

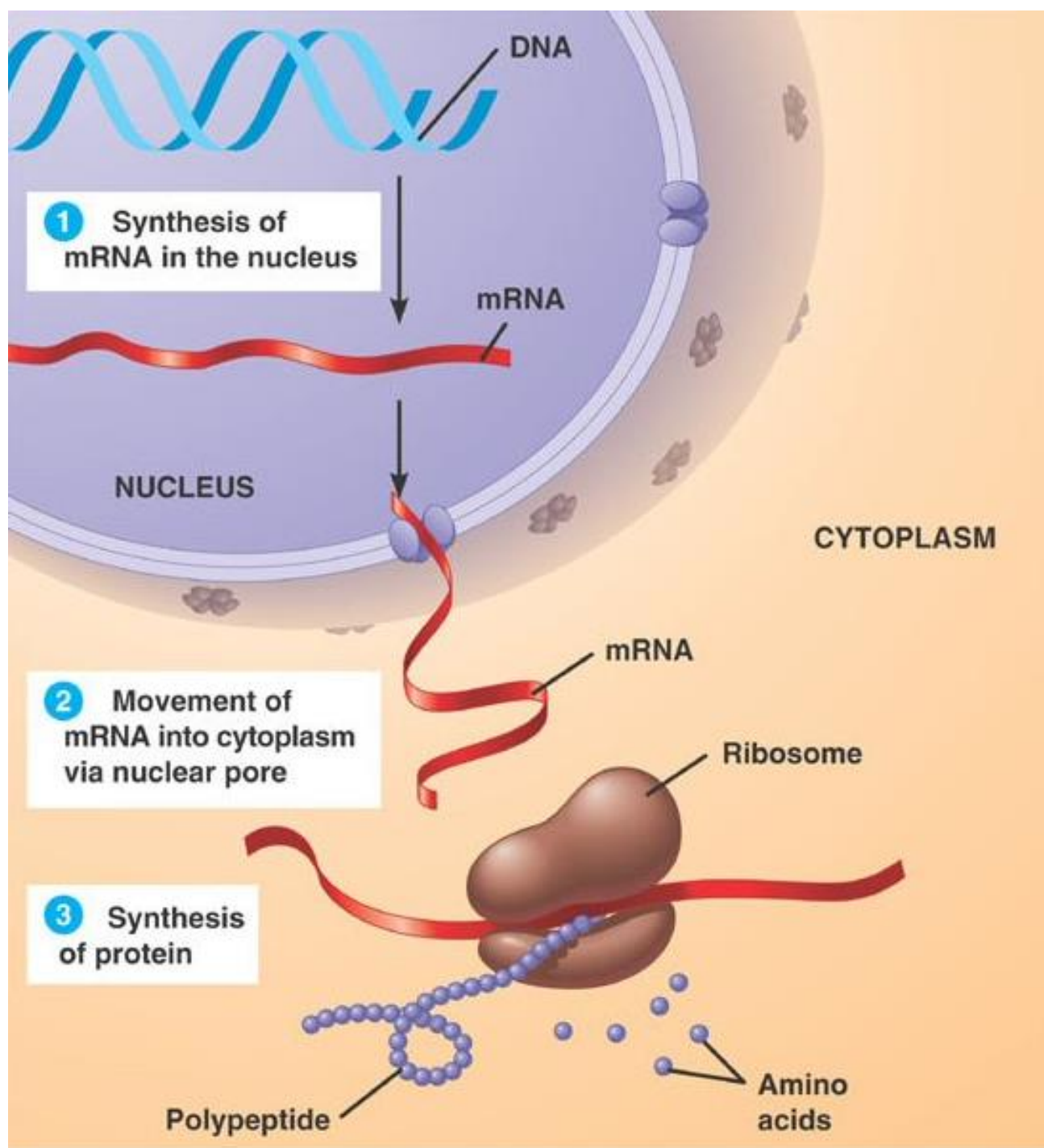
# Exprese genů a replikace DNA

## seminář

Kateřina Vopěnková

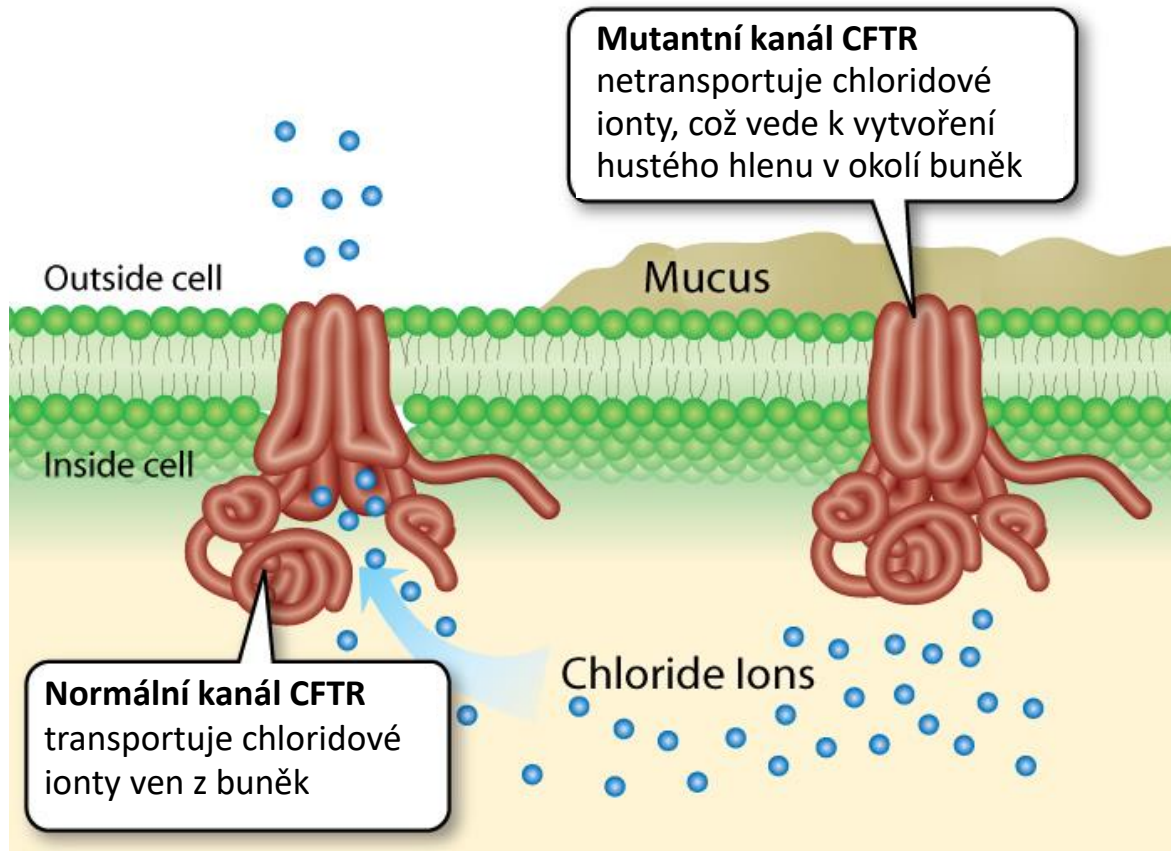
[vopenkova@med.muni.cz](mailto:vopenkova@med.muni.cz)

**Expresa genů**



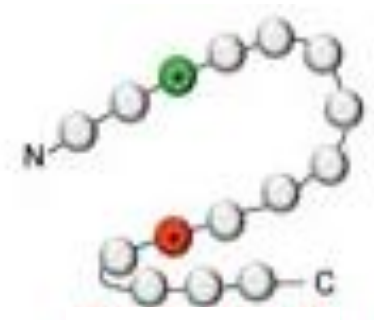
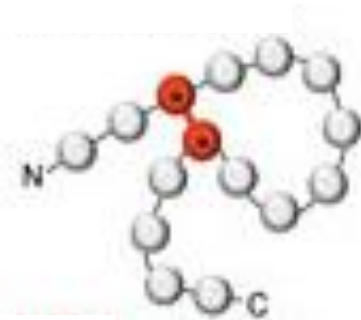
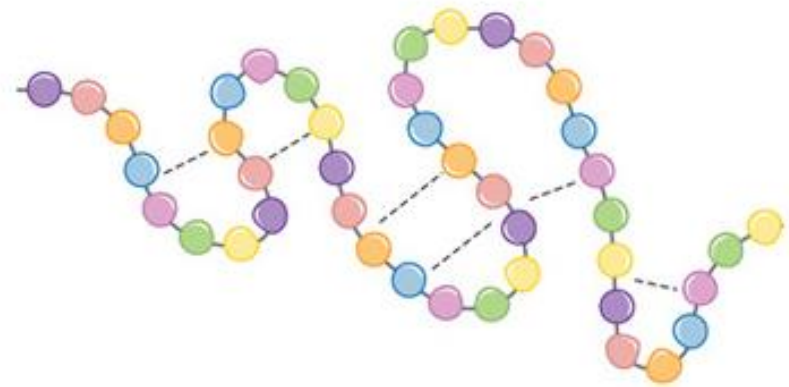
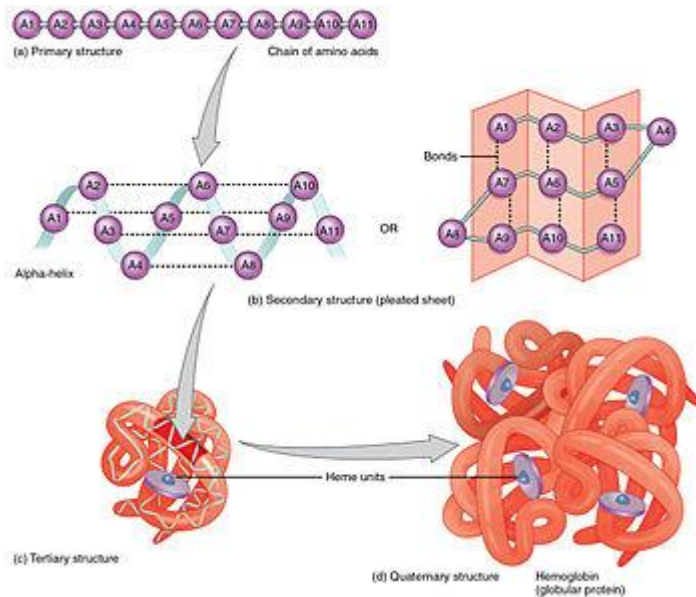
# Co dává proteinu jeho funkci?

