

Molekulární biologie pro informatiky

(VV072)

Molekulární biologie pro informatiky

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

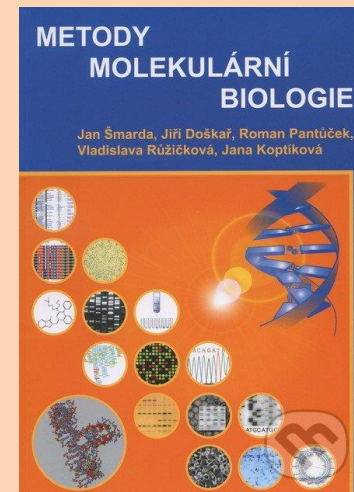
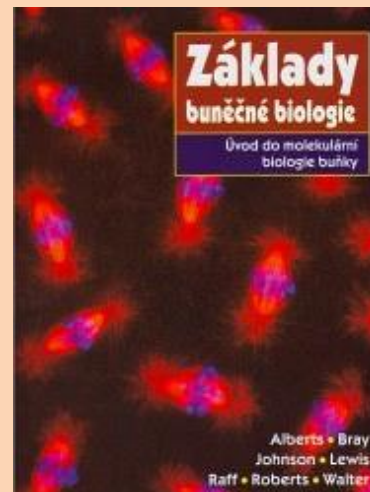
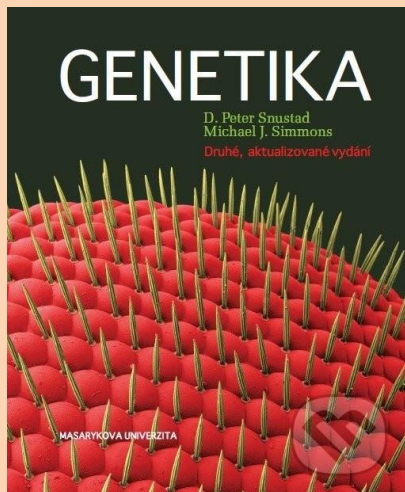
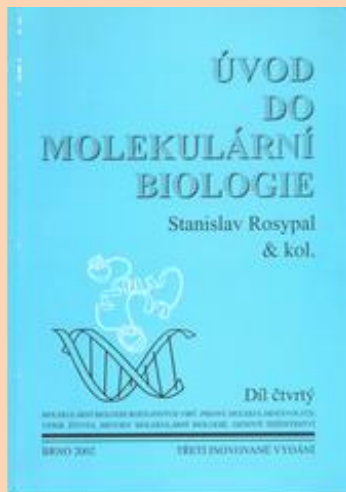
Doporučená literatura:

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

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

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

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



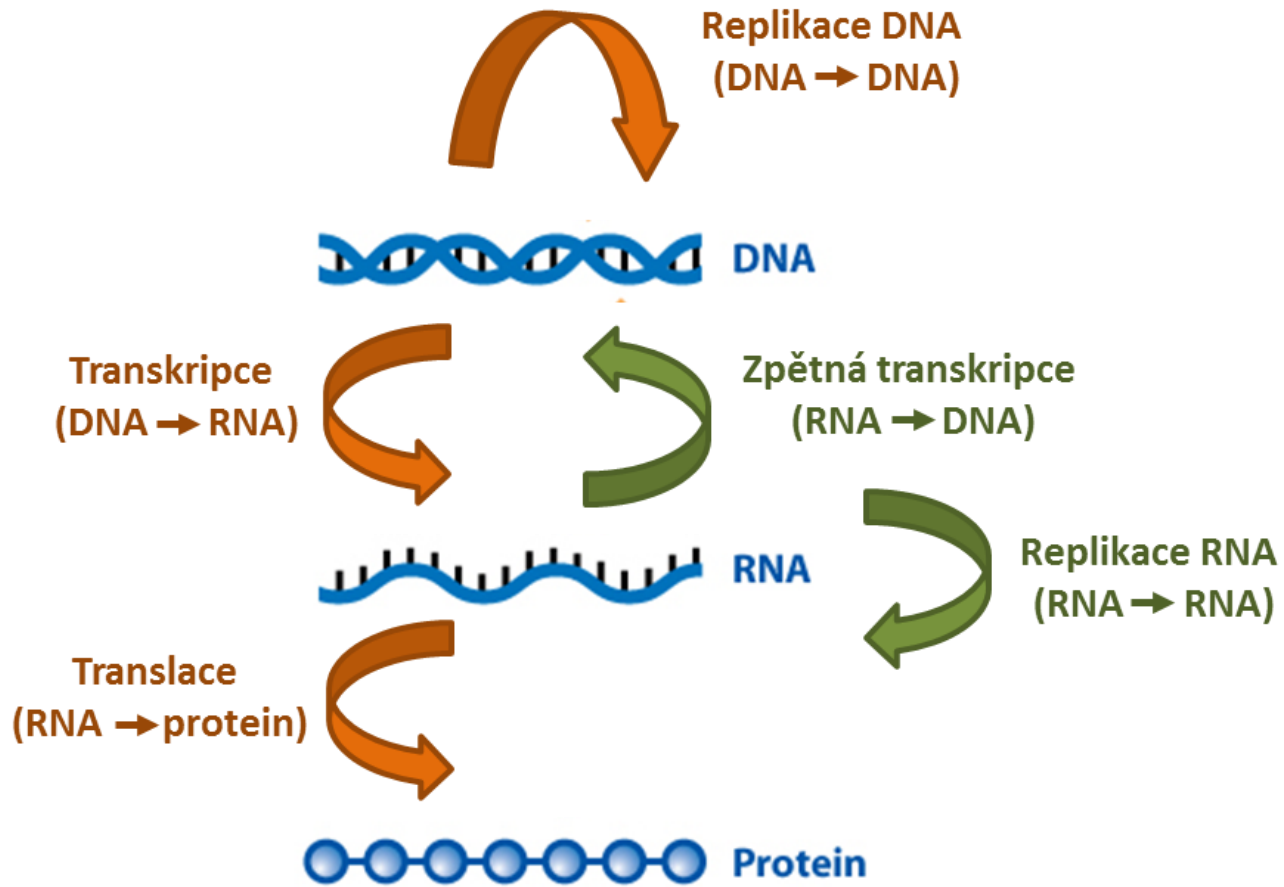
Molekulární biologie pro informatiky

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

Molekulární biologie pro informatiky - 1

**Historie molekulární biologie
Nukleové kyseliny a proteiny**

Ústřední dogma molekulární biologie

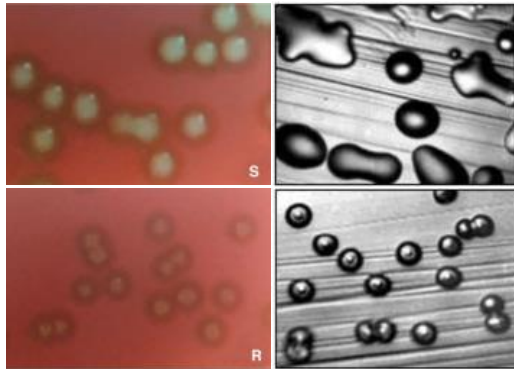


Historie objevů genetické informace

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

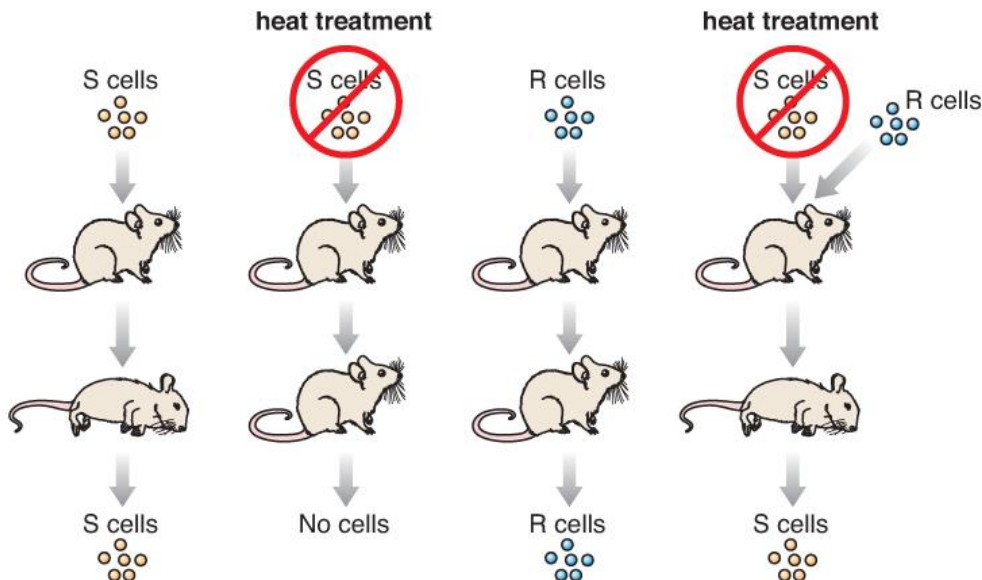
Griffith - Transformační princip (1928)

Streptococcus pneumoniae



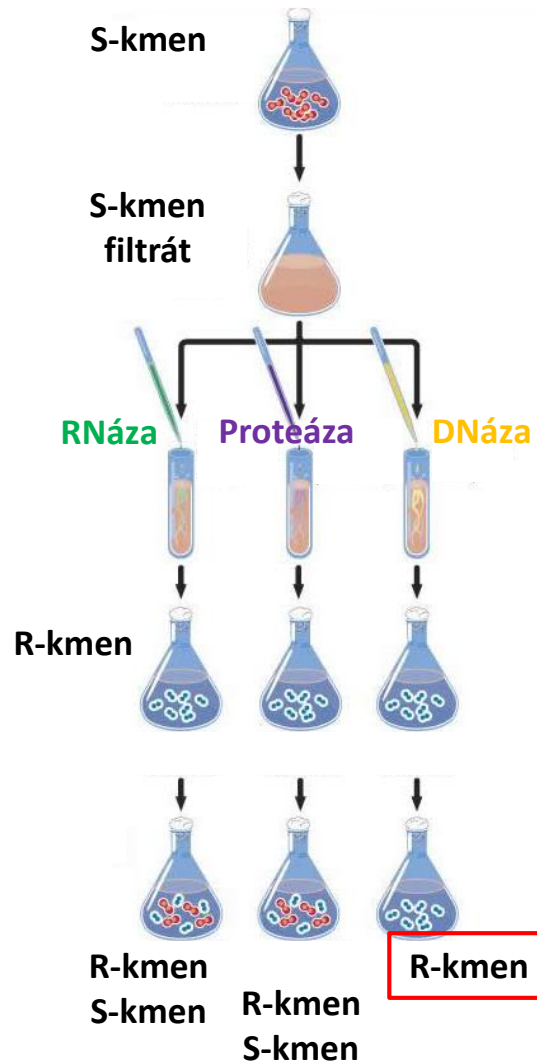
S-kmen: smooth, kapsula dodávající hladký vzhled
patogenní (zápal plic u člověka, smrt u myši)

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



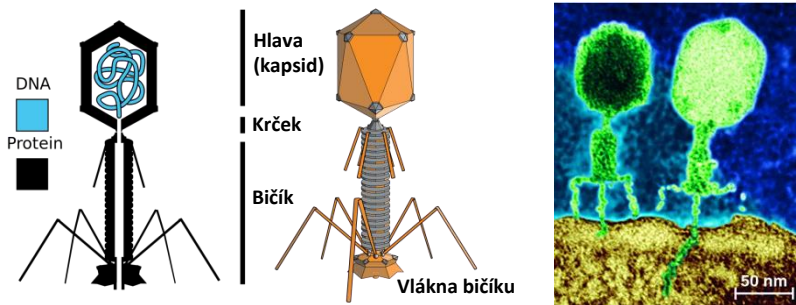
Přenos genetického materiálu mezi
dvěma kmeny bakterií procesem
transformace.

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



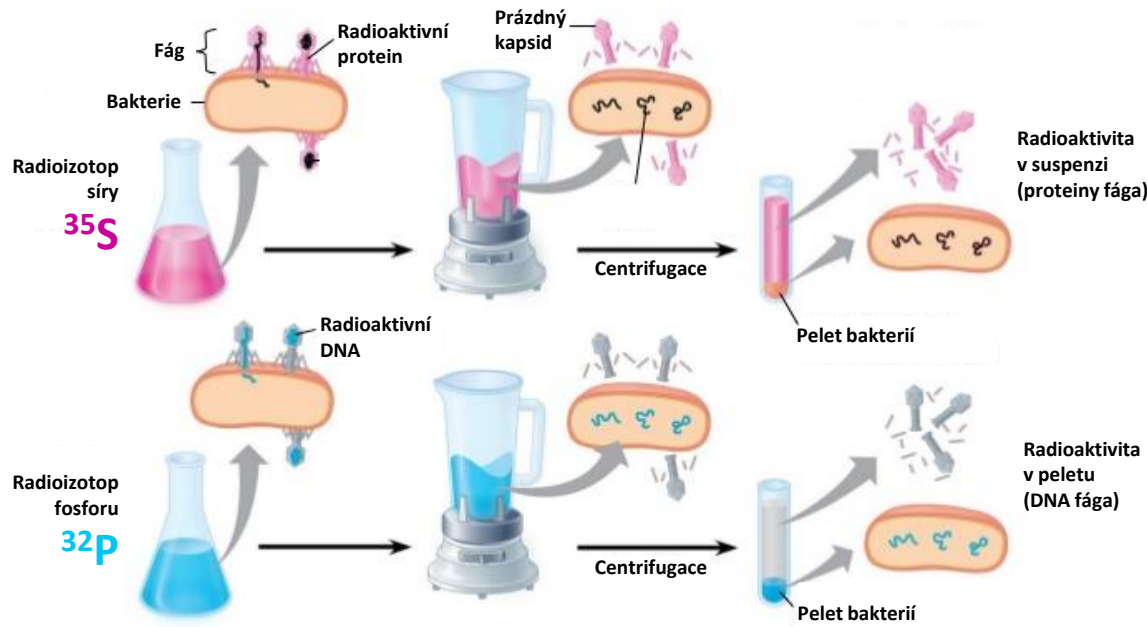
Pouze ošetření vzorku DNázou zabránilo transformaci - **transformační substancí je DNA**

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



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

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

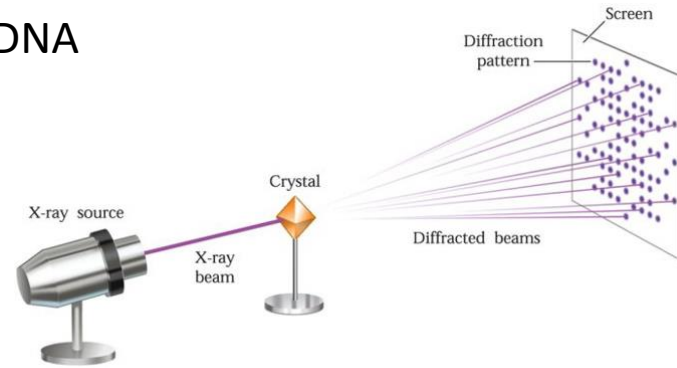
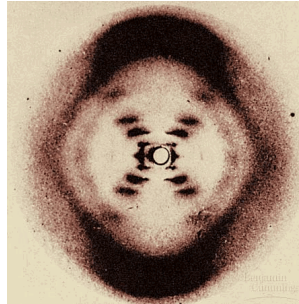


Během infekce zůstávají proteiny fága vně bakteriální buňky, zatímco DNA fága vstupuje do buněk.

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

Objasnění struktury DNA

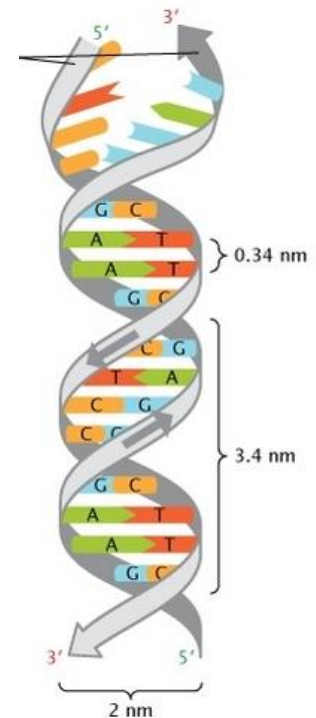
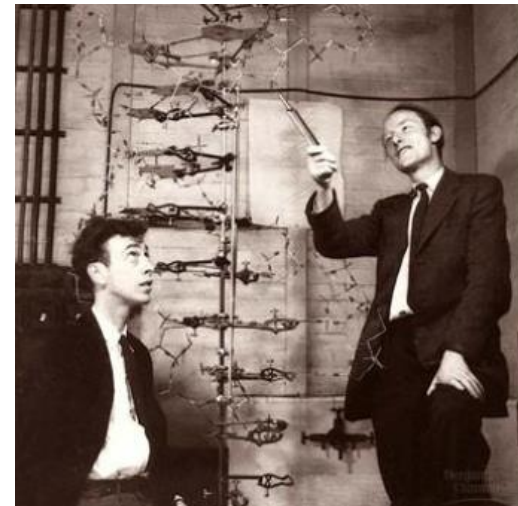
1952 - R. Franklin, rentgenová difrakční analýza DNA



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

1962 - Nobelova cena, spolu s M. Wilkins

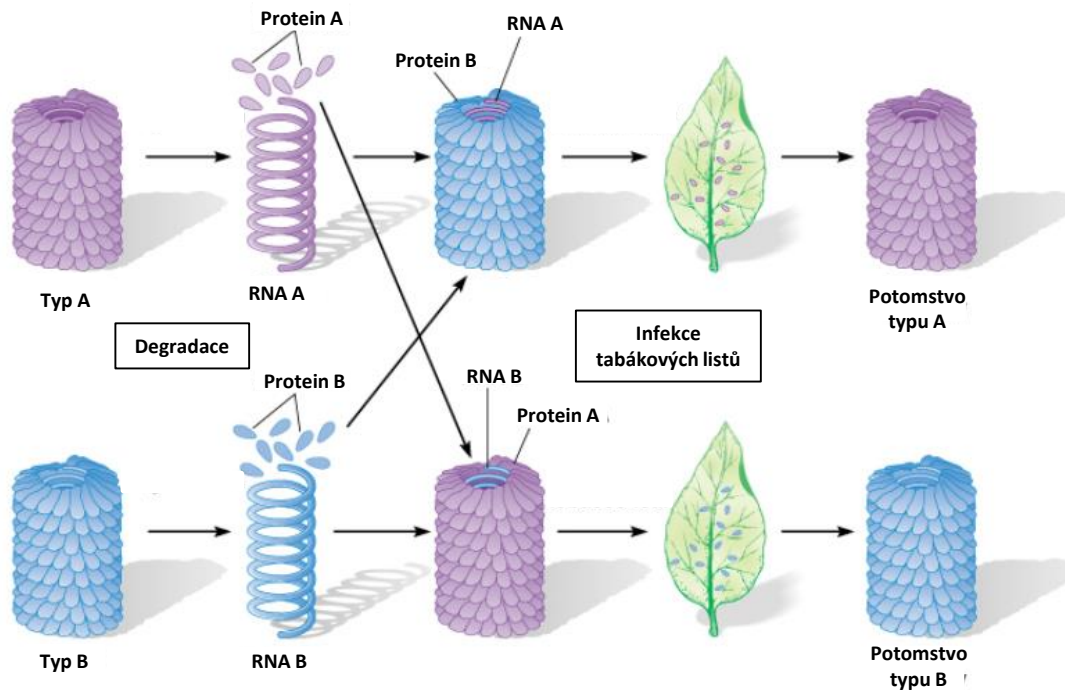
- DNA je double helix
- Báze vrstveny kolmo k ose
- Vzdálenost mezi bázemi (0,34 nm)
- Průměr šroubovice (2 nm)
- Počet bazí na 1 otočku (10 bp)



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

TMV - virus tabákové mozaiky

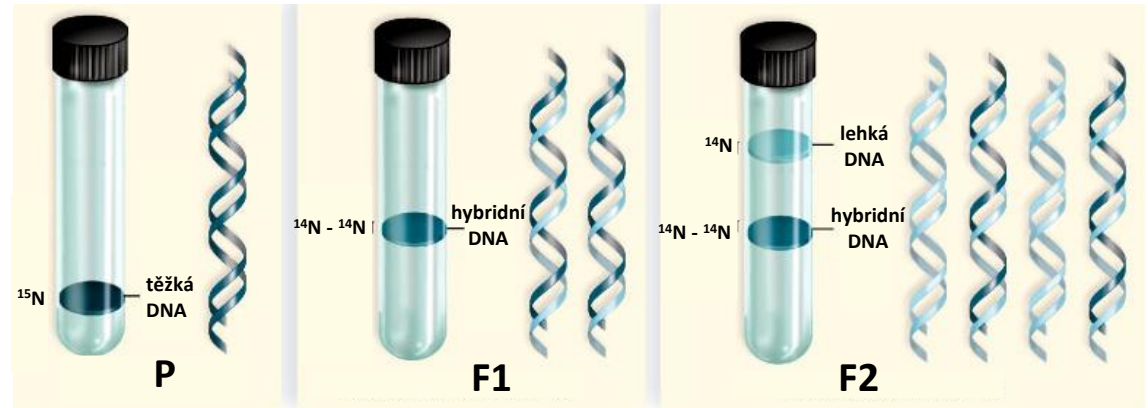
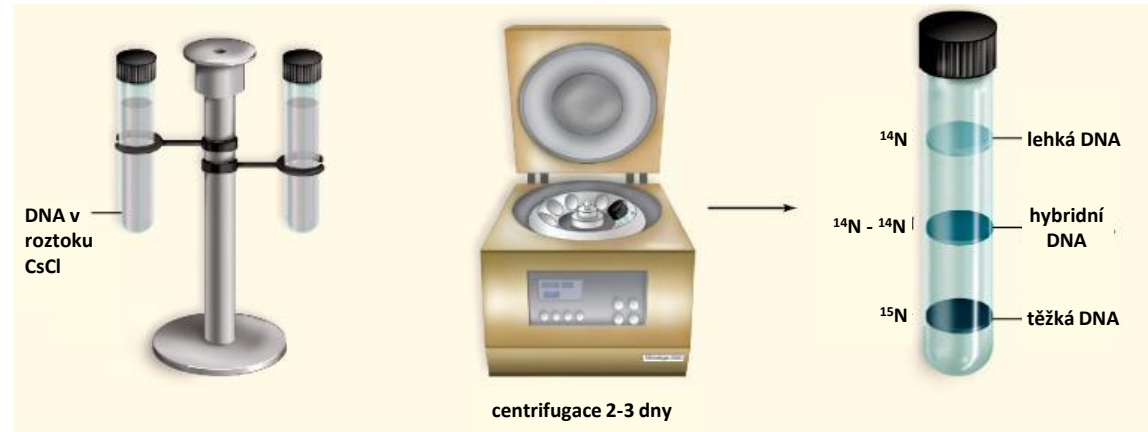
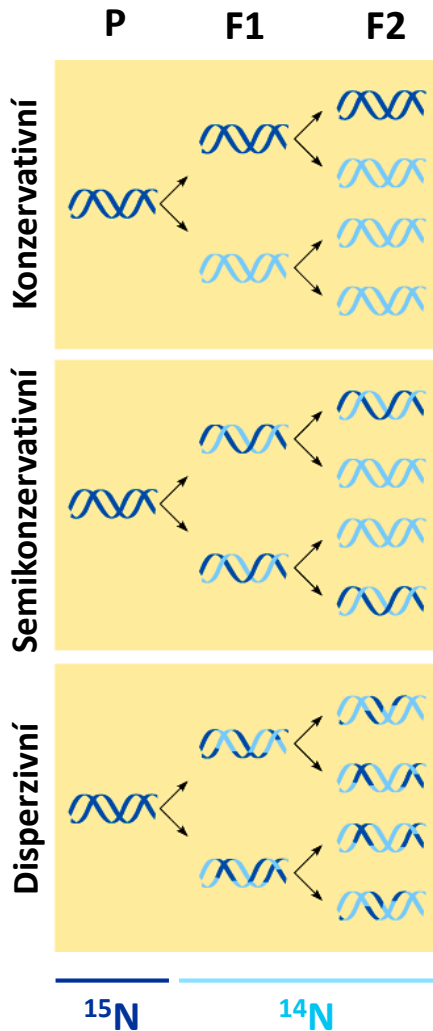
- molekula RNA obklopena kapsidem ze spirálovitě uspořádaných molekul proteinu



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

RNA nese genetickou informaci u TMV.

Meselson, Stahl - Semikonzervativní replikace DNA (1958)

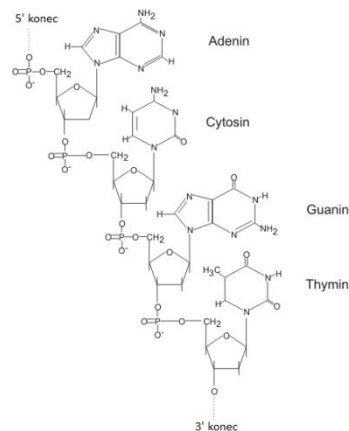


Potvrzen semikonzervativní způsob replikace DNA

Struktura nukleových kyselin

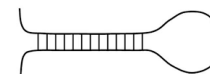
Primární struktura

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



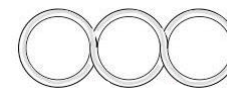
Sekundární struktura

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



Terciární struktura

- nadšroubovicové vinutí



Kvartérní struktura

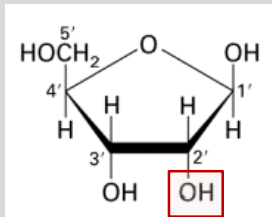
- uspořádání DNA do chromozomů
- struktura nukleozomu, chromatinu



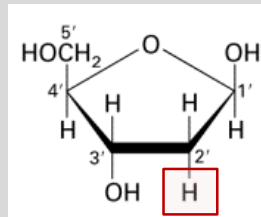
Primární struktura nukleových kyselin

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

Pentóza

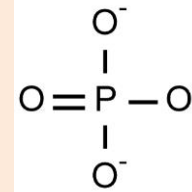


Ribóza (RNA)

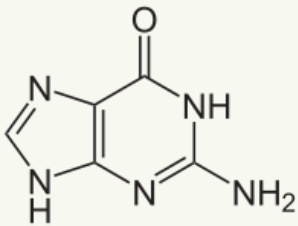


Deoxyribóza (DNA)

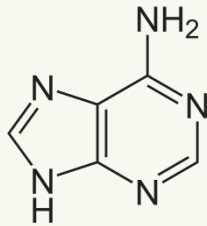
Fosfát



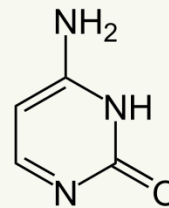
Dusíkatá báze DNA (A, G, C, T) RNA (A, G, C, U)



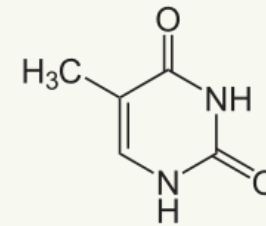
Guanin



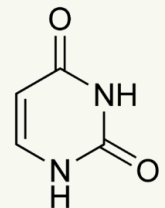
Adenin



Cytosin



Tymin



Uracil

Purinové

Pyrimidinové

Primární struktura nukleových kyselin

Ribonukleotidy v RNA

Nukleosid = cukr + báze

Volné nukleotidy ve formě trifosfátů

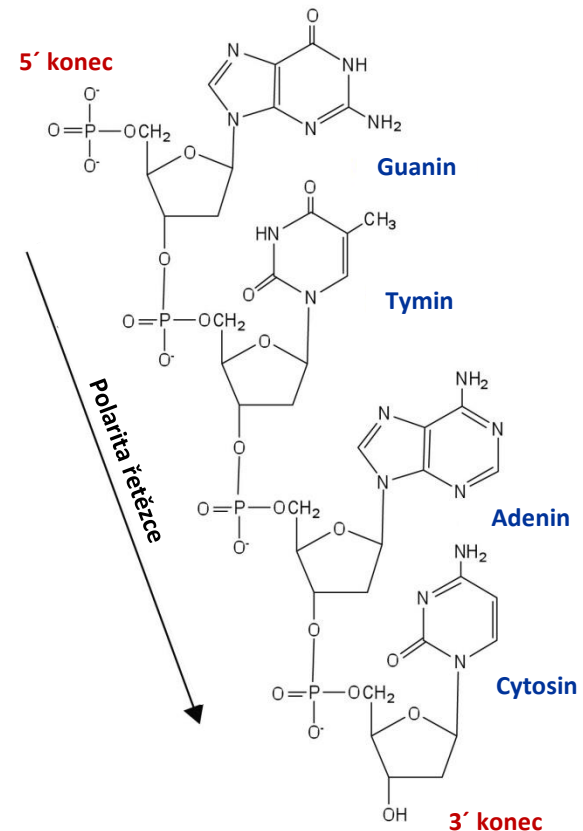
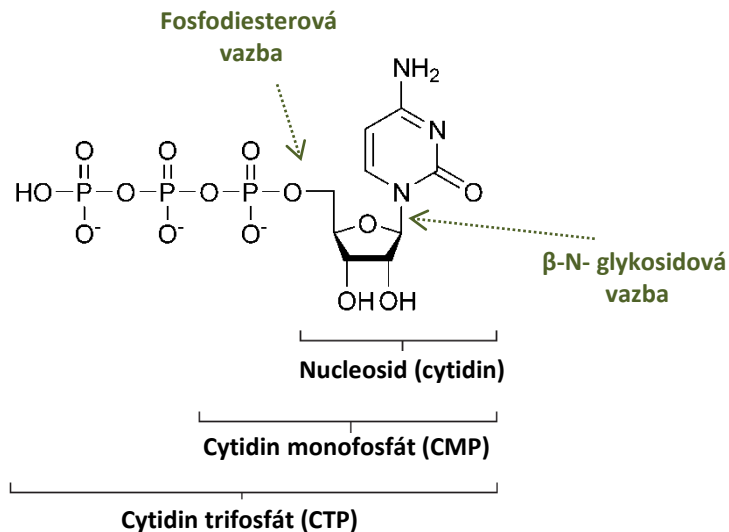
Deoxyribonukleotidy v DNA

Nukleotid = nukleosid + fosfát

Nukleotidy zabudované v NK ve formě monofosfátů

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

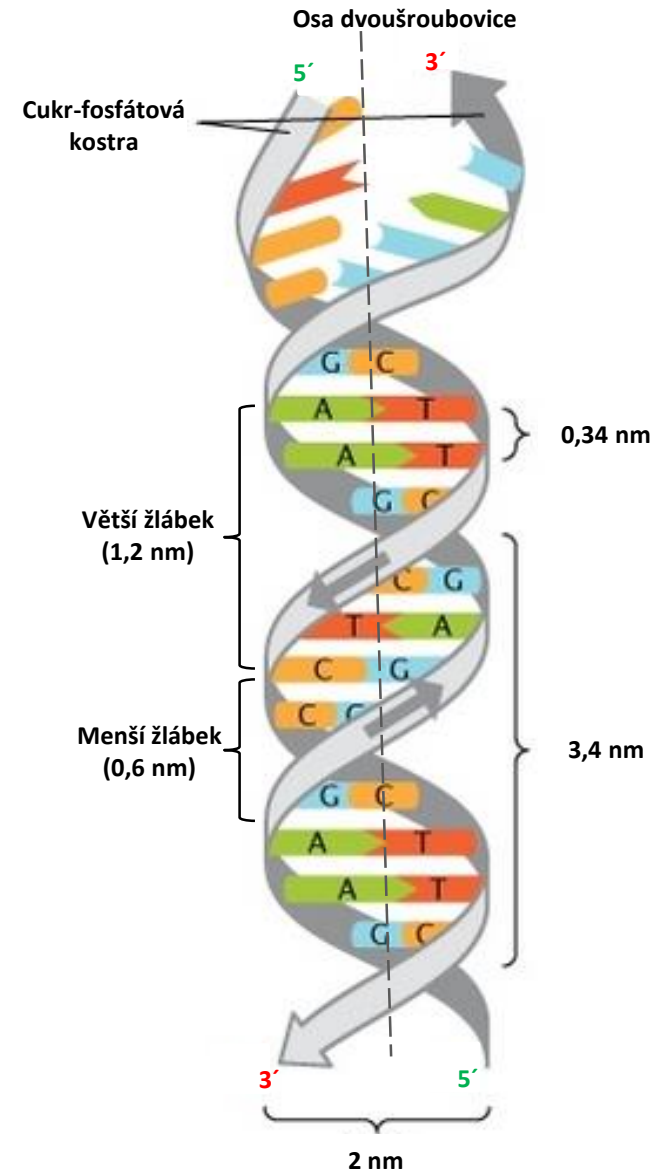
3' konec - OH skupina na 3' uhlíku pentózy



Sekundární struktura DNA

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

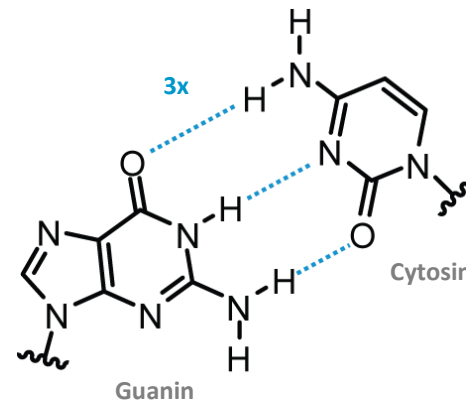
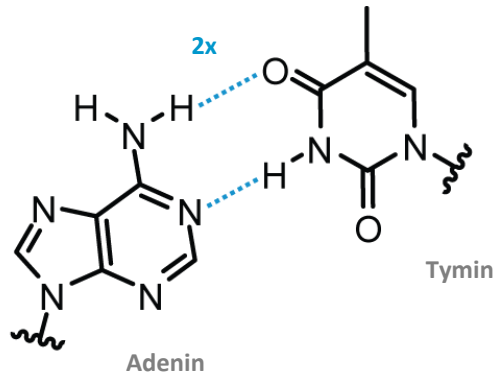
- (1) dvoušroubovice s cukr-fosfátovou kostrou vně šroubovice a bázemi poskládanými uvnitř molekuly
- (2) antiparalelní polynukleotidové řetězce s opačnou polaritou
- (3) komplementarita řetězců, párování bází (A-T, G-C), Chargaffovo pravidlo
- (4) průměr dvoušroubovice 2 nm
- (5) vzdálenost mezi páry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



Sekundární struktura DNA

Párování bází

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



Chargaffova pravidla

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

Transferová RNA

Primární struktura

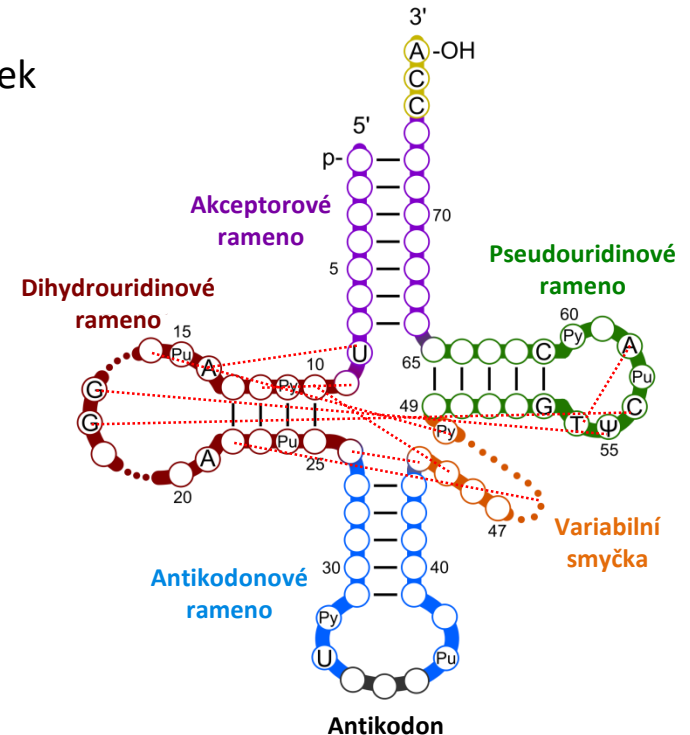
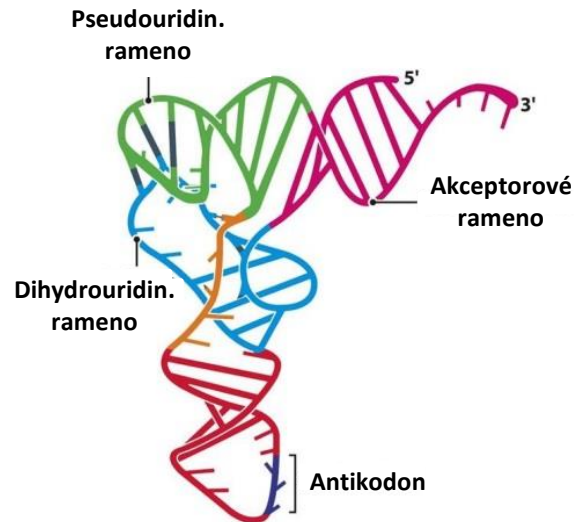
- 74 - 95 nuleotidů, 5'-CCA-3' sekvence na 3' konci
- neobvyklé báze - vznik posttranskripční modifikací, nenáhodné rozdělení v sekvenci
 - vliv na párování bazí, přesnost vazby aminokyselin a syntézy proteinů

Sekundární struktura

- tvar jetelového listu
- čtyři ramena, variabilní smyčka

Terciální struktura

- vodíkové vazby mezi nukleotidy různých ramen a jejich smyček



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

Speciální struktury v DNA a RNA

Nukleotidové sekvence

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

Repetice

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

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

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

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

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

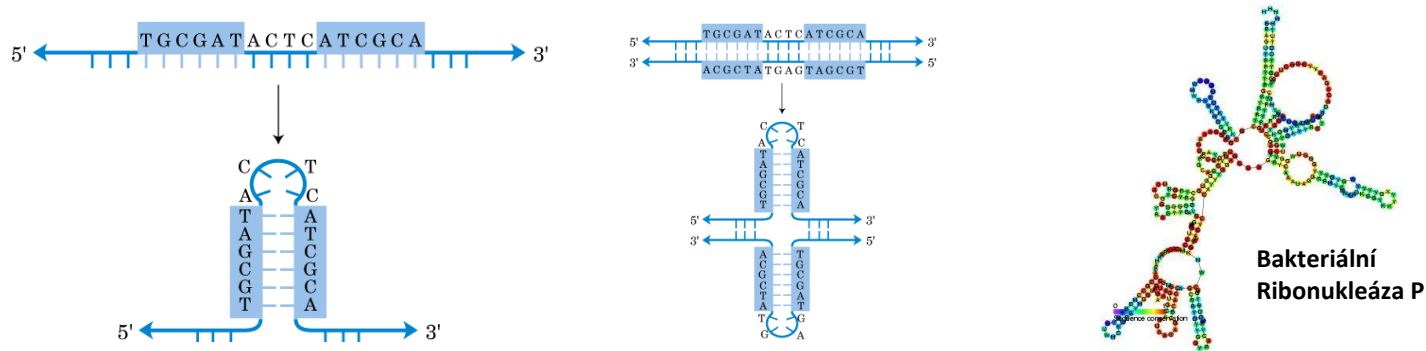
3. **Obrácená:** sekvence opakovaná na stejném nukleotidovém řetězci ve své komplementární podobě jako **palindrom** se označují přilehlé obrácené repetice

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

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

Speciální struktury v DNA a RNA

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



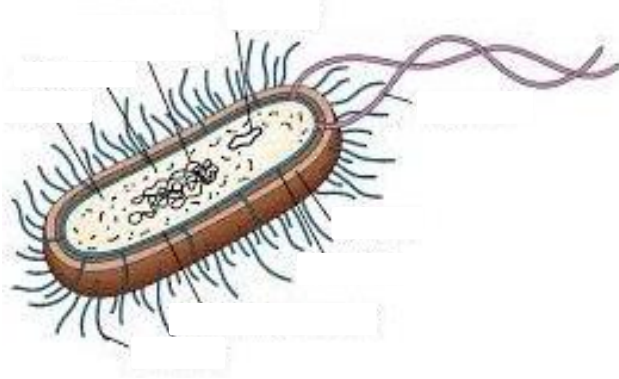
4. **Dlouhá koncová repetice:** LTR sekvence, dlouhá přímá repetice na obou koncích téhož DNA řetězce konce LTR sekvence jsou navzájem ve vztahu obrácených repeticí



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

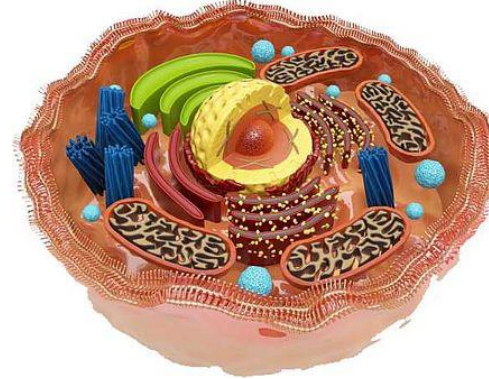
Terciální struktura DNA

Escherichia coli



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

Lidská buňka



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

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

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

Terciální struktura DNA

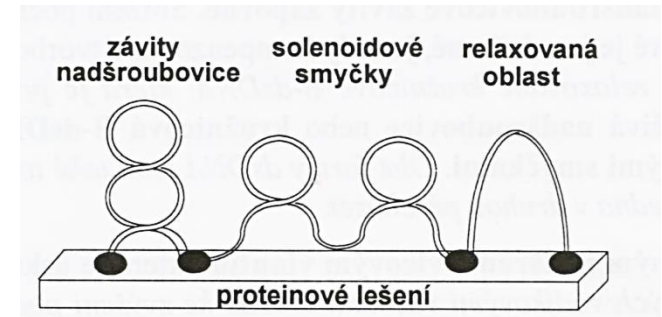
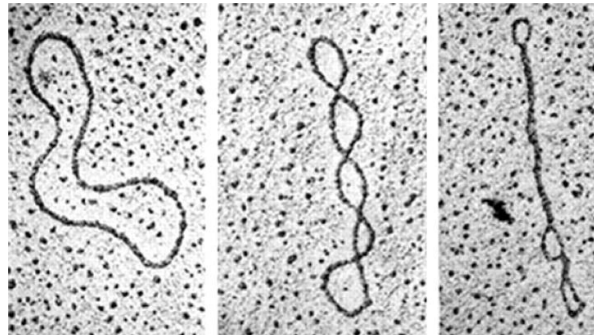
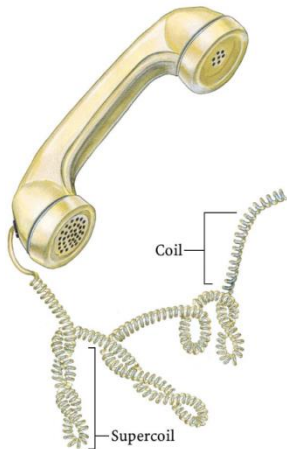
Nadšroubovice (superhelix)

Vzniká, když je do dvoušroubovice DNA zavedeno další vinutí

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

Předpoklad pevných konců

- kružnicová dsDNA
- lineární dsDNA připevněná k substrátu



Terciální struktura DNA

Topoizomerázy

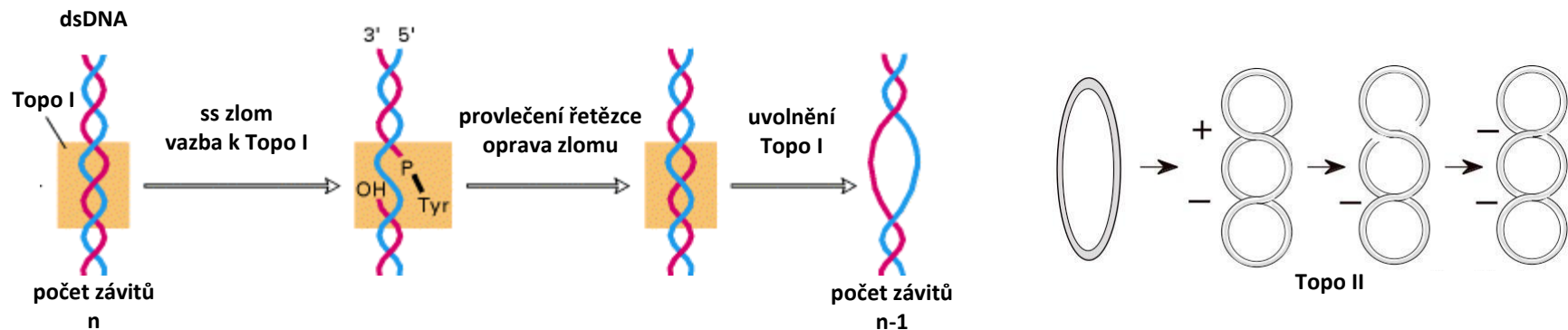
Přidávají či odstraňují závitů v dsDNA dočasným zlomem řetězců, obtočením konců kolem sebe a následným spojením zlomených konců.

Typ I

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

Typ II

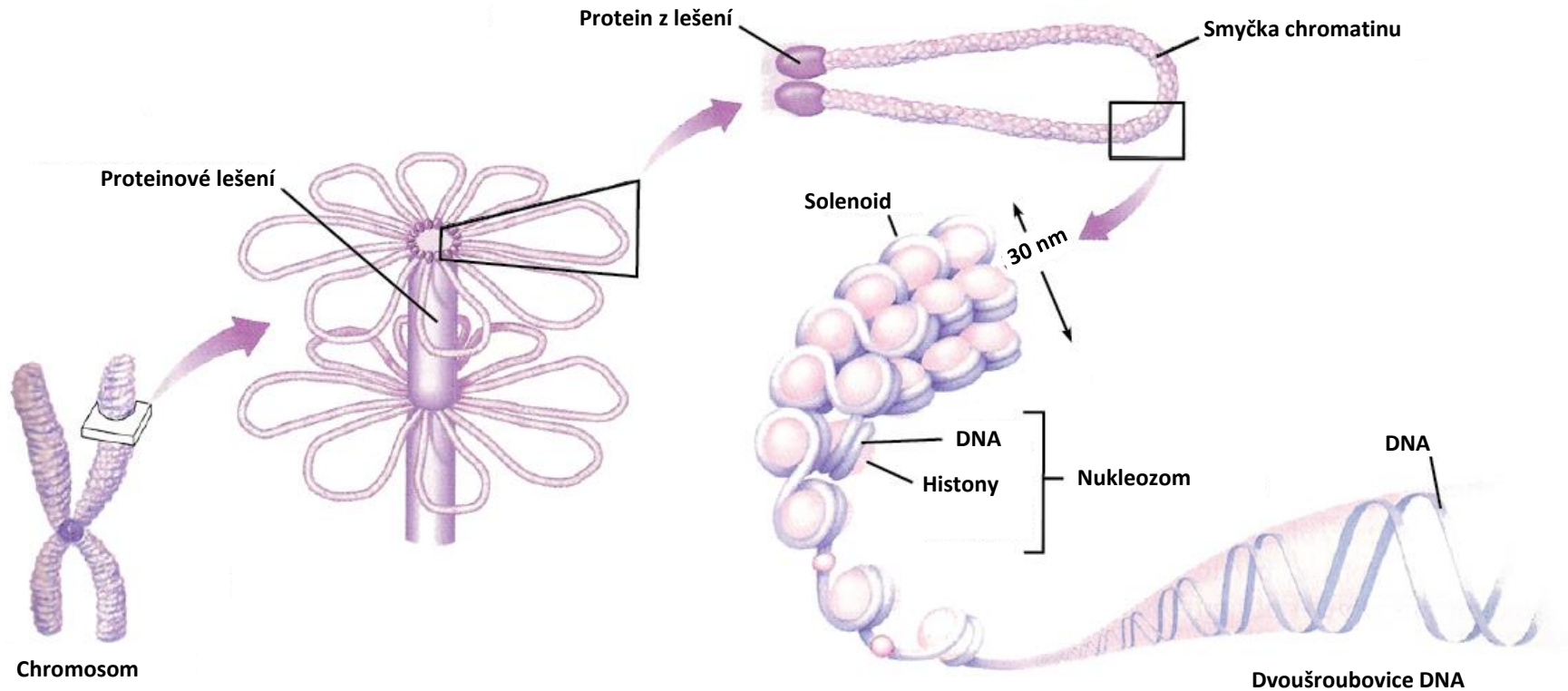
- dvouřetězcové zlomy, přemísťují dsDNA přes zlomy obou řetězců v dsDNA



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

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

Kvartérní struktura DNA



Viz přednáška č. 2

Primární struktura proteinů

Pořadí standartních aminokyselin v polypeptidovém řetězci

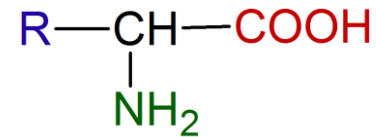
Aminokyseliny (AK)

- uhlík α , na který se váže vodík

karboxylová skupina

aminoskupina

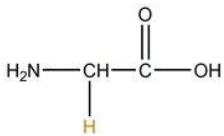
postranní řetězec



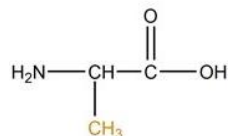
1. AK s nepolárním zbytkem - hydrofobní

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

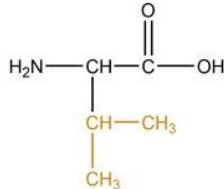
Gly



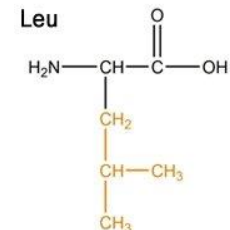
Ala



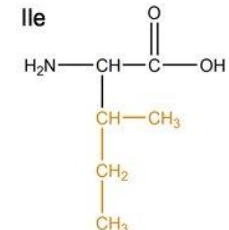
Val



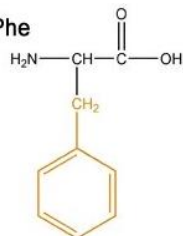
Leu



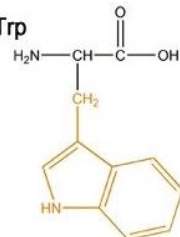
Ile



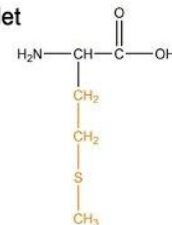
Phe



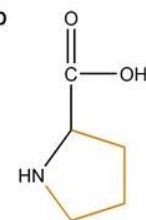
Trp



Met



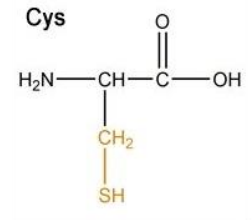
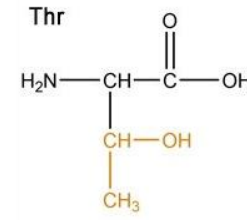
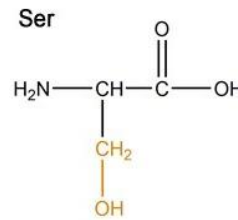
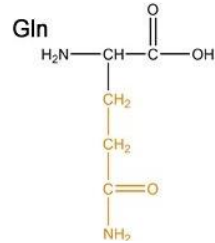
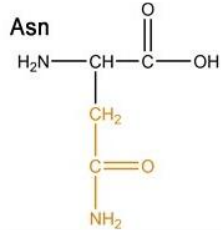
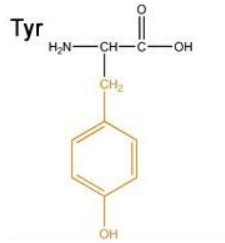
Pro



Primární struktura proteinů

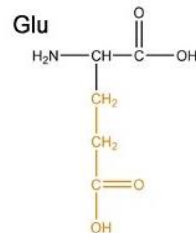
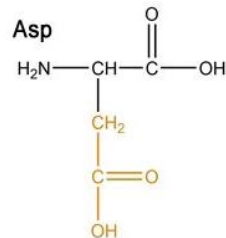
2. AK s polárním zbytkem - hydrofilní, vodíkové vazby s molekulami vody

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



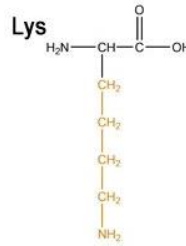
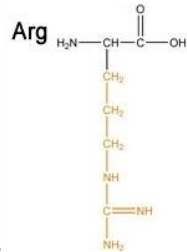
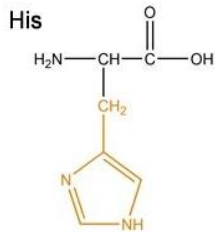
3. AK s kyselým zbytkem - karboxylová skupina

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

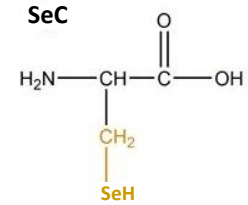


Primární struktura proteinů

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

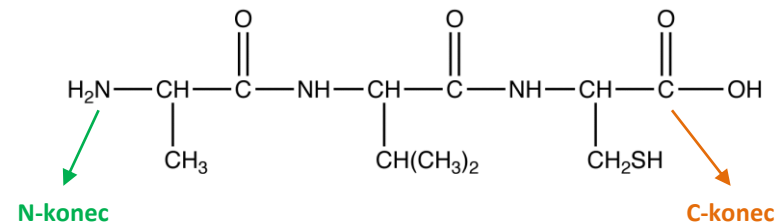
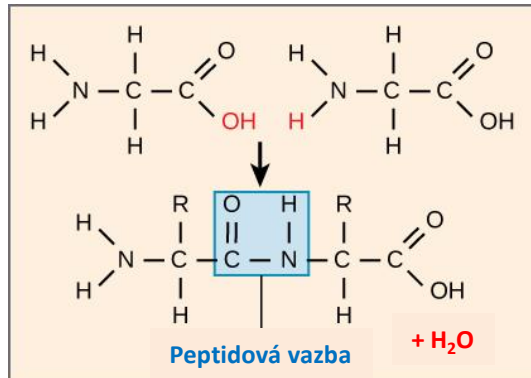


5. selenocystein



Vznik primární struktury proteinů

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

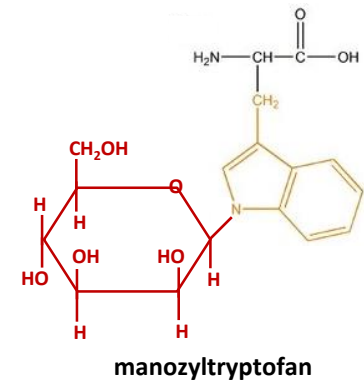
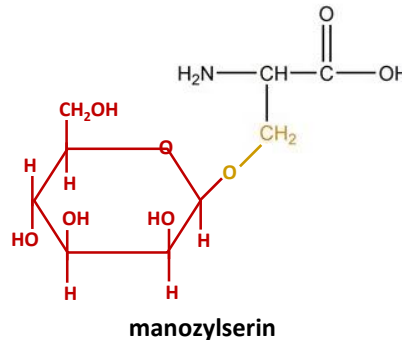
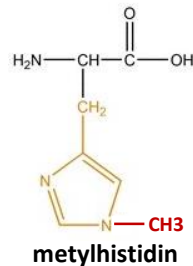
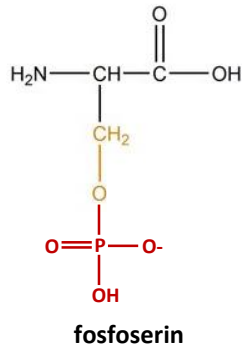
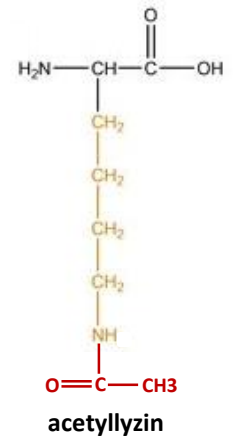
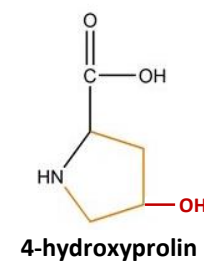


Ala-Val-Cys

Primární struktura proteinů

Chemické modifikace standardních AK

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

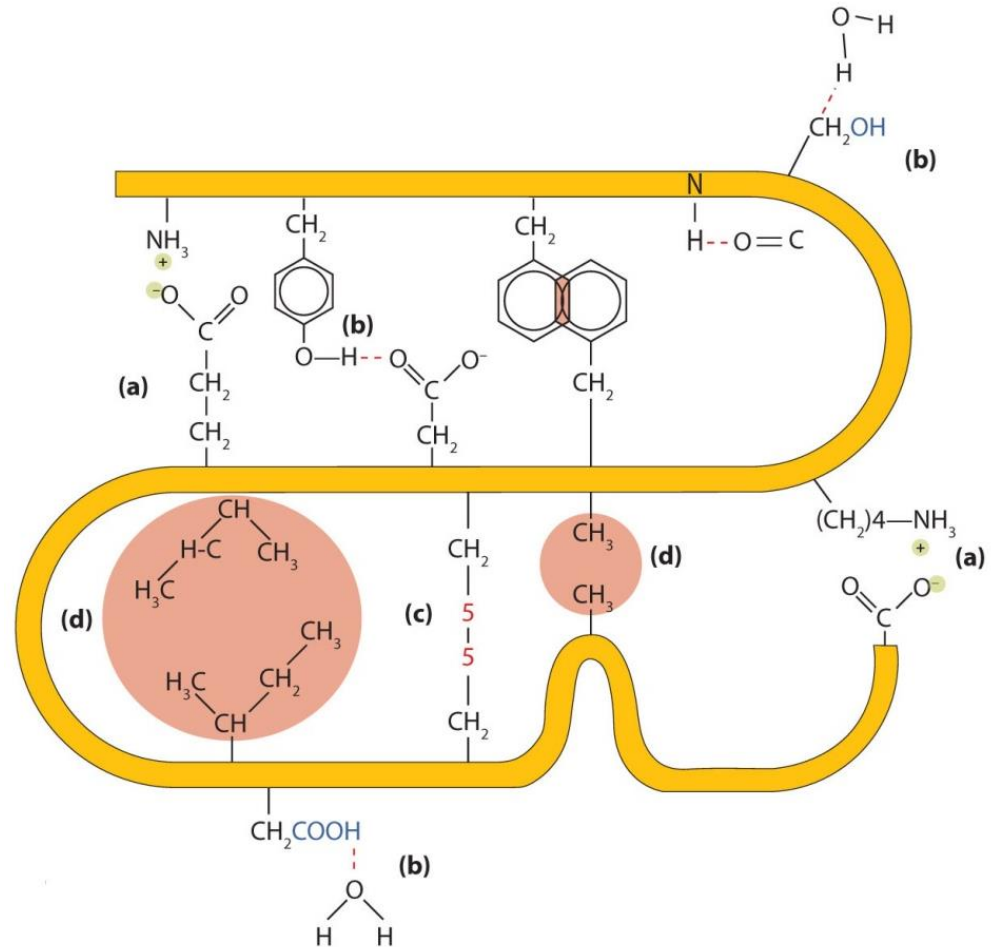


Primární struktura proteinů obsahuje veškerou informaci pro tvorbu vyšších struktur polypeptidu a vyjádření jeho biologické funkce.

Sekundární struktura proteinů

Nekovalentní vazby proteinů

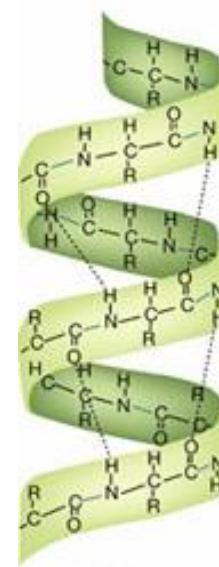
- tvoří se mezi atomy či skupinami atomů v rámci jednoho polypeptidového řetězce či mezi řetězci
- **Disulfidová vazba** - tvoří se mezi -SH skupinami cysteinu uvnitř jedné molekuly proteinu
- Tyto interakce spolu s rozložením polárních a nepolárních AK v polypeptidovém řetězci ovlivňují celkový tvar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



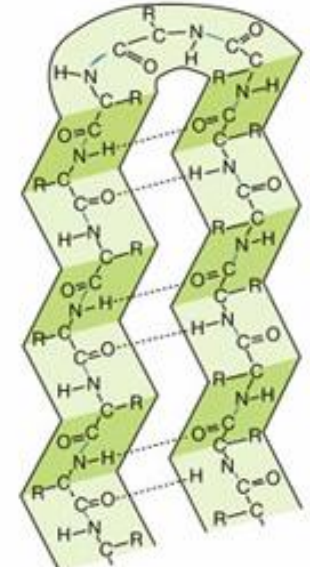
Sekundární struktura proteinů

α -šroubovice (α -helix)

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



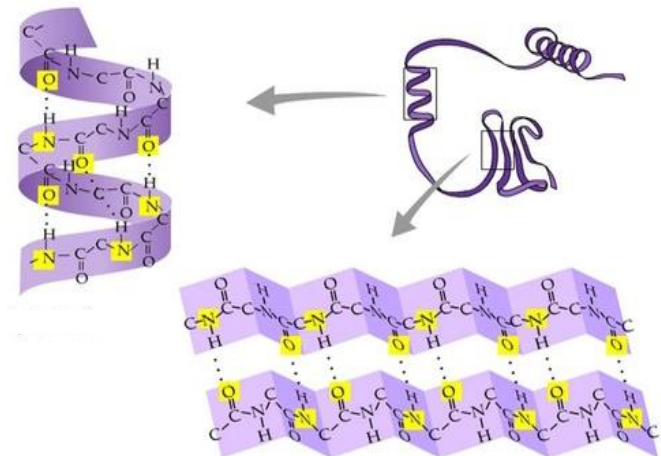
α -šroubovice



β -skládaný list

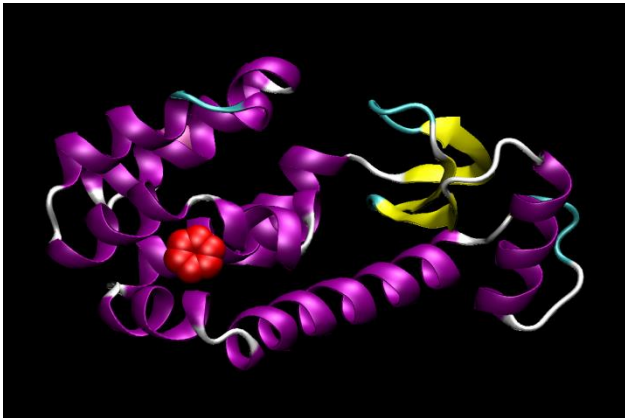
β -skládaný list

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

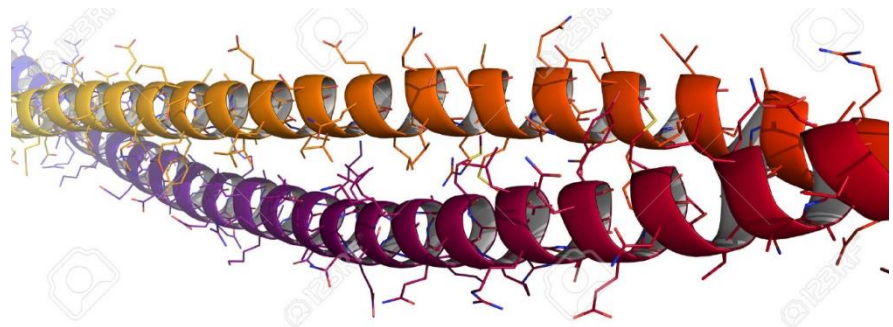


Terciální struktura proteinů

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



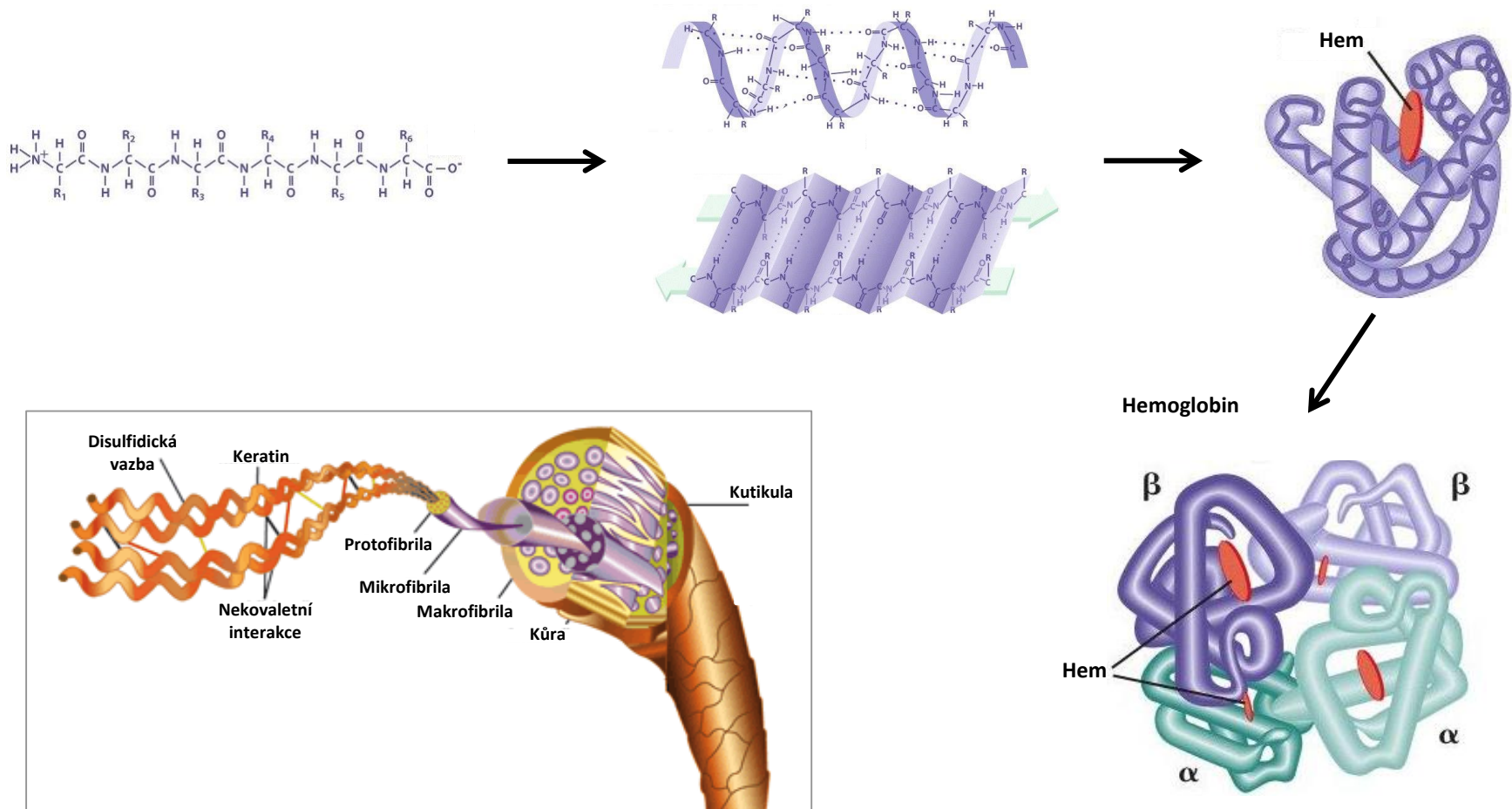
Lysozym



Keratin

Kvartérní struktura proteinů

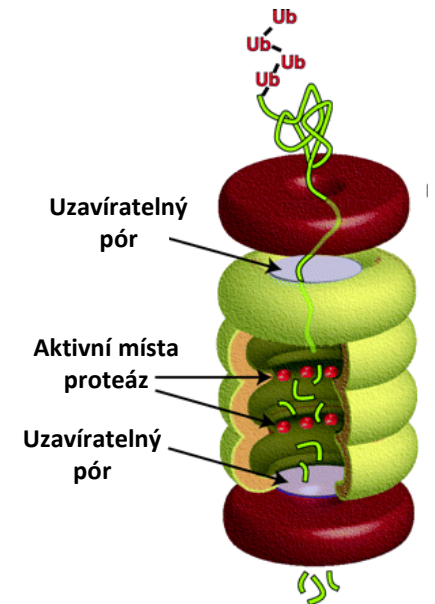
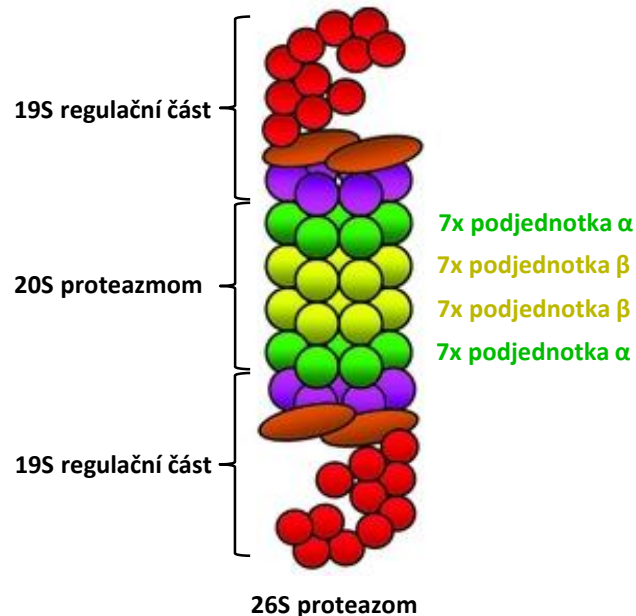
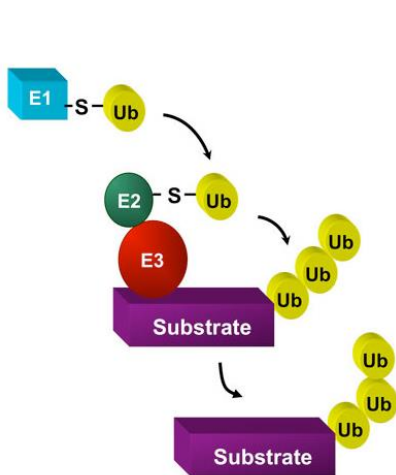
- uspořádání jednotlivých polypeptidových řetězců v molekule proteinu
- týká se oligomerních proteinů
- podjednotky (monomery) složeny v dimery, trimery, tetramery,...



Degradace proteinů

Proteazom

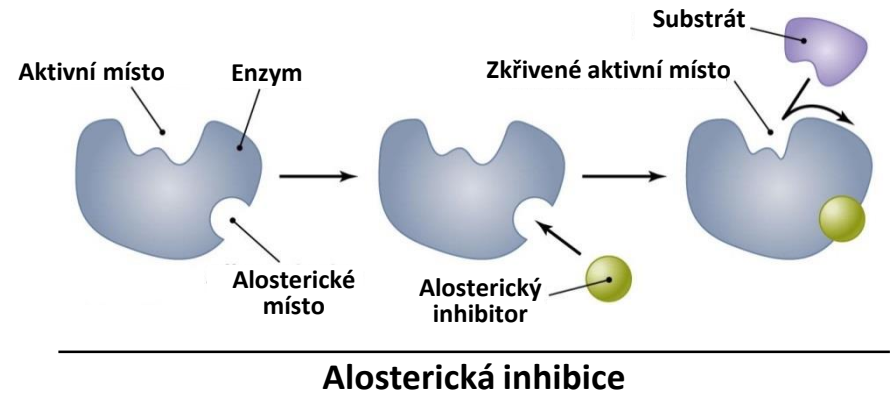
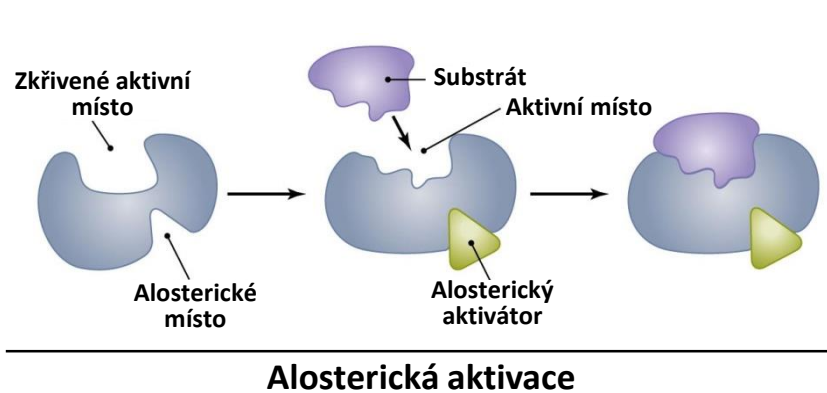
- odstraňuje nežádoucí proteiny - nedokončená či poškozená proteinová struktura, špatně sbalený polypeptidový řetězec, nadbytečný protein měnící svoji koncentraci vlivem stavu buňky
- proteiny určené k degradaci jsou označeny ubikvitinem (Ub) pomocí ubikvitin ligáz (E1-E3)
- **centrální část** (20S proteazom)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



Biologické funkce proteinů

Enzymy

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



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

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

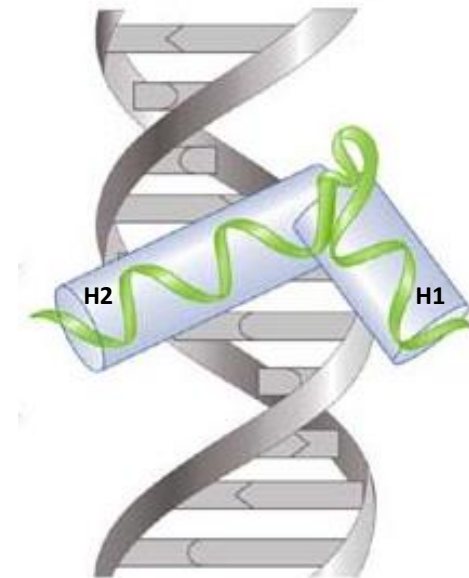
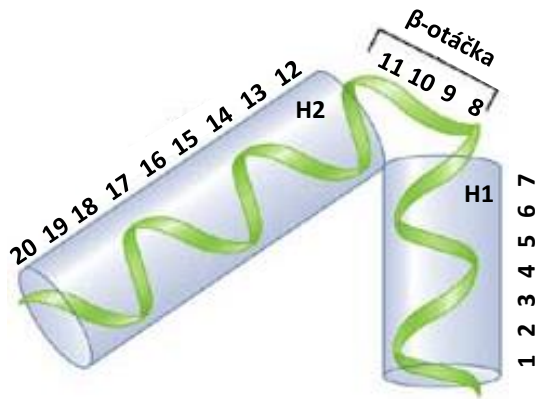
Vazebné interakce proteiny-DNA

Molekulární podstata rozpoznání DNA proteiny

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

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

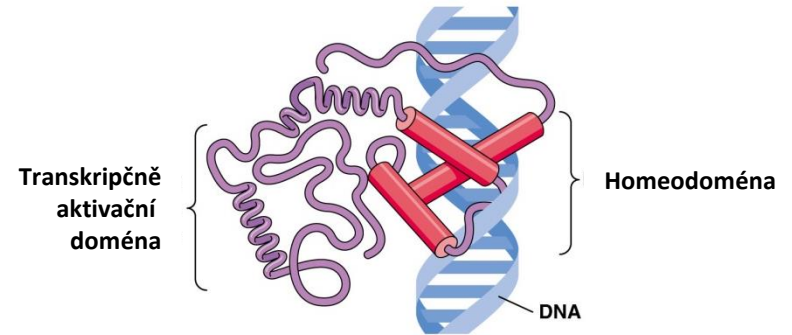
- dva α -helixy (7 a 9 AK) mezi kterými je jedna beta otáčka (4 AK)
- H2 je rozpoznávací, H1 má upevňovací funkci



Vazebné interakce proteiny-DNA

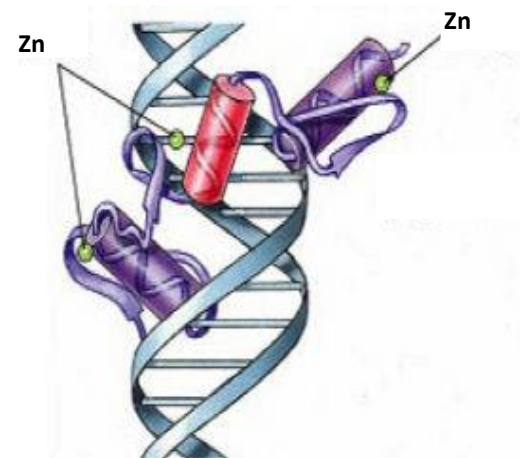
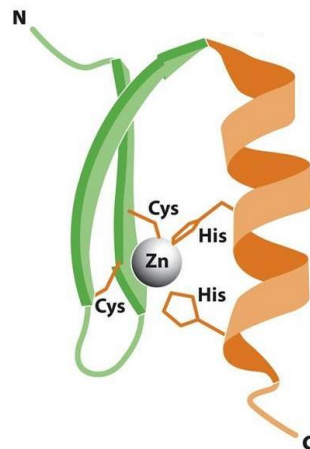
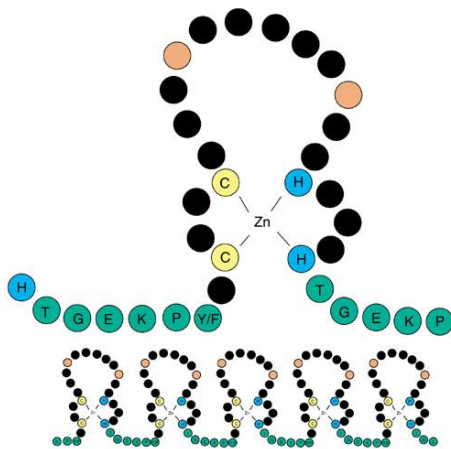
Proteiny s motivem homeodomén

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



Proteiny s motivem zinkových prstů

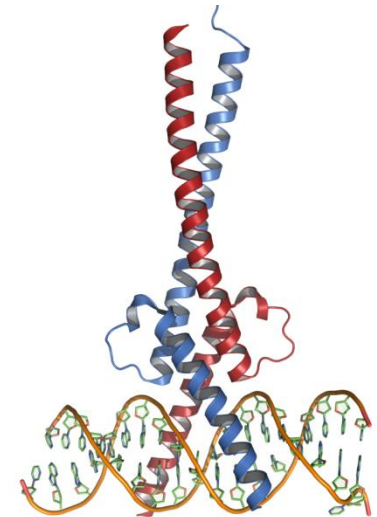
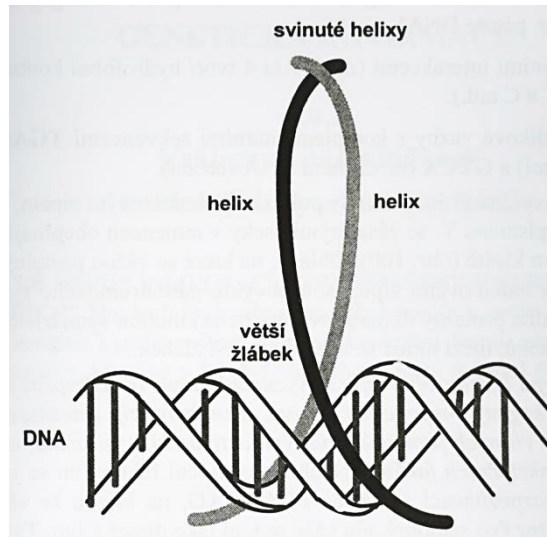
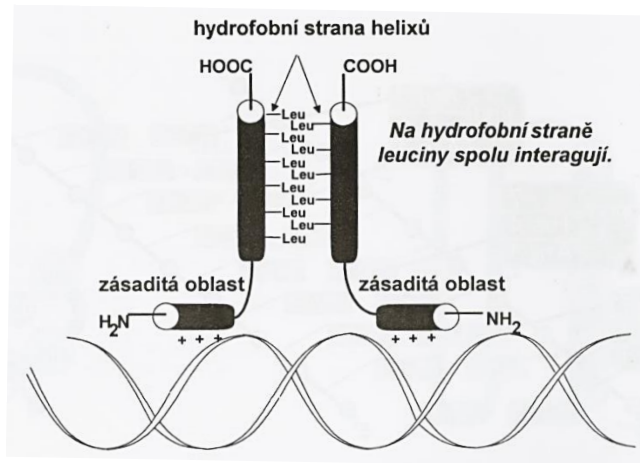
- 3-9 tandemových repetitivních o 29-31 AA
- sekvence držena ve tvaru smyčky **iontem zinku**, na který se váží 2x Cys a 2x His
- každý prst obsahuje **antiparalelní β -skládání list a α -helix**, který se váže ve větším žlábkku DNA



Vazebné interakce proteiny-DNA

Proteiny s motivem leucinového zipu

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



Zvídavé otázky

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

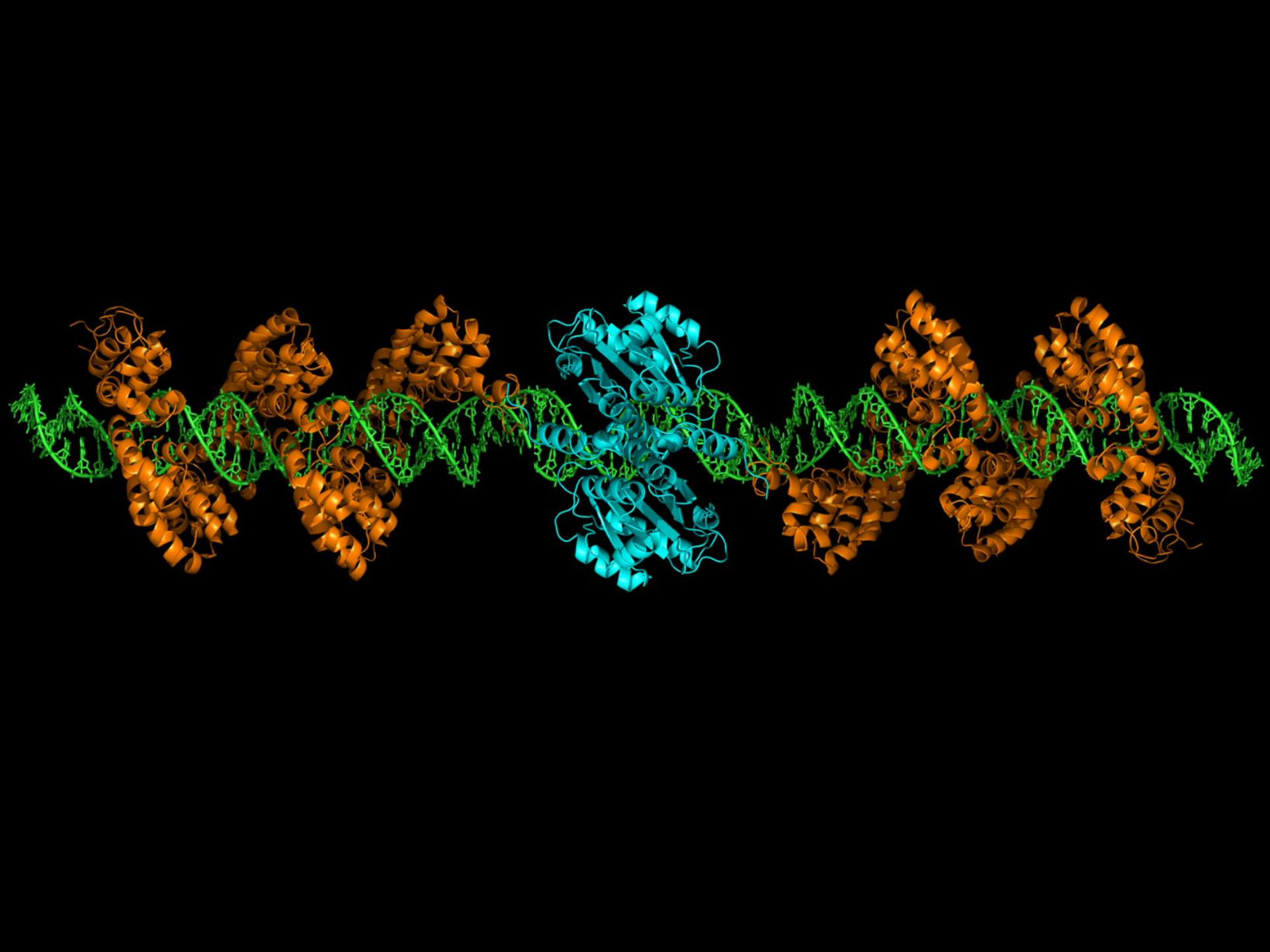
5' **C A T T G A G T** 3'

- Procentuální zastoupení cytozinu v molekule dvoušroubovicové DNA je 40 %. Jaké je v této molekule procentuální zastoupení thyminu?
- Které z těchto vztahů platí pro procentuální zastoupení bází v dvoušroubovicové DNA:

$$(a) C + T = A + G$$

$$(b) C/A = T/G$$

- Jak se liší nukleotid RNA od nukleotidu DNA?
- Jaké purinové a pyrimidinové báze lze najít ve struktuře RNA, DNA?
- Které DNA báze jsou schopné mezi sebou tvořit vodíkové vazby (dle základního Watson-Crickova párování bází)?
- Uveďte libovolnou sekvenci jednovláknové DNA, která by mohla vytvořit vlivem párování bází vlásenku se smyčkou.
- Které aspekty ve struktuře dvoušroubovicové DNA přispívají k stabilitě její molekuly?



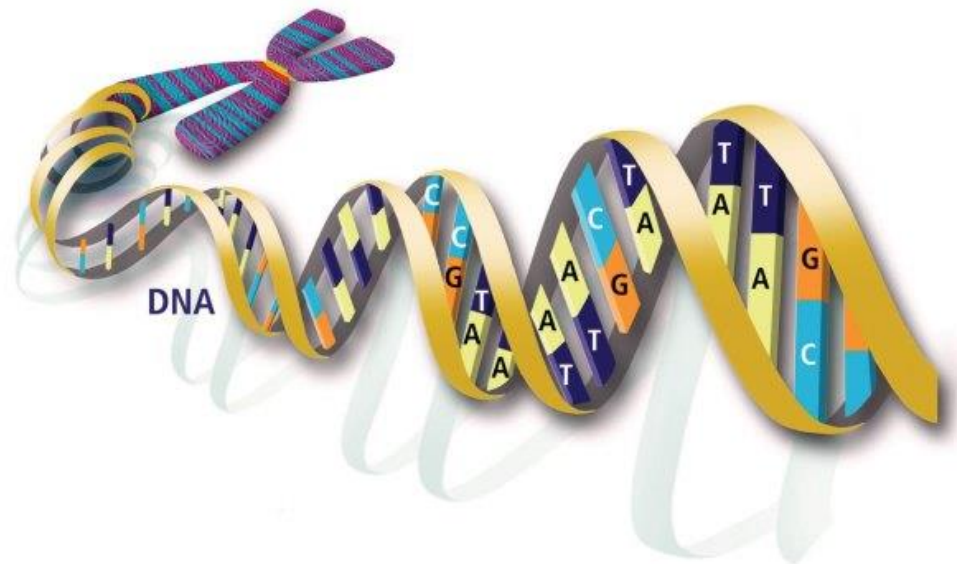
Molekulární biologie pro informatiky - 2

**Struktura genomu
a genetická informace**

Vlastnosti genetického materiálu

Genetický materiál se musí vyznačovat:

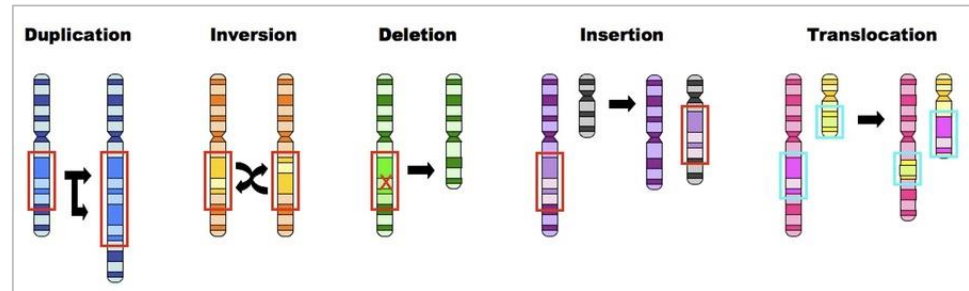
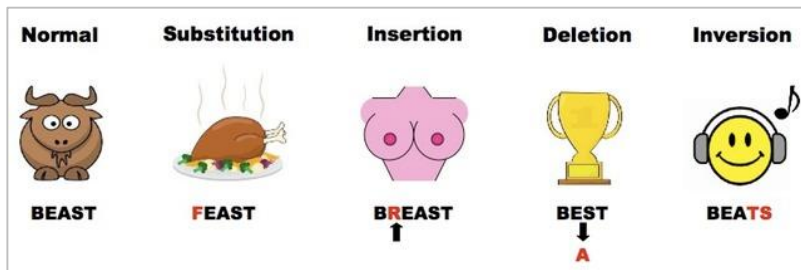
- schopností **uchovat velké množství biologických informací ve stabilní formě**, tyto informace musí mít možnost se mezi jedinci a druhy různit
- schopností **přesně se replikovat**, v rámci mnohobuněčného organismu i při přenosu genetické informace do potomstva
- schopností **kódovat fenotyp** jedince, přítomen mechanismus překládající genetickou informaci do struktury proteinů
- schopností **změny** (možnost evoluce)



Zdroje změn v genetický materiálu

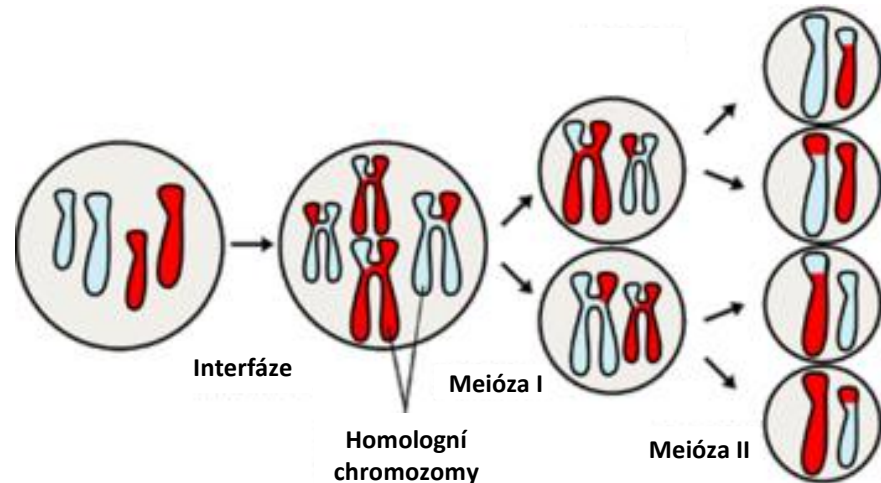
Mutace

- změna informace přenášené z rodičů na potomky (mateřské buňky na dceřiné)
- radikální zásah zavádějící rozmanitost



Rekombinace

- kombinace genetických informací rodičů při pohlavním rozmnožování
- vznikají nové kombinace genů zděděné potomky
- mírnější zdroj rozmanitosti



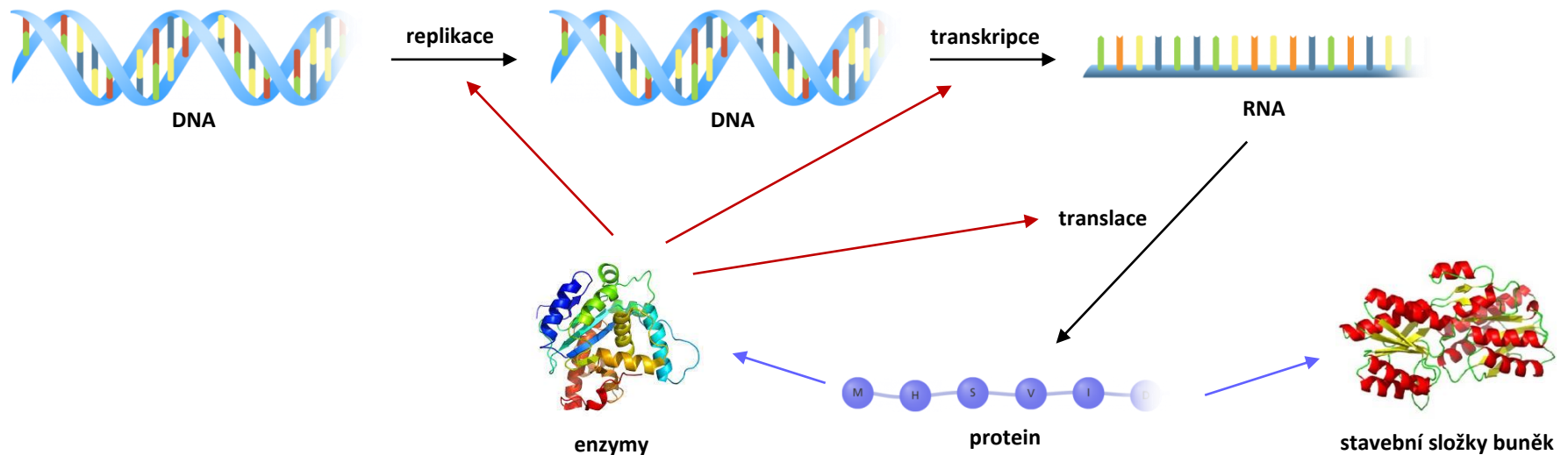
Vzájemná podmíněnost NK a proteinů

- **funkce DNA** - nositelka genetické informace (GI)
 - přenos GI na potomstvo
 - přenos GI na proteiny



- **funkce proteinů** - stavební a katalytické
 - dány jejich primární strukturou

- syntéza DNA a proteinů je závislá na DNA jako nositelce GI, proteinech jako enzimech



Genetická informace

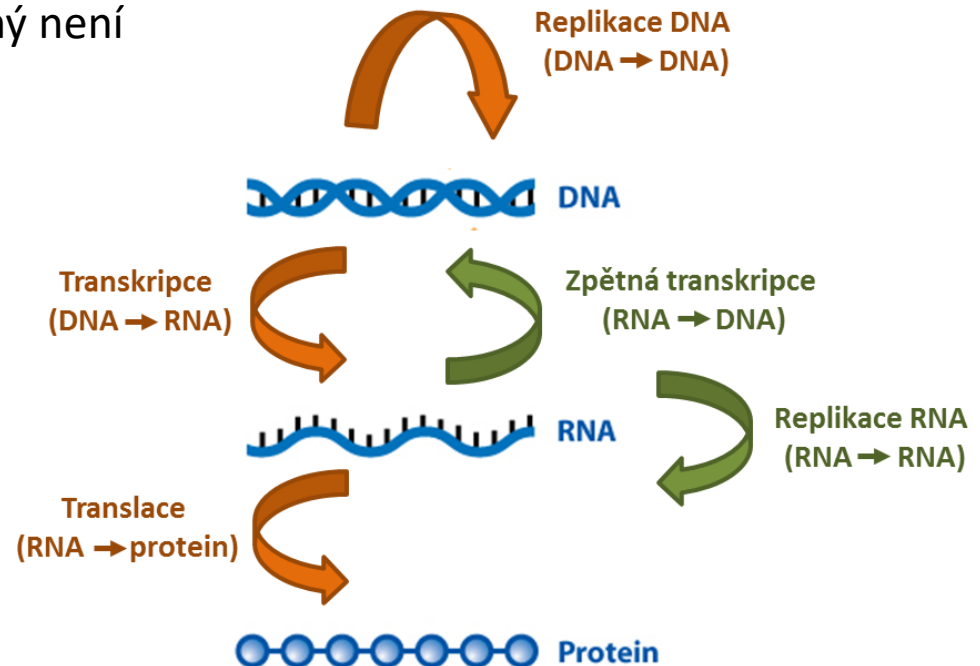
Genetická informace se zapisuje ve formě sekvence nukleotidů

v DNA (prokaryota, eukaryota, DNA viry) pomocí A, T, G, C

v RNA (RNA viry) pomocí A, U, G, C

Přenos genetické informace

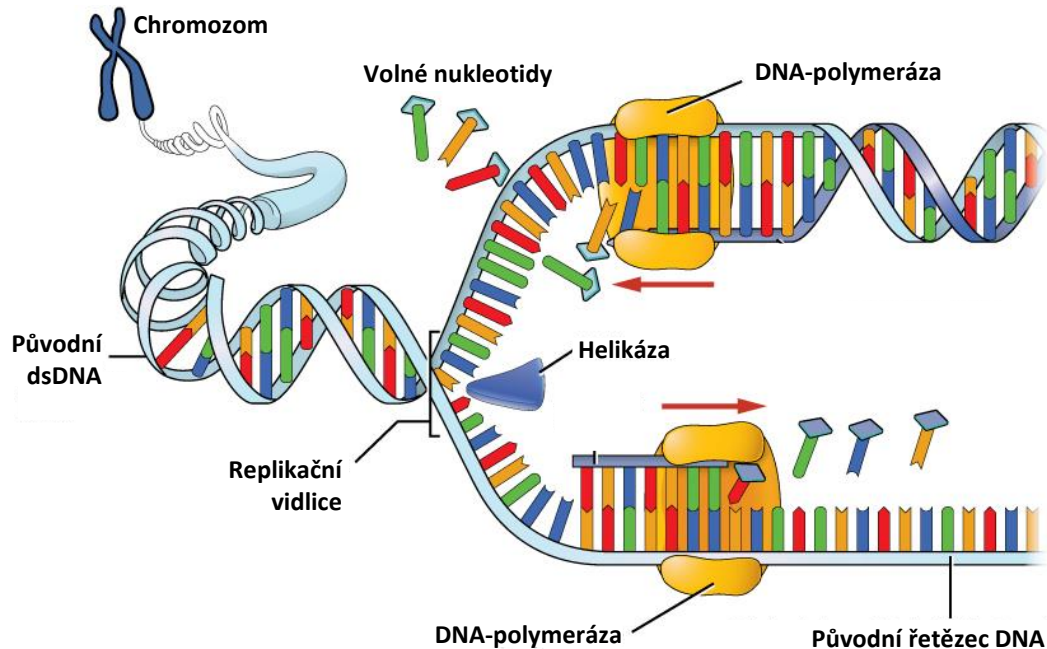
- zformulován v ústředním dogmatu molekulární biologie
- přenos možný z NK do NK nebo z NK do proteinu
- zpětný přenos z proteinu do NK možný není
- replikace
- transkripce
- translace



Replikace

Během replikace se tvoří kopie (repliky) nukleových kyselin zajišťující přenos GI.

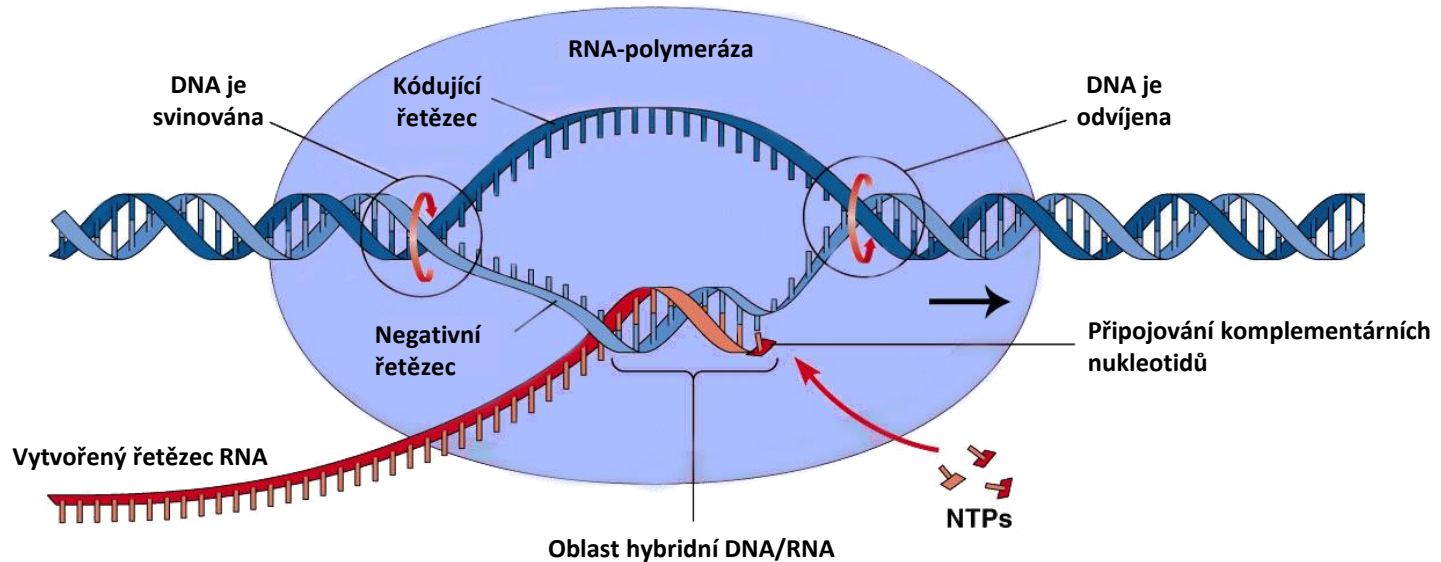
Semikonzervativní způsob replikace dsDNA: po rozpletení dvoušroubovice slouží oba řetězce jako předloha pro syntézu komplementárních řetězců. Ve výsledných molekulách dsDNA je vždy zachován jeden řetězec původní molekuly dsDNA.



Replikace ssRNA: u RNA-virů, dočasná dsRNA, která se následně rozpojí a obě molekuly mohou tvořit nový templát.

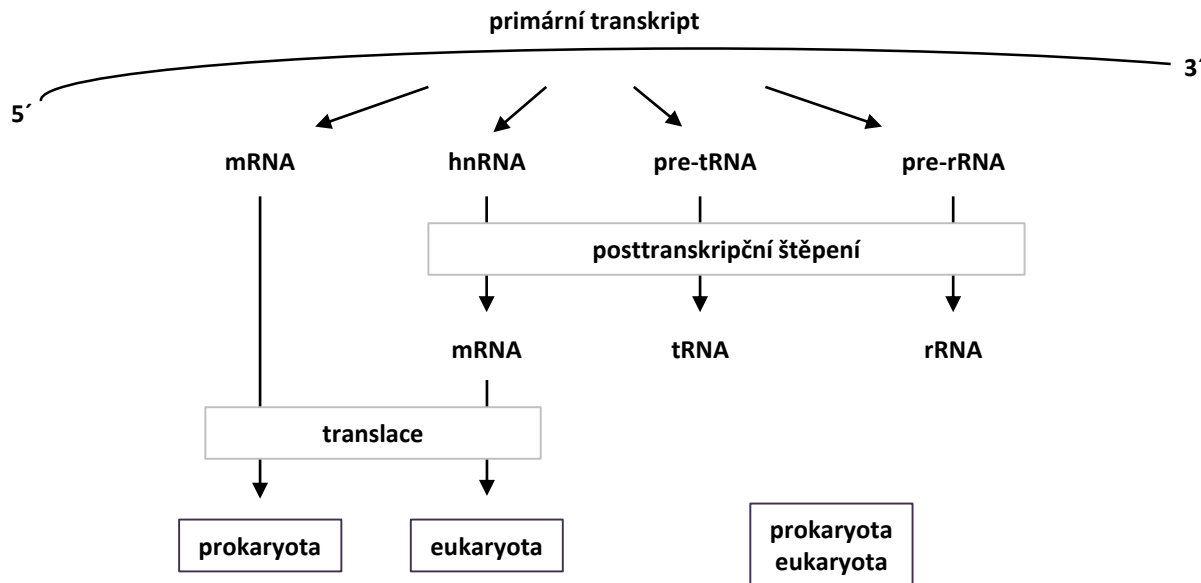
Transkripce

- přepis genetické informace z DNA do RNA
- přepis genetické informace z RNA do DNA - zpětná transkripce
- probíhá vazbou komplementárních ribonukleotidů k přepisovanému úseku DNA
- tvorbu fosfodiesterových vazeb katalyzuje RNA-polymeráza
- výsledkem je transkript



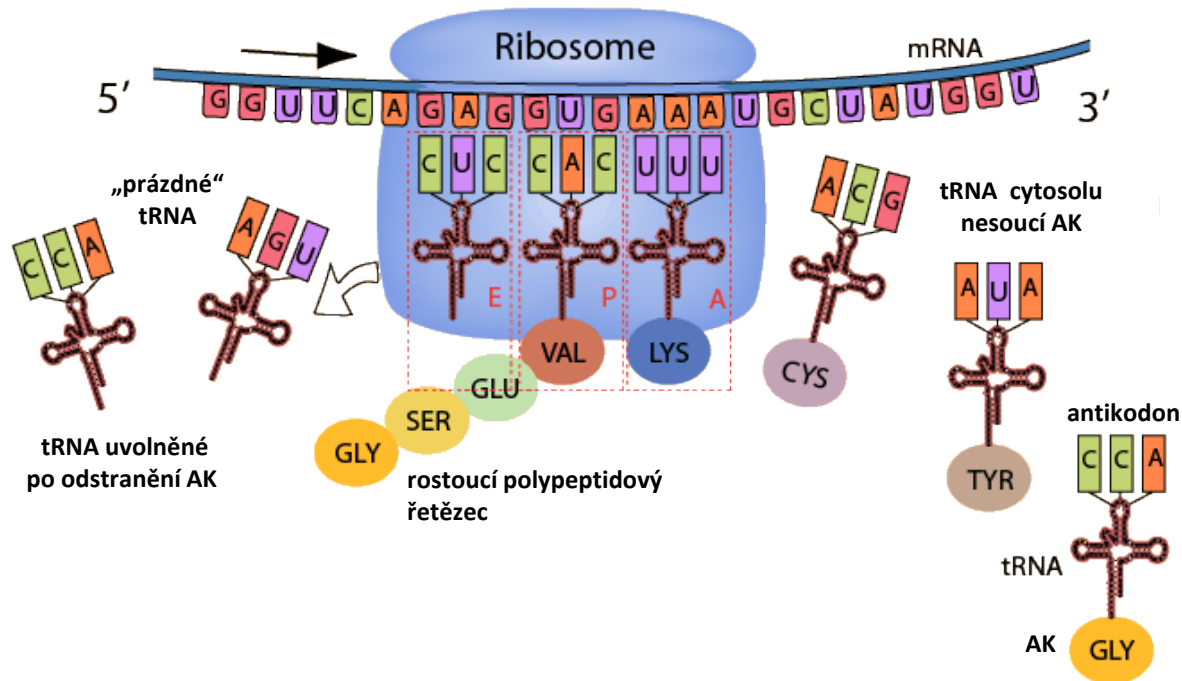
Transkripce

- bezprostředním produktem transkripce je primární RNA-transkript, který může podléhat posttranskripčním úpravám (nejčastěji štěpení transkriptu)
- **mRNA** - podléhá translaci
 - u prokaryot je primárním transkriptem, u eukaryot podléhá sestřihu
- **tRNA, rRNA** - funkční RNA, nepodléhají translaci
 - prodělávají sestřih u prokaryot i eukaryot



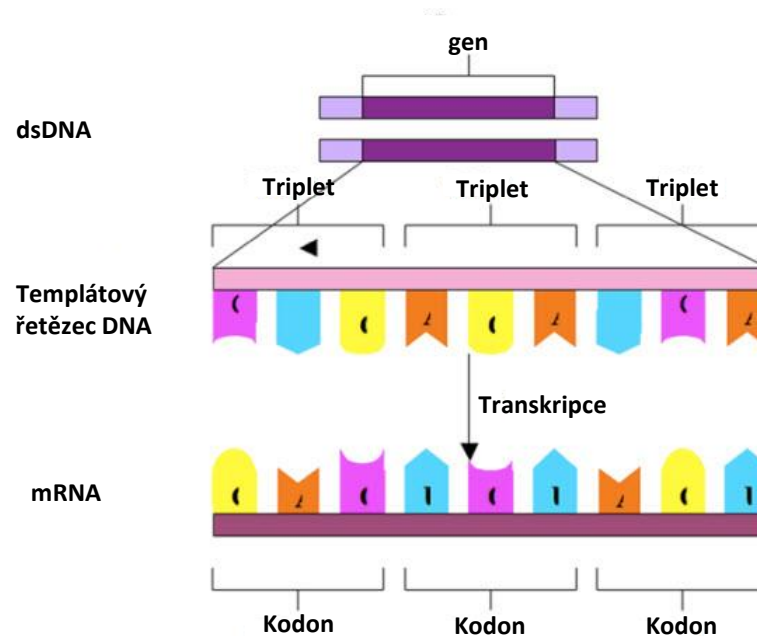
Translace

- překlad genetické informace z mRNA do primární struktury proteinu
- genetická informace zapsaná v jednom jazyku se překládá podle určitého kódu do jiného jazyku



Genetický kód

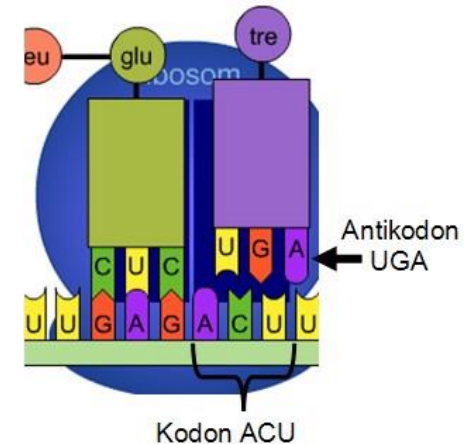
- genetickým kódováním se označuje určení primární struktury proteinu sekvencí DNA podle pravidel genetického kódu, uskutečňuje se translací
- každá AK proteinu je v DNA kódována trojicí nukleotidů, tzv. **tripletem**



- základní jednotkou genetického kódu je **kodon** = pořadí tří nukleotidů kódujících v proteinu určitou AK
- genetický kód je systém pravidel, podle kterých jednotlivé kodony určují zařazení standardních AK do proteinu

Čtení genetického kódu

- jednosměrné rozeznání kodonů v mRNA antikodony tRNA
- **antikodon** je triplet, pomocí kterého se tRNA přechodě váže ke komplementárnímu kodonu v mRNA
- každá tRNA je obsazena konkrétní aminokyselinou



- 3 možnosti způsobu čtení tripletů

1. **ATG** CAA TGG GGA AAT GTT ACC AGG TCC GAA CTT ATT GAG GTA AGA CAG ATT **TAA**
2. A TGC AAT GGG GAA **ATG** TTA CCA GGT CCG AAC TTA TTG AGG **TAA** GAC AGA TTT AA
3. AT GCA **ATG** GGG AAA TGT TAC CAG GTC CGA ACT TAT **TGA** GGT AAG ACA GAT TTA A

- způsob čtení tripletů založený na daném začátku se nazývá čtecí rámeček
 - **otevřený čtecí rámeček (ORF)**: vymezen iniciačním a terminačním kodonem
může kódovat souvislý a dostatečně dlouhý polypeptid
 - uzavřený čtecí rámeček: přerušovaný terminačními kodony

Strukturní gen

Základní funkční jednotkou genetické informace je gen. Rozlišují se následující formy genu:

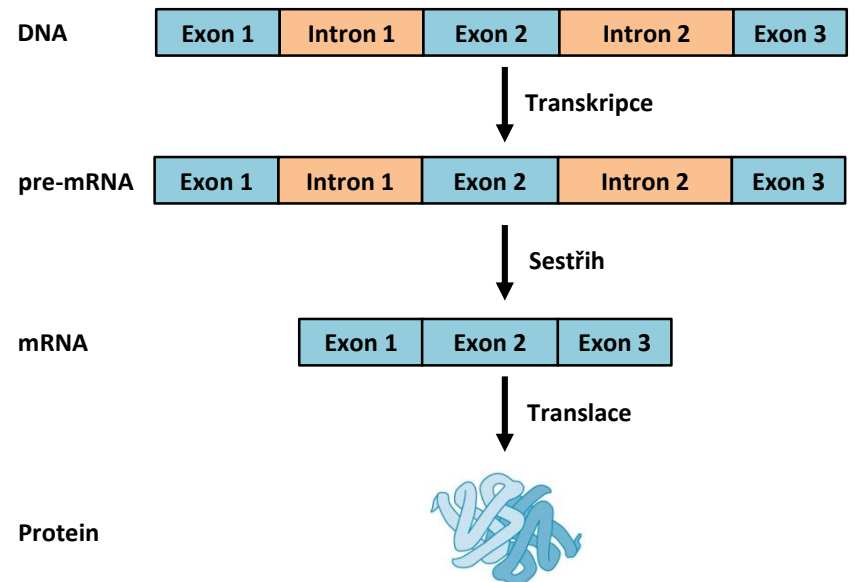
strukturní geny, geny pro funkční RNA, regulační oblasti DNA

Strukturní gen

1. jednoduchý strukturní gen: primární transkript nepodléhá sestřihu, neobsahuje introny

2. Složený strukturní gen

- primární transkript podléhá posttranskripční úpravě sestřihem
- složen z exonů a intronů
- intron je část genu, jejíž přepis se při sestřihu vyštěpí a nepřechází do výsledné mRNA
- exon se při sestřihu nevyštěpuje, jednotlivé exony se spojují a tvoří výslednou mRNA



Strukturní gen

Sestřih strukturních genů:

1. konstitutivní sestřih

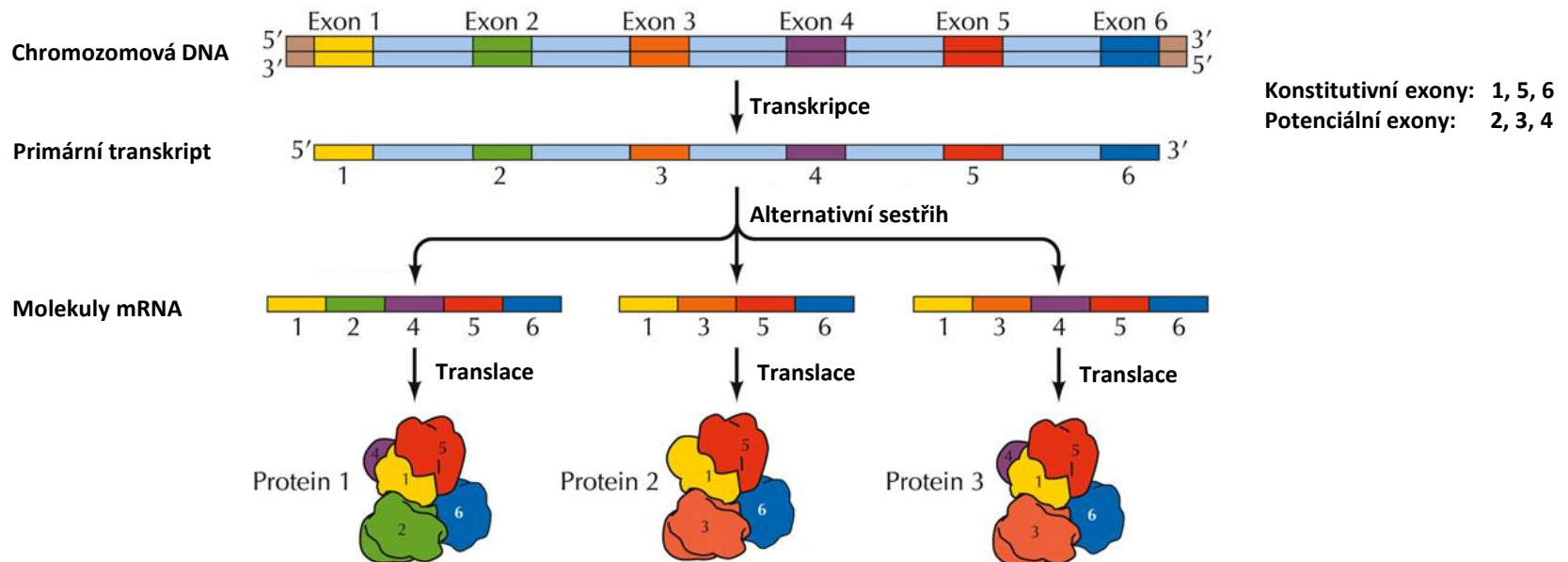
- výsledkem je molekula mRNA vždy o stejné primární struktuře

2. alternativní sestřih

- exon konstitutivní: vždy působí během sestřihu jako exon

- exon potenciální: při některém sestřihu působí jako exon, při jiném jako intron

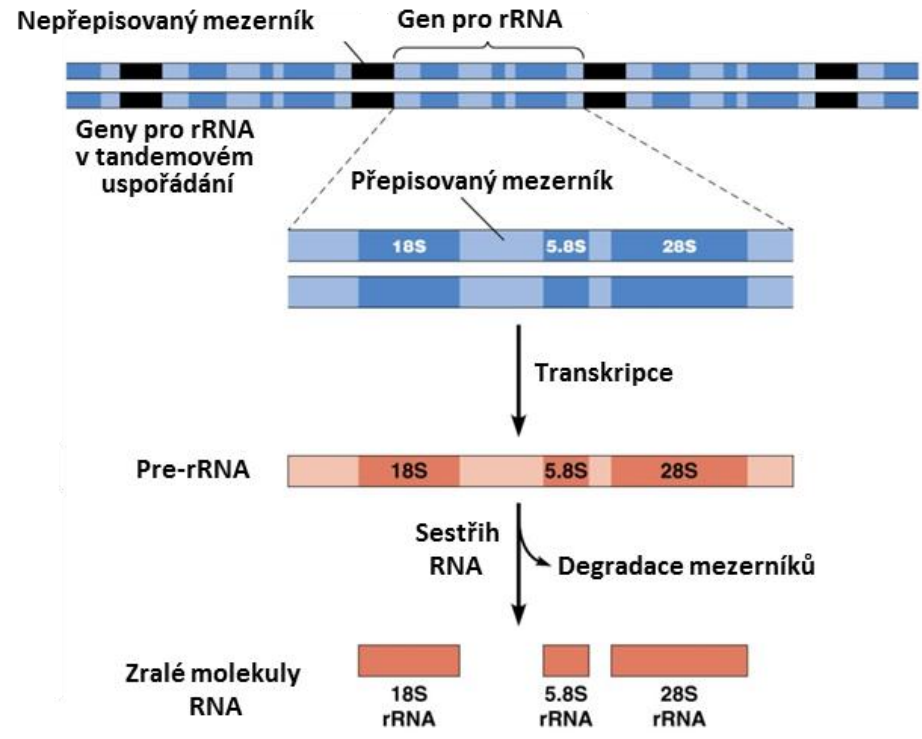
- izoformy jsou funkčně příbuzné proteiny, které se více či méně liší ve své struktuře



Ostatní formy genu

Gen pro funkční RNA

- transkripce do primární struktury RNA, které nejsou určeny k translaci, např. tRNA, rRNA
- několik genů pro tRNA a rRNA se přepisuje do jedné molekuly primárního transkriptu, které se post-transkripčně štěpí na jednotlivé funkční typy RNA
- nevyskytují se u virů

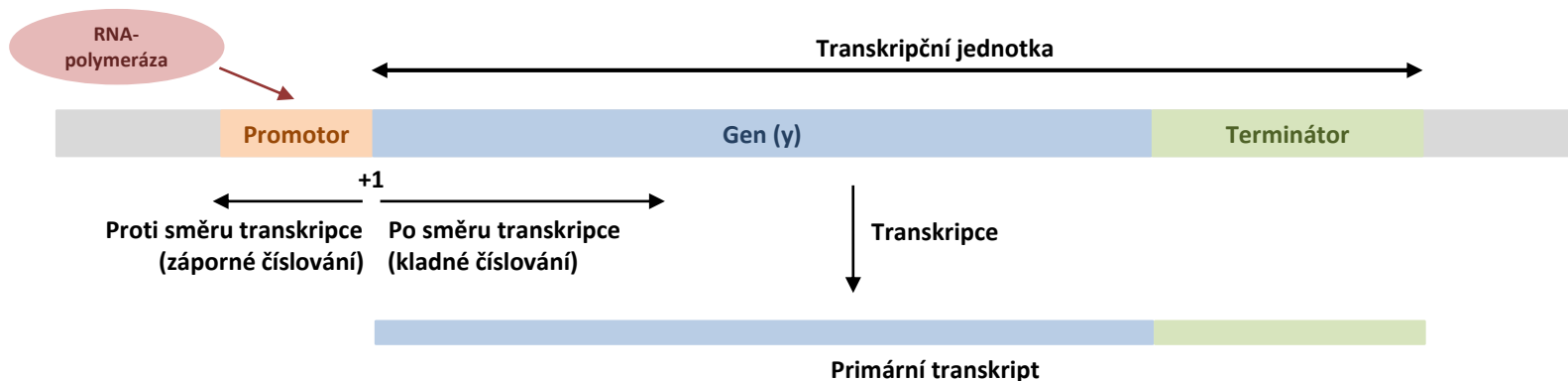


Gen jako regulační oblast

- rozeznávány proteiny signalizujícími zahájení nebo zastavení transkripce, nemají produkt

Transkripční jednotka

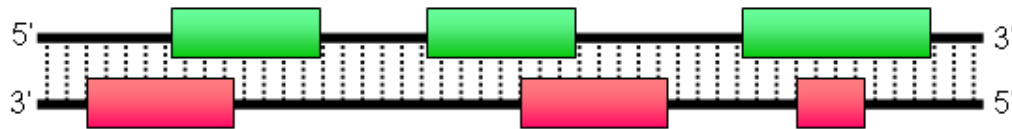
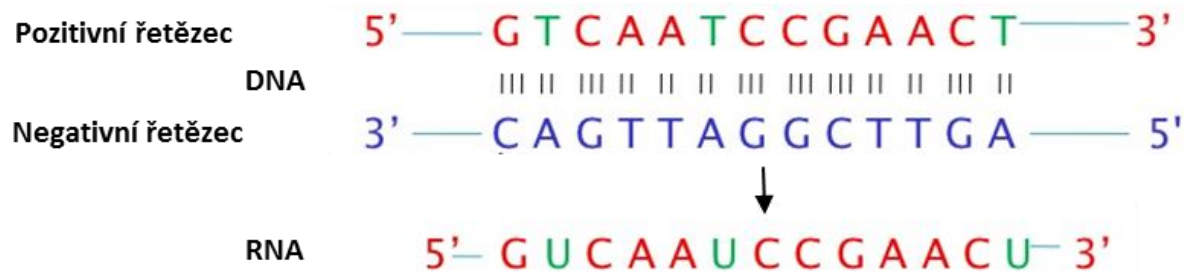
- vymezena startovacím nukleotidem a posledním nukleotidem v terminátoru
- od **startovacího nukleotidu** (+1) začíná přepis transkripční jednotky
- nukleotidy po směru transkripce jsou +2, 3, +4, ..., proti směru transkripce jsou -1, -2, -3, -4, ...
- **promotor** není součástí transkripční jednotky, váže se na něj **RNA-polymeráza**
- **terminátor** je regulační oblast transkripční jednotky, na které končí její přepis
- obsahuje jeden gen (eukaryota) či více genů (prokaryota)
- přepisuje se do primárního transkriptu, který obsahuje přepis všech přítomných genů



Transkripční jednotka

Pozitivní a negativní řetězce DNA

- negativní řetězec (antikódující, antisense) - řetězec v dsDNA, který se přepisuje, slouží jako templát
- pozitivní řetězec (kódující, sense) - nepřepisuje se, má stejnou sekvenci nukleotidů jako RNA, která vzniká na negativním řetězci (T/U)
- negativní řetězec se přepisuje ve směru od 3' k 5' konci, RNA se z dsDNA odvíjí 5' koncem
- v rámci chromozomu se střídají úseky negativních a pozitivních řetězců



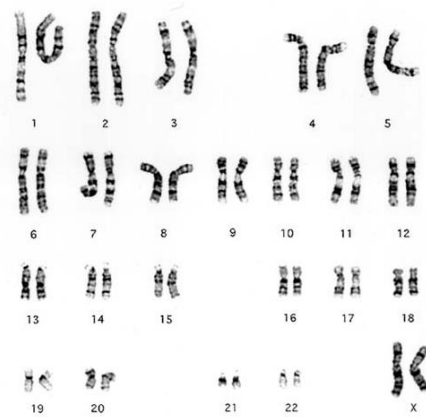
Genofor, genom

Genofor

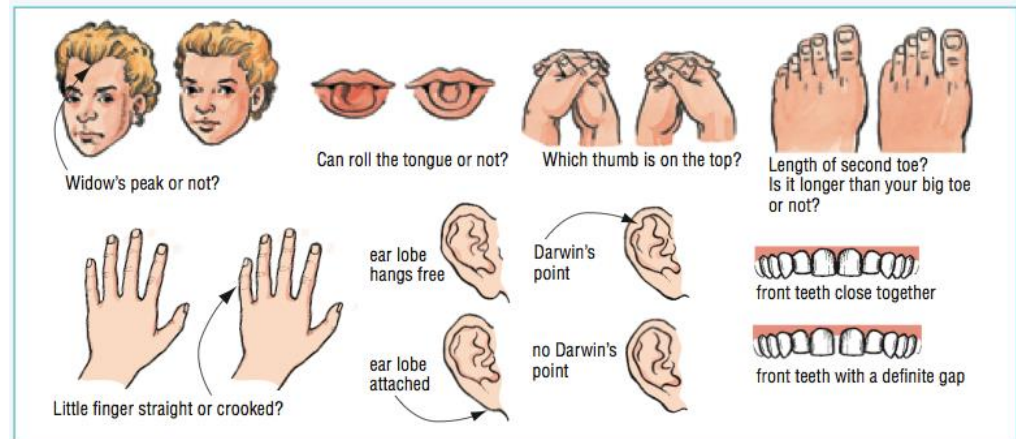
- struktura, která nese geny a je schopná replikace
- genofory obsažené v jádře buňky se nazývají chromozomy
- každý genofor obsahuje soubor genů, vazbová skupina
- homologické genofory se vyznačují stejnými vazbovými skupinami
 - např. chromozomy stejného páru v diploidní eukaryotické buňce

Genom

- souhrn všech genů buňky
- rozlišen do různých organel - jaderná, mitochondriální, chloroplastová složka genomu
- genotyp = genetická sestava alel v organismu, vztahuje se na jedince daného druhu
- fenotyp = soubor znaků a vlastností jedince, jeho utváření je dáno genotypem, závisí také na podmínkách prostředí

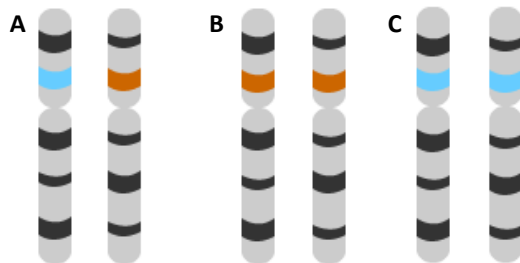




Courtesy of Dr. K. Phelan, Greenwood Genetic Center.
Noncommercial, educational use only.



Alela

- každý gen má jednu či více alel, které se navzájem liší v nukleotidové sekvenci
- vztah mezi alelami
 - dominance** - projev dominantní alely (A) převládá a potlačuje projev recesivní alely
 - recesivita** - recesivní alela (a) se v kombinaci s dominantní alelou neprojevuje
 - kodominance** - žádná z alel není dominantní, ve fenotypu se projeví funkce obou alel
- v somatických buňkách je každý gen zastoupen dvěma alelami
 - homozygotní** sestava alel: obě alely genu stejné (AA, aa)
 - heterozygotní** sestava alel: obě alely genu rozdílné (Aa)



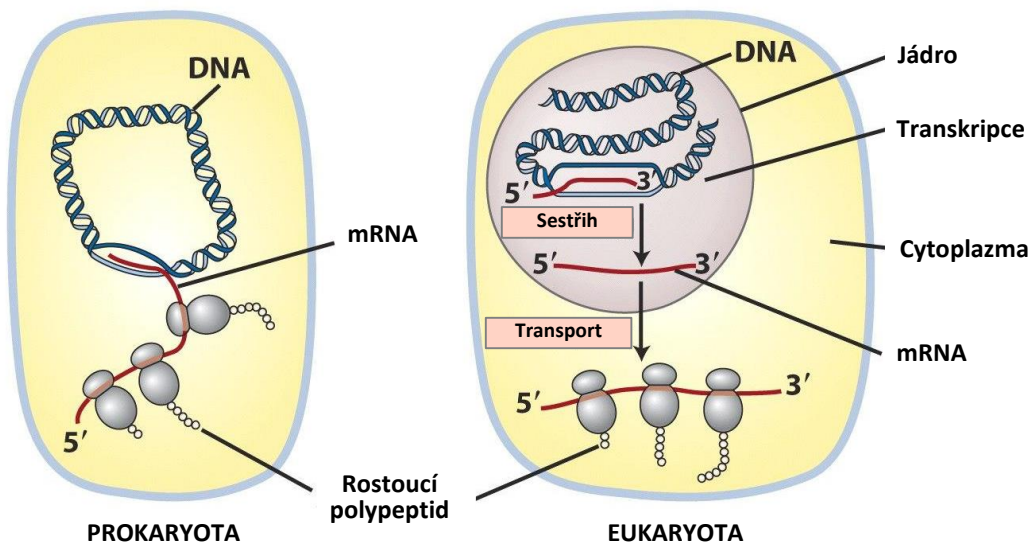
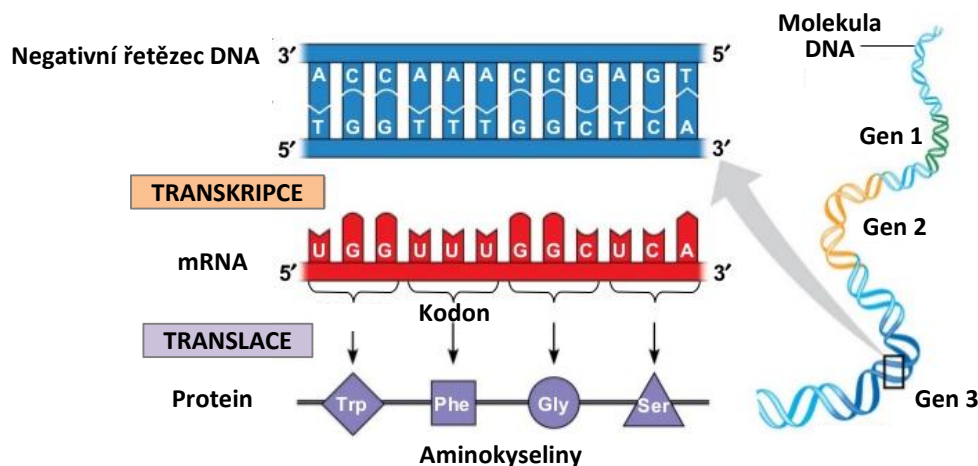
 alela pro hnědé oči (B, dominantní)
 alela pro modré oči (b, recesivní)

A - heterozygot Bb, hnědé oči

B - dominantní homozygot BB, hnědé oči

C - recesivní homozygot bb, modré oči

Tok genetické informace v živých soustavách



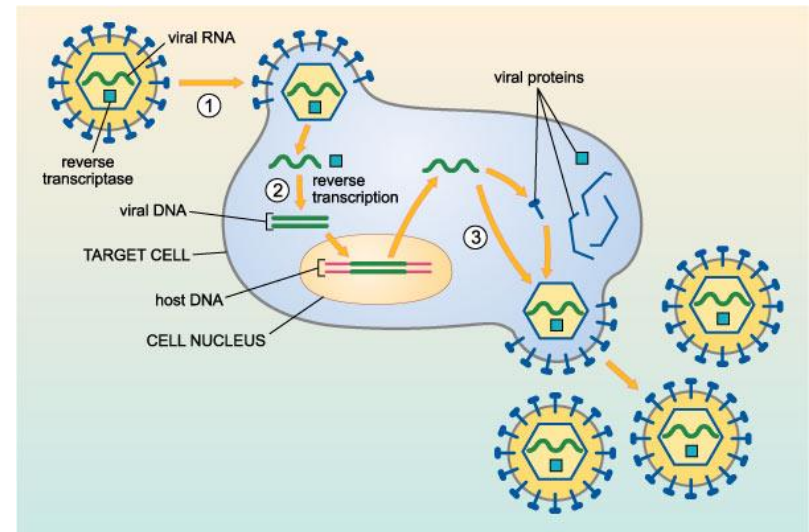
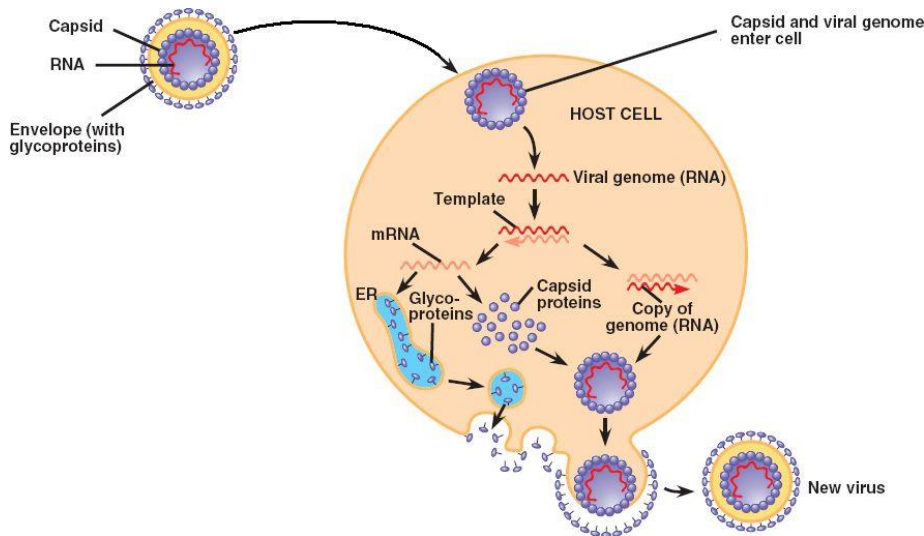
Živé soustavy

1. Buněčné živé soustavy (jednobuněčné a mnohobuněčné organismy)

- všechny základní životní funkce, autonomní překlad GI do primární struktury proteinů
- typy buněk: prokaryotická, eukaryotická

2. Nebuněčné živé soustavy (viry a viroidy)

- intracelulární parazitizmus: přenos GI závislý na hostitelské buňce
- nukleoproteinové částice schopné infikovat hostitelské buňky a v nich se reprodukovat v závislosti na jejich translačním systému
- v genomu nejsou geny pro rRNA, tRNA a strukturní geny pro ribozomové proteiny



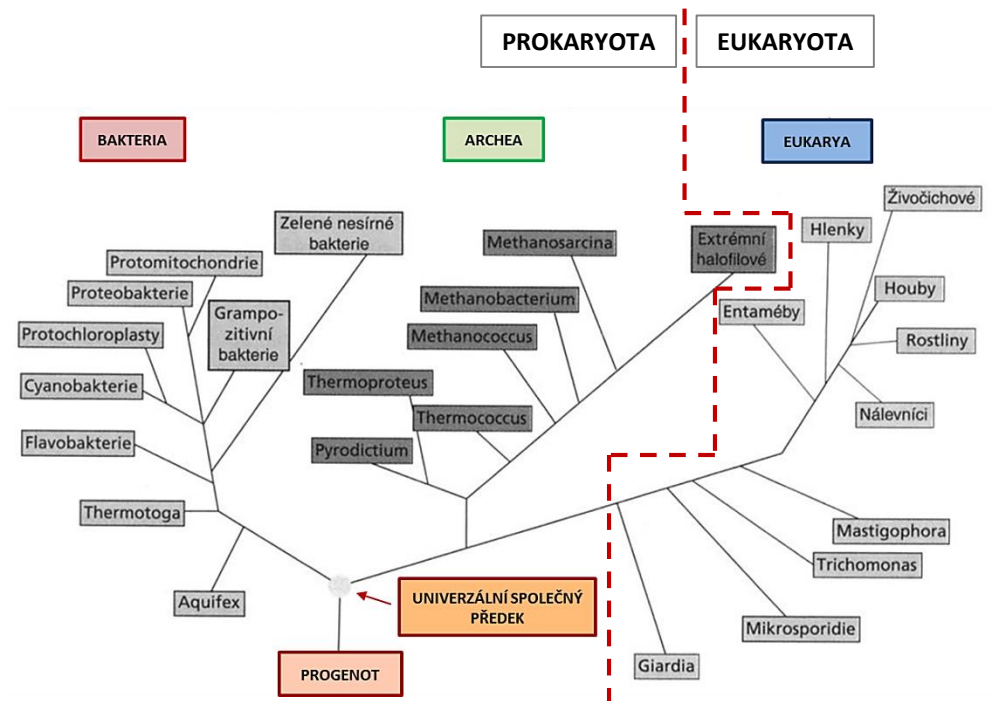
Buněčné živé soustavy

Buněčné živé soustavy děleny do 3 domén: bakteria, archea, eukarya

Univerzální fylogenetický strom

- 16/18S-rRNA: jedna z nejstarších biologických molekul, funkčně konstantní výskyt u všech organismů, faktor spjatý s evolucí translace
- ukazuje vývoj všech živých soustav z **univerzálního společného předka**
- tomu předcházel **progenot**: jednoduchá živá soustava, vznik 3,8 - 4,2 x 10⁹ let před současností

- dělení živých soustav na **prokaryota** a **eukaryota** dle fenotypu buněk (struktura a organizace buňky)
- dělení živých soustav do domén na základě evoluční příbuznosti jejich zástupců
- archea jsou podle molekulárně biologických vlastností evolučně blíže eukaryím



Prokaryota

Struktura buňky rozlišena na jádro, cytoplazmu a buněčné obaly

Jádro (nukleoid)

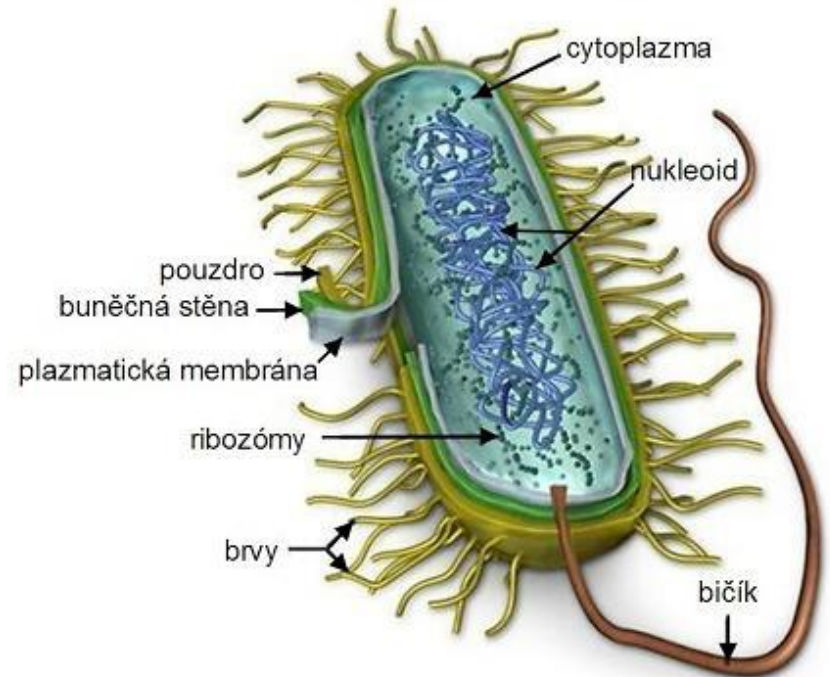
- prokaryotického typu
- není proti cytoplazmě ohraničeno membránou
- nedělí se mitoticky
- vždy obsahuje jednu molekulu dsDNA (chromozom prokaryotické buňky), která je většinou kružnicová

Dochází ke všem přenosům genetické informace (replikace a transkripce DNA, translace mRNA)

Nepohlavní rozmnožování

Ribozomy

- typ 70S
- rRNA molekuly 5S, 16S, 23S



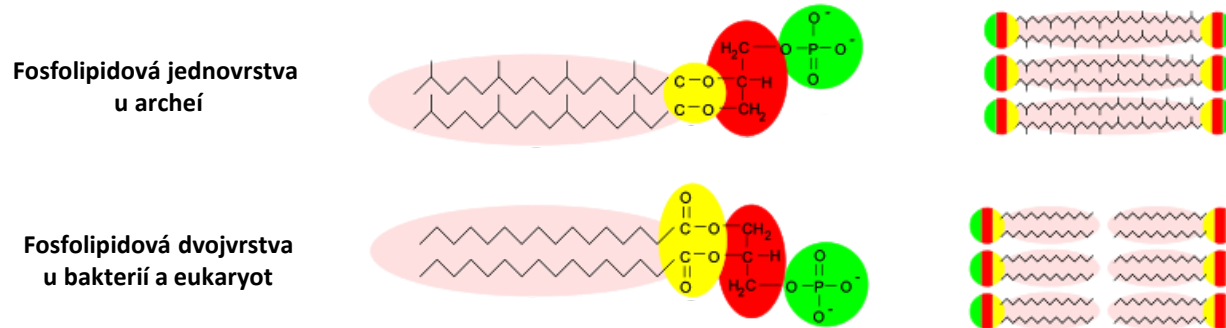
Prokaryota

Bakteria (bakterie a sinice)

- buněčná stěna tvořena mureinem, glycerol-esterlipidy v cytoplazmatické membráně
- geny neobsahují introny, značná část je jich organizována do operonů
- při translaci se jako první řadí N-formylmetionin
- metabolismus foto- i chemo- hetero- i autotrofové

Archea (archebakterie)

- v buněčné stěně je pseudomurein či jiné složky, glycerol-etherlipidy v cytoplazmatické membráně
- geny přepisované do tRNA a rRNA obsahují introny, sestřih podobný eukaryotům
- přenos genetické informace se vyznačuje prvky bakteriální i eukaryotní translace
- metabolismus chemoautotrofní, chemoheterotrofní



Eukaryota

Jednobuněčné i mnohobuněčné organizmy.

