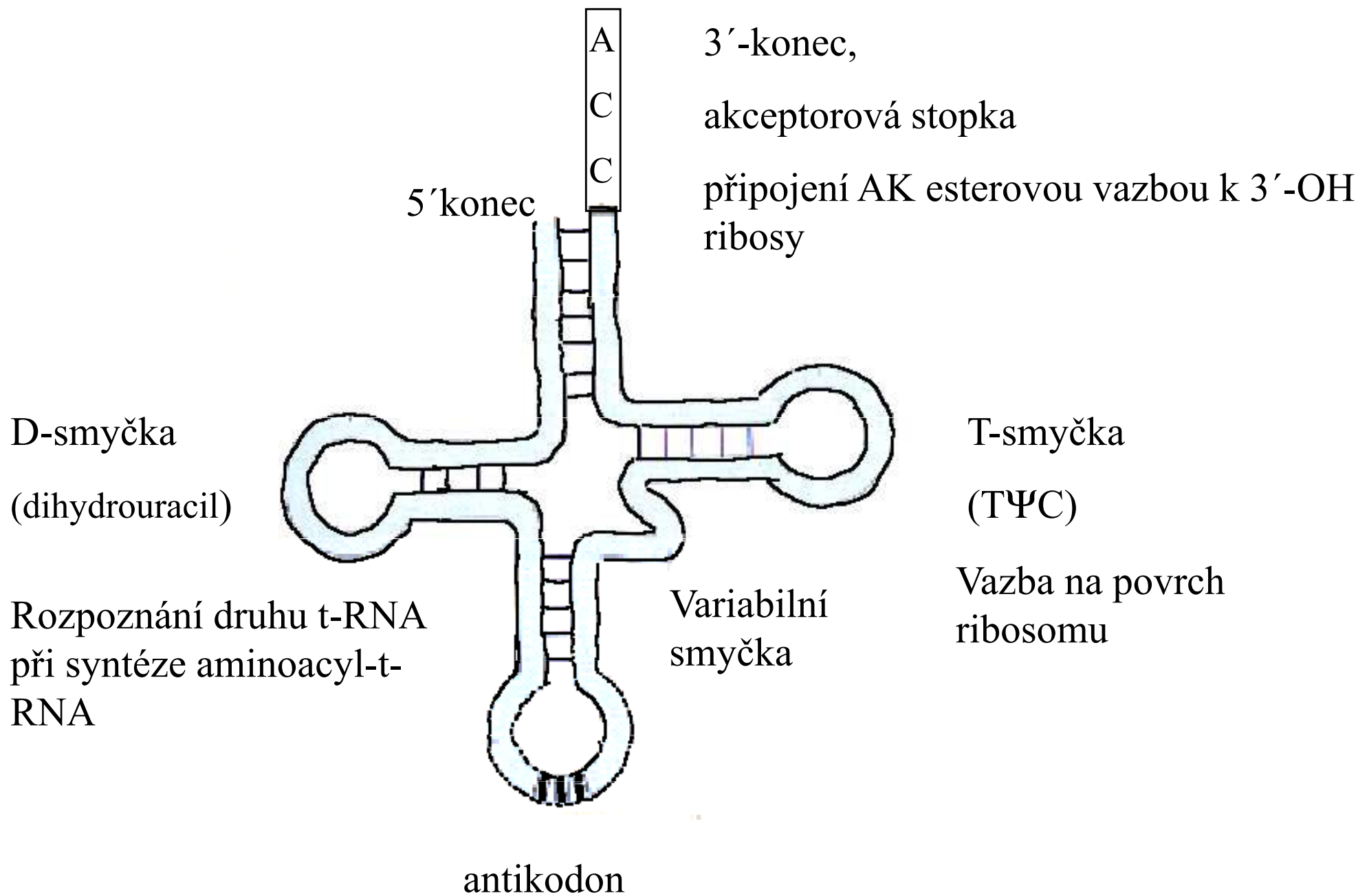
- cytoplazma, ribosomy (mitochondrie)
- 10-15 % celkové RNA
- ≈ 80 nukleotidů (7-15 % minoritní báze),
- vznik z prekurzorových molekul, úpravy nukleasami
- sedimentační konstanta $\approx 4S$
- transportují aminokyseliny na ribosomy
- každá buňka má nejméně 20 různých tRNA