- prostorové uspořádání jeho molekuly – **tvar**,  
a fyzikální a chemické **interakce**, kterých je schopný



# Co dává proteinu jeho tvar a schopnost jeho interakcí?

- **sekvence aminokyselin** daného proteinu



správně složená  
sekvence aminokyselin

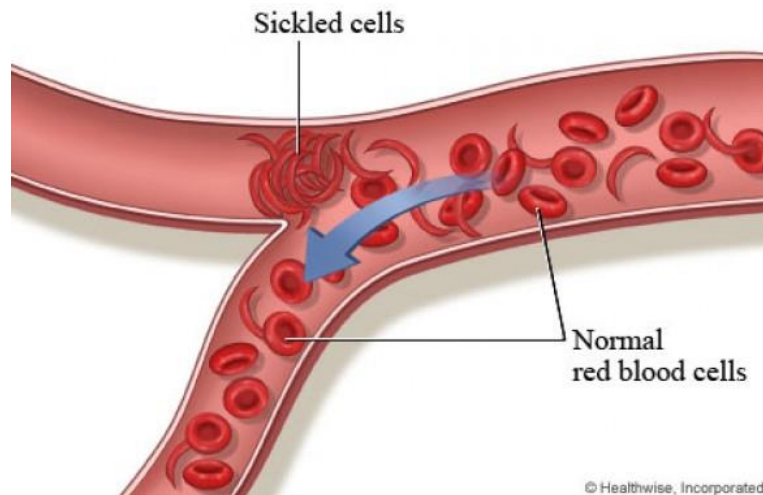
nesprávně složený peptid  
v důsledku zařazení  
nesprávné aminokyseliny

Mutace

# Způsobí substituční mutace (náhrada nukleotidu jiným) onemocnění?

Mutace pouze zaměřující jednu aminokyselinu mohou a nemusí mít vliv na funkci proteinu, záleží:

jak moc se změní výsledné uspořádání a **tvar** proteinu, v případě enzymu také jeho **vazebná místa**



Záměna 1 nukleotidu v genu pro hemoglobin způsobí záměnu 1 aminokyseliny, což změní strukturu i chování výsledného hemoglobinu a způsobí srpkovitou anémii

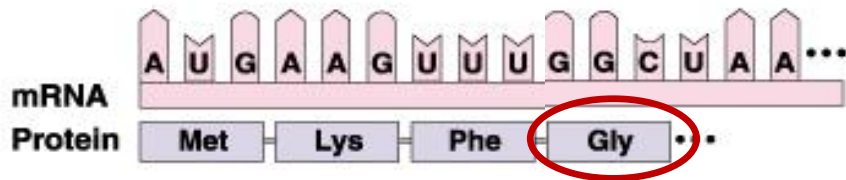


Záměna neovlivňující tvar a vazebné vlastnosti proteinu – zdravý fenotyp

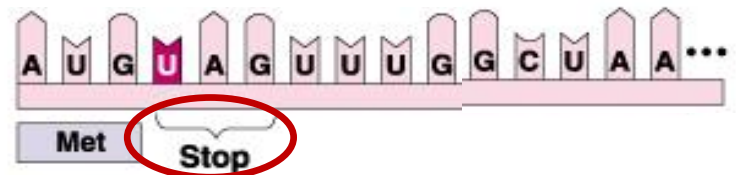
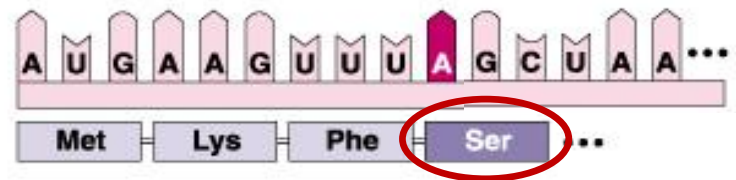
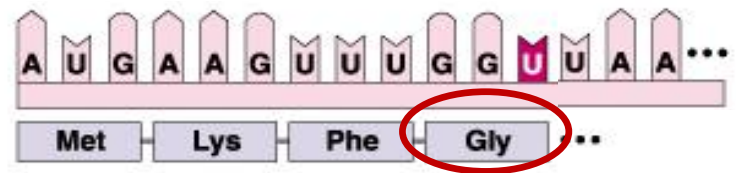
# Substituční mutace

- nukleotid v DNA je nahrazen jiným

původní sekvence genu



substituce jednoho nukleotidu





Mutace způsobující vyštěpení (deleci) nukleotidu z genu, nebo vložení (inzerci) nového nukleotidu:

- A. způsobují posun čtecího rámce (zařazení jiných aminokyselin do výsledného proteinu)
- B. vedou k nahrazení jedné aminokyselinu za jinou ve výsledném proteinu
- C. mohou způsobit objevení nového stop kodonu v sekvenci DNA
- D. mohou způsobit syntézu úplně změněného proteinu, který je nefunkční
- E. nemají na výsledný protein žádný vliv

Mutace způsobující vyštěpení (deleci) nukleotidu z genu, nebo vložení (inzerci) nového nukleotidu:

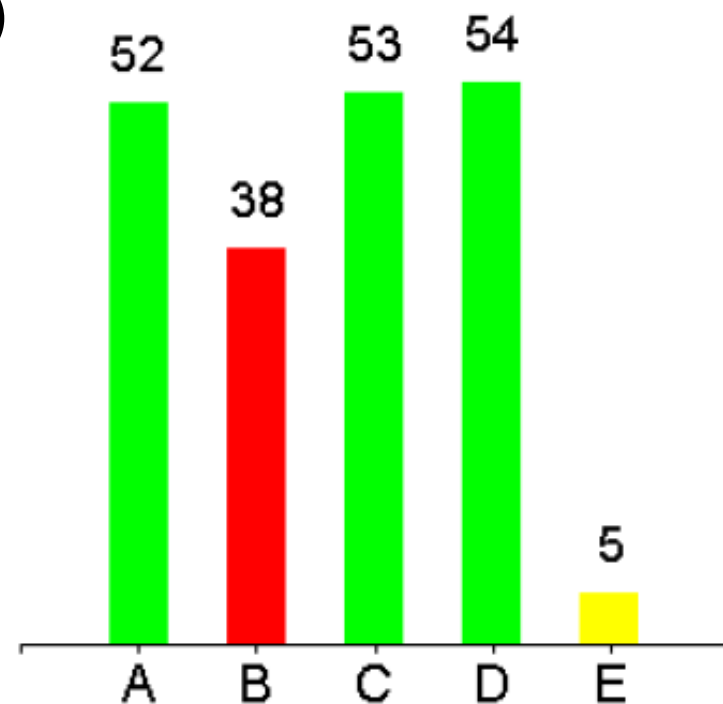
✓ A. způsobují posun čtecího rámce (zařazení jiných aminokyselin do výsledného proteinu)

B. vedou k nahrazení jedné aminokyseliny za jinou ve výsledném proteinu

✓ C. mohou způsobit objevení nového stop kodonu v sekvenci DNA

✓ D. mohou způsobit syntézu úplně změněného proteinu, který je nefunkční

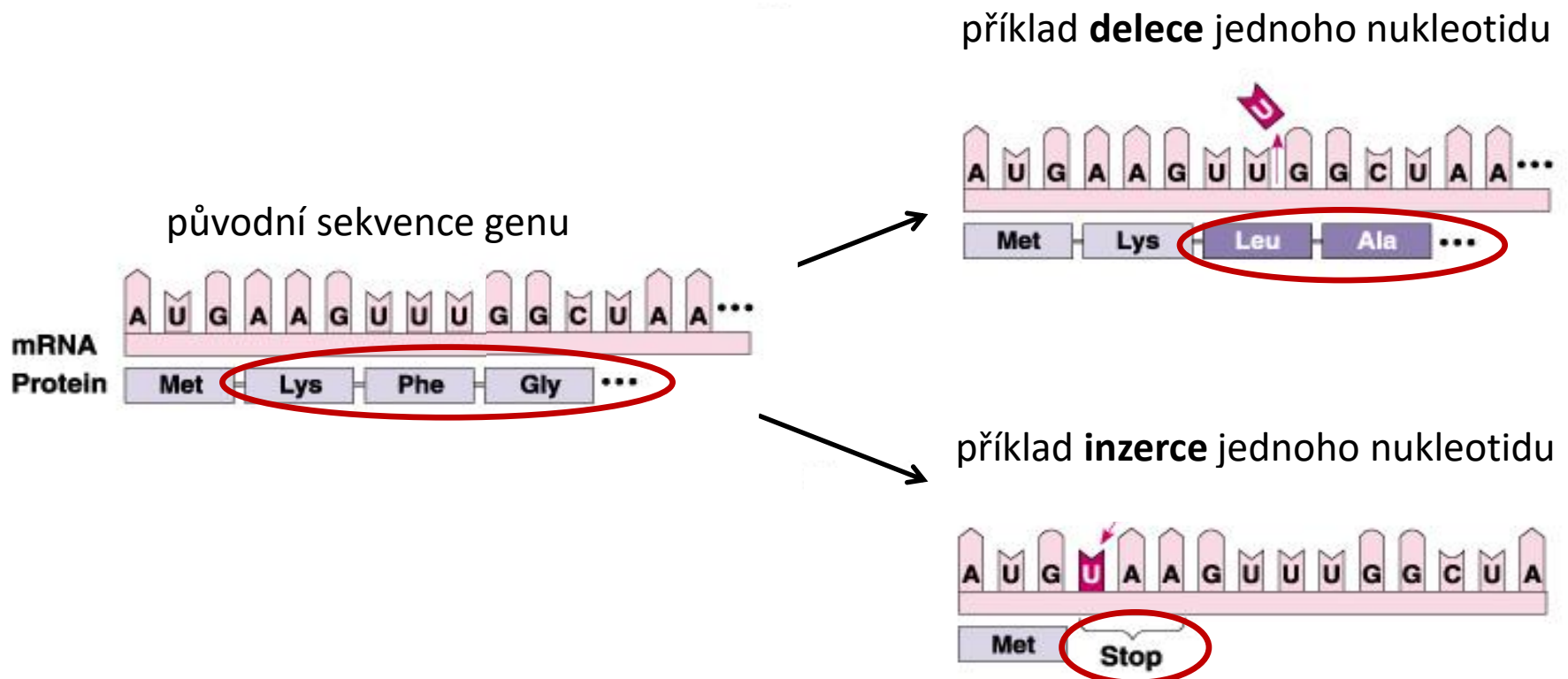
E. nemají na výsledný protein žádný vliv