Buněčná stěna tvořena z celulózy u rostlin, z chitinu u hub, u živočichů chybí

Diferenciace buněk během ontogeneze mnohobuněčných organizmů

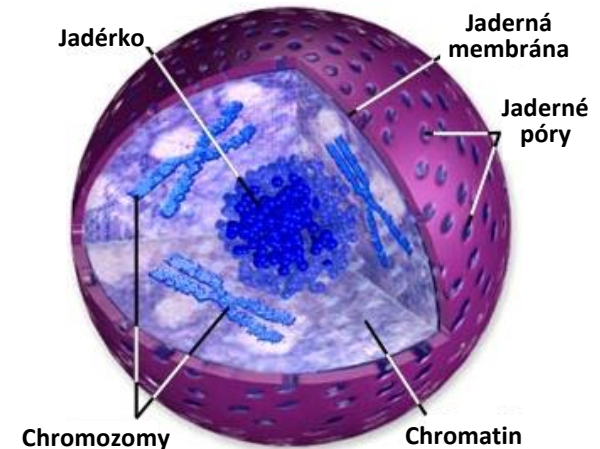
Rozmnožování nepohlavní u jednobuněčných druhů, pohlavní u mnohobuněčných druhů

Metabolismus fotoautorofní u rostlin, chemoheterotrofni u živočichů a hub

Dělení do říší: prvoci, rostliny, houby, živočichové

Jádro

- eukaryotického typu, zřetelně ohraničeno jadernou membránou
- obsahuje chromatin složený z DNA, histonů a proteinů nehistonové povahy
- lineární molekuly dsDNA, chromozomy
- mitotické dělení, které zajišťuje rozdělení chromozomů do dceřiných buněk



Eukaryota

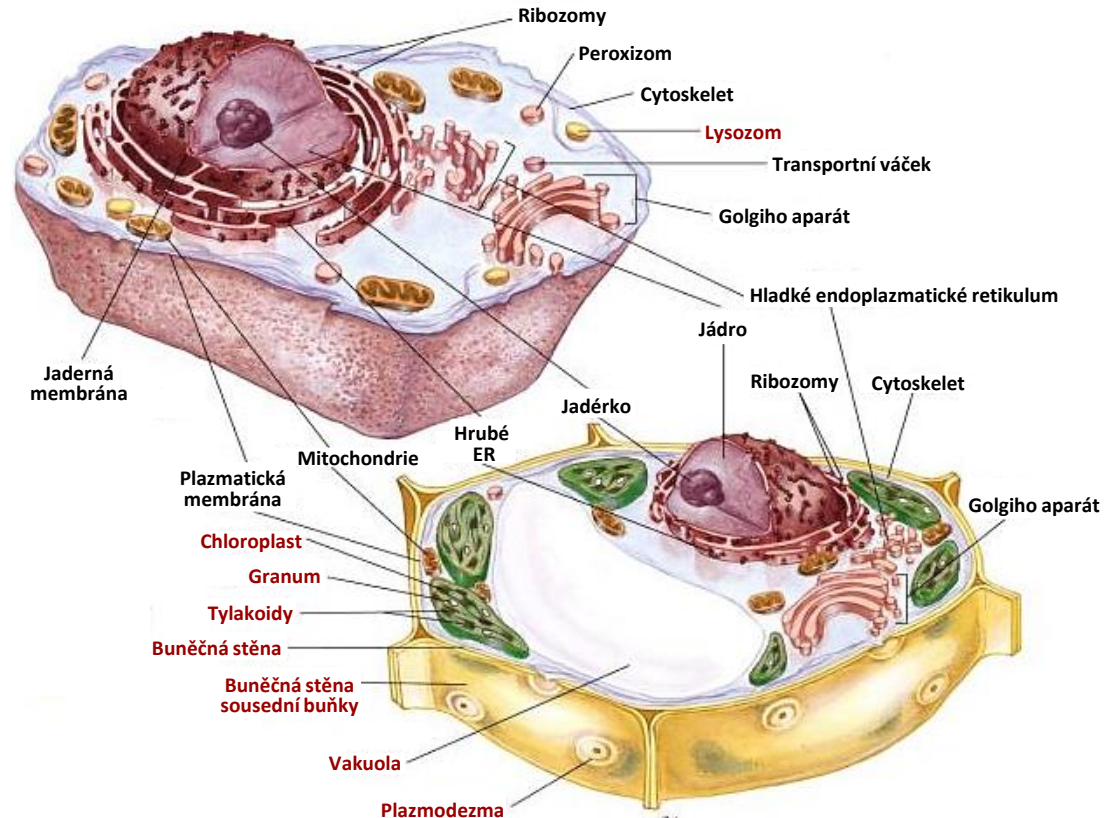
Všechny mechanismy přenosu genetické informace vyjádřené ústředním dogmatem molekulární biologie zachovány jako u prokaryot. Modifikace těchto mechanismů za účelem diferenciacce buněk.

Složené geny s introny.

Při translaci se jako první řadí metionin.

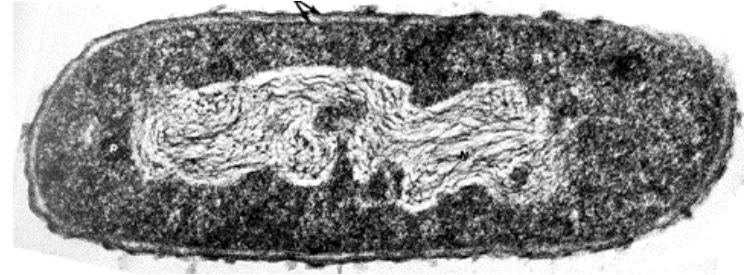
Řada organel, které nejsou přítomny v prokaryotické buňce:

- mitochondrie a chloroplasty
- ribozomy (80S; 5.8S, 18S, 28S)
- endoplazmatické retikulum
- Golgiho aparát
- lyzozom
- peroxizom
- cytoskelet
- vakuola



Struktura prokaryotického genomu

Prokaryotický genom se soustřeďuje do prokaryotického jádra, nukleoidu
U řady druhů plasmidy, genom rozdělen na více genoforů



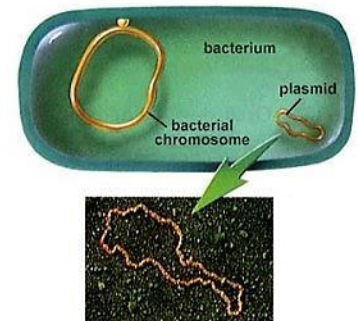
Nukleoid

- funkční ekvivalent eukaryotického jádra
- geny nepostradatelné pro životní funkce a činnost prokaryotické buňky
- prokaryotická buňka je haploidní (1 alela od každého genu)
- nedělí se mitoticky, pouhou replikací
- hmota tvořená proteiny a DNA
- **prokaryotický chromozom**
 - jediná molekula dsDNA, většinou kružnicová
 - E.coli: $4,6 \times 10^6$ bp, délka 1,36 mm
 - zhruba 4300 kódujících sekvencí, 1800 známých proteinů
 - nadšroubovice rozdělená do 50-100 smyček, struktura dohromady držena proteiny

Struktura prokaryotického genomu

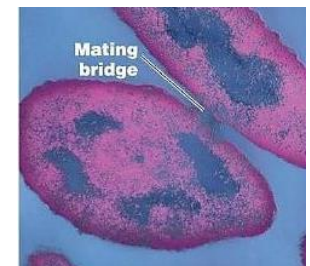
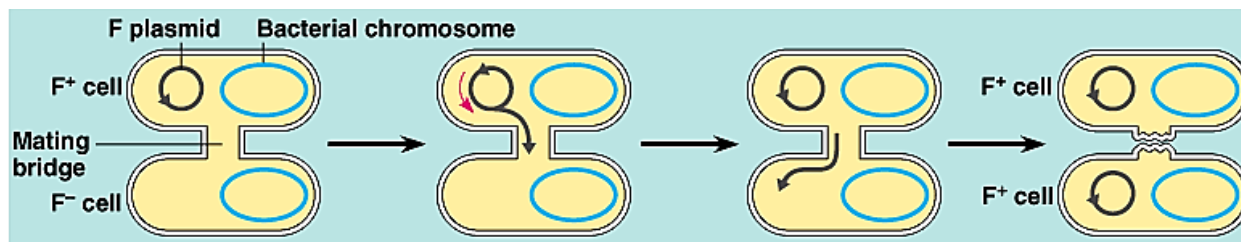
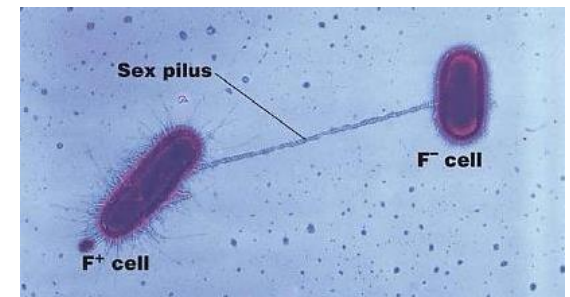
Plazmidy

- u řady bakteriálních druhů, dva až několik set v jedné buňce
- izolovaná kružnicová molekula dsDNA
- počátek replikace (ori), místo pro připojení k membráně buňky (Inc)
- geny nejsou nezbytné pro životní funkce buňky, ale poskytují jí selekční výhodu (rezistence vůči antibiotikům, syntéza vlastních antibiotik, fixace N₂)



Konjugativní plazmidy

- přenos z donorové buňky do recipientní procesem konjugace
- kontakt buněk pomocí pilusů, vytvoření „mostu“, kterým plazmid prochází
- současně s přenosem dochází k replikaci plazmidu
- např. F-plazmid navozuje konjugaci u *E.coli* K12
- F⁺ buňka obsahuje F-plazmid, F⁻ buňka neobsahuje



Struktura eukaryotického genomu

Geny jsou u eukaryot rozděleny do 2-3 organel: jádra, mitochondrií, chloroplastů (rostlinná buňka)

- jaderná DNA: nDNA, většina genů, lineární dsDNA
- mitochondriová / chloroplastová DNA: mt / ct DNA, malá část genů, kružnicová dsDNA
- jen u mála eukaryot zjištěny plasmidy, např. *Saccharomyces cerevisiae*

Chromatin

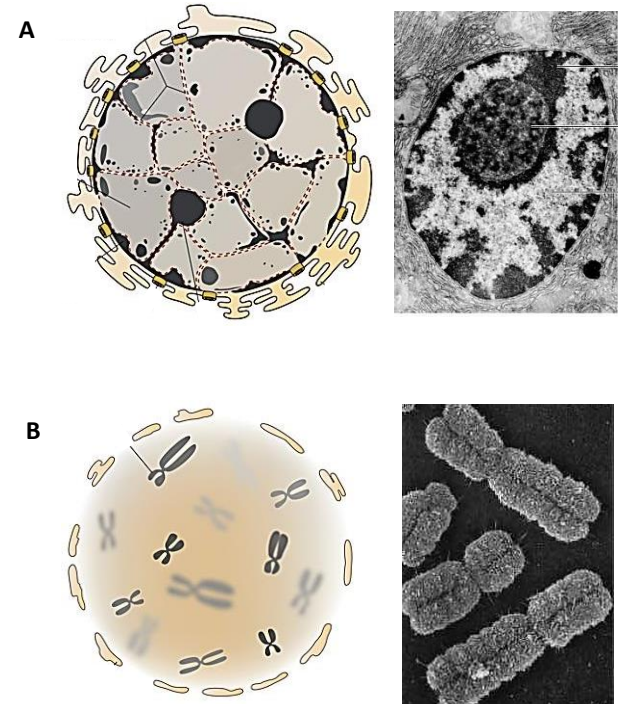
- hmota v eukaryotickém jádře složena z dsDNA, histonů a proteinů nehistonové povahy

(i) euchromatin - dekondezovaný, přístupný transkripci

(ii) heterochromatin

- kondenzovaný, transkripčně inaktivní
- konstitutivní: trvale ve stavu heterochromatinu
- fakultativní: přechází do stavu euchromatinu

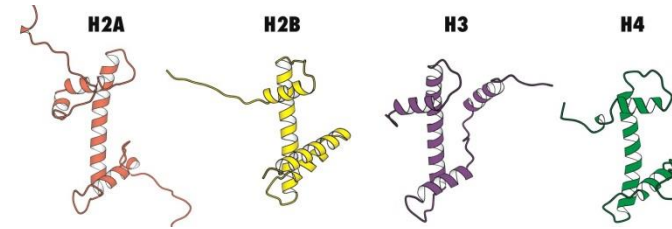
- interfázní chromatin (**A**) - silně dekondezovaný, 10-30 nm chromatinová vlákna
- mitotické chromozomy (**B**) - nejvyšší forma kondenzace chromatinu



Chromatin

Histony

- globulární střed molekuly, vláknité flexibilní konce s vysokým obsahem argininu a lysinu
- jaderné histony H2A, H2B, H3, H4
- linkerový histon H1

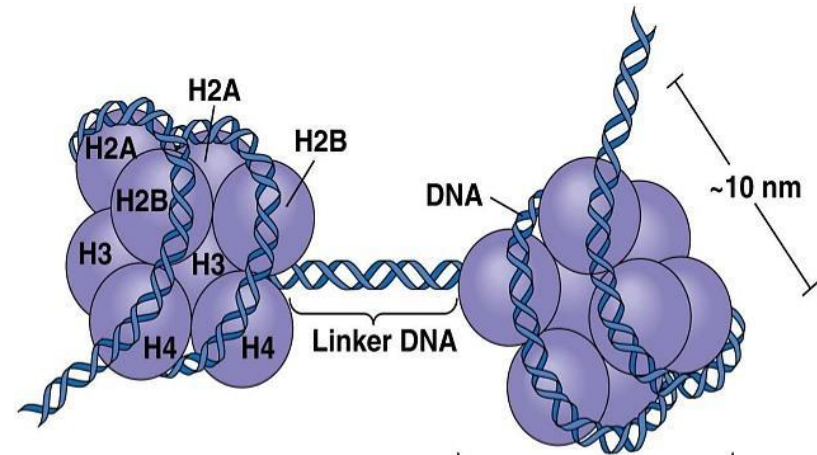


Proteiny nehistonové povahy

- proteiny transkripčního aparátu, hlavně RNA-polymerázy
- HMG-proteiny - vazba na neobvyklé struktury DNA, na jádro nukleozomu v místech syntézy RNA

Nukleozom

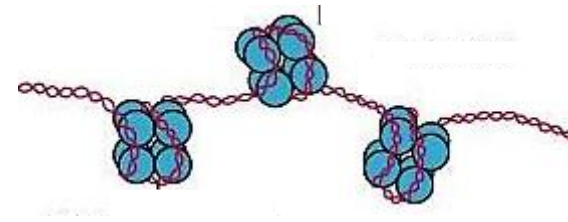
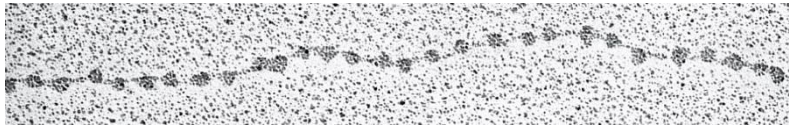
- základní jednotka chromatinu
- oktamer histonů - tetramer $(H3)_2 - (H4)_2$
 - dva dimery H2A - H2B
- úsek DNA o délce 146 bp (1,75 otáčky)
- šířka 10-11 nm, výška 6 nm
- molekula H1 není součástí oktameru, spojuje sousední nukleozomy v řetězci



Chromatin

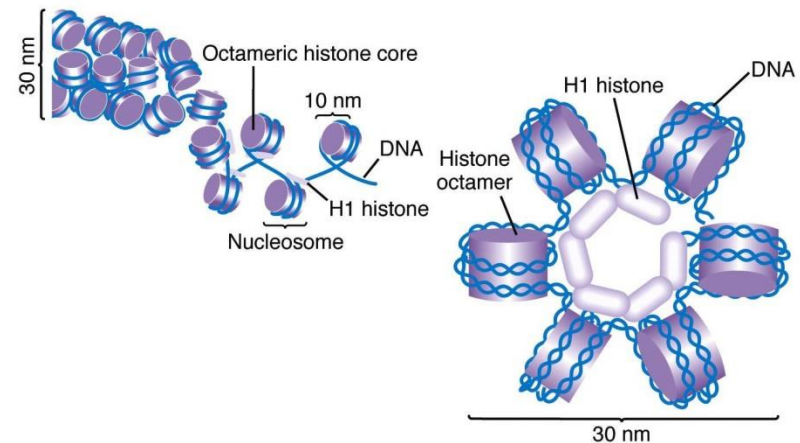
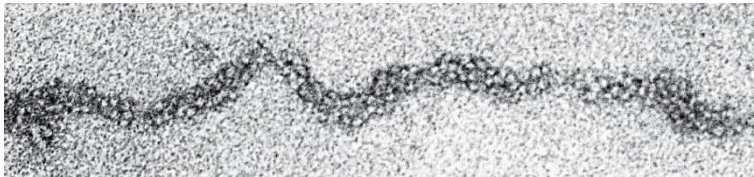
Nukleozomový řetězec (10-nm chromatinové vlákno)

- jádra nukleozomů spojená lineární molekulou dsDNA
- plně dekonzenzovaný euchromatin během interfáze



30-nm chromatinové vlákno

- H1 se globulární částí váže na nukleozom, vláknité konce váže na sousední nukleozomy v místě vstupu a výstupu DNA z nukleozomu
- spiralizace nukleozomového řetězce do solenoidové struktury
- vlákno s průměrnou tloušťkou 30 nm, jeden závit tvořen 6 nukleozomy



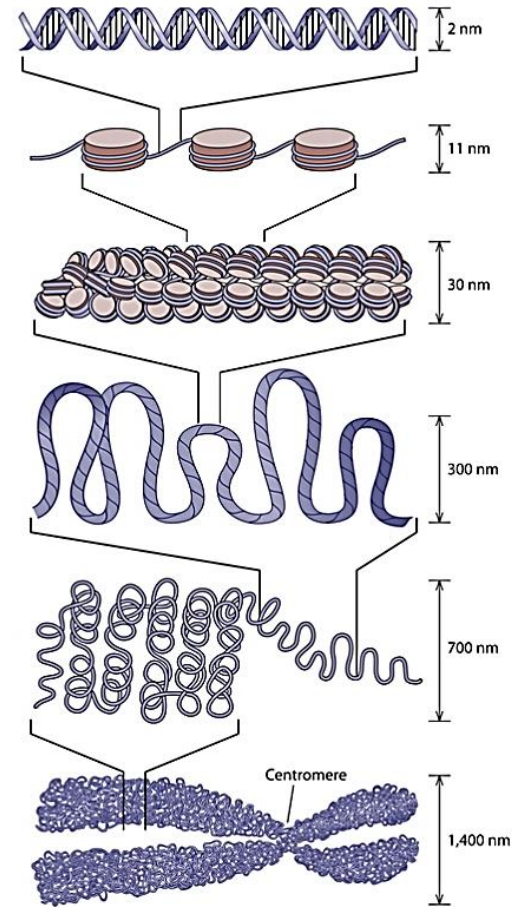
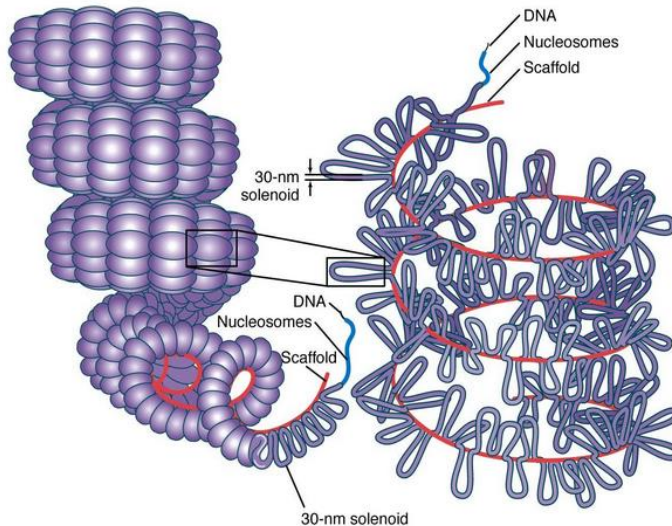
Chromatin

30-nm chromatinové vlákno je dále uspořádáno do smyček, tzv. **chromatinových domén**

- vazba k proteinovému lešení 60-150 kb, nezávislý replikon

600-nm chromatinové vlákno

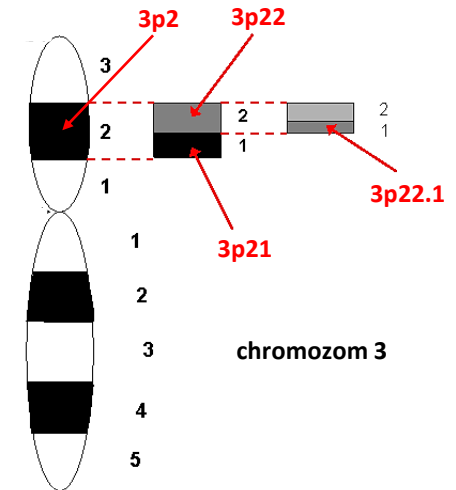
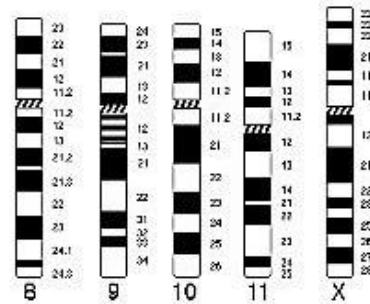
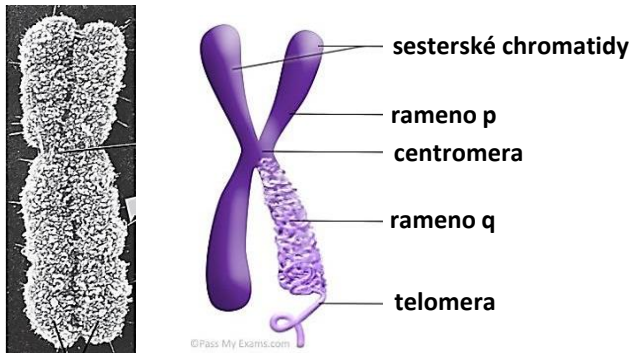
- 30-nm chromatinové vlákno navázané na proteinové lešení spiralizací dále kondenzuje v 600-nm vlákno
- struktur metafázních chromozomů
- viditelné pomocí světelného mikroskopu
- nejvyšší stupeň kondenzace chromatinu, transkripčně inaktivní



Chromozom

Mitotické chromozomy

- v metafázi rozděleny na sesterské chromatidy obsahující molekuly DNA vzniklé v S-fázi b. cyklu
- krátké rameno (p), dlouhé rameno (q), centromera (+kinetochory), telomery



Pruhování chromozomů

- G pruhy: tmavé oblasti GC párů
- Q pruhy, R pruhy : přednostní barvení AT párů
- číslování pruhů v p- a q-raménku směrem od centromery, umístění genu na chromozomu v určitém místě (lokus), např. gen OCA-2 15q11.2-q12

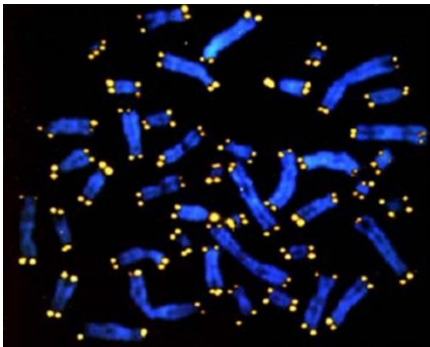
Chromozom

Centromera

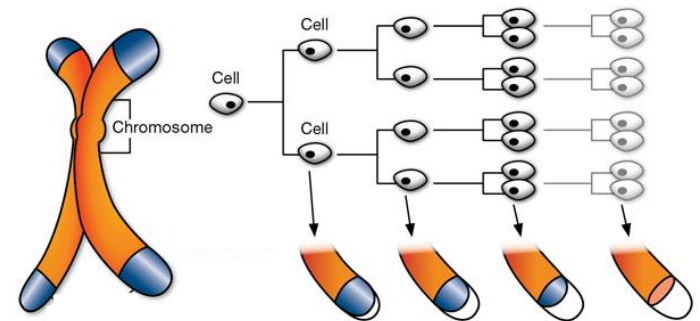
- zajišťuje během buněčného dělení segregaci chromozomů do dceřiných buněk

Telomera

- ochrana konců lineárních molekul dsDNA u eukaryotických chromozomů
- při replikaci DNA řídí dokončení syntézy dceřiných řetězců
- **telomerické sekvence** - tandemové repetice se sekvencí bohatou na G)
 - netvoří se replikací ale syntetizovány telomerázou
- **telomeráza** - u rychle se dělících buněk jednobuněčných organismů
 - u savců není přítomna v somatických buňkách (ztráta repetice)
 - u savců přítomna v pohlavních, embryonálních, nádorových buňkách



TTAGGG	člověk, myš
TGGG	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TTTAGGG	<i>Arabidopsis thaliana</i>
TTTTGGGG	<i>Oxytricha nova</i>



Jaderná DNA

Velikost jaderného genomu

- hodnota C = velikost jaderné složky haploidního genomu daného druhu
- paradox hodnoty C = neexistuje vztah mezi velikostí genomu a biologickou komplexitou organismu
- jednotky Mb - stovky Gb

Druh	Velikost genomu (bp)	Počet chromozomů v haploidním genomu	Počet genů
<i>S. cerevisiae</i>	$1,2 \times 10^7$	16	5.770
<i>C. elegans</i>	$1,0 \times 10^8$	4	21.700
<i>D. melanogaster</i>	$1,2 \times 10^8$	4	17.000
<i>Xenopus laevis</i>	$3,1 \times 10^9$	18	
<i>Mus musculus</i>	$2,8 \times 10^9$	20	23.000
<i>Homo sapiens</i>	$3,3 \times 10^9$	23	21.000
<i>Zea mays</i>	$5,0 \times 10^9$	10	50.000
<i>Allium cepa</i>	$1,5 \times 10^{10}$	8	18.000

Genové repetice

- u mnohobuněčných organismů se 50 - 75 % strukturních genů vyskytuje ve dvou nebo více kopiích

1. tandemové genové repetice

- geny či skupiny genů které se opakují bezprostředně za sebou (odděleny mezeríky)
- např. geny přepisované do 5S rRNA (250x), tRNA (10-100x)
geny kódující histony (20x skupina genů kódující všech pět histonů)

2. rozptýlené genové repetice

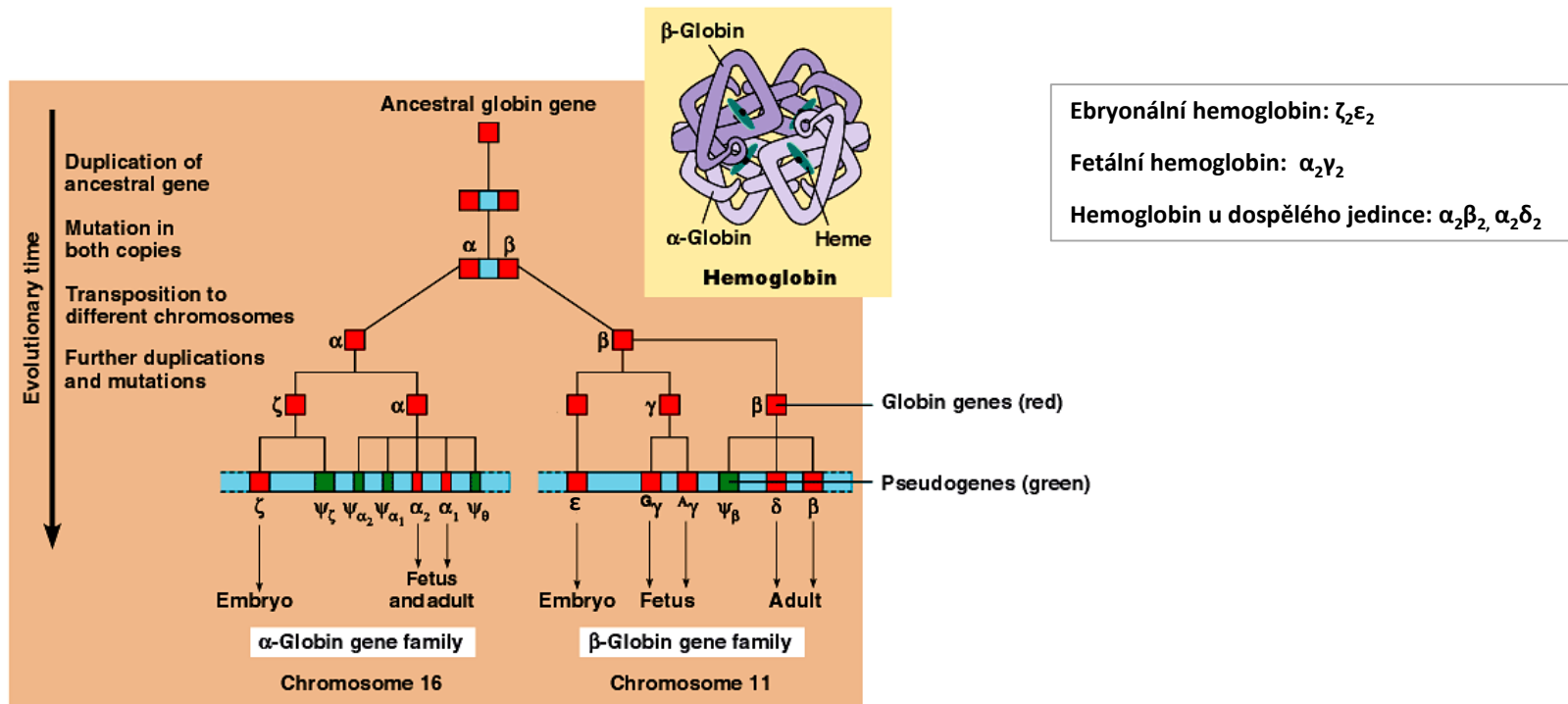
- gen nebo skupina genů s kopiemi na různých místech haploidního genomu
- např. některé geny pro tRNA, snRNA, aj.

Jaderná DNA

Genové repetice

3. genové rodiny

- skupina sekvenčně příbuzných genů
- společný evoluční původ a biologická funkce genů
- často se geny v rámci rodiny nevyjadřují současně ve stejném vývojovém stádiu organismu
- např. geny kódující polypeptidové řetězce hemoglobinu, ve dvou genových rodinách pseudogeny = nepřesné kopie strukturních genů (inaktivní)



Lidský genom

Celková velikost ~3.200.000.000 bp

Počet genů ~ 20.500 (odhad před sekvenací 150.000)

Odlišnosti v rámci druhu Homo sapiens ~ 0,1 %

Homologie s ostatními primáty 96 % (celkem), 99 % v genech

26 % z celkové sekvence genomu přepisováno do RNA

1,5 % sekvencí kóduje proteiny nebo funkční RNA

Lidský karyotyp

- 23 párů chromozomů
- 22 párů autozomů (homologní chromozomy)
- 1 pár gonozomů (pohlavní chromozomy X a Y)
- dělení do 7 skupin podle makrostavby chromozomu

A – 1, 2, 3

B – 4, 5

C – 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, X

D – 13, 14, 15

E – 16, 17, 18

F – 19, 20

G – 21, 22, Y

velké metacentrické

velké submetacentrické

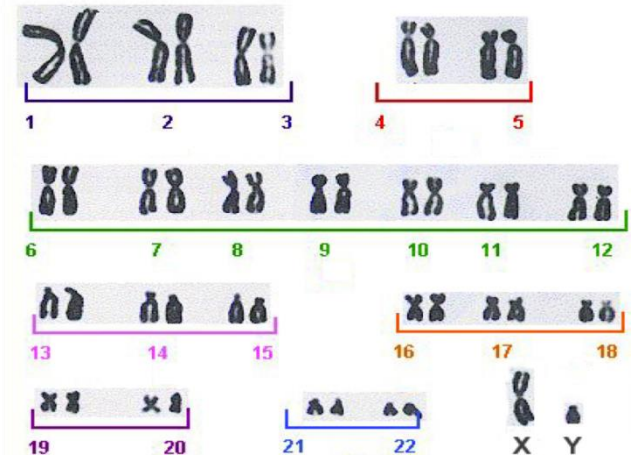
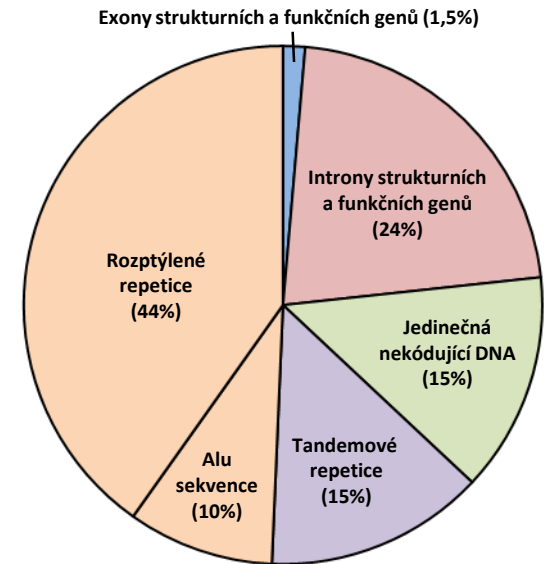
střední submetacentrické

střední akrocentrické

malé submetacentrické

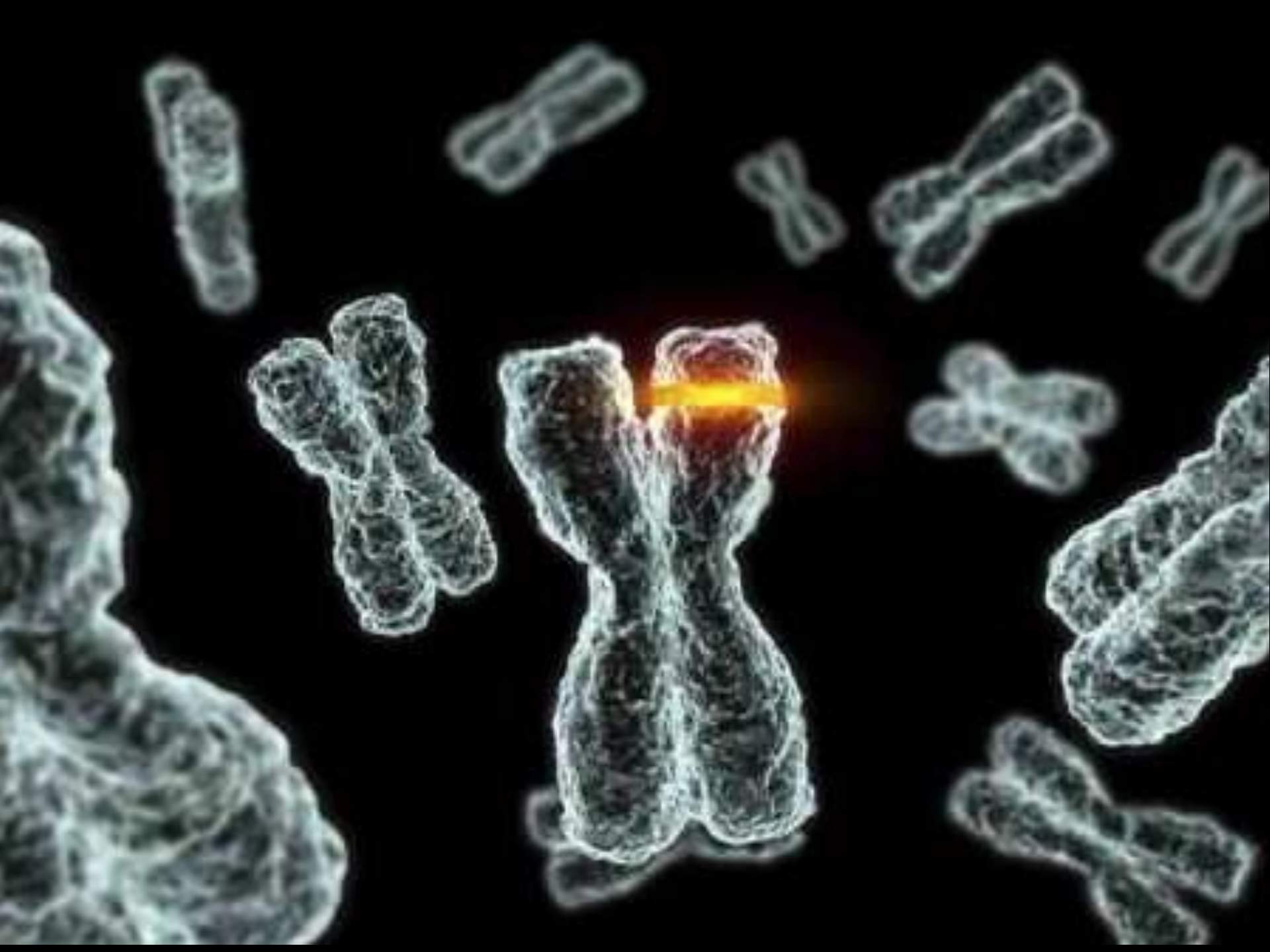
malé metacentrické

malé akrocentrické



Zvídavé otázky

- Seřadte následující položky od nejméně po nejvíce složitou strukturu: chromatin, nukleozom, DNA, chromozom
- Jakými čtyřmi základními vlastnostmi se musí vyznačovat genetický materiál?
- Jaký je přibližný počet genů v lidském genomu?
- Co je to chromatin a jaké jsou jeho hlavní složky?
- Co je to nukleozom a jaké jsou jeho hlavní složky?
- Co je to heterochromatin?
- Popište postupné úrovně zhušťování, které musí podstoupit molekula jaderné DNA, aby vytvořila kondenzovanou strukturu mitotického chromozomu.
- Kolik se nachází chromozomů ve většině buněk lidského těla?
- Co se myslí tím, když je alela popsána jako dominantní?
- Jaký termín se používá pro označení genu, pokud jsou obě jeho alely identické?



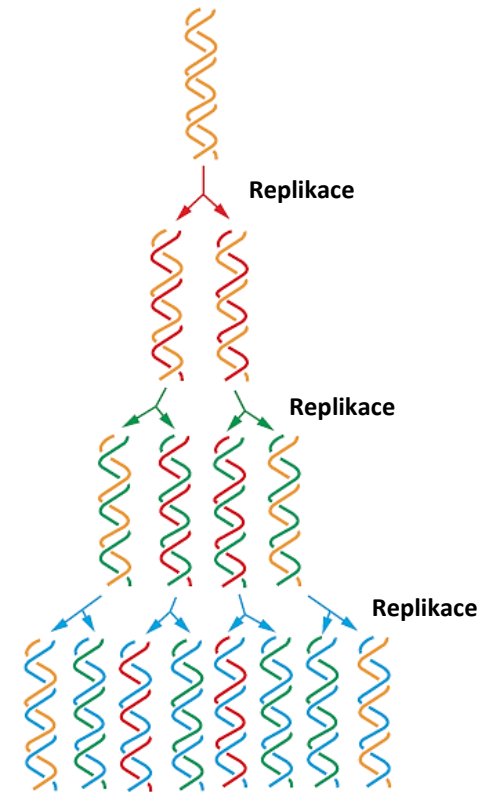
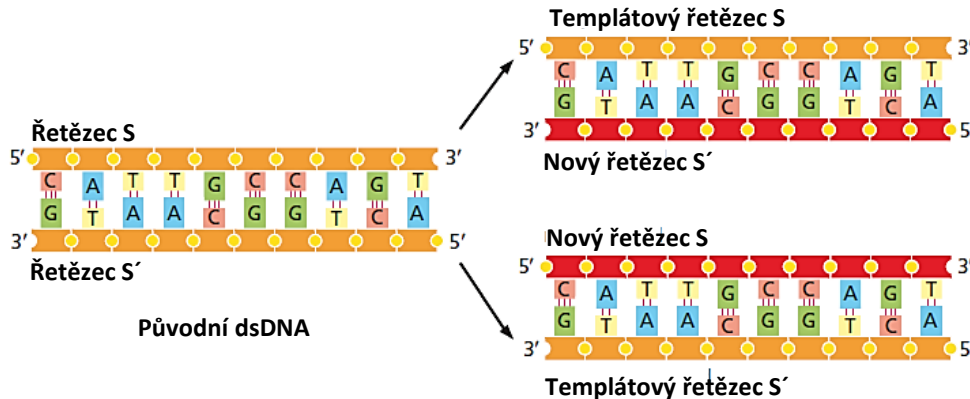
Molekulární biologie pro informatiky - 3

Replikace genomu, reparace a rekombinace DNA

Replikace DNA

Schopnost buňky přežít a množit se závisí na přesném zdvojení genetického materiálu. Při každém dělení musí buňka zkopírovat svůj genom s mimořádnou přesností a dostatečnou rychlostí.

Replikace DNA je umožněna párováním bází. Komplementarita řetězců v dsDNA umožňuje, aby po separaci řetězců sloužil každý z nich jako templát pro syntézu nového vlákna.

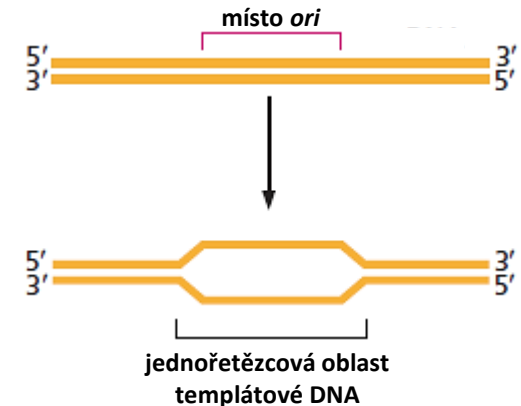


Replikace DNA

- 1. iniciace** - zahájení replikace (*ori*), vazba replikačních proteinů, tvorba replikační vidlice
- 2. elongace** - syntéza řetězce DNA
- 3. terminace** - zakončení replikace daného replikonu

Počátek replikace (místo *ori*)

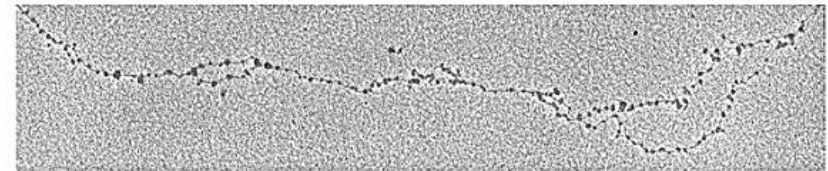
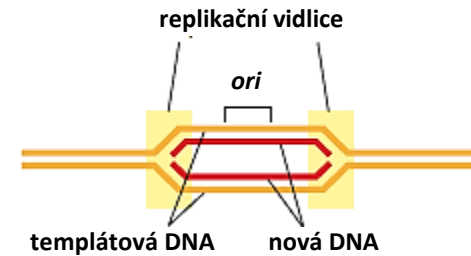
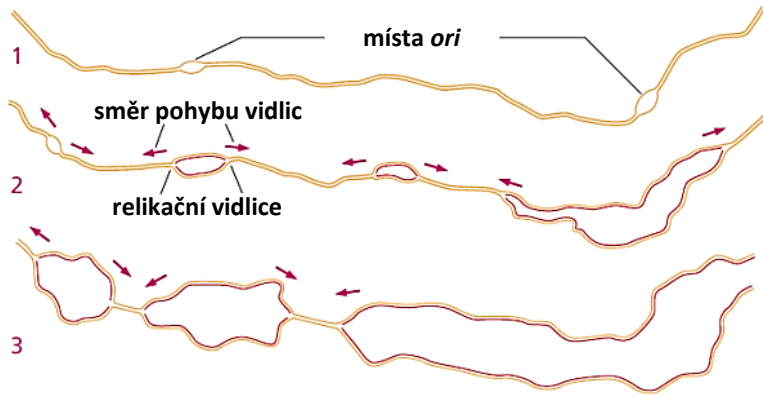
- specifická sekvence DNA bohatá na AT páry
- vazba iniciačních proteinů otvírá strukturu dsDNA
- vazba dalších proteinů zodpovědných za replikaci
- přítomen na každém replikonu
- u bakterií - 1x na chromozomu
- u člověka - 10.000x na jaderné DNA
- 220x na chromozom



Replikace DNA

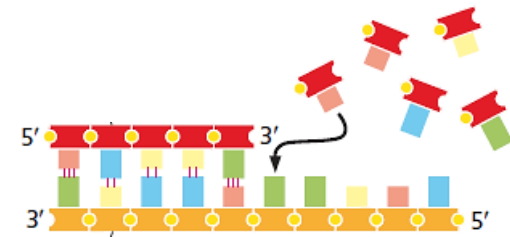
Replikační vidlice

- struktura DNA ve tvaru „Y“ během replikace
- dvousměrná replikace - dvě vidlice pohybující se v opačných směrech od místa *ori*
- rychlost pohybu - bakterie ~ 1000 nukleotidů / s
- člověk ~ 100 nukleotidů / s



DNA polymeráza

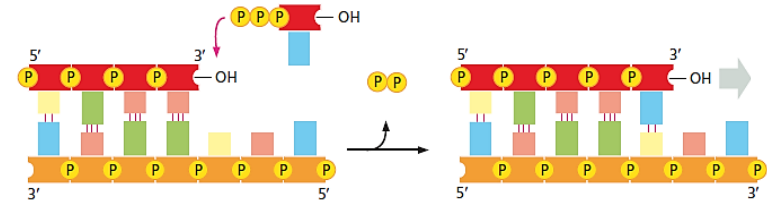
- tvorba nové DNA dle jednoho z původních řetězců
- připojení nukleotidů k 3' konci rostoucího řetězce DNA
- tvorba fosfodiesterové vazby mezi dNTP a DNA



Replikace bakteriální chromozomové DNA

DNA-polymerázy

- DNA-dependentní-DNA-polymerázy, 5' → 3'
- vyžadují přítomnost primeru (DNA či RNA)



1. DNA-polymeráza I (Kornbergův enzym)

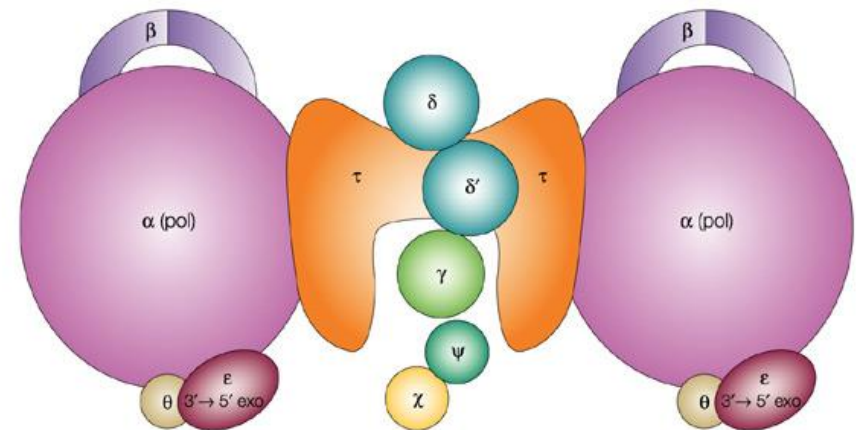
- DNA-primer; odstranění RNA-primerů, syntéza DNA mezi Okazakiho fragmenty, opravy DNA

2. DNA-polymeráza II

- záložní polymeráza, opravy DNA

3. DNA-polymeráza III

- 2x katalytické jádro (α , θ , ϵ) - 8 nt/s
- spojena v dimer (τ) - 20 nt/s
- β -svorka - stabilizace úseků dsDNA
- γ -komplex ($\gamma_2\delta\delta'\psi\chi$) - nakládání β -svorky na DNA v místech RNA-primerů
- 500 nukleotidů/s
- procesivita pro celou molekulu DNA
- 3'-5' exonukleázová aktivita
- RNA-primer; replikace DNA, opravy DNA



Replikace bakteriální chromozomové DNA

DNA-helikáza

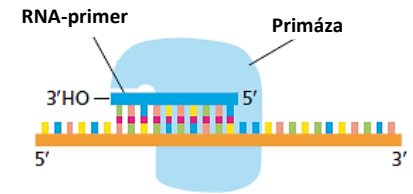
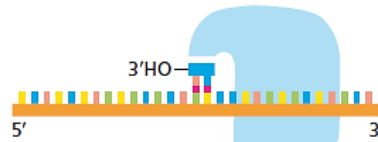
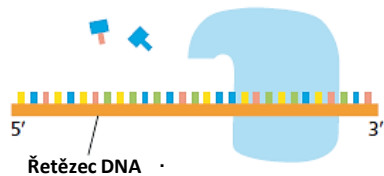
- odvíjení komplementárních řetězců v dsDNA
- DnaB-protein a ν -protein

DNA-gyráza

- topoizomeráza II
- mění kladné nadšroubovicové závitky na záporné

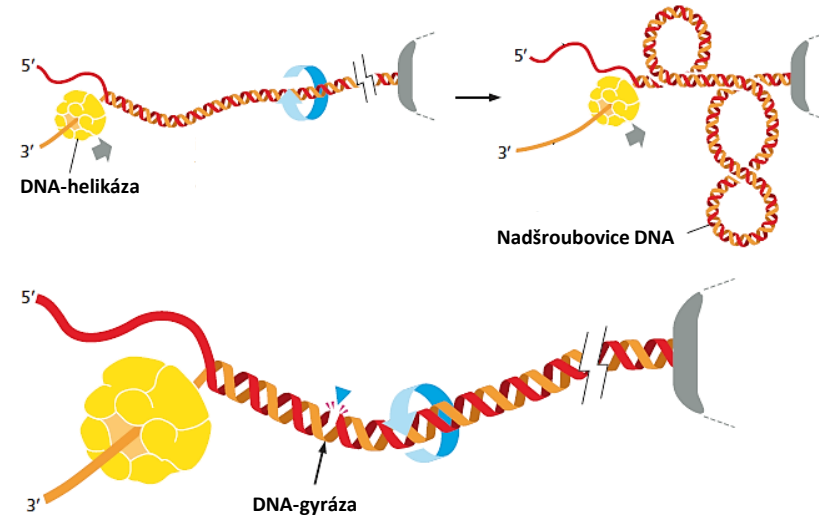
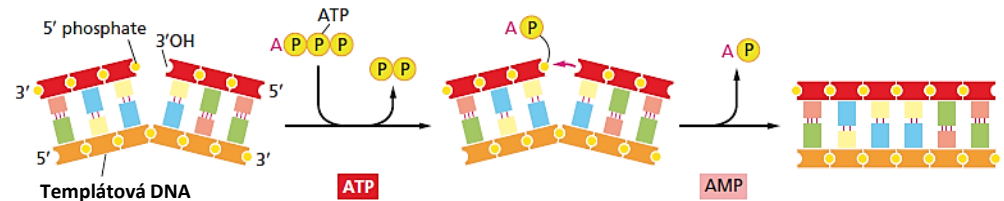
DNA-primáza

- DNA-dependentní-RNA-polymeráza, syntéza RNA-primerů



DNA-ligáza

- ligace polynukleotidových řetězců
- spojení Okazakiho fragmentů



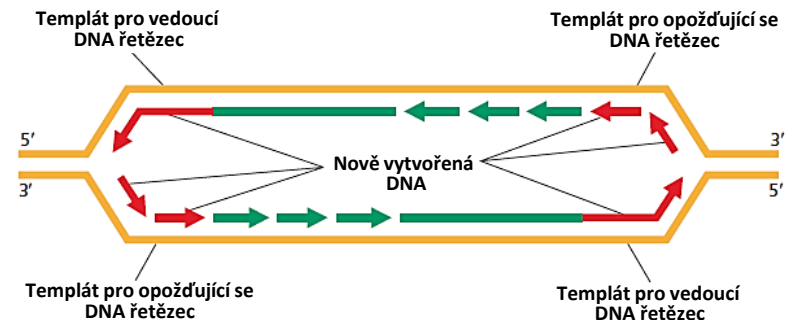
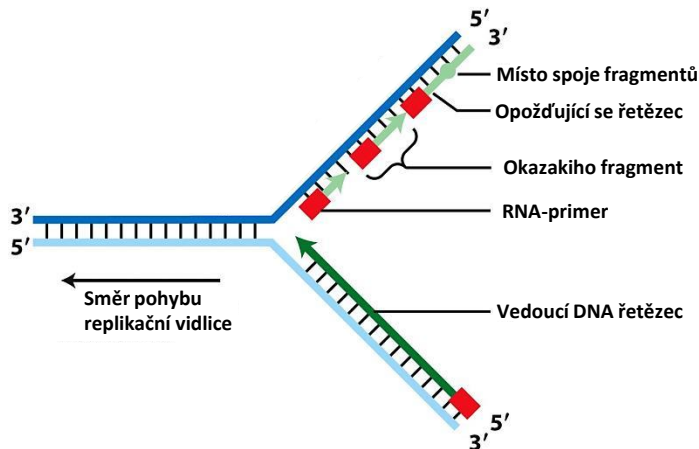
Semikontinuální syntéza dsDNA při replikaci

Vedoucí DNA řetězec

- kontinuální syntéza na řetězci 3' → 5'
- jeden RNA-primer v místě *ori*

Opožďující se DNA řetězec

- diskontinuální syntéza přes Okazakiho fragmenty na řetězci 3' → 5'
- RNA-primer pro každý Okazakiho fragment, odbourány od 5'-konce
- prodloužení Okazakiho fragmentů na 3'-konci, spojení do souvislého řetězce DNA



Iniciace replikace

Počátek replikace *oriC*

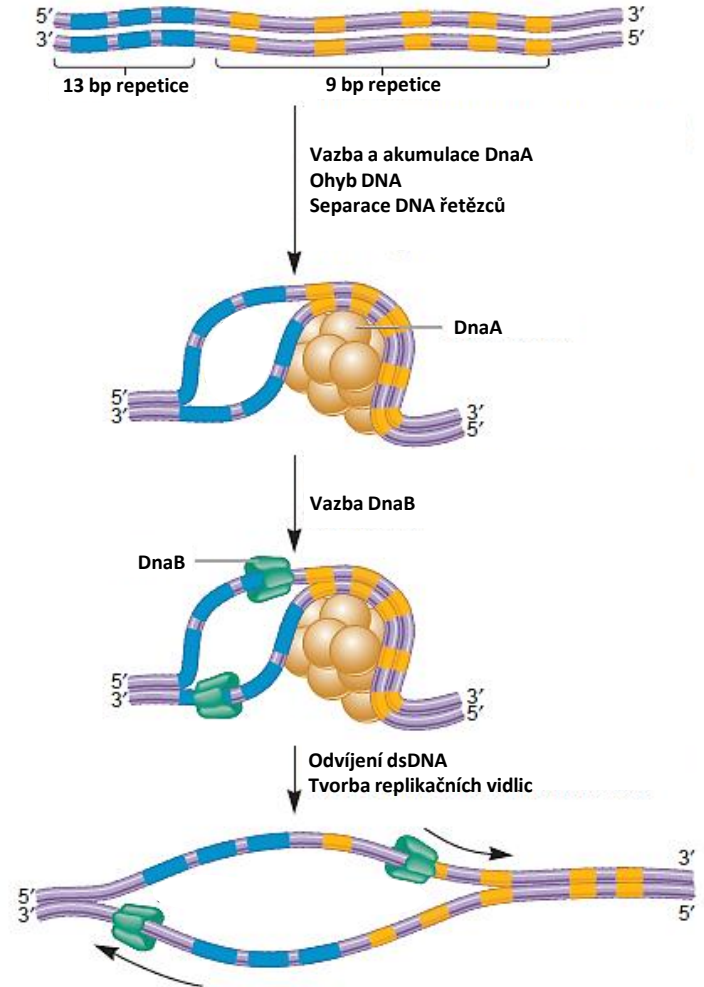
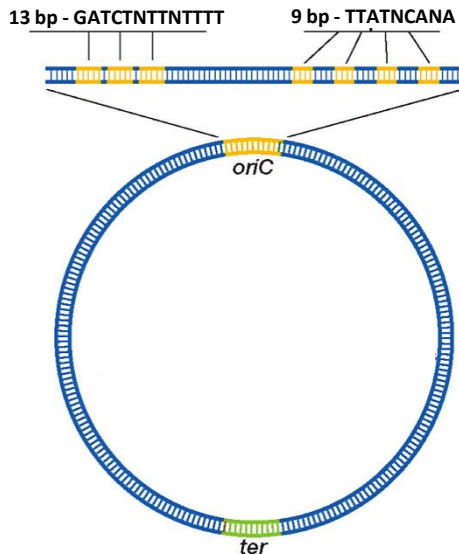
- 13 bp tandemová repetice bohatá na AT páry
- 9 bp repetice: vazba DnaA

DnaA - rozeznání *oriC*, převod do otevřené formy

DnaB - vazba na otevřený úsek DNA

- odvíjení dsDNA, vznik replikačních vidlic

SSB-proteiny - vazba na jednořetězcové úseky

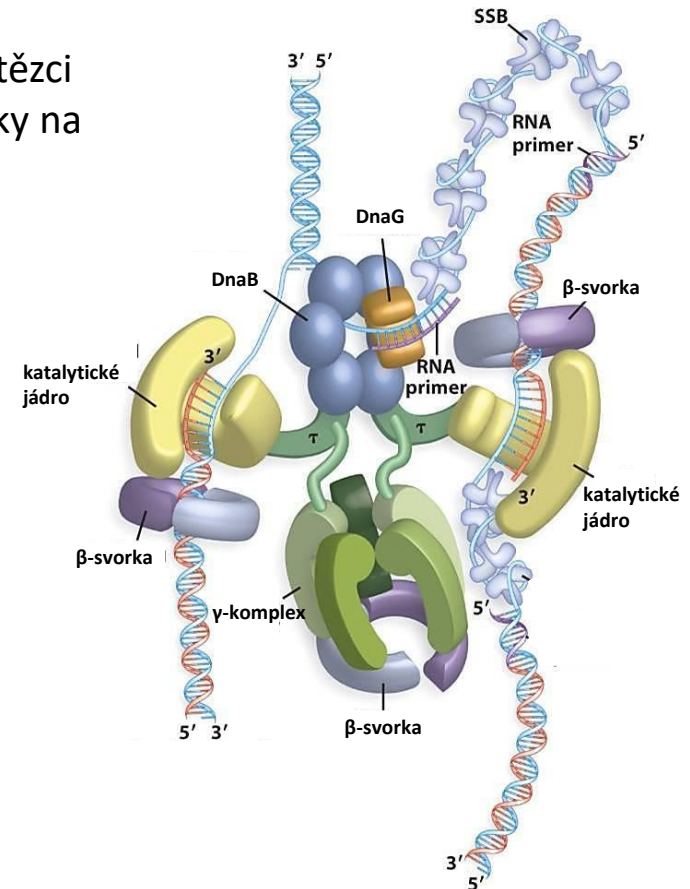
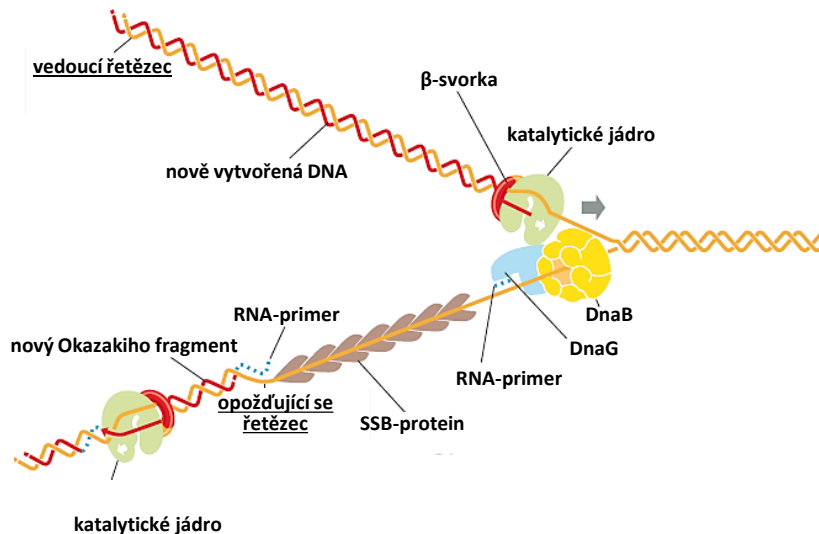


Elongace replikace

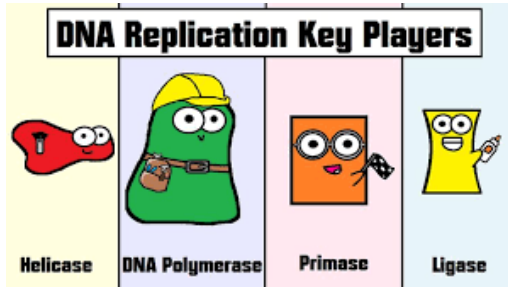
- vedoucí řetězec - RNA-primer na počátku replikace
- opožďující se řetězce - RNA-primer na začátku každého Okazakiho fragmentu
- primozom = komplex DnaB a DnaG (DNA-primáza)

Koordinace syntézy obou DNA řetězců ve směru replikační vidlice

- ohyb DNA, struktura DNA-polymerázy III
- katalytická jádra umístěna každé na jednom matricovém řetězci
- γ -komplex umístěn asymetricky, opakovaně nakládá β -svorky na opožďující se řetězec
- pohyb katalytického jádra mezi jednotlivými β -svorkami



Elongace replikace



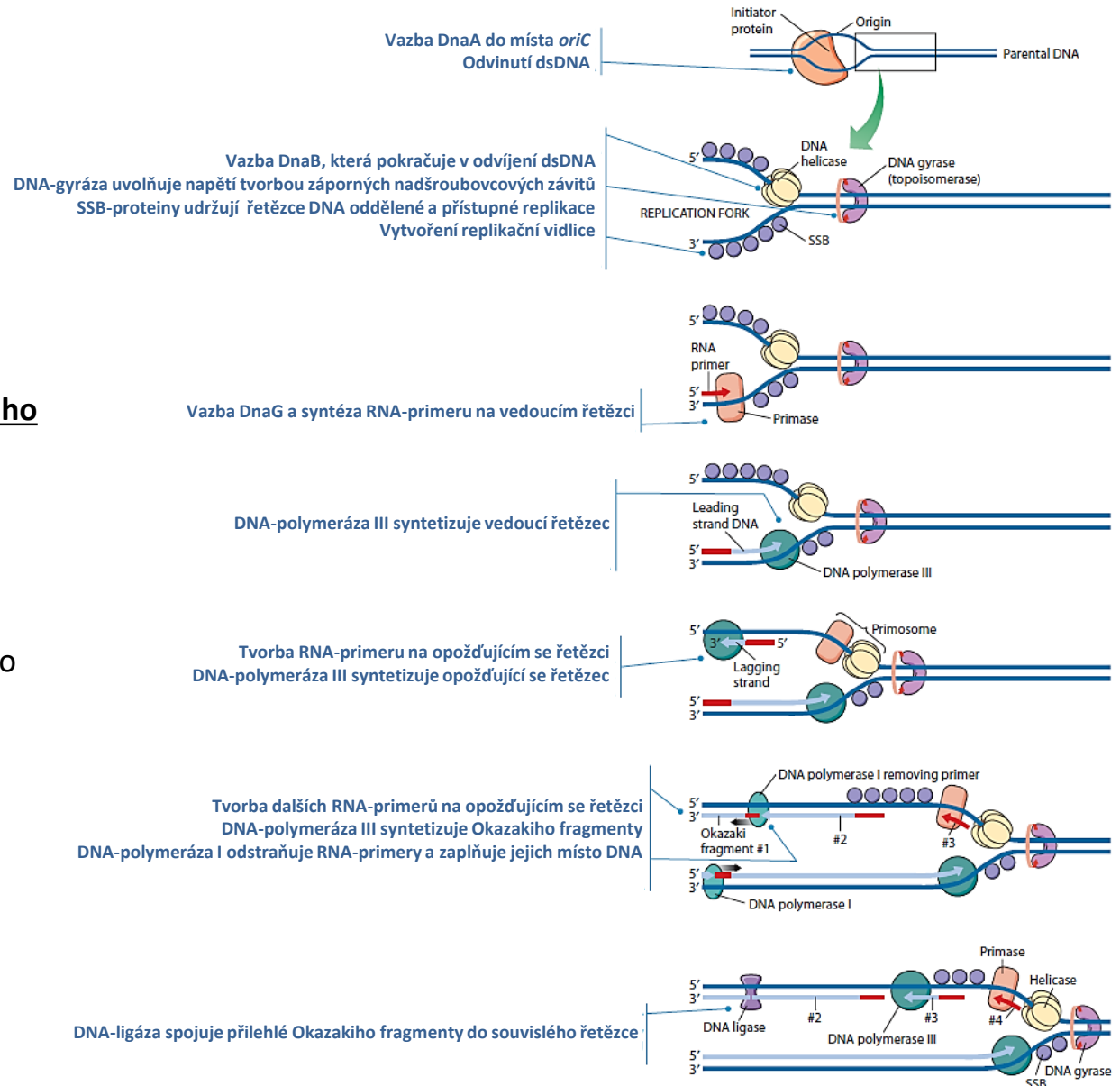
Tvorba souvislého řetězce z Okazakiho fragmentů

DNA-polymeráza I

- postupuje za DNA-polymerázou III
- odbourává z 5'-konce RNA-primery
- na 3'-konec následujícího Okazakiho fragmentu napojuje dNTP

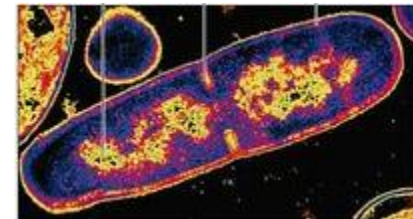
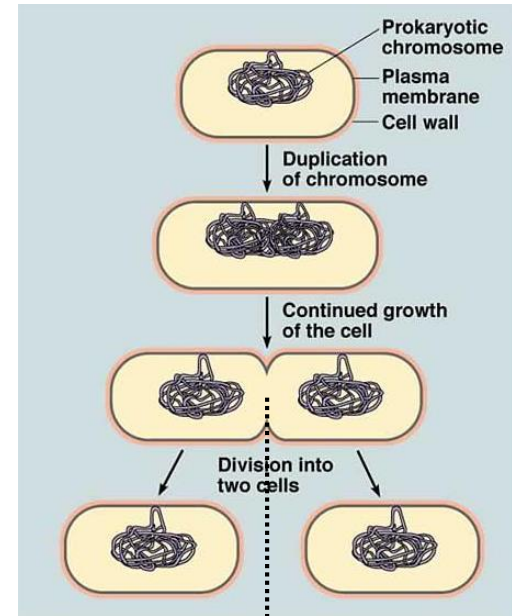
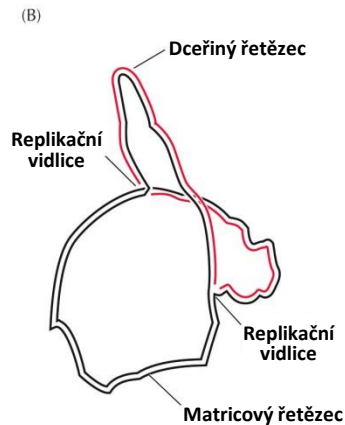
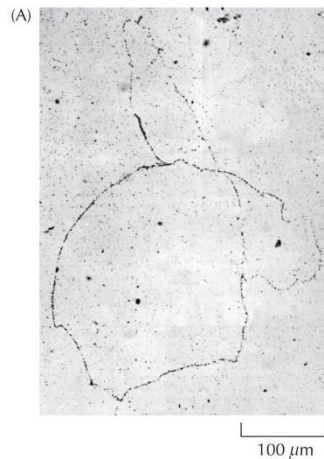
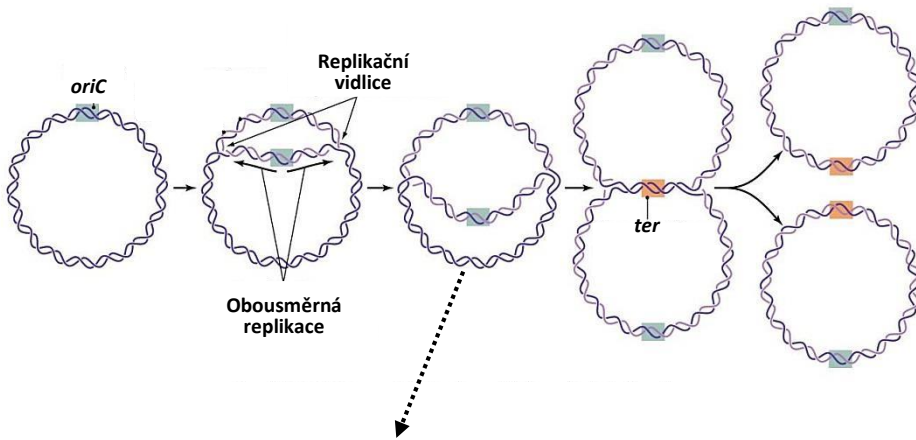
DNA-ligáza

- spojuje doplněné fragmenty



Terminace replikace

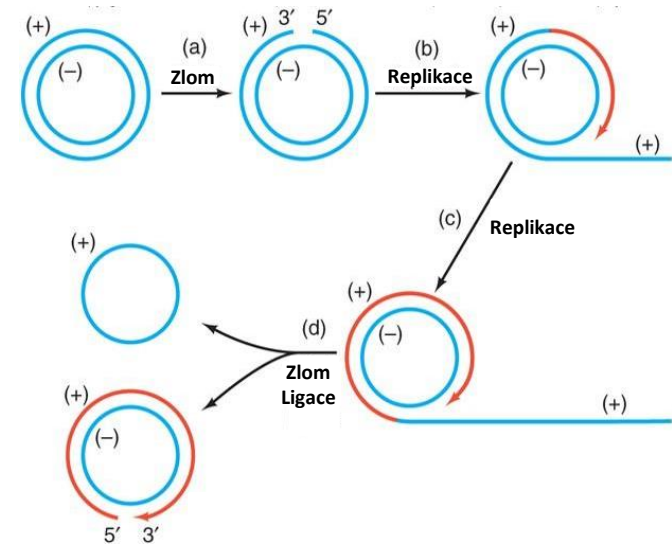
- terminátor replikace, *ter*
- vazba specifických proteinů, které inhibují DnaB a zastavují tvorbu replikační vidlice
- topoizomeráza typu II odděluje vzniklé chromozomy



Replikace plazmidové DNA

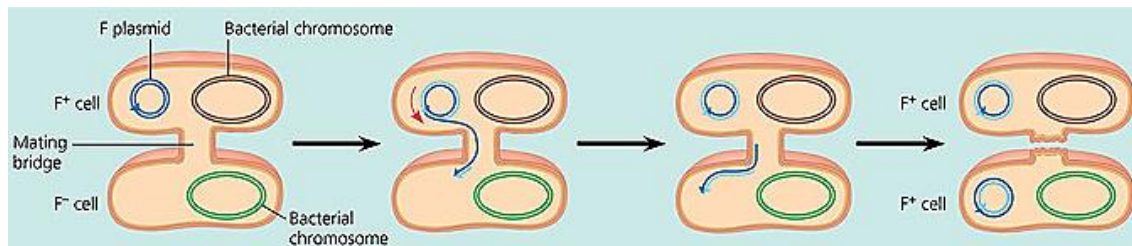
Replikace plazmidů otáčivou kružnicí

- v místě *ori* štěpí Rep-protein (+) řetězec
- vzniklý 3'-konec prodlužován, vytlačení (+) řetězce
- zlom (+) řetězec mezi původní a novou DNA, ligace
- vzniká (i) kružnicová dsDNA
(ii) kružnicová ssDNA (doplnění přes Ok. fr.)



Replikace konjugativních plazmidů během konjugace

- replikaci otáčivou kružnicí, vytlačovaný (+) řetězec přestupuje do recipientní buňky
- (-) řetězec zůstává v donorové buňce, kontinuální syntéza
- (+) řetězec se v recipientní buňce dosyntetizuje přes Okazakiho fragmenty



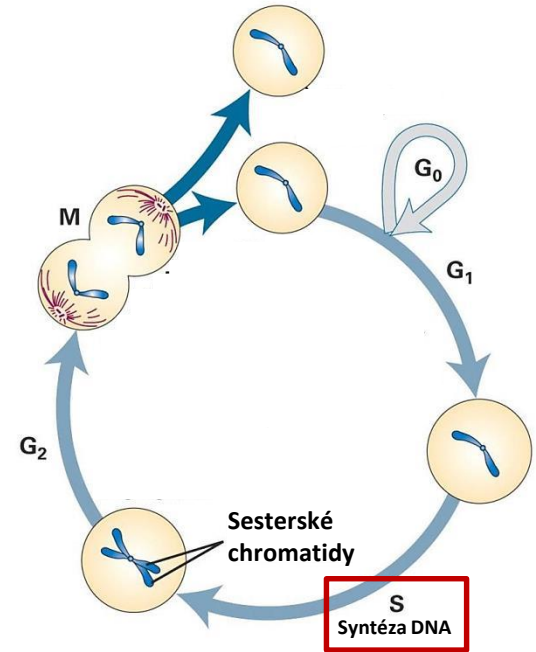
Replikace chromozomové DNA u eukaryot

Podobné rysy jako u replikace bakteriálního chromozomu:

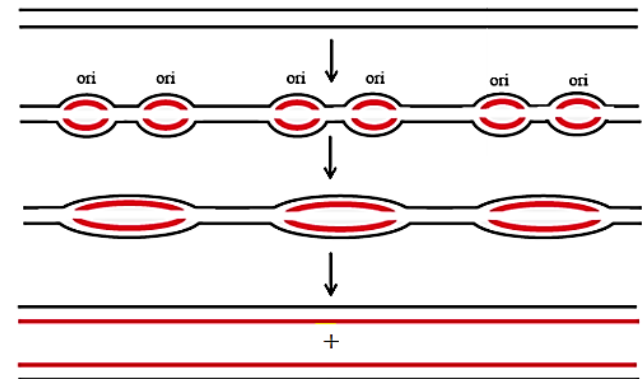
- semikonzervativní a semikontinuální
- replikační vidlice, replikační proteiny
- iniciace, elongace a terminace

Odlišnosti od replikace prokaryot:

- replikace omezena do S-fáze buněčného cyklu
- přítomnost nukleozomů
- mnohonásobná místa počátku replikace
- problém s doreplikováním konců lineární molekuly DNA



Druh	Velikost genomu (bp)	Rychlost syntézy DNA (kbp/min)	Počet počátků replikace
<i>E. coli</i>	4,6 x 10 ⁶	30	1
<i>S. cerevisiae</i>	1,4 x 10 ⁷	3	330
<i>D. melanogaster</i>	1,8 x 10 ⁸	2,6	3.500
<i>Mus musculus</i>	2,5 x 10 ⁹	2,2	25.000
<i>Homo sapiens</i>	3,2 x 10 ⁹	3	>10.000 ?



Replikace chromozomové DNA u eukaryot

DNA-polymerázy

u eukaryot nalezeno nejméně 13 druhů

α, δ, ϵ	replikace jaderné DNA
β	opravy DNA
γ	replikace mitochondriální DNA
$\tau, \kappa, \eta, \dots$	funkce neznámá

DNA-polymeráza α

- tetramer (RNA-primáza), tvorba RNA-primerů a části Okazakiho fragmentů
- mírná procesivita, 5'-3' exonukleázová aktivita

DNA-polymeráza β

- monomer, syntéza krátkých řetězců při reparaci DNA
- nízká procesivita, 5'-3' exonukleázová aktivita

DNA-polymeráza γ

- dimer, syntéza mitochondriální DNA
- vysoká procesivita, 5'-3' a 3'-5' exonukleázová aktivita

DNA-polymeráza δ

- interakce s proteiny RCF a PCNA, dokončení syntézy Okazakiho fragmentů
- vysoká procesivita v asociaci s PCNA-proteinem, 5'-3' a 3'-5' exonukleázová aktivita

DNA-polymeráza ϵ

- úzce souvisí s δ , hlavní polymeráza pro syntézu vedoucího řetězce

Iniciace replikace

Replikační počátky po 1 - 300 kbp

- na savčích chromozomech bez specifických sekvencí, bohaté na AT páry, 500 - 50.000 bp

Pre-iniciační komplex

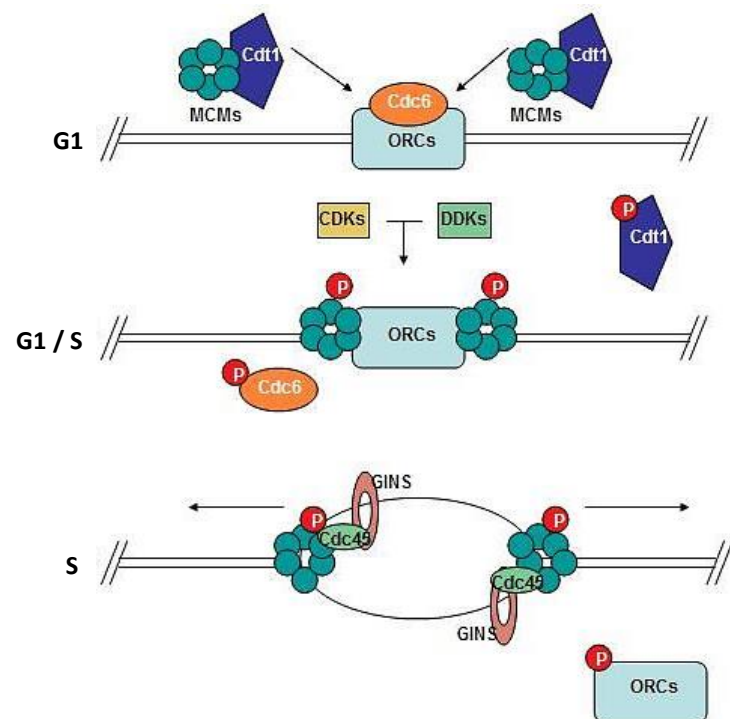
- sestaven v G1 fázi buněčného cyklu
- replikační počátek rozeznán proteinem ORC
- vazba CDC6, CDT1, MCM2-7

Při vstupu do S-fáze jsou složky pre-iniciačního komplexu fosforylovány, uvolnění už nepotřebných složek, aktivace MCM2-7

Iniciační komplex

- Mcm2-7 spolu s dalšími proteiny (CDC45, GINS) plní funkci DNA-helikázy
- vazba DNA-polymeráz do replikační vidlice

Výsledkem iniciace je založení replikační vidlice s navázanými proteiny, které se budou účastnit elongační fáze replikace.



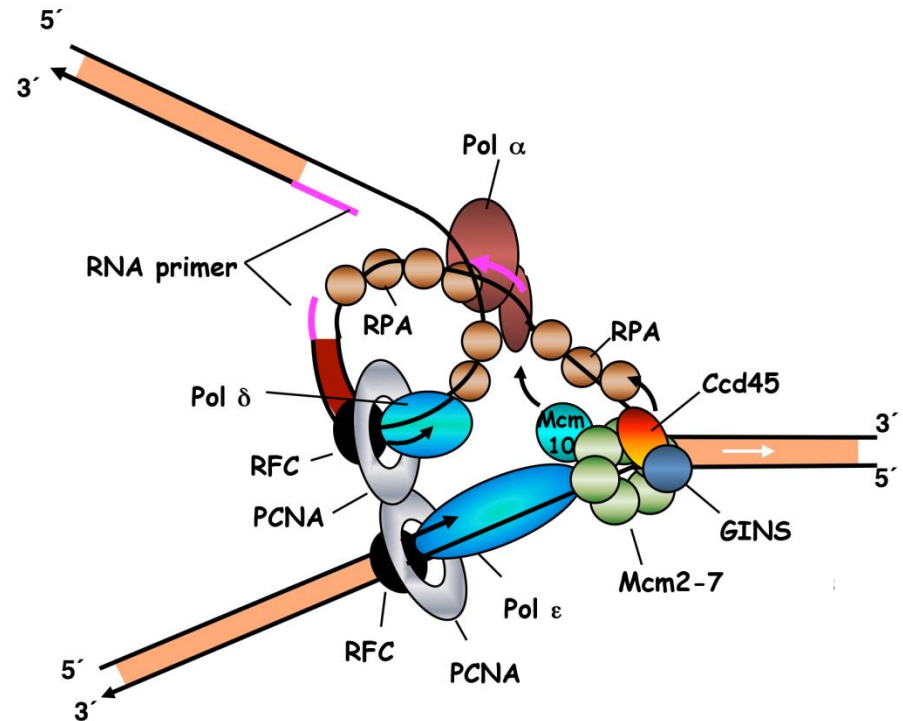
Elongace replikace

Vedoucí řetězec

- jediný primer vytvořený DNA-polymerázou α
- RFC-protein nakládá PCNA na konec RNA-primeru
- PCNA-protein vytěsňuje DNA-polymerázu α a zvyšuje procesivitu DNA-polymerázy ϵ , která se na něj váže a syntetizuje DNA

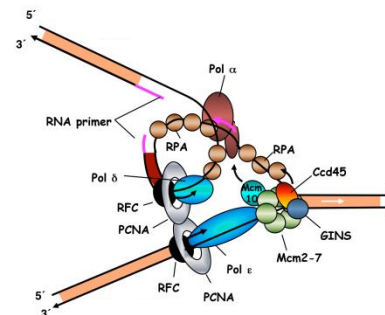
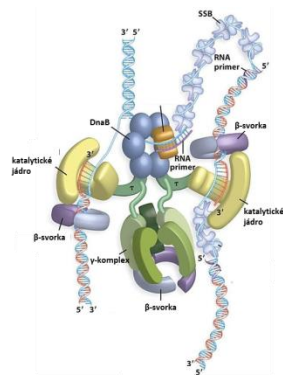
Opožďující se řetězec

- RPA pokrývá jednořetězcové úseky DNA
- DNA-polymeráza α tvoří RNA-primer (10 nt) a část Okazakiho fragmentu (10-20 nt)
- PCNA vytlačuje DNA-polymerázu α
- RNázaH odstraňuje RNA-primery z 5'-konce
- DNA-polymerázou δ dokončuje Okazakiho f.
- DNA-ligáza spojuje Okazakiho f.



Složky bakteriálního a eukaryotického replizomu

Funkce	Bakterie	Eukaryota
Rozpoznání <i>ori</i>	DnaA	ORC
Vazba helikázy k DNA	DnaC	CDT1, CDC6
Helikáza	DnaB	MCM komplex
Relaxace DNA	DNA-gyráza	Topoizomeráza II
Ochrana ss řetězců	SSB	RPA
Primáza	DnaG	Pol α
Syntéza vedoucího řetězce	Pol3	Pol ϵ
Syntéza opožďujícího se řetězce	Pol3	Pol α , Pol δ
Posuvná svorka	β -svorka	PCNA
Nakládání svorky	γ -komplex	RCF
Odstranění RNA-primeru	Pol1	RnázaH
Dokončení Okazakiho fragmentů	Pol1	Pol δ
Spojení Okazakiho fragmentů	DNA-ligáza	DNA-ligáza



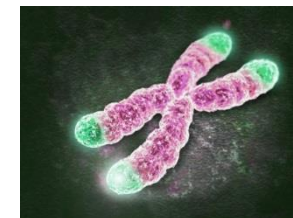
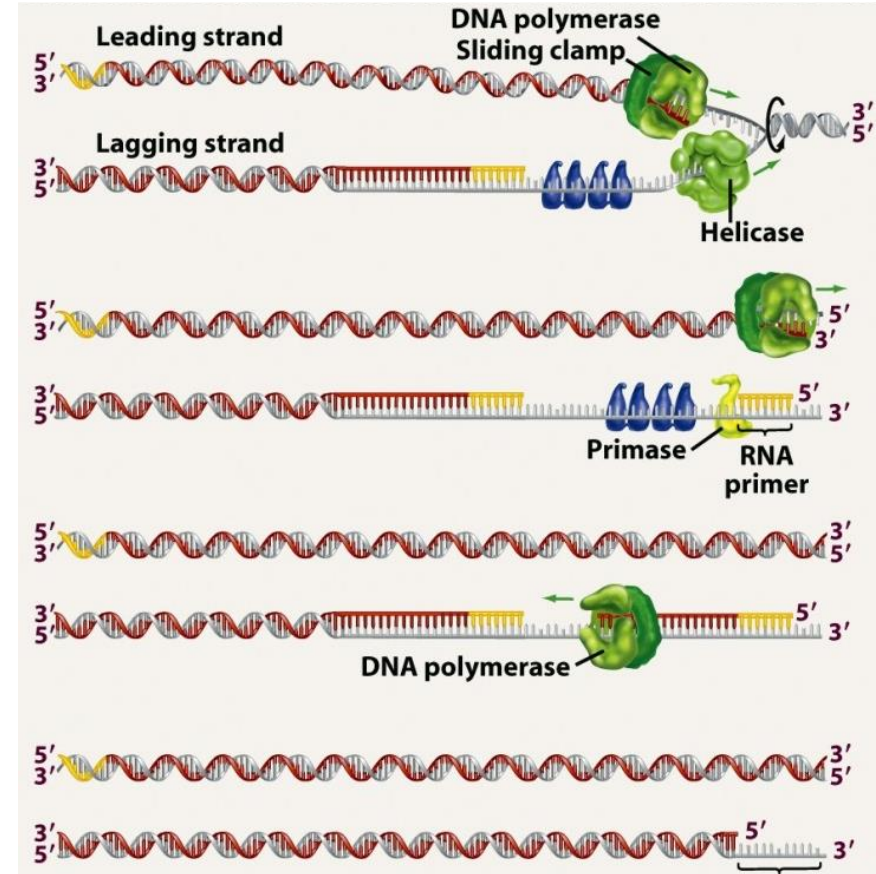
Terminace replikace

Problém zakončení replikace lineárních dsDNA

- po odstranění RNA-primeru na 3'-konci matricového řetězce pro opožďující se řetězec vzniká prázdné místo, které DNA-polymeráza nedokáže zaplnit
- bez strategie, jak tento úsek doreplikovat by docházelo ke zkracování chromozomů a ztrátě genetické informace

Telomery

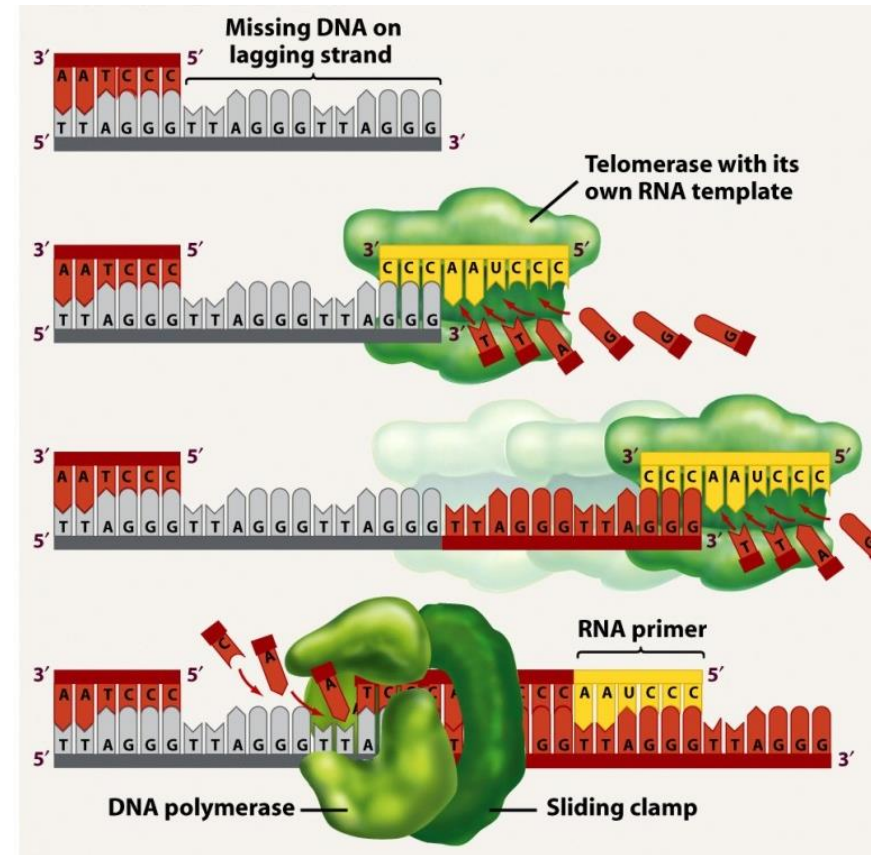
- druhově specifické repetitivní sekvence
- udržovány telomerázou, bez ní dochází ke zkracování telomer (~50-150 bp / dělení)
- senescence či smrt buněk po zkrácení telomer pod kritickou hranici
- ochrana chromozomů před degradací
- rozeznány jako skutečné konce chromozomů, odlišený od dvouřetězcových zlomů uprostřed chromozomů



Terminace replikace

Telomeráza

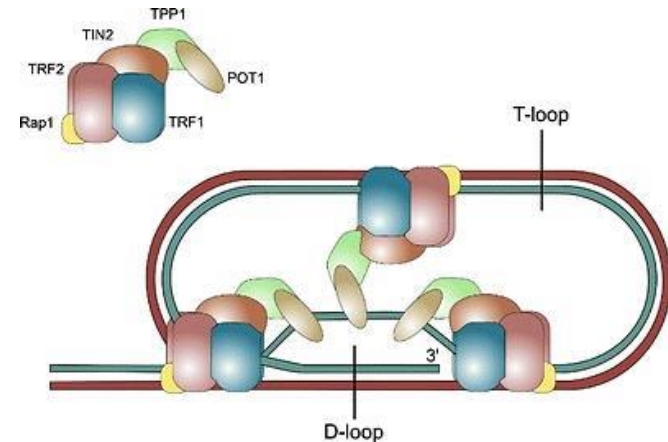
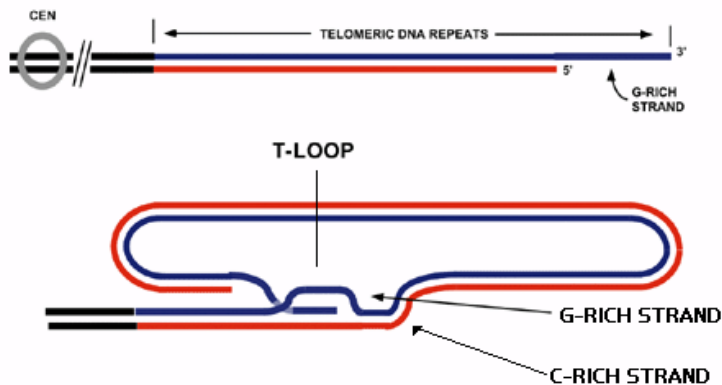
- ribonukleoproteinový komplex složený z
 - (i) RNA (templát)
 - (ii) RNA-dependentní-DNA-polymeráza
- vazba k přečnívajícímu 3'-konci DNA přes RNA
- tento konec je využit jako primer a podle RNA matrice prodloužen o telomerické sekvence
- syntéza tandemových repetitivních zajištěna translokací telomerázy podél vznikajícího řetězce
- na prodlouženém 3'-konci vytvoří replikační enzymy další Okazakiho fragment
- původní délka chromozomu je zachována
- přítomna v zárodečných/kmenových buňkách, nepřítomna v somatických buňkách
- reaktivace v nádorových buňkách



Terminace replikace

Ochrana přechýlajících 3'-konců chromozomů

- telomerické sekvence se ohýbají a vytvářejí strukturu telomerické smyčky (T-smyčka)
- ssDNA na konci řetězce se zanořuje do dsDNA úseku a tvoří trojvláknovou strukturu (D-smyčka)
- celou strukturu stabilizuje komplex proteinů = shelterin
 - ochrana před endonukleázami, potlačení oprav DNA, regulace telomerázy

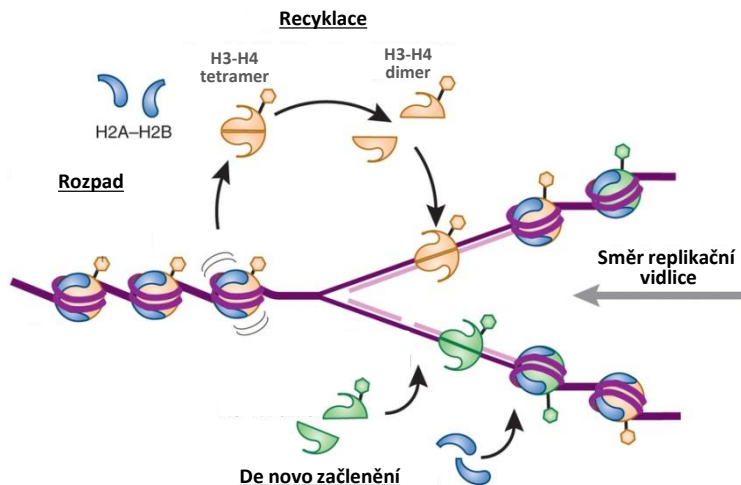
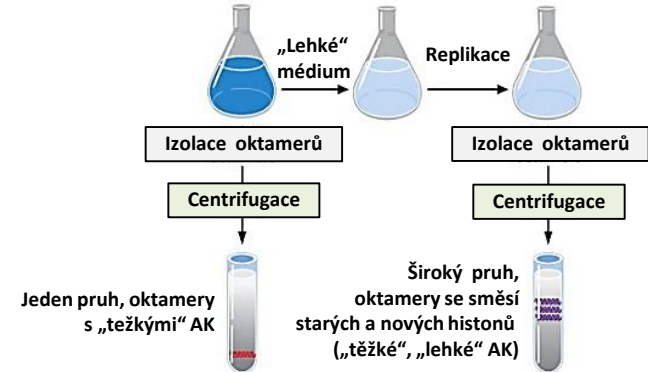
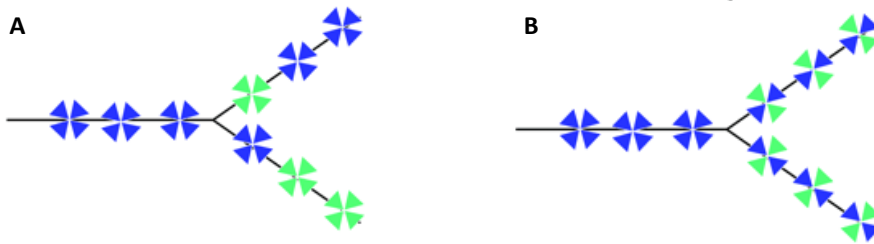


Replikativní senescence

- způsobena zkrácením telomer a rozpadem T-smyčky
- buňky zastaví růst, vstoupí do senescence nebo spustí apoptózu
- obrana před nestabilitami v genomu a vývojem nádorů (telomery by byly rozeznány jako poškození DNA, odhalené konce by mohly vést k fúzi chromozomů)

Nukleozomy během replikace

Během G1 a S fáze buněčného cyklu syntetizovány histony nutné pro zdvojení nukleozomů během replikace DNA.



- rozpad nukleozomů během replikace
- rychlé opětovné sestavení
- nové oktamery jsou náhodnou směsí původních a nových histonů

Přesnost replikace DNA

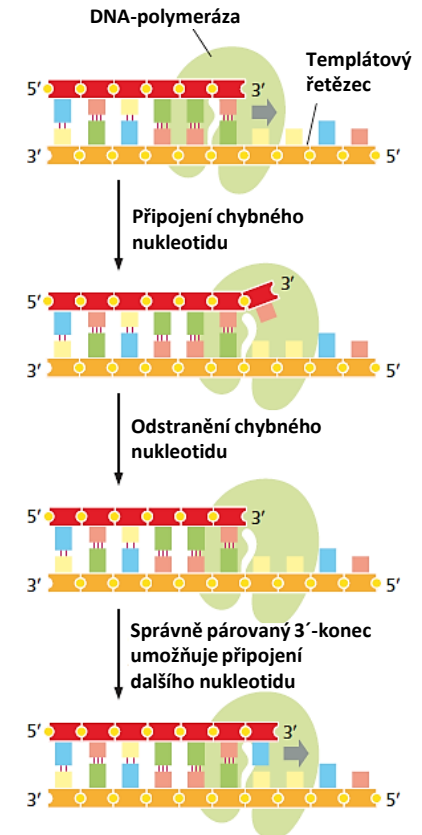
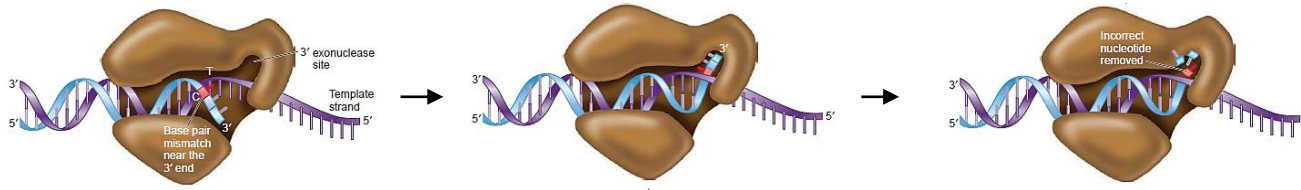
Chybovost DNA-polymerázy: 1 chyba na 10^7 bází

Přesnost replikace zajištěna párováním bází a vlastnostmi DNA-polymerázy

- (i) přednostní připojení nt se správným párováním
- (ii) odstranění chybného nt procesem zvaným proofreading

Proofreading

- kontrola správného párování začleněných nukleotidů během replikace
- špatně začleněný nukleotid odstraněn 3'-5' exonukleázovou aktivitou
- polymerační a korekční aktivita DNA-polymerázy zajištěna různými katalytickými doménami enzymu

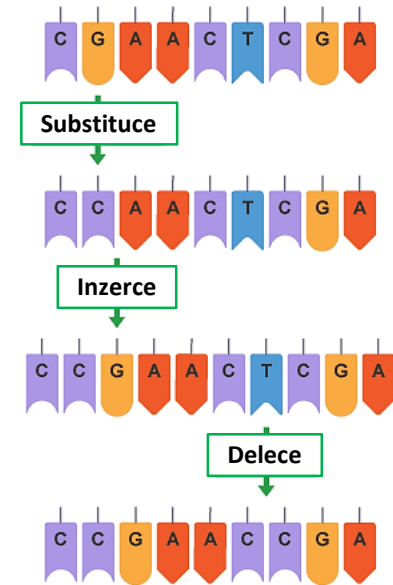


Molekulární podstata mutagenese

- zachování genomu buněk vyžaduje
 - přesnost replikace DNA
 - schopnost opravit poškozenou DNA
- mutace jsou dědičné změny genotypu, jejichž molekulární podstatou jsou nukleotidové substituce, delece a inserce

Substituce

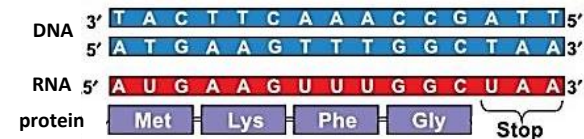
- výměna nukleotidu
- synonymní substituce: vznik kodónu se stejným smyslem
AAG (Lys) ---> AAA (Lys)
- nesmyslná mutace: vznik terminačního kodonu
AAG (Lys) ---> TAG (STOP)
- neutrální substituce: změnou aminokyseliny se nemění konformace peptidového řetězce
AAG (Lys) ---> AGG (Arg)
- mutace měnící smysl kodonu
AAG (Trp) ---> ACG (Thr)



Molekulární podstata mutagenese

Delece, inserce

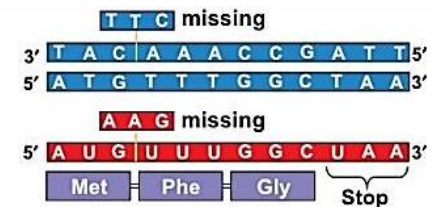
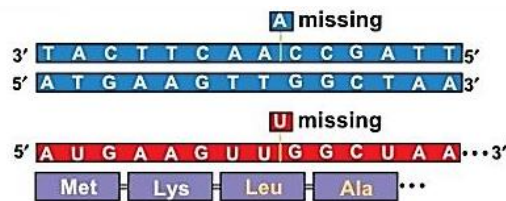
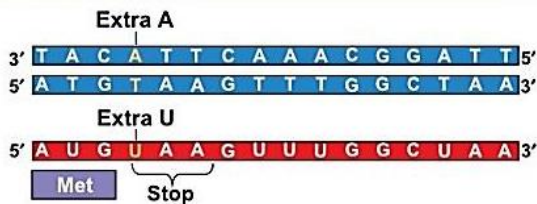
- ztráta / vložení nukleotidu(ů)
- posunové mutace: změna čtecího rámce



jednonukleotidová inserce

jednonukleotidová delece

trinukleotidová delece



Standardní alela: převládá v populaci, funkční

Mutantní alela: četnost v populaci nepřesahuje 1 %, nemusí být funkční

Spontánní mutace: vznikají bez účinku mutagenu

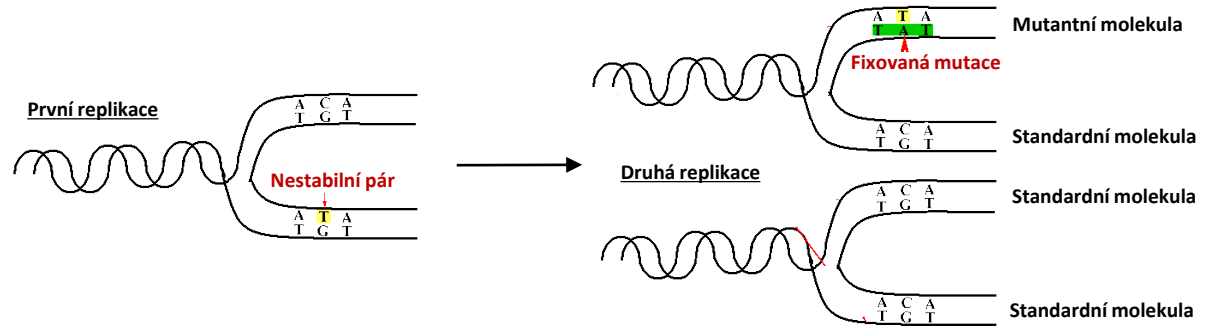
Indukované mutace: vyvolané mutagenem

Mutagen

- fyzikální nebo chemické agens vyvolávající mutace, působí genotoxicky, poškozují genotyp
- promutagen přeměněn na mutagen metabolickou aktivací

Spontánní mutace

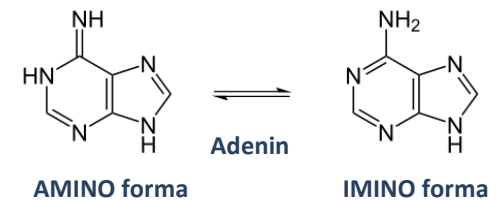
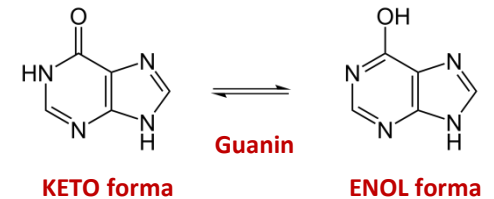
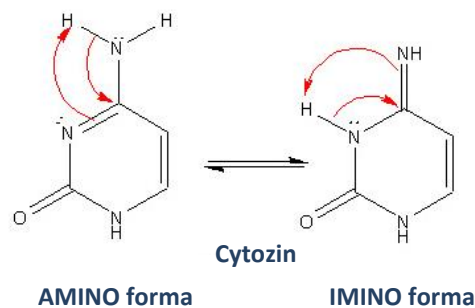
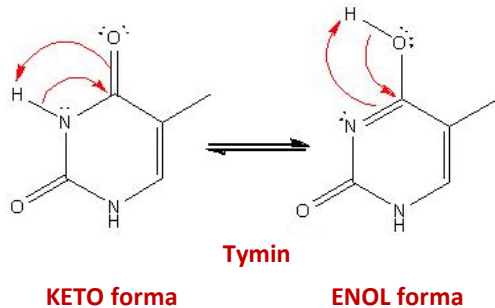
Pokud není chybné párování bází opraveno, dochází při dalších replikacích k fixaci mutace.



Chybné páry bází mohou vzniknout během replikace díky chemickým vlastnostem bází a těmto dějům:

1. Tautomerní změny bází

- stabilní tautomery podléhají Watson-Crickovu párování
- přechodné tautomery mohou tvořit páry AC, GT
- frekvence výskytu 10^{-4} - 10^{-5} / na nukleotid a replikační cyklus



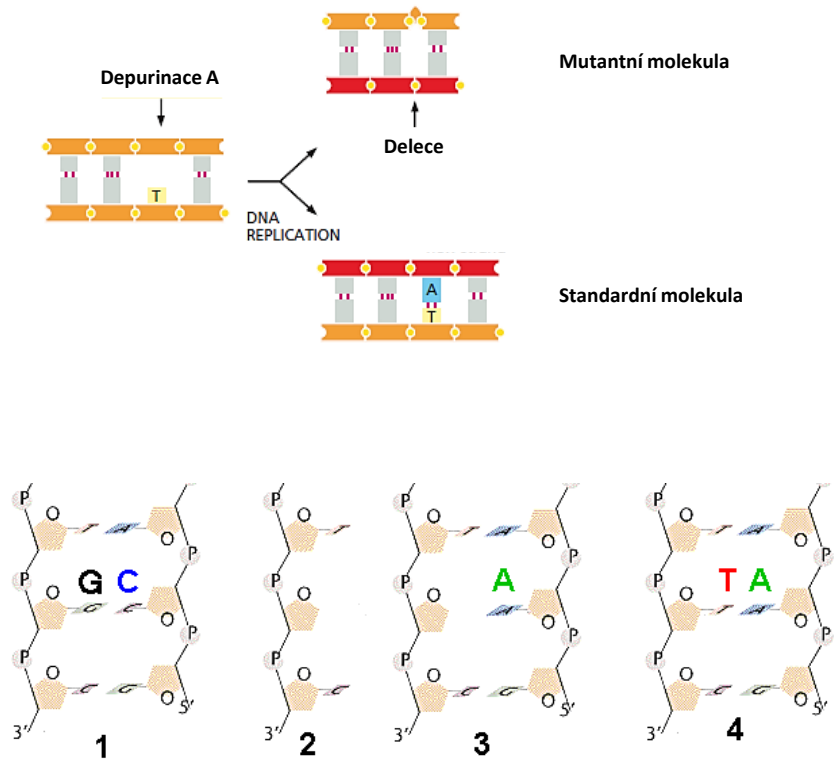
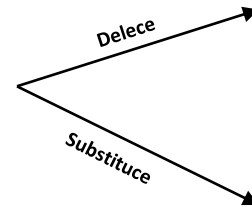
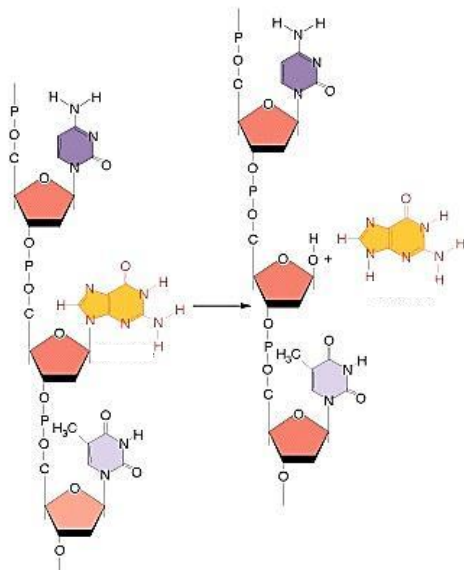
Spontánní mutace

2. Kolísavost párování bází

- vznik párů CT, GA, TG

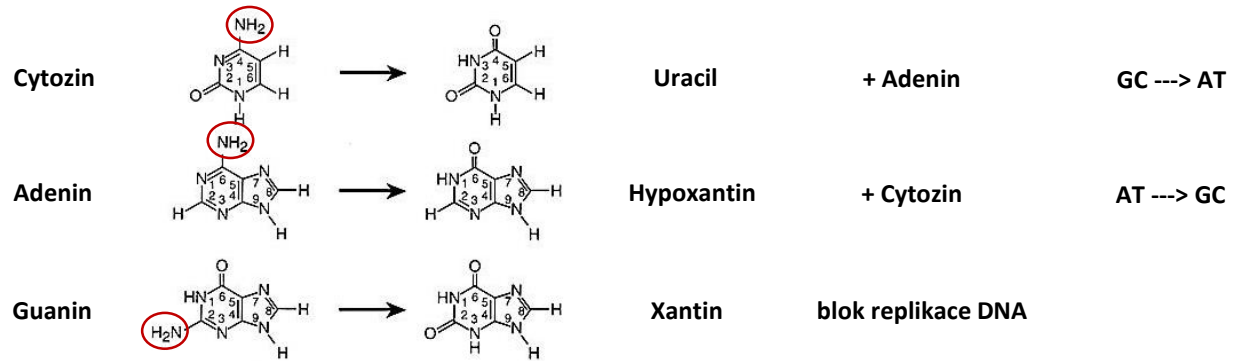
3. Depurace a depyrimidinace

- přerušení glykosidické vazby mezi bází a cukrem, ztráta báze, vznik AP místa
- po replikaci může vzniknout substituce (přednostně A) či delece
- několik tisíc událostí / den v genomu savců



Spontánní mutace

4. Deaminace

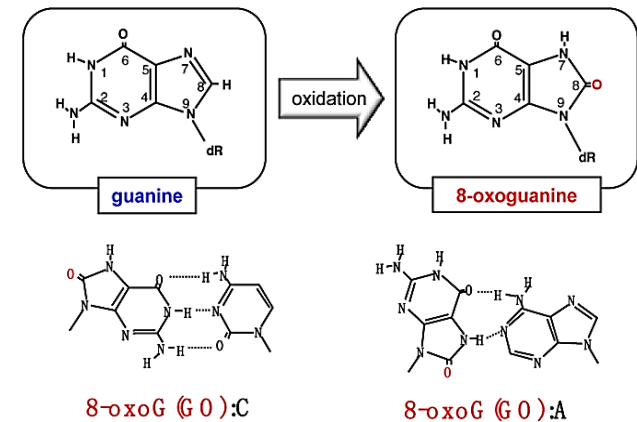
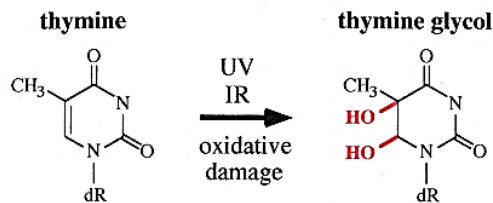


5. Inkorporace uracilu do DNA

- místo thyminu, odstraňován uracil-DNA-glykosylázou

6. Oxidativní poškození DNA

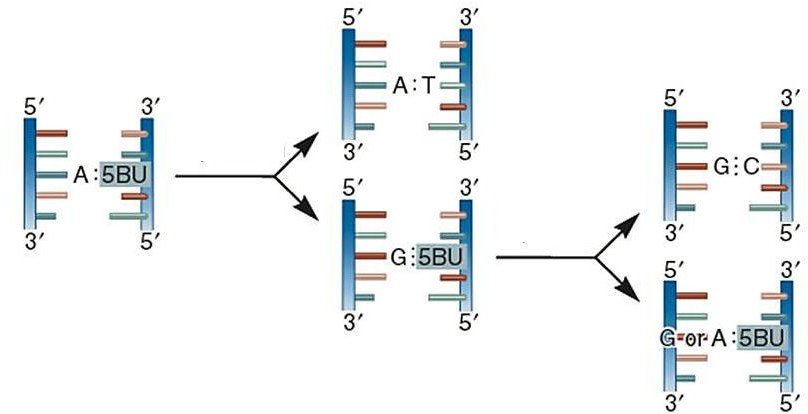
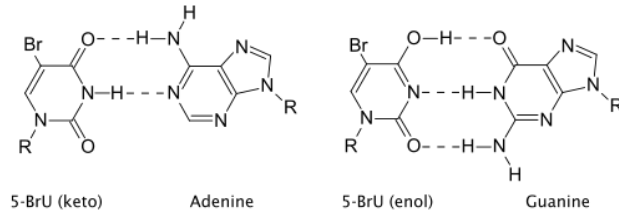
- vyvolává především hydroxylový radikál (OH●)
- 8-oxodeoxyguanozin (8-OxoG) se přednostně páruje s A
- tyminglykol zastavuje replikaci



Indukované mutace - chemomutageny

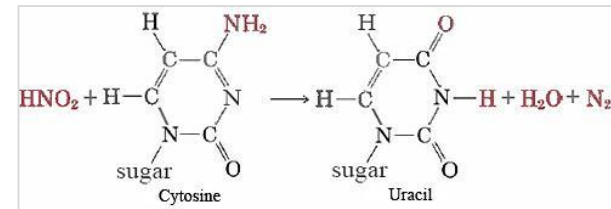
Analogy bází

- purinové a pyrimidinové deriváty
- např. 5-bromuracil: analog tyminu, AT ---> GC



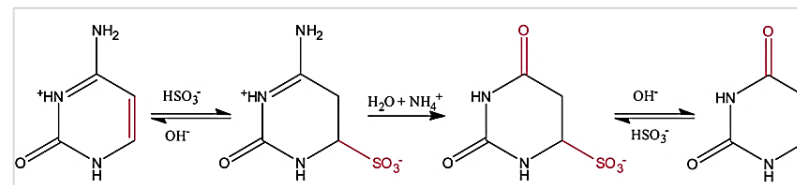
Kyselina dusitá (HNO₂)

- oxidativní deaminace bází, AT <---> GC
- vznik v žaludku z NaNO₃



Hydrogensířičitan (HSO₃⁻)

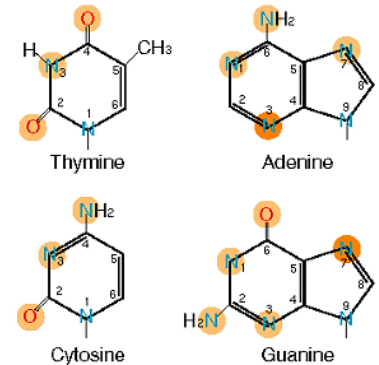
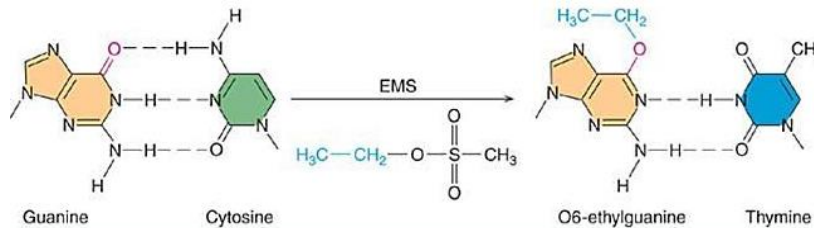
- deaminace C, GC ---> AT



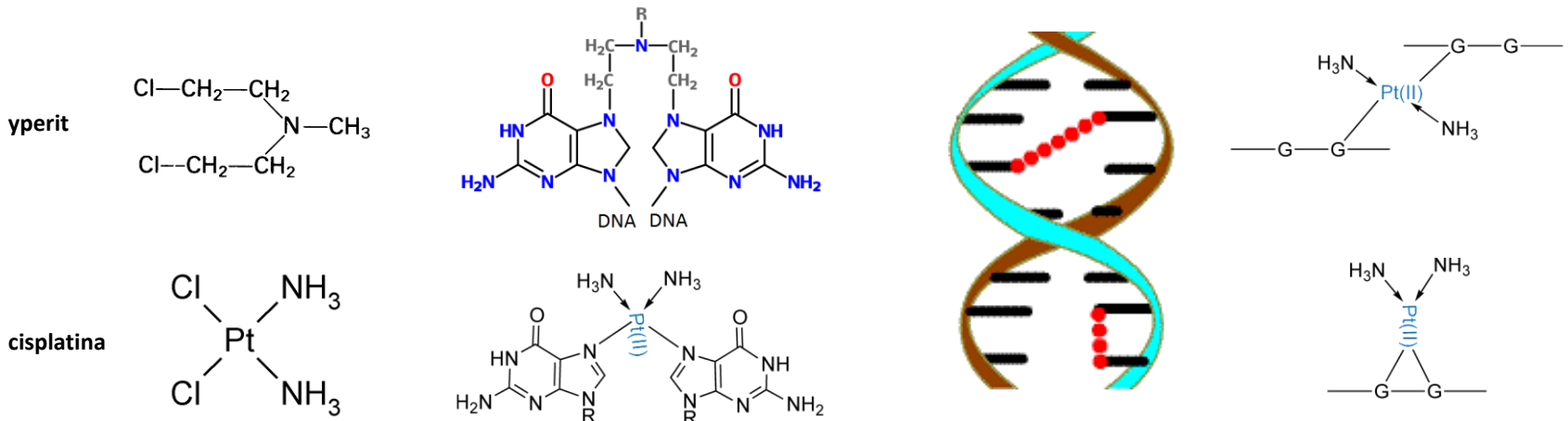
Indukované mutace - chemomutageny

Alkylační látky

- alkylace nukleofilních center bází DNA, atomy dusíku a kyslíku
- jednofunkční** - jedna reaktivní skupina, alkylace bází, změna párování
 - př. ethylmetansulfonát (EMS)



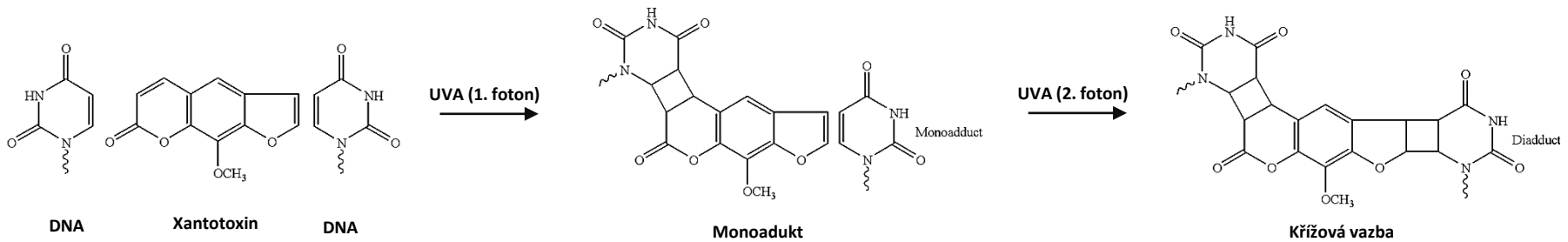
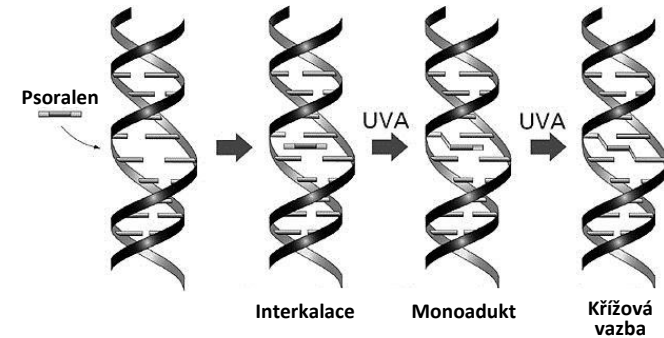
- dvojfunkční** - dvě reaktivní skupiny, křížové vazby mezi dvěma nukleofilními centry
 - zástava replikace DNA, př. yperit (hořčičný plyn)



Indukované mutace - chemomutageny

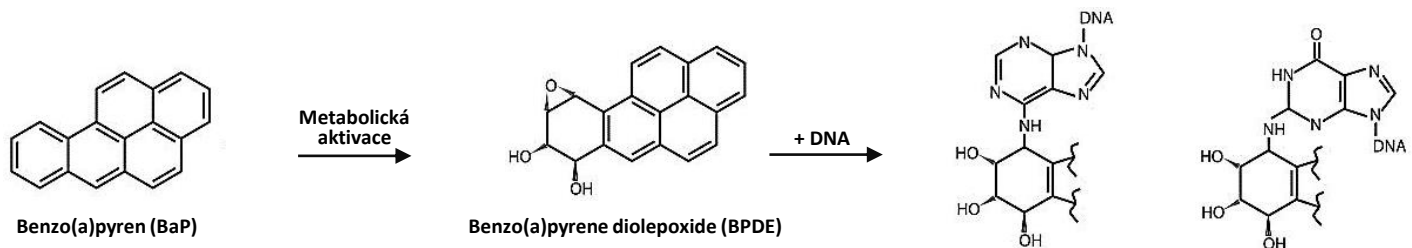
Psoraleny

- interkalace mezi sousední nukleotidy, posunové mutace
- fotoreaktivace UVA světlem vede k tvorbě monoadduktů a křížových vazeb na DNA, zástava replikace



Polyaromatické uhlovodíky

- interkalace do dsDNA, metabolickou aktivací vznikají epoxidy, které tvoří monoaddukty s DNA
- př. benzo(a)pyren



Indukované mutace - promutageny

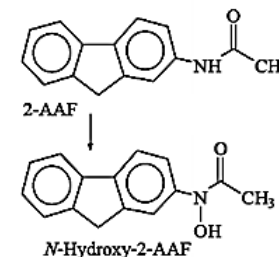
Promutageny jsou samy o sobě neškodné. Vyžadují metabolickou aktivaci, aby se staly mutageny.

Benzo(a)pyren

- produkt nedokonalého spalování
- uhelný dehet, výfukové plyny, cigaretový kouř, grilované maso
- vznik epoxidů tvořících adukty s DNA

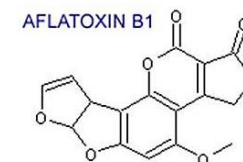
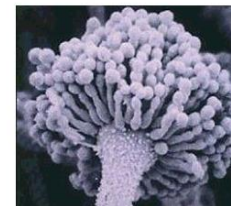
2-acetylaminofluoren (AAF)

- původně vyvinut jako insekticid
- vznik N-hydroxy-2-aminofluorenu tvořícího adukty s DNA
- nádory jater, močového měchýře, ledvin



Aflatoxiny

- mykotoxiny produkované plísněmi rodu *Aspergillus*
- kontaminované potraviny (obilniny, olejniny, koření, ořechy)
- aflatoxinu M₁ jeden z nejsilnějších jaterních mutagenů



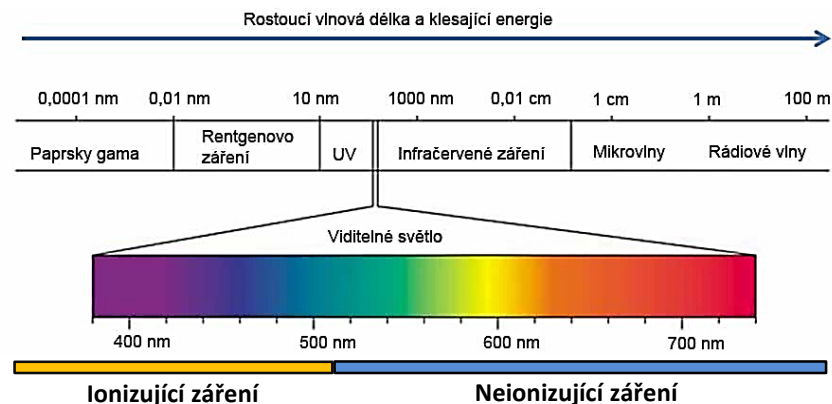
Dusičnany, dusitany

- hnojiva, potravinové konzervanty; potraviny rostlinného i živočišného původu
- vznik nitrosaminů, které modifikují báze DNA a mění jejich párování

Indukované mutace - fyzikální mutageny

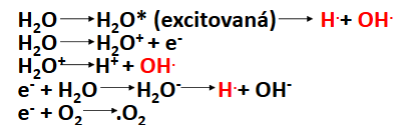
Ionizující záření

- záření s dostatkem energie pro ionizaci atomů a molekul ozářené látky
- gama záření, paprsky X, část UV záření
- vyvolává vznik modifikovaných bází, křížových vazeb a zlomů DNA



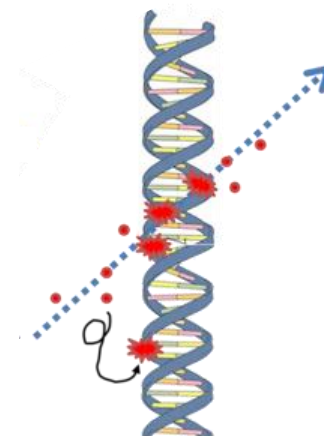
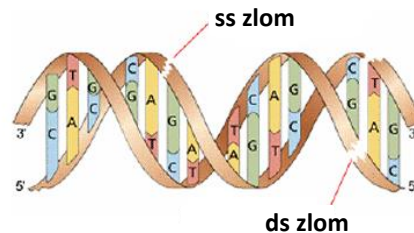
(i) nepřímý účinek (65 % poškození)

- ionizace vody a vznik vysoce reaktivních radikálů
- modifikace bází: hydroxylace, deaminace, demethylace



(ii) přímý účinek (35 % poškození)

- DNA absorbuje energii a ionizuje se, štěpení vazeb a zlomům DNA
- př. ozáření dávkou 1 Gy vyvolá v buňce 15 - 60 ds zlomů, > 1000 ss zlomů



Indukované mutace - fyzikální mutageny

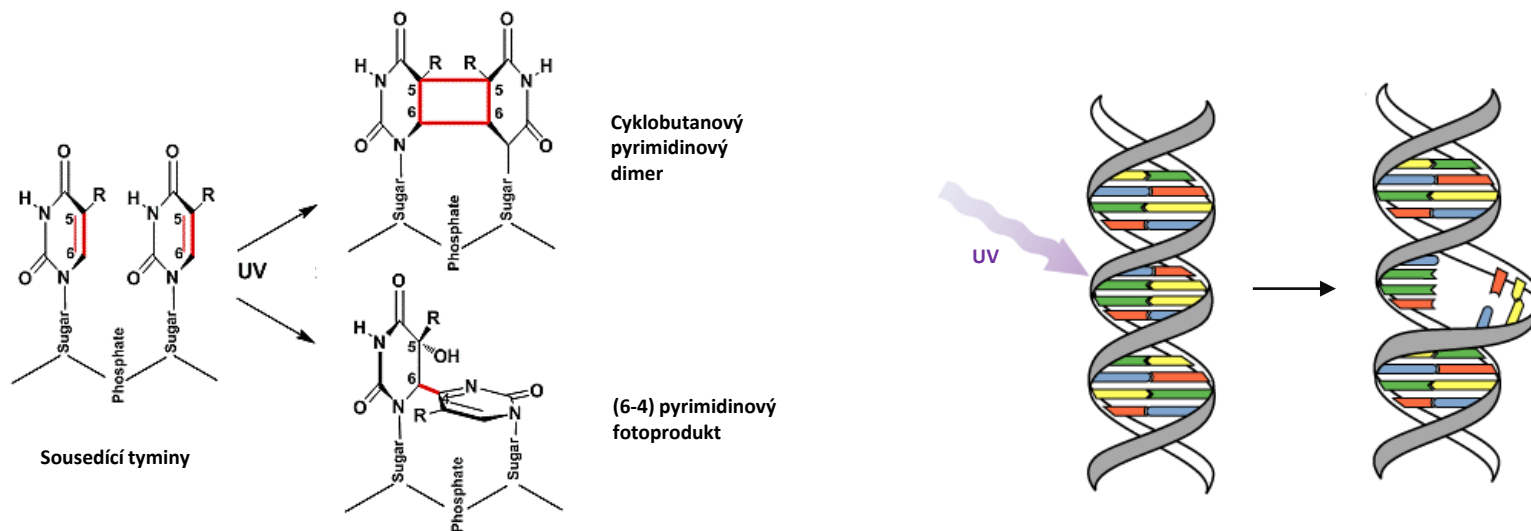
Ultrafialové záření

- nižší energie a specifitější účinek než ionizující záření, absorpční maximum bází při 254 nm

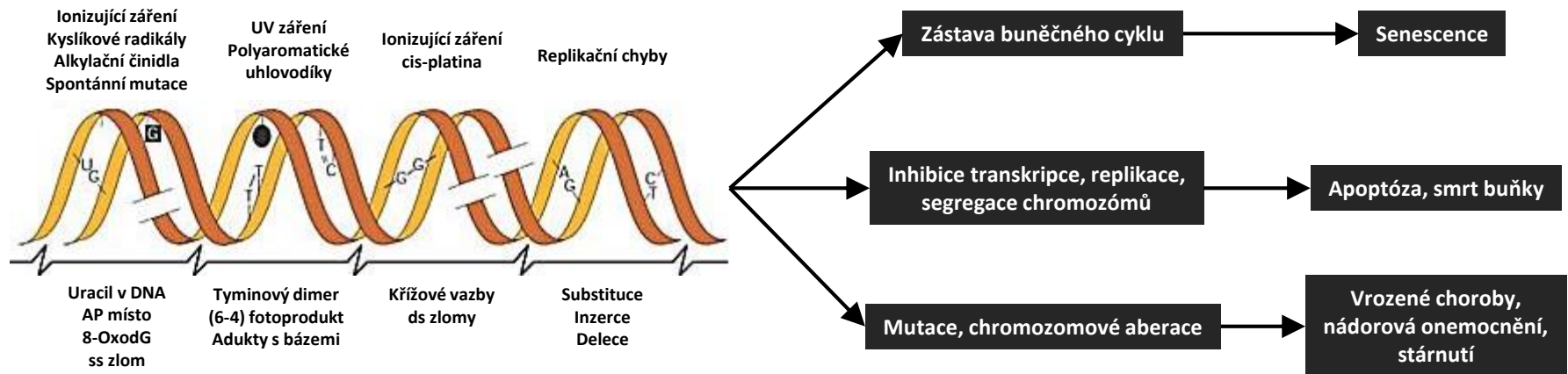
(i) zvýšení frekvence spontánních mutací

(ii) tvorba pyrimidinových dimerů

- dimerizace dvou sousedních pyrimidinových molekul (nejčastěji tyminové dimery)
- kovalentní spojení přes cyklobutanový kruh či (6-4) pyrimidinové fotoprodukty
- narušena struktura DNA a replikace



Opravy poškozené DNA



V buňkách existují mechanismy, pomocí kterých buňka rozezná a úplně nebo do určité míry odstraní poškození DNA. Tyto opravné mechanismy jsou katalyzovány různými sadami enzymů.

Schopnost opravit poškozenou DNA je zásadní pro udržení integrity genomu buněk a pro normální fungování mnohobuněčného organismu.

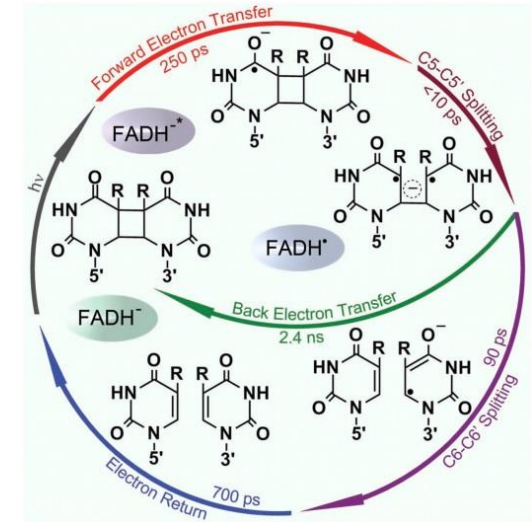
Typy oprav DNA

- úplná oprava - oprava na původní stav bez syntézy DNA
- excizní oprava - vyštěpení poškozeného místa, syntéza nepoškozené DNA
- tolerantní oprava - obnova funkce DNA bez opravy poškození

Úplné opravy DNA

Fotoreaktivace

- odstranění pyrimidinových dimerů v DNA vyvolaných UV zářením
- katalyzována fotolyázou (aktivace VIS o vlnové délce 340 - 400 nm)
- fotolyáza štěpí cyklobutanový kruh v pyrimidinovém dimeru
- fylogeneticky konzervativní mechanismus, u savců excizní oprava

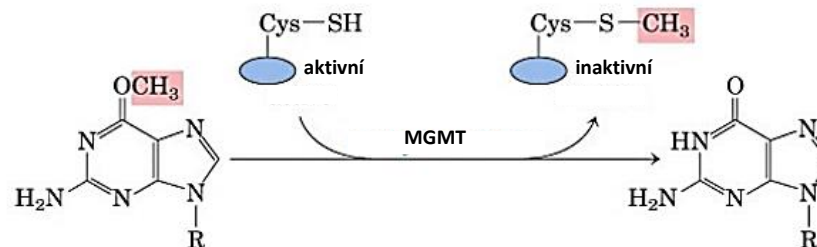


Zheyun Liu et al. PNAS 2011;108:14831-14836

Přímá oprava alkylovaných bází

O⁶-metylguanin-DNA-metyltransferáza

- u lidí *MGMT*, u bakterií *Ada*, „sebevražedný enzym“
- demethylace O⁶-metylguaninu na guanin, přenos methyl skupiny na vlastní Cys
- deficity *MGMT* nalezeny u nádorů děložního hrdla, kolorekta, žaludku, jater, glioblastomu



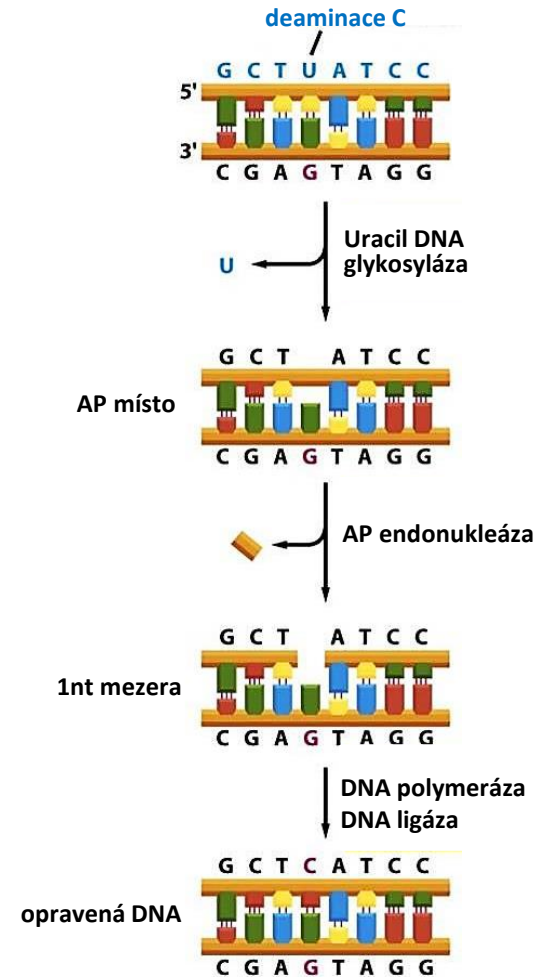
Excizní opravy DNA

Třístupňový proces:

1. rozpoznání a vyštěpení poškozené DNA (nukleázy)
2. zaplnění mezery správnými nukleotidy (DNA polymerázy)
3. spojení zlomu v cukr-fosfátové páteři (DNA ligázy)

Bázová excizní oprava (BER)

- oprava poškozených bází, odstranění U
- DNA glykosyláza
 - rozeznání a odstranění nevhodné báze, tvorba AP míst
- AP endonukleáza
 - vyštěpení AP místa, tvorba 3'-OH
- DNA polymeráza
 - připojení správného nukleotidu
 - Pol β u eukaryot, Pol1 u prokaryot
- DNA ligáza
 - spojení řetězce
- zvýšené riziko kolorektálních nádorů u mutací Pol β , DNA glykosylázy



Excizní opravy DNA

Nukleotidová excizní oprava (NER)

- oprava rozsáhlejšího poškození DNA, které mění a deformuje dvoušroubovici DNA
- adukty bází, UV fotoprodukty

Bakterie

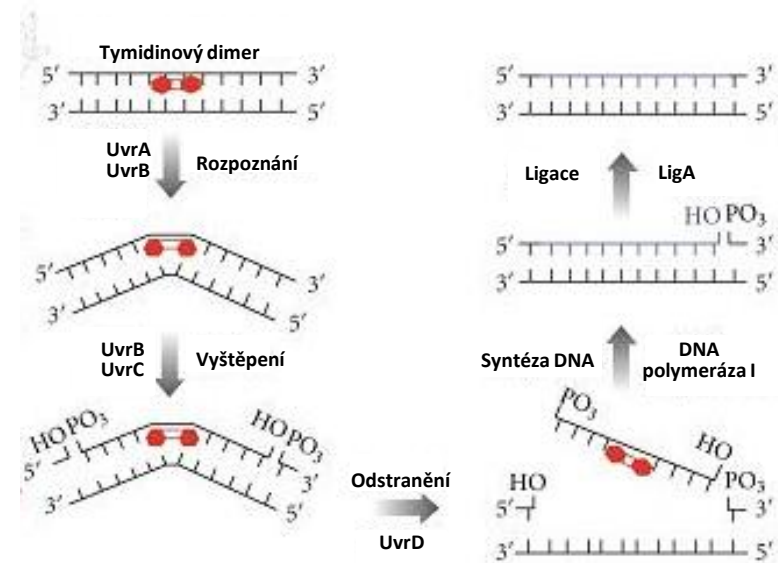
- rozeznání poškozeného místa
- vyštěpení poškozeného místa
- uvolnění vyštěpeného úseku
- dosyntetizování chybějící DNA
- spojení řetězce

UvrAB
UvrBC
UvrD
Pol1
LigA

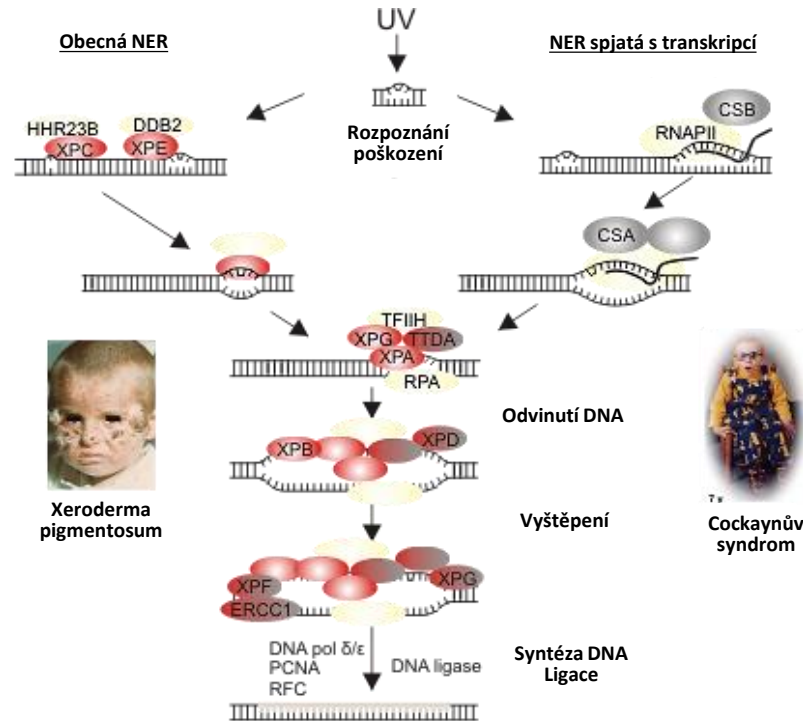
Člověk

- rozeznání poškozeného místa
- odvinutí DNA
- vyštěpení poškozeného místa
- dosyntetizování chybějící DNA
- spojení řetězce

XPA, XPC, XPE; CSA, CSB
XPB, XPD
XPF, XPG
Pol δ/ϵ
DNA ligáza I



Excizní opravy DNA



- deficity v NER mechanismech geneticky podmiňují některé syndromy

Xeroderma pigmentosum - autosomálně recesivní choroba, nejčastěji deficit XPA, XPC

- extrémní citlivost k slunečnímu záření

- > 1000 x zvýšeno riziko vzniku kožních nádorů

Cockaynův syndrom - autosomálně recesivní choroba, deficit CSA, CSB

- fotosenzitivita, trpaslctví, retinitis pigmentosa

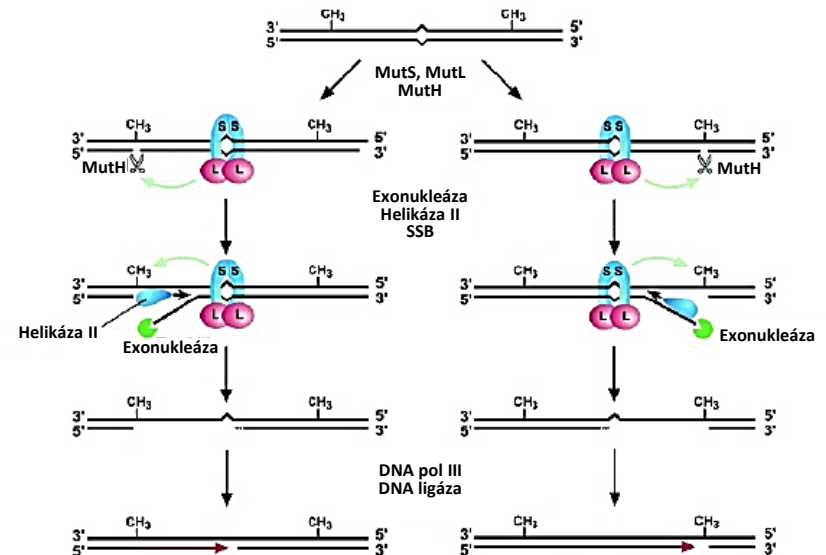
Excizní opravy DNA

Oprava chybného párování (mismatch repair)

- frekvence chyb při syntéze DNA replikace 1 : 100.000
- + proofreading 1 : 10.000.000
- + opravy 1 : 1.000.000.000

E. coli

- Dam metyláza metyluje A v sekvenci GATC
- těsně po replikaci hemimetylovaný stav
- rozpoznání chybného nukleotidu (MutS)
- navázání opravných enzymů (MutL , MutH)
- MutH štěpí řetězec s nemetylovanou GATC
- exonukleáza s helikázou a SSB proteiny odstraňuje naštěpený řetězec až k chybnému nt
- syntéza DNA podle původního řetězce (Pol3)
- spojení řetězce (DNA ligáza)



- opravný systém používán i u eukaryot a člověka, mutace v opravných genech zvyšují riziko rakoviny

Opravy dvojřetězcových zlomů

Štěpení cukr-fosfátové kostry a dvouřetězcové zlomy indukované ionizujícím zářením, chybami v replikační vidlici, působením některých chemikálií.

Nebezpečí fragmentace chromozomů, přestaveb genomu, ztráty genetické informace.

Nehomologní spojování konců (NHEJ)

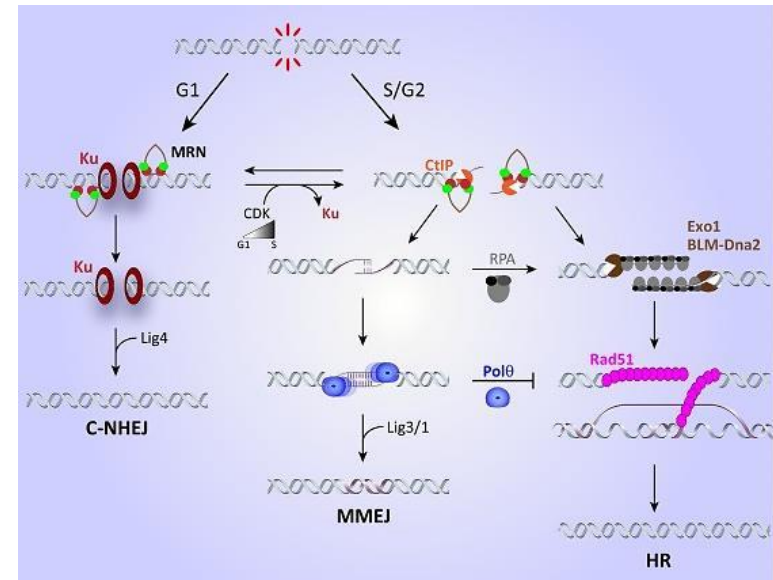
- v G1 fázi buněčného cyklu, před replikací DNA
- zarovnání zlomených řetězců a následné znovu spojení
- náchylné k chybám, možná ztráta nukleotidů

Spojení konců přes mikrohomologii (MMEJ)

- v brzké S fázi buněčného cyklu
- úprava konců, která odhalí krátkou oblast homologie
- párování homologní oblasti, spojení řetězců

Homologní rekombinace (HR)

- v S/G2 fázi buněčného cyklu, po replikaci DNA
- bezchybná oprava bez ztráty genetické informace



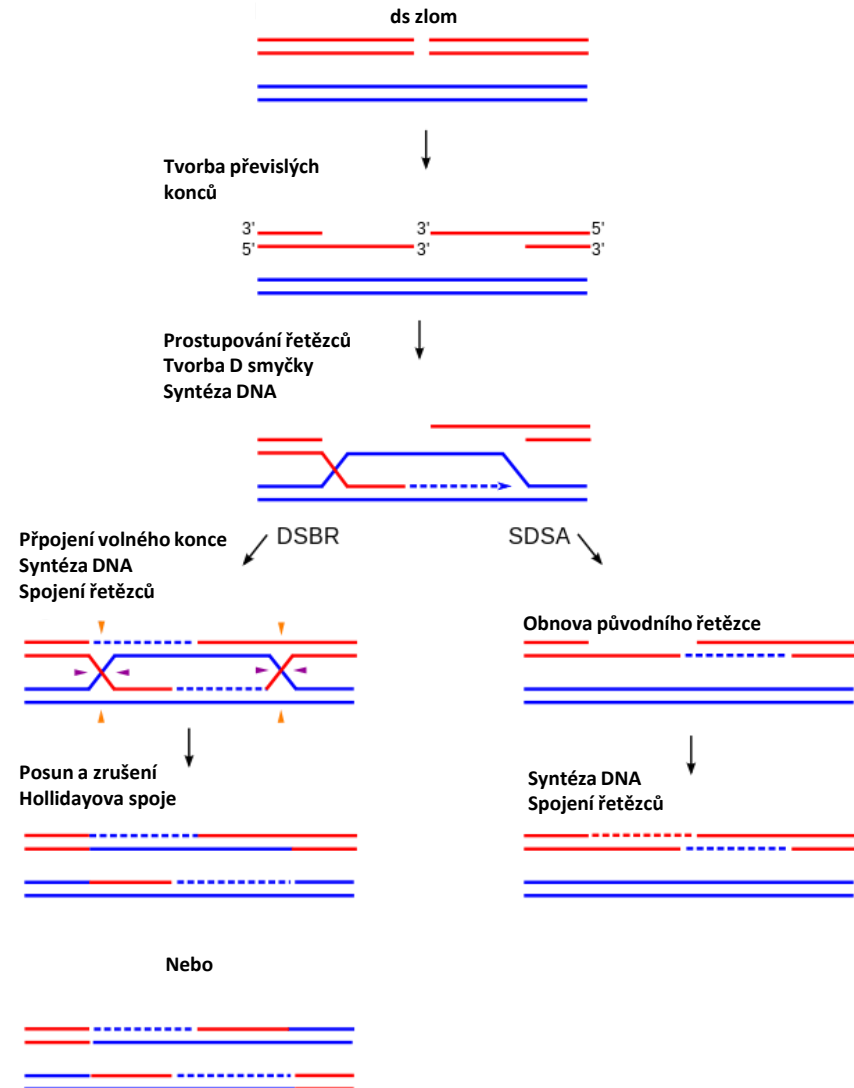
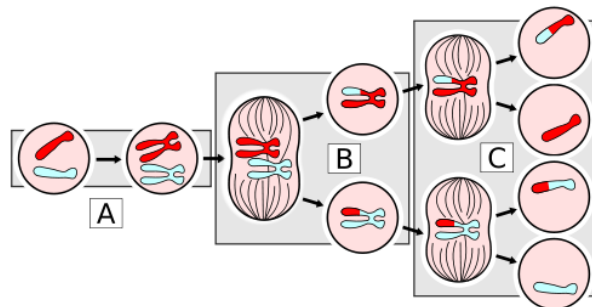
Homologní rekombinace

Dva modely oprav ds zlomů DNA

- Hollidayův model
(DSBR, double-strand break repair)
- nasedání závislé na syntéze
(SDSA, synthesis-dependent strand annealing)

Člověk

- rozpoznání zlomů a úprava vzniklých konců - BRCA2, Rad52, Rad54, Rad51
- nukleoproteinové vlákno - Rad51
- helikázy (RecQ), nukleázy, topoizomerázy
- deficity v procesech HR spjatý s tvorbou nádorů, početními chromozom. abnormalitami

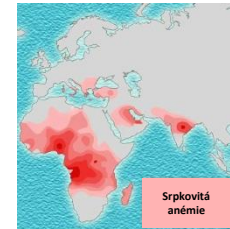
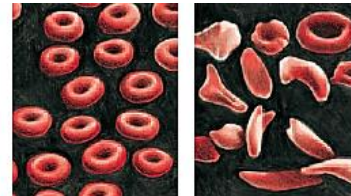


Opravy poškozené DNA

Při selhání replikačních a opravných mechanismů dochází ke vzniku mutací. Záměna pouhého jednoho nukleotidu může vážně poškodit zdatnost a zdraví organismu.

