

# KONTROLA GENOVÉ EXPRESE

Buňky vícebuněčného organismu: ⇒ stejná DN  
⇒ různá RN

Buňky z dospělého organismu ⇒ tkáňová kultura =  
Analýza chromosomů diferencovaných a nediferencovaných

Analýza mRNA EB ⇒ ~ 10000 - 20000 různých pro

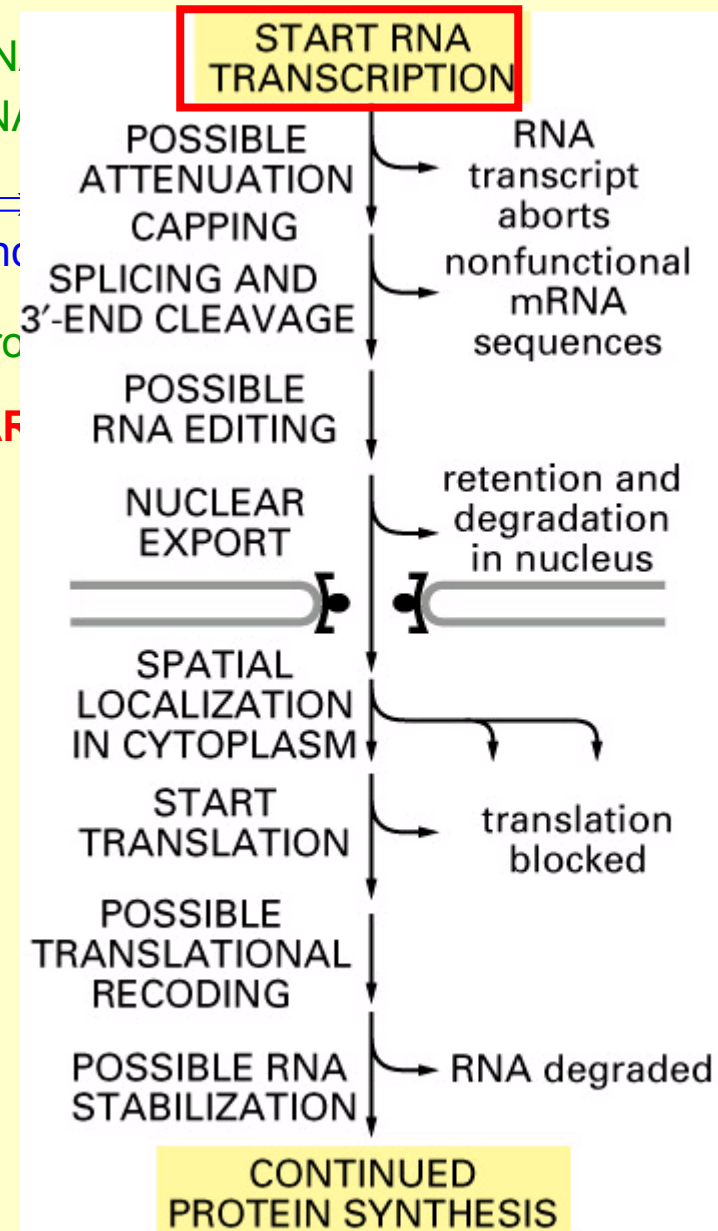
Změna exprese genů v buňce ⇒ **EXTRACELULÁRNÍ**

## REGULACE GENOVÉ EXPRESE

⇒ různá úroveň

### Úroveň iniciace transkripce

- ⇒ nejsou žádné zbytečně syntetizované intermediáty
- ⇒ regulační proteiny, obsahují DNA-vazebné domény

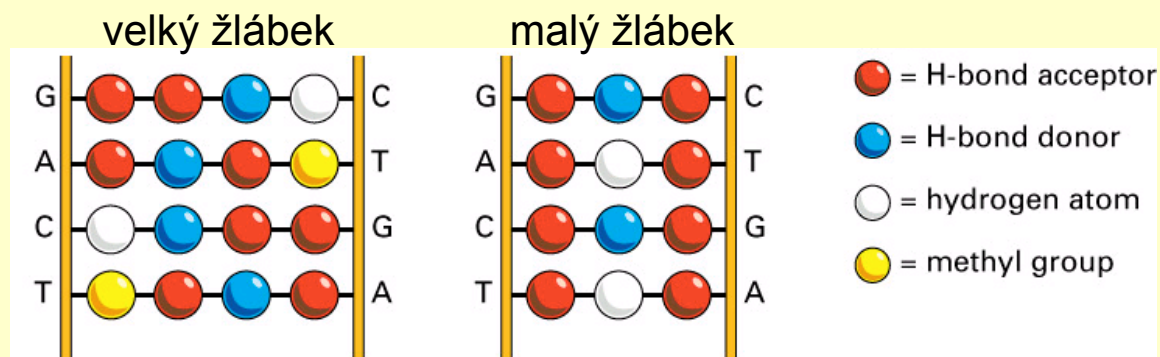
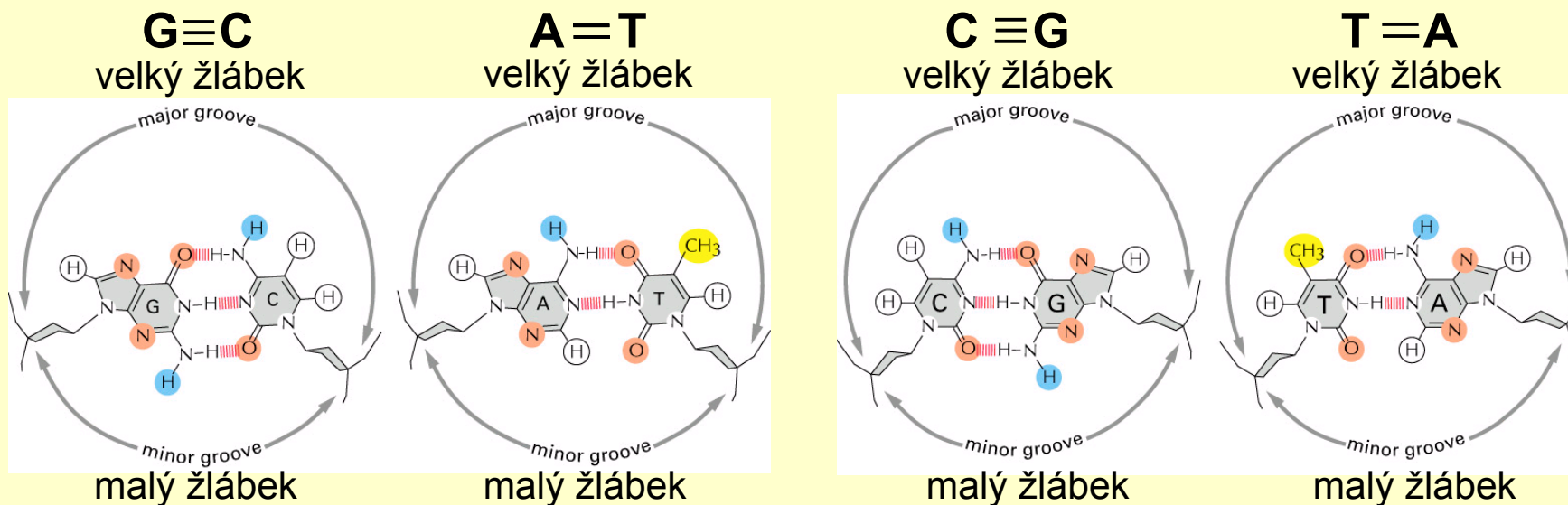


## Rozpoznání DNA-double helixu regulačními proteiny

- Regulační proteiny mohou rozeznat povrch double helixu bez nutnosti porušit vodíkové páry

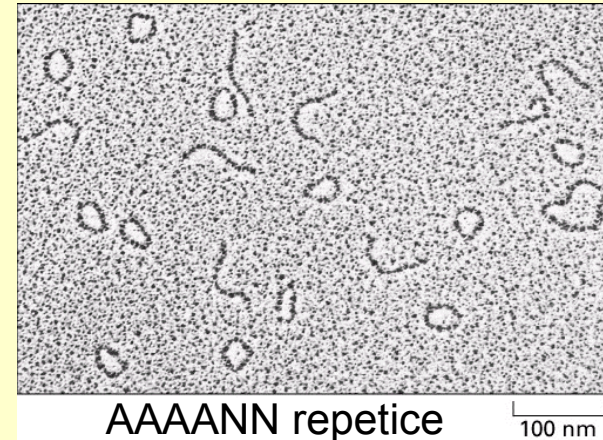
Každý pár bází se „projeví“ na povrchu double helixu  $\Rightarrow$  přesný vzorec možností vodíkových můstků a hydrofobních vazeb pro „hledající“ proteiny

Malý i velký žlábek, ve velkém žlábků mají každý ze 4 párů jiný vzorec  $\Rightarrow$  regulační proteiny se většinou váží do velkého žlábků

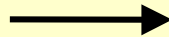


- + rozeznání „geometrie“ double helix
    - idealizovaná DNA molekula – 36° helikální obrátky
    - skutečná DNA lokální nepravidelnosti (úhel větší nebo menší než 36°)
- ⇒ rozpoznávání regulačními proteiny

př. sekvence AAAANN (N není A) ⇒ slabý  
ohyb DNA ⇒ je-li opakována s 10bp intervaly  
na delší molekule ⇒ ohnutá DNA



- + další deformace po navázání proteinu, aby se vazba stabilizovala, energetický požadavek, který to umožní, závisí na lokální nukleotidové sekvenci



změny ohybu double-helix DNA  
dané vazbou proteinu



Vazba CAP (catabolite activator)  
proteinu na DNA

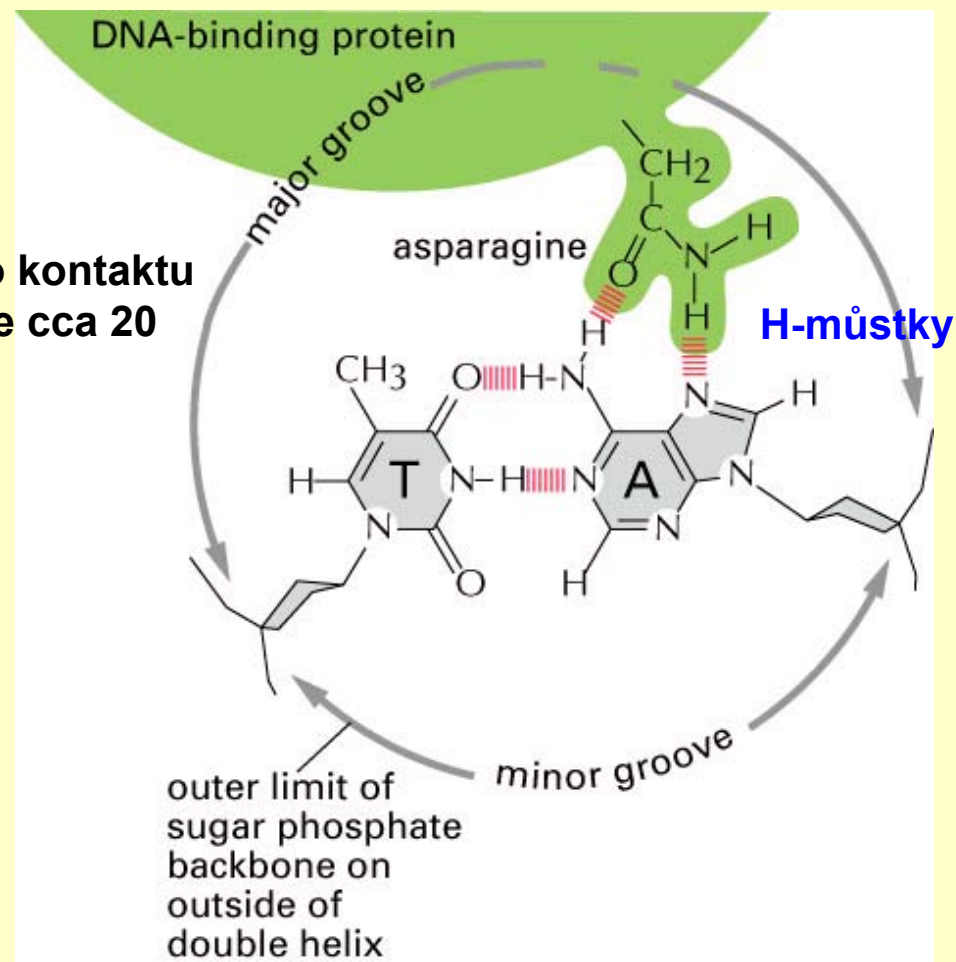
- regulační proteiny rozpoznávají většinou sekvence < 20 nukleotidů

povrch proteinu

- ⇒ komplementární k povrchu double helix
- ⇒ většinou kontakt zprostředkován více vazbami (H-můstky, hydrofobní interakce, iontové vazby)
- ⇒ i když je jeden kontakt (vazba) slabý, 20 vazeb umožní kontakt velmi specifický (silný)

Příklad jednoho kontaktu (vazby), obvykle cca 20 vazeb

vazba DNA-vazebného proteinu do velkého žlábků





# DNA-vazebné motivy na proteinech

## HELIX-TURN-HELIX MOTIV: • prokaryota i eukaryota

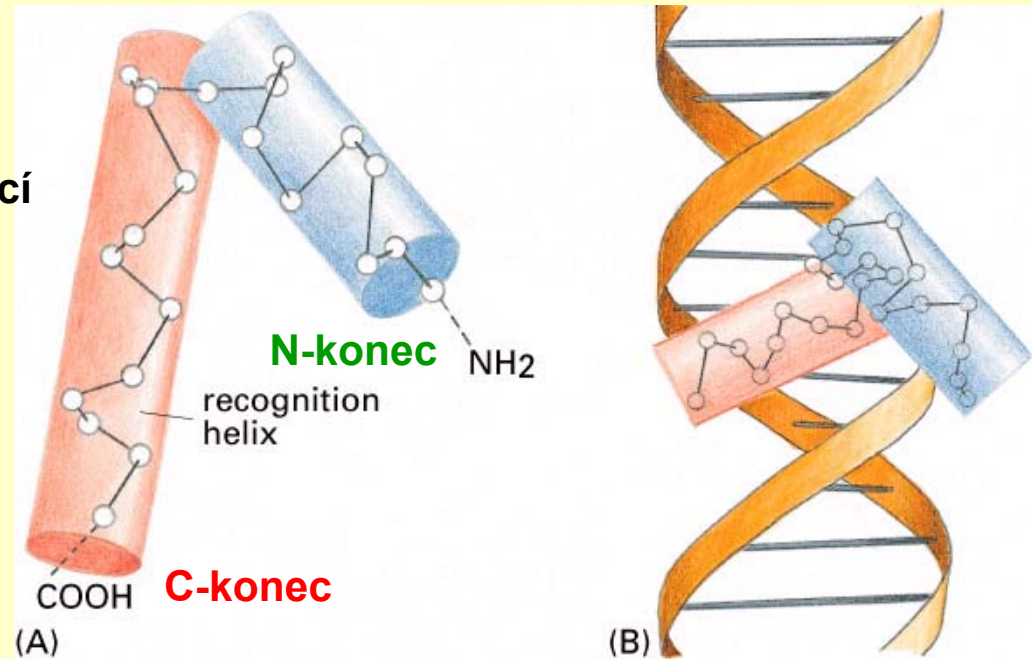
- dva  $\alpha$ -helixy spojené krátkým řetězcem AK
  - ↳ udržovány ve fixním úhlu (interakce mezi helixy)

### C- koncový $\alpha$ -helix

ROZPOZNÁVACÍ HELIX  $\Rightarrow$  vazba do velkého žlábkku  $\Rightarrow$  AK sekvence se liší  $\Rightarrow$  rozeznání specifických DNA sekvencí

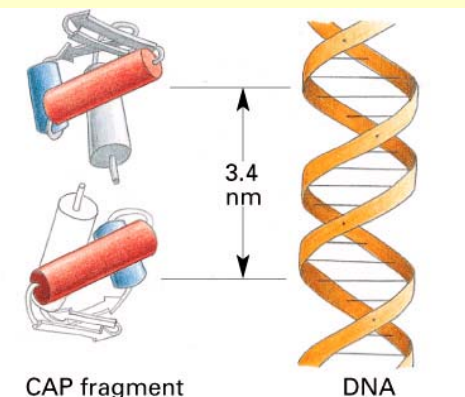
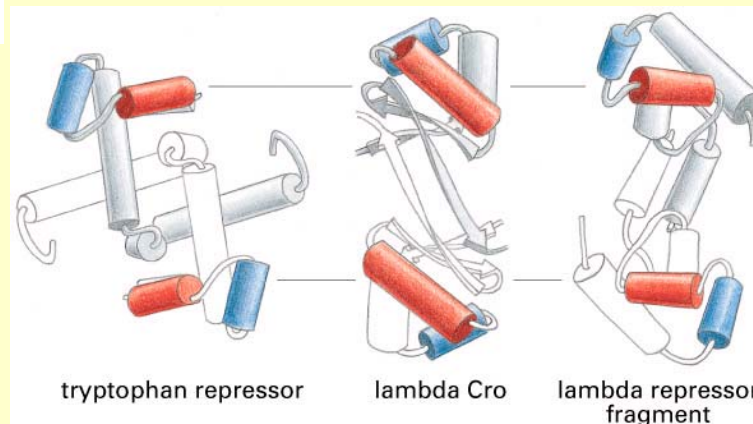
$\Rightarrow$  sekvence mimo velmi variabilní  
 $\Rightarrow$  zvyšuje specifitu rozpoznávaných sekvencí (často také kontakt s DNA)

$\Rightarrow$  často vazba ve formě dimeru  $\Rightarrow$  vazba na symetricky uspořádané sekvence  $\Rightarrow$  zvýšení vazebné afinity



Vazba do velkého žlábkku

Příklady:  
Helix-turn-helix dimery

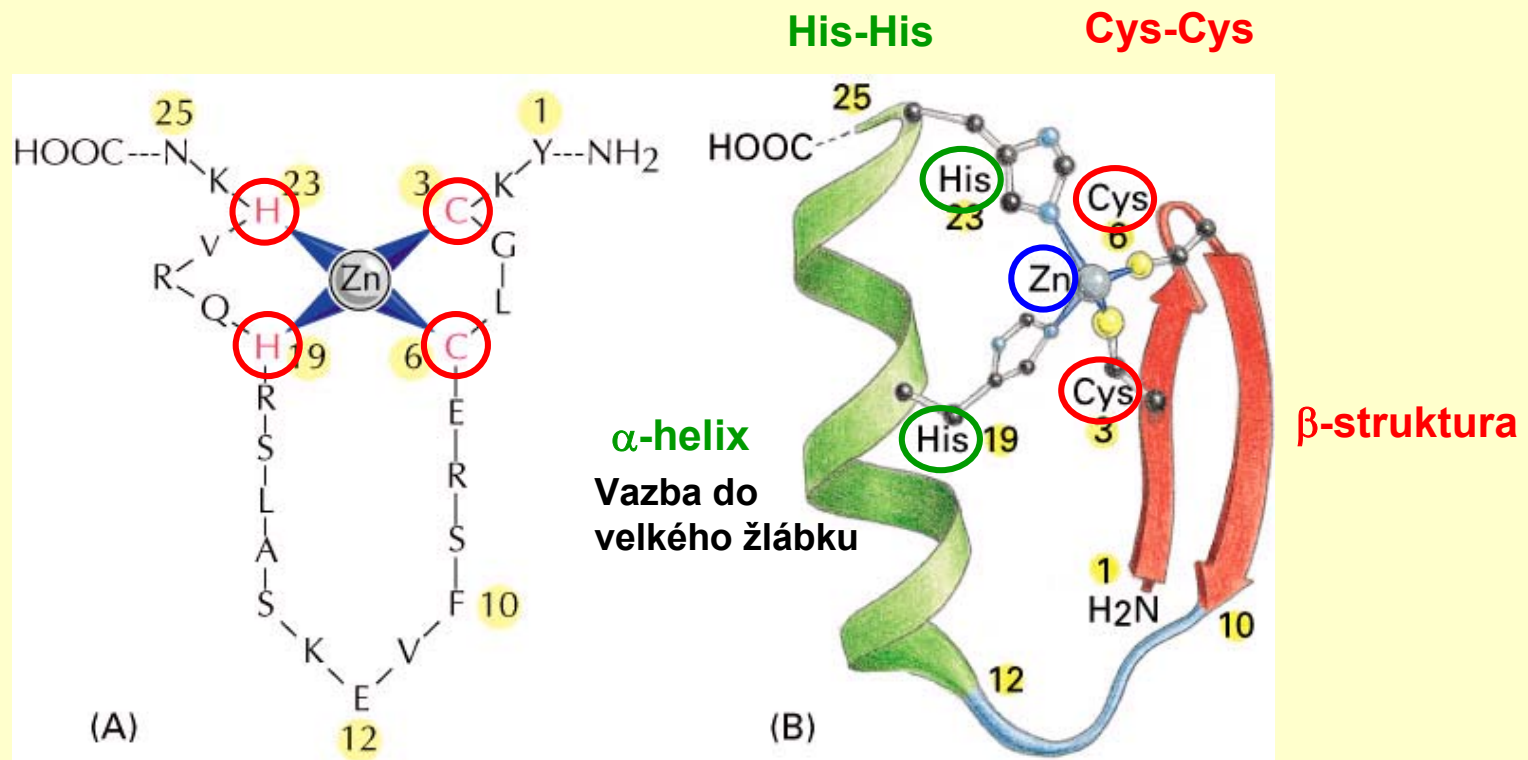


## ZINK FINGER MOTIV = MOTIV ZINKOVÉHO PRSTU

- různý počet atomů Zn na molekulu proteinu
- různé skupiny

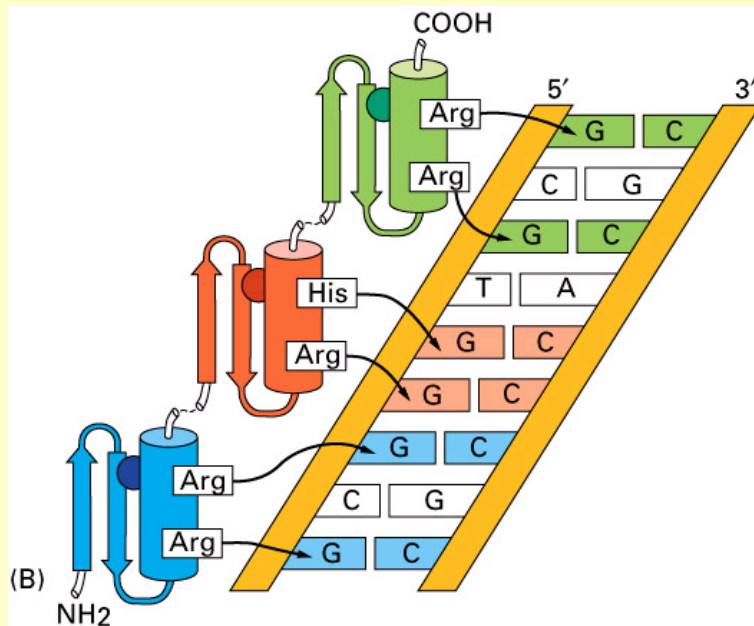
### a) $\alpha$ -helix, $\beta$ -struktura, spojené Zn

