



Molekulární biologie

(přednáška JS 2011, 3 hod)

prof. RNDr. Jiří Doškař, CSc.

Molekulární biologie - předmět studia

- Vědní obor zabývající se studiem vztahu struktury a interakcí biomolekul, zvláště informačních biomakromolekul, k funkcím a vlastnostem živých soustav.
- Cílem molekulární biologie je vysvětlit funkce a vlastnosti živých soustav strukturou a interakcemi jejich molekul (makromolekul).
- Tento vztah vysvětluje z komplexního hlediska integrujícího fyzikální, chemické a biologické přístupy.

Studium procesů, které probíhají v živých soustavách na molekulární úrovni a jimiž se realizuje genetická informace

Definice pojmu „Molecular Biology“

- is the study of the structure and function of biological molecules.**
- field of biology that studies the molecular level of organization.**
- study of the molecular basis of life including the biochemistry of molecules such as DNA, RNA and proteins and the molecular structure and function of the various parts of living cells**
- a branch of biological science that studies the biology of a cell at the molecular level. Molecular biological studies are directed at studying the structure and function of biological macromolecules and the relationship of their functioning to the structure of a cell and its internal components ...**
- the science of studying the genetic composition and mechanism of living organisms at the molecular level. The molecular studies of all other organic molecules like proteins, fats, and carbohydrates is called biochemistry.**
- the study of molecules that are found in cells.**
- field of biology that concerns itself with understanding the interactions among the molecules of life.**
- a general term referring to study of the structure and function of proteins and nucleic acids in biological systems.**

Vznik a vývoj molekulární biologie umožnily tři základní objevy

1. Poznání struktury a funkce nukleových kyselin (DNA a RNA)
2. Rozluštění genetického kódu
3. Poznání procesů, jimiž se realizuje genetická informace (transkripce, translace, regulace genové exprese)

Specifické rysy historie molekulární biologie

1. Zaměření molekulární biologie na řešení **genetických problémů**
2. Návaznost molekulární biologie na biofyziku, fyzikální chemii, biochemii, mikrobiologii a genetiku
3. Vznik molekulární biologie v podobě **molekulární genetiky** syntézou **funkcionalistické a strukturalistické koncepce** ve výzkumu proteinů a nukleových kyselin

Vznik molekulární biologie v podobě molekulární genetiky syntézou funkcionalistické a strukturalistické koncepce ve výzkumu proteinů a nukleových kyselin

**Strukturalisté
(fyzici, chemici)**

- zaměření na objasnění struktury biomakromolekul (proteinů, NK)
(nezajímali se o funkci biomakromolekul ani genetickými problémy)

W. T. Astbury

J.D. Bernal

L. Pauling

E. Chargaff

M.H.F. Wilkings

F.H.C. Crick

**Funkcionalisté
(biochemici, mikrobiologové, genetici)**

- zaměření na vysvětlení, které biomakromolekuly jsou nositeli genetické informace a jaké funkce plní
(objektem studia byly bakterie a bakteriofágy)

M. Delbrück, E. Schrödinger,

G.W. Beadle, E.L. Tatum

O.T. Avery, C.M. MacLeod, M. McCarty, J. Lederberg,

A.D. Hershey,

J.D. Watson

Důležité etapy ve vývoji molekulární biologie

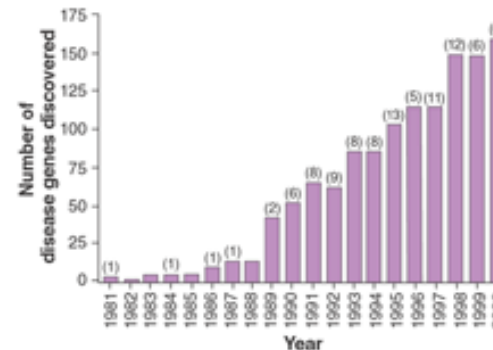
- **1944 - transformace bakterií pomocí purifikované DNA**
- **1953 - model struktury DNA (J. Watson, F. Crick, M. Wilkins)**
- 1956 - genetická informace v DNA je zapsána pořadím bází
- 1958 - při replikaci se oddělují komplementární vlákna DNA
- 1958 - izolace DNA-polymerázy I a syntéza DNA *in vitro*
- **1958 - vyhlášení ústředního dogmatu molekulární biologie**
- **1960 - objev mRNA a důkaz její funkce**
- 1961 - mRNA použita k rozluštění genetického kódu
- **1961- experimentální důkaz ústředního dogmatu MB**
- 1961 – postulování operonové teorie – regulace genové exprese
- **1966 - kompletní vyřešení genetického kódu**
- 1970 - izolace prvního restrikčního enzymu
- 1970 - objev reverzní transkriptázy u retrovirů
- **1972 - příprava prvních rekombinantních molekul DNA *in vitro***
- 1973 - začátek klonování genů - základ GI

Důležité etapy ve vývoji molekulární biologie

- 1975 - Asilomarská konference-moratorium na práce s rekombinantní DNA
- 1977 - první rekombinované molekuly nesoucí savčí geny
- 1977 - objev složených genů (sestřih pre-mRNA)
- 1977 - zavedení metod sekvenování DNA
- **1981 - objev katalytické aktivity RNA**
- 1982 - komerční výroba lidského inzulinu z bakterií
- 1983 - stanovení sekvence DNA bakteriofága λ
- - **projekty sekvenování genomů modelových organismů**

Genomická a postgenomická éra

- **Analýza sekvencí genomů**
- **Vztah genomu k proteomu**
- **Bioinformatické přístupy**



Současná etapa molekulární biologie

● Oblast výzkumu

- analýza genomu (genomika) a proteomu (proteomika)
- studium regulace genové exprese a procesů diferenciace buněk (buněčný cyklus, signální dráhy, poruchy regulace, výzkum kmenových buněk)
- neurobiologie
- molekulární evoluce
- molekulární mikrobiologie, virologie, imunologie, fyziologie...

● Praktické aplikace

- genové inženýrství - moderní biotechnologie, příprava transgenních organismů a nových látek cílenou změnou genů
- molekulární diagnostika infekčních, dědičných a nádorových chorob, nové způsoby jejich léčby
- farmakogenomika - léky „šité na míru“
- genové terapie = léčba genetických onemocnění

Sylabus přednášky z Molekulární biologie (JS 2011)

1. Úvodní přednáška. Předmět studia molekulární biologie, její vznik a hlavní etapy vývoje. Struktura a funkce nukleových kyselin
2. Genetická informace, genetický kód, definice genu, typy genů, struktura a informační obsah genomů
3. Replikace DNA (zúčastněné enzymy a mechanismus)
4. Transkripce u prokaryot a eukaryot, posttranskripční úpravy RNA,
5. Translace, transferové RNA, ribozomy, kotranslační a posttranslační procesy, samosestavování
6. Regulace genové exprese u prokaryot a eukaryot, struktura a vlastnosti regulačních molekul a regulačních sekvencí, pozitivní a negativní regulace, atenuace, specifické rysy regulace genové exprese u eukaryot. Regulace na posttranskripční úrovni.

Sylabus přednášky z Molekulární biologie 2009

7. Molekulární základ tvorby imunitních molekul
8. Změny genetické informace, mutace, obecná a místně specifická rekombinace. Reparace mutačně poškozené DNA
9. Mobilní elementy (prokaryotické a eukaryotické transpozony, retrotranspozony)
10. Základy genového inženýrství, příprava transgenních organismů a jejich využití, mutageneze *in vitro*, příprava biopreparátů metodami GI, genové terapie

Doporučená literatura

- *Rosypal S. a kol.: Úvod do molekulární biologie. I.-IVdíl. Brno 1999-2002 (třetí vydání). 2006 - I. díl (čtvrté vydání)*
- *Rosypal S. a kol.: Terminologie molekulární biologie, Brno 2001.*
- *Šmarda J. a kol.. Metody molekulární biologie, Brno, 2005.*
- *Lewin B. Genes VII, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo 2002.*
- *Alberts et al.: Molecular biology of the cell. Garland Publ. 2004.*
- *Alberts a kol: Základy buněčné biologie, Espero, 2000, 2005.*
- *Clark D.: Molecular biology, Elsevier, 2005.*
- *Watson J.D. et al., Recombinant DNA, 2nd ed., W.H.Freeman, New York 1992.*
- *Snustad D.P., Simmons M.J.: Genetika (překlad originálu Principles of Genetics), MU Brno, 2009*
- **Předlohy k přednáškám: IS MU**

ÚVOD DO MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE

Stanislav Rosypal



Díl první

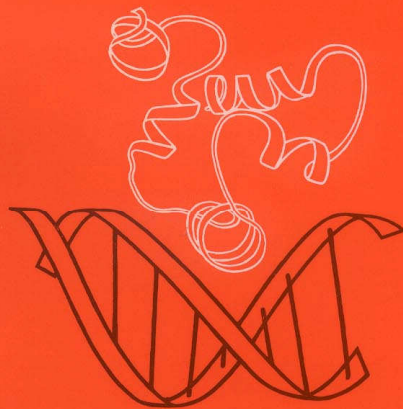
VSTUP DO MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE •
MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE PROKARYOTICKÉ BUŇKY

BRNO 2006

ČTVRTÉ (INOVOVANÉ) VYDÁNÍ

TERMINOLOGIE MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE

Stanislav Rosypal
& kol.



ČESKÉ ODBORNÉ TERMÍNY, JEJICH DEFINICE A ANGLICKÉ EKVIVALENTY

BRNO 2001

PRVNÍ VYDÁNÍ

METODY MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE

Jan Šmarda, Jiří Doškař, Roman Pantůček,
Vladislava Růžičková, Jana Koptíková

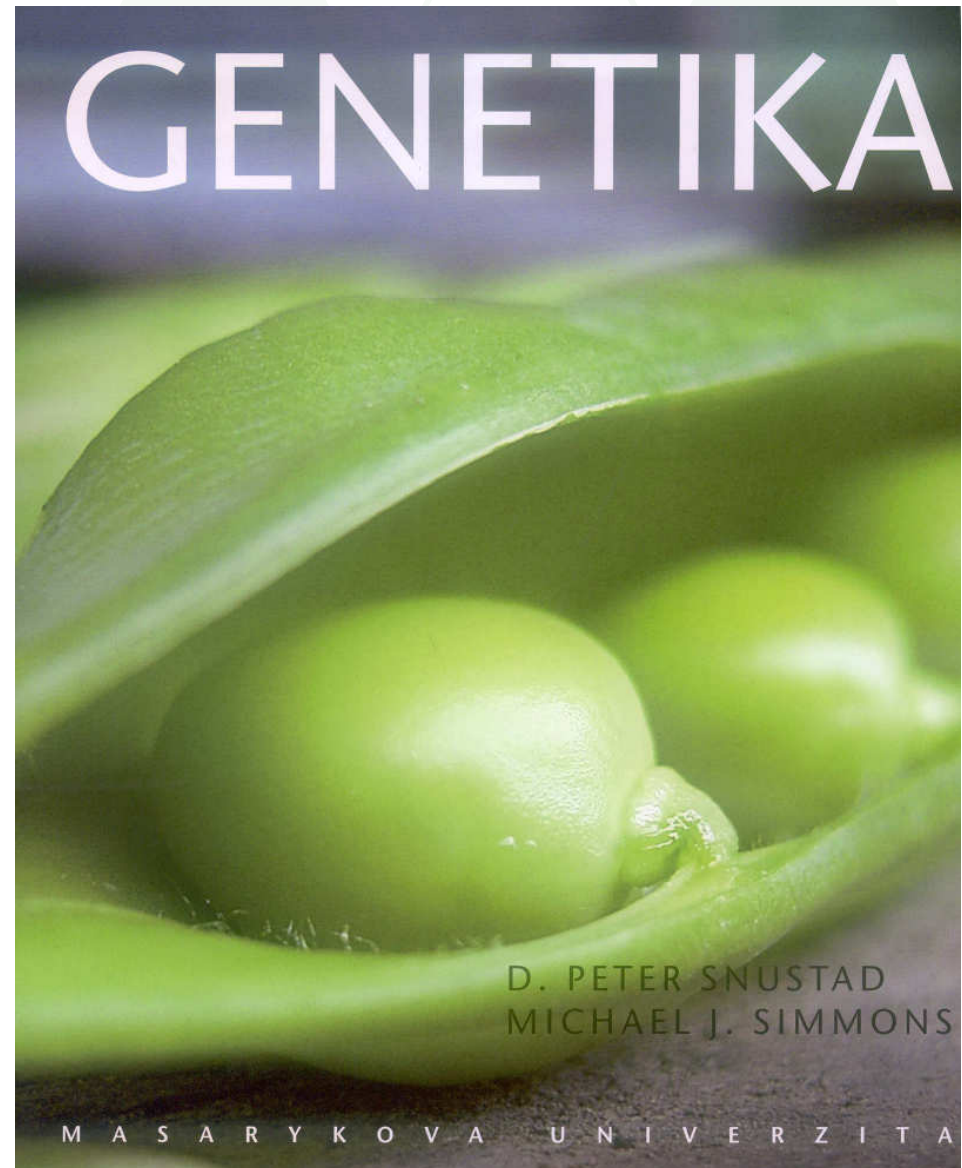
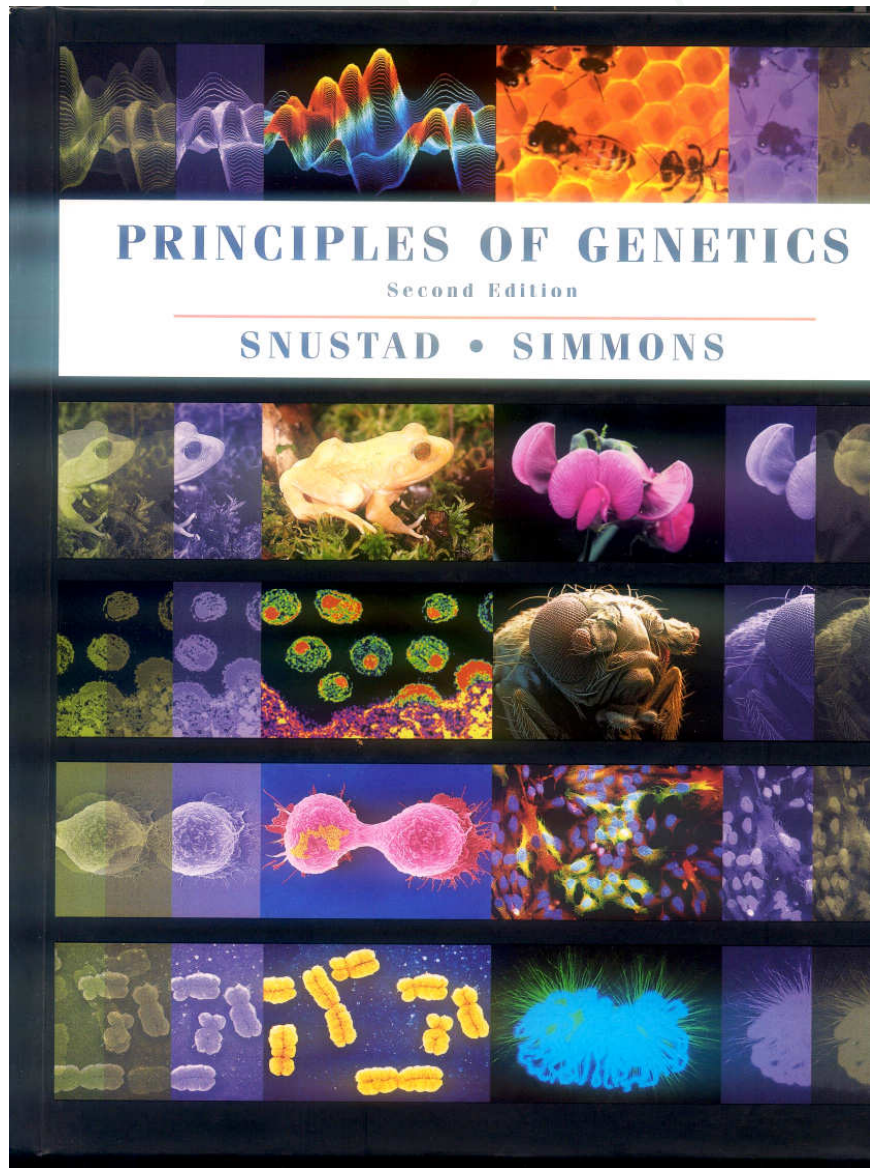




