Replikace a transkripce DNA

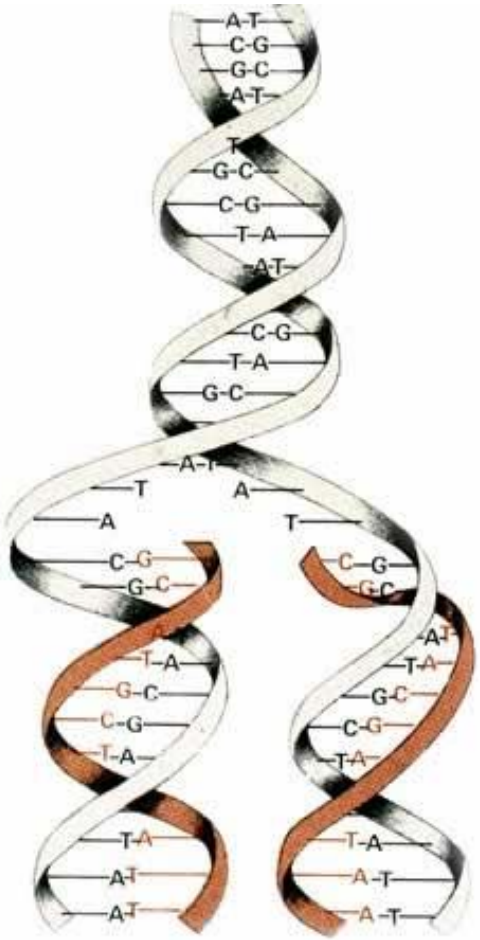
Replikace DNA

Replikace (reduplikace) = zdvojování

Každé ze dvou mateřských vláken DNA slouží jako templát pro syntézu komplementárních vláken

V nových řetězcích se báze řadí na principu komplementarity vůči bazím v templátovém řetězci

Probíhá v jádře



Replikace DNA. [online]. [cit. 2014-07-27]. Dostupné z: http://biologie.webz.cz/www/DNA/replikace.html

Obecné rysy replikace u prokaryontů a eukaryontů

3 fáze replikace DNA

- Iniciace
- Elongace
- Spojení a terminace

Látkové faktory potřebné k syntéze DNA

- dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- Mg^{2+}
- primer RNA
- templát DNA (mateřské vlákno)

Enzymy potřebné potřebné pro syntézu DNA (různé u prokaryontů a eukaryontů)

Rozplétací enzym (DNA-helikasa)

RNA- polymerasa

DNA-dependentní DNA-polymerasa

DNA-ligasa

ATP-asa

(topoisomerasa)

Chemická reakce syntézy DNA

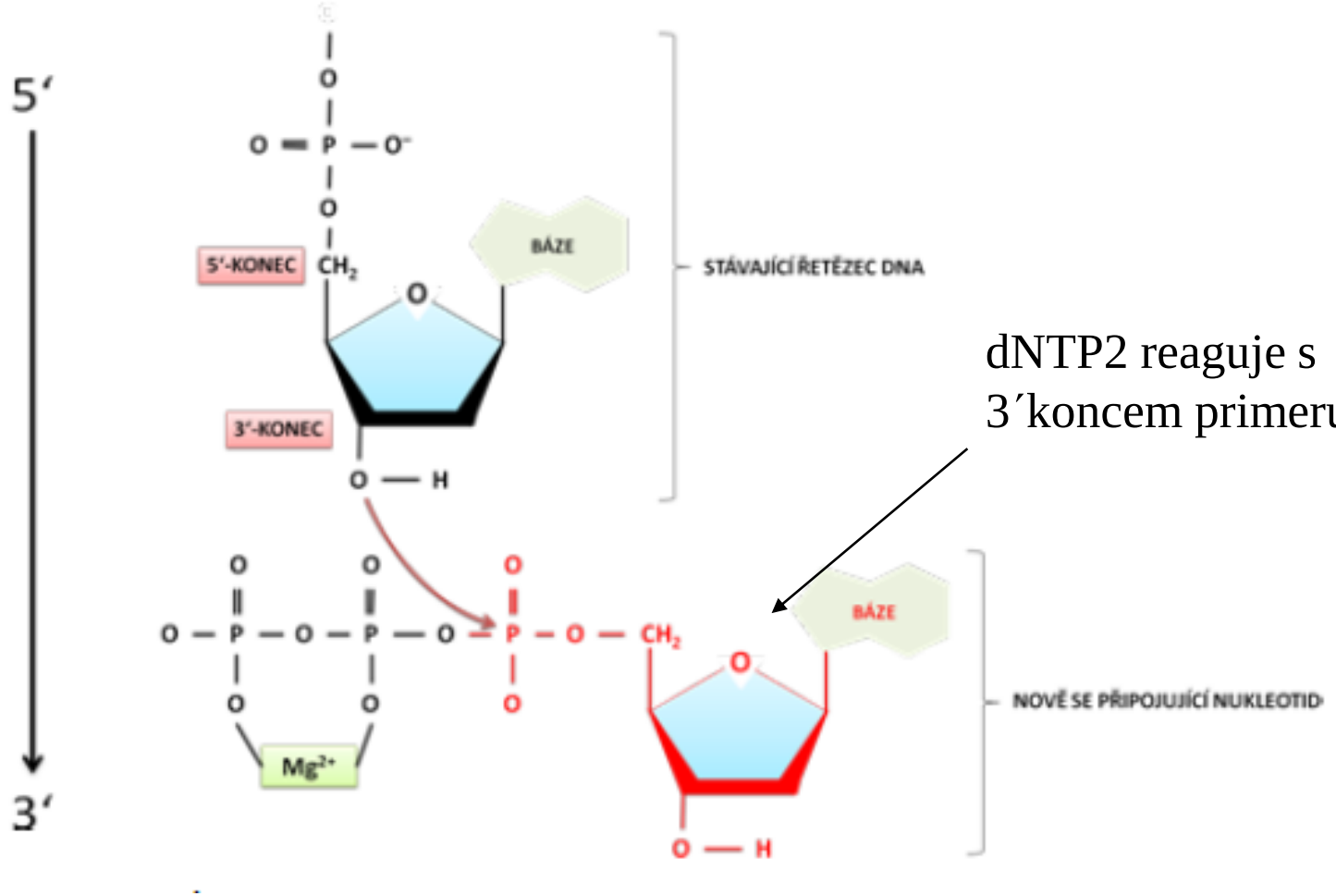
Vlastní syntéza je katalyzována DNA-polymerasami

Do reakcí s již vytvořenou DNA (nebo primerem RNA) vstupuje deoxyribonukleotidtrifosfát (dNTP)

Odštěpuje se difosfát a dNMP se připojí esterovou vazbou

všechny DNA polymerasy navazují nukleotidy na 3´-konec primeru (nová DNA vzniká ve směru 5´→3´)

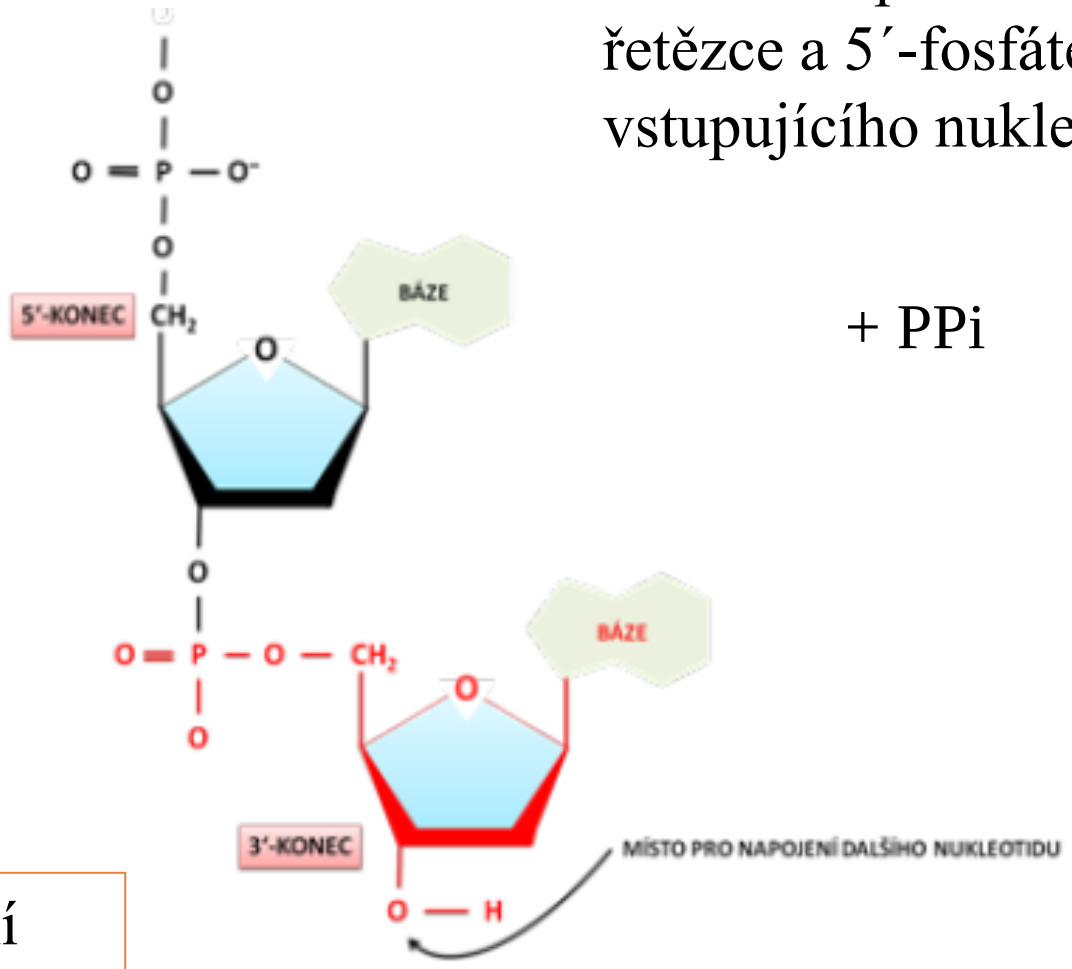
Připojení deoxynukleotidu při elongaci řetězce DNA



dNTP2 reaguje s 3´koncem primeru

NOVÁK, Jan. *Biochemie I.* Brno: Muni, 2009, s. 278.

5´



3´

Vzniká esterová vazba mezi 3´-OH skupinou stávajícího řetězce a 5´-fosfátem vstupujícího nukleotidu

+ PPi

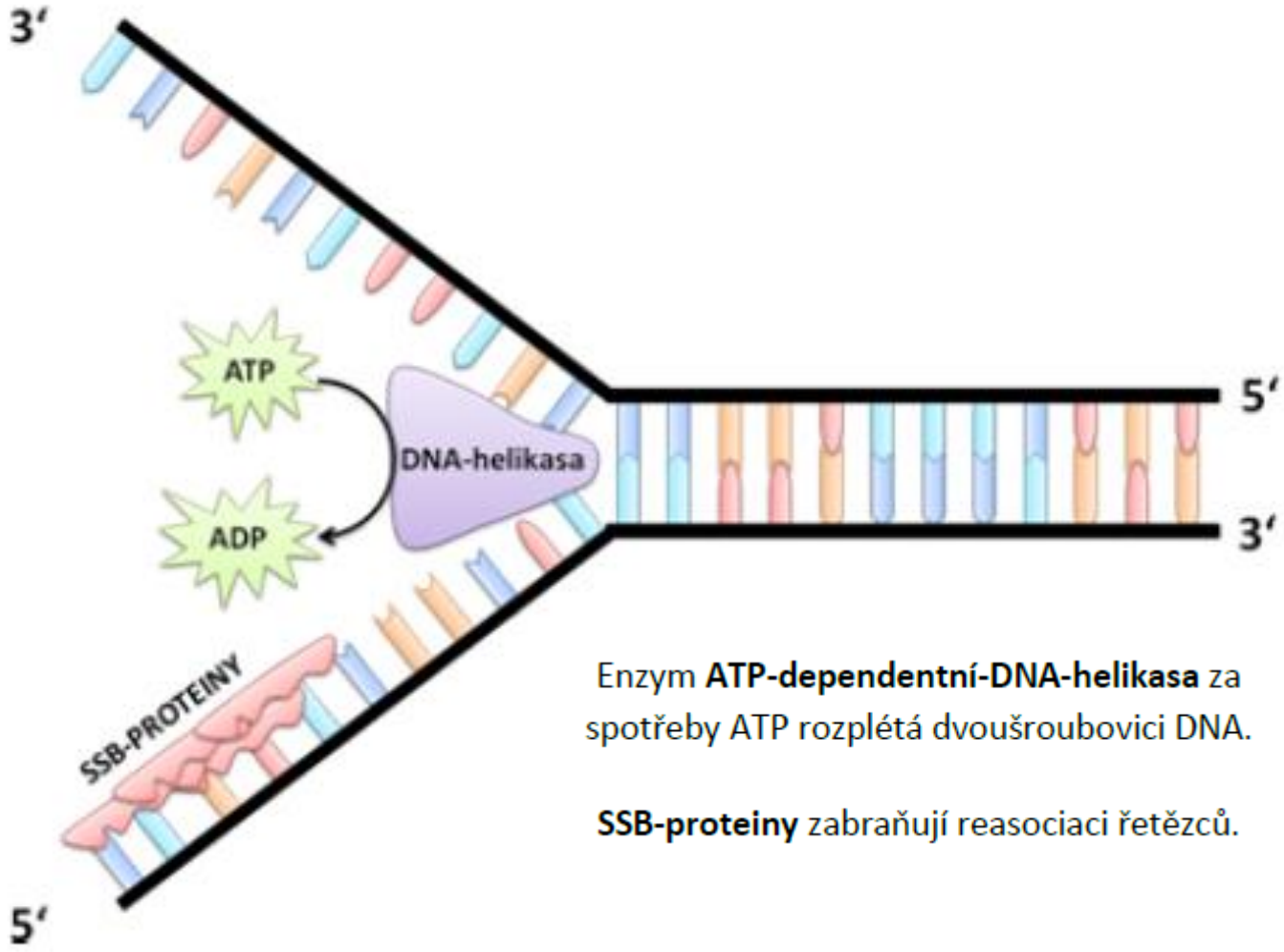
prodlužování řetězce

NOVÁK, Jan. *Biochemie I.* Brno: Muni, 2009, s. 278.

Replikace probíhá na obou vláknech

- dvoušroubovice musí být rozvinuta – enzym helikasa
- vytváří se replikační vidlice
- reasociaci řetězců zabrání ssb-proteiny
  (single strain binding protein)
- podle matrice obou mateřských vláken probíhá syntéza vláken nových

Proteiny podílející se na oddělení řetězců a udržování jednovláknové struktury



Enzym **ATP-dependentní-DNA-helikasa** za spotřeby ATP rozplétá dvoušroubovici DNA.

SSB-proteiny zabraňují reasociaci řetězců.

NOVÁK, Jan. *Biochemie I*. Brno: Muni, 2009, s. 278.

K syntéze DNA je potřebný RNA primer

•DNA polymerasa neumí iniciovat syntézu nových řetězců

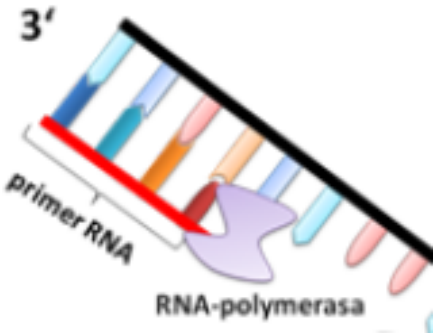
•Pro svou funkci vyžaduje volnou 3´-OH skupinu

•Tuto skupinu zajišťuje RNA primer (10-20 bází)

•RNA primer je syntetizován ve směru 5´→3´účinkem RNA polymerasy (primasy)

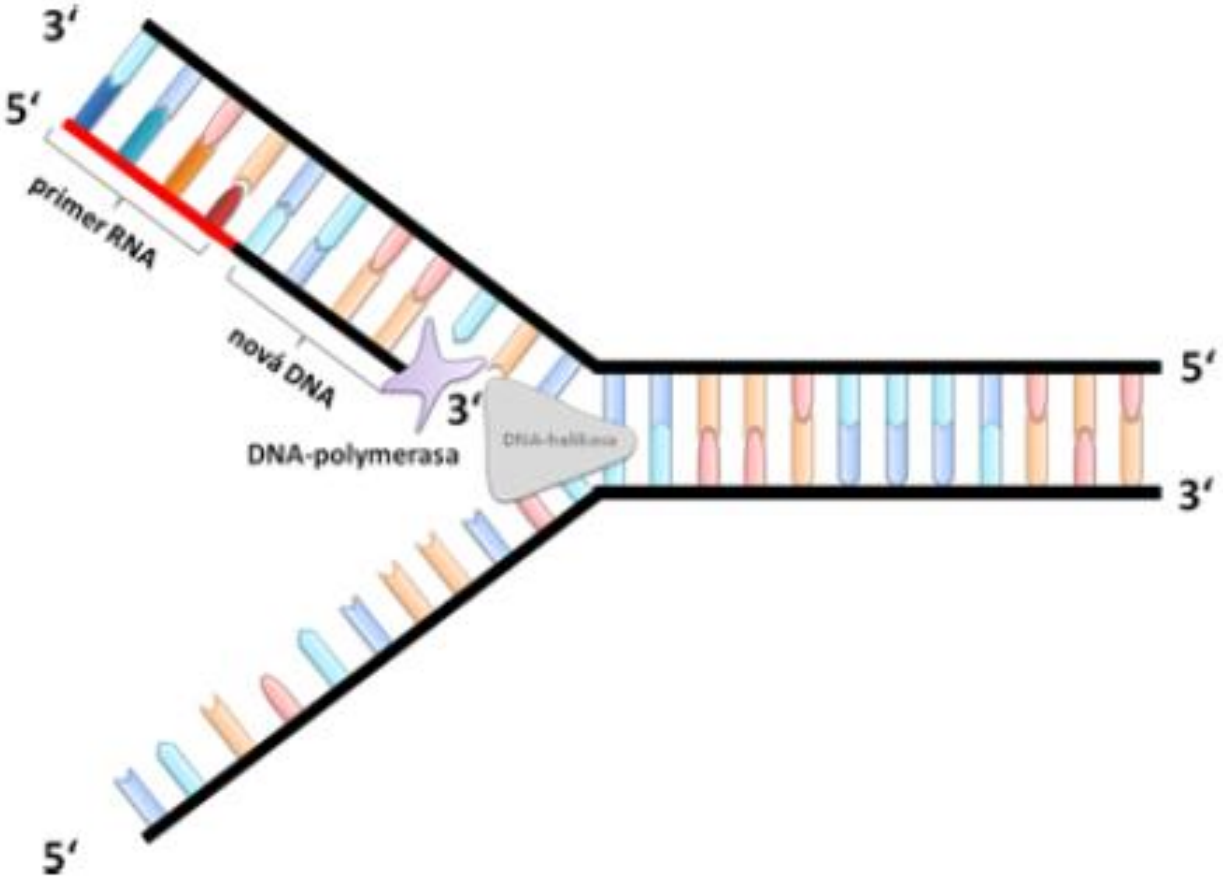
•Primer je kódován podle odpovídající sekvence templátu

RNA-DNA hybrid



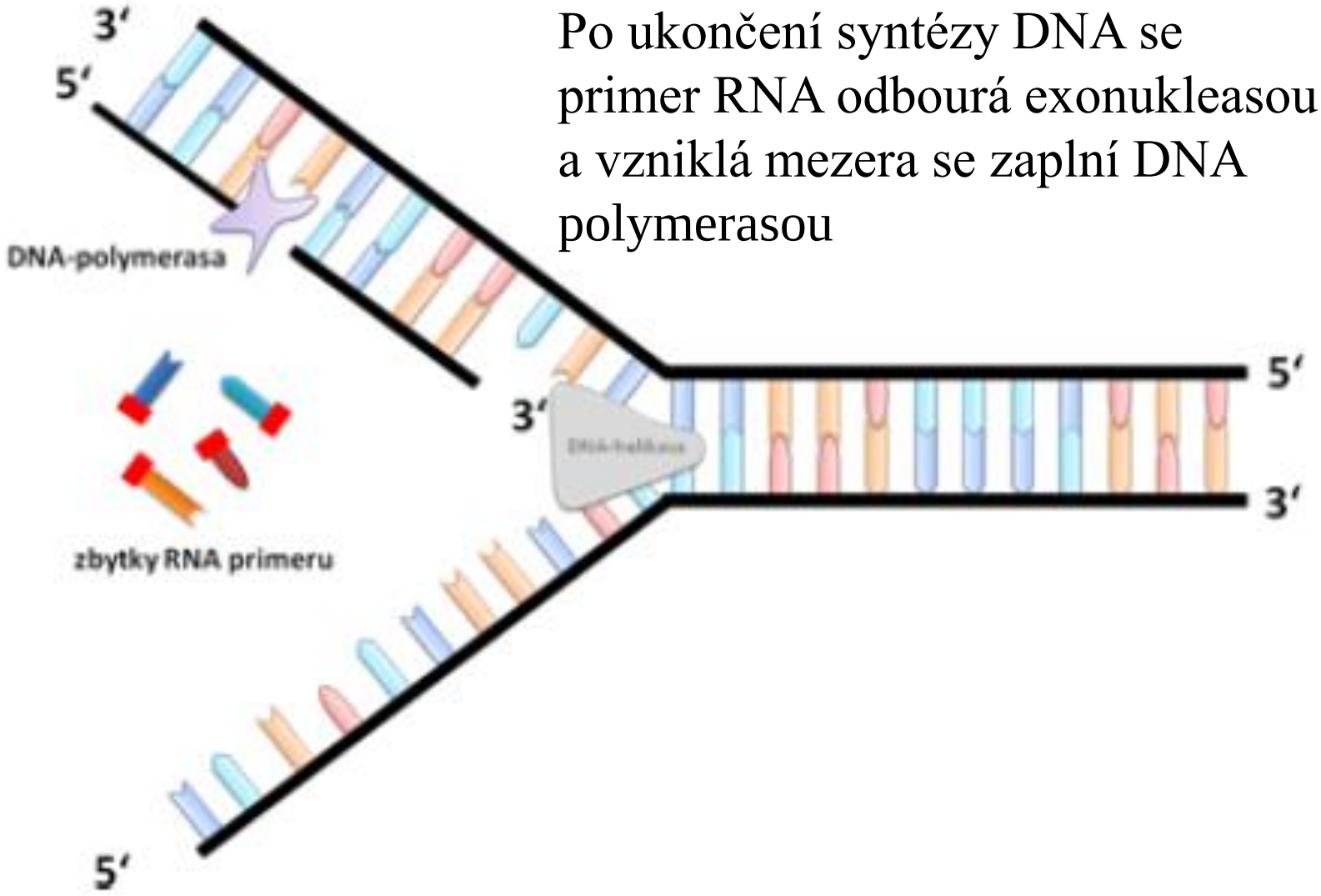
NOVÁK, Jan. *Biochemie I*. Brno: Muni, 2009, s. 279.

Po vytvoření primeru se na 3´-konci RNA syntetizuje DNA působením DNA polymerasy



NOVÁK, Jan. *Biochemie I.* Brno: Muni, 2009, s. 279.

Po ukončení syntézy DNA se primer RNA odbourá exonukleasou a vzniklá mezera se zaplní DNA polymerasou



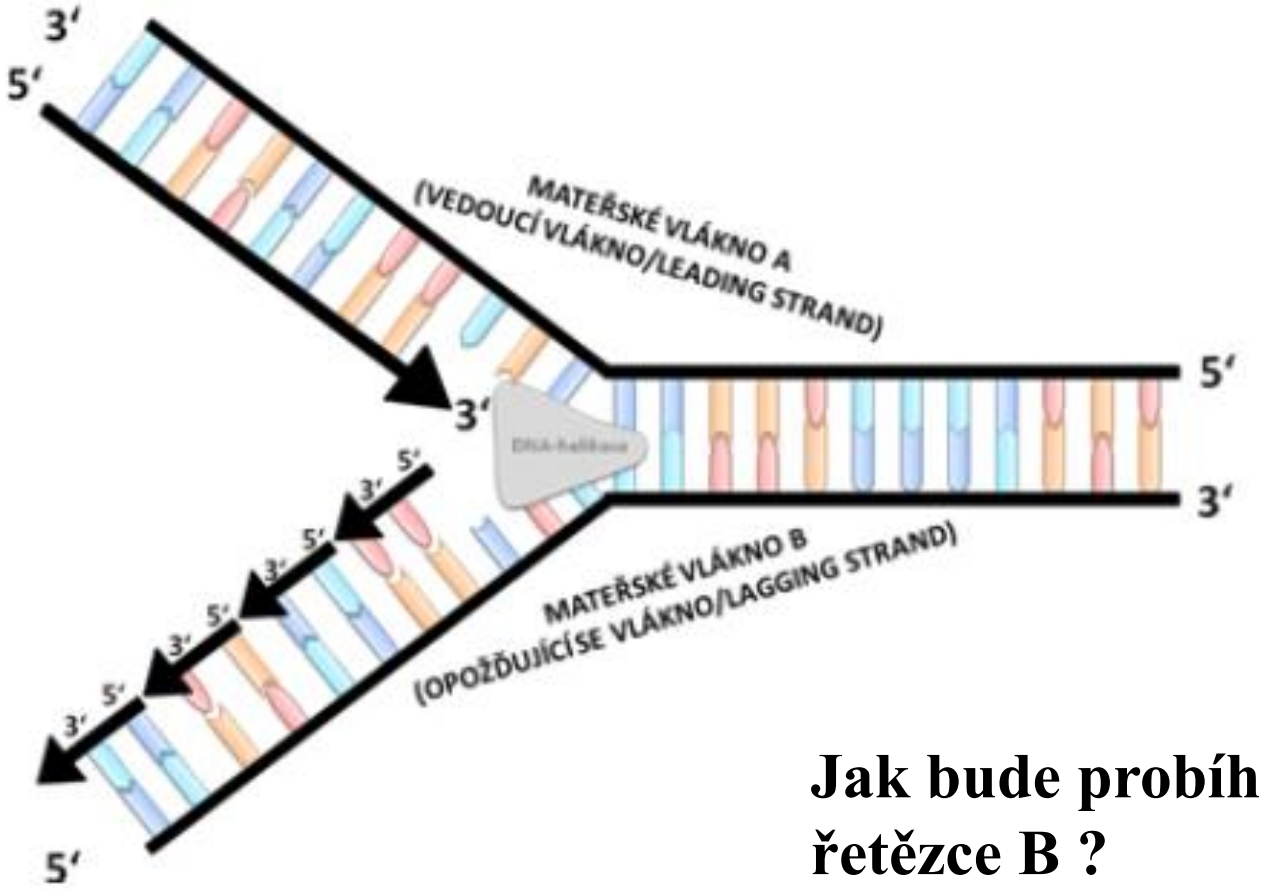
NOVÁK, Jan. *Biochemie I*. Brno: Muni, 2009, s. 279.

Oba úseky DNA se spojí DNA-ligasou

Syntéza nové DNA probíhá vždy ve směru 5´→ 3´

Bez problému tedy proběhne podél řetězce A

Mateřský řetězec A



Jak bude probíhat podél řetězce B ?

Mateřský řetězec B

NOVÁK, Jan. *Biochemie I*. Brno: Muni, 2009, s. 280.

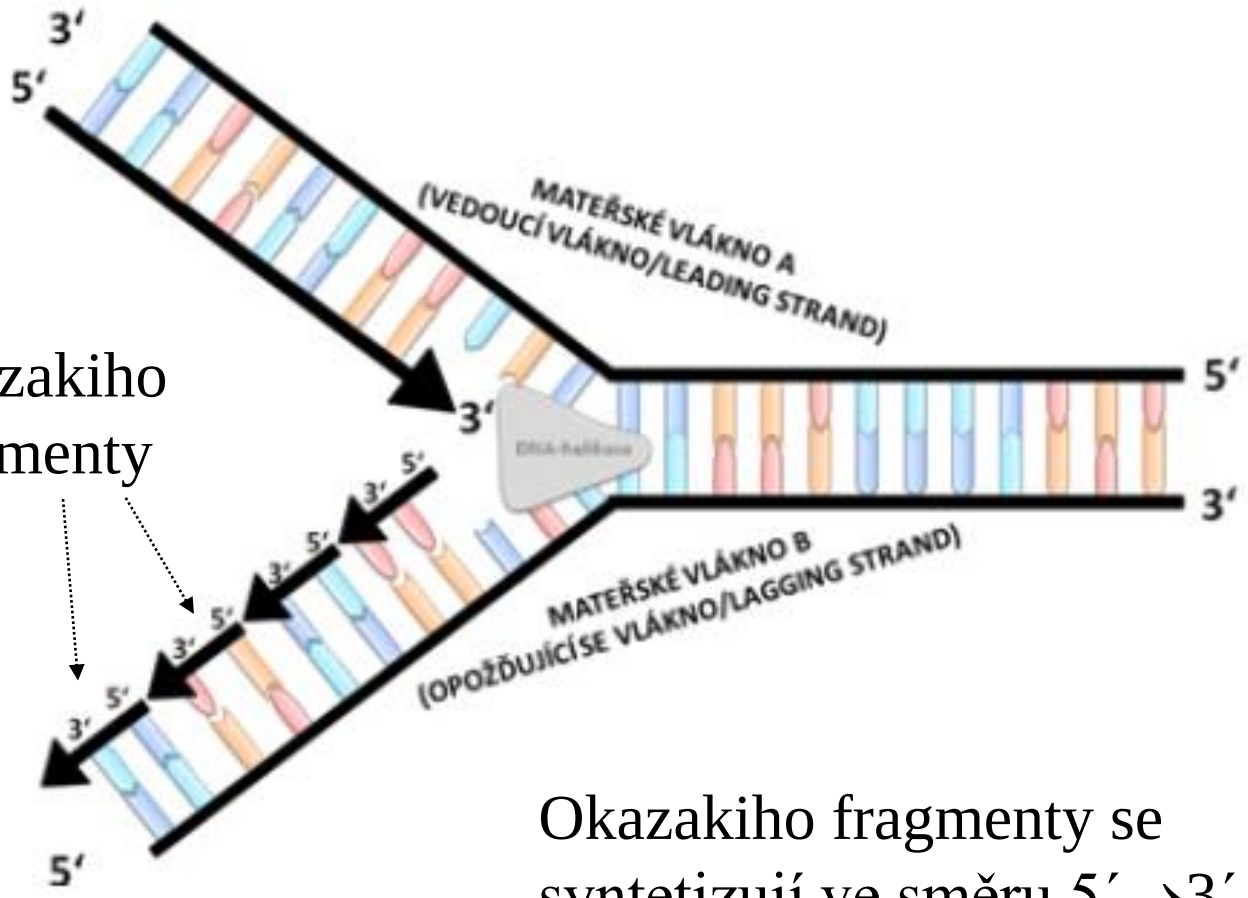
Terminologie

Řetězec A – označuje se jako vedoucí vlákno (leading strand)

Řetězec B – opožďující se (otálející) vlákno (lagging strand)

Vedoucí vlákno se syntetizuje kontinuálně

Na otálejícím řetězci vznikají Okazakiho fragmenty

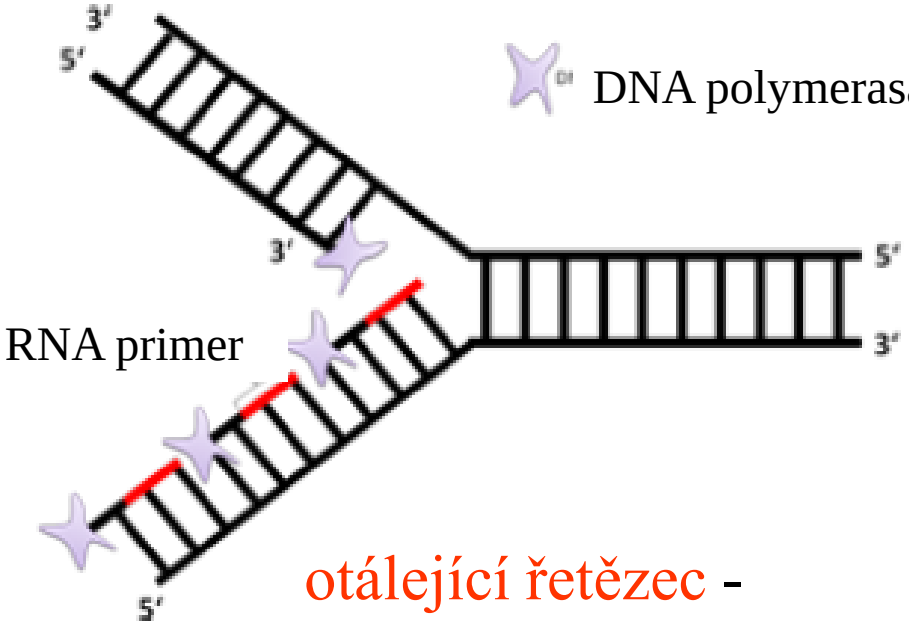


Okazakiho fragmenty

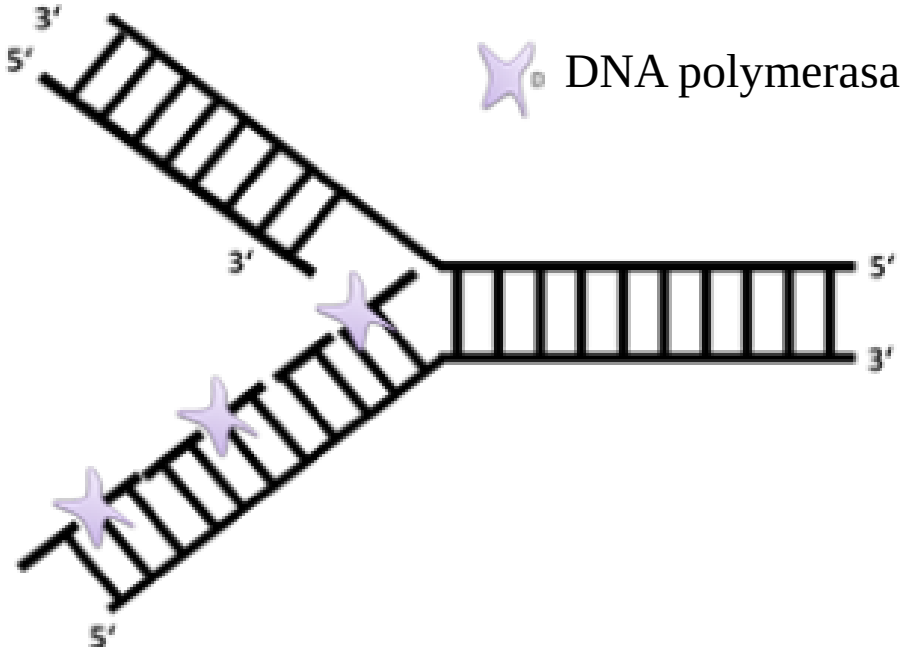
Okazakiho fragmenty se syntetizují ve směru 5′→3′

NOVÁK, Jan. *Biochemie I.* Brno: Muni, 2009, s. 280.