Původně nalezen na proteinu, který aktivuje transkripci eukaryotické ribosomální RNA

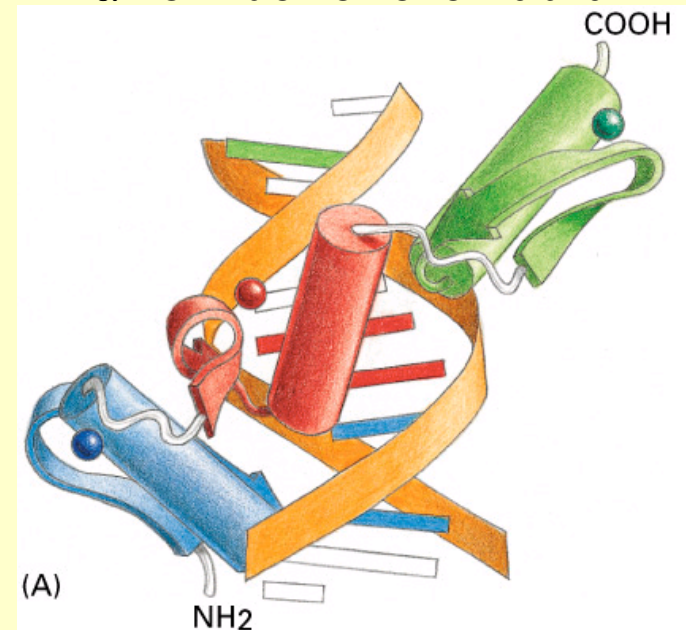


⇒ často v komplexu s jinými zinc-finger proteiny, vazba na repetitivní sekvence

za sebou  $\Rightarrow$  vazba na repetit. sekvence



$\alpha$ -helix do velkého žlábků



**Tři zinc-finger domény tandemově uspořádané**  
 $\Rightarrow$  vazba stejné sekvence

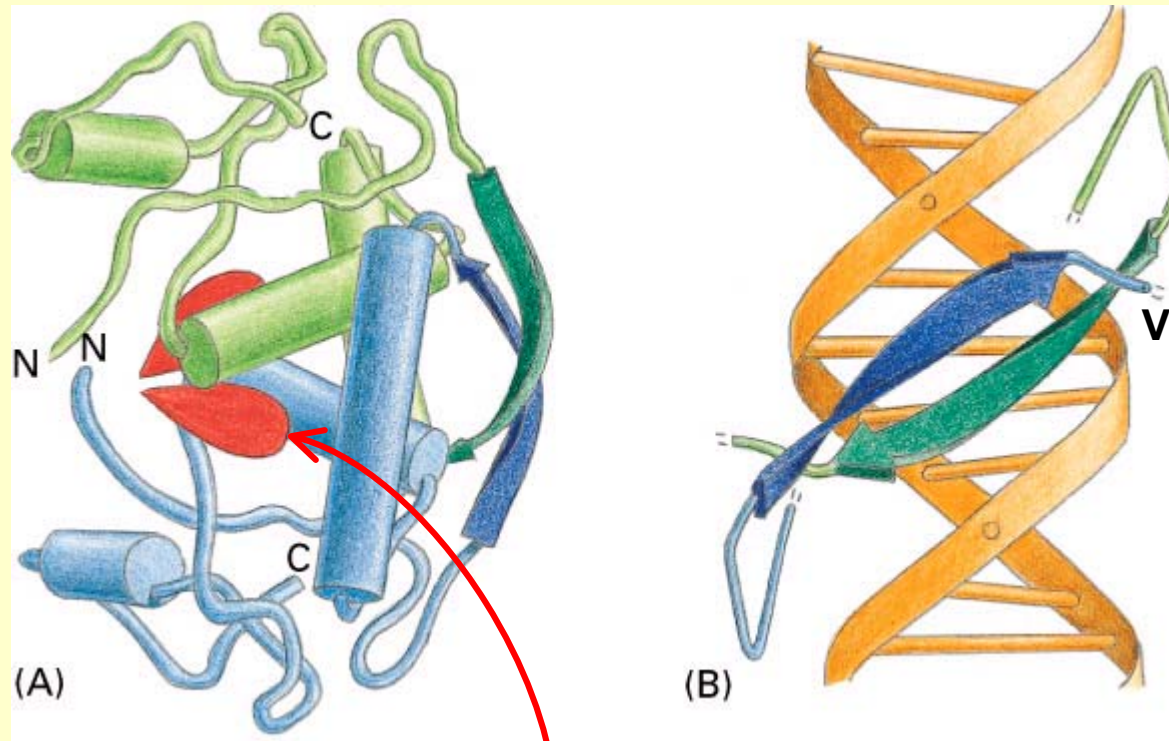
**b) dva  $\alpha$ -helixy, držené dohromady 2 Zn**

**Skupina intracelulárních receptorů**

- tvoří dimery  $\Rightarrow$  jeden z helixů interaguje s velkým žlábkem  
 $\Rightarrow$   $\alpha$ -helix vazba do velkého žlábků

## $\beta$ -STRUKTURA

- vazba  $\beta$ -struktury do velkého žlábků  
různé sekvence DNA  $\Rightarrow$  různé sekvence AK



Vazba do velkého  
žlábků

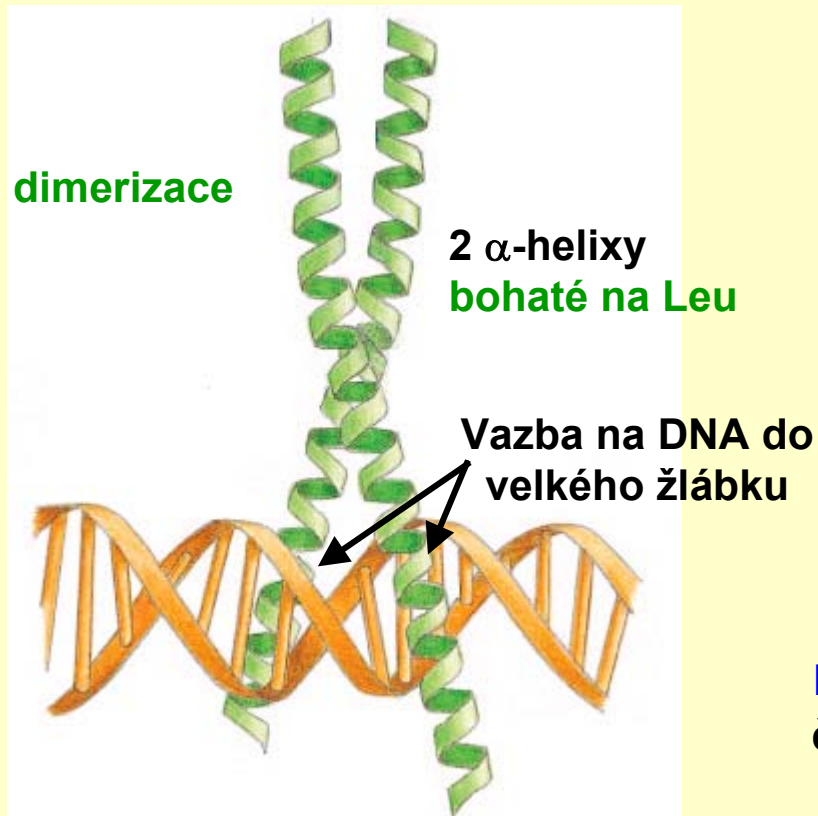
př. bakteriální met represor protein  
 $\Rightarrow$  regulace synthesy methioninu  $\Rightarrow$  pro pevnou vazbu s DNA  
komplex s **S-adenosyl methioninem**



## LEUCINE-ZIPPER MOTIV = MOTIV LEUCINOVÉHO ZIPU

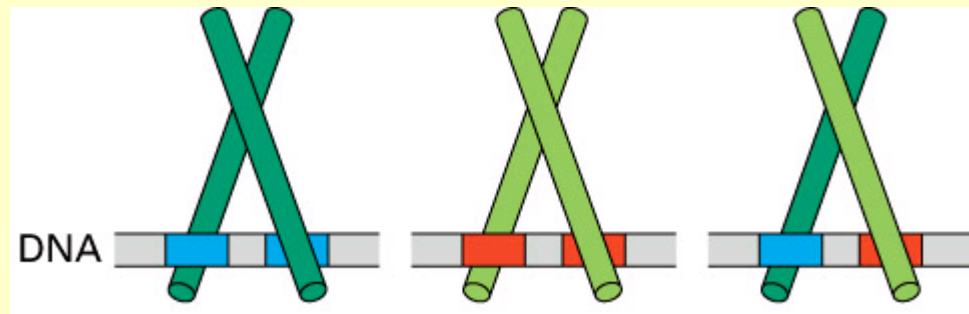
2  $\alpha$ -helixy  $\Rightarrow$  bohaté na hydrofobní AK (často na leucin)  $\Rightarrow$  spojení hydrofob. interakcemi

↳ každý z jednoho monomeru  
 $\Rightarrow$  tvorba Y struktury  
 $\Rightarrow$  vazba do velkého žlábků



dimer

### HETERODIMERY x HOMODIMERY



Homodimer  
rozeznává  
symetrickou  
DNA sekvenci

Homodimer  
rozeznává  
symetrickou  
DNA sekvenci

Heterodimer  
rozeznává  
asymetrickou  
DNA sekvenci

### HETERODIMERY

často různá DNA-vazebná doména

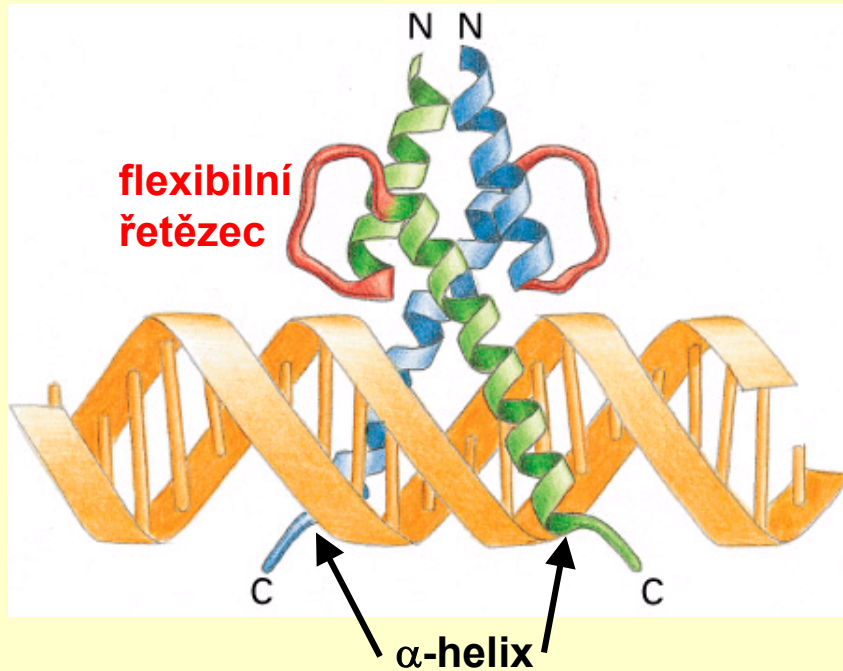
$\Rightarrow$  zvyšování variability vazebných možností

## HELIX-LOOP-HELIX MOTIV

krátký  $\alpha$ -helix spojený smyčkou s delším  $\alpha$ -helixem

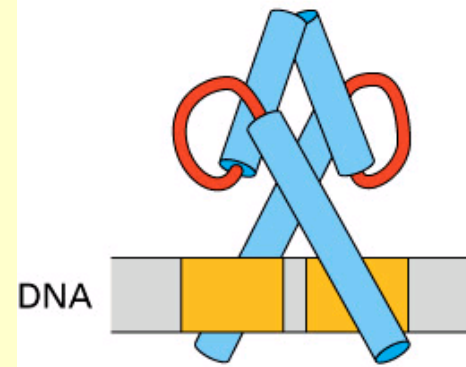
↳ flexibilita

Dimerizace



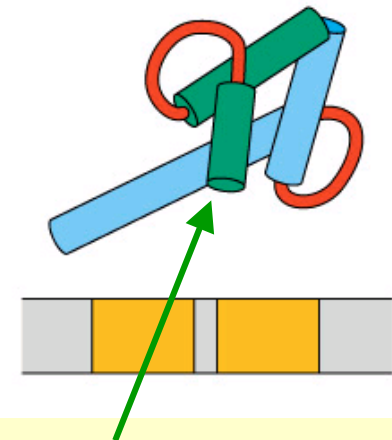
aktivní HLH  
homodimer

active HLH homodimer



neaktivní HLH  
heterodimer

inactive HLH heterodimer



Zkrácený HLH bez DNA  
vazebné domény

Zkrácené HLH proteiny

- ⇒ regulační role
- ⇒ heterodiméry

**PREDIKCE DNA sekvence rozpoznávané regul. proteinem ?**

není jednoduchý kód, tj. neplatí, že G-C pár vždy kontaktuje určitou AK  
jeden pár bazí může být rozpoznán větším počtem způsobů

## REGULACE INICIACE TRANSKRIPCE

NEGATIVNÍ regulace  $\Rightarrow$  regulační protein po nasednutí do regulační oblasti v promotoru zabrání transkripci  $\Rightarrow$  **REPRESORY**

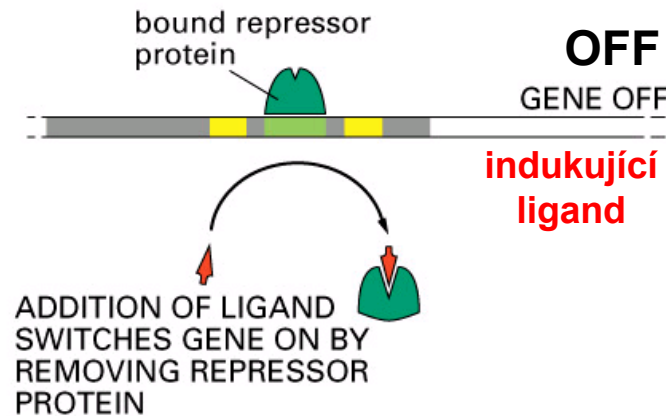
POZITIVNÍ regulace  $\Rightarrow$  regulační protein po nasednutí do regulační oblasti v promotoru podpoří transkripci  $\Rightarrow$  **AKTIVÁTORY**

ROLE LIGANDU  $\Rightarrow$  Indukující x Inhibující ligand

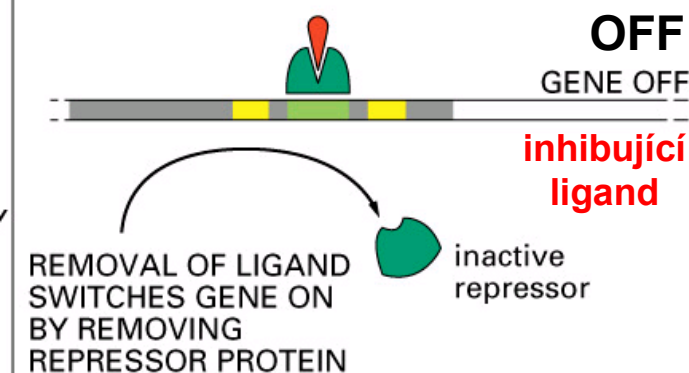
### NEGATIVNÍ REGULACE

bound repressor protein prevents transcription

vazba  
ligandu  
uvolní  
regulační  
protein z  
DNA

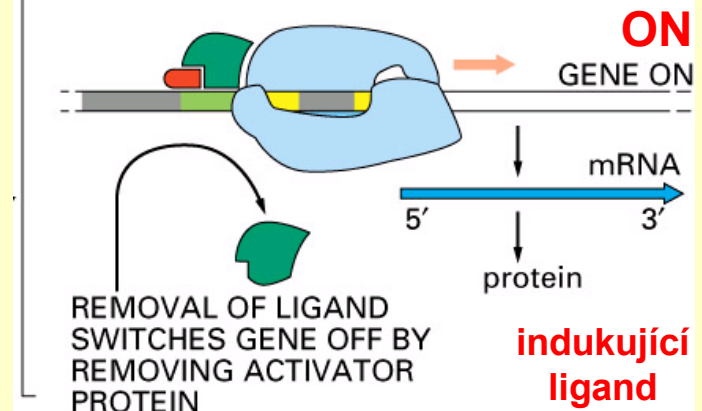
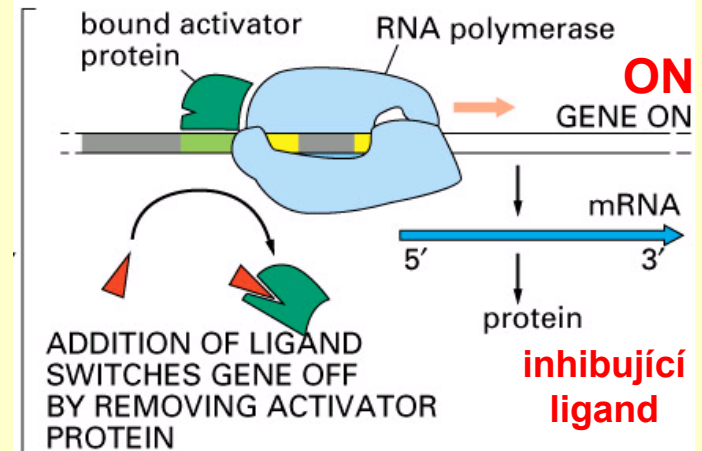


vazba  
ligandu  
umožní  
regulačnímu  
proteinu  
nasednout  
na DNA



### POZITIVNÍ REGULACE

bound activator protein promotes transcription



# PŘÍKLADY REGULACÍ TRANSKRIPCE - PROKARYOTA

## *E. coli* – TRYPTOPHAN REPRESOR

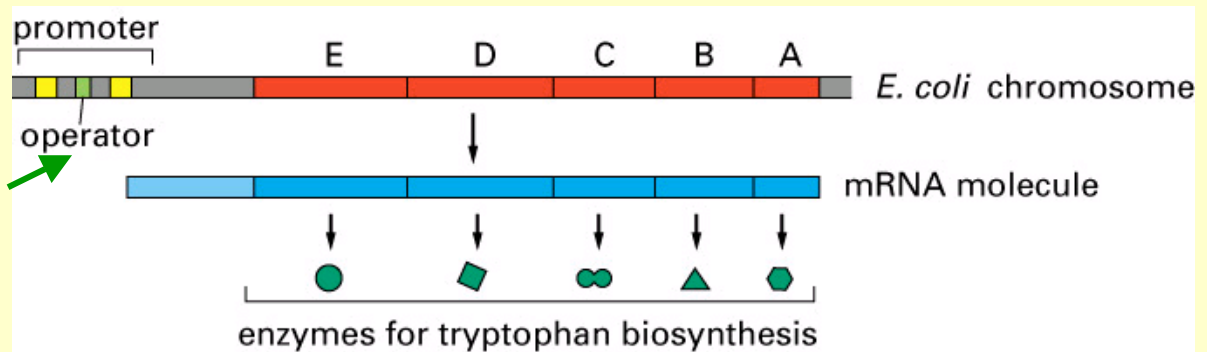
biosynthesa tryptofanu:

regulovaná exprese  $\Rightarrow$  Trp v médiu  $\Rightarrow$  blok exprese

### TRP OPERON

5 genů  $\Rightarrow$  přepis jako 1 mRNA  
 $\Rightarrow$  1 promotor

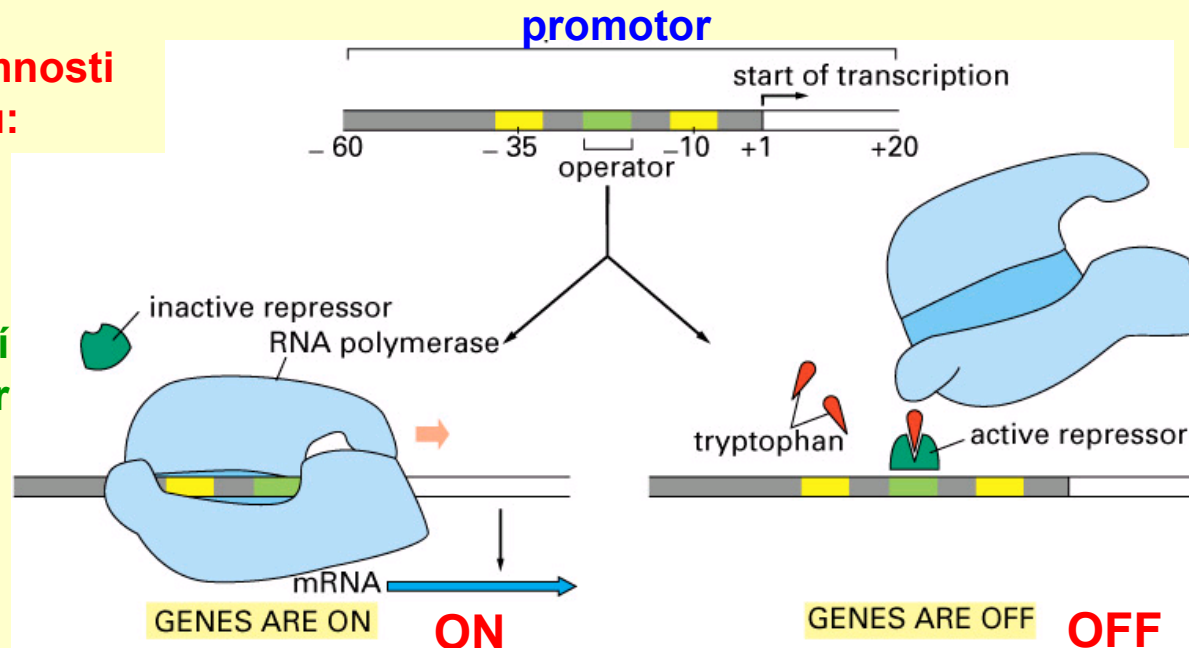
v promotoru je oblast OPERATOR  
 $\Rightarrow$  rozpoznávaná proteinem Trp  
represoru (helix-turn-helix)  
jen v přít. 2 molekul Trp  
 $\Rightarrow$  brání nasednutí polymerázy