- např. srpkovitá anémie

HbA							HbS						
CTG	ACT	CCT	GAG	GAG	AAG	TCT	CTG	ACT	CCT	GTG	GAG	AAG	TCT
Leu	Thr	Pro	Glu	Glu	Lys	Ser	Leu	Thr	Pro	Val	Glu	Lys	Ser
3			6			9	3			6			9



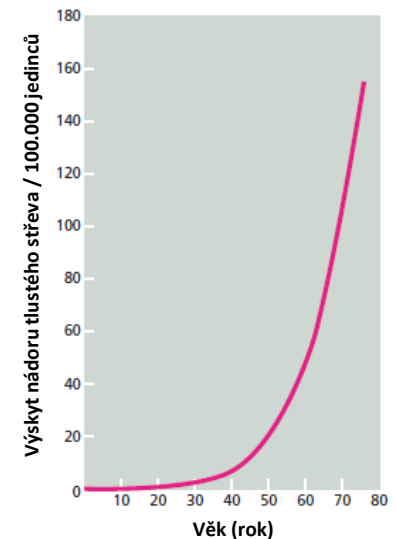
Změny DNA v zárodečných buňkách přenášeny na potomstvo.

Změny DNA v somatických buňkách mohou vést ke vzniku nádorových onemocnění. Pravděpodobnost akumulace dostatečného množství mutací pro vznik nádoru roste s věkem.

Chyby v opravných mechanismech zvyšují frekvenci spontánních mutací a citlivost buněk k mutagenům.

Nalezeno přes 30 mutací v genech pro opravy DNA, které zvyšují riziko vzniku nádoru.

Využití chemických i fyzikálních mutagenů při léčbě nádorových onemocnění (chemoterapie, radioterapie).



Shrnutí

- Před tím než se buňka rozdělí, musí replikovat veškerou genetickou informaci uloženou v DNA.
- Vlákna v dvouřetězcové DNA jsou navzájem komplementární, každé z nich proto může sloužit jako templát pro syntézu dalších vláken. Během replikace DNA vznikají dvě úplně stejné molekuly, což umožňuje kopírovat genetickou informaci a předávat ji do dceřiných buněk a z rodičů na potomstvo.
- Během replikace DNA se vlákna dvoušroubovice oddělují za vzniku replikační vidlice ve tvaru „Y“. DNA polymeráza na každém z vláken vytvoří nový komplementární řetězec DNA.
- DNA polymeráza syntetizuje DNA pouze v jednom směru, takže pouze vedoucí řetězec může být v replikační vidlici tvořen nepřerušovaně. Na opožďujícím se řetězci probíhá syntéza DNA přerušovaně, ve formě krátkých fragmentů, které jsou následně spojeny do souvislého řetězce.
- Syntéza DNA začíná od krátkých RNA primerů, které jsou následně odstraněny a nahrazeny DNA.
- Replikace DNA vyžaduje spolupráci mnoha proteinů, které tvoří multienzymový komplex pohybující se podél replikované DNA.
- U eukaryot jsou konce chromozomů replikovány pomocí telomerázy.
- DNA polymeráza se vyznačuje vysokou přesností replikace podporovanou proofreadingovou aktivitou. Případné chybné báze jsou opravovány pomocí oprav chybného párování bází.
- Poškození DNA je opravováno řadou enzymů, které poškozené místo rozeznají, odstraní a nahradí novou DNA, která se tvoří podle nepoškozeného templátu.
- Dvouřetězcové zlomy DNA jsou opravovány v závislosti na fázi buněčného cyklu pomocí nehomologního spojování konců či homologní rekombinace.

Zvídavé otázky

Vysvětlete vlastními slovy, proč se replikace DNA označuje jako „semikonzervativní“?

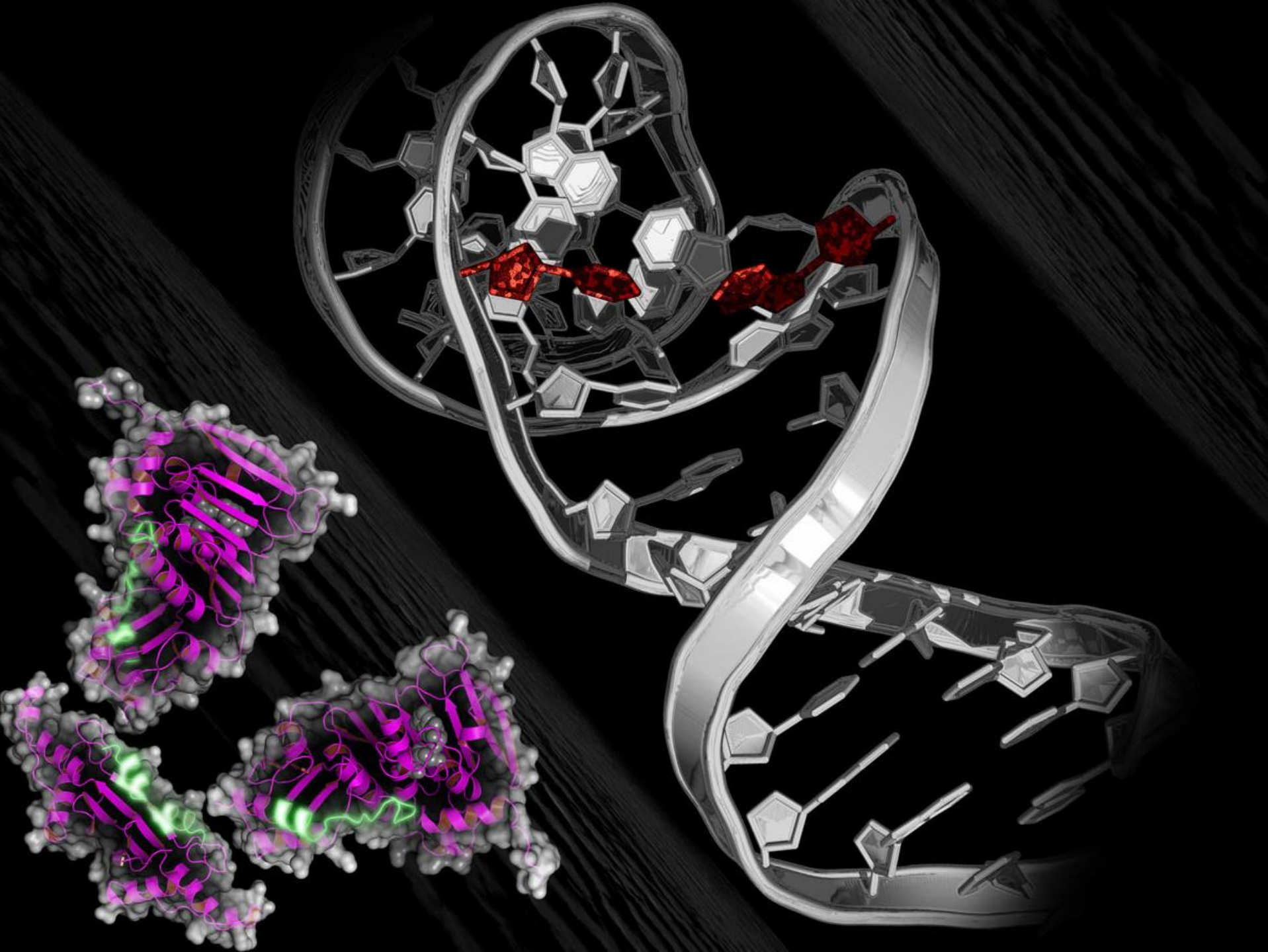
Proč jsou telomery a telomeráza potřebné pouze pro replikaci eukaryotických chromozomů a prokaryotických ne?

Která z následujících tvrzení jsou pravdivá? Vysvětlete svoji odpověď.

- a) Bakteriální replikační vidlice je asymetrická, protože obsahuje dvě DNA polymerázy, které se liší ve své struktuře.
- b) Okazakiho fragmenty jsou odstraňovány nukleázou, která degraduje RNA
- c) Frekvence replikačních chyb je snižována jak proofreadingovou aktivitou DNA polymerázy tak opravou chybného párování bází.
- d) Při chybění oprav DNA jsou geny nestabilní.
- e) Žádná z chybných bází vzniklých deaminací se v DNA přirozeně nevyskytuje.
- f) Nádory mohou vznikat v důsledku akumulace mutací v somatických buňkách.

Zvídavé otázky

- V jakém pořadí by denaturovaly následující molekuly DNA při postupném zahřívání jejich roztoku?
 - A) 5'-CCGGGCCAGCCGGTGTGGGTTGCCGAGG - 3'
3'-GGCCCGGTTCGGCCACACCCAACGGCTCC - 5'
 - B) 5'-AGTGCTTGATCGAT - 3'
3'-TCACGAACTAGCTA - 5'
 - C) 5'-ATTATAAAATATTTAGATACTATATTTACAA- 3'
3'-TAATATTTTATAAATCTATGATATAAATGTT- 5'
- Rychlost syntézy DNA u *E.coli* je 100.000 nt / min. Replikace celého chromozomu trvá 45 minut. Kolik párů bází obsahuje chromozom *E.coli*? Jaká je přibližná délka tohoto chromozomu?
- Haploidní genom *D. melanogaster* obsahuje $1,35 \times 10^8$ bp. Syntéza na jedné replikační vidlici probíhá rychlostí 30 bp/s. Obě kopie genomu se zreplikují během 5 minut. Kolik replikačních počátků je pro takto rychlou syntézu DNA potřeba?
- Jaký bude konečný produkt nebo stav replikace, pokud bude mutací inaktivován následující enzym, a i přes tuto mutaci se bude buňka snažit zreplikovat DNA?
 - a) DNA-polymeráza
 - b) DNA-ligáza
 - c) DNA-helikáza
 - d) primáza



Molekulární biologie

4. Transkripce

Transkripce (přepis) genetické informace z DNA do RNA

Osnova

1. Transkripce (prokaryotického) bakteriálního genomu
2. Transkripce eukaryotického genomu
3. Posttranskripční úpravy RNA a mechanismy sestřihu

Hlavní zdroje:

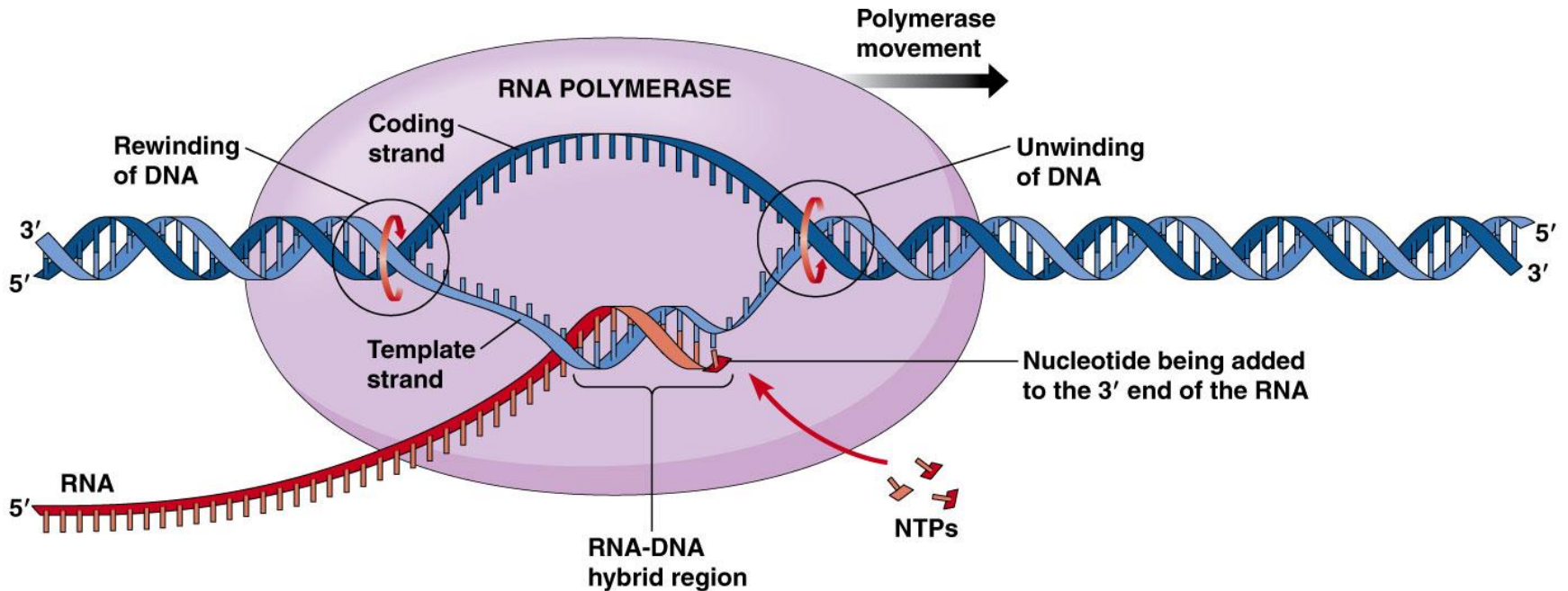
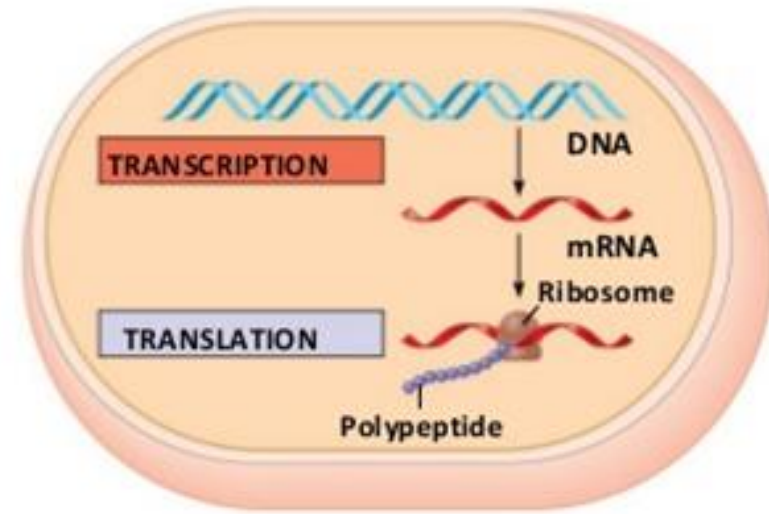
*S. Rosypal, Úvod do molekulární biologie 1-4
Masarykova Universita Brno
ISBN 80-902562*

*B. Staveley, Principles of Cell Biology
Memorial University of Newfoundland
<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CBhome.html>*

*M. Muller, Biology of Cells and Organisms
University of Illinois, Chicago
<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/summer2010/lecturesm10.htm>*

Transkripce

Informace z DNA se nepřekládá do proteinu přímo, ale přes prostředníka - **mRNA** (messenger; mediátorová)



Část první: Bakteriální transkripce

Transkripce (přepis) genetické informace z DNA (chromozomové a plazmidové) do RNA pomocí enzymu RNA-polymerázy

RNA-polymeráza (transkriptáza)

- váže se na **promotor**
- katalyzuje syntézu dlouhých primárních transkriptů
- u bakterií stejná RNA-polymeráza pro všechny typy RNA

Primární transkripty:

Většinou obsahují přepisy více genů (polygenní/polycistronní).

Na DNA: promotor - geny - terminátor

3 hlavní skupiny RNA

1. mRNA (mediátorová; messenger)

matrice pro syntézu polypeptidů. U bakterií nepodléhá posttranskripčnímu sestřihu

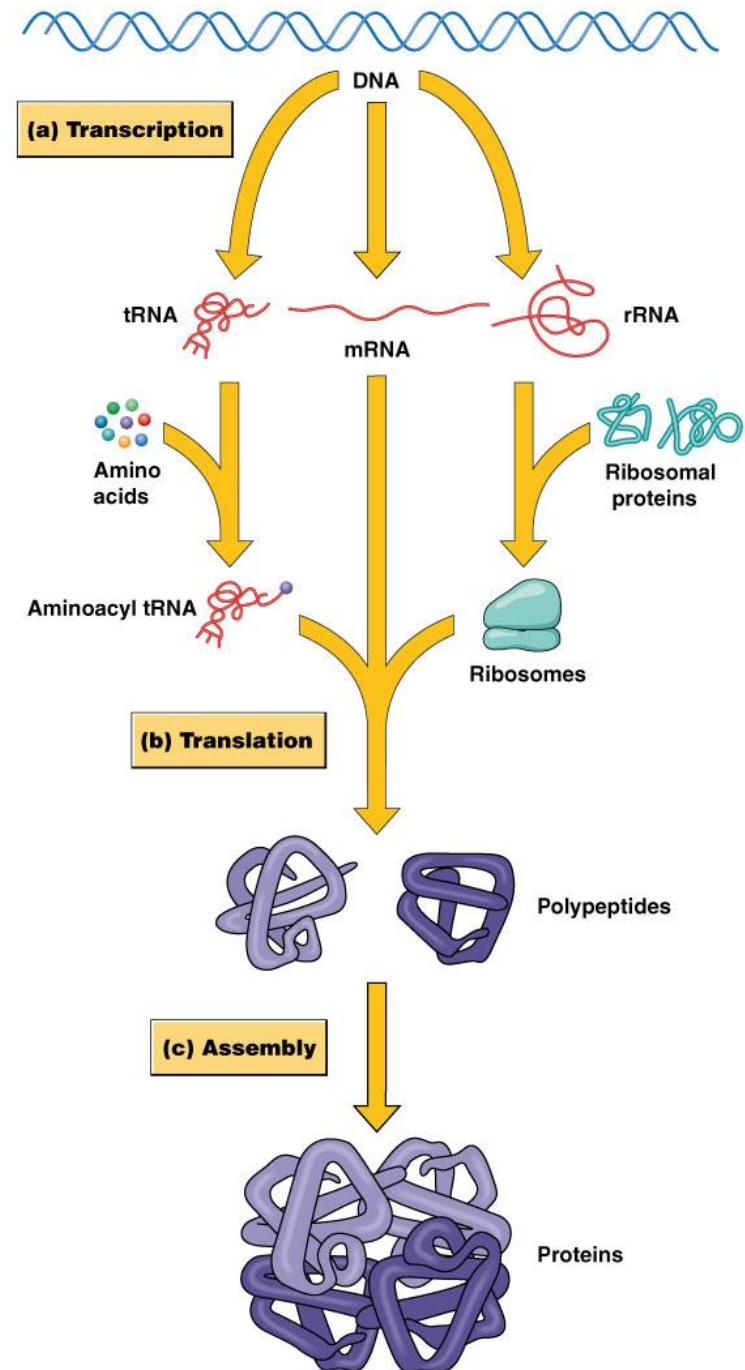
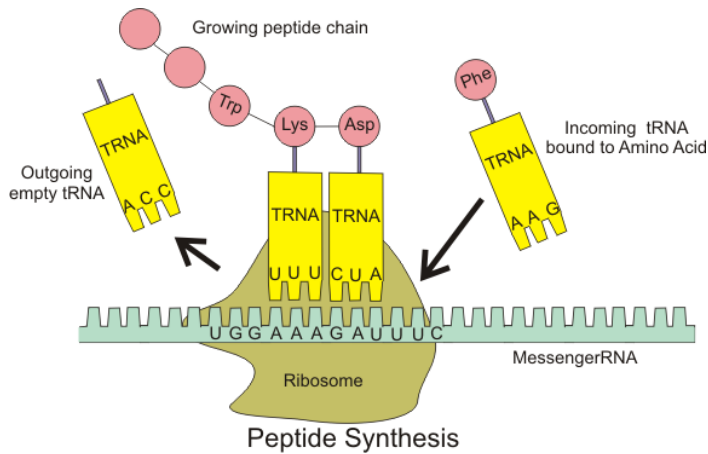
2. rRNA (ribosomová)

posttranskripčně upravována z pre-rRNA

3. tRNA (transferová)

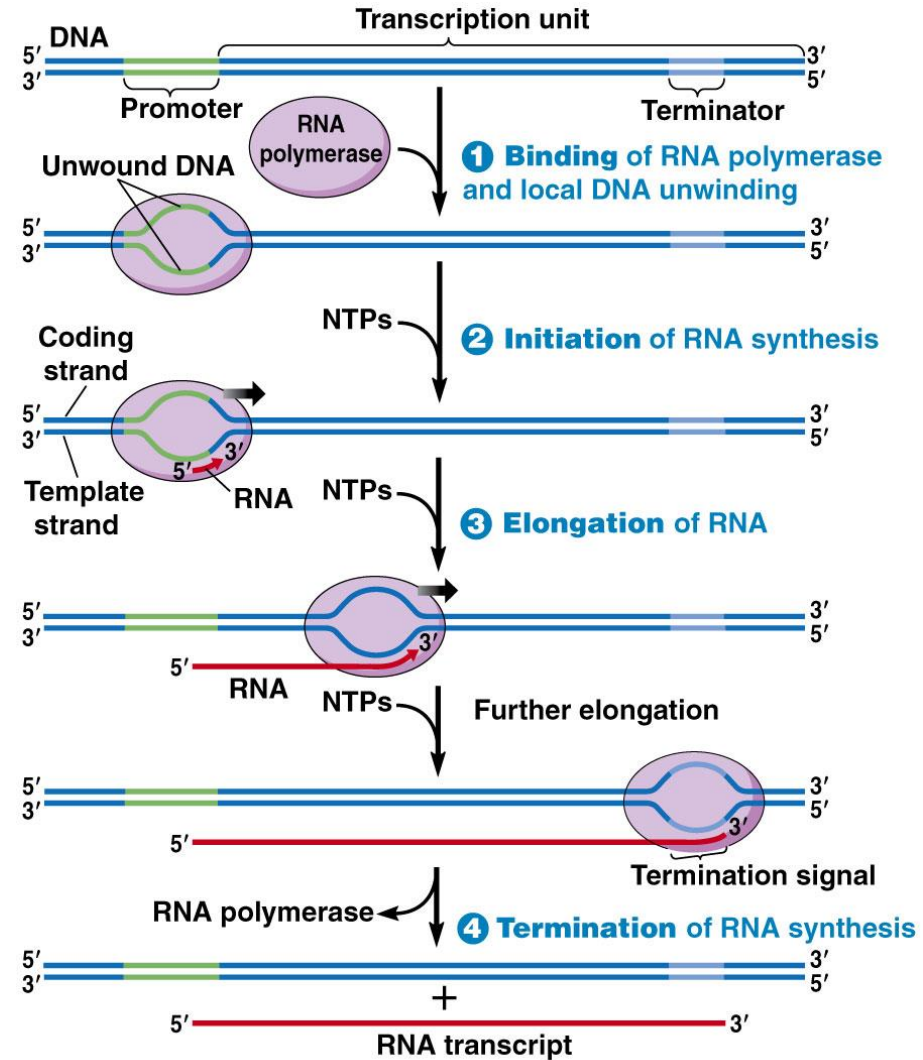
posttranskripčně upravována z pre-tRNA

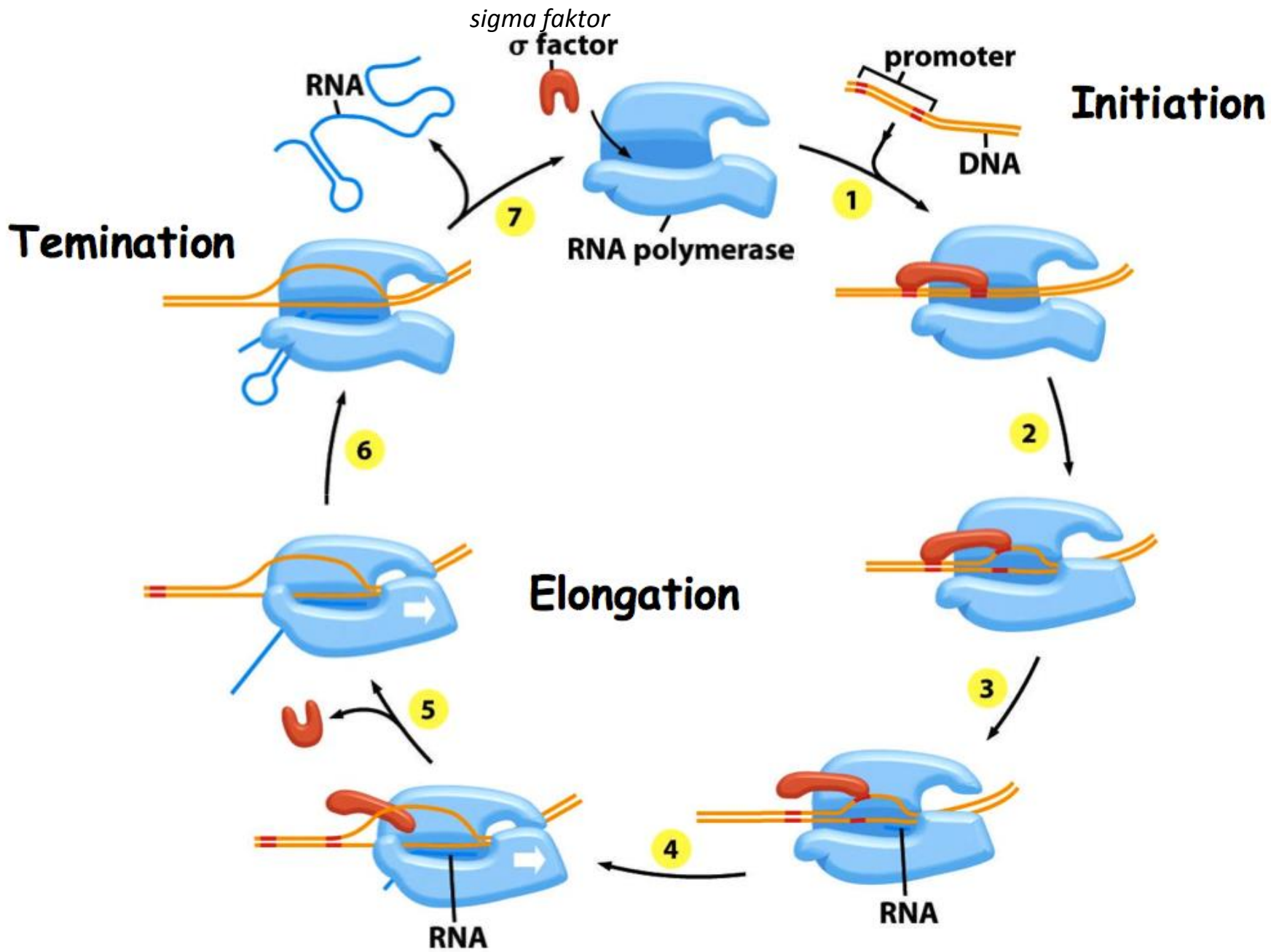
Váže se na ni aminokyselina, obsahuje antikodon



Fáze transkripce

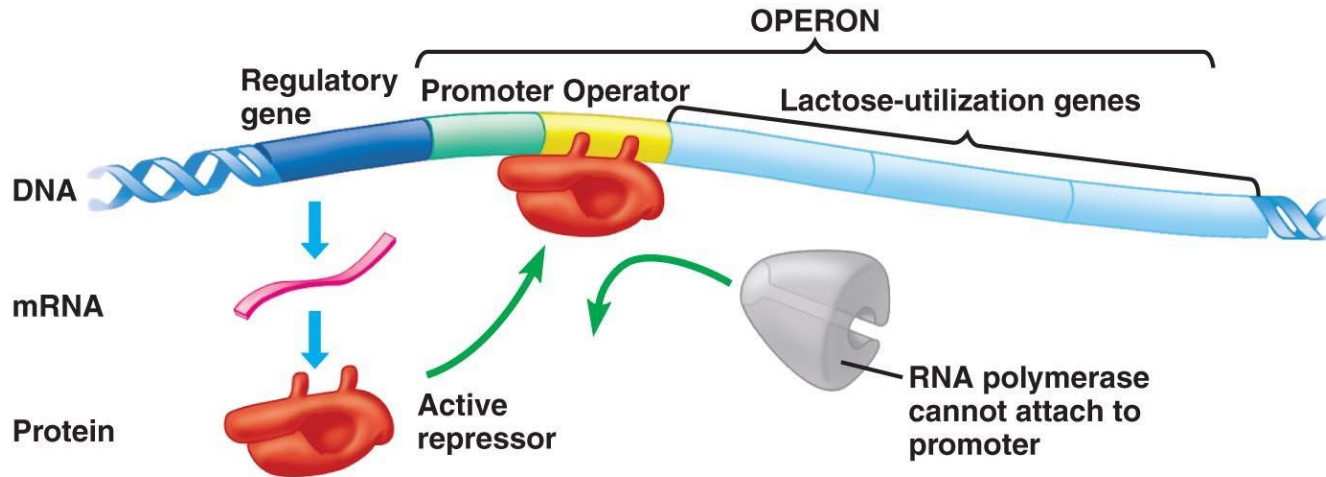
- 1. Iniciace:** Navázání RNA-polymerázy na promotor a zahájení syntézy
- 2. Elongace:** Připojování nukleozid-5'-monofosfátu k 3'-konci RNA řetězce podle matricového řetězce
- 3. Terminace:** Zastavení elongace na terminátoru a uvolnění z matricového řetězce





Operon:

- Transkripční jednotka, která je spolu s promotorem řízena také operátorem
- Mezi promotorem a startovacím nukleotidem se nachází regulační oblast - OPERÁTOR.
- Na operátor se může vázat regulační protein - REPRESOR. Ten zastavuje transkripci



Operon turned off (lactose absent)

Copyright © 2009 Pearson Education, Inc.

Operon: transkripční jednotka řízená promotorem a operátorem
Operátor: regulační oblast na DNA, na níž se může vázat represor
Transkripční jednotka: oblast na DNA, která se přepisuje do mRNA

Promotor:

Sekvence na DNA před transkripční jednotkou, nasedá na něj RNA-polymeráza

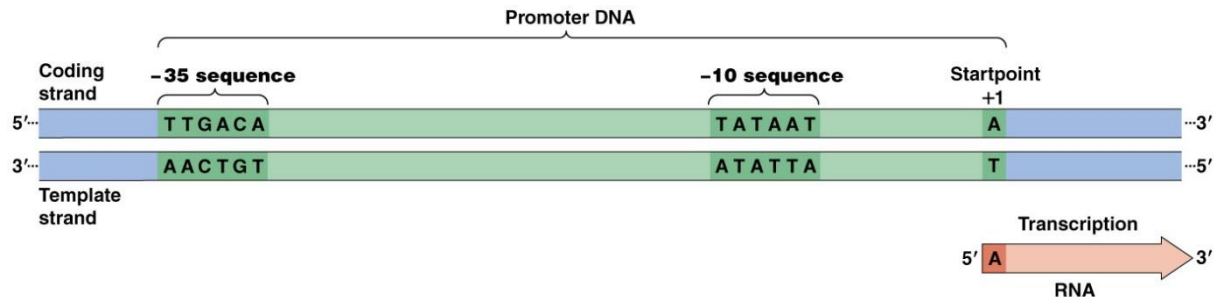
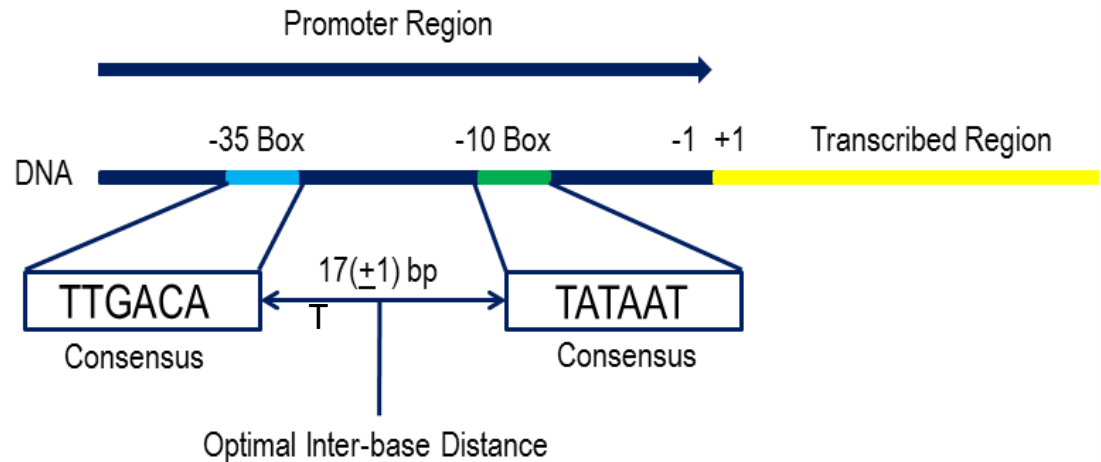
- Podobné u všech transkripčních jednotek, ale ne totožné. Liší se mírou afinity k RNA-polymeráze.
- Silný/slabý promotor - vysoká/nízká frekvence iniciace transkripce
- Silnější promotor se více blíží konvenční sekvenci v místech:

a) kolem nukleotidu -35:

5' TTGACAT 3'

b) Pribnowův box* (-10):

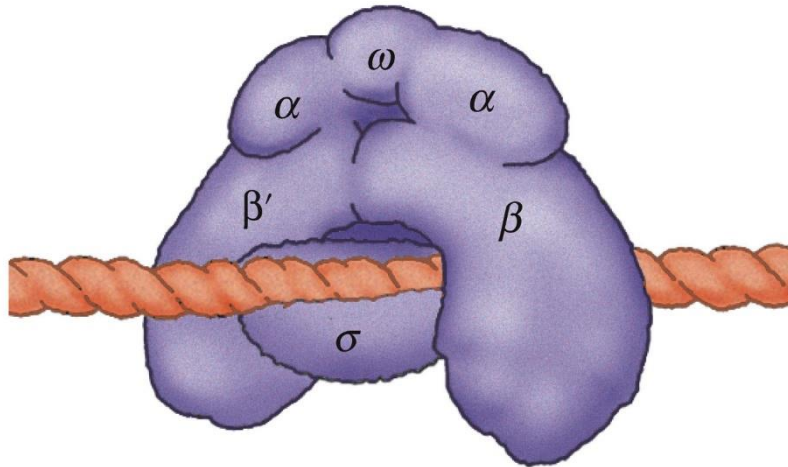
5' TATAAT 3'



*Podobný TATA boxu u eukaryot

Bakteriální RNA-polymeráza

- Rozeznává promotory všech transkripčních jednotek
- Složena z podjednotek (holoenzym):
 - 2 α : udržují stabilitu molekuly
 - 1 β : umožňuje vazbu ribonukleotidů na polymerázu
 - 1 β' : umožňuje spojení polymerázy s matricovým DNA řetězcem
 - 1 ω (omega) stabilizuje molekulu
 - 1 σ (sigma faktor): podmiňuje vazbu RNAP na **promotor**. Nemá katalytickou funkci, bez ní polymeráza funguje, ale začíná na libovolném místě



THE CELL, Fourth Edition, Figure 7.1 © 2006 ASM Press and Sinauer Associates, Inc.

Holoenzym: enzym se všemi kofaktory (podjednotkami) nutnými k jeho funkci; úplný enzym

Apoenzym: enzym, který vyžaduje kofaktory pro svoji funkci, ale nemá je; momentálně nefunkční

1. Iniclace

Navázání RNA-polymerázy (sigma faktoru) na promotorové sekvence -35 (rozpoznávací) a Pribnowův box -10 (otevřít binární komplex)

a) tvorba "Uzavřeného transkripčního binárního komplexu" (holoenzym RNA-polymerázy + promotorová oblast dsDNA) - řetězce dsDNA ještě nejsou rozvinuty

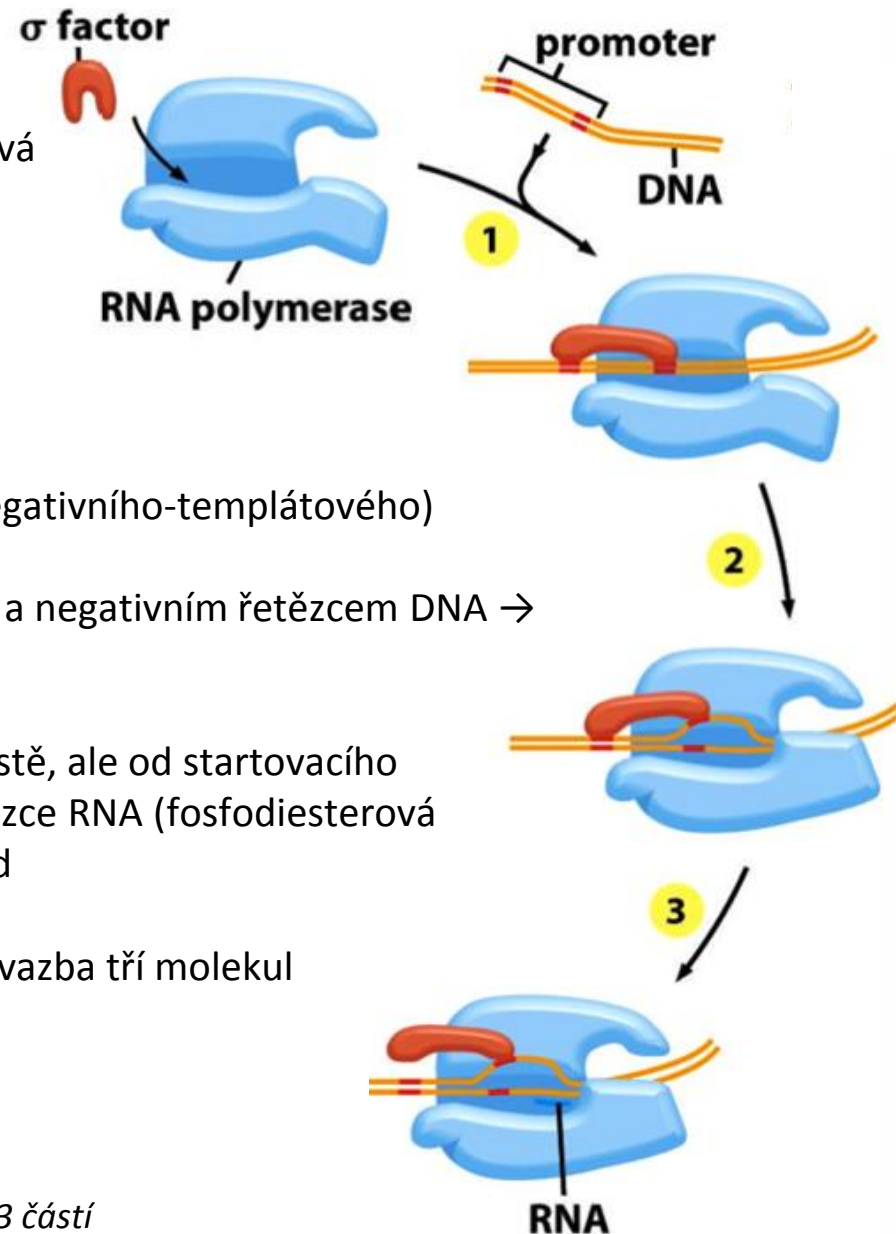
b) RNA-polymeráza v komplexu mění konformaci, prodlužuje se a pokrývá gen v rozsahu -50 až +20 bp

c) RNA-polymeráza se váže na oba řetězce DNA, ale pevněji na pozitivní-kódující (přepisuje se podle negativního-templátového)

d) V Pribnowově boxu se uvolňují vazby mezi pozitivním a negativním řetězcem DNA → otevřený binární komplex

e) Při iniciaci transkripce zůstává RNA-polymeráza na místě, ale od startovacího nukleotidu (+1) začíná katalyzovat tvorbu nového řetězce RNA (fosfodiesterová vazba mezi dvěma ribonukleotidy) → první dinukleotid

f) Otevřený transkripční ternární (ze tří částí) komplex = vazba tří molekul (1. DNA, 2. RNA-polymeráza, 3. RNA)

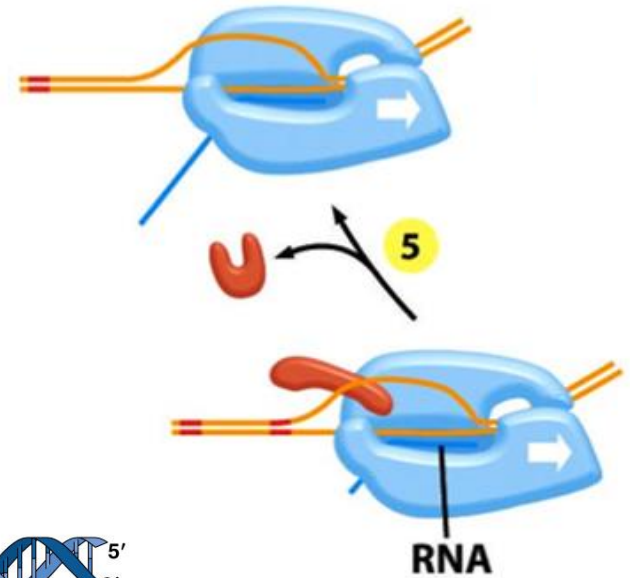
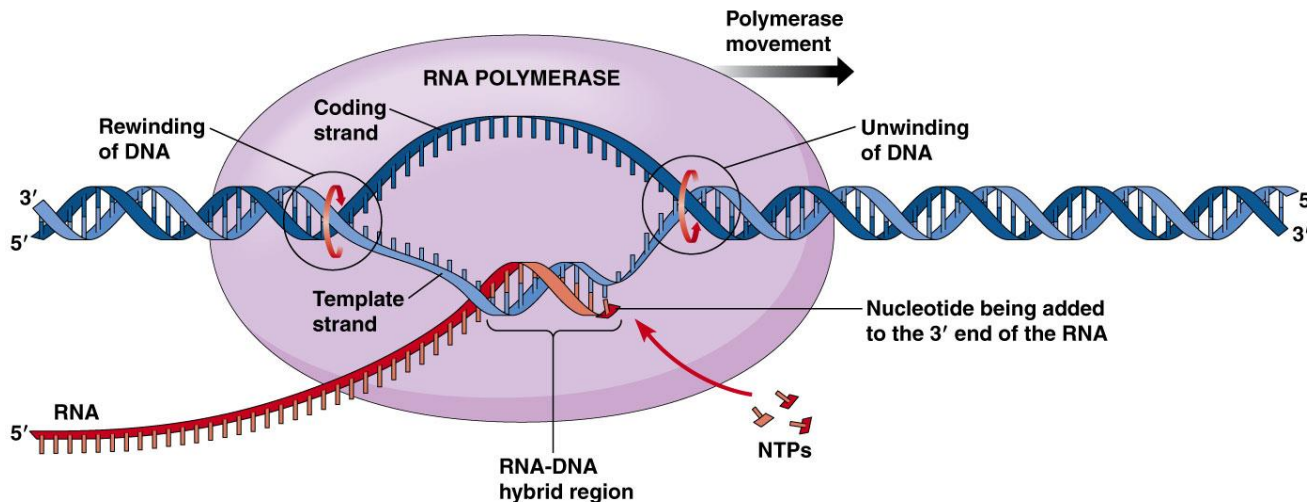


Latinsky: "binarius" = složený ze 2 částí; "ternarius" = složený ze 3 částí

2. Elongace

Prodlužování RNA

- Katalyzována RNA-polymerázou bez Sigma-faktoru (uvolňuje se po vytvoření počátečního fragmentu RNA a je nahrazen NusA-proteinem)
- RNA-polymeráza se posunuje po negativním řetězci DNA (40 nukleotidů/sek; 37°C) směrem od 3' → 5'-konci DNA
- cca 18bp dlouhá rozvinutá oblast DNA; hybrid RNA-DNA dlouhý cca 2-5bp
- RNA v hybridní dvojšroubovici se pevněji váže k RNA-polymeráze než k DNA
- Syntéza RNA řetězce směrem od 5' → 3'-konci
- S NusA proteinem dorazí RNA-polymeráza až k terminátoru



Průběh transkripce bakteriálního genomu

3. Terminace

Zastavení pohybu RNA-polymerázy - uvolnění hotové RNA - uvolnění RNA-polymerázy

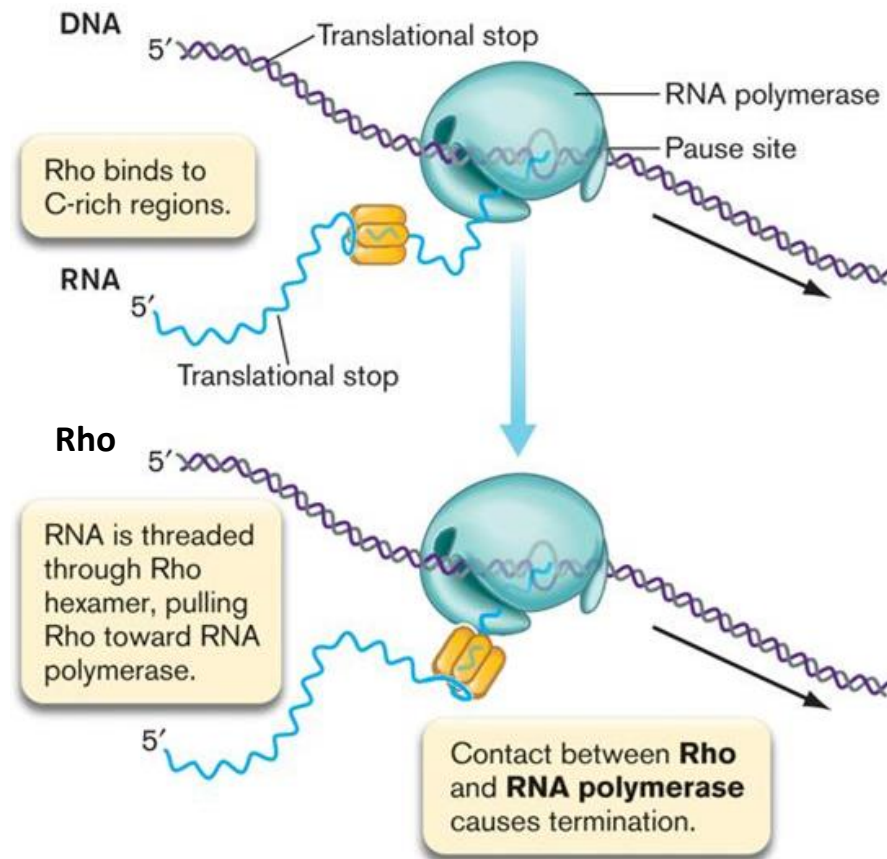
A) závislá na Rho-faktoru

B) nezávislá na Rho-faktoru

Rho-faktor: protein katalyzující uvolnění dokončeného RNA-řetězce z templátového (negativního) DNA-řetězce

3A) Terminace závislá na Rho-faktoru

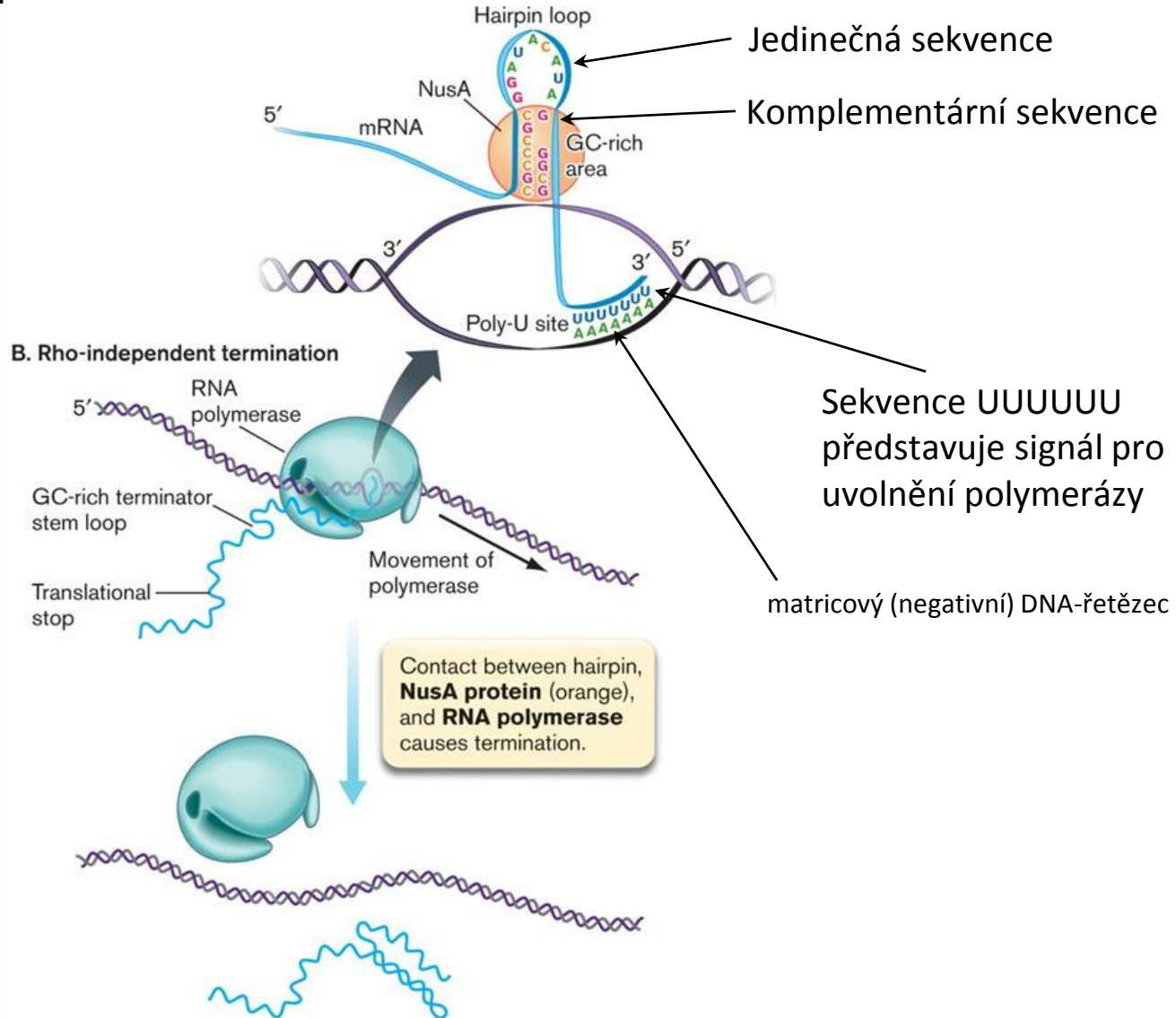
- Rho protein aktivní ve formě hexameru
- váže se během transkripce na 5'-konec mRNA a pohybuje se za RNA-polymerázou
- v terminátoru se RNA-polymeráza zastaví, rho-faktor ji dostihne
- Rho-faktor katalyzuje uvolnění mRNA z DNA-řetězce a uvolnění RNA-polymerázy (za spotřeby ATP)



Rho-faktor: protein katalyzující uvolnění dokončeného RNA-řetězce z matricového (negativního) DNA-řetězce

3B) Terminace nezávislá na Rho-faktoru

- Tvorba vlásenky na RNA, na konci se sekvencí UUUUUU - nestabilní hybrid DNA-RNA → rozpad
- Uvolnění NusA-proteinu



Strukturní geny – mRNA

Překládají se do polypeptidu

- Transkripcí transkripční jednotky obsahující **strukturní geny** vzniká **mRNA**

- mezi promotorem (popř. za operátorem) a prvním strukturním genem leží **vedoucí sekvence s Shineovou-Dalgarno sekvencí**, která zajišťuje vazbu na ribozom a nepřekládá se.

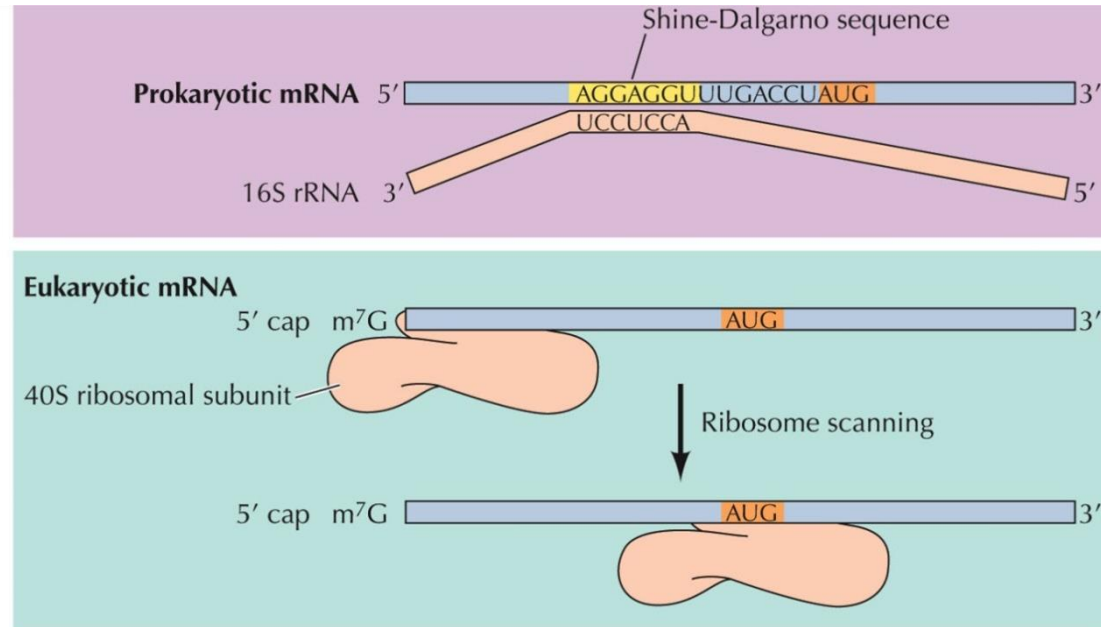
Shineova-Dalgarno sekvence v mRNA:

5' AGGA 3'

- vazba na ribozom (k 16 S-rRNA podjednotky 30S):

3' UCCU 5'

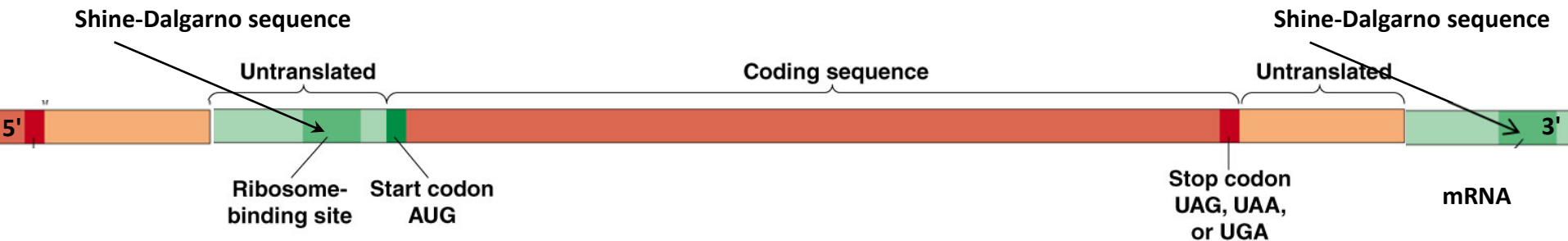
- pokud primární transkript neobsahuje Shineovu-Dalgrinovu sekvenci, nemůže se vázat k ribozomu a působí jako funkční RNA



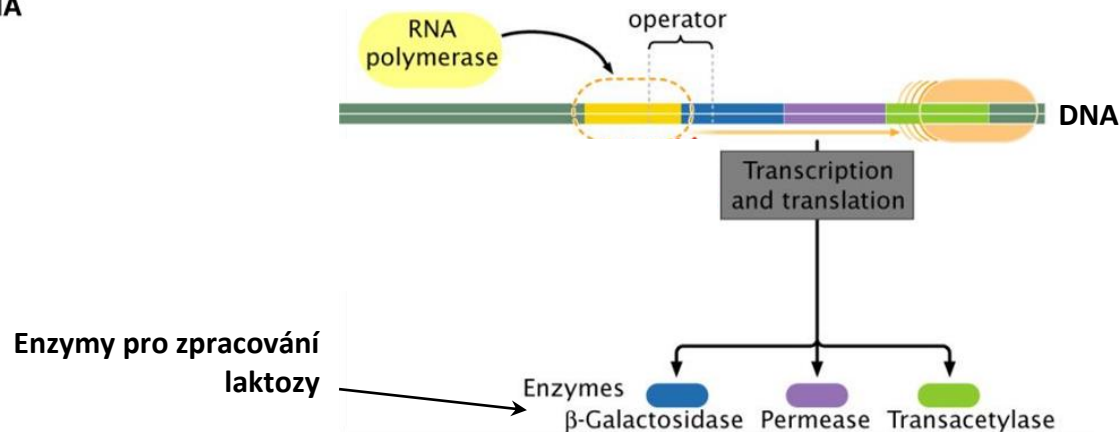
Funkční RNA: RNA, které nejsou určeny k translaci (tRNA, rRNA)

mRNA se strukturními geny

- Na 5'-konci obsahuje přepis vedoucí sekvence s Shineovou-Dalgarnovou sekvencí, nepřekládá se
- Na 3'-konci za stop-kodonem obsahuje nepřekládanou sekvenci
- Jeden strukturní gen se překládá do jedné molekuly polypeptidového řetězce
- U prokaryot jsou geny polycistronní (více genů na jednom transkriptu mRNA)
 - každý gen na transkriptu obsahuje svůj start a stop kodon a svou Shine-Dalgarno sekvenci pro vazbu ribozomu
 - na DNA mají jeden společný promotor a jednu terminační sekvenci na 3'-konci. Promotor není součástí transkripční jednotky.

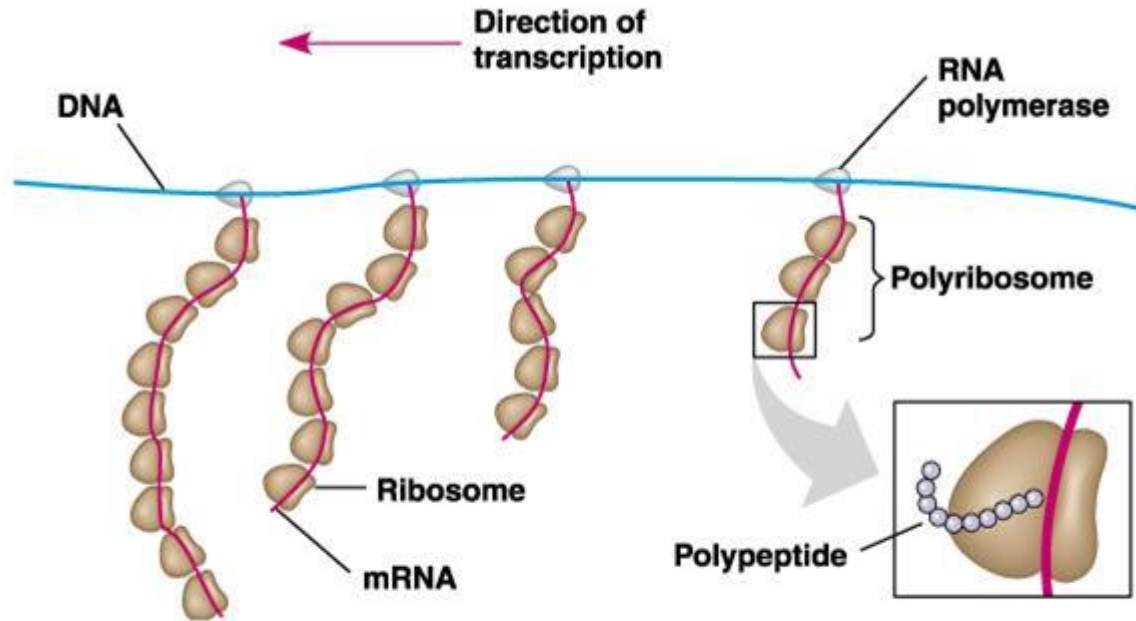


(a) Bacterial mRNA



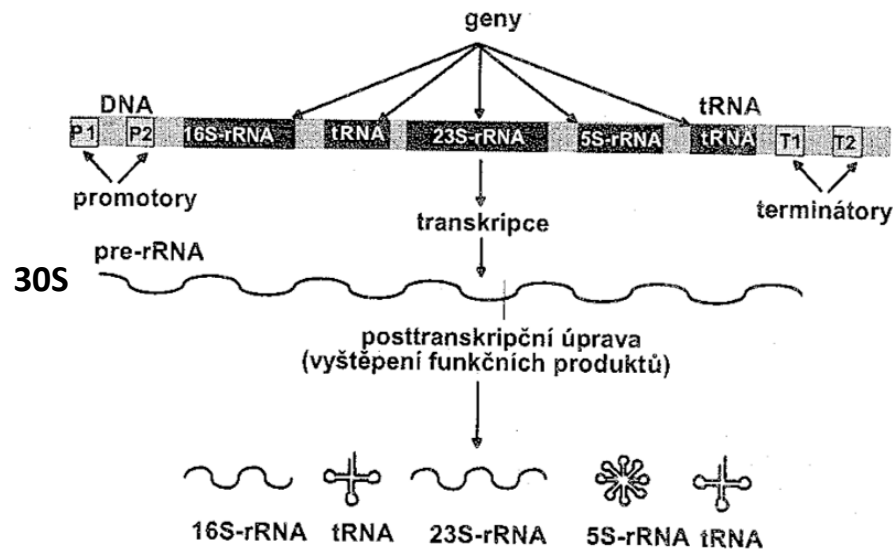
Bakteriální mRNA

- **posttranskripčně se neupravuje** a slouží přímo pro tvorbu polypeptidu
- rozpad během několika minut účinkem ribonukleázy (RNázy) ve směru 5' → 3'
- **translace** molekuly mRNA na ribozomu probíhá **současně s její transkripcí**. Polypeptidový řetězec se začne syntetizovat ještě před ukončením transkripce
- rychlosti: 40 nukleotidů za sekundu; 13 aminokyselin za sekundu; až 15 iniciací transkripce za minutu u jedné transkripční jednotky
- **Polyribosom**: více ribozomů na jedné mRNA urychluje transkripci
- **Spojení transkripce s translací** umožňuje efektivní syntézu proteinů (např: 15 molekul mRNA, každá pokryta 30 ribozomy)



Bakteriální rRNA

- geny pro rRNA na chromozomu v 5-9 kopiích
- každá transkripční jednotka má 2 promotory (P1, P2) a 2 terminátory (T1, T2)
- mezi některými geny jsou vmezeřeny geny pro tRNA
- nejprve přepis do pre-rRNA: sedimentační koeficient 30S
- 30S jsou štěpeny RNázou III na sekvence 5S, 16S a 23S

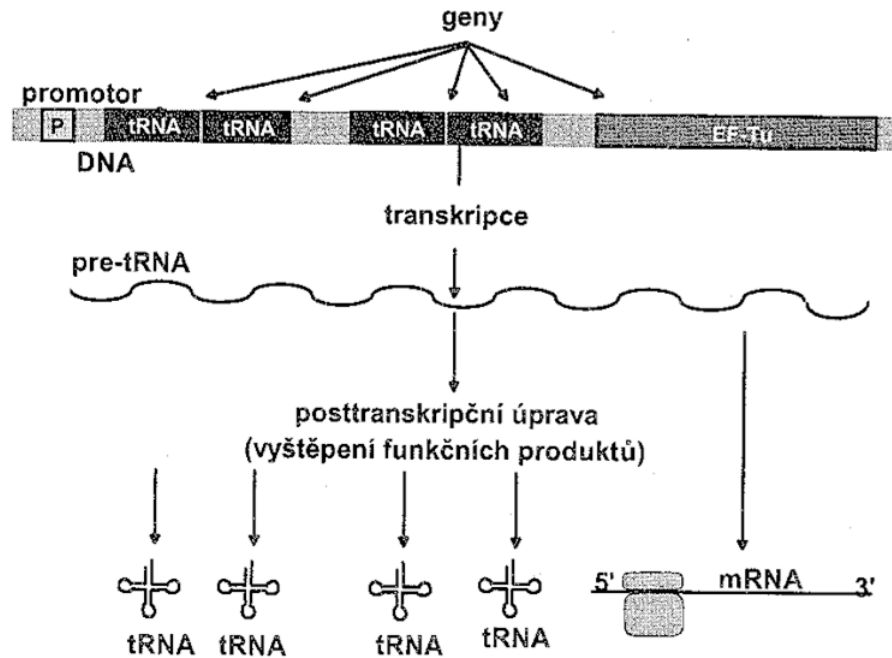


Jednotka S (Svedberg) - sedimentační koeficient

(veličina udává čas, za který proběhne sedimentace dané makromolekuly při její ultracentrifugaci)

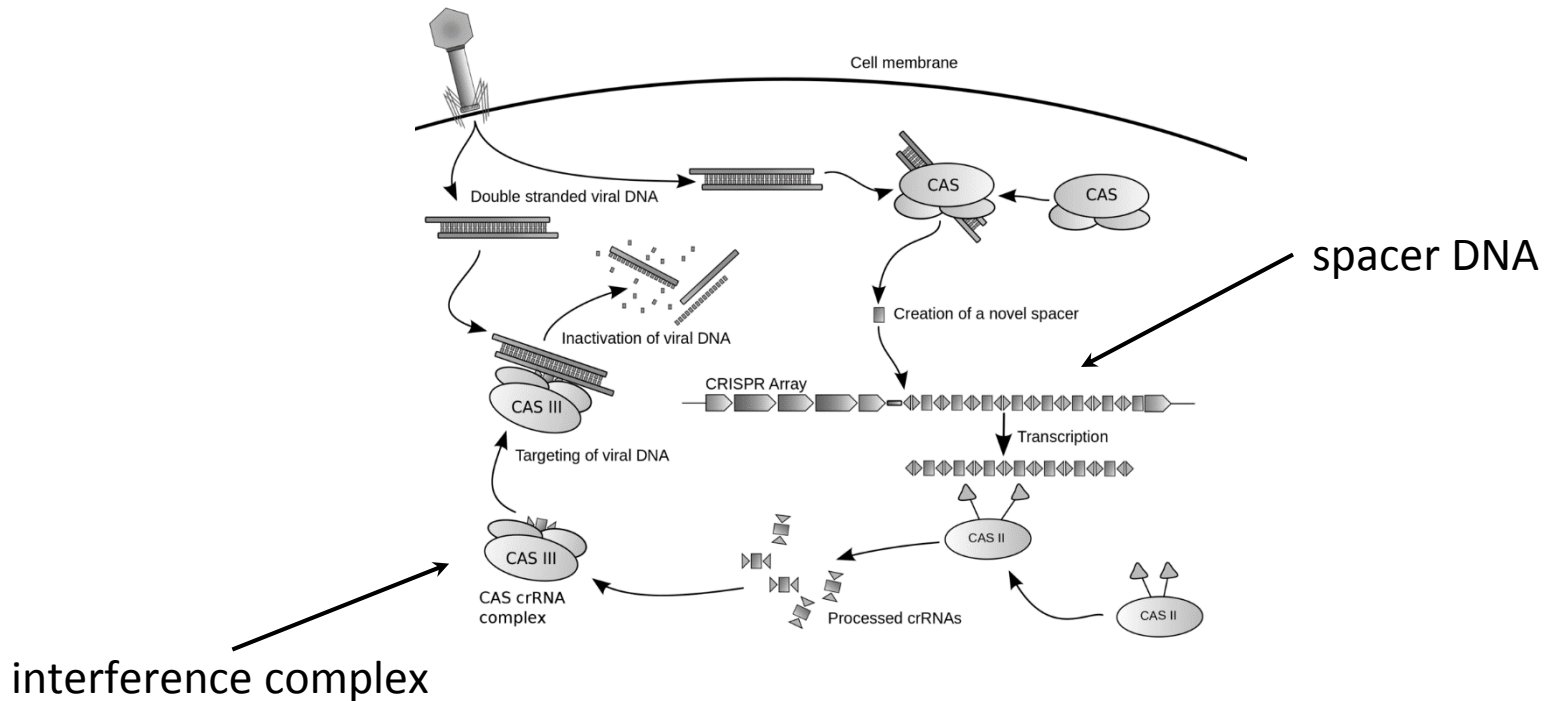
Bakteriální tRNA

- u E coli 2 multigenní transkripční jednotky s geny pro tRNA
- jen jeden promotor, poslední gen je strukturální (např. pro elongační faktor EF-Tu)
- strukturální gen umožňuje vazbu na ribozom, protože obsahuje Shineovu-Dalgarnovu sekvenci



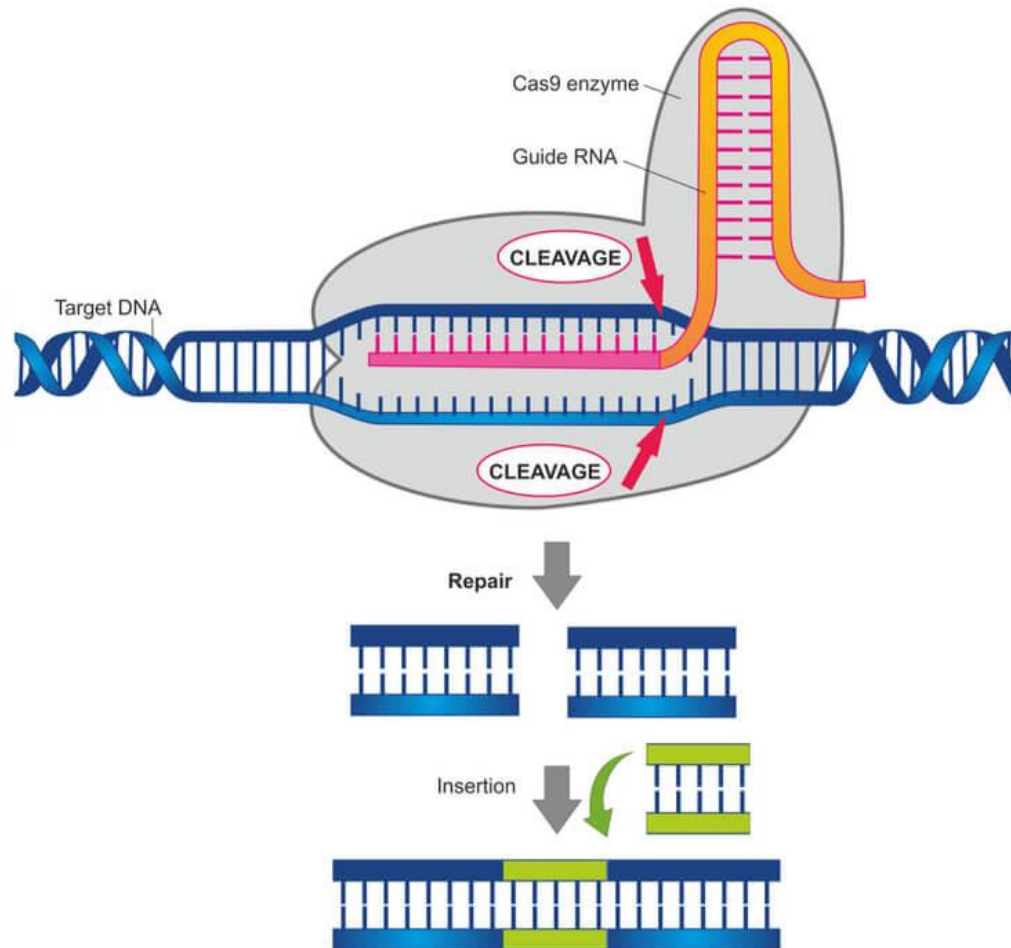
CRISPR (Clustered regularly-interspaced short palindromic repeats)

- adaptivní (získaná) imunita bakterií - obrana cizímu genetickému materiálu (např. virální DNA)
- segment prokaryotické DNA se "**spacer DNA**" obsahujícími části DNA virů z předešlých infekcí
- při nové infekci je třeba vytvořit novou "spacer DNA"
- **Transkripce do crRNA (CRISPR RNA)**, komplementární s virovou DNA, spolu s CAS (crispr-associated) proteiny
- crRNA s CAS proteiny tvoří "**interference komplexy**"
- párování s odpovídající sekvencí virové DNA a její inaktivace



CRISPR-Cas9

Velké uplatnění v editaci lidského genomu: vhodná guide RNA + Cas9 protein štěpí DNA ve zvoleném místě (inaktivace nebo vložení jiné sekvence)



CRISPR-Cas9: a Bacterial Immune System Repurposed as a Transformative Genome Engineering Technology

by *Emmanuelle Charpentier*

(*Max Planck Institute for Infection Biology, Berlin, Germany*)

Professor Charpentier is best known for her role in deciphering the molecular mechanisms of the bacterial **CRISPR/Cas9** immune system and repurposing it into a **tool for genome editing**. In collaboration with Jennifer Doudna's laboratory, Charpentier's laboratory showed that Cas9 could be used to make cuts in any DNA sequence desired



Emmanuelle Marie Charpentier (born 11 December 1968) is a French professor and researcher



Mendelův refraktář, Mendelovo muzeum



Nobelova cena za chemii 2020

Emmanuelle Charpentier a Jennifer Doudna

“for the development of a method for genome editing”



Objev CRISPR/Cas9 genetických nůžek: nástroj na přepisování genetické informace

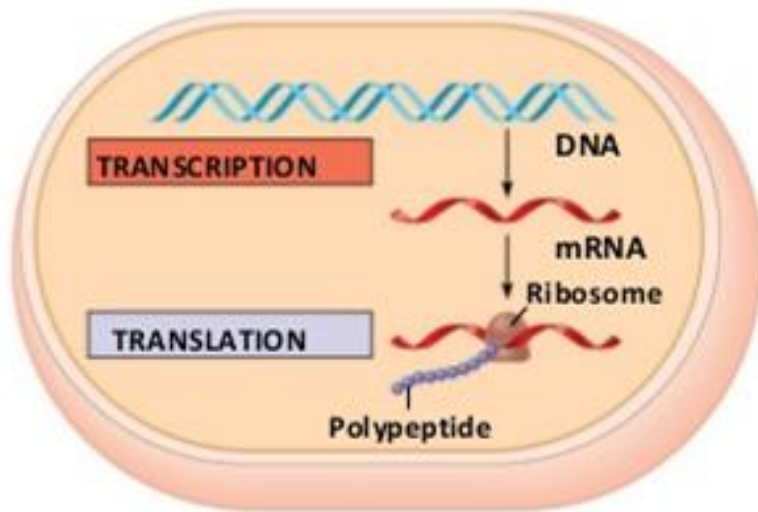
2011 Nature: CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III

- lidský patogen *Streptococcus pyogenes* používá CRISPR/Cas9 jako primitivní imunitní systém

2012 Science: A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity

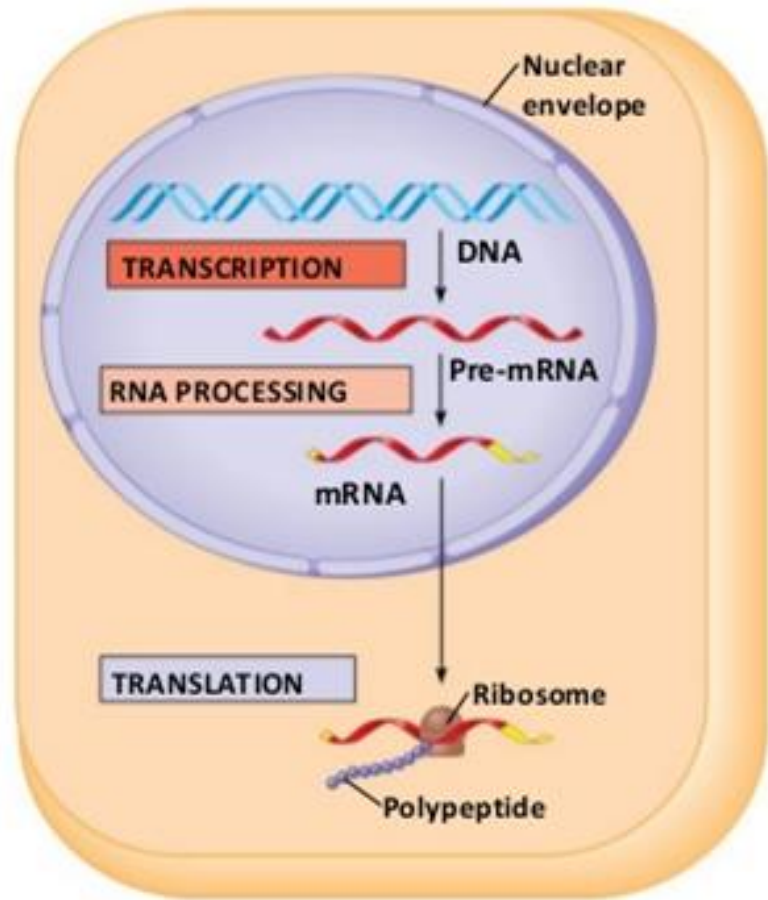
- štěpení DNA v přesně zvoleném místě (site-specific DNA cleavage) – genomová editace

2. Transkripce eukaryotického genomu



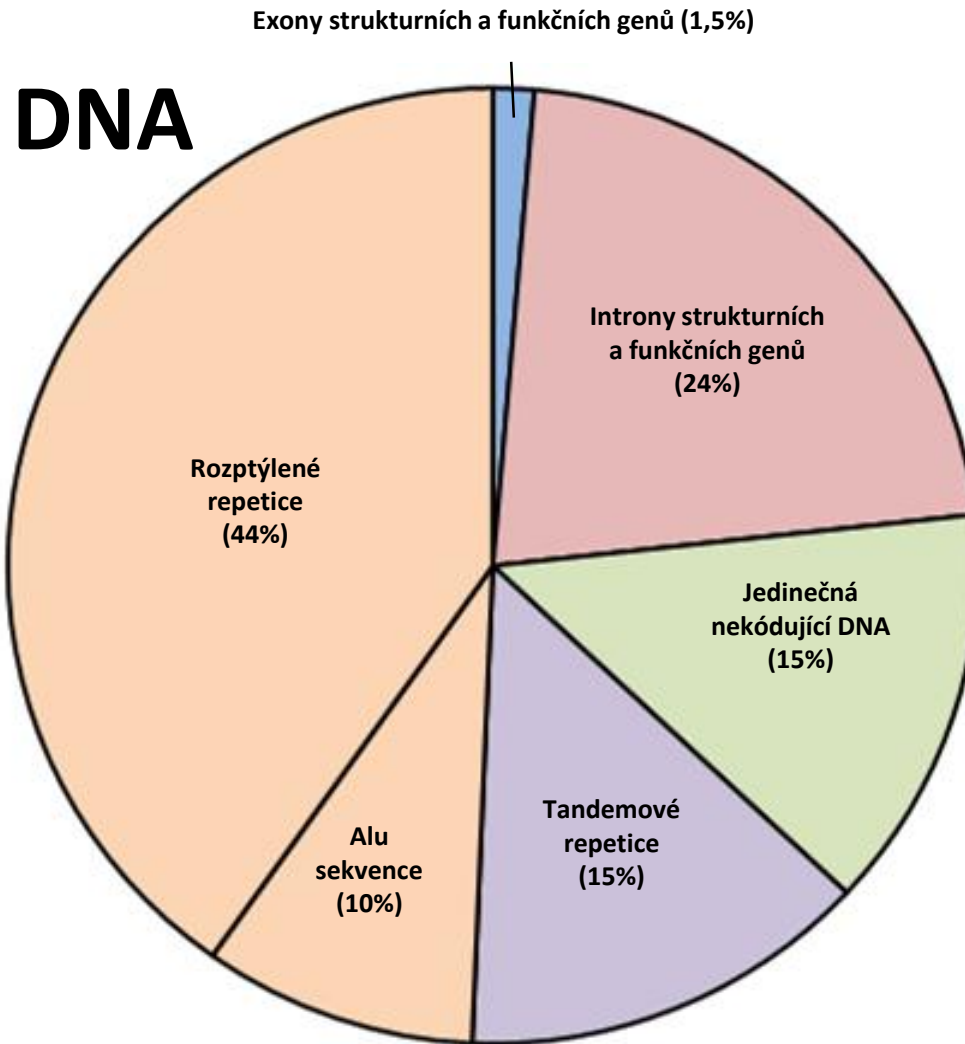
(a) Bacterial cell

© 2011 Pearson Education, Inc.



(b) Eukaryotic cell

Rozlišujeme transkripci jadernou, mitochondriální a chloroplastovou.



Alu sekvence - transpozónální DNA (schopná měnit pozici), funkce větš. neznámá, hraje roli při buň. Dělení Prokaryota nemají mitochondrie ani chloroplasty

Polycistronní vs. monocistronní mRNA

Na rozdíl od prokaryot mají eukaryota pouze monocistronní mRNA

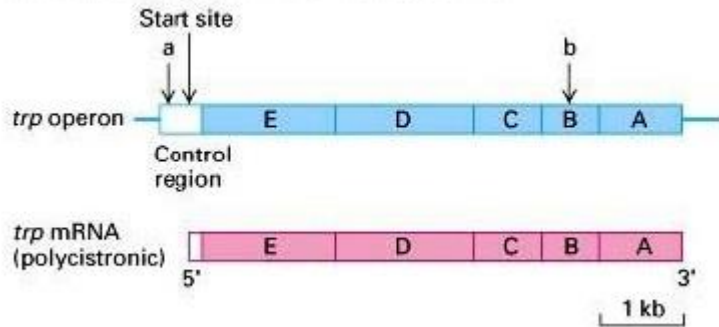
Eukaryotická mRNA

- obsahuje kódující sekvenci pouze pro jeden polypeptid (monocistronní)
- jeden iniciační a jeden terminační kodon

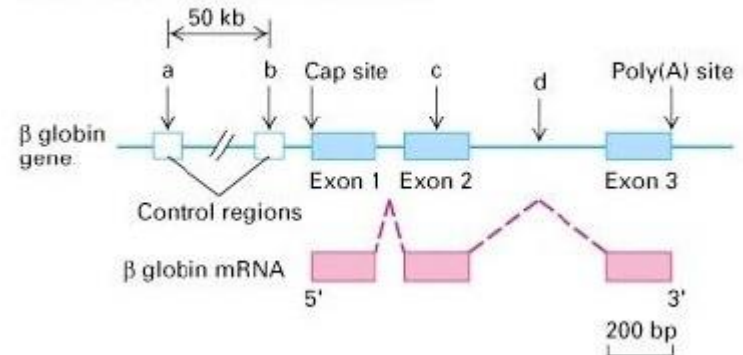
Prokaryotická mRNA

- obsahuje kódující sekvenci pro několik genů, většinou jedné metabolické dráhy
- mRNA transkript obsahuje hodně iniciačních a terminačních kodonů

(a) Prokaryotic polycistronic transcription unit



(b) Eukaryotic simple transcription unit



Typy RNA

1. Kódující RNA

- **pre-mRNA: prekurzorová mRNA (též hnRNA - heterogenní jaderná RNA)**
 - primární transkript obsahující přepisy strukturních genů
 - je upravován do mRNA

2. Nekódující RNA

- **pre-rRNA: prekurzorová ribozomová RNA**
 - posttranskripční úpravou se štěpí na
 - a) 5,8S-rRNA, 18S-rRNA a 28S-rRNA u savců
 - b) 5,8S-rRNA, 16S-rRNA a 25S-rRNA u rostlin
- **pre-tRNA: prekurzorová transférová RNA**
 - štěpí se na různé druhy tRNA
- **5S-rRNA: tvoří se transkripcí genů pro 5S-rRNA**
- **Malé RNA: Nízkomolekulární stabilní RNA (80-300 nukleotidů)**
 - řídí sestřih a posttranskripční úpravy pre-RNA (katalyzovány RNA-polymerázami II a III)
 - a) malé jaderné RNA (snRNA)
 - b) malé jadérkové RNA (snoRNA)
 - c) malé cytoplazmatické RNA (scRNA)
 - d) regulační RNA (miRNA a siRNA)

snRNA se účastní sestřihu pre-mRNA ve spliceozomu; Jadérko – místo tvorby ribosomu

Transkripční faktory (TF)

- regulační proteiny
- vážou se na regulační oblasti promotoru nebo zesilovače (enhancer) transkripce
- nutné pro zahájení transkripce
- působí ve skupině, nasednou na promotor a na ně se váže RNA-polymeráza

Typy TF:

1. Obecné TF: ve většině eukaryot, geny potřebné pro základní funkce všech buněk
2. Speciální TF: vyskytují se v určitých tkáních v určitý čas

Transkripční aktivita = rychlost syntézy RNA: počet primárních transkriptů za minutu

1. Bazální transkripční faktory:

- nízká aktivita, minimální požadavky buňky
- umožňují zahájení transkripce

2. Konstitutivní transkripční faktory:

- zvýšená aktivita
- konstitutivní TF se přidávají k bazálním TF

3. Indukovatelné transkripční faktory:

- úprava transkripční aktivity v reakci na vnější podmínky
- význam při diferenciaci

Eukaryotické DNA-dependentní RNA-polymerázy

Každá má svůj specifický promotor (bakterie jeden typ RNA-polymerázy a jeden typ promotoru)

1. RNA-polymeráza I

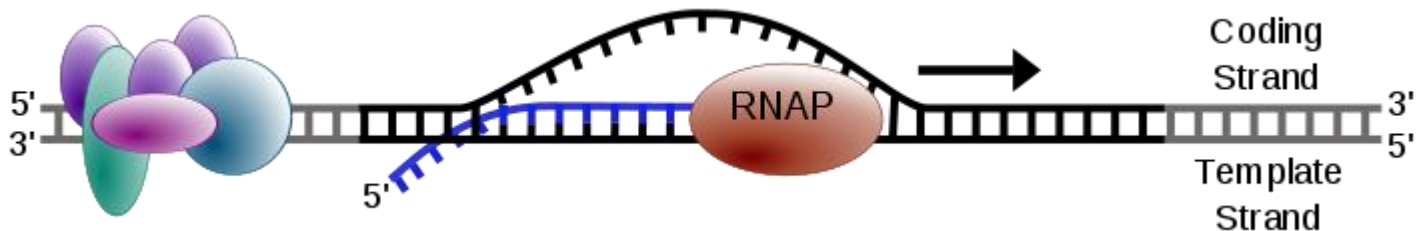
- katalyzuje syntézu pre-rRNA
- pouze v jadérku*

2. RNA-polymeráza II

- syntéza mRNA (strukturní geny) a malých RNA
- v jádře

3. RNA-polymeráza III

- syntéza pre-tRNA, 5S-rRNA a malých RNA
- v jádře



*v jadérku se skládají ribozomy z proteinů a rRNA

Promotor pro RNA-polymerázu II obsahuje krátké sekvence

1. TATA-box (též Hognessův box): T A T A A A

-34 až -26 od startovacího nukleotidu

- vazba TF **TFIID** - specificky rozeznáván RNA-polymerázou II

2. CAAT-box: G G C C A A T C T

- nukleotidy -75 až -80

- vazba TF **CTF/NF1**, zvyšuje sílu promotoru (enhancer)

3. GC-box: G G G C G G

- nukleotid -90

- vazba TF **SP1**, zvyšuje sílu promotoru (enhancer)

- je fosforylován proteinkinázou vázanou na DNA - stimulace tvorby přediniciačního komplexu

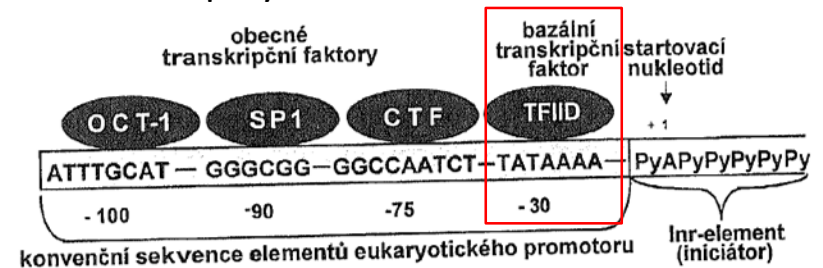
- umožňuje vazbu TFIID na TATA-box

4. Oktamer: A T T T G C A T

- váže se na konstitutivní TF **OCT-1**

5. Startovací nukleotid: Iniciátor (Inr-element)

- obvykle **A** uvnitř úseku s pyrimidinovými bazemi (C nebo T)



Promotory různých genů se liší počtem, umístěním a kombinací těchto elementů. Všechny promotory však musí obsahovat jeden nebo více elementů, aby mohly zahájit bazální transkripci.

Provozní geny mají jen Inr-element bez TATA-boxu (Hognessův box).

Tyto se vyskytují ve většině promotorů RNA-polymerázy II

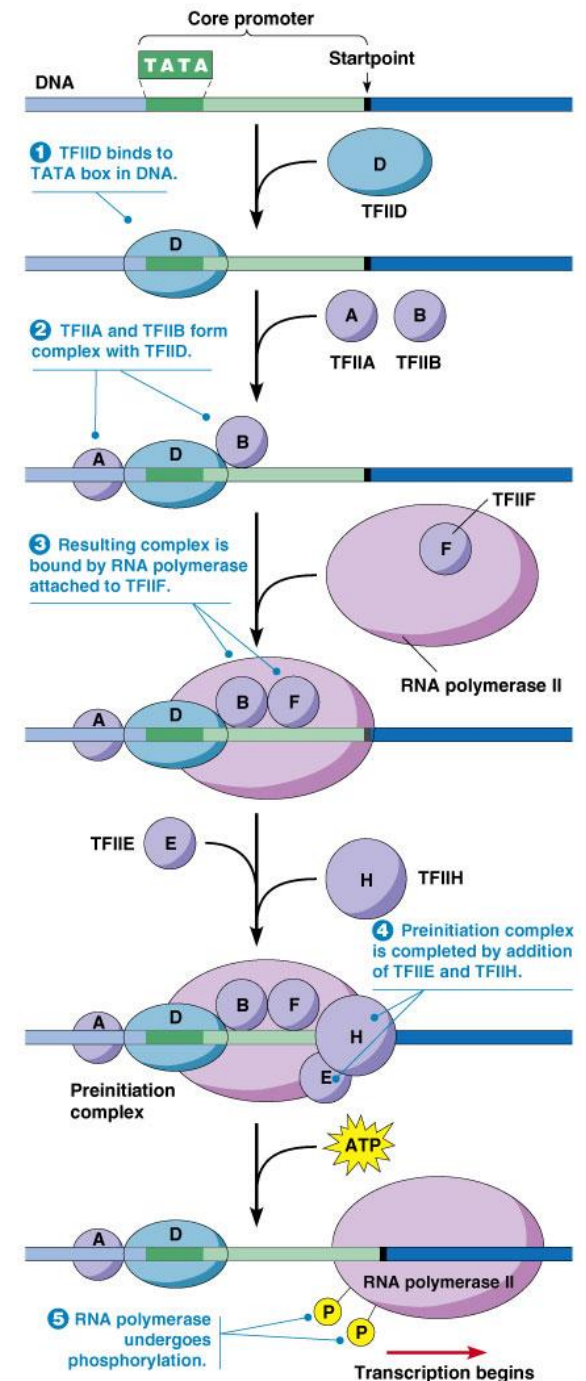
Iniciace transkripce polymerázou II

- Transkripční faktor **TFIIF** umožňuje umístění RNA-polymerázy na promotor (3.)
- Uzavřený transkripční komplex je ještě inaktivní (3.)
- Transkripční komplex je aktivován až **TFIIH** fosforyluje RNA-polymerázu (4, 5)
- Všechny TF kromě TFIID a TFIIA se uvolní a aktivní RNA-polymeráza elonguje pre-mRNA (hnRNA) (5.)

Význam transkripčních faktorů:

"Umožňují rozeznat místa, kam se má navázat RNA-polymeráza II a aktivují ji."

Pokud promotor nemá TATA-box, začíná transkripce na Inr-elementu

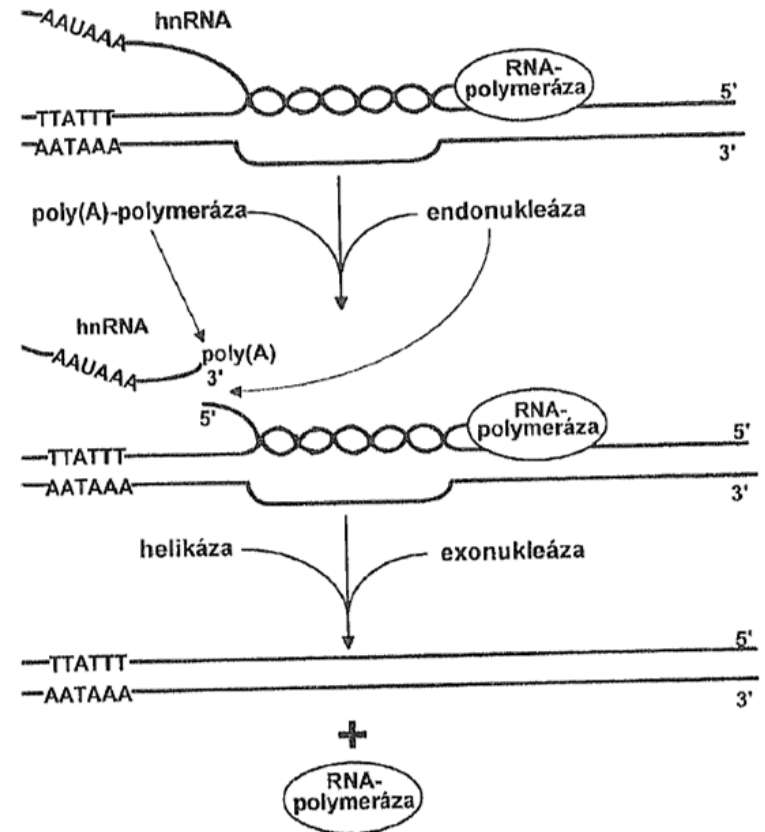


Terminace transkripce polymerázou II

Polyadenylační signál: T T A T T T na negativním řetězci DNA

- do pre-mRNA přepsán jako A A U A A A
- označuje terminaci transkripce
- sekvence je rozeznána endonukleázou - štěpí 10-30 nukleotidů za signálem
- poly(A)-polymeráza katalyzuje polyadenylaci 3'-konce
- helikáza rozdělí zbytek hybridní DNA-RNA a zbytková RNA je rozštěpena exonukleázou

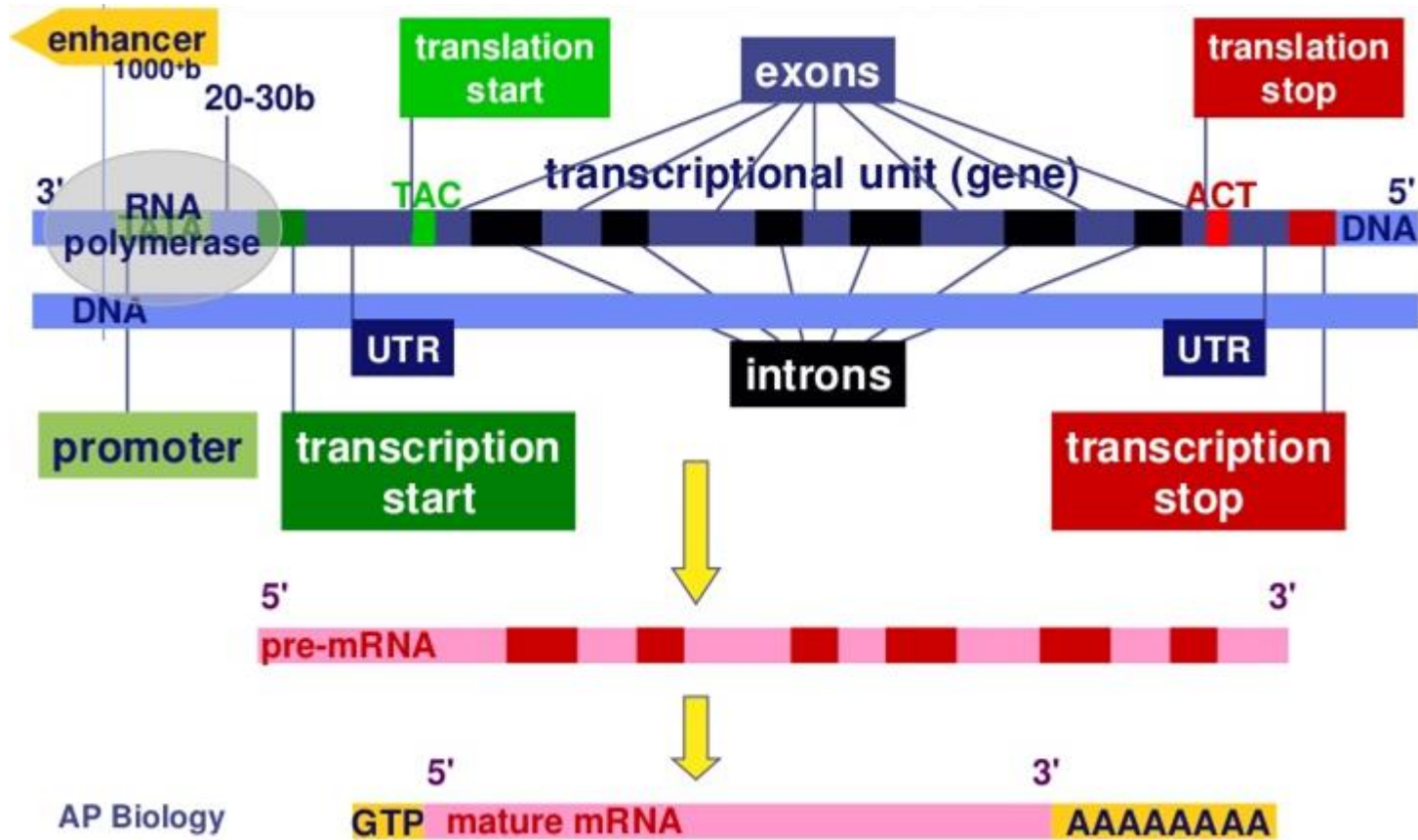
[Video: Eukaryotická transkripce](#)



Exonukleáza: štěpí nukleotidy od krajů

Endonukleáza: štěpí nukleotidy od prostředku

Helikáza: oddaluje řetězce DNA nebo RNA



RNA polymeráza nasedá na TATA box

UTR - untranslated region

Eukaryotické mRNA jsou monocistronní - obsahují kodující sekvenci pouze pro jeden polypeptid

Translace:

- začíná na mRNA na "sekvenci Kozakové" CAAAAUG (což na DNA odpovídá sekvenci TAC)

- končí na mRNA na stop kodonech UAG (Amber), UGA (Opal), UAA(Ochre) - na DNA odpovídá (ATC, ACT, ATT)

Regulační RNA

- krátké molekuly RNA se sekvencí komplementární k určitým částem mRNA nebo DNA
- působí mechanismem RNA interference (RNAi)
 - typicky **inhibují genovou expresi** vazbou na mRNA
 - 2006 Nobelova cena za fyziologii a medicínu pro A. Fire a C. Mello za výzkum RNAi
 - epigenetická **posttranskripční regulace** exprese a též **obrana buněk** proti parazitickým nukleotidovým sekvencím (např. RNA virům)
 - využívána ve výzkumu pro supresi exprese specifických genů

1. miRNA (microRNA; 22 nukleotidů)

- endogenní původ, transkripcí genomové DNA

2. siRNA (small inhibitory RNA; 20-25 nukleotidů)

- exogenní původ (např. virový)

siRNA a miRNA jsou si velmi podobné
Epigenetická regulace genové exprese



The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006



Photo: L. Cicero
Andrew Z. Fire
Prize share: 1/2

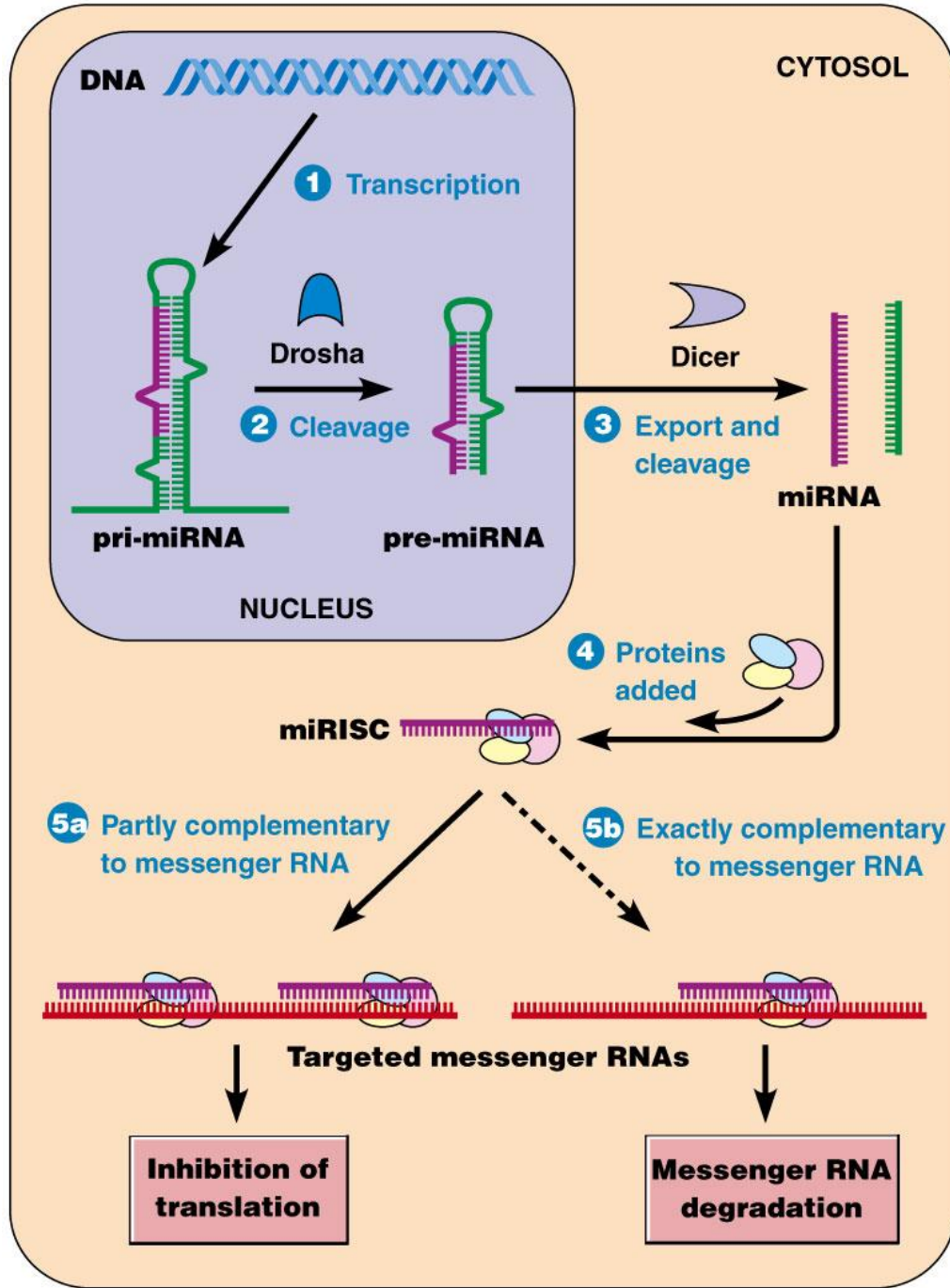


Photo: J. Mottern
Craig C. Mello
Prize share: 1/2

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006 was awarded jointly to Andrew Z. Fire and Craig C. Mello "for their discovery of RNA interference - gene silencing by double-stranded RNA"

1. miRNA (microRNA; 21-22 nukleotidů)

- vlásenka pri-miRNA je štěpena RNAázou "Drosha" na pre-miRNA (70 nukleotidů)
- export pre-miRNA do cytoplasmy - štěpení Dicerem na miRNA 21-22 nukleotidů
- spolu s proteiny tvoří tzv. miRISC (miRNA-induced silencing complex)

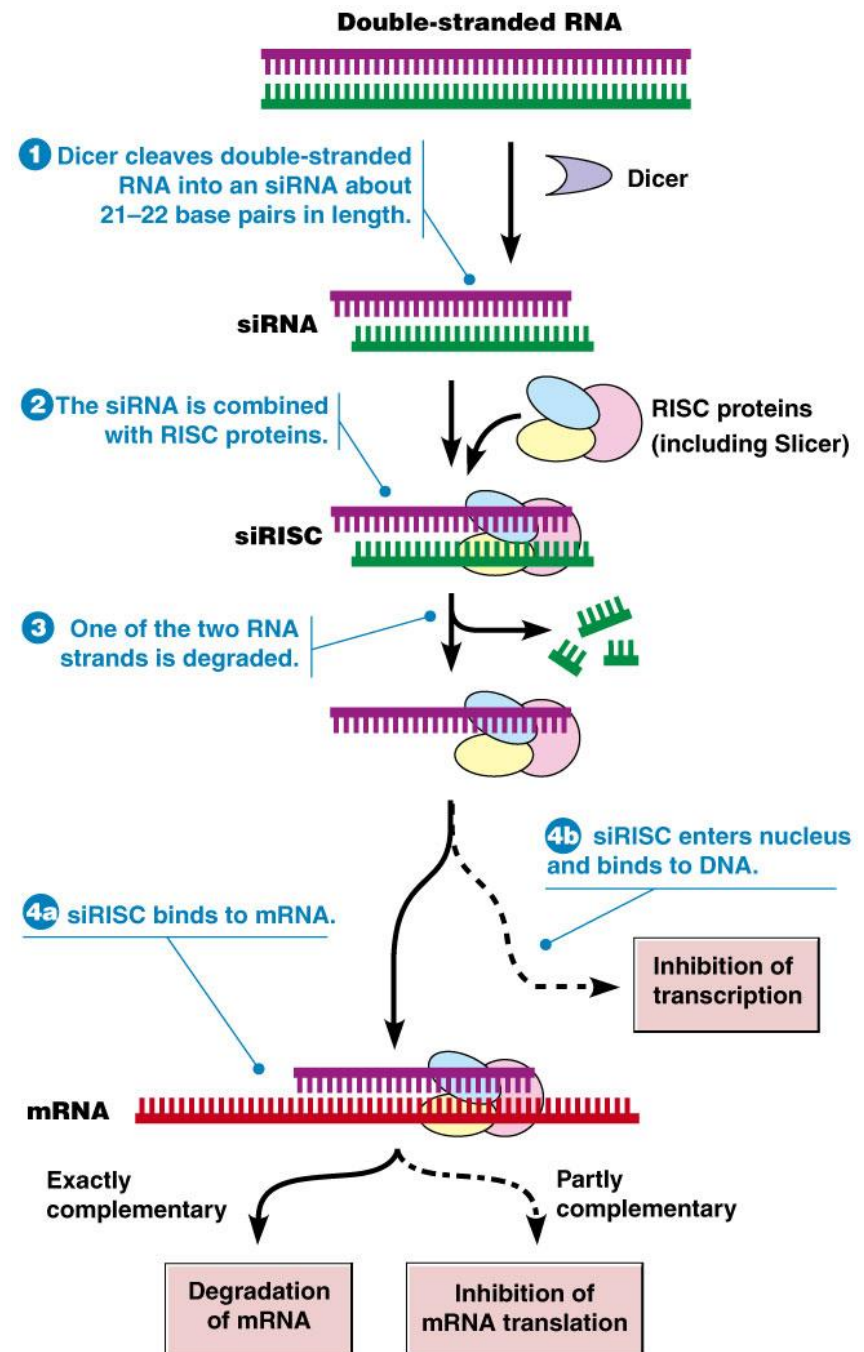


1. miRNA (microRNA; 21-22 nukleotidů)

- Funkce: RNA silencing a posttranskripční regulace genové exprese
- párování s komplementárními sekvencemi mRNA (nemusí být 100% komplementární)
- mechanismy silencingu:
 - a) štěpení řetězce mRNA na dva kusy (endonukleázami)
 - b) destabilizace mRNA zkrácením poly(A) konce (dřívější degradace exonukleázami)
 - c) snížení účinnosti translace do proteinu na ribozomu (fyzicky blokuje)
- vyskytuje se nejprve ve formě shRNA (short hairpin RNA) - štěpena enzymem zvaným "**Dicer**"
- lidský genom kóduje přes 1000 miRNAs - evolučně konzervované

2. siRNA (small inhibitory RNA; 20-25 nukleotidů)

- Funkce: posttranskripční RNA silencing
- dvojřetězec (štěpena také enzymem Dicerem)
- exogenní původ – např. **virový**
- spolu s proteiny tvoří tzv. siRISC (siRNA-induced silencing complex)
- jeden řetězec degradován
- vazba siRISC na cílovou mRNA
- při 100% párování s cílovou sekvencí se mRNA štěpí



3. Posttranskripční úpravy RNA a mechanismy sestřihu

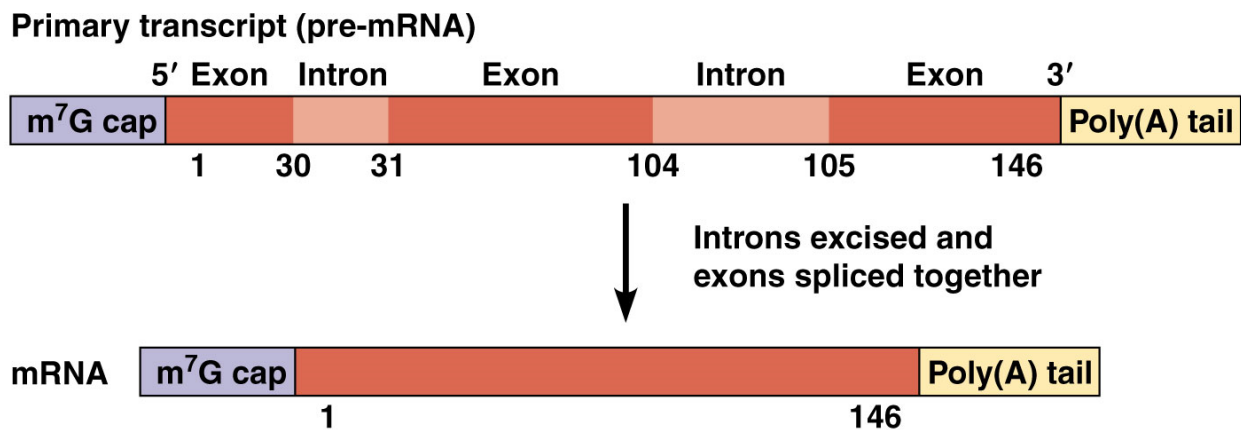
Posttranskripční úpravy

Primární transkripty jsou dlouhé molekuly a musí být zkráceny, aby mohly být transportovány z jádra do cytoplasmy

a) modifikace, které neovlivňují primární strukturu

- tvorba komplexů jaderné pre-mRNA s proteiny
- úprava 5'-konce pre-mRNA tzv. čepičkou
- polyadenylace 3'-konce pre-mRNA

b) úprava primární struktury (sestřih; editace; vystřížení intronů)



Intron (intragenic region): nekódující sekvence RNA uvnitř genu, která je vystřížena
Exon (expressed regions): kódující sekvence RNA, přeložená do proteinů

Modifikace, které neovlivňují primární strukturu

Tvorba komplexů jaderné pre-mRNA s proteiny

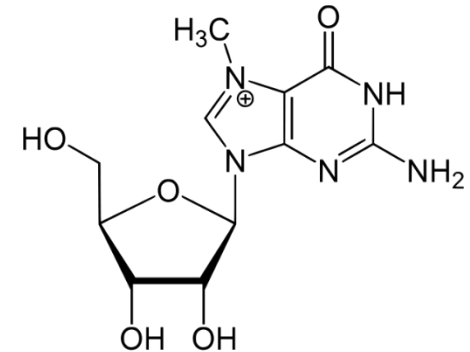
- proteiny, které se vážou na pre-mRNA se označují RNP-proteiny
- komplex RNA s RNP-proteiny nazýváme spliceozom

Funkce: RNA-proteiny uvádějí RNA do stavu přístupného k posttranskripčním úpravám

Úprava 5'-konce čepičkou

- čepička: **m⁷G**
- 7-metylguanozin se váže na mRNA ve směru 5' - 5'

Funkce: čepička váže proteiny nezbytné pro iniciaci translace



7-Methylguanosine

hnRNA (heterogenous nuclear RNA) je synonymum pro pre-mRNA

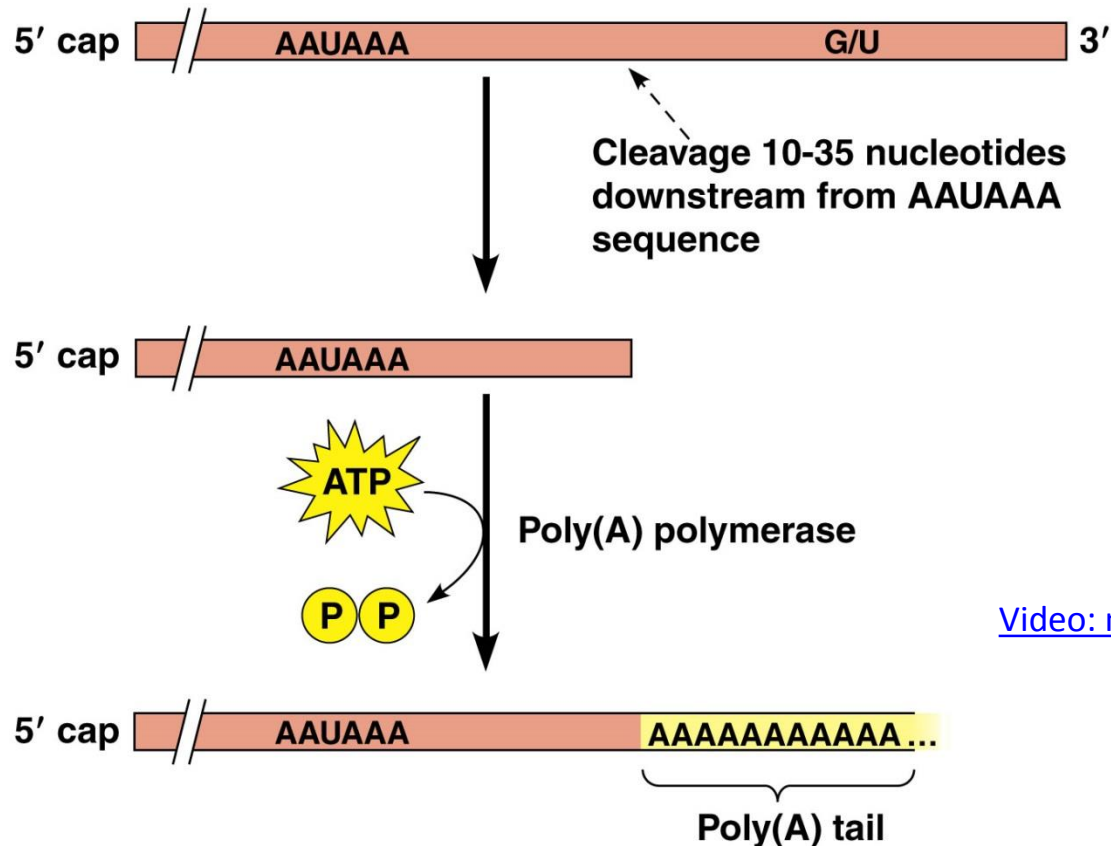
RNP - ribonucleoprotein

Modifikace, které neovlivňují primární strukturu

Polyadenylace 3'-konce

- K polyadenylačním signálu AAUAAA na 3'-konci pre-RNA se připojí sekvence 50 - 250 nukleotidů (A)
- katalyzována poly(A)-polymerázou

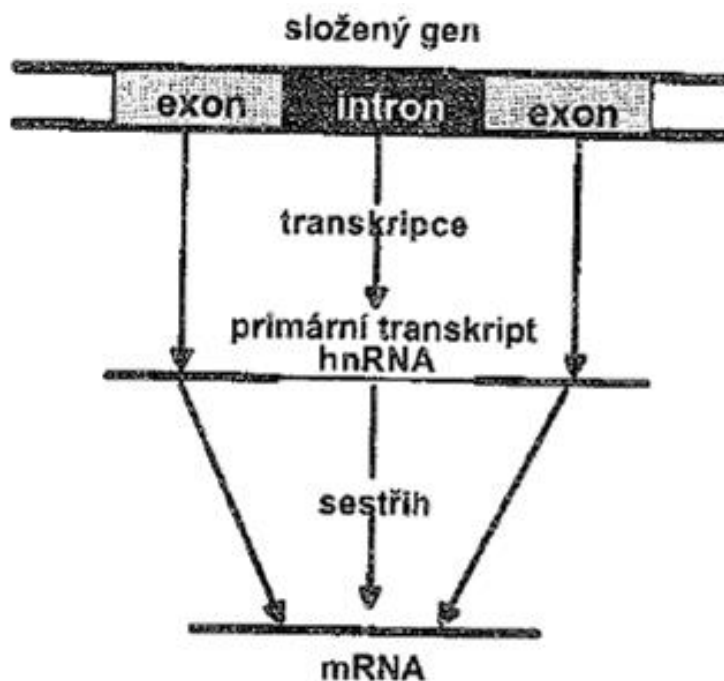
Funkce: ochrana proti účinku exonukleáz (dél trvá než se dostanou přes AAAA ke kódující sekvenci)



[Video: m7G a polyadenylace](#)

Sestřih pre-mRNA (hnRNA) → mRNA

- Úprava primární struktury RNA

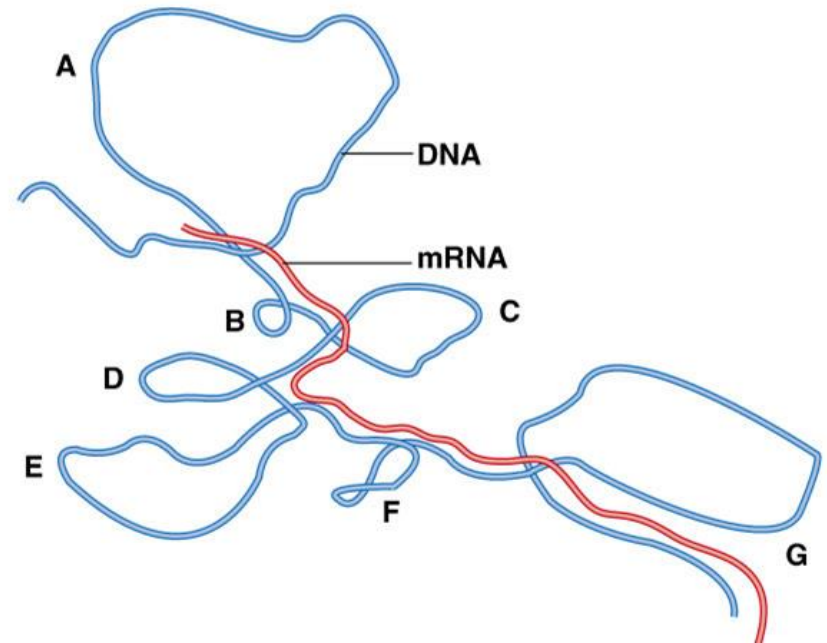
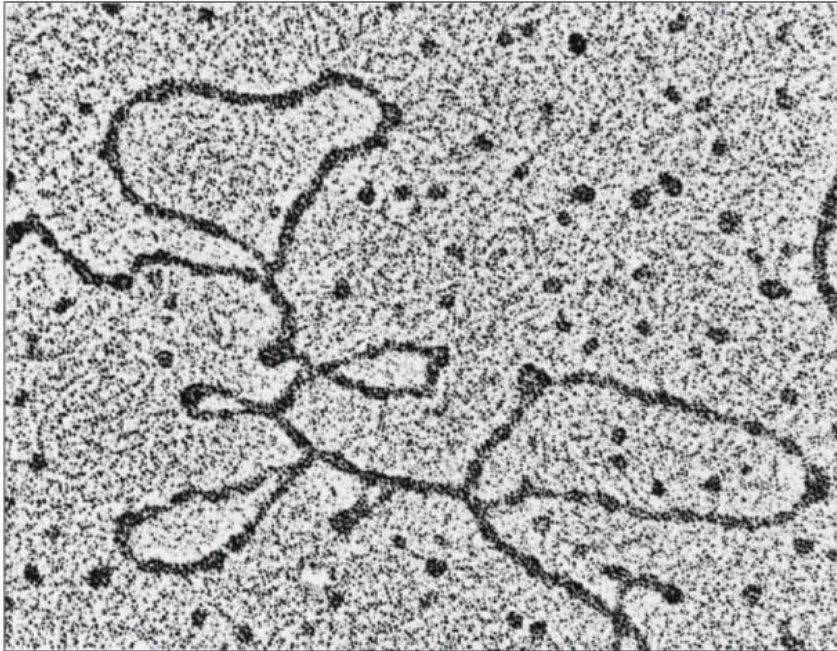


Intron (intragenic region): nekódující sekvence RNA uvnitř genu, která je vystřižena
Exon (expressed regions): kódující sekvence RNA, přeložená do proteinů

Sestřih pre-mRNA → mRNA

Objev intronů:

- při hybridizaci DNA s mRNA pod elektronovým mikroskopem
- určité části na DNA přebývaly (introny)
- tvorba smyček DNA (na obr. A až F)



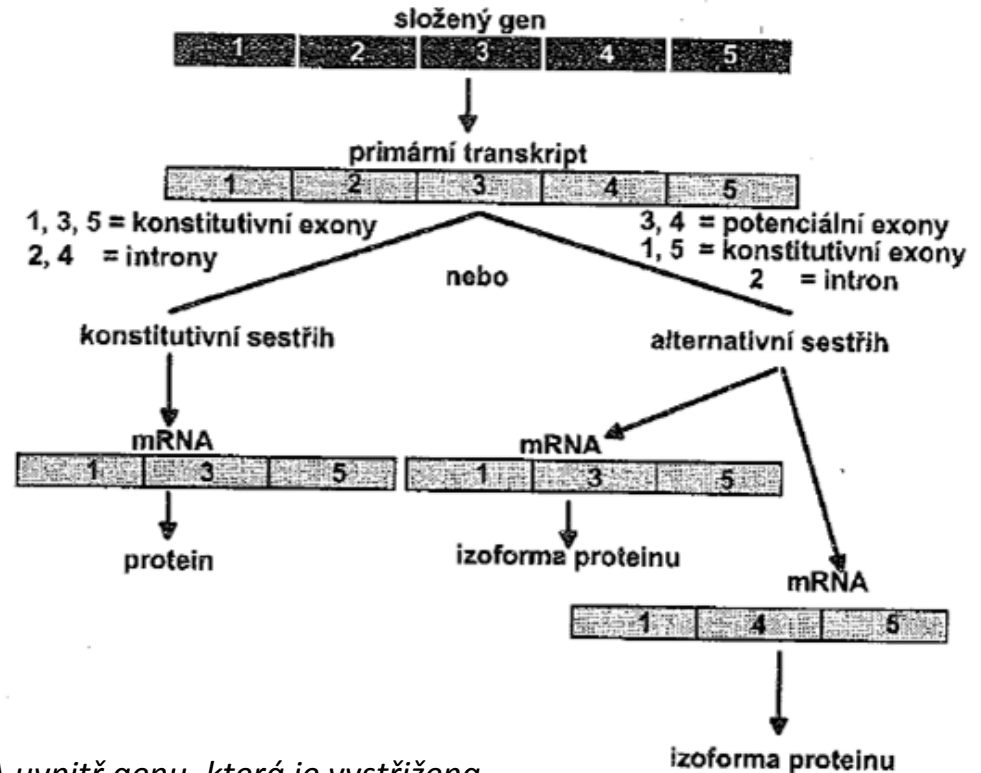
Intron (intrinsic region): nekódující sekvence RNA uvnitř genu, která je vystřižena
Exon (expressed regions): kódující sekvence RNA, přeložená do proteinů

Konstitutivní vs. alternativní sestřih

a) Konstitutivní: po sestřihu vždy stejná molekula mRNA → stejný protein

b) Alternativní: vzniká více druhů molekul mRNA → různé izoformy proteinů

- regulace exprese
- regulace poměrů izoformem



Intron (intragenic region): nekódující sekvence RNA uvnitř genu, která je vystřižena

Exon (expressed regions): kódující sekvence RNA, přeložená do proteinů

- konstitutivní exon: při všech posttranskripčních úpravách působí jako exon

- potenciální exon: při některých posttranskripčních úpravách působí jako exon, jindy jako intron

Izoformy proteinů: funkčně příbuzné proteiny, liší se v primární struktuře

Alternativní sestřih

Skipped exon



Splicing



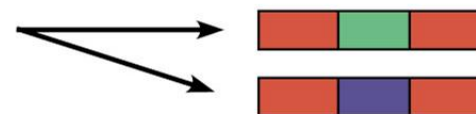
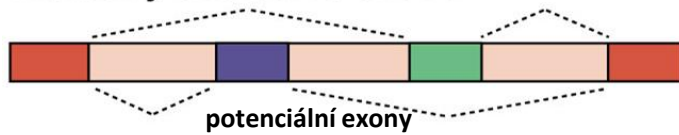
Alternative 5' splice site



Alternative 3' splice site



Mutually exclusive exons

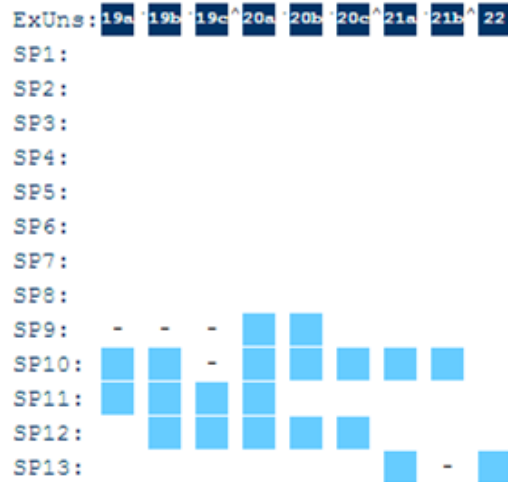
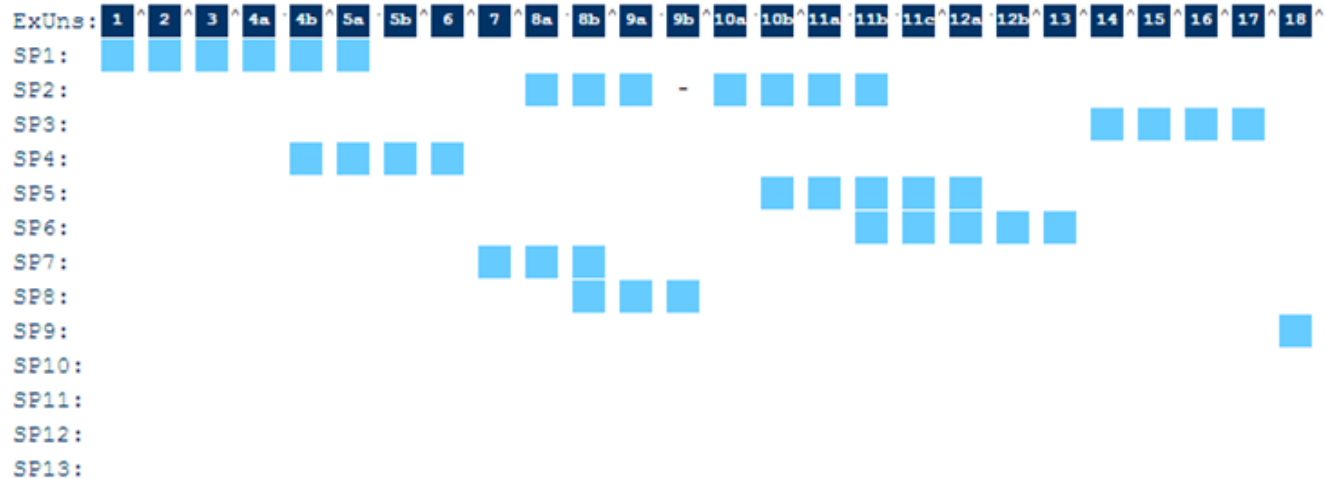


pre-mRNAs

mRNAs

13 variant alternativního sestřihu u genu SYNGAP1

Alternative Splicing Database (ASD) splice patterns (SP) for SYNGAP1 Gene



22 exonů (písmeny označeny exonové jednotky)

^ intron

. spojení dvou exonových jednotek

Relevant External Links for SYNGAP1 Gene

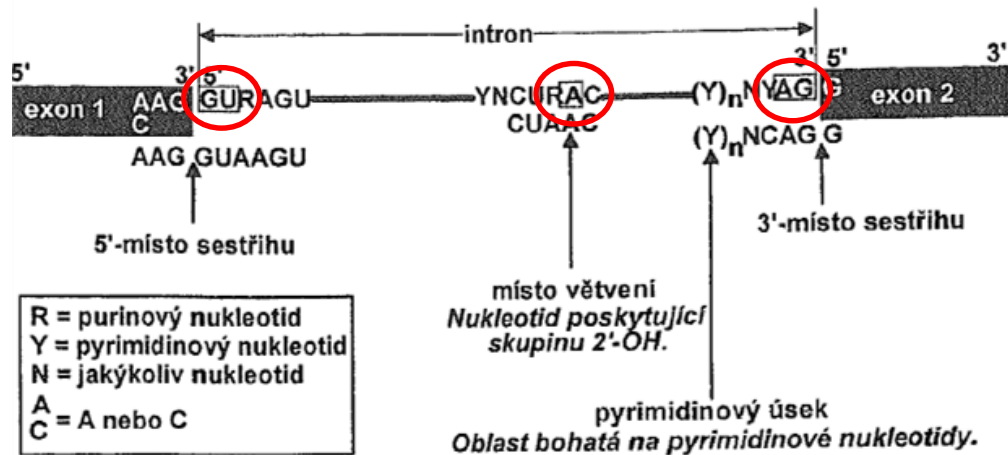
[GeneLoc Exon Structure for SYNGAP1](#)

[ECgene alternative splicing isoforms for SYNGAP1](#)

SYNGAP1 protein is critical for the development of cognition and proper synapse function. Mutations in humans can cause intellectual disability, epilepsy, autism and sensory processing deficits.

Mechanismus sestřihu mRNA

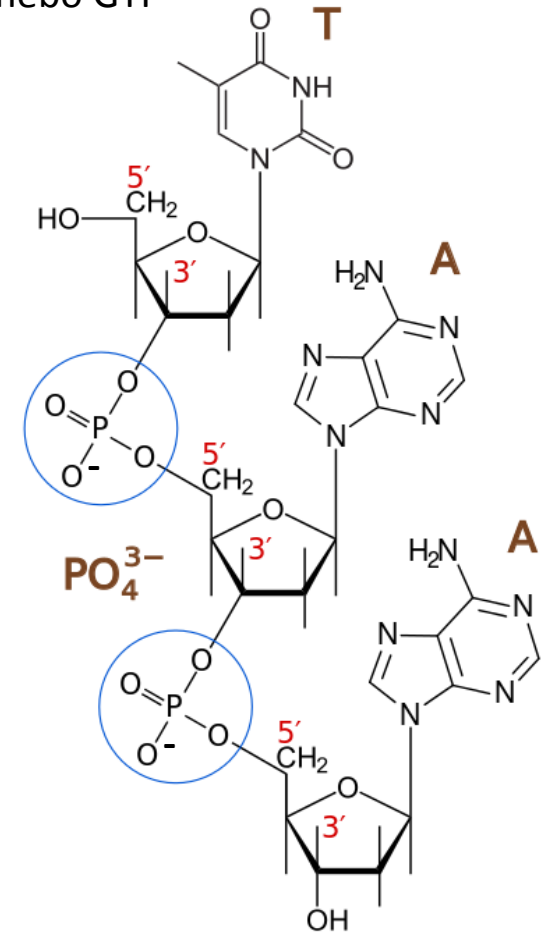
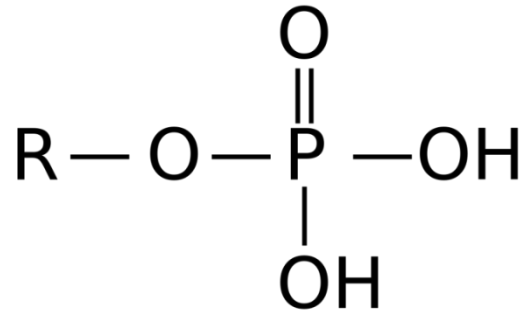
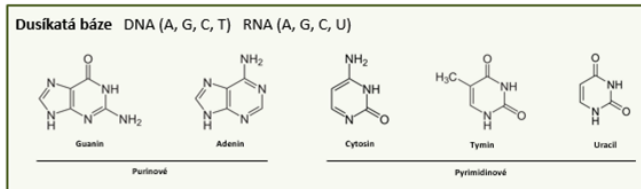
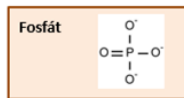
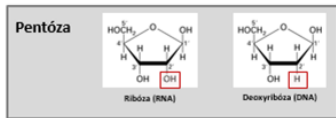
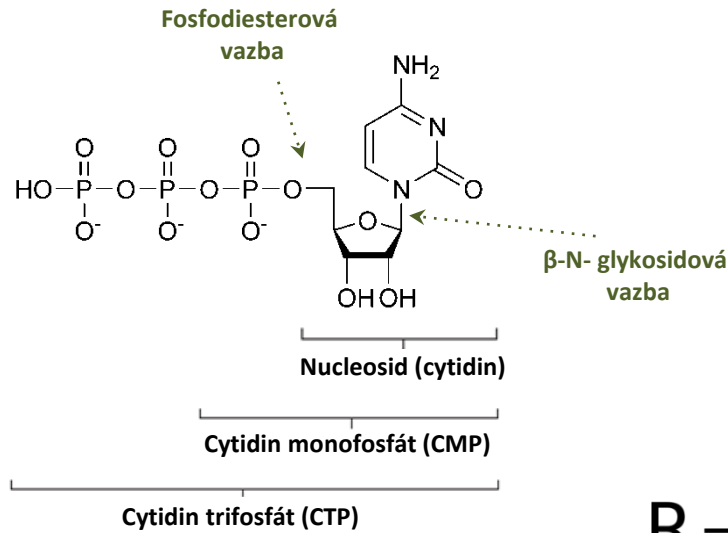
- Úprava primární struktury mRNA - pouze za účasti spliceozomu
- Proces řídí snRNP částice (komplex snRNA- a proteinů) - tvoří spliceozom
- primární struktura intronu určuje místo sestřihu: **GU-AG**
- **Intron:** 5'-konec **GU**; 3'-konec **AG**; uprostřed místo větvení **A**
- Vlastní sestřih probíhá pomocí chemické reakce: **Transesterifikace**



Sekvence a nukleotidy zakreslené do šedého rámečku jsou vysoce konzervativní (četnost 100 %).
Ostatní sekvence se vyskytují v četnosti 70 - 95 %.
Sekvence uvedené pod schématem intronu a exonu jsou sekvence, které byly zjištěny u savců.

Transesterifikace v sestřihu pre-mRNA → mRNA

- přeměna fosfátového esteru v jiný bez hydrolyzy za nepřítomnosti ATP nebo GTP
- energie fosfodiesterové vazby zůstává zachována



Estery: organické sloučeniny, ve kterých je -OH skupina nahrazena organickým zbytkem vzniklým z alkoholu po odštěpení vodíku.

