

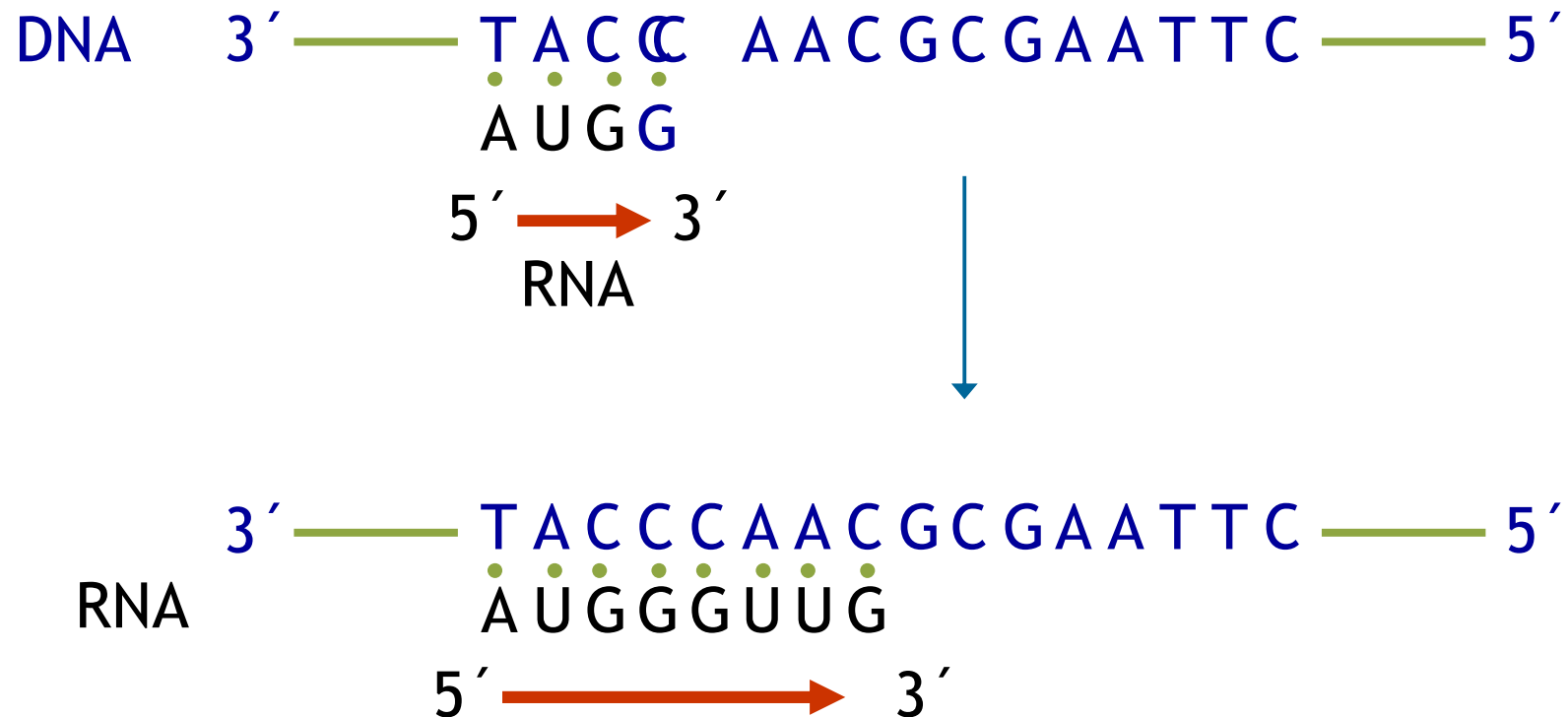


Transkripce

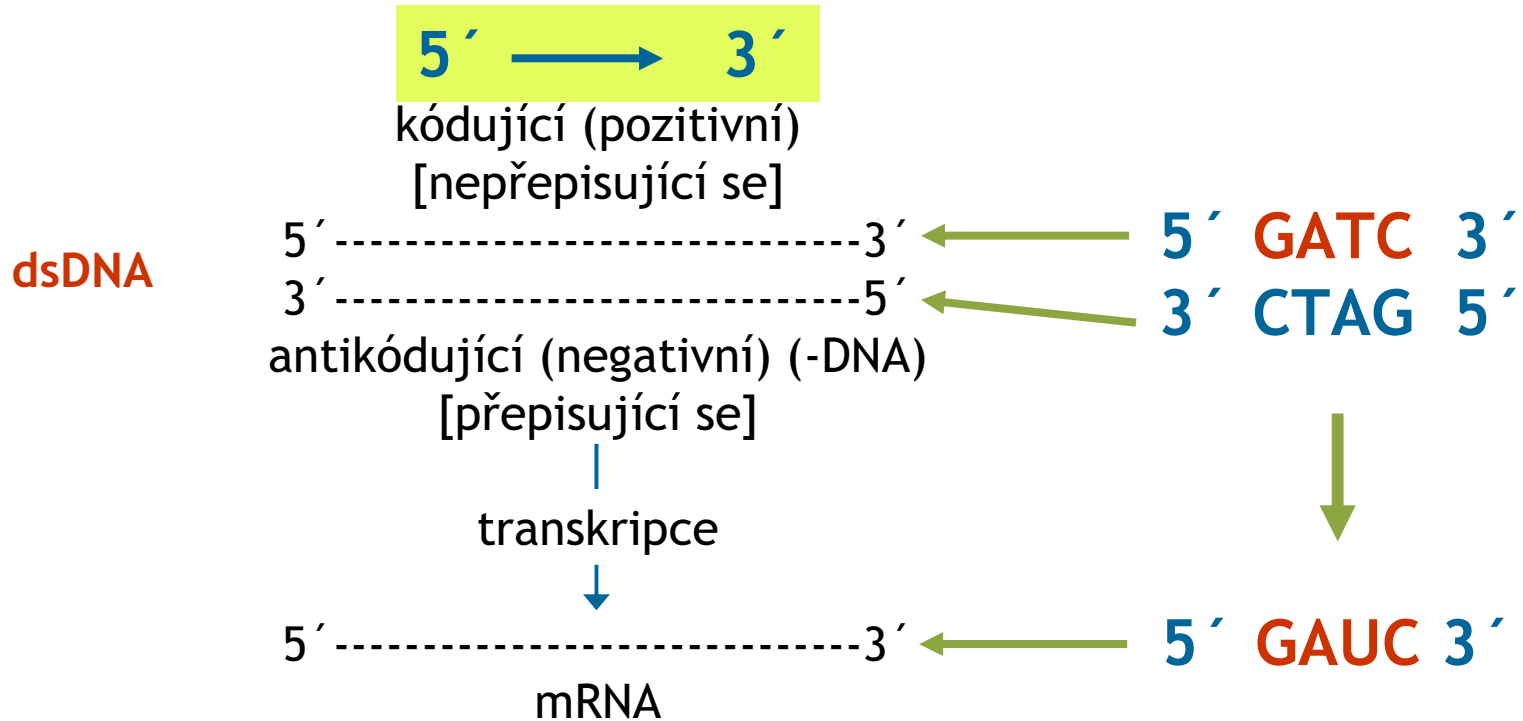
přepis genetické informace z DNA do RNA, při které DNA slouží jako matrice pro syntézu RNA. Reakci katalyzuje RNA-polymeráza (transkriptáza)

Zpětná transkripce (reverzní transkripce: RT) - přepis genetické informace z RNA do DNA. Reakci katalyzuje zpětná (reverzní) transkriptáza

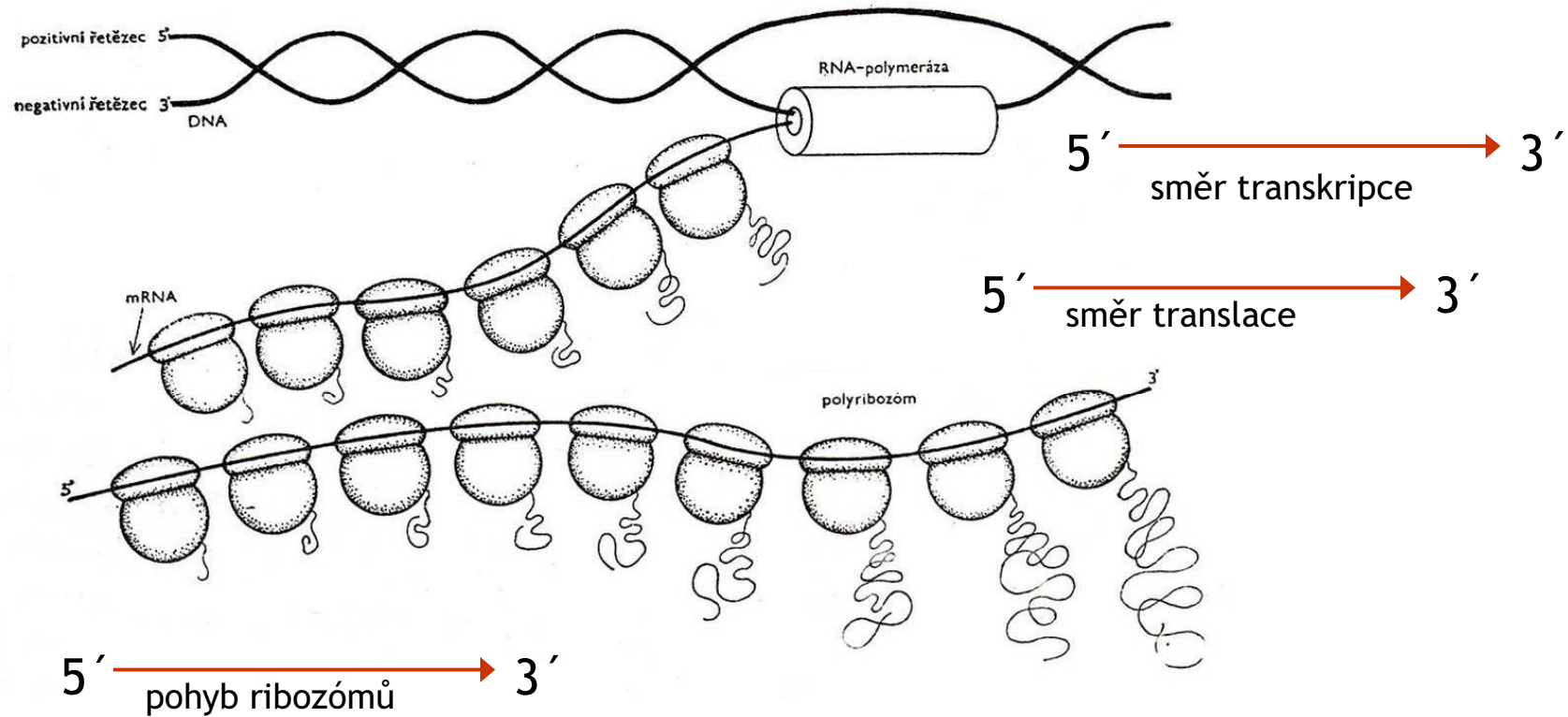
Transkripce sekvence DNA do sekvence RNA



Značení řetězců DNA podle jejich funkce



Směr syntézy mRNA při transkripci, směr translace mRNA a směr syntézy polypeptidů

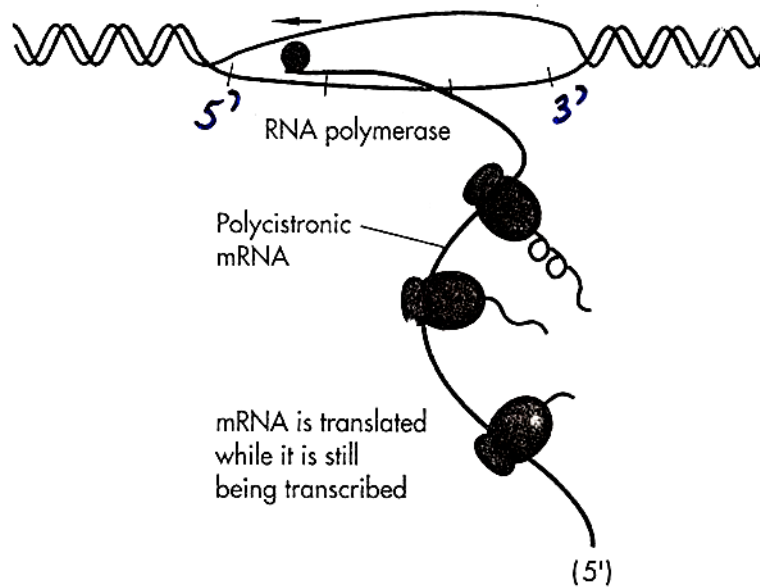


**Syntéza polypeptidů
N-konec C-konec**

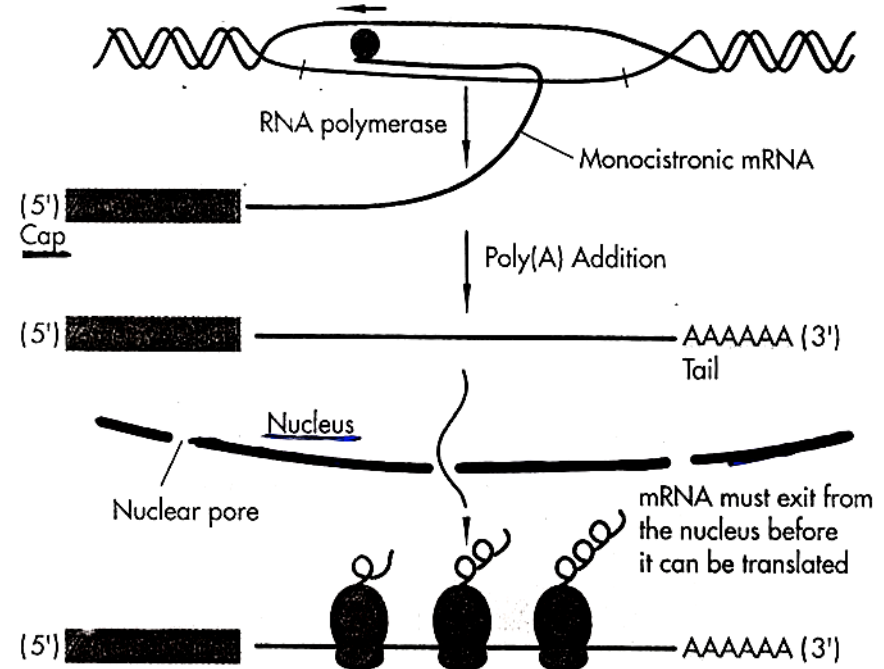


Transkripce u prokaryot je spřažena s translací, u eukaryot jsou tyto procesy odděleny

Prokaryota

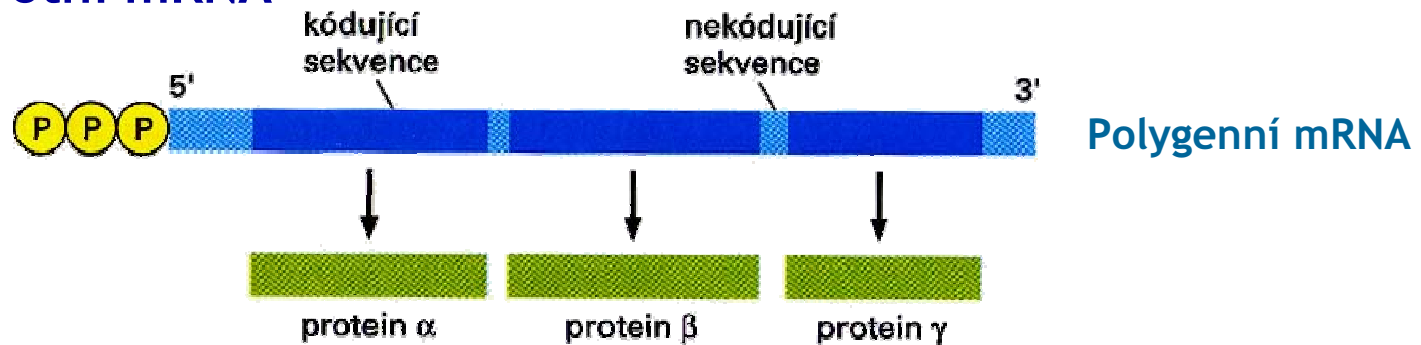


Eukaryota

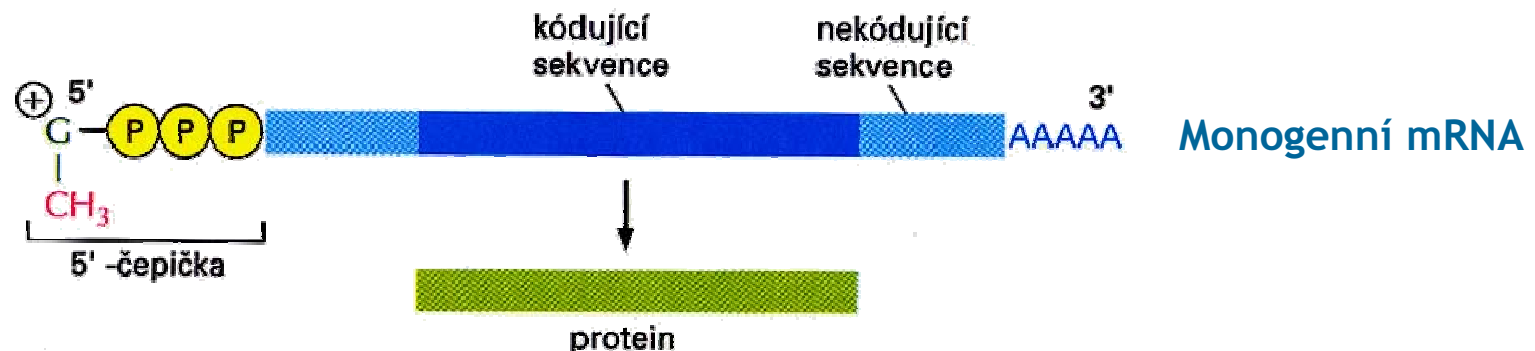


Srovnání prokaryotické a eukaryotické mRNA

Prokaryotní mRNA

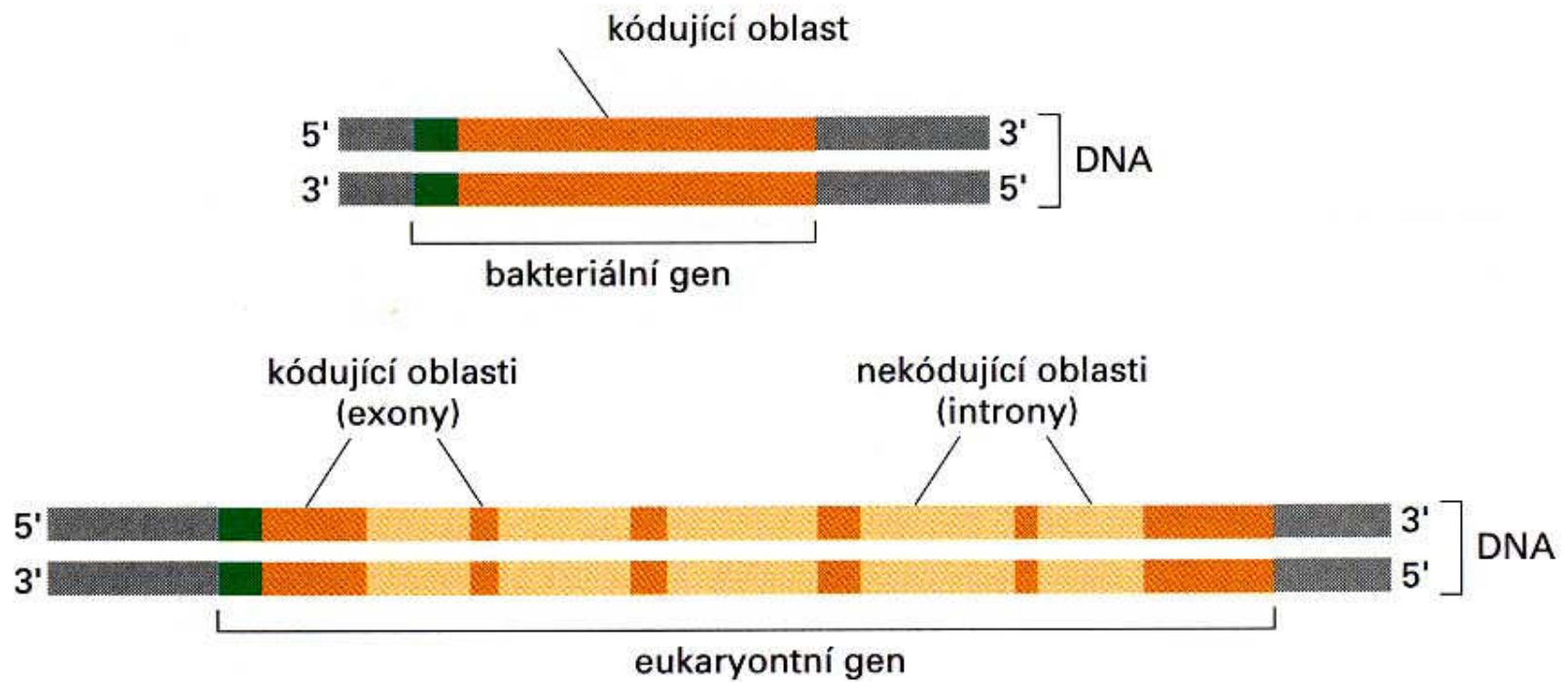


Eukaryotní mRNA

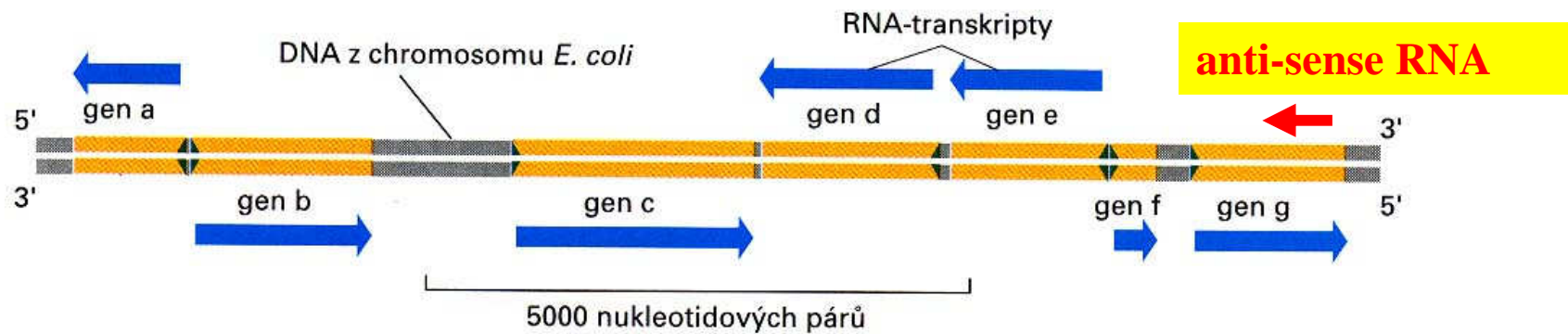


(A)

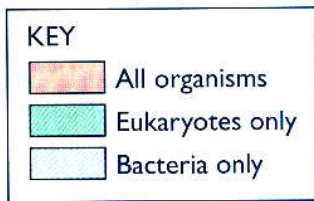
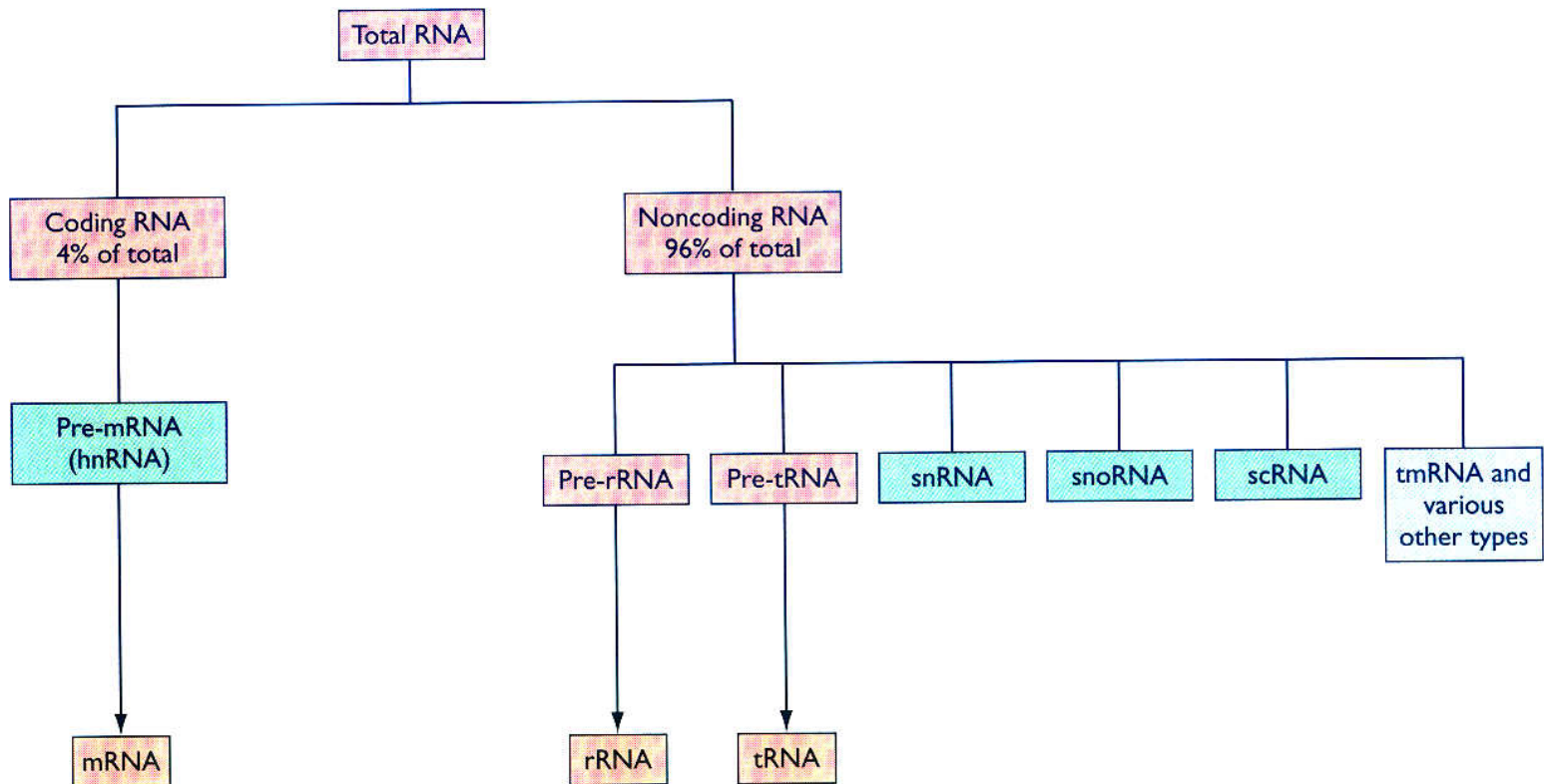
Srovnání prokaryotických (jednoduchých) strukturních genů s eukaryotickými (složenými) geny



Geny mohou být transkribovány z obou řetězců; jako templát je na daném úseku DNA využíván obvykle jen jeden z řetězců

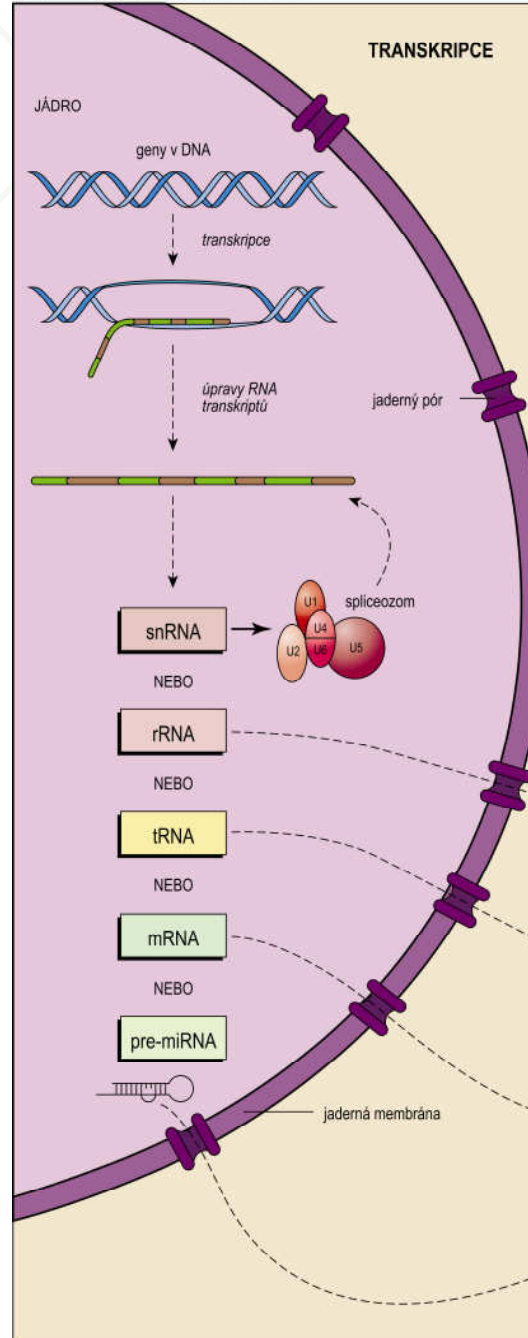


Typy RNA vznikající při transkripci u různých typů organismů



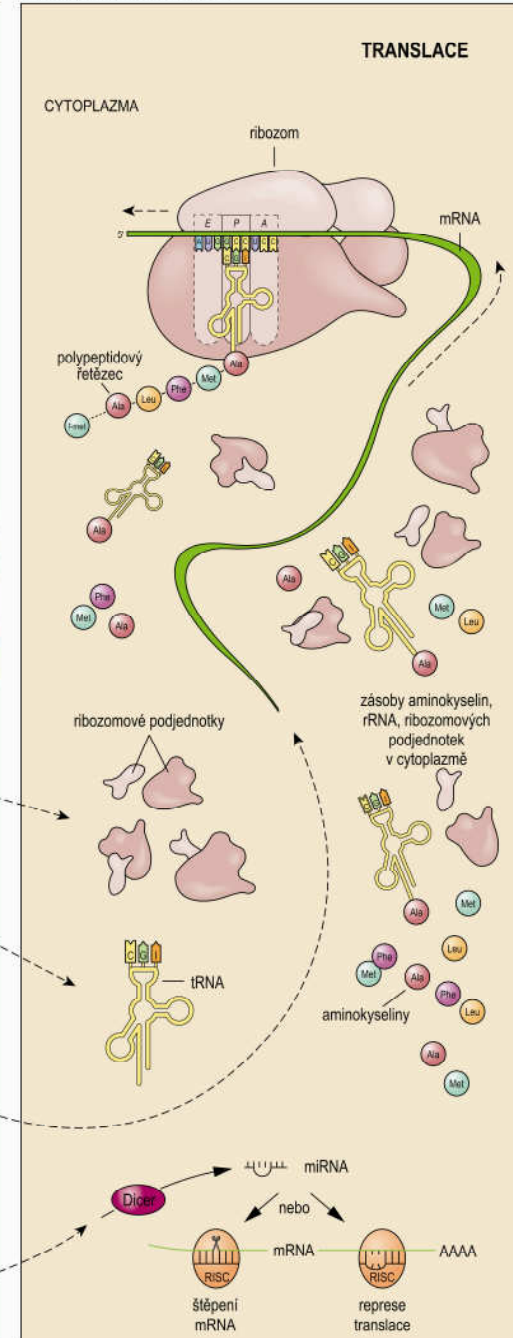
Molekulární druhy molekul RNA vytvářené transkripcí u eukaryot

Transkripce a úpravy RNA probíhají v jádře.