### NEGATIVNÍ kontrola transkripce – represory transkripce

v nepřítomnosti  
tryptofanu:

inaktivní  
represor

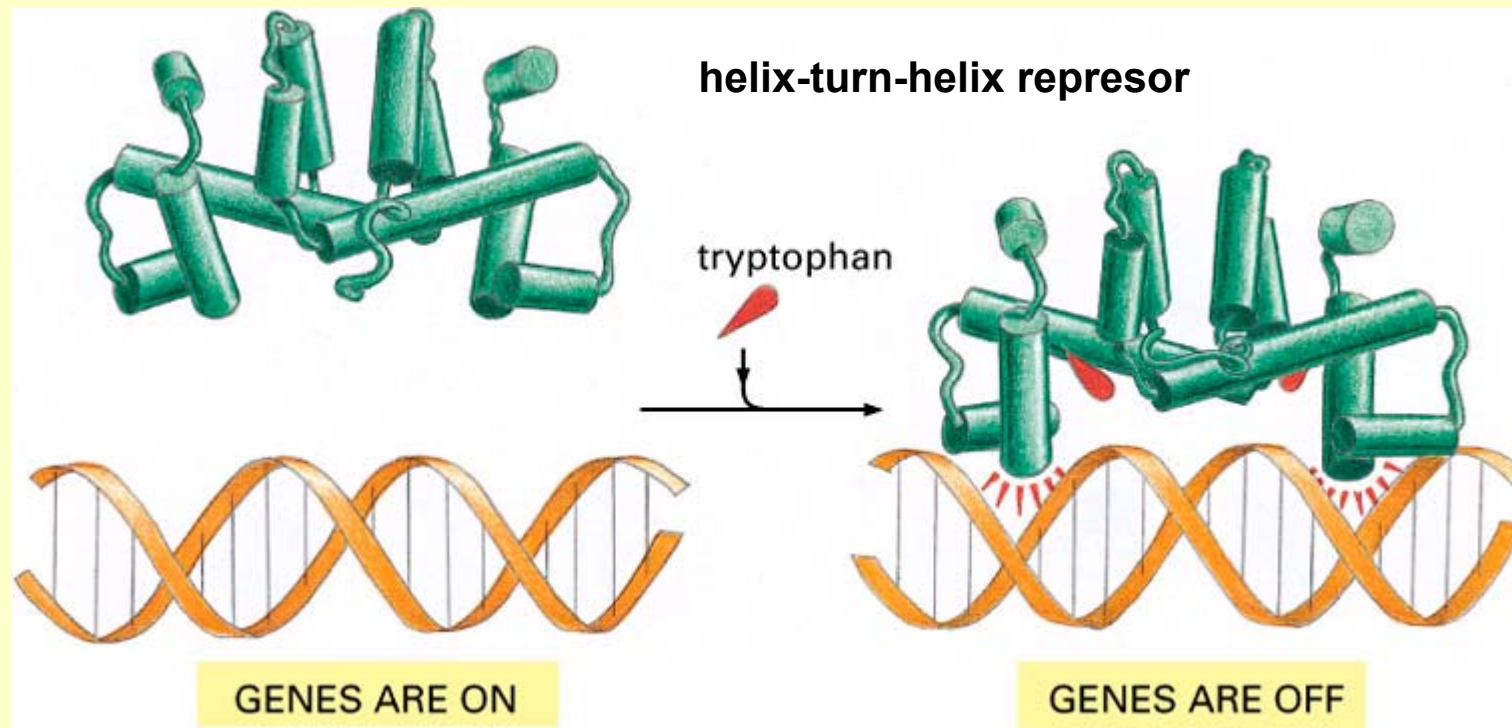


v přítomnosti  
tryptofanu:

aktivní  
represor



## NEGATIVNÍ kontrola transkripce – represory transkripce



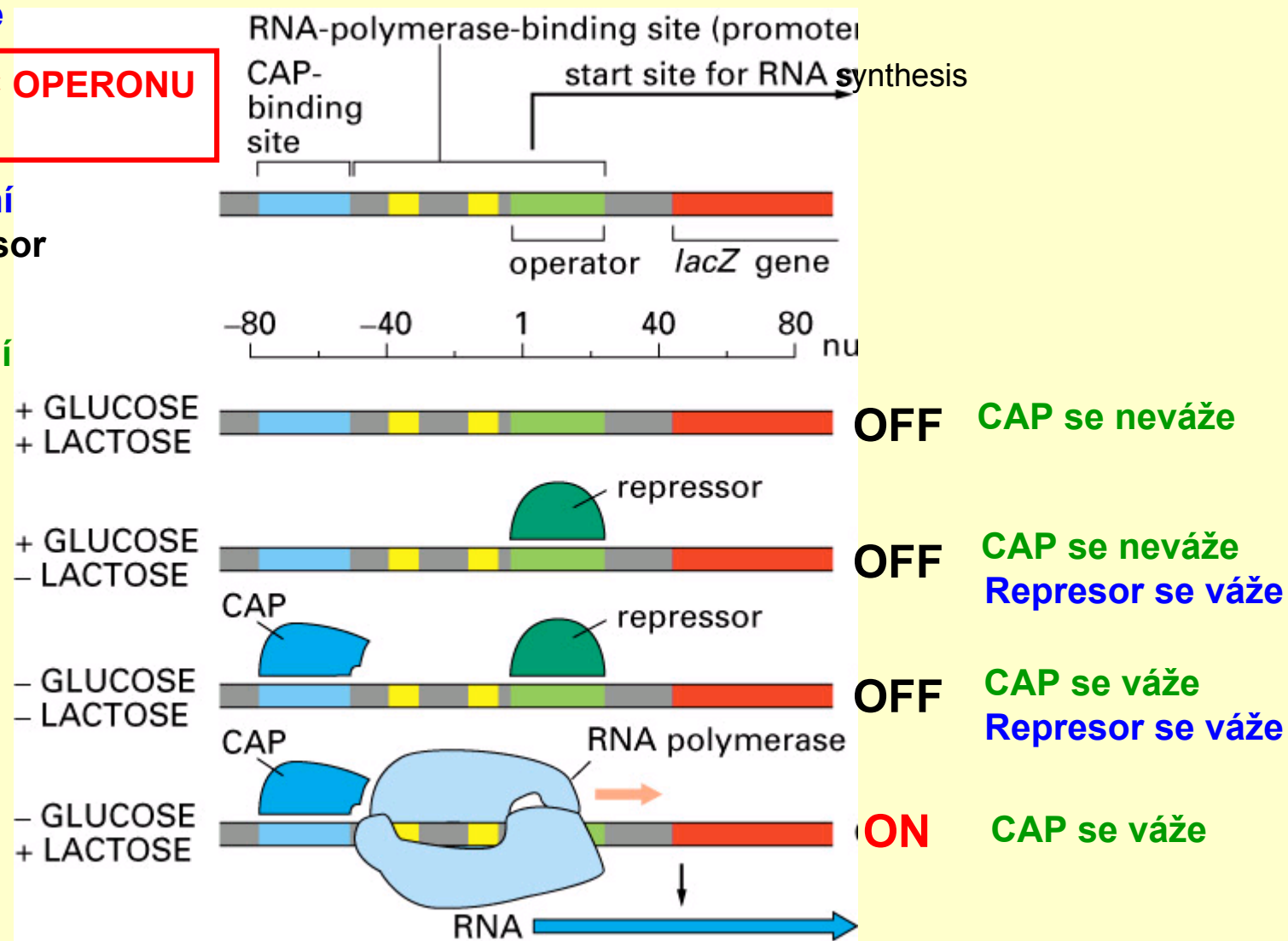
## Často kombinovaná regulace více faktory **POSITIVNÍ** vliv **AKTIVÁTORU** a **NEGATIVNÍ** vliv **REPRESORU**

Polymerasa nerozpozná promotor (nebo jen slabě) pokud není přítomen aktivátor  
 př. **bakteriální aktivátor CAP** (catabolite activator protein)  $\Rightarrow$  **aktivace genů umožňujících využití jiných zdrojů C než je glukosa**  $\Rightarrow$  **pokles glukosy**  $\Rightarrow$  **zvýšení cAMP**  $\Rightarrow$  **vazba CAP**  $\Rightarrow$  **aktivace exprese**

### REGULACE LAC OPERONU u *E.coli*

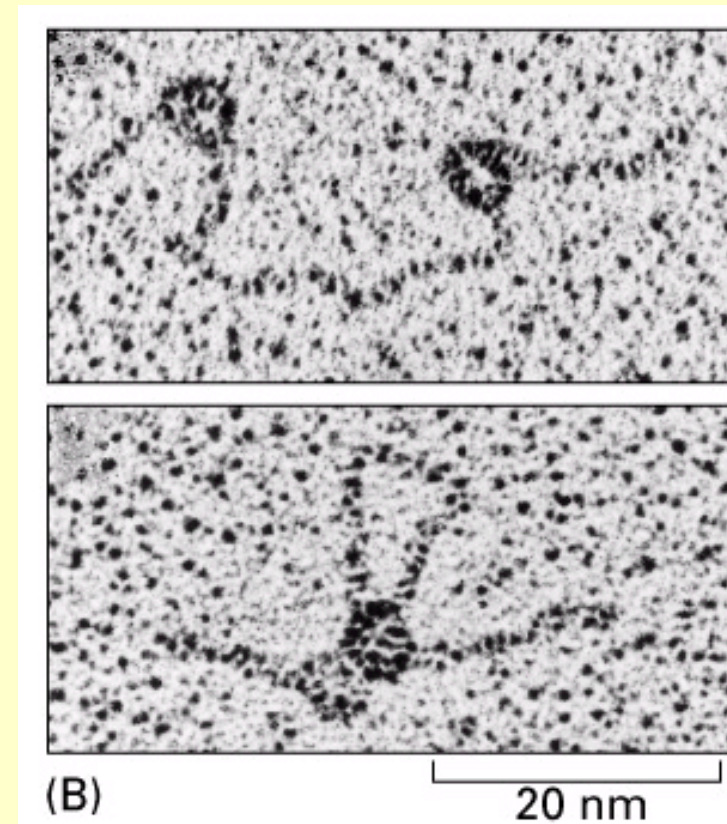
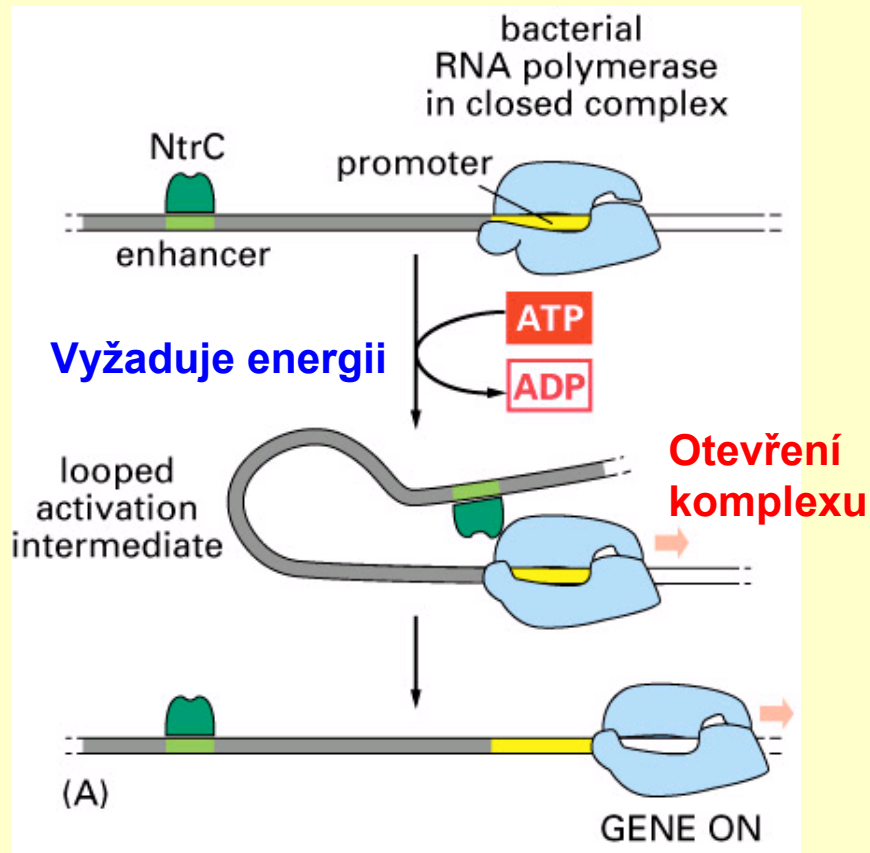
**Laktosa**  $\Rightarrow$  **zvýšení**  
 $\Rightarrow$  **vazba na represor**  
 $\Rightarrow$  **uvolnění**

**Glukosa**  $\Rightarrow$  **snížení**  
 $\Rightarrow$  **zvýšení cAMP**  
 $\Rightarrow$  **vazba CAP**



## REGULACE NA DELŠÍ VZDÁLENOST

- ⇒ častější u EB (rozsáhlejší regulační oblasti), ale někdy i u PB
- ⇒ enhancery
- ⇒ ohyb DNA ⇒ interakce regulátoru vázaného na enhancer s polymerasovým iniciačním komplexem

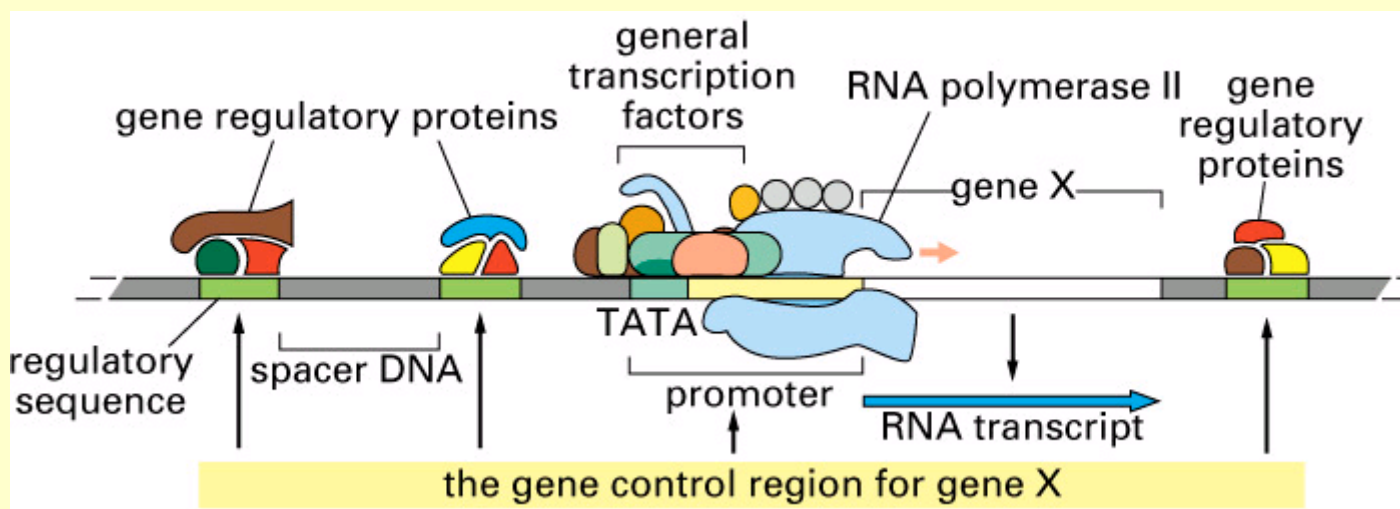


## REGULACE TRANSKRIPCE - EUKARYOTA

### Rozdíly od PROKARYOT:

⇒ RNA polymeráza EB vyžaduje přítomnost Obecných transkripčních faktorů (General Transcription Factors GTF), které se sestaví na promotoru před zahájením transkripce ⇒ **regulační proteiny často GTF sestavování regulují**

⇒ většina regulačních proteinů funguje, i když jsou vázány ve velkých (i 50000 bp) vzdálenostech od promotoru („upstream“ i „downstream“) ⇒ **kombinovaný vliv velkého množství faktorů**



⇒ ohyb DNA ⇒ interakce regulátoru vázaného na enhancer s GTF

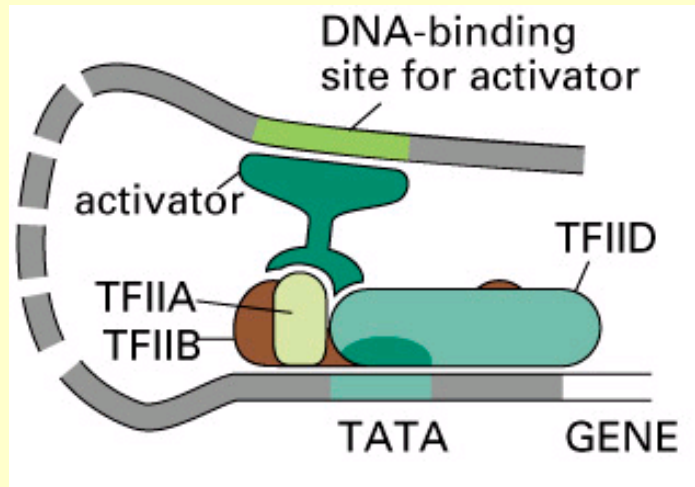


**Aktivátorové proteiny  $\Rightarrow$  často alespoň 2 domény**

$\Rightarrow$  **DNA vazebná doména**  $\Rightarrow$  rozeznání specifické DNA sekvence