Esterifikace: chemická reakce, při které ester vzniká

*Nukleové kyseliny jsou polymery: vlákno nukleotidů navzájem spojených **fosfodiesterovou** vazbou. Dusíkatá báze (A, T/U, C, G) + cukr – pentóza (ribóza/deoxyribóza) + fosfát (mono- v řetězci, tri- volně)*

Transesterifikace v sestřihu pre-RNA → mRNA

První transesterifikace:

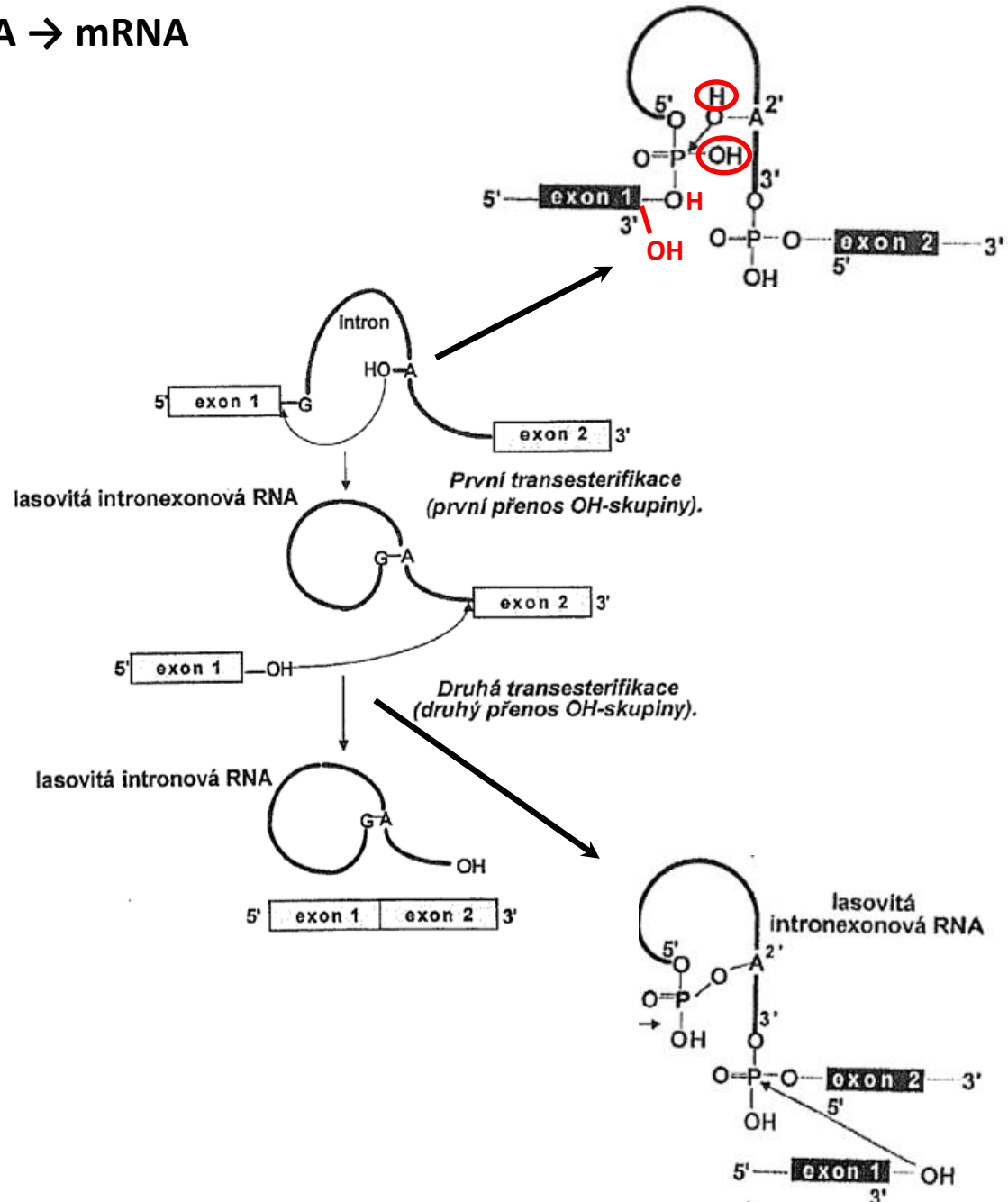
- spojení exonu 1 a intronu přes OH-skupiny
- odpad z vazby (H_2O) je použit na zakončení 3'-konce exonu 1 (OH) a zakončení 5'-konce intronu (H)

Druhá transesterifikace:

- spojení obou exonů do výsledné mRNA
- intron se odpojí ve formě lasovité RNA

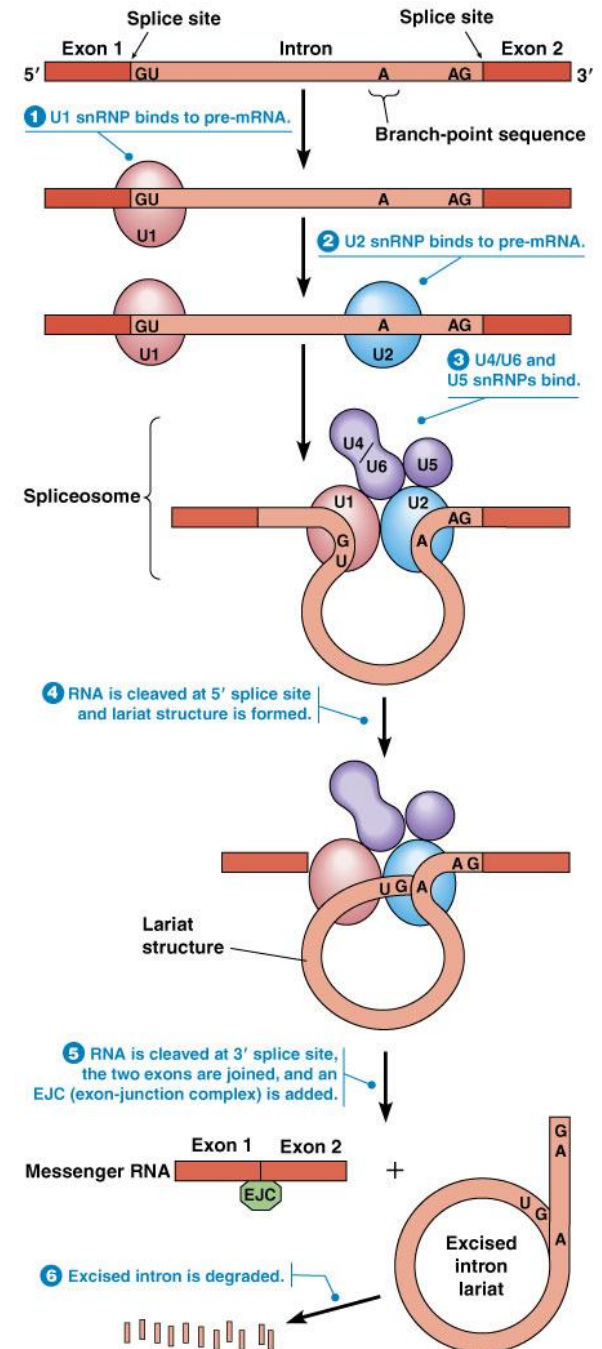
Sekvence pro transesterifikaci jsou rozeznávány snRNP-částicemi a tvoří komplexy katalyzující sestřih -

Spliceozom



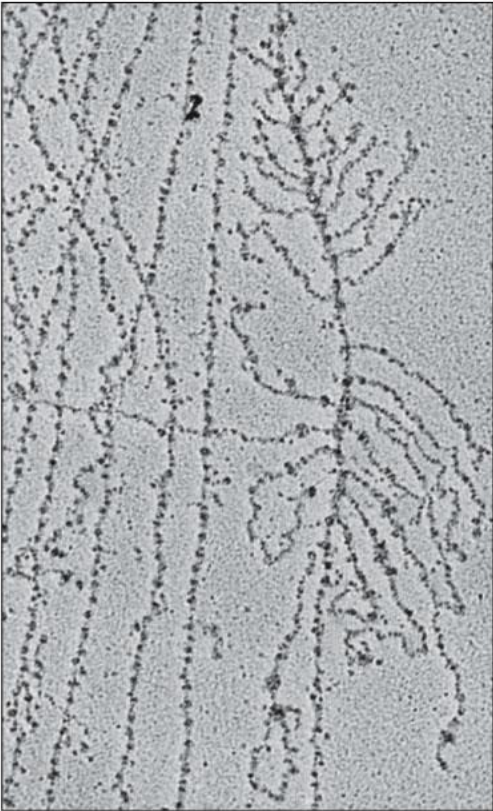
Spliceozom

- velká elipsoidní částice, sedimentační koeficient 60S
- uvnitř jádra
- **funkce:** odstraňuje introny z pre-mRNA (katalyzuje sestřih mRNA)
- tvořen komplexem **5 snRNA** (U1, U2, U4, U5, U6) a různými **proteiny**
- složitostí podobný ribozomům, pozorovatelný elektronovým mikroskopem

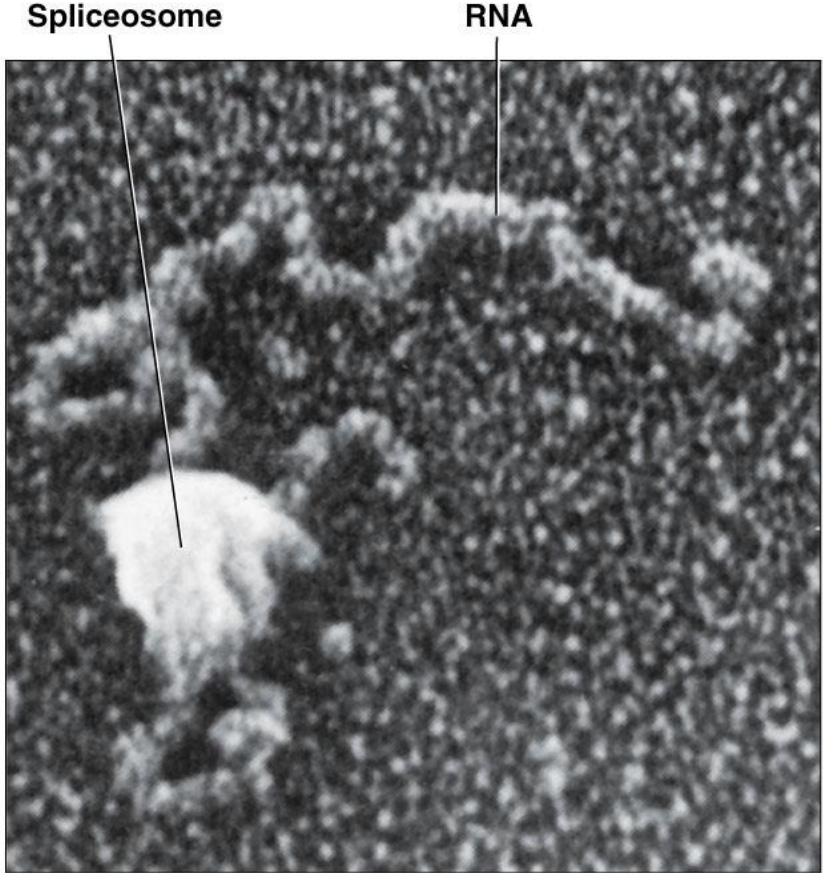
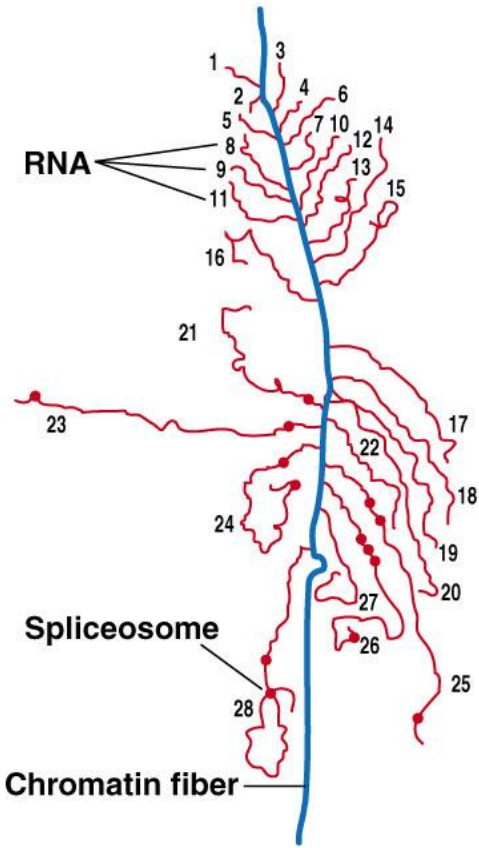


Lariat - laso

Spliceozom



0.2 μm



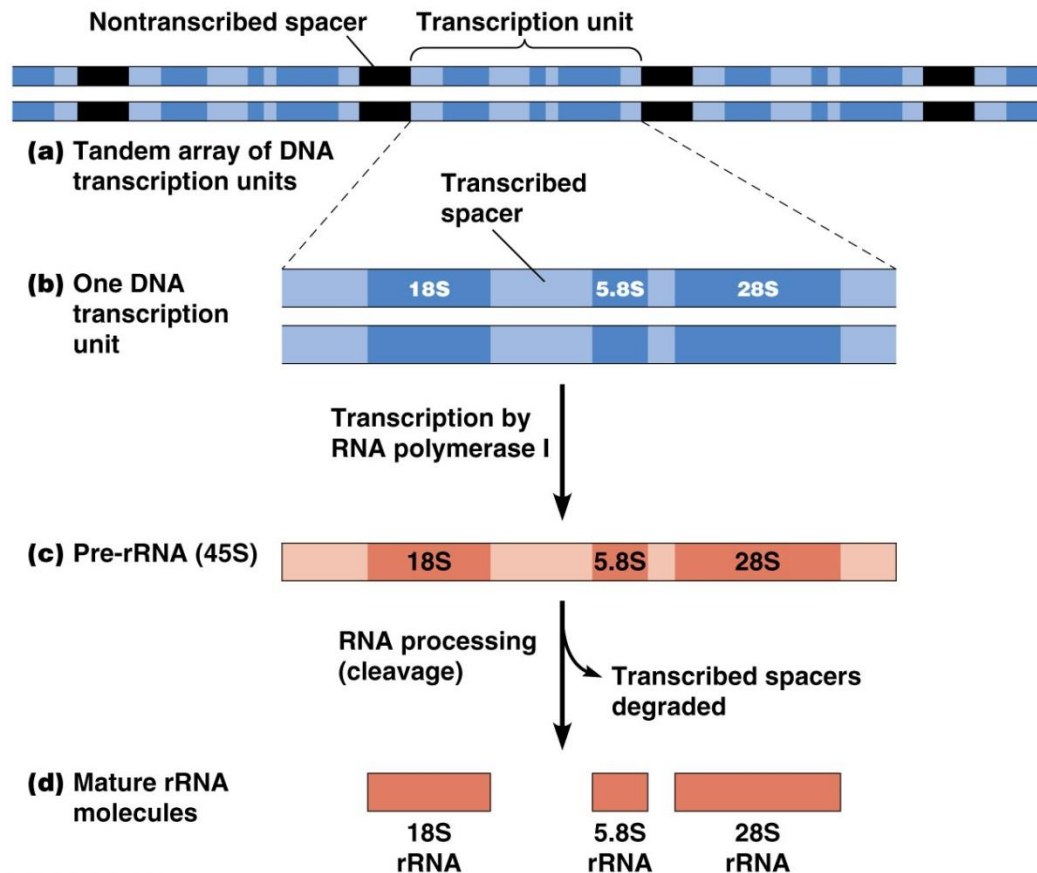
10 nm

mRNA je výsledkem spojení exonů na stejné molekule primárního transkriptu (výjimečně dvou různých molekul - bimolekulární sestřih)

[Video: mRNA sestřih \(splicing\)](#)

Posttranskripční úpravy pre-rRNA

- transkripce RNA polymerázou I
- pre-rRNA obsahuje přepisy genů pro **5,8S**, **18S** a **28S** rRNA
- geny jsou lokalizovány v DNA jadérka, kde probíhá též jejich transkripce do pre-rRNA
- introny jsou vyštěpeny, ale **exony se nespojují**
- štěpení pomocí endonukleáz
- 3 jednotky rRNA jsou využity ke stavbě ribozomů spolu s ribozomovými proteiny



Posttranskripční úpravy pre-tRNA

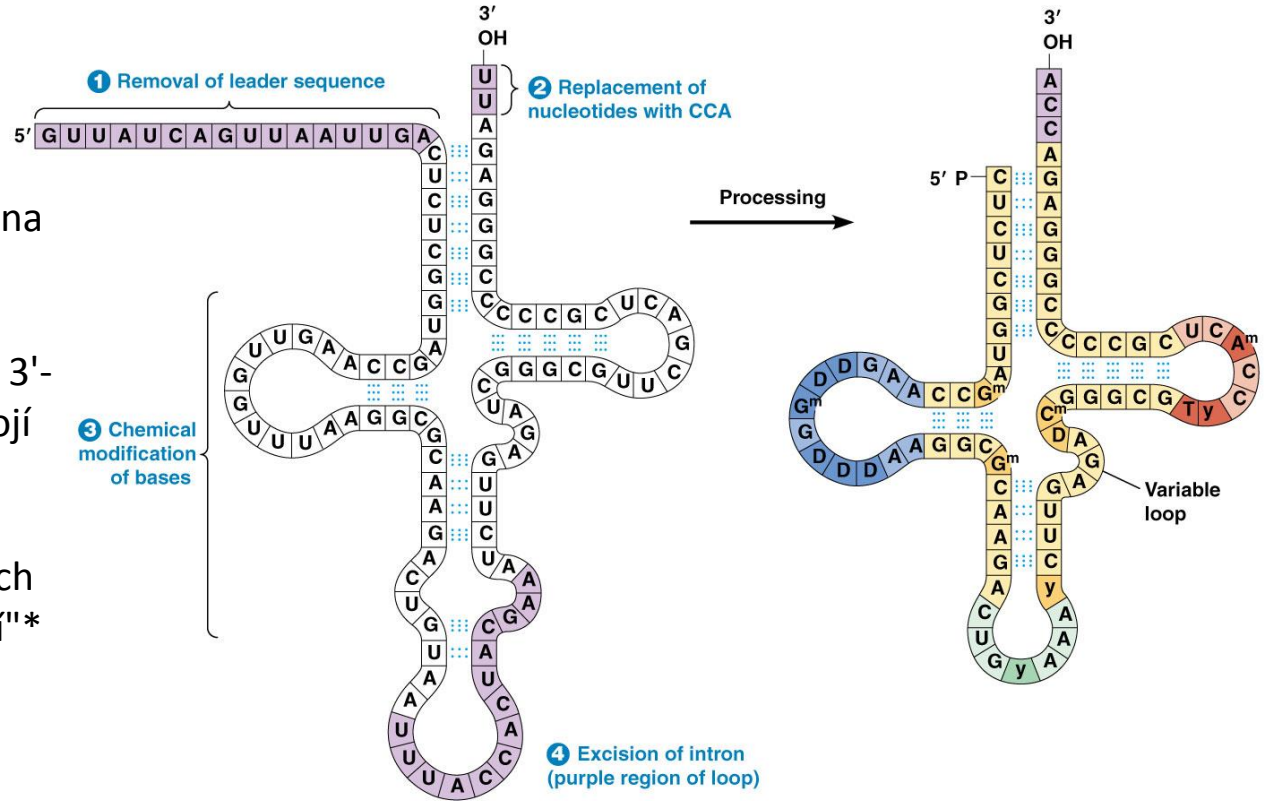
jednotlivé tRNA uskutečňují přenos jednotlivých aminokyselin

1. Odstranění vedoucí sekvence na 5'-konci

2. nahrazení dvou nukleotidů na 3'-konci sekvencí CCA (tam se připojí AMK)

3. chemická modifikace vybraných bazí → tvorba "neobvyklých bazí"*

4. vystřížení intronů



(a) Primary transcript (precursor) for yeast tyrosine tRNA

(b) Mature tRNA, secondary structure

© 2012 Pearson Education, Inc.

*neobvyklé báze zpřesňují syntézu proteinů (4-thiouridin, dihydrouridin, 1-methylguanozin...)

Posttranskripční úpravy genoforu mitochondrií

- nepodléhají úpravě 5'-konce čepičkou
- začínají vedoucím kodonem AUG
- nejdůležitější úpravou je polyadenylace

Pravděpodobný původ mitochondrií:

- endosymbioza* před 1,45 miliardami let
- důvody symbiozy: detoxifikace od O₂ nebo produkce H₂ jako zdroje energie

**fagocytoza prokaryotické buňky primitivní eukaryotickou jadernou buňkou nebo jinou prokaryotickou buňkou*

Zajímavosti o RNA

- většina molekul mRNA rychle degraduje
- bakteriální mRNA má poločas rozpadu v řádu minut
- eukaryotická mRNA má poločas rozpadu v řádu hodin až dní
- tRNA a rRNA jsou stabilnější než mRNA
- transkripce umožňuje amplifikaci genetické informace díky množství kopií mRNA

Molekulární biologie

5. Translace genomu

Translace (překlad): tvorba proteinů na ribozomech podle mRNA

Osnova

Translace bakteriální mRNA

Translace eukaryotické mRNA

Posttranslační procesy

Hlavní zdroje:

S. Rosypal, Úvod do molekulární biologie 1-4

Masarykova Universita Brno

ISBN 80-902562

B. Staveley, Principles of Cell Biology

Memorial University of Newfoundland

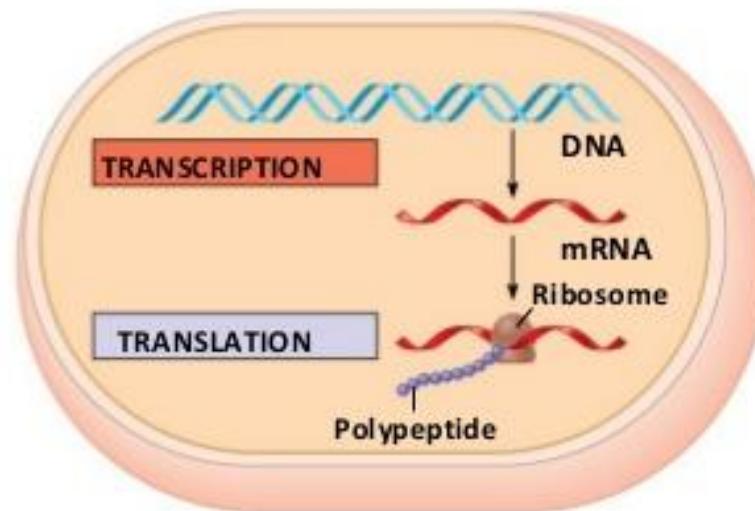
<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CBhome.html>

M. Muller, Biology of Cells and Organisms

University of Illinois, Chicago

<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/summer2010/lecturesm10.htm>

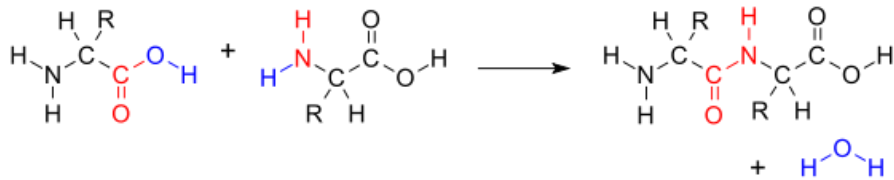
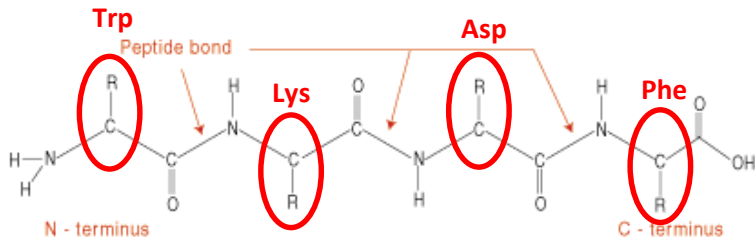
Translace bakteriální mRNA



Část první: Bakteriální translace

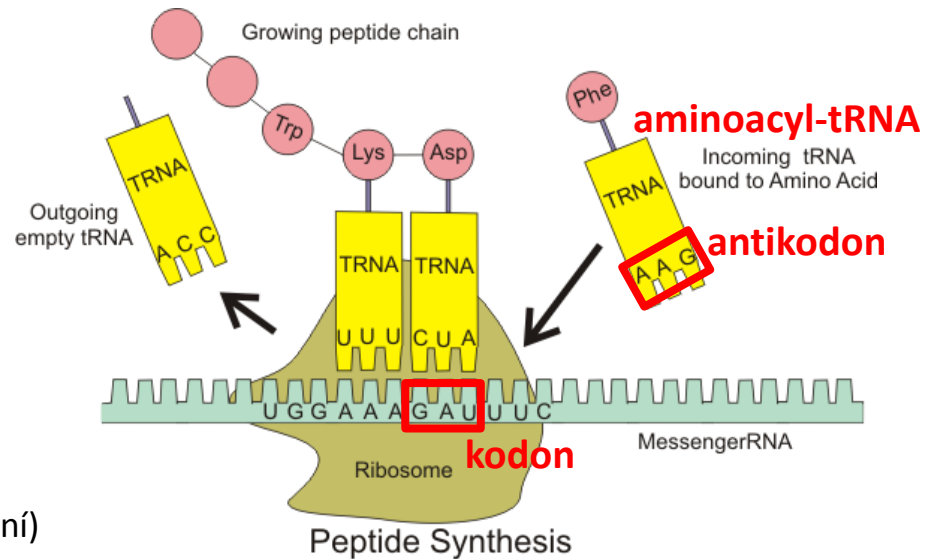
Peptid = krátký řetězec aminokyselin (AA); polypeptid = dlouhý řetězec AA

- na ribozomech se tvoří polypeptidové řetězce za účasti tRNA podle informace obsažené v mRNA
- výchozími látkami je 20 standardních aminokyselin + selenocystein a pyrrolysin
- aminokyseliny se nejprve aktivují enzymem **aminoacyl-tRNA-syntetázou**
- dojde k vazbě aminokyseliny na tRNA a vzniká **aminoacyl-tRNA (aa-tRNA)**
 1. Inicie: tvorba iniciačního komplexu z ribozomů 70S, mRNA a tRNA
 2. Elongace: prodlužování polypeptidového řetězce
 3. Terminace: zakončení syntézy polypeptidového řetězce, signalizováno terminačním kodonem.



Aminokyselinový (poly-peptidový) řetězec (protein)

- AA spojeny **peptidovou vazbou** mezi -NH₂ a COOH (kovalentní)
- rozlišujeme N-konec a C-konec
- na tRNA se váže C-koncem, k řetězci se připojí N-koncem

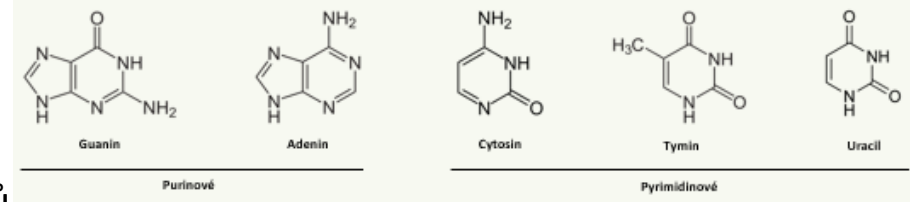


NH₂ - Amin; COOH - karboxylová kyselina

Trp (tryptofan; W; kodon UGG); Lys (lyzín; K; AAA a AAG); Asp (kyselina asparagová; D; GAU a GAC); Phe (fenylalanin; F; UUU a UUC)

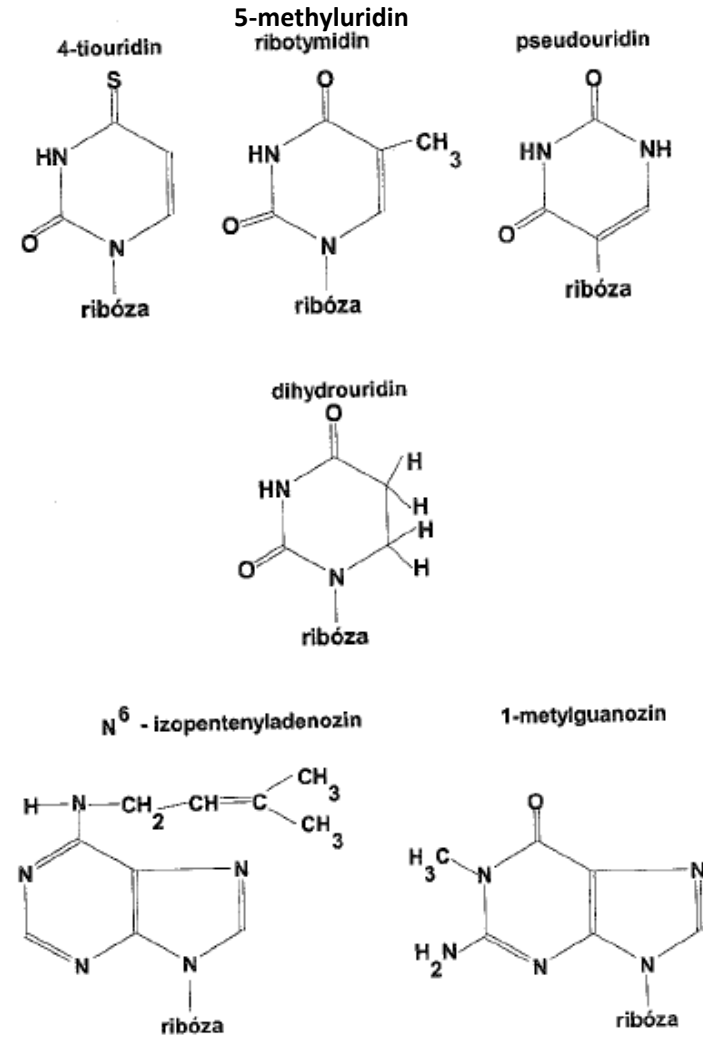
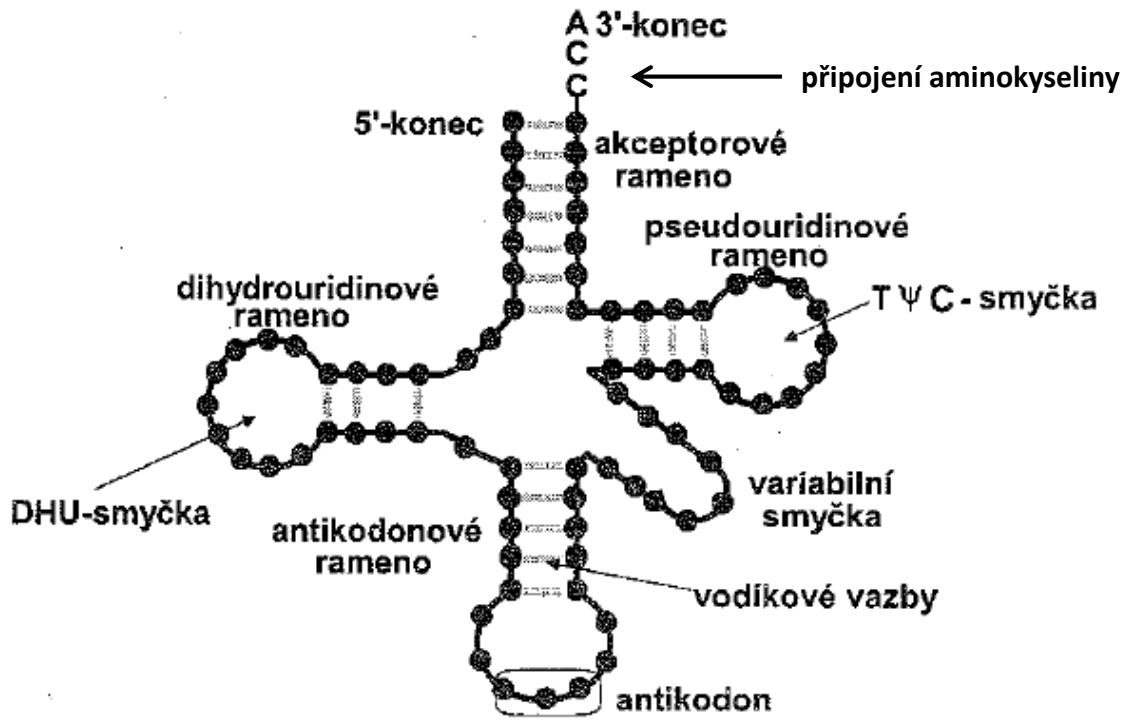
Transferová RNA (tRNA)

- sekvence CCA na 3'-konci
- obsahuje neobvyklé báze - zpřesňují syntézu proteinů
- jednotlivé tRNA uskutečňují přenos jednotlivých aminokyselin (existuje více tRNA pro jednu aminokyselinu)



Sekundární struktura - jetelový lístek (komplementární sekvence)

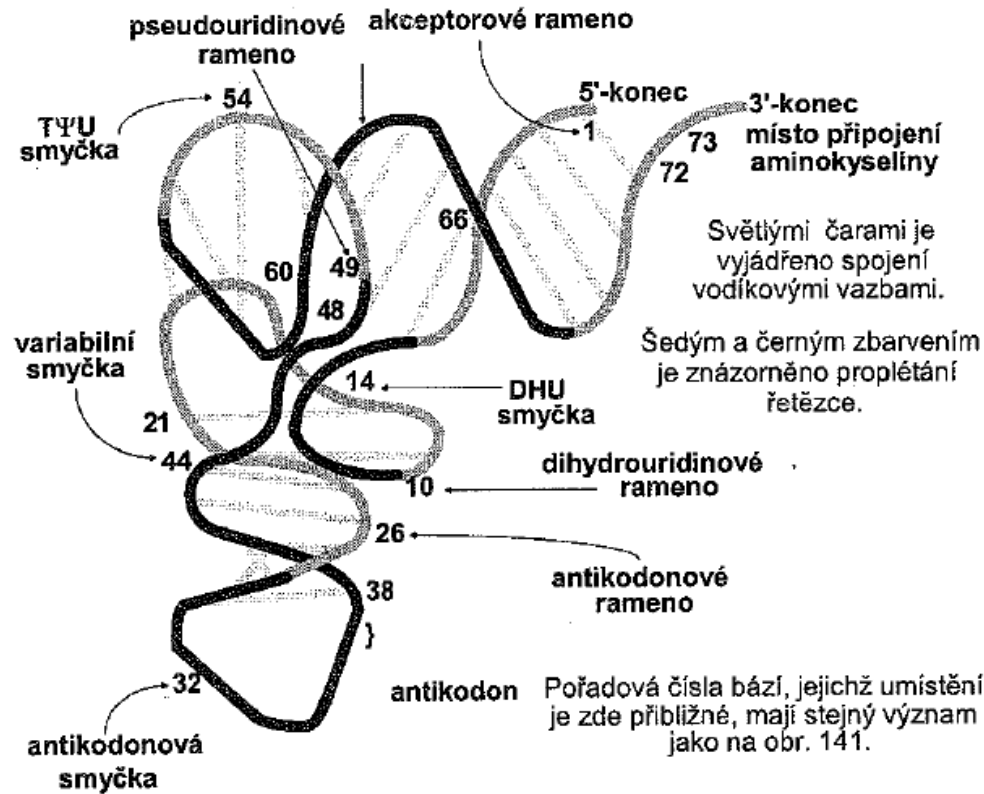
- 4 hlavní ramena
- variabilní smyčka
 - a) krátká (3-5 nukleotidů)
 - b) dlouhá (13-21n., 75%RNA)



Transferová RNA (tRNA)

Terciární struktura

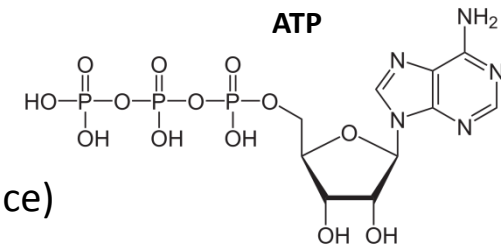
- vodíkové vazby mezi bazemi dihydrouridinového ramena a pseudouridinového ramena



Aktivace aminokyselin

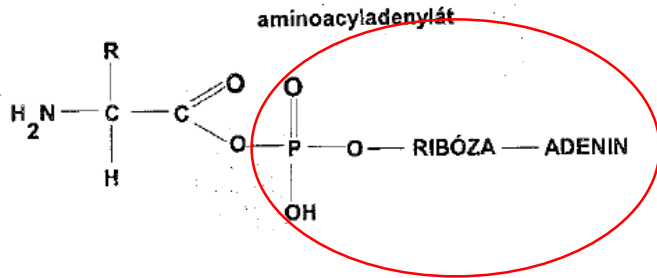
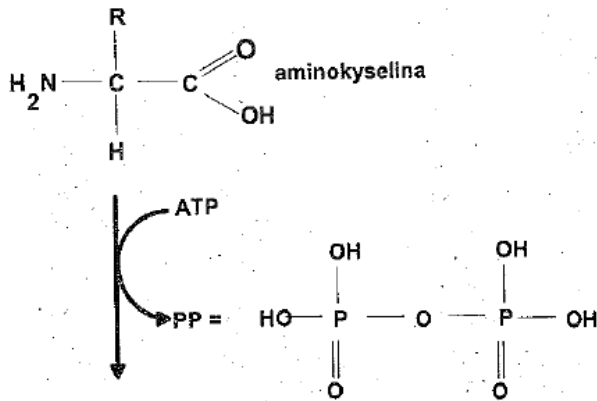
Připojení aminokyseliny (AA) k příslušné tRNA

- ve dvou krocích za katalýzy enzymem aminoacyl-tRNA-syntetázou (esterifikace)

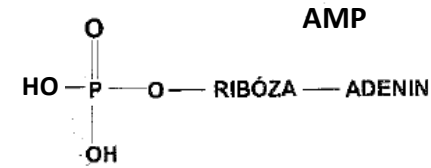


1. AA + ATP \leftrightarrow AA-AMP + PP
2. AA-AMP + tRNA \leftrightarrow AA-tRNA + AMP

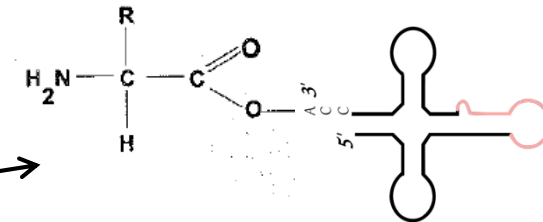
1.



2.



+



Estery: organické sloučeniny, ve kterých je -OH skupina (např. z karboxylu COOH) nahrazena organickým zbytkem vzniklým z alkoholu po odštěpení vodíku.

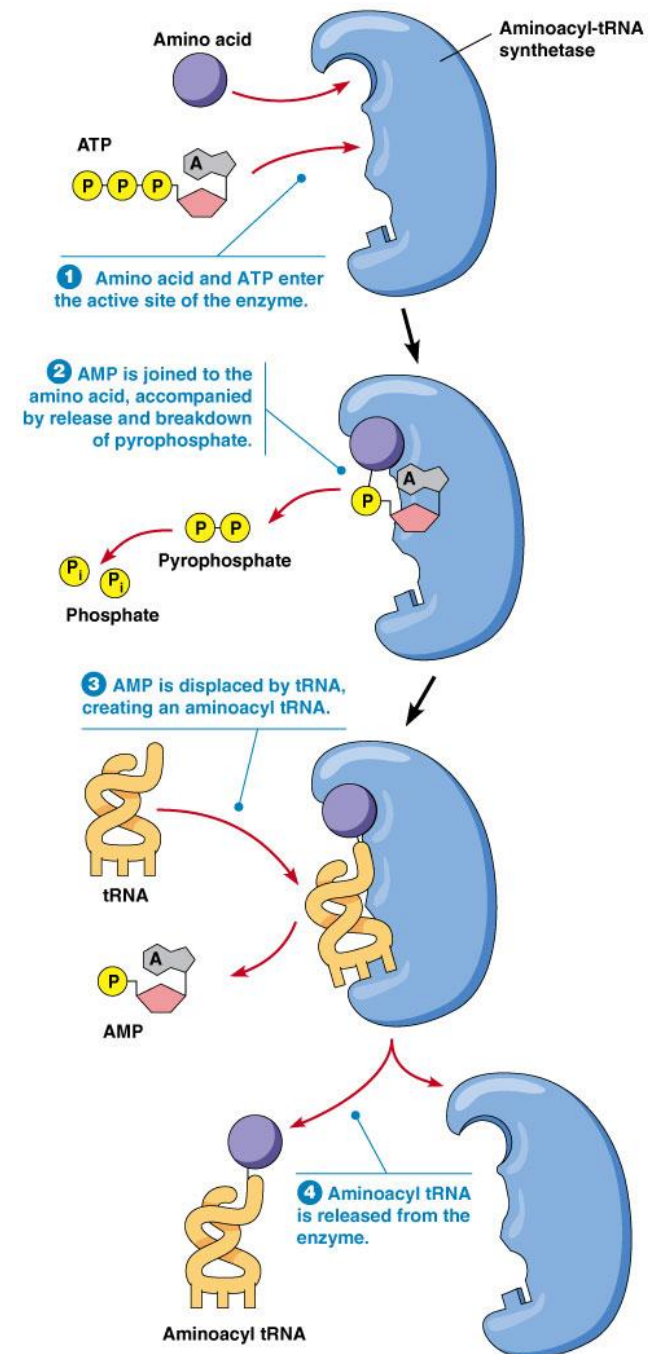
Esterifikace: chemická reakce, při které ester vzniká

Vazebná rozpoznávací místa na enzymu:

1. pro aminokyselinu
2. pro ATP
3. pro tRNA

Aktivace aminokyselin enzymem aminoacyl-tRNA-syntetázou

- AA + ATP vstupuje do aktivního místa enzymu
- ATP ztrácí pyrofosfát (PP) a AMP se kovalentně váže na AA
- PP je hydrolyzován na dvě fosfátové skupiny
- tRNA se kovalentně váže na AA a nahrazuje tak AMP
- AA-tRNA se uvolňuje z enzymu

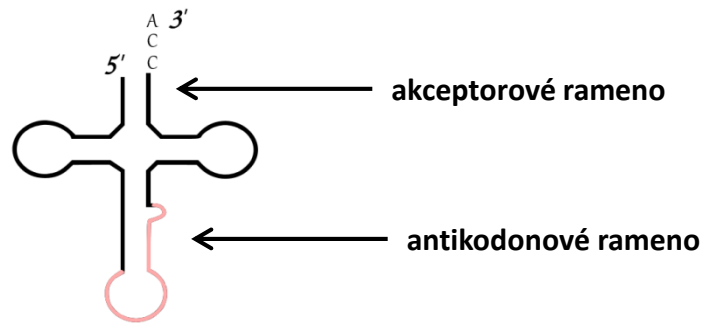


Enzym aminoacyl-tRNA-syntetáza

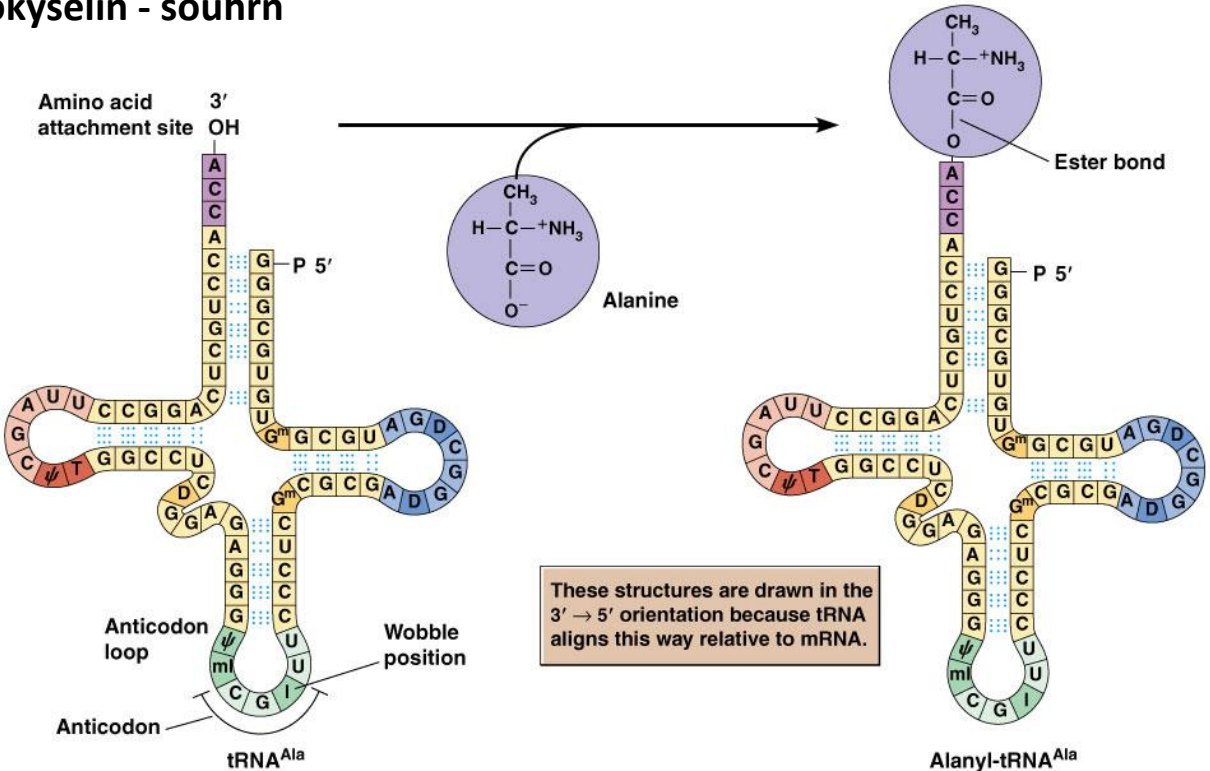
- každá aminoacyl-tRNA-syntetáza je specifická jen pro jednu aminokyselinu a k ní odpovídající varianty tRNA (příbuzné)
- evolučně konzervovaná: 70% homologie mezi bakteriemi a savci
- patří mezi nejstarší enzymy, spjat s vývojem genetického kódu

Vazba enzymu na příslušnou tRNA:

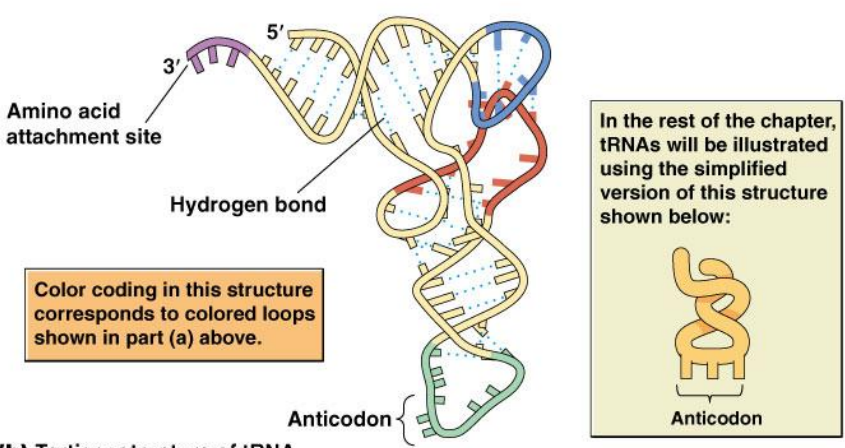
- mimořádně přesná (mutace v jednom nukleotidu způsobí nerozpoznání)
- rozpoznávací místa leží na akceptorovém a antikodonovém rameni



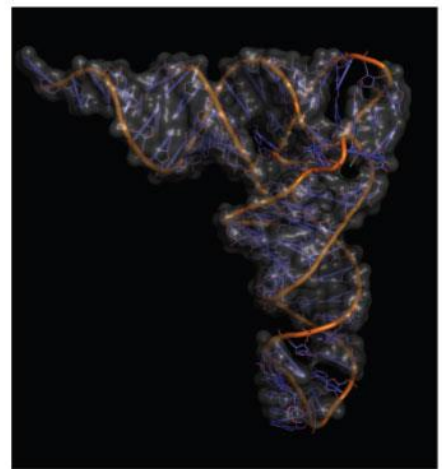
Aktivace aminokyselin - souhrn



(a) Secondary structure of tRNA, before and after amino acid attachment



(b) Tertiary structure of tRNA



Aminokyseliny

Kde se berou?

Syntéza AA probíhá v biochemických drahách za katalýzy enzymy

Ne všechny organismy dokáží syntetizovat všechny AA

Člověk nedokáže syntetizovat 9 z 21 AA (esenciální aminokyseliny)

Esenciální AA přijímá člověk v potravě

Základním kamenem pro aminokyseliny je **dusík** (též pro nukleotidy)

Hlavním problémem v přírodě je získat dusík v použitelné formě; ve vzduchu 78%

Atmosferický dusík N_2 ($N\equiv N$) je relativně inertní a netvoří snadno sloučeniny

Řešení: mikroorganismy redukují atmosferický dusík $N\equiv N$ na amoniak (čpavek, NH_3) a ten pak používají rostliny pro tvorbu aminokyselin

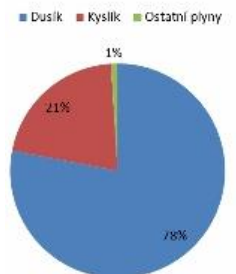
* za určitých patofyziologických podmínek může být syntéza těchto AA omezena

- Fenylketonurie: porucha přeměny fenylalaninu na tyrosin; genetická, mentální retardace

** pyrrolyzin není zahrnut v tabulce, jelikož se nevyskytuje u člověka (zdroj: Wikipedia)

Essential	Nonessential **
Histidine	Alanine
Isoleucine	Arginine*
Leucine	Aspartic acid
Lysine	Cysteine*
Methionine	Glutamic acid
Phenylalanine	Glutamine*
Threonine	Glycine*
Tryptophan	Proline*
Valine	Serine*
	Tyrosine*
	Asparagine*
	Selenocysteine

Složení vzduchu



Ribozom

Ribonukleoproteinová částice (rRNA + proteiny)

Funkce: Katalyzuje připojování aminokyselin podle kodu v mRNA

Poprvé popsán rumunským vědcem **Georgem Emilem Paladem** v 1950s

- v elektronovém mikroskopu se jeví jako "husté částice" či "granula"
- r. 1974 obdržel Nobelovu cenu

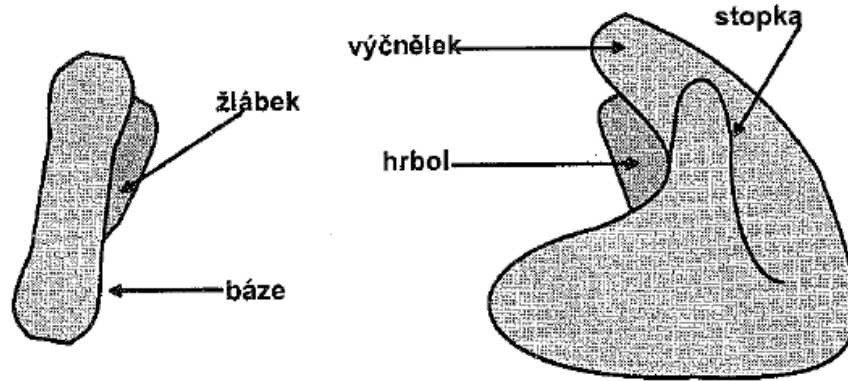


Termín "ribozom" byl navrhnout na konferenci "Syntézy proteinů" r. 1958

During the course of the symposium a semantic difficulty became apparent. To some of the participants, microsomes mean the ribonucleoprotein particles of the microsome fraction contaminated by other protein and lipid material; to others, the microsomes consist of protein and lipid contaminated by particles. The phrase 'microsomal particles' does not seem adequate, and 'ribonucleoprotein particles of the microsome fraction' is much too awkward. During the meeting the word 'ribosome' was suggested; this seems a very satisfactory name, and it has a pleasant sound. The present confusion would be eliminated if 'ribosome' were adopted to designate ribonucleoprotein particles in the size range 20 to 100 S.

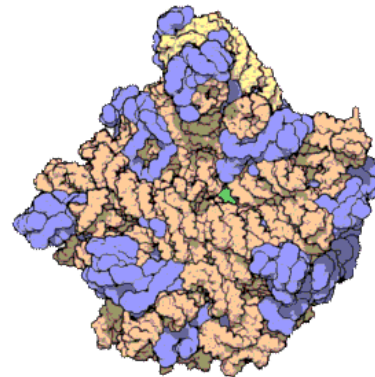
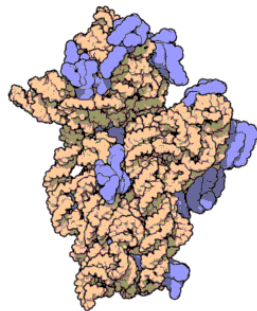
Prokaryotické ribozomy 70S

- Sedimentační koeficient 70S
- Podjednotky: 30S a 50S



Podjednotka 30S

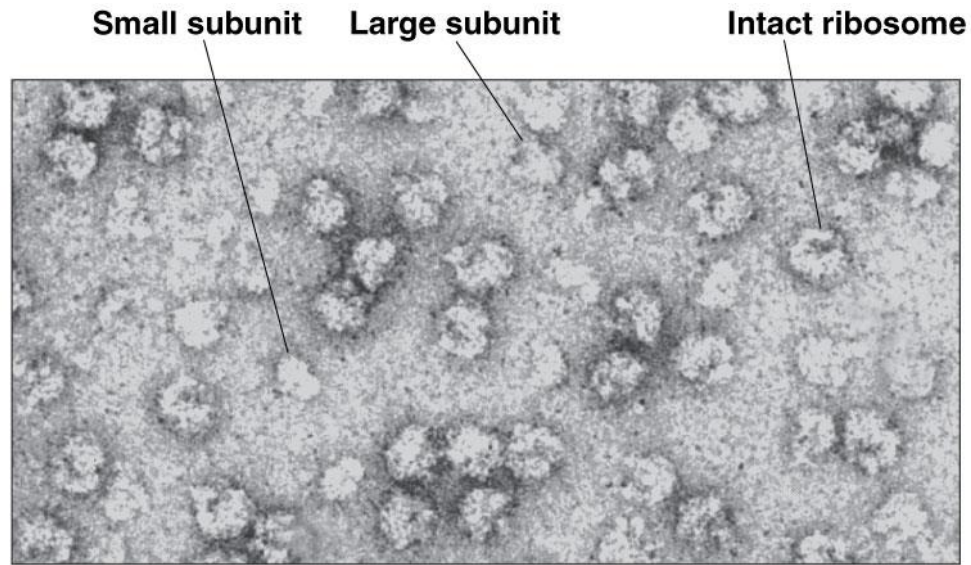
Podjednotka 50S



Proteiny - fialová; rRNA oranžová/žlutá

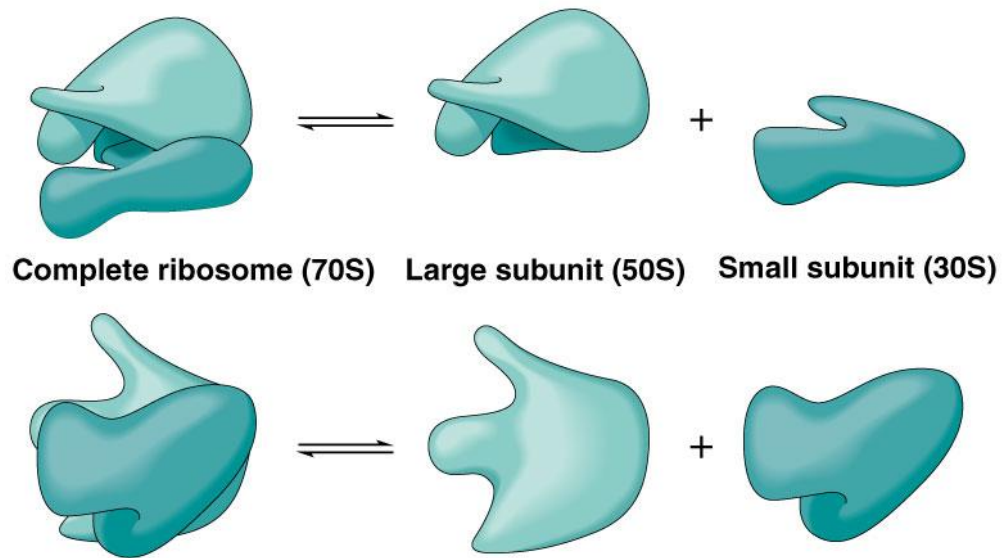
S - Svedberg - sedimentační koeficient

Ribozom



(a) Bacterial ribosomes and free subunits

0.1 μm



(b) Two views of a bacterial ribosome and its subunits

Vazebná místa na prokaryotickém ribozomu

1. pro mRNA

- na podjednotce 30S
- obsahuje proteiny a 3'-konec 16S-rRNA

2. Aminoacylové místo (A-místo)

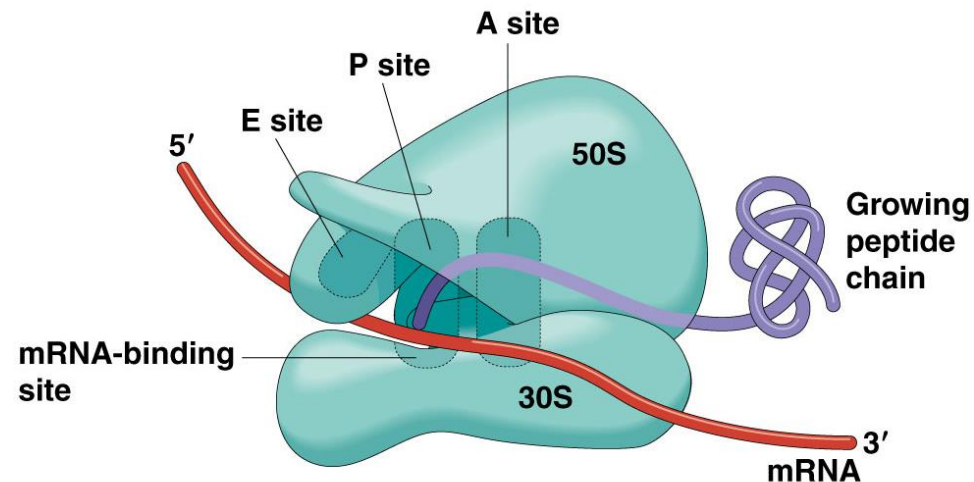
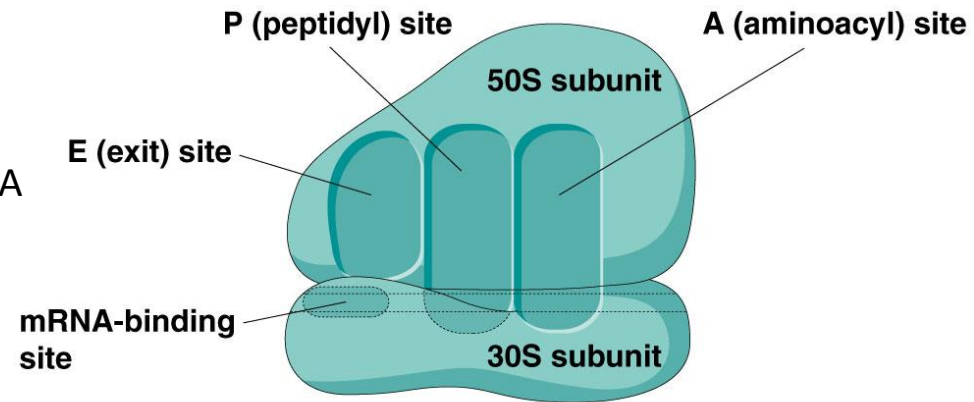
- vazba AA-tRNA
- na obou podjednotkách

3. Peptidylové místo (P-místo)

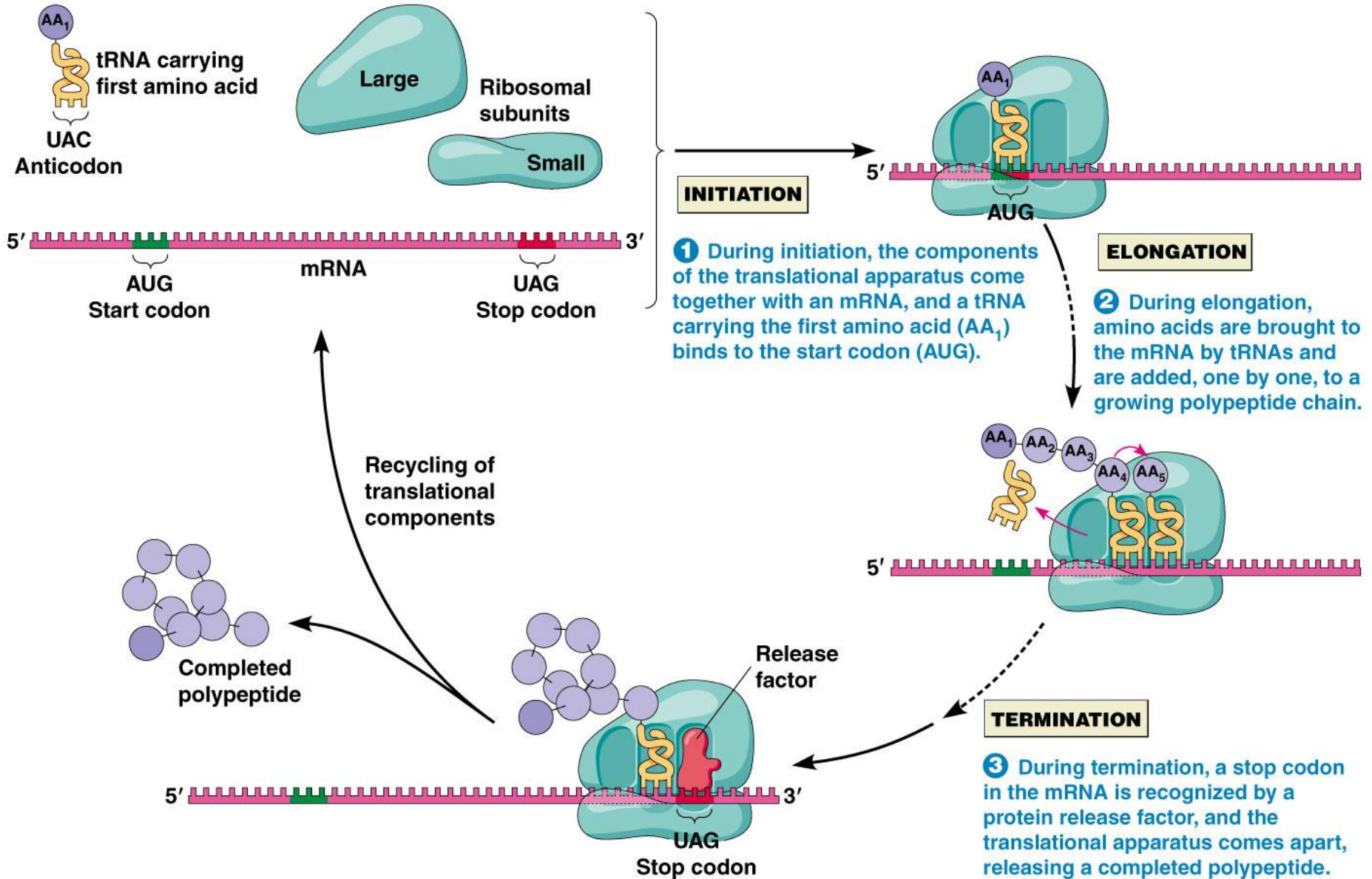
- na obou podjednotkách
- připojení nové AA (na tRNA) k nascentnímu polypeptidovému řetězci

4. Výstupní místo pro deacylovanou tRNA (exit; E-místo)

- výstup pro tRNA bez AA
- na podjednotce 50S



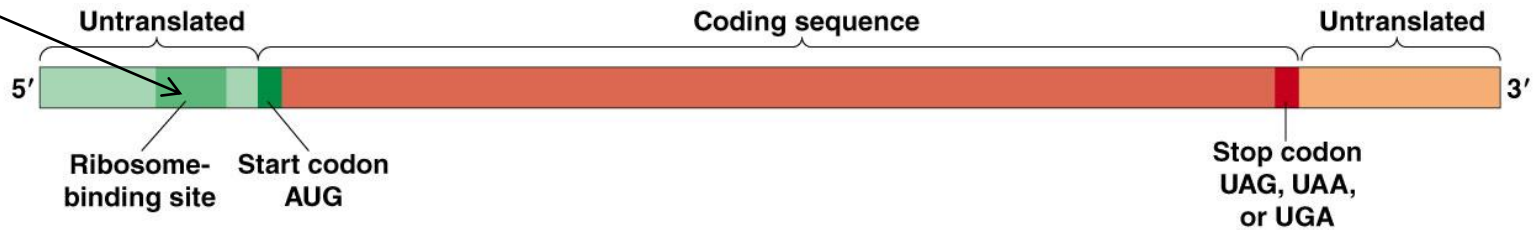
PROCES TRANSLACE



Průběh translace - Iniclace

- bakteriální mRNA se váže do mRNA binding site ribozomu 5'-koncem (Shine-Dalgarno sekvencí)
- začíná AUG a končí stop kodonem (UAG, UAA nebo UGA) a za ním nekodující sekvence na 3'-konci
- tyto sekvence jsou společné pro všechny prokaryotní geny
- u prokaryot jsou geny polycistronní (více genů na jedné mRNA) a tyto sekvence má každý gen zvlášť

Shine-Dalgarno sequence

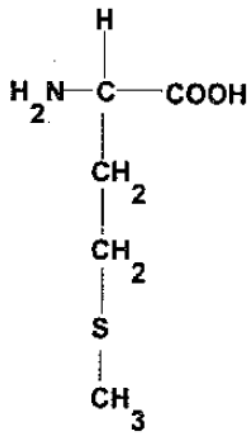
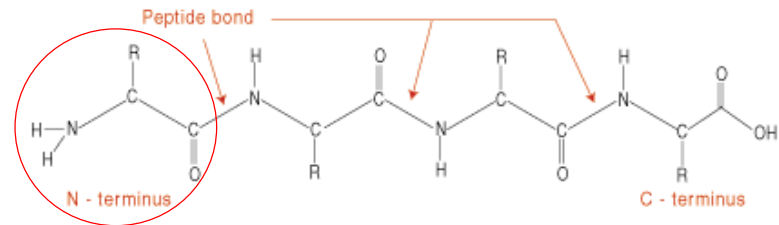


(a) Bacterial mRNA

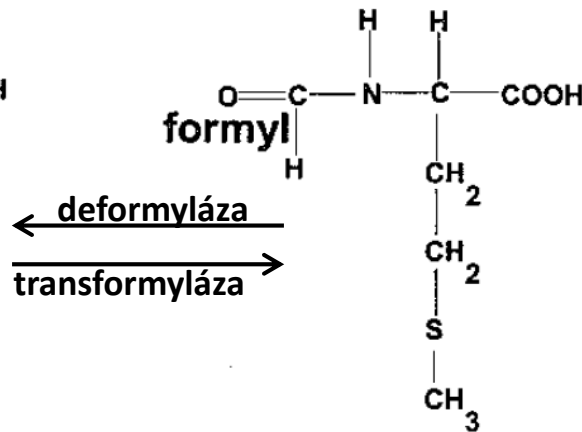
Průběh translace - Iniclace

- první se zařazuje aminokyselina **formylmethionin**

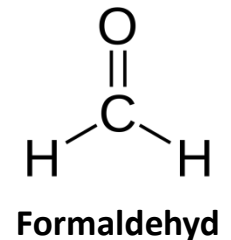
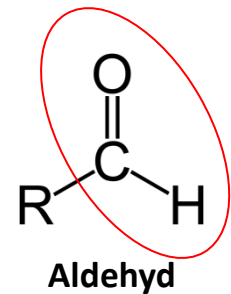
- vznik katalyzován transformylázou
- k formylaci dochází až po připojení metioninu k tRNA (fMet-tRNA^{fMet})
- vazba na kodon **AUG**, pokud je na začátku → fMet-tRNA^{fMet}, pokud není → Met-tRNA^{Met}
- po prodloužení na 15-30 AA se (50/50):
 - a) deformuluje na zpět methionin (katalyzováno deformylázou)
 - b) odbourává (katalyzováno aminopeptidázou)
- tedy cca 50% polypeptidů začíná methioninem a zbytek tou druhou AA (kterákoli)



Metionin



N-formylmetionin

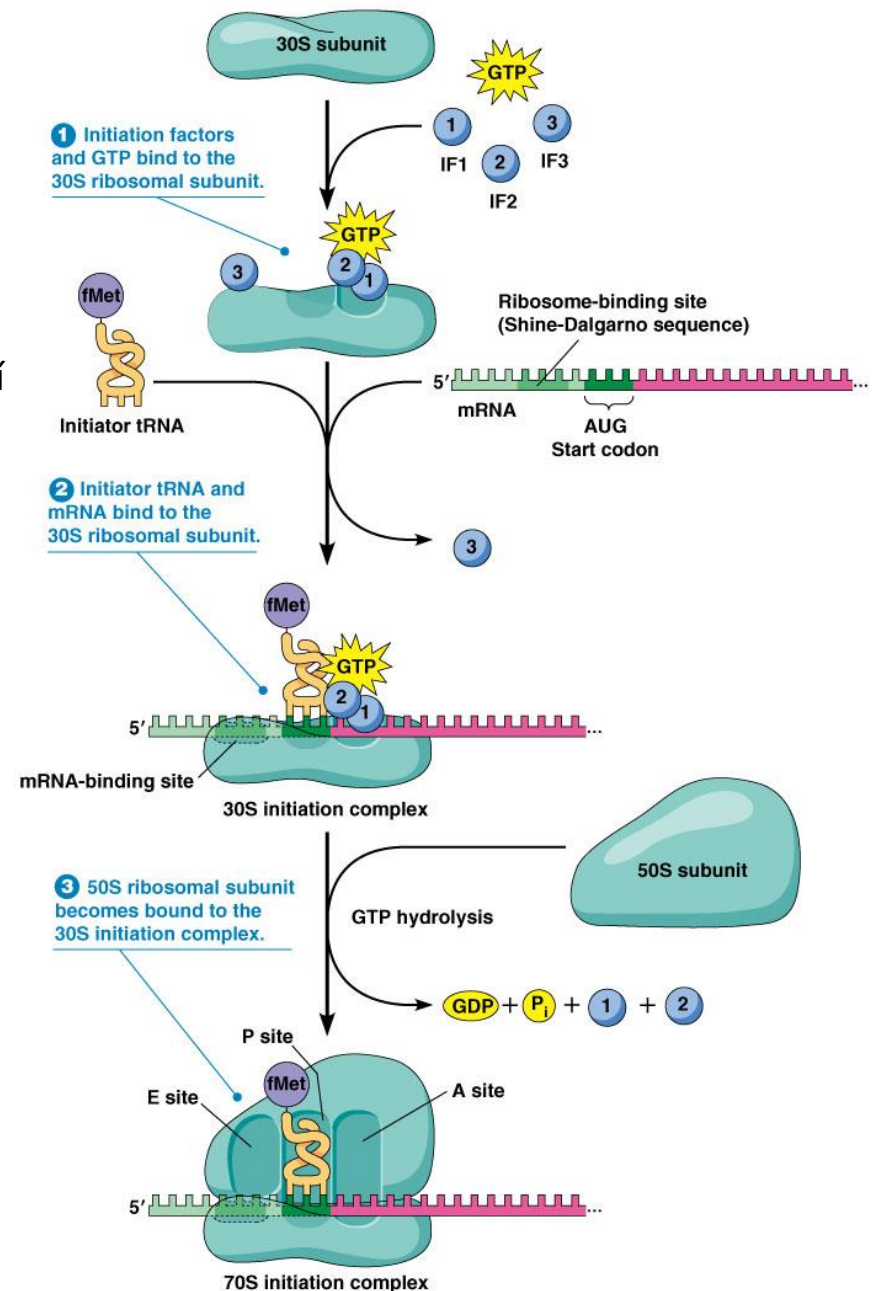


Aldehyd: organická sloučenina, která obsahuje aldehydickou funkční skupinu formyl (-CHO)
neplést s alkoholem (R-CH₂-OH)

Průběh translace - Iniclace

Iniciaci řídí iniciační faktory IF1, IF2 a IF3

1. Disociace ribozomu na jednotky 30S a 50S
 - vazba IF na 30S mj. zabraňuje znovuspojení
 - mRNA se spojuje Shine-Dalgarno sekvencí s podjednotkou 30S
2. IF2 se váže s fMet-tRNA^{fMet} a ten nasedne na AUG
3. Odpojení IF1 a IF2 za hydrolýzy GTP je signálem pro připojení velké podjednotky - zůstává fMet-tRNA^{fMet} na AUG kodonu mRNA v peptidylovém místě - **iniciační komplex** na úplném ribozomu



© 2012 Pearson Education, Inc.

Průběh translace - Elongace

Elongaci řídí elongační faktory:

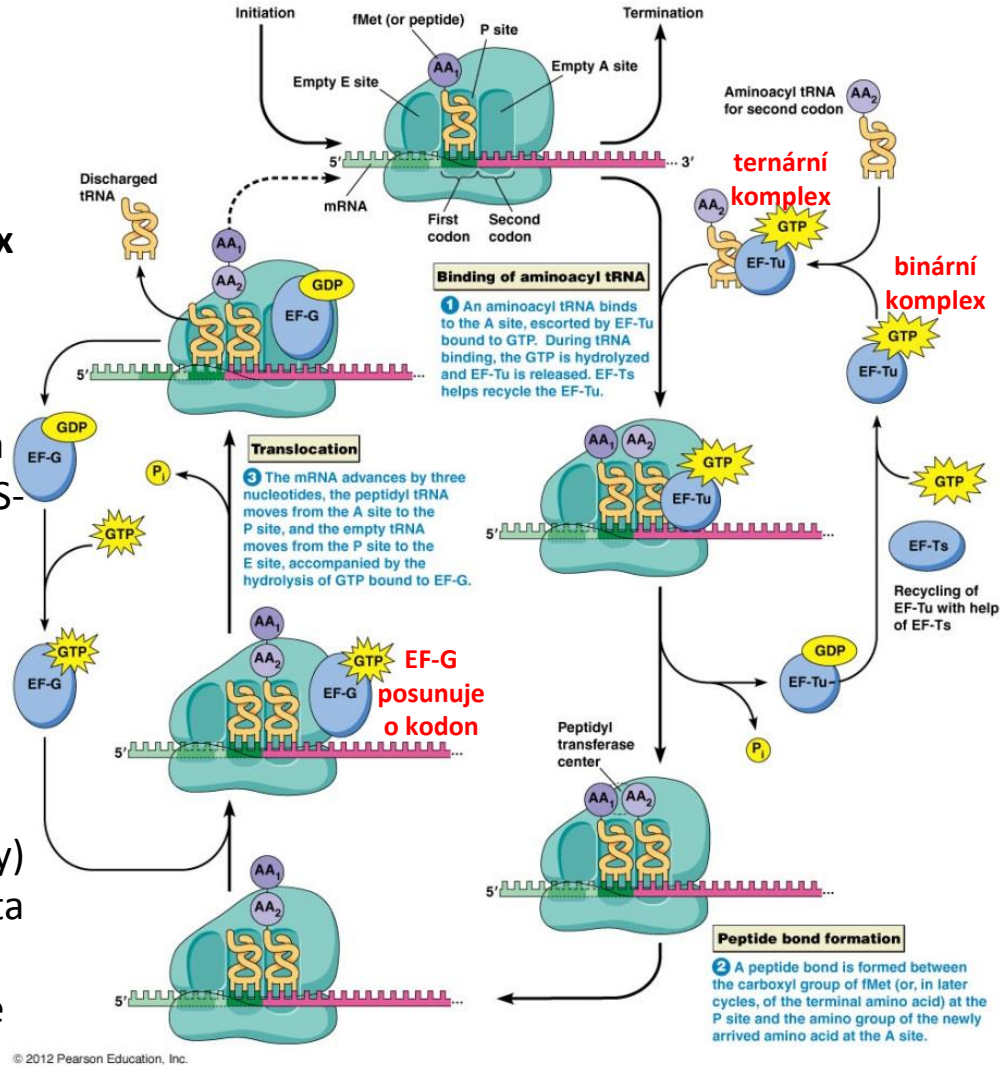
1. EF-Tu (přináší aminocyl tRNA)
2. EF-G (posunuje ribozom o 1 kodon)

1. **binární komplex** EF-Tu.GTP → **ternární komplex** EF-Tu.GTP.AA-tRNA (všechny AA s výjimkou fMET-tRNA^{fMet}) kodon AUG je čten vždy jako metionin

2. ternární komplex řídí vazbu aa-tRNA do A-místa ribozomu. Vazba na kodon mRNA a nukleotidy 16S-rRNA a 23S-rRNA. Hydrolýza GTP a uvolnění EF-Tu

3. přesun z A-místa do P-místa. Tvorba peptidové vazby se sousední AA. Z E-místa je vytěsněna deacylovaná tRNA

4. Ribozom se posune o jeden kodon (3 nukleotidy) směrem ke 3'-konci mRNA. Vlivem EF-G Do A-místa se dostává nový kodon. Prodloužení polypeptidového řetězce o jednu AA. Označujeme jako **translokace ribozomu**.



Latinsky: "binarius" = složený ze 2 částí; "ternarius" = složený ze 3 částí

Průběh translace - Terminace

Nutná přítomnost **terminačního kodonu** a **terminačních faktorů**

Terminaci řídí "release" faktory RF1, RF2 a RF3

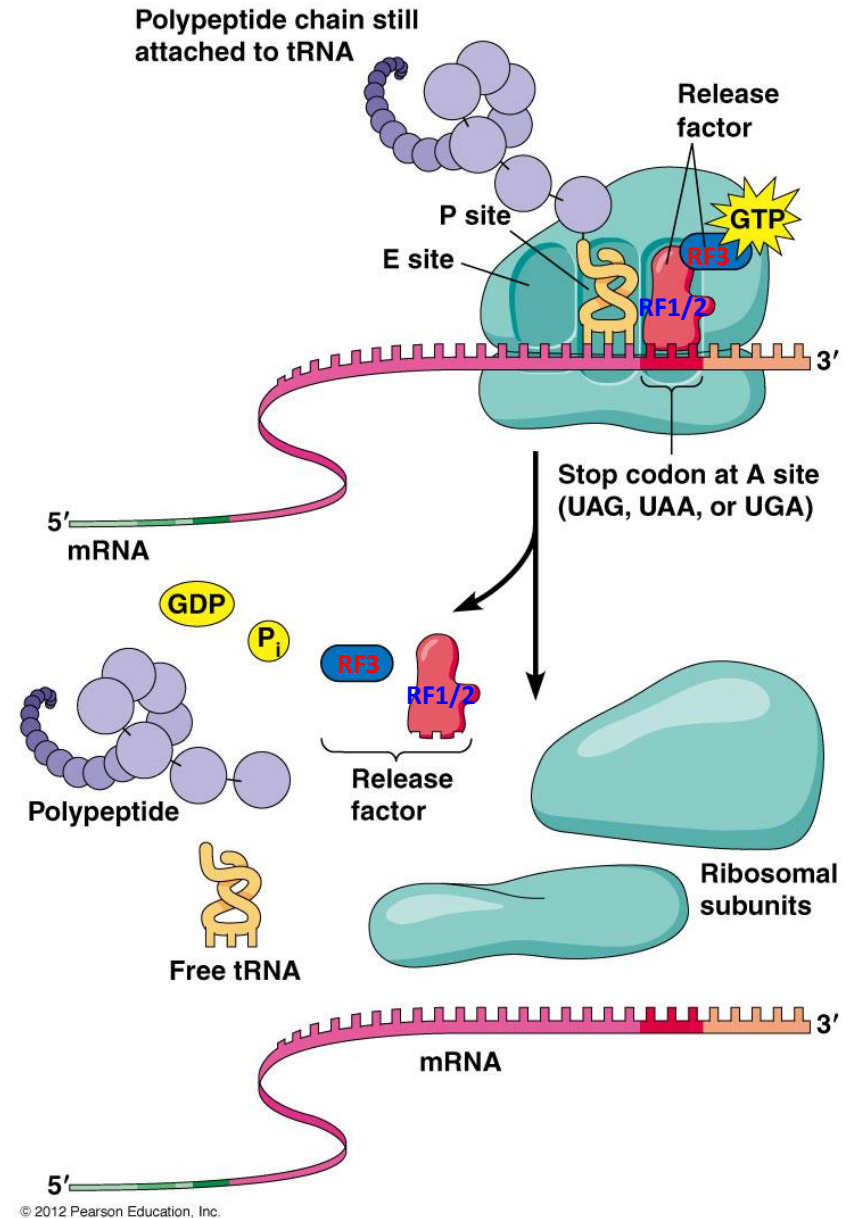
RF1: rozeznává kodony UAA a UAG

RF2: rozeznává kodony UAA a UGA

RF3: váže GTP a stimuluje činnost RF1 a RF2

Průběh terminace:

faktory uvolní tRNA z karboxylového konce polypeptidového řetězce - zastaví jeho prodlužování. Následuje uvolnění polypeptidu a rozpad ribozomu na podjednotky



Pojmenování STOP kodonů:

UAG	Amber
UGA	Opal
UAA	Ochre

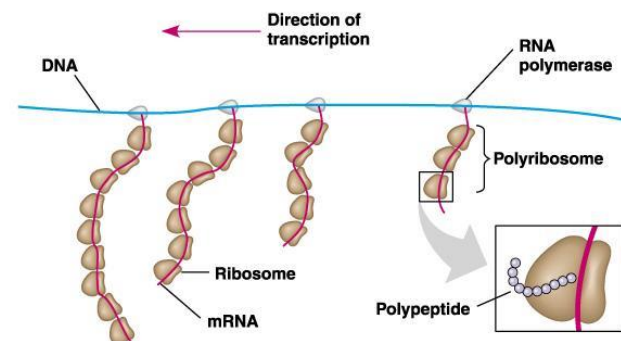
Nejprve byl objeven STOP kodon UAG a jeho objevitelé Richard Epstein a Charles Steinberg pojmenovali "Amber" po svém kamarádovi Harris Bernsteinovi. Další 2 STOP kodony byly pojmenovány pro zachování "pojmenování barevných nerostů".

der Bernstein.....	Amber.....	Jantar
der Opal.....	Opal.....	Opál
das Ocker.....	Ochre.....	Okr



Rychlost syntézy polypeptidu

- v *E. coli* se řetězec prodlužuje 10-20 AA/sek (cca 40 nukleotidů/s)
- na jedné molekule mRNA obvykle 10-15 ribozomů (polyribosom)



Genetický kód

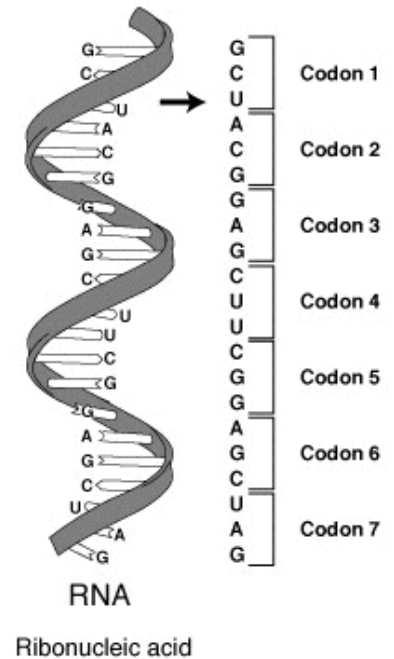
Sady tří nukleotidů (kodony) kódují jednotlivé aminokyseliny

4 druhy nukleotidů v kodonu po třech: **$4^3 = 64$ kombinací**

Platný pro všechny organismy od bakterie po člověka

Genetický kód prolomen v **1960's**

- Nebuněčný systém translace přeložil poly-uracil (UUUU...) do peptidu ze samých fenylalaninů, poly-adenin (AAAA...) do poly-lysinu
- Kombinace krátkých řetězců mRNA filtrovány skrz filtr s ribozomy a byly analyzovány výsledné aminokyseliny - odhalení tripletů kódujících jednotlivé AA



1959 Nobelova cena "syntéza RNA a DNA"

S. Ochoa
A. Konberg



Photo from the Nobel Foundation archive.
Severo Ochoa
Prize share: 1/2

Photo from the Nobel Foundation archive.
Arthur Kornberg
Prize share: 1/2

1968 Nobelova cena "breaking the genetic code"

M. W. Nirenberg
H. G. Khorana
R. W. Holley



Photo from the Nobel Foundation archive.
Robert W. Holley
Prize share: 1/3

Photo from the Nobel Foundation archive.
Har Gobind Khorana
Prize share: 1/3

Photo from the Nobel Foundation archive.
Marshall W. Nirenberg
Prize share: 1/3

Tabulka mRNA kodonů

Celkem 64 kodonů (4 x 4 x 4; dle tabulky) kóduje 20 + 1 + 1 aminokyselin
Platný pro prokaryota i eukaryota

nonpolar polar basic acidic (stop codon)

Standard genetic code

1st base	2nd base								3rd base		
	U		C		A		G				
U	UUU	(Phe/F) Phenylalanine	UCU	(Ser/S) Serine	UAU	(Tyr/Y) Tyrosine	UGU	(Cys/C) Cysteine	U		
	UUC		UCC		UAC		UGC		C		
	UUA		UCA		UAA		Stop (Ochre)		UGA	Stop (Opal)	A
	UUG		UCG		UAG		Stop (Amber)		UGG	(Trp/W) Tryptophan	G
C	CUU	(Leu/L) Leucine	CCU	(Pro/P) Proline	CAU	(His/H) Histidine	CGU	(Arg/R) Arginine	U		
	CUC		CCC		CAC		CGC		C		
	CUA		CCA		CAA		(Gln/Q) Glutamine		CGA	A	
	CUG		CCG		CAG				CGG	G	
A	AUU	(Ile/I) Isoleucine	ACU	(Thr/T) Threonine	AAU	(Asn/N) Asparagine	AGU	(Ser/S) Serine	U		
	AUC		ACC		AAC		AGC		C		
	AUA		ACA		AAA		(Lys/K) Lysine		AGA	A	
	AUG ^[A]		ACG		AAG				AGG	G	
G	GUU	(Val/V) Valine	GCU	(Ala/A) Alanine	GAU	(Asp/D) Aspartic acid	GGU	(Gly/G) Glycine	U		
	GUC		GCC		GAC		GGC		C		
	GUA		GCA		GAA	(Glu/E) Glutamic acid	GGA		A		
	GUG		GCG		GAG		GGG		G		

AUG na začátku řetězce je rozpoznán formylmethioninem, jinde pouze methioninem

21. aminokyselina Selenocystein je rozpoznávána stop kodonem Opal (UGA) za specifických podmínek (vč. člověka)

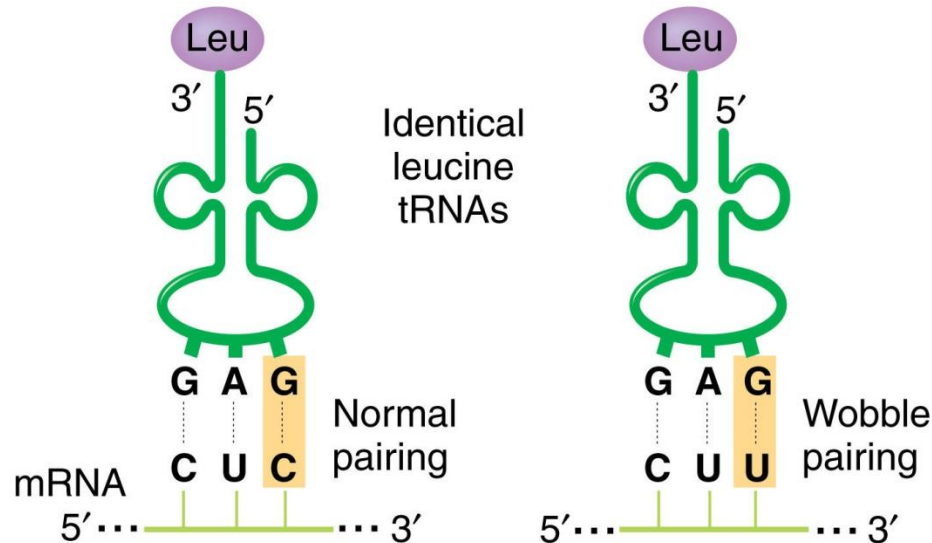
22. aminokyselina Pyrrolysin je rozpoznávána stop kodonem Amber (UAG) za specifických podmínek (pouze prokaryota)

Kodování aminokyselin:

- Celkem 64 kodonů na mRNA (4 x 4 x 4; dle tabulky) kóduje 20 + 1 + 1 aminokyselin
- Antikodonů na **tRNA**, které rozeznávají kodony na mRNA je **vždy méně** a liší se dle skupiny organismů
- Tedy, jedna tRNA, která přináší aminokyselinu dokáže rozpoznat více kodonů na mRNA (na posledním - třetím - místě kodonu nemusí odpovídat komplementární báze)

= Pravidlo o kolísavém párování bazí (wobble base pairing)

- v závislosti na druhu organismu může existovat více tRNA pro jednu AA
 - *E. coli*: 40 antikodonů (tRNA) pro 64 kodonů (gramnegativní bakterie)
 - Grampozitivní bakterie: 33 tRNA; mykoplasmata: 28 tRNA



© 2010 Pearson Education, Inc.

Mykoplasmata: drobné bakterie bez buněčné stěny. Resistentní vůči antibiotikům cílícím na buněčnou stěnu (např. Penicilin)

Pravidlo o kolísavém párování bazí

Gramnegativní bakterie: 40 antikodonů* (tRNA) pro 64 kodonů

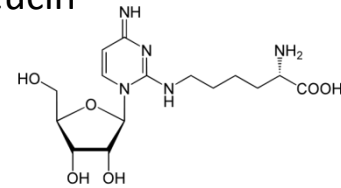
Antikodony tRNA používané ke čtení genetického kódu v ribozomech gramnegativních bakterií

kodon (5'XXX3')	antikodon (5'XXX3')	kodon (5'XXX3')	antikodon (5'XXX3')	kodon (5'XXX3')	antikodon (5'XXX3')	kodon (5'XXX3')	antikodon (5'XXX3')
Phe (UUU)	GAA	Ser (UCU)	GGA	Tyr (UAU)	QUA	Cys (UGU)	GCA
Phe (UUC)		Ser (UCC)		Tyr (UAC)		Cys (UGC)	
Leu (UUA)	UAA	Ser (UCA)	UGA	Trm (UAA)	0	Trm (UGA)	0
Leu (UUG)	CAA	Ser (UCG)	CGA	Trm (UAG)	0	Trp (UGG)	CCA
Leu (CUU)	GAG	Pro (CCU)	GGG	His (CAU)	QUG	Arg (CGU)	ICG
Leu (CUC)		Pro (CCC)		His (CAC)		Arg (CGC)	
Leu (CUA)	UAG	Pro (CCA)	UGG	Gln (CAA)	UUG	Arg (CGA)	CCG
Leu (CUG)	CAG	Pro (CCG)	CGG	Gln (CAG)	CUG	Arg (CGG)	
Ile (AUU)	GAU	Thr (ACU)	GGU	Asn (AAU)	QUU	Ser (AGU)	GCU
Ile (AUC)		Thr (ACC)		Asn (AAC)		Ser (AGC)	
Ile (AUA)	LAU	Thr (ACA)	UGU	Lys (AAA)	JUU	Arg (AGA)	UCU
Met (AUG)	CAU	Thr (ACG)	CGU	Lys (AAG)		Arg (AGG)	CCU
Val (GUU)		Ala (GCU)		Asp (GAU)	QUC	Gly (GGU)	GCC
Val (GUC)	UAC	Ala (GCC)	GGC	Asp (GAC)		Gly (GGC)	
Val (GUA)		Ala (GCG)		Glu (GAA)	UUC	Gly (GGA)	UCC
Val (GUG)	GAC	Ala (GCA)	UGC	Glu (GAG)		Gly (GGG)	CCC

**Neobvyklé baze typické v tRNA
(na posledním místě*)**

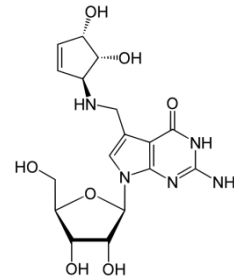
Lyzidin (L)

- specifický pro isoleucin
- vazba na adenin



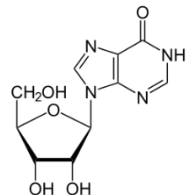
Queosine (Q)

- specifický pro histidin, tyrosin, kyselinu asparagovou a asparagin
- vazba na uracil a cytosin



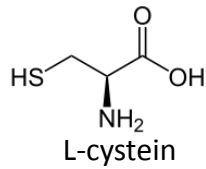
Inosine (I)

- specifický pro arginin
- vazba na uracil a cytosin

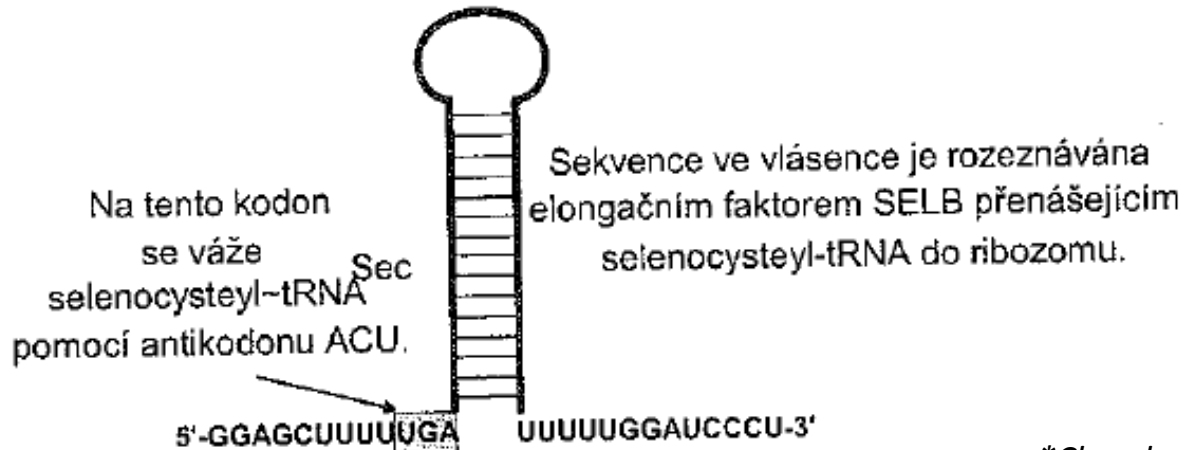


* Antikodon v tabulce nutno obrátit zrcadlově

21. aminokyselina Selenocystein (Sec)



- je obsažen v tzv. "selenoproteinech" (např. enzym glutathion peroxidáza)
- vyskytuje se i u člověka
- přenášen speciální tRNA (tRNA^{Sec})
- na tRNA^{Sec} se nejprve váže serin, který je pomocí selenocysteinázy přeměněn na selenocystein
- rozpoznává Opal kodon UGA (normálně terminační); známo od r1986*
- aby nebyl UGA rozpoznán jako terminační, je nutná vlásenka (hairpin) na mRNA a protein SELB
- selenocysteyl-tRNA^{Sec} je do ribozomu přenášena specifickým **elongačním faktorem SELB**

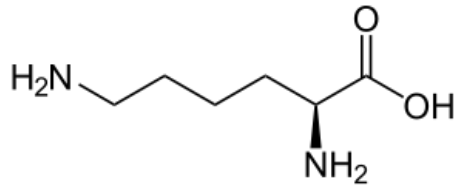


*Chambers et al., Zinoni et al.

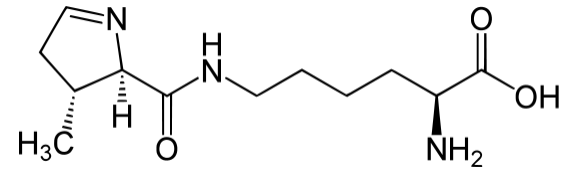
Glutathion peroxidáza: enzym, který v těle mění jedovatý peroxid vodíku na vodu a molekulární kyslík

22. aminokyselina Pyrrolysin (Pyl)

- obsažena v některých archea a bakteriích, ne u člověka
- rozpoznává Amber kodon UAG (normálně terminační)
- objeven v r. 2002*
- vyskytuje se v aktivním místě enzymu methyltransferázy u archeí produkujících metan
- syntetizován ze 2 molekul lysinu
- podobně jako u selenocysteinu, přítomnost RNA vlásenky (PYLIS; Pyl insertion structure) za UAG místem umožňuje inserci Pyrrolysinu v archaea.
- ostatní varianty lysinu (např. hydroxylysin, methyllysin) nejsou kódovány samostatným kodonem a vznikají post-translační modifikací lysinu



2x L-lysine



Pyrrolysine

REPORTS

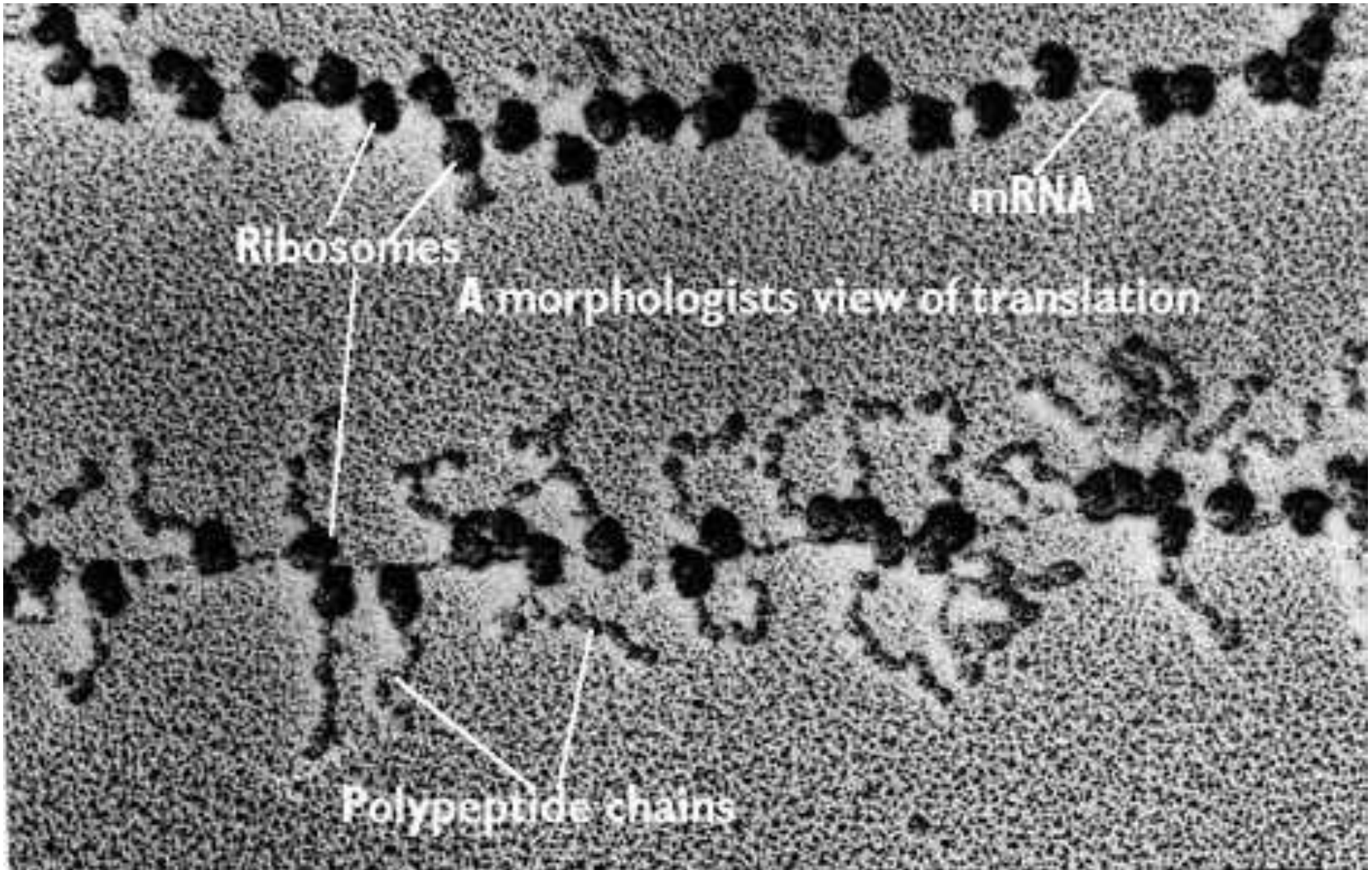
Pyrrolysine Encoded by UAG in Archaea: Charging of a UAG-Decoding Specialized tRNA

Gayathri Srinivasan, Carey M. James, Joseph A. Krzycki*

Pyrrolysine is a lysine derivative encoded by the UAG codon in methylamine methyltransferase genes of *Methanosarcina barkeri*. Near a methyltransferase gene cluster is the *pylT* gene, which encodes an unusual transfer RNA (tRNA) with a CUA anticodon. The adjacent *pylS* gene encodes a class II aminoacyl-tRNA synthetase that charges the *pylT*-derived tRNA with lysine but is not closely related to known lysyl-tRNA synthetases. Homologs of *pylS* and *pylT* are found in a Gram-positive bacterium. Charging a tRNA_{CUA} with lysine is a likely first step in translating UAG amber codons as pyrrolysine in certain methanogens. Our results indicate that pyrrolysine is the 22nd genetically encoded natural amino acid.

* Srinivasan et al., Science 2002

Translace v elektronovém mikroskopu



Translace eukaryotické mRNA

Část druhá: Eukaryotická translace

a) u živočichů v cytoplasmě a v mitochondriích

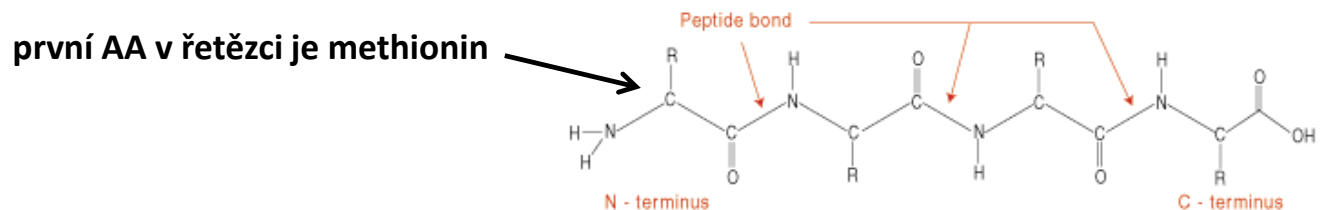
b) u rostlin v cytoplasmě, mitochondriích a chloroplastech

Cytoplasmatické ribozomy: liší se od prokaryotických; 80S

Mitochondriální a chloroplastové ribozomy: stejné jako u prokaryot; 70S

Rozdíly v eukaryotické (cytoplasmatické) translaci oproti prokaryotické:

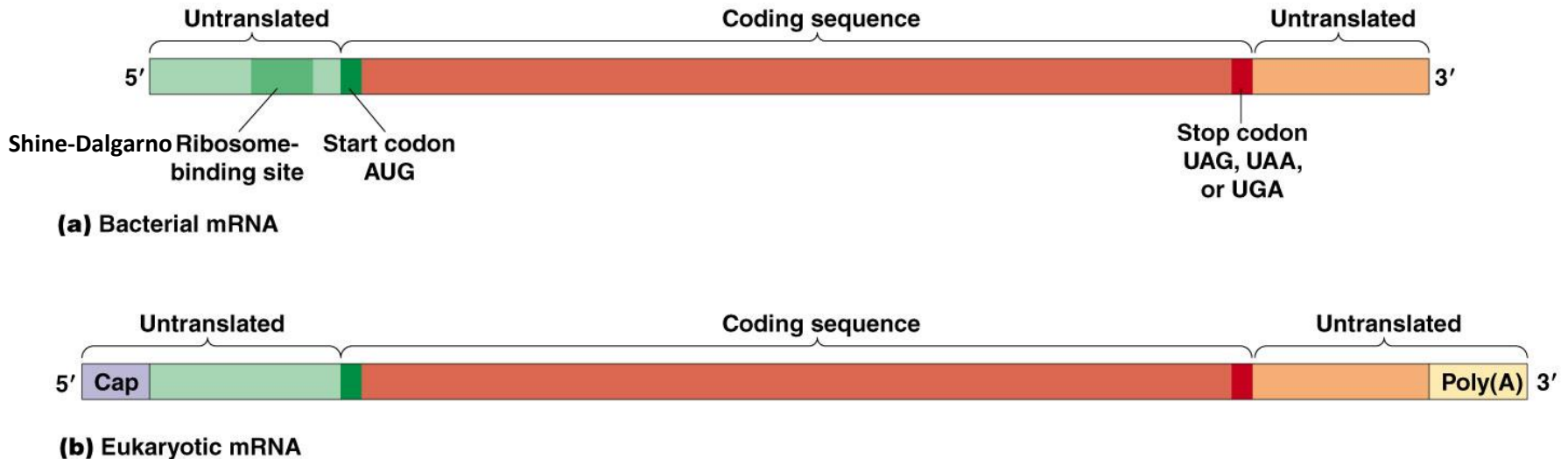
1. Počáteční AA je methionin (na N-konci polypeptidového řetězce)
 - iniciační tRNA^{Met} není formylována *in vivo**
 - stejný iniciační kodon AUG
 - po prodloužení řetězce bývá odštěpen aminopeptidázou
2. Vyšší počet iniciačních faktorů než u prokaryot



* pokusy prokázaly, že *in vitro* ji lze formylovat formylázou z *E. coli*

Eukaryotní mRNA:

- narušil od prokaryotní mRNA neobsahuje Shine-Dalgarno sekvenci (ribosome binding site)
- startovací kodon se nachází v "sekvenci Kozakové" CAAA**AUG**, kam je položena první AA Met-tRNA^{Met} proti kodonu AUG (ne, formylmethionin)
- oproti prokaryotům, obsahuje navíc:
 - čepička na 5'-konci (5 prime cap; m7G - 7-metylguanozin) - váže CBP-proteiny* nezbytné pro iniciaci translace (posadí mRNA na ribozom)
 - polyadenylace 3'-konce (3 prime poly(A) tail) - ochrana proti účinku exonukleáz



© 2012 Pearson Education, Inc.

*CREB-binding protein (poprvé izolován jako nukleární protein, který se váže na CREB protein)

Cytoplasmatický ribozom 80S:

- 2 podjednotky složené z:
 - 4 molekuly rRNA (18S, 5S, 5,8S a 28S u savců)
 - 70 proteinů
- Sedimentační koeficient závisí na druhu organismu:
 - celkem kolem 80S
 - podjednotky cca 40S a 60S

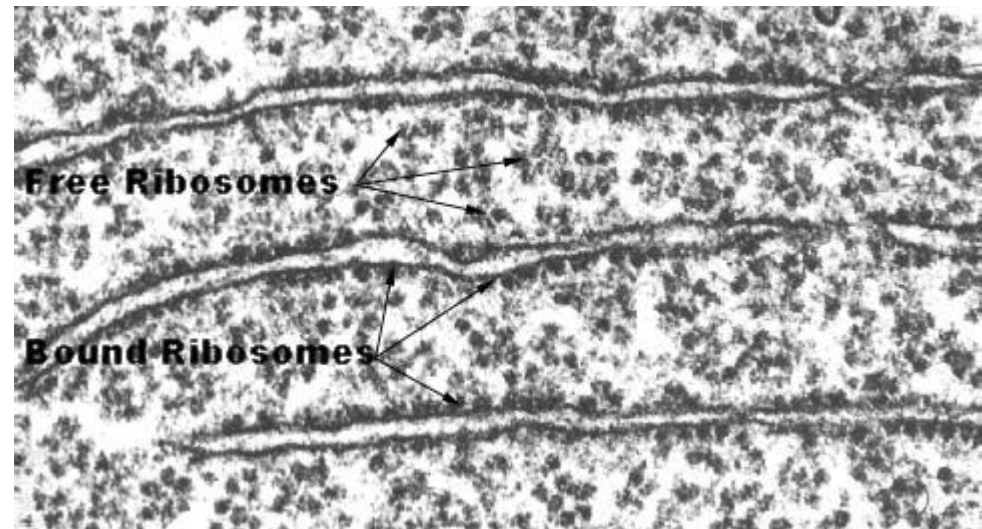
40S 18S rRNA 30 proteinů
60S 5,0S rRNA 5,8S rRNA 28S rRNA (savci) 25S rRNA (rostliny) 40 proteinů

a) Volné ribozomy: volně v cytoplasmě

- většinou syntéza intracelulárních proteinů

b) Vázané ribozomy: vázané na endoplazmatické retikulum (ER)

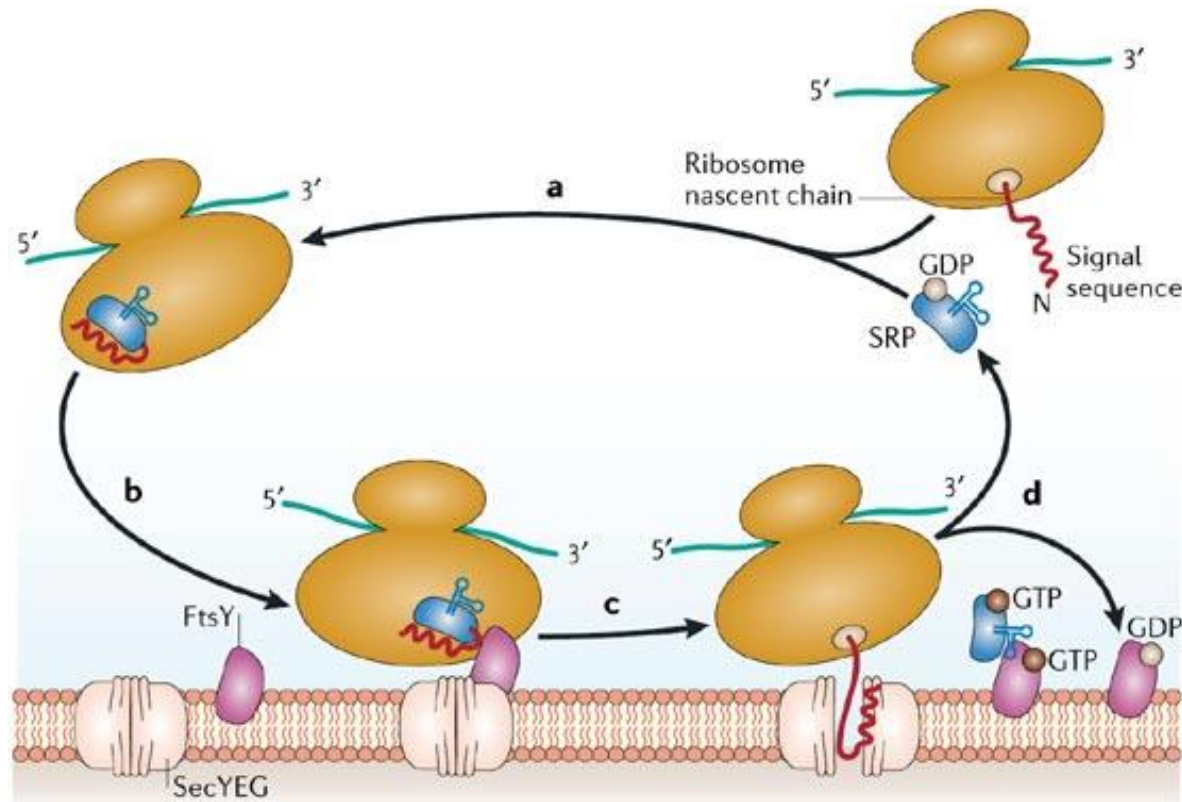
- pokryté části ER (drsňé ER) a nepokryté části ER (hladké ER)
- většinou syntéza extracelulárních proteinů (cirkulující v krvi a membránové)



Signální rozpoznávací částice (SRP)

- SRP slouží pro vazbu proteinů na endoplasmatické retikulum (pro transport ven z buňky či zabudování do membrán) u eukaryot*
- SRP se vyskytuje též u prokaryot u proteinů cytoplasmatické membrány*
- N-konec polypeptidu obsahuje signální sekvenci (15-25 AA)
- Během syntézy vazba na SRP a zastavení elongace
- Komplex nascentního polypeptidu + SRP se váže na specifický receptor v membráně ER
- SRP je odštěpen

- po dokončení translace je ribozom uvolněn z ER



Průběh cytoplasmatické translace

Elongace

- Řízena elongačními faktory EF-1 a EF-2
- Oba faktory značně homologní s bakteriálními EF-T a EF-G
- Elongace probíhá stejně jako u bakterií

Terminace

- Na rozdíl od prokaryot (3 RFs) pouze jeden terminační faktor: **eRF** (eukaryotic release factor)
- Rozeznává stejné 3 terminační kodony jako u prokaryot a uvolňuje polypeptidový řetězec z ribozomu

UAG

UGA

UAA

Amber

Opal

Ochre



Kódování aminokyselin u eukaryot

- Standardní genetický kód
- Platí pravidlo o kolísavém párování bazí: **45 tRNA** pro 64 mRNA
- z neobvyklých bazí se vyskytuje pouze inosine (I) (vazba na uracil a cytosin)

Tab. 27

Antikodony tRNA používané ke čtení genetického kódu v cytoplazmatických ribozomech eukaryotické buňky

aminokyselina kodon (5'XXX3')	antikodon (5'XXX3')	aminokyselina kodon (5'XXX3')	antikodon (5'XXX3')	aminokyselina kodon (5'XXX3')	antikodon (5'XXX3')	aminokyselina kodon (5'XXX3')	antikodon (5'XXX3')
Phe (UUU)	GAA	Ser (UCU)	IGA	Tyr (UAU)	GUA	Cys (UGU)	GCA
Phe (UUC)		Ser (UCC)		Tyr (UAC)		Cys (UGC)	
Leu (UUA)	UAA CAA	Ser (UCA)	UGA CGA	Trm (UAA)	0	Trm (UGA)	0
Leu (UUG)		Ser (UCG)		Trm (UAG)	0	Trp (UGG)	CCA
Leu (CUU)	IAG UAG CAG	Pro (CCU)	IGG UGG CGG	His (CAU)	GUG	Arg (CGU)	ICG UCG CCG
Leu (CUC)		Pro (CCC)		His (CAC)		Arg (CGC)	
Leu (CUA)		Pro (CCA)		Gln (CAA)	UUG CUG	Arg (CGA)	
Leu (CUG)		Pro (CCG)		Gln (CAG)		Arg (CGG)	
Ile (AUU)	IAU UAU	Thr (ACU)	IGU UGU CGU	Asn (AAU)	GUU	Ser (AGU)	GCU UCG CCG
Ile (AUC)		Thr (ACC)		Asn (AAC)		Ser (AGC)	
Ile (AUA)		Thr (ACA)		Lys (AAA)	UUU CUU	Arg (AGA)	
Met (AUG)		Thr (ACG)		Lys (AAG)		Arg (AGG)	
Val (GUU)	IAC UAC CAC	Ala (GCU)	IGC UGC CGC	Asp (GAU)	GUC	Gly (GGU)	GCC UCC CCC
Val (GUC)		Ala (GCC)		Asp (GAC)		Gly (GGC)	
Val (GUA)		Ala (GCA)		Glu (GAA)	UUC CUC	Gly (GGA)	
Val (GUG)		Ala (GCG)		Glu (GAG)		Gly (GGG)	

* Antikodon v tabulce nutno obrátit zrcadlově

Translace v mitochondriích

- translace podobná jako u bakterií (podpora endosymbiotické teorie)
- začíná formylmethioninem
- ribozomy 70S
- probíhá uvnitř mitochondrie, ale není úplně autonomní
- závislá na některých proteinech tvořených v cytoplasmě
 - aminoacyl-tRNA-syntetázy; ribozomové proteiny a iniciační a elongační faktory
 - vlastní tRNA

Genetický kód:

- pouze 22 tRNA (bez neobvyklých bazí)
- **nejnižší** známý počet druhů tRNA schopný zajistit translaci

aminokyselina kodon (5'XXX3')	antikodon (5'XXX3')	aminokyselina kodon (5'XXX3')	antikodon (5'XXX3')	aminokyselina kodon (5'XXX3')	antikodon (5'XXX3')	aminokyselina kodon (5'XXX3')	antikodon (5'XXX3')
Phe (UUU)	GAA	Ser (UCU)	UGA	Tyr (UAU)	GUA	Cys (UGU)	GCA
Phe (UUC)		Ser (UCC)		Tyr (UAC)		Cys (UGC)	
Leu (UUA)	UAA	Ser (UCA)	UGG	Trm (UAA)	0	Trp (UGA)	UCA
Leu (UUG)		Ser (UCG)		Trm (UAG)	0	Trp (UGG)	
Leu (CUU)	UAG	Pro (CCU)	UGG	His (CAU)	GUG	Arg (CGU)	UCG
Leu (CUC)		Pro (CCC)		His (CAC)		Arg (CGC)	
Leu (CUA)		Pro (CCA)		Gln (CAA)	UUG	Arg (CGA)	
Leu (CUG)		Pro (CCG)		Gln (CAG)		Arg (CGG)	
Ile (AUU)	GAU	Thr (ACU)	UGU	Asn (AAU)	GUU	Ser (AGU)	GCU
Ile (AUC)		Thr (ACC)		Asn (AAC)		Ser (AGC)	
Met (AUA)	UAU	Thr (ACA)	UGC	Lys (AAA)	UUU	Trm (AGA)	0
Met (AUG)		Thr (ACG)		Lys (AAG)		Trm (AGG)	0
Val (GUU)	UAC	Ala (GCU)	UGC	Asp (GAU)	GUC	Gly (GGU)	UCC
Val (GUC)		Ala (GCC)		Asp (GAC)		Gly (GGC)	
Val (GUA)		Ala (GCA)		Glu (GAA)	UUC	Gly (GGA)	
Val (GUG)		Ala (GCG)		Glu (GAG)		Gly (GGG)	

* Antikodon v tabulce nutno obrátit zrcadlově

Translace v chloroplastech

- podobná jako u bakterií a mitochondrií
- začíná formylmethioninem
- ribozomy 70S
- 30 druhů tRNA (bez neobvyklých bazí)

aminokyselina kodon (5'XXX3')	antikodon (5'XXX3')	aminokyselina kodon (5'XXX3')	antikodon (5'XXX3')	aminokyselina kodon (5'XXX3')	antikodon (5'XXX3')	aminokyselina kodon (5'XXX3')	antikodon (5'XXX3')
Phe (UUU)	GAA	Ser (UCU)	CGA	Tyr (UAU)	GUA	Cys (UGU)	GCA
Phe (UUC)		Ser (UCC)		Tyr (UAC)		Cys (UGC)	
Leu (UUA)	UAA CAA	Ser (UCA)	UGA	Trm (UAA)	0	Trm (UGA)	0
Leu (UUG)		Ser (UCG)		Trm (UAG)	0	Trp (UGG)	CCA
Leu (CUU)	UAG	Pro (CCU)	UGG	His (CAU)	GUG	Arg (CGU)	ACG
Leu (CUC)		Pro (CCC)		His (CAC)		Arg (CGC)	
Leu (CUA)		Pro (CCA)		Gln (CAA)	UUG	Arg (CGA)	
Leu (CUG)		Pro (CCG)				Gln (CAG)	
Ile (AUU)	GAU	Thr (ACU)	GGU	Asn (AAU)	GUU	Ser (AGU)	GCU
Ile (AUC)		Thr (ACC)		Asn (AAC)		Ser (AGC)	
Ile (AUA)	CAU	Thr (ACA)	UGU	Lys (AAA)	UUU	Arg (AGA)	UCU
Met (AUG)	CAU	Thr (ACG)		Lys (AAG)		Arg (AGG)	
Val (GUU)	GAC	Ala (GCU)	UGC	Asp (GAU)	GUC	Gly (GGU)	GCC
Val (GUC)		Ala (GCC)		Asp (GAC)		Gly (GGC)	
Val (GUA)	UAC	Ala (GCA)		Glu (GAA)	UUC	Gly (GGA)	
Val (GUG)		Ala (GCG)				Gly (GGG)	

* Antikodon v tabulce nutno obrátit zrcadlově

Posttranslační procesy

Posttranslační procesy

- U prokaryot i eukaryot
- translací končí přenos genetické informace ze strukturního genu na protein
- vlastnosti proteinu určuje primární struktura: tvar, chemické vlastnosti...

Úpravy polypeptidového řetězce

- a) kotranslační - úprava nascentního* řetězce polypeptidu
- b) posttranslační - vzniká funkční polypeptidový řetězec

Úrovně organizace proteinu (3D tvar)

1. Primární struktura: *pořadí aminokyselin v řetězci*
2. Sekundární struktura: *prostorové uspořádání hlavního řetězce (α -helix a β -skládaný list)*
3. Terciární struktura: *prostorové uspořádání celého řetězce (vč. reakce na okolí hydrofobní)*
4. Kvartérní struktura: *uspořádání více podjednotek (oligomerní protein)*

**Nascentní řetězec: ještě se prodlužující (rozlišujte mezi nascentním řetězcem mRNA a polypeptidu)*

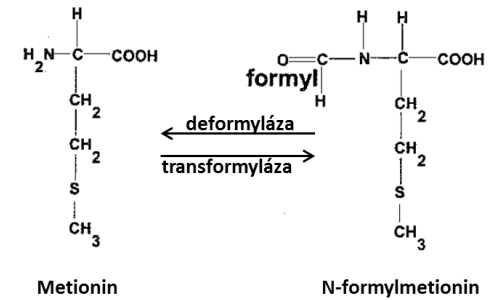
Někdy nebývá rozlišována kotranslace a posttranslace a oba děje jsou spojeny do posttranslačních modifikací

KOTRANSLACE

Úprava nascentního* řetězce

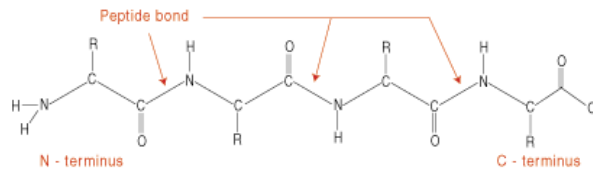
- Deformylace

- u prokaryot; u eukaryot pouze v mitochondriích a chloroplastech
- odstranění formylové skupiny z formylmethioninu na N-koci polypeptidového řetězce
- enzym: deformyláza



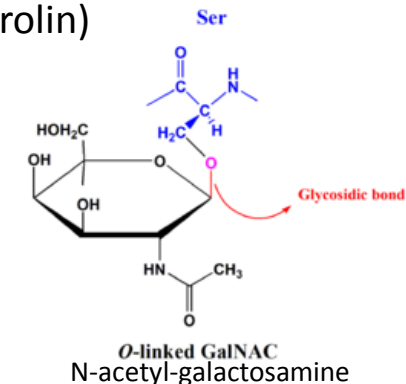
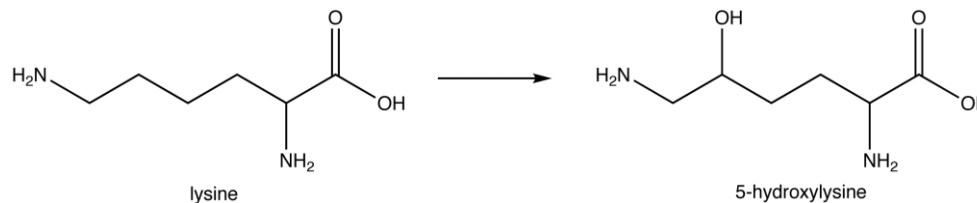
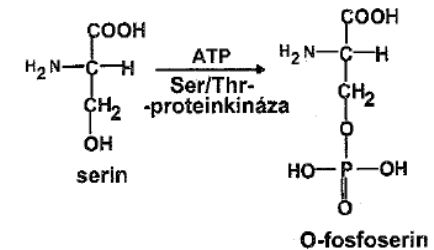
- Odštěpení aminokyselin

- u prokaryot i eukaryot
- odštěpení první AA (N-terminálního methioninu) (popř. i dalších AA)
- enzym: aminopeptidáza



- Chemická modifikace aminokyselin polypeptidu

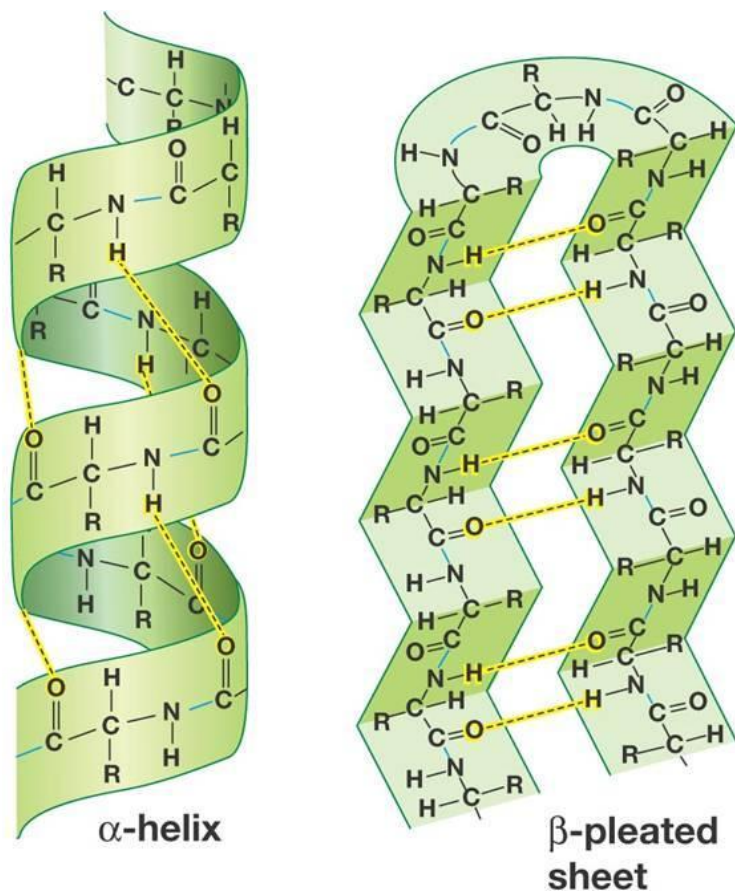
- modifikace R-zbytků aminokyselin
 - a) Fosforylace - připojení fosfátu (serin, treonin a tyrozin)
 - b) Glykozylace - připojení cukru (asparagin a serin)
 - c) Hydroxylace - připojení hydroxylové skupiny (-OH; lyzin a prolin)
- katalýza příslušnými enzymy



*Nascentní řetězec: ještě se prodlužující

Sekundární struktura

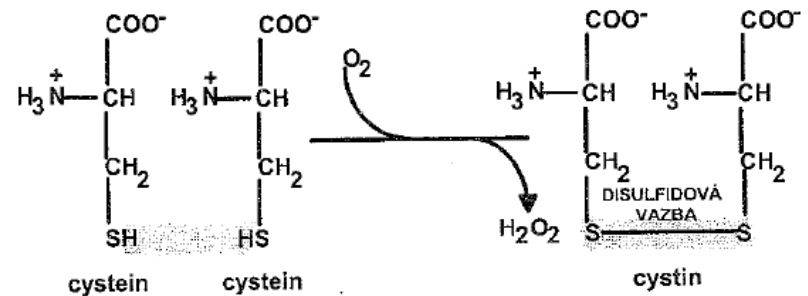
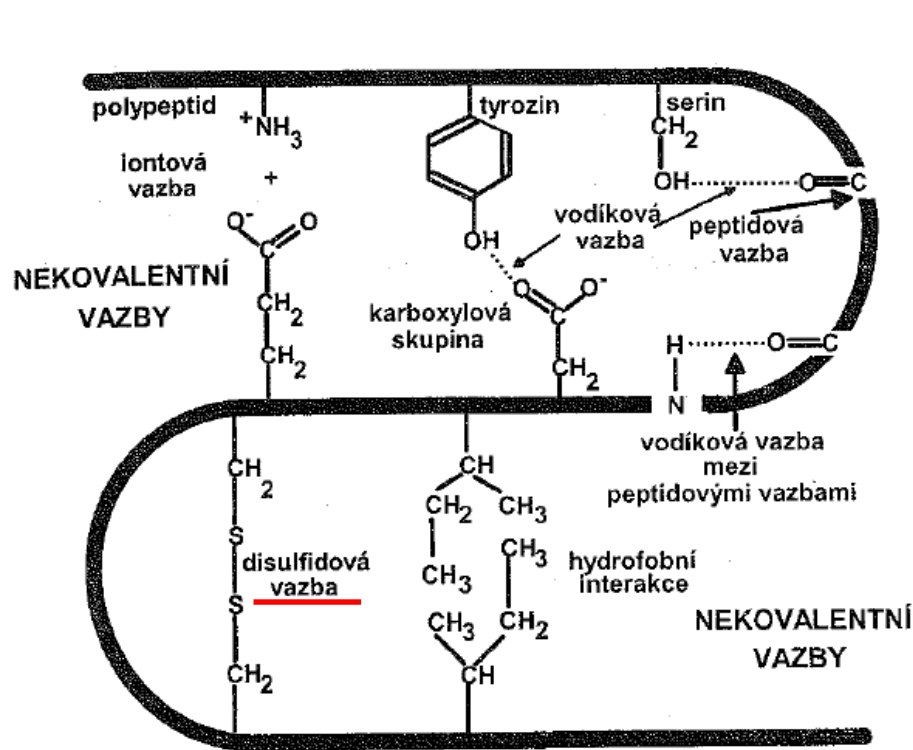
- Spontánní tvorba **sekundární** struktury ještě před dokončením syntézy polypeptidu
- Sekundární strukturu proteinu určují vodíkové vazby mezi CO- a NH- skupinami
- α -helix nebo β -skládaný list
- rozhodnutí jestli bude helix nebo list je zřejmě určeno primární strukturou



Terciární struktura

- Tvorba disulfidových vazeb (SS můstek)

- proti sobě položené sulfhydrylové skupiny mohou být oxidovány - tvorba **disulfidových vazeb**
- pouze u cysteinu (vodíky se odštěpí a vytvoří peroxid vodíku)
- tvorba terciární struktury polypeptidového řetězce
- **disulfidová vazba je kovalentní**
- spontánně se tvoří pomalu oxidací (hodiny), v buňce je však katalyzována enzymem **proteindisulfidizomerázou** (sek.)



*Kovalentní vazba: dva prvky sdílí jeden nebo více párů elektronů, vysoká vazebná energie
Nekovalentní vazby: nižší vazebná energie, např. iontová nebo vodíková*

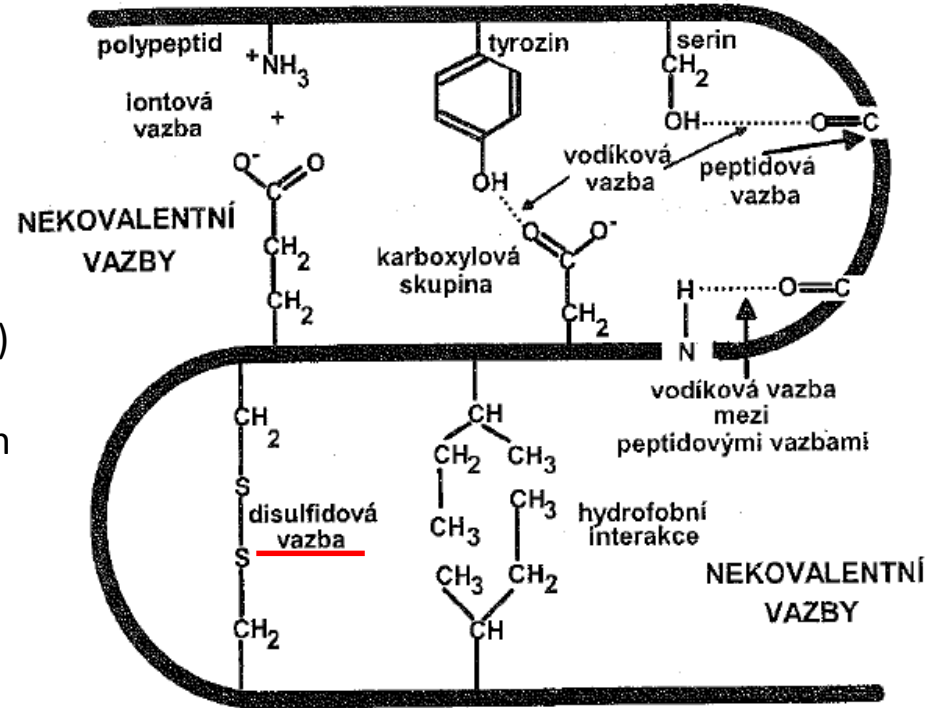
Terciární struktura

- Tvorba disulfidových vazeb (SS můstek)

Disulfidová vazba spojuje

- cysteiny stejného řetězce (např. u ribonukleáz)
- cysteiny různých řetězců (např. glutathion, inzulín)

Mikroorganismy žijící v extrémně vysokých teplotách mají ve svých bílkovinách mnohem více SS můstků než ostatní organismy



Definice nekovalentních vazeb účastnících se tvorby **terciární struktury proteinu**:

Nekovalentní vazby:

- **iontová:** jeden prvek přitáhne elektron(y) druhého a stane se aniontem (-), druhý prvek kationtem (+). Prvky jsou vázány elektrostaticky. Slabší vazba než kovalentní
- **vodíková** (též vodíkový můstek): podstatně slabší než kovalentní a iontová. Vodík je vázán na silný elektronegativní prvek (kyslík, fluor, dusík). Jediný elektron vodíku je odčerpán a (např. kyslíkem) kladně nabitě jádro je odhaleno a vzniká parciální kladný náboj, který poutá okolní elektronegativní prvky (např. kyslík)

Kovalentní vazba:

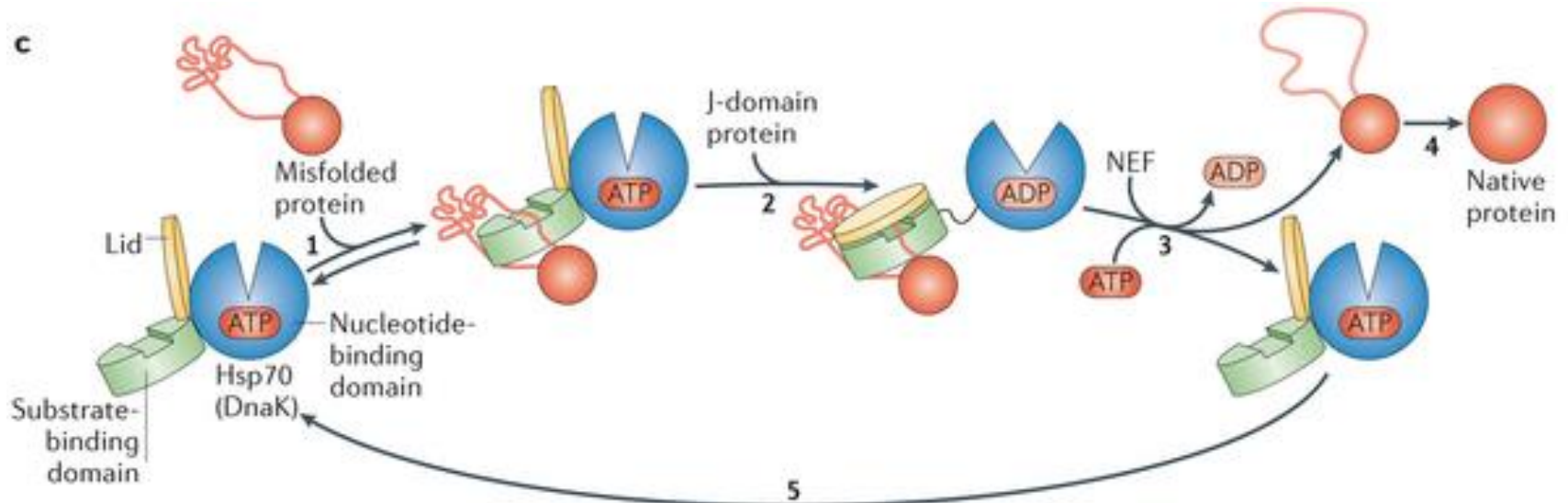
dva prvky sdílí jeden nebo více párů elektronů, vysoká vazebná energie

Skládání proteinů (folding)

- pro správnou funkci musí být protein správně složen
- Primární sekvence je někdy dostatečná pro přímé skládání

Chaperony

- Čerstvě vytvořené nebo denaturované proteiny často potřebují pomoc "chaperonů" pro složení do správného tvaru
- **Funkce:** Chrání nesbalené proteiny a pomáhají jejich správnému sbalení
- Nejznámějšími chaperony jsou **heatshock proteiny** rodiny **Hsp70** (velikost 70 kDa), které v podobné struktuře existují u všech organismů
- Prokaryota exprimují 3 proteiny Hsp70 rodiny: **DnaK**, HscA (Hsc66) a HscC (Hsc62)
- Heatshock proteiny se také tvoří vlivem stresu (např. vysoké teplotě)
- Proteiny denaturované teplem mohou být renaturovány pomocí chaperonů



POSTTRANSLAČNÍ ÚPRAVY

Chemická modifikace, kterou vzniká funkční polypeptidový řetězec

- Vyštěpení peptidů

- odstraňují se větší úseky polypeptidu
- podobně jako u pre-mRNA dochází ke "splicingu"
- vyštěpují se "inteiny" a zůstávají "exteiny"

- Tvorba kvartérní struktury

- spojení více polypeptidových řetězců do "oligomerních proteinů"
- většinou vodíkové můstky a jiné nekovalentní vazby
- dimer, trimer, tetramer...
- oligomer se v živé soustavě chová jako jedna molekula s biologickou funkcí

- Sestavování nadmolekulárních struktur

- enzymové komplexy, ribozomy, proteinové filamenty, membrány aj.

- Přidání prostetických skupin (kofaktorů)

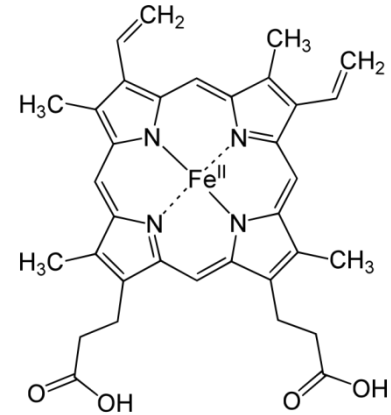
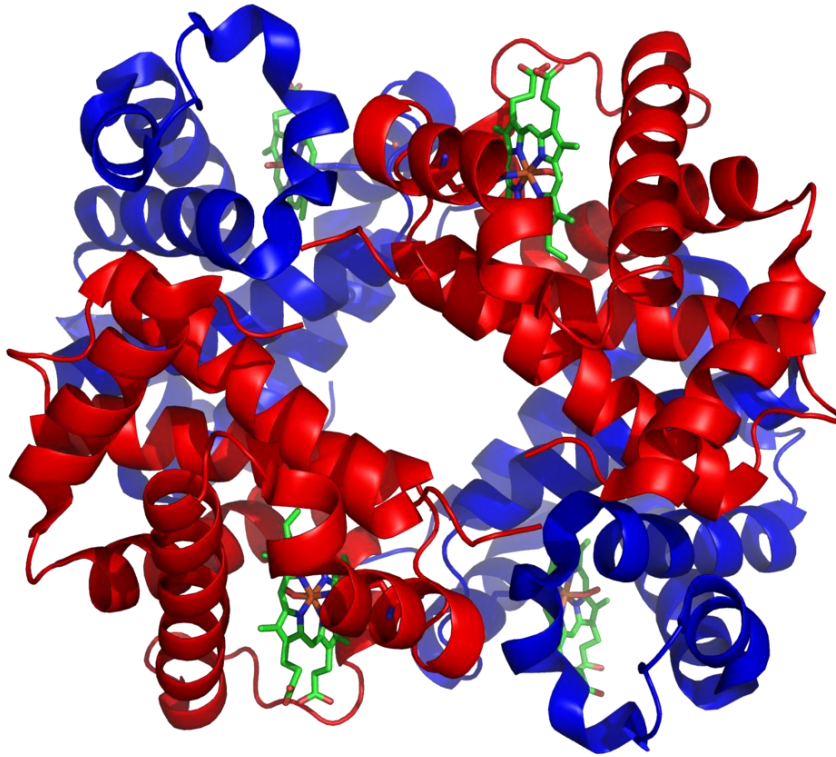
- kofaktor: nepolypeptidová jednotka nutná pro funkci určitého proteinu
- prostetická skupina: kofaktor pevně vázaný na protein (i kovalentně)
- nachází se v aktivním místě enzymu

a) organická: vitamín, lipid, cukr

b) anorganická: iont kovu

POSTTRANSLAČNÍ ÚPRAVA HEMOGLOBINU

- transportní metaloprotein červených krvinek obratlovců
- **Funkce:** transport kyslíku z plic do tkání a odstraňování oxidu uhličitého z tkání do plic
- u dospělého člověka se skládá ze **4 podjednotek** (2x α , 2x β)
- každá podjednotka obsahuje
 - a) bílkovinnou část – globin
 - b) prostetickou část – hem (s železem)



Hemová skupina (zdroj: wikipedia)

Struktura hemoglobinu: Proteiny 2x α (červená) a 2x β (modrá) a hemové skupiny (zelená) (zdroj: wikipedia)

POSTTRANSLAČNÍ ÚPRAVA HEMOGLOBINU

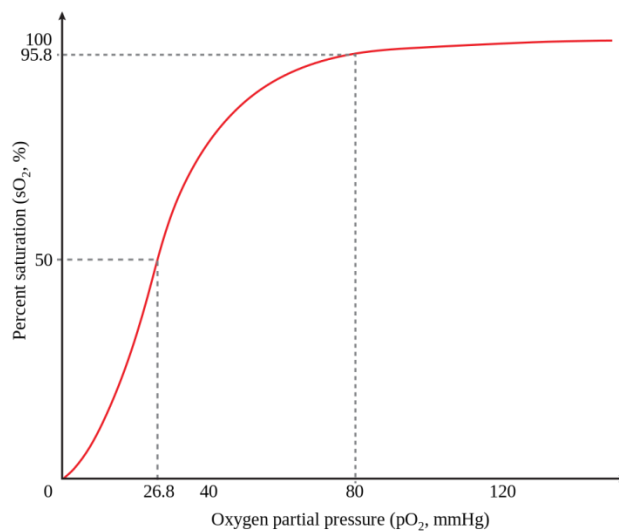
- podle polarity aminokyselin v globinu se molekula ve vodě uspořádá do terciární struktury (hydrofobní interakce)

a) hydrofilní AA vně molekuly

b) hydrofobní AA dovnitř molekuly (tzv. hydrofobní kapsa)

- do hydrofobní kapsy je vložena molekula hemu (dvojmocné železo chráněno proti oxidaci $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$)

- každý ze 4 Fe^{2+} iontů hemu reverzibilně váže molekulu kyslíku (oxygenace hemoglobinu)

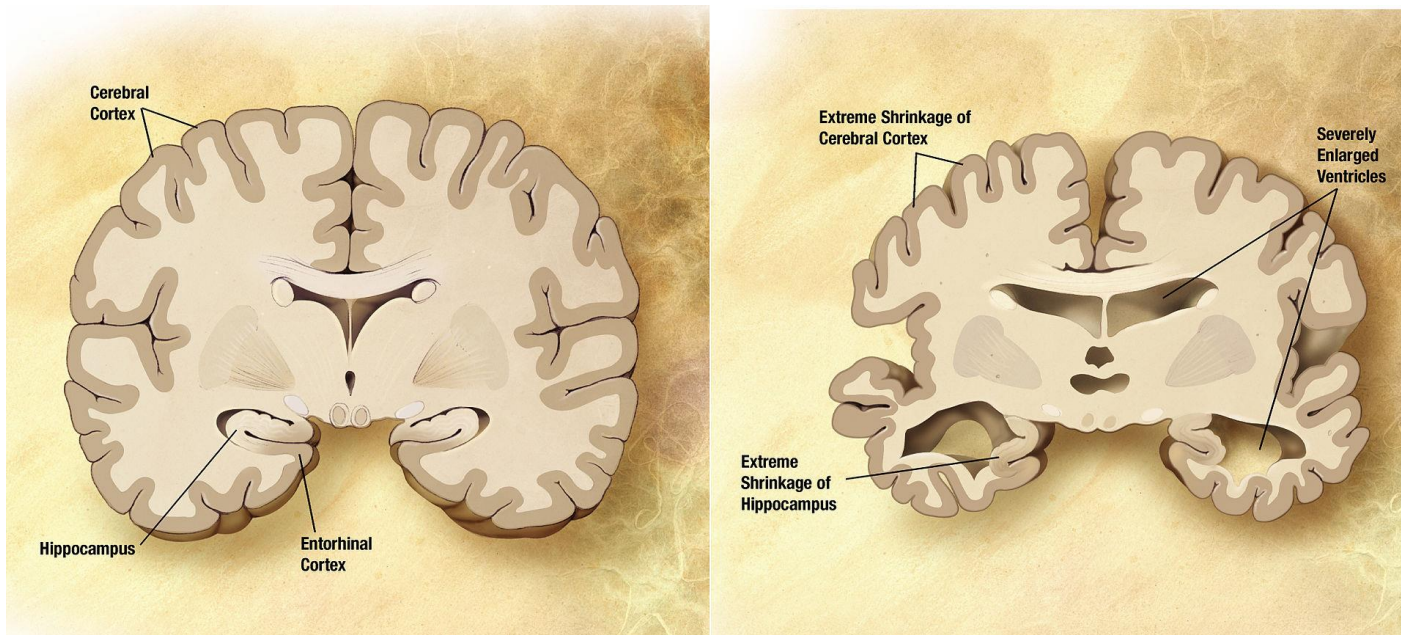


Schopnost navázání O₂ a ztráta CO₂ na železnatém ionu je úměrný parciálnímu tlaku dýchacích plynů (v plicích má kyslík vyšší parciální tlak než oxid uhličitý – ve tkáních je tomu naopak). Zdroj Wikipedia.