# Mutace s posunem čtecího rámce

Mutace způsobující inserce nebo delece jednoho a více nukleotidů (kromě násobků tří) mění čtecí rámec – při **syntéze proteinů** na ribozomech jsou pak nukleotidy mRNA rozpoznávány **v jiných trojicích**

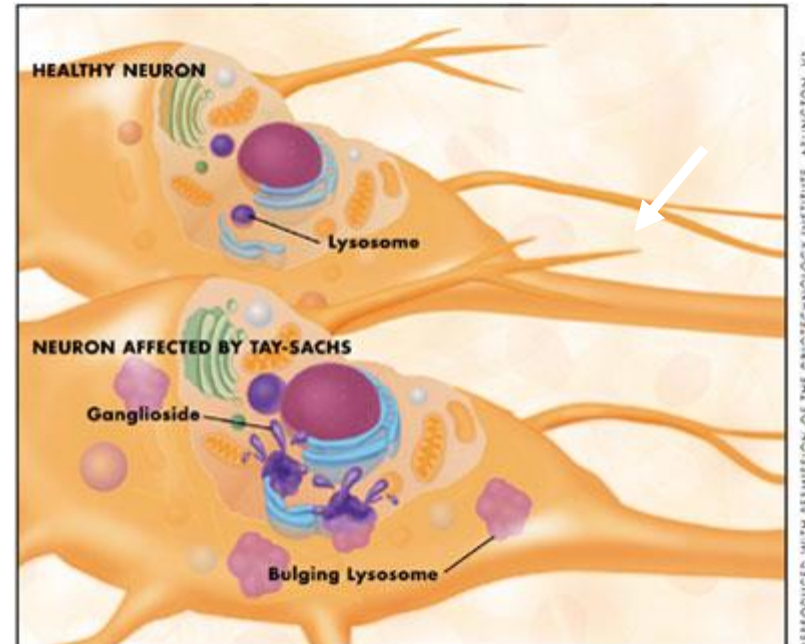
Posunové mutace obvykle vedou k tvorbě **nefunkčních proteinů**



# Příklad mutace s posunem čtecího rámce

## TAY-SACHSOVA CHOROBA

- vzácné autozomálně recesivní genetické onemocnění
- **mutovaný HEXA gen**  
(až u 80 % pacientů – inserce 4 bp)
- tělo neprodukuje funkční **lyzozomální hydrolytický enzym hexosaminidázu A (Hex-A)**
- bez tohoto enzymu nejsou metabolizovány některé **membránové glykolipidy (gangliosidy)** a hromadí se v mozku a neuronech → smrt nervových buněk
- svalová slabost, ztráta zraku anebo sluchu, křeče, ztráta hybnosti (upoutání na vozík)

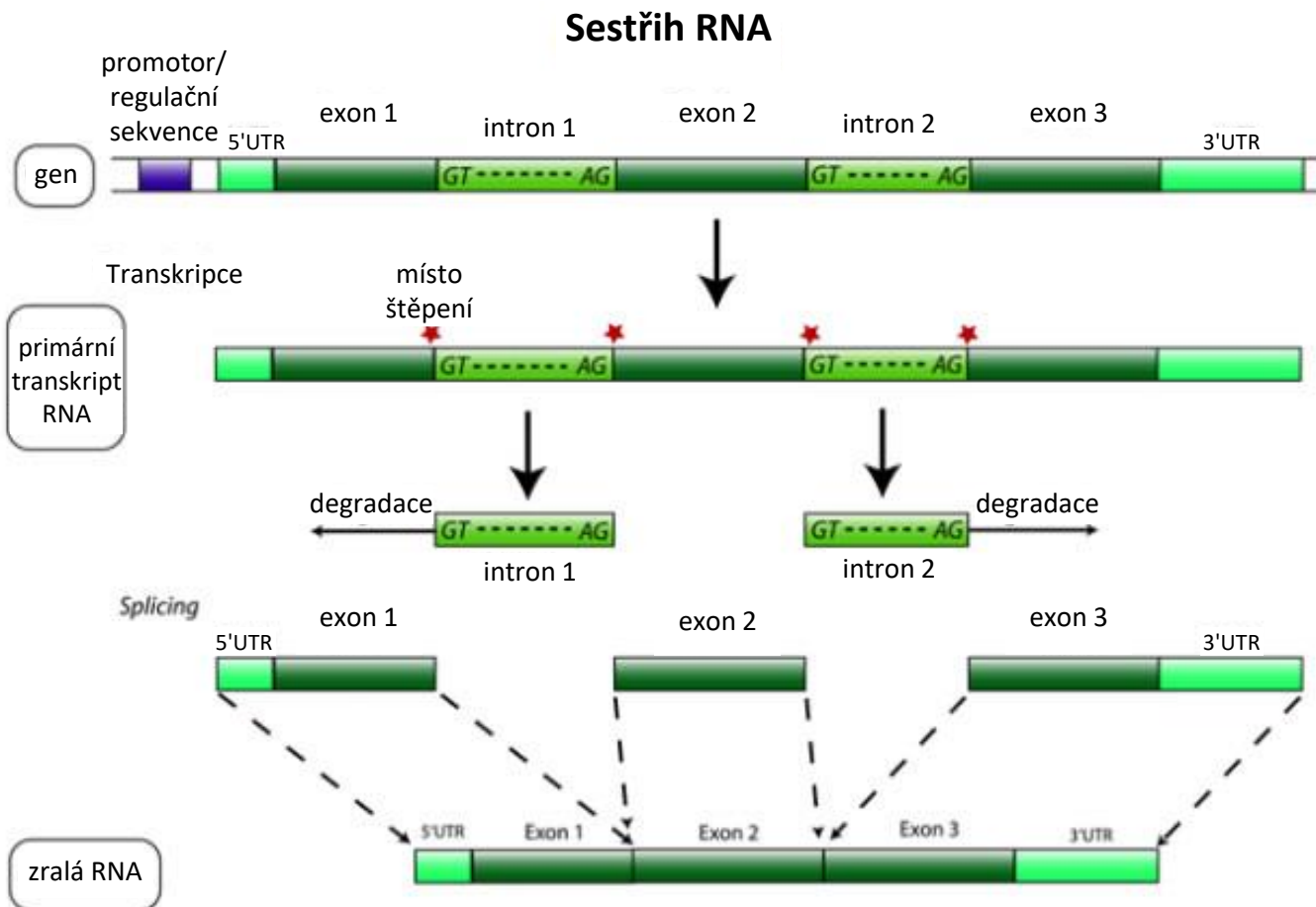


Society for Neuroscience - Treating Tay-Sachs Disease." Society for Neuroscience



# Mutace v sekvenci intronů

Mutace v sekvenci **intronů** (úseky vystřižené z RNA po transkripci) nemění funkci výsledného proteinu nebo RNA, pokud ovšem nezmění **sestřih** tvořené RNA (to, které úseky jsou rozpoznávané jako introny a vystřihovány)



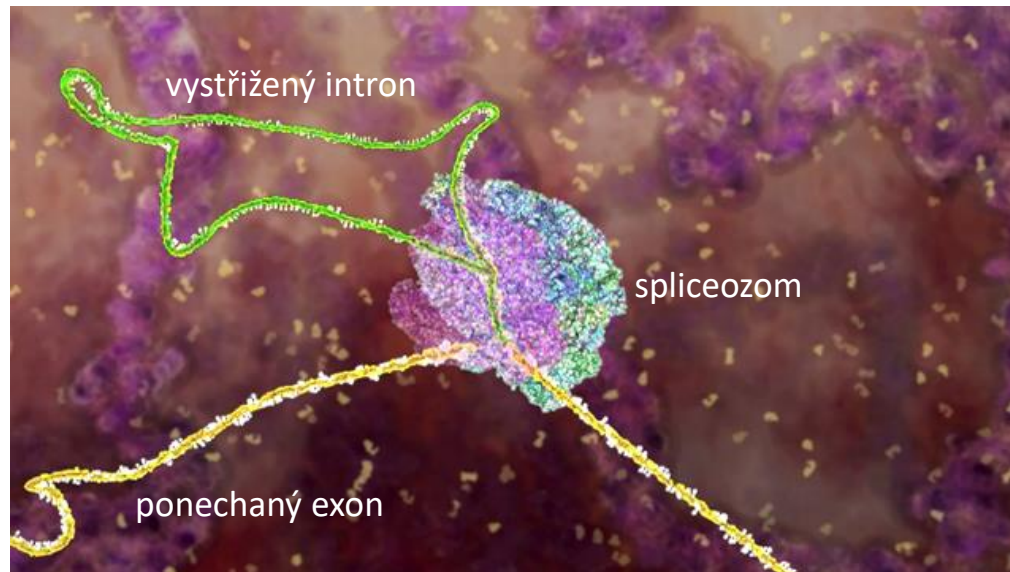
5'UTR a 3'UTR = nepřekládané oblasti (untranslated regions) na 5' a 3' konci mRNA

