

1. Regulace genové exprese:

- Prokaryotické b.
- Eukaryotické b.

2. Vybrané metody studia genů

3. Šum v genetické informaci

- mutagenní faktory
- typy mutací

Regulace genové exprese u prokaryont

- Konstitutivní a adaptivní proteiny

Strategie syntézy adaptivních proteinů:

katabolické dráhy – indukce substrátem

anabolické dráhy – represe konečným produktem

OPERON – transkripční jednotka:

promotor, operátor, strukturní geny

represor, induktor

negativní a pozitivní regulace operonu

Regulace genové exprese u eukaryont

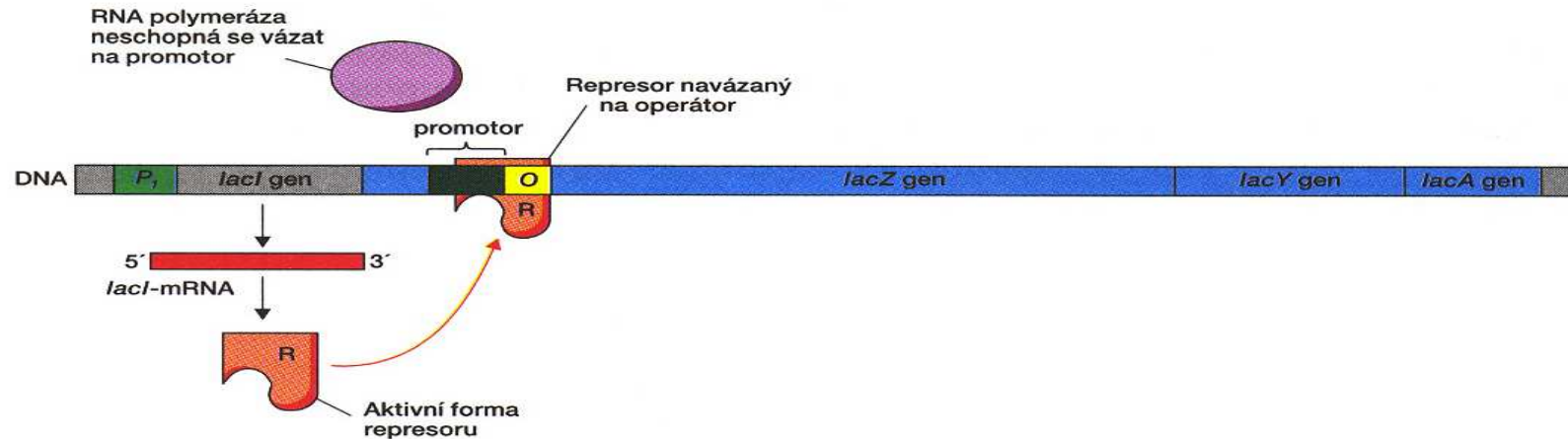
Rozdíly:

- velikost genomu
- lokalizace genomu
- struktura chromozómů
- životnost m RNA

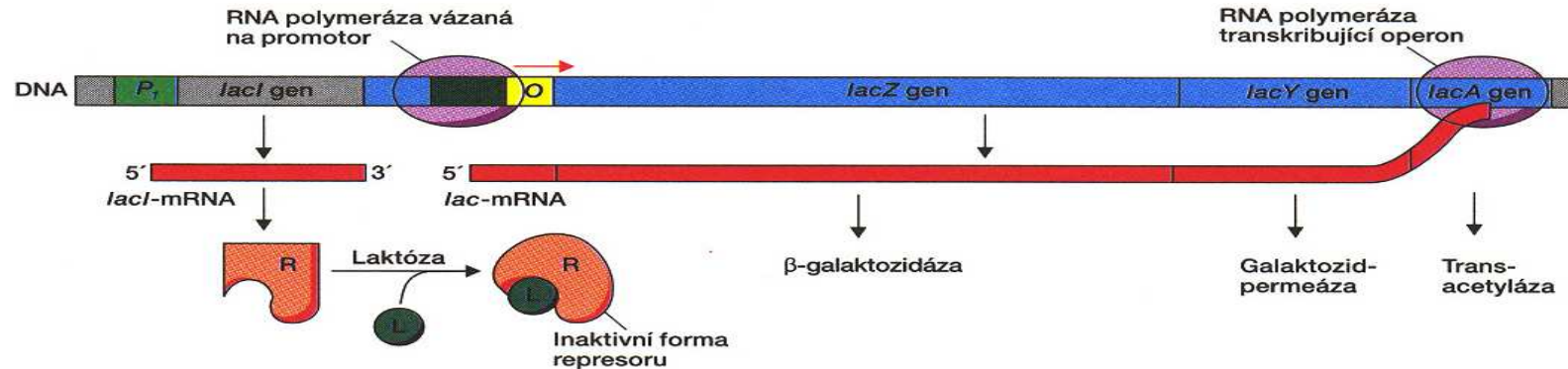
Úrovně regulace:

- genomu
- transkripce
- úpravy RNA a translokace
- translace
- posttranslační

Negativní regulace operonu



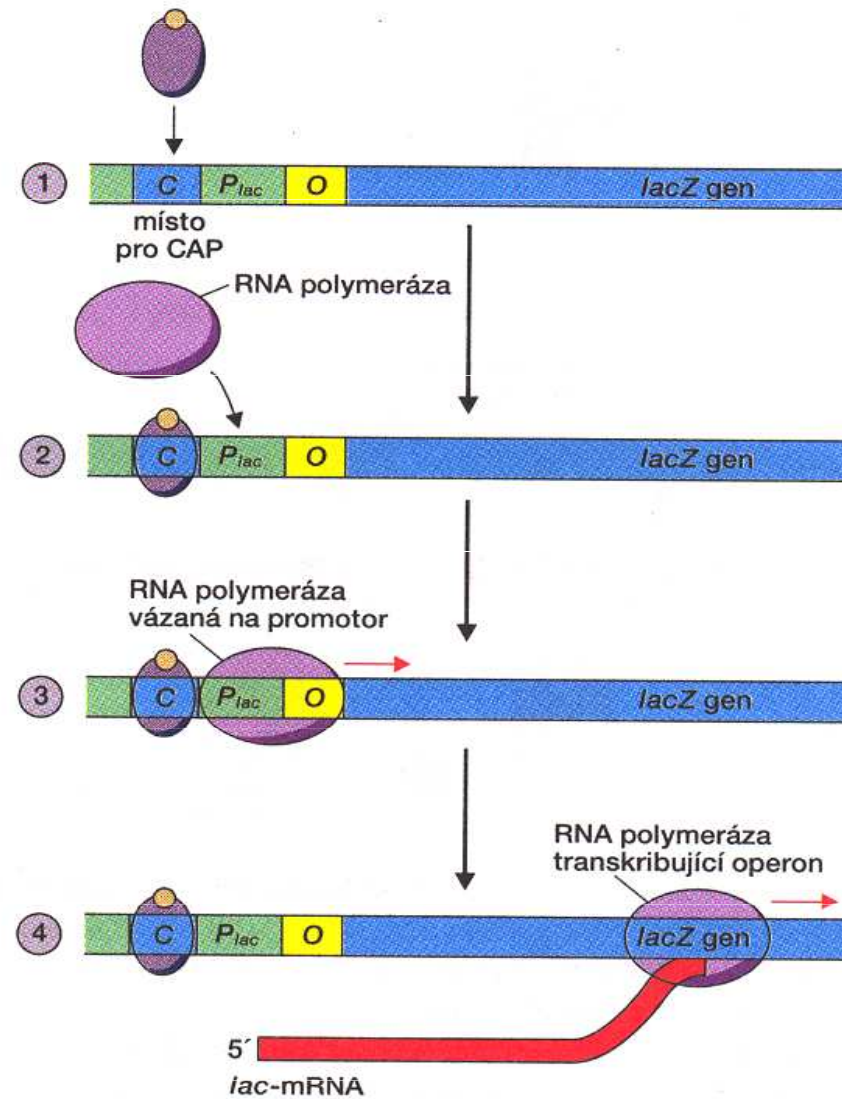
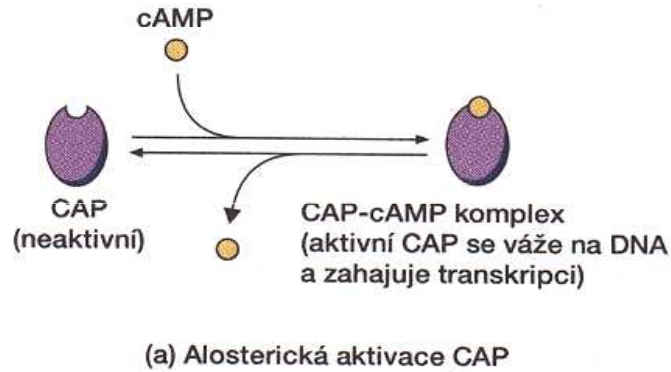
(a) Laktóza nepřítomna, represor navázaný na operátor, operon reprimován



