

Univerzita Jana Evangelisty Purkyně v Ústí nad Labem

STUDIJNÍ OPORY
MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE PRO NANOTECHNOLOGY
Mgr. Jan Malý, Ph.D.



EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



Studium, výzkum a inovace - rozvoj přírodovědných a technických doktorských programů na Univerzitě J. E. Purkyně v Ústí n. L., Reg. č.: CZ.02.2.69/0.0/0.0/16_018/0002735.

1. Úvod

Molekulární biologie je vědní disciplína zabývající se **studiem buněčných biologických procesů na jejich molekulární úrovni**. Věnuje se popisu **biologických makromolekul** a jejich vzájemným funkčním vztahům. Zvláštní pozornost je věnována zejména funkci makromolekul podílejících se na dědičnosti organismu, tedy **DNA, RNA a proteinům**, jejich vzájemné interakci a regulaci jejich funkce.

Název molekulární biologie byl poprvé použit ve třicátých letech dvacátého století, a to hned dvěma vědci nezávisle na sobě – Warrenem Weaverem a Williamem Thomasem Astburym.

1.1 Struktura a funkce bílkovin

Bílkoviny (tj. **proteiny**) jsou makromolekulární organické látky tvořené **řetězcem aminokyselin** vzájemně spojených **peptidovou vazbou**. Ta spojuje jednoduchou **kovalentní vazbou** aminoskupinu jedné aminokyseliny a karboxylovou skupinu druhé aminokyseliny. **Polykondenzací pak** vzniká různě dlouhý řetězec aminokyselin ukončený na jedné straně volnou aminoskupinou (**N- konec**) a na straně opačné volnou karboxylovou skupinou (**C- konec**).

Proteiny lze podle složení rozdělit na dvě základní skupiny: 1) **jednoduché** a 2) **složené**. Mezi jednoduché proteiny, které obsahují řetězce tvořené jen aminokyselinami patří **fibrilární proteiny (skleroproteiny)** a **globulární proteiny (sféropoteiny)**. Fibrilární proteiny jsou ve vodě nerozpustné a plní především strukturní funkce (například **kolagen, keratin**). Globulární proteiny jsou ve vodě rozpustné a mají kulovitý tvar (například **albumin**). Složené proteiny obsahují kromě proteinové části i část neproteinovou, podle níž se rozlišují na: **glykoproteiny** (obsahující glykosidicky vázaný sacharid); **metaloproteiny** (vázající iont kovu, např. **feritin, transferin**); **chromoproteiny** (obsahující jako prostetickou skupinu pigment, např. **hemoglobin, myoglobin**); **nukleoproteiny** (obsahující navázané nukleové kyseliny) a **lipoproteiny** (obsahující lipidy).

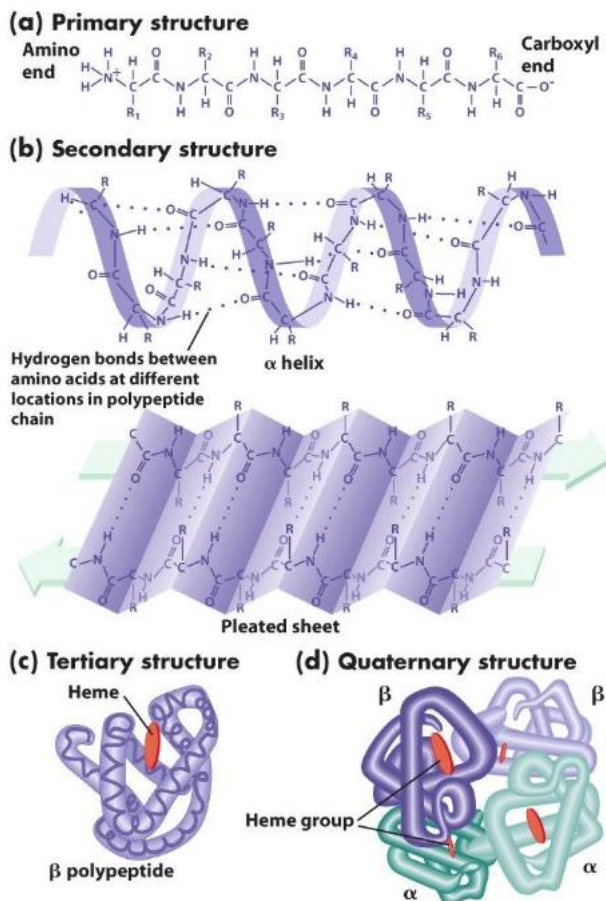
V molekule proteinů lze rozlišit několik struktur: 1) **primární strukturu**; 2) **sekundární strukturu**; 3) **terciární strukturu** a 4) **kvarterní strukturu**. **Primární struktura** je podmíněna sekvencí aminokyselin (vzájemně propojených peptidickými vazbami) v řetězci bílkoviny, jejichž pořadí je čteno od **N- k C- konci**. **Sekundární struktura** je podmíněna vznikem vodíkových můstků mezi **NH-** a **C=O** skupinami peptidové vazby. Mezi nejčastější sekundární struktury patří tzv. **alfa-helix**, kdy je řetězec bílkoviny stočen do pravotočivé nebo levotočivé šroubovice s délkou jednoho závitů 3,6 aminokyselinových zbytků a tzv. **beta-skládaný list**, kdy jsou řetězce dva, uspořádané rovnoběžně a antiparalelně, přičemž je vzájemně stabilizují **H-můstky**. Mezi sekundární struktury patří též například **Zn-prst, Leu-zip** a další. **Terciární struktura** popisuje prostorové uspořádání molekuly podmíněné interakcemi mezi vedlejšími skupinami řetězce (elektrostatickými silami, H-můstky, SH- vazbami, nepolárními interakcemi apod.). Nepolární skupiny obvykle směřují do nitra molekuly a vzájemnými hydrofobními silami přispívají k udržení jejího tvaru (na povrchu molekul rozpustných bílkovin se objevují zřídka). Relativně dlouhou dobu se předpokládalo, že se prostorová struktura proteinu vytváří samovolně, v důsledku primární struktury. V současné době je však známo, že v mnoha případech asistují u tohoto děje speciální proteiny, tzv. **chaperony**, které mohou navíc (díky **ATP**) za určitých podmínek opravit i porušené uspořádání molekuly. **Kvarterní struktura** popisuje prostorové uspořádání podjednotek proteinů složených z více než jednoho řetězce (podjednotky nejsou vzájemně spojeny peptidovými vazbami).

Důsledkem prostorového uspořádání proteinové molekuly je to, že se postranní skupiny aminokyselin (které v primární struktuře mohou být daleko od sebe) dostanou do vzájemné blízkosti a do zcela určitých prostorových vztahů. Při velké rozmanitosti proteinů tak vznikají na povrchu proteinových molekul místa, která jsou specificky schopna vázat nejrůznější organické látky, které se označují jako **ligandy** tohoto proteinu. Pravděpodobně nejnámější je případ **enzymů**, kde je ligandem **substrát**, tj. látka, jejíž chemickou přeměnu je enzym schopen katalyzovat.

Proteiny mají v organismu řadu funkcí, mezi hlavní patří například výše zmíněná **strukturní/strukturální funkce** (opora buněk, tkání, těla), podílí se na **zajištění integrity** organismu, na **transportu látek**, **látkové výměně** nebo třeba také **obraně organismu** (protilátky).

Změna prostorové struktury proteinové molekuly se označuje jako **denaturace**. Denaturace je proces, při němž protein ztrácí své specifické vazebné (případně katalytické) vlastnosti (například působením řady fyzikálních a chemických faktorů). Mírná denaturace může být vratným procesem (**renaturace**), avšak denaturace například velmi vysokou teplotou, může protein trvale (nevratně) poškodit.

Obr. 1 – Struktura proteinů



Zdroj: <http://www.materialy-do-skoly.cz/maturitni-otazky/chemie/aminokyseliny-bilkoviny/>

Další pojmy ke studiu: specializované funkce aminokyselin, historické milníky v porozumění proteinům, typy aminokyselin, svinuté klubko, proteinové rodiny, protilátky, chromatografie, enzymy, motorové proteiny, molekulární přepínače, proteinové stroje

1.2 Struktura a funkce nukleových kyselin – párování basí, denaturace, renaturace a hybridizace, sekundární struktury, vyšší struktury DNA

Nukleové kyseliny jsou svým původem podobné proteinům. Jejich hlavní úlohou je zodpovídat za **reprodukcí organismu**. Díky odlišné produkci proteinů působí druhové odlišnosti. I přes to, že byly nukleové kyseliny poprvé izolovány již roku 1869 (švýcarský lékař Mieschner objevil neznámou látku v jádrech buněk bílých krvinek hnisu – **nuklein**), jejich význam byl prokázán až v roce 1944 (**Averyho-**

MacLeodův-McCartyho experiment).

Do historie objevování nukleových kyselin patří několik významných milníků:

- 1865 - Mendelovy zákony dědičnosti
- 1869 - poprvé izolována DNA Mieschnerem z jader buněk hnisu
- 1911 - gen jako základní jednotka dědičnosti
- 1943 - rentgenová difrakce DNA
- 1952 - geny jsou z DNA
- 1953 - Watson + Crick – dvoušroubovice - DNA (1962 Nobelova cena)**
- 1961 - m-RNA přenáší genetickou informaci v buňce
- 1975 - sekvenování DNA
- 1977 - objev intronů
- 1982 - vznik GenBank – databáze přečtené DNA
- 1990 - projekt sekvenace lidského genomu HUGO
- 1995 - osekvenován první mikrobiální genom *Haemophilus influenzae* (patogenní bakterie)
- 1996 - osekvenován první eukaryotický genom – kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*
- 1998 - osekvenován první mnohobuněčný organismus hlístice *Caenorhabditis sp.*
- 1999 - osekvenován nejmenší lidský chromozóm 22
- 2000 - lidský chromozóm 21, první pracovní verze kompletního lidského genomu
- 2003 - finální verze lidského genomu**

* více např na: https://www.nature.com/milestones/miledna/pdf/miledna_timeline.pdf
<https://sig.ias.edu/rise/tumblr/milestones-of-molecular-biology>
<https://www.broadinstitute.org/what-broad/areas-focus/project-spotlight/crispr-timeline>

Nukleové kyseliny jsou biochemické makromolekulární látky, tvořené **polynukleotidovým řetězcem**, který ve své struktuře uchovává **genetickou informaci** – tím určují činnosti buněk a nepřímo i celého organismu. Podobně jako proteiny mají nerozvětvený řetězec vzniklý kondenzací nukleotidů. **Nukleotidy** jsou nízkomolekulární sloučeniny sestávající ze tří základních složek: 1) **dusíkatých cyklických bází** (**purinové** – **adenin** a **guanin** a **pyrimidinové** – **cytozin** v obou typech, v RNA pak **uracil** a v DNA **tymin**), 2) **pentózy** (RNA – **ribóza**, DNA – **deoxyribóza**) a 3) **kyseliny trihydrogenfosforečné**.

V „páteři“ řetězce nukleových kyselin se střídají zbytky pentózy a kyseliny fosforečné, postranní skupiny jsou dusíkaté báze, **glykosidicky vázané** na zbytky pentóz. Kyselina fosforečná se váže na hydroxyl na uhlíkovém atomu 3' (součástí cyklu) a na hydroxyl atomu 5' (není součástí cyklu) **diesterovou vazbou**. Molekuly nukleových kyselin mají tedy **3' - konec** a **5' - konec**.

Deoxyribonukleová kyselina (DNA) je nositelkou genetické informace všech organismů s výjimkou některých nebuněčných, u nichž hraje tuto úlohu **RNA** (například RNA viry). U eukaryotických organismů (například rostliny a živočichové) je DNA hlavní složkou **chromatinu** (směsi nukleových kyselin a proteinů), zatímco u prokaryot (například bakterie) se DNA nachází volně v cytoplasmě. **Primární struktura DNA** lze znázornit jako lineární řada **nukleotidů** (báze, cukr, fosfát) nebo třeba jako řada písmen, které odpovídají dusíkatým bázím v těchto **nukleotidech** (chybí-li fosfát, hovoří se o tzv. **nukleosidu**). Jak již bylo zmíněno, DNA je směrovaná (tzv. **direkcionální**), tzn., že se dají jednoznačně odlišit oba konce.

Molekula DNA může **být jedno-řetězcová až čtyř-řetězcová** (jedno-řetězcová a dvou-řetězcová u virů, dvou-řetězcová, tzv. dvoušroubovice u buněčných, troj-řetězcová dočasně při crossing-overu, čtyř-řetězcová – Hollidayův spoj). **Dvoušroubovici DNA (sekundární struktura, tzv. double-helix** – obvykle pravotočivá dvoušroubovice, kdy na jeden závit připadá deset párů bází) tvoří dvě navzájem spletené šroubovice, každá mířící opačným směrem (řetězce jsou tzv. **antiparalelní**). Mezi protilehlými bázemi obou vláken se vytvářejí **vodíkové můstky**, a to **tři** mezi **guaninem** a **cytosinem** nebo **dva** mezi **adeninem** a **thyminem**. Jedná se o tzv. **komplementaritu bází** – z ní poté vychází i vzájemná

komplementarita obou vláken DNA (vždy je na určité pozici v molekule jeden nukleotid z dvojice a v protějším vlákně druhý z nich – takto se uchovává v každém z vláken tatáž informace). Díky velkému množství vodíkových vazeb je dvoušroubovice relativně stabilní útvar, ovšem při zahřátí molekula DNA **denaturuje** a oba řetězce se od sebe oddělí. Po ochlazení však mohou i dlouhé komplementární řetězce utvořit původní dvoušroubovici, tzv. **renaturovat**. Na schopnosti denaturace a renaturace DNA je založena tzv. **hybridizace DNA**, tj. tvorba dvou-řetězcových hybridů ze dvou jedno-řetězcových a komplementárních molekul (využívá se například k testu komplementarity sekvencí aj.).

V obecném povědomí DNA tvoří dvoušroubovici (**DNA A, DNA B, DNA Z**), nicméně existují i jiné způsoby uspořádání řetězce, vymykající se tradiční představě. Některé se vyskytují i v buňkách (*in vivo*), jiné jsou spíše laboratorní záležitostí. V rámci **terciární struktury** dvoušroubovice zaujímá tvar tzv. **super-helixu**, kdy se dvoušroubovice stáčí do další šroubovice. **Kvartérní struktura** bývá označována jako **nuklozóm**, který se formuje v tzv. **solenoid** a ten pak v určité fázi dělení buňky tvoří tzv. **chromosom** (kondenzovaná DNA). Ve fázi buňky, kdy neprobíhá dělení je chromosom rozvolněn do tzv. **chromatinu**. Mezi další vyšší úrovně struktury DNA patří také tzv. **genom** – souhrn DNA v buňce.

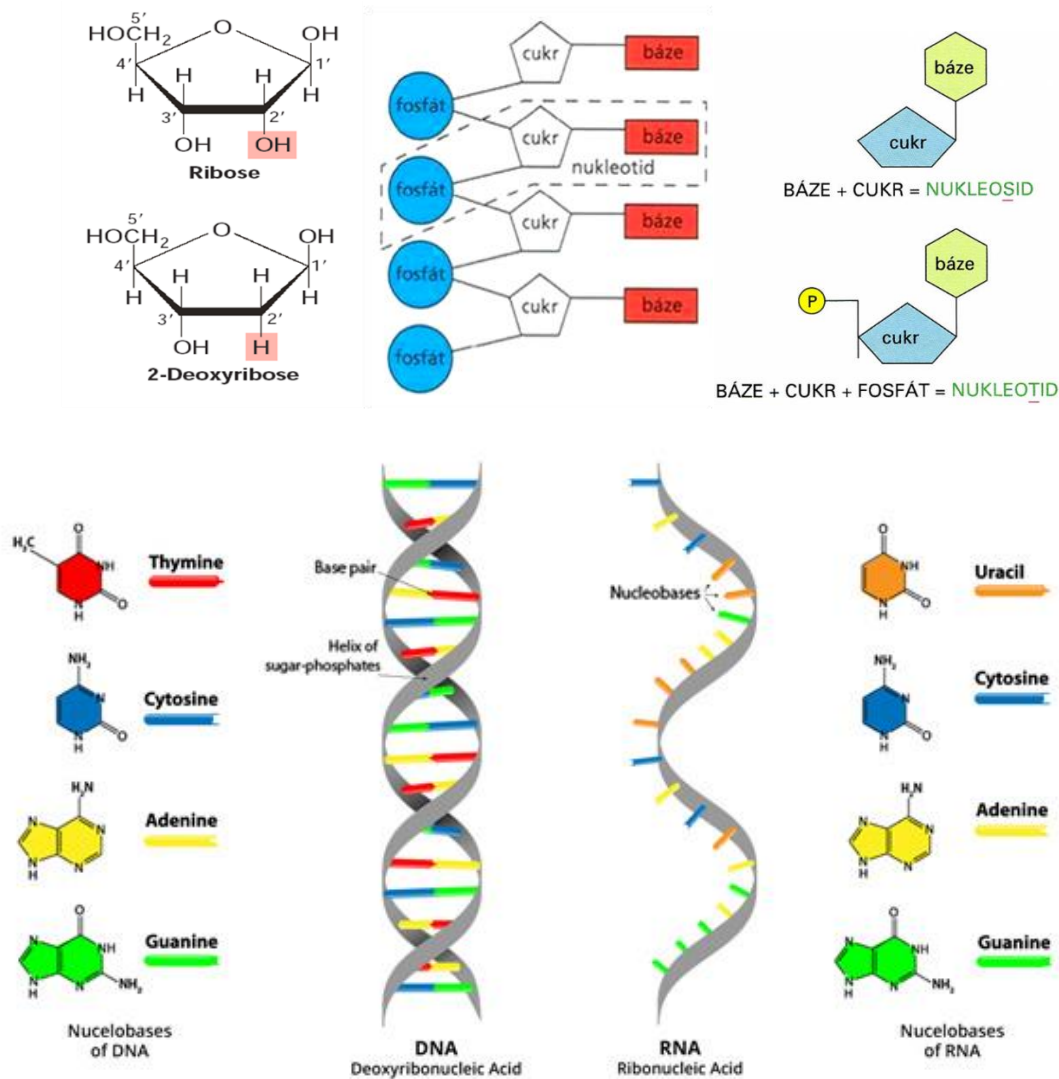
Mnohdy se využívá neobvyklých párovacích míst na molekulách bází (například **G-kvartetů**, čtyřvláknových úseků DNA v telomerických oblastech chromozomů, v nichž do kruhu párují čtyři guaninové báze). Co se týče **trojšroubovice DNA**, pravděpodobně může dočasně vzniknout při tzv. **crossing-overu** nebo být připravena laboratorně. DNA se také může větvit – tak mohou vznikat např. třívláknová či **čtyřvláknová spojení**. V některých případech dvoušroubovicová DNA na jednom svém konci lokálně denaturuje a na uvolněné konce se připojí třetí řetězec – v prostředí buňky by tato struktura mohla vznikat například při výše zmiňovaném crossing-overu, pokud nedošlo k replikaci v jednom z genomů. V jiném případě mohou denaturovat dvě dvoušroubovice a vzájemně se komplementárně přiložit, čímž vznikne čtyřvláknové spojení (v případě crossing-overu se jedná o známý **Hollidayův spoj**, který umožňuje vlastní výměnu homologních vláken). Při replikaci DNA či při její opravě mohou větvení vznikat také. V laboratoři nicméně vznikají ještě mnohem fantastičtější prostorové struktury DNA – byly vyrobeny například krychle či osmistěny složené celé pouze z DNA molekul (tyto a další syntetické struktury DNA jsou v centru zájmu DNA nanotechnologů).