**Základy
buněčné biologie**

Úvod do molekulární
biologie buňky

Alberts • Bray
Johnson • Lewis
Raff • Roberts • Walter



Důkaz, že genetická informace je uložena v DNA

Nepřímé důkazy:

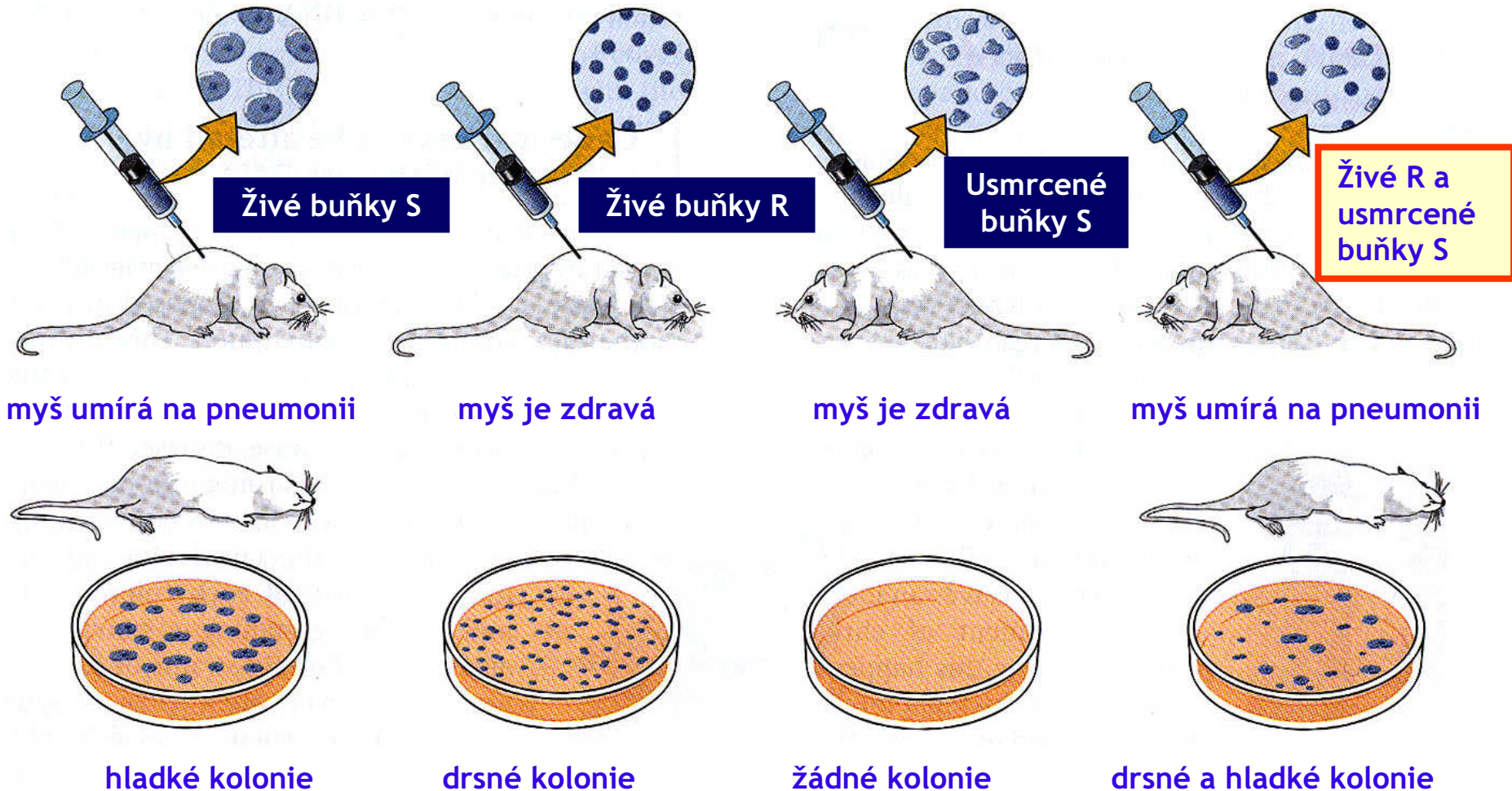
- DNA se nachází v chromozomech, RNA a proteiny jsou i v cytoplazmě
- Množství DNA v somatických buňkách koreluje s počtem sad chromozomů, v pohlavních buňkách je množství DNA poloviční
- DNA je stabilnější než RNA nebo proteiny

Přímé důkazy:

- Transformace u *Streptococcus pneumoniae* – změna virulence
- Analýza bakteriofága T2 – do bakteriální buňky vstupuje jen DNA, nikoliv proteiny
- U viroidů a některých virů je nositelkou genetické informace RNA

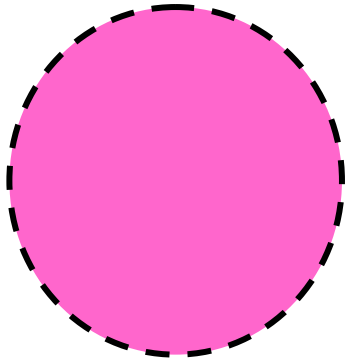
Experiment demonstrující transformaci bakteriálních buněk *Streptococcus pneumoniae* (Griffith 1928)

S buňky = virulentní, tvoří hladké kolonie, R buňky = avirulentní, tvoří drsné kolonie

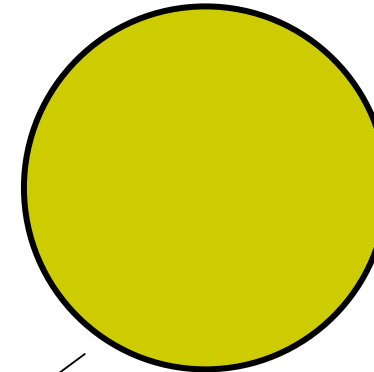


Princip transformace

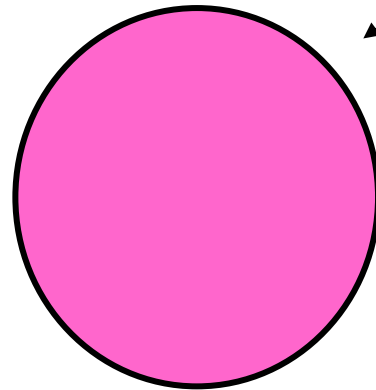
Donorová buňka



Recipientní buňka
přijímá volnou DNA

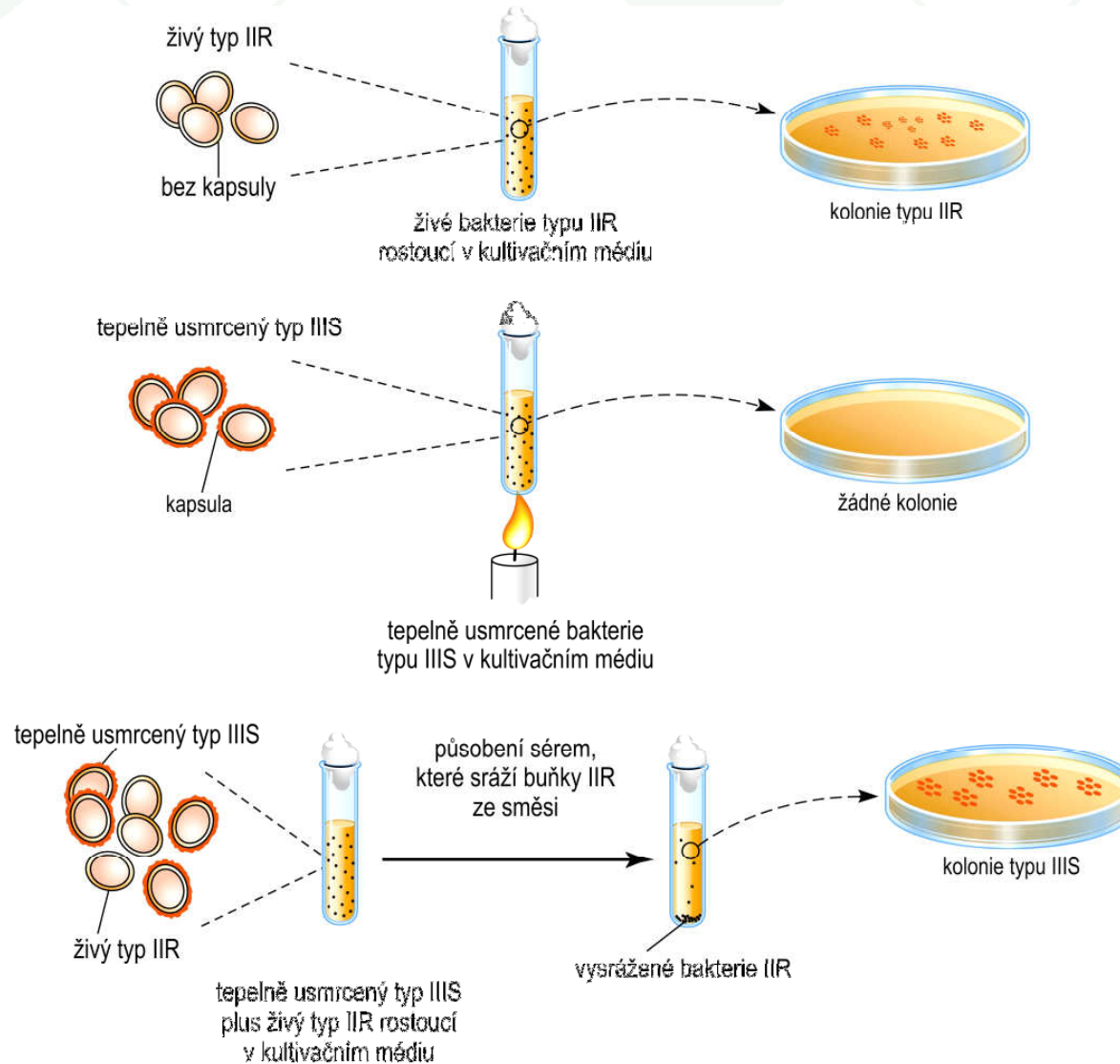


Lýze buňky, uvolnění
DNA, RNA a proteinů

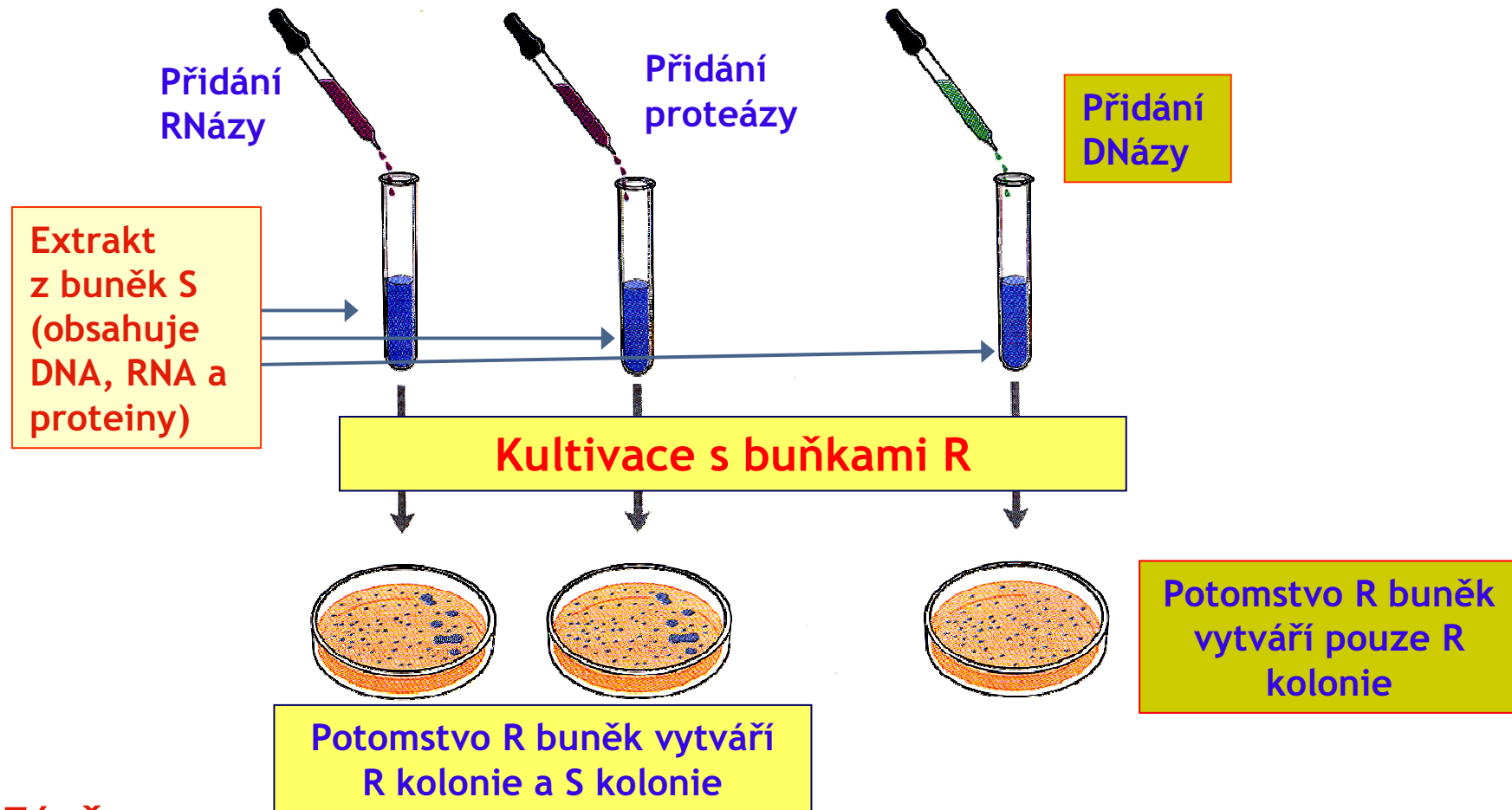


Začlenění přijaté DNA do
genomu recipientní buňky,
změna znaku (= transformace)

