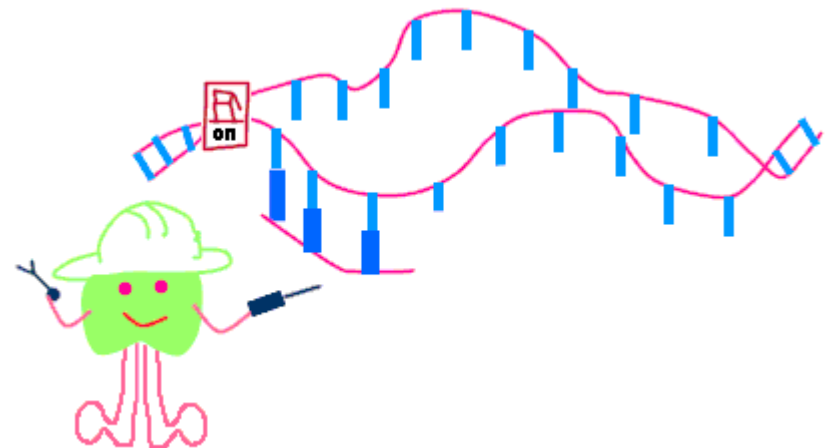


# SINTEZA RNK



## Genska ekspresija

---

Kako se jezik nukleotida prevodi u jezik proteina?

---

...ATCGACGCCCACATCTATCTTACTTCAGAGCATACGATG...  
...TAGCTGCGGGTGTAGATAGAATGAAGTCTCGTATGCTAC...



...IleAspAlaHisIleTyrLeuThrSerGluHisThrMet...

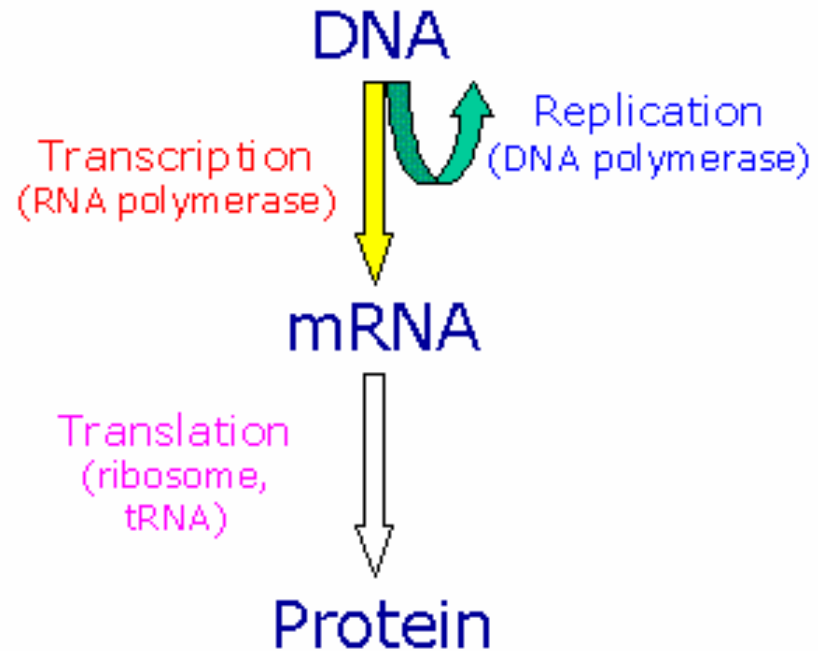


# Genska ekspresija

Francis Crick (1957) postavio Centralnu Dogmu

## Molekularne Biologije

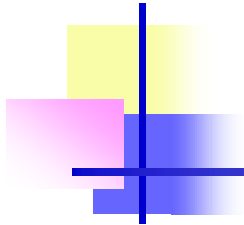
- ∅ Jednosmerni protok informacija
- ∅ Dvostepeni proces
- ∅ iRNK intermedijer



Ovaj proces se naziva genska ekspresija

# Geneska ekspresija

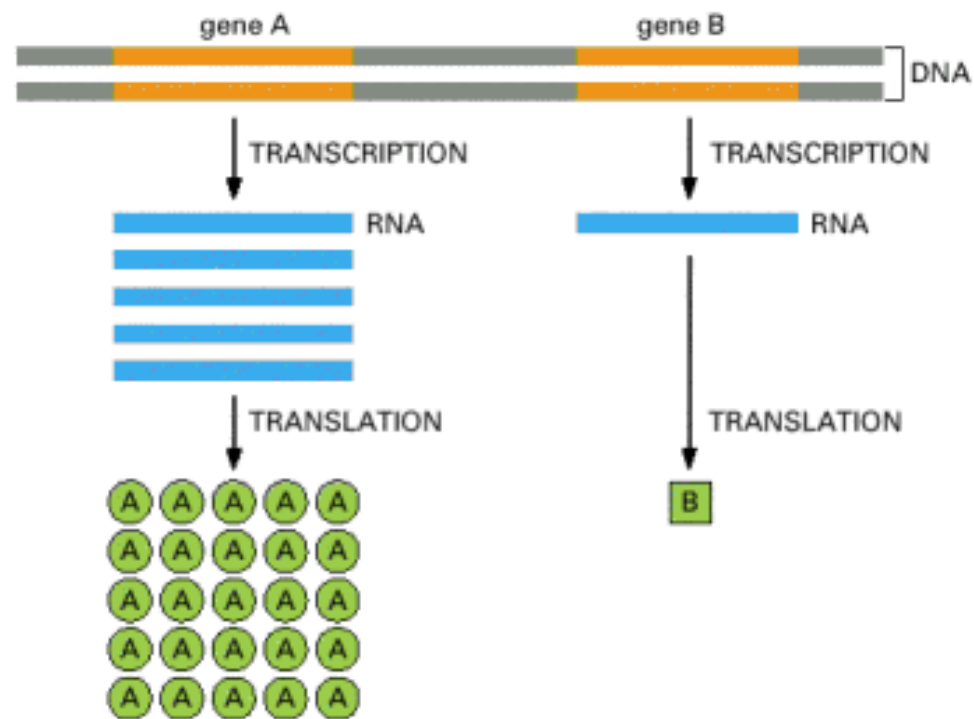
---



n **Transkripcija i translacija** su sredstva pomoću kojih ćelija čita ili eksprimira genetske instrukcije u svojim genima.

Mogu nastati brojne identične kopije RNK sa istog gena, a svaki RNK molekul može odrediti sintezu mnogih identičnih molekula proteina.

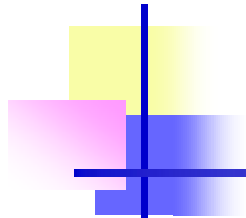
Ali svaki gen može biti transkribovan i preveden u protein sa različitom efikasnošću, omogućavajući da ćelija sintetiše velike količine jednih i male količine drugih proteina.



Geni mogu da se eksprimiraju sa različitom efikasnošću  
Gen A se više prepisuje od gena B. To obezbeđuje da protein A u  
ćeliji ima utoliko veću koncentraciju u odnosu na protein B.

# Transkripcija

---



- n Najveći broj gena u ćelijskoj DNK određuje sekvencu amino kiselina.

RNK molekuli koji se kopiraju sa ovih gena se nazivaju informaciona RNK (iRNK).

- n Manji broj gena kao finalni proizvod daje samu RNK.

# Transkripcija

---

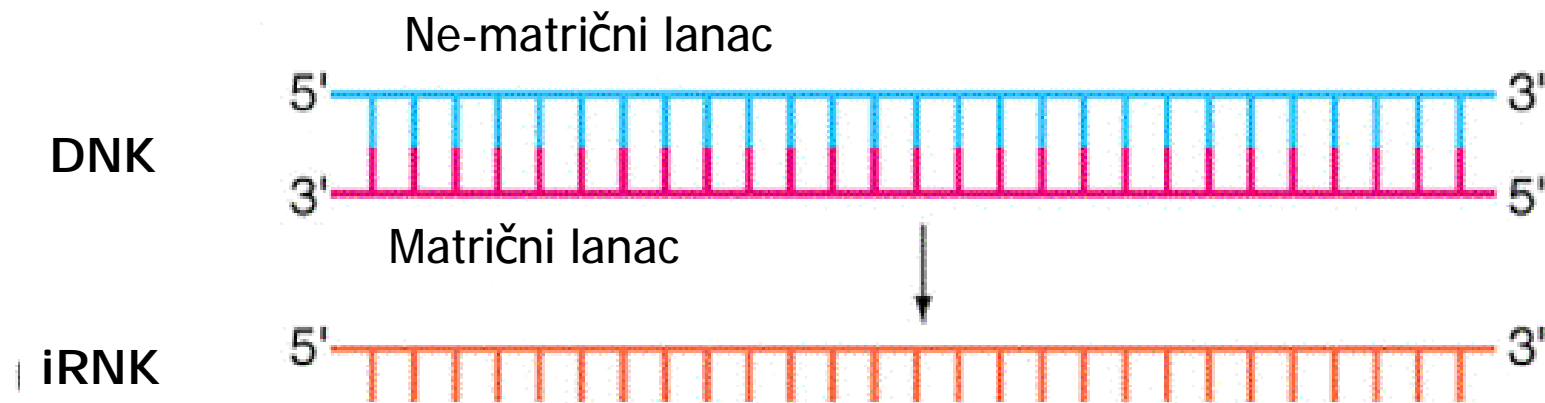
Tip RNK	Funkcija
iRNK	informaciona RNK, kodira proteine
rRNK	ribozomalna RNK, gradi osnovnu strukturu ribozoma i katališe sintezu proteina
tRNK	transportna RNK, uloga u sintezi proteina, adapter između iRNK i aminokiseline
snRNK	mala jedarna RNK ( <i>small nuclear RNA</i> ), učestvuje u brojnim procesima u jedru uključujući obradu isecanjem pre-iRNK
snoRNK	mala nukleolarna RNK ( <i>small nucleolar RNA</i> ), učestvuje u obradi i hemijskoj modifikaciji rRNK
Druge nekodirajuće RNK	Učestvuju u različitim ćelijskim procesima, uključujući sintezu telomera, inaktivaciju X hromozoma i transport proteina u ER

# Transkripcija

---

✓ Pojedini regioni DNK se kopiraju u iRNK

- ∅ iRNK je jednolančani molekul
- ∅ Jedan lanac DNK se čita: matrični lanac
- ∅ Drugi lanac liči na iRNK: ne-matrični lanac

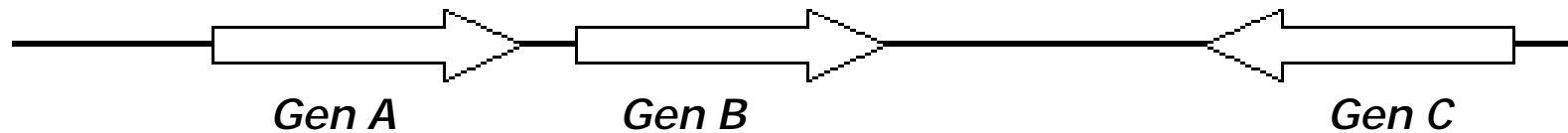
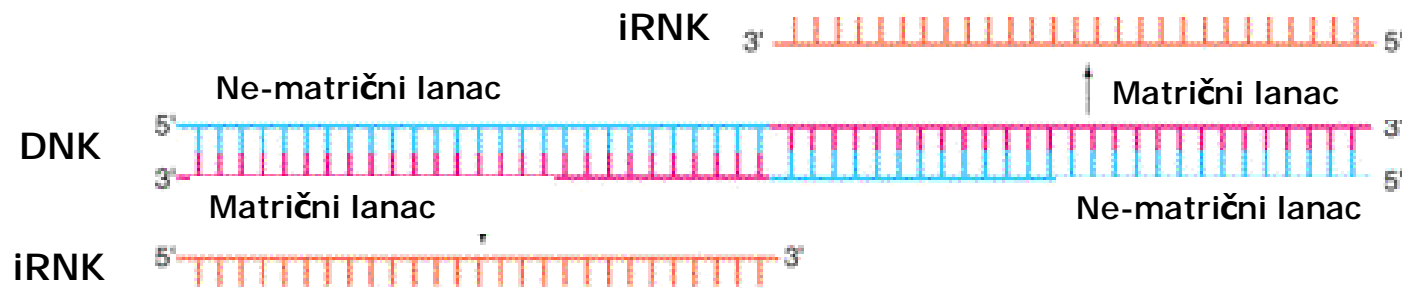




# Transkripcija

✓ Pojedini regioni DNK služe kao matrica za sintezu iRNK

∅ Matrični lanac može da bude "gornji" za jedan gen a "donji" za drugi gen

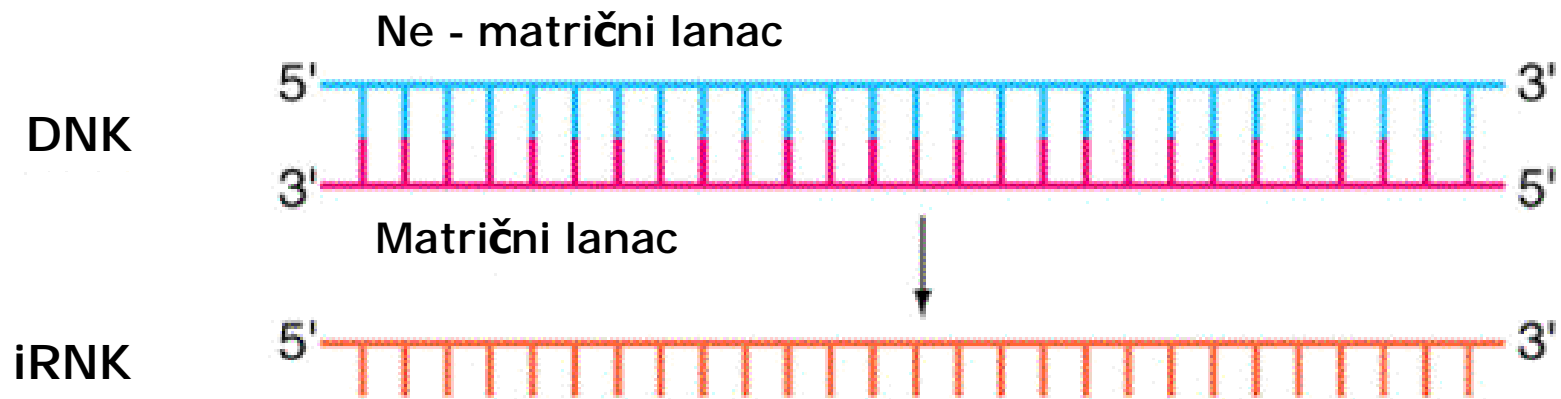


# Transkripcija

---

## ✓ Zašto se informacija sa DNK kopira na iRNK?

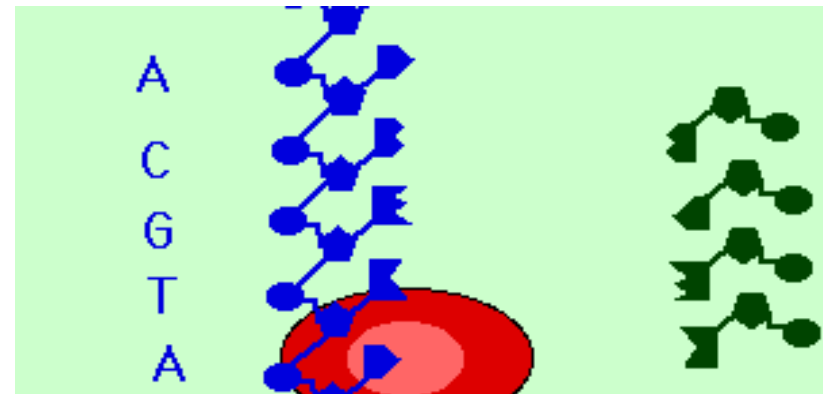
- ∅ Štiti se "glavna kopija" informacije
- ∅ Proizvodi se iRNK samo za specifične gene
- ∅ Proizvodi se iRNK samo kada je potrebna
- ∅ Nestabilnost iRNK omogućava regulaciju



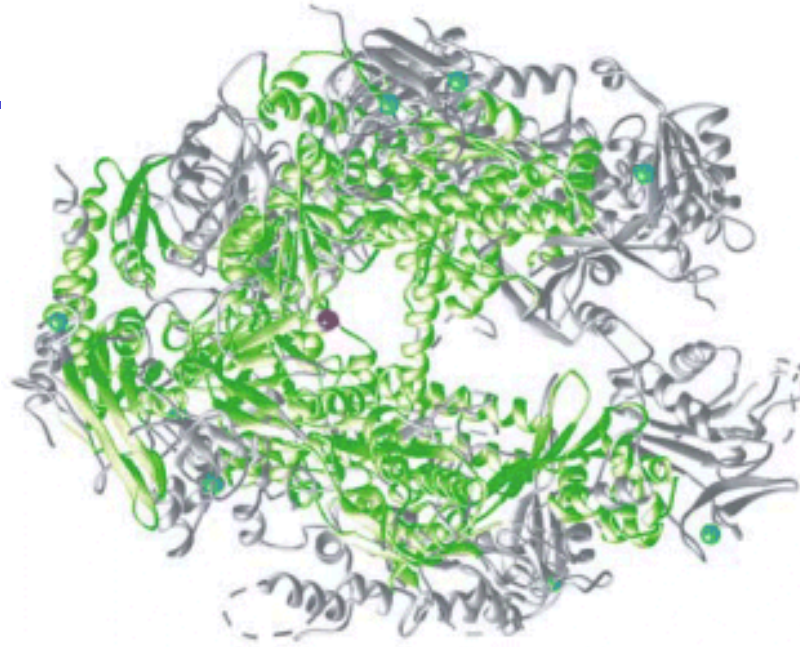
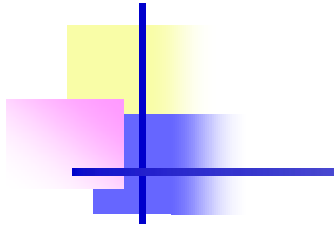
# Transkripcija

---

- n Enzim koji vrši transkripciju je **DNK zavisna RNK polimeraza (RNK polimeraza)**.
- n **RNK polimeraza** katališe stvaranje fosfodiesterne veze koja povezuje nukleotide u linearni lanac.
- ∅ RNK polimeraza eukariota:
  - o se sastoji od 12 subjedinica (u prokariota od 5).
  - o sadrži atome Zn koji čine strukturne komponente polimeraze i
  - o sadrži atome Mg koji su prisutni u aktivnom mestu gde se odigrava polimerizacija.



## Strukturna sličnost između bakterijske RNK poly u eukariotske RNK poly II



Slični regioni su označeni zelenom bojom

Dodatni regioni su sivi

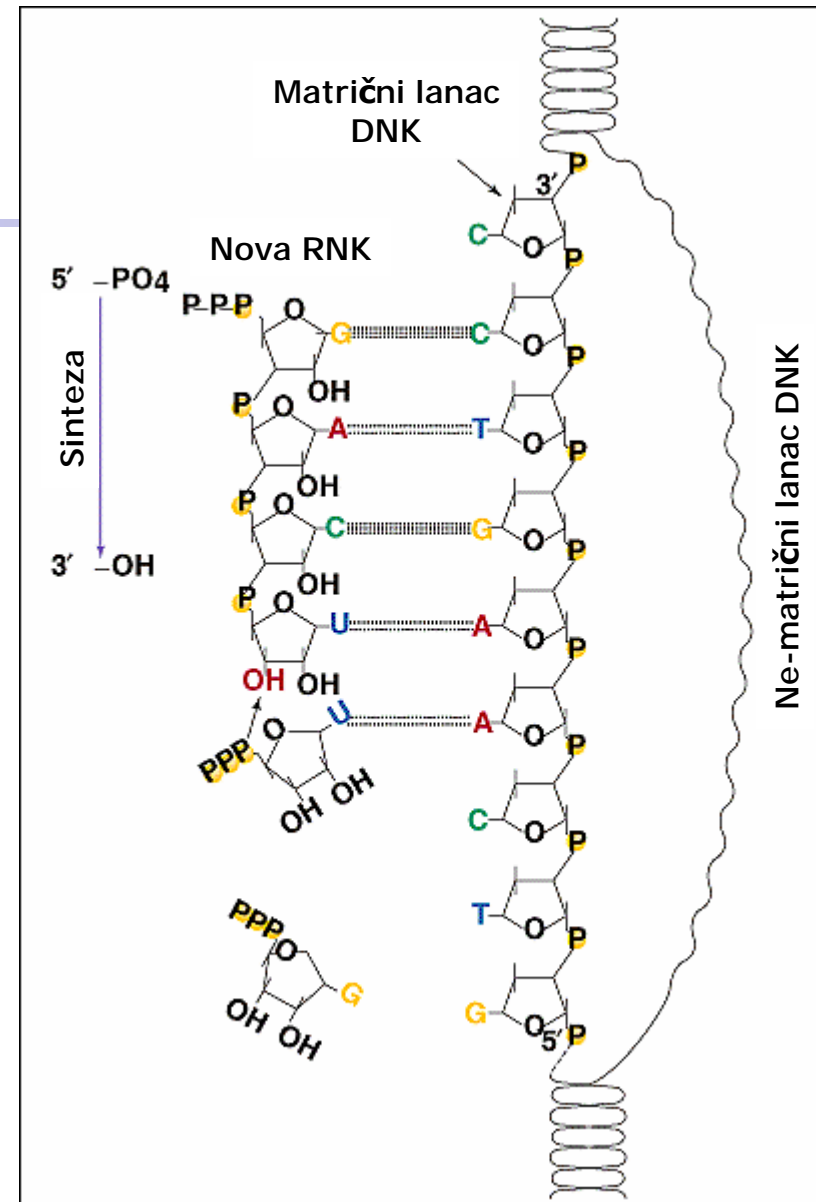
Plavo su atomi Zn

Crveno su joni Mg-deo aktivnog centra gde se dešava polimerizacija

Za razmotavanje DNK se ne troši energija-RNK poly i DNK-konformacione promene koje su energetski povoljne

# Transkripcija

- Ø Nukleozid 5' trifosfati se redaju komplementarno bazama na jednom lancu DNK.
- Ø Sinteza novog lanca RNK se odvija u 5' → 3' pravcu.
- Ø Supstrati za RNK polimerazu su nukleozid trifosfati (ATP, CTP, UTP i GTP)
- Ø Hidroliza visokoenergetskih veza obezbeđuje energiju neophodnu za odvijanje ove reakcije.





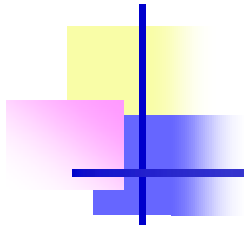
---

Jedina razlika između replikacije DNK i transkripcije jeste što za transkripciju **NIJE POTREBNA RNK POČETNICA.**

Oba procesa se odvijaju u 5' → 3' pravcu, zahtevaju prisustvo aktiviranih nukleotida uz jone Mg i Mn koji ih čine funkcionalnim

# Transkripcija

---



Transkripcija se odvija u tri faze:

Ø **inicijacija** (započinjanje) lanca

Ø **elongacija** (produžavanje) lanca

Ø **terminacija** (završetak) lanca.

Osnovni mehanizmi **elongacije** lanca u eukariota i prokariota su isti, dok se **inicijacija** i **terminacija** bitno razlikuju.





