

Molekulární biologie pro informatiky

(VV072)

Molekulární biologie pro informatiky

Přednášející: Mgr. Lenka Tesařová, Ph.D.
Mgr. Pavel Šimara, Ph.D.

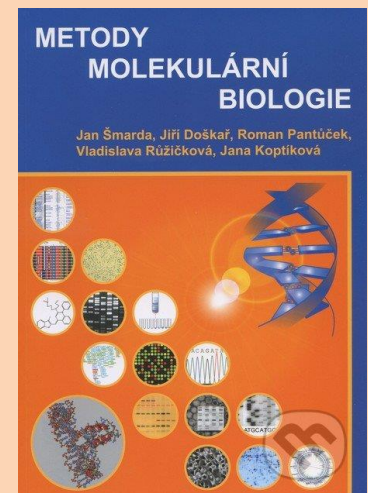
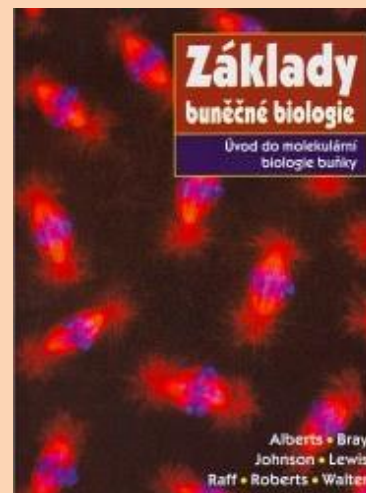
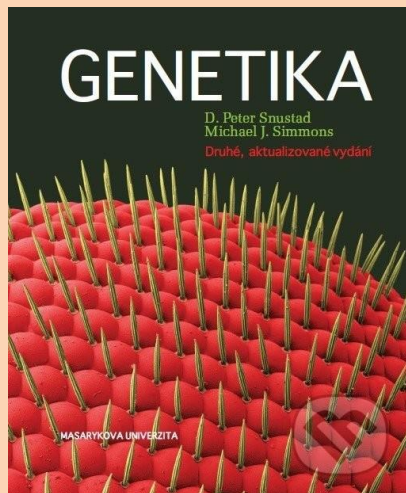
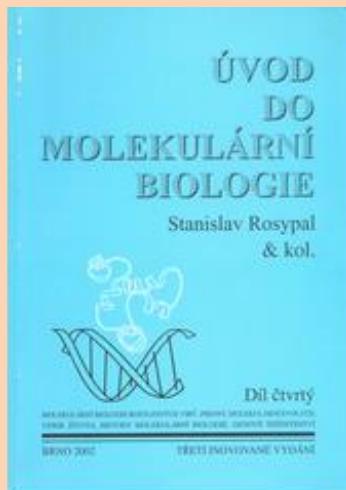
Doporučená literatura:

Rosypal a kol.: **Úvod do molekulární biologie.** Brno, 2006 (4. vydání)

Snustad a kol.: **Genetika.** Brno, 2017

Alberts a kol.: **Základy buněčné biologie : úvod do molekulární biologie buňky.**
(orig. Molecular biology of the cell)

Šmarda a kol.: **Metody molekulární biologie.** Brno, 2010



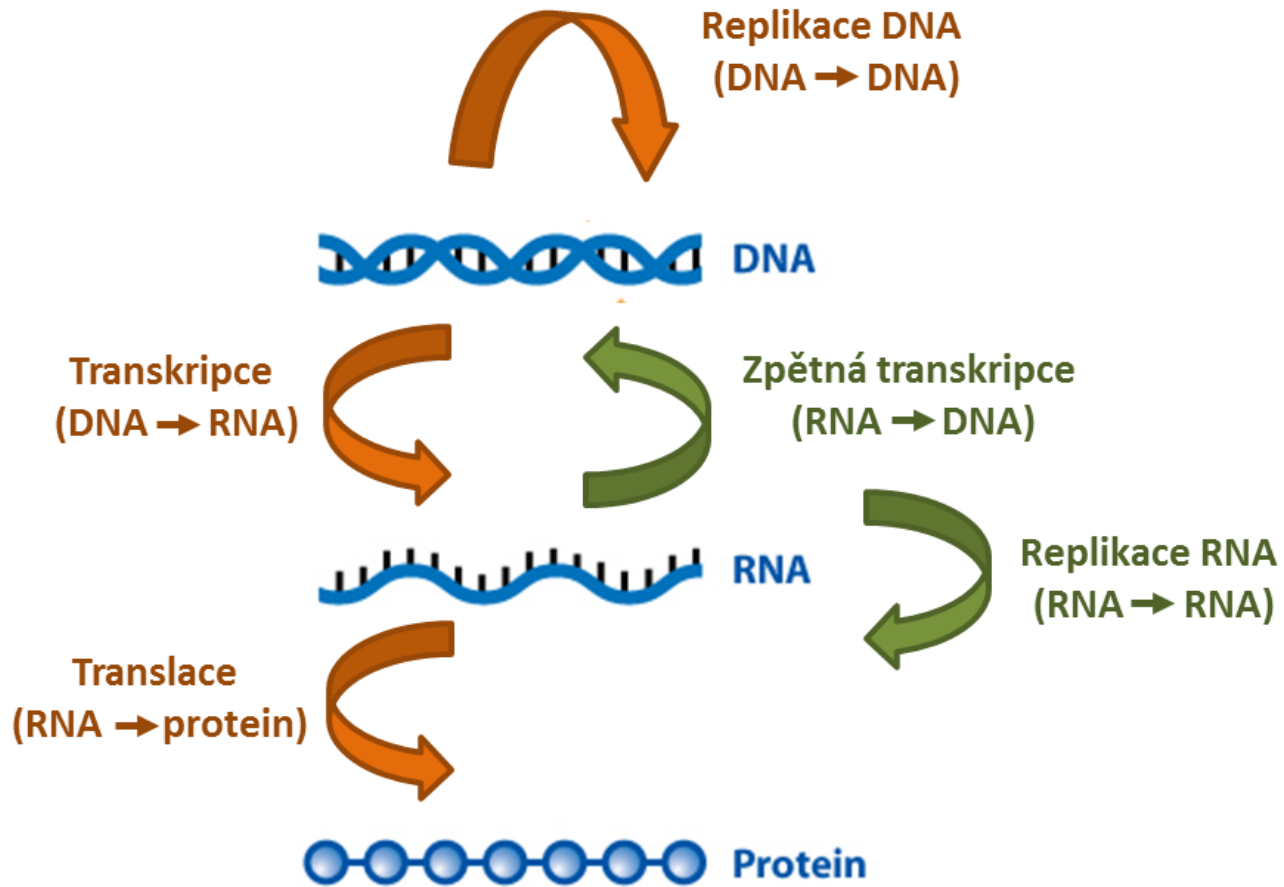
Molekulární biologie pro informatiky

1. Historie molekulární biologie. Nukleové kyseliny a proteiny
2. Struktura genomu a genetická informace
3. Replikace genomu, reparace a rekombinace DNA
4. Transkripce genomu
5. Translace genomu
6. Regulace genové exprese
7. Molekulární mechanismy signalizace
8. Molekulární struktura eukaryotické buňky
9. Regulace buněčného cyklu
10. Programovaná buněčná smrt a molekulární podstata získané imunity
11. Molekulární podstata nádorových onemocnění
12. Metody molekulární biologie a základy genového inženýrství

Molekulární biologie pro informatiky - 1

**Historie molekulární biologie
Nukleové kyseliny a proteiny**

Ústřední dogma molekulární biologie

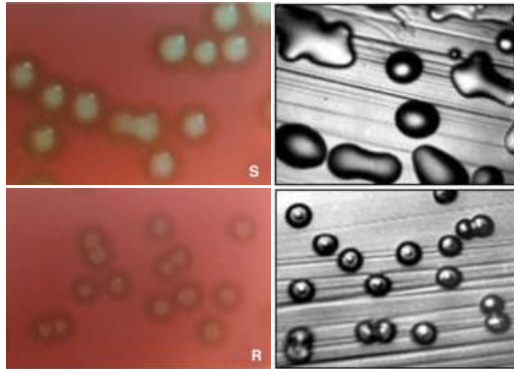


Historie objevů genetické informace

- 1868** **Johann Friedrich Meischer**
Hrubé extrakty DNA
- 1919** **Phoebus Aaron Theodor Levene**
Tetranukleotidová hypotéza
- 1928** **Frederick Griffith**
Transformační princip
- 1944** **Oswald Avery, Colin Munro MacLeod, Maclyn McCarty**
Transformační princip je DNA
- 1952** **Alfred Hershey, Martha Cowles Chase**
DNA je nositelkou genetické informace
- 1953** **James Dewey Watson, Francis Crick**
Objasnění struktury DNA
- 1956** **Heinz Fraenkel-Conrat, Bea Singer**
RNA jako nositelka genetické informace
- 1958** **Matthew Meselson, Franklin Stahl**
Semikonzervativní replikace DNA

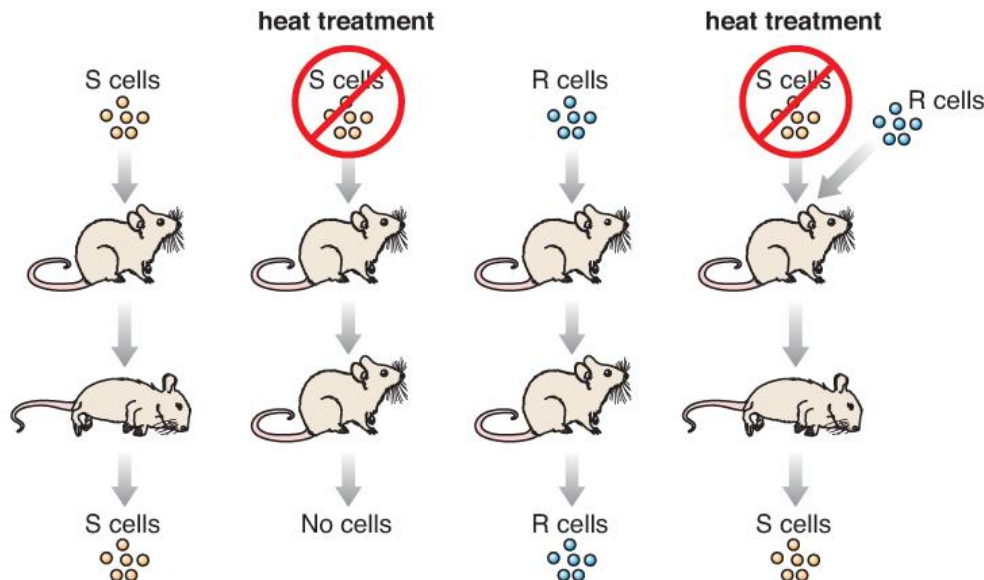
Griffith - Transformační princip (1928)

