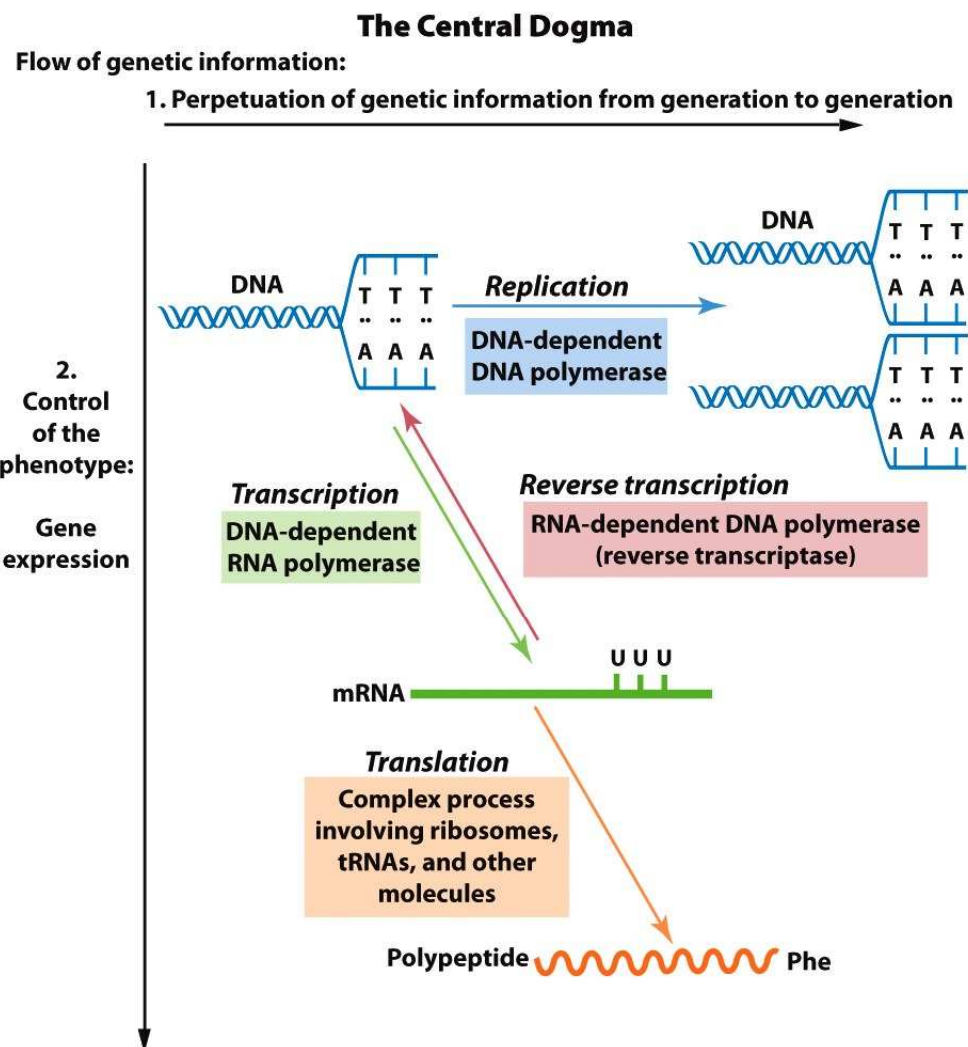
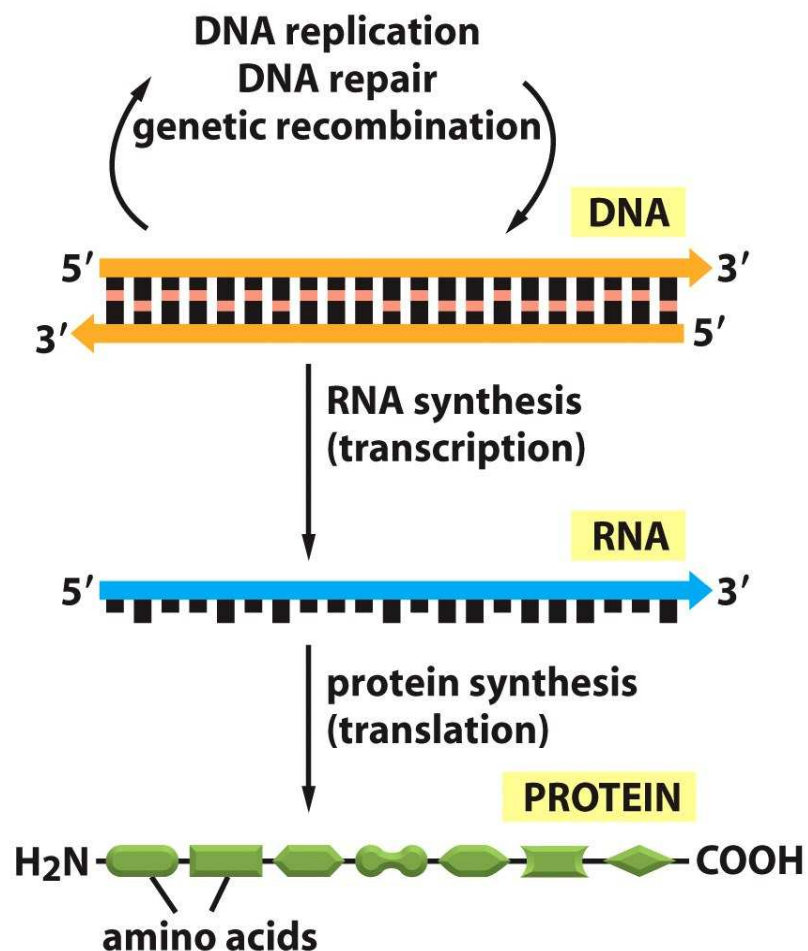


# Transkripce a úpravy RNA

## Osnova přednášky

- Přenos genetické informace: Centrální dogma
- Proces genové exprese
- Transkripce u prokaryot
- Transkripce a úpravy RNA u eukaryot
- Přerušované geny u eukaryot: exony a introny
- Odstranění intronů sestřihem RNA

# Genová exprese: cesta od DNA k RNA a proteinu



# Informační kapacita DNA

## binární kód (2 symboly)

- počítače (0 a 1)
- morseova abeceda ( tečka a čárka)

## DNA: 4 symboly

# Přepis genetické informace z DNA do RNA: **transkripce**

- převedení informace v podobě sekvence deoxyribonukleotidů v DNA do sekvence ribonukleotidů v RNA (transkriptu)
- informace si uchovává podobnou chemickou povahu
- jedno vlákno DNA genu se použije jako templát pro syntézu komplementárního vlákna RNA
- kóduje-li transkript protein, podrobí se **translaci** na ribozomech, tj. informace skrytá v sekvenci ribonukleotidů se převede do pořadí aminokyselin v proteinech

# Transkripce se významně podílí na regulaci genové exprese

- geny mohou být podrobeny transkripci a translaci s různou účinností
- některé proteiny se proto tvoří v mnohonásobně vyšších množstvích než jiné

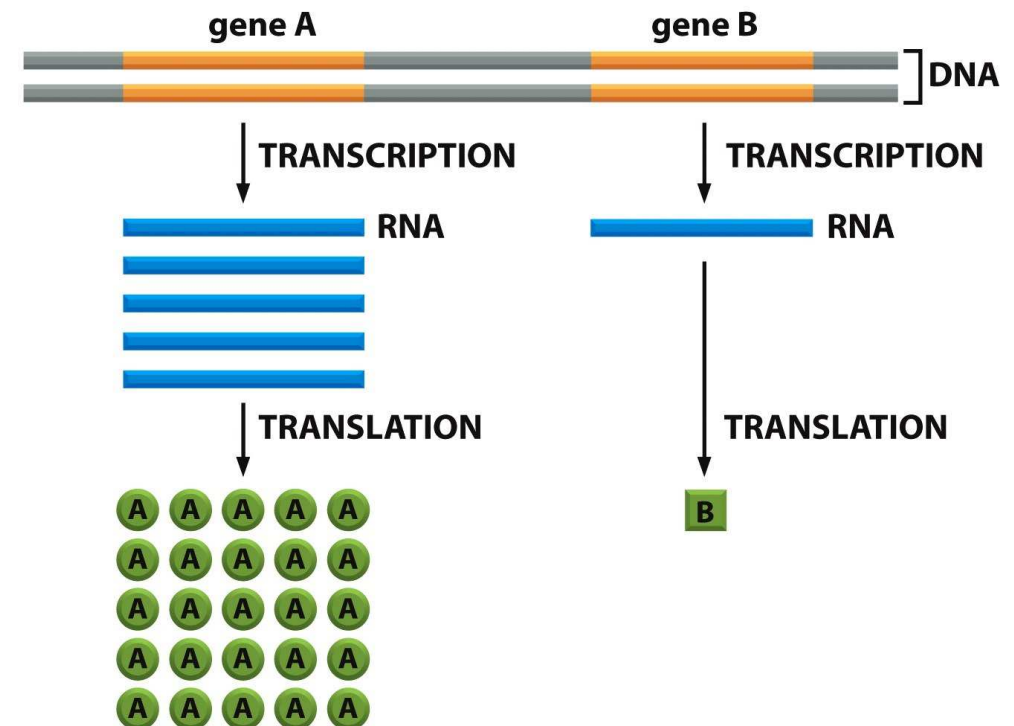
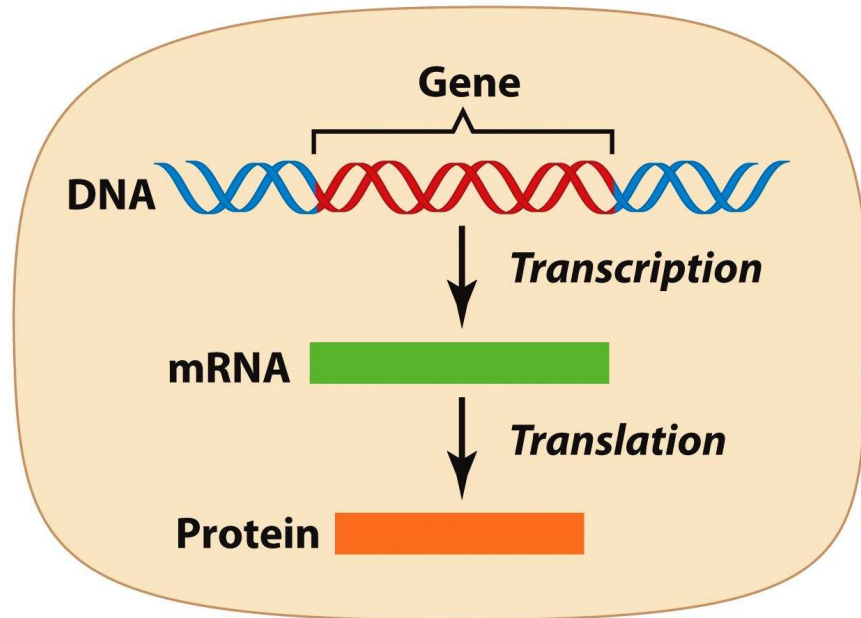


Figure 6-3 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

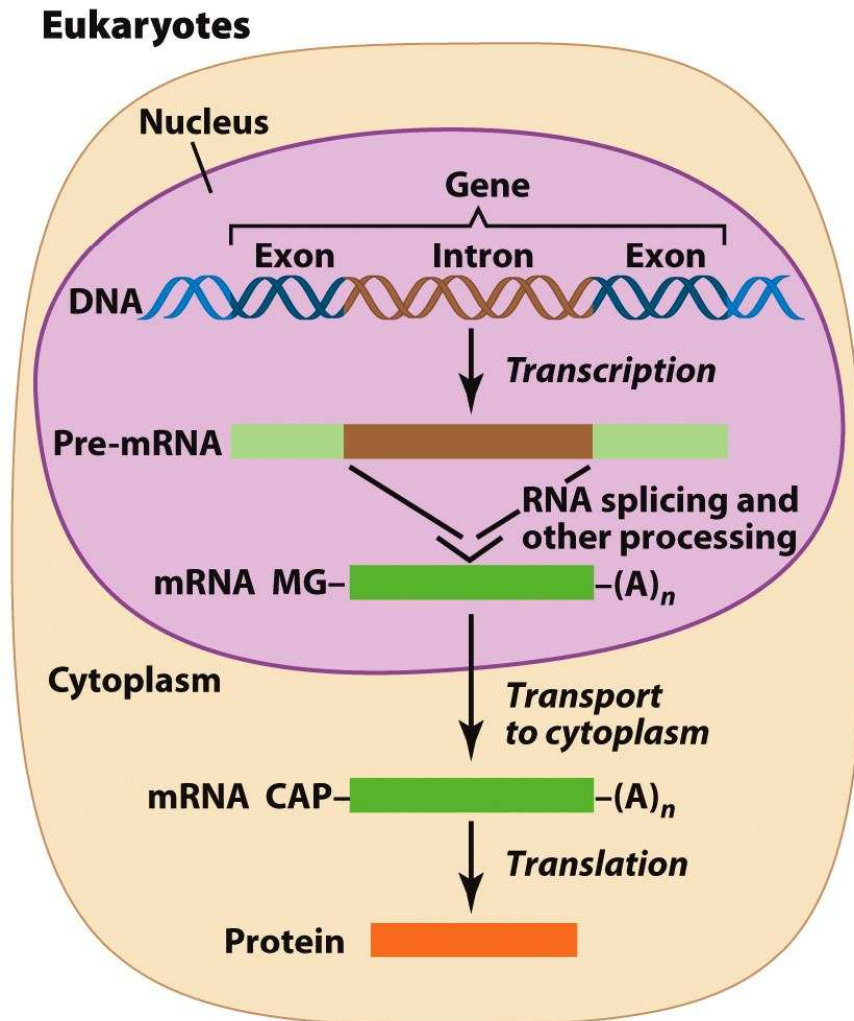
# Transkripce a translace u prokaryot

## Prokaryotes



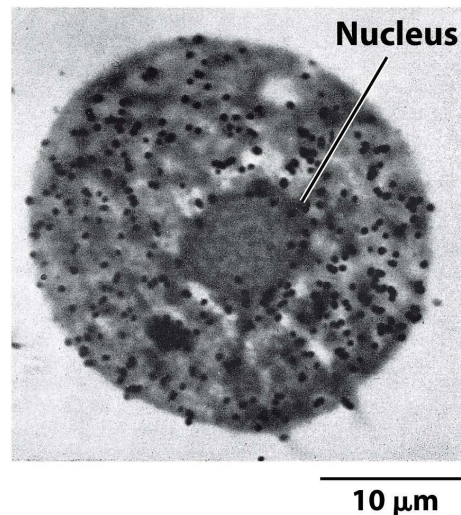
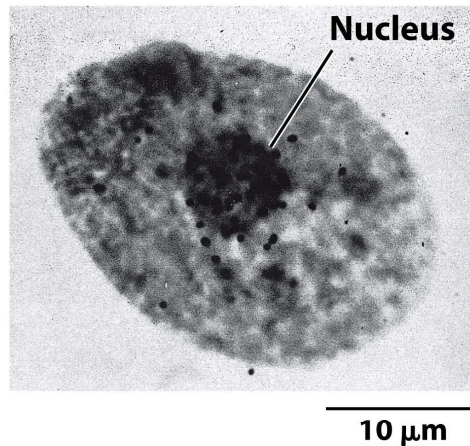
- primární transkript je ekvivalentí molekule mRNA
- mRNA se podrobuje translaci na ribozomech