# Transkripcija u prokariota

## Inicijacija

IRNA <sub>lyt</sub>	CAACGTAAACACTTTACAGCGGCGCBTCATTTGATATGATGCGCCCCCTTCCCBATA
Slr	TGTATATTTCTTGACACCTTTTCGGCATCGCCCATAAATTCGGCTCCTCATATTGT
Spc	TTATTTTTTCTACCCATATCCTTGAAGCGGTGTATAAATGCCGCCTCCTCBATATGG
rmD <sub>1</sub>	CAAAAAAATACTTTGTGCAAAAAATTGGGATCCCATAAATGCCCTCCCTTGAGACGA
rmE <sub>1</sub>	CAATTTTTCTATTGGGCTCGGAGAACTCCCATAAATGCCCTCCCTCGACACGG
rmX <sub>1</sub>	CATTTTTTCCGCTTGTCTCTGAGCCGACTCCCATAAATGCCCTCCCTCGACACGG
rmD <sub>2</sub> E <sub>2</sub> X <sub>2</sub>	GAAATTCAGGTTGACTCTGAAGAGGAAAGCGATAATACGCCACCTCGCGACAGT
rmA <sub>1</sub>	TAAATTTCTCTTGTGAGCGGGAATAACTCCCATAAATGCCCACCTCGACACGG
rmA <sub>2</sub>	AAAAATAAATGCTTGACTCTGTAGCGGGAAGGCGATAATGCACACCTCGCGCGCTG
SV40	GCAATTGTTGTTGTTAACTTGTATTATTGCAGCTATAAATGGTTACAATAAAGCAA

Najčešće      TTGACA      (17-16p)      TATAAT

Većina faktora koji regulišu transkripciju gena vezuju se u blizini promotora ili na samom promotoru i na taj način utiču na inicijaciju transkripcije.

# Transkripcija u prokariota

---

## ✓ Inicijacija

---

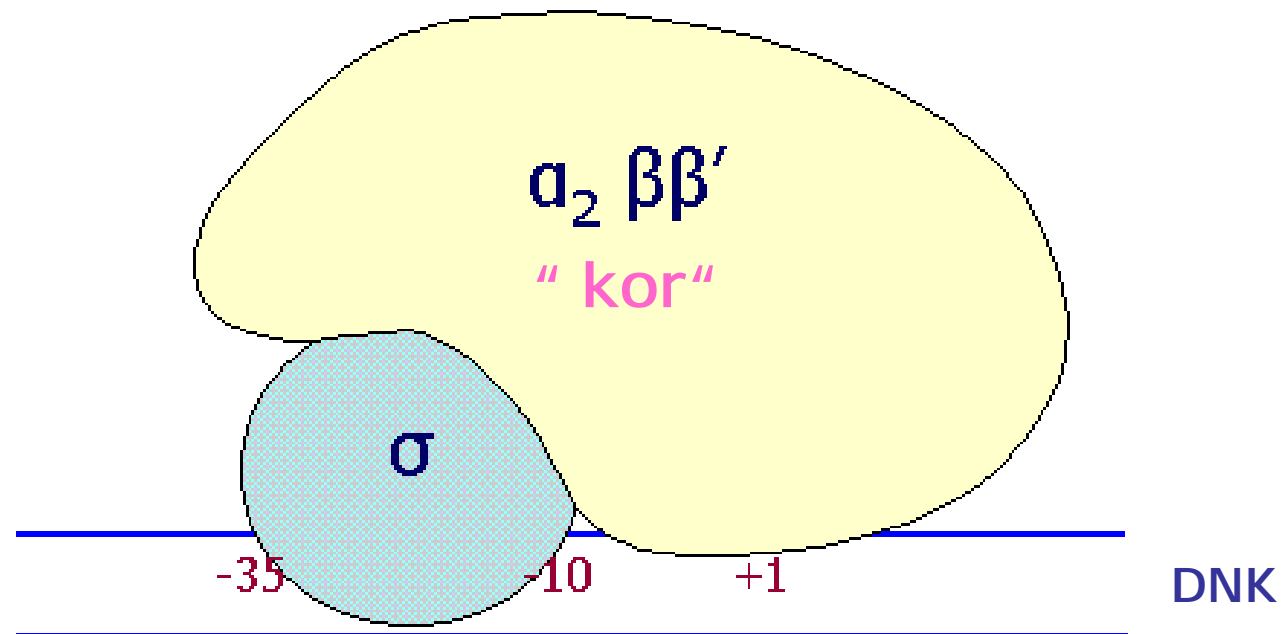
- Transkripcija je najdetaljnije proučena kod *E. coli* gde sva tri tipa RNK prepisuje samo jedna vrsta RNK-polimeraze.

# 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.



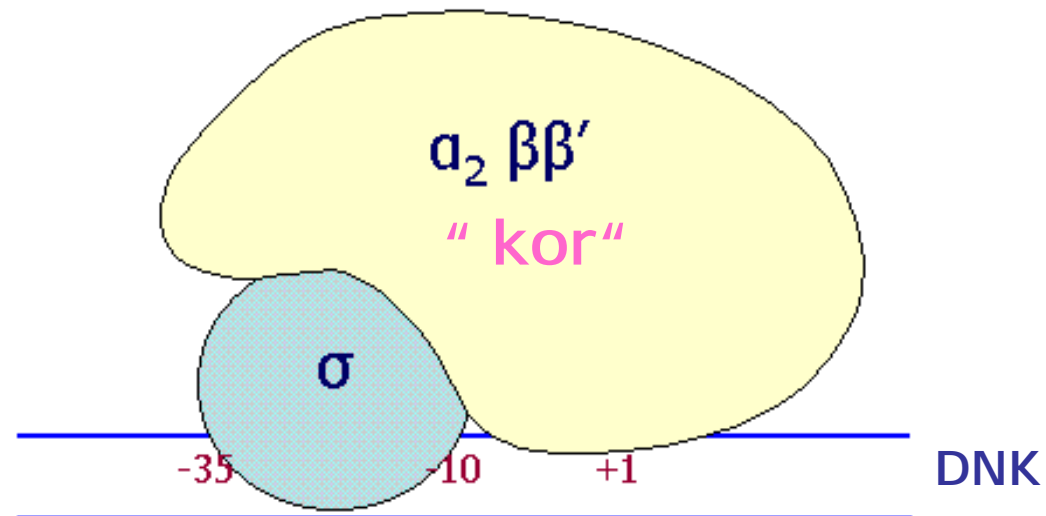
# Transkripcija u prokariota

---

## ✓ 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

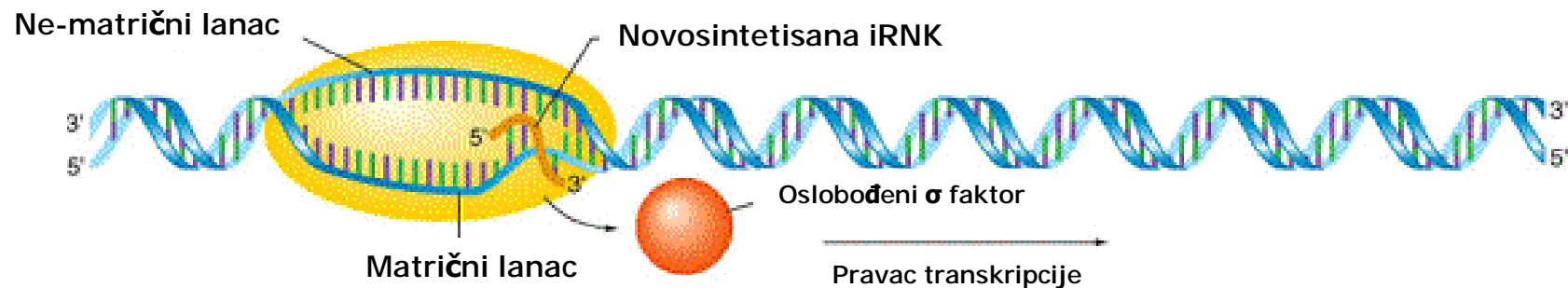
- Ø Rifampicin se vezuje za **b-subjedinicu**, kada se RNK polimeraza nalazi u obliku holoenzima.
- Ø Vezivanjem za b-subjedinicu holoenzima **rifampicin specifično inhibira inicijaciju** transkripcije RNK.
- Ø Rifampicin **nema uticaja** na nuklearnu RNK eukariota.



# Transkripcija u prokariota

## ✓ Elongacija

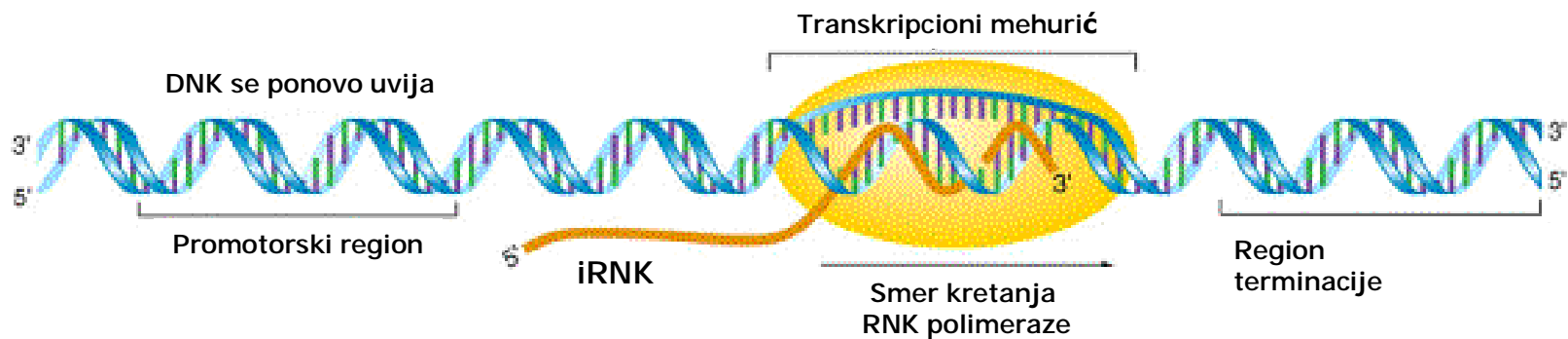
- Ø RNK polimeraza otvara transkripcioni mehurić
- Ø Započinje transkripcija matričnog lanca (bez početnice)
- Ø iRNK se sintetiše u 5' ® 3' smeru
- Ø Oslobađa se sigma subjedinica (pošto se u molekul RNK veže oko 10 NT)
- Ø Uloga sigma subjedinice- prepoznavanje i vezivanje RNK poly za korektno mesto inicijacije sinteze RNK lanca



# Transkripcija u prokariota

## ✓ Elongacija

- ∅ Samo kratki delovi iRNK su preko baza spojeni sa DNK
- ∅ Iza RNK polimeraze se ponovo formira heliks



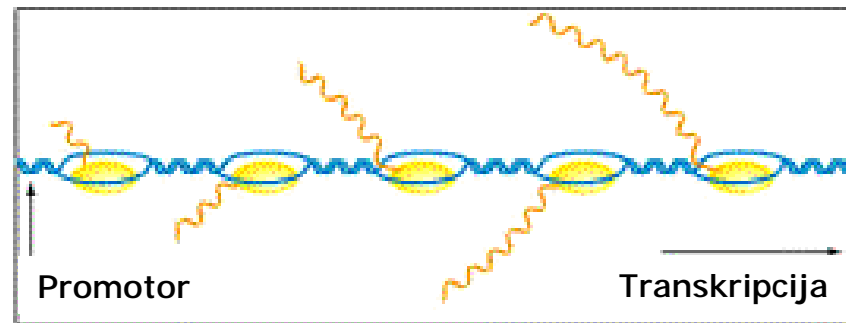
# Transkripcija u prokariota

---

## ✓ Elongacija

---

- ∅ Druga polimeraza može inicirati transkripciju čim se oslobodi promotor

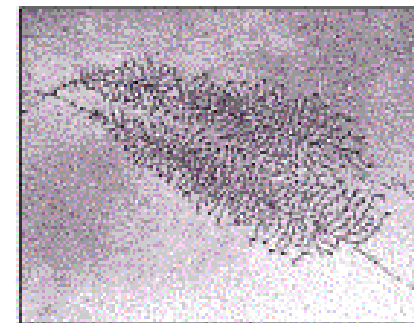
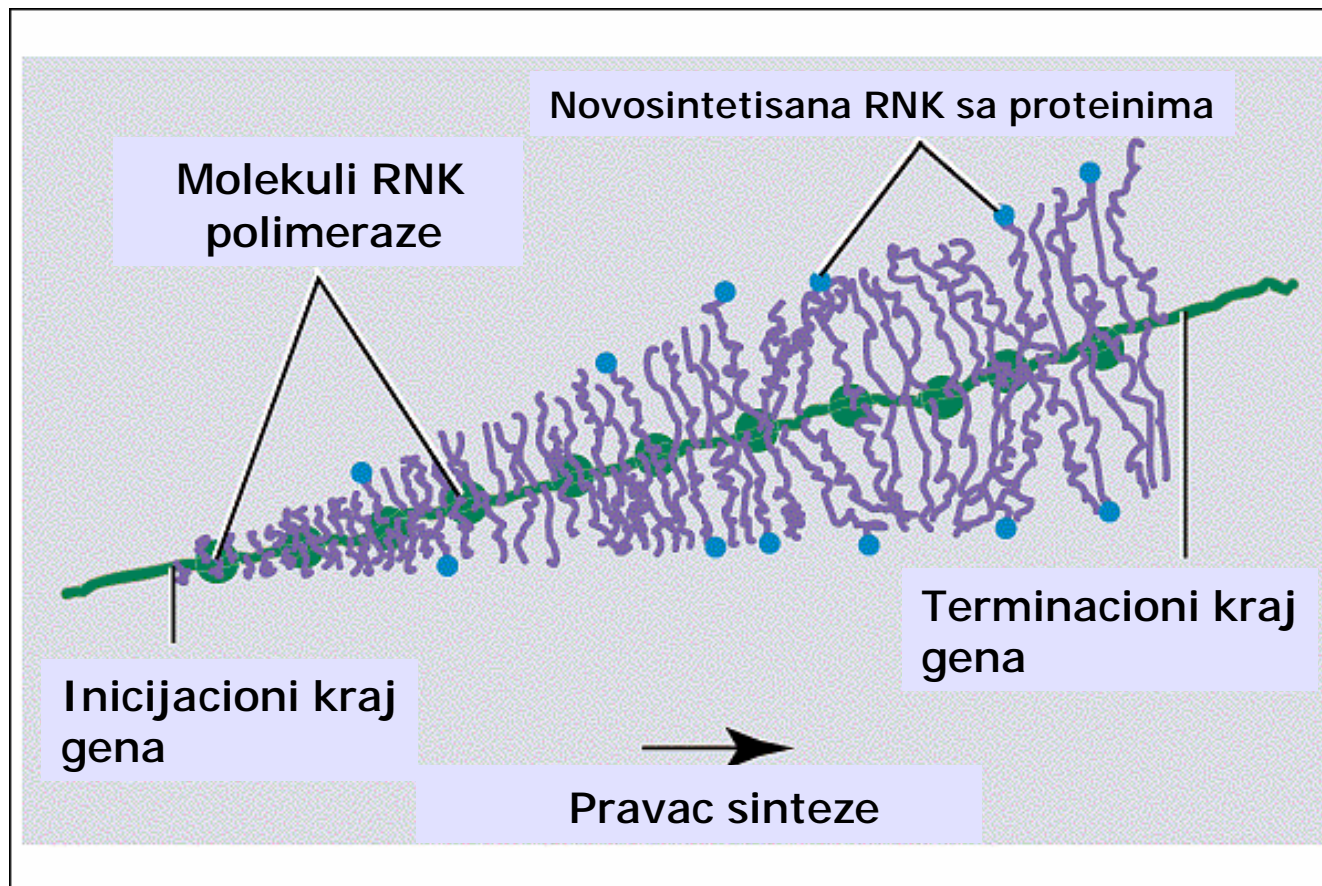




# Transkripcija prokariota

## ✓ Elongacija

- ∅ Druga polimeraza može inicirati transkripciju čim se oslobodi promotor



# Transkripcija u eukariota

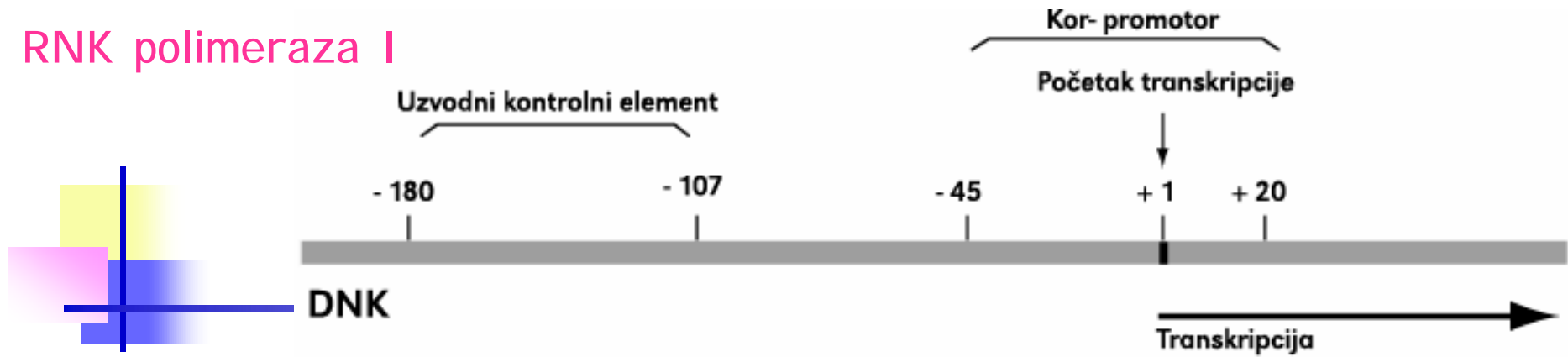
---

## ✓ Klase RNK polimeraze

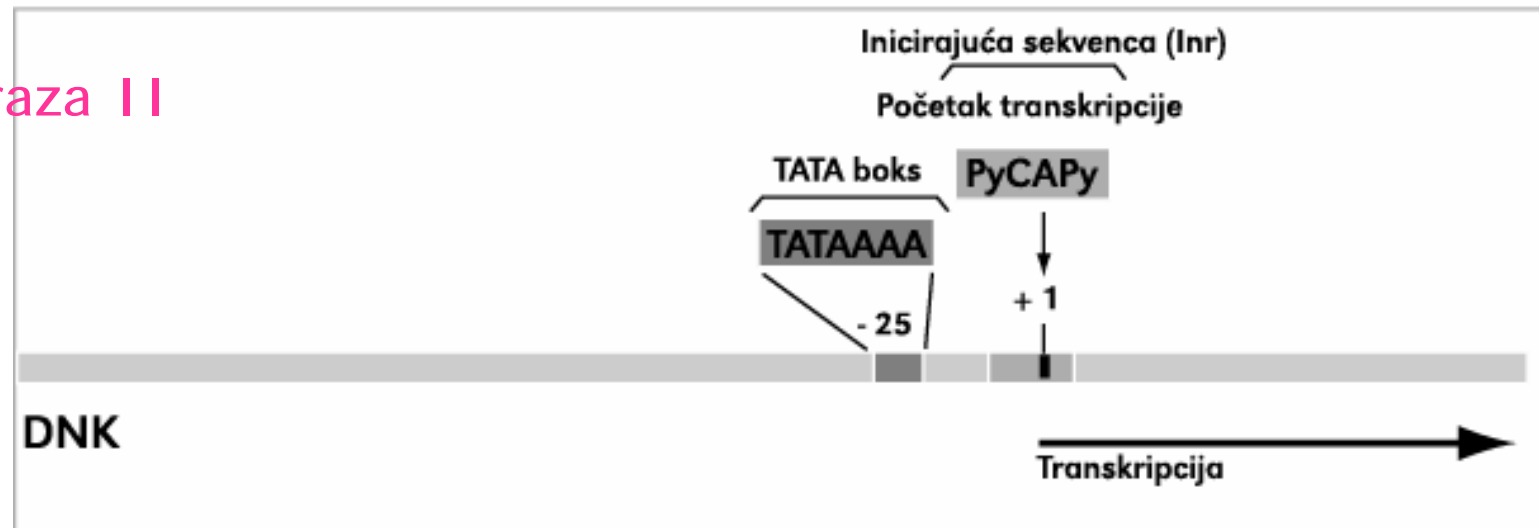
nKlasa enzima	Osetljivost prema $\alpha$ -amanitinu	Proizvodi	Subcelularna lokalizacija
RNK-polimeraza I	Neosetljiva	45S RNK	Nukleolus
RNK-polimeraza II	Osetljiva na nisku koncentraciju	hnRNK (iRNK)	Nukleoplazma
RNK-polimeraza III	Osetljiva na visoku koncentraciju	tRNK, 5S RNK, 7S RNK	Nukleoplazma

Specifičan inhibitor eukariotske nukleoplazmatske RNK polimeraze II

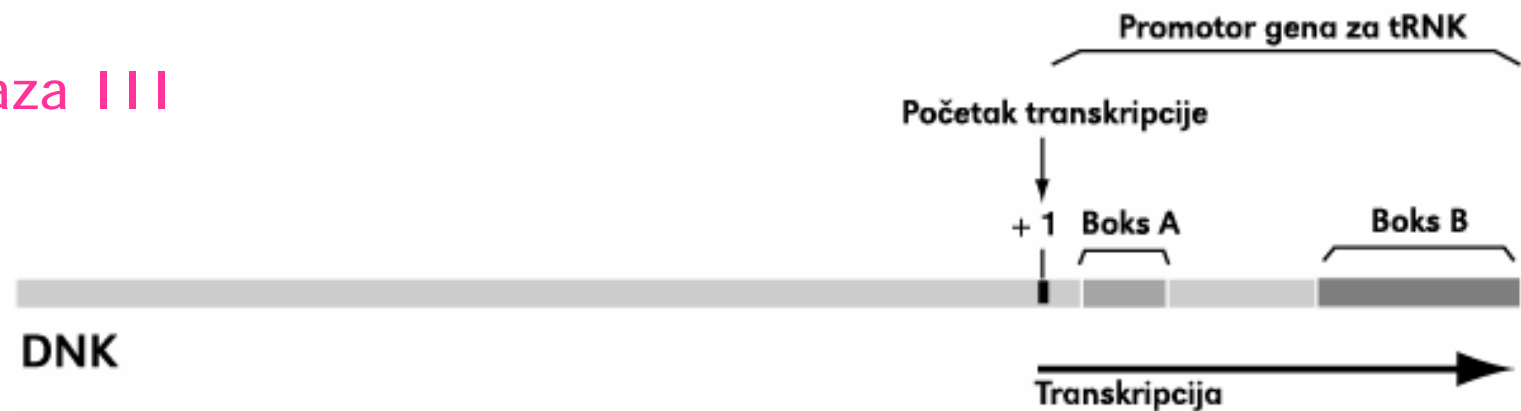
## RNK polimeraza I



## RNK polimeraza II



## RNK polimeraza III



# Transkripcija u eukariota

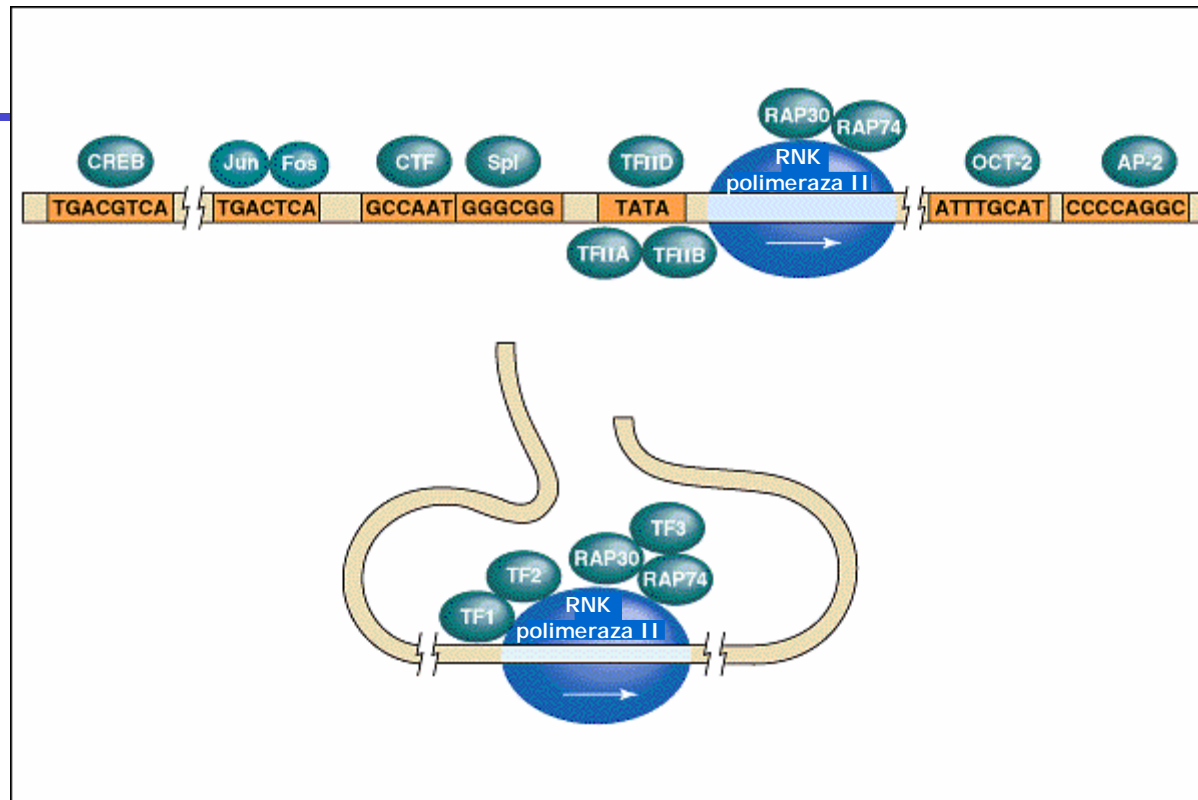
---

## ✓ RNK polimeraza

- Ø RNK polimeraza eukariota, za razliku od RNK polimeraze prokariota, ne može da inicira transkripciju *in vitro*, već su potrebni dodatni proteini koji se nazivaju bazalni (osnovni) transkripcioni faktori.
- Ø Inicijacija transkripcije u eukariota mora rešiti problem pakovanja DNK u nukleosome.
- Ø Bazalni transkripcioni faktori:
  1. pomažu postavljanje RNK polimeraze na promotor
  2. doprinose razdvajanju dva lanca DNK
  3. oslobađaju RNK polimerazu sa promotora u elongacionom modu, kada transkripcija počne.

