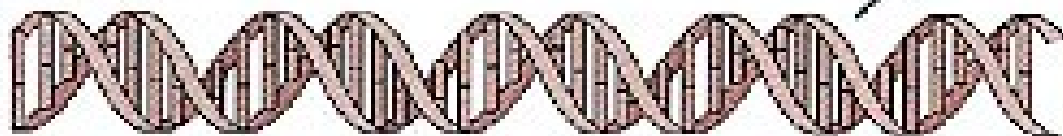


**TRANSKRYPCJA**

DNA



REPLIKACJA

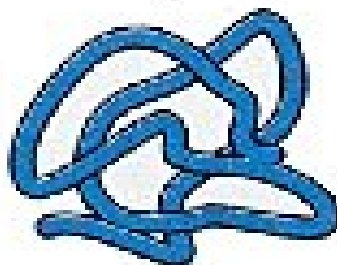
TRANSKRYPCJA

RNA

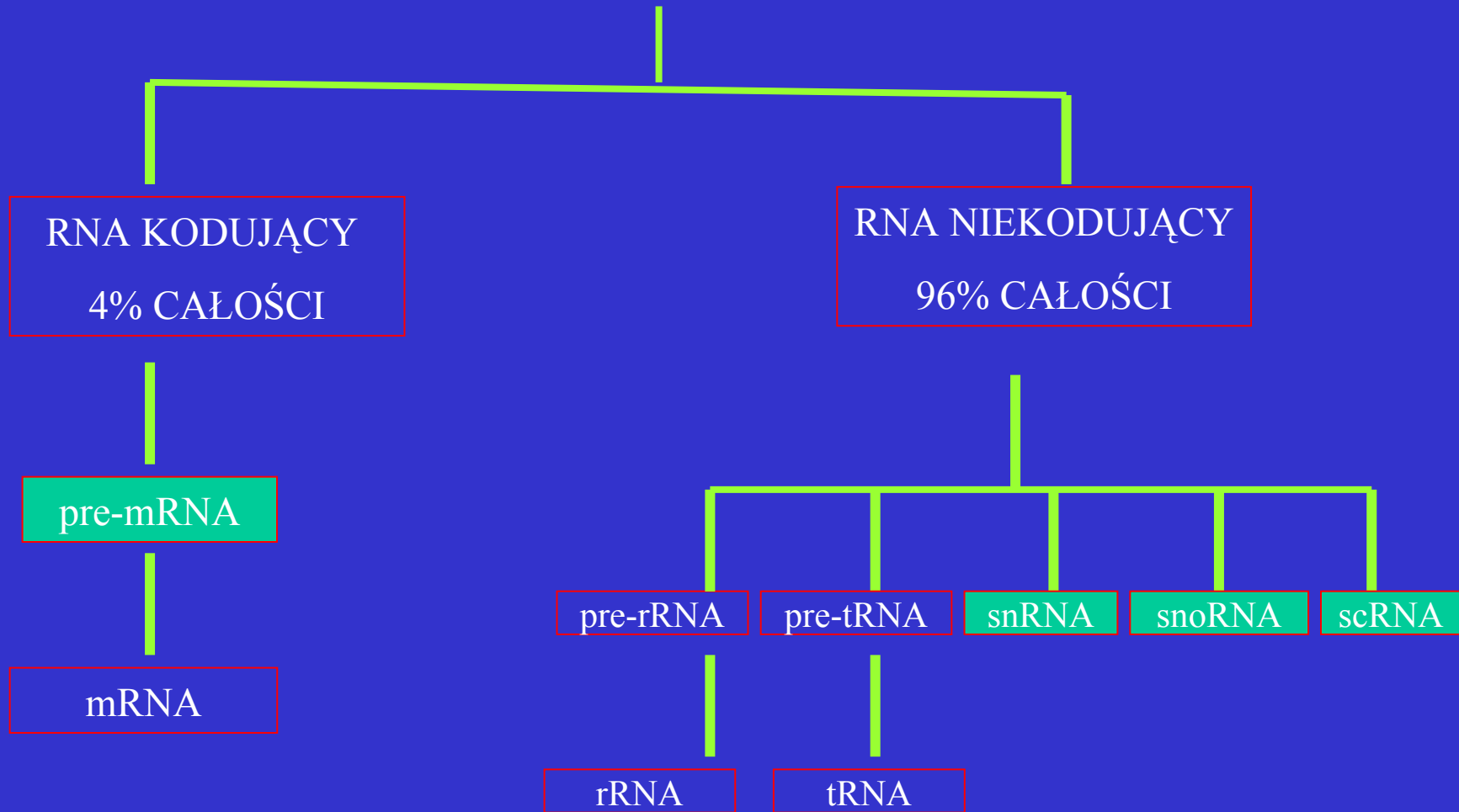


TRANSLACJA

BIAŁKO

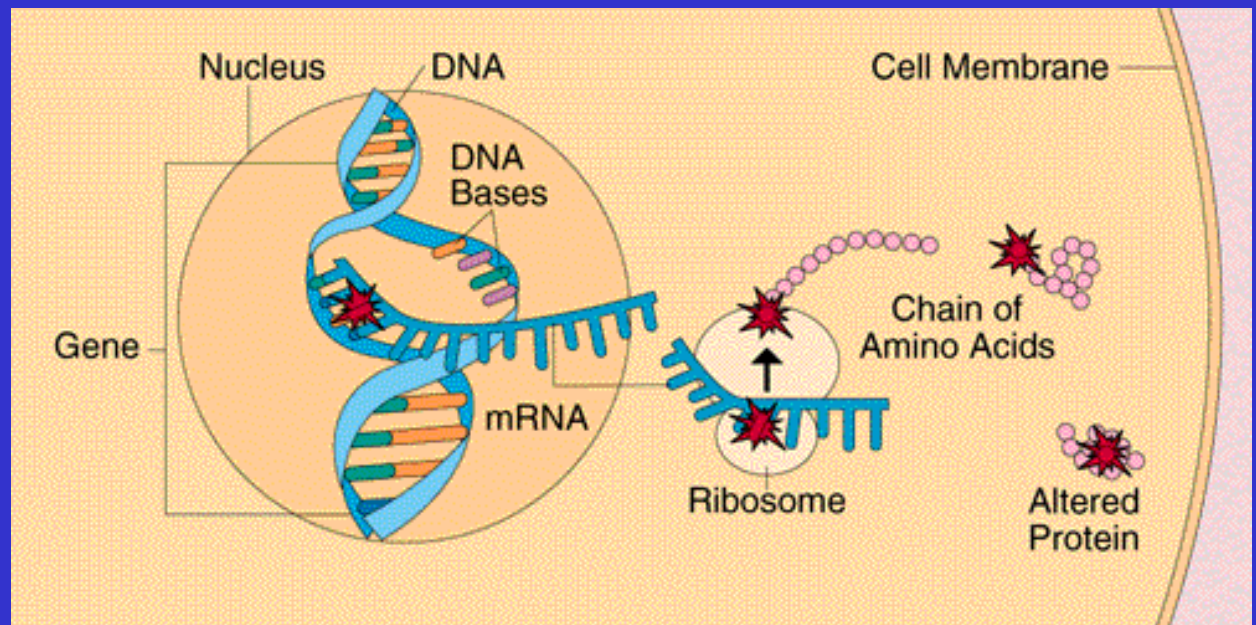
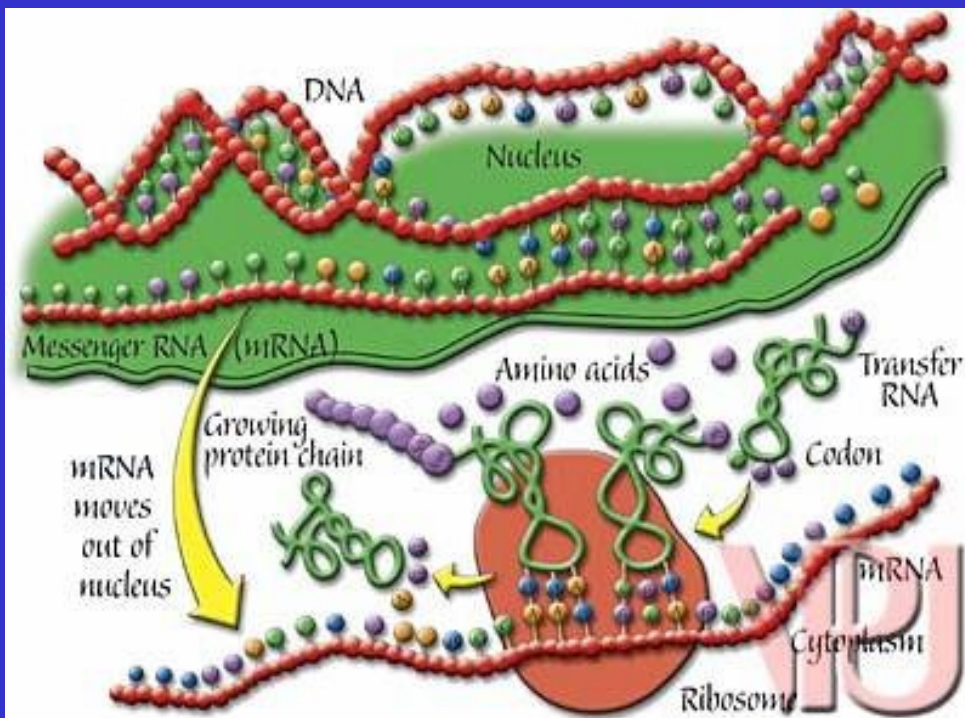


# RNA



Tylko eukarioty

wszystkie organizmy





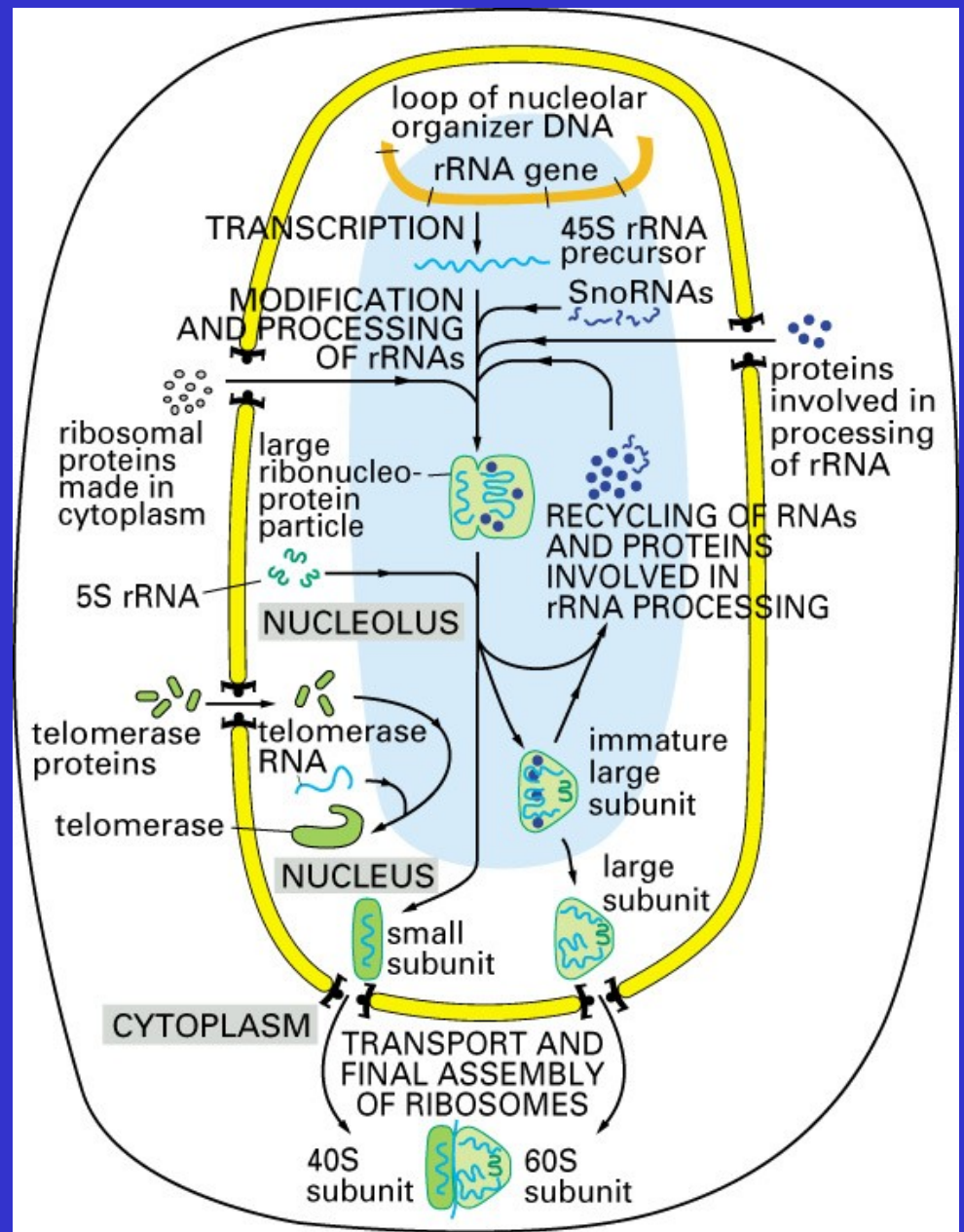
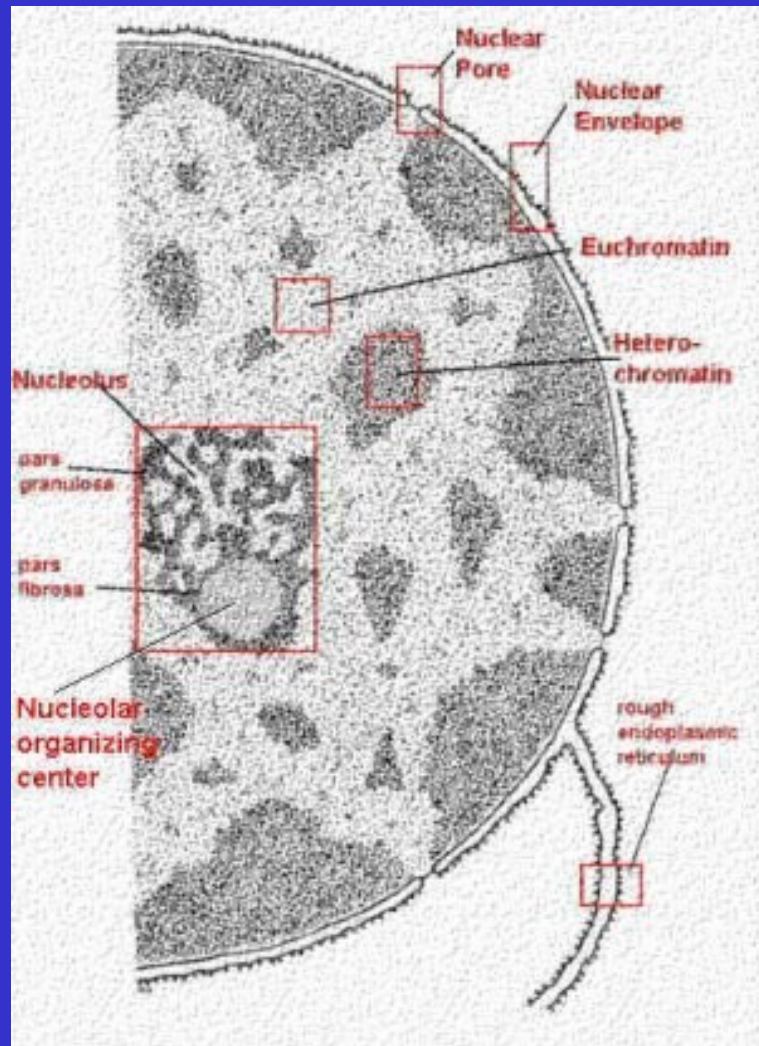
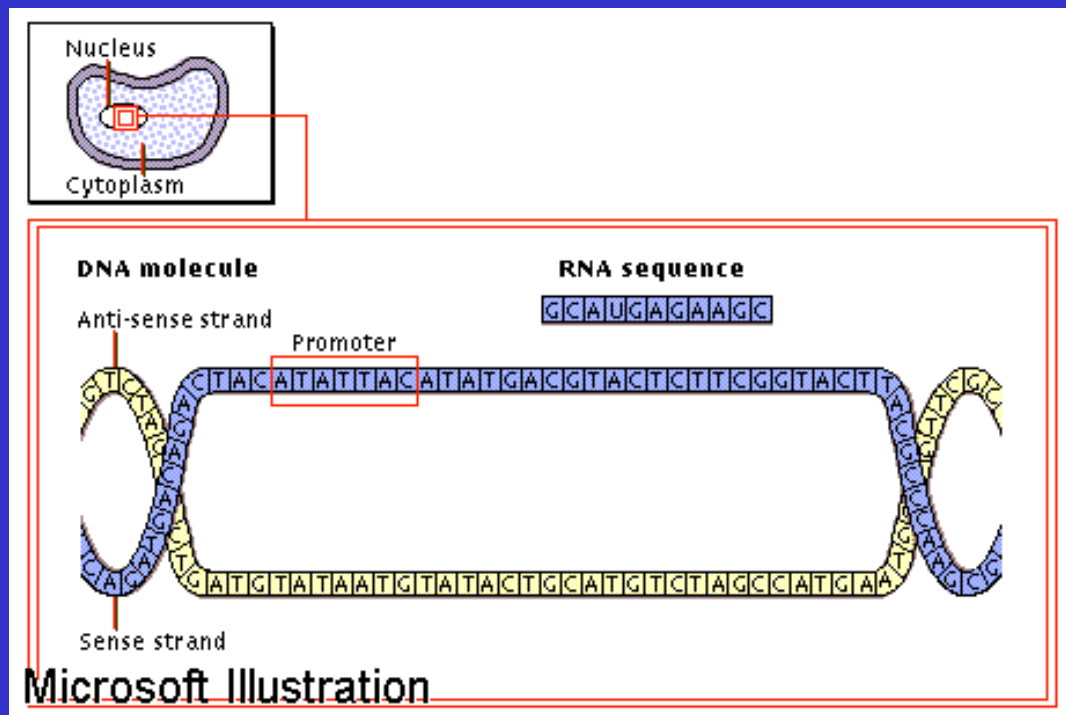
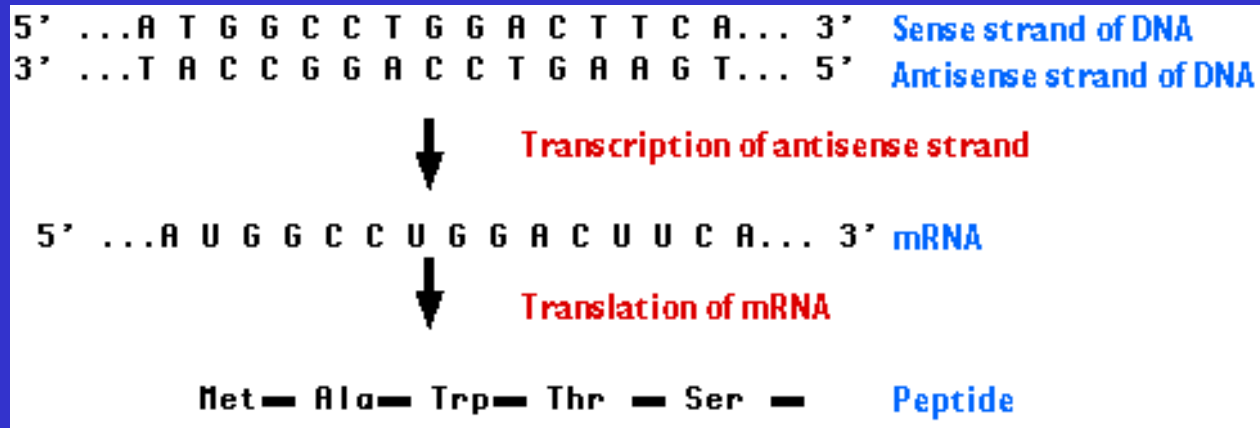