# Příklady genů s alternativním sestřihem mRNA

- gen BCR pro **receptor B-lymfocytů** a zároveň pro **protilátky (imunoglobuliny)** – jedním typem sestřihu vzniká protein vázaný na plazmatickou membránu (receptor B-lymfocytů, díky kterému rozpoznávají antigeny), jiným typem sestřihu vzniká volný, sekretovaný protein – protilátka daného B-lymfocytu po rozpoznání antigenu (versus VDJC rekombinace – editace genomu)
- gen CDKN2A (také INK4A, ARF) pro **inhibitory cyklin-dependentních kináz** podílejících se na regulaci buněčného cyklu v kontrolním bodě G1/S – jedním typem sestřihu vzniká inhibitor CDK **p16** (regulace hladiny proteinu Rb), jiným typem sestřihu vzniká inhibitor CDK **p14** (regulace hladiny proteinu mdm2/p53)
- gen **Bcl-x** pro **transmembránový protein mitochondrií** podílející se na **regulaci apoptózy** – jedním typem sestřihu vzniká negativní regulátor apoptózy Bcl-xL (podporuje přežití buněk), jiným typem sestřihu vzniká kratší varianta Bcl-xS, která působí jako pozitivní regulátor apoptózy (podporuje buněčnou smrt)
- gen **Fas** (také CD95) pro „receptor smrti“ podílející se na regulaci vnější dráhy apoptózy – jedním typem sestřihu vzniká protein vázaný na plazmatickou membránu a působící jako **receptor smrti** (podporuje apoptózu), jiným typem sestřihu vzniká volný, sekretovaný protein, který inhibuje apoptózu

# Sestřihem RNA se odebírají introny z pre-mRNA

- mutace v místech sestřihu vedou k syntéze mnohem delšího nebo kratšího proteinu → **změna tvaru, ztráta funkce**
- **všechna geneticky podmíněná onemocnění** (způsobená mutacemi v DNA) mohou být způsobena jak mutacemi v kódujících oblastech genů, tak v místech sestřihu



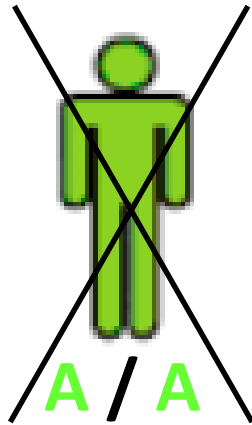
Mutace, které způsobí nefunkčnost proteinu, ovlivňují funkčnost nebo chování buněk nezávisle na tom, jakým způsobem výsledný protein svou funkci ztratil

- pacienti se **stejným** geneticky podmíněným **onemocněním** mají často úplně **odlišné mutace ve stejném genu** (případně v různých genech, jejichž proteiny ovlivňují stejnou funkci, stejnou metabolickou dráhu, stejnou signální dráhu...)
- může se ale lišit **závažnost symptomů** (nefunkční enzym *versus* snížená funkce *versus* změna lokalizace v buňce, atd.)



# Evoluční výhodnost některých mutací – v homozygotním stavu

Mutace ani v homozygotním stavu (aspoň v daných podmínkách) **nevede ke smrti pacienta** – výhodná obvykle v **homozygotním** stavu



obě alely genu kódují  
funkční protein



heterozygot



obě alely genu kódují  
nefunkční protein

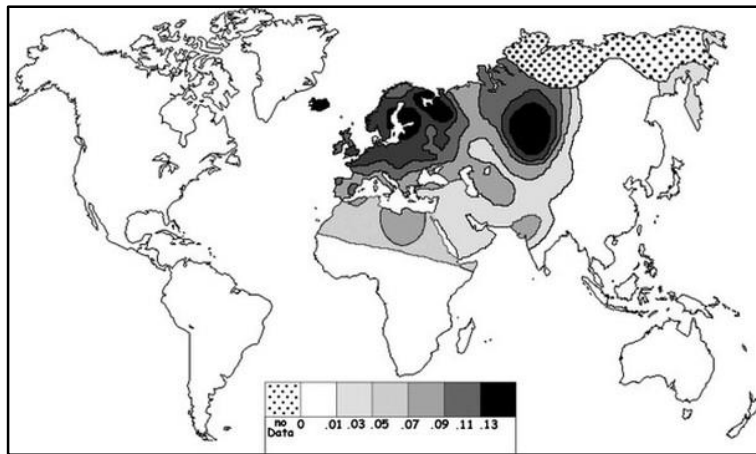
# Lidé nesoucí delecii 32-bp v genu kódujícím CCR5 jsou rezistentní k infekci HIV-1

CCR5

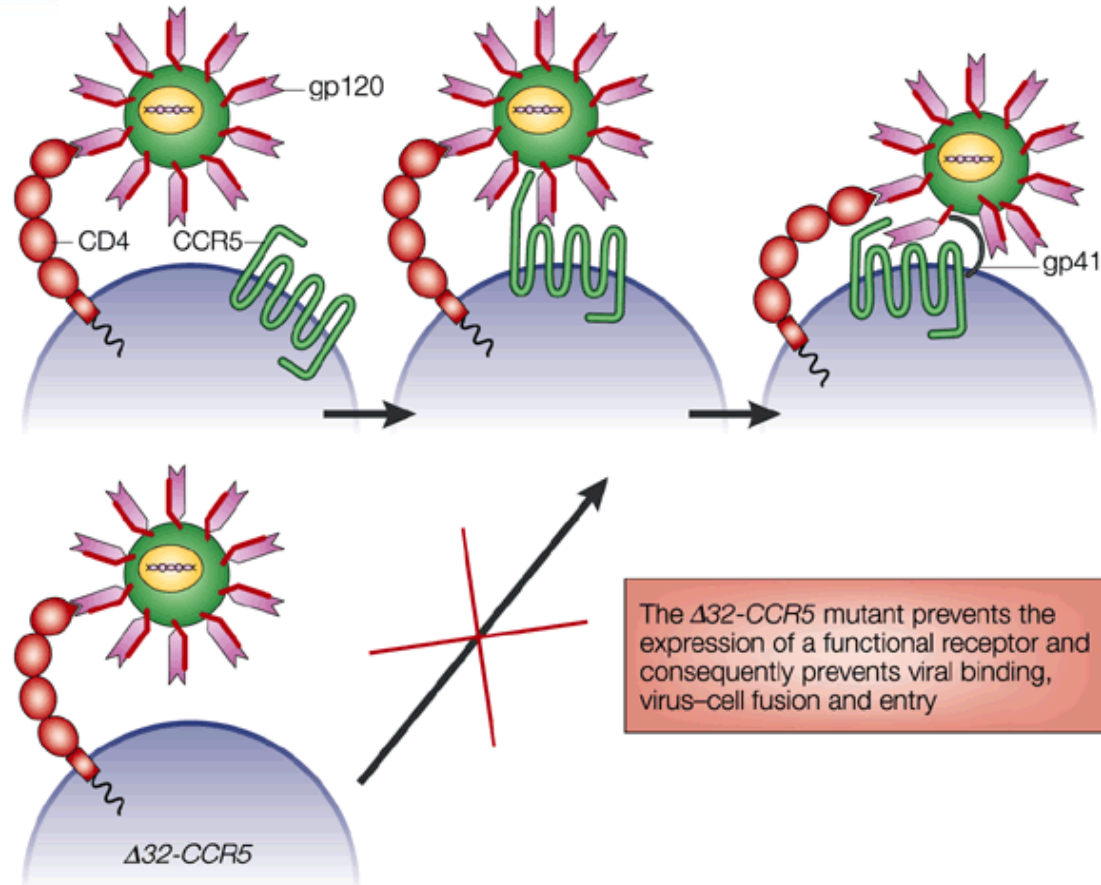
F	P	Y	S	Q	Y	Q	F	W	K	N	F	Q	T	L	K	I	V
TTT	CCA	TAC	AGT	CAG	TAT	CAA	TTC	TGG	AAG	AAT	TTC	CAG	ACA	TTA	AAG	ATA	GTC

TTT	CCA	TAC	ATT	AAA	GAT	AGT	CAT	CTT	GGG	stop
F	P	Y	I	K	D	S	H	L	G	

CCR5 $\Delta$ 32



<http://www.delta-32.com/research.html>

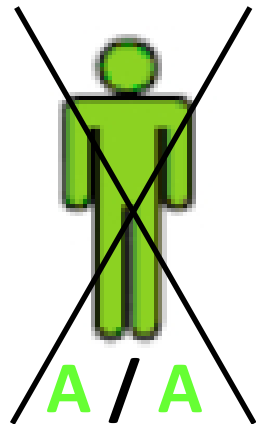


The  $\Delta$ 32-CCR5 mutant prevents the expression of a functional receptor and consequently prevents viral binding, virus-cell fusion and entry

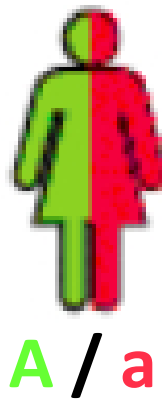
# Evoluční výhodnost některých mutací – v heterozygotním stavu

V některých případech **špatně tvarovaný protein chrání** jedince **před parazity** využívajícími tento protein ke vstupu do těla nebo buněk hostitele, ke své reprodukci, nebo zabraňuje propuknutí smrtelných symptomů onemocnění