Důkaz transformace *S. pneumoniae* (Sia a Dawson, 1931)



Důkaz, že chemickou substancí zodpovědnou za transformaci buněk R na S je DNA (O. Avery, C. MacLeod, M. McCarty 1944)

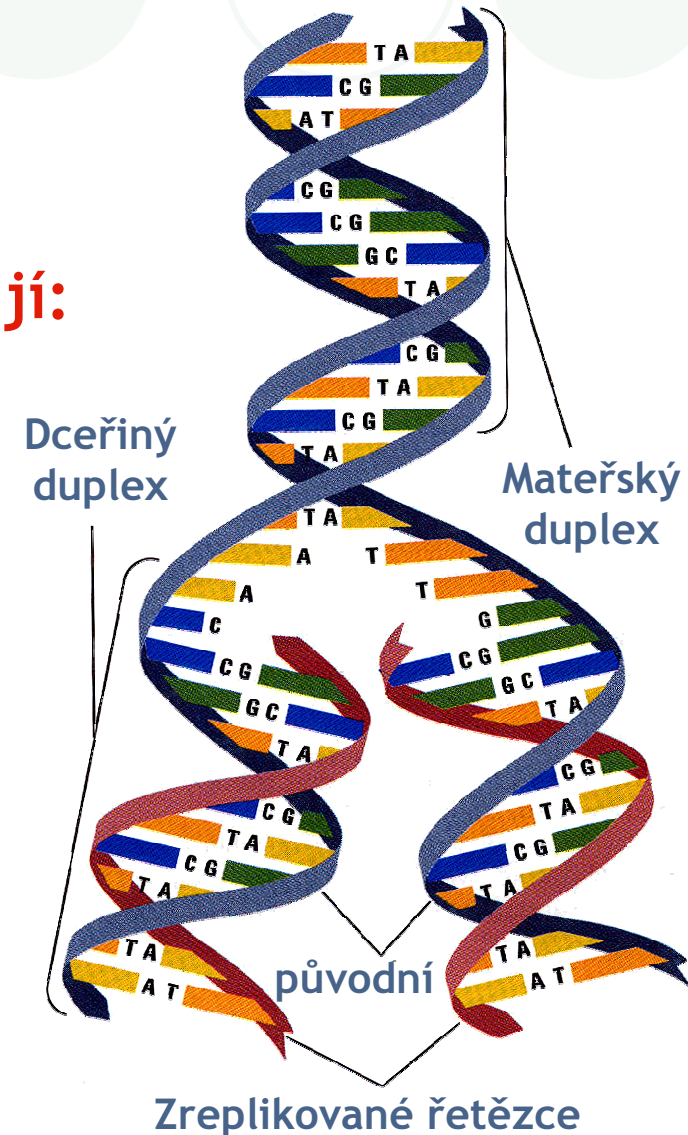


Závěr:
transformující aktivitu vykazuje pouze DNA, ne RNA nebo proteiny

Struktura DNA navržená Watsonem a Crickem (1953)

Vlastnosti struktury DNA umožňují:

1. Replikaci spočívající v párování komplementárních bází
2. Spontánní mutabilitu v důsledku tautomerie bází
3. Kódování genetické informace ve formě pořadí (sekvence) bází



Nukleové kyseliny

- **DNA - tvoří genom prokaryot, eukaryot a DNA-virů**
- nDNA - jaderná, gDNA - genomová, mtDNA - mitochondriová, ctDNA - chloroplastová, pDNA - plazmidová, recDNA - rekombinantní, rDNA - ribozomální,
- cDNA (copy DNA, complementary DNA) - komplementární;
- dsDNA - dvouřetězcová, ssDNA - jednořetězcová, cccDNA - kovalentně uzavřená kružnicová, ocDNA - otevřená kružnicová, linDNA - lineární
- A-DNA, B-DNA, Z-DNA - konformace ovlivněná sekvencí a prostředím
- **RNA - tvoří genom RNA-virů, u buněčných organismů je složkou ribozomů a plní různé funkce při přenosu a realizaci genetické informace**
- mRNA - mediátorová, hnRNA - heteronukleární, tRNA - transferová, rRNA - ribozomová, snRNA - malá jaderná, snoRNA - malá jadérková, scRNA - malá cytoplazmatická, gRNA - řídicí
- **Ribozymy: RNA s katalytickou funkcí (např. siRNA, miRNA)**

Složení nukleových kyselin

N-glykozidická vazba



● Nukleotid

- kyselina fosforečná
- pentóza
 - ribóza
 - deoxyribóza
- organická báze
 - purinové báze
 - adenin
 - guanin
 - pyrimidinové báze
 - cytozin
 - tymin
 - uracil

● Nukleozid = pentóza---org. báze

● Kys. deoxyribonukleová

- kys. fosforečná
- deoxyribóza
- adenin, guanin, cytozin, **tymin***

● Kys. ribonukleová

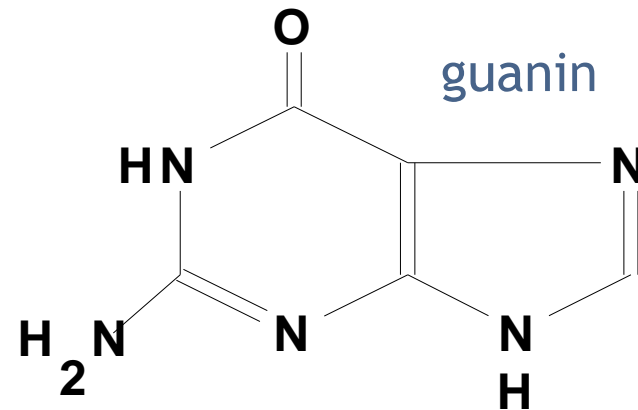
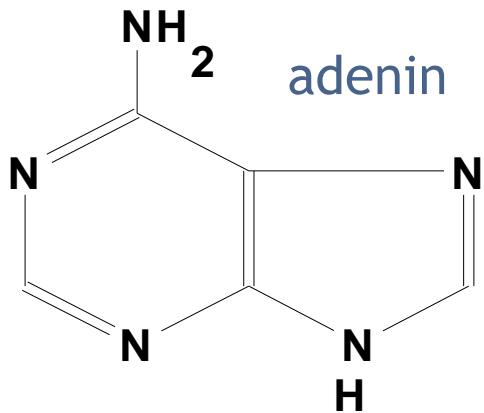
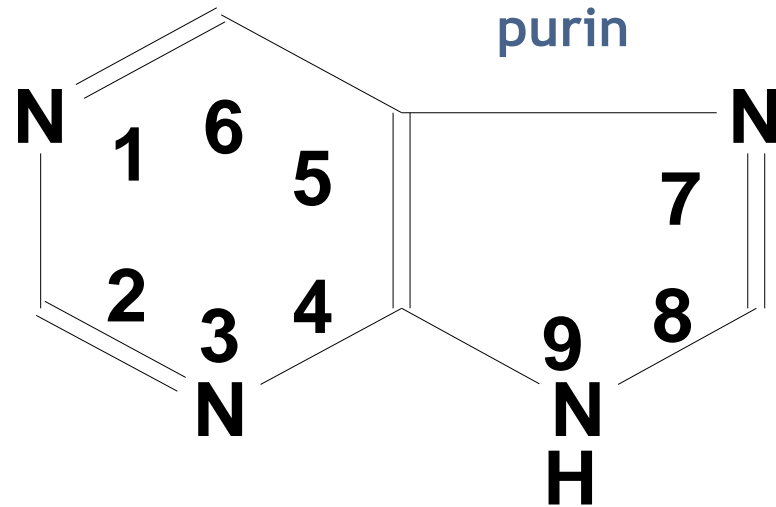
- kys. fosforečná
- ribóza
- adenin, guanin, cytozin, **uracil***

*modifikace bází (metylace, acetylace...)

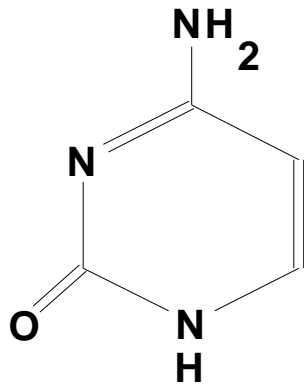
Organické báze

- Adenin = 6-aminopurin
- Guanin = 2-amino-6-oxopurin
- Cytozin = 4-amino-2-oxopyrimidin
- Tymin = 2,4-dioxo-5-metylpyrimidin
- Uracil = 2,4-dioxopyrimidin

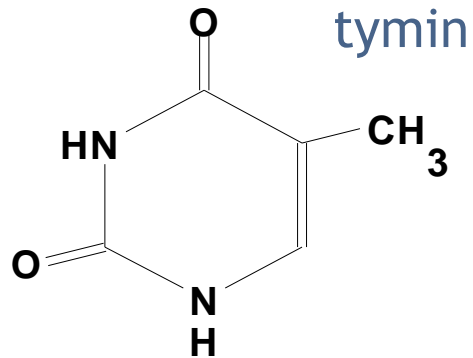
Purinové báze



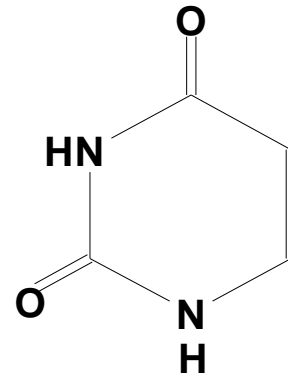
Pyrimidinové báze



cytozin

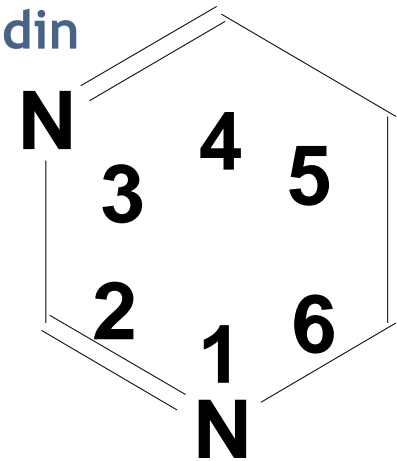


tymin



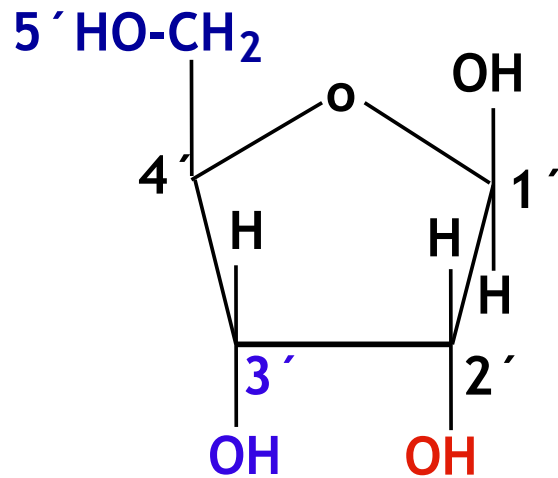
uracil

pyrimidin



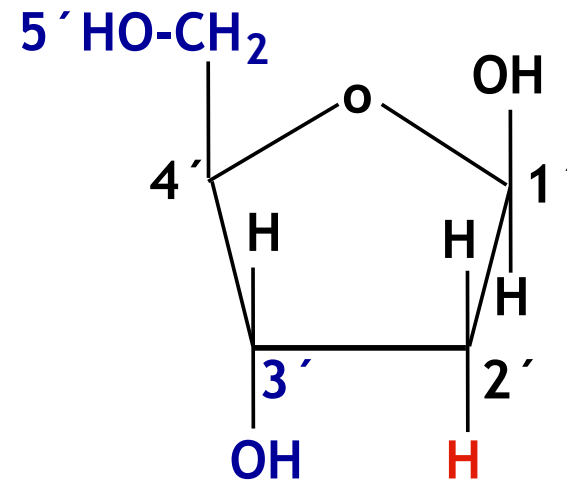
Pentózy nukleových kyselin

RNA



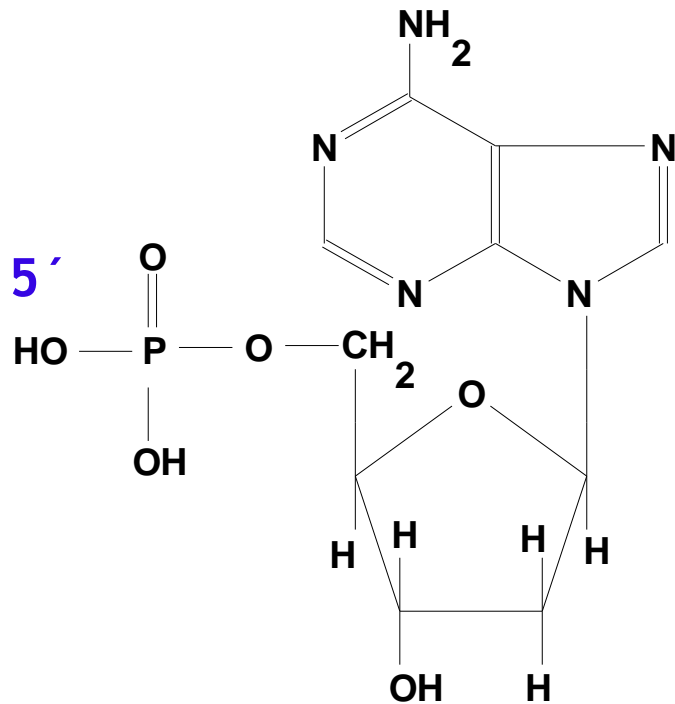
β -D-ribóza
 β -D-ribofuranóza

DNA

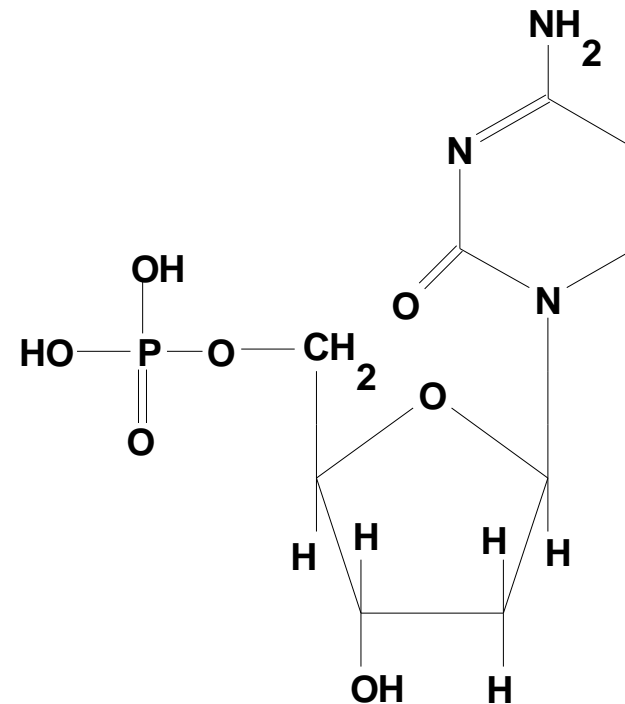


β -D-2-deoxyribóza
2-deoxy- β -D-ribofuranóza

Nukleotidy (nomenklatura)



