

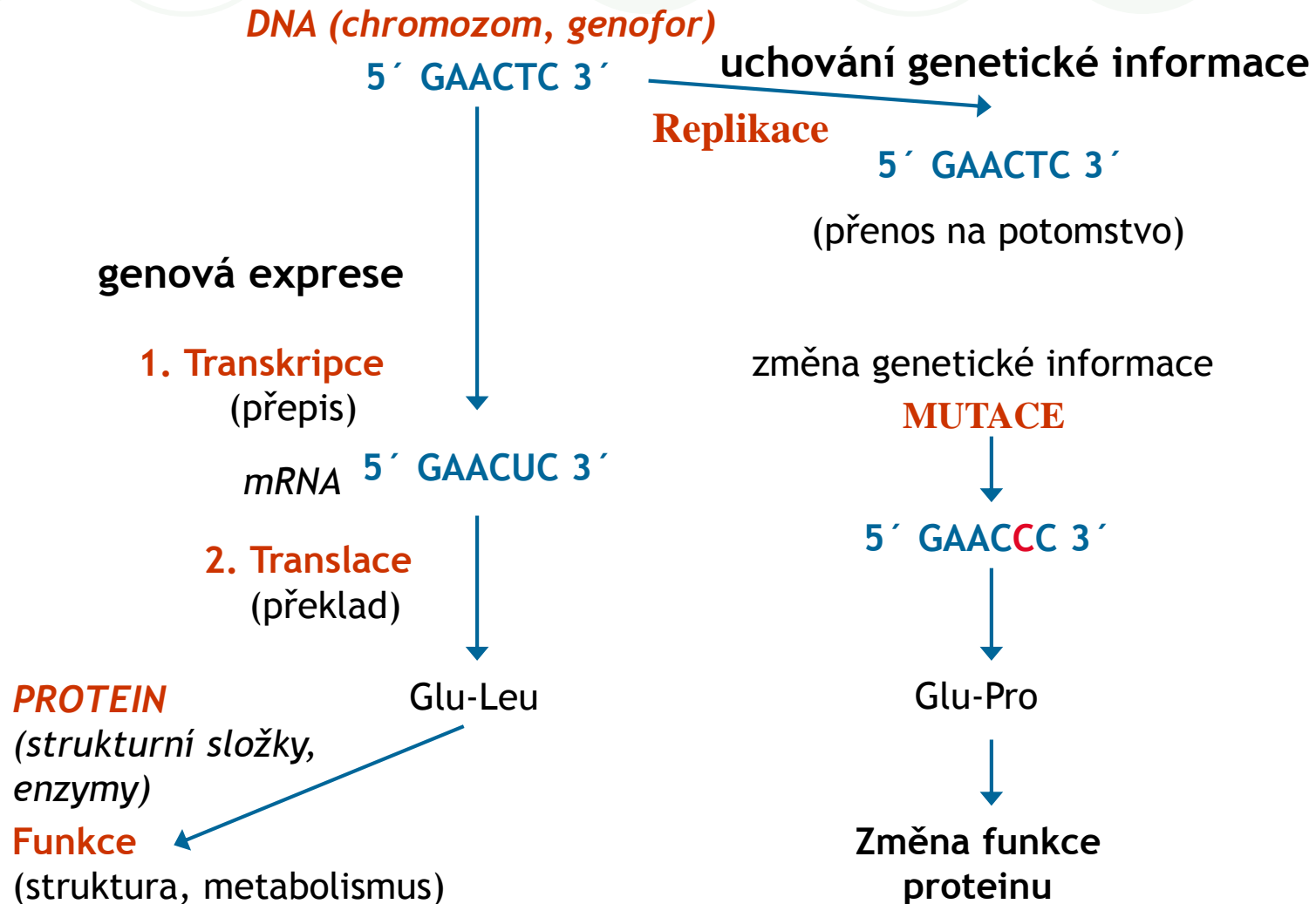
Základní pojmy molekulární genetiky

- genetická informace, gen, genetický kód
- **Struktura a informační obsah genomů**
 - prokaryotický genom
 - eukaryotický genom (jaderný, mitochondriový, chloroplastový)
 - virový genom

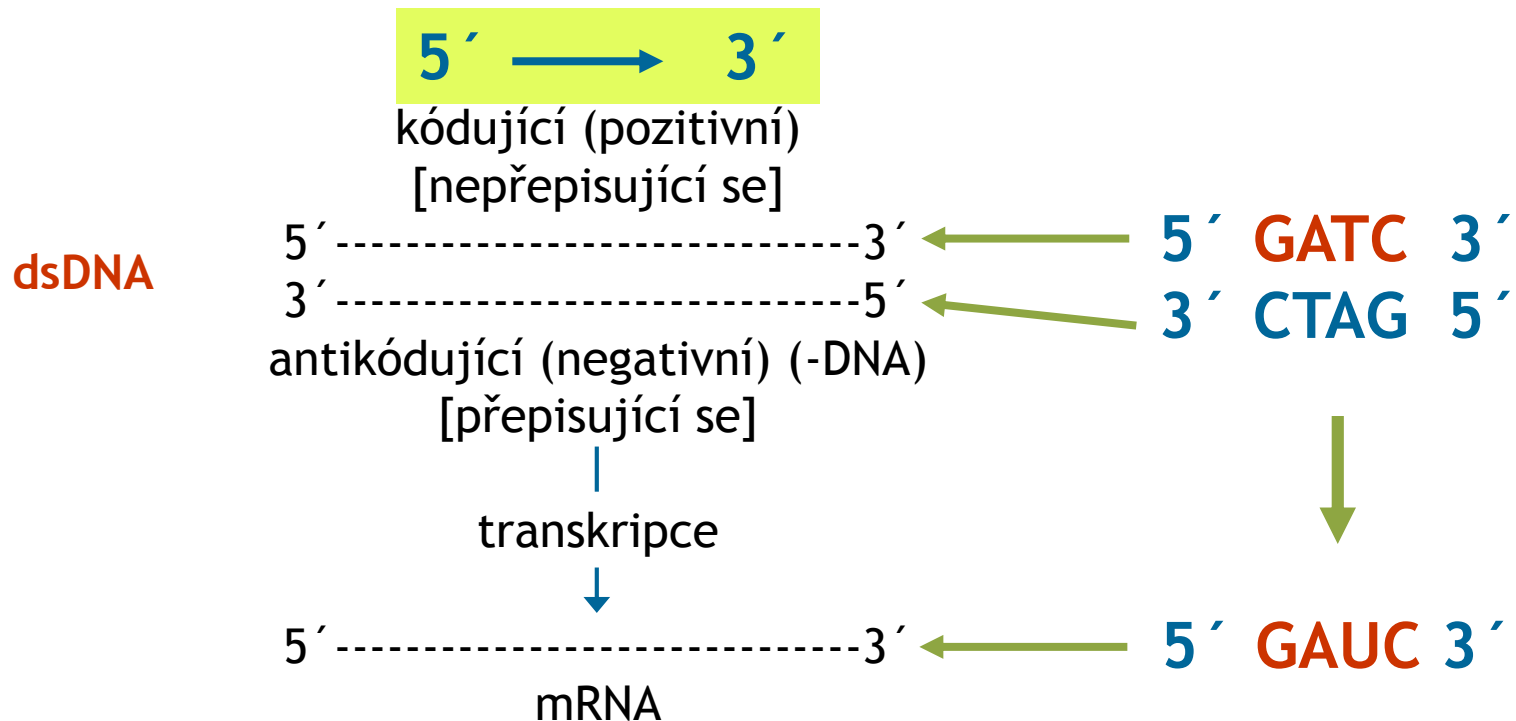
Základní pojmy molekulární genetiky

- **Gen** = Informační a funkční jednotka obsahující genetickou informaci o primární struktuře funkční molekuly translačního produktu (proteinu) nebo funkční molekuly produktů transkripce RNA (tRNA, rRNA, snRNA a **dalších RNA**) nepodléhajících translaci
- **Genetická informace** = informace primárně obsažená v nukleotidové sekvenci genomové DNA (genomové RNA u RNA-virů)
- **Genetický kód** = systém pravidel, podle kterých jednotlivé kodony určují na ribozomu zařazení standardních aminokyselin do polypeptidu
- **Genom** = všechny molekuly DNA (nebo RNA u RNA virů) živé soustavy, které se vyznačují replikací a dědí se na potomstvo
(**Genom = soubor veškeré genetické informace konkrétního organismu**)
(**The total genetic content in one set of chromosomes – haploidní sada**)
- **Genotyp** = genetická konstituce organismu reprezentovaná souborem alel (tj. konkrétních variant genů) a sekvencí jeho genomu
- **Fenotyp** = soubor znaků a vlastností, kterými se v daném prostředí projevuje daný organismus (vyjádření genotypu)

Způsoby přenosu genetické informace



Značení řetězců nukleových kyselin podle jejich funkce při přenosu genetické informace



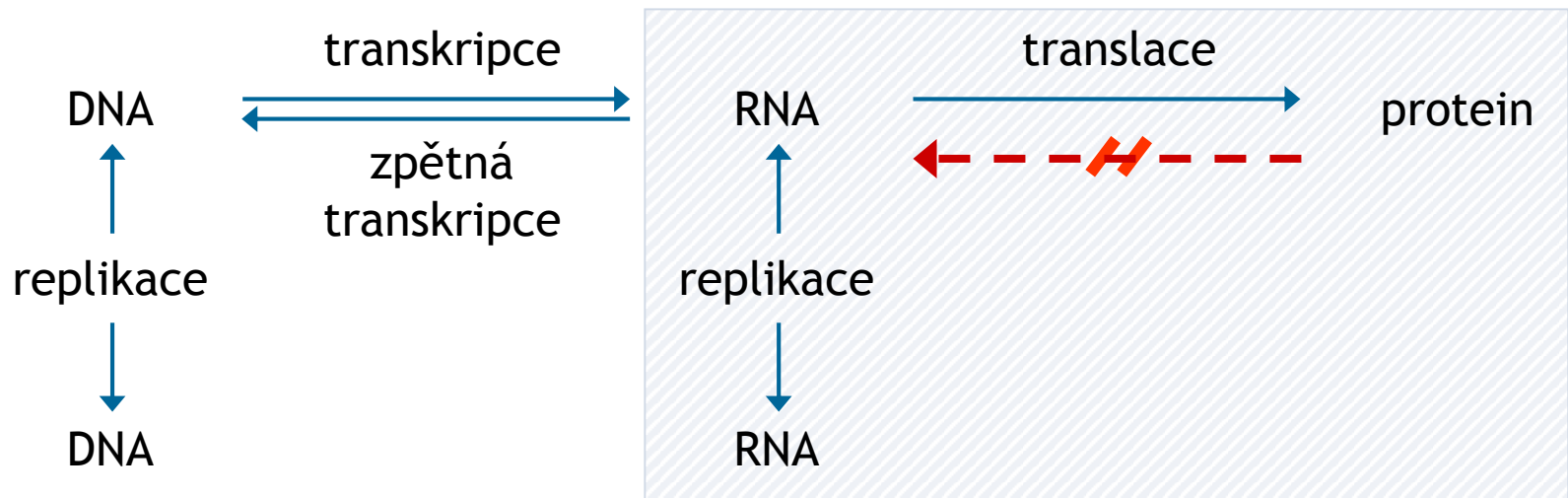
RNA v genomu virů

- pozitivní (+) = překládá se do virových proteinů (plní funkci mRNA)
- negativní (-) = nepřekládá se, slouží k replikaci (regulační funkce)

Ústřední dogma molekulární biologie

Přenos genetické informace je možný z NK do NK nebo z NK do proteinu, ale není možný z proteinu do proteinu nebo z proteinu do NK

F.H.C. Crick - 1958



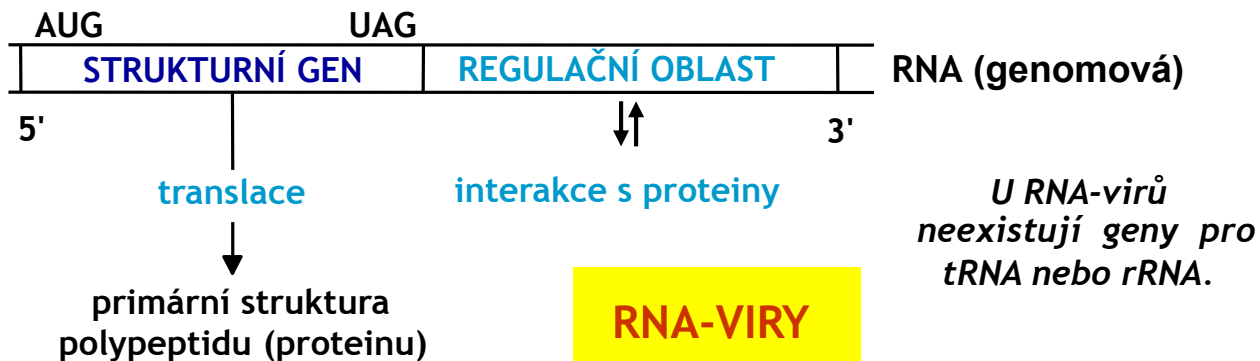
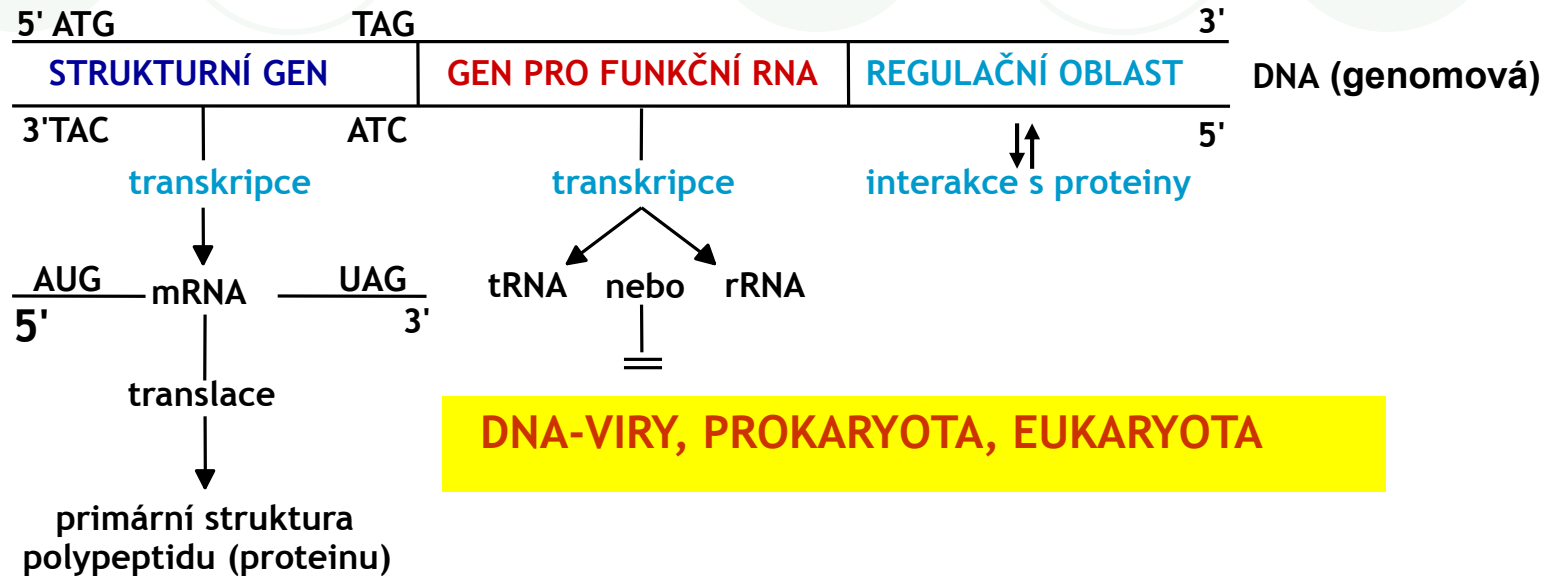
Způsoby vyjádření genetické informace

- informace o primární struktuře proteinů
- informace o primární struktuře RNA (u DNA sekvencí) nebo DNA (u RNA sekvencí)
- informace, určující navázání proteinů na sekvence NK (regulační funkce)
- informace o vazbě regulačních RNA na DNA

Konkrétní formy genů

- **Geny strukturní** = přepisují se do molekul mRNA, které se překládají a kódují polypeptid (translační produkt)
 - strukturní gen jednoduchý, neobsahující introny
 - strukturní gen složený, tvořený exony a introny
- **Geny pro funkční typy RNA** = přepisují se do molekul RNA, které se nepřekládají (tRNA, rRNA, snRNA, miRNA a další funkční typy)
- **Geny jako regulační oblast** = úsek DNA, na nějž se váže regulační protein nebo molekula regulační RNA (nepřepisují se ani nepřekládají)

Vztah mezi geny a jejich produkty



Rozdíl mezi jednoduchým složeným strukturním genem

Rozdíl mezi jednoduchým a složeným strukturním genem spočívá v tom, že složený gen je sestaven z intronů a exonů a jeho primární transkript podléhá sestřihu, kdežto jednoduchý gen neobsahuje ani introny ani exony a jeho primární transkript nepodléhá sestřihu.

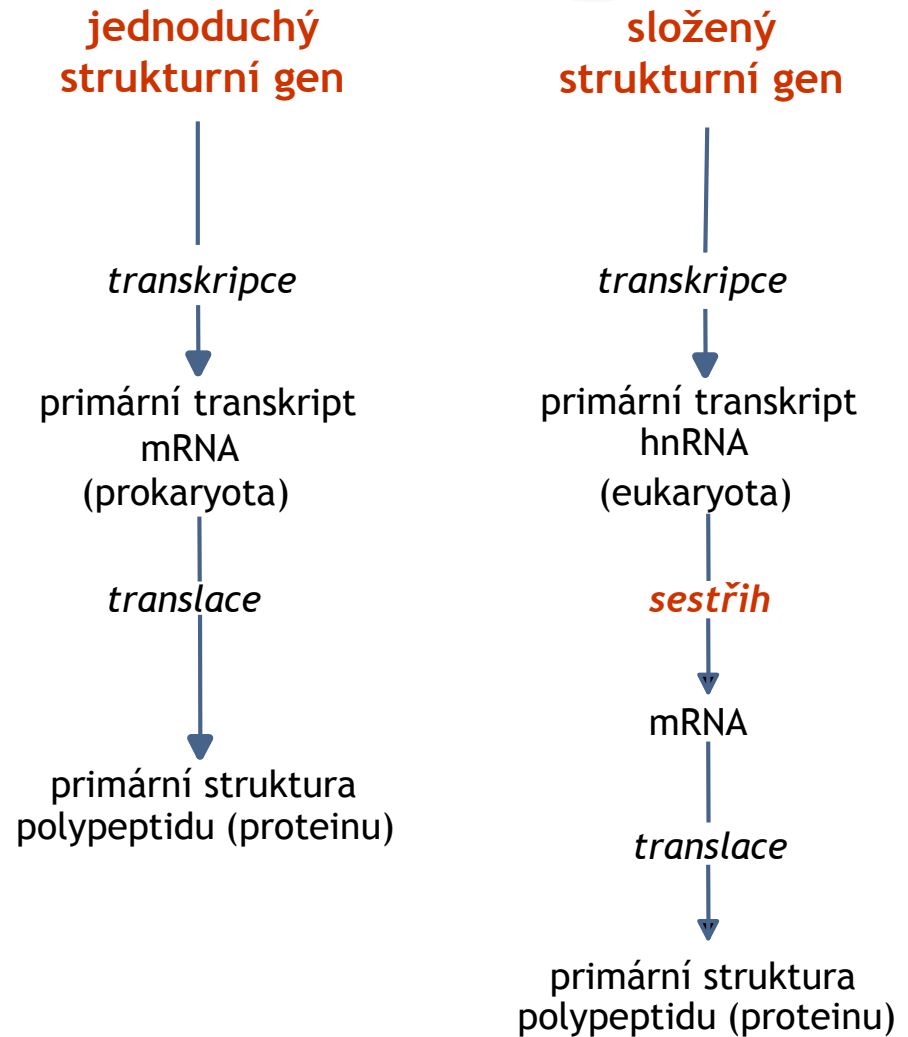
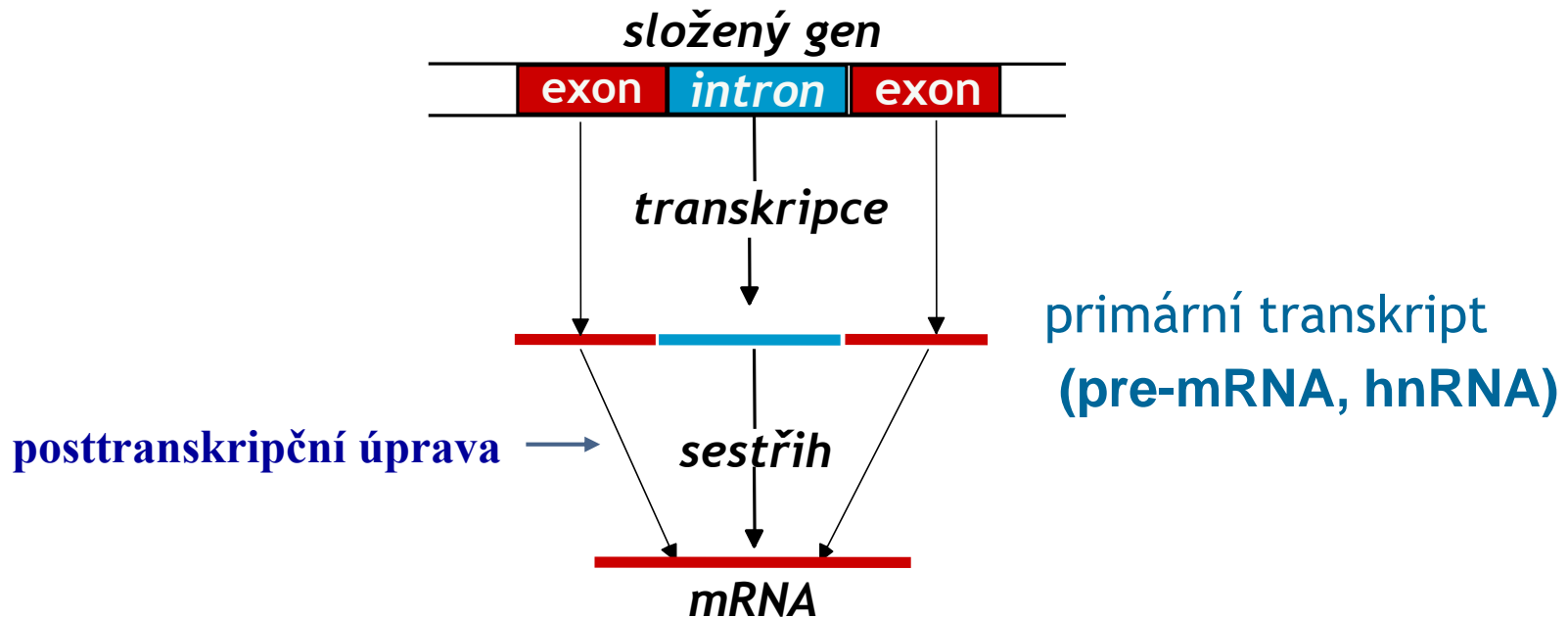
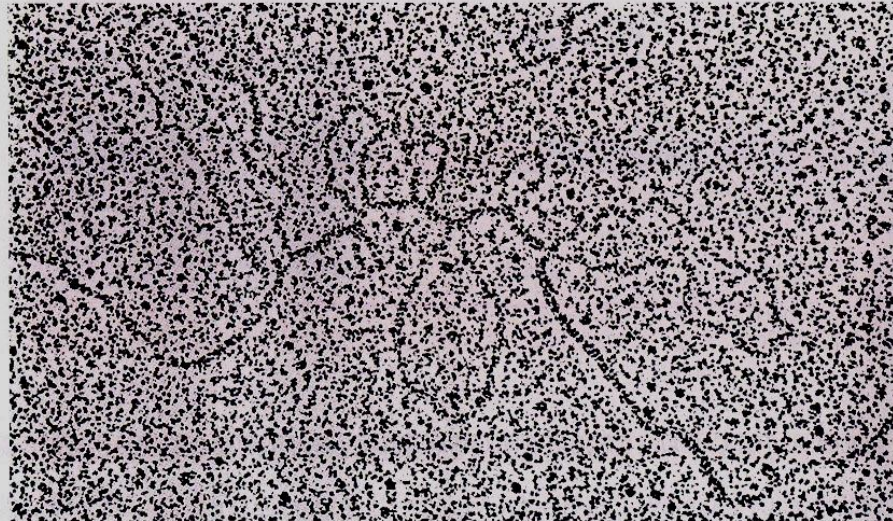