Sekundární a terciární struktura tRNA

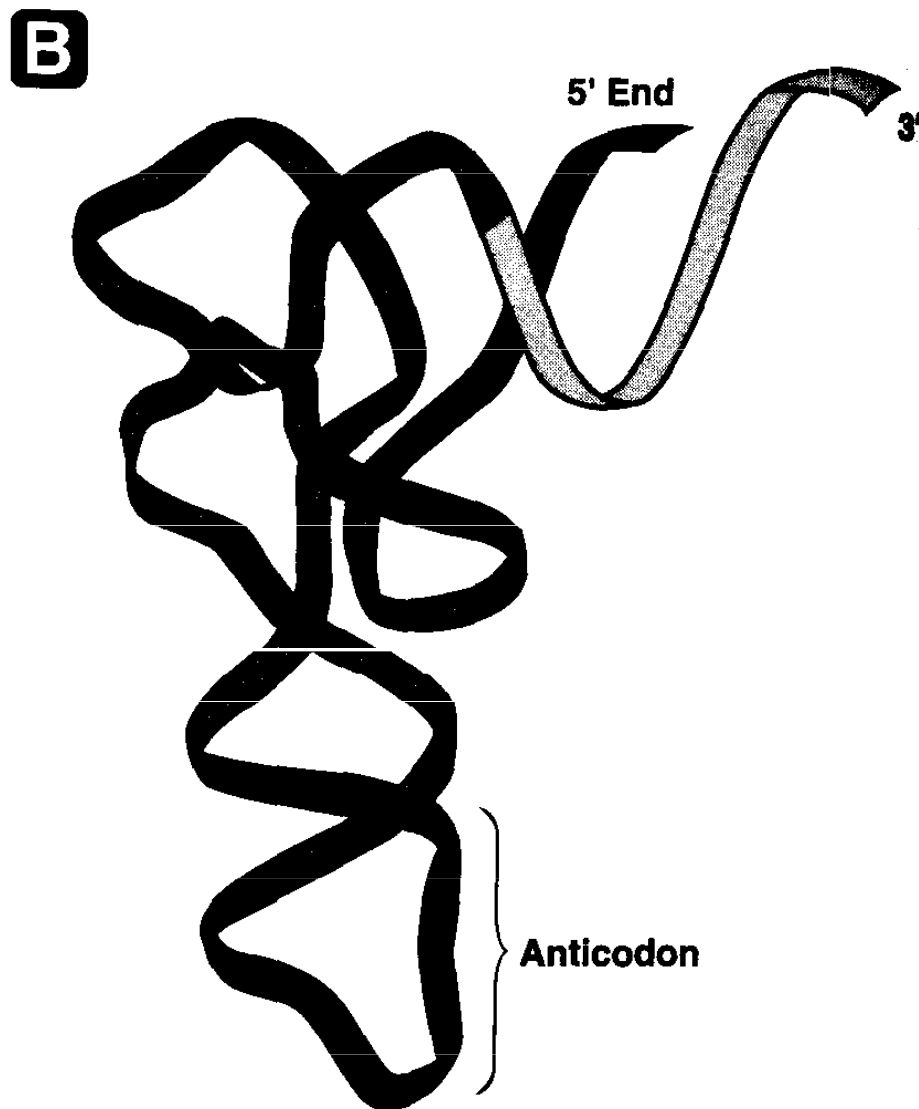
- tvorba smyček a ramének

raménka jsou tvořena na základě spárování komplementárních sekvencí

- spárována je asi polovina nukleotidů
- projekce sekundární struktury připomíná jetelový trojlístek
- terciární struktura prostorově tvar L
vodíkové můstky, interakce aromatických jader