# Transkripcija u eukariota

## ✓ Interakcija bazalnih transkripcionih faktora sa promotorom

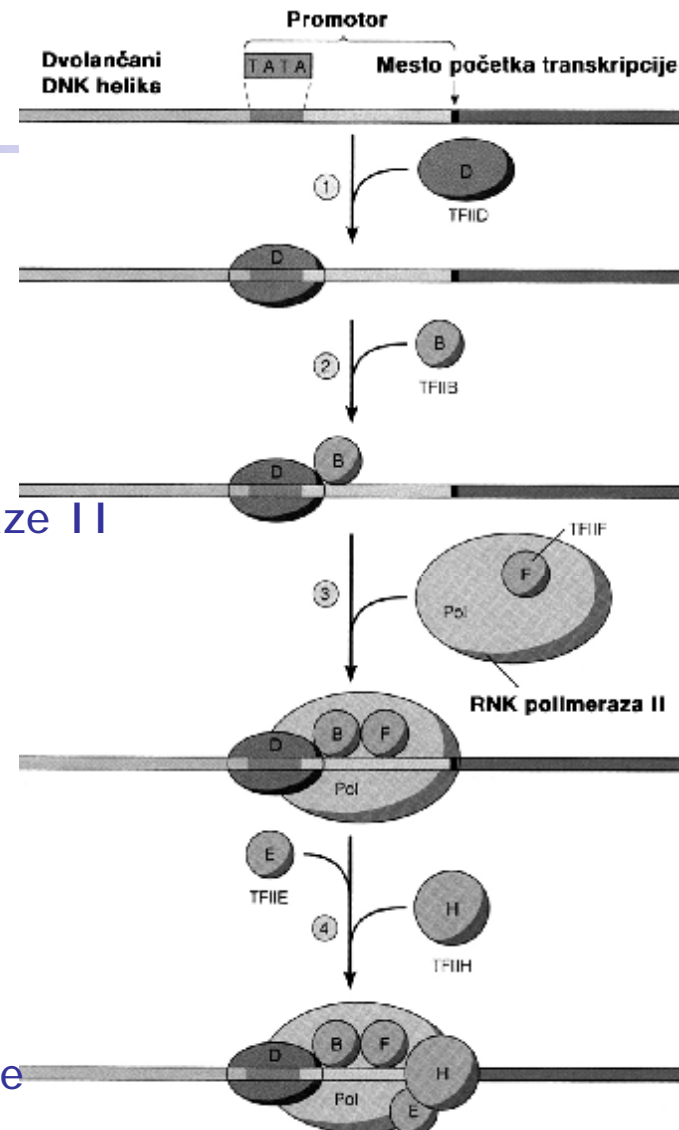


- ∅ TATA boks je konsenzus sekvenca u promotoru koju prepoznaje faktor TFIID (sastoji se od TATA vezujućeg proteina (TBP) i TBP vezujućeg faktora).
- ∅ Nalazi se 25 nukleotida uzvodno od mesta početka transkripcije.

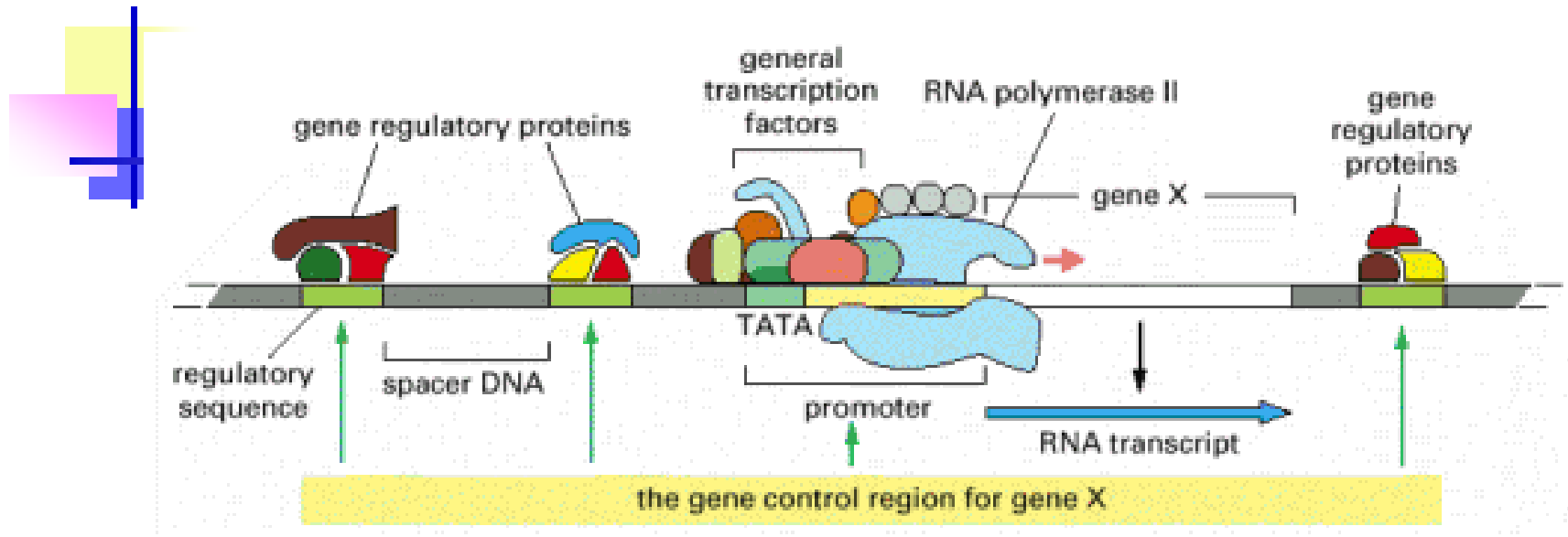
# Transkripcija u eukariota

## ✓ Interakcija bazalnih transkripcionih faktora sa promotorom

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



## Kontrolni region tipičnog gena eukariota



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

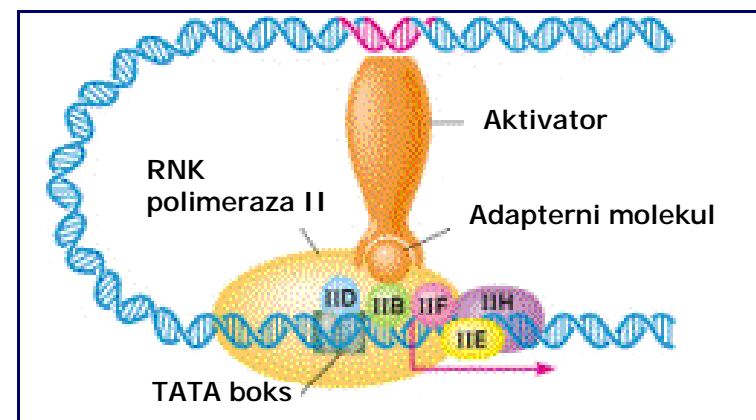
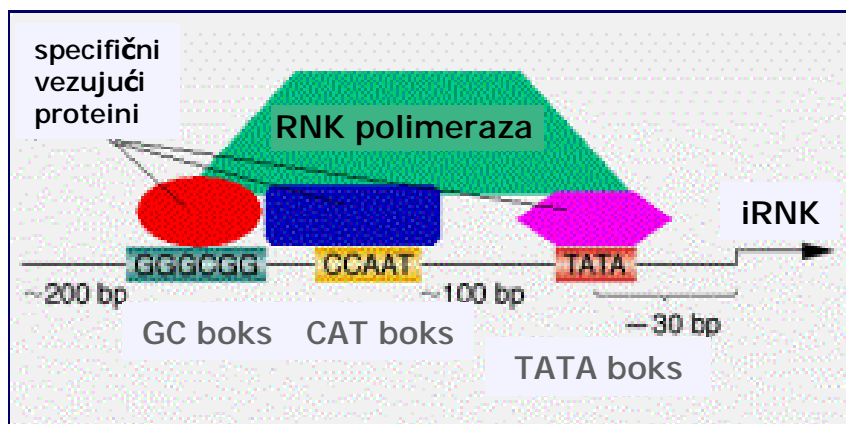
Regulatorna sekvenca služi kao vezno mesto za regulatorni protein gena, čije prisustvo na DNK utiče na brzinu inicijacije transkripcije. Ove sekvence mogu da budu smeštene odmah uz promotor, daleko uzvodno od njega ili unutar introna ili nizvodno od samog gena.

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.

# Transkripcija u eukariota

## ✓ Inicijacija

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





# Transkripcija u eukariota

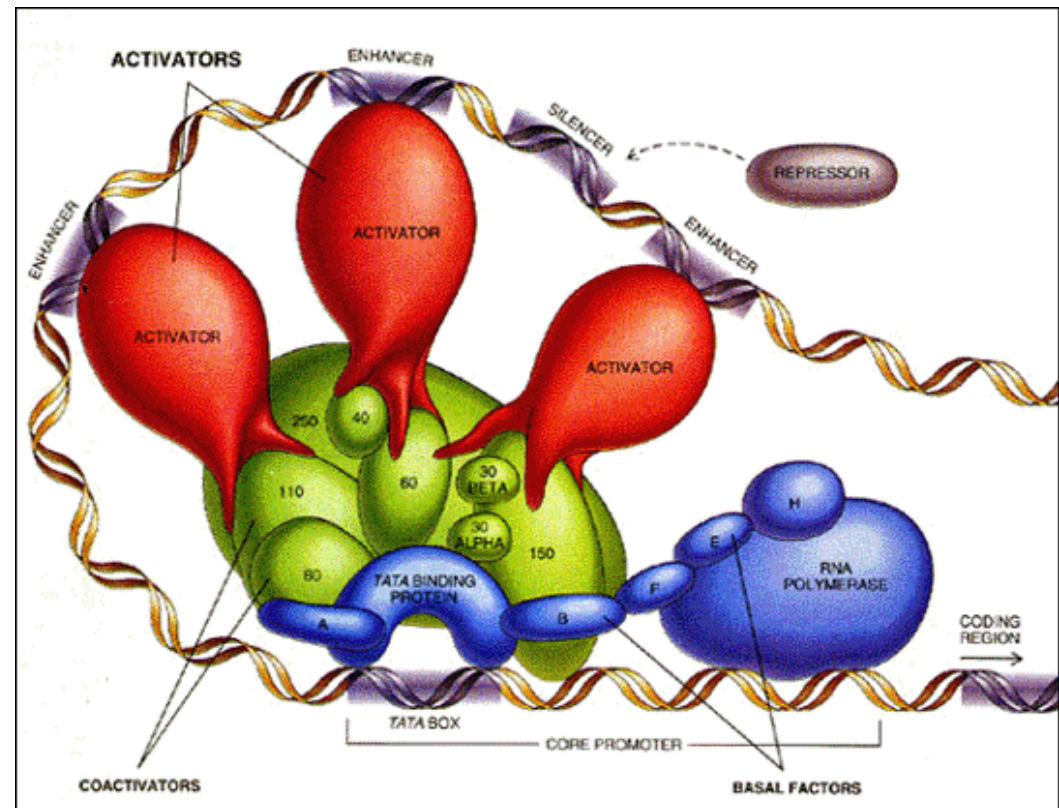
## ✓ Inicijacija

### Pojačivači

Gen specifične sekvence, dužine 10-20 NT koji stimulišu transkripciju kod eukariota, bilo da su lokalizovani na početku ili na kraju gena ali moraju biti na istom lancu na kome se nalazi i odgovarajući gen.

Za razliku od promotora, pojačivači su funkcionalni i na velikim udaljenostima od mesta početka transkripcije (do 50 000bp).- omogućeno postojanjem DNK petlje.

Stimulacija transkripcije se ostvaruje vezivanjem za transkripcione faktore.



# Transkripcija u eukariota

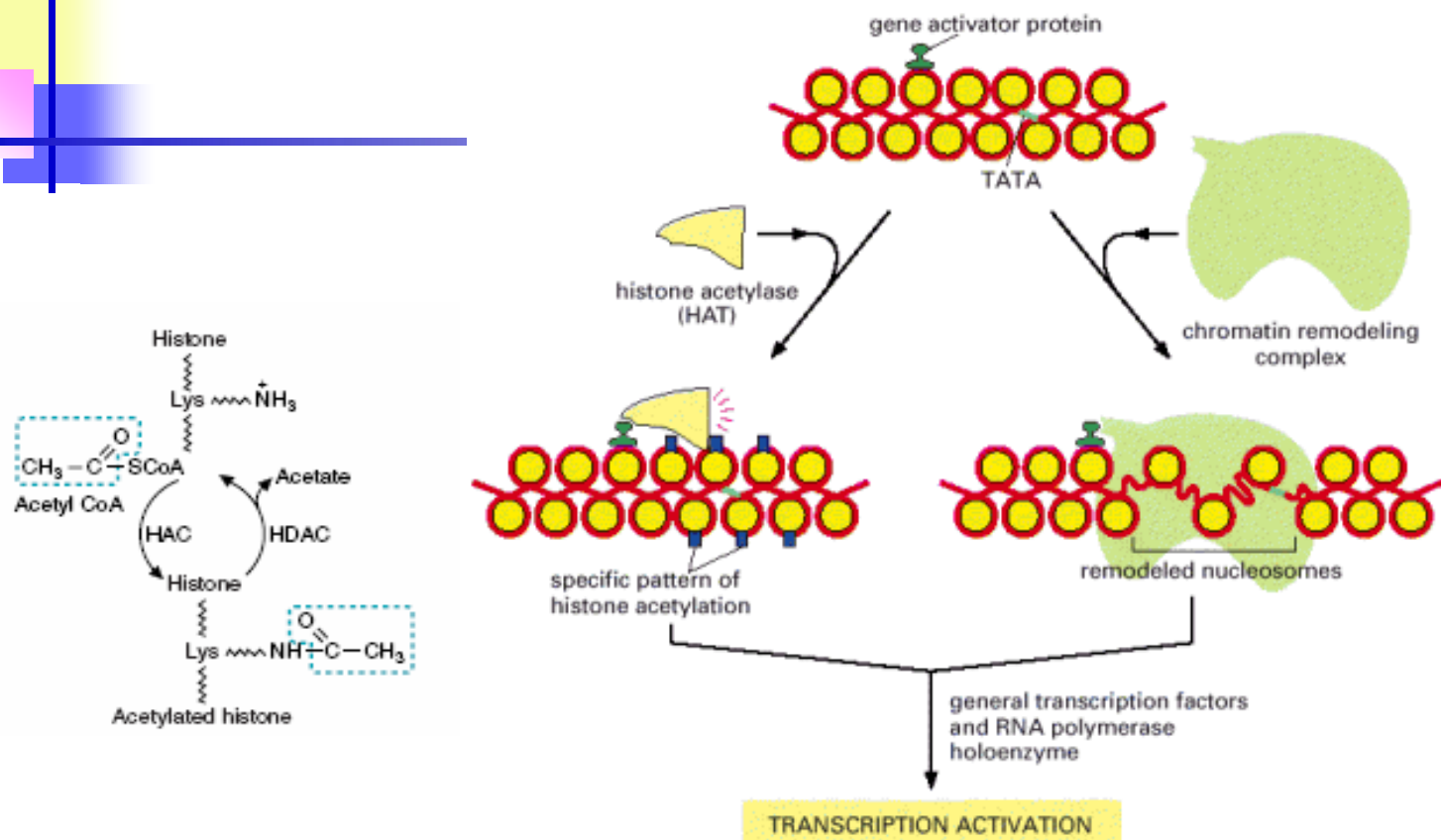
---

## ✓ Elongacija

---

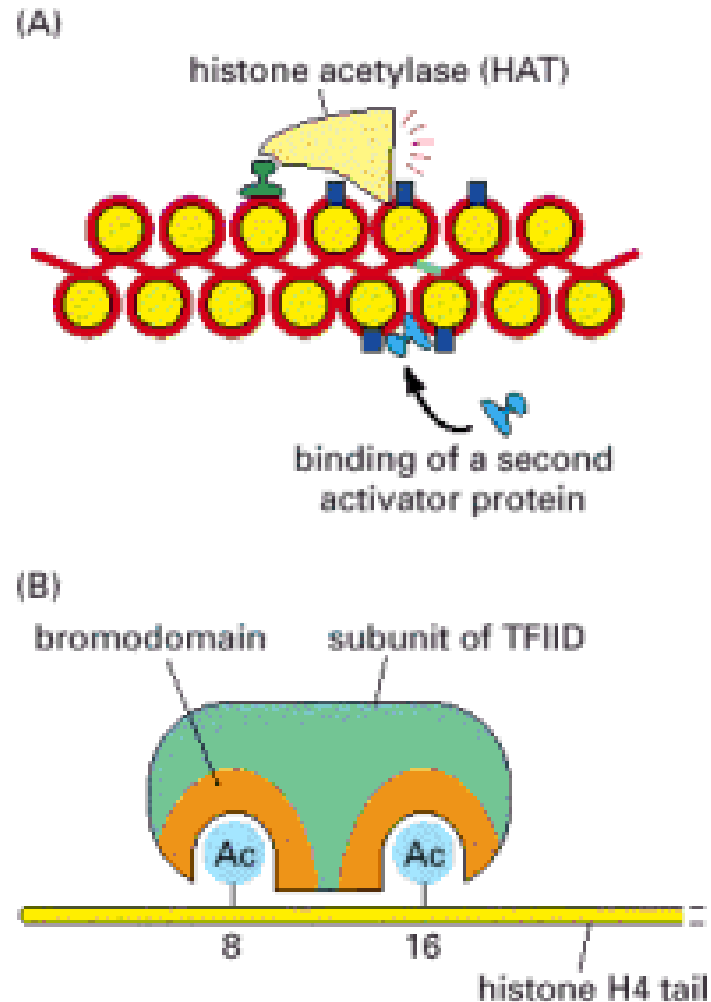
- ∅ U toku elongacije za RNK polimerazu su vezani elongacioni faktori-proteini koji sprečavaju da RNK polimeraza disosuje pre nego što dostigne kraj gena.
- ∅ Kompleksi za remodelovanje hromatina pomažu u kretanju RNK polimeraze kroz nukleosome (i drugi elongacioni faktori verovatno učestvuju u ovom procesu).
- ∅ Problem stvaranja supernavoja u eukariota prevazilaze topoizomeraze a u prokariota posebne topoizomeraze DNK giraze koje stvaraju negativne supernavoje ispred mesta početka transkripcije.

# 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.

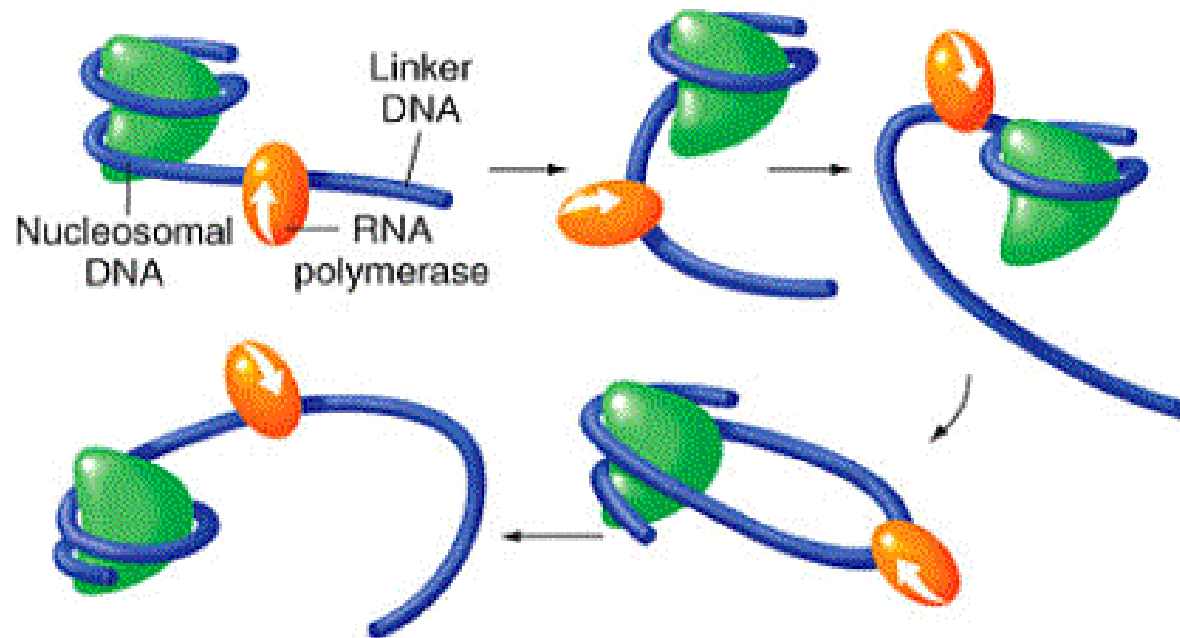
Različiti oblici acetilacije H4 su vezano za transkripciono aktivne regione hromatina.

