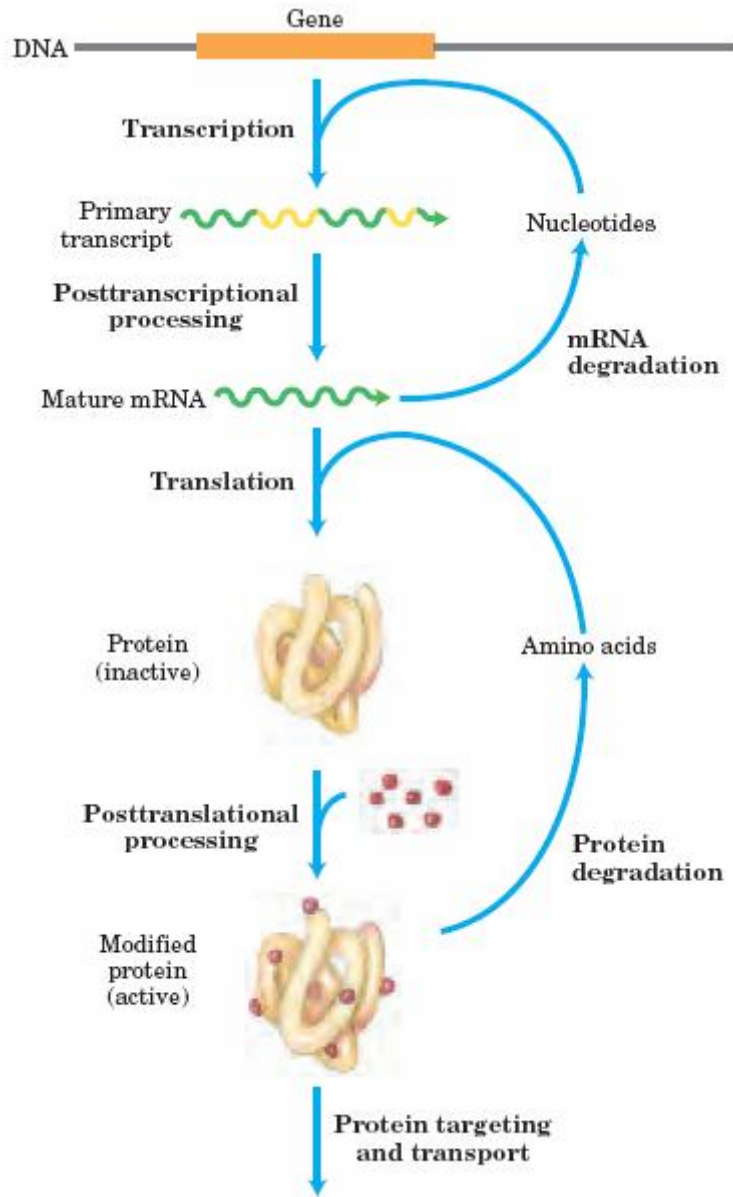


# KONTROLA GENSKE EKSPRESIJE

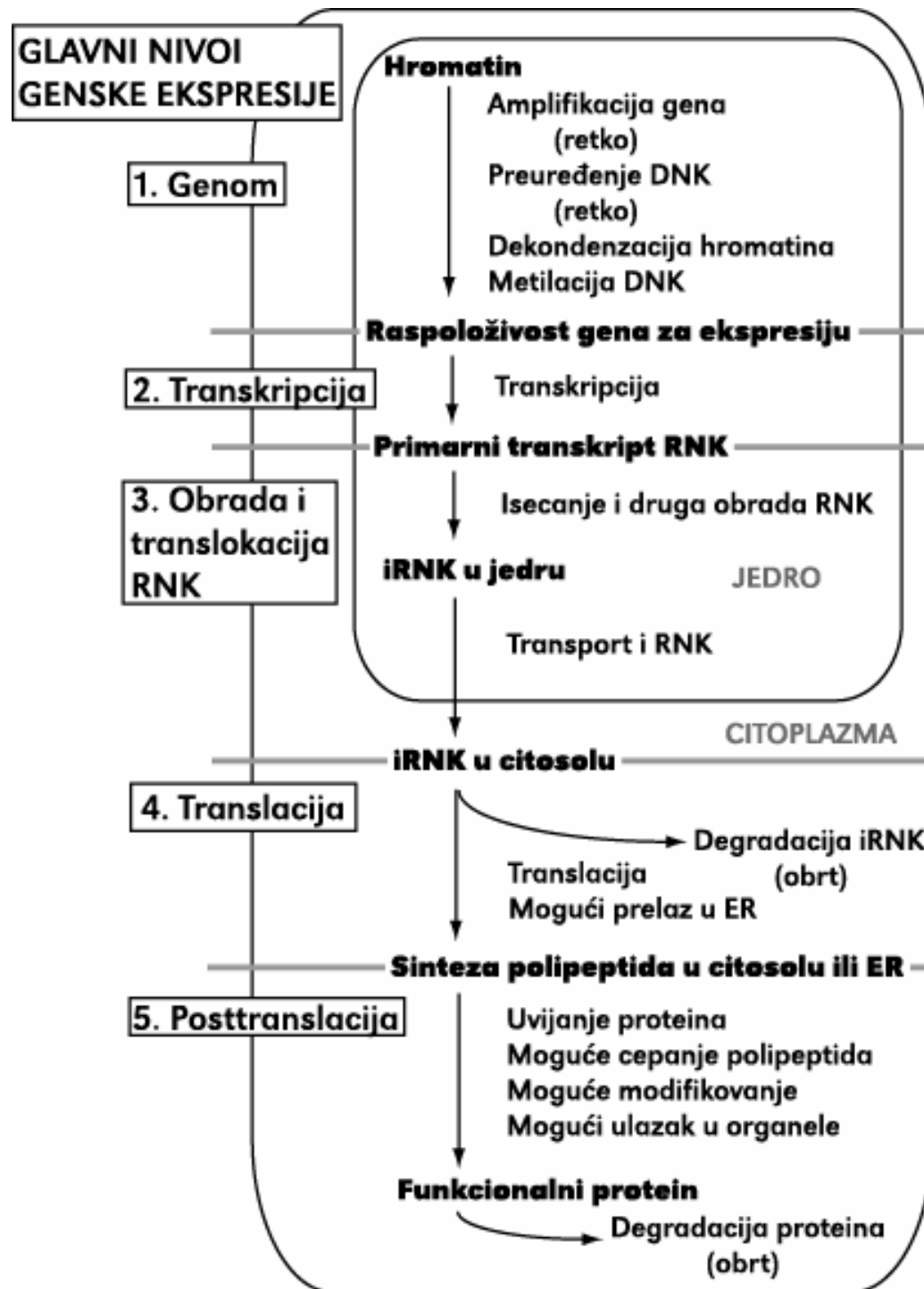
Navesti sve nivoe kontrole genske ekspresije –  
kontrola na nivou:

genoma,  
transkripcije,  
obrade i translokacije RNK,  
translacije,  
posttranslacione obrade proteina



## Kontrola količine proteina u ćeliji

1. Sinteza primarnog transkripta RNK (transkripcija)
2. Posttranslaciona modifikacija RNK
3. Razgradnja iRNK
4. Sinteza proteina (translacija)
5. Posttranslaciona modifikacija proteina
6. Usmeravanje proteina i njihov transport
7. Razgradnja proteina



## Kontrola obrade RNK

- Obrada RNK
- Stabilnost RNK
- Regulacija transporta RNK iz jedra

## Regulacija procesa translacije

- Kontrola translacije (kontrolisana u toku inicijacije i elongacije)- u retikulocitima hem stimuliše sintezu globina (protein kinazna aktivnost hem kontrolisanog inhibitora-eIF2)

## Posttranslaciona kontrola:

- Uvijanje proteina (šaperoni)
- Usmeravanje proteina
- Proteoliza, glikozilacije-trajna promena funkcije proteina
- Fosforilacije-reverzibilna promena funkcije proteina

Različiti tipovi ćelija istog organizma sadrže istu DNK, ali akumuliraju različiti set RNK i proteina.

1. Mnogi procesi su zajednički za sve ćelije pa one imaju mnoge iste proteine (proteini hromozoma, RNK poly, ribozomalni proteini, ključni enzimi metaboličkih procesa...)
  2. Neki proteini se nalaze samo u nekim ćelijama (Hb)
  3. U bilo kom trenutku, ćelija eksprimira 10 000- 20 000 gena (od ukupna 30 000). Nivoi istog proteina se razlikuju između ćelija
  4. iRNK-specijalizovani proteini. Na nivou transkripcije-
- KONTROLA GENSKE EKSPRESIJE

- Geni za proizvode koji su ćeliji stalno potrebni, kao npr za enzime osnovnih metaboličkih procesa, se više manje eksprimiraju jednako u svakoj ćeliji jednog organizma. Oni se nazivaju- housekeeping geni. Nepromenljiva ekspresija gena se naziva- konstitutivna genska ekspresija

- Ćelija može da promeni ekspresiju gena kao odgovor na spoljašnje signale- Ćelije jetre-pod uticajem glukokortikoida- promena sinteze proteina-povećana sinteza glukoze iz AK i drugih malih molekula. Ovo predstavlja regulisanu gensku ekspresiju a izvodi se po modelu indukcije i represije (induktori i represori).

- Prvi nivo kontrole jeste inicijacija transkripcije tj specifična interakcija proteinske komponente RNK poly sa DNK

## RNK polimeraza se vezuje za DNK preko specifične strukture-promotora. Značaj njegove sekvence

Postoje velike varijacije u sekvenci promotora koje kod prokariota mogu da utiču na frekvencu inicijacije transkripcije.

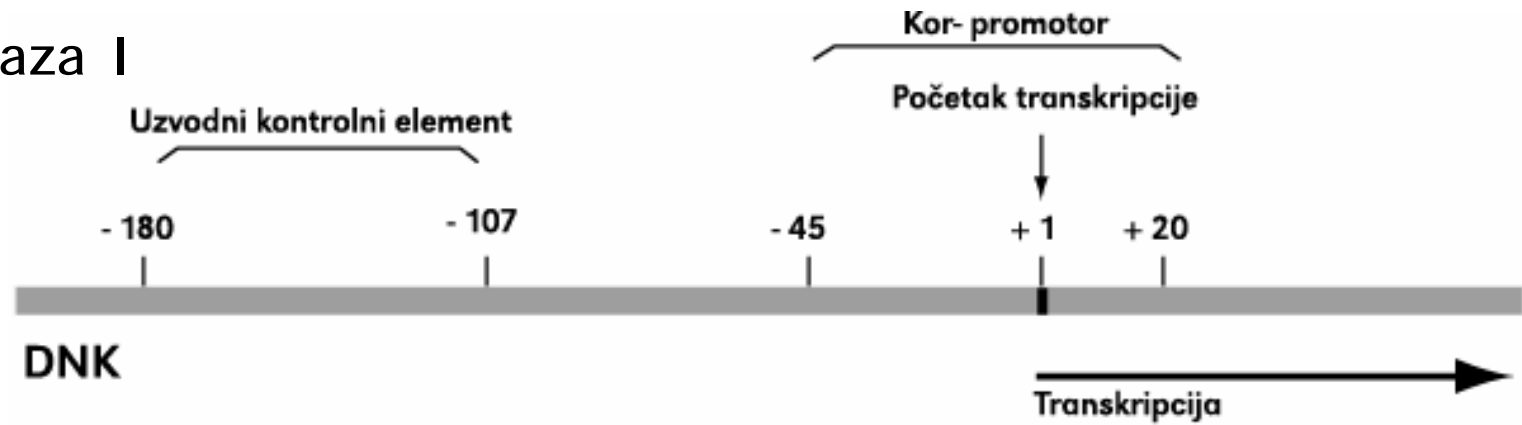
I ako se housekeeping geni konstitutivno eksprimiraju, koncentracija proteina koje oni kodiraju u jednoj ćeliji može znatno da varira, zavisno od interakcije RNK poly sa promotorom

Osnovna brzina prepisa ne-housekeeping gena je takođe određena sekvencom promotora, ali se ekspresija ovih gena kasnije znatno menja različitim regulatornim proteinima

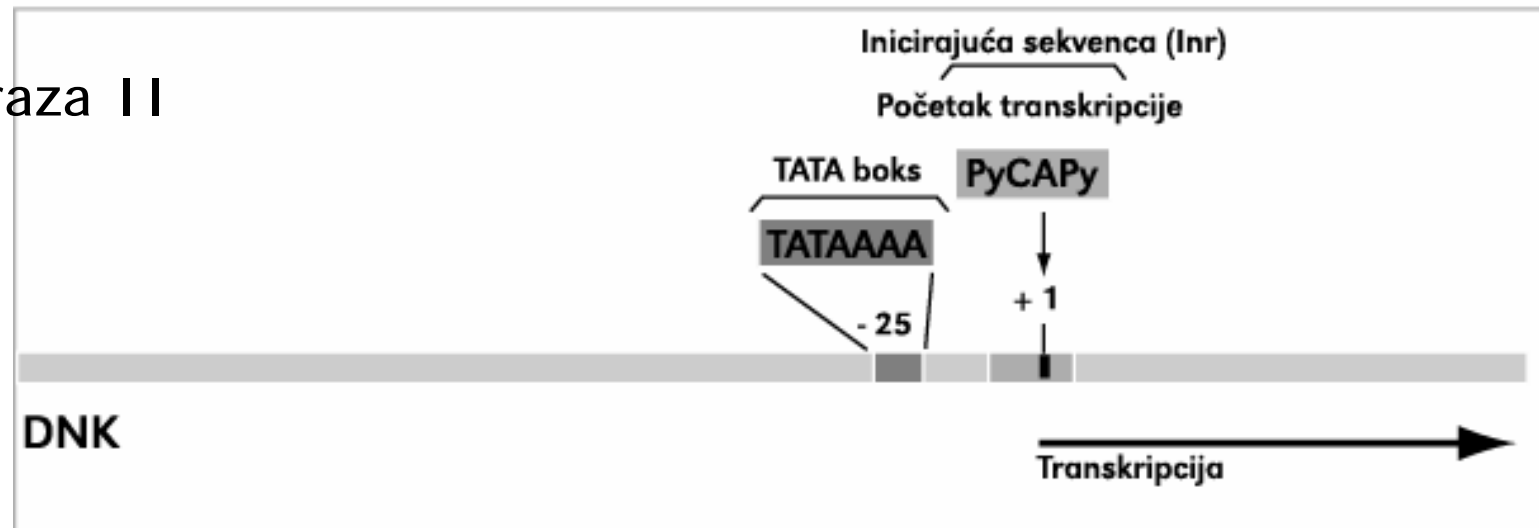
Sekvenca promotora kod eukariota je raznovrsnija nego kod prokariota- različite RNK poly



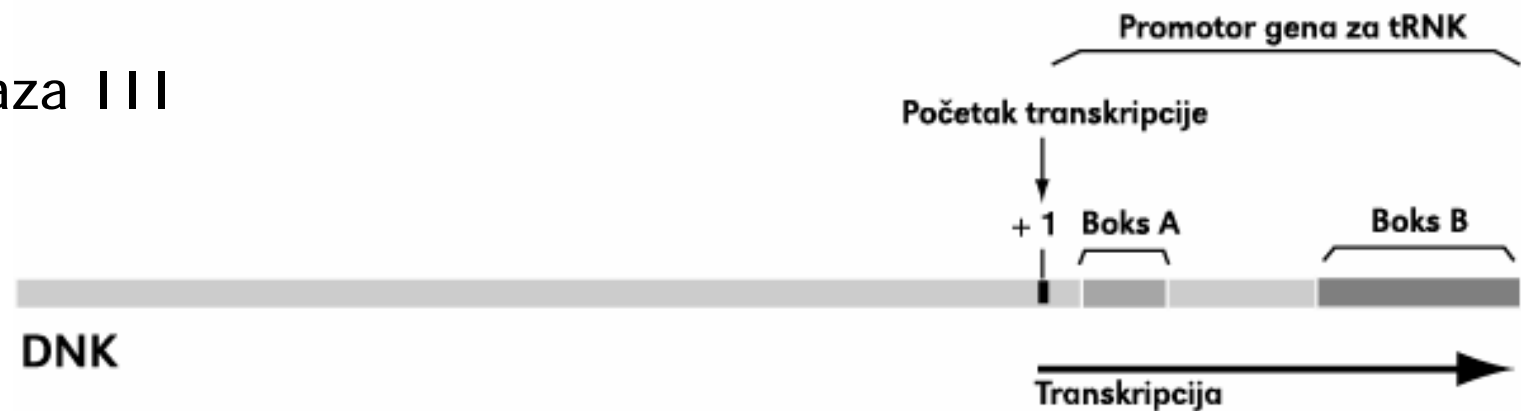
### RNK polimeraza I



### RNK polimeraza II



### RNK polimeraza III



Inicijacija transkripcije je regulisana proteinima koji se vezuju za ili blizu promotora

Specifični faktori- određuju specifičnost RNK poly prema promotoru

Represori- otežavaju pristup RNK poly promotoru

Aktivatori- pojačavaju interakciju RNK poly sa promotorom

Represori se kod prokariota vezuju za specifična mesta DNK-operatore, koji se nalaze blizu promotora. Regulacija represorom kojim se onemogućava transkripcija se naziva **NEGATIVNA REGULACIJA**.

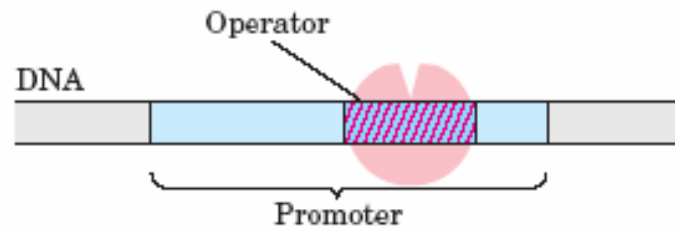
Vezivanje represora za DNK je pod kontrolom nekog molekularnog signala-EFEKTORA, najčešće malog molekula ili proteina koji menja konformaciju represora pošto se za njega veže.

Reakcija između efektoru i represora može da pojača ili smanji transkripciju

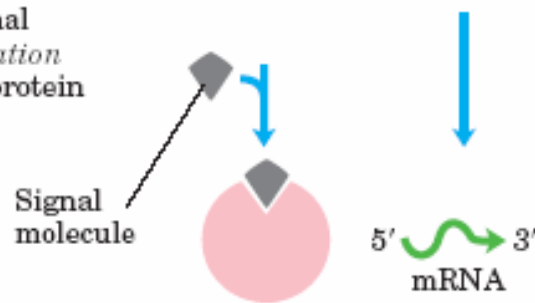
Kod eukariota, se vezno mesto za represor može nalaziti dosta udaljeno u odnosu na promotor

**Negative regulation**  
(bound repressor inhibits transcription)

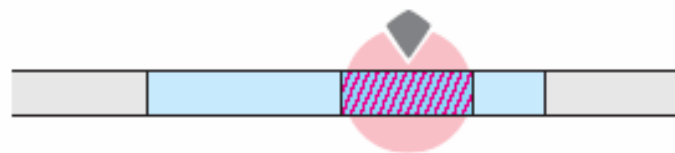
(a)



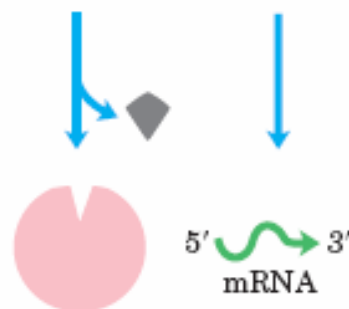
Molecular signal  
causes *dissociation*  
of regulatory protein  
from DNA



(b)



Molecular signal  
causes *binding*  
of regulatory protein  
to DNA



## Inicijacija transkripcije je regulisana proteinima koji se vezuju za ili blizu promotora

Aktivatori deluju suprotno represorima- oni se vezuju za DNK i time pojačavaju aktivnost RNK polya na promotoru. Vezna mesta za aktivatore se nalaze uglavnom pored promotora.

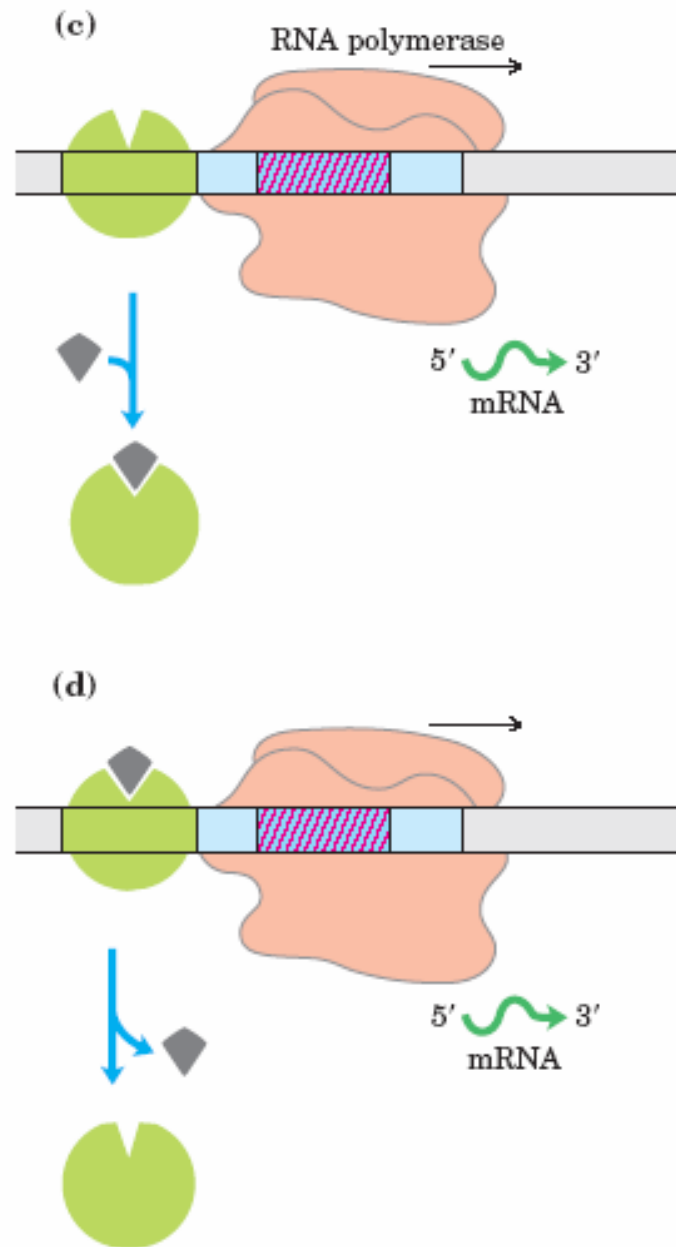
Neki aktivatori kod eukariota se vezuju za DNK mesta koja se nazivaju **POJAČIVAČI**, i nalaze se na znatnoj udaljenosti od promotora (na 1000 bp).

Neki aktivatori su vezani za DNK dok se ne odvoje u prisustvu nekog signalnog molekula

Drugi se vezuju za DNK tek pod interakciji sa odgovarajućim signalnim molekulom.

Signalni molekuli mogu ili da pojačaju ili da smanje transkripciju, zavisno do toga kako deluju na aktivator

**Positive regulation**  
(bound activator facilitates transcription)



Prikazana su dva načina negativne/pozitivne regulacije:

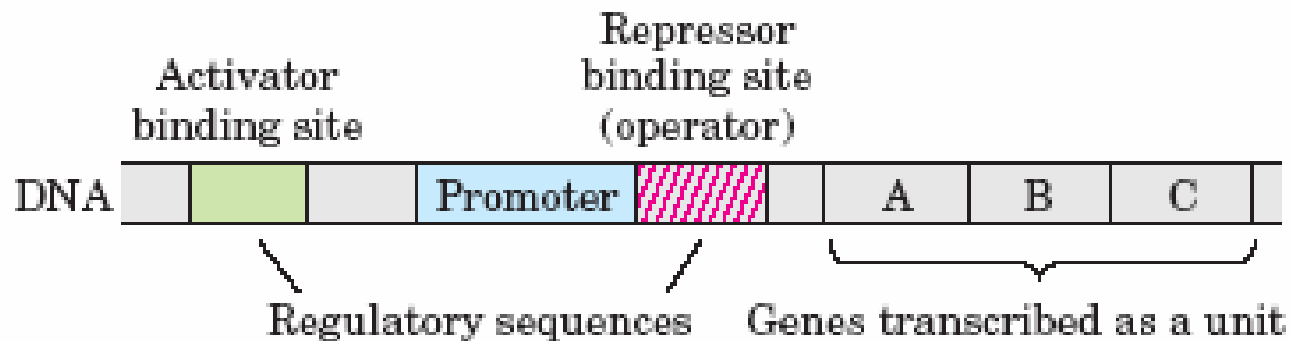
- a. Represor se vezuje za operator u odsustvu molekularnog signala; signali iz okoline dovode do disocijacije represora čime je omogućena transkripcija
- b. Represor se vezuje u prisustvu signala; represor disosuje čime je omogućena transkripcija, kada se spoljašnji signal ukloni
- c. Aktivator se vezuje u odsustvu molekularnog signala i transkripcija počinje. Kada se signal ponovo javi, aktivator disosuje i transkripcija se inhibira.
- d. Aktivator se vezuje u prisustvu signala; disosuje samo kada se ukloni signal

Naziv "pozitivna" i "negativna" regulacija se odnosi na tip regulatornog proteina koji je uključen u regulaciju. Ovaj protein ili olakšava ili otežava transkripciju. U oba slučaja, dodatni molekularni signal može da pojača ili smanji transkripciju, zavisno od svog efekta na regulatorni protein.