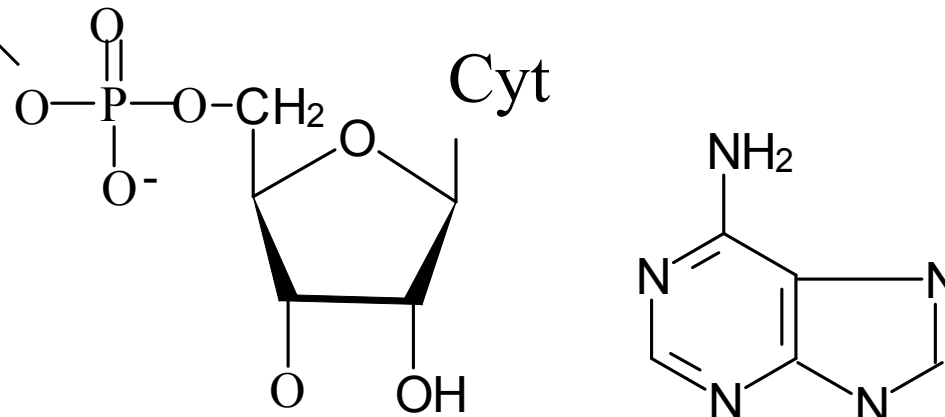


Prostorové uspořádání tRNA

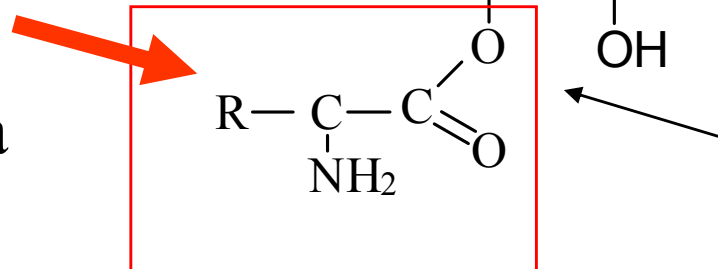


Vazba AK na 3'-konec transferové RNA

t-RNA



Esterová vazba mezi -
COOH aminokyseliny a
3'-OH ribosy



3'-konec t-RNA

aminokyselina

Mediátorová RNA (informační, messengerová)


- 5-10 % RNA
- výsledek transkripce genů – proměnlivá velikost
- každá aminokyselina je kódována tripletem bází - kodón
- speciální kodóny: AUG (počáteční)
UAA, UAG,UGA (terminační)