Při pokračující replikaci jsou úseky RNA v Okazakiho fragmentech odstraněny exonukleasou, polymerasa vyplní prázdná místa a ligasa spojí fragmenty DNA



otálející řetězec - replikace probíhá diskontinuálně

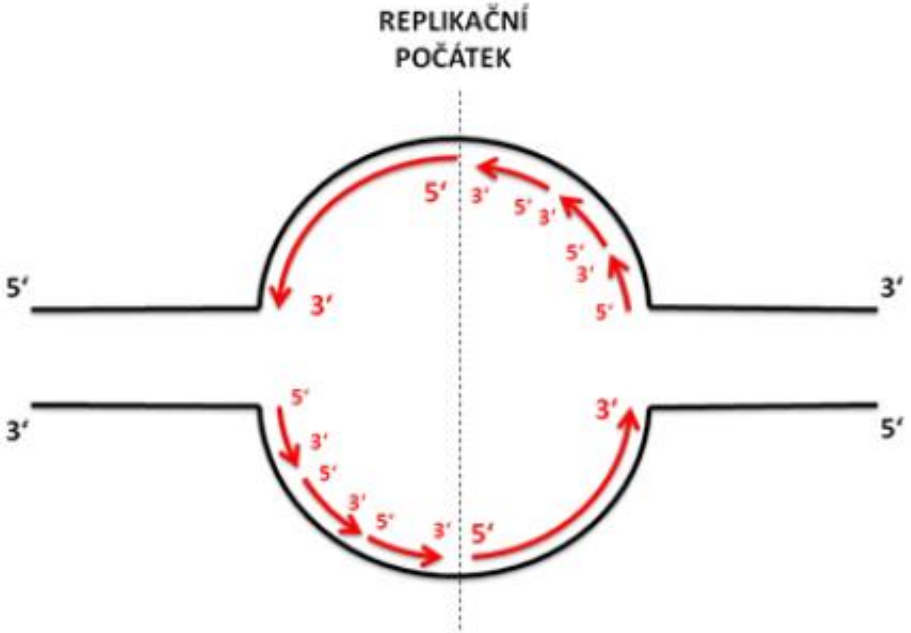


NOVÁK, Jan. *Biochemie I.* Brno: Muni, 2009, s. 280.

Rozdíly mezi eukaryonty a prokaryonty

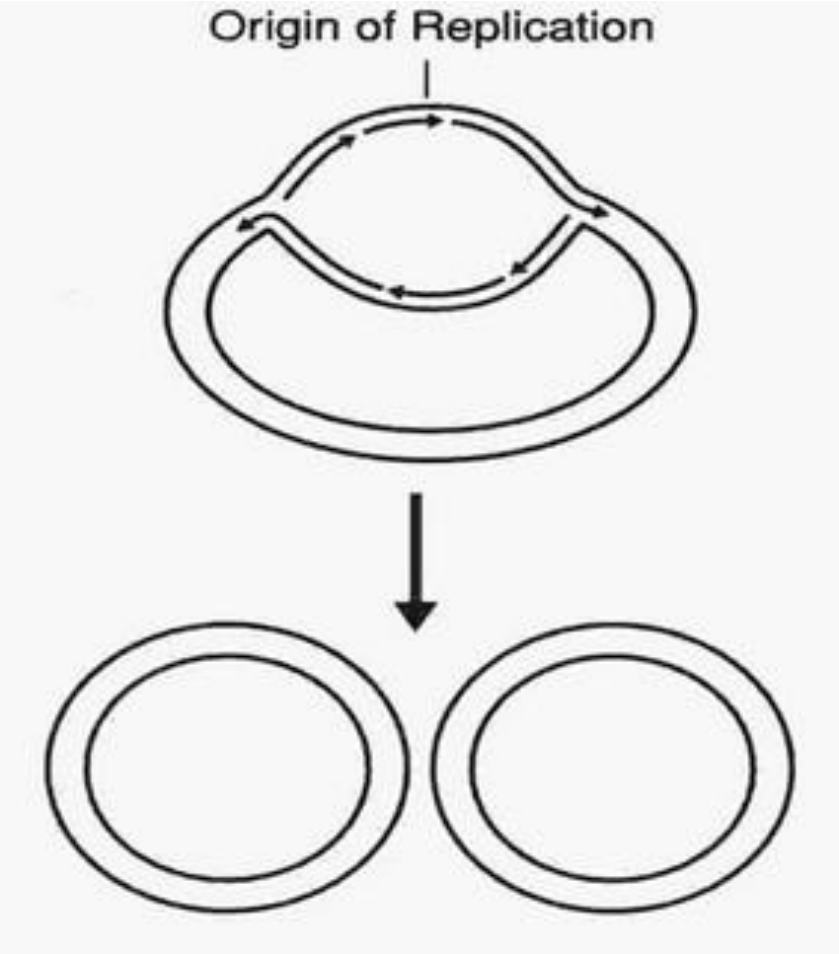
Iniciace replikace

- replikace je prokaryontů i eukaryontů vždy zahájena v počátku
- probíhá v obou směrech od každého počátku, vznikají dvě replikační vidlice, které se od sebe vzdalují
- vznikají replikační bubliny - replikony



NOVÁK, Jan. *Biochemie I.* Brno: Muni, 2009, s. 281.

Iniciace replikace u prokaryontů



oriC-počátek replikace (pouze jediný)

Další syntéza může začít, i když první cyklus ještě není ukončen

~40 min.

Replikace začíná v počátku a pokračuje, dokud se obě vidlice nesetkají

MBBS Medicine (Humantity First). [online]. [cit. 2014-07-27]. Dostupné z: http://medicinembbs.blogspot.cz/2012_08_01_archive.html

Iniciace replikace u eukaryontů

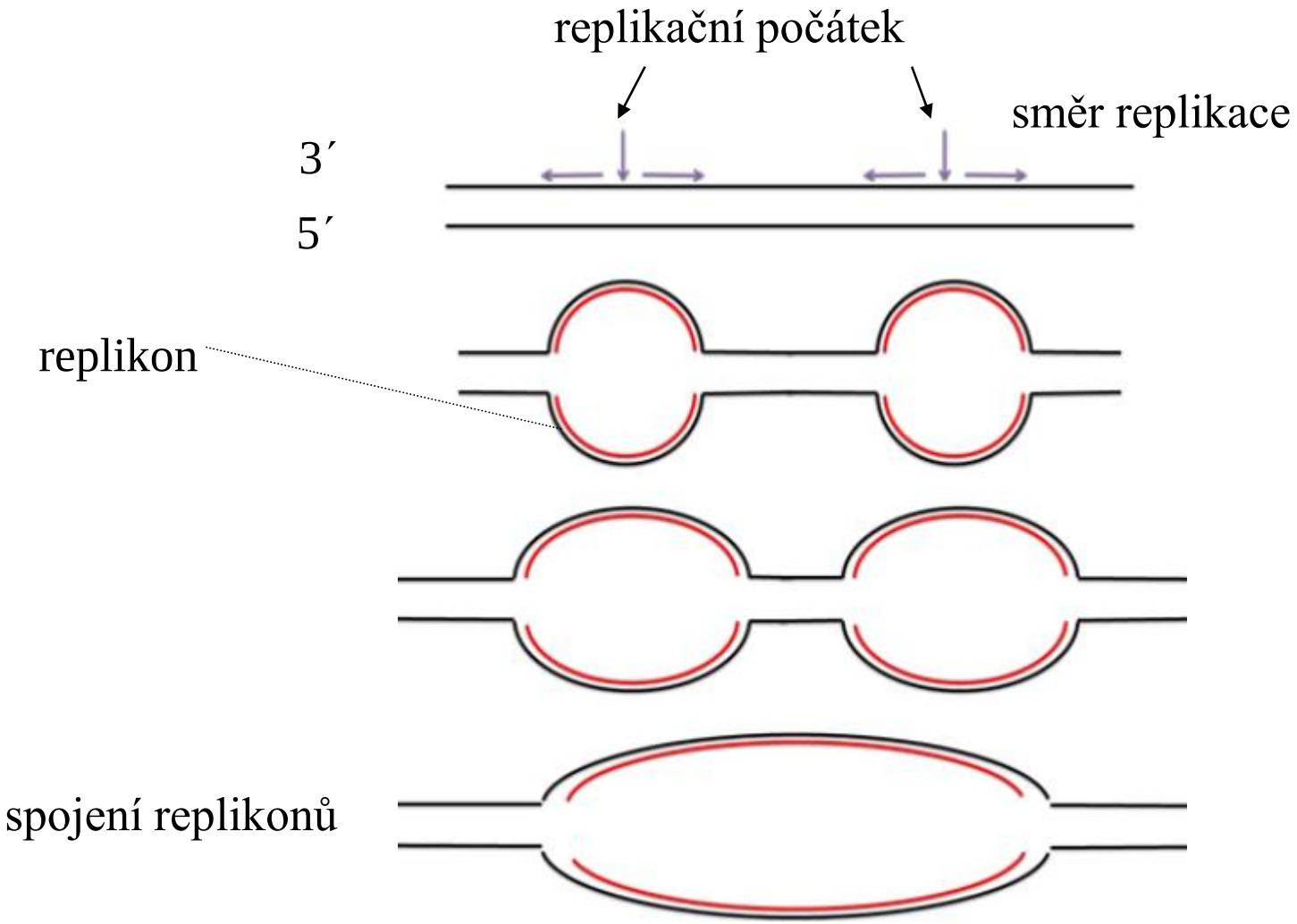
• eukaryotické chromozomy jsou tvořeny dlouhými molekulami DNA, který nemohou být replikovány kontinuálně. Proto replikace těchto velkých molekul vyžaduje zahájení na několika místech současně.

• počátek replikace - až 30 000 míst současně

• zahájení je řízeno prostorově i časově, nemusí být zahájeno na všech počátcích současně

• rychlost replikace je menší než u prokaryontů

• probíhá v S fázi



NOVÁK, Jan. *Biochemie I.* Brno: Muni, 2009, s. 281.

Enzymy prokaryontní replikace

Polymerasa	Funkce	Exonukleasová aktivita
DNA polymerasa I	Vyplnění místa o RNA, opravy DNA, odstranění RNA primerů	5′→3′ i 3′→5′
DNA polymerasa II	Opravy DNA	3′→5′
DNA polymerasa III	Replikace	3′→5′

Enzymy eukaryontní replikace*

Polymerasa	Funkce	Exonukleasová aktivita
DNA polymerasa α	replikace, opravy DNA	žádná
DNA polymerasa β	opravy DNA	žádná
DNA polymerasa γ	replikace v mitochondriích	3′→5′
DNA polymerasa δ	replikace, opravy DNA	3′→5′
DNA polymerasa ε	replikace	3′→5′

* Je známo kolem 9 polymeras

Další enzymy podílející se na replikaci

Helikasa	Oddělují vlákna DNA
SSB-proteiny	Zabraňují reasociaci vláken DNA
topoisomerasy	Uvolňují pnutí vyvolané superstáčením
Enzymy odstraňující primer (RNA-sy)	Hydrolyzují RNA z RNA-DNA hybridů
DNA ligasy	Spojují úseky DNA fosfodiesterovou vazbou
Telomerasy	úprava 3´konce templátu
Sliding clamp (klouzavá svorka)	Udržuje DNA polymerasu ve vazbě na DNA

Okazakiho fragmenty u ekaryontů a prokaryontů

Prokaryonty – 1000-2000 bází

Eukaryonty - ~ 200 bází

Topoisomerasy

(Topologie DNA = trojrozměrná struktura DNA)

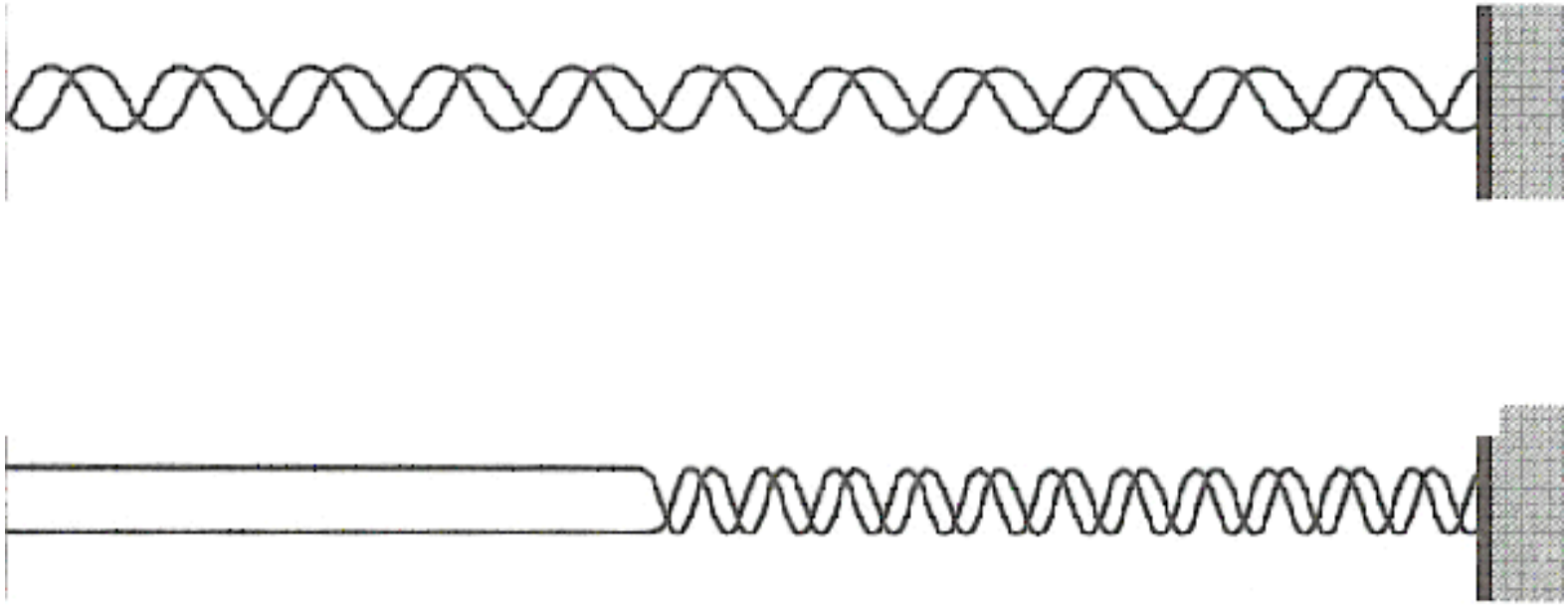
U dvojité DNA dochází často k superstáčení

Superstáčení může být pozitivní (ve stejném směru jako stočení helixu, doleva) nebo negativní (v opačném směru jako helix, doprava)

Superstáčení může být odstraněno topoisomerasami

DNA topoisomerasy mají řadu funkcí (při replikaci, transkripci, ukládání DNA do buněk, při opravách)

Superstáčení při rozvíjení dvojitého helixu DNA



Pozitivní superstáčení

NOVÁK, Jan. *Biochemie I.* Brno: Muni, 2009, s. 283.

Topoisomerasa I

Reversibilně přerušuje fosfoesterovou vazbu v jednom řetězci, umožní otáčení kolem jednoho řetězce (uvolnění superstočení) a katalyzuje opětné spojení řetězců

Nevyžaduje energii.

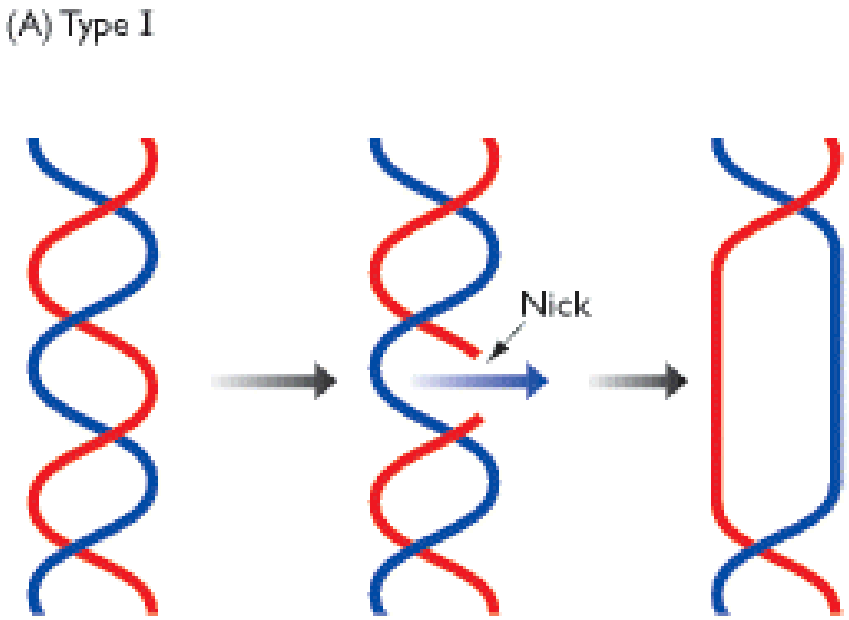
Je u prokaryontů i eukaryontů.

Topoisomerasa II

Může relaxovat superstočenou DNA nebo superstáčení zavádět.
Štěpí oba řetězce.
Je u prokaryontů (DNA gyrasa) i eukaryontů.
Gyrasa vyžaduje ATP.

Účinek topoisomerasy I

Přerušení fosfoesterové vazby následované rotací kolem druhého vlákna a opětným spojením



Modes of replication. [online]. [cit. 2014-07-27]. Dostupné z: http://biosiva.50webs.org/rep2.htm

Inhibitory topoisomerasy- zabraňují replikaci

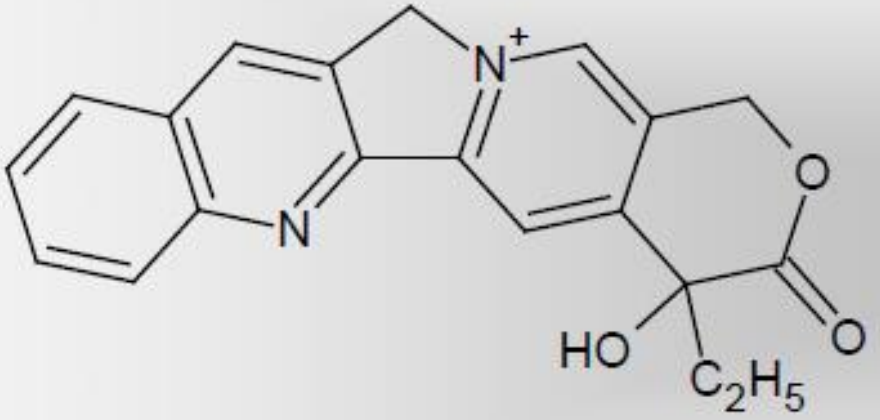
protinádorové léky

Příklady inhibitorů topoisomerasy

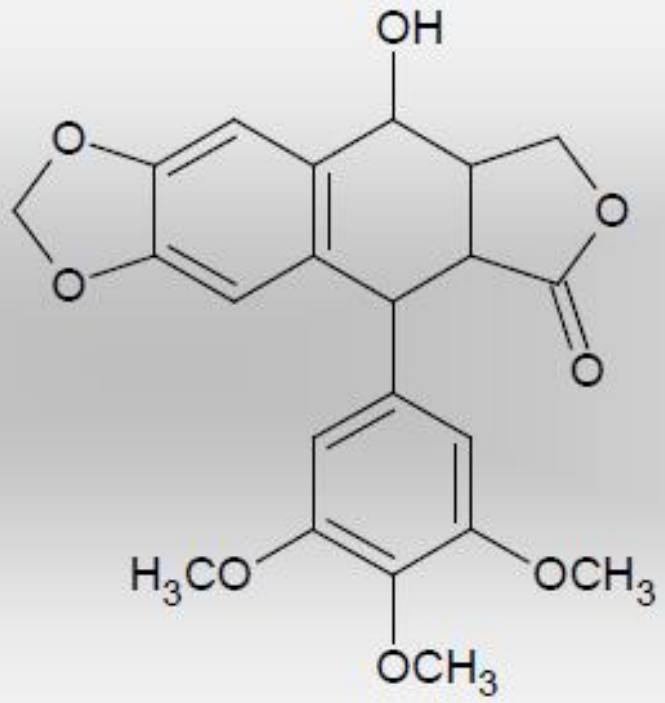
kamptothecin – rostlinný produkt

antracykliny (daunorubicin) - bakteriální produkty

podofyllotoxiny - rostlinné produkty



kamptothecin
(*Camptotheca acuminata*)



podofyllotoxin
(*Podophyllum peltatum ad.*)

NOVÁK, Jan. *Biochemie I.* Brno: Muni, 2009, s. 284.

Telomery

zvláštní sekvence DNA na koncích chromosomů

tandemy druhově specifických oligonukleotidů, bohatých na G

(u člověka TTAGGG až 1000x)

mají ochrannou funkci (před působením enzymů)

Při syntéze opožďujícího řetězce vyžaduje replikační aparát přítomnost určité délky templátové DNA za sekvencí, která má být kopírována.

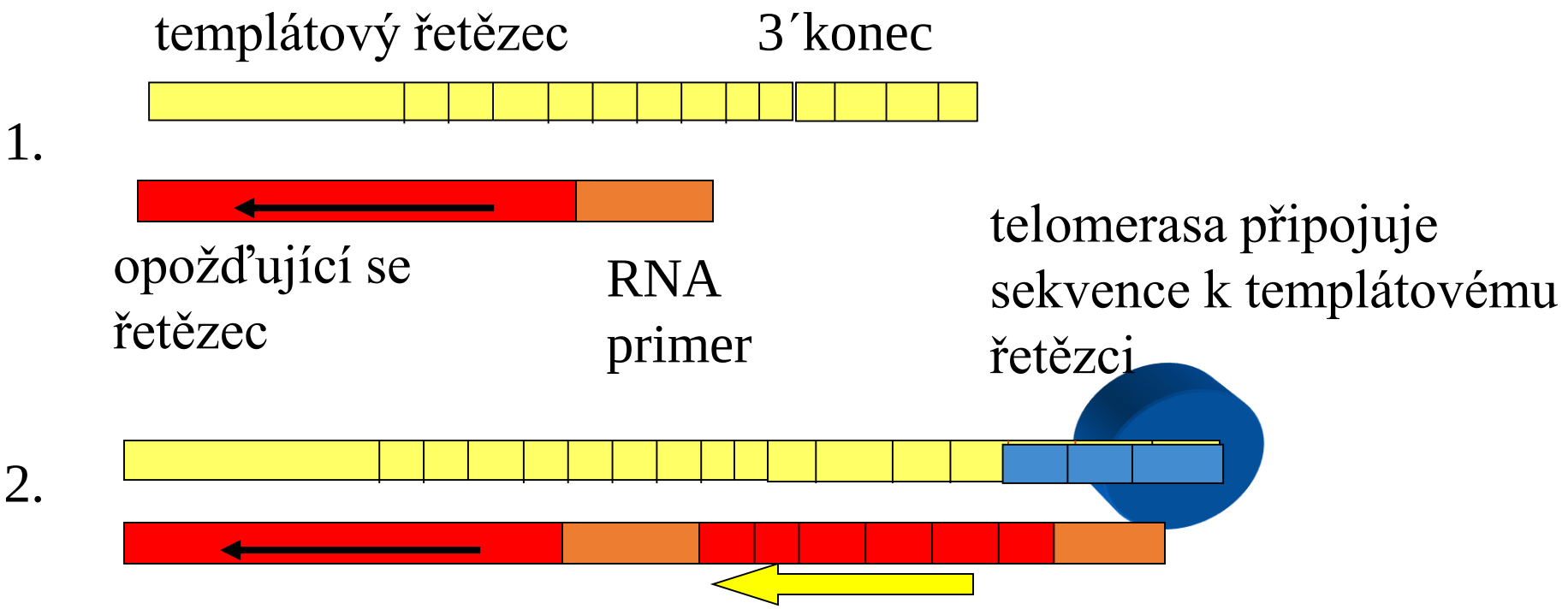
Syntéza opožďující se DNA by se zastavila před koncem templátu.

Telomerasa

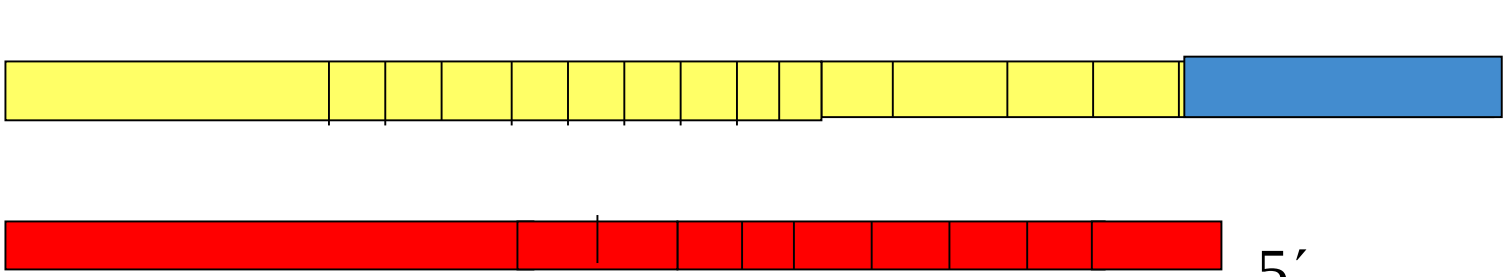
- dokončení syntézy DNA
- připojuje preformovaný hexanukleotid na 3´-konec templátového vlákna
- je reverzní transkriptasa – ve své struktuře nese RNA templát, ten připojí k 3´konci templátové DNA a podle něj dosyntetizuje příslušnou komplementární sekvenci DNA

Dokončení syntézy DNA na koncích chromozomů

replikující se vedoucí řetězec není zakreslen



http://faculty.plattsburgh.edu/donald.slish/Telomerase.html



replikovaný konec
váznoucího řetězce

Další funkce telomer: vytváří ochranu před působením DNA-nukleáz na koncích chromozomů

? Délka telomer koreluje se stářím a replikační kapacitou buňky ?

- buňky získané od mladších jedinců mají delší telomery a mohou podléhat většímu počtu dělení
- snížená aktivita telomerasy pravděpodobně souvisí se stářím organismu
- buňky, které se často dělí (zárodečné, kmenové a nádorové) mají vyšší hladinu telomerasy
- inhibitory telomerasy mohou být užitečné v terapii nádorů

Poškození a opravy DNA.

Hrubý odhad počtu poškozujících zásahů do DNA v lidské buňce:

cca10^4-10^6/den

$\Rightarrow$ u dospělého člověka (10^{12} buněk) se jedná o 10^{16}-10^{18} opravných kroků za den.

Poškození a opravy DNA

Typ poškození	Příčina
Chybějící báze	Depurinace (10^4purinů za den)
Změněná báze	Ionizační záření, alkylační činidla
Nepřesná báze	Spontánní deaminace
Delece-inserce	Interkalační činidla (akridiny)
Formace dimerů	UV záření
Zlomy řetězců	Ionizační záření, chemikálie (bleomycin)
Mezivřetězové vazby	Chemické látky (deriváty psoralenu, mitomycin c)
Tvorba tautomerů	Spontánní a dočasná

Většina buněk má schopnost rozeznat a vystřihnout poškozenou oblast DNA a následně syntetizovat opravenou formu

specifické glykosylasy, exonukleasy a endonukleasy

DNA polymerasa β nahradí chybějící báze

DNA ligasa spojuje úseky

Poškozená DNA je v buňkách opravována reparačními enzymy

Buňky mají k dispozici opravné systémy :

•přímá oprava (zvratem – jen u bakterií)

•vystřižení porušené báze („base excision repair“)

•vystřižení porušeného nukleotidu („nukleotide excision repair“)

•oprava chybného párování („mismatch repair“)

•opravy dvojitých zlomů - homologní rekombinace, nehomologní spájení konců

•prevence inkorporace porušeného nukleotidu do DNA

Mutace, které vzniknou během DNA replikace jsou opravovány zpětnou kontrolu správného zařazení posledního nukleotidu (3´→5´proofreading)

Viz též Poškození a opravy DNA – doplňující text

Alkylační činidla

Spontánní reakce, oxidační stres, alkylační činidla, ioniz.záření.