Ribonukleová kyselina (RNA) je zodpovědná za přenos informace z úrovně nukleových kyselin do proteinů a u některých virů je dokonce samotnou nositelkou genetické informace (viz výše). V mnoha ohledech je podobná deoxyribonukleové kyselině (DNA), od které se liší jednak přítomností **ribózy**, kterou má ve své cukr-fosfátové kostře namísto deoxyribózy, a také tím, že využívá nukleovou bázi **uracil** namísto thyminu. Díky větší reaktivitě ribózy může molekula RNA zaujímat větší množství prostorových uspořádání a zastávat mnohem více funkcí než mnohem stabilnější DNA, která je využívána buňkou především jako úložiště genetické informace. Molekula RNA je také na rozdíl od DNA **obvykle jednovláknová** (často ovšem díky vnitřnímu párování zaujímá složitější strukturu, a v některých případech, například u některých virů, se vyskytuje i dvouvláknová RNA). RNA má v těle řadu funkcí, z nichž hlavní je **zajištění překladu genetického kódu**, tedy převod informace z DNA do struktury proteinů. Oblast DNA nesoucí gen je nejprve přepsána (procesem **transkripce**) do **mediátorové/messenger RNA (mRNA)**. Ta je následně přeložena (procesem **translace**) do proteinů tvořených řetězcem aminokyselin. Zařazení správné aminokyseliny při tvorbě proteinů zajišťuje vazba **transferové RNA (tRNA)** na specifický kodón v mRNA pomocí párování jejich bází. Samotný překlad genetického kódu probíhá na **ribozomu**, který je složený z **ribosomální RNA** (tzv. **rRNA**) i proteinů, přičemž RNA v ribozomu netvoří pouze strukturní složku, ale je zodpovědná i za syntézu peptidové vazby v nově vznikajícím proteinu. Ribozom je tedy významným zástupcem skupiny RNA s katalytickou aktivitou, tzv. **ribozymů**. Kromě už zmíněných rolí v překladu genetického kódu nebo strukturních a katalytických funkcí, hraje RNA roli v řadě dalších buněčných pochodů, jako je **úprava RNA**, jemná **kontrola translace** pomocí **RNA interference**, funguje **jako templát pro**

syntézu telomer, atd.

Podle hypotézy RNA světa mohla být RNA pro svou všestrannost, schopnost nést i replikovat genetickou informaci a syntetizovat podle ní proteiny první nukleovou kyselinou využívanou živými organismy.

Obr. 2 – Typy a struktura nukleových kyselin



Zdroje: http://www.mojechemie.cz/Biochemie:Nukleov%C3%A9_kyseliny
<https://www.technologynetworks.com/genomics/lists/what-are-the-key-differences-between-dna-and-rna-296719>

Další pojmy ke studiu: nukleotidové deriváty, Chargaffovo pravidlo, cirkulární DNA, denaturace, renaturace

2. Genetická informace a genetický kód

Proces **přenosu genetické informace** je zformulován v tzv. **ústředním dogmatu molekulární biologie**, postulátu, podle kterého je přenos genetické informace možný jediň z nukleové kyseliny do nukleové kyseliny nebo z nukleové kyseliny do proteinu. Zpětný přenos z proteinu do nukleové kyseliny není

možný – toto dogma zásadně odmítá přenos genetické informace z proteinu do proteinu, z proteinu do nukleové kyseliny a orientuje biologii na obousměrný přenos genetické informace mezi nukleovými kyselinami a jednosměrný přenos z nukleových kyselin do proteinu. Mezi způsoby přenosu genetické informace patří: 1) **replikace** (zajišťující přenos genetické informace z DNA do DNA nebo RNA do RNA), 2) **transkripce** (přepis genetické informace z DNA do RNA nebo z RNA do DNA = **reverzní transkripce**, 3) **translace** (překlad genetické informace z mRNA do primární struktury proteinu).

Genetický kód představuje soubor pravidel, podle kterých se genetická informace uložená v DNA (respektive RNA) převádí na primární strukturu bílkovin (pořadí aminokyselin v řetězci).

Genetický kód je **univerzální** – stejný u většiny živých organismů (pouze u několika málo skupin, např. u mitochondrií se vyskytují drobné odchylky).

Podoba genetického kódu – společná většině živých organismů se nazývá **standardní genetický kód**. Genetický kód je **tripletový**/třípísmenkový, tj. pořadí tří nukleotidů (tzv. **triplet**) kóduje vždy jedinou aminokyselinu. Ze čtyř různých nukleotidů v mRNA se tak může vytvořit $4^3 = 64$ různých tripletů neboli kódových slov, tzv. **kodonů**. Existence více kodonů pro jednu aminokyselinu znamená, že kód je tzv. **degenerovaný** (resp. **redundantní**).

Čtení genetického kódu probíhá na **ribosomech**. Jedná se o proces, který je součástí **translace** a spočívá v jednosměrném rozeznávání kodonů v mRNA **antikodony** tRNA. **Kodony** jdou v mRNA za sebou, bez mezer a bez překrývání v tzv. **čtecím rámci**. Ten se nastaví prvním, tzv. **iniciačním kodonem**, což je nejčastěji **AUG** kódující **methionin** (spolu s **UGA** – ten může vystupovat jako kodon terminační nebo kódovat aminokyselinu **selenocystein** – jedná se o tzv. **bifunkční kodón**) za předpokladu, že se na něj naváže **antikodonem iniciační tRNA**. **Antikodonem** se rozumí specifický triplet v tRNA, jehož prostřednictvím se tRNA nesoucí příslušnou aminokyselinu přechodně váže ke komplementárnímu kodonu v mRNA. Naprostá většina nově syntetizovaných bílkovinných řetězců začíná výše zmiňovanou aminokyselinou methioninem (u bakterií začíná syntéza polypeptidového řetězce na ribozomu **formylmethioninem**). Některé kodony jsou označovány jako tzv. **terminační** (nebo také **nesmyslné**). Tyto kodony (**UGA, UAA, UAG**) nekódují žádnou aminokyselinu, jejich funkce spočívá v signalizaci zakončení syntézy polypeptidu na ribozomu.

Většina kodonů, které mají smysl, je rozdělena do tzv. **kodonových rodin** a **dvoukodonových sad**. **Kodonová rodina** je skupina čtyř synonymních kodonů, které se liší jen nukleotidem ve třetí pozici a kódují stejnou aminokyselinu. **Dvoukodonová sada** jsou dva synonymní kodony končící ve třetí pozici jeden na A a druhý na G (purinové nukleotidy) nebo jeden na U a druhý na C (pyrimidinové nukleotidy).

Pojem **gen** se obecně chápe jako jednotka genetické informace. Obsahuje genetickou informaci o primární struktuře buď funkční molekuly translačního produktu (polypeptidu, proteinu) nebo funkční molekuly produktu transkripce (tRNA, rRNA aj.), který nepodléhá translaci.

Mezi **konkrétní formy genu** patří: 1) **strukturní gen** (úsek DNA nebo RNA řetězce, který obsahuje informaci o primární struktuře polypeptidu jako translačního produktu), 2) **gen pro funkční RNA** (úsek DNA řetězce přepisovaný do primární struktury tRNA nebo rRNA, případně dalších druhů RNA, které nejsou určeny k translaci) a za 3) **gen jako regulační oblast** (plní regulační funkci neboť obsahuje informaci o vazbě ke specifickému proteinu, který po realizaci této vazby signalizuje určitý proces, například zahájení nebo zastavení transkripce).

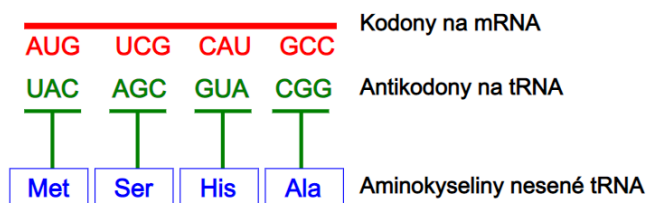
Obr. 3 – Genetický kód, čtení genetického kódu

		2. báze				
		U	C	A	G	
1. báze (5' konec)	U	Phe ^{UUU}	Ser ^{UCU}	Tyr ^{UAU}	Cys ^{UGU}	U
		Phe ^{UUC}	Ser ^{UCC}	Tyr ^{UAC}	Cys ^{UGC}	C
		Leu ^{UUA}	Ser ^{UCA}	Stop ^{UAA}	Stop* ^{UGA}	A
		Leu ^{UUG}	Ser ^{UCG}	Stop ^{UAG}	Trp ^{UGG}	G
C	Leu ^{CUU}	Pro ^{CCU}	His ^{CAU}	Arg ^{CGU}	U	
	Leu ^{CUC}	Pro ^{CCC}	His ^{CAC}	Arg ^{CGC}	C	
	Leu ^{CUA}	Pro ^{CCA}	Gln ^{CAA}	Arg ^{CGA}	A	
	Leu ^{CUG}	Pro ^{CCG}	Gln ^{CAG}	Arg ^{CGG}	G	
A	Ile ^{AUU}	Thr ^{ACU}	Asn ^{AAU}	Ser ^{AGU}	U	
	Ile ^{AUC}	Thr ^{ACC}	Asn ^{AAC}	Ser ^{AGC}	C	
	Ile ^{AUA}	Thr ^{ACA}	Lys ^{AAA}	Arg ^{AGA}	A	
	Met I ^{AUG}	Thr ^{ACG}	Lys ^{AAG}	Arg ^{AGG}	G	
G	Val ^{GUU}	Ala ^{GCU}	Asp ^{GAU}	Gly ^{GGU}	U	
	Val ^{GUC}	Ala ^{GCC}	Asp ^{GAC}	Gly ^{GGC}	C	
	Val ^{GUA}	Ala ^{GCA}	Glu ^{GAA}	Gly ^{GGA}	A	
	Val ^{GUG}	Ala ^{GCG}	Glu ^{GAG}	Gly ^{GGG}	G	

I - Iniciační kodon; * - Sec - Selenocystein; Stop - Terminační (stop) kodon



Čtení genetického kódu



Zdroje: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=1483&typ=html
<https://slideplayer.cz/slide/6077889/>

Další pojmy ke studiu: transferová DNA, transferová RNA, UGA, odchylky v kódování, mutace, supresorové mutace

3. Replikace

Replikace je tvorba kopií molekul nukleových kyselin (zajišťujících přenos genetické informace) z DNA do DNA nebo z RNA do RNA. Při replikaci se genetická informace přenáší z jedné molekuly nukleové kyseliny do jiné molekuly stejného typu. Kopie původní molekuly vzniklá její replikací se označuje jako tzv. **replika**.

Replikace **dvouřetězcové DNA (dsDNA)** probíhá **semikonzervativním způsobem** – dvoušroubovice molekuly DNA se rozplétá a oba její řetězce slouží jako **matrice (templát)** pro syntézu komplementárních řetězců, tzn. že v obou výsledných molekulách se zachová jeden řetězec výchozí molekuly. Takto je zajišťováno, že si dceřiné molekuly DNA zachovávají stejnou genetickou informaci jako původní molekula (nemění se primární struktura replikující se molekuly). Podle pravidla párování bází se po rozpletení dvoušroubovice váží na řetězec volné nukleotidy, které se za katalytického účinku **DNA-polymerázy** spojují fosfodiesterovými vazbami.

Na matricovém způsobu syntézy je založena také replikace **jednořetězcové RNA (ssRNA)**, která tvoří genom RNA virů. RNA slouží jako matrice pro syntézu komplementární RNA, jež pak přechodně tvoří s matricovou RNA dvouřetězcovou molekulu. Jednotlivé RNA řetězce se však z dvouřetězcové RNA uvolní a stávají se matricemi pro další, což se mnohokrát opakuje. Fosfodiesterové vazby mezi **ribonukleotidy** jsou katalyzovány enzymem **RNA-replikázou**.

Do tajů procesu replikace začali vědci blíže pronikat mezi šedesátými až sedmdesátými lety minulého století. V současné době jsou již známy relativně detailní informace o tom, jaké molekulární pochody se v replikaci uplatňují. Získané informace jsou také prakticky využívány v některých výzkumných metodách, například **PCR** nebo **sekvenování**.

3.1 Replikace bakteriálního genomu

Replikace u bakterií je relativně dobře prozkoumaná, zejména proto, že jejich menší genom představuje snadnější model než komplexní eukaryotické organizmy. Zásadní pro průběh replikace u bakterií je skutečnost, že obvykle mají kruhovou molekulu DNA, tzv. **nukleoid**. Zatímco u bakterií replikace probíhá jen z jednoho **replikačního počátku**, u archeí (řadících se stejně jako bakterie mezi prokaryota) je těchto míst zpravidla více (podobně jako u eukaryot). Také příslušné **DNA polymerázy** jsou podobné spíše eukaryotním DNA polymerázám.

Obě složky bakteriálního genomu (**chromozomová** a **plazmidová DNA**) mají vlastnosti **replikonů**. Jejich replikace začíná v každém replikonu od tzv. **místa ori**, kde se vytvoří nejdříve tzv. **replikační vidlice**. Replikační vidlice je místo ve dvoušroubovici DNA, kde dochází k rozestupu DNA řetězců (vlivem přerušení vodíkových vazeb) – vzniká tak prostor potřebný k umístění proteinů a enzymů katalyzujících replikaci. Replikační vidlice se poté rozevívá a pohybuje směrem, kterým replikace probíhá (**jednosměrná replikace** – pohyb jedním směrem, **dvousměrná replikace** – pohyb oběma směry od počátku). Na replikaci bakteriální dvouřetězcové DNA se svými katalytickými účinky podílí celá řada enzymů: 1) **DNA-polymerázy**, 2) **DNA-ligáza**, 3) **DNA-primáza**, 4) **DNA-helikázy**.

DNA-polymerázy (DNA-polymeráza typu I., II. a III.) přítomnosti **DNA** nebo **RNA primeru** (krátký oligonukleotid poskytující 3' konec pro zahájení syntézy polydeoxyribonukleotidového řetězce). Nutnou podmínkou pro jimi katalyzovanou syntézu nového řetězce je DNA jako matrice (viz výše). Pro všechny DNA (a také RNA) polymerázy je charakteristické, že polymerace, kterou katalyzují, se uskutečňuje vždy ve směru **5' → 3'** – tzn., že polynukleotidový řetězec prodlužují na jeho 3' konci tak, že na 3'OH skupinu tohoto konce napojují vždy nukleosid-5'-monofosfáty (které odnímají z nukleosid-5'-trifosfátu). **DNA-ligáza** je enzymem katalyzujícím **ligaci** (spojování) polydeoxyribonukleotidů, tedy vytvoření fosfodiesterové vazby mezi 5' koncem a 3' koncem DNA řetězců nebo jejich fragmentů. Uplatňuje se při replikaci DNA během spojování tzv. **Okazakiho fragmentů**. **DNA-primáza** je enzym, který katalyzuje syntézu RNA primeru, od jehož 3' konce se syntetizuje Okazakiho fragment. **DNA-helikázy** jsou enzymy katalyzující odvíjení komplementárních polynukleotidových řetězců, tvořících

dvoušroubovici DNA. Jejich katalytický účinek spočívá v rozrušení vodíkových vazeb, které drží pohromadě polydeoxyribonukleové řetězce ve dvoušroubovici (spřaženo s **hydrolýzou ATP**). Energie, která se hydrolýzou uvolní je helikázou využívána k odvíjení DNA řetězce ve směru 5' → 3' (na kterém probíhá syntéza Okazakiho fragmentů). Vlivem odvíjení tohoto řetězce dochází před replikační vidlicí k „překrucování“ dvoušroubovice, které odstraňuje enzym **topoizomeráza**. Topoizomerázy (které se dělí do třech skupin – **topoizomeráza I**, **topoizomeráza II** a **recQ-helikáza**) jsou schopné rozštěpit vlákno DNA, rozmotat 1 či 2 otočky dvoušroubovice a opět spojit rozrušený řetězec do celistvé podoby.

Obecně u replikace dvouřetězcové DNA kromě těchto enzymů působí ještě další proteiny (například **DNA clamp**, **SSB proteiny** aj.)