Rozdíly mezi mRNA eukaryontů a prokaryontů

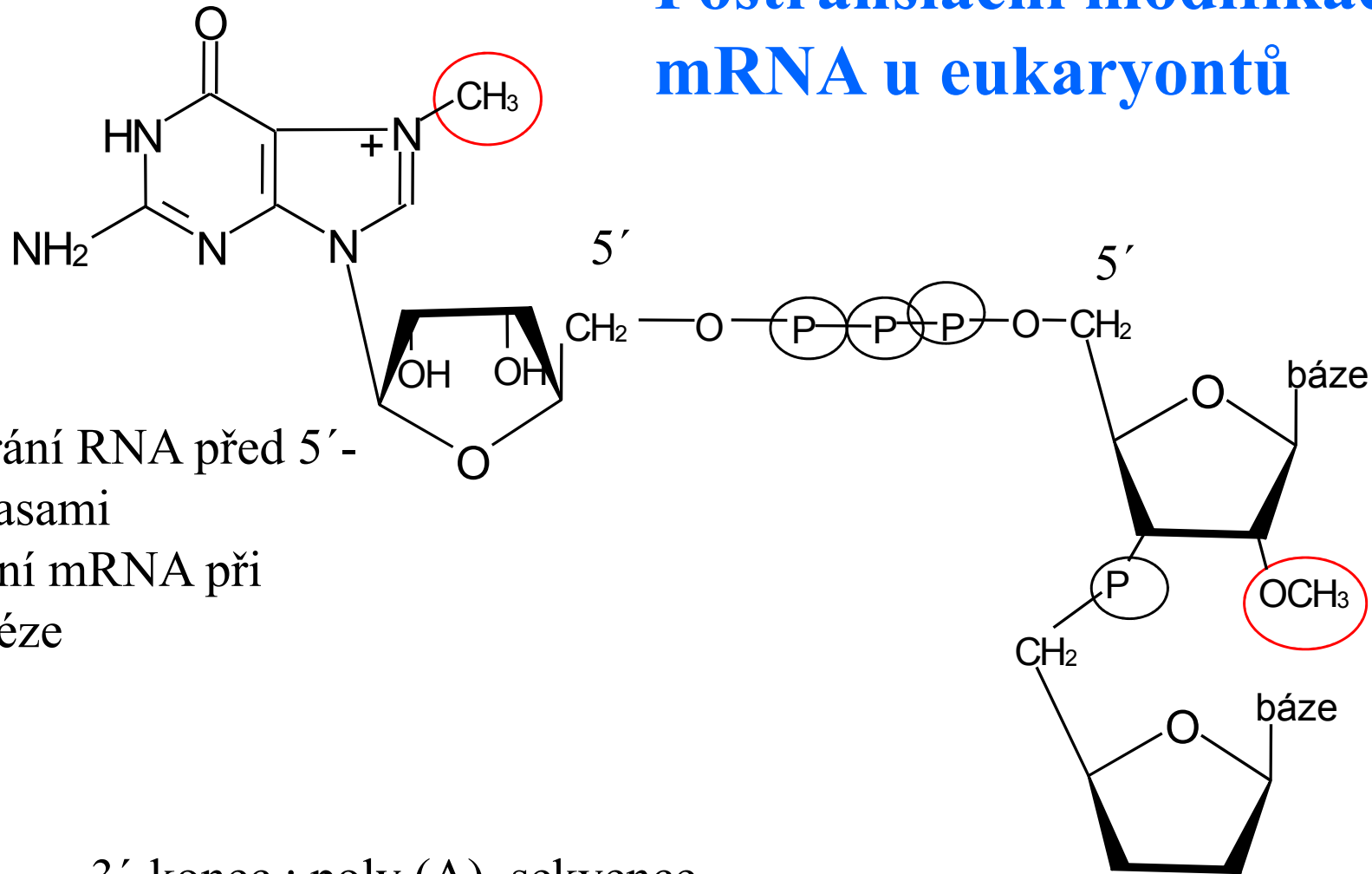
Prokaryontní x eukaryontní mRNA

Typ RNA	prokaryontní	eukaryontní
Vznik	přepisem DNA	přepisem DNA
Místo vzniku	cytoplasma	jádro
Primární transkript	konečný transkript	hn RNA
Charakter transkriptu	polycistronická	přepis jediného genu
Úpravy	nejsou	čapka, poly A, sestřih



 Kódující oblast mRNA

Postranlační modifikace mRNA u eukaryontů

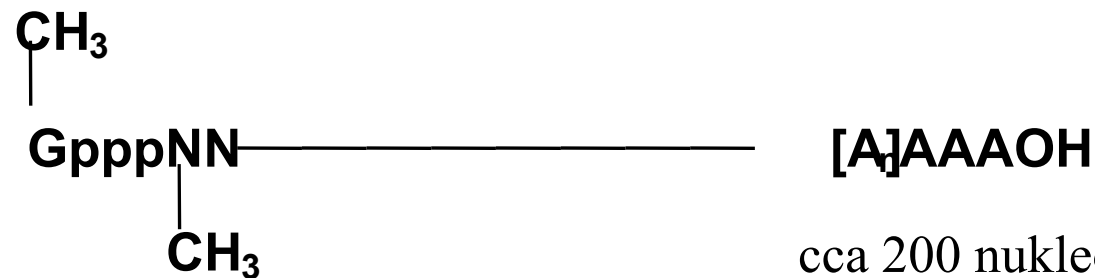


5'-konec :