2'-deoxyadenozin-5'-monofosfát



2'-deoxycytidin-5'-monofosfát

↙ -difosfát, -trifosfát

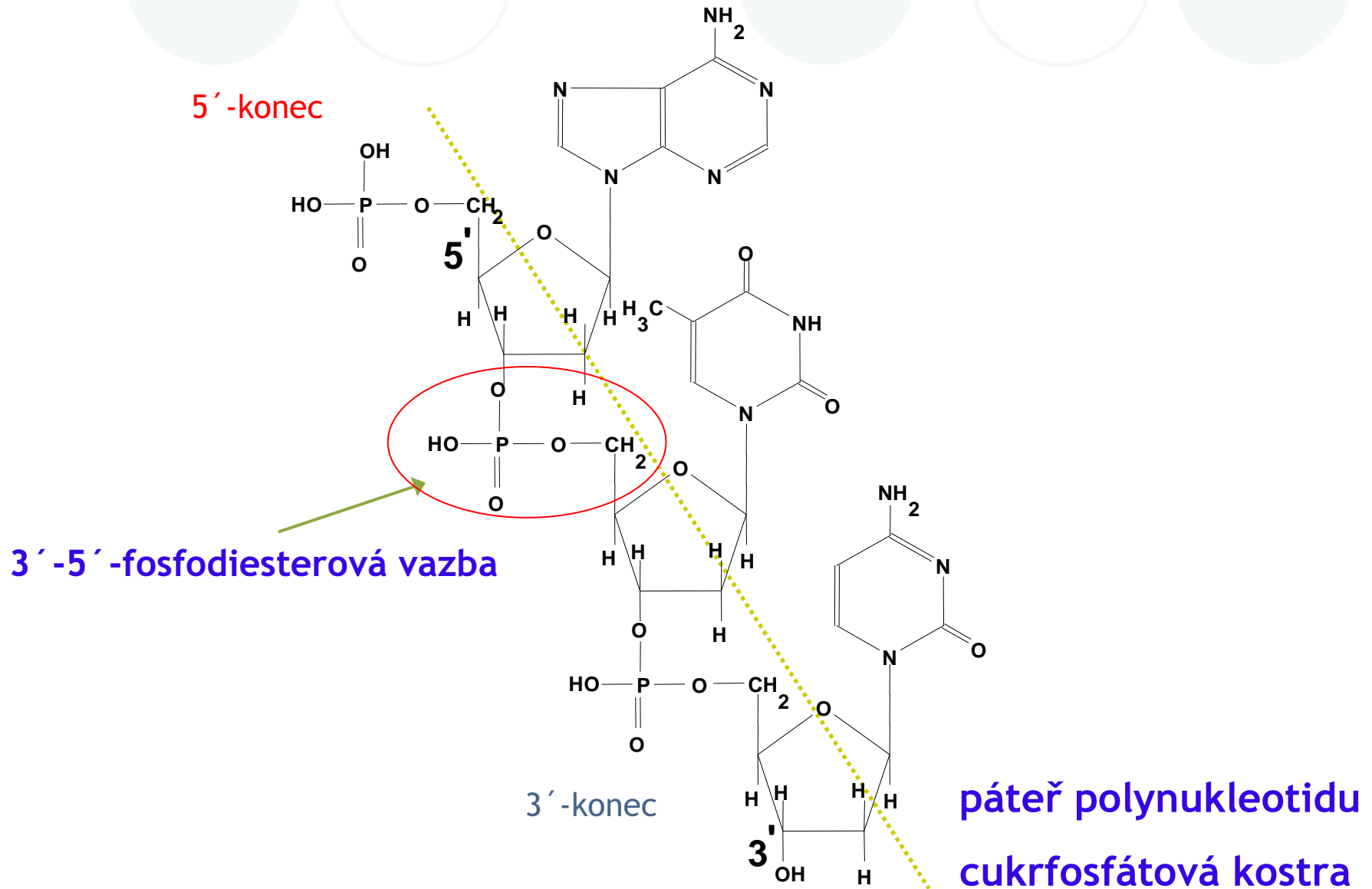
ATP, GTP

Polynukleotidový řetězec



- Významné strukturní rysy:
 - 5' - a 3' - konec polynukleotidového řetězce
 - Páteř polynukleotidu (pentózafosfátová kostra, cukr-fosfátová kostra)
 - prodlužování polynukleotidového řetězce - ***probíhá vždy ve směru 5' - 3'***

Část polynukleotidového řetězce DNA



Strukturní úrovně DNA

- Polydeoxyribonukleotidový řetězec → primární struktura
- dvoušroubovice DNA → sekundární struktura
- ↓ nadšroubovicové vinutí
- nadšroubovice DNA superhelix → terciární struktura
- nadšroubovice kružnicová nebo lineární → ^{*}relaxovaná DNA

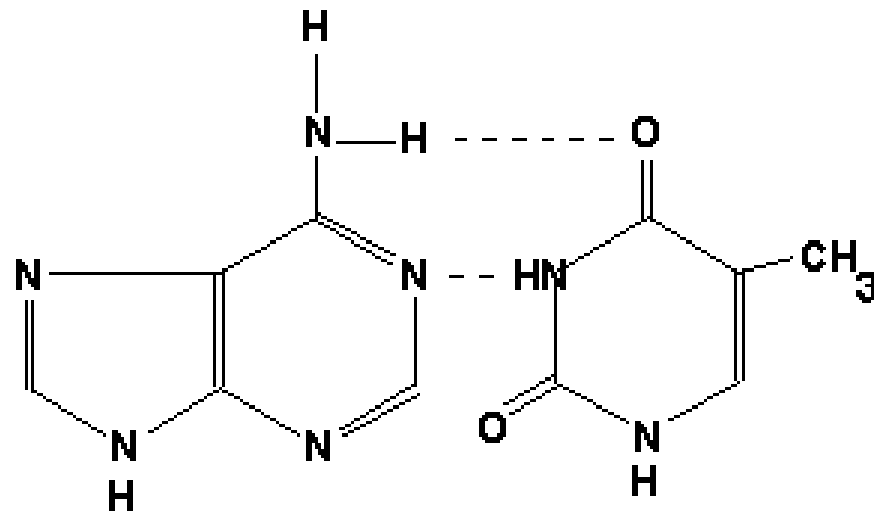
*zrušení nadšroubovicového vinutí

Párování bází

párování bází = spojování protilehlých bází
vodíkovými vazbami

- a) mezi dvěma řetězci = **duplex**
- b) mezi třemi řetězci = **triplex**
- c) mezi čtyřmi řetězci = **kvadruplex**

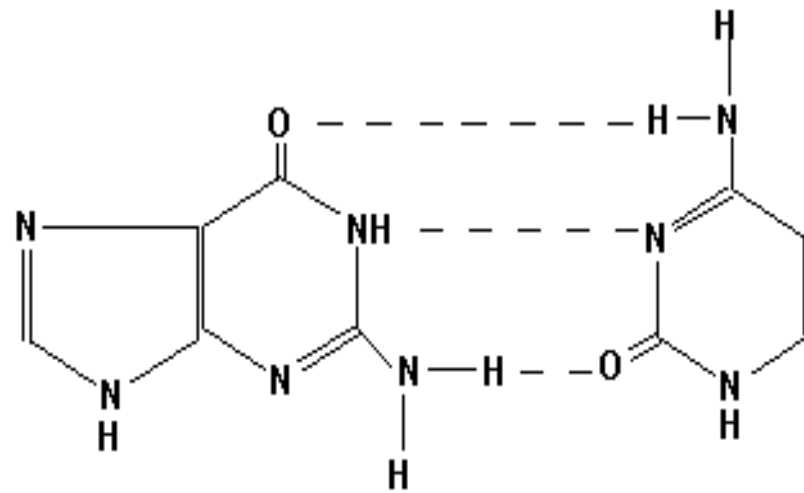
Watsonovo-Crickovo párování bází



adenin
(aminoforma)

tymin
(ketoforma)

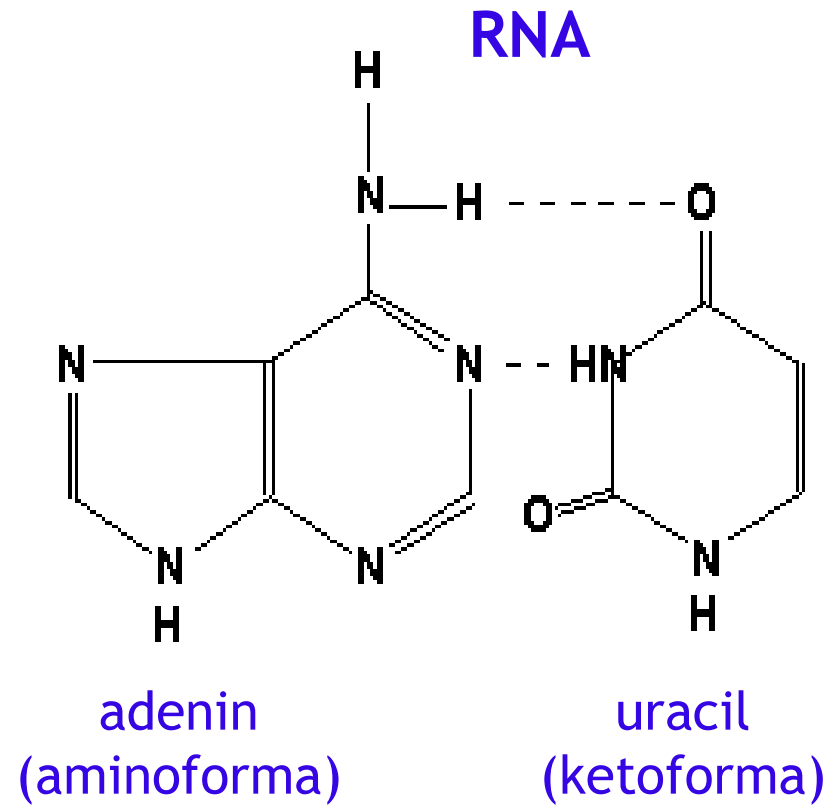
Watsonovo-Crickovo párování bází



guanin
(ketoforma)

cytozin
(aminoforma)

Watsonovo-Crickovo párování bází



Charakteristika dsDNA

1. společná osa
2. komplementarita řetězců
3. vnitřní část tvoří báze AT a GC
4. páteř - osa = 1nm
5. antiparalelizmus = směr fosfodiesterových vazeb 5'-3' a 3'-5'
6. Chargaffovo pravidlo

$$\frac{A+G}{T+C} = 1 \quad \frac{G+C}{A+T} \text{ je různý}$$
7. planární charakter bází
8. menší a větší žlábek = místa vazby proteinů k DNA. Vazby jsou vodíkové