(a)

Translace probíhá v cytoplazmě.



(b)

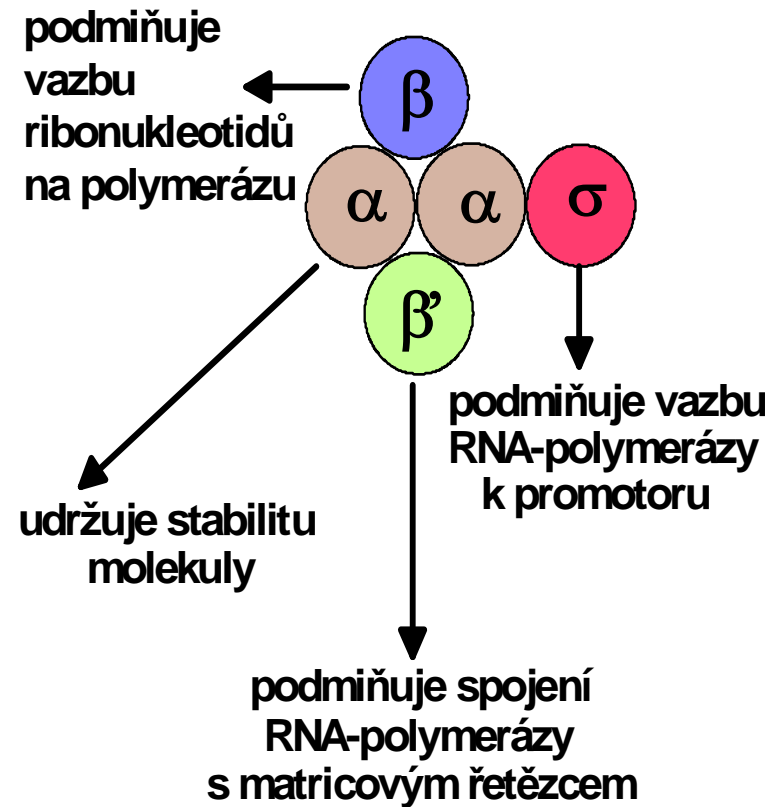
Enzymy katalyzující transkripci

- A. DNA-dependentní RNA-polymeráza (RNA-polymeráza, transkriptáza)
matricí je řetězec DNA (prokaryota, eukaryota, DNA-viry)
- B. RNA-dependentní DNA-polymeráza (zpětná/reverzní transkriptáza)
matricí je řetězec RNA (retroviry, retrotranspozony, retroelementy)

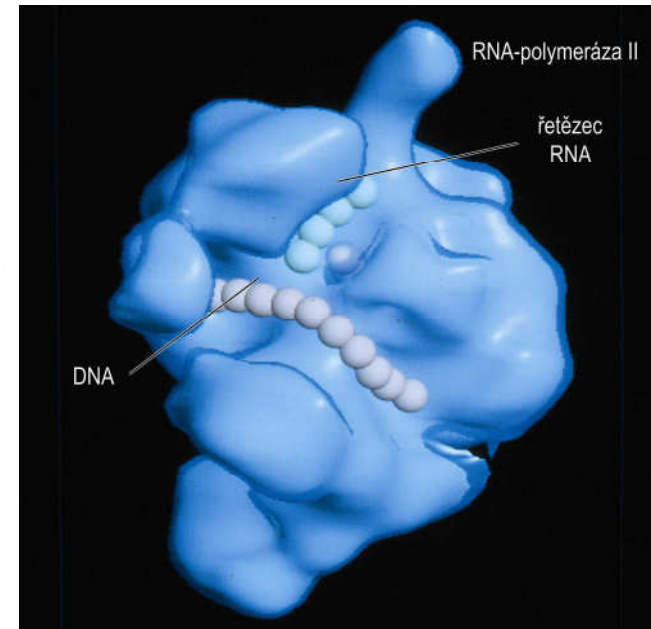
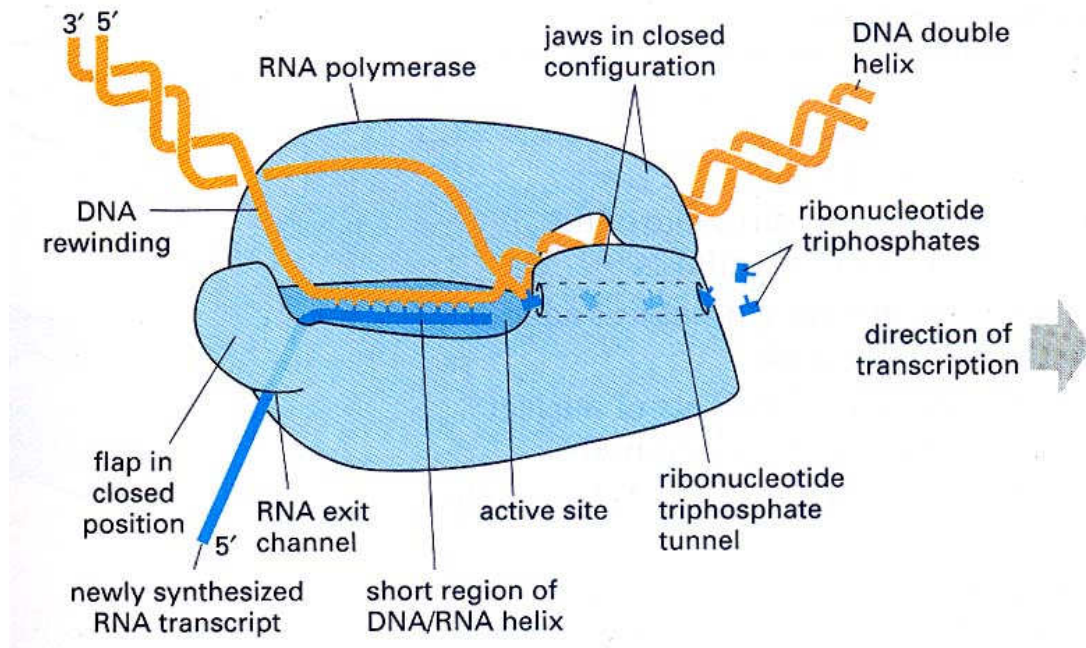
Primární transkripty tvořené na řetězci DNA

- přepisy strukturních genů (mRNA, pre-mRNA/hnRNA)
- přepisy genů pro funkční typy RNA
 - pre-rRNA
 - pre-tRNA
 - malé RNA (snRNA, snoRNA, scRNA, miRNA, ...)

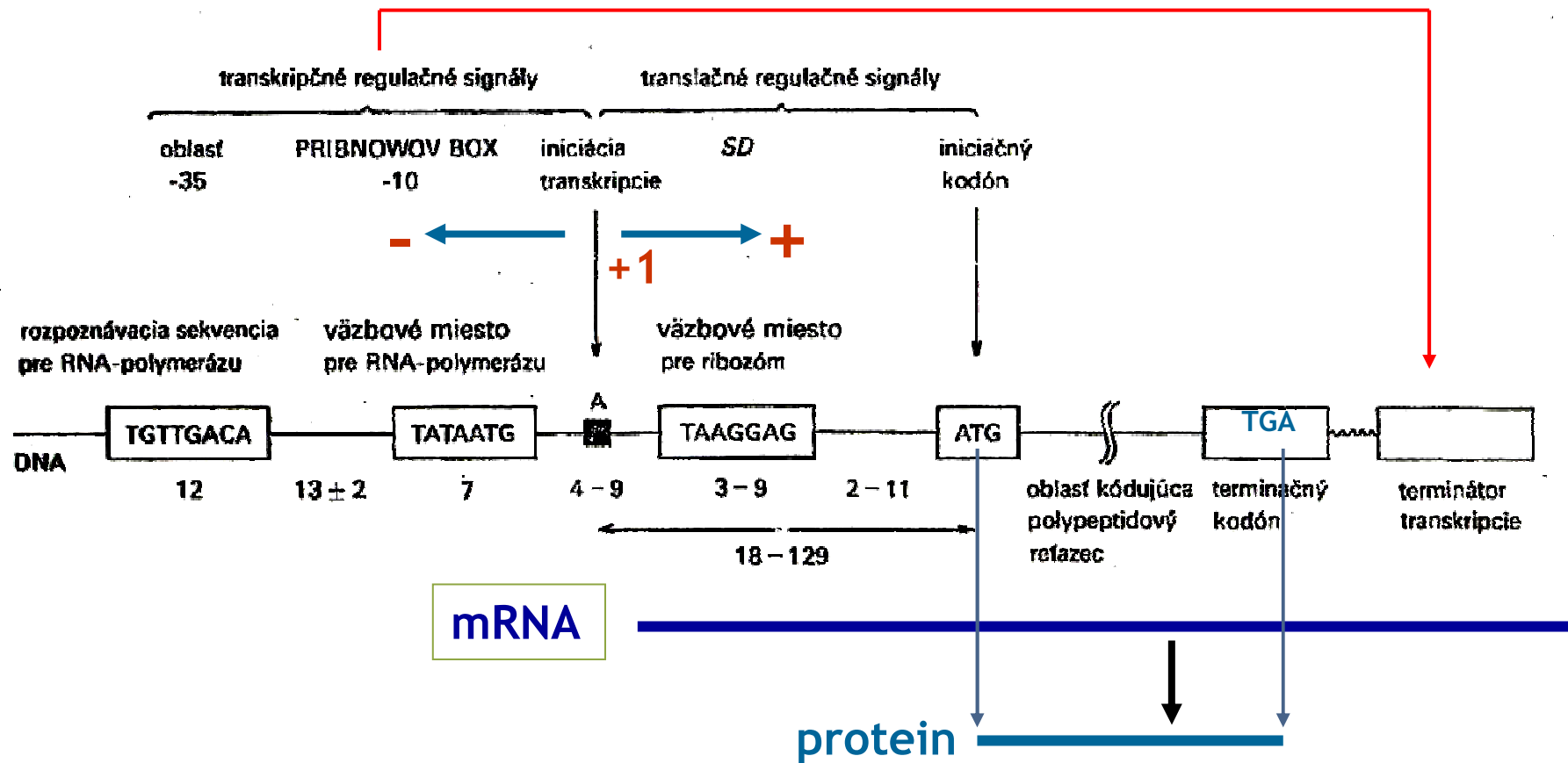
Funkce podjednotek RNA-polymerázy u *E. coli*



Struktura RNA-polymerázy



Strukturní gen prokaryot s vyznačením signálů pro transkripci a translaci



Sekvence po směru transkripce (downstream) a proti směru transkripce (upstream)



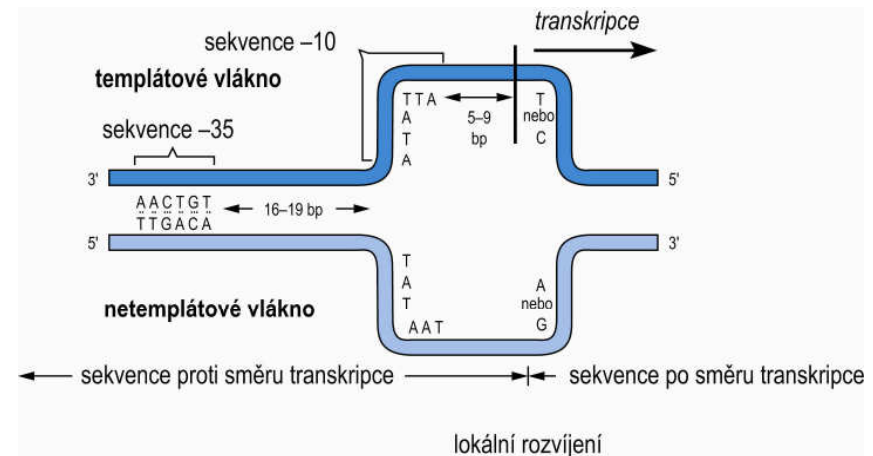
Funkční elementy bakteriálního promotoru



promotor
 ↙ silný
 ↘ slabý

Pribnowův box startovací nukleotid

box = krátká sekvence o stejné funkci



Sekvence přirozených a hybridních promotorů

	-35 Region									17 bp							-10 Region																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17																				
CONSENSUS	•	•	•	T	T	G	A	C	A	•	•	•	•	•	•	•	•	T	A	T	A	A	T	•	•												
<i>lac</i>	G	G	C	T	T	T	A	C	A	C	T	T	T	A	T	G	C	T	T	C	C	G	G	C	T	C	G	T	A	T	A	T	T	G	T		
<i>trp</i>	C	T	G	T	T	G	A	C	A	A	T	T	A	A	T	C	A	T	C	G	A	A	C	T	A	G	T	T	A	A	C	T	A	G	T	A	G
λ P _L	G	T	G	T	T	G	A	C	A	T	A	A	A	T	A	C	C	A	C	T	G	G	C	G	G	T	G	A	T	A	C	T	G	A	T	G	
<i>rec A</i>	C	A	C	T	T	G	A	T	A	C	T	G	T	A	T	G	A	A	G	C	A	T	A	C	A	G	T	A	T	A	A	T	T	G	T	G	
<i>tacI</i>	C	T	G	T	T	G	A	C	A	A	T	T	A	A	T	C	A	T	C	G	G	C	T	C	G	T	A	T	A	A	T	T	G	T	G		
<i>tacII</i>	C	T	G	T	T	G	A	C	A	A	T	T	A	A	T	C	A	T	C	G	A	A	C	T	A	G	T	T	T	A	A	T	T	G	T	G	

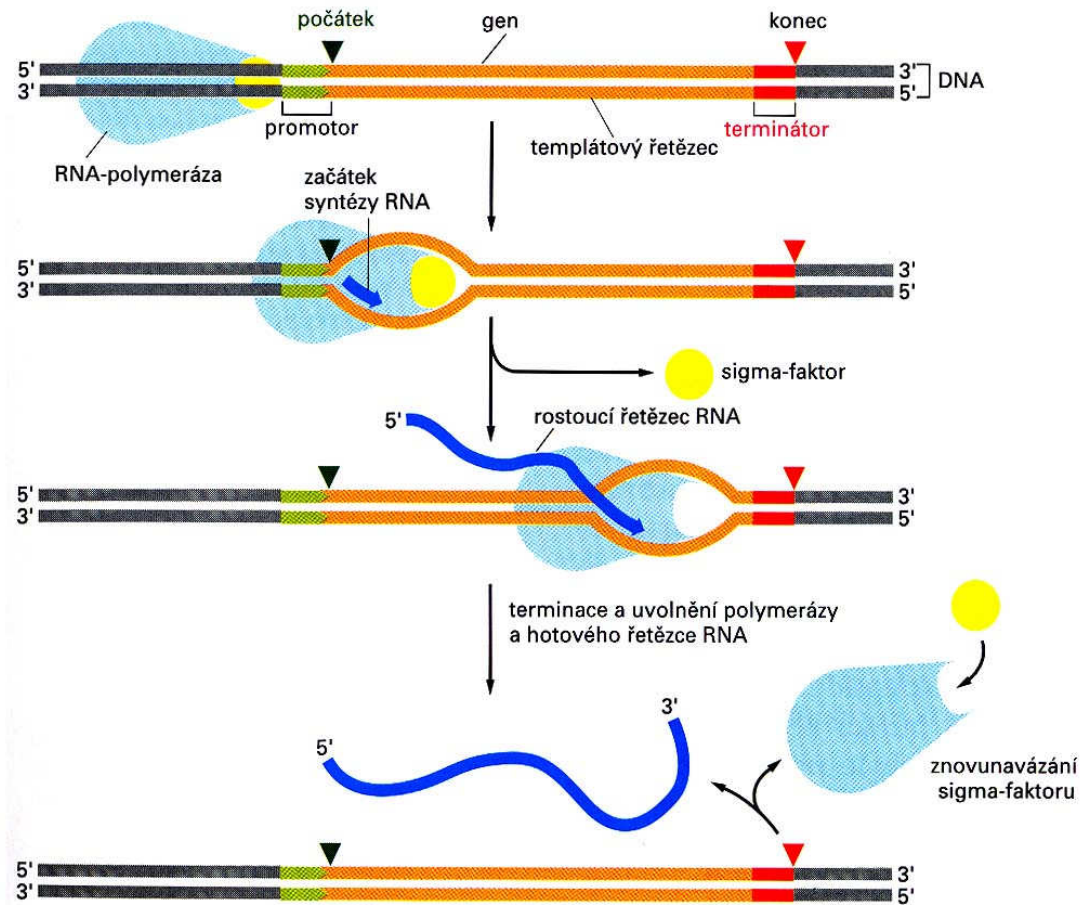
Hybridní promotory $tac = lac \times trp$

Transkripce bakteriálního genu RNA-polymerázou

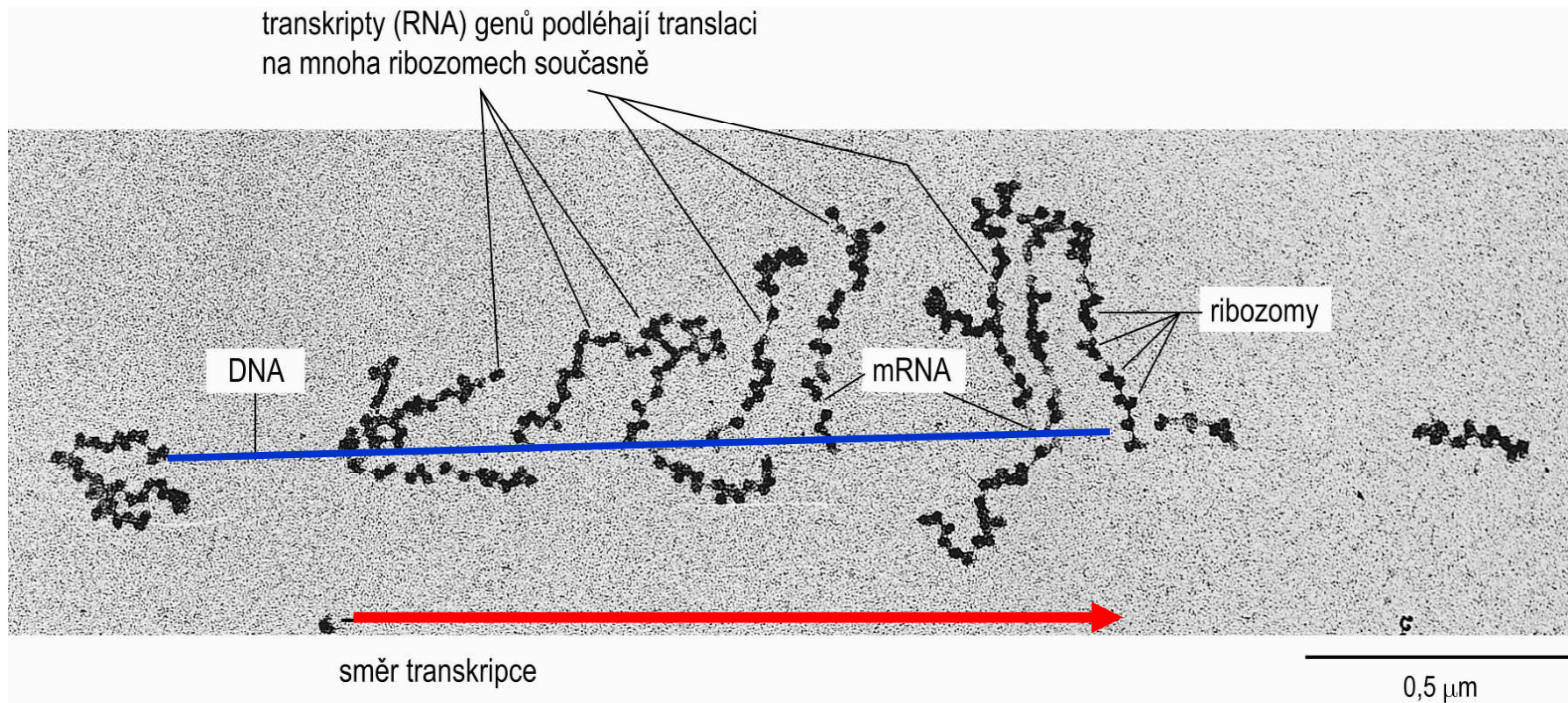
1. iniciace

2. elongace

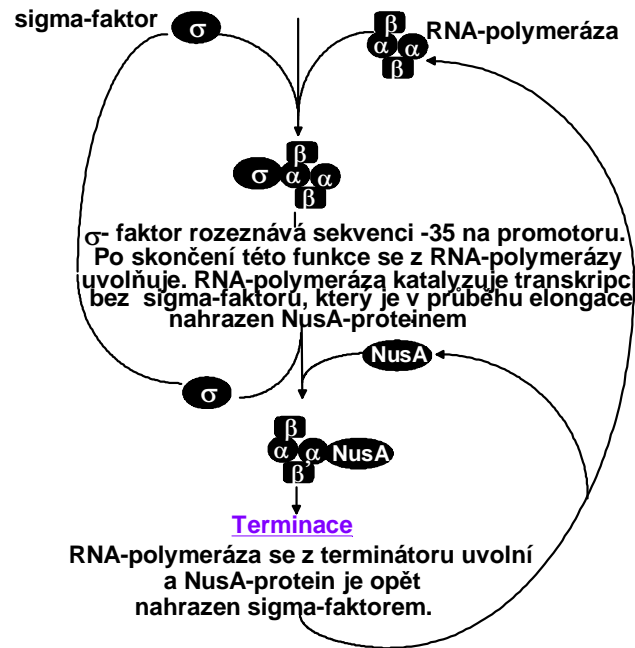
3. terminace



Vytváření molekul mRNA na prokaryotické transkripční jednotce a spřažení transkripce a translace u prokaryot



Výměna podjednotek vázajících se na RNA-polymerázu v průběhu transkripce



Obr. 148

Vzájemné výměny sigma-faktoru a NusA-proteinu na RNA-polymeráze

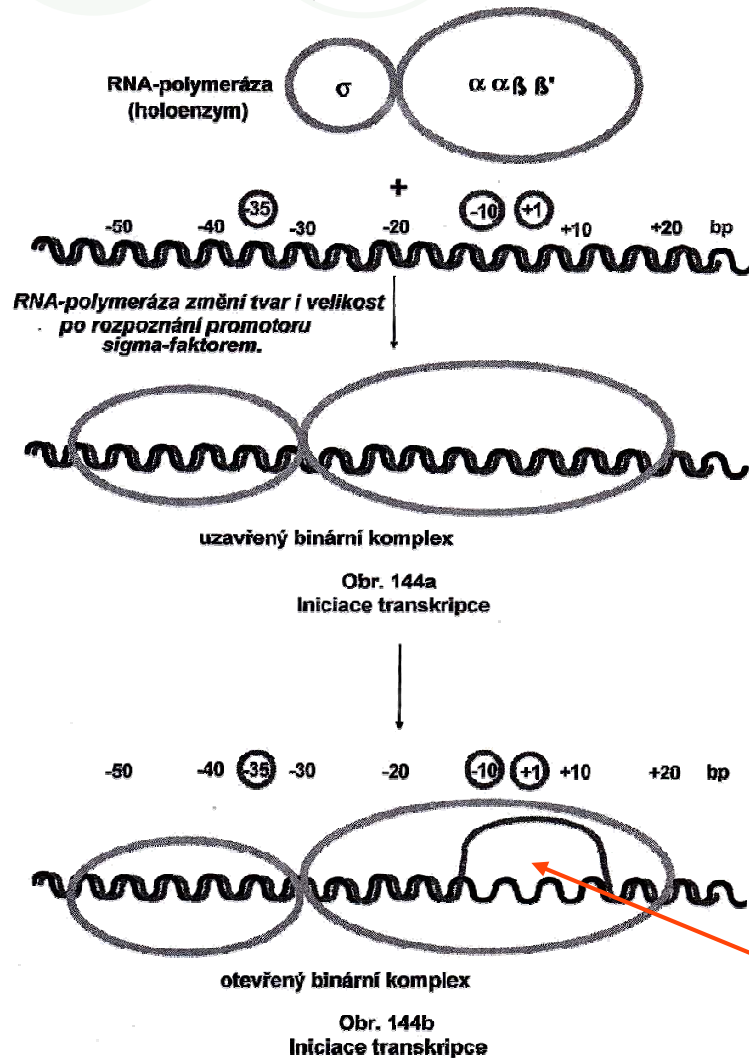
Terminace transkripce nezávislá na Ró-faktoru

Zastavení pohybu RNA-polymerázy

Uvolnění hotové RNA

Uvolnění RNA-polymerázy z DNA

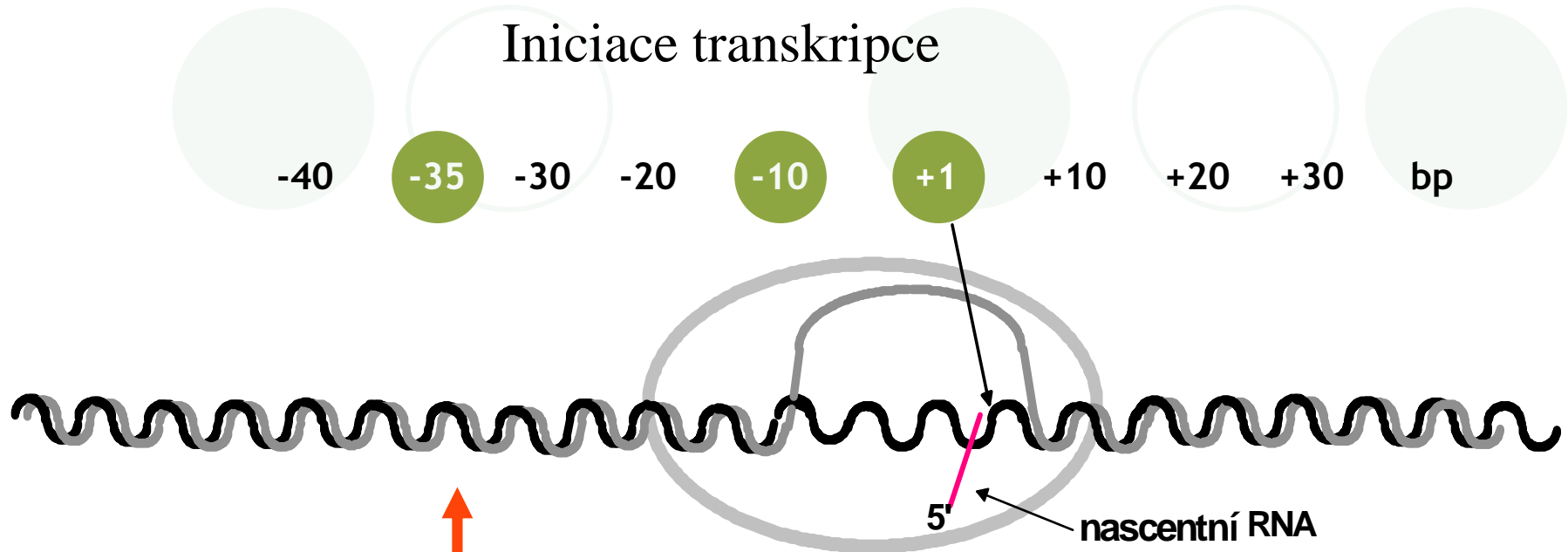
Vazba prokaryotické RNA-polymerázy na promotor



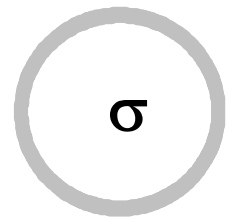
- α - stabilita holoenzymu
- β - vazba rNTP na polymerázu
- β' - spojení s matricovým řetězcem
- σ - vazba k promotoru

Denaturace v oblasti +1
oblast bohatá na páry A:T

Iniciace transkripce



vazba sigma-faktoru
na -35

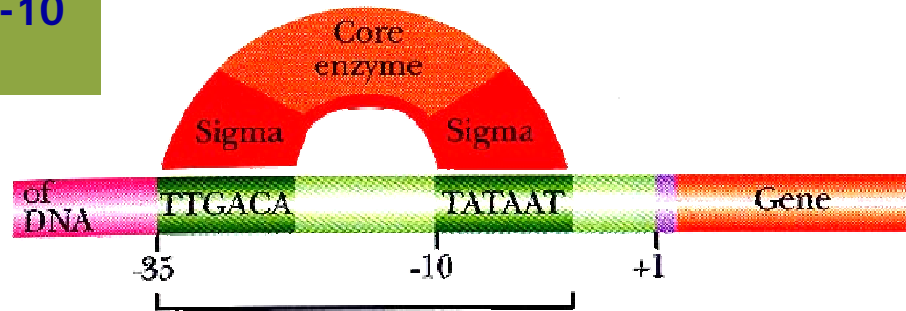


Sigma-faktor se uvolňuje
z RNA-polymerázy.