(b) Laktóza přítomna, represor není vázan na operátor, operon dereprimován

Obr. 79. *Negativní regulace operonu*. Transkripce *lac* operonu u *E. coli* je regulována vazbou represoru na operátor. (a) V nepřítomnosti laktózy zůstává represor vázaný na operátor a RNA polymeráza nemá přístup k promotoru. Transkripce je tedy zablokována. (b) V přítomnosti laktózy je represor konformačně změněn a nemůže se vázat na operátor. RNA polymeráza se může navázat na promotor a transkribuje tři geny laktózoového operonu, *lacZ* (β -galaktozidáza), *lacY* (galaktozidpermeáza) a *lacA* (transacetyláza).

Pozitivní regulace operonu

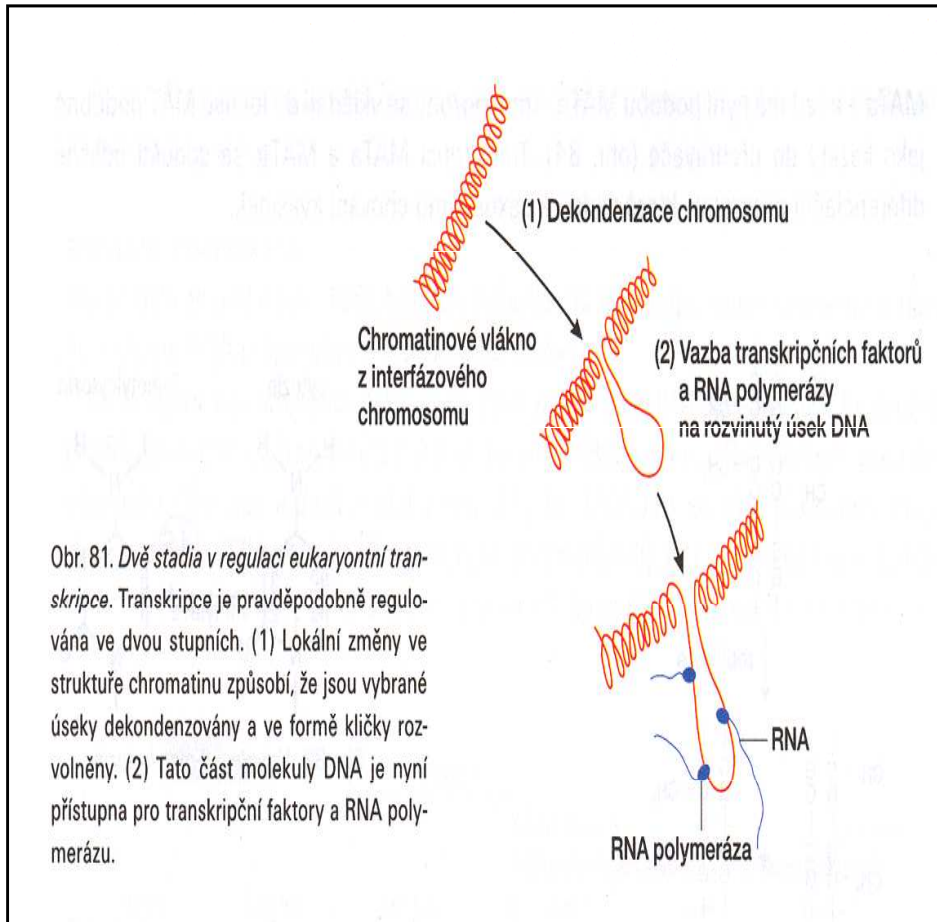


Obr. 80. Pozitivní regulace operonu. (a) Alosterická aktivace CAP vazbou s cAMP. (b) Účinek aktivovaného CAP na lac operon. (1) Aktivovaný CAP-cAMP komplex se naváže na DNA v místě promotoru nebo jeho blízkosti (místo C) a tak zvyšuje afinitu promotoru k RNA polymeráze (2). RNA polymeráza se váže snadno na promotor (3) a transkribuje operon (4).

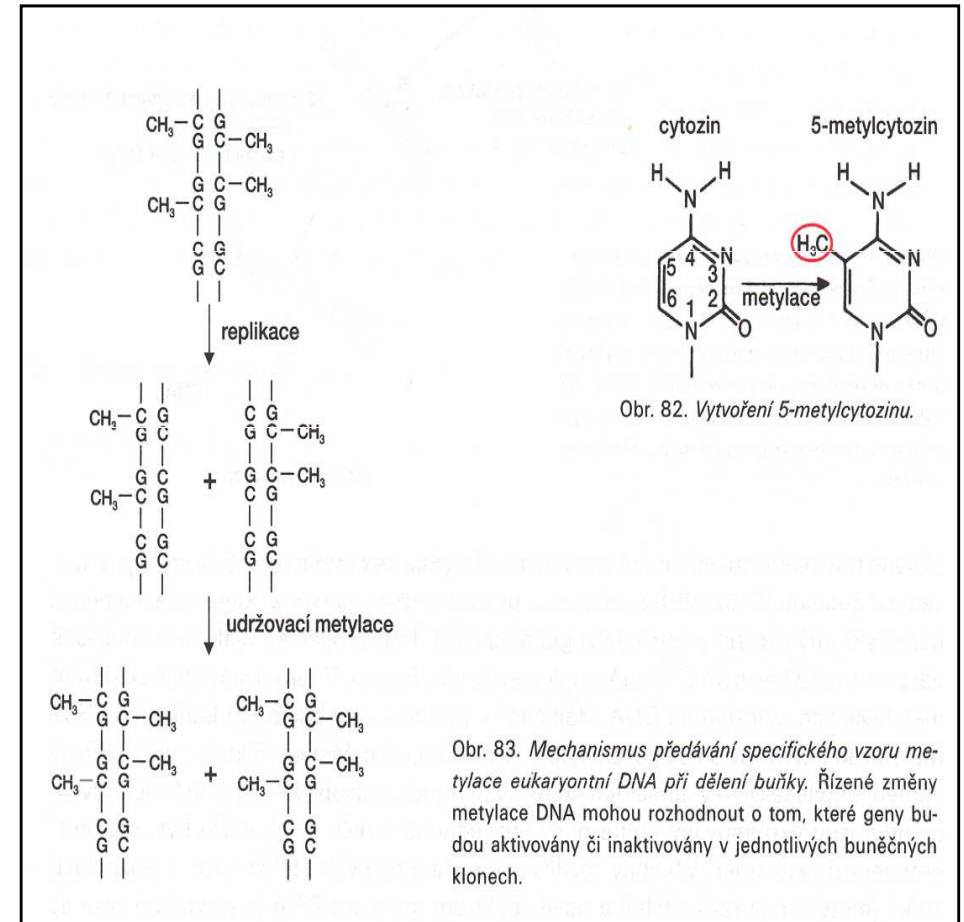
(b) Účinek aktivovaného CAP na lac operon