Streptococcus pneumoniae



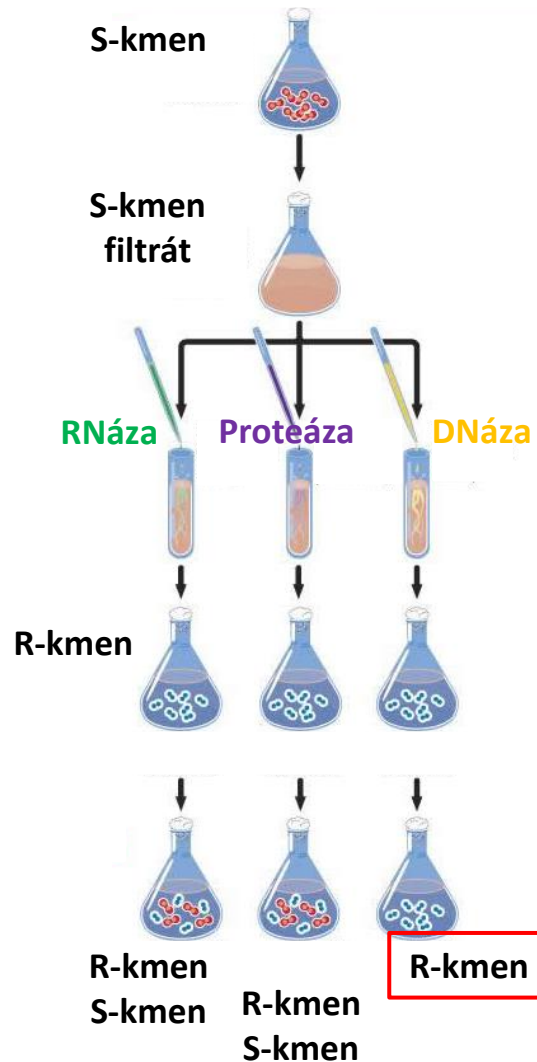
S-kmen: smooth, kapsula dodávající hladký vzhled
patogenní (zápal plic u člověka, smrt u myši)

R-kmen: rough, bez kapsuly, drsný vzhled
mutantní, nepatogenní



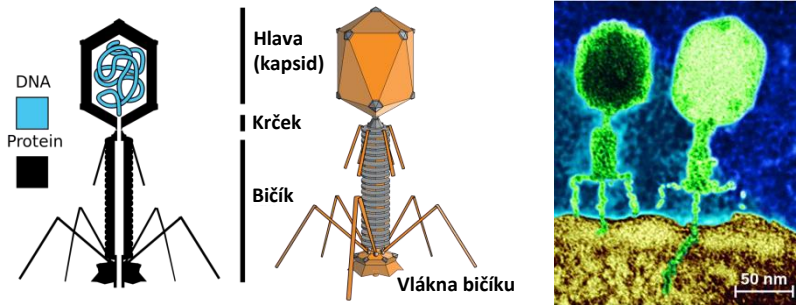
Přenos genetického materiálu mezi
dvěma kmeny bakterií procesem
transformace.

Avery, MacLeod, McCarty - Transformační princip je DNA (1944)



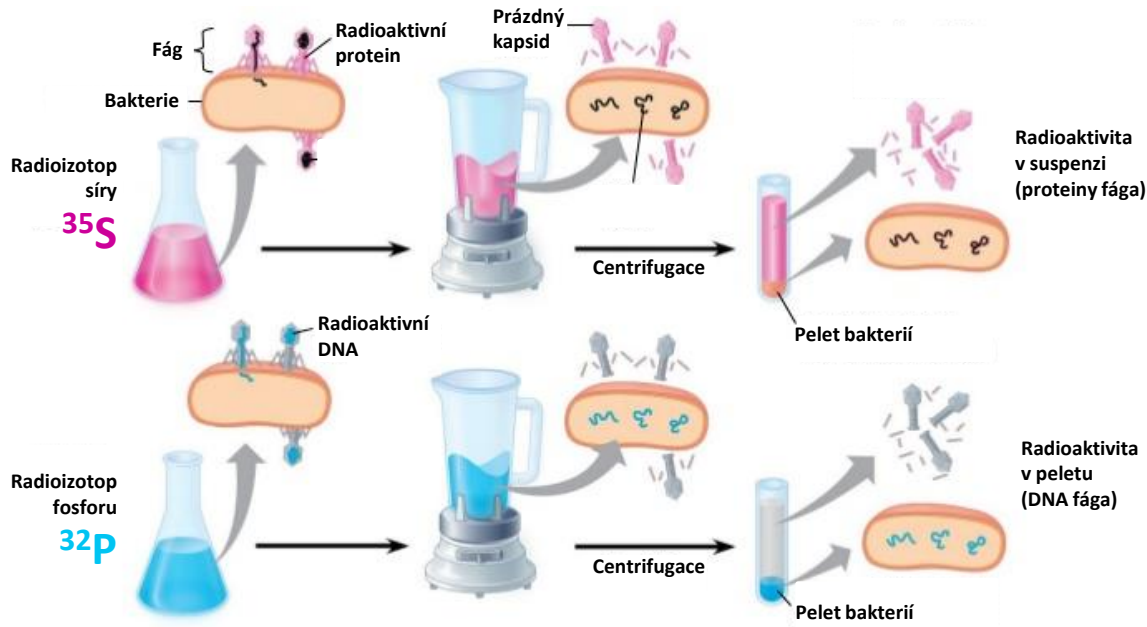
Pouze ošetření vzorku DNázou zabránilo transformaci - **transformační substancí je DNA**

Hershey, Chase - DNA je nositelkou genetické informace (1952)



Kapsidy fágů zůstávají na povrchu, genetický materiál jde do bakterie.

Využití pokroku: mikrobiologie E. coli, izolace fágů, radioizotopy.

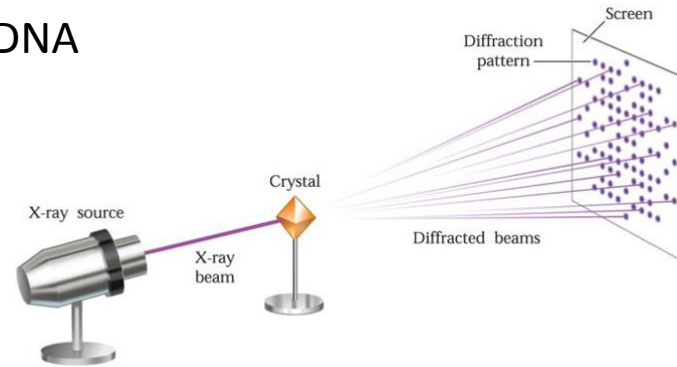
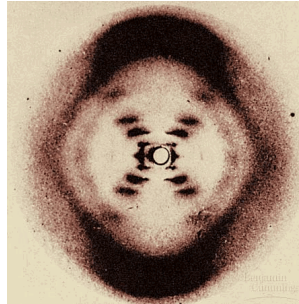


Během infekce zůstávají proteiny fága vně bakteriální buňky, zatímco DNA fága vstupuje do buněk.

Za přenos genetické informace (i u virů) je zodpovědná DNA.

Objasnění struktury DNA

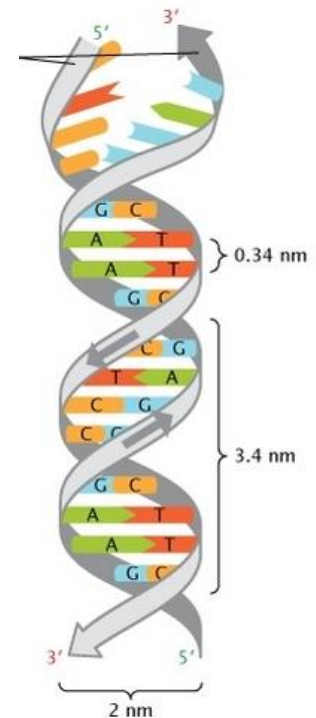
1952 - R. Franklin, rentgenová difrakční analýza DNA



1953 - J. D. Watson, F. Crick, trojrozměrný model struktury DNA

1962 - Nobelova cena, spolu s M. Wilkins

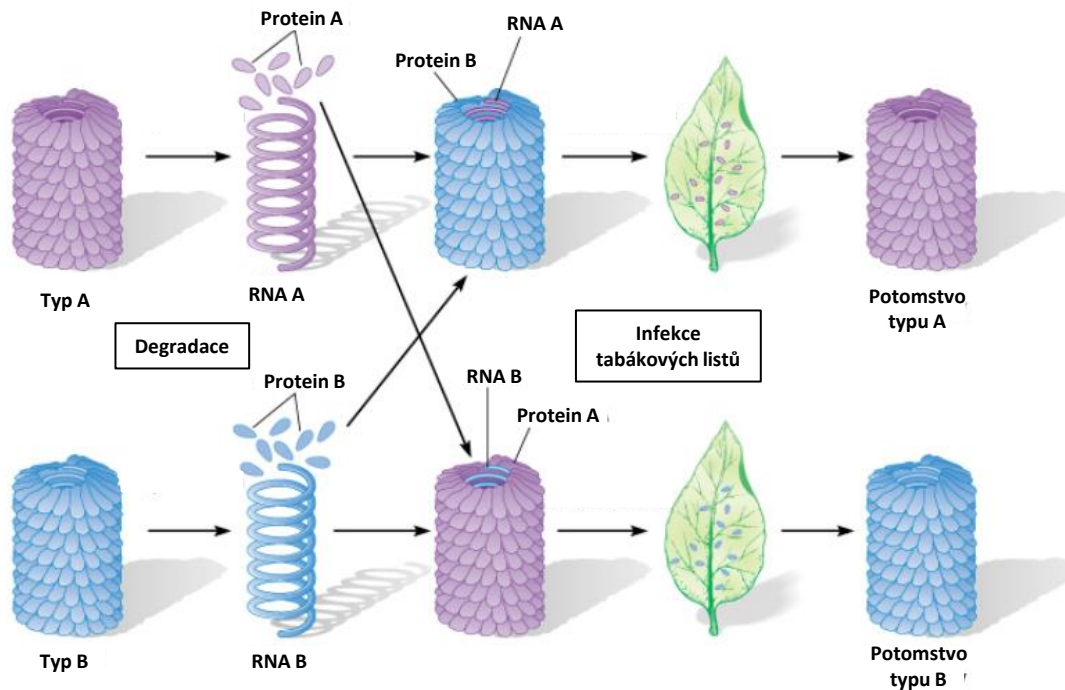
- DNA je double helix
- Báze vrstveny kolmo k ose
- Vzdálenost mezi bázemi (0,34 nm)
- Průměr šroubovice (2 nm)
- Počet bazí na 1 otočku (10 bp)



Fraenkel-Conrat, Singer - RNA jako nositelka genetické informace (1956)