Některé nemoci jsou charakteristické chybným tvarem určitých proteinů

Alzheimerova nemoc (AD)

- 70% případů demence je způsobeno AD
- ztráta krátkodobé paměti → problémy s řečí, dezorientace, výkyvy nálad, nevhodné chování → ztráta tělních funkcí a smrt
- doba přežití od diagnózy: 3-9 let
- příčiny: genetické predispozice (70%), vysoký tlak, deprese
- fyzické a duševní cvičení pomáhá, léčba neexistuje



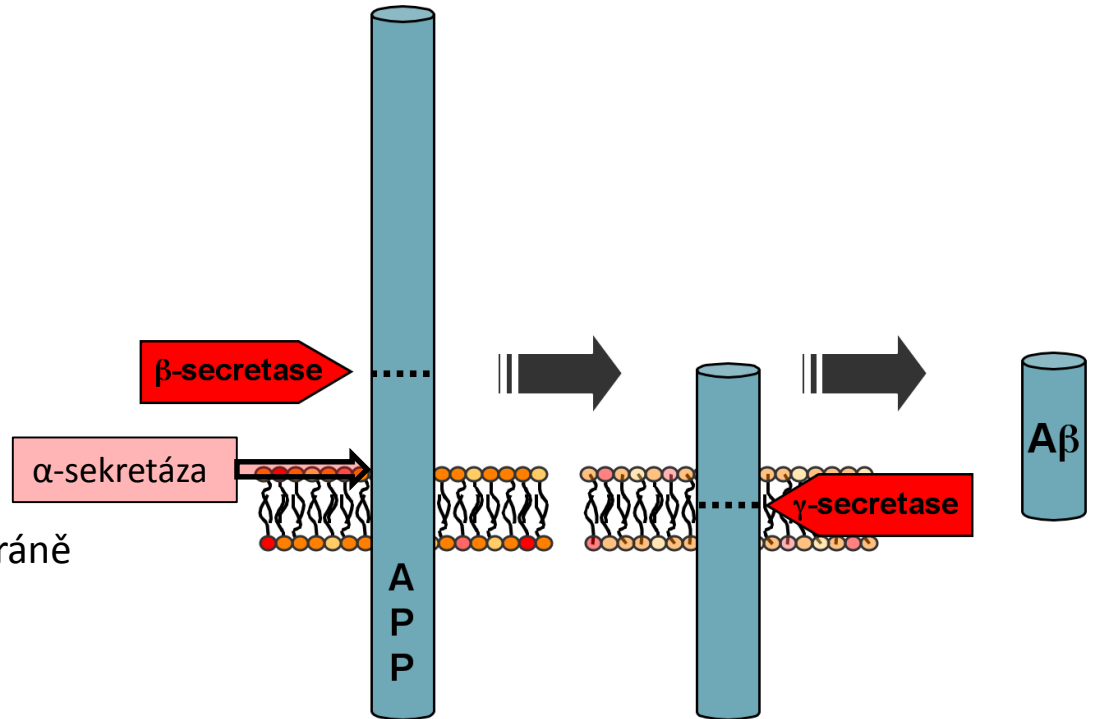
Molekulární podstata AD

Amyloid prekursorový protein (APP)

- membránový protein
- koncentrován v synapsích neuronů
- regulátor tvorby synapsí, neurální plasticity a exportu železa
- je prekurzorem molekuly **beta amyloidu (A β)** - polypeptidu 37-49 AA
- oligomery A β způsobují **amyloidní plaky na mozku pacientů s AD**

Sekretáza

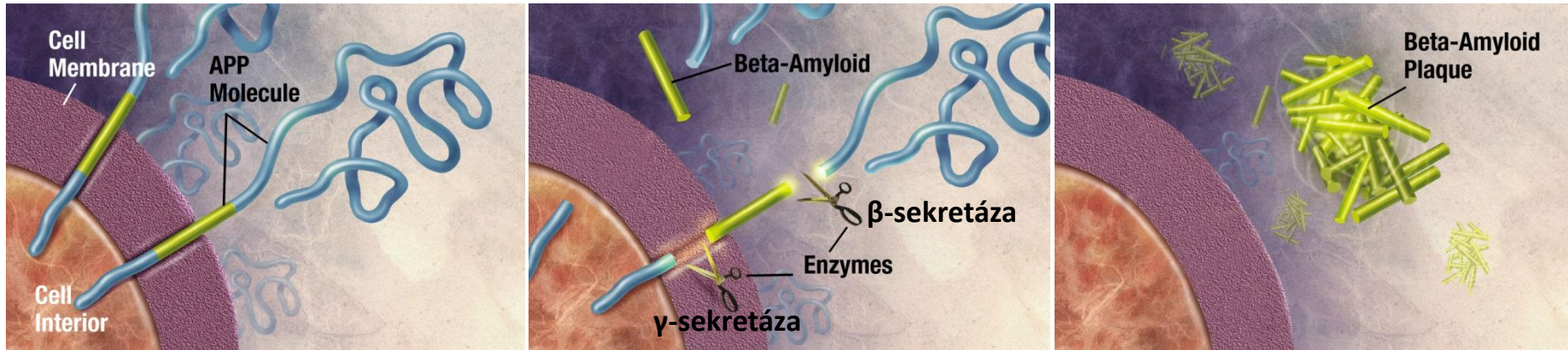
- enzym, který štěpí APP
- 3 formy:
 1. α -sekretáza (hodná)
 2. β -sekretáza (zlá)
 3. γ -sekretáza (neutrální)
- pokud štěpí nejprve β -sekretáza a pak γ -sekretáza \rightarrow vzniká A β
- α -sekretáza štěpí blíže buněčné membráně a po štěpení γ -sekretázou nevzniká A β



Molekulární podstata AD

Progresivní akumulace toxických A β oligomerů vede k:

1. disbalanci mezi hladinou produkce, agregace a odstraňování A β
2. poškození synapsí - tvorba membránových pórů
3. změny signálních drah účastnících se neurogenese a správné tvorby synapsí (GSK3b, CDK5)



Pro podporu teorie akumulace A β oligomerů v AD hovoří výskyt nemoci (kolem věku 40 let) u Downova syndromu (trizomie 21 páru, kde se nachází gen pro APP)

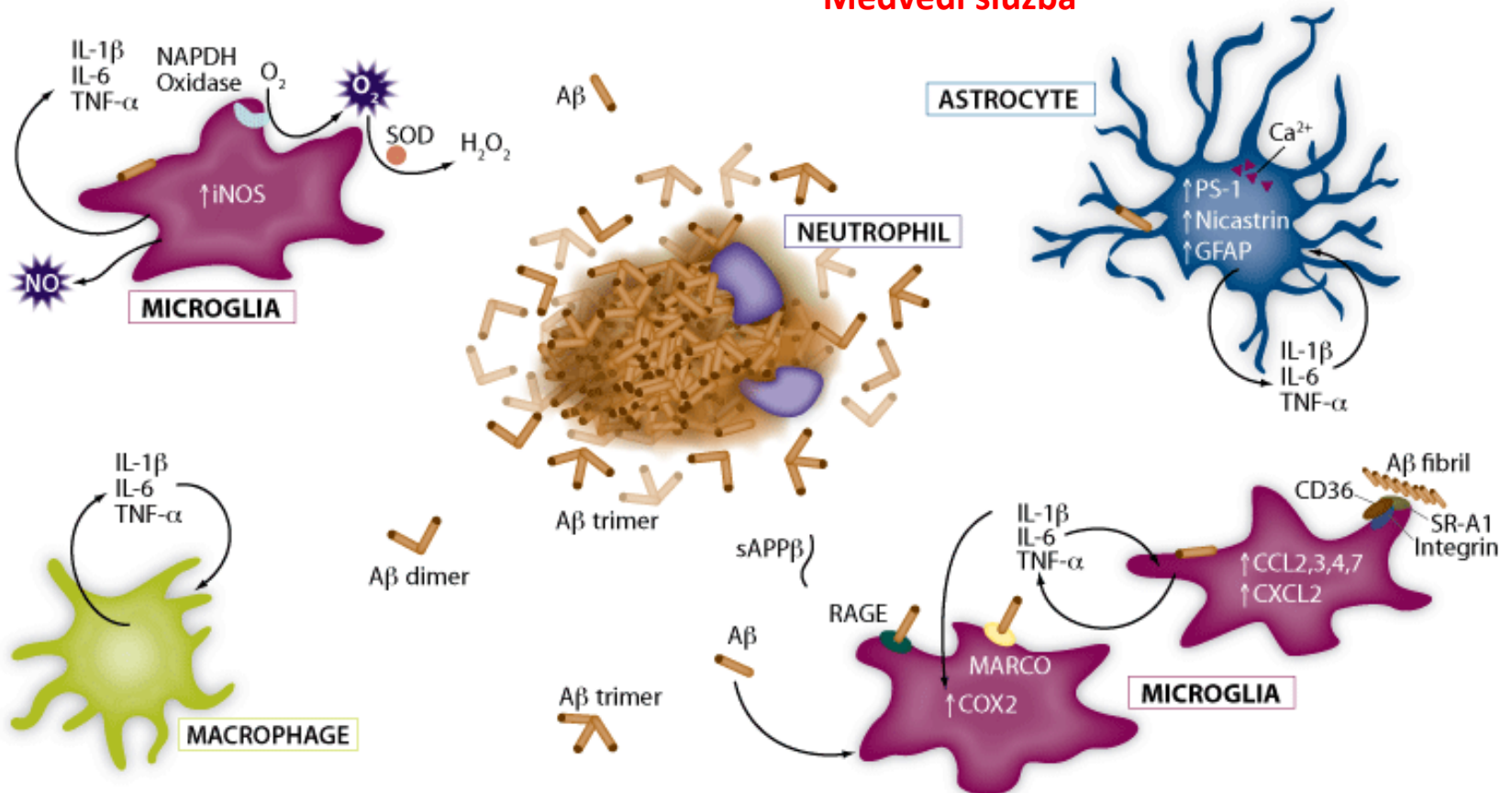
pozn. Existuje také "Tau hypotéza", která přisuzuje vznik AD špatně fungujícímu Tau proteinu, který má za úkol stabilizovat mikrotubuly v neuronálních synapsích

Molekulární podstata AD

4. aktivaci imunitního systému

- shluky A β oligomerů, tvořící amyloidní plaky, stimulují vyplavování chemoaktraktantů poškozenými neurony, makrofágy, mikroglii (druh makrofágu v mozku) a astrocyty (výživové, strukturní a imunitní buňky)
- cytokiny jako IL-1 β , IL-6 a TNF- α působí pro-zánětlivě a přivábí neutrofily
- tato imunitní reakce má bránit mozek, ale v důsledku vede ke chronickému zánětu a je jedním z hlavních faktorů rozvoje nemoci :(

Medvědí služba



Molekulární podstata AD

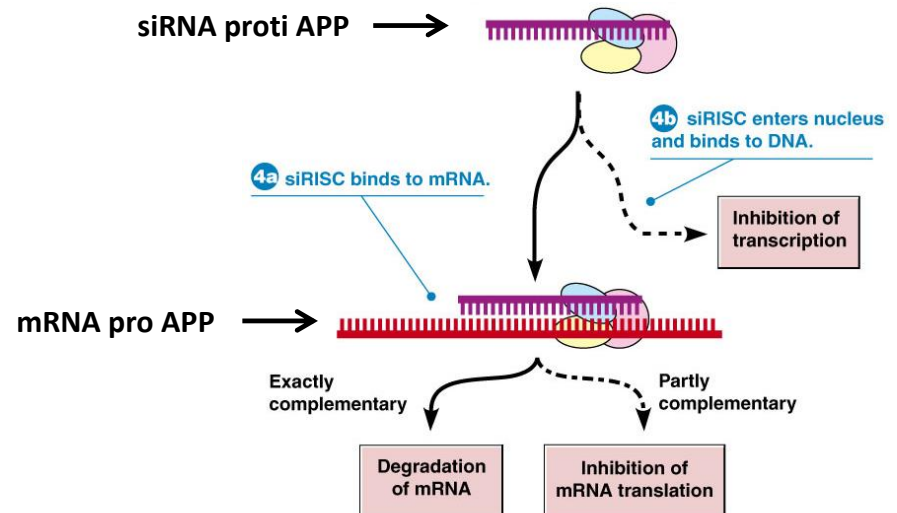
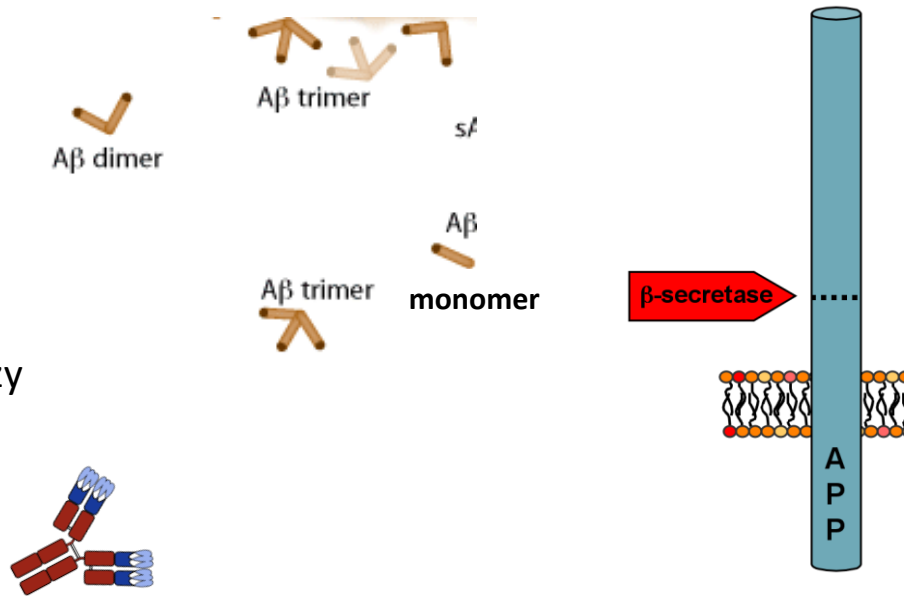
Látky pro možnou léčbu AD

- anti-agregační látky - blokují tvorbu oligomerů
- regulátory APP proteolýzy - blokace β -sekretázy

- redukce produkce APP - např. siRNA

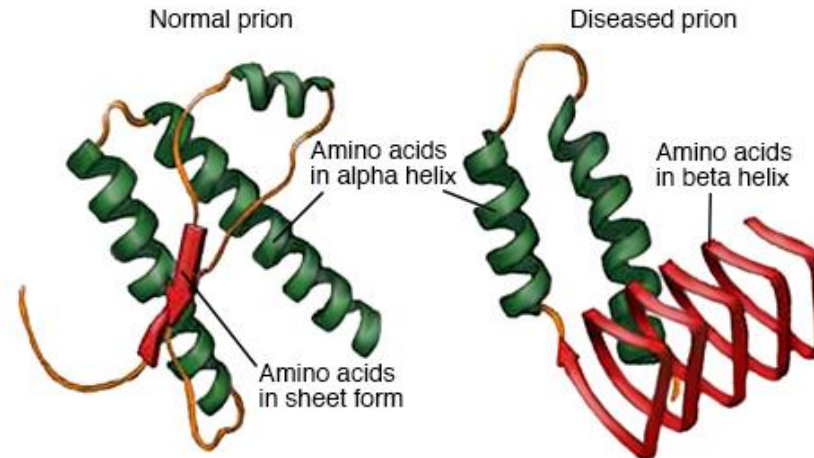
- odstranění $A\beta$ oligomerů - např. protilátkami

- blokátory hyperaktivních signálních drah a jejich receptorů, které jsou aktivovány neurotoxickými $A\beta$ oligomery (Fyn kináza, GSK3b, CDK5 inhibitory)



Priony

- přirozeně se vyskytující proteiny v mozku zvířat a lidí jsou-li správně složené jsou neškodné
- špatně složené způsobují poškození mozku
 - BSE u dobytka (Bovinní spongiformní encefalopatie; nemoc šílených krav)
 - Creutzfeldt-Jakobova nemoc u lidí
- 1982 Stanley Prusiner dokázal, že původcem nemoci nemusí být patogenní organismus s vlastní DNA, ale pouze špatně složený protein, který je schopen „infikovat“ ostatní proteiny ke špatnému složení (Nobelova cena 1997)
 - a) Spontánní indukce
 - b) Přenos
 - v rámci druhu i mezidruhově
 - požitím, krví
 - infekční protein prion může v prostředí přežít i několik let



© MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH. ALL RIGHTS RESERVED

Molekulární biologie

6. Regulace genové exprese

Osnova

Řízení exprese bakteriálního genomu

Řízení exprese eukaryotického genomu

Hlavní zdroje:

S. Rosypal, Úvod do molekulární biologie 1-4

Masarykova Universita Brno

ISBN 80-902562

B. Staveley, Principles of Cell Biology

Memorial University of Newfoundland

<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CBhome.html>

M. Muller, Biology of Cells and Organisms

University of Illinois, Chicago

<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/summer2010/lecturesm10.htm>

Řízení exprese bakteriálního genomu

Část první: Řízení exprese bakteriálního genomu

- u bakterií nejčastěji regulace na úrovni **transkripce**
 - NE všechny promotory jsou si rovny - některé mají slabší afinitu k RNA-polymeráze než jiné
 - proto potřebují pomoc regulátorů (pozitivní nebo negativní)
 - vypínání a zapínání transkripce v reakci na okolní podmínky
 - nikdy není potřeba vyrábět všechny proteiny najednou
- buňky nikdy neplýtvají zbytečně energií**

Regulátory:

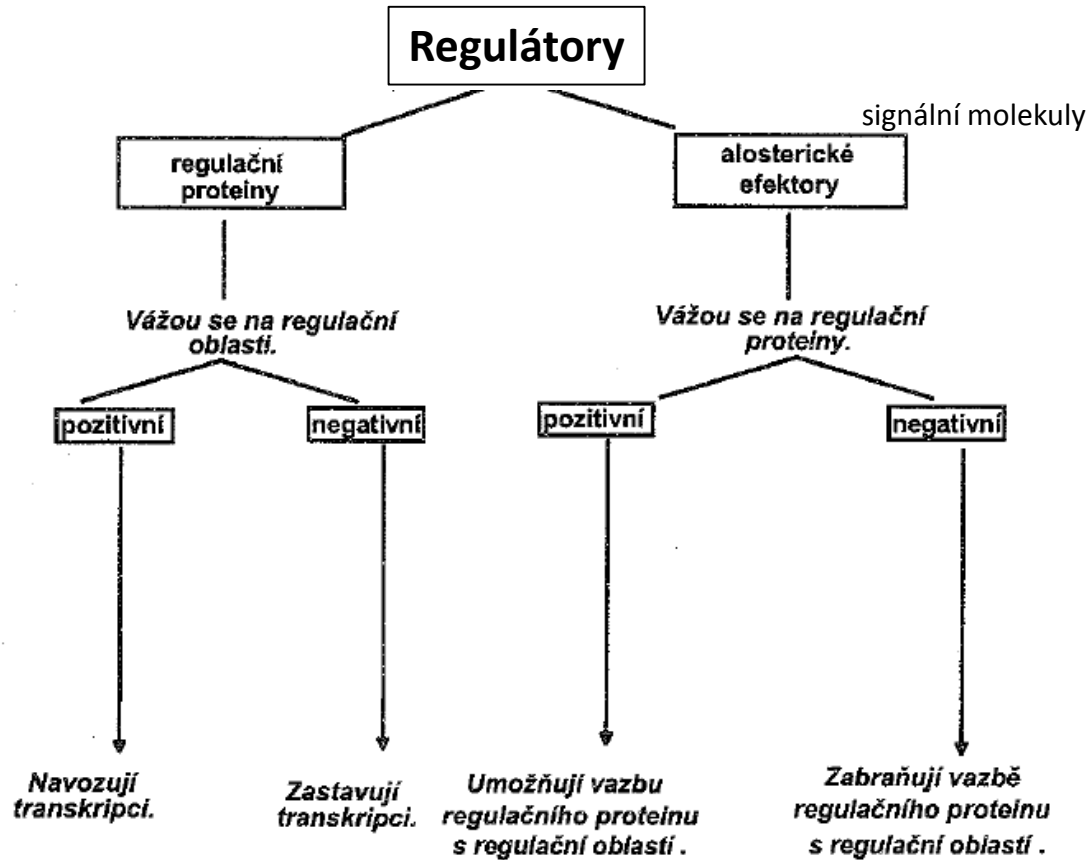
1. Regulační protein

- vážou se na regulační oblast DNA (promotor/operátor)
- 2 vazebná místa
 - a) pro rozlišení DNA promotoru/operátoru regulovaného genu
 - b) pro příslušnou signální molekulu
- po vazbě signální molekuly mění konformaci a tím afinitu k promotoru

2. Signální molekula (alosterický efektor)

- většinou malá a neschopná se přímo vázat na regulační oblast DNA (promotor/operátor)
- často **substrát** (např. **laktóza**) nebo **produkt** (např. **aminokyselina**) příslušného enzymu
- daný enzym se buď **zapne** (**β -galaktozidáza**) nebo **vypne** (**AA-syntetáza**)
- vazba na regulační protein (zprostředkovatel)

Signální molekula (alosterický efektor) a Regulační protein



*Systém regulace genů je zkoumán od roku 1961,
kdy **Jacques Monod** objevil lac operon (Nobelova cena 1968)*



www.nobelprize.org

Indukce syntézy proteinů

β -galaktozidáza (u *E. coli*)

- jeden z enzymů pro štěpení laktozy u *E. coli* (spolu s permeazou a transacetylázou)
- v prostředí kde je jediný zdroj uhlíku glukóza se enzym netvoří
- po přenosu do prostředí s jediným zdrojem uhlíku laktózou začnou syntetizovat β -galaktozidázu za 1min
- **Koreprese:** glukóza aktivně potlačuje syntézu β -galaktozidázy
 - samotná přítomnost laktozy nestačí, aby se začal tvořit enzym
 - tzn. za přítomnosti glukózy i laktozy zůstává laktoza nedotčena

Represe syntézy proteinů

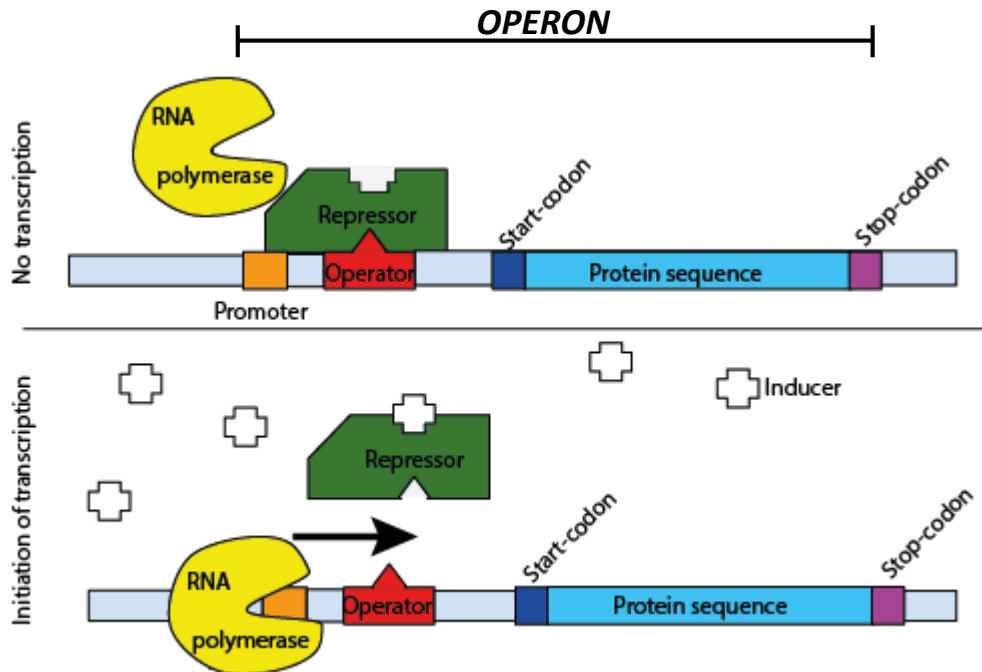
- syntéza enzymu potlačena metabolitem dané biochemické dráhy
- syntéza se zastavuje pokud se v buňce nahromadí metabolit do kritického množství (např. aminokyseliny)
- při poklesu pod kritickou mez se obnovuje

Regulace operonu

- Operon - transkripční jednotka, která obsahuje regulační místa "Promotor" a "Operátor" před strukturálními geny
- Operátor - úsek na operonu, kam se váže **represor** → zastavení transkripce
- Slabé nekovalentní vazby

Represor (negativní regulační protein)

- Fyzicky brání RNA-polymeráze ve vazbě nebo pohybu na DNA
- Na represor se váže signální molekula
 - a) induktor - zabraňuje vazbě na operátor - probíhá transkripce
 - b) korepresor (není nezbytný) - podporuje vazbu na operátor - neprobíhá transkripce



Laktóзовý operon *E. coli* (*lac* operon)

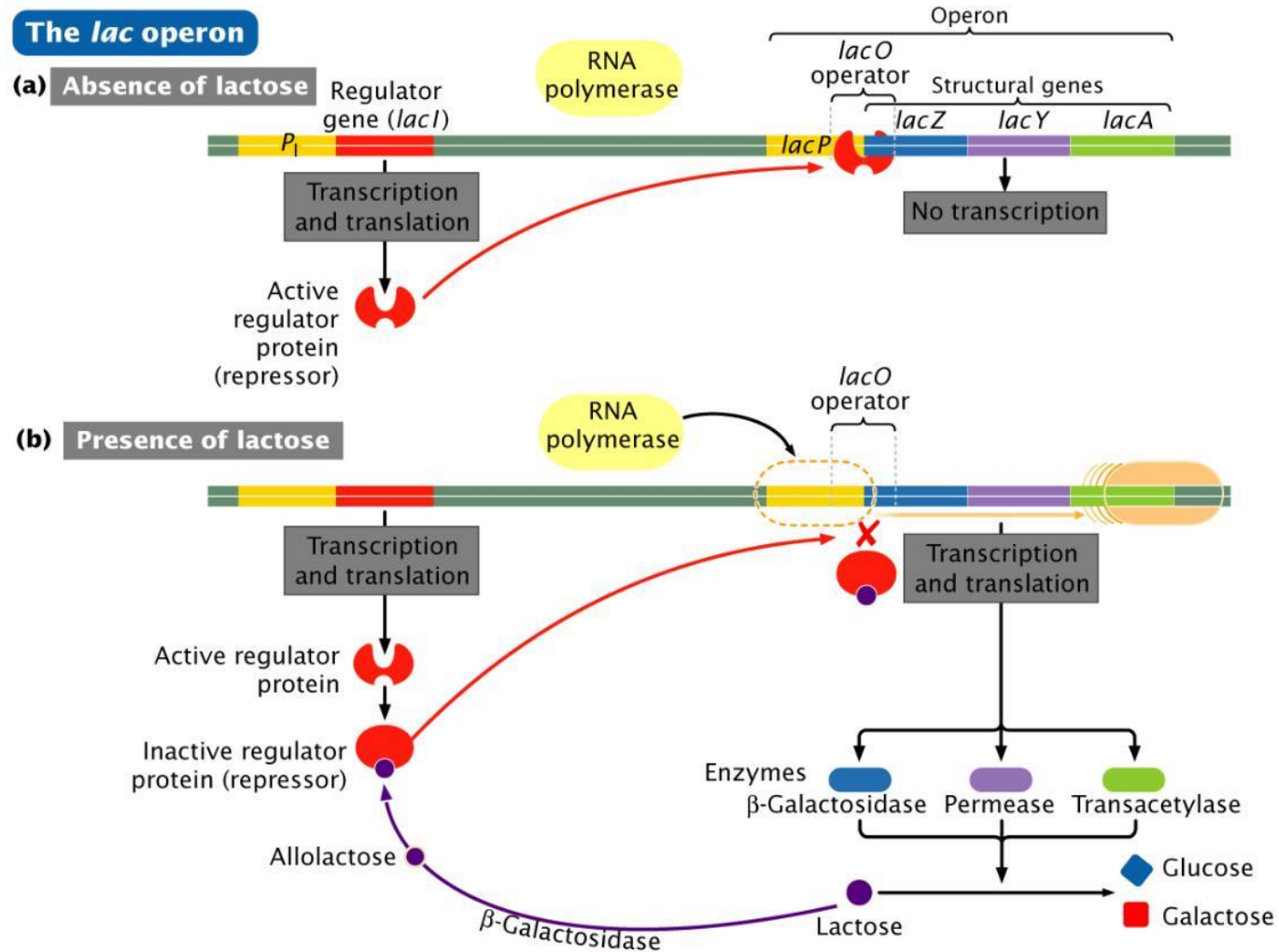
lacI - gen pro regulační protein (nachází se před strukturálními geny pro enzymy štěpící laktozu)

lacZ - gen pro β -galaktozidázu

lacY - gen pro Permeázu

lacA - gen pro Transacetylázu

Geny pro funkčně blízké proteiny se nachází na DNA v rámci jedné transkripční jednotky (operonu)



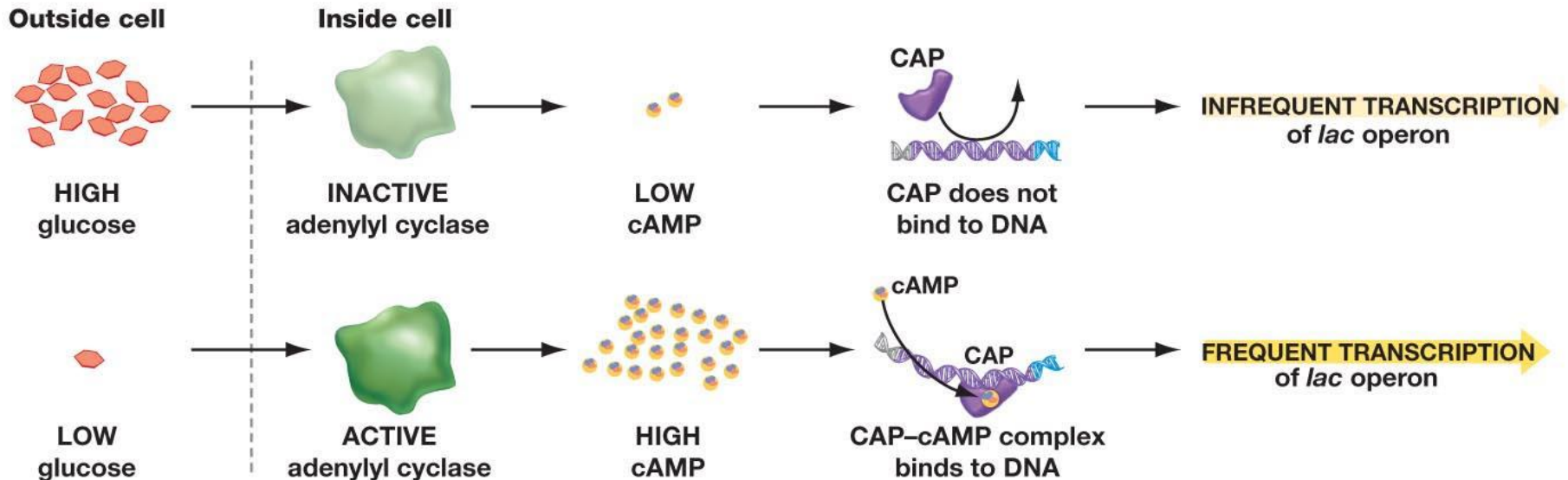
Fig_16-08 *Genetics, Second Edition* © 2005 W.H. Freeman and Company

Laktózový operon *E. coli* (*lac operon*)

- glukóza je pro *E. coli* "sugar of choice" a dává jí přednost před laktozou
- samotná přítomnost laktozy nestačí, aby se začal naplno tvořit enzym
- musí být zároveň nepřítomná glukóza

- RNA polymeráza má sama o sobě slabou afinitu k promotoru *lac operonu*
- potřebuje pomoc pozitivního regulačního proteinu - CAP (catabolite activator protein)
- CAP se váže na promotor *lac operonu* pouze po aktivaci pomocí cAMP (signální molekula/alosterický ef.)
- Glukóza ovšem inhibuje tvorbu cAMP inhibicí enzymu adenyl cyclázy

(b) The amount of cAMP and the rate of transcription of the *lac operon* are inversely related to the concentration of glucose.



Laktózový operon *E. coli* (*lac* operon)

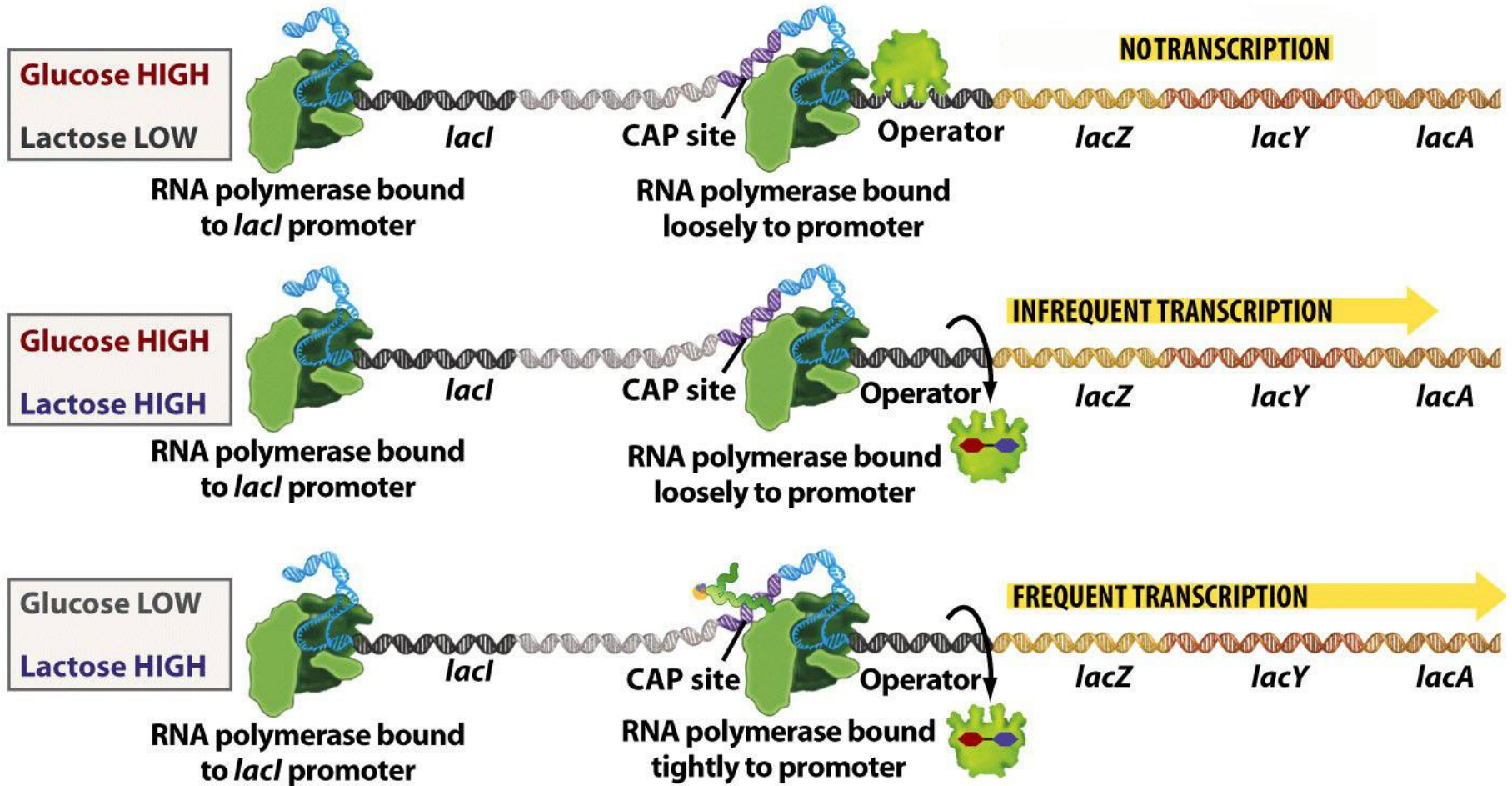
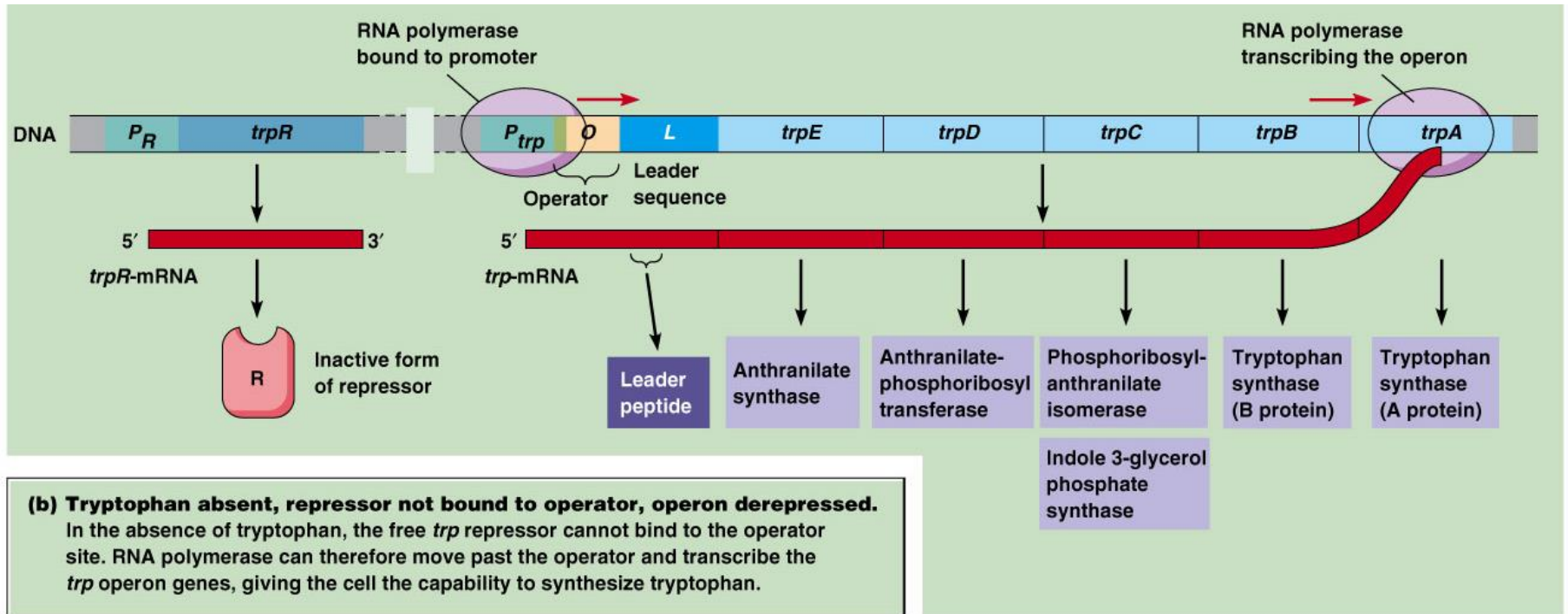


Figure 17-10 Biological Science, 2/e

© 2005 Pearson Prentice Hall, Inc.

Tryptofanový operon (trp operon)

- obsahuje 5 strukturních genů (*trpE*, *trpD*, *trpC*, *trpB*, and *trpA*), promotor (P_{trp}), operator (O), a vedoucí sekvenci (L)
- Pokud Tryptofan chybí - represor (kodován *trpR*) je inaktivní - transkripce probíhá

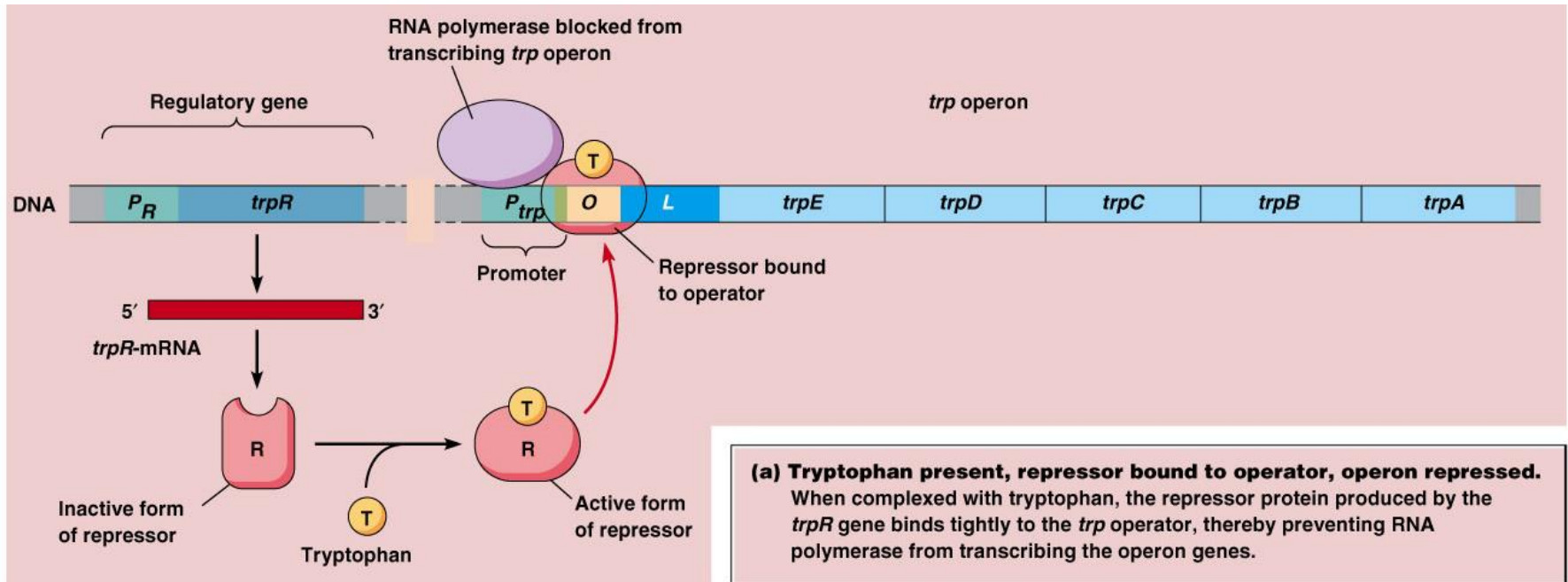


© 2012 Pearson Education, Inc.

Vedoucí sekvence DNA – úsek DNA v bakteriálních transkripčních jednotkách uložená mezi promotorem a prvním strukturním genem. Je v ní uložena Shine-Dalgarnova sekvence. Může obsahovat atenuátor.

Tryptofanový operon (*trp* operon)

- Pokud je Tryptofan přítomen, váže se na represor a represor vazbou na DNA zastaví transkripci
- - Exprese genů kodujících enzymy biochemické dráhy pro syntézu Tryptofanu je navíc ještě řízena tzv. atenuací

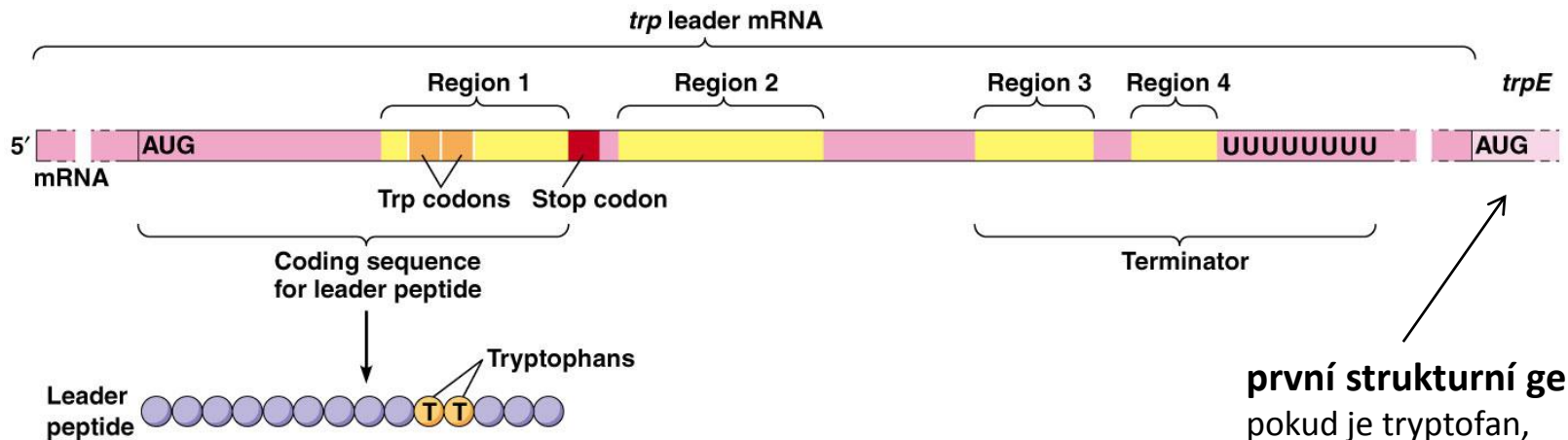


Atenuace

- Atenuátor - oblast ve vedoucí sekvenci DNA (překládá se)
- Pouze u prokaryot
- Spojení mezi transkripcí a translací u prokaryot umožňuje fungování kontrolního mechanismu atenuace
- Nascentní řetězec RNA je kousek dál simultánně překládán do proteinu
- Transkript *trp* operonu (mRNA) obsahuje 162 nukleotidů před prvním strukturálním genem *trpE*
- Tato vedoucí sekvence obsahuje "sensor" (neboli vedoucí peptid) o velikosti 14 AA

a) pokud je přítomen tryptofan - vytvoří se pouze vedoucí peptid

b) pokud není přítomen tryptofan - celý operon je přeložen a vytvoří se enzymy pro syntézu tryptofanu



© 2012 Pearson Education, Inc.

první strukturální gen
pokud je tryptofan,
transkripce se ukončí před *trpE*

Vedoucí sekvence DNA – úsek DNA v bakteriálních transkripčních jednotkách uložený mezi promotorem a prvním strukturálním genem. Je v ní uložena Shine-Dalgarnova sekvence. Může obsahovat atenuátor.

Mechanismus atenuace

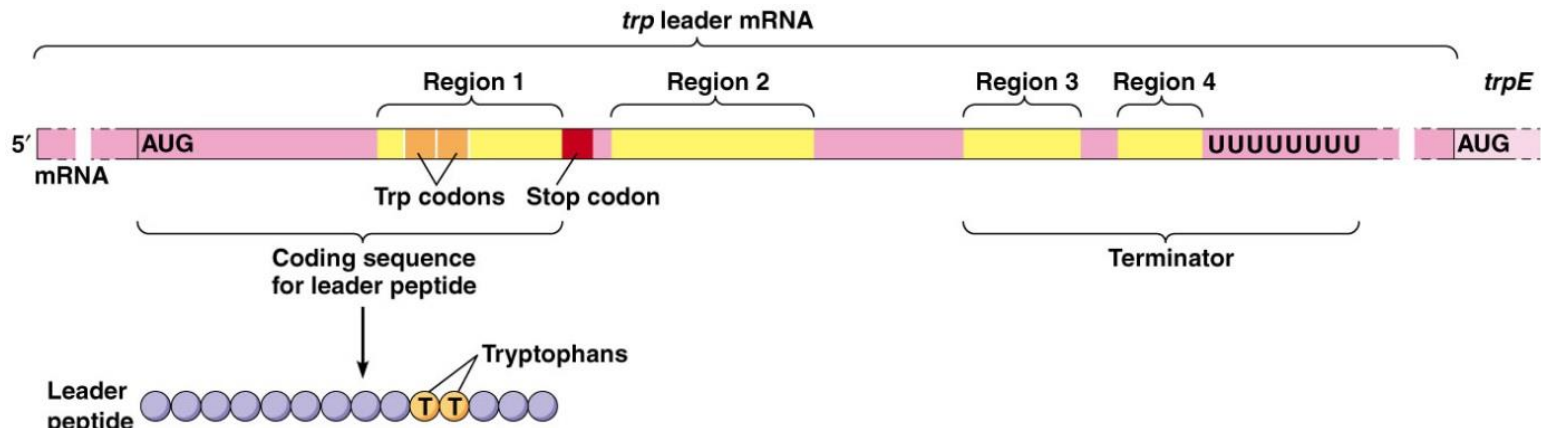
- vedoucí sekvence mRNA obsahuje 4 regiony, které jsou vzájemně kompatibilní a schopny tvořit vlásenky: 1+2, 2+3, 3+4
- regiony 3+4 jsou schopny tvořit terminační vlásenku - RNA-polymeráza se uvolňuje z DNA

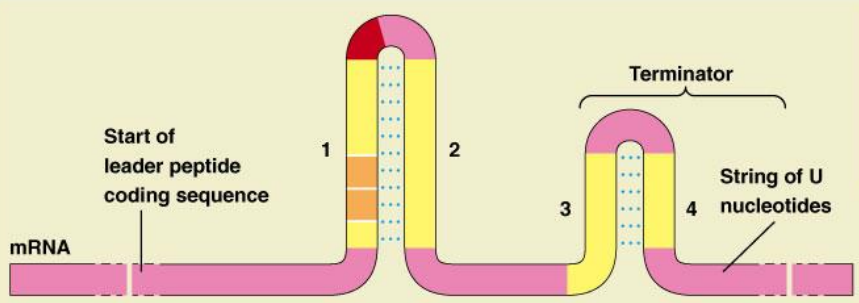
1. Nedostatek tryptofanu

- ribozom se zastaví na místě kodovaném pro tryptofan (region 1) čeká až přiletí tRNA
- ribozom fyzicky zablokuje pouze region 1. **Region 2 je volný** a vytvoří vlásenku s regionem 3
- nevzniká tedy terminační vlásenka 3+4 → translace pokračuje a enzymy pro syntézu nedostatkového tryptofanu jsou vyrobeny

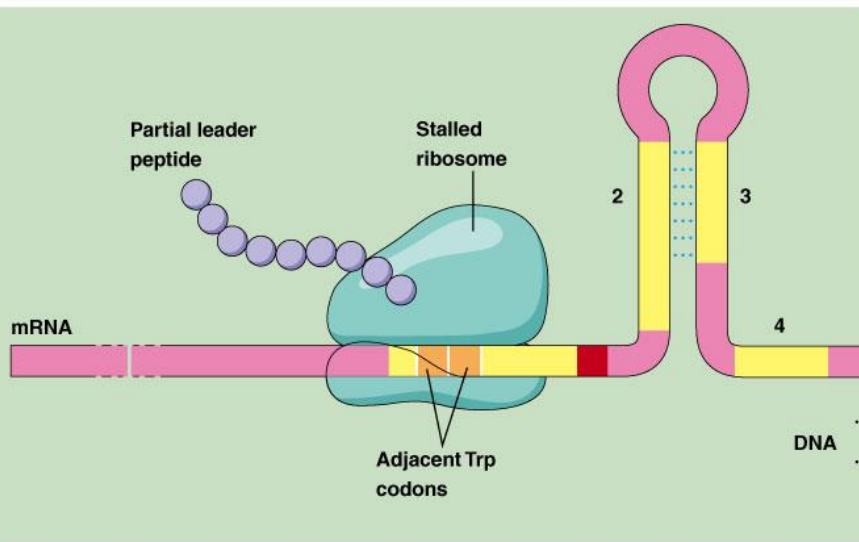
2. Dostatek tryptofanu

- ribozom se zastaví až ve stop kodonu - **blokuje region 2**
- vzniká terminační vlásenka 3+4 a RNA-polymeráza se uvolňuje
- výsledkem je pouze krátký vedoucí peptid (14 AA)



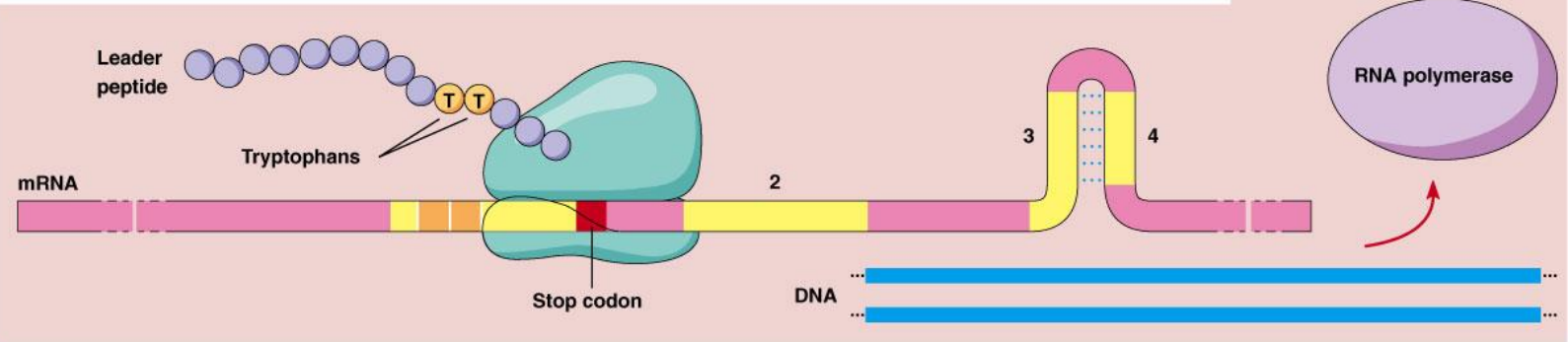


(a) The most stable secondary structure for *trp* leader mRNA. Attenuation depends on the ability of regions 1 and 2 and regions 3 and 4 of the *trp* leader sequence to base-pair, forming hairpin secondary structures. The 3-4 hairpin structure acts as a transcription termination signal.



(b) When tryptophan is scarce the ribosome stalls, allowing a 2-3 "antiterminator" hairpin to form. The ribosome stalls when it encounters the two tryptophan (Trp) codons due to a shortage of tryptophan-carrying tRNA molecules. The stalled ribosome blocks region 1, so a 1-2 hairpin cannot form. Instead an alternative 2-3 hairpin is created, which prevents formation of the 3-4 termination hairpin. Therefore RNA polymerase can move on to transcribe the entire operon.

(c) When tryptophan is plentiful the ribosome continues, allowing the 3-4 transcription termination signal to form. The moving ribosome completes translation of the leader peptide and pauses at the stop codon, blocking region 2. As a result, the 3-4 structure forms and terminates transcription near the end of the leader sequence.

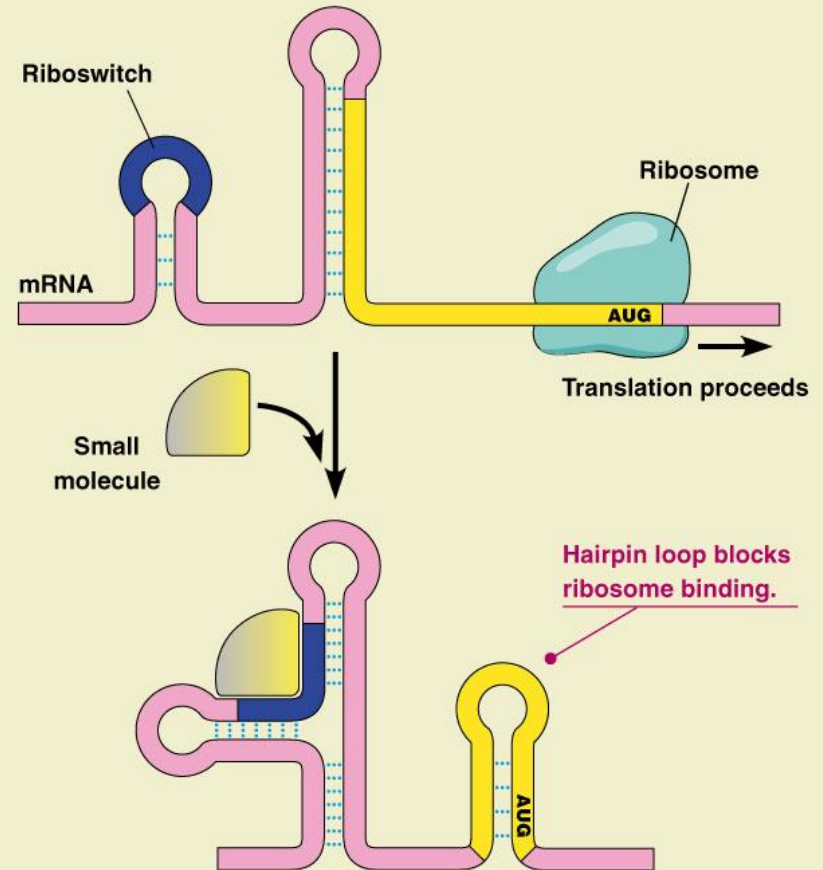
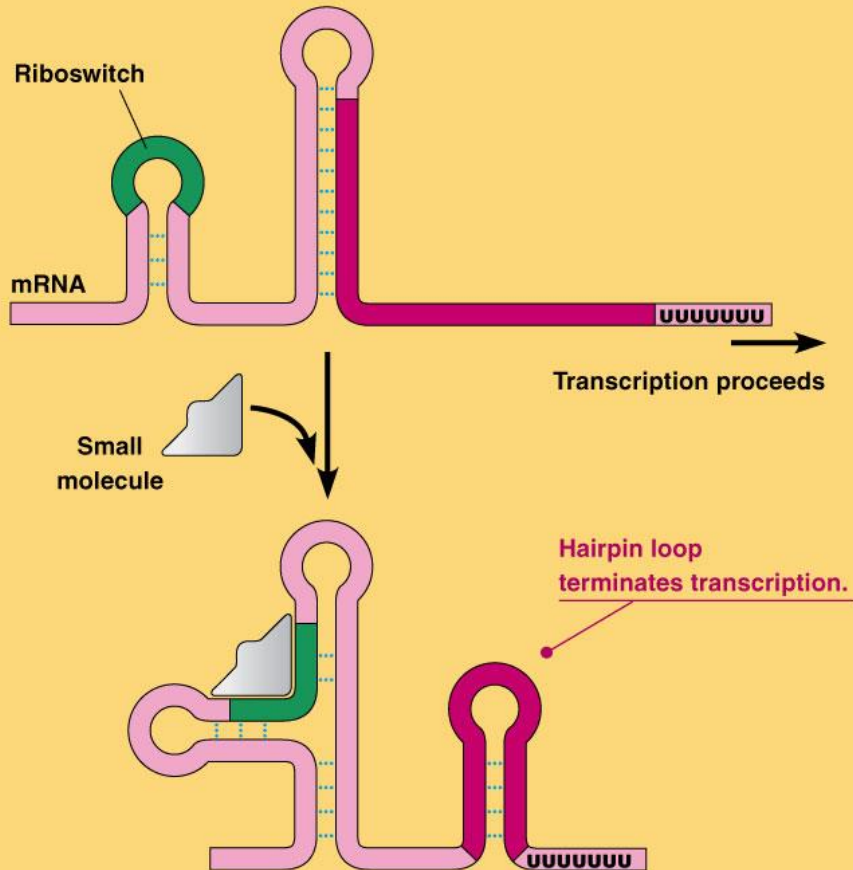


Riboswitch - další příklady

- regulační úsek na mRNA, který kontroluje produkci daného proteinu (může vázat signální molekuly)

(a) Transcription termination. Binding of a small molecule to a riboswitch in the leader sequence of some mRNAs triggers the formation of a hairpin loop that terminates transcription. FMN binding to the leader sequence of the mRNA transcribed from the *rib* operon of *B. subtilis* works in this way.

(b) Translation initiation. In other mRNAs, a small molecule binding to a riboswitch triggers formation of a hairpin loop containing the site where ribosomes normally bind, thereby interfering with translation initiation. In *E. coli*, this type of control is used by FMN to inhibit translation of mRNAs coding for enzymes involved in FMN synthesis.



© 2012 Pearson Education, Inc.

FMN - Flavinmononukleotid je redoxně aktivní kofaktor (prostetická skupina) flavoproteinů, hraje roli např. v dýchacím řetězci. Podobný princip jako tryptofan - pokud je ho hodně, zpětná vazba - nevyrábí se další

Řízení exprese eukaryotického genomu

Část druhá: Řízení exprese eukaryotického genomu

Mnohem komplexnější než u prokaryot - příkladem je regulace exprese lidského genomu

- Všechny buňky mají stejnou DNA (s výjimkou gamet)
- V běžné buňce musí být téměř všechny geny vypnuty
- Většinou má každý gen několik regulátorů
- Lidská buňka obsahuje kolem 21 000 genů (původní odhad 100 000)

	chromosomes --diploid	base pairs	genome size (#genes)
fruit fly	8	1.65×10^8	13,600
Budding yeast	16	12,462,637	6,275
human	46	3.3×10^9	~21,000
human mitochondria		16,569	13
rice	24	4.66×10^8	46,022 -55,615
dog	78	2.4×10^9	~25,000
mouse	40	3.4×10^9	~23,000

http://www.edinformatics.com/math_science/human_genome.htm

Část druhá: Řízení exprese eukaryotického genomu

Exprese genů (tzn. "výroba proteinů")

1. **Housekeeping** geny

- exprimovány ve všech buňkách stále
- rutinní metabolické funkce, buňka se udržuje naživu

2. Geny exprimované při diferenciaci buňky - **Vývojové**

- zapnutí určité signální dráhy nezbytné pro diferenciaci z progenitoru
- zapnutí pouze po určitou dobu

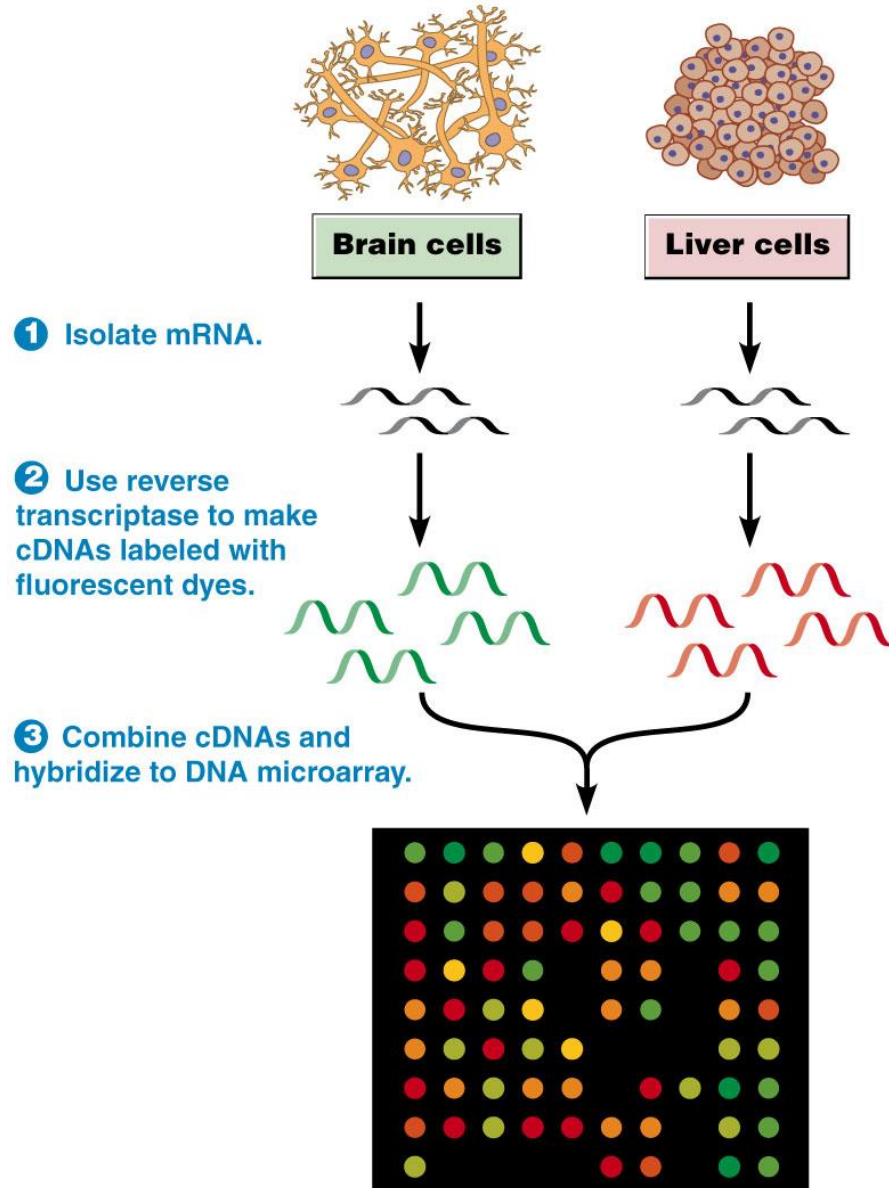
3. Geny nutné pro funkci specializované buňky – **Tkáňově specifické**

- stálá exprese pouze u určitého typu buněk
- např. syntéza protilátek v plazmatických buňkách (terminálně diferencovaný B-lymfocyt)

4. Geny zapnuté/vypnuté v reakci na okolní podmínky - **Indukovatelné**

- např. po signalizaci hormonem

V rozdílných tkáních jsou transkribovány odlišné geny (vzniká jiná mRNA)



Regulace genové exprese eukaryot

1. Chromatinová remodelace

- oblast chromozomu musí být otevřená aby měly enzymy a TF* přístup ke genu
- epigenetické modifikace:
 - methylace DNA
 - methylace a acetylace histonů

2. Transkripční kontrola

- vazba TF na regulační oblasti DNA
- vypínání/zapínání tvorby mRNA

3. Post-transkripční úpravy

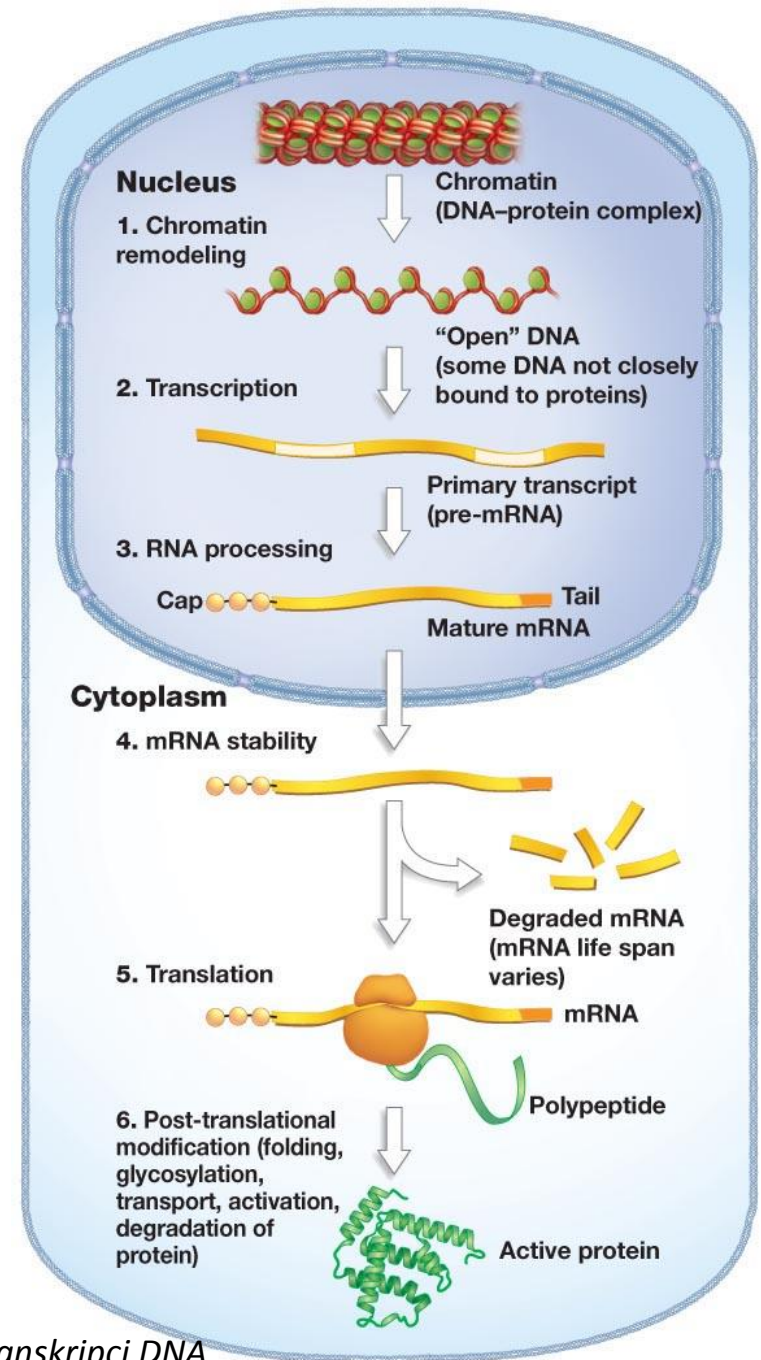
- zpracování pre-mRNA do mRNA - sestřih
- RNA interference (RNAi)

4. Kontrola translace

- Translační iniciační faktory regulují intenzitu translace

5. Posttranslační procesy

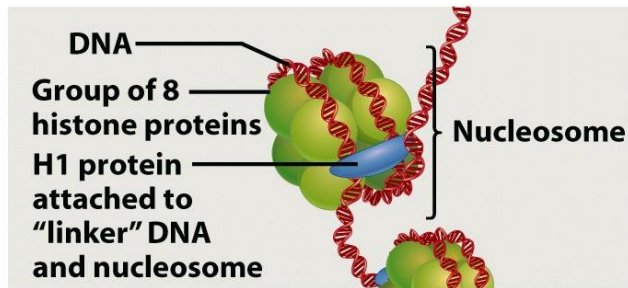
- modifikace proteinu do formy aktivního proteinu



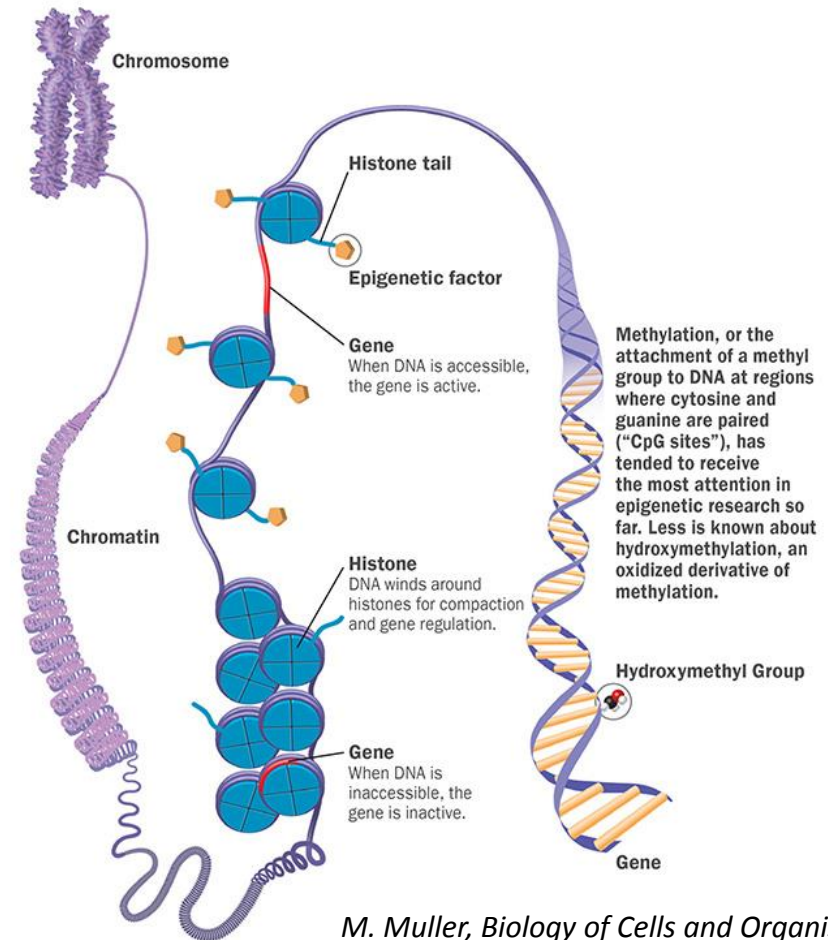
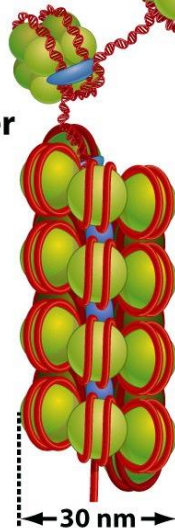
* TF (Transkripční faktor): protein schopný spouštět či jinak regulovat transkripci DNA

Chromatinová remodelace

- oblast chromozomu musí být otevřená (dekondenzovaná) aby měly enzymy a TF přístup ke genu
- chromozom je tvořen komplexem histonových proteinů a DNA, nazývaným **CHROMATIN**
- transkripce může proběhnout, pouze pokud se "zabalený" **heterochromatin** dekondenzuje do "rozbaleného" **euchromatinu**
- Chromatinové remodelace patří mezi nejtypičtější **epigenetické modifikace**



(c) 30-Nanometer fiber



M. Muller, *Biology of Cells and Organisms*
University of Illinois, Chicago

<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/summer2010/lecturesm10.htm>

Chromatinová remodelace

- **Chromatin-remodeling complexes** - skupina proteinů, které mění strukturu chromatinu

- **KONDENZACI** a **DEKONDENZACI** chromatinu zajišťují enzymy:

1. Histon acetyl transferázy (HAT)

- rozbalují (dekondenzují) chromatin do euchromatinu

2. Histon deacetylázy (HDAC)

- zabalují (kondenzují chromatin)
do heterochromatinu

3. Dnmt (DNA methyltransferázy)

- Methylace DNA (Cytosinu)
- Zabalují chromatin

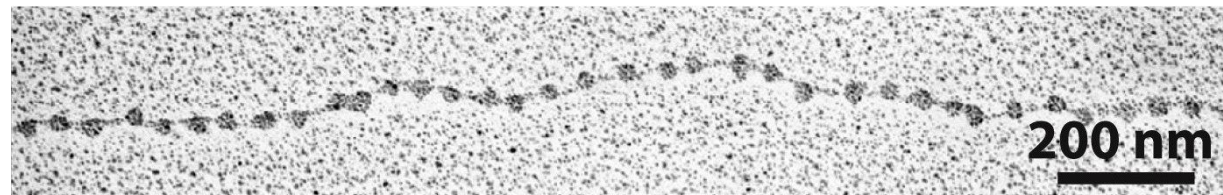
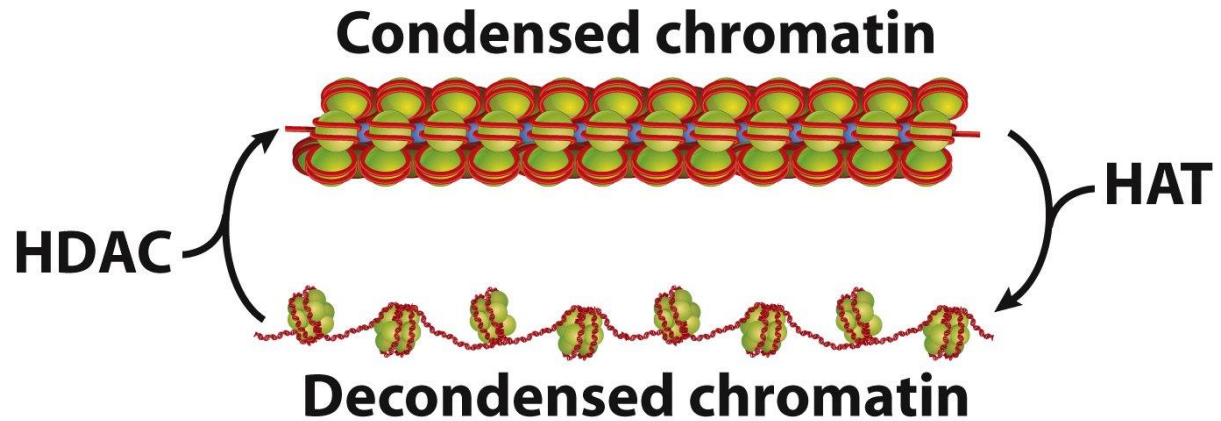
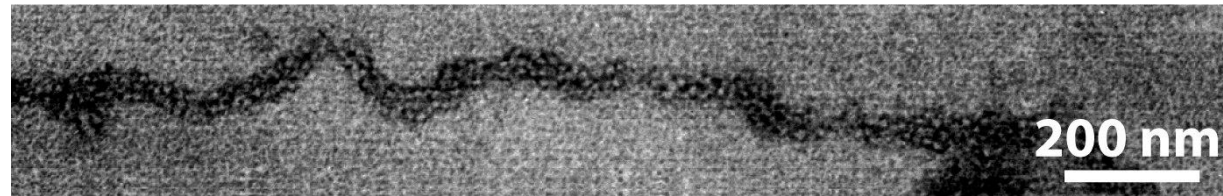


Figure 18-4 Biological Science, 2/e

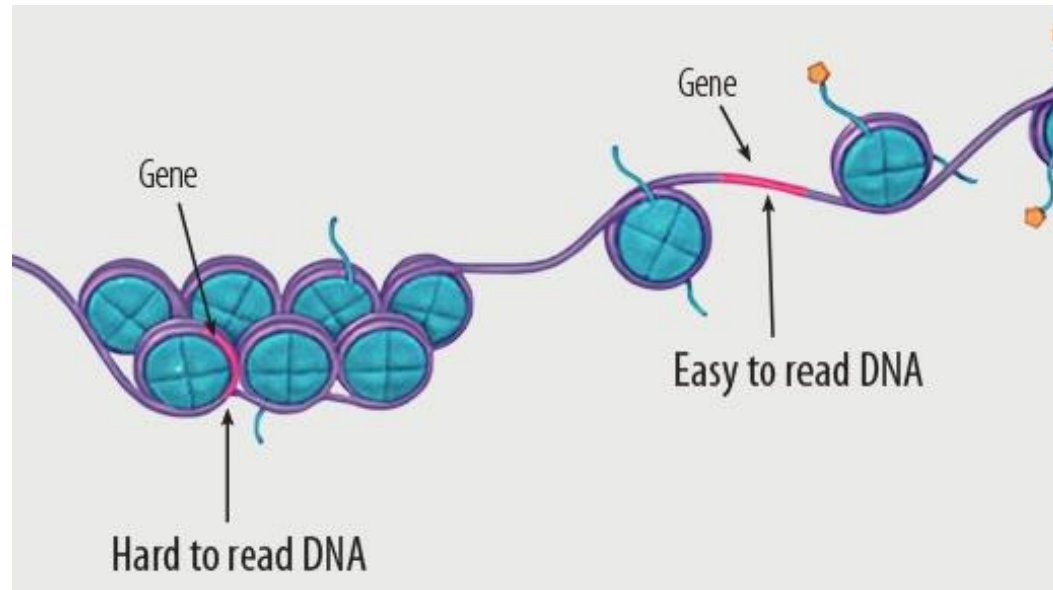
© 2005 Pearson Prentice Hall, Inc.

Chromatinová remodelace - EPIGENETIKA

"Studuje změny v genové expresi (buněčného fenotypu), které nejsou způsobeny změnou nukleotidové sekvence DNA, ale mohou být dědičné"

DNA sekvence (A, C, T, G) je jako manuál a epigenetické modifikace jako zvýrazňovače, které podtrhují různými barvami různě důležité části v jednotlivých buňkách

Na rozdíl od DNA sekvence se epigenetické značky mění během vývoje a v reakci na vnější okolnosti a mohou se též dědit



Chromatinová remodelace - EPIGENETIKA

- hlavně kovalentní modifikace a) DNA a b) histonů
- tyto bývají synonymem pro "epigenetiku"
- mezi epigenetické regulátory řadíme též siRNA a miRNA (souhrnně RNA interference - RNAi)

a) modifikace DNA

- methylace cytosinu

- inhibuje transkripci
- umlčení exprese

- Dnmt (DNA methyltransferáza)
- v CpG ostrůvcích**

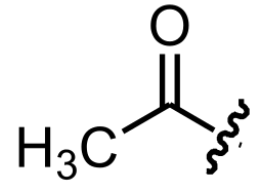
b) modifikace histonových proteinů

- methylace nebo acetylace

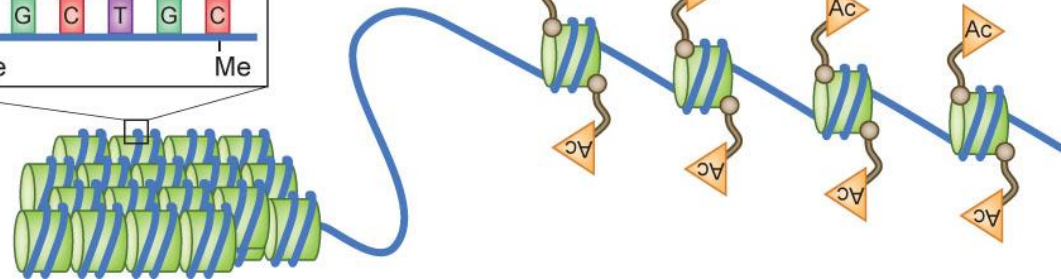
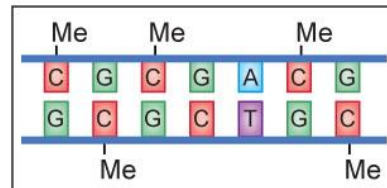
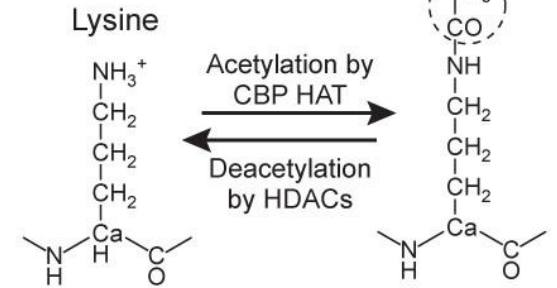
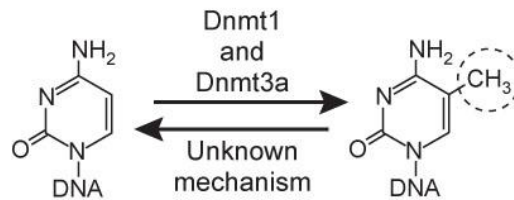
- hlavně acetylace lysinu

- aktivuje transkripci

- HAT a HDAC



Acetylated lysine



*Dawson and Kouzarides, Cell 2012

**CpG ostrůvky: nukleotidy C a G vedle sebe na stejné DNA řetězci (cytosin - fosfát - guanin)

Histonový kód

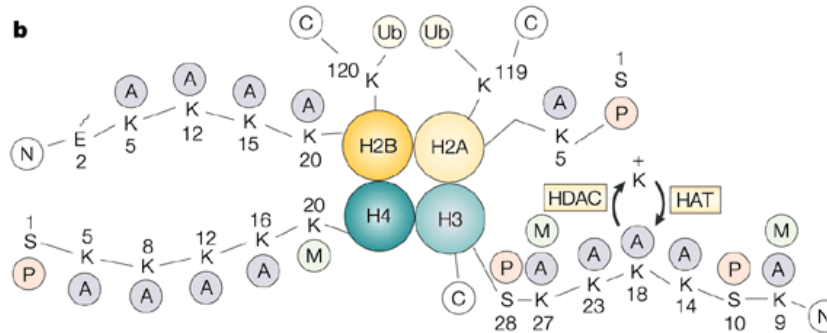
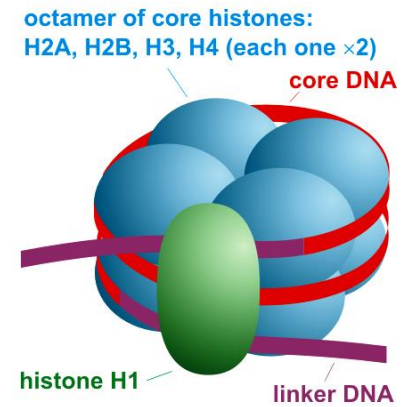
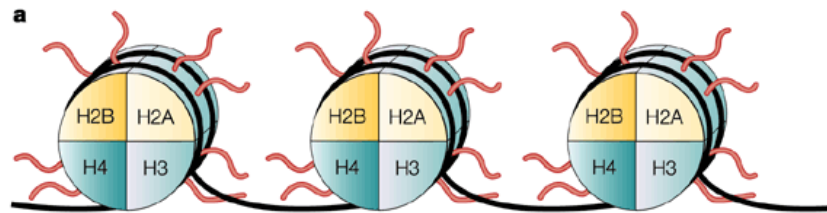
Hypotéza, že informace kódovaná v DNA je částečně řízena chemickými modifikacemi histonů

- spolu s DNA methylacemi tvoří *epigenetický kód*

- zatímco DNA kód mají všechny somatické buňky stejný, histonový a epigenetický kód je specifický pro každou buňku či tkáň

- modifikovány bývají N-konce, které vyčnívají z nukleozomu

- nejčastěji bývá modifikován lysin (K)



Nature Reviews | Cancer

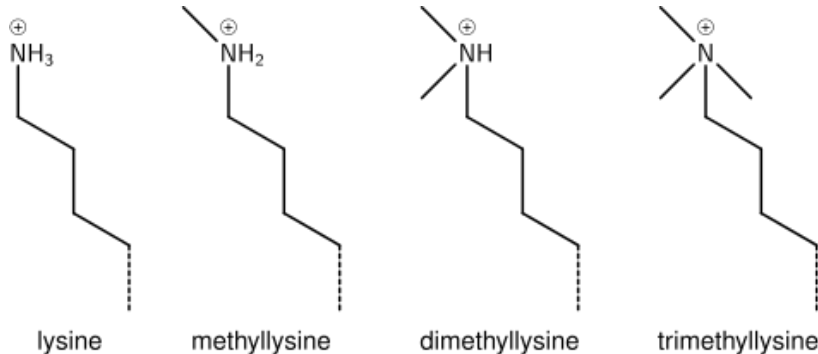
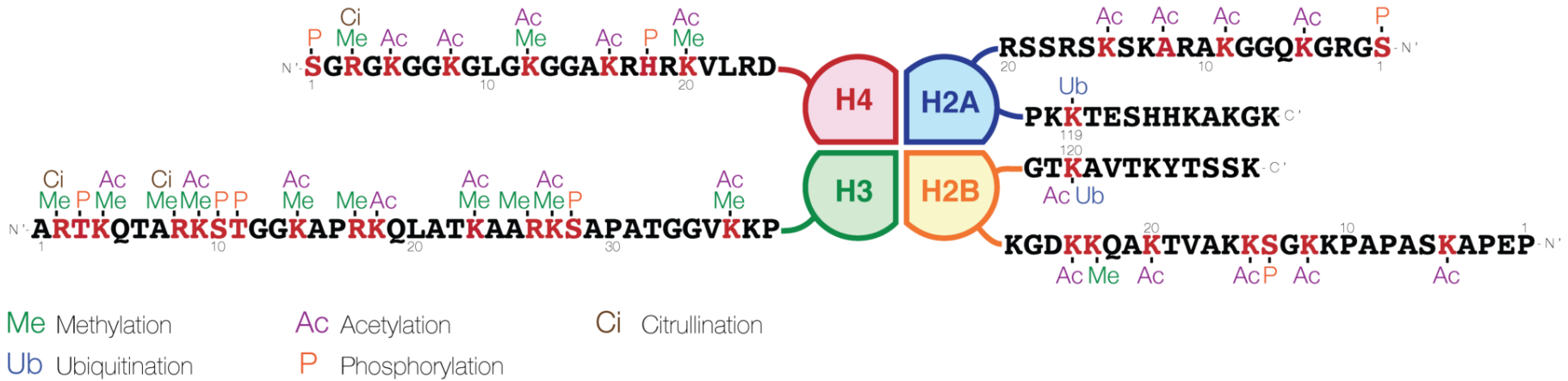
Nukleozom: skládá se z osmi histonových proteinů (2 od každého ze 4 druhů: H2A, H2B, H3 a H4) a z navinutého řetězce DNA dlouhého 147 nukleotidů

Histony: proteiny, okolo kterých je omotána DNA. 5 druhů (H1, H2A, H2B, H3 and H4)

Nomenklatura histonových modifikací

1. Jméno histonu (např. H3)
2. Jednopísmenná zkratka aminokyseliny (např. K pro lysin) a pozice AA v proteinu (počítáno od N'-konce)
3. Typ modifikace (Me: methyl, P: phosphate, Ac: acetyl, Ub: ubiquitin)
4. Počet modifikací (pouze methyl může mít více - až tři - kopie na AA zbytek)

Příklad: **H3K4me1** značí monomethylaci čtvrté AA od N'-konce (lysinu - K) na proteinu H3



Příklady známých histonových modifikací

Acetylace histonu vede k rozvolnění chromatinu a aktivaci exprese

Na rozdíl od methylace DNA neplatí, že methylace histonu vždy znamená umlčení (represi) exprese genu

Type of modification	Histone						
	H3K4	H3K9	H3K14	H3K27	H3K79	H4K20	H2BK5
mono-methylation	activation ^[6]	activation ^[7]		activation ^[7]	activation ^{[7][8]}	activation ^[7]	activation ^[7]
di-methylation	activation	repression ^[3]		repression ^[3]	activation ^[8]		
tri-methylation	activation ^[9]	repression ^[7]		repression ^[7]	activation, ^[8] repression ^[7]		repression ^[3]
acetylation		activation ^[9]	activation ^[9]				

[Video: Histonové modifikace](#)

V kostce:

HDAC - Histon deacetylázy

potlačují expresi

HDAC1, HDAC2, HDAC2...

HAT - Histon acetyl transferázy

aktivují expresi

Gcn5, CBP/p300, PCAF, SRC-1, ACTR, ESA1, MOZ...

Histon methyltransferázy

aktivují/potlačují exp.

Suv39H, CARM1, PRMT1...

DNMT - DNA methyltransferázy

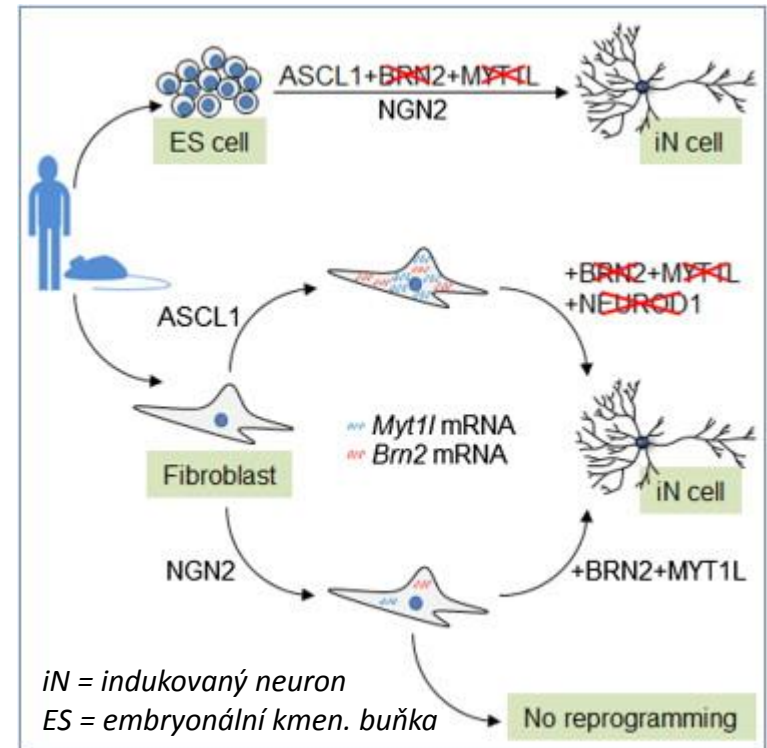
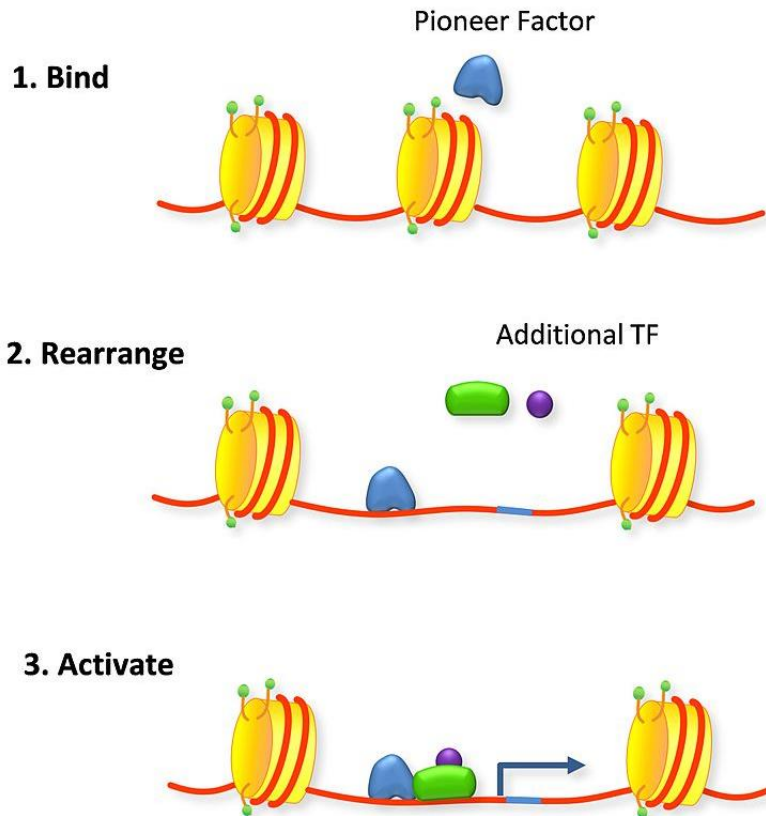
potlačují expresi

DNMT1, DNMT3...

Pioneer Transcription Factor (TF)

TF, který se dokáže vázat na kondenzovaný (uzavřený) heterochromatin

- objeven r. 2002*
- účastní se zejména zahájení diferenciace a aktivace buněčně-specifických genů
- příkladem je pioneer transkripční faktor ASCL1, který zahajuje (trans)diferenciaci do neuronu** (navíc MYT1L zajišťuje vypnutí non-neuronálních genů; např. fibroblastových při transdiferenciaci)



* Cirillo et al., 2002, "Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4". *Molecular Cell*. 9 (2): 279–89.

** Wapinski 2013; Chanda 2014

EPIGENETIKA

epigenetické změny mohou být ovlivněny okolními podmínkami (věkem, nemocí, výživou...)

Vzrůstající epigenetické rozdíly v průběhu života u monozygotických dvojčat*

- dvojčata jsou po narození epigeneticky identická, avšak po několika letech lze detekovat rozdíly v genomické distribuci 5-methylcytosinu DNA a acetylaci histonů
- rozdíly se zvětšují pokud mají dvojčata rozdílný životní styl nebo nežijí spolu*

EPIGENETIKA A VÝŽIVA

Epigenetické změny způsobené prenatálním vystavením hladomoru**

- okolní podmínky mohou u lidí způsobit epigenetické změny které přetrvají po celý život
- testování DNA methylace u genu IGF2 mezi sourozenci stejného pohlaví
- lidé prenatálně vystavení hladu během hladomoru v Holandsku 1944-1945
- snížená methylace DNA v genu pro insulin-like growth factor II (IGF-2)
- zvýšená náchylnost k obezitě a srdečním onemocněním či schizofrenii

* *Fraga et al., PNAS 2005*

** *Heijmans et al., PNAS 2008*

EPIGENETIKA A VÝŽIVA

Rozdíl mezi včelí královnou a dělnicí

- včelí královna a dělnice mají shodný genom
- rozdíly v methylaci DNA u více než 550 genů



Královská výživa

- "Royal jelly" je látka, produkovaná včelími dělnicemi pro výživu larev, určených za královny
- tyto larvy jsou geneticky identické s ostatními, vyrůstají v tzv. "Queen cup"
- tato dieta mj. utlumuje expresi DNA methyltransferase **Dnmt3**
- experimentální umlčení genu Dnmt3 pomocí RNA interference (RNAi) u larvy vedlo k vývoji v královnu u 72% larev*



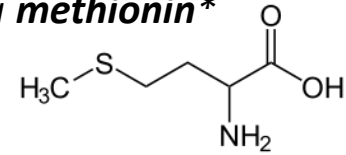
<http://learn.genetics.utah.edu/content/epigenetics/nutrition/>

* Kucharski et al., Science 2008

EPIGENETIKA A VÝŽIVA

Výživa hraje velkou roli v methylačním statusu i u člověka

Zdrojem methyl-skupiny (-CH₃) pro methylaci DNA u člověka je esenciální aminokyselina **methionin***



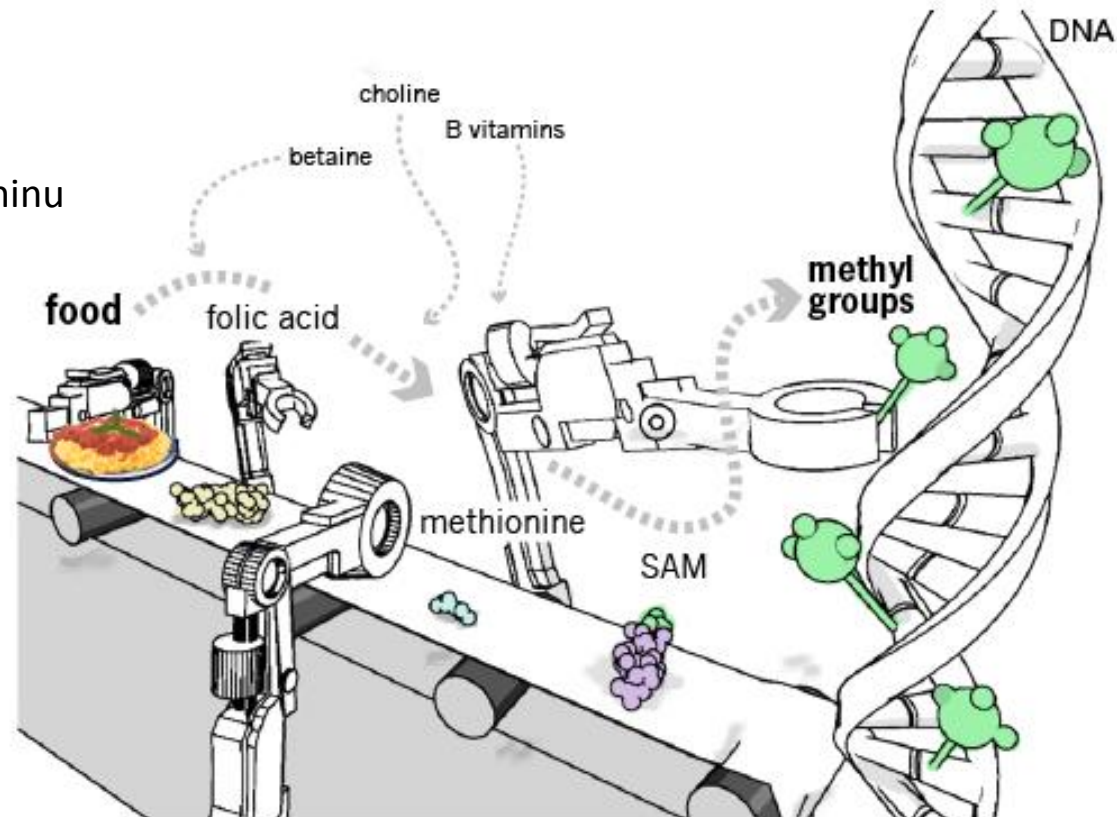
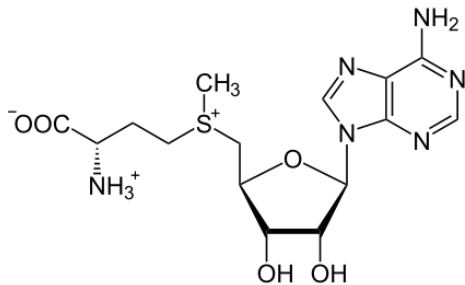
B-komplex (soubor vitamínů B):

Působí jako koenzymy a donory -CH₃ v metabolismu methioninu

- Kyselina listová (folic acid; folate; Vitamín B9)
- Vitamíny B12 a B6
- Cholin (též označován jako B4)

S-Adenosyl methionine (SAM)

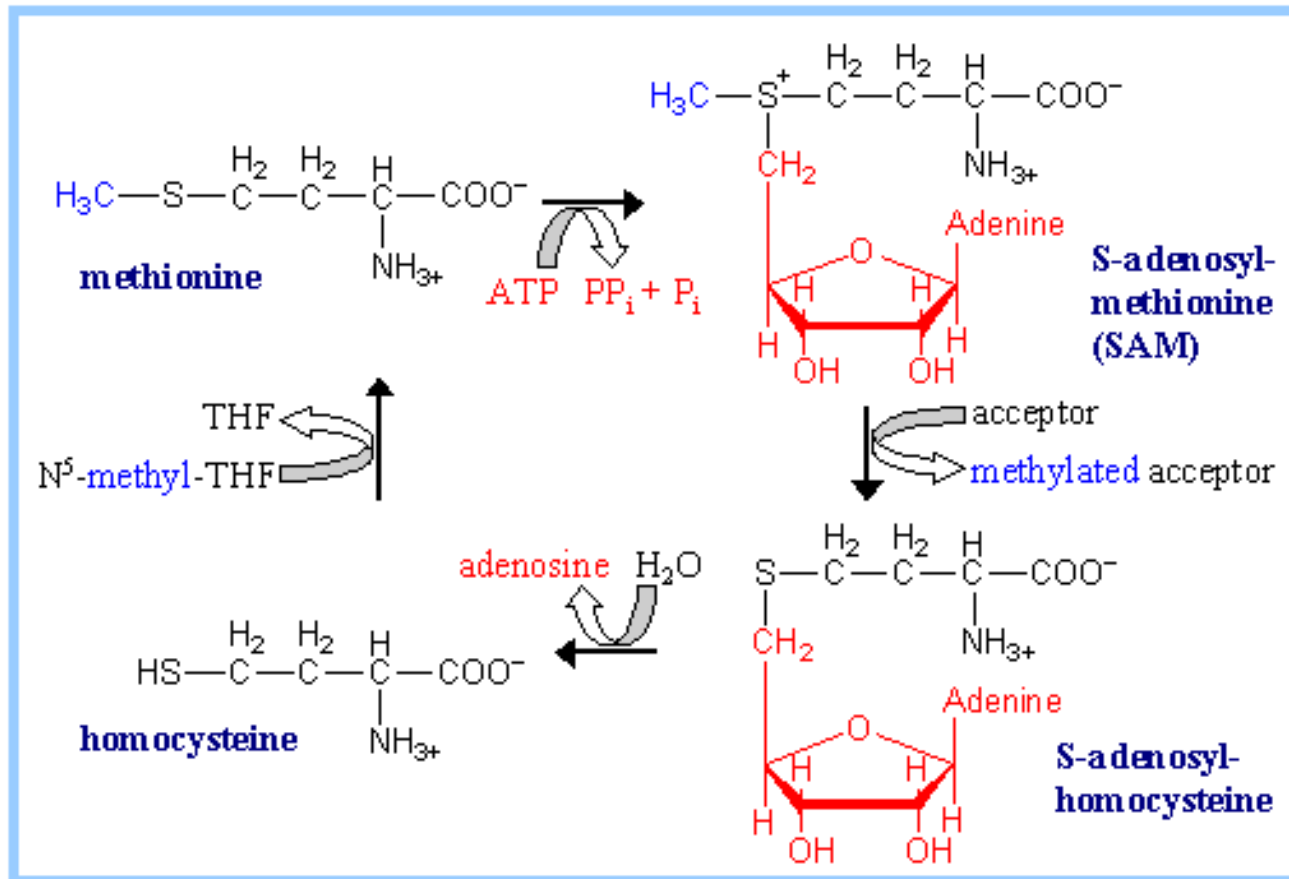
- meziprodukt při získávání -CH₃ z methioninu
- též výživový doplněk



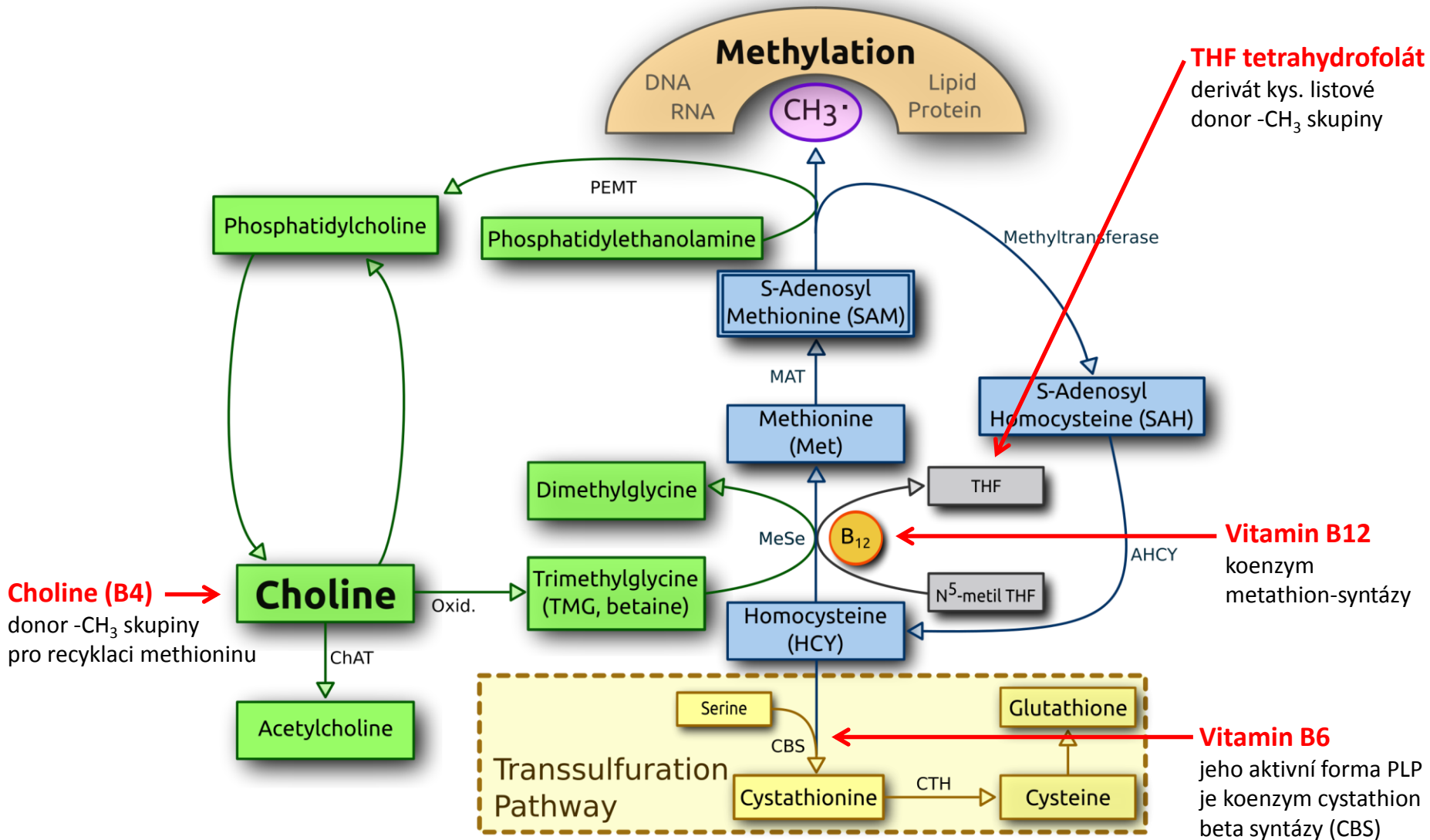
EPIGENETIKA A VÝŽIVA - KDE SE BERE METHYL SKUPINA?

Získání methyl-skupiny z aminokyseliny methioninu

- probíhá ve všech buňkách těla, zejména v játrech
- příjemci methyl-skupiny jsou nukleové kyseliny, proteiny, lipidy...
- methionin zbavený $-CH_3$ se v těle recykluje přes homocystein přidáním $-CH_3$ za účasti tetrahydrofolátu (THF), B12 a cholinu (a jeho metabolitu betainu)



EPIGENETIKA A VÝŽIVA - KDE SE BERE METHYL SKUPINA?



EPIGENETIKA A VÝŽIVA

Nutrient	Food Origin	Epigenetic Role
Methionine	Sesame seeds, brazil nuts, fish, peppers, spinach	SAM synthesis
Folic Acid B9	Leafy vegetables, sunflower seeds, baker's yeast, liver	Methionine synthesis
Vitamin B12	Meat, liver, shellfish, milk	Methionine synthesis
Vitamin B6	Meats, whole grain products, vegetables, nuts	Methionine synthesis
SAM-e (SAM)	Popular dietary supplement pill; unstable in food	Enzymes transfer methyl groups from SAM directly to the DNA
Choline B4	Egg yolks, liver, soy, cooked beef, chicken, veal and turkey	Methyl donor to SAM
Betaine	Wheat, spinach, shellfish, and sugar beets	Break down the toxic byproducts of SAM synthesis

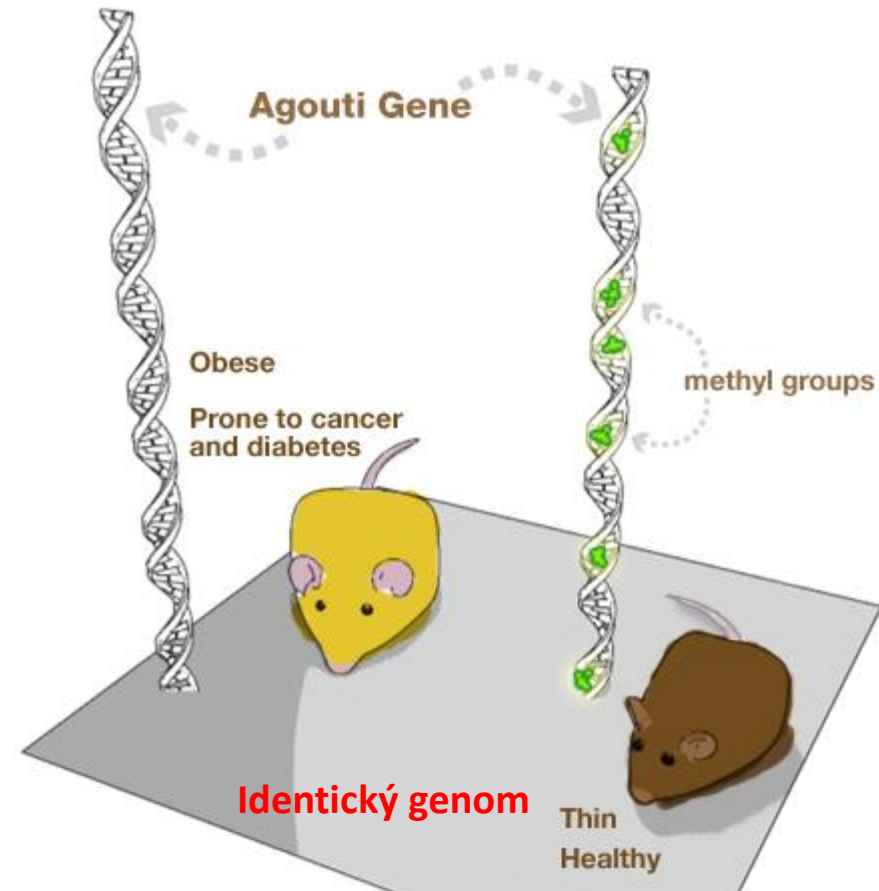
EPIGENETIKA A VÝŽIVA

Výživa bohatá na zdroj methylové skupiny (cholin a folát) ovlivňuje methylaci DNA hlavně v prenatálním vývoji

- některé regiony genomu pak zůstávají odmethylovány (zapnuty) po celý život
- methyl-deficientní dieta v dospělosti vede také ke snížení methylace DNA, ale je reverzibilní

Gen *Agouti*

- vyskytuje se u všech savců
- normálně je u myši **zamethylován**:
 - hnědá srst, normální váha
- pokud je u myši **odmethylován**:
 - žlutá srst, obezita
 - sklony k diabetu a rakovině
- při krmení žluté myši v březosti stravou bohatou na zdroj methyl-skupin se narodili hnědí potomci, zdraví po celý život (žluté matce už tato dieta nepomohla)



EPIGENETIKA A VÝŽIVA

Bisphenol A (BPA)

- sloučenina k výrobě plastů (plastové láhve, plechovky)
- snižuje metylaci DNA (prokázáno na *Agouti* genu u myší*)
 - BPA podávané matkám, potomstvo bylo žluté a obézní
 - pokud však zároveň s BPA krmili methyl-rich dietou - potomstvo hnědé a neobézní

These Two Mice are Genetically Identical and the Same Age



While pregnant, both of their mothers were fed Bisphenol A (BPA) but **DIFFERENT DIETS**:

The mother of this mouse received a **normal mouse diet**

The mother of this mouse received a diet **supplemented** with choline, folic acid, betaine and vitamin B12

EPIGENETIKA

Genomický imprinting (vtiskování)

- exprese alely závisí na pohlaví rodiče, od něhož byla zděděna
- např. pro určitý gen je exprimována pouze otcovská alela (nemethylovány u spermií)
- mateřská alela v oocytech je methylována
- potomci tohoto mezidruhového křížení jsou obecně neplodní

- morfologická, anatomická i etologická odlišnost samice muly a samice mezka
- identický genom

Mula

kříženec samice osla se
samici koně

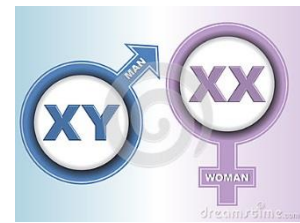


Mezek

kříženec samice osla se
samcem koně

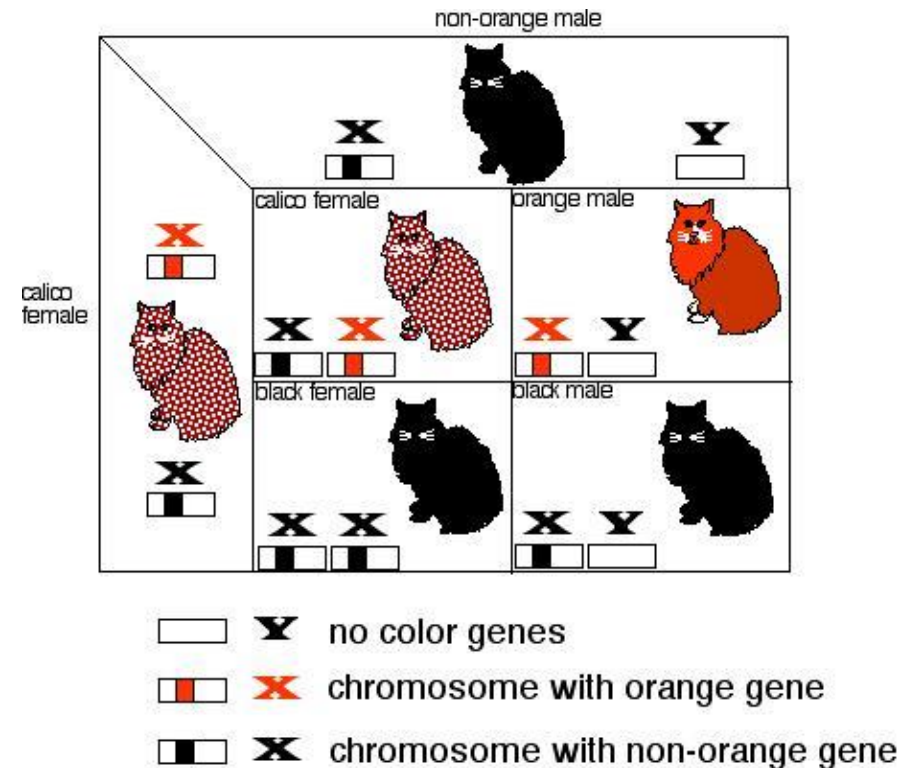
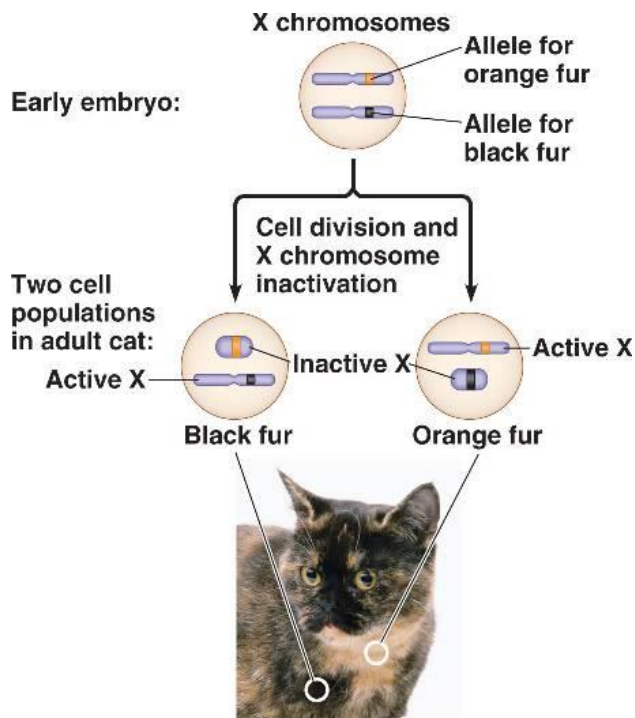


EPIGENETIKA - X-inactivation



Proces, při kterém je inaktivována jedna z kopií X-chromozomu u samic savců

- k umlčení transkripce dochází zabalením do **heterochromatinu**, nepřístupného transkripci
- důvod: zabránit aby samice měly dvojnásobnou expresi genů na X-chromosomu než samci
- u placentálních savců (člověk) je volba X-chromosomu pro inaktivaci náhodná (ve fázi raného embrya)
- Vizuální manifestace inaktivovaného X-chromozomu: na X-chromosomu se nachází gen pro zbarvení srsti kočky (strakaté jsou vždy samice a říká se jim "calico")



EPIGENETIKA - X-inactivation

- jedná se o epigenetickou změnu, která vede ke změně fenotypu
- X-inaktivace je reverzibilní u zárodečných buněk
- Ženy často přenašečky chorob vázaných na X-chromozom (u heterozygotek je ten nemocný X-chromozom inaktivován*), ale ve vajíčku se reaktivuje
- Muž má X vždy aktivní (100% zdravý nebo 100% nemocný)

**Nebo je vypnutý u části buněk, takže má choroba mírnější formu*

EPIGENETIKA - X-inactivation

- každá ženská somatická buňka obsahuje aktivní (Xa) a inaktivní (Xi) chromozom
- Xi neexprimuje většinu genů

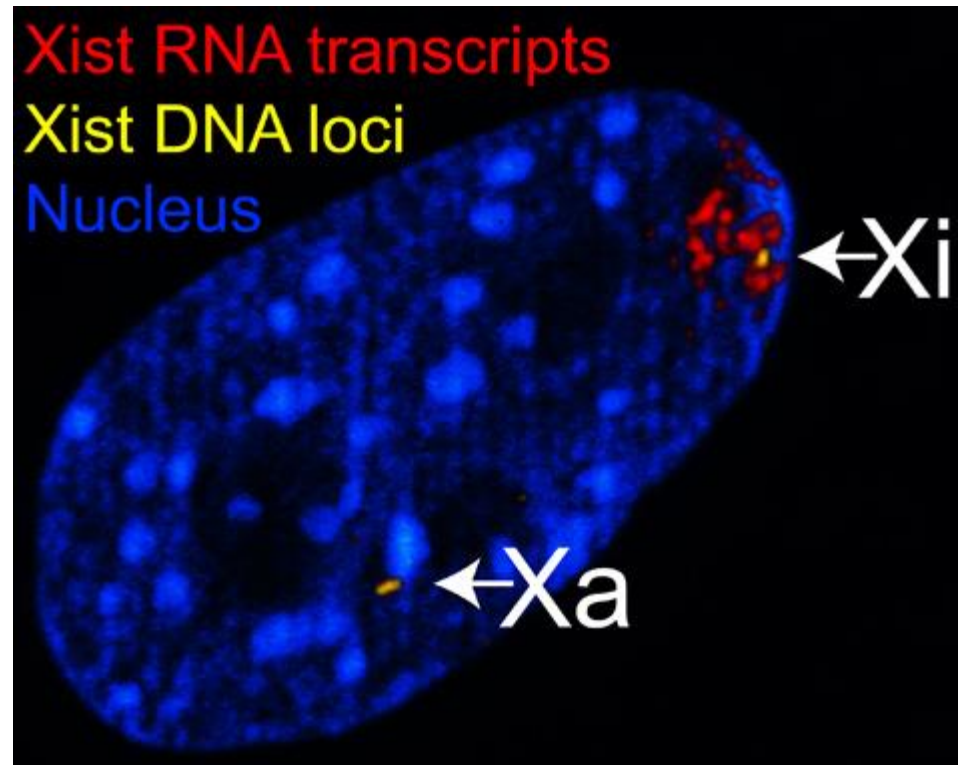
Xist (*X-inactivation specific transcript*)

- hlavní gen zodpovědný za inaktivaci X-chromozomu je exprimován Xi chromozomem
- přepisuje se do nekódující RNA
- váže se na oblasti bohaté na aktivní geny - euchromatin - a inaktivuje je

Xi má na rozdíl od Xa:

- vyšší hladiny methylace DNA
- nízké hladiny histonové acetylace
- nízkou 4-methylaci lyzinu na histonu H3 (H3K4)

Xa	aktivní chromozom
Xi	inaktivní chromozom



EPIGENETIKA A RAKOVINA

Methylace DNA

- U nádorových buněk je pozorována **celková hypomethylace genomu**
- avšak 5-10% normálně nemethylovaných CpG ostrůvků **na promotorech** je v **rakovinných buňkách abnormálně methylováno**
- **hypermethylace na promotorech** ovlivňuje jak expresi proteinů tak nekodující regulační RNA
- důležité je prostorové rozložení DNA methylací:
 - methylace DNA na **promotoru** inhibuje transkripci
 - methylace DNA uvnitř genů transkripci tolik nevadí

Spíš než celkový stav methylace/acetylace je důležité, které konkrétní geny jsou umlčeny/aktivovány (tumor-supresor nebo onkogen)

Hypermethylace: Methylační inaktivace tumor-supresorů (p53)

Hypomethylace: Aktivace onkogenů

EPIGENETIKA A RAKOVINA

Léčba cílená na epigenetiku

Roku 1983 byly poprvé popsány změny v methylaci DNA, související s **rakovinou tlustého střeva***

- pozorovány specifické vzorce v methylaci určitých genů
- srovnání s nezasazenou okolní tkání
- u 4 z 5 pacientů byla pozorována hypomethylace v rakovinných buňkách
- progresivní hypomethylace u metastazujících pacientů

- DNA hypo- a hypermethylace a změny v acetylaci histonů byly pozorovány u **rakoviny prostaty****

- Ovlivnění velkého množství genů

Epigenetická regulace hraje důležitou roli i v dalších typech rakoviny: děložního čípku, leukemie...

* *Feinberg and Vogelstein, Nature 1983*

** *Li et al., J Natl Cancer Inst 2005*

EPIGENETIKA A RAKOVINA

- Léčiva se zaměřují na reverzi epigenetických změn vedoucích ke vzniku rakoviny
- Nespecifické a s vedlejšími účinky
- Musí být **cílená na daný typ rakoviny** (např. nefunkční tumorsupresor, nebo hyperaktivní onkogen)

1. Inhibitory DNA methyltransferáz (Dnmt)

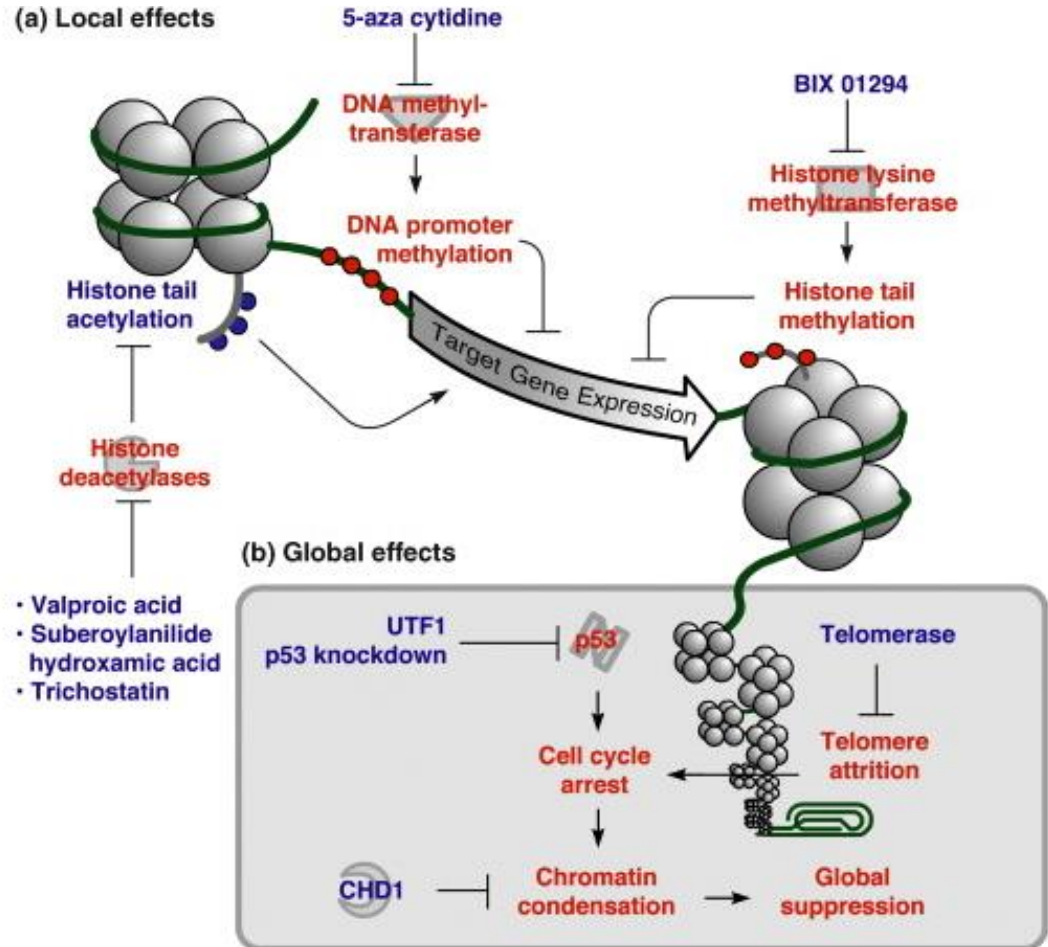
- hypometylační efekt
- **nastartování** transkripce tumorsupresorů
- azacitidine, decitabine

2. Inhibitory histon acetyltransferáz (HAT)

- **inhibice** transkripce onkogenů
- vorinostat, romidepsin

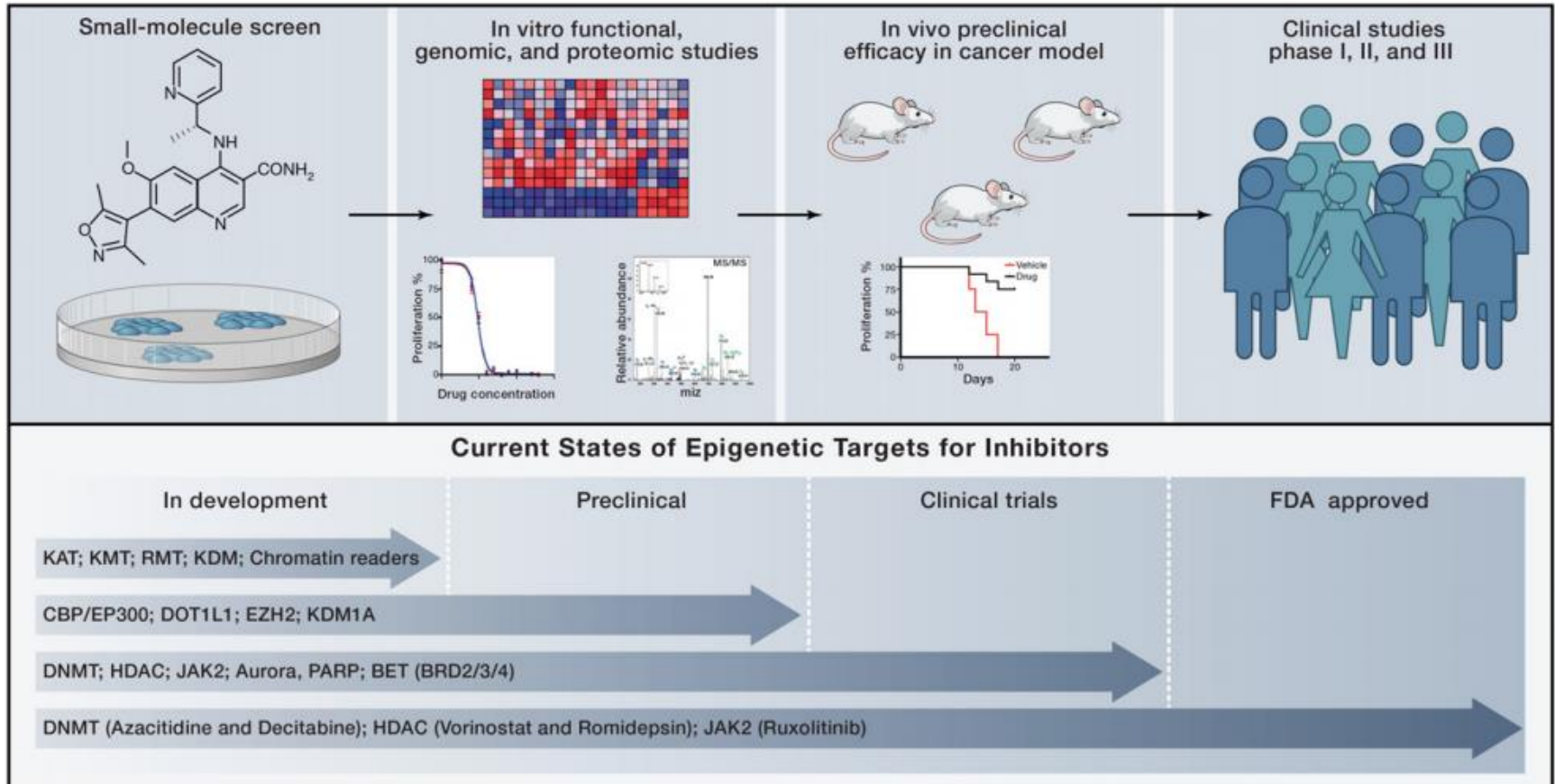
3. Inhibitory histon deacetyláz (HDAC)

- kyselina valproová, trichostatin
- **podpora** exprese genů spojených s apoptozou - zpomalení progresu rakoviny
- též indukce diferenciaci u nezralých buněk (např. při leukemiích)



Vývoj léčiv pro epigenetickou terapii

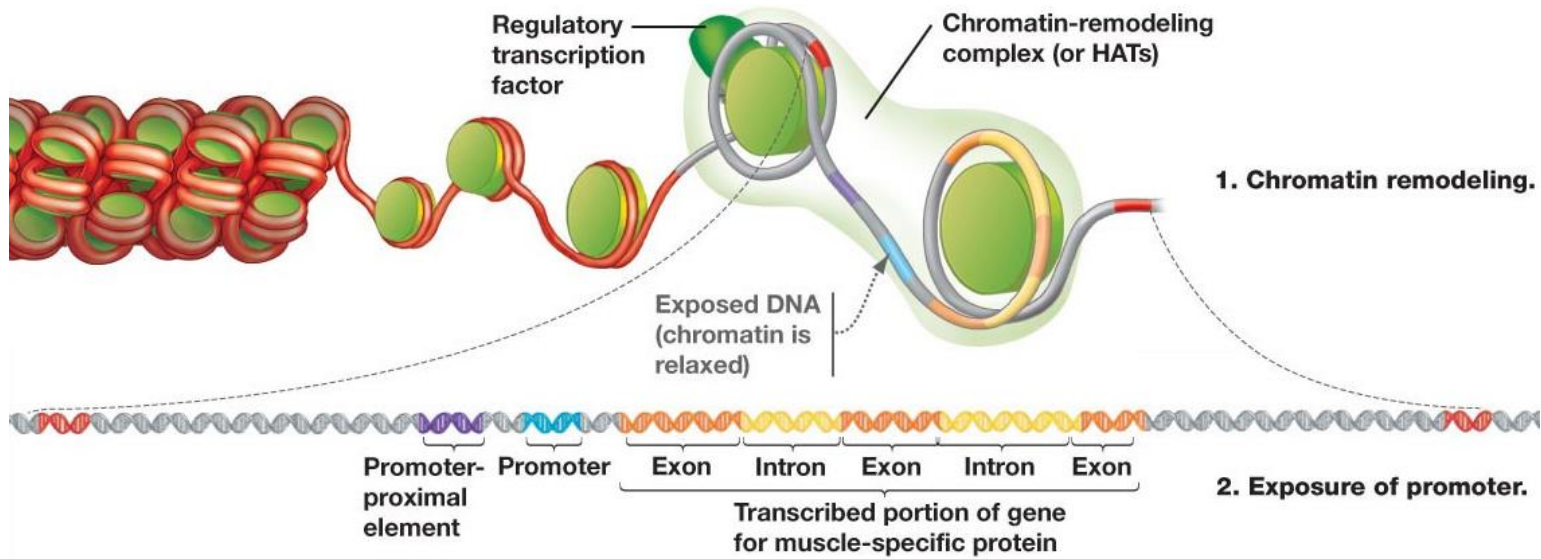
1. Kandidátní malé molekuly jsou nejprve testovány na rakovinných buňkách *in vitro* (inhibice proliferace, indukce apoptozy, cell-cycle arrest)
2. Zjištění potenciálních signálních drah, které jsou zodpovědné za daný pozorovaný efekt (např. expresní microarrays)
3. Účinné látky jsou testovány na zvířecích modelech s rakovinou (zjištění *in vivo* terapeutického účinku - survival, a dále toxicitu, vedlejší účinky a farmakokinetické vlastnosti dané látky)
4. Kandidátní molekuly jsou do klinických studií



Transkripční kontrola

podobně jako u prokaryot se RNA-polymeráza (větš. II) váže na oblast promotoru

1. remodelace chromatinu odhalí promotor



Transkripční kontrola

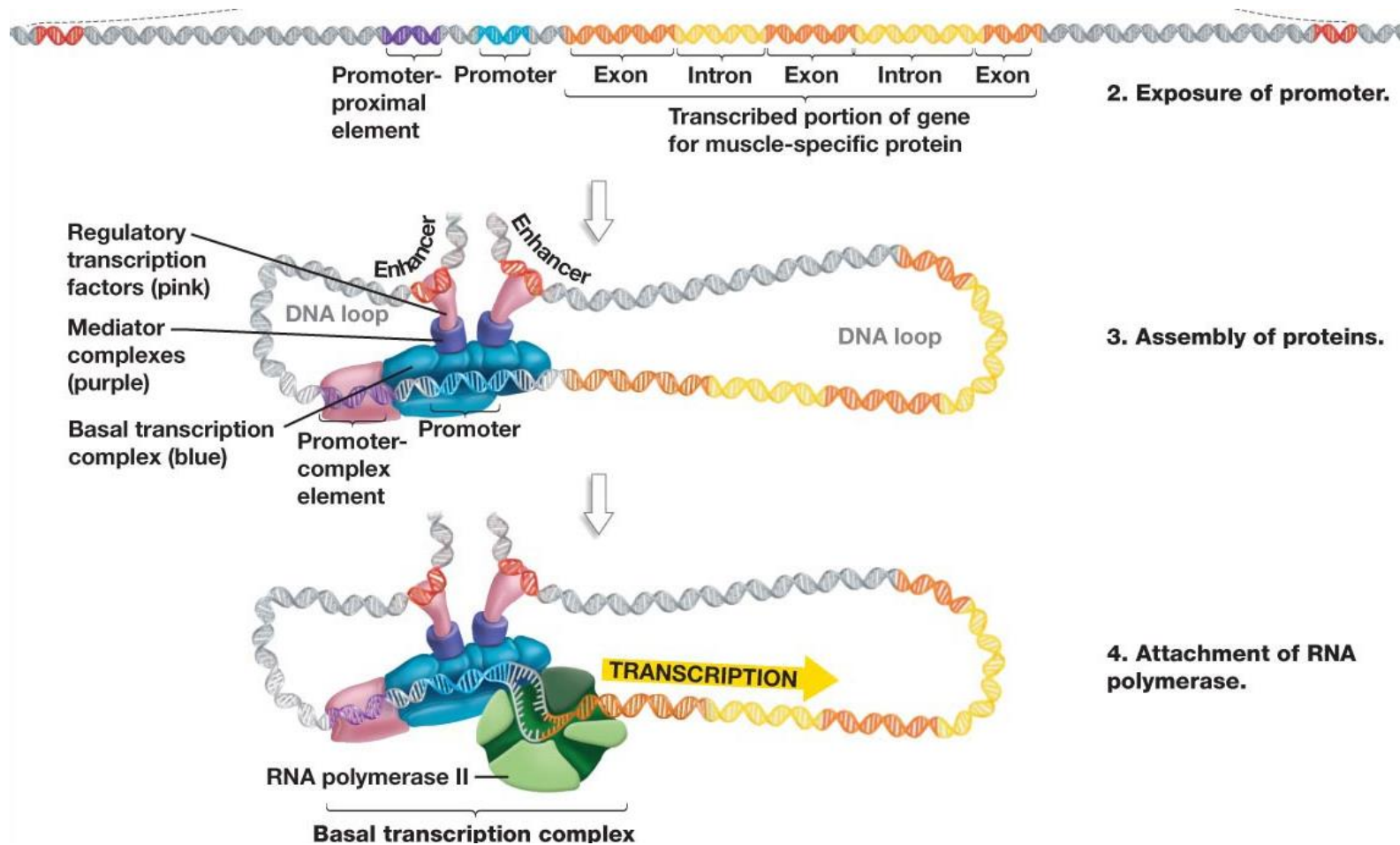
podobně jako u prokaryot se RNA-polymeráza (větš. II) váže na oblast promotoru

2. bazální TFs (modrá) se váží na promotor

3. regulační TFs (růžová) se vážou na enhancery (červená oblast), silencery nebo na promotor-proximální elementy (fialová oblast). DNA může tvořit vlásenku.

4. bazální a regulační TFs dohromady tvoří **INICIAČNÍ KOMPLEX**

5. RNA-polymeráza II se váže na promotor a je aktivována - **BAZÁLNÍ TRANSKRIPČNÍ KOMPLEX**



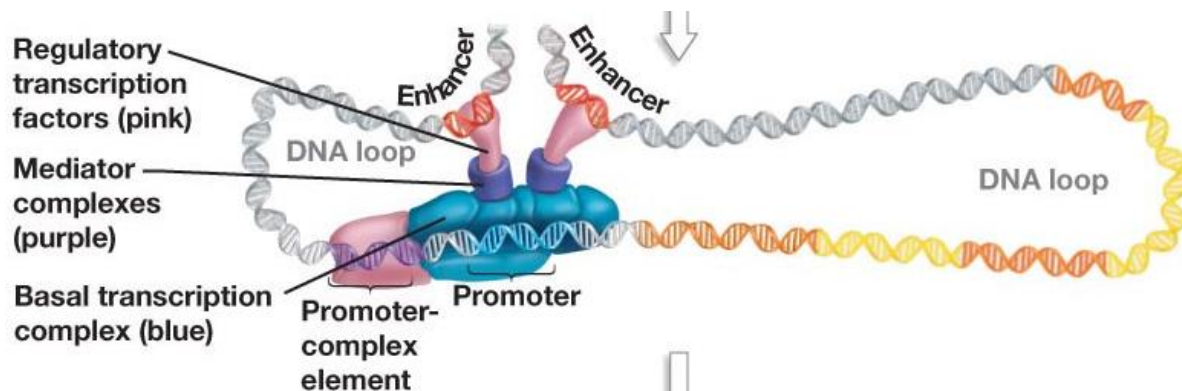
Transkripční Faktory

1. Bazální a obecné transkripční Faktory (TFs)

- ve všech eukaryotických buňkách
- nezbytné pro transkripci, ale neposkytují žádnou regulaci
- Bazální: TFIIA, TFIID, TFIIB, TFIIE, TFIIH, TFIIF
- Obecné: Oct1, CT1, SPF
- nejdůležitější je TFIID a jeho podjednotka TBP (TATA binding protein)
- interagují s promotorem
- TFIID je první protein, který se váže na DNA při zahájení transkripce (tvorbě iniciačního komplexu)

2. Regulační Transkripční Faktory (TFs)

- též zvané aktivátory iniciace transkripce
- jsou **hlavními regulačními mechanismy genové exprese u eukaryot**
- proteiny jež se vážou na
 - a) enhancery (zesilovače transkripce)
 - b) silencers
 - c) promoter-proximální elementy
- jsou specifické pro určité geny (nebo rodiny genů)



Funkční klasifikace transkripčních faktorů

1. Konstitutivně aktivní

- Přítomné stále ve všech buňkách
- Bazální a obecné TFII A-H, Sp1, NF1...

2. Regulační

a) Vývojové (buněčně specifické) – exprese přísně kontrolována, ale jakmile dojde k aktivaci, nepotřebují další aktivaci – GATA, HNF, PIT-1, MyoD, Myf5, Hox, Winged Helix

b) signal-dependentní – vyžadují externí signalizaci pro aktivaci

1 extracelulárním ligandem (endokrinní nebo parakrinní) – vazba na DNA v jádře

2 intracelulárním ligandem (autokrinní) – např. p53 – vazba na DNA v jádře

3 závislé na membránovém receptoru – nutná signalizační kaskáda vedoucí k aktivaci transkripčního faktoru (fosforylace)

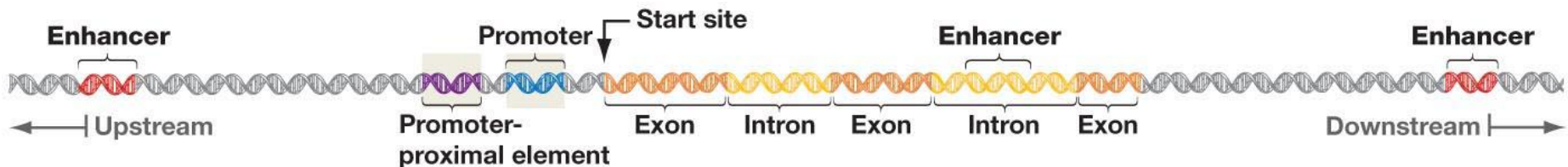
Kontrolní elementy

Promoter-proximální elementy

- vždy umístěny v blízkosti promotoru
- na rozdíl od promotoru unikátní pro každý gen
- tyto oblasti na DNA umožňují vazbu specifických regulačních TFs
- díky PPE je eukaryotická buňka schopná rozlišovat mezi jednotlivými geny a regulovat expresi

Enhancery a silencery

- zvyšují nebo snižují míru transkripce
- také genově specifické
- mohou sousedit s promotorem nebo se nacházet uvnitř transkripční jednotky
- často bývají umístěny daleko od promotoru (10-100 bazí), pak se tvoří DNA vlásenka
 - po směru transkripce (downstream)
 - proti směru transkripce (upstream)
- nefungují pokud se vzdálí miliony bazí od promotoru či na jiný chromozom



Transkripční kontrola

Zapínání a vypínání určitých genů v určitých buňkách pravděpodobně regulováno unikátními kombinacemi:

1. vazebných míst na DNA (promotor, promoter-proximální elementy, silencers a enhancers)
a
2. transkripčních faktorů

Analogie s bankovní schránkou

- klíč bankéře - stejný pro všechny schránky, ale sám o sobě větš. nefunkční - **BAZÁLNÍ FAKTOR**
- můj klíč - specifický pro určitou schránku, ale sám o sobě ji neotevře - **REGULAČNÍ FAKTOR**

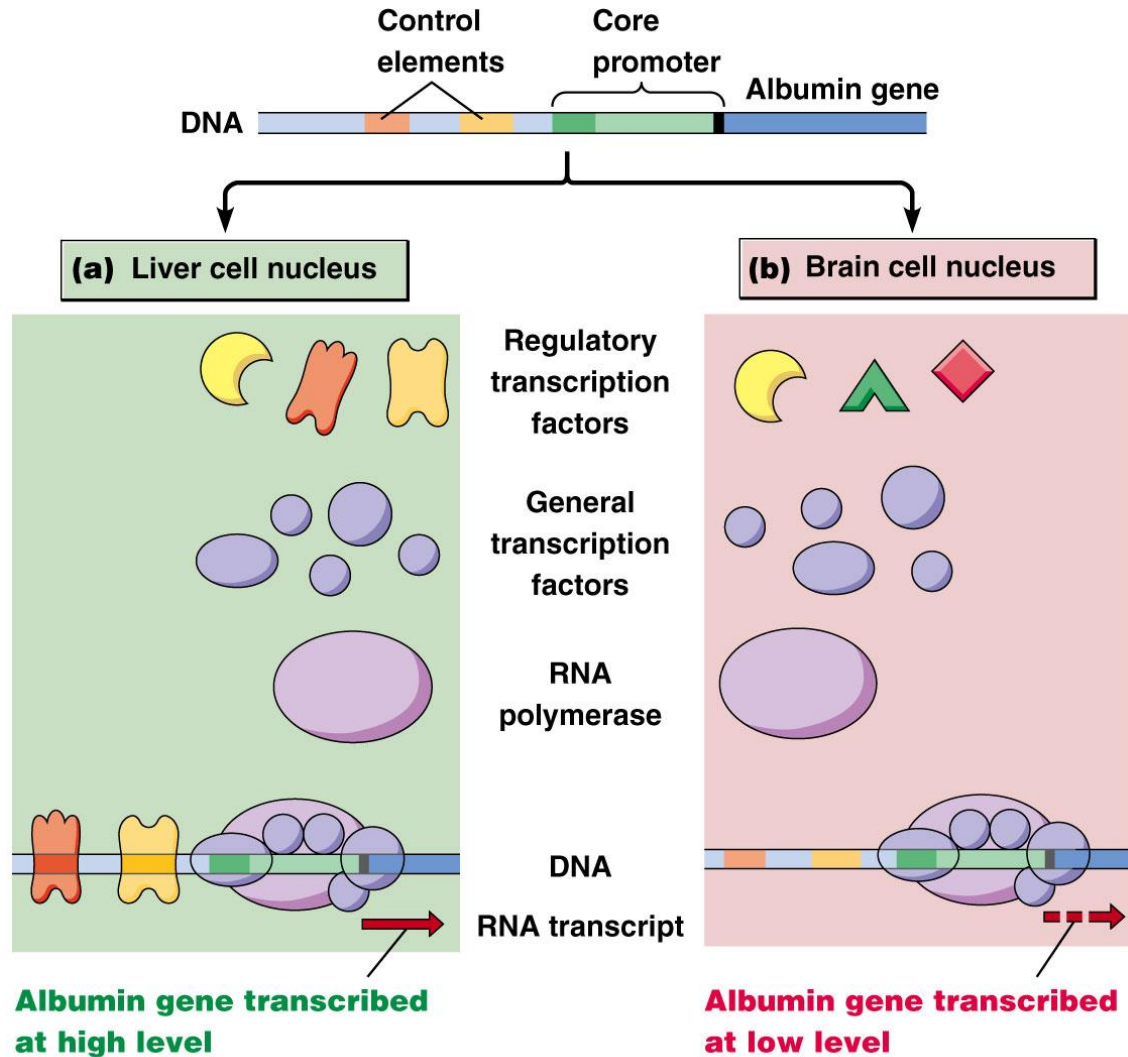


Transkripce genu pro albumin*

Všechny buňky obsahují RNA-polymerázu a **bazální (obecné) TFs**

Jaterní buňky obsahují **regulační TFs** rozpoznávající všechny kontrolní elementy pro albuminový gen (enhancery/silencery/promotor-proximální elementy)

Regulační TFs mozkových buněk nerozpoznávají všechny kontrolní elementy albuminového genu



© 2012 Pearson Education, Inc.