Syntéza nových DNA řetězců při replikaci není jen **semikonzervativní**, ale také tzv. **semidiskontinuální**, což je způsob syntézy v replikační vidlici spočívající v tom, že se jeden řetězec syntetizuje na matricovém řetězci **kontinuálně** a druhý **diskontinuálně**. **Kontinuální syntéza** spočívá v již zmíněném postupném připojování nukleosid-5'-monofosfátu k 3'-OH konci DNA řetězce prodlužujícího se souvisle od počátku jeho syntézy až do jejího konce (ve směru 3' → 5'). Řetězec syntetizovaný kontinuálně se označuje jako **vedoucí DNA řetězec**. Tzv. **diskontinuální syntéza** probíhá přes zmíněné Okazakiho fragmenty ve směru 5' → 3'. Každý Okazakiho fragment je syntetizován na matricovém řetězci ve směru 5' → 3' od 3' konce RNA primeru. Okazakiho fragmenty se poté spojují do souvislého DNA řetězce za odbourání RNA primerů. Řetězec syntetizovaný diskontinuálně (prostřednictvím Okazakiho fragmentů) se označuje jako tzv. **opožďující se DNA řetězec**.

Protože je semidiskontinuální způsob syntézy při replikaci dvouřetězcové DNA rozšířen jak u bakterií, archeí, tak i u eukaryot, je pravděpodobně obecný.

3.2 Replikace plazmidové DNA

Plazmidy jsou replikony kružnicového typu, ale značně menších rozměrů, než je bakteriální chromozomová DNA. Principiálně se však od jejich replikace neliší – je **semikonzervativní**, **semidiskontinuální** a **dvousměrná**.

3.3 Replikace DNA eukaryotického genomu

Replikace chromozomové (jaderné) dvouřetězcové DNA probíhá v klíčových rysech prakticky stejně jako u bakterií – je **semikonzervativní** a **semidiskontinuální** – má však také řadu specifických odlišností. První z nich je, že probíhá jen v určité fázi **buněčného cyklu** (tzv. **S fáze**). To je velmi důležitý rozdíl oproti bakteriím, u kterých replikace začíná okamžitě po skončení buněčného dělení. Zdvojené molekuly DNA segregují jako součást chromozomu během mitózy (**M fáze** buněčného cyklu) do dceřiných buněk, v tzv. **fázi G1** (která předchází S fázi) a ve **fázi G2** (která nastupuje po S fázi) se eukaryotická buňka vyznačuje metabolickou aktivitou (transkripce DNA, translací, nikoli však replikací). Další odlišností je, že DNA každého chromozomu je lineární a replikuje se na mnoha úsecích, z nichž každý představuje jeden **replikon s jedním počátkem replikace**. Do konce S fáze skončí replikace celé molekuly DNA, přičemž platí, že **každý replikon se replikuje pouze jedenkrát**.

Vezme-li se v úvahu celý genom eukaryotické buňky, pak lze konstatovat, že jeho replikace je katalyzována třemi DNA-polymerázami: 1) **DNA-polymerázou α** (v komplexu s DNA-primázou katalyzuje syntézu Okazakiho fragmentů), 2) **DNA-polymerázou γ** (katalyzuje syntézu mitochondriové DNA) a za 3) **DNA-polymerázou δ** (katalyzuje syntézu vedoucího řetězce a dokončuje syntézu opožďujícího se řetězce; mimo to má také 3' → 5' exonukleázovou aktivitu).

Na rozdíl od bakterií, u nichž je syntéza vedoucího a opožďujícího se řetězce katalyzována DNA-polymerázou III., je k syntéze u eukaryot zapotřebí dvou samostatných polymeráz (DNA-polymeráza α a DNA-polymeráza δ).

Při replikaci lineárních molekul DNA vyvstává problém, jenž se u replikace kružnicových

molekul DNA (bakteriální, mitochondriová a chloroplastová DNA) nevyskytuje. Jedná se o **nedokončení replikace na 3' koncích řetězců**, které působí jako matricové. Na těchto koncích totiž nemůže DNA polymeráza katalyzovat napojování deoxyribonukleotidů, neboť vlastně „nemá co napojovat“ (po odstranění RNA primerů chybí totiž pro toto napojování 3' konec). Doreplikování na 3' koncích matricových řetězců lineární DNA probíhá pomocí tzv. **telomerázy** (enzymu, jenž působí jako **zpětná transkriptáza**).

3.4 Postreplikační modifikace

Během každého dne dochází v DNA buněk k tisícům náhodných chemických změn, kdy převážná většina je odstraněna **opravou DNA**. Obecně v buňce existuje celá řada opravných mechanismů a každý z nich je katalyzován jinou skupinou enzymů. **Většina opravných mechanismů je závislá na existenci dvou kopií genetické informace**, pokud dojde k poškození jednoho řetězce, není informace nenávratně ztracena, lze ji znovu obnovit podle komplementárního vlákna. Při většině změn vznikají struktury, které se v nepoškozené DNA nevyskytují – proto lze snadno odlišit, který z řetězců je chybný. Důležitost reparace DNA je potvrzena existencí více jak 300 genů, kódující v lidském genomu proteiny účastníci se reparačních pochodů.

Většina typů opravných systémů používá tři následující kroky: 1) **vystřížení** (poškozený úsek je odstraněn jednou z řady specifických nukleáz), 2) **resyntéza DNA** (vystřížený úsek DNA je znovu nasyntetizován DNA-polymerázou) a 3) **ligace** (fragmenty jsou spojeny DNA-ligázou za využití energie hydrolýzy ATP). Opravná funkce DNA-polymerázy se nazývá **korektura (proofreading)**. Pro opravu jiných poškození (například thyminových dimerů, pyrimidinových dimerů vznikajících UV zářením) je nutné rozložit delší úsek DNA (obvykle 10–20 nukleotidů). Reparace (tzv. **přímá oprava poškození nukleotidů**) je umožněna existencí tzv. **fotoreaktivačních enzymů**, jako je **DNA fotolyáza** (přítomná jak u prokaryot tak i eukaryot). Tento enzym se váže ve tmě ve formě dimeru (55 a 65 kD) na pyrimidinový dimer. **Chromofor**, nejčastěji tzv. **MTHF**, nebo **5-deazaflavin** absorbuje v oblasti 300–500 nm a přenáší excitační energii na **FADH-**, který redukuje thyminový dimer a způsobí jeho reparaci na dva nesvázané thyminy.

Chemické látky, tzv. **alkylační činidla** (např. tzv. **NMNG**) mají schopnost alkylovat (přenášet alkylovou skupinu) dusíkaté báze (např. guanin za vzniku **O6-alkylguaninu**). Tyto chemické změny jsou velmi **mutagenní**, neboť vnášejí při replikaci do vznikajícího řetězce špatné báze v důsledku nesprávného párování (například thymin místo cytosinu). Příkladem enzymu, který umí odstranit tyto alkylované báze je vznik **O6-alkylguanin-DNA-alkyltransferázy**, která je však po této reakci sama zničena a není tedy klasickým enzymem.

Poměrně větší poškození DNA, ale i menší poškození (včetně jednoduchých bází) je zajišťována tzv. **excizní reparací**. V případě většího poškození se jedná o tzv. **nukleotidovou excizní reparaci (NER)**, která se nachází u všech organismů, které eliminují poškození dsDNA vystřížením celých poškozených úseků (oligonukleotidů) a následným nahrazením novou DNA. Tento systém je zpravidla aktivován v místě, kdy dochází k porušení struktury helixu v důsledku přítomnosti nesprávných či modifikovaných nukleotidů (bází). **U člověka** je tento způsob reparace **hlavním mechanismem**, jak dochází k boji proti karcinogenům, nadměrnému UV ozáření a toxickému působení cigaretového kouře. **NER systémy** prokaryot a eukaryot si jsou velmi podobné (až na počet podjednotek enzymu, tj. 3 u prokaryot a 6 u eukaryot), avšak pravděpodobně vznikly **konvergentní evolucí**.

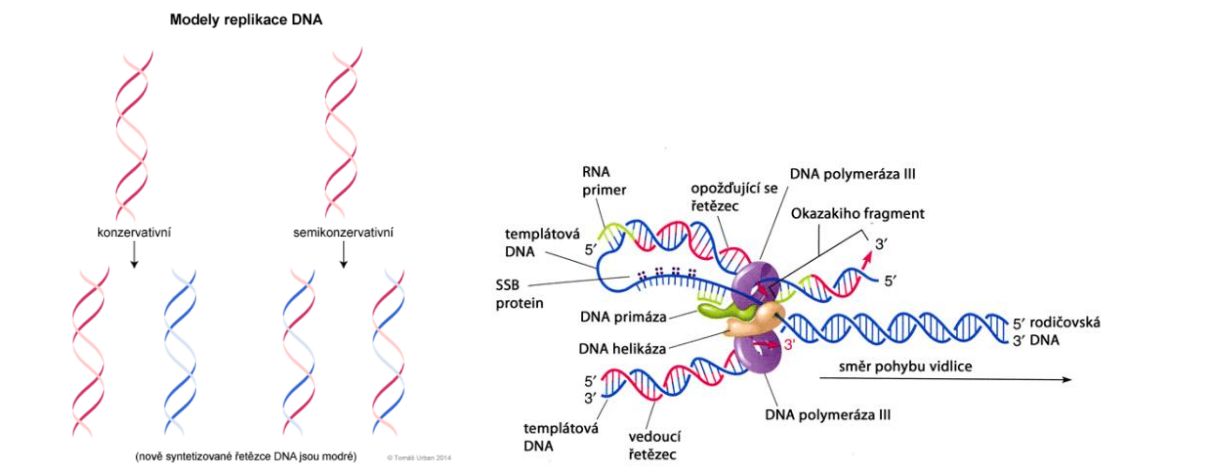
Báze nukleových kyselin jsou často modifikovány reakcemi, které probíhají za normálních fyziologických podmínek, ale i skrze nejrůznější toxické působení polutantů. Vznikají tak modifikované báze jako je například **7-methylguanin**, **3-methyladenin** atd. Ionizující záření může způsobit otevření heterocyklů bází. Tyto změny mohou způsobit změnu párování bází. **BER mechanismus** napomáhá tyto pozměněné báze odstranit. Buňky obsahují řadu tzv. **DNA glykosiláz**, které mají schopnost rozpoznat

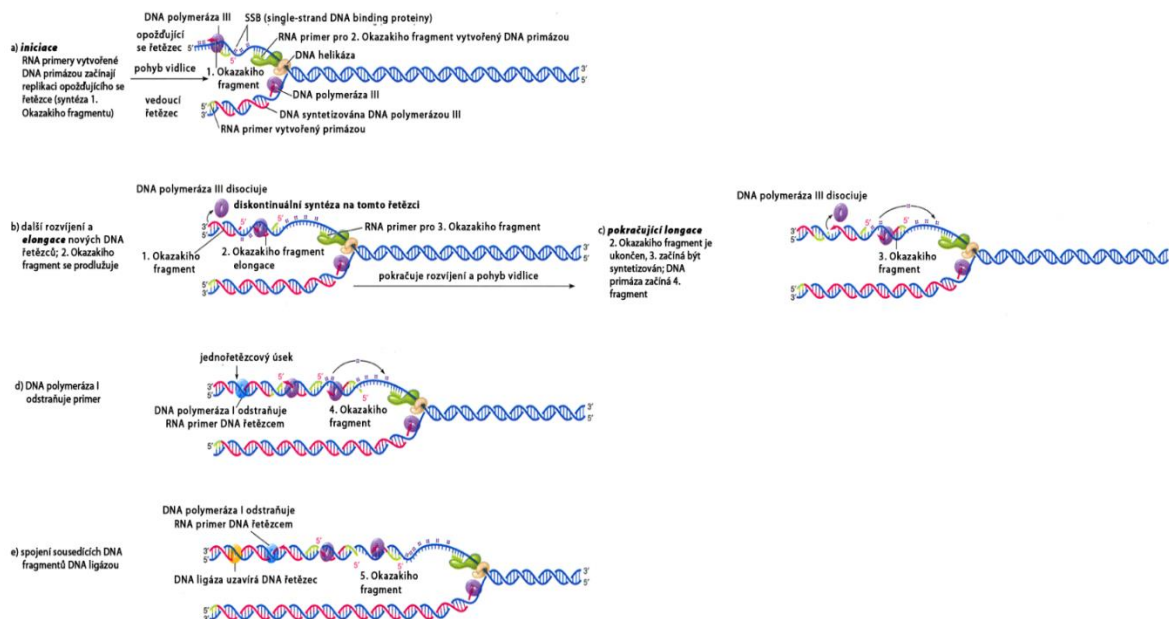
specificky modifikovanou bází a rozštěpit glykosidickou vazbu mezi bází a cukrem a ponechat tak pouze cukernou část nukleotidu v řetězci DNA. V následném kroku je tzv. **bezbázové místo (apurinic nebo apyrimidinic site, AP-site)** odstraněno naštěpením AP endonukleázou a nahrazeno pomocí DNA-polymerázy a DNA-ligázy správným nukleotidem.

Jakákoliv chyba párování, která není opravena v průběhu replikace (tj. editační aktivitou DNA-polymerázy) může být opravena pomocí mechanismu tzv. **mismatch repair (MMR – mismatch repair)**. Replikační aparát udělá zhruba jednu chybu na 10^7 zkopírovaných nukleotidů (navíc 99 % z nich je poté ještě odstraněno opravou chybného párování bází, což zvyšuje přesnost replikace na jednu chybu na 10^9 zreplikovaných nukleotidů). Kdykoli udělá replikační aparát chybu, zanechá za sebou špatně se párující nukleotidy. Pokud nejsou opraveny, dochází k zafixování této mutace v příštím kole replikace (dědičná predispozice k rakovinám). Proteiny komplexu pro opravu chybného párování bází jsou schopné tyto nukleotidy rozpoznat, odstranit v tomto místě jeden z řetězců DNA a znovu ho nasyntetizovat.

Jako vedlejší produkt metabolismu buňky mohou po expozici DNA ionizujícím zářením (nebo vlivem volných radikálů) vznikat tzv. **dvojřetězcové zlomy DNA (DSB)**. Navíc jsou DSB také normálními intermediáty DNA v přirozených procesech (například meióza). Neopravené DSB mohou být pro buňku letální, či mohou způsobovat vznik rakoviny. Z tohoto důvodu jsou opravné mechanismy DSB esenciální pro život buňky. Buňky mají ve své podstatě **dvě odlišné strategie/mechanismy** reparace DSB – 1) **rekombinační** a 2) **non-homologní rekombinaci konců**.

Obr. 4 – Modely replikace DNA, model replizomu – komplex klíčových proteinů, schéma replikace





Zdroj: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=1481&typ=html

Další pojmy ke studiu: plazmidy, sliding clamp protein, SSB protein, depurinace, deaminace, *E. coli*, *Thermus aquaticus* (Taq), bakteriofág ϕ X174, *Saccaromyces cerevisiae*, retroviry, SOS odpověď

4. Transkripce

Transkripce je přepis genetické informace z DNA do molekuly RNA. V drtivé většině případů se jedná o přepis informace z jednoho genu, sloužícího k tvorbě jedné specifické bílkoviny, kterou buňka v danou chvíli potřebuje (existují však také tzv. **nekódující RNA**, například **tRNA**, **rRNA**, **siRNA** atd.). Vlákno RNA se vytváří na **principu komplementarity** k vláknu DNA. Poté, co je informace přepsána, je prostřednictvím mRNA přenesena na tzv. **proteosyntetický aparát**, kde se podle opsaného pořadí zahájí **proteosyntéza**.

Transkripce je enzymatický proces, kdy je enzym **DNA-dependentní RNA-polymeráza** schopná podle vzoru v podobě DNA vyrábět kopii v podobě RNA. Nejdříve se rozplete dvoušroubovice DNA (jeden z řetězců slouží jako **templát** pro syntézu RNA), poté se RNA polymeráza naváže na začátek genu a začne na nukleotidy DNA připojovat komplementární nukleotidy RNA (kupříkladu řetězec DNA v podobě A-T-C-G-G se do RNA přepíše jako U-A-G-C-C). Když se do mRNA přepíše celý gen, jednořetězcová lineární molekula RNA se odpojí (dochází k obnovení dvoušroubovice DNA) a v typickém případě putuje k ribozomu, kde z ní v procesu translace vzniká bílkovina.

Jak již bylo zmíněno výše, většina genů v buňce kóduje aminokyselinovou sekvenci proteinů a molekuly RNA vzniklé transkripcí těchto genů jsou společně nazývány **informační, mediátorová** nebo **messenger RNA**, jejichž zásadní funkcí je řídit vznik proteinu. Konečným produktem jiných genů jsou však i tzv. **nekódující RNA**, které mají (stejně jako proteiny) v buňce **funkce strukturní** a **enzymovou úlohu** a hrají důležitou roli při **překlada** RNA do proteinu.

Ribozomální RNA (rRNA) tvoří jádro ribozomů, na kterých je mRNA překládána do proteinu. **Transferová RNA (tRNA) je adaptorem**, který **vybír**á **správné aminokyseliny** a umísťuje je do

správného místa na ribozomu tak, aby mohly být začleněny do rostoucího aminokyselinového řetězce. **microRNA (miRNA)** se významně podílí na **regulaci genové exprese**, **small/short-interfering RNA (siRNA)** se uplatňují v procesu nazvaném **RNA interference**, jevu, kdy tato RNA ovlivňuje expresi (míru translace) určitého genu a tzv. **small-nuclear RNA (snRNA)** se podílí na procesu zvaném **splicing**, při němž dochází k vystříhání intronů z **pre-mRNA**.

Celý proces je poměrně komplikovaný, nicméně obecně je možné transkripci rozdělit na čtyři fáze: 1) **vazba na oblast DNA zvanou tzv. promotor** (aktivace RNA-polymerázy), 2) **iniciace** (rozvinutí dvoušroubovice DNA, tvorba RNA, RNA-polymeráza vystupuje z oblasti promotoru), 3) **elongace** (prodlužování řetězce), 4) **terminace** (ukončení transkripce a uvolnění RNA molekuly). Po samotné transkripci (ke které dochází zásadně ve směru 5' → 3') následuje několik **posttranskripčních úprav** (nejsou součástí samotného procesu transkripce).

4.1 Transkripce bakteriálního genomu

Transkripci v buňkách bakterií katalyzuje výše zmíněný enzym **RNA-polymeráza**, tj. **transkriptáza**, která se váže na promotor a katalyzuje na matricovém DNA řetězci syntézu dlouhých primárních transkriptů: 1) **mRNA (messenger RNA)** – nese přepis genetické informace obsažené ve strukturních genech a slouží jako matrice pro syntézu polypeptidového řetězce na ribozomu – nepodléhá splicingu, 2) **pre-rRNA (prekurzorová ribozomová RNA)** – primární transkript genů pro rRNA, který se posttranskripčně upravuje na různé funkční typy rRNA a 3) **pre-tRNA (prekurzorová transferová RNA)** – představuje primární transkript genů pro tRNA, která se jednotlivě upravuje na různé funkční typy tRNA.