TMV - virus tabákové mozaiky

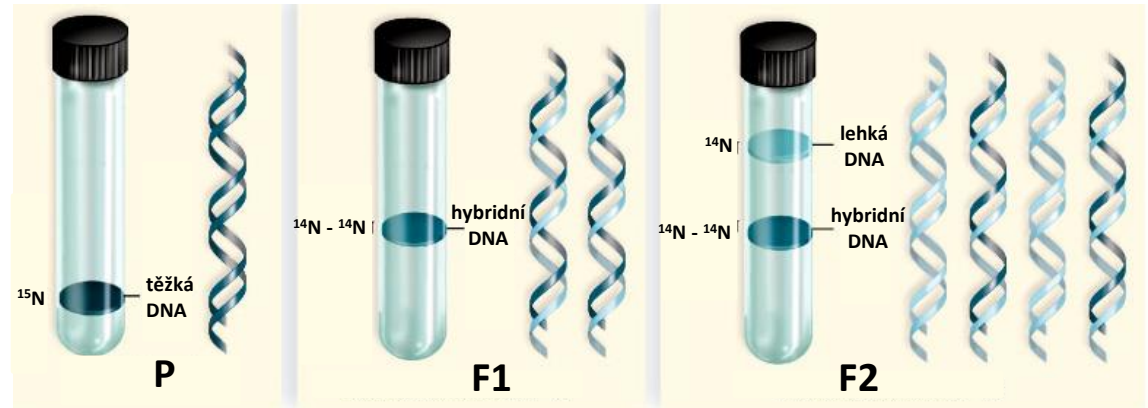
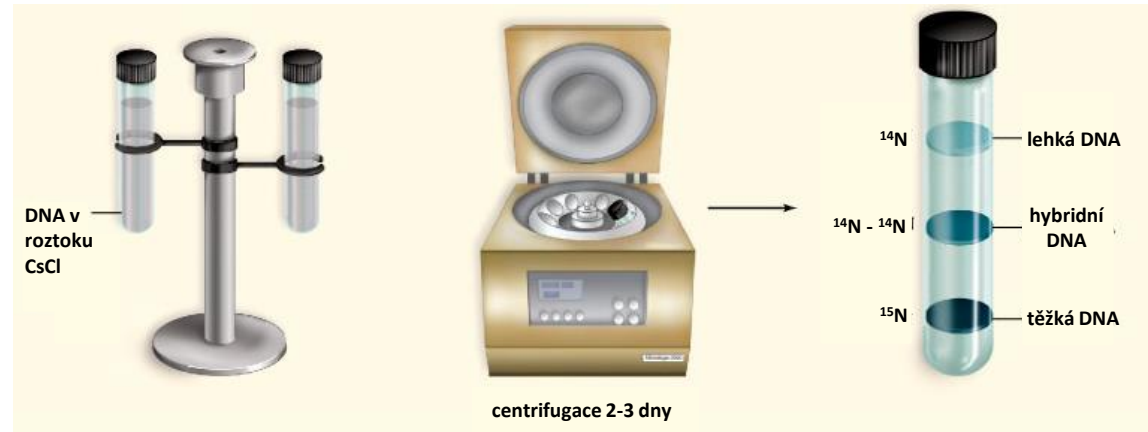
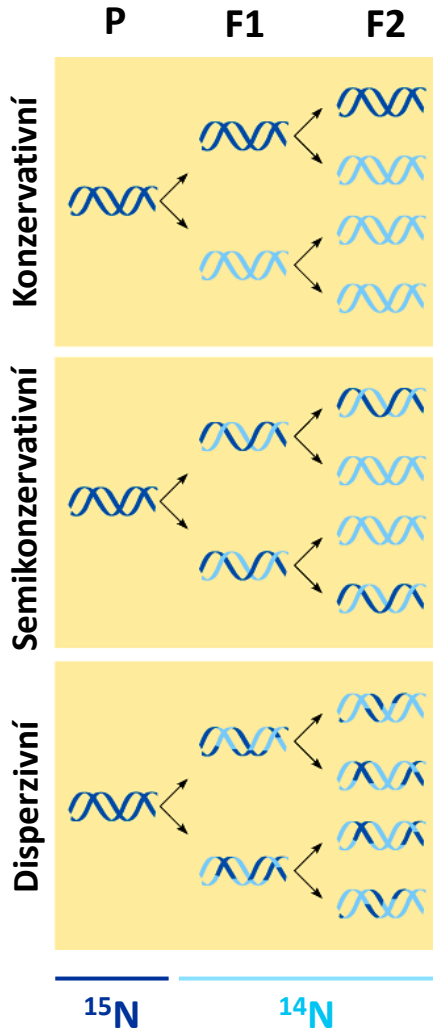
- molekula RNA obklopena kapsidem ze spirálovitě uspořádaných molekul proteinu



Virové potomstvo je shodné s typem, z kterého byla získána RNA, nevykazuje znaky typu, ze kterého byl získán protein.

RNA nese genetickou informaci u TMV.

Meselson, Stahl - Semikonzervativní replikace DNA (1958)

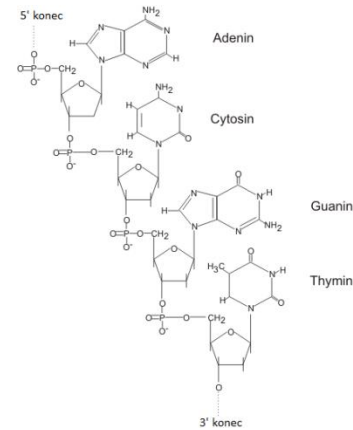


Potvrzen semikonzervativní způsob replikace DNA

Struktura nukleových kyselin

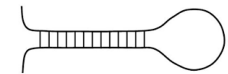
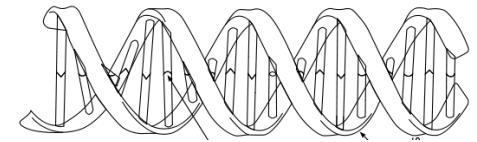
Primární struktura

- struktura nukleotidů a jejich vzájemné spojení
- pořadí, sekvence nukleotidů v řetězci



Sekundární struktura

- stabilní trojrozměrná konfigurace
- vzájemná poloha nukleotidů
- DNA - šroubovice dvou řetězců (Watson, Crick)
- RNA - šroubovice dvou úseků téhož řetězce (vlásenka)



Terciární struktura

- nadšroubovicové vinutí



Kvartérní struktura

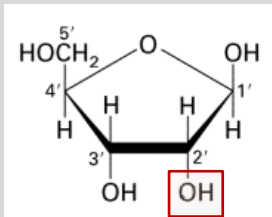
- uspořádání DNA do chromozomů
- struktura nukleozomu, chromatinu



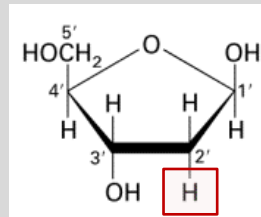
Primární struktura nukleových kyselin

Nukleové kyseliny jsou polymery, jejichž primární struktura představuje vlákno nukleotidů navzájem spojených fosfodiesterovou vazbou. Každý **nukleotid** se skládá z:

Pentóza

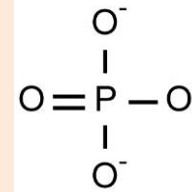


Ribóza (RNA)

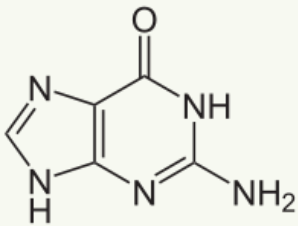


Deoxyribóza (DNA)

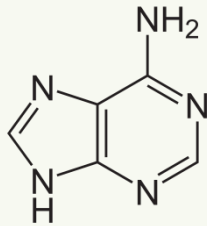
Fosfát



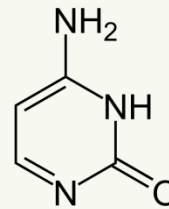
Dusíkatá báze DNA (A, G, C, T) RNA (A, G, C, U)



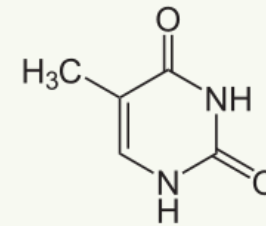
Guanin



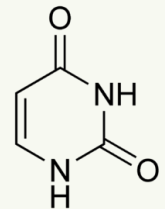
Adenin



Cytosin



Tymin



Uracil

Purinové

Pyrimidinové

Primární struktura nukleových kyselin

Ribonukleotidy v RNA

Nukleosid = cukr + báze

Volné nukleotidy ve formě trifosfátů

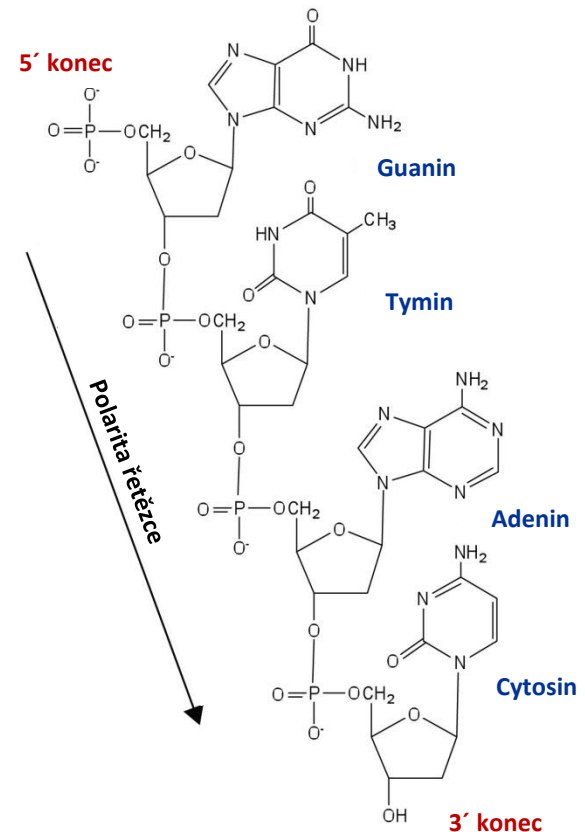
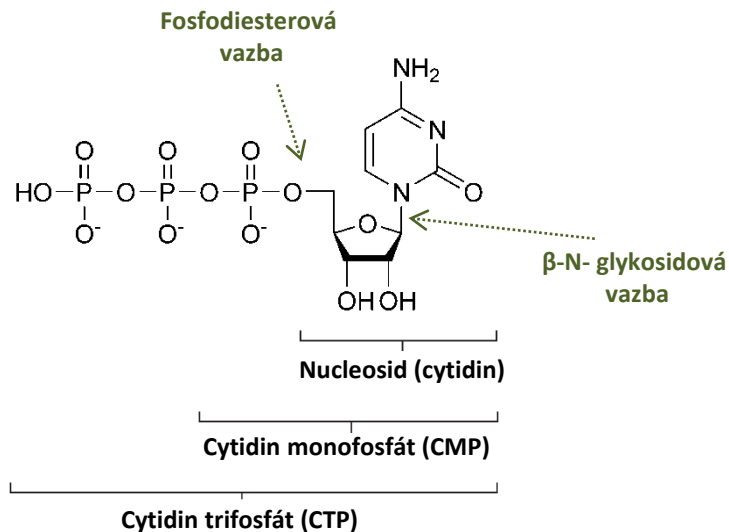
Deoxyribonukleotidy v DNA

Nukleotid = nukleosid + fosfát

Nukleotidy zabudované v NK ve formě monofosfátů

Polarita řetězce: 5' konec - fosfátová skupina na 5' uhlíku pentózy

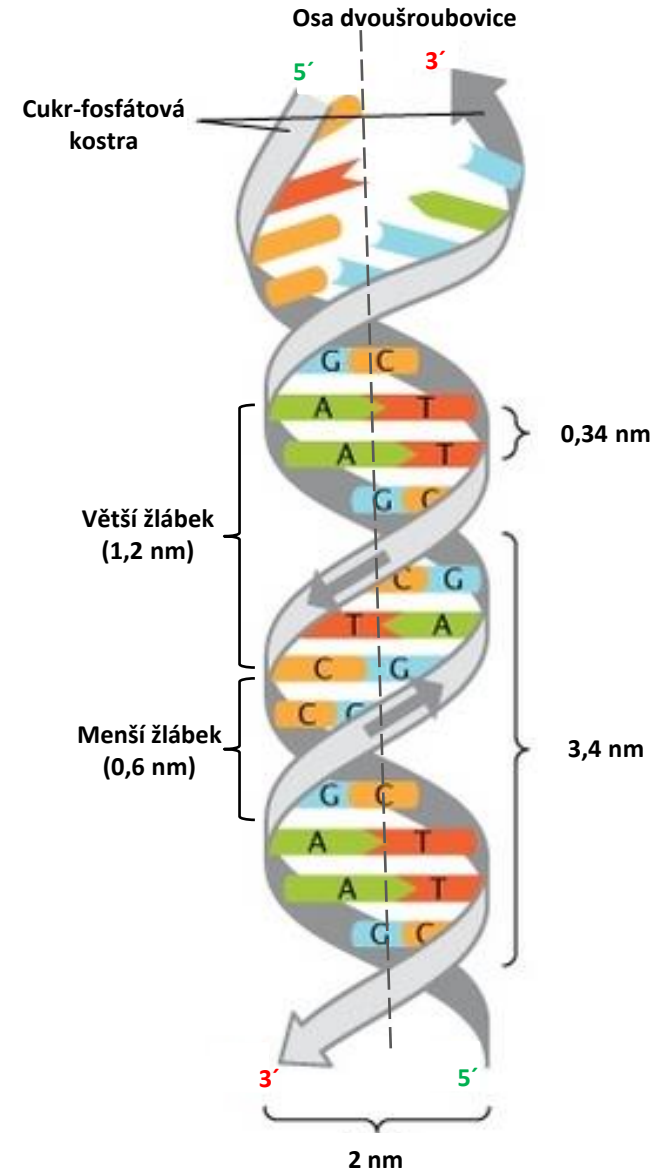
3' konec - OH skupina na 3' uhlíku pentózy