* Albumin: protein krevní plazmy, tvoří 60 % všech plazmatických bílkovin. Důležitý při transportu látek krví (mastné kyseliny, minerály, léky). Syntetizován v játrech.

Extracelulární signál (hormon) spouští expresi genů specifických pro svalovou buňku

EXTRACELLULAR SIGNALS TRIGGER CELL-SPECIFIC GENE EXPRESSION.

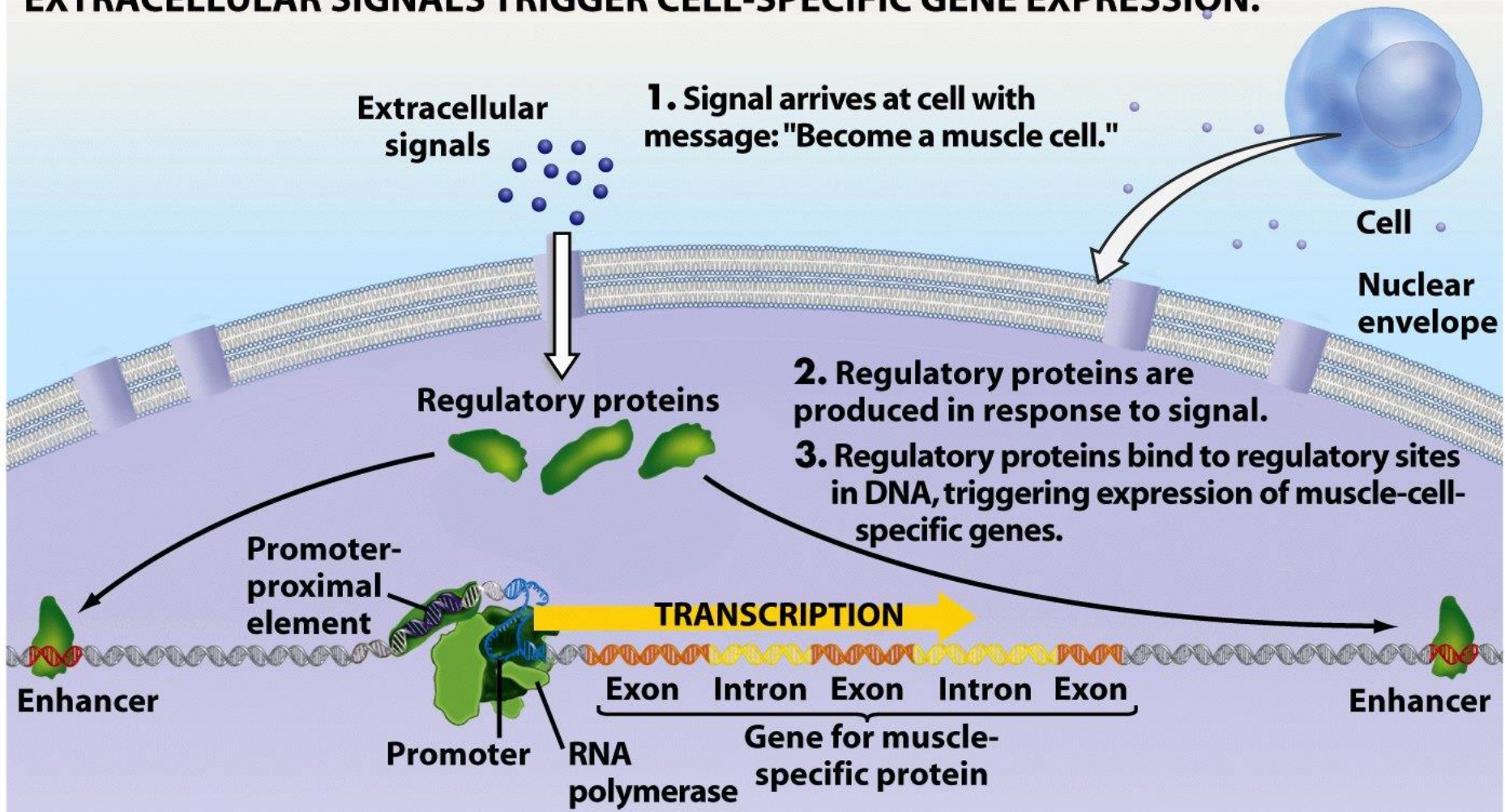


Figure 18-9 Biological Science, 2/e

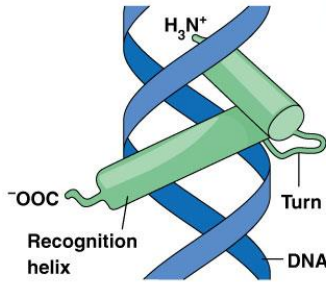
Jak se proteiny vážou k DNA?

- nejčastěji vazba α -helixu s větším žlábkem DNA
- nekovalentní vazby: vodíkové můstky a iontové vazby
- **sequence-specific recognition**

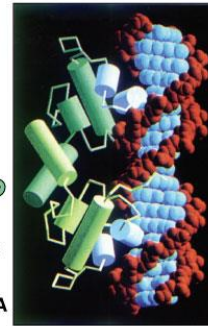
Motivy vazby:

a) Helix-turn-helix

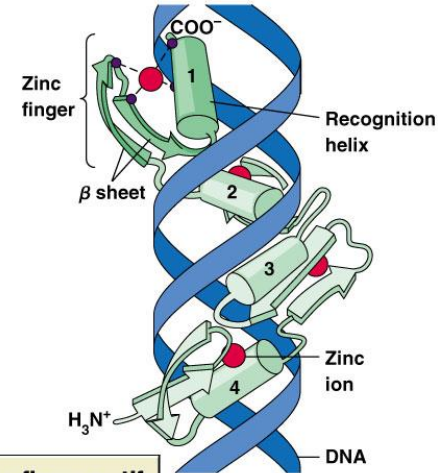
- 2 α -helixy spojené krátkou otáčkou



(a) Helix-turn-helix motif



Phage λ repressor bound to DNA



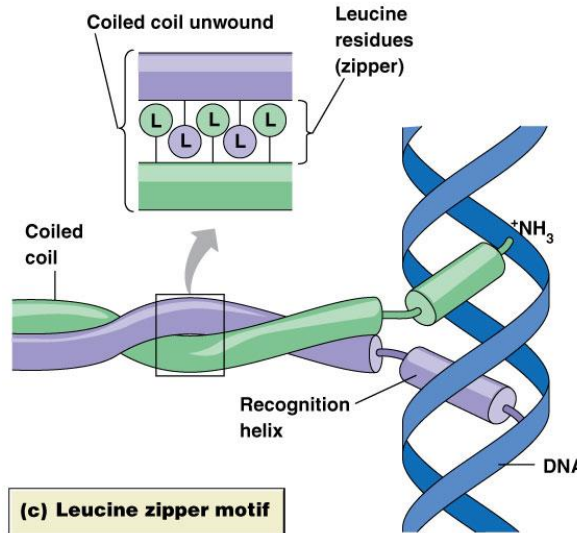
(b) Zinc finger motif

b) Zinkové prsty

- 1 α -helix a 2 antiparalelní β -listy, vše spojené atomem zinku
- více jednotek (zinkových prstů)

c) Leucinový zip

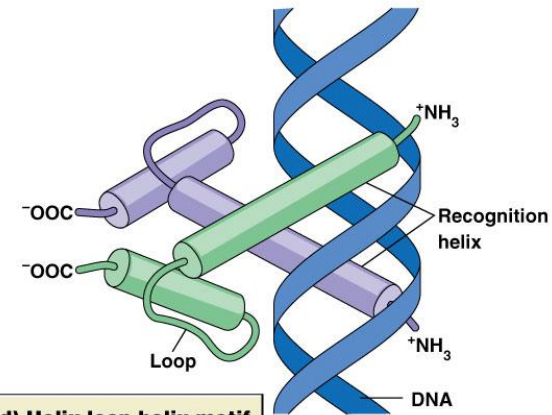
- 2 α -helixy se okolo sebe ovinují díky pravidelně uspořádaným leucinům



(c) Leucine zipper motif

d) Helix-loop-helix

- kratší a delší α -helix v dimeru



(d) Helix-loop-helix motif

SUMMARY TABLE 18.1 **Regulating Gene Expression in Bacteria and Eukaryotes**

Level of Regulation	Bacteria	Eukaryotes
Chromatin remodeling	<ul style="list-style-type: none"> • Limited packaging of DNA • Remodeling not a major issue in regulating gene expression. 	<ul style="list-style-type: none"> • Extensive packaging of DNA • Chromatin must be opened for transcription to begin.
Transcription	<ul style="list-style-type: none"> • Positive and negative control by regulatory proteins that act at sites close to the promoter • Sigma interacts with promoter. 	<ul style="list-style-type: none"> • Positive and negative control by regulatory proteins that act at sites close to and far from promoter • Large basal transcription complex interacts with promoter. • Mediator complex required.
RNA processing	<ul style="list-style-type: none"> • None documented 	<ul style="list-style-type: none"> • Extensive processing: alternative splicing of introns addition of 5' cap and 3' tail
mRNA stability	<ul style="list-style-type: none"> • Some RNA interference documented 	<ul style="list-style-type: none"> • For many genes, RNA interference limits life span or translation rate.
Translation	<ul style="list-style-type: none"> • Regulatory proteins bind to mRNAs and/or ribosome and affect translation rate. 	<ul style="list-style-type: none"> • Regulatory proteins bind to mRNAs and/or ribosome and affect translation rate.
Post-translational modification	<ul style="list-style-type: none"> • Folding by chaperone proteins • Chemical modification (e.g., phosphorylation) may change activity. 	<ul style="list-style-type: none"> • Folding by chaperone proteins • Chemical modification (glycosylation, phosphorylation) • Ubiquitination targets proteins for destruction by proteasome.

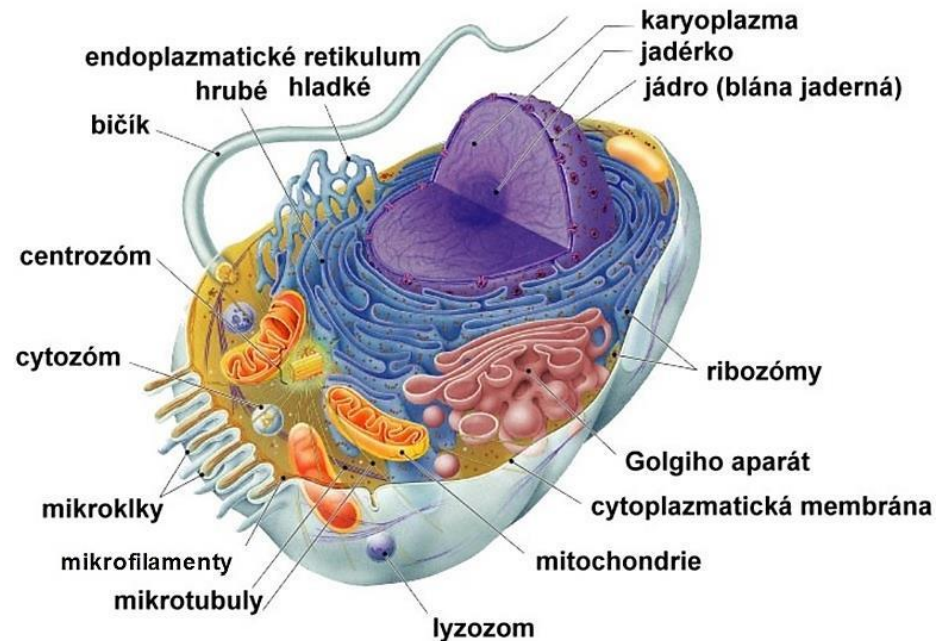
Molekulární biologie pro informatiky - 7

Molekulární struktura eukaryotické buňky

Eukaryotická buňka

Struktura buňky

- povrch buňky (CM, BS)
- základní cytoplazma
- jádro
- semiautonomní organely
- endomembránový systém (GA, ER)
- cytoskelet

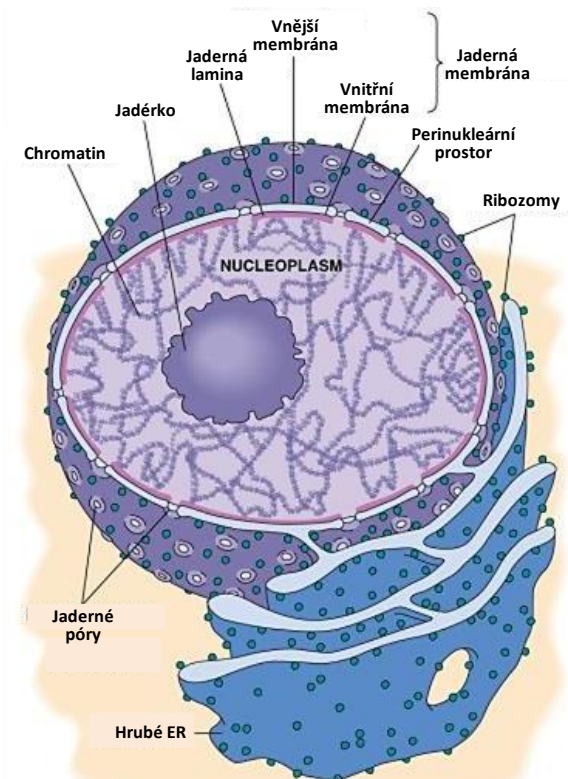
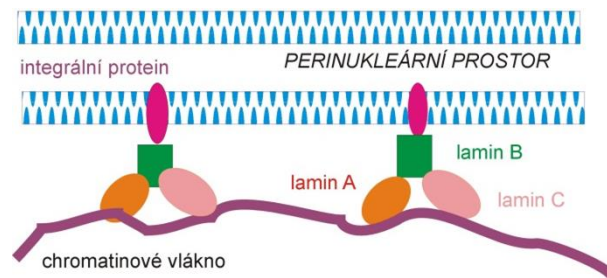
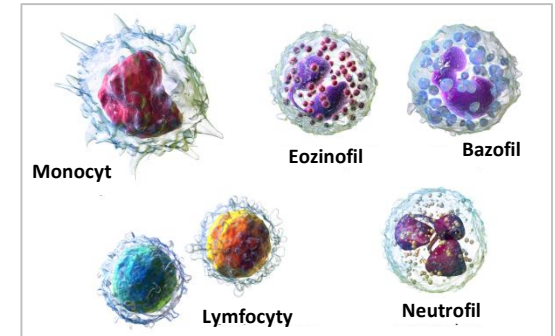


Buněčné kompartmenty

- oddělení a organizace chemických reakcí
- výhody - protichůdné chemické procesy, mikroprostředí chemické reakce
 - oddělení nebezpečných rozkladných dějů, dělba práce mezi organelami
- nevýhody - koordinace procesů, biosyntéza organel, třídění proteinů

Jádro

- funkce genetická, metabolická, regulační
- hmota uvnitř jádra = chromatin
- **jaderná membrána**
 - dvě biomembrány (vnější navazuje na membránu ER)
 - perinukleární prostor (navazuje na lumen ER)
 - jaderné póry
- **jaderná lamina**
 - vyztužení vnitřní membrány, vazba chromatinu
 - lamin A, B, C
- **jadérko**

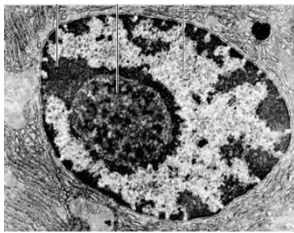
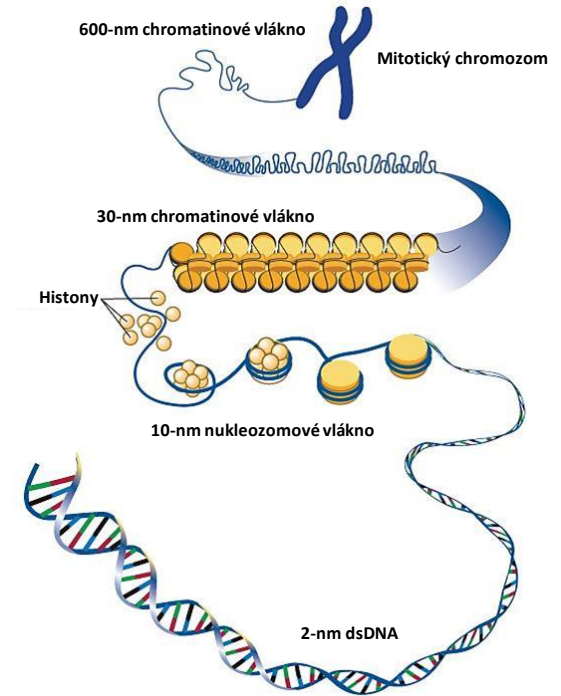


Chromatin

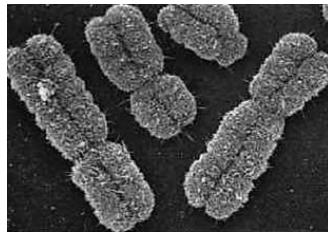
- dsDNA, histony , proteiny nehistonové povahy
- dvoušroubovice DNA - nukleozomový řetězec - 30-nm chrom. vlákno - 600-nm chrom. vlákno - mitotický chromozom
- euchromatin, heterochromatin

Chromozom

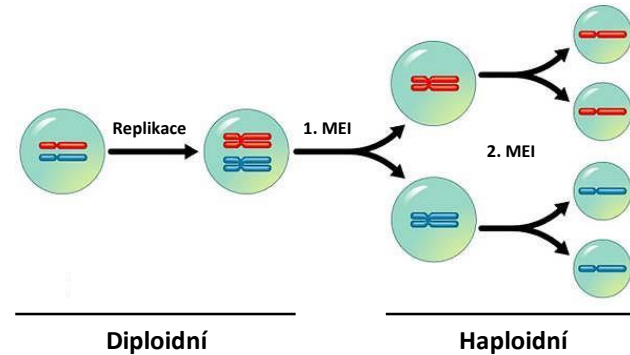
- v interfázním jádře rozprostřen
- při mitóze ve formě mitotického chromozomu
- haploidní sada chromozomů v pohlavních buňkách
- diploidní sada chromozomů v somatických buňkách



Interfáze



Mitotické chromozomy



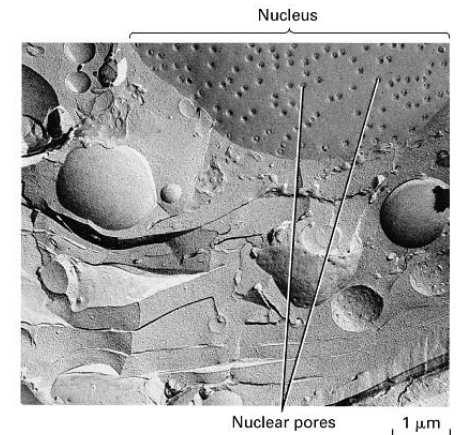
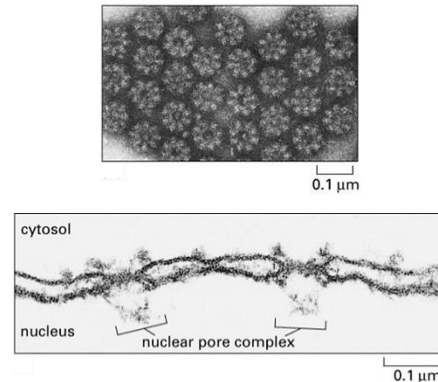
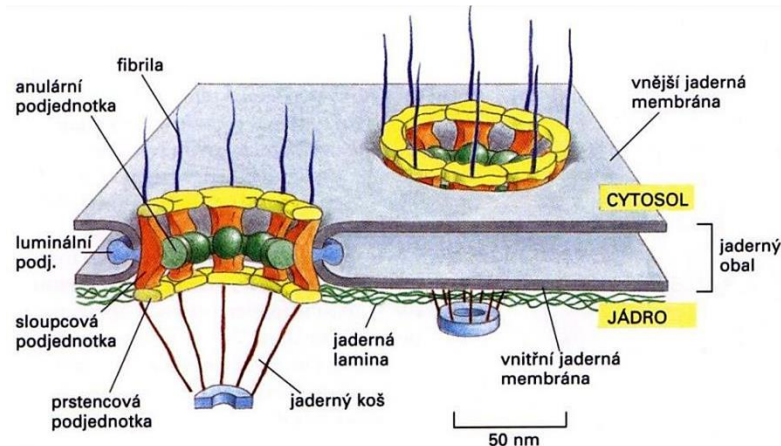
Transport přes jaderný pór

Jaderný pór

- 3000 - 4000 pórů v jádře savčích buněk
- komplex cca 100 různých nukleoporinů, osmičetná symetrie
- cytoplazmatická strana - kruh s vlákny
- nukleoplazmatická strana - kruh v jaderné lamině, struktura ve tvaru koše

Transport molekul mezi jádrem a cytoplazmou

- pasivní transport - volná difuze menších molekul rozpuštěných ve vodě
- aktivní transport - selektivní transport molekul s třídícími signály
 - vazba molekuly na importin/exportin, translokace jaderným pórem
 - jednostranný transport zajišťuje Ran



Jadérko

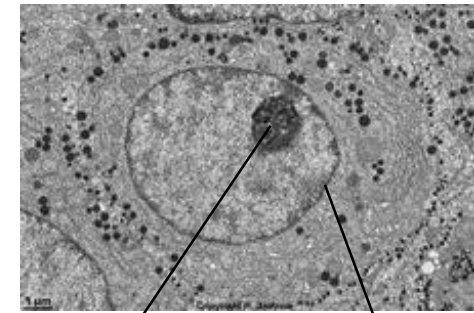
Syntéza molekul rRNA, sestavení ribozomálních podjednotek

Organizátor jadérka

- krátká raménka chromozomů 13, 14, 15, 21, 22
- tandemové repetice rDNA (geny pro rRNA)
- přepis rDNA do 45S pre-rRNA (RNA Pol I)
- štěpení na 18S, 5.8S a 28S rRNA (snoRNP)

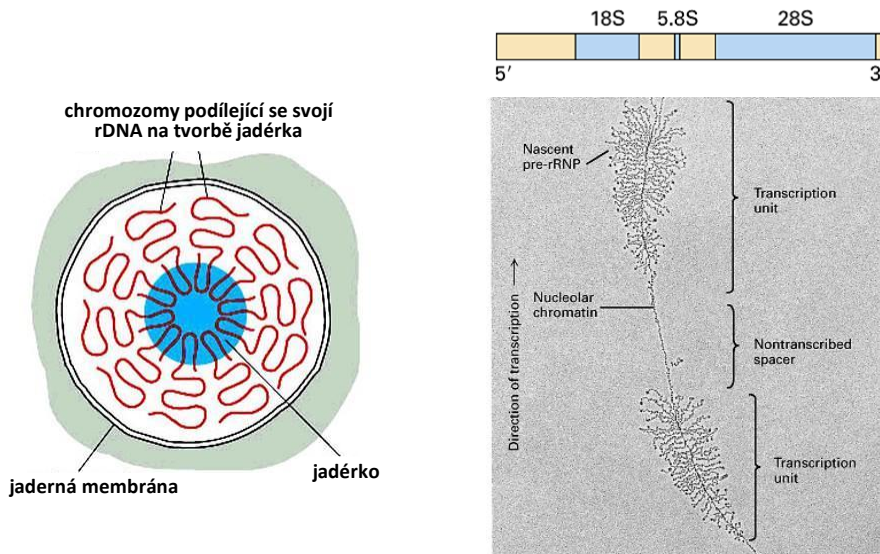
5S rRNA přepisována mimo jadérko (RNA Pol III)

Import ribozomálních proteinů - sestavení ribozomálních podjednotek - export podjednotek



jadérko

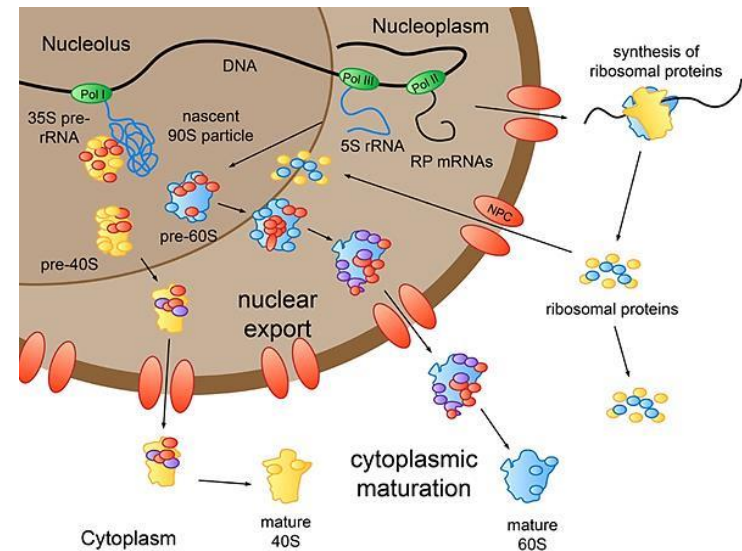
jaderná membrána



chromozomy podílející se svojí rDNA na tvorbě jadérka

jaderná membrána

jadérko



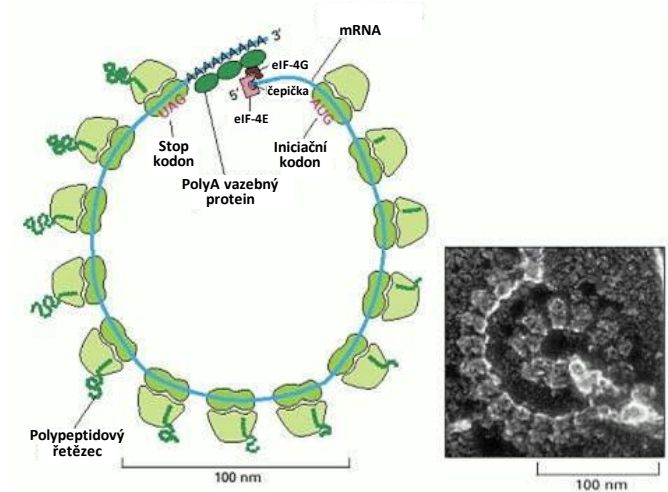
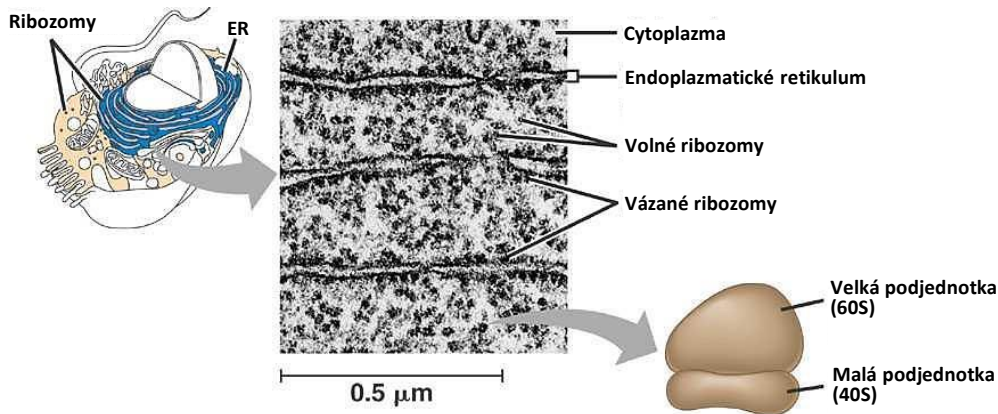
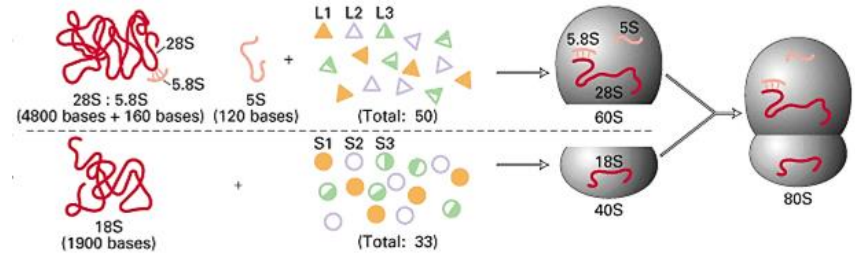
Cytoplasm

mature 40S

mature 60S

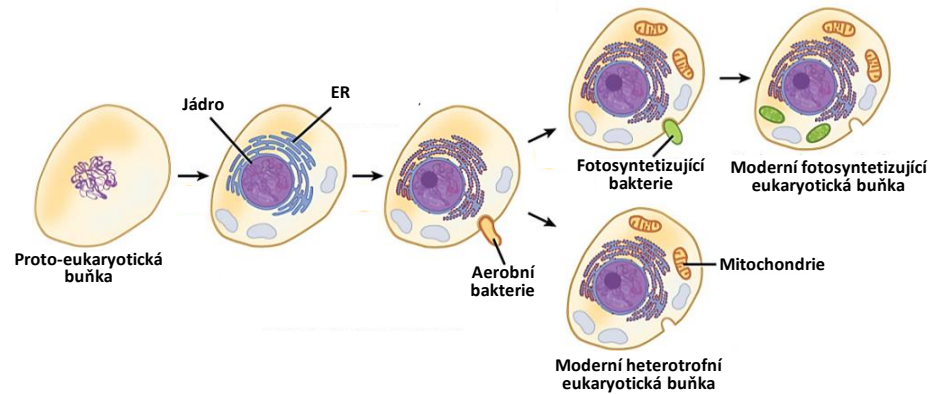
Ribozomy

- 80S, bez membrány
- volně v cytoplasmě, vázané na ER
- 2 podjednotky
 - vznik v jadérku, spojení v cytoplasmě
 - 60S: 5S, 5.8S, 28S rRNA; 50 L proteinů
 - 40S: 18S rRNA; 30 S proteinů
- syntéza proteinů na základě genetické informace uložené v mRNA
- polyribosom: řada ribosomů připojených na jedinou molekulu mRNA



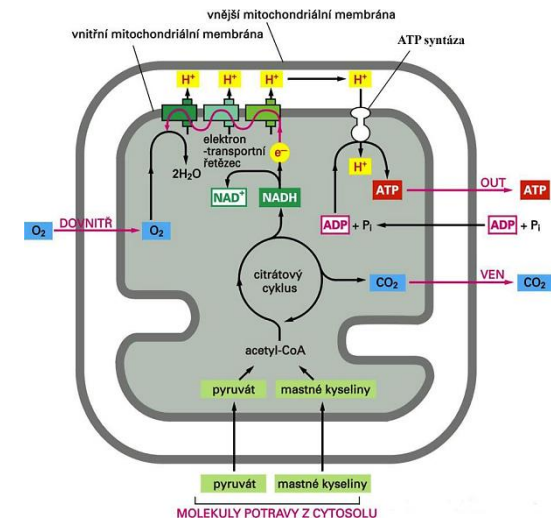
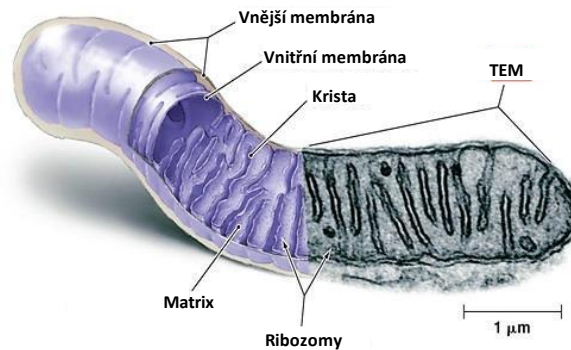
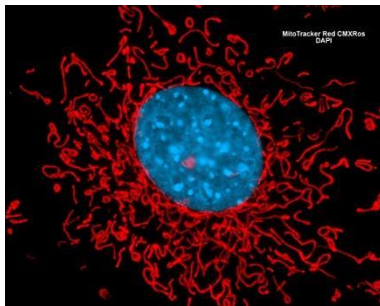
Semiautonomní organely

- energetická centra buňky
- vlastní genom a proteosyntetický aparát
- část proteinů řízena jadernými geny
- endosymbiotická teorie



Mitochondrie

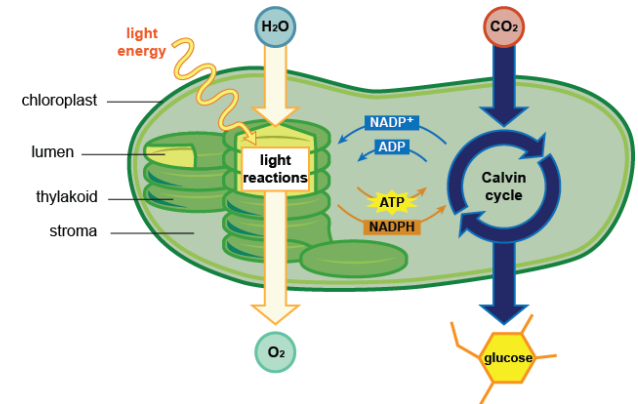
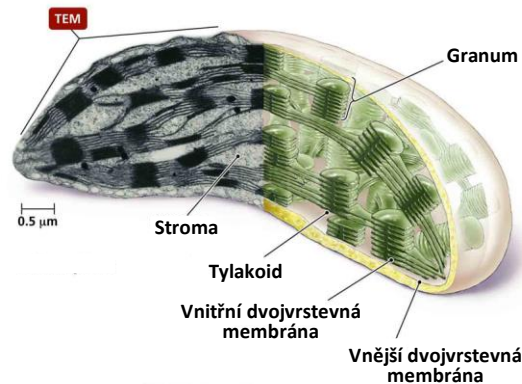
- organely buněčného dýchání, získání ATP
- dvě biomembrány - vnější hladká, vnitřní zvrásněná (kristy)
- dva kompartmenty - mezi membránami, matrix mitochondrie
- enzymy oxidativní fosforylace a dýchacího řetězce na vnitřní membráně
- enzymy Krebsova cyklu a katabolismu MK v matrix



Semiautorní organelly

Chloroplasty

- thylakoidy - ploché vaky navrstvené do gran
- fotosyntetické pigmenty (zelený chlorofyl)
- tři kompartmenty - prostor mezi dvojitou membránou obalu, lumen thylakoidů
- stroma (matrix): vnitřní základní hmota; DNA, ribozomy a inkluze



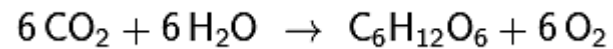
• oxgyenní fotosyntéza

i) světelná fáze (thylakoidy)

- přeměna světelné energie na chemickou, vznik ATP a NADPH, O₂

ii) temnostní fáze (stroma)

- uložení chemické energie fixací CO₂, tvorba glukózy a zásobních látek (škrob)



Cytoplazmatická membrána

Funkce

- soudržnost buňky, ochrana před vnějšími vlivy
- tvar buňky, ukotvení cytoskeletu
- regulovaný transport látek (semipermeabilita)
- podíl na adhezi buněk a buněčné signalizaci

Složení

i) lipidy

- amfifilní dvojvrstva
- fosfolipidy, glykolipidy, cholesterol

ii) proteiny

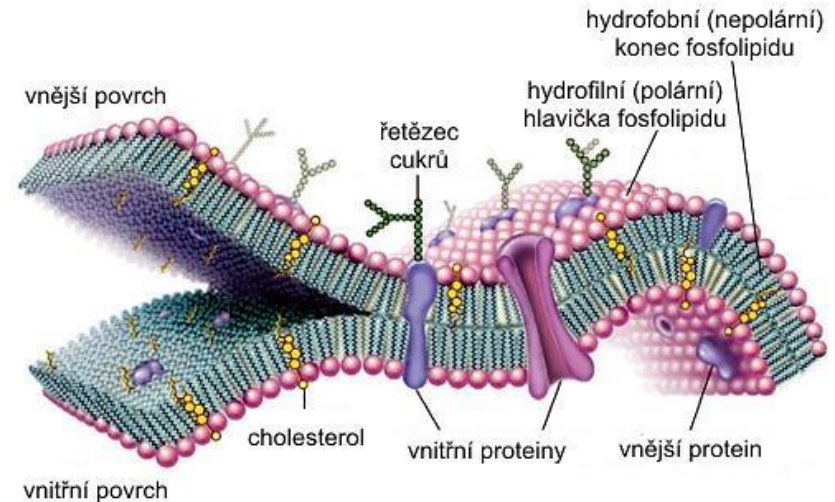
- integrální, ukotvené s lipidy, periferní
- funkce: receptory, signalizace, transport látek, mezibuněčný kontakt, kontakt cytoskeletu

iii) sacharidy

- glykolipidy a glykoproteiny, glykokalyx na vnější straně buňky
- funkce: mechanická, informační, vazebná místa pro patogeny

Model tekuté mozaiky

- molekuly lipidů i proteinů v neustálém pohybu, pohyb proteinů v rámci fosfolipidové dvojvrstvy



Transport mezi vnitrobuněčnými oddíly

Sekreční a endocytické dráhy

- spolupráce buněčných organel, transport materiálů mezi organelami

- **sekreční (exocytická) dráha**

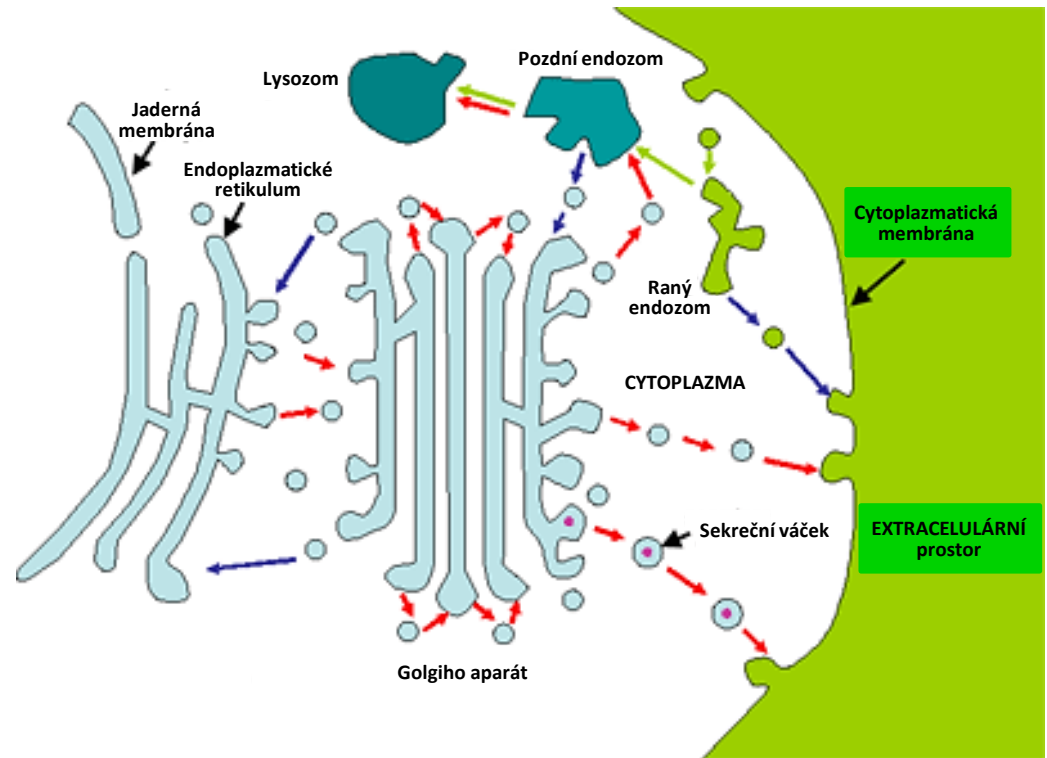
- biosyntéza organel
- vylučování molekul do mezibuněčného prostoru

- **endocytická dráha**

- příjem a zpracování signálů a materiálu z vnějšího prostředí

- **vezikulární transport**

- transport proteinů a lipidů mezi organelami



Transport mezi vnitrobuněčnými oddíly

Chaperony

- podporují sbalování proteinů, brání agregaci proteinů
- proteinové rodiny - Hsp70, Hsp90, válcovité chaperoniny

Hsp70 a jejich regulátory

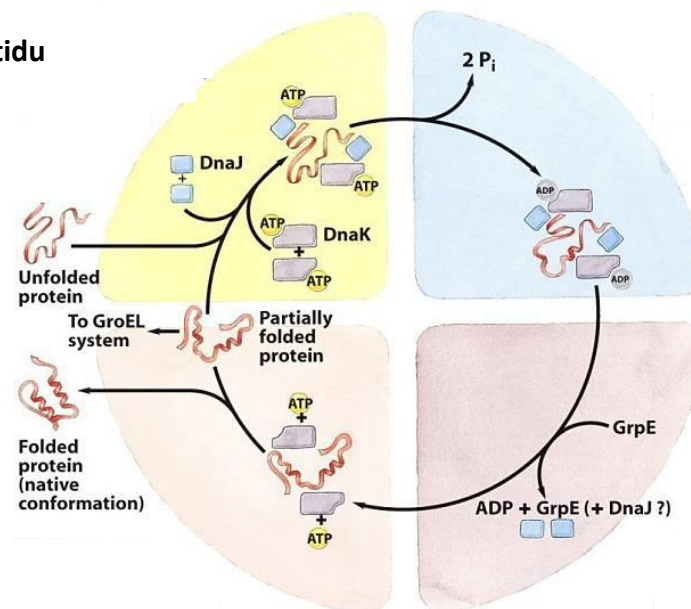
- vazba na nově vznikající proteiny na ribozomu
- ve stresových podmínkách - vazba na chybně poskládané proteiny, sbalení proteinů po denaturaci
- působí při transportu proteinů
- DnaK: bakteriální Hsp70, podpůrné proteiny DnaJ a GrpE

Vazba DnaJ k nesloženému peptidu
Vazba komplexu k DnaK-ATP

DnaJ stimuluje hydrolýzu ATP
DnaK-ADP pevně váže nesložený protein

DnaK váže ATP
Uvolnění složeného proteinu

GrpE stimuluje uvolnění
ADP



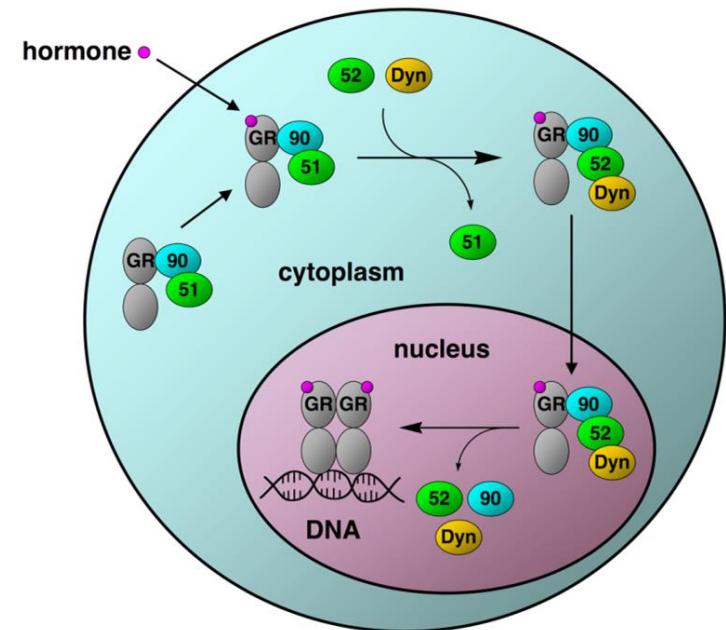
Transport mezi vnitrobuněčnými oddíly

Hsp70 u savců

- Hsc73 (cytosol), BiP (ER), mHsp70 (mitochondrie), ctHsp70 (chloroplasty)
- Hsp40 - vyhledávají specifické substráty (obdobu DnaJ)
- samy si zajišťují výměnu ADP/ATP a uvolnění peptidu (ekvivalent GroE netřeba)

Hsp90

- správné skládání a funkce receptorů pro steroidní hormony (kortizol, estrogen, progesteron, aj.)
- např. glukokortikoidový receptor (GR) - kortizol
- v klidu se na GR váže imunofilin 51 a Hsp90, které ho udržují ve správné konformaci pro vazbu liganu
- po vazbě kortizolu se vymění imunofilin 51 za 52
- imunofilin 52 váže dynein (Dyn), který připojuje komplex k cytoskeletu a zajišťuje jeho traslokaci do jádra
- v jádře se pomocné proteiny uvolní, GR dimerizuje a spouští expresi cílových genů



Transport mezi vnitrobuněčnými oddíly

Hsp60, chaperoniny

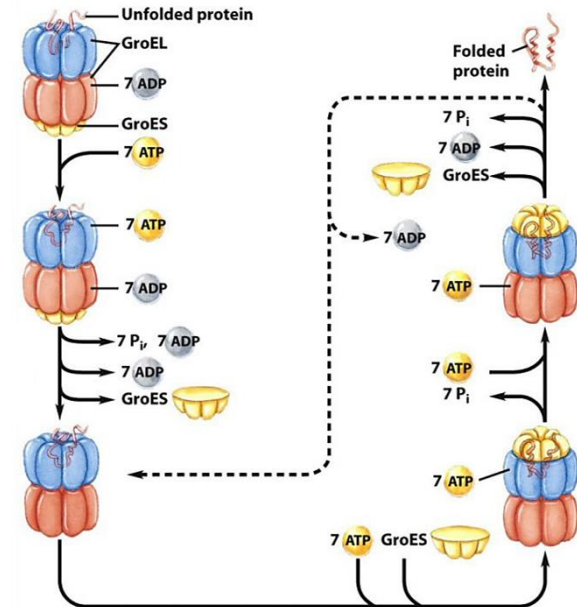
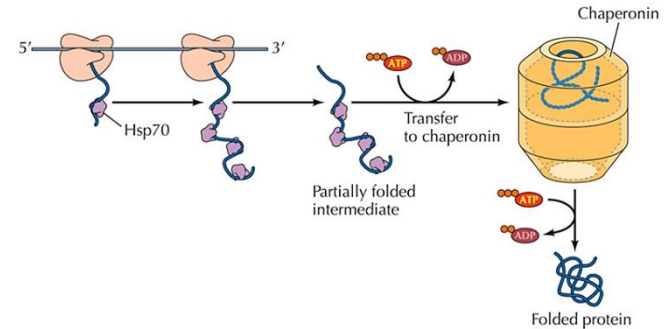
- válcovité částice
- skládání nových i denaturovaných proteinů

Chaperoniny GroEL a GroES u *E. coli*

- GroEL - 2 kruhy tvořící válec
- GroES - poklička válce
- vazba nesloženého proteinu na vnitřní stěnu kruhu
- vazba ATP k obsazenému kruhu
- hydrolýza ATP, uvolnění ADP a GroES
- vazba ATP a GroES k obsazenému kruhu
- skládání proteinu
- hydrolýza ATP, uvolnění GroES a složeného proteinu

Obdobné struktury u eukaryot

- mitochondrie Hsp60 a Hsp10
- chloroplasty Cpn60 a Cpn10
- po translokaci proteinu do mitochondrií a chloroplastů s ním nejdříve asociují Hsp40 a Hsp70, které zachovají jeho schopnost skládání a přenesou ho do chaperoninu, kde je skládání dokončeno



Transport mezi vnitrobuněčnými oddíly

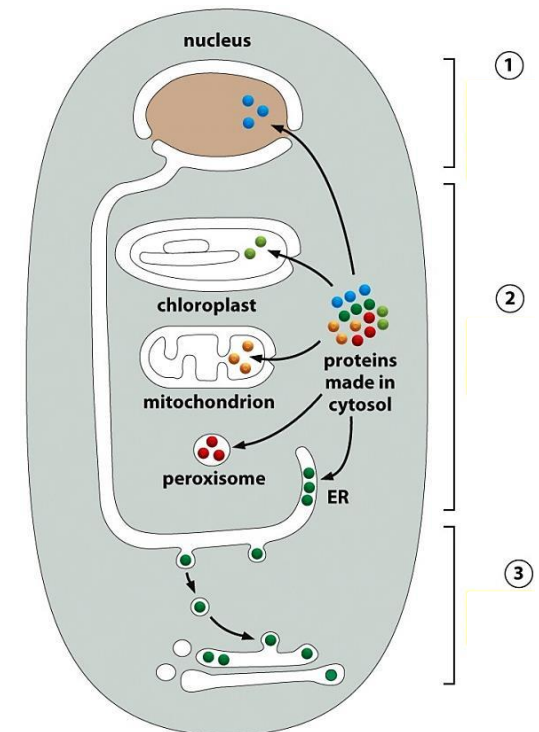
Třídění proteinů

- proteiny pro jádro, mitochondrie, chloroplasty a peroxizomy transportovány přímo z cytoplazmy pro Golgiho aparát, lysozomy, endozomy, extracelulární prostor přichází z ER

Adresová sekvence

- sekvence v proteinu určující do jaké organely má jít (15 - 60 aminokyselin)
- přesné sekvence pro jednotlivé organely se mohou lišit, vliv **hydrofobních**, **kladně nabitých** a **záporně nabitých** aminokyselin

Funkce signálu	Příklad adresové sekvence
Import do ER	$+H_3N$ -Met-Met-Ser-Phe-Val-Ser-Leu-Leu-Leu-Val-Gly-Ile-Leu-Phe-Trp-Ala-Thr-Glu-Ala-Glu-Gln-Leu-Thr-Lys-Cys-Glu-Val-Phe-Gln-
Zadržení v lumen ER	-Lys-Asp-Glu-Leu-COO ⁻
Import do mitochondrií	$+H_3N$ -Met-Leu-Ser-Leu-Arg-Gln-Ser-Ile-Arg-Phe-Phe-Lys-Pro-Ala-Thr-Arg-Thr-Leu-Cys-Ser-Ser-Arg-Tyr-Leu-Leu-
Import do jádra	-Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-
Import do peroxizomů	-Ser-Lys-Leu-



Tři mechanismy importu proteinů do membránových organel

1. transport jaderným pórem
2. proteinové translokátory (ER, mitochondrie, chloroplasty)
3. transportní váčky (sekreční dráha z ER)

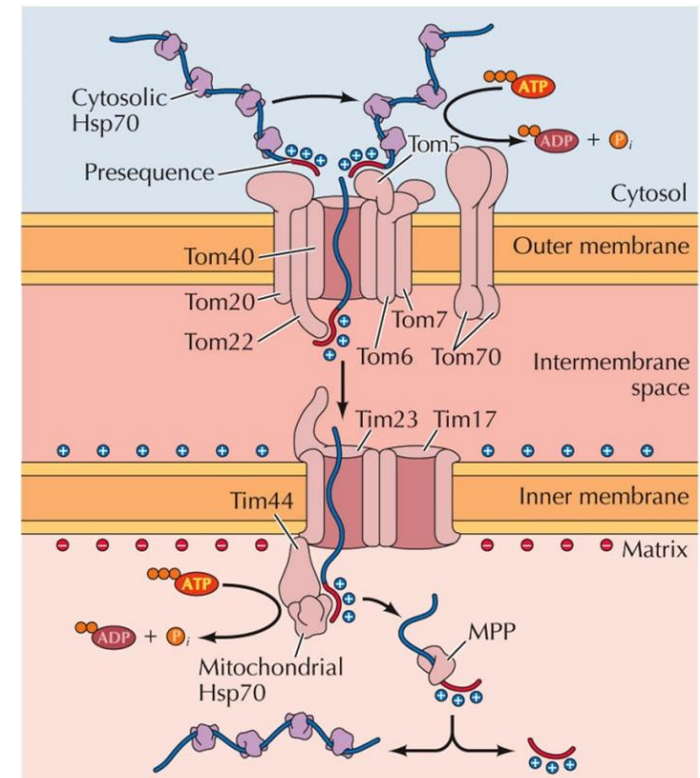
Import proteinů pomocí proteinových translokátorů

- vstup do mitochondrií a chloroplastů
 - proteinové translokátory v membráně organel
 - adresová sekvence na N-konci transportovaného proteinu
 - během přenosu je protein rozvinut a odstraněna adresová sekvence
 - po transportu přes membrány je protein opětovně složen

Import do mitochondrií

1) import do matrix

- cytosolické Hsp70 rozvinou transportovaný protein
- receptor rozezná adresovou sekvenci
- translokace proteinu vnější membránou (TOM)
vnitřní membránou (TIM)
- matrixová proteáza odštěpení adresovou sekvenci
- mHsp70 dokončuje translokaci a sbalení proteinu
- elektrochemický gradient na vnitřní membráně
- průchod membránami vyžaduje ATP



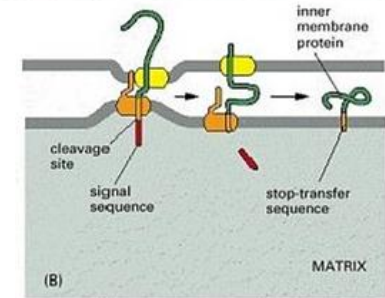
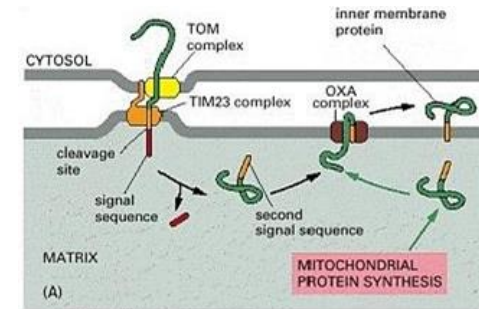
THE CELL, Fourth Edition, Figure 11.4 © 2006 ASM Press and Sinauer Associates, Inc.

Import proteinů pomocí proteinových translokátorů

Import do mitochondrií

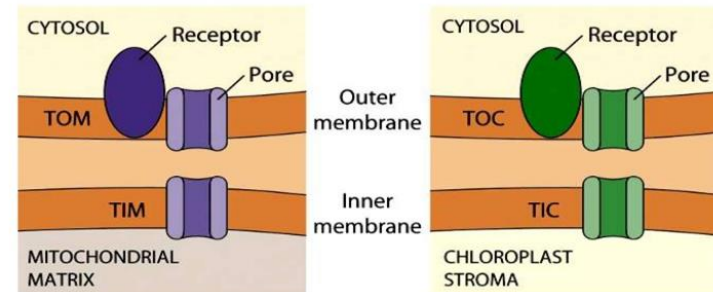
2) translokace do mezimembránového prostoru

- i) translokace do matrix, odstranění adresové sekvence, přes vnitřní membránu do mezimembránového prostoru (komplex OXA)
- ii) sekvence zastavující přenos přeruší translokaci vnitřní membránou odštěpení proteinu do mezimembránového prostoru
- iii) translokace vnější membránou, vazba faktorů, které protein zadrží v mezimembránovém prostoru



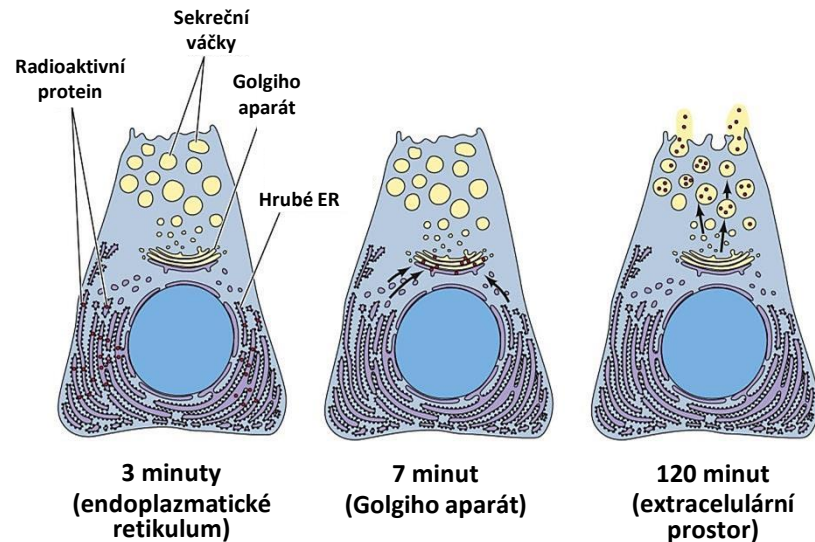
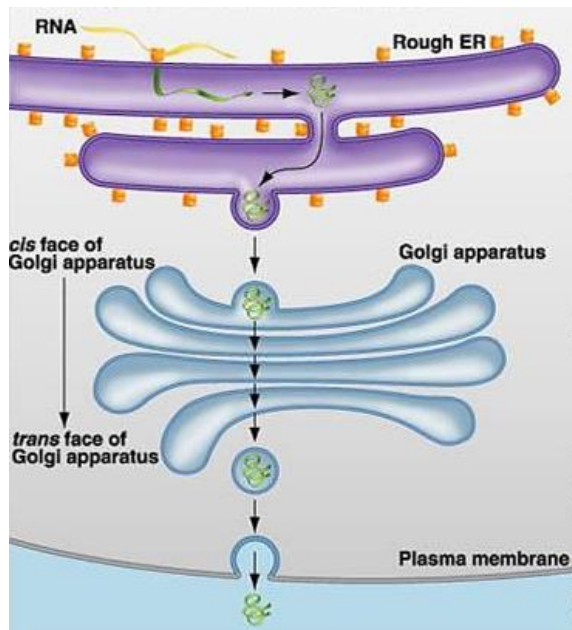
Import do chloroplastů

- komplex TOC ve vnější, TIC ve vnitřní membráně
- netřeba elektrochemický gradient
- proteiny určené do lumen tylakoidu mají dvě adresové sekvence za sebou
- účast ctHsp70 a Cpn60/10 na správném sbalení translokovaného proteinu



Sekreční dráha

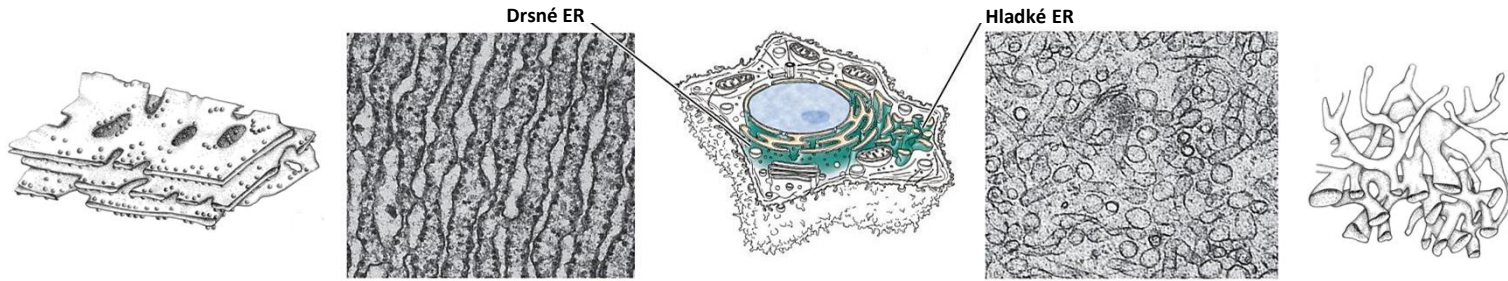
- hrubé ER - ER - Golgiho aparát - sekreční váčky - extracelulární prostor
- proteiny směřující do ER, Golgiho aparátu, lysozomů, plazmatické membrány a vně buňky
- sekreční váčky - dopravní prostředky obsahující proteiny z vnitřních organel
 - proteiny vyloženy po splynutí membrány váčku s membránou cílové organely
- poprvé pozorována u buněk žláзовého epitelu pomocí radioaktivně značených aminokyselin



Sekreční dráha

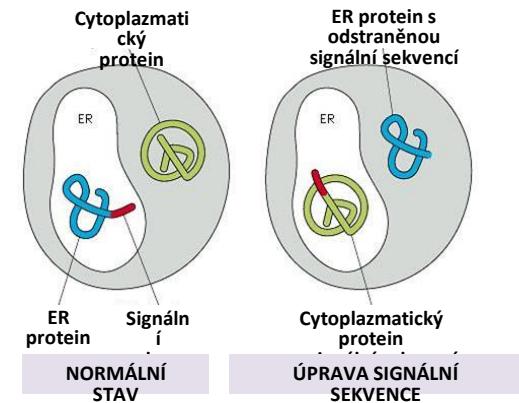
Endoplazmatické retikulum (ER)

- systém plochých váčků a kanálků, návaznost na jaderný obal a perinukleární prostor
- dává vzniknout Golgiho aparátu, lysozomům, plazmatické membráně
- funkce: biosyntéza proteinů a lipidů, přeprava látek, reakce na podněty z vnějšího prostředí, skladování buněčných produktů
- drsné - s ribozomy, syntéza proteinů
- hladké - bez ribozomů, metabolismus lipidů a polysacharidů, detoxifikační reakce, zásobárna Ca^{2+}



Import proteinů do ER

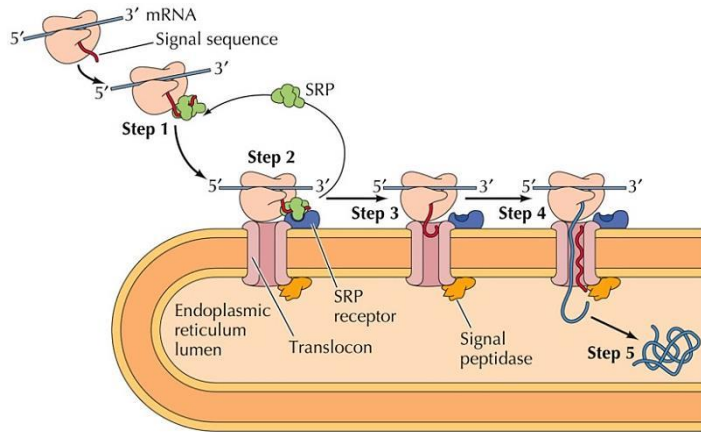
- adresová sekvence pro ER = signální sekvence
- odstranění signální s. z proteinu ER umístí protein do cytosolu
- začlenění signální s. do cytoplazmatického proteinu způsobí jeho nasměrování do ER



Sekreční dráha

Syntéza proteinů v drsném ER

- sbalování proteinů, tvorba disulfidických vazeb, sestavování oligomerních proteinů, glykosylace
- ER je hlavní křižovatka v dopravě proteinů po buňce
 - i) volné proteiny jsou uvolněny do lumen ER - proteiny z lumen organel, sekretované ven z buňky
 - ii) membránové proteiny zůstávají zanořeny v membráně ER - proteiny vyskytující se v membránách organel, plazmatické membráně



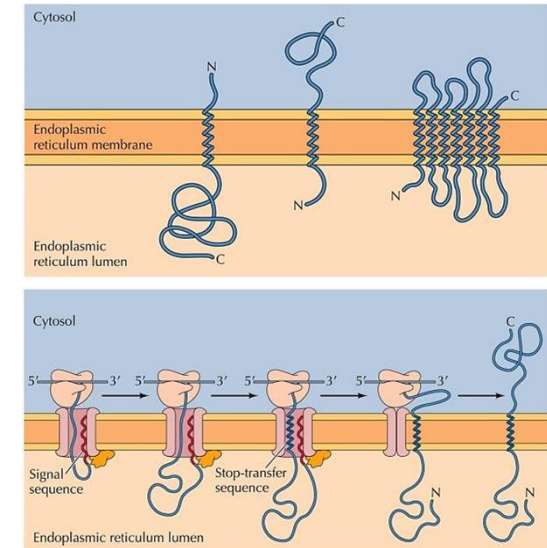
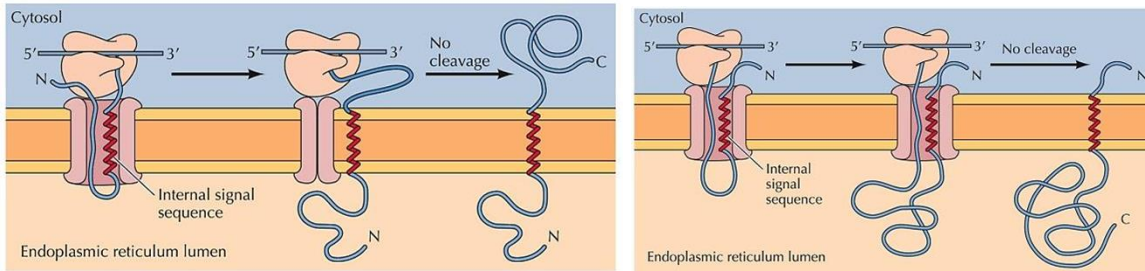
Proteiny lumen ER

- začátek syntézy proteinu na volných ribozomech
- vazba SRP k signální sekvenci, pozastavení translace
- SRP receptor přitahuje ribozom/peptid/ /SRP
- vazba ribozomu k translokačnímu komplexu
- vazba GTP, začlenění signální sekvence do membrá- nového kanálku
- hydrolýza GTP, uvolnění SRP, spuštění translace
- rostoucí peptid prochází membránou ER
- odštěpení signální sekvence signální peptidázou
- uvolnění peptidu do lumen ER

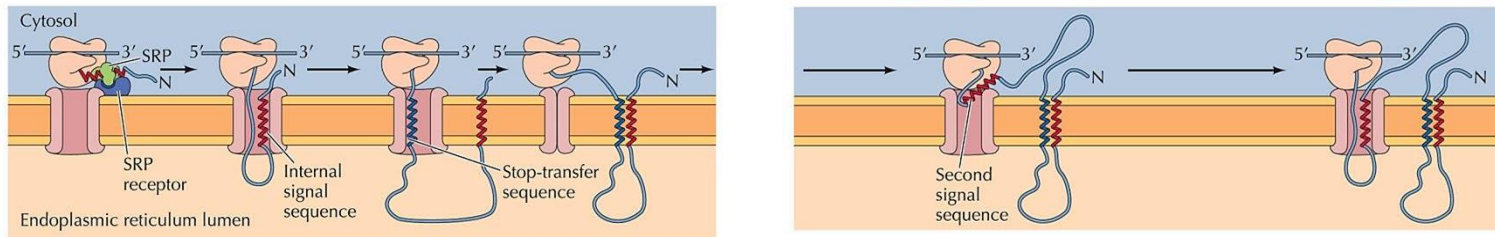
Sekreční dráha

Začlenění proteinu do membrány ER

- různé orientace proteinu a počet jeho průchodů přes membránu
- sekvence zastavující přenos, vnitřní signální sekvence
 - α -šroubovice, 20 - 25 aminokyselin, interakce s fosfolipidy
 - vnitřní s.s. rozeznána pomocí SRP, neštěpena signální peptidázou
 - jejich orientace určují orientaci proteinu v membráně
- různé orientace proteinu



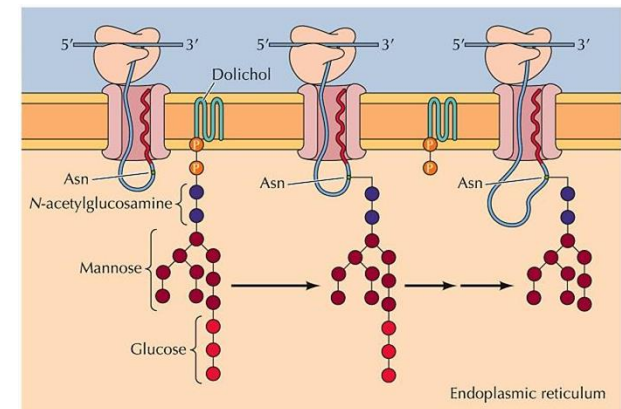
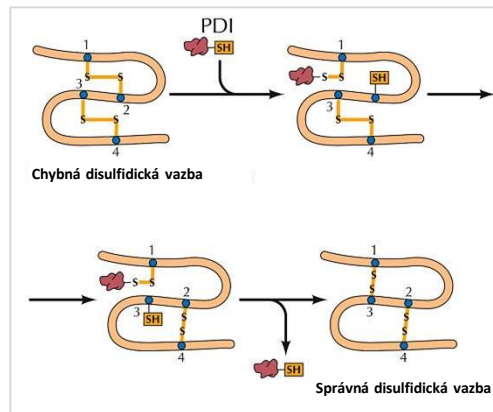
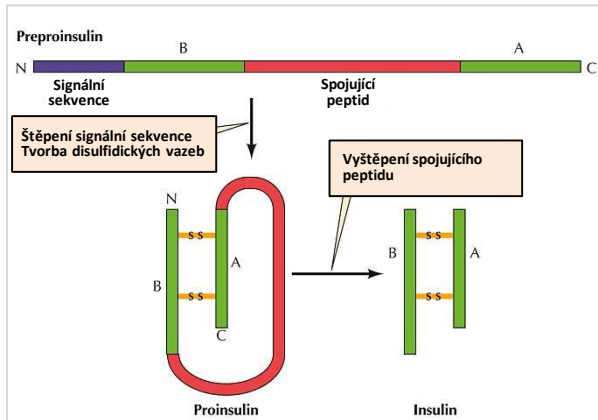
- protein procházející membránou několikrát - střídání vnitřních s.s. a sekvencí zastavujících přenos



Sekreční dráha

Sbalování a úprava proteinů v ER

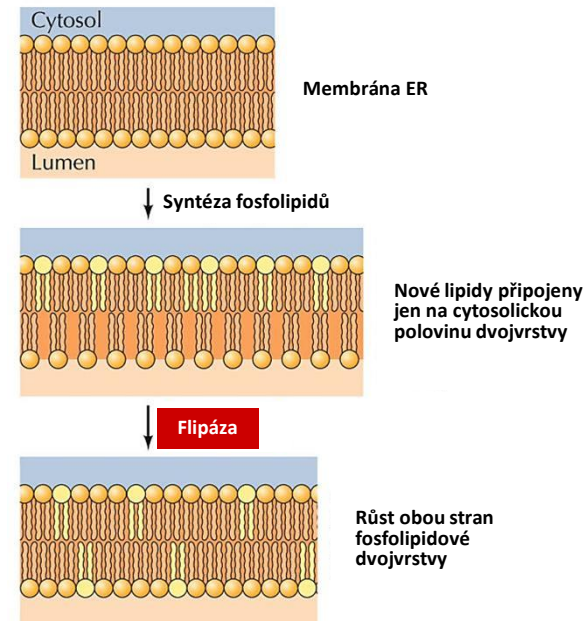
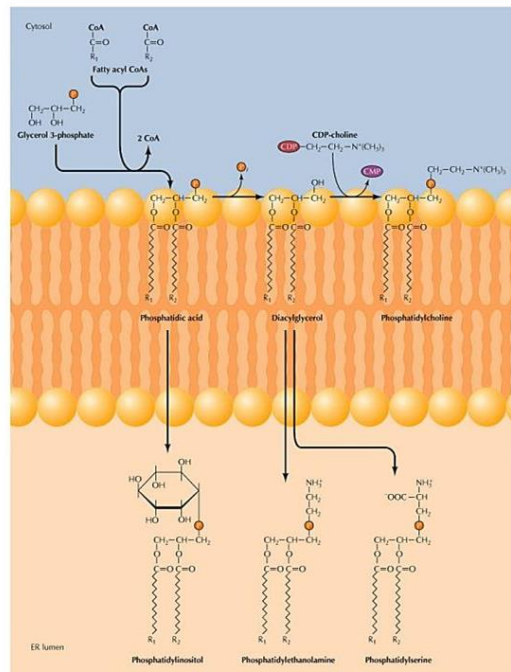
- sbalování - chaperony rodin Hsp70 (BiP) a Hsp90 (Grp94)
- štěpení - vždy odstranění iniciačního Met a signální sekvence, u některých proteinů i jiné sekvence
 - např. inzulín: syntetizován jako preproinzulín, do lumen ER uvolňuje proinzulín
 - vyštěpení a degradace interní sekvence
 - spojení 2 výsledných polypeptidů disulfidickou vazbou → inzulín
- tvorba disulfidických vazeb - disulfid izomeráza
- glykosylace - připojení oligosacharidů



Sekreční dráha

Hladké endoplazmatické retikulum

- syntéza membránových lipidů na cytosolické straně membrány ER
- syntéza fosfolipidů
 - vznik kyseliny fosfatidové z glycerol-3-fosfátu a mastných kyselin nesených CoA
 - začlenění kyseliny fosfatidové do membrány a její další konverze
 - translokace fosfolipidů přes membránu pomocí flipáz



Sekreční dráha

Vezikulární transport z ER

- směřuje do Golgiho aparátu, lysozomů, plazmatické membrány, extracelulárního prostoru
- proteiny a lipidy po cestě upravovány (glykosylace, tvorba disulfidických vazeb)
- náklad váčků je specifický, daný receptory v membráně váčku
- proteiny určené pro lumen ER - adresová sekvence Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL)

Golgiho aparát (GA)

- systém plochých nádrží (cisteren) a kanálků
- funkce: zpracování, třízení a modifikace proteinů z ER (glykosylace proteinů), syntéza glykolipidů
- cis strana - vznik nových cisteren fúzí váčků z ER
- trans strana - pučení váčků, které směřují zpět do ER, zpět do GA, ven z buňky; vznik lysozómů

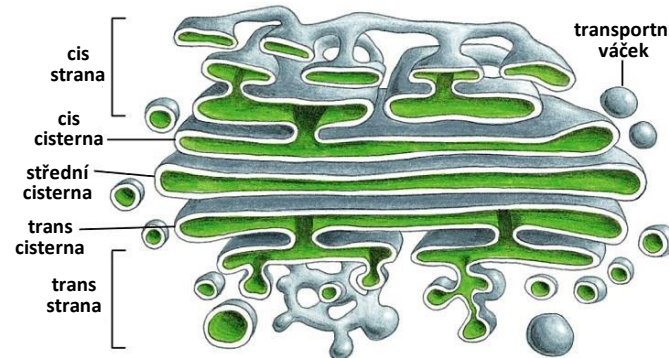
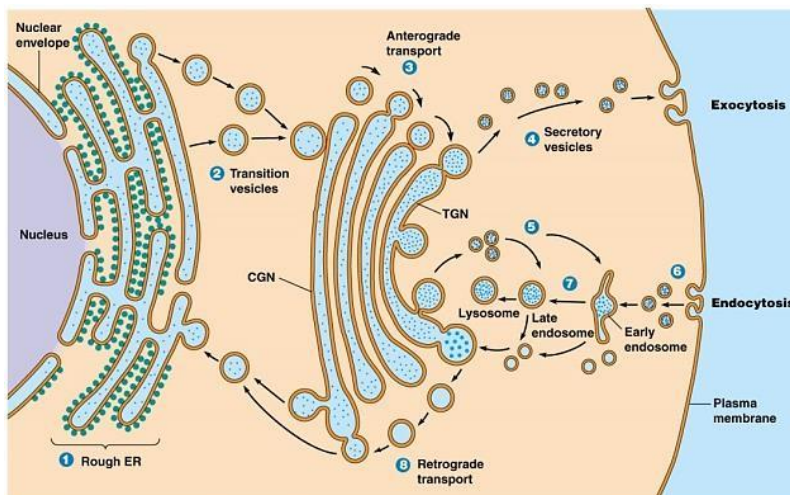


Figure 15-26a Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

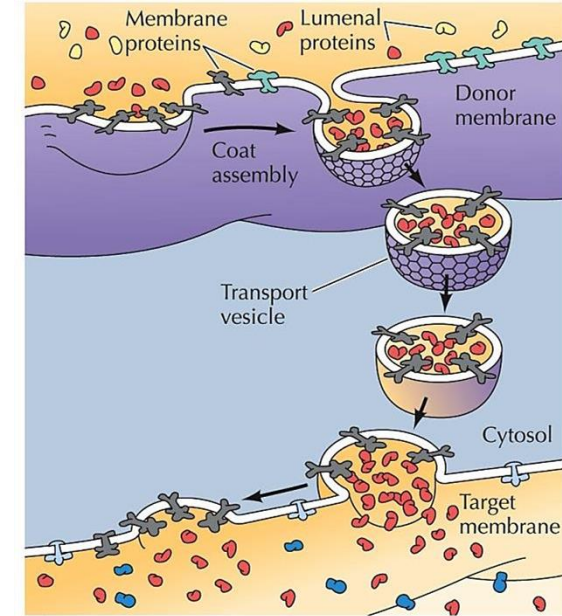


Sekreční dráha

Transportní váčky

- různé typy pro transport specifického nákladu
- kyvadlová doprava mezi organelami
- opláštěné váčky - proteinový obal na cytosolické straně váčků napomáhá tvarovat membránu do podoby váčku a podílí se na zachycení specifických molekul
- po odškrcení váčku plášť odstraněn a váček fúzuje s cílovou mem.

Typ váčku	Proteiny pláště	Výchozí organela	Cílová organela
Klathrinový	klathrin + adaptin 1	GA	lysozom
Klathrinový	klathrin + adaptin 2	plazmalema	endozom
COP	proteiny Coat	ER	GA
		cisterna GA	cisterna GA
		GA	ER



Klathrinové váčky

- nakládaná molekula - receptor - adaptin - klathrin
- zesíťování klathrinu, vznik jamky a váčku s klathrin. pláštěm
- dynamin - vazba kolem ústí váčku, za hydrolýzy GTP se stáhne a odškrtí váček od membrány

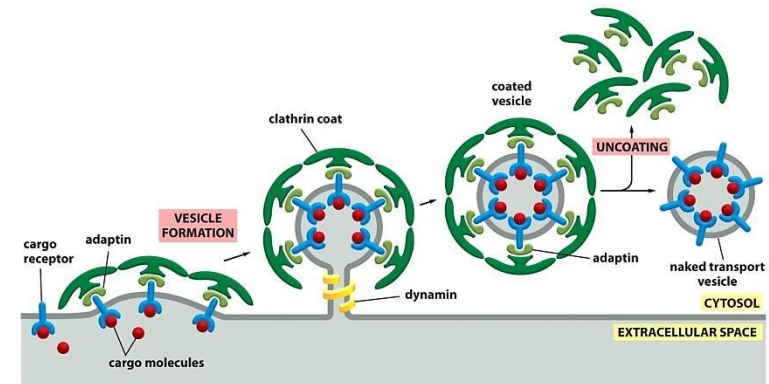
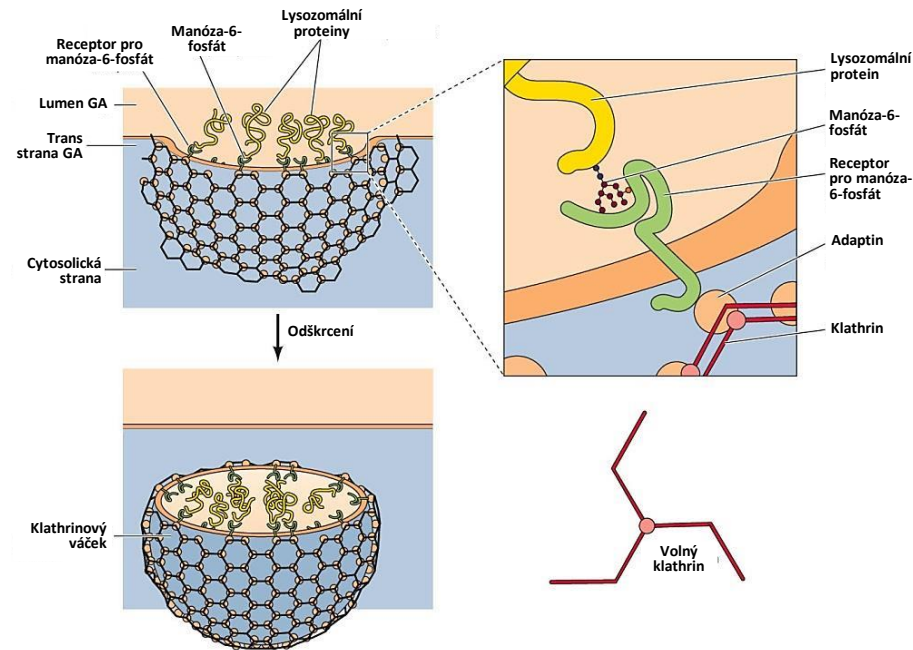


Figure 15-20 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

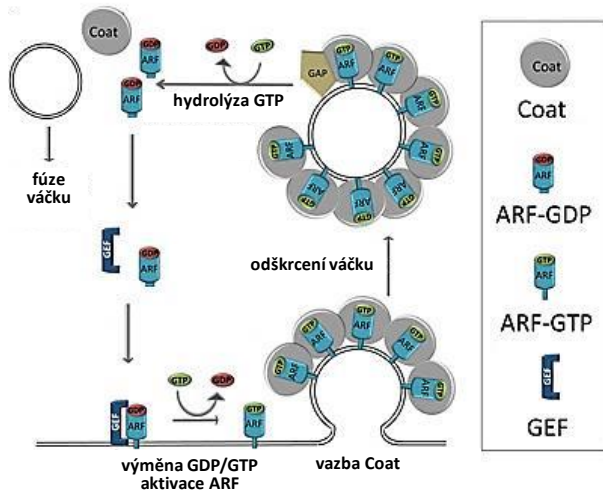
Sekreční dráha

Klathrinové váčky

- proteiny určené do lysozomů označeny manóza-6-fosfát
- receptor pro manóza-6-fosfát v membráně na trans straně GA
- přes adaptiny se k receptoru váží klattriny, které spojí svoje řetězce v síť a zahajují pučení váčku



THE CELL, Fourth Edition, Figure 10.36 © 2006 ASM Press and Sinauer Associates, Inc.



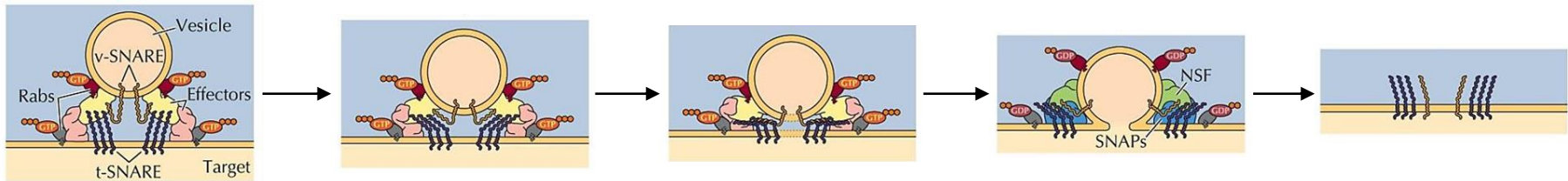
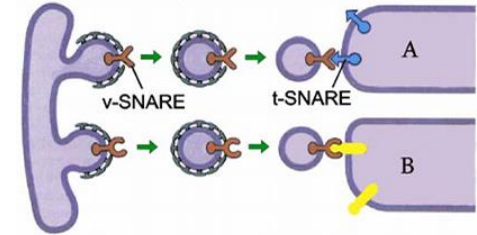
COP váčky

- přeprava molekul mezi ER a GA, v rámci GA
- plášťový protein Coat, pomocný protein ARF (GTPáza)
- ARF-GTP se spojuje s membránou GA, nutný pro vazbu Coat proteinů a podílí se na tvorbě váčků
- po odškrcení váčku hydrolyza ARF-GTP na ARF-GDP
- rozložení COP, fúze váčku s cílovou membránou

Sekreční dráha

Doručení váčků

- proteiny SNARE
- v-SNARE na povrchu váčků, t-SNARE na povrchu cílových membrán
- unikátní SNARE pro každou organelu a typ transportních váčků
- interakce proteinů NSF a SNAP zodpovídá za fúzi váčku s cílovou membránou



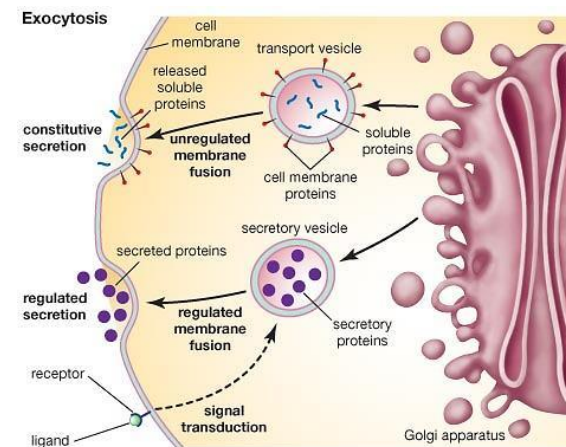
Sekrece molekul z buňky

i) řízená sekrece molekul po přijetí signálu

- transportní váčky splývají a tvoří větší váček
- po přijetí signálu jeho exocytóza
- sekrece specifických molekul u žlaznatých buněk

ii) konstitutivní

- sekrece průběžná, bez signálu

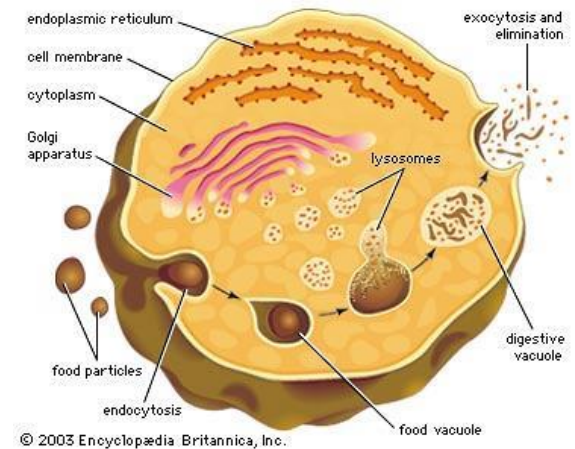
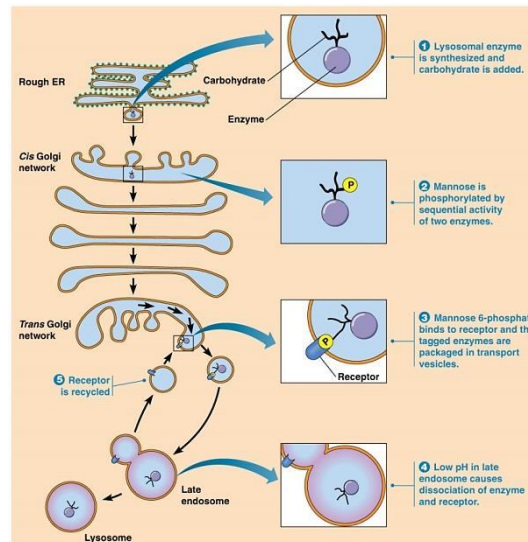
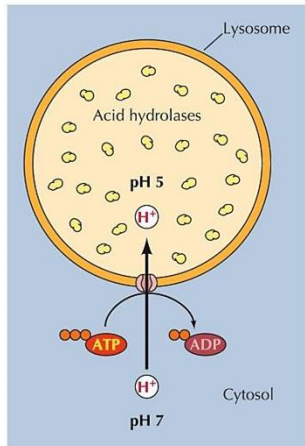


© 2008 Encyclopædia Britannica, Inc.

Sekreční dráha

Lysozomy

- funkce: nitrobuňčné trávení, rozklad materiálu z nitra i vnějšku buňky
- cca 50 typů kyselých hydroláz na rozklad všech organických složek buňky
- pH ~ 5, ATP dependentní H⁺ pumpy
- proteiny v membráně lysozomu chráněny glykosylací
- primární lysozom vzniká odškrcením od GA - po splynutí s endozomem vzniká sekundární (aktivní) lysozom - terciální lysozom s nestravitelnými zbytky odstraňovanými exocytózou
- přes 30 genetických chorob člověka s mutantními geny pro lysozomální enzymy
 - např. Gaucherova nemoc: glukocerebrosidáza na rozklad glykolipidů, léčba aplikací enzymu



Endocytická dráha

Endocytóza

- příjem částic, molekul a kapaliny z vnějšího prostředí
- malé molekuly přijímány u všech buněk, velké částice přijímány fagocytujícími buňkami
- pohlcovaný materiál obklopen plazmalemou - pučení dovnitř buňky - odškrcení endocytického váčku - fúze s lysozomem

i) pinocytóza

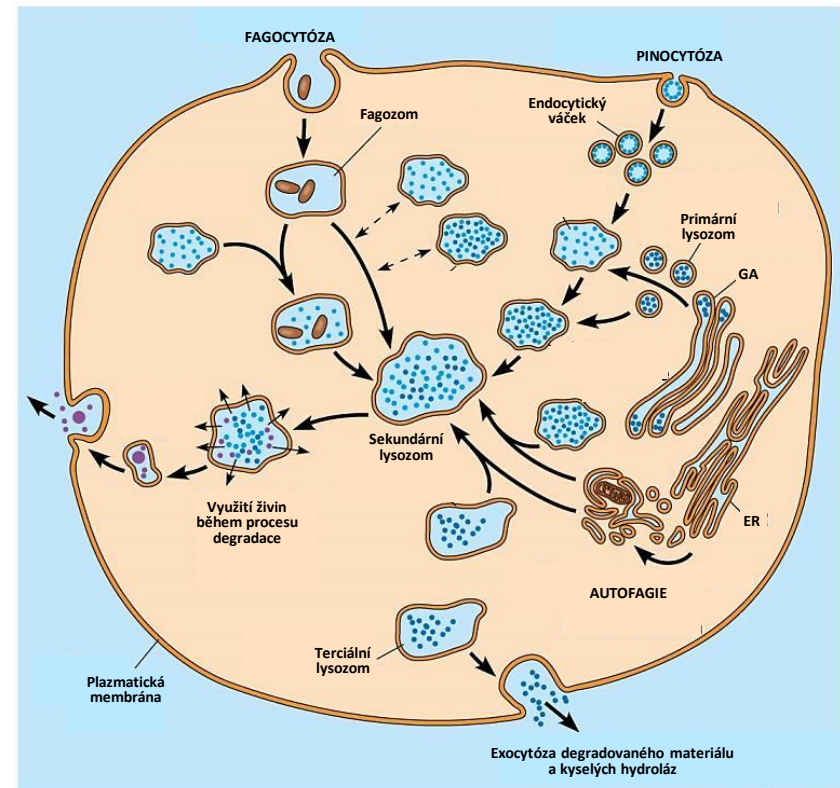
- kapaliny a malé molekuly
- klathrinové jamky a váčky
- nerozlišuje přijímaný materiál

ii) fagocytóza

- pohlcení velkých částic
- vazba částice k povrchovým receptorům - tvorba pseudopodií obklopujících částici - tvorba fagozomu - fúze s lysozomem

iii) autofagie

- rozklad vlastních struktur
- staré organely, hladovějící buňky
- uzavření organely v membráně z ER - tvorba autofagozomomou - fúze s lysozomem



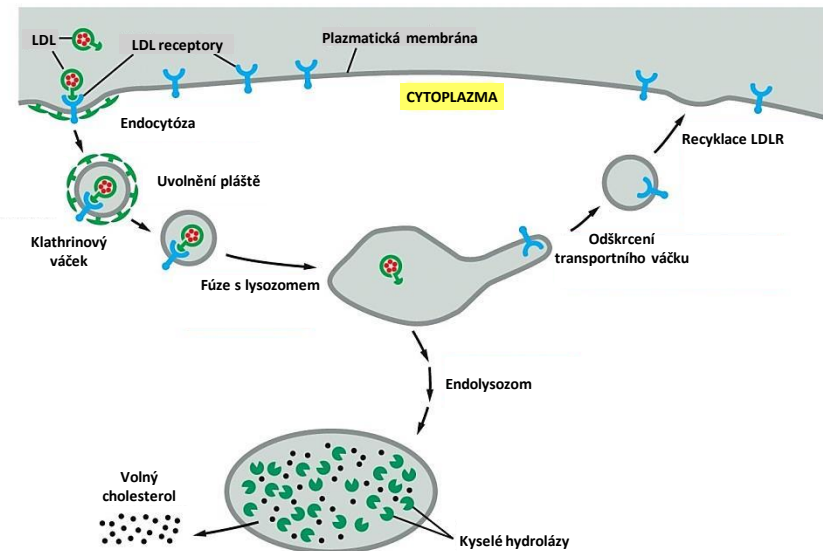
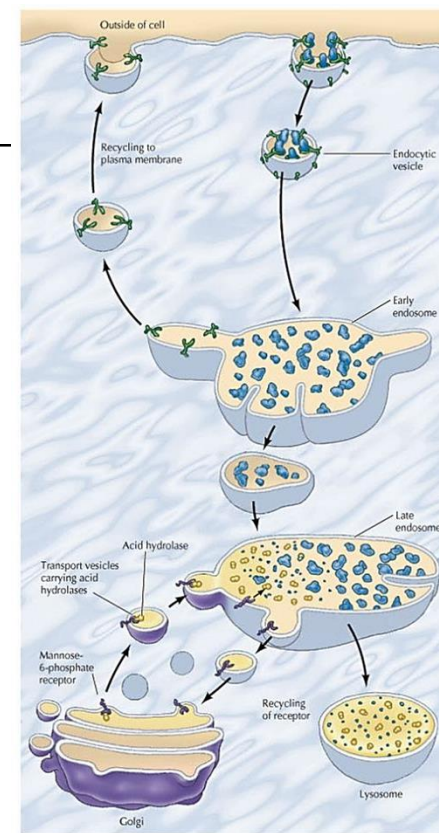
Endocytická dráha

Endocytóza přes povrchové receptory

- vazba molekul k příslušným receptorům
- uzavření komplexu receptor/ ligand do klathrinových váčků
- odstranění obalu váčku
- fúze s lysozomem, zpracování pohlceného materiálu, recyklace receptorů

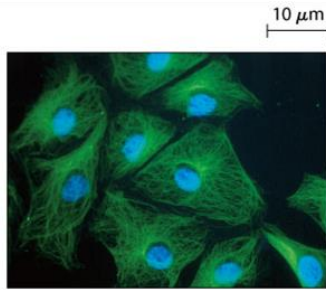
Cholesterol

- v krvi vázán na proteinovém nosiči (lipoprotein)
- nízkodenzitní lipoprotein (LDL) vzniká v játrech a dopravuje cholesterol k buňkám
- vazba LDL s cholesterolem na LDLR - klathrinová endocytóza - fúze s lysozomem - uvolnění LDL od LDLR - recyklace receptorů - rozložení LDL - uvolnění cholesterolu do cytoplazmy
- porucha LDLR receptoru: hromadění cholesterolu v krvi, vývoj aterosklerózy, srdeční infarkty v raném věku

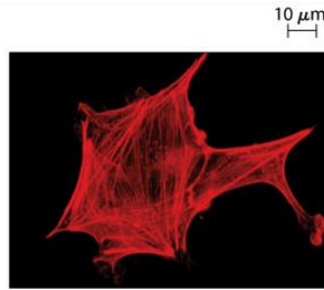


Cytoskelet

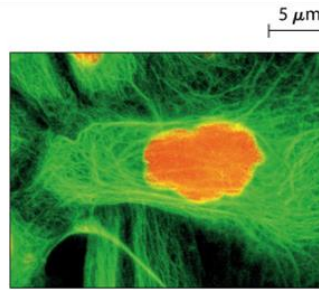
Mikrotubuly



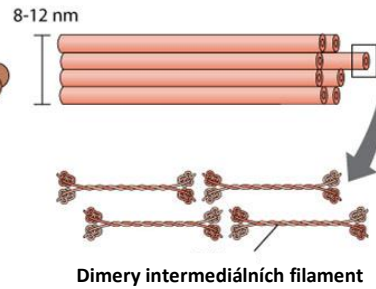
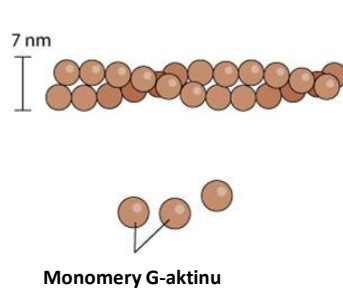
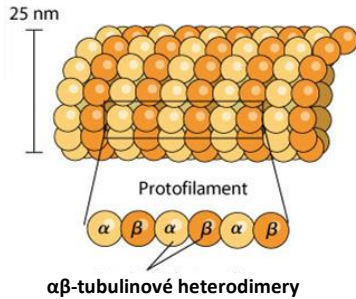
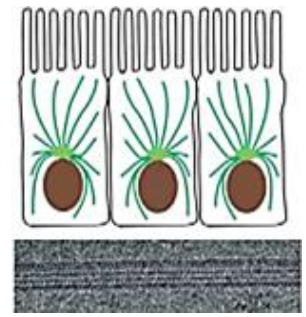
Mikrofilamenta



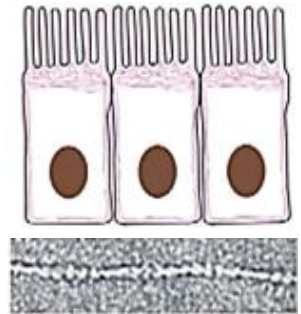
Intermediální filamenta



Mikrotubuly



Mikrofilamenta

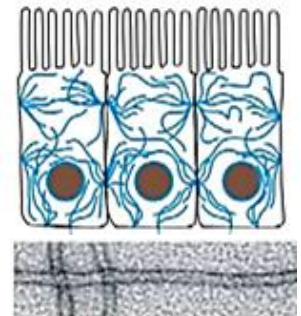


Struktura	Dutý váleček, stěna z 13 protofilament
Monomery	α -tubulin β -tubulin
Polarita	(+) a (-) konce
Funkce	Organizace a udržení tvaru a polarity buňky Pohyb chromozomů Intracelulární transport Pohyb organel Pohyblivost buněk (axonema)

Struktura	Dva propletené řetězce F-aktinu
Monomery	G-aktin
Polarita	(+) a (-) konce
Funkce	Kontrakce svalů Pohyb buněk, cytokineze Proudění cytoplazmy Udržení tvaru buňky Intracelulární transport

Struktura	8 protofilament
Monomery	Cytokeratin, vimentin, desmin, neurofilamenta, nestin, laminy
Polarita	---
Funkce	Podpora buněčných struktur Udržení tvaru buňky Tvorba jaderné laminy a lešení Zesílení axonů nervových buněk Organizace svalových vláken

Intermediální filamenta



Spoje buněk

- spojení sousedních buněk a spojení buněk s extracelulární matrix (ECM)
- důležité pro morfologii a funkci epitelů s těsným uspořádáním buněk
- vyžadují napojení na cytoskelet

Těsné vazby

- brání průniku molekul a tekutiny

Adherentní vazby

- propojují mikrofilamenta sousedních buněk

Desmozomy

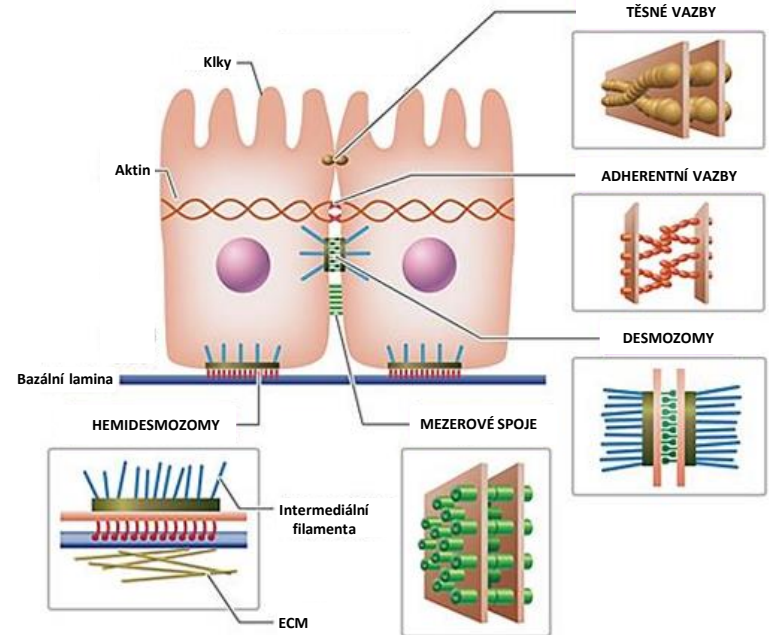
- propojují intermediální filamenta sousedních buněk

Mezerové spoje

- spojují cytoplazmy sousedních buněk

Hemidesmozomy

- připojují intermediální filamenta k bazální lamině



Polarita epitelálních buněk

- apikální povrch - mikrokilky a řasinky
 - pohyb hlenů v dýchací trubici, vajíčka ve vejcovodu, receptory
- laterální povrch - adherentní, mezerové a těsné vazby a desmozomy
 - spojení buněk přes speciální ligandy a cytoskelet
- bazální povrch - hemidesmozomy a adhezivní plaky, ukotvení buněk v bazální lamině

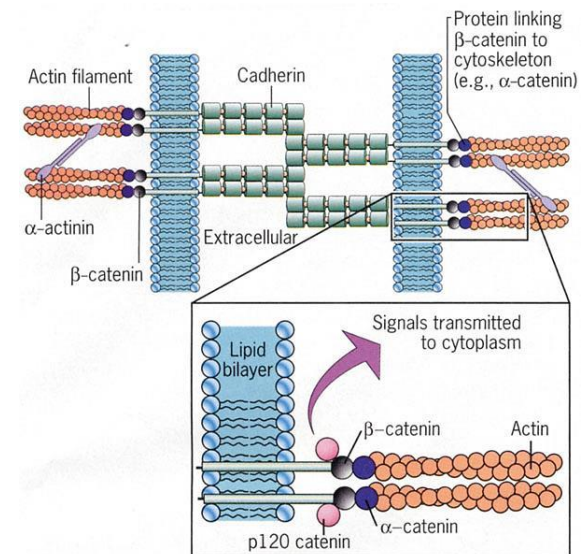
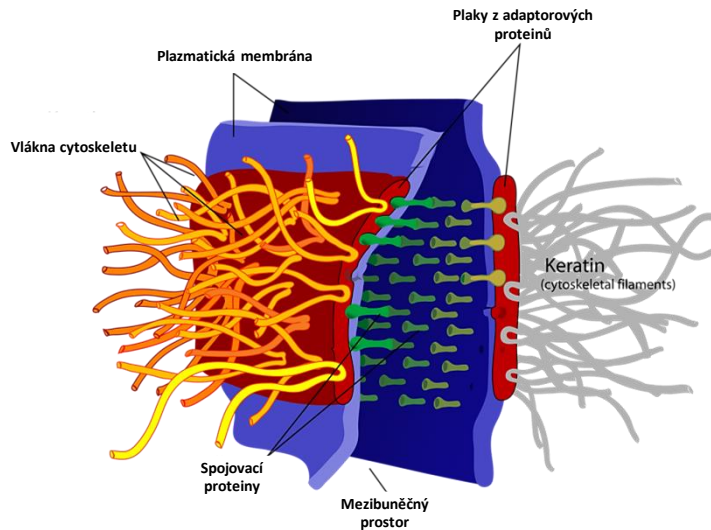
Spoje buněk

Adherentní spoje, desmozomy a hemidesmozomy obsahují plakky

- destičky nahromaděných adaptorových proteinů na cytosolické straně plazmatické membrány
- ukotvení transmembránových spojovacích proteinů, které váží ECM či proteiny sousední buňky
- vazba cytoskeletu

Adherentní vazby

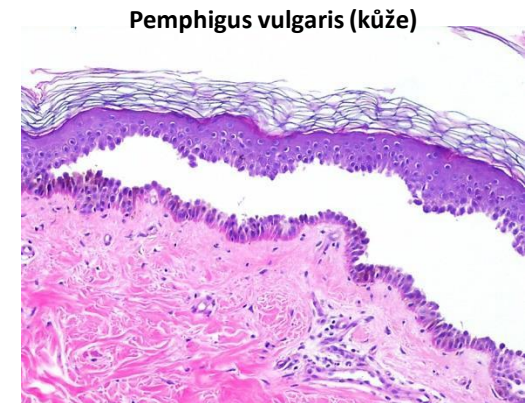
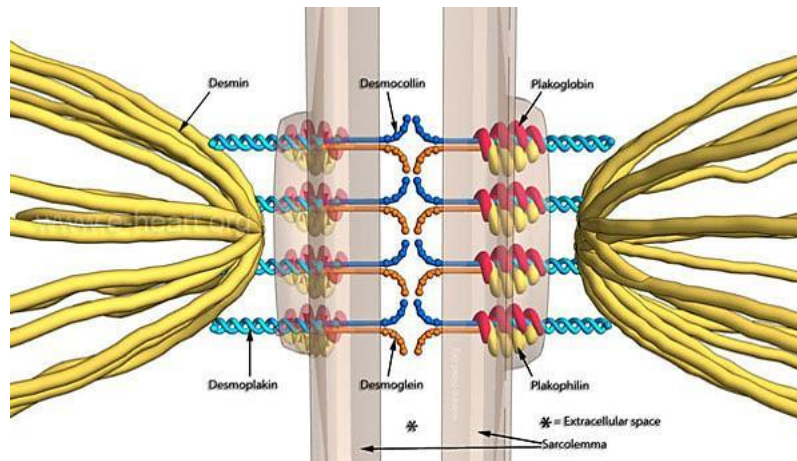
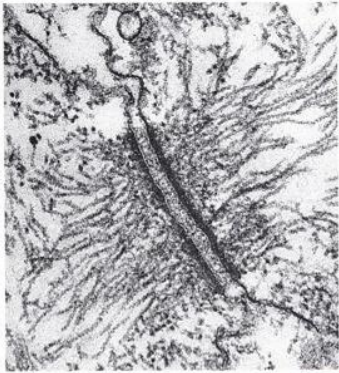
- kadheriny - spojovací proteiny, homofilní vazby v přítomnosti Ca^{2+}
 - extracelulární domény v mezibuněčném prostoru
- adaptorové proteiny - kateniny (α , β , p120), vinkulin
- interakce s mikrofilamenty (F-aktin)



Spoje buněk

Desmozomy

- silná adheze buněk (střevní epitel, kůže, srdce)
- spojovací proteiny - desmocollin a desmoglein
- adaptorové proteiny - plakofilin, plakoglobin, desmoplakin
- Pemphigus vulgaris - autoimunitní onemocnění kůže, tvorba protilátek proti desmogleinu
 - narušena adheze epitelu, mezi buňky proniká tělní tekutina, tvorba puchýřů



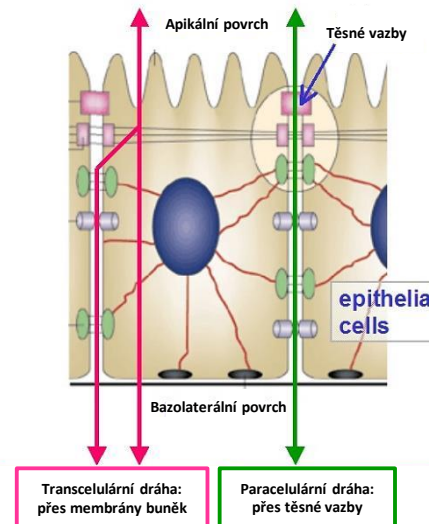
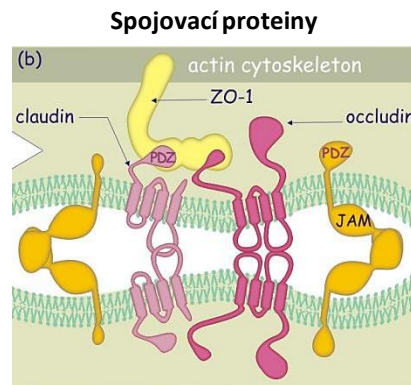
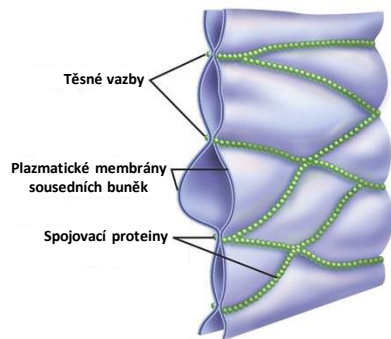
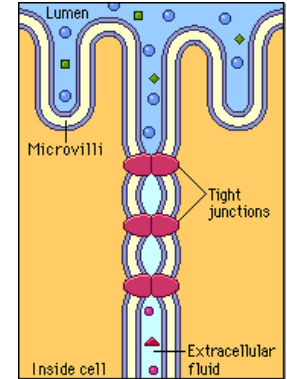
Hemidesmozomy

- propojení buněk s bazální laminou (ECM)
- podobnost s desmozomy, jako spojovací proteiny využity integriny, které se váží k laminům bazální membrány

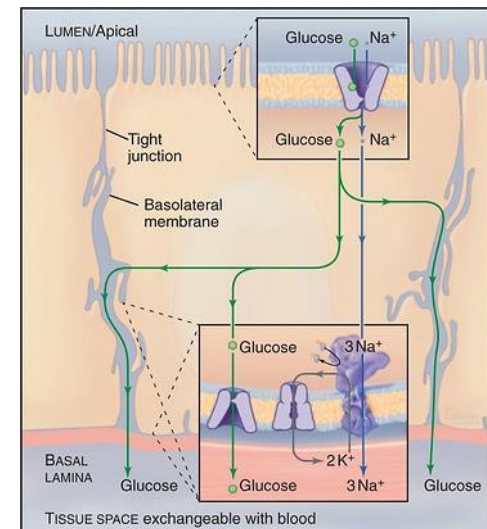
Spoje buněk

Těsné vazby

- spojovací proteiny - claudin, occludin, JAM
 - homofilní interakce s proteiny sousední buňky
- podíl na polarizaci buněk, brání laterálnímu pohybu membránových molekul
- překážka pro průchod tekutin a molekul přes vrstvu buněk, oddělení tělních dutin
- rozhodují o průchodu molekul transbuněčnou či parabuněčnou drahou
- transport glukózy přes střevní epitel
 - vstup do buňky na apikální straně přes Na^+ /glukóza synportní protein
 - export glukózovým transportérem na bazolaterálním povrchu



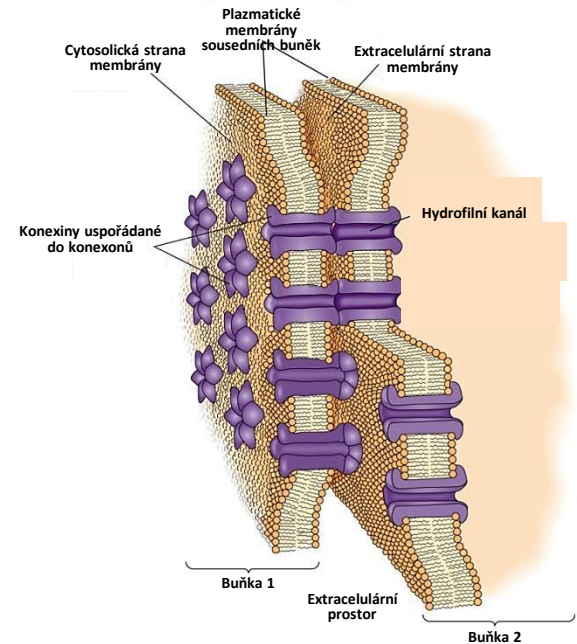
Transport glukózy ve střevě



Spoje buněk

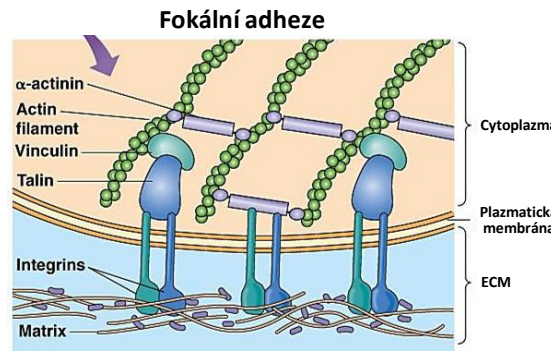
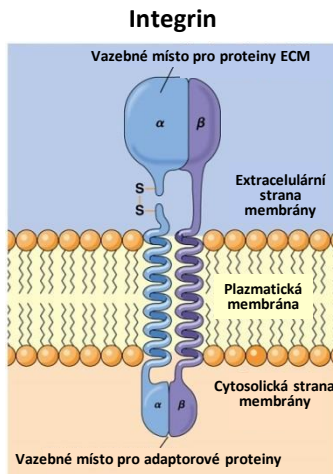
Mezerové spoje

- 6 molekul konexinu uspořádaných do kruhu tvoří konexon
- konexony dvou sousedních buněk tvoří hydrofilní kanál, který propojuje cytoplazmy buněk
- přímá chemická a elektrochemická komunikace buněk
- tok malých molekul mezi buňkami (ionty, cukry, cAMP)

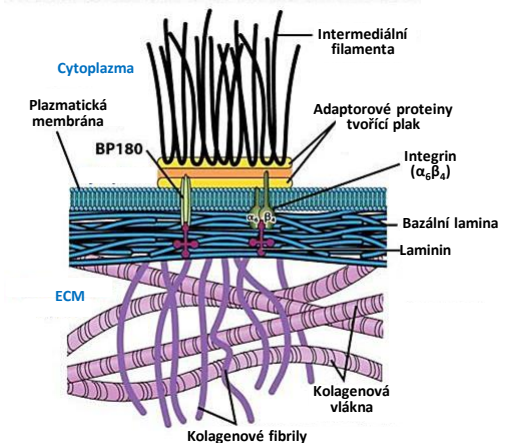


Spojení buněk s ECM

- fokální adheze a hemidesmozomy, integriny
- rozdíl v napojení na cytoskelet - fokální adheze váží mikrofilamenta
 - hemidesmozomy váží intermediální filamenta



Hemidesmozom





Molekulární biologie pro informatiky - 8

Molekulární mechanismy signalizace

Signální molekuly

Signál

- zprostředkovává a předává informaci
- extracelulární - ligand reagující s buňkou pomocí receptoru
- intracelulární

Extracelulární signály

- proteiny, peptidy, aminokyseliny, nukleotidy, lipidy, steroidy, mastné kyseliny, plyny
- hormony - odvozené od aminokyselin (adrenalin, thyroxin)
 - peptidy a proteiny (inzulín, glukagon, oxytocin)
 - steroidní (testosteron, estrogen, kortizol)
 - vitamín D, kyselina retinová
- cytokiny - interleukiny, interferony
 - nádorové nekrotické faktory (TNF- α , TNF- β , TNF- γ)
 - růstové faktory (EGF, PDGF, IGF-1, GM-CSF, GHF, NGF)
- nervové mediátory (acetylcholin, GABA)
- lokální mediátory (histamin, oxid dusnatý)

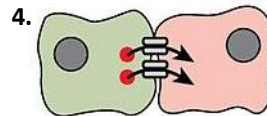
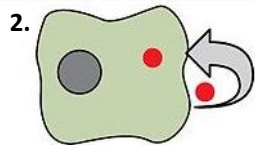
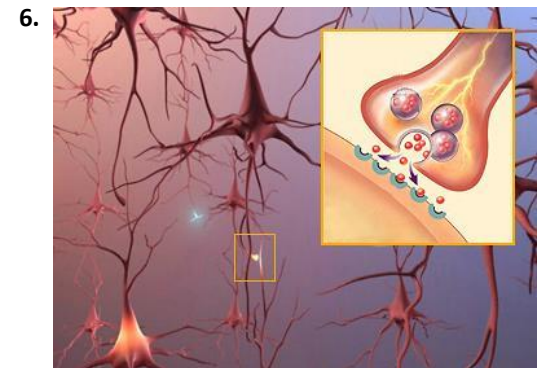
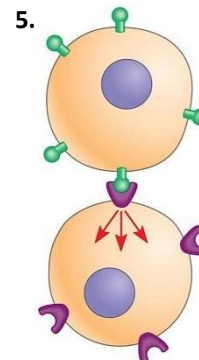
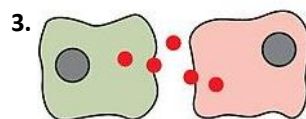
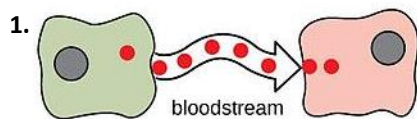
Signály **hydrofilní**: vazba na membránové receptory, krátkodobá odpověď

Signály **lipofilní**: vazba na intracelulární receptory, dlouhodobá odpověď

Extracelulární signalizace

Přenos signálu ze zdrojové buňky na receptor buňky cílové

1. **endokrinní** - buňky vzdáleny, přenos signálu krví (př. hormony)
2. **autokrinní** - stejná buňka
3. **parakrinní** - produkce signálu do tělních tekutin, lokální účinek (př. histamin, NO)
4. **dutý spoj** - buňky v těsném kontaktu, tubulární struktura (př. Ca^{2+} , cAMP)
5. **přímý kontakt** - ligand i receptor na povrchu buněk v přímého kontaktu (př. FasL)
6. **synapse** - nervová soustava, permeabilita membrán (př. acetylcholin)



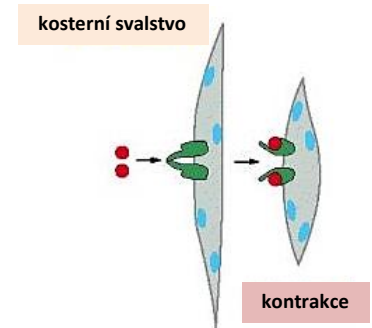
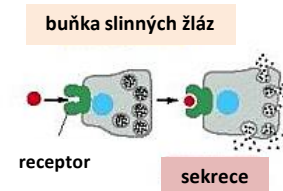
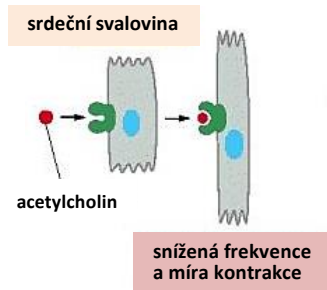
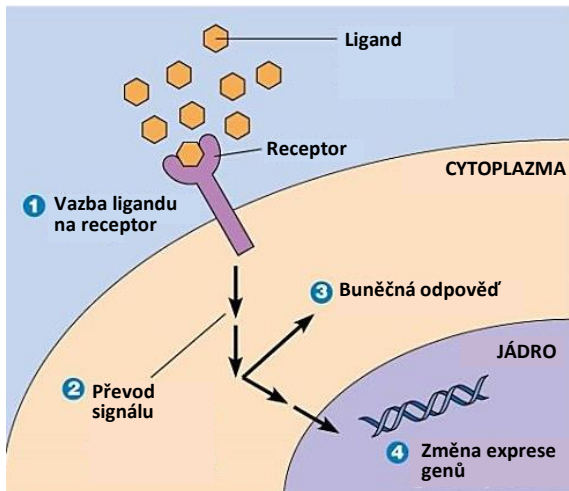
Signalizace

Intracelulární signalizace

- přenos signálu na cílovou molekulu uvnitř buňky

Odpověď buňky

- genová exprese, aktivita metabolických enzymů, konfigurace cytoskeletu, permeabilita membrány, syntéza DNA, indukce apoptózy
- přítomnost receptorů a výbava buňky rozhoduje o tom, na který signál bude buňka reagovat
- stejný signál může mít různé účinky u různých buněk (např. acetylcholin)
- rychlost reakce - změna funkce proteinů (s - min), změna v expresi genů (min - hod)



Signální dráhy

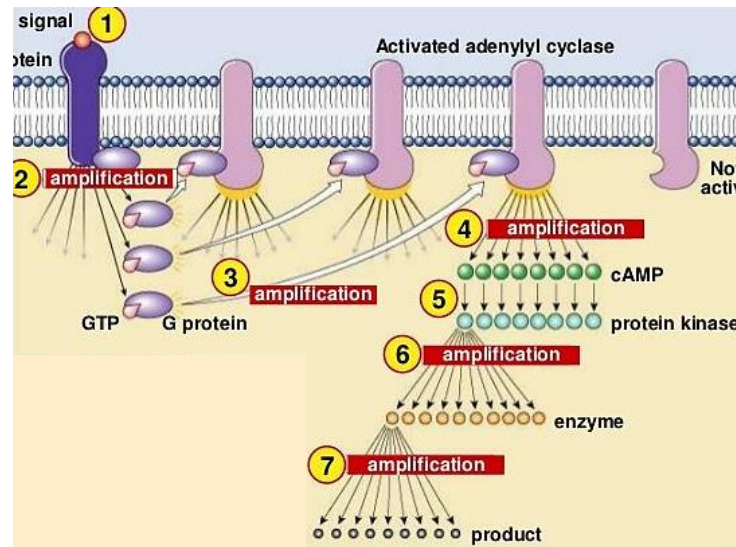
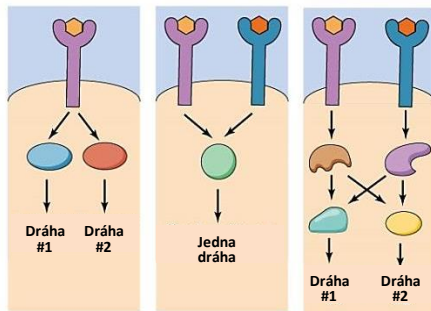
První přenašeč signálu: prvotní signál zachycený buňkou

Druhé přenašeče signálu: malé molekuly produkované uvnitř buňky po vazbě ligandu na receptor

Intracelulární signalizace zahrnuje

- přenos signálu a jeho převod do srozumitelné podoby
- zesílení, rozdělení signálu
- propojení signálních drah

Po přijetí signálu se rovnováha signálních molekul velmi rychle obnovuje.



Intracelulární receptory

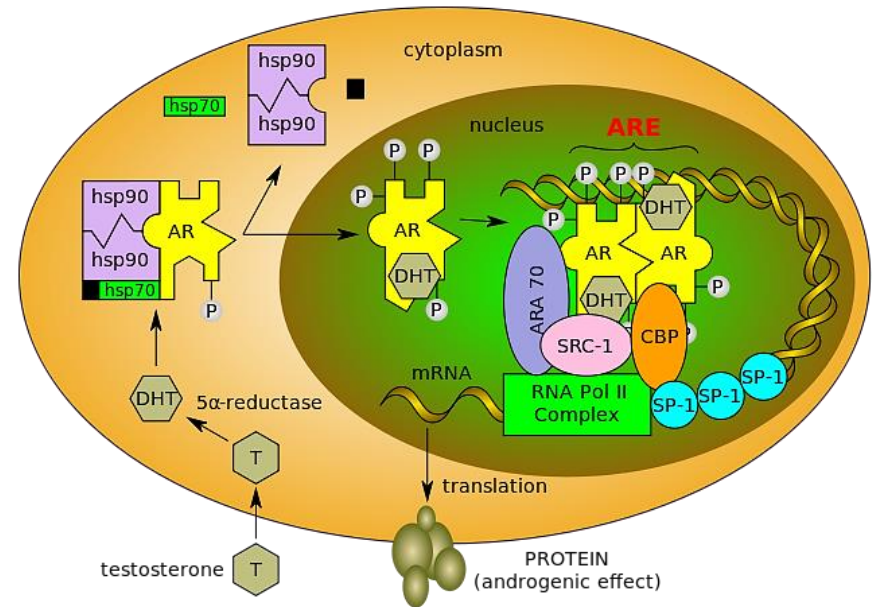
- receptory steroidních a tyroidních hormonů, vitamínu D, kyseliny retinové, oxidu dusnatého
- difuze ligandu cytoplazmatickou membránou → vazba na receptor → změna konformace receptoru → regulace transkripce cílových genů

Funkční domény receptorů

- doména pro vazbu ligandu
- doména pro dimerizaci
- aktivační doména - vazba k TFIID, TFIIB
- DNA vazebná doména - motiv dvou zinkových prstů

1. Cytoplazmatické receptory

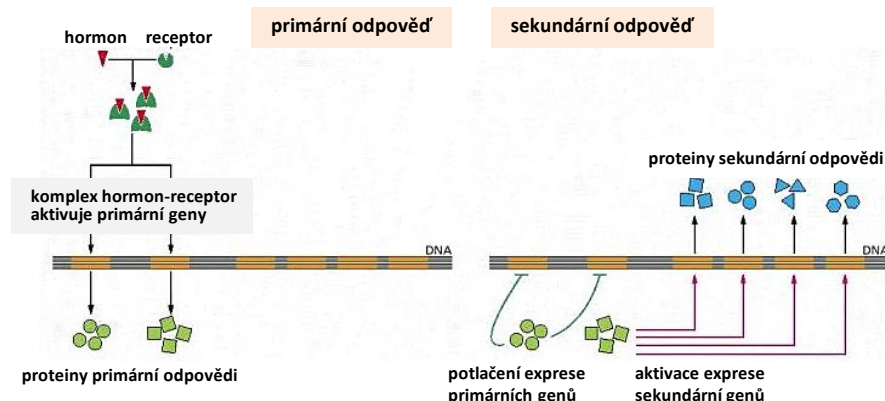
- steroidní hormony, glukokortikoidy, testosteron
- vazba HSP90
- tvorba homodimeru, přechod do jádra, aktivace příslušných genů
- př. androgenní receptor



Intracelulární receptory

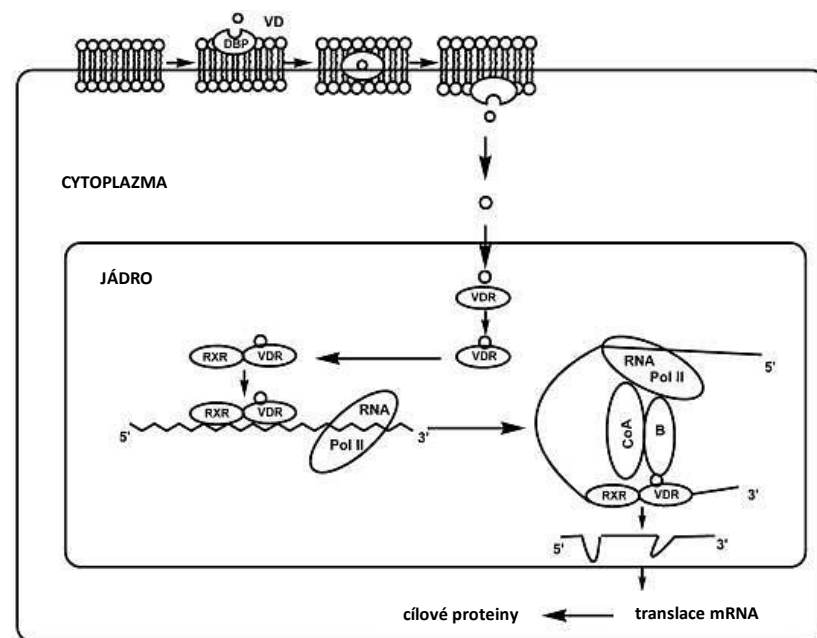
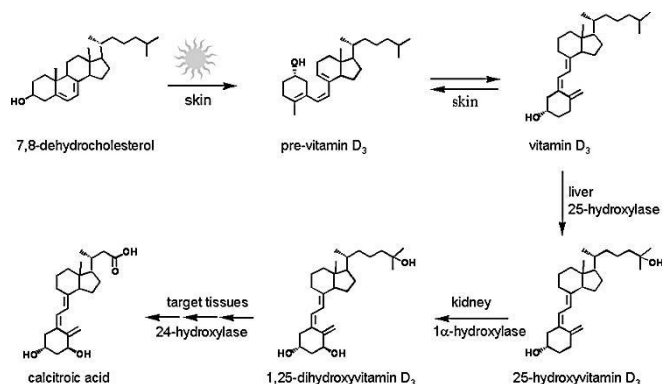
1. Cytoplazmatické receptory

- dvoustupňová reakce na steroidní hormony



2. jaderné receptory

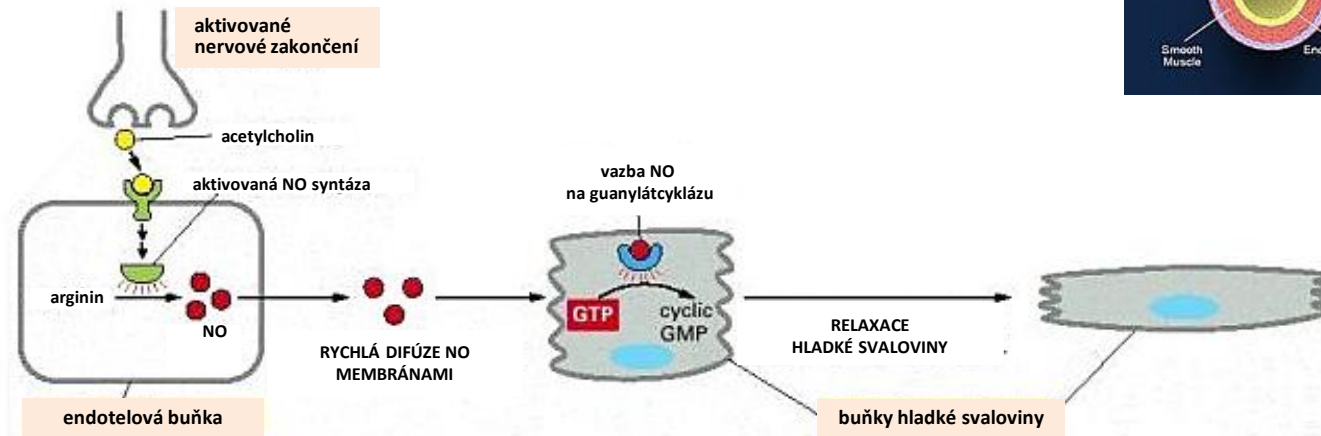
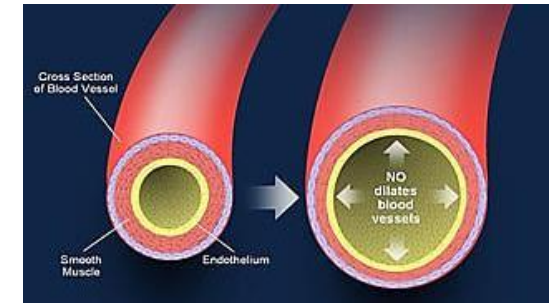
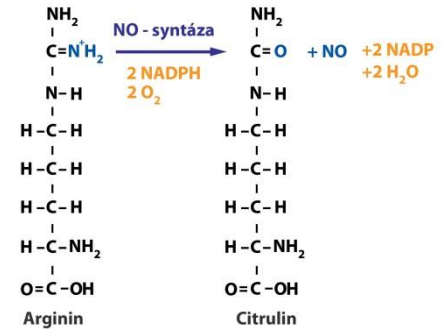
- tyroidní hormony, vit D, kyselina retinová
- tvoří heterodimery (RXR)
- př. vitamín D - v krvi vázán na DBP protein - jaderný receptor VDR



Intracelulární receptory

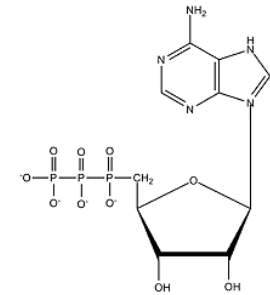
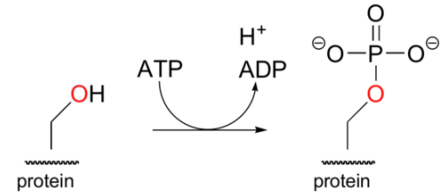
Oxid dusnatý (NO)

- parakrinní signál, volný průnik přes membrány buněk
- NO syntáza - deaminace argininu
- rychlý, lokální účinek
- vazodilatátor - aplikace nitroglycerinu při angíně pectoris
 - prodloužení účinku NO po aplikaci viagry
- acetylcholin → vznik a uvolnění NO z endotelových buněk → difuze k buňkám hladké svaloviny → aktivace guanylátcyklázy → relaxace svalové buňky



Přehled proteinkináz

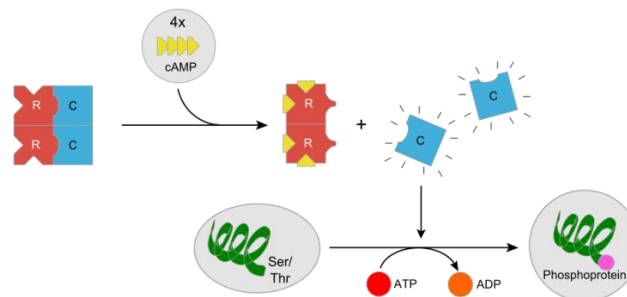
- fosforylace - vazba fosfátové skupiny na AK
- jako donor fosfátové skupiny slouží ATP, vznik ADP
- tyrosinkinázy - vazba fosfátu na fenolickou skupinu Tyr
- serin/treoninkinázy - vazba fosfátu na hydroxylovou skupinu Ser či Thr



SERIN / TREONIN KINÁZY

1. proteinkináza A, PKA

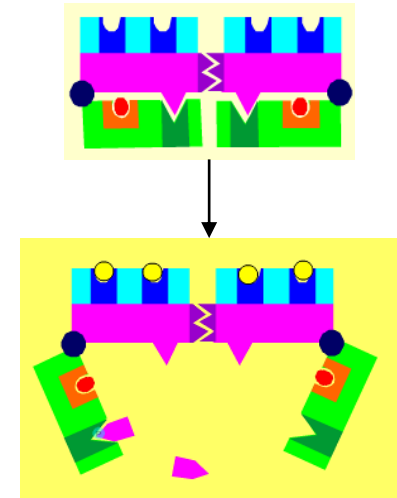
- cAMP dependentní protein kináza
- homodimer, regulační (R) a katalytická (C) doména
- po vazbě cAMP na R jsou C uvolněny a mohou fosforylovat cílové proteiny
- př. rozklad glykogenu ve svalových vláknech, syntéza somatostatinu v D-buňkách



Přehled proteinkináz

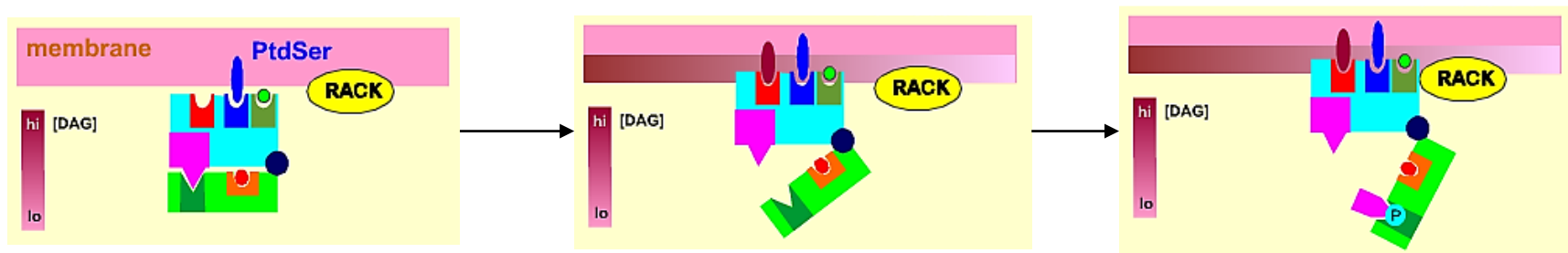
2. proteinkináza G, PKG

- cGMP dependentní protein kináza, homodimer
- regulační doména: dimerizace, vazba cGMP, blok aktivního místa
- katalytická doména: fosforylace
- PKG-I - hladká svalovina, trombocyty, endotely, kardiomyocyty
- PKG-II - buňky ledvin, střevní mukóza, pankreas



3. proteinkináza C, PKC

- monomer v blízkosti plazmalemy, aktivace účinkem DAG, PtdSer a Ca^{2+}
- regulační doména - vazba DAG, PtdSer a Ca^{2+} , blok aktivního místa
- katalytická doména - fosforylace



Přehled proteinkináz

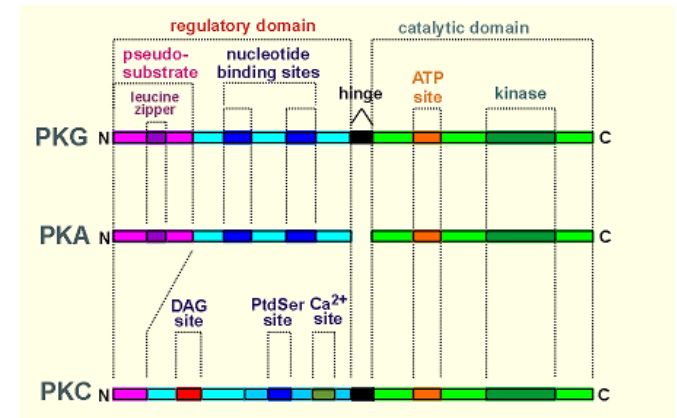
Struktura PKA, PKC a PKG je vysoce příbuzná

Regulační doména

- pseudosubstrát blokující aktivní místo
- leucinový zip pro dimerizaci
- vazebná místa pro ligandy

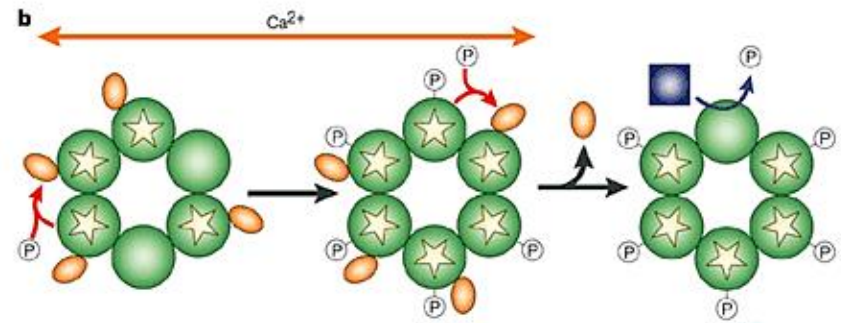
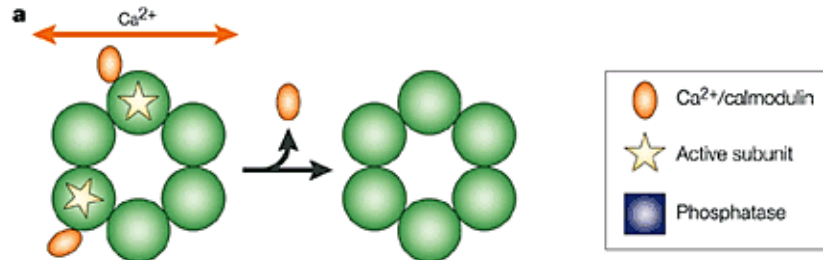
Katalytická doména

- aktivní místo enzymu s kinázovou aktivitou
- vazba ATP



4. Ca²⁺/kalmodulin dependentní proteinkináza II (CaMKII)

- regulována komplexem Ca²⁺/kalmodulin, autofosforylace
- katalytická doména - fosforylace
- regulační doména - pseudosubstrát, vazba monomerů do multimerů
- specializované CaMKII - př. kináza lehkého řetězce myozinu



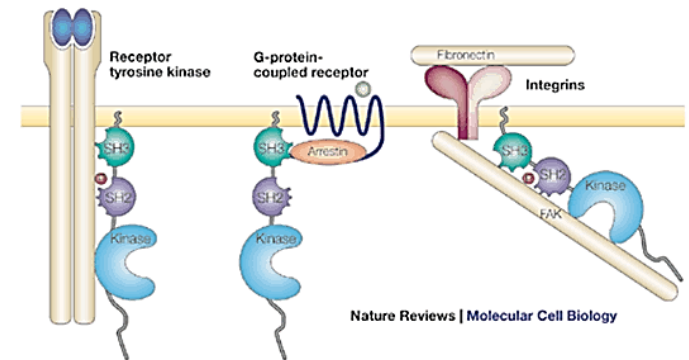
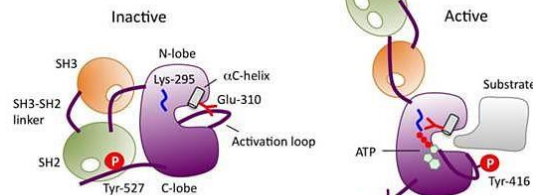
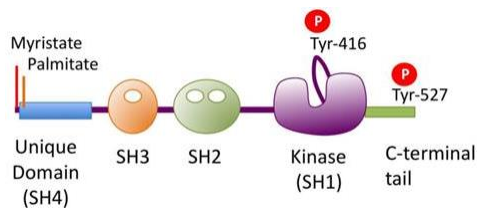
Přehled proteinkináz

TYROSIN KINÁZY

- kinázová doména SH1
- receptorové - vázané na plazmatickou membránu, součást receptorů
- nereceptorové - asociují s receptory, děleny do rodin:

1. proteinkinázy Src-rodiny

- SH1; regulační domény SH2, SH3; ukotvení k membráně přes SH4
- c-Src - inaktivní: fosforylace Tyr-527, vazba SH2, blok SH1
 - aktivace: defosforylací či vyvázáním fosfátu na Tyr-527, fosforylace Tyr-416
- asociace s receptory - receptorové tyrosinkinázy, receptory vázané s G-proteiny, adhezní receptory



2. proteinkinázy Jak-rodiny

- přímá aktivace receptory pro interferon, Jak/STAT signální dráha

3. proteinkinázy Syk-rodiny

Přehled proteinkináz

MAP-PROTEINKINÁZY

- proteinkinázy aktivované mitogeny

1. MAP-kinázakinázakinázy (MAPKKK)

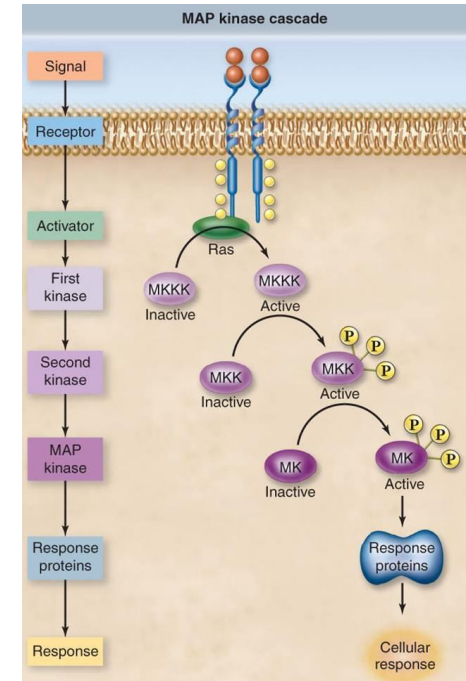
- aktivace MAPKK přes Ser či Thr
- př. Raf-proteinkináza přímo aktivovaná Ras proteinem

2. MAP-kinázakinázy (MAPKK)

- aktivace MAPK fosforylací Thr a Tyr (Thr-X-Tyr)
- př. MAP/ERK-proteinkináza (MEK-proteinkináza)

3. MAP-kinázy (MAPK)

- po své aktivaci migrují k cílovým molekulám



SERIN / TREONIN KINÁZY

- proteinkináza A (PAK)
- proteinkináza G (PKG)
- proteinkináza C (PKC)
- Ca²⁺/kalmodulin d. proteinkináza II (CaMKII)

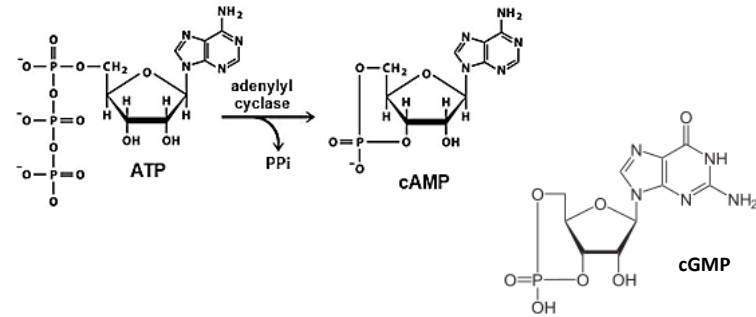
NERECEPTOROVÉ TYROSIN KINÁZY

- proteinkinázy Src-rodiny
- proteinkinázy Jak-rodiny
- proteinkinázy Syk-rodiny

Další enzymy signálních drah

Adenylátcykláza

- ATP → bisfosfát + cyklický adenosinmonofosfátu (cAMP)



Guanylátcykláza

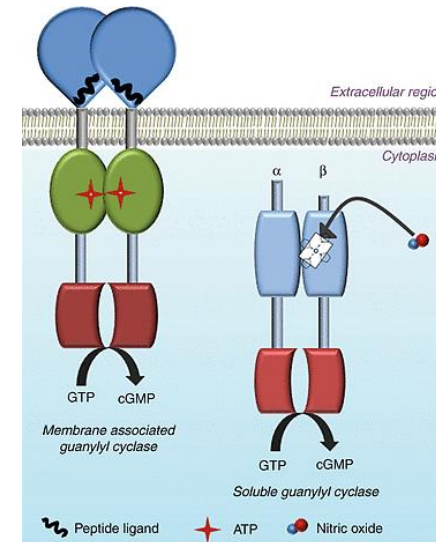
- GTP → bisfosfát + cyklický guanosinmonofosfát (cGMP)

