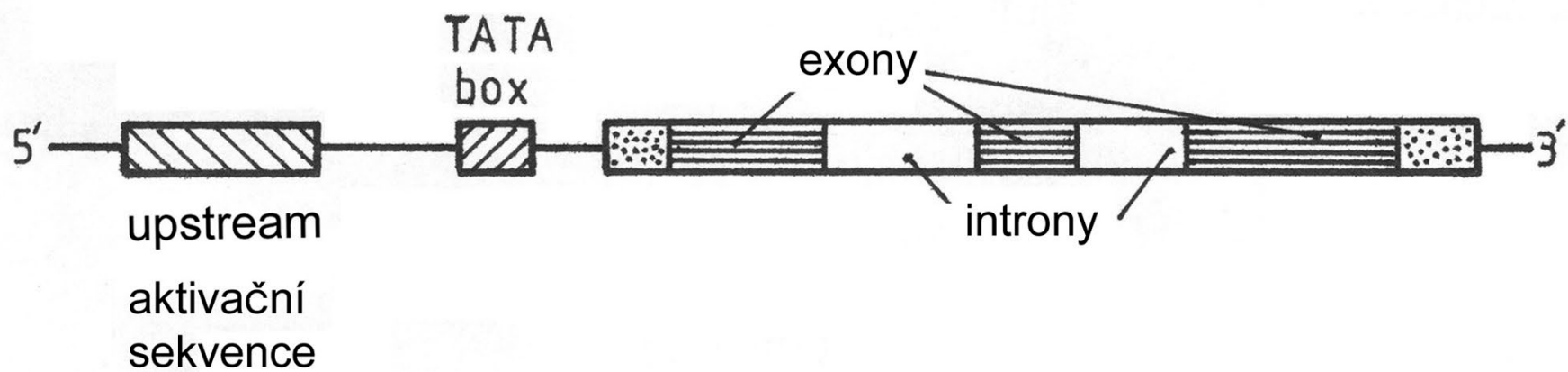


TRANSKRIPCE DNA
+ mRNA modifikace, histony



Typický eukaryotický gen

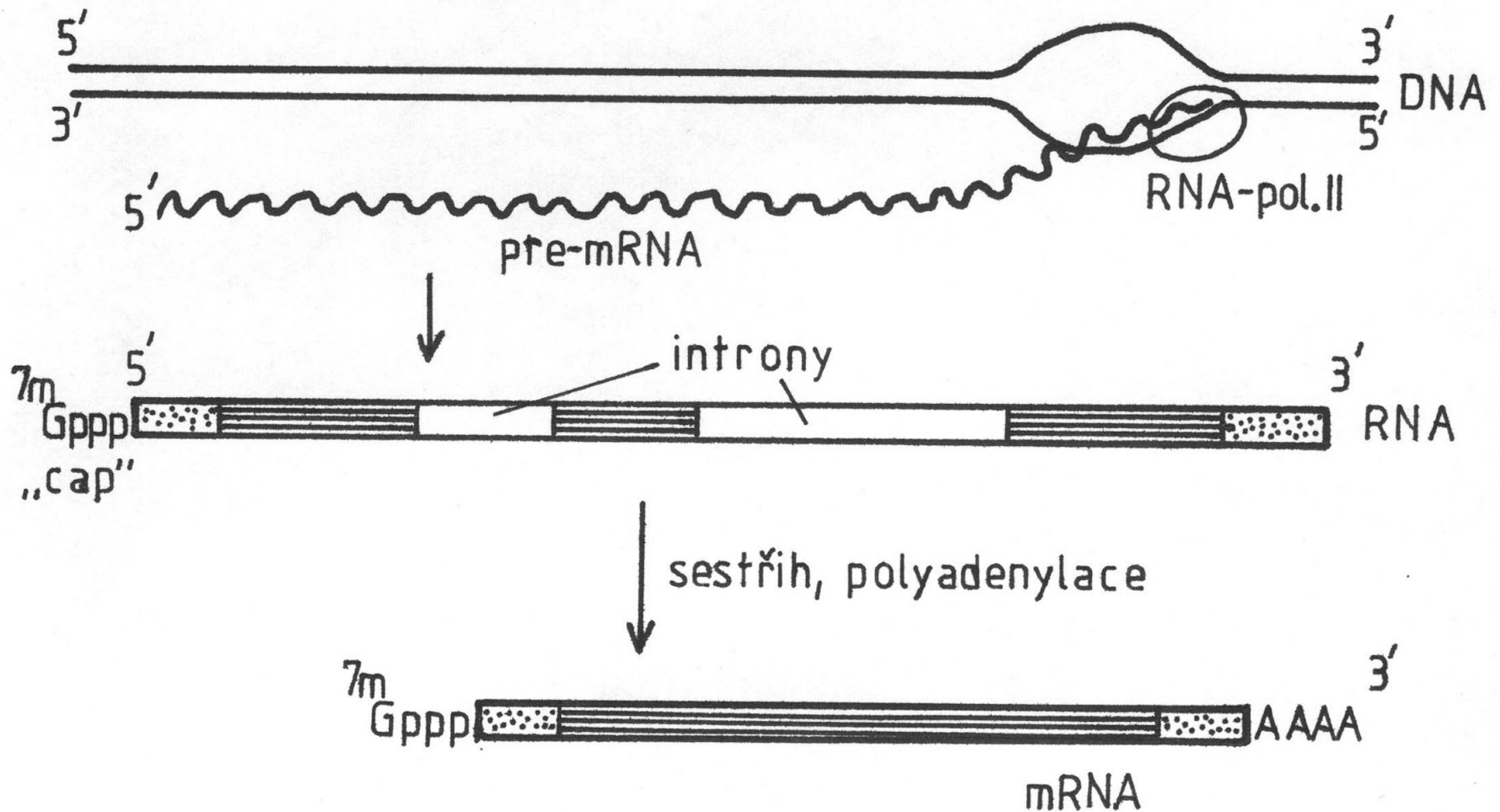
TRANSKRIPCE = přepis informace z DNA do RNA

DNA duplex: 5' ... TACGACGAGCTACG ... 3'
 3' ... ATGCTGCTCGATGC ... 5'

RNA: 5' ... UACGACGAGCUACG ... 3'

(reverzní transkripce: RNA > DNA, např. mRNA > cDNA)

Jednoduché schéma transkripce a úprav primárního transkriptu



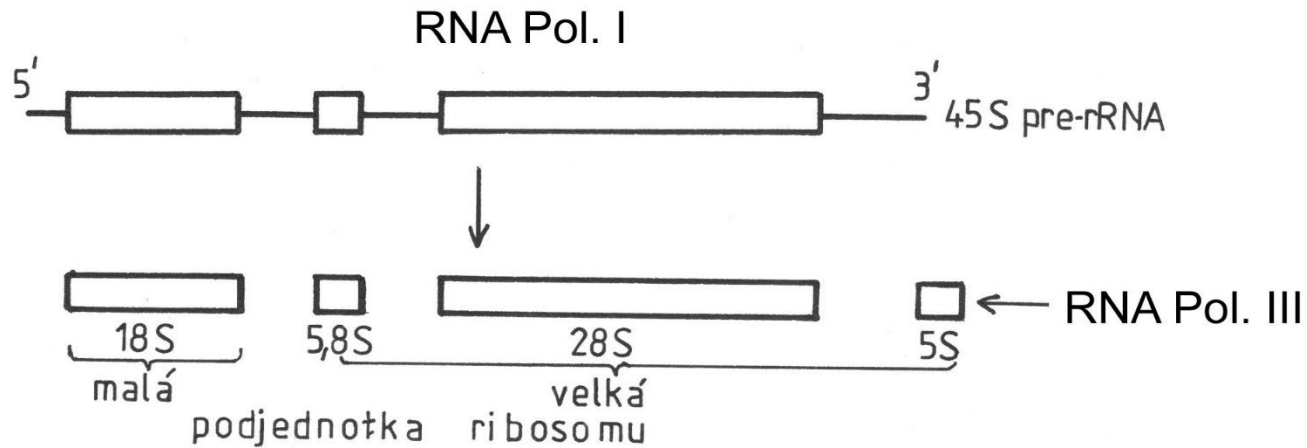
Tři typy RNA polymerázy v eukaryotických buňkách:

RNA pol. I: transkripce **ribozomálních RNA (28S, 18S, 5,8S)**

RNA pol. II: **mRNA**, snRNA U1,U2,U4,U5, snoRNA

RNA pol. III: **tRNA**, 5S RNA, snRNA (U6,...)

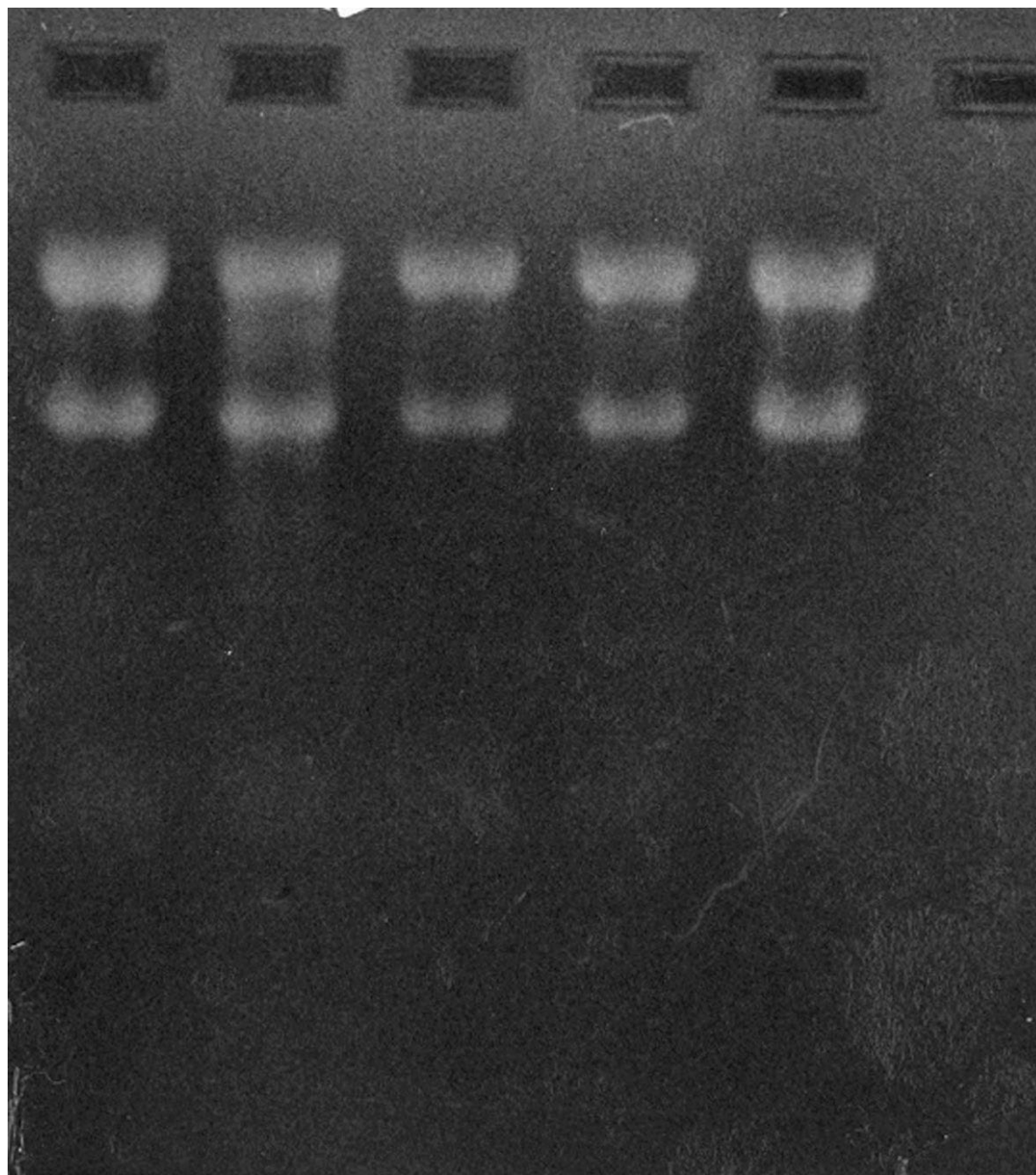
Ribosomální RNA



~200 kopií genu pro pre- rRNA

transkripce RNA pol. I., vyštěpení
jednotlivých rRNA a složení ribosomálních podjednotek
probíhá v nukleolu

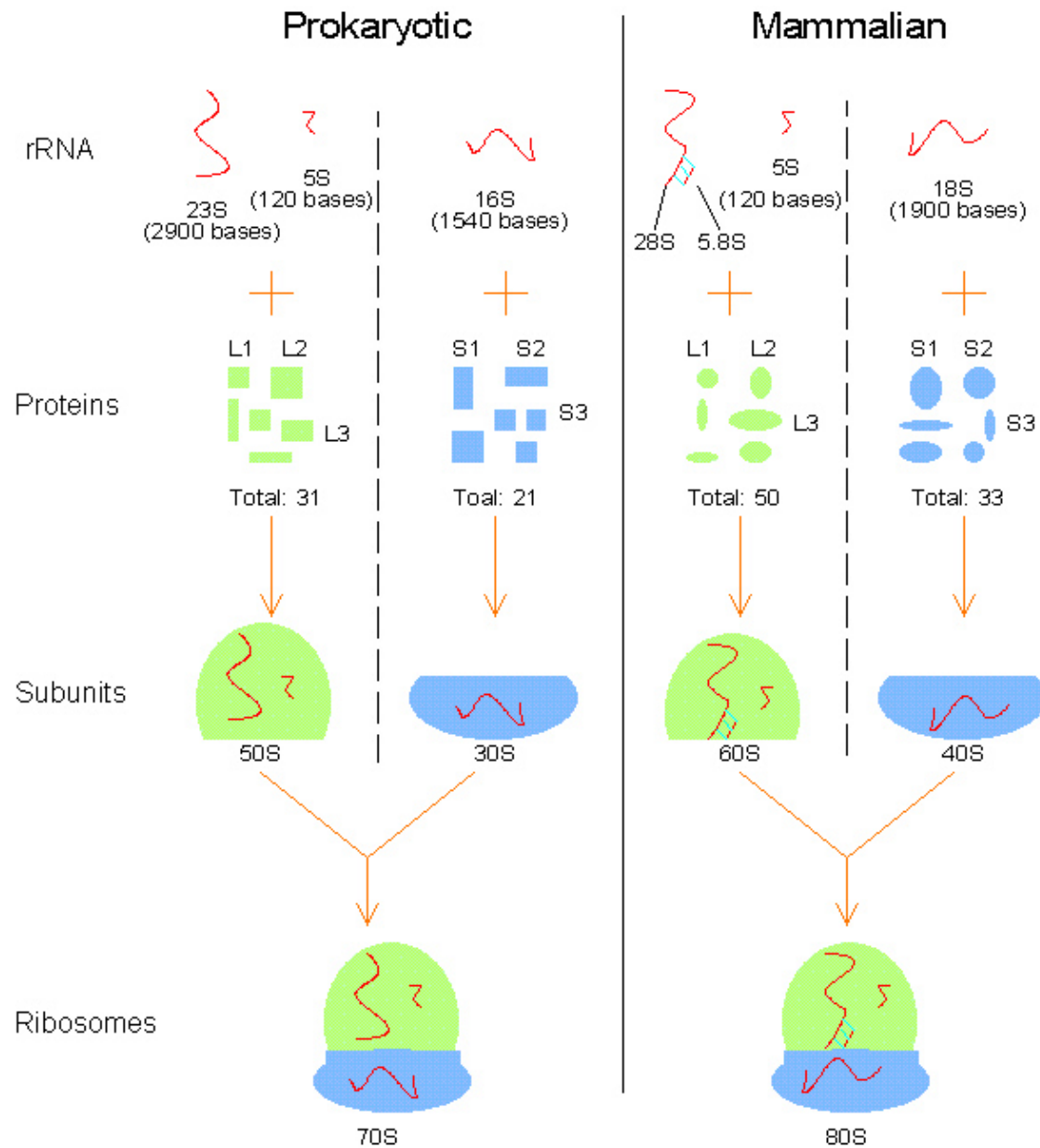
nukleové baze v 18S, 28S a 5,8S jsou
často modifikovány pomocí snoRNP komplexů