Při zakončení fáze iniciace a vstupu do
fáze elongace mění sigma-faktor i
RNA-polymeráza svou konformaci, což
se projevuje změnou v její velikosti i
tvaru.

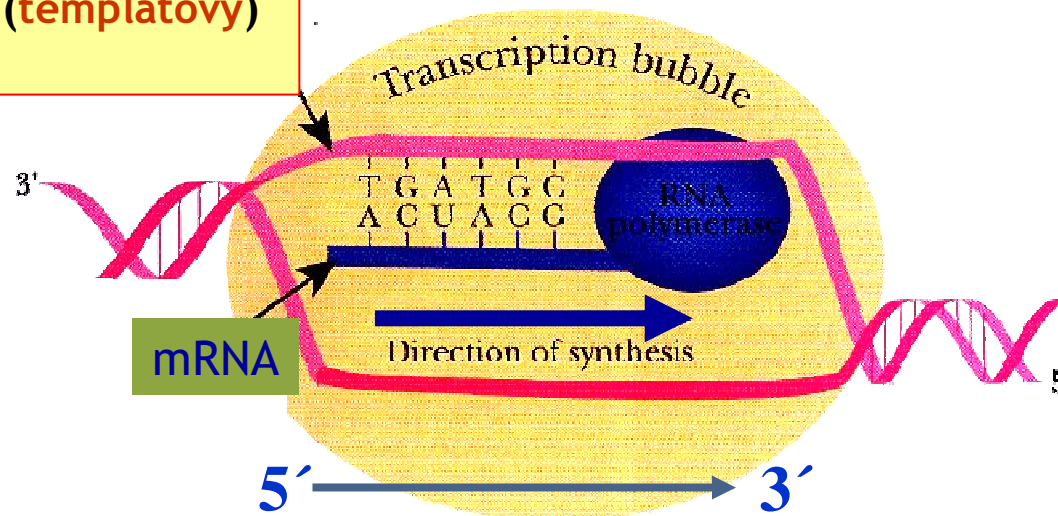
Iniciační fáze transkripce u prokaryot

Rozpoznání sekvence -10 a -35 sigma faktorem



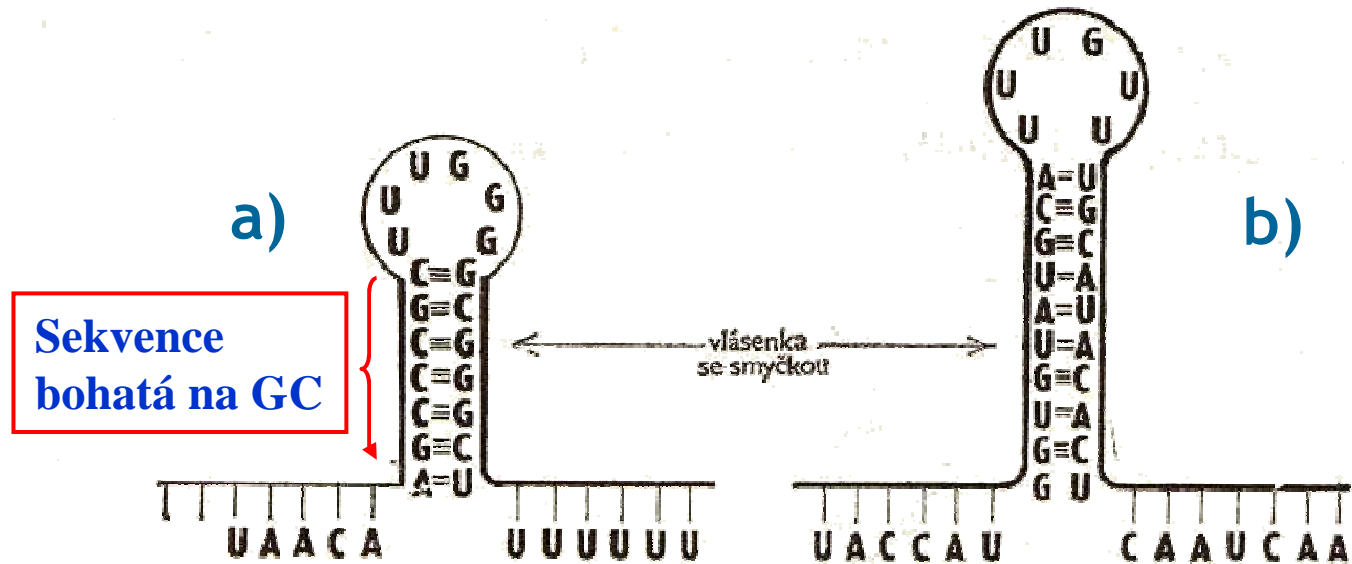
negativní (templátový) řetězec

Prodlužování mRNA



Typy terminátorů transkripce u prokaryot

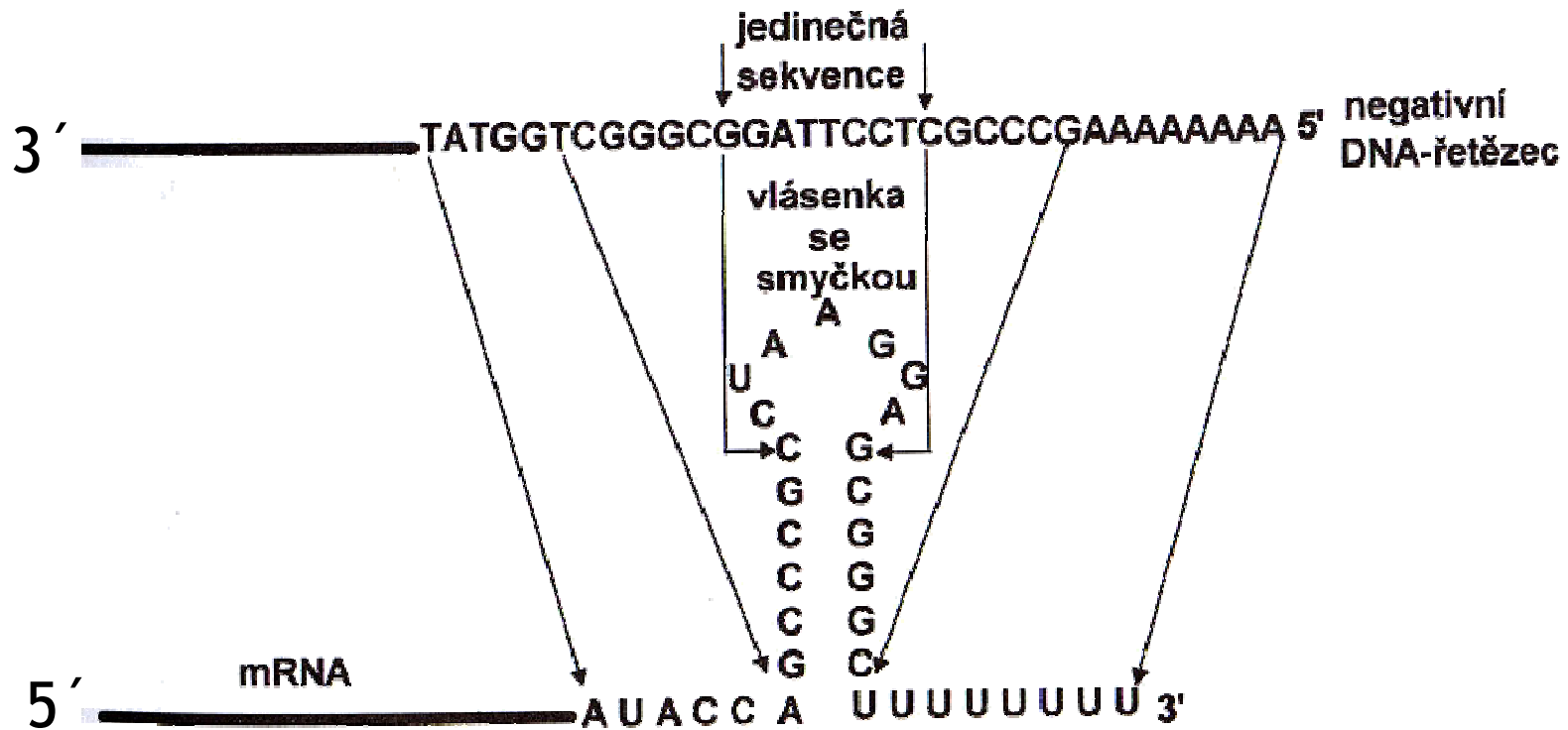
sekvence terminátorů přepsané do mRNA



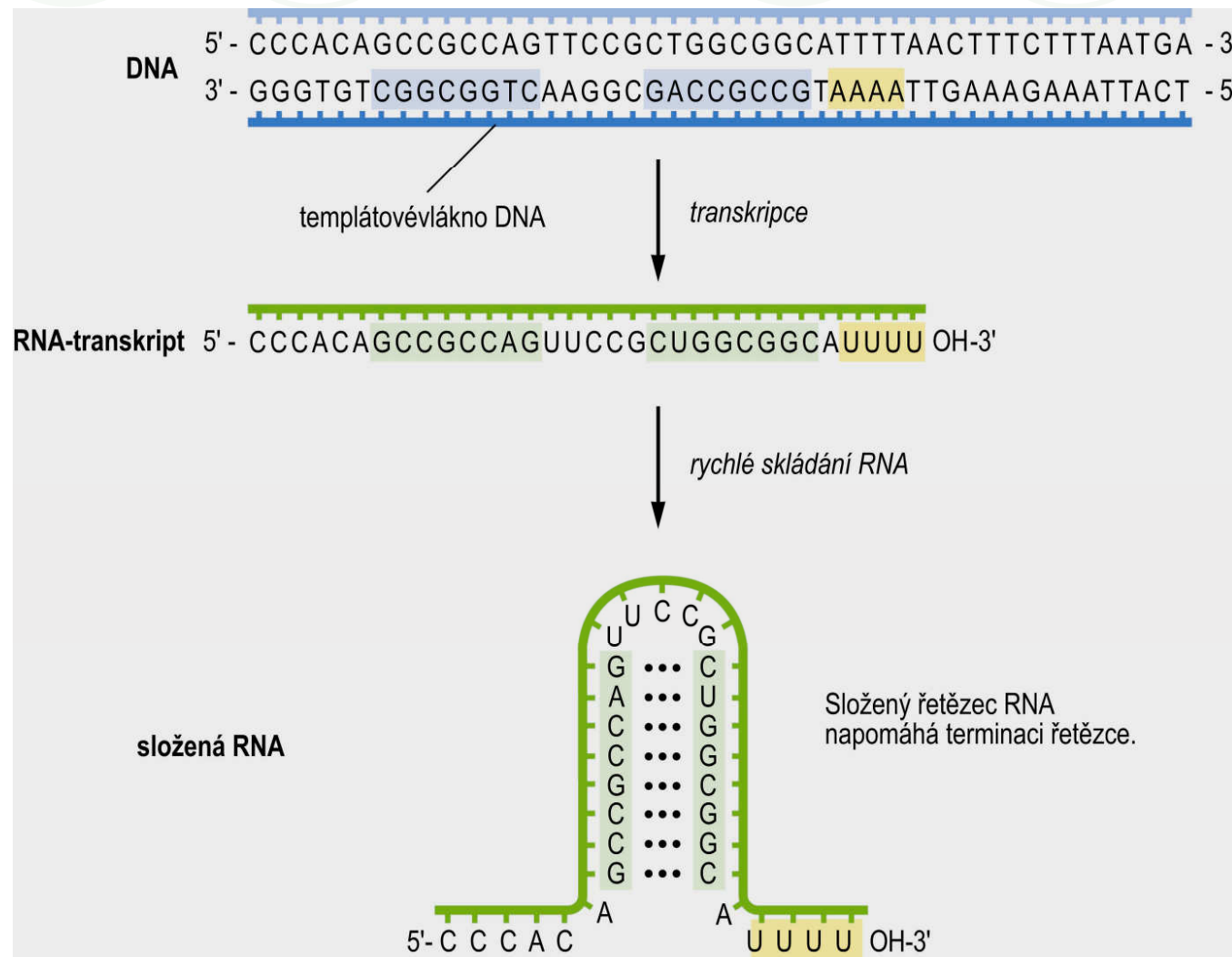
Terminátory: a) nezávislý na rho faktoru b) závislý na rho

Strukturní rozdíly mezi dvěma typy prokaryotických terminátorů (jejich transkriptů)

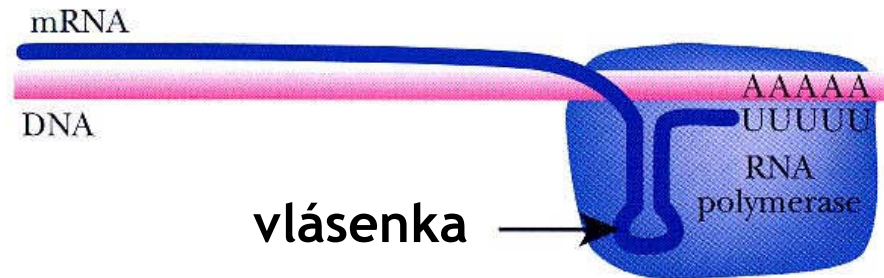
Struktura terminátorů nezávislých na ró-faktoru a jejich přepis do mRNA



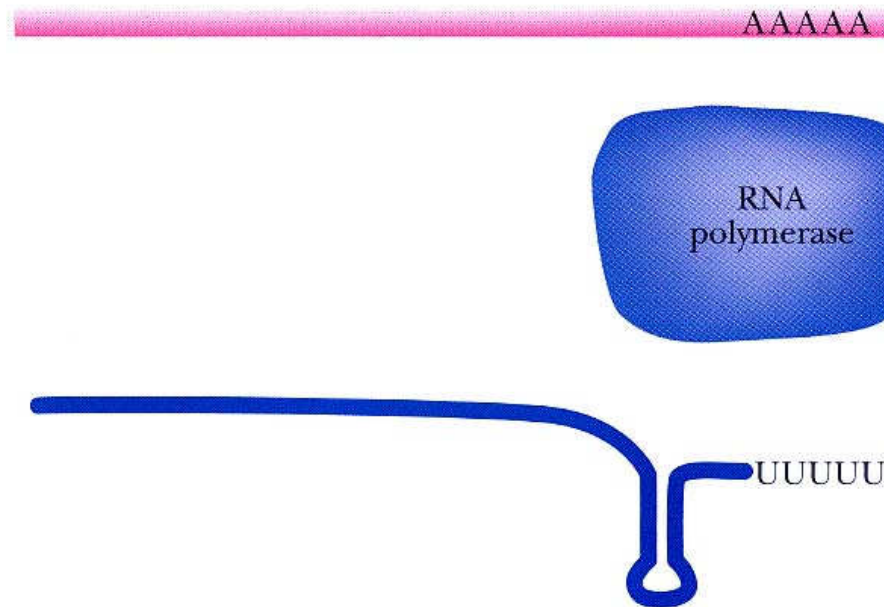
Struktura transkripčního terminátoru nezávislého na rho faktoru

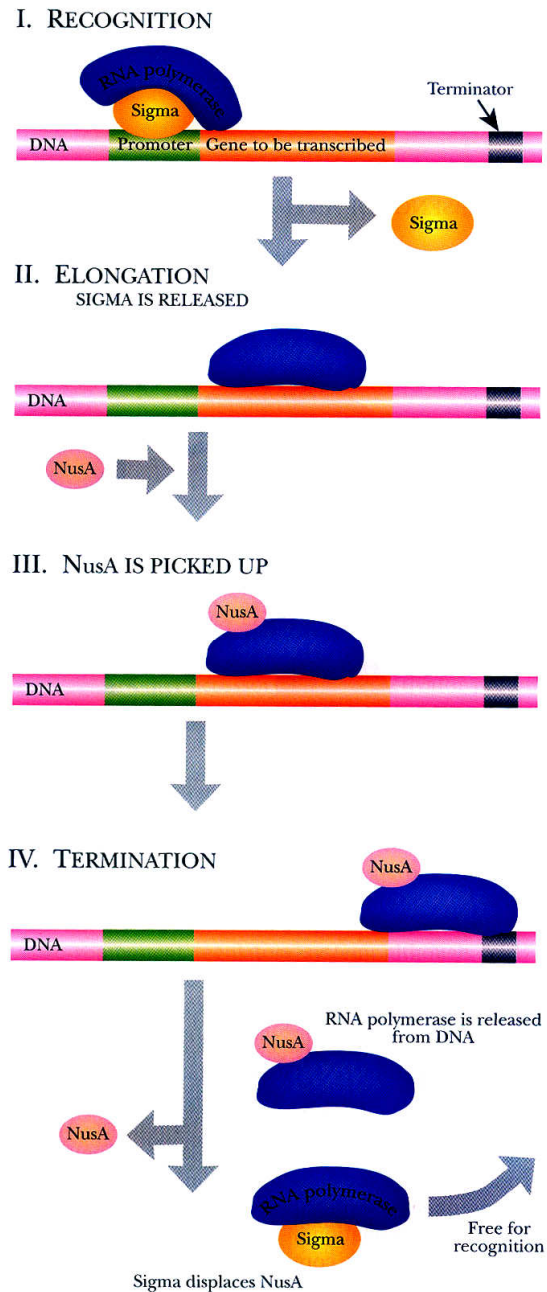


Terminace transkripce mRNA



**párování A:U
napomáhá
uvolnění RNA**

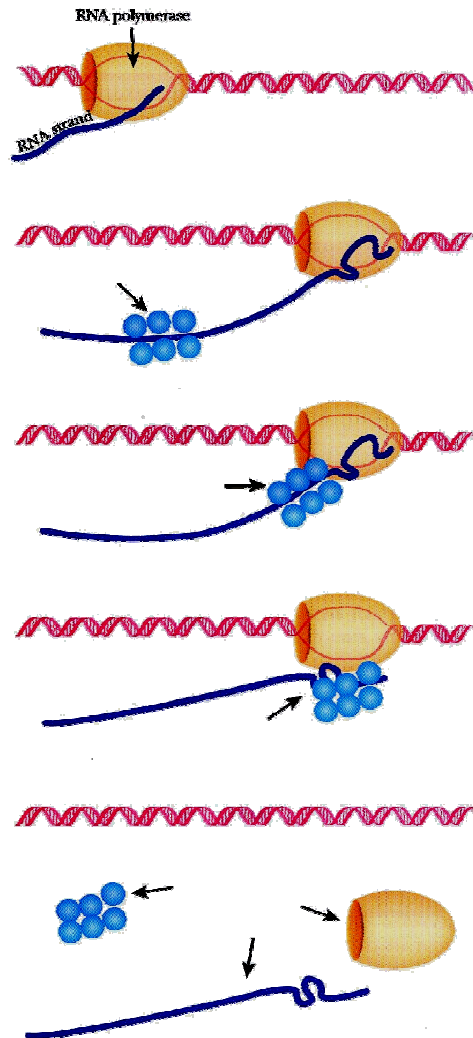




Výměna sigma faktoru a NusA proteinu na RNA-polymeráze

- Sigma faktor: iniciace
- NusA protein - terminace

Terminace transkripce za účasti Rho faktoru



Elongační fáze transkripce

Připojení Rho-faktoru a jeho pohyb po mRNA

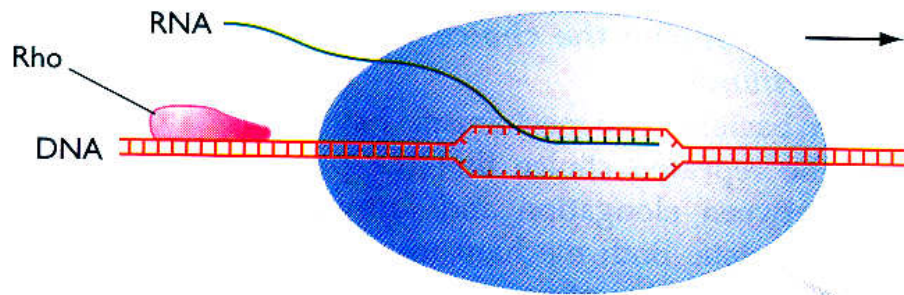
Připojení Rho-faktoru k sekvenci terminátoru

Rho faktor rozmotává hybridní DNA-RNA

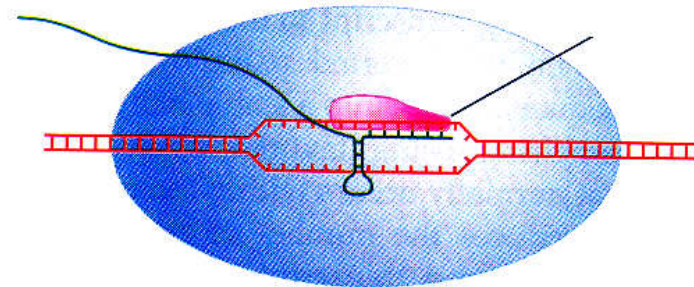
Uvolnění Rho-faktoru, RNA-polymerázy a mRNA

Terminace transkripce závislá na Rho-faktoru

Elongační fáze



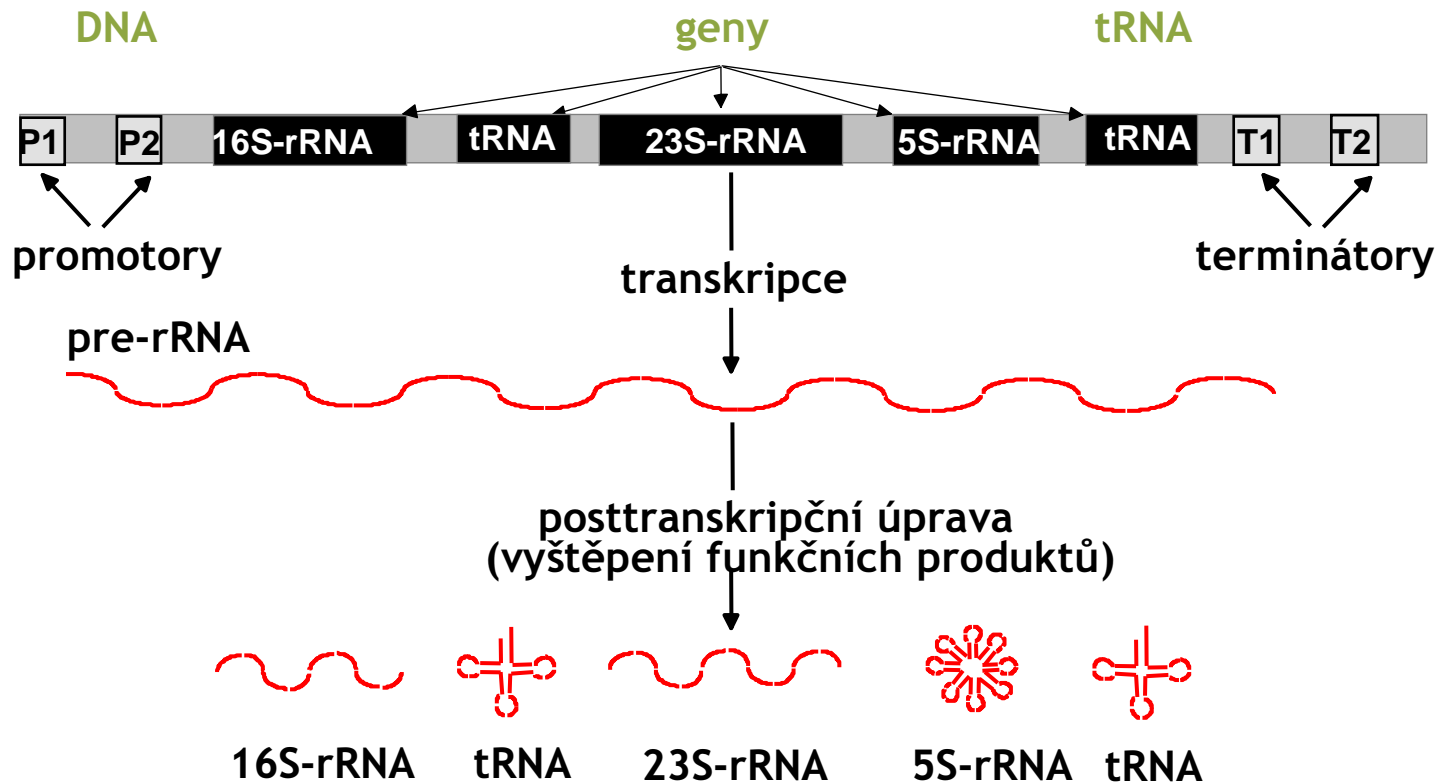
Rho-faktor se pohybuje za RNA-polymerázou



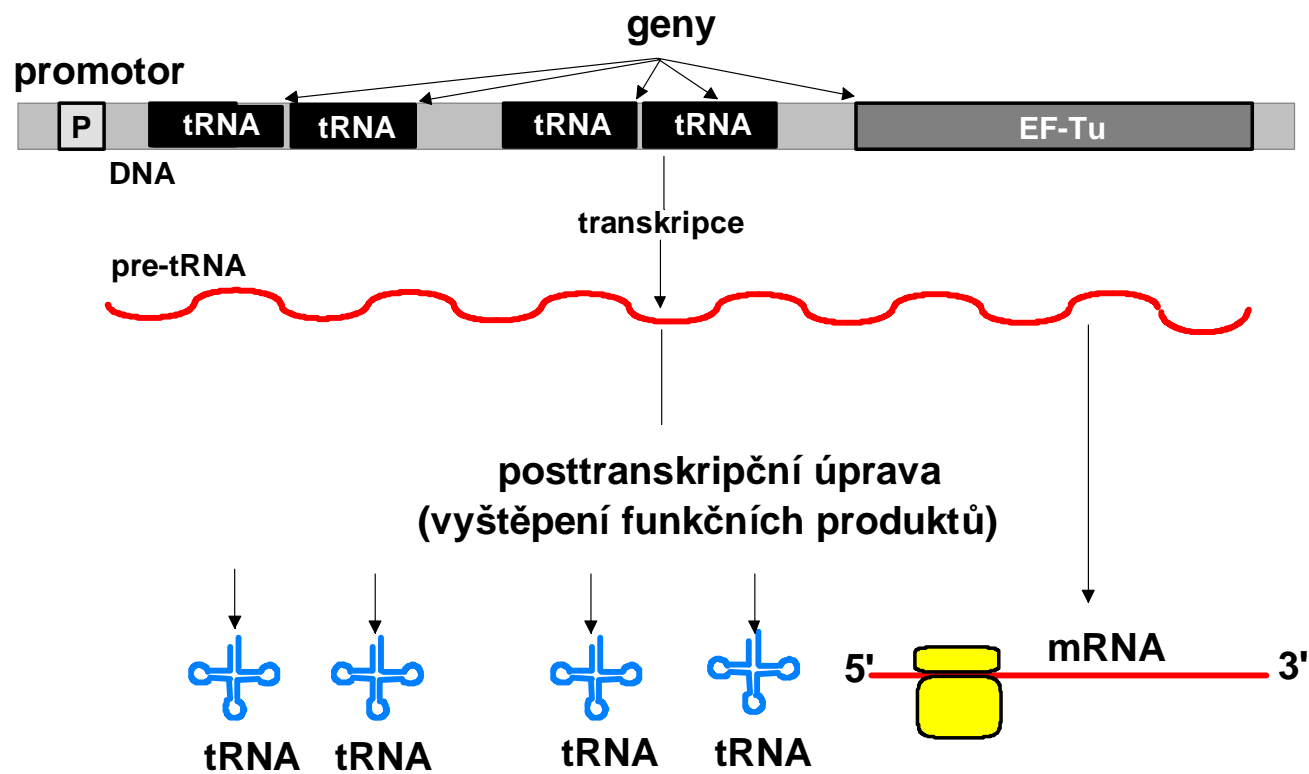
- Rho-faktor je rozeznáván NusA-proteinem, který je přechodnou součástí RNA-polymerázy. Rho-faktor katalyzuje po vazbě na tento protein odvíjení mRNA z DNA-řetězce a uvolnění RNA-polymerázy. K tomu je zapotřebí ATP, který je hydrolyzován Rho-faktorem vyznačujícím se aktivitou ATPázy.

