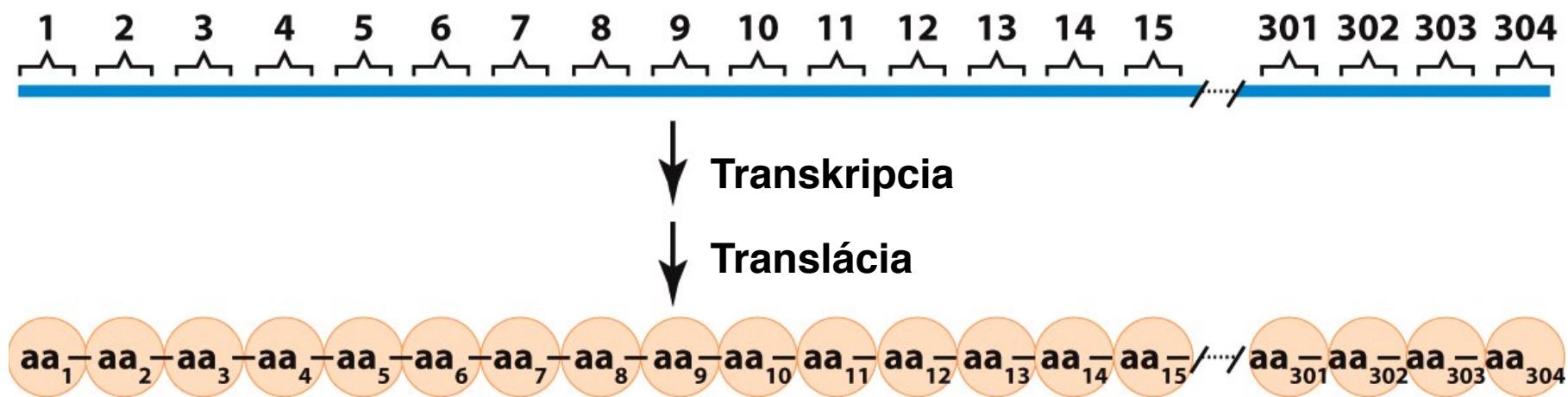


# Expresia génov I:

## Tok genetickej informácie z DNA k RNA

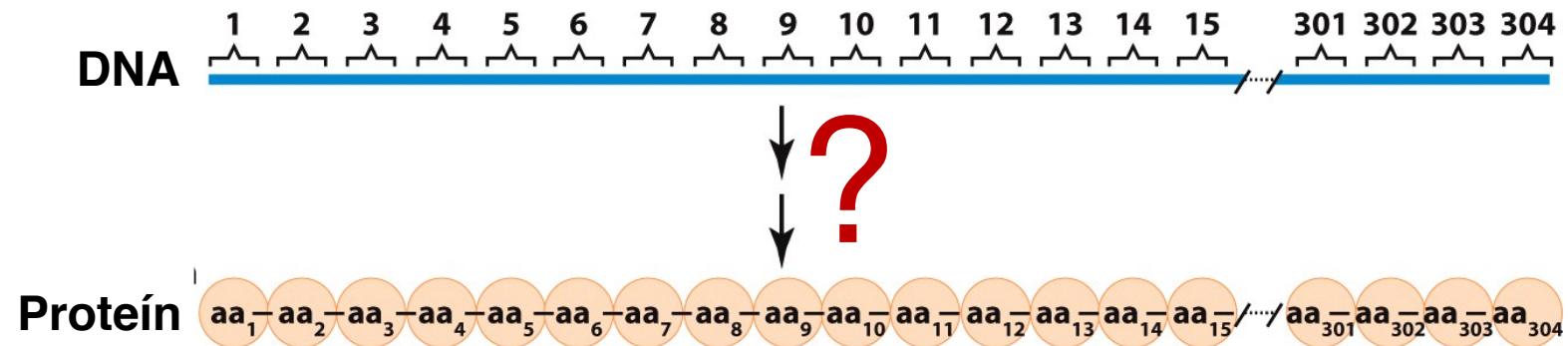


# Moderná koncepcia génu

- **Gén je funkčnou jednotkou**, ktorá kontroluje syntézu polypeptidu, alebo RNA
- **Štruktúrnou jednotkou je pár nukleotidov**, ktorý je najmenšou jednotkou schopnou podliehať mutáciám a rekombináciám.

# Gén a proteín sú kolineárne

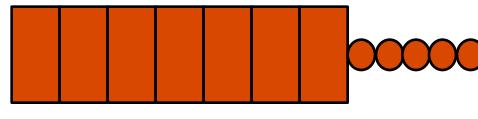
Kódujúca oblast' neprerušeného prokaryotického génu



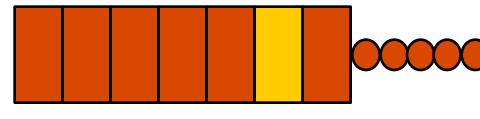
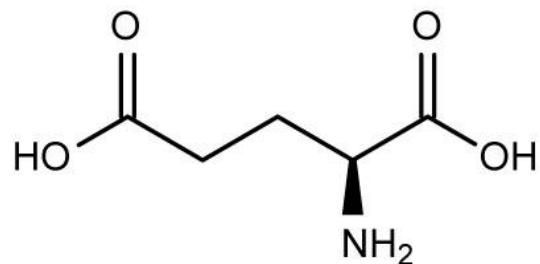
Zmena v poradí nukleotidov často vede k zmene v poradí aminokyselín v polypeptide: Kosáčikovitá anémia



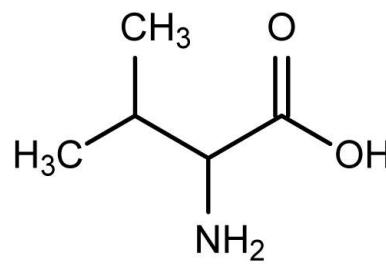
**β-ret'azec  
hemoglobínu**



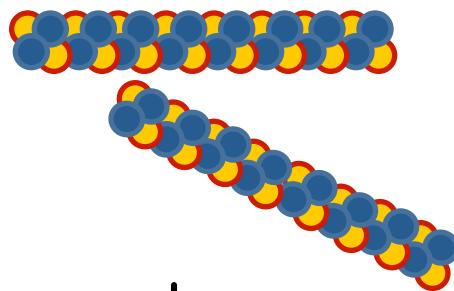
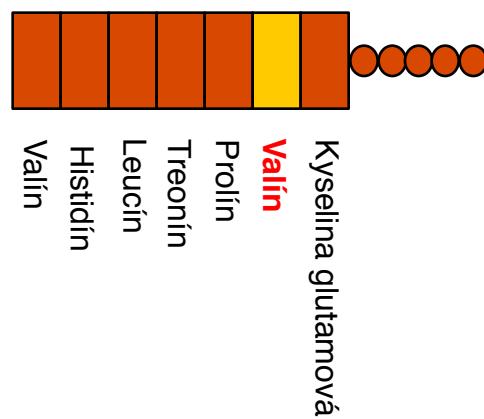
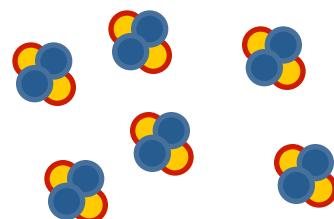
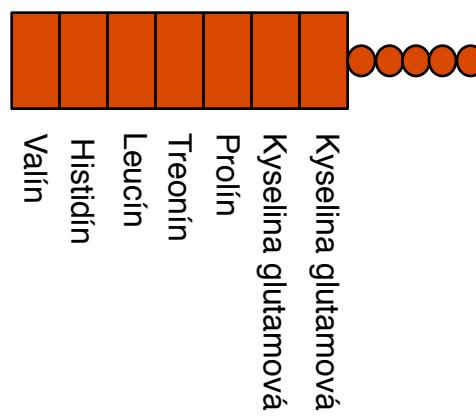
Kyselina glutamová  
Kyselina glutamová  
Prolín  
Treonín  
Leucín  
Histidín  
Valín



Kyselina glutamová  
Kyselina glutamová  
Prolín  
Treonín  
Leucín  
Histidín  
**Valín**  
Valín



Zámena 1 aminokyseliny v  $\beta$ -reťazci hemoglobínu sa prejaví na úrovni proteínu i celého organizmu



Deštrukcia abnormálnych krviniek

Anémia

Poškodenie srdca

Hyperrekativita kostnej drene

Agregácia krviniek  
Upchávanie ciev

Lokálne upchávanie ciev

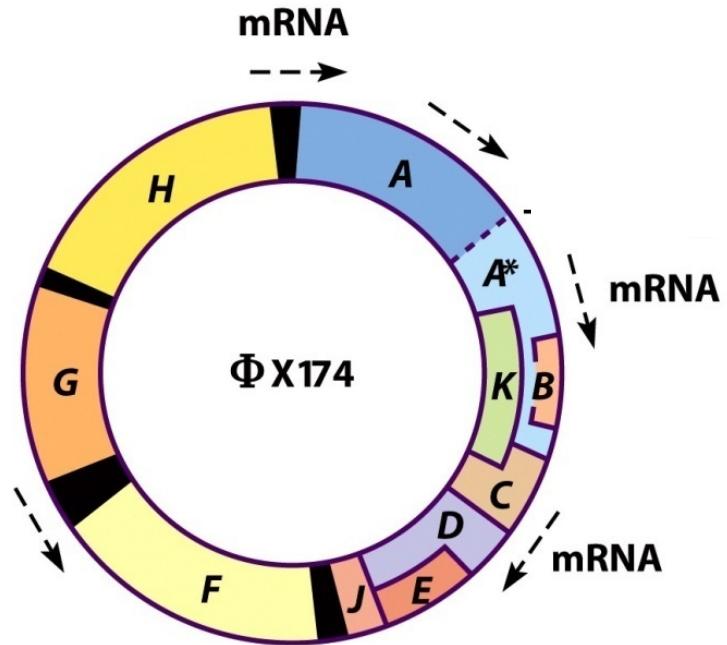
Poškodenie obličiek, srdca  
svalov, mozgu, plúc, ...

Akumulácia krviniek  
v slezine

Zväčšenie  
a poškodenie sleziny

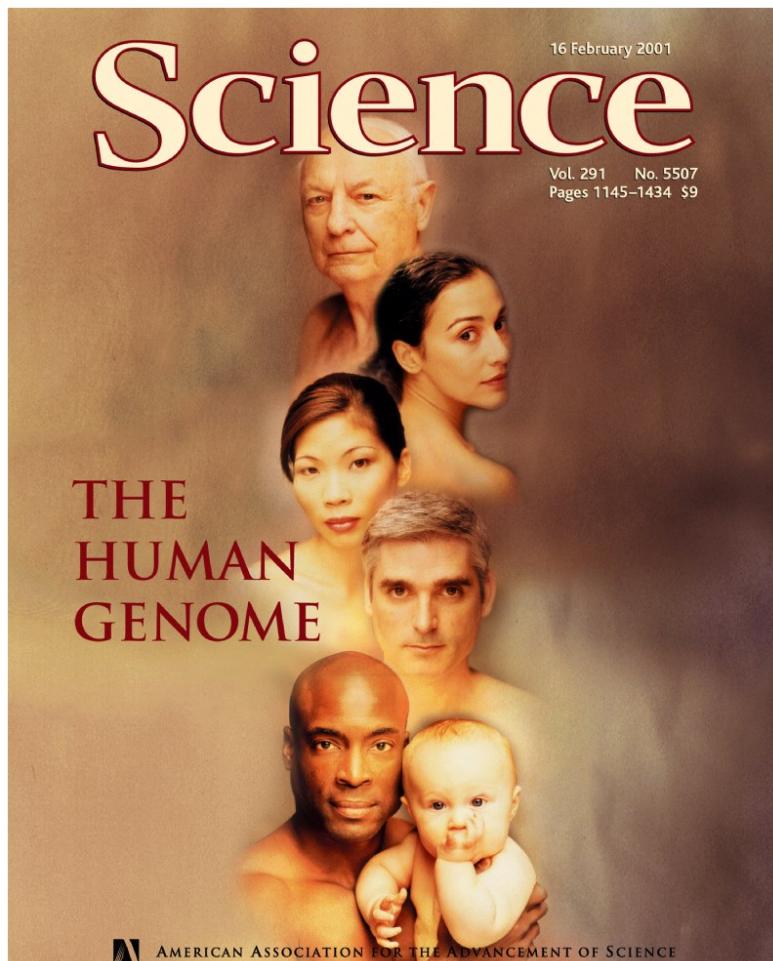
**PLEIOTROPNÝ EFEKT**

Jeden úsek DNA môže kódovať viac polypeptidov, napríklad v prípade úsporných genómov vírusov



- 5386 nukleotidov
- Kóduje 11 proteínov, ktoré majú dokopy 2300 aminokyselín
- Genóm obsahuje **gény-v-génoch**

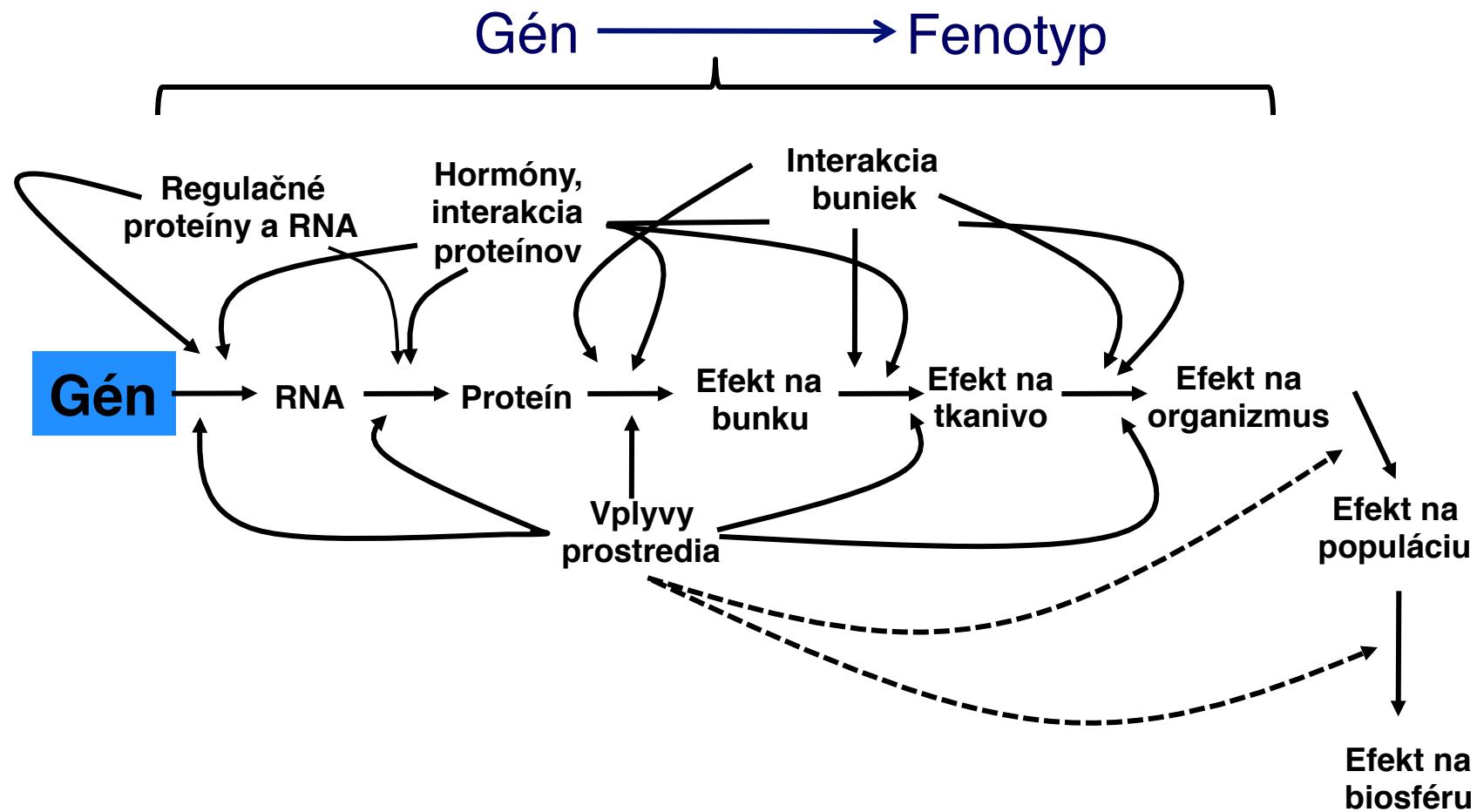
# Koľko teda máme (proteín-kódujúcich) génov?



- *E. coli*: 4,800
- *S. cerevisiae*: 6,000
- *D. melanogaster*: 13,000
- *C. elegans*: 19,000
- *A. thaliana*: 26,000
- Človek: 20,000-25,000

V ľudských bunkách je vyše 100000 rôznych proteínov; ako je to možné?

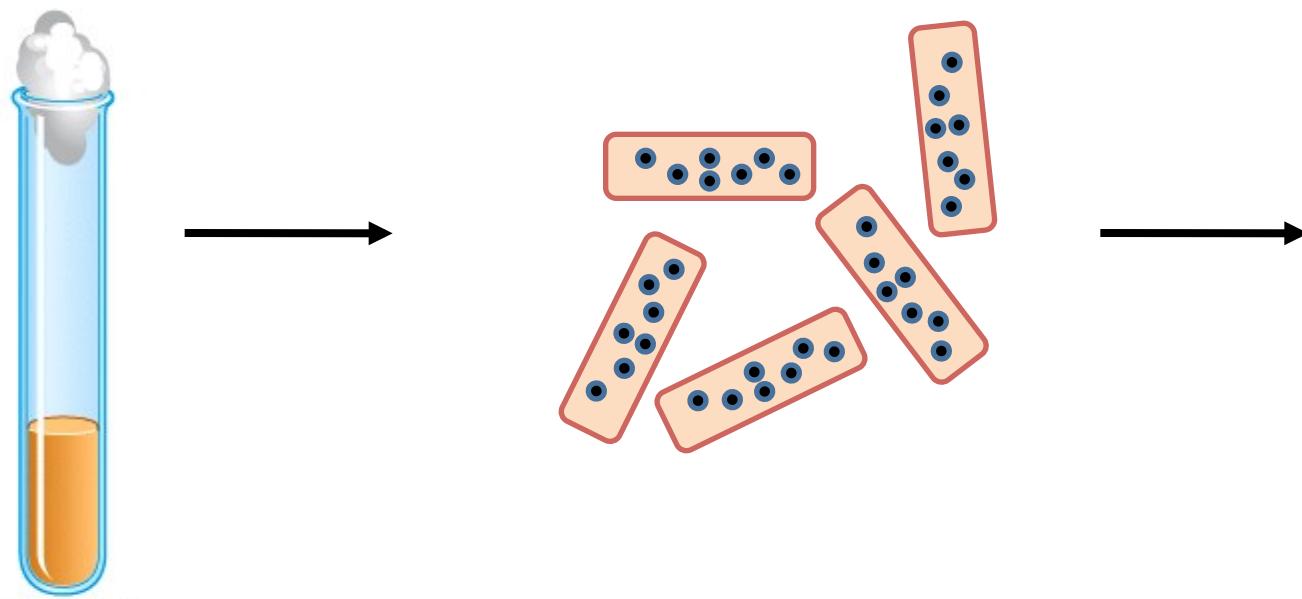
Od genov k fenotypu je komplikovaná cesta a dnes je jasné, že pôvodná predstava 1 gén – 1 znak (či 1 enzym), je neadekvátnie zjednodušená



# Program prednášky

- Experimentálny dôkaz existencie mRNA
- Centrálna dogma molekulárnej biológie
- Základné princípy prepisu/transkripcie DNA
- Schéma typického promótora
- Základné rozdiely medzi pro- a eukaryotickou transkripciou
- Post-transkripčné úpravy: mechanizmus a význam