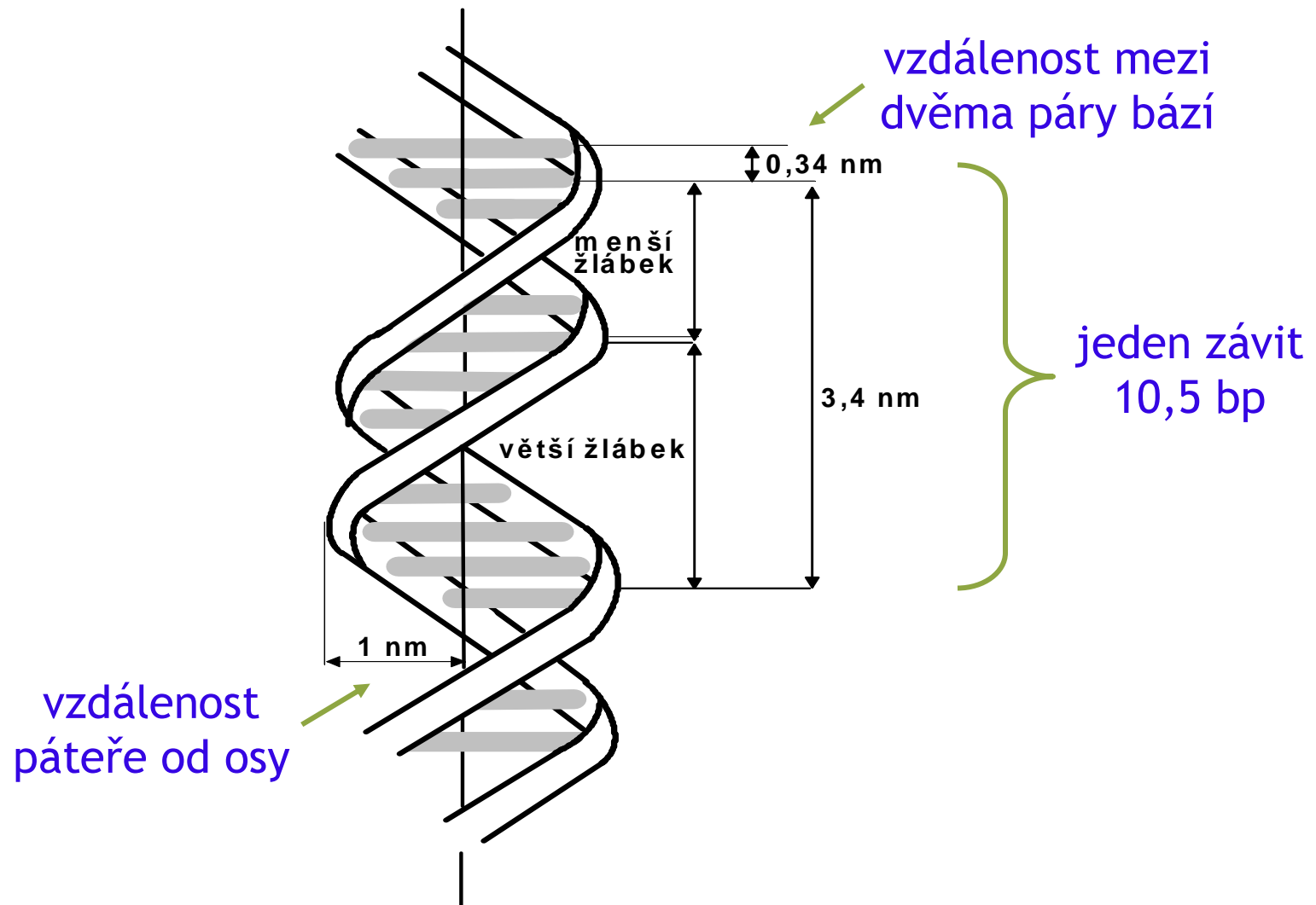


puriny
 pyrimidiny

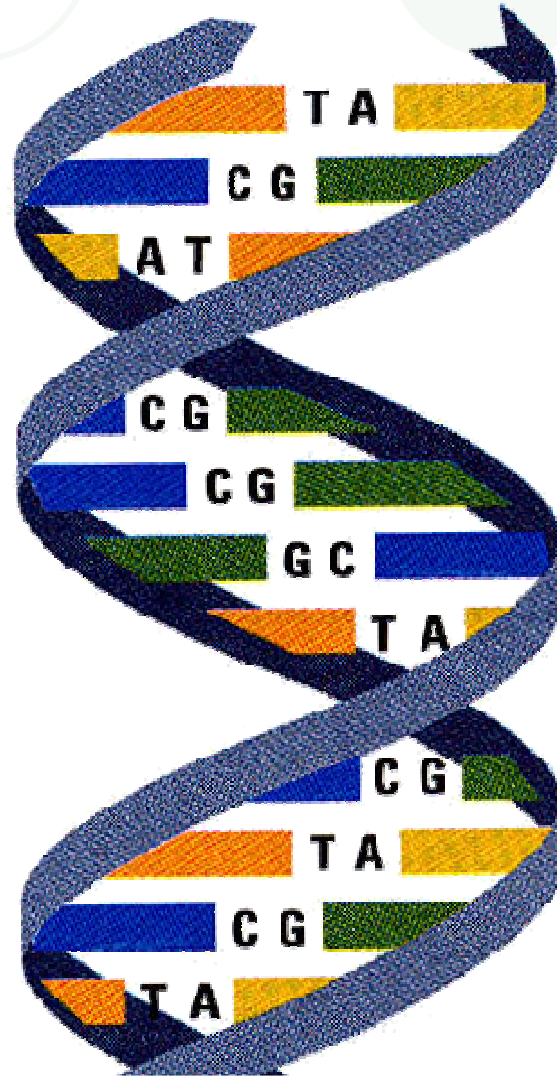
$$\frac{3+9}{3+9} = \frac{12}{12} = 1$$

$$\frac{9+9}{3+3} = \frac{18}{6} \text{ je různý } (\%GC)$$

Sekundární struktura DNA (schéma dvoušroubovicové DNA - konformace B)



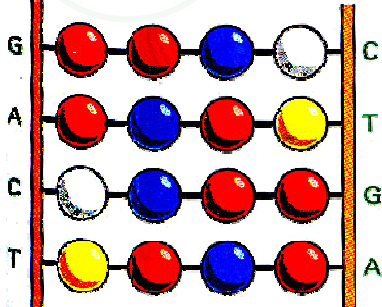
Velký a malý žlábek na dsDNA



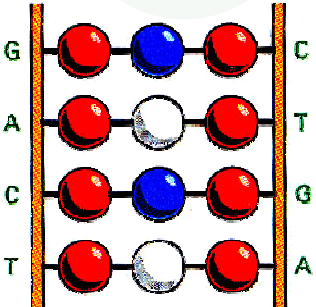
velký žlábek

malý žlábek

Rekogniční kód DNA

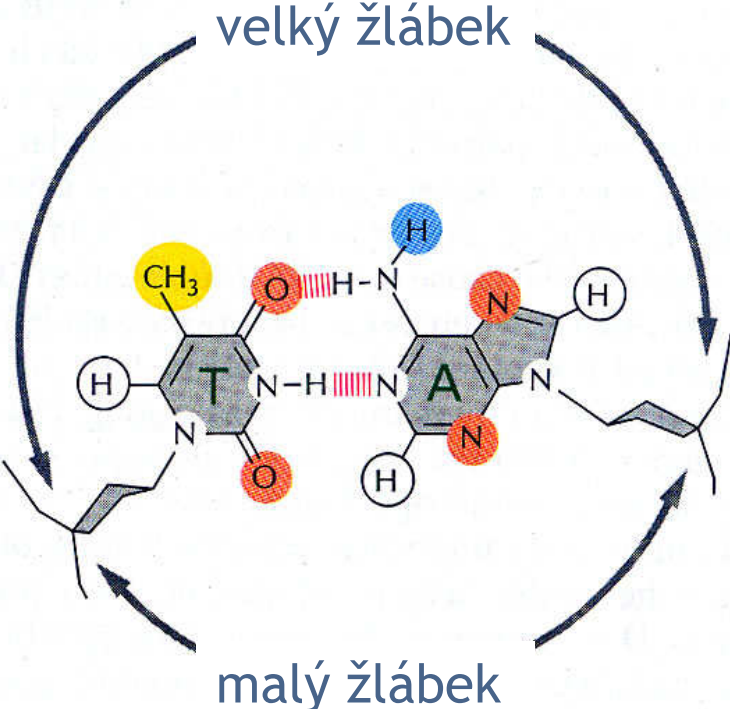


velký žlábek

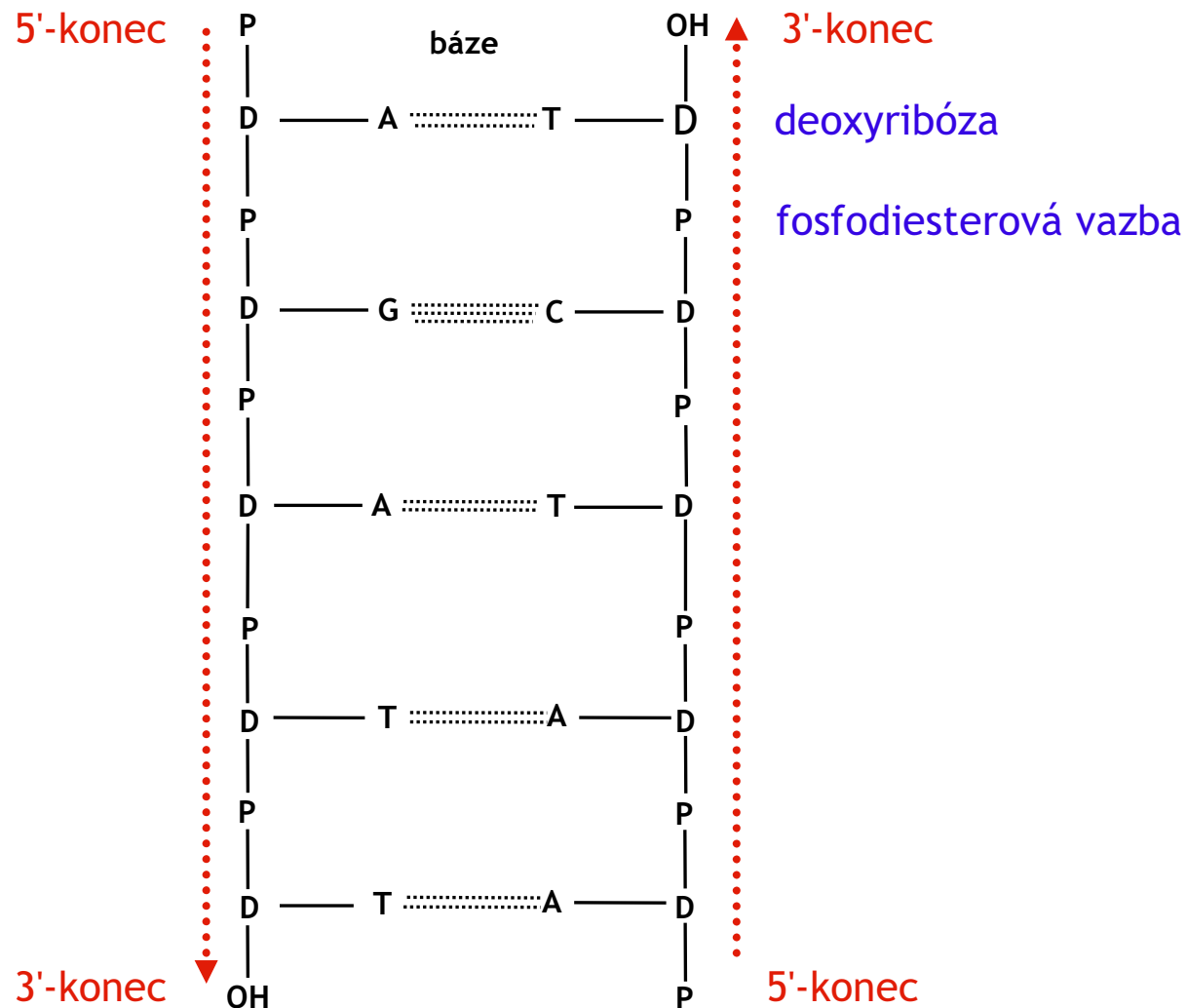


malý žlábek

- KEY:
- = H-bond acceptor
 - = H-bond donor
 - = hydrogen atom
 - = methyl group



Antiparalelismus komplementárních řetězců DNA = opačný směr fosfodiesterových vazeb

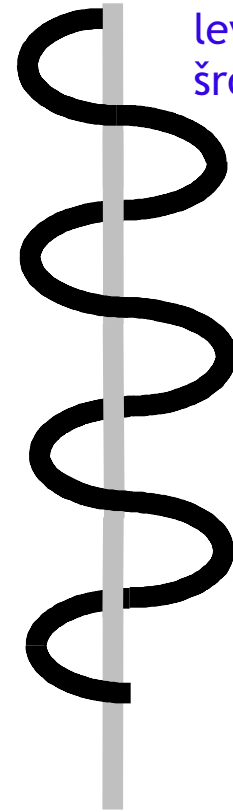


Vinutí dvoušroubovice DNA

- **Vinutí** = mnohonásobné otáčení jednoho řetězce kolem druhého
- Vinutí může být **pravotočivé** nebo **levotočivé**

Vinutí dvoušroubovice DNA

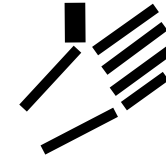
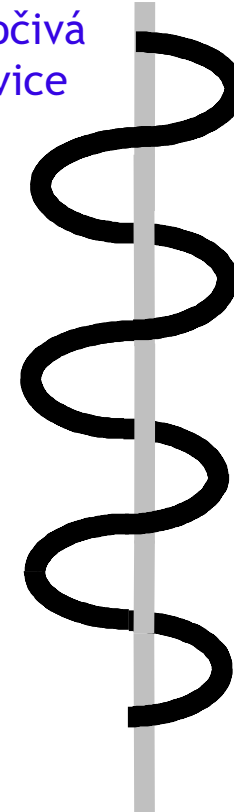
Levotočivé a pravotočivé
vinutí šroubovice



levotočivá
šroubovice



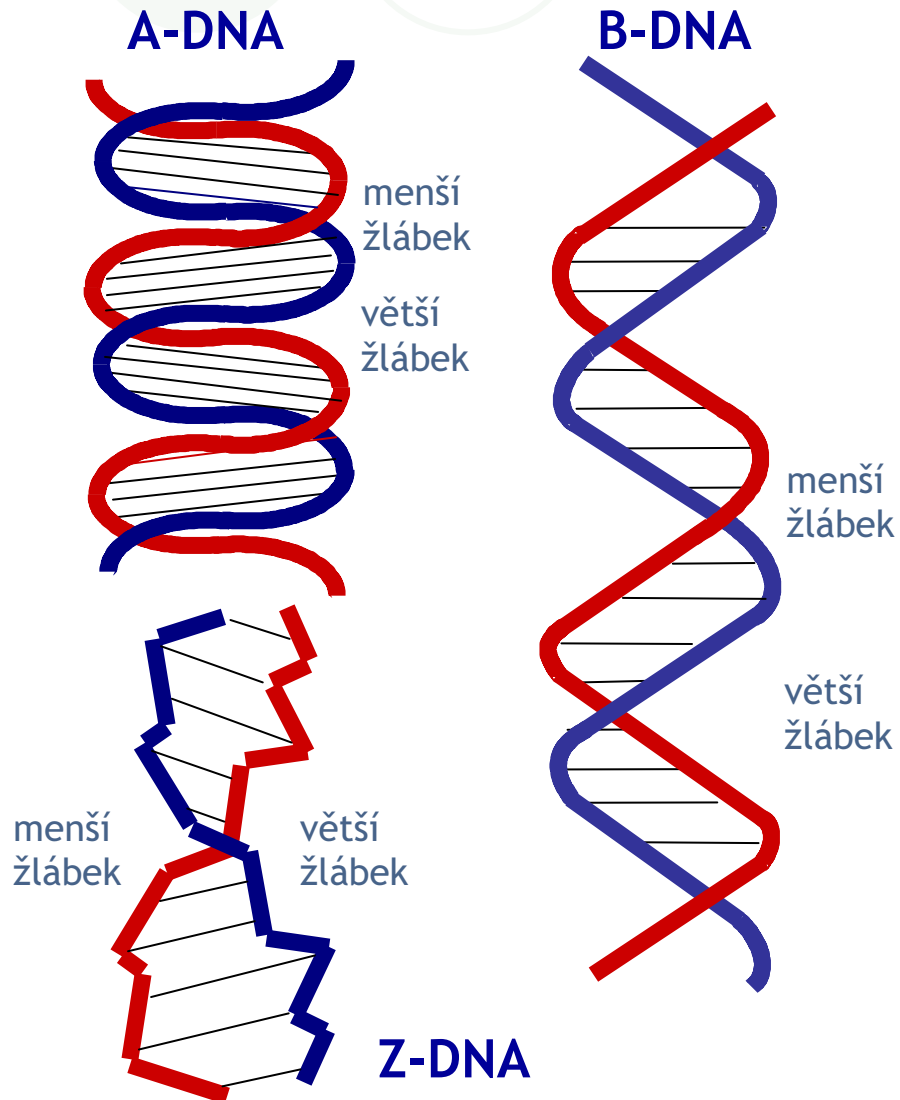
pravotočivá
šroubovice



Konformace dvouřetězcové DNA (RNA)