Jakmile se RNA-polymeráza zastaví na terminátorové vlásence, Rho-faktor ji dostihne a oddělí RNA od DNA (Rho = helikáza)

Transkripce transkripční jednotky pro rRNA (*rrn* operony)



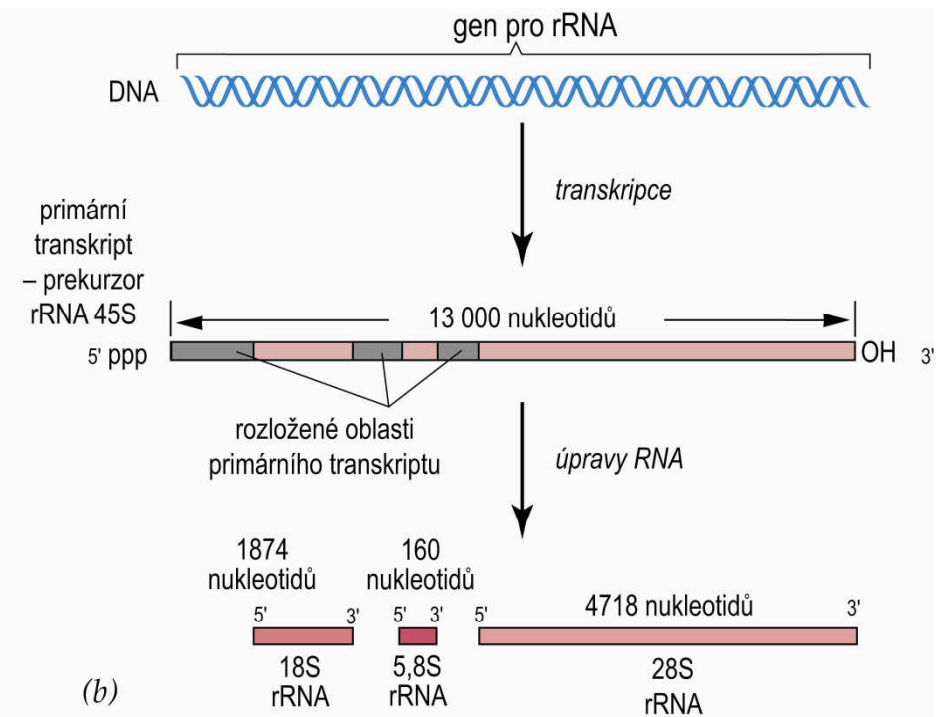
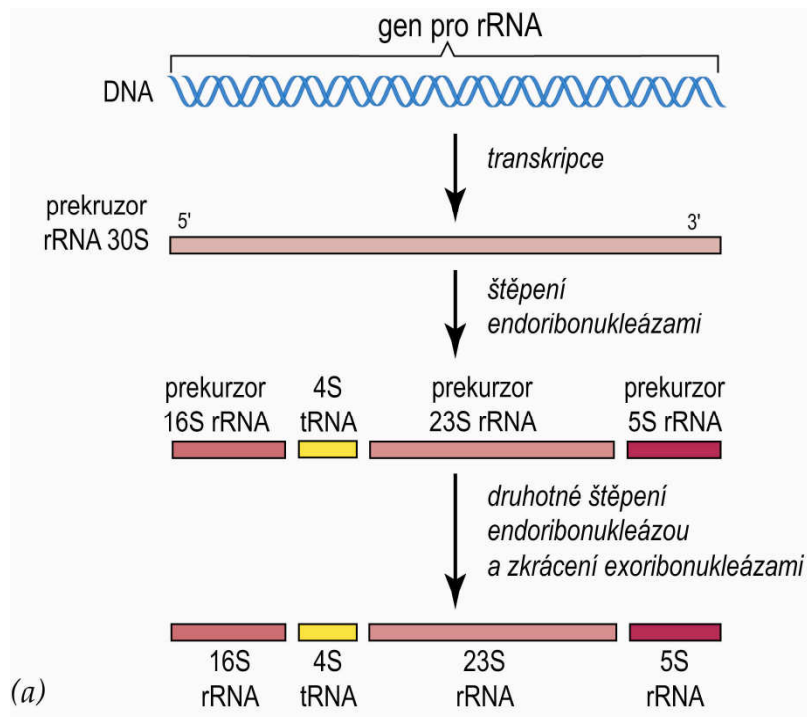
Transkripce transkripční jednotky pro tRNA



Transkripce a úprava genů pro rRNA u bakterií a savců

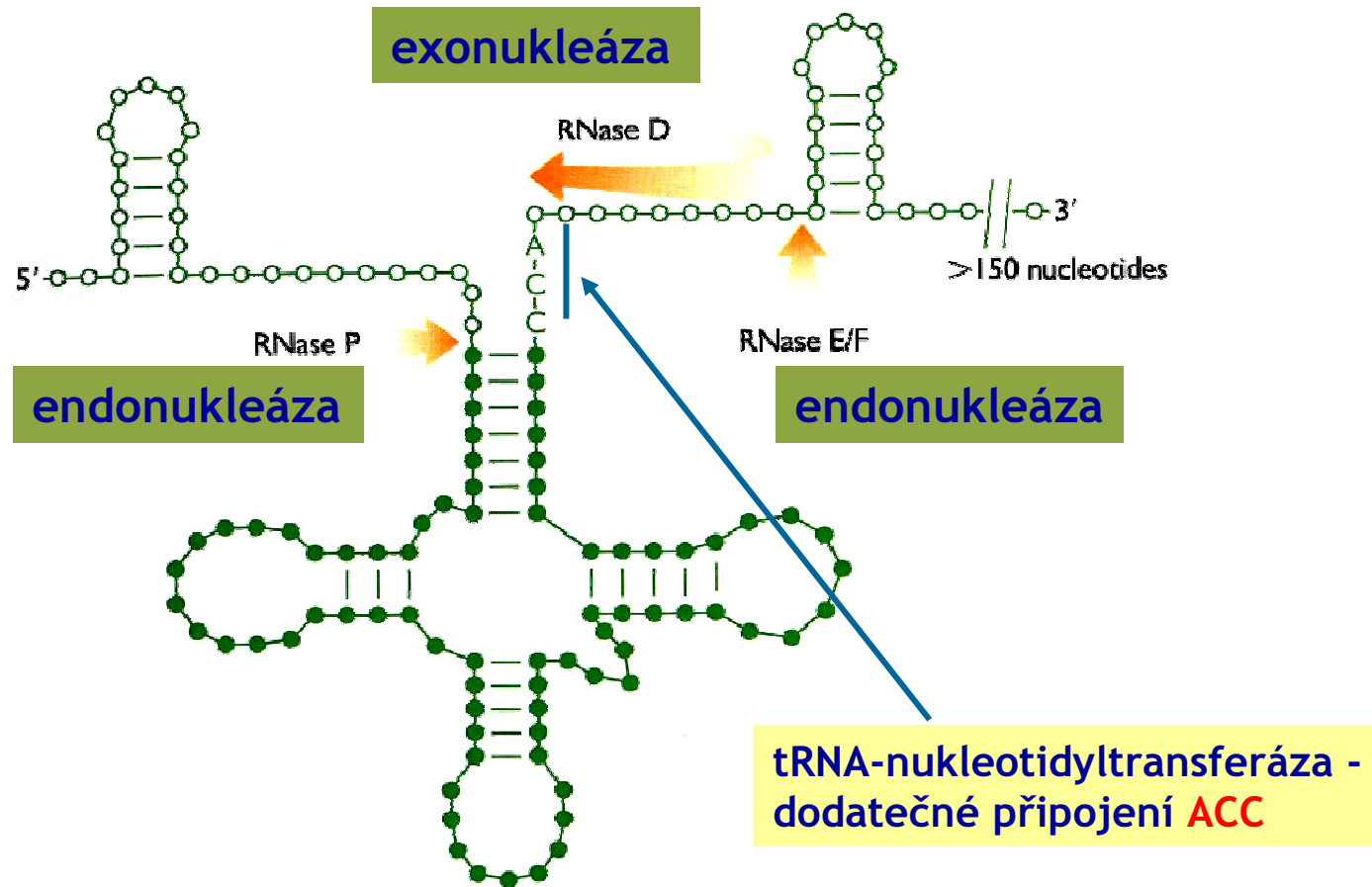
Bakterie

Savci

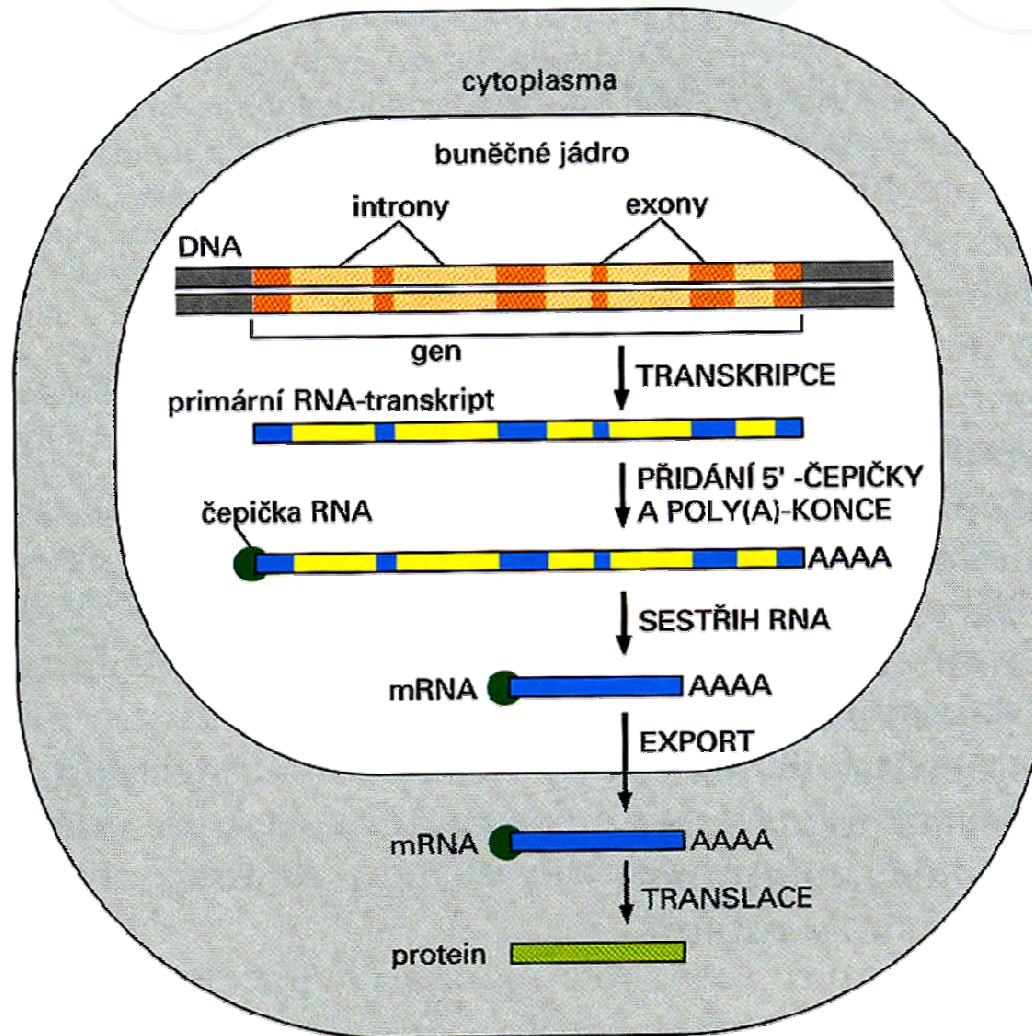


Úprava pre-tRNA u *E. coli*

* probíhá působením enzymů



Transkripce u eukaryot



Eukaryotické DNA-dependentní RNA-polymerázy

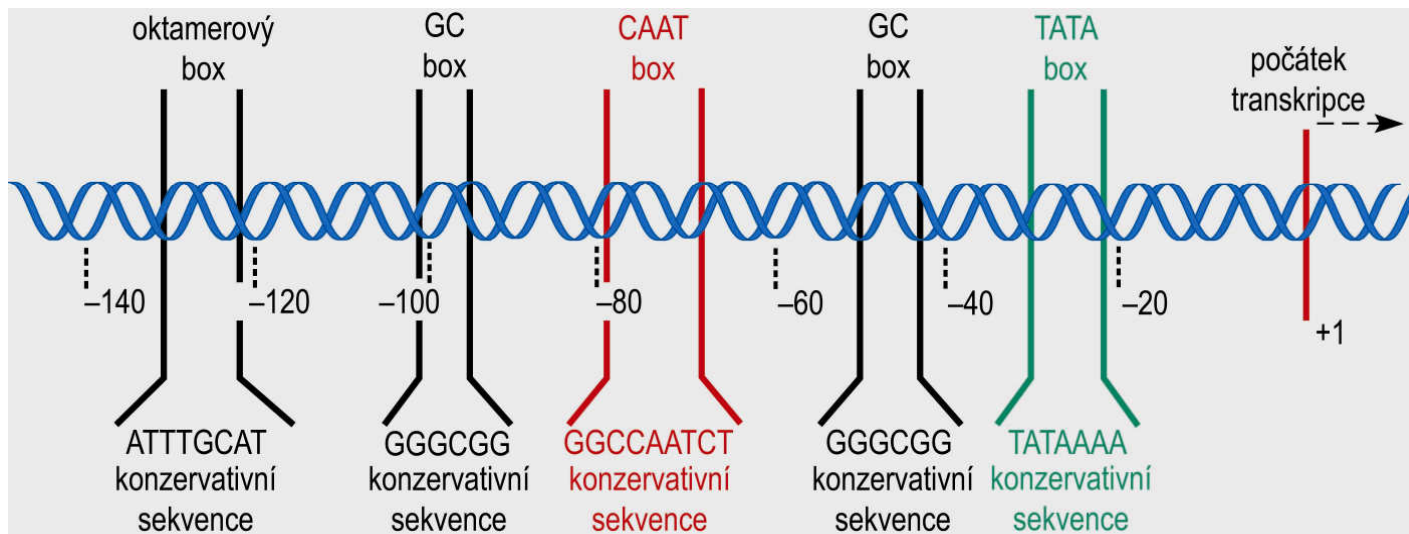
Matricí pro syntézu RNA je u všech těchto polymeráz negativní DNA-řetězec. Existují tři druhy těchto RNA-polymeráz:

- **RNA-polymeráza I**, která katalyzuje syntézu pre-rRNA. Nachází se v jádru a není citlivá k α -amanitinu **Geny I. třídy**
- **RNA-polymeráza II**, která katalyzuje syntézu hnRNA a některých malých rRNA. Je citlivá k α -amanitinu. Vyskytuje se v karyoplazmě. Sestává přibližně z 10 protomerů, z nichž tři největší jsou homologické s protomery α , β a β' prokaryotické RNA-polymerázy. Protomer β váže volné ribonukleotidy, β' se váže k DNA a α spojuje protomery navzájem. Ostatní protomery se neliší od protomerů polymeráz I a III. **Geny II. třídy**
- **RNA-polymeráza III**, která katalyzuje syntézu pre-tRNA, 5S-rRNA a některých malých RNA. Citlivost k α -amanitinu je druhově specifická. Vyskytuje se v karyoplazmě. **Geny III. třídy**

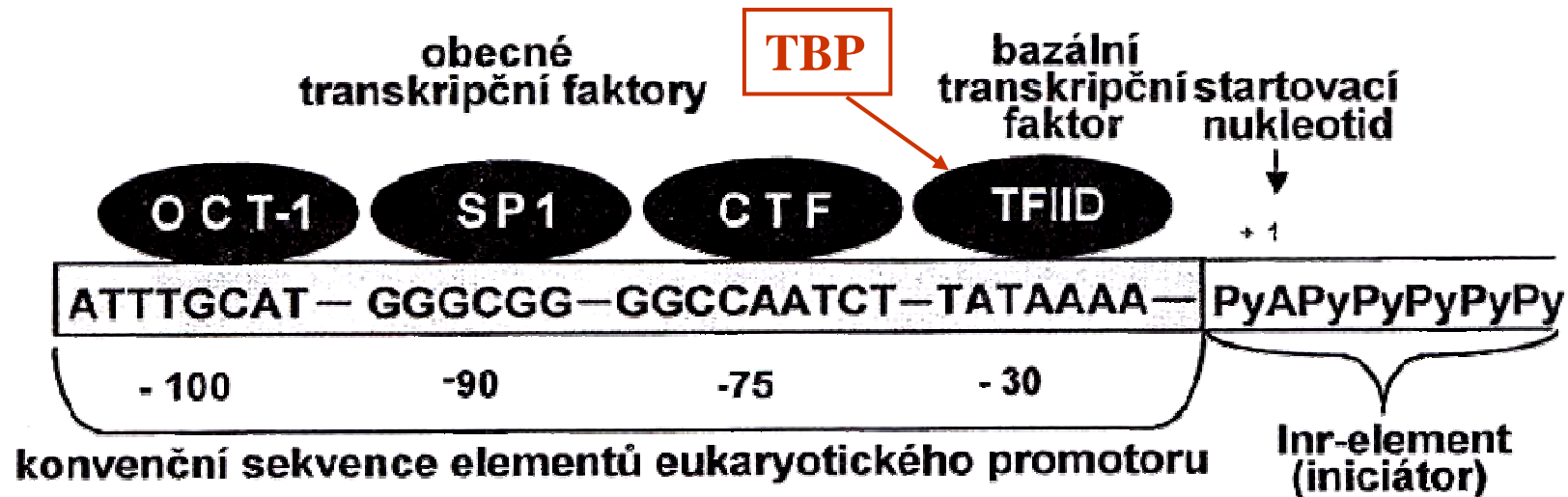
Každá z uvedených tří RNA-polymeráz vyžaduje svůj specifický promotor, na který se váže. To je rozdíl proti prokaryotům, která mají jen jeden typ RNA-polymerázy a jeden typ promotoru

Elementy eukaryotického promotoru (Pol II)

- +1 (startovací nukleotid + Inr-element) - **iniciátor**
 - TATA-box (Hognessův b.) -34 až -26 - **TATA-box**
 - CAAT-box -75 až -80
 - GC-box -90
 - Oktamer ATTTGCAT
- Elementy proti směru transkripce (upstream elements)



Struktura promotoru RNA-polymerázy II

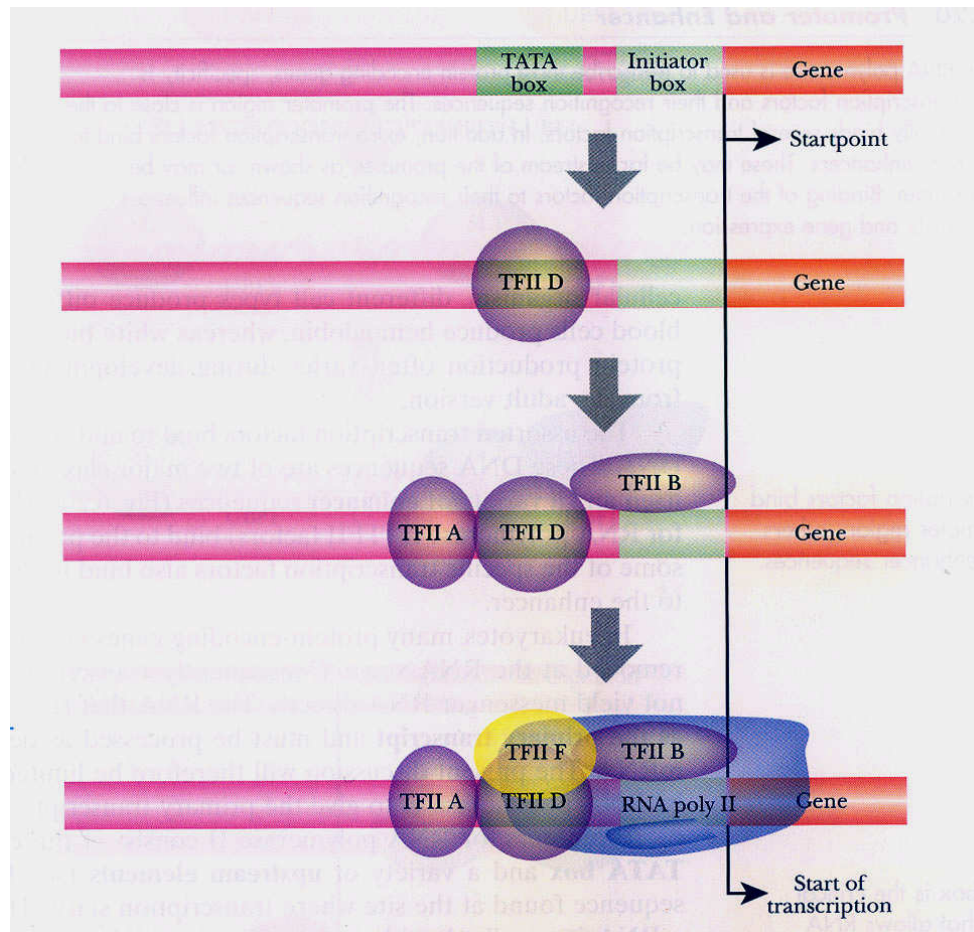
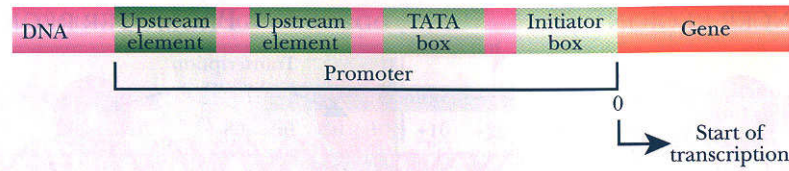


Promotory různých genů se liší počtem, umístěním a kombinací těchto elementů. Všechny promotory však musí obsahovat jeden nebo více elementů, aby mohly zahájit bazální transkripci.

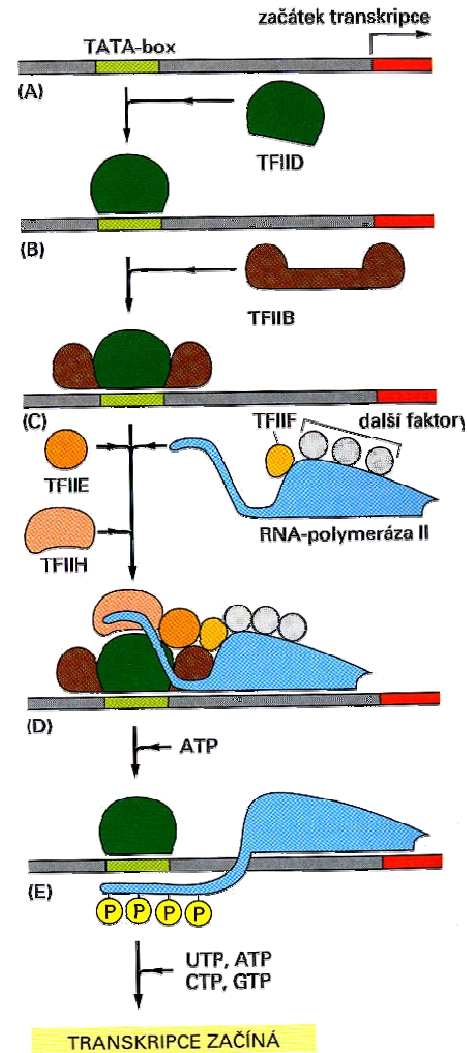
Provozní geny mají jen Inr-element bez TATA-boxu (Hognessův box).

Poznámka
Promotory RNA-polymerázy II u některých genů nemají ani TATA-box ani Inr-element. Transkripce těchto genů může začít z různých míst seřazených za sebou.