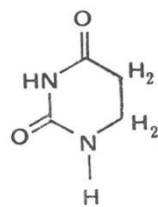
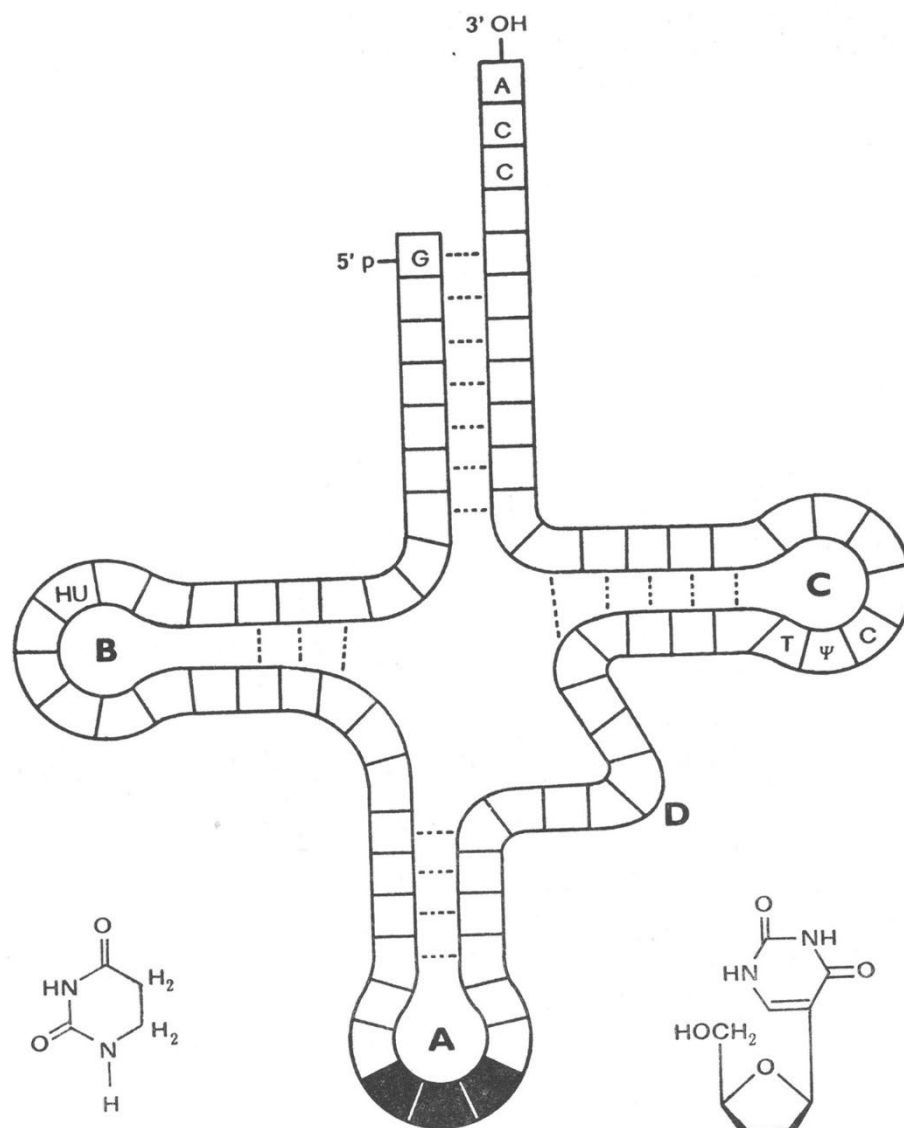
28S

18S

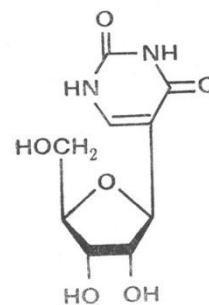
Struktura ribosomu.



Transferová RNA má typickou sekundární strukturu



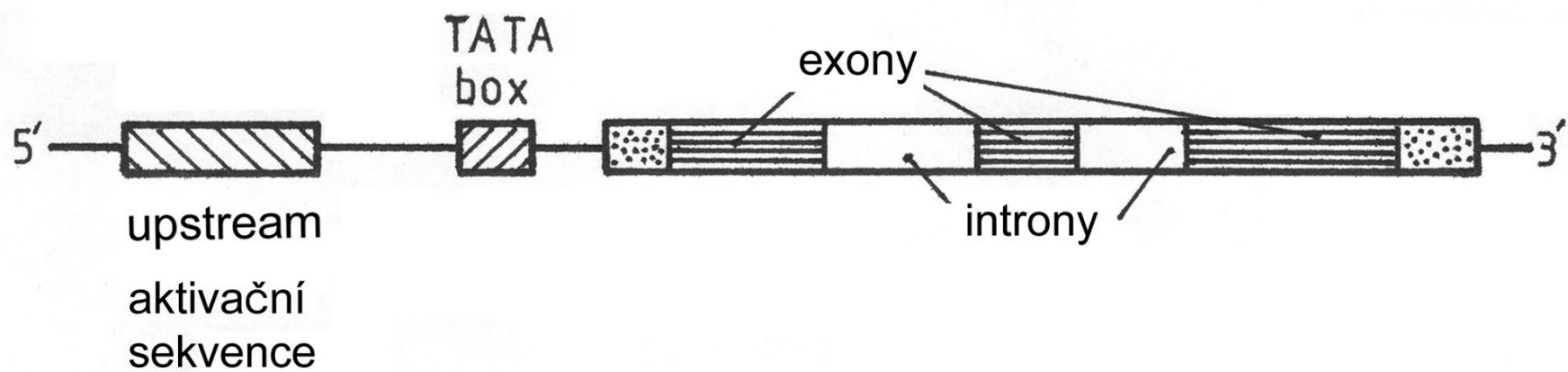
dihydrouracil
(HU)



pseudouridine

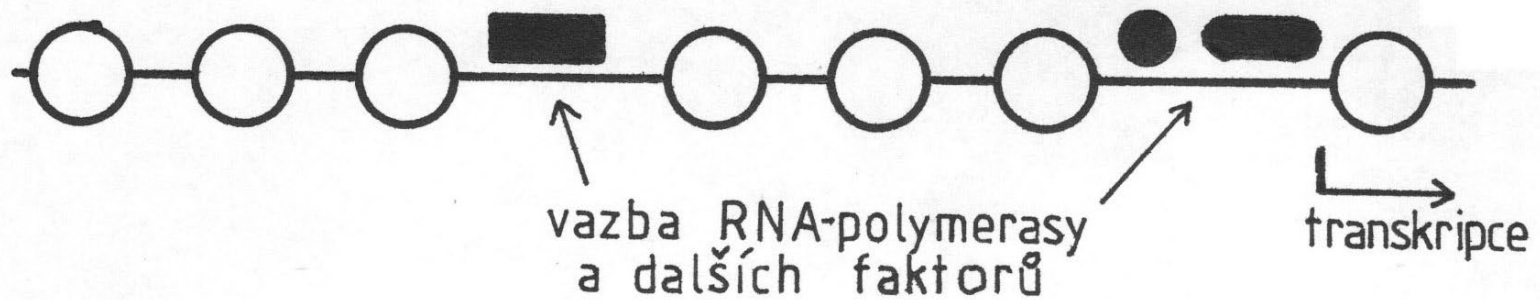
Transkripce v eukaryotických buňkách:

- k transkripci jsou nutné cis-elementy, tj. specifické sekvence v DNA v oblasti promoteru, a transkripční faktory (proteiny se specifickou funkcí vázat se na dvoušroubovici DNA a s další nezávislou funkcí aktivovat transkripci)
- pouze malá část genomu je transkribována
- geny trvale transkripčně aktivní a trvale reprimované
- bazální a aktivovaná transkripce, indukovaná transkripce
- transkripce genů v chromosomech x transkripce episomální DNA
- regulace transkripce – na úrovni tvorby pre-iniciačního komplexu
 - specifické transkripční aktivátory (transkripční faktory)
 - methylace DNA
- modifikace chromatinu: - remodelace nukleosomů
- kovalentní modifikace histonů v nukleosomech (acetylace, methylace, fosforylace)
 - koaktivátory transkripce
 - transkripční represe

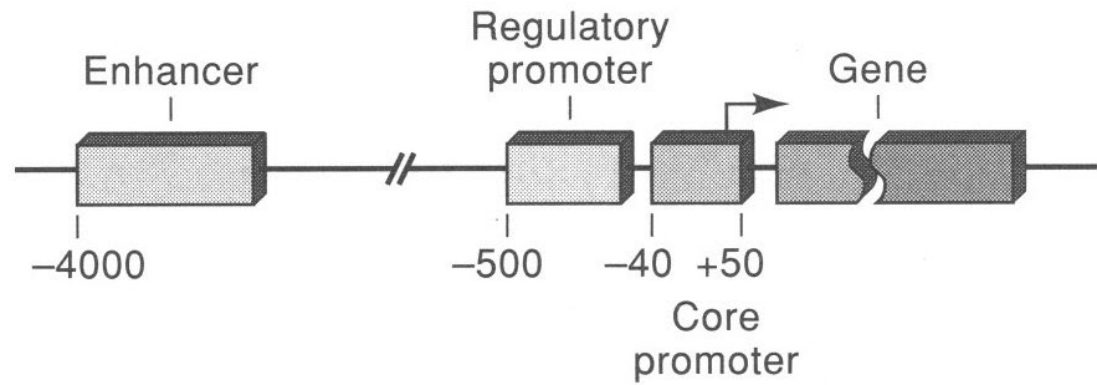
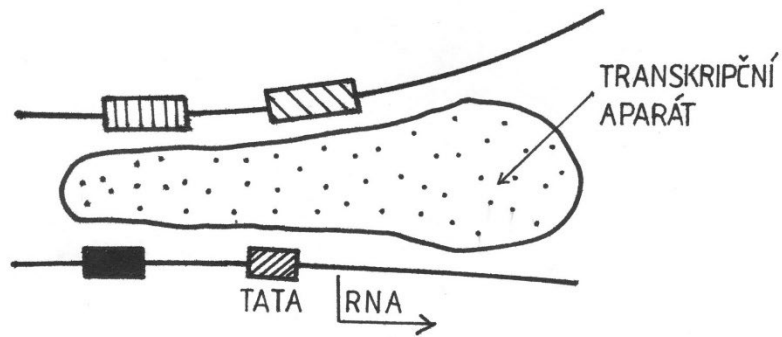


Typický eukaryotický gen

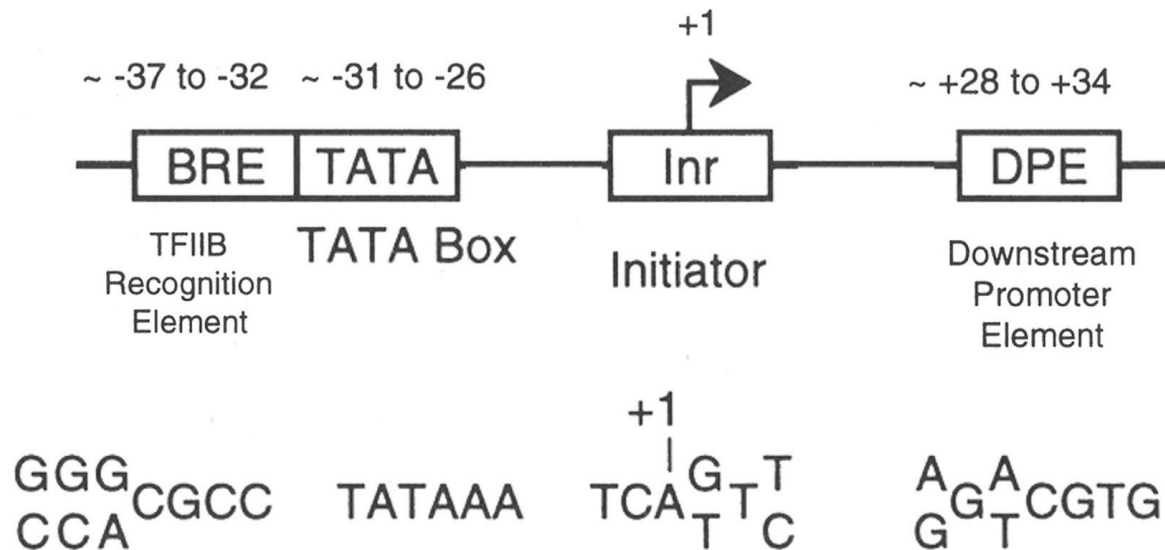
Promoter při transkripci



Enhancer



CIS-ELEMENTY V EUKARYOTICKÉM PROMOTERU



Prokaryotický promoter (E. coli)

- 35 - 10 +1
 T T G A C A T A T A A T
 T T T T T T
 T T T T A T

Bazální transkripční aparát pro RNA polymerázu II:

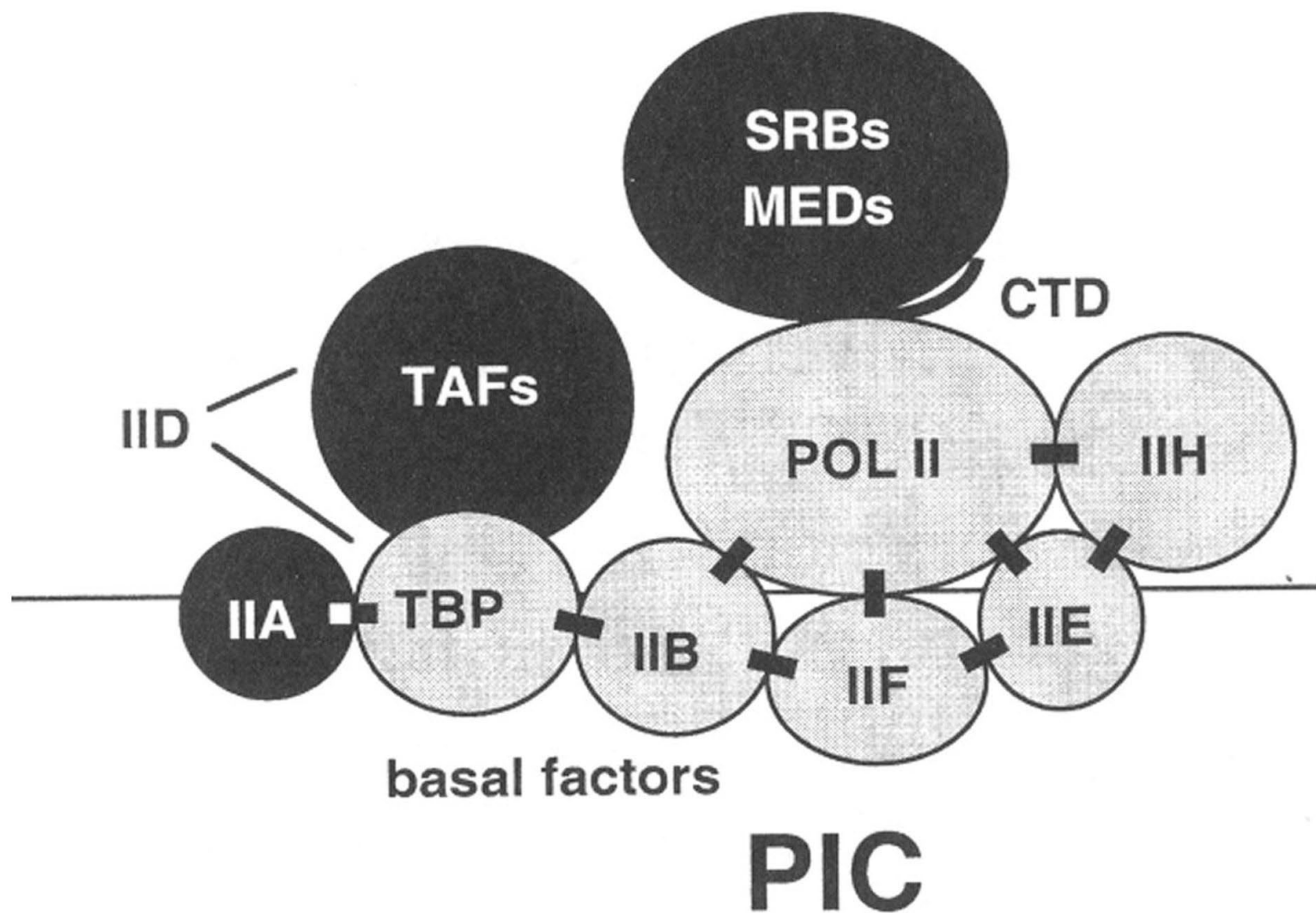
Bazální transkripční faktory – tvoří proteinový komplex v oblasti promoteru:

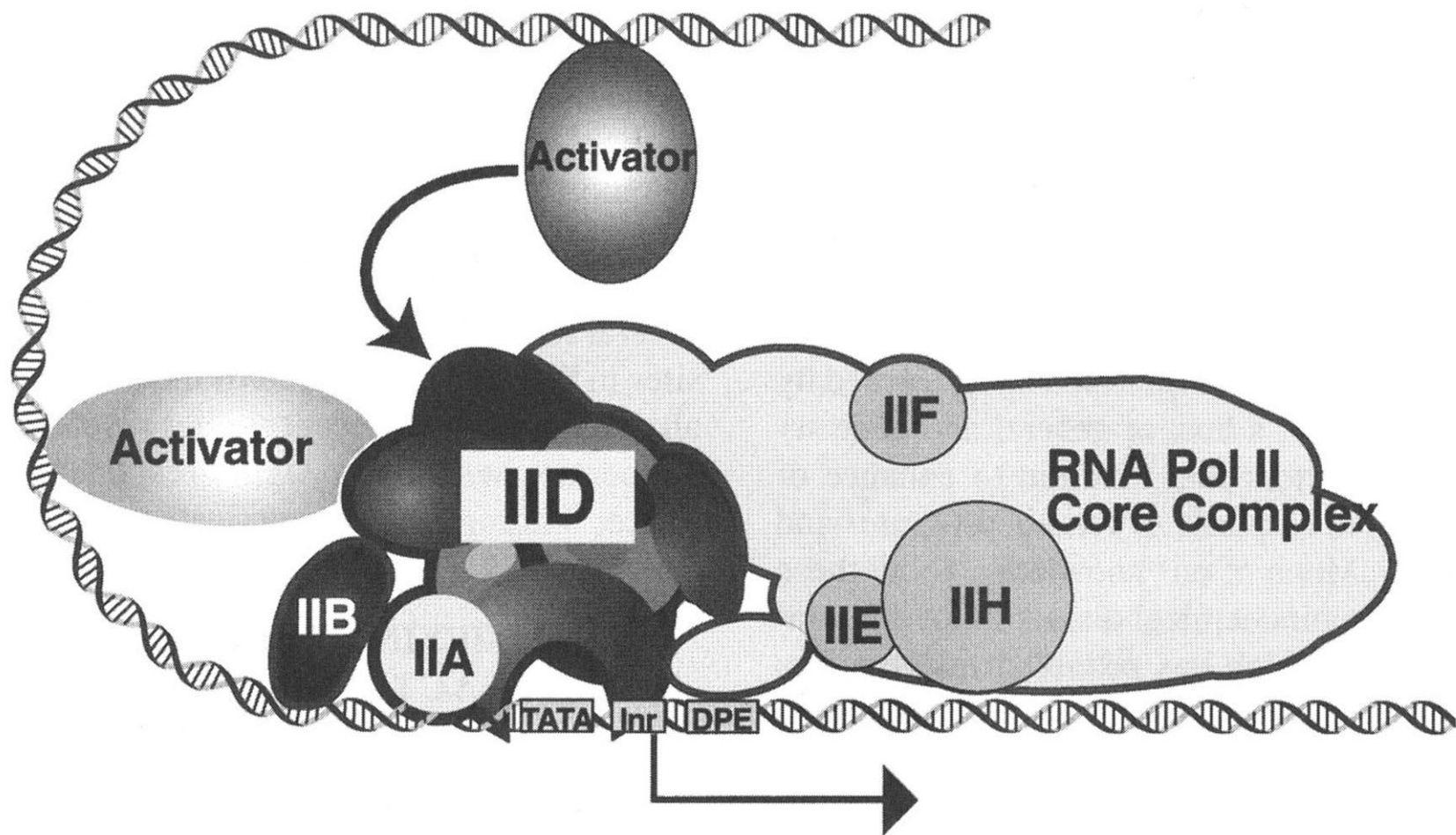
TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF, TFIIH (cca 9 podjednotek)

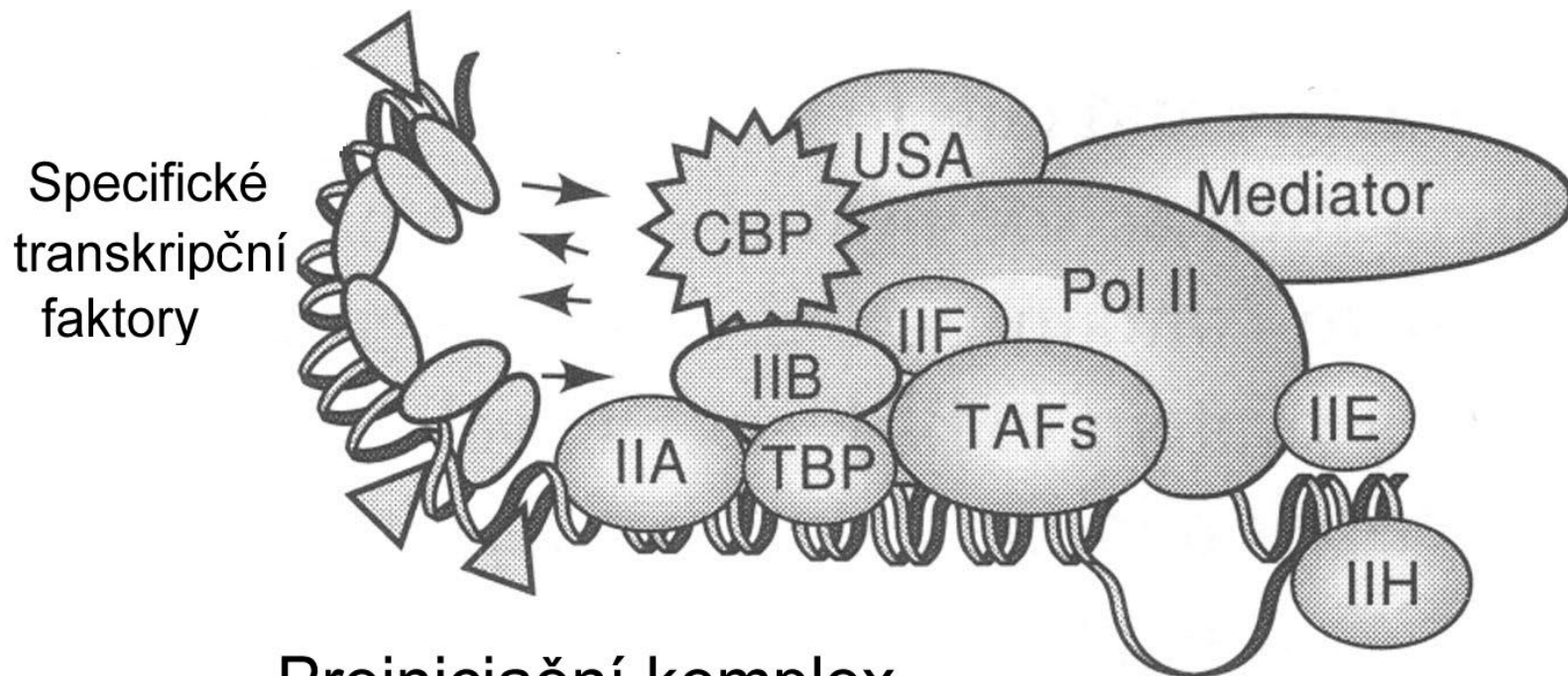
TFIID = TBP + TAFs (TBP-associated factors) –asi 10 TAFs

TBP = TATA-binding protein

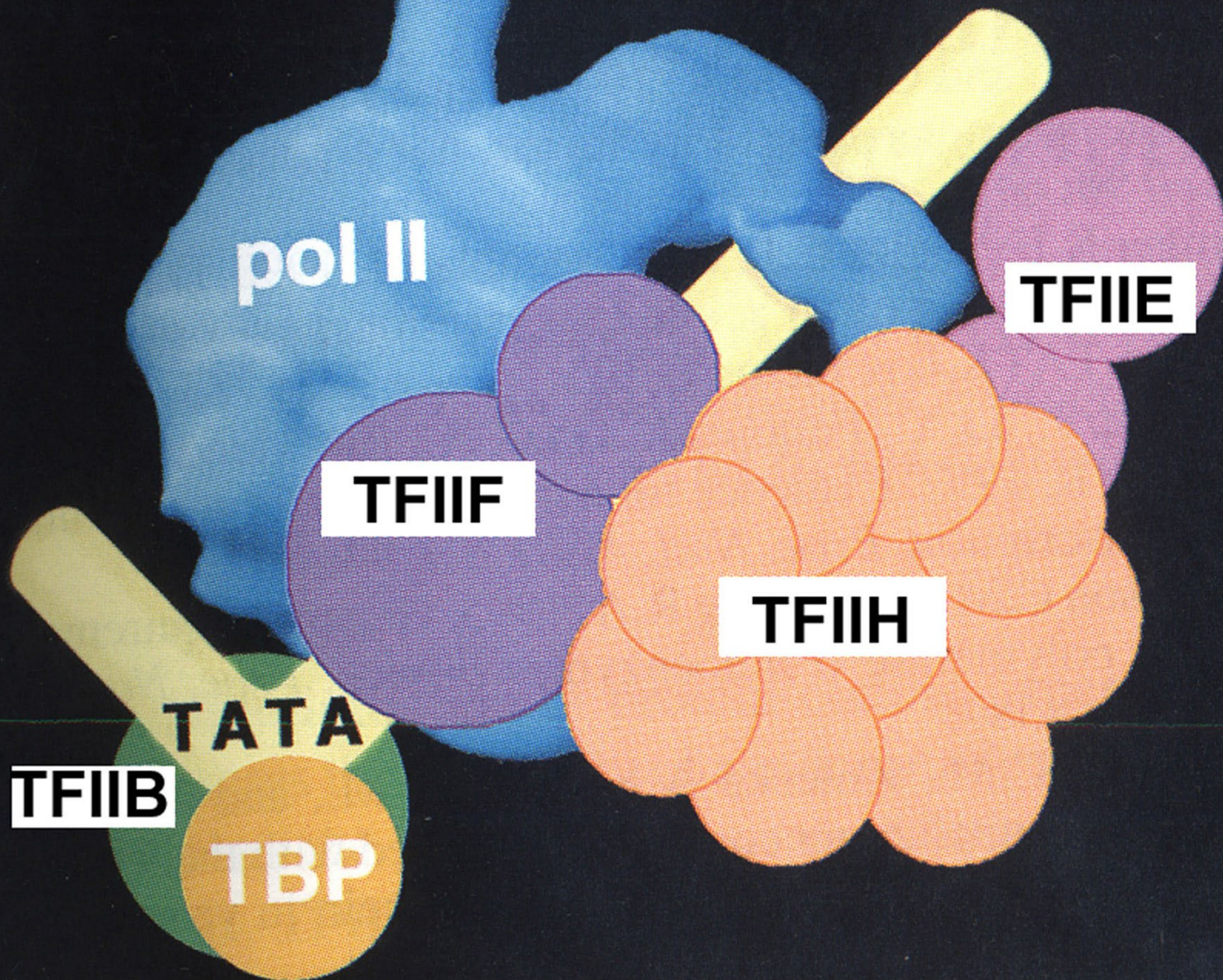
Iniciační komplex při transkripci







Preiniciační komplex
RNA polymerazy II - model



C

CTD
(C-terminus of conserved
region of largest subunit)



RNA polymeráza II

- 10 podjednotek, největší podjednotka má C-terminální doménu (CTD) složenou z 52 (u lidské RNA pol.)

opakování aminokyselin YSPTSPS

- CTD je fosforylována po utvoření iniciačního komplexu a fosforylace je nutná k elongaci (změna konformace RNA polymerázy, rozpad iniciačního komplexu)

- CTD váže proteinové faktory nutné pro opracování primárního transkriptu

Modifikace nukleosomových histonů/remodelace nukleosomů



Tvorba preiniciačního transkripčního komplexu



Iniciační komplex a „otevření“ promoteru



Promoter „escape“



Elongace transkripce



Re-iniciace



REGULACE TRANSKRIPCE

1. Správná lokalizace transkripčních faktorů (TF) v jádře, stabilita molekul TF - regulace: exprese TF, jejich kovalentní modifikace, např. fosforylace)

2. Vazba (TF) na DNA

- regulace: kovalentní modifikace, např. fosforylace, acetylace, přítomnost dimerizujícího TF v případě heterodimerů, ...