Schéma posttranskripční úpravy sestřihem

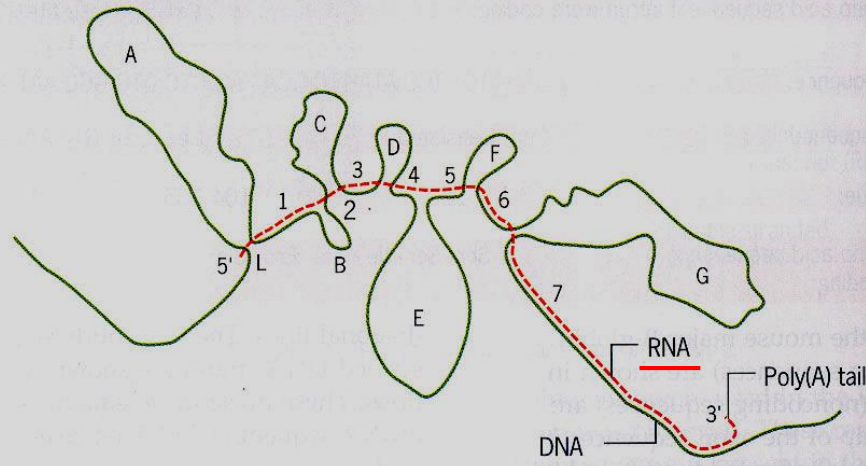


**Při sestřihu se z primárního transkriptu vyštěpí
přepis intronu a spojí se přepisy exonů**

Důkaz přítomnosti intronů v genu pro ovalbumin



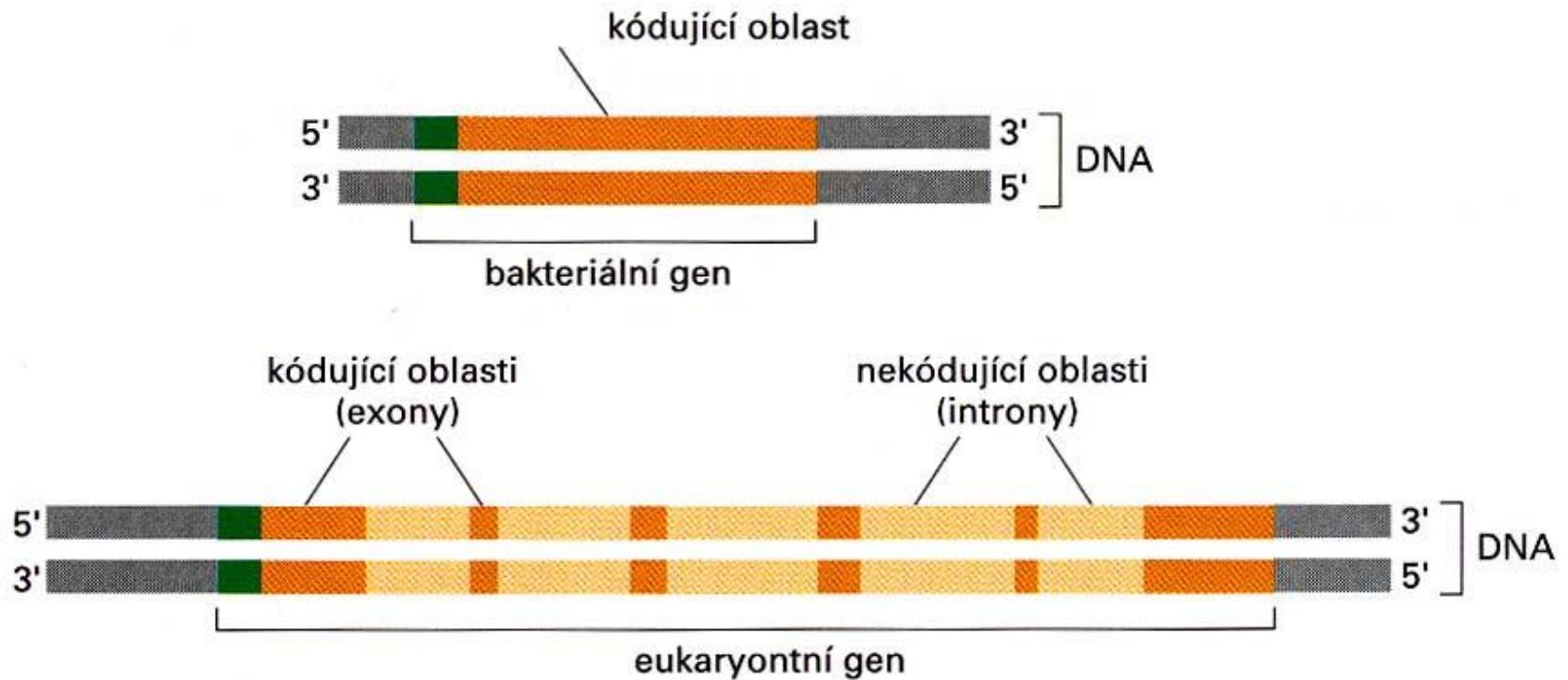
Heteroduplex DNA-mRNA v EM



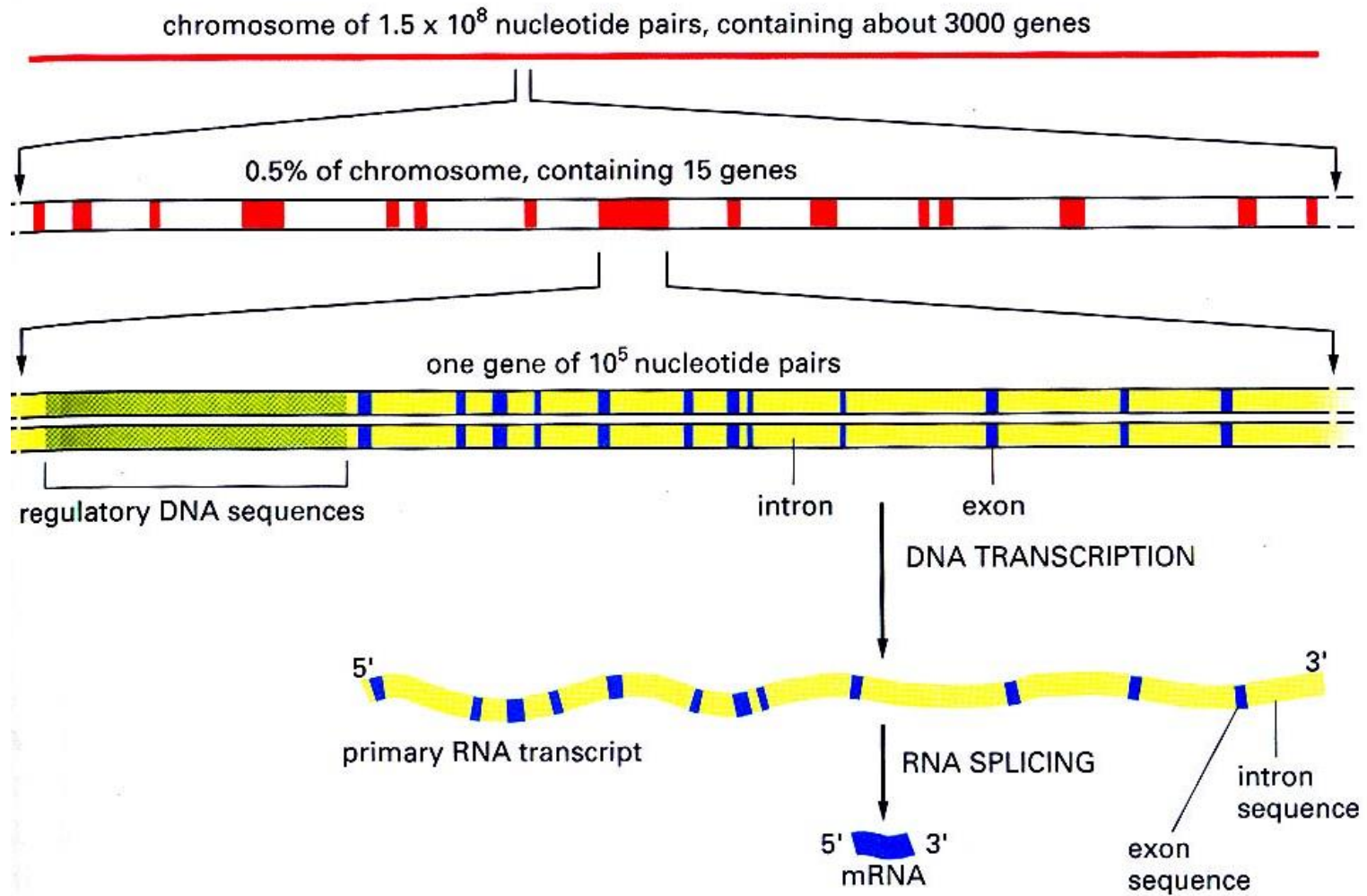
intron



Srovnání jednoduchého bakteriálního a složeného eukaryontního strukturního genu



Organizace genů na chromozomu obratlovců a jejich přepis do mRNA



Velikost vybraných genů člověka (v kbp), velikost mRNA a počty intronů

	velikost genu kb	velikost mRNA kb	počet intronů
β-Globin	1.5	0.6	2
Insulin	1.7	0.4	2
Protein kinase C	11	1.4	7
Albumin	25	2.1	14
Catalase	34	1.6	12
LDL receptor	45	5.5	17
Factor VIII	186	9	25
Thyroglobulin	300	8.7	36
Dystrophin*	more than 2000	17	more than 50

Překlad genetické informace

U C G C A U G C C = kodony na mRNA

A G C G U A C G G = antikodony tRNA

Ser

His

Ala

= aminokyseliny nesené tRNA

Transferová RNA rozeznává svým antikodonem na mRNA kodon pro aminokyselinu, kterou nese. Jinými slovy čte genetickou informaci na mRNA a překládá ji do pořadí aminokyselin v polypeptidovém řetězci.

Kompletní dešifrování genetického kódu: 1966

Standardní genetický kód (na úrovni RNA)

History of the names of the stop codons First, the amber codon was named following experiments in the Benzer's lab at Caltech. In searching for a mutation that would allow a type of phage mutant to grow, Seymour Benzer said that whoever identified the mutation would get to name it after themselves (in some versions of the story, it would be named after the discoverer's mother). The graduate student who isolated the mutation was a young man named Harris Bernstein, whose name "Bernstein" in German means "amber". Thus, the UAG codon, known as a nonsense codon (later known as a stop codon), was named the amber codon. Later, the other two stop codons were called "ochre" (UAA) and "opal" (UGA) (sometimes called, "umber") to maintain the color metaphor. What happened to the graduate student? He became a famous molecular biologist.

Vysvětlivky: (SC) = selenocystein, (PL) = pyrolyzin, (I) = iniciační kodon

Kodony					
1.	2.				3.
U	U	C	A	G	
	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	N	N (SC)	A
C	Leu	Ser	N (PL)	Trp	G
	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
A	Leu	Pro	Gln	Arg	G
	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
G	Met (I)	Thr	Lys	Arg	G
	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

N = nesmyslný kodon, I = iniciační kodon.
 1.2.3 = pořadí nukleotidů v kodonu.
 Kodonové rodiny jsou vyznačeny modře, sady červeně.

Základní vlastnosti genetického kódu

- je **tripleťový** (třípísmenový)
- obsahuje **64** kodonů
- je **degenerovaný** - jedna aminokyselina může být kódována více kodony **redundance**
- 61 kodonů má smysl (kódují aminokyseliny)
- většina kodonů je **synonymních** (tj. odlišné kodony kódují stejnou aminokyselinu)
- synonymní kodony jsou zařazeny do kodonových rodin a dvoukodonových sad
- 3 kodony jsou nesmyslné (stop kodony, terminační kodony): UAA - ochre, UAG - amber, UGA – opal
- 3 kodony jsou bifunkční:
 - UGA - opal = nesmyslný nebo kóduje selenocystein (21. aminokyselina)
 - UAG – amber = nesmyslný nebo kóduje pyrolyzin (22. aminokyselina)
 - AUG = působí jako iniciační při translaci nebo kóduje metionin
- je **univerzální**, tj. většina kodonů má stejný smysl ve všech živých soustavách (prokaryota, eukaryota, viry)

Charakteristika standardního genetického kódu

8 kodonových rodin	tj.	32 kodonů
8 dvoukodonových sad UC	tj.	16 kodonů
5 dvoukodonových sad AG	tj.	10 kodonů
1 iniciační a bifunkční kodon AUG	tj.	1 kodon
3 terminační kodony (z toho dva bifunkční)	tj.	3 kodony
1 kodon Ile AUA	tj.	1 kodon
1 kodon Trp UGG	tj.	1 kodon

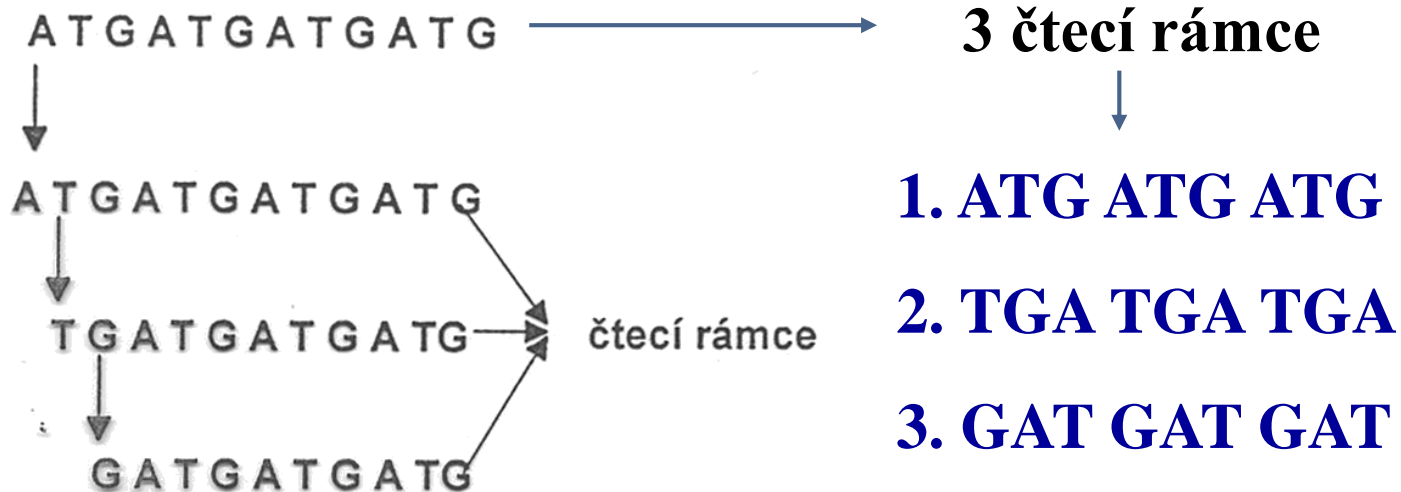
celkem

64 kodonů

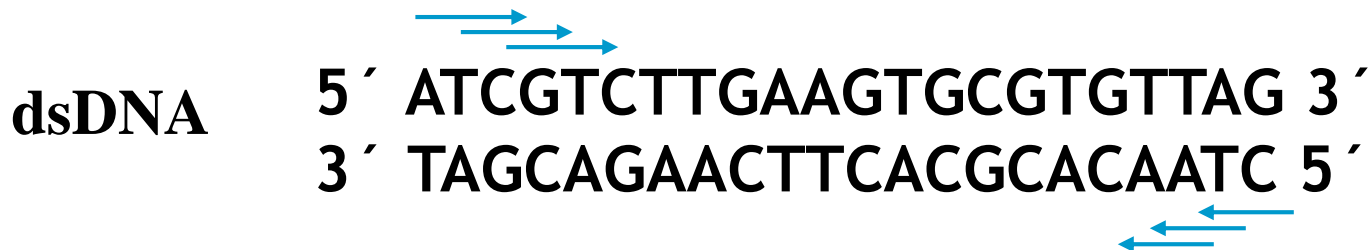
Čtení kodonů

Čtení kodonů (tripletů) závisí na tom, u kterého nukleotidu dané sekvence stanovíme počátek čtení.

Čtecí rámec (reading frame) – jeden ze tří možných způsobů rozpoznávání tripletů v nukleotidové sekvenci. Je dán polohou nukleotidu, na kterém začíná čtení



ORF = open reading frame = otevřený čtecí rámec



Struktura genomů

- **Prokaryotický genom**
 - chromozom (nukleoid) - bakteriální chromozom
 - plazmidy
- **Eukaryotický genom**
 - soubor chromozomů v jádře (jaderný genom)
 - Mitochondrie (mitochondriový genom)
 - chloroplasty (u rostlin) (chloroplastový genom)
 - plazmidy
- + složky genomů: proviry, transpozony, aj.

- **nDNA** = jaderná, ds lineární
- **mtDNA** = mitochondriová, ds kružnicová nebo lineární
- **ctDNA** = chloroplastová, ds kružnicová

- **virový genom** = DNA (ds, ss) nebo RNA (ds, ss)

Živé soustavy

Tři domény organizmů (16S RNA a 18S RNA)

- Bakterie (Bacteria)
- Archea (Archea)
- Eukarya (Eukarya)

- buněčné
 - jednobuněčné
 - mnohobuněčné
- nebuněčné
 - viry
 - viroidy

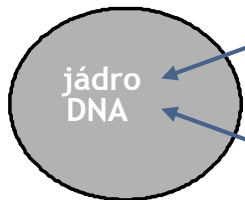


Všechny způsoby přenosu genetické informace.
Mají všechny složky translačního systému.
(aa-tRNA-syntetázy, tRNA, ribozomy)



Jsou v translaci závislé na hostitelských buňkách.
Viry = živé soustavy schopné reprodukce v závislosti na translačním systému hostitelských buněk.