Podle primárních transkriptů jsou rozlišovány **transkripční jednotky**: 1) **obsahující strukturní geny**, 2) **obsahující geny pro rRNA** a 3) **obsahující geny pro tRNA**. Na rozdíl od eukaryot stejná bakteriální RNA-polymeráza katalyzuje transkripci všech uvedených typů transkripčních jednotek a syntézu všech uvedených typů primárních transkriptů. Všechny typy transkripčních jednotek mají též principiálně stejnou strukturu a sestávají z promotoru, za kterým následuje obvykle více genů a terminátor. **Primární transkript** obsahuje většinou přepisy více genů, je tzv. **polygenní**.

Transkripční jednotky bakteriálního genomu jsou dvojího typu: **operony** a **neoperonové transkripční jednotky**. Základní funkční elementy obou typů jsou 1) **promotor**, 2) **startovací nukleotid**, 3) **přepisované geny** a 4) **terminátor**. Operony se liší od neoperonových jednotek v tom, že se mezi jejich promotorem a startovacím nukleotidem nachází regulační oblast, označovaná jako tzv. **operátor** (regulační oblast v DNA, na kterou se váže protein, který se označuje jako **represeor** – po jeho vazbě se transkripce zastaví). Operon je tedy transkripční jednotkou řízenou promotorem a operátorem. Neoperonová jednotka je řízena pouze promotorem.

RNA-polymeráza se naváže na sekvence promotoru jen tehdy, obsahuje-li protein označovaný jako **sigma faktor**, tj. podjednotku RNA-polymerázy podmiňující její specifickou vazbu na promotor. Další průběh transkripce spočívá již ve výše popsaném mechanismu – **vazba, iniciace, elongace a terminace**. K ukončení transkripce jsou dvě možnosti: 1) **opakující se guanin – cytosin (G – C) vazby a následně sekvence několika adeninových bází** (RNA řetězec se vlivem této sekvence „zacuchá“, a vzniklé prostorové uspořádání je zřejmě signál pro RNA polymerázu k ukončení své aktivity), 2) **protein rho** (hexamerický proteinový komplex s helikázovou aktivitou), který rozpozná jistou sekvenci na RNA a „vytrhne“ konec RNA řetězce z dosahu RNA-polymerázy. Oba způsoby terminace ještě vyžadují jisté pomocné bílkoviny a pomocné okolní sekvence, které jejich průběh ovlivňují.

Transkripce u bakterií je **bezprostředně spřažena s translací** – současně s transkripcí mRNA probíhá translace téže molekuly mRNA a polypeptidový řetězec se tedy začíná syntetizovat ještě před ukončením samotné transkripce. **Spřažení transkripce a translace** je velmi účinný proces syntézy proteinů. Několik ribozomů navázaných na jednu molekulu mRNA se označuje jako **polyribozom**.

4.2 Transkripce u eukaryot

U transkripce eukaryot je třeba rozlišovat transkripci jaderného genomu od transkripce, která probíhá v mitochondriích a chloroplastech. Transkripční jaderných genů se tvoří tyto primární transkripty: **1) heterogenní jaderná RNA (hnRNA)** – prekurzorová mRNA, vzniká transkripcí transkripčních jednotek obsahujících strukturní geny v jádře, **2) prekurzorová ribozomová RNA (pre-rRNA)** – vzniká transkripcí transkripčních jednotek, které obsahují geny pro rRNA (posttranskripční úpravou se štěpí na funkční druhy rRNA), **3) prekurzorová transferová RNA (pre-tRNA)** – vzniká transkripcí transkripčních jednotek obsahujících geny pro tRNA (posttranskripčně se upravuje na jednotlivé tRNA), **4) 5S-rRNA – rRNA** tvořící se transkripcí genů pro 5S-rRNA a za **5) malé RNA** – nízkomolekulární stabilní druhy RNA, jejichž délka je 80–300 nukleotidů, dělí se do skupin podle výskytu v buňce na: **a) malé jaderné RNA (snRNA)**, **malé jadérové RNA (snoRNA)** a **malé cytoplazmatické RNA (scRNA)**. Malé RNA mají důležitý význam v životních procesech buňky (například při řízeném sestřihu atd.).

Eukaryotické **RNA-polymerázy** katalyzující transkripci jaderných genů se dělí na tři druhy: **1) RNA-polymeráza I** – vyskytuje se v jádru a katalyzuje syntézu **pre-rRNA**, **2) RNA-polymeráza II** – vyskytuje se v nukleoplazmě a katalyzuje syntézu **hnRNA** a některých **malých rRNA**, **3) RNA-polymeráza III** – vyskytuje se v nukleoplazmě a katalyzuje syntézu **pre-tRNA** a **5S-rRNA**. Každá z těchto tří RNA-polymeráz vyžaduje svůj **specifický promotor**, na který se váže (to je rozdíl oproti bakteriím, které mají jen jeden typ RNA-polymerázy a jeden typ promotoru).

Pro zahájení transkripce příslušné transkripční jednotky je u eukaryot nutná přítomnost tzv. **transkripčních faktorů**, tj. **regulačních proteinů**, které se vážou na **regulační oblasti promotoru** a většinou pozitivně navozují zahájení transkripce. Transkripční faktory lze rozdělit na dvě skupiny: **1) obecné transkripční faktory** – vyskytují se ve většině eukaryotických buněk a buněčných typech mnohobuněčných organismů – jsou naprosto nezbytné pro zahájení transkripce u všech tří typů promotorů, **2) speciální transkripční faktory** – vyskytují se v buňkách určitých tkání a v určité době, značně zvyšují účinnost transkripce u těch genů, které svou expresí specifikují daný buněčný typ pro produkci určitých proteinů – uplatňují se i u diferenciaci buněk a jsou indukovatelné.

Ukončení transkripce u eukaryot probíhá zcela odlišně než u bakterií. Sekvence terminátoru není přesně vymezena, konec je signalizován sekvencí označovanou jako **polyadenylační signál (AAUAAA)** k tomu, že 10–30 nukleotidů za ním se **hnRNA** bude štěpit. Sekvence polyadenylačního signálu na negativním řetězci DNA se přepíše do hnRNA a její prepis je pak specificky rozeznáván komplexem proteinů spojených s endonukleázou. Uvolněný 3' konec hnRNA je pak **polyadenylován** za katalytického účinku **poly(A)polymerázy**.

Transkripce mitochondriového a chloroplastového genomu vznikají primární transkripty strukturních genů (například v mitochondriích jsou to geny kódující některé podjednotky cytochrom c-oxidázy). Těž jsou v nich přepisovány geny pro **tRNA** a **rRNA** (které se poté uplatňují v procesech translace probíhající v těchto organelách).

4.3 Posttranskripční úpravy

Ačkoli způsob, jakým je DNA přepisována do RNA, je u všech organismů v podstatě totožný (rozdíly viz výše), další úpravy, které RNA podstupuje před svým využitím, se velice liší mezi bakteriemi a eukaryoty. Jakmile se v průběhu transkripce bakterií objeví volný 5' konec RNA, ihned na něj nasedají ribozomy a začíná proteosyntéza. Oproti tomu, DNA u eukaryot je uzavřena v jádře, ale ribozomy se nachází v cytoplazmě, proto před tím, než je RNA přeložena do aminokyselinového řetězce, musí být transportována z jádra do cytoplazmy (malými póry v membráně). Před opuštěním jádra navíc podléhá několika úpravám (**RNA processing = posttranskripční úpravy**). Primární transkripty jsou upravovány dvěma základními úpravami: 1) **přidáním čepičky (RNA capping)**, 2) **polyadenylací**.

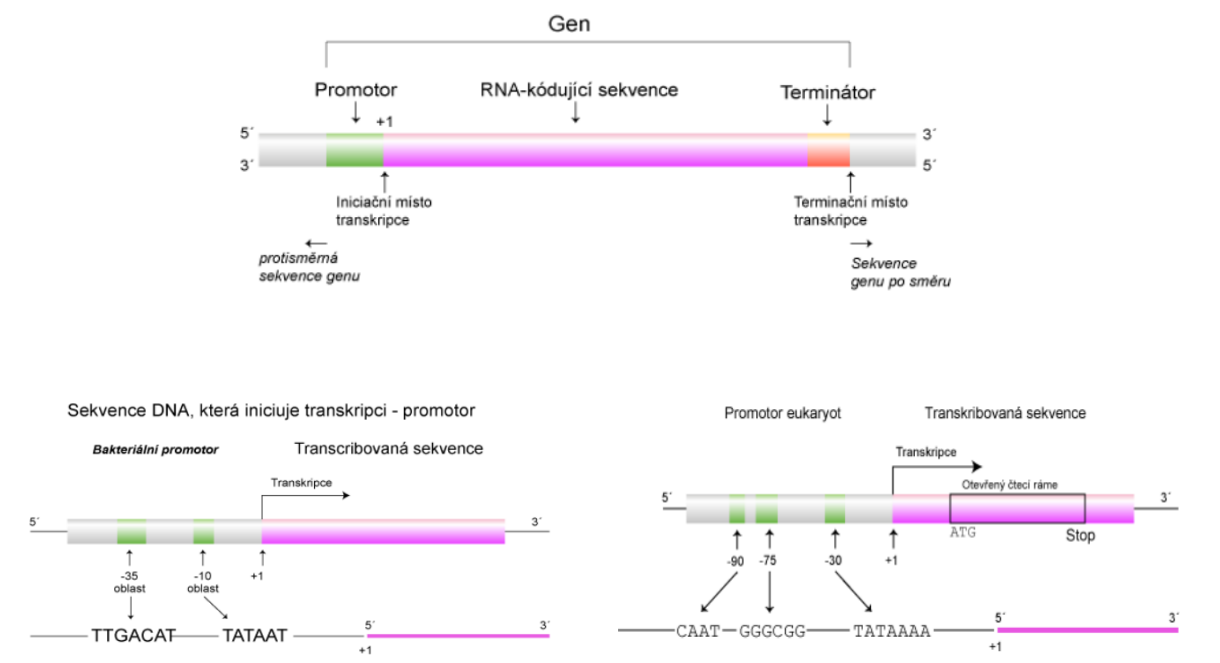
Přidání čepičky je **modifikace 5' konce** primárního transkriptu – dochází k vazbě atypického

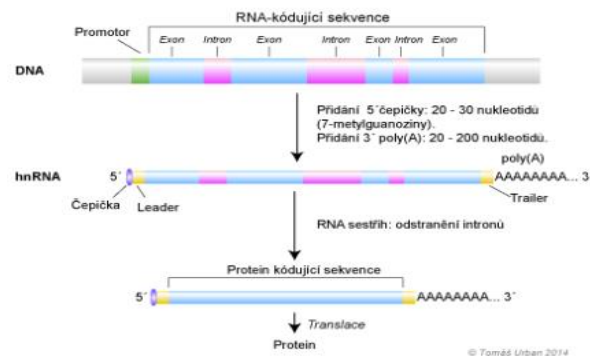
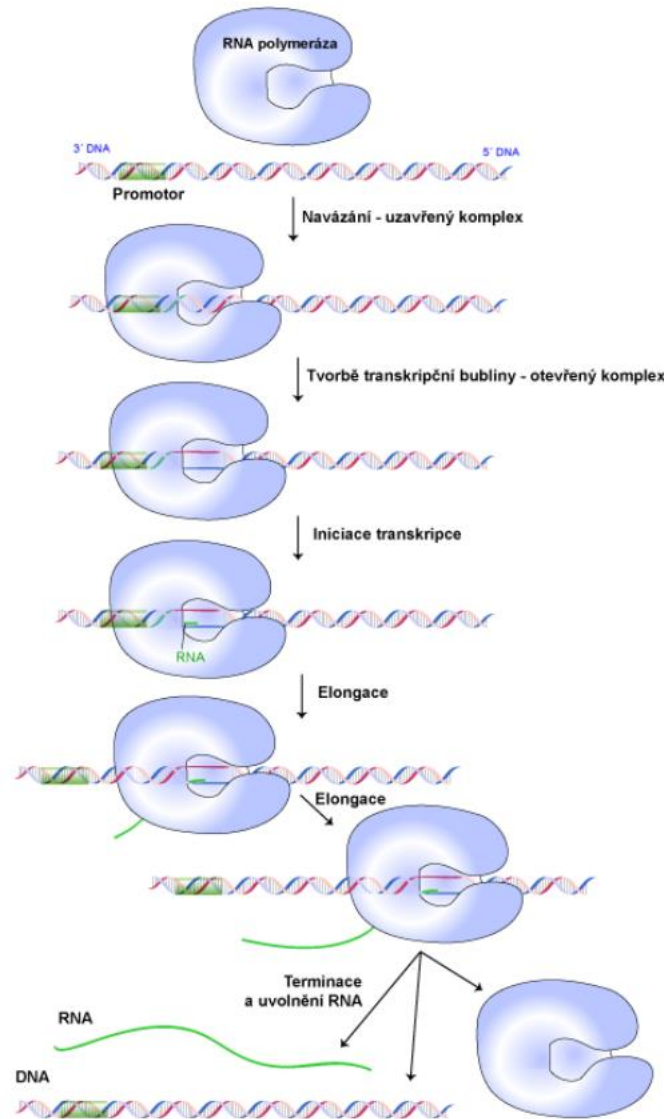
nukleotidu (**guaninový nukleotid s navázanou methylovou skupinou**). K tomuto procesu dochází ve většině případu **kotranskripčně**, tedy ještě před finálním dokončením transkripce celého genu. K tzv. **polyadenylaci** dochází u většiny nově transkribované mRNA, a to na **3' konci**, který je nejdříve naštěpen ve specifickém místě nukleázou a pak další enzym přidá na nově vytvořený konec RNA sekvenci složenou pouze z adeninů (**poly(A) konec**).

Zmíněné dvě modifikace pravděpodobně slouží ke **stabilizaci** a **pomáhají při transportu** RNA do cytoplazmy. Později jsou navíc také **využívány aparátem syntetizujícím proteiny** jako signál, že daná mRNA má oba konce, a že informace, kterou kóduje je kompletní.

Většina eukaryotní RNA podléhá kromě dvou výše zmíněných úprav ještě další úpravě, tzv. **splicingu (sestřihu)**. V roce 1977 bylo zjištěno, že eukaryotní RNA (na rozdíl od bakteriální) má kódující sekvence (tj. **exony**) přerušované sekvencemi, které nejsou překládány do proteinů (tzv. **introny**). Po přidání čepičky a poly(A) konce jsou před opuštěním jádra všechny introny vystřiženy (**sestřih RNA**) a exony spojeny dohromady. Takto upravená RNA je teprve poté transportována do cytoplazmy a tam překládána na proteiny.

Obr. 5 – Transkripční jednotka, prokaryotický a eukaryotický promotor, transkripční proces, sestřih





Zdroj: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=1483&typ=html

Další pojmy ke studiu: regulace exprese genů, regulace transkripčními faktory, regulace katabolickou represí, regulace sekvencně specifickými protein-DNA interakcemi, regulace ara(BAD) operonu, regulace tryptofanového (trp) operonu atenuací, regulace syntézy rRNA za přísných podmínek (stringent response), editace RNA, ribozymy, katalytická aktivita RNA, struktura promotorových sekvencí, wobble hypotéza, *E. coli*

5. Translace

Translace (překlad) je druhým stupněm exprese strukturních genů. Výchozími látkami je **20 (21) standardních aminokyselin a selenocystein**. Na ribozomech se z nich pak podle informace obsažené v mRNA tvoří za účasti tRNA polypeptidové řetězce. K translaci musí být aminokyseliny chemicky aktivovány procesem, který se označuje jako tzv. **aktivace aminokyselin**. Tento děj je katalyzován **aminoacyl-tRNA-syntetázami** a jeho výslednými produkty jsou **aminoacyl-tRNA (aa-tRNA)**, tj. molekuly tRNA, ke kterým se aminokyseliny vážou ve formě aminoacylů.

5.1 Transferová RNA (tRNA)

Na rozdíl od většiny molekul ostatních nukleových kyselin jsou vlákna tRNA poměrně krátká – tvoří ji pouze 74–95 nukleotidů. Přesto má tRNA **poměrně složitě uspořádaní**, kdy jsou komplementární nukleotidy místy navzájem propojeny vodíkovými můstky, takže vlákno vytváří čtyři ramena.

Svou **primární strukturou** se jednotlivé druhy tRNA vzájemně liší a označují se indexem podle aminokyseliny, jejíž přenos uskutečňují (například **tRNA^{Ala}**, **tRNA^{Leu}** atd.). Pokud je na tyto tRNA navázána aminokyselina ve formě aminoacylu, označují se například jako **Ala-tRNA^{Ala}**, **Ala-tRNA^{Leu}** atd. Vzhledem k tomu, že je genetický kód degenerovaný, může v buňce existovat více tRNA pro jednu aminokyselinu. Molekulární druhy, které se liší navzájem antikodony a jsou acylovány stejnou aminokyselinou, se označují jako **izoakceptorové tRNA**.

Většina bází polynukleotidové řetězce, které tvoří primární strukturu tRNA, je komplementární, a proto se páruje – polynukleotidový řetězec se splétá do **sekundární struktury**, tzv. **tvaru jetelového lístku**, který sestává ze čtyř hlavních ramen: **1) akceptorové rameno** (tvoří 5' konec a 3' konec tRNA), **2) pseudouridinové rameno (TΨC) rameno se smyčkou** (ve smyčce se vyskytuje triplet s pseudouridinem), **3) dihydrouridinové rameno (rameno DHU, D rameno) se smyčkou** (obsahuje dihydrouridin) a **4) antikodonové rameno se smyčkou** (rameno obsahující antikodon). Kromě hlavních ramen má tRNA ještě tzv. **variabilní smyčku** (vlivem vazeb mezi DHU, TΨC a variabilní smyčkou vzniká složitější prostorový útvar – **obrácené písmeno L**, typické pro **terciální strukturu**).