Typ 1 - homodimer, receptor pro různé ligandy

- domény: extracelulární, transmembránová kinázová, cyklázová
- př. ANF: vyloučení Na⁺ a vody z ledvin

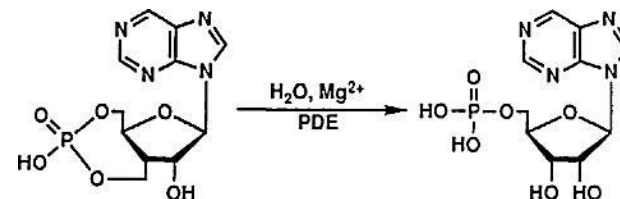
Typ 2 - rozpustný heterodimer (α, β)

- aktivace vazbou NO
- domény: vazebná (hem), cyklázová

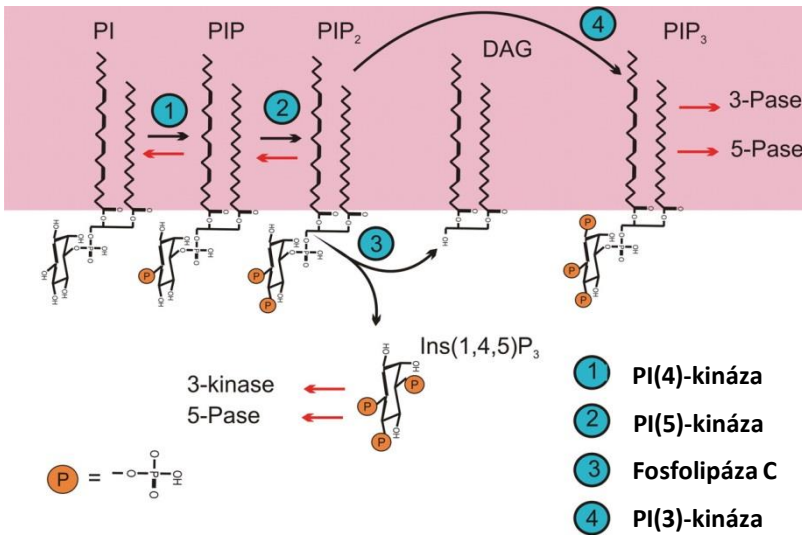


cAMP-fosfodiesteráza, cGMP-fosfodiesteráza

- hydrolýza cAMP / cGMP na AMP / GMP



Další enzymy signálních drah



PI fosfatidylinositol
PIP fosfatidylinositol-4-fosfát
PIP₂ fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PIP₃ fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát

DAG diacylglycerol
Ins(1,4,5)P₃ inositol-1,4,5-trisfosfát

Fosfolipáza C (PLC) hydrolyzuje PIP₂ na DAG a Ins(1,4,5)P₃

Povrchové receptory

Signalizace zprostředkovaná povrchovými receptory

1. mimobuněčný signál (ligand)
2. povrchový receptor
3. sekundární přenašeč
4. cílová molekula (efektor)

Typy povrchových receptorů

1. Receptory spojené s iontovými kanály

- průchodnost kanálů dle přítomnosti ligandu
- změna permeability membrány
- rychlá signalizace na synapsích

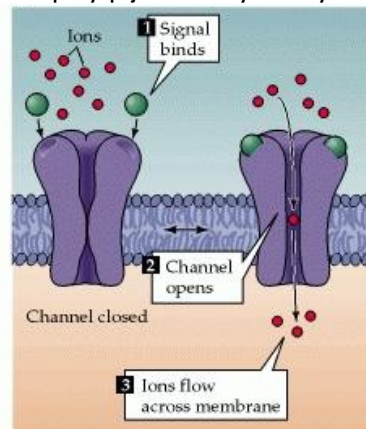
2. Katalytické receptory

- získání katalytické schopnosti po vazbě ligandu
- transmembránové proteiny s PTK aktivitou

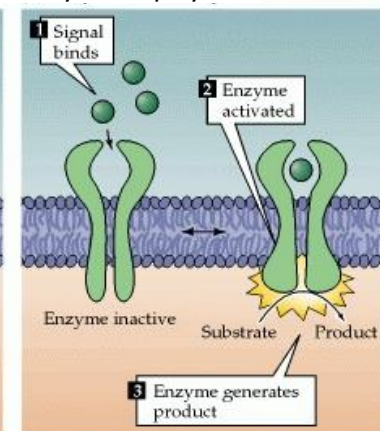
3. Receptory vázané na G protein

- přes G-protein ovlivňují aktivitu enzymů nebo průchodnost kanálů

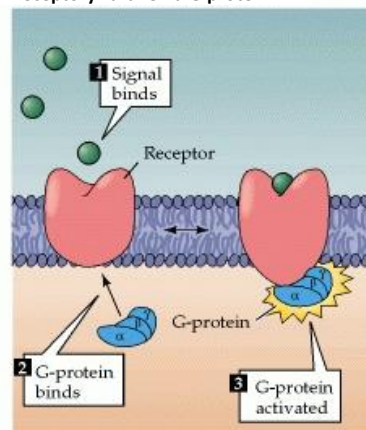
Receptory spojené s iontovými kanály



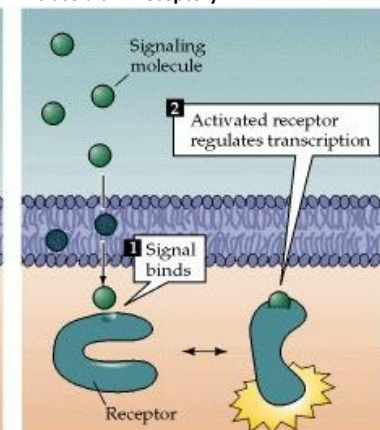
Katalytické receptory



Receptory vázané na G-protein



Intracelulární receptory

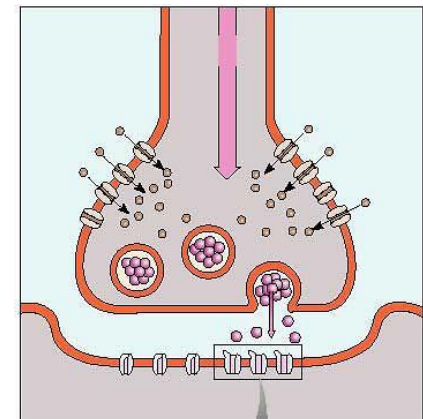
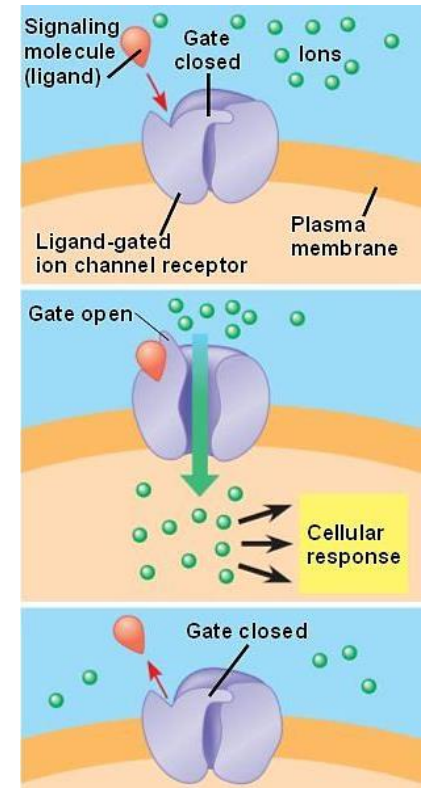


Receptory spojené s iontovým kanálem

- iontový kanál v plazmatické membráně
- vazba ligandu → konformační změna receptoru → otevření kanálu → pohyb iontů → disociace ligandu z receptoru → uzavření kanálu
- ligandy - neurotransmitery, peptidové hormony
- molekuly procházející kanálem - ionty Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-

Signalizace na synapsích

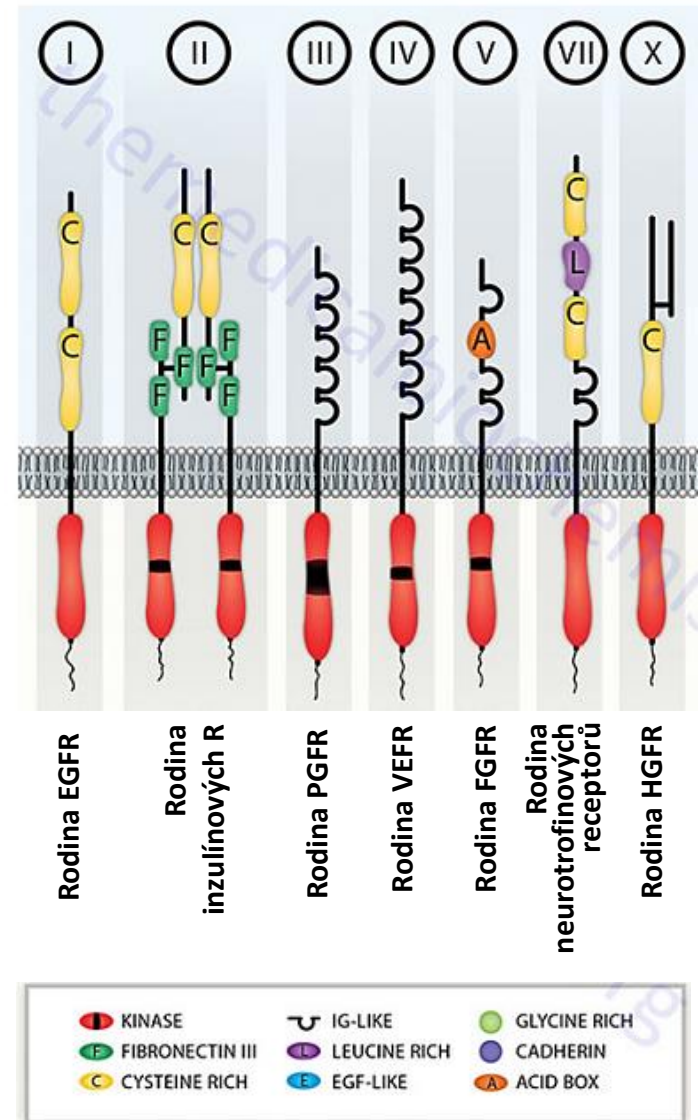
- převod chemických signálů na elektrické
- excitovaný presynaptický neuron vypouští neurotransmitter, který se váže na receptor spojený s iontovým kanálem
- otevřeným kanálem proudí ionty, které vyvolají excitaci postsynaptického neuronu
- př. receptor pro serotonin
receptor pro GABA (γ -aminomáslená kyselina)



Katalytické receptory

TYROSINPROTEINKINÁZOVÉ RECEPTORY

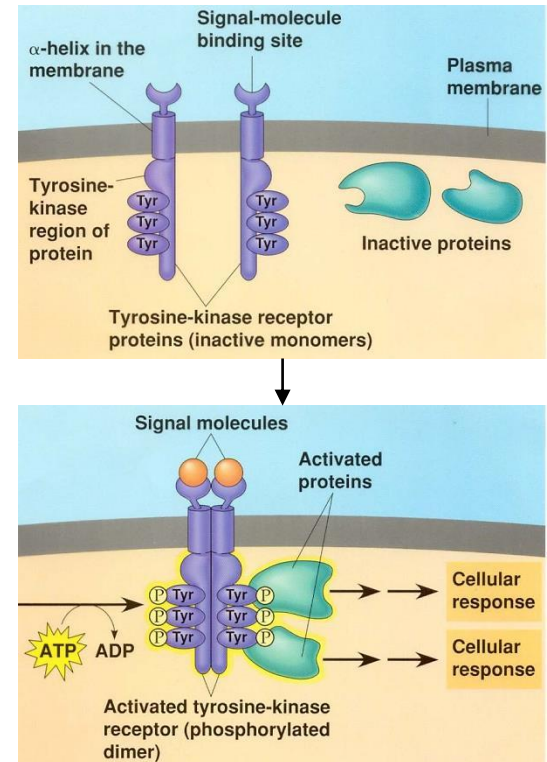
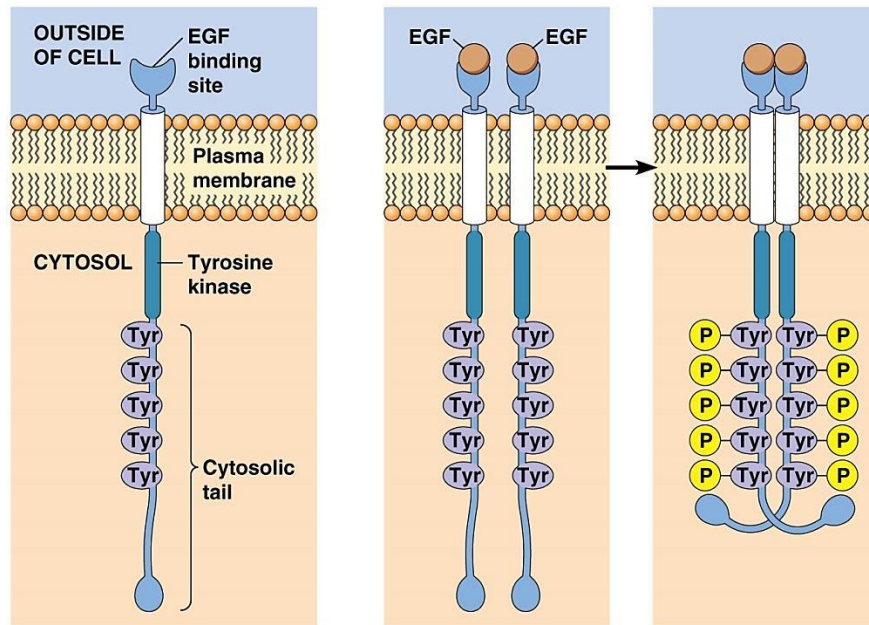
- tyrosinproteinkinázová aktivita regulovaná ligandy
- společné strukturní rysy
- **extracelulární doména**
 - N-konec, glykosylována
 - vazba ligandu
 - určuje typ signálu, na který bude buňka citlivá
- **transmembránová doména**
 - krátká, hydrofobní, α -šroubovice
- **cytoplazmatická doména**
 - C-konec, tyrosinproteinkinázová aktivita
 - určuje typ signální dráhy a tím i buněčnou odpověď
- kolem 50 receptorů
- 14 rodin podle motivu v extracelulárních doménách



Katalytické receptory

Aktivace tyrosinproteinkinázových receptorů

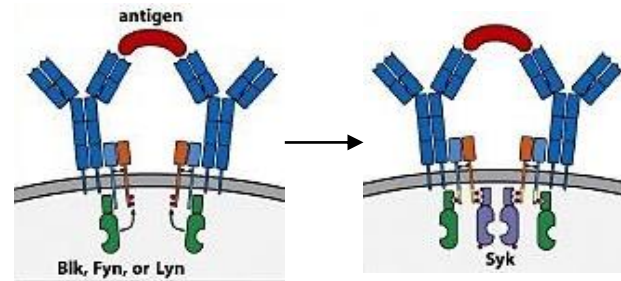
- vazba ligandu v extracelulární doméně
- změna konformace a dimerizace receptoru
- stimulace tyrosinproteinkinázové aktivity, autofosforylace
- P-Tyr jsou vazebnými místy pro intracelulární proteiny, které předávají signál dál



Katalytické receptory

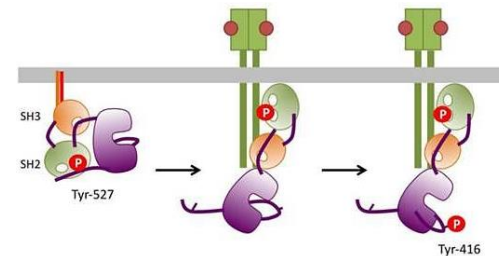
RECEPTORY S PŘIDRUŽENOU TYROSINPROTEINKINÁZOVOU AKTIVITOU

- po vazbě ligandu dimerizují, aktivují nereceptorové tyrosinproteinkinázy
- imunoglobulinové receptory
 - BCR, TCR, vazba antigenů
 - asociace s kinázami Src- a Syk-rodin
- receptory pro cytokiny
 - př. Epo, GM-CSF, HGF, IL2-10, interferony



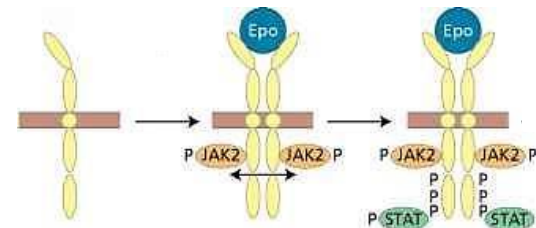
Receptory asociované s proteinkinázami Src-rodiny

- po dimerizaci receptoru aktivována Src-kináza
- vazba adaptorových molekul na P-Tyr-416



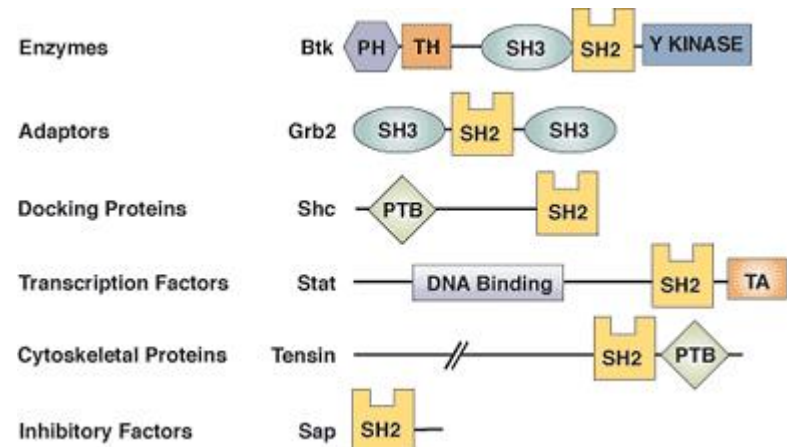
Receptory asociované s proteinkinázami Jak-rodiny

- po dimerizaci receptoru aktivována Jak-kináza
- fosforylace receptoru
- vazba a fosforylace STAT



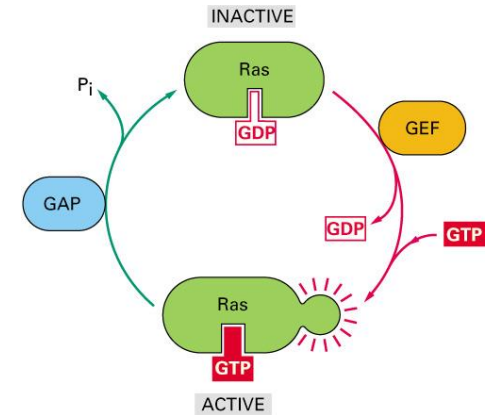
SH2 doména

- **S**rc **H**omology 2
- strukturní doména (cca 100 AK) u většiny eukaryotických organismů
- vazba na P-Tyr mění konformaci a aktivitu proteinu s SH2
- **podíl na interakcích signálních molekul**
 - spojuje katalytické receptory s dalšími molekulami signálních drah
 - součástí enzymů (Src, Jak, Lck, Fyn, Syk, PLCG, PI3K)
adaptorových molekul (Grb2)
transkripčních faktorů (STAT)
regulátorů signalizace (SOCS)
- signální dráha přes proteiny Ras = příklad zapojení SH2 domény do signalizací



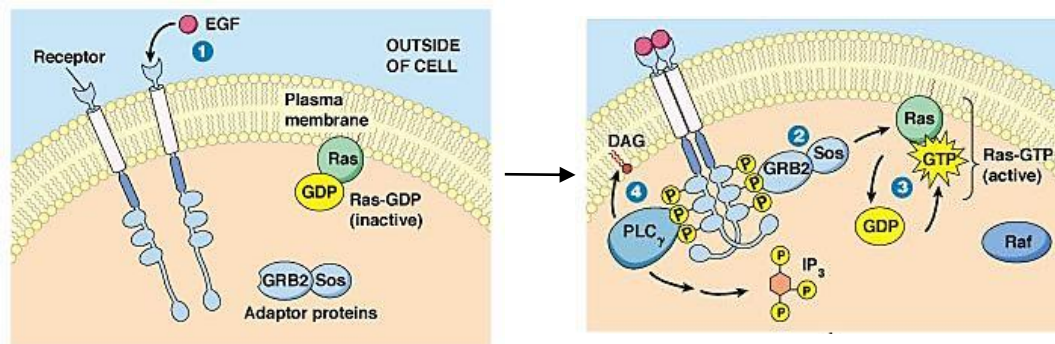
Rodina proteinů Ras

- monomerní GTPázy, vazba GDP/GTP
- vazba k plazmatické membráně
- aktivace - **GEF faktor**, uvolnění GDP
- Ras váže GTP a přenáší signál na své efekторы
- inaktivaci - **GAP protein**, hydrolýza GTP
- nadrodina proteinů Ras - rodiny Ras (růst a diferenciace buněk)
 - Rho (morfologie a pohyb buněk)
 - Rab a Arf (transport měchýřků)
 - Ran (jaderný transport)



Signalizace přes Grb2-Sos

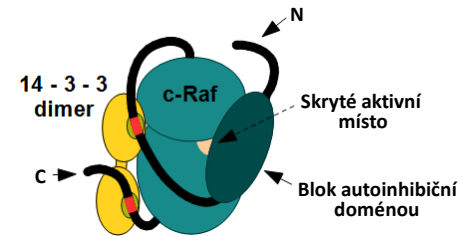
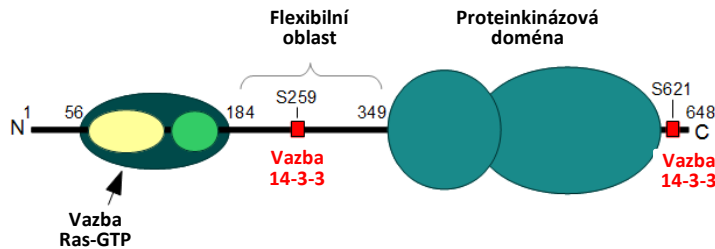
- Grb2 - SH2: aktivovaný tyrosinproteinkinázový receptor
 - SH3: vazba k Sos
- Sos funguje jako GEF a zajišťuje aktivaci Ras



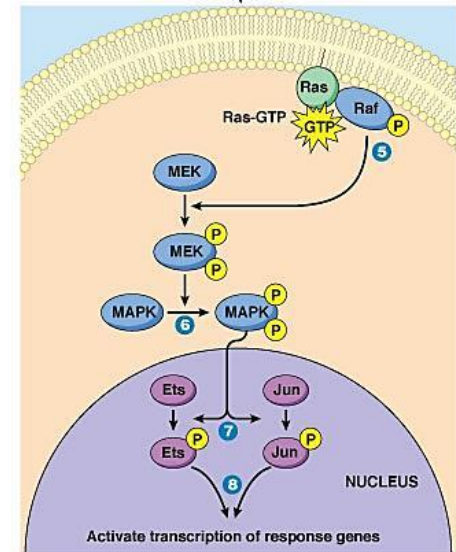
Rodina proteinů Ras

MAPK dráha zahájená aktivací Raf

- Raf - Ser/Thr MAPKKK
 - v inaktivním stavu udržuje faktor 14-3-3 konformaci blokující katalytické místo
 - vazba Ras-GTP indukuje disociaci 14-3-3

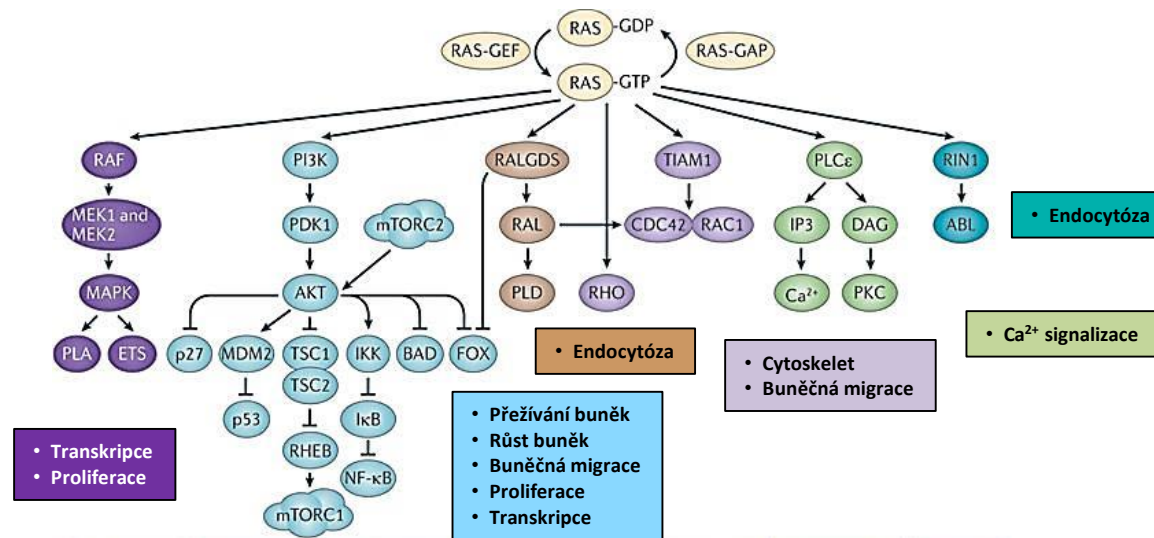


- MAPKK - MEK
- MAPK - ERK, transport do jádra, aktivace transkripčních faktorů
- transkripční faktory indukují transkripci specifických genů
- přenos signálů od mitogenů
- dominantní při signalizaci určující růst, vývoj a diferenciaci buněk



Rodina proteinů Ras

Efektory proteinů Ras



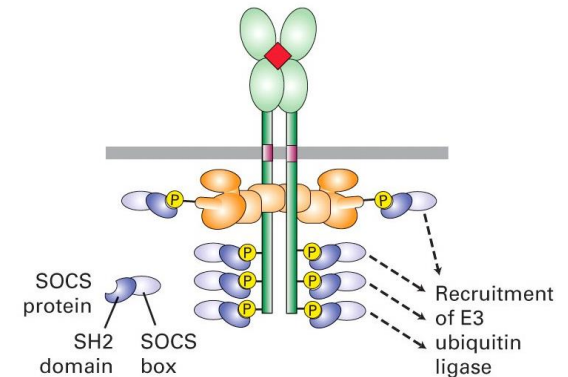
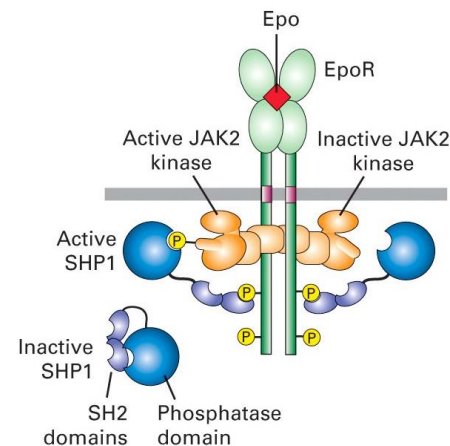
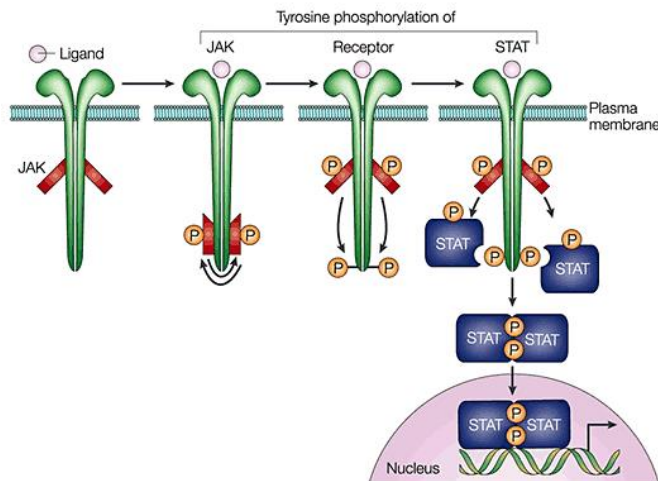
Nádorová onemocnění

- stále aktivní Ras-GTP (blok hydrolýzy GTP, mutace GAP proteinů)
- H-Ras, K-Ras a N-Ras nejčastější onkogeny nádorových onemocnění (u 20 - 30 % nádorů)
- inhibitory Ras proteinů předmětem protinádorové léčby

Přímá aktivace transkripčních faktorů

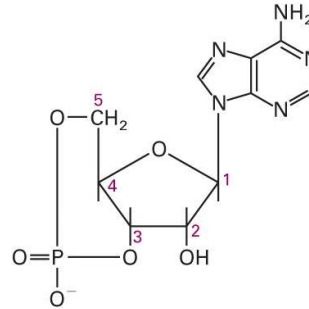
Signální dráha Jak/STAT

- Jak - asociuje s receptorem
- STAT - transkripční faktory (SH2), translokace cytoplazma → jádro
- vazba cytokinu → dimerizace receptoru → fosforylace Jak, fosforylace receptoru → vazba a aktivace STAT → dimerizuje STAT → translokace do jádra → aktivace cílových genů
- negativní regulace dráhy
 - fosfatáza SHP1: vazba na P-Tyr receptoru (SH2), defosforylace Jak
 - proteiny SOCS: vazba na P-Tyr receptoru (SH2), blok struktury vazba ubikvitin ligázy, degradace Jak v proteazomu

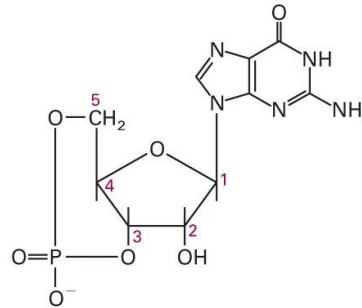


Sekundární přenašeče

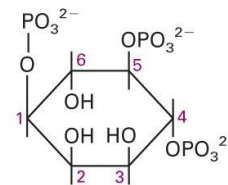
- nízká molekulová hmotnost
- dobře rozpustné
- krátký poločas rozpadu
- intracelulární signály
- přenos, amplifikace a rozdělení signálu z receptorů
- po přijetí signálu aktivovány enzymy zodpovědné za jejich tvorbu
- jejich koncentrace v buňce stoupá a klesá v závislosti na přítomnosti mimobuněčného signálu
- vyvolávají rychlou změnu aktivity enzymů nebo jiných proteinů



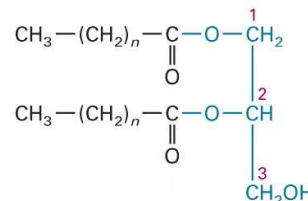
3', 5'-cyklický adenosinmonofosfát (cAMP)
Aktivuje proteinkinázu A (PKA)



3', 5'-cyklický guanosinmonofosfát (cGMP)
Aktivuje proteinkinázu G (PKG)



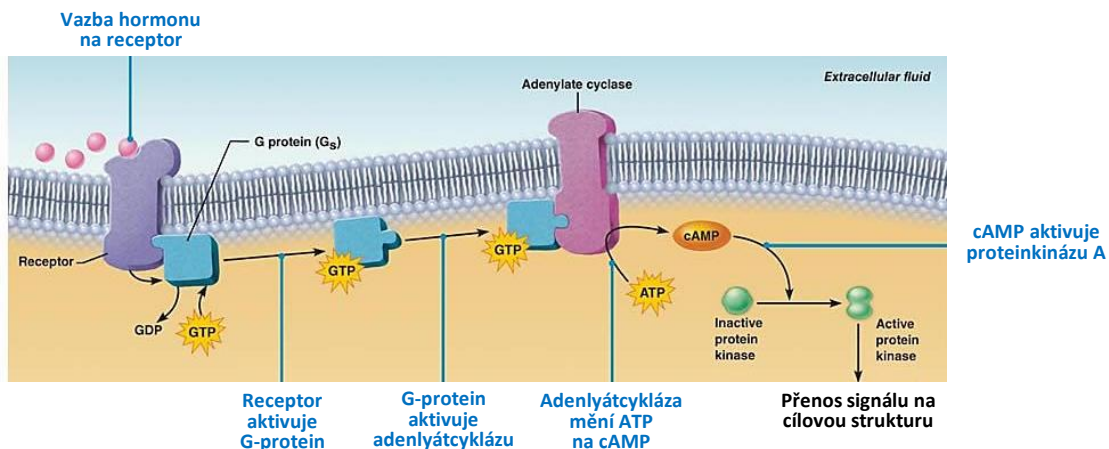
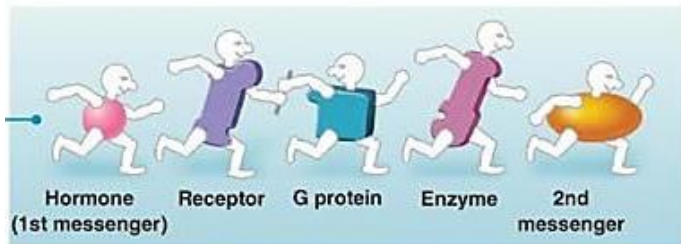
Inositol-1,4,5-trisfosfát (Ins(1,4,5)P₃)
Otevírá Ca²⁺ kanály ER



1,2-diacylglycerol (DAG)
Aktivuje proteinkinázu C (PKC)

Receptory vázané na G-protein

G-proteiny (trimerní)



Podjednotka α - vazba GDP/GTP, GTPáza

Podjednotky $\beta\gamma$ - ukotvení v plazmatické membráně

Základní stav

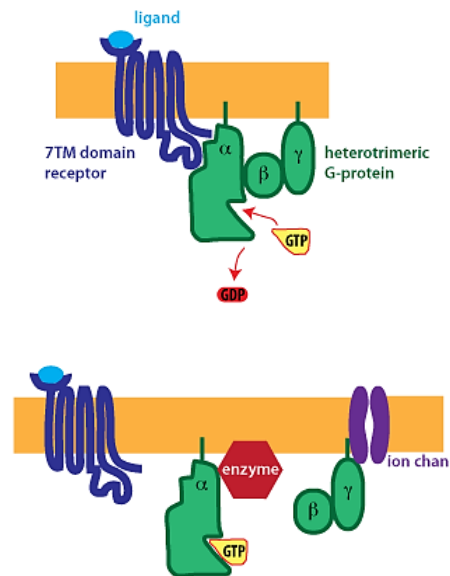
- asociace $\alpha\beta\gamma$ podjednotek, GDP na α

Aktivace

- vazba ligandu na receptor vede k výměně GDP za GTP
- disociace α od $\beta\gamma$
- α a $\beta\gamma$ regulují aktivitu specifických cílových proteinů

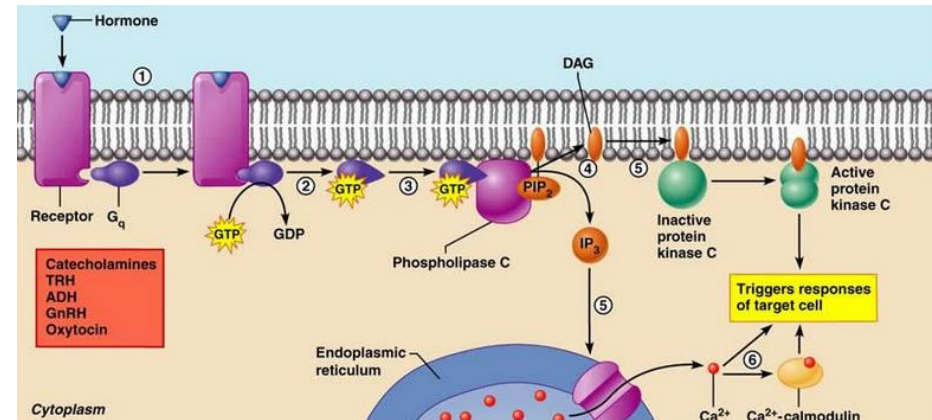
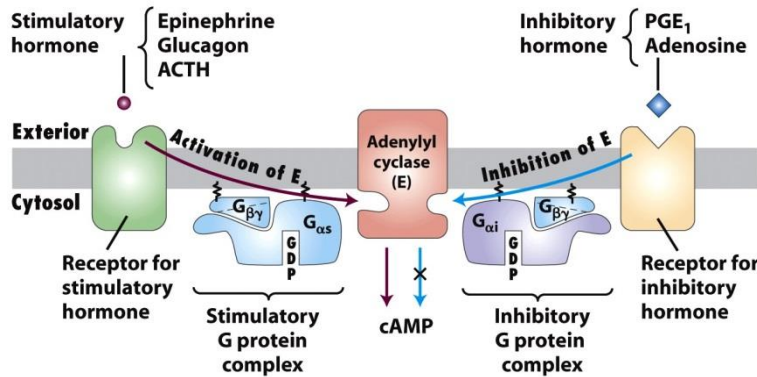
Inaktivace

- po hydrolýze GTP na GDP, návrat do trimerního stavu



Receptory vázané na G-protein

G_{αs}	α	aktivace adenylátcyklázy, Ca ²⁺ kanálů
G_{αi}	α	inaktivace adenylátcyklázy, aktivace fosfolipázy C a cGMP fosfodiesterázy
	βγ	aktivace K ⁺ kanálů a fosfolipázy C
G_{αq}	α	aktivace fosfolipázy C
G_{α12}	α	aktivace Rho



Efektory

- adenylátcykláza - nárůst cAMP - aktivace PKA, regulace iontových kanálů
- fosfolipáza C - vznik DAG, Ins(1,4,5)P3 - aktivace PKC, otevření Ca²⁺ kanálů
- Ca²⁺ kanál

Receptory vázané na G-protein

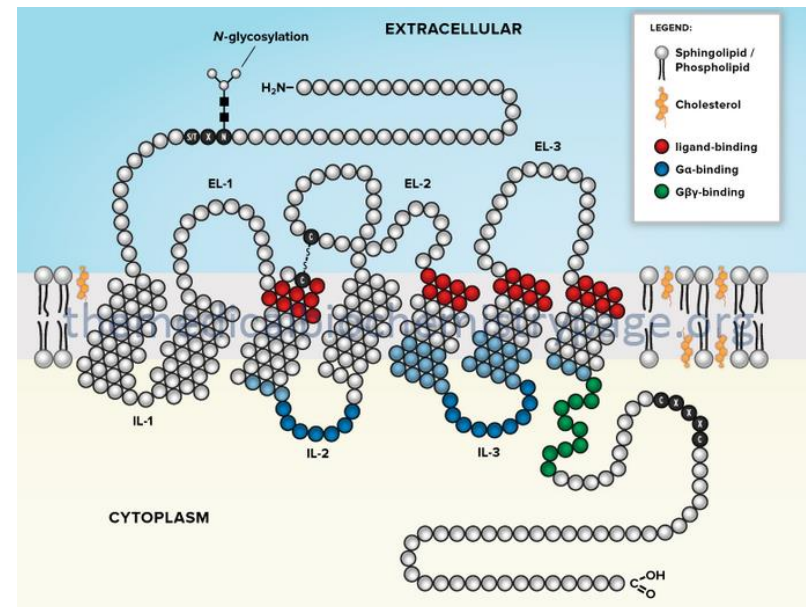
Robert J. Lefkowitz, Brian K. Kobilka
2012 NC za chemii



- sedm α helixů (22-24 AK) v plazmatické membráně
- α helixy spojeny variabilními smyčkami
 - extracelulární: vazba ligandu
 - intracelulární: vazba G-proteinu
- vazba ligandu mění konformaci intracelulární části receptoru, na kterou se váže a aktivuje G proteinu

Ligandy

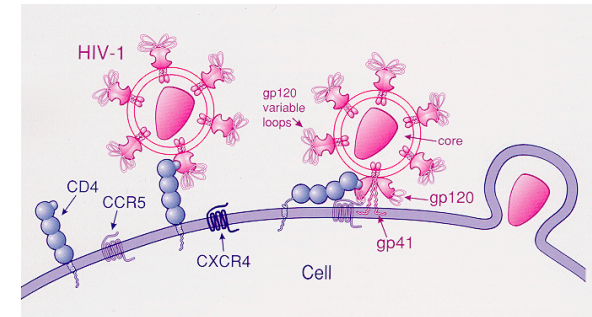
- neurotransmitery, neuropeptidy
- odoranty, lipidy
- hormony - př. serotonin, epinefrin, glukagon, tyrotropin, kalcitonin, ACTH, prostaglandiny
- ztráta citlivosti vlivem přetrvávající přítomnosti ligandu



Receptory vázané na G-protein

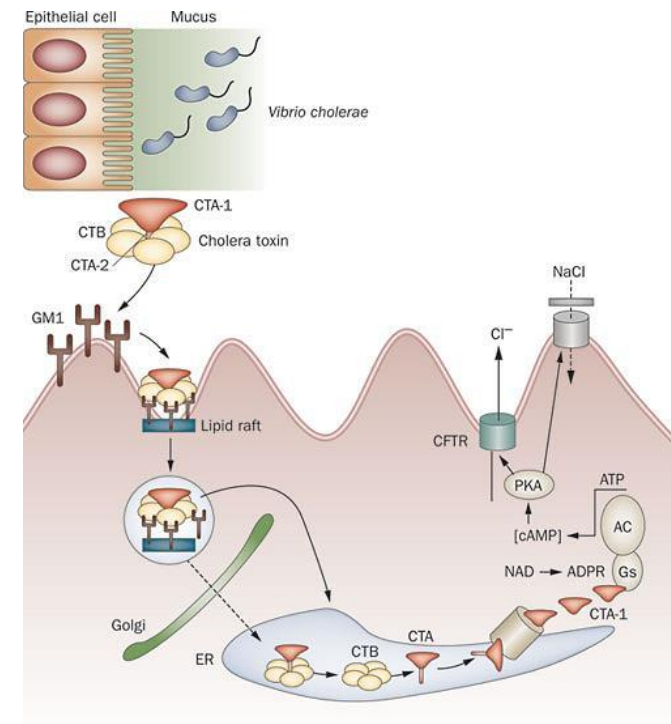
Biologické účinky

- růst a diferenciace buněk, chemotaxe
- přenos signálů z chuťových, pachových a světelným vjemů
- nervová signalizace
- regulace krevního tlaku, funkce endokrinních žláz
- embryogeneze a vývoj organismu



Nemoci spjaté s G-proteiny

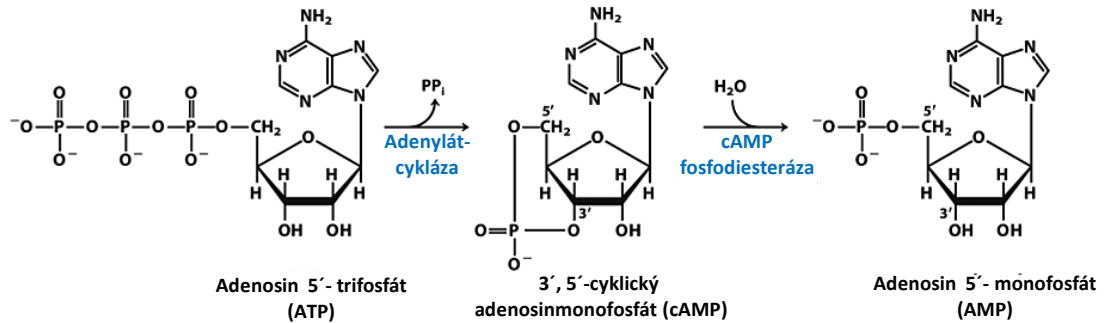
- nádorová onemocnění (1/5 nádorů)
- infekce virem HIV (CXCR4 a CCR5)
- cholera (*Vibrio cholerae*)
 - cholera toxin z podjednotek A a B
 - podjednotka B: vazba na povrch buněk (GM1)
 - podjednotka A: ADP-ribosylace $G_{\alpha s}$, ne hydrolyza GTP
 - hyperaktivace adenylátcyklázy → vysoká koncentrace cAMP v epitelu střeva → propustnost iontových kanálů → únik vody a iontů do lumen střeva → prudké průjmy



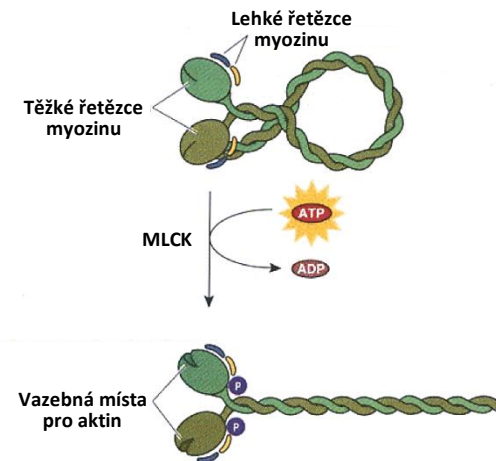
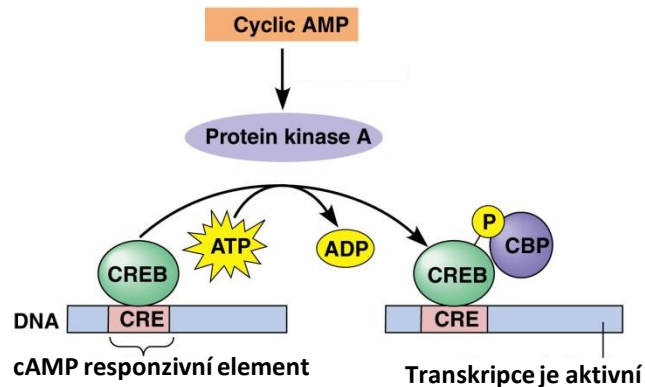
Nitrobuněčné signální dráhy

Cyklický adenosinmonofosfát (cAMP)

- koncentrace závislá na aktivitě:
adenylátcyklázy
cAMP fosfodiesterázy



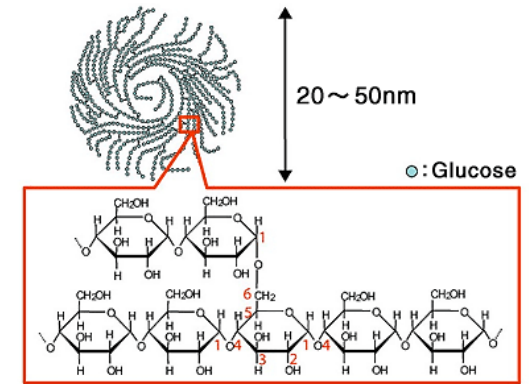
- aktivace PKA → fosforylace cílových substrátů
 - i) transkripční faktor CREB: vazba k sekvencím CRE, aktivace příslušných genů
 - ii) receptory steroidních hormonů
 - iii) kináza lehkého řetězce myozinu (MLCK) v buňkách hladké svaloviny



Nitrobuněčné signální dráhy

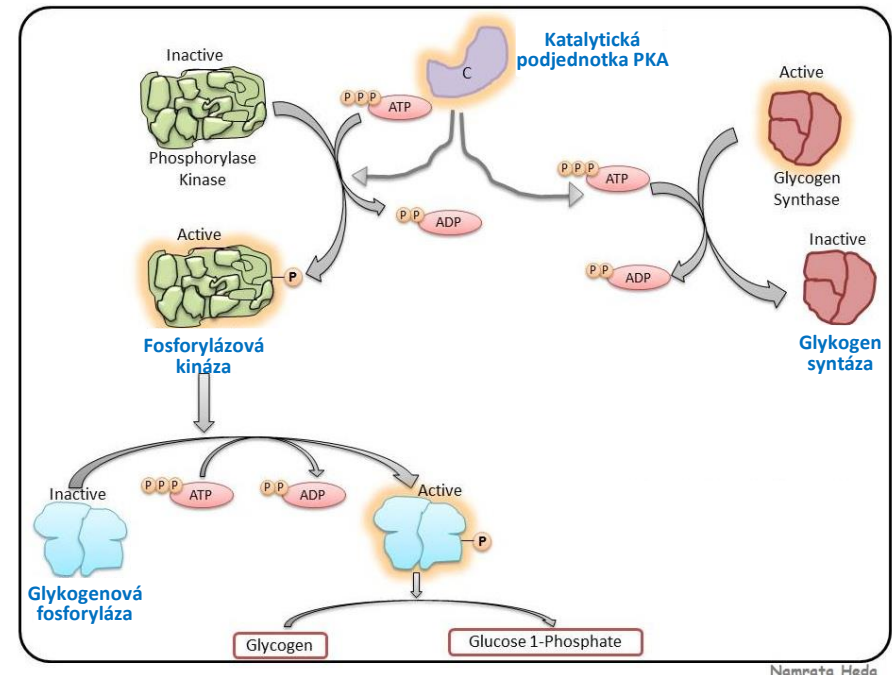
Cyklický adenosinmonofosfát (cAMP)

- objeven při studiu metabolismu glykogenu
- glykogen - zásobárna glukózy
- při stresu se do krve produkuje adrenalin, který stimuluje svalové a jaterní buňky k uvolnění a štěpení glykogenu



Mechanismus

- vazba adrenalinu na β -adrenergní receptory svalových buněk
- aktivace G-proteinu \rightarrow aktivace adenylátcyklázy \rightarrow zvýšení hladiny cAMP \rightarrow aktivace PKA
- fosforylace/aktivace fosforylázové kinázy
- fosforylace/aktivace glykogenové fosforylázy
- štěpení glykogenu na glukóza-1-fosfát, která je po defosforylaci uvolněna do krve
- PKA zároveň fosforyluje/inaktivuje glykogen syntázu



Namrata Heda

Signalizace přes inzulínový receptor

Inzulín - heterodimer, B buňky Langerhansových ostrůvků slinivky břišní

- snižuje hladinu glukózy v krvi, podporuje její využití buňkami a přeměnu na glykogen

Inzulínový receptor - IR, tyrosinproteinkinázový receptor, heterotetramer

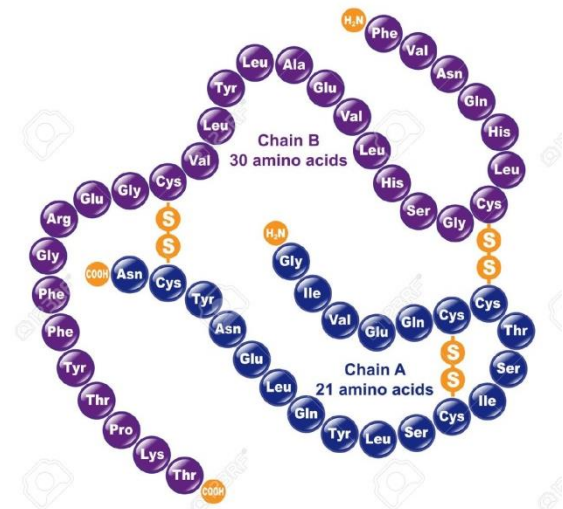
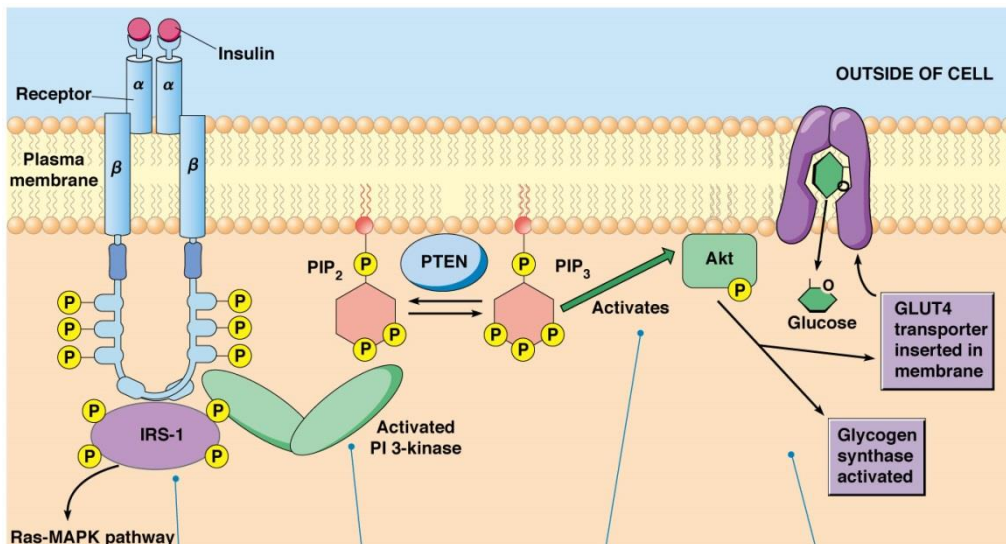
Signální dráha

• vazba inzulínu → autofosforylace/aktivace IR → fosforylace/aktivace IRS-1

• na IRS-1 se přes SH2 domény váží

i) Grb2-Sos → Ras-Raf-MAPK dráha

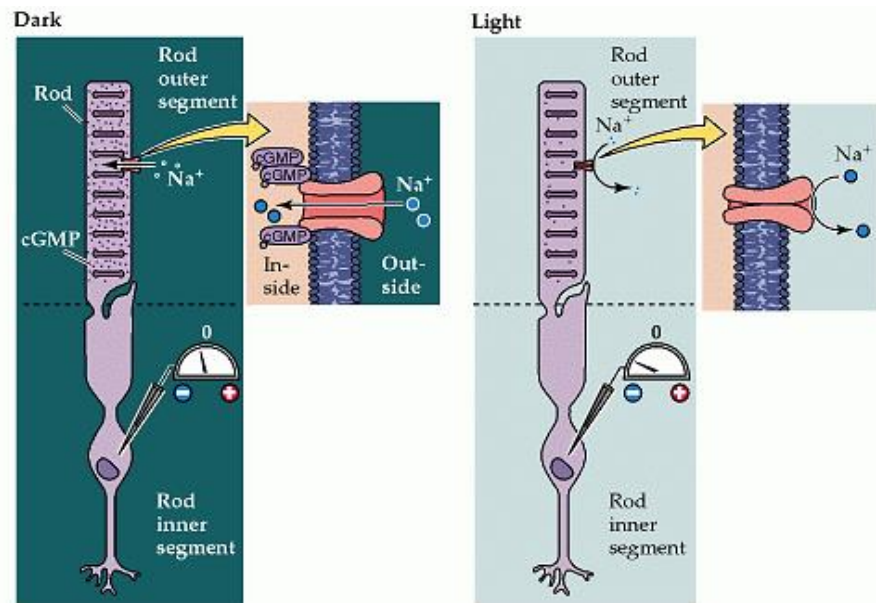
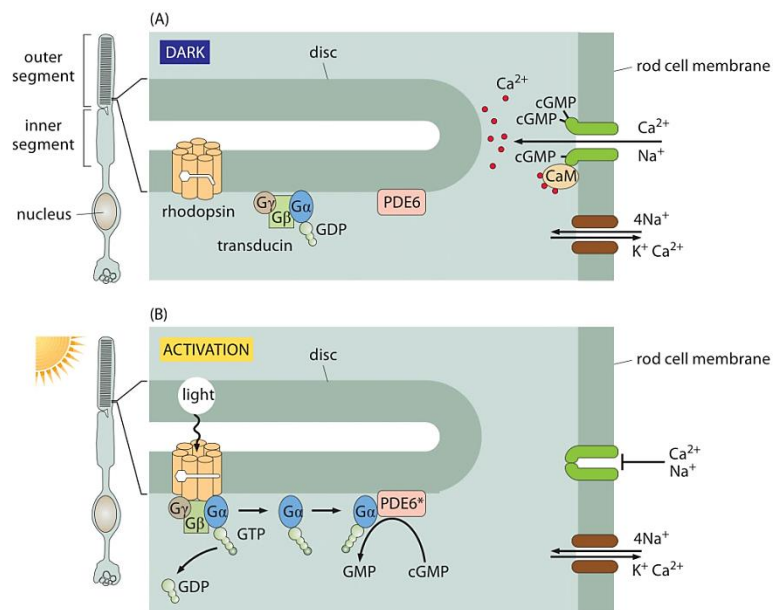
ii) PI(3)K → tvorba PIP₃ → aktivace Akt - translokace glukózového transportéru GLUT4 k membráně
- aktivace glykogen syntázy



Nitrobuněčné signální dráhy

Cyklický guanosinmonofosfát (cGMP)

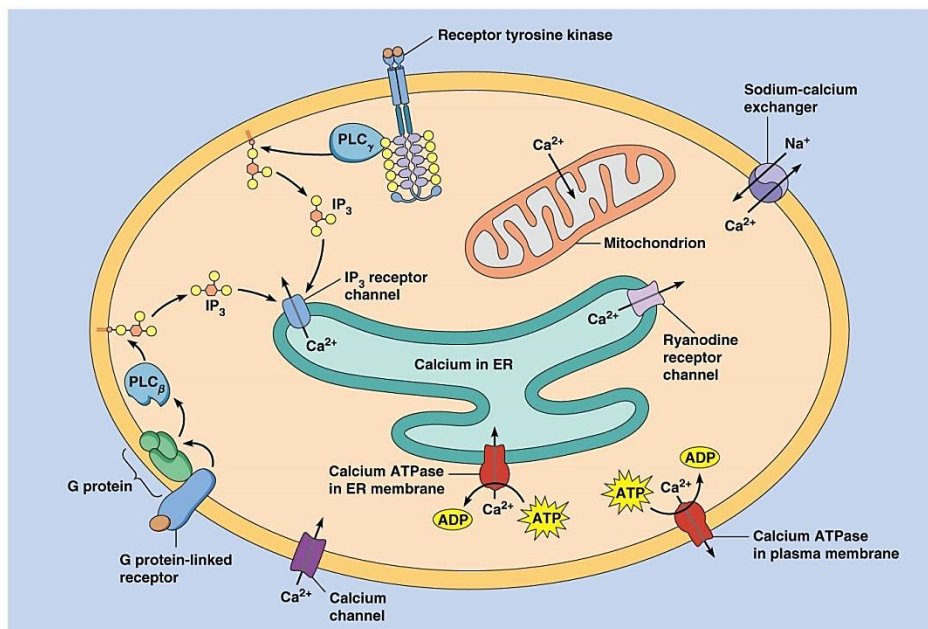
- koncentrace závislá na aktivitě guanylátcyklázy a cGMP fosfodiesterázy
- aktivuje PKG - stimulace iontových kanálů (Ca^{2+} , Na^+)
 - uvolnění hladké svaloviny, dilatace tepen, sekrece Na^+ a vody v trávicí soustavě
- mění propustnost iontových kanálů v tyčinkách oční sítnice
 - tma: guanylátcykláza tvoří cGMP, iontové kanály otevřeny
 - světlo: absorpce fotonu \rightarrow aktivace rodopsinu \rightarrow aktivace G-proteinu \rightarrow aktivace fosfodiesterázy \rightarrow hydrolýza cGMP \rightarrow zavření iontových kanálů \rightarrow hyperpolarizace membrány \rightarrow vizuální signál



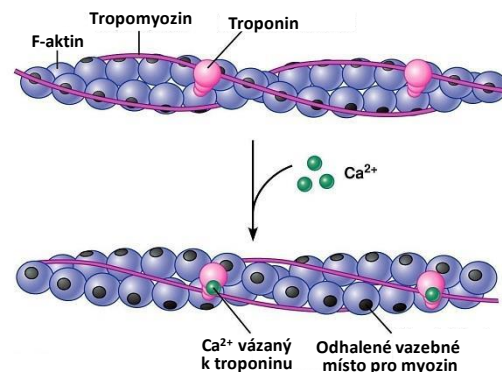
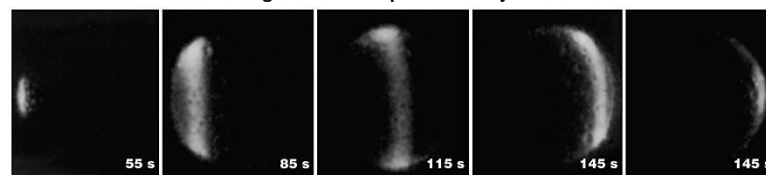
Nitrobuněčné signální dráhy

Dráha Ca^{2+}

- rozdílná koncentrace v cytoplasmě (10^{-7} M) a mimobuněčné tekutině (10^{-3} M)
- buňka jej nepřijímá, aktivně vyčerpává, váže do organel
- zvýšení koncentrace v cytoplasmě
 1. depolarizace membrán akčním potenciálem
 2. fosfolipáza C štěpí PIP_2 , vzniklý $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ otvírá Ca^{2+} kanál endoplazmatického retikula
- cílové proteiny - troponin C v buňkách kosterního svalstva (svalová kontrakce), kalmodulin



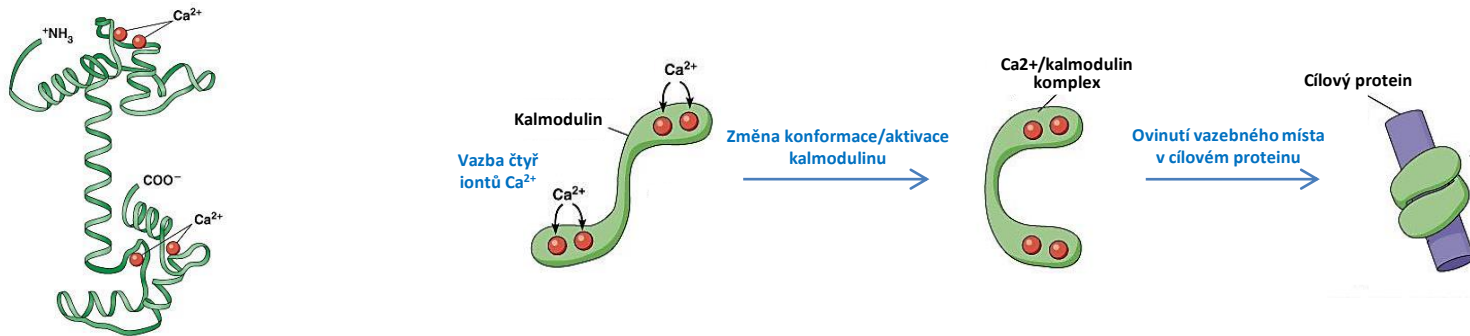
Ca^{2+} signální vlna v oplozeném vajíčku



Nitrobuněčné signální dráhy

Kalmodulin

- globulární domény (vazba Ca^{2+}) spojené flexibilní oblastí (vazba k různým substrátům)
- vazba čtyř iontů Ca^{2+} mění jeho konformaci, vyšší afinita k proteinům, které mění svoji aktivitu
- úloha v metabolismu (aktivace fosforylázové kinázy), kontrakci hladké svaloviny (aktivace MLCK), expresi genů (CREB), sekreci neurotransmiterů, zánětu, pohybu buněk, apoptóze



Interakce cAMP a Ca^{2+} drah

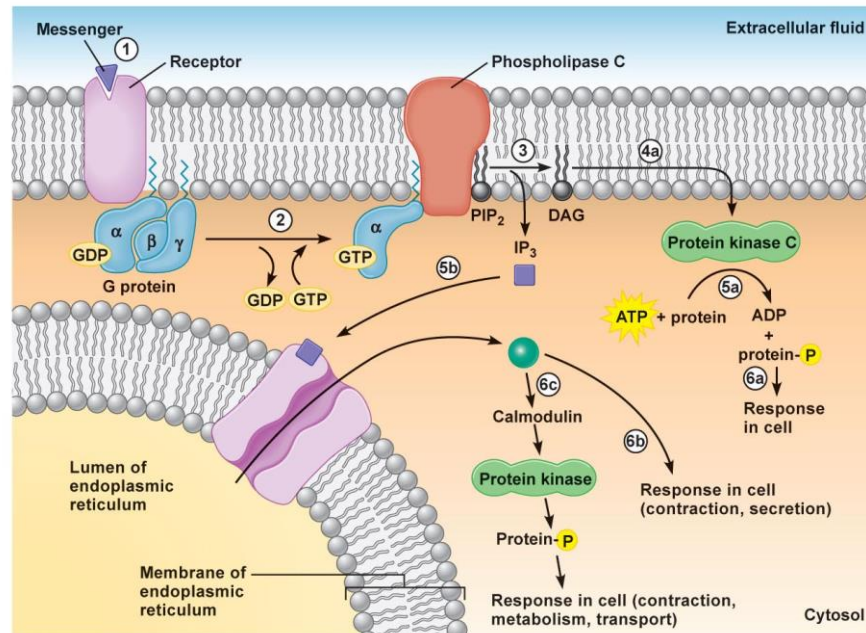
- komplex Ca^{2+} /kalmodulin může vázat a regulovat aktivitu adenylátcyklázy a fosfodiesterázy
- PKA může fosforylovat některé kanály určující obsah Ca^{2+} v cytosolu
- CaMKII může být fosforylována PKA
- PKA a CaMKII často fosforylují aminokyseliny stejného proteinu (např. CREB)

Nitrobuněčné signální dráhy

Dráha inositolových fosfolipidů



- PLC β aktivována G-proteinem z rodiny G α_q
- PLC γ aktivována po vazbě na tyrosinproteinkinázový receptor (SH2 doména)
- Ins(1,4,5)P₃ uvolňuje Ca²⁺ z buněčných zásob
- DAG aktivuje PKC, PI3K



Oxid dusnatý při vazodilataci - mechanismus účinku

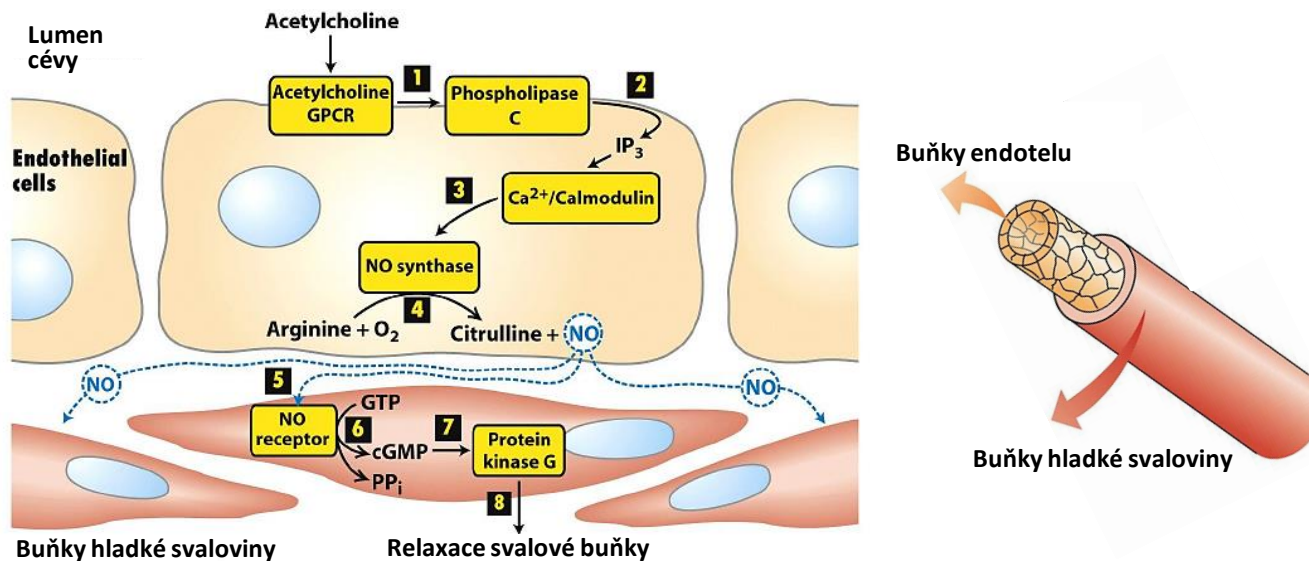
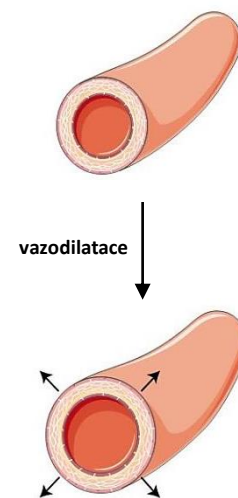
Nervová zakončení signalizující uvolnění hladké svaloviny uvolňují acetylcholin

Buňky endotelu

- vazba acetylcholinu na receptor vázaný na G-protein, aktivace $G\alpha_q$
- aktivace $PLC\beta$, produkce $Ins(1,4,5)P_3$
- uvolnění Ca^{2+} z endoplazmatického retikula, tvorba komplexu Ca^{2+} /kalmodulin
- aktivace NO syntázy, produkce NO, který difunduje k buňkám hladké svaloviny

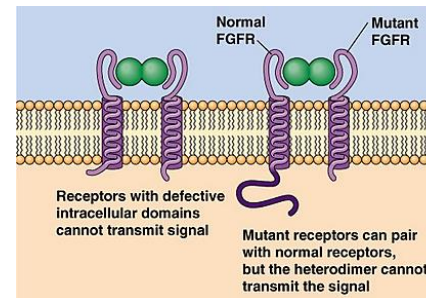
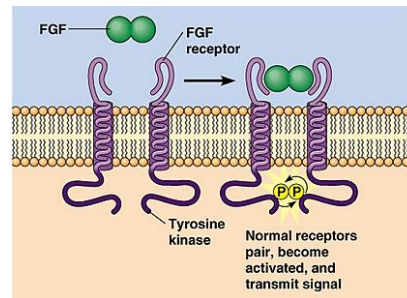
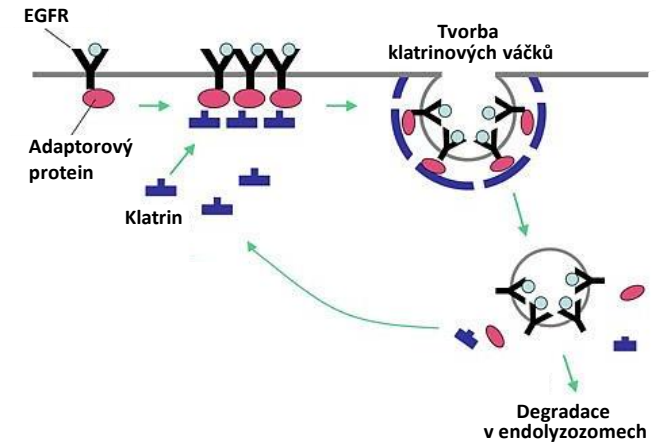
Buňky hladké svaloviny

- vstup NO membránou, aktivace rozpustné guanylátcyklázy, produkce cGMP
- aktivace PKG, fosforylace řady svalových proteinů, relaxace svalové buňky



Utlumení signálních drah

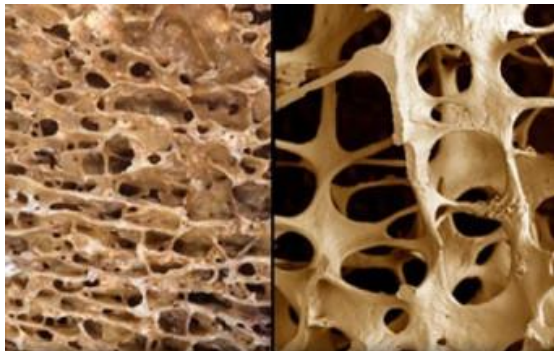
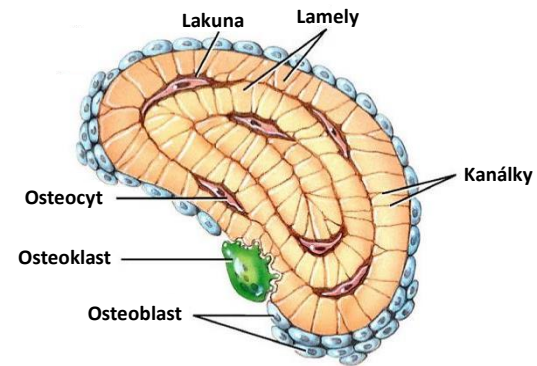
- snížení hladiny hormonů, defosforylace složek signálních drah, degradace sekundárních přenašečů
- nitrobuněčné negativní regulátory (SOCS)
- odstranění receptorů z povrchu buňky endocytózou
 - př. pohlcení EGFR do klatrinových váčků, degradace v lysozomu
- přítomnost mutantních složek signálních drah
 - př. dominantně negativní mutace receptoru pro FGF



- sekrece proteinů, které vychytávají hormony
 - př. kontrola resorpce kostí

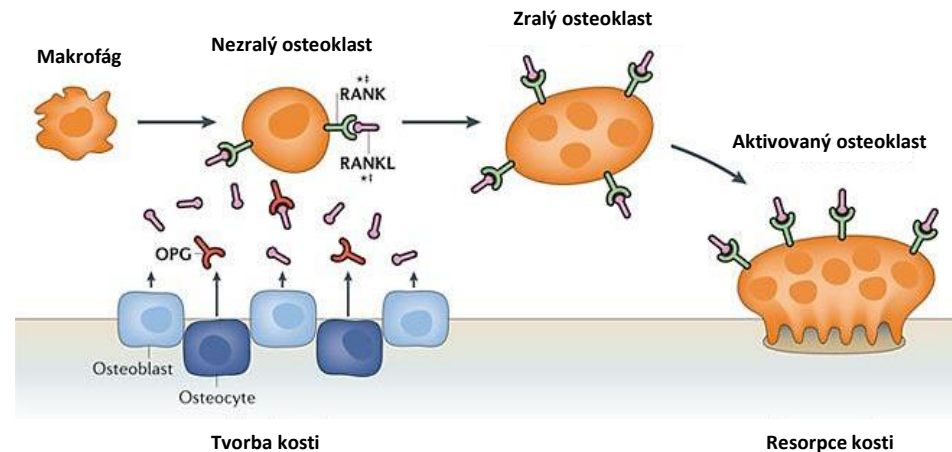
Tvorba kostí u savců

- osteoklasty: odbourávání kostní hmoty, receptor RANK
- osteoblasty: tvorba mezibuněčné hmoty
produkce ligandu RANKL a osteoprotegerinu (OPG)
- osteocyty: klidová forma osteoblastu
- vazba RANKL na RANK aktivuje diferenciaci osteoklastů, resorpci kostí
- útlum resorpce kosti přes sekreci OPG, který brání vazbě RANKL na RANK
- poruchy tvorby kostí u člověka
 - i) osteoporóza: přílišná resorpce kosti, nedostatečná denzita kostní tkáně, zvýšená křehkost kostí
 - ii) osteopetróza: abnormálně nízká resorpce kosti, zvýšená denzita kostní tkáně
lámání kostí, poškození kostní dřeně



Normální stav

Osteoporóza



Zvídavé otázky

Buňka dokáže rychle odpovědět na extracelulární signál pokud:

- A. buňka nevyžaduje receptor pro signální molekulu
- B. odpověď nevyžaduje, aby se změnily proteiny v cílové buňce
- C. odpověď nevyžaduje, aby se spustila exprese genů či syntéza proteinů

Co potřebuje cílová buňka, aby mohla odpovědět na extracelulární signální molekulu?

- A. přístup k signální molekule
- B. přítomnost odpovídajícího receptoru
- C. odpovídající intracelulární signální dráhu
- D. vše z uvedeného

Po vazbě ligandu se tyrosinproteinkinázové receptory aktivují dimerizací, což umožňuje:

- A. každý polypeptidový řetězec dimeru fosforyluje sám sebe na tyrosinu cytoplazmatické domény
- B. každý polypeptidový řetězec dimeru fosforyluje druhý řetězec na tyrosinu cytoplazmatické domény
- C. internalizaci receptoru, což umožní fosforylaci a aktivaci různých intracelulárních signálních proteinů

Jaká je funkce diacylglycerolu (DAG) v dráze inositolových fosfolipidů?

- A. Aktivuje fosfolipázu C (PLC)
- B. Sám o sobě váže a aktivuje proteinkinázu C (PKC)
- C. Spolu s Ca^{2+} váže PKC z cytosolu k plazmatické membráně a aktivuje ji
- D. Váže se k Ca^{2+} kanálům, otevírá je a umožňuje extracelulárními Ca^{2+} dostat se do buňky

Mutantní Ras protein, který se často vyskytuje u nádorů, nemůže hydrolyzovat GTP na GDP a proto:

- A. se nemůže zapnout
- B. se nemůže vypnout
- C. nemůže být degradován
- D. je schopný přímo aktivovat MAPK dráhu

Zvídavé otázky

Každý extracelulární signál indukuje podobnou odpověď v rozdílných cílových buňkách (ANO / NE)

Jaká je funkce inositol-1,4,5-trisfosfátu (Ins(1,4,5)P₃) v dráze inositolových fosfolipidů?

- A. vytváří díry do membrány endoplazmatického retikula (ER), čímž vypouští Ca²⁺ z ER do cytoplazmy
- B. váže se k Ca²⁺ kanálům v membráně ER, čímž je otevírá a vypouští Ca²⁺ z ER do cytoplazmy
- C. Přímo aktivuje proteinkinázu C (PKC)
- D. Aktivuje fosfolipázu C (PLC)

Když je adenylát cykláza aktivována přes receptor vázaný na G-protein, tak:

- A. mění AMP na cAMP
- B. mění ADP na cAMP
- C. mění ATP na cAMP
- D. mění cAMP na AMP

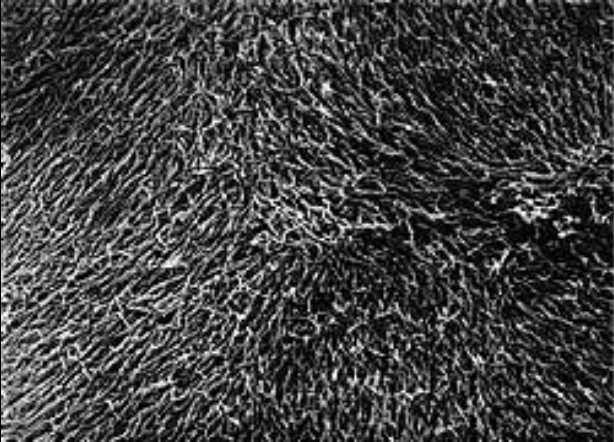
Protein Ras je aktivován Ras-aktivačním proteinem, který:

- A. způsobuje vazbu Ras ke G-proteinu
- B. fosforyluje Ras
- C. defosforyluje Ras
- D. vyvolává u Ras výměnu GDP za GTP

Paralelní intracelulární signální dráhy mohou interagovat mimojiné proto, že proteinkinázy z jedné dráhy mohou fosforylovat a regulovat proteiny z jiných drah (ANO / NE)

Která z následujících molekul není malou intracelulární signální molekulou (sekundárním přenašečem)?

- A. cAMP
- B. Fosfolipáza C
- C. Inositol-1,4,5-trisfosfát
- D. Diacylglycerol



Molekulární biologie pro informatiky - 9

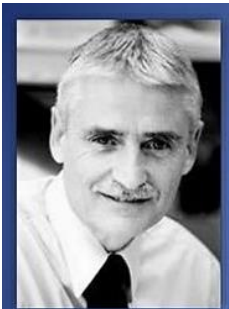
Regulace buněčného cyklu

Historie objevů buněčného cyklu



**„When a cell arises, there must be a previous cell,
just as animals can only arise from animals and plant from plants.“**

Rudolph Virchow, 1858



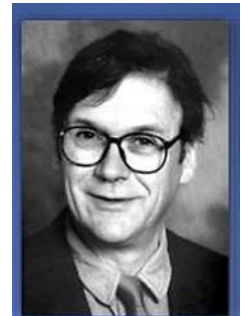
Leland H. Hartwell

2001 - Nobelova cena za objevy v oblasti buněčného cyklu

Leland Hartwell - specifické geny řídící buněčný cyklus
- pojem kontrolní body buněčného cyklu

Paul Nurse - cyklin-depenentní kinázy
- evoluční konzervativnost

Timothy Hunt - cykliny
- degradace během buněčného cyklu



Tim Hunt

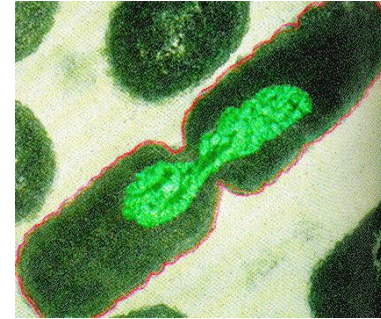


Sir Paul M. Nurse

Dělení buněk

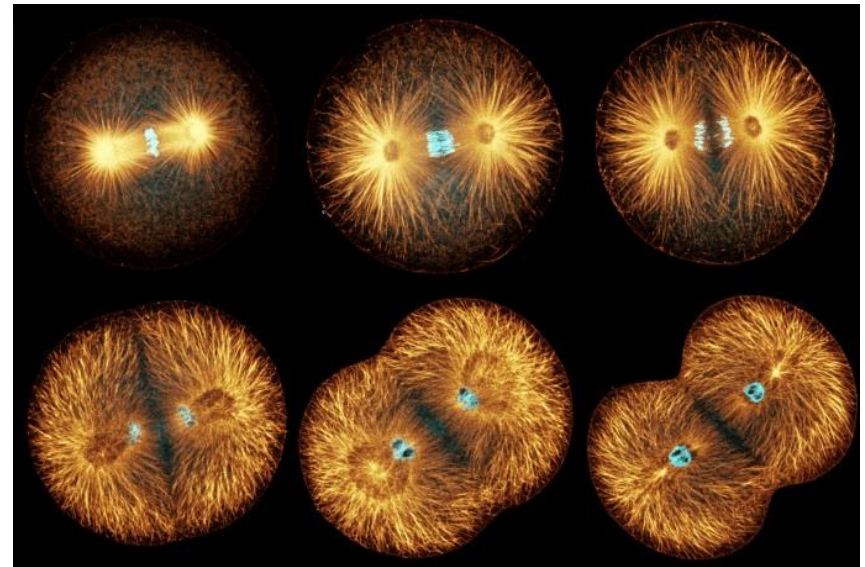
Prokaryota

- příčné dělení buněk



Eukaryota

- dělení buněk nezbytné pro
 - růst organismu
 - náhradu poškozených a starých buněk
 - šíření genetické informace: mitóza, meióza
- před rozdělením se buňka musí zvětšit, zduplikovat chromozomy a přesně je rozdělit do dceřiných buněk
- koordinace procesů v rámci buněčného cyklu
- dělení buněk je přísně řízeno
- abnormální vývoj může být příčinou nádorů

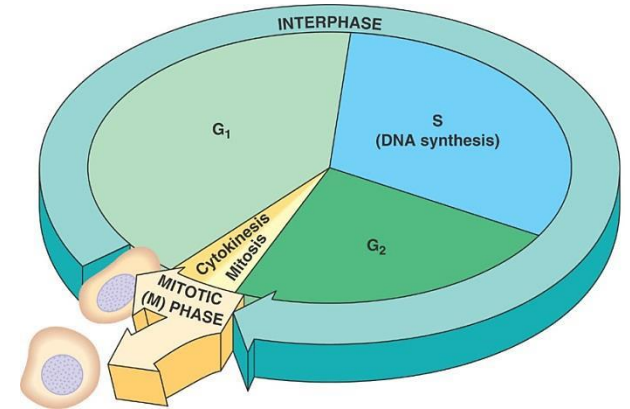


Buněčný cyklus

Interfáze

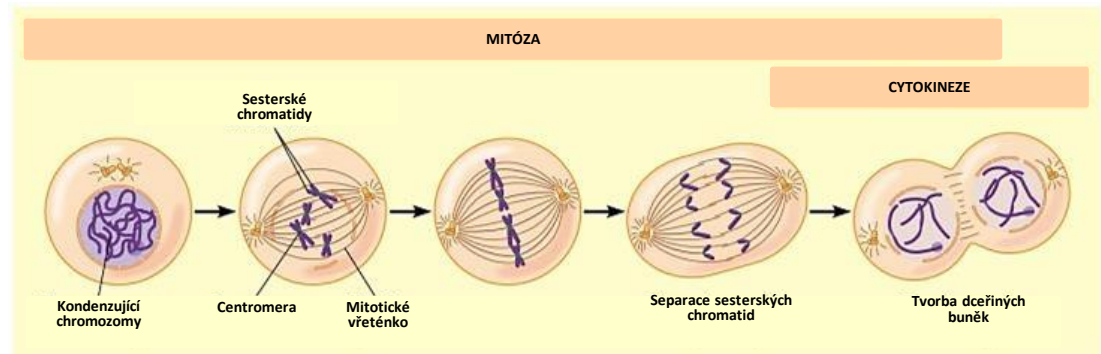
- růst buňky, duplikace organel, zvýšený metabolismus

- G₁** syntéza RNA a proteinů
příprava na syntézu DNA (replikační proteiny, histony)
- S** syntéza DNA, duplikace chromozomů
- G₂** pokračuje syntéza RNA a proteinů
příprava na M fázi (mitotické vřeténko)



M fáze

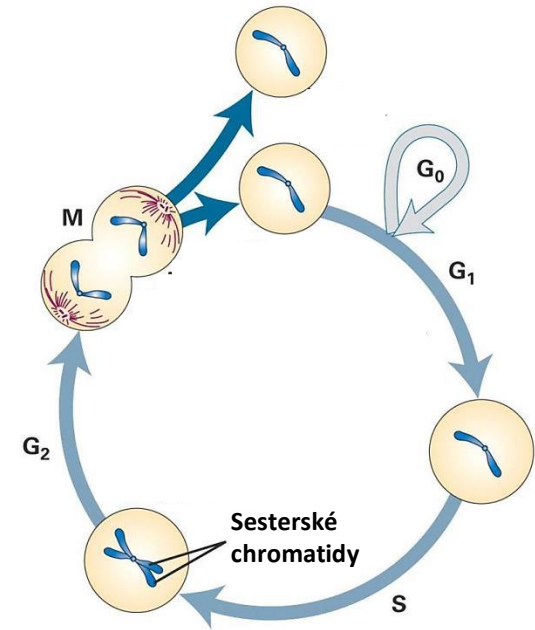
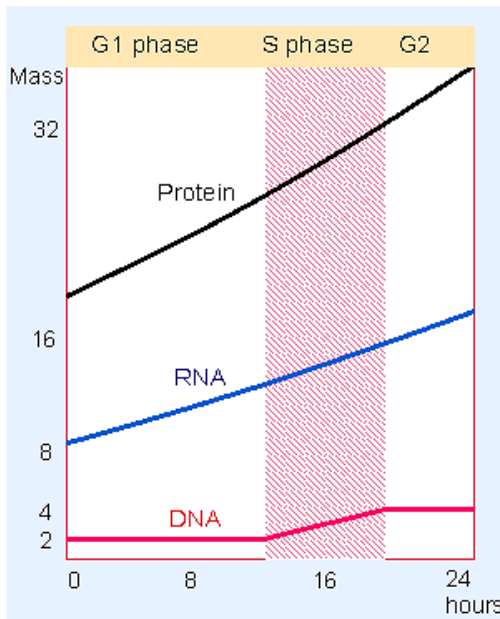
- mitóza, cytokineze
- kondenzace chromatinu
- rozpad jaderné membrány
- tvorba vřeténka a kinetochorů
- separace chromatid
- rozpad vřeténka
- dekonenzace chromatinu
- tvorba membrány, rozdělení buňky



Buněčný cyklus

Syntéza DNA během buněčného cyklu

- DNA se replikuje před vlastním rozdělením buňky
- duplikace chromozomů
- buňka v G₂ fázi má 2x vyšší obsah DNA než v G₁ fázi
- kopie chromozomů jsou spojeny v oblasti centromery
- sesterské chromatidy, které se při dělení jádra oddělují



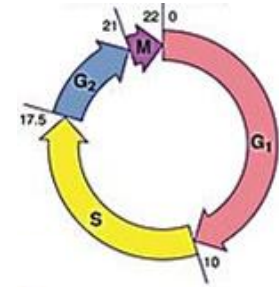
Syntéza proteinů a RNA během buněčného cyklu

- stejně rychlá během interfáze
- v M fázi klesá syntéza proteinů a zastavuje se syntéza RNA
- histony se tvoří pouze v G₁ a S fázi

Buněčný cyklus

Časové nároky buněčného cyklu

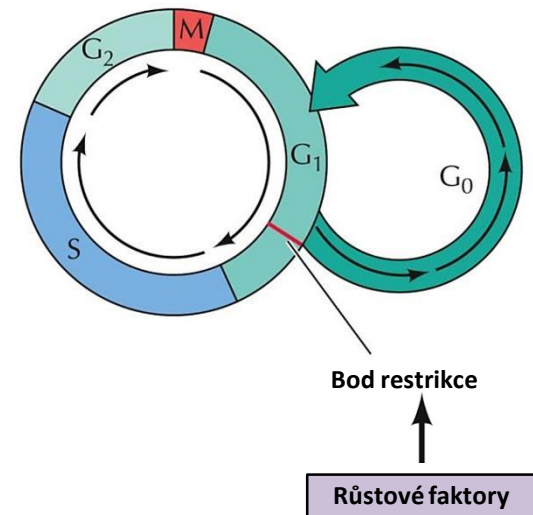
- buňky bez schopnosti se dělit (neurony, svalové b., červené krvinky)
- buňky dělící jen za určitých podmínek (jaterní buňky, lymfocyty)
- rychle se dělící buňky (epiteliální, krevní kmenové buňky)
- většinu doby zabírá interfáze
- proliferující lidská buňka má cca 22 hodinový cyklus
- kvasinky 1,5 - 3 hod, střevní epitel 12 hod, savčí fibroblasty v kultuře 20 hod, savčí játra cca 1 rok
- klidová fáze G₀



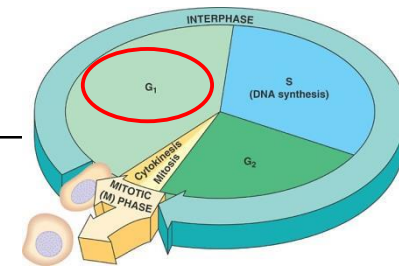
Cell cycle phase	Length (hours)
G ₁	10
S	7.5
G ₂	3.5
M	1.0
Generation time	22

Bod restrikce

- v pozdní G₁ fázi
- na přechod z G₁ do S je potřeba mimobuněčný signál
- bez tohoto signálu buňka cyklus opustí a vstoupí do G₀



G1 fáze



- první růstová fáze, dosažení původní velikosti buňky mateřské
- u raných embryí chybí fáze G1 a G2, buňka se dělí a zmenšuje
- tvorba cytoplazmy a nových organel, syntéza RNA a strukturních i regulačních proteinů
- příprava na S fázi (syntéza replikační proteiny a histony)
- v optimálních podmínkách 9 - 11 hod



2 buňky

4 buňky

5 buněk

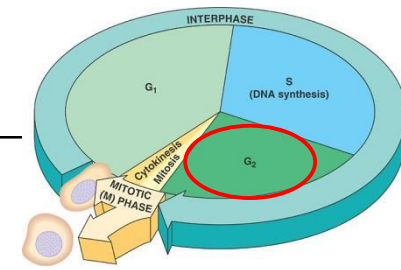
6 buněk

8 buněk

10 buněk

- u raných embryí chybí fáze G1 a G2, buňka se dělí a zmenšuje
- genetický materiál ve formě dekonzenzovaného chromatinu, 2n molekul DNA (46 u lidí)
- 1. kontrolní bod buněčného cyklu (vnější faktory)
 - i) vstup do G0 fáze: absence růstových faktorů, senescence, diferencované buňky
 - ii) vstup do S fáze: přítomnost růstových faktorů

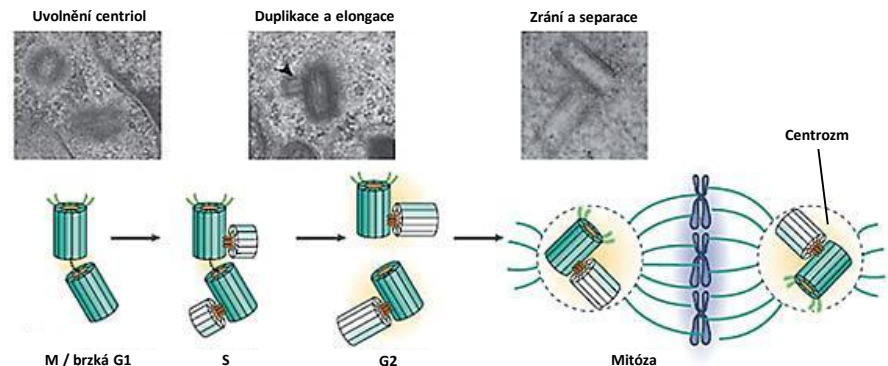
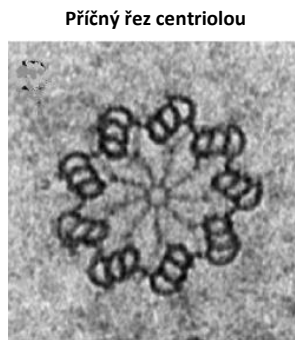
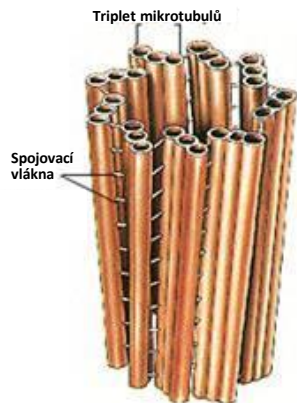
G2 fáze



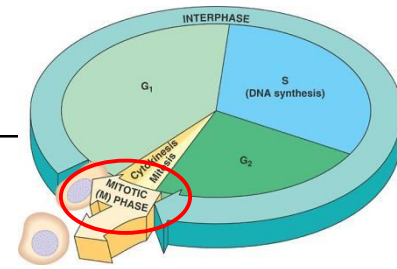
- druhá růstová fáze
- příprava na M fázi - proteiny mitotického vřeténka, duplikace centriolu
- 2 x 2n molekul DNA, dekonenzovaný chromatin
- 2. kontrolní bod buněčného cyklu (celistvost DNA, správnost replikace)

Centriola

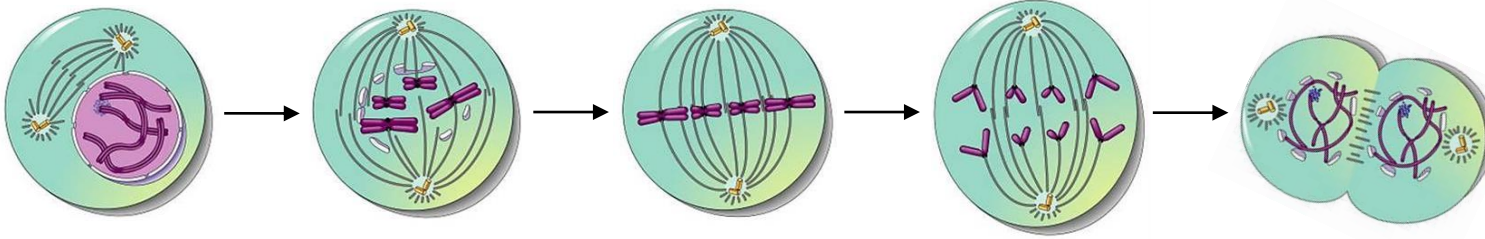
- párová organela, samostatné dělení
- devět trojic mikrotubulů, centrální dutina
- duplikace v S a G₂ fázi
- spolu se svým okolím tvoří centrosom, který organizuje mitotické vřeténko



M fáze

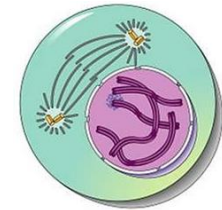
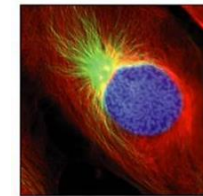


- dělení jádra (mitóza, karyokineze) a cytoplazmy (cytokineze)



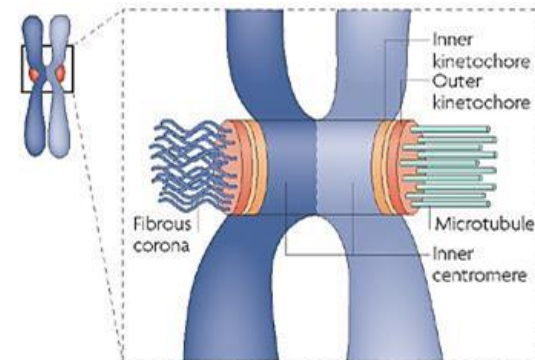
1) Profáze

- kondenzace chromozomů
- posun centrozomů na opačné strany buňky
- v centrozomech zahájena tvorba mitotického vřeténka



2) Prometafáze (pozdní profáze)

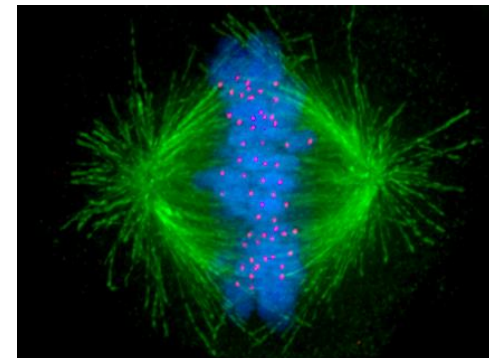
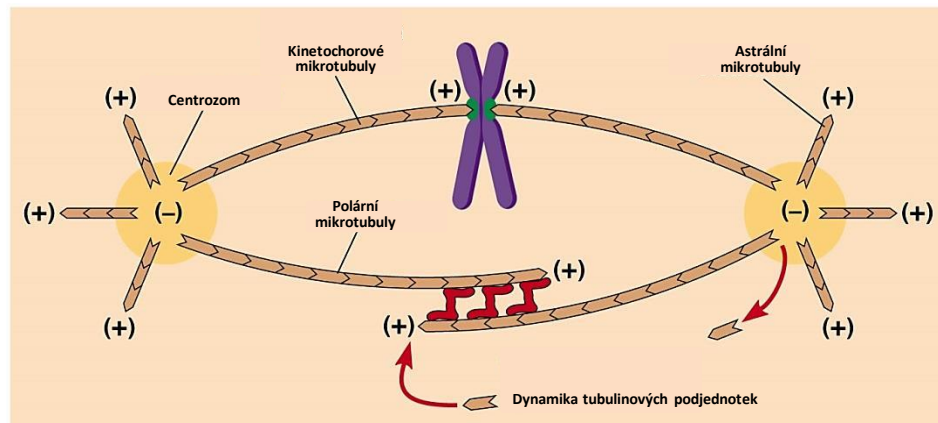
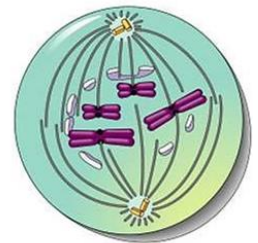
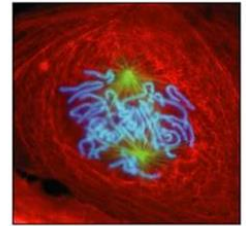
- tvorba kinetochorů (proteinový komplex)
 - vazba chromozomů na mikrotubuly vřeténka
 - vnitřní vrstva váže DNA
 - prostřední vrstva
 - vnější vrstva váže (+) konce mikrotubulů



M fáze

2) Prometafáze (pozdní profáze)

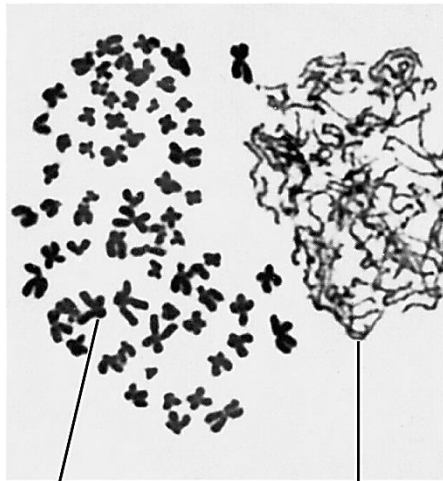
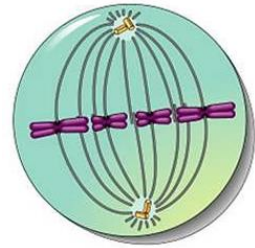
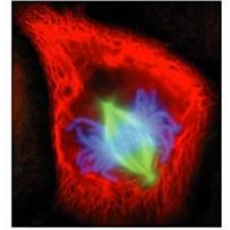
- rozpad jaderné membrány a jadérka
- ustálení centrozomů na opačných stranách buňky
- pohyb chromozómů do středu buňky
- mitotické vřeténko
 - kinetochorové mikrotubuly: připojeny ke kinetochorům
 - polární mikrotubuly: připojeny k tubulům z opačného pólu vřeténka
 - astrální mikrotubuly: připojeny k proteinům plazmatické membrány



M fáze

3) Metafáze

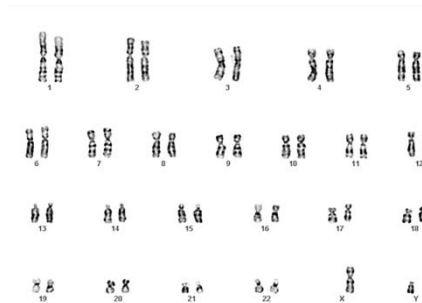
- seřazení chromozomů v ekvatoriální rovině mezi póly vřeténka (metafázní destička)
- sesterské chromatidy každého chromozomu připojeny k opačným pólům vřeténka
- karyotyp z buněk zastavených v metafázi (kolchicin)



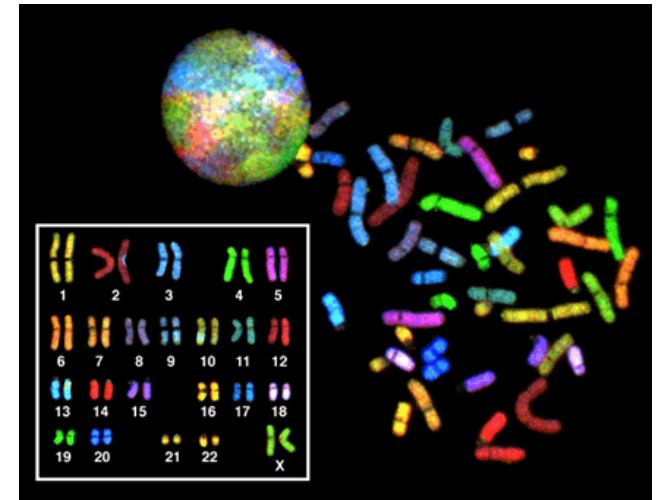
Metafázní chromozomy

G1 chromozomy

Klasický karyogram



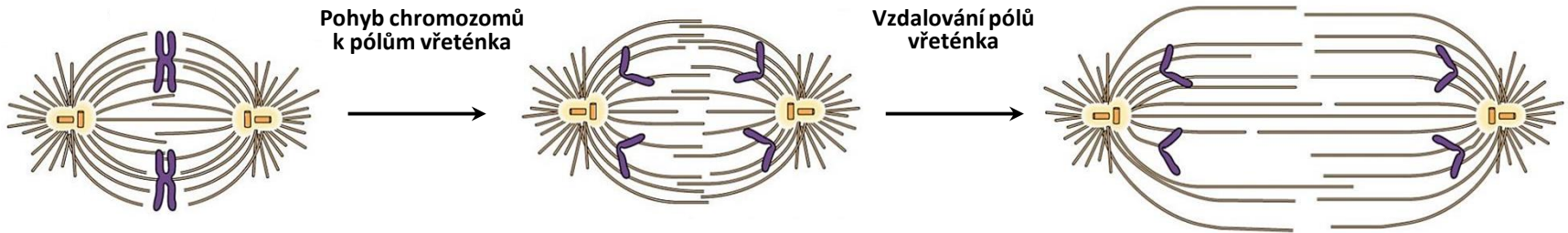
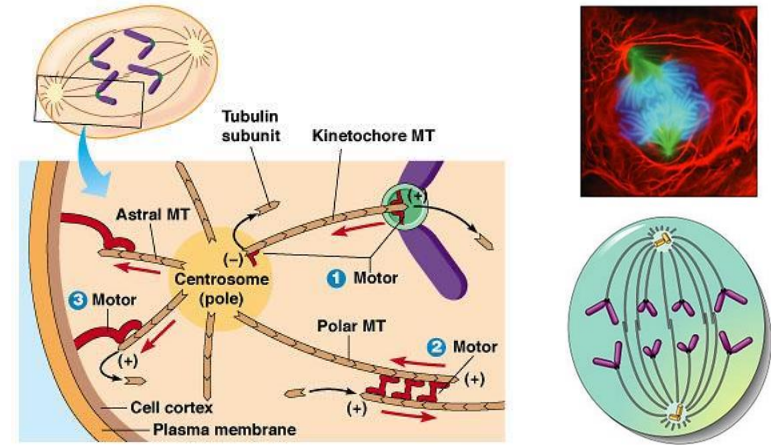
Spektrální karyogram



M fáze

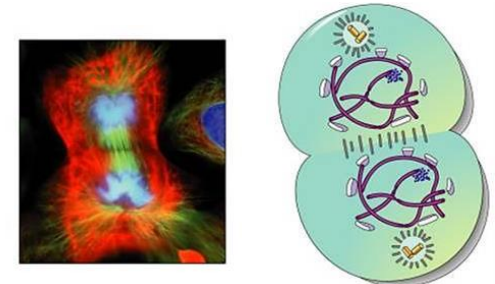
4) Anafáze

- separace sesterských chromatid
- pohyb chromatid k pólům vřeténka
- u každého pólu vřeténka shromážděna stejná sada genetické informace, základ dceřiných buněk

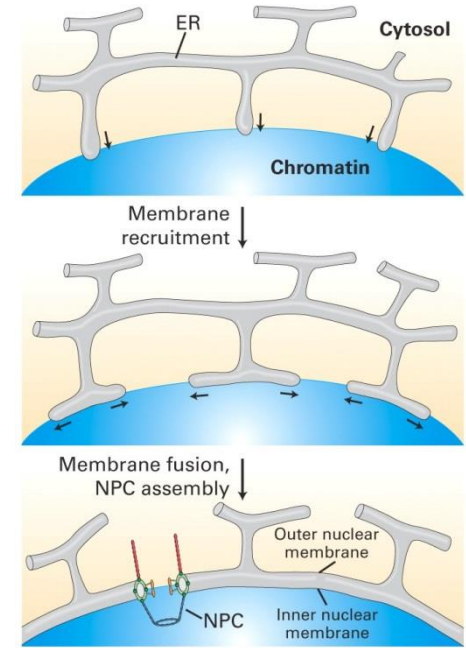
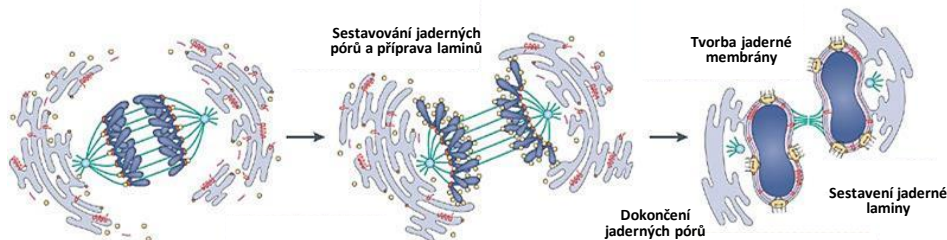
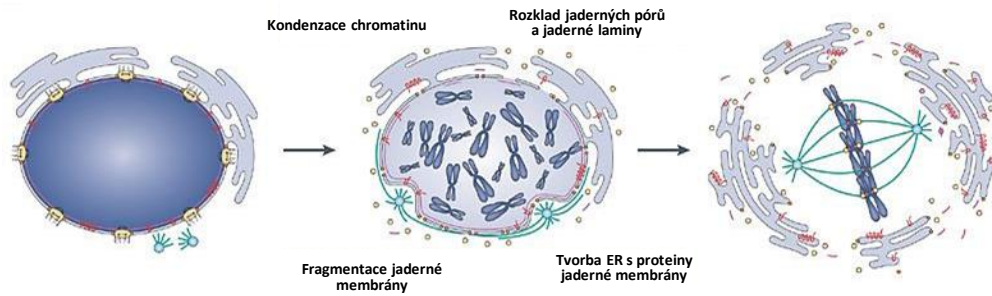


5) Telofáze

- příprava na cytokinezi
- chromozomy začínají dekonduzovat
- rozpad kinetochorů, rozpad mitotického vřeténka, tvorba jadérka
- obnova jaderné membrány

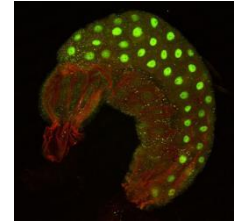


Jaderná membrána během M fáze



Cytokineze

- rozdělení cytoplazmy po rozdělení chromozomů k opačným pólům vřeténka
- vznik dvou identických dceřiných buněk
- výjimečně replikace a dělení jádra bez cytokineze (endocykly)
 - např. brzká vývojová stádia *D. melanogaster*

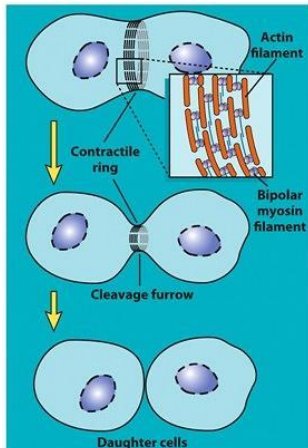


Živočišná buňka

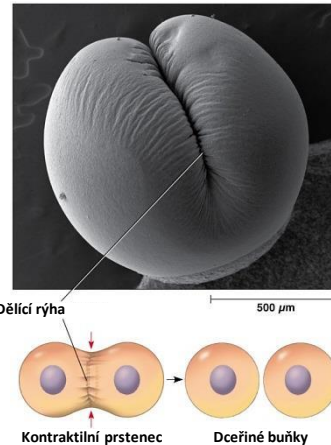
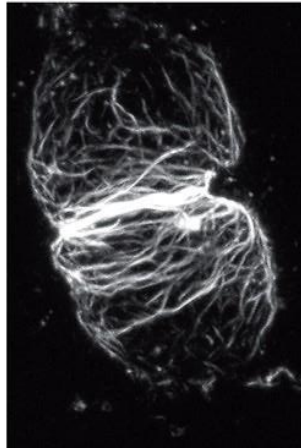
- kontraktilní prstenec z aktinových filament, dělicí rýhu

Rostlinná buňka

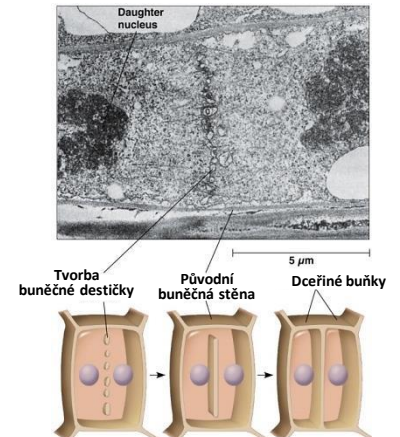
- buněčná destička mezi dceřinými buňkami



Živočišná buňka



Rostlinná buňka



Meióza

Nepohlavní rozmnožování

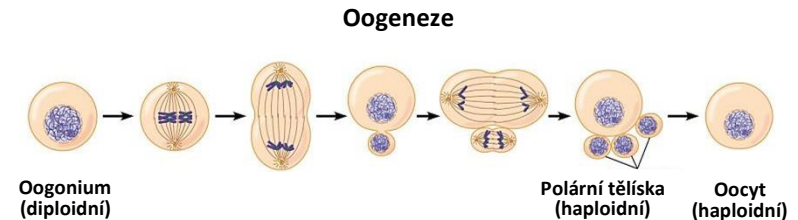
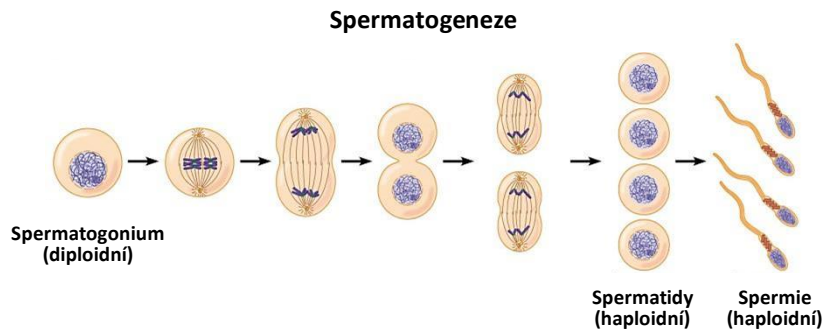
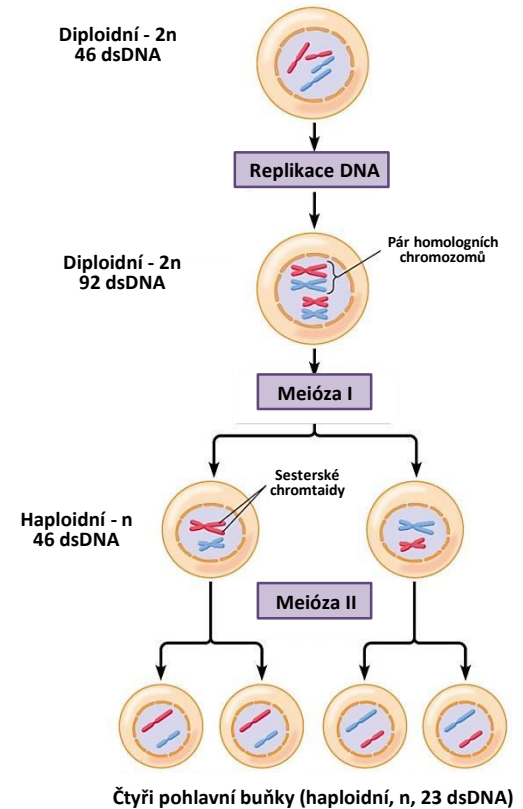
- vznik dvou identických dceřiných buněk
- např. mitóza, binární dělení

Pohlavní rozmnožování

- spojení dvou buněk za vzniku nové buňky (zygota) je odlišné od těch původních

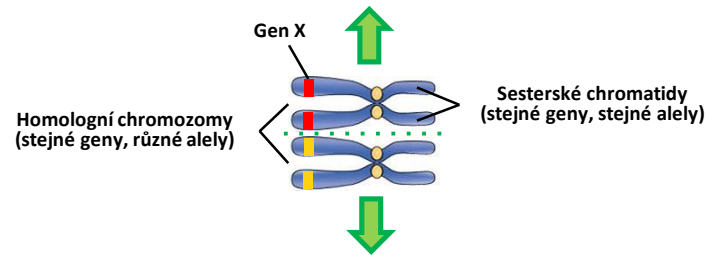
Meióza (redukční dělení)

- vznik gamet (vajíčka, spermie)
- interfáze s replikací chromozómů, dvě meiotická dělení
- původní buňka je diploidní ($2n$), vznik čtyř haploidních (n) buněk



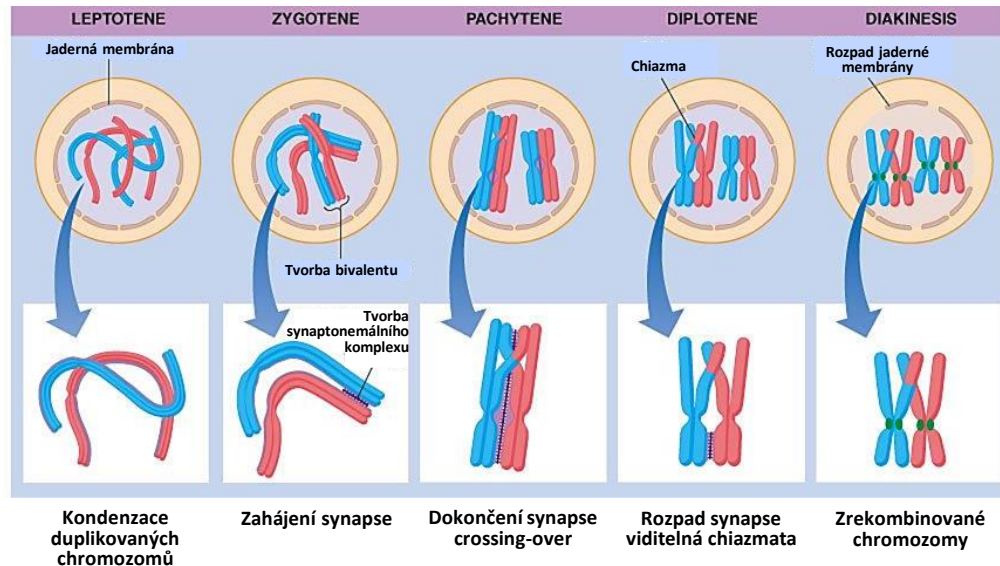
Meióza I - redukční dělení

- separace homologních chromozomů s různými alelami genu



Profáze I

- párování homologních chromozomů, chromozomy spojeny synapsí
- crossing-over (homologní rekombinace) - výměna částí chromozomů, zajišťuje genetickou rekombinaci u potomků
- kondenzace chromozomů, tvorba dělicího vřeténka, rozpad jaderné membrány



Meióza I - redukční dělení

Metafáze I

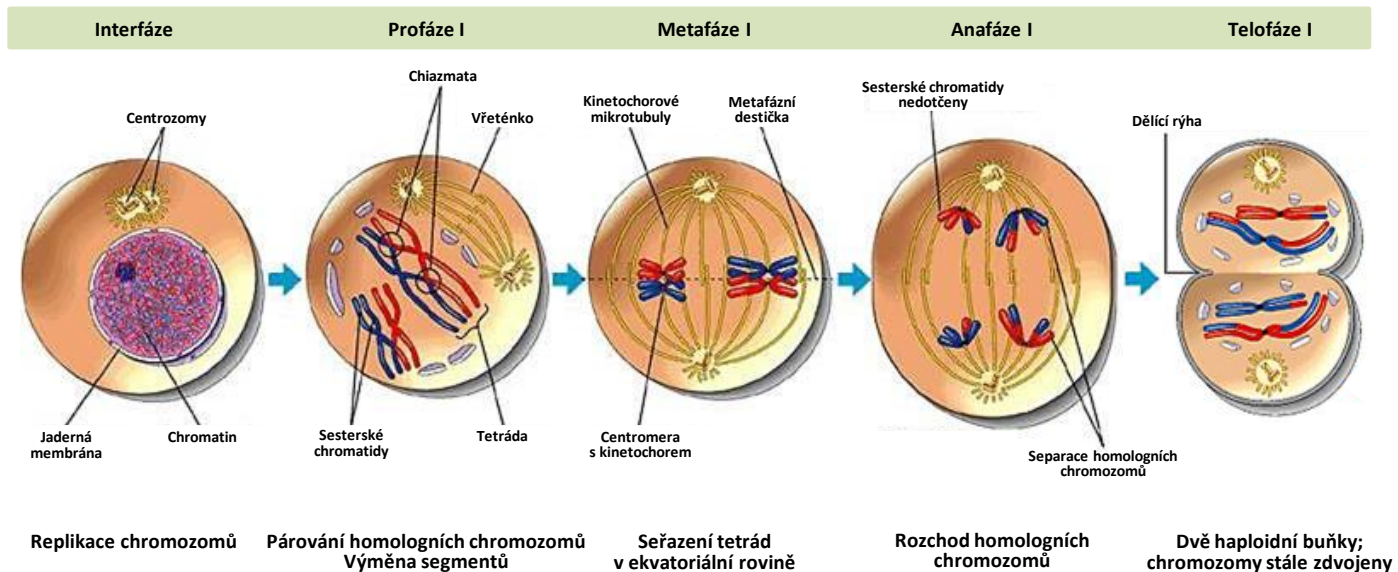
- seřazení párů homologních chromozomů v ekvatoriální rovině

Anafáze I

- separace homologních chromozomů a jejich pohyb k pólům dělicího vřeténka
- sesterské chromatidy zůstávají spojeny v oblasti centromer

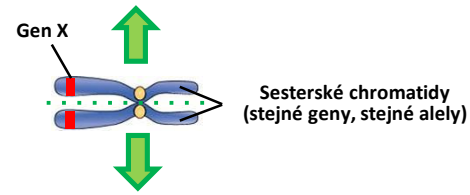
Telofáze I

- rozpad dělicího vřeténka, obnova jaderné membrány
- cytokineze dělí buňku na dvě



Meióza II - separační dělení

- separace sesterských chromatid, které obsahují stejnou genetickou informaci



Profáze II

rozpad jaderné membrány, tvorba dělicího vřeténka

Metafáze II

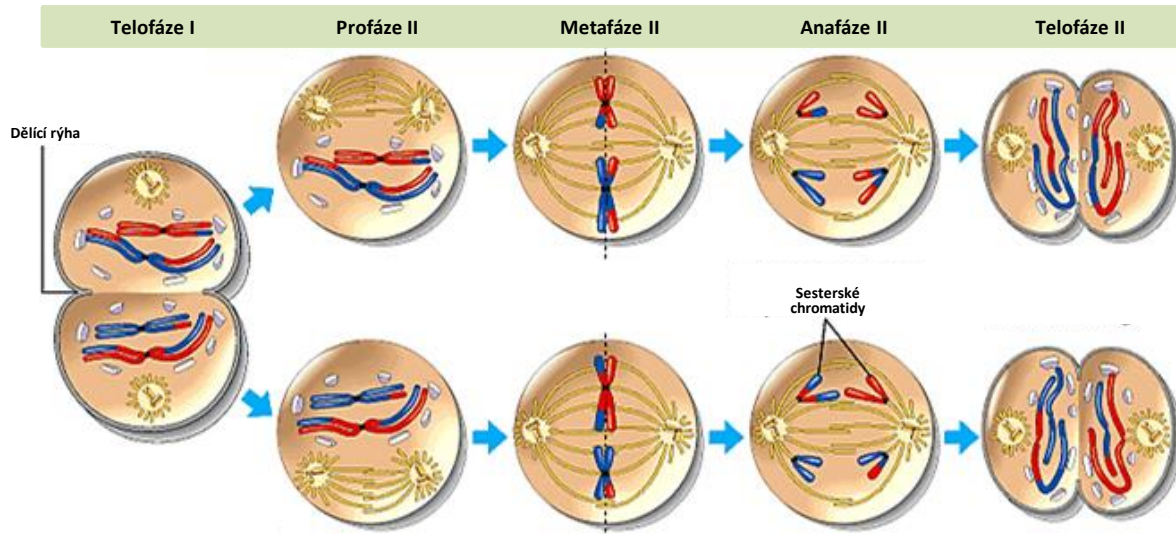
seřazení chromozomů v ekvatoriální rovině

Anafáze II

separace sesterských chromatid a jejich pohyb k opačným pólům vřeténka

Telofáze II

rozpad dělicího vřeténka, obnova jaderné membrány, cytokineze

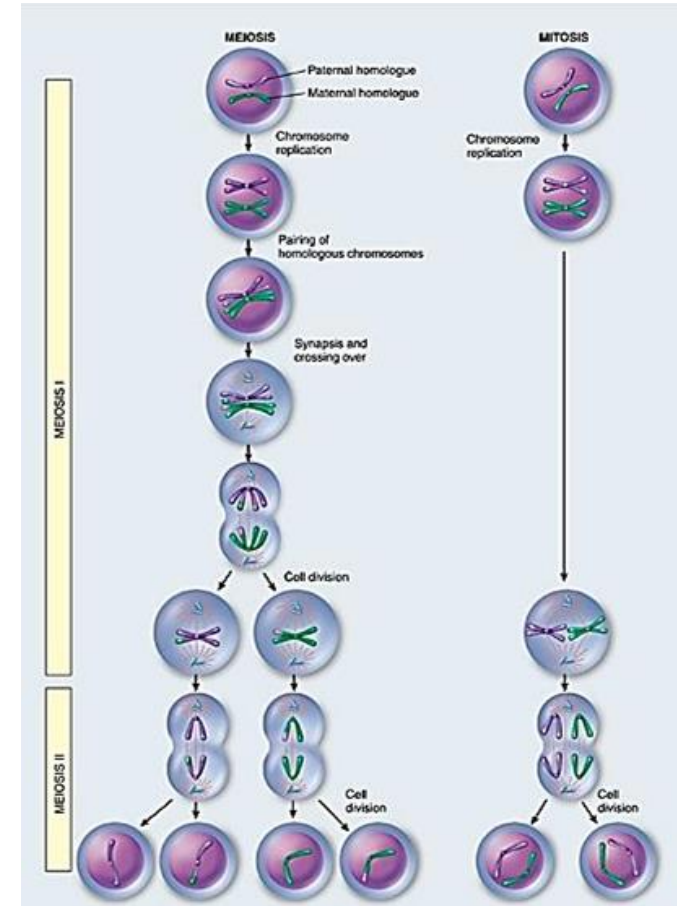


Dvě haploidní buňky;
chromozomy stále zdvojeny

Během meiózy II dochází ke konečné separaci sesterských chromatid.
Vznikají čtyři haploidní dceřiné buňky, které obsahují jednu kopii každého chromozomu.

Meióza

- čtyři haploidní buňky s jednou kopií každého chromozomu
- crossing-overem vznikají různé kombinace alel různých genů v rámci chromozomu
- meióza je základem pro pohlavní rozmnožování
- potomstvo je geneticky odlišné od svých rodičů i sourozenců
- genetická rozmanitost pochází z:
 - nezávislý výběr chromozomů během meiózy I
 - náhodné oplodnění: náhodné oplození vajíčka spermií
 - crossing-over: nové kombinace alel v rámci chromozomu



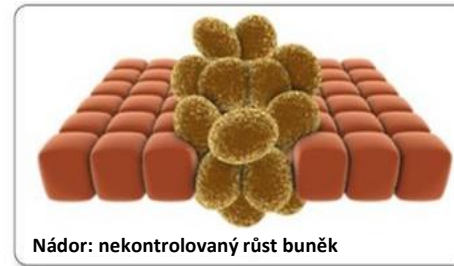
	Mitóza	Meióza
Replikace DNA	Během interfáze, před mitózou	Během interfáze, před meiózou, pouze jednou
Počet dělení	1	2
Synapse homologních chromozomů	Neprobíhá	Probíhá spolu s crossing-overem mezi nesesterskými chromatidami během profáze I.
Počet dceřiných buněk a jejich genetický obsah	Dvě diploidní (2n) dceřiné buňky, geneticky identické s rodiči.	Čtyři haploidní (n) dceřiné buňky, obsahují polovinu počtu chromozomů rodičovské buňky, geneticky odlišné od rodičů i mezi sebou.
Úloha v lidském těle	Produkce buněk pro růst a opravy organismu.	Produkce gamet které zajišťují genetickou rozmanitost při sexuálním rozmnožování.

Řízení buněčného cyklu

- při dělení reagují buňky na svoji velikost a extracelulární signály (přítomnost živin, růstových faktorů, stresových faktorů, poškození DNA)
- u savců převládá vliv růstových faktorů a mitogenů

Principy řízení buněčného cyklu

- mitóza neproběhne před koncem replikace DNA, replikace DNA neproběhne bez rozdělení buňky
- poškozená DNA se nesmí replikovat a předat do dceřiných buněk
- chybně spárované chromozomy nesmí dokončit mitózu



i) posttranslační modifikace proteinů

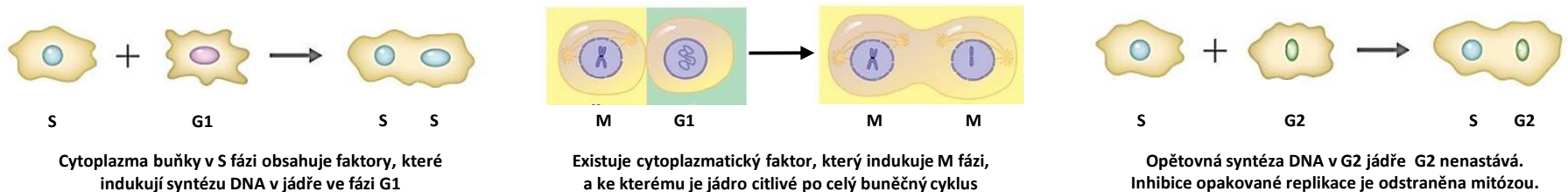
- fosforylace: reverzibilní, proteinkinázy
- proteolýza: ireverzibilní, ubikvitinem + proteazom

ii) kontrolní body buněčného cyklu

Řízení buněčného cyklu - historie

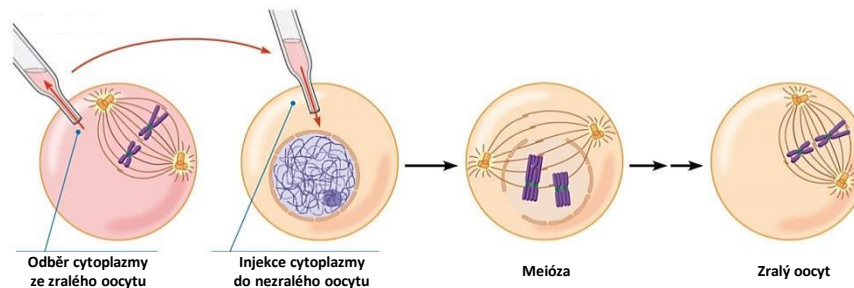
Potu Rao, Robert Johnson (1970)

- fúze buněk v různých fázích cyklu, vznik heterokaryonu
- buněčný cyklus řízen signály v cytoplasmě
- řízení cyklu ve dvou místech - G1/S přechod, G2/M přechod



Yoshio Masui, Clement Markert (1971)

- faktor MPF (mitosis-promoting factor), dimer složený z proteinkinázy (CDK) a cyklinu
- *Xenopus laevis* - modelový organismus, velké oocytům



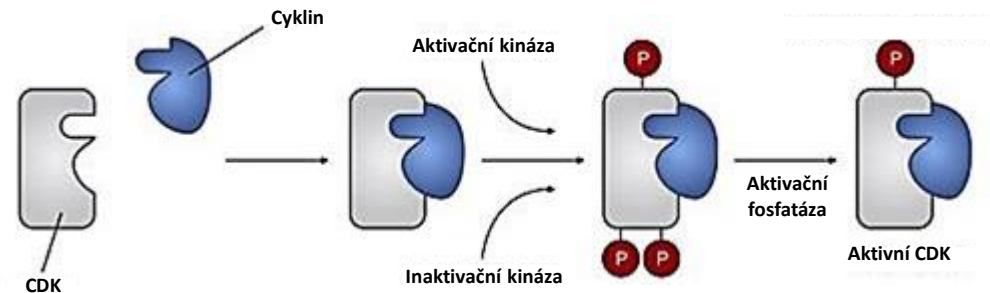
Faktory zajišťující řízení buněčného cyklu

Cyklin-dependentní-proteinkinázy (Cdk)

- fosforylace specifických proteinů
- aktivita regulována
 - i) aktivita v komplexu s cyklinem
 - ii) Tyr fosforylační místa - aktivační, inhibiční
 - fosforylace specifickými kinázami, defosforylace fosfatázami
 - iii) inhibitory

- u člověka 5 enzymů

G1	CDK4, CDK2, CDK6
S	CDK2
G2	CDK2, CDK1
M	CDK1



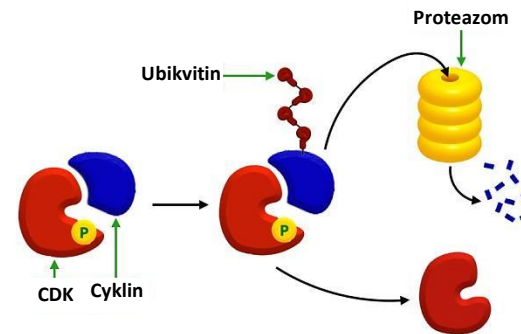
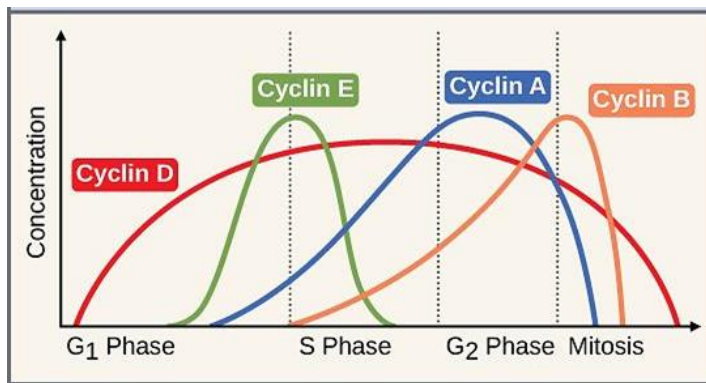
Inhibitory CDK (CKI)

- negativní regulátory průchodu BC
- váží se na CDK a tlumí jejich aktivitu, zástava buněčného cyklu v G1
- např. p21

Faktory zajišťující řízení buněčného cyklu

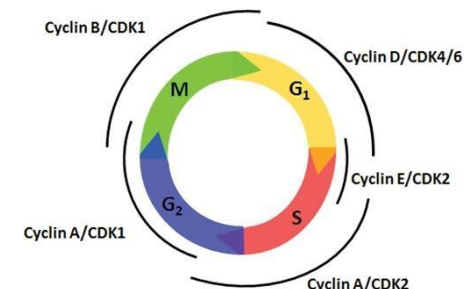
Cykliny

- komplexy s Cdk, aktivují Cdk a určují jejich substrátovou specifitu
- jejich koncentrace kolísá během fází BC - specifická syntéza / ubiquitinace a proteolýza



- u člověka 4 rodiny

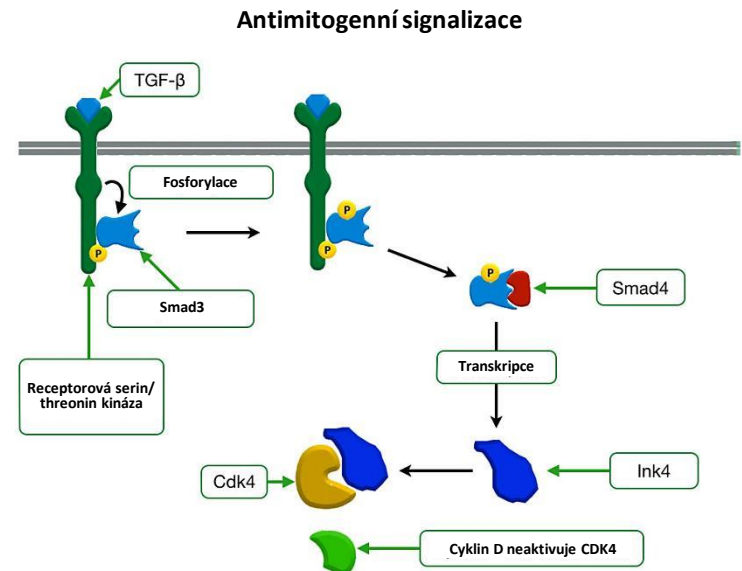
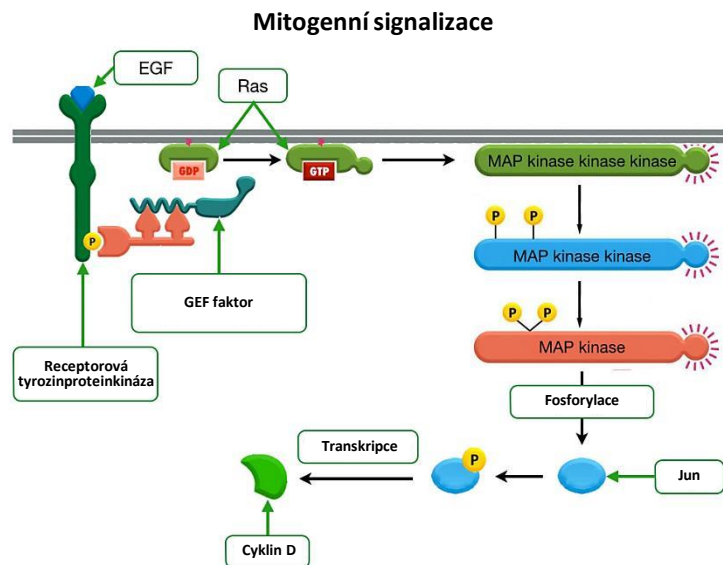
Fáze BC	Cyklin	CDK	Funkce
G1	D, E	CDK4, CDK6, CDK2	Umožňují překonat bod restrikce v pozdní G1
S	A, E	CDK2	Umožňují zahájit replikaci DNA
G2	A	CDK2, CDK1	Navádějí buňku k M fázi
M	B	CDK1	Podporují mitotické děje



Řízení buněčného cyklu - raná G1

Cyklin D - CDK4/6

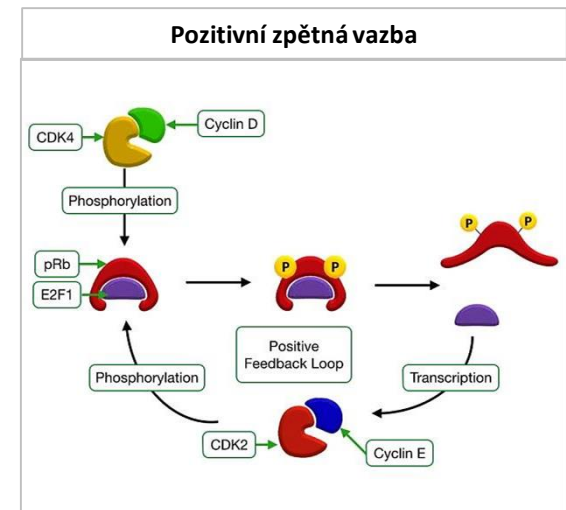
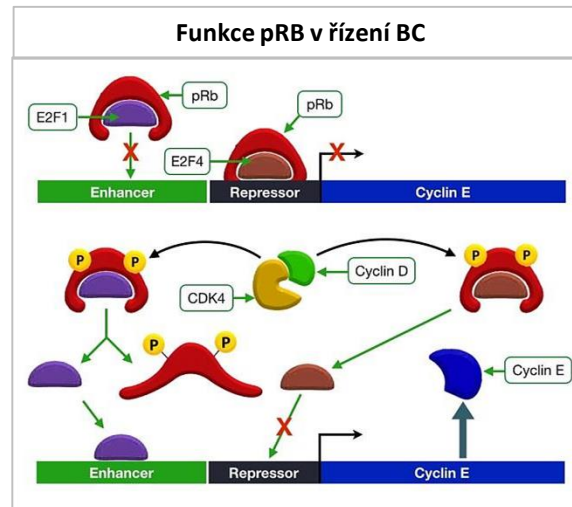
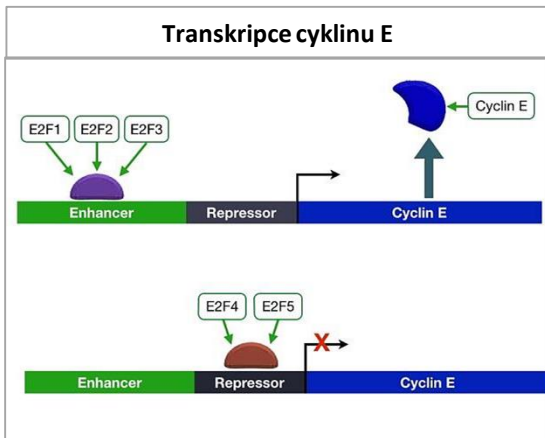
- cyklin D - senzor mitogenních signálů
- aktivace transkripčních faktorů, které zajišťují expresi replikačních proteinů a cyklinu E
- sestavení pre-replikačních komplexů v místech ori
- odpověď na mitogenní signály
př. EGF - EGFR - GEF faktor - Ras protein - MAP kinázy - transkripční faktory - exprese cyklinu D
- inhibice antimitogenními signály
př. TGF β - TGF β R - transkripční faktor Smad3, Smad4 - exprese CDK inhibitoru



Řízení buněčného cyklu - přechod G1/S

Cyklin D - CDK4/6, cyklin E - CDK2

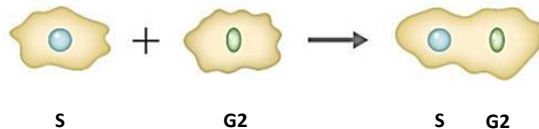
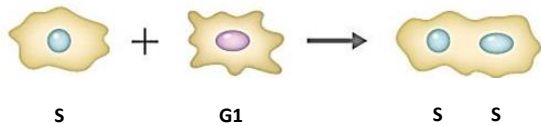
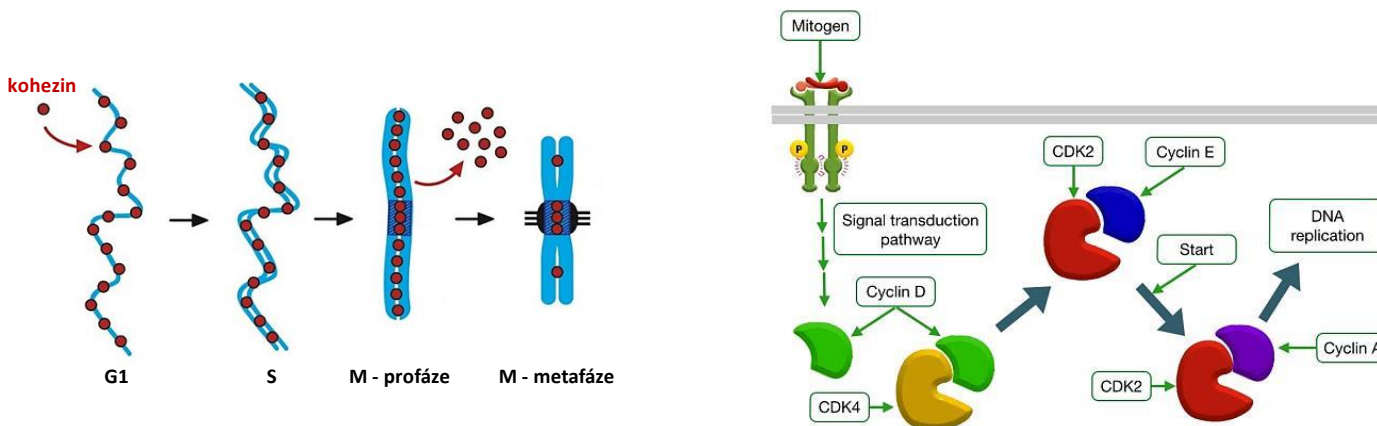
- transkripce cyklinu E řízena transkripčními faktory E2F
- Rb protein (pRb) aktivní v nefosforylované formě, inhibován fosforylací
- v G0 a G1 inhibuje pRB expresi cyklinu E
- po fosforylaci (cyklin D - CDK4/6) se pRb uvolňuje a E2F spouští expresi cyklinu E, cyklinu A a replikačních proteinů
- pozitivní zpětná vazba - cyklin E tvoří komplex s CDK2 a dokončuje fosforylaci pRb



Řízení buněčného cyklu - S fáze

Cyklin A - CDK2

- fosforylace složek pre-iniciačního komplexu
- výsledkem S fáze je vznik dvou sesterských chromatid každého chromozomu spojených molekulami kohezinu



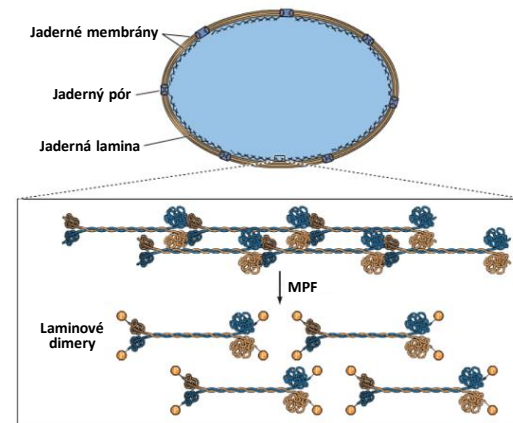
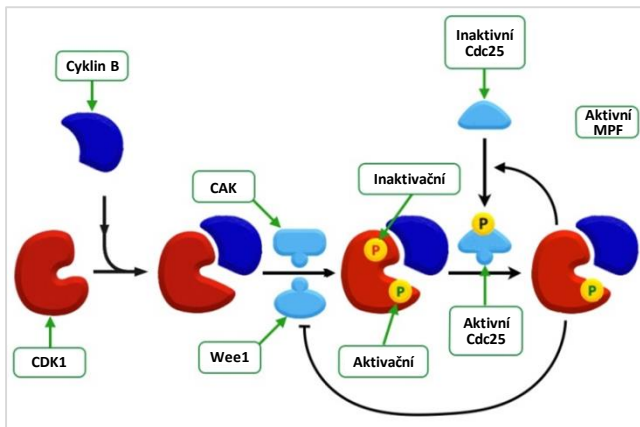
Cytoplazma buňky v S fázi obsahuje cyklin E - CDK2 a cyklin A - CDK2. Již není třeba mitogenní signál.