# Transkripcija

---

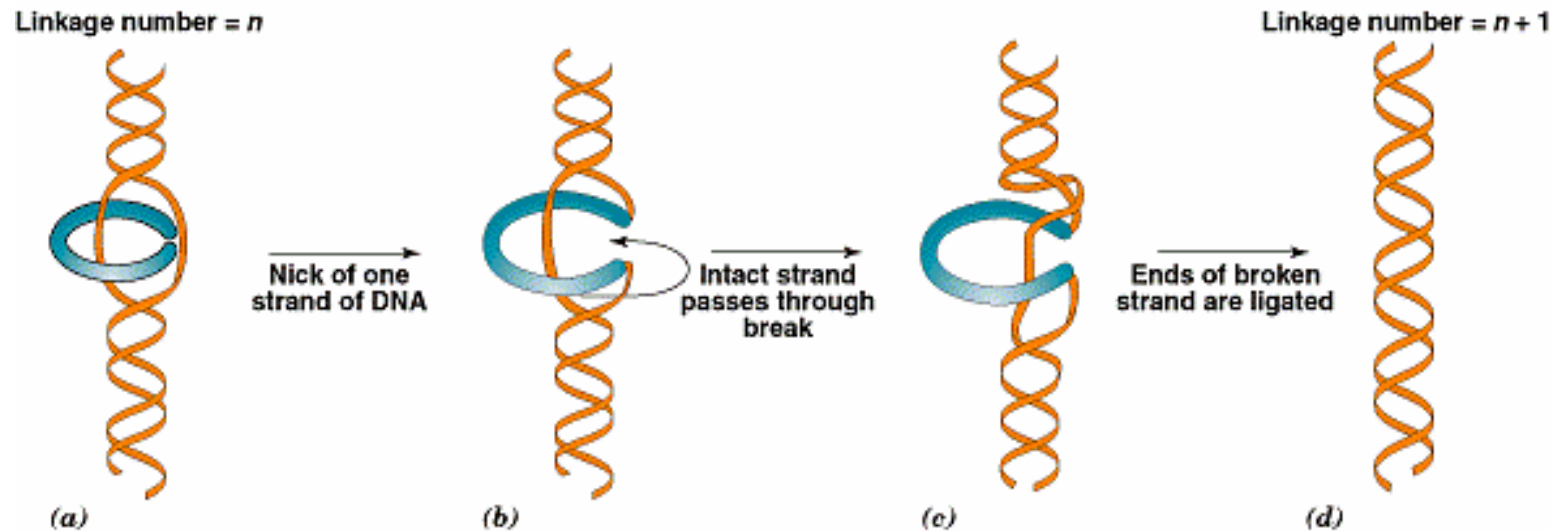
Ø Hromatin mora da bude de-kondenzovan

§ Nukleozomi se ne odvijaju potpuno



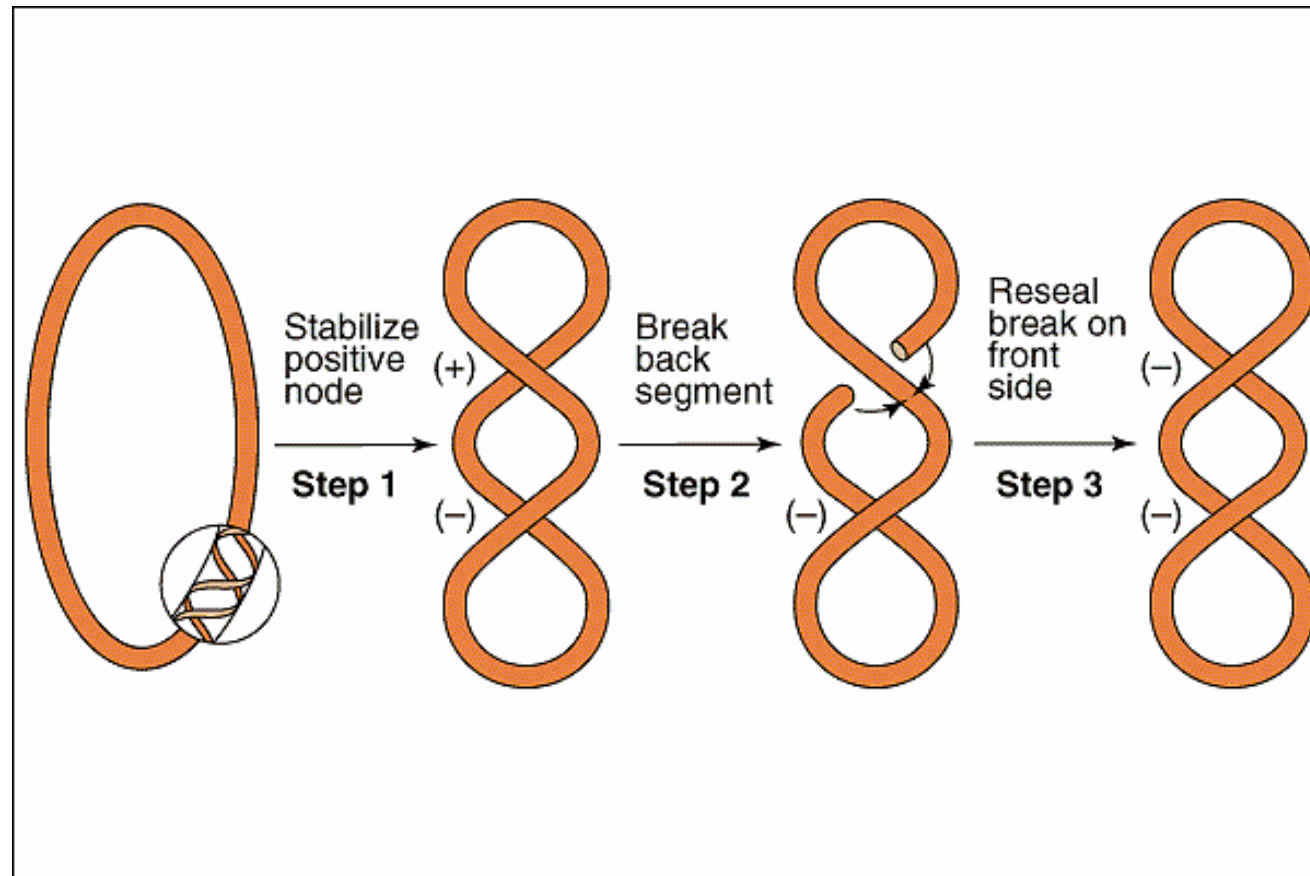
# Transkripcija – problem uvijanja dvostrukog heliksa

## Topoizomeraza I



# Transkripcija - problem uvijanja dvostrukog heliksa

## Topoizomeraza II



# Transkripcija u prokariota

---

## ▼ Terminacija

Postoje dva načina terminacije:

- ▼ terminacija zavisna samo od DNK-sekvence -  $\rho$  faktor nezavisna
- ▼ terminacija pomoću proteina terminacije -  $\rho$  faktor zavisna

### Ø $\rho$ faktor zavisna terminacija.

- Pojedine sekvence imaju ulogu terminacionih sekvenci samo u prisustvu  $\rho$  faktora.

-  $\rho$  protein je heksamer molekulske mase 200.000.

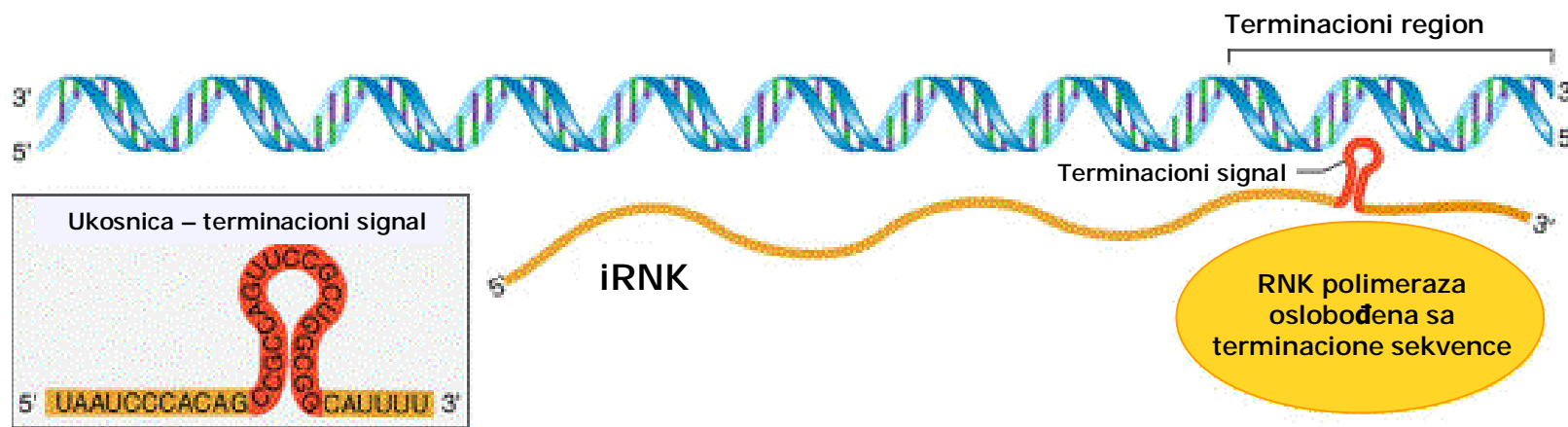
- Vezuje se za molekul RNK, i kreće prema molekulu RNK polimeraze, koja se zaustavlja na nekom terminacijskom mestu, istiskuje je sa 3' OH kraja RNK i oslobađa primarni transkript. Pri ovome se hidrolizuje jedan molekul ATP-a.



# Transkripcija u prokariota

## ✓ Terminacija - $\rho$ faktor nezavisna terminacija

- ∅ Terminaciona sekvenca u matričnom lancu DNK signalizira završetak sinteze molekula RNK.
- ∅ Ispred mesta terminacije postoji sekvenca bogata citozinom i guaninom - palindrom sekvenca, koja sadrži međusobno komplementarne regione, dolazi do savijanja RNK molekula i formiranja petlje u obliku ukosnice.
- ∅ RNK polimeraza se zaustavlja i ponovo se formira DNK heliks



# Transkripcija u eukariota

## ✓ Terminacija-

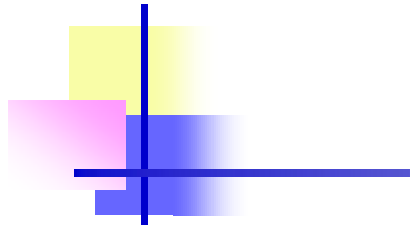
---

Terminacija transkripcije kod eukariota obuhvata odvajanje novonastalnog primarnog RNK transkripta uz adiciju Adeninskih nukleotida na 3' kraj transkripta.

Ova poliadenilacija je potpuno nezavisna od matrice DNK sa koje se prepisuje primarni transkript RNK.

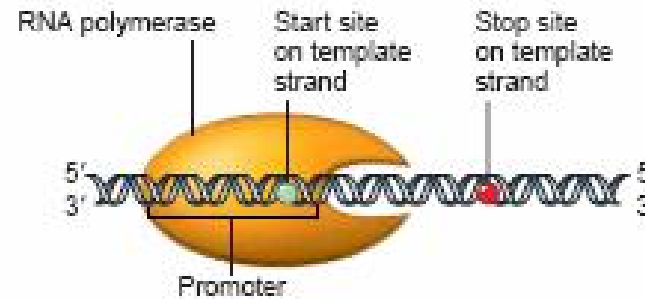
Slično prokariotama, postoji tzv unutrašnja (Intrinsic) terminacija (Rho-nezavisna) pri čemu iRNK sadrži sekvence bogate C-G parovima (7-20 bp), koje formiraju petlju. Ovu stabilnu petlju (trustruke H-veze između C-G) prati segment bogat uracilom pri čemu su novoformirane veze između uracila i adenina slabe.

Vezivanje RNK poly za petlju je sinhronizovano sa transkripcijom poli-uracil sekvence, tako da slabe Adenin-Uracil veze destabilizuju RNA-DNA dupleks, i dovode do odvajanja RNK poly.

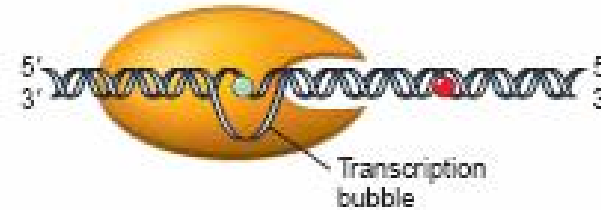


## INITIATION

- 1** Polymerase binds to promoter sequence in duplex DNA. "Closed complex"



- 2** Polymerase melts duplex DNA near transcription start site, forming a transcription bubble. "Open complex"

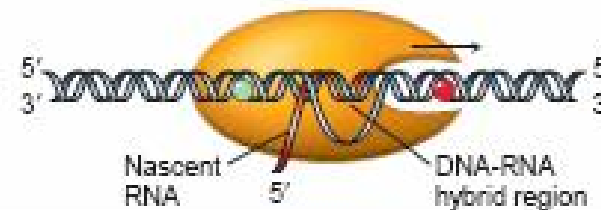


- 3** Polymerase catalyzes phosphodiester linkage of two initial rNTPs.



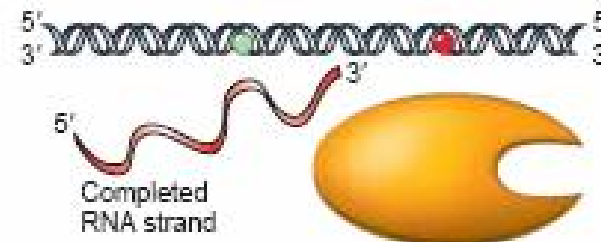
## ELONGATION

- 4** Polymerase advances 3' → 5' down template strand, melting duplex DNA and adding rNTPs to growing RNA.



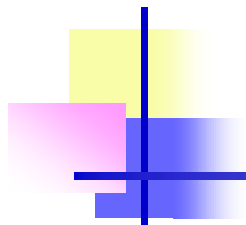
## TERMINATION

- 5** At transcription stop site, polymerase releases completed RNA and dissociates from DNA.



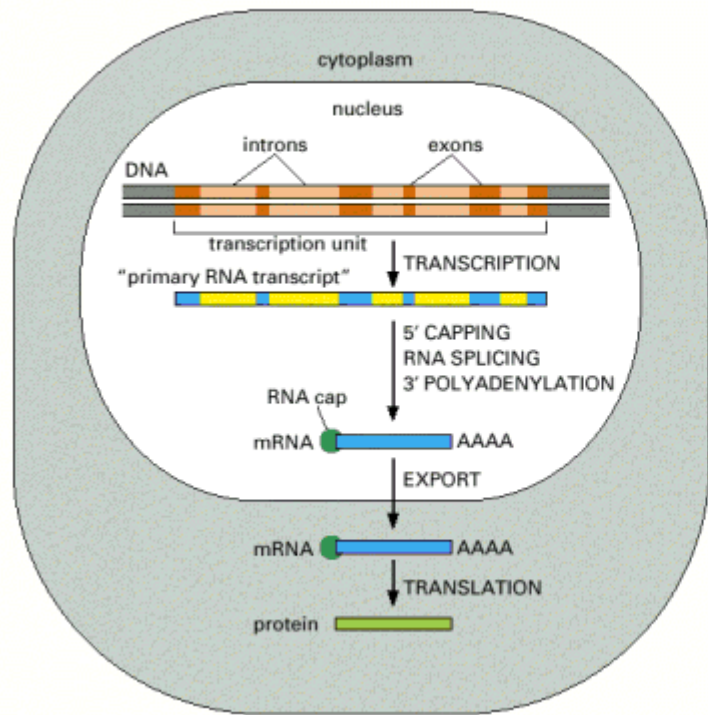
# Obrada RNK

---

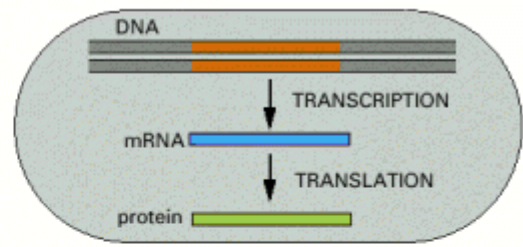


# Zbir svih događaja od gena do proteina u bakterijama i eukariotskim ćelijama

(A) EUCARYOTES



(B) PROCARYOTES



Konačni nivo proteina u ćeliji zavisi od efikasnosti svakog koraka i od brzine razgradnje RNK i samog molekula proteina.

(A) U eukariotskim ćelijama, RNK koje nastaju transkripcijom sadrže u introne i egzone. Pre daljeg translacije u protein, ovaj primarni transkript mora da se obradi, introni se uklanjaju enzimski katalisanim reakcijama RNK "spicing-a" i tako dobijena RNK se iznosi iz jedra u citoplazmu.

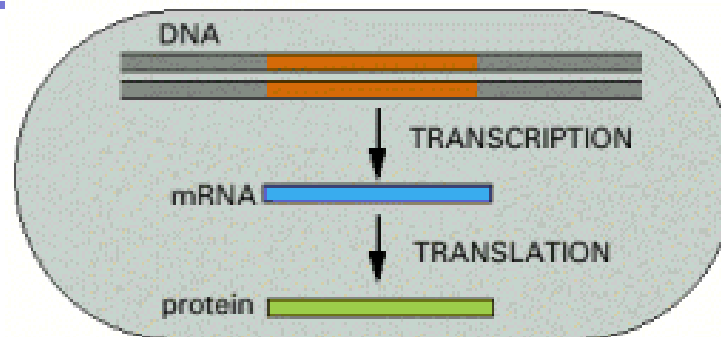
(B) U prokariotama, produkcija iRNK je mnogo jednostavnija. 5` kraj iRNK nastaje inicijacijom transkripcije samom RNK poly, a 3` kraj nastaje terminacijom transkripcije.

Kako prokariotske ćelije nemaju jedro, transkripcija i translacija se dešavaju u istom kompartmanu. Uglavnom translacija počinje po završetku transkripcije

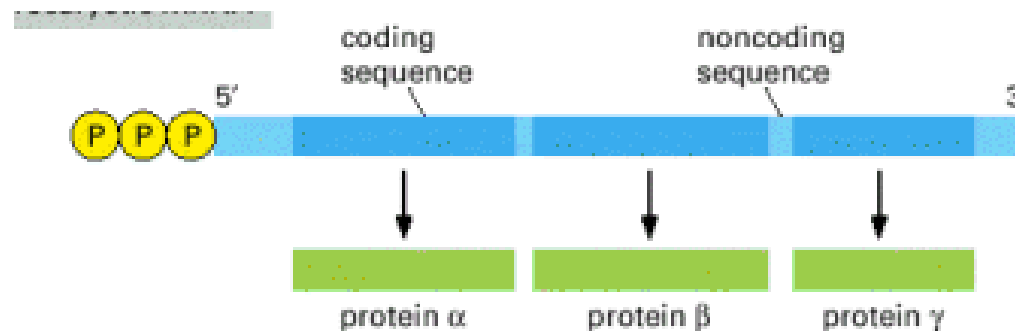
# Obrada RNK - prokariote

---

Ø U prokariota većina molekula **iRNK** prepisanih sa matričnog lanca služi kao matrica za sintezu **JEDNOG** proteina **odmah** po završetku transkripcije.

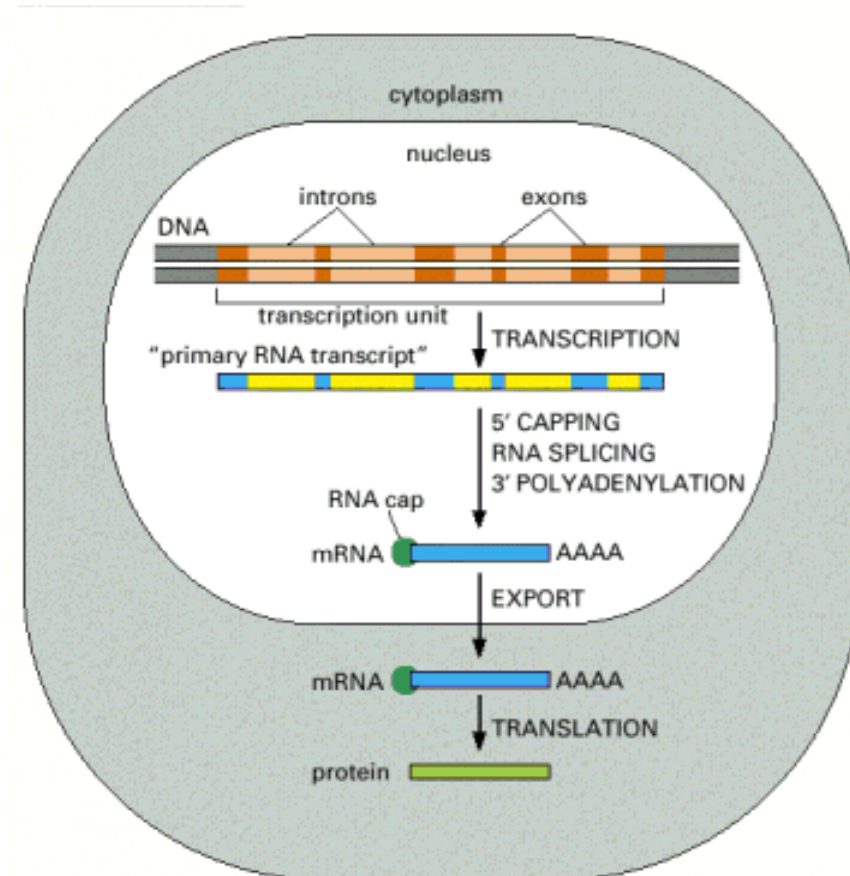


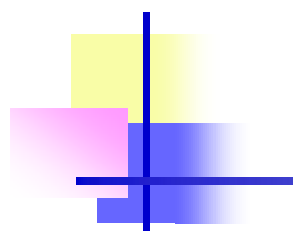
Ø U prokariota **iRNK** je **policistronska** - sadrži prepis više gena koji nose informaciju za nekoliko različitih genskih produkata.