Sekundární struktura DNA

Sekundární struktura DNA představuje trojrozměrnou konfiguraci - základní šroubovicovou strukturu, pro kterou platí:

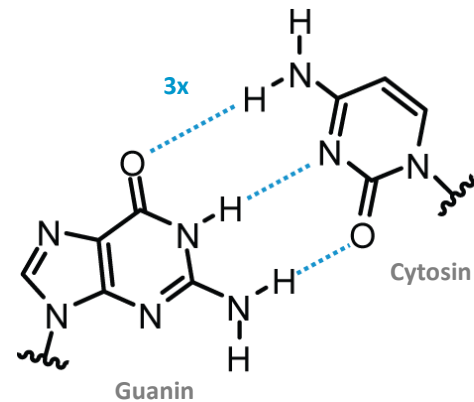
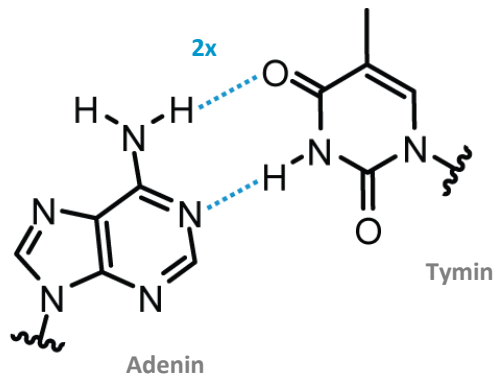
- (1) dvoušroubovice s cukr-fosfátovou kostrou vně šroubovice a bázemi poskládanými uvnitř molekuly
- (2) antiparalelní polynukleotidové řetězce s opačnou polaritou
- (3) komplementarita řetězců, párování bází (A-T, G-C), Chargaffovo pravidlo
- (4) průměr dvoušroubovice 2 nm
- (5) vzdálenost mezi páry bází 0,34 nm, na jednu otočku dvoušroubovice připadá 10 bp, což zabírá vzdálenost 3,4 nm
- (6) přítomnost většího a menšího žlábku
- (7) pravotočivé dvoušroubovicové vinutí
- (8) řetězce jsou vzájemně drženy pohromadě dvěma typy molekulárních interakcí - vodíkové vazby, vrstvení bází



Sekundární struktura DNA

Párování bází

- spojení dvou bází opačných řetězců prostřednictvím vodíkových vazeb
- umožňuje separaci řetězců DNA během různých procesů, šíření genetické informace
- **Watson-Crickovo**: specifita A-T, G-C (A-U v RNA)



Chargaffova pravidla

- v DNA je stejný počet adeninových a tyminových zbytků
- v DNA je stejný počet guaninových a cytosinových zbytků
- poměr purinů a pyrimidinů se rovná jedna
- $A = T$ $G = C$ $A + G = C + T$ $(A+G)/(C+T) = 1$

Transferová RNA

Primární struktura

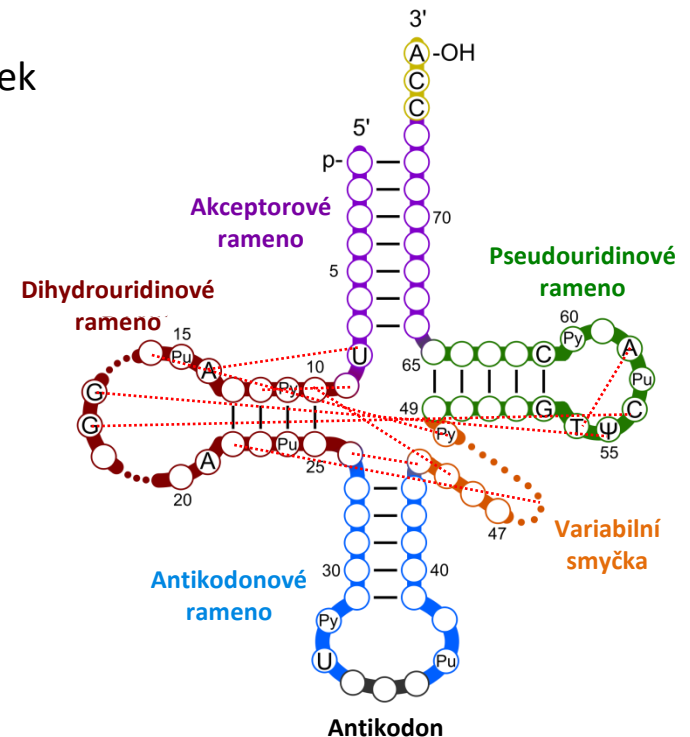
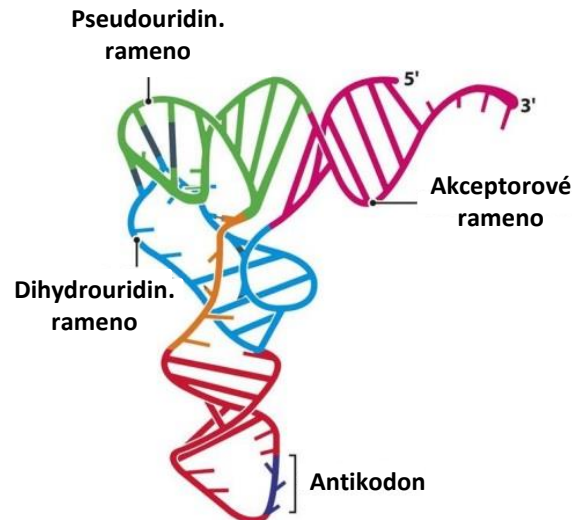
- 74 - 95 nuleotidů, 5'-CCA-3' sekvence na 3' konci
- neobvyklé báze - vznik posttranskripční modifikací, nenáhodné rozdělení v sekvenci
 - vliv na párování bazí, přesnost vazby aminokyselin a syntézy proteinů

Sekundární struktura

- tvar jetelového listu
- čtyři ramena, variabilní smyčka

Terciální struktura

- vodíkové vazby mezi nukleotidy různých ramen a jejich smyček



ψ	pseudouridin
I	inozin
i ⁶ A	N ⁶ -izopentenyladenozin
T	ribotymidin
S ⁴ U	4-thiouridin
m ¹ G	1-methylguanozin
DHU	dihydrouridin

Speciální struktury v DNA a RNA

Nukleotidové sekvence

- jedinečné - v molekule se vyskytují pouze jedenkrát
- repetitivní - v molekule se mnohonásobně opakují

Repetice

- jednotka repetice - opakovaná sekvence
- délka repetice - počet nukleotidů, které ji tvoří
- četnost repetice - počet jednotek dané repetice v haploidním genomu (molekule)

1. **Přímá:** sekvence opakovaná ve stejném směru na témže řetězci DNA

5'ATGC.....ATGC.....3'

2. **Tandemová:** přímá repetice, u které se jednotka opakuje bezprostředně za sebou

5'GATA/GATA/GATA/GATA.....3'

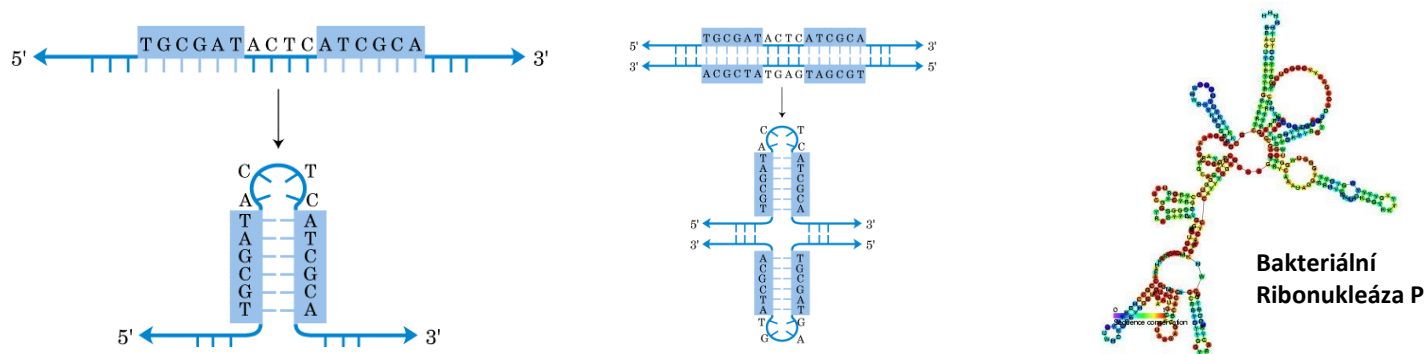
3. **Obrácená:** sekvence opakovaná na stejném nukleotidovém řetězci ve své komplementární podobě jako **palindrom** se označují přilehlé obrácené repetice

5'ATGC.....GCAT.....3'

5'ATGC/GCAT.....3'

Speciální struktury v DNA a RNA

3. **Obrácená:** spárováním na ssDNA mohou tvořit **vlásenku**, vlásenku se smyčkou spárováním na dsDNA mohou tvořit **křížovou strukturu**, křížovou strukturu se smyčkou



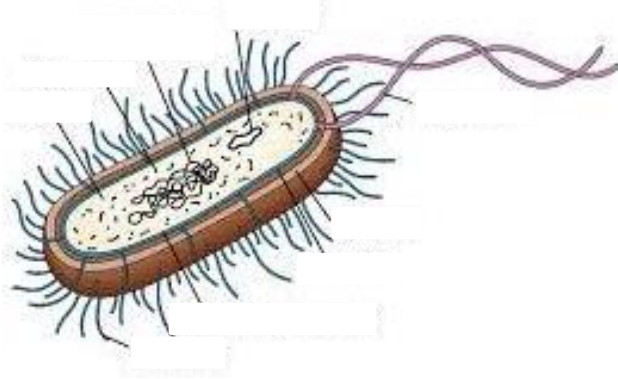
4. **Dlouhá koncová repetice:** LTR sekvence, dlouhá přímá repetice na obou koncích téhož DNA řetězce konce LTR sekvence jsou navzájem ve vztahu obrácených repeticí



5. **Rozptýlená:** jednotlivé kopie se vyskytují na různých místech haploidního genomu

Terciální struktura DNA

Escherichia coli



DNA - 4,7 miliónů bp
- délka 1,6 mm
velikost buňky 3 μm

Lidská buňka



DNA - 6 miliard bp
- délka 1,8 m
velikost jádra 6 μm

Chromozomální DNA existuje ve formě dlouhých molekul, které se musí vejít do mnohem menších buněk.