Vazebná místa eukaryotického promotoru pro RNA-polymerázu II



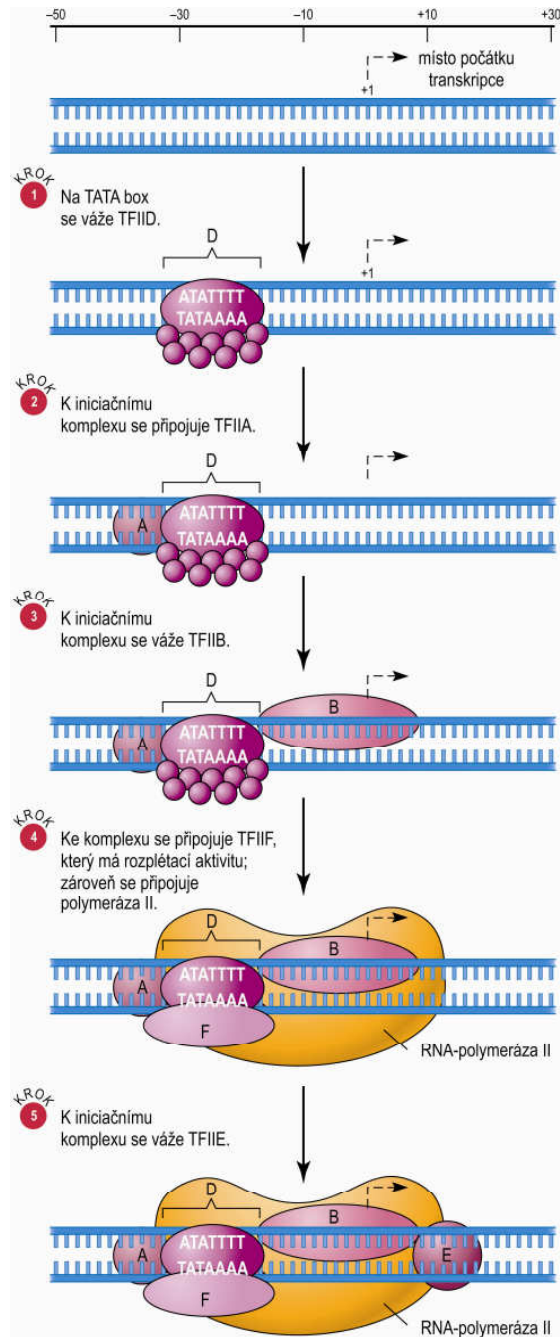
Iniciace transkripce eukaryotních genů RNA-polymerázou II za účasti obecných transkripčních faktorů



**pro zahájení transkripce
je nutné navazání TF
na TATA-box a na
RNA-polymerázu**

**RNA-polymeráza je
fosforylována TFIIH
(+ATP), mění konformaci
a zahajuje transkripci**

Iniciace transkripce RNA-polymerázou II



TFIID obsahuje TATA-vazebný protein (TBP), kterým se váže k TATA-boxu

Posttranskripční úpravy hnRNA

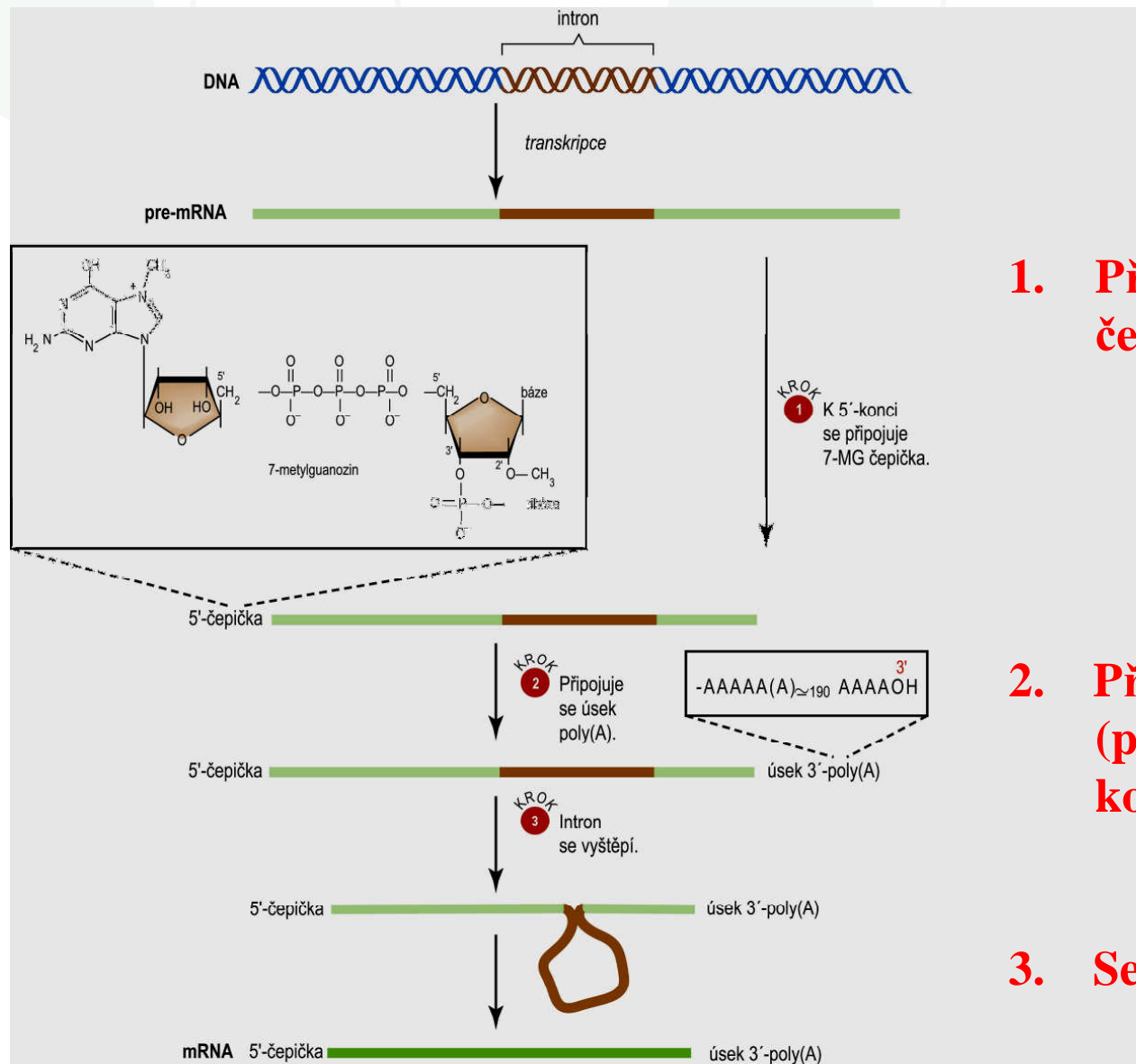
Úpravy konců

- 5' -konec: připojení čepičky (*angl. cap*)
- 3' -konec: polyadenylace

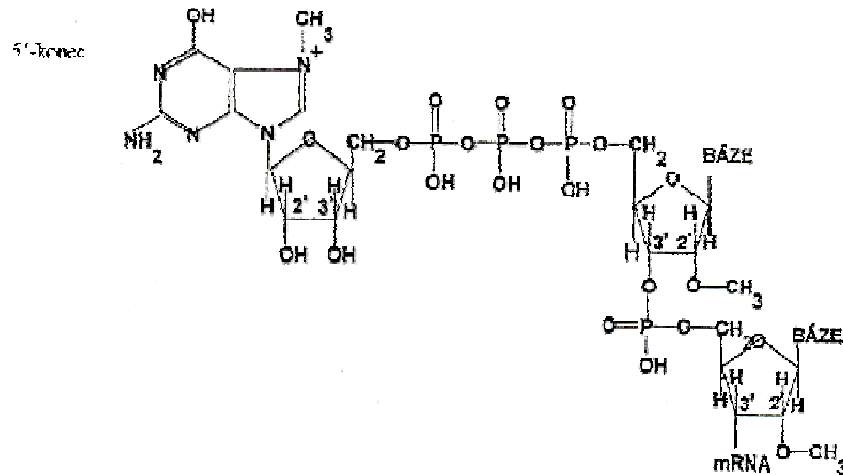
Úpravy vnitřní sekvence

- Methylace
- Sestřih
- Editace (redakční úprava)

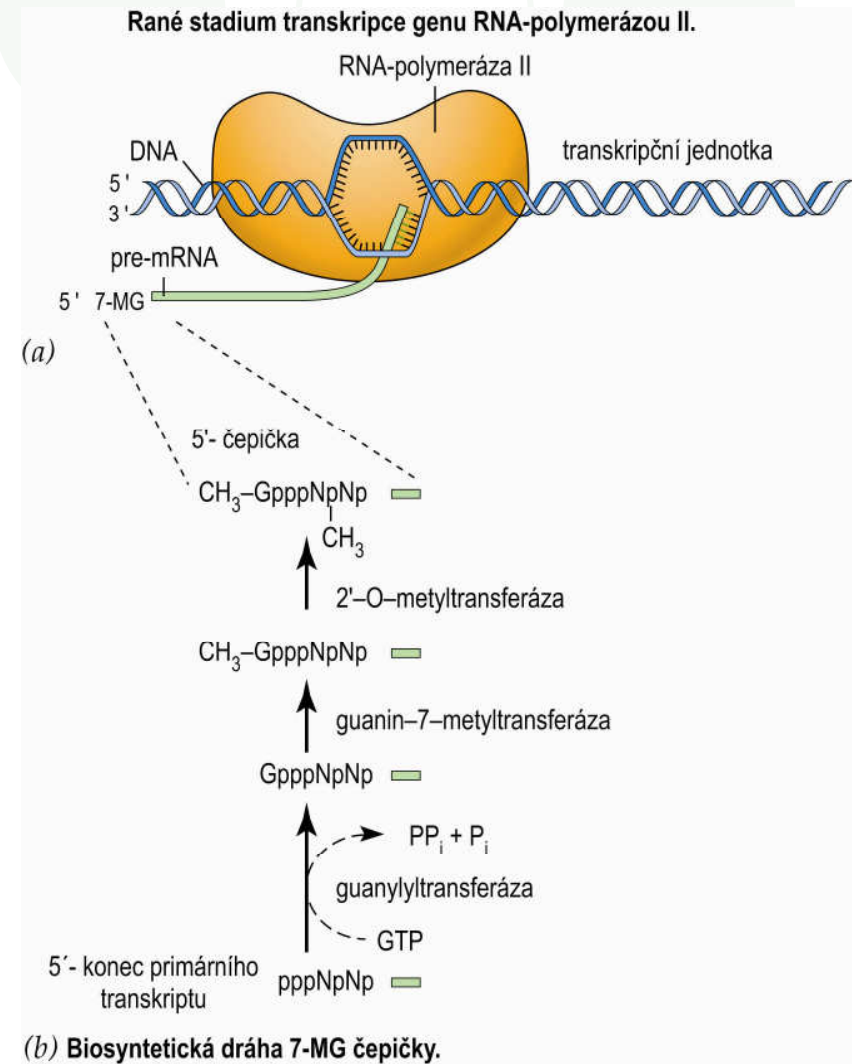
Posttranskripční úprava transkriptů strukturních genů eukaryot



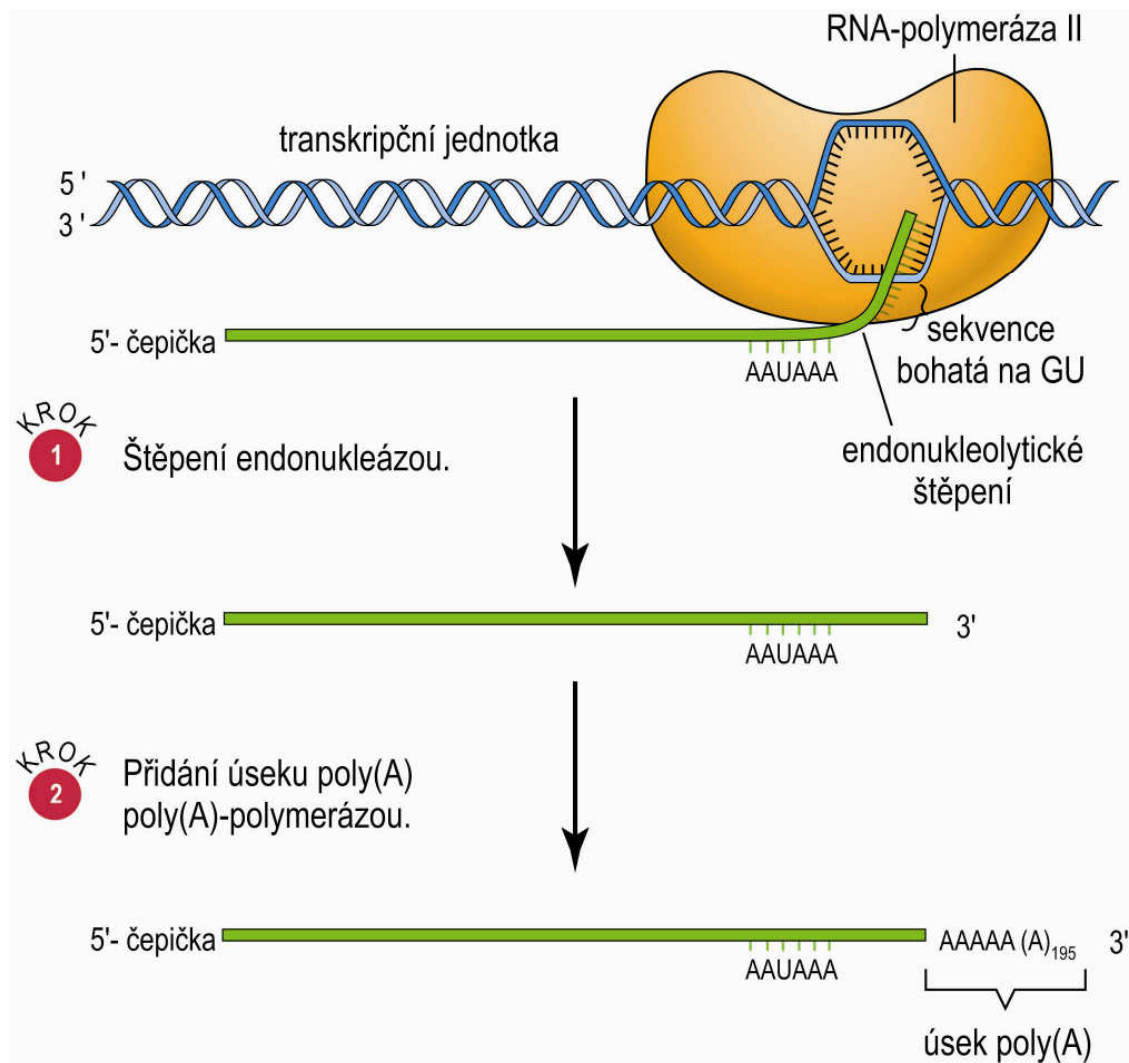
Struktura čepičky



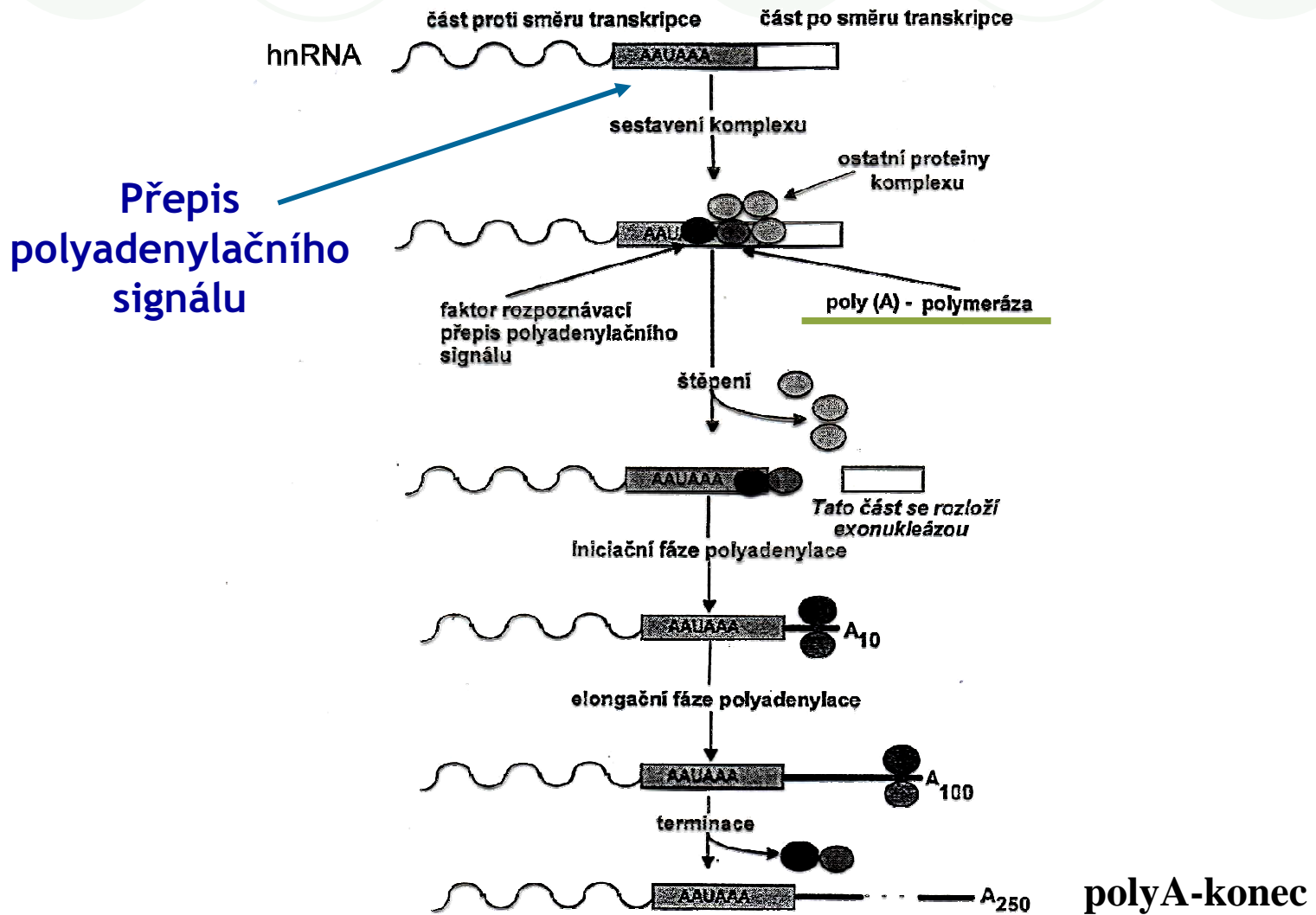
$m^7G^{5'} ppp^{5'}\text{-mRNA}$



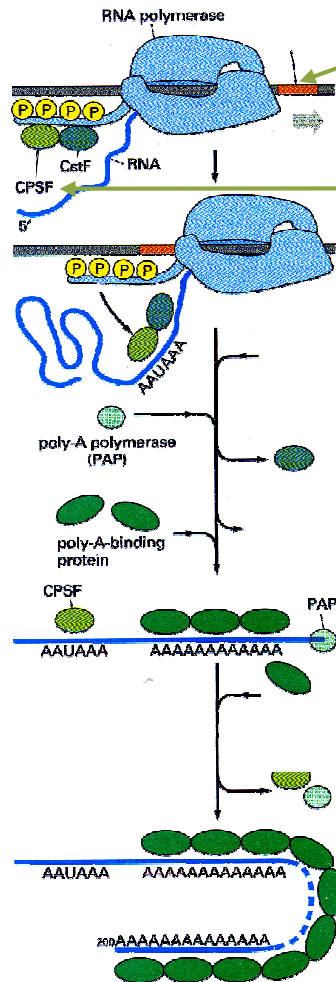
Připojení sekvence poly(A) k 3' konci mRNA



Schema polyadenylace 3'-konce hnRNA



Proces vytváření polyA konce na mRNA



Signály na DNA pro uvolnění mRNA a připojení polyA konce

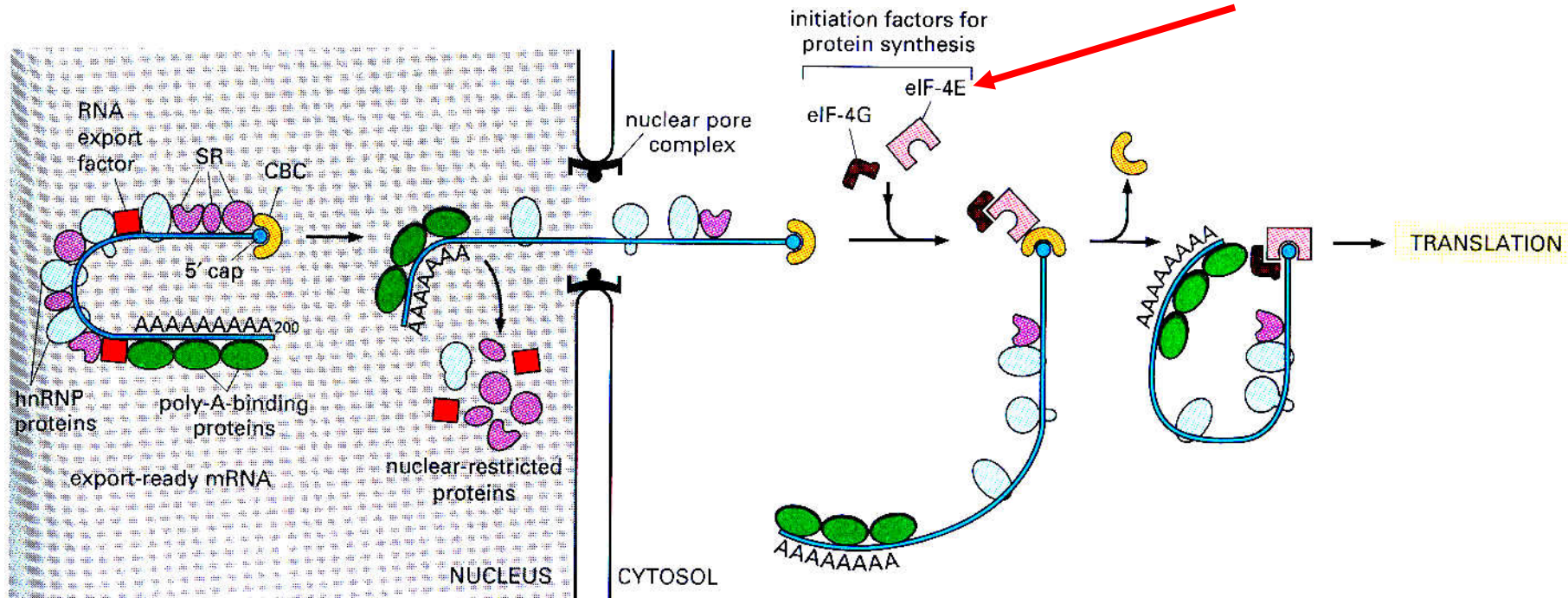
CstF - cleavage stimulation factor F
CPSF - cleavage and polyadenylation specificity factor

Připojení dalších faktorů, uvolnění mRNA

Připojení dalších proteinů vázajících se na polyA

Hotový 3' - konec mRNA

Transport hotové eukaryotické mRNA z jádra do cytoplazmy



Některé z proteinů zůstávají v jádře, jiné jsou transportovány spolu s mRNA do cytoplazmy a zajišťují její stabilitu a iniciaci translace

Sestřih (splicing) – proces, při němž jsou odstraňovány introny

Intron: nekódující sekvence uvnitř genu

Objev:

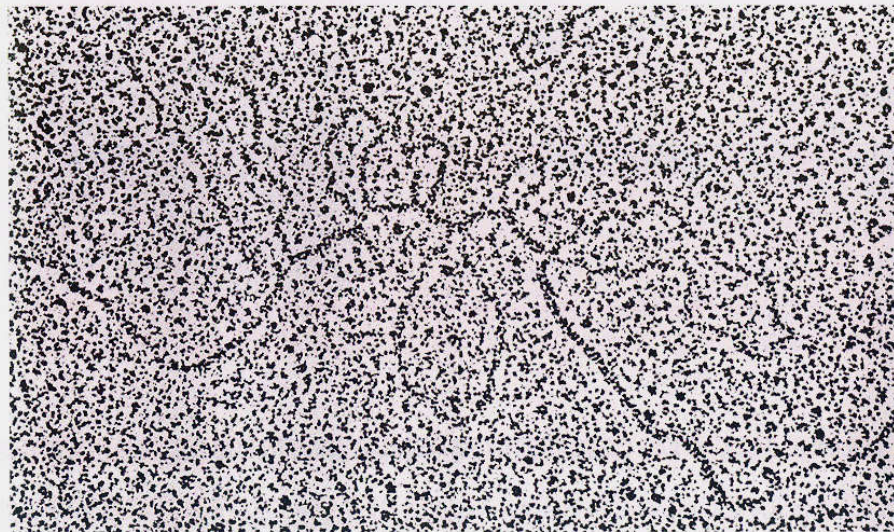
1977: v genu adenovirů

1978: β -globin, imunoglobulin, ovalbumin, tRNA and rRNA.

Známé typy intronů

Intron type	Where found
GU–AG introns	Eukaryotic nuclear pre-mRNA
AU–AC introns	Eukaryotic nuclear pre-mRNA
Group I	Eukaryotic nuclear pre-rRNA, organelle RNAs, few bacterial RNAs
Group II	Organelle RNAs, some prokaryotic RNAs
Group III	Organelle RNAs
Twintrons	Organelle RNAs
Pre-tRNA introns	Eukaryotic nuclear pre-tRNA
Archael introns	Various RNAs

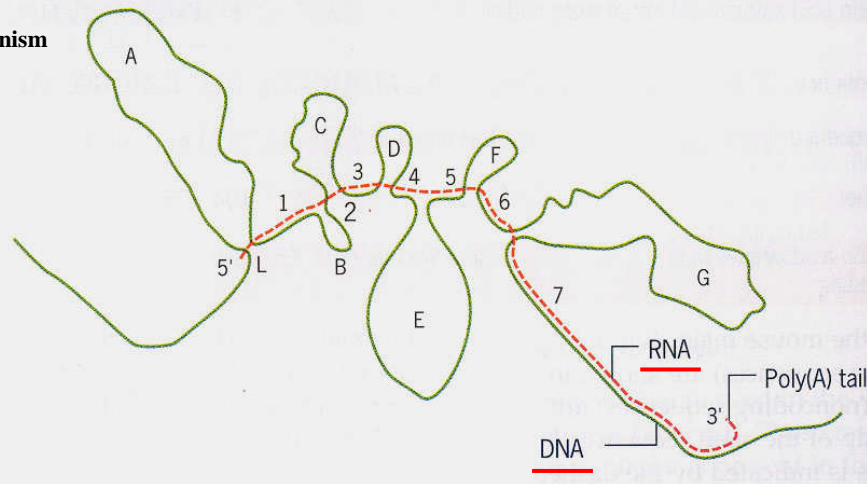
Důkaz přítomnosti intronů v genu pro ovalbumin



(a) Electron micrograph of ovalbumin DNA-mRNA heteroduplex.