# Transkripce a translace u eukaryot



- prekurzorem mRNA je primární transkript (pre-mRNA)
- pre-mRNA se na obou koncích modifikuje a zbavuje se přepisů intronů
- po úpravách se mRNA is exportuje do cytoplazmy, aby se zde podrobila translaci na ribozomech

# Syntéza a transport RNA u eukaryot



- metoda: pulzové značení RNA  $^3\text{H}$ -uridinem
- nejprve se značená RNA nachází výlučně v jádře
- později se značená RNA objevuje v cytoplasmě
- Závěr: RNA se syntetizuje v jádře a později se transportuje do cytoplazmy



# Introny a exony

- **introny**: nekódující sekvence přítomné v genech eukaryot
- **exony**: exprimované sekvence eukaryotických
- sekvence zahrnující introny i exony se transkribují do pre-mRNA
- nekódující sekvence se následně vyštěpují **sestřihovými úpravami** ("splicing") ve speciálních makromolekulárních komplexech zvaných **spliceozomy**

# Molekuly RNA

při procesech genové exprese se uplatňuje několik typů RNA

- messenger RNA (**mRNA**)—přenáší genetickou informaci z DNA do ribozomů
- transferová RNA (**tRNA**)—adaptér spojující aminokyseliny a kodony v mRNA
- ribozomální RNA (**rRNA**)—strukturní a katalytické složky ribozomů
- malé jaderné RNA (**snRNA**)—strukturní složky spliceozomů
- micro RNA (**miRNA**)—krátké jednořetězcové RNA, které blokuje translaci komplementárních mRNA
- small interfering RNA (**siRNA**)—krátké jednořetězcové RNA, které selektivně rozkládají komplementární mRNA a tak znemožňují jejich translaci

**Table 6–1 Principal Types of RNAs Produced in Cells**

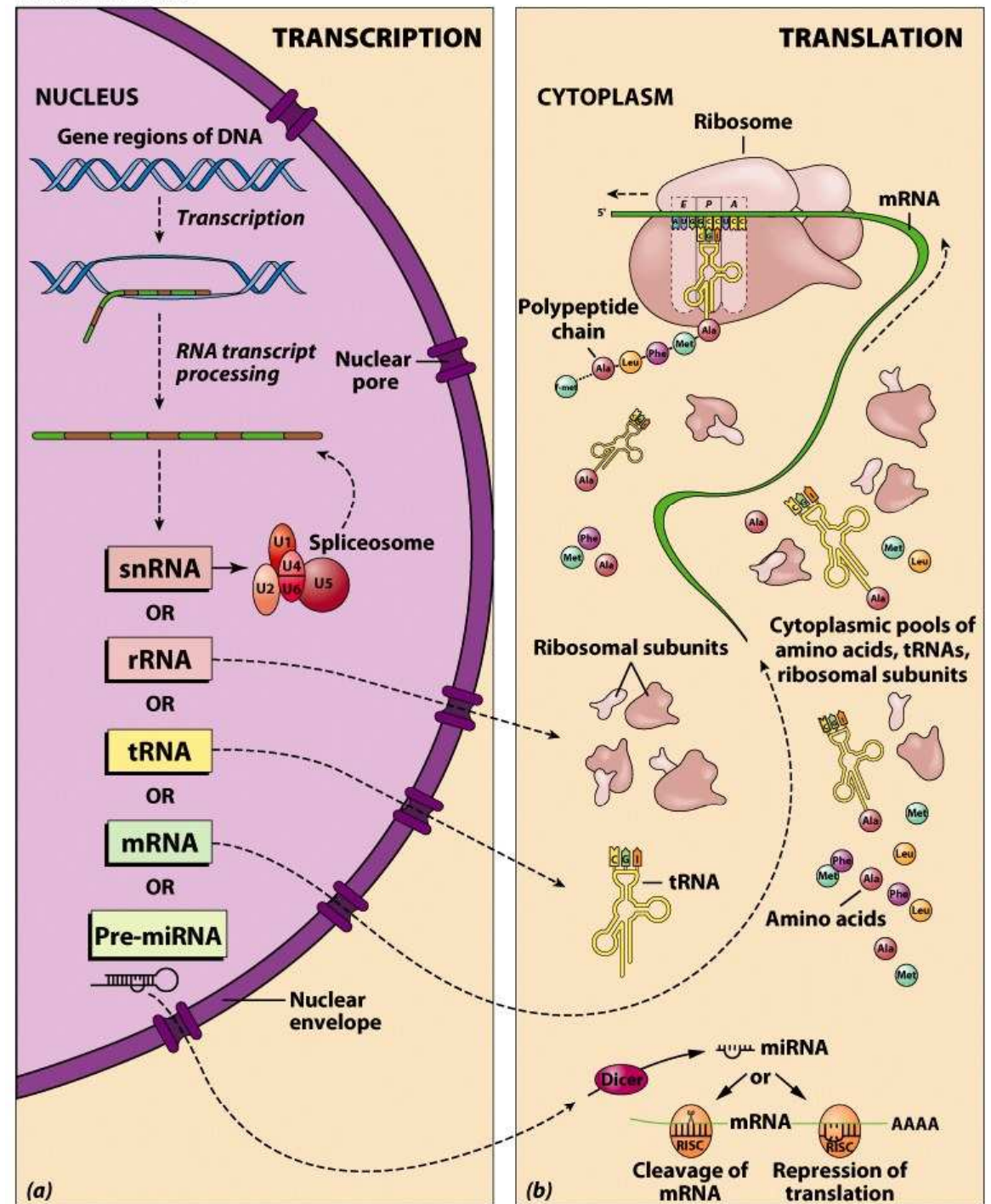
<b>TYPE OF RNA</b>	<b>FUNCTION</b>
<b>mRNAs</b>	<b>messenger RNAs, code for proteins</b>
<b>rRNAs</b>	<b>ribosomal RNAs, form the basic structure of the ribosome and catalyze protein synthesis</b>
<b>tRNAs</b>	<b>transfer RNAs, central to protein synthesis as adaptors between mRNA and amino acids</b>
<b>snRNAs</b>	<b>small nuclear RNAs, function in a variety of nuclear processes, including the splicing of pre-mRNA</b>
<b>snoRNAs</b>	<b>small nucleolar RNAs, used to process and chemically modify rRNAs</b>
<b>scaRNAs</b>	<b>small cajal RNAs, used to modify snoRNAs and snRNAs</b>
<b>miRNAs</b>	<b>microRNAs, regulate gene expression typically by blocking translation of selective mRNAs</b>
<b>siRNAs</b>	<b>small interfering RNAs, turn off gene expression by directing degradation of selective mRNAs and the establishment of compact chromatin structures</b>
<b>Other noncoding RNAs</b>	<b>function in diverse cell processes, including telomere synthesis, X-chromosome inactivation, and the transport of proteins into the ER</b>

- všechny typy RNA vznikají transkripcí
- translaci se podrobuje jen mRNA
- typy RNA, které nepodléhají translaci plní enzymové a strukturální funkce podobně jako proteiny

U prokaryot:

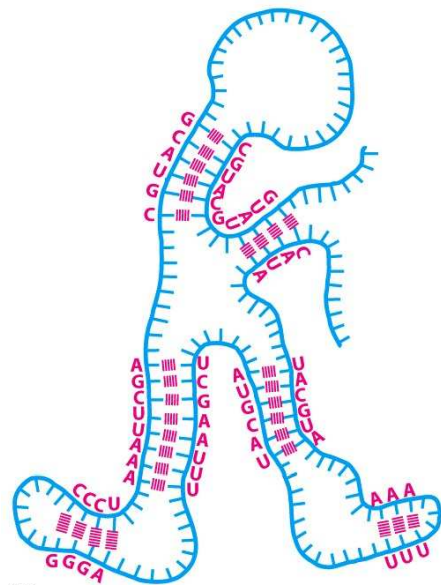
- absence jádra
- absence sestřihu

Transcription and RNA processing occur in the nucleus. Translation occurs in the cytoplasm.

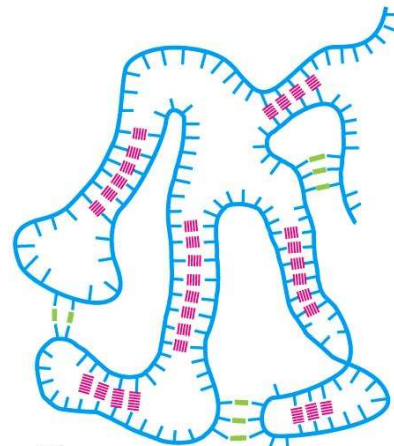


# Prostorová struktura RNA

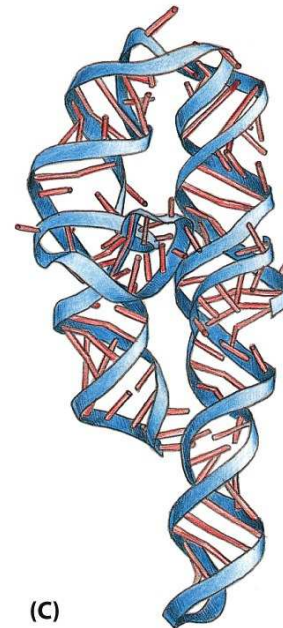
- přes malé chemické odlišnosti je struktura RNA podstatně odlišná od DNA
- DNA je v buňkách v podobě pravidelné dvoušroubovice, **RNA je jednořetězcová**
- řetězec RNA se skládá do specifického tvaru (párováním bází uvnitř téže molekuly) podobně jako polypeptidový řetězec proteinu



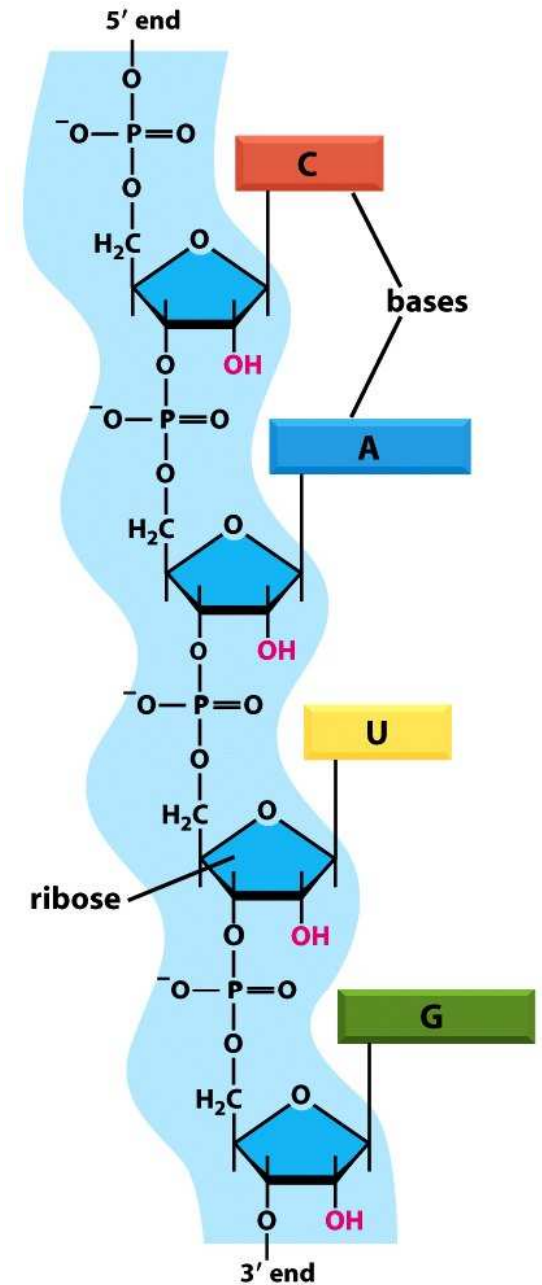
(A)



(B)

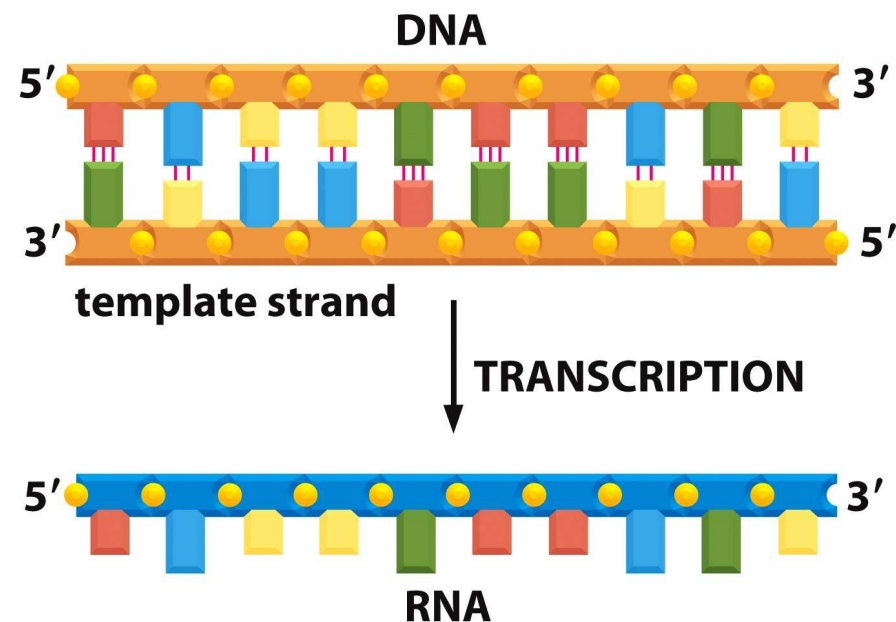


(C)



# Transkripce má několik stejných rysů jako replikace DNA

- začíná rozvolněním malé oblasti dvoušroubovice DNA: obnažení několika bází obou řetězců
- jeden z řetězců DNA slouží jako templát pro syntézu komplementárního vlákna (RNA)
- výběr začleňovaného nukleotidu vyplývá z párování komplementární bází
- nový nukleotid je do rostoucího vlákna začleněn kovalentní vazbou enzymatickou reakcí
- vzniklá RNA je přesnou komplementární verzí templátového řetězce
- syntéza RNA probíhá ve směru 5'→3'