# Obrada RNK

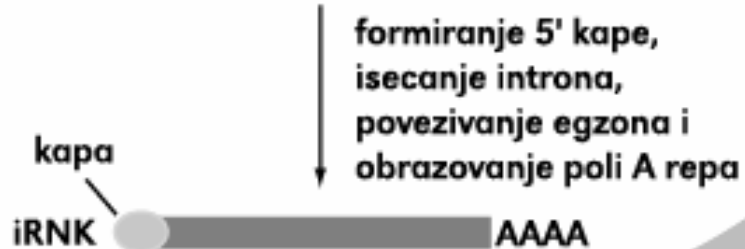
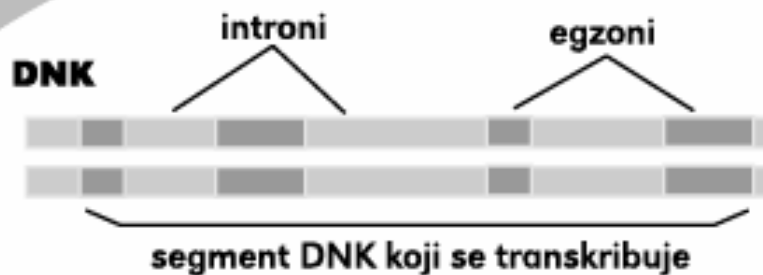
- Ø U eukariota primarni transkript tek nakon obrade postaje zrela iRNK.
- Ø Svi primarni transkripti u čijoj polimerizaciji učestvuje RNK polimeraza II nazivaju se heterogenom nuklearnom RNK (hnRNK), jer su različite dužine.
- Ø Informaciona RNK eukariota nastaje obradom hnRNK.
- Ø Oko 3% hnRNK nizom modifikacija postaje iRNK.
- Ø Obrada se obavlja primarno u jedru, ali i tokom transporta u citoplazmu.
- Ø Obrada iRNK odvija se u tri faze:
  - § modifikacija 5' kraja
  - § modifikacija 3' kraja
  - § isecanje i spajanje krajeva RNK.





citoplazma

jedro

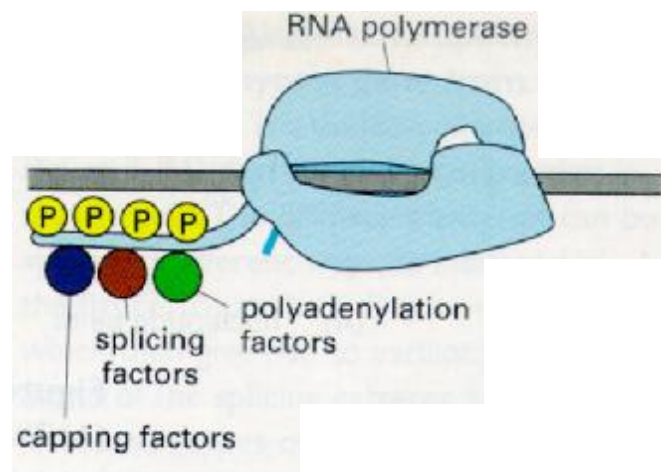




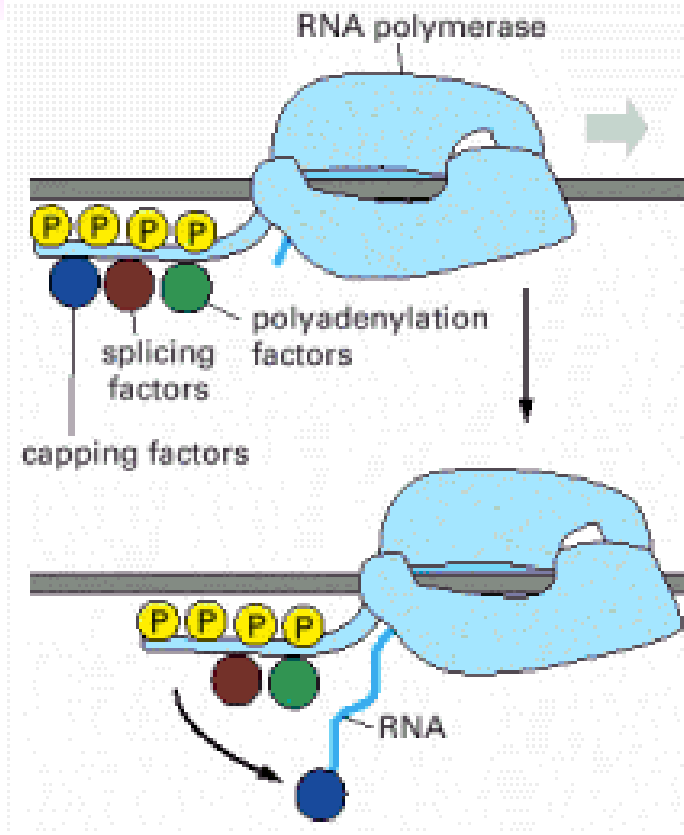
# Obrada RNK

---

- 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.



# "RNK fabrika" RNK poly eukariota



Ne obuhvata samo prepisivanje DNK u RNK već nosi sa sobom i proteine za obradu iRNK na svom repu, koji se tada prenose na novოსintetisamu RNK, u odgovarajućem trenutku.

Postoji mnogo enzima koji su uključeni u obradu RNK i ne dolaze svi do RNK u sastavu RNK poly.

Za RNK "splicing" na repu RNK poly se donosi samo nekoliko ključnih komponenti. Kada se jednom prenesu na RNK, oni predstavljaju centre za preostale komponente.

Proteini za obradu RNK se prvo vezuju za RNK poly rep pošto se on fosforiliše, kasno tokom procesa inicijacije transkripcije. Kada RNKpoly II završi transkripciju, odvaja se od DNK, uklanjaju se fosfatne grupe sa njenog repa i ona može ponovo da započne inicijaciju.

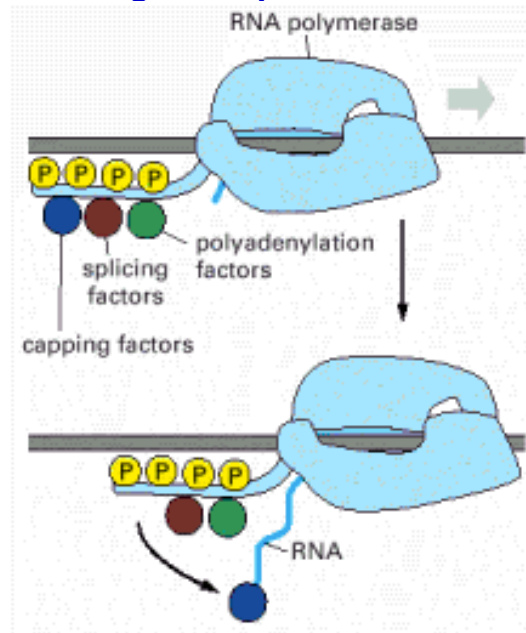
Samo defosforilisana RNK poly može da inicira transkripciju.

# Obrada RNK

## Ø Fosforilacija CTD RNK polimeraze:

Ø je odgovorna za disocijaciju RNK 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.

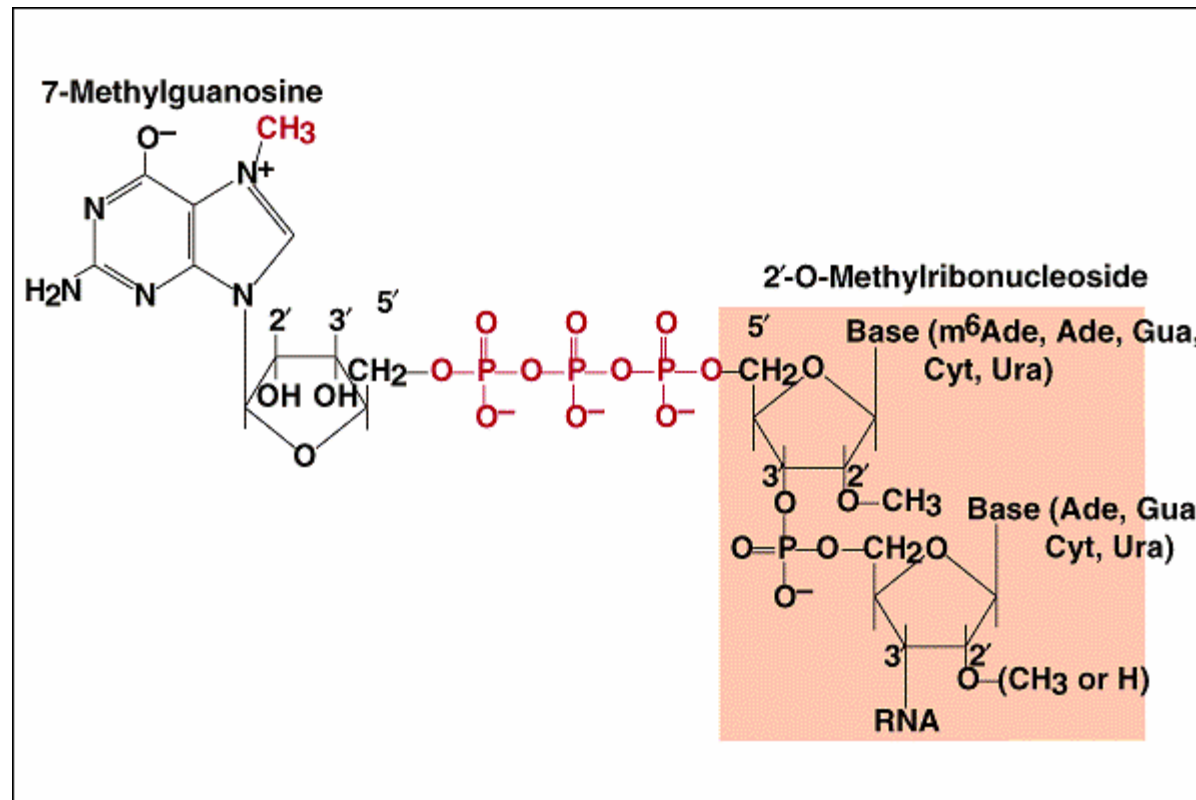


Tako se, RNK polimeraza II u elongacionom modu može smatrati mašinerijom koja i transkribuje DNK u RNK i obrađuje RNK neposredno nakon stvaranja.

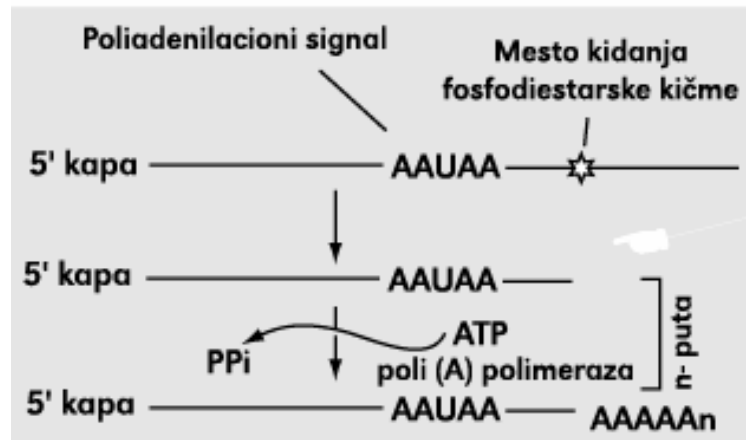
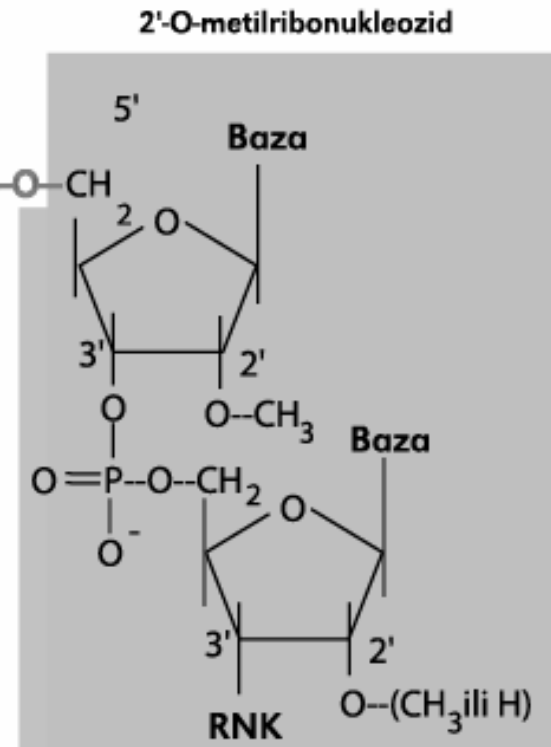
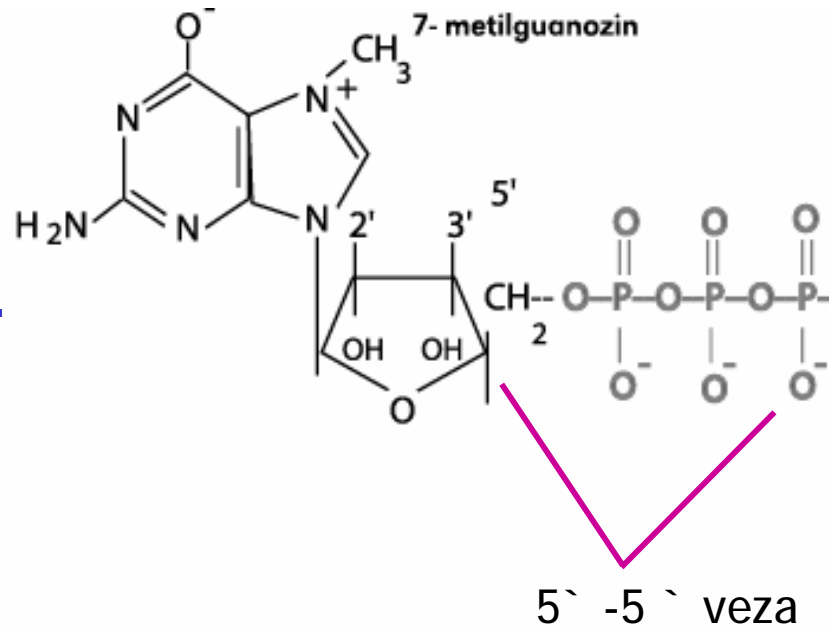
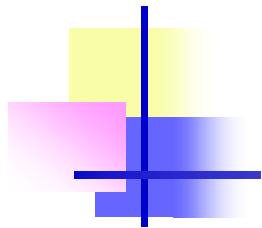
# Obrada RNK - modifikacija 5' kraja

5' kraj novog RNK molekula se modifikuje:

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



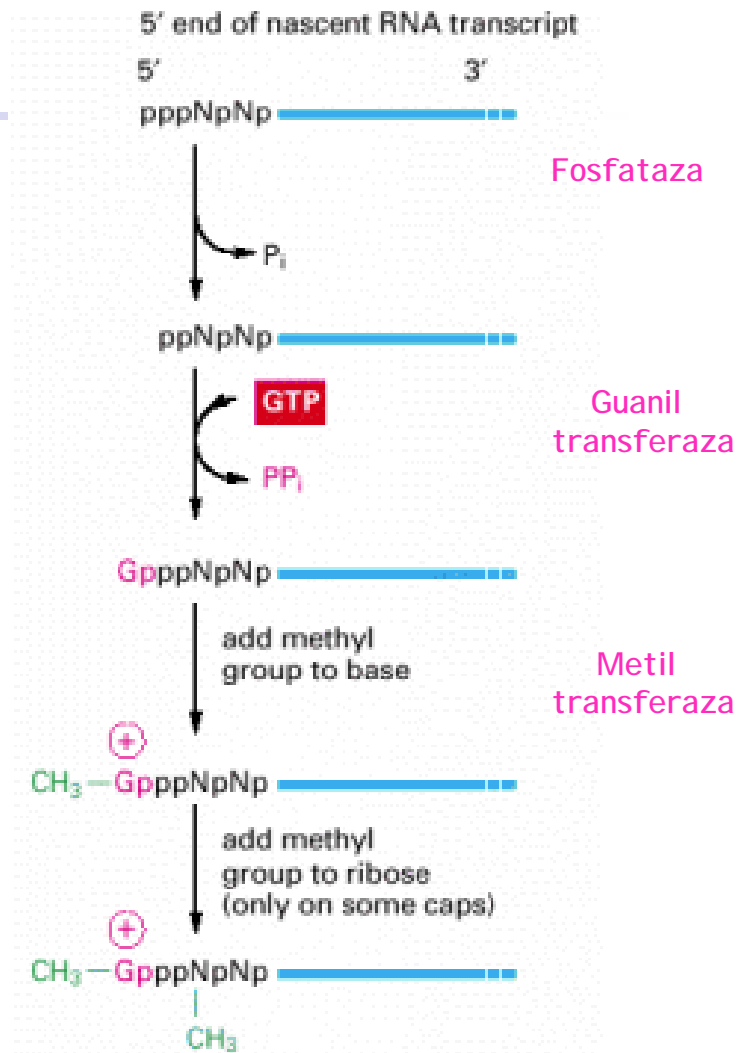
U formiranju "kape" na 5' kraju učestvuju 3 enzima:

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:

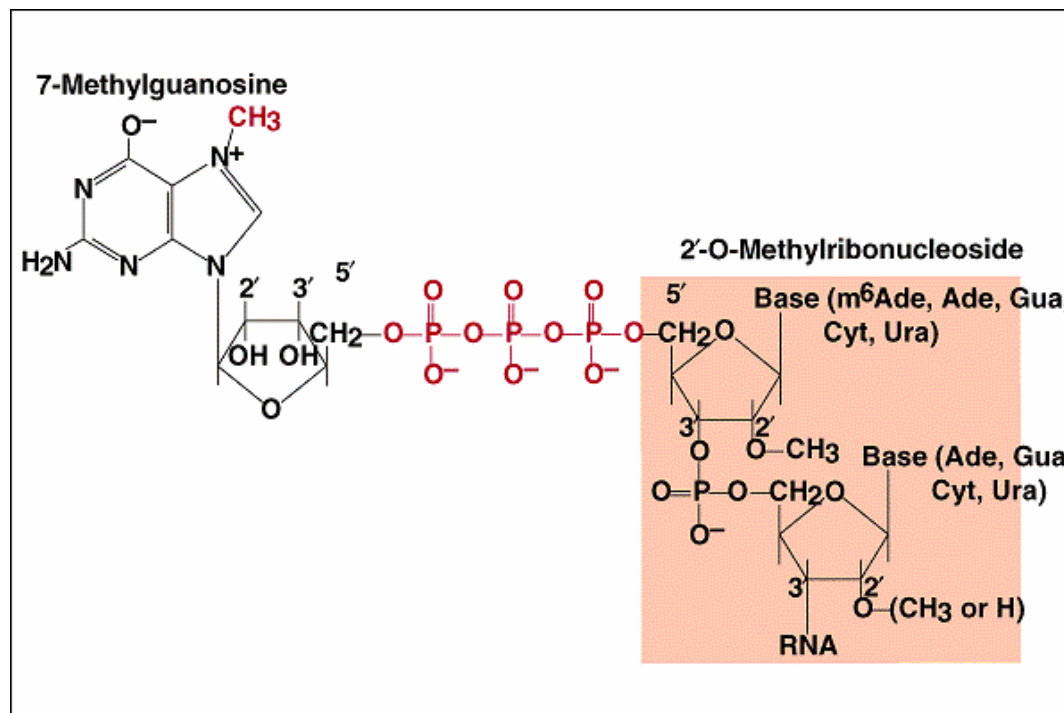
- Ø razlikovanje iRNK od drugih tipova RNK
- Ø vezivanje "kapa" vezujućeg kompleksa proteina u jedru pomaže da se RNK adekvatno obradi i eksportuje iz jedra.
- Ø Učestvuje u translaciji iRNK u citosolu.

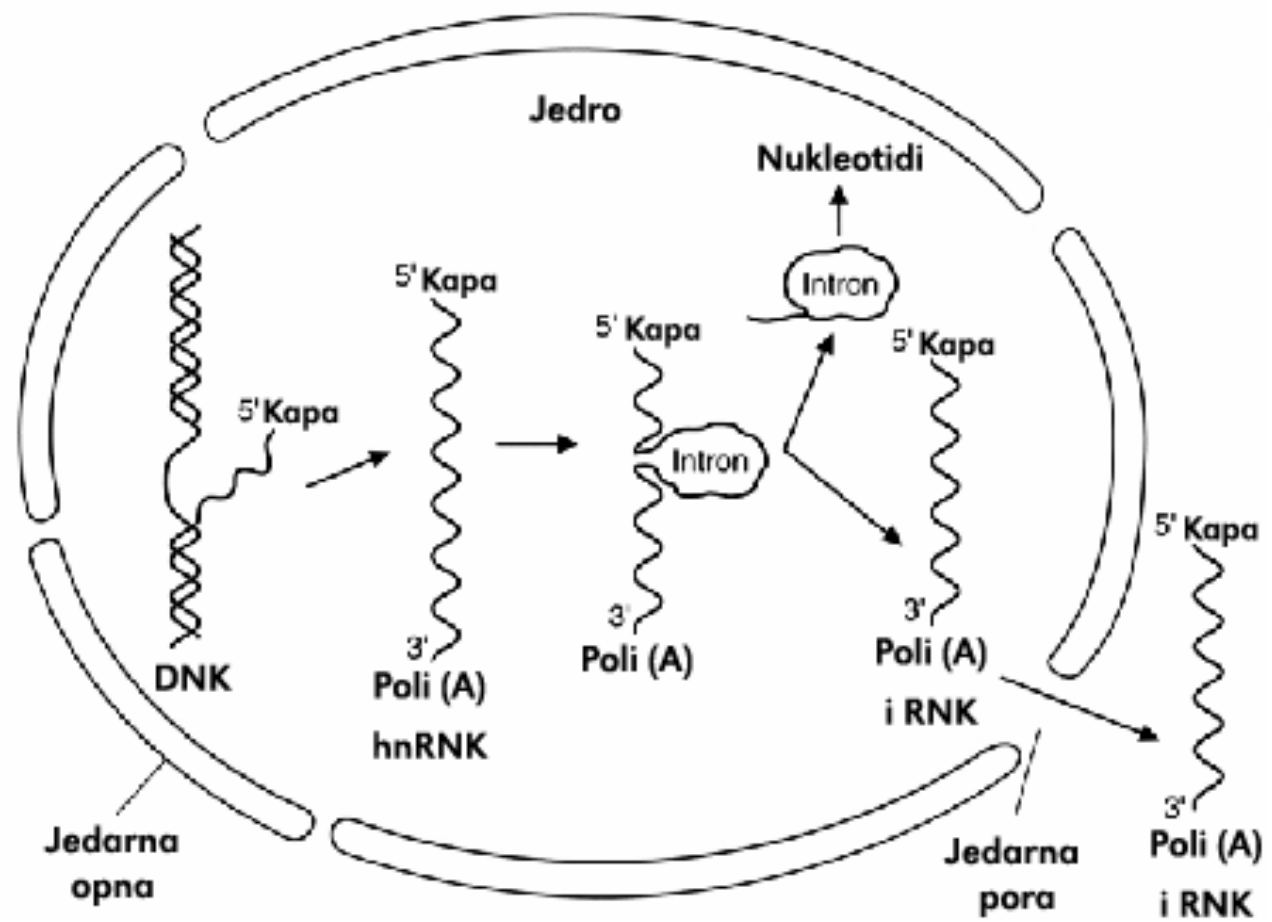
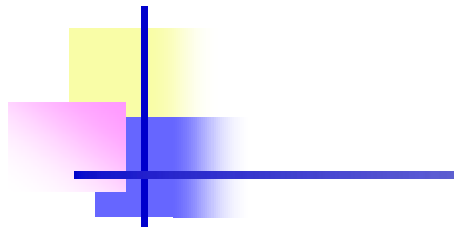


# Obrada RNK - modifikacija 5' kraja

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 - modifikacija 3' kraja

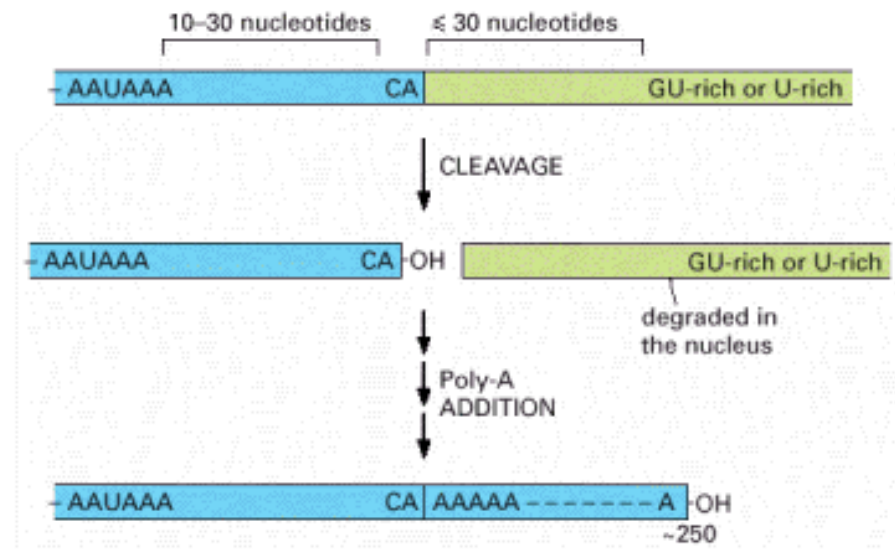
Ø 3' kraj iRNK je određen specifičnom sekvencom u DNK

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.