Splicing diversity

[edit] Biochemical mechanism



intron



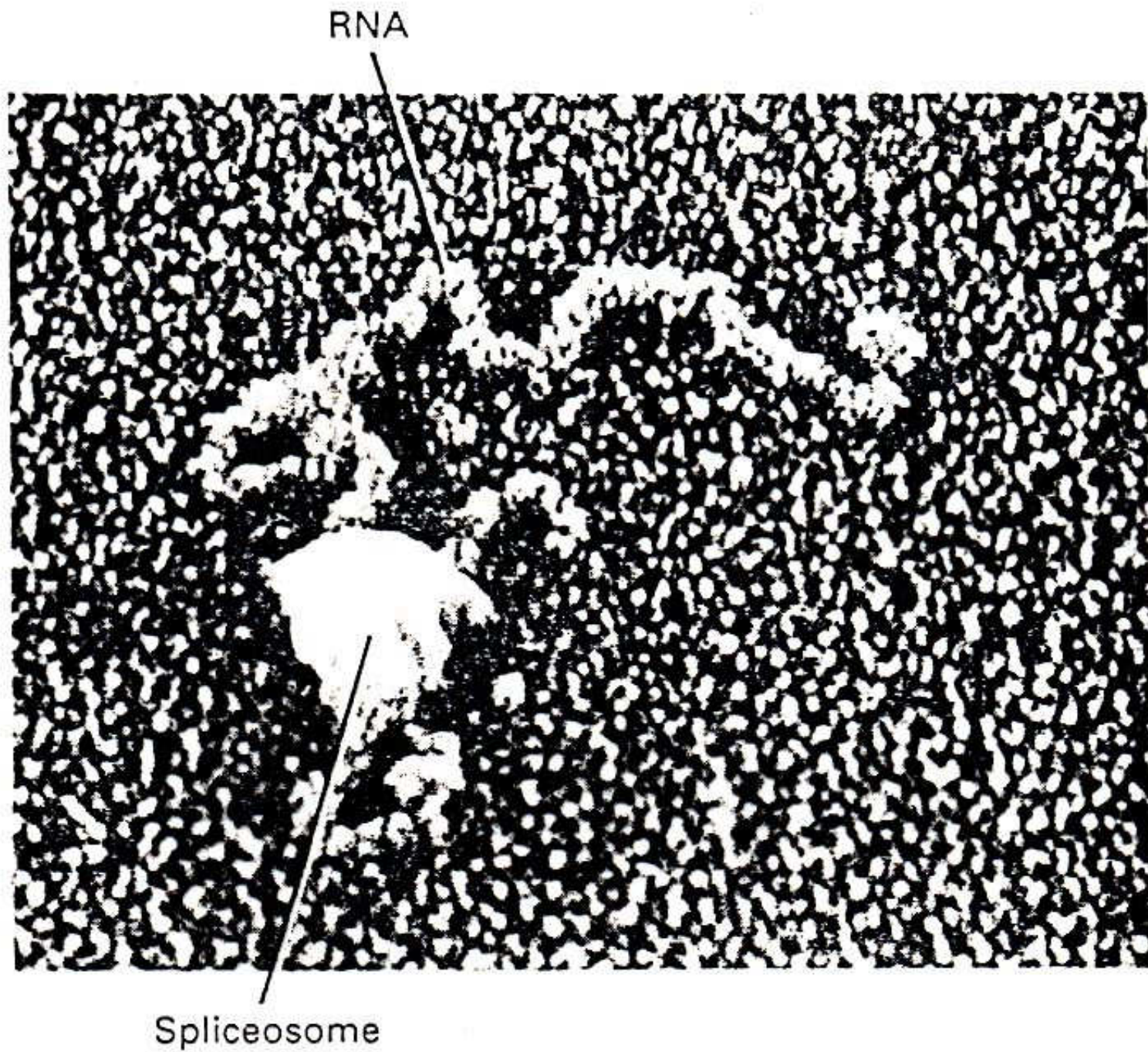


Schéma intronu s vyznačením konzervativních sekvencí

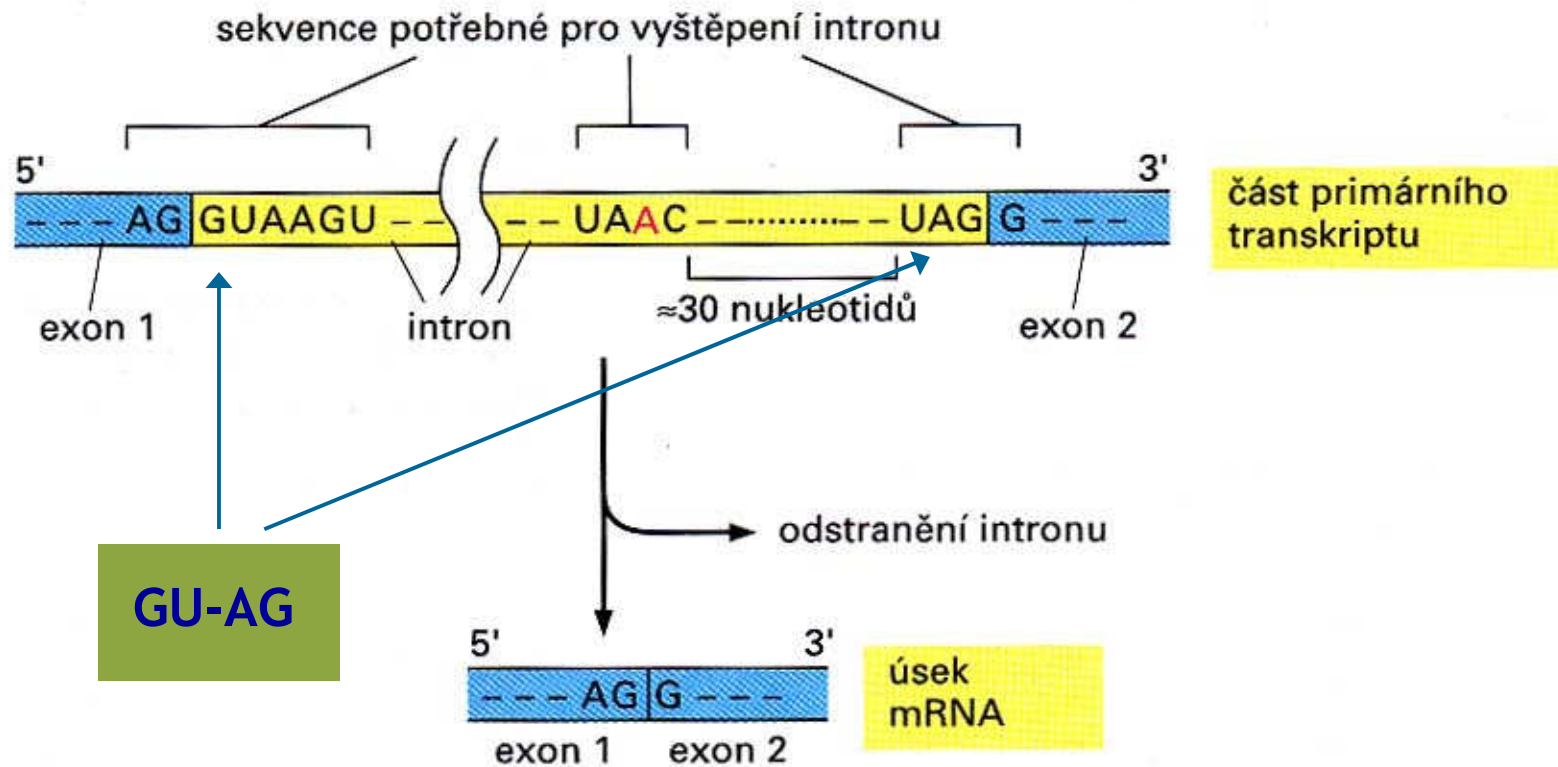
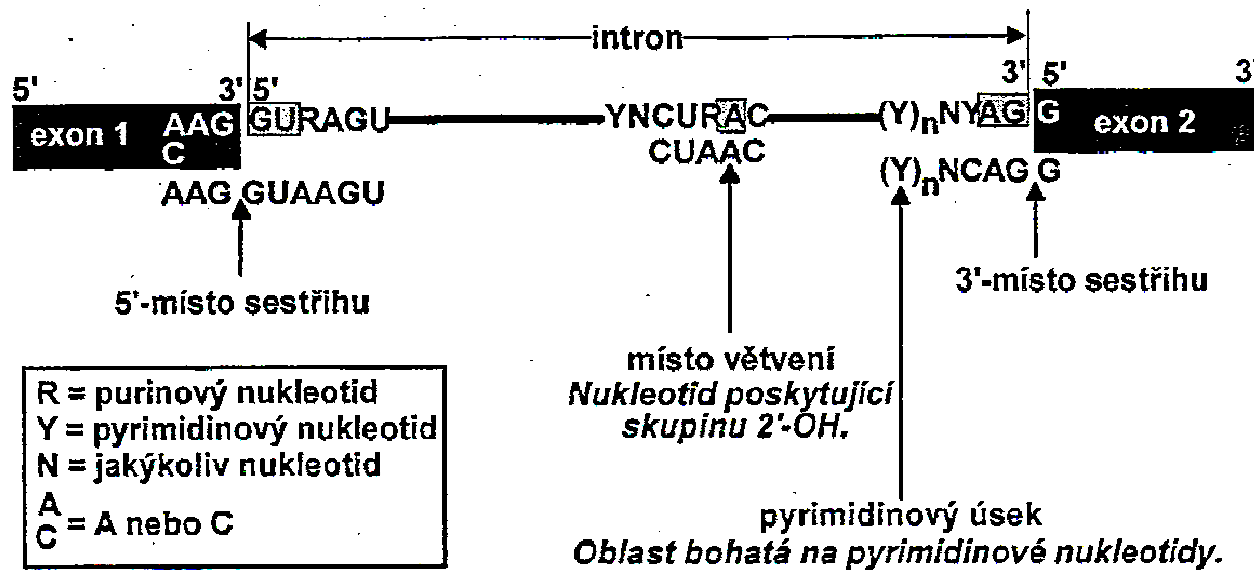
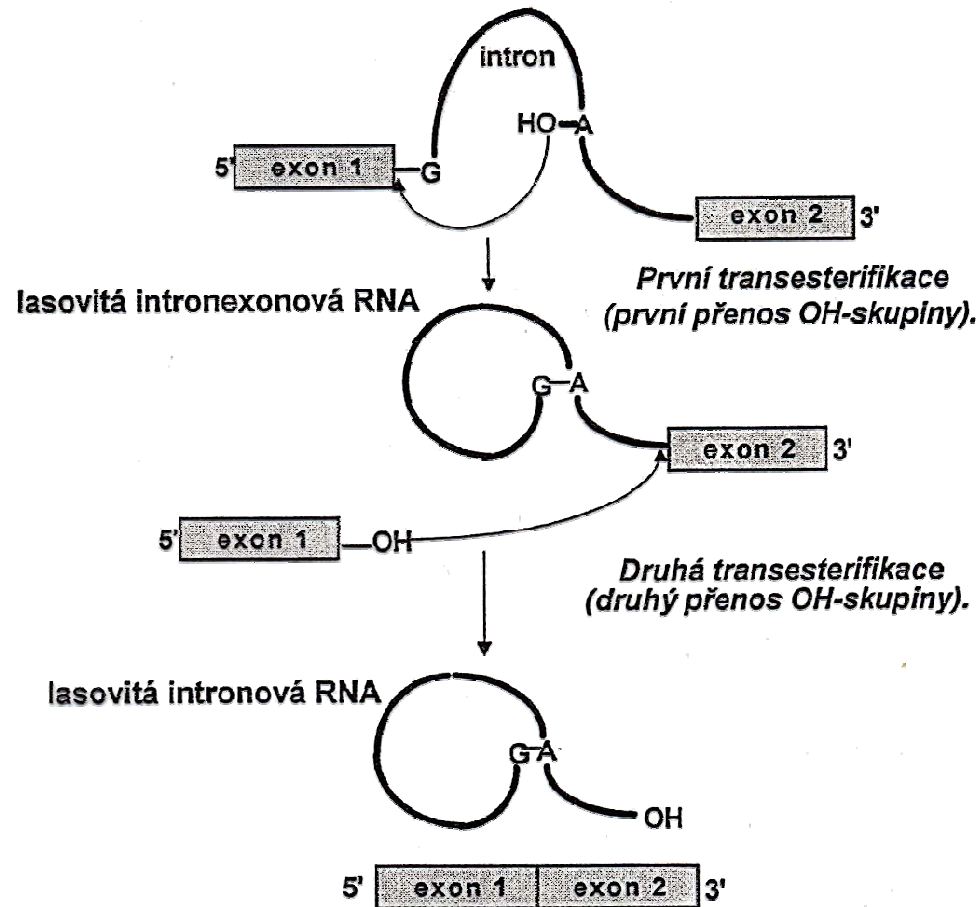


Schéma struktury intronu v hnRNA



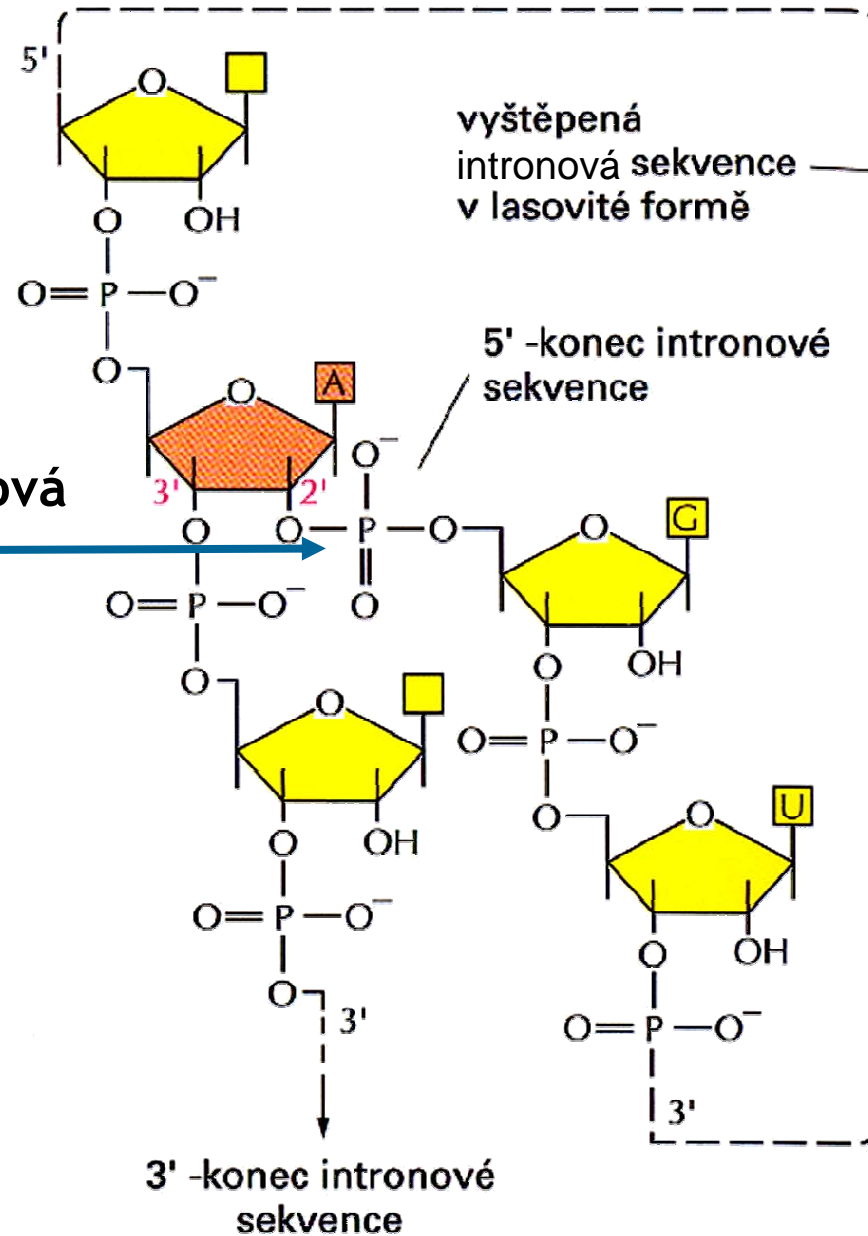
Sekvence a nukleotidy zakreslené do šedého rámečku jsou vysoce konzervativní (četnost 100 %).
 Ostatní sekvence se vyskytují v četnosti 70 - 95 %.
 Sekvence uvedené pod schématem intronu a exonu jsou sekvence, které byly zjištěny u savců.

Schéma transesterifikace při sestřihu hnRNA

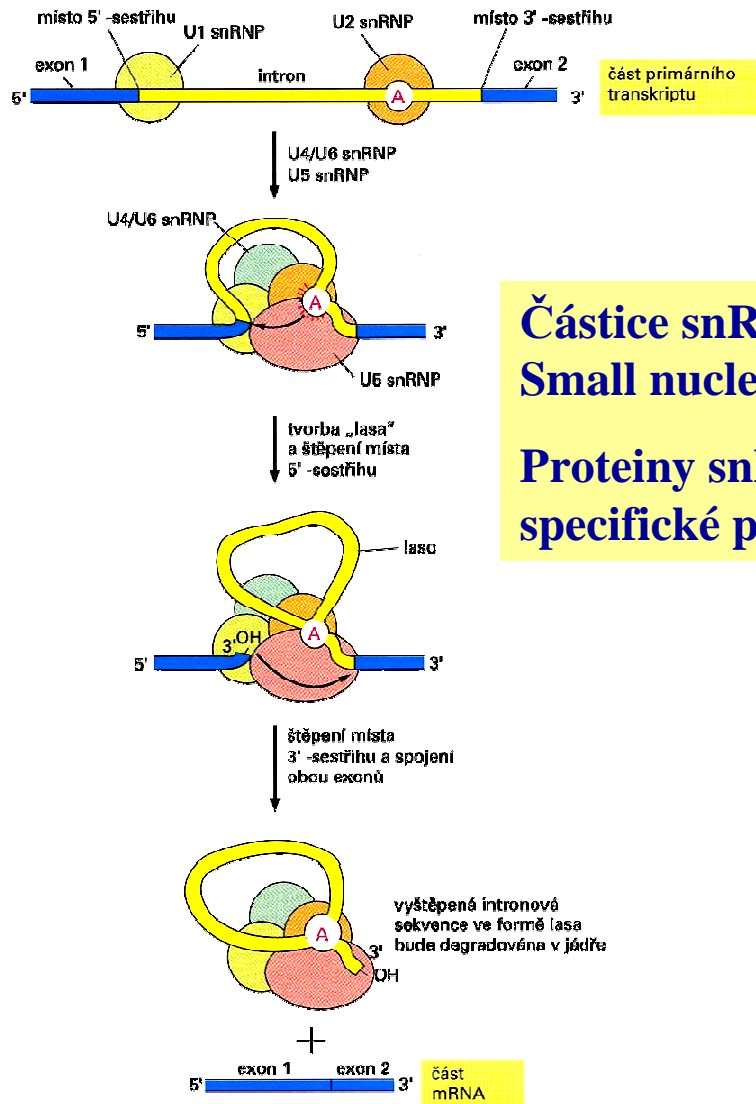


Transesterifikace
= přeměna jednoho
fosfátového esteru
v jiný probíhající
přenosem OH-
skupiny bez
hydrolýzy a za
nepřítomnosti ATP
n. GTP

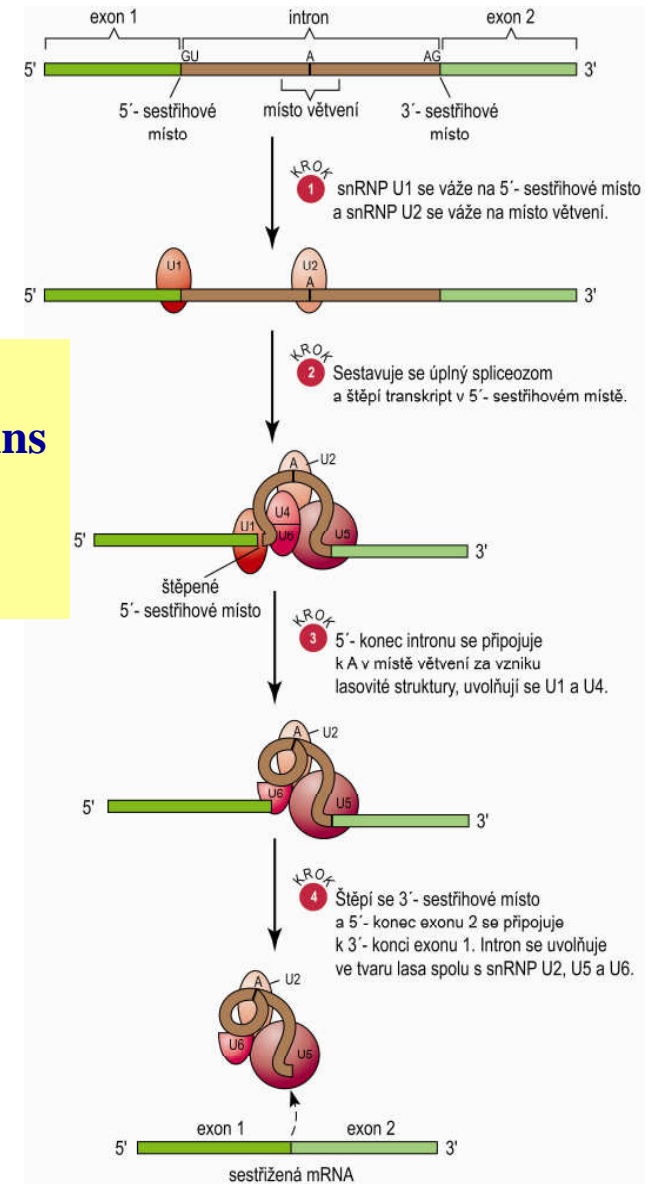
2',5' - fosfodiesterová
vazba



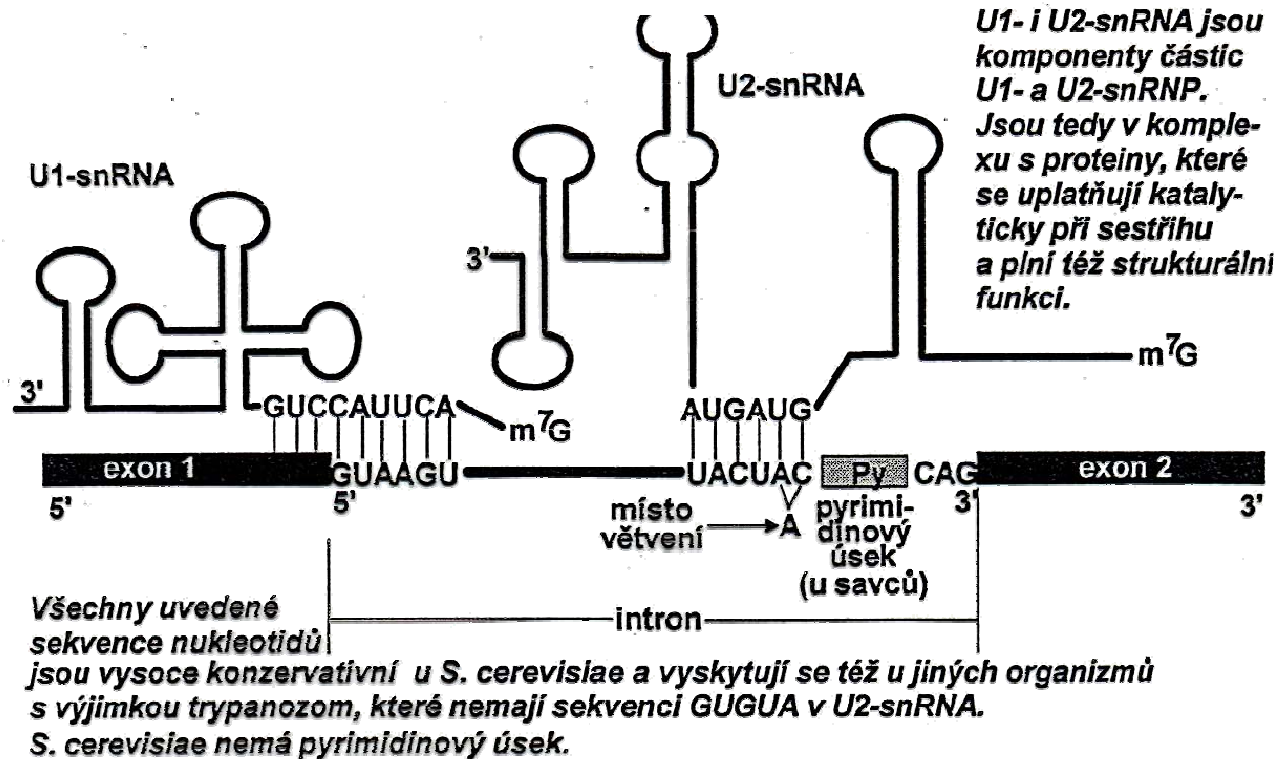
Průběh sestřihu strukturního genu – účast U snRNP



Částice snRNP
Small nuclear ribonucleoproteins
Proteiny snRNP + U snRNA + specifické proteiny

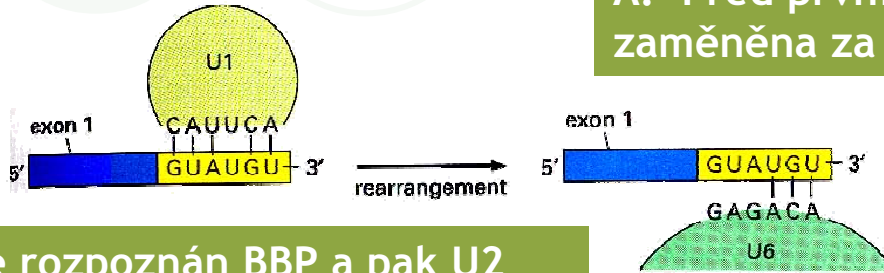


Rozeznávání 5´-místa sestřihu a místa větvení malými jadernými U1-snRNA a U2-snRNA

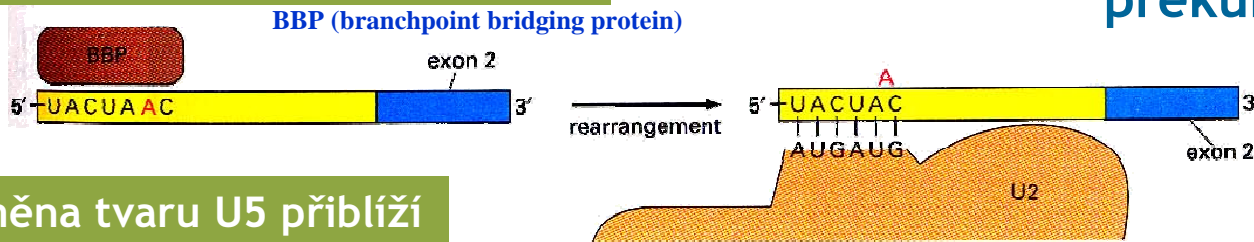


Průběh sestřihu ve spliceosomu během úpravy pre-mRNA

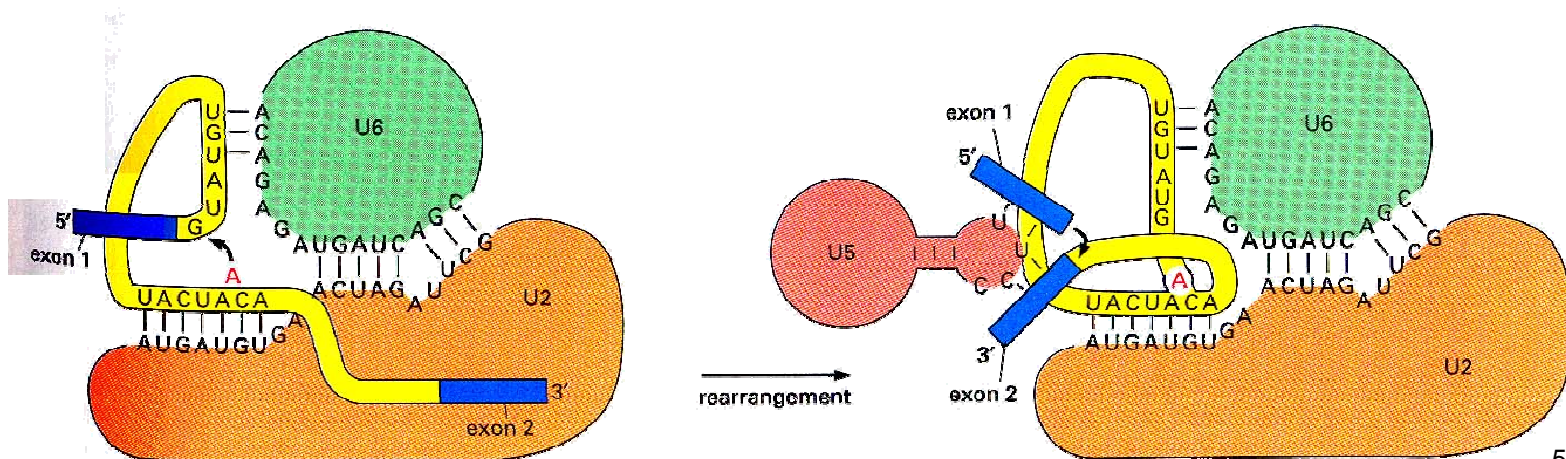
A. Před první transesterifikací je U1 snRNP zaměněna za U6 snRNP