Čapka: chrání RNA před 5'-endonukleasami

- rozpoznání mRNA při proteosyntéze

3'-konec : poly (A) sekvence
chrání RNA před 3'-endonukleasami ?



cca 200 nukleotidů

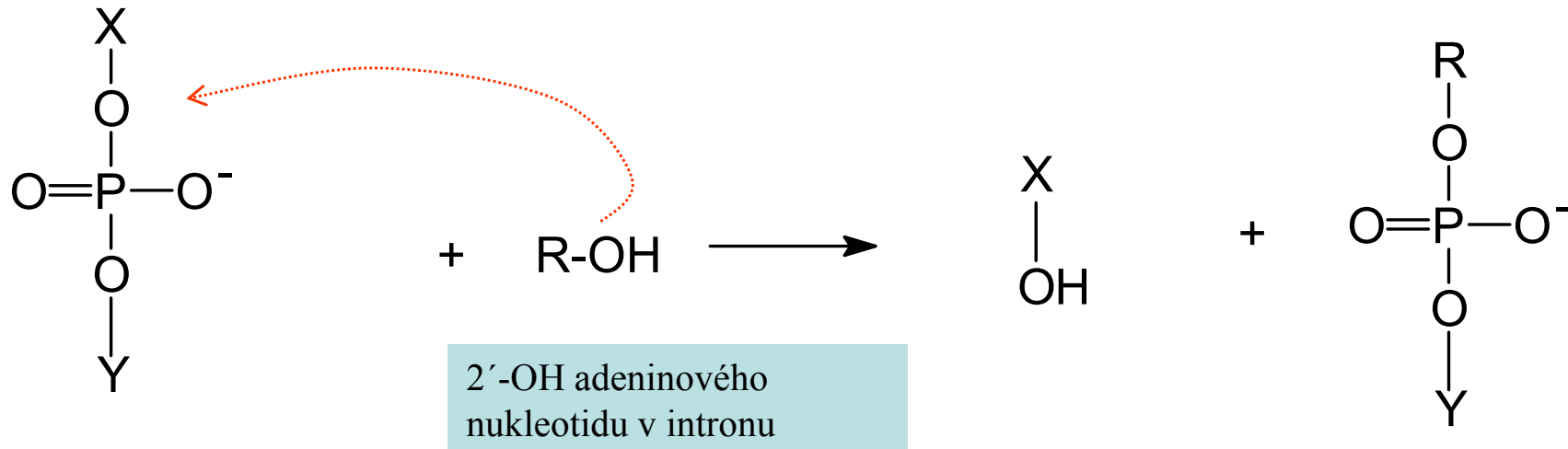
Úpravy eukaryontní mRNA

- prekursorem mRNA je hnRNA (heterogenní jaderná RNA) ($M_r > 10^7$). Obsahuje transkripty intronů i exonů.
- transkripty intronů jsou v jádře vyštěpeny- sestřih (excision), vyštěpené úseky spojeny (splicing),