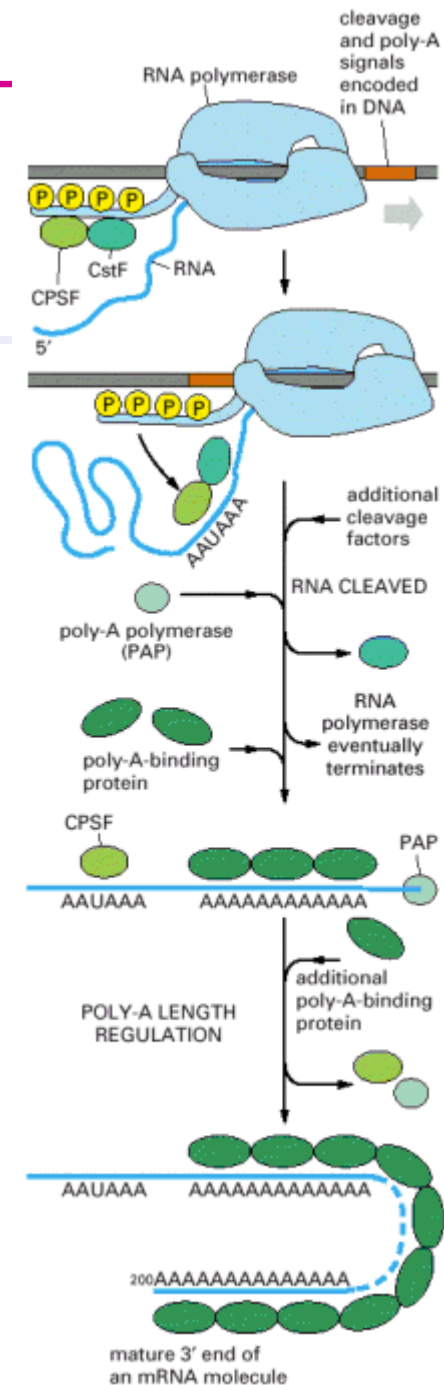
# Obrada RNK - modifikacija 3' kraja

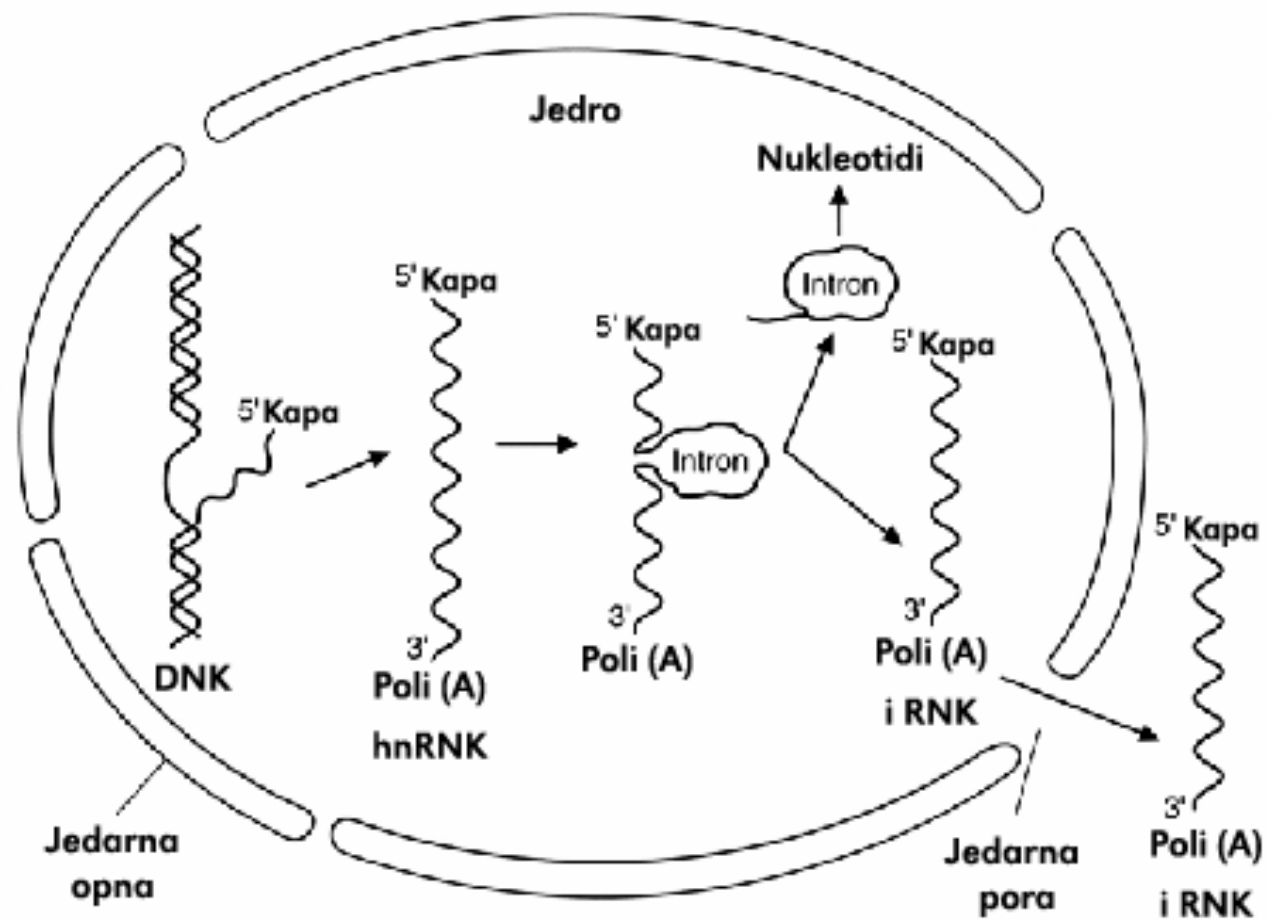
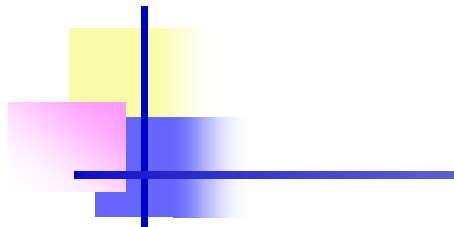
- Ø Posle vezivanja CPSF i CstF se vezuju se drugi proteini koji su uključeni u obradu 3' kraja.
- Ø RNK se otcepljuje.
- Ø Poli A polimeraza dodaje jedan po jedan oko 200 adeninskih nukleotida na 3' kraj.
  - Prekursor je ATP.
  - Ne zahteva matricu.
- Ø Za poli A "rep" se vezuje poli A- vezujući protein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





# Obrada RNK - isecanje introna

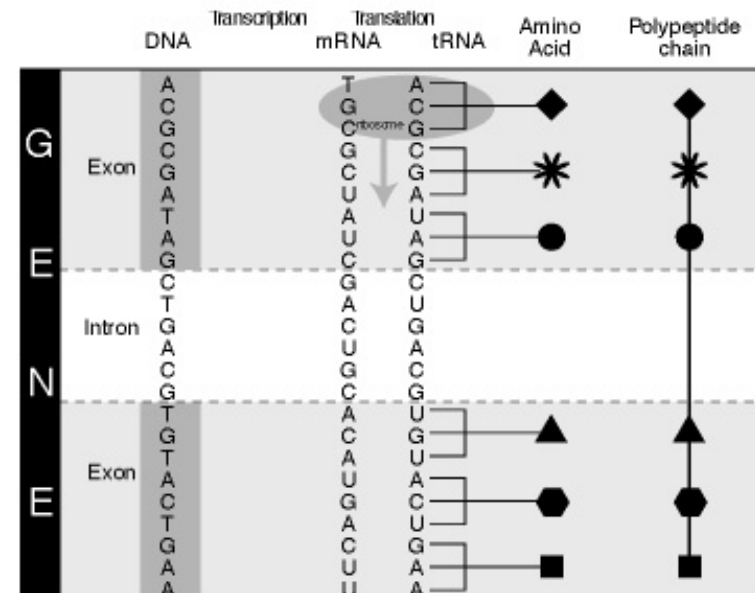
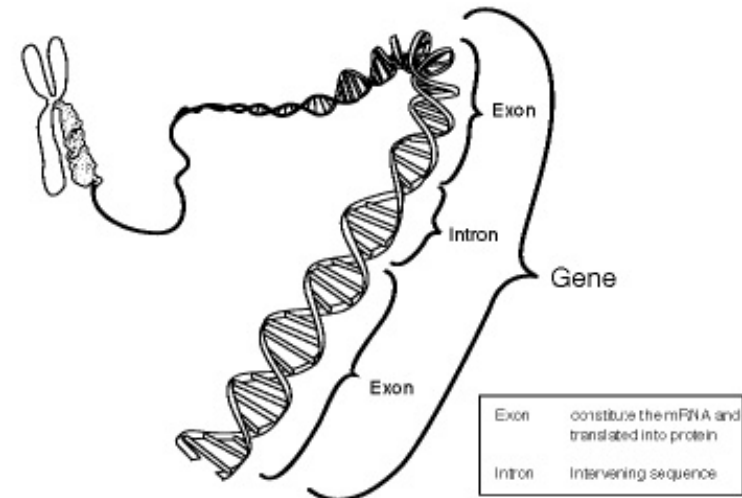


- Ø Primarni prepis iRNK sadrži:
  - kodirajuće sekvence - egzone, i
  - nekodirajuće sekvence - introne.

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.

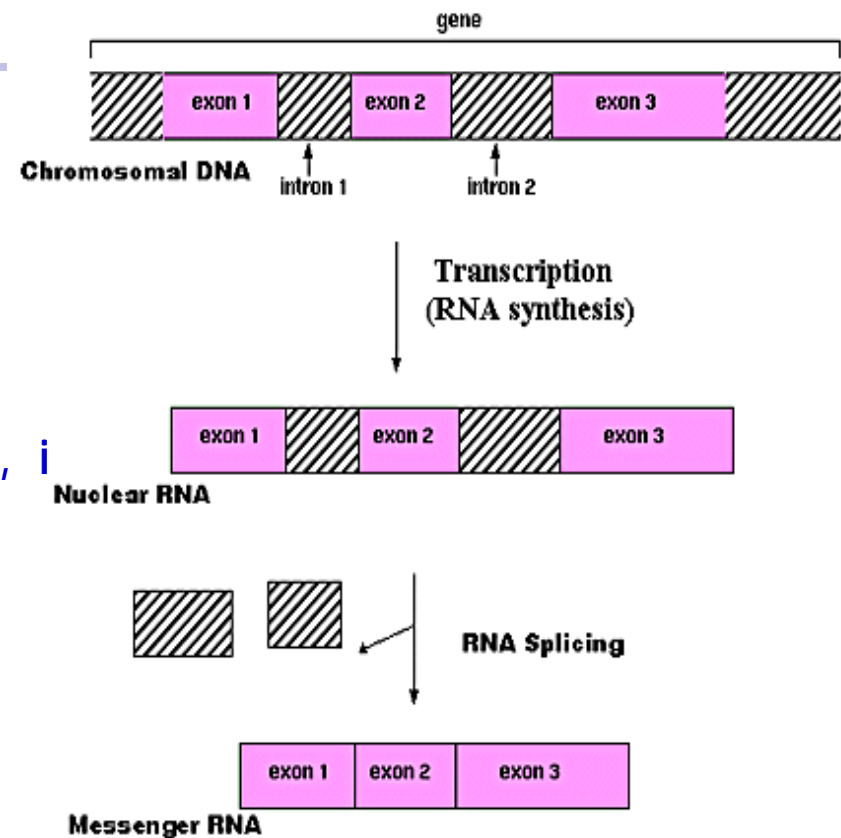
Ø Introni variraju u veličini od 80-10 000 nukleotida.



# Obrada RNK - isecanje introna



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

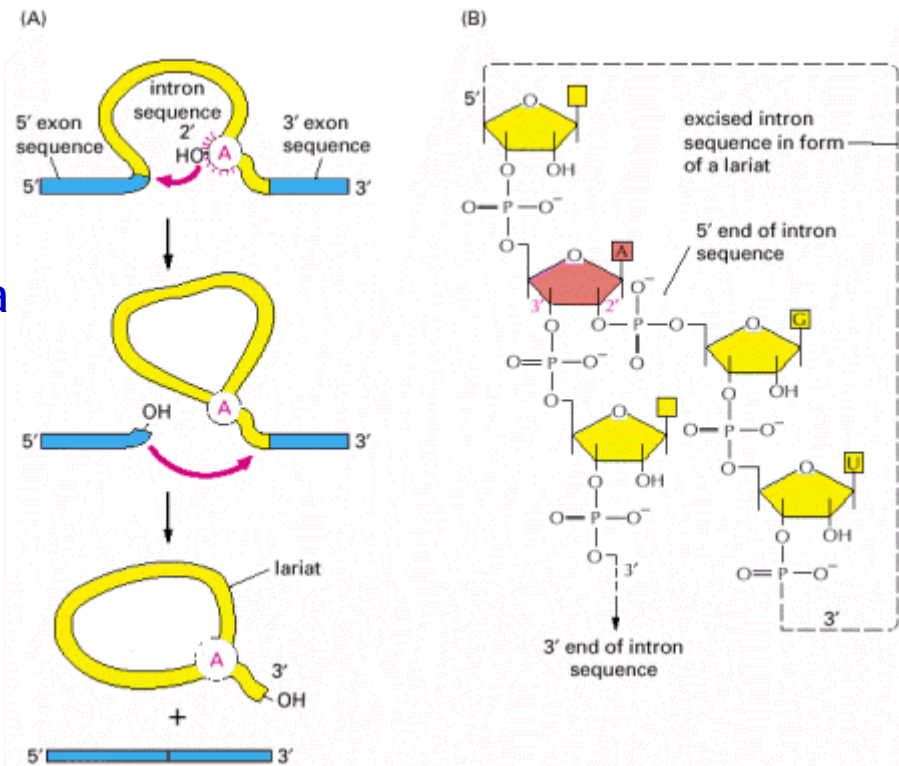


RNA synthesis and processing

# 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*).

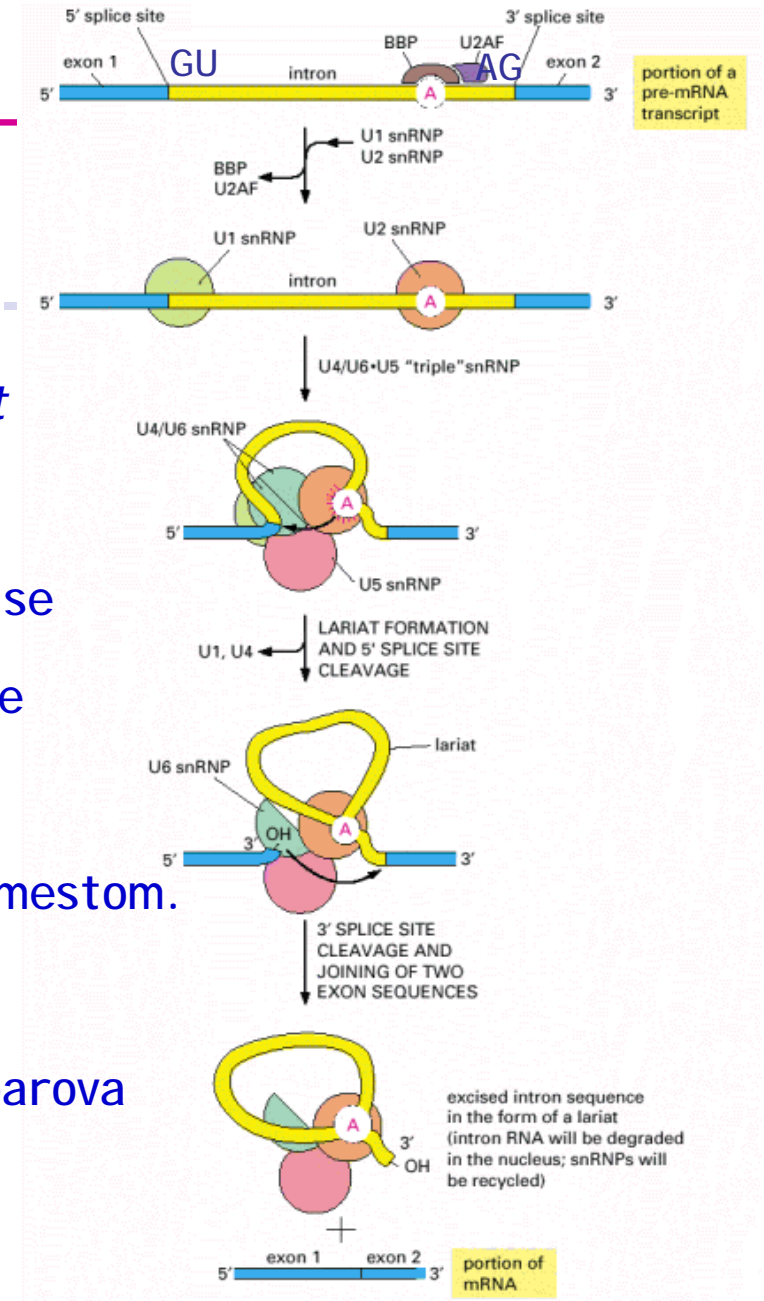
Ø Ovi mnRNP čine jezgro čestica za isecanje.

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

# Obrada RNK - isecanje introna



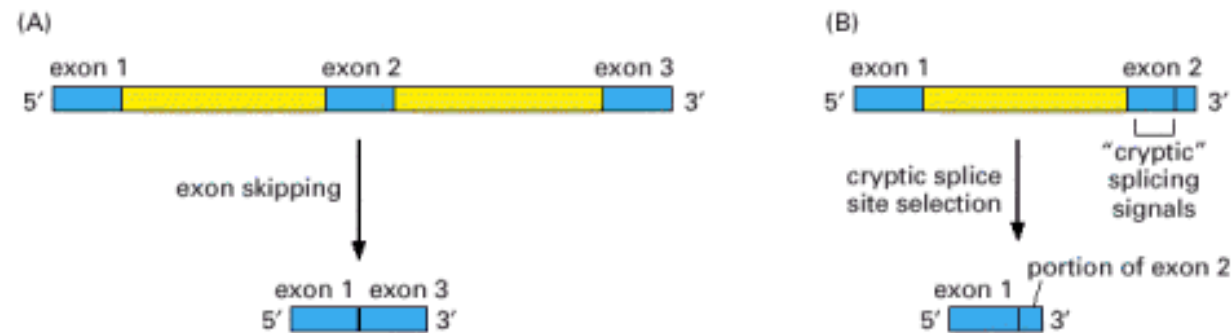
- Ø Tačku grananja prepoznaju BBP (*branch point binding protein*) i U2AF - pomoćni protein.
- Ø U2 mnRNP zamenjuje BBP i U2AF i baze mu se sparuju sa bazama konsenzus sekvence tačke granjanja.
- Ø Baze U1 mnRNP se sparuju sa 5' isecajućim mestom.
- Ø U4/U6 i U5 ulaze u česticu za isecanje.
- Ø U4 i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





# Obrada RNK - isecanje introna

- Ø U reakcijama transesterifikacije (transfosforilacije) broj fosfatnih veza ostaje isti, pa bi se moglo očekivati da se ove reakcije odvijaju bez hidrolize nukleozid trifosfata.
- Ø 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.

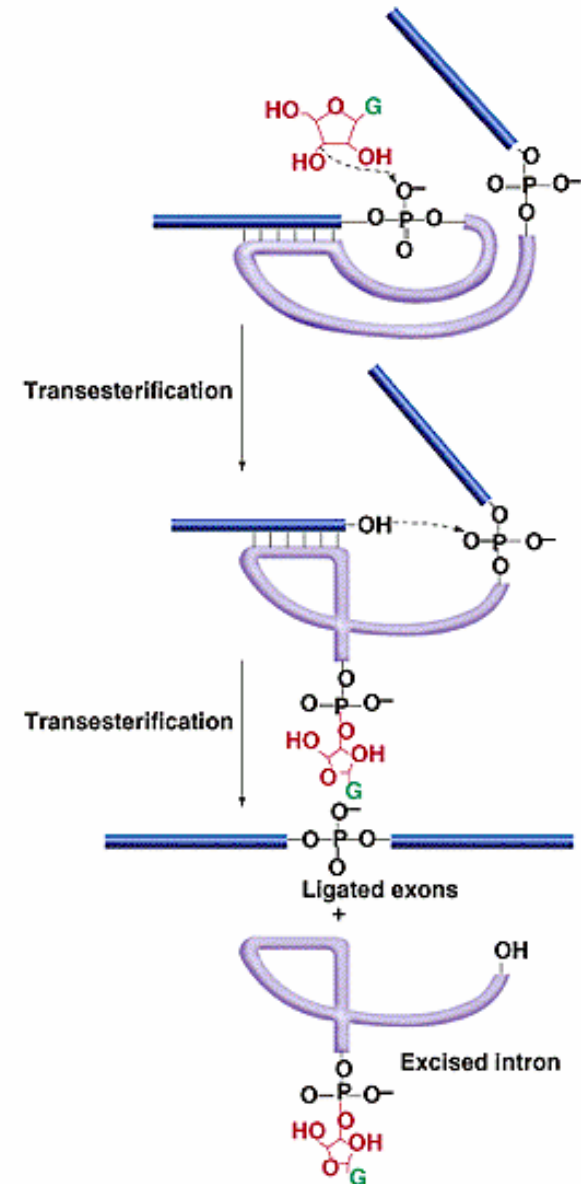
Ø Ovo odlaganje znači da:

Ø se introni ne moraju isecati onim redom kojim su se pojavili u RNK lancu

Ø Iako se čestice za isecanje pojavljuju ko-transkripciono reakcije isecanja se uglavnom odigravaju post-transkripciono, posle sinteze kompletnog hnRNK

# Obrada RNK - isecanje introna

- Ø Prve ćelije su upotrebljavale RNK molekule kao glavne katalizatore i nosioce genetskih informacija.
- Ø Dokaz za ovo shvatanje je postojanje samo-isecajućih introna u nekih organizama (nuklearni rRNK geni trepljara *Tetrahymena*, nekoliko gena bakteriofaga T4) i u nekim genima mitohondrija i hloroplasta.
- Ø Samo-isecanje introna se odigrava u odsustvu proteina i bilo kojih drugih RNK molekula.