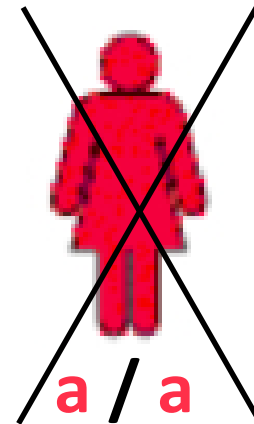
Obvykle nejvýhodnější pro **heterozygoty** (jedna kopie genu produkuje funkční protein, ale druhá alela ne) – jsou částečně chráněni, a neumírají na dané genetické onemocnění spojené s úplnou nefunkčností daného proteinu v těle



obě alely genu kódují  
funkční protein



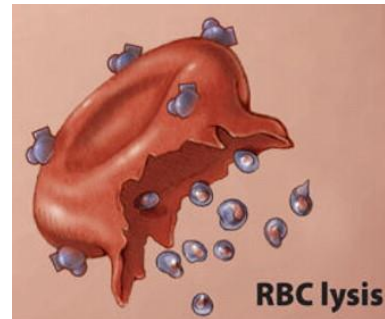
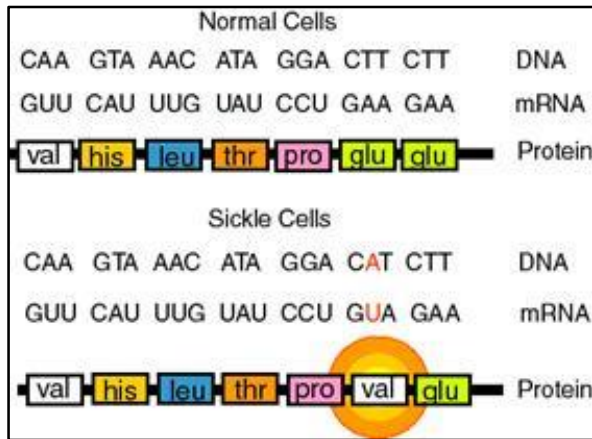
heterozygot



obě alely genu kódují nefunkční protein  
– pokud je to neslučitelné se životem,  
pacient umírá

# Snížená pravděpodobnost úmrtí na malárii

**Heterozygoti** pro mutaci v genu pro hemoglobin  $\beta$  (která u homozygotů způsobuje srpkovitou anémií) jsou relativně chráněni proti **malárii**



Parazitický prvok (*Plasmodium*) se pomnoží v jaterních buňkách a pak v červených krvinkách, šíří se v těle, způsobuje odumírání jaterních buněk a erytrocytů, a způsobuje symptomy malárie

**AA**

homozygoti s normálním hemoglobinem  $\beta$



Změna tvaru erytrocytů ve stresových podmínkách (hypoxie, acidóza...)

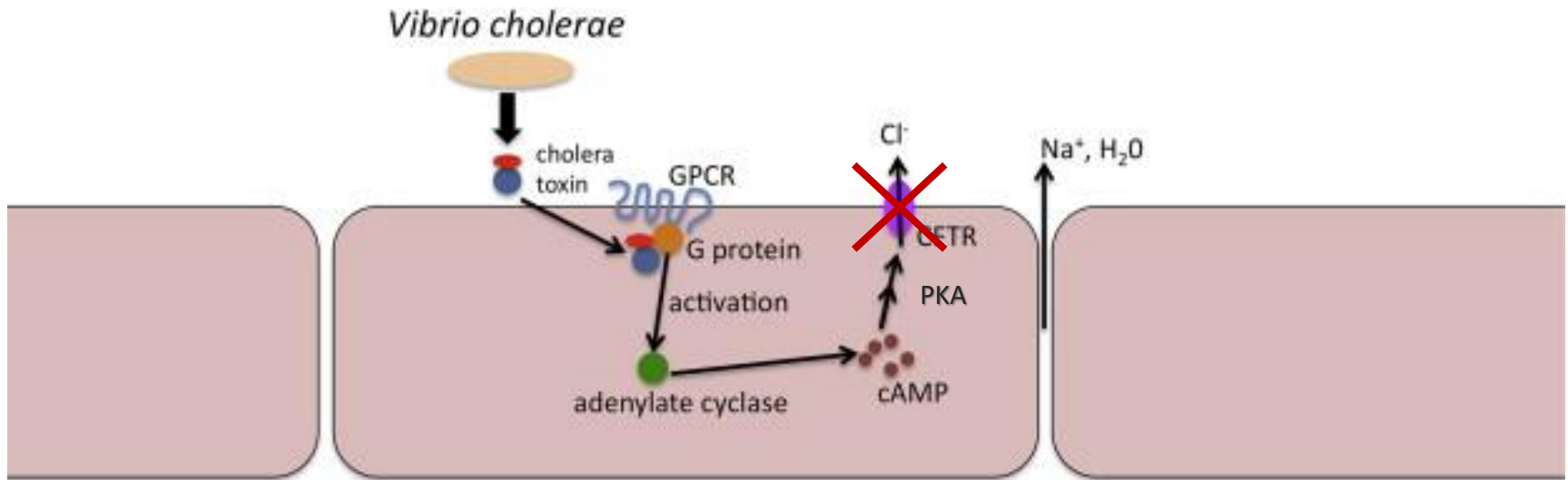


Vlivem přítomnosti parazitů (stresový faktor) dojde ke změně tvaru erytrocytů – srpkovité erytrocyty s parazity jsou odbourávány přednostně – selektivní fagocytóza, a odbourávání ve slezině

**Aa (AS)**

heterozygoti s jednou alelou pro abnormální hemoglobin  $\beta$

# Snížená pravděpodobnost úmrtí na cholera



- cholera toxin A modifikuje G-protein, který tak zůstává stále aktivní, což způsobuje mimo jiné nadměrnou aktivaci jednoho z **iontových kanálů** – **CFTR** (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)
  - **Cl<sup>-</sup> a další ionty** jsou pumpovány ze střevních buněk do dutiny střeva, což vede ke **ztrátám vody** ze střevních buněk do střev a těžkému průjmu

Když je iontový kanál CFTR mutovaný a **nefunkční**, **nemůže být nadměrně aktivovaný**  
→ **heterozygoti** pro tuto mutaci mají nižší pravděpodobnost, že zemřou na cholera

**Více o příslušné signalizaci v přednášce č. 5 – Buněčná signalizace**

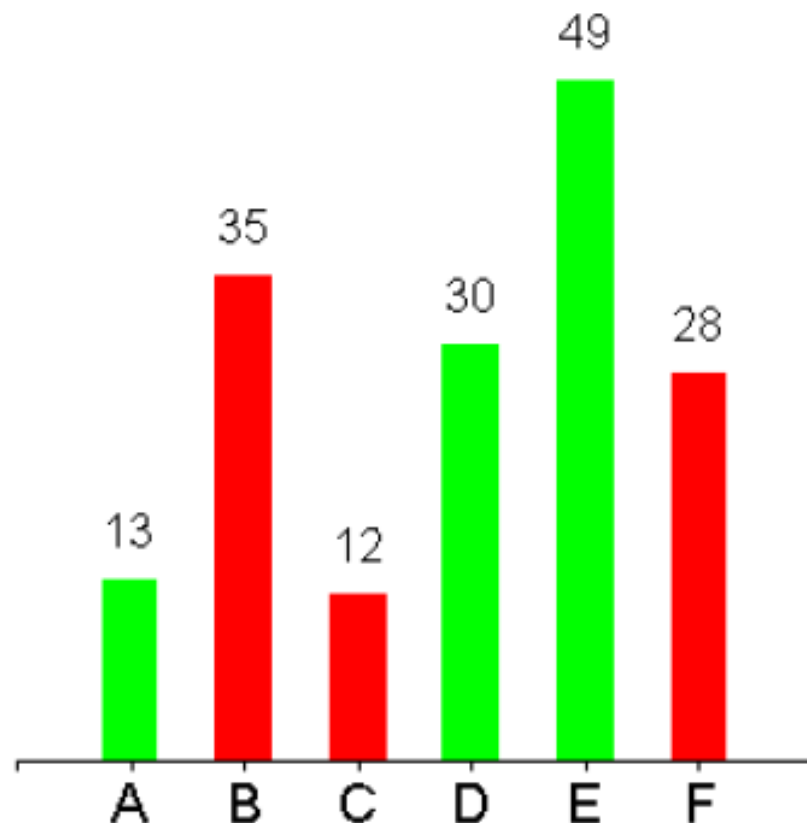
# Replikace DNA

## Replikace lidské chromozomální DNA:

- A. probíhá pouze po zachycení růstových faktorů příslušnými receptory
- B. je v buňce nezbytná pro vznik proteinů
- C. probíhá ve všech buněčných typech dospělého člověka zhruba stejně často
- D. probíhá pouze v buňkách připravujících se na dělení
- E. probíhá v rostoucích a regenerujících tkáních
- F. probíhá před každou transkripcí

## Replikace lidské chromozomální DNA:

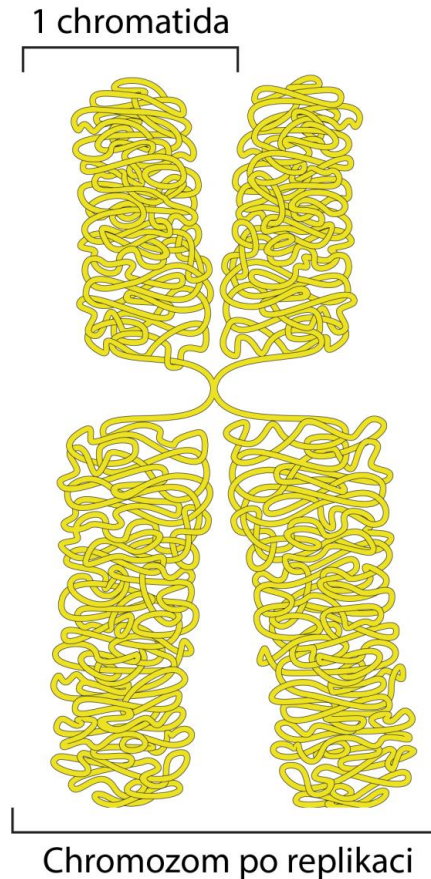
- ✓ A. probíhá pouze po zachycení růstových faktorů příslušnými receptory
- B. je v buňce nezbytná pro vznik proteinů
- C. probíhá ve všech buněčných typech dospělého člověka zhruba stejně často
- ✓ D. probíhá pouze v buňkách připravujících se na dělení
- ✓ E. probíhá v rostoucích a regenerujících tkáních
- F. probíhá před každou transkripcí