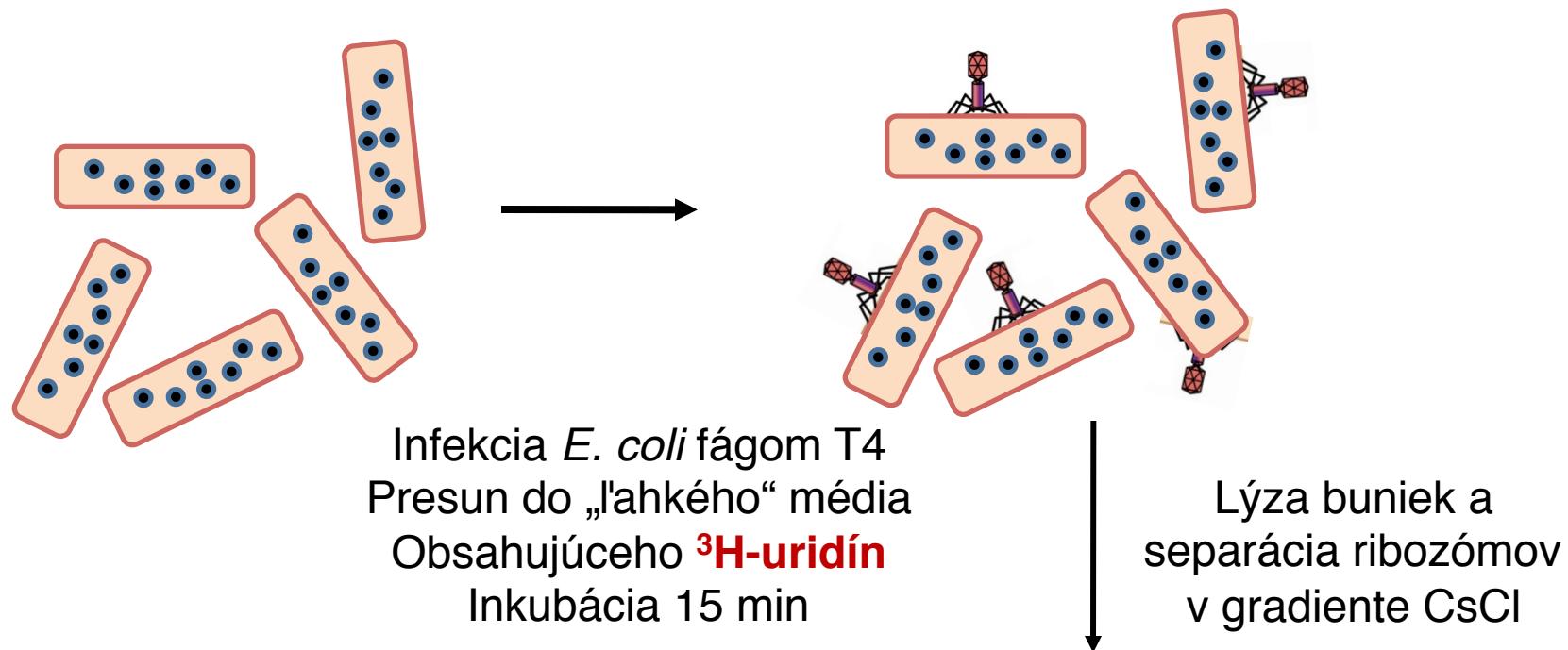
# Experiment F. Jacoba, S. Brennera a M. Meselsona (1960): Dôkaz existencie messengerovej RNA



Kultivácia/rast *E. coli*  
v médiu obsahujúcom:  
 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl} + ^{13}\text{C}$

„Tažké“ *E. coli* obsahujúce  
„ťažké“ ribozómy

# Experiment F. Jacoba, S. Brennera a M. Meselsona (1960): Dôkaz existencie messengerovej RNA



Ak ribozómy špecifikujú *de novo* syntézu proteínov, mali by byť tvorené „l'ahké“ fágové ribozómy

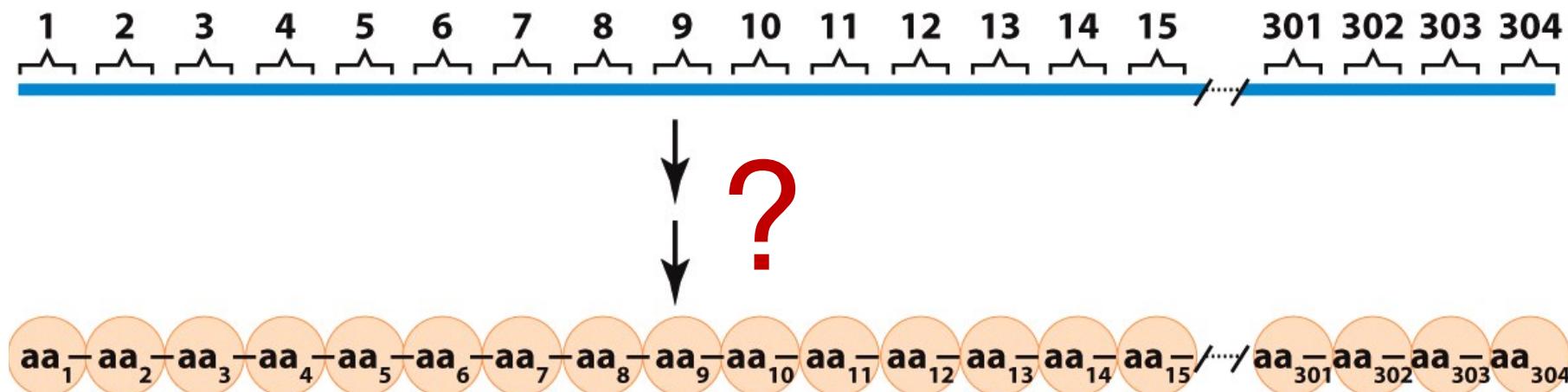
„L'ahké“ ribozómy sa však nevytvorili v bunkách sú len „ťažké“ ribozómy



## ZÁVER 1:

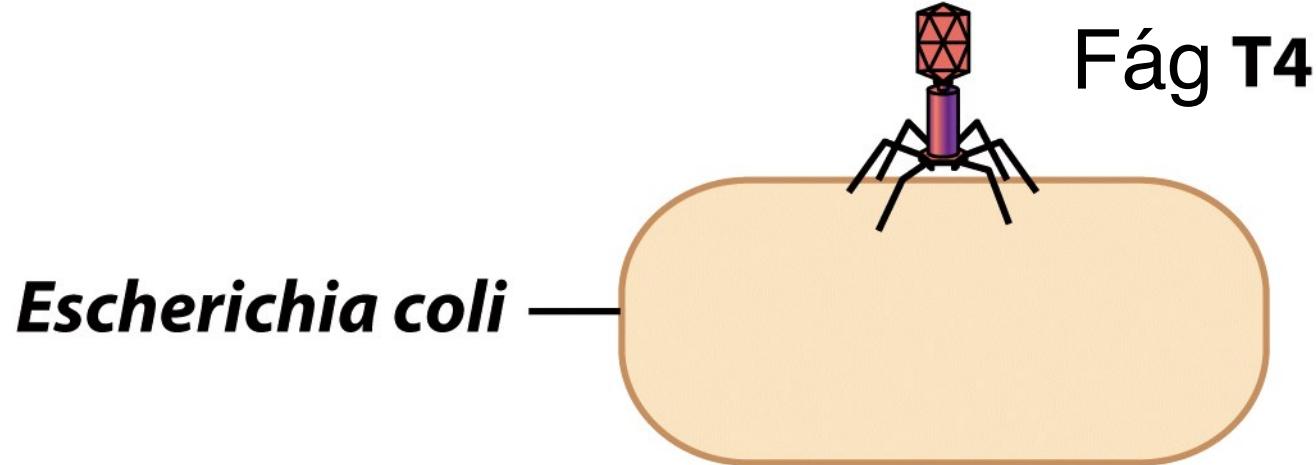
Po infekcii bakteriofágom nedochádza k syntéze nových ribozómov

Po infekcii bakteriofágom a pred syntézou fágových proteínov však dochádza k syntéze RNA. Odkiaľ pochádza?

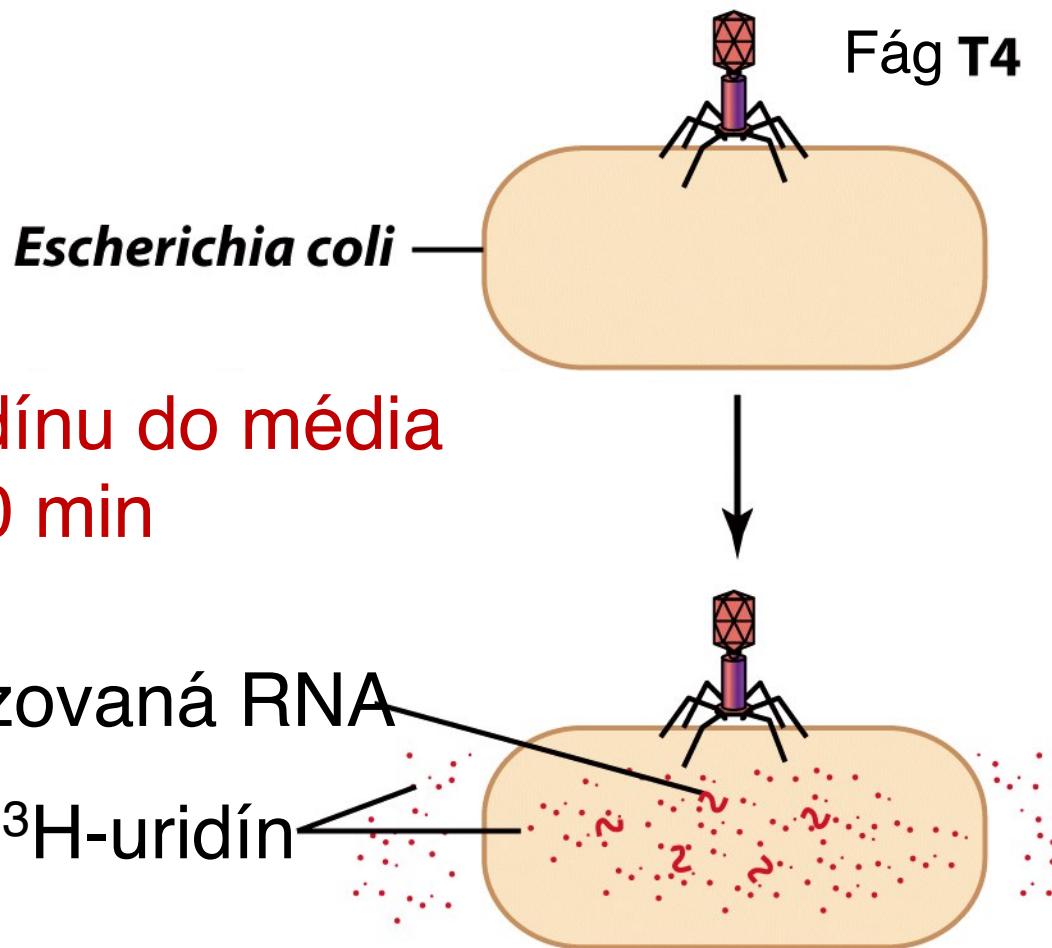


# Experimentálny dôkaz existencie nestabilnej mediátorovej RNA (mRNA)

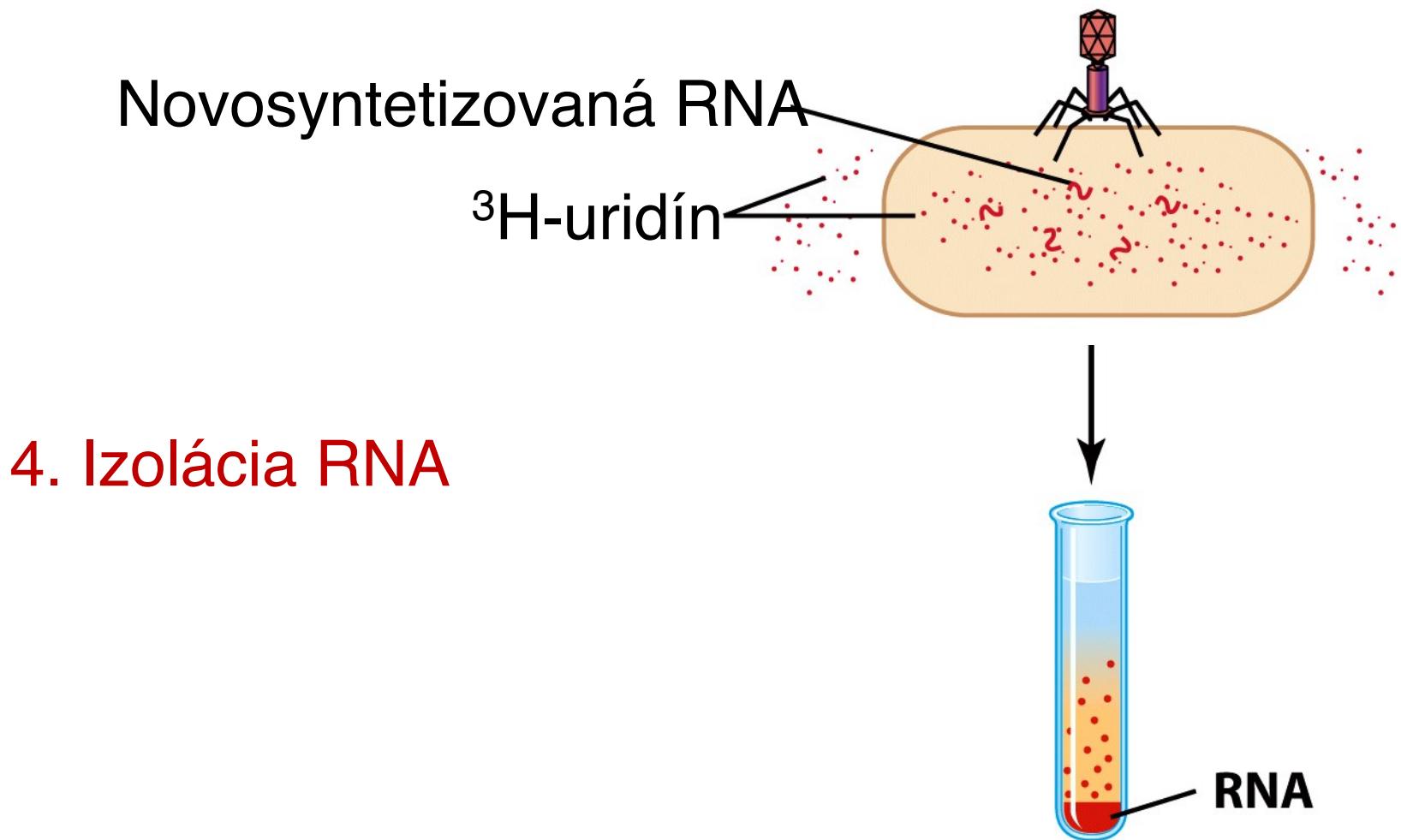
## 1. Infekcia *E. coli* fágom T4



# Experimentálny dôkaz existencie nestabilnej mediátorovej RNA (mRNA)



# Experimentálny dôkaz existencie nestabilnej mediátorovej RNA (mRNA)



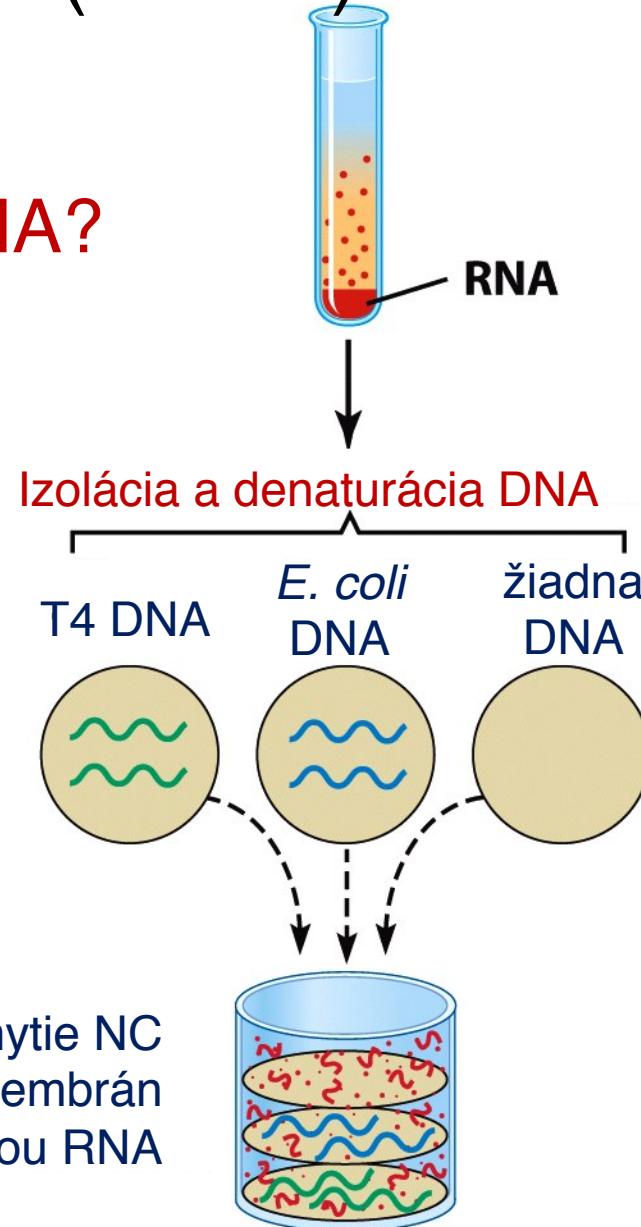
Experiment F. Jacoba, S. Brennera a M. Meselsona (1960)

# Experimentálny dôkaz existencie nestabilnej mediátorovej RNA (mRNA)

## 5. Aká frakcia RNA pochádza z fábovej DNA?

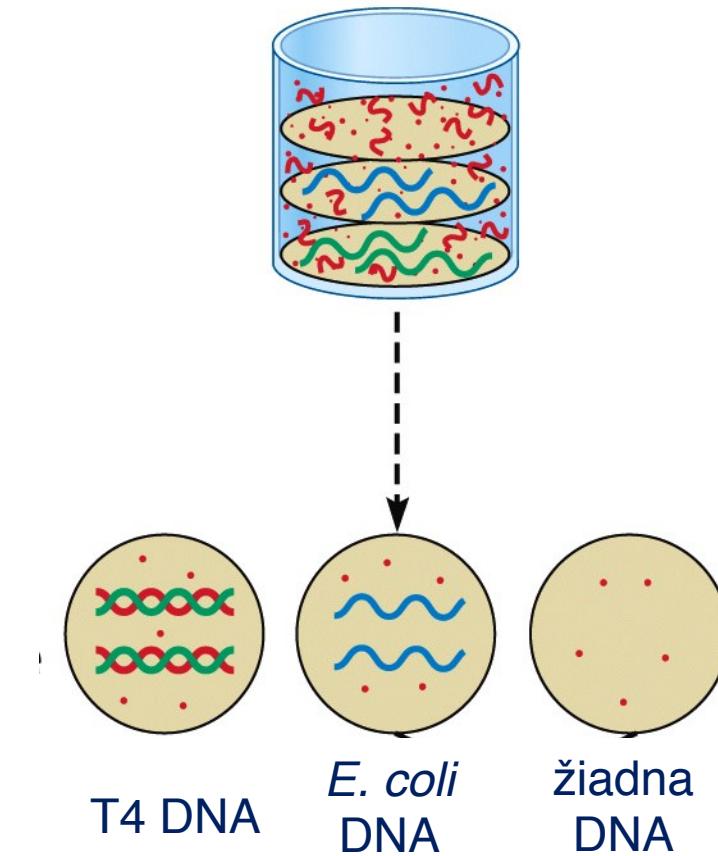
Nitrocelulózová (NC)  
membrána obsahujúca