5.2 Aminoacyl-tRNA-syntetázy

Aminoacyl-tRNA-syntetázy jsou enzymy, které **katalyzují esterifikaci** aminokyselin s příslušnými tRNA. Výsledným produktem jejich činnosti je **aktivace aminokyselin** za tvorby aminoacyl-tRNA. Každá aminoacyl-tRNA-syntetáza je specifická pro jednu aminokyselinu.

Na molekule **aa-tRNA – syntetázy** jsou tři rozpoznávací **vazebná místa**: **1) vazebné místo pro ATP**, **2) specifické vazebné místo pro jednu z dvaceti standardních aminokyselin** a **3) vazebné místo pro příbuzné tRNA**, které přenášejí stejnou aminokyselinu. Naproti tomu, každá tRNA má dvě **specifická vazebná místa**: **1) vazebné místo pro aminoacyl-tRNA-syntetázu** a **2) antikodon**, kterým se váže ke kodonu.

5.3 Ribozomy

Každý ribozom se skládá ze dvou složek označovaných jako tzv. **malá a velká podjednotka**. Teprve spojením obou těchto podjednotek vzniká ribozom, na kterém může probíhat syntéza polypeptidového řetězce. Prokaryotický (**70S**) a eukaryotický ribozom (**80S**) se liší **sedimentačním koeficientem**, kterým je udávána rychlost sedimentace (při centrifugaci) makromolekuly ve **Swedbergových jednotkách (S)** – 1 swedberg = 1S = 10⁻¹³ s.

Na ribozomu je **několik vazebných míst**, která se při syntéze uplatňují, z nichž některá jsou pro ni zvláště důležitá: **1) aminoacylové místo (A-místo)** – z části na malé, jinak na velké podjednotce, vstupují a vážou se na něj všechny aa-tRNA vyjma **fMet-tRNA_i^{Met}** a **Met-tRNA_i^{Met}**, **2) peptidylové místo (P-místo)** – z části na malé, jinak na velké podjednotce, váže se na něj peptidylová tRNA, a také fMet-

tRNA_i^{Met} u bakterií a Met-tRNA_i^{Met} u eukaryot, **3) výstupní místo pro deacylovanou tRNA (E-místo)** – deacyl tRNA se rozumí tRNA, ze které se při translaci již uvolnila aminokyselina – posouvá se na výstupní místo a za **4) peptidyltransferázové místo** – vyznačuje se aktivitou **peptidyltransferázy** katalyzující tvorbu peptidových vazeb. Dále jsou pak na ribozomu vazebná místa pro **iniciační a elongační faktory**.

5.4 Translace u bakterií

Pochody, kterými je translace zahájena probíhají na malé ribozomové podjednotce – kní se prostřednictvím **Shineovy-Dalgarnovy sekvence** komplementárně váže na **16S-rRNA** mRNA. První aminokyselina, která zahajuje syntézu na ribozomu 70S, je **formylmethionin**, který se odvozuje **formylací** aminoskupiny methioninu (katalýza **transformylázou**). Opačnou reakcí je **deformylace** (katalýza **deformylázou**) formylmethioninu na **methionin**, k níž dochází až po vytvoření polypeptidu. Z tohoto důvodu má asi 50 % různých polypeptidů na začátku methionin (u ostatních 50 % se methionin odbourává procesem, který je katalyzován aminopeptidázou). K formylaci methioninu dochází až po připojení methioninu k tRNA. Existují dva typy tRNA, které methionin vážou (tRNA^{Met} a tRNA_i^{Met}), přičemž obě mají stejný antikodon, kterým se váží na kodon **5'-AUG-3'**, ale liší se v primární struktuře. Pouze methionin vázaný na Met-tRNA_i^{fMet} se pak formyluje, proto jsou pro vazbu na **kodon AUG** připraveny dva druhy tRNA (**Met-tRNA^{Met}** a **fMet-tRNA_i^{fMet}**). Jestliže se kodon AUG nachází na začátku kódující sekvence (působí jako iniciační), váže se na něj **fMet-tRNA_i^{fMet}**, pokud se vyskytuje kdekoli na jiném místě, váže se na něj **Met-tRNA^{Met}**. Zařazení **fMet-tRNA_i^{fMet}** na kodon AUG během zahájení translace řídí specifický protein označovaný jako **iniciační faktor**. Zařazení **Met-tRNA^{Met}** na kodon AUG během prodlužování polypeptidového řetězce řídí specifický **elongační faktor**.

Iniciační komplex se tvoří tak, že na podjednotku 30S se nejdříve naváže proteinové **iniciační faktory IF1, IF2 a IF3**. Připojení **GTP** k **IF2** umožní vazbu tohoto komplexu s mRNA a iniciační Met-tRNA. Vznikne **iniciační komplex 30S.IF3.mRNA.IF1.IF2.fMet-tRNA.GTP**, ke kterému se pak naváže ribozomální podjednotka 50S. Současně se uvolní faktory IF1, IF2, IF3 a hydrolyzuje se GTP na **GDP** a fosfát. fMet-tRNA_i^{fMet} obsadí na ribozomu tzv. **peptidylové místo (P-místo)**. Další, **aminoacylové místo (A-místo)**, je určeno k vazbě další aa-tRNA, odpovídající kodonu následujícímu za AUG. **Elongace** (prodlužování) syntetizovaného peptidu pak dále probíhá ve třech krocích: **1) dekódováním** – navázání další aa-tRNA (viz výše), **2) transpeptidací** (tvorba peptidové vazby katalyzovaná **peptidyltransferázou**) a **3) translokací**. V průběhu **dekódování** ribozom vybírá a váže správnou tRNA, jejíž antikodon je komplementární k odhalenému tripletu bází na mRNA v ribozomu. Proces je zahájen vazbou GTP společně s tzv. **elongačním faktorem EF-Tu**. Při předání aa-tRNA se GTP hydrolyzuje a EF-Tu se uvolní z ribozomu. Na **EF-Tu.GDP** se připojí **elongační faktor EF-Ts** a změní konformaci komplexu natolik, že se GDP uvolní. Regenerovaný EF-Tu tak může po vazbě s novým GTP vstoupit do dalšího cyklu. EF-Tu nereaguje **fMet-tRNA_i^{fMet}**. Proto se tato aa-tRNA nenavazuje na aminoacylové místo. EF-Tu však váže **Met-tRNA^{Met}** a zajišťuje tak zařazení methioninu dovnitř řetězce. Při hydrolyze GTP a uvolňování EF-Tu.GDP z ribozomu se konformace faktoru mění v blízkosti právě navázané aa-tRNA natolik, že jen aa-tRNA skutečně pevně a přesně vázaná na antikodon a aminoacylové místo, se neuvolní. Pokud je omylem zařazena nesprávná aa-tRNA se slabšími vazbami, je v této fázi translace uvolněna. Faktor EF-Tu udává rychlost (krok) celé translaci (dekódování může být uskutečněno i bez elongačního faktoru, nicméně za těchto podmínek je proces pomalejší a obvykle nezvládne zcela pokrýt potřebu buňky).

Transpeptidace je proces, kdy je peptidylová skupina na tRNA v místě P přenesena na aminokyselinu na tRNA v místě A ribozomu nukleofilním atakem aminoskupiny aa. Tato reakce probíhá bez dodání vnější energie ve formě ATP, neboť je štěpena vysoce energetická esterová vazba mezi nascentním polypeptidem a tRNA v místě P. Na místě A tak vznikne peptidyl-tRNA. Jinak řečeno, peptidyl se přenesou z předchozí tRNA na skupinu NH₂ následující aa-tRNA, čímž se řetězec prodlouží o jednu aminokyselinu. Z toho vyplývá, že **peptidový řetězec roste od N- konce k C- konci**. Reakce je katalyzována **peptidyl-transferázovou** aktivitou velké podjednotky ribozomu (50S). Tato katalytická aktivita je převážně zajišťována vlastní rRNA velké podjednotky a ribozom tak lze považovat za **ribozym**. **Translokace** je pochod, při kterém se volná tRNA z peptidylového místa uvolní a mRNA se

posune o 3 nukleotidy (o jeden kodon), takže peptidyl-tRNA se dostane z místa A na místo P. K posunu je třeba **elongační faktor EF-G** s navázaným **GTP**, který patří mezi **proteiny G** (jako například výše zmíněný EF-Tu). Hydrolyzou GTP se EF-G z ribozomu uvolní a na volné místo A se tak může navázat další aa-tRNA – cyklus se opakuje. Tímto způsobem se mRNA posunuje po ribozomu, z něhož se zároveň odvíjí rostoucí polypeptidový řetězec.

Translace přirozené mRNA je vždy ukončena vznikem polypeptidu a jeho oddělením od ribozomu. Ribozom se během syntézy polypeptidu posune k tzv. **terminátoru**, tj. **terminačnímu kodonu**, signalizujícímu ukončení translace. Jedná se o kodony **UAG, UAA** a **UGA**, přičemž žádný z nich nekóduje zařazení aminokyseliny do peptidu. Tyto kodony rozpozná některý z tzv. **proteinových uvolňovacích terminačních faktorů (releasing factors)**. Faktor **RF1** pozná UAA a UAG, **RF2** pak UGA a UAA. Po navázání faktoru na ribozom se peptidyl-tRNA přesune z místa A na místo P a specifita peptidyltransferázy se změní natolik, že přepojí peptidyl na molekulu vody místo na 2-NH₂ další aa-tRNA – tj. hotový peptid se hydrolyticky uvolní od poslední tRNA, uvolní se také tRNA a mRNA a ribozom se rozpadne na podjednotky 50S a 30S. Iniciační faktor **IF3** se ihned naváže na 30S a tak zabráni reasociaci ribozomu, který by byl nefunkční (neboť by neobsahoval žádnou mRNA). Jednotlivé složky se mohou účastnit tvorby nového iniciačního komplexu a zahájit nový cyklus.

Na jediné mRNA je simultánně navázáno několik ribozomů, které po řetězci mRNA postupují v určitém odstupu a na každém z nich probíhá syntéza jednoho peptidu. Celý útvar se nazývá **polyribozom**, též **polyzom**. Tímto způsobem se tedy mRNA využívá velmi efektivně.

5.5 Translace u eukaryot

Translace se u eukaryot uskutečňuje (podle typu) **v několika částech buňky** – u živočichů ve dvou (v cytoplasmě a mitochondriích) a u rostlin ve třech (v cytoplasmě, mitochondriích a chloroplastech). S tímto rozdělením translace do různých částí souvisí i typy ribozomů, na kterých příslušná translace probíhá.

5.5.1 Cytoplazmatická translace

Translace probíhá na ribozomech **80S**, na kterých se překládá mRNA (odvozená z **hnRNA**). Principiálně probíhá obdobně jako u bakterií, avšak počáteční kyselinou je namísto N-formylmethioninu **methionin**, který se váže na specifickou iniciační tRNA (**tRNA^{Met}**), jež rozpoznává **iniciační kodon AUG**. Počet iniciačních faktorů potřebných k zahájení translace je vyšší než u bakterií a mRNA se neváže na malou podjednotku 40S pomocí Shineovy-Dalgarnovy sekvence, ale prostřednictvím **iniciačních faktorů** vázajících se na čepičku mRNA. Tyto faktory jsou rozeznávány na ribozomové podjednotce 40S a umožňují v interakci s nimi nalezení **iniciačního kodonu pro Met-tRNA^{Met}**. Navíc translace probíhá jak na **volných ribozomech**, tak na ribozomech vázaných na **drsné endoplazmatické retikulum**. Na volných ribozomech se syntetizují zpravidla **intracelulární proteiny**, kdežto na ribozomech drsného retikula **proteiny extracelulární**, které pak dále cirkulují v krevní plazmě.

5.5.2 Translace v mitochondriích a chloroplastech

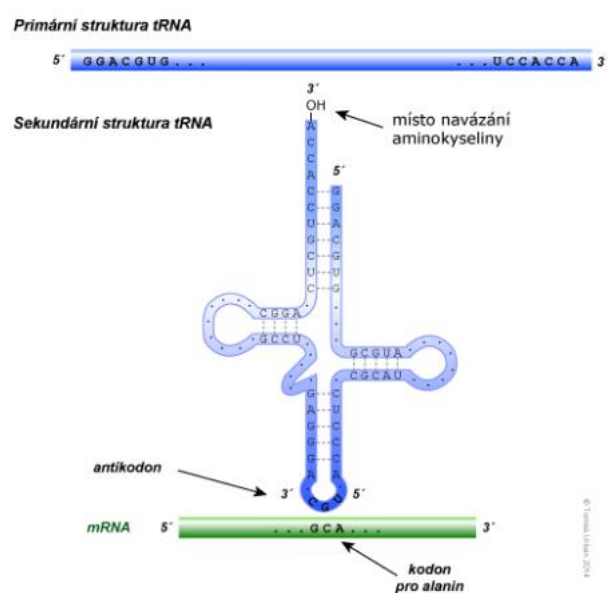
Translace v mitochondriích a chloroplastech se uskutečňuje na ribozomech, jejichž sedimentační koeficient je přibližně stejný jako u bakterií (**70S**) a jsou na nich překládány specifické mRNA mitochondrií a chloroplastů. Na těchto ribozomech pak probíhá translace stejným způsobem jako na bakteriálních. Translace v mitochondriích a chloroplastech **není autonomní**, některé její složky jsou závislé na proteinech tvořených v cytoplasmě. Mitochondrie sice mají všechny molekulární druhy tRNA, které jsou k translaci potřebné, ale **nesyntetizují se v nich aminoacyl-tRNA-syntetázy, ribozomové proteiny, ani iniciační a elongační faktory**.

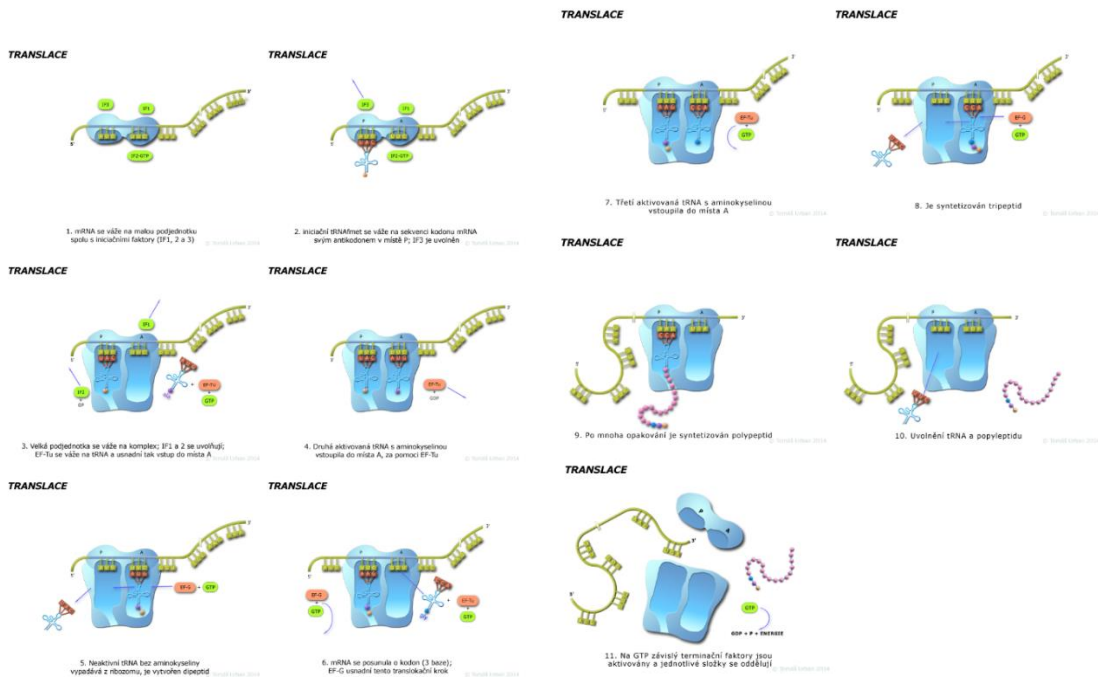
5.6 Translační přesnost a posttranslační procesy

Nejrůznějšími postupy bylo zjištěno, že translace je **poměrně přesný proces – s 10^{-4} chybami na jeden kodon**. Tato přesnost je výrazně ovlivněna například některými **antibiotiky** (streptomycinem), které do translace vnášejí daleko více chyb. Z výpočtů vyplývá, že pro uvedenou přesnost nepostačuje z energetického hlediska pouze schopnost ribozomu rozpoznat správnou tRNA dle kodon-antikodon interakce. Z tohoto důvodu musí ribozom disponovat dalším mechanismem, který mu umožňuje danou přesnost navýšit, tzv. **proofreading mechanismem**. Tento mechanismus je kontrolován v posttranslokační fázi, kdy je nově přichodící aa-tRNA navázána na místě A malé podjednotky, a její vazba do místa A na velké podjednotce je možná až po rozštěpení GTP navázaného **faktoru EF-G.GTP**. Tato situace tak s nejvyšší pravděpodobností umožňuje ribozomu „prověřit“ aa-tRNA navázanou v místě A. Ne zcela komplementární nebo nekomplementární tRNA, která se do místa A dostane, není schopna v tomto místě vydržet delší dobu – disociuje ještě dříve, než může dojít k hydrolýze GTP a uvolnění elongačních faktorů. Tak je zaručena kontrola správného čtení tripletů.