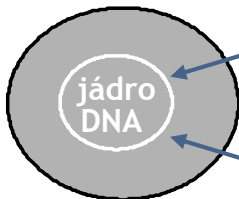
prokaryotický typ buňky



jádro bez jaderné membrány
nedělí se mitoticky

DNA kružnicová (většinou)
nebo lineární

eukaryotický typ buňky



jádro obaleno jadernou membránou
dělí se mitoticky

chromozomy = chromatin (proteiny + DNA)

Univerzální fylogenetický strom

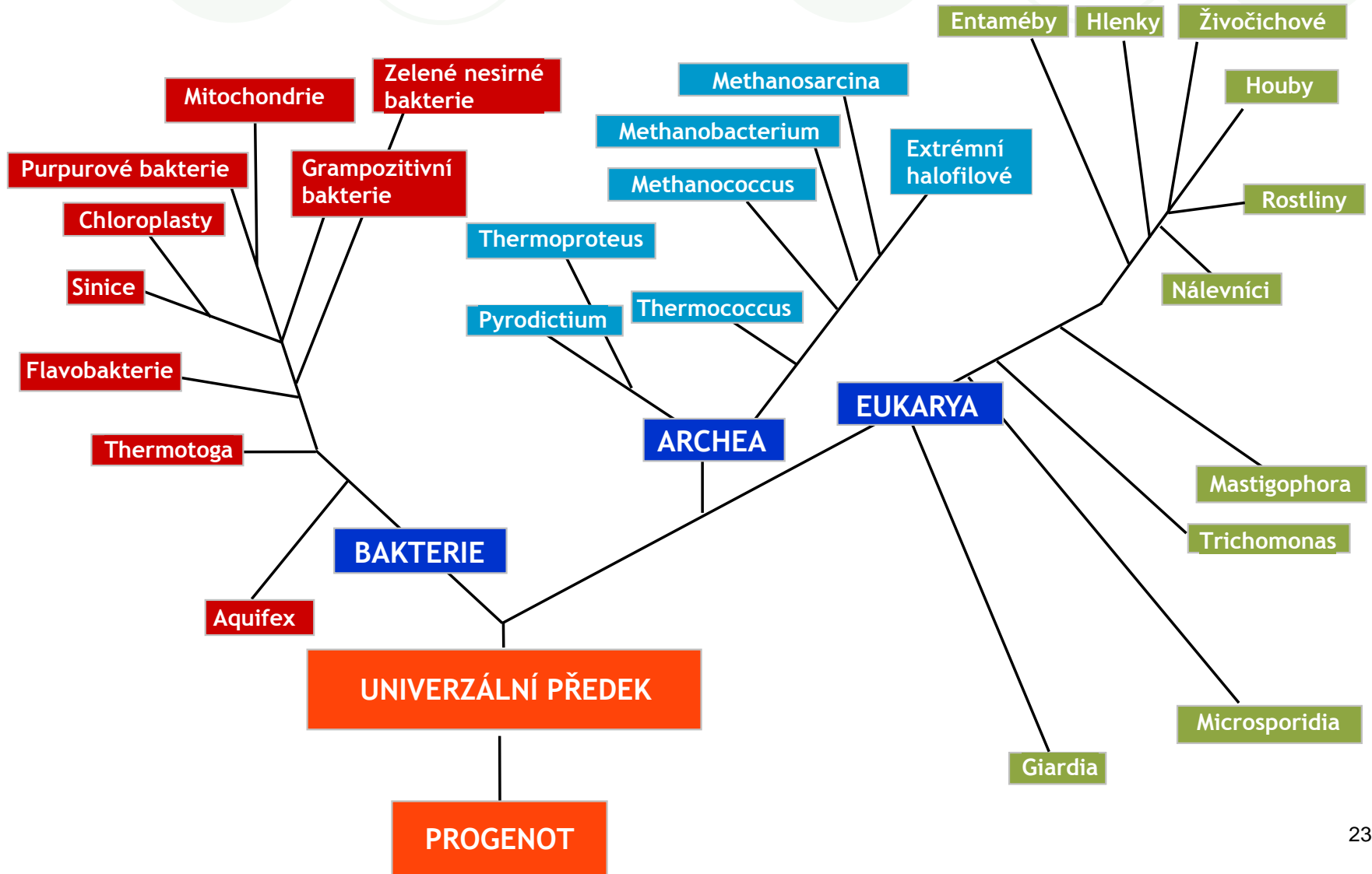
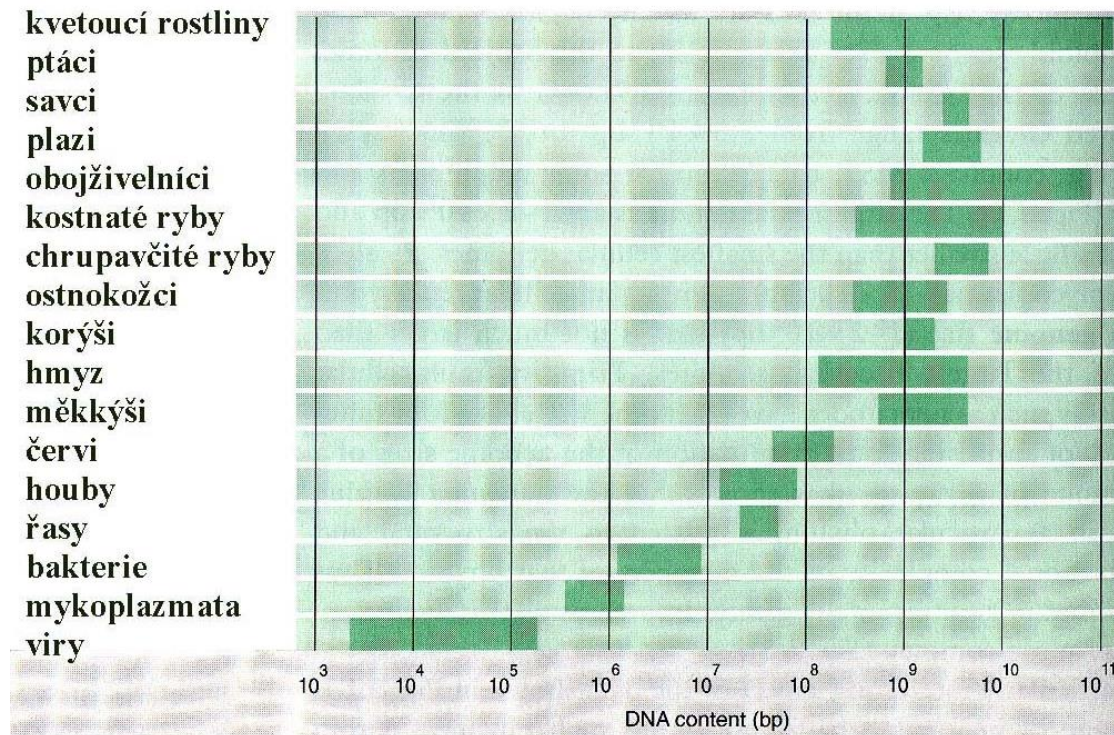


Table 8.1 Structural aspects of genomes.

Organismal level	Genome type	Typical genome size (bp)	Localization	Structural proteins
virus	dsDNA, dsRNA, ssDNA, ssRNA; linear or circular	10^3 – 10^5	viral envelope/ capsid	capsid/envelope proteins
bacteria	dsDNA; usually circular	10^6 – 10^7	cytoplasm	HU, IHF, minor proteins (see Table 8.2)
archaea	dsDNA; usually circular	10^5 – 10^6	cytoplasm	histone-like proteins (contain histone fold and interact through handshake motif, see main text)
eukaryotes	dsDNA; linear	10^7 – 10^{11}	nucleus	histones; non-histone proteins

Velikost genomu jednotlivých skupin organismů



Velikost genomu se udává v počtech párů bází:

bp = pár bází

nt = nukleotid

kbp = 1000 bp

Mbp = 1000 kbp

Gbp = 1000 Mbp

1 bp = 660 D

1 mm DNA = 3 Mbp

Paradox hodnoty C - velikost genomu neodpovídá vývojovému postavení (celkové komplexitě) organismů

Počet genů a velikost genu- mu u zástupců jednotlivých skupin organis- mů

TABLE 4.01

Genome Sizes

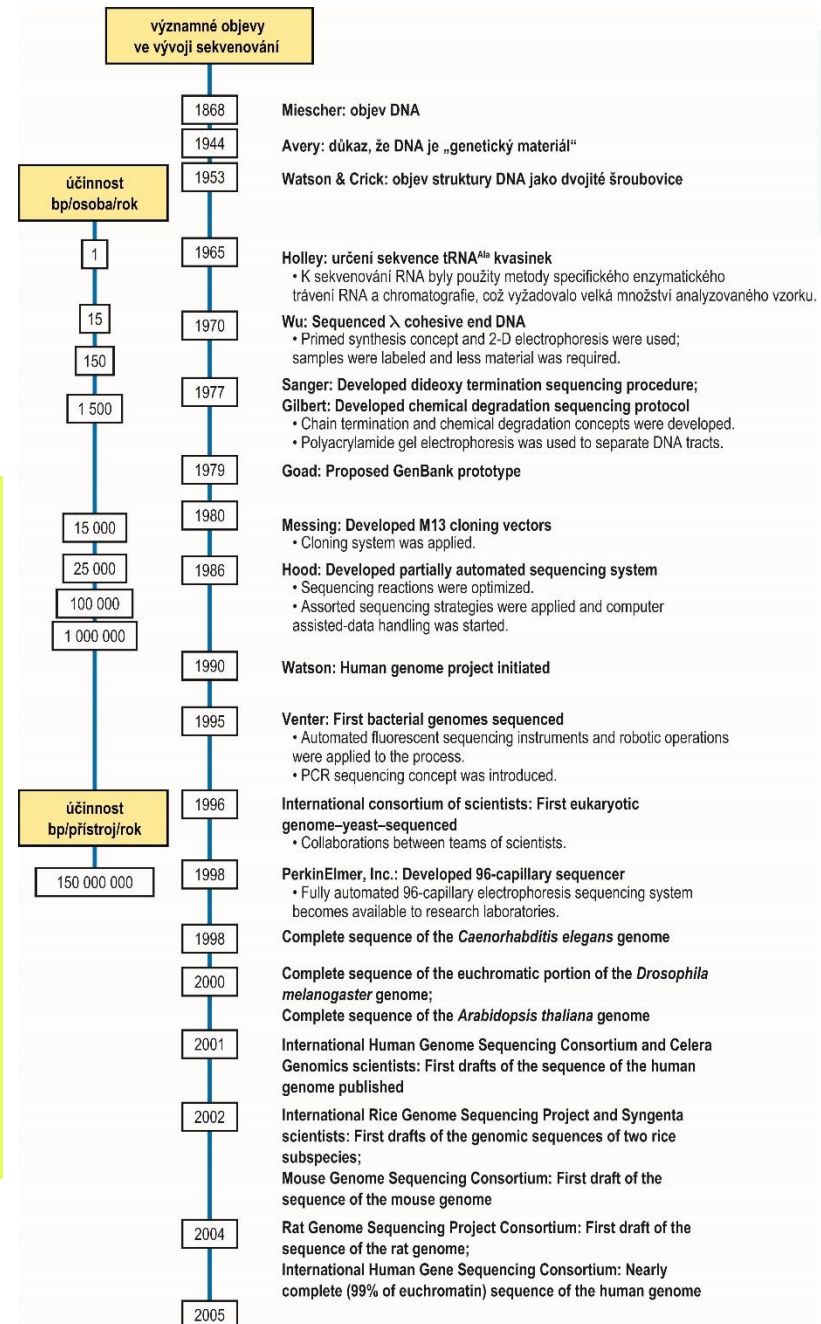
Organism	Number of Genes	Amount of DNA (bp)	Number of Chromosomes
<u>Viruses</u>			
Bacteriophage MS2	4	3,600	1 (ssRNA)*
Tobacco Mosaic Virus	4	6,400	1 (ssRNA)*
ΦX174 bacteriophage	11	5,387	1 (ssDNA)
Influenza	12	13,500	8 (ssRNA)
T4 bacteriophage	200	165,000	1
Poxvirus	300	187,000	1
Bacteriophage G	680	498,000	1
<u>Prokaryotes</u>			
Mitochondrion (human)	37	16,569	1
Mitochondrion (<i>Arabidopsis</i>)	57	366,923	1
Chloroplast (<i>Arabidopsis</i>)	128	154,478	1
<i>Nanoarchaeum equitans</i>	550	490,000	1
<i>Mycoplasma genitalium</i>	480	580,000	1
<i>Methanococcus</i>	1,500	1.7 Mbp	1
<i>Escherichia coli</i>	4,000	4.6 Mbp	1
<i>Myxococcus</i>	9,000	9.5 Mbp	1
<u>Eukaryotes (haploid genome)</u>			
<i>Encephalitozoon</i>	2,000	2.5 Mbp	11
<i>Saccharomyces</i>	5,700	12.5 Mbp	16
<i>Caenorhabditis</i>	19,000	100 Mbp	6
<i>Drosophila</i>	12,000	140 Mbp	5
<i>Homo sapiens</i>	25,000	3,300 Mbp	23
<i>Arabidopsis</i>	25,000	115 Mbp	5
<i>Oryza sativa</i> (Rice)	45,000	430 Mbp	12

*ssRNA = single stranded RNA; ssDNA = single stranded DNA; all other genomes consist of double stranded DNA.

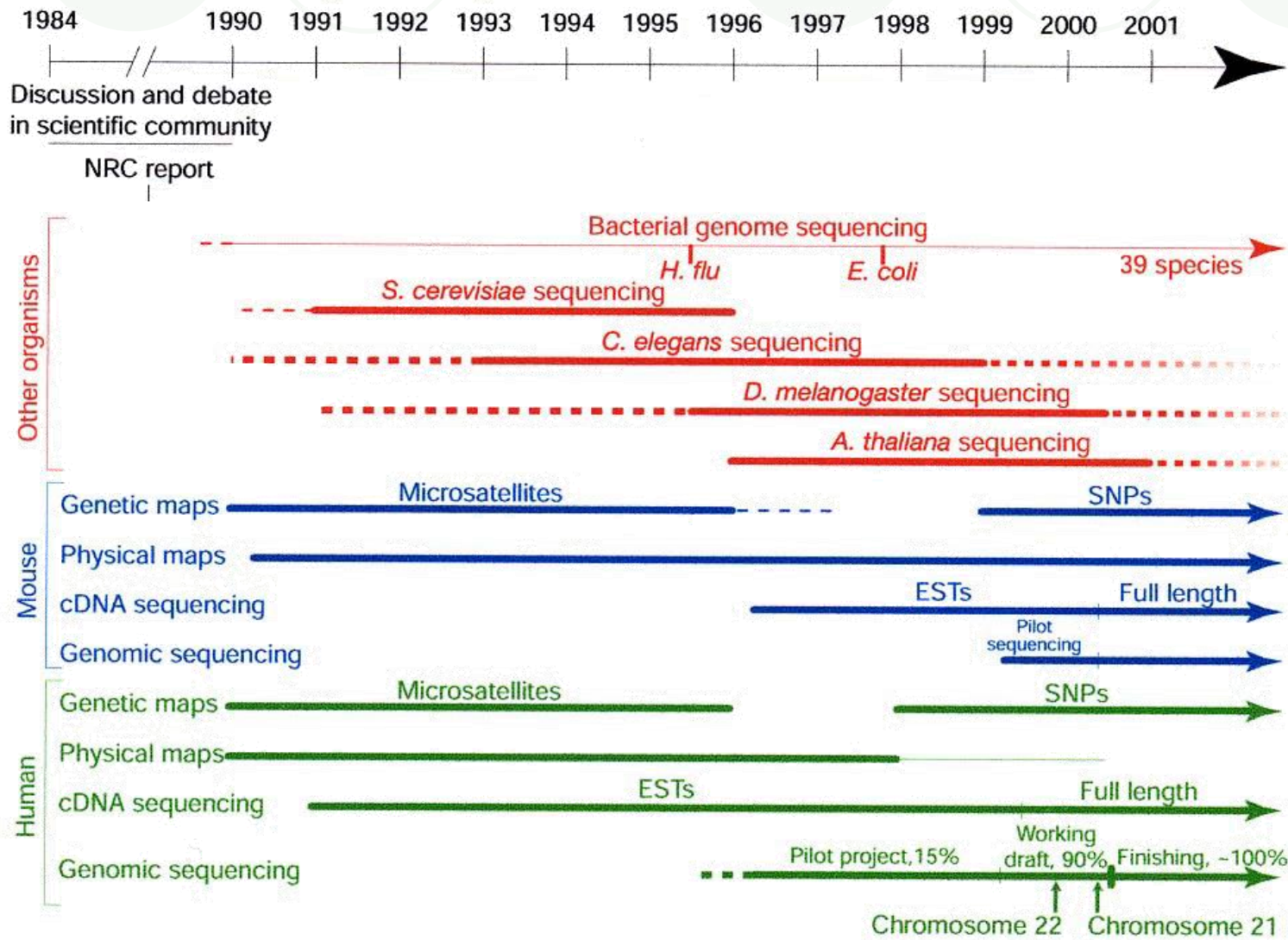
Účinnost sekvenování DNA a historie analýzy DNA

Současnost:

1. Stále vyšší účinnost sekvenování, nižší cena
2. Nové bioinformatické přístupy
3. Aplikace v biomedicíně (zejm. v onkologii)
4. Komerencializace
5. Analýza mikrobiomu a metagenomu



Časový průběh sekvenování genomů

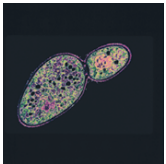


Projekty sekvenování genomů modelových organismů



Escherichia coli (4.6 Mb) - bakterie, prokaryotický organismus

- známá struktura genomu, regulace a funkce genů
- dobře prostudovány biochemické dráhy



Saccharomyces cerevisiae (14 Mb) - kvasinka, jednobuněčný eukaryotický organismus

- známá struktura genomu, regulací a funkce genů
- probíhá mitóza a meióza
- velký počet dobře definovaných mutant
- vysoká frekvence homologní rekombinace - snadné záměny alel



Caenorhabditis elegans (100 Mb) - jednoduchý mnohobuněčný organismus (hlístice, červ)

- obsahuje 959 buněk, jejichž vývojové linie jsou známy
- detailně prostudovaný nervový systém (302 neuronů a jejich spojení)
- modelový organismus vývojové biologie (procesy diferenciací)

Projekty sekvenování genomů modelových organismů



Drosophila melanogaster (165 Mb) - zástupce hmyzu

- objekt klasické genetiky
- dobře prostudována struktura genů, jejich regulace a funkce
- řada dobře definovaných mutant.



Fugu rubripes (400 Mb) - ryba

- model genomu obratlovců
- nízká proporce repetitivních sekvencí
- vysoká proporce exonů
- relativně krátké geny ve srovnání s lidskými homologními geny (vhodný pro identifikaci lidských kódujících genů)



Danio rerio - ryba

Studium vývoje obratlovců. Velká embrya s rychlým růstem.
Studium genetických poruch u člověka.

Projekty sekvencování genomů modelových organismů



Arabidopsis thaliana (100 Mb) - kvetoucí rostlina

- neobvykle malý genom
- nízký počet chromozomů
- nízká proporce repetitivních sekvencí
- vysoký počet semen (10 000) během krátké generační doby

Mus musculus - myš, savec (3000 Mb)



- geneticky nejlépe prostudovaný savec
- vhodný experimentální model pro studium mutací a genetická křížení
- vazba genů podobná jako u člověka
- možnost přípravy transgenních myší s genetickými modifikacemi
- model studia genové exprese a funkce genů.

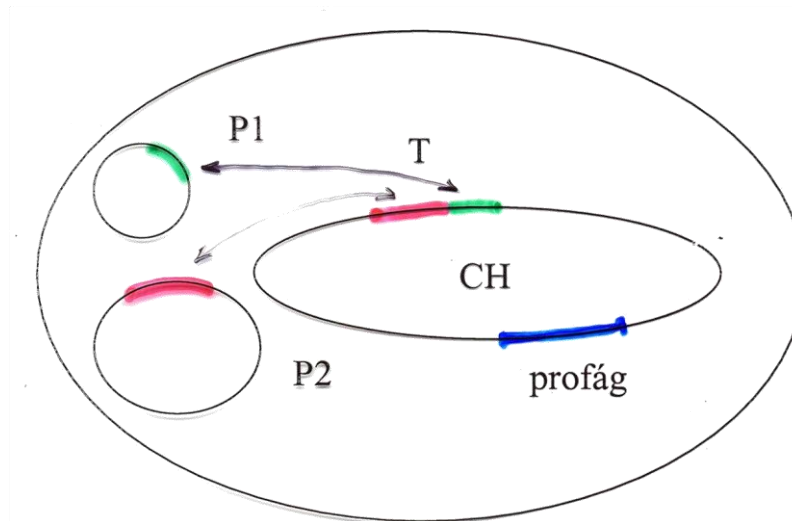
metagenom = genetický materiál pocházející z určitého prostředí

mikrobiom = mikrobiální osídlení lidského těla

Prokaryotický genom

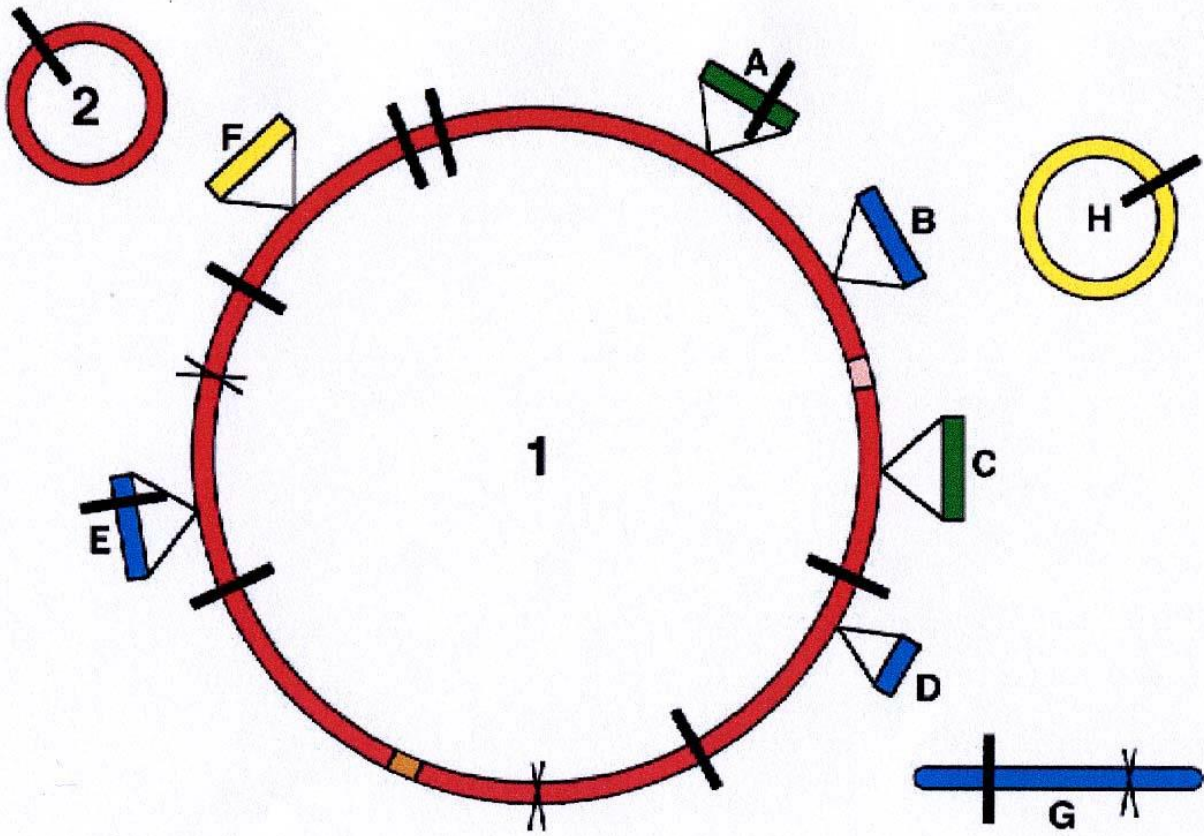
- Složky

- Bakteriální chromozom (nukleoid)
- Mobilní elementy (Plazmidy, inzerční sekvence, transpozony, genomické ostrovy, integrony aj)
- Bakteriofágy, profágy



Mozaikový charakter

Vysoká dynamika a plasticita



- Endochromozomy (1,2)
- Přídavné genetické elementy (A-H)
 - Plazmidy (H, F)
 - Profágy a defektní profágy (B, D, E, G)
 - Genomické ostrovy (A, C)
 - IS-elementy, transpozony, integrony (I)