Obmytie NC  
membrán  
izolovanou RNA

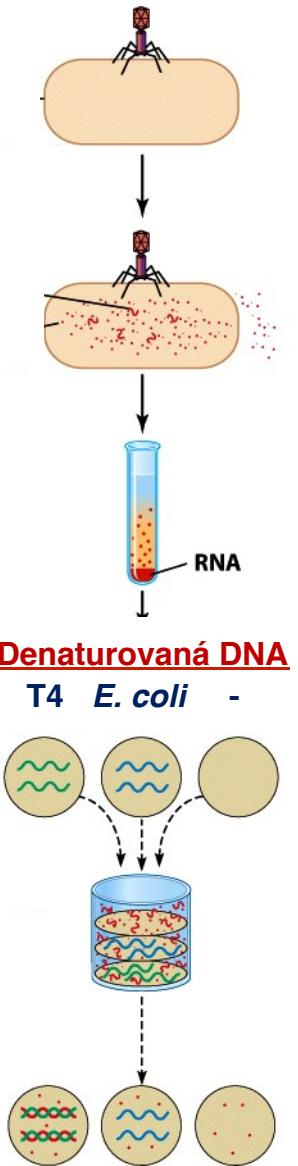


# Experimentálny dôkaz existencie nestabilnej mediátorovej RNA (mRNA)

## 6. Kvantifikácia RNA hybridizovanej k DNA

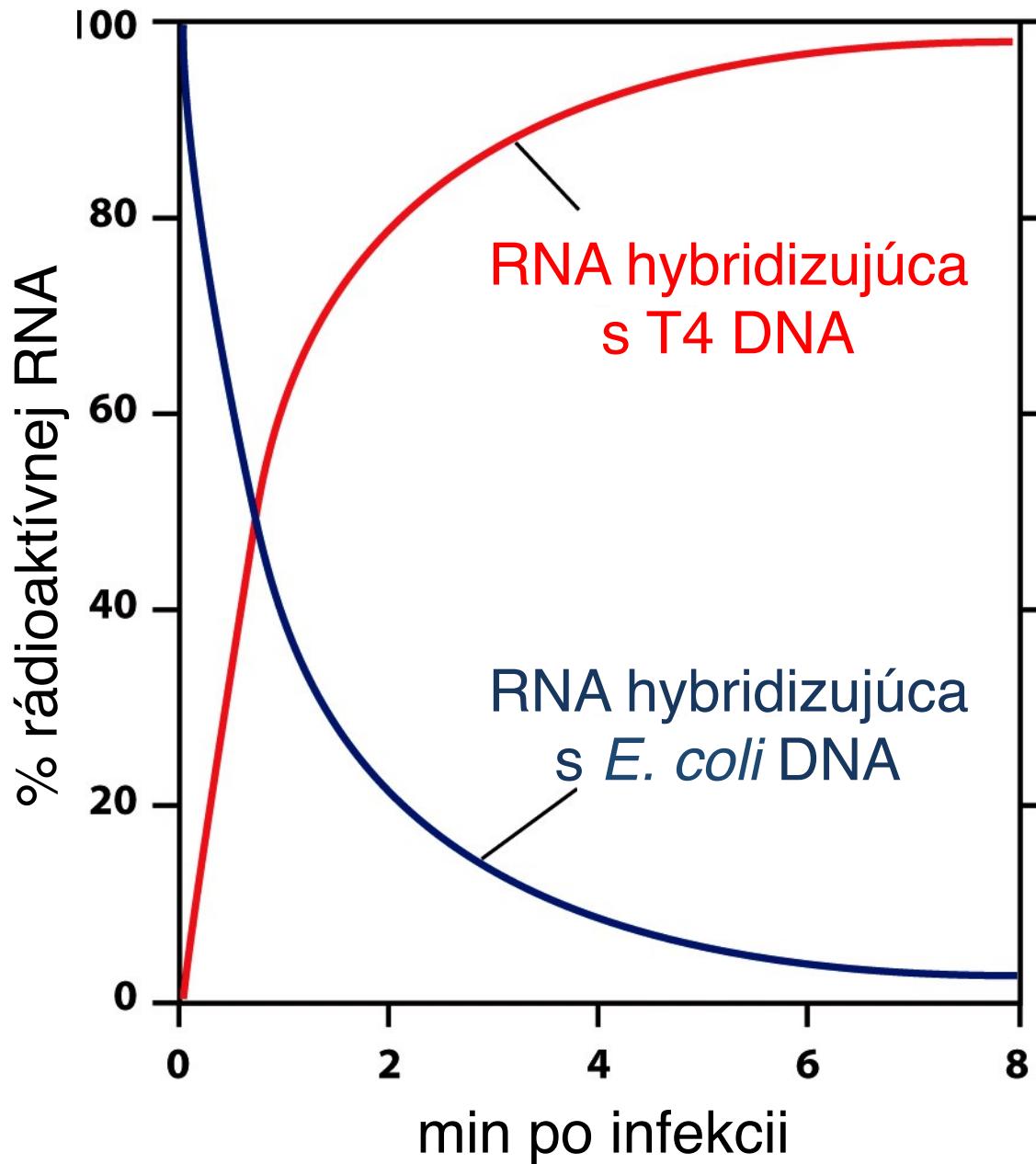


# Rekapitulácia experimentu:



Experiment F. Jacoba, S. Brennera a M. Meselsona (1960)

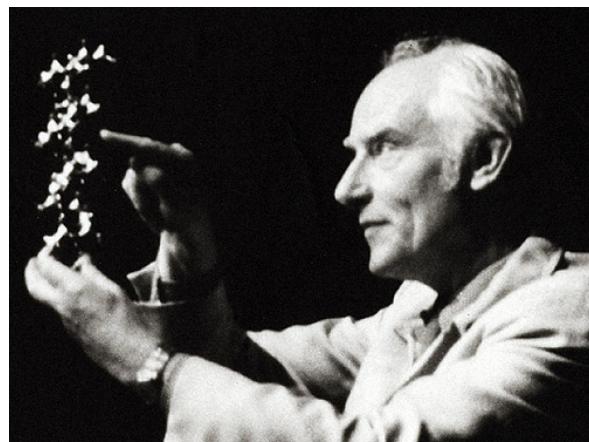
# Výsledok experimentu:



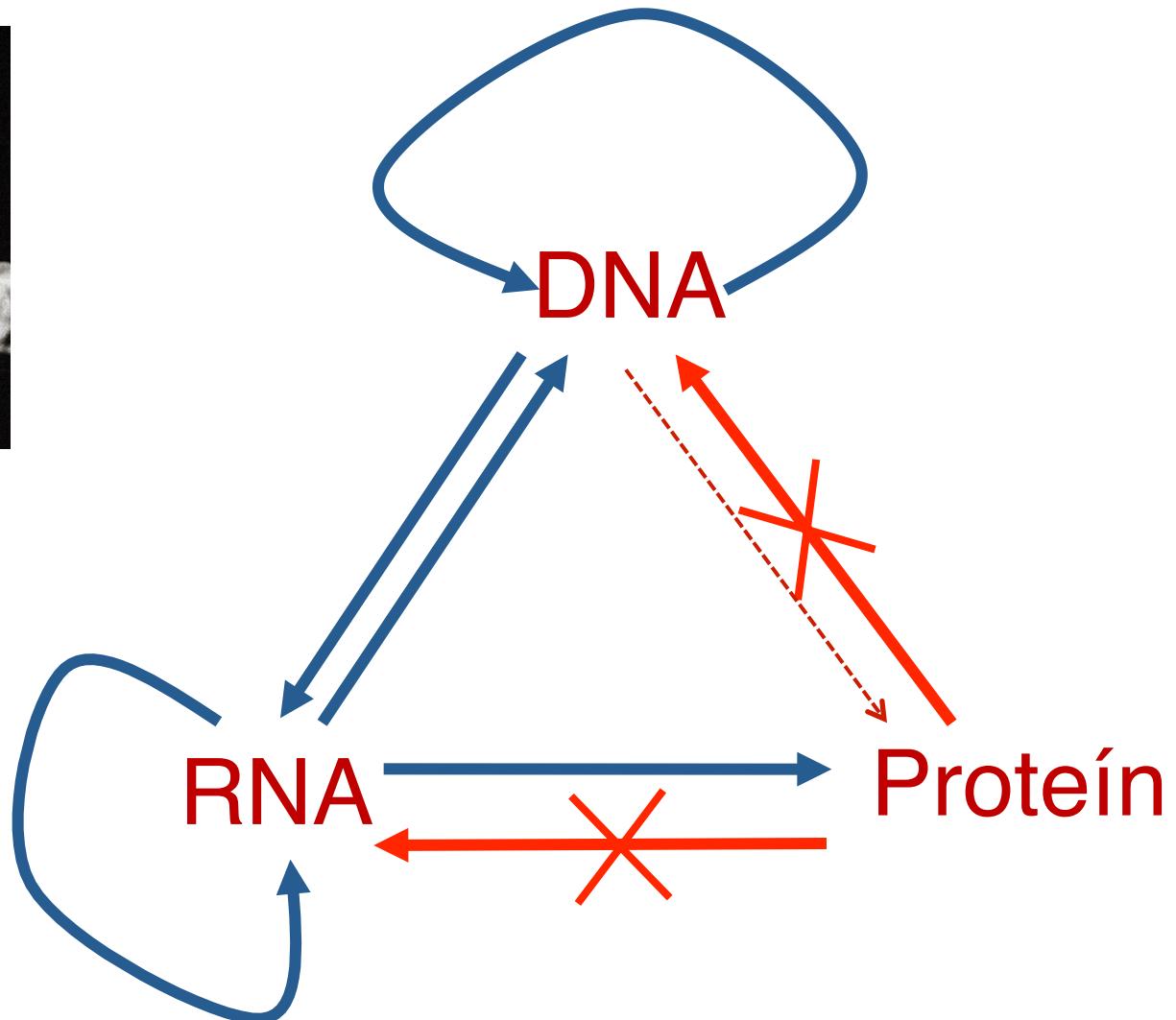
## ZÁVER 2:

Mediátorom medzi DNA (nesúcou gény) a ribozómami (továrne na výrobu proteínov) je *messengerová RNA* (mRNA)

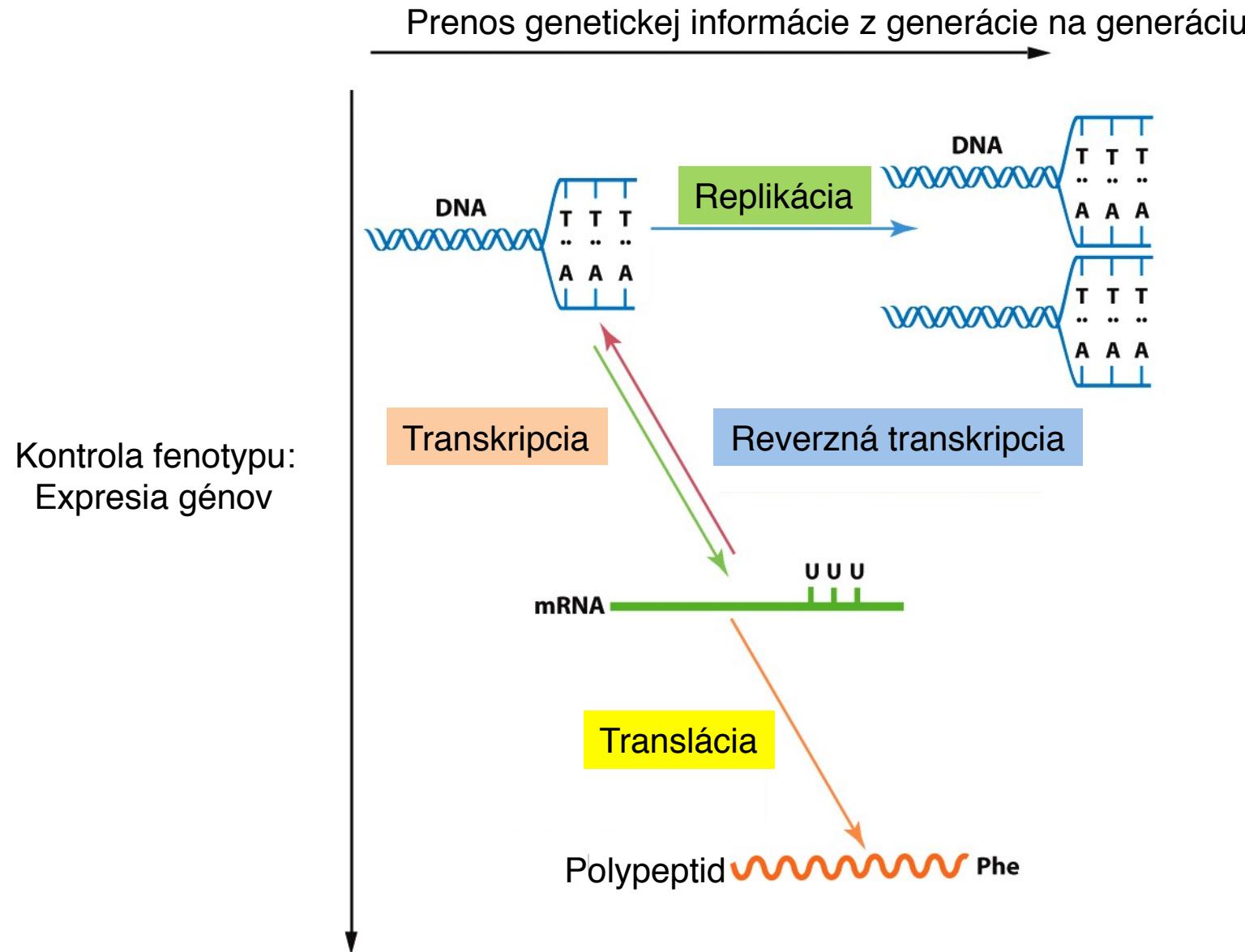
# Centrálna dogma molekulárnej biológie (1956)



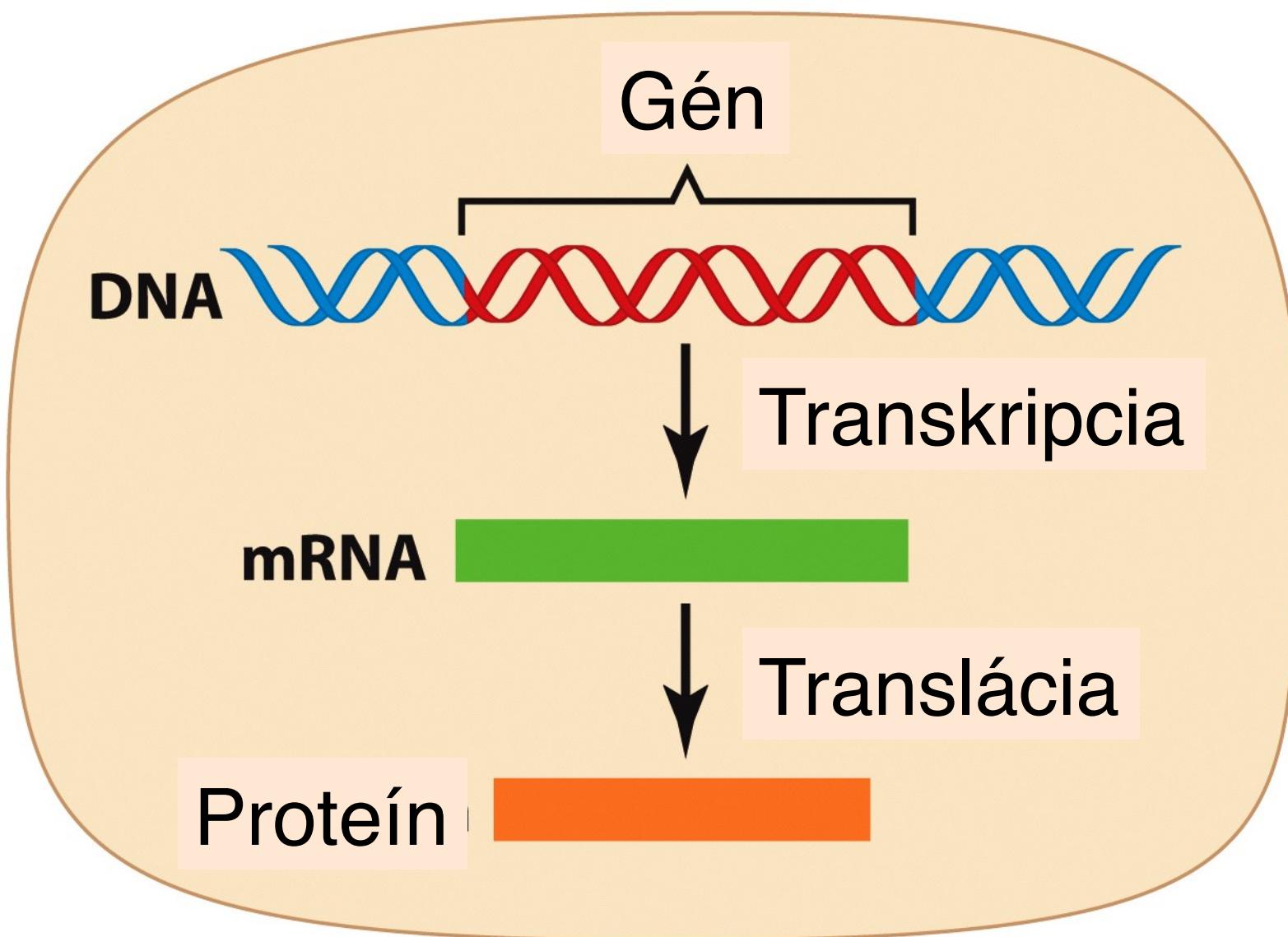
Francis Crick  
(1916-2004)



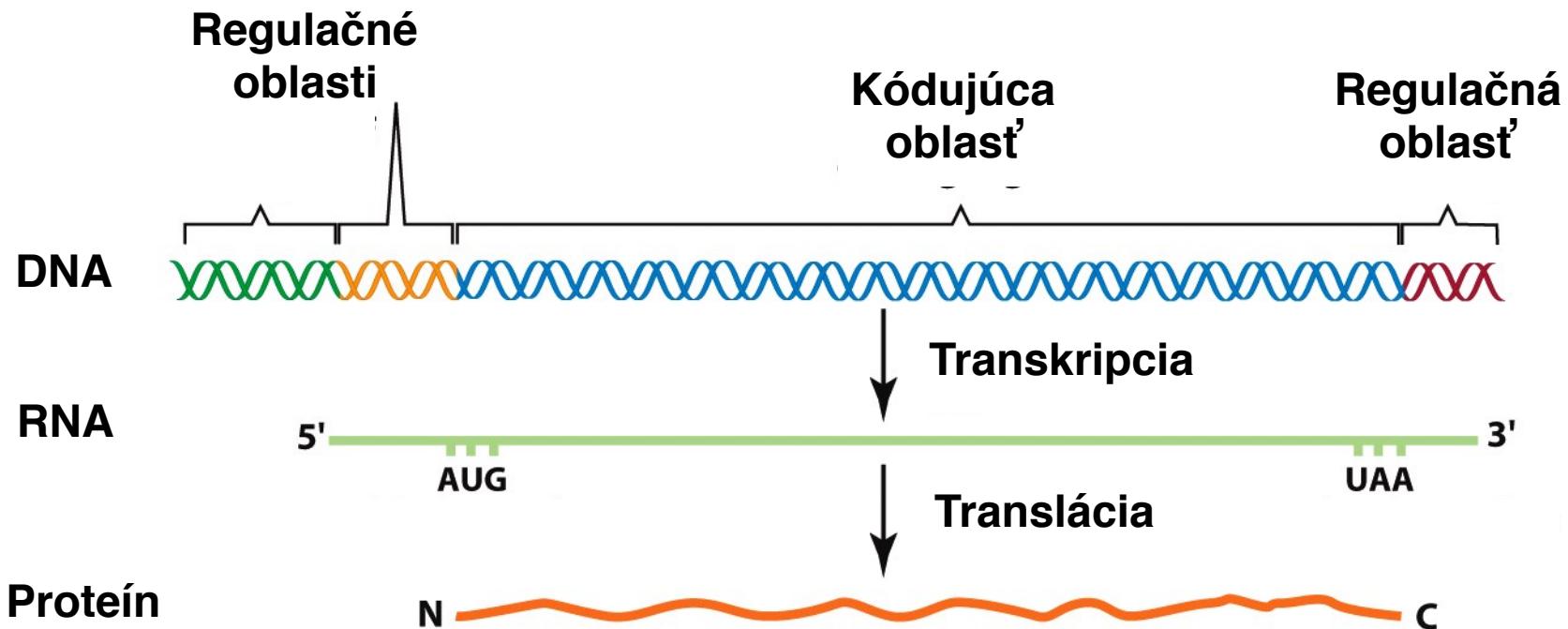
# Centrálna dogma molekulárnej biológie



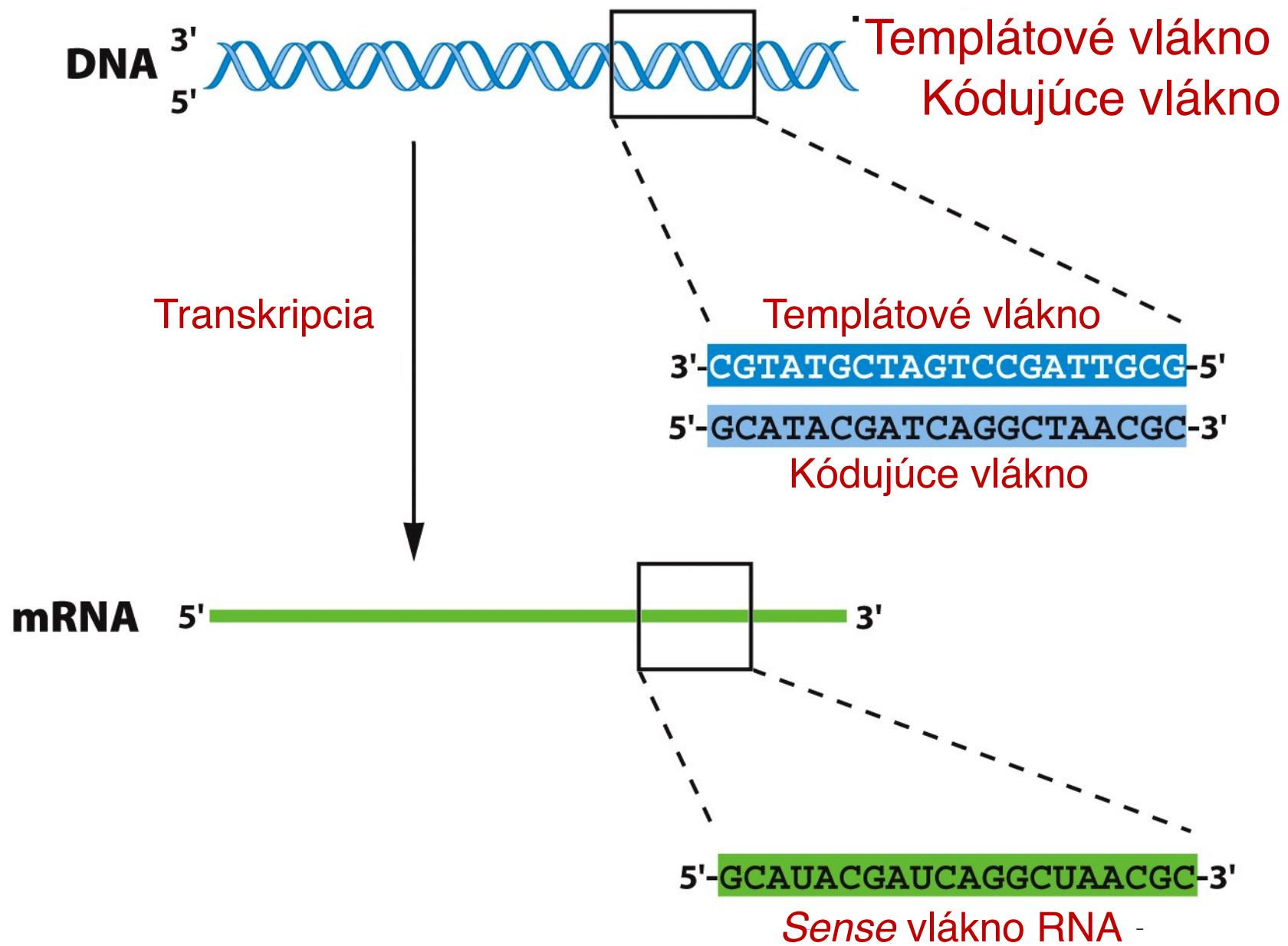
# Základná schéma expresie génov u prokaryotov