UV zář., mutageny z prostředí

Ioniz. záření

Chyby v replikaci

O^6-MeG

Přímá oprava

Bazická místa, oxidace, deaminace, alkylace, ssDNA zlomy

Vystřižení báze

Pyridinové dimery, bulky adducts

Vystřižení nukleotidu

Dvojité zlomy

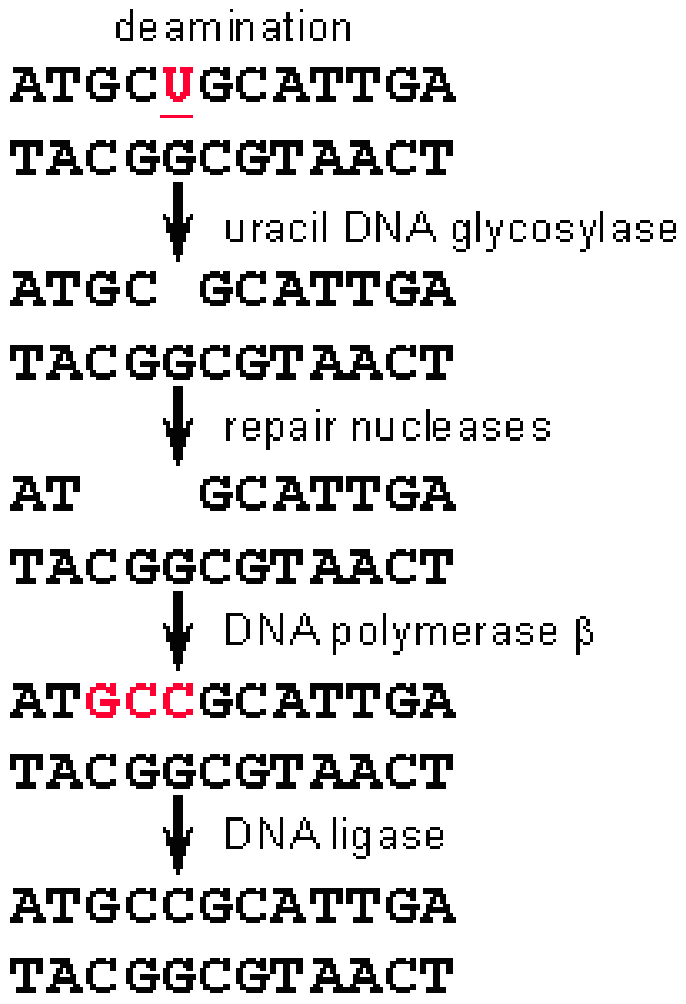
Homologní rekombinace, nehomologní spájení konců

Chyby při opravách, inserce, delece

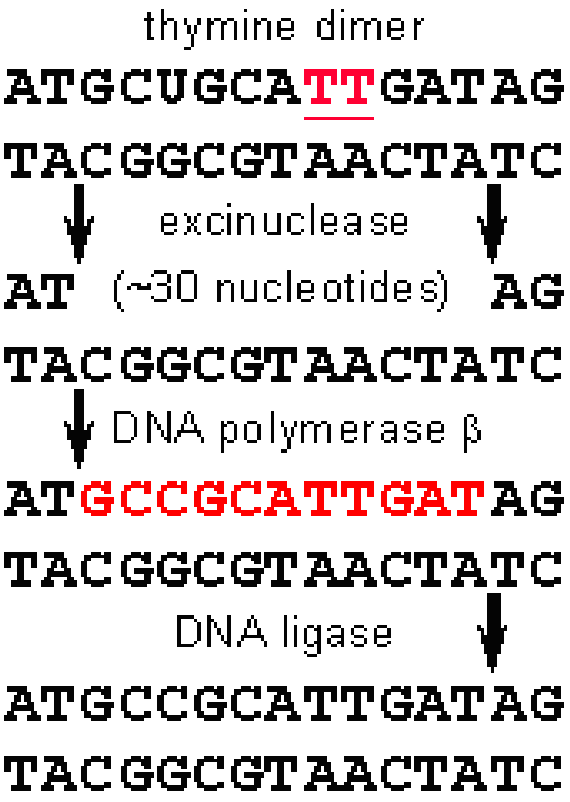
Oprava chybného párování

Vektorová Grafika Zdarma: DNA, Double Helix [online]. [cit. 2014-07-27]. Dostupné z: http://pixabay.com/cs/dna-double-helix-v%C4%9Bda-biologie-30518/

Příklady oprav vystřižením báze nebo nukleotidu



Base excision repair



Nucleotide excision repair

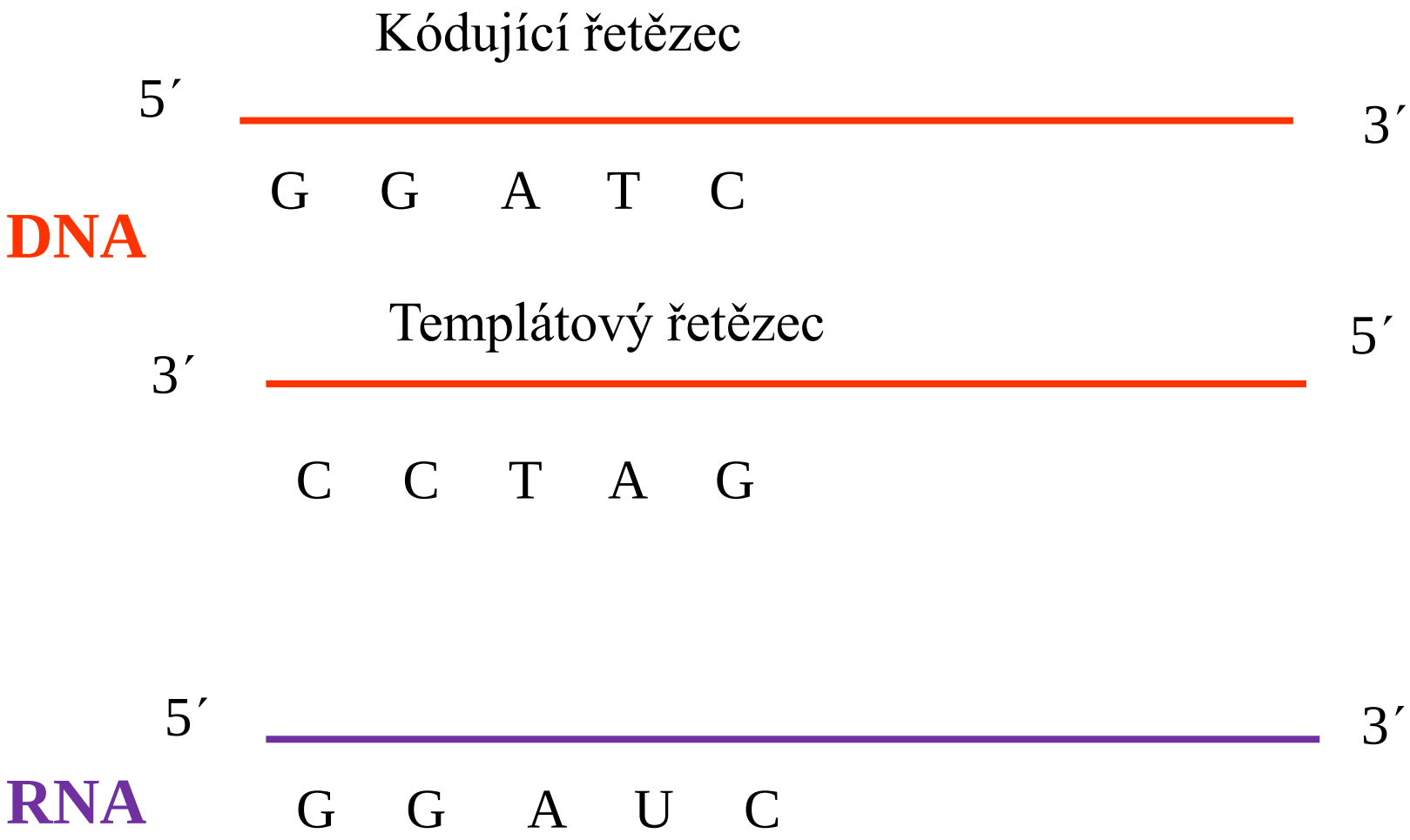
Syntéza a postranskripční úpravy RNA

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

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)

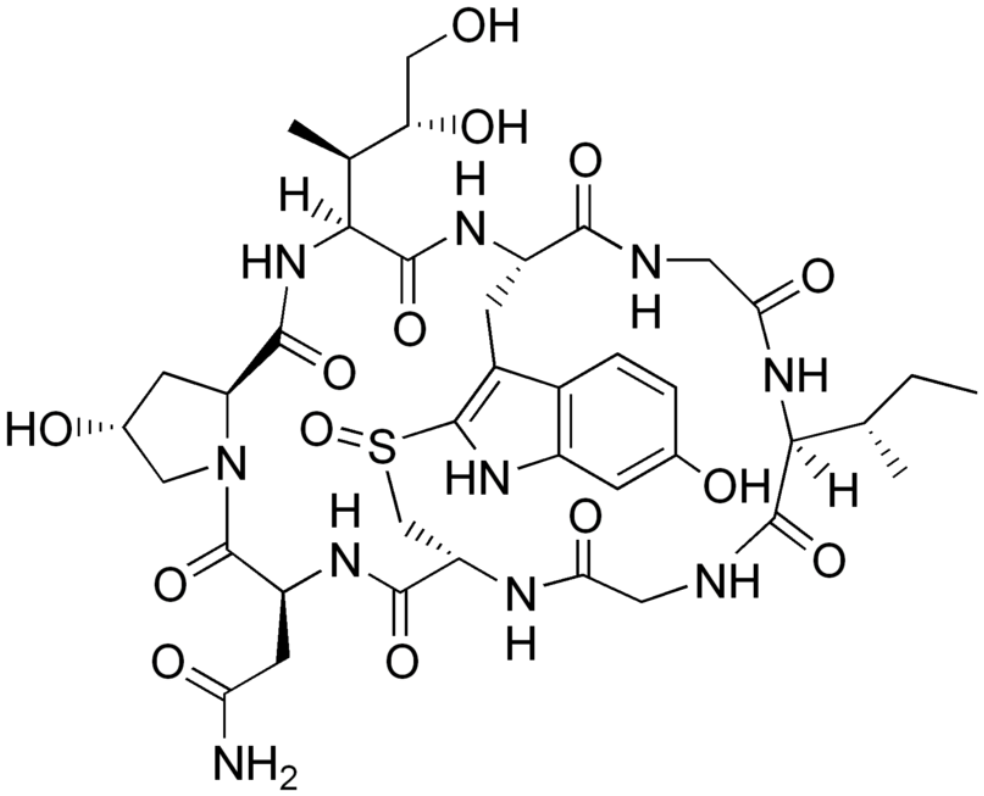
RNA pol III – syntéza tRNA, 5S RNA (jádro)

RNA pol IV - syntéza mitochondriální RNA

Mají stejný mechanismus účinku, rozlišují různé promotory

Amanitin

Inhibitor eukaryontních RNA polymeras (hlavně typu II)



Detailed Eukaryotic Description: Effects of the Deadly Amanitin Toxin From the Poisonous Amanita phalloides Mushroom. [online]. [cit. 2014-07-27]. Dostupné z: http://www.chem.uwec.edu/Webpapers2006/sites/zuehlkjt/WebPages/amanitintoxin.html

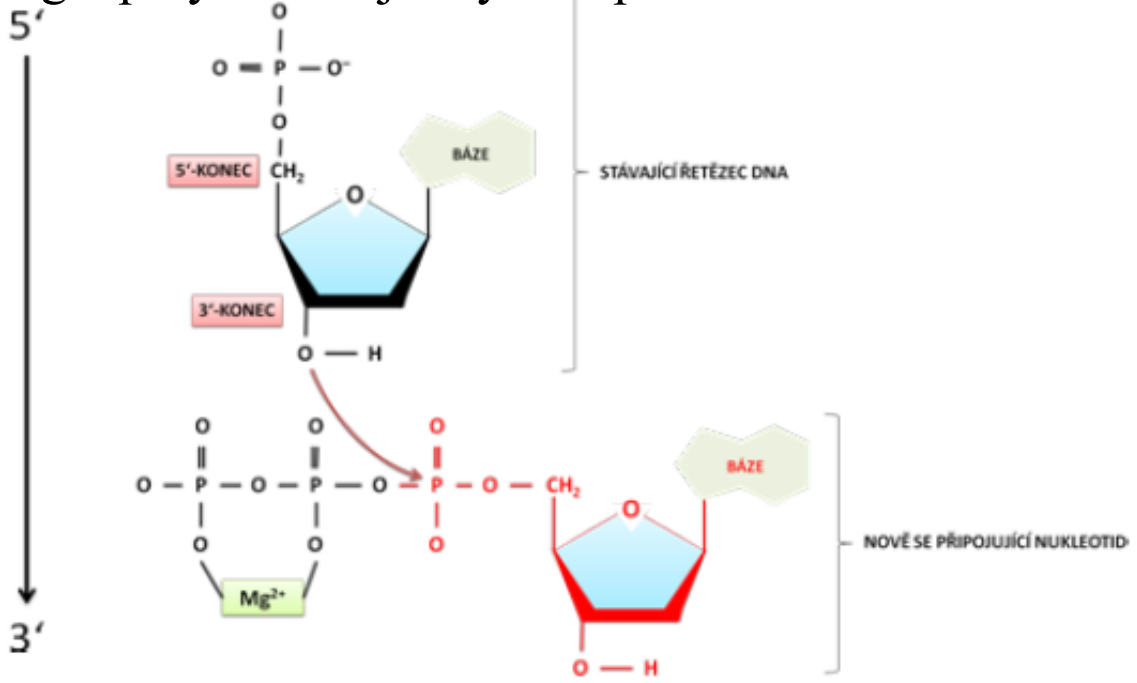
Wikipedie: Alfa-amanitin. [online]. [cit. 2014-07-27]. Dostupné z: http://cs.wikipedia.org/wiki/Alfa-amanitin

3 fáze transkripce

- iniciace
- elongace
- terminace

Účinek RNA polymeras

- Syntéza nové RNA probíhá ve směru 5´→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 vláknu a α-fosfátem navázaným na 5´OH ribosy vstupujícího nukleotidu
- energie polymerace je kryta štěpením NTP



+ PPi

NOVÁK, Jan. *Biochemie I.* Brno: Muni, 2009, s. 288.

Terminologie transkripce

Promotor – oblast DNA dlouhá asi 40 nukleotidů nacházející se před místem startu od 5´konce

Transkripční jednotka - oblast od promotoru k terminační oblasti

Boxy (elementy): malé sekvence obsažené v oblasti promotoru

Cis-působící sekvence: leží na molekule DNA, která je přepisována, v blízkosti genu

Trans-působící faktory : proteinové faktory vážící se na DNA (geny řídící jejich syntézy jsou na jiných chromozomech)

Primární transkript - RNA produkt nasyntetizovaný ve směru 5´→3´

Rozpoznání templátu

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

V místě promotoru se nachází konvenční sekvence

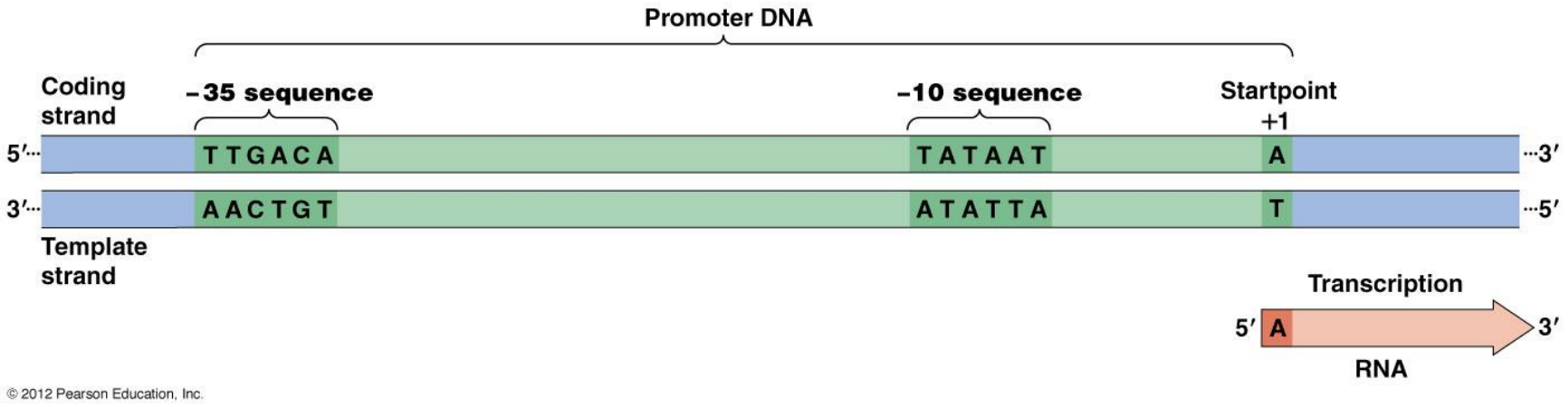
(sekvence, které se obecně najdou v určité oblasti mnoha zkoumaných genů)

Promotor u prokaryontů

V pozici ~ -10 obsahuje Pribnowův box TATAAT

V pozici ~ -35 další sekvence TTGACA

Tyto sekvence jsou rozeznány σ -faktorem prokaryotické RNA polymerasy



© 2012 Pearson Education, Inc.

BIOL2060: Gene Expression: Transcription. [online]. [cit. 2014-07-27]. Dostupné z: http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-21/CB21.html

Promotor u eukaryontů (RNA polymerasa III)

Transkripce eukaryontních genů je mnohem komplikovanější

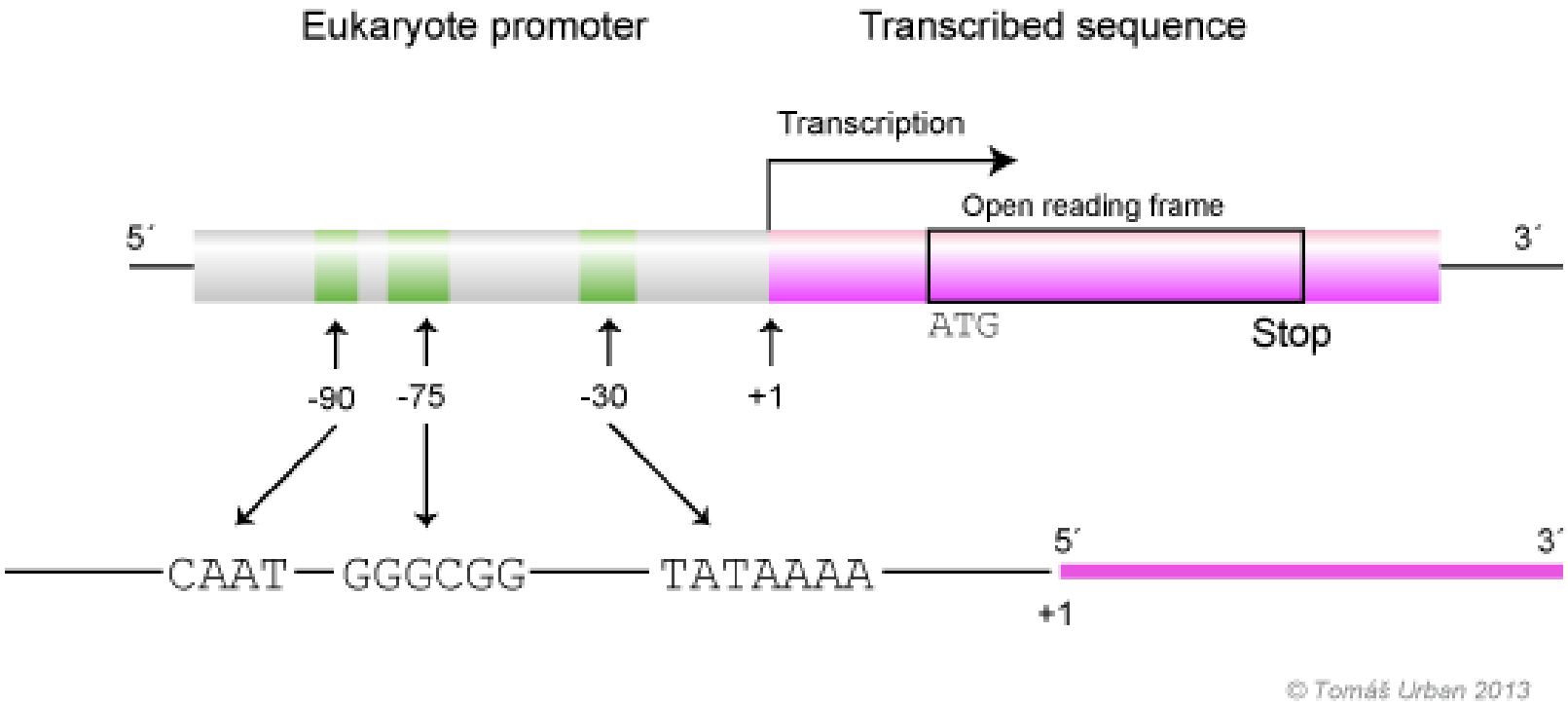
Je zapojena řada transkripčních faktorů, které se váží k různým úsekům DNA

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) (též nazývané enhancery, silencery)– vážou specifické transkripční faktory

Promotor u eukaryontů



Animal Genetics - Gene expression. [online]. 5.2.2013 [cit. 2014-07-27]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=307

Bazální transkripční faktory u eukaryontů

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

Jsou nezbytné pro rozpoznání promotoru a místa startu

Bazální = jsou potřebné pro transkripci všech genů

Bazální transkripční faktory

TFIID – největší z bazálních faktorů transkripce

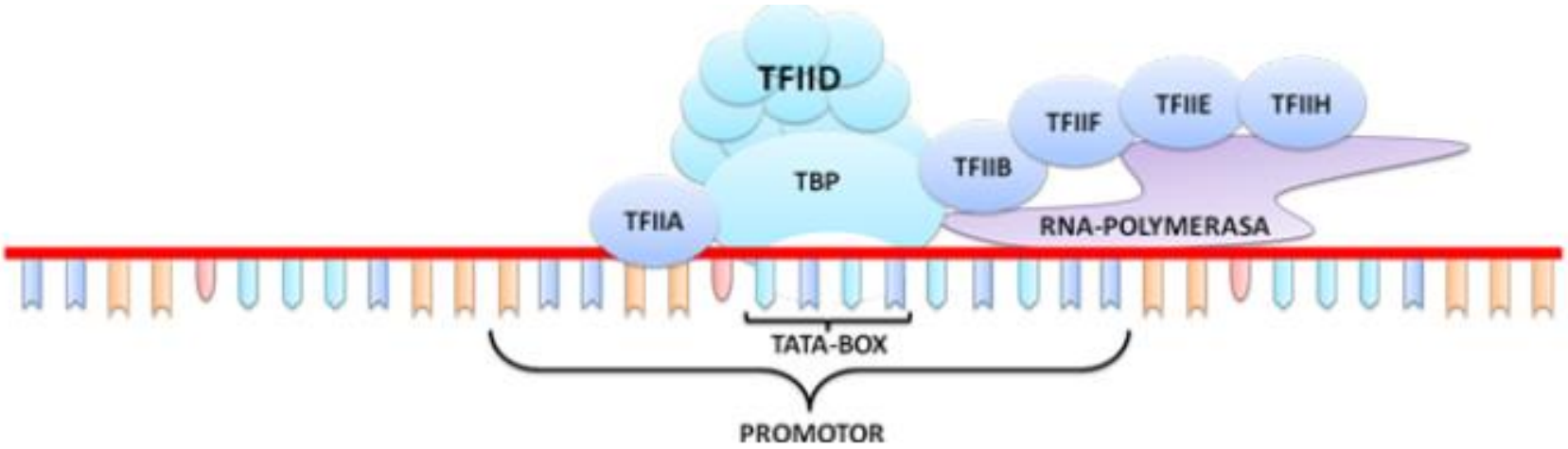
Má celkem 11 podjednotek

Jednou podjednotkou je TBP (TATA box binding protein).

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

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

Bazální transkripční faktory



NOVÁK, Jan. *Biochemie I*. Brno: Muni, 2009, s. 290.

Genově specifické regulační proteiny

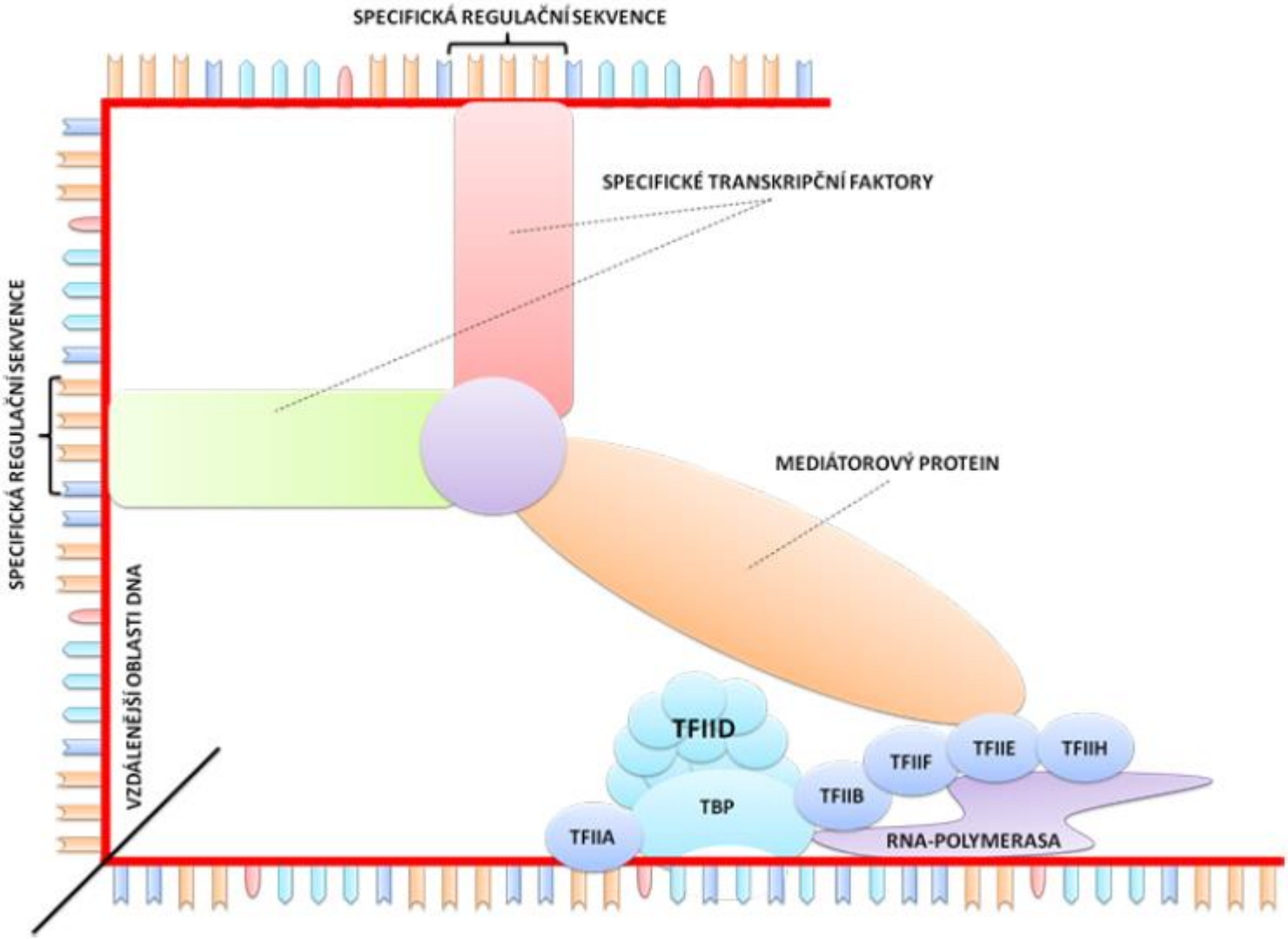
Specifické transkripční faktory - proteiny, které se vážou v regulačních sekvencích mimo promotor, často velmi vzdálených.

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.

Viz následující přednáška

Specifické transkripční faktory



NOVÁK, Jan. *Biochemie I.* Brno: Muni, 2009, s. 290.

Transkripční faktory a zahájení transkripce

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

Elongace

Je zahájena navázáním RNA-polymerasy v místě startu

RNA-polymerasa nevyžaduje primer

Využívá ATP,GTP, CTP a UTP, uvolňuje PP_i

RNA-polymerasa má rozplétací aktivitu, dochází rovněž k superstáčení

Účast topoisomeras při uvolňování superstáčení

Terminace

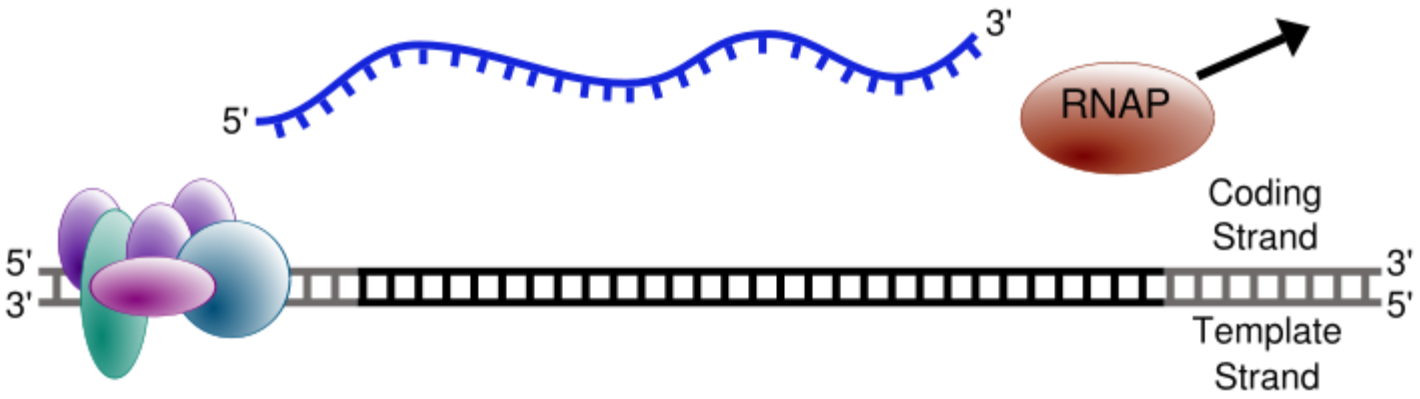
Proces elongace je ukončen při dosažení terminačního signálu

U prokaryontů je terminace

závislá na ρ faktoru

nezávislá na ρ faktoru

U eukaryontů je o terminaci málo známo



Wikibooks: An Introduction to Molecular Biology/Transcription of RNA and its modification. [online]. [cit. 2014-07-27]. Dostupné z: http://en.wikibooks.org/wiki/An_Introduction_to_Molecular_Biology/Transcription_of_RNA_and_its_modification

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

NOVÁK, Jan. *Biochemie I.* Brno: Muni, 2009, s. 294.

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

Úprava hnRNA v jádře

- Chemická modifikace (navázání 5´ čapky) – 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 odpovídajích intronům)

- Polyadenylace (adice 3´ polyA) – brání účinku 3´exonukleas

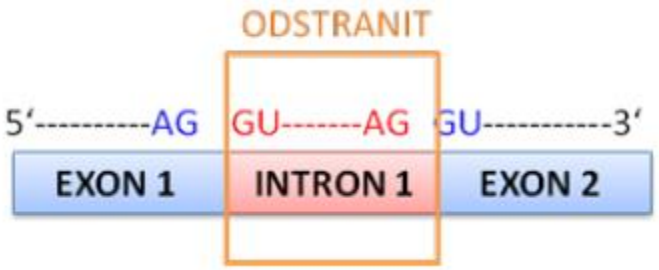
Sestřih hnRNA - splicing

Probíhá působením jaderných enzymových komplexů – splicesomů

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

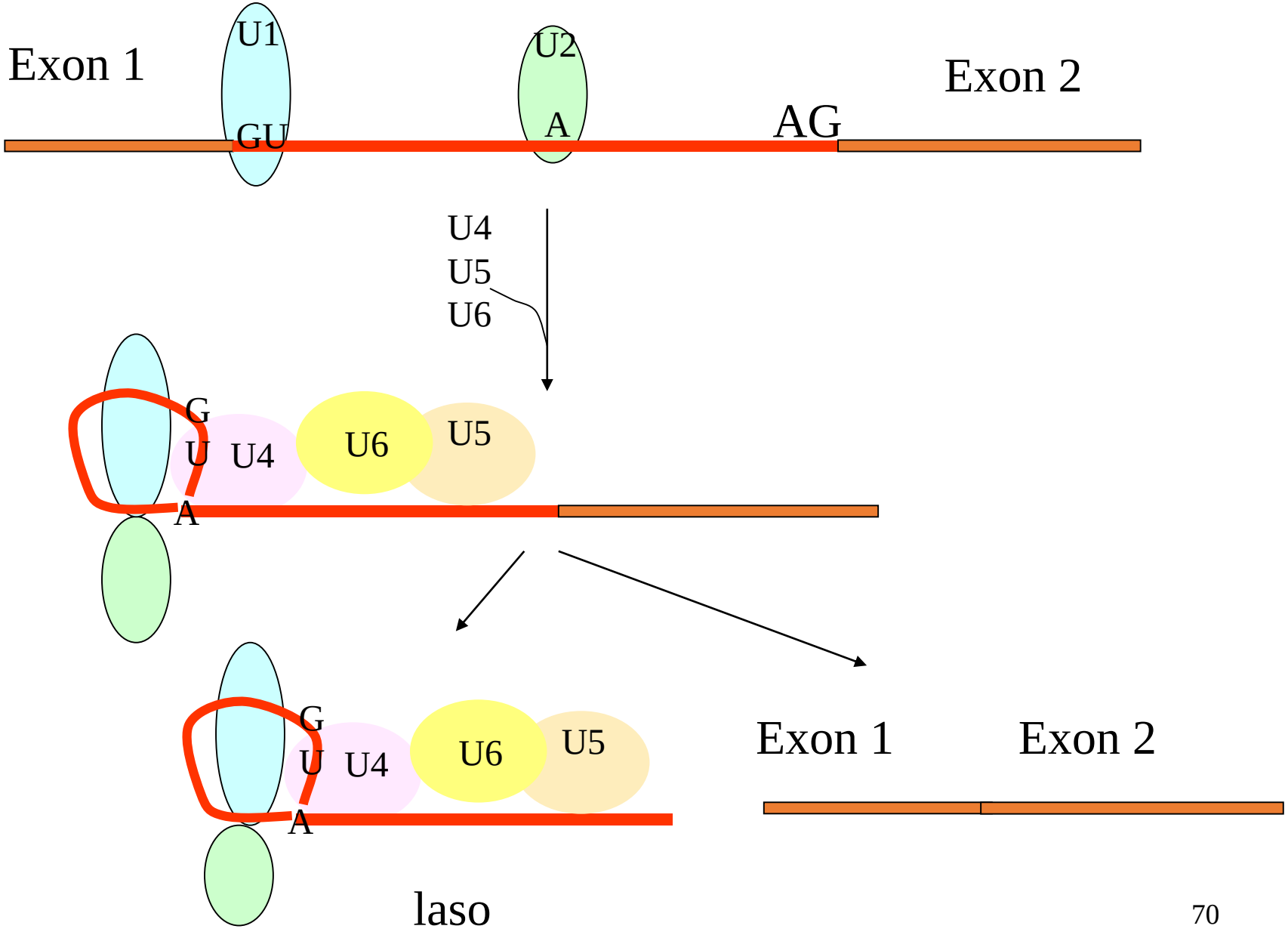
Jsou asociovány s proteiny a tvoří snRNPs (small nuclear ribonucleoprotein particles).