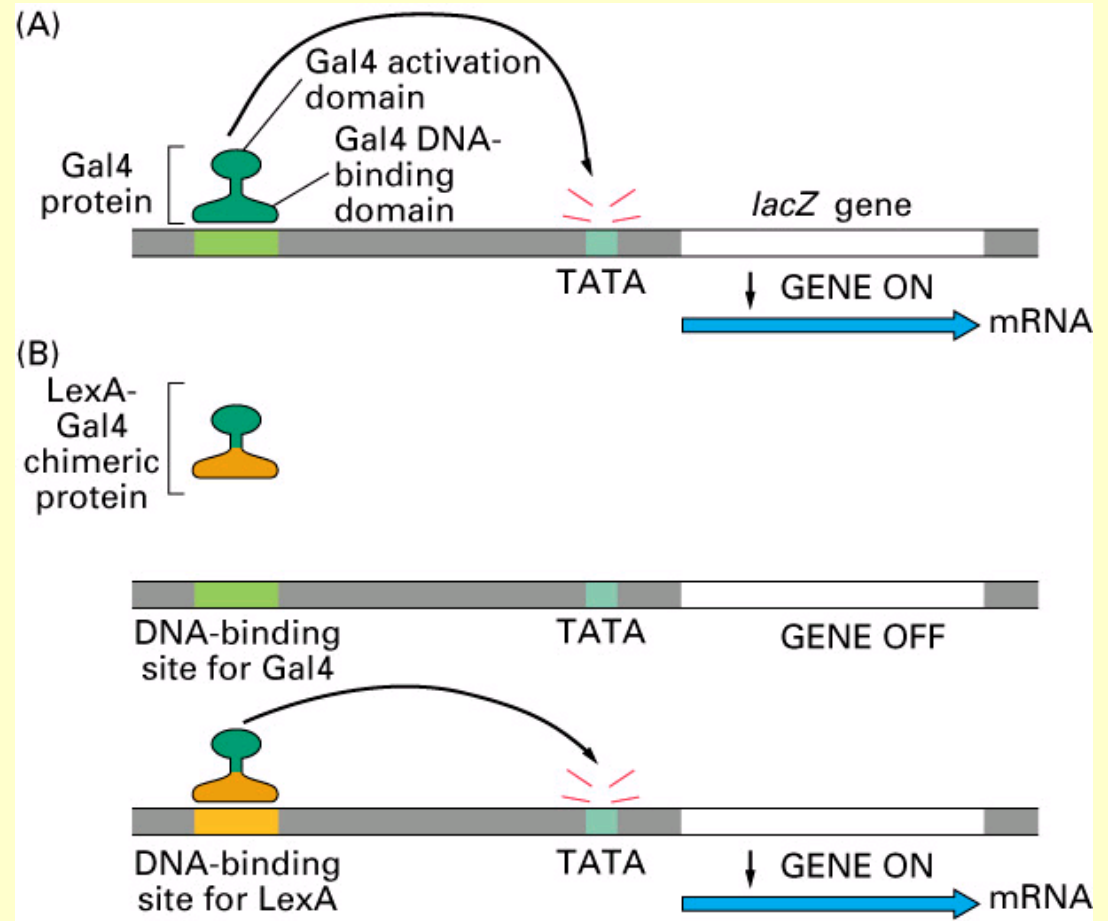
$\Rightarrow$  **Aktivační doména**  $\Rightarrow$  interakce s transkripčním systémem (GTF)  $\Rightarrow$  indukce a urychlení iniciace transkripce

### KYSELÉ AKTIVÁTORY



$\Rightarrow$  **aktivační doména nese několik negativně nabitých (kyselých) AK**  
 $\Rightarrow$  **urychlují uspořádání GTF na promotoru (v různých stádiích uspořádávání)**

### KOMBINACE DOMÉN - CHIMERNÍ REGULAČNÍ PROTEINY

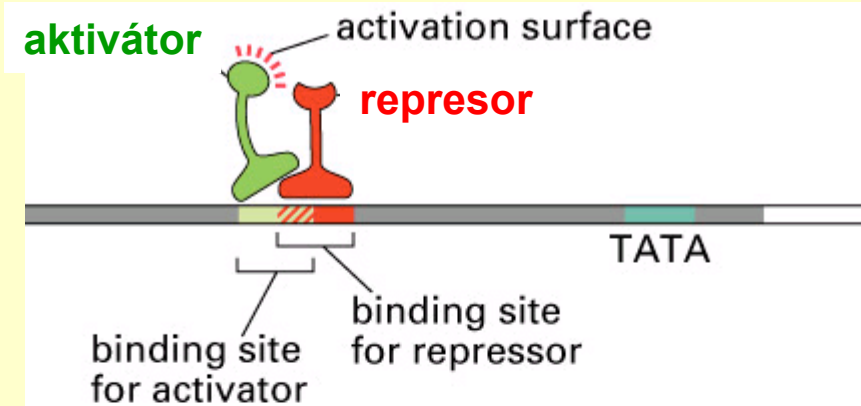


## REPRESOROVÉ PROTEINY

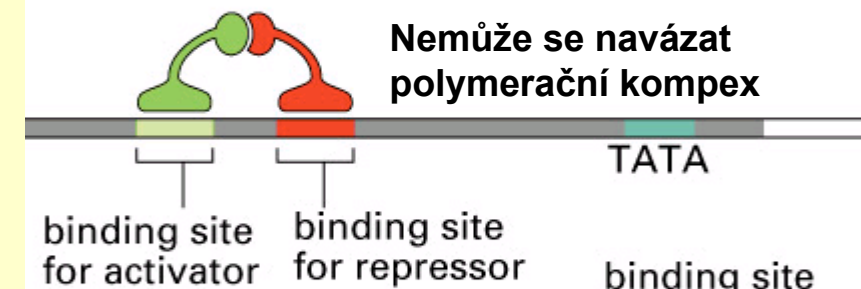
- různé mechanismy  
funkce

### 1. KOMPETICE

Vazba aktivátoru a  
represoru na  
stejnou sekvenci

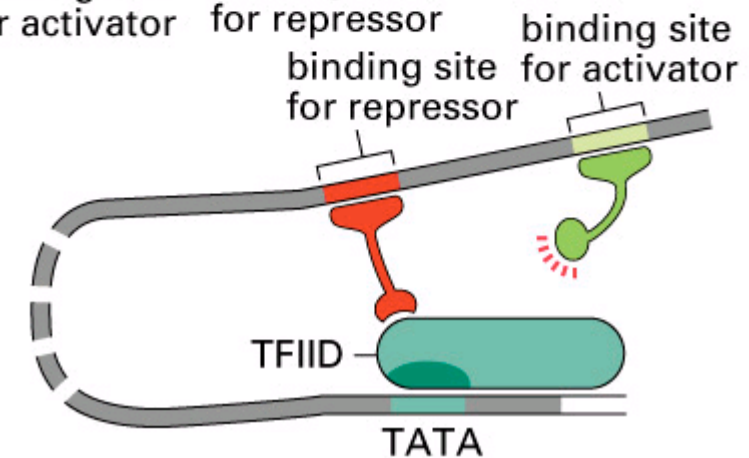


### 2. REPRESOR VÁŽE AKTIVÁTOR



### 3. PŘÍMÁ INTERAKCE REPRESORU S GTF

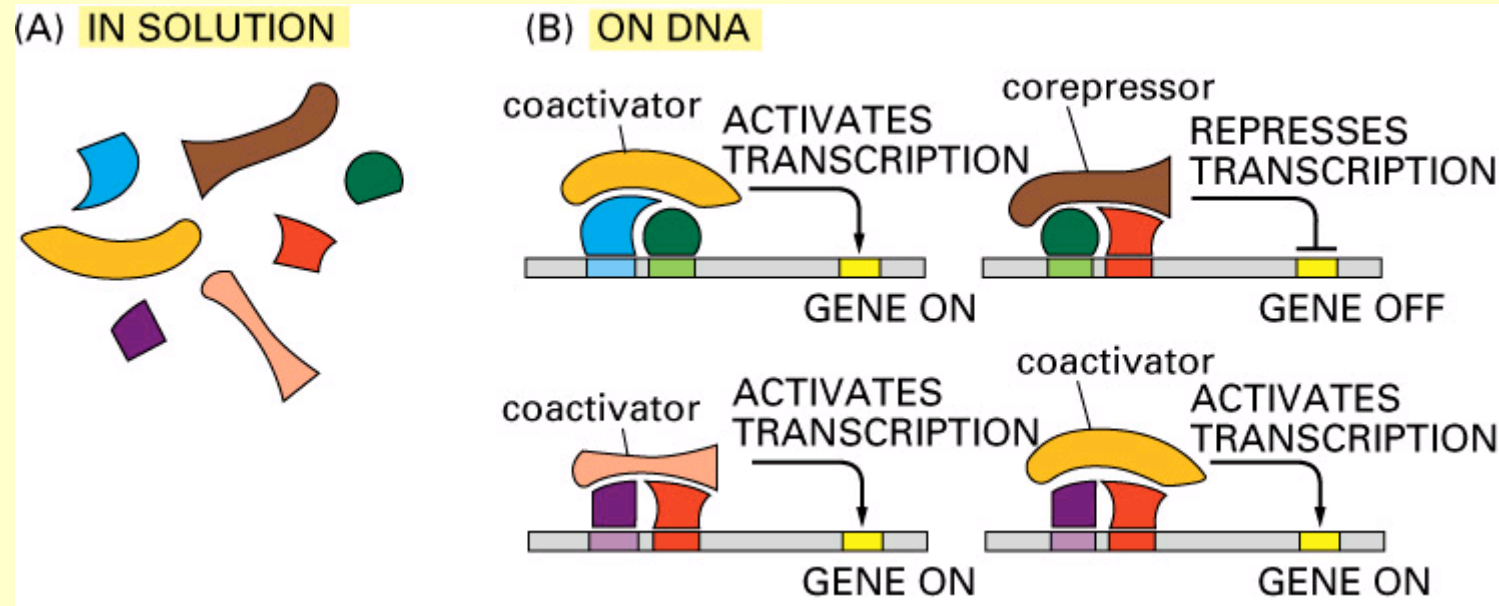
Blokuje se  
uspořádání GTF



### 4. TVORBA HETERODIMERU

**Většina EB regulačních proteinů** ⇒ fungují v komplexu s jinými proteiny, nikoli individuálně

⇒ komplex (specifický) se tvoří často pouze v přítomnosti specifické DNA sekvence



⇒ protein-protein interakce, které jsou příliš slabé pro spojení proteinů v roztoku mohou být dostatečné pro uspořádání komplexu vázaného na DNA

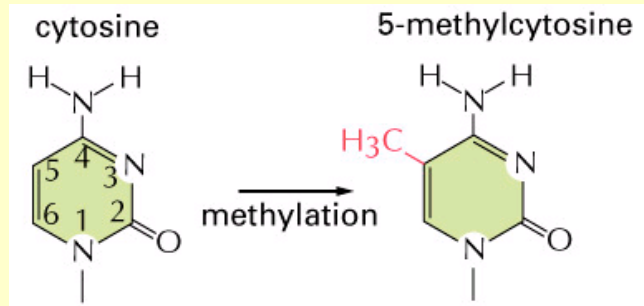
⇒ Role proteinu jako **AKTIVÁTORU** nebo **REPRESORU** závisí na konkrétním komplexu (kontextu) ⇒ řada proteinů může fungovat jako **AKTIVÁTOR** i jako **REPRESOR**

⇒ Regulace regulačních proteinů ⇒ různé mechanismy, regulační kaskády

## REGULAČNÍ ROLE METHYLACE

DNA  $\Rightarrow$  modifikace nukleotidů

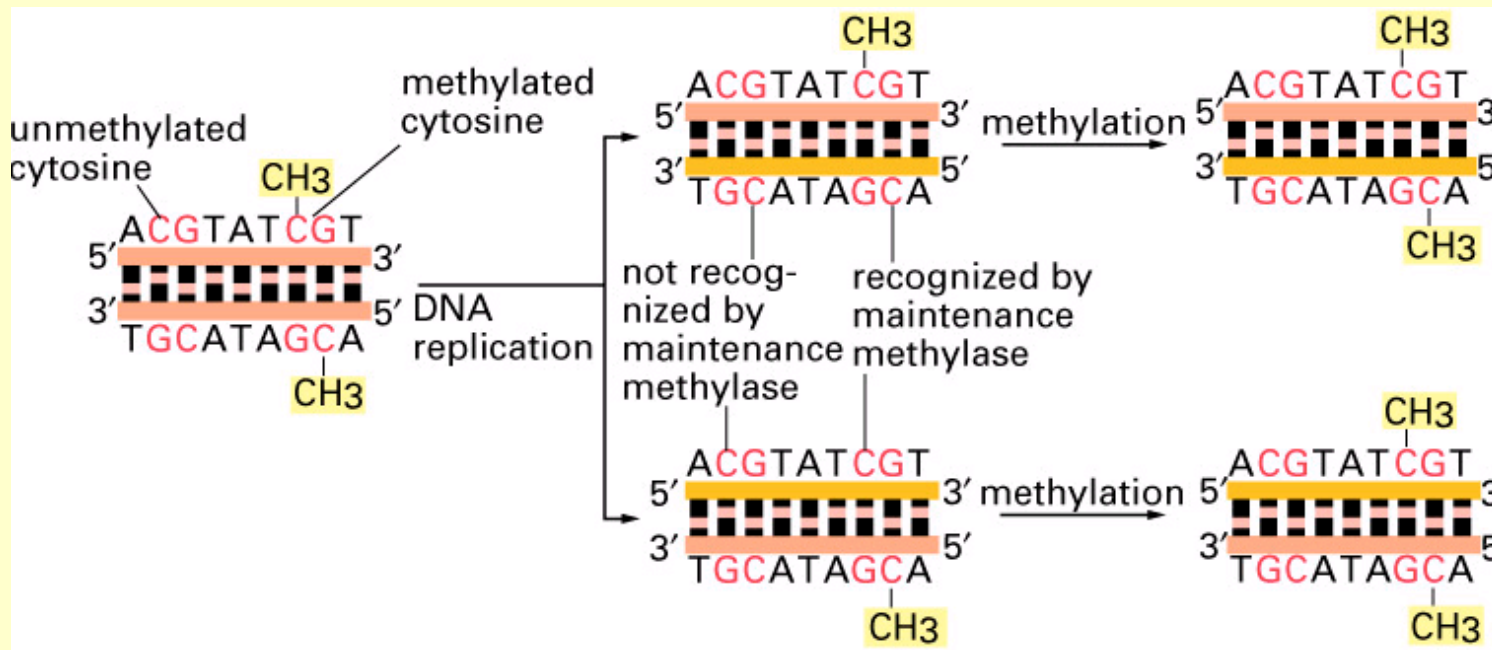
$\Rightarrow$  vyšší EB  $\Rightarrow$  methylace cytosinu  $\Rightarrow$  rozeznání aktivních a neaktivních genů



$\Rightarrow$  5-methyl cytosin  $\Rightarrow$  správné párování  
 $\Rightarrow$  v sekvencích CG  
GC

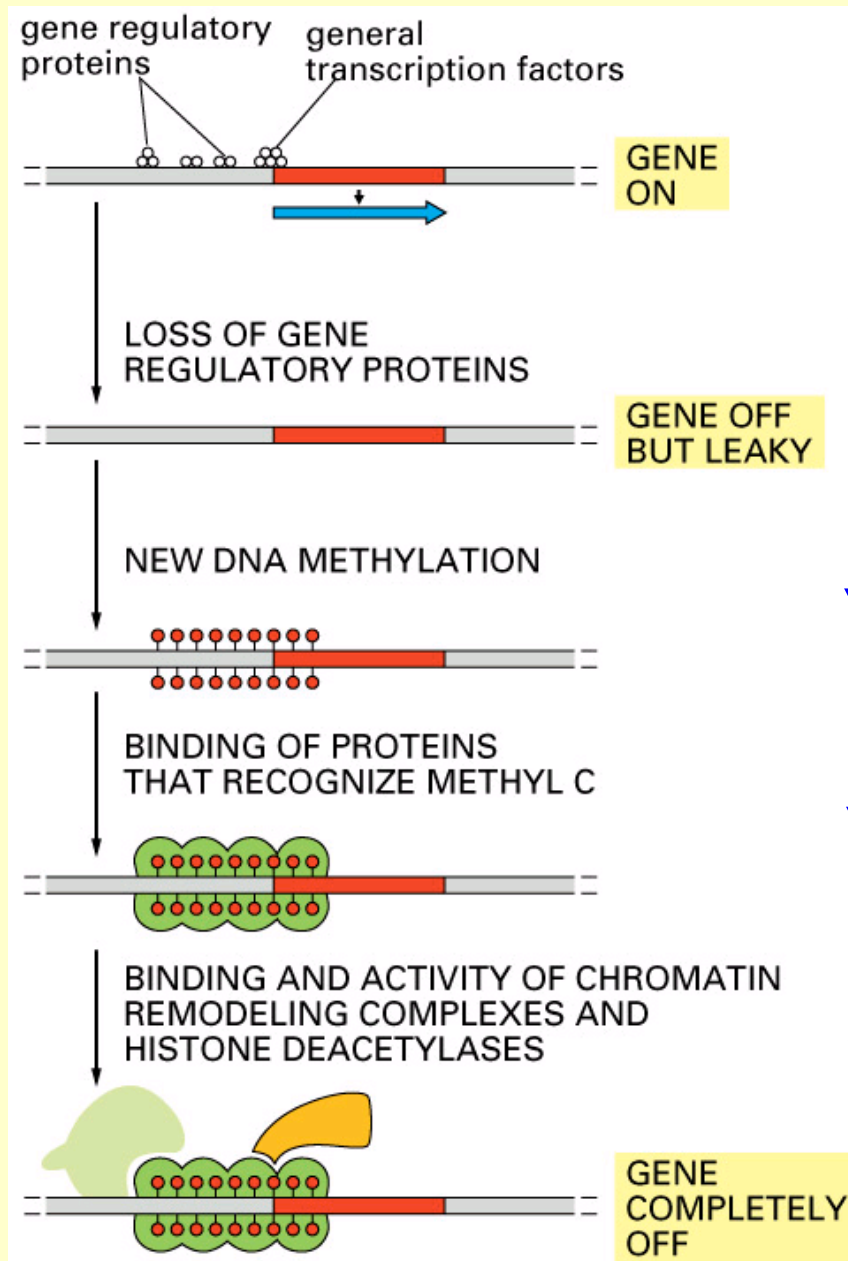
Enzym „**udržovací methylasa**“  $\Rightarrow$  během replikace preferenční methylace CG sekvencí v dceřinném řetězci, které již jsou methylovány v řetězci druhém.

$\Rightarrow$  „**vzorec**“ methylace „**rodičovského**“ řetězce se přenáší již při replikaci





## Methylace „de novo“ ⇒ role při umlčování genů v určité oblasti genomu



Odstranění aktivačních regulačních proteinů  
⇒ vypnutí transkripce  
⇒ stále basální hladina transkripce

„de novo“ methylace

⇒ Vazba proteinů rozeznávajících methyl C

⇒ Vazba proteinů ovlivňujících strukturu chromatinu a transkripční aktivitu dané oblasti (např. histon deacetylasy)

⇒ transkripce vypnuta úplně

## REGULAČNÍ ROLE CHROMATINU

**Aktivátorový protein**  $\Rightarrow$  vazba na DNA, která není „zabalena“ do nukleosomu, nebo rozezná vazebné místo i na „zabalené“ DNA  $\Rightarrow$  **destabilisace nukleosomu, částečné rozbalení** **X GTF** se mohou vázat až po rozvolnění struktury

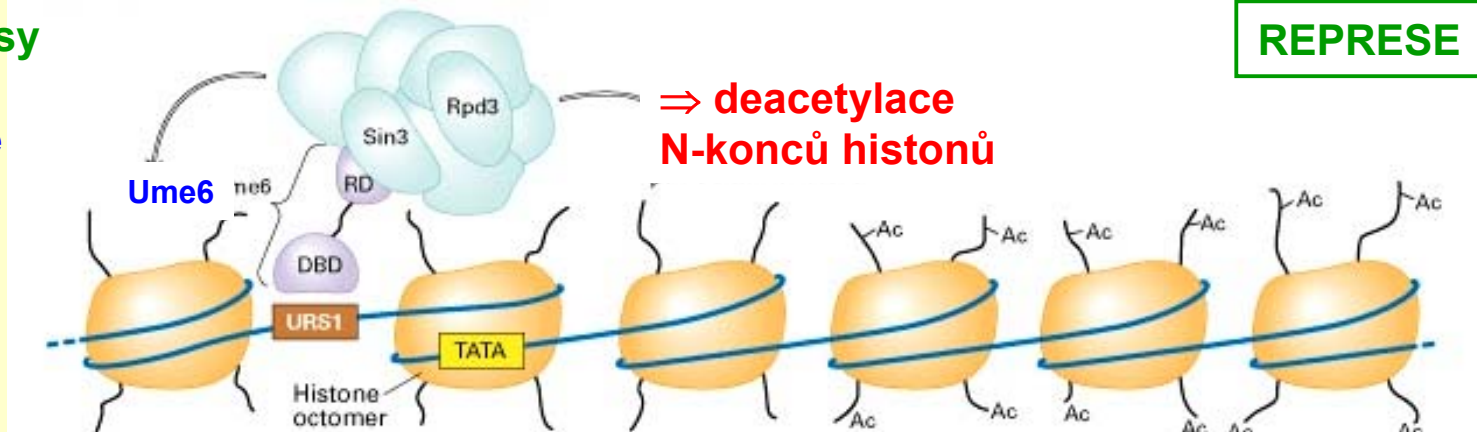
**Heterochromatin** (např. telomery)  $\Rightarrow$  vysoký stupeň kondensace  $\Rightarrow$  **nedostupný i pro aktivátorové proteiny**