Možnosti regulace eukaryontní genomu

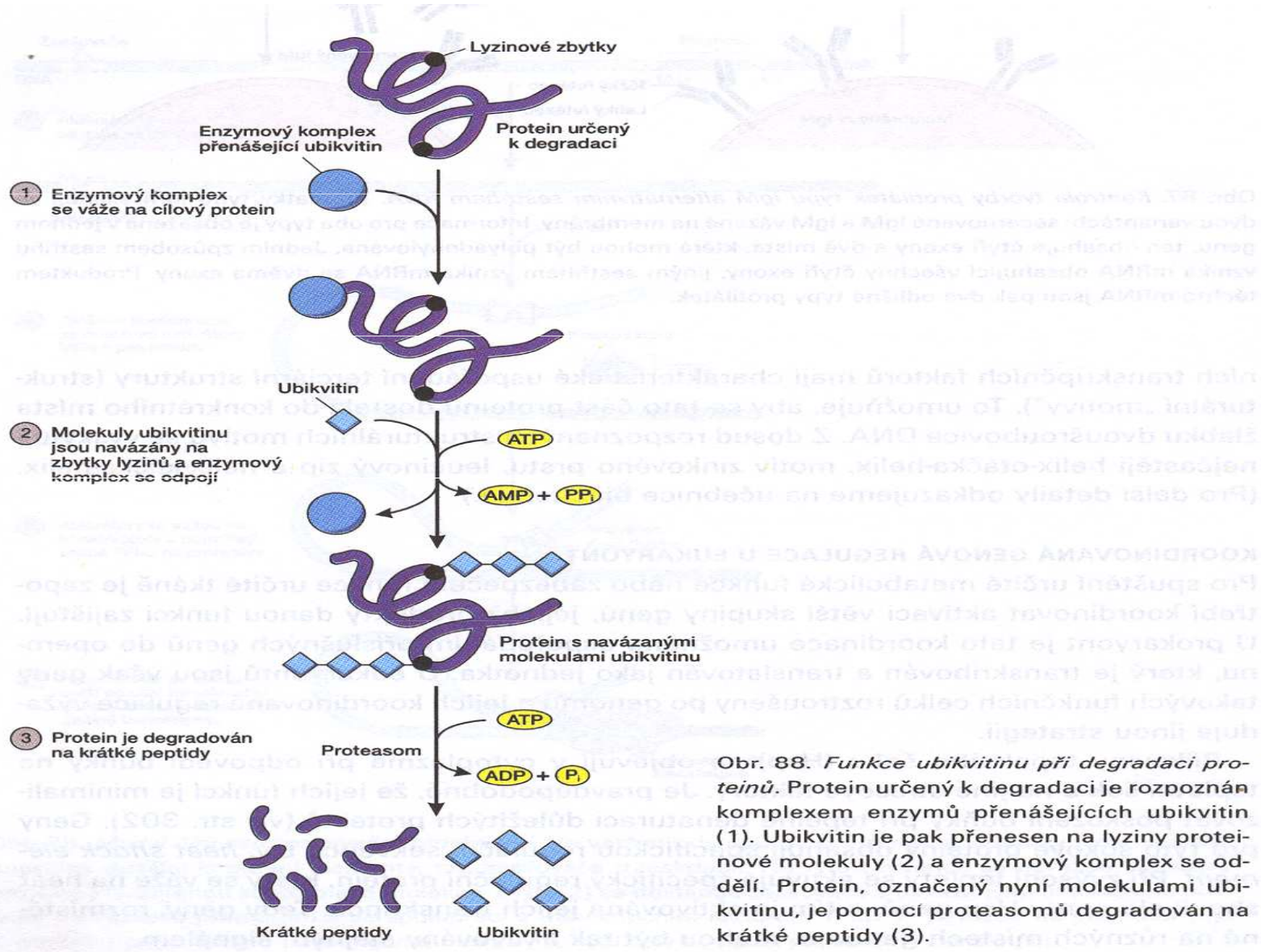
- změny ve struktuře chromatinu



- metylace DNA



Degradace proteinů



Obr. 88. Funkce ubikvitinu při degradaci proteinů. Protein určený k degradaci je rozpoznán komplexem enzymů přenášejících ubiquitin (1). Ubikvitin je pak přenesen na lyziny proteinové molekuly (2) a enzymový