Terciální struktura DNA - organizace DNA vyššího řádu, která umožňuje umístit ji do omezeného prostoru buňky.

Terciální struktura DNA

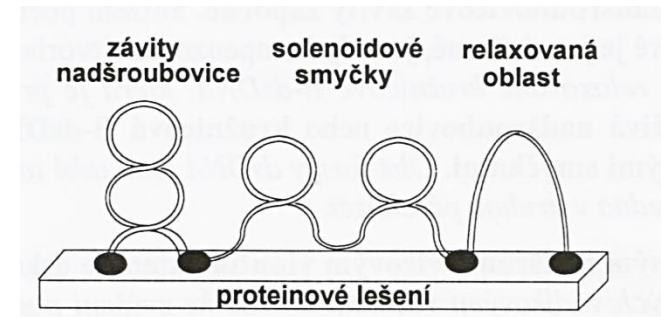
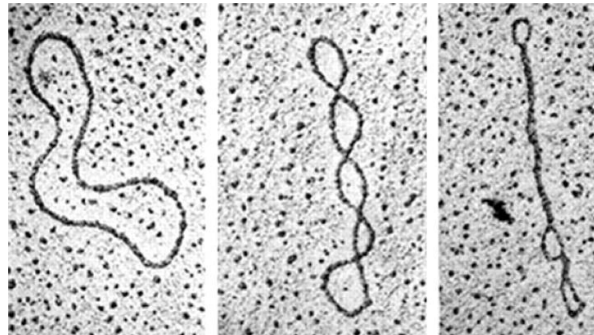
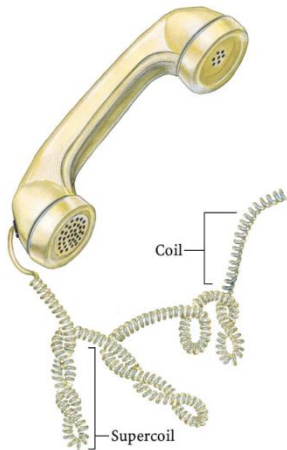
Nadšroubovice (superhelix)

Vzniká, když je do dvoušroubovice DNA zavedeno další vinutí

1. relaxovaná DNA - dvoušroubovice bez nadšroubovicového vinutí, stav s nejnižší energií
2. záporná nadšroubovice - vznik odvíjením řetězců, pravotočivá nadšroubovice
3. kladná nadšroubovice - vznik svinováním řetězců, levotočivá nadšroubovice

Předpoklad pevných konců

- kružnicová dsDNA
- lineární dsDNA připevněná k substrátu



Terciální struktura DNA

Topoizomerázy

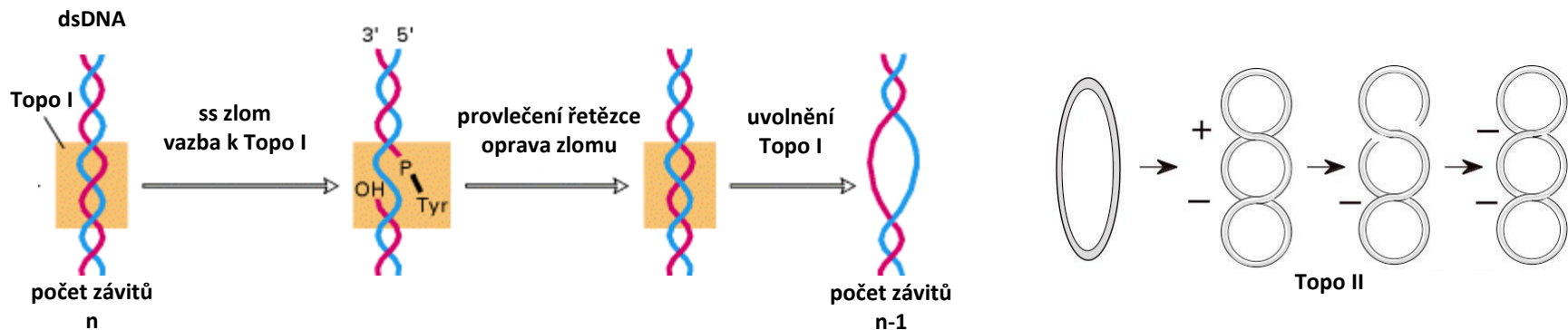
Přidávají či odstraňují závitů v dsDNA dočasným zlomem řetězců, obtočením konců kolem sebe a následným spojením zlomených konců.

Typ I

- jednořetězcové zlomy, přemísťují řetězec přes zlom v druhém řetězci v rámci dvoušroubovice

Typ II

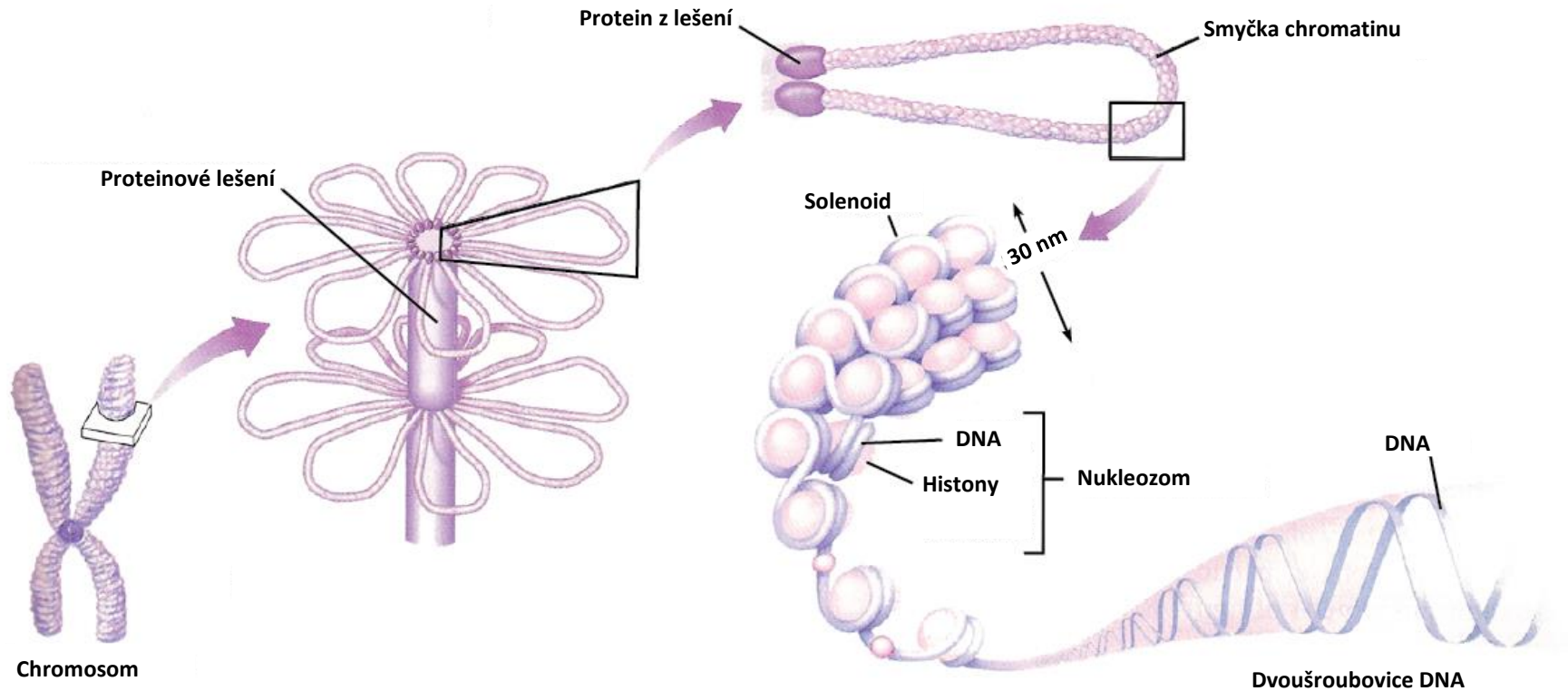
- dvouřetězcové zlomy, přemísťují dsDNA přes zlomy obou řetězců v dsDNA



Většina DNA v buňce ve formě **záporné nadšroubovice**

- snazší separace řetězců během replikace a transkripce
- sbalení do menšího prostoru v buňce

Kvartérní struktura DNA



Viz přednáška č. 2

Primární struktura proteinů

Pořadí standartních aminokyselin v polypeptidovém řetězci

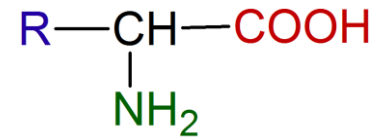
Aminokyseliny (AK)

- uhlík α , na který se váže vodík

karboxylová skupina

aminoskupina

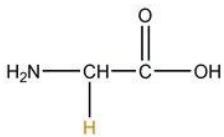
postranní řetězec



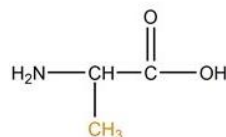
1. AK s nepolárním zbytkem - hydrofobní

glycin (Gly, G), alanin (Ala, A), valin (Val, V), leucin (Leu, L), izoleucin (Ile, I), fenylalanin (Phe, F), tryptofan (Trp, W), metionin (Met, M), prolin (Pro, P)

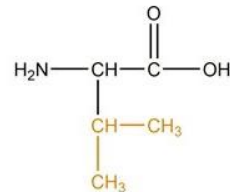
Gly



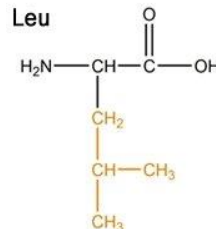
Ala



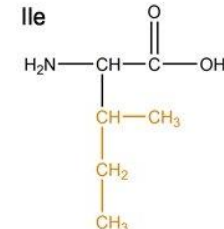
Val



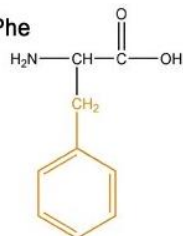
Leu



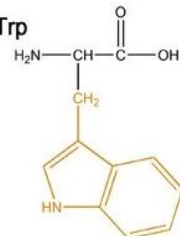
Ile



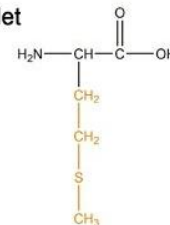
Phe



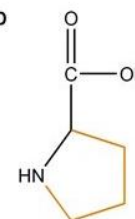
Trp



Met



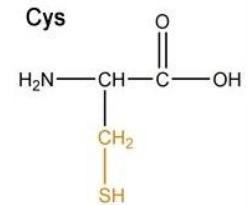
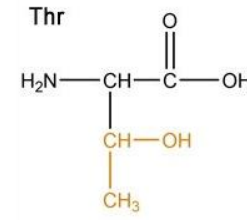
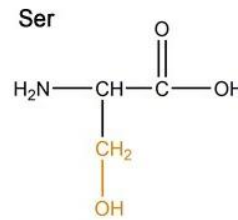
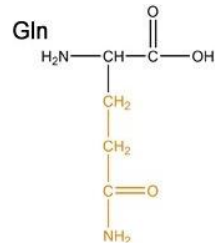
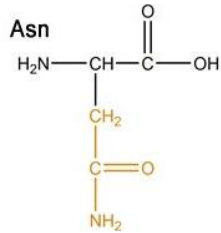
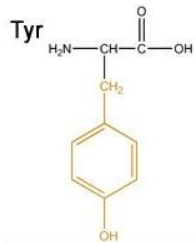
Pro