Sekvence AGGU určují hranice mezi intronem a exonem



NOVÁK, Jan. *Biochemie I.* Brno: Muni, 2009, s. 294.

Sestřih


Exon 1
U1
GU
U2
A
AG
Exon 2
U4
U5
U6
G
U
U4
U6
U5
A
G
U
U4
U6
U5
A
Exon 1
Exon 2
laso

Mechanismus sestřihu

Snurps U1-U se vážou k intronu

U1 se váže v blízkosti spojení exon1-intron a U2 se váže v oblasti, kde je obsažen adeninový nukleotid

Vytváří se smyčka – fosfát vázaný ke G na 5´-konci intronu tvoří vazbu 2´-5´s 2´-OH skupinou adeninového nukleotidu

Na konci exonu 1 proběhne štěpení mezi AG na 3´konci exonu a GU na 5´konci intronu

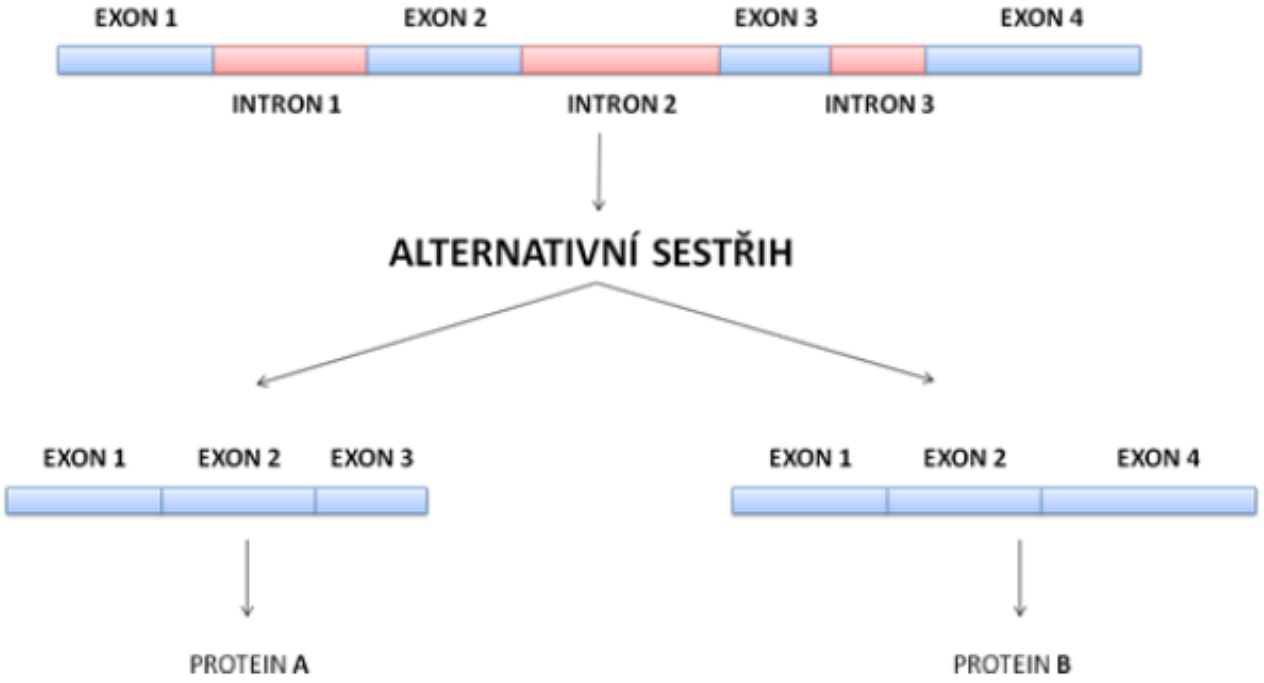
Pak následuje štěpení na 3´konci intronu v místě AG sekvence

Exony se spojí, intron je uvolněn a degradován na nukleotidy

Alternativní sestřih

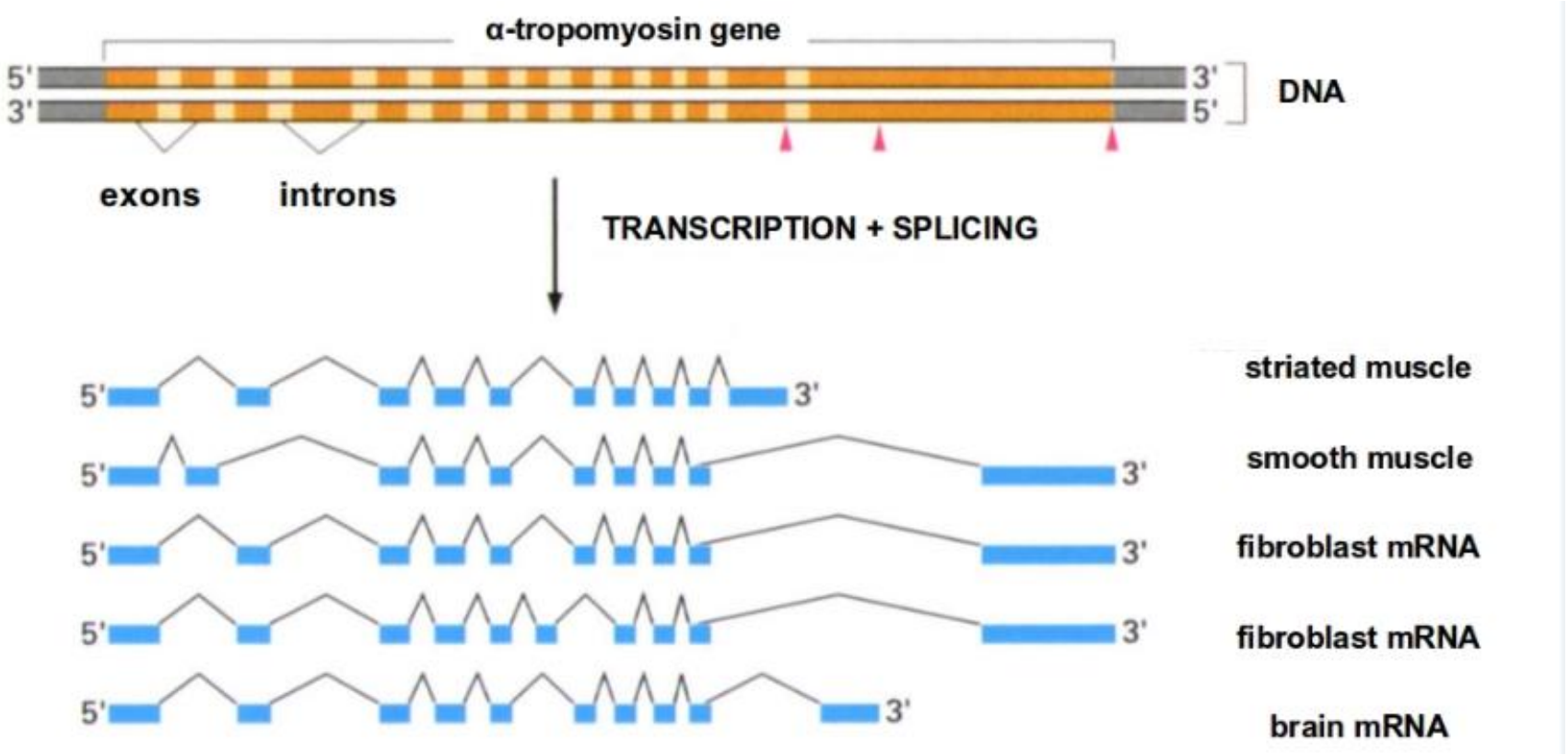
Při typickém sestřihu jsou všechny exony primárního RNA transkriptu spojeny dohromady za vzniku mRNA pro syntézu specifického proteinu

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



NOVÁK, Jan. *Biochemie I.* Brno: Muni, 2009, s. 294.

Alternativní sestřih mRNA



Architektura buněčného jádra a nemoc. [online]. [cit. 2014-07-27]. Dostupné z: http://lge.lf1.cuni.cz/heslo/priklady/files/abjan.html

Poruchy sestřihu

Vedou ke genetickým chorobám

Př. β - thalasemie:

β-podjednotka hemoglobinu se netvoří v normálním množství

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

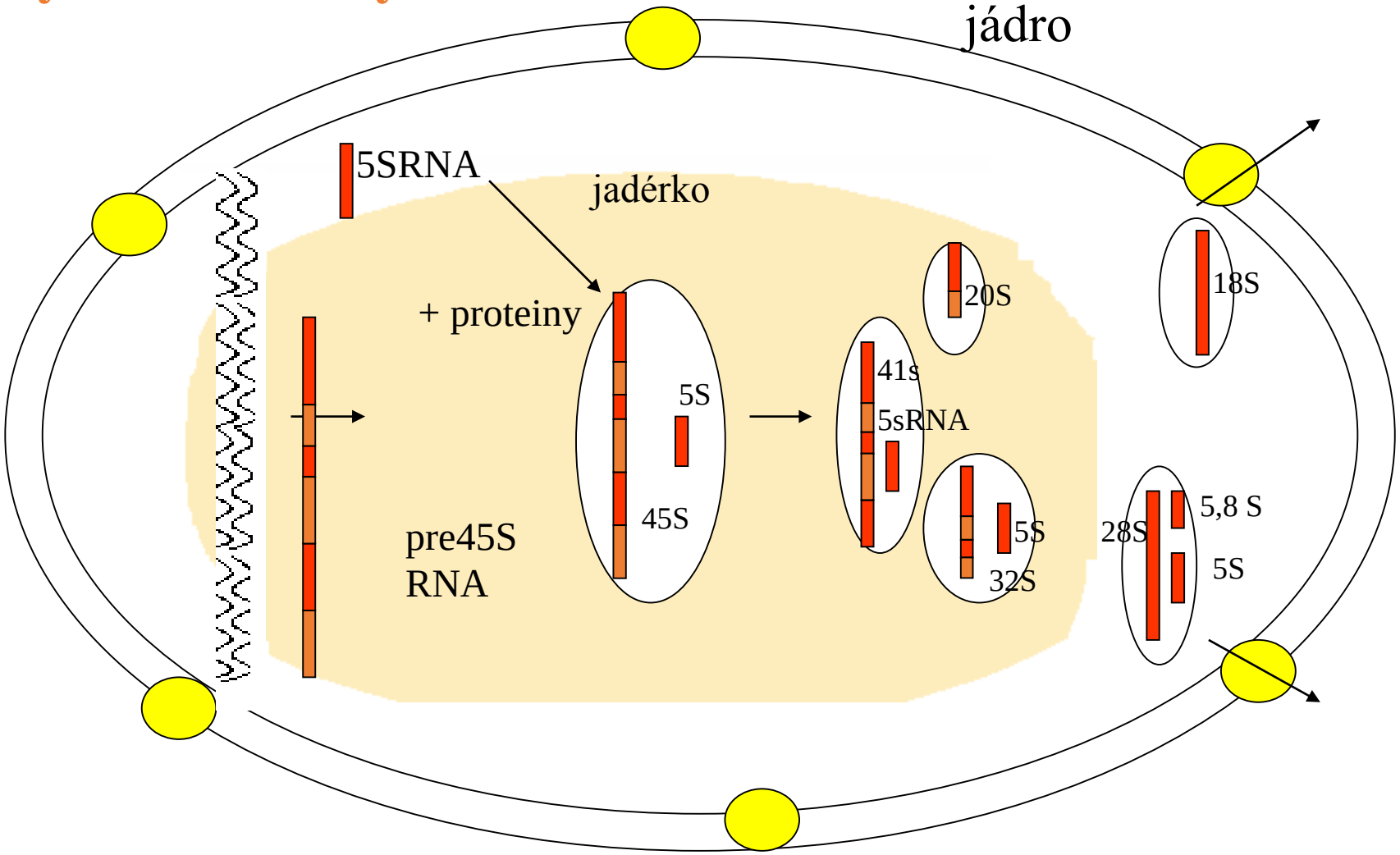
Přeskupování exonů (exon shuffling)

- Přítomnost početných intronů v DNA zvyšuje pravděpodobnost genetické rekombinace mezi exony rozdílných genů.

- Mnoho proteinů u současných buněk připomíná složeniny vzniklé ze společných sad kusů proteinů, které se nazývají proteinové domény.

- Přeskupování exonů - evoluční proces, při němž vznikají nové geny spojením dříve oddělených genů kombinací, které kódovaly různé proteinové domény

Syntéza eukaryontní rRNA



Syntéza eukaryontní rRNA

Jadérko:

45S RNA je syntetizována ve formě prekursoru preRNA

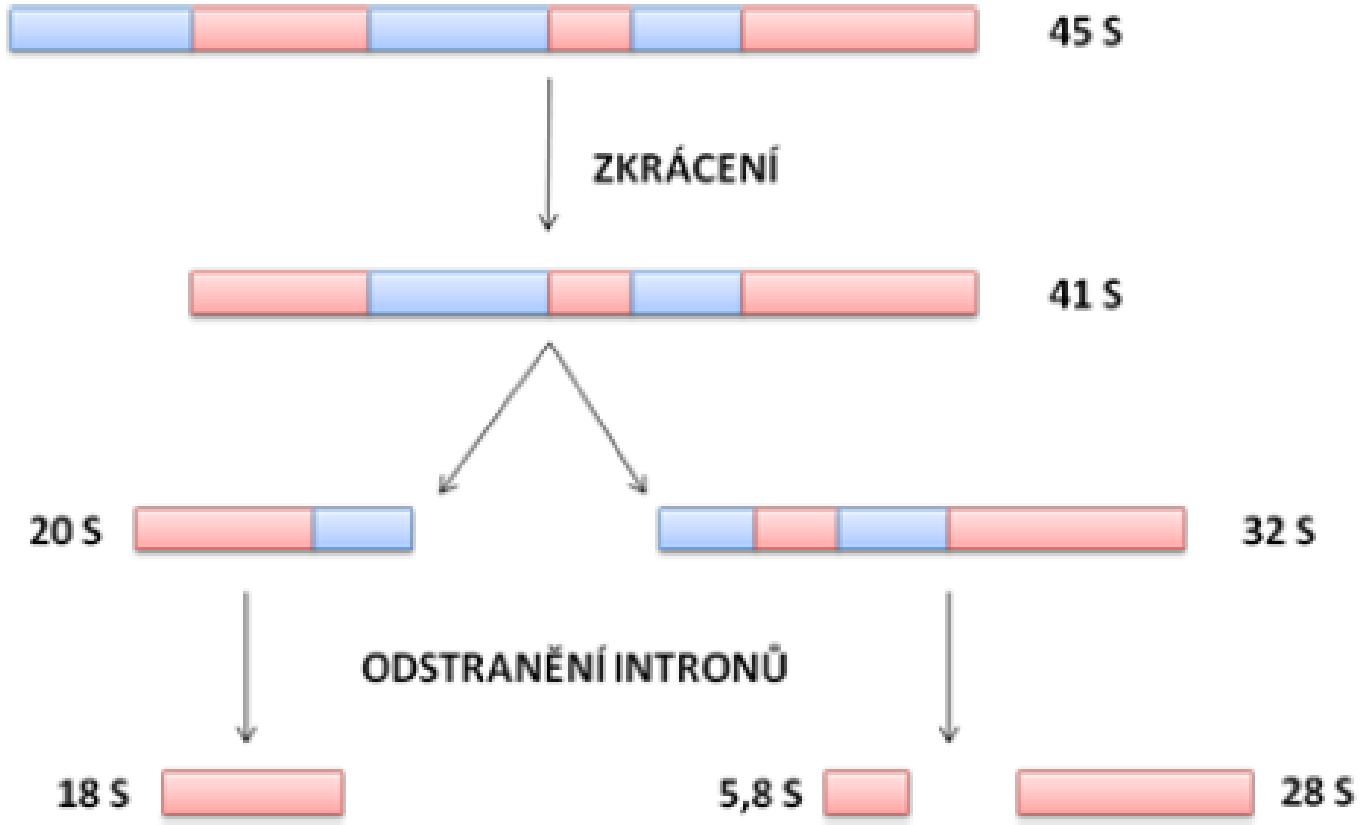
komplexace s proteiny – tvorba ribonukleoproteinů

Methylace a zkrácení

5S RNA syntetizována mimo jadérko, migruje do jadérka a připojuje se k ribonukleoproteinovým částicím

Transport zkrácených RNA do nukleoplasmy a přes jaderné póry do cytoplasmy. Tvorba ribosomů.

Úpravy 45 S eukaryontní rRNA



NOVÁK, Jan. *Biochemie I.* Brno: Muni, 2009, s. 295.

Syntéza eukaryontní tRNA

Syntéza ve formě pre t-RNA v jádře

Odštěpení intronů

Modifikace bází:

- methylace uracilu na thymin
- dehydrogenace uracilu
- vznik pseudouridinu (vazba C-C mezi uracilem a ribosou)
- deaminace adenosinu na inosin

a další

Připojení CCA sekvence na 3´konci

Migrace do cytoplasmy

Syntéza proteinů

Syntéza proteinů - translace

Kde: v buňkách obsahujících jadernou DNA

Kde v buňce: ribosomy (volné nebo vázané na ER, mitochondrie)

- prokaryonty: transkripce, úpravy transkriptu a translace nejsou prostorově odděleny
- eukaryonty: translace probíhá až je zralá mRNA dopravena do cytoplazmy

Které molekuly jsou potřebné pro syntézu proteinů?

Aminokyseliny

Řada enzymů

Bílkovinné faktory

ATP a GTP

Anorganické ionty (Mg^{2+}, K^{+})

Genetický kód

Proteiny – 20 AK

RNA – 4 báze

Každá aminokyselina je charakterizována tripletem bází v mRNA – **kodonem**

Celkem 64 kodonů → 61 kóduje aminokyseliny

3 jsou STOP kodony (UAA,UAG, UGA)

Nierenberg (1961) – poly(U) sekvence mRNA je předlohou pro syntézu polyfenylalaninu ⇒ sekvence UUU je kódem pro fenylalanin

Genetický kód

První báze	Druhá báze				Třetí báze
5´	U	C	A	G	3´
	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
U	Leu	Ser	Stop	Stop	A
	Leu	Ser	Stop	Trp	G
	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
C	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
	Ile	Thr	Asn	Ser	U
A	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Vlastnosti genetického kódu:

• degenerovaný (jedna aminokyselina může mít více než jeden kodon)

• jednoznačný (každý kodon specifikuje pouze jednu aminokyselinu)

• „kolísavý“ (třetí báze tripletu může být zaměněna)

• téměř universální (všechny organismy mají stejný genetický kód, je jen několik výjimek : např. v lidské mitochondriální mRNA triplet UGA kóduje trp namísto stop-kodonu, AUA koduje methionin místo leucinu)

• nepřekrývající se (každý kodon je čten jen jedenkrát)

• nepřerušovaný (kodony nejsou odděleny, triplety na sebe navazují)

Vztah mezi mRNA a proteinem

- Sekvence bází v mRNA je roztříděna do kodonů
- Startovací kodon zahajuje čtení úseku
- Pořadí kodonů v mRNA určuje pořadí, ve kterém jsou aminokyseliny připojovány v rostoucím polypeptidovém řetězci – čtení je určeno čtecím rámcem

Efekt mutací

Mutace jsou výsledkem poškození nukleotidů v DNA nebo neopravených chyb během replikace.

Mohou být přepsány do mRNA

Translací chybné báze může v proteinu vzniknout abnormální sekvence AK

Typy mutací

1. bodové ⟶ výměna jediné báze

a) mírné - neovlivní sekvenci AK v proteinu

např. CGA→CGG (obě sekvence kódují Arg)

b) měnící smysl – jedna AK je zaměněna jinou

např. GCA→CCA vyvolá záměnu arg prolinem

c) nesmyslné – vyvolají předčasnou terminaci řetězce

např. CGA →UGA, kodon pro Arg je nahrazen stop-kodonem

Typy mutací (pokr.)

2. inserce – vložení jednoho nebo více nukleotidů

3. delece – vypuštění jednoho nebo více nukleotidů

Porucha záleží na počtu vypuštěných nebo vložených nukleotidů

Jsou-li vypuštěny tři nukleotidy, nebo více trojic nukleotidů při zachování čtecího rámce, dojde k tvorbě polypeptidu s chybějícími AK

Je-li vypuštěn jeden nebo dva nukleotidy, dojde ke změně čtecího rámce a vznikají zkomolené sekvence AK, nesmyslné kodony atd.

Příklad bodové mutace

Bodové mutace v genech pro **hemoglobin:**

Je známo asi 800 strukturních variant lidského hemoglobinu

Většina je způsobena bodovou mutací a je neškodná.

Některé však vyvolávají choroby.

Methemoglobinemie – např. nahrazení jednoho histidinu tyrosinem⇒bílkovina je nepřístupná pro působení methemoglobin reduktasy, zvyšuje se methemoglobin v krvi

Srpková hemoglobinemie – nahrazení glutamátu valinem v pozici 6 β-řetězce ⇒ řetězec je méně rozpustný, dochází k řetězení ⇒ srpkovitý tvar erytrocytů

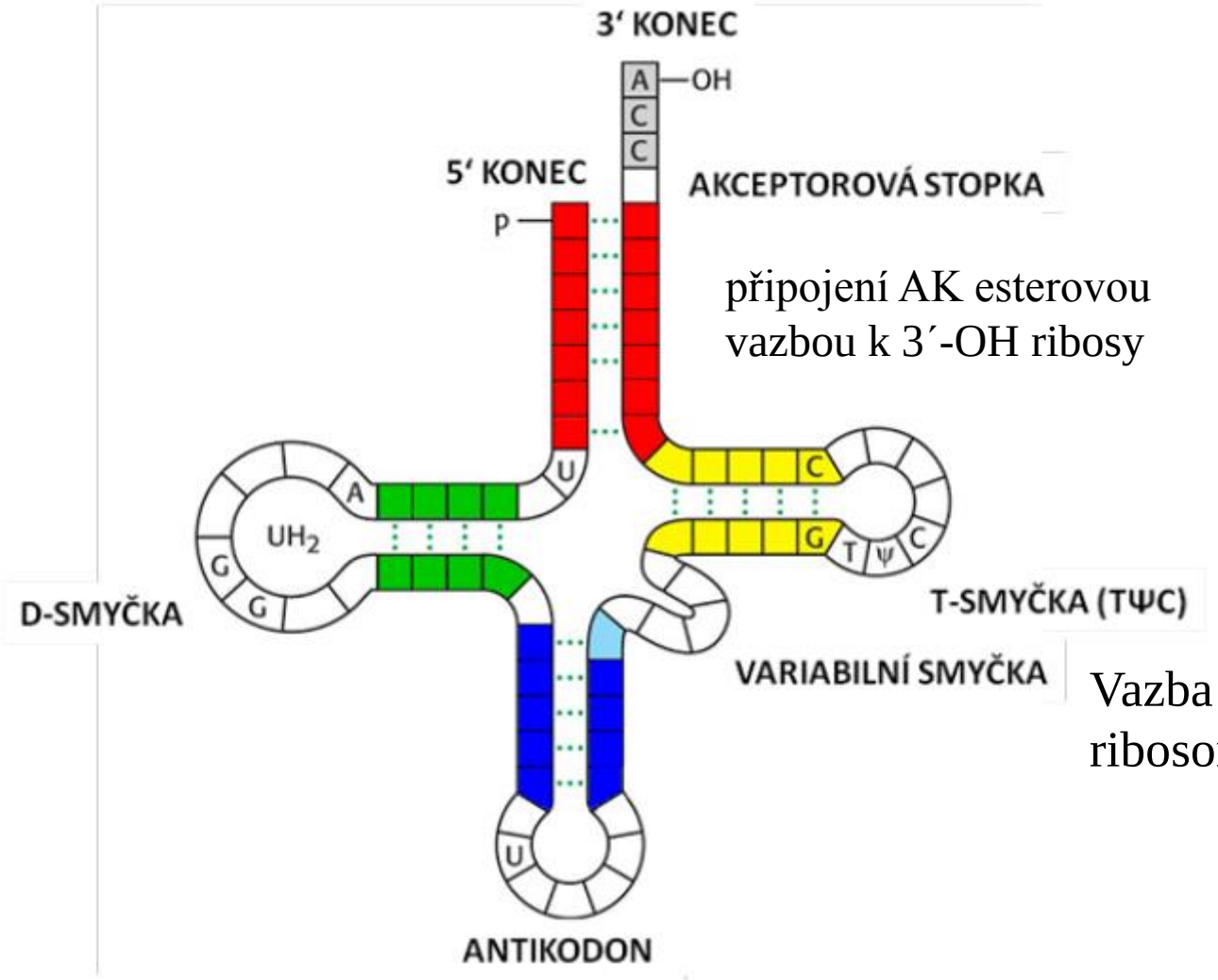
Syntéza proteinů podle kodonů:

Aminokyseliny nemohou přímo reagovat s bázemi

„adaptérem jsou tRNA molekuly“

- každá molekula tRNA obsahuje antikodon
- antikodon je triplet bází komplementárních ke kodonu mRNA
- každá tRNA může vázat specifickou AK na svém 3´-konci

Struktura tRNA



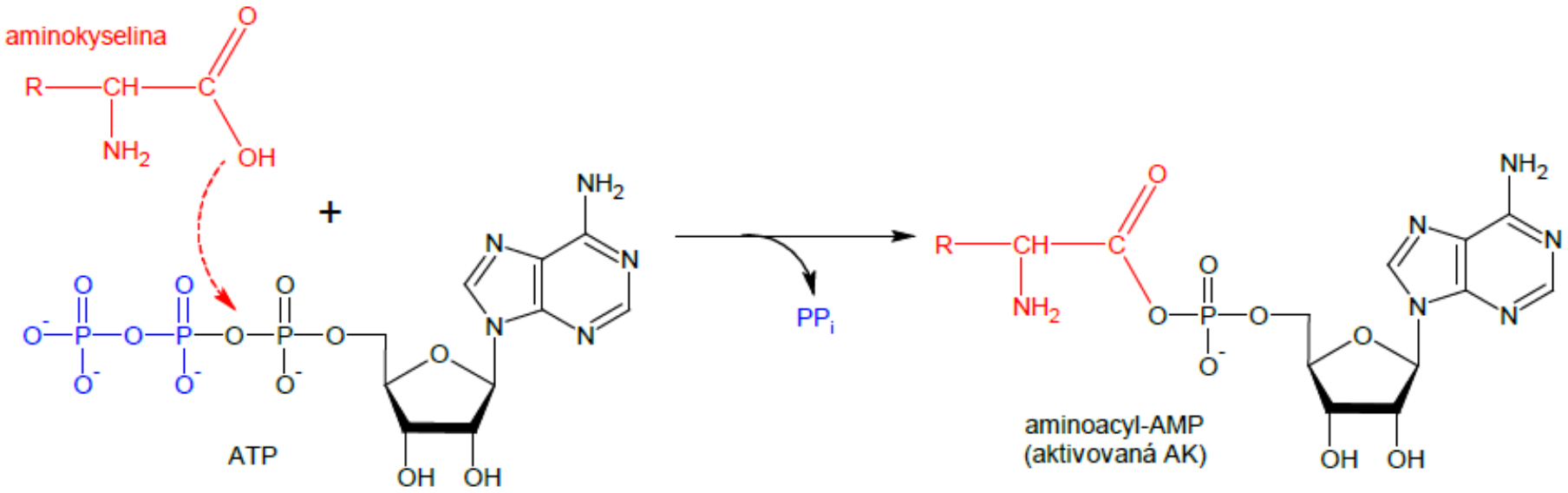
NOVÁK, Jan. *Biochemie I.* Brno: Muni, 2009, s. 298.

Tvorba aminoacyl-tRNA*

- aminokyselina je nejprve aktivována reakcí s ATP na aminoacyl-AMP
- aktivovaná AK je přenášena na 2´- nebo 3´- OH skupinu ribosy na 3´konci tRNA
- reakce je katalyzována specifickými enzymy (aminoacyl-tRNA synthetasy)
- reakce vyžaduje dodání energie

** tRNA s navázanou AK se nazývá „nabitá“ (charged) tRNA*

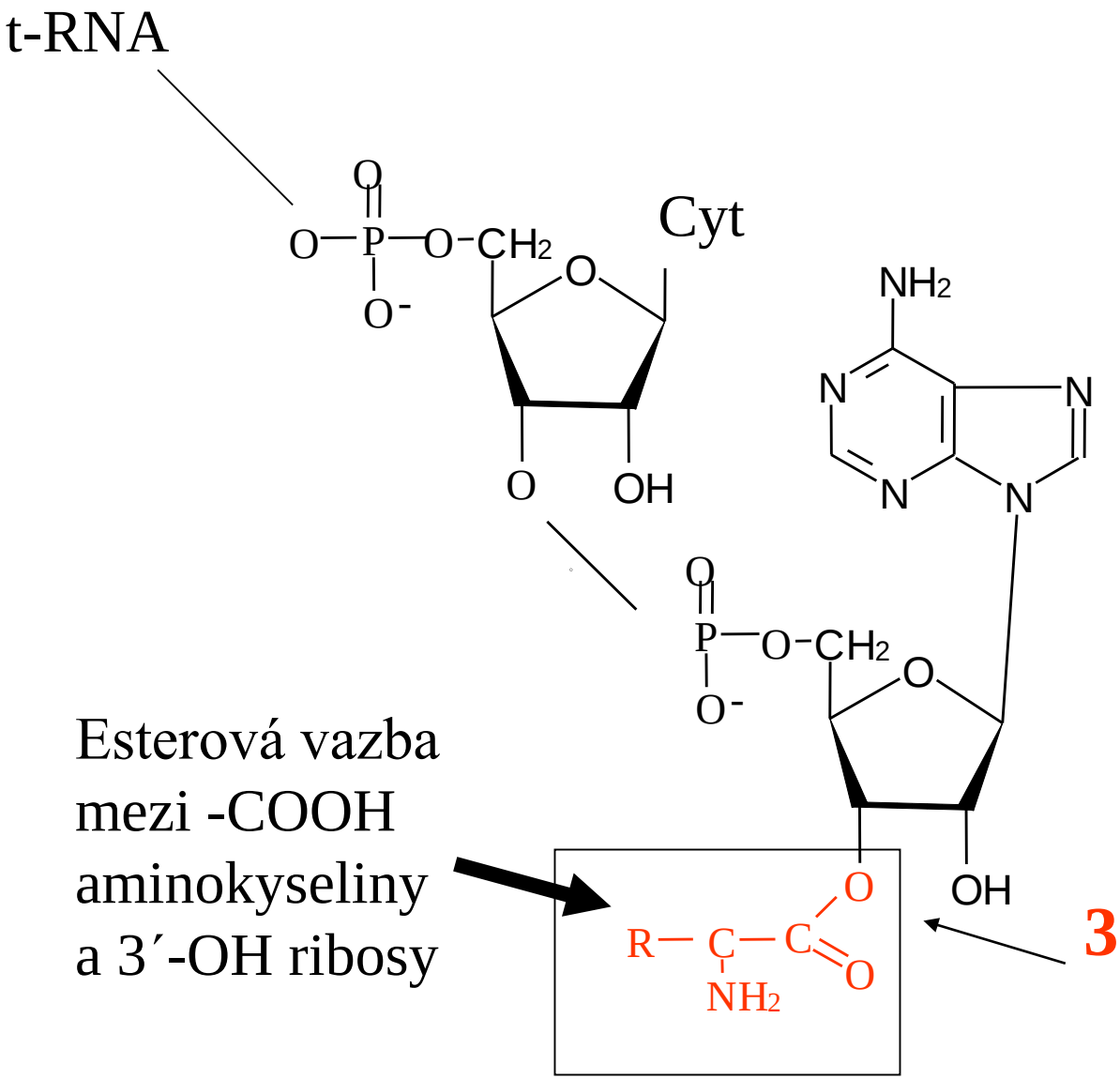
Aktivace AK



(smíšený anhydrid)

NOVÁK, Jan. *Biochemie I.* Brno: Muni, 2009, s. 300.