komplex se oddělí. Protein, označený nyní molekulami ubikvitinu, je pomocí proteasomů degradován na krátké peptidy (3).

In vitro replikace DNA

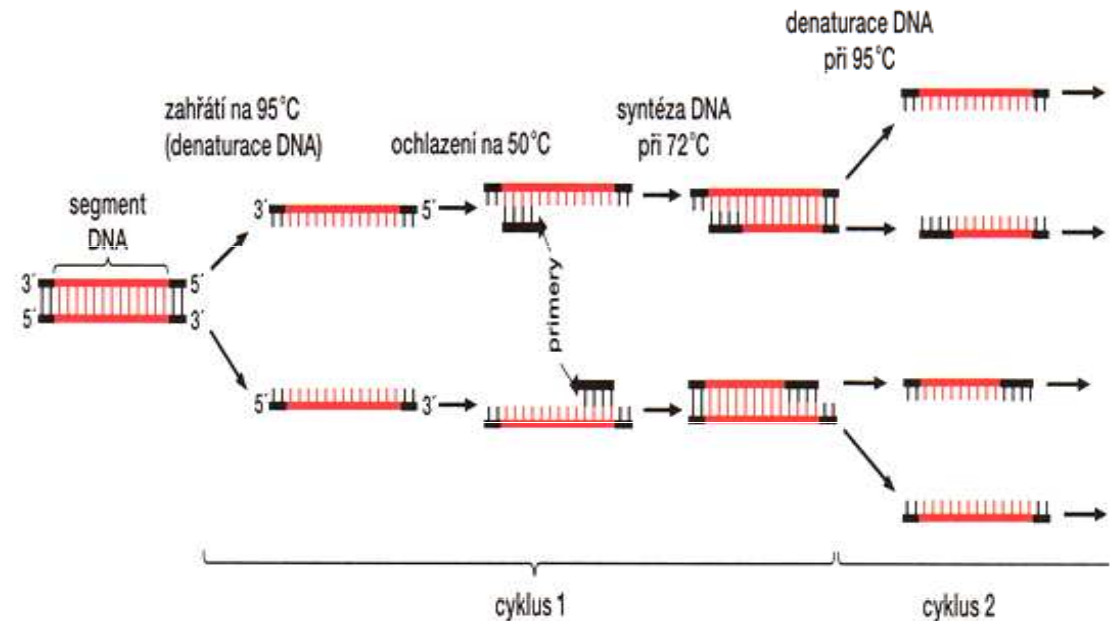
řetězová polymerázová reakce (polymerase chain reaction PCR)

- **Komponenty:**

- syntetické primery
- DNA polymeráza

(Taq polymeráza – z bakterie
Thermus aquaticus - optimum
72°C)