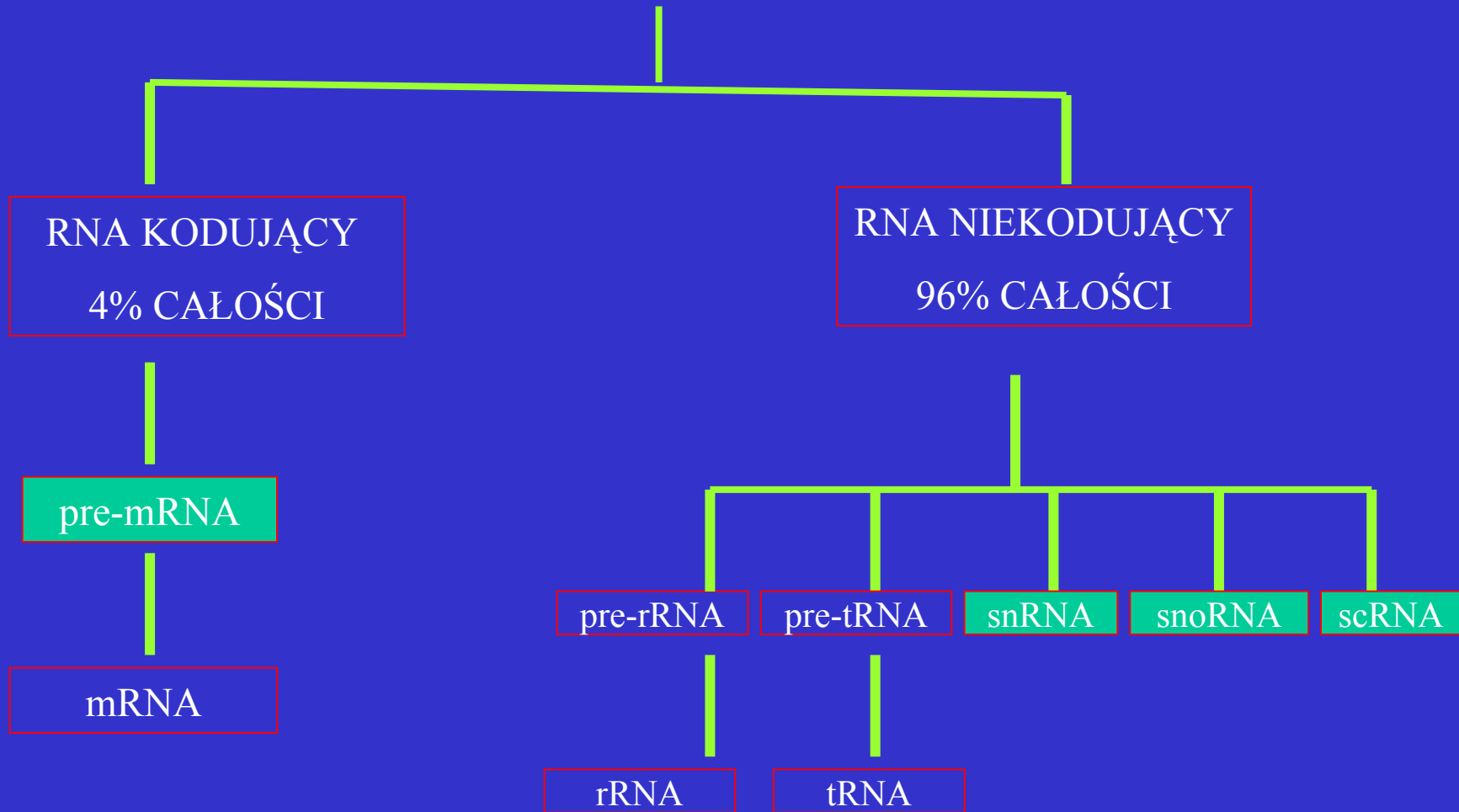
Figure 6-47. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

# Przebieg transkrypcji bliżej.... MATRYCA



# Transkrypcja u organizmów eukariotycznych

# RNA



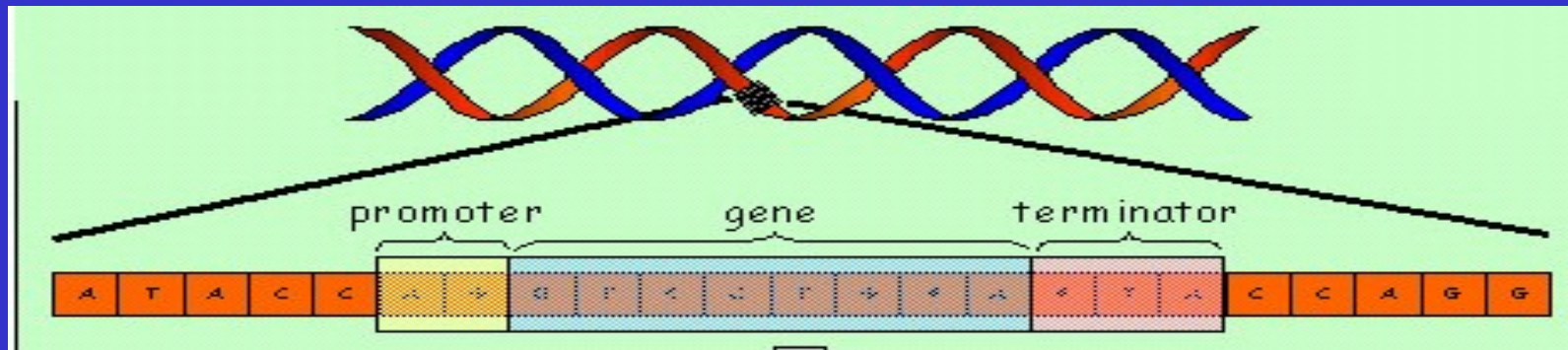
Tylko eukarioty

wszystkie organizmy



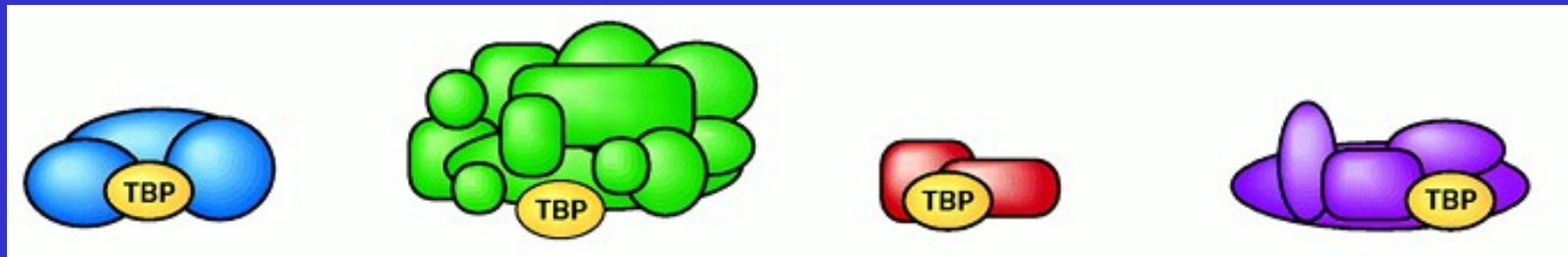
# Elementy konieczne do transkrypcji

1



2

Czynniki transkrypcyjne (TF – transcription factors)



1

Enhancery i silencery (sekwencje wzmacniające i wyciszające)

2

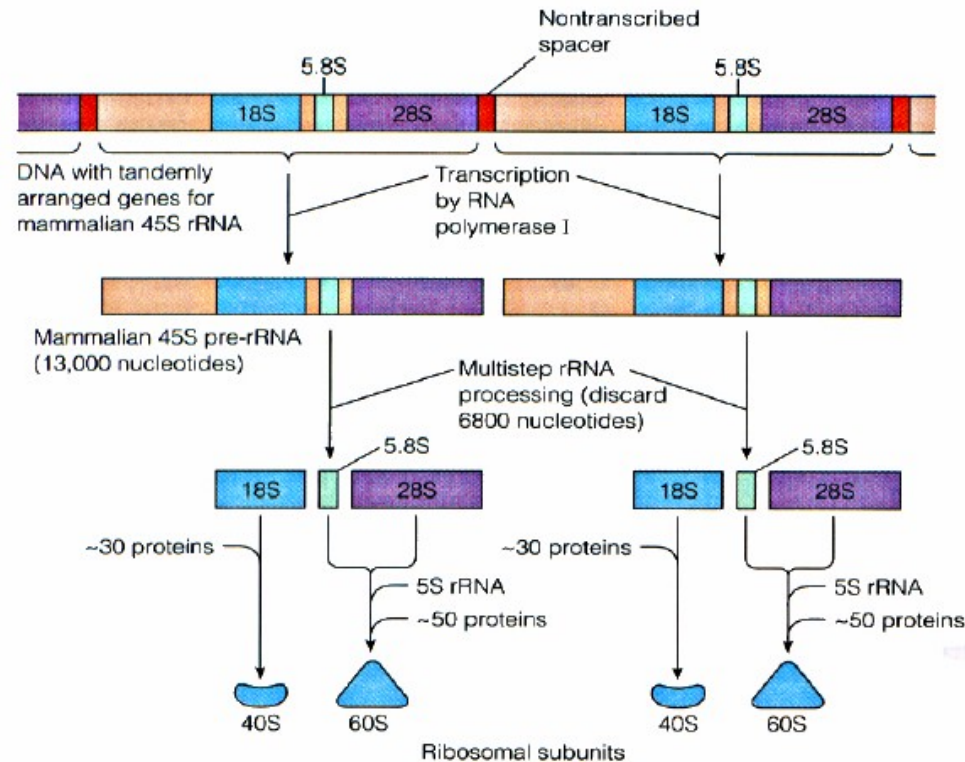
Polimeraza RNA

## Eukariotyczne polimerazy RNA

- Polimeraza RNA I – syntetyzuje prekursorowe rRNA (pre-rRNA) w jąderku
- Polimeraza RNA II – występuje w nukleoplazmie i jest odpowiedzialna za syntezę prekursorów mRNA i niektórych małych jądrowych RNA
- Polimeraza III – występuje w nukleoplazmie i jest odpowiedzialna za syntezę prekursorów 5S rRNA, tRNA i innych małych jądrowych i cytoplazmatycznych RNA

# Transkrypcja genów kodujących rybosomowe RNA (rRNA)

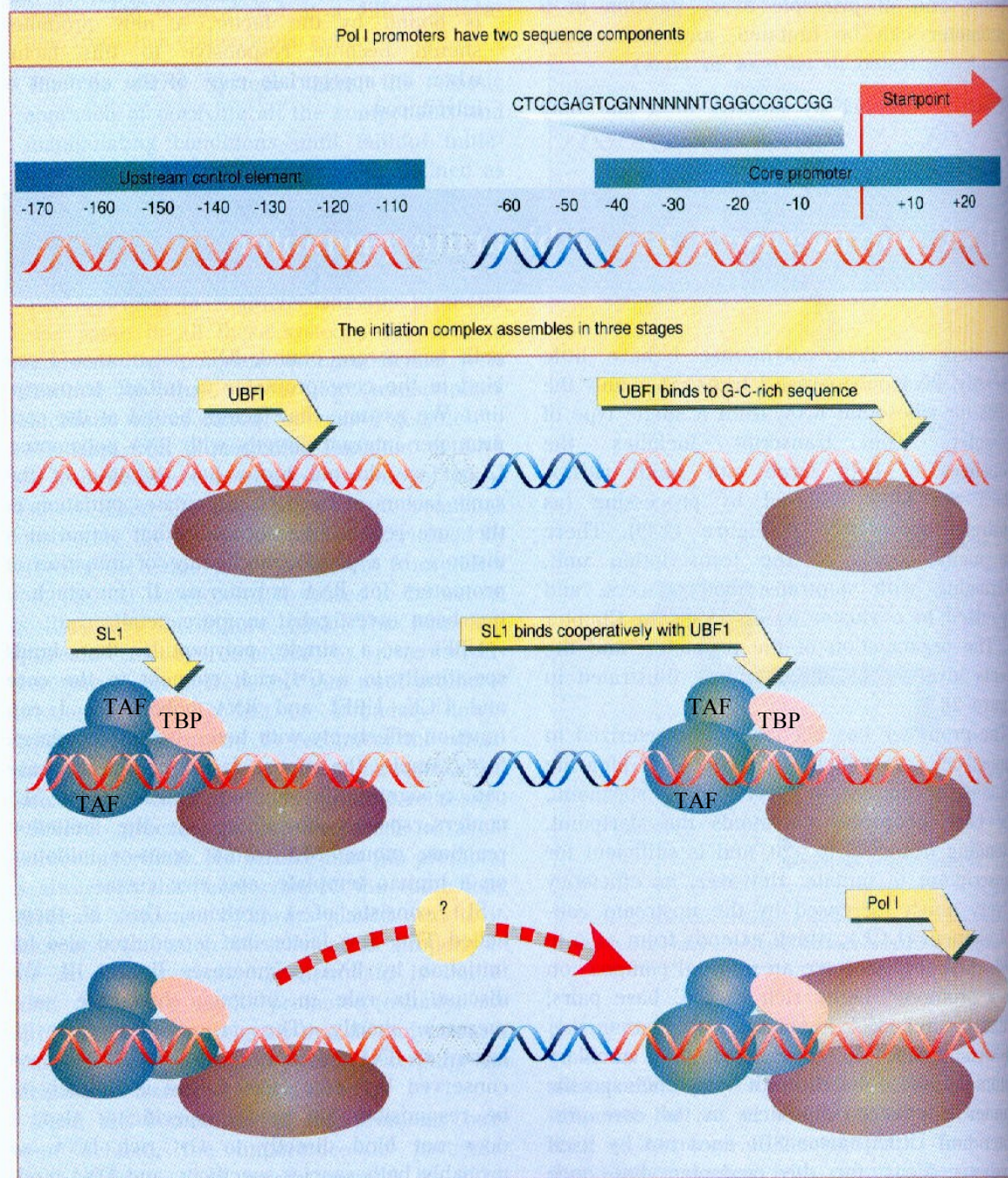
## Transcription of rRNA genes by RNA polymerase I



Ribosomal RNA genes consist of tandem repeats of about 200 genes that are separated by spacer regions. A 45S rRNA precursor is formed that is later processed into individual rRNAs.



Jednostka transkrypcyjna **pol. RNA I** ma rdzeń promotora oddzielony o ok. 70 pz od „upstream control element. Czynn timer UBF1 (upstream binding factor) przyłącza się do obydwu regionów a następnie czynnik SL1 (czynnik selekcyjny, *selectivity factor*) przyłącza pol RNA I do rdzeniowej części promotora. W skład czynnika SL1 wchodzą: TBP (TATA binding protein) oraz czynn timer jemu towarzyszące: TAF (TBP-associated factors)



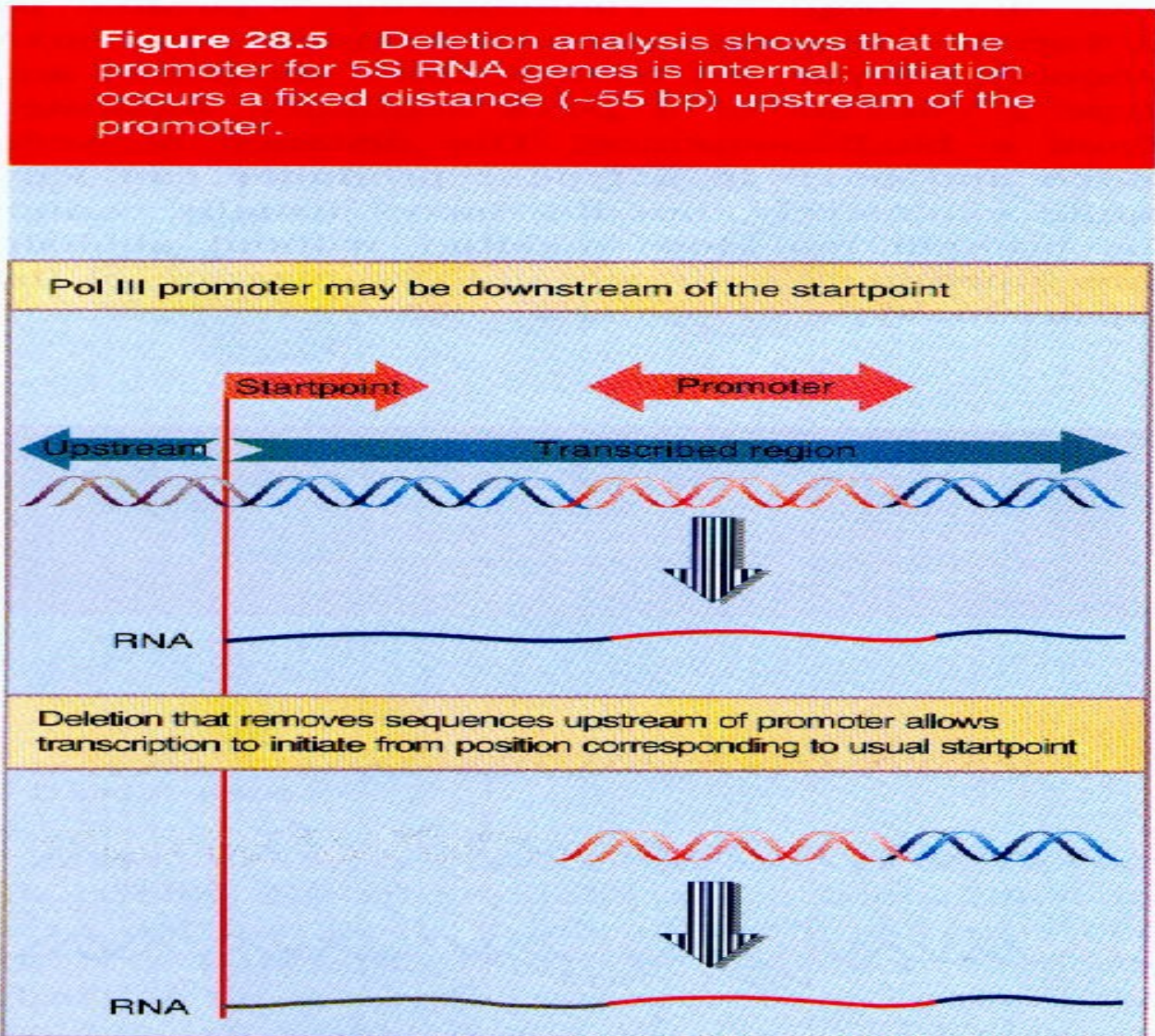


# Transkrypcja genów kodujących 5S rybosomowe RNA i tRNA

Geny 5S RNA są zorganizowane w zespoły, w których ułożone są tandemowo. U człowieka występuje jeden zespół zawierający 2000 tych genów.

5S RNA jest jedynym RNA transkrybowanym niezależnie.

Promotory genów znajdują się wewnątrz sekwencji kodującej.