Mnogi geni prokariota su udruženi i regulisani u jedinstvenoj formaciji operona

Geni koji kodiraju proizvode uključene u niz zajedničkih procesa su organizovani i prepisuju se zajedno- policistronske iRNK kod prokariota

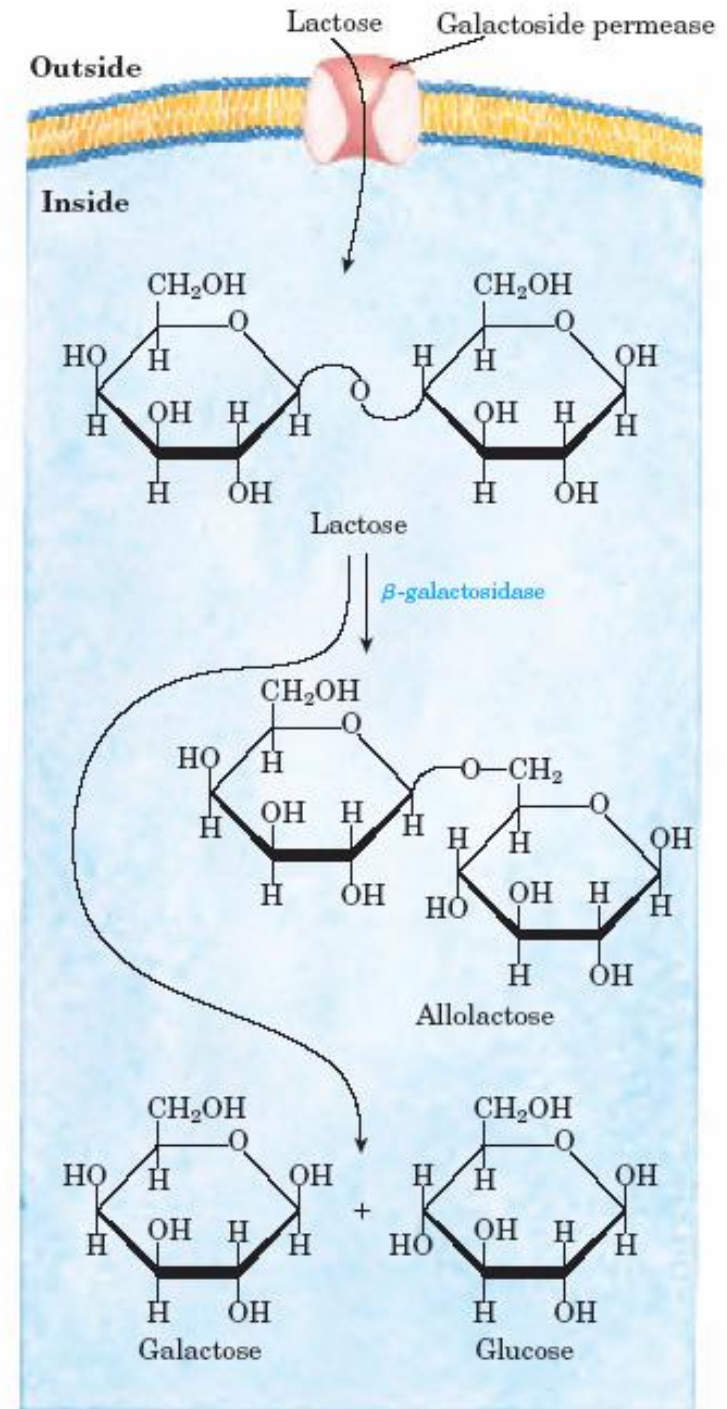
OPERON- udruženi geni + promotor + ostale sekvence koje funkcionišu zajednički u kontroli i regulaciji transkripcije



Lac operon kod bakterija - NEGATIVNA / POZITIVNA REGULACIJA

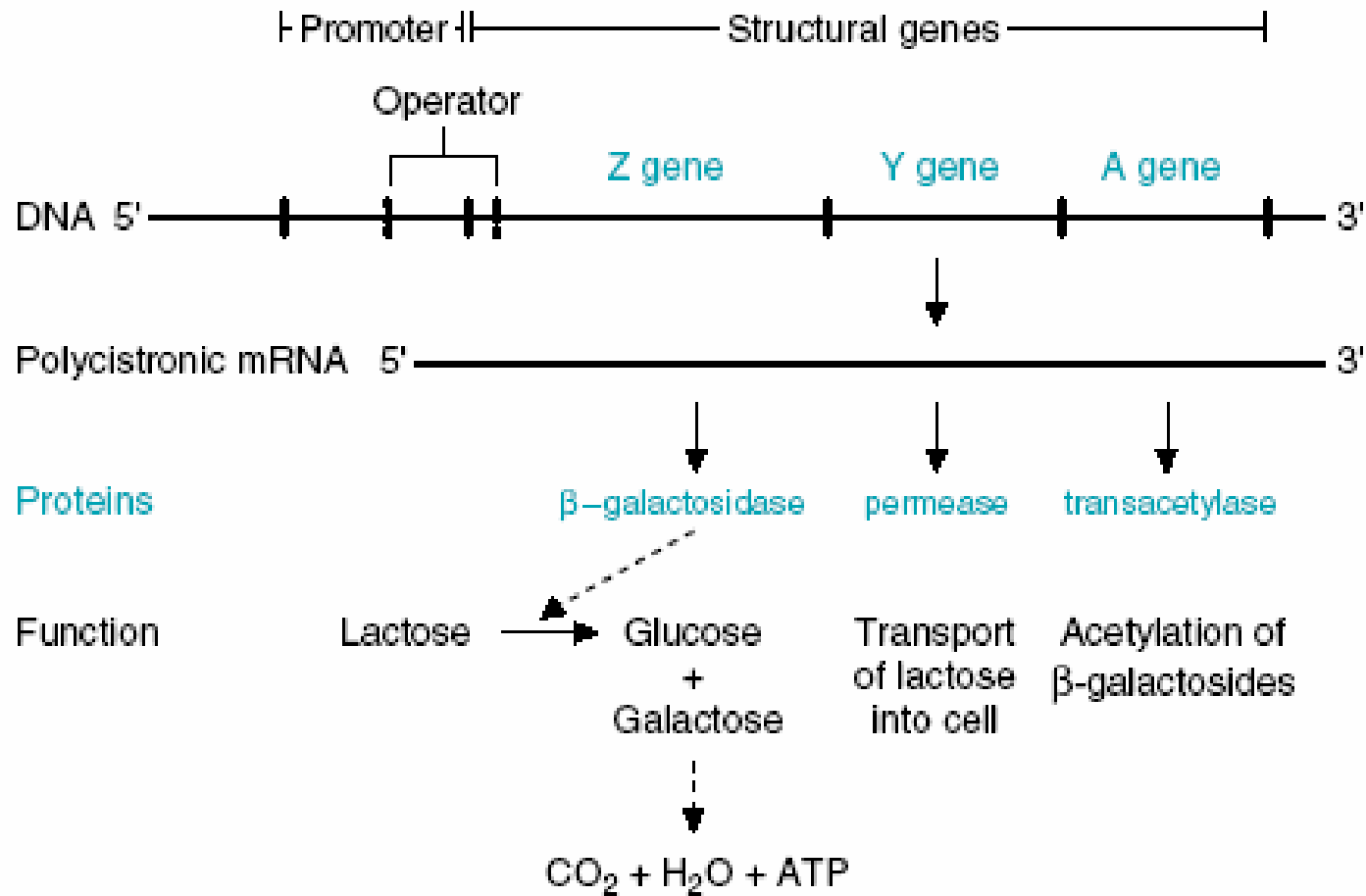
## Metabolizam laktoze kod E. Coli

Za preuzimanje i metabolizam laktoze je neophodna aktivacija galaktozid permeaza i beta-galaktozidaza. Prevođenje laktoze u alolaktozu reakcijom transglikozilacije je reakcija koju katališe takođe beta-galaktozidaza.





## The lac operon

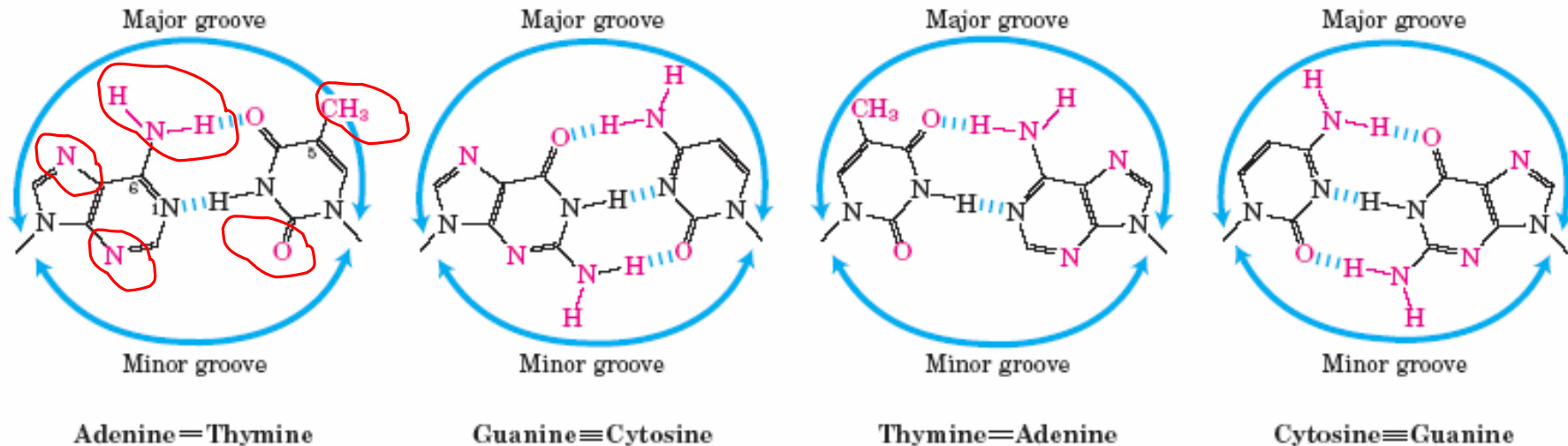


## Regulatorni proteini poseduju DNK vezne domene

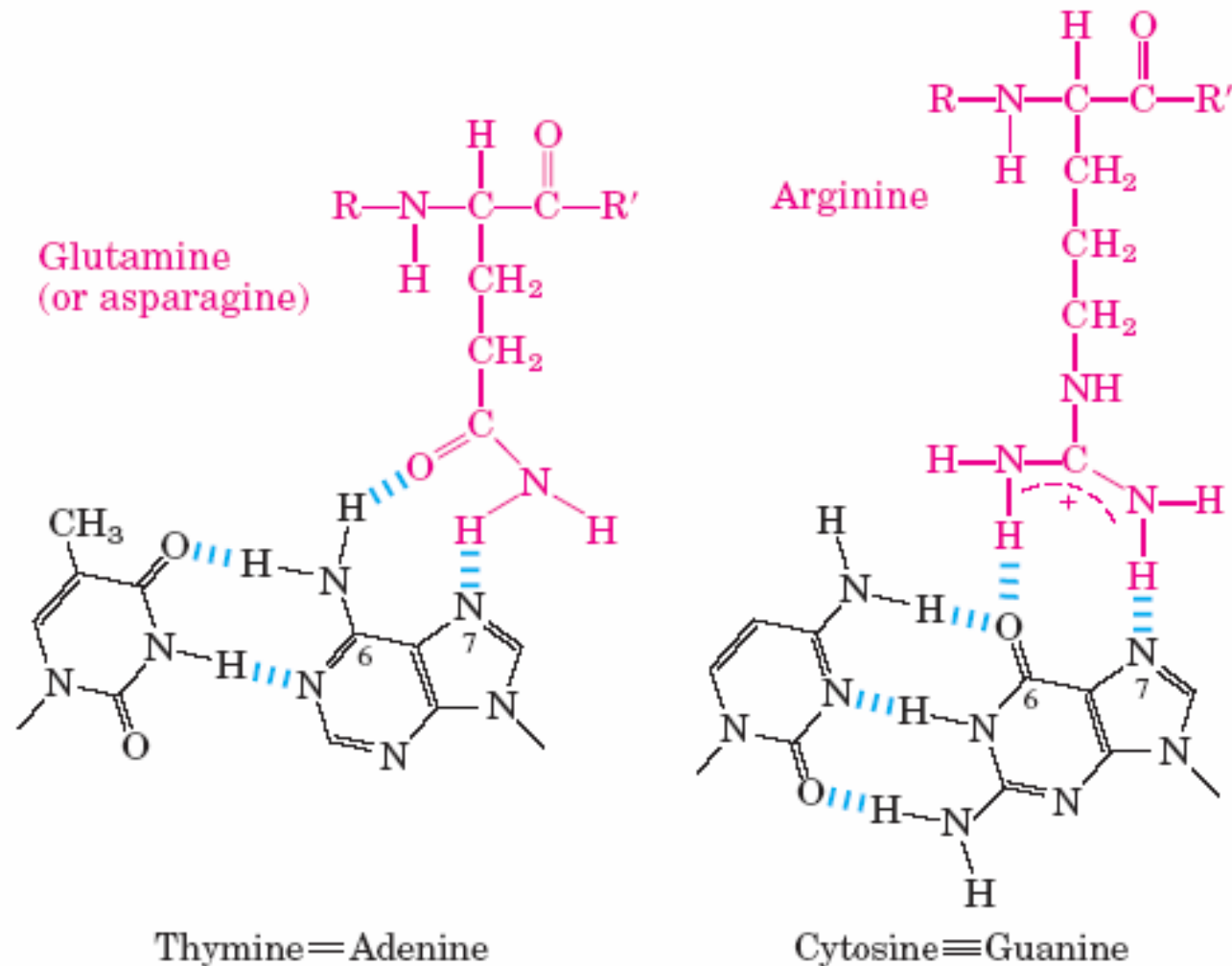
Regulatorni proteini se vezuju za specifične DNK sekvence. Njihov afinitet prema tim sekvencama je oko  $10^4$ - $10^6$  puta veći nego prema bilo kojoj drugoj sekvenci.

Ovi vezujući domeni regulatornih proteina su uglavnom neki karakteristični strukturni motivi.

Da bi se vezao za DNK, regulatorni protein mora da prepozna odgovarajuću DNK sekvencu- to su uglavnom bazni parovi, donori ili akceptori vodoničnih veza smešteni u velikoj krivini DNK.



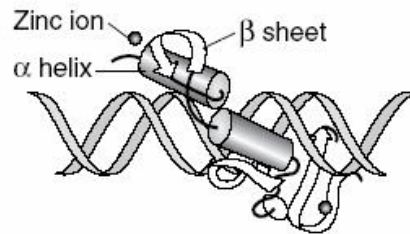
Amino kiseline regulatornog proteina koje uglavnom učestvuju u vezivanju vodoničnim vezana za odgovarajući bazni par na DNK su Asparaginska kiselina, Glutaminska kiselina, Glutamin, Lizin i Arginin



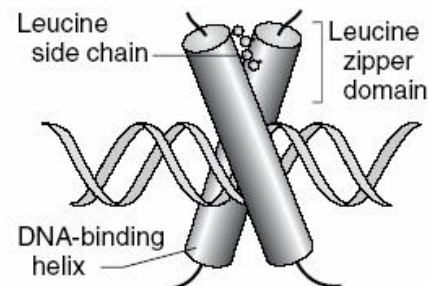
Vezujući domeni regulatornih proteina moraju da budu mali kako bi reagovali sa bazama u velikoj krivini DNK. Ovi DNK vezujući domeni uglavnom imaju oko 60-90 AK a strukturni domen koji direktno reaguje sa DNK je još manji. Protein kao celina nije mali, jer su mali proteini nestabilni, obzirom da ne mogu da formiraju dovoljno stabilizujućih hidrofobnih interakcija.

DNK vezujući domeni regulatornih proteina uglavnom imaju suprasekundarnu strukturu: heliks-okret-heliks, Zn-prsten

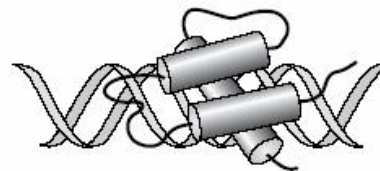
A. Zinc fingers



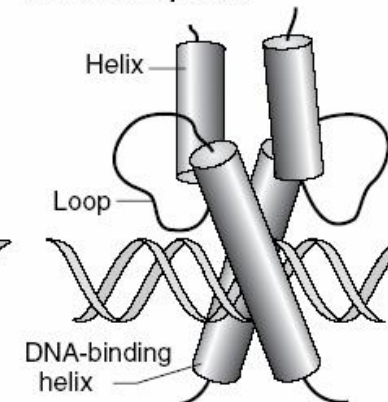
B. Leucine zipper

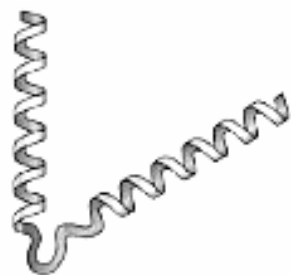


C. Helix-turn-helix

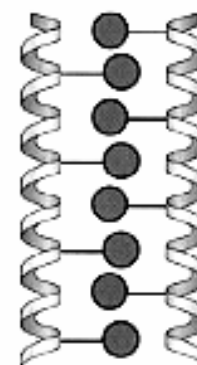


D. Helix-loop-helix

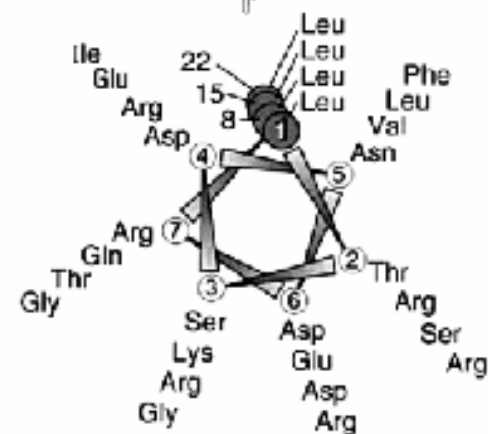




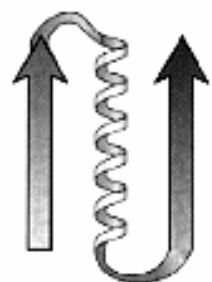
**Heliks - okret - heliks**



**Leucinski rajsferšlus**

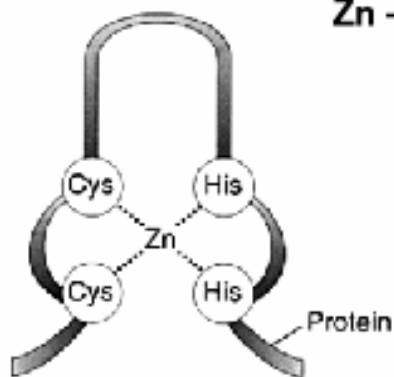


Suprasekundarne strukture proteina značajne za funkciju regulatornih transkripcionih faktora



**$\beta\alpha\beta$  jedinica**

**Zn - finger**



## Kako se prepoznaje gen koji je aktivan?

- Neki regulatorni regioni su jednostavni (on/off) i reaguju na pojedinačni signal
- Drugi su kompleksni, reaguju kao mikroprocesor na veći broj signala (interpretacija i integracija)
- 1950. - "gene regulatory protein"

### DNK vezujući proteini-motivi

Heliks-okret-heliks

Zn finger

Nabrana ploča

Le-zipper

Prepoznavanje spec. DNK sekvence preko strukture regulatornog proteina (H veze, jonske, hidrofobne)  
Stvori se oko 20 veza- osigurava se da je stvoreni kompleks adekvatan

Vezuju se spolja DNK heliksa-bez otvaranja heliksa (uglavnom za veliki usek)

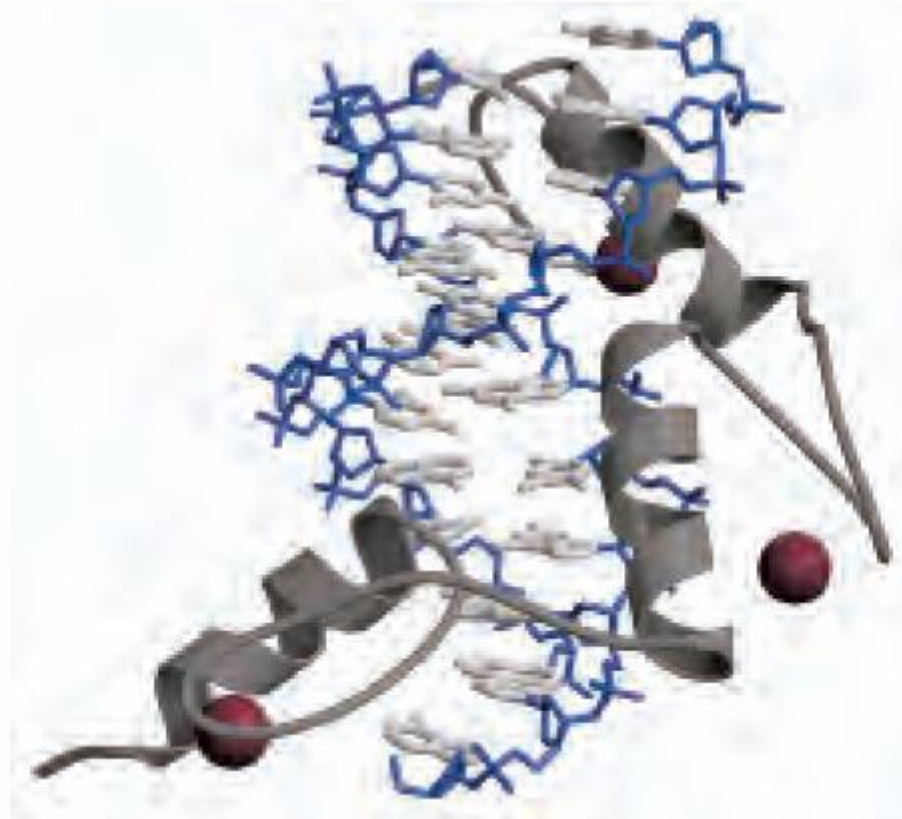
Heliks-okret-heliks- kod prokariota i retko kod eukariota. Čini ga 20AK (7-9 u svakom heliksu) koje su povezane beta nabranom pločom.

Ova samostalna struktura nije stabilna već predstavlja reaktivni deo većeg DNK-vezujućeg proteina. Jedan heliks se zove **PREPOZNAJUĆI HELIKS** pošto on direktno reaguje sa DNK



Zn prsten- predstavlja najčešći DNK vezujući domen regulatornih gena kod eukariota. Čini ga oko 30 AA ostataka koji formiraju dugačku petlju zatvorenu sa Zn jonom koji je koordinativnim vezama vezan za 4 AA ostatka (4 Cisteina, ili 2 Cisteina i 2 Histidina). Jon Zn ne učestvuje direktno u interakciji sa DNK.

Neki Zn prsteni deluju i kao RNK vezujući domeni- kod nekih proteina koji kod eukariota deluju kao represori translacije i vezuju se direktno za DNK



Regulatorni  
protein Zif 268



## Regulatorni proteini također imaju protein-protein vezujuće domene

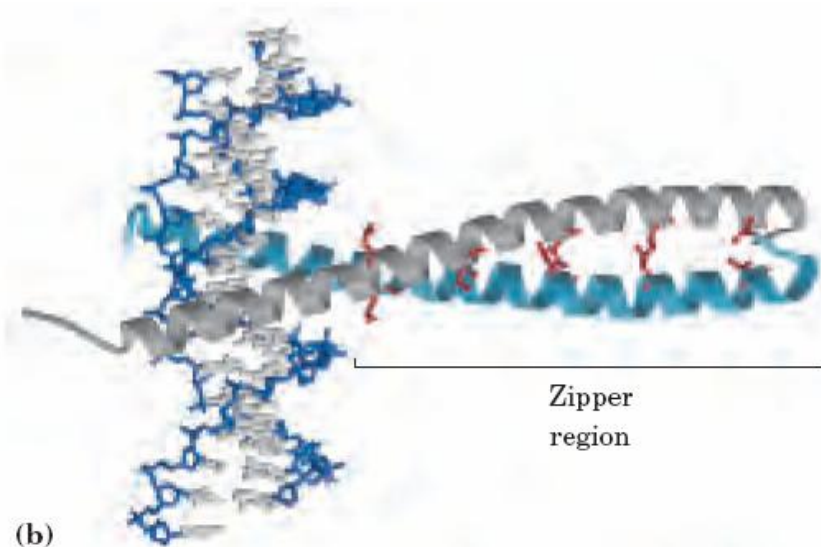
Ovi domeni omogućavaju povezivanje regulatornih proteina sa RNK poly, drugim regulatornim proteinima ili drugim subjedinicama istog regulatornog proteina. To su npr. mnogi TF eukariota koji se, u formi dimera, vezuju za DNK koristeći vezni domen Zn prsten.