- **Konformace** = prostorové uspořádání biomakromolekuly do struktury, která je za daných podmínek energeticky nejvýhodnější
- **Konformace DNA závisí na:**
 - nukleotidové sekvenci
 - obsahu vody v prostředí
 - iontové síle prostředí

Konformace dsDNA



A, B = pravotočivá

A-DNA

- dsDNA při vysoké konc. solí nebo dehydrataci
- dsRNA, DNA/RNA hybrid,

Z-DNA

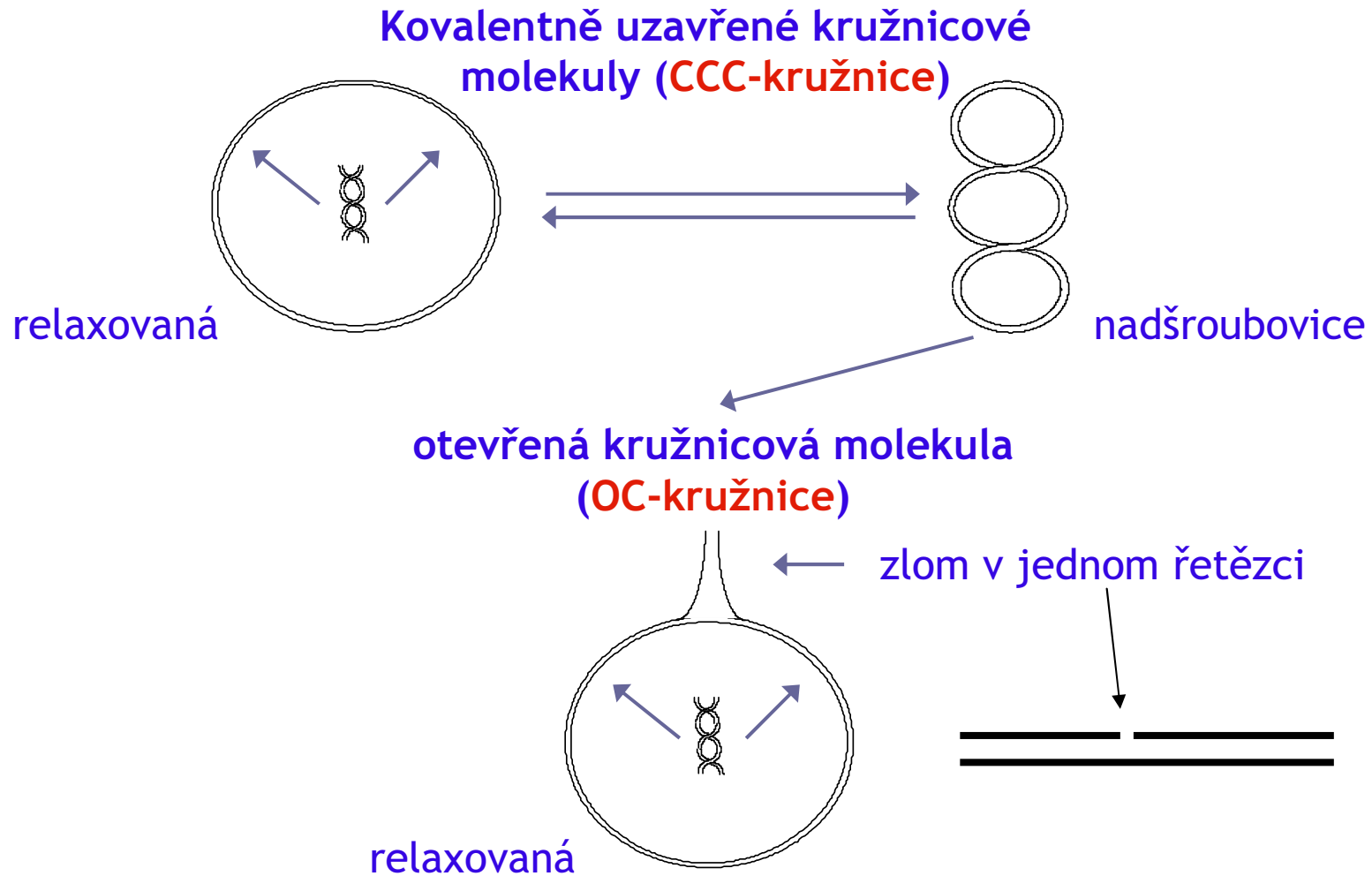
- vysoké konc. solí
- úseky obsahující (GC)_n nebo (GT)_n

Z = levotočivá

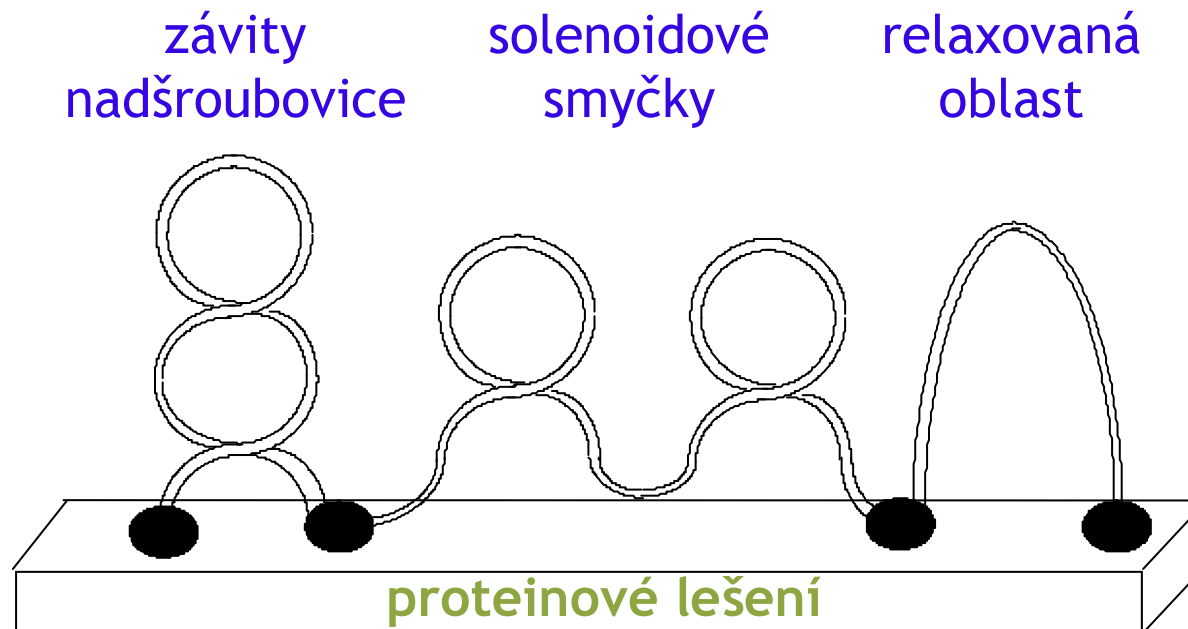
Terciární struktura DNA

- **Terciární struktura dsDNA** = nadšroubovice
- Vzniká zavedením dalšího vinutí (záporného nebo kladného) do dvoušroubovice.
- Nadšroubovice se může vytvářet jak z relaxované uzavřené kružnicové DNA, tak i z lineární DNA
- Záporné vinutí vzniká odvinováním dvoušroubovice (ubíráním závitů), kladné vinutí jejím svinováním (přidáváním závitů).

Konformace dvouřetězcových kružnicových molekul DNA

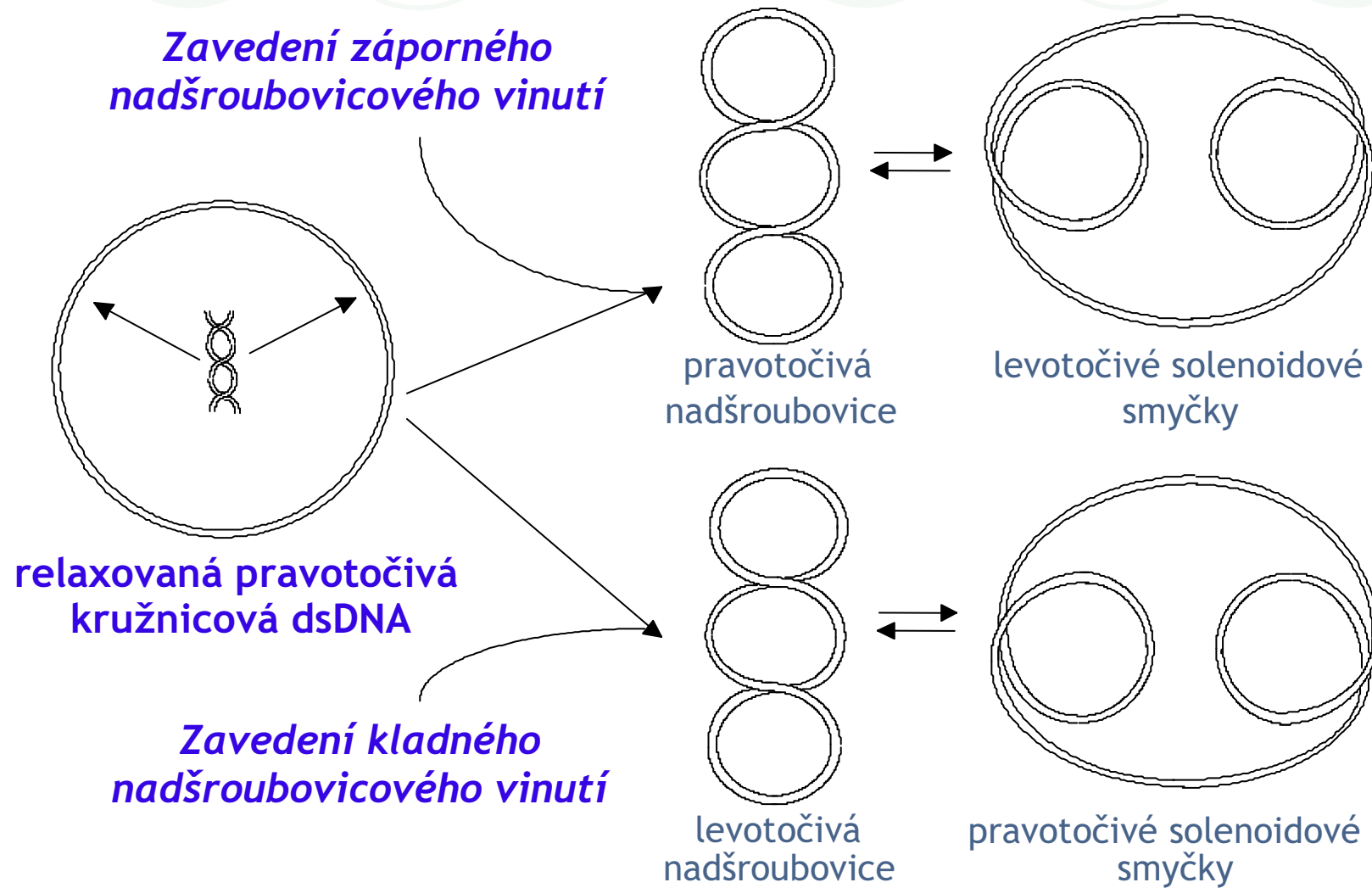


Nadšroubovicové a relaxované oblasti v lineární dvouřetězcové DNA

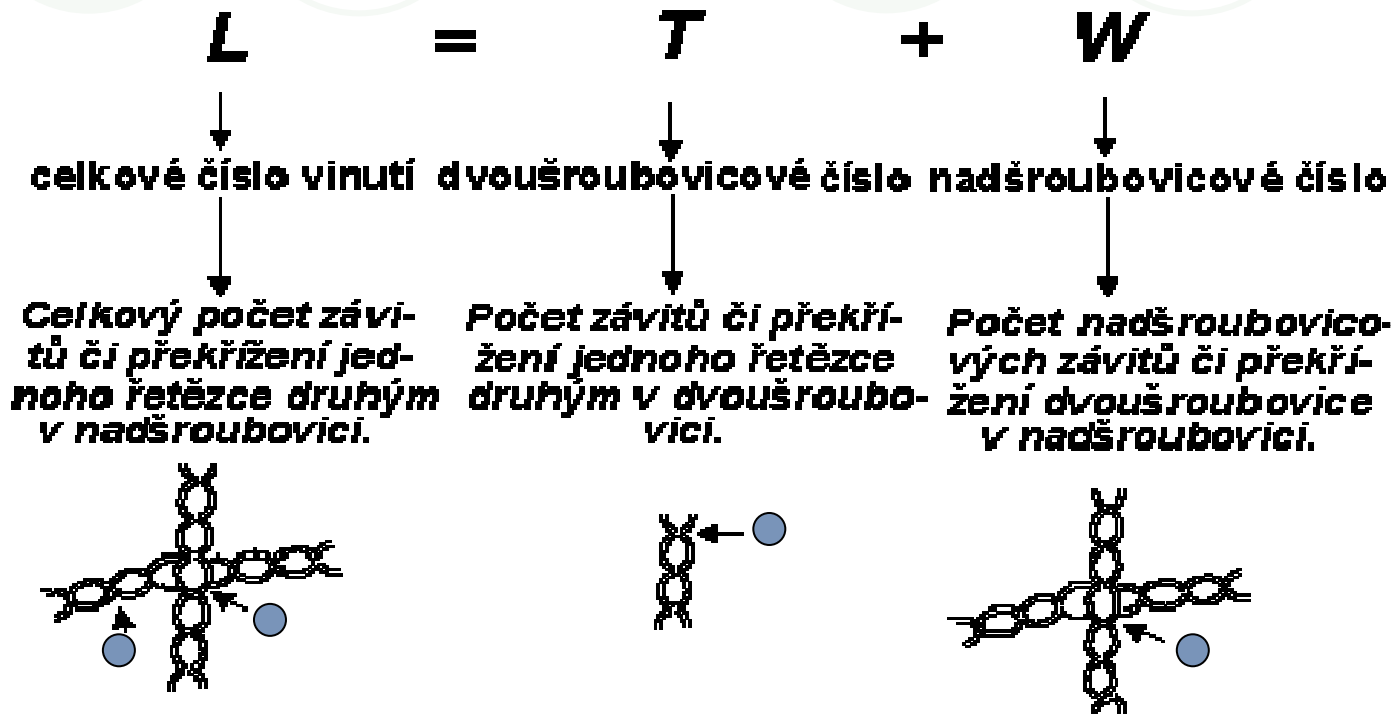


Eukaryotická DNA, která je lineární a dvouřetězcová, se váže k proteinovému lešení. Tvoří se v ní závity nadšroubovice, solenoidové smyčky a také relaxované oblasti.