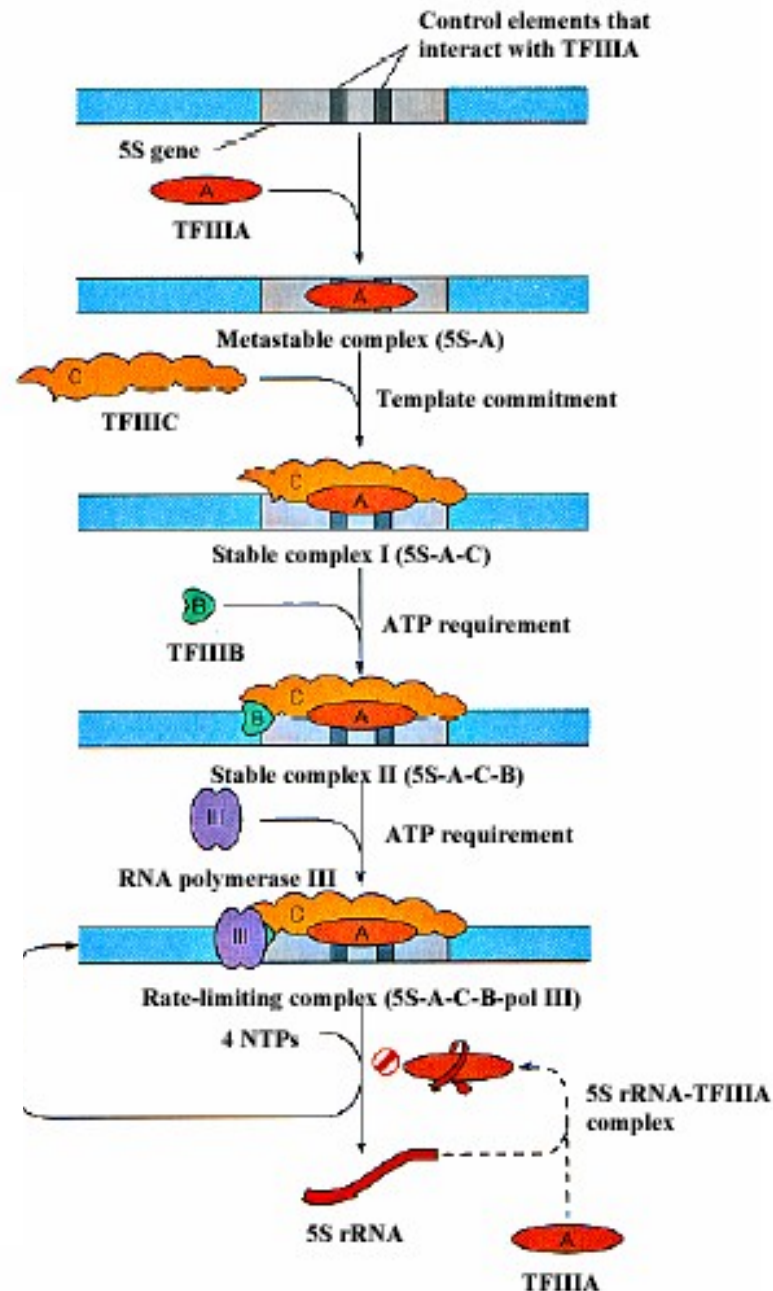


## Transkrypcja rDNA z udziałem pol. RNA III

Co najmniej 3 czynniki białkowe są wymagane do przyłączenia się polimerazy RNA III. Przyłączenie się czynnika A (czynnik organizujący) umożliwia związaną się czynnika C z promotorem 5S rDNA. To umożliwia związanie czynnika B i w konsekwencji polimerazy RNA III i rozpoczęcie transkrypcji.

W skład TFIIBB wchodzi również TBF.

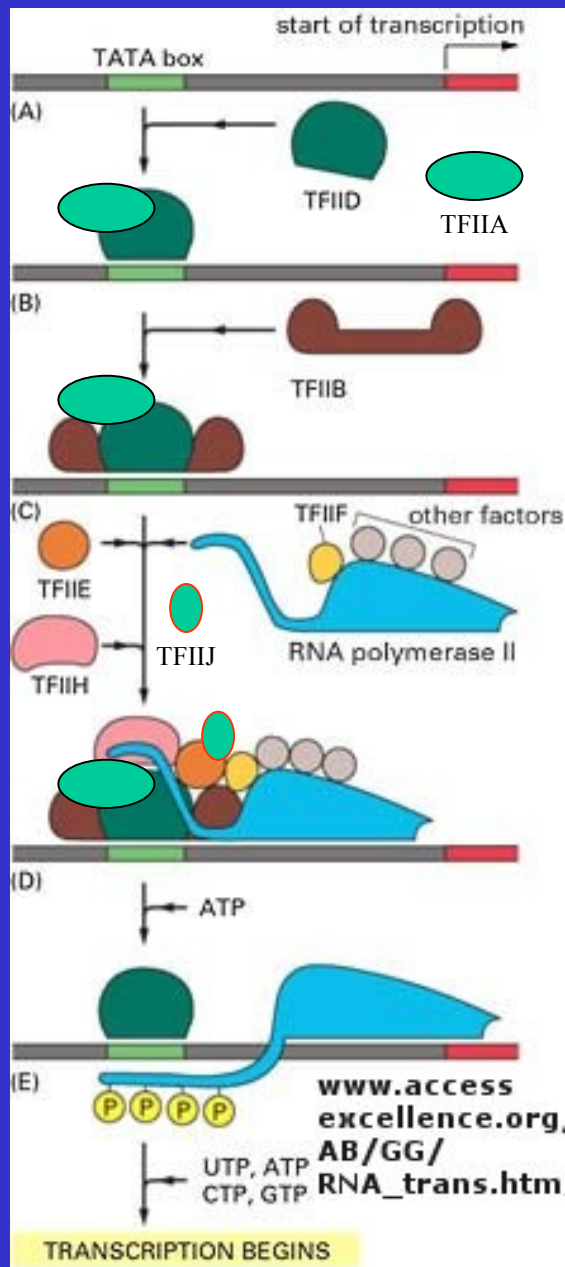
W przypadku syntezy tRNA nie wymagany jest czynnik A.



# Transkrypcja z udziałem polimerazy RNA II

- Większość eukariotycznych promotorów posiada kasetę TATA, leżącą w przybliżeniu między nukleotydami 25-35 powyżej miejsca startu transkrypcji
- Niektóre promotory nieposiadające kasety TATA zawierają element inicjatorowy w miejscu inicjacji transkrypcji. Często zawierają one C w pozycji -1 i A w pozycji +1
- Geny, których promotory są pozbawione kasety TATA, a także elementu inicjatorowego charakteryzują się małą wydajnością transkrypcji.
- Niektóre geny zawierają elementy regulujące (URE – upstream regulatory element) znajdujące się powyżej sekwencji promotora umożliwiające wydajną transkrypcję.
- Transkrypcja w wielu przypadkach genów eukariotycznych jest wzmocniona obecnością sekwencji wzmacniających.

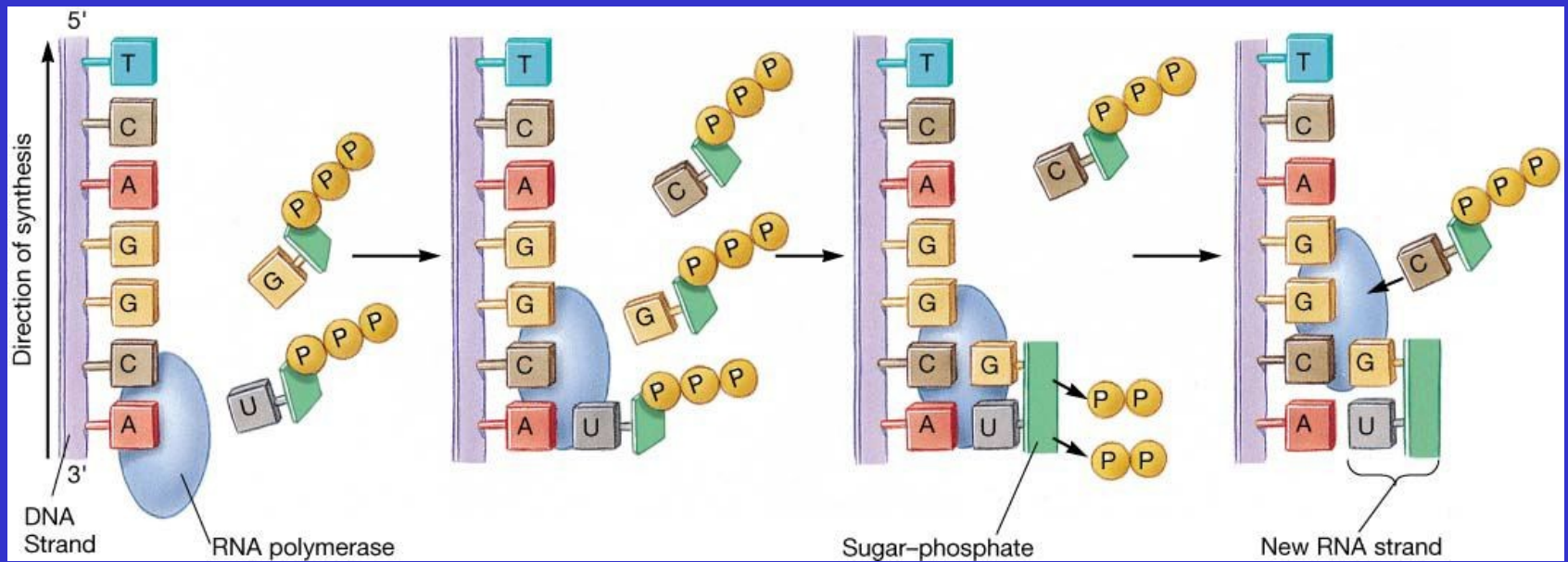




- 1) Wiązanie się czynnika TFIID z kasetą poprzez jego podjednostkę TBP. Powoduje rozluźnienie helisy DNA i jednocześnie umożliwia TFIIB przyłączenie się do DNA).
- 2) TFIIA wiąże się z TFIID, wzmacnia jego wiązanie z kasetą TATA
- 3) Przyłączenie się TFIIB, umożliwia związanie polimerazy i kolejnego czynnika TFIIF z DNA
- 4) Dołączenie kolejnych trzech: E (stymulacja aktywności TFIIH), H i J

TFIIH – duży kompleks białkowy posiadający aktywności kinazy i helikazy. Fosforyluje C-kończową domenę (CDT) polimerazy RNA, to uaktywnia kompleks umożliwiając polimerazie opuszczenie sekwencji promotorowej.

# Elongacja



# Elongacja eukariotycznych mRNA

- ♦ U eukariontów transkrypcja jednego genu przez polimerazę RNA II (2000 nukleotydów/min) może trwać kilka godzin ze względu na obecność intronów np.: pre-mRNA genu ludzkiej dystrofiny (2400 000 pz) syntetyzowany jest przez 20 godz.
- ♦ Wielkość genów eukariotycznych wymaga więc ogromnej stabilności kompleksu transkrypcyjnego, której nie może zapewnić Pol RNAII – konieczne są czynniki elongacyjne
- ♦ Występuje konieczność omijania przez eukariotyczne polimerazy RNA nukleosomów (krótki odcinek DNA odłącza się od nukleosomu umożliwiając zatoczenie wokół niego pętli) dane z obserwacji pracy pol RNAIII

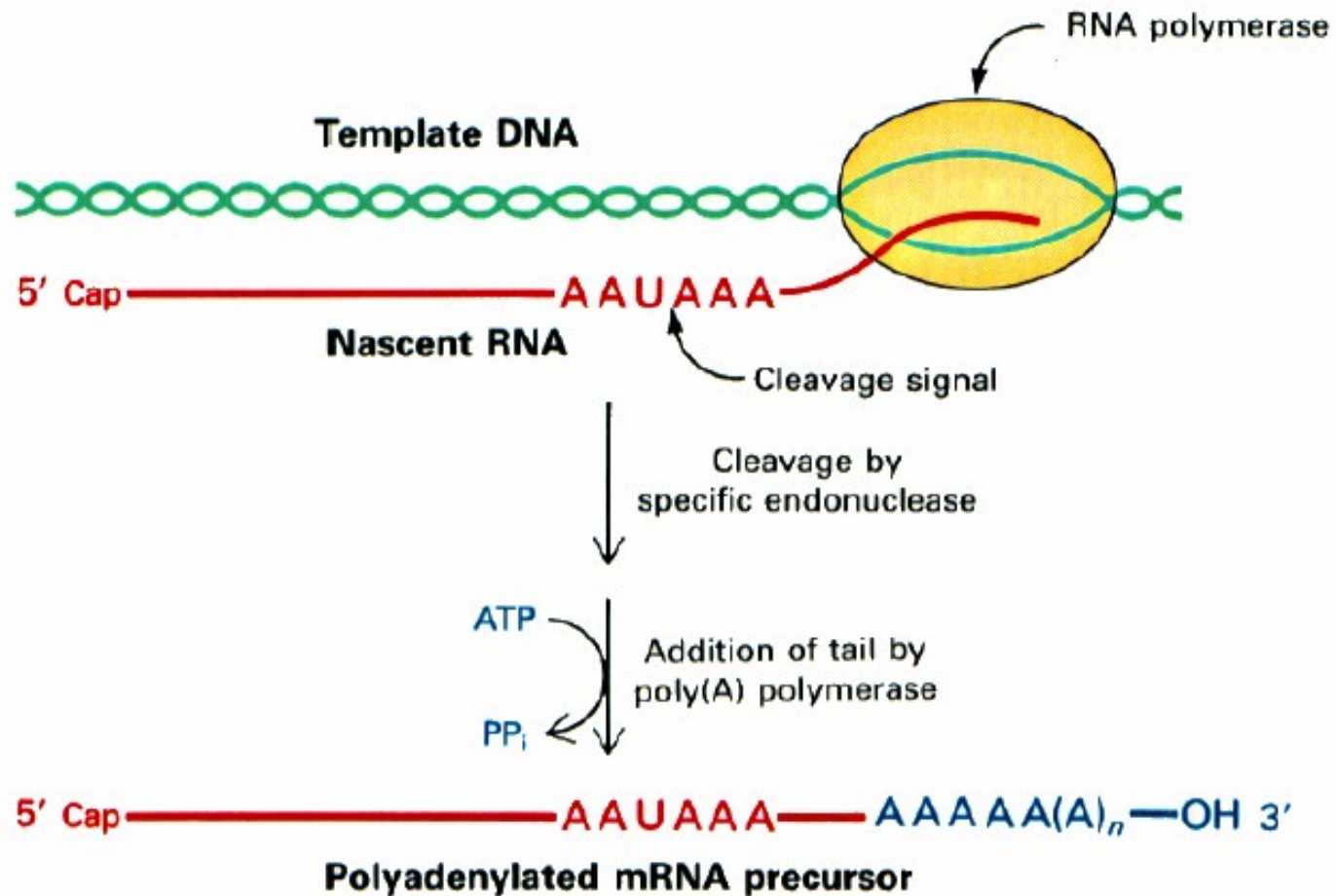
## CZYNNIKI ELONGACYJNE DLA

**POLIMERAZY RNAII** = białka, które wiążą się z polimerazą po opuszczeniu przez nią promotora i odłączeniu się czynników transkrypcyjnych

**Czynnik elongacyjny S2** - przeciwdziała pauzowaniu polimerazy RNAII, które może nastąpić wówczas, kiedy enzym przeprowadza transkrypcję rejonu, gdzie komplementarne zasady mogą łączyć się ze sobą w obrębie jednej nici (np. powstawanie struktury spinki do włosów)

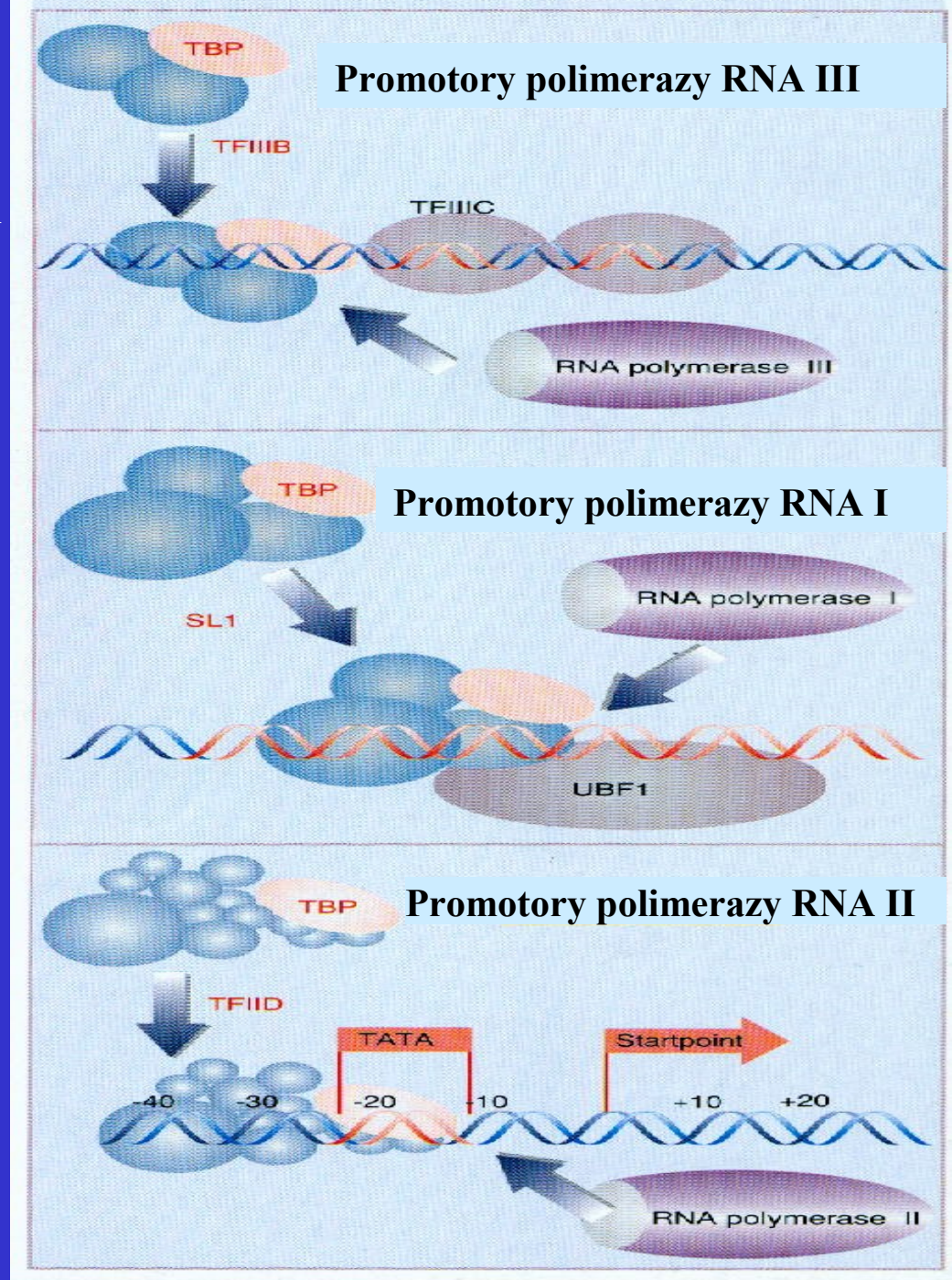
**ELL (elongina TFIIF)**- zapobiega zatrzymywaniu się polimerazy RNA i przedwczesnego uwalniania końca 3'transkryptu

**Terminacja transkrypcji u eukariontów zachodzi przy pomocy swoistych endonukleaz które odcinają powstającą nić RNA przy sekwencji AAUAAA**