**ACETYLACE / DEACETYLACE HISTONU**  $\Rightarrow$  Role v regulaci genové transkripce

### Histon-deacetylasy

$\Rightarrow$  rozpoznání a vazba na specifické represorové proteiny

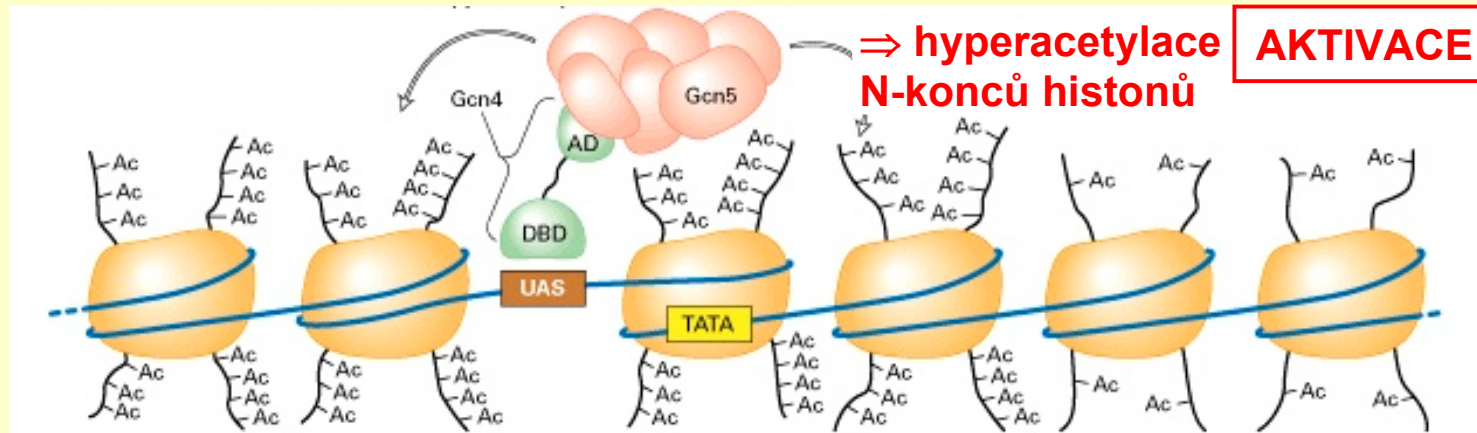
Ume6p  $\Rightarrow$  vazba Rpd3p histon deacetylasy



### Histon-acetylasy

$\Rightarrow$  rozpoznání a vazba na specifické aktivátory

Gcn4p  $\Rightarrow$  vazba Gcn5p histon deacetylasy



**Neacetylované histony**  $\Rightarrow$  N-koncový Lys  $\Rightarrow$  + náboj  $\Rightarrow$  silná interakce s fosfáty DNA  $\Rightarrow$  pevná vazba  $\Rightarrow$  GTF nemohou vstoupit

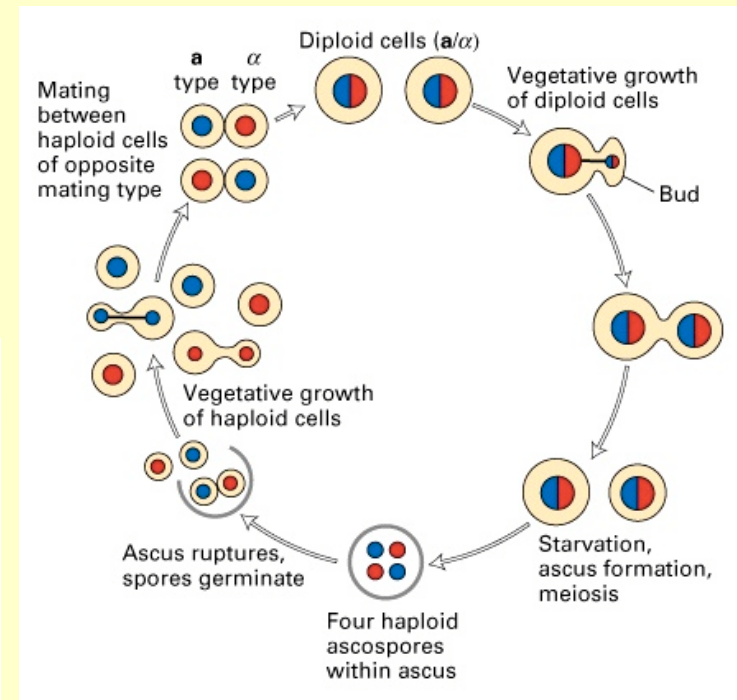
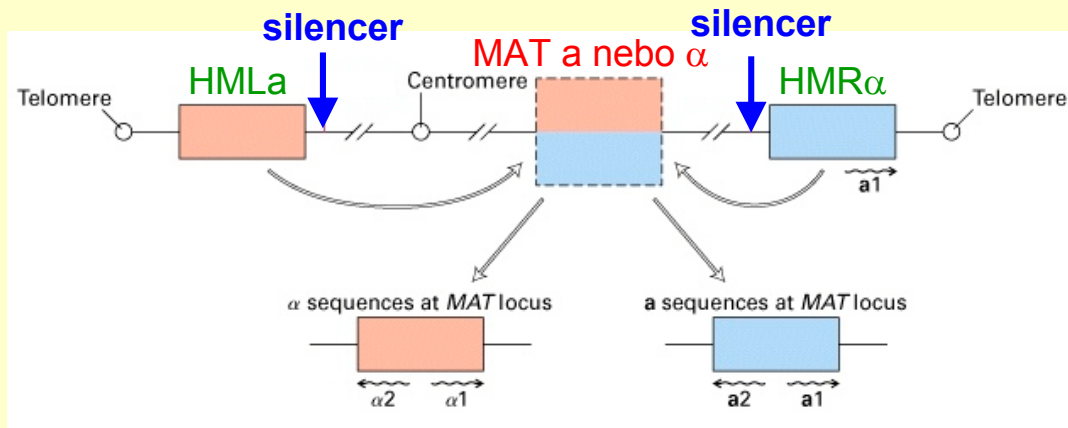
**Hyperacetylované histony**  $\Rightarrow$  neutralisace + nabitých Lys  $\Rightarrow$  zeslabení elektrost. interakcí s fosfáty DNA

## Regulace transkripce strukturou chromatinu $\Rightarrow$ umlčování částí genomu

**HETEROCHROMATIN**  $\Rightarrow$  kondensovaný  $\Rightarrow$  „umlčení“ („silencing“) dané oblasti

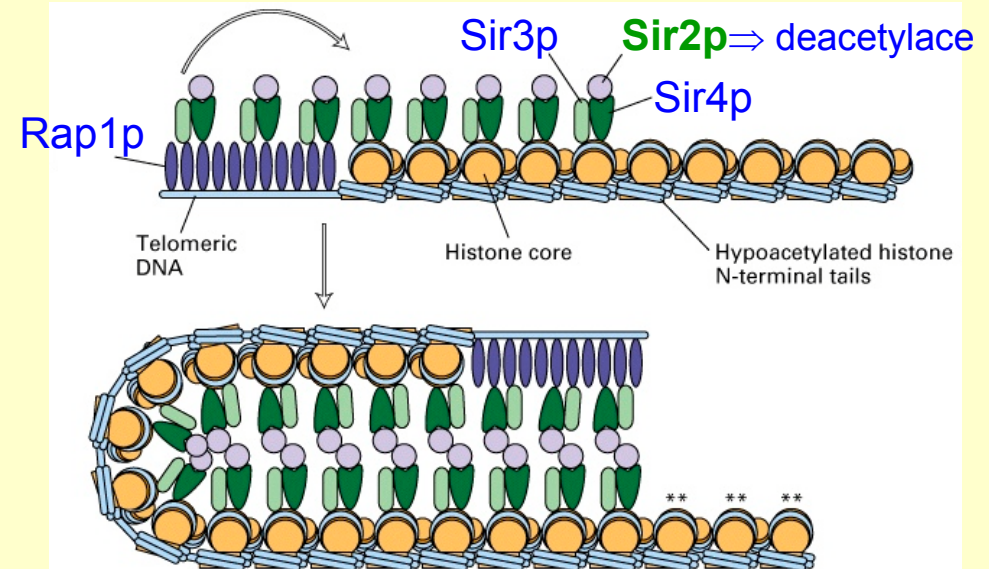
MAT / HML / HMR lokus } u kvasinek *S.cerevisiae*  
TELOMERY

Určení párovacího typu kvasinek (a nebo  $\alpha$ )



**Geny SIR (Sir1p, Sir2p, Sir3p, Sir4p)**

- $\Rightarrow$  „silent information regulator“
- $\Rightarrow$  Sir2p = histon deacetylaza (konzervativní)
- $\Rightarrow$  Role i v TELOMERÁCH  $\Rightarrow$  heterochromatin



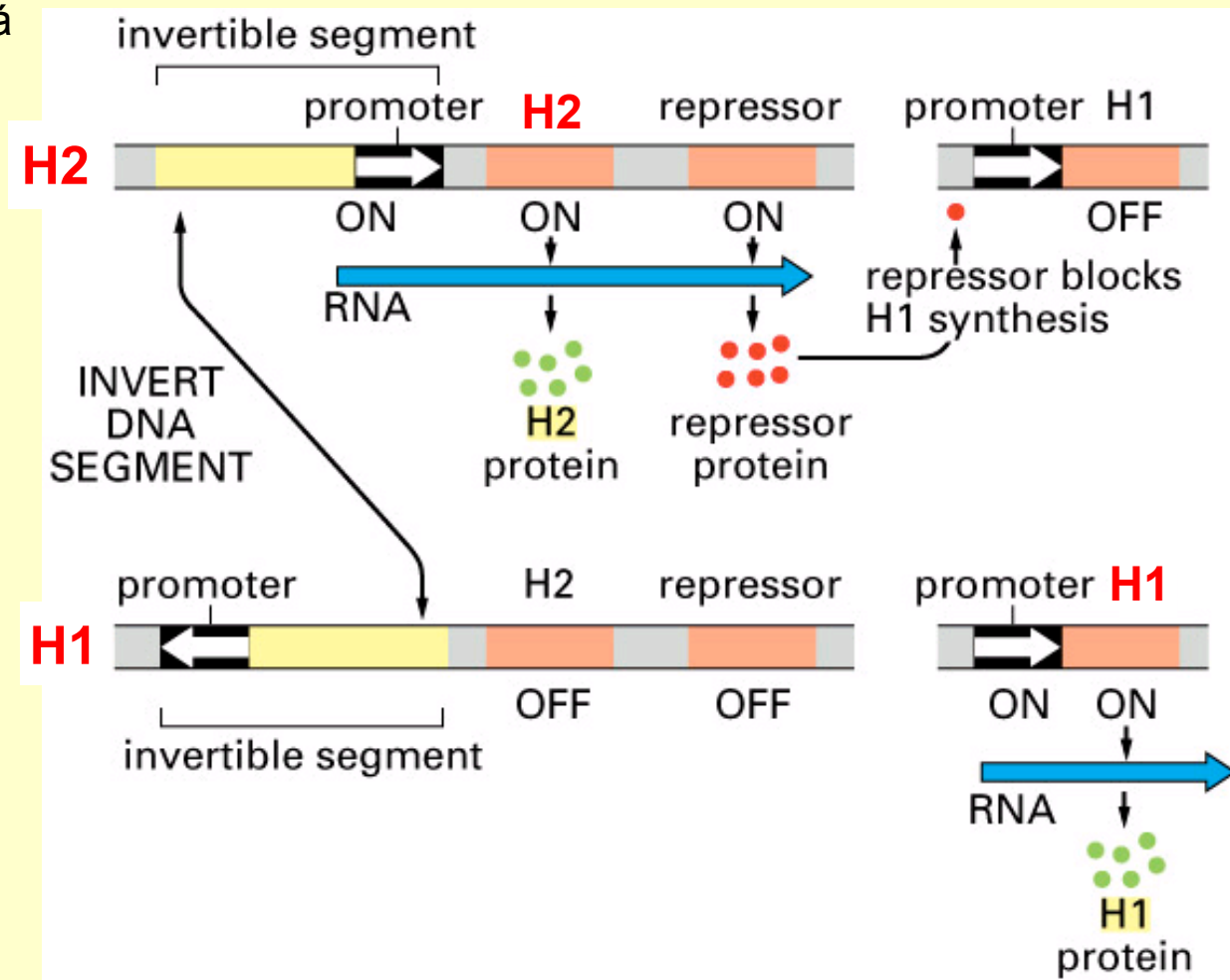
## Změny exprese provázené změnami DNA genomu

⇒ změny reversibilní, ⇒ změny přenášené do potomstva

### 1. BAKTERIE *Salmonella* ⇒ únik bakterií imunitnímu systému

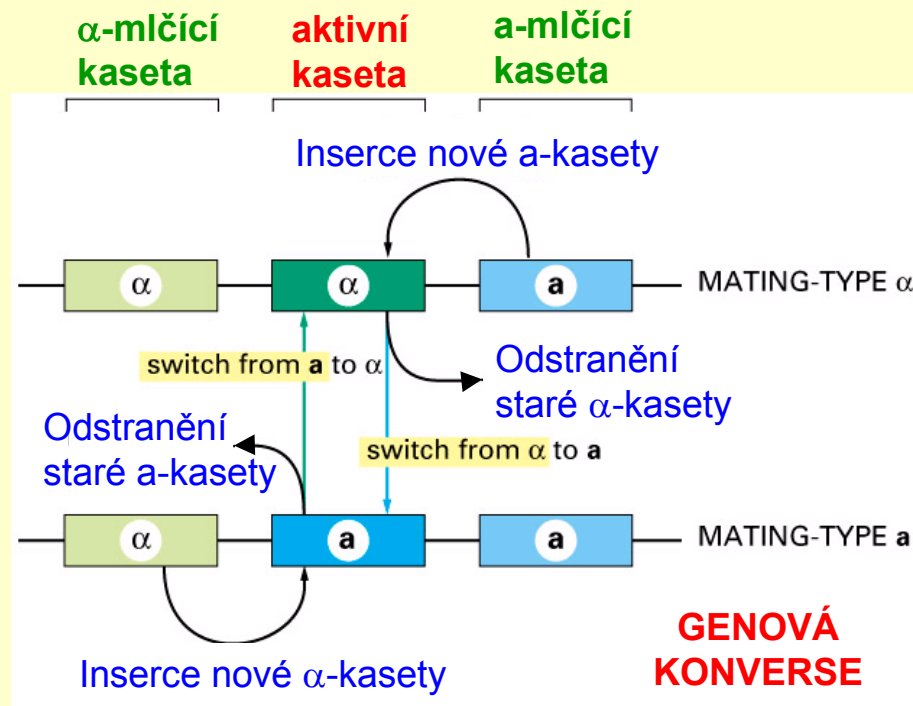
⇒ inverse cca 1000 bp dlouhého úseku DNA ⇒ změny exprese povrchového proteinu flagellinu (2 různé formy kódované 2 různými geny H1 a H2)

⇒ frekvence otáčení nízká  
⇒  $10^5$  buněčných dělení  
⇒ 1x otočení





## 2. Určení párovacího typu u kvasinek



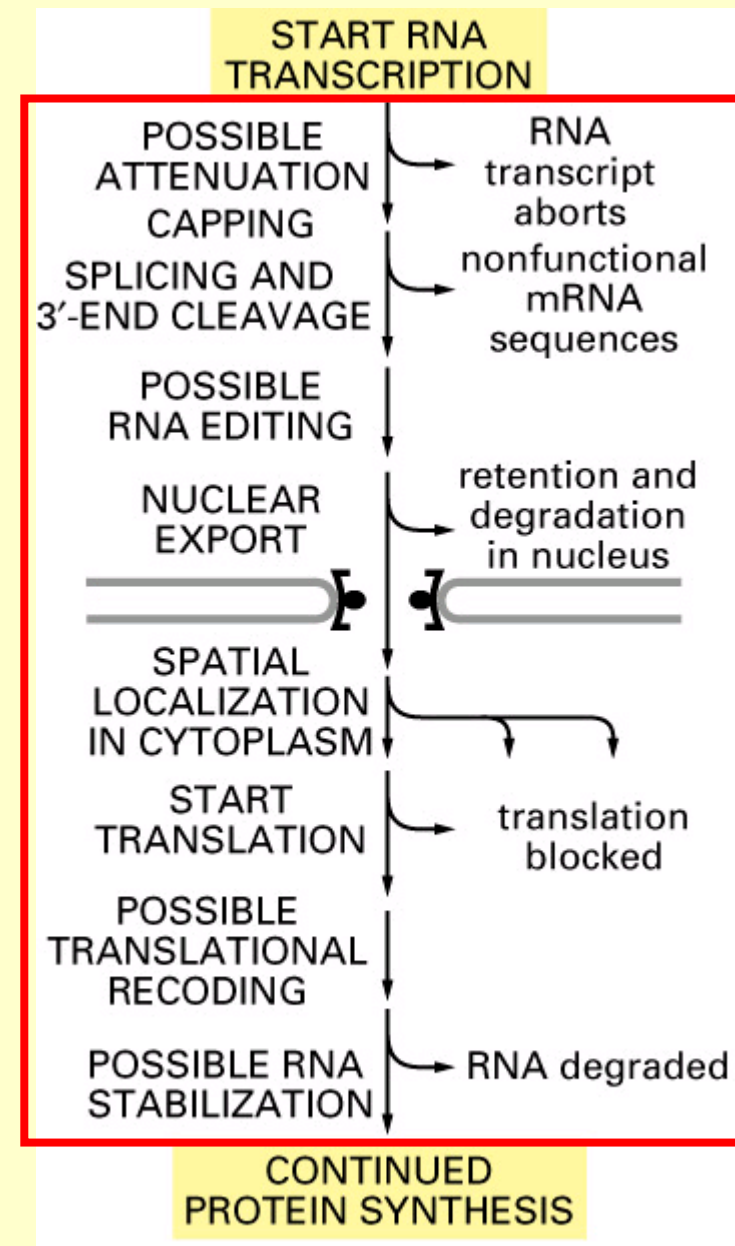
Přítomnost specifické (a nebo  $\alpha$ ) kasety v MAT lokusu  $\Rightarrow$  reguluje změny exprese velkého počtu genů lokalizovaných na různých místech genomu (aSG,  $\alpha$ SG, hSG)  $\Rightarrow$  určuje buněčný typ (a,  $\alpha$ , a/ $\alpha$ )



gene regulatory proteins produced by MAT locus	cell type	set of genes controlled by MAT
<p>a a1 (no effect)</p>	<b>a haploid</b>	<p>Mcm1</p> <p>aSG ON</p> <p><math>\alpha</math>SG OFF</p> <p>hSG ON</p>
<p><math>\alpha</math> <math>\alpha1</math> <math>\alpha2</math></p>	<b><math>\alpha</math> haploid</b>	<p>Mcm1 <math>\alpha2</math></p> <p>aSG OFF</p> <p><math>\alpha1</math> Mcm1 <math>\alpha</math>SG ON</p> <p>hSG ON</p>
<p><math>\alpha</math> a <math>\alpha2</math> a1 <b>komplex</b></p>	<b>a/<math>\alpha</math> diploid</b>	<p>Mcm1 <math>\alpha2</math></p> <p>aSG OFF</p> <p><math>\alpha</math>SG OFF</p> <p><math>\alpha2</math> a1 hSG OFF</p>

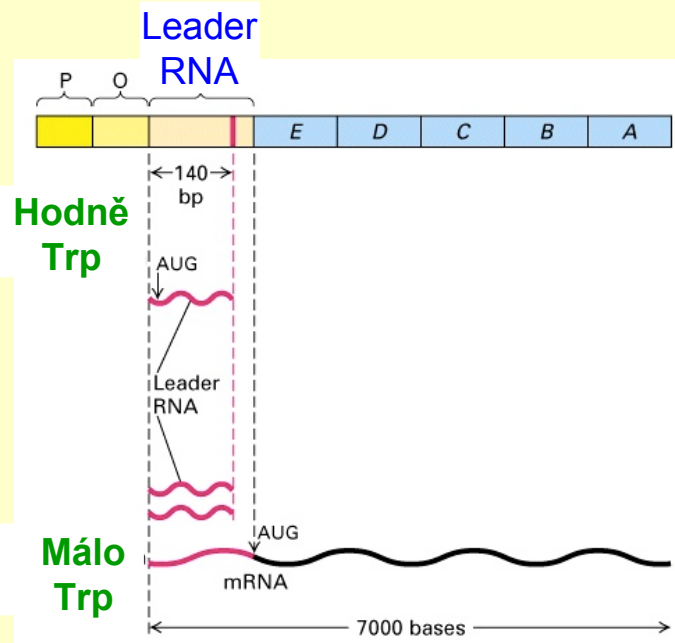
## REGULACE POST-TRANSKRIPČNÍ

- ⇒ poté co je zahájena transkripce
- ⇒ méně častá (energeticky méně výhodná)
- ⇒ někdy rychlejší, umožňuje zapojení dalších signálních mechanismů