Dva najznačajnija protein-protein vezujuća domena su Leu rajsferšlus (zipper) uglavnom kod regulatornih proteina eukariota i heliks-petlja-heliks kod nekih regulatornih proteina eukariota ali uglavnom kod regulatornih proteina prokariota.

Le zipper- čini ga amfipatični heliks sa nizom hidrofobnih AK koje su koncentrisane sa jedne strane, tako da hidrofobne površine čine kontaktnu površinu dva polipeptida ovog dimera.

Leu se nalazi kao svaka 7. AK u nizu

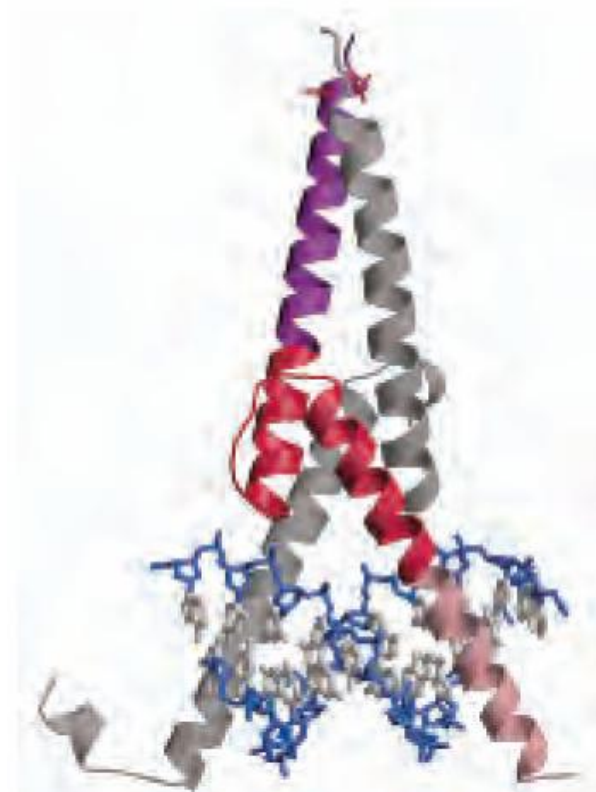
DNK vezujući domen ovih proteina je uglavnom bogat baznim AK (Arg i Liz)



Heliks-petlja- heliks- sadrži oko 50AK koje su značajne i za vezivanje za DNK ali i za dimerizaciju ovog proteina. Ovaj region čine 2 kratka amfipatična heliksa koja su povezana petljom, promenljive dužine.

Ovakva 2 motiva intereaguju i formiraju dimere.

DNK vezujući domen ovih proteina je uglavnom bogat baznim AK (Arg i Liz)



# PROKARIOTE

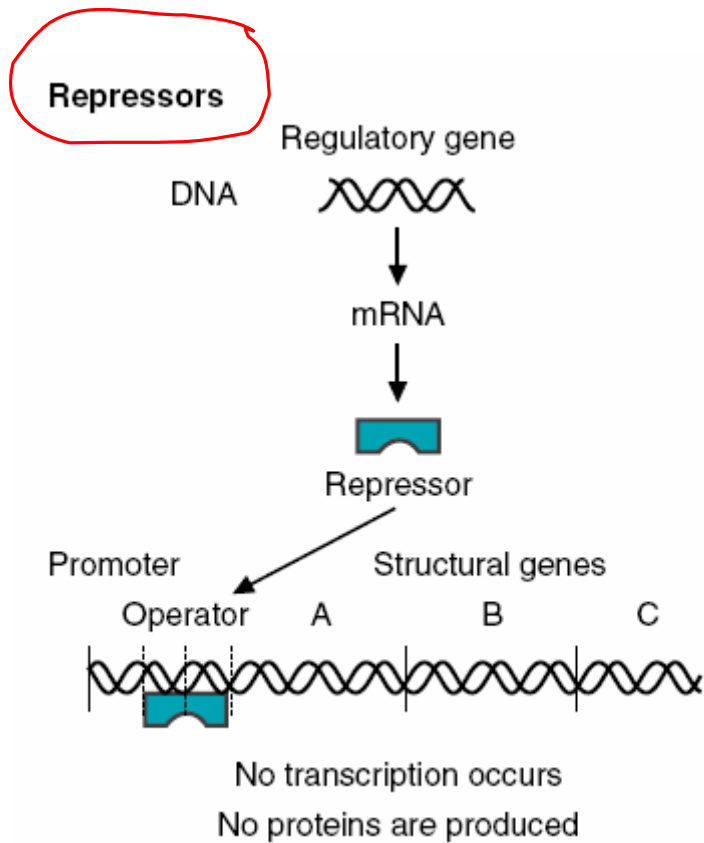
## Kontrola genske ekspresije kod prokariota:

- o Pojam operona

- o Kontrola vezivanja RNK polimeraze prisustvom represora: indukcija represora koja dovodi do inaktivacije represora; aktivacija represora prisustvom aktivatora tj ko-represora

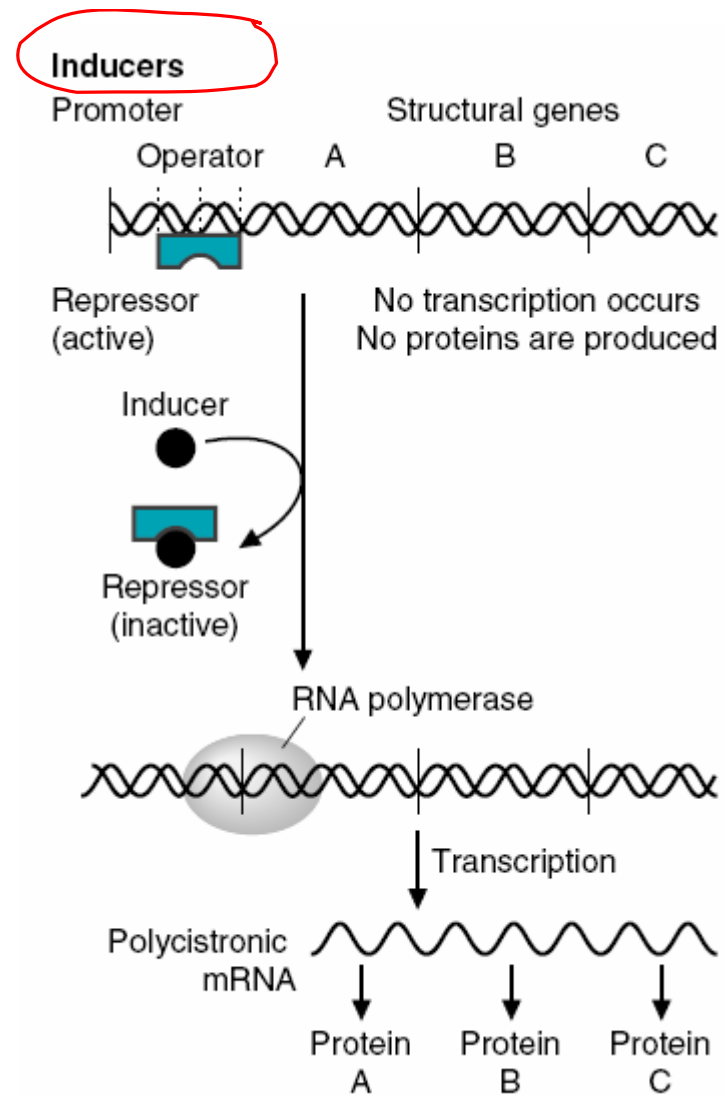
- o Uloga sigma faktora RNK polimeraze u vezivanju RNK polimeraze za DNK

- o Regulacija aktivnosti operona prisustvom prigušivača (atenuacija transkripcije)



### Regulacija operona represorom.

Kada se veže protein represor za operator, RNK poly ne može da se veže pa se transkripcija ne dešava



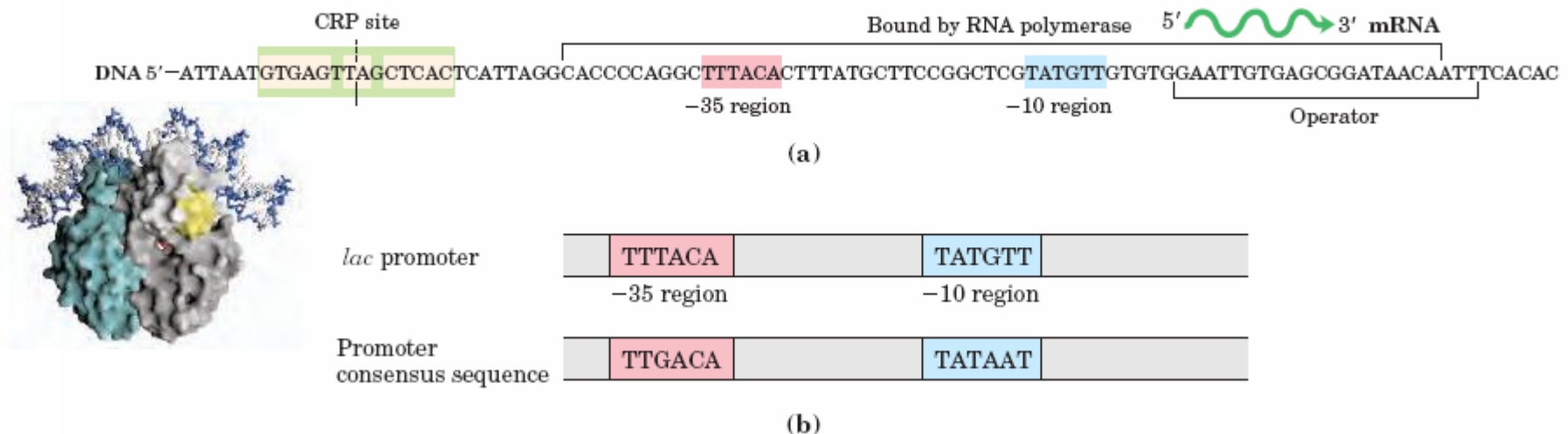
**Inducibilan operon.** U prisustvu aktivatora, on se vezuje za represor i inaktivira ga, zbog čega se ovaj odvaja od operatora. RNK poly se vezuje i transkripcija teče.

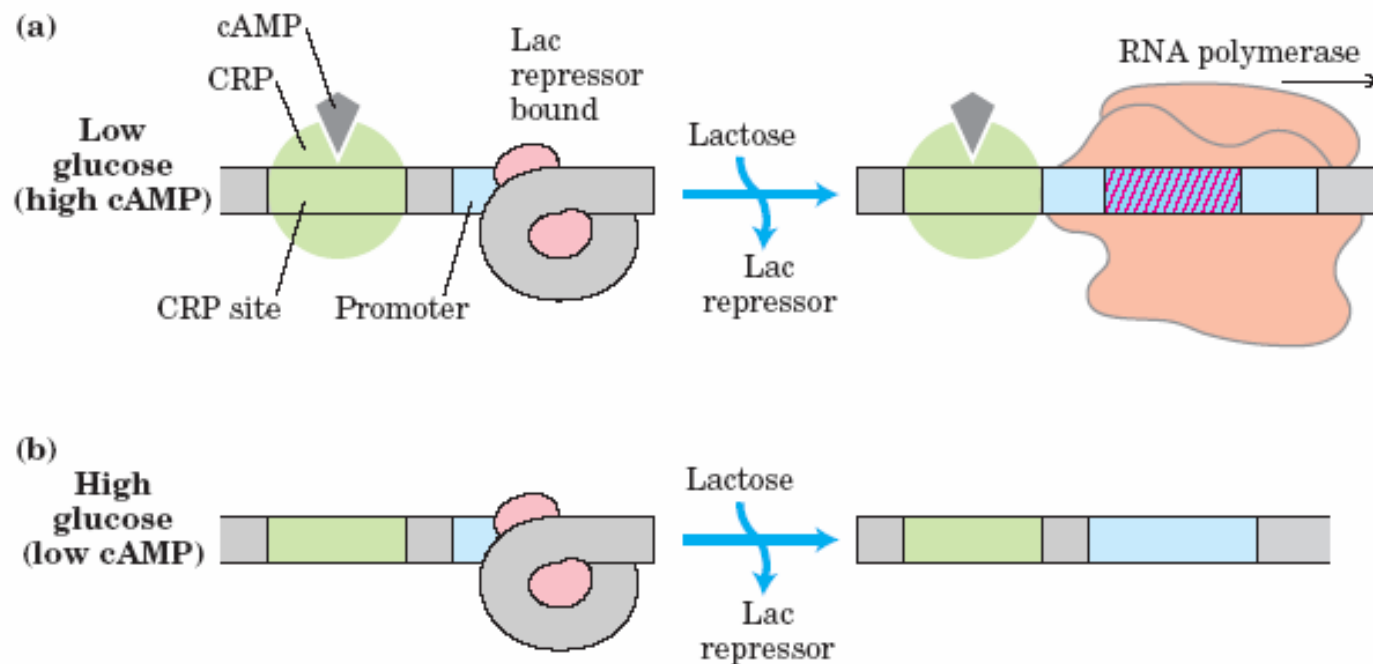
# Aktivacija transkripcije lac operona preko CRP

Glu + Lac- katabolička represija

Efekat glukoze se ostvaruje preko cAMP-a kao koaktivatora i aktivatornog proteina- CRP ili CAP (cAMP Represor protein/ Catabolite Activator protein)

CRP je homodimer koji poseduje vezna mesta i za DNK (heliks-okret-keliks) i za cAMP.





Kombinovani efekti glukoze i laktoze na ekspresiju *lac* operona

(a) U odsustvu glukoze (cAMP nivo raste pa i CRP-cAMP kompleksa) tako da se transkripcija povećava. To znači da tada Lac represor nije vezan

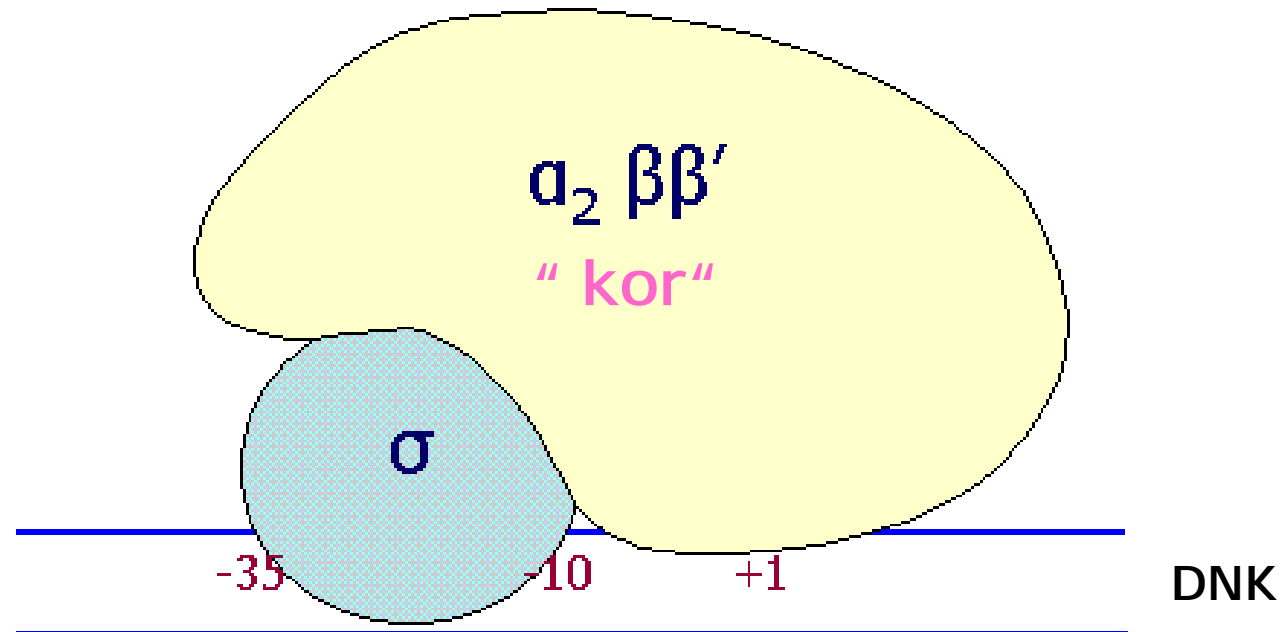
(b) Bez vezanog aktivatora (CRP-cAMP), *lac* promotor se slabo prepisuje čak i kada je koncentracija laktoze visoka i Lac represor nije vezan

# Transkripcija u prokariota

---

## ✓ RNK polimeraza

- ∅ Sastoji se iz pet subjedinica (polipeptidnih lanaca):  
 $\alpha_2$ ,  $\beta'$ ,  $\beta$ ,  $\sigma$ , koji čine holoenzim.
- ∅ Tetramer  $\alpha_2$ ,  $\beta'$ ,  $\beta$  naziva se *kor-enzim*.
- ∅ Relativna molekulska masa celog enzima je oko 500.000 daltona.

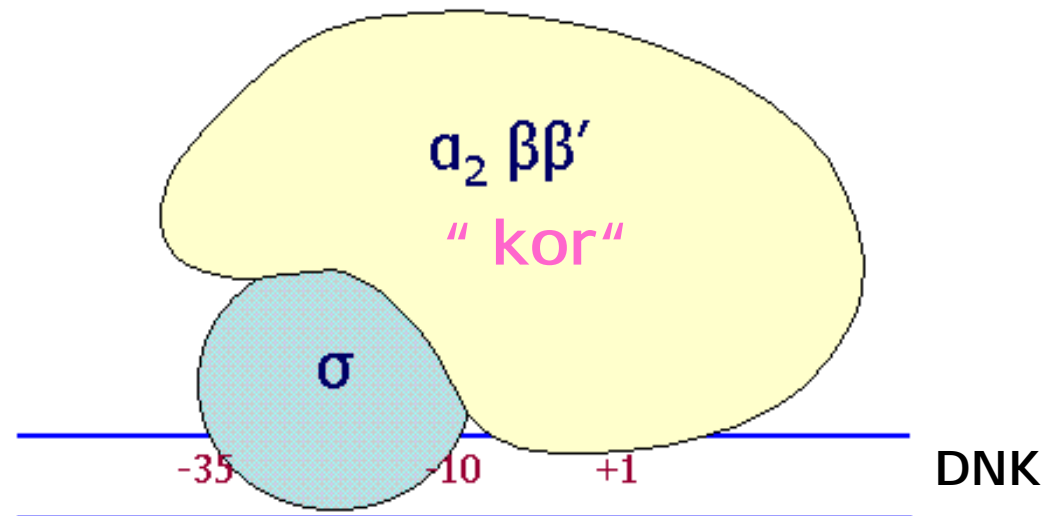


# Transkripcija u prokariota

---

## ✓ RNK polimeraza

- ∅ Sigma subjedinica RNK polimeraze se vezuje za -10/-35
- ∅ Kor-enzim RNK polimeraze ( $\alpha_2\beta'\beta$ ) vezuje sigma subjedinicu ( $\sigma$ ).





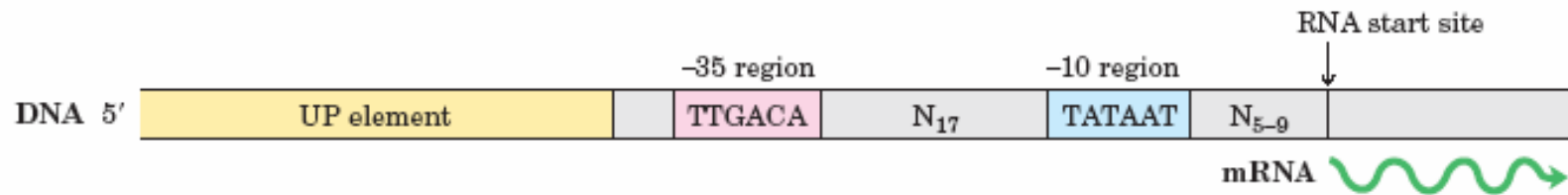
# Transkripcija u prokariota

---

## ▼ Inicijacija

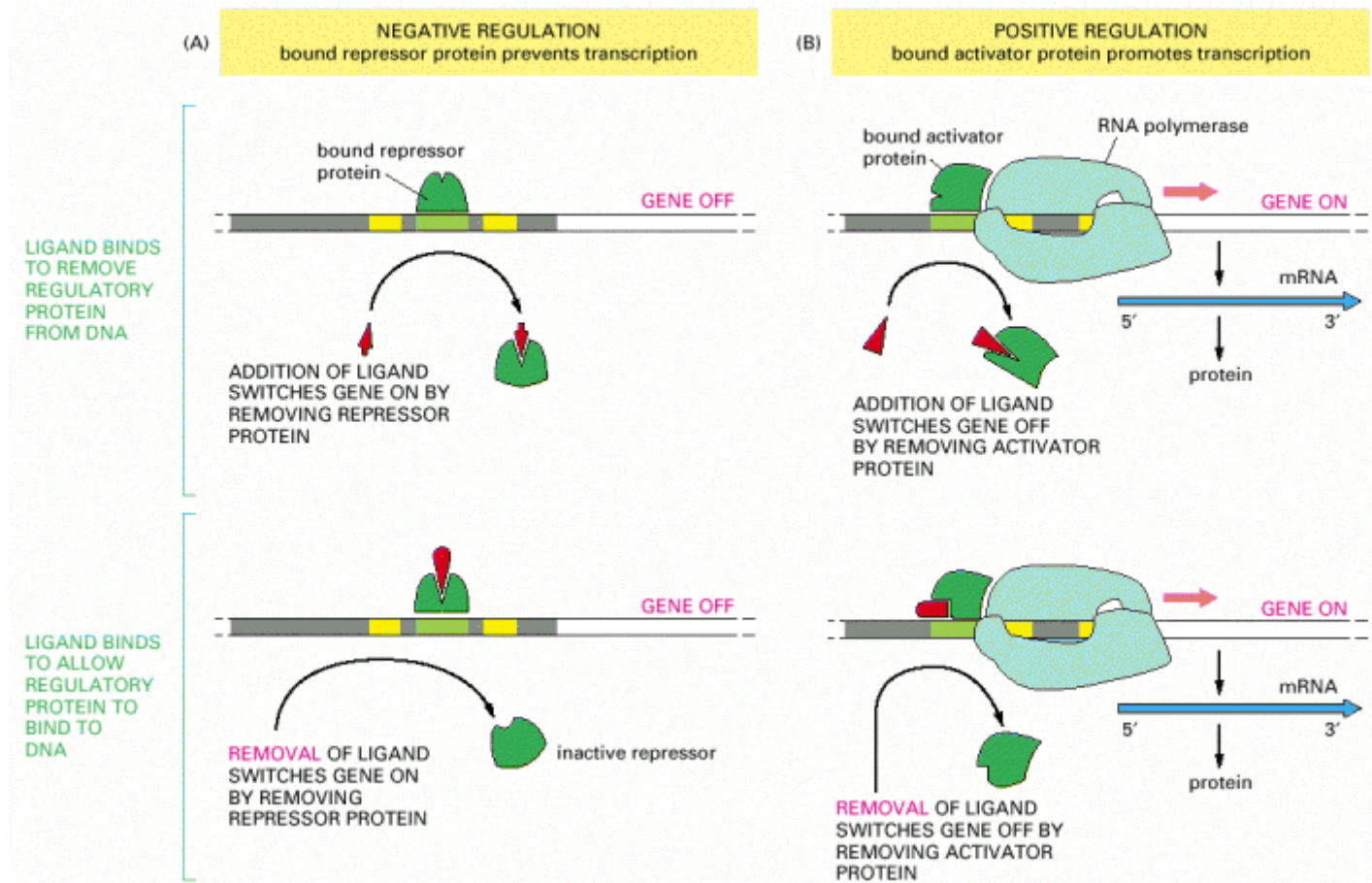
- Ø Rifampicin se vezuje za **b-subjedinicu**, kada se RNK polimeraza nalazi u obliku holoenzima.
- Ø Vezivanjem za b-subjedinicu holoenzima **rifampicin specifično inhibira inicijaciju** transkripcije RNK.
- Ø Rifampicin **nema uticaja** na nuklearnu RNK eukariota.