$$M_r \approx 10^6$$

Splicing je chemická reakce

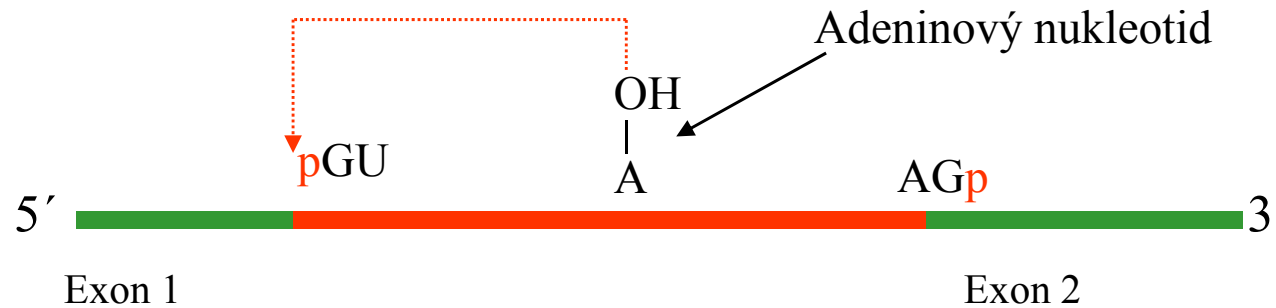
Transfosfoesterifikační reakce



Řetězec
RNA

Fosfodiesterová vazba je přesunuta na jinou –OH skupinu.
Neprobíhá hydrolýza, nedodává se energie.

Mechanismus RNA-splicing



2'-OH skupina adeninového nukleotidu atakuje fosfát v pozici 5'guaninového nukleotidu v místě spájení a tvoří „laso“. Tím se přeruší řetězec na 3'konci exonu 1, uvolní se 3'-OH konec a ten atakuje 5'-konec exonu 2



mRNA

vystřížený intron

Katalyzováno komplexem RNA-proteiny = spliceosomy

Spliceosomy

Komplexy protein-RNA (small ribonucleine particles
(snRNPs - snurp)