3. Vazba koaktivátorů na TF

- regulace: kovalentní modifikace, např. fosforylace,

4. Struktura chromatinu v oblasti promoteru:

- regulace: a) „remodelace“ nukleosomu (nukleosomy remodelující multiproteinové komplexy)
- b) kovalentní modifikace histonů (acetylace, methylace, fosforylace)

acetylace histonů: histon acetyltransferasy (HAT)

x histon deacetylasy (HDAC)

5. Represe transkripce

- „pasivní“ represe
- „aktivní“ represe (transkripčně-represivní domény)
- methylace DNA v oblasti promoteru

REPRESE TRANSKRIPCE:

REPRESE PROTEINOVÝMI FAKTORY (transkripční represory)

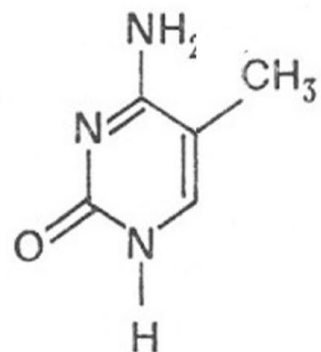
1. Nepřímá represe (~ specifická represe), represe způsobující inhibici transkripce aktivované transkripčním faktorem (TF)
 - zablokování vazebného místa pro transkripční faktor na DNA
 - blokování TF přebytkem represoru = sekvestrace
 - neutralizace TF v nepřítomnosti „induktoru“
 - nadbytek „přemostovacího faktoru“ v proteinovém komplexu
 - inaktivace transkripčního kofaktoru/koaktivátoru
 - vazbou HDAC (histon deacetylasy) v multiproteinovém komplexu
2. Přímá represe (~ obecně účinkující represe), represe blokující funkci basálního transkripčního aparátu
 - Dr1 x TBP

REPRESE MODIFIKACÍ DNA V PROMOTERU (cis)

- methylace promoteru (methyl-CpG binding proteins)
- (- mutace)

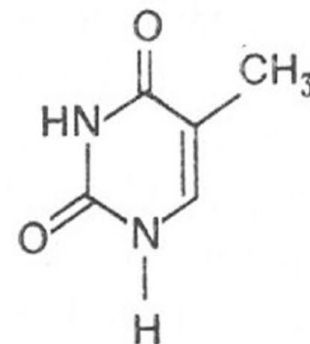
CpG ostrůvky

genomová DNA je často
methylována na cytosinu

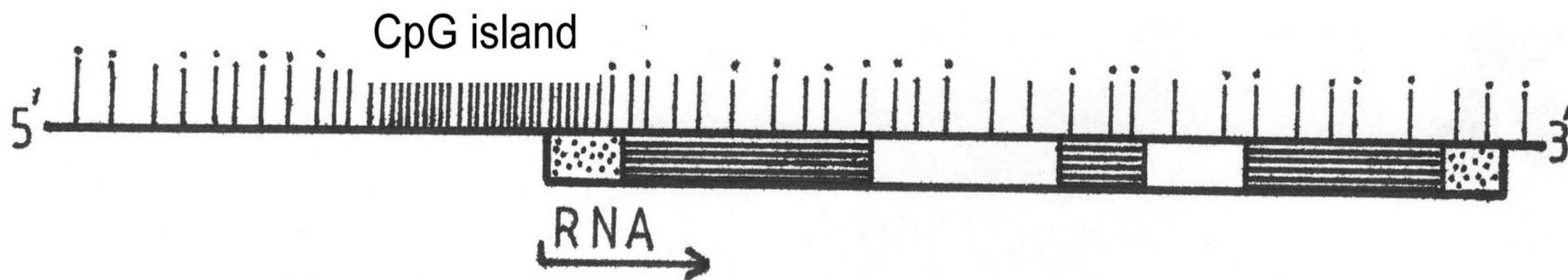


5-methylcytosin

deaminace



thymin



Transkripce v lidských buňkách	Transkripce v E. coli
Templát DNA v chromatinu	Templát DNA v podobě volného chromozomu
3 RNA polymerázy (I, II, III)	1 RNA polymeráza
Promotery s více cis-elementy, enhancery	Jednoduché promotery
Iniciace transkripce: bazální transkripční aparát, specifické transkripční faktory, koaktivátory	Sigma faktor

Průběh transkripce RNA pol. II a potranskripčních změn primárního transkriptu:

Tvorba pre-iniciačního komplexu



INICIACE (iniciační komplex)



promoter escape

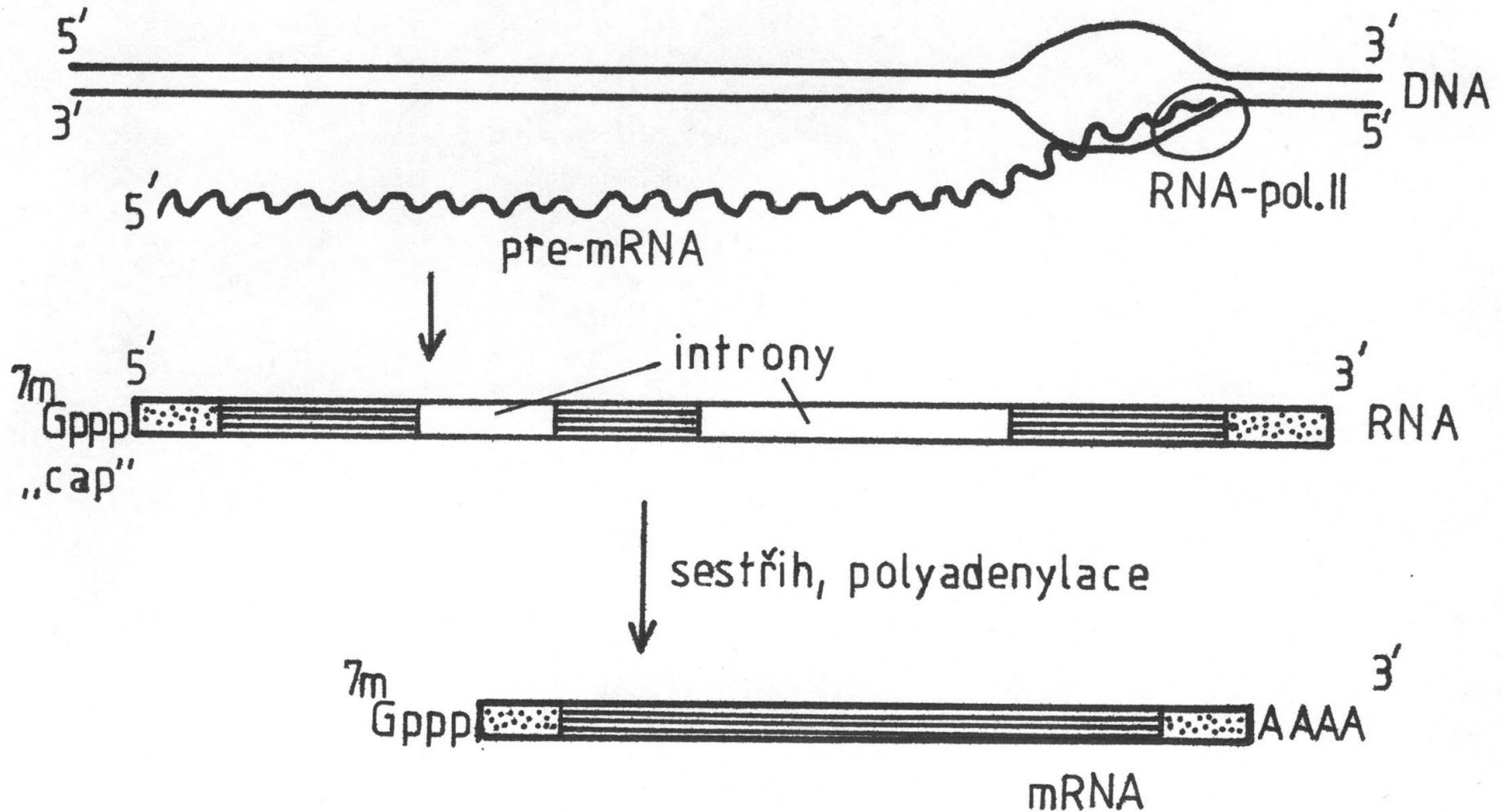


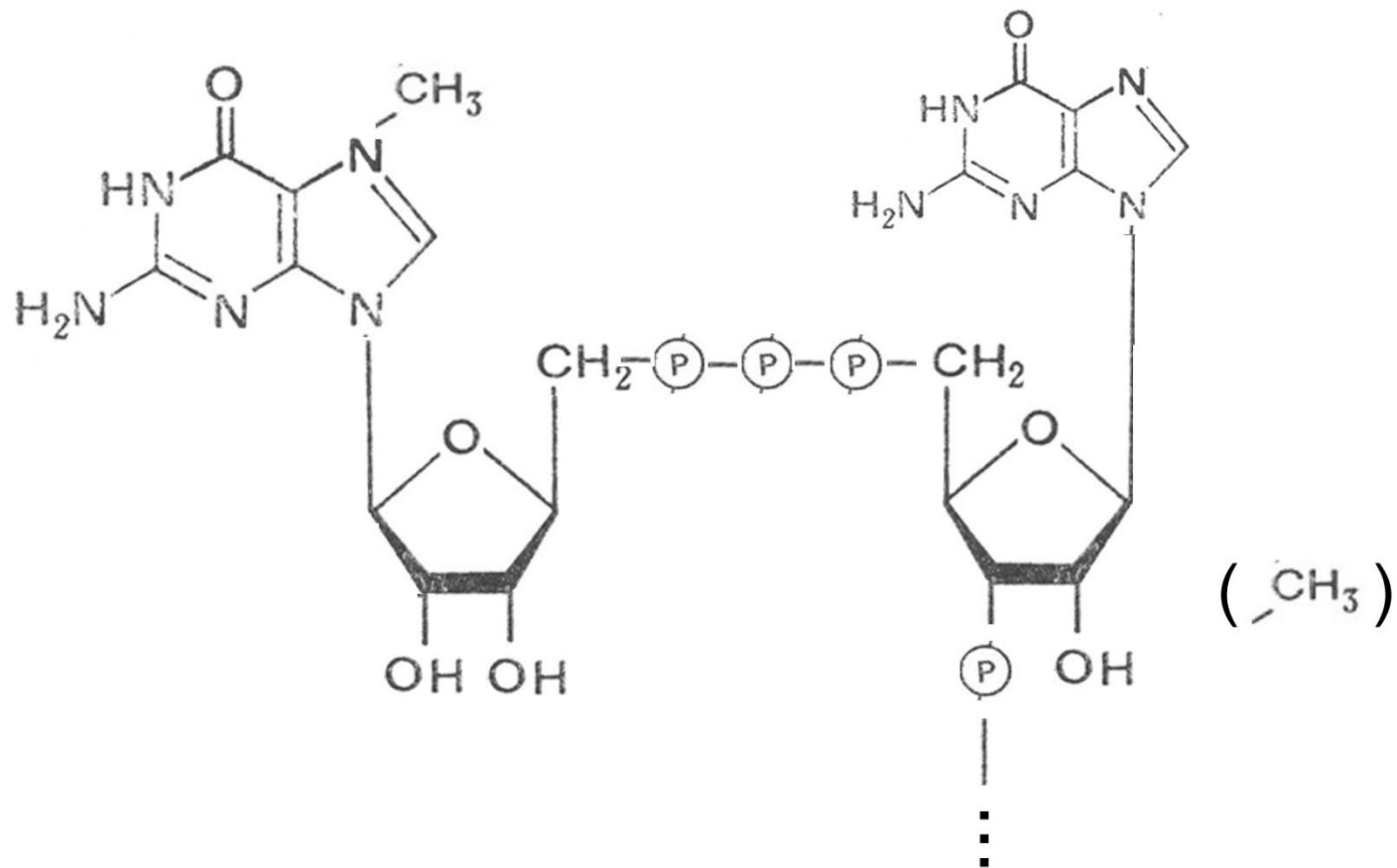
ELONGACE ⇨ modifikace pre-mRNA (čepička + sestřih)