# Obrada RNK - isecanje introna

Ø Dve grupe sekvenci samo-isecajućih introna:

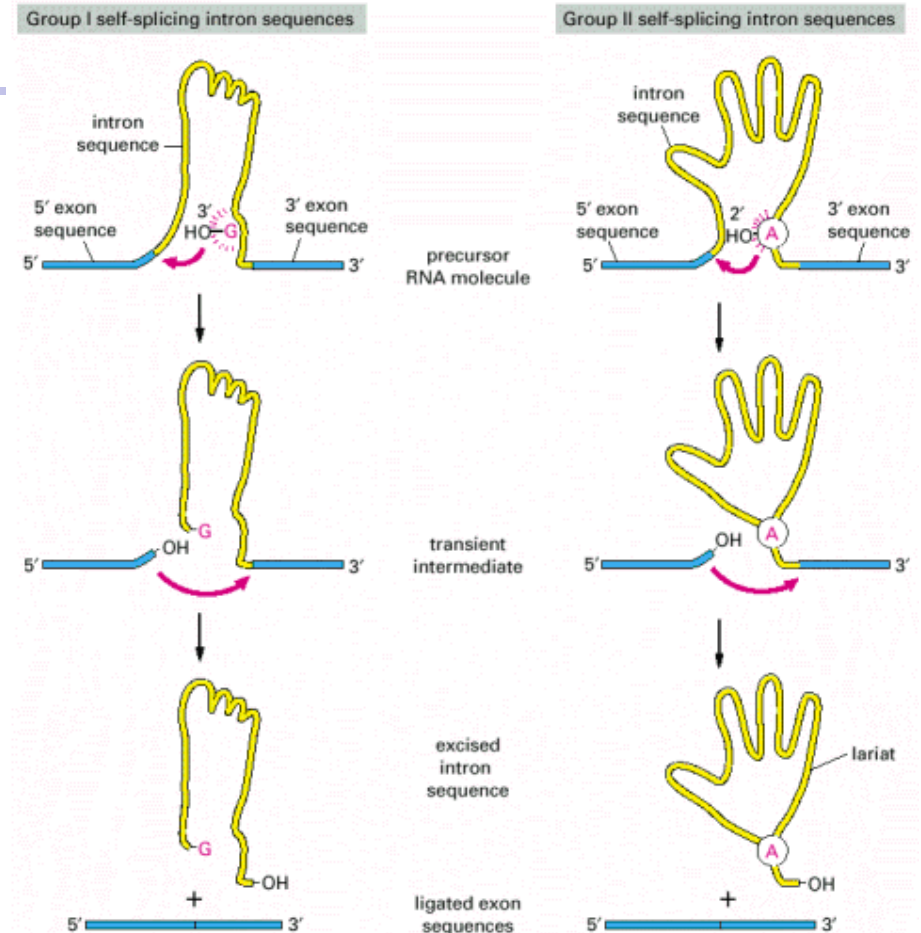
○ Grupa I sekvenci introna

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

○ Grupa II sekvenci introna

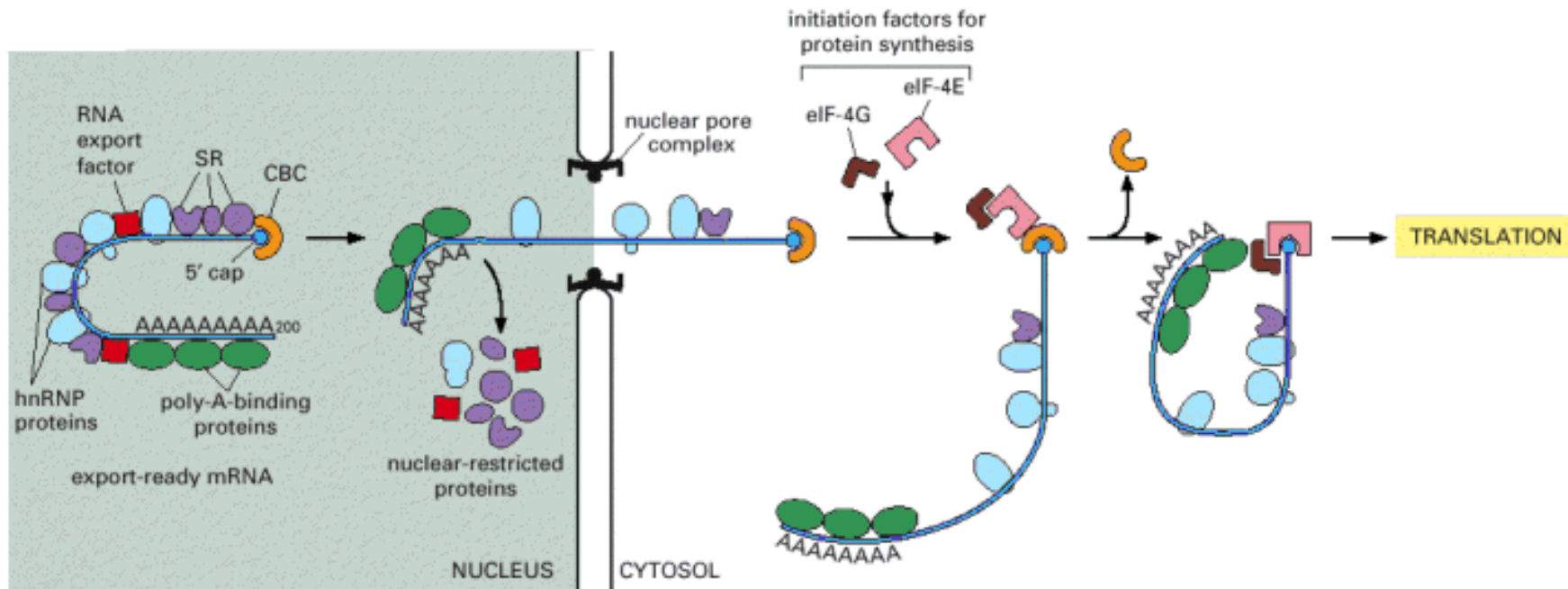
Posebno aktivan A u intronu je grupa koja napada i formira se intermedijer u vidu omče.

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



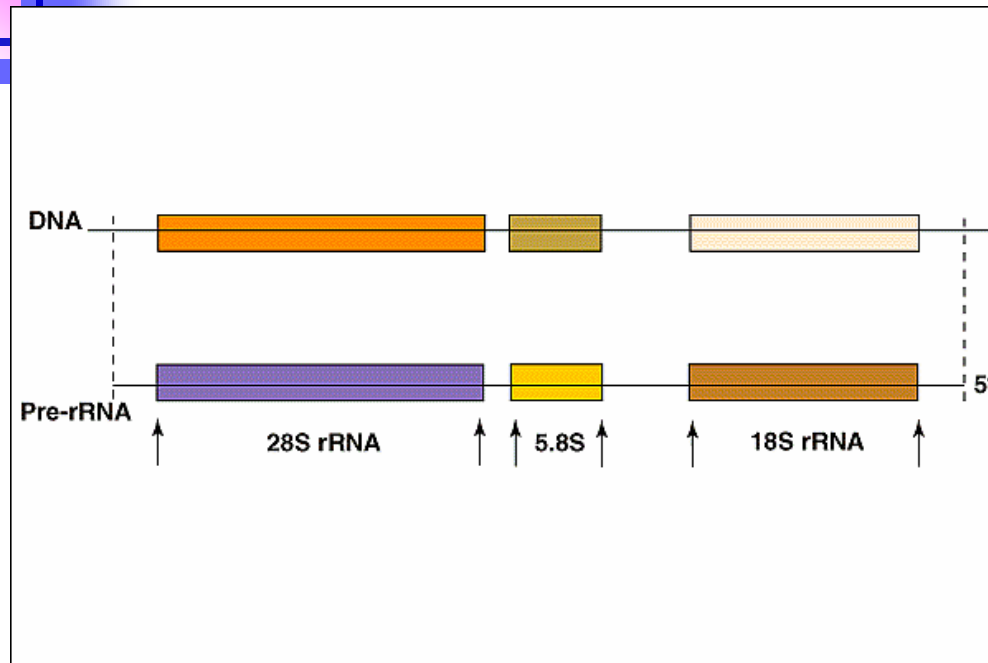
# Transport iRNK iz jedra

- ∅ Transport zrele iRNK iz jedra u citoplazmu je visoko selektivan i zavisi od pravilne obrade hnRNK.
- ∅ Kompleks nuklearnih pora prepoznaje i transportuje samo kompletnu iRNK.

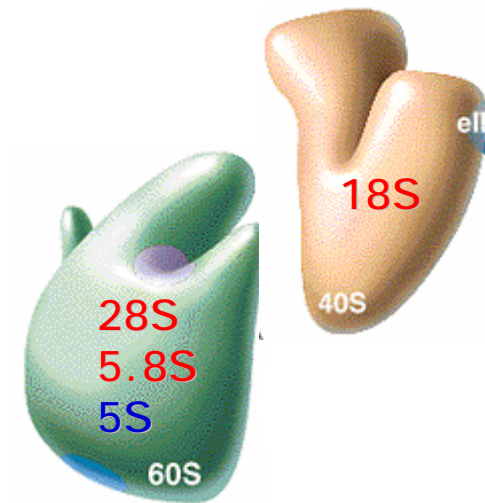


# rRNK

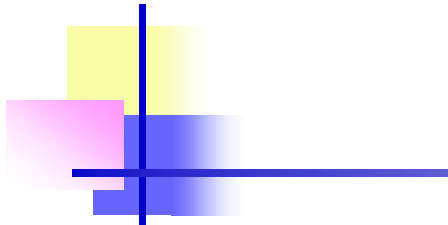
Ljudska ćelija sadrži oko 200 rRNK genskih kopija po haploidnom genomu, rasutih u malim grupama na pet različitih hromozoma.



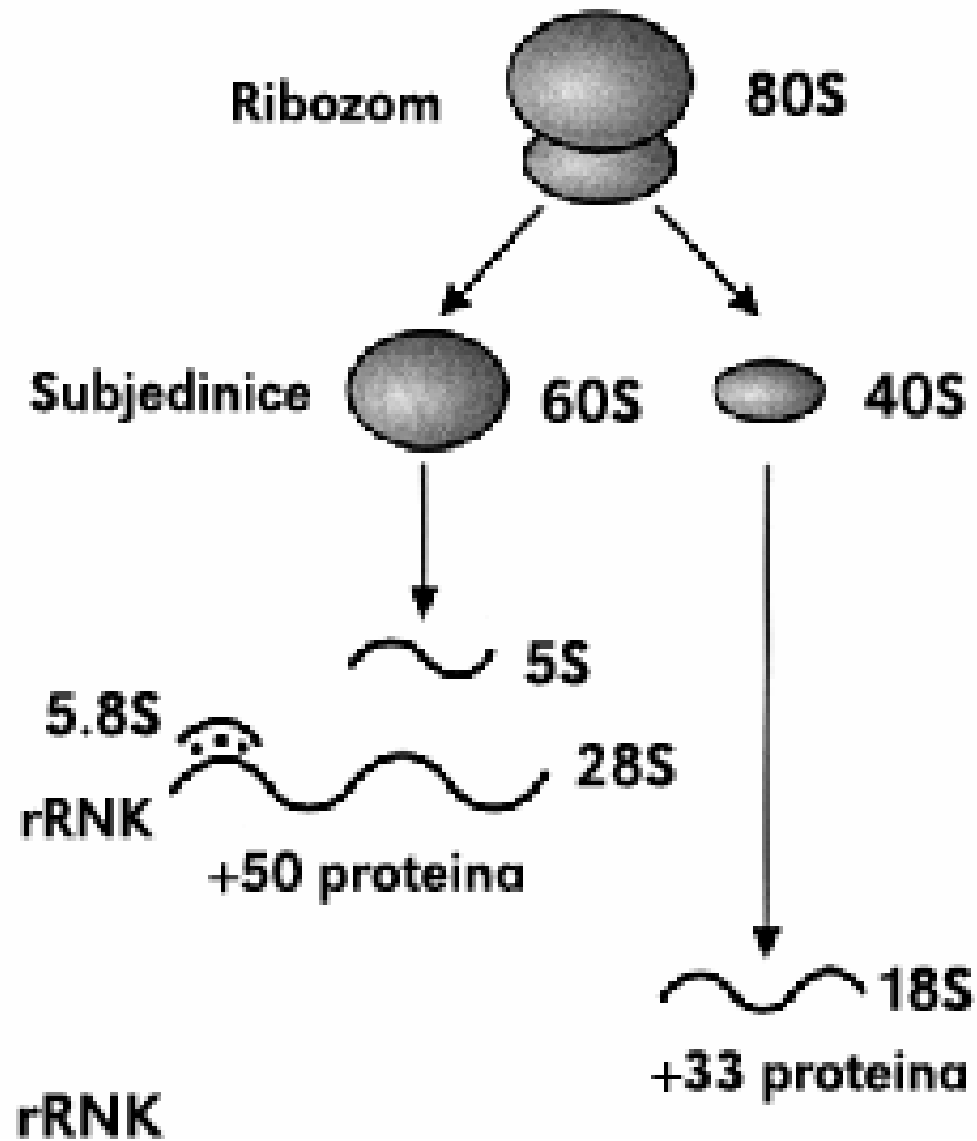
Copyright © 1997 Wiley-Liss, Inc.



- Ribozomalne RNK čine 80% RNK u ćeliji.
- 28S, 18S i 5.8S rRNK nastaju iz 45S prekursora rRNK koji se sintetiše u nukleolusu.  
Poreklo od istog gena obezbeđuje stvaranje sve tri rRNK u podjednakim količinama.
- 5S rRNK nastaje u nukleoplazmi iz posebnog prekursora, koji se prepisuje sa drugog gena.

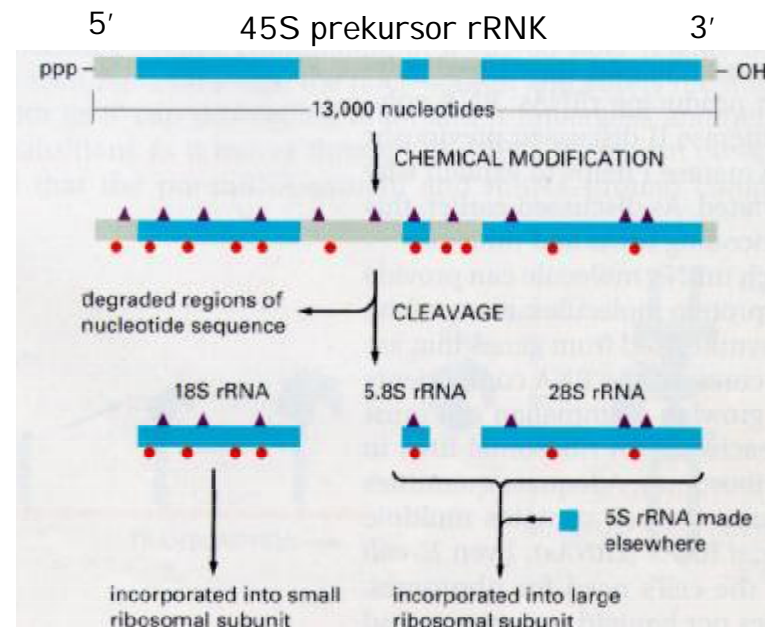


# EUKARIOTE

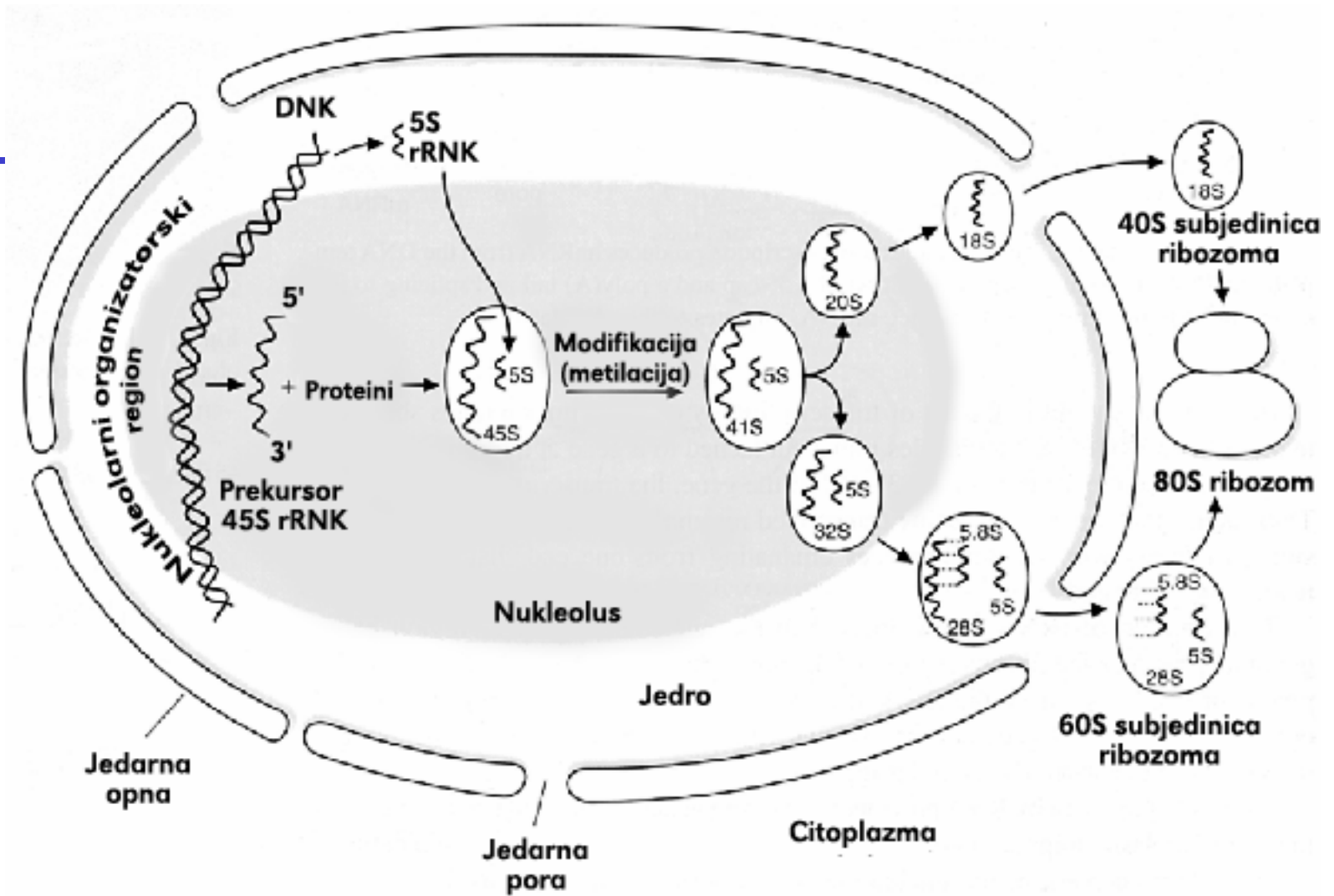
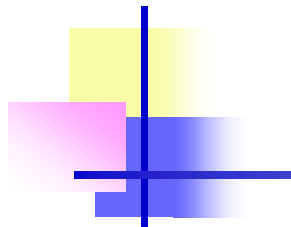


# Sinteza i obrada rRNK

- Ø rRNK je najzastupljenija RNK u ćeliji - oko 80% ukupne RNK u ćeliji koja se brzo deli.
- Ø Sintetiše ih RNK polimeraza I (28S, 18S, 5.8S) i RNK polimeraza III (5S).
- Ø Slična je RNK polimerazi II ali nema C-terminalni "rep" što objašnjava zašto rRNK nema ni 5' "kapu" ni poli-A "rep".
- Ø Rastuća ćelija sisara mora da sintetiše oko 10 miliona kopija svakog tipa rRNK u svakoj ćelijskoj generaciji.
- Ø Humana ćelija sadrži oko 200 rRNK gena u haploidnom genomu raspoređenih na 5 hromozoma.







# Sinteza i obrada rRNK

Ø Prekursor rRNK je dug oko 13.000 nukleotida.

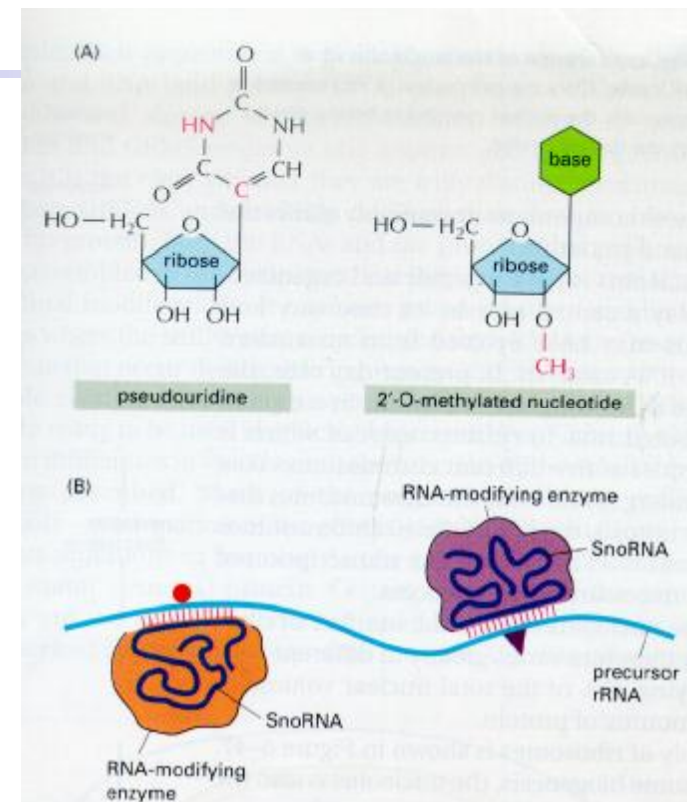
Ø Veliki broj modifikacija se odigrava pre njegovog isecanja:

- Oko 100 reakcija metilacije na 2' OH šećera
- Oko 100 izomerizacija uridina u pseudouridin

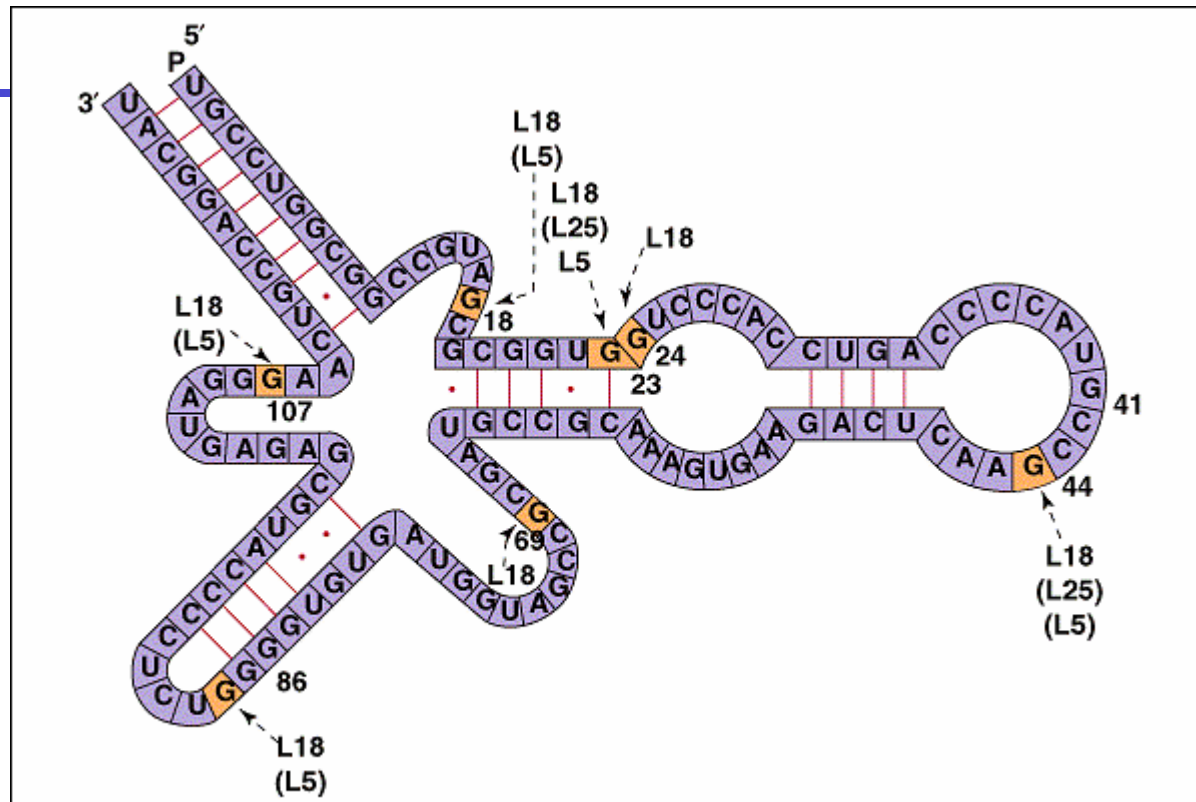
Ø Svaka modifikacija se odvija na određenoj poziciji rRNK.