Konsenzus sekvence za mnoge promotere E. Coli.

Većina baza koje se nalaze u delu -10 i -35 deluju negativno na funkciju promotora. Neki promotori takođe uključuju USHODNI REGULATORNI element.



Zbirni mehanizam kojim specifični regulatorni proteini vrše kontrolu transkripcije kod prokariota

(A) Negativna regulacija

(B) Pozitivna regulacija - Uklanjanje represora sa DNK ili vezivanjem aktivatora

# EUKARIOTE

## Kontrola genske ekspresije kod eukariota:

- o Dostupnost hromatina za proces transkripcije: remodeliranje hromatina, metilacija DNK, rearanžiranje genoma, amplifikacija i delecija gena (ne fiziološki mehanizmi regulacije)
- o Regulacija na nivou transkripcije. Regulatorni proteini (promotori, koaktivatori, korepresori, TATA boks vezujući proteini). Kontrola transkripcije na primeru receptora za steroidne/tireoidne hormone. Struktura DNK vezujućih proteina. Kontrola transkripcionih faktora (response elementi, pojačivači)
- o Posttranskripciona obrada RNK: isecanje introna, poliadenilacija
- o Regulacija na nivou translacije: transport i stabilnost iRNK, kontrola inicijacije translacije

# Eukariote

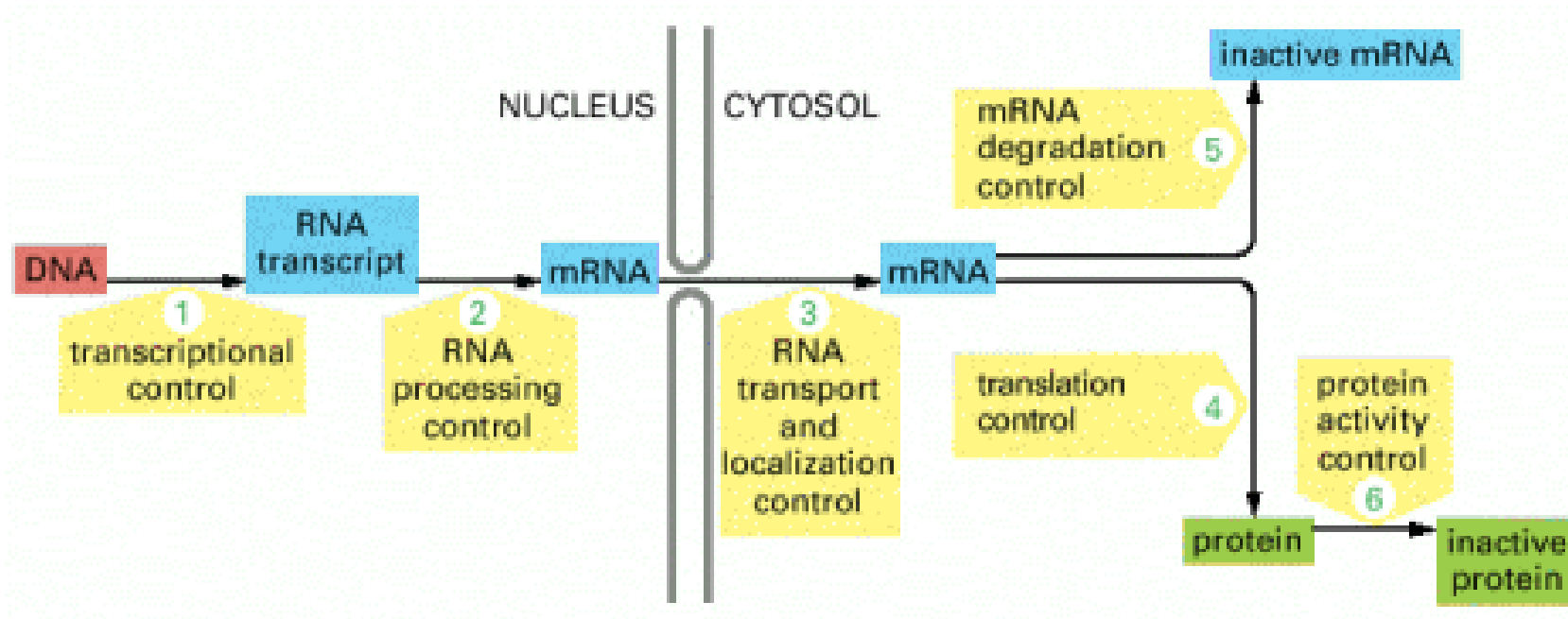
1. Regulatorni proteini mogu da budu vezani daleko od promotora
2. RNKpoly II mora da bude u kompleksu sa odgovarajućim baznim TF
3. Pakovanje hromatina-specifična regulacija u odnosu na bakterije

- Regulatorne sekvence se mogu nalaziti i na udaljenosti od po 100 NT uzvodno od mesta početka transkripcije- proksimalni kontrolni element

- Regulatorne sekvence se mogu nalaziti i na udaljenosti od po 1000-50 000 NT uzvodno ili nizvodno od mesta početka transkripcije- pojačivači/prigušivači

- Aktivaciju regulatornih sekvenci vrše specifični regulatorni TF koji se nazivaju AKTIVATORI ako se vazuju za pojačivače ili REPRESORI ako se vezuju za prigušivače

# Mesta (koraci) na kojima može doći do kontrole ekspresije gena eukariota



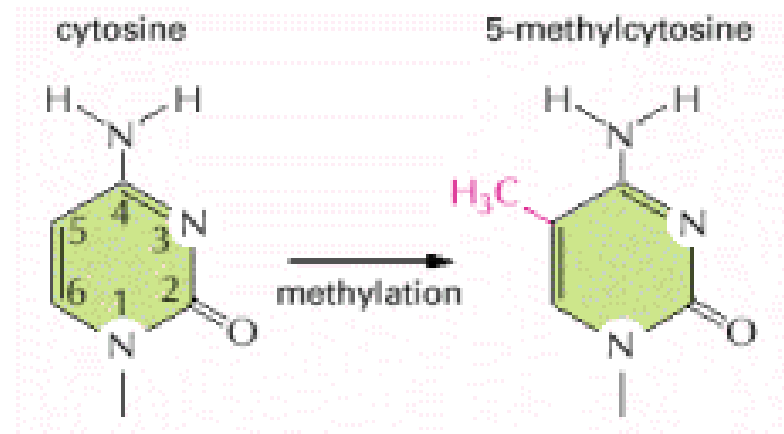
Kontrola od koraka 1-5

Kontrola 6- kontrola aktivnosti proteina obuhvata reverzibilnu aktivaciju ili inaktivaciju fosforilacijom proteina, kao i ireverzibilnu inaktivaciju proteolitičkom razgradnjom.

## Metilacija C u paru CG- neaktivan genom

Regulacija procesa transkripcije se kod eukariota dešava po principu "sve ili ništa"- kontrola inicijacije. Ona predstavlja kontrolu na nivou individualnih gena.

Regulacija transkripcije individualnog gena uključuje sve faktore koji su inače uključeni u transkripciju: promotor, bazalni transkripcioni faktori, sekvence "pojačivači"



Kod kičmenjaka se ova metilacija dešava na citozinu koji se nalazi uz guanin (sekvenca CG)

Ključni nivo regulacija ekspresije gena kod eukariota jeste inicijacija transkripcije

Transkripciono aktivni i inaktivni hromatin se strukturno razlikuju

Oko 10% hromatina u tipičnoj ćeliji eukariota se nalazi u obliku heterohromatina. On je uglavnom povezan sa određenim strukturama hromozoma, npr centromerama.

Nekondenzovani hromatin-euhromatin

Histoni transkripciono aktivnog hromatina (H2A, H2B, H3 i H4)-kovalentna modifikacija (ireverzibilna metilacija Liz, fosforilacije Ser i Tre, acetilacija, vezivanje ubikvitina).



# Remodeliranje hromatina-acetilacija i premeštanje nukleozoma

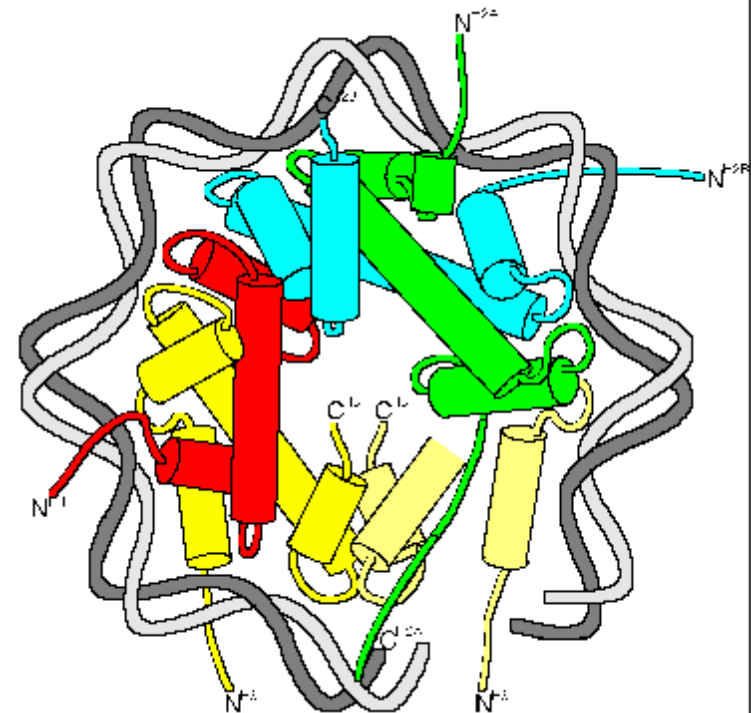
Danas su poznati mnogi enzimi koji su uključeni u remodeliranje- kovalentna modifikacija histona nukleozoma

Acetilacija i deacetilacija histona- Histon acetiltransferaza (HAT). Acetilacija N-terminalnih delova histona koji su bogati Liz

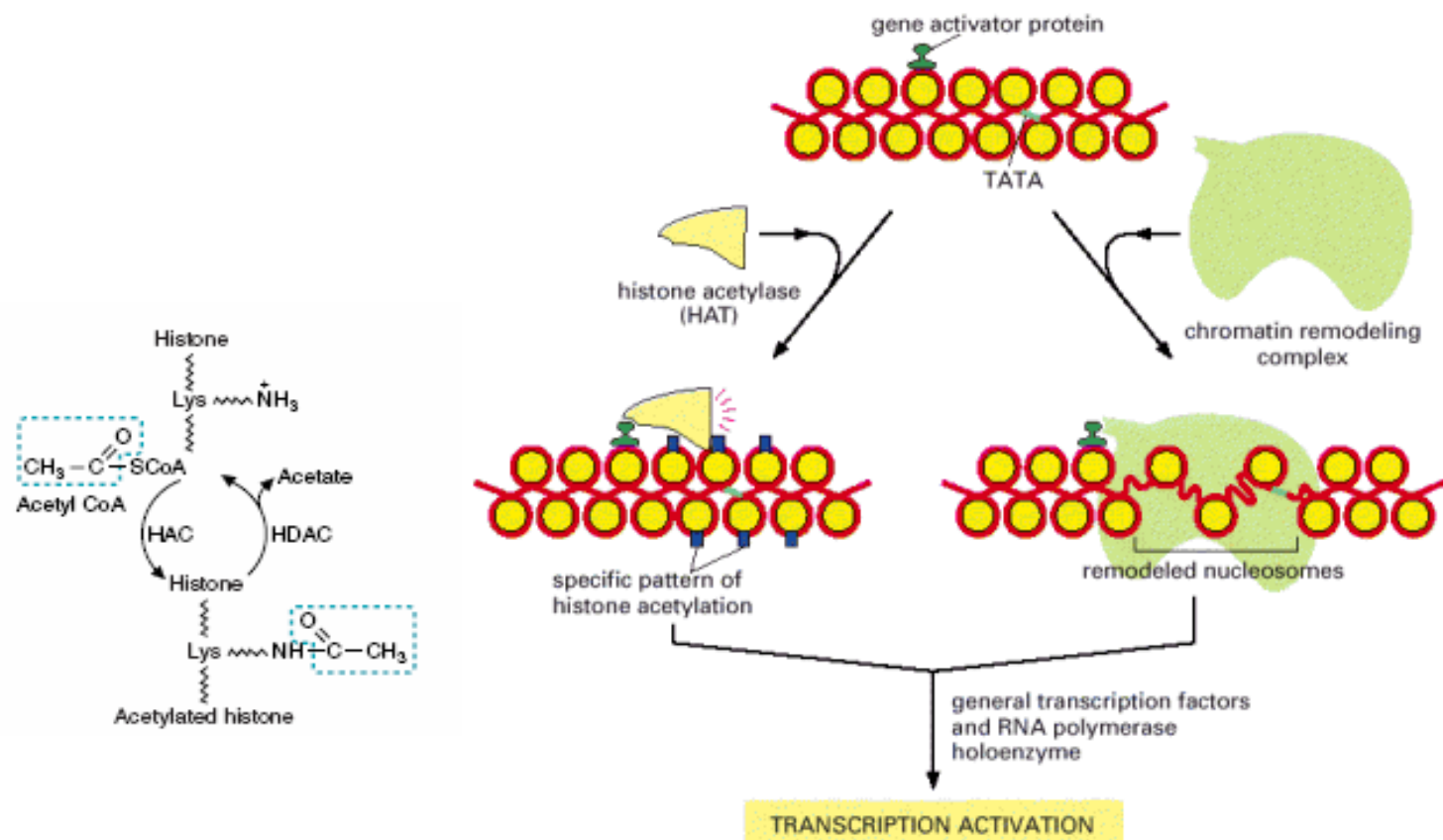
Citosolna HAT vrši acetilaciju novosintetisanih histona pre njihovog transporta u jedro.

Kada se hromatin aktivira za transkripciju, acetilaciju histona tada katališe nuklearna HAT. Acetilacija N terminalnih domena H3 i H4 smanjuje afinitet nukleozoma prema DNK. Kada transkripcija datog gena više nije potrebna, acetilacija nukleozoma se smanjuje kao i aktivnost HAT.

Po uklanjanju nekih acetilnih ostataka, dolazi do druge kovalentne modifikacije nukleozoma karakteristične za neaktivni hromatin-Liz9 u H3 podleže metilaciji u heterohromatinu.

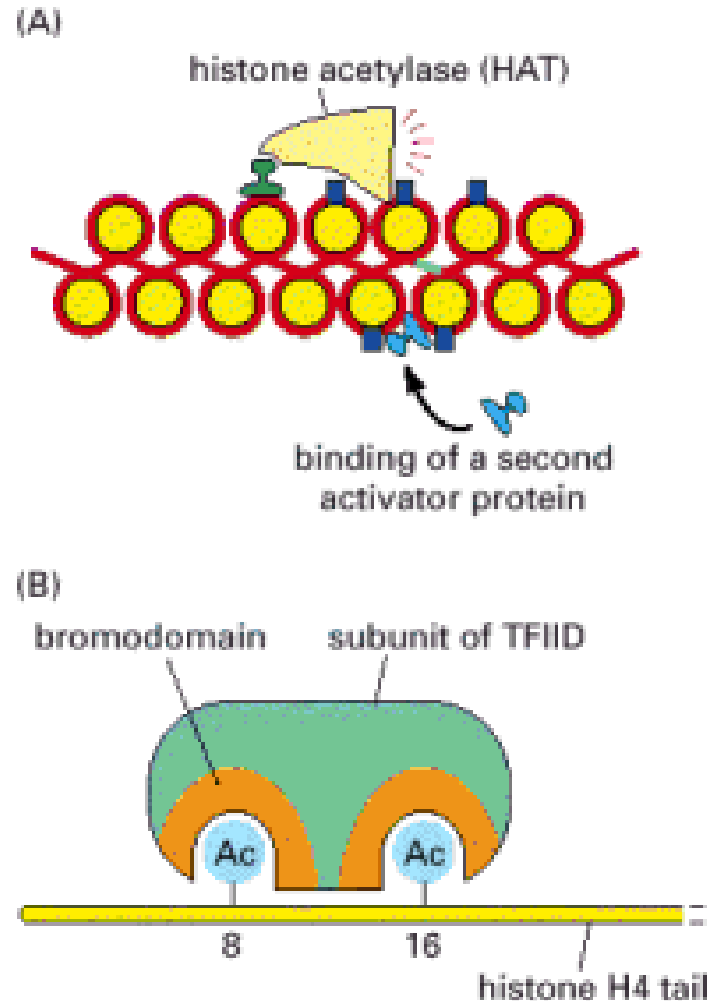


# Lokalna promena strukture hromatina koja je uslovljena proteinima aktivatorima gena kod eukariota



Acetilacija histona i nukleazoma menja pakovanje hromatina čineći ga pristupačnijim za vezivanje za druge proteine u ćeliji, uključujući i proteine koje predstavljaju inicijatore transkripcije.

## Dva specifična načina kojima acetilacija histona može da stimuliše inicijaciju transkripcije



- (A) Neki proteini aktivatori mogu direktno da se vežu za DNK koja je upakovana u nemodifikovani hromatin. Privlačenjem histon acetilaze (i kompleksa za remodeliranje nukleazoma) ovi aktivatori olakšavaju vezivanje za DNK ostalih proteina aktivatora koji ne mogu inače da se vežu za nemodifikovani hromatin. Ovi proteini dalje mogu da uzrokuju modifikaciju hromatina ili deluju direktno kao transkripciona mašinerija.
- (B) Subjedinica opšteg transkripcionog faktora TFIIID sadrži dva kisela proteinska domena od kojih se svaki sastoji od 120 AK, a nazivaju se *bromodomeni*. Svaki bromodomen formira vezujući džep za jedan bočni lanac acetiliranog lizina (Ac); u TFIIID ova dva džepa su odvojena sa 25 Å, što predstavlja optimalno rastojanje za prepoznavanje para acetiliranih lizina koji su odvojeni sa 6 ili 7 AK ostataka na N-terminalnom kraju histona H4.

Dodatno primeru acetilacije, ova subjedinica TFIIID takođe prepoznaje N-terminalni kraj histona H4 kada je acetilovan na poziciji 5 i 12 kao i potpuno acetiliran rep.

On ne poseduje poseban afinitet prema neacetiliranom H4 repu i ima samo mali afinitet prema H4 repu koji je acetiliran na samo jednom Liz.

Različiti oblici acetilacije H4 su vezano za transkripciono aktivne regione hromatina.

## DNK-vezujući transaktivatori i koaktivatori olakšavaju povezivanje potrebnih TF

RNKpoly II - iRNK

Promotor za RNK poly II - TATA box i Inr (sekvenca inicijacije)

Dodatne regulatorne sekvence-pojačivači (više eukariote) tj ushodni regulatorni element (kvasac).

Vezivanje RNK poly II za njen promotor zavisi od:

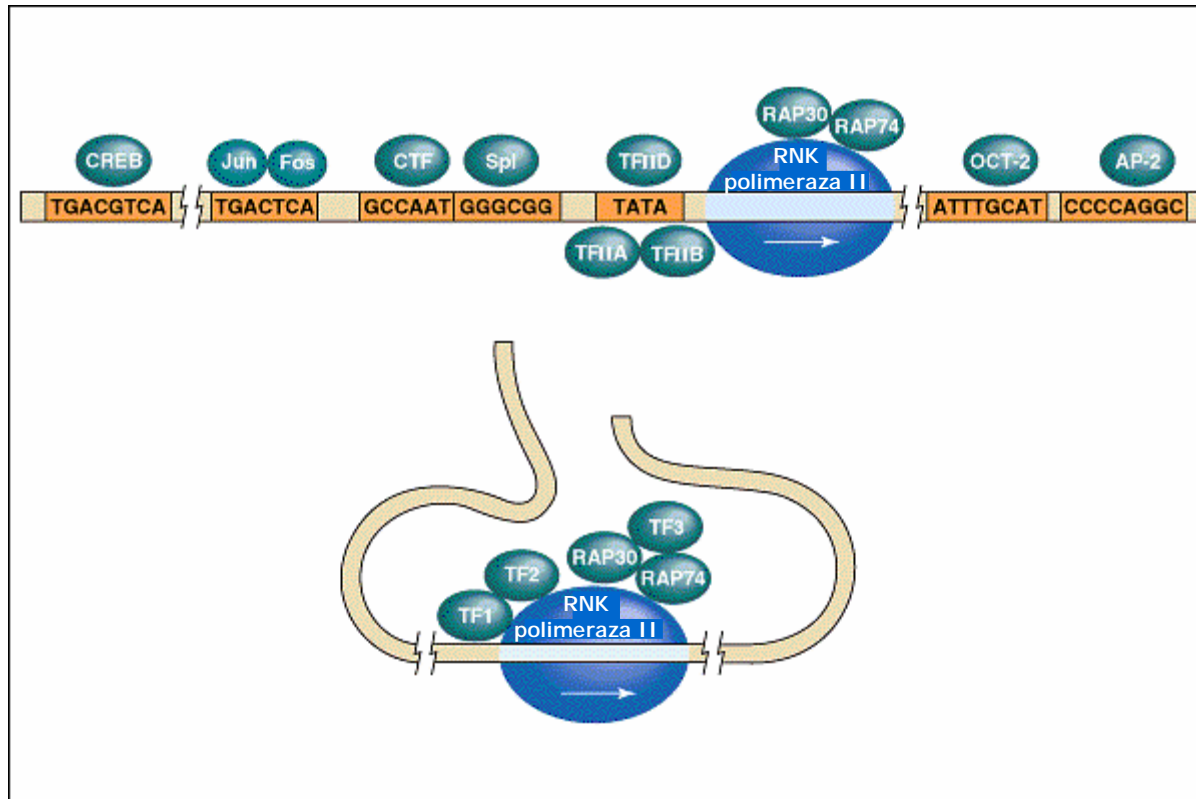
1. prisustva bazalnih transkripcionih faktora, npr TATA vezujući protein (TBP)
2. DNK-vezujućih transaktivatora (vezuju se za pojačivač/ushodni regulatorni element i pojačavaju transkripciju). Osetljivi su na delovanje signalnih molekula, udaljeni od promotora.
3. Koaktivatora- ne deluju direktno na DNK već posreduju u povezivanju RNKpoly sa svim transkripcionim faktorima sa jedne strane i DNK-vezujućih transaktivatora sa druge strane. Primer je TFIID i medijator

## REDOSLED KORAKA U REGULACIJI EKSPRESIJE GENA

- Remodeliranje hromatina
- Vezivanje DNK-transaktivatora za DNK (čak i u formi heterohromatina)
- Vezani transaktivatori dalje se vezuju za koaktivator TFIID ili medijator (ili oba) čime se stabilizuje vezivanje kompleksa RNKpoly II

# Transkripcija u eukariota

## ✓ Interakcija bazalnih transkripcionih faktora sa promotorom

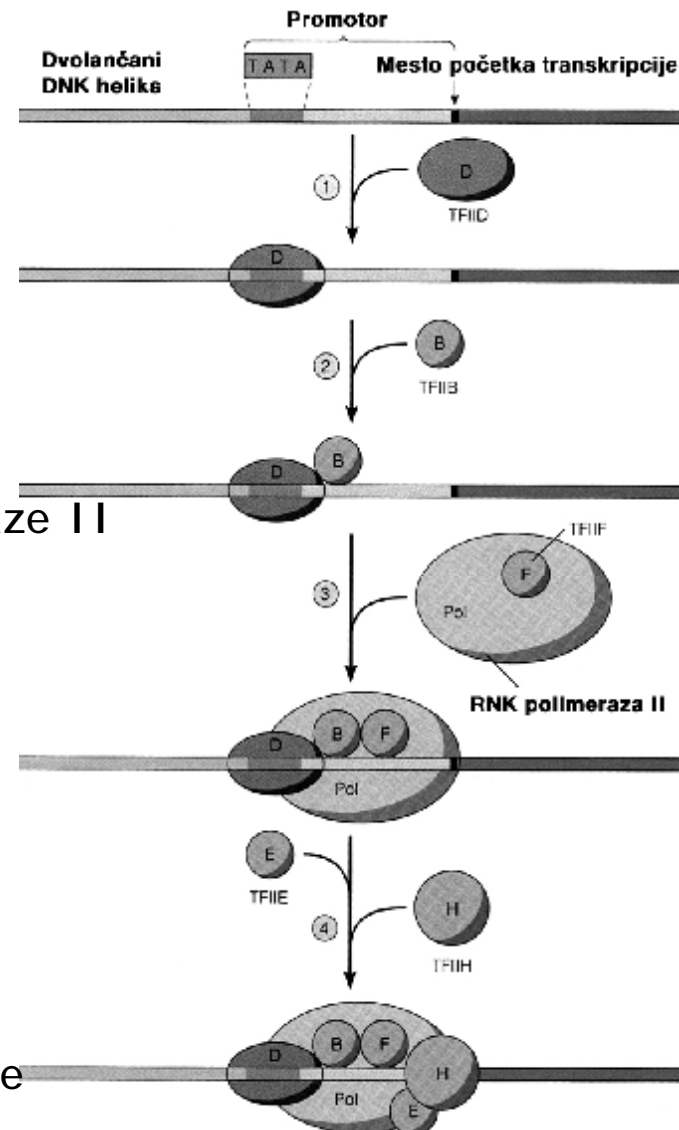


- ∅ TATA boks je konsenzus sekvenca u promotoru koju prepoznaje faktor TFIID (sastoji se od TATA vezujućeg proteina (TBP) i TBP vezujućeg faktora).
- ∅ Nalazi se 25 nukleotida uzvodno od mesta početka transkripcije.