TERMINACE ⇨ sestřih, polyadenylace ⇨ export z jádra

Jednoduché schéma transkripce a úprav primárního transkriptu



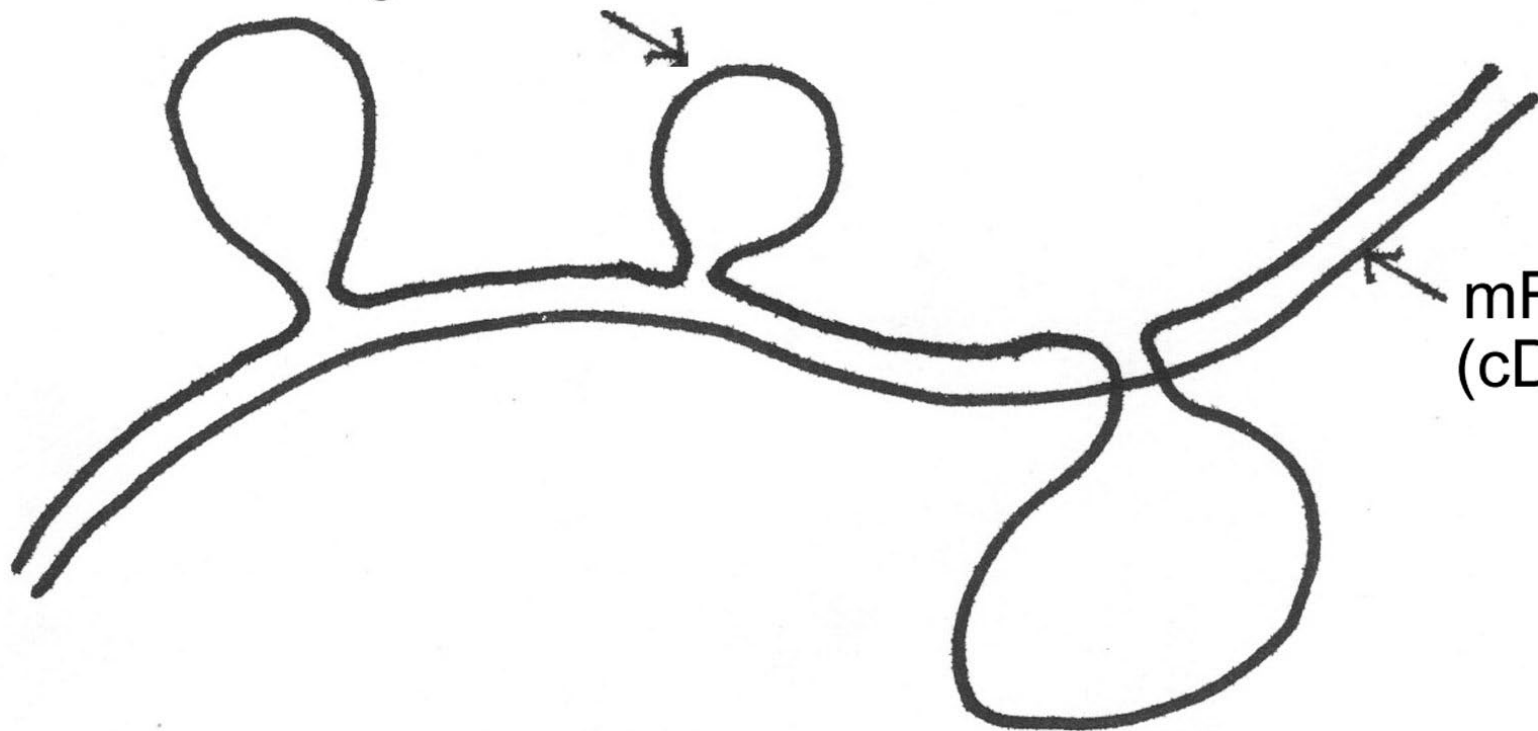


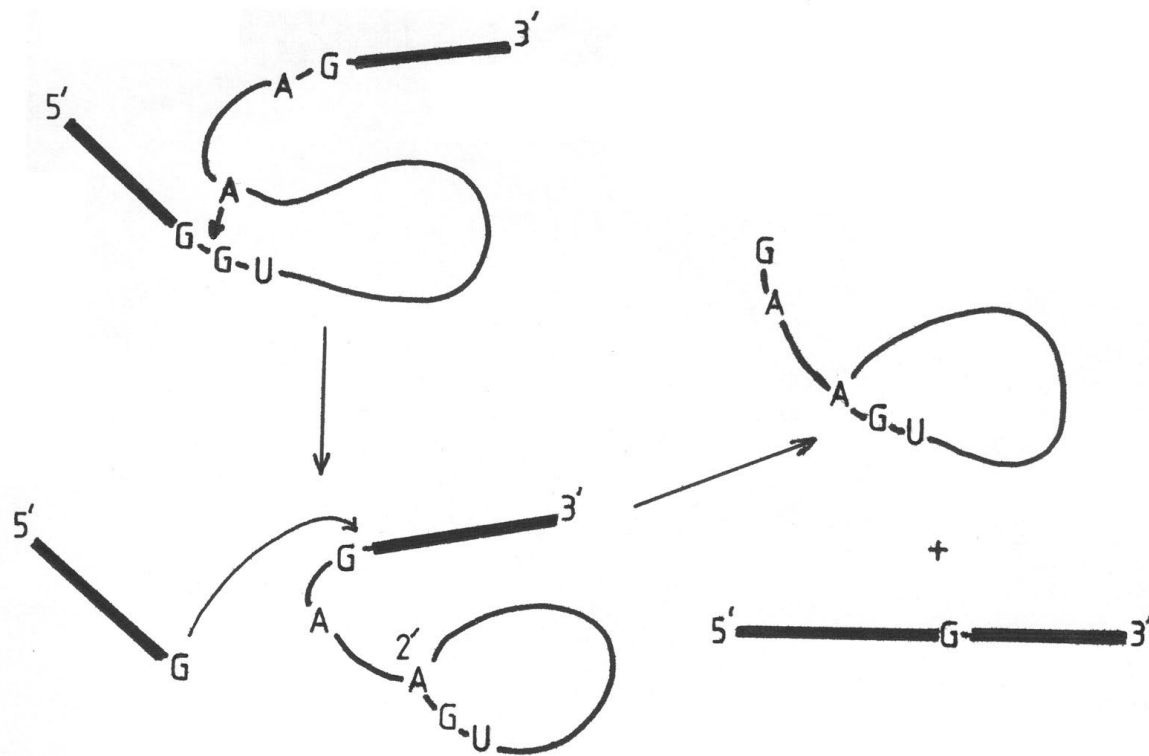
5'-konec mRNA: "cap"

fosfatasa, guanyltransferasa, metyltransferasa (cap struktura váže CBC)

genomová DNA

mRNA
(cDNA)



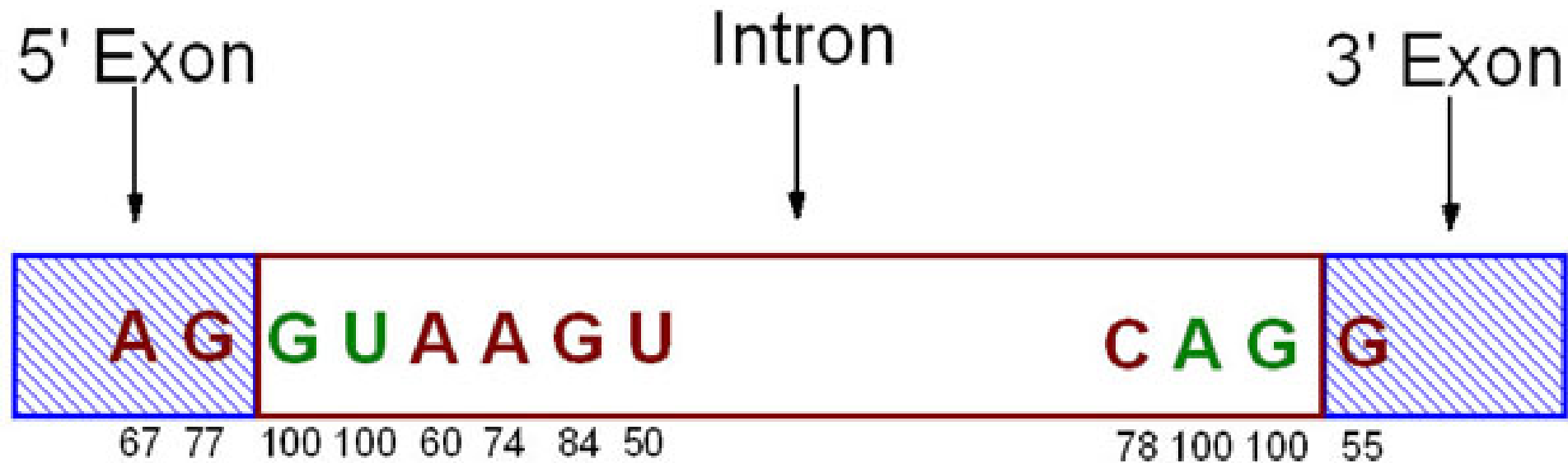


AG **GURAGU.....CURAY....Y(>8x)NCAG** G

INTRON

Sestřih primárního transkriptu

Splicing Consensus Sequences



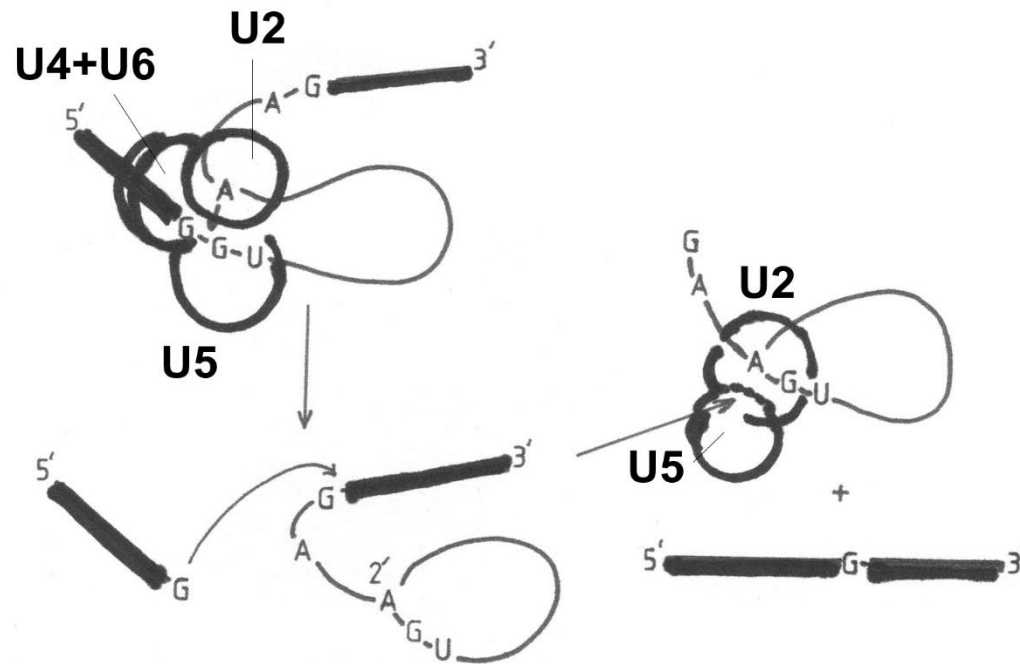
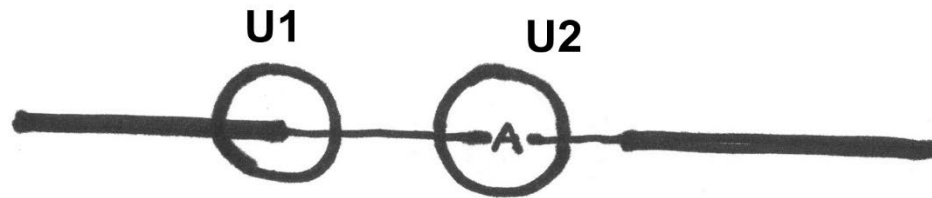
Numbers = Frequency (%)