# Replikace DNA probíhá pouze před dělením buňky

- vede ke vzniku **identické sesterské chromatidy** každého chromozomu



## Jak můžeme blokovat replikaci DNA:

- A. Záměnou nukleotidů v obou řetězcích – mutovaný dvouřetězec DNA se nereplikuje
- B. Inhibitory topoizomeráz (enzymů odstraňujících z DNA nadšroubovicové vinutí)
- C. Inhibitory DNA-polymerázy
- D. Zapojením nukleotidu bez reaktivní OH skupiny na 3-uhlíku
- E. Zapojením modifikovaného nukleotidu bez cukerné složky

## Jak můžeme blokovat replikaci DNA:

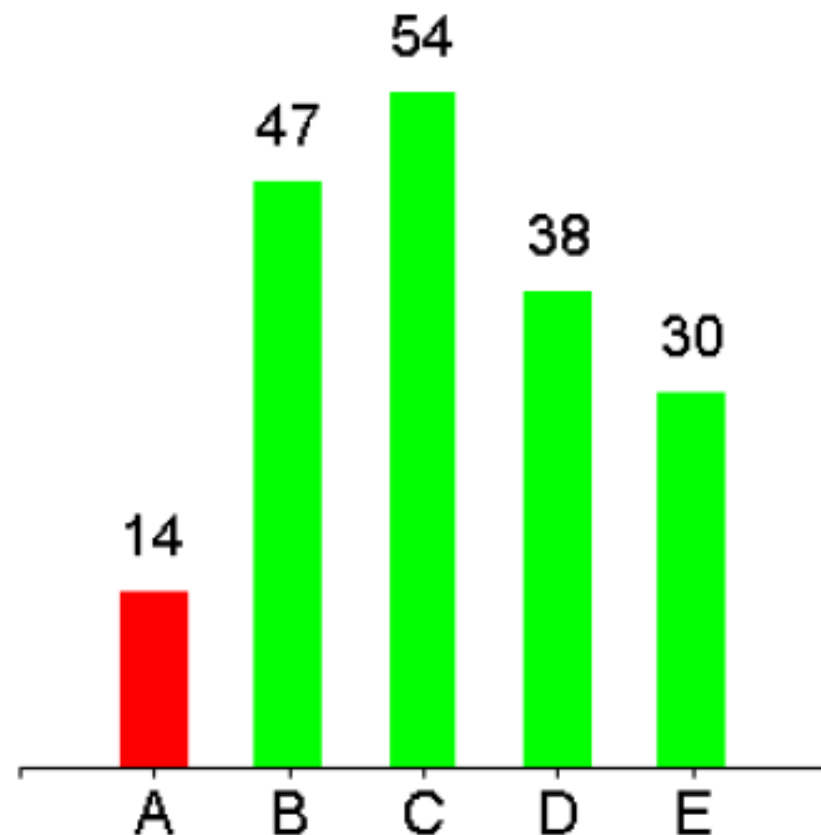
A. Záměnou nukleotidů v obou řetězcích – mutovaný dvouřetězec DNA se nereplikuje

✓ B. Inhibitory topoizomeráz (enzymů odstraňujících z DNA nadšroubovicové vinutí)

✓ C. Inhibitory DNA-polymerázy

✓ D. Zapojením nukleotidu bez reaktivní OH skupiny na 3-uhlíku

✓ E. Zapojením modifikovaného nukleotidu bez cukerné složky



# Topoizomerázy jsou enzymy, které odstraňují nadměrné svinutí DNA způsobené aktivitou helikáz

- štěpí jeden řetězec DNA (topoizomeráza I) nebo oba (topoizomeráza II) a poté rozštěpený řetězec opět spojí

Relaxovaná dvoušroubovice DNA



aktivita helikázy



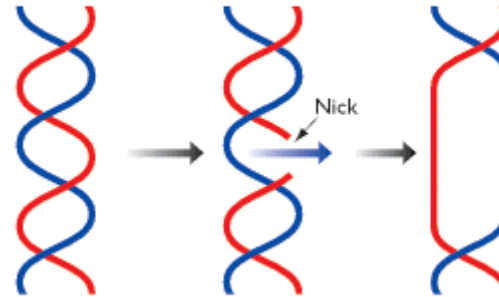
Dvoušroubovice DNA nadměrně svinutá na jedné straně kvůli rozvíjení na druhé



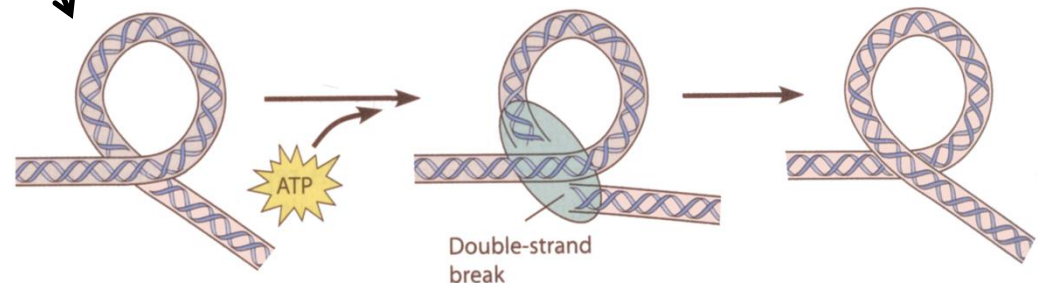
helikáza

nadšroubovicové vinutí („supercoiling“)

Topoizomeráza I – jednořetězcový zlom a znovuspojení



Topoizomeráza II – dvouřetězcový zlom a znovuspojení



# Inhibitory topoizomeráz

## - indukované poškození DNA buněk při replikaci

Inhibují například znovuspojení DNA při aktivitě topoizomerázy II  
→ **dvouřetězcové zlomy** vznikající dočasně v DNA dělicích se buněk vlivem aktivity topoizomerázy II nejsou odstraněny a zůstávají

Topoizomeráza II vytvoří přechodné dvouřetězcové zlomy v DNA



normálně je zlom znovu spojený

**inhibitory topoizomeráz**



zlom není znovu spojený

Poškození DNA je opravitelné,  
buňka zahájí **opravy DNA** a přežije

Poškození DNA je neopravitelné,  
nebo je oprava inhibovaná dalšími léčivy,  
eukaryotická buňka odumírá **apoptózou**

# Inhibitory topoizomeráz v léčbě nádorů

## – indukované poškození DNA buněk při replikaci

Antracykliny (například doxorubicin) a některá další protinádorová léčiva inhibují znovuspojení DNA při aktivitě topoizomerázy II → zůstávají **dvouřetězcové zlomy**, které mají v DNA dělicích se buněk vznikat pouze dočasně



# Inhibitory topoizomeráz: Fluorochinolony interferují s aktivitou bakteriální topoizomerázy

## Použití fluorochinolonů:

oční infekce, infekce respiračního traktu, vdechnutí antraxu, mykobakterie (TBC), infekce kloubů a měkkých tkání, infekce trávicího traktu a břicha, bakteriální zánět prostaty, chlamydie

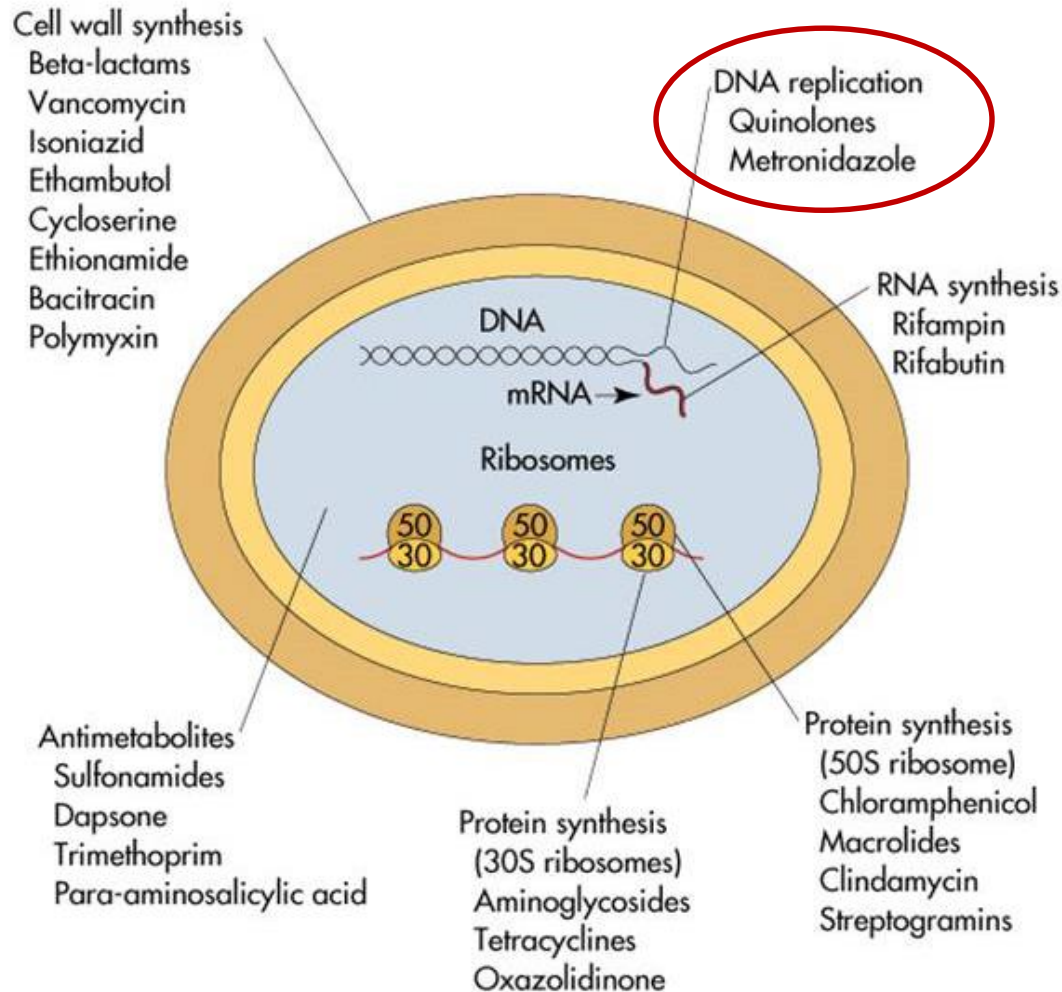
## Vedlejší účinky:

natržení šlach, poškození vývoje šlach a kostí u plodu při podání těhotným ženám, změny EKG, zmatení, závratě, křeče a mnoho dalších