# Transkripcija u eukariota

## ▼ Interakcija bazalnih transkripcionih faktora sa promotorom

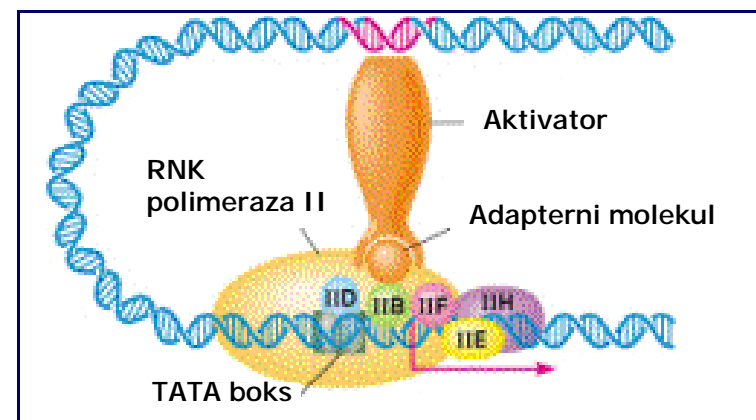
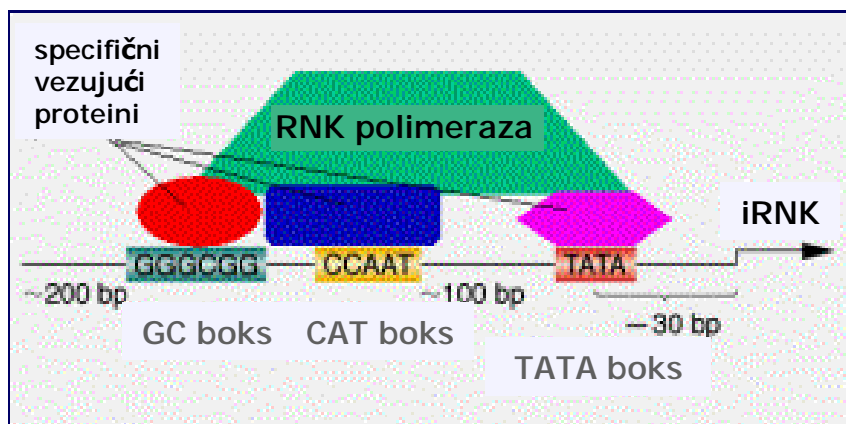
- Ø Vezivanje TFIIID uzrokuje veliku distorziju TATA boksa -označava se aktivni promotor.
- Ø TFIIIB se vezuje za TBP i stvara kompleks TBP-TFIIIB.
- Ø Zajedno sa transkripcionim faktorom TFIIIF, TFIIIB služi kao most za vezivanje RNK polimeraze II
- Ø TFIIH je sastavljen iz više subjedinica.
  - Prve dve subjedinice su *helikaze* koje odvijaju DNK lanac na mestu početka transkripcije
  - Sledeća subjedinica je *protein-kinaza*, fosforiliše ponavljajuće sekvence C-terminalnog kraja RNK-polimeraze II.
- Ø Fosforilacijom ovih sekvenci RNK-polimeraza II se oslobađa iz kompleksa i nastavlja da se kreće duž DNK matrice i stvara RNK.



# Transkripcija u eukariota

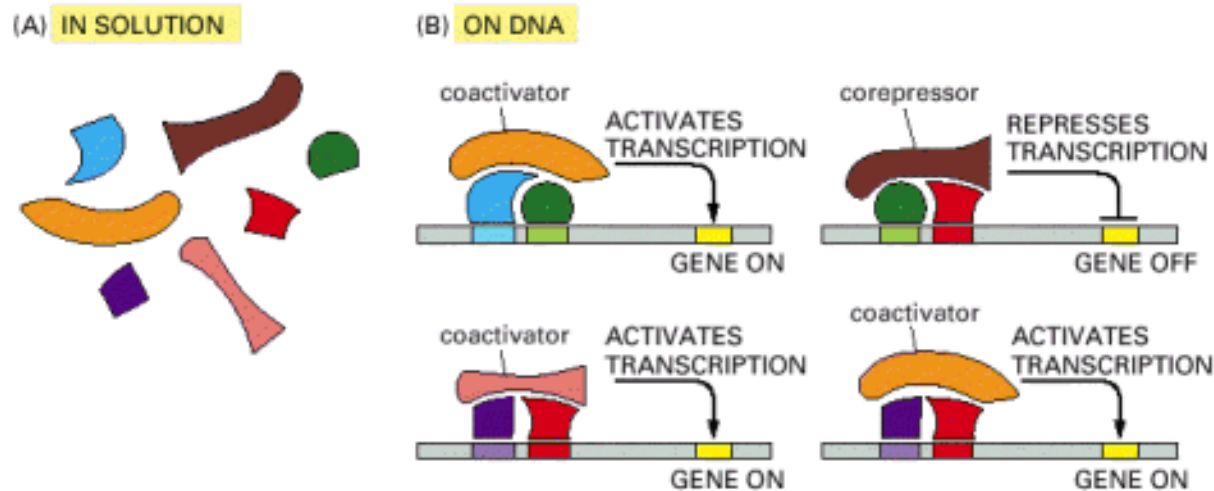
## ▼ Inicijacija

- ∅ Transkripcioni aktivatori su regulatorni proteini gena koji pomažu u postavljanju RNK polimeraze na mesto početka transkripcije.
- ∅ Medijatorni kompleks proteina omogućava da RNK polimeraza II komunicira sa bazalnim transkripcionim faktorima.
- ∅ Kompleksi za remodelovanje hromatina i histon acetilaze takođe su često potrebni za inicijaciju transkripcije





## Regulatorni proteini gena eukariota se uglavnom vezuju u komplekse sa DNK



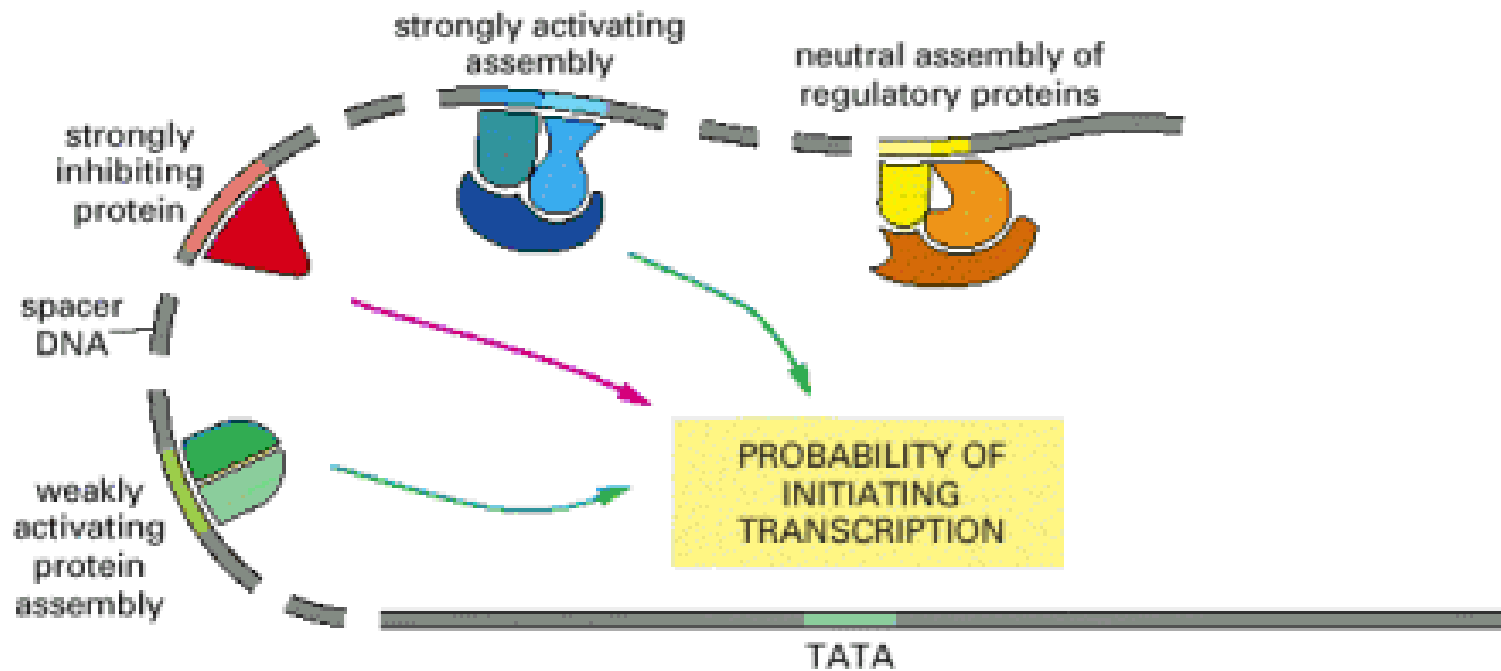
Sedam regulatornih proteina je prikazano na slici.

(A). Priroda i funkcija kompleksa koji formiraju zavisi od specifične DNK sekvence za koju se oni vezuju.

(B). Neki vezani kompleksi aktiviraju transkripciju gena dok drugi vrše represiju transkripcije.

Crveni protein je zajednički i za aktivirajući i za represujući kompleks.

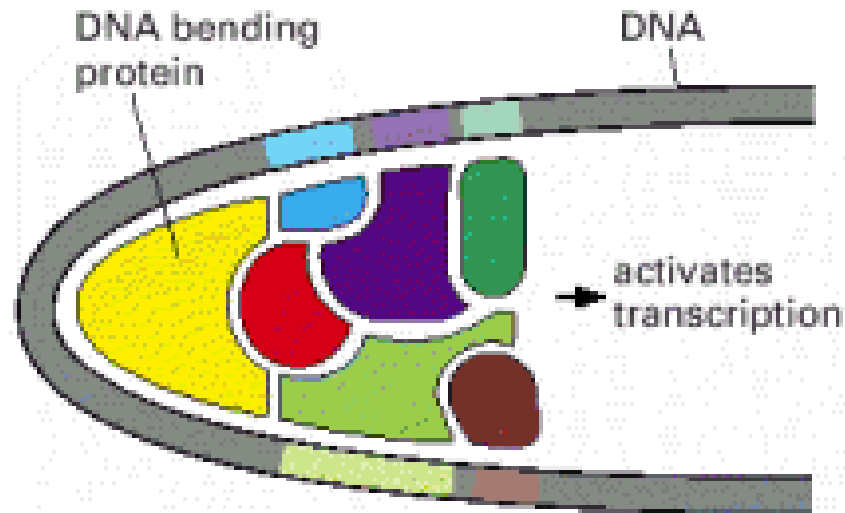
# Integracija promotora



Multipli setovi regulatornih proteina gena mogu da funkcionišu zajedno kako bi uticali na inicijaciju transkripcije koja se dešava na promotoru.

Još uvek nije potpuno jasno kako se postiže integracija većeg broja subjedinica ali izgleda da finalna transkripciona aktivnost gena nastaje kao rezultat kompeticije između aktivatora i represora..

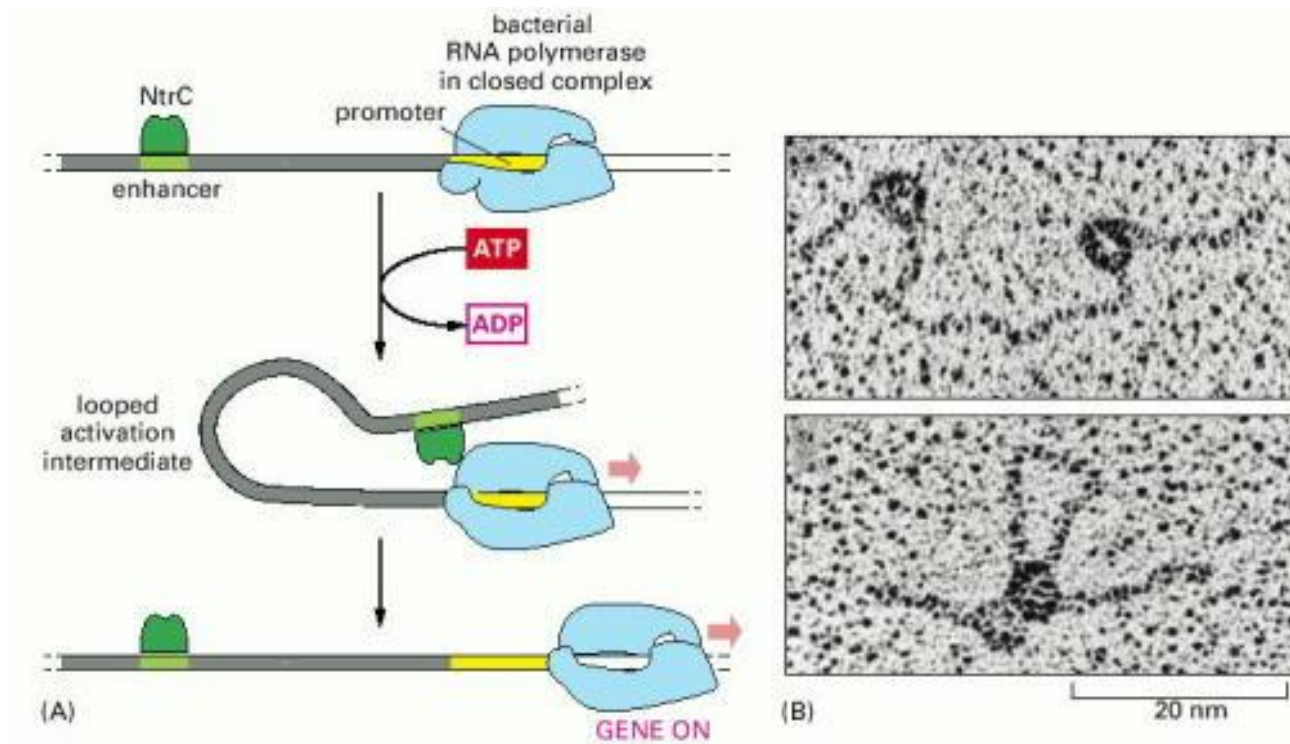
## Shema pojačivača-enhansera



Žuti protein-arhitektonski protein čija je glavna uloga da se veže za DNK i omogući kooperativno povezivanje ostalih komponenti. Površina ovog proteina pojačivača, intereaguje sa ko-aktivatorima koji aktiviraju transkripciju u neposrednoj blizini promotora.

Kompletan set proteinskih komponenti za pojačivač su poznate samo u nekim ćelijama imunskog sistema u razvoju od kojih nastaju zrele T ćelije.

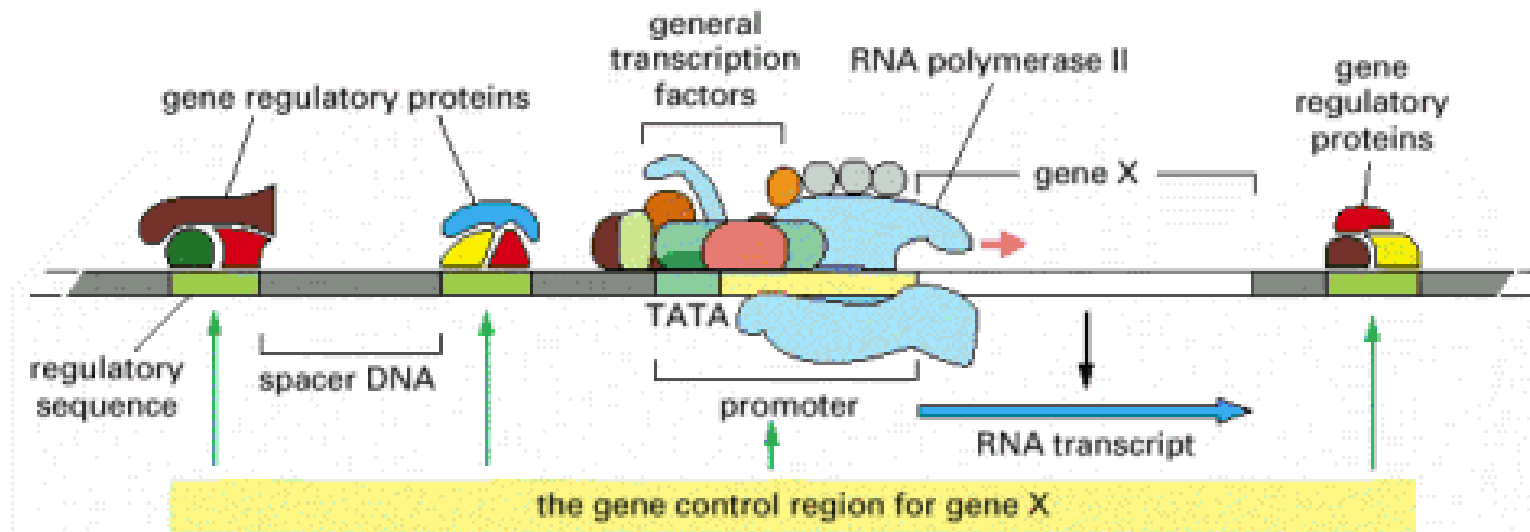
# Aktivacija gena iz daljine



- (A) NtrC je regulatorni protein bakterijskog gena koji aktivira transkripciju tako što olakšava transkripciju između inicijalnog vezivanja RNK poli za promotor i formiranja inicijalnog kompleksa. Za transkripciju koju je stimulisao NtrC neophodna je energija koja se dobija hidrolizom ATP-a, mada je ovaj zahtev za energijom neobičan za regulaciju bakterijskih gena.
- (B) Interakcija između NtrC i RNK poli sa pomoćnim formiranjem omče DNK, može da se vidi i pod elektronskim mikroskopom.

Ovakva aktivacija transkripcije formiranjem omče je atipična za prokariote ali je tipična za regulatorne proteine gena eukariota.

## Kontrolni region tipičnog gena eukariota

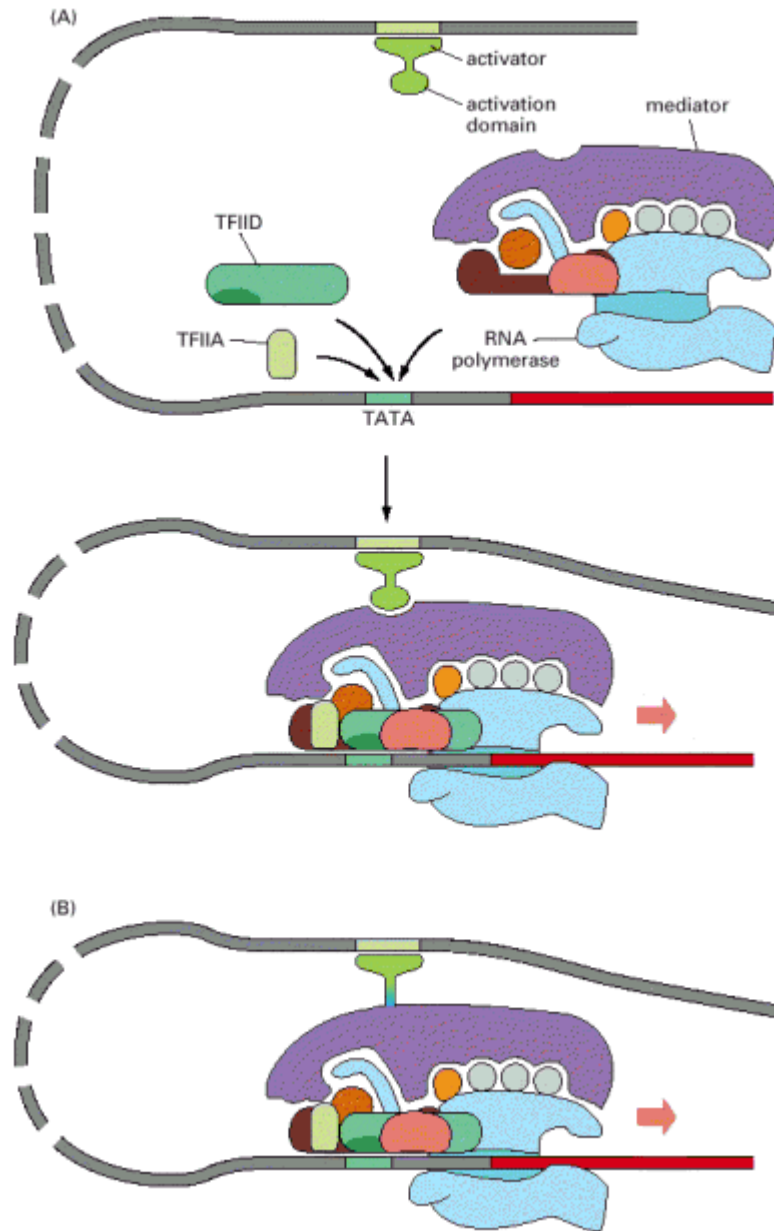


Promotor je DNK sekvenca gde se vezuju opšti faktori transkripcije i polimeraza.

Regulatorna sekvenca služi kao vezno mesto za regulatorni protein gena, čije prisustvo na DNK utiče na brzinu inicijacije transkripcije. Ove sekvence mogu da budu smeštene odmah uz promotor, daleko uzvodno od njega ili unutar introna ili nizvodno od samog gena.

Smatra se da formiranje omče DNK omogućava regulatornim proteinima gena da se vežu na bilo koju od pomenutih pozicija i da reaguju sa proteinima koji se nalaze uz promotor.

Kako su opšti faktori transkripcije veoma slični kod svih polimeraza I i II transkripcione gene, regulatorni proteini gena kao i pozicija njihovih veznih mesta u odnosu na promotor se razlikuju za svaki gen.



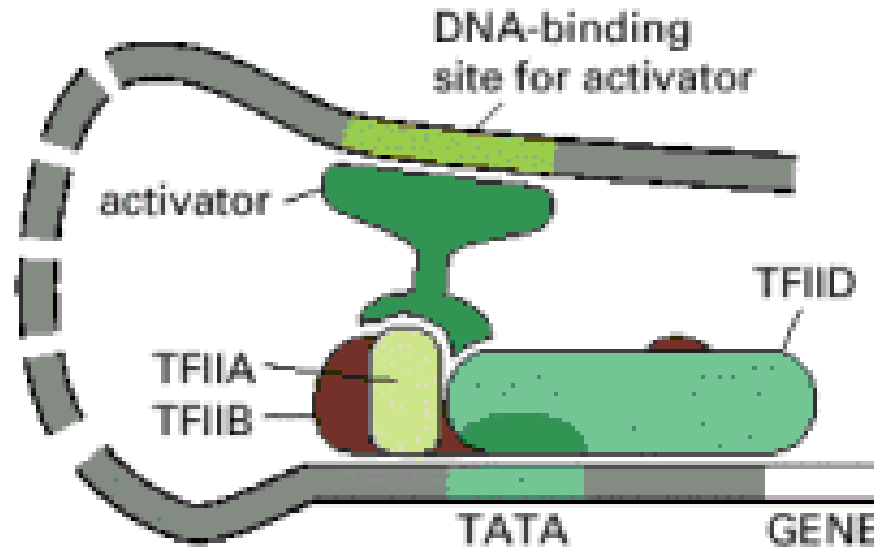
## Aktivacija inicijacije transkripcije kod eukariota pomoću RNK poly II holoenzimskog kompleksa

(A) Protein aktivator se vezuje proksimalno od promotora, i privlači holoenzimski kompleks na promotor. Tako je holoenzim (koji sadrži više od 100 proteinskih subjedinica) usmeren ka promotoru nezavisno od faktora transkripcije. TFIIID i TFIIA..

(B) DNK-vezujući domen proteina je fuzionisao direktno sa proteinskom komponentom medijatora, proteinskog kompleksa od 20 subjedinica koji je deo kompleksa holoenzima ali koji se lako može odvojiti od ostatka holoenzima. Kada se vezno mesto ovog "hibridnog" proteina eksperimentalno umetne blizu promotora, inicijacija transkripcije se znatno pojačava.