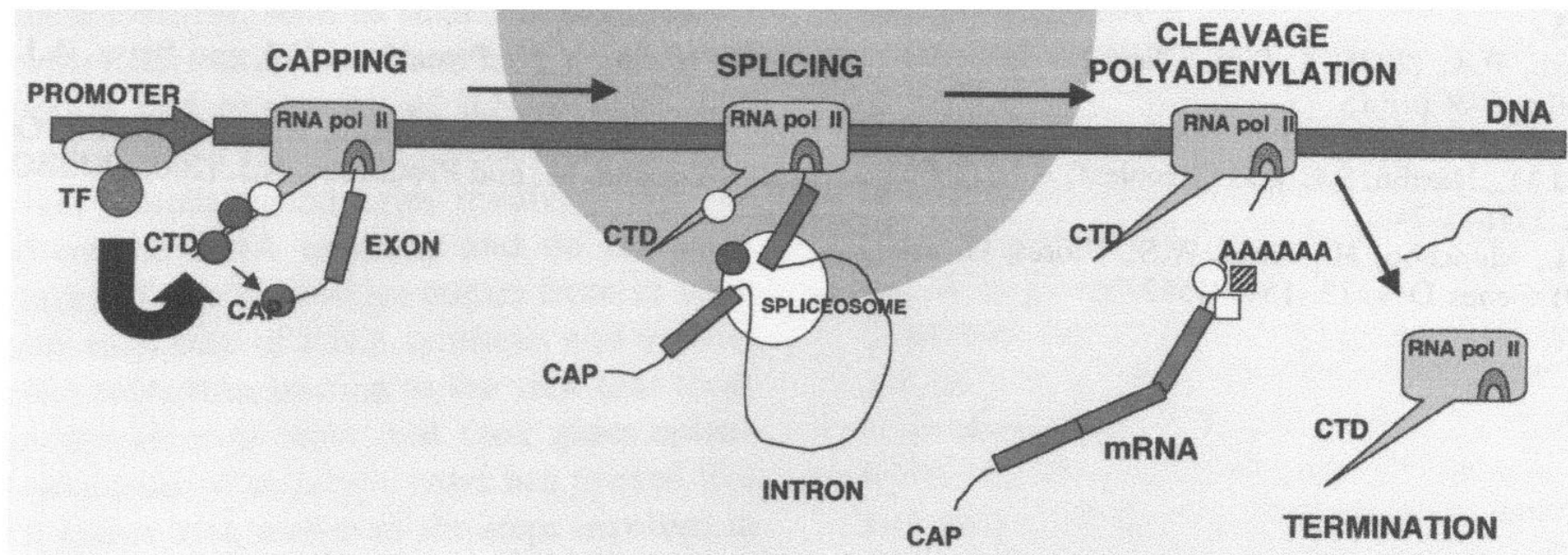
copyright 1996 M.W.King

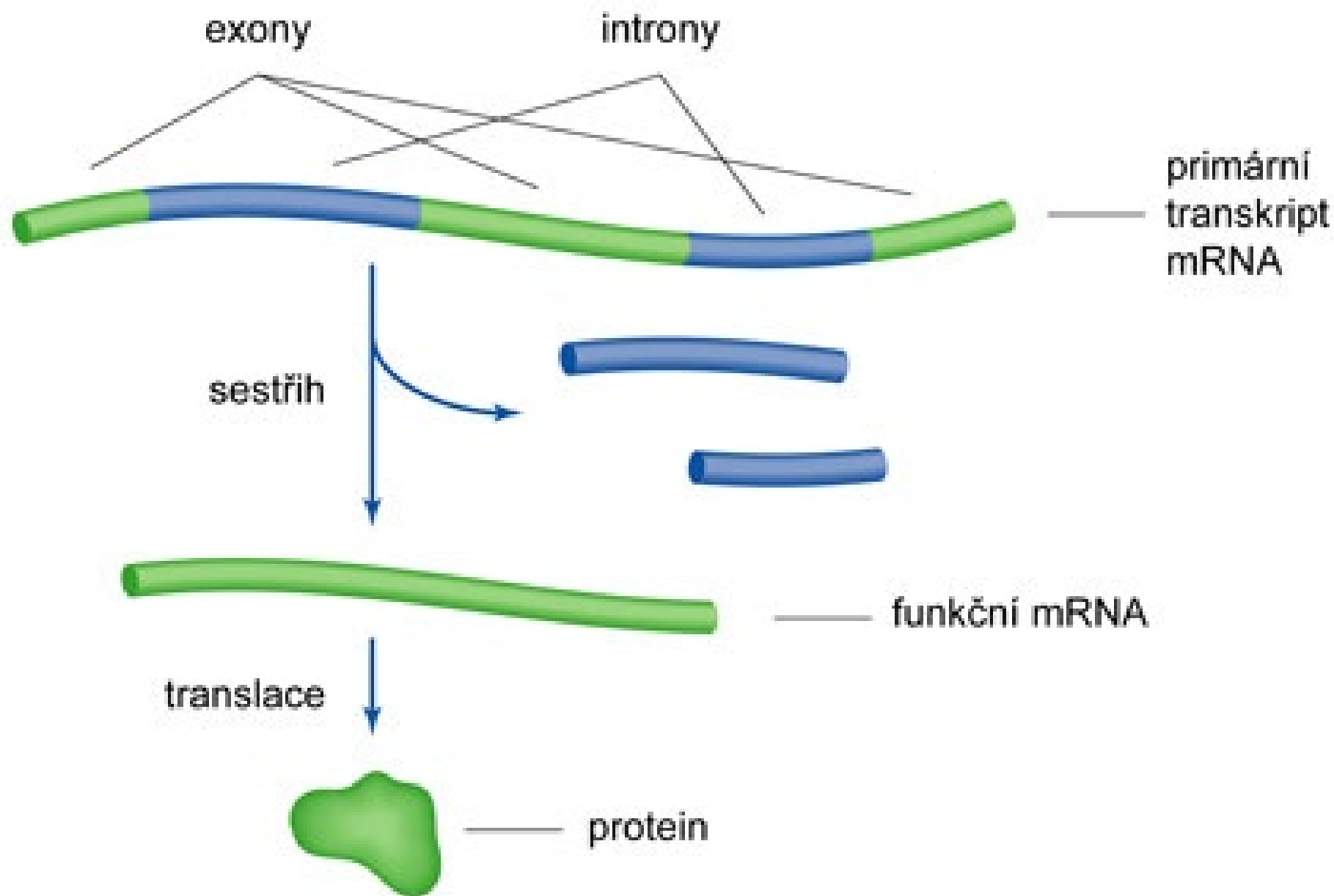
Spliceosom

U snRNP: U1, U2, U4, U5, U6

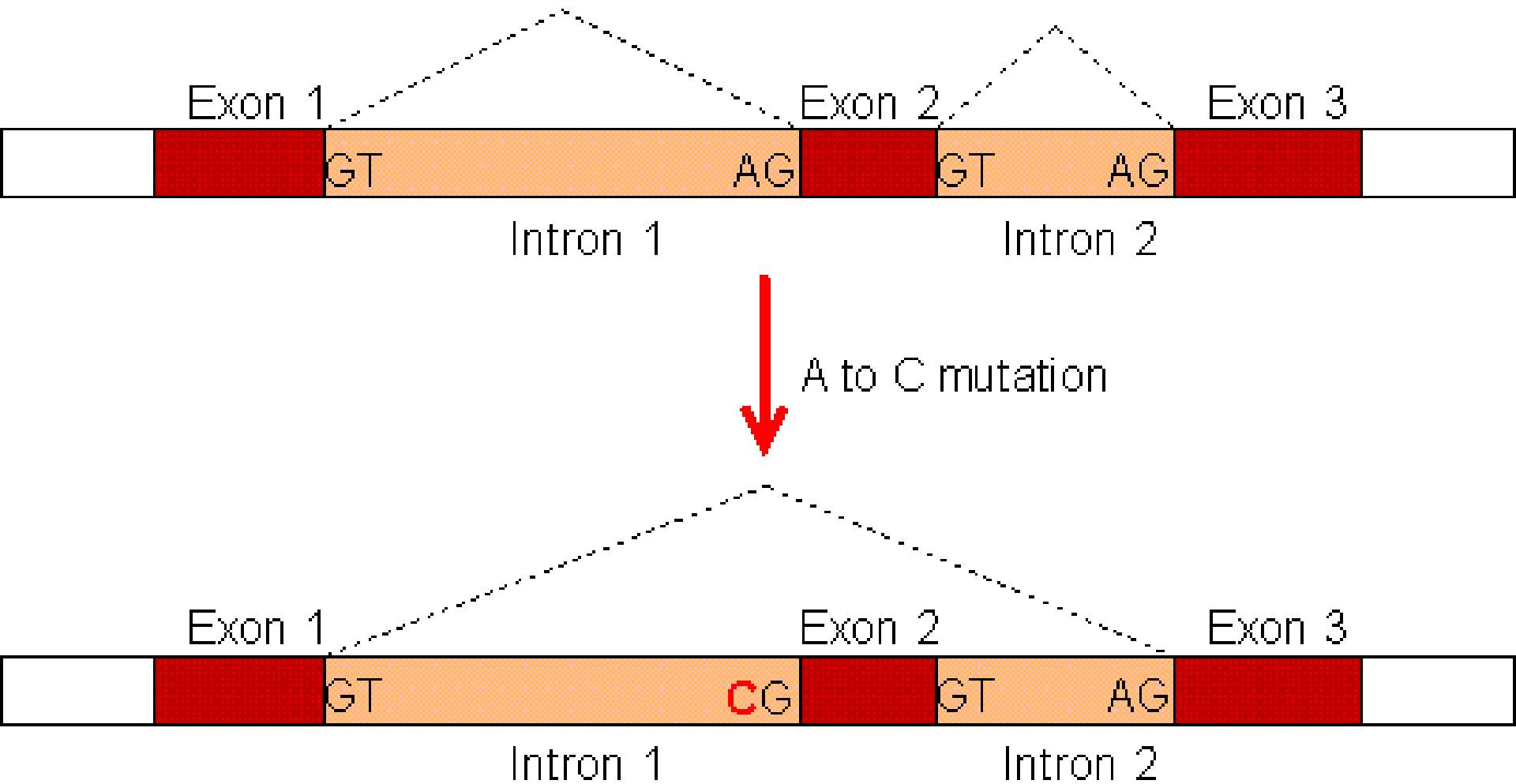
složení: U RNA a proteiny (~7)



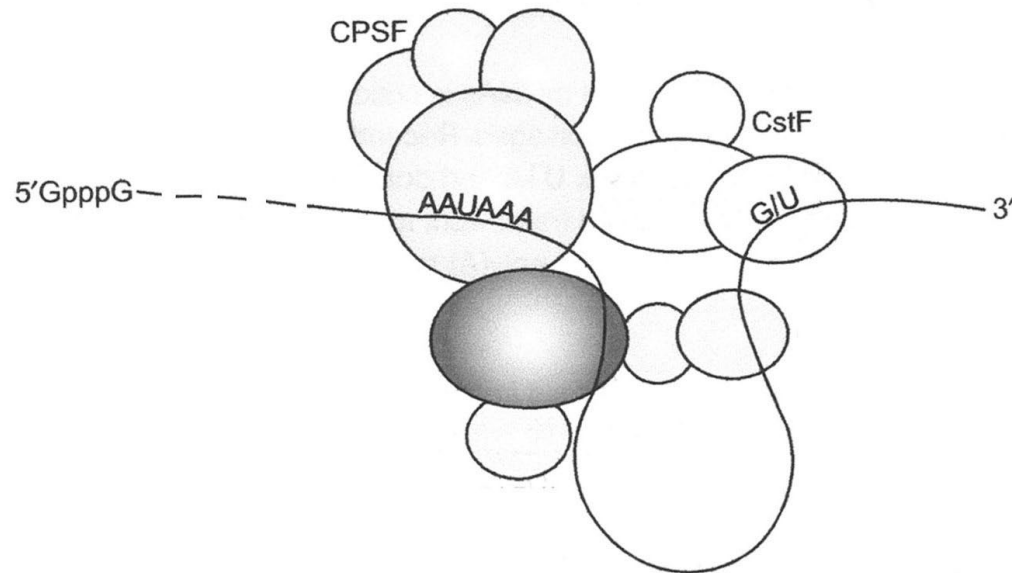




Exon skipping



3'-konec mRNA



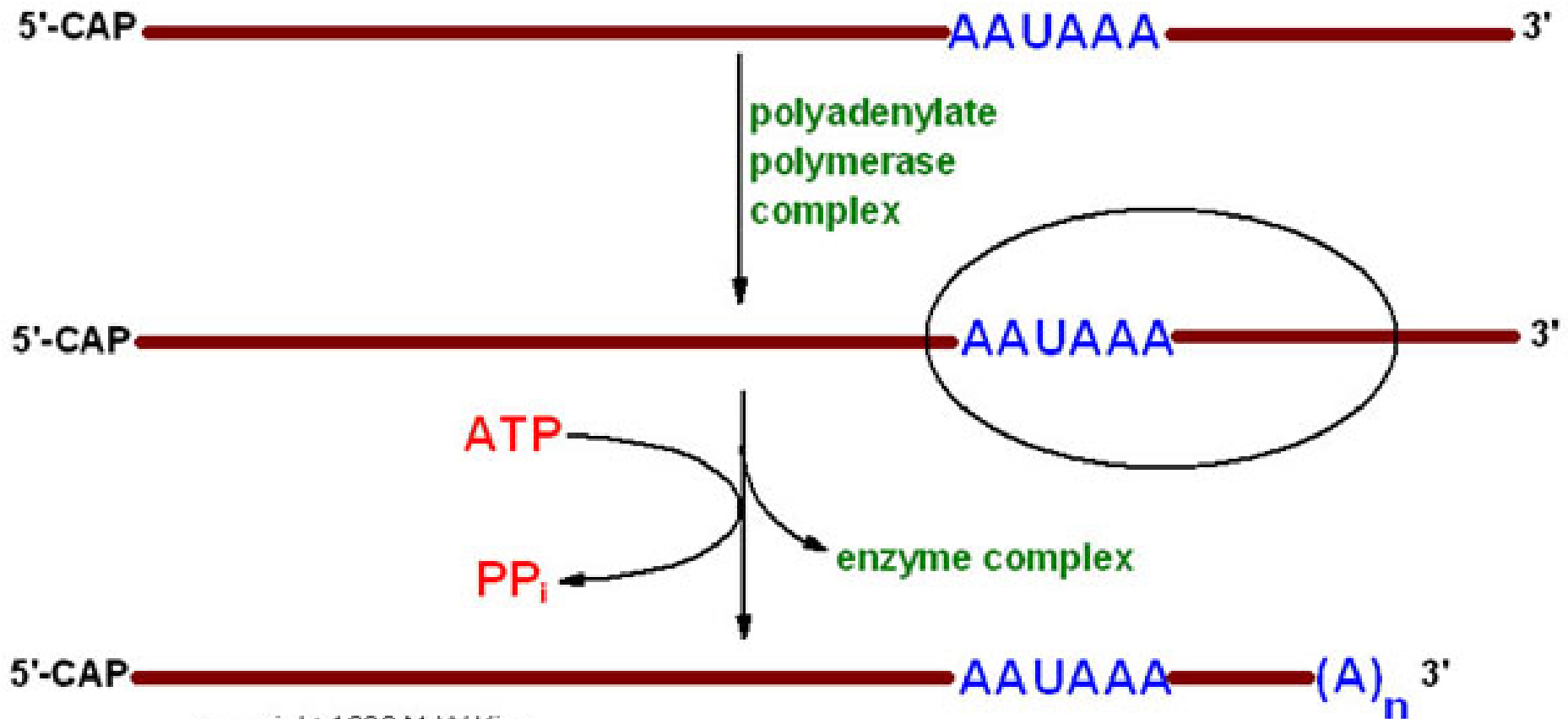
AAUAAA.....CA ↓.....G/U

AAUAAA.....CAAAAAAAAAA(~200 b.)

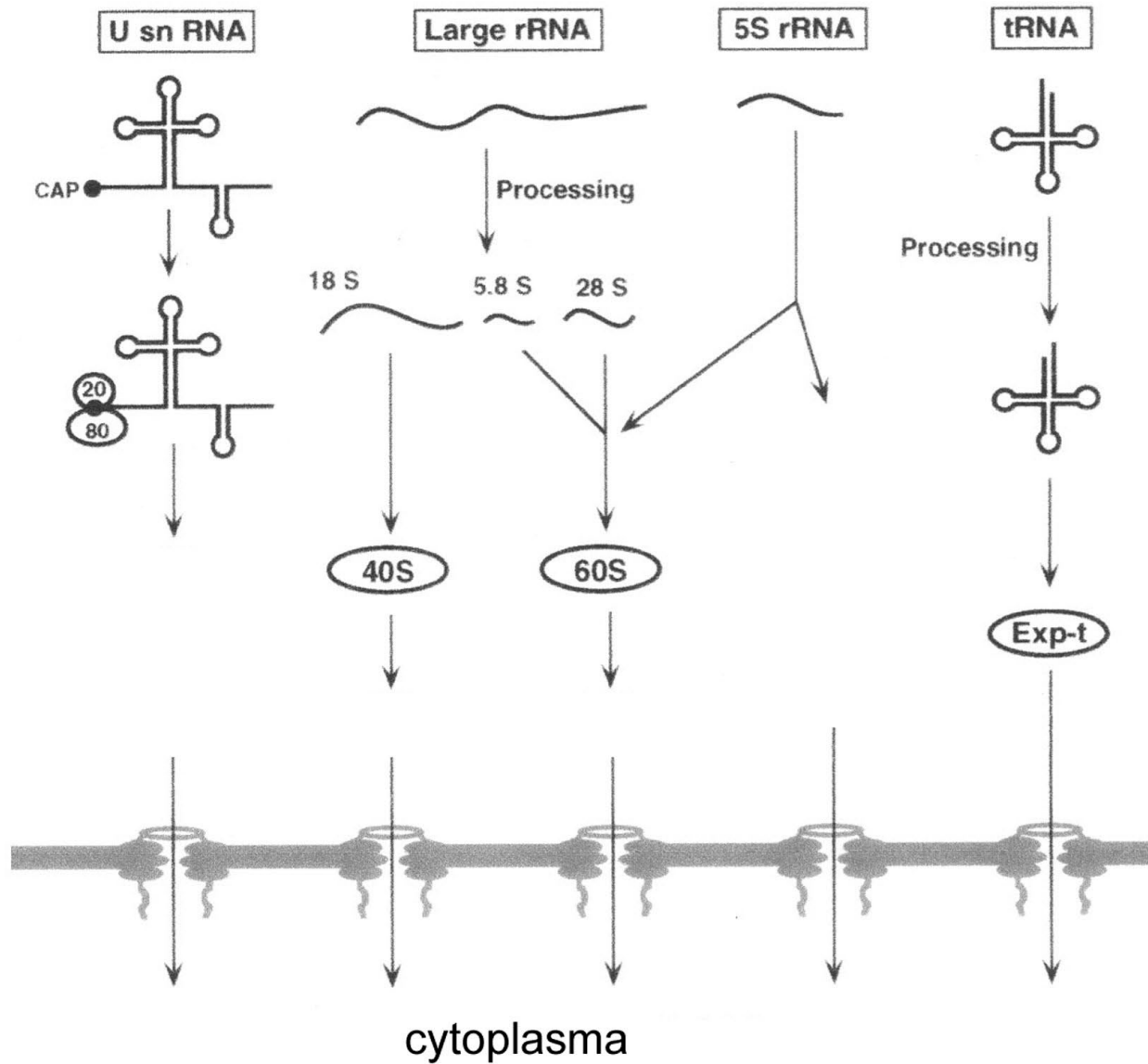
CPSF - cleavage and polyadenylation specificity factor

CstF - cleavage stimulation factor

Polyadenylation of mRNAs



Export RNA z jádra



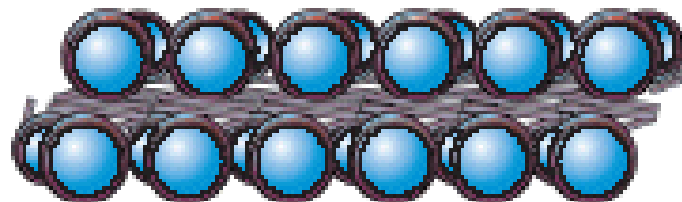
DNA



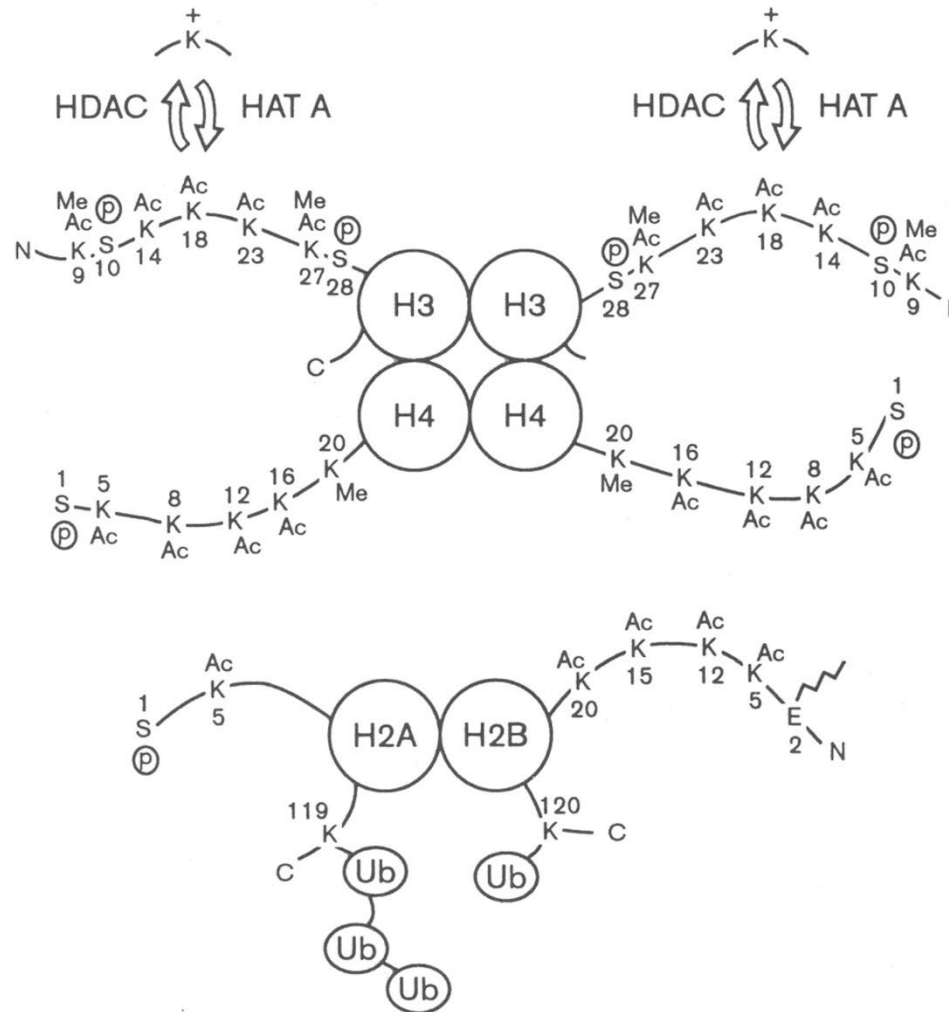
DNA wrapped around histone octamers to form nucleosomes