# Typický prokaryotický gén

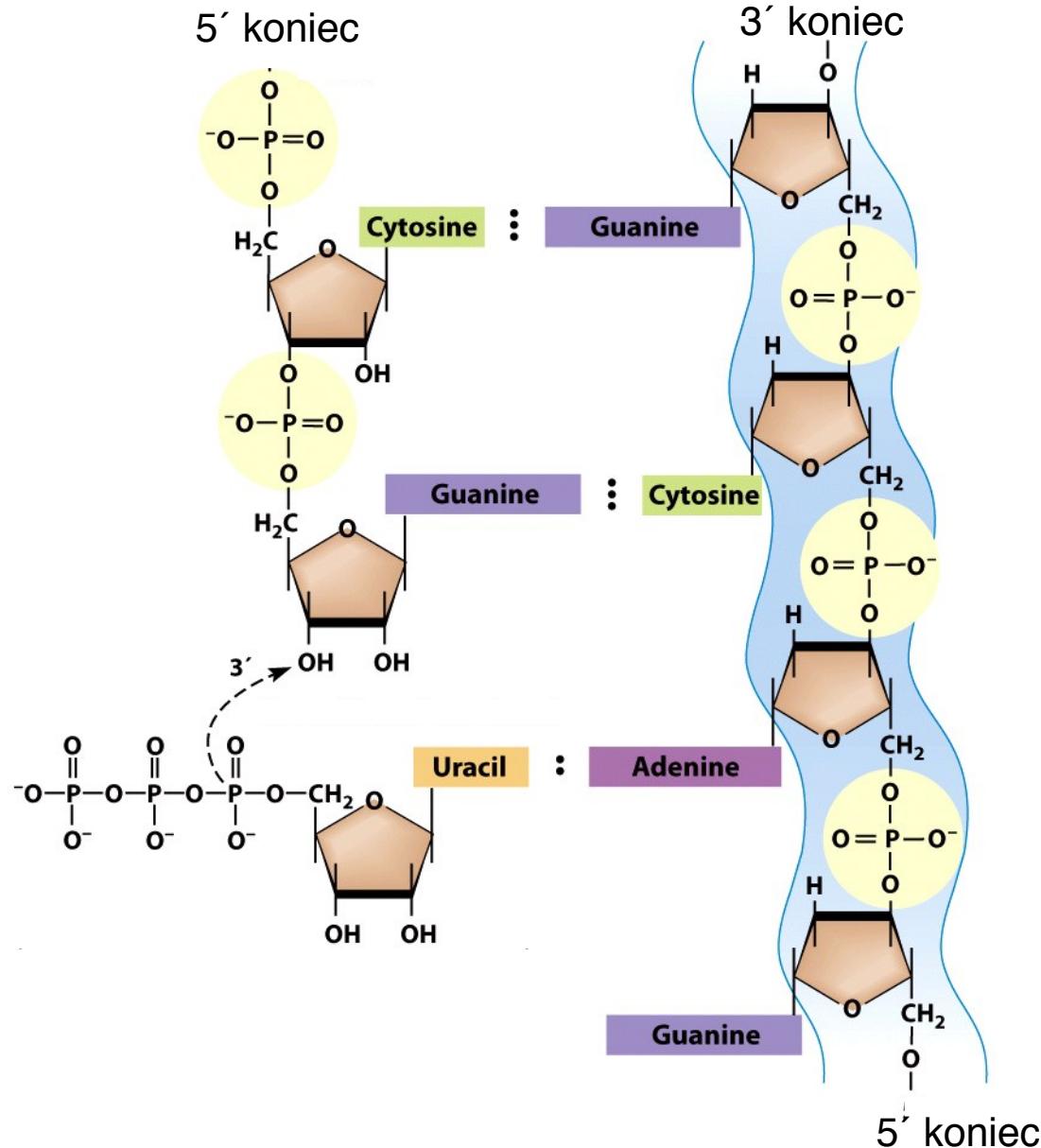


Pre syntézu príslušnej RNA je využívané iba 1 vlákno DNA

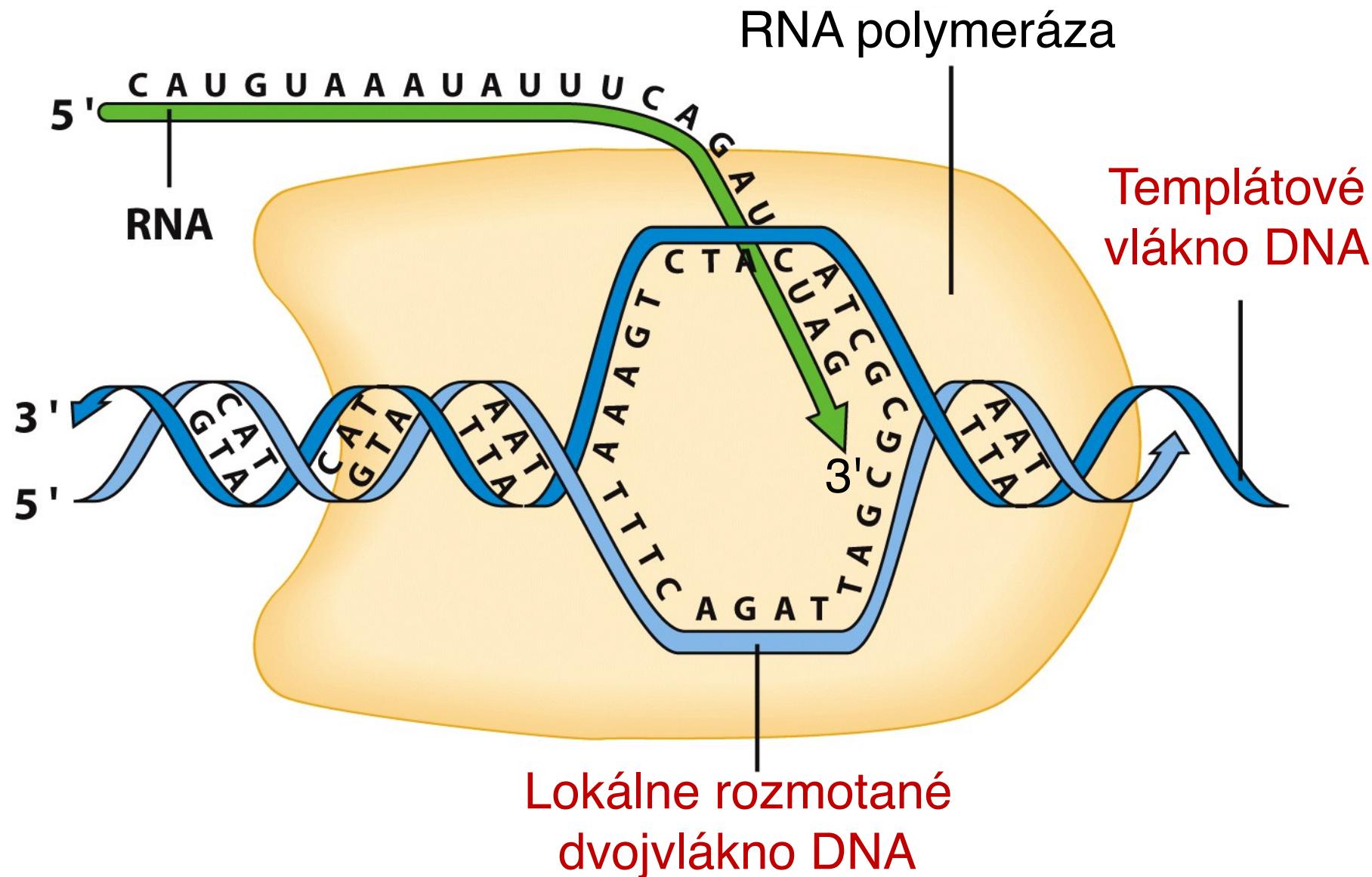


# Elongácia RNA je katalyzovaná RNA polymerázou

Templátové vlákno DNA



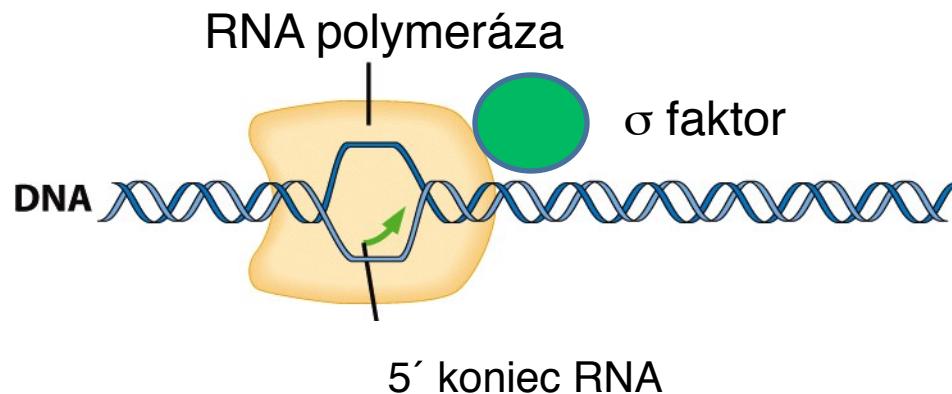
Elongácia RNA je katalyzovaná RNA polymerázou



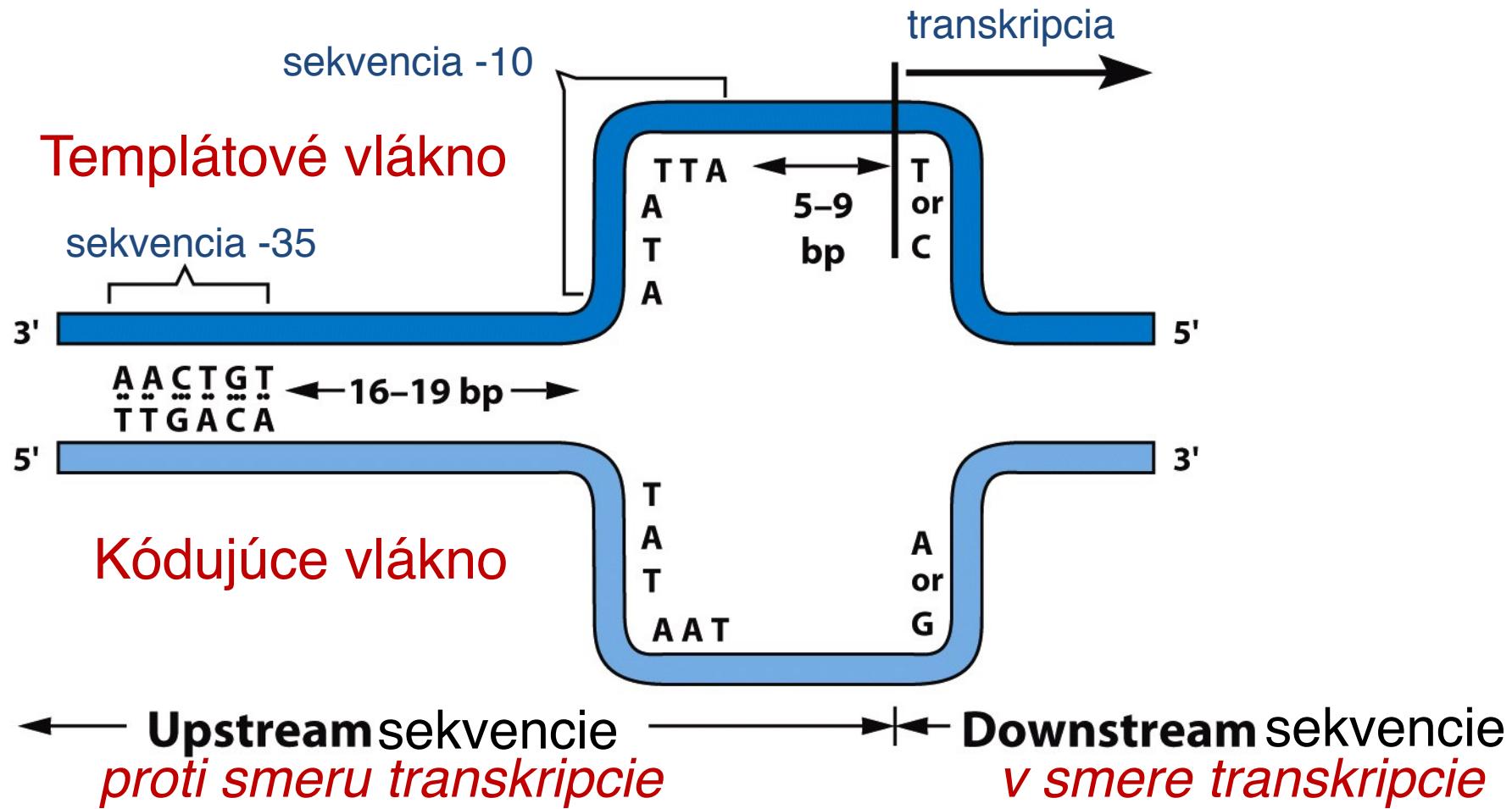
# Tri fázy transkripcie u prokaryotov

→  
*Smer pohybu RNA polymerázy*

## 1. INICIÁCIA



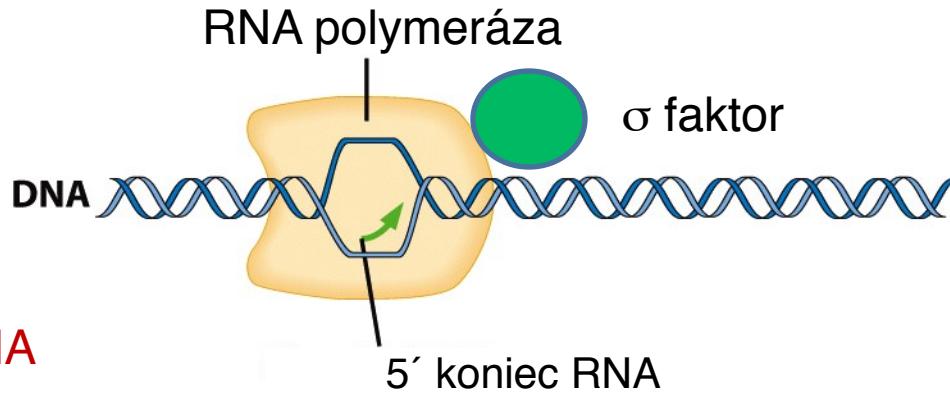
# Štruktúra typického prokaryotického promóторa