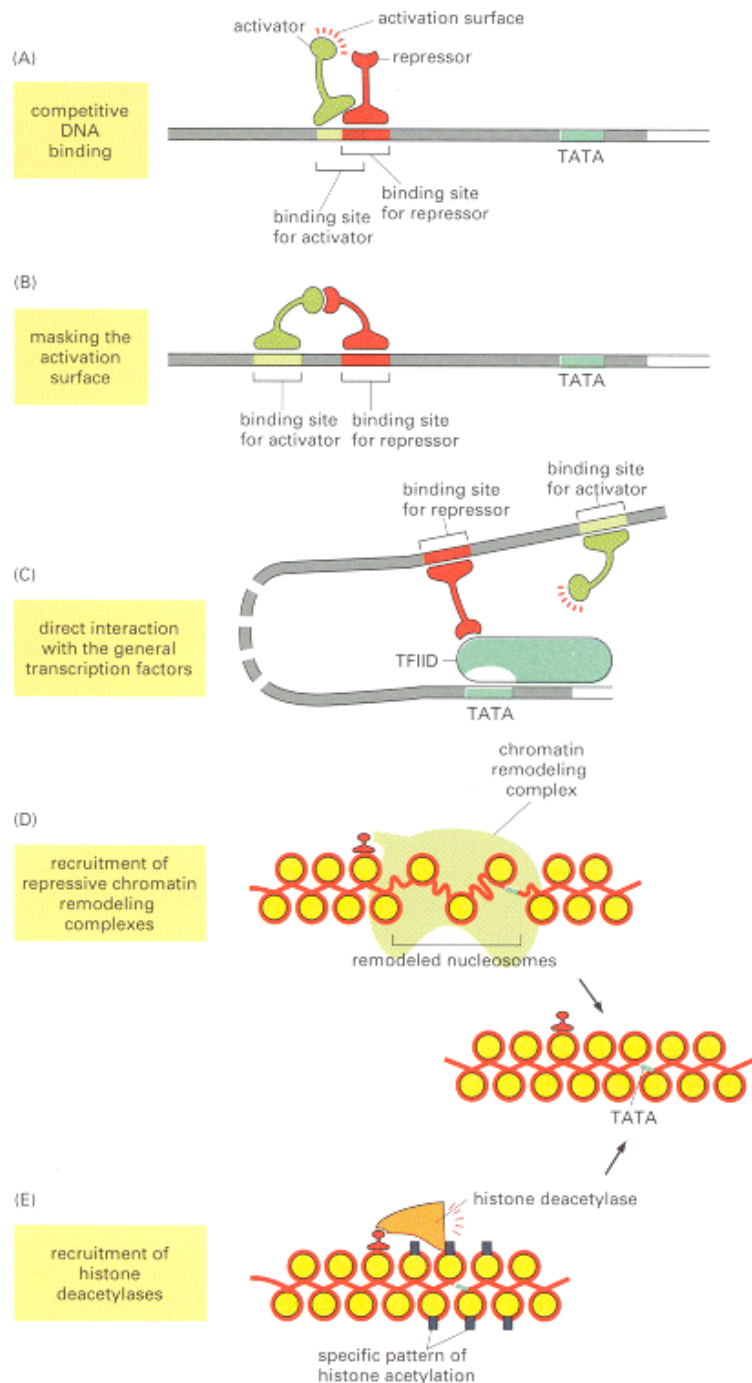
“Prekinuta” DNK samo označava da ovi segmenti mogu da budu jako dugi.

## Model aktivnosti nekih transkripcionih aktivatora kod eukariota



Protein aktivator gena, vezan za DNK unutar promotora, olakšava povezivanje nekih opštih transkripcionih faktora.

I ako neki proteini aktivatori deluju u nekim koracima inicijacije transkripcije, neki od njih mogu da budu uključeni u različite korake inicijacije.



## Pet načina funkcionisanja represora gena kod eukariota

- Protein aktivator gena i protein represor gena konkurišu za vezivanje za istu regulatornu sekvencu DNK
- Oba proteina mogu da se vežu za DNK, ali se represor vezuje za aktivacioni domen proteina aktivatora čime sprečava njegovu funkciju aktivacije. Moguće je da se represor veže za aktivator a da pri tome ne bude vezan za DNK direktno
- Represor interaguje sa ranim oblikom "vezujućeg" kompleksa opštih transkripcionih faktora, blokirajući njihovo dalje povezivanje. Neki represori deluju kasnije u toku inicijacije transkripcije, npr sprečavajući oslobađanje RNK poli od opštih transkripcionih faktora
- Represor "aktivira" kompleks za remodeliranje hromatina čime se promotor vraća u pretranskripcionu nukleozomalnu formu. Isti kompleks za remodeliranje može i da aktivira i da inhibira transkripciju zavisno od koncentracije drugih proteina u jedru od kojih zavisi stabilnost remodeliranog ili "represovanog" oblika. Kompleks za remodeliranje omogućava hromatinu da menja svoju strukturu
- Represor privlači deacetilazu histona na promotor. Lokalna deacetilacija histona smanjuje afinitet TFIID prema promotoru i smanjuje pristupačnost DNK unutar zahvaćenog hromatina.



## Regulacija genske ekspresije kod eukariota je uslovljena mnogim unutarćelijskim i vanćelijskim signalima

Steroidni hormoni + Re- dimerizacija.

Nastali kompleks se u jedru vezuje za DNK sekvencu- hormon response element (HRE), koji utiče na ekspresiju gena. Ove sekvence su različite za različite steroidne hormone.

**TABLE 28-4** Hormone Response Elements (HREs)  
Bound by Steroid-Type Hormone Receptors

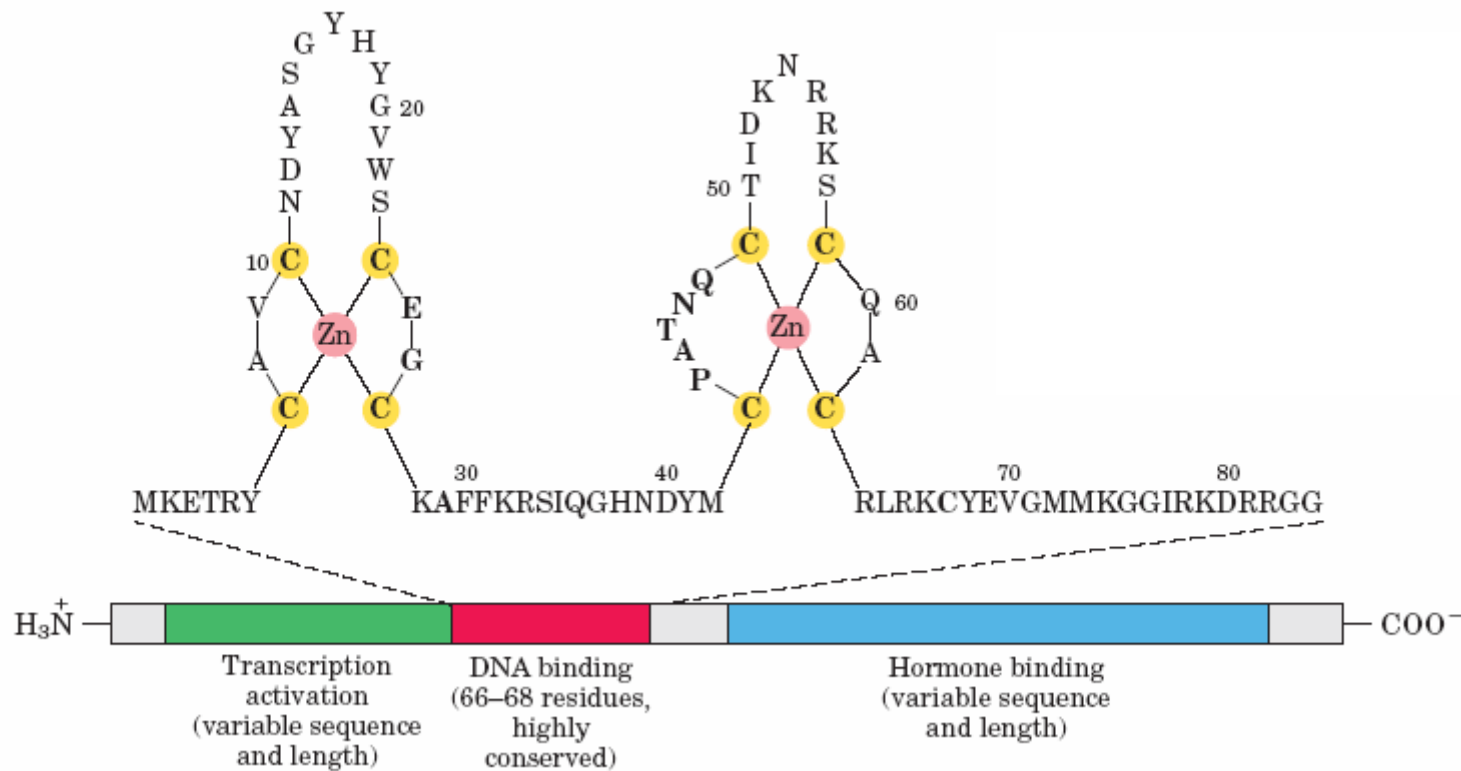
<i>Receptor</i>	<i>Consensus sequence bound*</i>
Androgen	GG(A/T)ACAN <sub>2</sub> TGTTCT
Glucocorticoid	GGTACAN <sub>3</sub> TGTTCT
Retinoic acid (some)	AGGTCAN <sub>5</sub> AGGTCA
Vitamin D	AGGTCAN <sub>3</sub> AGGTCA
Thyroid hormone	AGGTCAN <sub>3</sub> AGGTCA
RX <sup>†</sup>	AGGTCANAGGTCANAGGTCANAGGTCA

## Struktura receptora za steroidne hormone

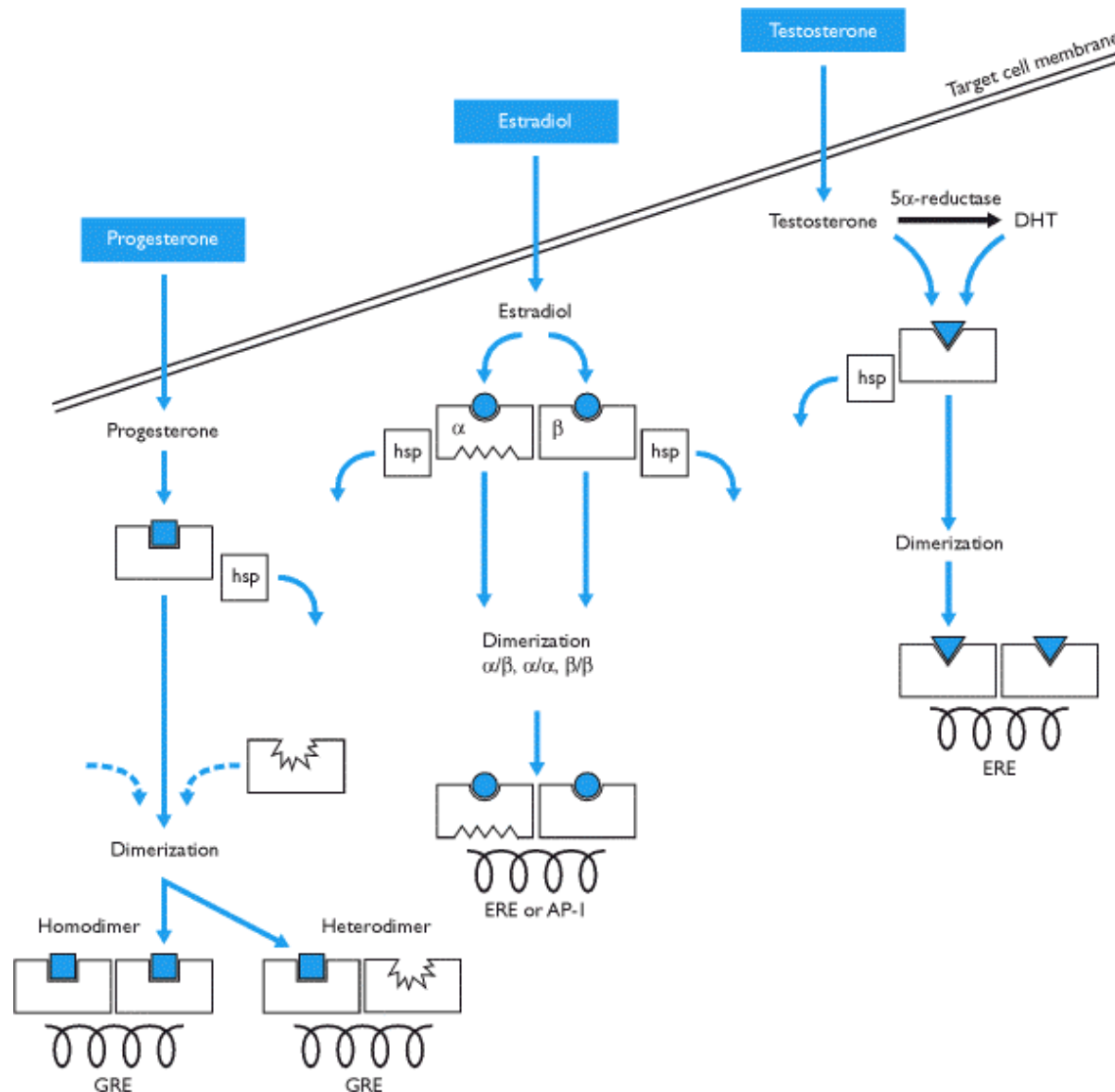
C-terminalni kraj- ligand vezujući domen

Centralni deo- DNK vezujući domen. Zn prsten

N-terminalni kraj- antigenski domen



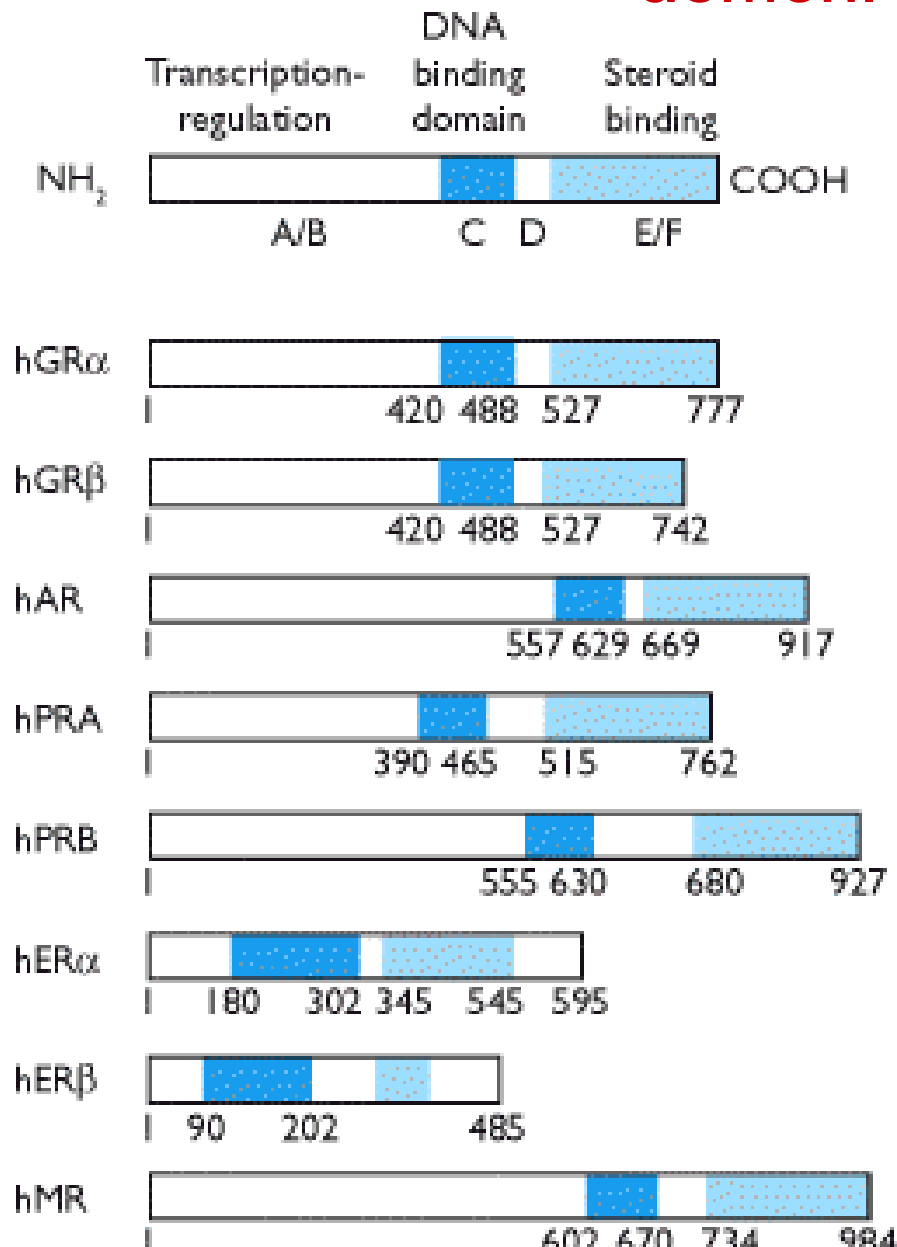
# Mehanizam dejstva unutarćelijskih receptora za tri najvažnija polna hormona



Receptori su uglavnom u citoplazmi vezani za proteine toplotnog šoka (hsp). Po vezivanju liganda, hsp se odvajaju, receptoru dimerizuju u prelaze u jedro. U nekim ciljnim tkivima testosteron se mora prvo prevesti u dihidrotestosteron (DHT) pre nego što stupi u kontakt sa receptorom.

Kompleks hormon-receptor se vezuje za estrogen-response element (ERE) na DNK.

# Struktura receptora za steroidne hormone domeni i broj AK

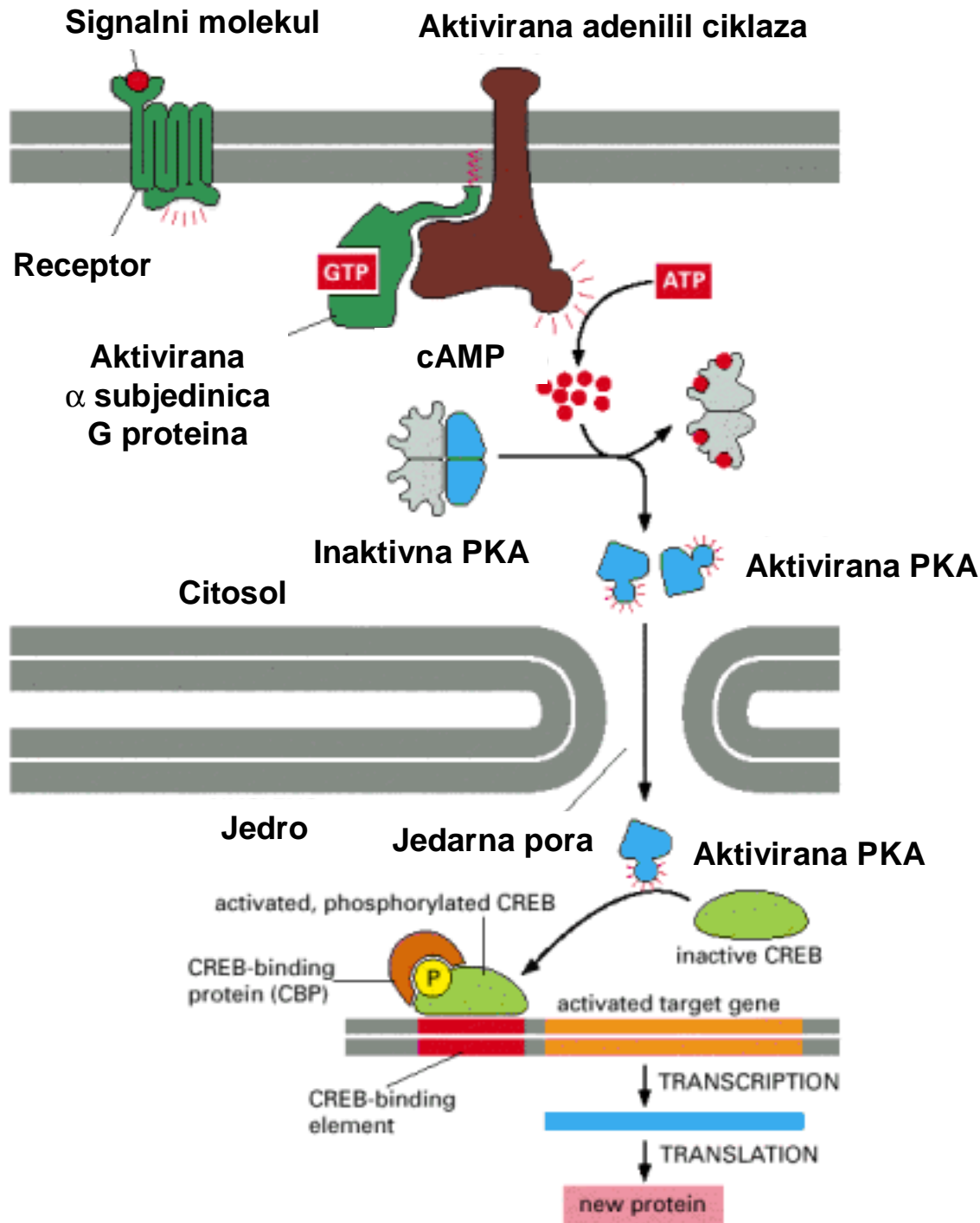


DNK-vezujući domen (C) je visoko konzerviran kod svih steroidnih receptora.

Postoje 2 tipa humanog glukokortikoidnog receptora (hGRa i hGRb) usled različite obrade istog primarnog iRNK transkripta;

Dva progesteronska receptora (hPRA i hPRB) nastaju usled različitih mesta inicijacije transkripcije;

Dva estrogenska receptora (hERa i hERb) su kodirana različitim genima



Regulacija može da se ostvari i fosforilacijom faktora transkripcije

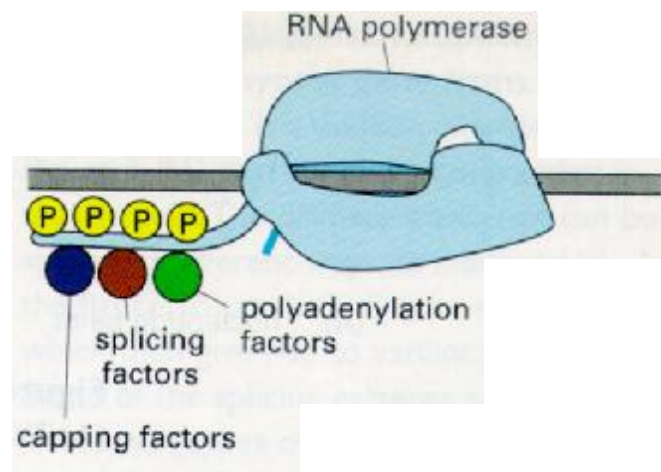
Delovanje nesteroidnih hormona

REGULACIJA NA NIVOU  
POSTRTRANSKRIPCIONE OBRADJE RNK

# Obrada RNK

---

- Ø Obrada RNK je tesno povezana sa fazom elongacije transkripcije.
- Ø Ključni korak u preusmeravanju RNK polimeraze u elongacioni mod je ekstenzivna fosforilacija C-terminalnog kraja RNK polimeraze koji se skraćeno obeležava **CTD (C-terminalni domen)**.
- Ø **CTD** se nalazi na najvećoj subjedinici i sastoji se od 52 puta ponovljene sekvence od 7 amino kiselina.
  - Svaka **sekvenca** od 7 amino kiselina sadrži po 2 **serina** koja mogu biti fosforilisana.
  - Kompletnom fosforilacijom polimeraze dodaje se ukupno 104 negativno naelektrisanih fosfatnih grupa.



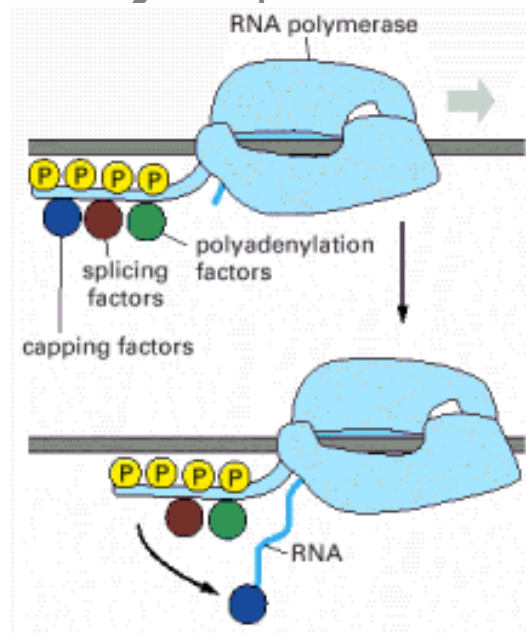
# Obrada RNK

## Ø Fosforilacija CTD RNK polimeraze:

Ø je odgovorna za disocijaciju RNA polimeraze II od drugih proteina prisutnih na početnom mestu transkripcije i omogućava novoj grupi proteina, da se vežu za CTD polimeraze.