Variabilní složka genomu – adaptace na prostředí

TOPOLOGIE PROKARYOTICKÉHO GENOMU

Replikony

CHROMOZOM

- kružnicový
- lineární

PLAZMIDY

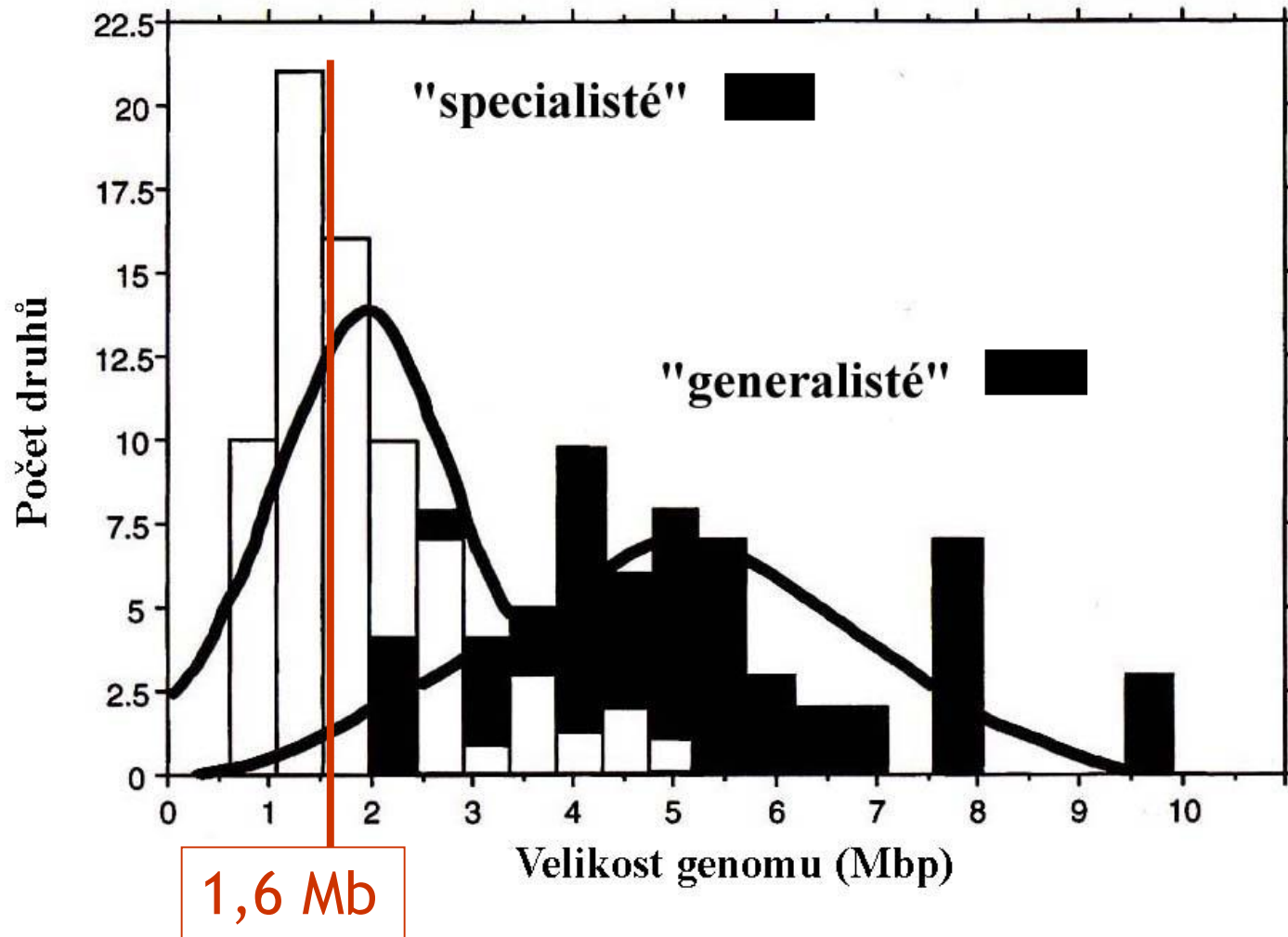
- kružnicové
- lineární

DRUH	CHROMOZOMY		PLAZMIDY	
	KRUŽNICOVÉ	LINEÁRNÍ	KRUŽNICOVÉ	LINEÁRNÍ
<i>Escherichia coli</i>	1 (4,6 Mb)		několik	
<i>Bacillus cereus</i>	1 (5 Mb) 1 (2,4 Mb)		0 několik (2,6 Mb)	
<i>Vibrio cholerae</i>	2 (2,9+1,1 Mb)			
<i>Borrelia burgdorferi</i>		1 (0,9Mb)	9 (kb)	12 (kb)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	1 (2,8 Mb)	1 (2,1 Mb)	2 (0,75 Mb)	
<i>Streptomyces lividans</i>	1 (8 Mb)			1 (50 kb)

Prokaryota s lineárním chromozomem

- **Streptomyces** (ambofaciens, lividans) 10 Mb
- **Borrelia burgdorferi** (B. hermsii) 0.95 Mb
 - + lineární plazmidy
- **Coxiella burnetii** 2,1 Mb
- **Paracoccus denitrificans** - tři molekuly DNA
 - 2; 1,1; 0,64 Mb, dvě jsou lineární
- **Agrobacterium tumefaciens**
- a řada dalších...

Velikost genomu prokaryot



Genetická organizace prokaryotického genomu

- velmi kompaktní genom s malými mezerami mezi geny
- většina genomu je obsazena strukturními geny
- malá část (10 %) je tvořena nekódující DNA
- operonové uspořádání genů (většinou funkčně příbuzných)
- pořadí genů není u prokaryot konzervováno - důsledek přestaveb genomu a horizontálního přenosu genů

Velikost a genový obsah vybraných prokaryotických genomů

druh	velikost genomu v párech nukleotidů	předpokládaný počet genů
Archaea		
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	2 178 400	2 486
<i>Methanosarcina acetivorans</i>	5 751 492	4 721
<i>Nanoarchaeum equitans</i>	490 885	582
<i>Pyrococcus furiosus</i>	1 908 256	2 228
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	2 992 245	3 033
<i>Thermoplasma volcanium</i>	1 584 804	1 548
Eubacteria		
<i>Bacillus subtilis</i>	4 214 630	4 225
<i>Bordetella parapertussis</i>	4 773 551	4 467
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	9 105 828	8 373
<i>Buchnera aphidicola</i>	615 980	550
<i>Chlamydia pneumoniae</i> kmen AR39	1 229 853	1 167
<i>Escherichia coli</i> kmen K12 MG1655	4 639 675	4 467
<i>Escherichia coli</i> kmen O157 EDL933	5 528 970	5 463
<i>Haemophilus influenzae</i> Rd KW20	1 830 138	1 789
<i>Legionella pneumophila</i> kmen Paris	3 503 610	3 136
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> kmen CDC	4 403 837	4 293
<i>Mycobacterium genitalium</i>	580 076	525
<i>Neisseria meningitidis</i> Z2491	2 184 406	2 208
<i>Pseudomonas syringae</i> kmen DC3000	6 397 126	5 660
<i>Rickettsia typhi</i>	1 111 496	919
<i>Salmonella typhimurium</i>	4 857 432	4 622
<i>Staphylococcus aureus</i> kmen MW2	2 820 462	2 712
<i>Streptomyces coelicolor</i>	8 667 507	7 912
<i>Ureaplasma parum</i> ATCC 700970	751 719	653
<i>Yersinia pestis</i> kmen KIM	4 600 755	4 240

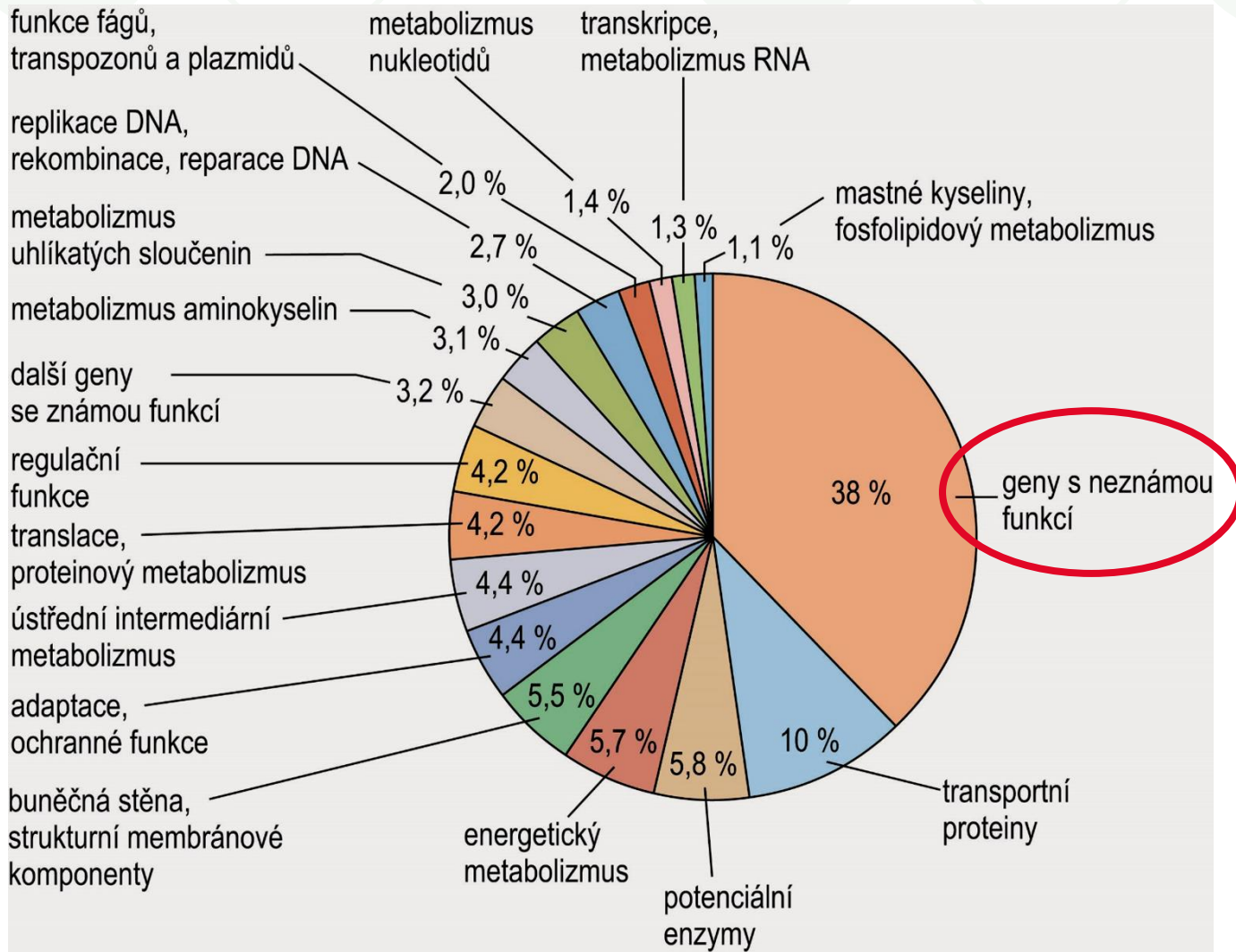
Údaje jsou převzaty z webové stránky NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genomes/>), květen 2008.

Počet genů u prokaryot je proporcionalní velikosti jejich genomu - **paradox hodnoty C u nich neplatí**

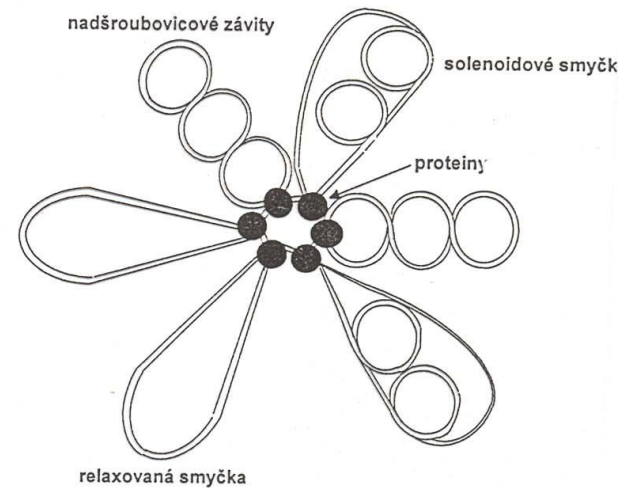
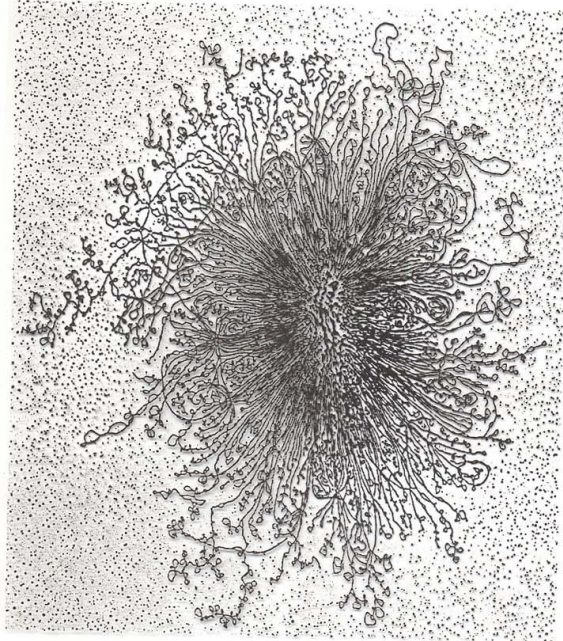
Organismus	Velikost genomu (Mbp)	Počet ORF
<i>T. pallidum</i>	1.14	1 040
<i>B. burgdorferi</i>	1.44	1 751
<i>H. pylori</i>	1.66	1 657
<i>A. fulgidus</i>	2.18	2 437
<i>B. subtilis</i>	4.20	4 100
<i>M. tuberculosis</i>	4.41	3 924
<i>E. coli</i>	4.60	4 288

1 gen ~ 1 kbp

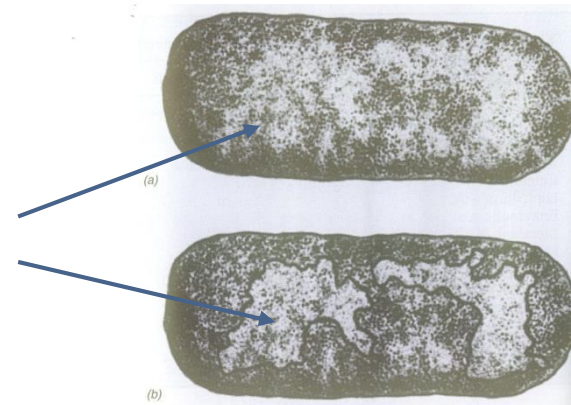
Klasifikace 4288 genů E. coli podle jejich funkce



Struktura chromozomu *E. coli*



Bakteriální nukleoid



HLP, HU-proteiny, enzymy a faktory účastníci se replikace a transkripce

Charakteristika plazmidů

dsDNA - kružnicová nebo lineární, velikost: 1-1000 kb

Základní typy plazmidů:

- kryptické - funkce neznámá
- epizomální - reverzibilní intergace do chromozomu hostitele
- konjugativní - schopné přenosu konjugací
- mobilizovatelné - přenositelné za přítomnosti konjugativního plazmidu

Příklady plazmidů:

- F-plazmidy (fertilní faktor, konjugativní)
 - zodpovědné za konjugaci
- R-plazmidy (R-faktory)
 - zodpovědné za rezistenci k antibiotikům
- kolicinogenní (Col-plazmidy)
 - tvorba proteinů s antibiotickým charakterem (*Enterobacteriaceae, aj.*)
- Ti-plazmidy (tumory indukující)
 - tvorba nádorů u dvouděložných rostlin (*Agrobacterium tumefaciens*)
- plazmidy odbourávající organické sloučeniny (*Pseudomonas*)
- plazmidy podílející se na fixaci vzdušného dusíku (*Rhizobium*).
- plazmidy používané jako vektory pro přenos DNA (pBR322, pUC)

Eukaryotický typ buněk

- Jádro je ohraničeno od cytoplazmy membránou
- Dělení buněk probíhá mitózou nebo meiózou
- Genetický materiál tvoří chromatin
- Buněčná stěna je odlišná od prokaryotické nebo chybí
- Buňka obsahuje organely: **mitochondrie, chloroplasty**, cytoplazmatické retikulum, Golgiho aparát, lysozomy aj.

Přenosy genetické informace u eukaryot probíhají principiálně stejně jako u prokaryot

Složky eukaryotického genomu

- **jaderný genom** - lineární chromozomy v různém počtu
- **mitochondriový genom** - kružnicové nebo lineární genofory
- **chloroplastový genom** (rostliny) - kružnicové genofory
- **plazmidy** (velmi vzácně) - kružnicové genofory

Chromatin = genetický materiál eukaryotické buňky
30 % NK (DNA + RNA) + 70 % proteinů

Základní formy organizace chromatinu

chromatinová síť vláken
v interfázi

jednotlivé chromozomy
při mitóze

chromatin

euchromatin (transkripčně aktivní)

(méně kondenzovaný, slabě barvitelný bazickými barvivy)

heteroterochromatin (transkripčně inaktivní)

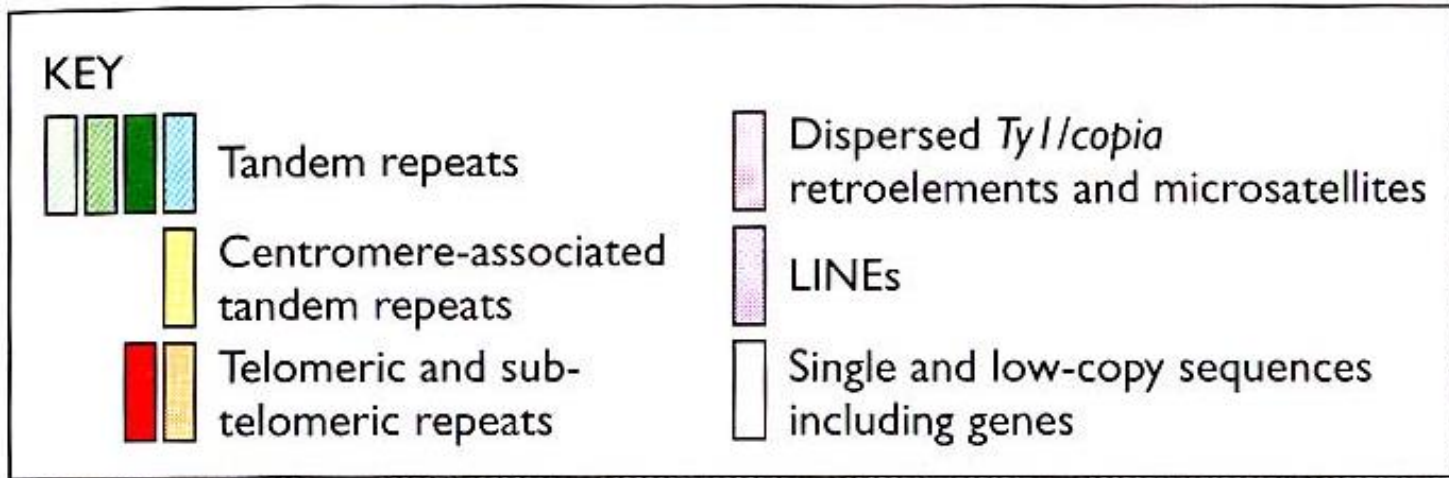
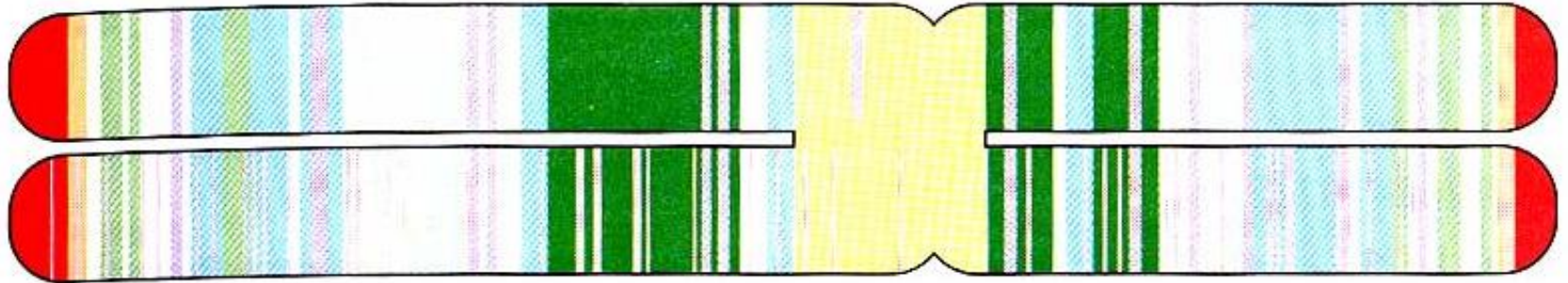
konstitutivní

centroméra + teloméra

fakultativní

dočasně netranskribované geny,
změny během ontogenetického
vývoje

Struktura mitotických chromozomů



Funkční složky eukaryotických chromozomů

- **centromera** - zajišťuje segregaci chromozomů do dceřiných buněk při mitóze (meióze)
- **telomera** - koncová oblast - její struktura zajišťuje dokončení replikace lineárního chromozomu
 - Typické telomerové repetice:
 - TTGGGG - Tetrahymena
 - TTAGGG - člověk
- **počátky replikace (ori)**