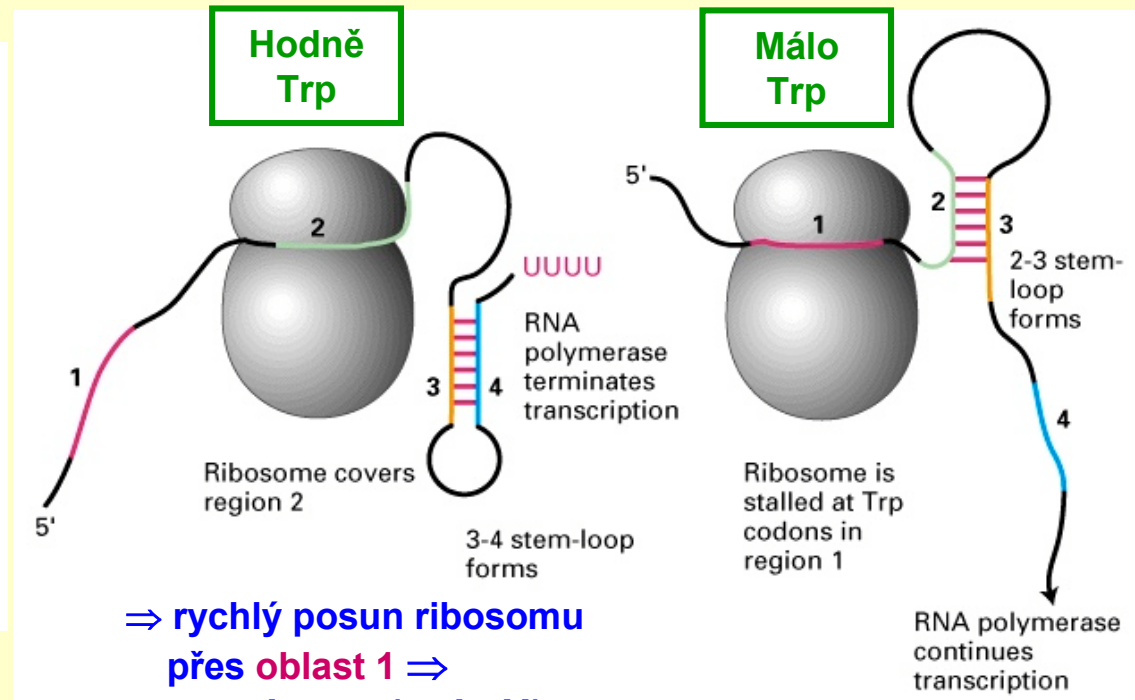


# 1. Atenuace transkripce ⇒ předčasná terminace není-li produkt potřeba

## Trp - operon

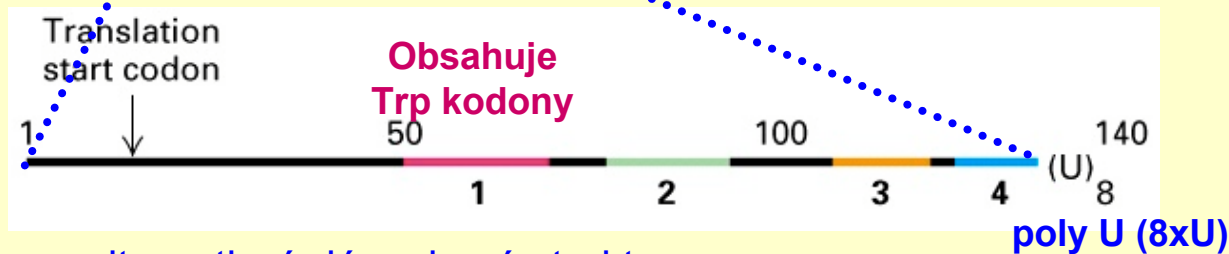


## Translase Trp leader RNA



⇒ rychlý posun ribosomu  
přes oblast 1 ⇒  
terminace (poly U)

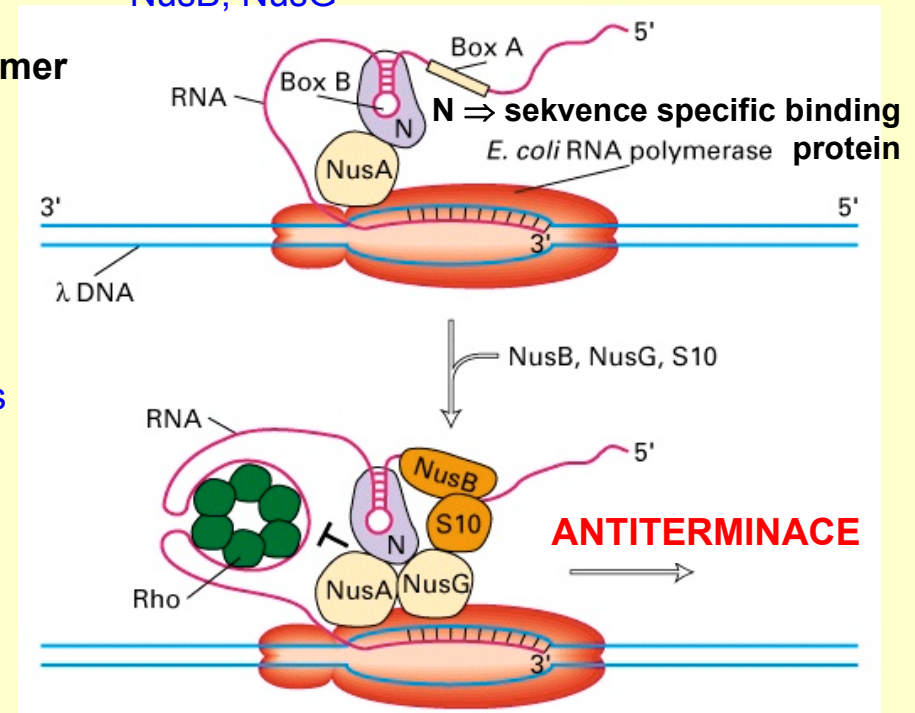
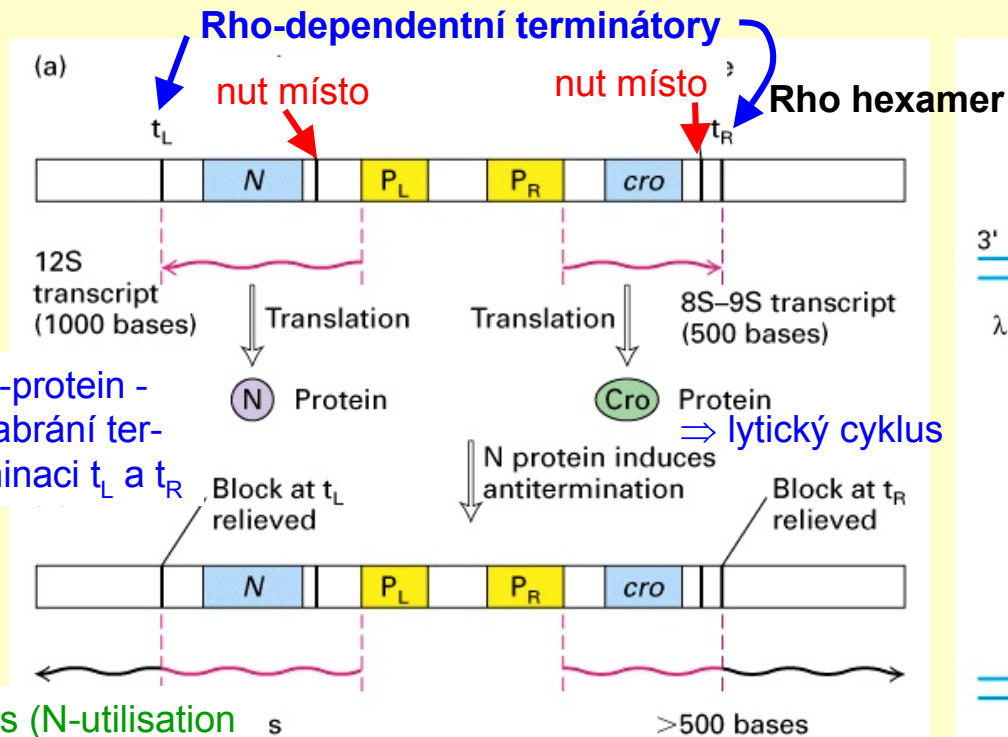
⇒ ribosom se zpomalí  
(zastaví) na oblasti 1 ⇒  
vytvoření vlásenky 2-3  
⇒ transkripce pokračuje



⇒ alternativní vlásenkové struktury

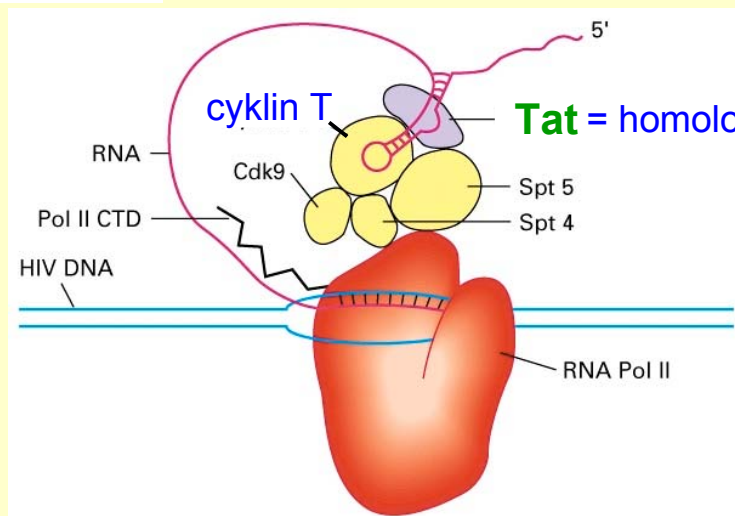
## Rho-závislá terminace - fág $\lambda$

Nus komplex: NusA  $\Rightarrow$  elongační faktor  
 NusE  $\Rightarrow$  protein malé ribosomální podjednotky  
 NusB, NusG



nut místo  $\Rightarrow$  BoxA, Box B (vazba N-prot.)

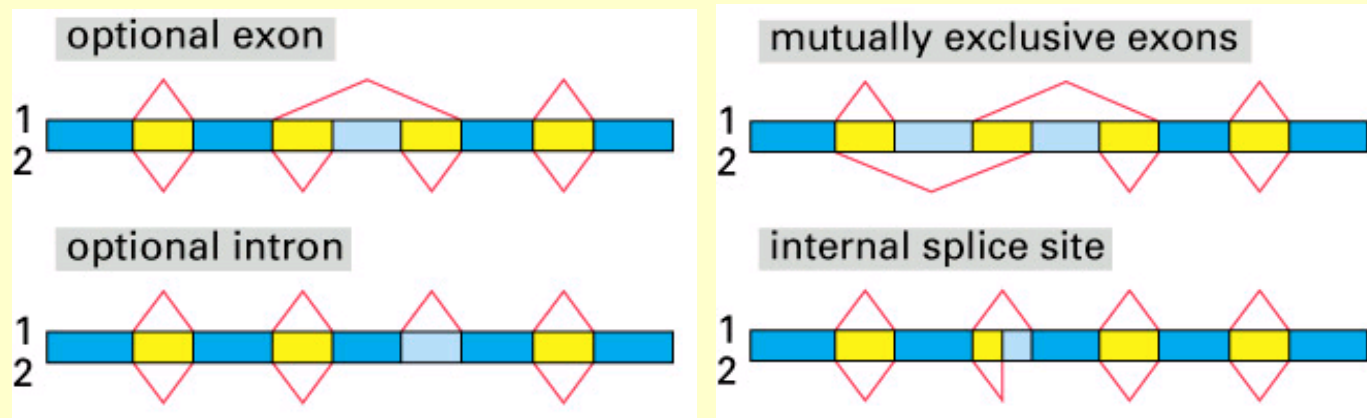
## Antiterminace v HIV genomu



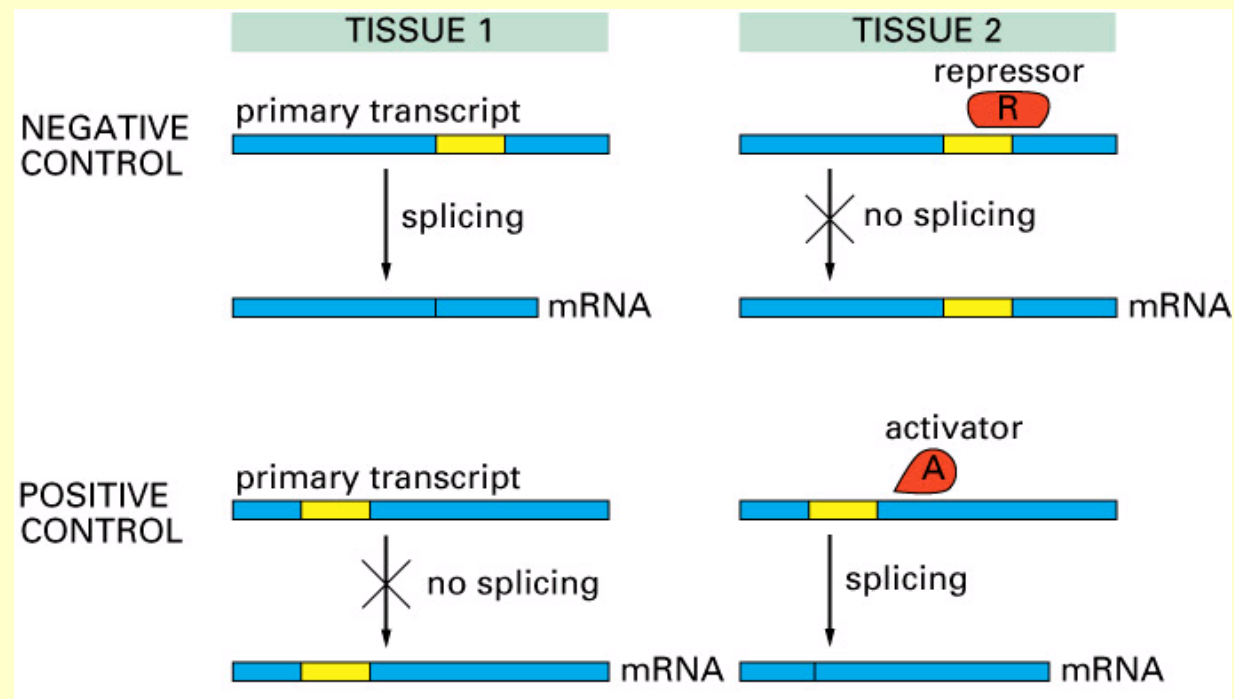
Účinná exprese HIV genů  $\Rightarrow$  vyžaduje virový Tat protein  
 tat mutanty  $\Rightarrow$  krátké transkripty  
 $\Rightarrow$  tat = antiterminační faktor - sekvenční specifický vazebný protein  $\Rightarrow$  vazba na sekvenci TAR

+ vazba cyklinu T  $\Rightarrow$  aktivace cdk9  $\Rightarrow$  fosforylace polymerasy

## 2. Alternativní sestřih mRNA a jeho kontrola



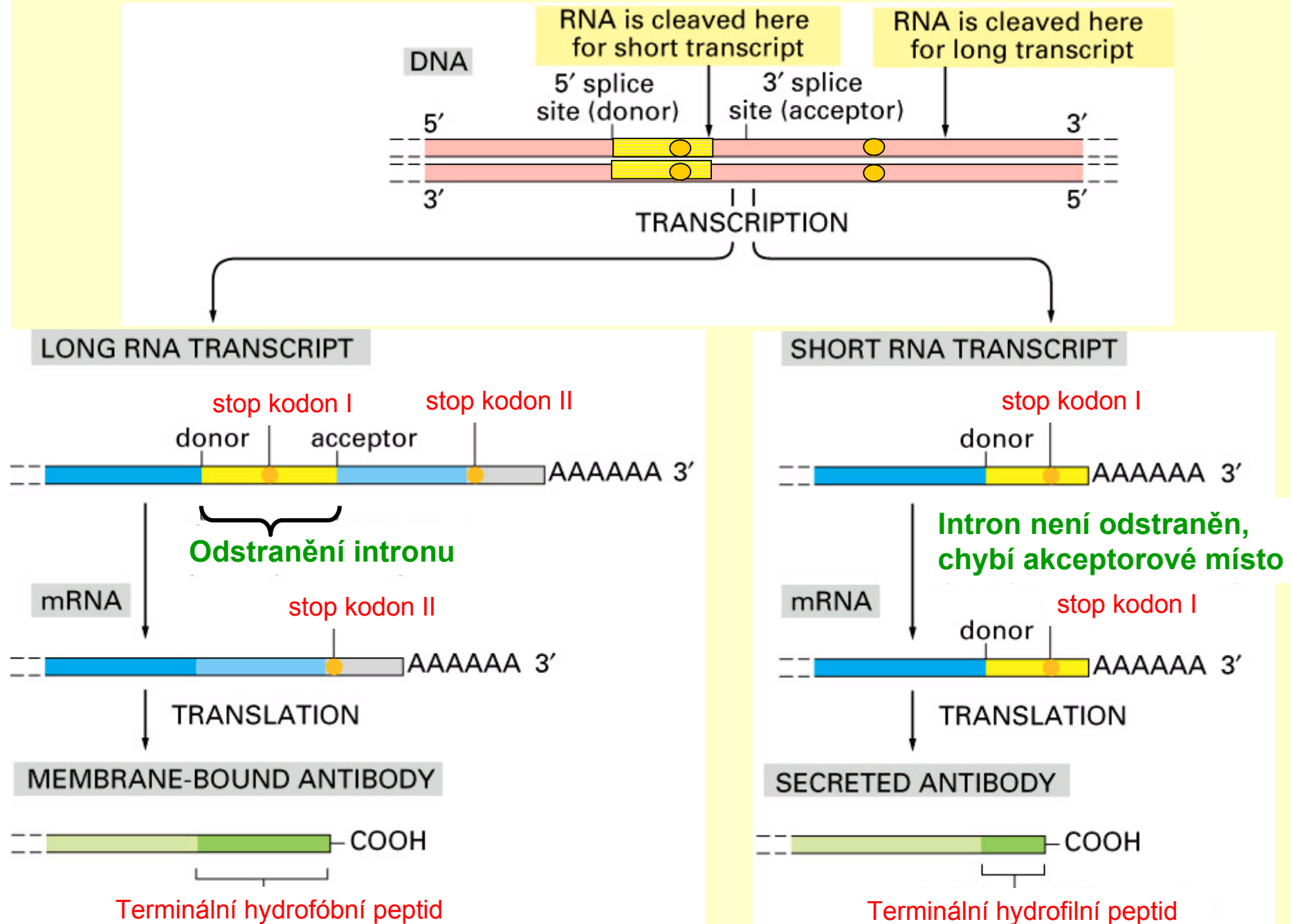
### Alternativní sestřih konstitutivní X regulovaný



Alternativní sestřih a) mění čtecí rámeček, b) nemění čtecí rámeček



### 3. Regulace místa štěpení RNA a přidání polyA



#### 4. Regulace transportu z jádra

- ⇒ cca 1/2 syntetizované RNA se dostane do cytoplasmy
- ⇒ cca 1/2 primárních RNA transkriptů se v jádře degraduje, neupraví se pro transport
- ⇒ **transport jaderným pórem** ⇒ aktivní proces ⇒ vyžaduje 5'čepičku a 3'poly A (asi nestačí, ? jaké další signály/markery)

#### 5. Lokalisace mRNA ve specifických místech cytoplasmy

- ⇒ většinou ⇒ rovnou translace po přechodu jádro ⇒ cytosol

**X**

- ⇒ **některé mRNA ⇒ transport do specifických míst cytoplasmy prostřednictvím signálů na mRNA (před translací)**

Lokalisace signálů ⇒ 3'nepřekládaná oblast (UTR „untranslated region“)

př. *Drosophila* (vajíčko) ⇒ lokalizace některých mRNA v různých zónách ⇒ gradienty proteinů

*Caulobacter crescentus* ⇒ regulace diferenciací

#### 6. Trans-RNA sestřih

- Trypanosoma* ⇒ všechny mRNA mají 5'sekvence, které jsou přepisovány separátně a přidávány k 5'konci RNA transkriptů
- ⇒ štěpení dvou původně oddělených transkriptů

i jiné organismy (nematoda, chloroplasty a mitochondrie rostlin) ⇒ **kombinace původně oddělených transkriptů ⇒ nové proteiny**

Cytoplasma

## 7. RNA editing ⇒ alterace nukleotidových sekvencí RNA transkriptů

### *Trypanosoma*: proteiny mitochondrií

⇒ inserce 1 nebo více U (nebo delece) do přesných míst transkriptu ⇒ **modifikace sekvence i čtecího rámce** ⇒ **modifikace produktu**

### „guide“ RNA molekuly ⇒

(cca 40-80 b dlouhé)

⇒ určují jaká bude modifikace cílových míst

### Mitochondrie rostlin ⇒

⇒ editing ⇒ změna C ⇒ U (nejsou inserce a delece)

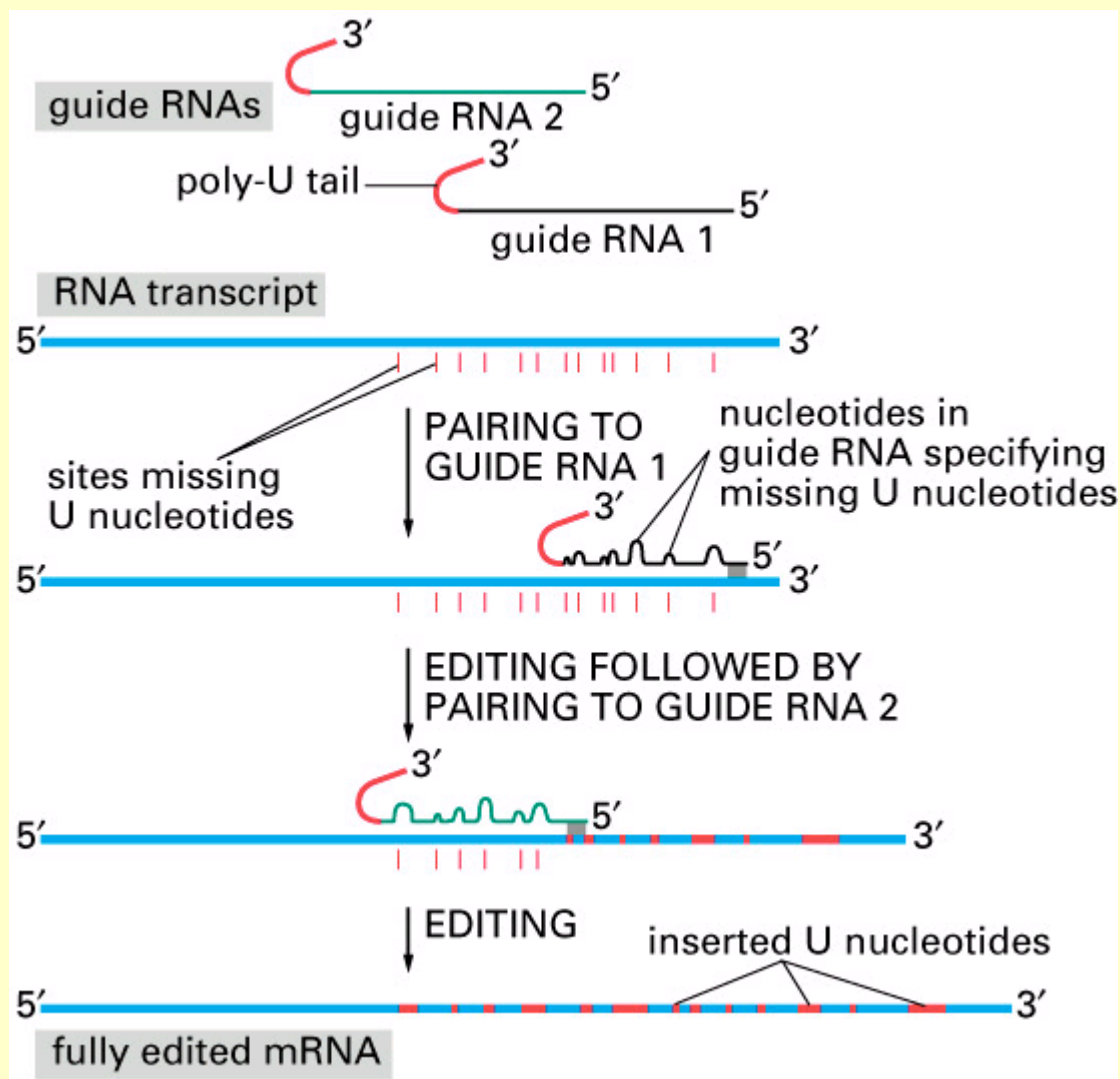
⇒ změny až 10 % aminokyselin kódovaných mRNA