# Odlišnosti transkripce a replikace

- prekurzory jsou **ribonukleozidtrifosfáty** a ne deoxyribonukleozidtrifosfáty
- transkribuje se jen **jedno vlákno DNA**
- syntéza RNA může být iniciována **de novo**
- vzniklý **řetězec RNA** nezůstává připojen vodíkovými vazbami k DNA, ale **odvíjí se** od něj, čímž umožňuje obnovení dvoušroubovicové struktury DNA
- transkripty se z templátu uvolňují jako **jednořetězce**
- velikost transkriptů je podstatně menší než velikost genomu
- transkripci zajišťuje **DNA-dependentní RNA polymeráza**, zatímco replikaci katalyzuje DNA-dependentní DNA polymeráza

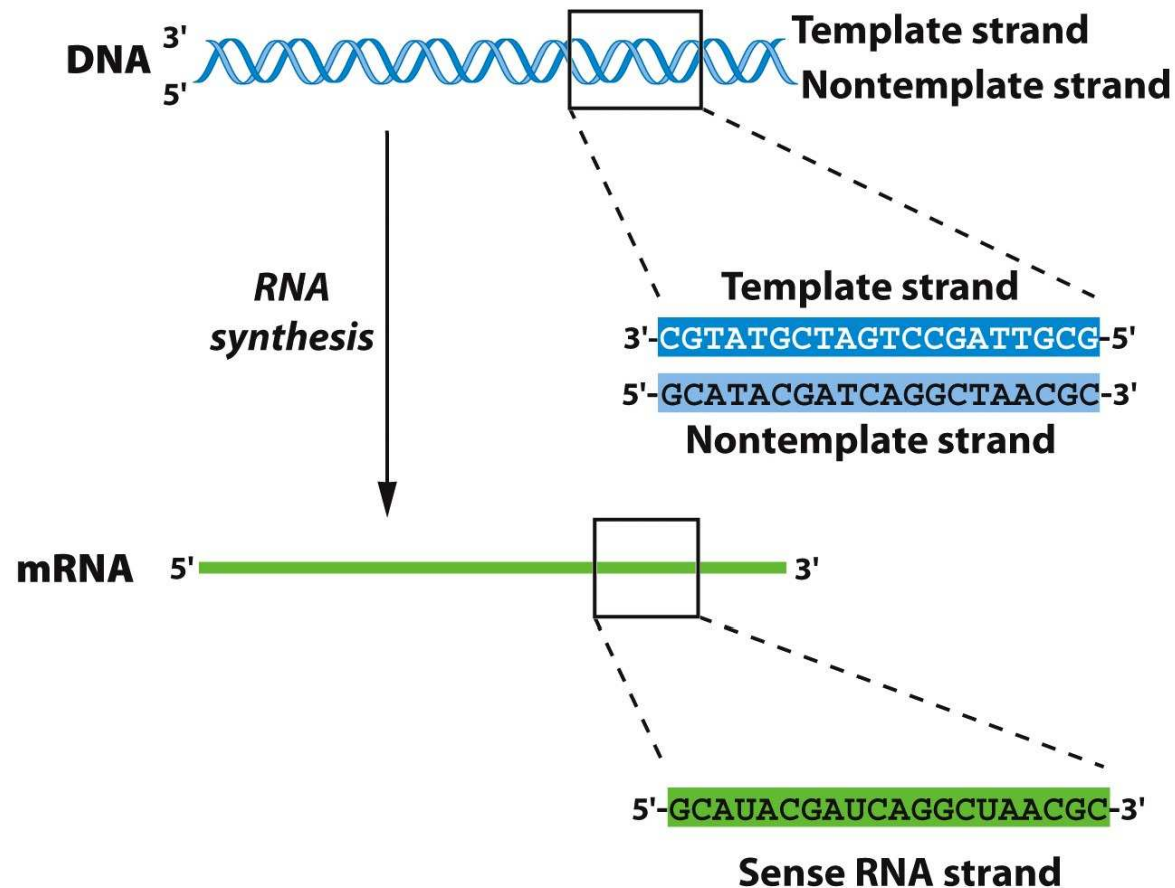
# Odlišnosti RNA a DNA polymeráz

- odlišná chemická povaha substrátů a produktů reakce
- RNA polymerázy mohou katalyzovat tvorbu RNA za nepřítomnosti primeru
- RNA polymerázy jsou méně přesné než DNA polymerázy (1 chyba/ $10^4$  nukleotidů versus 1 chyba/ $10^7$  nukleotidů)

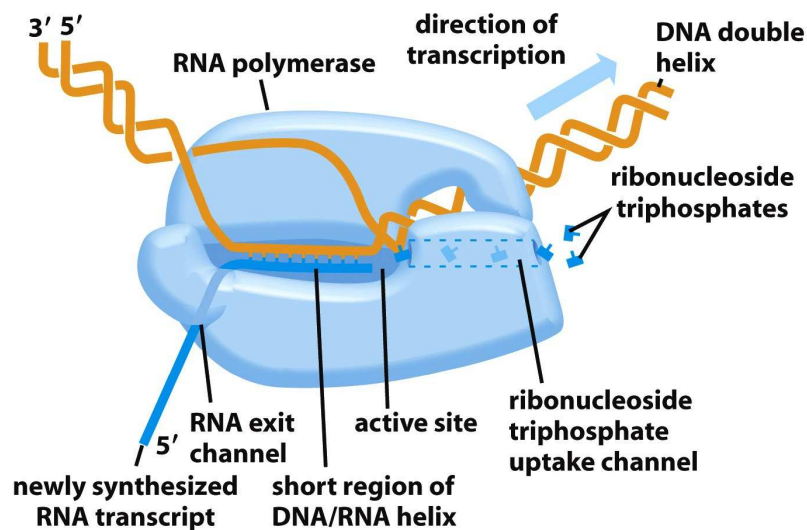


# Pro transkripci se využívá jen jedno vlákno DNA

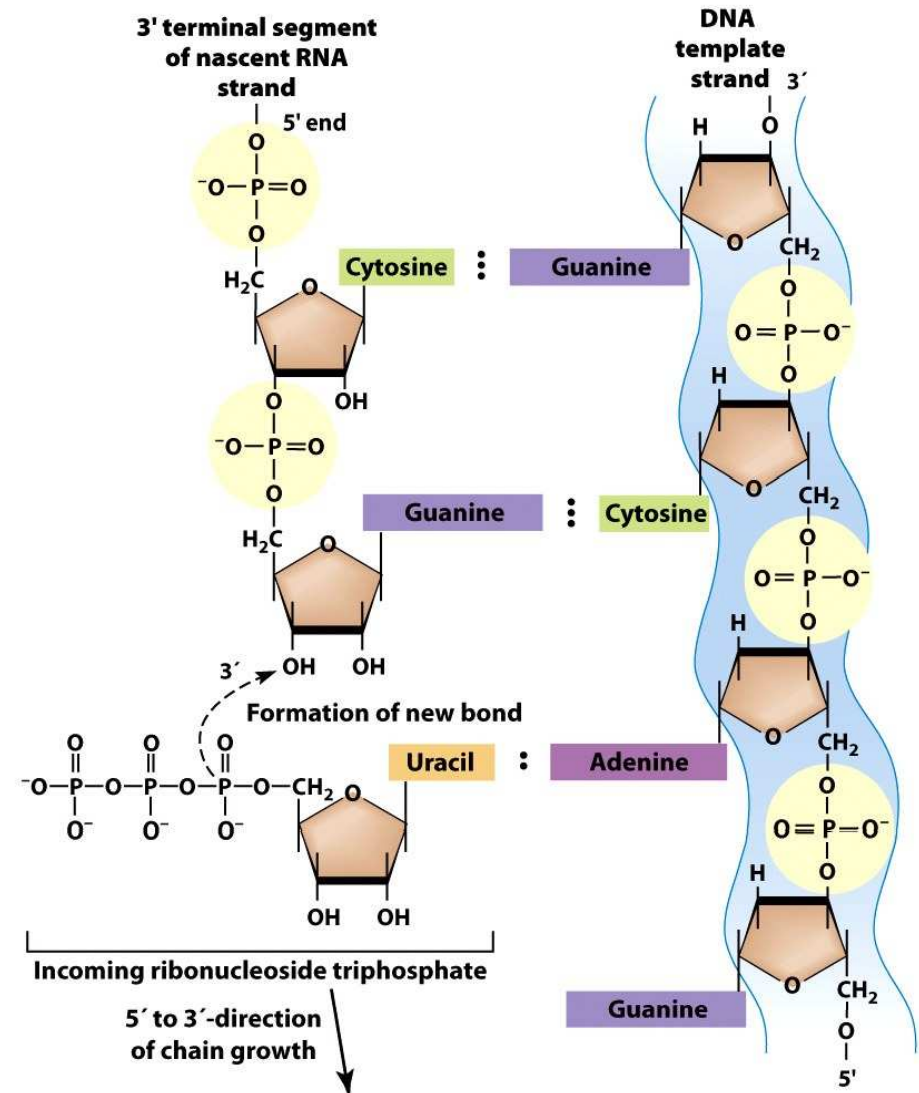
kódující (templátové) vlákno je určeno signálními sekvencemi



- katalyzují tvorbu fosfodiesterových vazeb mezi nukleotidy a vytvářejí tak lineární řetězec
- pohybují se podél DNA, postupně rozvíjejí dvoušroubovici, obnažují templátový řetězec pro párování s komplementárními bázemi
- vznikající řetězec RNA se prodlužuje ve směru 5' - 3'
- substráty polymerace jsou nukleosidtrifosfáty ATP, CTP, UTP a GTP
- nutnou energii poskytuje hydrolýza makroergických vazeb

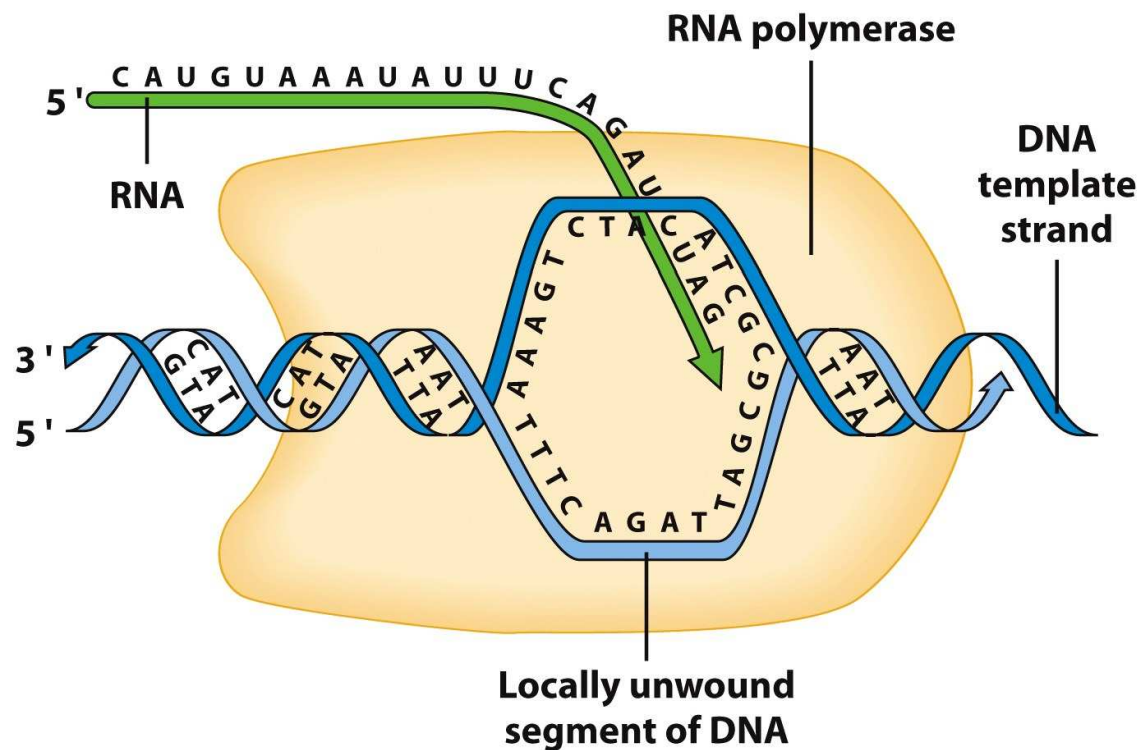


# RNA polymerázy



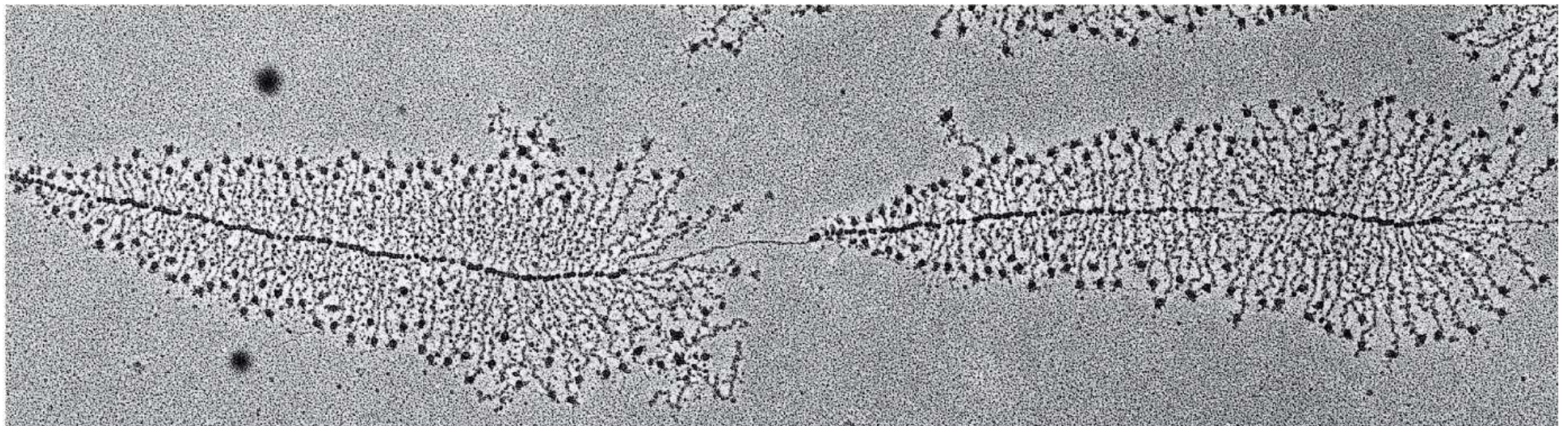
# Průběh transkripce - stručný přehled

- RNA polymeráza se váže na specifickou nukleotidovou sekvenci, tzv. **promotor**
- k tomu ji napomáhají transkripční faktory
- transkripce je iniciována v místě lokálního rozvinutí DNA, vzniká **transkripční bublina**



# Proces transkripce je rychlý

- vzniklá RNA se rychle uvolňuje z templátu
- transkripce téhož genu může být zahájena ještě před dokončením transkripce předchozí
- stejný gen může být podroben opakované transkripci v krátkém čase
- RNA polymeráza se pohybuje rychlostí 20 nukleotidů za sekundu (u eukaryot)
- za hodinu se může vytvořit více než 1000 transkriptů téhož genu