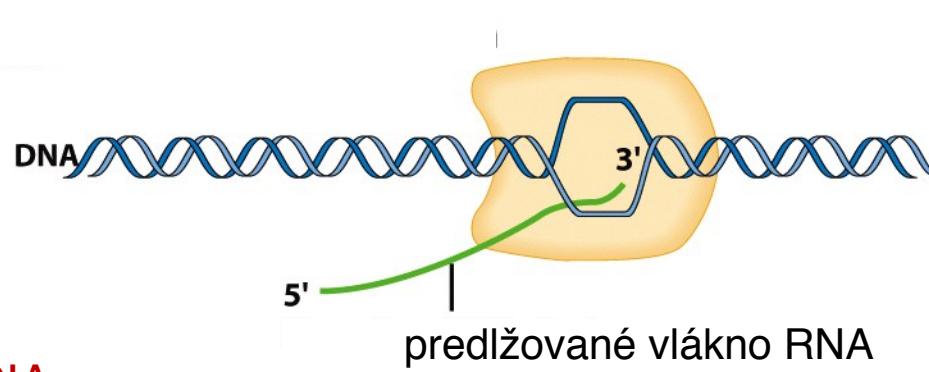
# Tri fázy transkripcie u prokaryotov

Smer pohybu RNA polymerázy →

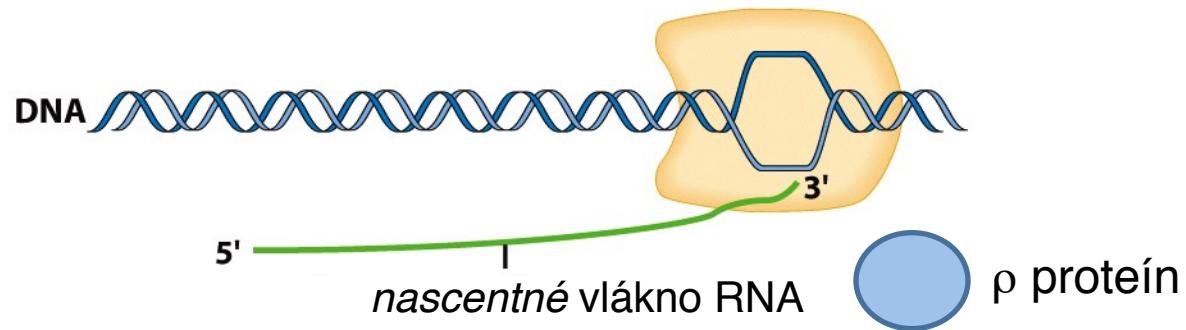
## 1. INICIÁCIA



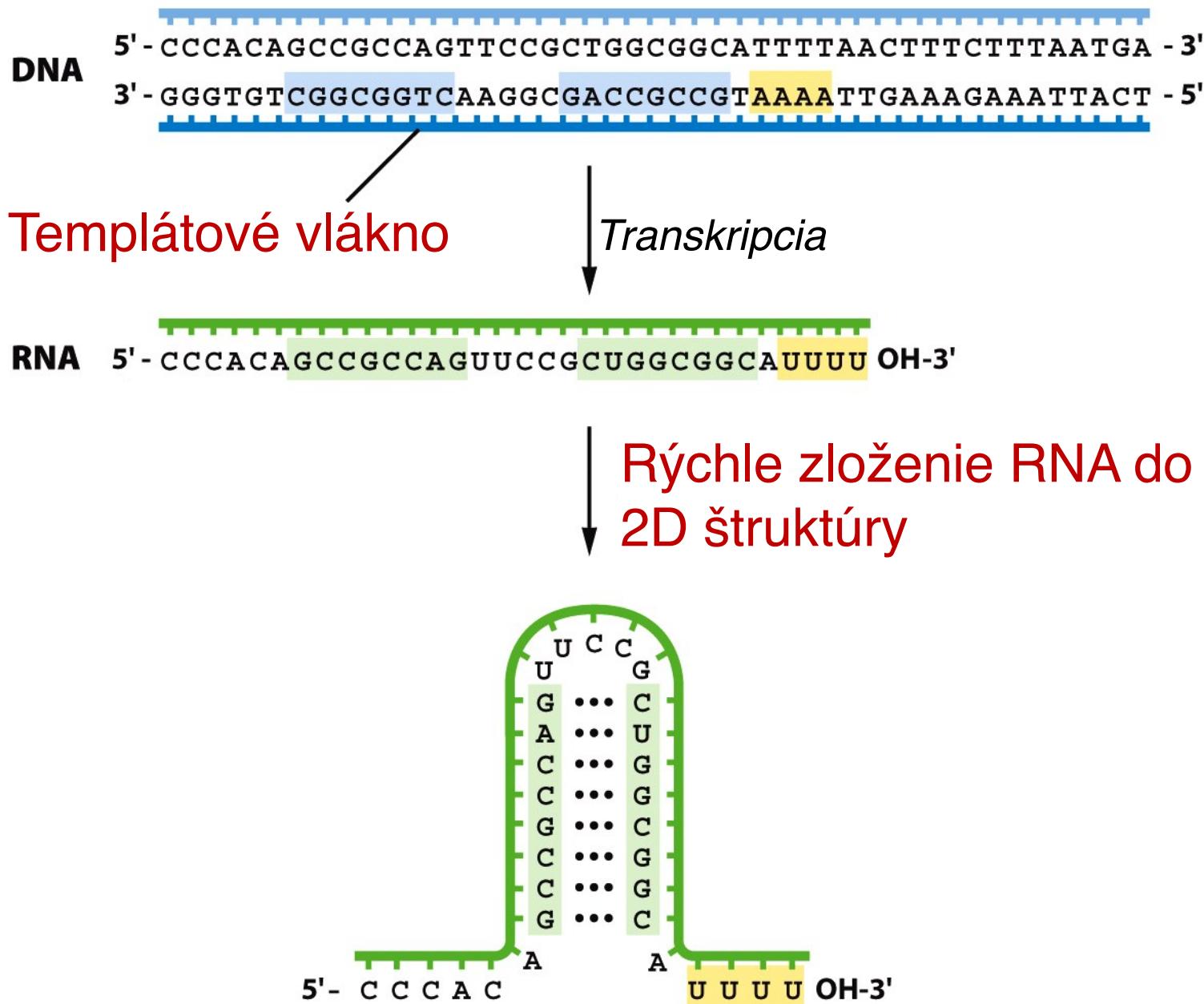
## 2. ELONGÁCIA



## 3. TERMINÁCIA

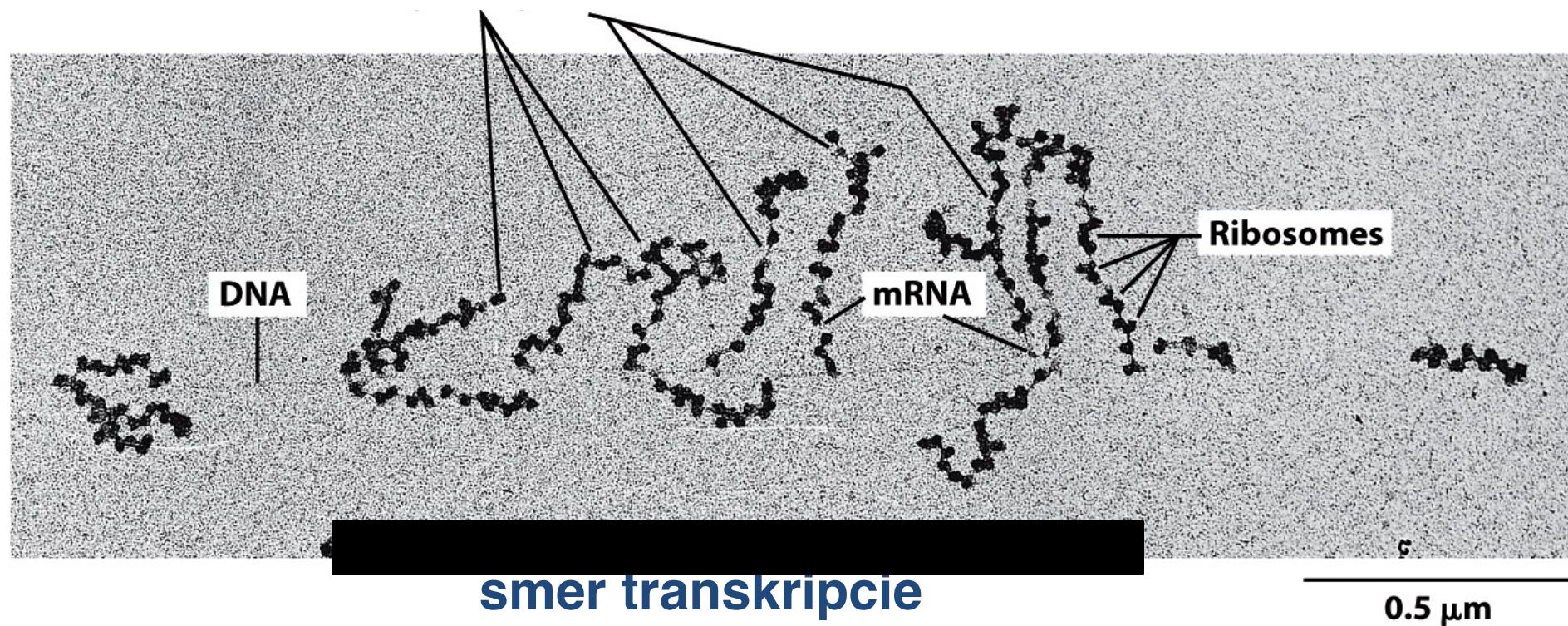


# Terminácia transkripcie môže prebiehať aj bez rho proteínu



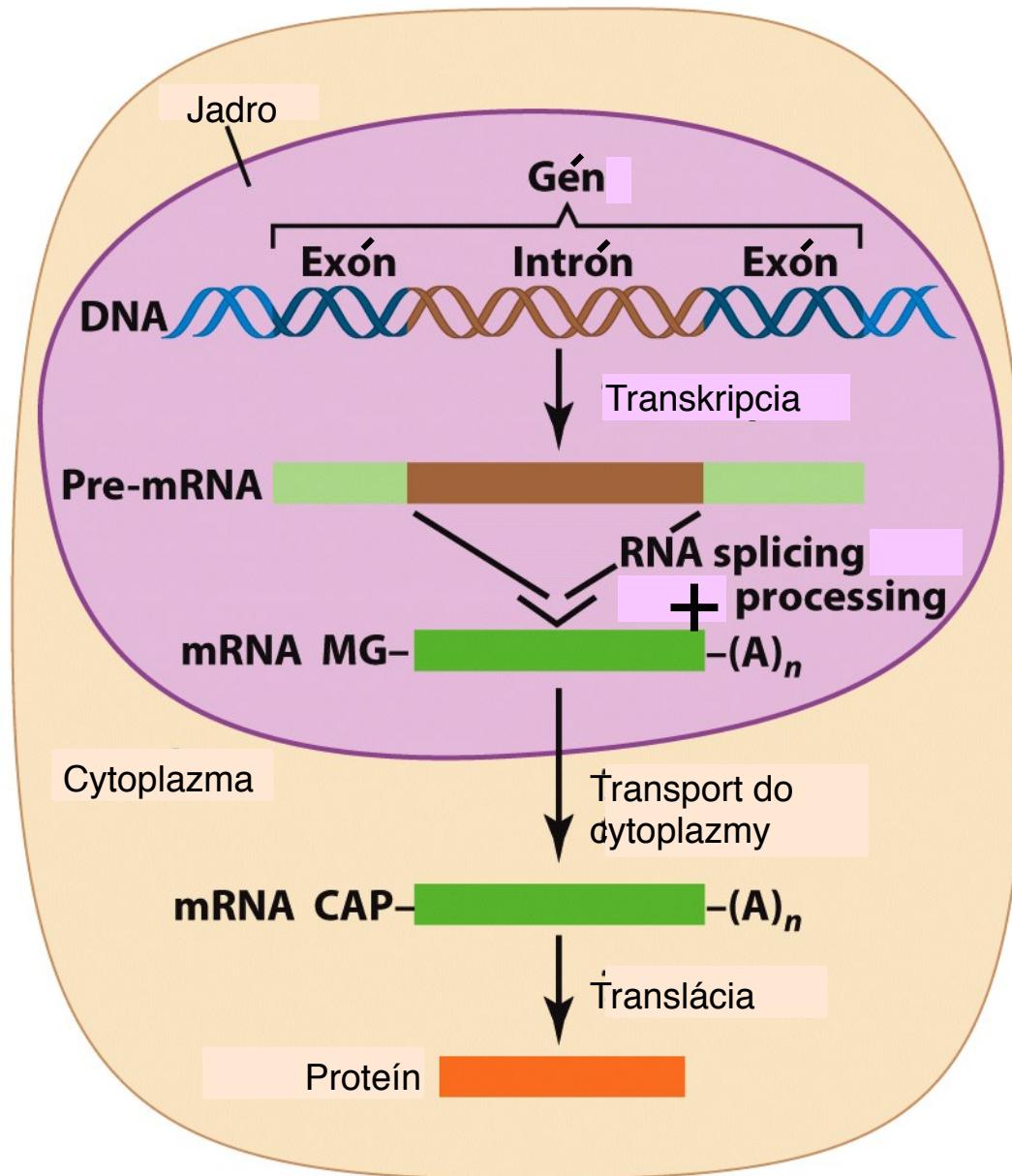
# Transkripcia a translácia sú prebiehajú v *E. coli* simultánne

Transkripty, ktoré súčasne podliehajú translácii na ribozónoch



From O.L. Miller, Jr., B.A. Hamkalo, and C.A. Thomas, Jr., *Science* 169:392-395, 1970. Copyright © 1970 by the American Association for the Advancement of Science.  
Original micrograph courtesy O. L. Miller, Jr.

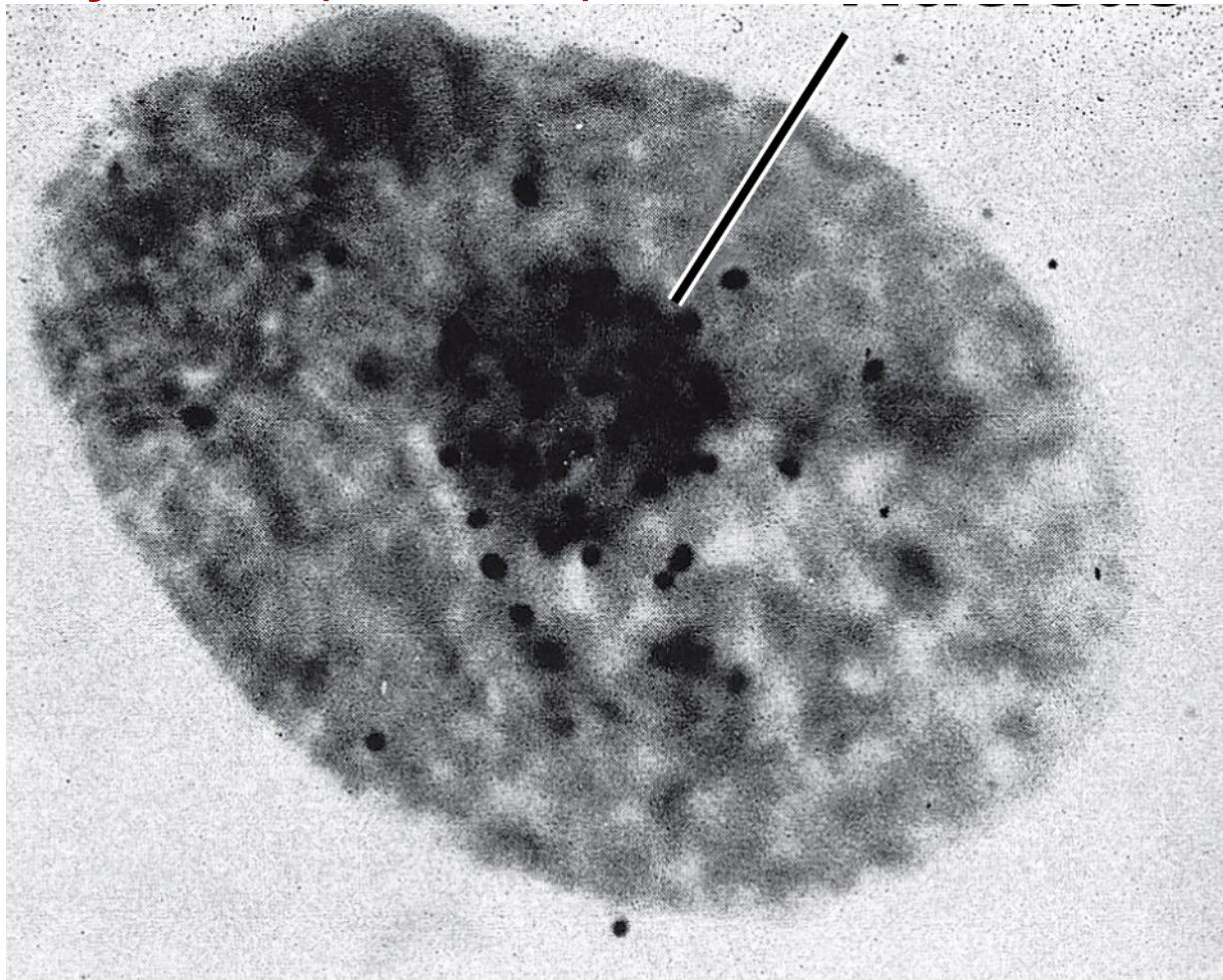
# Základná schéma expresie génov u eukaryotov



Syntéza RNA prebieha v jadre

+<sup>3</sup>H-cytidín (15 min)

JADRO

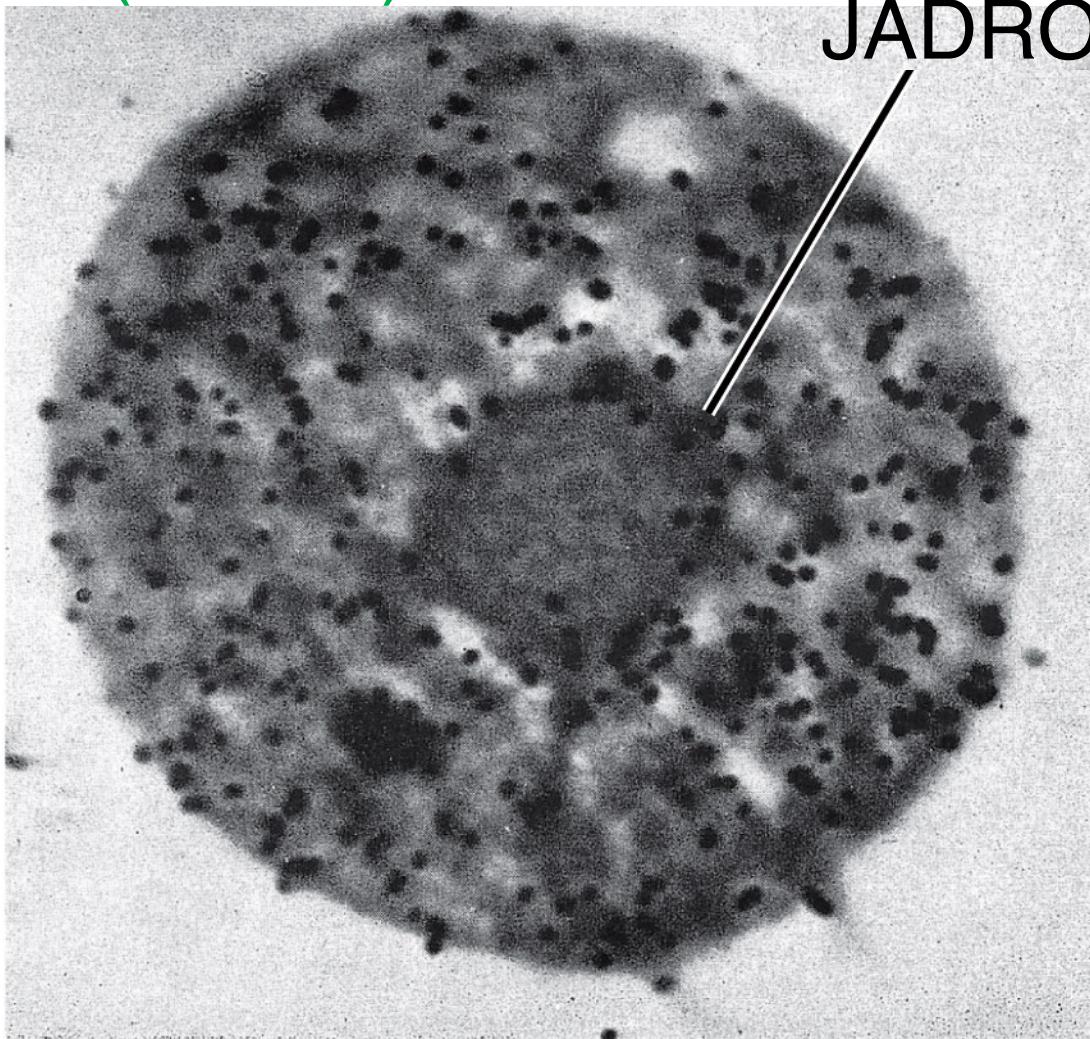


10 μm

Po syntéze je RNA exportovaná z jadra

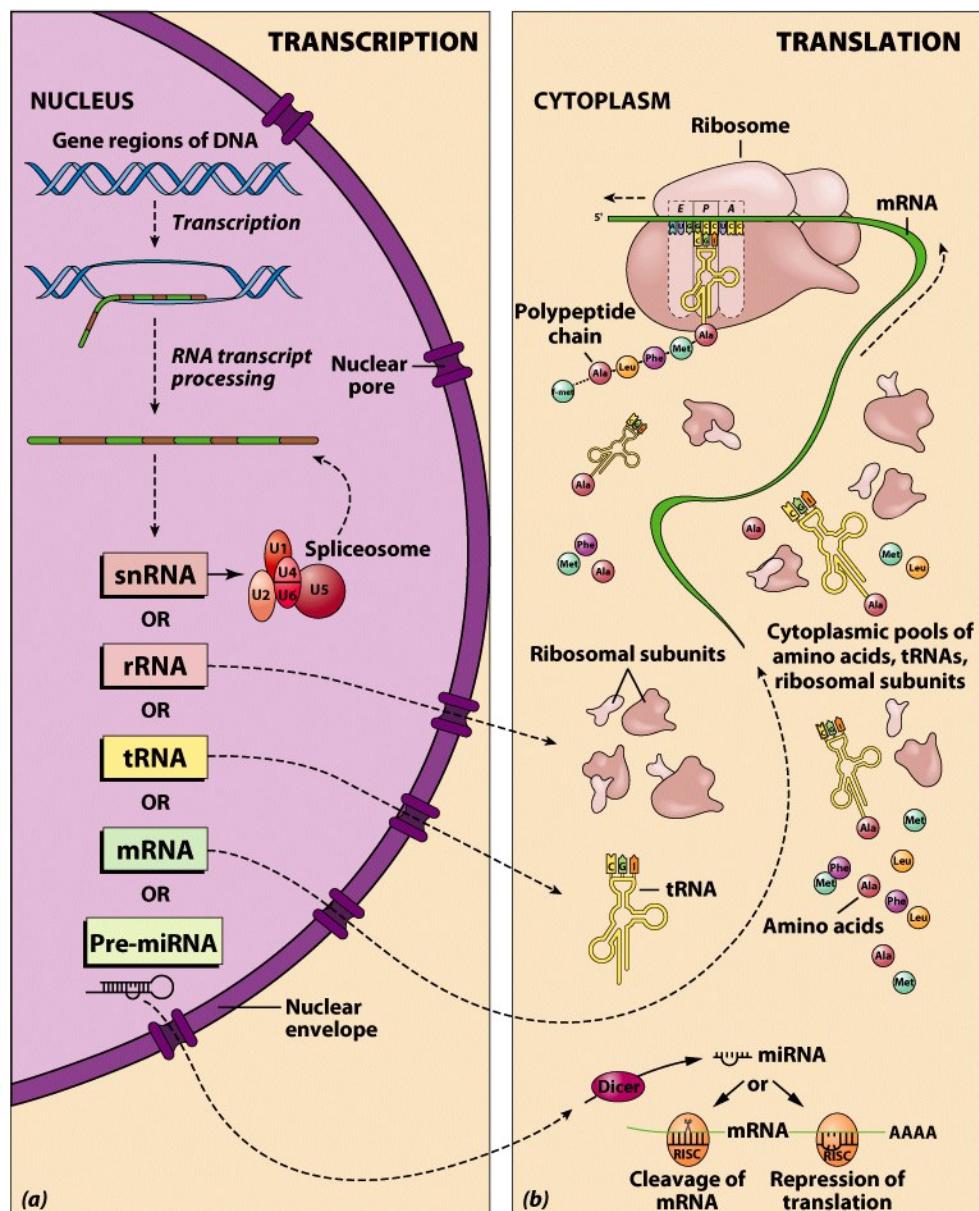
+<sup>3</sup>H-cytidín (15 min)

-<sup>3</sup>H-cytidín (88 min)