### Funkce ?

⇒ evolučně staré organismy

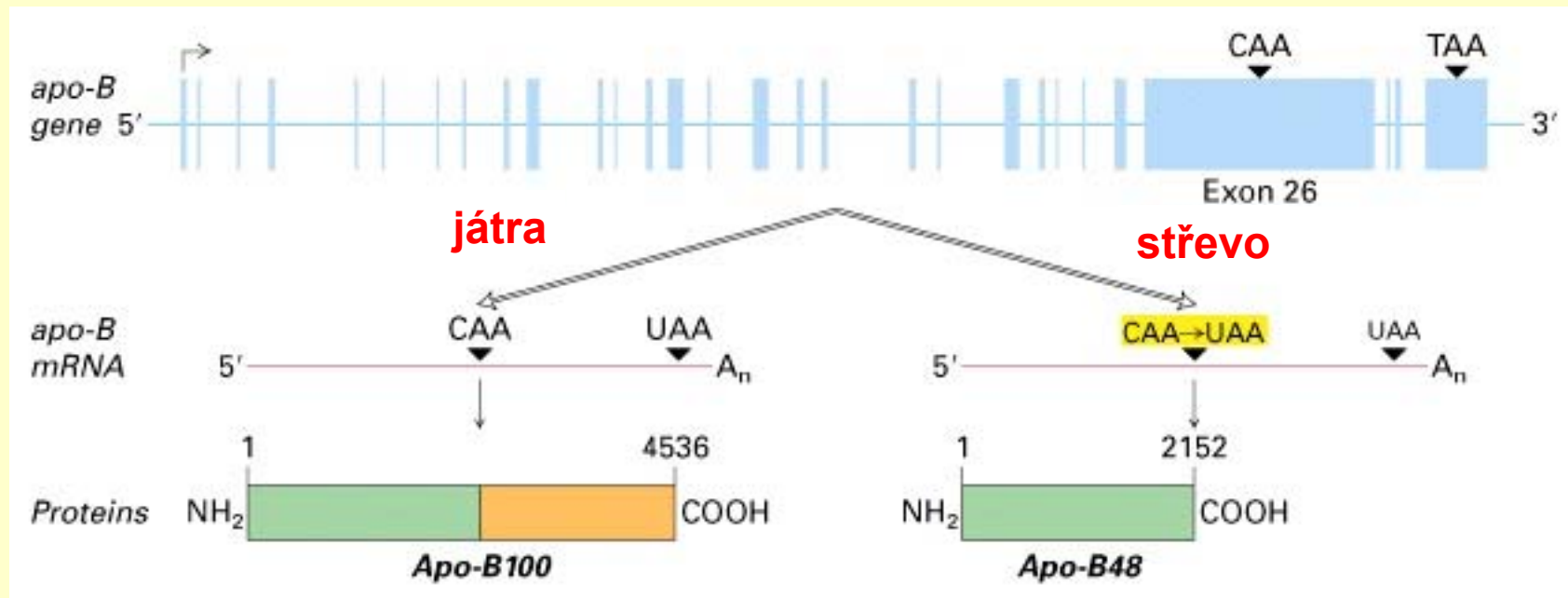
⇒ rozdíly kódu

⇒ enzymatická role RNA

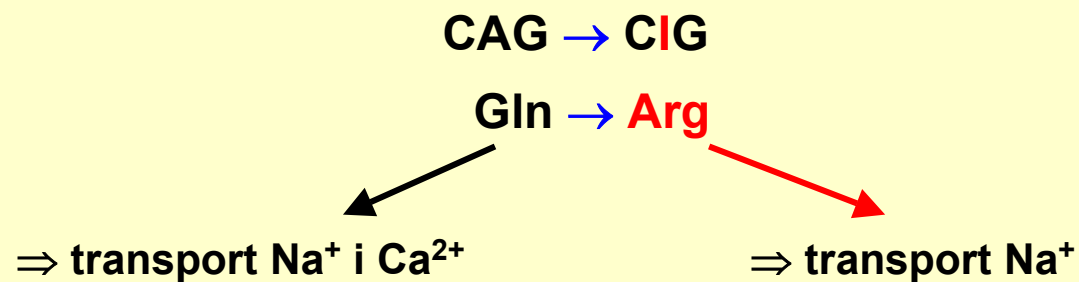


## Savčí buňky

1) Apolipoprotein B  $\Rightarrow$  2 varianty produktu dané RNA editováním



2) Receptor pro glutamát (neurotransmitter)  $\Rightarrow$  AK v iontovém kanálu



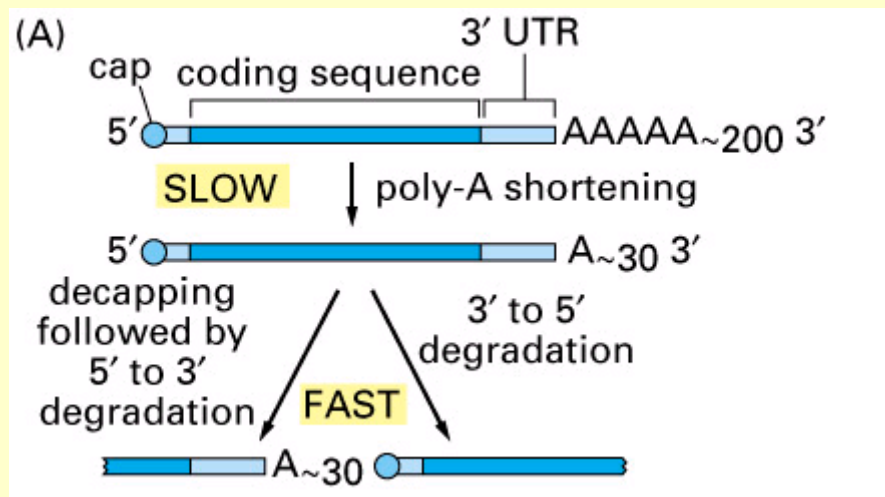
## 8. Stabilita mRNA

**Bakteriální buňka**  $\Rightarrow$  většina mRNA nestabilní  $\Rightarrow$  poločas cca 3 min  $\Rightarrow$  rychlá syntéza a rychlá degradace mRNA  $\Rightarrow$  rychlá adaptace bakterií na vnější podmínky

**Nižší eukaryota** (kvasinky)  $\Rightarrow$  cca 22 min ( $\emptyset$ )

**Vyšší eukaryota** (savčí buňka)  $\Rightarrow$  větší stabilita mRNA, některé poločas cca 10 hod jiné cca 30 min (např. histony), nestabilní mRNA často kóduje regulační proteiny  $\Rightarrow$  rychlá změna v buňce

**Cytosol**  $\Rightarrow$  postupné zkracování poly A ocásku  $\Rightarrow$  kratší než 30 AA  $\Rightarrow$  rychlá degradace

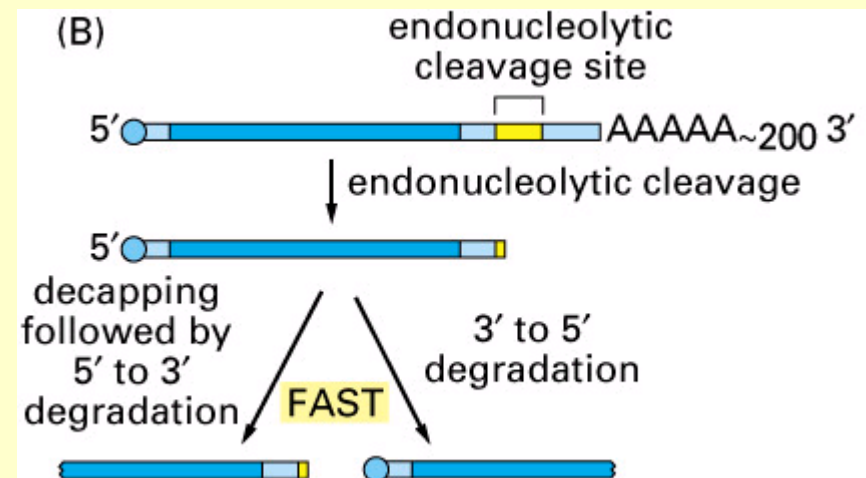


$\Rightarrow$  prodlužování polyA v cytosolu

**Specifické sekvence na mRNA, které stimulují degradaci**

1)  $\Rightarrow$  A-U bohatá oblast na 3'UTR  $\Rightarrow$  stimulace urychleného odstranění poly A z 3' konce

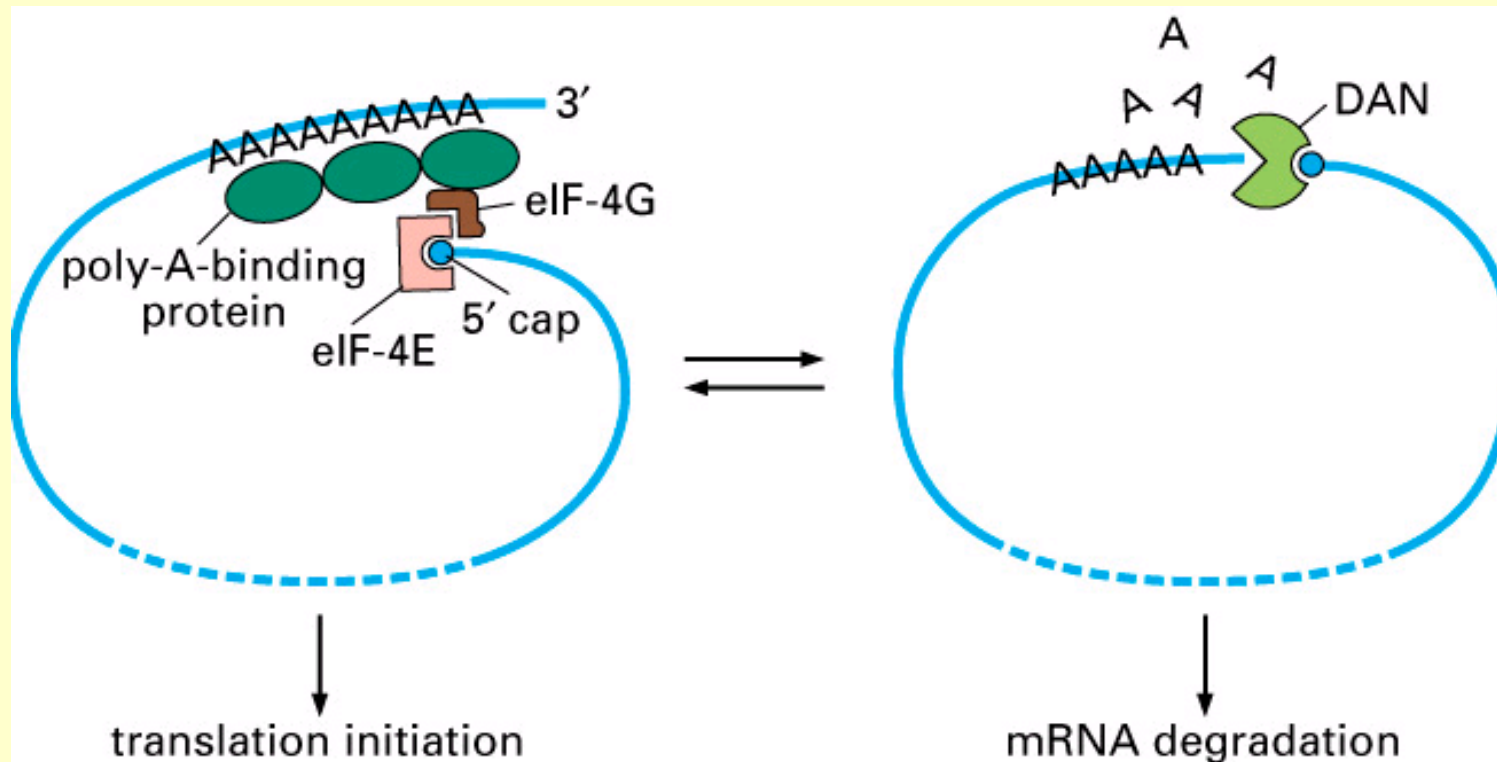
2)  $\Rightarrow$  specifická místa v 3'UTR  $\Rightarrow$  štěpení specifickými endonukleasami





## Kompetice mezi mRNA translací a mRNA degradací $\Rightarrow$ protein DAN

Role 5'čepičky  $\Rightarrow$  vazba IF translace nebo DAN



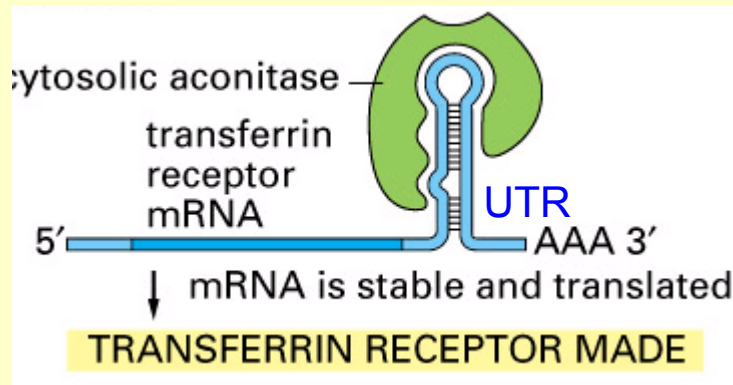
## Změna stability mRNA - odpověď na (extracelulární) signál

⇒ např. steroidní hormony ⇒ zvýšení stability některých mRNA

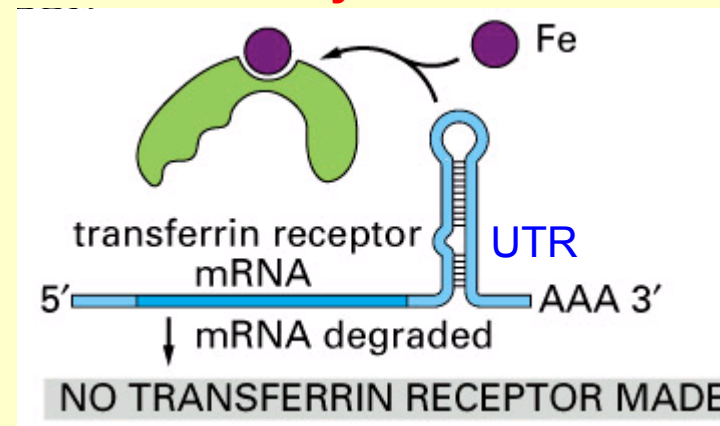
### ⇒ Fe homeostáze

Přidání Fe ⇒ snížení stability mRNA kódující receptorový protein, který váže transferin (transporter Fe) (uvolnění proteinu aconitasy, který blokuje místo degradace mRNA)

#### Hladovění na Fe

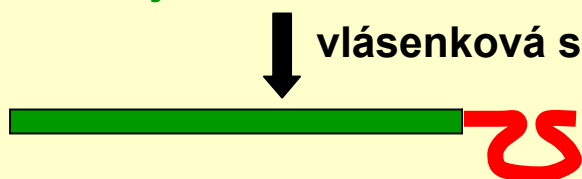


#### Nadbytek Fe



### ⇒ kontrola mRNA kódující histony

⇒ poločas cca 1 hod během S fáze b. cyklu X minuty mimo S fázi

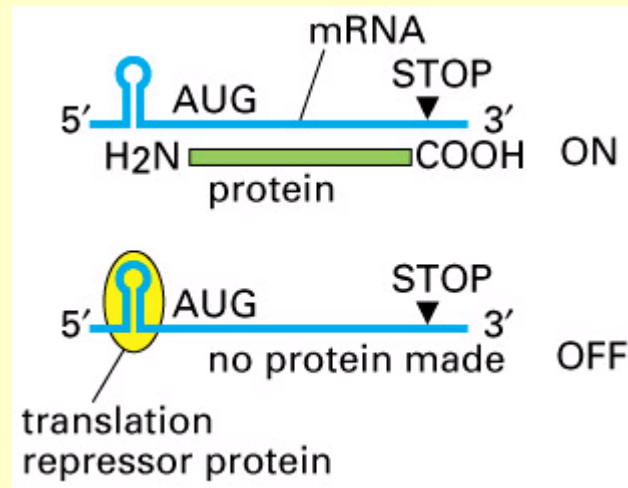


vlásečková sekvence nahrazuje polyA má-li začít degradace

⇒ připojena k syntetizované mRNA štěpící reakcí (vyžaduje párování snRNA ⇒ jádro)

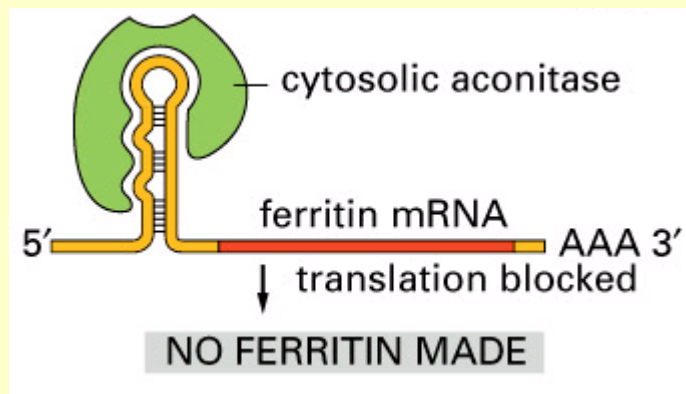
## 9. Negativní kontrola translace

⇒ translační represorové proteiny ⇒ vazba vedle 5' konce mRNA



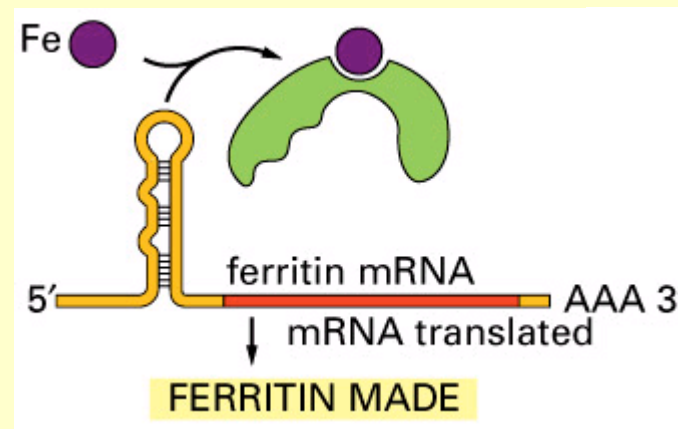
⇒ **Ferritin** ⇒ vazba Fe ⇒ ochrana před toxicitou