Nucleosomes compacted into a chromatin fibre

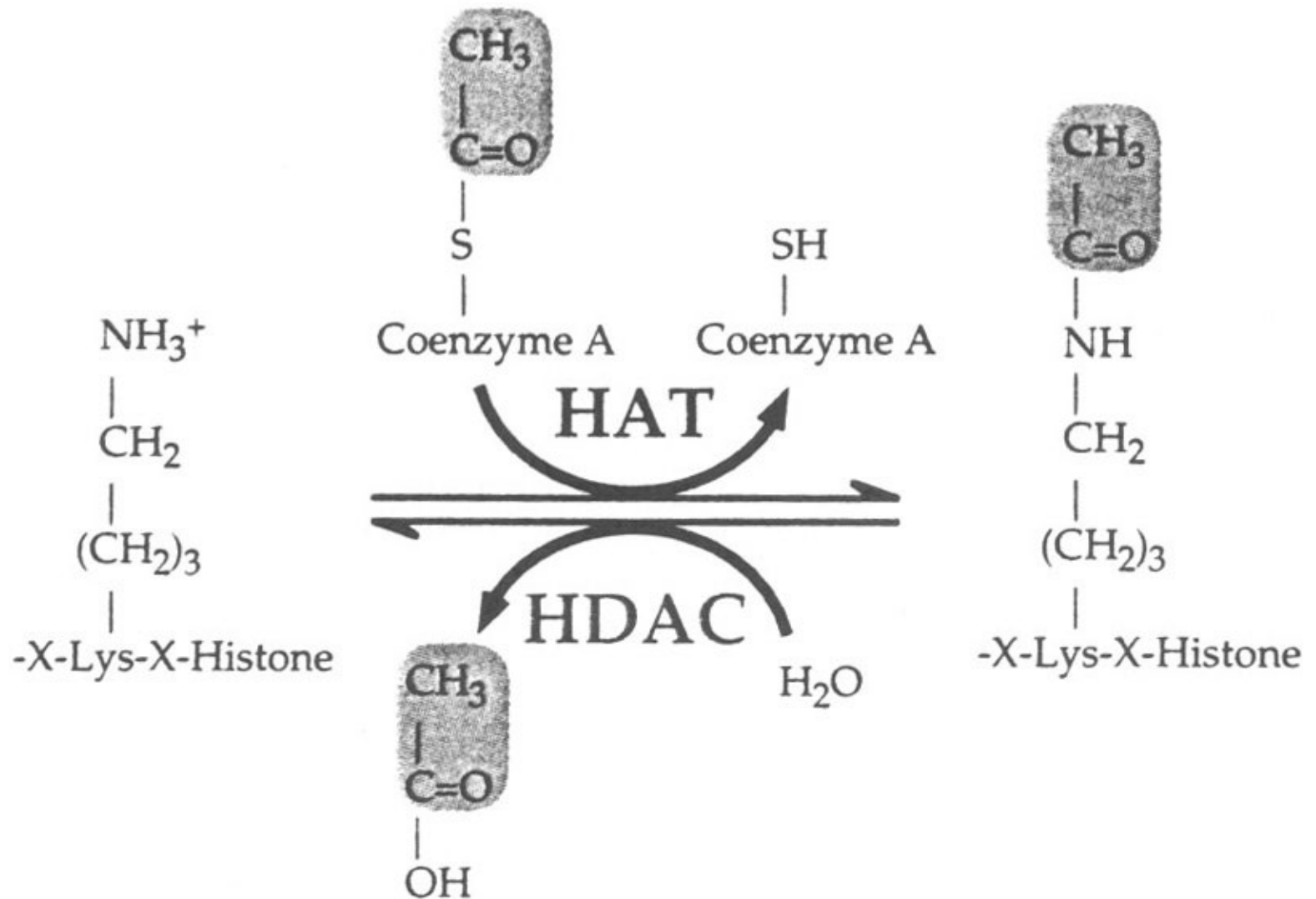


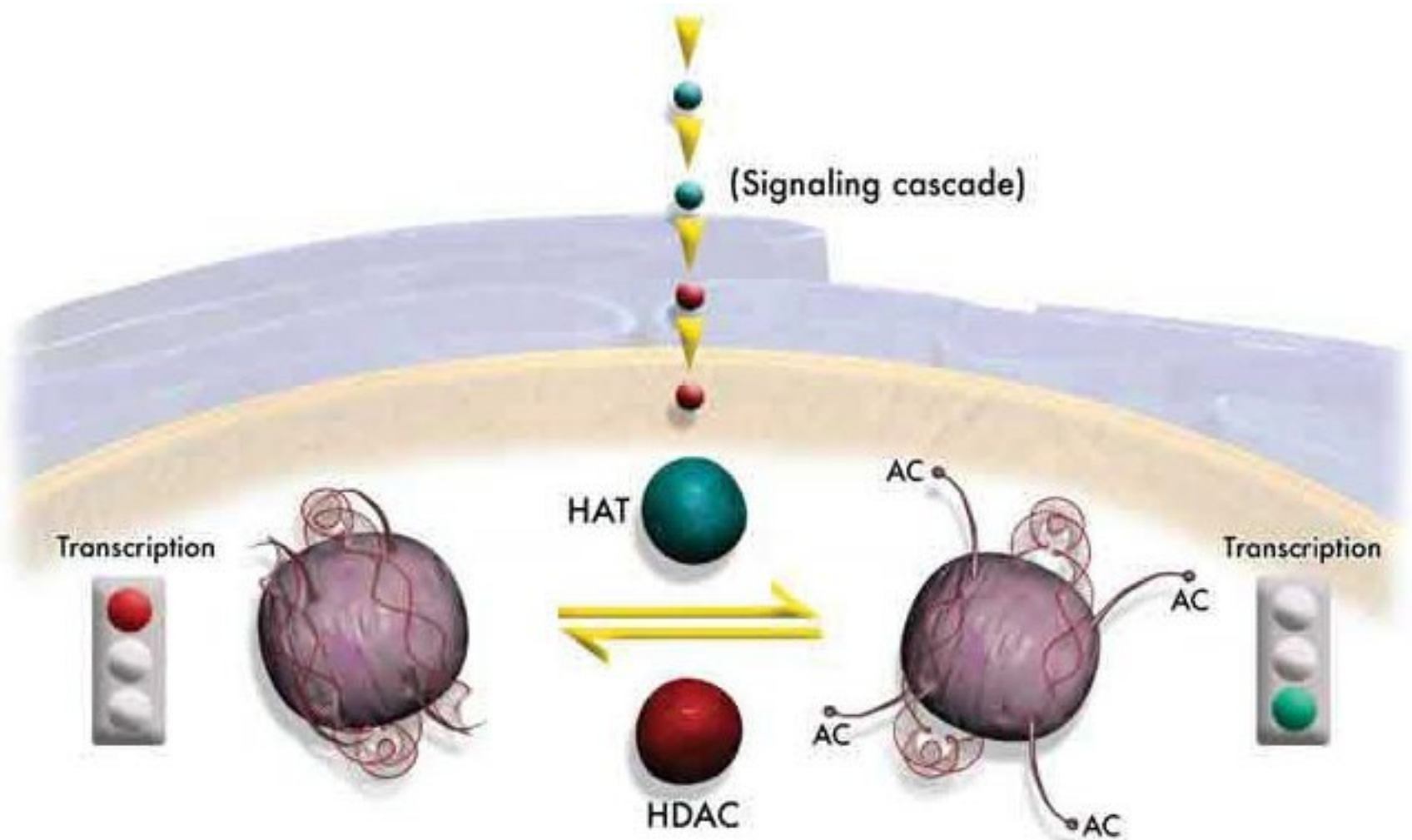
Acetylace a deacetylace histonů



HAT = histon acetyltransferasa HDAC = histone deacetylase

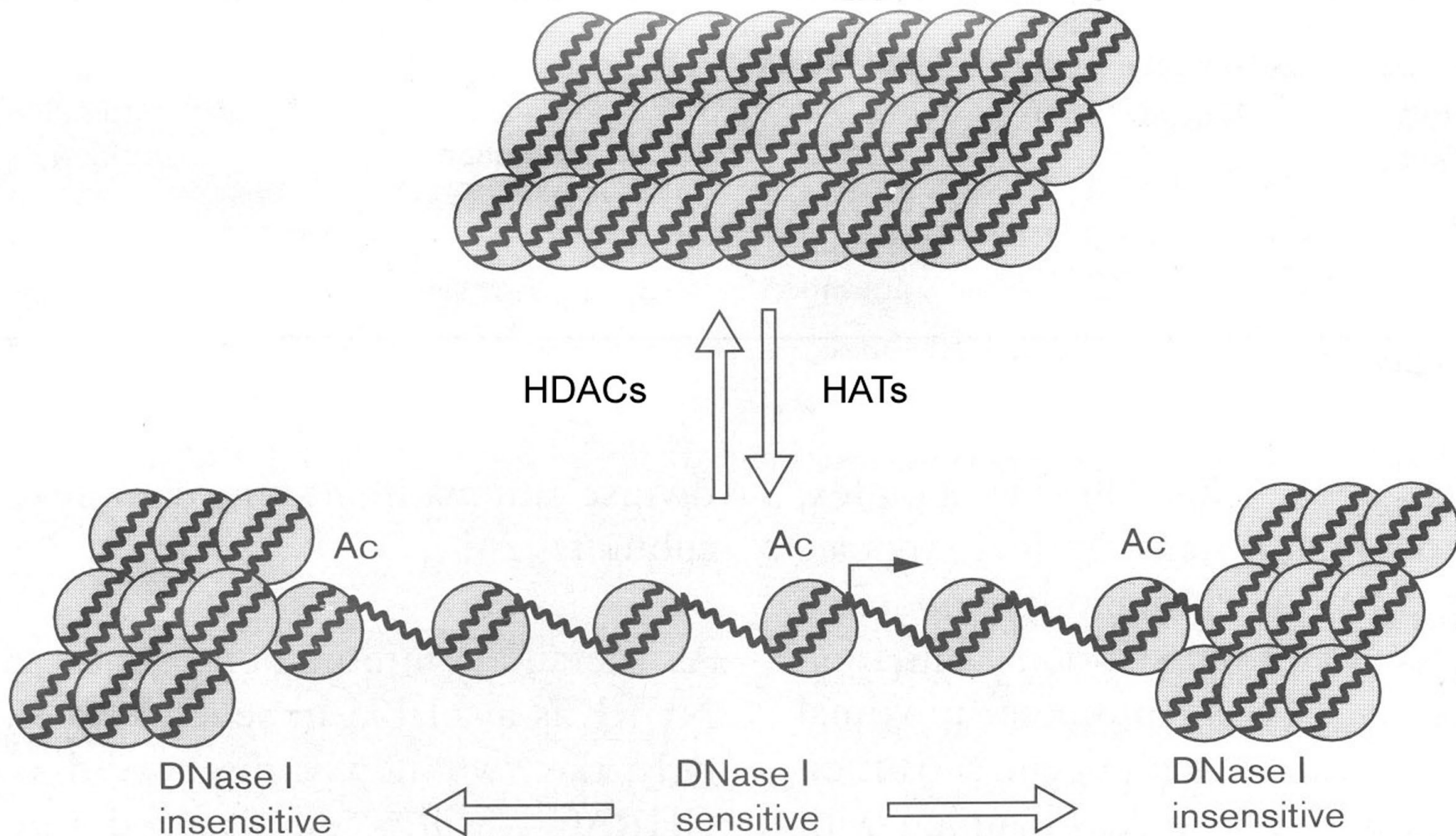
Acetylace a deacetylace lysinového zbytku v histonech





Signaling to Chromatin

Acetylce a deacetylce nukleosomových histonů



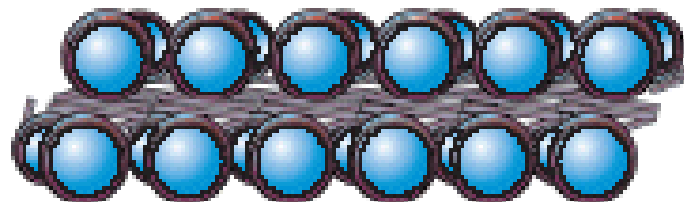
DNA



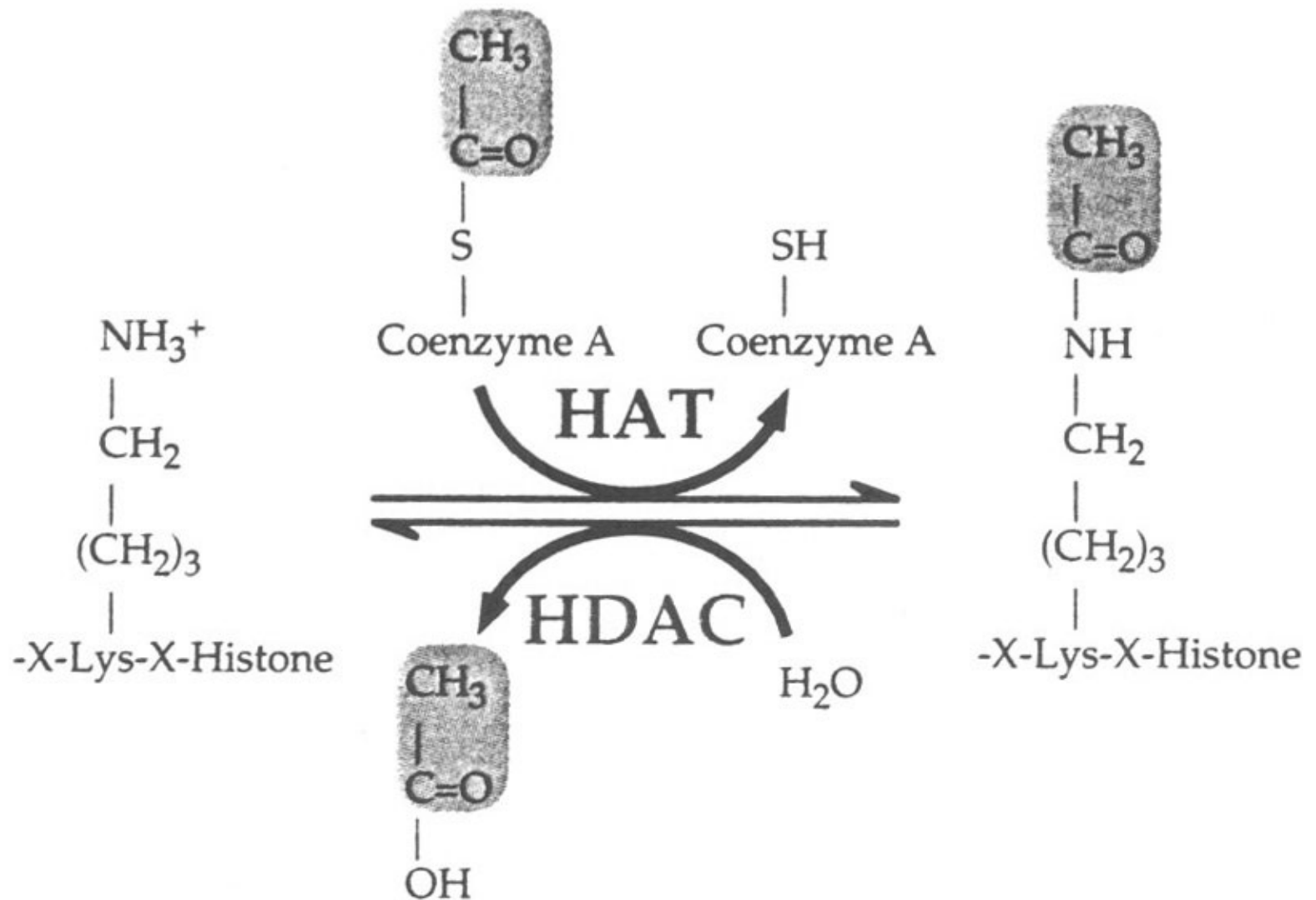
DNA wrapped around histone octamers to form nucleosomes