Používané pouze u pacientů, kteří nemají jinou možnost léčby  
– riziko **vážných vedlejších účinků**

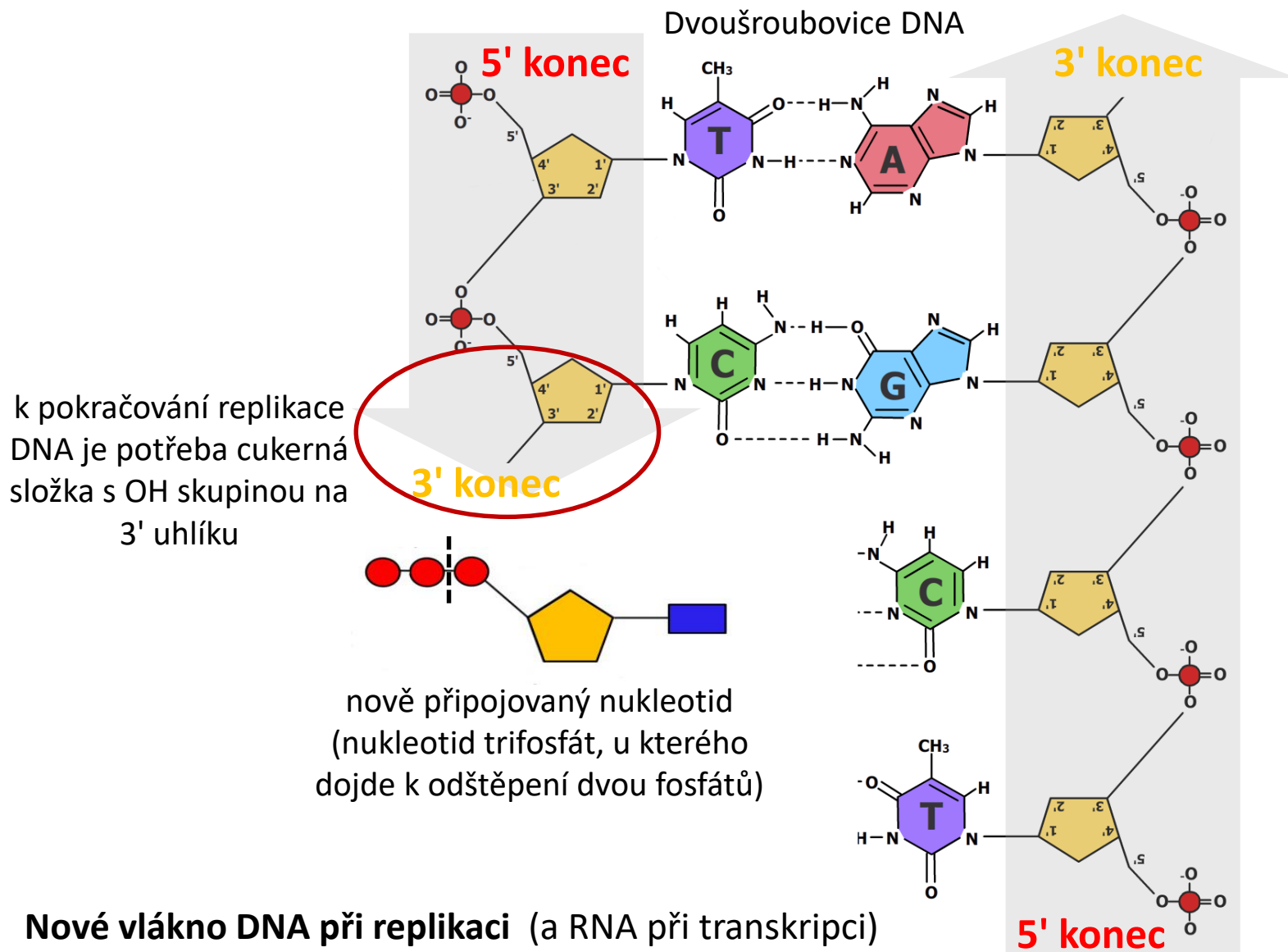
# Inhibitory prokaryotických DNA-polymeráz



Jedna ze skupin **antibiotik** jsou inhibitory **prokaryotických** DNA-polymeráz – brání replikaci DNA a tím i dělení (množení) bakteriálních buněk