- všechny 4
deoxyribonukleozidtrifosfáty

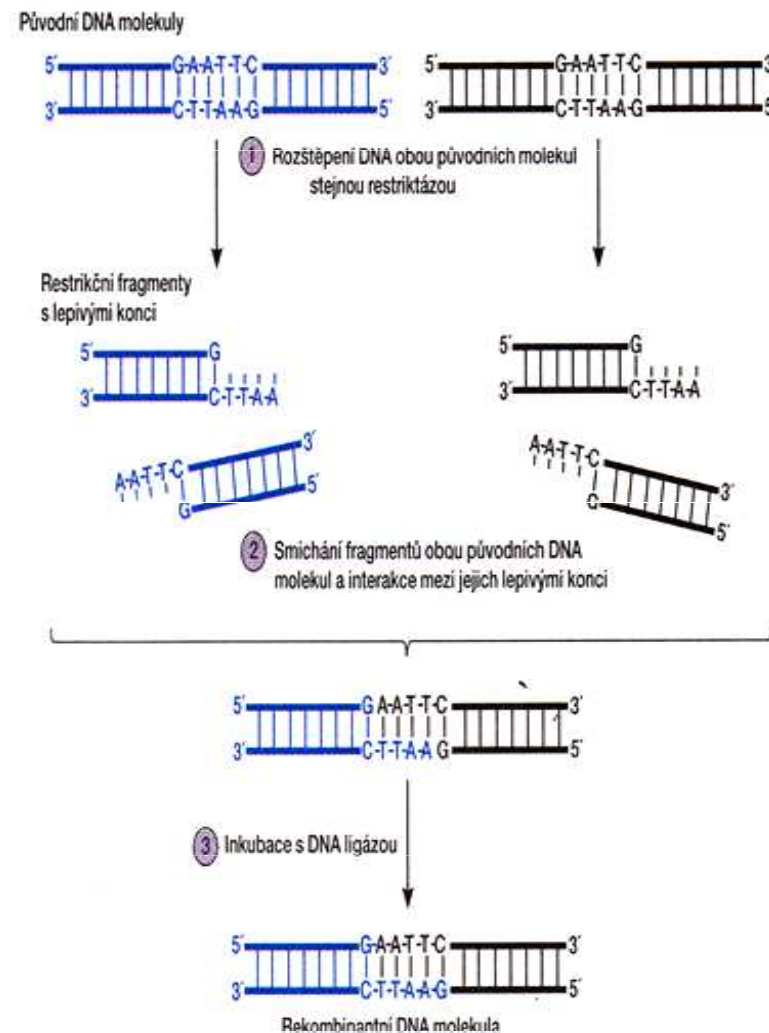


Obr. 95. Řetězová polymerázová reakce (PCR). DNA segment, který má být namnožen, je denaturován při 95 °C, po ochlazení na 50 °C je přidán syntetický primer, který se naváže na komplementární koncové sekvence řetězců DNA. Po přidání Taq polymerázy a deoxyribonukleozidtrifosfátů jsou při 72 °C vytvořeny dvě kopie DNA segmentu a replikační cyklus se opakuje, až je nasyntetizováno dostatečné množství kopií.

Rekombinantní DNA

Restrikční endonukleázy

enzymy bakteriálního původu, specificky rozeznávají určité sekvence v DNA o velikosti cca 5 nukleotidů, vznikají tzv. „lepivé konce“.