Přenos AK na 3´-konec transferové RNA



Fáze translace

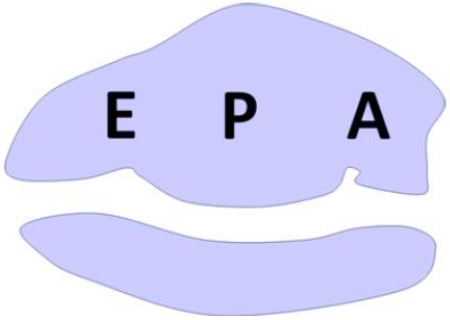
A. Inciace

B. Elongace

C. Terminace

Probíhají v cytoplazmě, ve vazbě na ribosomy

Ribosomy



NOVÁK, Jan. *Biochemie I*. Brno: Muni, 2009, s. 299.

Ribonukleoproteinové částice – složené z RNA a proteinů

Tvořeny velkou a malou podjednotkou

V inaktivním stavu podjednotky odděleny, při zahájení proteosyntézy agregují.

Na větší podjednotce tři vazebná místa pro molekuly tRNA – P, A, E

P-peptidyl-tRNA

A-aminoacyl-tRNA

E-volná tRNA (exit)

Prokaryotické X eukaryotické ribosomy

Vlastnost	Bakteriální	Lidský
Sedimentační konstanty:		
kompletní ribosom	70S	80S
Menší podjednotka	30S	40S
Větší podjednotka	50S	60S
Obsah RNA	65%	50%
	16S	18S
RNA-menší podjednotka	5S 23S	5S 5,8S 28S
RNA-větší podjednotka		
Umístění v buňce	Volně v cytoplazmě nebo vázané na plazmatickou membránu	Volně v cytoplazmě nebo vázané na membrány ER

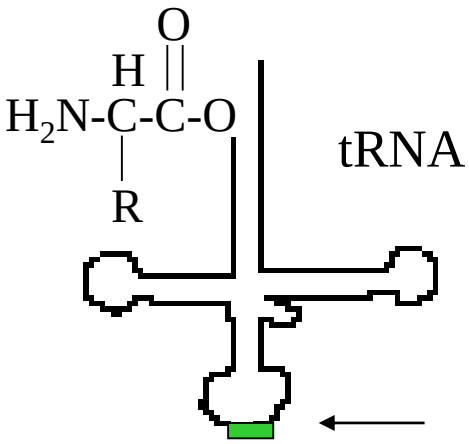
Iniciace

Tvorba iniciačního komplexu.

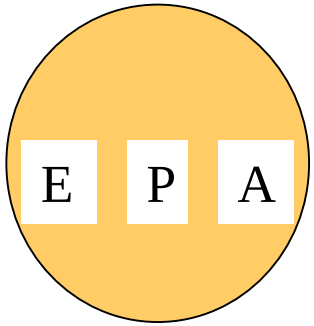
Rozdíly mezi eukaryonty a prokaryonty

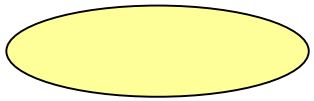
Děj	Eukaryonty	prokaryonty
Vazba mRNA k menší ribosomální podjednotce	Čapka na 5´konci mRNA váže IFs a 40S podjednotku obsahující t-RNA^{met}. mRNA je skenována po AUG	Shine-Dalgarno sekvence nad iniciačním AUG se váže ke komplementární sekvenci v 16S RNA
První AK	Methionin	Formyl-methionin
Iniciační faktory	eIFs(12 a více)	IFs (3)

Iniciace



Velká ribosomální podjednotka





Malá ribosomální podjednotka

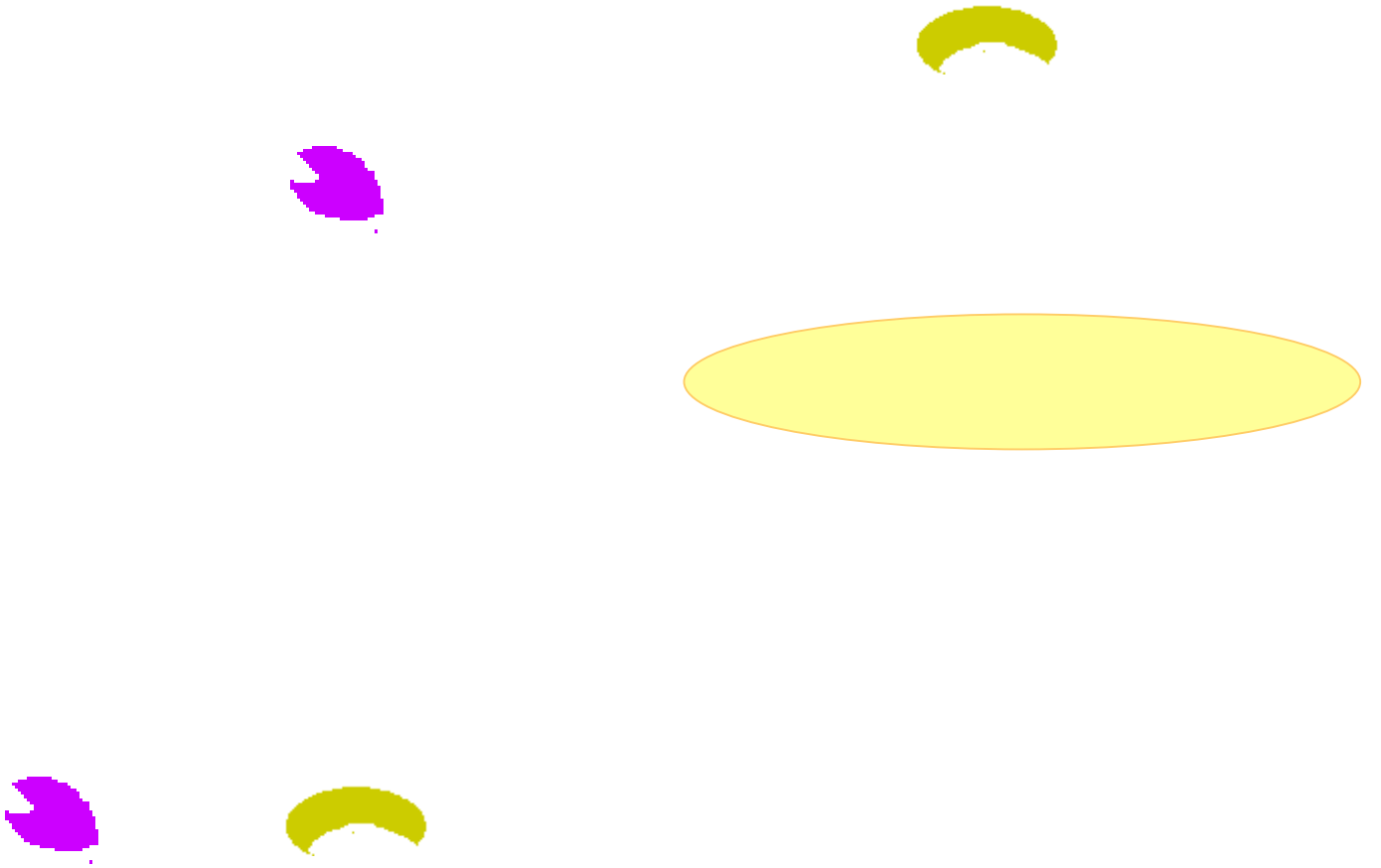
mRNA

5´ **G** 5´-P-P-P-5´-

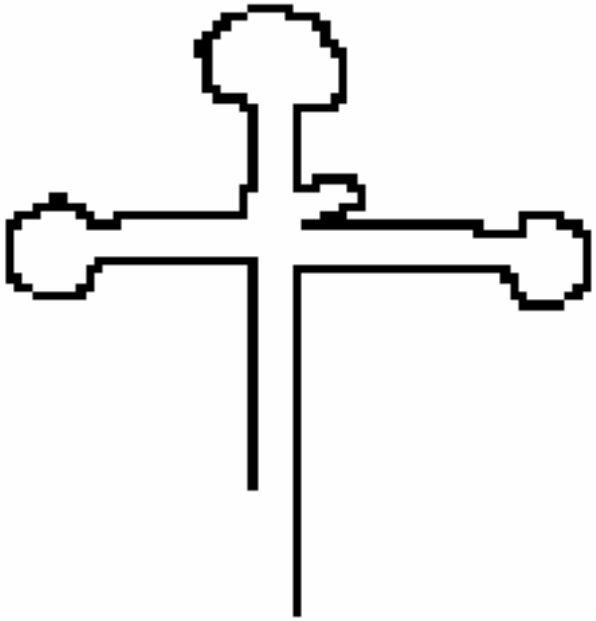
Guaninová čapka

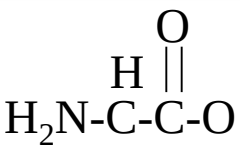
Iniciační faktory

Navázání faktorů eIF3 a eIF1A na menší podjednotku



Vazba aktivovaného Met na tRNAMet



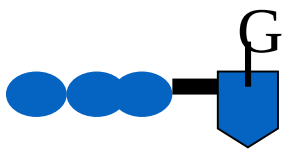


------- AMP

Met

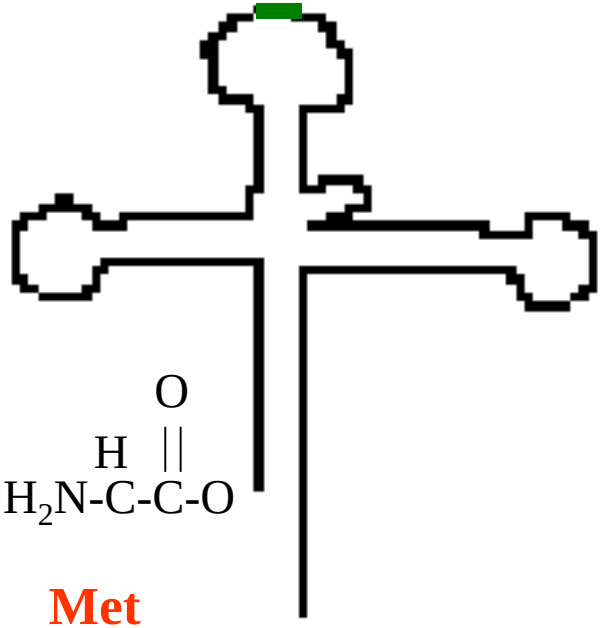
Vazba GTP k eIF2

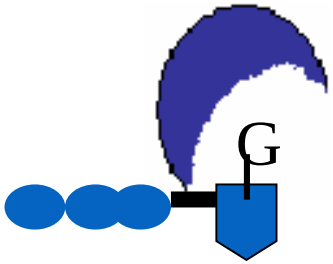
eIF2



GTP

Vazba komplexu GTP-eIF2 k t-RNAMet





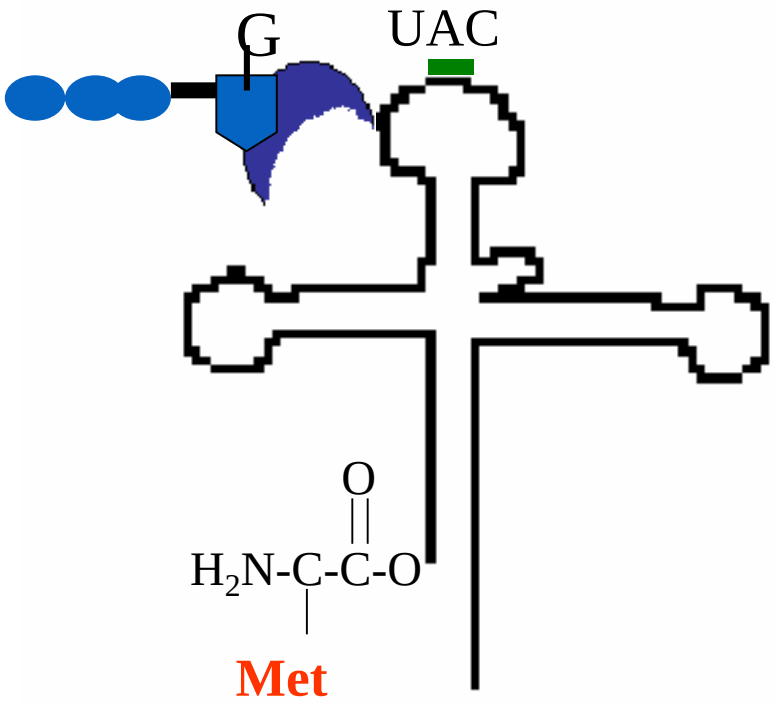
Na čepičku na 5´konci mRNA se váže CBP (cap binding protein)

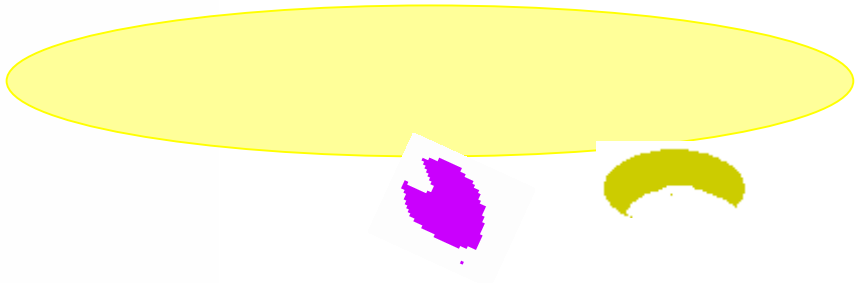
Součástí CPB je několik dalších iniciačních faktorů (eIFs)

5´ **G** 5´-P-P-P-5´- A C A U G U U G C C……

m-RNA

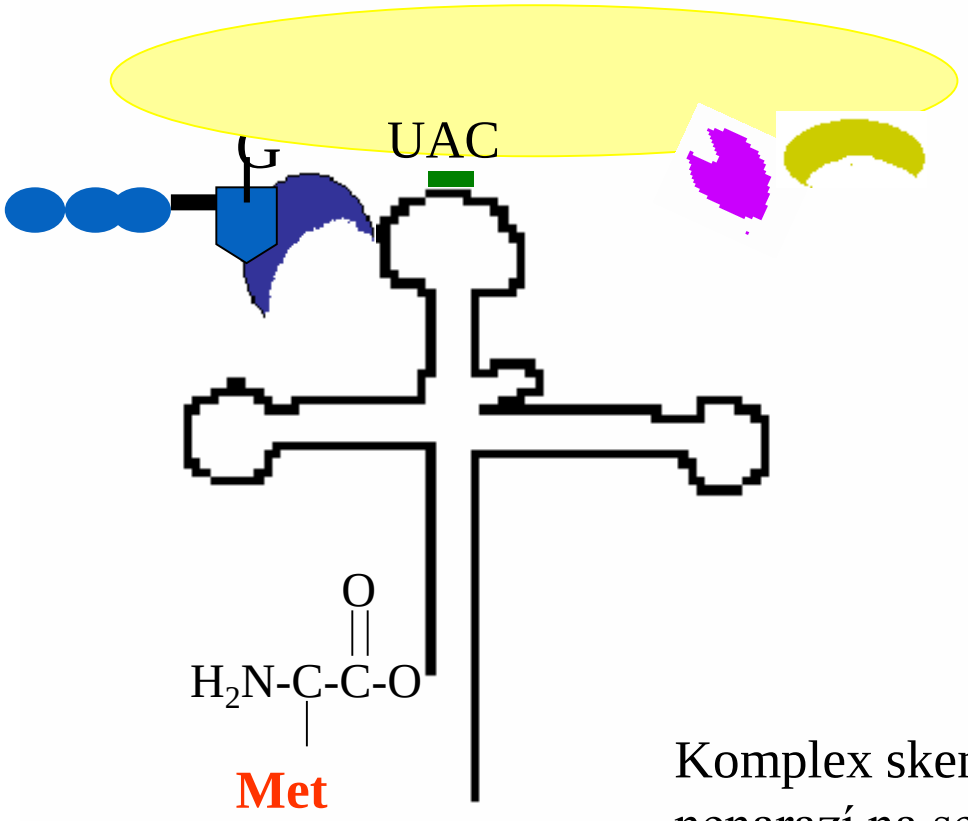
Vazba komplexu Met-tRNAMet, eIFs a GTP k menší ribosomální podjednotce 40S





Vazba m-RNA k preiniciačnímu komplexu

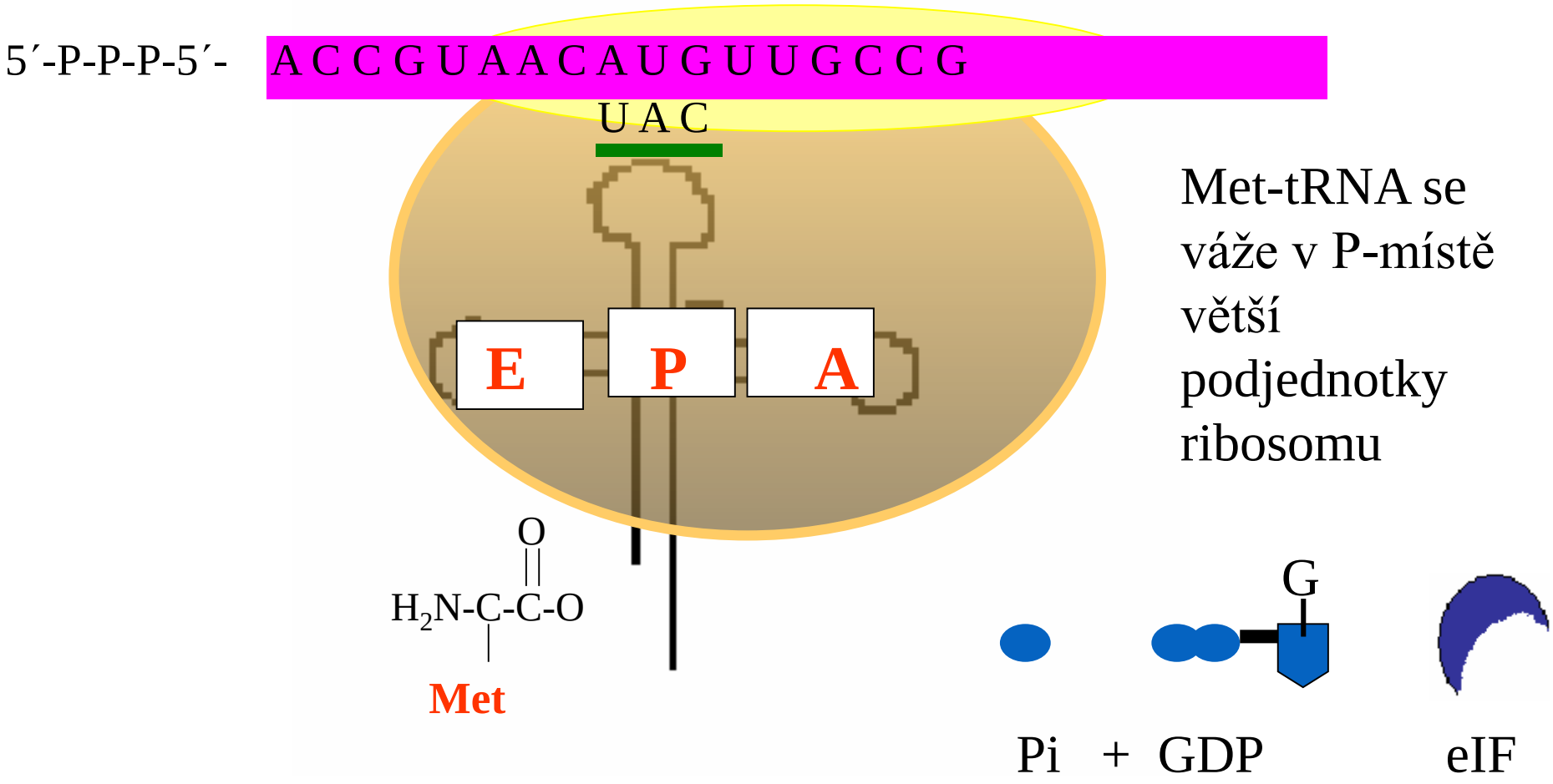
5´-P-P-P-5´- A C C G U A A C A U G U U G C C G



Komplex skenuje mRNA od 5´konce, dokud nenarazí na sekvenci AUG

Iniciační komplex 80S

- GTP je hydrolyzováno
- eIFs se oddělí
- připojí se větší ribosomální podjednotka



Rozdíly v iniciaci u prokaryontů a eukaryontů

	eukaryonty	prokaryonty
Vazba mRNA k malé ribos.podj.	Cap na 5´konci mRNA váže 40s rib.podjednotku obsahující tRNA, mRNA je skenována na AUG kodon	Nemá cap, Shin-Dalgarno sekvence nad iniciačním AUG se váže na komplementární sekvenci v 16s rRNA
První AK	methionin	formylmethionin
Iniciační faktory	12 a více	3
ribosomy	80s (40s a 60s)	70s (30s a 50s)

Faktor eIF2

zásadní význam pro zahájení translace

jeho fosforylovaná forma je neaktivní

Příklad regulace syntézy proteinu:

Syntéza globinu v retikulocytech

• Při nepřítomnosti hemu v retikulocytu je eIF fosforylován ⇒ neaktivní

• Přítomnost hemu inhibuje kinasu, která fosforyluje eIF2 ⇒ syntéza probíhá

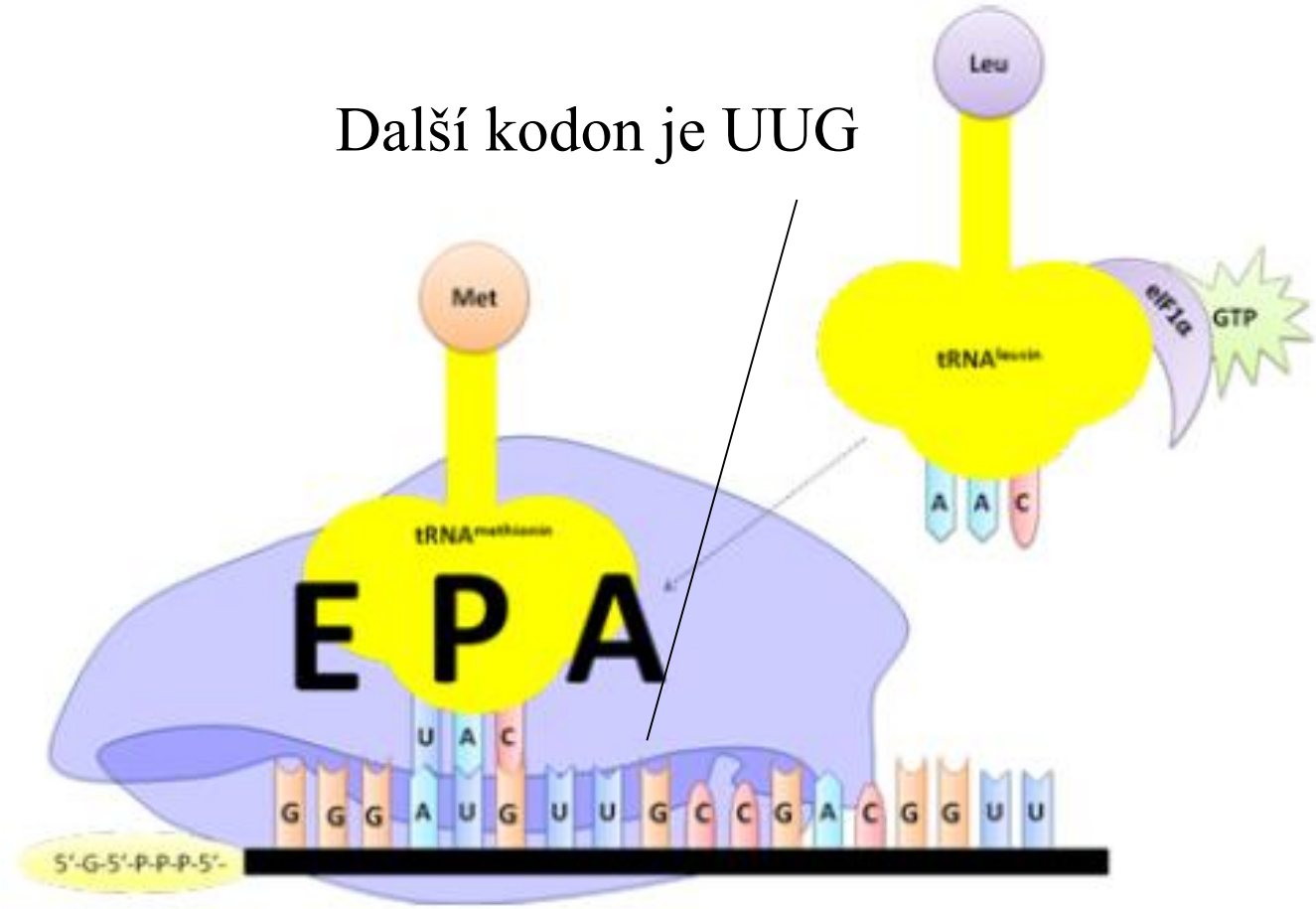
Kinasa eIF2 je aktivována také při virových infekcích, hladovění.

Elongace peptidového řetězce

- tvorba další aminoacyl-tRNA
- vazba aminoacyl-tRNA do místa A ribosomu
- tvorba peptidové vazby
- translokace peptidyl-tRNA do místa P

Která další AK bude připojena?

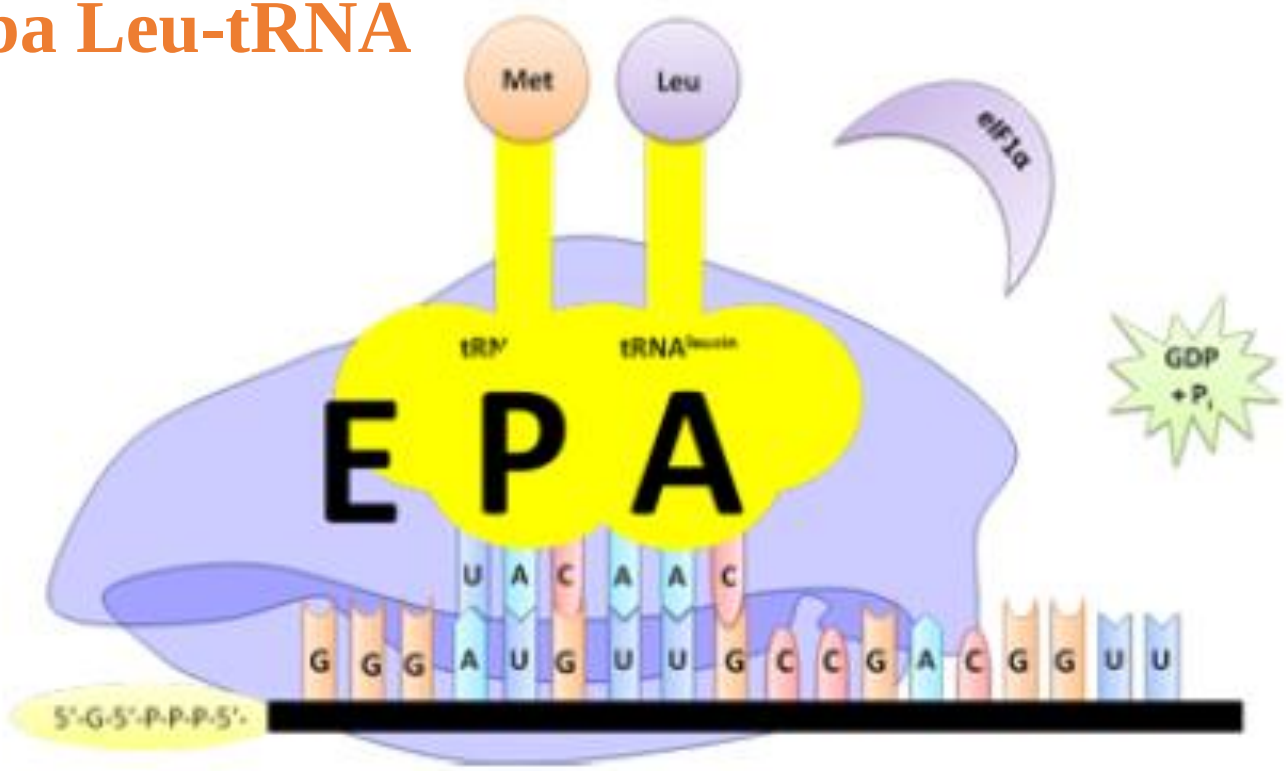
Další kodon je UUG



Antikodon je AAC
Aminokyselinou je leucin

NOVÁK, Jan. *Biochemie I.* Brno: Muni, 2009, s. 303.

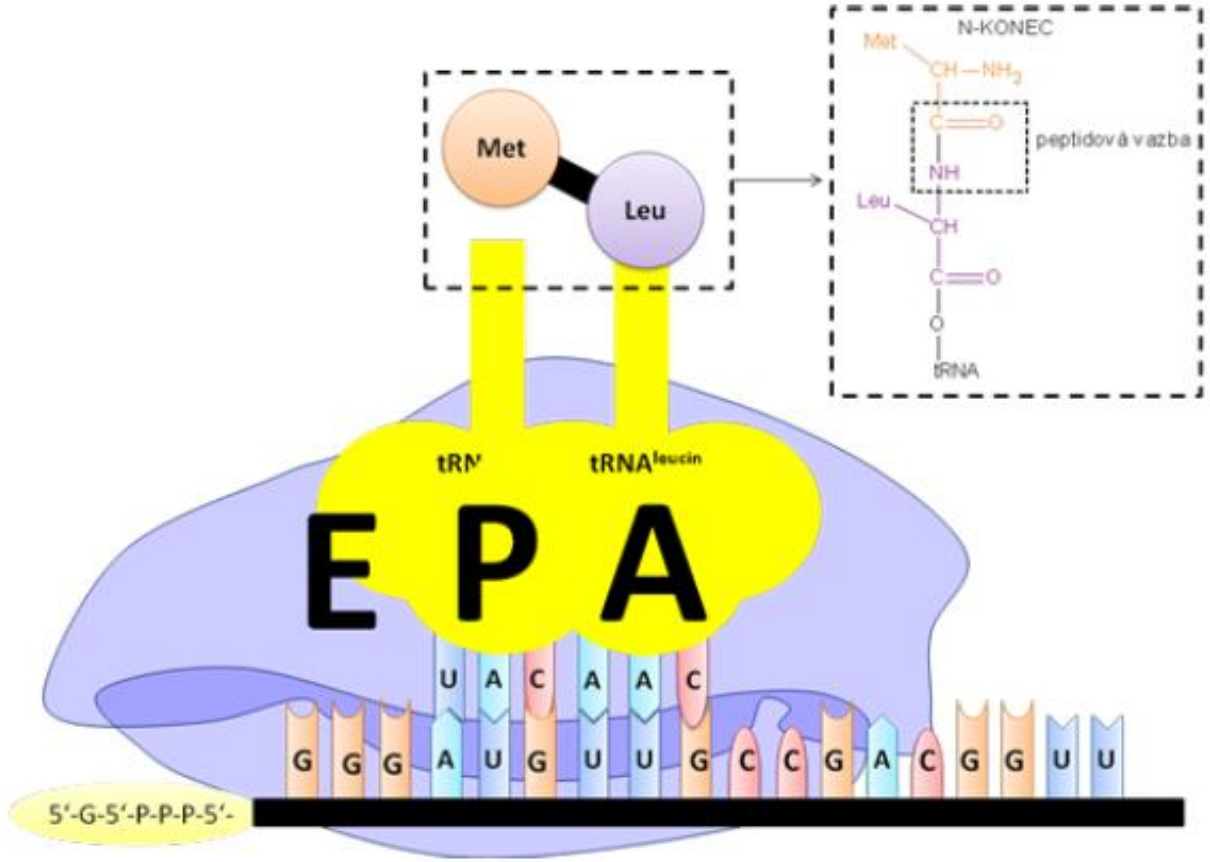
Tvorba Leu-tRNA



1. Aktivace leucinu reakcí s ATP → leucinyladenylát
2. tvorba leu-tRNA
3. + vazba GTP a EF1α

NOVÁK, Jan. *Biochemie I.* Brno: Muni, 2009, s. 303.