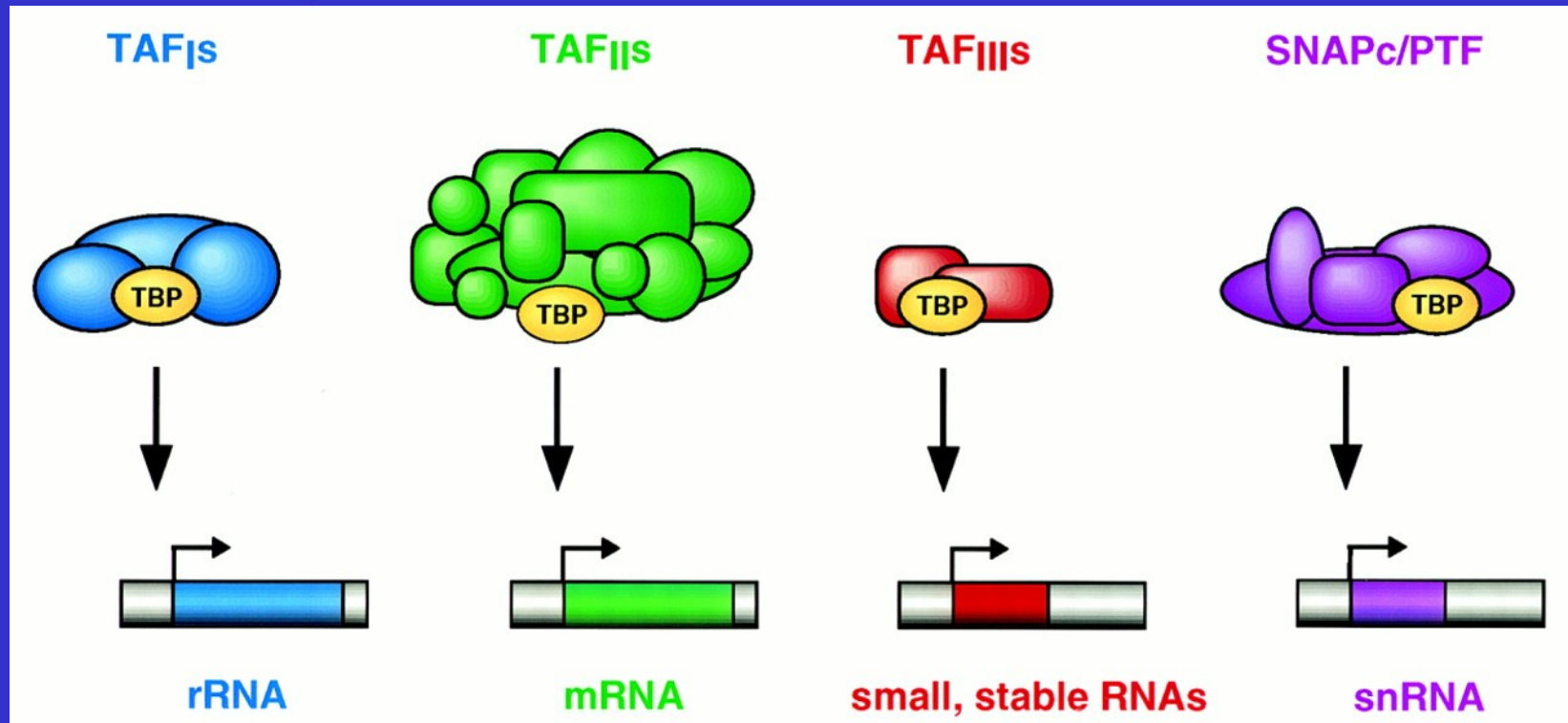




U eukariota polimeraza RNA we wszystkich promotorach wymaga obecności TBP (TATA Binding Protein)



# ZNANE SĄ 4 ZESTAWY CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH SWOISTYCH DLA RÓŻNYCH TYPÓW PROMOTORÓW



The association of TBP with TAF<sub>I</sub>s, TAF<sub>II</sub>s, TAF<sub>III</sub>s, and PTF/SNAPc directs TBP to different promoter classes. The distribution of TBP among these factors contributes to the global regulation of gene expression. From Lee and Young (1998) Regulation of gene expression by TBP-associated proteins. *Genes Dev.* 12, 1398.



# Transkrypcja u organizmów eukariotycznych w mikroskopie elektronowym...

# Potranskrypcyjna obróbka RNA

# Dojrzewanie eukariotycznych mRNA



5' CAP (czapeczka 5')

5'-GPPP-



AAAAAAAAAA-3'

3' ogonek poliA

# Kapowanie końca 5' eukariotycznych mRNA

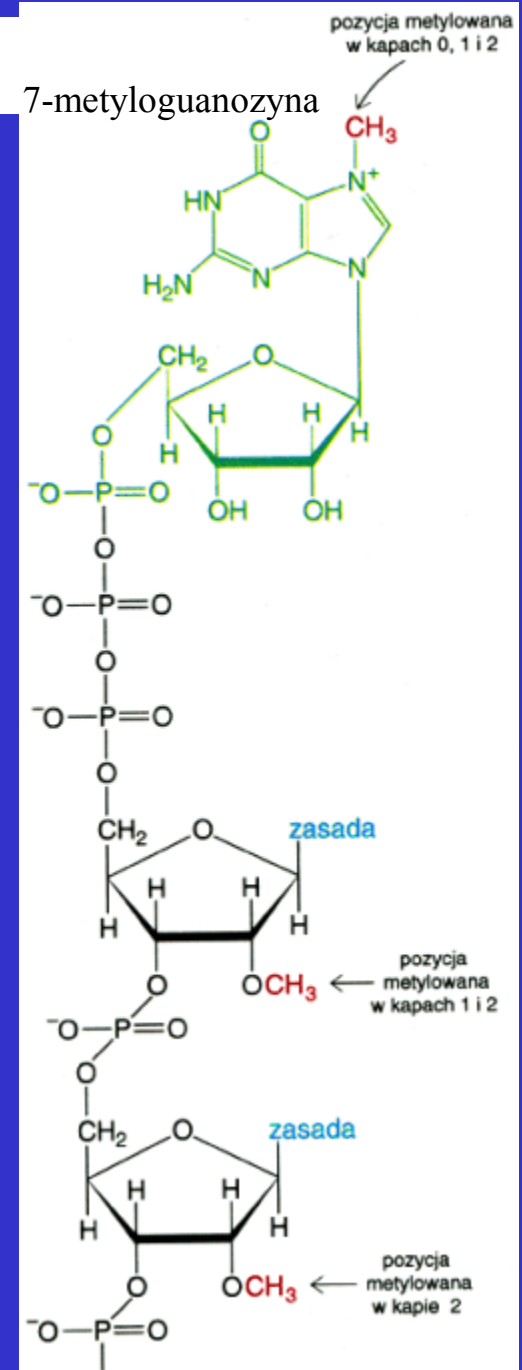
## I. Dodanie ekstra guanozyny na końcu 5'

- czapeczka GTP reaguje z końcem 5' mRNA z wytworzeniem wiązania trifosforanowego
- końcowa zasada G podlega metylacji przy azocie numer 7 (metylotransferaza guaninowa) – czapeczka typu 0

## Wyższe Eukarionty:

- czapeczka typu 1 (metylacja wodoru w grupie 2'-OH drugiego nukleotydu)
- czapeczka typu 2 (metylacja wodoru w grupie 2'-OH trzeciego nukleotydu)

Funkcje czapeczki:	inicjacja translacji ochrona przed degradacją
--------------------	--



## **Dojrzewanie końca 3'**

### **Rozcięcie i dodanie ogonka poli-A**

Kompleks białek enzymatycznych i regulatorowych rozpoznaje sekwencję AAUAAA około 30 nukleotydów poniżej miejsca przecięcia

### **W skład kompleksu wchodzi:**

- Endonukleaza (CFII/CFI)
- polimeraza poli A (dodaje 100-200 adenin do końca transkryptu)
- składnik rozpoznający sekwencje AAUAAA (CPSF) –
- czynnik stymulujący (CStF) – stabilizuje cały kompleks

**Do ogonka poli-A przyłączane są specyficzne białka (poli-A binding proteins)**

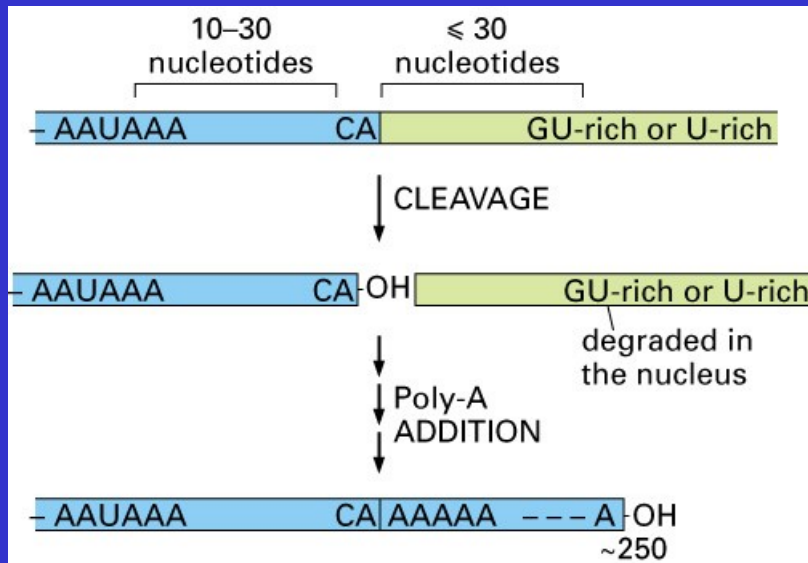


Figure 6–37. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

W skład kompleksu wchodzi:

**polimeraza poli A (dodaje 100-200 adenin do końca transkryptu)**

- **CPSF** - składnik rozpoznający sekwencje AAUAAA ok. 30 nt poniżej miejsca przecięcia
- **czynn timerymulujący (CStF)** – stabilizuje cały kompleks

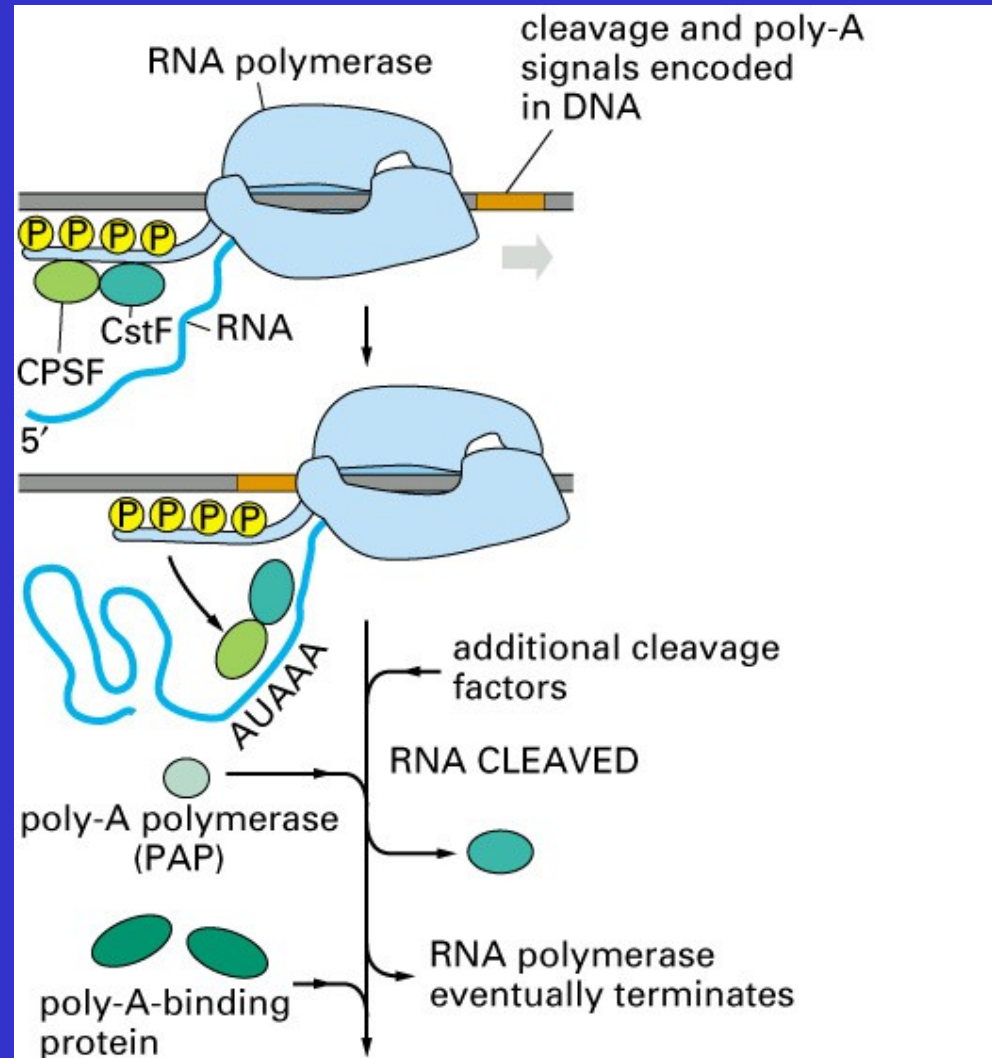


Figure 6–38 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Do ogonka poli-A przyłączane są specyficzne białka (poly-A binding proteins)

**Funkcje ogonka poli-A:**

- stabilizacja cząsteczki
- zabezpieczeniem końca 3' przed działaniem 3'endonukleaz
- udział w translacji w cytoplazmie

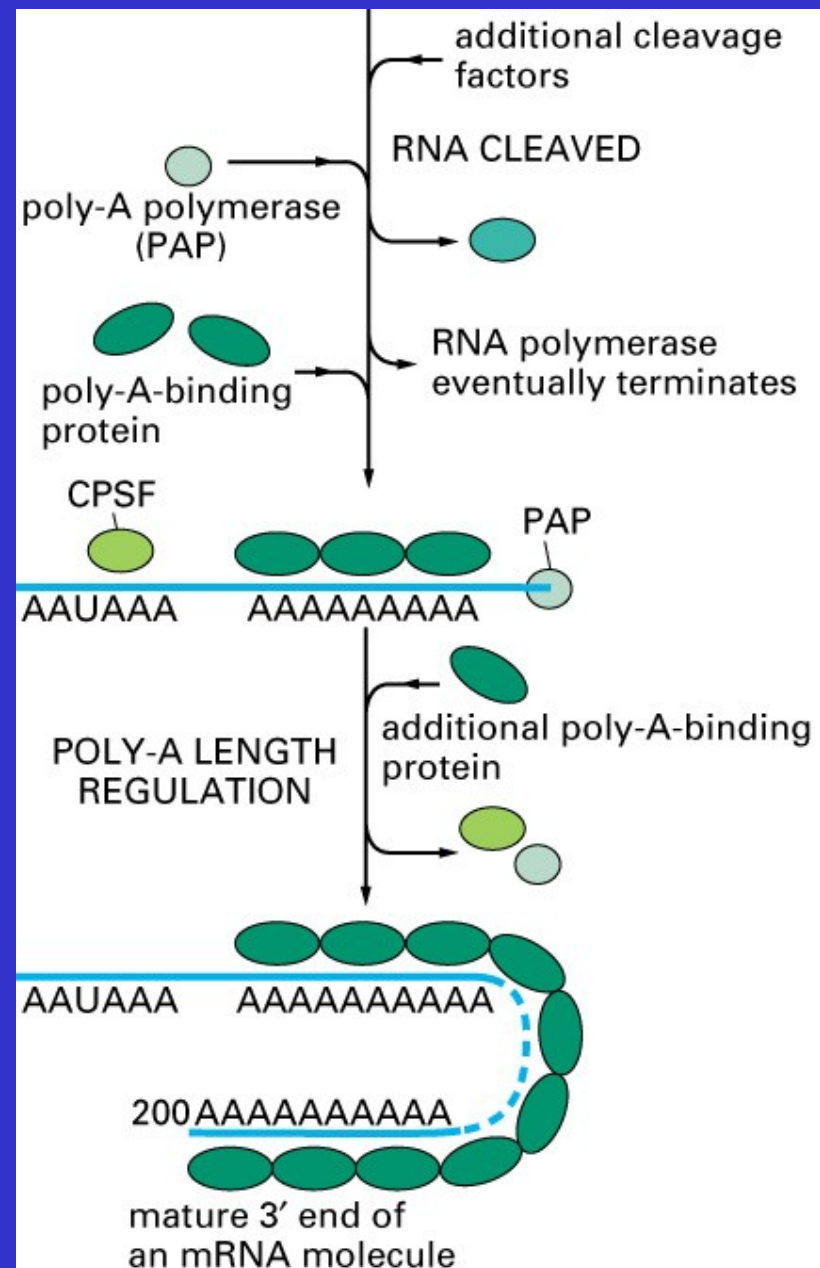


Figure 6-38 part 2 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.