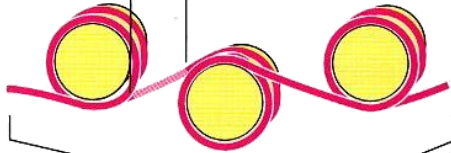
Úrovně kondenzace chromatinu

krátký úsek
dvojšroubovice
DNA



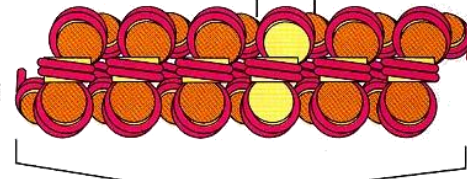
2 nm

„korálková“ forma
chromatinu



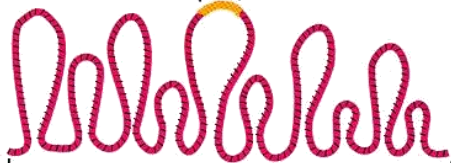
11 nm

30-nm chromatinové
vlákno s poskládanými
nukleosomy



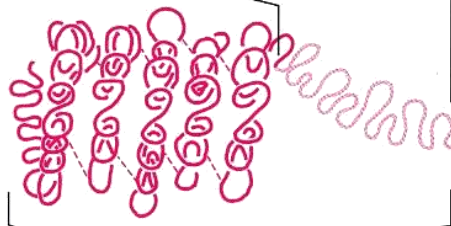
30 nm

úsek chromosomu
v rozvinuté formě



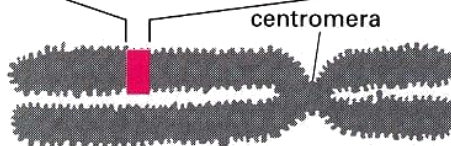
300 nm

kondenzovaný
úsek chromosomu

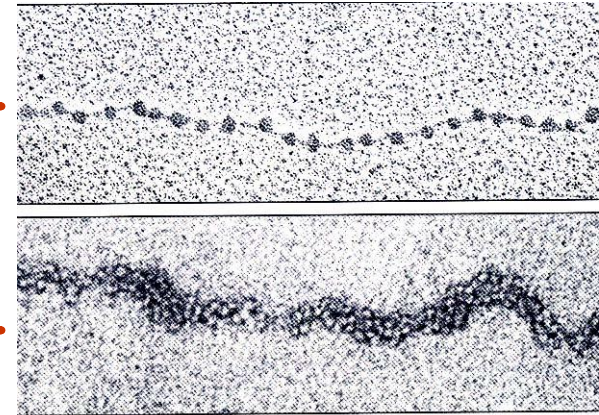


700 nm

úplný
mitotický
chromosom



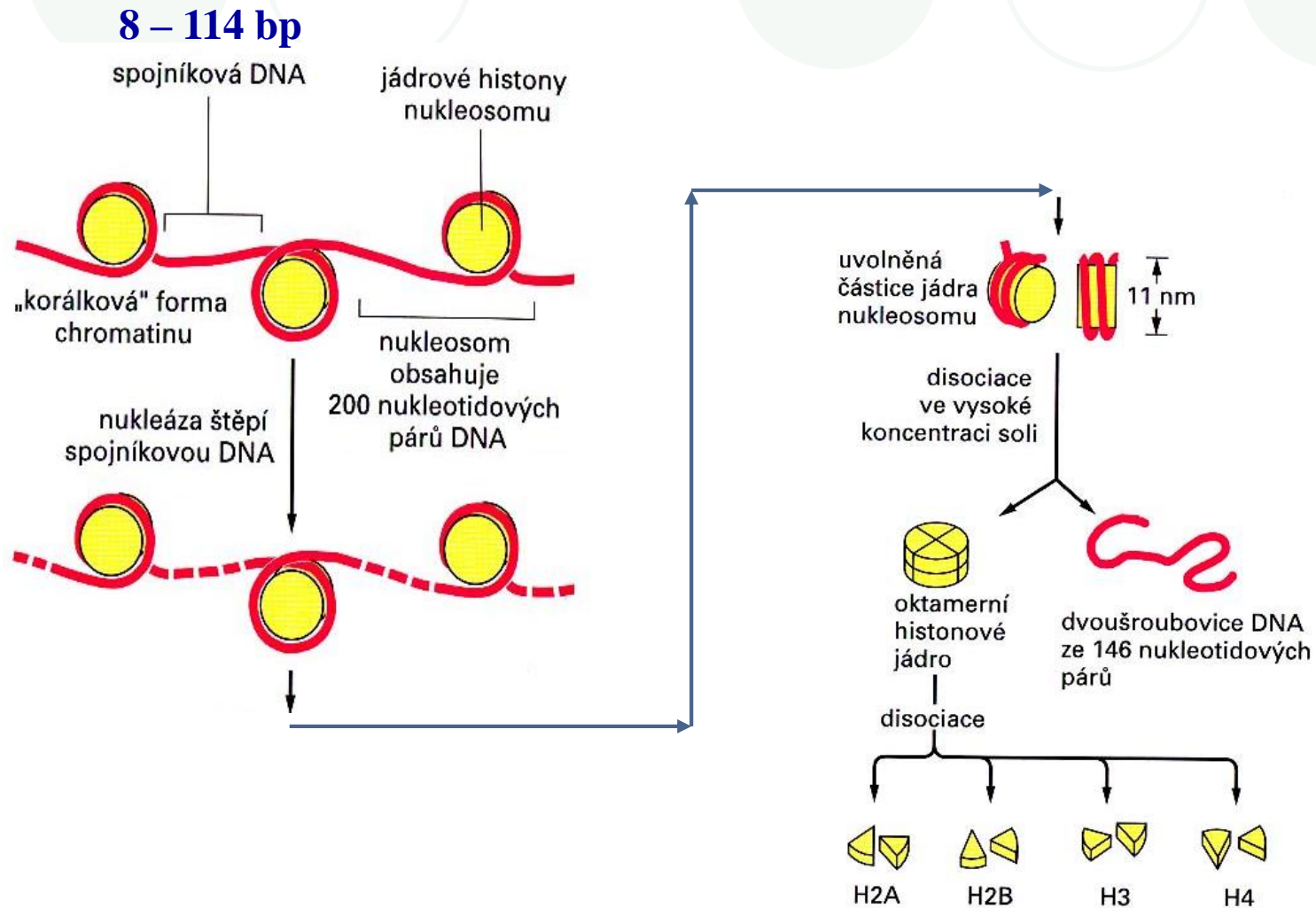
1400 nm

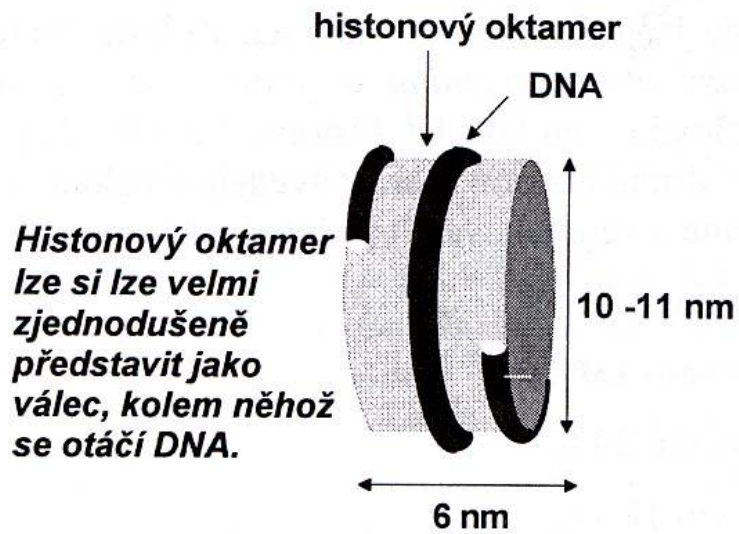


Výsledek:

Každá molekula DNA je zabalena do mitotického chromozomu tak, že je 50 000krát kratší než v rozvinuté formě

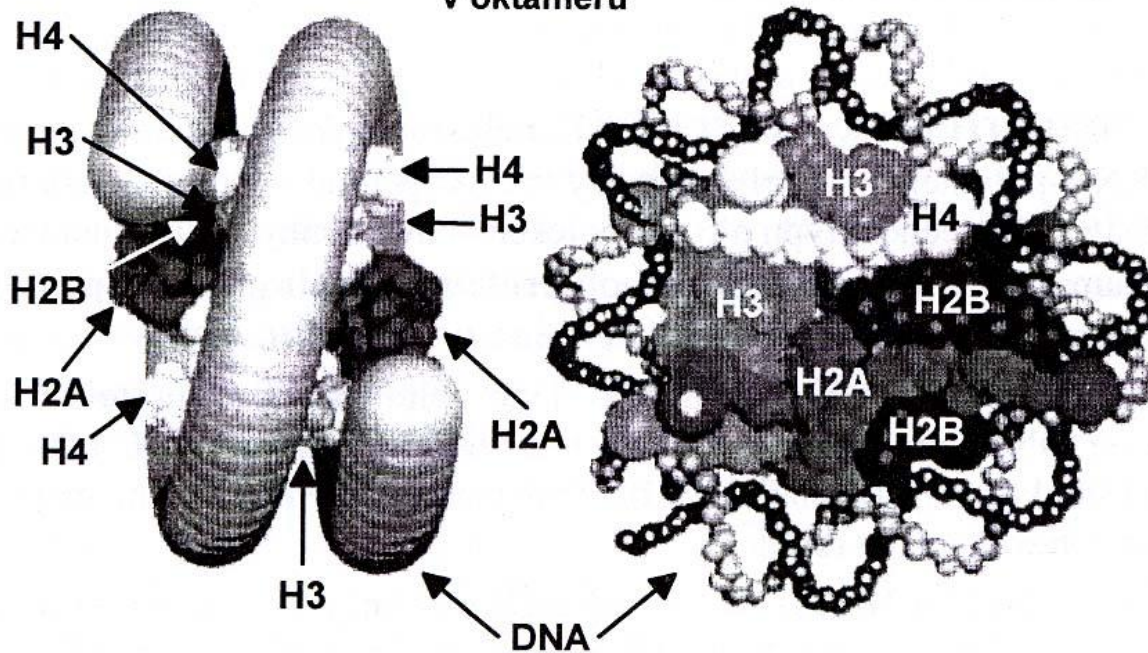
Nukleozómová struktura DNA



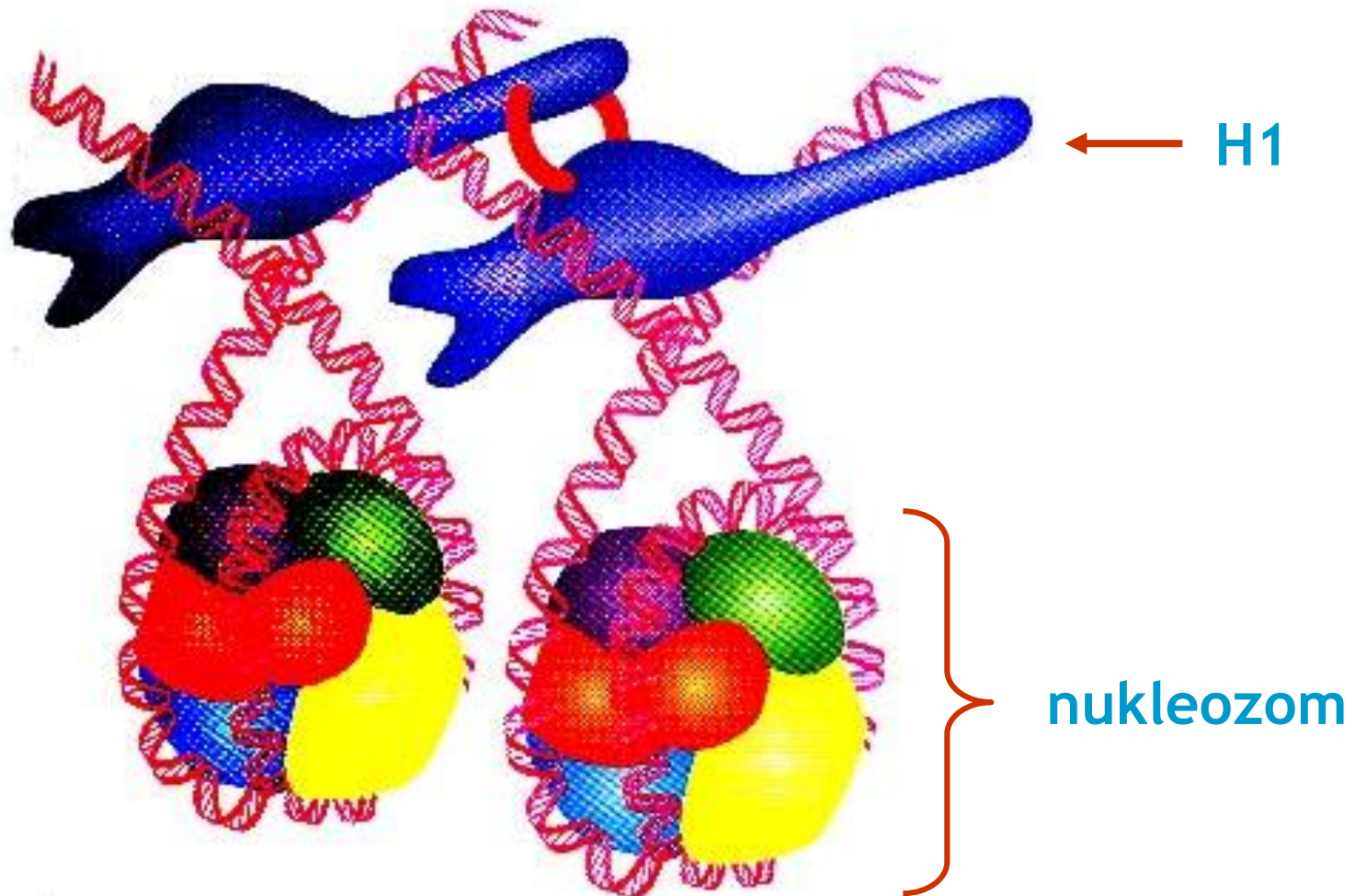


molekulární model

reálnější pohled na umístění histonů v oktameru

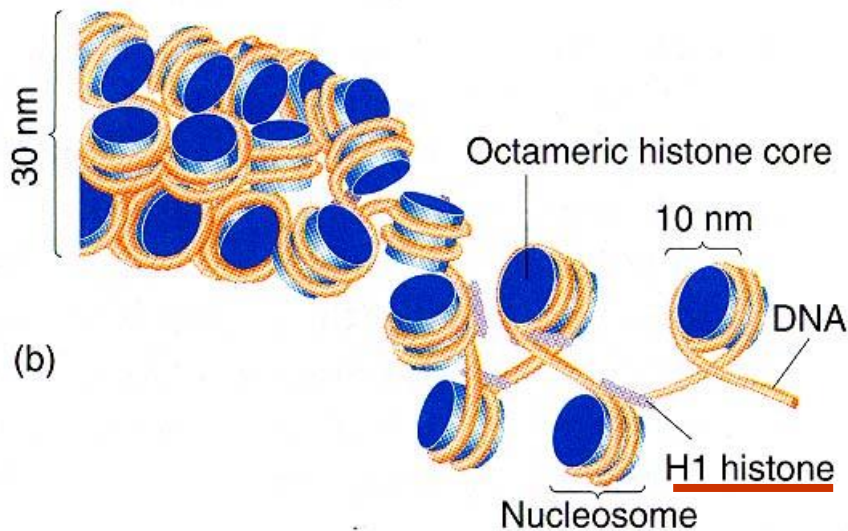


Funkce histonu H1 při spojování nukleozomů

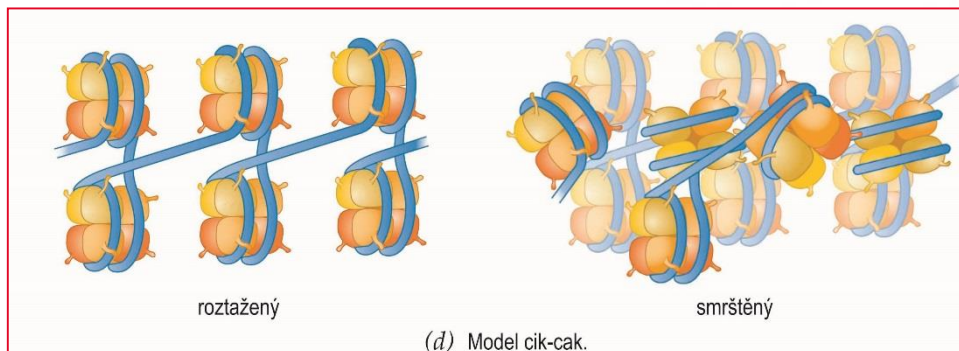
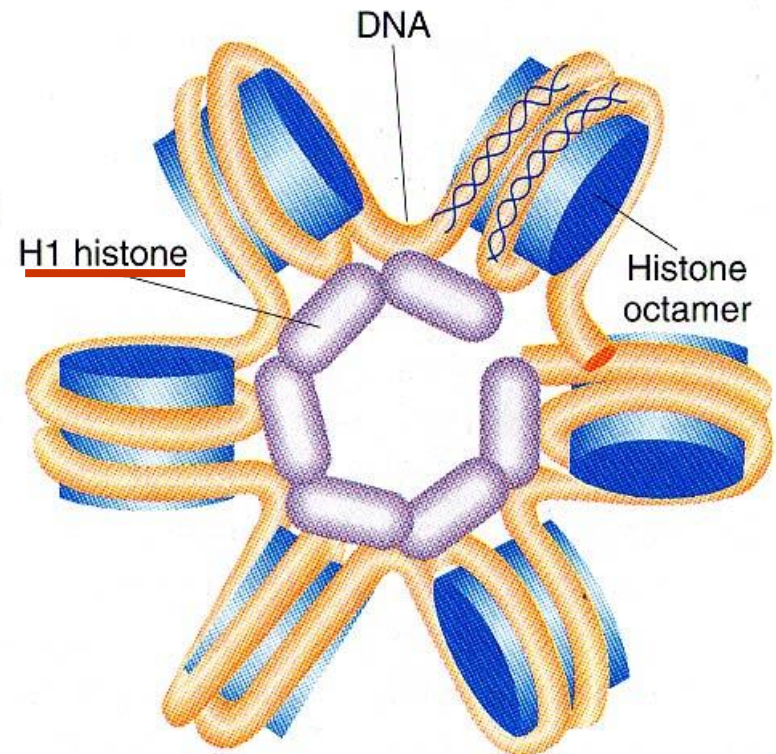


Molekulární struktura eukaryotického chromozomu

30 nm vlákno - solenoidová struktura



Závit solenoidu tvořený 6 nukleozomy



Proteiny chromatinu

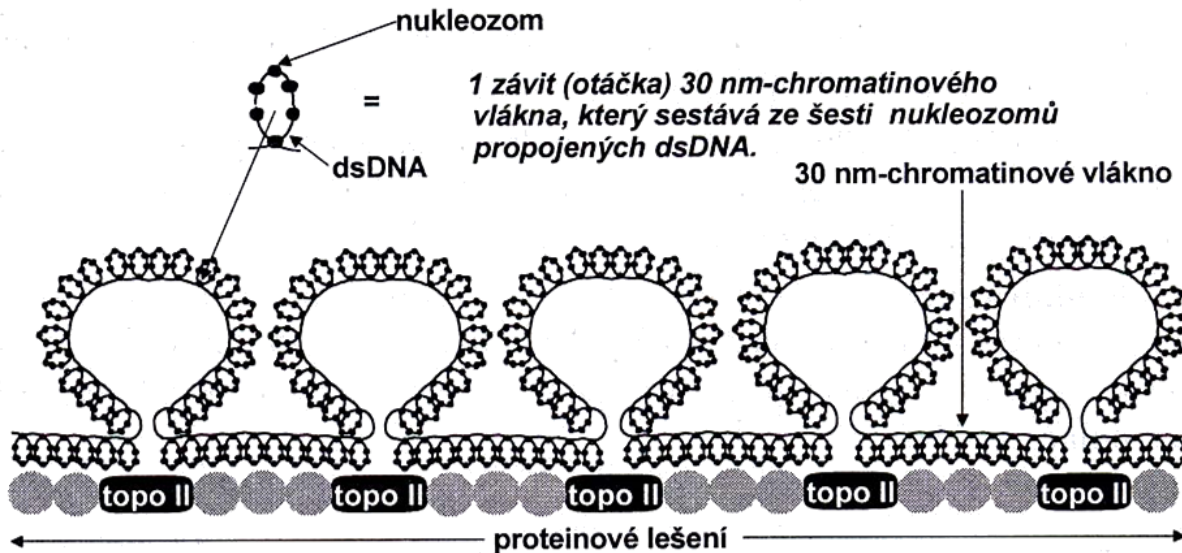
A. Histony

- Bázické proteiny obsahující vysokou proporci argininu a lyzinu (20-30%). U některých organismů jsou ve spermiích přítomny protaminy, které jsou bohaté na arginin.
- Histony jsou velmi konzervativní (zejména H3 a H4). U bakterií se vyskytují toliko HLP, u archeí se nacházejí histony, které jsou jen částečně homologní s H3 a H4.

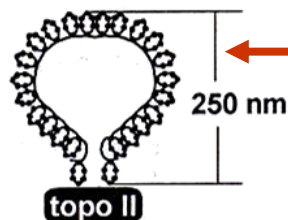
B. Proteiny nehistonové povahy

- proteiny s enzymovými funkcemi, zajišťující replikaci a transkripci (polymerázy, ligázy aj) a enzymy modifikující histony při remodelaci chromatinu (acetyltransferázy, metylázy aj) - regulace genové exprese
- HMG-proteiny (high mobility group), navozující změny chromatinu během transkripce

Struktura 30 nm chromatinového vlákna



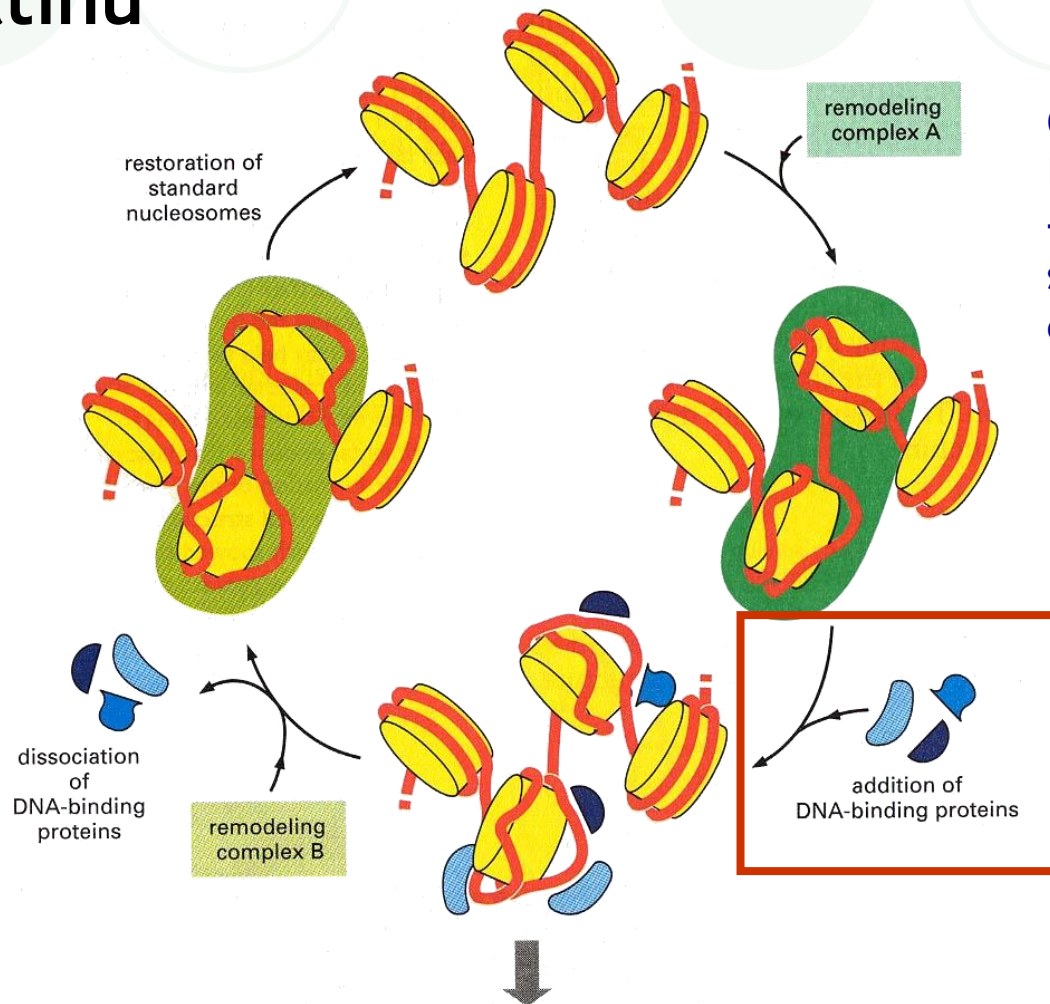
chromatinová doména
(chromatinová smyčka)



replikace
transkripce

*Tento obrázek je idealizujícím schématem.
Chromatinové domény nejsou stejně velké.
Jejich délka je 60 - 150 kb.*