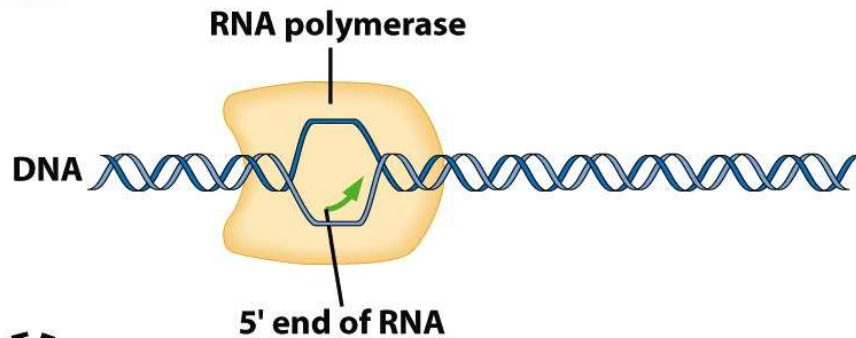


1  $\mu\text{m}$

# Fáze transkripce

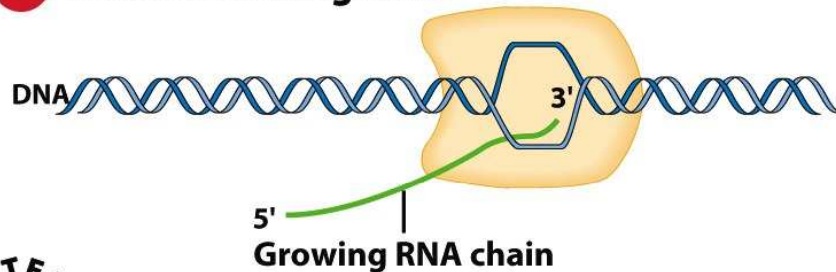
STEP

## 1 RNA chain initiation



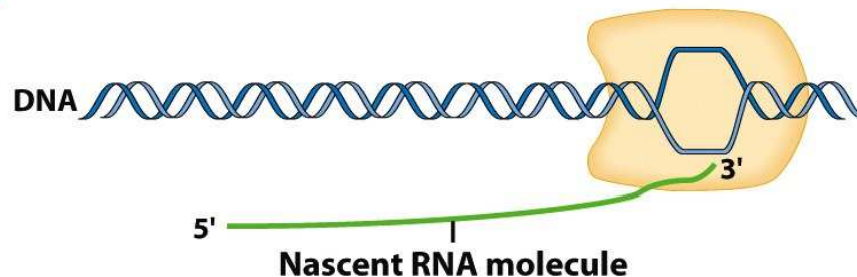
STEP

## 2 RNA chain elongation



STEP

## 3 RNA chain termination



**1. iniciace:** rozeznání promotoru RNA polymerázou, vazba na DNA, rozvinutí dvoušroubovice v místě startu transkripce, zahájení syntézy RNA

**2. elongace:** pokračování v syntéze transkriptu podle informace v DNA templátu

**3. terminace:** ukončení syntézy transkriptu, uvolnění RNA polymerázy z templátu

# Terminologie transkripce

## Transkripční jednotka

- úsek DNA, jehož transkripcí vzniká jediná molekula RNA
- může a nemusí být ekvivalentní genu (u prokaryot běžně zahrnuje několik genů)

## "Upstream" (proti směru transkripce) a "downstream" (po směru transkripce)

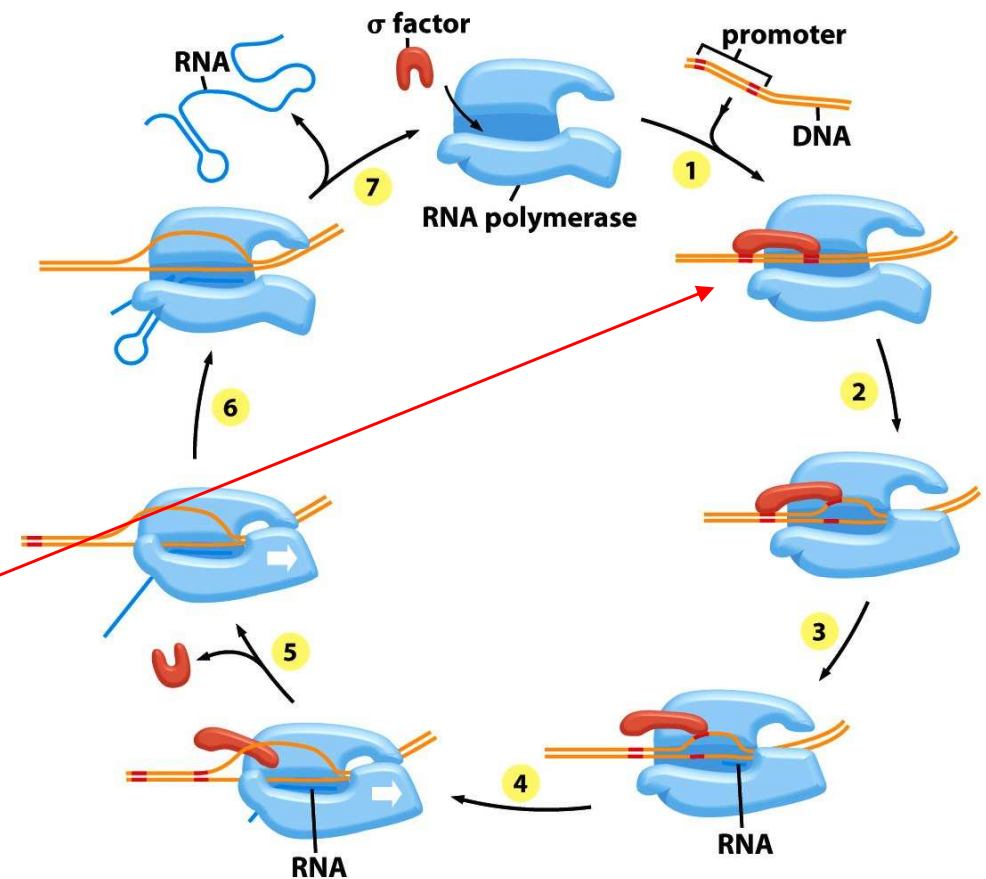
- oblasti transkriptu RNA, které jsou umístěny směrem k 5' konci (upstream, minus) nebo 3' konci (downstream, plus) vzhledem k určitému referenčnímu bodu
- termíny se používají i pro ekvivalentní sekvence DNA
- místo iniciace transkripce se značí +1

# Transkripce u prokaryot: RNA polymeráza

- vícepodjednotkový proteinový komplex (5 polypeptidů, z toho dva jsou identické) tvoří tzv. **holoenzym**
- obsahuje podjednotky  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$ ,  $\sigma$
- **podjednotky  $\alpha$**  napomáhají sestavení tetramerního jádra RNA polymerázy
- **podjednotka  $\beta$**  obsahuje vazebné místo pro ribonukleozidtrifosfáty
- **podjednotka  $\beta'$**  obsahuje vazebné místo pro DNA templát
- podjednotka  $\sigma$  (**sigma faktor**) se účastní iniciace transkripce (po dokončení iniciace a zahájení elongace se z komplexu uvolňuje) - zajišťuje **specifickou vazbu RNA polymerázy na promotor**

# Iniciace transkripce u prokaryot

- k jádru enzymu se připojuje sigma faktor a vzniká tak holoenzym RNA polymerázy
- tento komplex klouže po molekule DNA dokud se znovu nerozpadne
- pokud při pohybu po DNA narazí na nukleotidovou sekvenci (promotor), naváže se na ni pevněji
- promotor nastavuje RNA polymerázu k startovnímu bodu transkripce
- za rozeznání promotoru zodpovídá sigma faktor RNA polymerázy, který vytváří specifické kontakty s bázemi promotoru



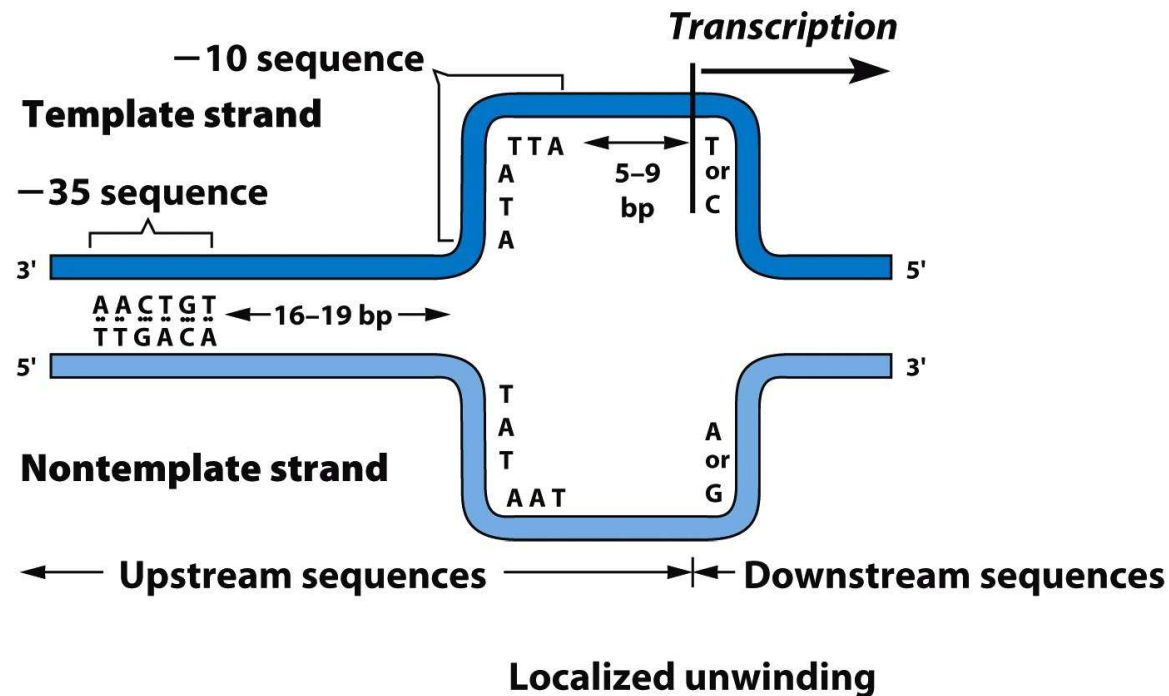


# Iniciace transkripce u prokaryot: 3 kroky

1. holoenzym RNA polymerázy se váže do promotorové oblasti DNA
2. přítomnost RNA polymerázy způsobí lokální rozvinutí vláken DNA, dojde k obnažení bází templátu, aby se mohly párovat s ribonukleotidy
3. RNA polymeráza katalyzuje tvorbu fosfodiesterových vazeb mezi několika prvními nukleotidy vznikajícího vlákna RNA (po dokončení syntézy cca 10 prvních nukleotidů se oslabuje vazba mezi RNA polymerázou a promotorem a mezi jádrem enzymu a sigma faktorem, iniciace končí)

# Struktura prokaryotických promotorů

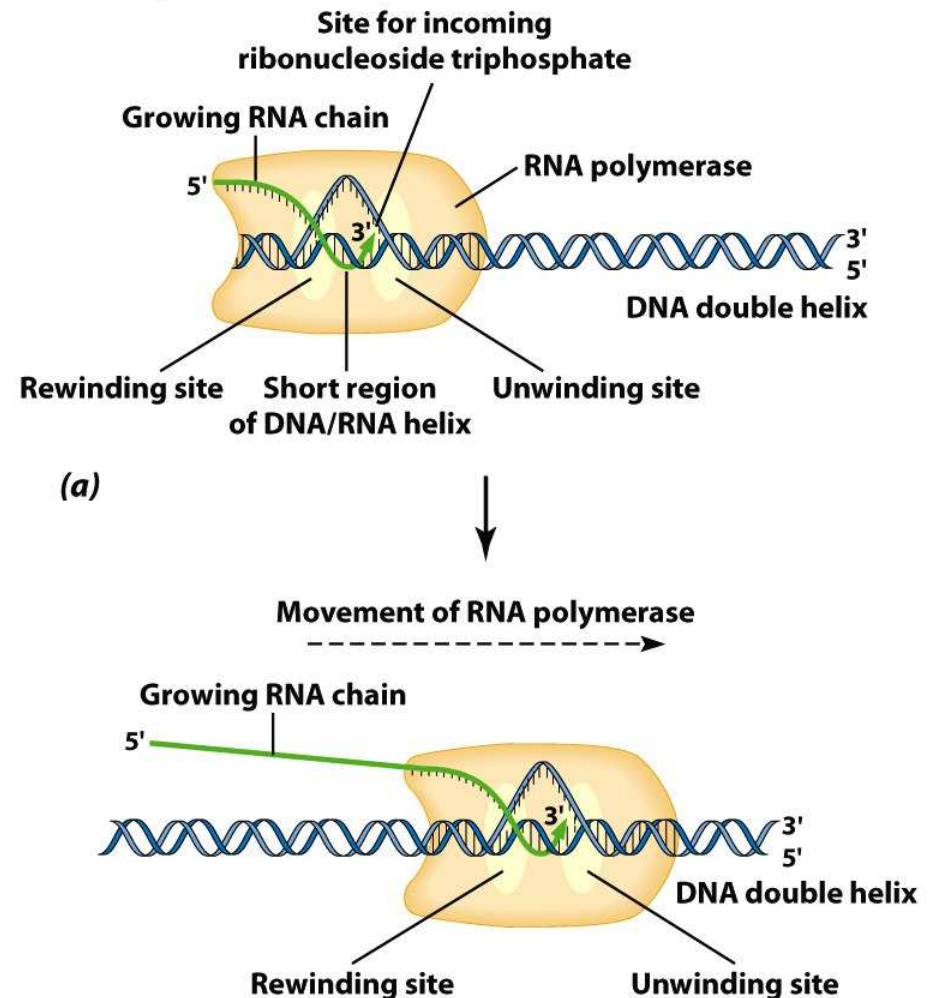
- krátké konzervativní sekvence v oblastech vzdálených 35 a 10 nukleotidů proti směru transkripce od místa startu
- **sekvence -10:** TATAAT (bohaté zastoupení AT usnadňuje rozvíjení dvoušroubovice)
- **sekvence -35:** TTGACA (rozeznávací sekvence, na kterou se váže sigma faktor)



# Elongace řetězce RNA u prokaryot

- katalyzována RNA polymerázou po uvolnění  $\sigma$  faktoru
- dochází k prodlužování RNA tvorbou kovalentních vazeb mezi ribonukleotidy
- RNA polymeráza se pohybuje po templátu a postupně rozvíjí DNA tvorbou transkripční bubliny
- za polymerázou se obnovuje dvoušroubovice DNA
- vznikající vlákno RNA se vytěsňuje z templátu
- oblast přechodného párování mezi DNA a RNA je velmi krátká (cca 3 páry bází)
- rychlost: 40 ribonukleotidů za sekundu

RNA polymerase is bound to DNA and is covalently extending the RNA chain.