Primární struktura proteinů

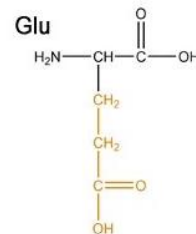
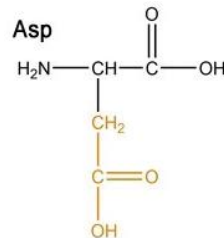
2. AK s polárním zbytkem - hydrofilní, vodíkové vazby s molekulami vody

tyrozin (Tyr, Y), asparagin (Asn, N), glutamin (Gln, Q), serin (Ser, S), treonin (Thr, T), cystein (Cys, C)



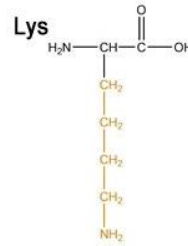
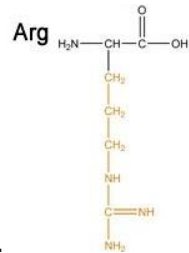
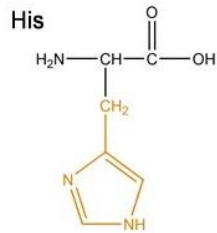
3. AK s kyselým zbytkem - karboxylová skupina

kyselina asparagová (Asp, D), kyselina glutamová (Glu, E)

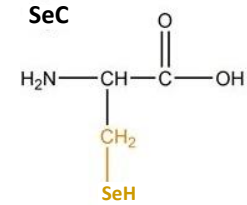


Primární struktura proteinů

4. AK se zásaditým zbytkem - kladný náboj postranního řetězce
histidin (His, H), arginin (Arg, R), lyzin (Lys, K)

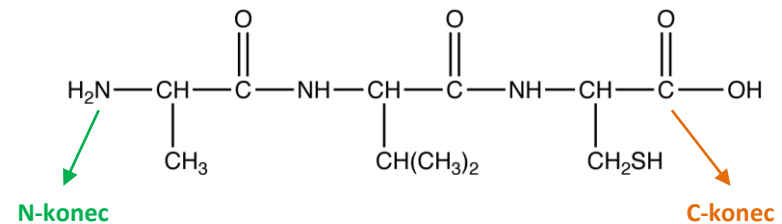
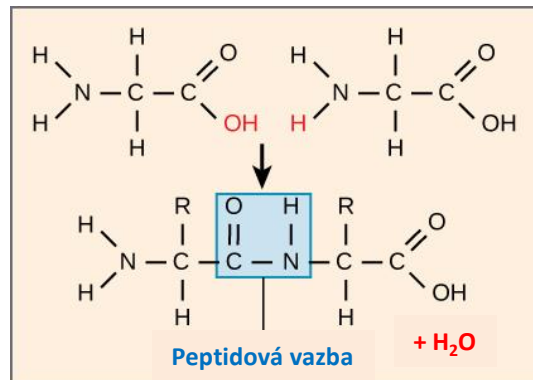


5. selenocystein



Vznik primární struktury proteinů

- tvorba **peptidové vazby** mezi $-NH_2$ skupinou na uhlíku α jedné aminokyseliny a $-COOH$ skupinou na uhlíku α jiné aminokyseliny s vyloučením vody

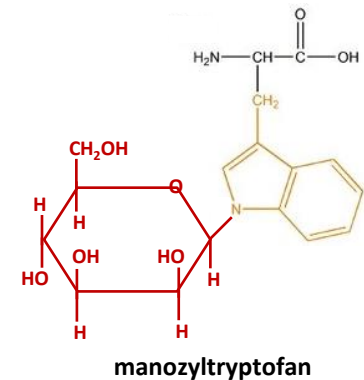
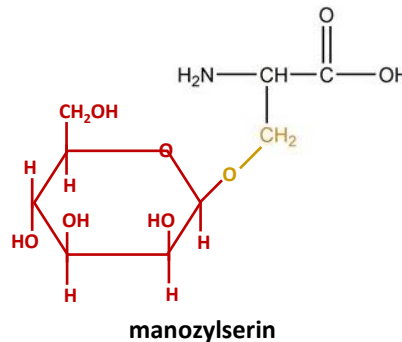
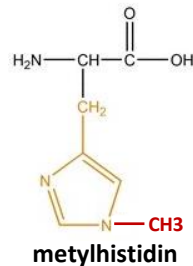
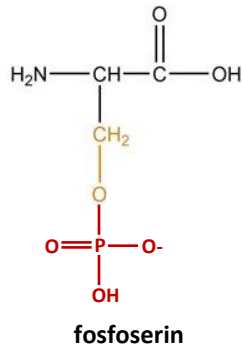
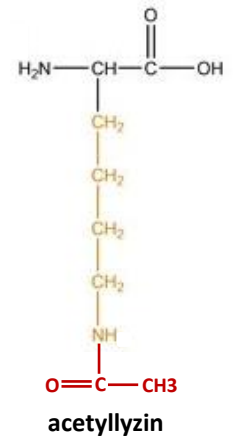
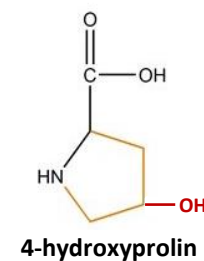


Ala-Val-Cys

Primární struktura proteinů

Chemické modifikace standardních AK

- fosforylace** - připojení fosfátu k -OH skupině Ser, Tyr, Thr
- fosfoproteiny, negativní náboj
- acetylace** - připojení acetylové skupiny k -NH₂ skupině Lys
- metylace** - připojení metylové skupiny k Lys, His
- glykozylace** - připojení oligosacharidu nebo polysacharidu, glykoproteiny
- N-glykozidová vazba sacharidu k -NH₂ skupině Asn, Gln, Trp
- O-glykozidová vazba sacharidu k -OH skupině Ser, Thr
- hydroxylace** - připojení hydroxylové skupiny k Pro, Lys

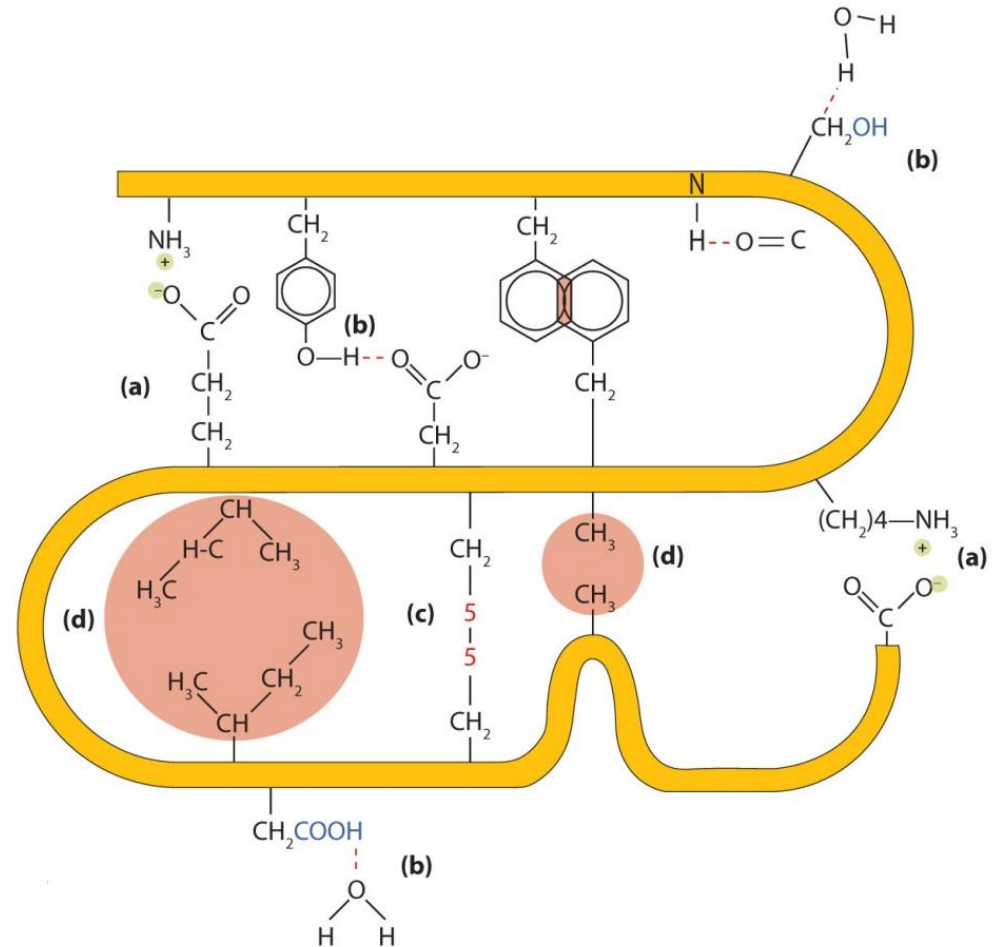


Primární struktura proteinů obsahuje veškerou informaci pro tvorbu vyšších struktur polypeptidu a vyjádření jeho biologické funkce.

Sekundární struktura proteinů

Nekovalentní vazby proteinů

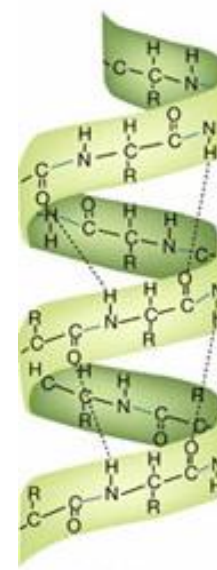
- tvoří se mezi atomy či skupinami atomů v rámci jednoho polypeptidového řetězce či mezi řetězci
- **Disulfidová vazba** - tvoří se mezi -SH skupinami cysteinu uvnitř jedné molekuly proteinu
- Tyto interakce spolu s rozložením polárních a nepolárních AK v polypeptidovém řetězci ovlivňují celkový tvar a konformaci proteinu. Proces tvorby sekundární a terciální struktury proteinu se nazývá **sbalování proteinu**, ke kterému dochází během syntézy proteinu na ribozomu.