10  $\mu\text{m}$

# Transkripciou DNA vzniká niekol'ko typov RNA s rôznou funkciou



**mRNA:** sekvencia nukleotidov v mRNA je prekladaná do sekvencie aminokyselín v proteínoch

**rRNA:** základná zložka ribozómov, na ktorých prebieha translácia

**tRNA:** prenáša aktivované aminokyseliny na rastúci polypeptidový reťazec

**snRNA:** základné zložky spliceozómu podielajúceho sa na zostrihu intrónov

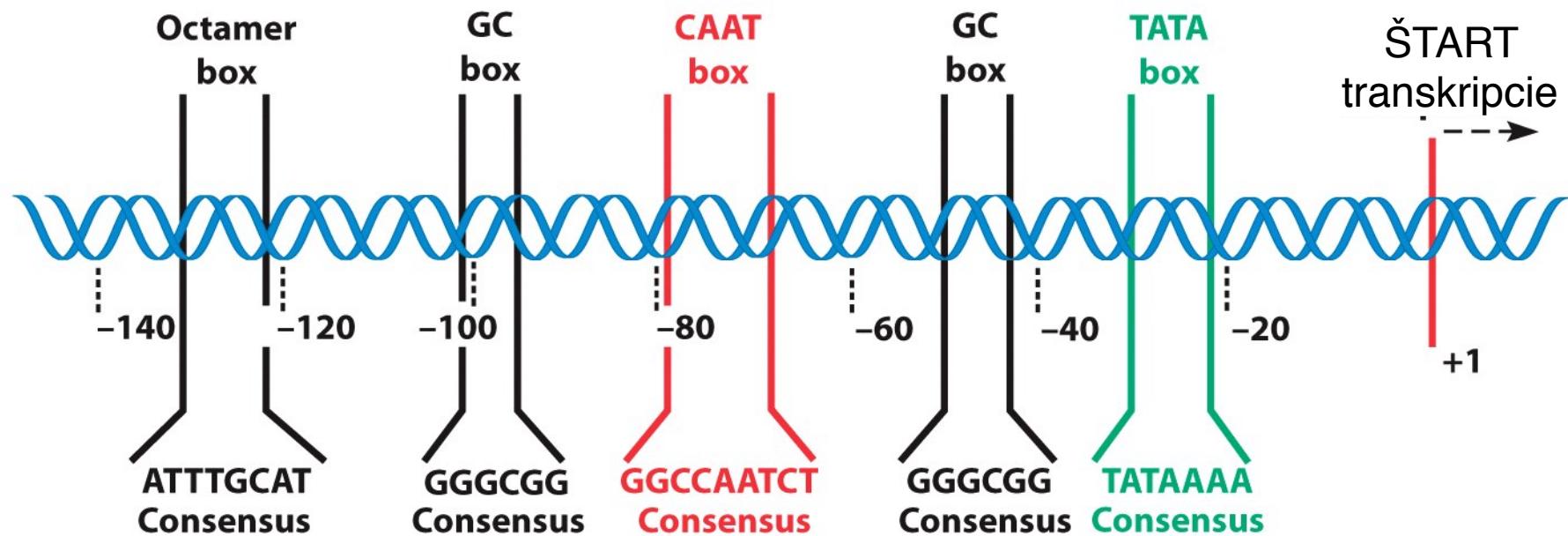
**miRNA, shRNA, siRNA, ...:** malé RNA podielajúce sa na regulácii génovej expresie

## MALÉ RNA

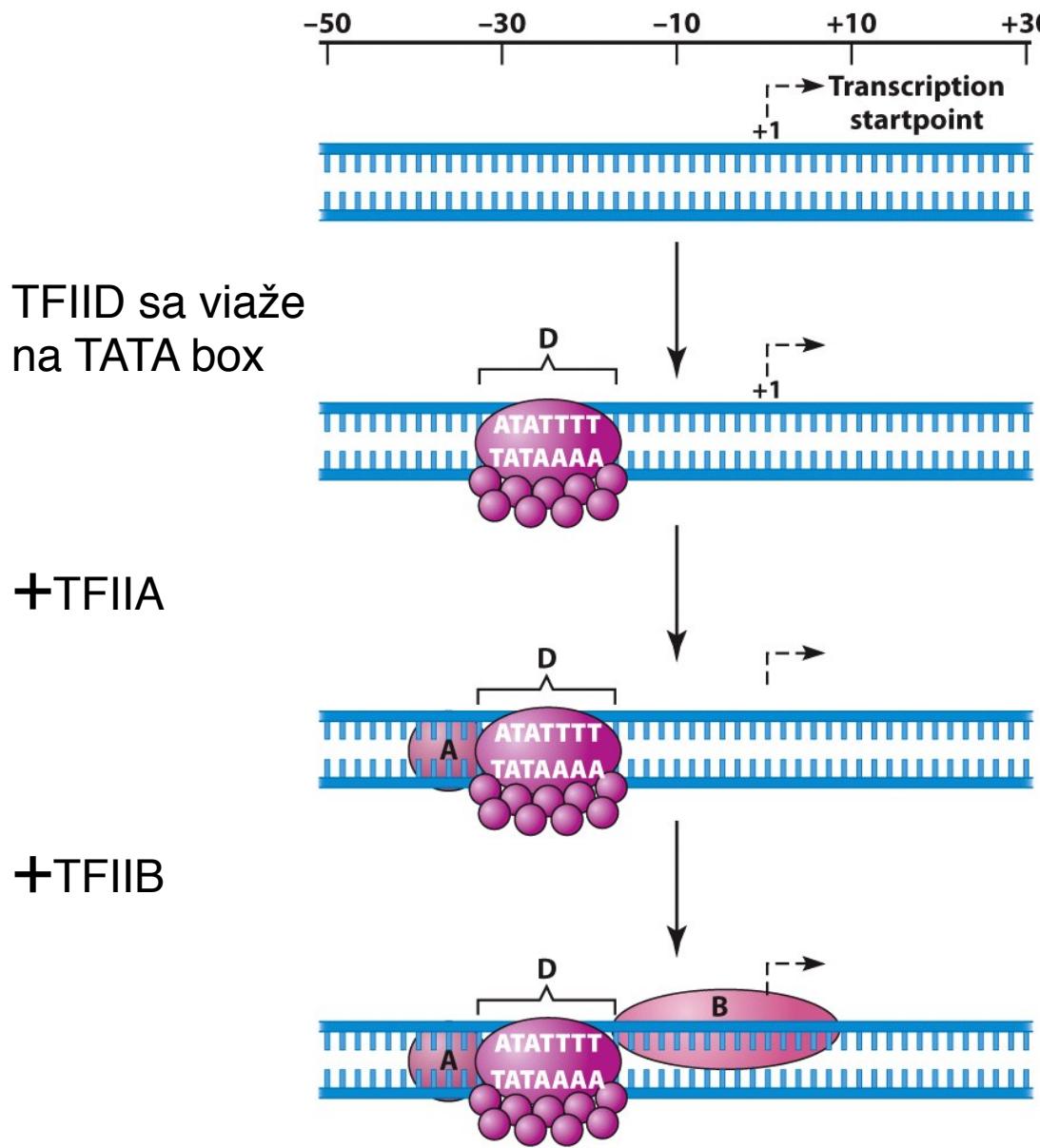
Na rozdiel od prokaryotov (1 RNA polymeráza)  
je transkripcia eukaryotov realizovaná 3 RNA polymerázami

Enzým	Lokalizácia	Produkty	Citlivosť k $\alpha$ -amanitínu
RNA polymeráza I	Jadierko	rRNA (okrem 5S)	-
RNA polymeráza II	Jadro	pre-mRNA	+++
RNA polymeráza III	Jadro	tRNA, 5S rRNA, malé jadrová RNA	+

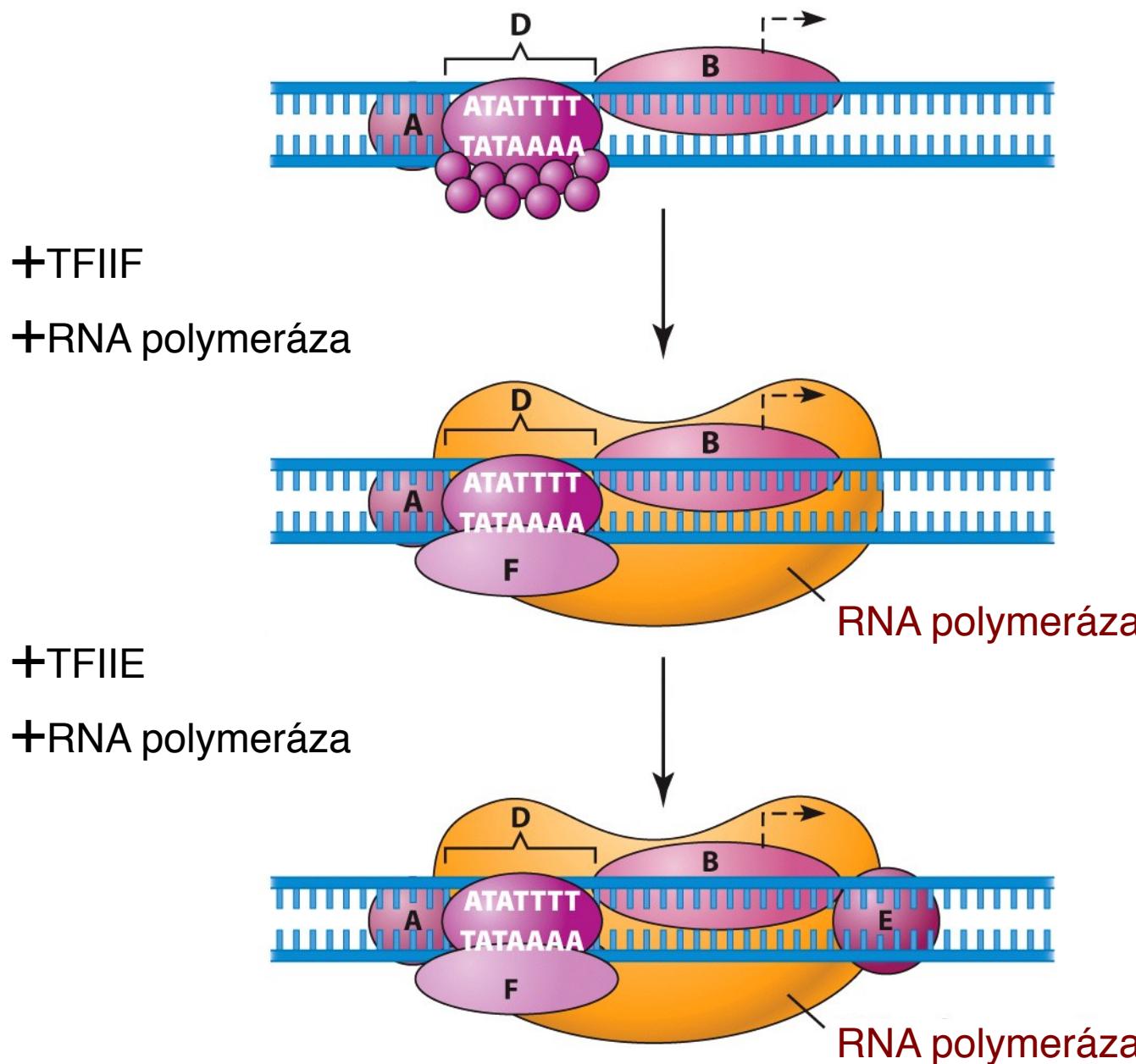
# Štruktúra promótora rozpoznávaného RNA polymerázou II



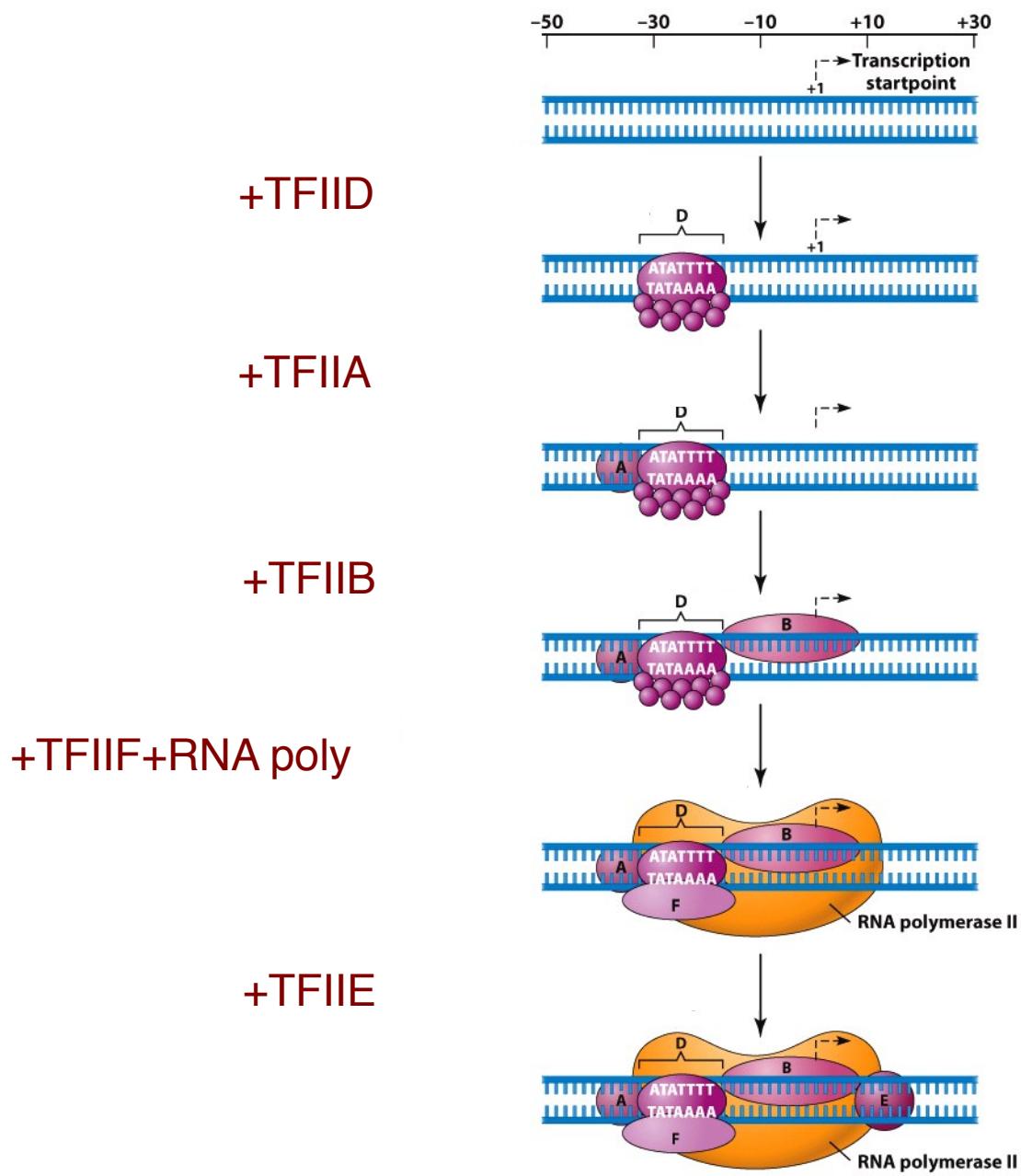
# Iniciácia transkripcie RNA polymerázou II vyžaduje tvorbu bazálneho iniciáčného komplexu



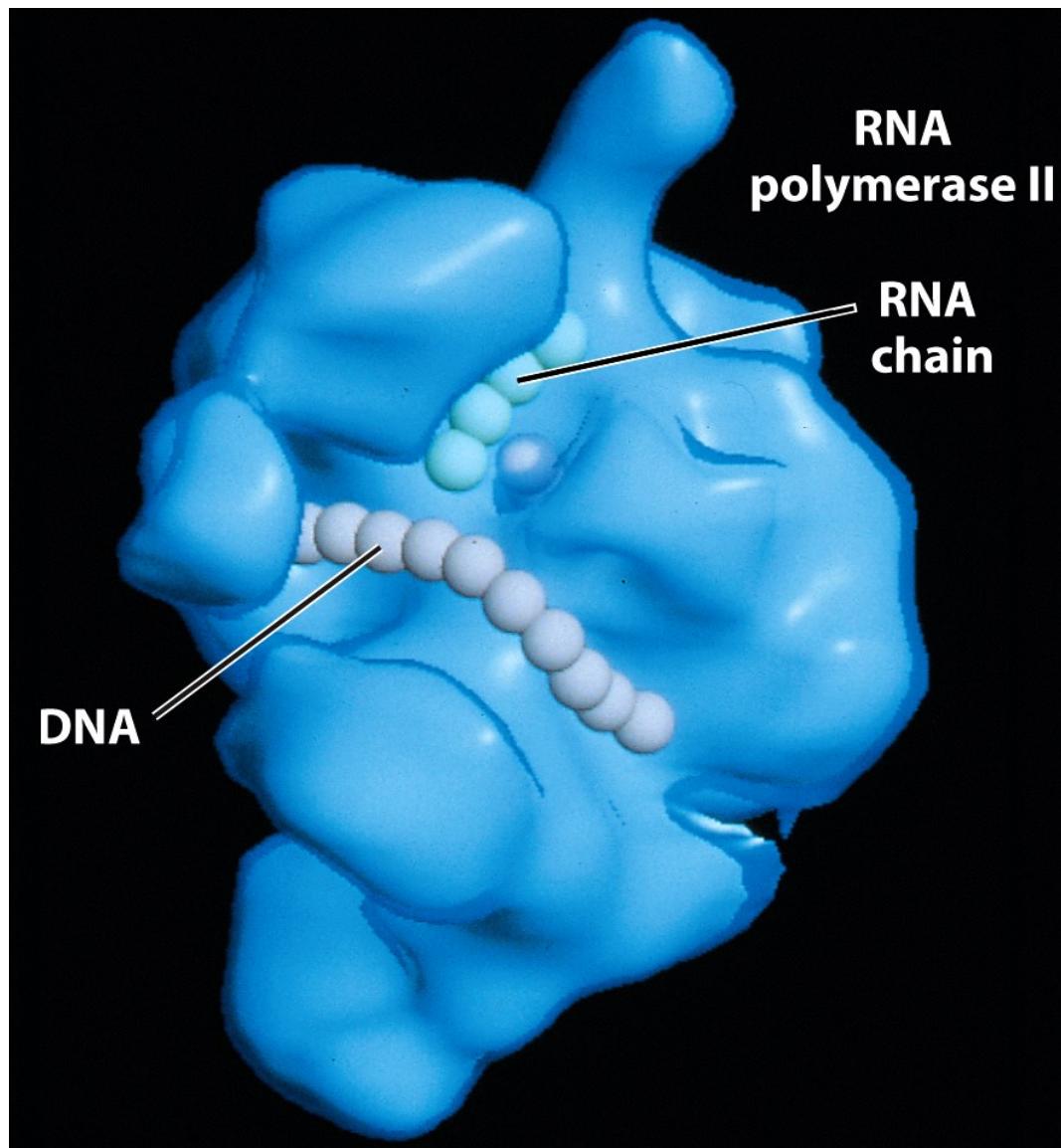
# Iniciácia transkripcie RNA polymerázou II vyžaduje tvorbu bazálneho iniciačného komplexu