# Dojrzewanie RNA:

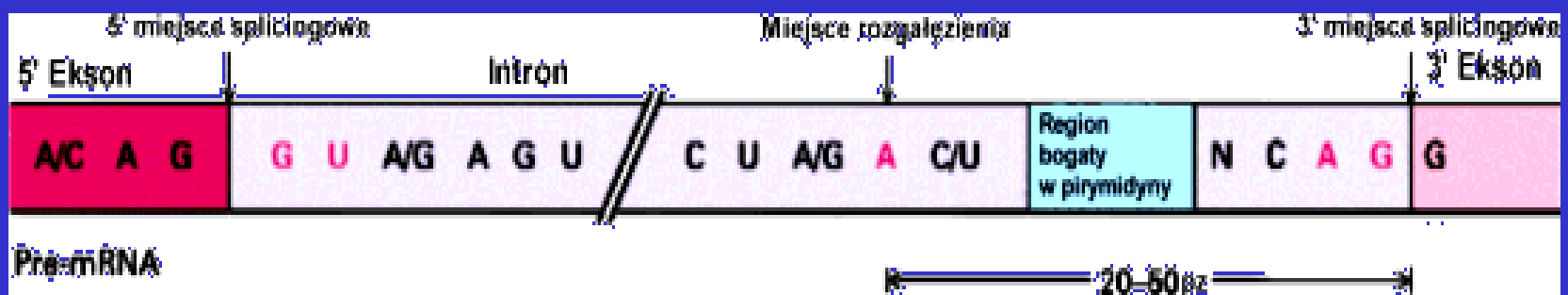
- modyfikacje chemiczne
- cięcie
- usuwanie intronów : splajsing (= składanie genów)

splicing = splajsing

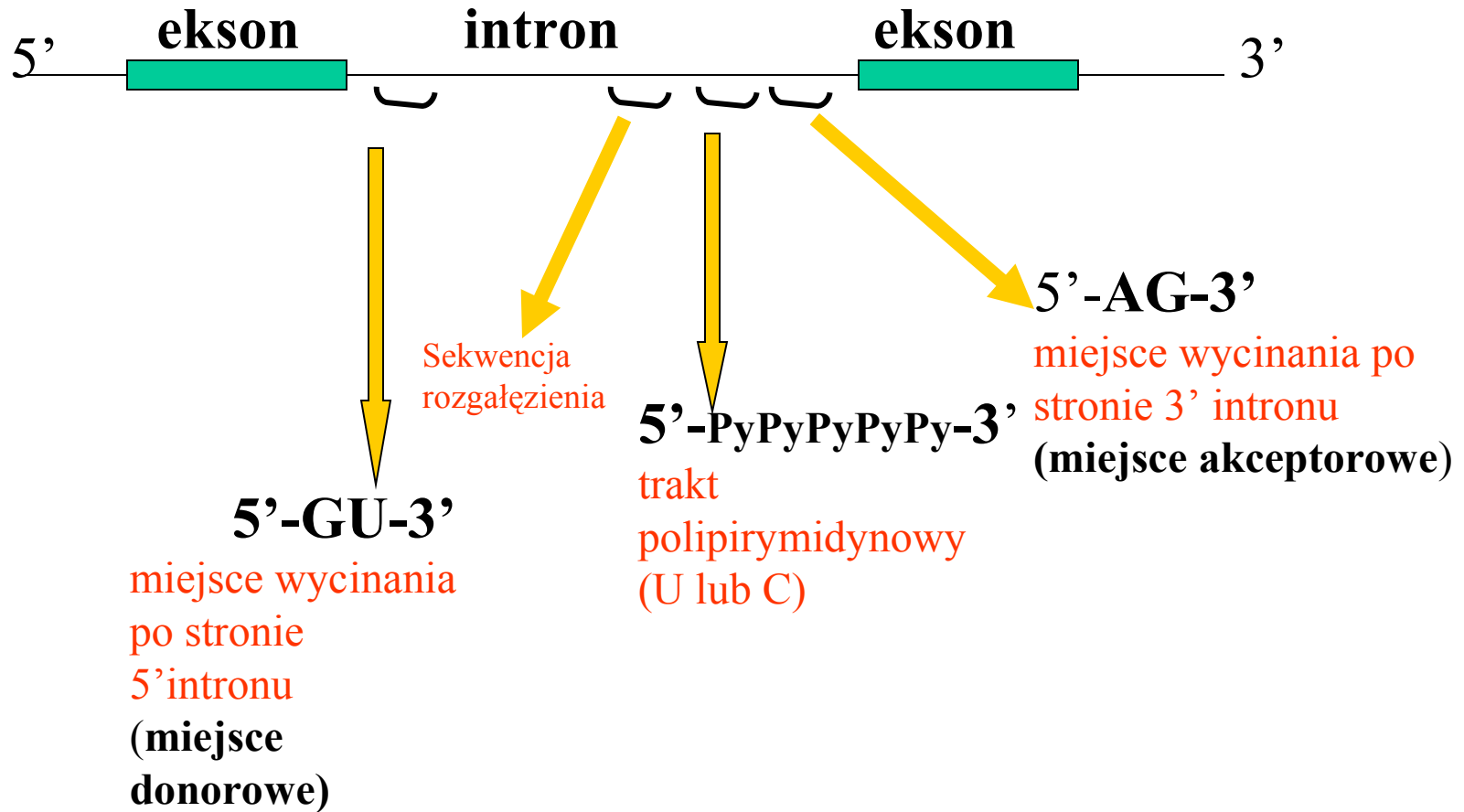
**Splajsing RNA** = usuwanie intronów z cząsteczki pre-RNA i łączenie eksonów w procesie dojrzewania funkcjonalnego RNA

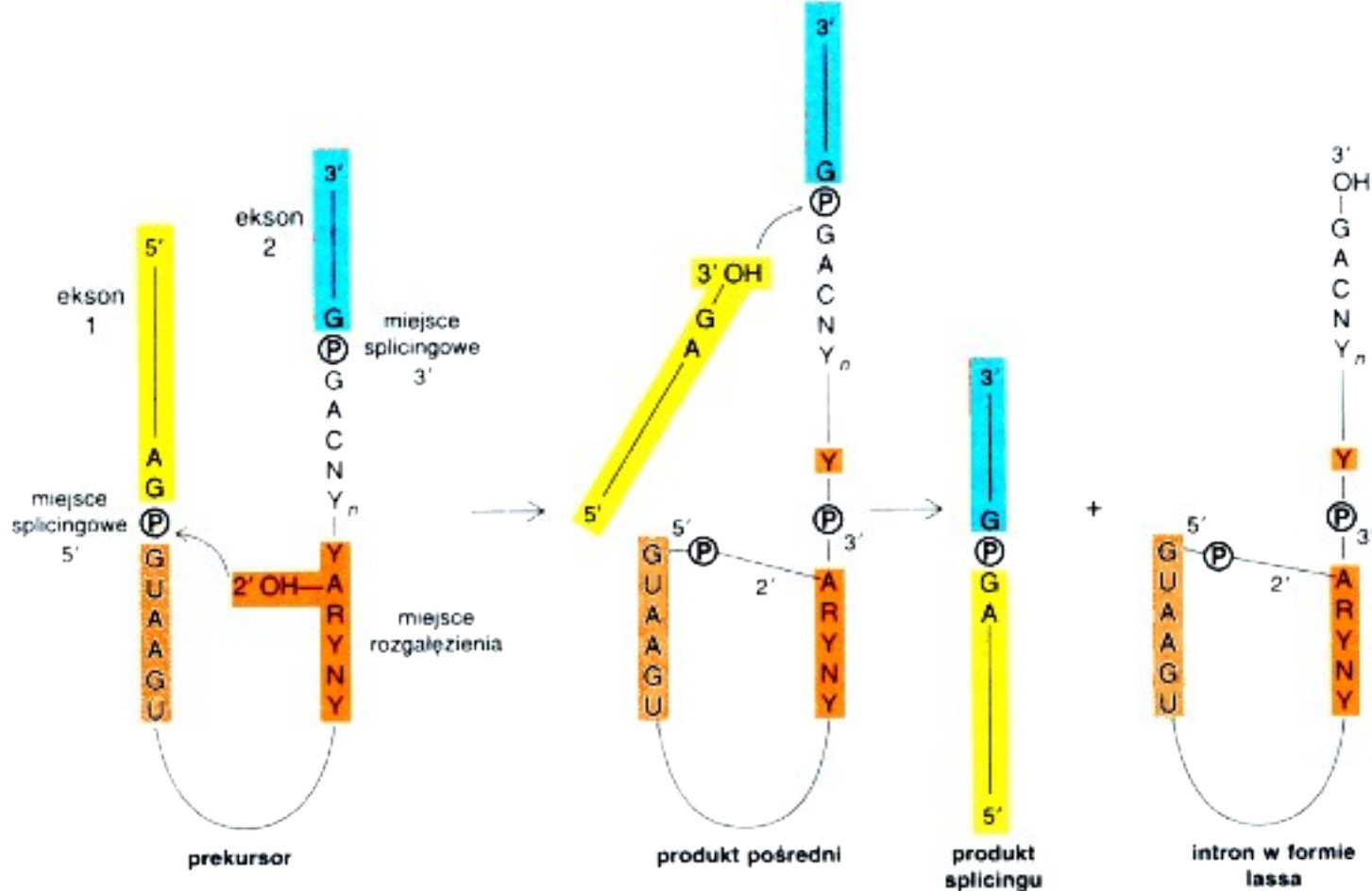
- Introny występują w genach kodujących białka, tRNA oraz rRNA, zarówno w genomach jądrowych jak i w genomach organelli
- Wyróżniamy 2 rodzaje intronów: wycinane przez cząsteczki snRNP oraz samowycinające się

- Introny posiadają wspólne elementy rozpoznawane przez aparat splicingowy. Z porównywania sekwencji różnych intronów wynika, że łączą je następujące podobieństwa:
- na 5' końcu zawierają zawsze kolejno: resztę guaninową i uracylową (5'- GU)
  - na ich 3' końcu występuje reszta guaninowa poprzedzona resztą adeninową (AG - 3')
  - wewnątrz zawierają tzw. miejsce rozgałęzienia, w którym kluczową dla splicingu rolę odgrywa nukleotyd adeninowy.



# Sekwencje konserwatywne w intronach kręgowców, wymagane dla zajścia splajsingu

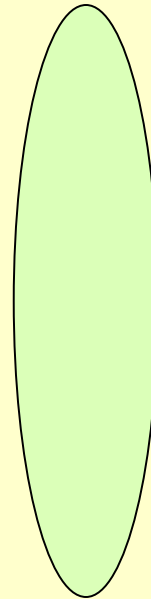
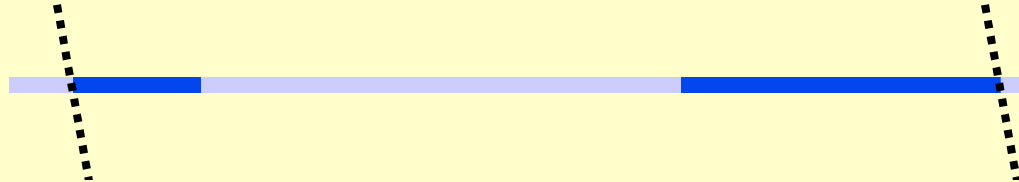




- Cięcie po stronie 5' intronu następuje poprzez reakcję transestryfikacji, w której bierze udział grupa hydroksylowa przyłączona do węgla 2' nukleotydu adozynowego położonego w obrębie sekwencji intronowej
- Cięcie po stronie 3' intronu i połączenie eksonów jest wynikiem drugiej reakcji transestryfikacji, następującej za sprawą grupy 3'-OH znajdującej się na końcu eksonu poprzedzającego intron. Grupa ta atakuje wiązanie fosfodiesterowe w miejscu cięcia 3', przecinając je i uwalniając intron w postaci struktury lasa, który jest następnie przekształcany z powrotem w RNA liniowy i ulega degradacji

Koniec 3' eksonu leżącego przed intronem przyłącza się do nowo utworzonego końca 5' eksonu leżącego poniżej, kończąc proces składania

# Pierwotny transkrypt



**mRNA**



**splajseosom**

## Splajseosom = kompleks składający RNA (40 S)

- \* Zbudowany jest z snRNA U1, U2, U4, U5 i U6

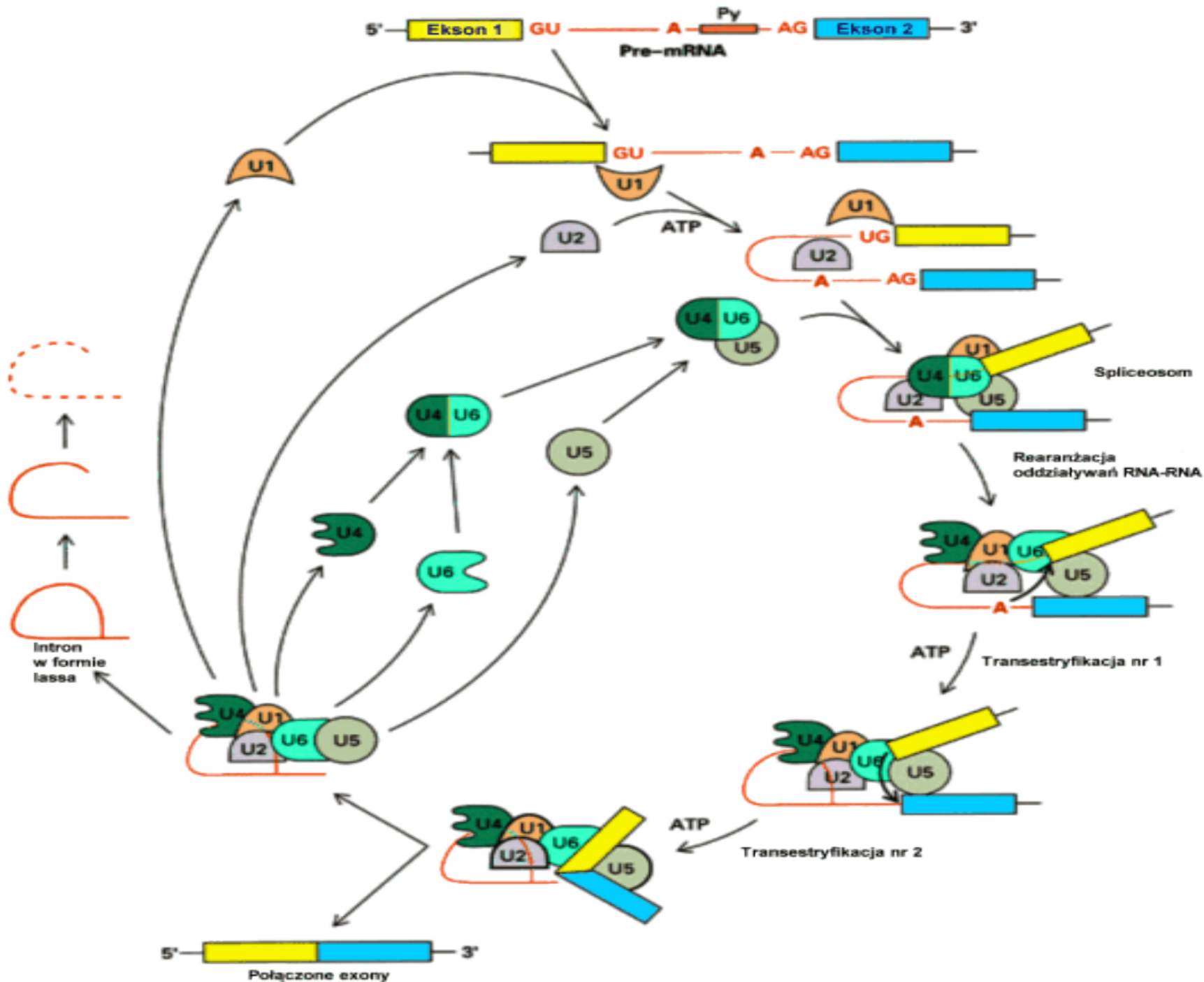
- \* U1-U6 są to liczące 106-185 nukleotydów cząsteczki snRNA, które wiążą się z czynnikami białkowymi tworząc małe jądrowe rybonukleoproteiny (**snRNP**)

- \* Funkcją **snRNP** jest prawidłowe rozpoznanie miejsca splajsingowego w prekursorach jądrowego mRNA i katalizowanie precyzyjnego usunięcia intronu

- \* Miejsce splajsingowe - granica między intronem a eksonem

- \* Do splajseosomu mogą dołączać się czynniki splajsingowe nie mające charakteru snRNP (zidentyfikowano ponad 60)





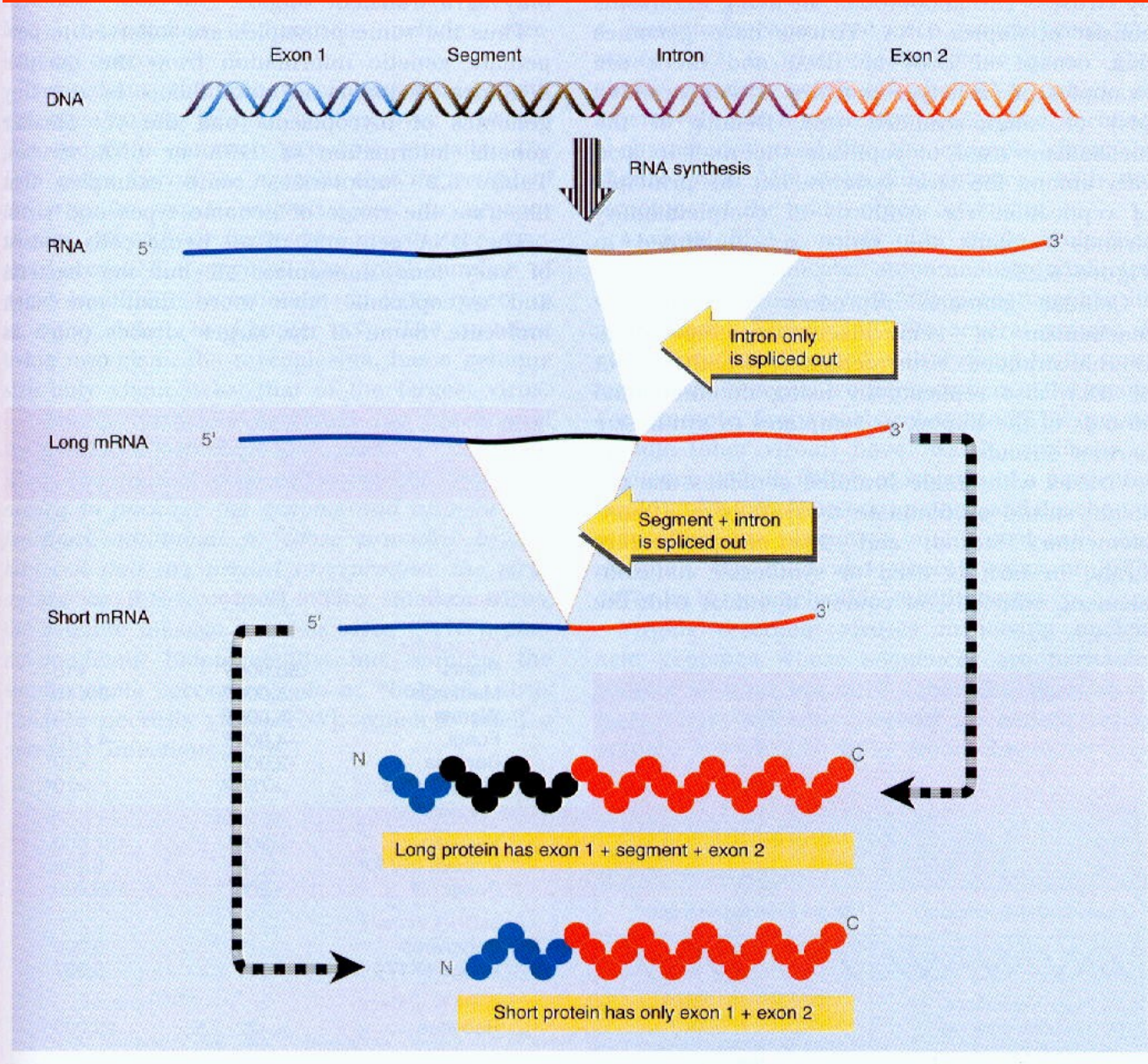
**Splajsing alternatywny** → z jednego genu powstaje więcej niż jeden mRNA

★ dla niektórych genów istnieje kilka możliwości składania pierwotnego transkryptu

★ w wyniku łączenia ze sobą różnych eksonów danego genu powstaje więcej niż jeden rodzaj mRNA dzięki czemu może powstać seria pokrewnych białek (izoform) jak np.: fibronektyna, różnicowanie przeciwciał