Modely přetváření nukleozomové struktury chromatinu



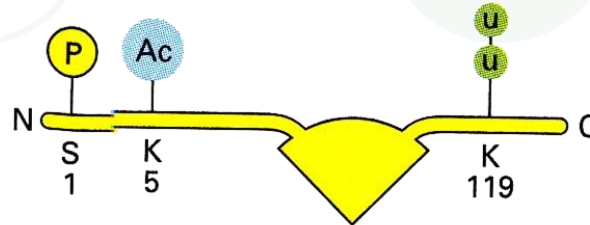
Chromatin remodelující komplexy - dočasné změny struktury chromatinu

Genová exprese, replikace DNA a další procesy vyžadující přístupnost DNA uložené v nukleozomech

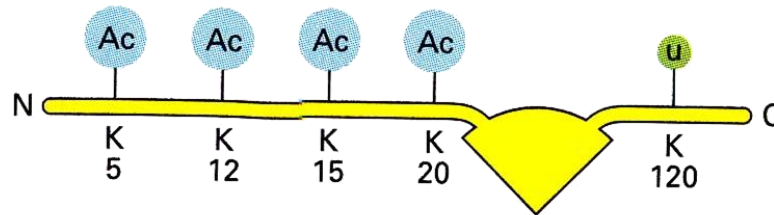
Kovalentní modifikace histonů

S – serin, K - lyzin

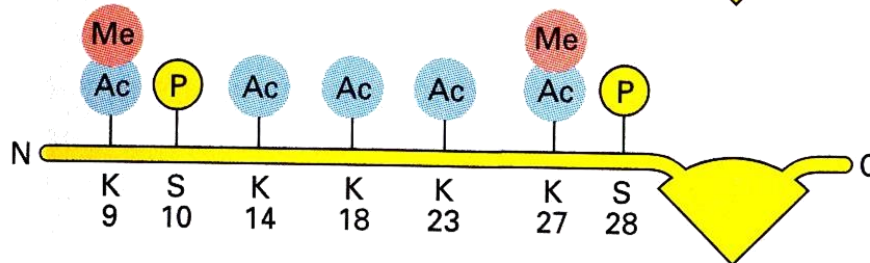
H2A



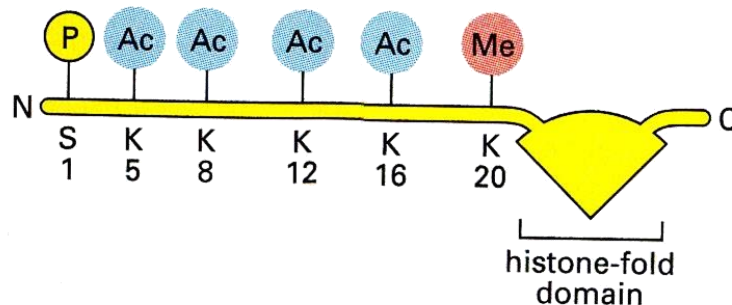
H2B



H3



H4



Ac = acetyl (lyzin)

Me = metyl (lyzin)

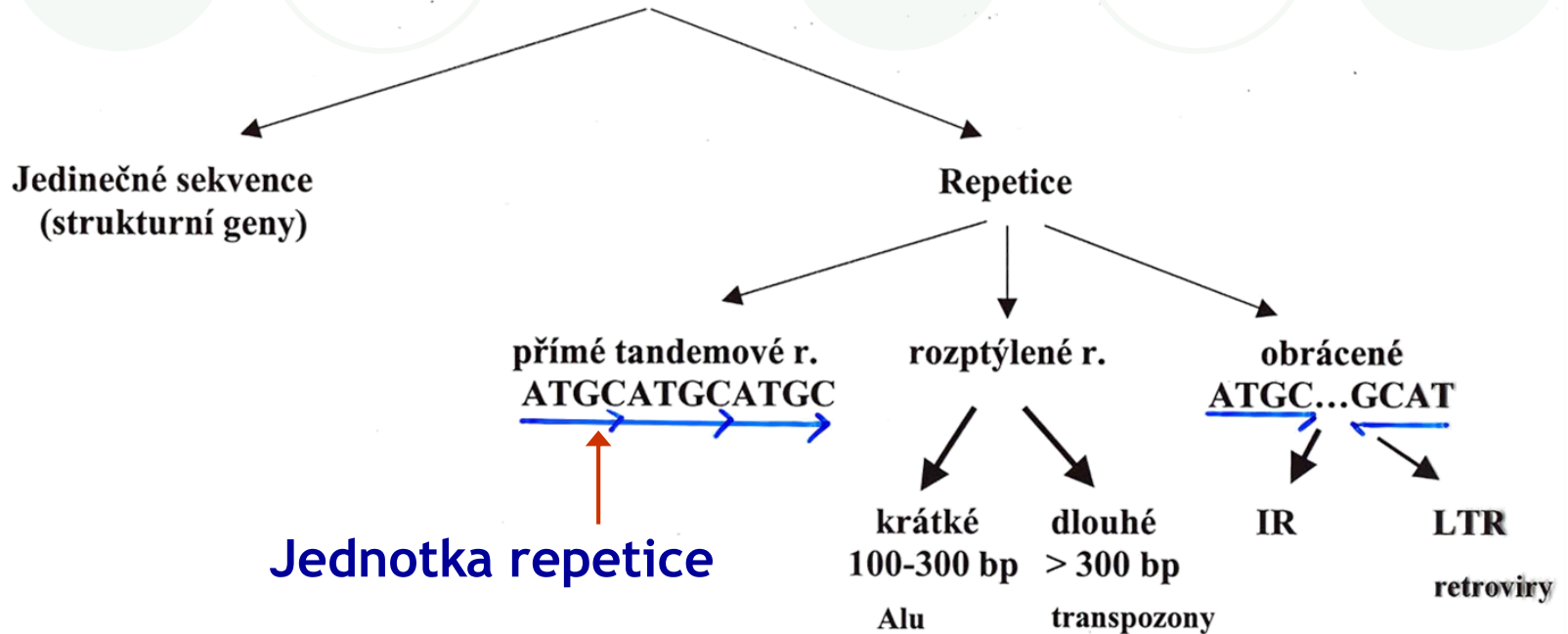
P = fosfát (serin)

u = ubiquitin

„Histonový kód“

- změna struktury chromatinu (de/kondenzace)
- exprese genů
- umlčení genů

Sekvence eukaryotického genomu



Typy genů na eukaryotické jaderné DNA

- **Jedinečné geny** (1 kopie, většina strukturních genů)
- **Tandemové repetice** (geny pro rRNA, geny pro histony)
- Genové rodiny (skupiny příbuzných genů - geny pro globin, aktin aj.)
- Pseudogeny (inaktivní kopie genů)
- **Rozptýlené genové repetice** (kopie genů nebo genových rodin rozptýlené po genomu - geny pro tRNA, snRNA aj.)
- **Orfany (orphans, ORFANS) = URF = ORF** s neznámou funkcí, bez homologie ke známým genům
- **Mezerníky** - sekvence oddělující geny nebo skupiny genů
 - a) přepisované
 - b) nepřepisované

Projekt analýzy lidského genomu

Human Genome Project (HGP)

- 1985 - první úvahy
- 1987 - první finanční zdroje
- 1990 - oficiální zahájení **Dept. Energy, NIH, HUGO**

Cíle dílčích etap:

1. Konstrukce genetické mapy s vysokým rozlišením
2. Konstrukce fyzikálních map různého typu
3. **Téměř úplná sekvence genomu stanovena v roce 2003 (2001-publikace v Nature a Science), dokončeno 2005**
 - identifikovat a lokalizovat geny v genomu člověka
 - stanovit rozdíly v genetické výbavě jedinců
 - jak rozdíly v genetické výbavě predisponují jedince k chorobám

Součást projektu:

- Rozvoj metodologie analýzy genomu (mapování genů, sestavování sekvencí)
- Bioinformatika (sběr a zpracování dat)
- Analýza genomu modelových organismů

Projekt diverzity lidského genomu (Human Genome Diversity Project)

- **Studium genetických variací v etnických skupinách**
 1. Původ člověka, migrace prehistorických populací, sociální struktura populací.
 2. Adaptace a choroby. Náchylnost populací k chorobám (hypertenze, thalasemie, srpkovitá anemie aj).
 3. Forezní antropologie. Variabilita DNA markerů, spolehlivost DNA-fingerprintů, identifikace jedinců.

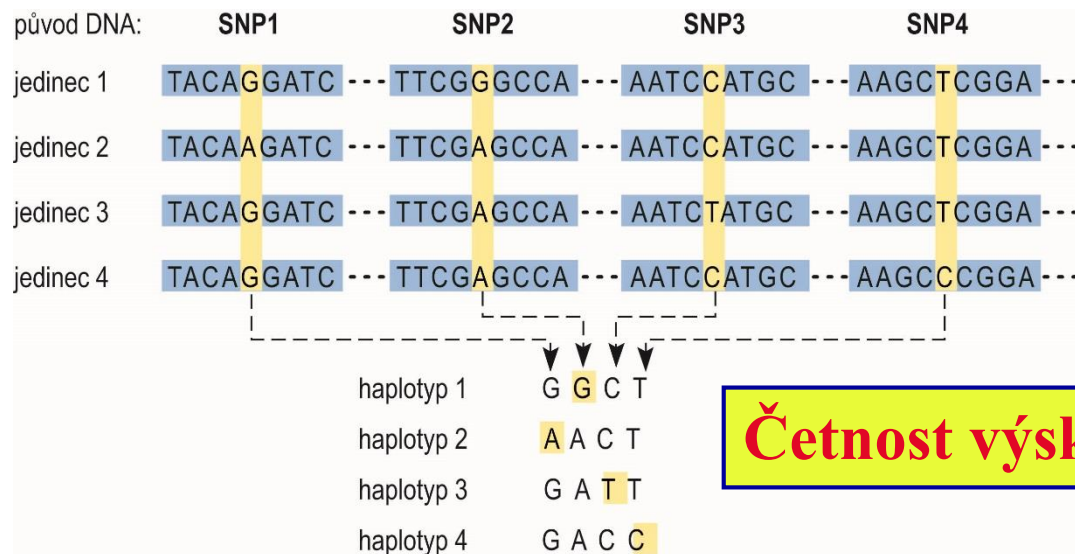
Matt Ridley: Genom – Životopis lidského druhu v třidvaceti kapitolách. Portál, Praha 2001.

Lidský mezinárodní projekt HapMap (Haplotype map)

Cíl projektu: identifikovat a mapovat SNP („snips“, single-nucleotide polymorphisms) v různých populacích, **zjistit jejich asociaci s geny zodpovědnými za choroby a tím stanovit rizika vzniku chorob** (270 národů ze čtyř větví lidstva - Američanů, původem evropských bělochů, Číňanů, Japonců a Yoruby ze západní Afriky)

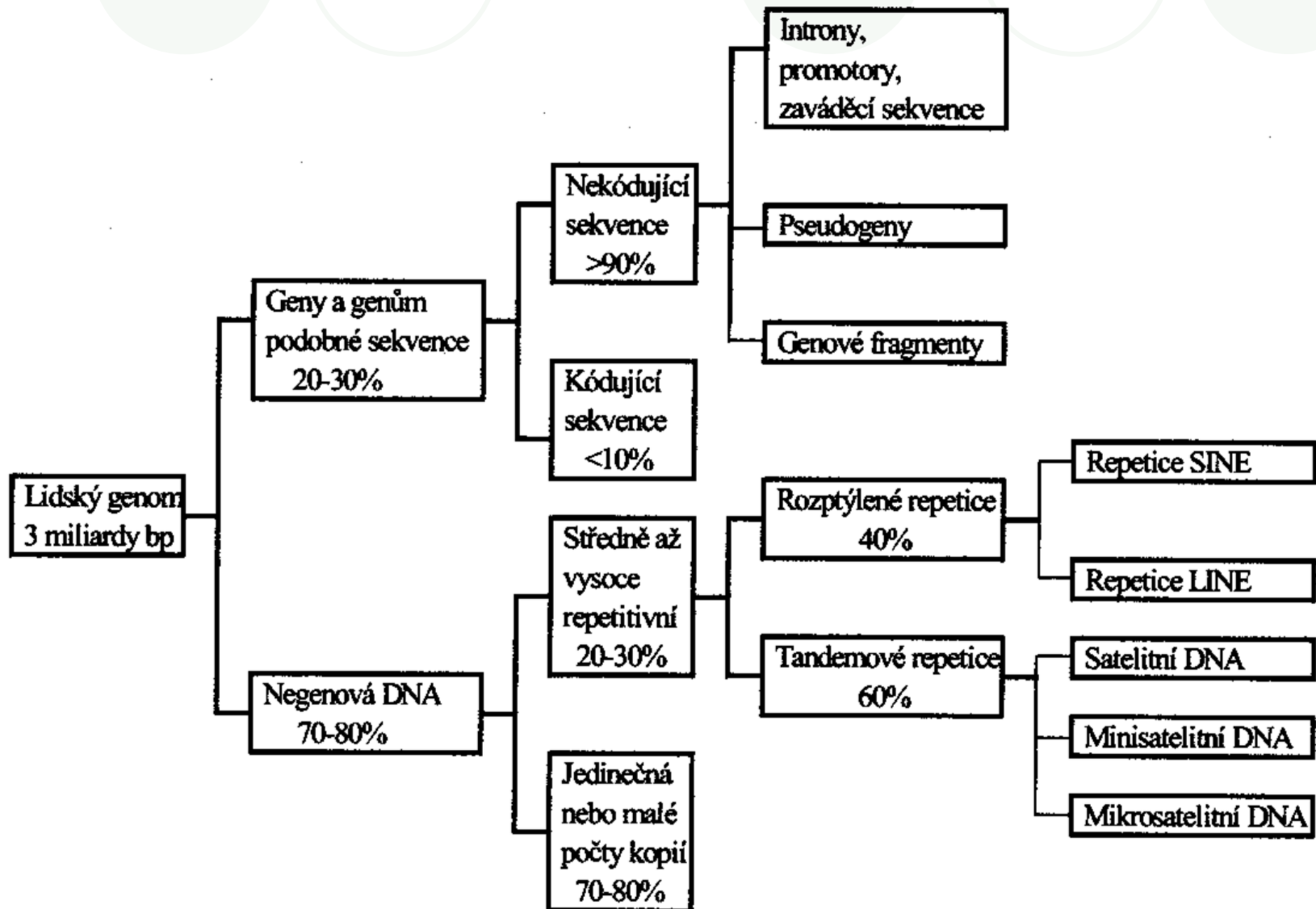
Drobné změny v lidském genomu: jednonukleotidové polymorfismy = SNP - záměny nukleotidů v četnosti **1 : 2 000** (podobnost genomů u nepříbuzných lidí ~99,5%)

Haplotyp: skupina vázaných SNP v určité oblasti chromozomu využívaných jako markery (jsou vázány k určitým genům (alelám) – asociace s geny zodpovědnými např. za choroby)



Četnost výskytu 1:1 200

Typy DNA-sekvencí v lidském genomu

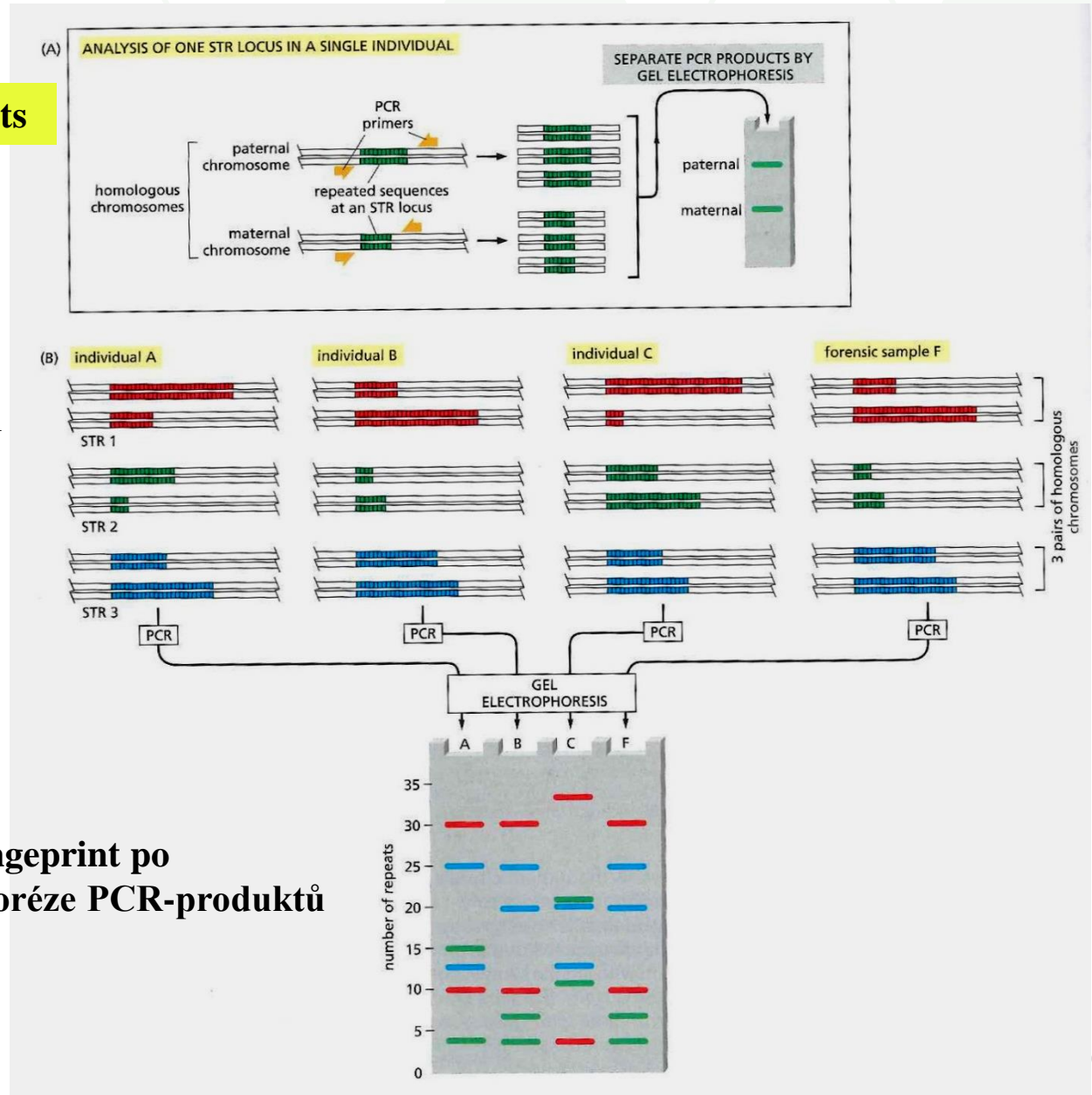


Odlišování jedinců na základě polymorfismů STR

STR = short tandem repeats

Rozdílný počet STR
ve stejném lokusu
tří párů
homologních
chromozomů

**DNA-fingerprint po
elektroforéze PCR-produktů**



Statistické údaje o lidském genomu

Celková velikost genomu	3289 Mb
Chromozomy	
- největší	279 Mb
- nejmenší	45 Mb
X	163 Mb
Y	51 Mb
Část genomu kódující proteiny	1,50 % (<2%)
Část genomu, která je transkribována	33 % (20-90%)
Počet dosud identifikovaných genů	26 500
Celkový počet předpovězených genů	22 287 (2008)
Střední hustota genů	9-14 genů/Mb
Průměrná velikost genu	27 kb
Největší gen	2,4 Mb (DMD)
Průměrná velikost transkriptu	1340 bp
Proporce repetitivních sekvencí	~ 45%
Počet psedogenů	13 000

Současný odhad
18 000-20 000

Vybrané typy nekódujících molekul RNA (ncRNA)

Typ	Název
tRNA	transfer
rRNA	ribosomal
miRNA	mikro
snRNA	Small nuclear
lncRNA	Long non-coding
lincRNA	Long intergenic non-coding

Genom organel: chloroplastů a mitochondrií

Table 14-2 The Size of Organelle Genomes*

Type of DNA	Size (thousands of nucleotide pairs)
Chloroplast DNA	
Higher plants	120–200
<i>Chlamydomonas</i> (green alga)	180
Mitochondrial DNA	
Animals (including flatworms, insects, and mammals)	16–19
Higher plants	150–2500
Fungi	
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (fission yeast)	17
<i>Aspergillus nidulans</i>	32
<i>Neurospora crassa</i>	60
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (budding yeast)	78
<i>Chlamydomonas</i> (green alga)	16 (linear molecule)
Protozoa	
<i>Trypanosoma brucei</i>	22
<i>Paramecium</i>	40 (linear molecule)

*These genomes are circular DNA molecules unless indicated otherwise.