- Ovi proteini učestvuju u elongaciji i obradi hnRNK.

- Neki od njih prelaze sa RNK polimeraze na nascentni molekul RNK koji počinje da se obrađuje neposredno nakon sinteze.



Tako se, RNK polimeraza II u elongacionom modu može smatrati mašinerijom koja i transkribuje DNK u RNK i obrađuje RNK neposredno nakon stvaranja.

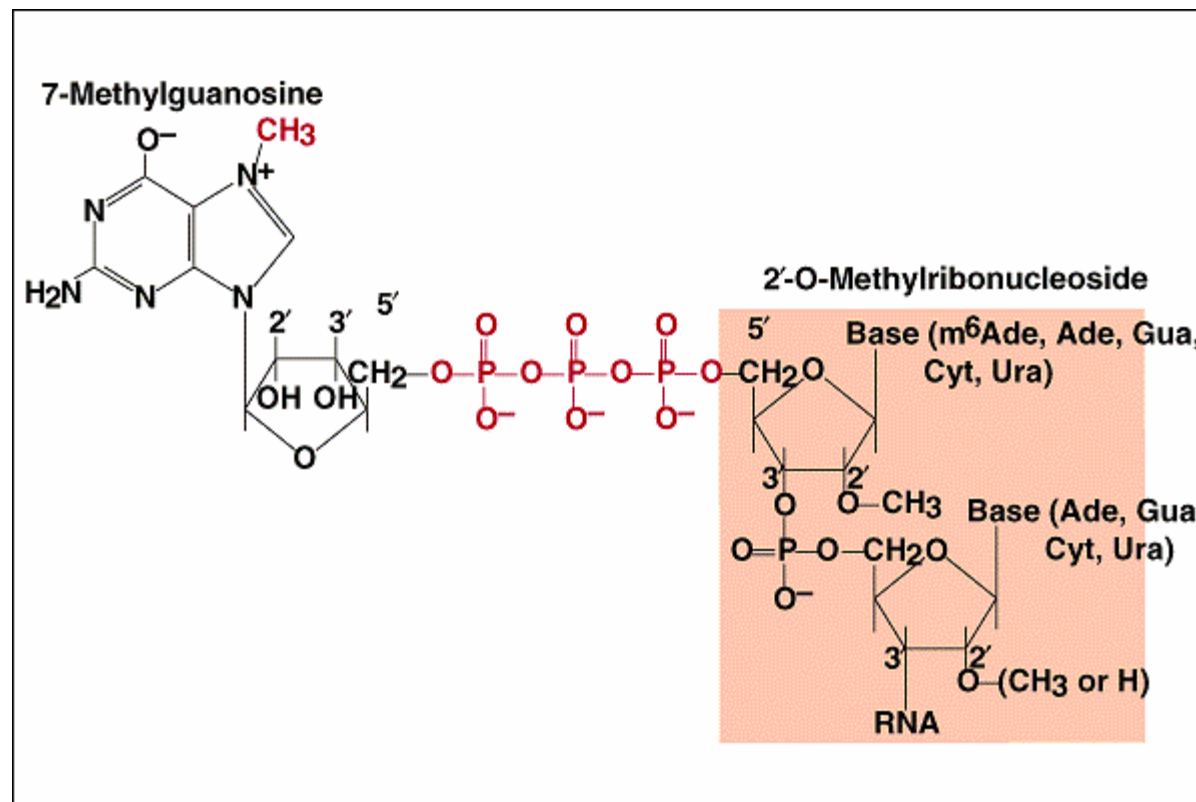


# Obrada RNK - modifikacija 5' kraja

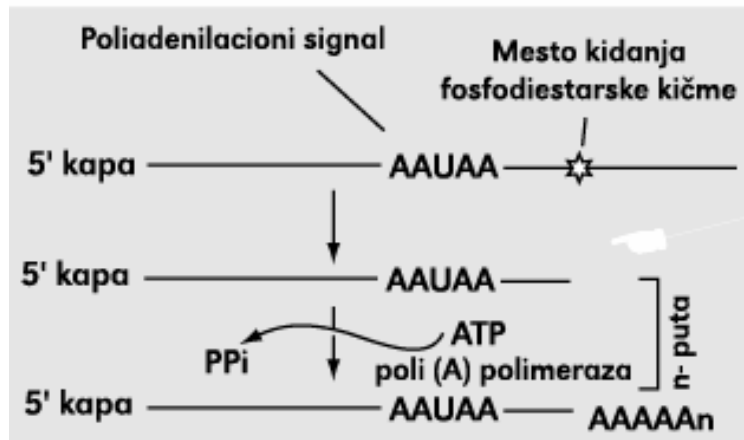
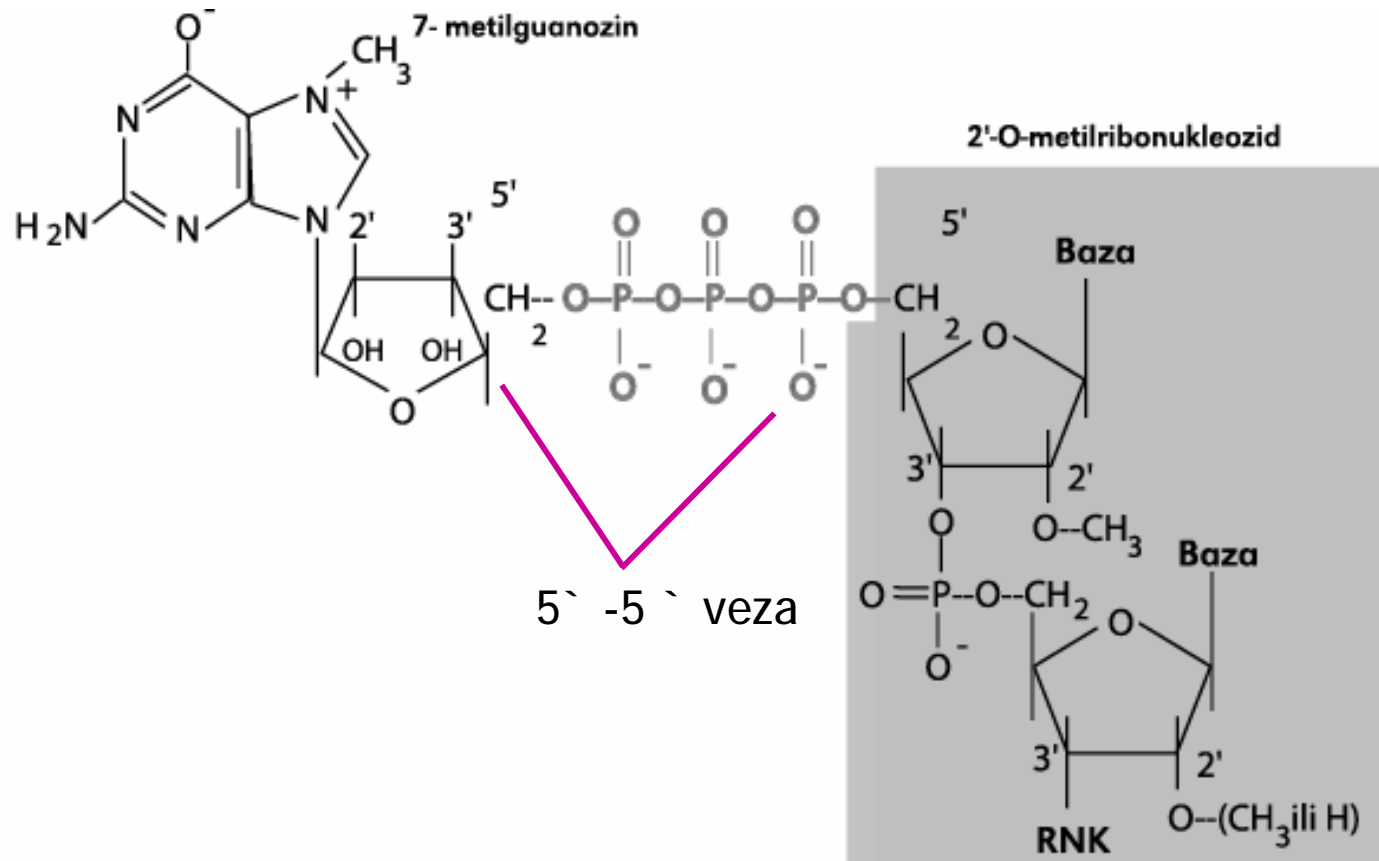
5' kraj novog RNK molekula se modifikuje:

Ø neposredno nakon što RNK polimeraza II poveže oko 25 prvih nukleotida

Ø dodavanjem "kape" koja se sastoji od modificiranog guaninskog nukleotida.



5' kraj sadrži informacije koje se nikada ne prevode u proteine (vodeće sekvence) kao ni 3' kraj (prateće sekvence)



# Obrada RNK - modifikacija 5' kraja

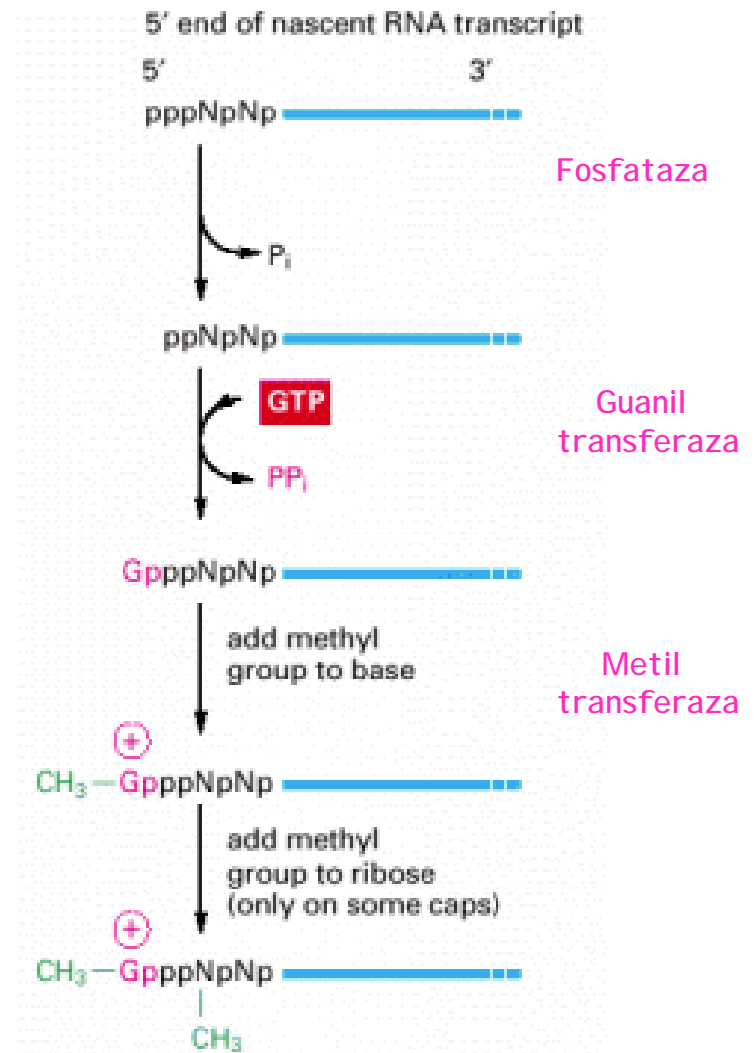
U formiranju "kape" na 5' kraju učestvuju 3 enzima:

1. **Fosfataza** - uklanja fosfat sa 5' kraja nascentne RNK
2. **Guanil transferaza** - dodaje GMP sa reverznom vezom (5' - 5' umesto 3' - 5')
3. **Metil transferaza** - dodaje metil grupu guanozinu.

Sva tri enzima se nalaze na CTD " repu " RNK polimeraze.

Uloga 5' kape:

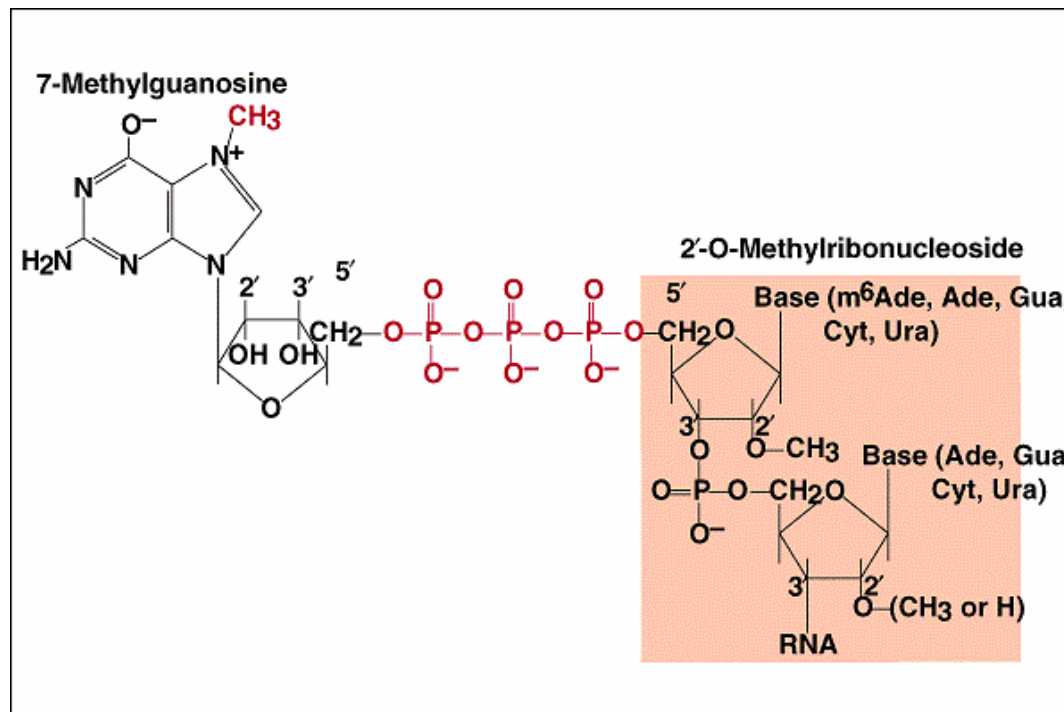
- Ø razlikovanje mRNK od drugih tipova RNK
- Ø vezivanje "kapa" vezujućeg kompleksa proteina u jedru pomaže da se RNK adekvatno obradi i eksportuje iz jedra.
- Ø Učestvuje u translaciji iRNK u citosolu.



# Obrada RNK - modifikacija 5' kraja

Postoje tri vrste "kapa" strukture u zavisnosti od toga da li su dva nukleotida koji su vezani za 7-metilguanilat metilisana.

- Ø "Kapa" 0 se javlja kada nema metilovanja iza 7-metilguanilata;
  - Ø "kapa" 1 postoji kada je prva ribozna jedinica vezana za 7-metilguanilat metilovana;
  - Ø "kapa" 2 postoji kada su i prva i druga ribozna jedinica metilovane.
- Sve iRNK imaju "kapa" strukturu.



# Obrada RNK - isecanje introna

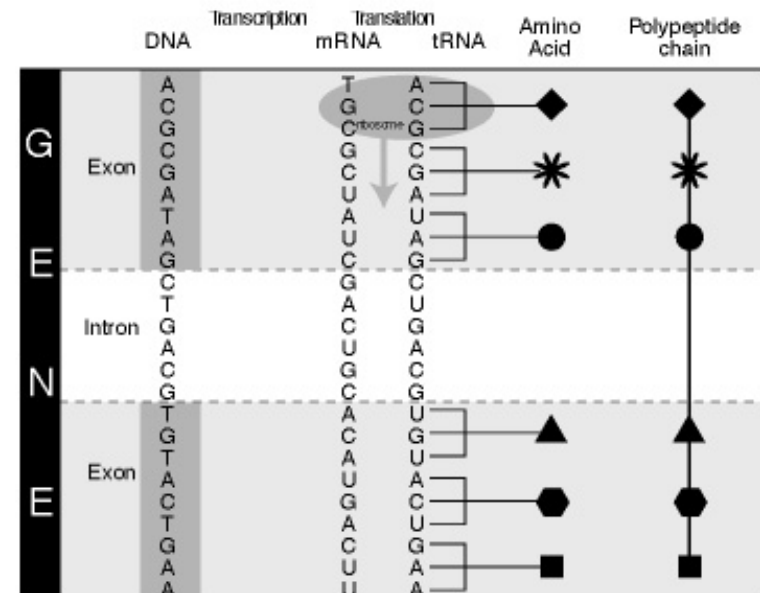
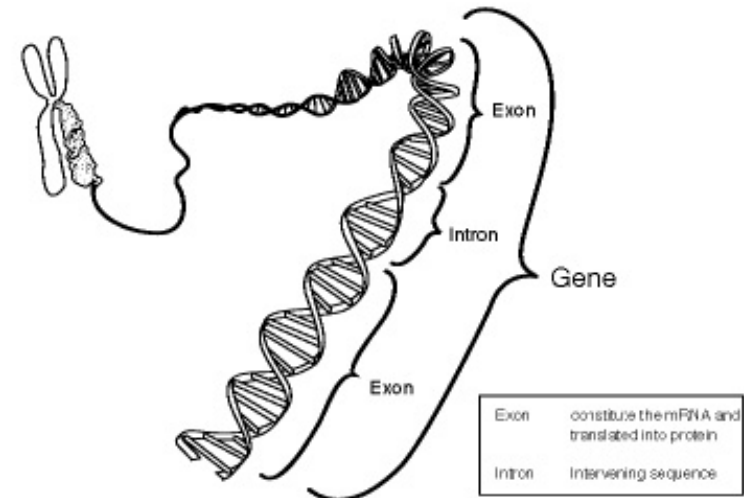
Ø Primarni prepis iRNK sadrži:

- Ø kodirajuće sekvence - egzone, i
- Ø nekodirajuće sekvence - introne.

Ø Introni su dugačke sekvence deoksinukleotida (10 - 100,000 nukleotida) koje nemaju udela u genetskoj informaciji koja se prepisuje u redosled aminokiselina u polipeptidnom lancu.

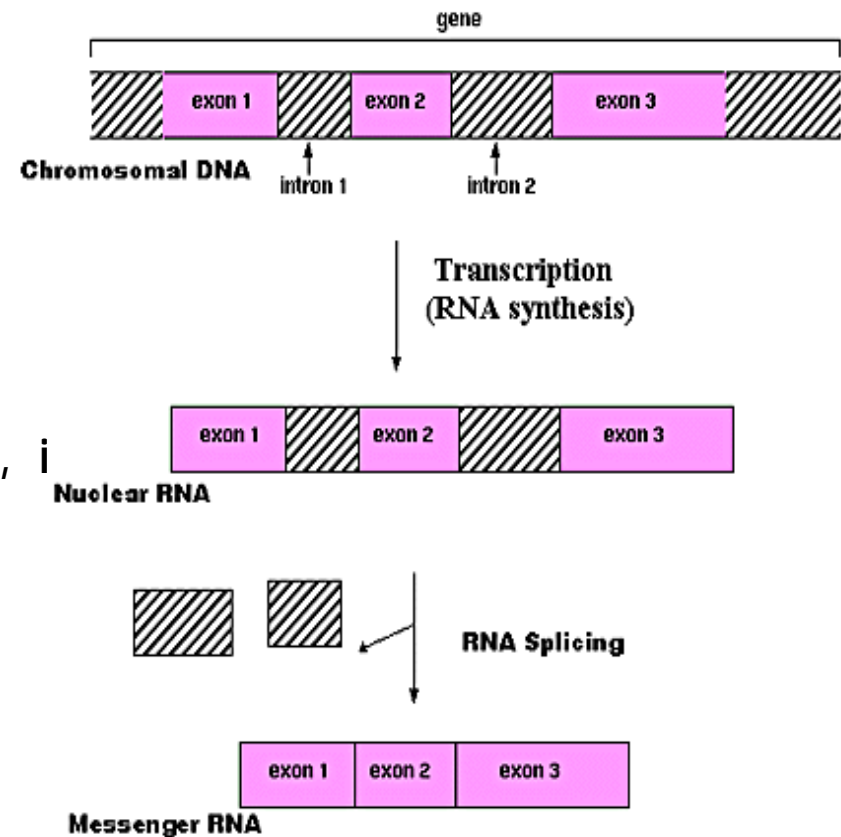
Ø Ove interventne sekvence postoje u većini gena eukariota.

Ø Introni variraju u veličini od 80-10 000 nukleotida.



# Obrada RNK - isecanje introna

- ∅ Za razliku od sekvence egzona, tačna sekvenca introna je nevažna.
- ∅ Jedino su sekvence koje učestvuju u uklanjanju introna, i koje se nalaze na krajevima visoko konzervisane.
- ∅ One su vrlo slične kod većine eukariota, i sadrže
  - 5' isecajuće/spajajuće mesto (donorsko mesto) i
  - 3' isecajuće/spajajuće mesto (akceptorsko mesto).

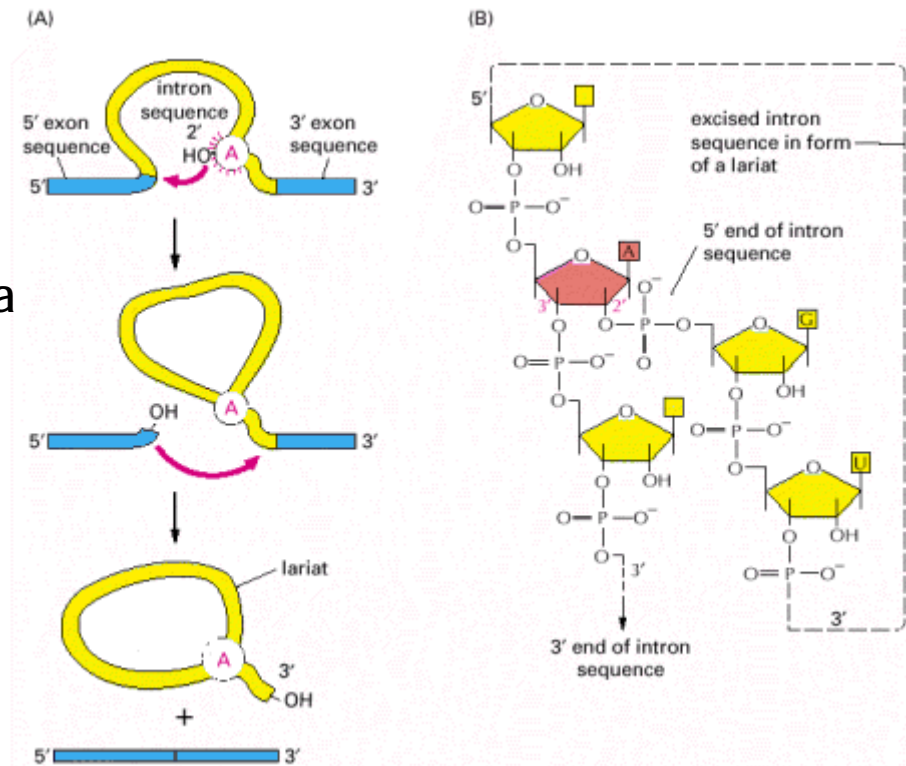


RNA synthesis and processing

# Obrada RNK - isecanje introna

## Reakcije isecanja introna iz hnRNK

- Ø Specifični adeninski nukleotid u sekvenci introna napada 5' isecajuće/spajajuće mesto i seče šećerno-fosfatnu kičmu u ovoj tački.
- Ø 5' kraj introna se kovalentno vezuje za adeninski nukleotid.
- Ø Nastaje petlja (laso) u molekulu RNK.
- Ø Oslobođeni 3' - OH kraj egzona reaguje sa početnom sekvencom susednog egzona.
- Ø Dva egzona se povezuju u kontinuiranu kodirajuću sekvencu.
- Ø Intron se oslobađa u obliku omče, i razgrađuje.



# Obrada RNK - isecanje introna

---

Isecanje introna se odigrava u specifičnim česticama (engl. *spliceosome*)

Ø Isecanje introna se izvodi uz pomoć RNK molekula koji se nazivaju male nuklearne RNK - mnRNK (engl. *small nuclear RNA* - snRNA).

Male nuklearne RNK - mnRNK:

Ø Sadrže do 200 nukleotida.

Ø Postoji pet vrsta: U1, U2, U4, U5 i U6.

Ø Svaka mnRNK se povezuje sa 6-10 molekula proteina gradeći male nuklearne ribonukleoproteine - mnRNP (*small nuclear ribonucleoprotein* - snRNP - *snurp*).