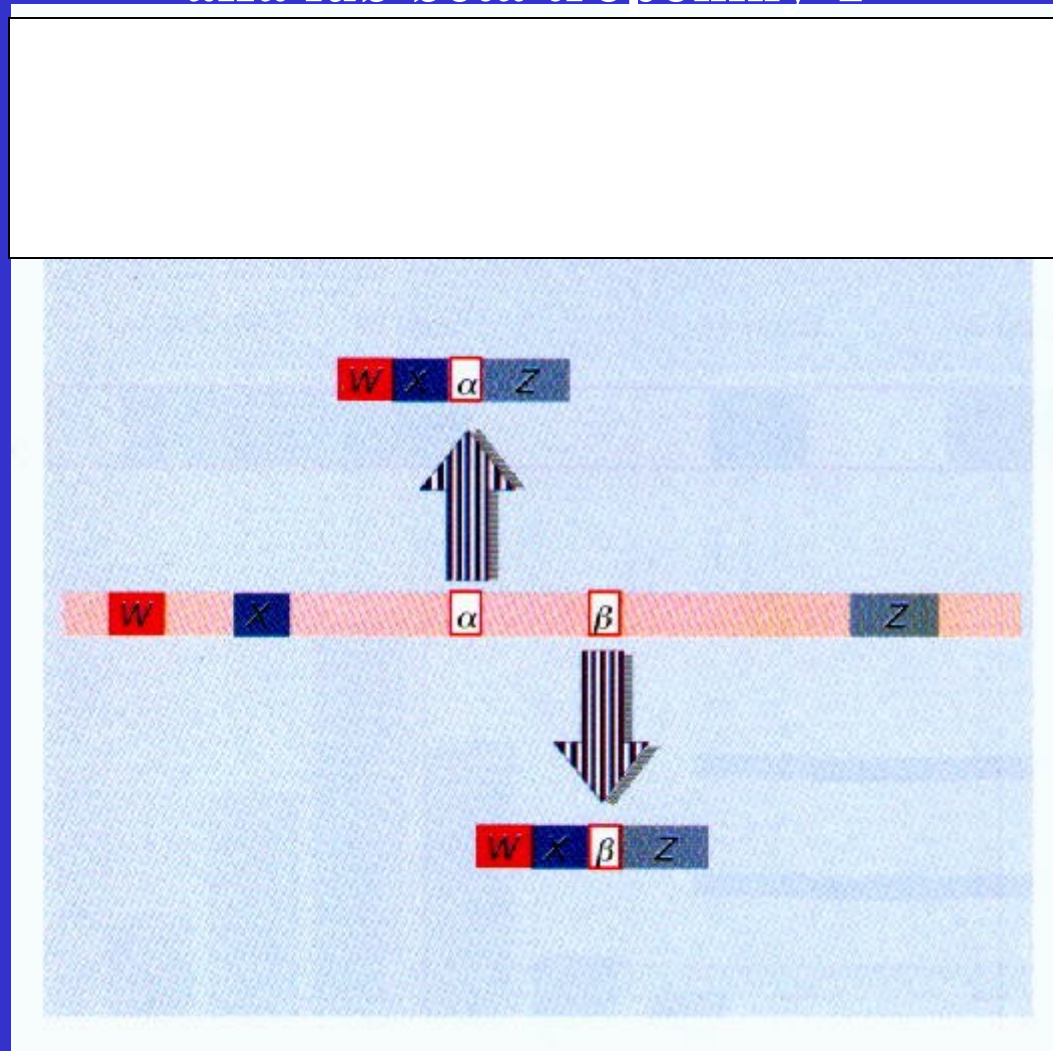
★ Splicing RNA jest mechanizmem, który może generować rozmaite izoformy białek, dzięki temu ekspresja białek przeznaczonych do pełnienia wyspecjalizowanych funkcji może następować w czasie rozwoju tylko w pewnych komórkach lub tkankach

# Niektóre geny mają alternatywne drogi ekspresji – mRNA powstaje na drodze splajsingu alternatywnego





**W wyniku alternatywnego splajsingu powstają warianty  
alfa lub beta troponiny T**



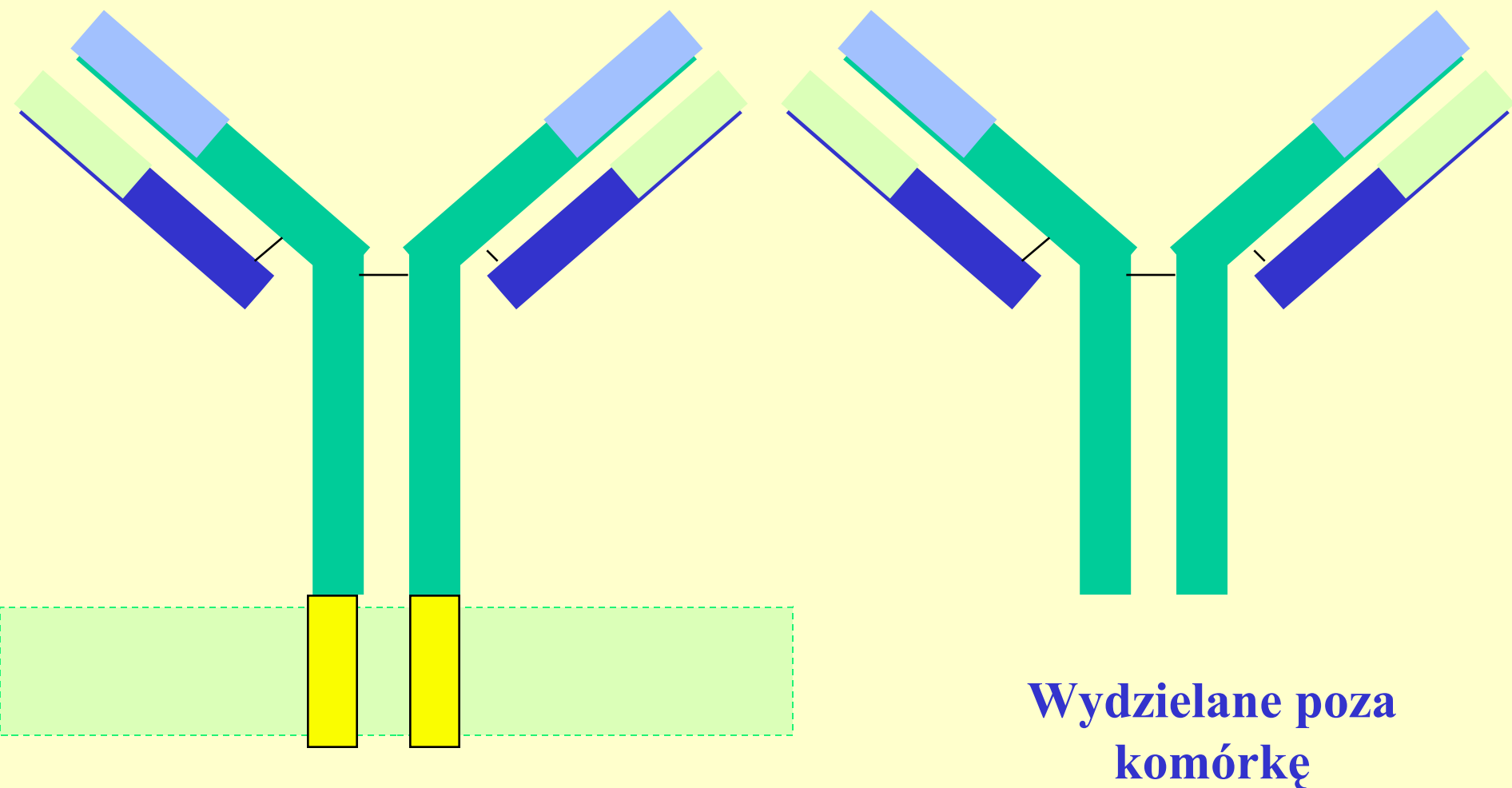
# Splajsing Alternatywny

## Przeciwciała

$L_2H_2$  (krążące) vs.  $L_2H_2$

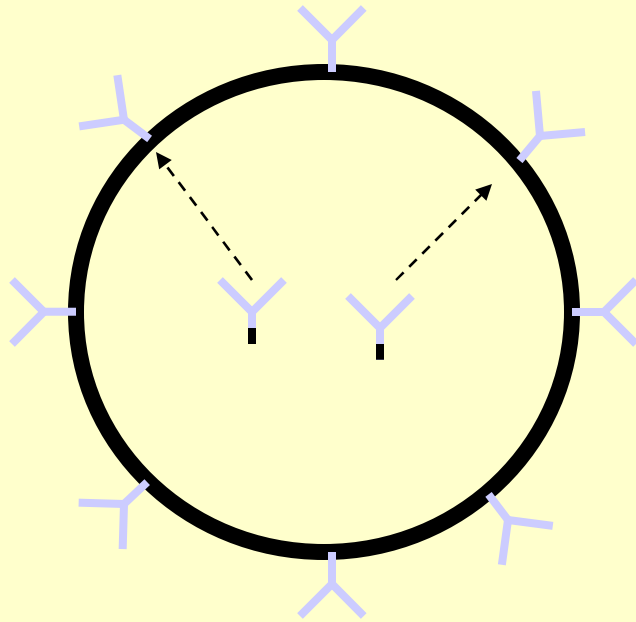
$L_2H_2$  w czasie splajsingu uzyskuje dodatkowy ekson, kodujący peptyd kotwiczący przeciwciało w błonie komórkowej

$L_2H_2$  (krążące) vs.  $L_2H_2$

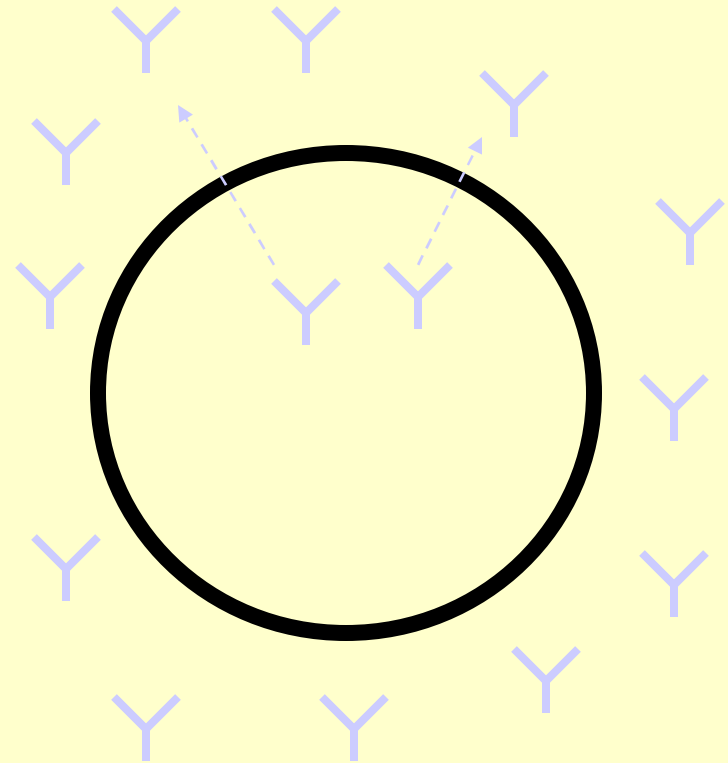




# Ten sam gen różne białka –splajsing alternatywny

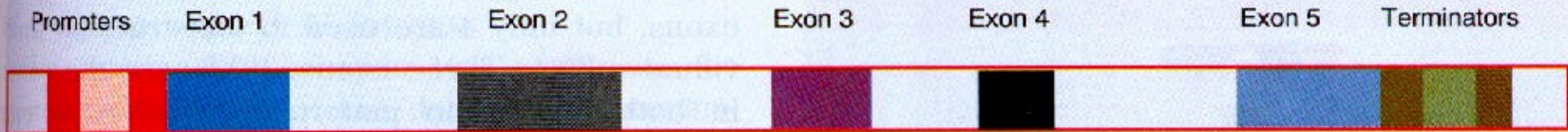


**Komórka  
rozpoznająca  
antygen**



**Plazmocyt = limfocyt  
B produkujący przeciwciała**

# Gen może kodować różne mRNA poprzez zmiany promotora, m. inicjacji lub terminacji transkrypcji



## Użycie alternatywnych promotorów



## Użycie alternatywnych terminatorów



## Splajsing alternatywny





Dwa białka mogą być produktem tego samego genu dzięki temu, że start bądź terminacja ekspresji nastąpią w różnych miejscach genu

Białko pełnej długości



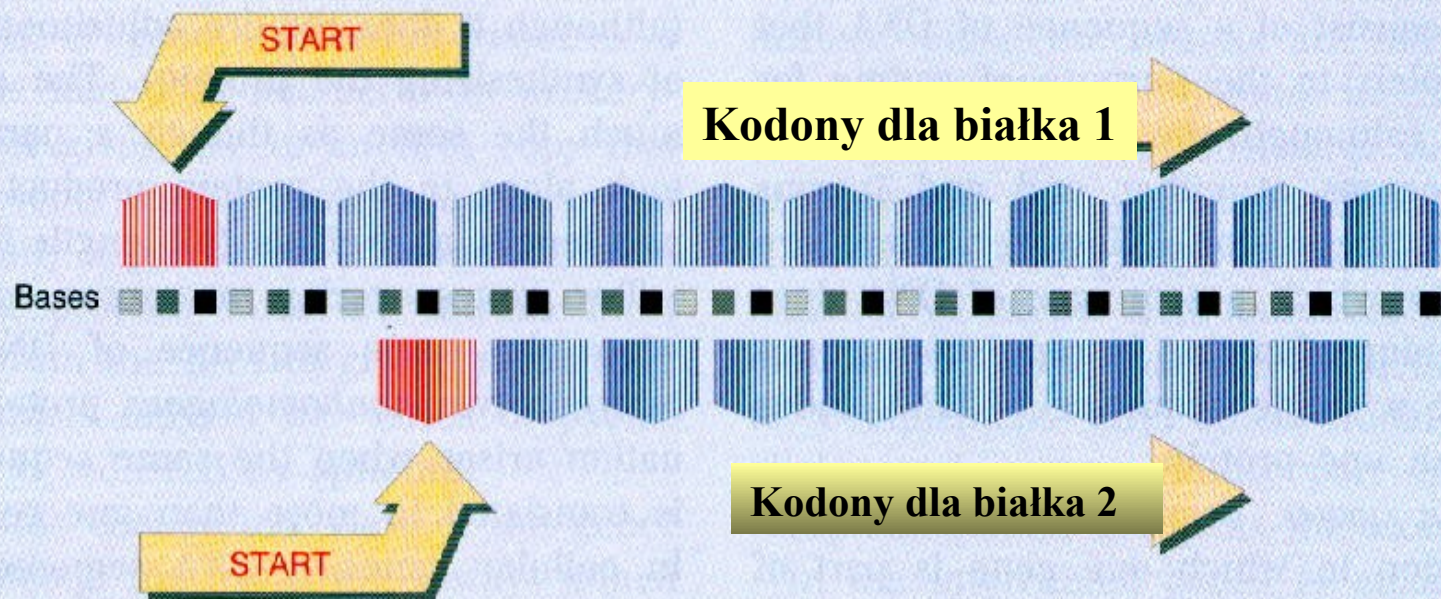
Krótką wersja białka



START alternatywny



**Dwa białka mogą być kodowane przez tę samą sekwencję DNA  
dzięki różnym ramkom odczytu**



# REDAGOWANIE RNA

✧ Szczególny rodzaj dojrzewania mRNA - modyfikacje chemiczne stwarzają możliwość zmiany właściwości kodujących transkryptu, prowadząc w efekcie do odpowiedniej zmiany sekwencji aminokwasowej zakodowanego białka

✧ Redagowanie RNA występuje u wielu różnych organizmów i obejmuje różnorakie zmiany nukleotydowe

## Redagowanie mRNA ludzkiej apolipoproteiny B



# REDAGOWANIE STWARZA WARUNKI DO TRANSLACJI NIETRANSLACYJNYCH RNA

✧ Redagowanie RNA opisano po raz pierwszy w 1986 w mitochondrialnym mRNA świdrowców

✧ Mechanizm tego zjawiska polega u tych pierwotniaków na wstawienie w określonym miejscu kilku-kilkunastu urydyn oraz na punktowych delecjach w różnych miejscach pierwotnego transkryptu mtRNA; powoduje to kreowanie otwartej ramki odczytu

✧ Sekwencje, które mają zostać zmodyfikowane, rozpoznaje cząsteczka RNA zwana „przewodnim” (gRNA) zawiera ona „ogon” poli-U dostarczający reszt urydyny



# Redagowanie RNA...

\* Niezależnie od gRNA w procesie redagowania uczestniczy specjalny system enzymatyczny, który może przeprowadzać zarówno insercję jak i delecję zasad w różnych miejscach pierwotnego transkryptu

\* Redagowanie RNA zachodzi w większości genomów mitochondrialnych i chloroplastowych oraz w niektórych genomach jądrowych

\* Redagowanie RNA to zjawisko powszechne w komórkach, pozwala na zwiększenie różnorodności białek a tym samym może wpływać na wiele procesów komórkowych

\* Redagowanie RNA może występować w infekcjach wirusowych (w. Ebola) lub nowotworzeniu - efekt niekorzystny dla organizmu

# Przykłady redagowania mRNA

**Tabela 3.1.** Przykłady redagowania mRNA

Organizm / organ	Organellum	Modyfikacja
<i>Kinetoplastidae</i>	mitochondria	insercja / delecja U
<i>Physarum polycephalum</i>	mitochondria	insercja C
Rośliny nasienne	mitochondria	konwersja C → U, U → C
Rośliny kwiatowe	chloroplasty	konwersja C → U
Wątroba / jelito szczura	jądro	konwersja C → U
Nowotwór ludzki	jądro	konwersja C → U
Wirus Hepatitis delta		konwersja A → I
Paramyksowirusy		insercje G
Wirus Ebola		insercje A

# Splajsing autokatalityczny RNA

❖ **Introny samowycinające** zaliczane są do **rybozymów**, a splicing przez nie dokonywany nosi nazwę **splajsingu autokatalitycznego**

❖ Splajsing autokatalityczny może być wspomagany przez czynniki białkowe takie jak maturazy, endonukleazy, odwrotne transkryptazy, które są zakodowane w intronach samowycinających się

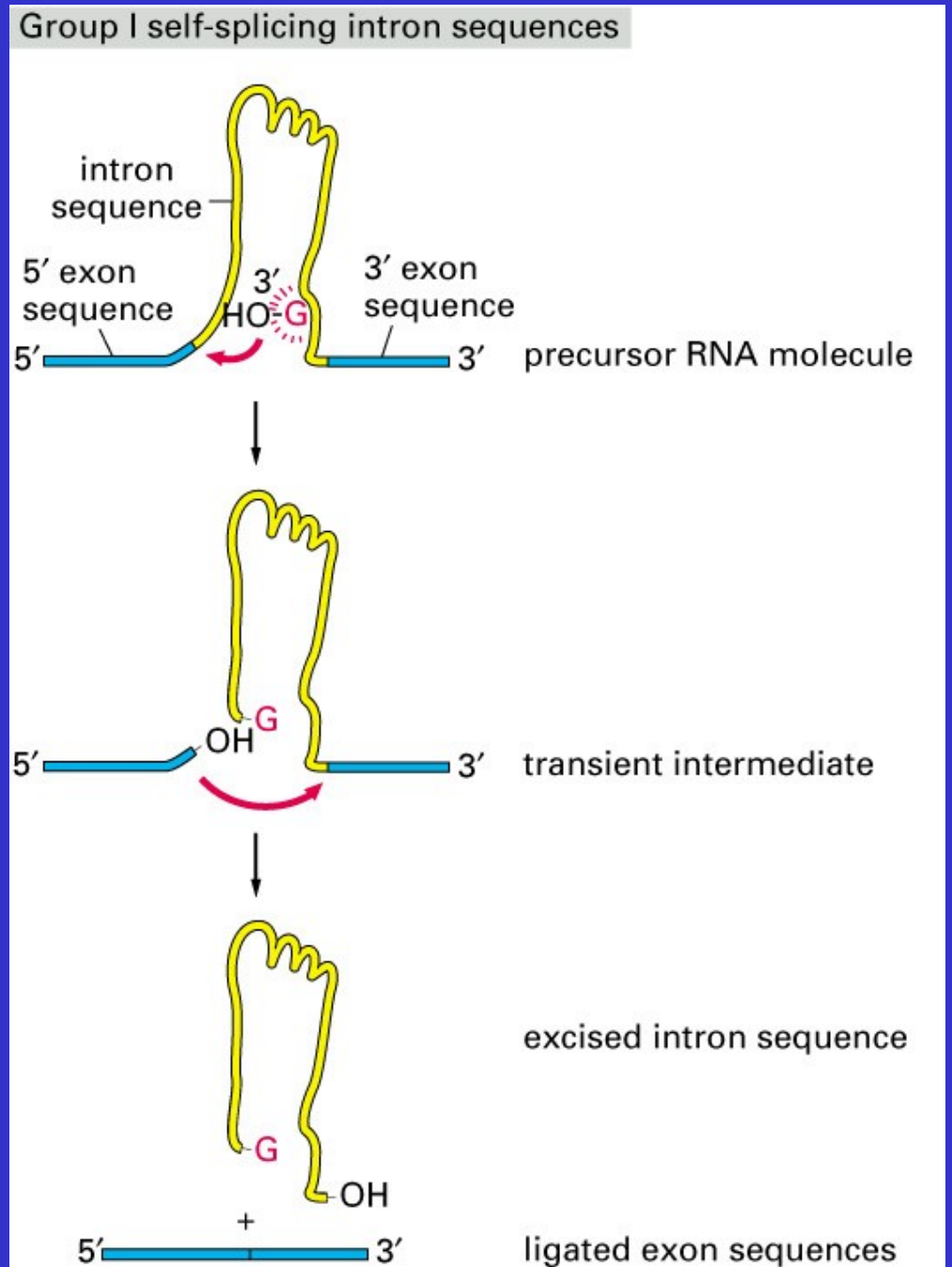
**Splajsing autokatalityczny RNA** odbywa się w dwóch etapach, przez dwie kolejne reakcje transestryfikacji