Počet kopií DNA v organelách: mtDNA: 5-50 i více, ctDNA = 20-80

heteroplasmie

► Tab. 16.2

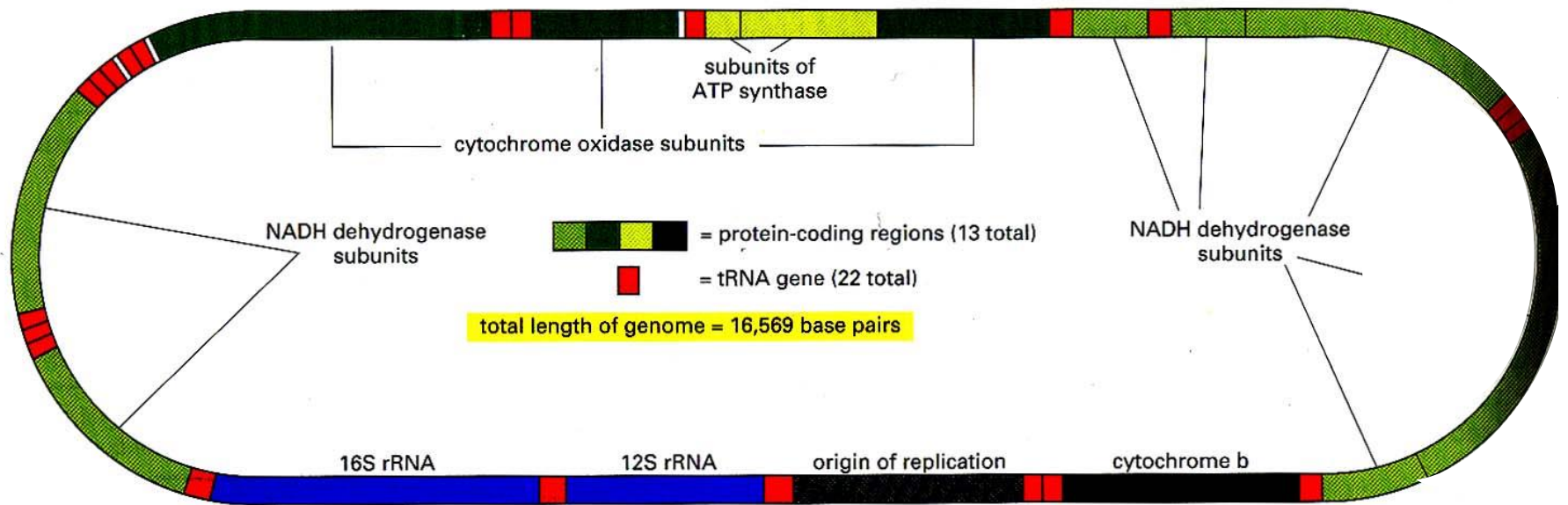
Velikost a genový obsah vybraných mitochondriálních a chloroplastových genomů

druh	triviální označení	velikost genomu v párech nukleotidů	předpokládaný počet genů
<u>mitochondriální genomy</u>			
<i>Apis mellifera</i>	včela	16 343	13
<i>Arabidopsis thaliana</i>	huseníček	366 924	57
<i>Caenorhabditis elegans</i>	háďátka	13 794	12
<i>Candida glabrata</i>	kvasinka (infekční)	20 063	37
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	zelená řasa	15 758	25
<i>Drosophila melanogaster</i>	octomilka	19 517	37
<i>Danio rerio</i>	dánio pruhované	16 596	37
→ <i>Homo sapiens</i>	člověk	16 571	37 ←
<i>Mus musculus</i>	myš	16 299	37
<i>Oryza sativa</i>	rýže	491 515	96
<i>Plasmodium falciparum</i>	prvok, původce malárie	5 967	3
<i>Rattus norvegicus</i>	potkan	16 313	37
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	pekařská kvasinka	85 779	43
<i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i>	kukuřice	569 630	218
<u>chloroplastové genomy</u>			
<i>Arabidopsis thaliana</i>	huseníček	154 478	129
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	zelená řasa	203 828	109
<i>Marchantia polymorpha</i>	játrovka	121 024	134
<i>Oryza sativa</i>	rýže	134 525	159
<i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i>	kukuřice	140 384	158

Údaje jsou převzaty z webové stránky NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genomes/>) k 15. květnu 2008.

Struktura genomu mitochondrií člověka

16 569 pb, 37 genů



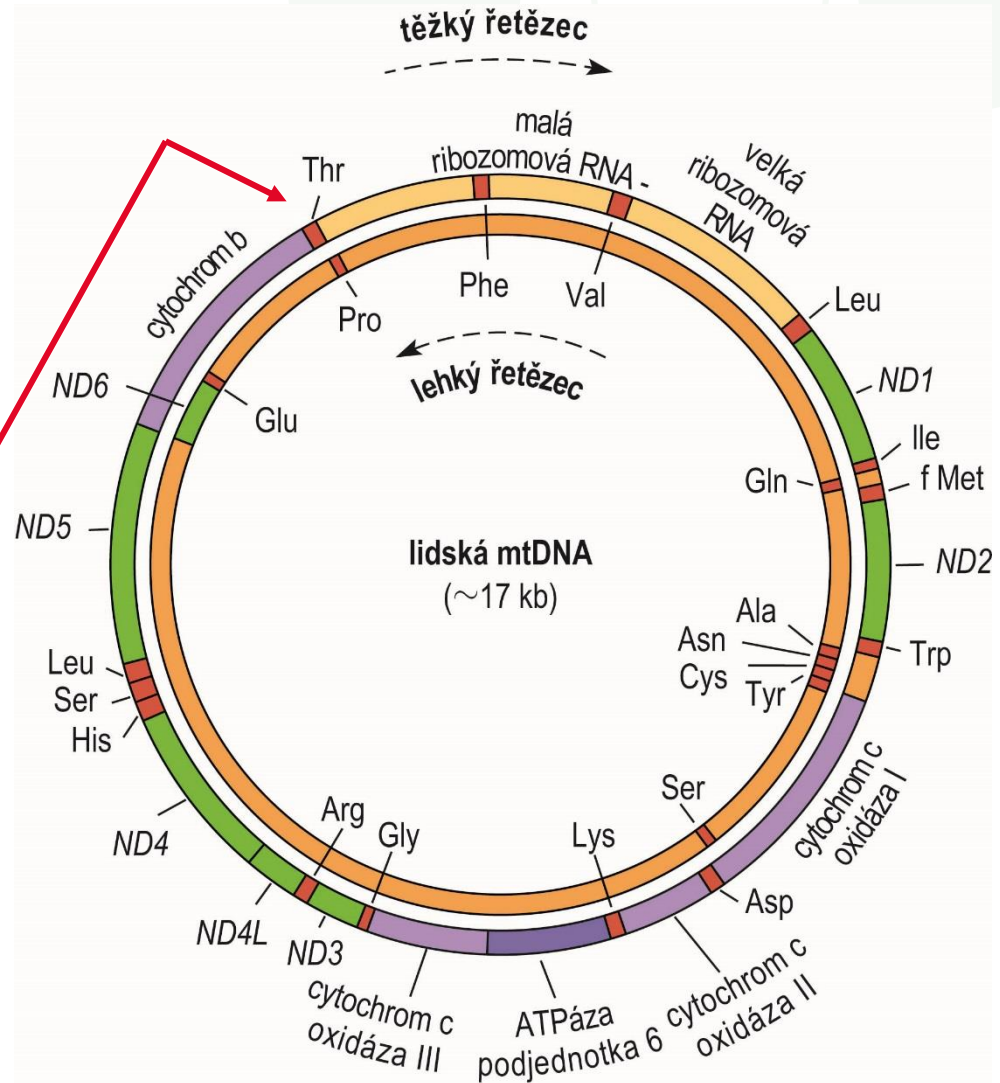
Funkce mitochondrií: tvorba ATP oxidací cukrů a mastných kyselin
mtDNA kóduje: rRNA (12S a 16S), 22 tRNA, cytochrom c-oxidázy, cytochrom b, ATP-syntetázu

Mapa lidského mitochondriálního genomu

těžký řetězec H (vyšší obsah purinů)

lehký L (vyšší obsah pyrimidinů)

Analýza mtDNA pro identifikační a genealogické účely je zaměřena zejména na první a druhou hypervariabilní oblast (HVR1 a HVR 2) kontrolní oblasti mtDNA (neobsahuje kódující sekvence), která se také nazývá D-smyčka. Tato oblast, o kterou se při analýze mtDNA (HVR 1 a HVR 2) především zajímáme, je velická pouze 1050 bází (~ 7% genomu mtDNA).



Mitochondriová DNA různých skupin organismů

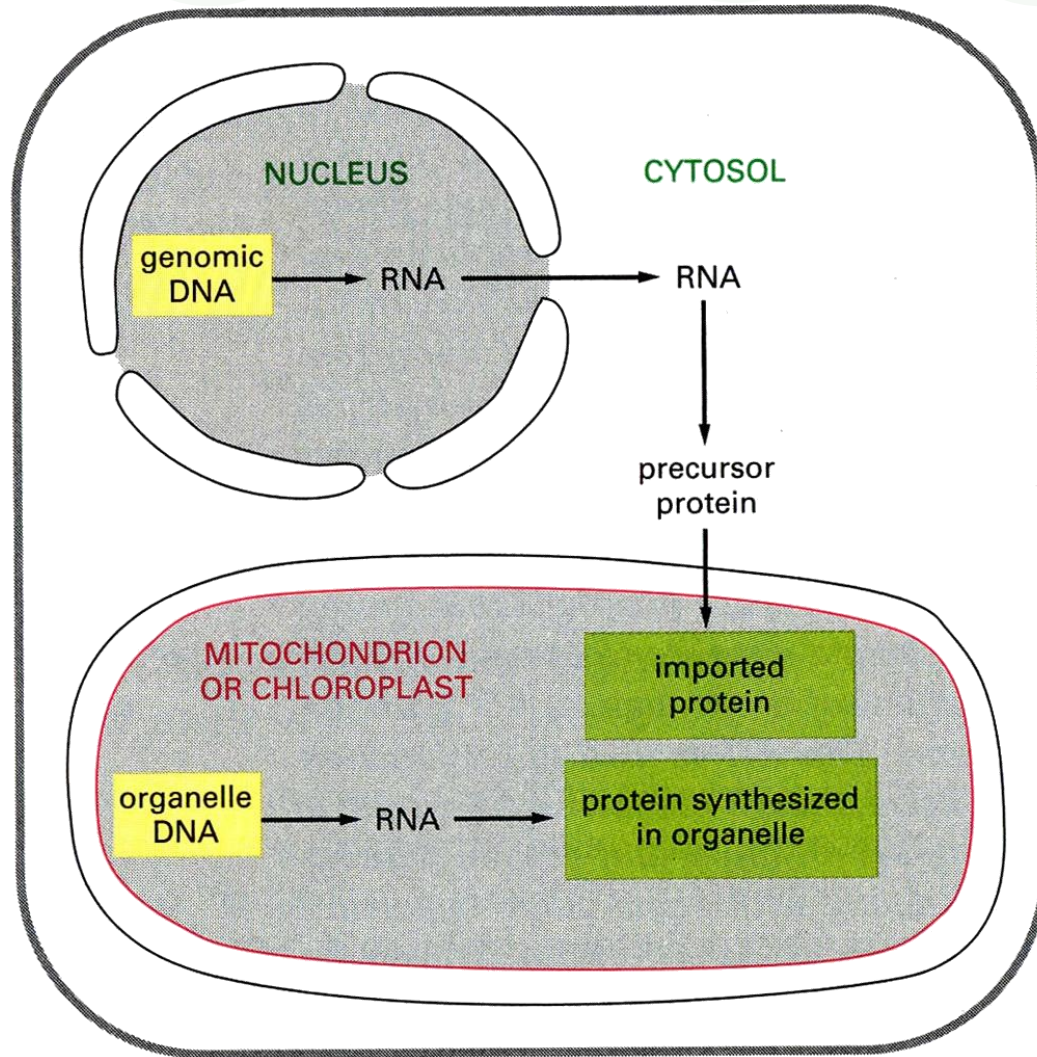
Organizmy	Velikost v bp	Struktura	Charakteristika
Buňky více-buněčných živočichů	1,6 až $2,0 \times 10^4$	kružnicová	každý živočišný druh má svůj vlastní typ mtDNA
Buňky vyšších rostlin	$2,5 \times 10^5$ až $2,0 \times 10^6$	kružnicová nebo lineární	pozoruhodná variabilita ve velikosti, struktuře a genetické organizaci nejen mezi druhy, ale také u stejného organismu, a tedy i ve stejné buňce
Prvoci	$3,0 \times 10^4$ až $6,0 \times 10^4$	kružnicová nebo lineární	rozdíly mezi druhy
Kvasinky	$2,0 \times 10^4$ až $1,0 \times 10^5$	kružnicová	jednotná uvnitř stejného druhu, ale rozdíly mezi druhy

- ◆ Velmi charakteristické pro mtDNA vyšších rostlin jsou úseky, které se podobají DNA chloroplastů.

Specifické rysy mitochondriového genomu

1. Geny jsou uspořádány velmi hustě, téměř celá sekvence je tvořena strukturními geny nebo se přepisuje do rRNA a tRNA
 2. K translaci je využíváno jen 22 tRNA, které jsou schopny díky kolísavému párování bazí přečíst všechny kodony
 3. Genetický kód používaný v mitochondriích (některých organismů) se liší od standardního genetického kódu. 4 ze 64 kodonů mají jiný smysl (zřejmě v důsledku malého počtu proteinů kódovaných v mitochondriích byly tyto změny během evoluce tolerovány)
- pro zajištění fungování mitochondrií je vyžadováno 90 genů lokalizovaných v jaderném genomu
 - mitochondriové geny se dědí nemendelisticky (matroklinně, cytoplazmatická dědičnost) - studium lidských populací
 - podléhá rychleji mutacím (10-100x častěji než jaderný genom, reparační procesy omezené) Mutace mitochondrií zodpovídají za řadu onemocnění (neurodegenerativní, svalové aj.)

Většina proteinů v organelách je kódovaná jaderným genomem

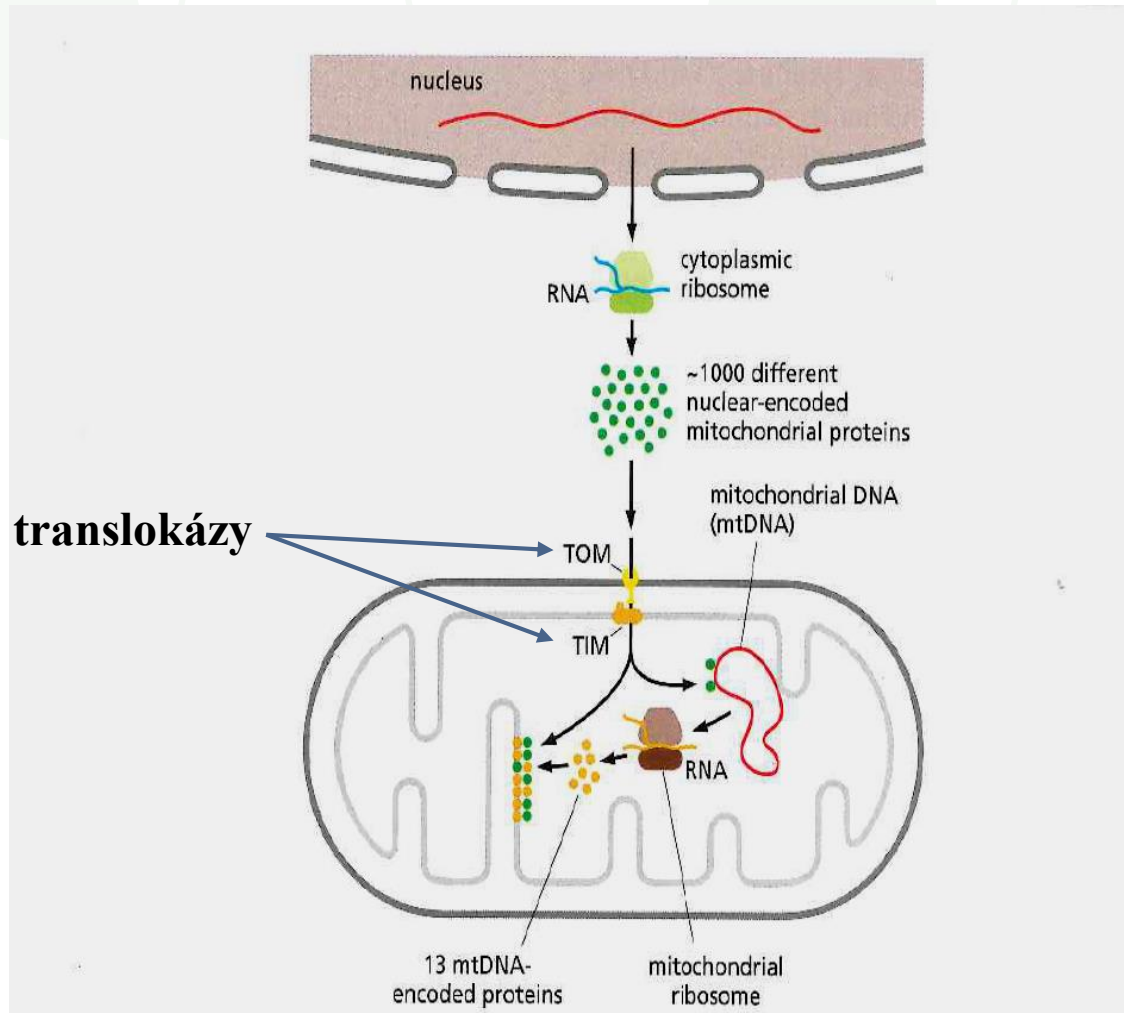


Kooperace jaderných genů s geny na mtDNA lidského genomu

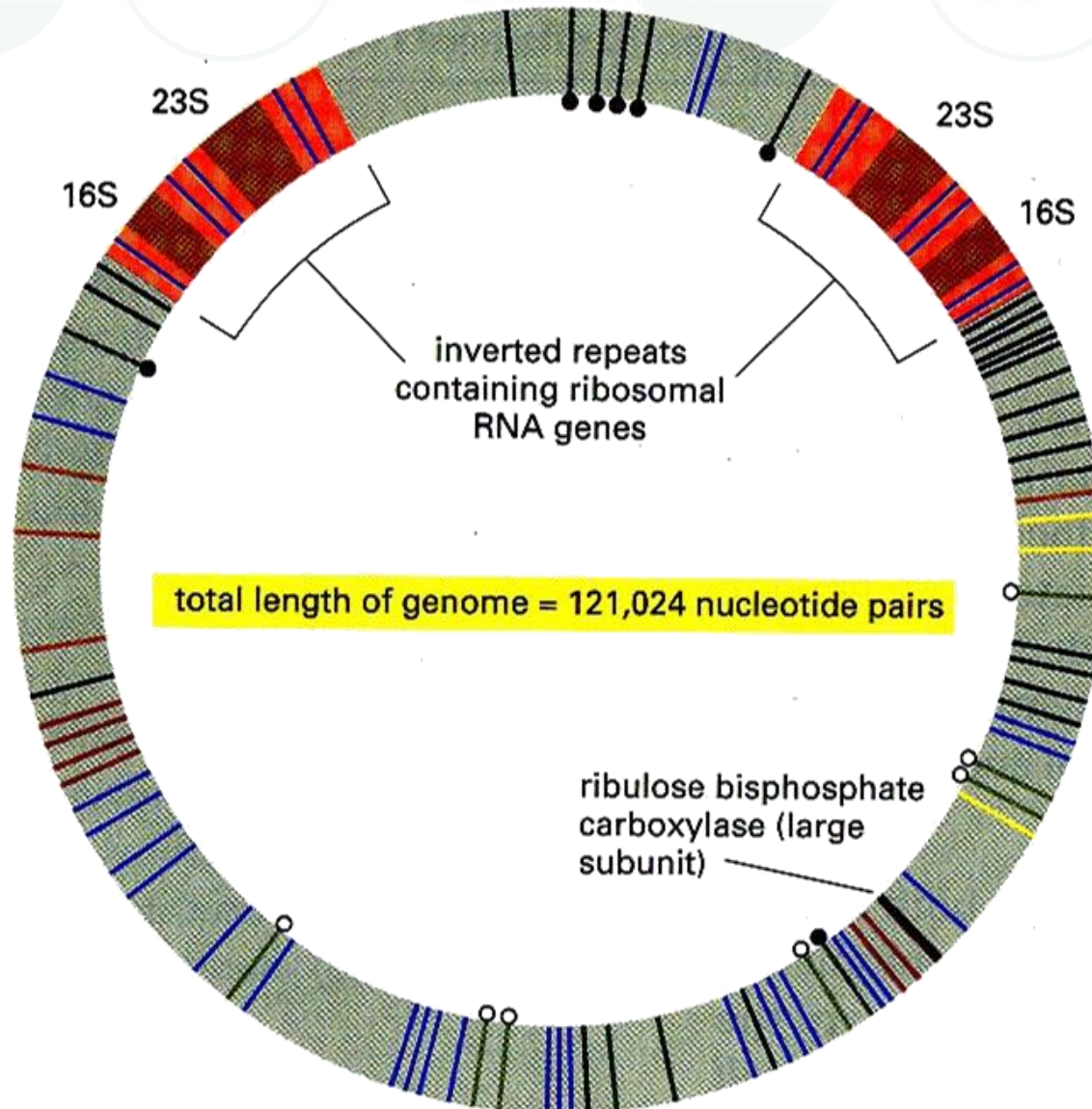
Funkční produkt	Podjednotky (protomery) funkčního produktu	
	určené geny lokalizovanými na mtDNA	určené geny lokalizovanými v jádře buňky
NADH-dehydrogenáza	7 podjednotek	>41 podjednotek
Sukcinát CoQ-oxidoreduktáza	0 podjednotek	4 podjednotky
Komplex cytochromu b-c1	1 podjednotka	10 podjednotek
Cytochrom c-oxidáza	3 podjednotky	10 podjednotek
H ⁺ -transportující ATP-syntáza	2 podjednotky	14 podjednotek
rRNA mitochondrií	2	0
tRNA mitochondrií	22	0
mRNA mitochondrií	13	0
DNA- a RNA-polymerázy	0	všechny
Ribozomové proteiny	0	~70

Onemocnění jako důsledek mutací mtDNA a nDNA

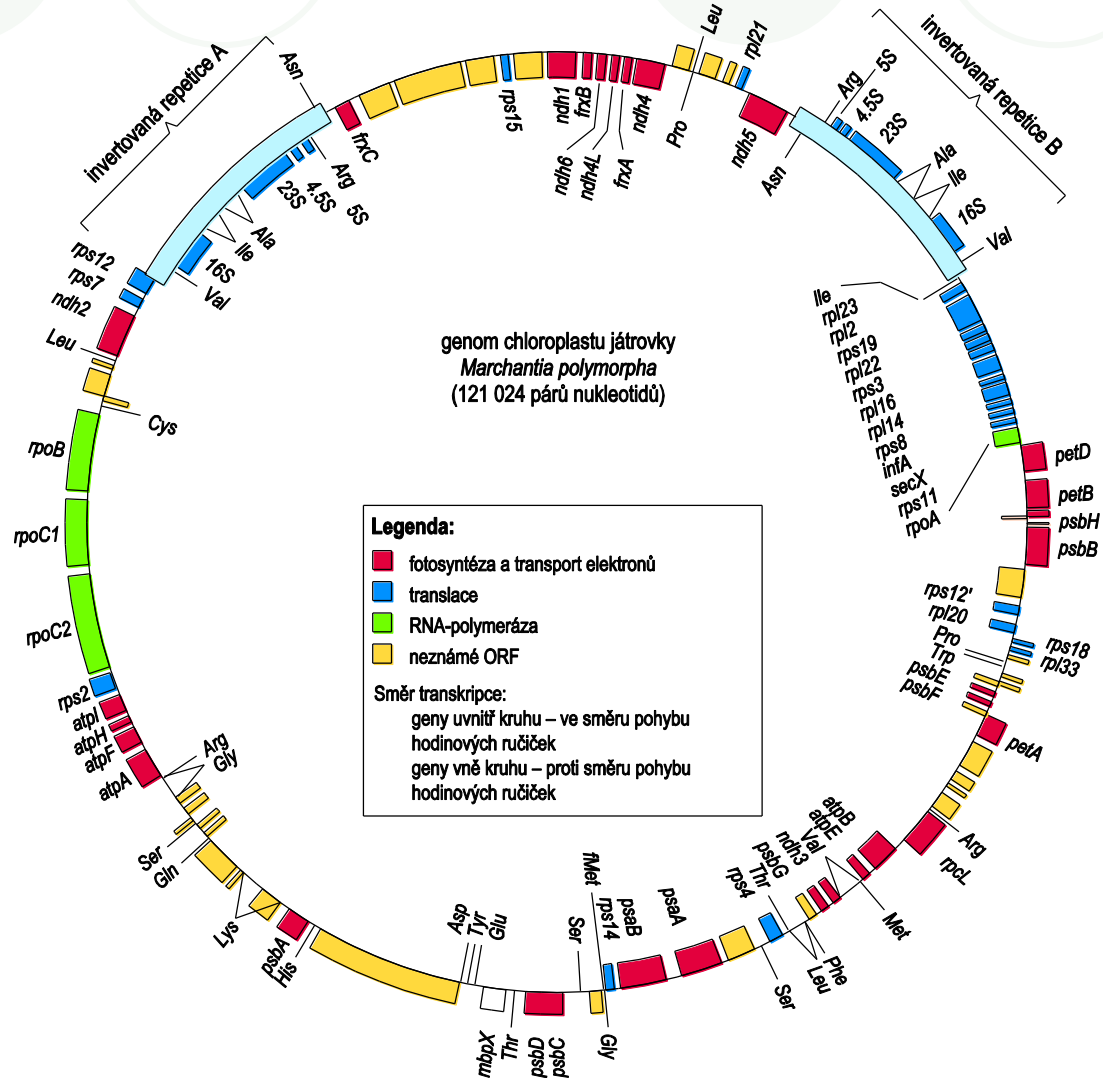
Biogeneze proteinů dýchacího řetězce v lidských mitochondriích