Translací končí přenos genetické informace ze strukturního genu tím, že se vytvoří primární struktura proteinu (polypeptidový řetězec). Veškeré další procesy, které se na polypeptidovém řetězci odehrávají, jsou závislé na jeho primární struktuře, která v závislosti na okolních chemických a fyzikálních podmínkách rozhoduje o tom, jaké budou jeho konečné chemické vlastnosti, sekundární a terciální struktura a do jaké kvartérní struktury a supramolekulárních sestav (buněčných organel) bude vstupovat. Většina supramolekulárních struktur vzniká procesem **samosestavování**, tj. spontánním seskupováním proteinových podjednotek a jejich spojováním nekovalentními interakcemi (například vodíkovými vazbami). Mezi posttranslační úpravy dále patří tzv. **proteolytické štěpení** a nejrůznější **kovalentní modifikace**. Proteolytické štěpení je nejběžnější formou posttranslačních úprav. Pravděpodobně každý ze známých proteinů projde touto úpravou, a to i v případě, že dochází pouze k odštěpení startovního Met (popř. fMet), jakmile se objeví vně ribozomu. Mnohé z proteinů, které vznikají v organismech, jsou syntetizovány jako **neaktivní prekurzory**, ze kterých následnými úpravami vznikají proteolytickými procesy **aktivní proteiny**. **Inaktivní proteiny**, které jsou aktivovány vyštěpením polypeptidu, jsou označovány jako tzv. **proproteiny**, a vyštěpené úseky jako tzv. **propeptidy**. **Kovalentní modifikace** spočívají jak v modifikaci postranních skupin aminokyselin, tak modifikaci N- a C-konců proteinů. Do dnešní doby je známo více jak sto padesát druhů nejrůznějších modifikací (například **acetylace, glykosylace, hydroxylace, methylace, nukleotidylace, fosforylace, ADP-ribosylace** atd.).

Obr. 6 – tRNA a translace





Zdroj: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=1483&typ=html

Další pojmy ke studiu: makroergická vazba, seryl-tRNA^{Sec}, příbuzné tRNA, polyzom, ribozym, G proteiny, inhibitory proteosyntézy (antibiotika), regulace genů na úrovni translace, transport a degradace proteinů, signální rozpoznávací částice (SRP), translokony, signální peptidy, polyproteiny

6. Transpozony

Téměř polovinu naší genetické informace (genomu) tvoří mobilní genetické elementy – **transpozony (tzv. „skákáající geny“)**. **Transpozony**, také jinak **transpozibilní elementy** jsou semiparazitické sekvence DNA (segmenty DNA), které jsou schopny měnit svou pozici (přemisťovat se) a kopírovat se v genomu (procházet **transpozicí**). Kromě toho, že způsobují genetické mutace a chromozomové přestavby, mohou pro své nositele tyto **mobilní genetické elementy** představovat i selekční výhodu a rovněž být i jedním ze zdrojů "nových genů" v evoluci.

Obecně jsou jedním z nástrojů genetického inženýrství jak u rostlin, tak živočichů.

6.1 DNA transpozony

DNA transpozony jsou v lidském genomu považovány za **inaktivní**, díky akumulaci mutací v průběhu fylogeneze, a tak lze najít pouze jejich evolučně staré zbytky (fosilie). Nicméně, s použitím informací získaných z lidského genomu i genomu ostatních obratlovců je možné **aktivní transpozon** (odvozený z lidských fosilních elementů) „vyrobit“. Příkladem takto vytvořeného transponu je transpozon "**Sleeping Beauty**" (Šípková Růženka), který se v současné době jeví jako možný základ pro další generaci genové terapie, a to zejména díky více specifickému místu integrace, než je tomu například u retrovirů.

Funkčnost typického DNA transponu je založena na sekvenci kódující enzym **transponázu (transpozázu)**, který se váže k oběma koncům repetitivního elementu, který je tvořen invertovanými repetitivy. Tyto invertované konce si tedy mohou "vyměnit" řetězce a stabilizovat tak strukturu,

nezbytnou pro aktivitu transponázy. Transponáza pak vyštěpí transpozon a liguje takto vzniklé volné konce chromozomální DNA. Uvolněný **komplex transpozon-transponáza** se váže na specifický sekvenční motiv jinde v genomu, kde transponáza štěpí hostitelskou DNA a liguje transpozon na nové místo. Takto se transpozon pohybuje tzv. mechanismem „**cut and paste**“ (vystříhnout a vložit).

Do této skupiny patří například **DS-element kukuřice**, poprvé popsany genetičkou Barbarou McClintokovou (objevitelka transpozonů, v roce 1983 získala Nobelovu cenu), a také některé transpozony (například **element P**) objevené u octomilky (*Drosophila melanogaster*) či některých bakterií.

6.2 Retrotranspozony

Retrotranspozony jsou v lidském genomu daleko **hojnější** (přímo tvoří nejméně 45 %) a navíc jsou stále **aktivní**. Pro transpozici vyžadují buněčné **RNA polymerázy (II nebo III)**, kterými jsou přepsány do RNA, zatímco původní kopie zůstává na svém místě. RNA kopie podléhá reverzní transkripci do DNA, která je vložena do genomu na nové místo. Tyto elementy tedy expandují mechanismem tzv. **duplikace – „copy and paste“** (kopírovat a vložit).

Proces retrotranspozice je relativně **náchylný** k různorodým chybám, a tak jsou nově vzniklé kopie většinou inaktivovány delekcemi nebo bodovými mutacemi. Protože je většina kopií inaktivní, další expanze dané rodiny retrotranspozonů je řízena několika aktivními úplnými elementy. Avšak i když by později během fylogeneze došlo ke ztrátě všech aktivních elementů, genom může být doslova přeplněn tzv. **fosilními členy** dané rodiny sekvencí.

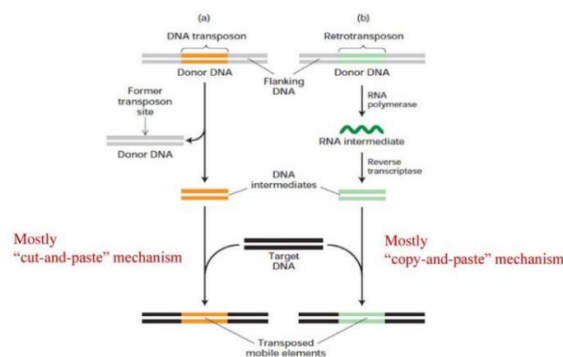
Retrotranspozony mohou být klasifikovány jako **autonomní** a **neautonomní**. Autonomní retrotranspozony (tzv. **LINE**) kódují proteiny nezbytné k jejich transpozici, ačkoli pro úspěšný „přeskok“ jsou také závislé na hostitelových RNA polymerázách a enzymech opravujících DNA. Neautonomní retrotranspozony (tzv. **SINE**) nekódují proteiny a musí tak využít enzymy jiného transpozonu, aby byly schopné transpozice.

6.3 Replikativní transpozony

Replikativní transpozony lze nalézt u bakterií. Sekvence (například **TN3 segment**) se speciálně přenáší například mezi bakteriálními plazmidy, přičemž na rozdíl od prosté transpozice dochází také k cílené replikaci segmentu, na základě čehož je tento segment po transpozici přítomen v obou plazmidech.

Bakteriálních transpozony hrají významnou roli v procesu horizontálního přenosu rezistence k různým antibiotikům.

Obr. 7 – Mechanismus transpozice



Zdroj: <https://slideplayer.com/slide/12116514/>

Další pojmy ke studiu: Alu sekvence, P element, TN3 segment, DS element, IS element

7. Viry, retroviry a bakteriofágy

Viry, viroidy (malé infekční cirkulární autokatalytické RNA nekódující žádný protein) a **virusoidy** (infekční agens tvořené ssRNA napadající rostliny) patří mezi nebuněčné živé soustavy. V přenosech genetické informace jsou na rozdíl od buněčných živých soustav v různé míře závislé na hostitelských buňkách, v nichž probíhá jejich reprodukce. Překlad genetické informace do virových proteinů, ke kterému dochází po infekci hostitelské buňky, je kompletně uskutečňován jejím translačním systémem, neboť nebuněčné živé soustavy nemají žádnou ze složek translačního systému. V tom spočívá podstata tzv. **intracelulárního parazitizmu**, kterým je virus charakteristický. Viry lze proto chápat jako nukleoproteinové částice vyznačující se schopností infikovat své hostitelské buňky a v nich se reprodukovat v závislosti na jejich translačním aparátu.

Velikost virů se pohybuje v desítkách až stovkách nanometrů. Jejich stavba je velmi jednoduchá – základní část (jakousi obdobu buněčného jádra) tvoří **nukleová kyselina** a okolo ní je **proteinový plášť**, tzv. **kapsida**. Dále mají některé viry ještě membránový obal (obalené viry), jeden nebo více bičíků (například některé bakteriofágy) nebo si v kapsidě dokonce přinášejí některé enzymy potřebné pro rozmnožení viru (například **reverzní transkriptázu** u retrovirů). Velmi důležité jsou také povrchové glykoproteiny viru, díky kterým se virová částice (**virion**) může vázat na specifické receptory buněk. Podle typu nukleové kyseliny lze všechny viry primárně rozdělit do dvou skupin na: **1) DNA viry** (obsahující lineární nebo cyklickou ssDNA nebo častěji dsDNA) a **2) RNA viry** (obsahující lineární nebo segmentovanou ssRNA nebo dsRNA).

Pokud má virus DNA (**DNA viry**), dochází k **přímým transkripcím** a **translacím** virových genů. Má-li ssRNA (**RNA viry**), může tato RNA sloužit přímo jako mRNA pro proteosyntézu (**pozitivní RNA viry**), nebo je nejprve zreplikována za vzniku komplementárního RNA vlákna, které poté plní roli mRNA (**negativní RNA viry**). Přepis je katalyzován **RNA dependentní RNA polymerázou**, která je do buňky přinesena v kapsidě virionu. Pokud je informace kódována dsRNA (**RNA viry**), dochází přímo k přepisu do mRNA. **DNA viry** se většinou **replikují v buněčném jádře**, zatímco **RNA viry volně v cytoplasmě**. Translaci zajišťuje vždy proteosyntetický aparát infikované buňky (viz výše).

Zvláštní skupinou jsou tzv. **retroviry**, jejichž RNA je po vpravení do hostitelské buňky nejprve přepsána do DNA. Na tomto procesu se podílí enzym **reverzní transkriptáza**, který je schopný katalyzovat **reverzní transkripci**, tj. **přepis informace z RNA do DNA**. Reverzní transkriptáza, schopná přepsat virovou RNA do DNA, se v hostitelské buňce nenachází, a proto musí být přinesena v kapsidě retroviru. Některé retroviry jsou schopny takto vyrobenou DNA dokonce včlenit do genomu buňky, která tak stále produkuje další viry. Pokud se infikovaná buňka dělí, dělí se s ní i virová informace.

Retroviry mohou sloužit jako vektory genetické informace v biotechnologiích a uvažuje se o nich i jako o vektorech pro genovou terapii (v současné době je však výzkum soustředěn především na bezpečnější nevirové vektory, například nanočástice, lipozomy aj.). Mezi nejznámější retrovirus patří například **virus HIV** (původce AIDS).

Viry bakterií (tzv. **bakteriofágy**) jsou schopny se vázat pouze na specifické receptory bakteriálních buněk a pouze v nich realizovat svůj **lytický** (popř. **lyzogenní**) **cyklus**. Ekologický význam bakteriofágů lze jen velmi obtížně vymezit – je však pravděpodobné, že jsou důležitým faktorem rovnováhy v bakteriálních biocenózách. Z praktického hlediska jsou bakteriofágy významné v lékařství, kde se v omezené míře používají k prevenci i léčbě některých bakteriálních infekcí. Epidemiologové laboratorně využívají soupravy vybraných bakteriofágů k typizaci řady druhů patogenních bakterií. Zásadní význam však mají bakteriofágy jako modelové objekty základního výzkumu. Bakteriofágy se dnes systematicky řadí do dvanácti čeledí.

Rostlinné viry se dnes rozdělují do třiceti šesti čeledí a skupin. Jsou v naprosté většině neobalené (z obalených jsou známy jen tři čeledě s ssDNA). Svými tvary a rozměry jsou rostlinné viry velmi pestré.

Dnes známé **živočišné viry** se klasifikují do jednoho řádu (*Mononegavirales*), do dvaceti pěti čeledí a skupin virů obratlovců, šestnácti čeledí a skupin bezobratlých a jednoho rodu viru prvoků.

7.1 Reprodukce virů v hostitelských buňkách

Životní funkce virů jsou omezeny jen na reprodukci a s ní spřaženou dědičnost. Samy se však rozmnožovat nemohou, jejich rozmnožování (respektive **pomnožování**) je zcela závislé na hostitelské buňce. Viry využívají její zásoby volných aminokyselin, nukleotidů i ostatních stavebních molekul a obvykle i její enzymové výbavy. Na enzimech hostitelské buňky bývá závislá replikace nukleové kyseliny virů a syntéza virových proteinů probíhá na jejích ribozomech, přičemž viry využívají také její tRNA (viz výše). **Reprodukční cyklus** virů probíhá obecně v sedmi stupních: **1) vazba virionu na povrch buňky, 2) penetrace do buňky, 3) uvolnění nukleové kyseliny z kapsidu, 4) replikace virové nukleové kyseliny, 5) syntéza virových proteinů, 6) maturace virionů** a za **7) uvolnění virionů z buňky**. Mezi penetrací virionu do buňky a vznikem prvních virionů probíhá tzv. **fáze eklipsy**, kdy v buňce nelze nezralý virus prokázat. Trvání této fáze je pro jednotlivé viry charakteristické a pohybuje se v řádu minut až hodin.

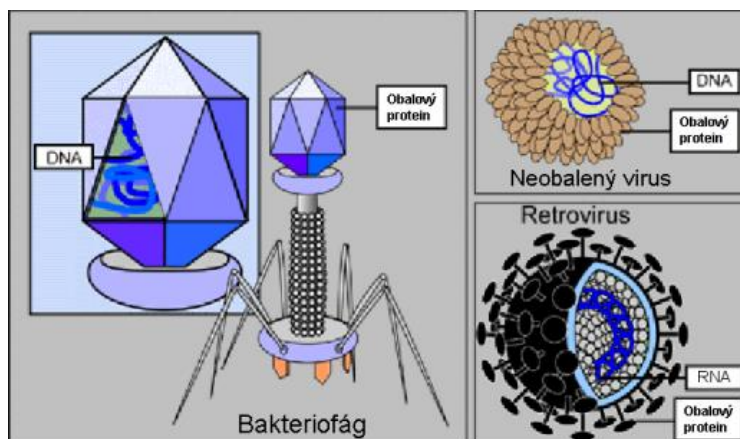
7.2 Satelity (virusoidy), viroidy a priony

Satelity (virusoidy) jsou nukleové kyseliny (RNA či DNA) s vlastní genetickou kontinuitou, uzavřené v kapsidách některých virů (vedle jejich vlastní nukleové kyseliny). Jedná se obvykle o relativně krátké sekvence (300–1500 nukleotidů), kovalentně uzavřené do kružnicové formy. K jejich objevu došlo až v roce 1981 a poznatků o nich tak postupně přibývá. Známý jsou již satelity s ssRNA (nejčastější), dsRNA, ssDNA i dsDNA, přičemž nukleová kyselina satelitu je vždy stejná jako nukleová kyselina viru (tzv. **pomocného**), ve kterém se nachází. Satelitní nukleová kyselina je totiž schopna replikace i uzavření do virového kapsidu jen činností enzymů kódovaných genomem příslušného viru, proto se tento vir označuje jako „**helper virus**“, neboli **pomocný virus** (a také hostitelské buňky). Vlastní geny satelitu pak kódují proteiny, které se podílejí na patogenitě pomocného viru.

Viroidy jsou samostatné, kapsidem ani jinou strukturou neobklopené, velmi krátké (250–375 nukleotidů) molekuly ssRNA. Viroidy se replikují a ukládají v jádrech infikovaných buněk, kde jsou replikovány enzymy hostitelské buňky (jejich RNA přitom nemá funkci mRNA). Předpokládá se, že vznikají **cirkularizací intronů genů** svých eukaryotických hostitelů, uvolněných posttranskripčním sestřihem. Dosud bylo popsáno asi třicet různých viroidů, kdy každý vyvolává specifické onemocnění kulturních rostlin určitého druhu, přičemž příznaky jsou obecně tytéž jako příznaky chorob virových. Nejznámější z nich jsou vřetenovitost bramborových hlíz (původcem je **viroid PSTV**) a bledost plodů okurek (**viroid CPFV**). Infekce viroidy se šíří především horizontálně (mezi rostlinami dané populace), a to mechanicky (zemědělským nářadím), avšak pro některé z nich byl prokázán i přenos vertikální (infikovanými semeny, pylovými zrny infikovaných rostlin).

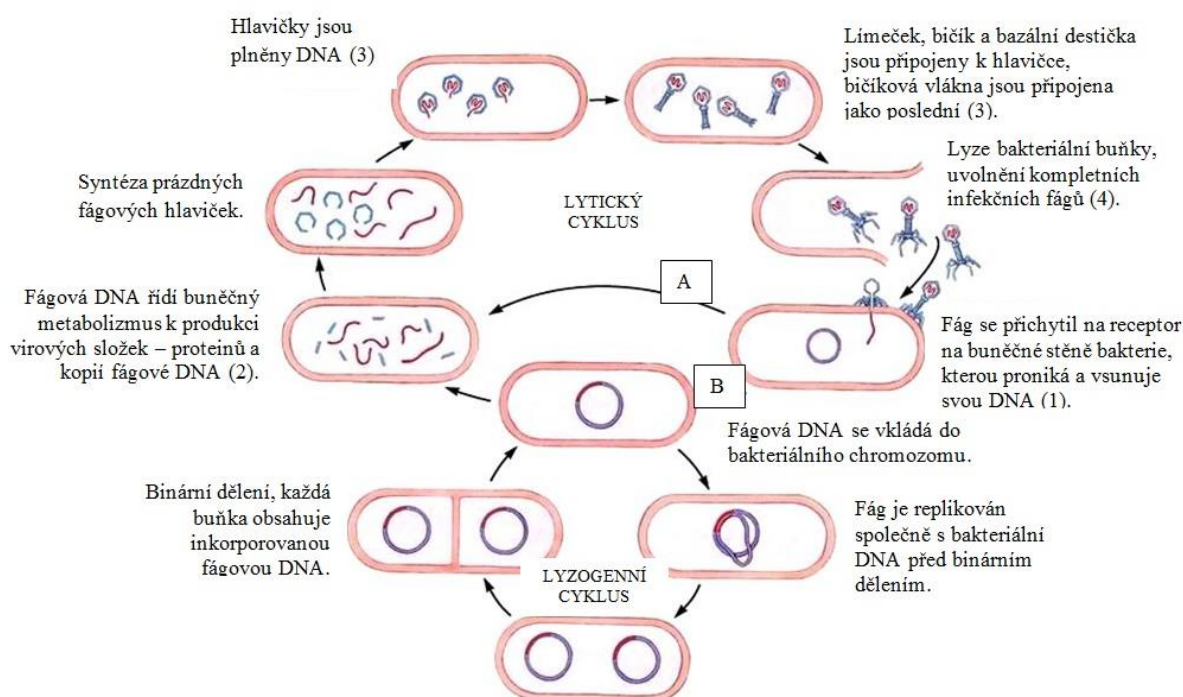
Jako **priony** se označují **specifické infekční proteiny** (bez nukleové kyseliny), kódované strukturálním genem hostitelského organismu. Priony jsou zatím známy jako přenosní patologičtí činitelé v buňkách savců a v buňkách nižších hub (lze předpokládat jejich objev i u dalších hostitelů). U savců jsou známy jako původci skupiny chorob s podobnou patogenezí a podobnými příznaky, tzv. **transmisibilních (přenosných) spongioformních encefalopatií (TSE)**. TSE jsou těžké, bez výjimky smrtelné choroby, vyskytující se u lidí a u některých druhů zejména domestikovaných zvířat. Mezi nejznámější prionové choroby člověka patří například **Creutzfeldtova-Jakobova choroba, Kuru, fatální familiární nespavost** a **Gerstmannův-Sträusslerův-Scheinkerův syndrom**.