Přechod relaxované DNA do nadšroubovicové



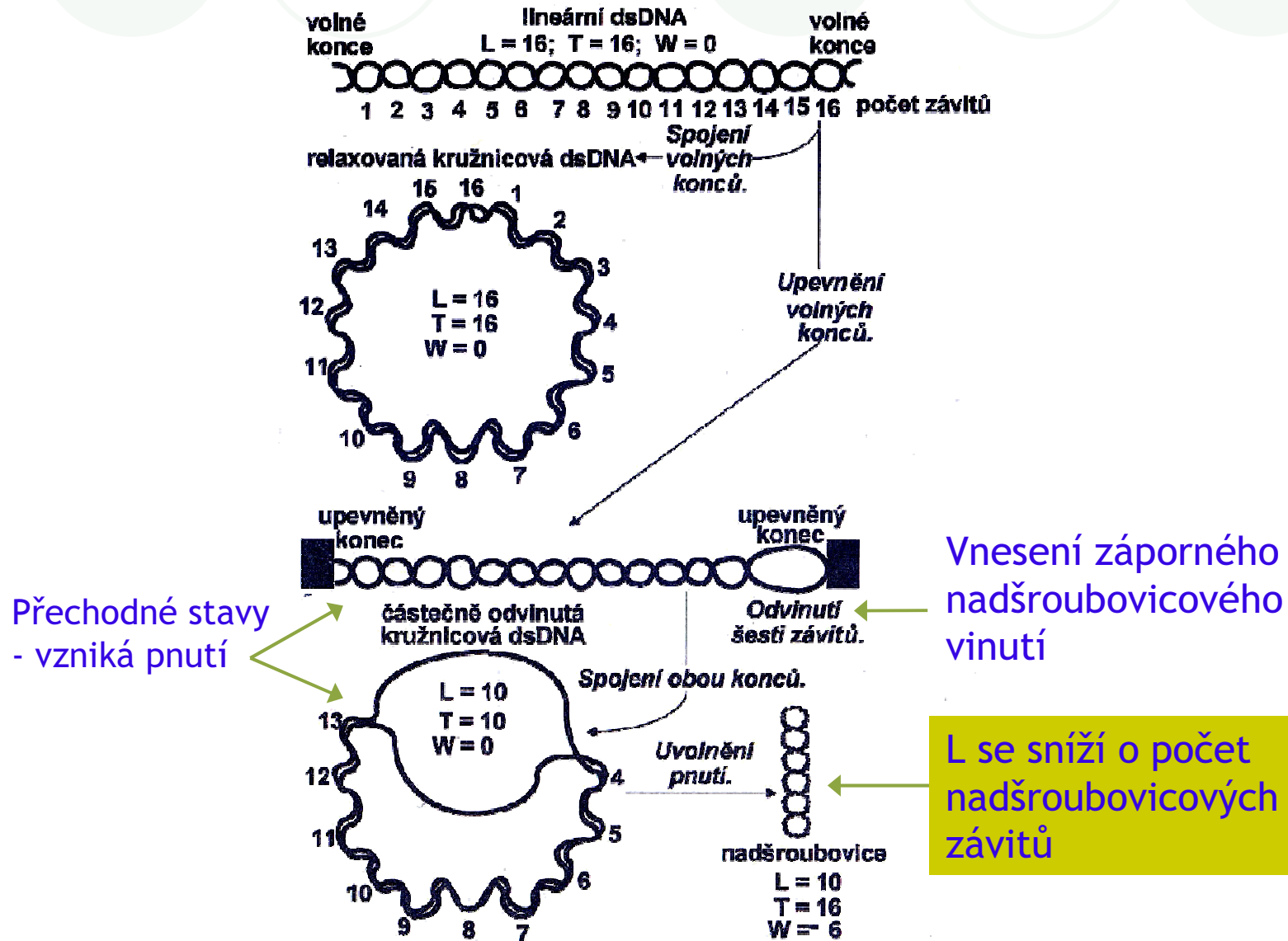
Parametry nadšroubovice



T a L jsou kladná čísla

W je záporné, když vyjadřuje počet záporných nadšroubovicových závitů, nebo kladné, jestliže vyjadřuje počet kladných nadšroubovicových závitů

Příklad vztahů mezi veličinami L, T a W



Přechod relaxované uzavřené dsDNA do nadšroubovice nebo toroidní (solenoidní) dsDNA

Uzavřená relaxovaná pravotočivá dsDNA

- Zavedení záporného nadšroubovicového vinutí. Ubírání závitů (odvinování).
- Zavedení kladného nadšroubovicového vinutí. Přidávání závitů (svinování, překrucování).



Záporná nadšroubovice

- Má záporné vinutí.
- Je pravotočivá.
- Proti relaxované dsDNA má nižší hodnotu L.

$$L < L_0$$



levotočivá

toroidní (solenoidní) dsDNA



Kladná nadšroubovice

- Má kladné vinutí.
- Je levotočivá.
- Proti relaxované dsDNA má vyšší hodnotu L.

$$L > L_0$$



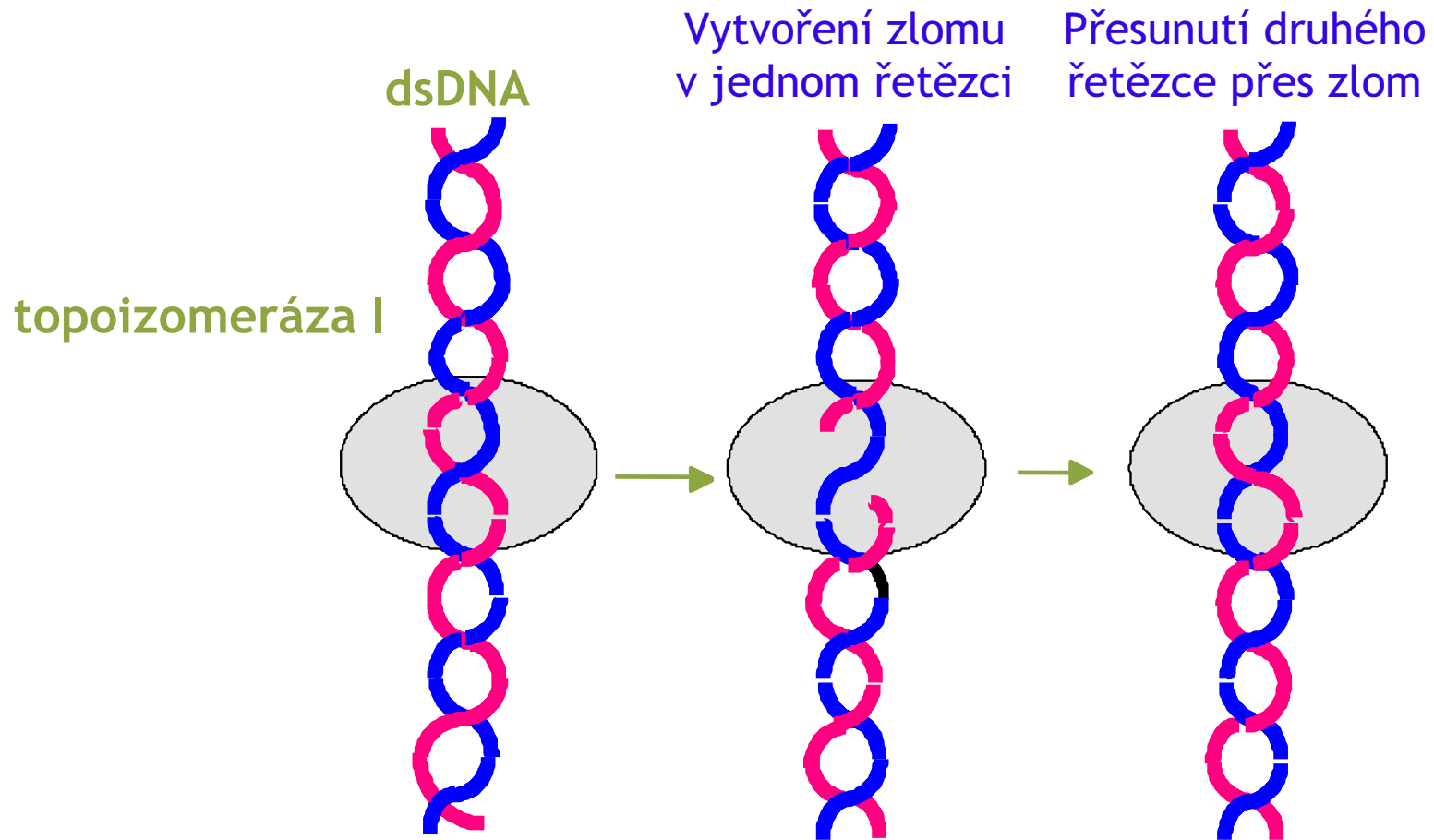
pravotočivá

toroidní (solenoidní) dsDNA

L = celkové číslo vinutí po svinování nebo odvinování

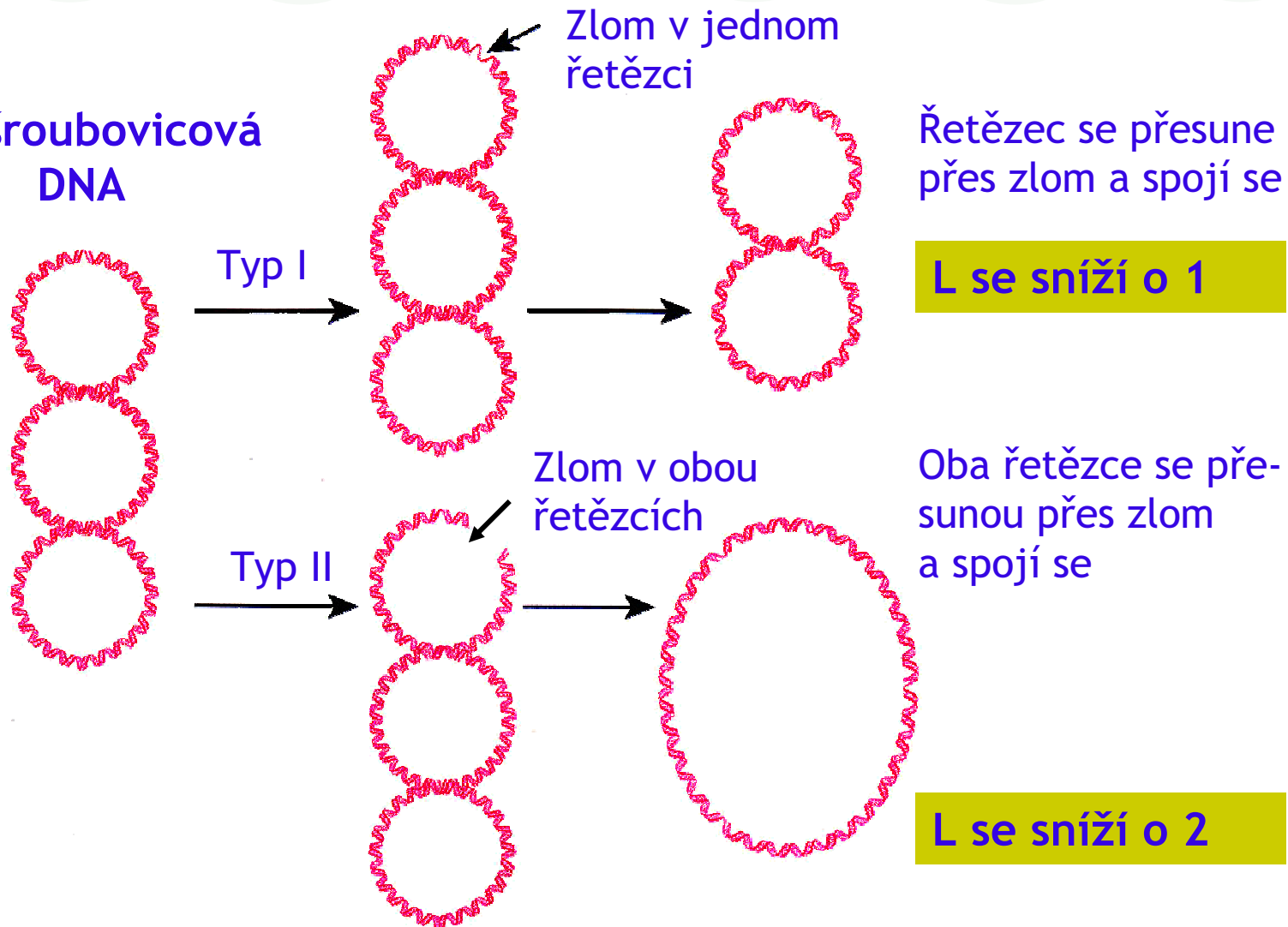
L_0 = celkové číslo vinutí před svinováním nebo odvinováním

Účinek topoisomerázy I



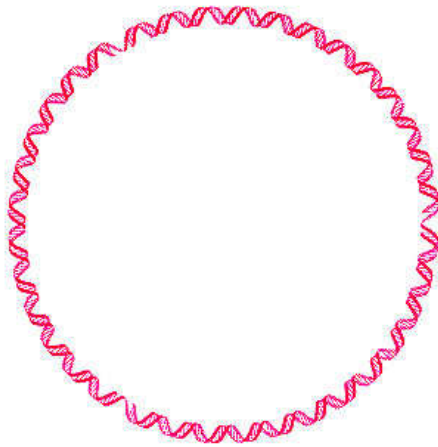
Mechanismus účinku topoizomeráz I a II typu