Komplex Leu-tRNA+GTP+EF1α se váže do místa A, GTP je hydrolyzováno na GDP + Pi, komplex GDP-EF1α se uvolní



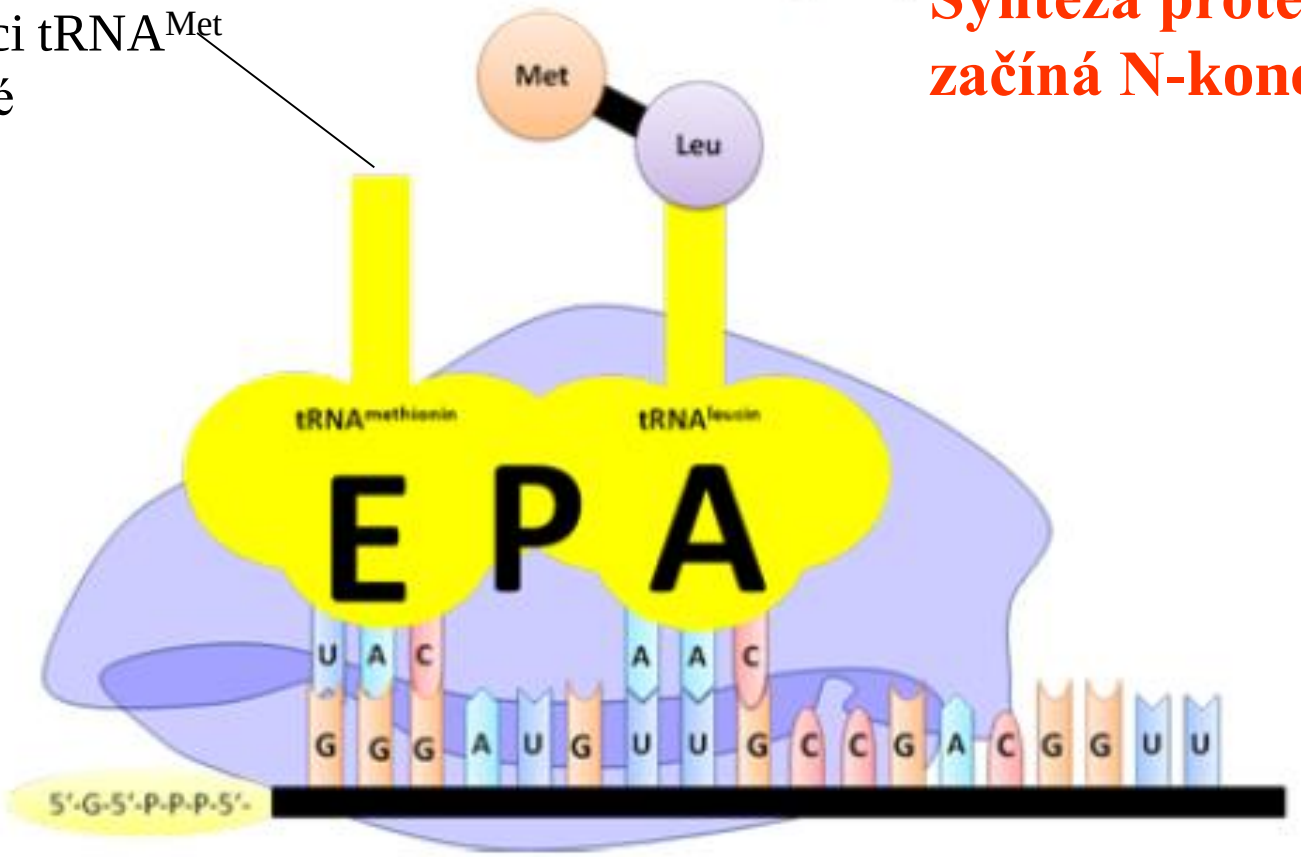
Proces elongace je u prokaryotů a eukaryontů velmi podobný (odlišné kofaktory elongace)

NOVÁK, Jan. *Biochemie I.* Brno: Muni, 2009, s. 304.

Tvorba peptidové vazby (transpeptidace)

Peptidyltransferasa katalyzuje odštěpení methioninu od tRNA a přenesení na leucin za vzniku peptidové vazby

Vazebné místo na 3´-konci $tRNA^{Met}$ je volné



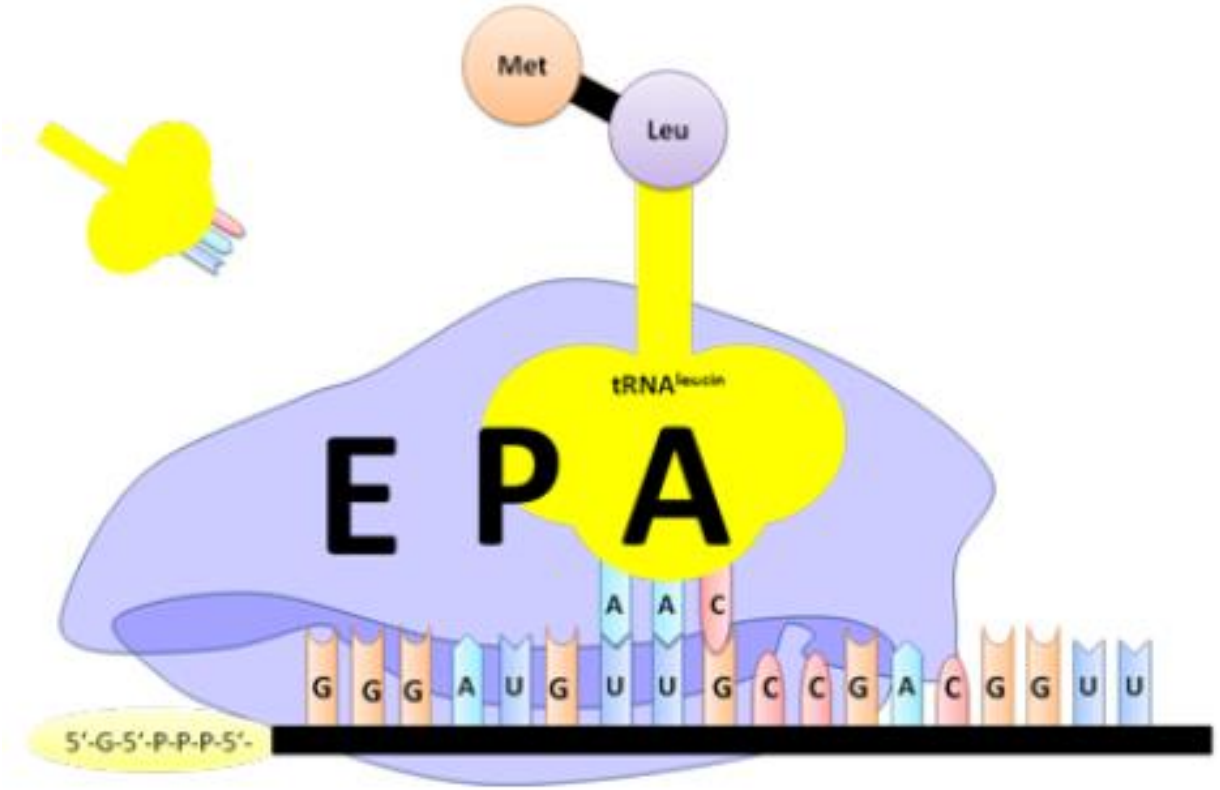
Syntéza proteinů začíná N-koncem

NOVÁK, Jan. *Biochemie I.* Brno: Muni, 2009, s. 304.

Uvolnění tRNA

+ EF2 + GTP

(k ribosomu se váže EF2 a GTP)



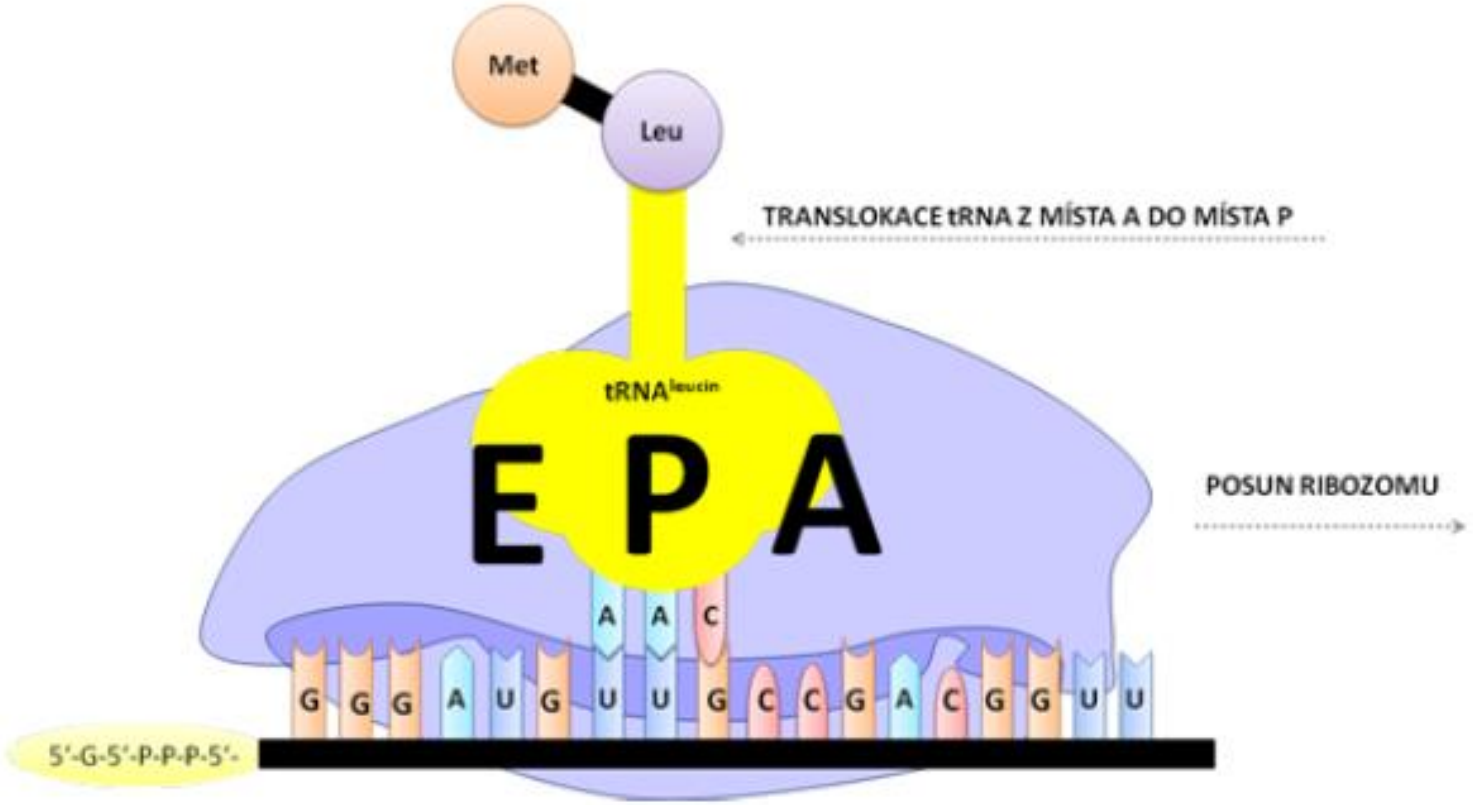
GTP je hydrolyzováno, EF2 se opět uvolní

$tRNA^{Met}$ se přesouvá do místa E, P místo se uvolní

+ EF2 + GDP+Pi

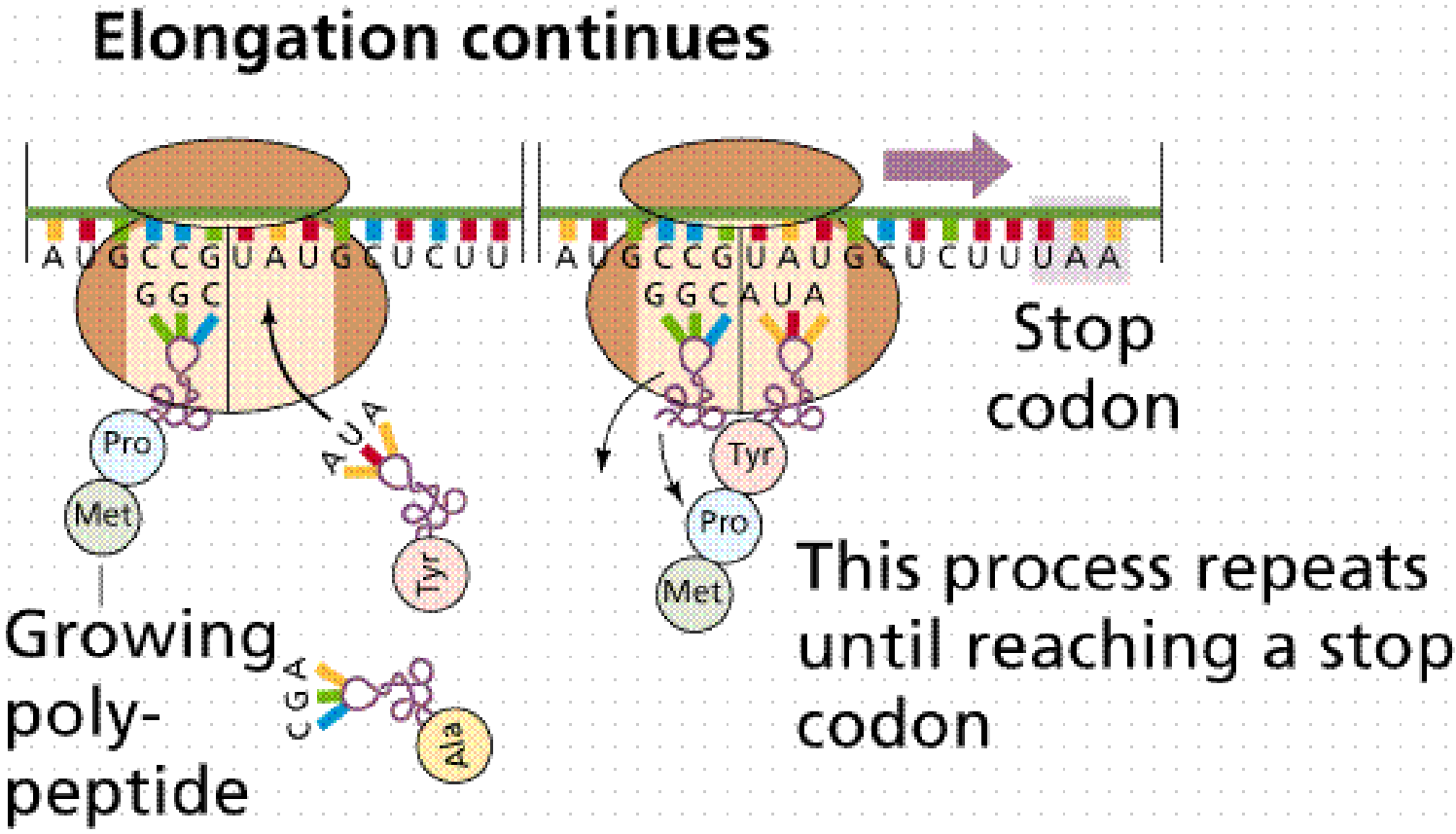
NOVÁK, Jan. *Biochemie I.* Brno: Muni, 2009, s. 304.

Translokace



Vzájemný posun ribosomu
a mRNA o jeden kodon

Další elongace



Protein Synthesis. [online]. [cit. 2014-08-15]. Dostupné z: http://www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/584proteinsyn.html

Do místa A se navazuje další tRNA s navázanou AK

Které další kroky budou následovat?

Terminace

• Elongace pokračuje dokud se terminační (Stop) kodon neposune k místu A na ribosomu

• V cytoplazmě není žádná tRNA schopná vázat se ke Stop-kodonu

• K ribosomu se navážou uvolňovací faktory (releasing factors)

• Peptidyltransferasa hydrolyzuje vazbu mezi peptidovým řetězcem a tRNA

• Nově syntetizovaný peptid je uvolněn z ribosomu

• Ribosom disociuje na podjednotky, mRNA se uvolní

Energetická bilance

		Ekvivalent ATP
Vznik aminoacyl-tRNA	ATP→ AMP + 2 Pi	2
Vazba aminacyl-tRNA do místa A	GTP → GDP + Pi	1
Přesun peptidyl-tRNA na místo P	GTP → GDP + Pi	1
		4 ATP

Na syntézu jedné peptidové vazby je potřeba 4 ATP.

Další energie je potřebná pro iniciaci a syntézu nukleotidů.

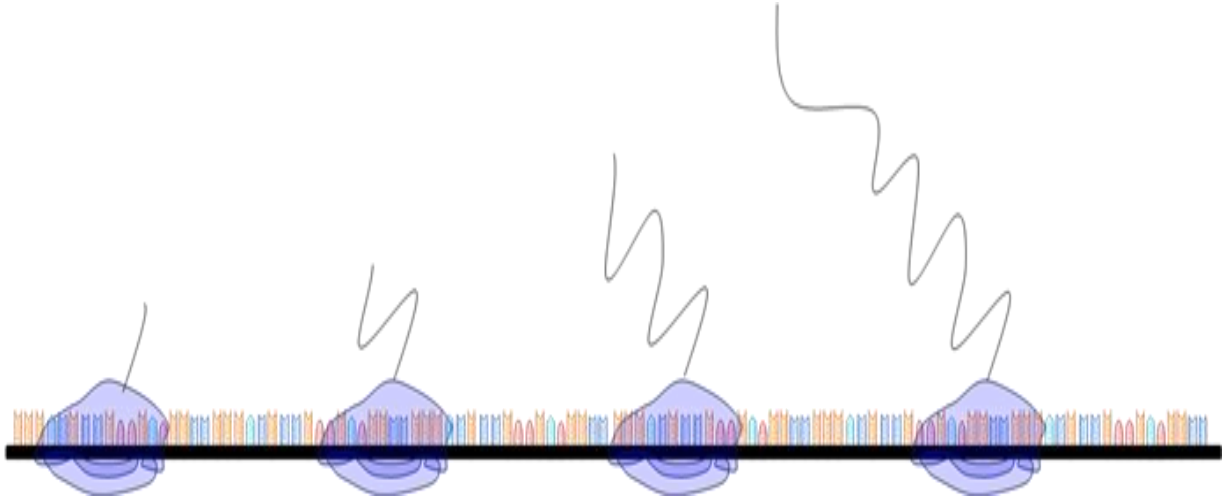
Rychlost proteosyntézy

U prokaryontů – 1 peptidová vazba/ ~setiny sekundy

U eukaryontů ~100 peptidových vazeb/min

Polysomy

Simultání translace mRNA na více ribosomech



NOVÁK, Jan. *Biochemie I.* Brno: Muni, 2009, s. 305.

Zatímco jeden ribosom se pohybuje podél mRNA a produkuje polypeptidový řetězec, další ribosom se může vázat do prázdného místa na 5´-konci. Současně může na jedné mRNA působit mnoho ribosomů (s odstupem cca 80 nukleotidů = polyribosom (polysom)

Syntéza proteinů v mitochondriích

- Mitochondrie obsahují 2-10 kopií uzavřené kruhové, dvouvláknové DNA
- Velikost kolísá v závislosti od druhu
- Živočišná mitochondriální DNA - $M_r \sim 10^7$
- Kóduje rRNA, sadu tRNA a mRNA pro několik proteinů
- Proteiny syntetizované v mitochodriích jsou nepatrnou frakcí proteinů vnitřní mitochondriální membrány, jsou však esenciální pro průběh oxidativní fosforylace (část komplexů I,III,IV a ATP synthasy)
- Syntéza proteinů v mitochodriích má řadu rysů shodných se syntézou u prokaryontů (iniciace formylmethioninem, citlivost k antibiotikům atd.)

Bakteriální mRNA je často polycistronická*

Obsahuje nukleotidové sekvence pro více než jeden protein

Proteiny jsou často metabolicky spřažené (např. mRNA obsahuje deset cistronů kódujících 10 enzymů potřebných pro syntézu histidinu)

Polycistronická mRNA obsahuje nepřekládané úseky na obou koncích a mezi každým úsekem kódujícím jednu bílkovinu

U eukaryontů nejsou polycistronické mRNA

* Cistron je u bakterií jednotkou genetické exprese

Některá antibiotika inhibují syntézu proteinů

- Při působení antibiotik jsou využívány rozdíly v mechanismu proteosyntézy u eukaryontů a prokaryontů
- Některá antibiotika reagují specificky s proteiny bakteriálních ribosomů
- Výsledkem je zastavení proteosyntézy a smrt bakterie
- Některá antibiotika mohou působit na eukaryontní mitochondriální proteosyntézu

Účinky antibiotik na proteosyntézu prokaryontů

Antibiotikum	Účinek
Streptomycin	Váže se k 30S ribosomální podjednotce, inhibuje tvorbu iniciačního komplexu.Vyvolává chyby ve čtení mRNA.
Tetracyklin	Váže se k 30S ribosomální podjednotce a inhibuje vazbu aminoacyl-tRNA do místa A
Chloramfenikol	Váže se k 50S ribosomální podjednotce a inhibuje peptidyltransferasu
Erytromycin	Váže se k 50S ribosomální podjednotce a inhibuje translokaci
Puromycin	Obsazuje A-místo ribosomu a vyvolává předčasnou terminaci

Skládání proteinů (folding)

Nascentní polypeptidový řetězec je transportován skrze ribosomy

Postupně se dostává mimo „chráněnou“ oblast ribosomu a nastává jeho prostorové skládání

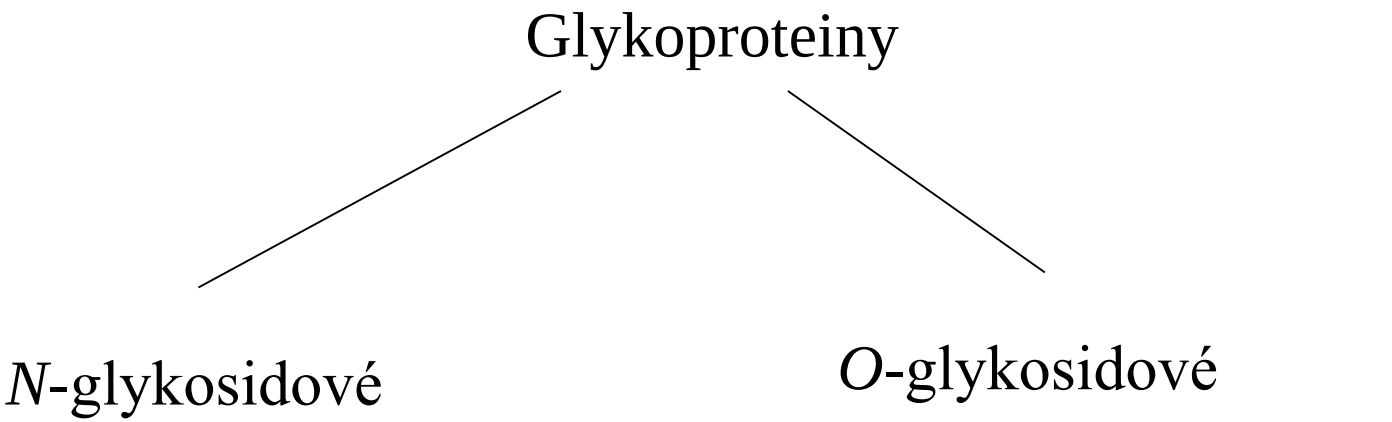
Skládání (folding) je zprostředkováno zvláštními proteiny – chaperony (heat shock proteins)

Poruchy ve skládání – Alzeimerova choroba,
BSE, cystická fibróza ad.

Posttranslační modifikace proteinů

- Odstranění methioninového zbytku
- Změna délky molekuly (odštěpení části polypeptidového řetězce)
- Glykosylace
- Acetylace
- Karboxylace
- Methylace
- Prenylace
- Hydroxylace
- Sulfatace ad.

Glykosylace proteinů

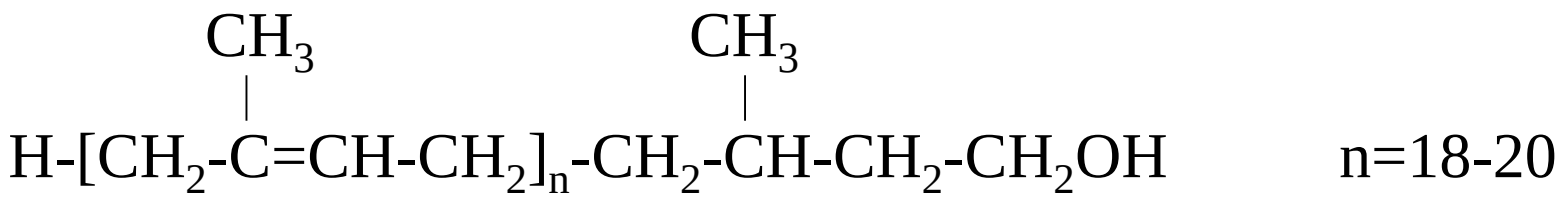


Liší se obsahem sacharidů a způsobem syntézy

Syntéza N-glykoproteinů

Syntéza cukerné složky se odehrává mimo bílkovinu

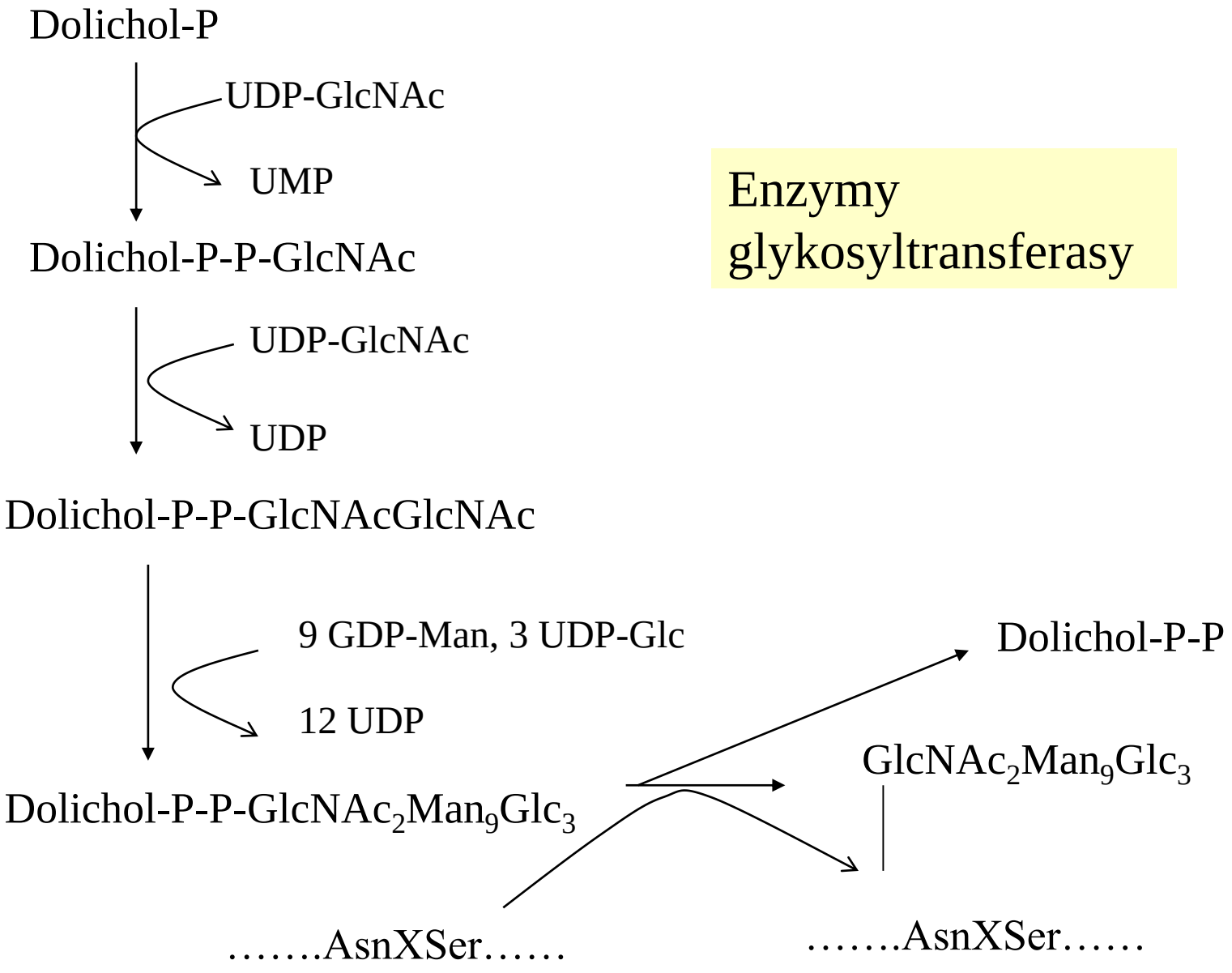
Základem je polyisopren dolichol (viz syntéza cholesterolu)



Dolichol ve formě difosfátu je vázán v membráně ER, na koncový fosfát se postupně napojují aktivované monosacharidy.

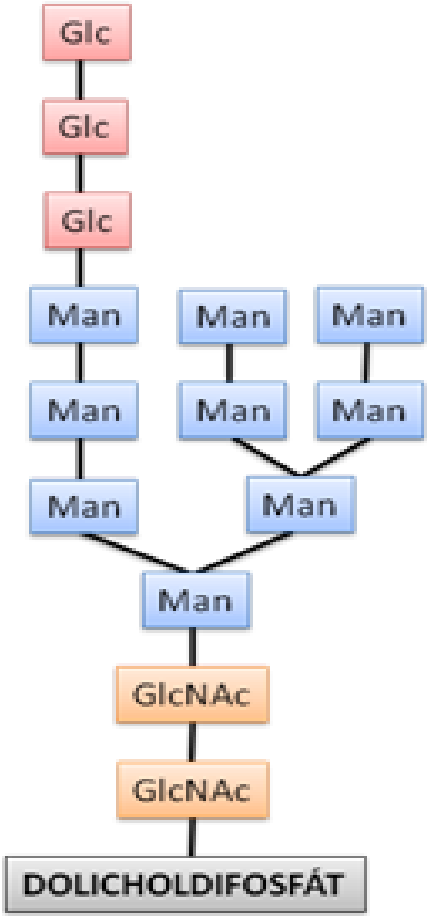
Hotový oligosacharid se přenese na bílkovinu, je vázán přes asparagin N-glykosidovou vazbou. Ve vazbě na bílkovinu proběhnou konečné úpravy oligosacharidové složky.

Glykosylace dolicholu



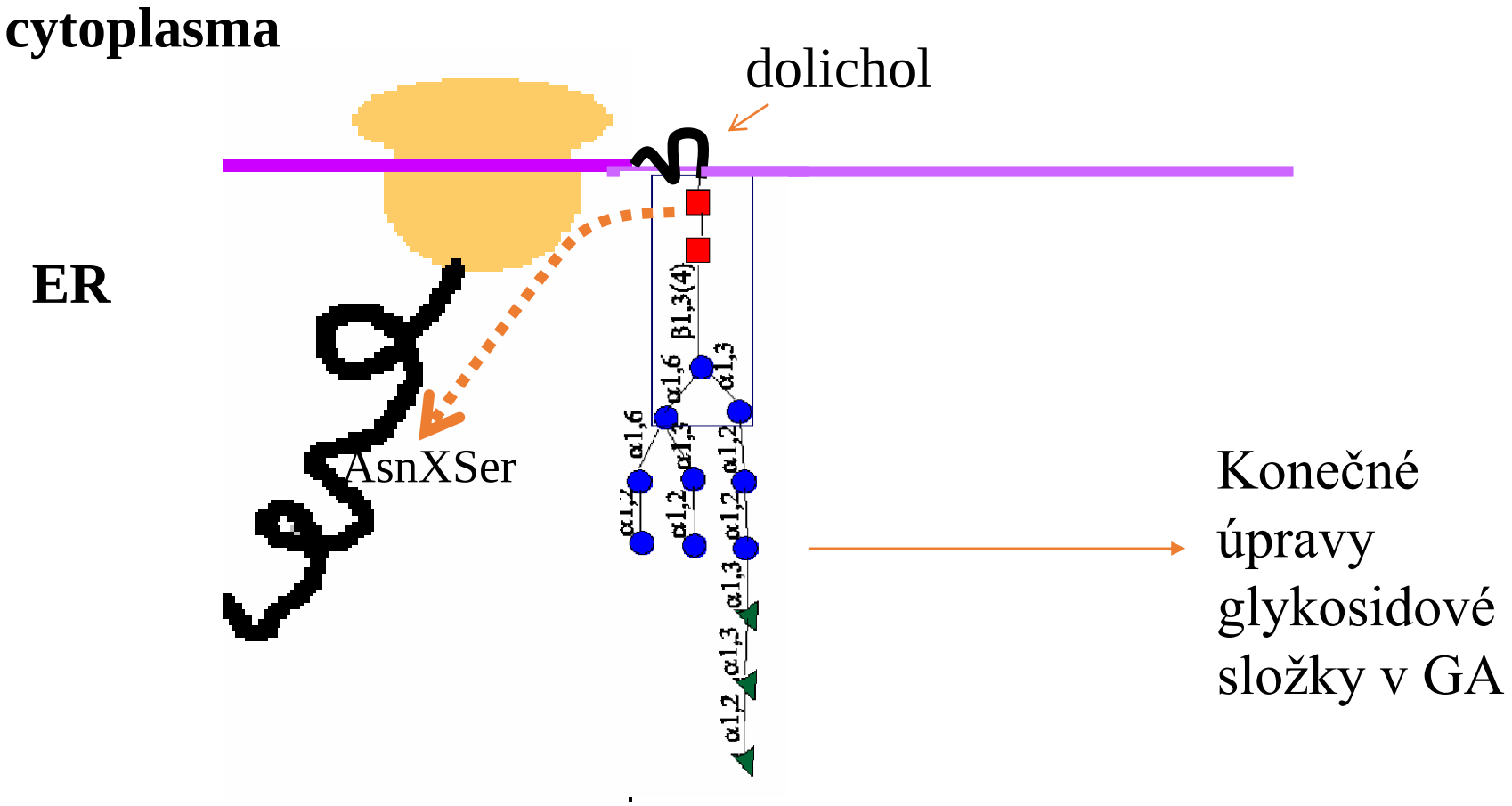
Enzymy glykosyltransferasy

Oligosacharidový prekursor vázaný na dolichol



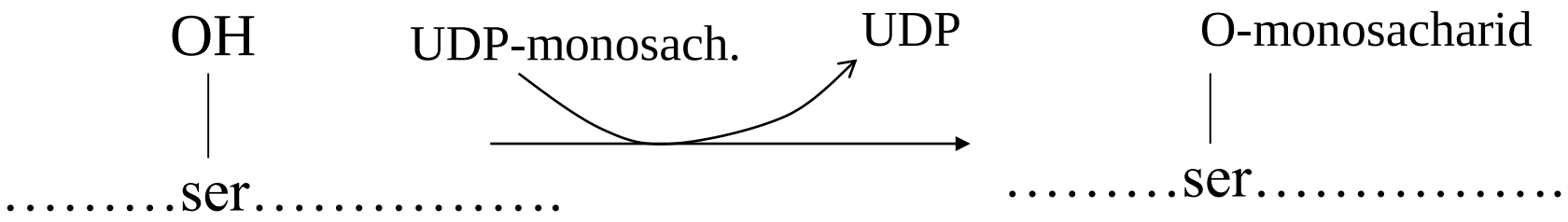
NOVÁK, Jan. *Biochemie I.* Brno: Muni, 2009, s. 305.