# Iniciácia transkripcie RNA polymerázou II: Sumár



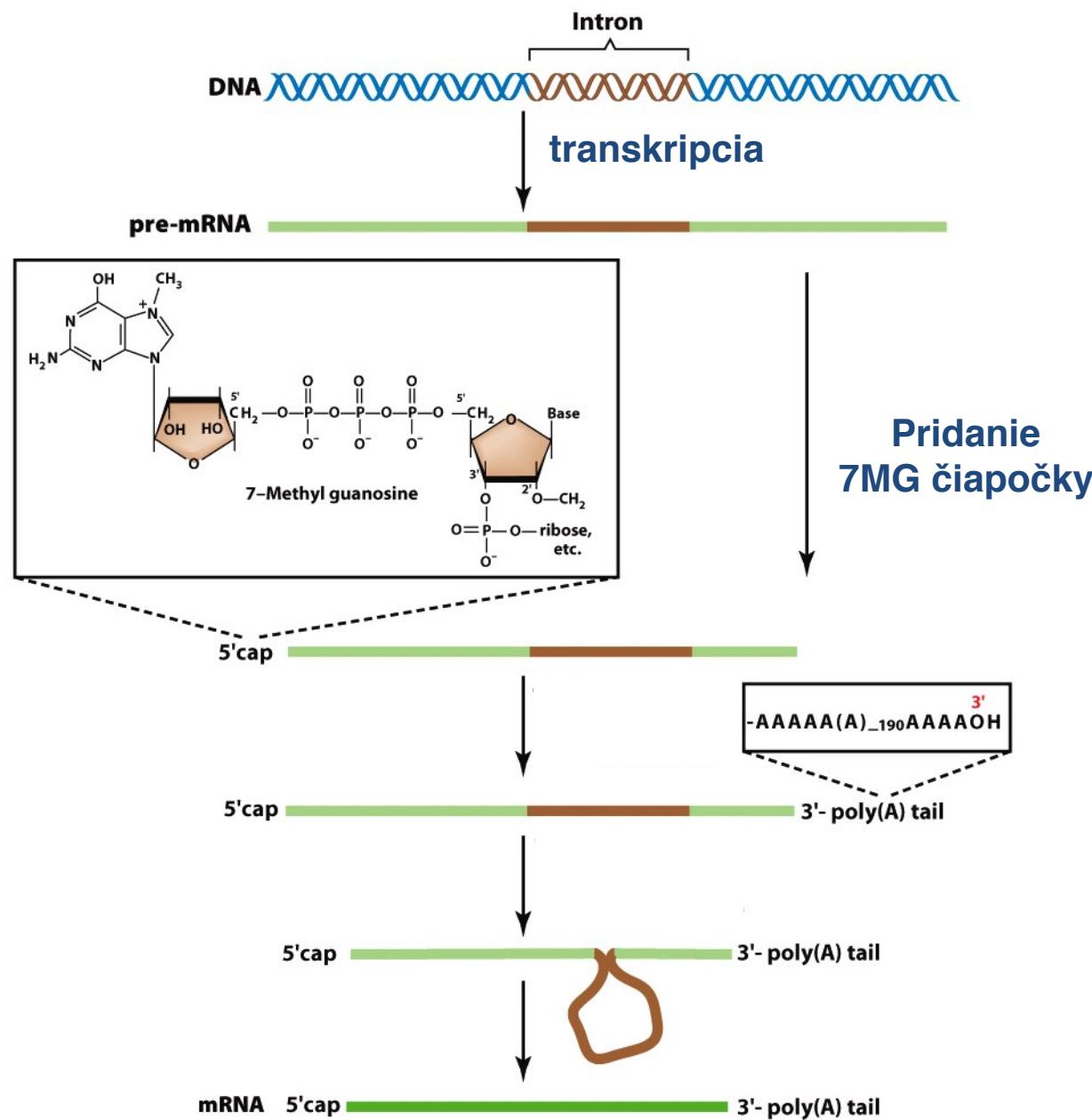
# 3D štruktúra RNA polymerázy II



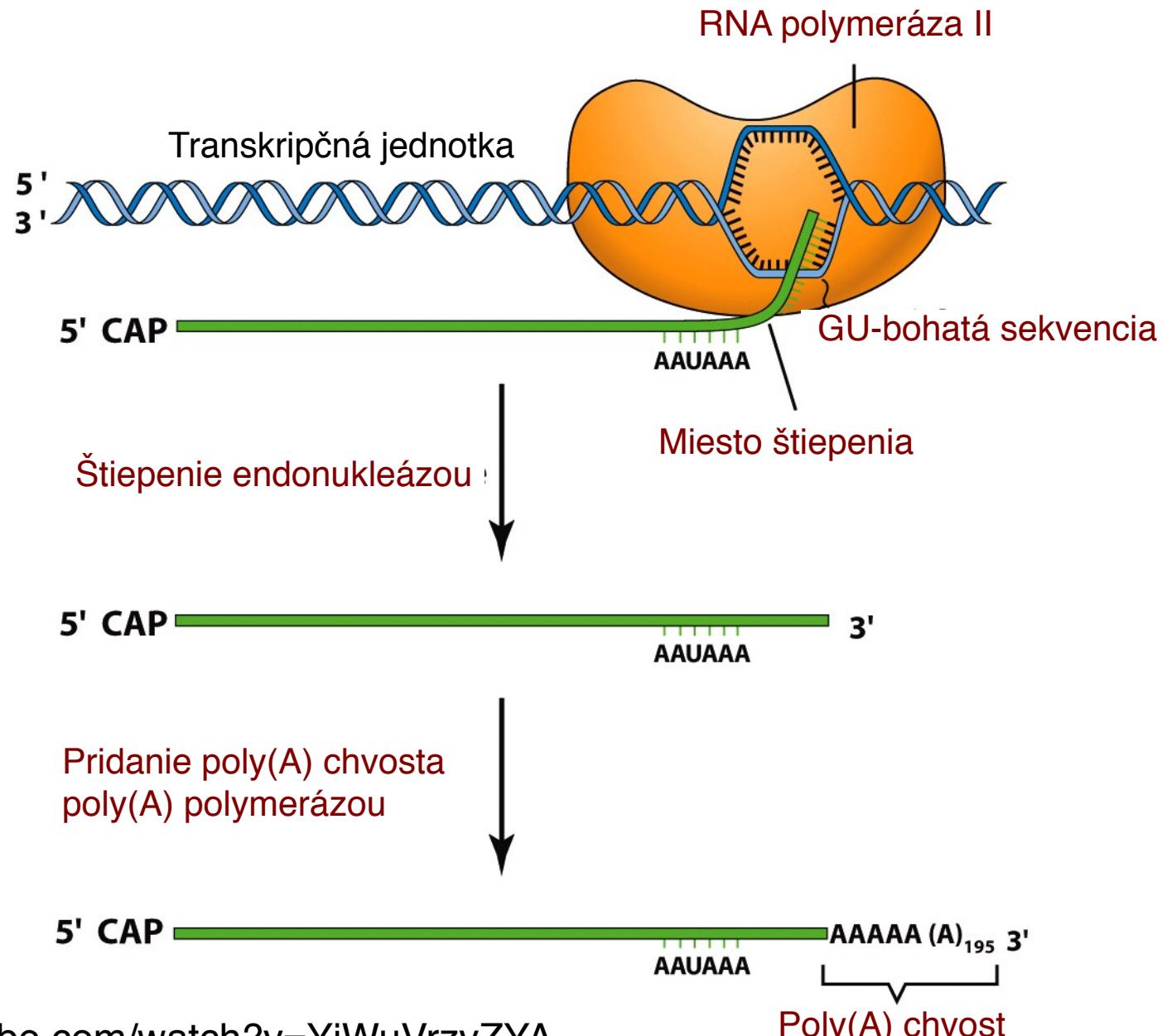
<http://www.youtube.com/watch?v=WsofH466lqk&NR=1>

<http://vcell.ndsu.edu/animations/transcription/movie-flash.htm>

# Post-transkripčné úpravy RNA u eukaryotov



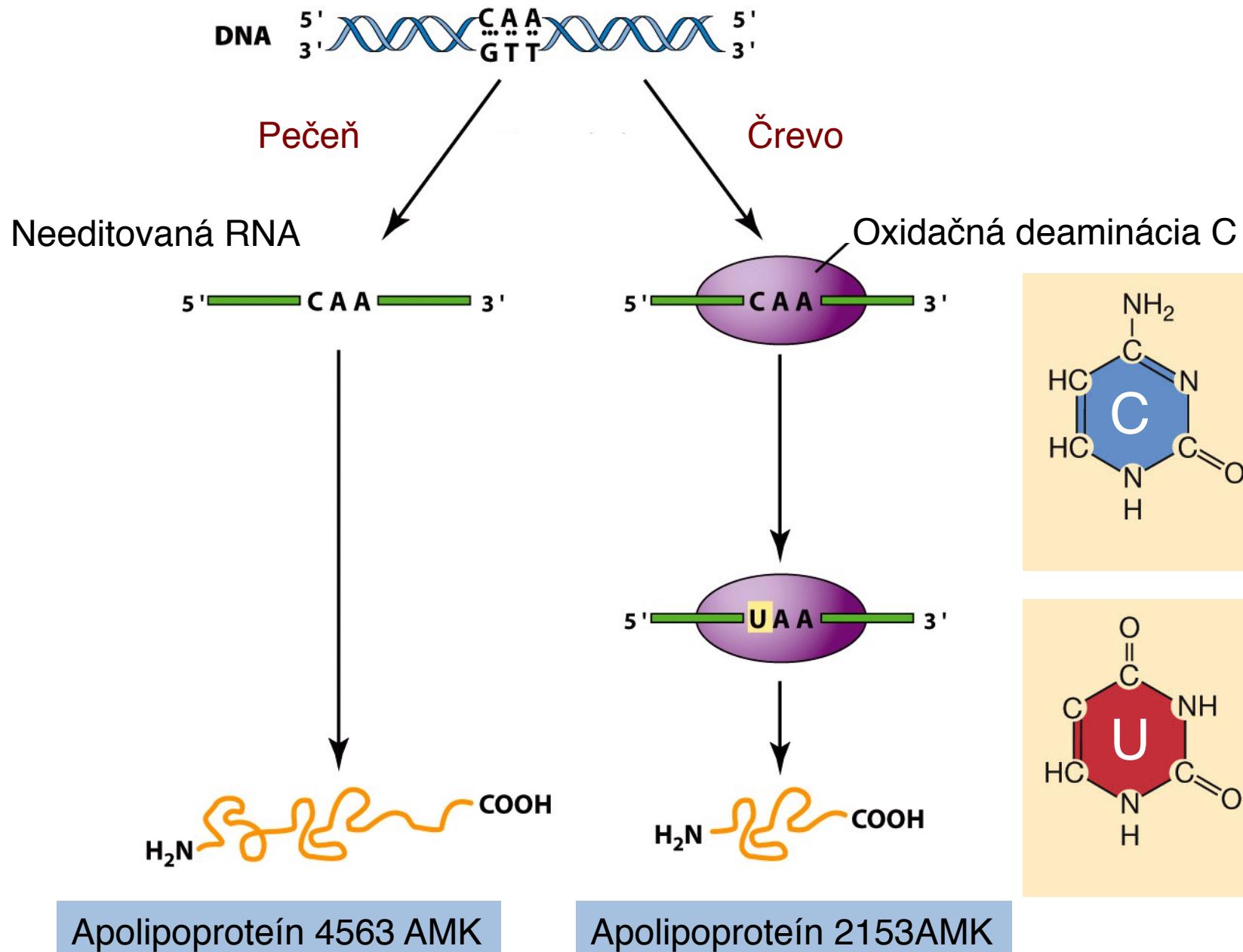
# Na 3' koniec pre-mRNA je pridávaná poly(A) sekvencia



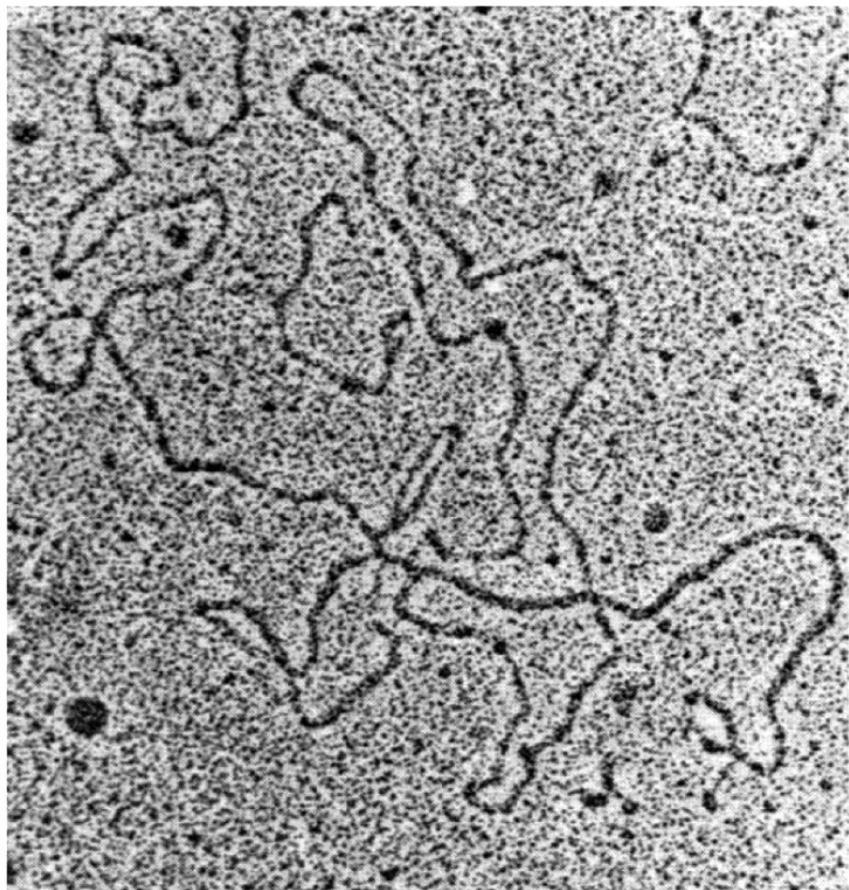
<http://www.youtube.com/watch?v=YjWuVrzvZYA>

<http://vcell.ndsu.edu/animations/mrnaprocessing/movie-flash.l>

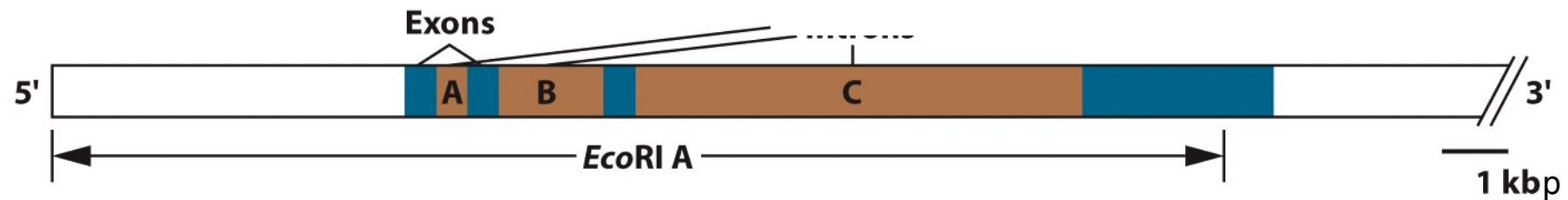
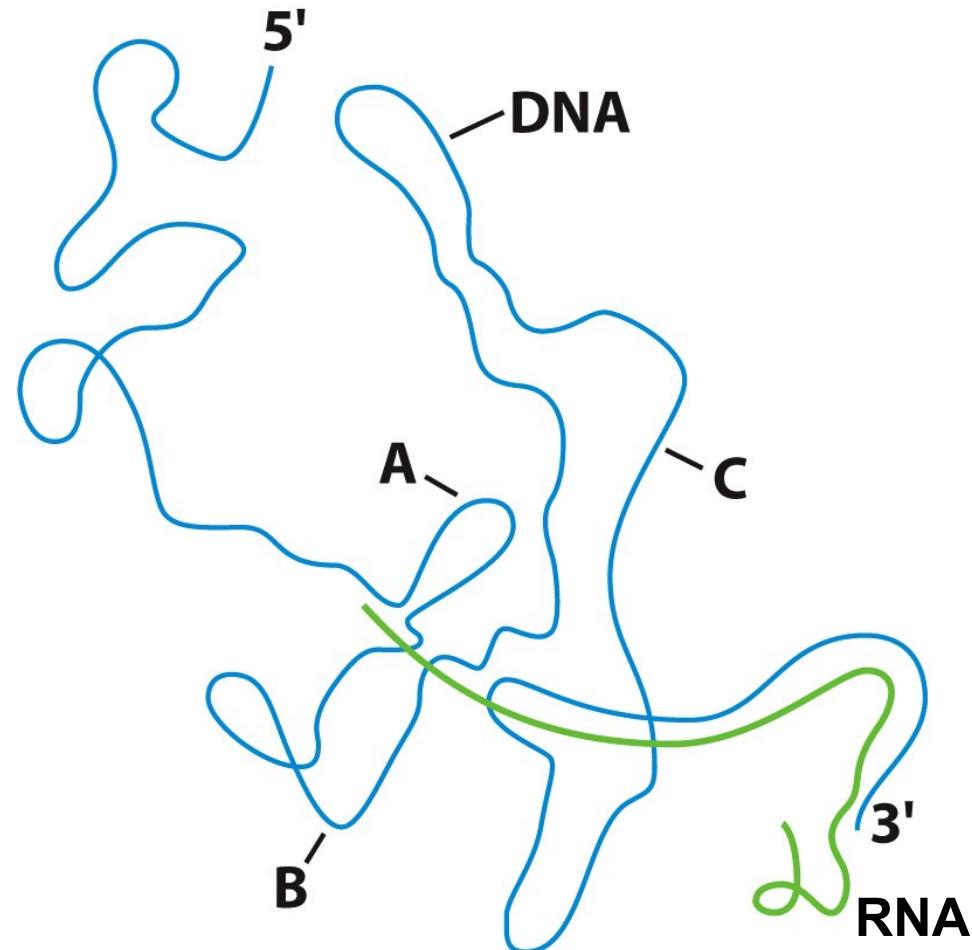
# RNA môže byť pred transláciou editovaná