(b) RNA polymerase has moved downstream from its position in (a), processively extending the nascent RNA chain.

# Terminace řetězce RNA u prokaryot

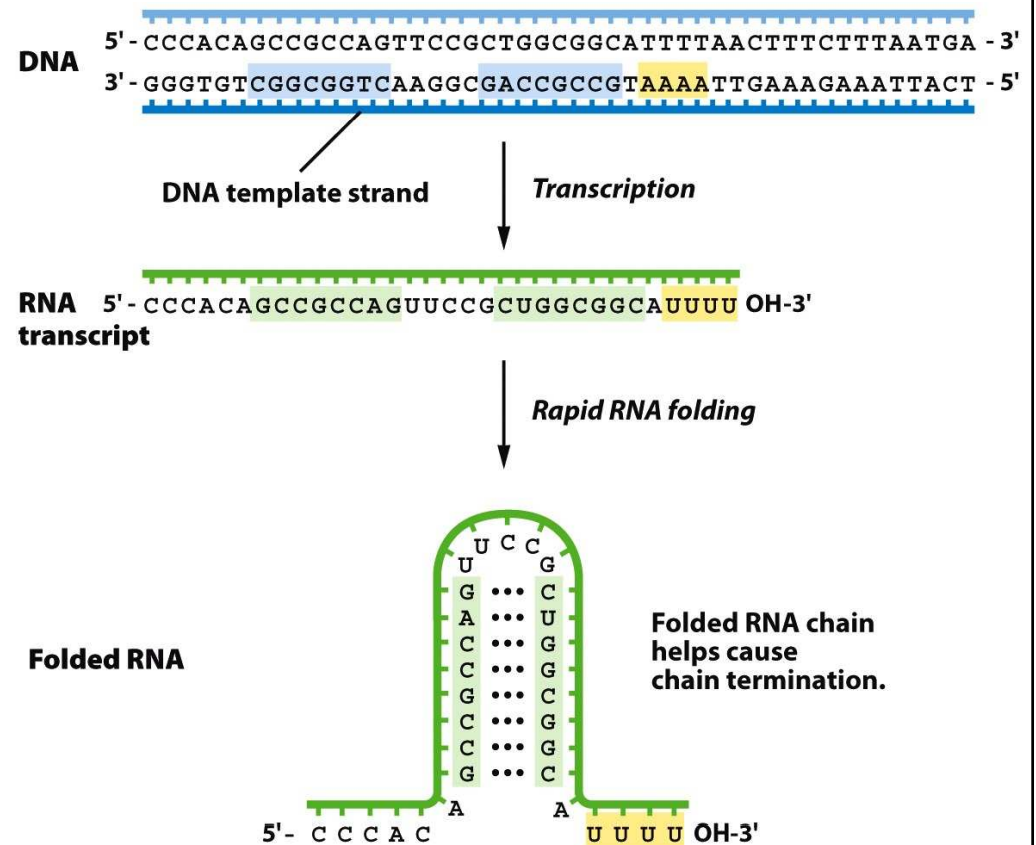
- elongace transkripce pokračuje dokud enzym nezaznamená ve struktuře DNA **terminační signál (terminátor)**
- v místě terminátoru se pohyb RNA polymerázy zastaví a transkripční komplex se rozpadá
- dojde k uvolnění řetězce RNA i templátu DNA
- uvolněná RNA polymeráza může znovu asociovat se sigma faktorem a znovu zahájit transkripci

# Terminační signály u *E.coli*: 2 typy

- terminátory závislé na  $\rho$  ( $\rho$ -) - vyžadují proteinový faktor  $\rho$
- terminátory nezávislé na  $\rho$  - fungují za nepřítomnosti proteinu  $\rho$

# Terminátory nezávislé na $\rho$

- obsahují sekvence bohaté na GC, po kterých následuje šest nebo více párů AT
- po přepisu do RNA v důsledku intramolekulárního párování bází GC vzniká vlásenka
- tato vlásenka zpomaluje pohyb RNA polymerázy, což vede k terminaci transkripce v přilehlé oblasti AU a uvolnění transkriptu

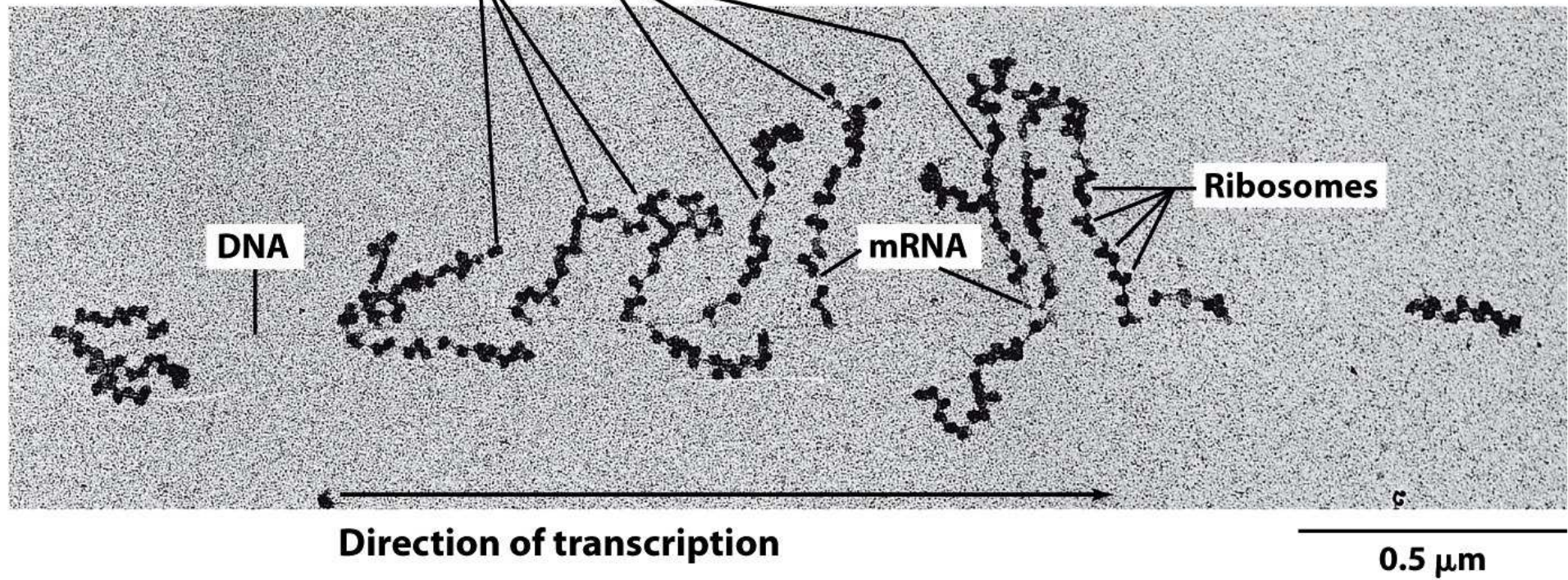


# Terminátory závislé na $\rho$

- sekvence dlouhé 50 - 90 pb
- transkripty vzniklé jejich přepisem jsou bohaté na C
- protein  $\rho$  se váže k syntetizované RNA a pohybuje se po ní ve směru 5' - 3' (jako by sledoval RNA polymerázu)
- jakmile se pohyb RNA polymerázy na terminátoru zpomalí, protein  $\rho$  ji **dostihne a zajistí uvolnění vlákna RNA z transkripční bubliny**

# Transkripce a translace je u *E. coli* často spojena

Gene transcripts (RNA) being simultaneously translated by many ribosomes





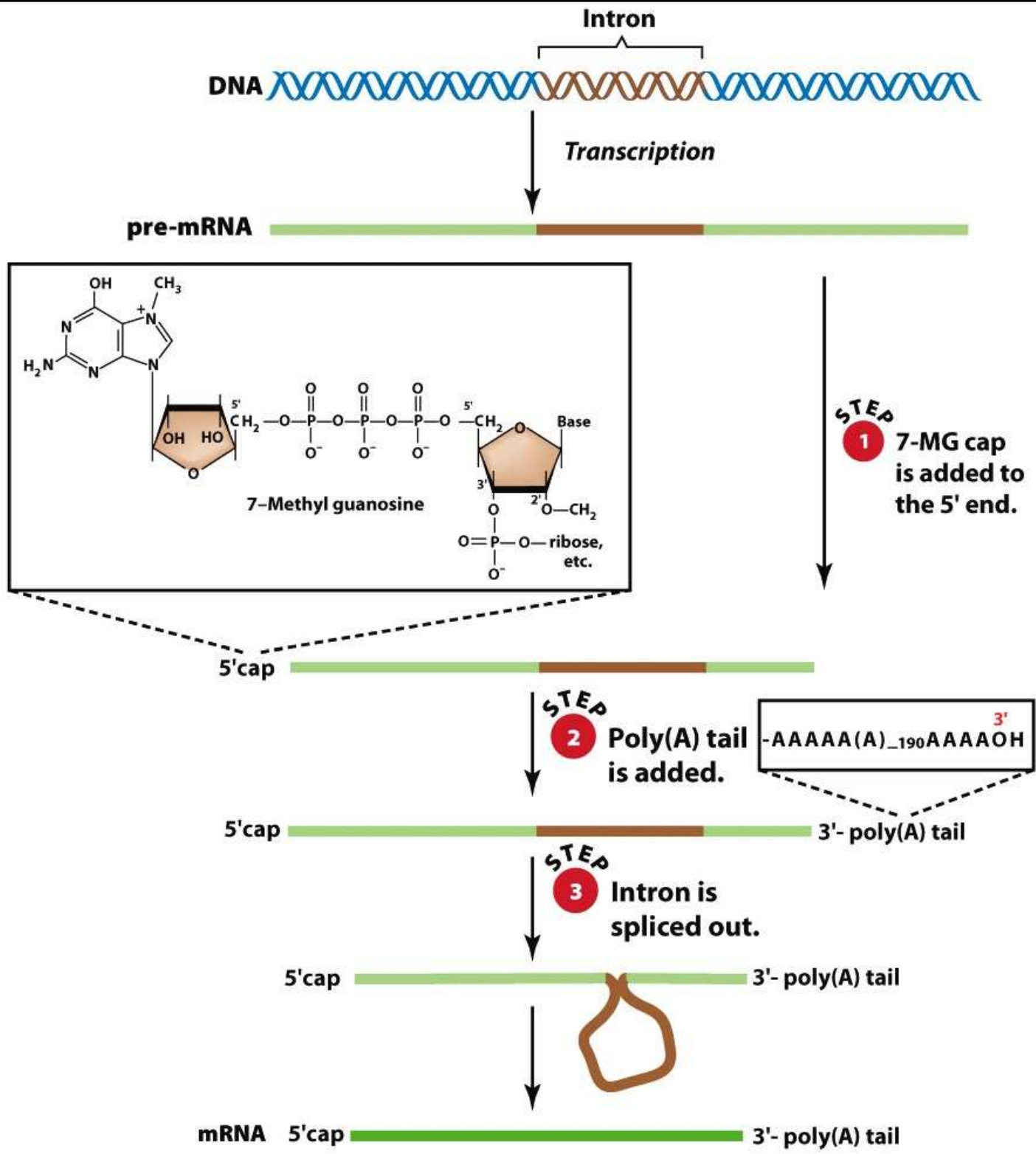
# Take home message

- syntéza RNA probíhá ve třech fázích (1) iniciace, (2) elongace a (3) terminace
- RNA polymerázy, které zajišťují transkripce jsou složité vícepodjednotkové proteiny
- kovalentní prodlužování řetězců RNA probíhá uvnitř oblastí lokálního rozvinutí DNA
- elongace končí v místech, kde RNA polymeráza zaznamená signál pro terminaci transkripce
- transkripce, translokace a degradace molekul mRNA často u prokaryot probíhá v těsném spřažení

# Transkripce a úpravy RNA u eukaryot

odlišnosti od prokaryot:

- RNA je syntetizovaná v jádře, ale proteiny v cytoplazmě
- eukaryotické transkripty jsou **monogenní**
- populace primárních transkriptů v jádře se označuje **heterogenní jaderná RNA (hnRNA)**
- transkripty se pokrývají proteiny již během své syntézy (ochrana před degradací ribonukleázami)
- **3 typy RNA polymerázy** (I, II, III), které jsou strukturně podobné, ale transkribují různé typy genů
- primární transkripty genů kódujících polypeptidy podléhají před transportem do cytoplazmy **třem modifikacím**:
  - na 5' konce primárních transkriptů se váže 7-metylguanozinová čepička
  - na 3' konce primárních transkriptů se vážou sekvence poly(A) (tj. sekvence A dlouhá 20 - 200 nukleotidů)
  - z primárních transkriptů se vystřihují sekvence intronů



# Tři typy RNA polymeráz u eukaryot

- 3 typy RNA polymerázy (I, II, III), které jsou strukturně podobné, ale transkribují různé typy genů:
- **RNA polymeráza I:** geny kódující 5,8S, 18S a 28S rRNA
- **RNA polymeráza II:** geny kódující proteiny, miRNA, siRNA a většinu snRNA
- **RNA polymeráza III:** geny kódující tRNA, 5S rRNA, některé snRNA a další malé RNA

► **TABLE 11.1**

## Characteristics of the Three RNA Polymerases of Eukaryotes

Enzyme	Location	Products	Sensitivity to $\alpha$ -Amanitin
RNA polymerase I	Nucleolus	Ribosomal RNAs, excluding 5S rRNA	No sensitivity
RNA polymerase II	Nucleus	Nuclear pre-mRNAs	Complete sensitivity
RNA polymerase III	Nucleus	tRNAs, 5S rRNA, and other small nuclear RNAs	Intermediate sensitivity