Kotranslační glykosylace



Syntéza O-glykoproteinů

Probíhá v ER a v Golgiho aparátu



Aktivované monosacharidy se postupně připojují O-glykosidovou vazbou

Transport bílkovin do subcelulárních a extracelulárních prostorů (targeting)

Syntéza proteinů na volných ribosomech

↓

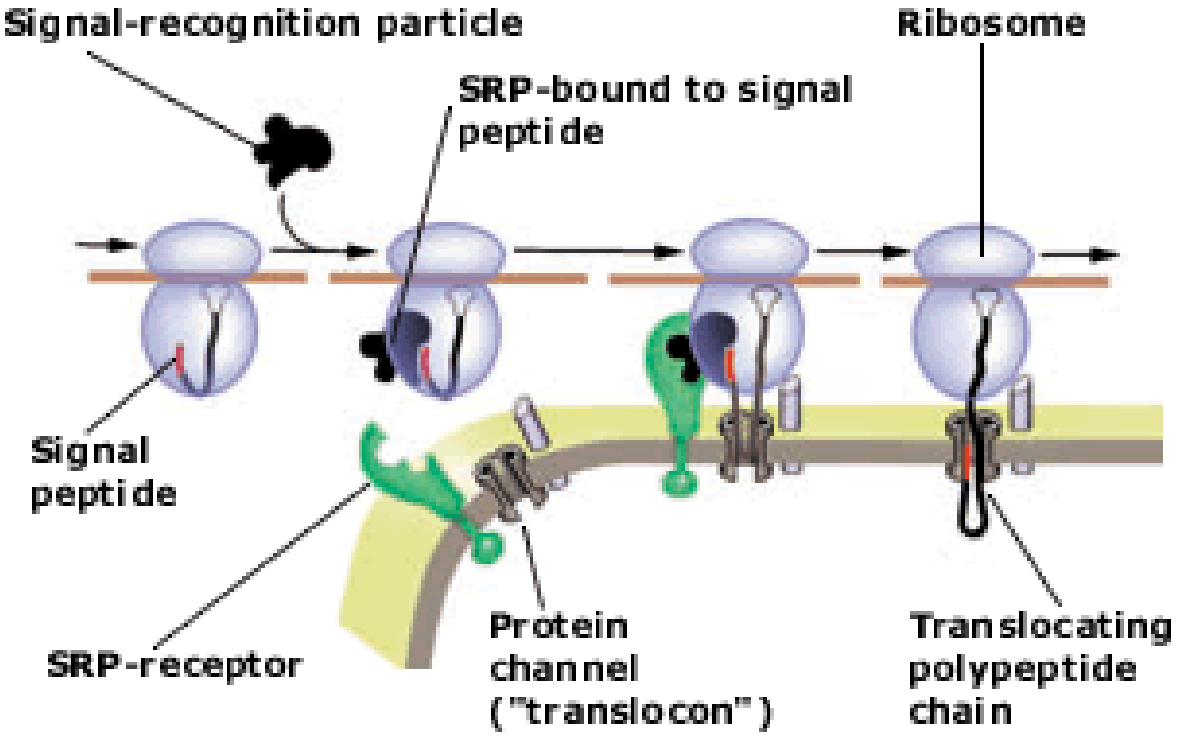
Proteiny zůstávají v cytoplazmě nebo jsou transportovány do organel (jádro, mitochondrie). Obsahují sekvenci AK, která směruje jejich transport

Syntéza proteinů na RER

↓

Transport do lyzosomů, ER, Golgiho komplexu nebo do membrán, sekrece z buňky

Transport proteinů syntetizovaných na RER



http://nobelprize.org/medicine/laureates/1999/illpres/protein.html

Transport proteinů syntetizovaných na RER

1. Translace začíná v cytosolu
2. Jakmile signální peptid opustí ribosom, naváže se na něj signál-rozpoznávající částice (signal recognition particle-SRP). Současně se váže k ribosomu a inhibuje další syntézu
3. SRP částice se váže k SRP receptoru v RER membráně a připoutá ribosom k RER
4. SRP se uvolní a syntéza pokračuje
5. Jakmile signální peptid proniká do RER, signální peptidasa jej odstraní
6. Syntéza nascentního proteinu pokračuje a kompletní protein je uvolněn do RER

Transport proteinů syntetizovaných na RER-pokr.

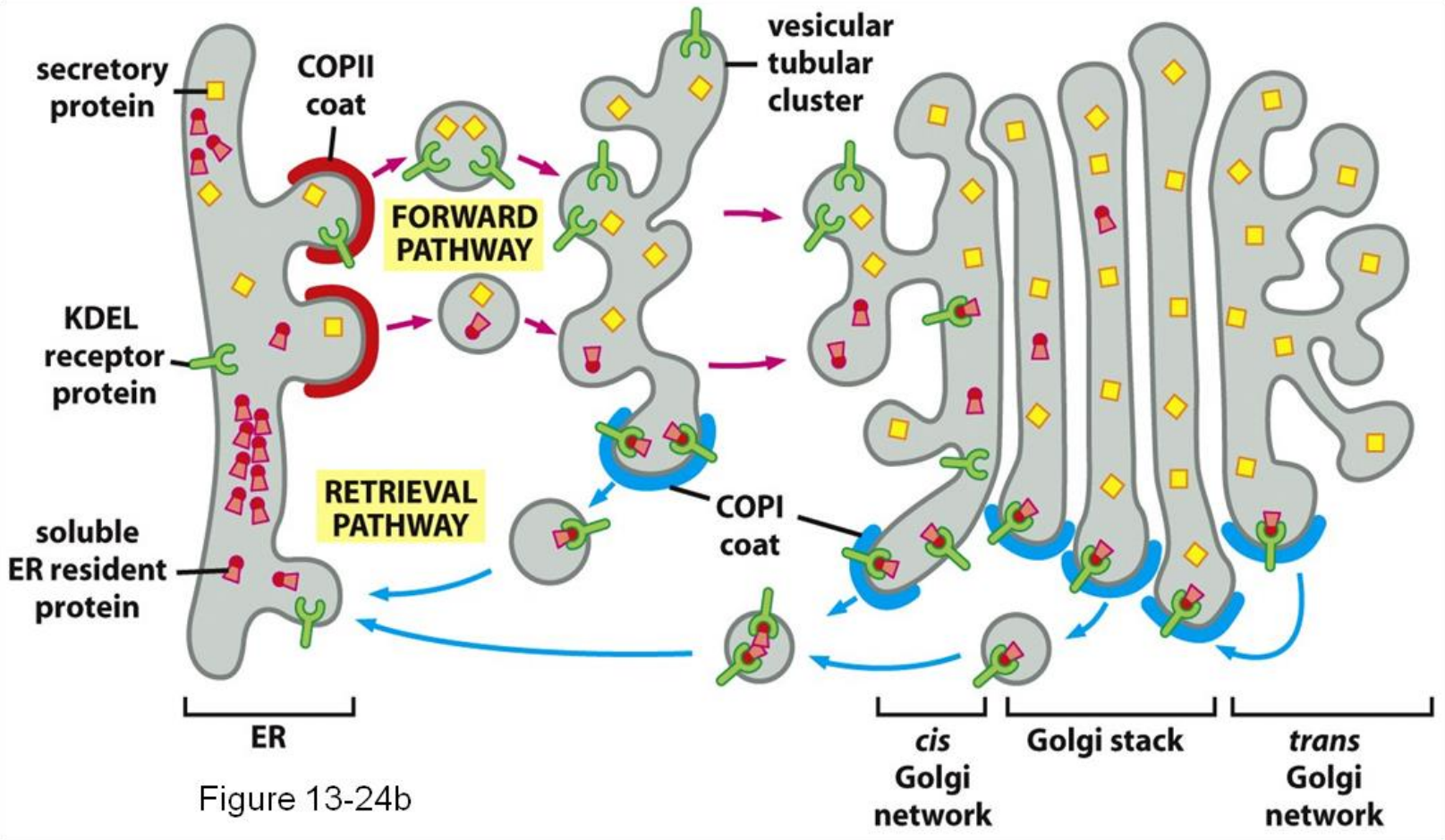


Figure 13-24b

StudyBlue: Flashcards - Molecular Exam 3. [online]. [cit. 2014-08-15]. Dostupné z: http://www.studyblue.com/notes/note/n/molecular-exam-3/deck/2630328

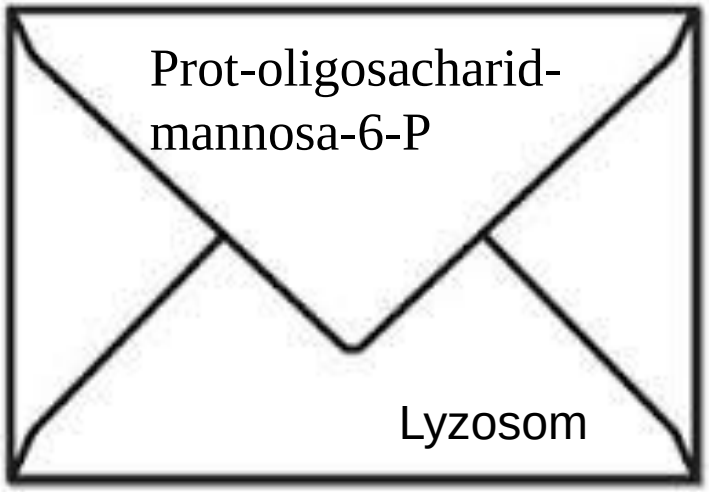
Transport proteinů syntetizovaných na RER-pokr.

- Proteiny syntetizované na RER jsou formou vesiklů transportovány do cis-části Golgiho aparátu
- Zde je třídící centrum – strukturní rysy určují, kam bude protein směřován (sorting)
- Některé zůstanou v Golgiho aparátu, jiné se vracejí do RER
- Další putují ve formě vesiklů do trans části Golgiho aparátu
- Zde se oddělují lyzosomy a sekreční váčky
- Obsah sekrečních váčků je uvolněn extracelulárně
- Hydrofobní proteiny zabudované v membránách váčků se stávají membránovými proteiny

Principy intracelulárního třídění (sorting)

Příklad 1:

proteiny určené pro lyzosomy jsou označeny N-vázanými oligosacharidy zakončenými mannosa-6-P



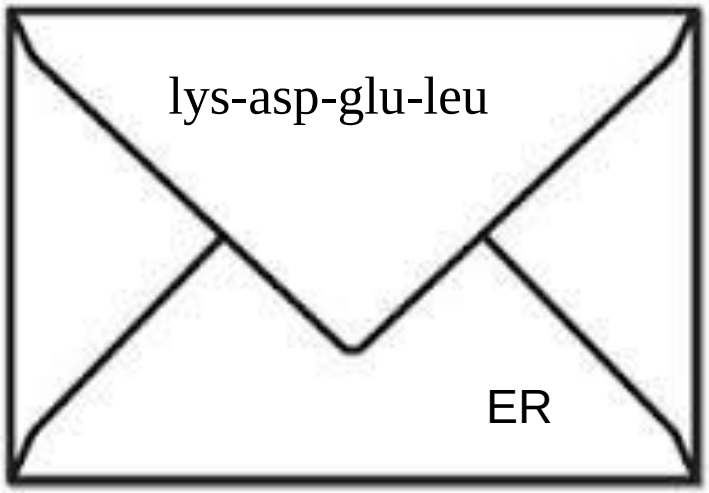
„adresa“ je rozpoznána specifickými membránovými receptory v Golgiho aparátu, který protein zabuduje do klathrinem pokrytého vesiklu

Clairefontaine - obálka - C6, obyčejná: Activa. [online]. [cit. 2014-08-15]. Dostupné z: https://obchod.activa.cz/produkt/clairefontaine-obalka-c6-obycejna-16028/

Principy intracelulárního třídění

Příklad 2:

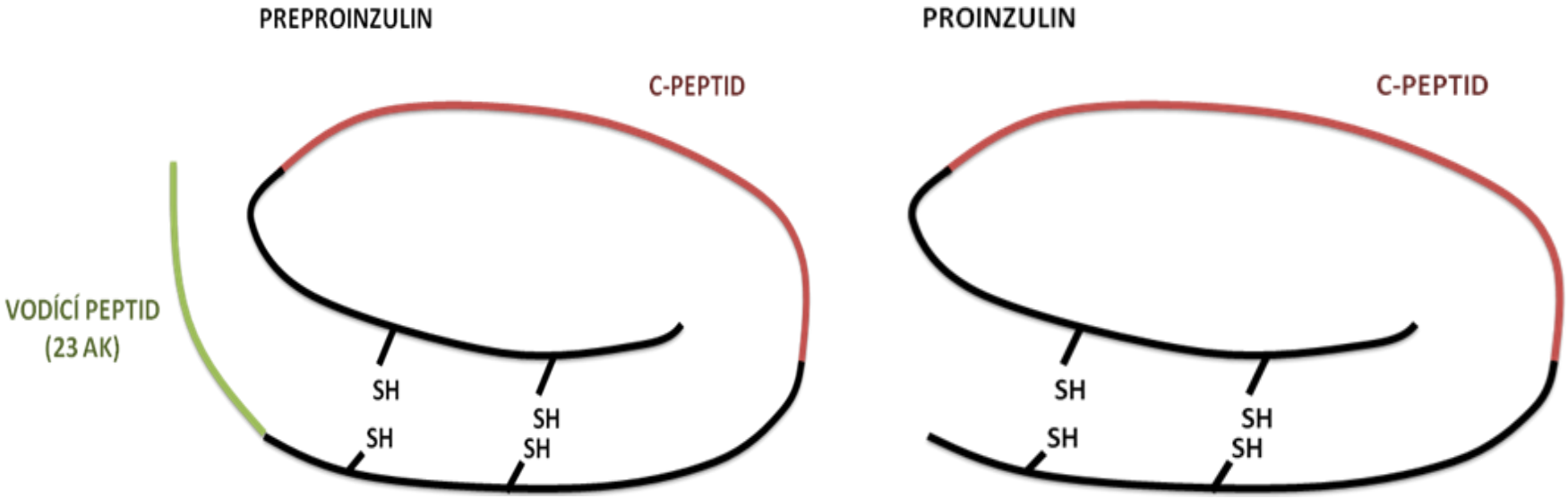
Proteiny určené pro ER mají na karboxylovém konci sekvenci Lys-Asp-Glu-Leu



Proteiny jsou z Golgiho aparátu transportovány zpět do ER

Clairefontaine - obálka - C6, obyčejná: Activa. [online]. [cit. 2014-08-15]. Dostupné z: https://obchod.activa.cz/produkt/clairefontaine-obalka-c6-obycejna-16028/

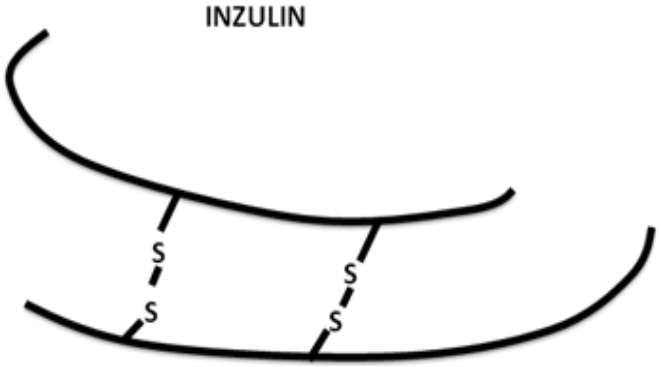
Příklad posttranslační úpravy: syntéza insulinu



NOVÁK, Jan. *Biochemie I.* Brno: Muni, 2009, s. 309.

Na ribosomech RER se syntetizuje preproinsulin
Po vstupu do ER se odstraní vodící peptid
Vytvoří se dva disulfidové můstky
Proinsulin putuje do Golgiho aparátu, zde začíná proteolýza a ukládání do sekrečních granul
Granula putují cytoplazmou k plazmatické membráně
Po stimulaci fůzují s membránou a inzulin se vylévá do extracelulárního prostoru

Výsledná struktura insulinu



NOVÁK, Jan. *Biochemie I.* Brno: Muni, 2009, s. 310.

Na ribosomech RER se syntetizuje preproinsulinu

Po vstupu do ER se odstraní vodící peptid

Vytvoří se dva disulfidové můstky

Proinsulin putuje do Golgiho aparátu, zde začíná proteolýza a ukládání do sekrečních granul

Granula putují cytoplazmou k plazmatické membráně

Po stimulaci fůzují s membránou a inzulin se vylévá do extracelulárního prostoru

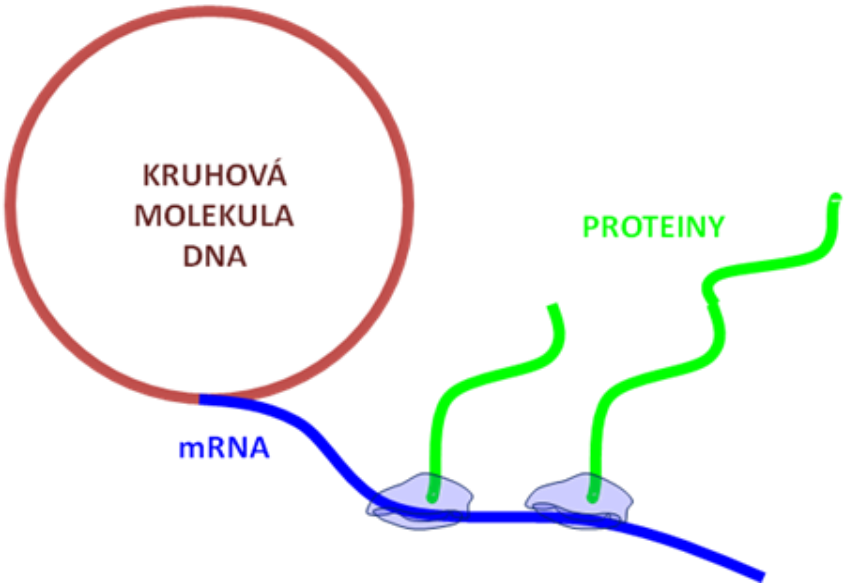
Regulace genové exprese

Genová exprese – tvorba proteinů nebo RNA produktů

Obvykle je v daném čase exprimována jen malá část genů přítomných v buňce

Genová exprese je regulována rozdílně u prokaryontů a eukaryontů

Základní rysy genové exprese u prokaryontů



NOVÁK, Jan. *Biochemie I.* Brno: Muni, 2009, s. 311.

Jediná kruhová DNA v buňce

DNA není komplexována s histony

Jádro není odděleno od cytoplazmy

Transkripty genů neobsahují introny

Translace a transkripce probíhají simultánně

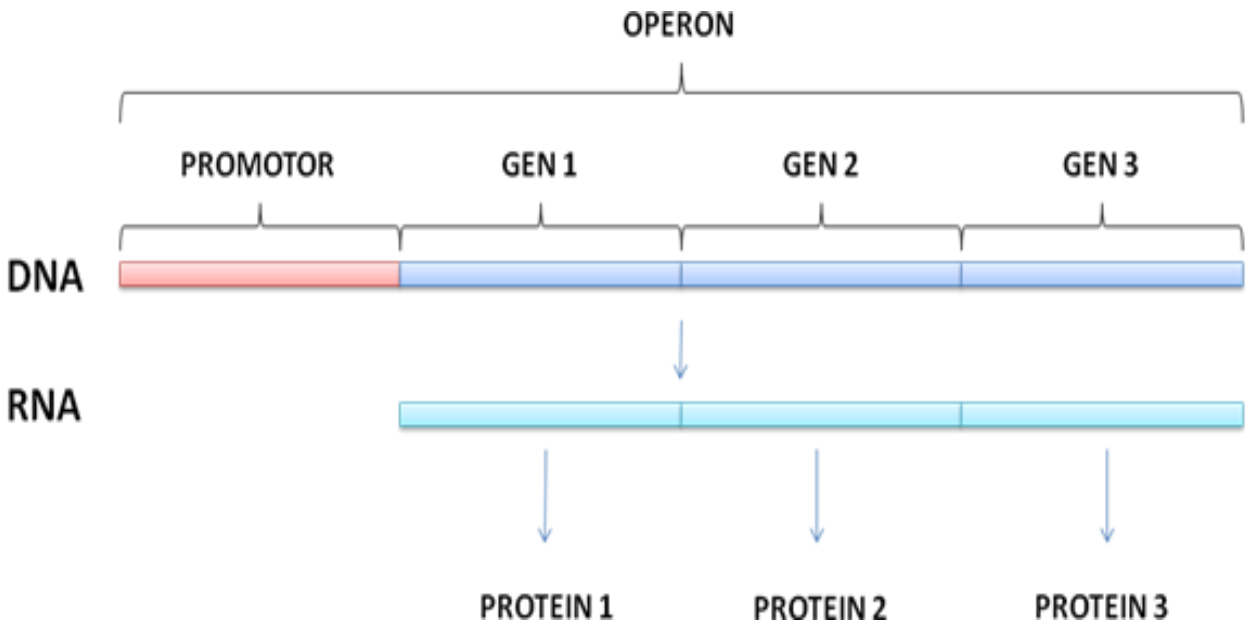
Regulace genové exprese u prokaryontů

Jednodušší regulační mechanismy než u eukaryontů

Regulace probíhá na úrovni iniciace transkripce

Operonová teorie

Strukturní geny u bakterií jsou často sdružovány do operonů

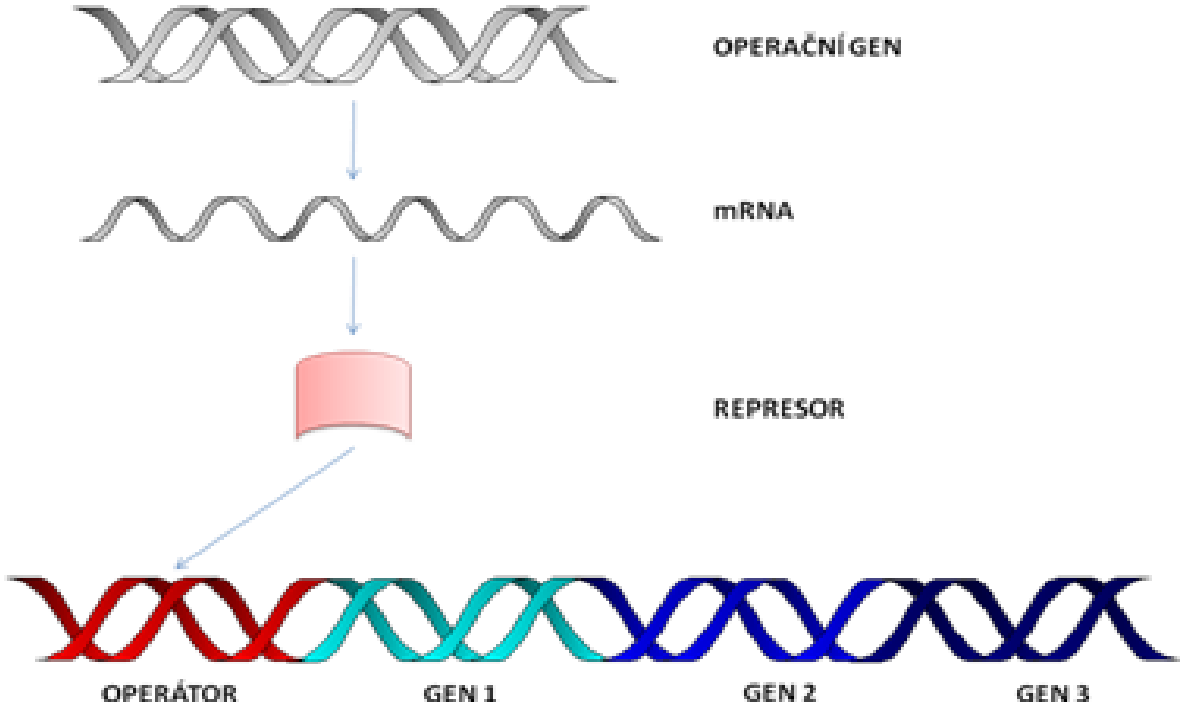


NOVÁK, Jan. *Biochemie I.* Brno: Muni, 2009, s. 311.

Operon

- Zahrnuje strukturní geny pro proteiny metabolicky spřažené
- Geny v operonu jsou většinou exprimovány koordinovaně (jsou buď všechny „vypnuty“, nebo všechny „zapnuty“)
- Produktem transkripce je polycistronická mRNA
- Transkripce je regulována jediným promotorem

Regulace RNA polymerasy represorem – negativní kontrola



NOVÁK, Jan. *Biochemie I.* Brno: Muni, 2009, s. 312.

Represor je kódován regulačním genem

Po syntéze represor difunduje k promotoru a váže se v oblasti nazývané operátor (většinou součást promotoru)

Represor blokuje vazbu RNA-polymerasy k promotoru

Syntéza mRNA neprobíhá

Represor je kontrolován dvěma mechanismy

Indukce

Induktor je malá molekula, která se váže k represoru, mění jeho konformaci a vyvolá odpojení od operátoru

Transkripce může začít

Induktory: malé molekuly živin nebo jejich metabolity

Korepresse

Represor není aktivní, pokud se na něj neváže korepresor. Komplex represor-korepresor se váže na DNA a brání navázání RNA-polymerasy

Transkripce neprobíhá

Korepresory: malé molekuly živin nebo jejich metabolity

Příklad indukce

Indukce lac operonu laktosou u E.coli

Enzymy pro metabolismus glukosy glykolýzou jsou u E.coli produkovány konstitutivně

Je-li přidána laktosa, buňky se adaptují a začnou produkovat další enzymy kódované *lac* operonem

Jako induktor slouží **allolaktosa** (isomer laktosy, vznikající spontánně), váže se k represoru a inaktivuje jej.

RNA polymerasa se může vázat k promotoru a přepisuje strukturní geny v *lac* operonu a produkuje polycistronickou RNA, která kóduje tři další enzymy (β-galaktosidasu, permeasu a transacetylasu)

* Děj probíhá, pokud je v buňce nedostatek glukosy (viz obr.68)

Příklad korepresе

Korepresе trp operonu (syntéza tryptofanu u E.coli)

Geny pro enzymy syntézy tryptofanu (celkem 5 enzymů) jsou soustředěny v *trp* operonu

Tryptofan je korepresorem, váže se k inaktivnímu represoru, mění jeho konformaci.

Komplex tryptofan-represor inhibuje transkripci operonu.

Stimulace RNA polymerasy - pozitivní kontrola

Regulační proteiny se vážou k promotoru a stimulují navázání RNA-polymerasy

regulační protein je aktivován na základě přítomnosti/nepřítomnosti molekuly živiny (nebo jejího metabolitu) v buňce

Příklad pozitivní kontroly

Vliv přítomnosti glukosy na lac operon u E.coli

Transkripce *lac* operonu může být indukována allolaktosou (obr.65) pouze v nepřítomnosti glukosy

Pokles hladiny glukosy v buňce vyvolá zvýšení hladiny cAMP (není známo proč)

cAMP se váže ke svému receptoru v buňce (cAMP-receptor CRP)

cAMP-CRP komplex se váže do regulační oblasti *lac* operonu, stimuluje vazbu RNA polymerasy k promotoru a transkripci genů pro metabolismus laktosy

→ buňka metabolizuje laktosu, pouze pokud nemá k dispozici glukosu

Atenuace transkripce

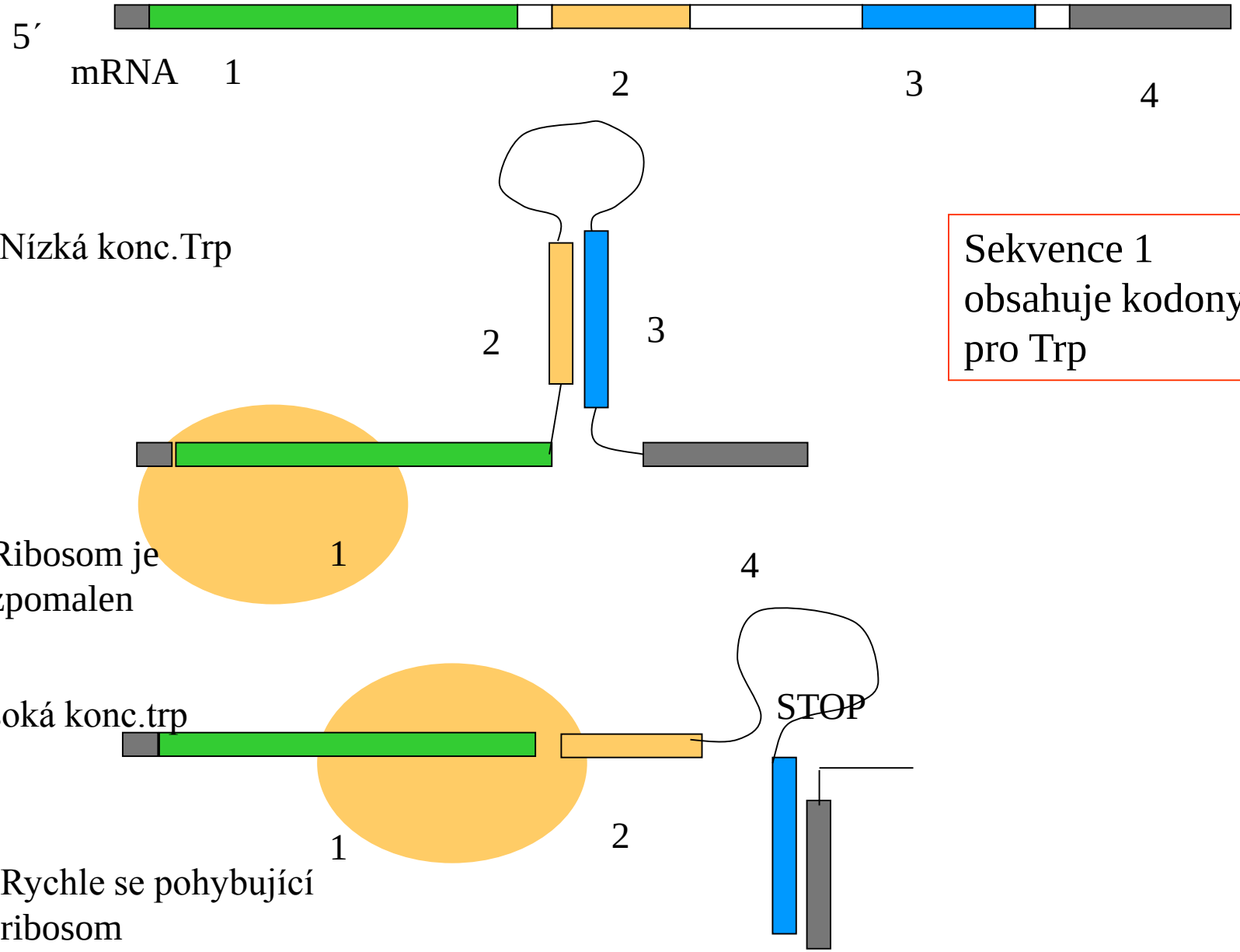
Předčasná terminace změnou sekundární struktury mRNA

Součástí operonu je sekvence zvaná atenuátor (zpomalovač)

Současně s transkripcí probíhá i translace

Rychlost translace ovlivňuje tvorbu smyček na mRNA

Atenuace transkripce – trp operon E.coli



Sekvence 1 obsahuje kodony pro Trp

Atenuace

• mRNA je přepisována a současně ribosomy začínají syntetizovat protein.