Ø Pozicije su određene pomoću specifičnih RNK koje se nazivaju male nukleolarne RNK (*small nucleolar RNA* - snoRNAs)

- Baze se sparuju sa prekursorom rRNK i
- Postavljaju RNK-modifikujuće enzime u odgovarajućem položaju
- uzrokuju konformacione promene prekursorne rRNK i dovode do cepanja prekursora u zrele rRNK.
- Mnoge snoRNA kodiraju introni drugih gena, posebno onih koji kodiraju ribozomalne proteine.



# rRNK - sekundarna struktura



Copyright © 1997 Wiley-Liss, Inc.

Pretpostavljena sekundarna struktura za 5S rRNK.

# Sinteza i obrada rRNK

## Nukleolus

Ø Nije ograničen membranom

Ø Veliki agregat makromolekula

○ rRNK geni

○ Prekursori rRNK

○ Zrela rRNK

○ Enzimi obrade rRNK

○ snoRNP

○ Proteinske subjedinice ribozoma

○ Delimično sklopljeni ribozomi

Ø Osim ribozoma u nukleolusu se stvaraju i

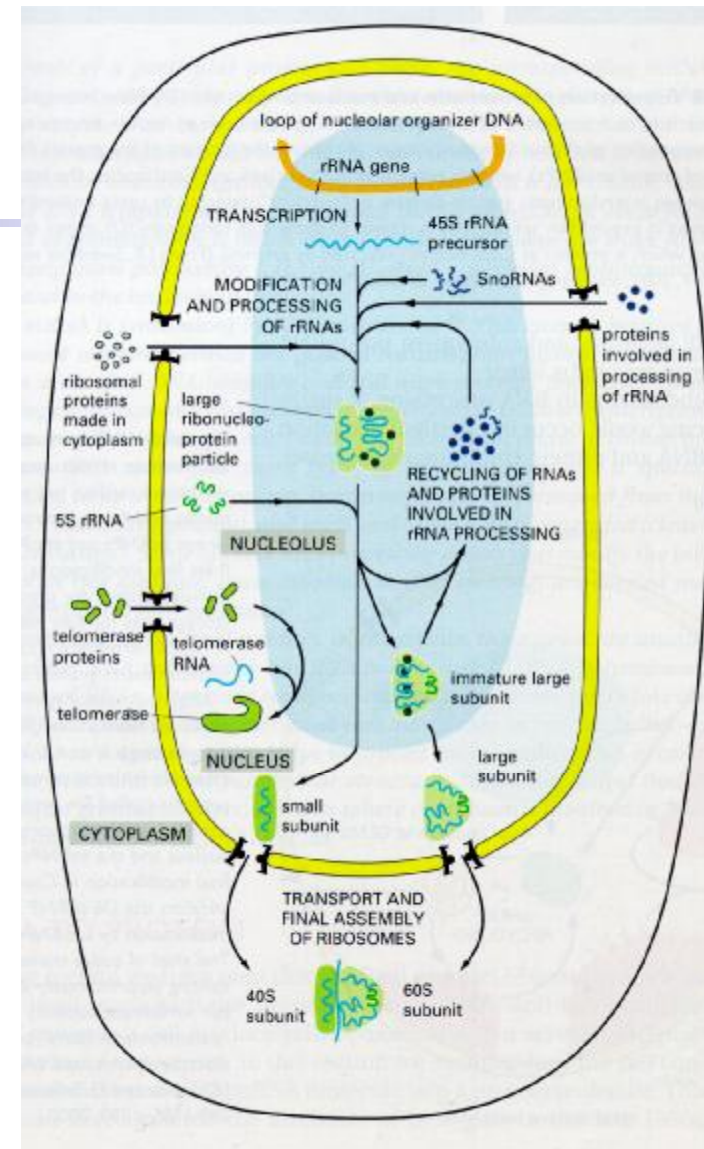
druge RNK i RNK-protein kompleksi

○ U6 mnRNP

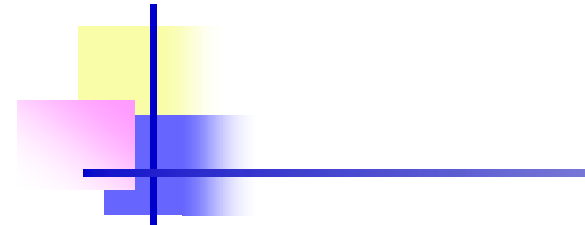
○ telomeraza

○ čestica za prepoznavanje signala

○ tRNK



# tRNK – sekundarna struktura



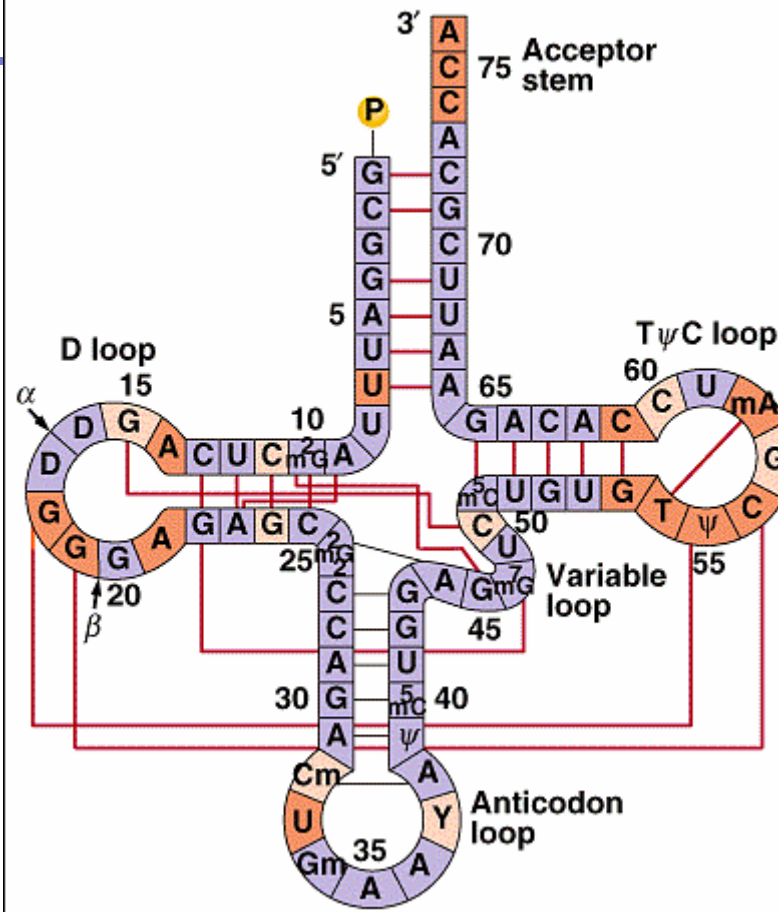
## DHU petlja

Sadrži dihidrouracil

Mesto vezivanja

amino acil-tRNK transferaze

Mesto vezivanja  
amino kiseline



## TψC petlja

Učestvuje u vezivanju  
za ribozom

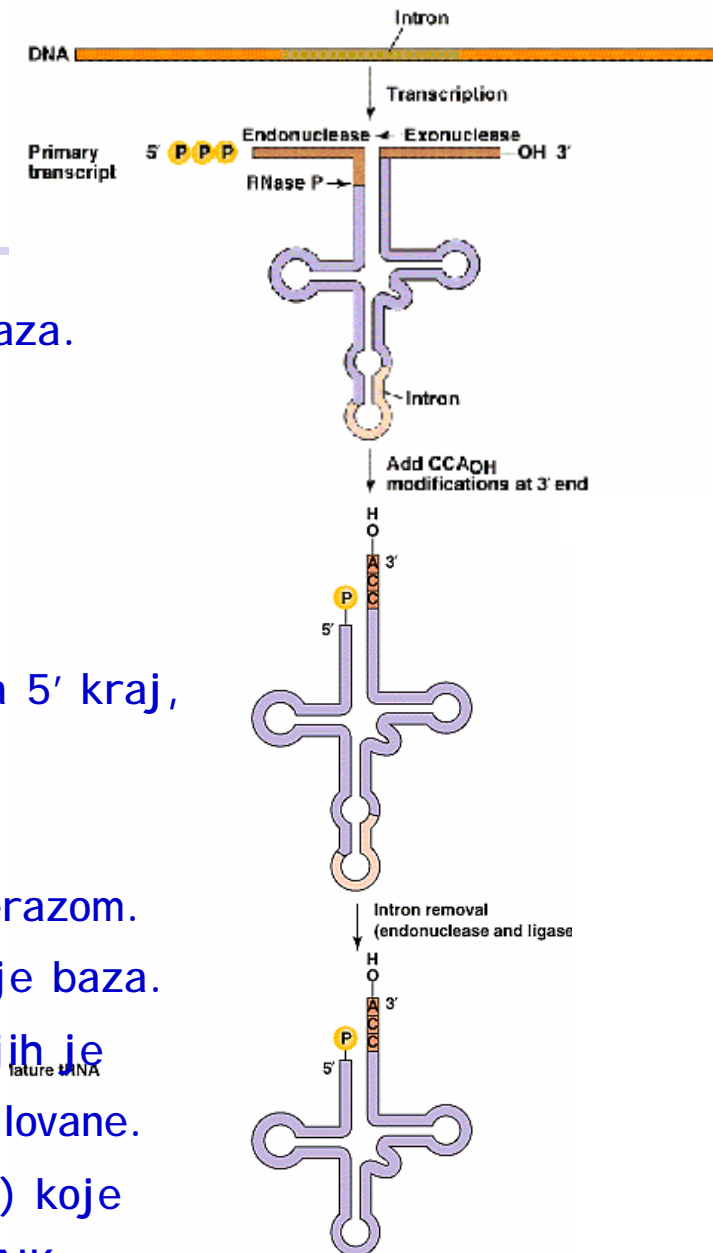
## Antikodonska petlja

Prepoznaje kodon na i RNK

# Sinteza i obrada tRNK

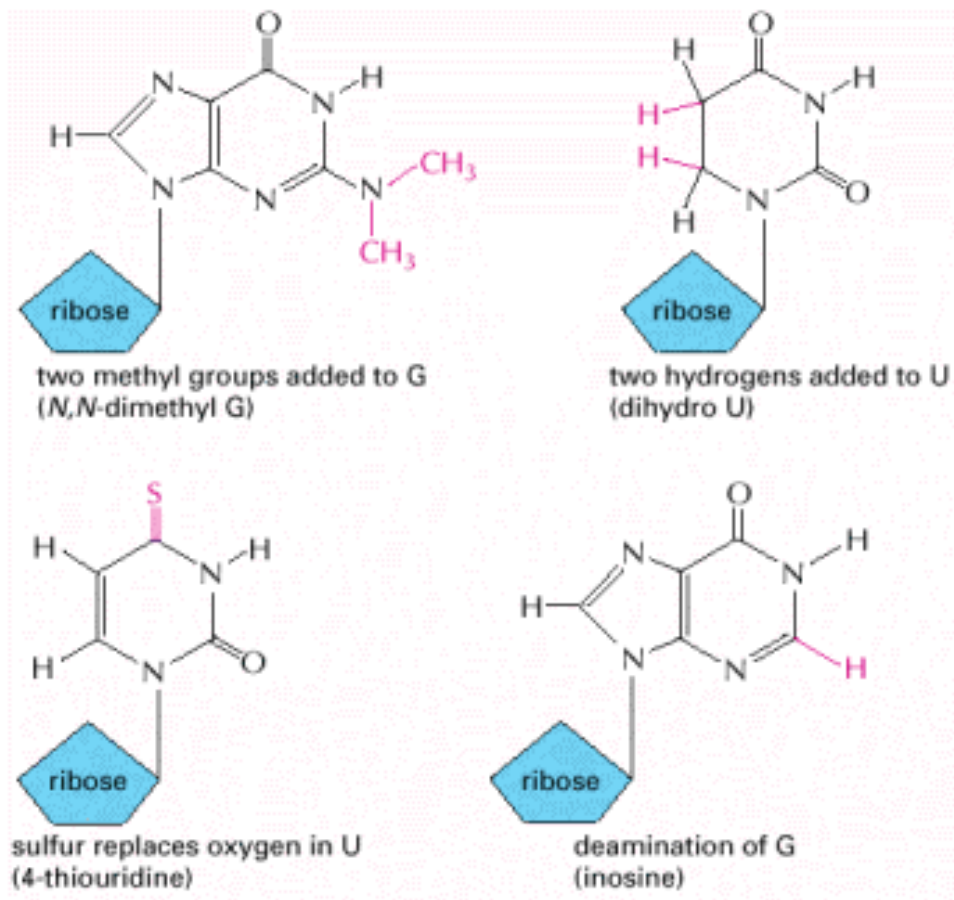


- Ø Transportna RNK je mali molekul veličine 70-90 baza.
- Ø Nastaje isecanjem iz velikih primarnih prekursora, koji sadrže sekvence za 2 do 7 molekula tRNK.
- Ø Isecanje funkcionalnih delova tRNK katališu enzimi ribonukleaza P i ribonukleaza D.
  - Ribonukleaza P endonukleaznim cepanjem odvaja 5' kraj, a 3' kraj se odvaja egzonukleaznim cepanjem.
- Ø Posle odvajanja tRNK, na 3' kraju počinje sinteza CCA sekvence, katalisana tRNK nukleotidiltransferazom.
- Ø Dalja obrada molekula tRNK obuhvata modifikovanje baza.
  - Postoji preko 60 različitih modifikacija, od kojih je najčešća metilacija. Većina baza tRNK su metilovane.
- Ø Neke tRNK sadrže male introne (14-50 nukleotida) koje se uklanjaju isecanjem i ponovnim povezivanjem RNK



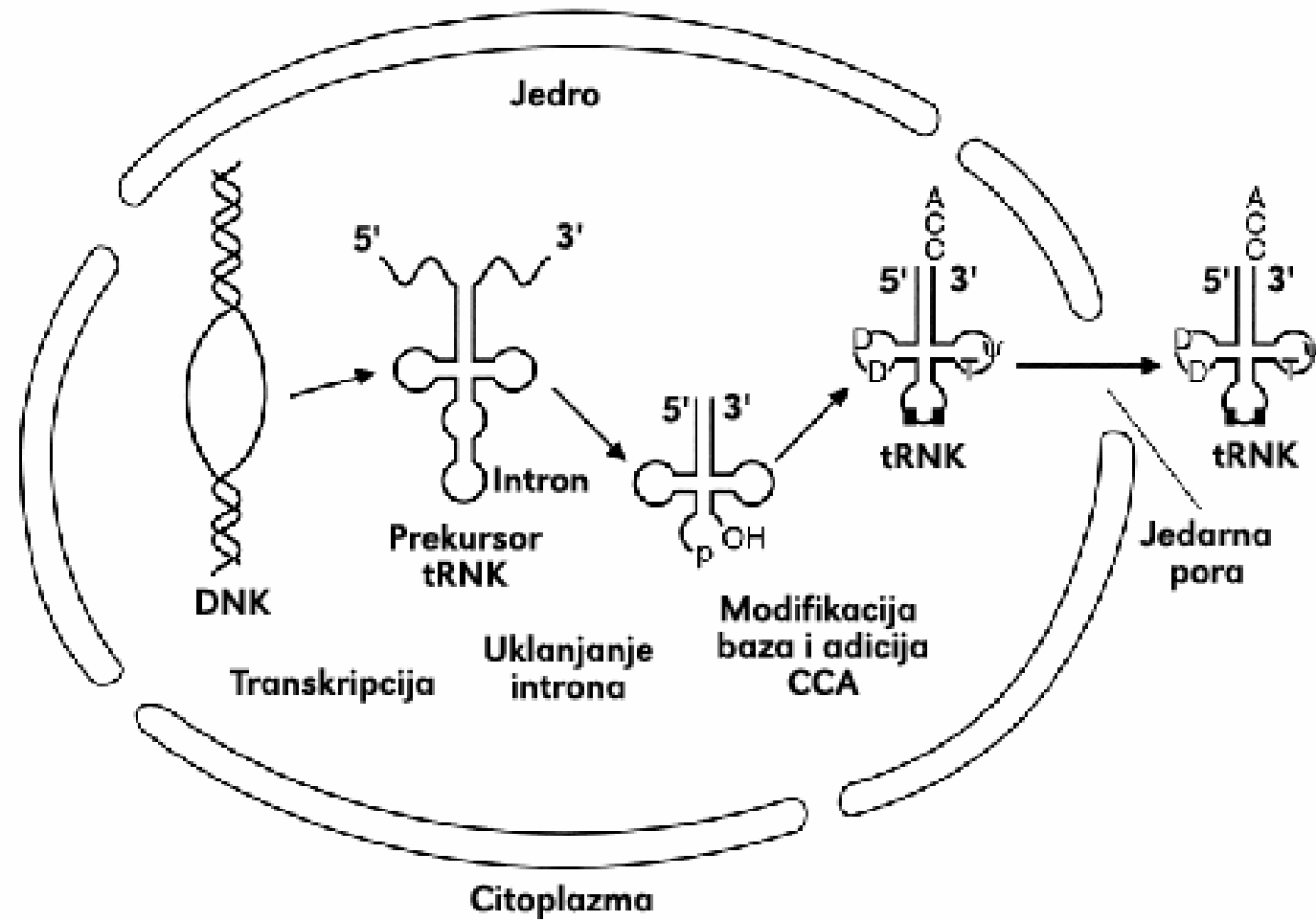
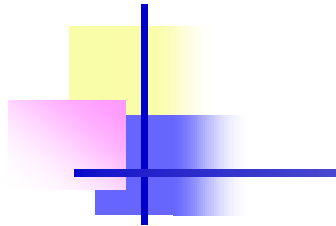


## Neuobičajeni NT prisutni u molekulu tRNK



Ovi nukleotidi nastaju kovalentnom modifikacijom normalnih nukleotida po njihovom ugrađivanju u lanac RNK.

U celoj tRNK, modifikovano je oko 10% nukleotida



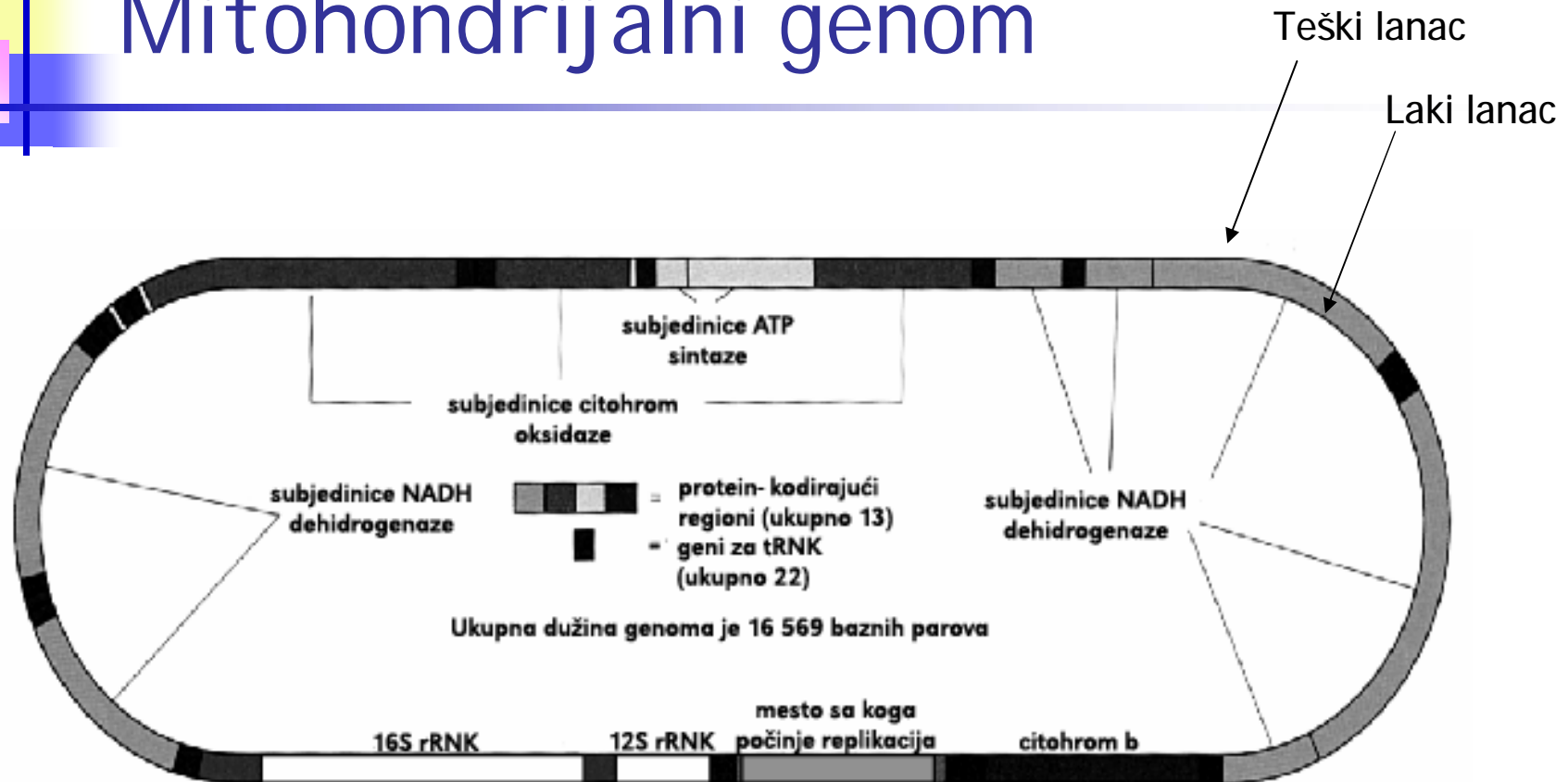




# Mitohondrijalni genom

---

# Mitochondrijalni genom



Oko 17000bp, 37 gena

Sadrži malo nekodirajućih sekvenci

Sopstvena replikacija i transkripcija