**Wśród intronów samowycinających się wyróżniamy:**

- ❖ Introny grupy I, ewolucyjnie starsze,
- ❖ Introny grupy II - ewolucyjnie młodsze,
- ❖ Obie grupy intronów różni mechanizm splajsingu

# Introny grupy - I

→ w intronach grupy I splajsing rozpoczyna się związaniem do sekwencji intronowej guanozyny lub GTP, które są kofaktorami tej reakcji; w jej wyniku uwalnia się intron w formie liniowej



## Introny - II

W splajsingu intronów grupy II następuje utworzenie przejściowego związku kształtu lasa. Introny tej grupy nie potrzebują do splicingu kofaktorów gdyż zawierają szczególnie reaktywną resztę adenylanową

Splajsing autokatalitycznych zachodzi

Group II self-splicing intron sequences

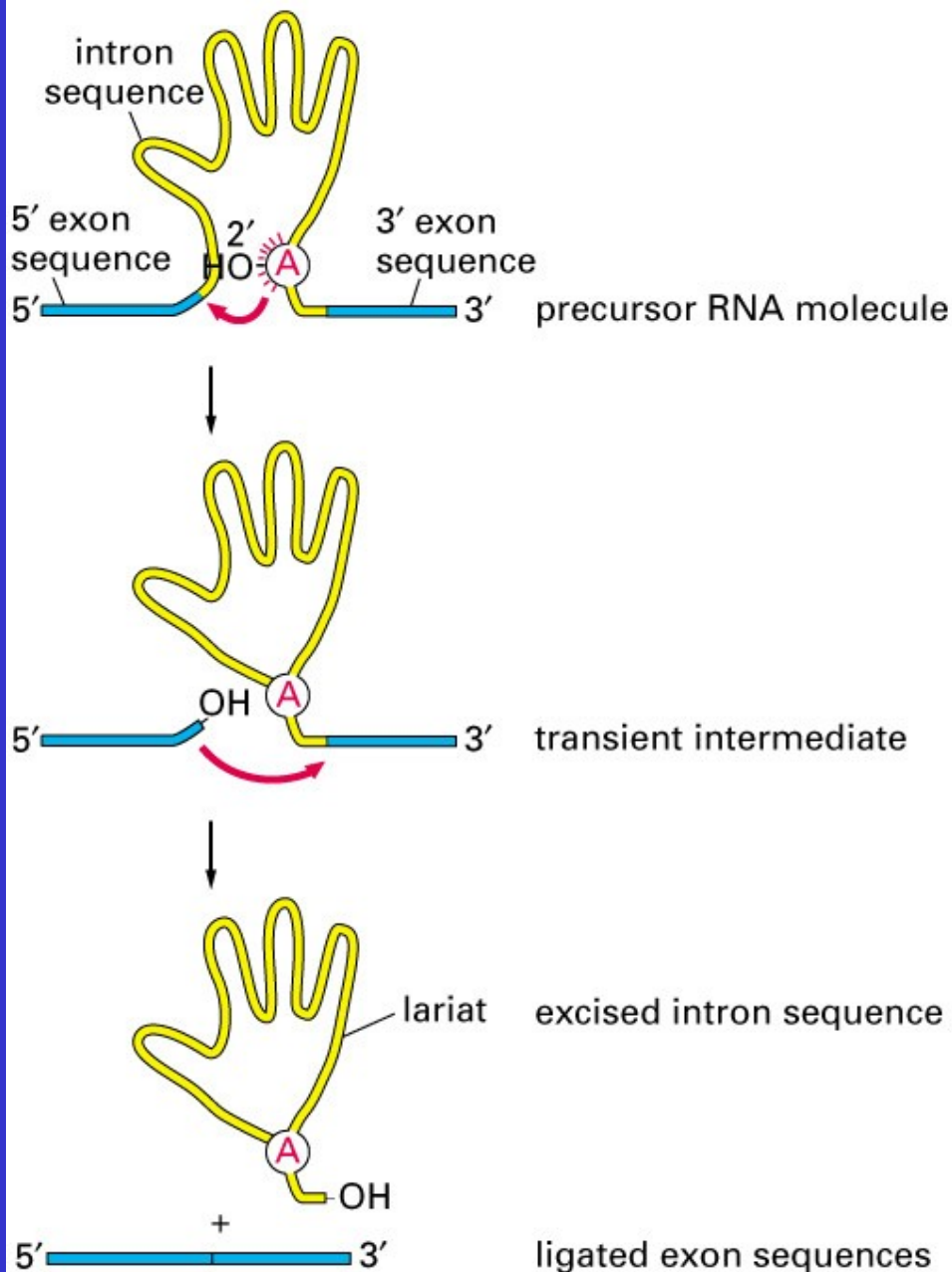


Figure 6-36 part 2 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

# Dojrzewanie eukariotycznych pre-rRNA

Eukariota - 4 rodzaje rRNA

♣ 5S-rRNA podlega transkrypcji przez polimerazę III, i nie podlega dojrzewaniu

♣ 5,8S rRNA, 18S rRNA i 28S rRNA podlegają transkrypcji przez polimerazę I z 1 jednostki transkrypcyjnej jako pre rRNA i podlegają dojrzewaniu poprzez cięcie i przycinanie końców przy udziale kilku nukleaz w tym rybonukleazy MRP

♠ Introny w pre-rRNA ulegają samowycinaniu (rybozomy - relikty świata RNA)



# W jąderku powstają podjednostki rybosomów i RNP

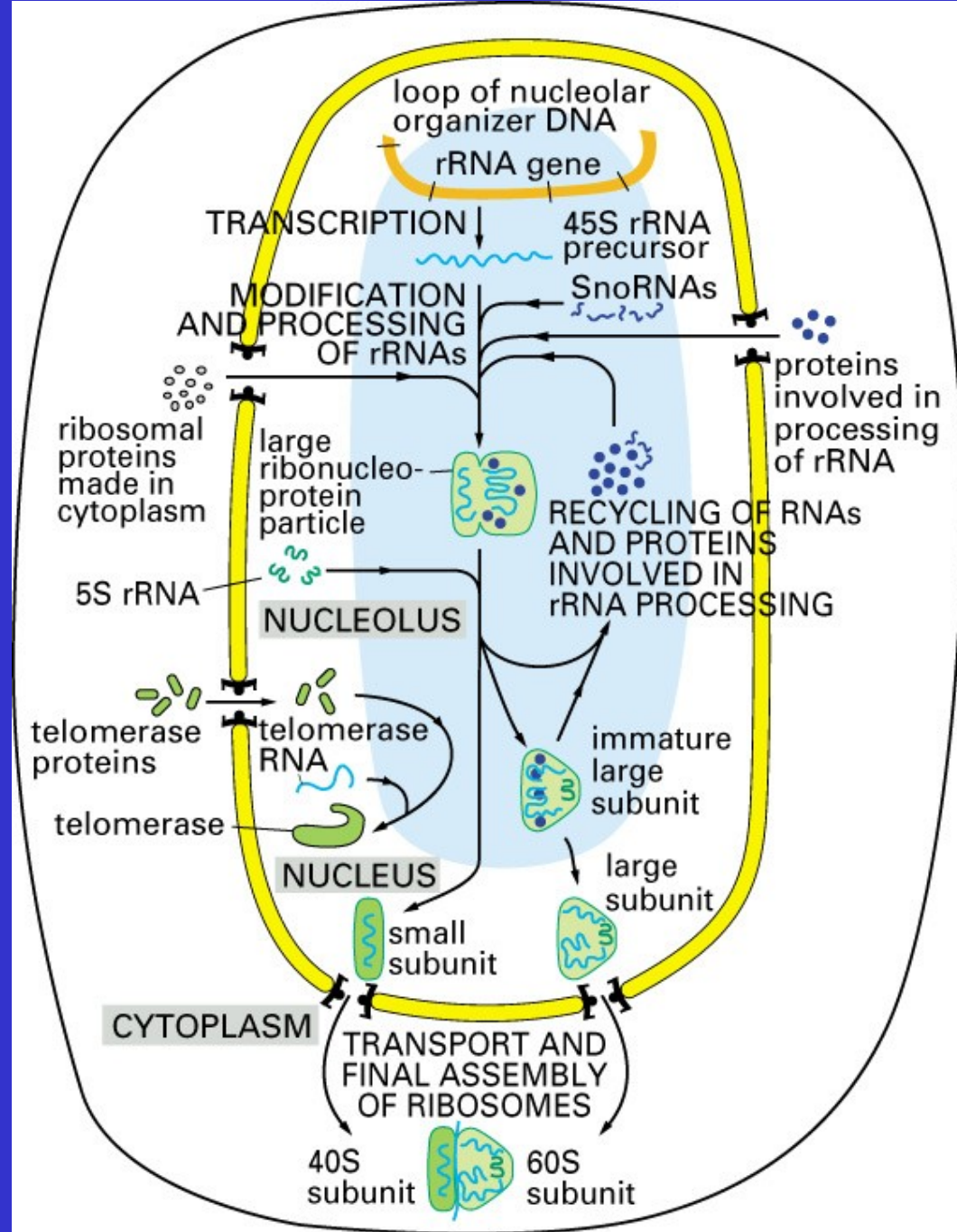
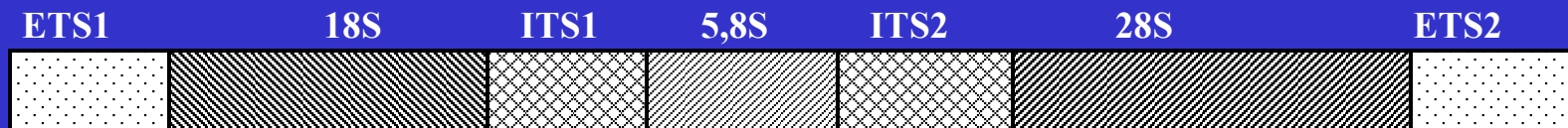


Figure 6-47. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.



**Schemat organizacji DNA kodującego rybosomalne RNA organizmów eukariotycznych.**

**ETS1, ETS2 - zewnętrzne transkrybowane sekwencje  
ITS1; ITS2 - wewnętrzne transkrybowane sekwencje  
rozdzielające**

**18S - sekwencje kodujące RNA małej podjednostki  
rybosomu**

**5,8S i 28 S - sekwencje kodujące RNA dużej  
podjednostki rybosomu**

# Dojrzewanie rRNA u eukariontów

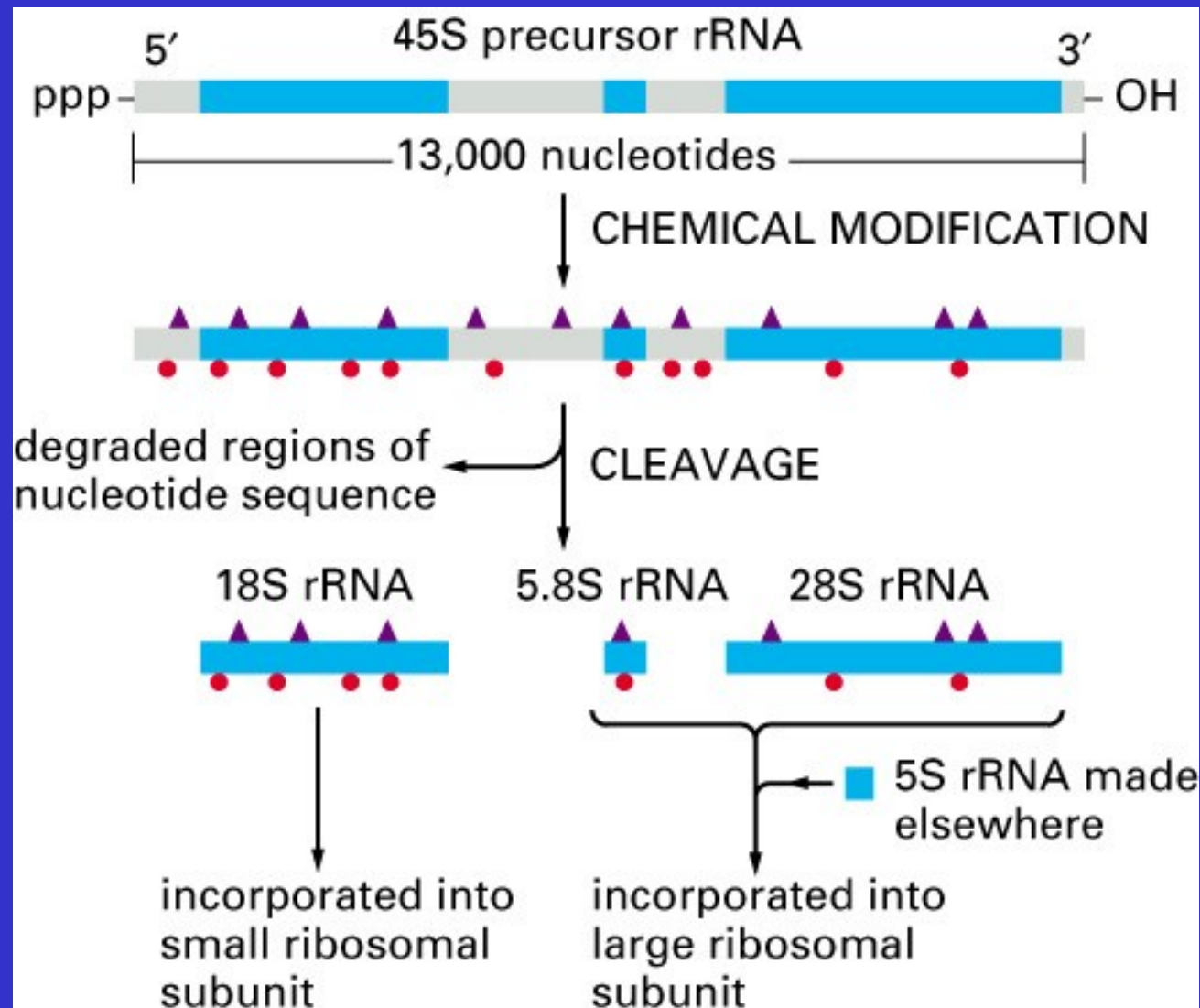


Figure 6-42. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

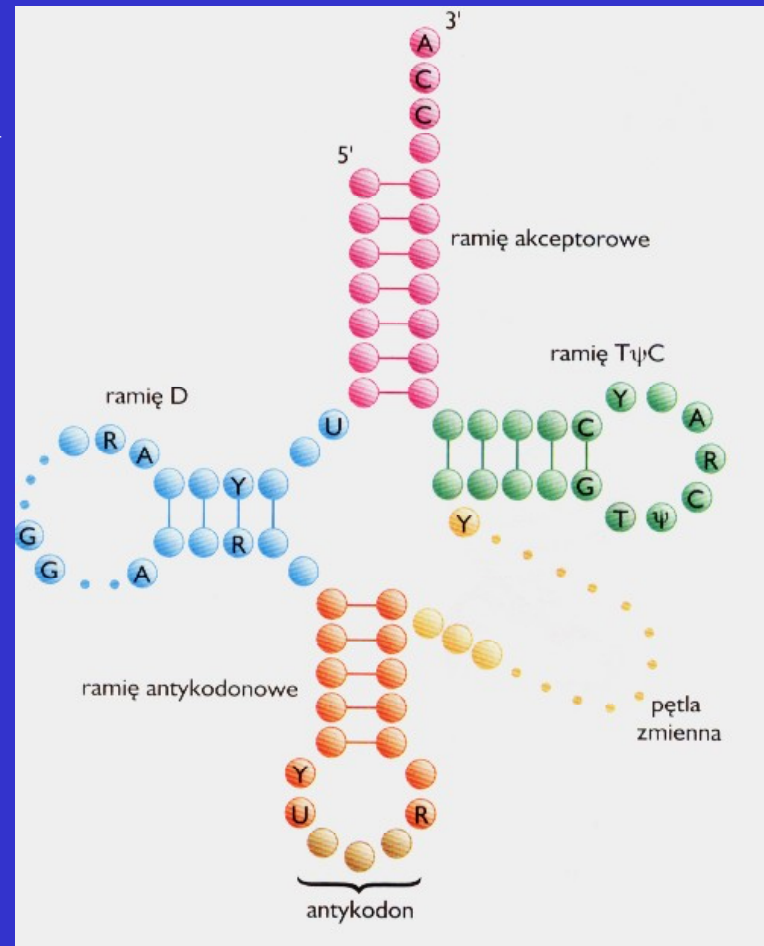
# Dojrzewanie eukariotycznych pre-tRNA

✳ Niektóre eukariotyczne pre-tRNA zawierają introny, które nie są podobne do intronów GU-AG i AU-AC występujących w pre-mRNA

✳ Introny w eukariotycznych pre-tRNA występują najczęściej w obrębie pętli antykodonu i są wycinane enzymatycznie (rybonukleazy)

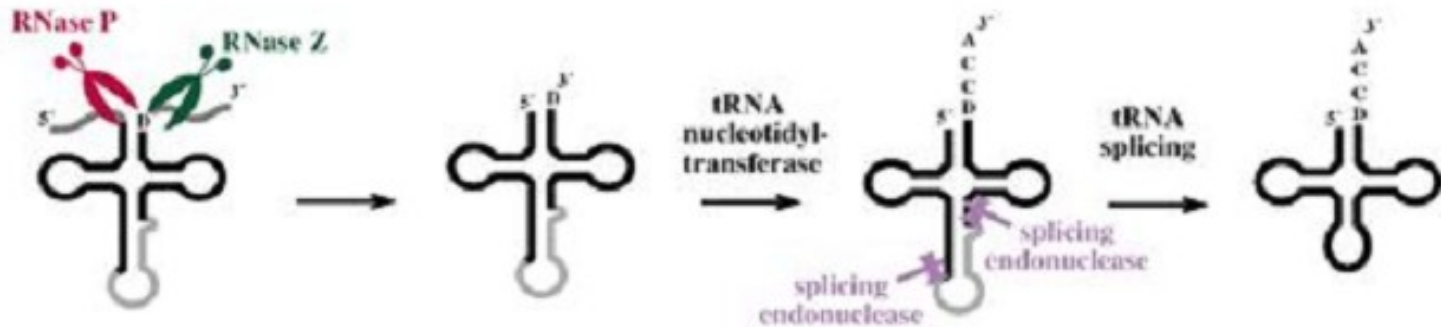
✳ pre-tRNA podlegają również obróbce przez serię rybonukleaz