# Vlastnosti eukaryotických RNA polymeráz

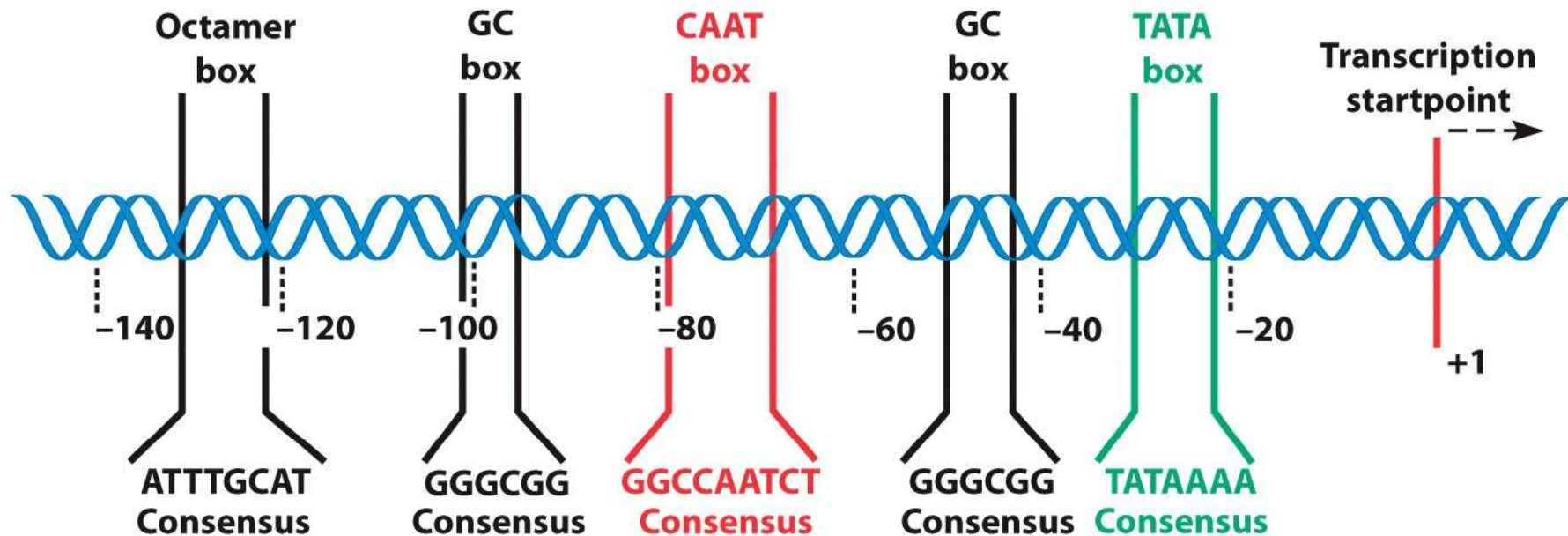
- obsahují 10 nebo více podjednotek
- pro správnou funkci nutná pomoc většího počtu transkripčních faktorů
- jednotlivé typy se liší citlivostí k houbovému jedu  $\alpha$ -amanitinu (producentem je houba *Amanita phalloides*):
  - RNA polymeráza I je zcela rezistentní
  - RNA polymeráza II je citlivá i k nízkým koncentracím
  - RNA polymeráza III je citlivá k vyšším koncentracím

$\alpha$ - amanitin lze použít pro určení typu RNA polymerázy, transkribující určitý gen

# Iniciace transkripce u eukaryot

- na rozdíl od prokaryot závislá na pomocných proteinech, které se vážou na promotory a účastní se tvorby iniciačního komplexu
- teprve následně se k DNA připojuje RNA polymeráza
- RNA polymerázy I, II a III používají různé promotory

Příklad promotoru RNA pol II: **TATA box** a **CAAT box** jsou přítomny u promotorů většiny genů RNA pol II



# Hlavní složky eukaryotických promotorů RNA pol II

2 hlavní konzervativní elementy:

## **TATA box:**

- konzervativní sekvence TATAAAA v netemplátovém vlákně
- umístěn v oblasti -30
- důležitý pro správné umístění transkripčních faktorů vzhledem k počátku transkripce

## **CAAT box:**

- konzervativní sekvence GGCCAATCT v netemplátovém vlákně
- umístěn v oblasti -80
- ovlivňuje účinnost iniciace transkripce

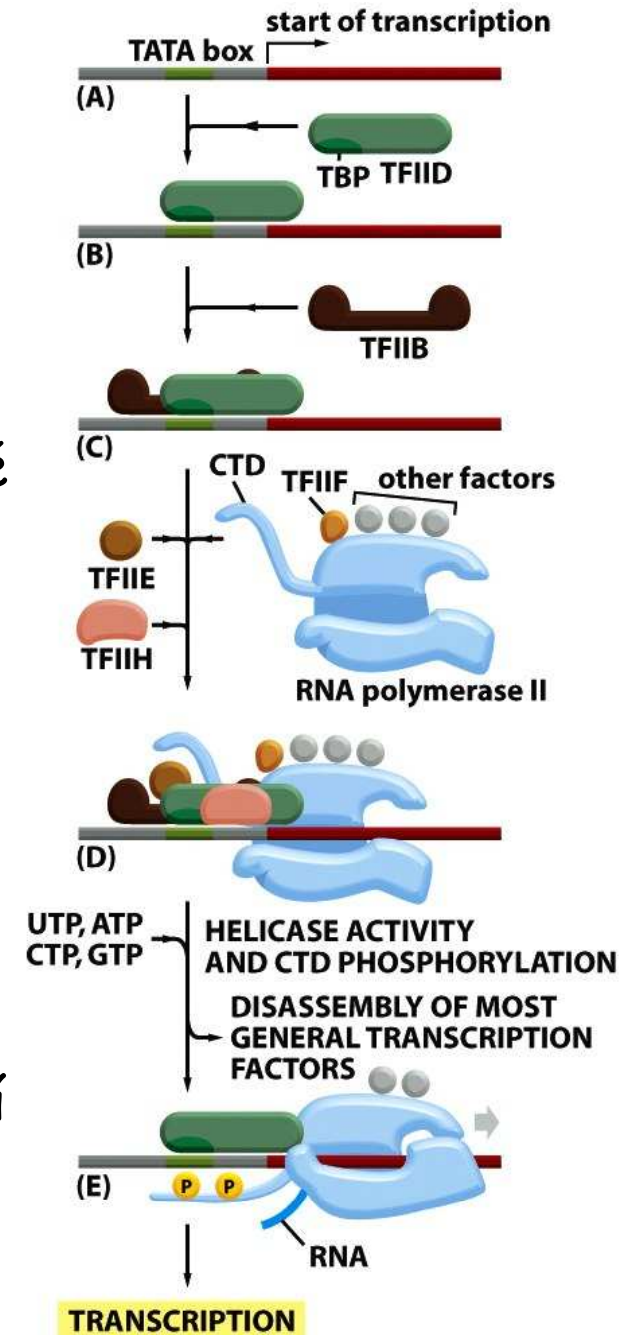
# Bazální transkripční faktory

- uvádějí RNA polymerázu přesně na promotor a ke startovacímu nukleotidu
- podílejí se na rozvolnění řetězců DNA před začátkem transkripce
- uvolňují RNA polymerázu z promotoru při přechodu z iniciace do elongace
- fungují na téměř všech promotorech RNA polymerázy II
- označují se **TFIIX** (**T**ranscription **F**actor for polymerase **II**, kde **X** je písmeno specifické pro daný faktor)



# Iniciace transkripce RNA polymerázou II

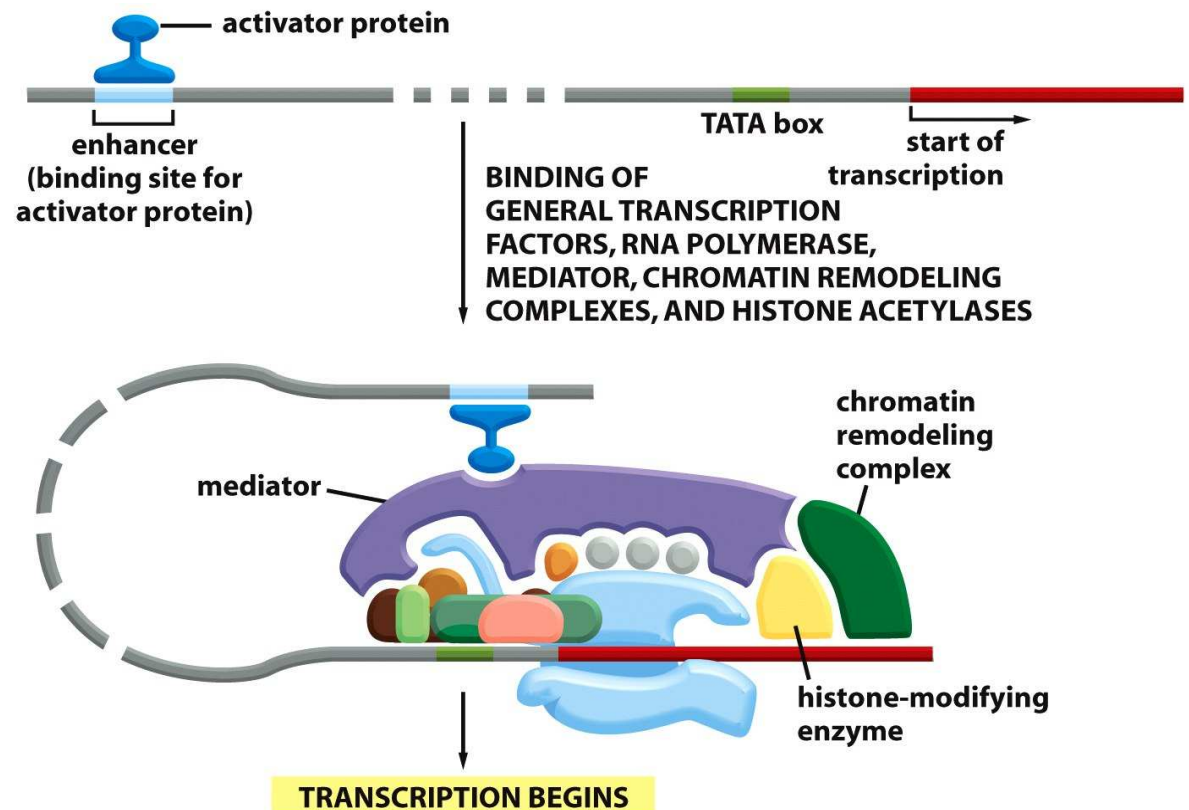
- **TFIID** rozeznává a váže TATA box
- tím se umožní vazba **TFIIB**
- takto označené místo na DNA slouží pro vazbu **RNA polymerázy II** a dalších TF, které společně vytvářejí **iniciační komplex**
- **TFIIH** iniciačního komplexu má aktivitu DNA helikázy a za spotřeby ATP napomáhá rozvíjení šroubovice DNA
- **TFIIH** rovněž fosforyluje RNA polymerázu II, čímž se mění její konformace, uvolňují se bazální transkripční faktory a začíná elongace



# Iniciace transkripce u eukaryot

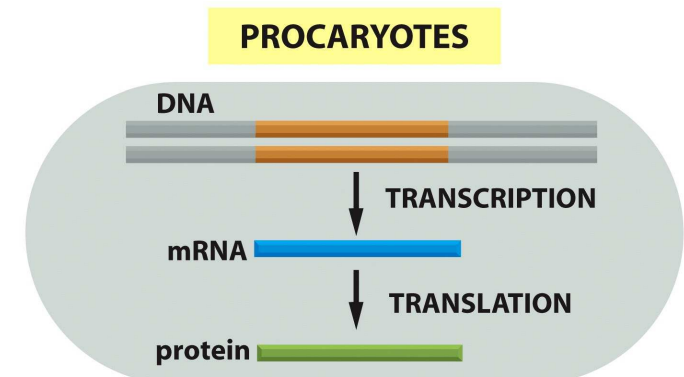
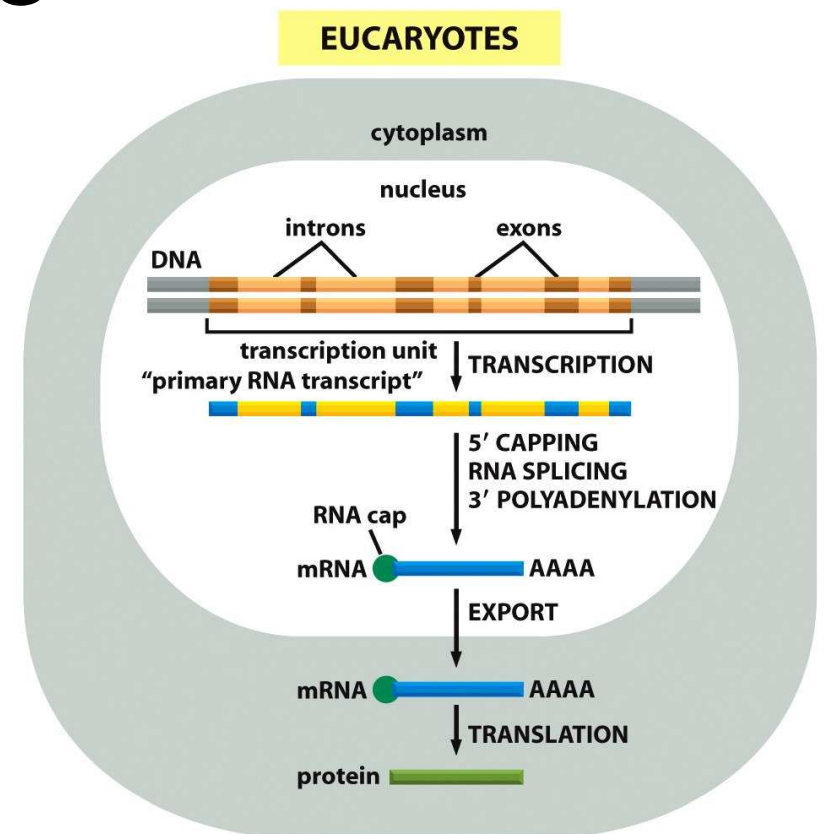
RNA polymeráza II spolupracuje s dalšími proteiny

- **aktivátory transkripce:** vážou se do specifického místa DNA („enhancer“) a přitahují RNA polymerázu II k začátku transkripce
- **mediátorový komplex:** zprostředkovává interakce mezi aktivátory, RNA polymerázou II a obecnými transkripčními faktory
- **chromatin remodelující komplexy a enzymy:** usnadňují přístup DNA v chromatinu



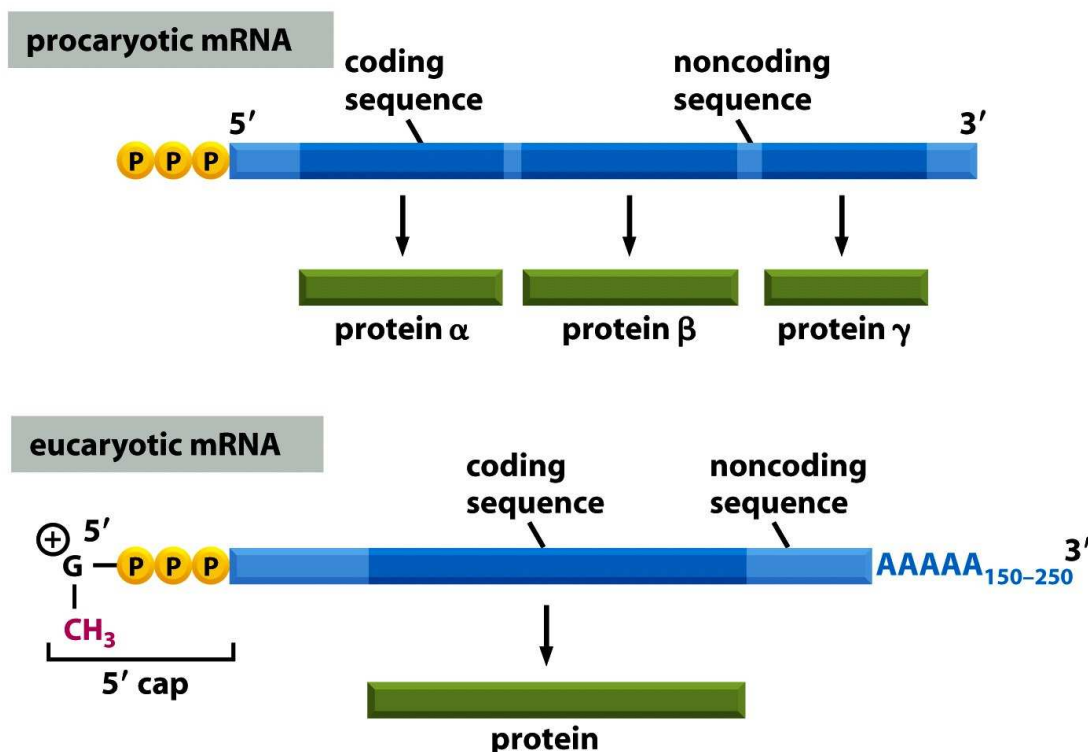
# Při elongaci transkripce u eukaryot RNA upravuje