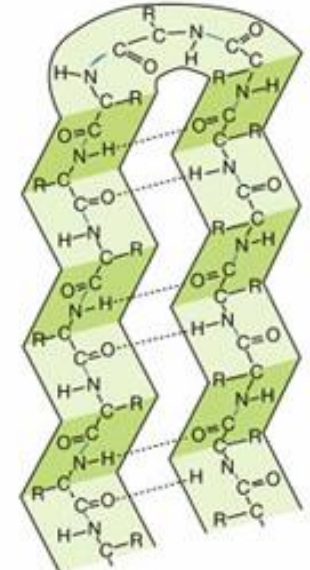
Sekundární struktura proteinů

α -šroubovice (α -helix)

- stočený polypeptidový řetězec stabilizovaný vodíkovými vazbami mezi -CO a -NH skupinami dvou peptidových vazeb
- jeden závit - 0,54 nm; 2 vodíkové vazby; 3,6 AK
- průměr - 1 nm
- délka kolem 10 AK



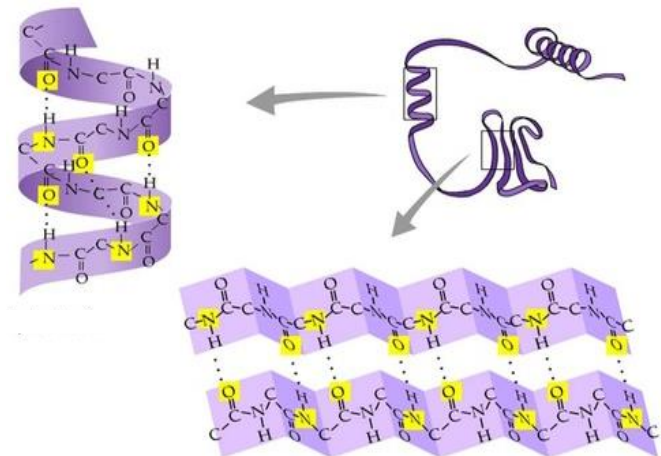
α -šroubovice



β -skládaný list

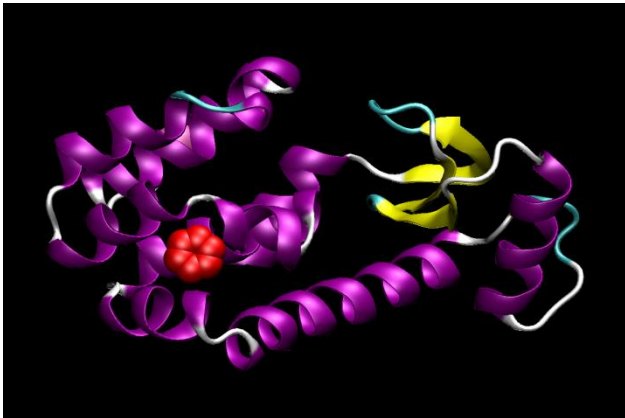
β -skládaný list

- úseky o 5-10 AK položeny vedle sebe a spojeny vodíkovými vazbami mezi -CO a -NH skupinami dvou peptidových vazeb odlišných úseků
- úseky mohou být orientovány
 - paralelně: směr od C-konce k N-konci poskládaných úseků je stejný
 - antiparalelně: směr od C-konce k N-konci úseků je opačný

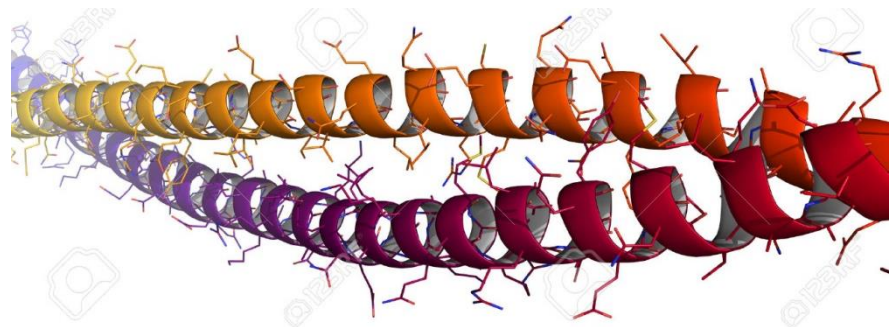


Terciální struktura proteinů

- prostorové trojrozměrné uspořádání polypeptidového řetězce
- vliv nekovalentních vazeb mezi AK a disulfidických můstků
- podle ní se proteiny dělí na
 - **globulární**: střídání úseků α -šroubovic a β -skládaných listů
kompaktní klubko kulovitého tvaru
 - **fibrilární**: převažují úseky α -šroubovic nebo β -skládaných listů
vláknitý tvar



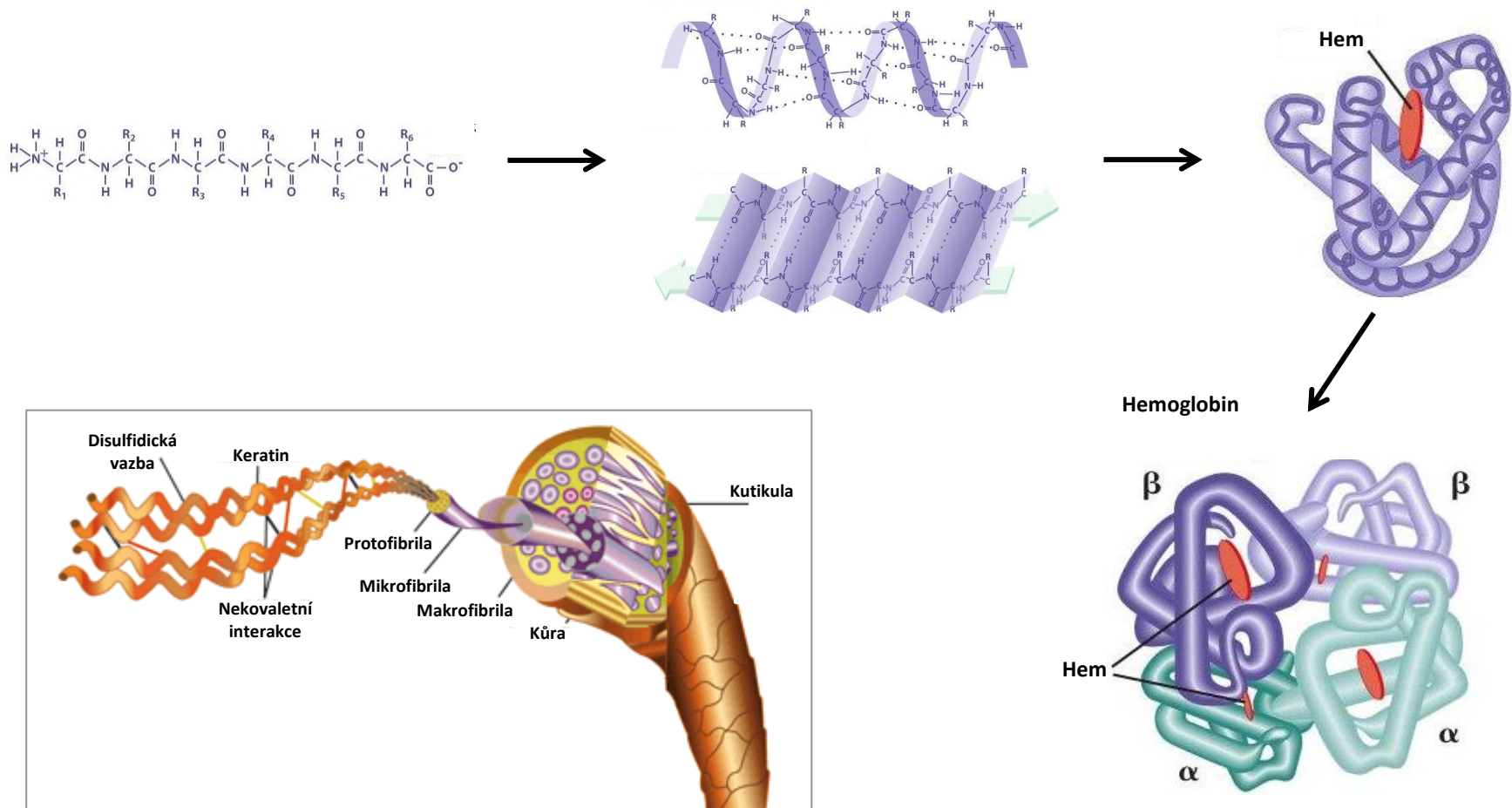
Lysozym



Keratin

Kvartérní struktura proteinů

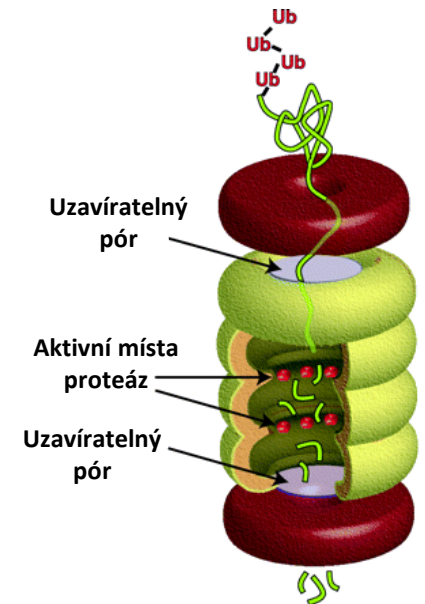
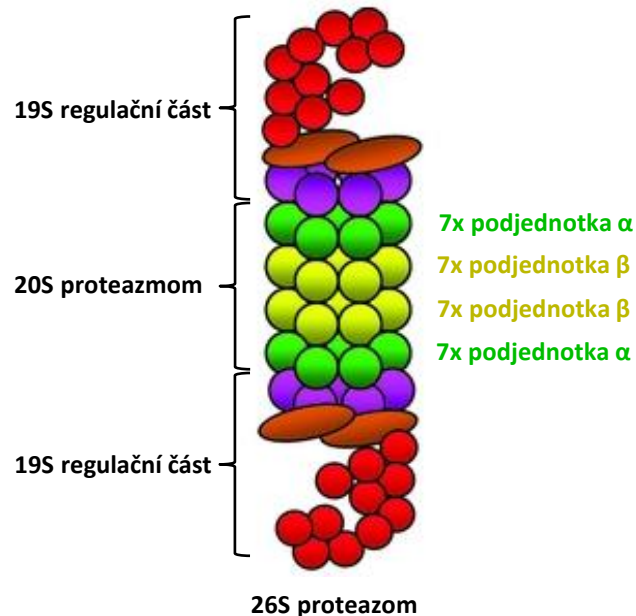
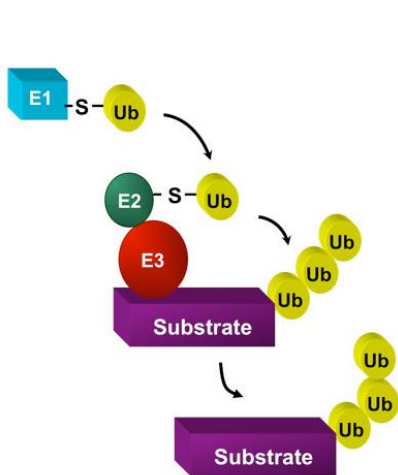
- uspořádání jednotlivých polypeptidových řetězců v molekule proteinu
- týká se oligomerních proteinů
- podjednotky (monomery) složeny v dimery, trimery, tetramery,...