• RNA polymerasa je následována pohybujícím se ribosomem

• Blízko 5´konce transkriptu je řada kodonů pro trp.

• Na počátku je koncentrace trp vysoká, je vysoká i koncentrace trp-tRNA a probíhá rychlá translace (ribosom se pohybuje rychle).

• Rychlý pohyb ribosomu vytvoří v mRNA smyčku, která slouží jako terminační signál pro RNA polymerasy a transkripce končí.

• Jsou-li koncentrace trp nízké, hladiny trp-tRNA jsou nízké, ribosom se zpomalí, RNA polymerasa může dokončit transkripci operonu

•Úroveň transkripce je nastavena podle hladiny trp v buňce

Regulace exprese v eukaryontních buňkách

Základní rysy genové exprese u eukaryontů (rozdíly od prokaryontů):

- DNA je organizována v nukleosomech
- gen se při expresi dostává do aktivní formy
- nejsou přítomny operony
- geny kódující metabolicky spřažené děje (dráhy) leží na různých chromozomech
- každý gen má svůj vlastní promotor
- transkripce a translace jsou odděleny

Úrovně regulace genové exprese u eukaryontů

- A) ovlivnění na úrovni DNA a chromozomů
- B) ovlivnění transkripce
- C) úprava transkriptů
- D) ovlivnění iniciace translace

Regulace dostupnosti genu pro transkripci

V buňkách diferencovaných tkání se projevují jen ty geny, které v dané buňce mají nějakou úlohu

Chromatin v jádře:

- Kondenzovaný (heterochromatin) – geny jsou neaktivní
- Difuzní (euchromatin)- geny produkují mRNA

Během vývoje dochází ke změnám v aktivitě genů, chromatin přechází z kondenzované formy do difuzní a naopak.

A) Příklady ovlivnění genové exprese na úrovni struktury chromosomu

- remodelace chromatinu
- methylace DNA
- přeskupení genové DNA
- genová amplifikace
- delece genu

Remodelace chromatinu

- změna stavu chromatinu, která vede k aktivaci transkripce

→ uvolnění nukleosomu z chromatinu

Mechanismy remodelace:

• Rozvinutí určitého úseku DNA z nukleosomu s využitím štěpení ATP

• Kovalentní modifikace histonových konců acetylací (acetylace ε -aminoskupiny v postranním řetězce lysinu na N-koncích histonů H2A,H2B,H3 a H4).

Methylace DNA

Methylace cytosinových zbytků v DNA → 5-methylcytosin

Probíhá často v oblastech bohatých na GC-sekvence v blízkosti promotorové oblasti genu (postsyntetická modifikace DNA – enzym methylasa)

Geny, které jsou methylovány jsou často méně snadno transkribovány

Př.: geny pro globin jsou methylovány v neerythroidních buňkách (syntéza hemoglobinu zde neprobíhá), v erytroblastech a retikulocytech (prekursory erytrocytů) tyto geny methylovány nejsou

Přeskupení genů

Segmenty DNA se mohou v rámci genomu přeskupovat a asociovat s jinými geny

Př.: Přeskupení genů v buňkách produkujících protilátky (imunoglobuliny)

(viz Imunologie)

Amplifikace genu

Při genové amplifikaci určitá oblast chromosomu podléhá opakovaným cyklům DNA replikace

Nově syntetizovaná DNA je vystřižena a tvoří malé, nestabilní chromosomy (double minutes)

Ty se integrují do jiných chromosomů a příslušný gen je tak amplifikován

Normálně je amplifikace vyvolána chybami při DNA replikaci a buněčném dělení - za určitých okolností mohou být v genomu zakódovány

Př.: U pacientů léčených methotrexátem (inhibitor dihydrofolátreduktasy) se vyvinula resistence na lék (lék přestal být účinný).

Příčinou je zvýšení počtu genů pro dihydrofolátreduktasu v důsledku amplifikace.

B) Regulace na úrovni transkripce

Základní regulace transkripce (společná všem genům)

Regulace složkami „bazálního transkripčního komplexu“ (RNA polymerasa vážící se k TATA boxu, TATA vážící se proteiny a další „bazální“ transkripční faktory vážící se s RNA-polymerasou nebo v oblasti promotoru)

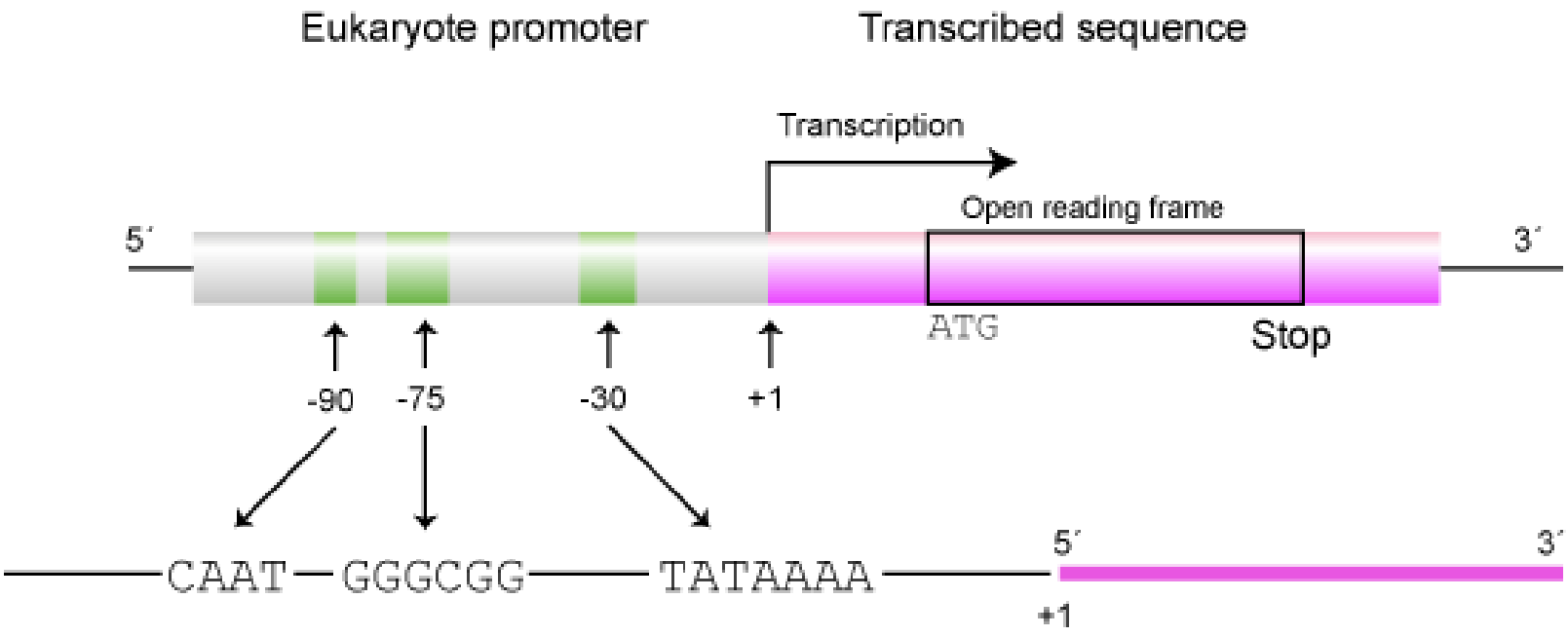
Geny regulované pouze tímto způsobem :

Konstitutivně exprimované geny

Specifické ovlivnění genové exprese:

Prostřednictvím regulační sekvence v DNA a specifických transkripčních faktorů.

Promotor u eukaryontů



Animal Genetics - Gene exoression. [online]. [cit. 2014-08-15]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=307

Vazba bazálních transkripčních faktorů

Terminologie

Starší terminologie :

Enhancery – regulační sekvence v DNA, které vážou transaktivátory

Transaktivátory vážou koaktivátory

Silencery – regulační sekvence, které vážou korepresor

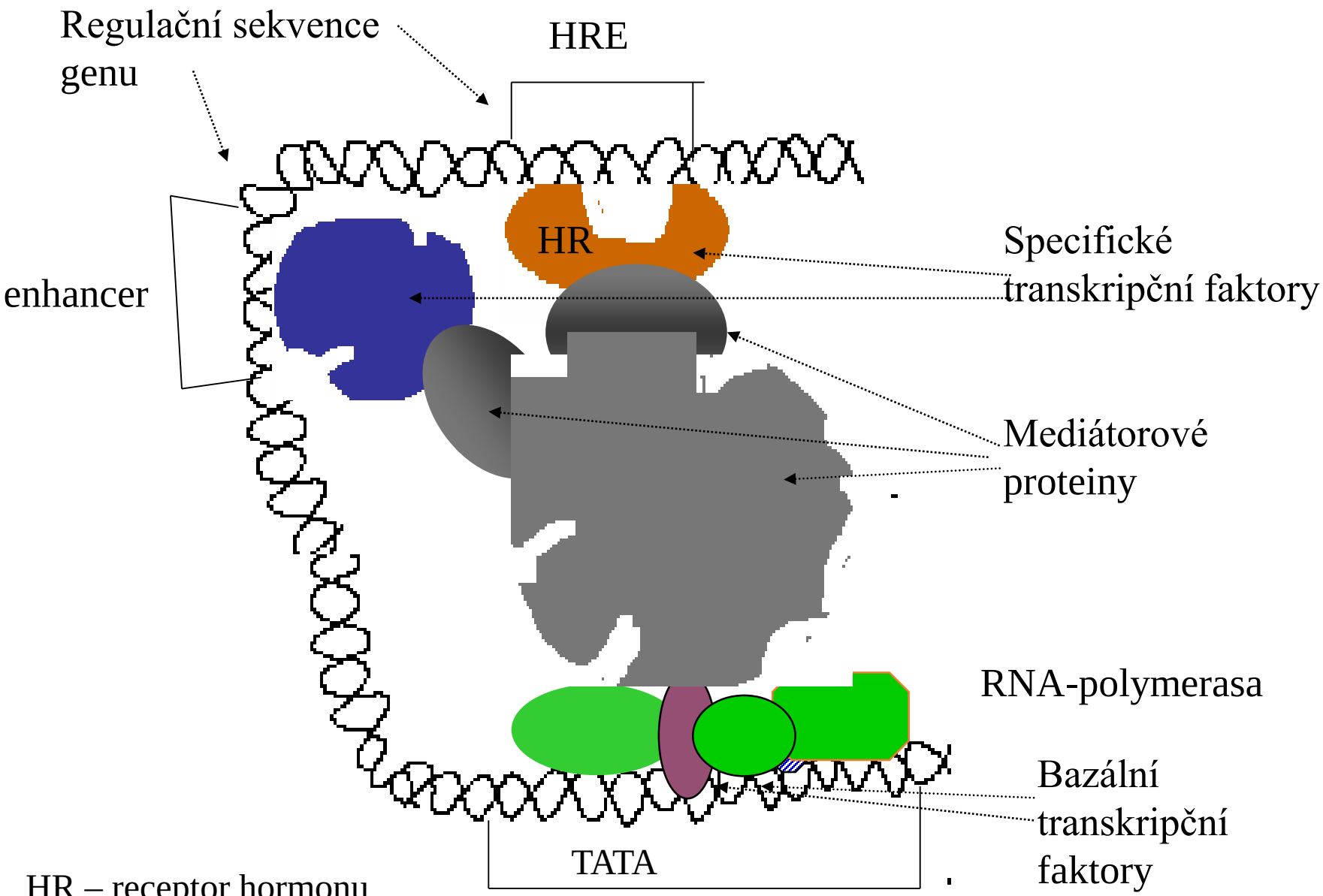
Hormony se vážou k intracelulárnímu receptoru a ten se váže k hormon-response elementu

Tyto termíny jsou stále užívány. Jsou postupně nahrazovány termíny:

regulační sekvence v DNA (enhancer, silencer, hormon response element)

specifické transkripční faktory (odlišné od bazálních transkripčních faktorů)

mediátorové proteiny (koaktivátory)



HR – receptor hormonu

HRE – hormon responsible element

Genově specifické regulační proteiny (komentář k předchozímu obrázku)

Regulační oblasti na DNA jsou tvořeny oblastí promotoru a dalších regulačních sekvencí.

V oblasti promotoru se vážou **bazální transkripční faktory**.

Bazální transkripční komplex – obsahuje RNA polymerasu a bazální transkripční faktory.

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 mediátorovýnmi proteiny (koaktivátory, korepresory), které jsou v kontaktu s bazálními transkripčními faktory.

Transkripční faktory, které jsou jadernými receptory hormonů (receptory steroidních a thyroidních hormonů)

•Receptory těchto hormonů jsou specifickými transkripčními faktory. Vážou se s navázaným hormonem v regulační oblasti DNA (tato oblast se nazývá 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

Jaderné receptory

- Rodina vzdáleně příbuzných regulačních proteinů odpovědných za modulaci genové exprese
- Hlavní skupinou jsou steroidní-thyreoidní receptory
- Androstanový receptor AR
- Estrogenový receptor ER
- Progesteronový receptor PR
- Glukokortikoidní receptor GR
- Mineralokortikoidní receptor MR

Př.1:

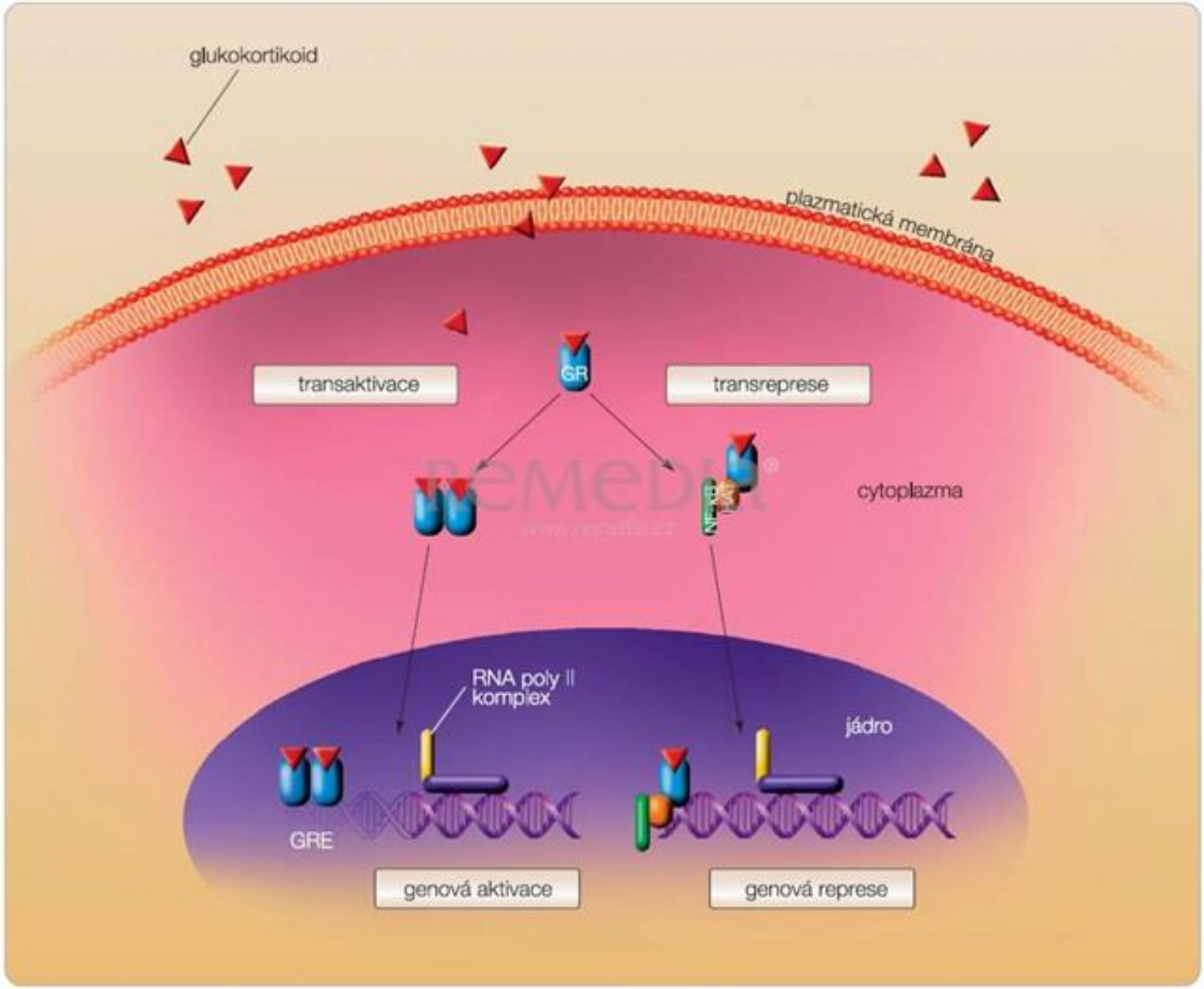
Glukokortikoidový receptor (GR)

GR se nachází v cytoplazmě

Po navázání kortisolu se změní jeho konformace a na povrchu se vystaví signál pro směřování do jádra (adresa)

Receptor s hormonem se přesouvá (translokuje) do jádra, kde se váže na glukokortikoid-HRE v regulační oblasti daného genu (GRE)

Transaktivační doména receptoru se váže k mediátorovým proteinům a tím vyvolá aktivaci transkripce příslušných genů (a inhibici transkripce genů jiných).



Posttranskripční a negenomové účinky glukokortikoidů: Remedia. [online]. [cit. 2014-08-15]. Dostupné z: http://www.remedia.cz/Okruhy-temat/Farmakologie/Posttranskripcni-a-negenomove-ucinky-glukokortikoidu/8-10-Qo.magarticle.aspx

GR receptory

GR je exprimován prakticky ve všech tkáních

Spektrum genů řízených GR je velmi široké

Některé jsou regulovány positivně, jiné negativně

Transkripční aktivita GR závisí také na koaktivátorech a může být též ovlivněna fosforylací kinázami

Degradace receptoru ubiquitin/proteasomem – její rychlost rovněž ovlivňuje transkripční aktivitu

Př.2

Receptor thyroidních hormonů tvoří dimer s receptorem retinoidním (RXR)

Vážou se k thyroidnímu HRE a ke korepresou

Tím je inhibována exprese příslušného genu

Po navázání thyroidního hormonu vyvolají konformační změny HRE a korepresoru iniciaci transkripce

Př.3

Retinoidní receptor RXR (váže cis-retinovou kyselinu) tvoří dimer s nejméně 8 dalšími jadernými receptory

Každý z dimerů má jinou vazebnou specifitu k DNA

RXR se tak podílí na regulaci exprese řady genů

Struktura proteinů vážících se na DNA

U specifických transkripčních faktorů bylo identifikováno několik strukturních motivů: helix-smyčka-helix, helix-otočka-helix, zinkový prst, leucinový zip.

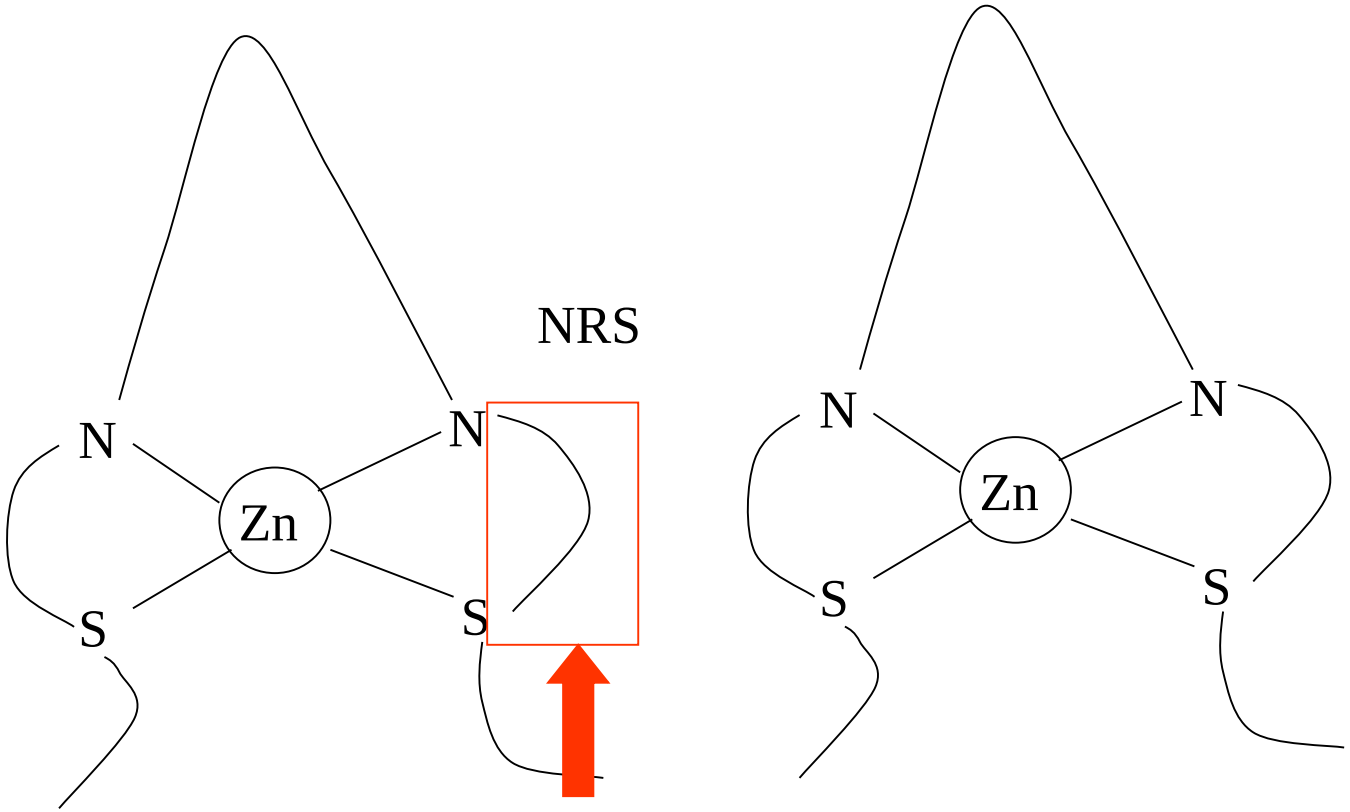
Uvedené strukturní motivy zprostředkují specifickou vazbu proteinu k DNA.

Za kontakt je odpovědná pouze malá část molekuly (obvykle α-helix), často se jedná o dvě blízká místa v molekule, zbytek molekuly zajišťuje správnou informaci.

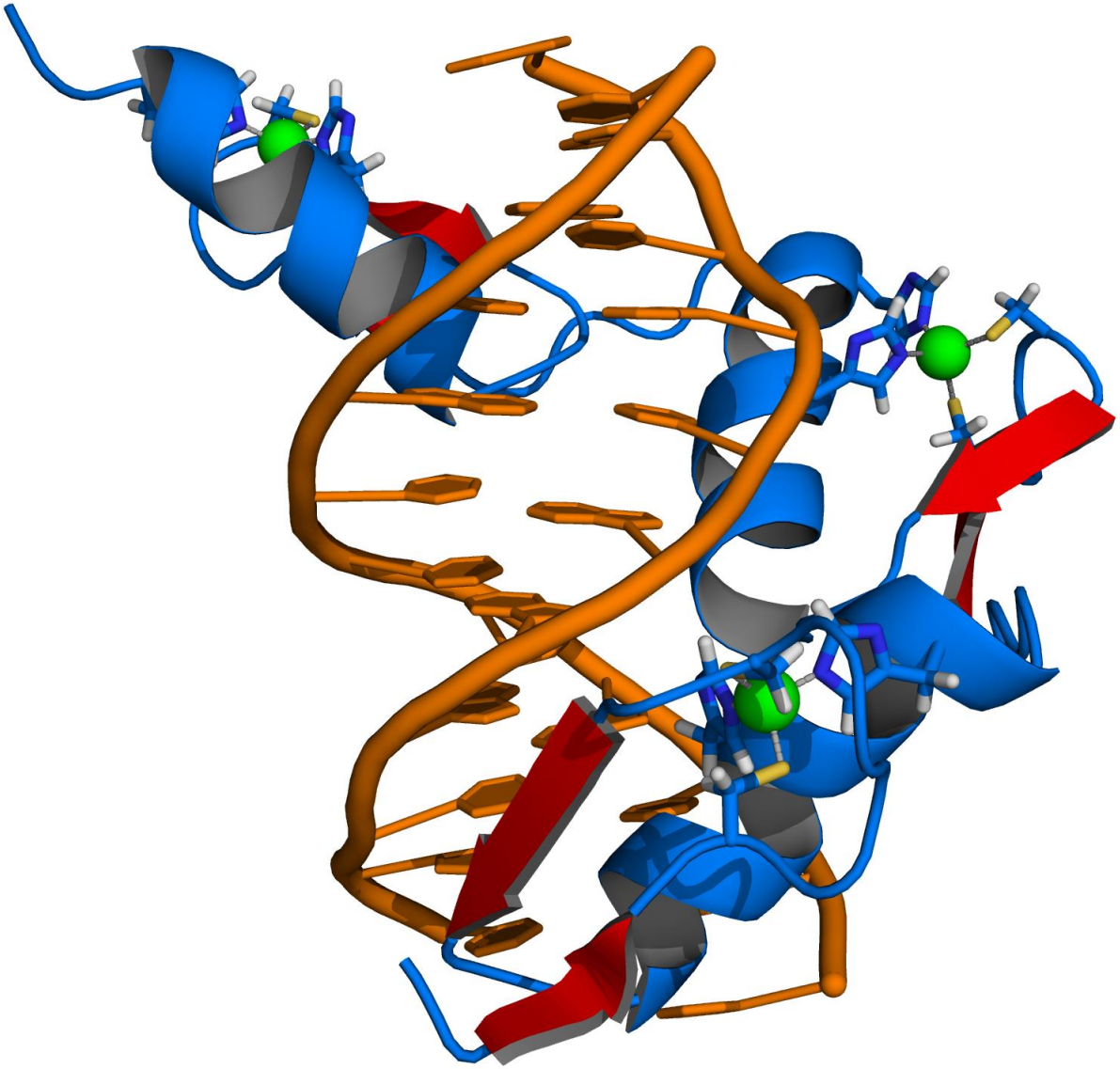
Kontakt obvykle probíhá v oblasti tzv. major groove ve struktuře DNA.

Princip interakce : „….regulační protein se váže, když je instruován, že se má vázat …….„

Př.: Zinkový prst (zinc finger)



Oblast sloužící k vnoření do dvoušroubovice DNA



Wikipedia: Zinc finger. [online]. [cit. 2014-08-15]. Dostupné z: http://en.wikipedia.org/wiki/Zinc_finger

Zinkový prst

Nachází se v DNA vazebných doménách receptorů pro steroidní hormony.

Zn^{2+} je chelatován ve 4 pozicích buď histidinem nebo cysteinem

Zn^{2+} udržuje terciární strukturu domény

NRS (nucleotide recognition signal) - α-helix obsahující sekvenci aminokyselin, která slouží k rozpoznání specifické sekvence v major groove DNA

Regulace (ovlivnění) působení transkripčních faktorů

Down(up)-regulace tvorby

Modulace působení vazbou stimulačních a inhibičních ligandů

Vzájemná kooperace transkripčních faktorů

Fosforylace/ defosforylace transkripčních faktorů řízená růstovými faktory, cytokiny, peptidovými hormony atd.

C) Regulace genové exprese úpravou transkriptů

Alternativní sestřih

Alternativní sestřih a variace místa polyadenylace na 3´konci způsobuje, že jediný gen může produkovat různé proteiny (viz předchozí přednáška)

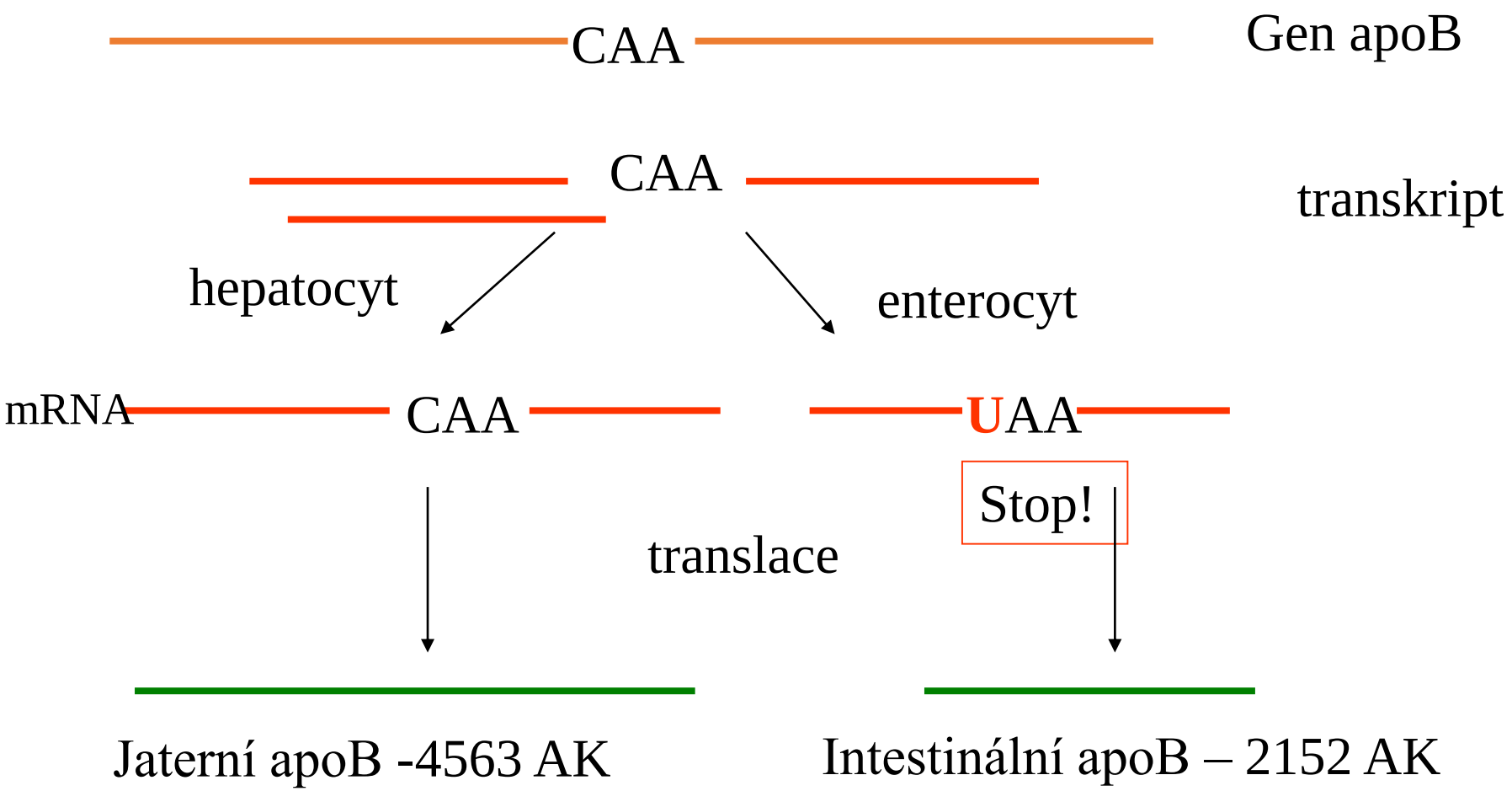
Editace RNA

V některých případech může být RNA po transkripci editována.

Primární transkript (hnRNA) je shodný, po transkripci dojde k záměně bazí nebo přidání (odstranění) nukleotidu

Editace RNA

Syntéza apoB v hepatocytech a enterocytech



Syntéza apoB v hepatocytech a enterocytech (je součástí chylomikronů a VLDL)

Komentář k předchozímu obrázku:

Gen apoB produkuje v játrech protein obsahující 4563 AK

Tentýž gen v enterocytech produkuje apoB obsahující jen 2152 AK

Konverze C(cytosin) na U (uracil) deaminací v RNA transkriptu generuje stop-kodón v intestinální mRNA. Tak protein produkovaný v enterocytu má pouze 48 % délky proteinu hepatálního

D) Regulace proteosyntézy na úrovni translace

Ovlivnění aktivity eukaryotických iniciačních faktorů (EIFs)

Př. Syntéza globinu v retikulocytech

Faktor EIF2 je aktivní ve fosforylované formě, neaktivní v defosforylované formě.

Přítomnost hemu zabraňuje fosforylaci EIF2.

→ pokud je v buňce přítomen hem, EIF2 je nefosforylován, je aktivní a syntéza globinu probíhá.

Není-li v buňce hem, EIF2 je neaktivní, syntéza globinu neprobíhá