- nastává po **uvolnění iniciačních faktorů**, RNA polymeráza II se uvolňuje z iniciačního komplexu
- C-koncová doména RNA polymerázy II (CTD) se fosforyluje a tím mění konformaci a mění se spektrum proteinů, se kterými interaguje
- RNA polymeráza II se spojuje s elongačními faktory: snížení rizika, že se DNA z genu odpoutá dříve než dosáhne jeho konce
- v rané fázi elongace se modifikuje 5' konec transkriptu čepičkou, pak probíhají další posttranskripční úpravy



# Modifikace konců transkriptů

- připojení čepičky na 5' konec („capping“)
- připojení polyadenylačního signálu na 3' konec
- umožňují buňce vyhodnotit, že jsou oba konce k dispozici a že transkript je intaktní před jeho transportem z jádra do cytoplazmy





# Význam modifikace 5' konce transkriptu

- pomáhá buňce odlišit mRNA od jiných typů RNA
- představuje vazebné místo pro „cap-binding complex“ (CBC), který napomáhá sestřihu a exportu transkriptu z jádra
- rozeznává proteiny zapojenými do iniciace translace - ochrana transkriptů před nukleázami

# Transkripce a chromatin

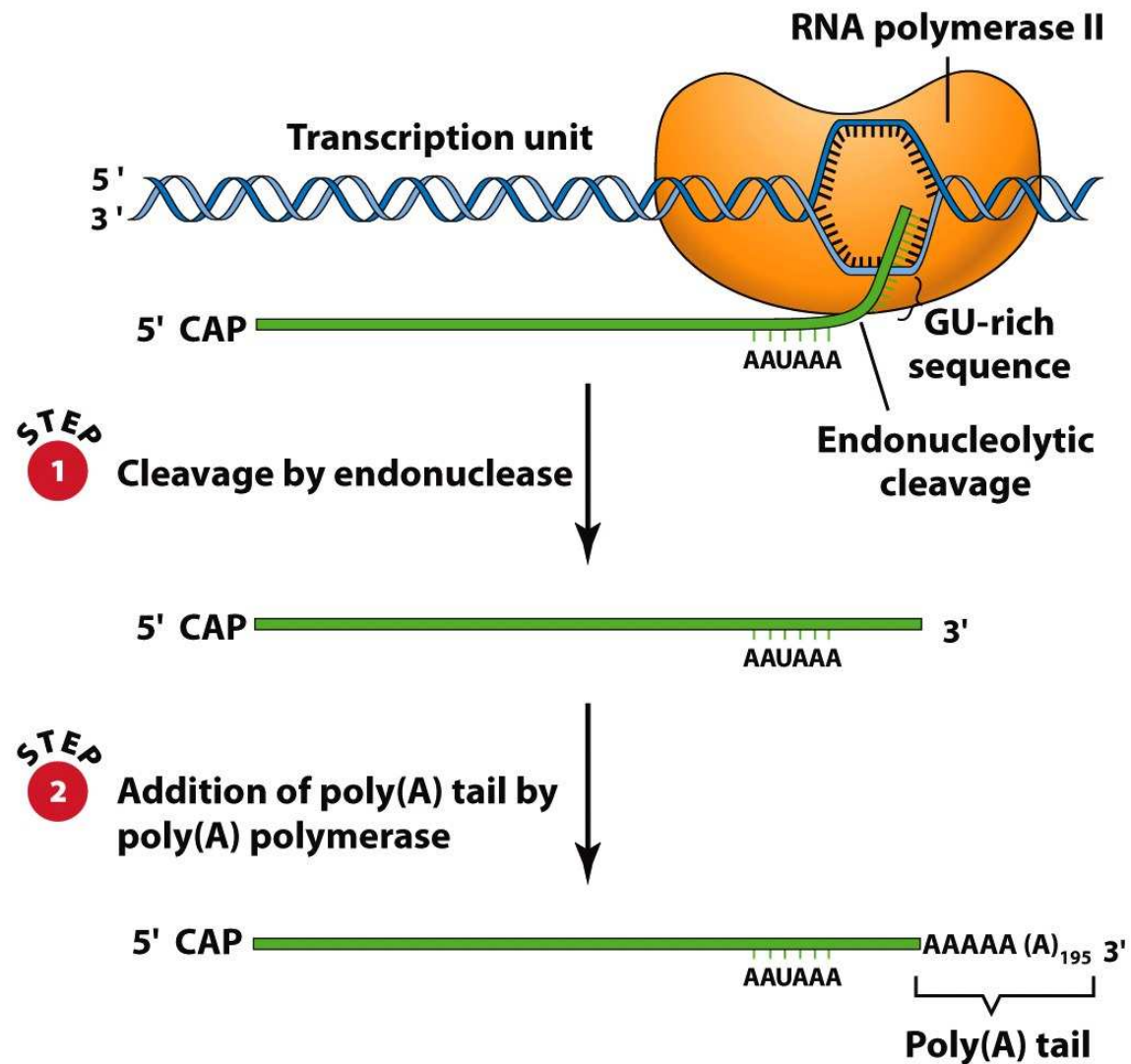
- RNA polymeráza II se dokáže pohybovat přes nukleozomy s pomocí protreinového komplexu FACT ("facilitates chromatin transcription")
- FACT odstraňuje dimery histonů H2A/H2B z nukleozomů před RNA polymerázou a podílí se na jejich opětném sestavení po průchodu RNA polymerázy
- pohybu RNA polymerázy chromatinem napomáhá rozvonění chromatinu acetylovanými histony (řízeno enzymaticky)

# Terminace transkripce

- transkripce probíhá za místo, které se na konec přepíše do 3' konce transkriptu
- distální část se odstraní endonukleolytickým štěpením
- k štěpení dochází v místě vzdáleném 10-30 nukleotidů po proudu transkripce od konzervativní sekvence AAUAAA
- po rozštěpení RNA se připojuje k 3'konci transkriptu úsek cca 200 nukleotidový úsek adenosinmonofosfátových zbytků - poly(A); katalyzováno poly(A) polymerázou
- význam polyadenylace:
  - zvýšení stability transkriptu
  - účast na transportu transkriptu do cytoplazmy



# Polyadenylace

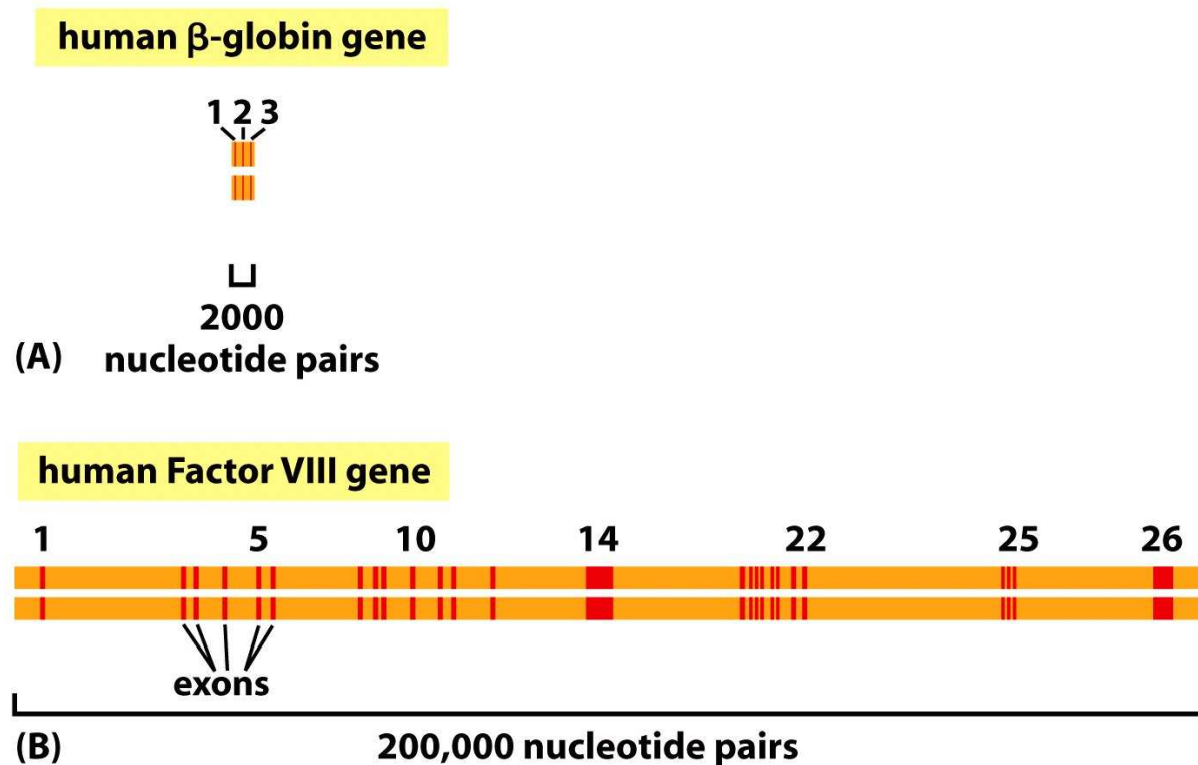


# Přerušované geny: exony a introny

- v roce 1977 překvapivý objev: většina eukaryotických genů obsahuje nekódující sekvence - **introny** („intervening sequences“) - které přerušují sekvence kódující - **exony** (exprimované úseky)
- počet intronů a jejich délka u různých genů značně kolísá
- exony i introny jsou podrobeny transkripci za vzniku hnRNA
- přepisy intronů jsou následně z hnRNA odstraněny sestřihem za vzniku zralé mRNA
- teprve zralá mRNA se transportuje do cytoplazmy, aby se podrobila translaci

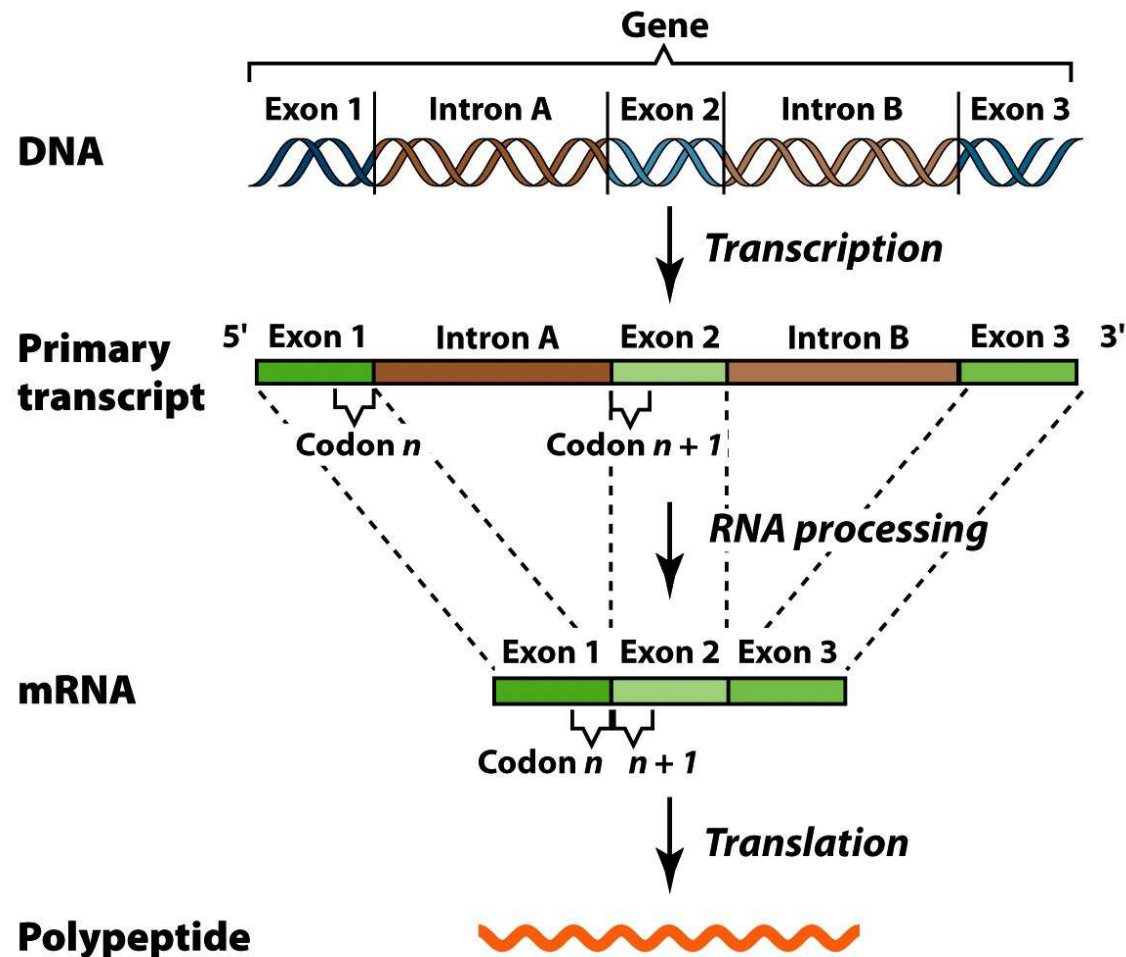
## Přesněji:

- introny jsou nekódující sekvence umístěné mezi sekvencemi kódujícími
- exony jsou kódující i nekódující sekvence, které zůstávají ve zralé mRNA po sestřihu
- velikost intronů je rozmanitá (od několika desítek po tisíce nukleotidů)



# Odstranění intronů: sestřih („splicing“) RNA

- požadavek na vysokou míru přesnosti (na 1 nukleotid)
- konzervativní sekvence jsou na hranicích intron/exon:  
exon-GU...intron...AG-exon
- TACTAAC box umístěný 30 nukleotidů proti směru od 3' sestřihového místa



# Odstranění intronů: 3 různé mechanismy

- introny prekurzorů **tRNA** se vyštěpují přesným endonukleolytickým **štěpením**, po kterém následuje **ligace**
- introny prekurzorů **rRNA** se vyštěpují **autokatalyticky** (bez účasti proteinů)
- introny prekurzorů **mRNA** se vyštěpují dvoufázovou reakcí, kterou zajišťují **ribonukleoproteinové částice spliceozomu**