Nadšroubovicová
DNA

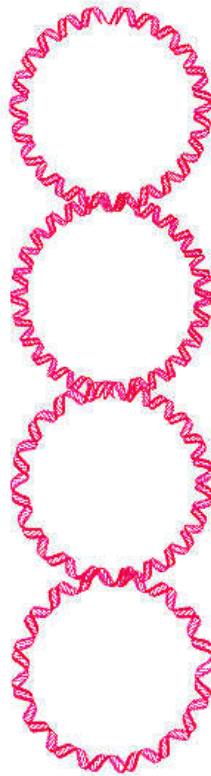


Nadšroubovicové uspořádání dsDNA

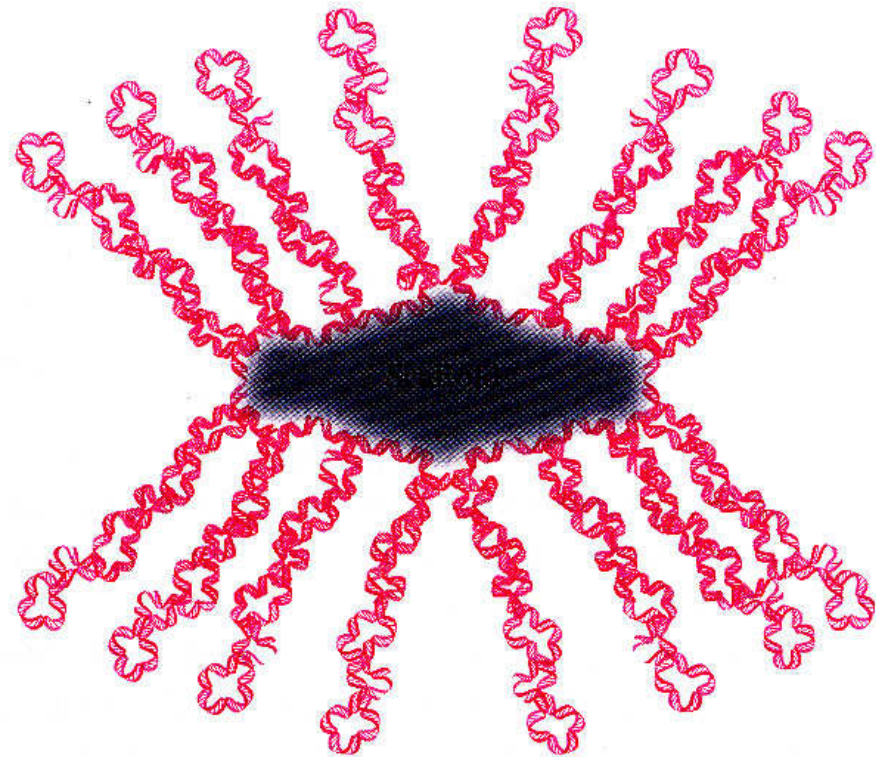
Kružnicová uzavřená
DNA (relaxovaná)



Nadšroubovicová
DNA (negativní)



Nadšroubovicové uspořádání
DNA - bakteriální chromozom



Typy sekvencí zodpovědné za vznik alternativních struktur

- Jedinečná DNA sekvence:AATGCTGATGTCTGACTCGGA...
- Repetitivní (opakující se) sekvence neboli repetice

(jednotka repetice, délka jednotky repetice, četnost repetice).

ATG...ATG...ATG...ATG...

(jednotka = ATG, délka = 3 nukleotidy, četnost = 4x)

- Tandemová repetice ..ATGCATGCATGC..
- Přímá repetice (5'ATGC....ATGC....3') opakuje se na témže řetězci ve stejném směru (5' → 3')

Obrácená repetice (opakuje se na druhém řetězci v obráceném směru - potenciál pro vytvoření vlásenky nebo vlásenky se smyčkou)

5' ...ATGCGCAT...3' palindrom (vlásenka)
3' ...TACGCGTA...5' (madam; Karla zamazal rak, tahat)

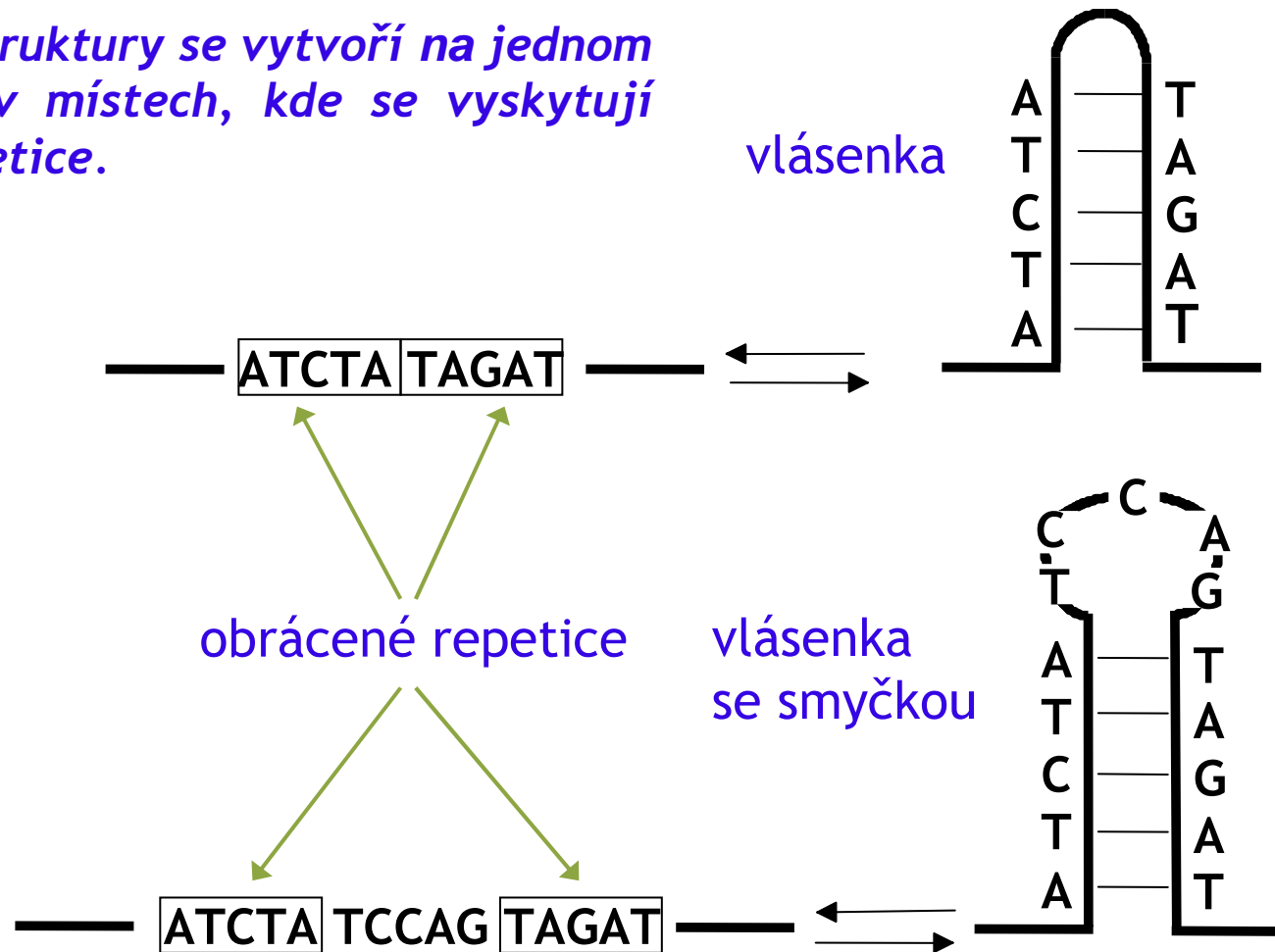
5' ...ATGCXXXXGCAT...3' vlásenka se smyčkou
3' ...TACGYYYYYCGTA...5' (na dsDNA vzniká křížová struktura)

● Dlouhá koncová repetice (sekvence LTR)

5' -ATGC...GCAT.....ATGC...GCAT-3'
3' -TACG...CGTA.....TACG...CGTA-5'

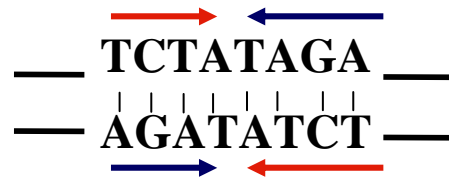
Schéma vlásenkových struktur DNA (RNA)

Vlásenkové struktury se vytvoří na jednom řetězci DNA v místech, kde se vyskytují obrácené repetice.

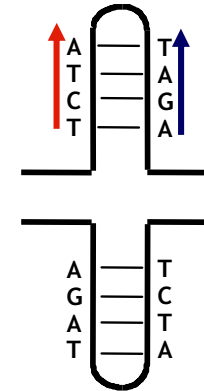


Vznik křížových struktur

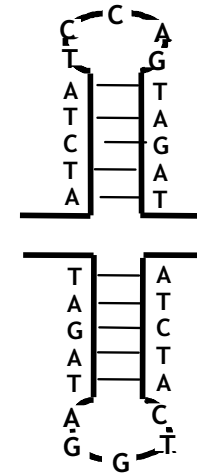
křížová struktura bez smyčky



palindrom



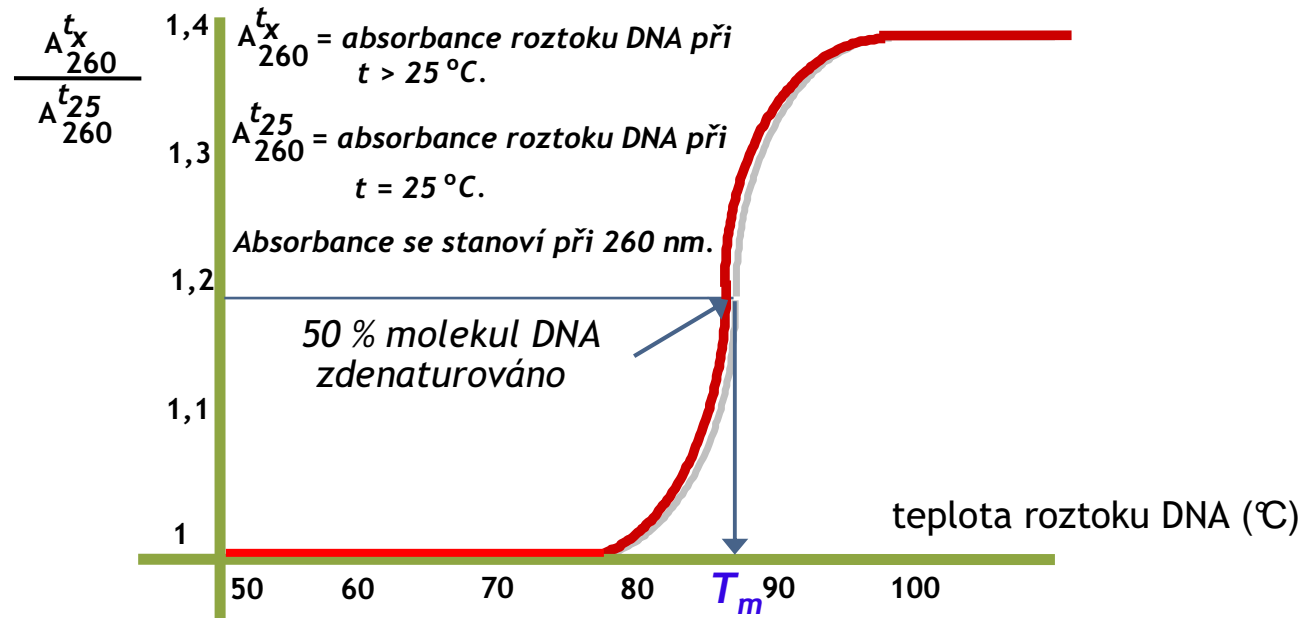
křížová struktura se smyčkou



Denaturace a renaturace dsDNA

- denaturace dsDNA = přechod dsDNA na ssDNA, opačný pochod = renaturace
- k denaturaci dsDNA dochází zvyšováním teploty roztoku, k renaturaci snižováním teploty (nebo změnou pH prostředí z neutrální hodnoty na alkalickou nebo kyselou)
- denaturace dsDNA se projevuje **hyperchromním efektem**, tj. zvýšením absorpance UV-světla o vlnové délce 260 nm.
- **hodnota T_m** nebo-li **teplota tání** = teplota, při které zdenaturovalo 50% molekul dsDNA

Denaturační křivka dsDNA



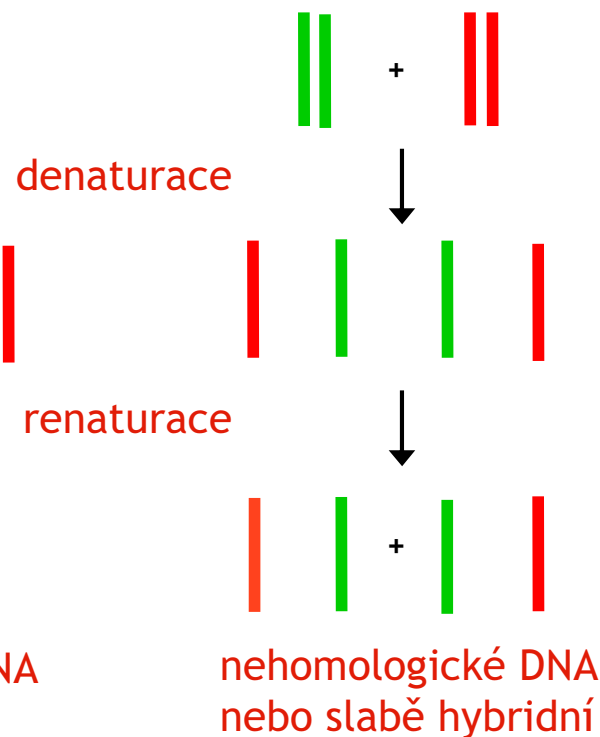
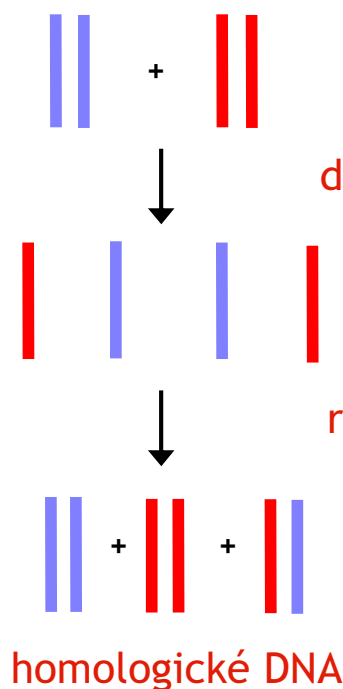
V definovaném roztoku např. platí, že $T_m = 69,3 + 0,41 (GC)$.

$$\text{Odtud } GC = \frac{T_m - 69,3}{0,41}.$$

GC = molární podíl guaninu a cytozinu v DNA,
 69,3 a 0,41 jsou empiricky stanovené koeficienty;
 pro poly(AT) $T_m = 69,3$.

Denaturace, renaturace a hybridizace molekul dsDNA

molekuly dsDNA



Čím více se hybridizované molekuly shodují v sekvencích neboli čím vyšší je jejich sekvenční homologie, tím je větší pravděpodobnost jejich hybridizace.