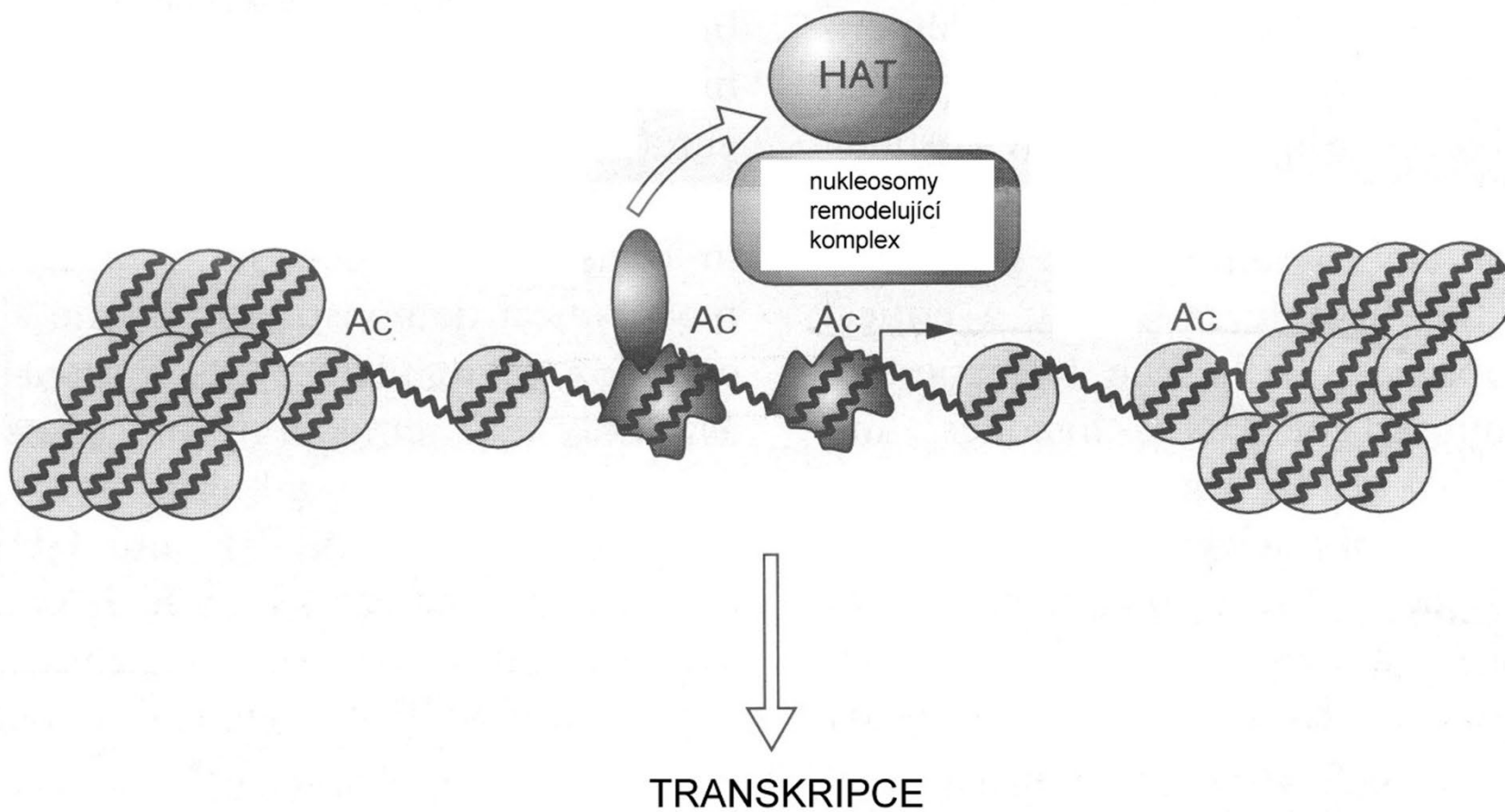
Nucleosomes compacted into a chromatin fibre

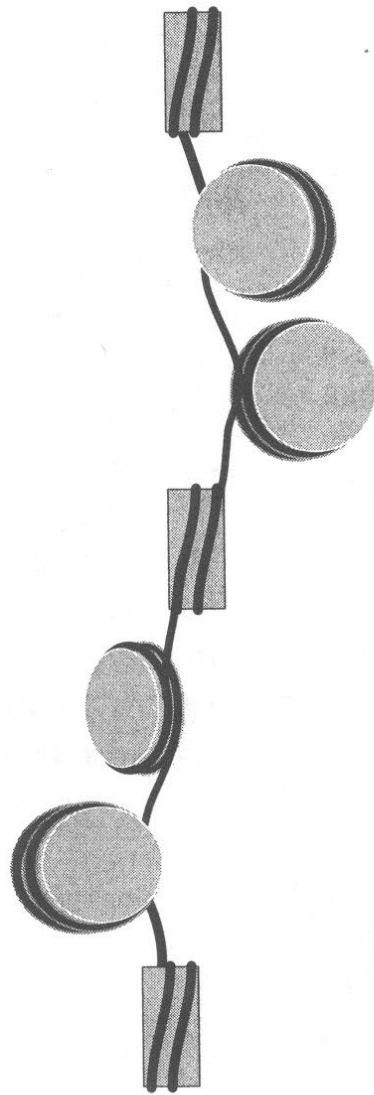


Acetylace a deacetylace lysinového zbytku v histonech

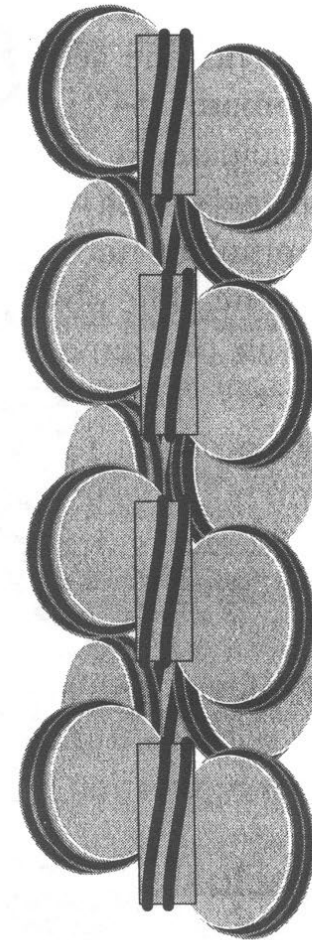
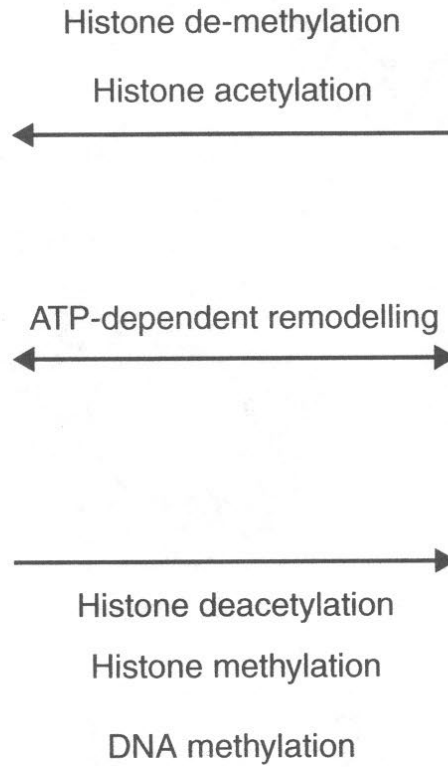


Modifikace lokálního chromatinu na promoteru



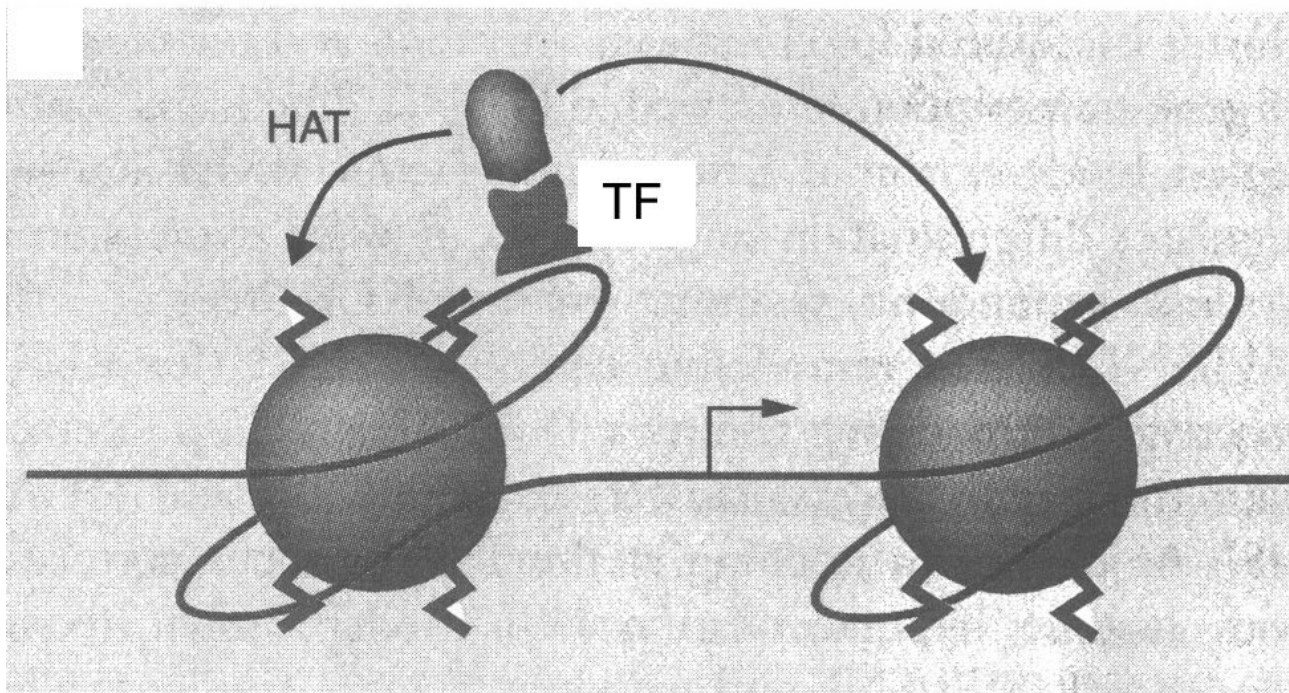
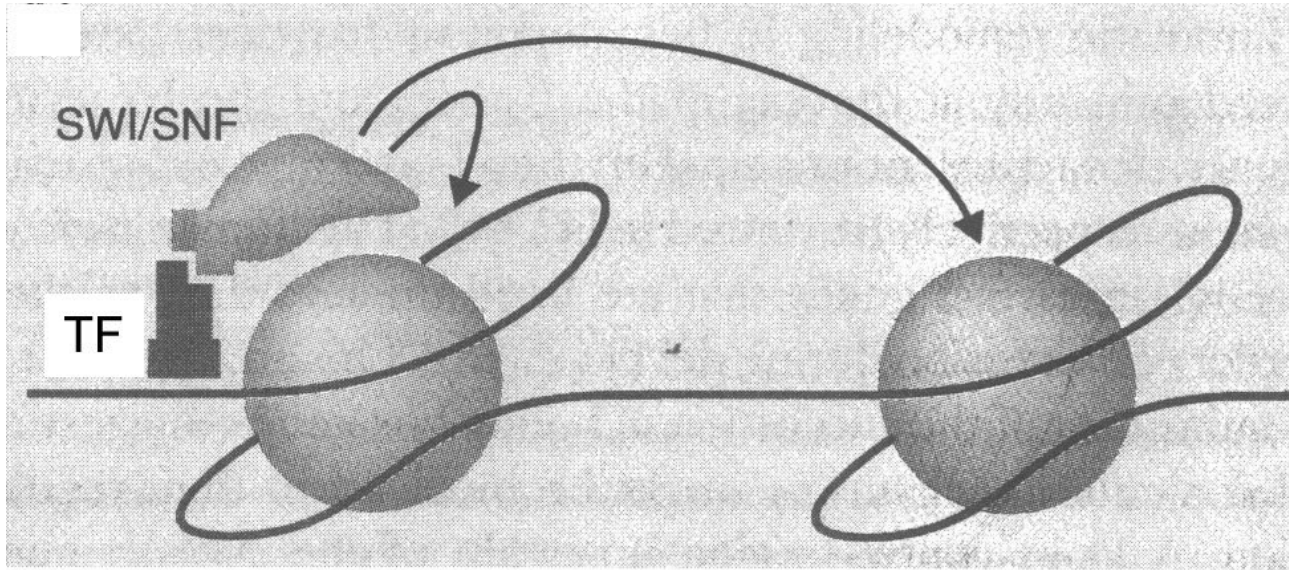


'Open' Chromatin



Condensed chromatin fibre

Transkripční faktor „rekrutuje“ nukleosomy-remodelující komplex
nebo histon acetylasu k promoteru



Transkripční faktory

MODULY:

DNA-vazebná doména Oligomerizační oblast Transaktivační doména



Obecné transkripční faktory:
(pro RNA polymerasu II)

TFIIA, B, D, E, F, H

TFIID komplex: TBP a TAFs

SPECIFICKÉ TRANSKRIPČNÍ FAKTORY

KOAKTIVÁTORY, KOREPRESORY

Transkripční faktory

DNA-vazebné domény:

1. basická doména
2. „zinc-finger“
3. „helix-turn-helix“

Dimerizační domény:

1. HLH („helix-loop-helix“)
2. LZ („leucine zipper“)

V transkripčních faktorech jsou v kombinaci, např. basic-HLH nebo basic-HLH-LZ (bHLH-LZ)

Transkripčně-aktivační domény:

1. z kyselých aminokys. zbytků („acidic domains“)
2. bohaté na glutamin
3. bohaté na prolin