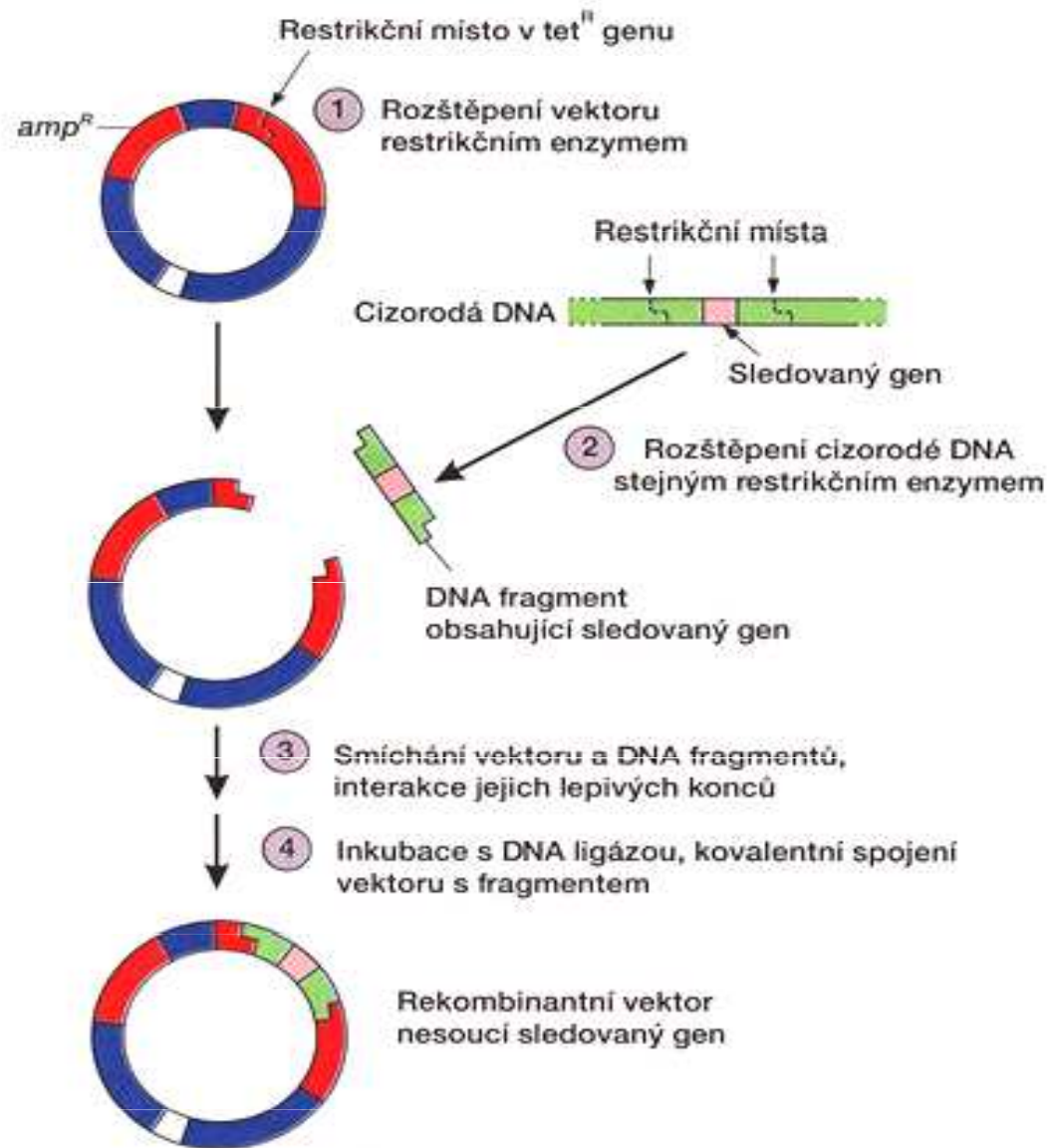
Obr. 102. Vznik rekombinované molekuly DNA. (1) Dvě původní molekuly DNA se rozštěpí stejnou restrikční endonukleázou (např. EcoRI). (2) Vzniklé fragmenty se smíchají a nechají se spojit svými „lepivými“ (komplementárními) konci. (3) DNA ligázou se spojí fragmenty obou molekul do molekuly hybridní.

Klonování genů

- Klon – populace DNA molekul vzniklých replikací jedné molekuly

Kroky:

- Inzerce cizorodé DNA do klonovacího vektoru
- Vnesení vektoru do hostitelských buněk
- Amplifikace vektoru v hostitelských buňkách
- Selektce buněk, které vektor skutečně obsahují
- Identifikace klonů obsahujících požadovaný gen



Obr. 104. Příprava rekombinantního plazmidového vektoru. (1) Plazmid je rozštěpen restrikčním enzymem v místě tet^R genu. (2) Cizorodá DNA obsahující určitý gen je rozštěpena stejnou restriktaázou. (3) Smíchání vektoru a fragmentů a jejich spojení lepivými konci. (4) Inkubace s DNA ligázou a kovalentní spojení úseků DNA.