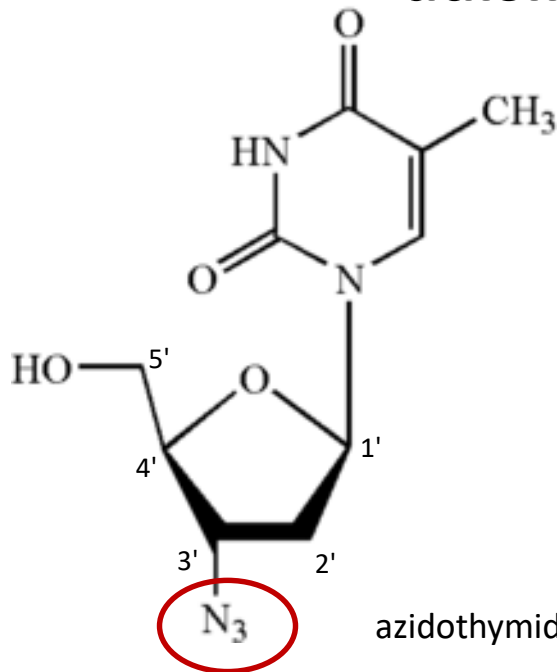


# Nové nukleotidy DNA i RNA se vždy připojují na 3' konci

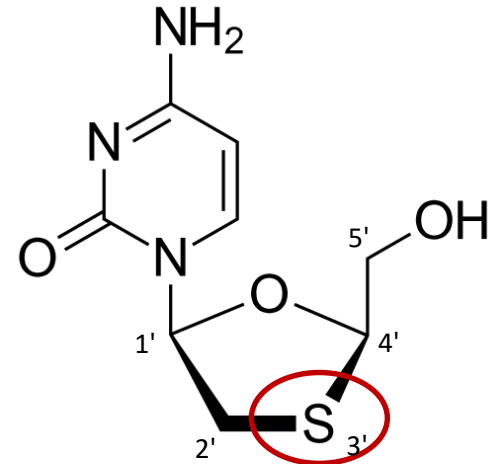


**Nové vlákno DNA při replikaci (a RNA při transkripci) vždy přibývá připojováním nových nukleotidů na 3' konci**

# Analogy nukleotidů s 3' koncem neumožňujícím napojení dalšího nukleotidu



azidothymidin

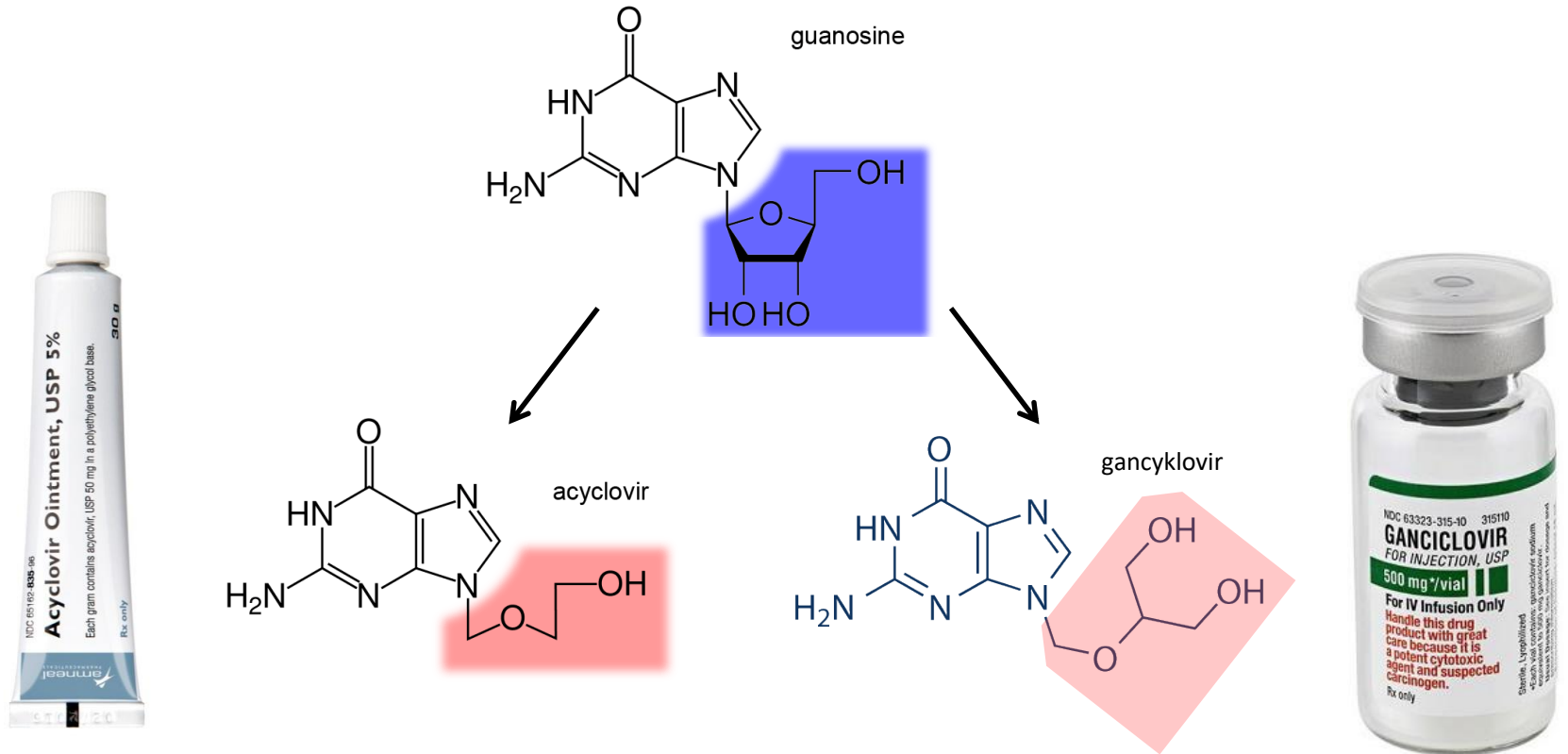


lamivudin

léčiva používaná při infekci virem HIV

Některá **antivirotika** jsou analogy nukleosidů, kde je 3'-uhlík cukerné složky nahrazen jiným atomem bez OH skupiny, nebo je na něm navázána funkční skupina neumožňující napojení dalšího nukleotidu za tento analog – replikace DNA se v místě zapojení analogu nukleotidu zastaví  
- zabraňují zároveň i **reverzní transkripci** (tvorbě DNA podle molekuly RNA)

# Analogy nukleotidů bez cukerné složky



léčba například oparu nebo pásového oparu

léčba například cytomegalovirových infekcí  
(zánět plic u pacientů s imunosupresivní léčbou, atd.)

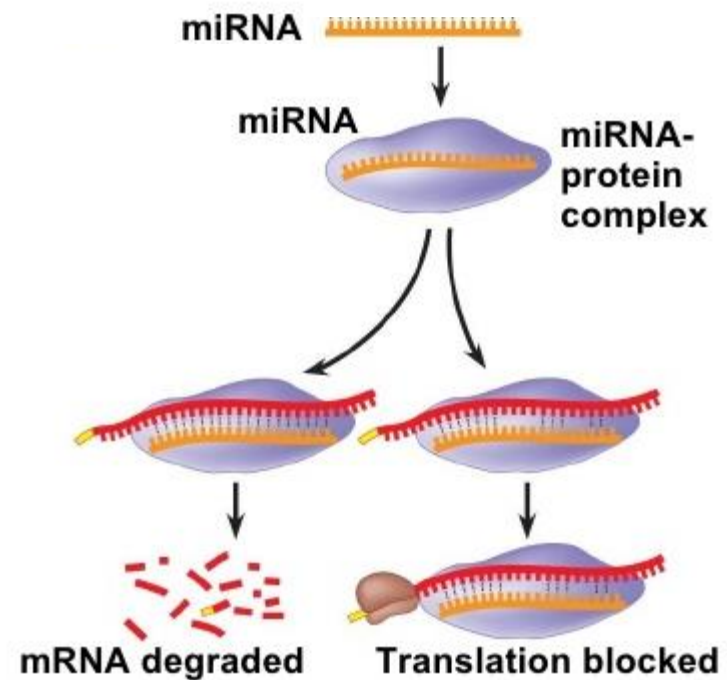
Jiná **antivirotika** jsou analogy nukleotidů bez cukerné složky poskytující 3'-konec pro prodlužování řetězce DNA, tedy bez možnosti připojení dalšího nukleotidu za tento analog – replikace DNA se v místě zapojení takového analogu nukleosidu zastaví

# **Klinický případ**

U pacientky (43 let) s metastazujícím nádorem prsu byly zjištěné **snížené markery apoptózy** (ukazatele řízené buněčné smrti, které nastává v buňkách například v důsledku poškození DNA) – snížená tvorba proteinů Bcl-2 a TP53INP1, které podporují apoptózu. Sekvenování ale neodhalilo **žádné mutace v DNA** těchto dvou genů. Čím tedy může být snížená tvorba těchto proteinů způsobena?

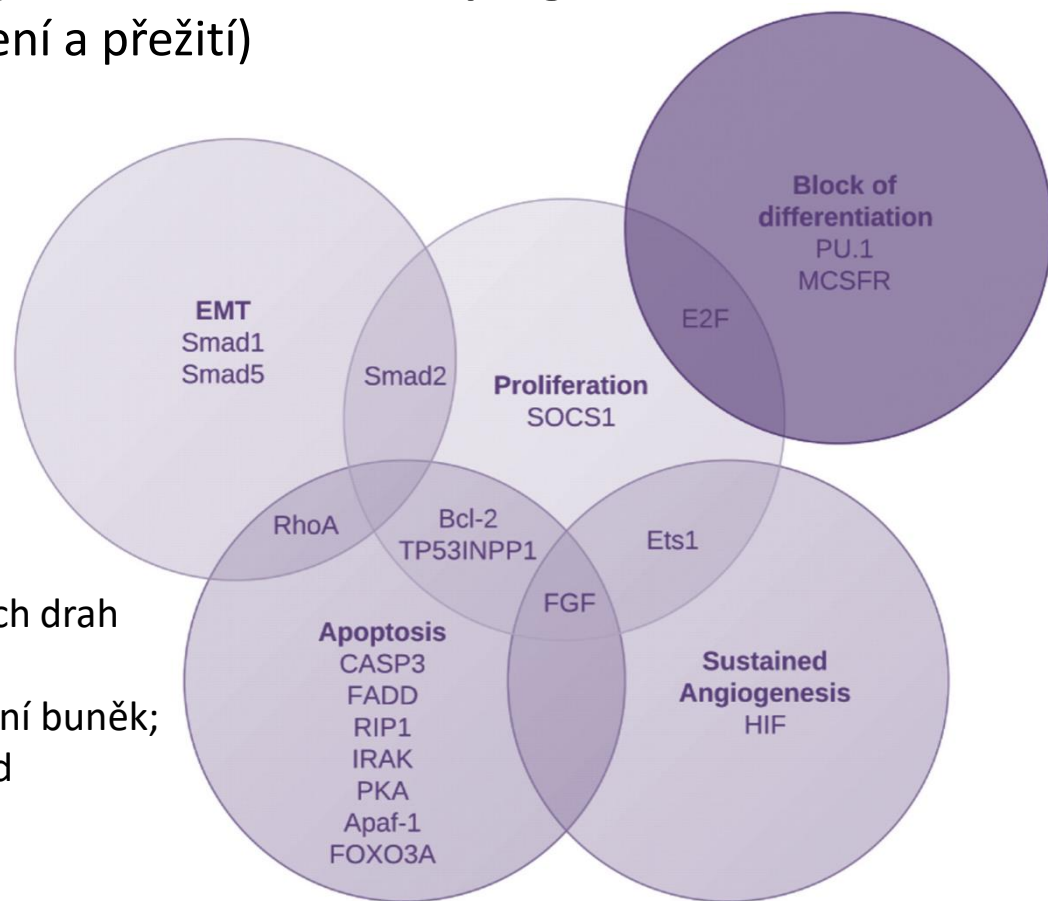


U pacientky (43 let) s metastazujícím nádorem prsu byly zjištěné **snížené markery apoptózy** (ukazatele řízené buněčné smrti, které nastává v buňkách například v důsledku poškození DNA) – snížená tvorba proteinů Bcl-2 a TP53INP1, které podporují apoptózu. Sekvenování ale neodhalilo **žádné mutace v DNA** těchto dvou genů. Čím tedy může být snížená tvorba těchto proteinů způsobena?



# Změna exprese některých typů miRNA byla zjištěna u mnoha typů nádorů

- například u nádorů prsu byla prokázána souvislost **zvýšené exprese miRNA-155** se zvýšenou malignitou nádoru a **horší prognózou** (nižší pravděpodobnost vyléčení a přežití)



Cílové geny miR-155 jsou součástí signálních drah souvisejících se vznikem a šířením nádorů (EMT = metastazování; proliferace = dělení buněk; apoptosis = řízená buněčná smrt, sustained angiogenesis = tvorba nových cév)

# Změna exprese některých typů miRNA byla zjištěna u mnoha typů nádorů

- **miRNA-155** – nový **diagnostický marker** – zvýšená exprese miRNA může být v krevní plazmě detekovatelná i roky předtím, než nádor díky tomu začne metastazovat a stane se maligním – včasný záchyt a **včasné zahájení léčby**
- souvislost **úbytku** miRNA-155 v krevní plazmě s **úspěšností chemoterapie** (ubývají nádorové buňky nadměrně exprimující tuto miRNA, a tím přestávají podporovat zvýšenou malignitu zbytkových nádorových buněk)  
→ klinické studie testující použití **inhibitorů miRNA** jako protinádorové léčby u konkrétních pacientů



miRNA nemůže způsobit degradaci mRNA cílových genů



"Now, just relax your back-bone & let yourself unwind..."

TOPO-ISOMERASE