B. A je rozpoznán BBP a pak U2

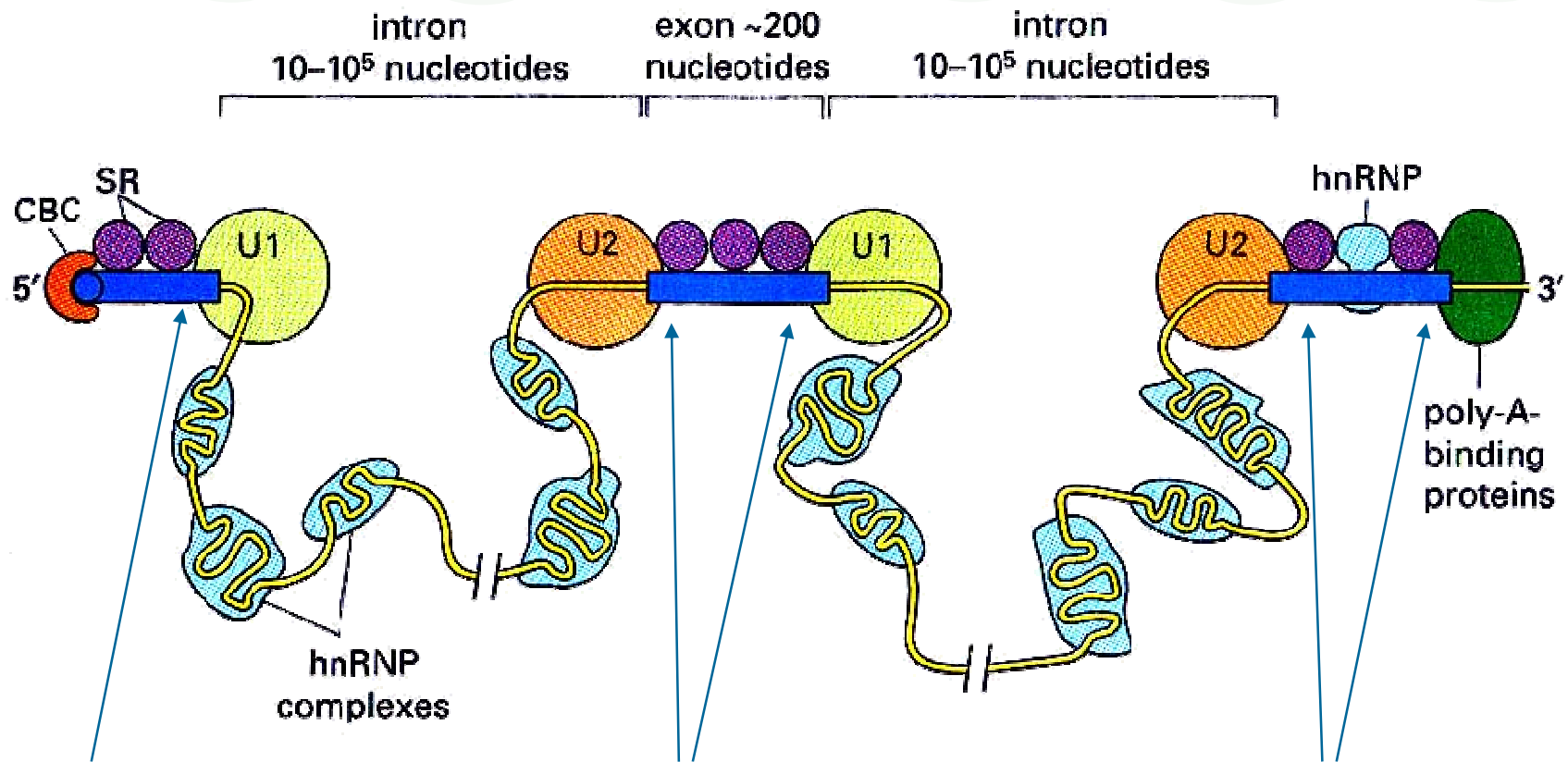


C. Změna tvaru U5 přiblíží konce exonů



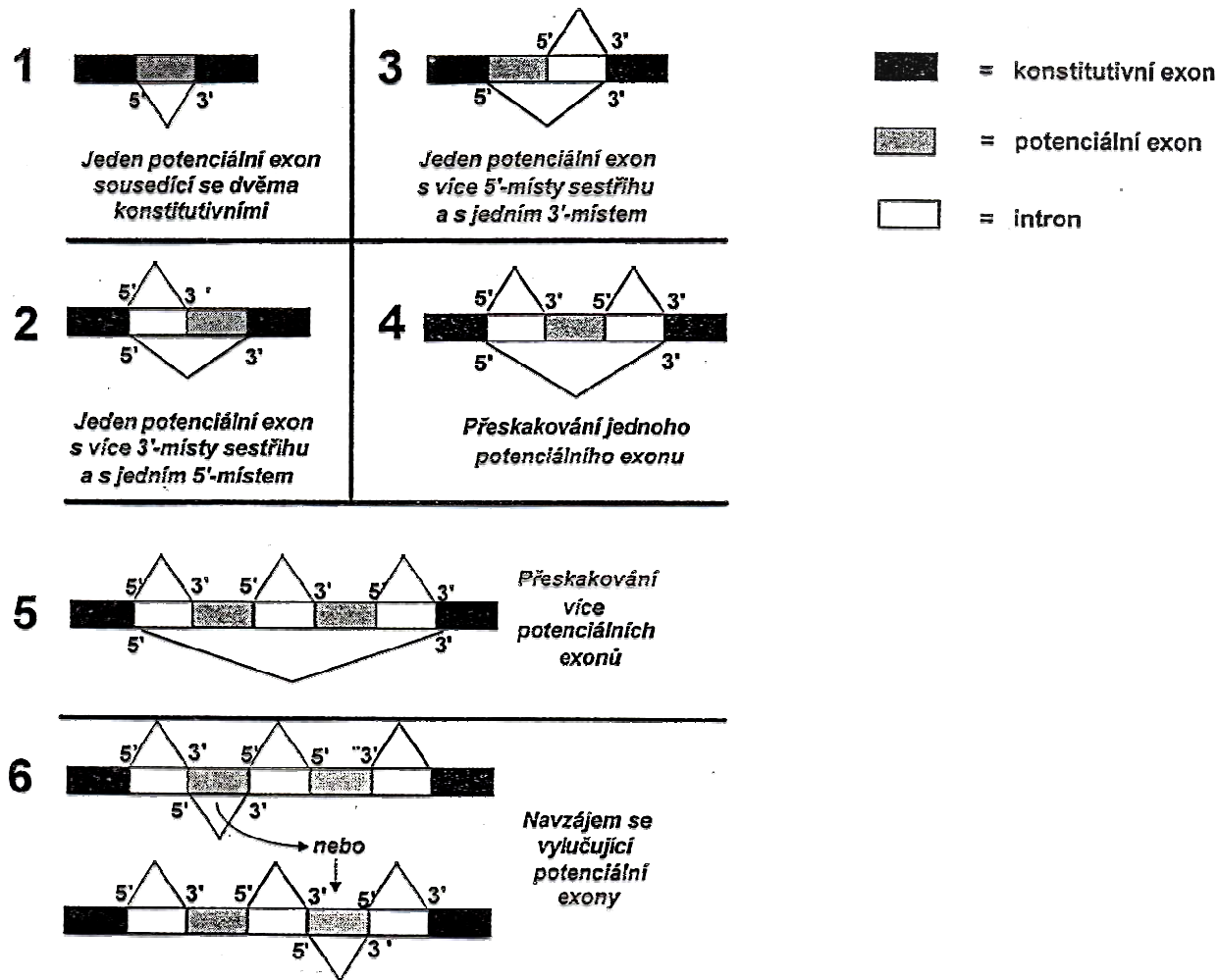
Účast PRP-proteinů (upravujících prekurzorovou RNA)

Účast SR proteinů při rozpoznání míst sestřihu („exon definition hypothesis“)



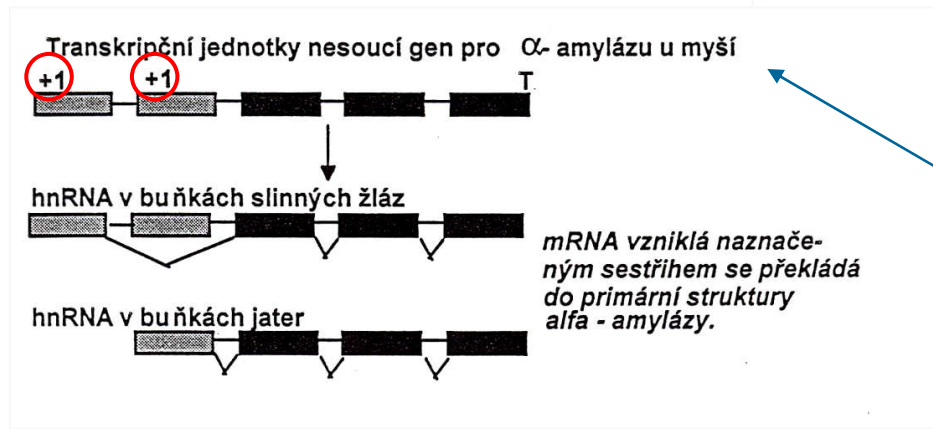
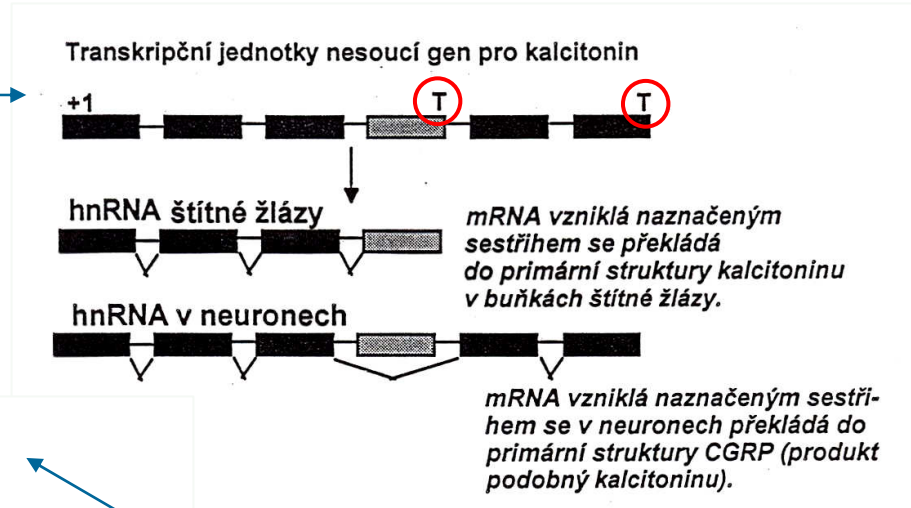
Proteiny SR (bohaté na serin a arginin) se během transkripce průběžně vážou na hranice exonů a pomáhají tak navádět částice snRNP do míst sestřihu

Způsoby alternativního sestřihu hnRNA



Příklady alternativního sestřihu sestřihu molekul hnRNA vzniklých transkripcí překrývajících se transkripčních jednotek

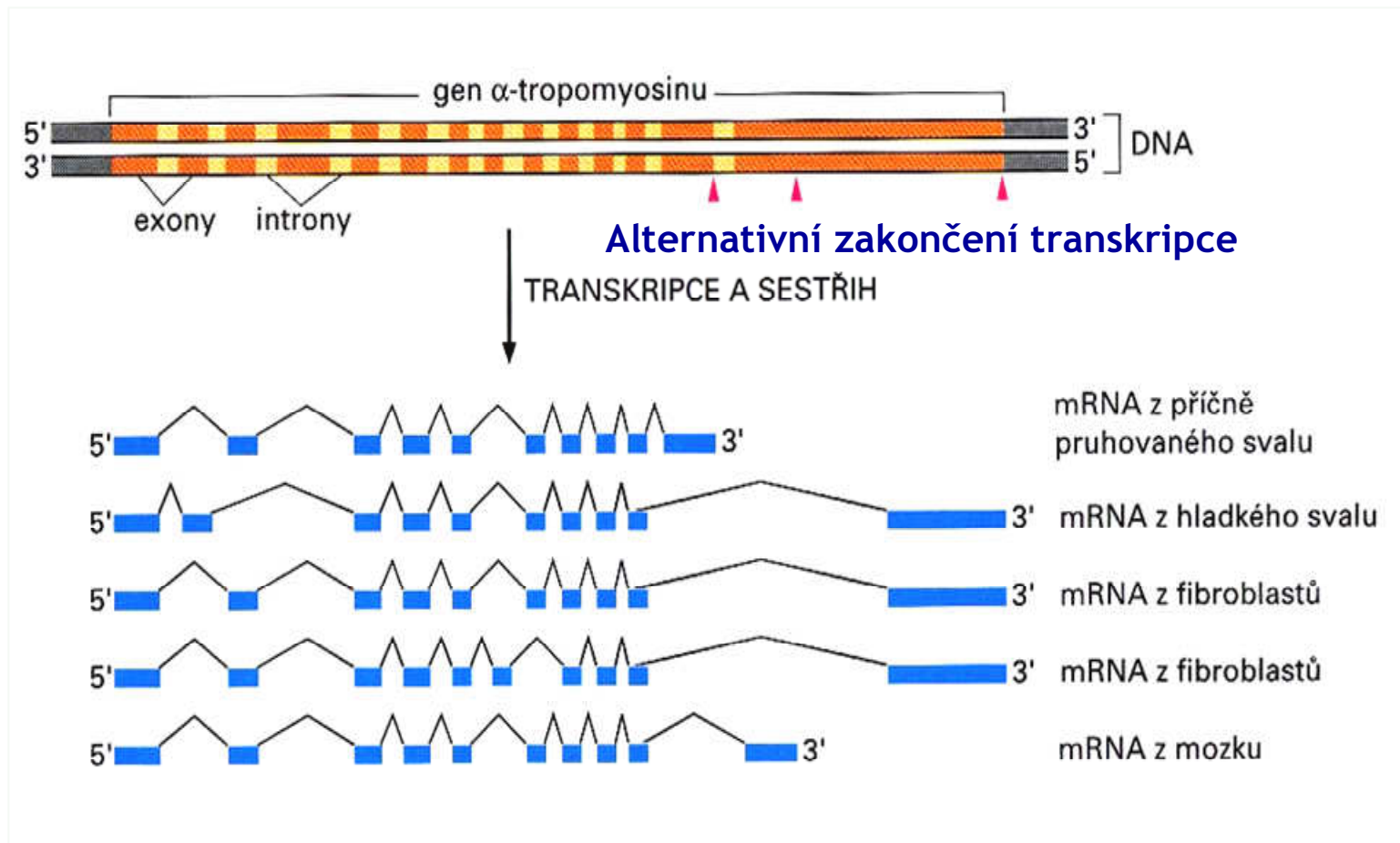
Alternativní terminace transkripce



Alternativní začátek transkripce

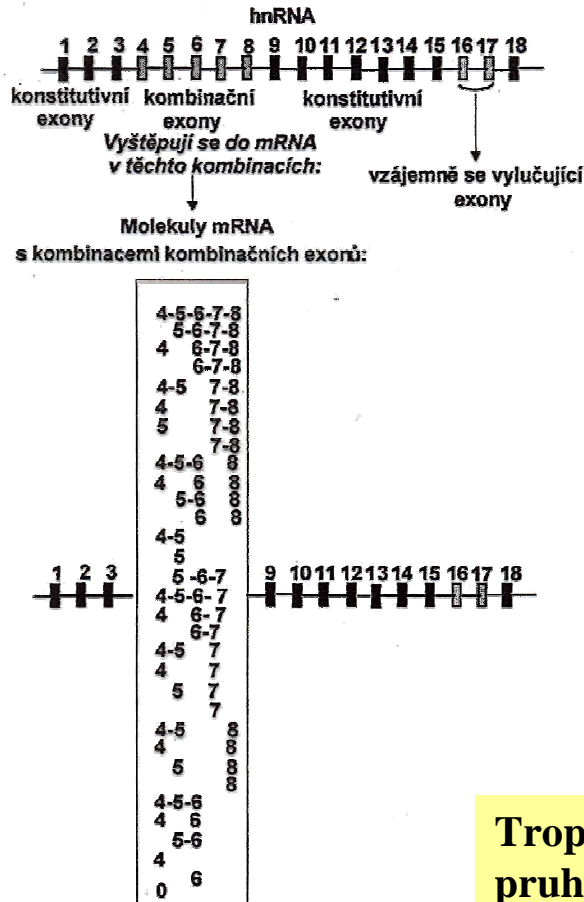
- = potenciální exon,
- = konstitutivní exon,
- +1 = startovací nukleotid,
- T = poly(A).

Alternativní sestřih genu pro alfa-tropomyozin u krysy (regulace kontrakce svalových buněk)



Faktory sestřihu - specifické proteiny aktivní jen v daném typu buňky

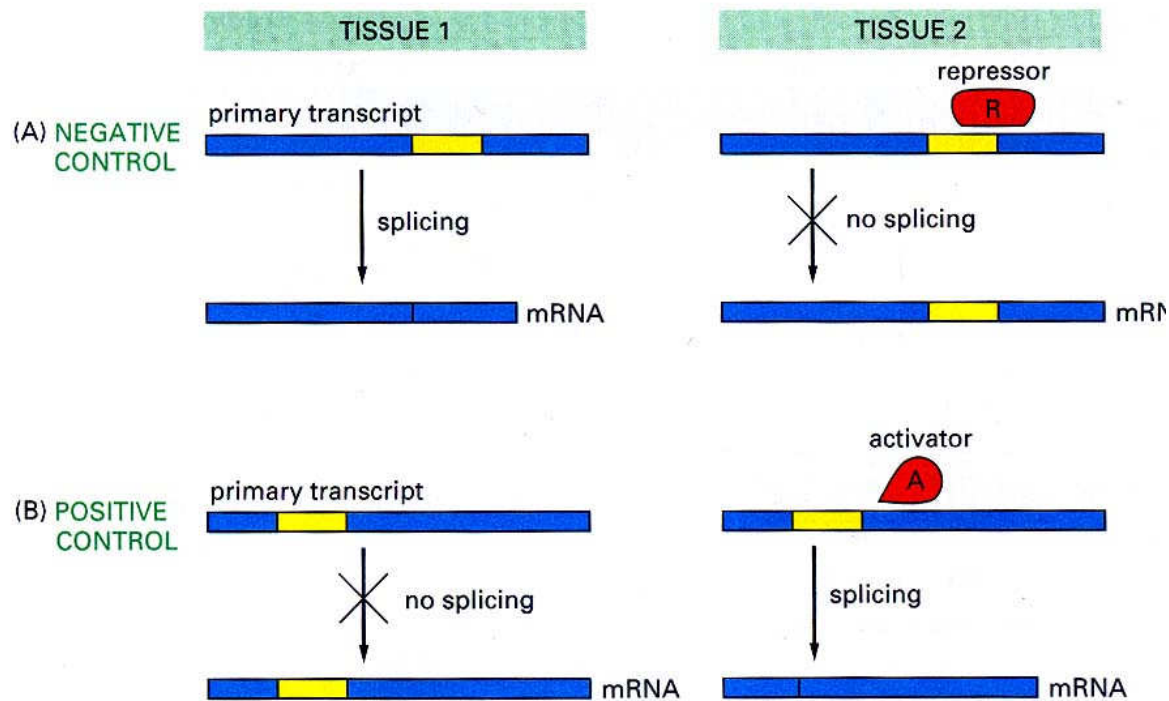
Sestřih kombinačních exonů hnRNA obsahující přepis genu kódujícího troponin T



Celkem se vytvoří 32 molekul mRNA, které se liší v části kódované kombinačními exony. Tyto kombinace jsou však ve vazbě vždy s jedním z dvojice vzájemně se vylučujících exonů. Proto celkově je možných 64 molekul mRNA lišících se v primární struktuře. Každá z nich se překládá do jedné izoformy troponinu T.

Troponiny jsou strukturní bílkoviny buněk příčně pruhovaného svalstva, jejich odlišné izoformy jsou u fetálních buněk a v buňkách dospělců

Negativní a pozitivní regulace alternativního sestřihu



Represor se váže na RNA a brání v sestřihu

Sestřih probíhá jen po vazbě aktivátoru na RNA

Samosestřih

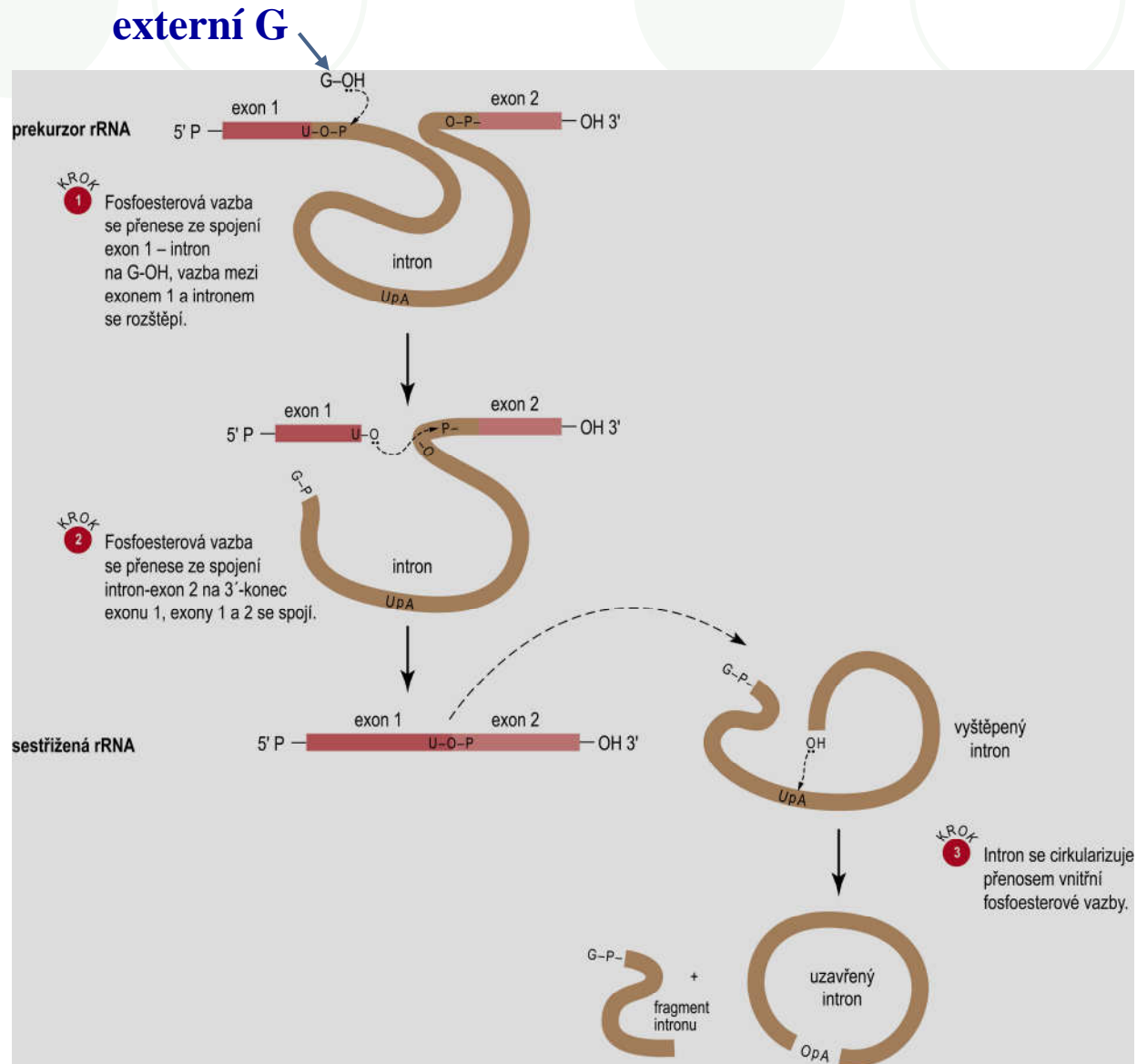
1982: T. R. Cech (26S rRNA Tetrahymena, S. Altmann (tRNA E. coli)- 1989
Nobelova cena

**Autokatalytický proces sestřihu nevyžadující proteiny
(in vitro)**

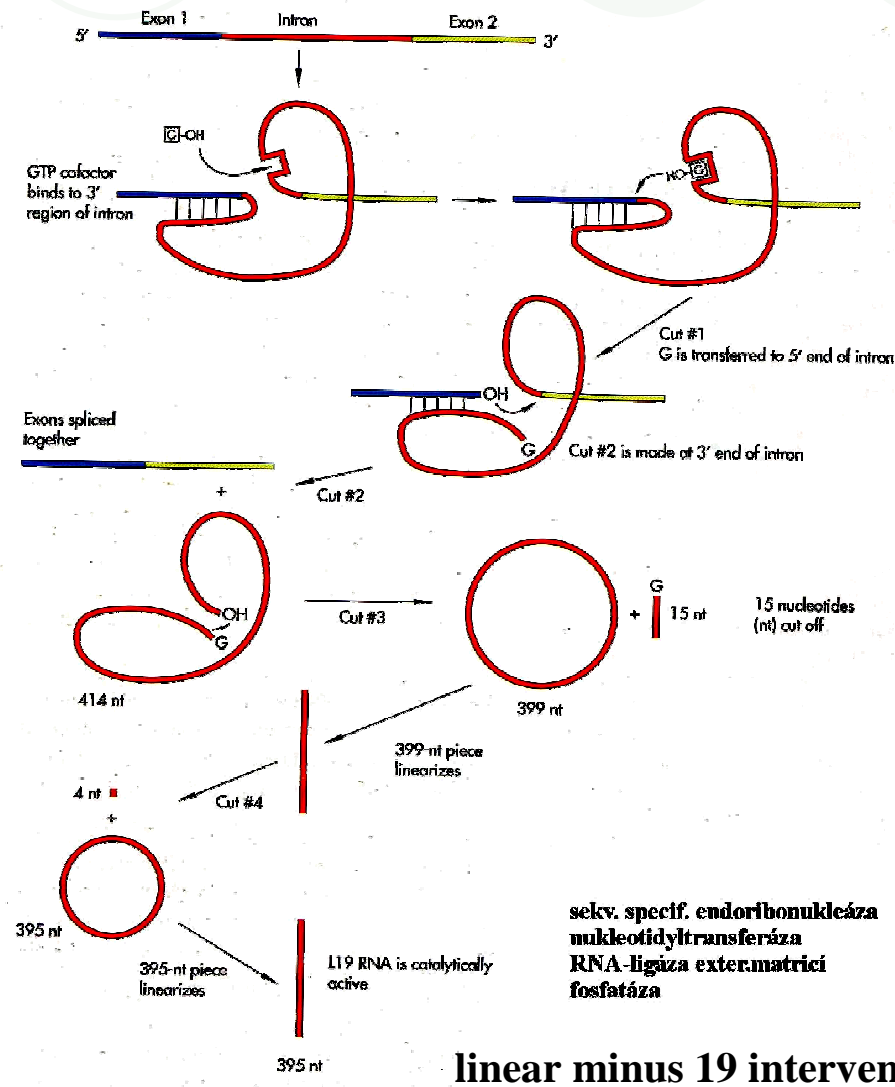
RNA schopná samosestřihu = ribozym

- introny první skupiny v genech přepisovaných do mRNA, tRNA a rRNA (mitochondrie, chloroplasty, nDNA eukaryot, bakteriofágy)
vyžadují externí G, *in vivo* nutná účast proteinů (maturáza)
- introny druhé skupiny v genech mitochondrií hub a v chloroplastech
nevyžadují externí G (ale interní A), *in vivo* nutná účast proteinů, podobnost se sestřihem hnRNA