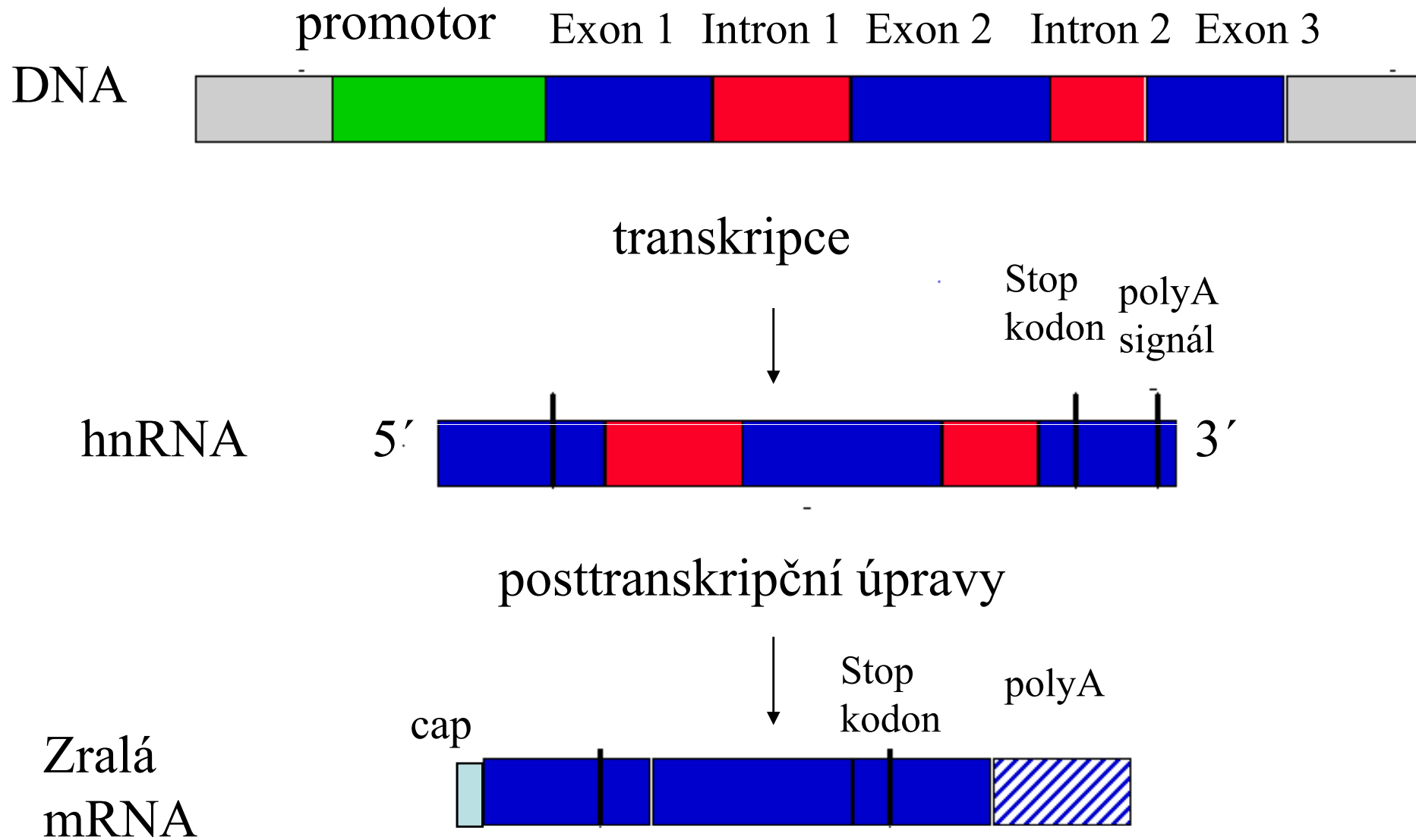
5 typů – U1, U2, U4, U5, U6

RNA 100-300 bází (small nuclear RNAs –snRNAs)

40 typů proteinů

Dále potřebné proteiny nazývané „splicing“ faktory

Úpravy eukaryontní mRNA souhrnně



Malé RNA

- Malé jaderné RNA (snRNA) – působí při zpracování mRNA a regulaci genů
- mikroRNA (miRNA) a malá interferující RNA (siRNA) – působí při regulaci genové exprese (tlumí aktivitu genu)

Micro RNA

(Nature – objev roku 2002)

Krátká jednovláknová RNA 21-23 nukleotidů

Vzniká transkripcí z DNA ve formě pri-miRNA

Upravována sestřihem na →pre-miRNA→miRNA

Reguluje genovou expresi

Odhaduje se, že lidské buňky vytvářejí asi pět stovek těchto krátkých miRNA.

Identifikovány asi dvě stovky genů, podle nichž se lidské mikroRNA tvoří.

miRNA se váže na mRNA, o vazbě rozhoduje míra komplementarity

Pokud zbývající část nemá plnou komplementaritu (obě molekuly RNA do sebe dokonale nezapadají), vytváří se dočasné spojení. Messenger RNA za těchto podmínek není schopna zajistit syntézu proteinu. Jakmile se mikroRNA od cílové sekvence mRNA zase odpojí, schopnost syntézy proteinu se obnoví. Pokud je ale komplementarita mezi miRNA a cílovou sekvencí mRNA dokonalá, je nastartována tzv. RNA interference.

Small interfering RNA siRNA

Třída dvouřetězové RNA o délce 20-25 nukleotidů

Je zapojena do dráhy RNA-interference, která interferuje s expresí specifických genů