Obr. 8 – Typy viru – bakteriofág, neobalený virus, retrovirus



Zdroj: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Virus#/media/Soubor:Virus-types3.png>

Obr. 9 – Lytický vs lyzogenní cyklus



Zdroj: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/is17/cviceni_mikrobiologie/web/pages/bakteriofag.html

Další pojmy ke studiu: lytický a lyzogenní cyklus, lysozym, fágy virulentní, fágy mírné, profág, indukční činitele, pinocytóza, transfekce, epizom, onkogenní působení virů, polyvalentní bakteriofágy, aktinofágy, termofilní bakterie *Thermoproteus tenax*, bakteriofág *Escherichia coli* ϕ X174, fágy T4 a T7, virus tabákové mozaiky, papilomavirus, poliovirus, viry lidské hepatitidy, viry rýmy, virus slintavky a kulhavy, rotaviry, viry neštovic, virus Epstein-Barové, herpes viry, viry spalniček a příušnic, viry hemoragických (krvácivých) horeček, virus encefalitidy, viry dengue a žluté zimnice, virus vztekliny, replikační strategie bakteriofágů, replikační strategie rostlinných a živočišných RNA virů, replikační strategie rostlinných a živočišných DNA virů, konjugativní pilusy

8. Metody molekulární biologie

K hlavním metodickým přístupům molekulární biologie patří zejména purifikace a izolace nukleových kyselin, amplifikace nukleových kyselin, různé způsoby manipulace s nimi, sekvenování DNA a dále pak různé metody analýzy genové exprese (studium transkripce a translace).

V následující části jsou vysvětleny principy nepoužívanějších molekulárně biologických metod spolu s příklady jejich možného využití.

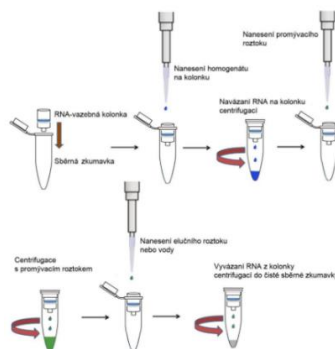
8.1 Metody izolace nukleových kyselin

Izolace nukleových kyselin je obvykle **prvním krokem** většiny molekulárně biologických technik. Materiálem pro izolaci mohou být jednotlivé buňky, tkáně nebo orgány (které jsou nejdříve homogenizovány), nebo například virové částice. Izolace zahrnuje 3 základní kroky: **1) rozrušení buněk nebo virových kapsidů působením enzymů** (detergenty), **2) odstranění kontaminantů pomocí enzymů** (proteínáza) a **3) vlastní extrakce nukleové kyseliny**.

Mezi nejčastěji využívané metody izolace DNA patří bezesporu **fenol-chloroformová extrakce**, kdy je buněčný lyzát promíchán se směsí fenolu a chloroformu. Fenol je organické rozpouštědlo používané k oddělení proteinů od nukleových kyselin (proteiny jsou hydrofobní a zůstávají v organické fázi, zatímco nukleové kyseliny jsou vysoce nabitě a přecházejí do vodné fáze). Chloroform denaturuje proteiny, rozpouští tuky a napomáhá oddělení jednotlivých fází získaných v následujícím kroku. Centrifugací je poté oddělena spodní organická fáze (tvořená fenolem), mezifáze (tvořená denaturovanými proteiny a zbytky buněk) a horní vodná fáze (v níž je rozpuštěna DNA). DNA je následně vysrážena ethanolom, precipitát je shromážděn centrifugací a získaný sediment je rozpuštěn ve vhodném roztoku (například ve vodě). K izolaci DNA je možné použít další metody extrakce, například **adsorpci na silikát** nebo komerčně dodávané **izolační soupravy** (tzv. **kity**), které výrazně zjednodušují a urychlují postup získání DNA.

Hlavním problémem při izolaci RNA jsou **RNázy** (všudypřítomné a velmi odolné enzymy, štěpící RNA). Všechny vodné roztoky a materiál, které přijdou do styku se zpracovávaným vzorkem, proto musí být RNáz zbaveny. Pro izolaci lze opět použít **fenol-chloroformovou extrakci** – fenol zde však musí mít vyšší teplotu a být kyselý. Takto lze získat roztok všech typů RNA, tj. tzv. **celkovou RNA** (kontaminující DNA se lze zbavit působením **DNázy**). Nejčastějším cílem izolace je však získání samostatné mRNA, která se používá např. pro sledování exprese konkrétních genů nebo pro přípravu **cDNA** apod. **Izolace samostatné mRNA** je založena na přítomnosti tzv. **polyA sekvence na 3'-konci** všech molekul mRNA. Díky ní lze mRNA z roztoku "vychytat" vazbou na krátké komplementární **polyT-řetězce** (ty mohou být připevněny například na stěnu mikrozkuřavky). Ostatní složky roztoku lze poté odstranit opakovaným promýváním podobně, jako při adsorpci DNA na silikátové částice. I pro tento typ izolace jsou opět dostupné komerční kity.

Obr. 10 – Princip izolace RNA pomocí centrifugačních RNA vazebných kolonek



Zdroj: <https://labguide.cz/metody/izolace-nukleovych-kyselin/izolace-rna/>

8.2 Elektroforéza

Elektroforéza patří k nejpoužívanějším separačním technikám sloužícím k izolaci a analýze makromolekul (nukleových kyselin a proteinů) o rozdílné hmotnosti, popř. odlišném elektrickém náboji, využívající jejich odlišnou pohyblivost v elektrickém poli. Využívá schopnosti nabitých částic pohybovat se v elektrickém poli, přičemž rychlost pohybu částic je závislá na velikosti celkového povrchového náboje, velikosti a tvaru molekuly a její koncentraci v roztoku. Rychlost molekuly při elektroforetické separaci lze vyjádřit:

$$\frac{v}{E} = C \cdot \frac{\epsilon_r \cdot \epsilon_0}{\eta} \cdot \zeta$$

Kde ζ je elektrokinetický potenciál (V), v je lineární rychlost pohybu částice ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$), E je intenzita elektrického pole ($\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$), η viskozita prostředí ($\text{Pa} \cdot \text{s}$), ϵ_r je relativní permitivita kapaliny, ϵ_0 permitivita vakua a C konstanta závislá na tvaru částic a na tloušťce elektrické dvojvrstvy.

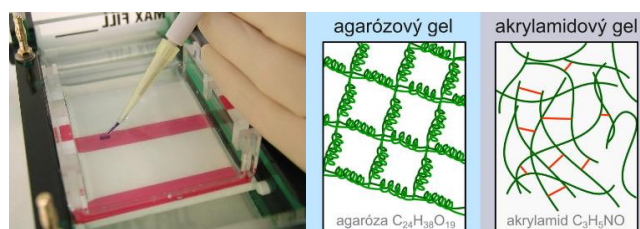
Nejčastěji používaným typem elektroforézy je elektroforéza na nosičích, konkrétněji gelová elektroforéza (agarózové gely, polyakrylamidové gely, SDS gelová elektroforéza aj.).

8.2.1 Použití gelové elektroforézy pro separaci různě dlouhých fragmentů DNA

Principem metody je **pohyb záporně nabitých molekul DNA** (záporně nabitě fosfátové skupiny) **v elektrickém poli směrem ke kladně nabitě anodě**. Pomocí gelové elektroforézy lze separovat molekuly DNA na základě rozdílných rychlostí pohybu molekul DNA v gelu, které jsou nepřímo úměrné velikosti molekuly DNA.

Elektroforéza se provádí na vhodném nosiči, nejčastěji v gelu z **agarózy** (či polyakrylamidu). Gel je tvořen složitou sítí polymerních molekul s póry, jimiž se různě velké molekuly DNA pohybují různou rychlostí (velké fragmenty pomaleji, malé fragmenty rychleji). Agarózový gel se připravuje v různé hustotě (udávané v objemových % práškové agarózy). Agaróza se rozpouští v **puftru**, který je také obsažen v elektroforetické vaně jako elektrolyt (**TBE**, **TAE** aj.). Vzorky se nanáší do **jamek** v gelu, které byly vytvořeny pomocí tzv. **hřebínku**. Zatížení DNA (klesne do jamky v gelu) a migrace DNA v gelu jsou zajištěny přidáním tzv. **nanášecího neboli vkládacího puftru**, který **může být** zbarvený (vizuální kontrola vložení produktu do příslušné jamky a také migrace v gelu). Pro odhad velikosti pozorovaných DNA fragmentů se do jedné jamky gelu nanáší tzv. **velikostní marker** (hmotnostní standard, **DNA ladder** = žebřík) o definované velikosti jednotlivých fragmentů. Separované fragmenty DNA je třeba zviditelnit. Pro vizualizaci DNA se používá **značení barvivem**, které se váže na DNA, např. **ethidiumbromid**, **SYBR Green** aj., a v přístroji zvaném **UV transiluminátor** následně zviditelní fragmenty DNA. Pro detekci fragmentů DNA lze použít také **radioaktivní značení**, nebo **hybridizaci se značenou sondou** (krátkým oligonukleotidem, který se komplementárně váže k hledané sekvenci). Rozdělené molekuly DNA lze také ve funkční formě izolovat z gelu.

Obr. 11 – Horizontální gelová elektroforéza, agarózový a akrylamidový gel

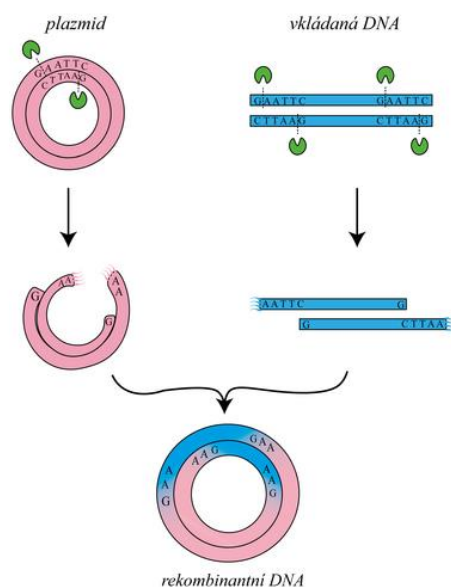


Zdroj: <https://www.wikiskripta.eu/w/Elektrofor%C3%A9za>

8.3 Rekombinantní DNA

Rekombinantní DNA je uměle syntetizovaná DNA, která vzniká inzercí celého genu nebo jeho určité části do genomu jiného organismu. **Rekombinantní molekuly (Rc-DNA)** tedy obsahují úseky DNA rozdílných organismů. Vytvářejí se inzercí cizorodé DNA do **vektoru**, kterým může být **bakteriální plazmid** nebo **fág**. Příprava rekombinantní DNA začíná pokusem vložit množství víceméně náhodných restrikních fragmentů do plazmidu. Z tohoto důvodu je rozhodující rozpoznat zejména konkrétní gen, což je možné pouze tehdy, kdy je dostupná příslušná mRNA – ta se purifikuje a použije se na přípravu **cDNA** pomocí enzymu **reverzní transkriptázy** – výsledkem je radionuklidem značená molekula cDNA, tzv. **sonda („probe“)**, která za specifických podmínek **hybridizuje** s příslušným genem (viz níže). Rekombinantní DNA technologie se používá např. v **genové terapii** nebo při přípravě **geneticky modifikovaných organismů (GMO)**.

Obr. 12 – Schéma vzniku rekombinantní DNA za použití plazmidu



Zdroj: https://www.wikiskripta.eu/w/Rekombinantn%C3%AD_DNA

8.4 Polymerázová řetězová reakce – PCR

PCR (polymerase chain reaction) je metoda sloužící k **mnohonásobné amplifikaci** (zmnožení) specifického úseku DNA *in vitro*. PCR zavedl v roce 1983 Kary Mullis, který za objev této metody dostal v roce 1993 Nobelovu cenu. **Princip syntézy DNA touto metodou je podobný replikaci** – kopie úseku DNA jsou syntetizovány pomocí enzymu **DNA-polymerázy** podle templátu ve formě ssDNA na principu **komplementarity bází**. K zahájení reakce je zapotřebí dvou tzv. **primerů** (chemicky syntetizovaných krátkých oligonukleotidů), které se připojují ke komplementárním úsekům protilehlých řetězců DNA tak, že jejich 3'-OH-konce směřují proti sobě. Pomocí primerů je zároveň vymezen úsek DNA, který bude amplifikován. Jako **templáty** pro syntézu slouží oba řetězce dsDNA, po předchozí denaturaci.

Reakční směs pro PCR (templátová DNA, dva primery, deoxyribonukleosidtrifosfáty a termostabilní DNA polymeráza) se napipetuje do malé PCR zkumavky, která se vloží do speciálního přístroje, tzv. **termocykleru**, kde probíhají cyklicky se opakující kroky za různých teplot.

Průběh PCR lze obecně shrnout do pěti kroků: 1) **počáteční denaturace DNA** – separace řetězců (94 °C, 2–5 min), 2) **denaturace** - separace řetězců (94–95 °C, 20–45 s), 3) **anelace (nasedání) primerů** (55–65 °C, 30–90 s), 4) **polymerační reakce (extenze)** – prodlužování řetězců pomocí DNA-

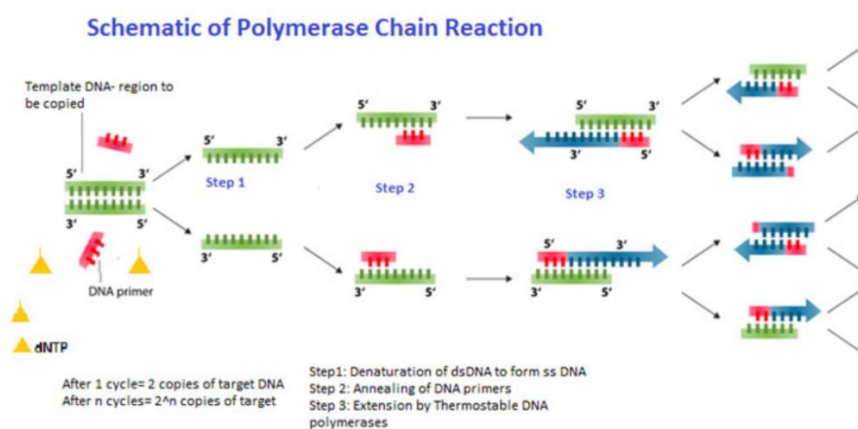
polymerázy, která syntetizuje komplementární řetězce DNA z volných nukleotidů, nově syntetizované řetězce slouží jako templáty pro další cyklus (72 °C, 45–90 s), 5) **závěrečná extenze (terminace)** – dosyntetizování, případně nedosyntetizovaných řetězců (72 °C, 5 min), přičemž **body 2–4 se cyklicky opakují** (25–30 cyklů).

Výhodou PCR je, že vyžaduje minimální množství DNA (teoreticky stačí 1 molekula DNA). Touto metodou lze získat $2^n - 1$ kopií, kdy n je počet cyklů. Z jedné molekuly DNA lze tedy například získat po proběhnutí 30 amplifikačních cyklů víc než 10^9 kopií. **Nevýhodou** této metody je v nízké (ale i tak významné) četnosti možné zanášení chyb do amplifikovaných kopií DNA (**Taq-polymeráza nemá korekční aktivitu** a následkem toho produkuje při replikaci chyby s větší četností, než je obvyklé).

Výsledný produkt PCR (amplifikovaný úsek DNA) lze analyzovat např. stanovením velikosti produktu **gelovou elektroforézou**, **štěpením restriktivními enzymy** a **posouzením vznikajících restriktivních fragmentů (RFLP)**, **hybridizací se značenou sondou** komplementární k části sekvence amplifikovaného úseku nebo **stanovením sekvence DNA** (viz níže). Variantou PCR umožňující syntézu cDNA podle RNA templátu je **reverzní PCR (RT-PCR)** využívající enzymu **reverzní transkriptázy**.

PCR má mnohostranné využití nejen v **základním výzkumu** (izolace genů nebo jejich částí, příprava značených sond, sekvenování DNA) a **aplikovaném genetickém výzkumu** (detekce mutací v genech, studium polymorfismu genů, populační genetika), ale uplatňuje se i v **klinických disciplínách** (prenatální diagnostika, detekce patogenních mikroorganismů, identifikace onkogenů), v **archeologii**, **kriminalistice** (identifikace jedinců), v **soudním lékařství** (určení paternity), v **potravinářském průmyslu** (identifikace falšování potravinářských výrobků) a v mnoha dalších vědních oborech (zoologie, botanika, mikrobiologie, parazitologie).