Genom chloroplastů



Genetická organizace genomu chloroplastu



Geny chloroplastů *Nicotiana tabacum*

Funkce	Počet genů
Transkripce	
RNA-polymeráza	4
Translace	
rRNA	4
tRNA	30
Ribozomové proteiny	21
Fotosyntéza	
Fixace CO ₂	1
Fotosystém I	5
Fotosystém II	14
Cytochromový komplex b/f	5
H ⁺ transportující ATP-syntáza	6
Jiné funkce	
NAD(P)H-dehydrogenázový komplex	11
Clp-proteáza	1
Acetyl-KoA-karboxyláza (EC 6.4.1.2)	1
Membrána plastidu	1
Maturázy (str. 394)	1
Otevřené čtecí rámce kódující více než 29 aminokyseliny	30

Geny chloroplastů jsou podobné genům cyanobakterií

Původ mitochondrií a chloroplastů (**endosymbiotická teorie**)

- **MITOCHONDRIE**

- chemoorganotrofní prokaryotické buňky **s aerobní respirací** (protomitochondrie)



améboidní anaerobní předchůdci eukaryotických buněk

- **CHLOROPLASTY**

- fotolitotrofní prokaryotické buňky (fotosyntetizující protochloroplasty)

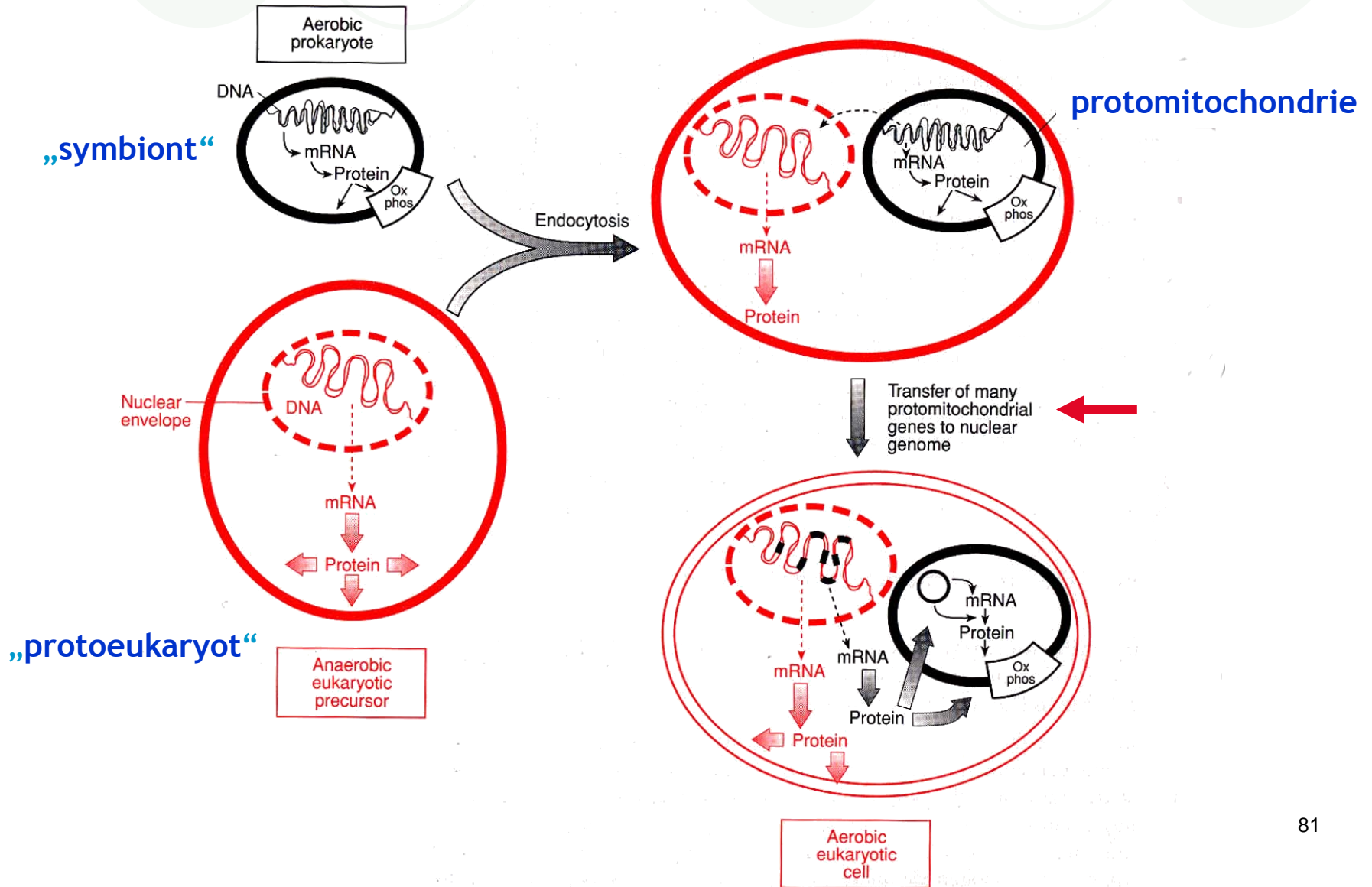


améboidní předchůdci eukaryotických buněk

- **Nepřímé důkazy:**

- **přehrádečné dělení mitochondrií**
- **konformace DNA (kružnicová forma)**
- **translační aparát podobný prokaryotům**
 - **podobnost sedimentačních koeficientů ribozomů**
 - **podobnost sekvencí mt-rRNA s rRNA bakterie *E. coli***

Původ mitochondrií

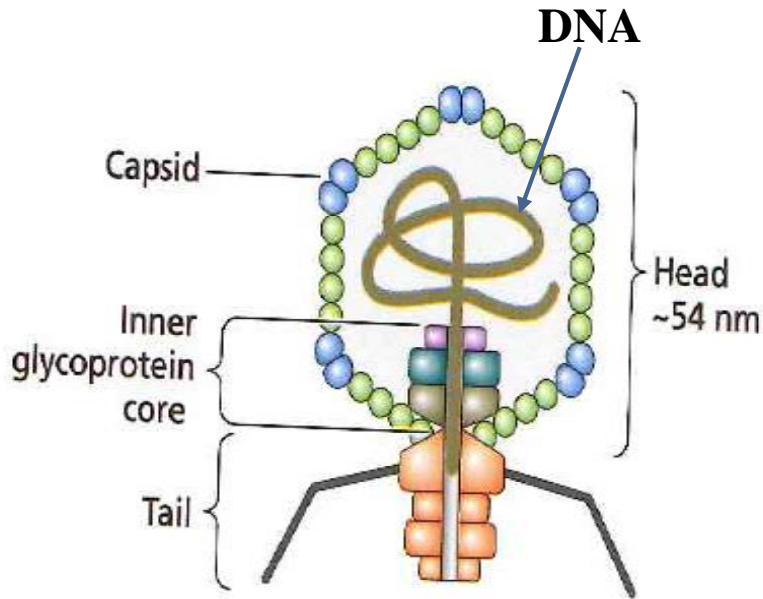


Genom virů

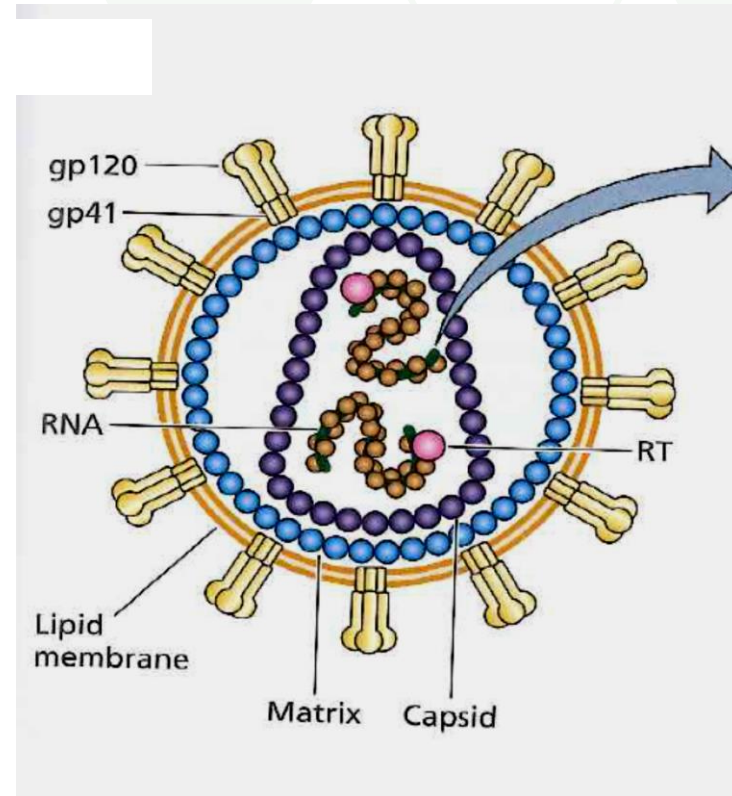
- Viry
 - Prokaryotické (bakteriofágy)
 - DNA
 - RNA
 - Eukaryotické
 - živočišné DNA/RNA
 - rostlinné DNA/RNA
 - houbové DNA/RNA
- **Typy genomové NK**
 - **ssDNA - lineární nebo kužnicová**
 - **dsDNA - lineární nebo kružnicová**
 - **ssRNA - lineární**
 - **dsRNA - lineární**

Segmentovaný genom

Struktura virových částic

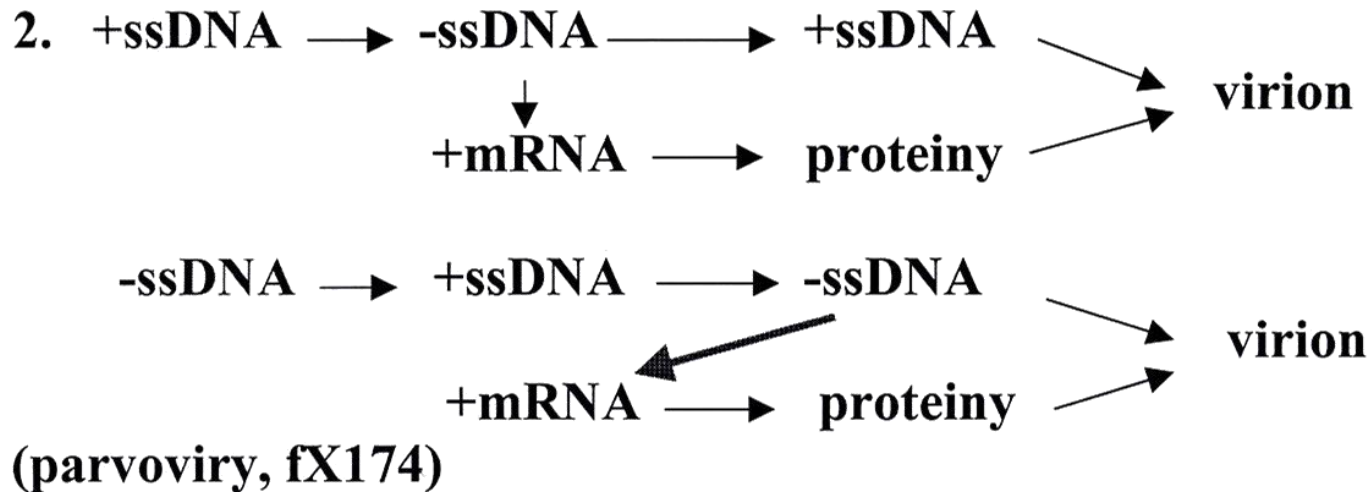
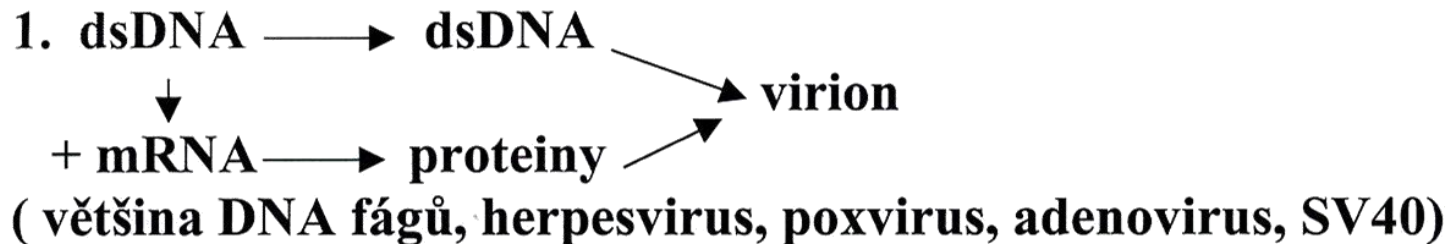


bakteriofág

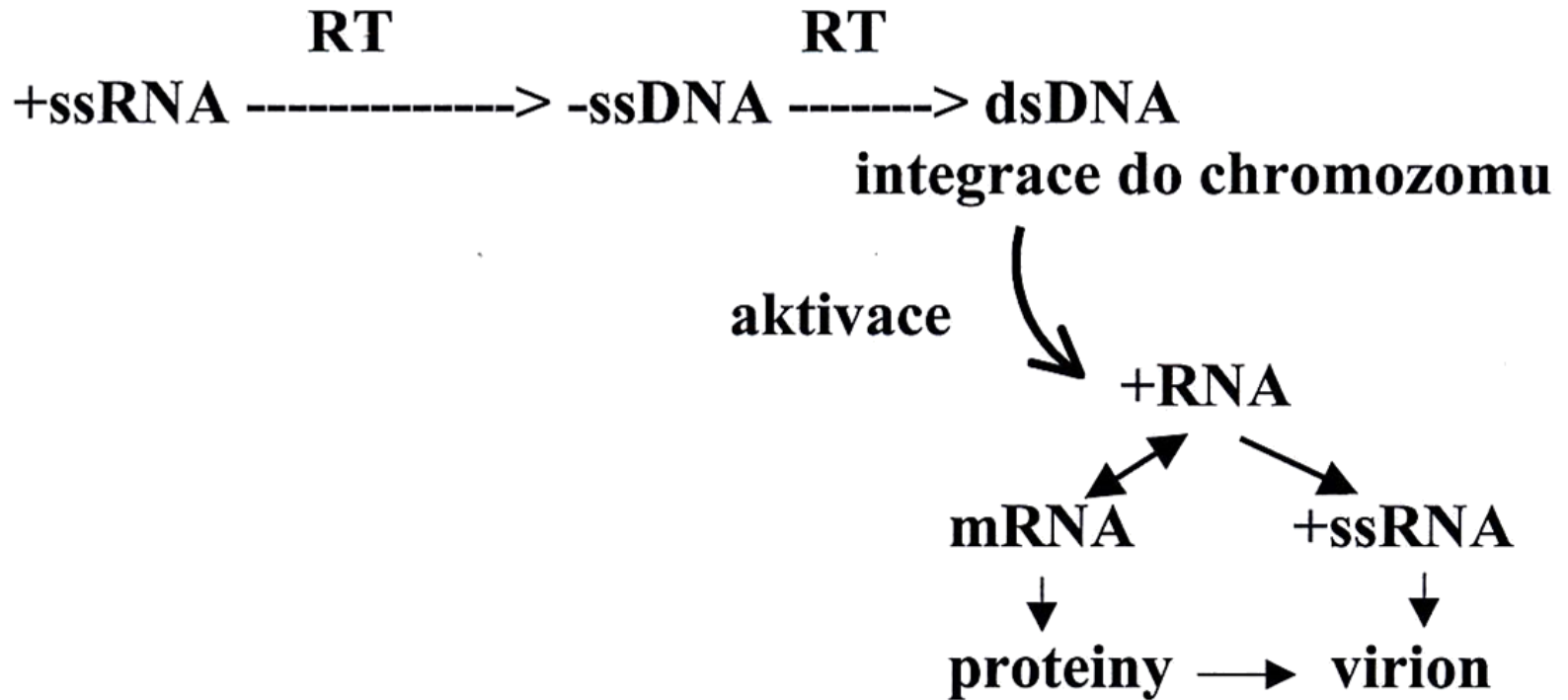


virus HIV

Rozdělení virů podle typu genomu

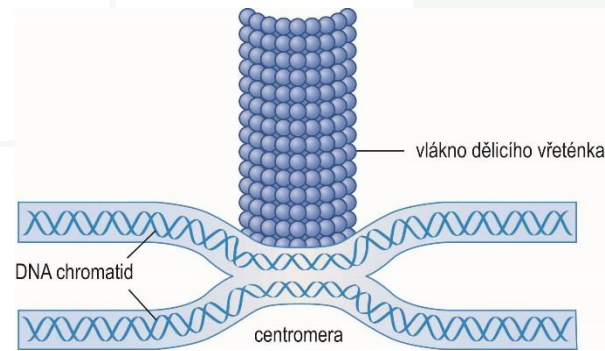


Retroviry (HIV)

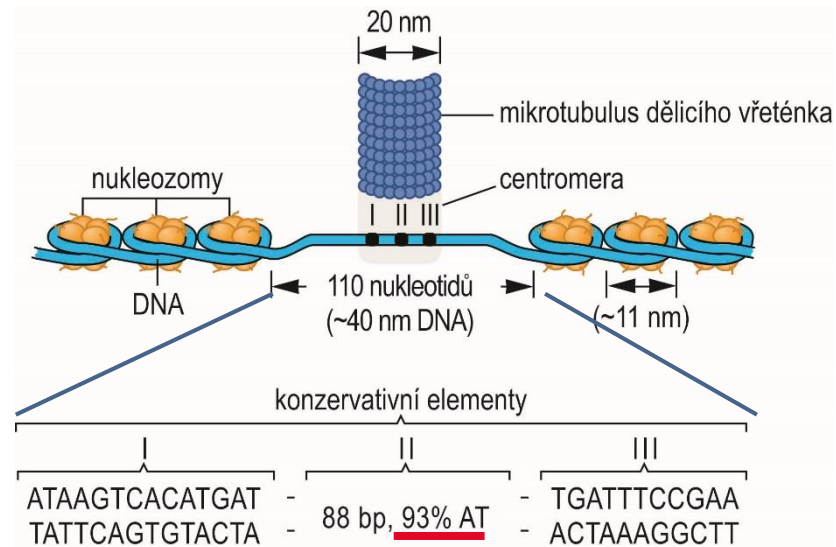




Model struktury centromery metafázního chromozomu



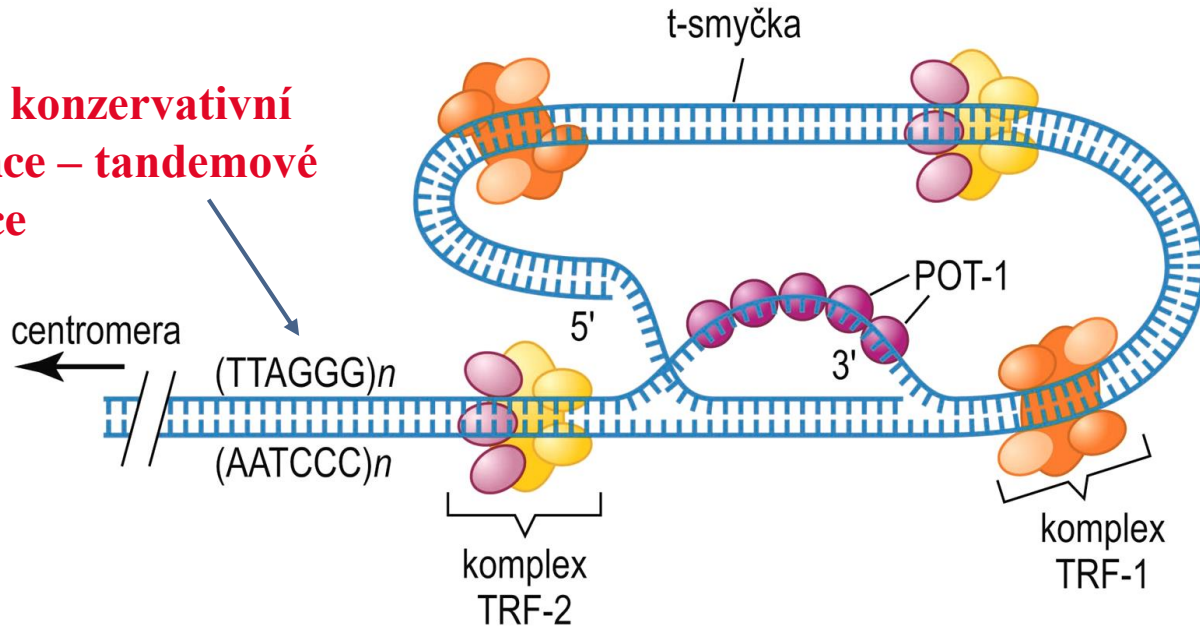
Konzervativní struktury centromer u kvasinky



↑
↑
vazba specifických proteinů

Model lidské telomery stabilizované tvorbou t-smyčky

**vysoce konzervativní
sekvence – tandemové
repetice**



Specifita struktury telomery:

- zabraňuje odbourávání konců chromozomů DNázami
- brání spojování (fúzí) konců různých chromozomů
- umožňuje replikaci lineárních chromozomů