Ribozymy – RNA s katalytickou funkcí

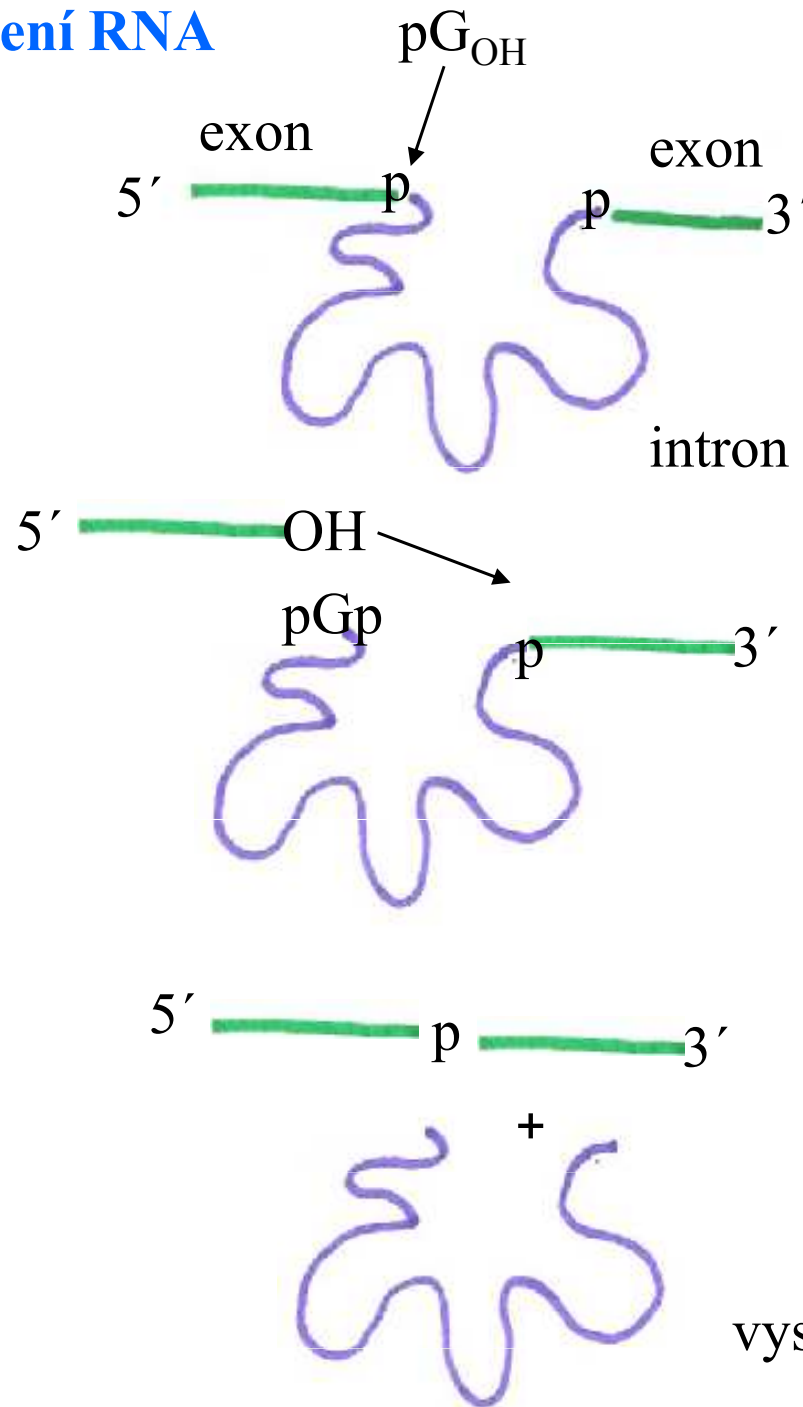
Některé typy RNA u některých prokaryontů mají enzymovou aktivitu:

za přítomnosti volného nukleosidu mohou štěpit fosfodiesterové vazby ve vlastní molekule (self-splicing).

Aternativní cesta sestřihu – je jen málo známo o tom, kdy a proč nahradí klasickou splicesomovou cestu.

Mechanismus samoštěpení RNA

- 3'-OH skupina guanosinu (pG_{OH}) atakuje fosfodiesterovou vazbu a uvolňuje exon na levé straně s volnou 3'-OH
- 3'-OH atakuje druhou fosfodiesterovou vazbu, uvolňuje intron a spojuje dva exony
- intron je velký polynuklotid a má trojrozměrnou strukturu, která je podmínkou samoštěpení. Předpokládá se, že tato terc. struktura poskytuje vazebné místo pro G-OH



pG_{OH} – guanosinový nukleotid nebo guanosin