Degradace proteinů

Proteazom

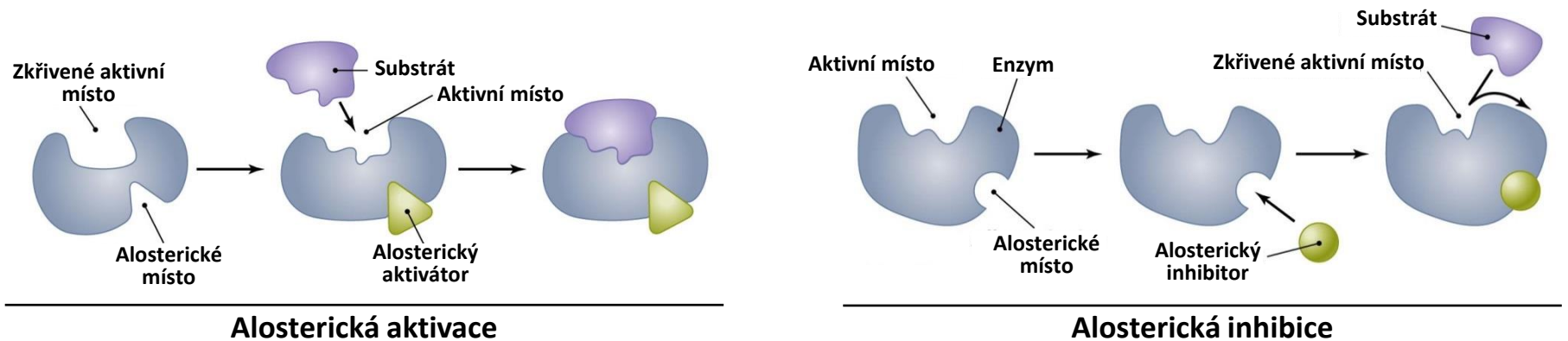
- odstraňuje nežádoucí proteiny - nedokončená či poškozená proteinová struktura, špatně sbalený polypeptidový řetězec, nadbytečný protein měnící svoji koncentraci vlivem stavu buňky
- proteiny určené k degradaci jsou označeny ubikvitinem (Ub) pomocí ubikvitin ligáz (E1-E3)
- **centrální část** (20S proteazom) - pár ze čtyř kruhů (α a β monomery), uvnitř umístěny proteázy
- **regulační část** - rozpoznání polyubikvitinovaných proteinů, které směřuje do centrálního póru



Biologické funkce proteinů

Enzymy

- **substrátem** se rozumí látka, která se vlivem enzymu mění
- **aktivní místo** - oblasti zodpovědné za vazbu substrátu a katalýzu chemické reakce
- alosterické enzymy mají navíc **alosterické místo**, do kterého se váže alosterický efektor. Ten svoji vazbou vyvolá změnu konformace aktivního místa a tím i změnu aktivity enzymu (inhibice/aktivace)



Další funkce proteinů: struktura buňky, transport látek přes buněčné membrány, pohybové mechanismy buněčných struktur, regulace růstu a diferenciace buněk, přenos specifických signálů v rámci buněčné komunikace, receptory v membráně buňky, protilátky v imunitní obraně.

Základem funkce proteinů je **schopnost rozpoznávání** = proces specifického spojení dvou biologických makromolekul nebo biologické makromolekuly s malou molekulou, které spočívá v nekovalentních interakcích (především vodíkových vazbách).

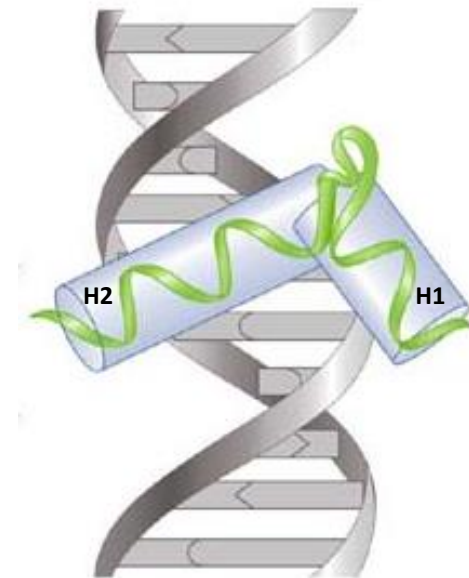
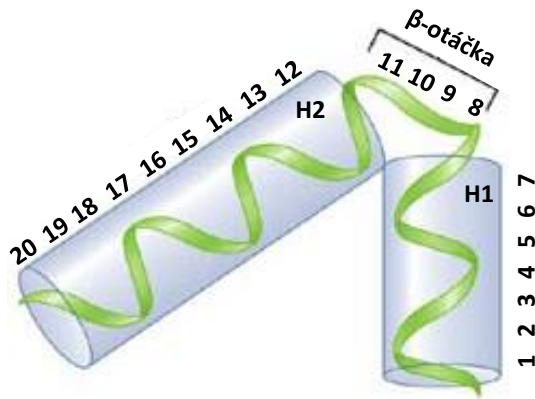
Vazebné interakce proteiny-DNA

Molekulární podstata rozpoznání DNA proteiny

- nejčastěji se využívá **vazba α -helixu s větším žlábkem na DNA** (přístupnější, více vazebných míst)
- okolní oblasti napomáhají umístění α -helixu do žlábků
- bez korespondence specifických sekvencí proteinu a DNA
- skupiny proteinů se společným **motivem** (krátký úsek proteinu s typickou strukturou), pomocí kterého se váží na DNA

Proteiny s motivem helix-otáčka-helix (HTH-jednotka)

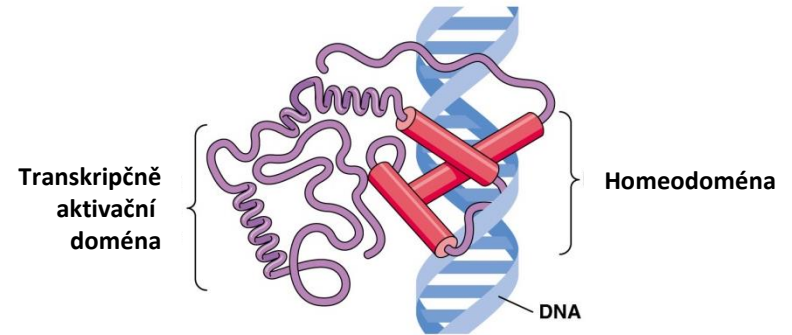
- dva α -helixy (7 a 9 AK) mezi kterými je jedna beta otáčka (4 AK)
- H2 je rozpoznávací, H1 má upevňovací funkci



Vazebné interakce proteiny-DNA

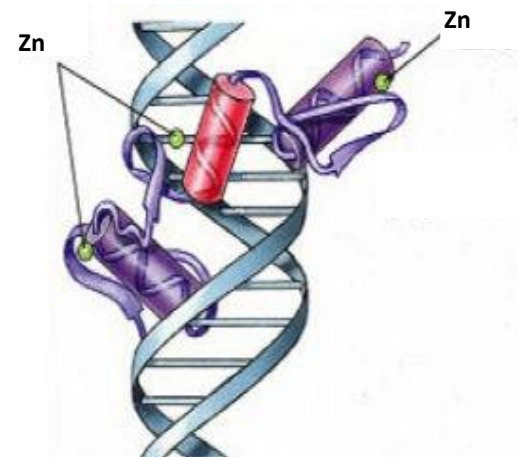
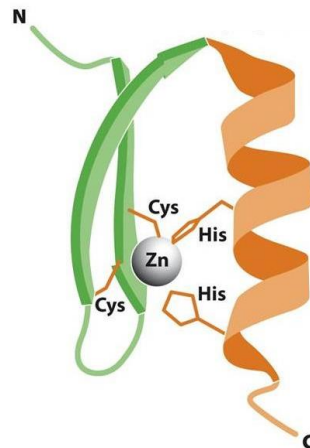
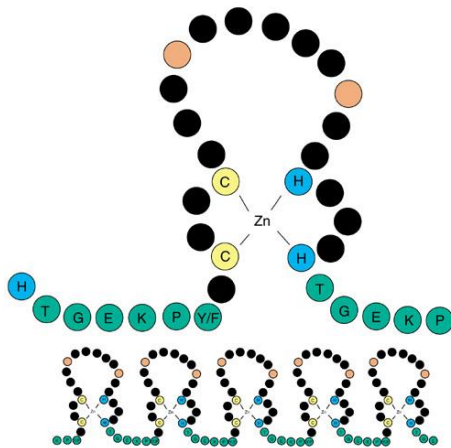
Proteiny s motivem homeodomén

- HTH-jednotka s upevňovací funkcí
- 3. helix umístěný ve větším žlábkku DNA



Proteiny s motivem zinkových prstů

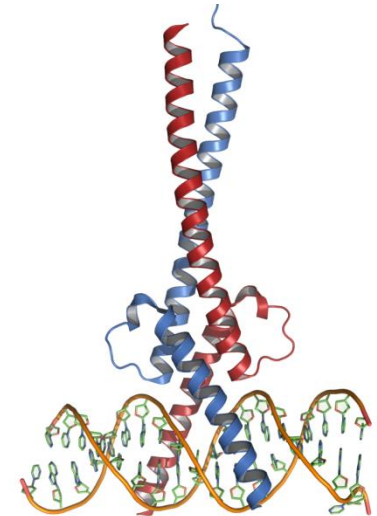
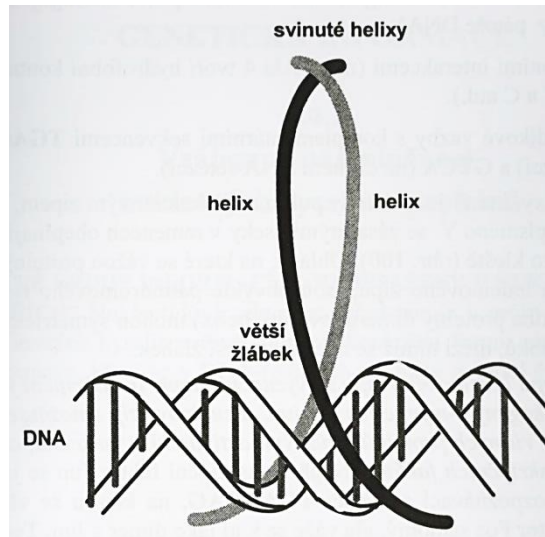
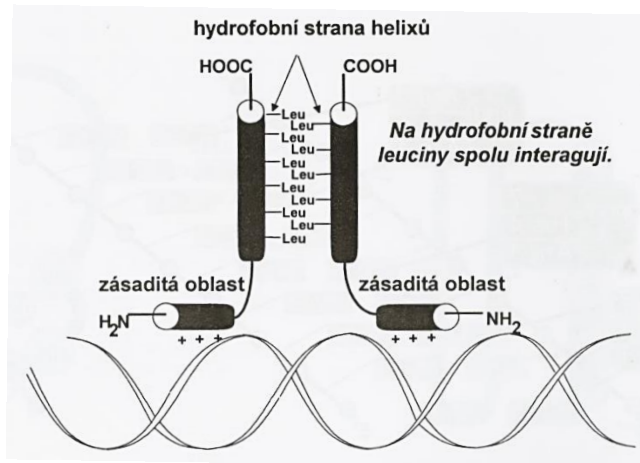
- 3-9 tandemových repetitivních o 29-31 AA
- sekvence držena ve tvaru smyčky **iontem zinku**, na který se váží 2x Cys a 2x His
- každý prst obsahuje **antiparalelní β -skládání list a α -helix**, který se váže ve větším žlábkku DNA



Vazebné interakce proteiny-DNA

Proteiny s motivem leucinového zipu

- dva α -helixy (30 ÅK) s pravidelným opakováním Leu
- dva zásadité helixy vážící se na DNA
- výskyt u transkripčních faktorů, kdy dimerizace umožňuje tvorbu homo a heterodimerů různých transkripčních faktorů



Zvídavé otázky

- Jaká je největší vzdálenost fosfodiesterové kostry DNA od osy dvoušroubovice?
- Dopište k zadanému vlákně komplementární vlákno, aby se obnovila dvoušroubovice.

5' **CATTGAGT** 3'

- Procentuální zastoupení cytozinu v molekule dvoušroubovicové DNA je 40 %. Jaké je v této molekule procentuální zastoupení thyminu?
- Které z těchto vztahů platí pro procentuální zastoupení bází v dvoušroubovicové DNA:
(a) $C + T = A + G$ (b) $C/A = T/G$
- Jak se liší nukleotid RNA od nukleotidu DNA?
- Jaké purinové a pyrimidinové báze lze najít ve struktuře RNA, DNA?
- Které DNA báze jsou schopné mezi sebou tvořit vodíkové vazby (dle základního Watson-Crickova párování bází)?
- Uveďte libovolnou sekvenci jednovláknové DNA, která by mohla vytvořit vlivem párování bází vlásenku se smyčkou.
- Které aspekty ve struktuře dvoušroubovicové DNA přispívají k stabilitě její molekuly?