# Sestřih prekurzorů tRNA

fáze 1:

- **sestřihová endonukleáza** navázaná k jaderné membráně přeruší prekurzorovou tRNA přesně na koncích intronu

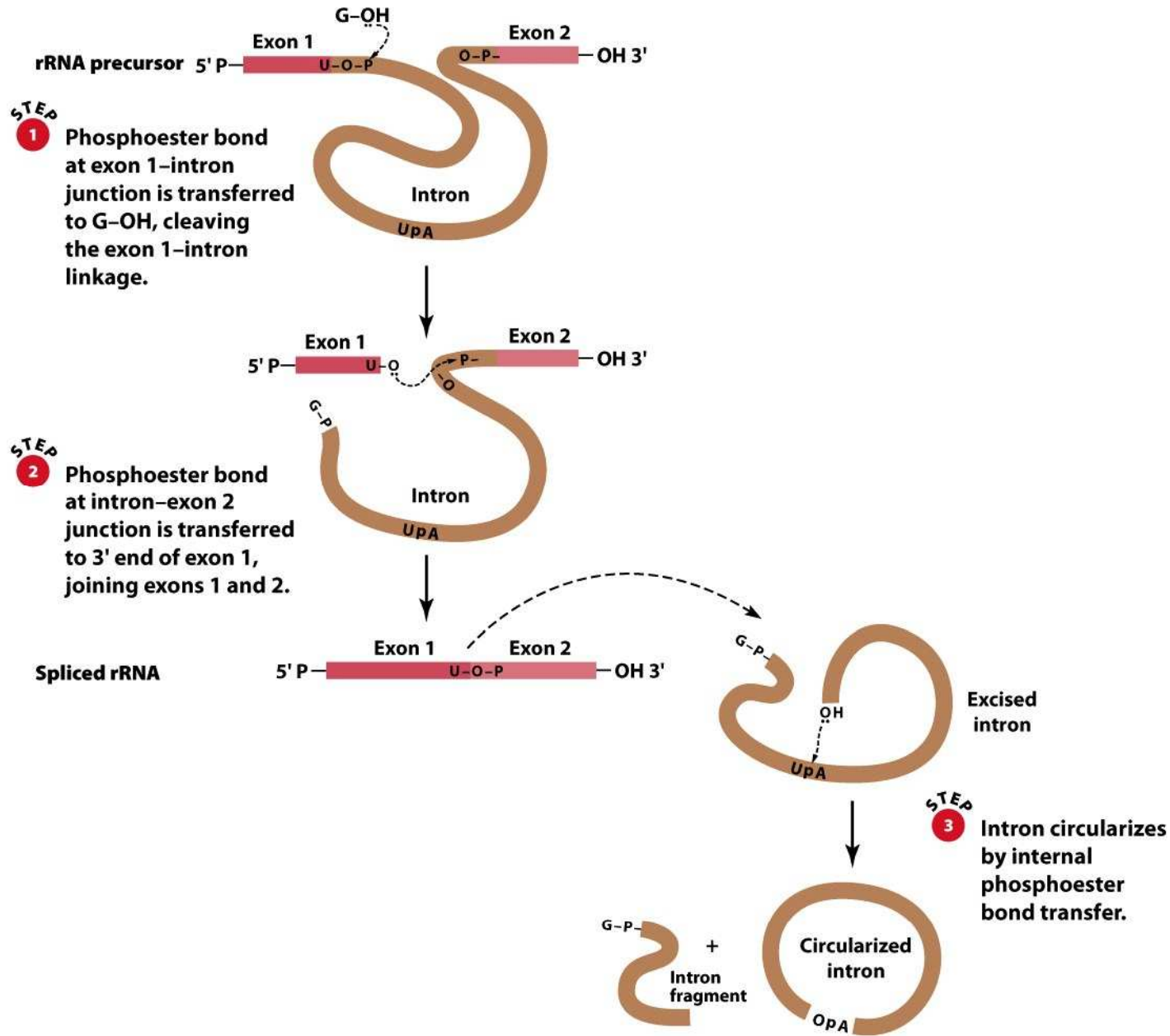
fáze 2:

- **sestřihová ligáza** spojí příslušné dva fragmenty tRNA k sobě za vzniku zralé tRNA

# Autokatalytický sestřih

- nevyžaduje externí zdroj energie
- nevyžaduje katalytickou aktivitu proteinu
- probíhá formou sérií přenosu fosfodiesterových vazeb; žádná nově nevzniká, ani nezaniká
- nutná je přítomnost guaninového nukleotidu s volnou 3'OH skupinou a jednomocné a dvojmocné kationty
- intron se přenosem fosfodiesterových vazeb vyštěpuje a následně cirkularizuje
- sekundární struktura intronu zajistí požadovanou blízkost obou spojení intron-exon

# Autokatalytický sestřih



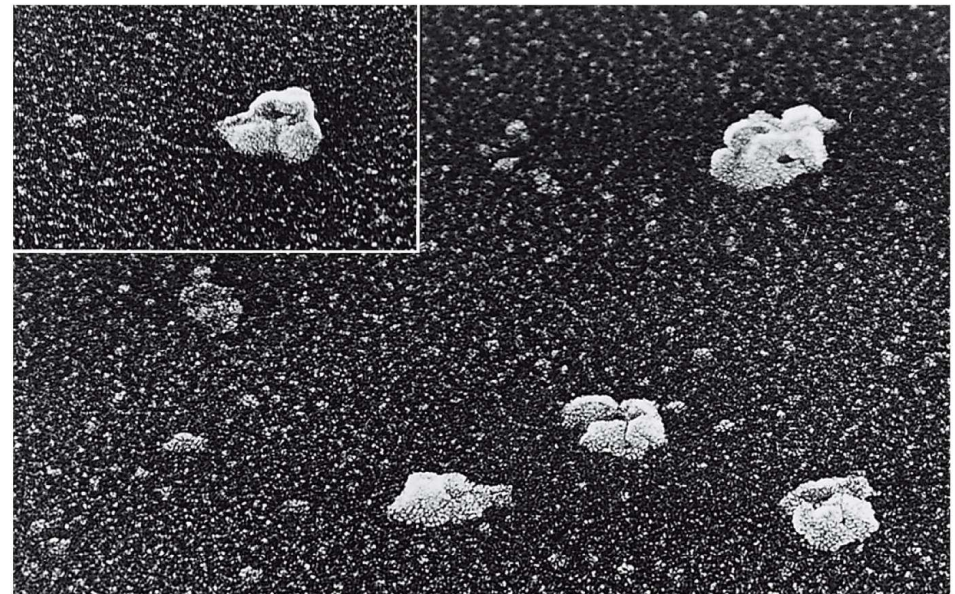


# Sestřih pre-mRNA

- zprostředkován **spliceozomy**

## Spliceozom

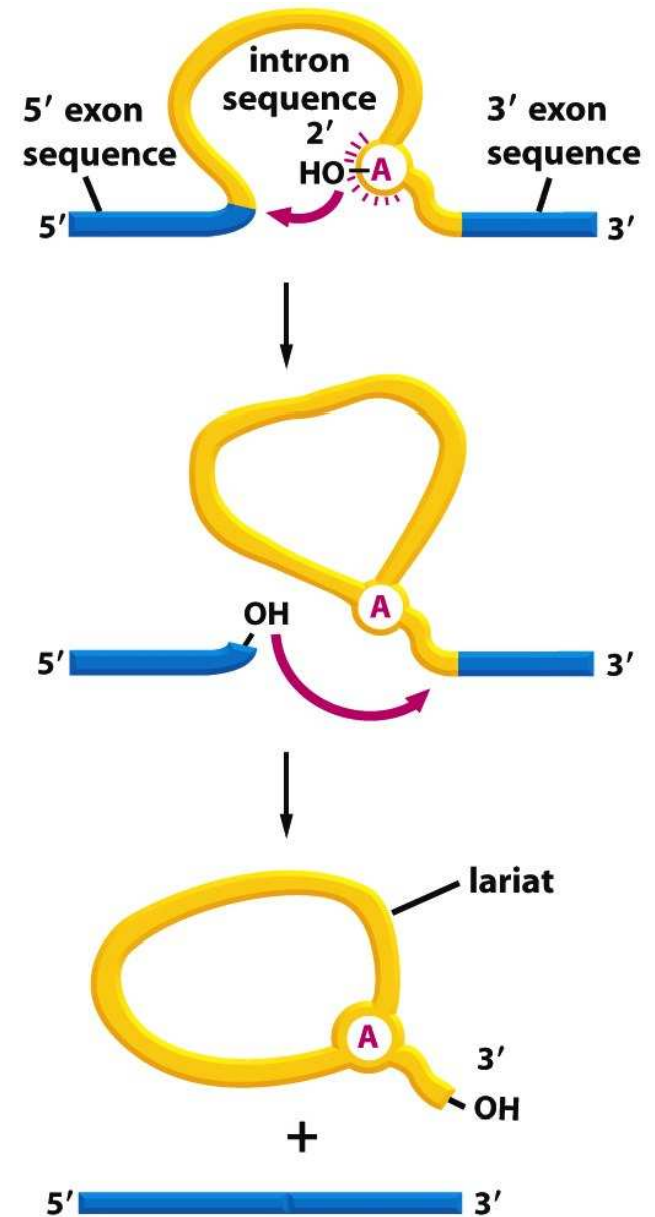
- komplex cca **40 proteinů** a RNA připomínající ribozom
- obsahuje malé molekuly RNA, tzv. **snRNA** (U1, U2, U4, U5, U6)
- některé z nich se s pojují s proteiny za vzniku **snRNP** (small nuclear ribonucleoproteins)



10 nm

# Sestřih pre-mRNA

- každé odstranění intronu probíhá **ve dvou transesterifikačních reakcích**:
- specifický **adenin** v sekvenci intronu atakuje 5' sestřihové místo a přeruší cukr-fosfátovou kostru: 5' konec intronu se tímto kovalentně (fosfodiesterovou vazbou) připojí k A
- uvolněný 3' OH konec exonu pak interaguje se začátkem sousední exonové sekvence
- oba exony se spojí a intron se uvolní v podobě lasovité struktury

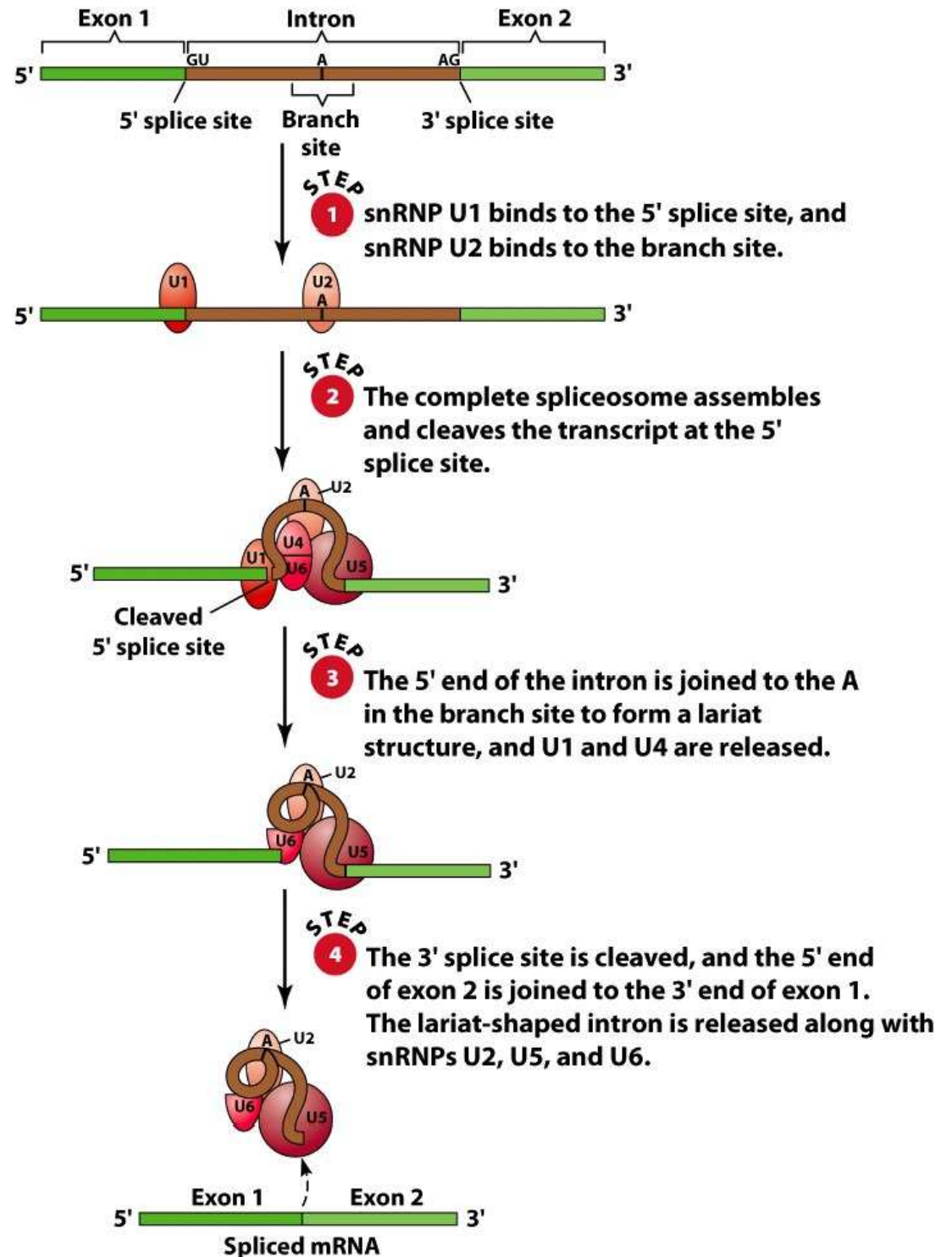


1. snRNP se vážou na 5' sestřihové místo (GU) a uvnitř intronu v místě budoucího větvení

2. sestavení spliceozomu, přerušení cukr-fosfátové kostry v 5' sestřihovém místě, současné vytvoření vazby mezi koncovým G a vnitřním intronovým A

3. vzniká lasovitá struktura, ze spliceozomu se uvolňují U1 a U4

4. štěpí se 3' sestřihové místo, exony se spojí obvyklou 5'-3' fosfodiesterovou vazbou



# Take home message

- nekódující intronové sekvence se vyštěpují z transkriptů RNA před transportem do cytoplazmy
- introny prekurzorů tRNA se vyštěpují postupným působením sestřihové endonukleázy a ligázy
- introny některých prekurzorů rRNA podléhají autokatalytickému sestřihu
- introny jaderných pre-mRNA se vyštěpují působením ribonukleoproteinových struktur zvaných spliceozomy
- vyštěpení intronů musí být přesné na úrovni jednotlivých nukleotidů, aby bylo zajištěno správné čtení exonových kodonů při translaci