Mechanismus samosestřihu prekurzoru rRNA

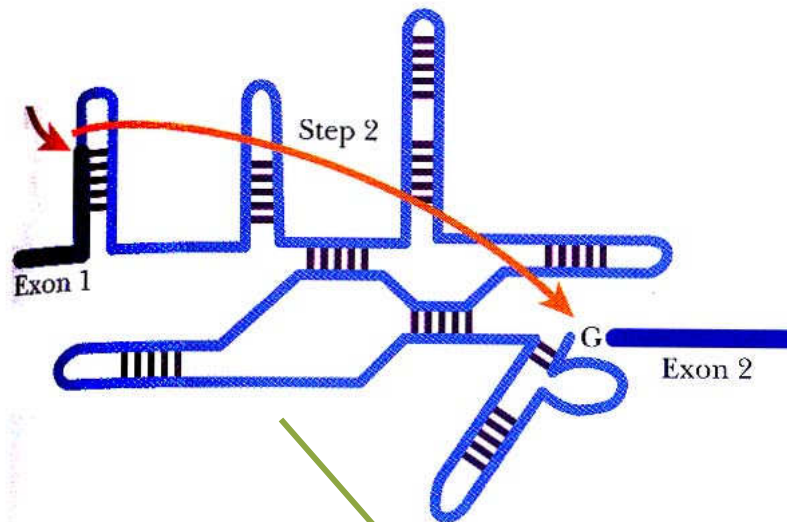


Průběh samosestřihu u intronů první skupiny

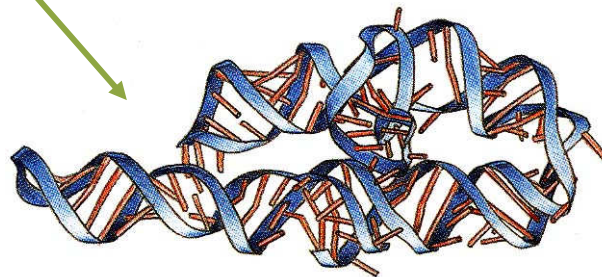
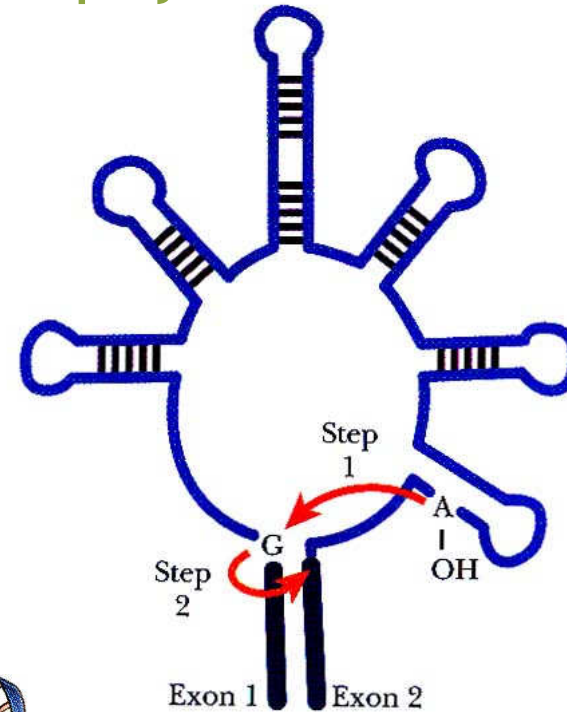


Reakce probíhající při samosestřihu intronů I a II

Introny skupiny I

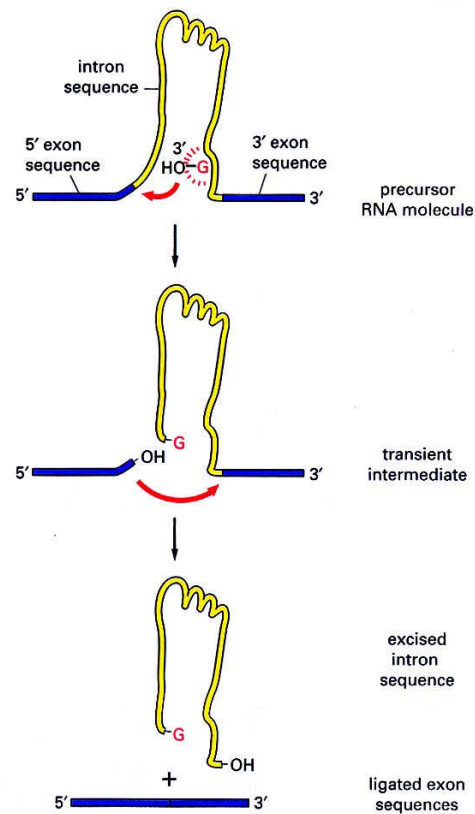


Introny skupiny II

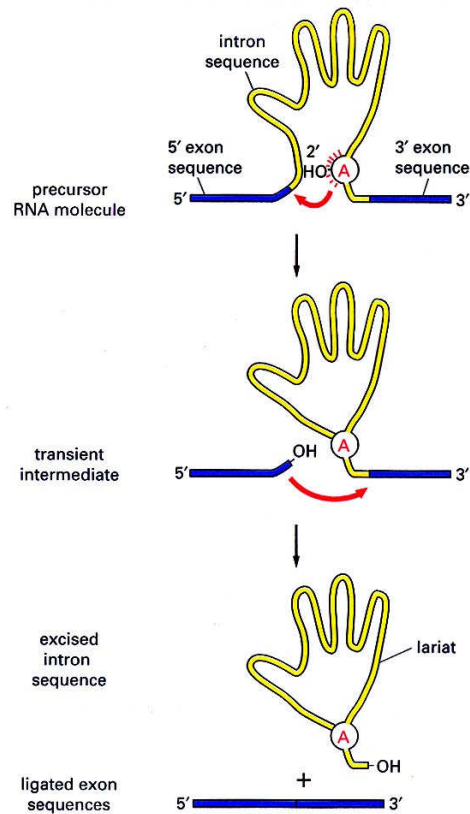


Srovnání samosestřihu intronů skupiny I a II

Skupina I



Skupina II

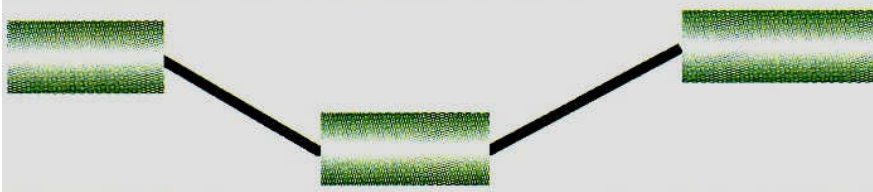


Bimolekulární sestřih (trans-splicing) mRNA u trypanozom

Primární transkript genu 1



způsob sestřihu



Primární transkript genu 2



TRANS-SPLICING



U prvoků – změny antigenních determinant

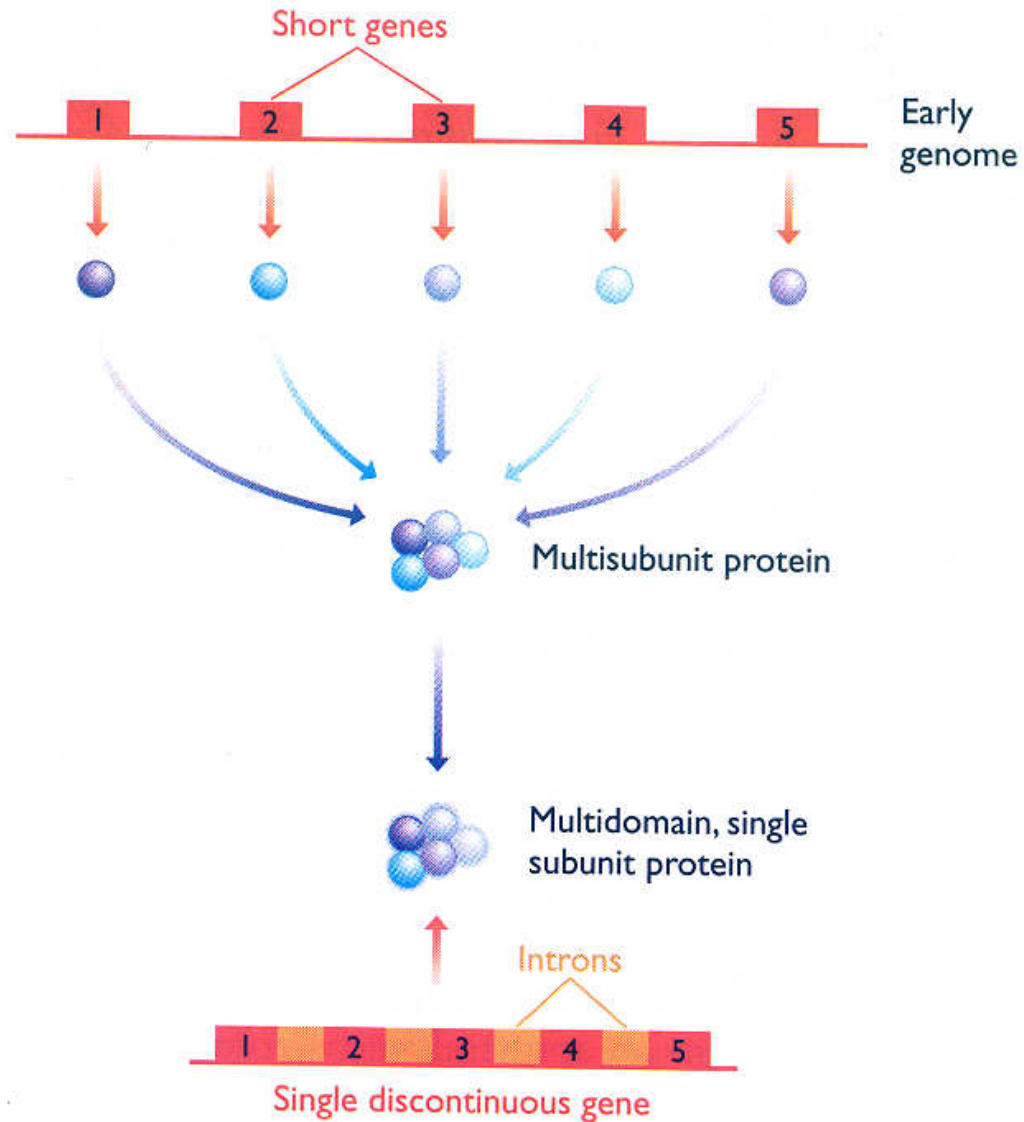


Další příklady: nematoda, chloroplasty

Twintron = intron uvnitř jiného intronu

- objeveny v chloroplastové DNA eugleny, později u kryptomonád, drosofilů aj.
- vystřihování probíhá sekvenčně (nejdříve vnitřní pak vnější intron)
- v jednom intronu může být více twintronů

Původ intronů. „Exon theory of genes“



Biologický význam intronů

1. Regulace genové exprese (přítomnost dlouhých intronů zpomaluje transkripci a snižuje množství výsledného transkriptu).
2. Pozůstatek evoluce (různé exony v genu kódují různé funkční domény produktu – geny vznikaly fúzí exonů).
3. Zvýšení rychlosti rekombinace kódujících úseků různých genů – zrychlení procesu evoluce (proteiny / domény).
4. Alternativní sestřih: z jednoho genu více produktů.

Některé eukaryotické geny neobsahují introny, tj. introny nejsou nezbytné pro normální genovou expresi (klonování cDNA)

Editace RNA

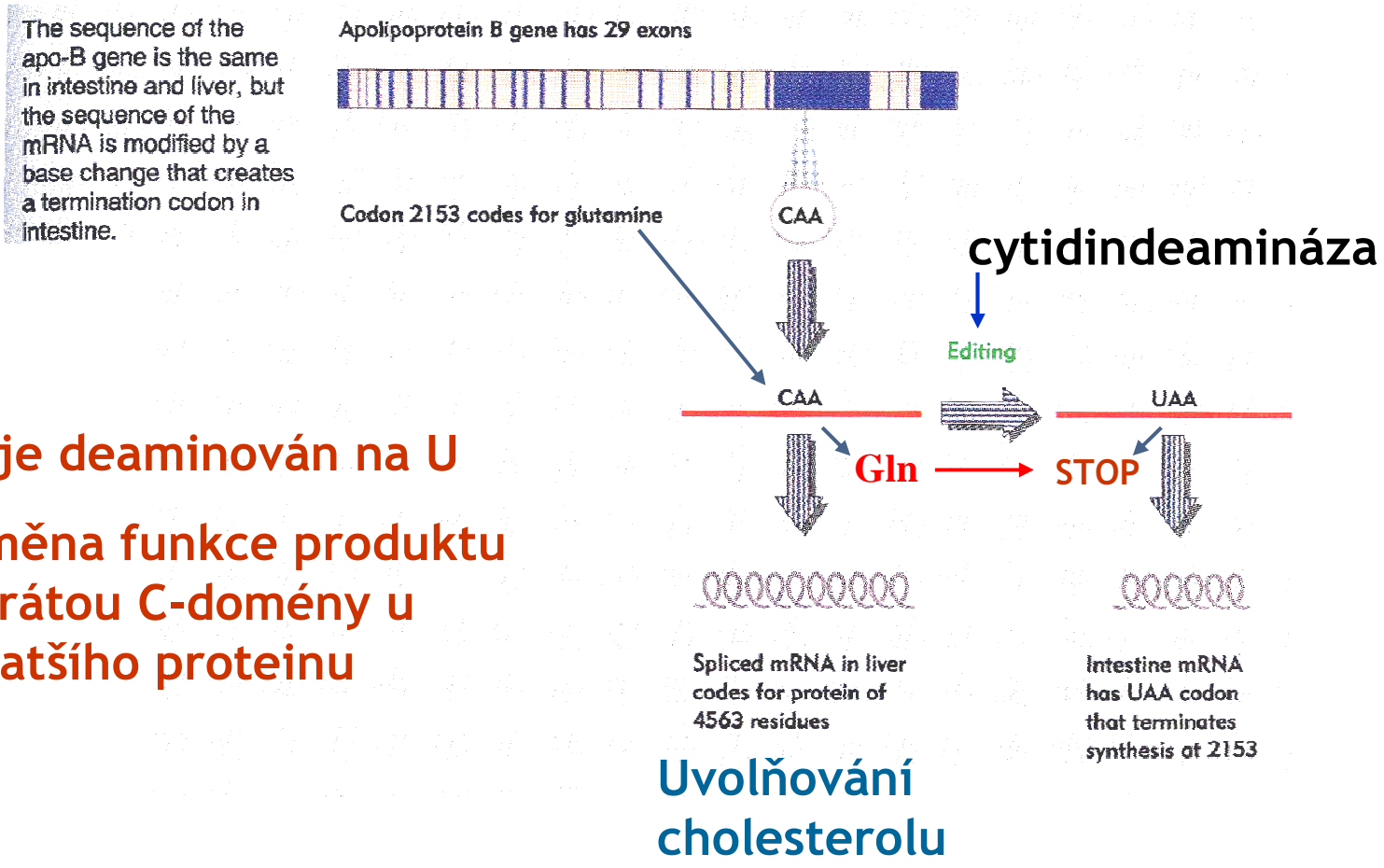
Editace RNA je jedna z posttranskripčních úprav, která byla zjištěna

- V mitochondriích trypanozom,
- V mitochondriích *Physarum polycephalum*
- V mitochondriích strunatců,
- V mitochondriích vyšších rostlin
- U genu pro apolipoprotein u savců

Editace RNA u různých organismů

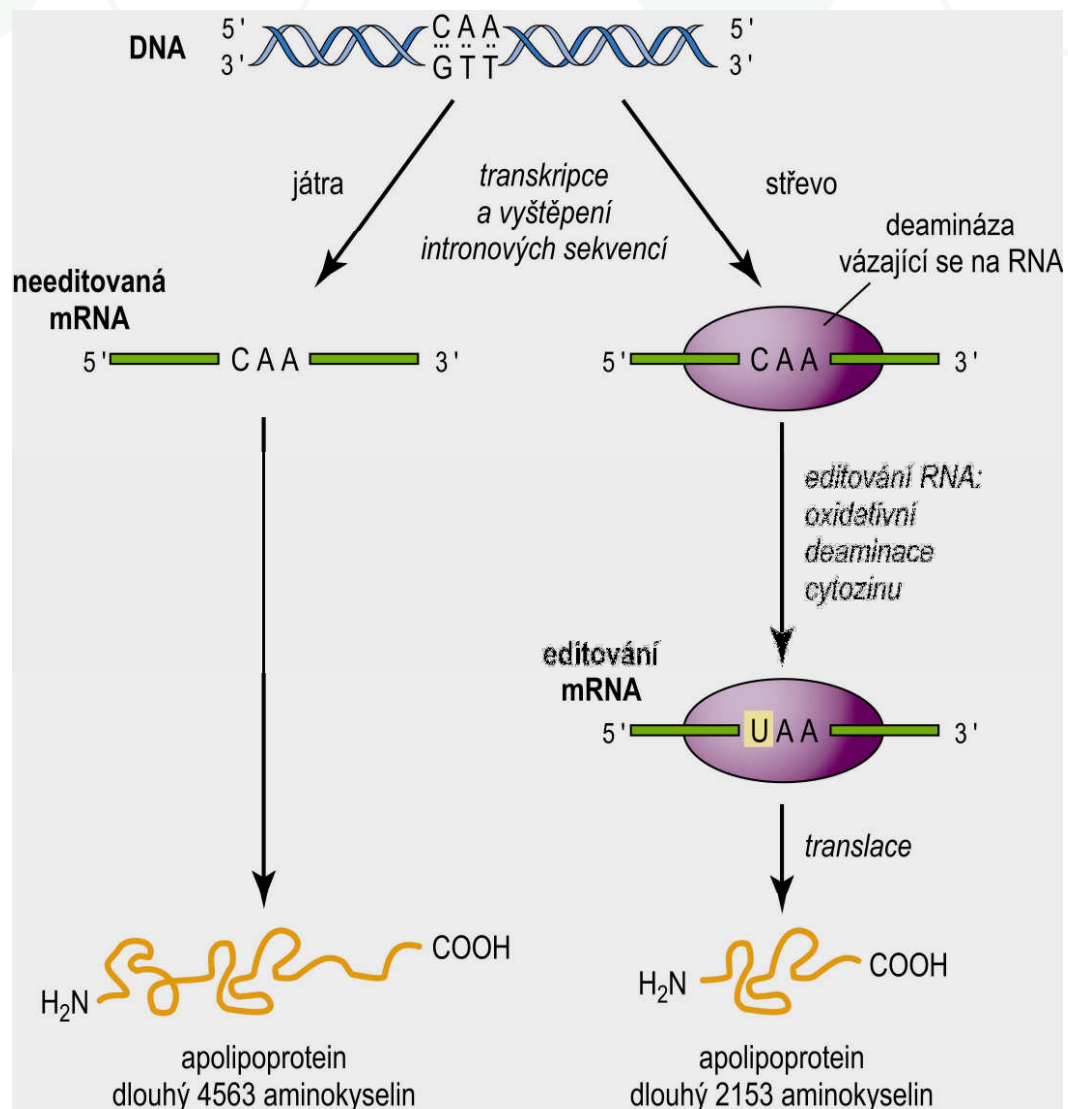
Organizmy	Organely	Způsob editace	Typ RNA
Trypanosoma Leishmania Crithidia	mitochondrie	inzerce U, delece U	mRNA
Rostliny	mitochondrie chloroplasty	substituce C za U, U za C substituce C za U	mRNA, rRNA
Savci	jádro	substituce C za U, A za G	mRNA

Substituční způsob editace hnRNA genu pro apolipoprotein



C je deaminován na U
změna funkce produktu
ztrátou C-domény u
kratšího proteinu

Editace mRNA genu pro apolipoprotein B ve střevě savců

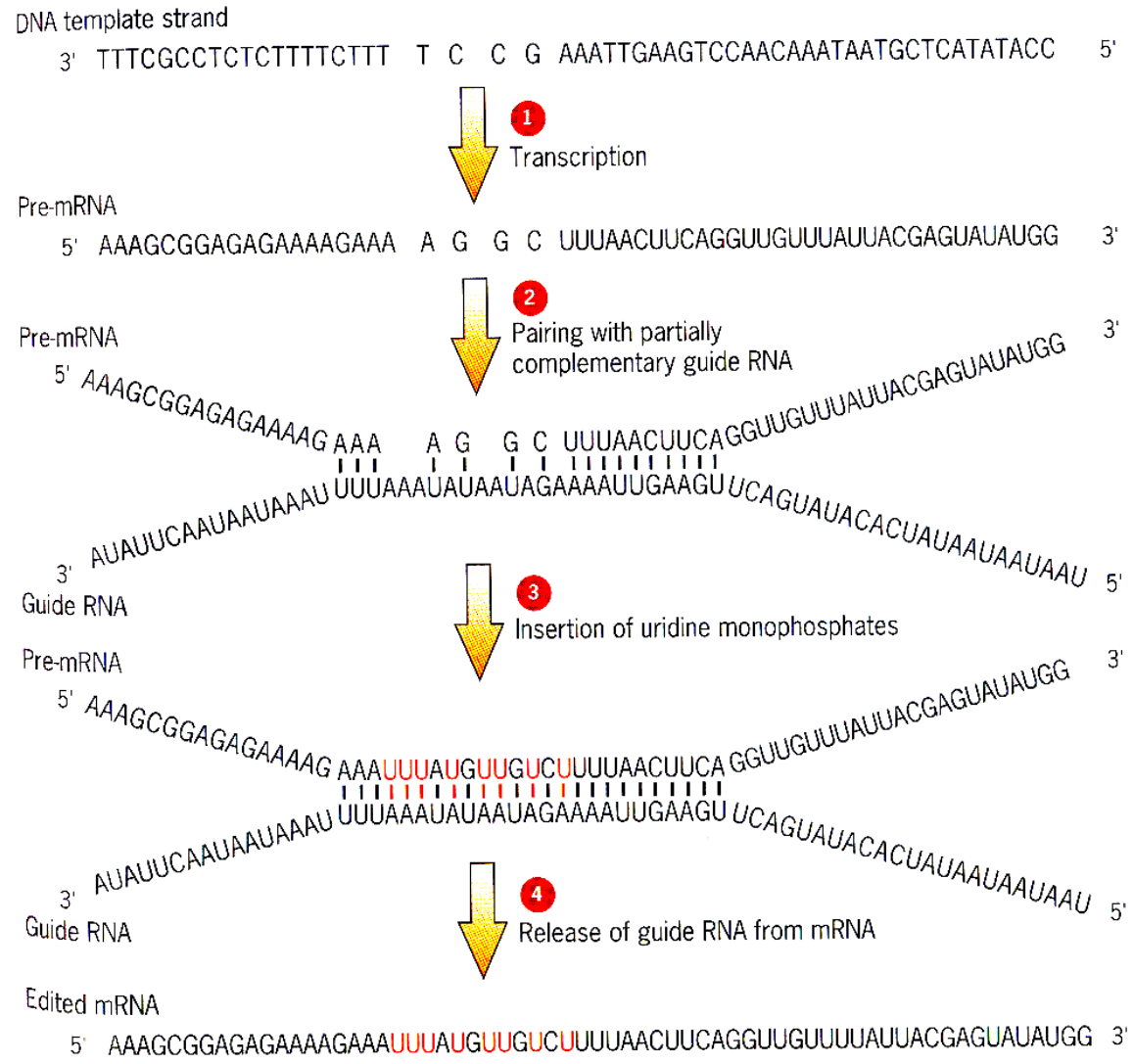


Příklady editace (redakčních úprav) mRNA - adice U a delece T (přítomen v DNA)

```
UAAUGUUUUUGUUUUUUUUUUAUGUGAUAUGGUUUUUUUUUUUUGGUUUUUUUUAGAUUUU  
UUUAAUUUGUUGAUAAAUAUAUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU  
UAGGUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU  
UUUGAAAACCAGUUUUUUGAGAGUUUUUGCAUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU
```

Part of the mRNA sequence of *T. brucei* *coxIII* shows many uridines that are not coded in the DNA (shown in green) or that are removed from the RNA (shown as T).

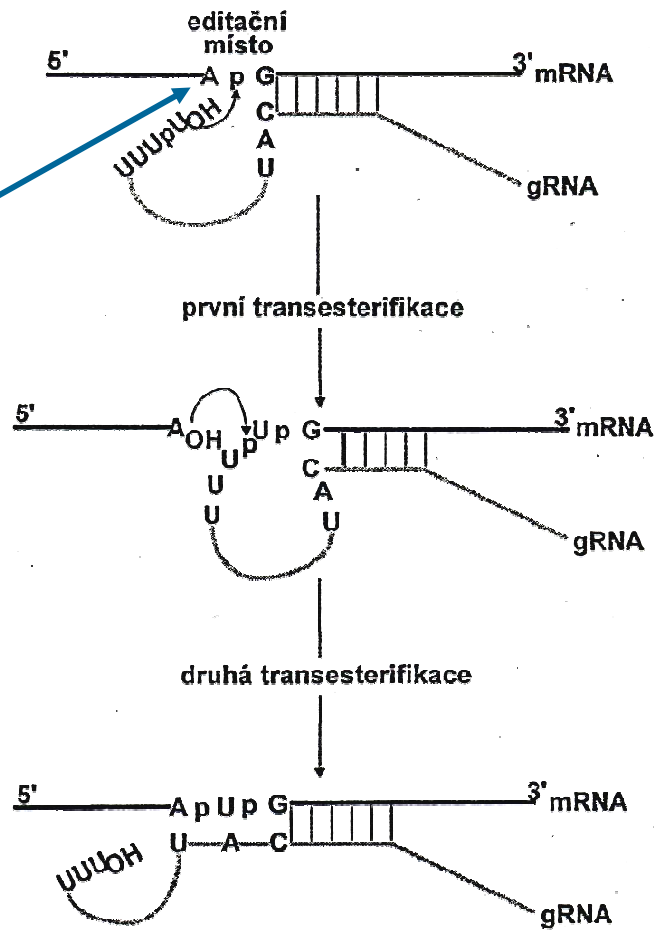
Editace pre-mRNA genu cytochromu b u *Leishmania*



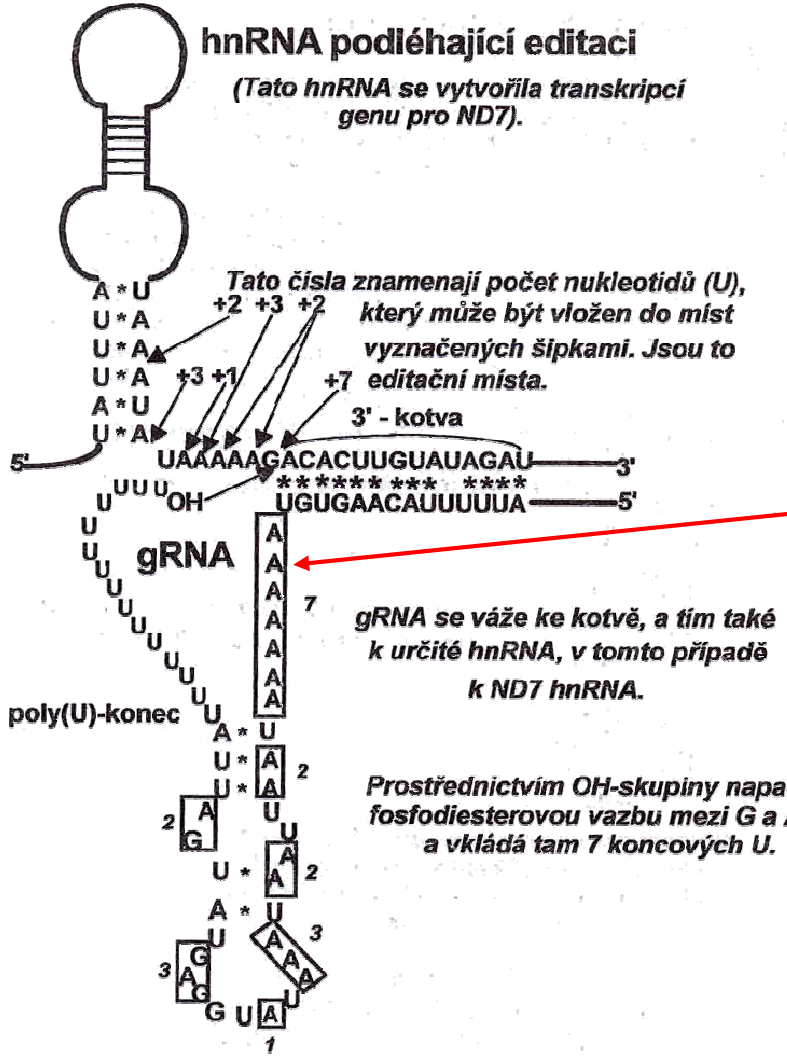
Vysvětlení editace na základě transesterifikačních reakcí

Nukleofilní atak fosfodiesterové vazby 3' OH skupinou

řídící RNA (guide)



Editace inserce nukleotidů do hnRNA u trypanozom řízená gRNA - první transesterifikace



Nukleotidy uvedené v rámečcích se postupně navážou komplementárně směrem k 3'-konci hnRNA. Čísla znamenají jejich počty, které odpovídají číslům uvedeným nahoře.

Hvězdičkami jsou vyjádřeny vodíkové vazby.



Proč probíhá editace?

- **Editace RNA byla běžná u prapůvodních buněk, u nichž byla řada reakcí katalyzována molekulami RNA a ne proteiny**
- **Primitivní mechanismus regulace genové exprese**