Obr. 13 – Schéma polymerázové řetězové reakce (PCR)



Zdroj: <https://igbiosystems.com/applications/techniques/polymerase-chain-reaction-real-time-pcr-digital-pcr/>

8.5 Hybridizace nukleových kyselin, DNA a RNA sondy

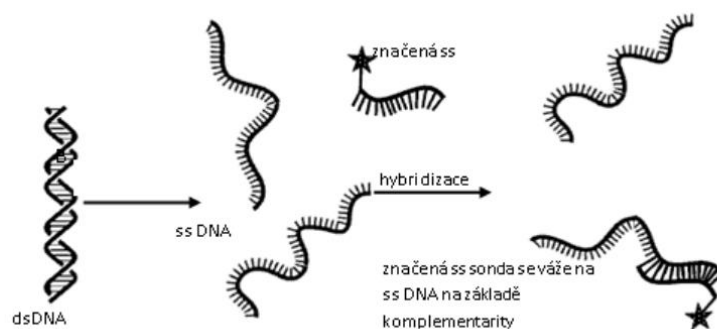
Hybridizační techniky jsou využívány k **detekci cílových genů**. Základním **principem** těchto metod je **hybridizace DNA či RNA**, tj. vzájemné párování jednořetězcových molekul DNA či RNA. Párování jednořetězců nukleových kyselin je dáno **komplementaritou bází**, tzn. formací vodíkových vazeb mezi adeninem a thyminem/uracilem a vodíkových vazeb mezi guaninem a cytosinem (pokud jsou tedy tyto vazby přítomny na jednořetězcové molekule nukleové kyseliny). Na základě komplementarity dochází k přisedání jednoho jednořetězcového úseku nukleové kyseliny k druhému a výsledné formaci dvouřetězcové molekuly. Při hybridizačních technikách je testovaná molekula nukleové kyseliny chemicky či teplem **denaturována** (z dvouřetězcové molekuly vznikají dvě jednořetězcové) a v této

denaturované formě je nanesena na **membránu**. Pro imobilizaci nukleové kyseliny jsou využívány membrány **nylonové**, **nitrocelulosové** nebo polyvinyliden difluoridové (**PVDF**) a u každé z nich jsou dostupné další typy s různými specifikami. Volba druhu membrány se odvíjí od způsobu detekce sondy, tj. doporučení výrobce daného systému.

V současné době se **nejčastěji** používají **pozitivně nabitě nylonové membrány**. Vzorek nukleové kyseliny imobilizovaný na membráně je následně hybridizován **se značenou sondou**. Jako **sonda** je využívána nukleová kyselina, která je komplementární k sekvenci testované molekuly. Sonda je **značená (radioaktivně či neradioaktivně, například fluorescenčně)** a může být přímo ve formě jednořetězcové molekuly či jako dvouřetězcová. Pokud je jako sonda využívána dvouřetězcová molekula, je nutné ji před použitím denaturovat. Jako **hybridizační sondy** jsou používány: **ssDNA**, **dsDNA**, **molekuly RNA** a **syntetické oligonukleotidy**. **Jednořetězcové DNA sondy** mohou být **syntetizovány z mRNA** použitím **reverzní transkriptázy** nebo z fragmentů **klonovaných do specializovaných M13** nebo **fagemidových vektorů**, které obsahují místo počátku replikace jednořetězcové **bakteriofágní DNA**. Využitím **radioaktivně značených ^{32}P** při syntéze vzniká radioaktivně značená sonda (využití ssDNA sondy na rozdíl od dvouřetězcových sond eliminuje riziko reasociace denaturovaných jednovláknových molekul sondy). Dále může být využita jakákoliv **dvouřetězcová molekula DNA** získaná například **zaklonováním do klonovacího vektoru** nebo pomocí **PCR**. **Značení dvouřetězcových sond** se provádí například **pomocí nick-translace** nebo **primer extension** pomocí komerčně dostupných kitů. **RNA sondy** jsou získávány ze **zaklonovaných fragmentů v klonovacích vektorech**. Tyto vektory obsahují promotorové sekvence **z bakteriofágů SP6** nebo **T7**, které přiléhají ke klonovacímu místu. Transkripce klonovaných úseků v přítomnosti rNTP značených ^{32}P dává vznik značené RNA sondě. Templátová DNA je odstraněna jednoduchým štěpením DNázou. RNA sondy mají mnohé uplatnění, ovšem jejich velkou **nevýhodou je riziko degradace RNA** při kontaminaci RNázami. **Syntetické oligonukleotidy** mohou být připraveny mnohými **komerčními firmami**. **Značení se provádí pomocí koncového značení, např. T4 DNA polymerázou.**

Standardně se využívají **sondy značené radioaktivně prostřednictvím ^{32}P** . V posledních letech je ovšem zvyšující se zájem o **neradioaktivní značení**, jako především značení **digoxigeninem (DIGem)**, **fluorescenčně** nebo **biotinem**. Při neradioaktivním značení jsou sondy detekovány kupříkladu pomocí protilátky s navázanou např. alkalickou fosfatázou. Alkalická fosfatáza reaguje s přidáním substrátu jako např. NBT / BCIP (nitro blue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-fosfát) s výslednou kolorimetrickou či chemiluminiscenční reakcí. V porovnání s radioaktivním značením je **neradioaktivní značení nepopíratelně výhodnější co do bezpečnosti a stability**, ale na druhou stranu je **mnohem méně citlivé**.

Obr. 14 – Princip hybridizace DNA



Zdroj: https://cit.vfu.cz/opyk2014/?title=teorie-metody_molekularni_biologie&lang=cz

8.5.1 Southern blotting

Southern blotting je jednou ze základních metod **identifikace specifických fragmentů DNA na bázi hybridizace** molekul nukleových kyselin. Nejprve je DNA separována standardně použitím agaróзовé elektroforézy – vzorky DNA jsou přímo v agaróзовém gelu denaturovány ponořením gelu do silně alkalického roztoku (ds molekuly jsou denaturovány do ss). Poté jsou vzorky již denaturované DNA přeneseny na membránu (viz výše) buď **kapilárním způsobem, pomocí vakua** nebo tzv. **elektropřenosem**. Výsledkem je membrána s navázanou nukleovou kyselinou v pozicích, které věrně odrážejí jejich původní pozice na gelu po elektroforetické separaci. Nukleová kyselina je na membráně navázaná na základě iontové vazby mezi nukleovou kyselinou a membránou. Vzhledem k tomu, že působením některých chemikálií (které jsou použity pro následnou hybridizaci) by docházelo k rozrušení iontových vazeb a značné ztrátě navázané nukleové kyseliny, je třeba nukleovou kyselinu na membráně ireverzibilně imobilizovat (například pomocí UV záření či tepla). Fragmenty DNA fixované na membráně jsou následně hybridizovány značenou sondou a poté (dle způsobu značení sondy) detekovány.

8.5.2 Northern blotting

Northern blotting je analogií Southernova blottingu, s tím rozdílem, že se separují a na membránu přenášejí **molekuly RNA**. Většina molekul RNA obsahuje sekundární strukturu, a proto musí zůstat během elektroforézy denaturovaná, aby byla zajištěna separace na základě velikosti. Po přenosu na příslušnou membránu se RNA hybridizuje buď s RNA, nebo DNA sondami stejně jako u Southernova přenosu. Northern blotting je užitečný při studiích genové exprese, případně k určení, kdy a kde jednotlivé geny exprimují.

8.5.3 Western blotting

Western blotting je obdobou Southernova blottingu, aplikovaný na **proteiny**. Důležitým nástrojem pro separaci a charakterizaci proteinů je **polyakrylamidová gelová elektroforéza**. Protože je mnoho funkčních proteinů složeno ze dvou či více podjednotek, jsou jednotlivé polypeptidy separovány v přítomnosti **detergentu** dodecylsulfátu sodného (SDS), který je **denaturuje**. Po proběhlé elektroforéze se proteiny **detekují barvením** (Coomassie blue) nebo **značí** například stříbrem. Rozdělené polypeptidy lze ale také **přenést z gelu na nitrocelulóзовou membránu** a jednotlivé proteiny **detekovat pomocí protilátek**. Přenos proteinů z polyakrylamidového gelu na nitrocelulóзовou membránu se uskutečňuje pomocí **elektrického proudu**. Specifický protein se po přenosu identifikuje tak, že se membrána s imobilizovanými proteiny umístí do roztoku obsahující **protilátku** k tomuto proteinu. Následně se nenavázané protilátky vymytím z membrány odstraní. Přítomnost první (primární) protilátky se detekuje inkubací se sekundární protilátkou, která reaguje s imunoglobuliny. Sekundární protilátka je spojena buď s radioaktivním izotopem (**autoradiografie**), nebo enzymem, který vytváří za přídavku substrátu viditelný produkt (**antigen-protilátka**).

8.6 DNA fingerprinting

DNA fingerprinting (genetická daktyloskopie) je v současné době rutinní způsob určení totožnosti osob z biologického vzorku na základě polymorfismů sekvencí vybraných úseků DNA. Je široce využíván jak v trestních případech, tak ve sporech občanskoprávních (zejména ve spojitosti s určováním rodičovství). V obou případech jeho výsledky často slouží jako hlavní důkazní materiál. Zároveň je využíván také k detekci některých onemocnění, slouží jako nástroj pro genetické mapování živočišných i rostlinných genomů či populační studie aj.

Postup DNA fingerprintingu je založen na **určování genetické identity srovnáváním DNA sekvencí**, které jsou **jedinečné** pro každého jedince (s výjimkou jednovaječných dvojčat). Pojem DNA

fingerprinting v sobě zahrnuje techniky jako polymorfismus délek restričních fragmentů (**RFLP**) a na PCR založený polymorfismus délky náhodně amplifikovaných fragmentů (**RAPD**) anebo určení variabilního počtu tandemových repetitiv (VNTR) či krátkých tandemových repetitiv (**STRP**).

8.6.1 Polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP)

RFLP (restriction fragment length polymorphism) je metoda, jejíž podstatou je **enzymatické štěpení molekul DNA ve specifickém restričním místě** enzymem **restriční endonukleázou**. Různé restriční endonukleázy štěpí cílovou DNA v různých místech, v závislosti na sekvenci DNA. Po rozdělení vzniklých fragmentů pomocí gelové elektroforózy lze na základě velikosti a počtu fragmentů sledovat rozdíly ve studovaných sekvencích, tzv. **polymorfizmy**. Polymorfizmy v délkách restričních fragmentů jsou způsobeny přestavbami (například insercemi, delecemi a substitucemi bází) ve studované sekvenci, které způsobí změnu počtu restričních míst.

8.6.2 Polymorfismus délky náhodně amplifikovaných fragmentů DNA (RAPD)

Metoda **RAPD** (random amplified polymorphic DNA) byla popsána v roce 1990 a jedná se v podstatě o **typ PCR reakce**, kde je na místo dvou **primerů použit pouze jeden**, u kterého navíc **není třeba znát konkrétní sekvence** cílových oblastí DNA. Nezbytný však je podíl **guanino-cytosinového komplementárního páru**, který by ve struktuře DNA měl tvořit minimálně 40 %. Primer hybridizuje na určitých místech řetězce DNA, kdy po syntéze nových řetězců vznikne směs mnoha fragmentů o rozličné délce. Jejich polohu lze zviditelnit pomocí fluorescenčního barviva převedením na agarózový gel.

Úspěšnost metody RAPD závisí zejména na koncentraci DNA, počtu cyklů v termocykleru, kvalitě a koncentraci použitých primerů, zvolené DNA polymeráze, ale také na přesnosti pipetování. RAPD reakce jsou také velmi citlivé na teplotní profil (změnou teploty se může výrazně změnit výsledná forma RAPD produktů).

8.6.3 Určení variabilního počtu (VNTR) nebo krátkých (STRP) tandemových repetitiv

VNTR (variable number tandem repeats) a **STRP** (short tandem repeat polymorphism, někdy také označované jako tzv. **mikrosatelity**) jsou moderní, dnes nejpoužívanější metody (podobné metodě RFLP) DNA fingerprintingu. Jsou založeny na detekci tzv. **tandemových repetitiv**, jejichž podoba a délka je u každého jedince výrazně individuální. Konkrétní počet repetitiv se zjišťuje opět metodou PCR a následnou elektroforézou fragmentů. Lze tak vytvořit spolehlivý genetický profil jedince, s 99 % přesností.

Další pojmy ke studiu: varianty elektroforetické separace, produkce, detekce a analýza rekombinantních proteinů, studium vzájemné interakce proteinů (Far western, SPR, fágový displej aj.), studium interakce proteinů s DNA, vektory, umělé chromozomy, kyvadlové vektory, exprese proteinů, mutagenese DNA, *in vitro* mutagenese, transformace organismů, qRT-PCR, Nested PCR, alelově specifická PCR, PCR *in situ*, Hybridizace *in situ* (ISH), fluorescenční hybridizace *in situ* (FISH), M-FISH, genové knihovny (genomové, cDNA), klonování (vektor, inzert, plazmidy, fágy, fagmidy, kosmidy, polylinker, selekční marker atd.), DNA a proteinové čipy (arrays), sekvenování (Sangerova metoda, Maxamova-Gilbertova metoda, pyrosekvenování, SMRT, „polony sequencing“), molekulárně-genetický polymorfismus

KONTROLNÍ OTÁZKY

Kapitola 1

1. Čím se zabývá molekulární biologie?
2. Jaké je rozdělení, složení a funkce bílkovin?
3. Jaké znáte aminokyseliny?
4. Co je to peptidová vazba?
5. Jaká je struktura bílkovin?
6. Co jsou to nukleové kyseliny a jaká je jejich hlavní úloha?
7. Jaké jsou rozdíly ve stavbě a funkci DNA a RNA?
8. Co je to komplementarita bází a jaké báze znáte?
9. Jakou mají nukleové kyseliny strukturu?

Kapitola 2

1. Co je to genetická informace a genetický kód?
2. Co je tzv. ústřední dogma molekulární biologie?
3. Jaký je genetický kód?
4. Kde a jak probíhá čtení genetického kódu?
5. Co to jsou iniciační a terminační kodony?
6. Jaké znáte konkrétní formy genu?

Kapitola 3

1. Co je to replikace?
2. Jak replikace obecně probíhá?
3. Jak probíhá replikace bakteriálního a jak eukaryotního genomu?
4. Jak probíhá replikace plazmidové DNA?
5. Jaké jsou hlavní rozdíly mezi replikací bakterií a eukaryot?
6. Jaké znáte postreplikační modifikace a v čem spočívají?

Kapitola 4

1. Co je to transkripce?
2. Jaké se v procesu transkripce uplatňují enzymy?
3. Jak probíhá transkripce u bakteriálního genomu?
4. Jak probíhá transkripce u eukaryotního genomu?
5. Jaké jsou hlavní rozdíly mezi transkripcí bakterií a eukaryot?
6. Jaké znáte posttranskripční úpravy?
7. Co je to a k čemu slouží proteosyntetický aparát?

Kapitola 5

1. Co je to translace?
2. Kolik je základních aminokyselin?
3. Co je to tzv. aktivace aminokyselin a čím je katalyzována?
4. Jaké znáte druhy RNA?
5. Co jsou to ribozomy a jaká mají vazebná místa?
6. Jak probíhá translace u bakterií?
7. Jak probíhá translace u eukaryot?

8. Jaká je translační přesnost a jakým dalším mechanismem k jejímu navýšení ribozom disponuje?
9. Jaké znáte posttranslační procesy?

Kapitola 6

1. Co jsou to transpozony?
2. Jaké transpozony znáte?
3. Jakými mechanismy pohybu transpozony disponují?
4. Jaké znáte alespoň dva příklady DNA transpozonů?
5. Jak mohou být retrotranspozony klasifikovány?
6. Kde se nachází replikativní transpozony a v jakém procesu hrají významnou roli?

Kapitola 7

1. Co jsou to viry, retroviry a virusoidy?
2. Jaká je jejich stavba?
3. Jak lze viry primárně rozdělit?
4. Co jsou to tzv. retroviry?
5. Co jsou to bakteriofágy?
6. Jaký je rozdíl mezi lytickým a lyzogenním cyklem viru?
7. Proč na viry neúčinkují antibiotika?
8. Jak obecně probíhá reprodukce viru v hostitelské buňce?
9. Co jsou to satelity, viroidy a priony?
10. Jaké znáte alespoň dva příklady DNA virů, RNA virů, retrovirů a viroidů?
11. Co způsobují priony?
12. Co si představíte pod pojmem onkogenní působení virů?

Kapitola 8

1. Jaké znáte metody izolace nukleových kyselin?
2. Co je to elektroforéza, na jakém principu je založena a k čemu se používá?
3. Jaké znáte varianty elektroforetické separace?
4. Co je to rekombinantní DNA?
5. Co je to rekombinantní protein?
6. Co je to PCR?
7. Jaký je princip metody PCR a co je součástí tzv. reakční směsi?
8. Lze PCR provést i bez termocykleru?
9. Co je to a na jakém principu funguje tzv. hybridizace nukleových kyselin?
10. Co jsou to tzv. sondy (probe) a jaké znáte?
11. K čemu slouží Southern, Northern a Western blotting a na jakém principu jsou založeny?
12. Co je to tzv. DNA fingerprinting?
13. Co je to RFLP?
14. Co je to RAPD?
15. Co je to VNTR a STRP?
16. Co znamená pojem mutageneze?
17. Jak lze dělit a jaké znáte mutageny?
18. Co je to klonování a k čemu se užívá?
19. Co jsou to DNA a proteinové čipy a k čemu se užívají?
20. Co je to sekvenování?
21. Jak sekvenování probíhá?
22. Jaké metody sekvenování znáte?

DOPORUČENÁ LITERATURA

ALBERTS, B. (1998). *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. Ústí nad Labem: Espero. ISBN 80-902906-0-4.

BURTON E. TROPP. (2012). *Molecular biology*. Jones & Bartlett Learning. ISBN 978-14-4968-917-9

CLARK, D. et al. (2018). *Molecular biology*. Academic Cell. ISBN 978-01-2813-288-3

KOČÁREK, E. (2007). *Molekulární biologie v medicíně*. Národní centrum ošetrovatelství. ISBN 978-80-7013-450-4

RUML, T. a kol. (2007). *Genové inženýrství*. VŠCHT Praha. ISBN 978-80-7080-499-5

ŠMARDA, J. a kol. (2010). *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-3841-7