# Eukaryotické gény súčasto prerušené intrónmi

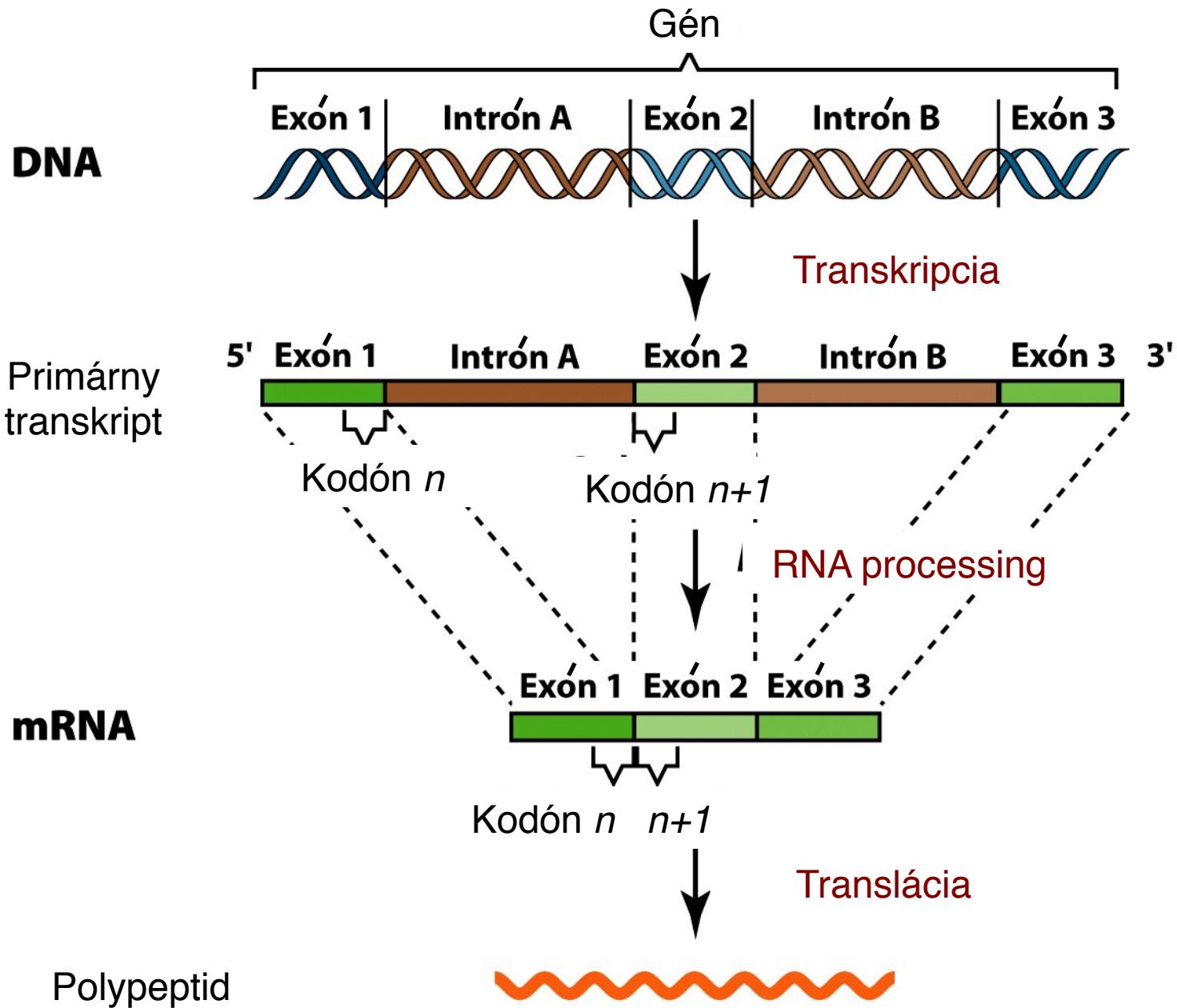


S. M. Berget, C. Moore, P. A. Sharp, 1977. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:3171-3175.

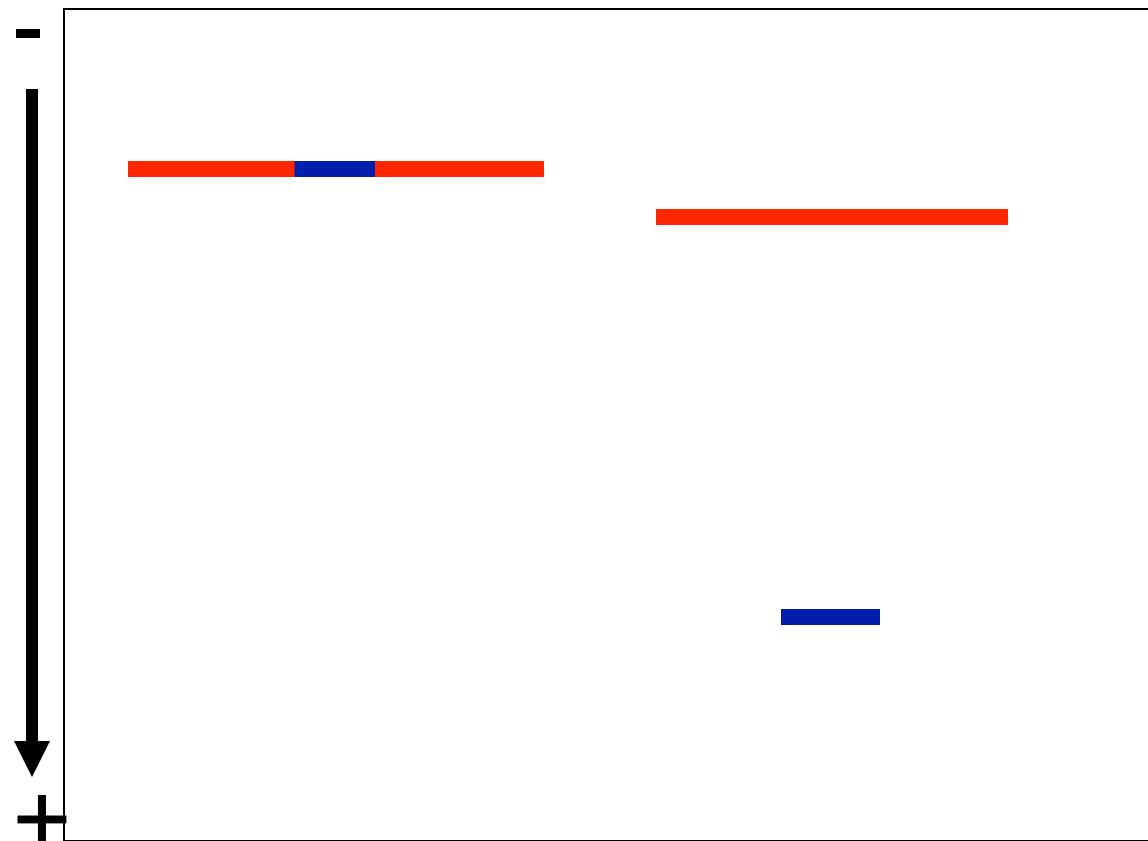
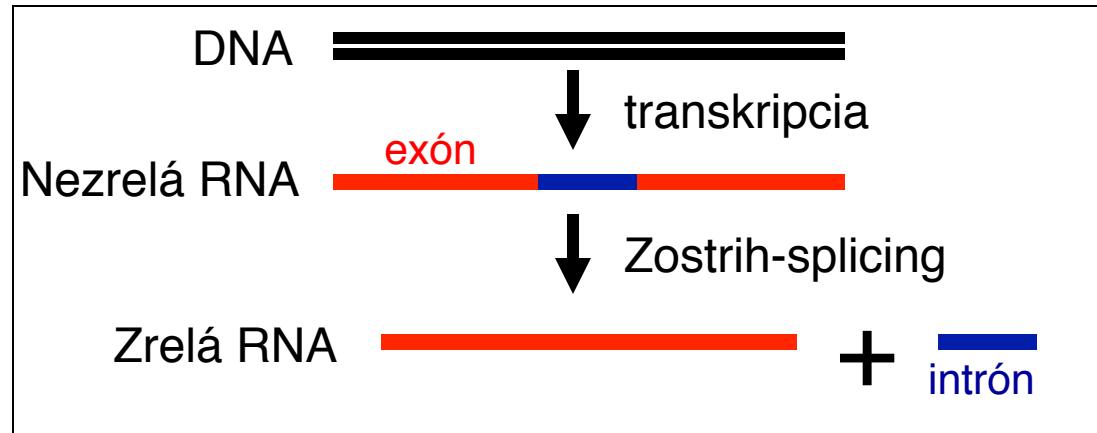


Lokalizácia exónov a intrónov v genóme adenovírusu

# Intróny sú z pre-RNA vyštiepené v procese *splicingu*-zostrihu



pre-rRNA *Tetrahymena thermophila* je zostrihnutá  
autokatalyticky, bez asistencie proteínov



# Objav katalytických RNA (ribozýmov): Nobelova cena za chémiu 1989

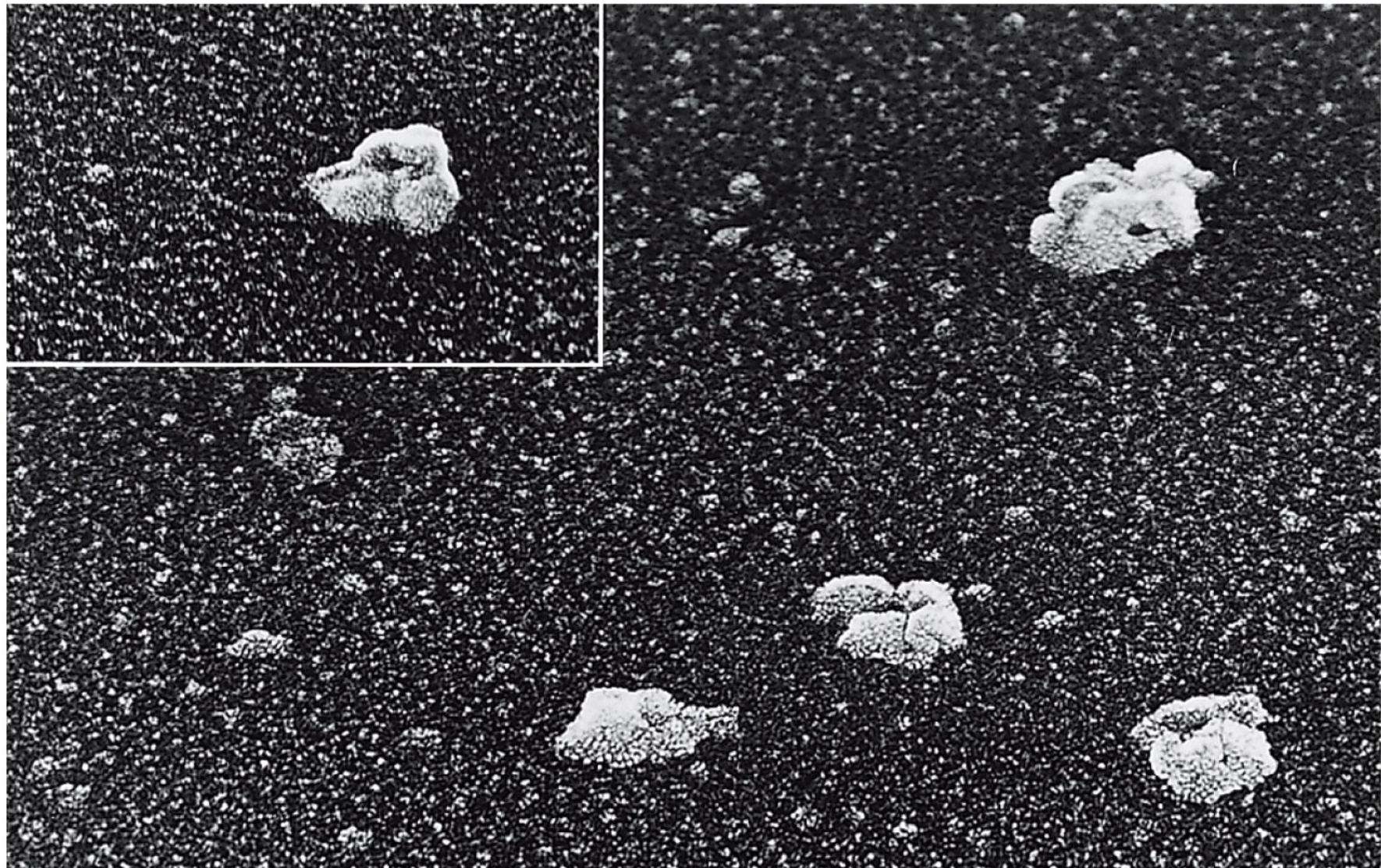


Thomas R. Cech



Sidney Altman

# Zostrih intrónov pre-mRNA je katalyzovaný spliceozómom



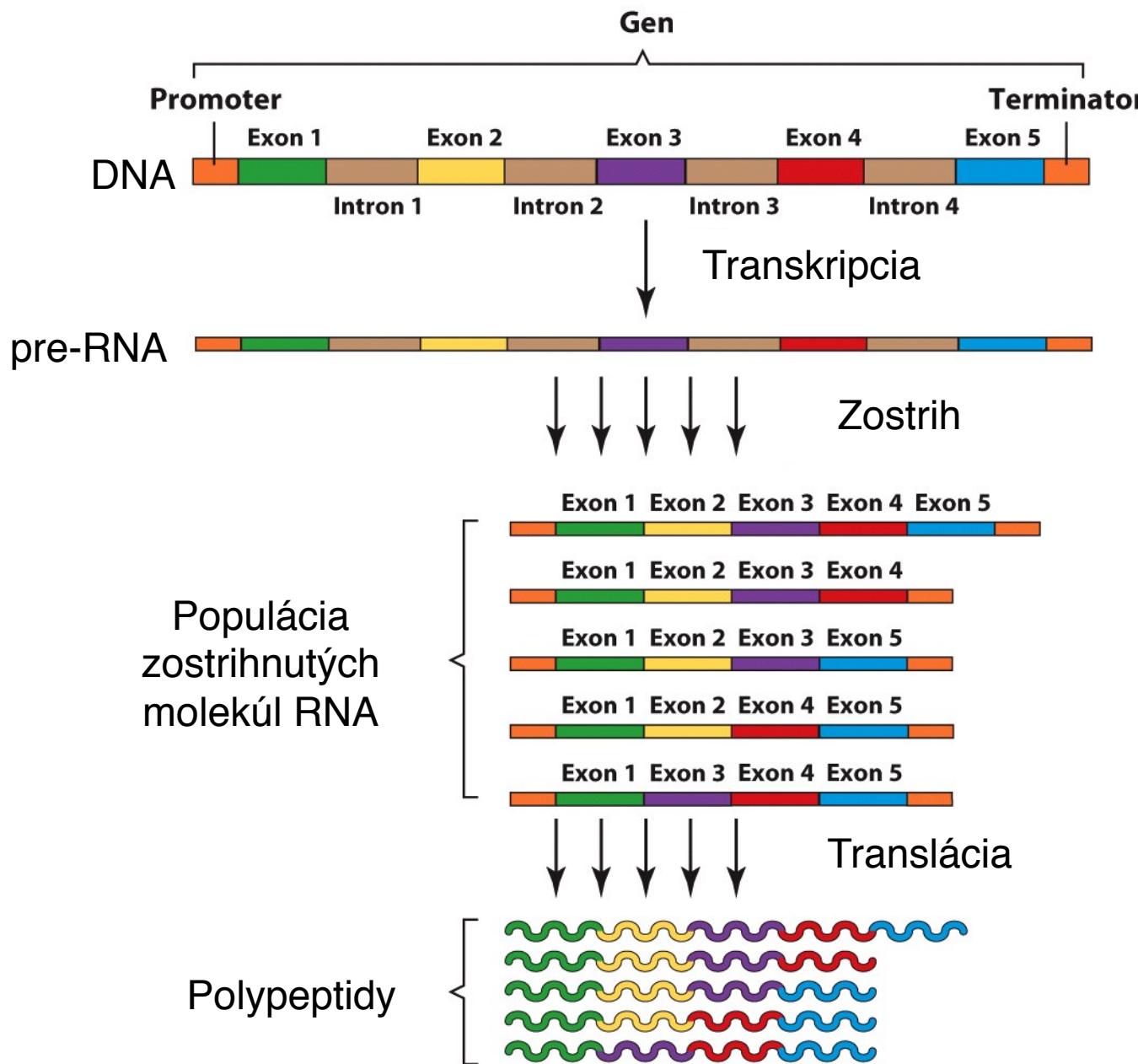
[http://www.youtube.com/watch?v=FVuAwBGw\\_pQ](http://www.youtube.com/watch?v=FVuAwBGw_pQ)

<http://vcell.ndsu.edu/animations/mrnasplicing/movie-flash.htm>

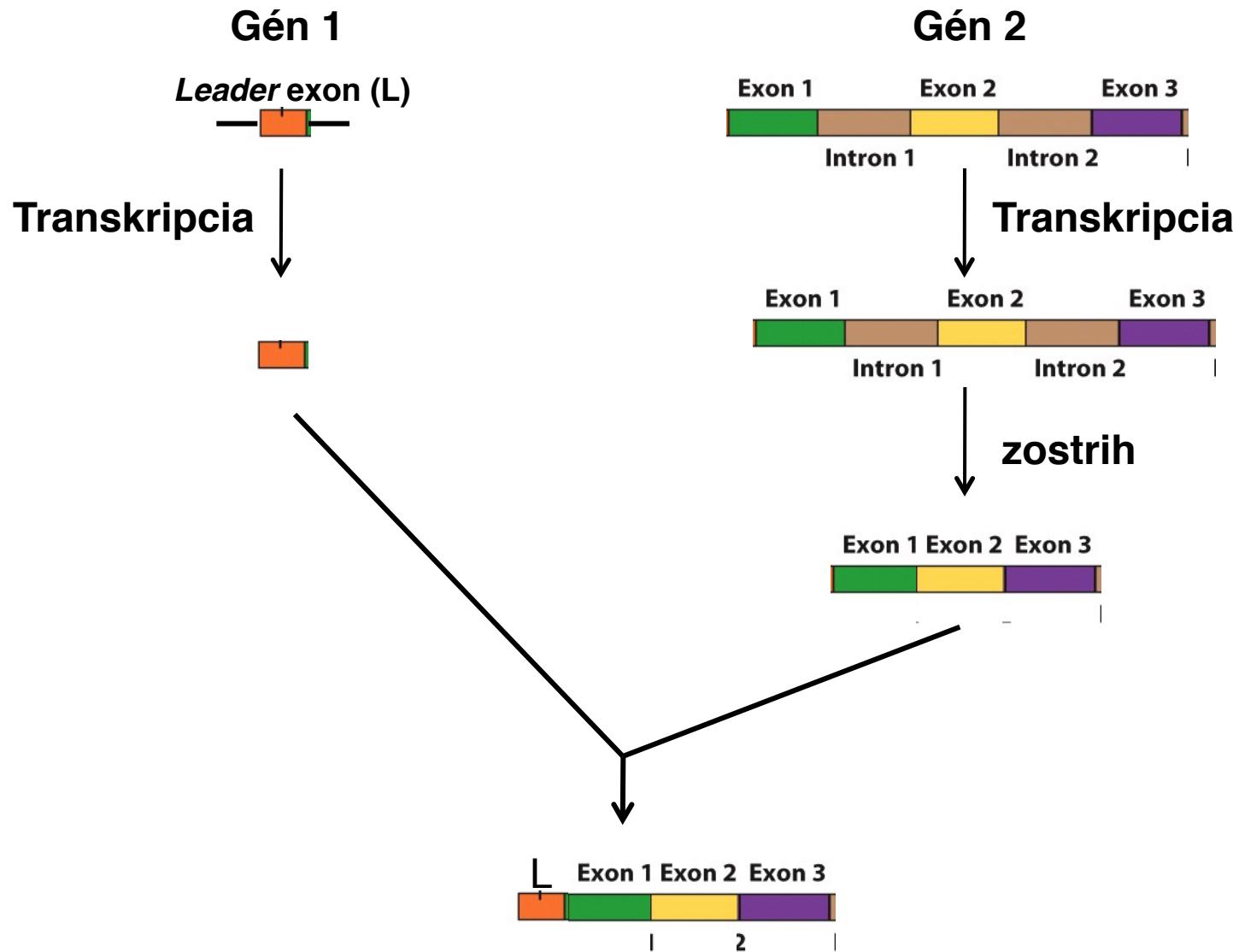
Courtesy Jack Griffith, Lineberger Comprehensive Cancer Center, University of North Carolina at Chapel Hill

10 nm

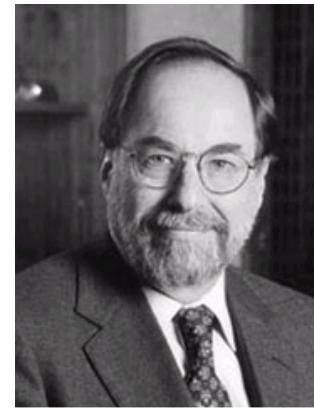
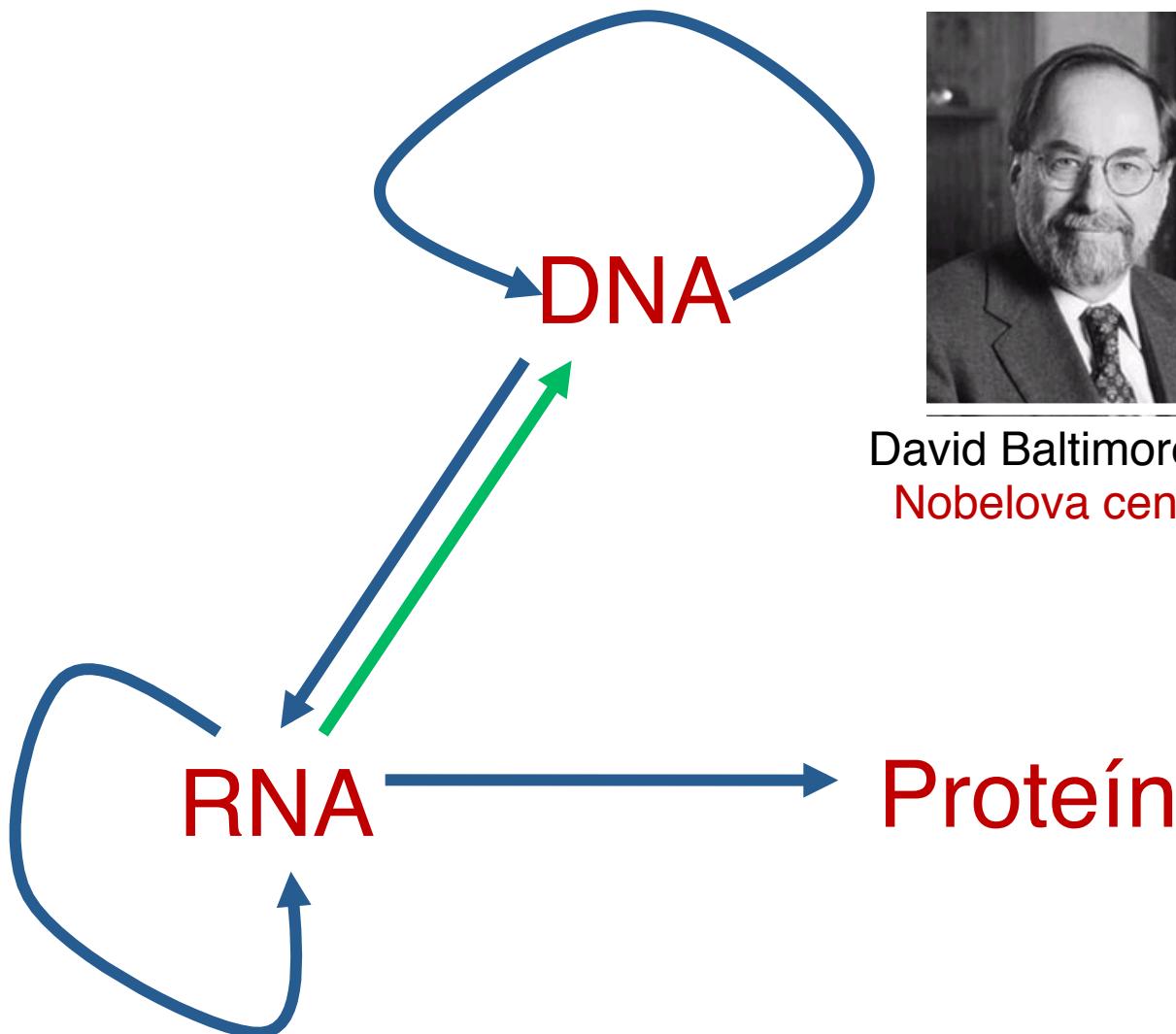
Alternatívny zostrih intrónov eukaryotických génov môže viest' k produkcii viacerých proteínov z jedného úseku DNA



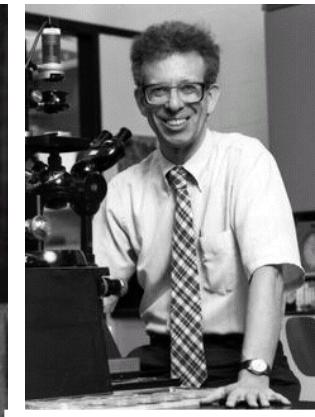
# *Trans-splicing* kombinuje exóny z dvoch rôznych génov



# Reverzná transkripcia je nástrojom životného cyklu retrovírusov



David Baltimore



Howard Temin  
Nobelova cena za chémiu 1975

# Životný cyklus retrovírusov je v súlade s centrálnou dogmou

Analógy báz ako liečivá (AZT, ddC, ddl)  
RT: 1 chyba na 5000 nukleotidov  
DNA polymeráza: 1 chyba na  $10^6$  nt