✳ Wszystkie dojrzałe tRNA muszą kończyć się trójką nukleotydów 5'-CCA-3', która jest dodawana przez nukleotydylotransferazę tRNA

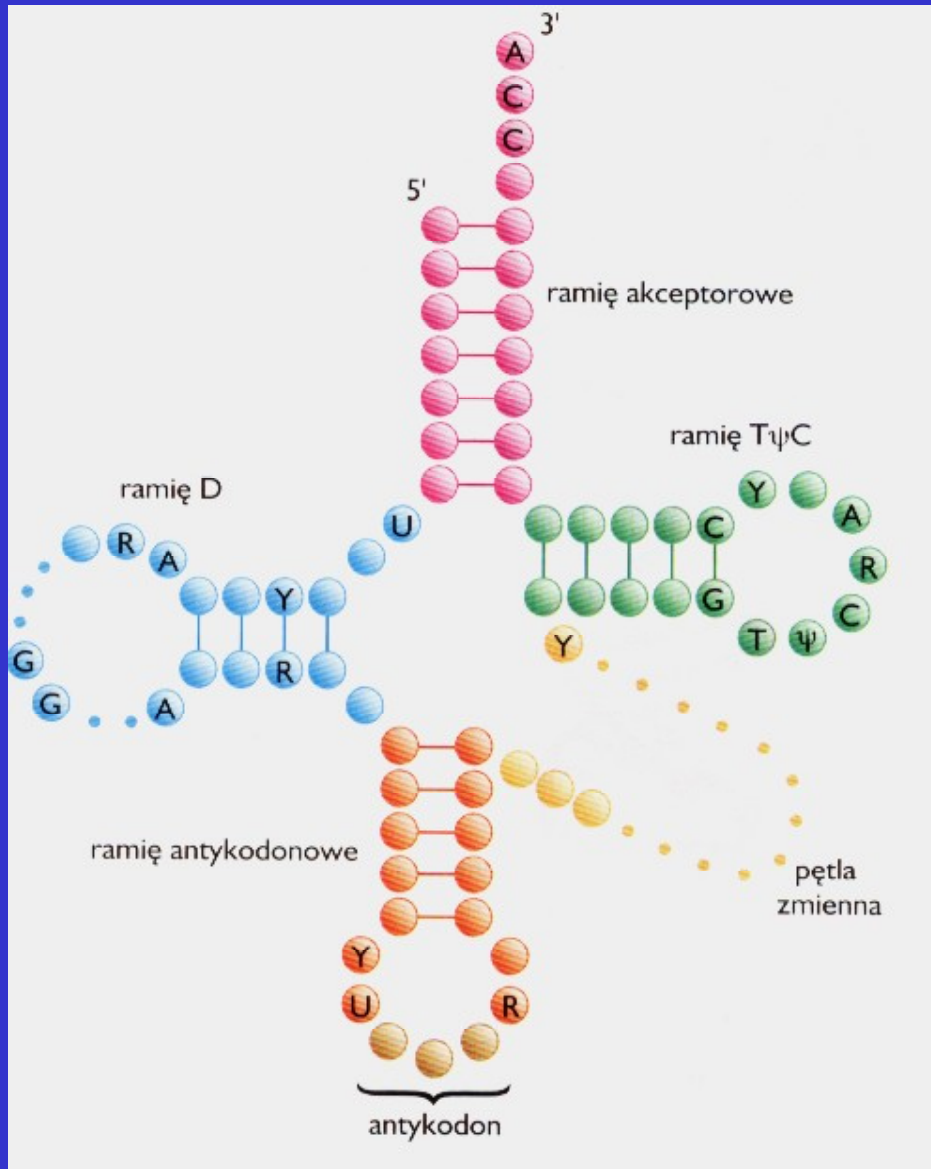


# Dojrzewanie pre-tRNA

## tRNA maturation in eukarya



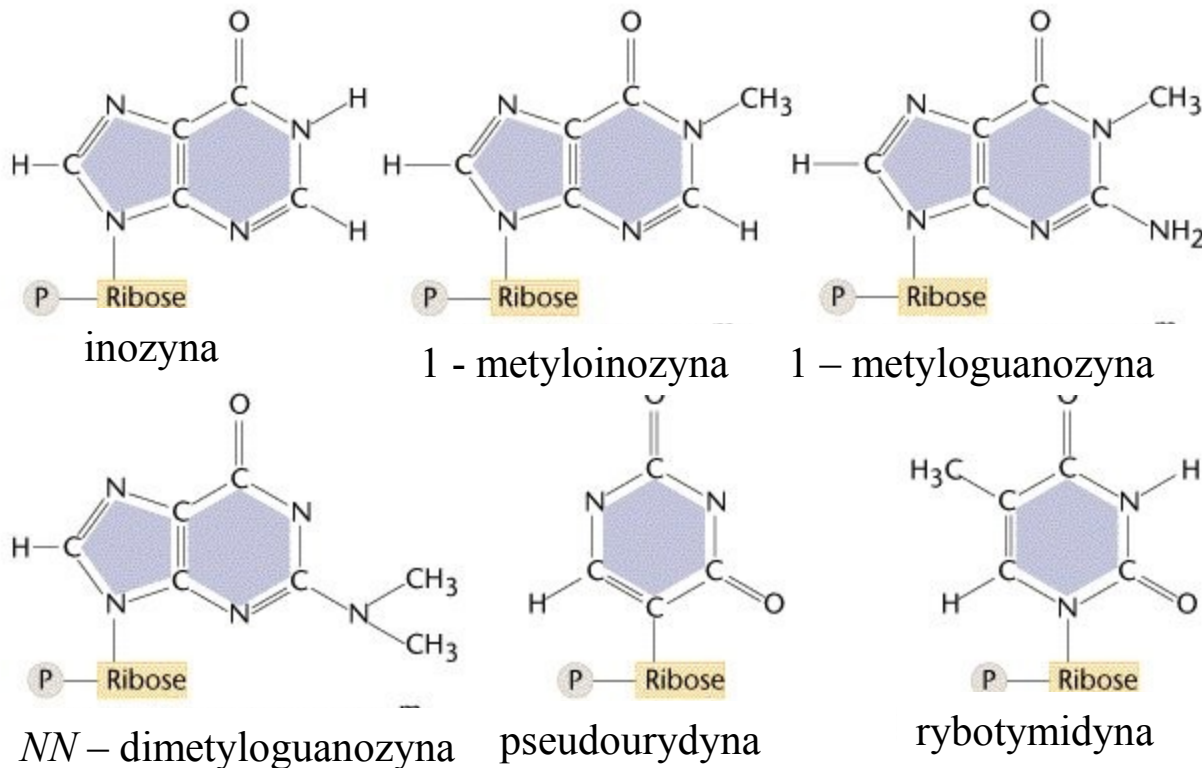
# Znane są sekwencje ponad 100 tRNA



## Cechy wspólne tRNA:

1. **Długość 73-93 nukleotydów**
2. **Zawiera wiele nietypowych zasad**
3. **Koniec 5' jest zawsze fosforylowany i zwykle zawiera pG**
4. **koniec 3' to zawsze -CCA-OH**
5. **Wysoce konserwatywne struktury 3-D,**
6. **Pętla antykodonowa zawiera 7 nukleotydów**





(Klug & Cummings 1997)

**Cząsteczki pre-tRNA są transkrybowane z genów przy użyciu 4 typowych zasad. W trakcie dojrzewania są one modyfikowane chemicznie aby ustabilizować strukturę drugorzędową tRNA**

tRNA zawierają  
zmodyfikowane zasady  
takie jak:

metryloguanozyna (mG)

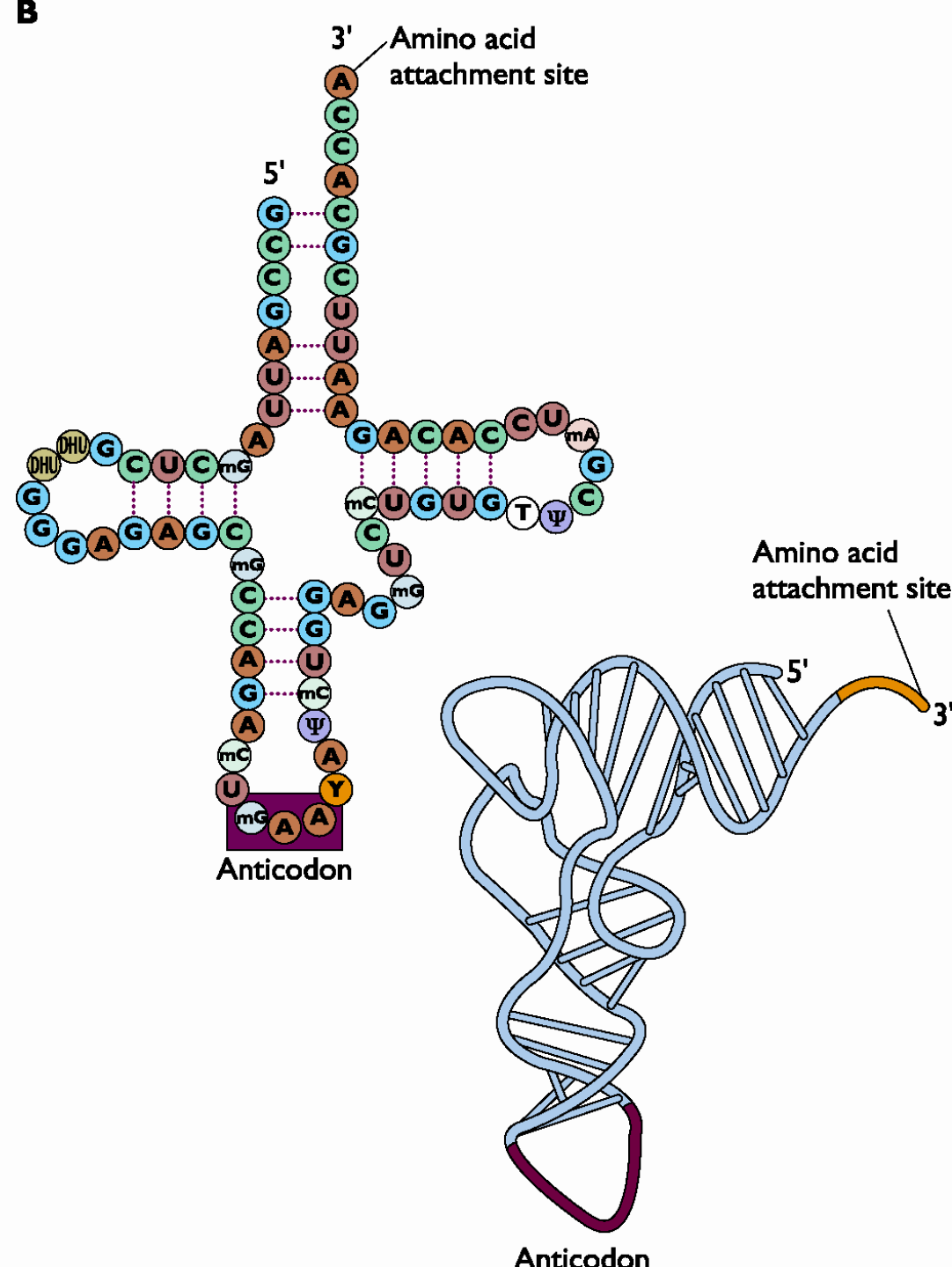
metrylocytozyna (mC)

Dihydrourydyna (DHU)

Rybotymidyna (G)

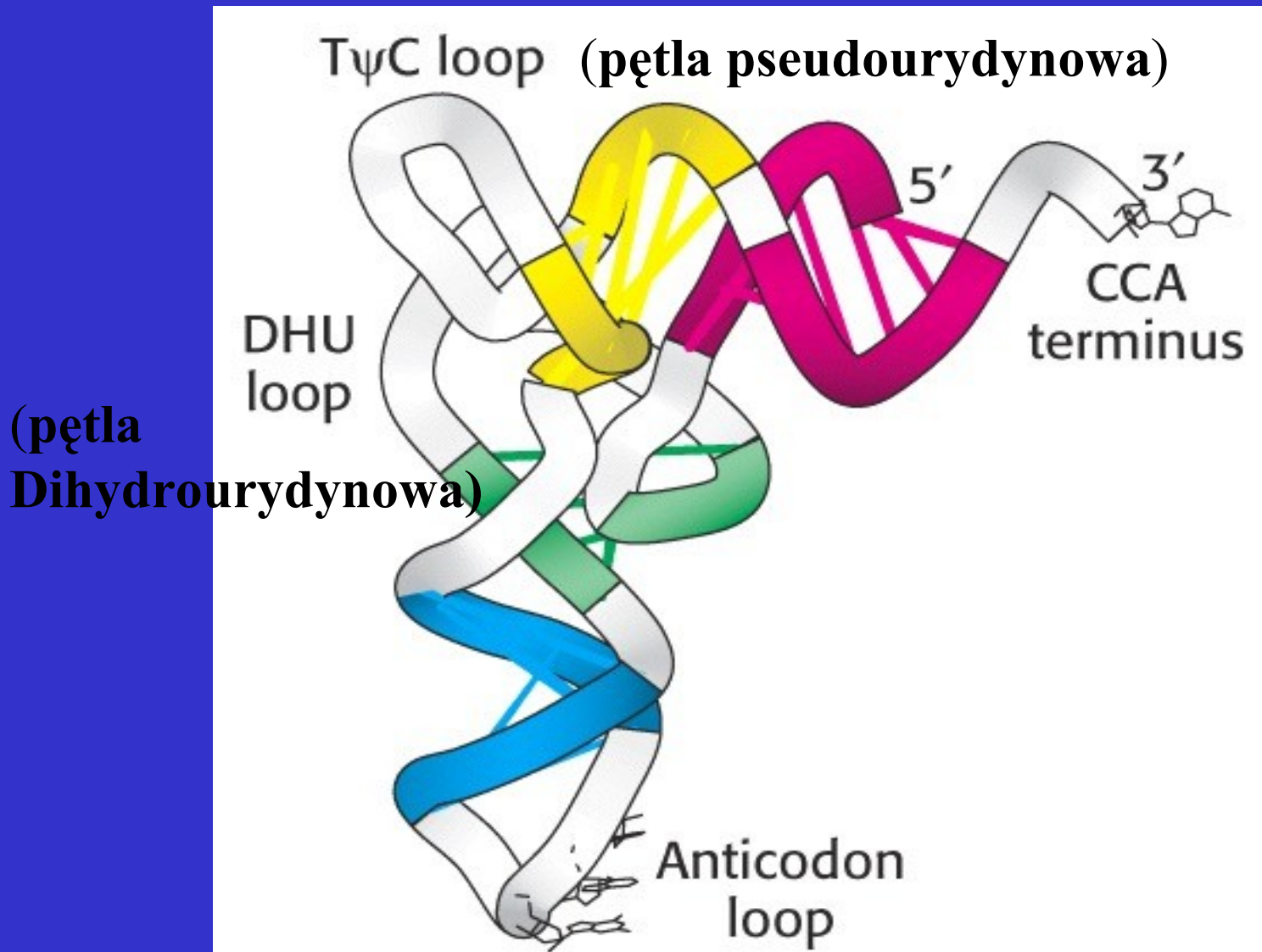
Modyfikowana puryna (Y)

Pseudourydyna (Ψ)



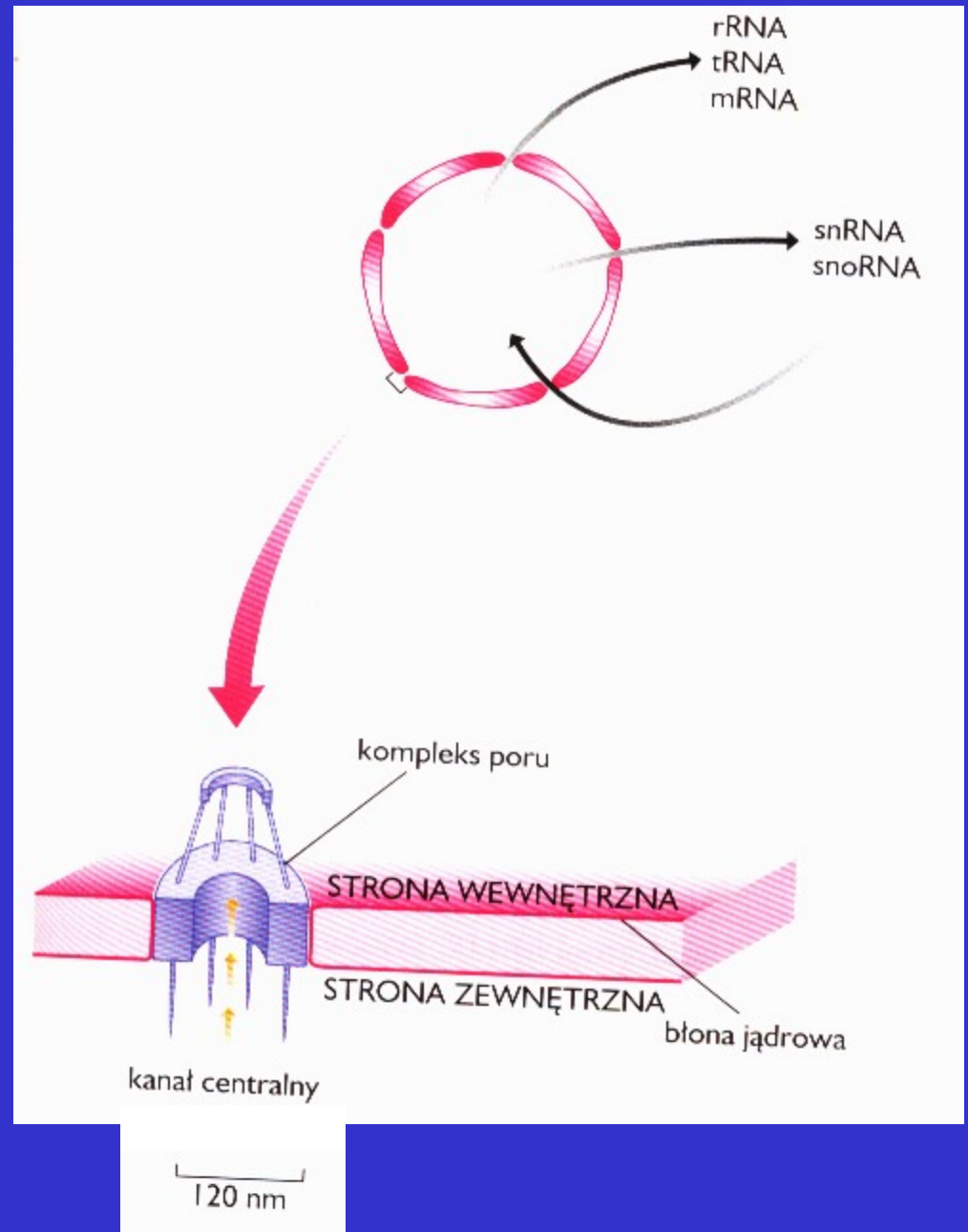
# Struktura przestrzenna (3-D) tRNA

Ustalona przez A. Richa i A. Kluga



Dojrzałe : mRNA, rRNA, tRNA, snRNA są transportowane z jądra do cytoplazmy.

snRNA po połączeniu z białkami wraca do jądra by uczestniczyć w splajsingu



Dziękuję za uwagę