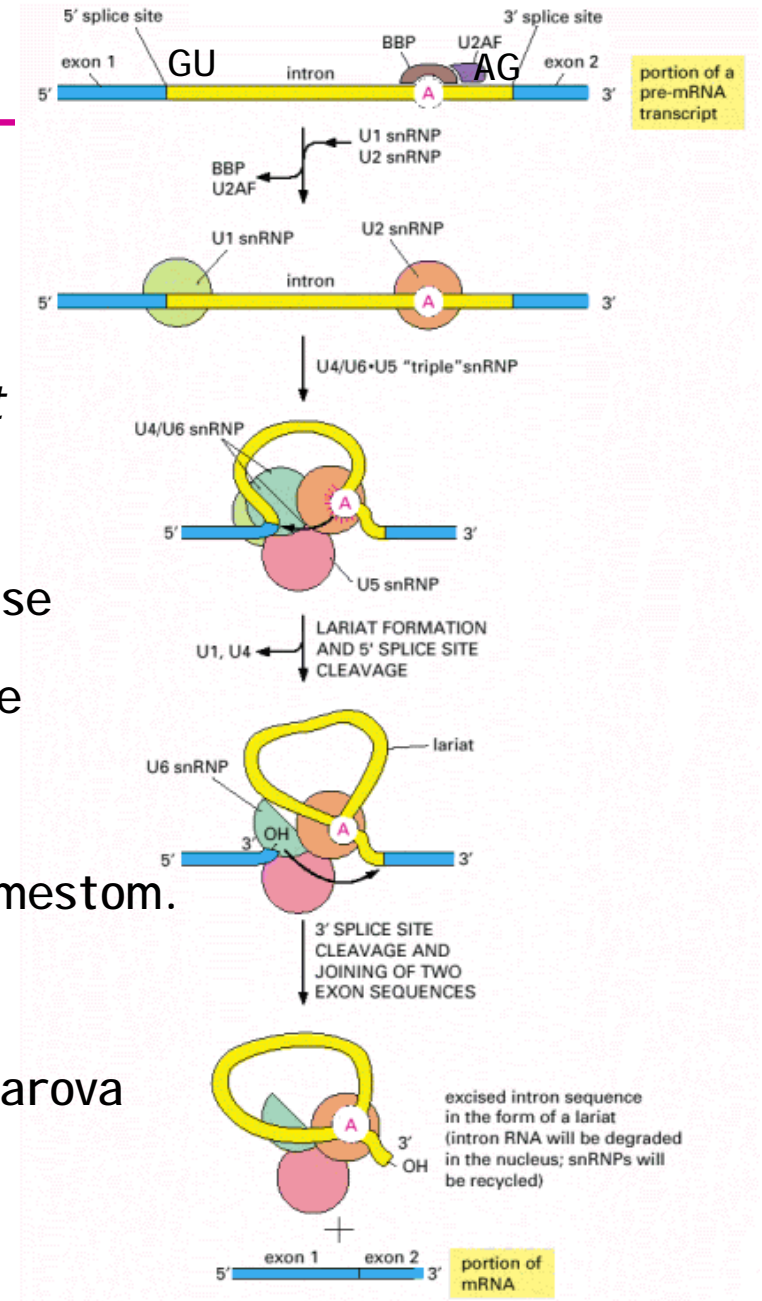
Ø Ovi mnRNP čine jezgro čestica za isecanje.

Ø RNK molekuli prepoznaju granice intron/egzon i učestvuju u reakcijama isecanja.



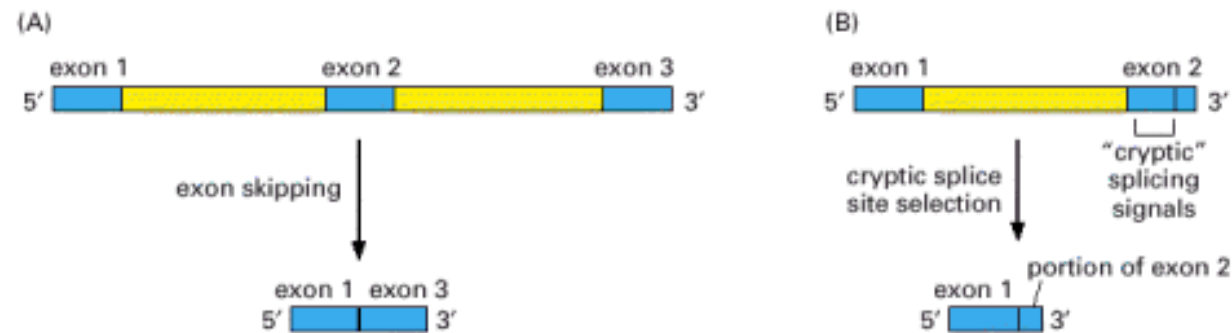
# Obrada RNK - isecanje introna

- Ø Tačku grananja prepoznaju BBP (*branch point binding protein*) i U2AF - pomoćni protein.
- Ø U2 mnRNP zamenjuje BBP i U2AF i baze mu se sparuju sa bazama konsenzus sekvence tačke granjanja.
- Ø Baze U1 mnRNP se sparuju sa 5' isecajućim mestom.
- Ø U4/U6 i U5 ulaze u česticu za isecanje.
- Ø U4 i U6 su međusobno čvrsto vezane preko parova baza.
- Ø Dolazi do preuređenja RNK-RNK veza



# Obrada RNK - isecanje introna

- ∅ U reakcijama transesterifikacije (transfosforilacije) broj fosfatnih veza ostaje isti, pa bi se moglo očekivati da se ove reakcije odvijaju bez hidrolize nukleozid trifosfata.
- ∅ Međutim energija je potrebna za postepeno postavljanje i preuređenje komponenti čestica za isecanje introna.
  - Neki od proteina koji ulaze u njihov sastav su helikaze koje koriste ATP za cepanje RNK-RNK interakcija da bi omogućile stvaranje novih.
  - Hidrolizu ATP-a ne zahtevaju samo
    - ∅ Vezivanje BBP za tačku grananja i
    - ∅ Vezivanje U1 za 5' isecajuće mesto.
  - Posle isecanja mnRNP ostaju vezani za omču introna, i rasformiranje ove strukture zahteva dodatna RNK-RNK preuređenja koja zahtevaju hidrolizu ATP-a, da bi mnRNK mogle da budu ponovo upotrebljene.



Greške koje bi često nastajale da se selekcija mesta isecanja vrši na RNK bez proteina

# Obrada RNK - isecanje introna

---

- Ø Iako se markiranje egzona i introna, i formiranje čestica za isecanje vrši u toku elongacije isecanje se vrši kasnije.
- Ø Ovo odlaganje znači da:
  - se introni ne moraju isecati onim redom kojim su se pojavili u RNK lancu
  - Iako se čestice za isecanje pojavljuju ko-transkripciono reakcije isecanja se uglavnom odigravaju post-transkripciono, posle sinteze kompletnog hnRNK

# Obrada RNK - isecanje introna

Ø Dve grupe sekvenci samo-isecajućih introna:

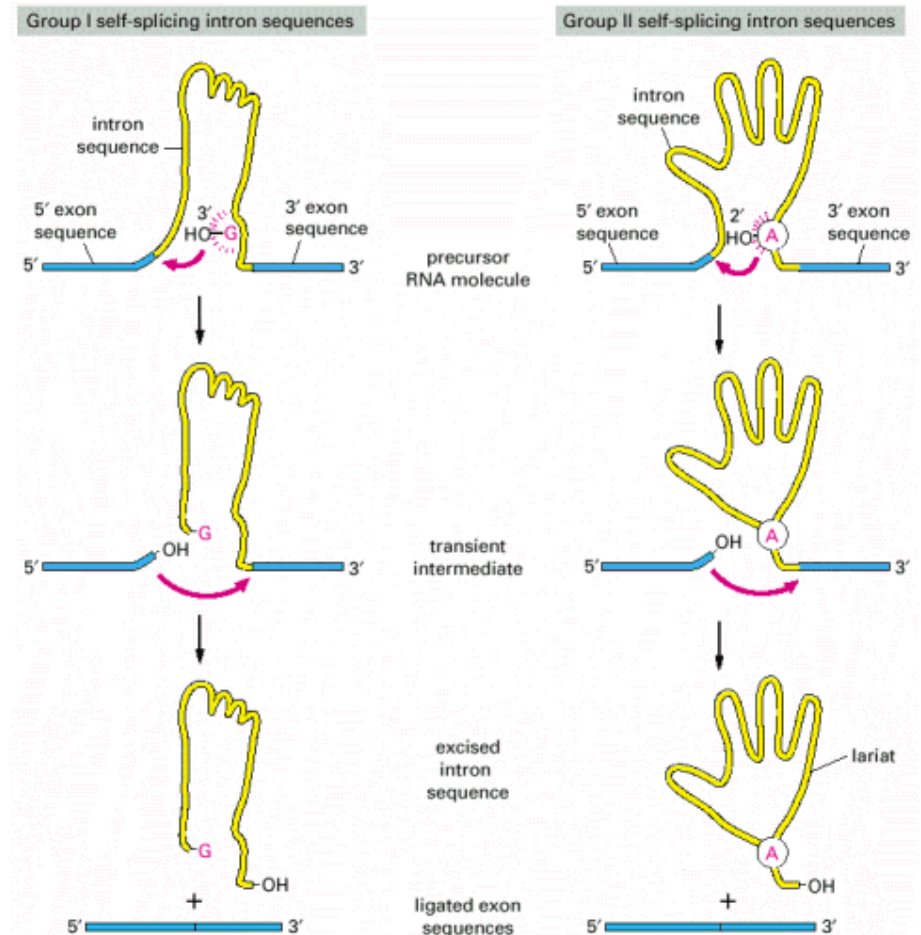
• Grupa I sekvenci introna

Isecanje započinje vezivanjem G nukleotida za sekvencu introna G se tako aktivira i napada prvu fosfodiesterarsku vezu (na 5' mestu)

• Grupa II sekvenci introna

Posebno aktivan A u intronu je grupa koja napada i formira se intermedijer u vidu omče.

Za obe grupe ključna je sekvenca introna. Smatra se da je isecanje hnRNK evoluiralo iz klase II.



# Obrada RNK - modifikacija 3' kraja

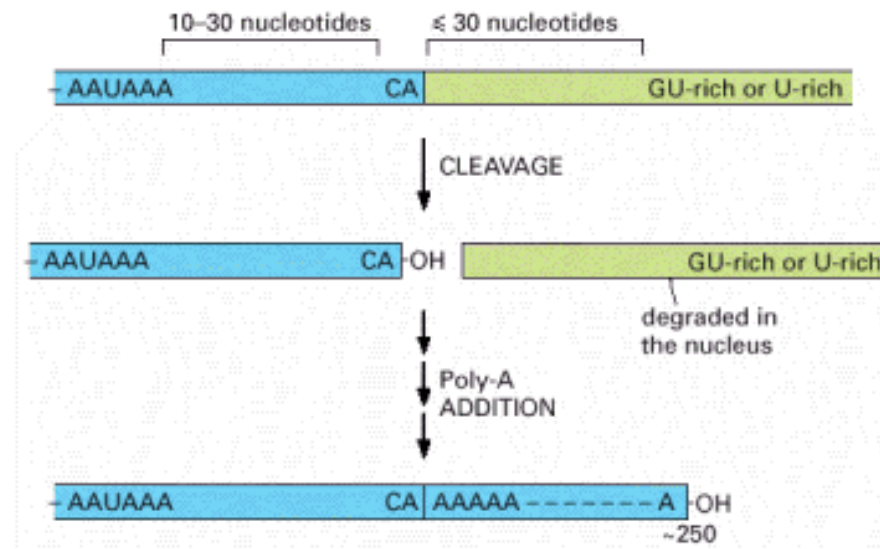
Ø 3' kraj iRNK je određen specifičnom sekvencom u DNK

Ø Proteini

Ø CstF (*cleavage stimulating factor F*) i

Ø CPSF (*cleavage and polyadenylation specificity factor*)

Putuju na "repu" RNK polimeraze i prebacuju se na 3' kraj čim se pojavi specifična sekvenca.



- Za heksamer AAUAAA se vezuje CPSF.
- Za GU bogatu sekvencu iza mesta cepanja se vezuje CstF.
- CA sekvenca je treći faktor potreban za cepanje.

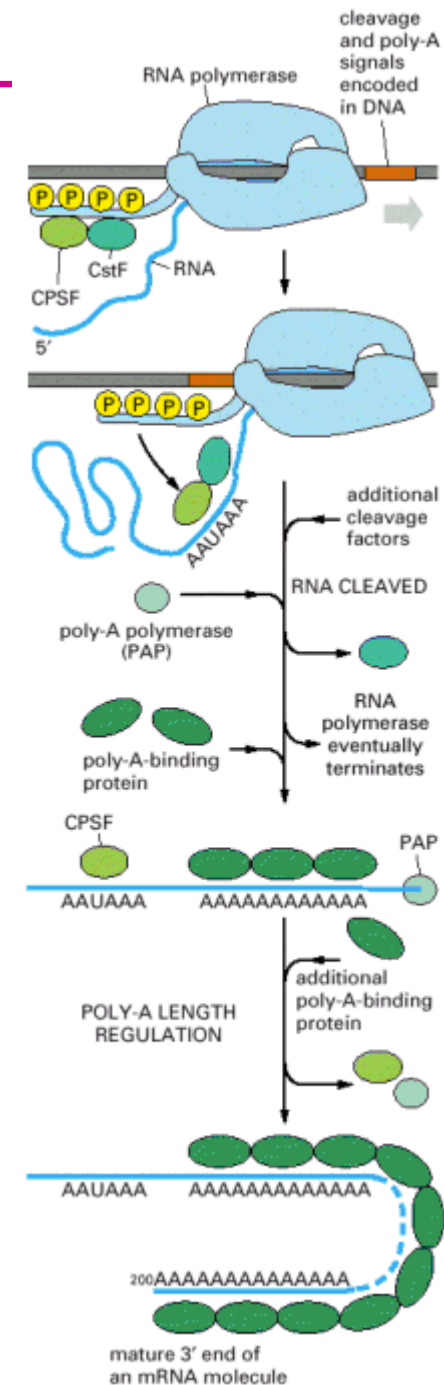
# Obrada RNK - modifikacija 3' kraja

- Ø Posle vezivanja CPSF i CstF se vezuju se drugi proteini koji su uključeni u obradu 3' kraja.
- Ø RNK se otcepljuje.
- Ø Poli A polimeraza dodaje jedan po jedan oko 200 adeninskih nukleotida na 3' kraj.
  - Prekursor je ATP.
  - Ne zahteva matricu.
- Ø Za poli A "rep" se vezuje poli A- vezujući protein koji određuje definitivnu dužinu repa.
- Ø Poli A rep

○ Pomaže u stabilizaciji iRNK.

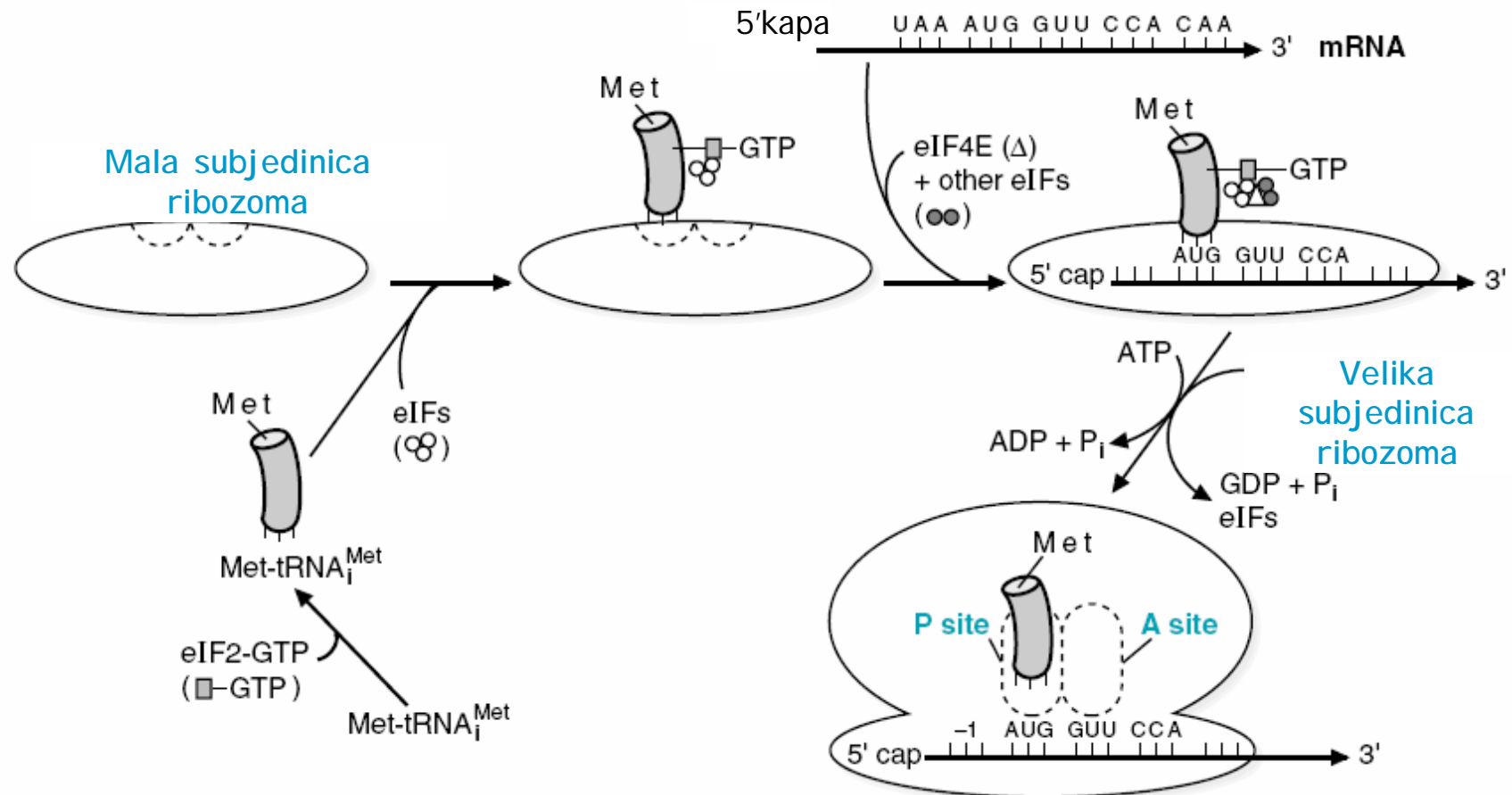
U citoplazmi, rep se polako skraćuje, i kada potpuno nestane dolazi do brze degradacije iRNK.

○ Takođe učestvuje u transportu iRNK iz jedra u citoplazmu, i ima ulogu signala, na osnovu koga ribozomi prepoznaju odgovarajuću iRNK.



# REGULACIJA NA NIVOU TRANSLACIJE

# Inicijacija sinteze proteina



Kod eukariota, inicijacija translacije uključuje nastajanje kompleksa koji čine metionin-tRNK<sup>Met</sup>, iRNK i ribozom



Tokom inicijacije translacije, za **5' kapu** iRNK koja se "prevodi" vezuje se **eIF4E** subjedinica eIF4 kapa vezujućeg kompleksa. **iRNK-eIF4** kompleks se udružuje sa kompleksom preinicijacije preko interakcije eIF4G subjedinice i **eIF3**, gradeći **inicijacioni kompleks**.

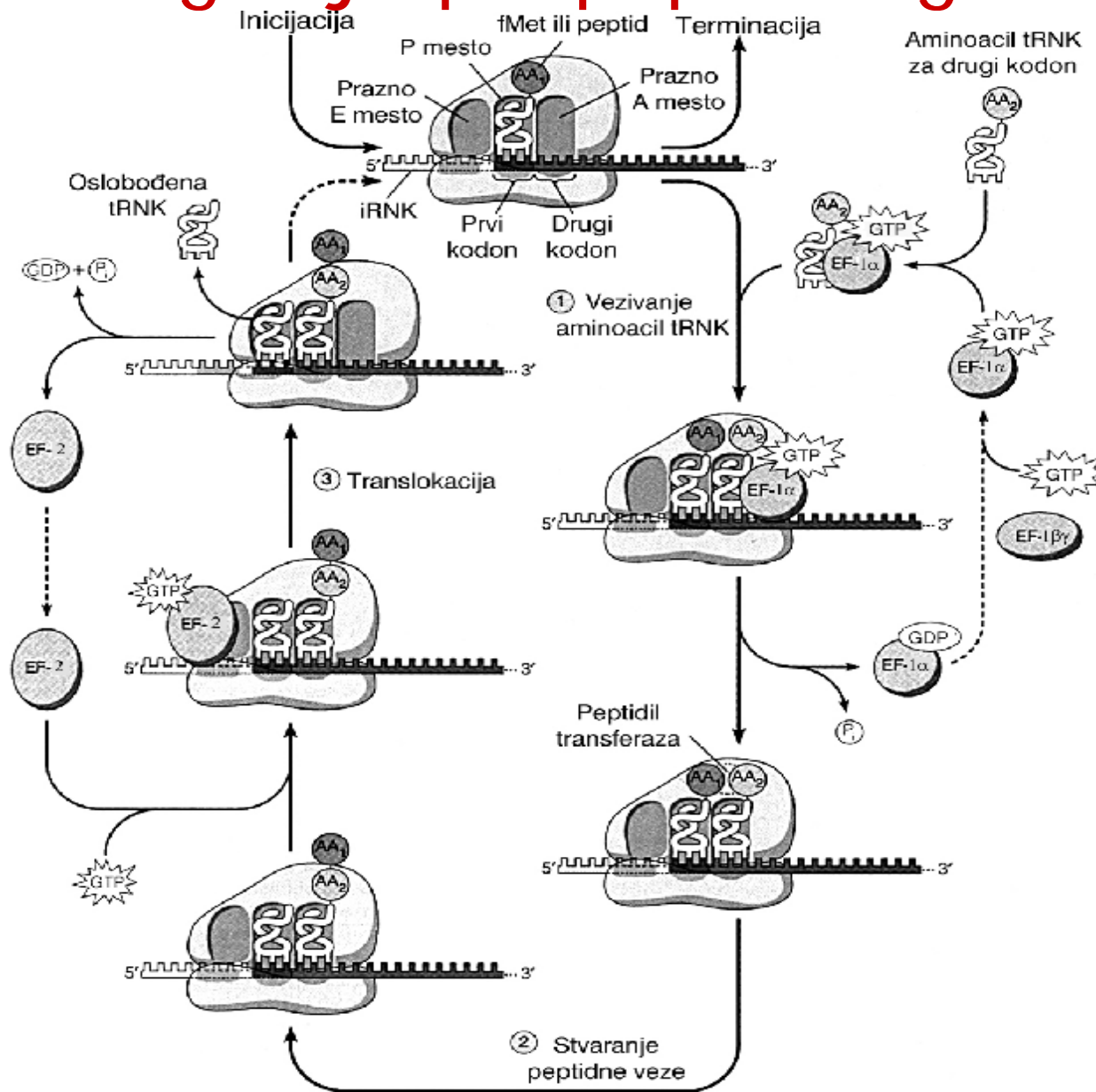
Inicijacioni kompleks "klizi" niz (**skenira**), **iRNK** dok **helikazna** aktivnost **eIF4A** koristi energiju hidrolize ATP-a da **rasplete sekundarnu strukturu iRNK**. Skeniranje prestaje kada **tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>** antikodon **prepozna start kodon**, koji je prvi AUG nishodno od 5' kraja u većini iRNK eukariota. Prepoznavanje start kodona dovodi do hidrolize GTP-a udruženog sa eIF2, ireverzibilan korak koji sprečava dalje skeniranje.

Prepoznavanje početnog AUG olakšavaju specifični nukleotidi koji ga okružuju tzv, **Kozak sekvenca** : (5) **ACCAUGG** (3). A koji prethodi AUG i G koji sledi neposredno iza su najvažniji nukleotidi koji određuju efikasnost inicijacije translacije.

Kada se **mala subjedinica** ribozoma sa vezanom tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> Met tačno **smesti na start kodon**, spaja se sa velikom (60S) ribozomalnom subjedinicom i nastaje 80S ribozom. Za ovo je potreban **eIF5** i hidroliza GTP-a koji je sa njim udružen. Spregnuta reakcija hidrolize GTP-a čini da je ovo ireverzibilan korak, tako da se subjedinice ribozoma ne razdvajaju sve dok se translacija celokupne iRNK i sinteza proteina ne završe.

Tokom elongacije lanca, rastući polipeptidni lanac ostaje vezan za tRNK na P mestu ribozoma.

# Elongacija polipeptidnog lanca



# POSTTRANSLACIONAL OBRADA PROTEINA