**Hladovění na Fe**



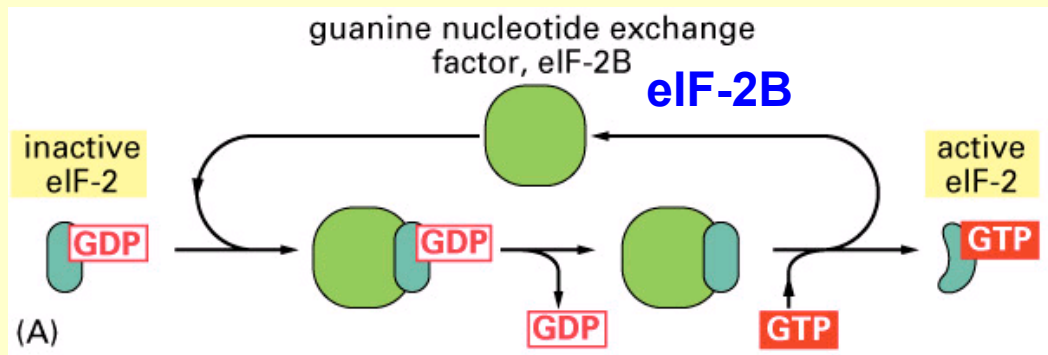
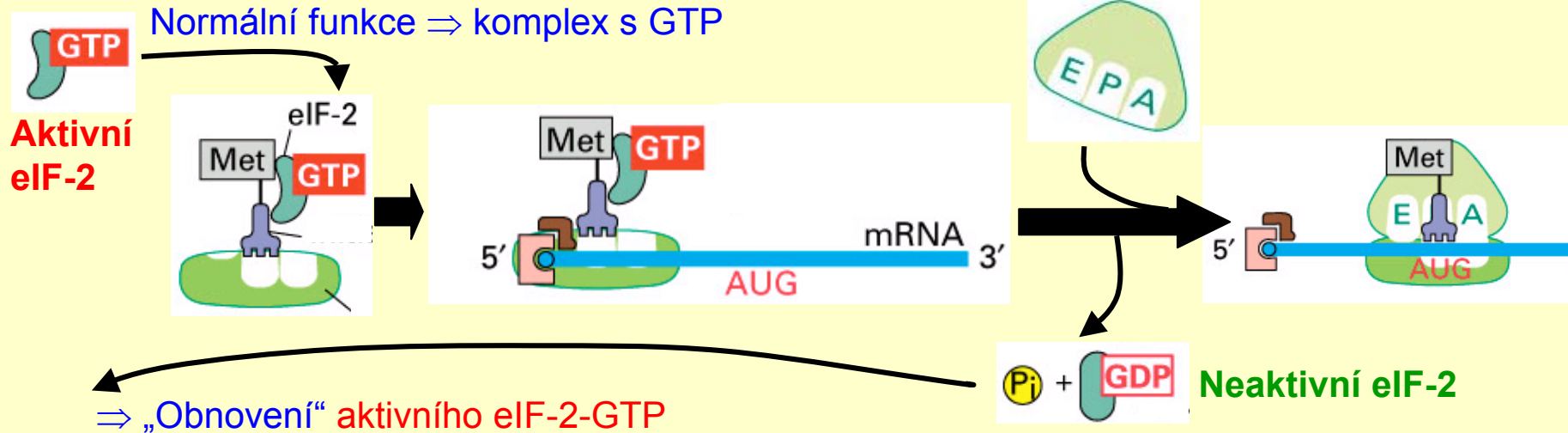
⇒ Fe není vázáno

**Nadbytek Fe**



⇒ vazba Fe

## Role eIF-2 v regulaci hladiny proteosyntézy

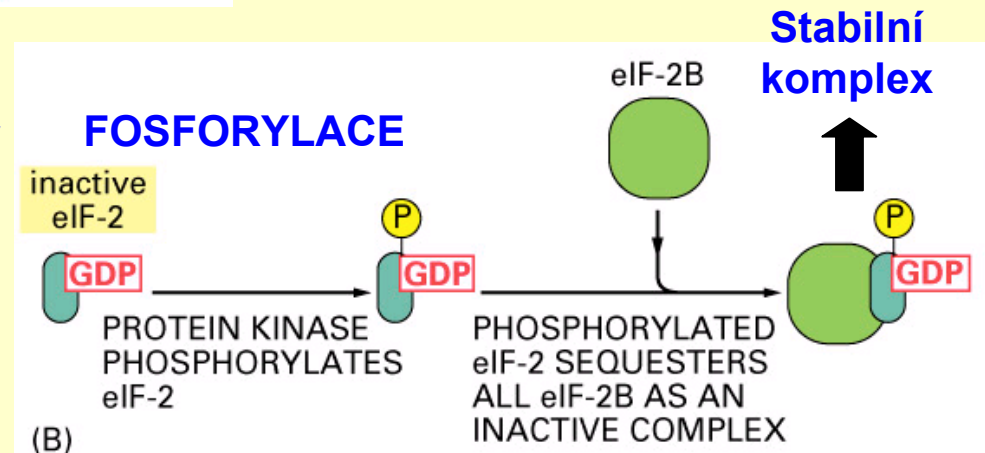


**Fosforylace eIF-2 specifickými protein kinázami  $\Rightarrow$  Celkový pokles proteosyntézy**

**Množství eIF-2B < eIF-2  $\Rightarrow$  nedostatek aktivního eIF-2B  $\Rightarrow$  zbývající část eIF-2 zůstane v neaktivní formě (-GDP)**

$\Rightarrow$  rychlý pokles proteosyntézy

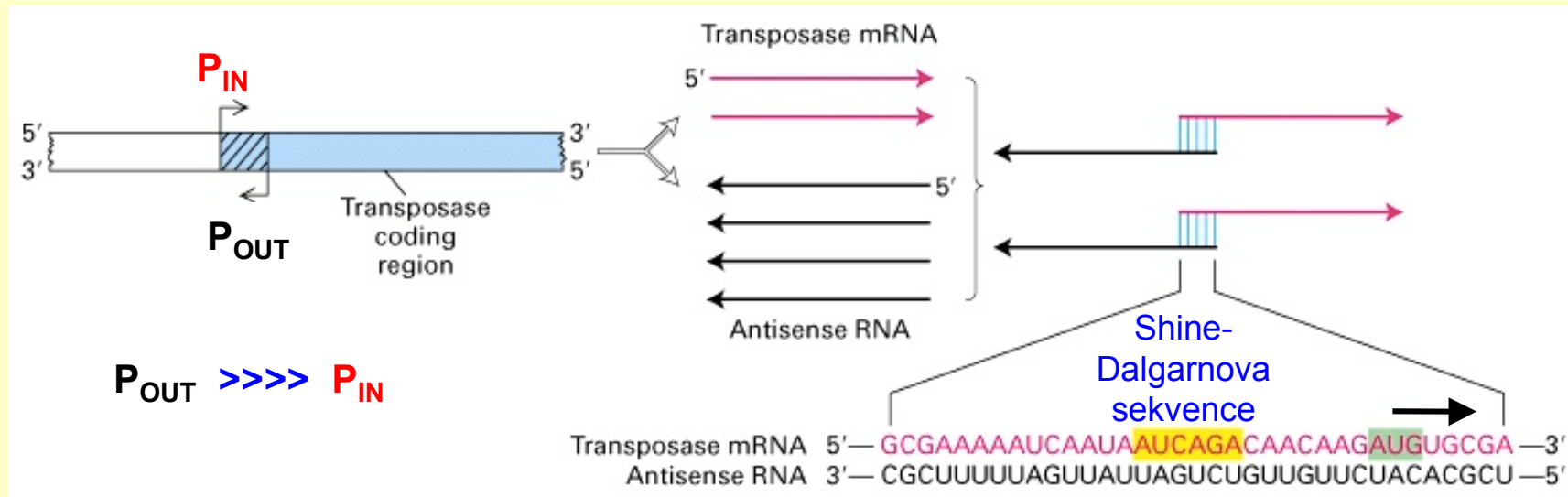
$\Rightarrow$  ne všechny mRNA



## 9. Regulace translace pomocí „antisense“ RNA

Bakterie  $\Rightarrow$  antisense RNA  $\Rightarrow$  vazba do místa iniciačního kodónu a Shine-Dalgarnovy sekvence (blok iniciace translace)

### TRANSPOSASA (IS10 element)



$\Rightarrow$  nízká exprese transposasy



## 10. Stabilita proteinů

### 1. Likvidace špatně sbalených/sestavených proteinů

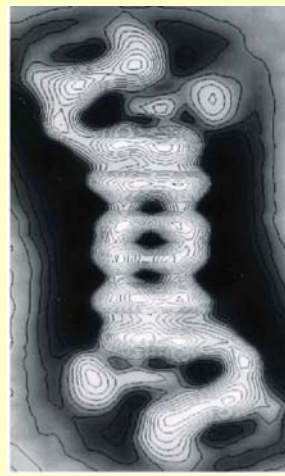
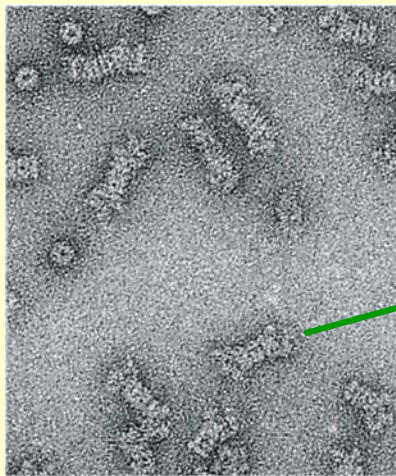
⇒ individuální proteiny

⇒ nadbytečné proteiny tvořící části vícepodjednotkového proteinu (nebo komplexu proteinů)

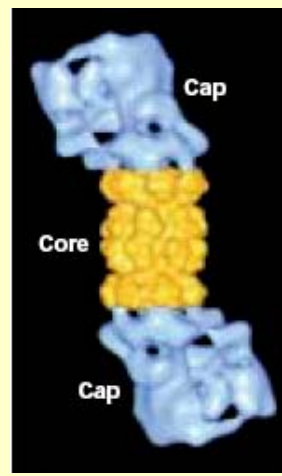
### Ubiquitin-dependentní proteolytická dráha - proteasom

⇒ + likvidace proteinů s krátkým poločasem

### PROTEASOMY - proteinové komplexy v cytoplasmě



10 nm



(cca 10 polypeptidů), hydrolýza ATP  
Selektce proteinů pro degradaci  
(rozpoznání substrátu, regulace)

Centrální cylindr - proteolytický  
aparát (proteasy) ⇒ degradace  
proteinů na krátké peptidy

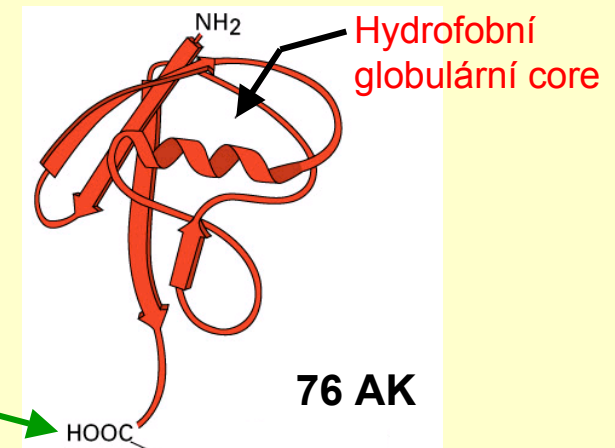
Selektce proteinů pro degradaci  
(rozpoznání substrátu, regulace)

⇒ **degraduje proteiny specificky označené UBIQUITINEM**

⇒ ve formě volné nebo vázané na proteiny

(právě vznikající proteiny chráněny -  
? translační aparát, chaperony)

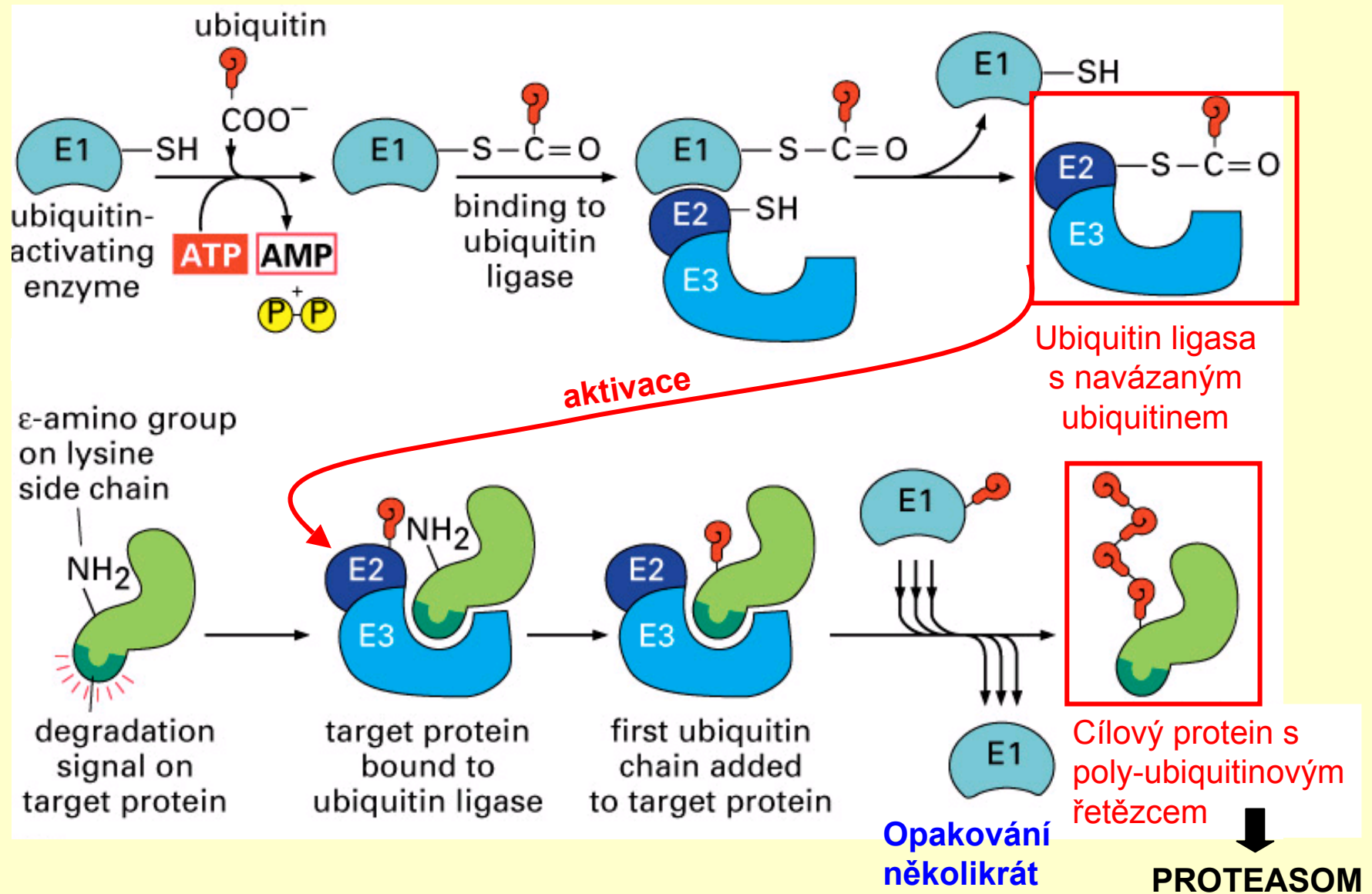
C-konec ⇒  
připojení k Lys  
proteinů určených  
k degradaci



E1 = ubiquitin aktivující enzym

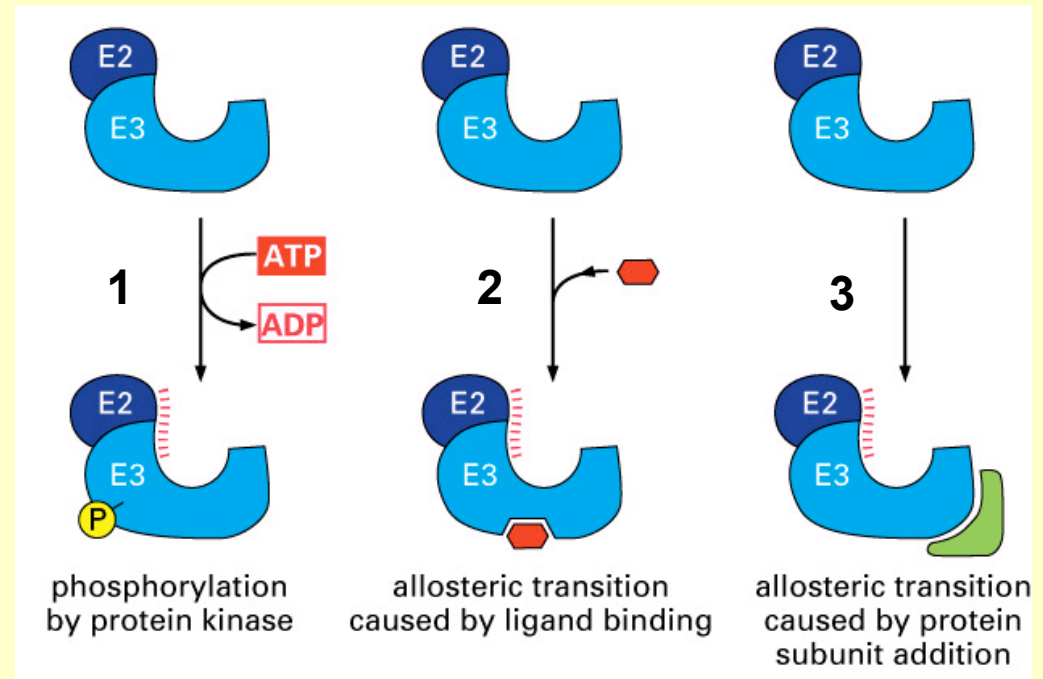
E2 = ubiquitin aktivující enzym

E3 = ubiquitin ligasa



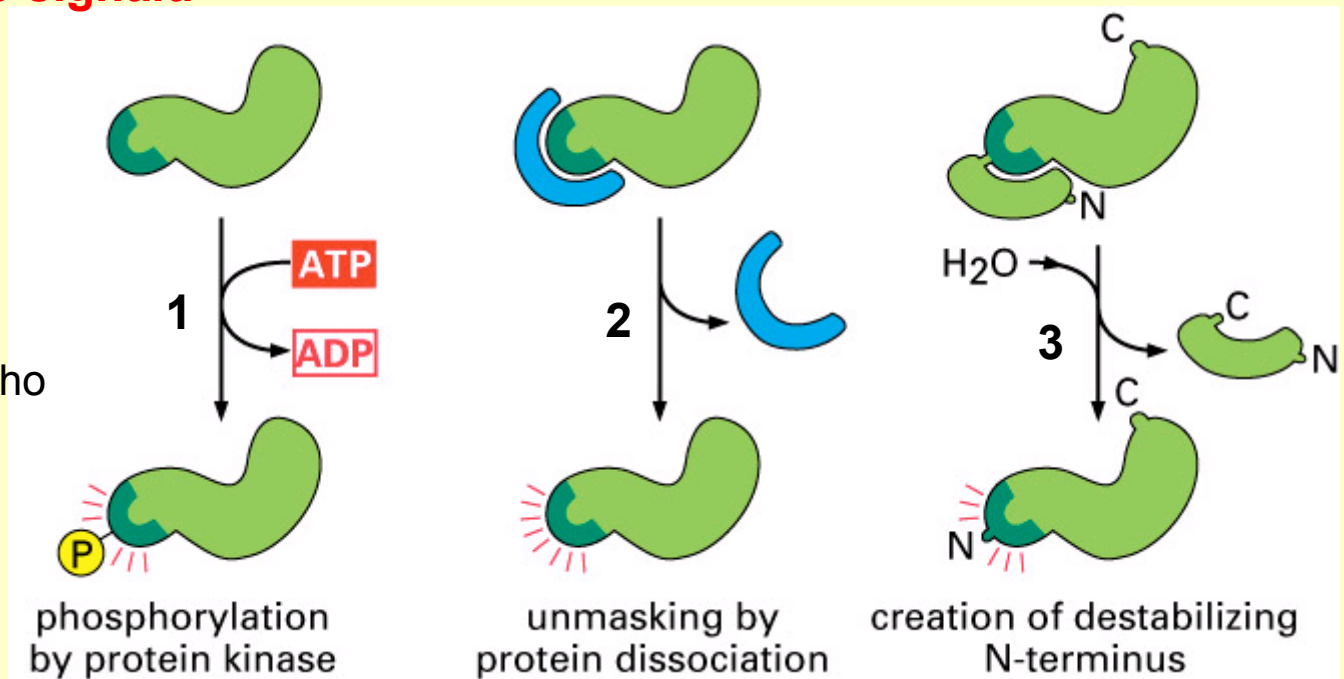
## Aktivace ubiquitin ligasy

1. Fosforylace specifickou protein kinasou
2. Vazba ligandu - změna konformace
3. Vazba proteinové podjednotky - změna konformace



## Aktivace degradačního signálu

1. Fosforylace specifickou protein kinasou
2. Odstranění proteinu blokujícího degradační signál
3. Vytvoření destabilizujícího N-konce (štěpení)



## **Poločas proteinů - N-koncové pravidlo** (funguje od bakterií ⇒ savčí buňky)

⇒ N-terminální aminokyselina - stabilisující X destabilisující

**Stabilisující aminokyseliny** ⇒ Met, Ser, Thr, Ala, Val, Cys, Gly, Pro

⇒ obvykle přes 30 hod

⇒ koncový Met odstraněn aminopeptidasou obvykle pouze je-li následující AK též stabilisující

**Destabilisující aminokyseliny** = všechny ostatní

⇒ většinou nejsou na koncích cytoplasmatických proteinů X často na konci proteinu transportovaného do jiného kompartmentu

? ⇒ degradace proteinů, které se omylem dostaly do cytoplasmy

⇒ specifické proteasy, které odštěpí N-konec a odkryjí destabilisující AK na novém N-konci

**Primární destabilisující AK** = Arg ⇒ přímo rozpoznán k degradaci

**Sekundární destabilisující AK** = Asp, Glu

⇒ modifikovány arginyl tRNA protein transferasou ⇒ připojení Arg

**Terciální destabilisující AK** = Asn, Gln

⇒ amidasa ⇒ konverse na Asp a Glu

**N-koncové AK** ⇒ někdy modifikace acetylací ⇒ ? Ochrana proteinů s dlouhým poločasem před degradací