V jádře G2 buňky neproběhne opakovaná S fáze v důsledku absence pre-iniciačních komplexů.

Řízení buněčného cyklu - přechod G2/M

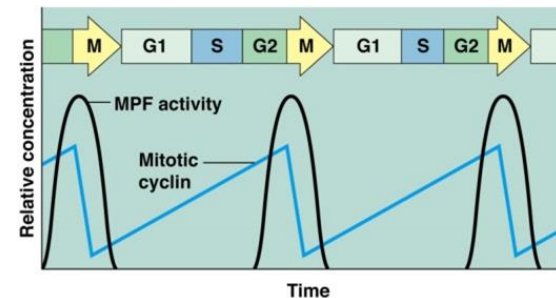
MPF (mitosis-promoting factor) = cyklin B - CDK1

- koncentrace cyklinu B roste průběžně během celé interfáze
- CDK1 - inhibiční fosforylace (Wee1) odstraněna fosfatázou (Cdc25), aktivační fosforylace (CAK)
- nárůst aktivity MPF je skokový, při maximální hladině cyklinu B a po odstranění inhibiční fosforylace



MPF fosforyluje cílové proteiny brzké fáze mitózy

- kondenzace chromatinu - aktivace kondenzinů
- rozpad jaderné membrány - depolymerace laminů
- tvorba mitotického vřeténka - aktivace centrozomů



Řízení buněčného cyklu - M fáze

APC, anaphase-promoting complex

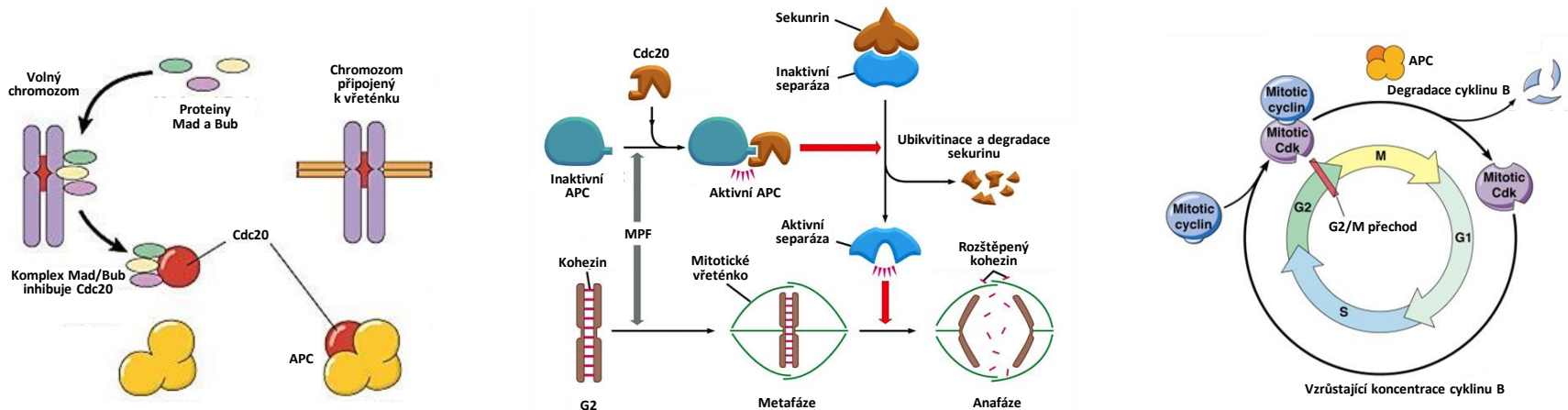
- aktivován v pozdní mitóze působením MPF
- funguje jen po připojení proteinu Cdc20, ten je blokován proteiny Mad a Bub, které ho uvolňují až po správném připojení kinetochorů všech chromozomů k mikrotubulům vřeténka
- připojuje ubikvitin k proteinům, které řídící mitózu

i) sekurin

- jeho rozklad uvolňuje separázu, která degraduje proteiny spojující sesterské chromatidy

ii) cyklin B

- inaktivace MPF, konstitutivně aktivní fosfatázy odstraňují fosfátové skupiny z proteinů, které byly fosforylovány MPF, zakončení mitózy, vstup do nové G1



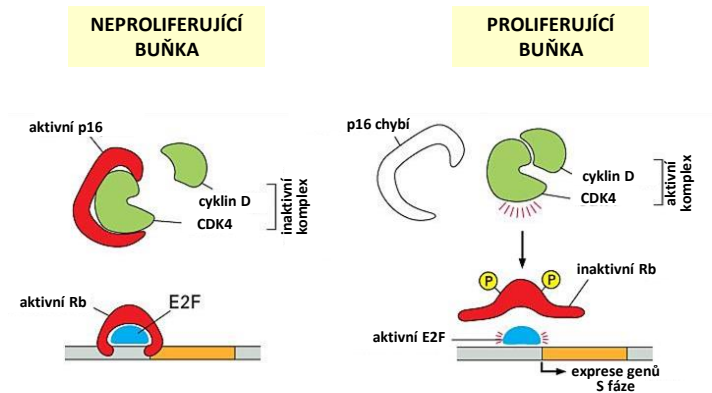
Inhibitory CDK (CKI)

Rodina INK4 (INhibitors of Kinase 4)

- p16, p15, p18, p19
- inhibují cyklin D - CDK4/6, zástava v G1

Rodina CIP (CDK Inhibitory Proteins)

- p21 (cílový gen proteinu p53), p27, p57
- inhibují cyklin D - CDK4/6, cyklin E - CDK2, cyklin A - CDK2, cyklin B - CDK1

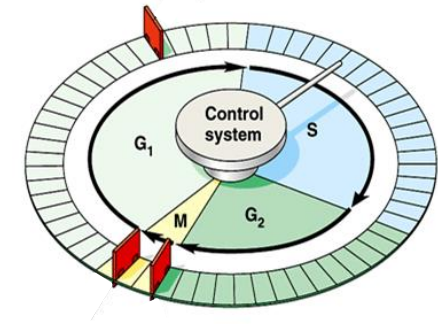


Farmakologické inhibitory CDK

- deregulace CDK u různých chorob, farmakologické inhibitory blokují ATP vazebné místo CDK
- selektivní účinek inhibitorů možno využít pro léčebné účely
 - nádory, neurodegenerativní choroby (Alzheimerova choroba, ALS, mrtvice)
 - kardiovaskulární choroby (ateroskleróza, hypertrofie srdce)
 - virové infekce (HCMV, HIV, HSV, HPV)
 - parazitická protozoa (malárie, spavá nemoc)

Kontrolní body buněčného cyklu

- vnímají vnější i vnitřní podněty a zajišťují správný chod BC
- kontrola dokončení předchozí fáze a splnění podmínek pro fázi následující



Kontrolní bod G1 - bod restrikce

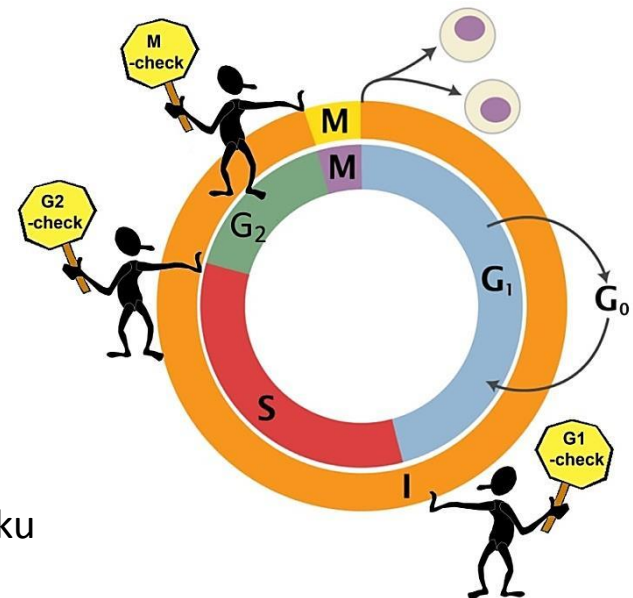
- vnější faktory - živiny, mitogeny, antiproliferační faktory
- po jeho překonání mohou BC zastavit už jen vnitřní faktory
 - celistvost DNA
 - velikost buňky (kvasinky)

Kontrolní bod G2

- dokončení replikace DNA
- celistvost DNA
- velikost buňky (kvasinky)

Kontrolní bod M

- přechod metafáze-anafáze
- správné připojení chromozomů k mitotickému vřeténku



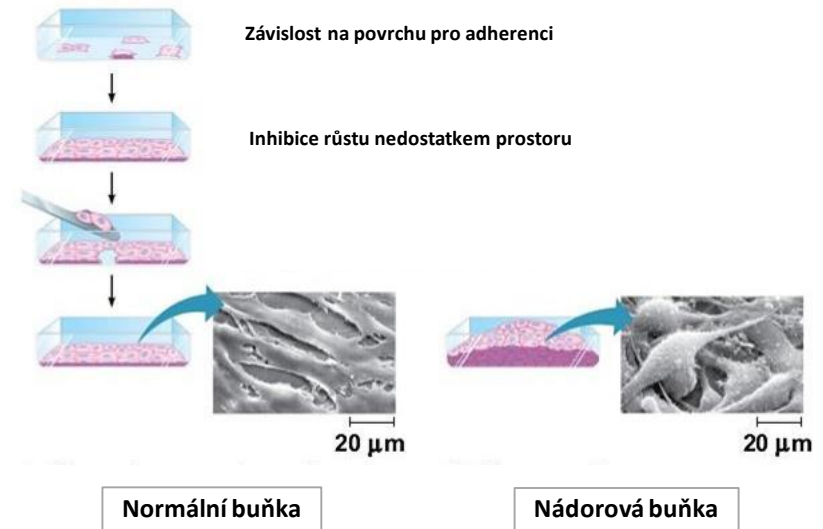
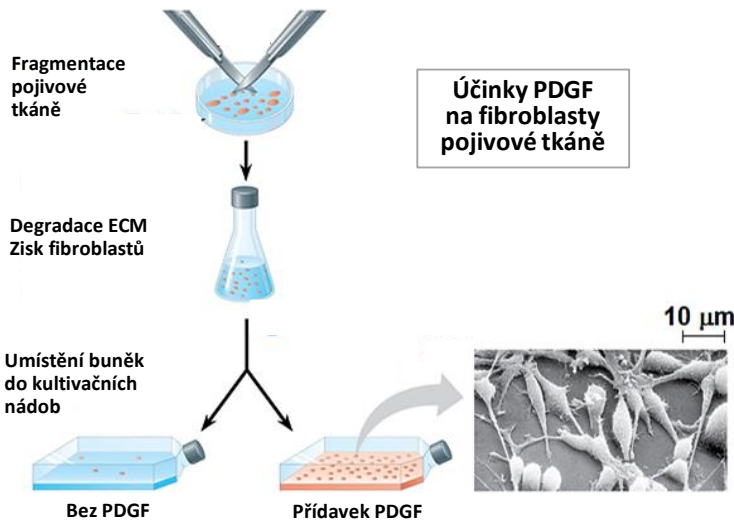
Kontrolní body buněčného cyklu

Vnější podněty - chemické

- živiny, signály pro růst, dělení a přežití
 - i) mitogeny - stimulují dělení buněk, přechod G1/S
 - ii) růstové faktory - stimulují růst buněk, syntézu makromolekul
 - iii) faktory pro přežívání - potlačují apoptózu

Vnější podněty - fyzikální

- prostor a povrch pro adhezenci



Kontrolní body buněčného cyklu

Vnitřní podněty

- celistvost DNA, připojení chromozomů k dělicímu vřeténku

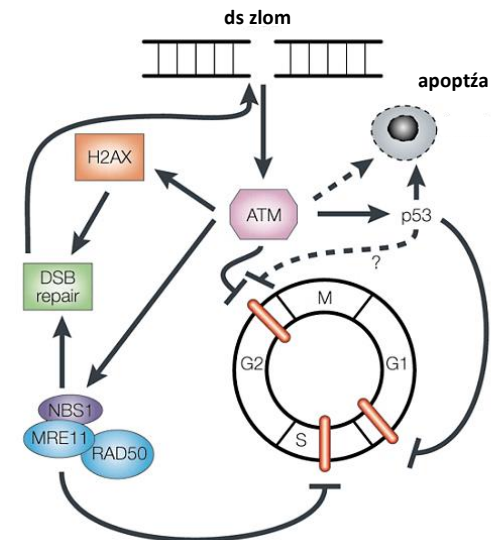
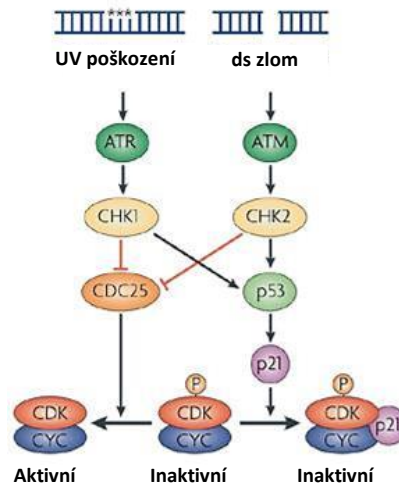
Poškození DNA

- fyzikální a chemické mutageny, zástava v BC v G1 nebo G2
- opravitelné poškození - zastavení BC do doby opravení DNA x rozsáhlé poškození - apoptóza
- nádorové supresory

ATM, ATR - rozpoznání poškozené DNA, aktivace CHK1 / CHK2

CHK1, CHK2 - aktivace p53, inhibice Cdc25

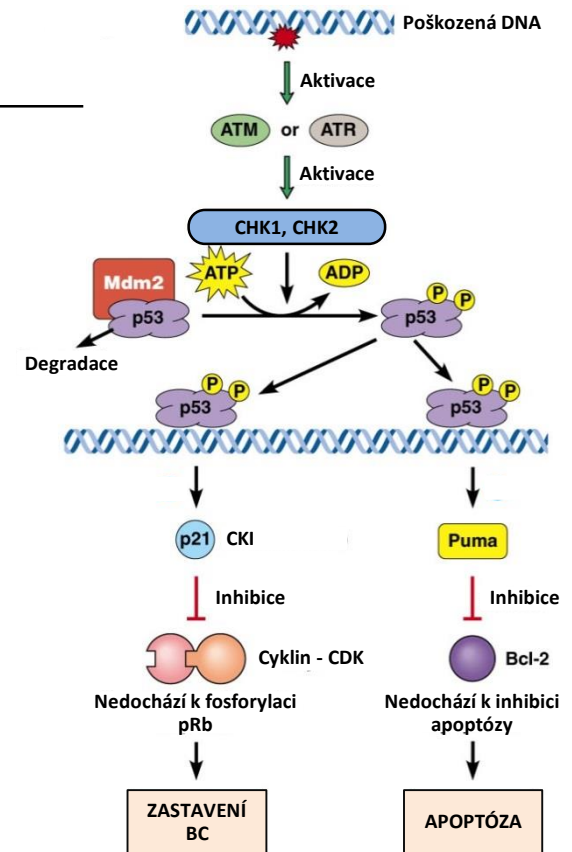
p53 - zvýšení hladin CKI



Kontrolní body buněčného cyklu

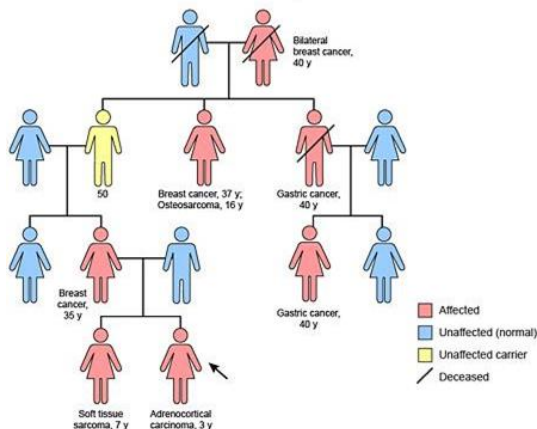
p53

- nádorový supresor
- nízká hladina, průběžná degradace, Mdm2 zajišťuje transport p53 z jádra k proteazomu
- stabilizován ve stresových situacích (poškození DNA)
- působí jako transkripční faktor, indukuje
 - zastavení BC: exprese p21/CIP
 - zastavení replikace DNA: inaktivace DNA polymerázy δ
 - zastavení mitózy: inaktivuje cdc25
 - apoptózu: exprese Bax, Puma



Deficit p53

- průchod BC s poškozenou DNA
- Li-Fraumeniho syndrom
 - dědičný syndrom, inaktivační mutací p53
 - zvýšené riziko vzniku nádoru (sarkomy, nádory mozku, prsu,...)
 - 50 % riziko nádoru do 40 let věku, 90% do 60 let věku



Kontrolní body buněčného cyklu

Kontrolní bod dělicího vřeténka

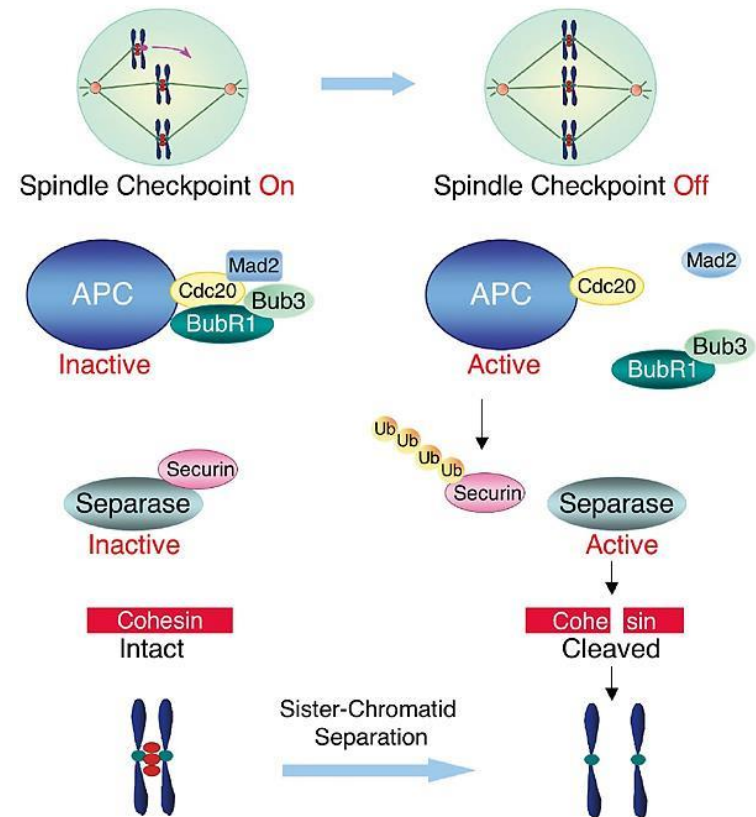
- vstup do anafáze, připojení chromozomů na kinetochorové mikrotubuly dělicího vřeténka
- poškození tohoto kontrolního mechanismu vede k poškození a nondisjunkci chromozomů

i) kontrolní bod zapnut

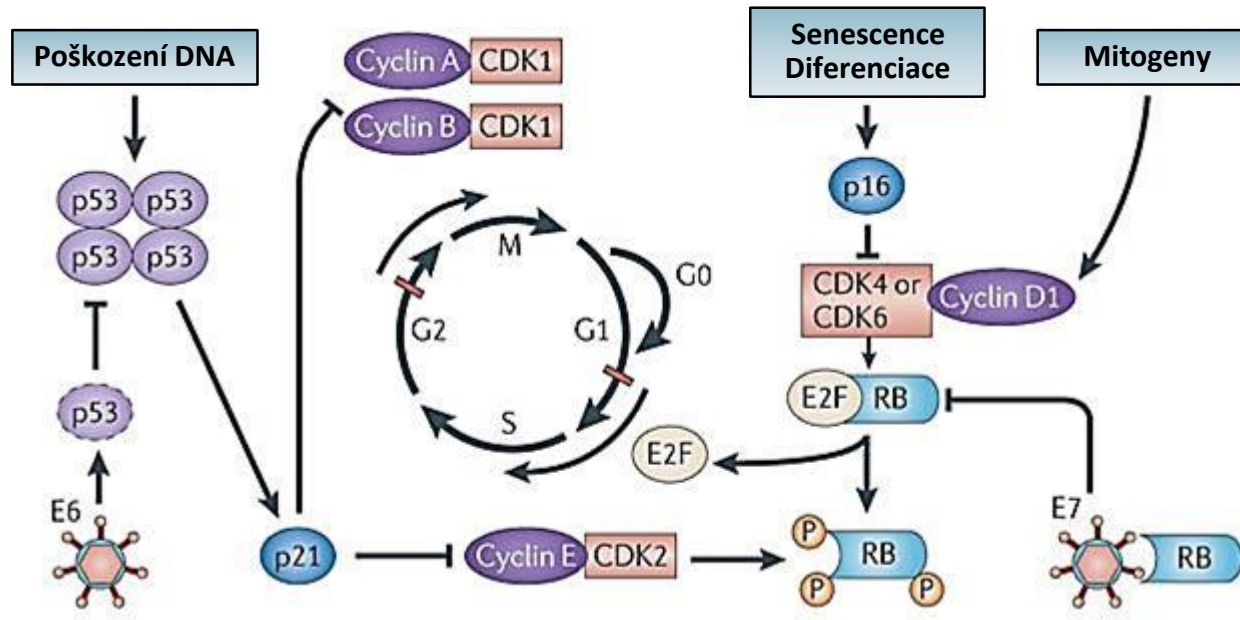
- nepřipojené kinetochory aktivují Mad a Bub
- komplex APC-Cdc20 v inaktivním stavu

ii) kontrolní bod vypnut

- správná vazba chromozomů na kinetochorové mikrotubuly vyvolává v chromozomech mechanické napětí
- netvoří se komplex Mad-Bub
- komplex APC-Cdc20 degraduje sekurin



Faktory ovlivňující průchod BC

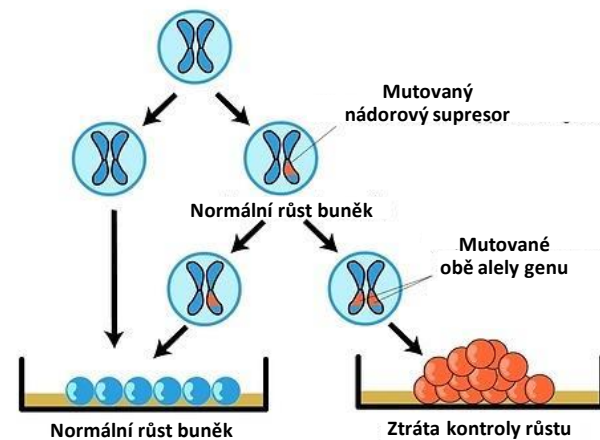
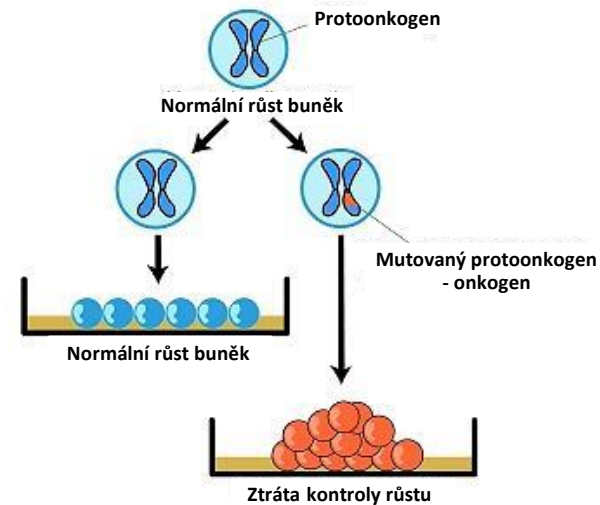


- mitogeny - exprese cyklinu D
- antimitogéní, diferenciační faktory - exprese CKI
- stárnutí buňky - exprese CKI
- poškození DNA - zástava BC přes p53
- virové infekce (např. HPV, lidský papilomavirus) - inhibice p53 a pRb

Poruchy řízení buněčného cyklu

Nádorová onemocnění

- nádorové buňky nepotřebují k dělení růstové faktory
- zvýšená proliferace buňky podpoří její transformaci do buňky nádorové
- nádor je v podstatě selhání kontroly buněčného dělení, nekontrolovatelný růst buněk
- **protoonkogeny**
 - aktivují proliferaci buněk
 - při abnormální aktivaci či ztrátě jejich inhibice podporují vznik nádoru
 - př. růstové faktory, cykliny, CDK, E2F, Mdm2, Ras
- **nádorové supresory**
 - potlačují dělení buněk
 - inaktivace či zvýšená inhibice podporuje vznik nádoru
 - př. pRb, p53, p21, p14, p16, TGF- β , ATM



Poruchy řízení buněčného cyklu

Početní změny chromozomů (aneuploidie)

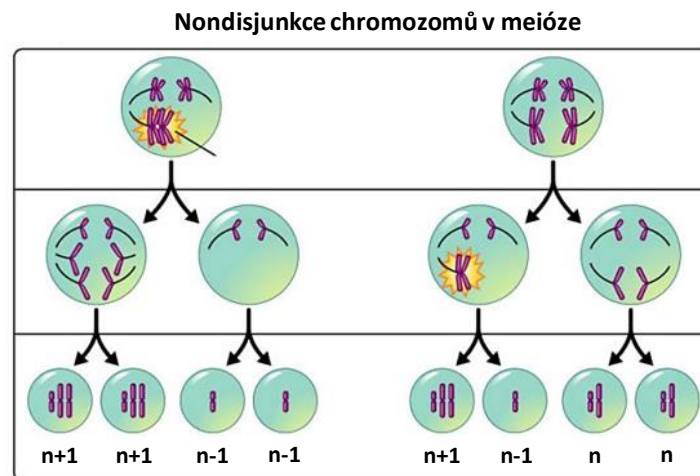
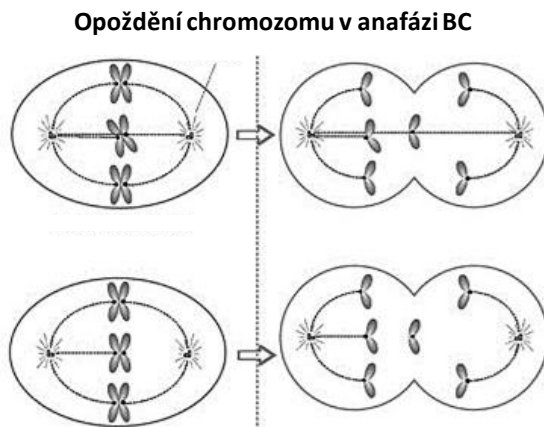
- normální karyotyp 46, XX(Y) monozomie - např. 45, X trizomie - např. 47, XY +21
- chyby v kontrolním bodu dělicího vřeténka

i) chyby v mitóze

- opoždění chromozomu v anafázi a jeho nezačlenění do dceřiného jádra
- vznik mozaicismu

ii) chyby v meióze

- nondisjunkce - vznik nulizomické / trizomické gamety, monozomie/trizomie po oplození
- opoždění chromozomu v anafázi: vznik nulizomické gamety



Zvídavé otázky

Kolik buněk vzniká z jedné buňky, která podstoupí meiózu?

Do jakých dvou hlavních fází se rozděluje buněčný cyklus?

Jaké buňky se množí pomocí mitózy?

Jaký typ mikrotubulů je zodpovědný za vazbu chromozomů během M fáze BC?

Jak se nazývá fáze buněčného cyklu, při které se buňka fyzicky rozdělí na dvě?

Jaká struktura zastává při mitóze funkci obdobnou chiasmatům při meióze?

Vstup do jaké fáze buněčného cyklu signalizuje aktivní komplex MPF?

Ke vstupu do jaké fáze buněčného cyklu vede degradace G1 fázových cyklinů?

Rozpad jaderné membrány odpovídá začátku prometáfáze (ANO/NE)

Při mitóze jsou jádra dceřiných buněk geneticky shodné s jádrem mateřské buňky (ANO/NE)

Během mitotické profáze obsahuje každý chromozom dvě chromatidy (ANO/NE)

Homologní chromozomy se párují během mitotické profáze (ANO/NE)

Začátek anafáze je inhibován až do seřazení všech chromozomů v ekvatoriální rovině (ANO/NE)

Buňky v G0 fázi buněčného cyklu obsahují stejné množství DNA jako ve fázi G2 (ANO/NE)

Zvídavé otázky

Co je cílem ubikvitinace komplexem APC na začátku anafáze?

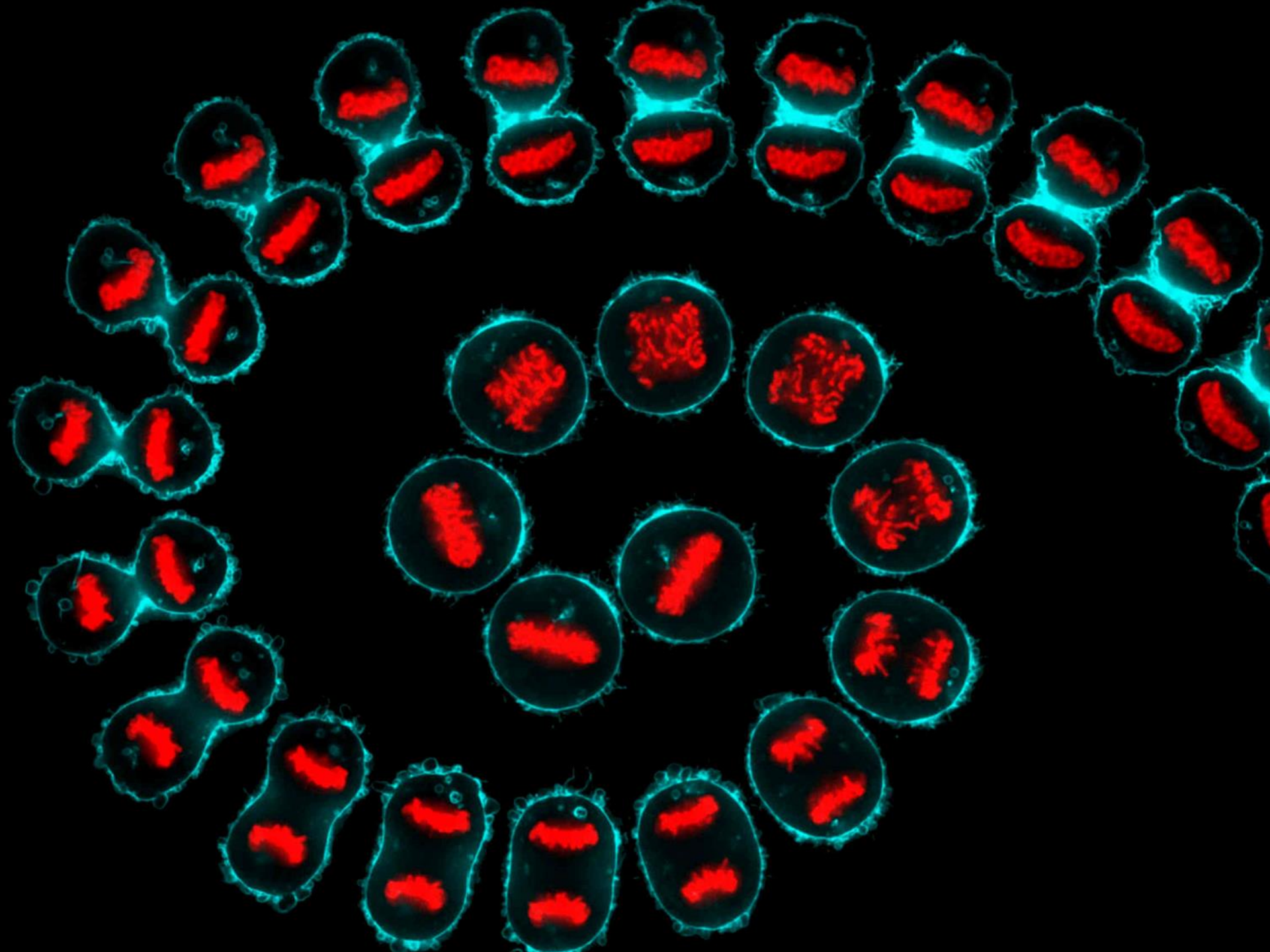
- a) sekurin
- b) separáza
- c) kohezin
- d) tubulin

Jaké z následujících tvrzení porovnávajících mitózu a meiózu není pravdivé?

- a) oba procesy využívají dělicí vřeténko z mikrotubulů
- b) po obou procesech následuje cytokineze
- c) oba procesy jsou pečlivě regulovány
- d) v obou procesech probíhá během profáze crossing-over
- e) oba procesy zahrnují redukci obsahu DNA v dceřiných buňkách

Jaké z následujících tvrzení o anafázi buněčného cyklu není pravdivé?

- a) zmenšuje se vzdálenost mezi kinetochory a póly dělicího vřeténka
- b) zvětšuje se vzdálenost mezi dvěma sadami dceřiných chromatid
- c) rozpadají se mikrotubuly dělicího vřeténka
- d) zvětšuje se vzdálenost mezi oběma póly dělicího vřeténky
- e) dochází k cyklin-dependentní aktivaci CDK1



Molekulární biologie

10. Metody molekulární biologie a základy genového inženýrství

Osnova

metody pro studium genomu,
transkriptomu a proteomu
genetické manipulace

Hlavní zdroje:

*S. Rosypal, Úvod do molekulární biologie 1-4
Masarykova Universita Brno
ISBN 80-902562*

*M. Muller, Biology of Cells and Organisms
University of Illinois, Chicago*

<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/summer2010/lecturesm10.htm>

Genové inženýrství

Snaha o manipulaci se sekvencí DNA organismu

Cíle genového inženýrství:

- vylepšit naše vědomostí o tom jak fungují geny
- vytvářet produkty nebo léčit nemoci

Příklad: produkce hormonů pomocí technologie rekombinantní DNA

- např. produkce růstového hormonu při poruchách růstu

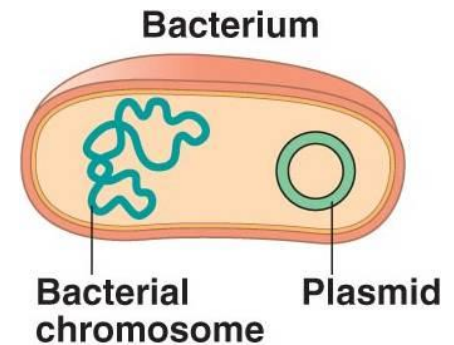
Plasmid

Malá kruhová DNA

- hlavní část bakteriálního genomu je uložena ve velké kruhové molekule DNA - tam jsou "důležité" geny
- na plasmidech jsou "doplňující" geny
- bakterie dokáže přijímat cizí DNA z okolí (hlavně pod stresem) - **Transformace**
- **Konjugace** - výměna plasmidů mezi bakteriemi
- za normálních podmínek není bakteriální ani eukaryotická cytoplazmatická membrána pro DNA propustná

Metody pro navození propustnosti membrány:

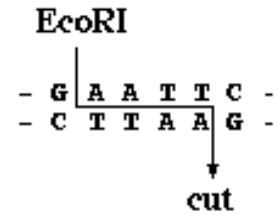
- Elektroporace
 - krátký elektrický šok vytvoří póry v membráně
- Chlorid vápenatý (calcium chloride; CaCl_2)
 - membrána normálně propustná pro chloridové ionty
 - nepropustná pro vápníkové ionty
 - vstupem CaCl_2 se do buněk dostává i voda a DNA
- Teplotní šok
 - při 42°C se v bakterii aktivují tzv. heat-shock geny zajišťující přežití ve vyšší teplotě
 - použití teplotního šoku po ovlivnění CaCl_2 zvyšuje účinnost transformace



Restrikční endonukleázy

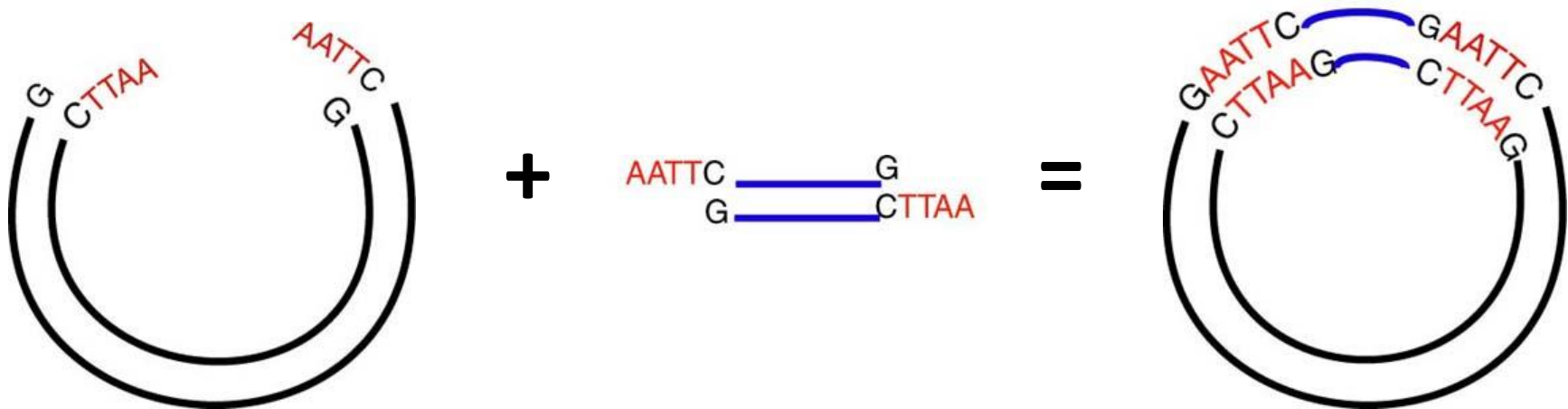
Enzymy, které štípou DNA

- štěpení probíhá v místě kódovaném specifickou sekvencí nukleotidů
- přirozeně používány bakteriemi pro štěpení virové DNA



Restrikční místa (rozpoznávací sekvence pro štěpení):

- jsou často palindromy na komplementárních řetězcích
- methylovány (-CH₃) aby chránily bakteriální DNA a štěpily pouze virovou
- často zanechávají "sticky ends", např. EcoRI ("eco R one") u *E. coli*
- "sticky ends" jsou využívány pro vložení genu do plasmidu



Exonukleáza: štěpí DNA od krajů

Endonukleáza: štěpí DNA od prostředku

Helikáza: oddaluje řetězce DNA nebo RNA

Ligáza: spojuje DNA řetězce



Genové inženýrství v praxi

Growth-hormone deficiency (GHD; pituitary dwarfism) - Nedostatek růstového hormonu

- hypofýza (pituitary gland) neprodukuje dostatek růstového hormonu (GH; growth hormone; somatotropin)
- léčba: injekce hormonu GH
- do roku 1985 GH získáván autopsií z hypofýzy (větš. mrtvá těla, častá kontaminace)
- od roku 1985 je GH vyráběn v geneticky upravené bakterii *E. coli* technologií rekombinantní DNA (rHGH; recombinant human growth hormone)

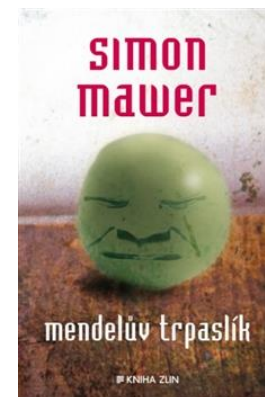


Achondroplasia



GHD

Většina případů trpasličího vzrůstu je dána dvěma poruchami 1. Achondroplasie (70%) a 2. GHD



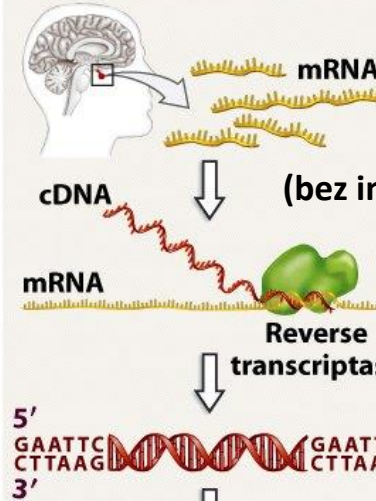
Výroba rekombinantního GH

- izolujeme mRNA z buněk hypofýzy (různé typy mRNA, nejen mRNA pro GH)
- pomocí reverzní transkriptázy přepíšeme mRNA do cDNA
- připojení míst, která rozeznává endonukleáza ke koncům každé cDNA
- vložíme do přichystaného plasmidu s genem na resistenci proti vybranému ATB - při štěpení endonukleázou vznikají tzv. "sticky ends" (komplementární báze)
- cDNA "vlepi" do plasmidu tzv. ligací za katalýzy DNA-ligázou
- vložíme plasmidy do bakterií *E. coli* - ATB v mediu → přežijí pouze bakterie, které přijmou plazmid
- takovou kolekci bakterií nazýváme cDNA knihovna
- nyní musíme najít pouze bakterie, které přijmou GH gen (různé cDNA podle různých mRNA)

cDNA (complementary DNA): dvojšroubovicová DNA syntetizovaná podle templátu mRNA za katalýzy enzymem reverzní transkriptáza
DNA-ligáza: enzym usnadňující spojení DNA řetězců katalýzou formace fosfodiesterové vazby

cDNA knihovna: kombinace cDNA vložených do hostitele, které tvoří část transkriptomu. cDNA podle sestřižené mRNA už neobsahuje introny a je v prokaryotním organismu připravena k translaci

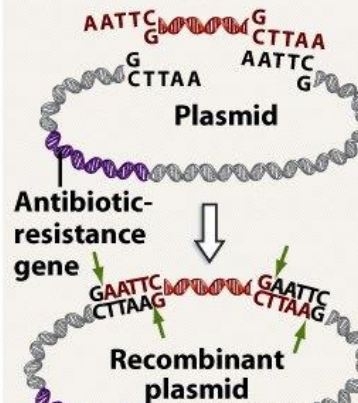
CREATING A cDNA LIBRARY THAT CONTAINS THE HUMAN GROWTH HORMONE GENE



1. Isolate mRNAs from cells in pituitary gland.

2. Use reverse transcriptase to synthesize a cDNA from each mRNA.

3. Attach a restriction endonuclease recognition site to ends of each cDNA.



4. Cut cDNAs and plasmids with restriction endonucleases; remaining sticky ends join by complementary base pairing.

5. Ligate cDNAs and plasmids with DNA ligase.

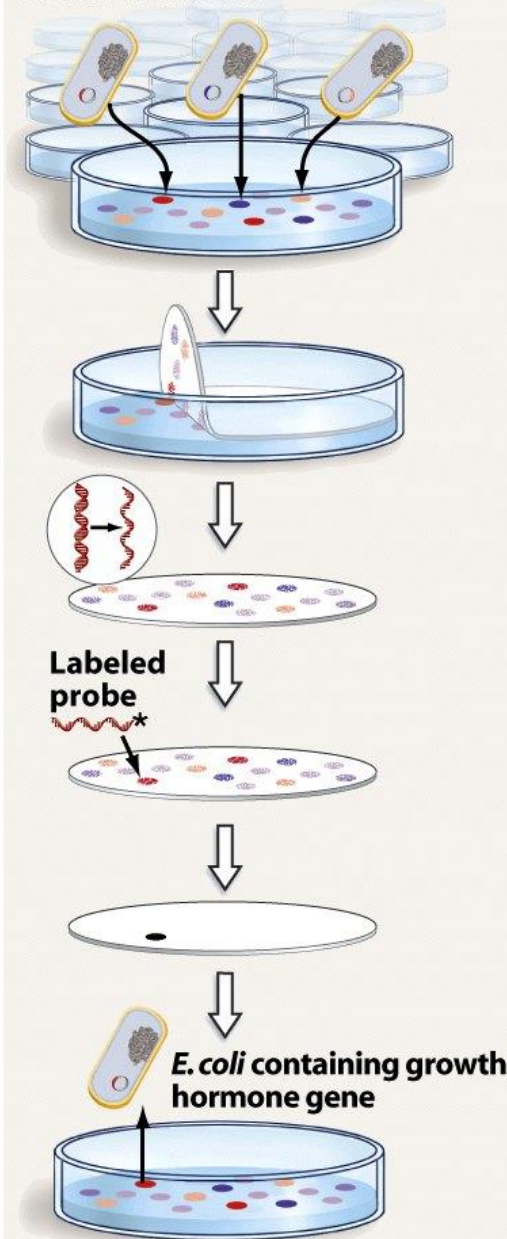
6. Introduce recombinant plasmids into *E. coli* cells via treatment that makes cells permeable to DNA. Grow cells in presence of antibiotic. Cells that can grow become part of cDNA library. Each cell contains one type of recombinant plasmid and thus one cDNA.

Výroba rekombinantního GH

- na Petriho misky s koloniemi položíme filtrační papír - kolonie se přilepí
- rozdělíme dvojšroubovici DNA na jednořetězce a inkubujeme se sondou
- sonda - krátká sekvence DNA, která odpovídá sekvenci v požadovaném genu (značená radioaktivně)
- RTG film vytvoří značky na místech s radioaktivní DNA sondou
- tyto kolonie namnožíme

[Video: Genové inženýrství](#)

FINDING THE GROWTH HORMONE GENE IN A cDNA LIBRARY



1. Grow *E. coli* cells containing plasmids on many plates. Each colony contains a different cDNA.

2. Lay a filter on each plate, then remove. Some cells from each colony stick to filters.

3. Treat filters with chemical to make DNAs single stranded.

4. Probe filters with labeled DNA (short sequence inferred from amino acid sequence of growth hormone).

5. Labeled probe and growth hormone cDNA base pair. Lay X-ray film over filters; black spot marks location of

6. On original plates, find colony of *E. coli* cells that contains growth hormone gene. Sample cells, grow, and analyze.

Další příklady genového inženýrství v praxi

Chymosin

- enzym používaný pro výrobu sýru
- první rekombinantní protein schválený v potravinářství
- produkce v *E. coli*



Inzulín

- rekombinantní inzulín kompletně nahradil inzulín izolovaný ze zvířecích tkání
- lidský gen pro inzulín vložený do *E. coli* nebo kvasinek *Saccharomyces Cerevisiae*

Faktor VII

- plazmatický koagulační faktor pro hemofiliky
- dříve izolován z krve dárců - riziko přenosu nemocí

Vakcína proti žloutence typu B

- produkce povrchových antigenů viru v kvasinkách
- virus hepatitidy B nelze pěstovat *in vitro* (jako např. virus obrny - Poliovirus)

Rostliny rezistentní k herbicidům

- např. sója, kukuřice, bavlna
- vložen rekombinantní gen zajišťující rezistenci proti herbicidu glyphosatu (Roundup)

Genové inženýrství v praxi

Úprava genomu eukaryotických organismů - geneticky modifikované potraviny

1. *Agrobacterium tumefaciens*

- gramnegativní bakterie - rostlinný parazit s přirozenou schopností genového transferu
- infikuje dvouděložné rostliny (brambory, rajčata a tabák)
- začleňuje do genomu rostliny Ti-plazmid (T-DNA)
- Ti-plazmid obsahuje geny pro produkci rostlinných hormonů
- tvorba nádoru produkujícího aminokyseliny "opiny", sloužící agrobakteriím jako energetický zdroj
- Ti-plazmid je nahrazen umělým plazmidem



2. Gene gun

- pro rostliny, které nejsou napadány Agrobakterií (jednoděložné: pšenice či kukuřice)
- DNA je zkombinována s částicemi zlata a pod tlakem "vstřelena" do buněk
- v buňce se DNA oddělí a je transportována do jádra

3. Elektroporace

- pro živočišné buňky a rostlinná pletiva, která neobsahují buněčnou stěnu

4. Virový vektor

- Různé druhy virů

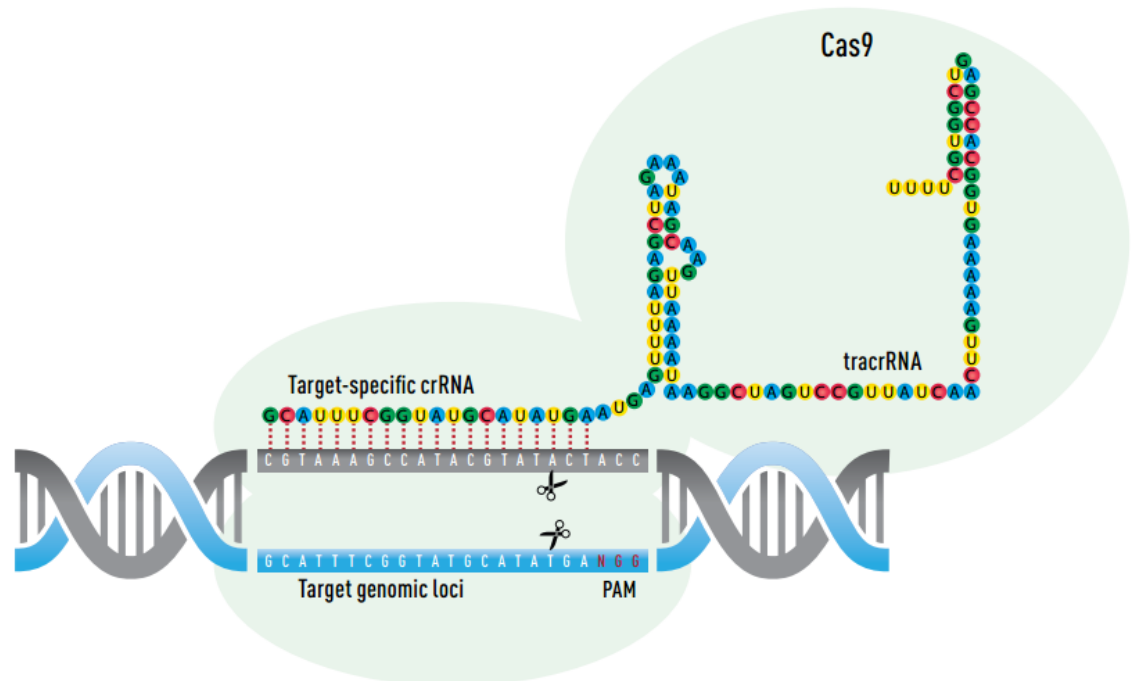
CRISPR - krok 1: vytvoření DNA DSB (double strand break)

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats

- editace genomu budoucnosti - přesně nalezne místo na genomu, které chceme upravit
- mechanismus adaptivní imunity bakterií (CRISPR/Cas)
- RNA-guided DNA-nukleáza je přirozeně využívána bakteriemi k inaktivaci virové DNA
- modifikován pro využití k úpravě genomu eukaryot (CRISPR/Cas typ II z *Streptococcus pyogenes*)
- 2 komponenty
 1. Cas9 protein (endonukleáza)
 2. nekódující guide RNA (gRNA)
- zvolíme si 20 nukleotidů dlouhou sekvenci na gRNA (target-specific crRNA), komplementární s místem na genomu, které chceme štěpit
- po navázání gRNA na toto místo, Cas9 zde vytváří na **DNA dvojlom (DSB)**

DSB lze využít

- a) sám o sobě k umlčení genu
- b) vložení jiného genu



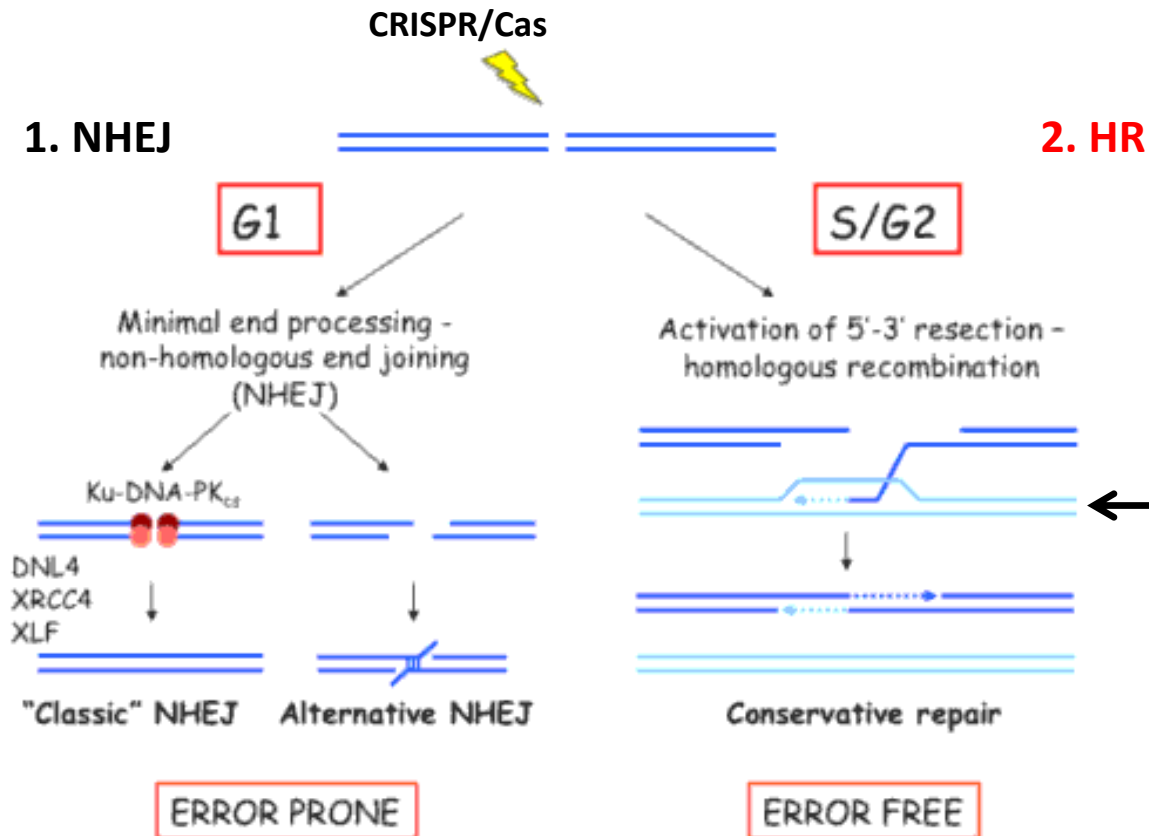
CRISPR - krok 2: vložení genu do místa DNA DSB

- DNA dvojlzomy mohou být opraveny dvěma mechanismy:

1. Non-homologous end joining (NHEJ)

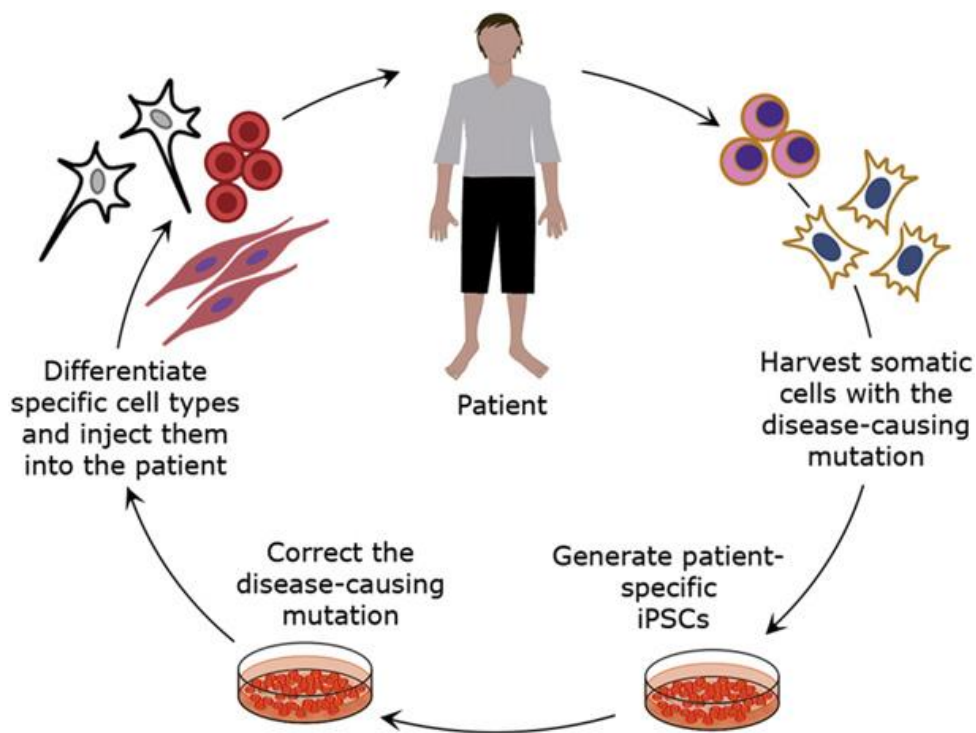
2. Homologní rekombinace (HR)

- pokud do buňky zároveň vložíme **templátovou DNA**, pak je šance na zabudování této nové DNA právě ve zvoleném místě, kde jsme vytvořili dvojlzom pomocí CRISPR/Cas



GENOVÉ KOREKCE

- proof-of-principle: Korekce defektního genu pro β -globin, způsobujícího srpkovitou anémií (sickle cell anemia); na myším modelu*



* Hanna J. et al, Science 2007; reviewed in Simara P. et al, Transl Res 2013

PCR - Polymerase Chain Reaction

Metoda pro masivní replikaci úseku DNA



www.nobelprize.org

Kary Mullis

- metodu vynalezl počátkem 80. let
- 1993 - Nobelova cena - jediná za výzkum v komerční biotechnologické firmě (Cetus)
- používal dva primery, které ohraničili úsek DNA, který chtěl amplifikovat
- nově vytvořená DNA se musela denaturovat (oddělit oba řetězce) při teplotě nad 90°C aby mohl začít další cyklus amplifikace
- teplotou nad 90°C se ovšem inaktivovala DNA Polymeráza I
- musela tedy být přidána nová Polymeráza při každém cyklu

Taq Polymeráza

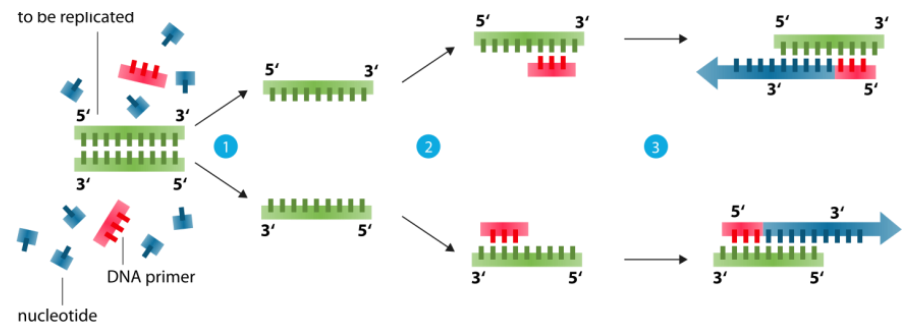
- původně izolována r. 1976 z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*
- bakterie žije v termálních pramenech (gejzír v parku Yellowstone; 70°C)
- optimální aktivita Taq Polymerázy je 75-80°C (vydrží 95°C až 40 min)
- při 73°C připojuje 100 bazí za sekundu



Patent

- Roche koupil r. 1993 patent na PCR od Cetus Corp. za \$330 milionů
- odhadovaný výtěžek pro Roche je \$2 miliardy

1. Denaturation (90°C)
2. Annealing (55°C)
3. Extension (73°C)



PCR - Polymerase Chain Reaction

Reakce probíhá v přístroji zvaném termo-cykler, který velmi rychle střídá teploty.

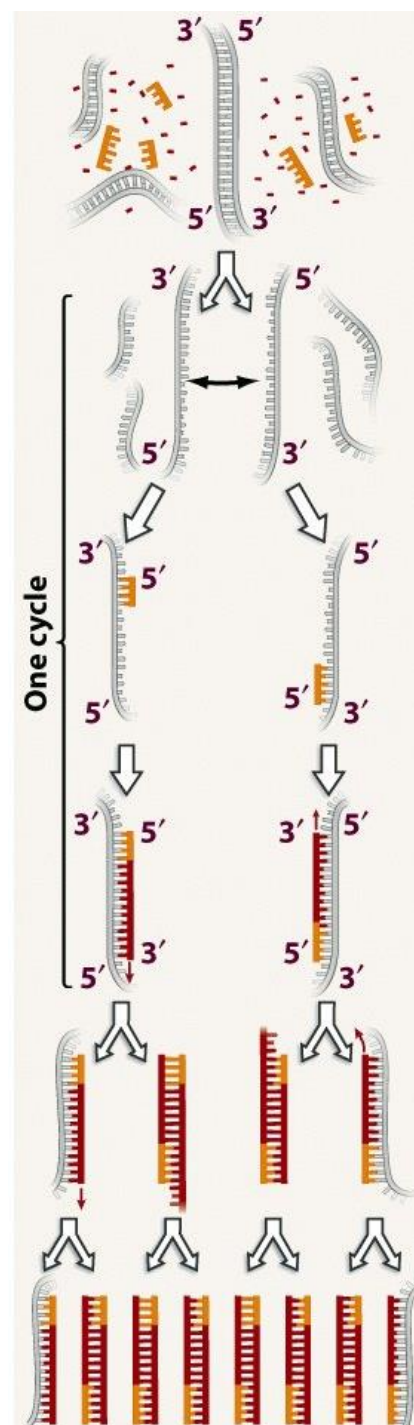


[Video: PCR](#)

30s 94°C

30s 55°C

30s 73°C



1. Start with a solution containing template DNA, synthesized primers, and an abundant supply of the four dNTPs.

2. Denaturation
Heating leads to denaturation of the double-stranded DNA.

3. Primer annealing
At cooler temperatures, the primers anneal to the template DNA by complementary base pairing.

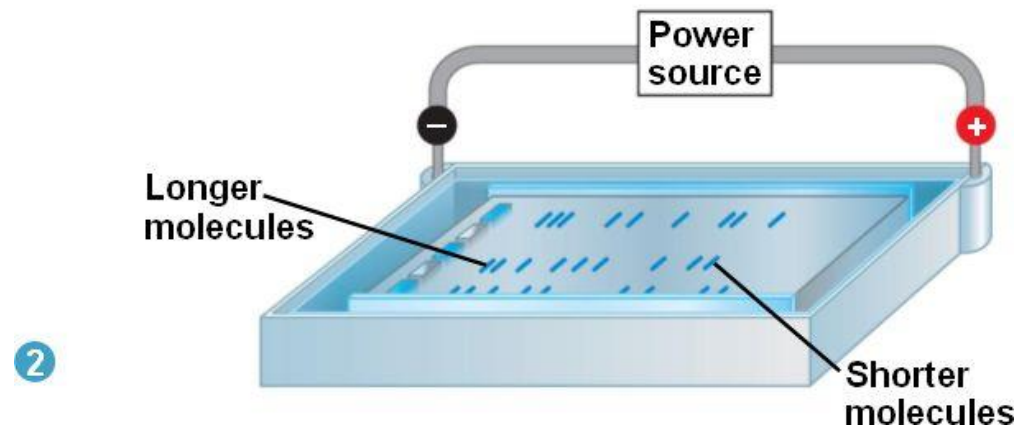
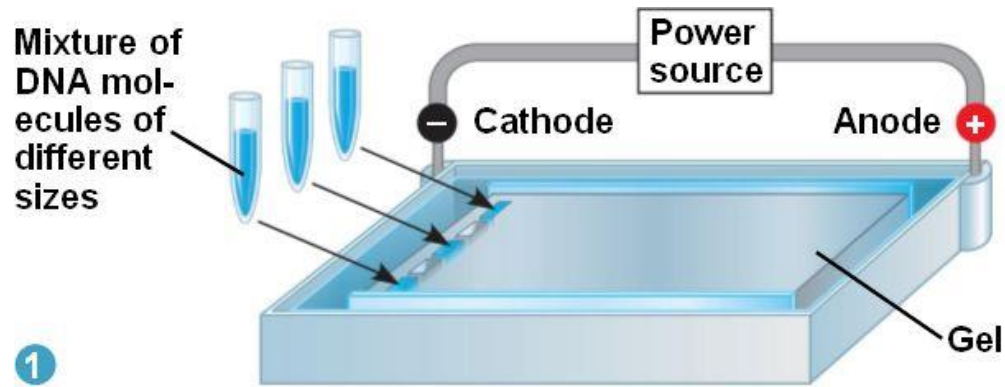
4. Extension
During incubation, DNA polymerase uses dNTPs to synthesize complementary DNA strand, starting at the primer.

5. Repeat cycle of three steps (2–4) again, doubling the copies of DNA.

6. Repeat cycle again, up to 20–30 times, to produce millions of copies of template DNA.

PCR - Polymerase Chain Reaction

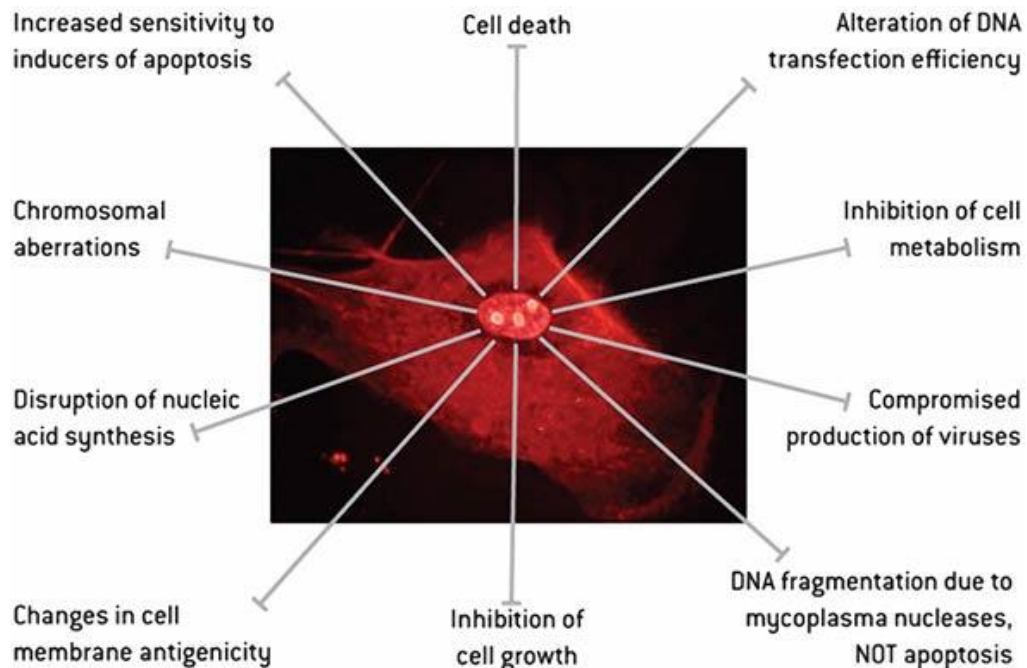
- velikost výsledného DNA fragmentu je ověřena na elektroforetickém gelu
- v elektrickém poli putují **záporně nabitě molekuly DNA** k anodě (+)
- gel tvořen Agarózou a kratší molekuly DNA v něm putují rychleji než delší
- pro vizualizaci fragmentů DNA je gel napuštěn etidium bromidem, který se váže na DNA a po ozáření UV světlem svítí



PCR v laboratorní praxi

Detekce kontaminace buněčné kultury mykoplasmaty

5x Green buffer	10ul	
PCR Nucleotide mix (20mM)	0,5ul	(final 0,2mM)
F primer (100uM)	0,25ul	(final 0,5uM)
R primer (100uM)	0,25ul	(final 0,5uM)
Taq DNA polymeráza	0,25ul	(final 1,25U)
Templátová DNA	x ul	(final 100ng)
Doplnit vodou pro PCR na 50ul		



Cycler byl nastaven:

název programu – MYCOPLAS

„Calculated“

step 1: teplota a čas (iniciální 2min 94°C)

1 cyklus {

- step 2: 0:30min 94°C - denaturace
- step 3: 0:30min 55°C - annealing
- step 4: 0:30min 73°C - extenze

step 5: GoTo step 2 35cycles

step 6: final extension 5min 73°C

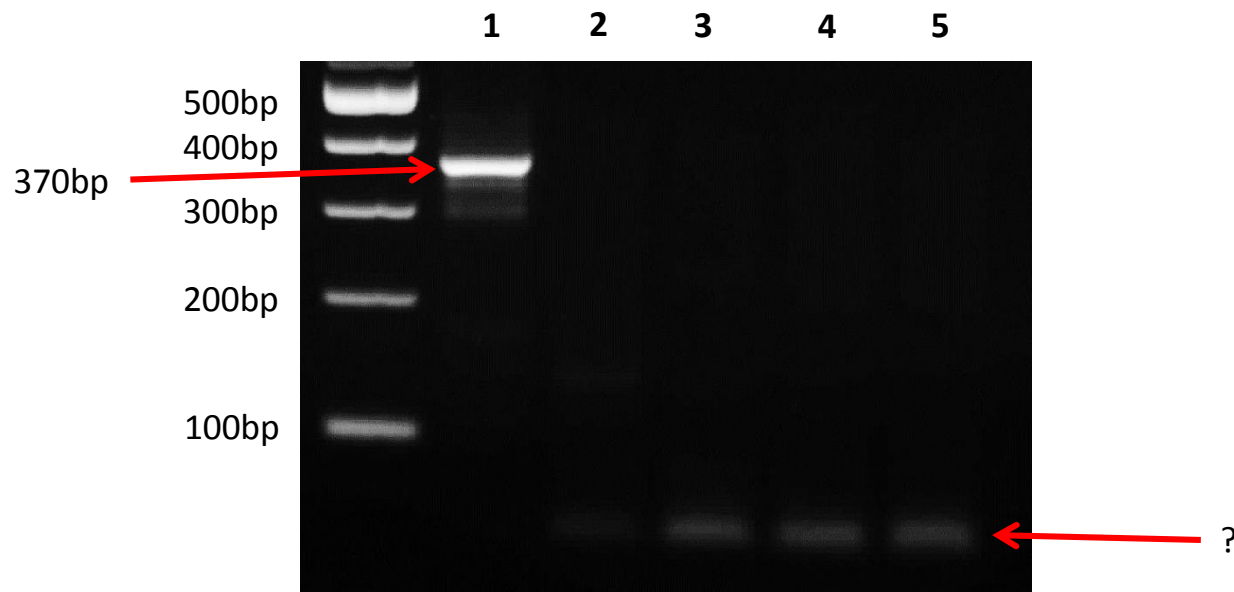
step 7: 4°C forever (zadat čas 0)

Mycoplasma: nejmenší a nejjednodušší rod bakterií (cca 0,1µm), nemají buněčnou stěnu (neúčinkují běžná ATB), často patogenní. V buněčných kulturách negativně ovlivňují růst buněk.

PCR v laboratorní praxi

Detekce kontaminace buněčné kultury mykoplasmaty

- PCR primery navrženy tak, aby nasedaly pouze na sekvence přítomné v DNA mykoplasmat
- PCR produkt vzniká pouze pokud je přítomna DNA mykoplasmat
- velikost produktu je 370bp
- do gelu přidán EtBr (DNA interkalátor) - vizualizuje DNA pod UV lampou



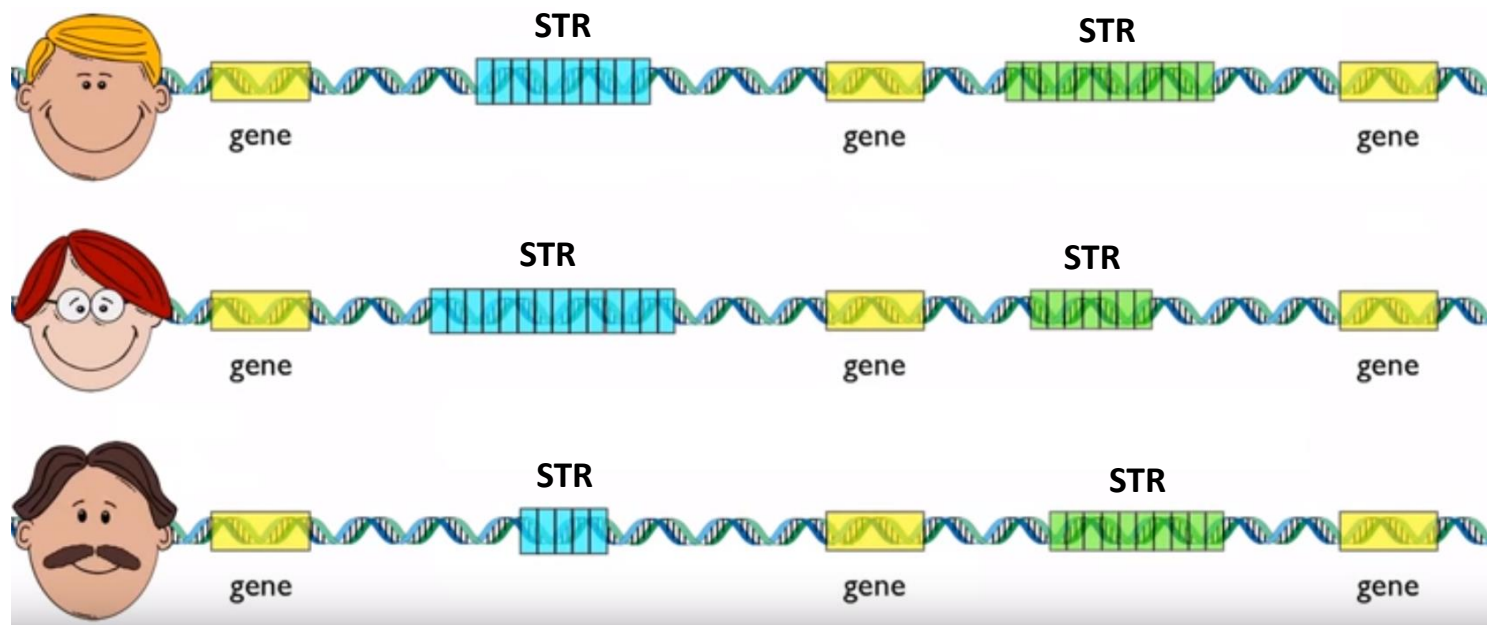
1. *pozitivní kontrola - mykoplazmatická DNA*
2. *negativní kontrola - genomová DNA*
3. *vzorek č. 1*
4. *vzorek č. 2*
5. *vzorek č. 3*

PCR v kriminalistice - DNA fingerprinting - STR

- navrhnul Alex Jeffreys r. 1984
- sledují se nekódující regiony DNA zvané **Short Tandem Repeats (STR)**
 - krátké sekvence o 2-5 bazích opakující se 5-50x
 - každý člověk má unikátní sestavu (s výjimkou jednovaječných dvojčat)
- primery jsou navrženy před a za STR sekvencí
- DNA vyizolovaná z buněk je amplifikována pomocí PCR v nekodujících úsecích DNA vytipovaných pro STR
- na elektroforetickém gelu se detekuje velikost fragmentu

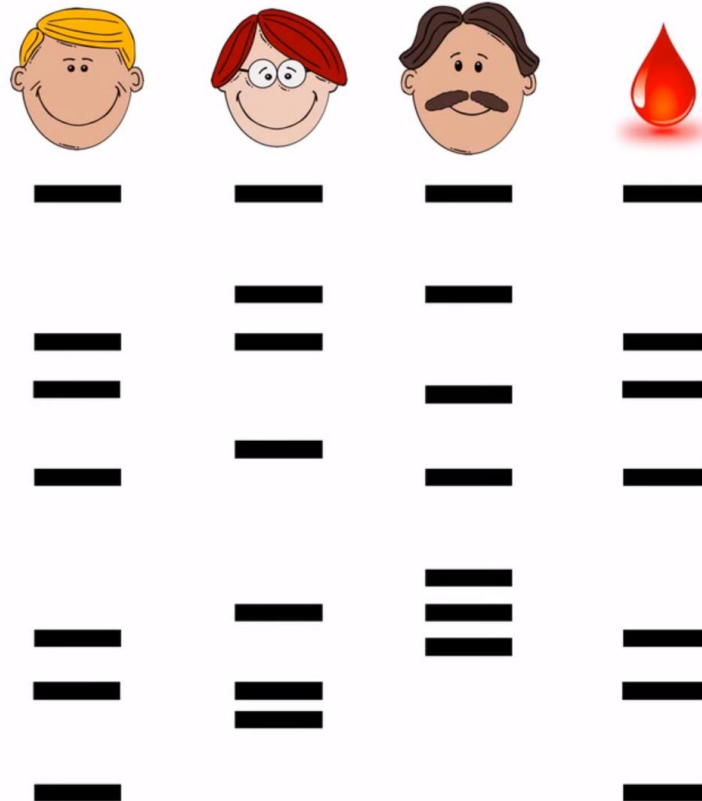


Wikipedia



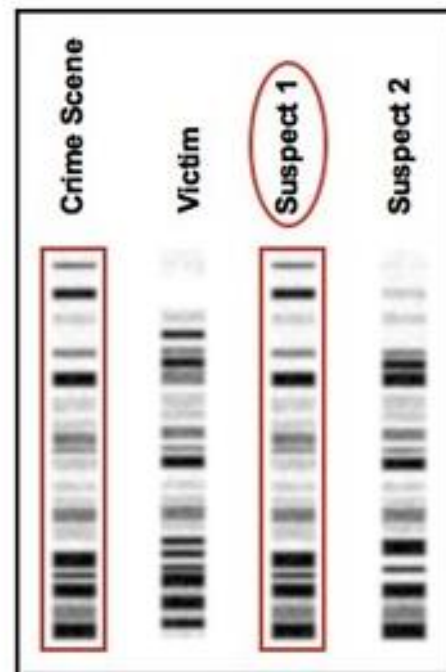
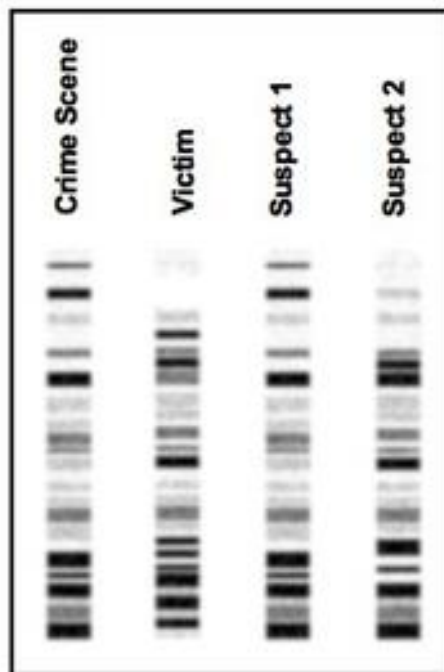
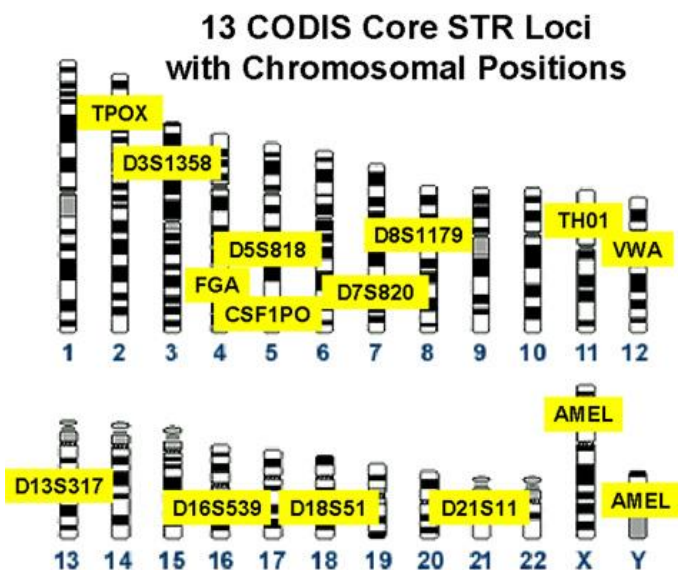
PCR v kriminalistice - DNA fingerprinting - STR

- porovnání s DNA nalezenou na místě činu (z krve, semene, kůže za nehty...)
- používají se STR s 4- nebo 5-nukleotidovými repeticemi



PCR v kriminalistice - DNA fingerprinting - STR

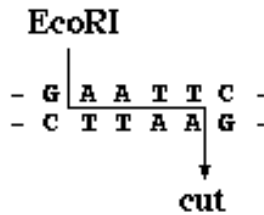
- FBI má databázi DNA zvanou CODIS (Combined DNA Index System)
- dle pravidel CODISu se testuje a uchovává 13 STR genetických markerů na různých somatických chromozomech (2 alely - tzn. max 26 bandů) + amelogenin pro určení pohlaví
 - AMEL: na chromozomu X obsahuje *intron 1* 6bp delecii, na rozdíl od Y (žena XX pouze 1 band 106; muž XY: bandy 106 a 112)



DNA fingerprinting - RFLP

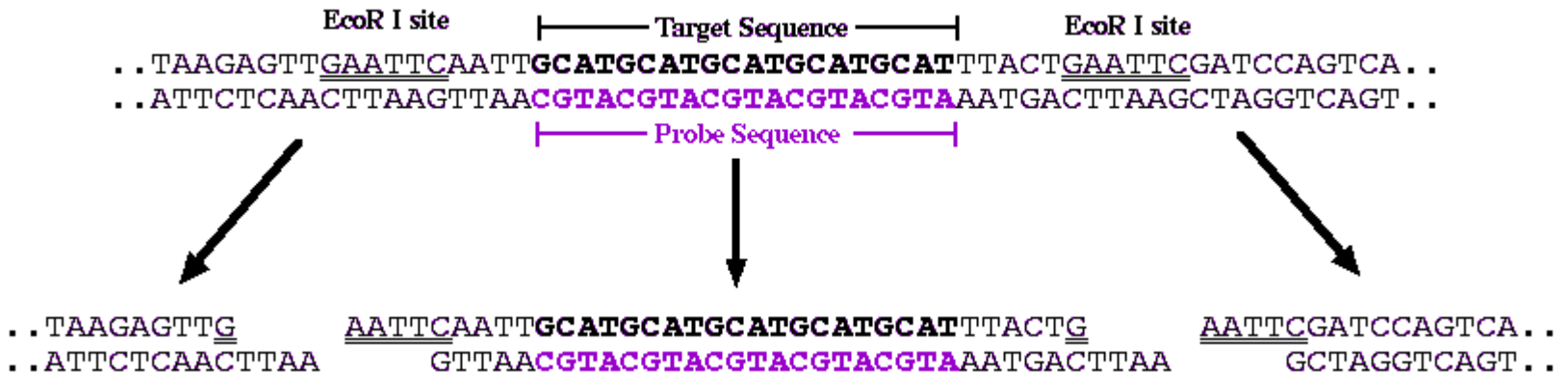
Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

- starší metoda pro testování identity na základě DNA
- restriční enzymy naštipou DNA ve specifických místech a vznikají různě dlouhé fragmenty DNA unikátní pro každého člověka



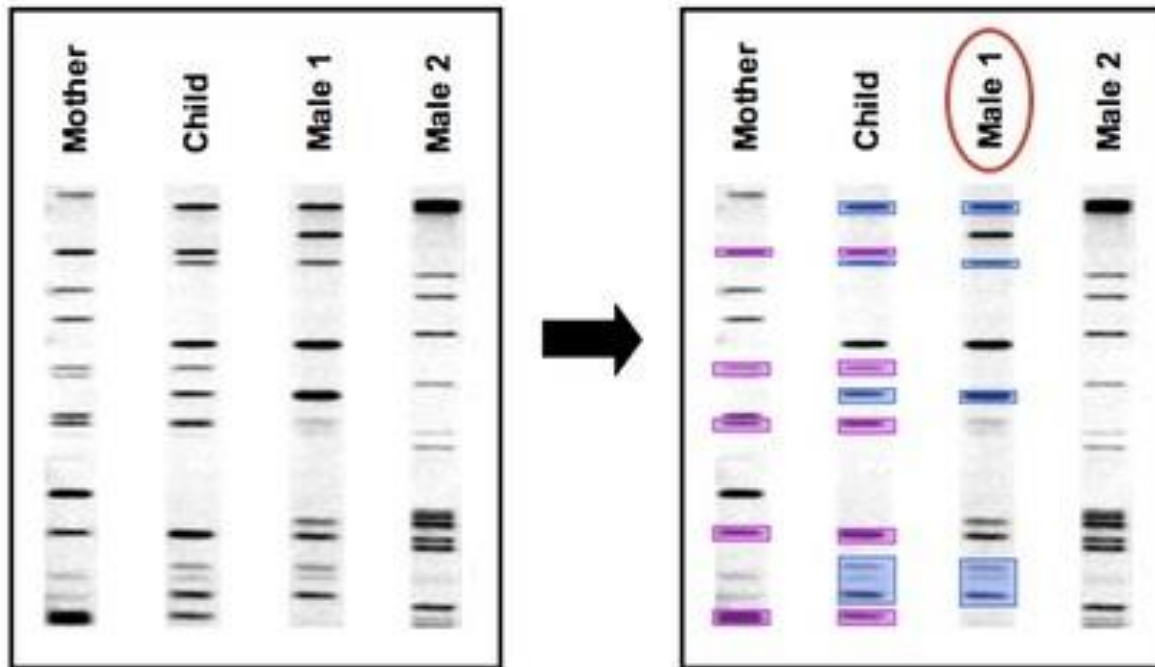
Nevýhody RFLP oproti STR

- pomalá, náročná metoda a méně přesná metoda
- vyžaduje velké množství DNA



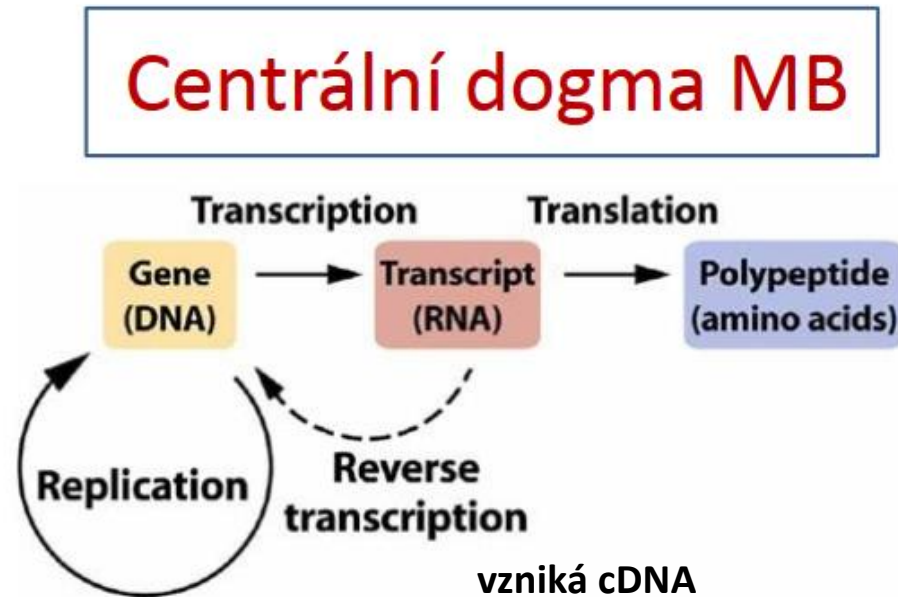
Testování otcovství

- dříve bylo používáno hlavně **vyloučení** otcovství na základě krevních skupin či dalších leukocytárních antigenů
- přesnější je testování DNA metodou RFLP, v současnosti hlavně STR
- typickým výsledkem je 0% pro negativní a 99,99% pro pozitivní test
- každý proužek DNA dítěte musí odpovídat proužku na vzorku otce nebo matky nebo obou
- je zde zanedbatelná možnost unikátního fragmentu, který u dítěte vznikne v důsledku crossing-overu a/nebo mutace



Kvantifikace exprese genů (aktivita genu)

1. pro určení množství transkribované **mRNA** z určitého genu
 - a) **Real-time PCR**
 - b) **Microarrays**
2. pro určení množství vyrobeného **proteinu** určitého genu
 - a) **Western blotting**
 - b) **Flow cytometrie**



1a) Real-time PCR (kvantitativní; qPCR)

Měření nárůstu nově syntetizované DNA po každém cyklu PCR

Funkce: určit výchozí množství mRNA ve vzorku a tím sledovat aktivitu genů

Postup:

1. izolujeme mRNA (pomocí kitu)
2. přepis mRNA do komplementární DNA (cDNA) pomocí enzymu reverzní transkriptázy
3. provedeme PCR podle principu popsaného výše, ale přidáme navíc fluorofor*
4. PCR reakci provedeme ve speciálním termo-cykleru s detektorem fluorescenčního záření
 - po každém cyklu přístroj zaznamená intenzitu fluorescence
 - vyšší intenzita = více DNA
 - přímé porovnání množství mRNA daného genu mezi vzorky
5. software vyhodnotí *relativní genovou expresi* (počet kopií mRNA)

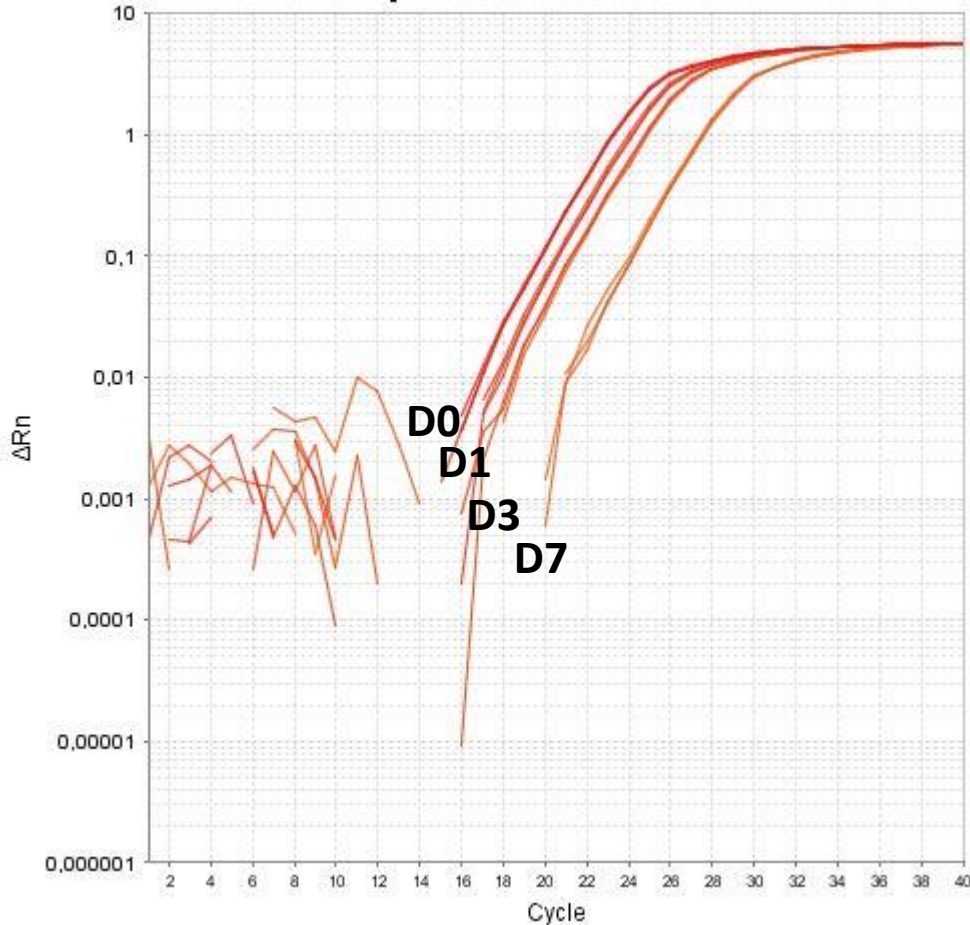
***Fluorofor (=fluorochrom):** molekula, která po osvětlení světlem určité vlnové délky absorbuje energii tohoto záření a prakticky okamžitě jí ztratí emisí záření o delší vlnové délce. Tomuto jevu se říká fluorescence. Fluoroforem může být malá molekula, typicky organická sloučenina s aromatickým jádrem, nebo i celý protein (např. GFP). (Wikipedia)

1a) Real-time PCR (kvantitativní; qPCR)

Vyhodnocení dat z qPCR

- 4 křivky v triplikátu
- pozdější nárůst = méně cDNA (menší exprese mRNA)
- sledování poklesu exprese genu OCT3/4 v průběhu diferenciaci embryonálních kmenových buněk (hESC)
- OCT3/4 je exprimován nejvíce v kmenových buňkách a u diferencovaných buněk je umlčen

Amplification Plot

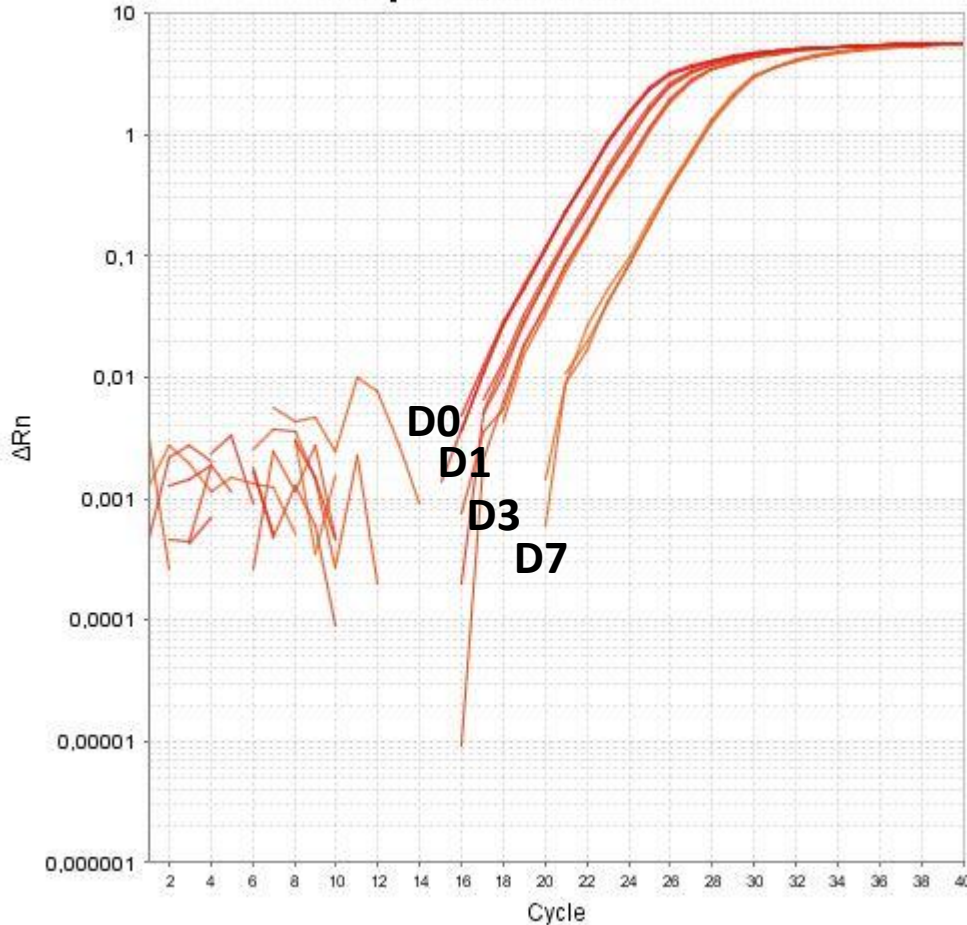


1a) Real-time PCR (kvantitativní; qPCR)

Vyhodnocení dat z qPCR

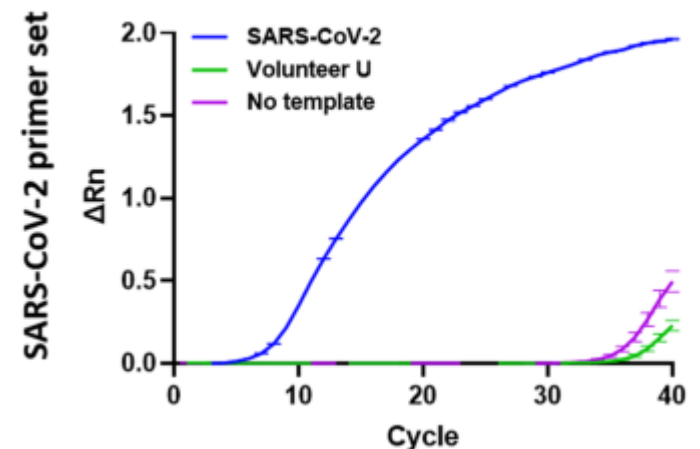
- 4 křivky v triplikátu
- pozdější nárůst = méně cDNA (menší exprese mRNA)
- sledování poklesu exprese genu OCT3/4 v průběhu diferenciac embryonálních kmenových buněk (hESC)
- OCT3/4 je exprimován nejvíce v kmenových buňkách a u diferencovaných buněk je umlčen

Amplification Plot



COVID RT-PCR

Amplification Plot

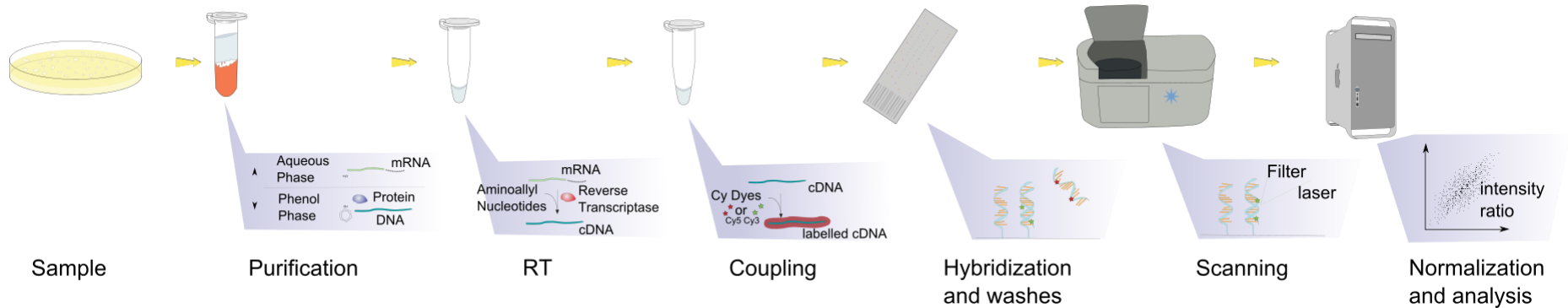
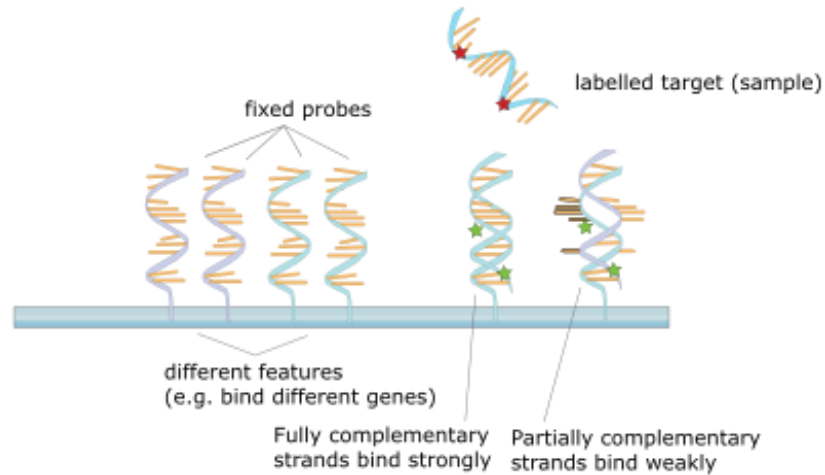


Park et al., Nature 2020

1b) Microarray

Mikroskopické spoty DNA fixované na pevném povrchu (chip, microarray)

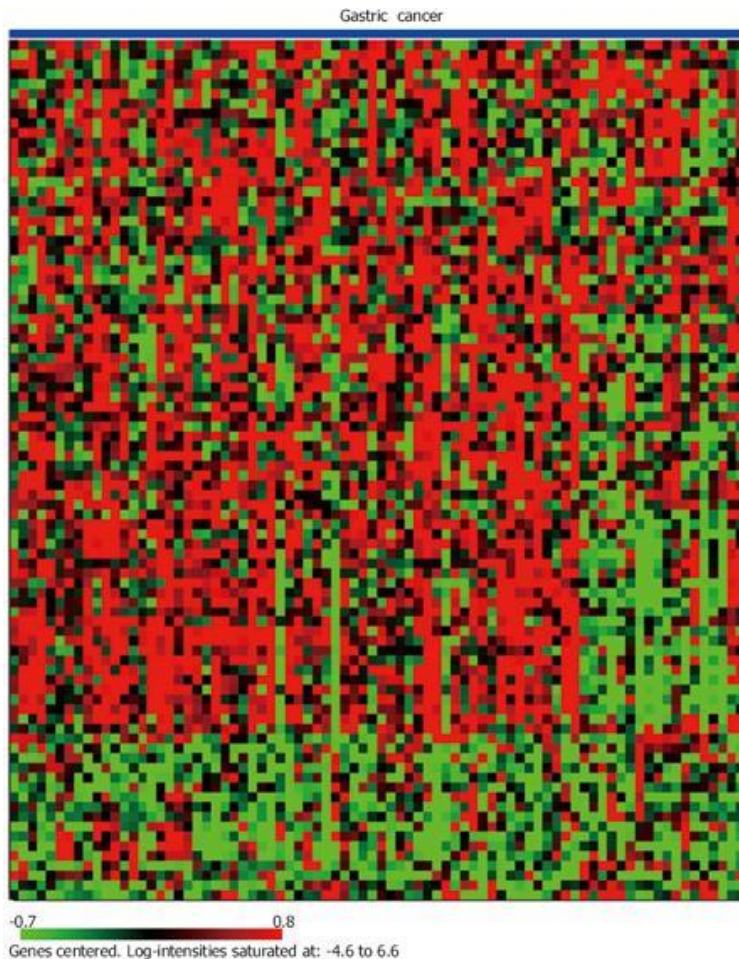
Funkce: zjištění míry genové exprese simultánně u obrovského množství genů
- každý spot (sonda, probe) je větš. krátký usek genu, který se hybridizuje s cDNA



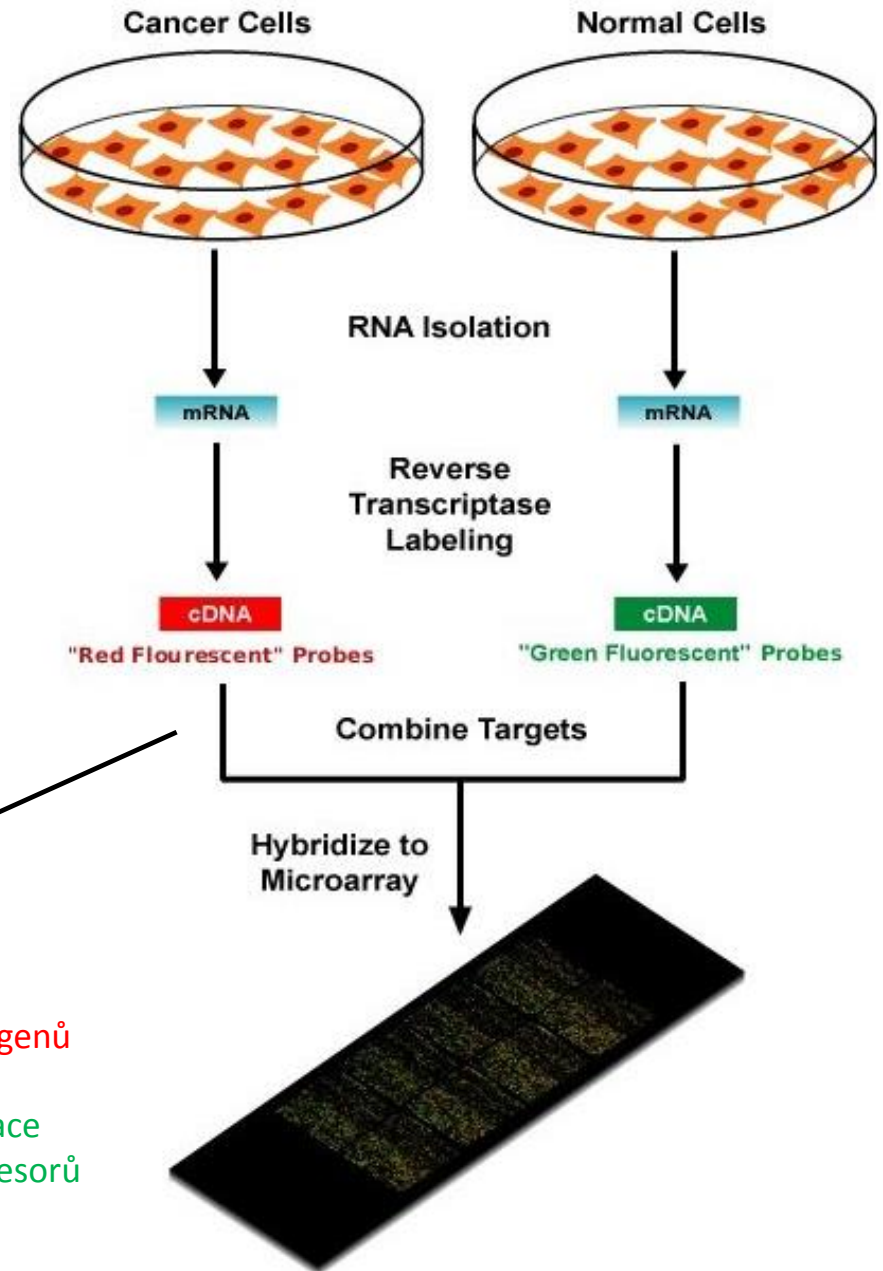
1b) Microarray

Srovnávají se mRNA dvou vzorků, např.:

- vzorek/referenční DNA
- zdravý/nemocný
- před/po léčbě



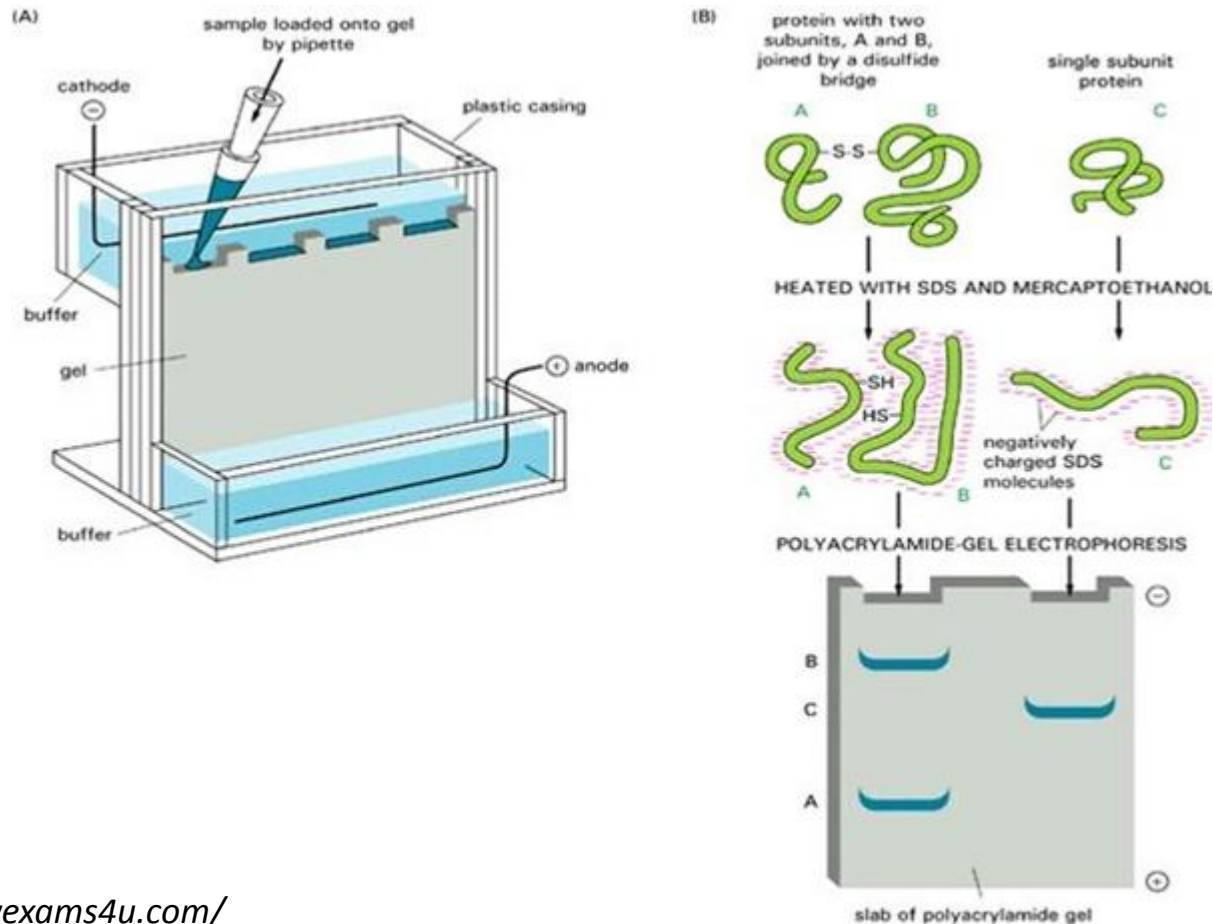
například:
upregulace
proto-onkogenu
downregulace
tumor supresorů



2a) Western blotting

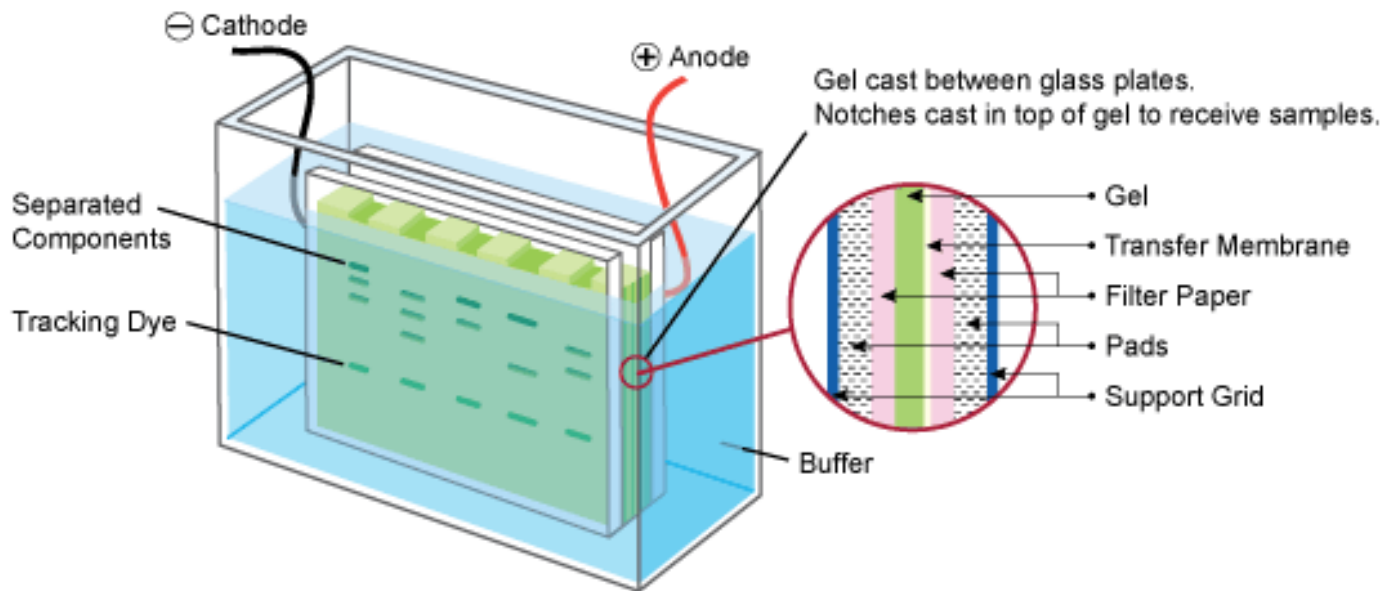
Určení množství určitého proteinu ve vzorku

1. vyizolovat celkový protein ze vzorků a změřit jeho koncentraci
2. zahřát s mercaptoethanolem a SDS pro přidělení negativního náboje a rozpojení disulfidických můstků
3. smíchat s barvičkou a nanést ve stejných koncentracích na polyakrylamidový gel



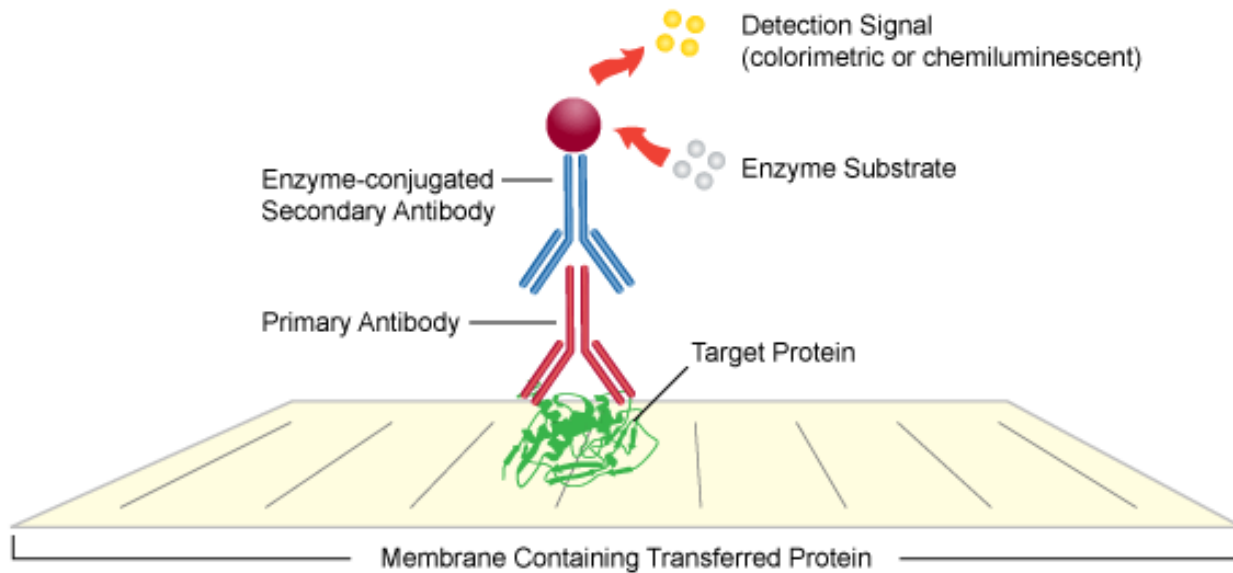
2a) Western blotting

4. přenést proteiny z gelu na nitrocelulozovou membránu



2a) Western blotting

5. inkubovat membránu s primární protilátkou proti sledovanému proteinu
6. inkubovat se sekundární protilátkou konjugovanou s enzymem (např. křenná peroxidáza; HRP)
7. nanést na membránu vyvolávací roztok se substrátem pro daný enzym (např. luminol)



2a) Western blotting

8. vyvolat membránu

- HRP katalyzuje oxidaci luminolu na 3-aminofthalát za emise světla
- nízká intenzita světla při 428nm
- přítomnost dalších chemikálií (fenoly) ve vyvolávacím roztoku amplifikuje světlo až 1000x
- tato amplifikace se nazývá "enhanced chemiluminescence - **ECL**"

- detekce pomocí CCD kamery
- vyvolání na fotografický film

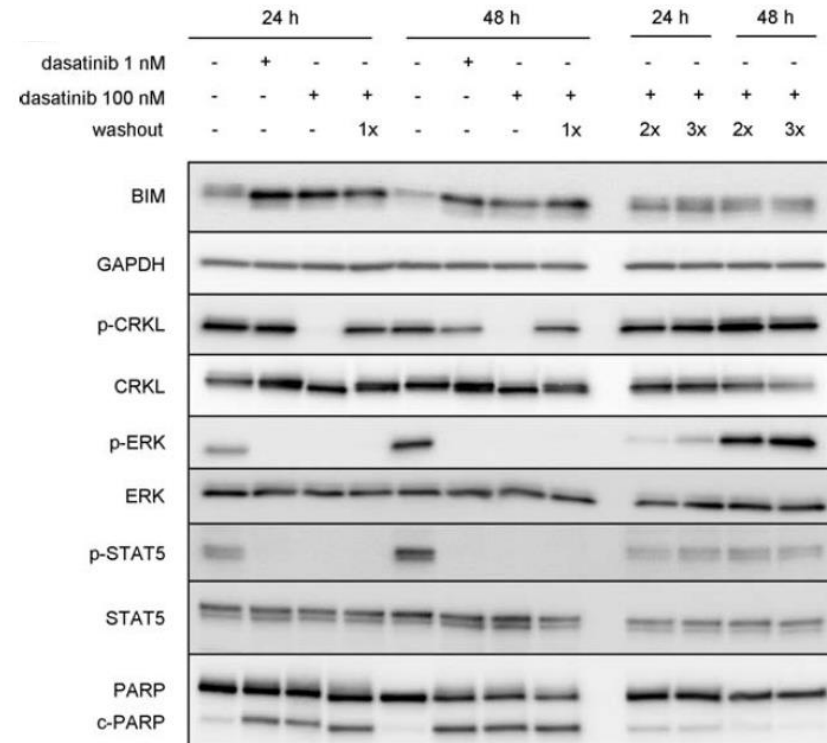


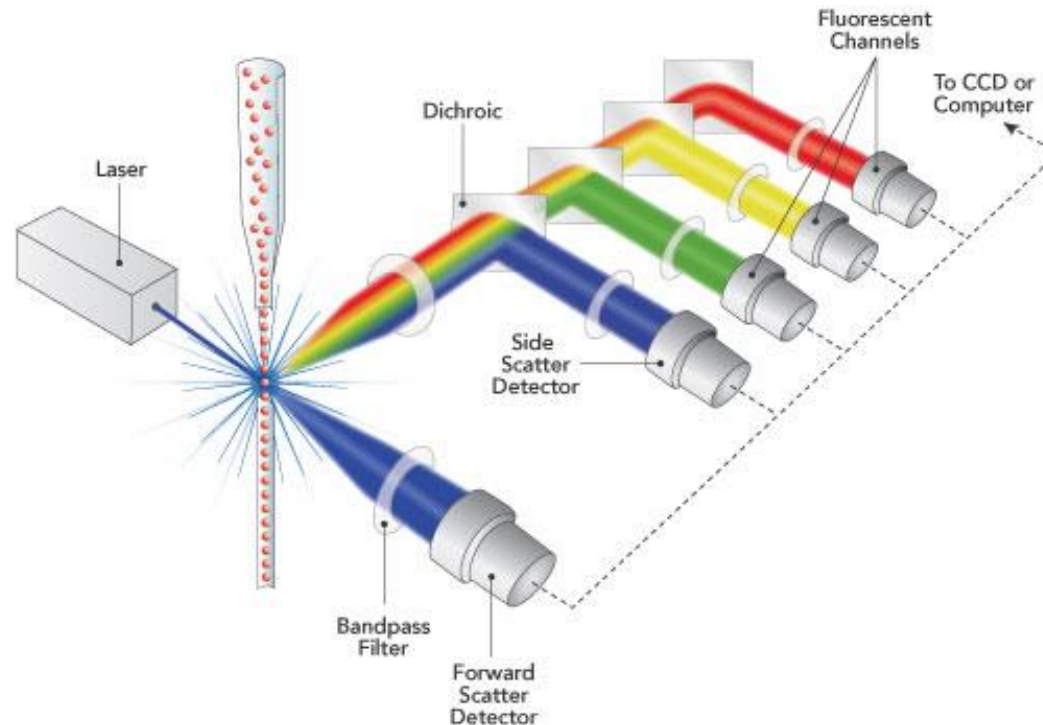
Figure 2. Effect of intermittent high-dose TKI treatment on signaling pathways in the K562 cell line. The cells were exposed to imatinib (A) or dasatinib (B) at a low dose continuously (2.5 μ M imatinib or 1 nM dasatinib), a high dose continuously (32.5 μ M imatinib or 100 nM dasatinib) or a high dose transiently (washout 1 \times , 2 \times , or 3 \times). The cells were then lysed and analyzed by Western blotting. The incubation time was 24 and 48 hr.

2b) Flow cytometrie

Technika pro analýzu velkého množství buněk.

Na buňkách je možné rozlišit

- **velikost** (forward scatter)
- **tvar** (granularitu; side scatter)
- expresi **povrchových proteinů** (protilátka proti povrchovým antigenům konjugovaná fluochromem)
- expresi **intracelulárních proteinů** (buňky nutno usmrtit a permeabilizovat membránu)



2b) Flow cytometrie

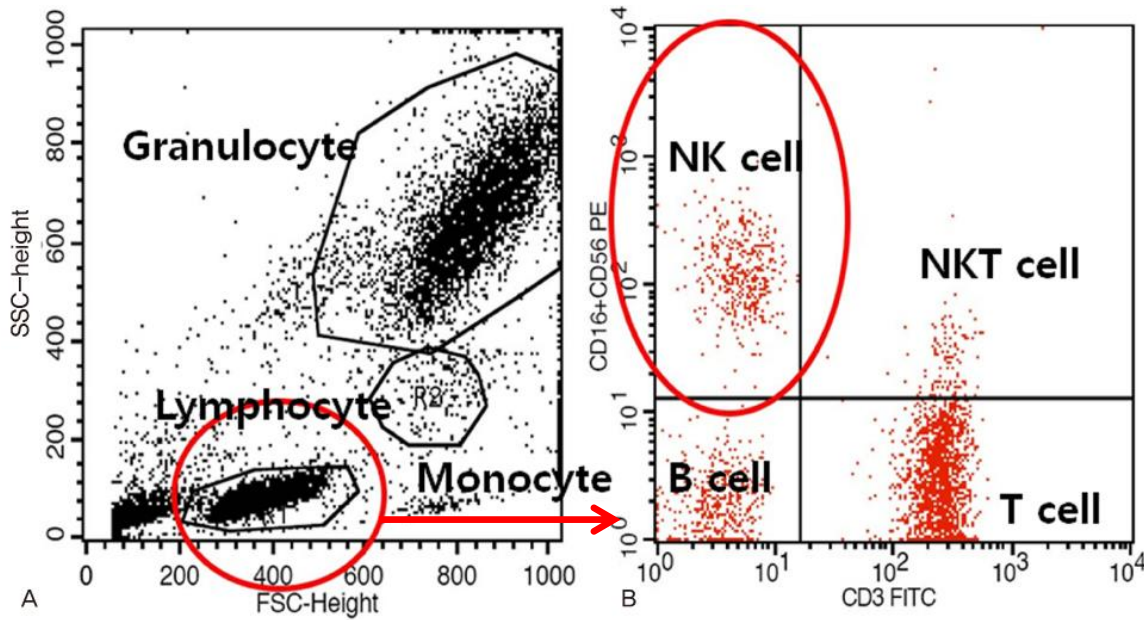
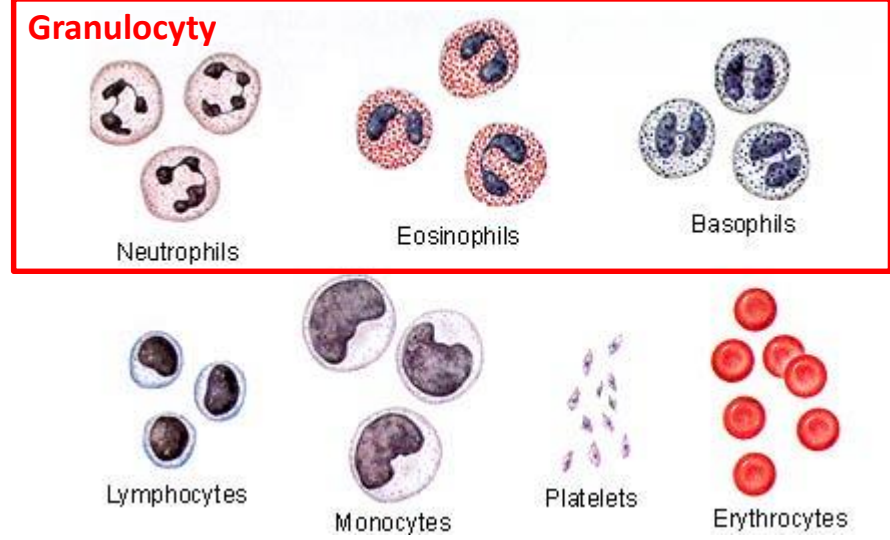
Vyhodnocení:

Leukocyty - bílé krvinky hledání NK buněk

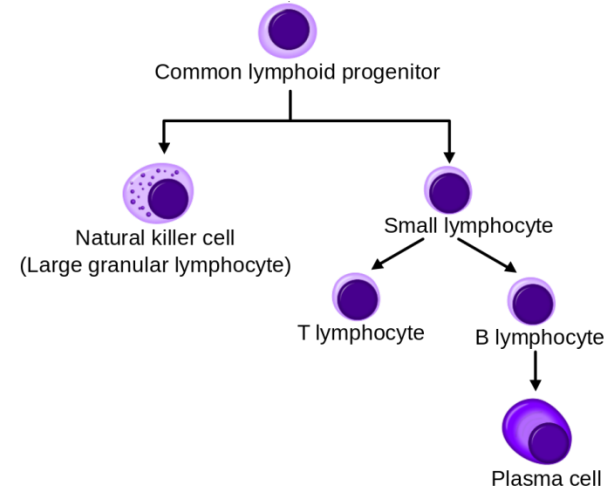
CD3 - T cell receptor

CD16 - povrchový antigen na NK buňkách,
neutrofilech, monocytech a makrofázích

CD56 - povrchový antigen NK buněk



R1 (lymphocyte) gating → CD3⁻/CD16⁺/CD56⁺ (upper right) part reading



www.biosbcc.net,
www.ogscience.org
wikipedia

NK cells - imunitní odpověď proti rakovinným buňkám a buňkám infikovaným virem
Granulocyty - přítomnost granulí v cytoplasmě a zaškrcení jádra

2b) Flow cytometrie

Identifikace T lymfocytů, aktivovaných k sekreci IFN- γ po in vitro kontaktu s proteiny koronaviru
Dárci, kteří koronavirus prodělali (nebo byli očkováni), měli vyšší procento aktivace

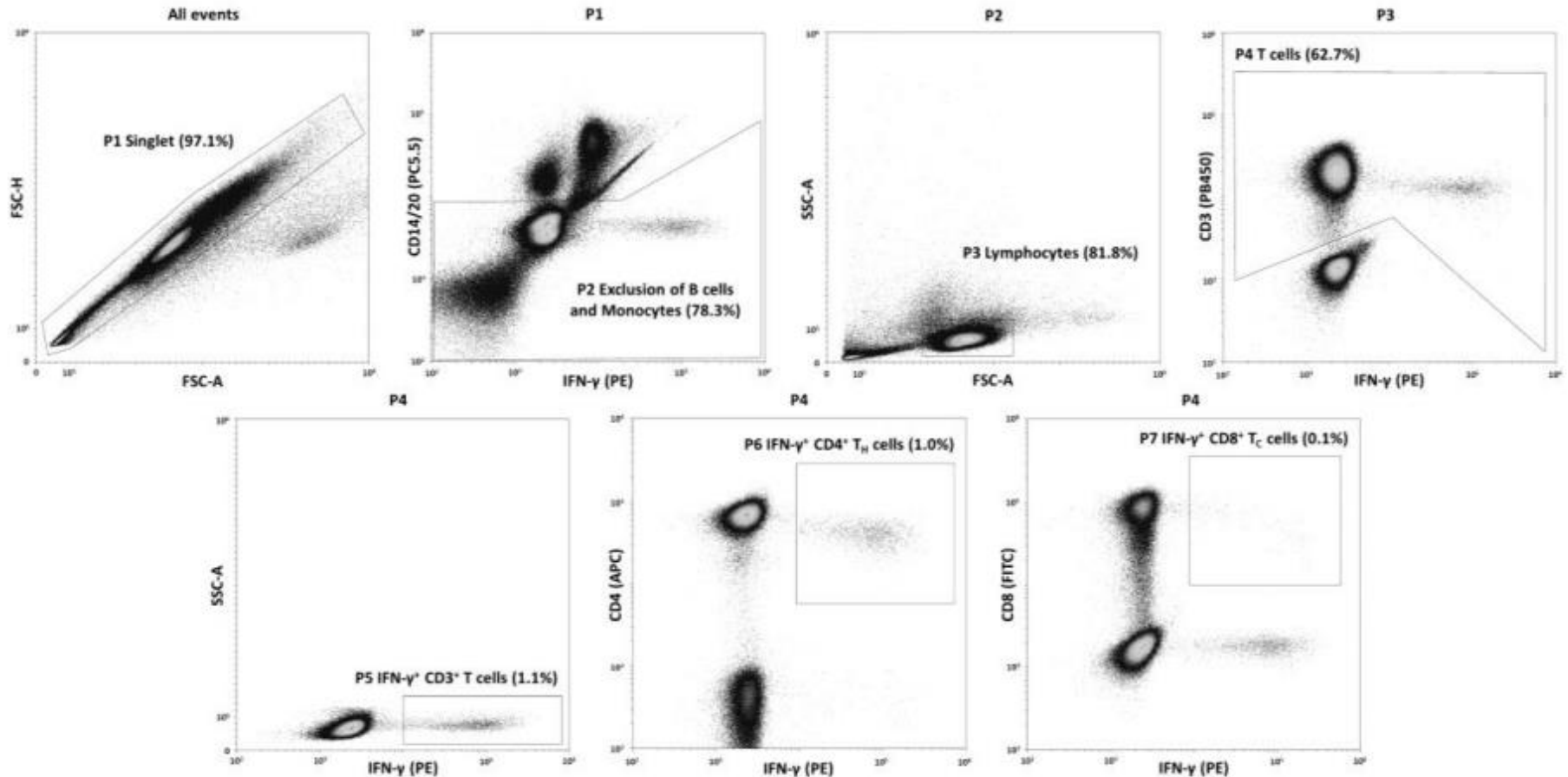
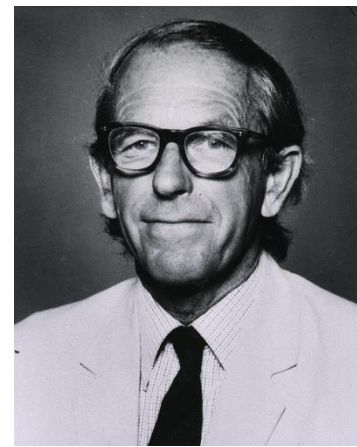


Figure 1. Gating strategy. Upper dot plots from left to right: Gate P1: singlets were selected within a FSC-A/FSC-H dot plot. Gate P2: monocytes and B cells were excluded using CD14 and CD20 antibodies. Gate P3: Lymphocytes were selected with a FSC-A/SSC-A dot plot. Gate P4: T cells were gated within the CD3⁺ population. Lower dot plots from left to right: cells secreting IFN- γ were gated in P4 in T cells (CD3⁺), T_H cells (CD4⁺), and T_C cells (CD8⁺). Data are shown on representative sample Cov-33.

Frederick Sanger (1918 - 2013)

Vynálezce metody dideoxy sekvenování DNA (též Sangerovo sekvenování)

- dvojnásobný držitel Nobelovy ceny za chemii (1958 a 1980)
 - 1952 definoval pořadí aminokyselin ve dvou řetězcích bovinního inzulínu
 - 1977 publikoval dideoxy metodu pro rychlé a přesné sekvenování



Wikipedia

Sangerovo sekvenování

Sekvenování je určování pořadí nukleotidů v molekule DNA

- principem je použití dideoxyribonukleosid trifosfátu (**ddNTP**) namísto deoxyribonukleosid trifosfátu (**dNTP**)
- při replikaci se normálně připojuje nový dNTP na OH-skupinu posledního dNTP na 3'-konci řetězce
- pokud se připojí ddNTP - elongace končí

ddNTPs terminate DNA synthesis.

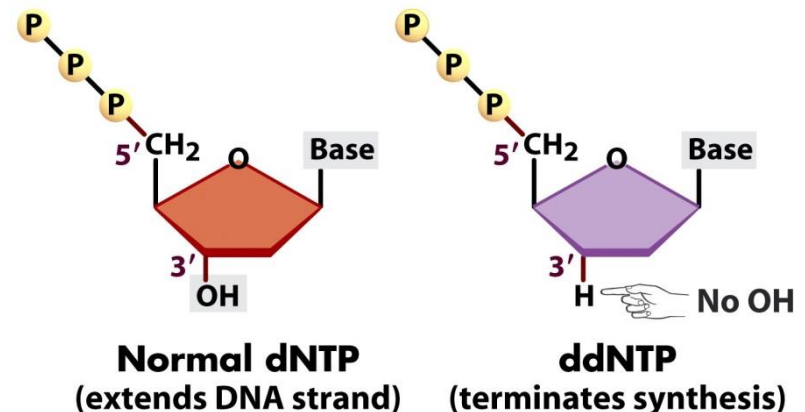


Figure 19-6a Biological Science, 2/e

© 2005 Pearson Prentice Hall, Inc.

Sangerovo sekvenování

- smícháme templátovou DNA + DNA polymerázu + dNTP (T, A, C, G) + 1 ddNTP (např. G) + radioaktivně značený primer → elongace řetězce se zastaví na místech zabudování ddGTP
- vznikají nám různě dlouhé řetězce DNA

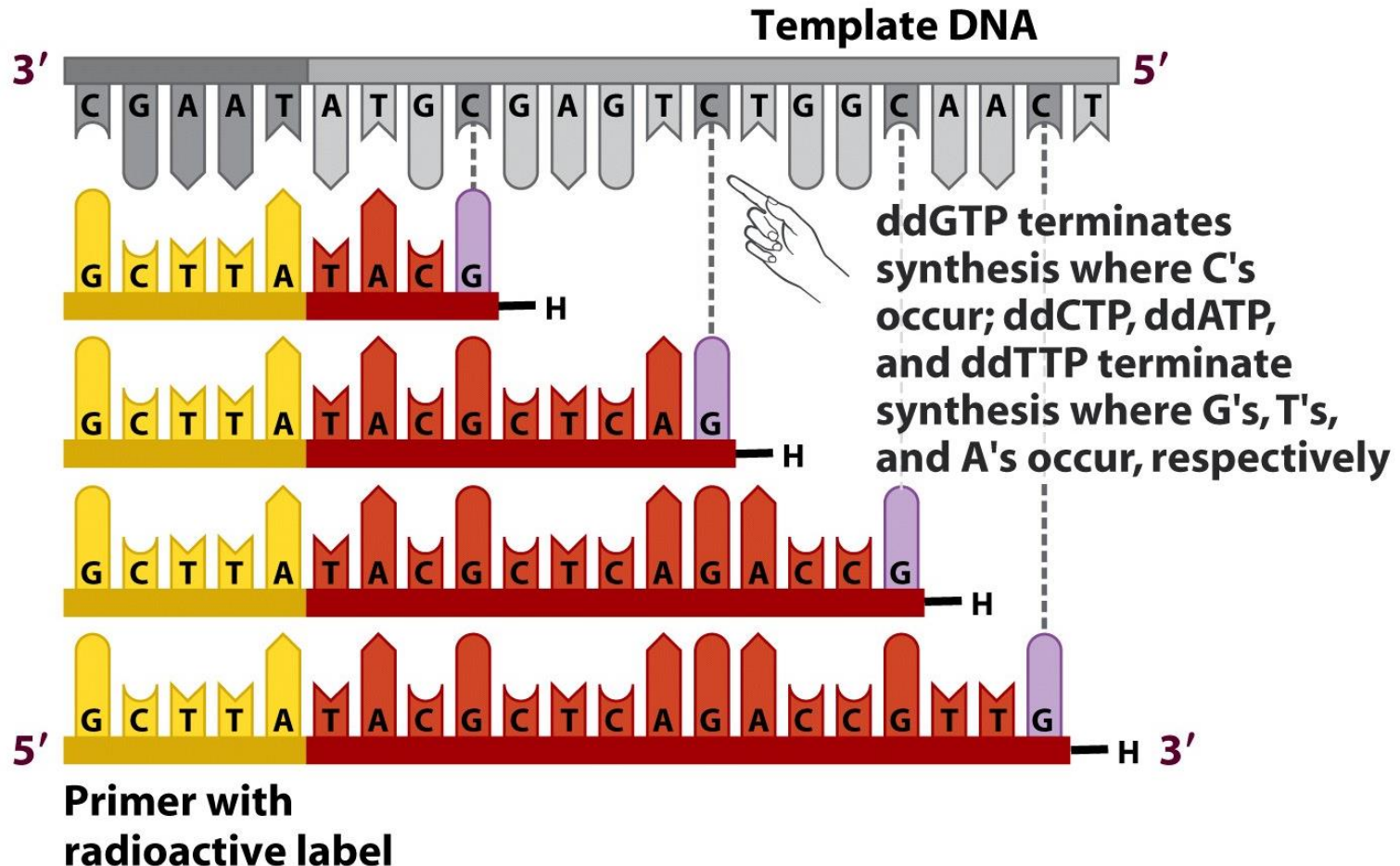


Figure 19-6b Biological Science, 2/e

© 2005 Pearson Prentice Hall, Inc.

Sangerovo sekvenování

- Reakci provedeme 4x, pro každý dideoxyribonukleosid zvlášť (ddATP, ddCTP, ddGTP a ddTTP)
- produkty těchto 4 reakcí nanese do 4 jamek elektroforetického gelu a roztrídíme podle délky
- sekvence DNA je jasná z gelu

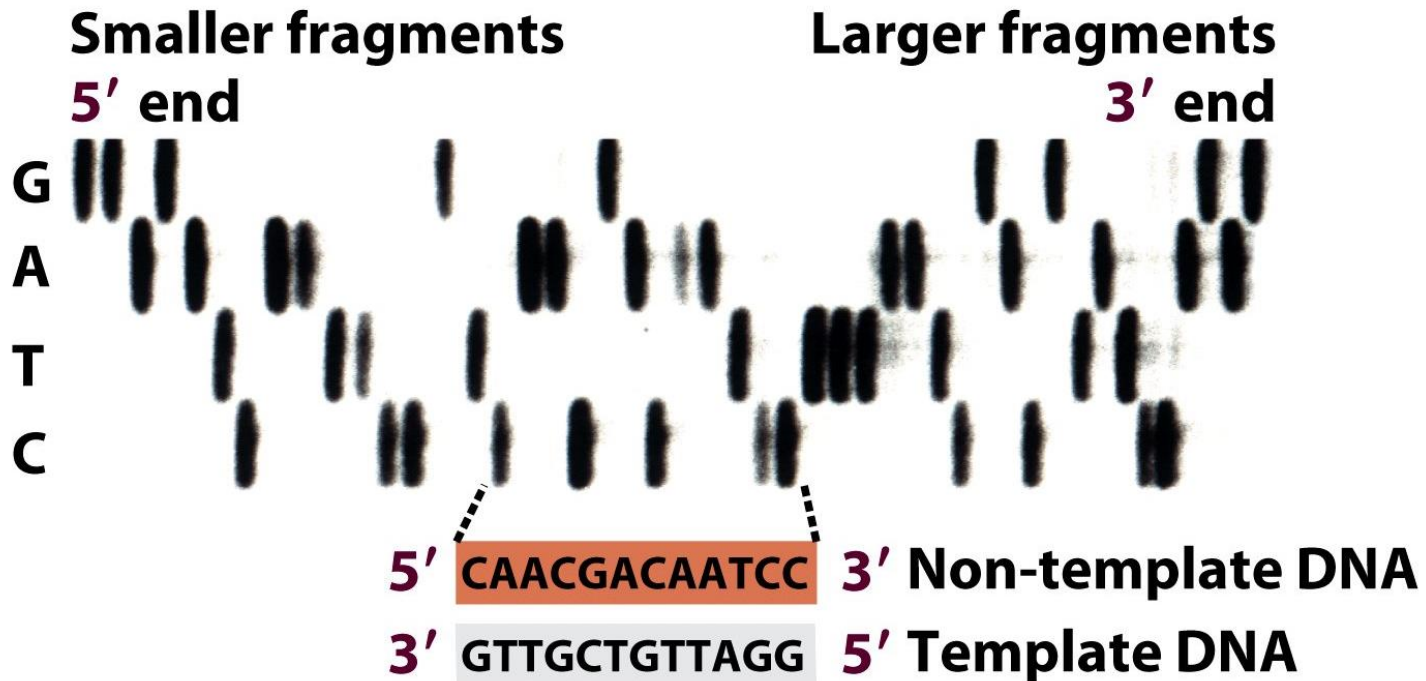


Figure 19-6c Biological Science, 2/e

Modernizace Sangerova sekvenování

- ddNTP jsou značeny fluorescenčně, každý jinou barvičkou a proto lze všechny 4 ddNTP smíchat do jedné reakce
- fragmenty jsou separovány v kapilárách naplněných gelem
- automatické zaznamenávání délky jednotlivých fragmentů

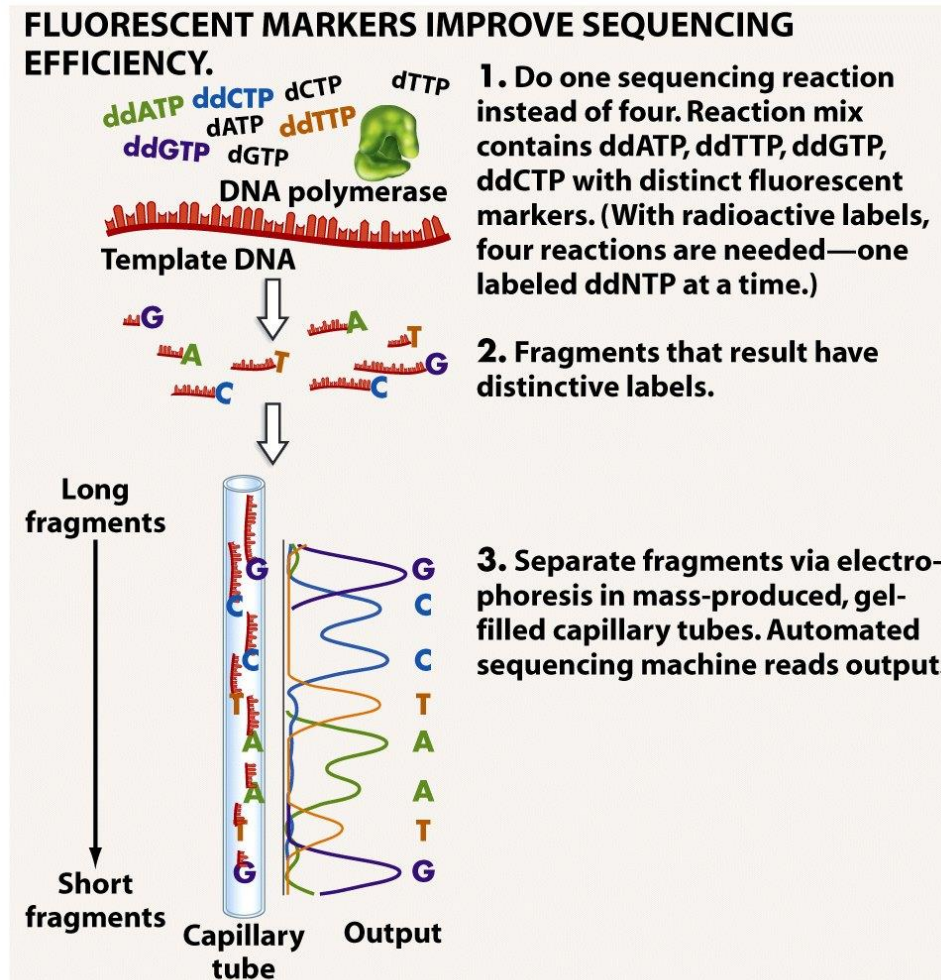


Figure 20-1 Biological Science, 2/e

Buněčné reprogramace

Příprava lidských indukovaných pluripotentních kmenových buněk (iPSC)

Tyto jsou schopny diferencovat do tkání všech třech zárodečných listů

Jedním z možných využití je příprava progenitorů pro transplantace (např. krevní, pankreatické, jaterní...)



Shinya Yamanaka

nar. 1962

Nobelova cena 2012 (sdílená s J. Gurdonem)

Sebeobnova (self-renewal) a diferenciacie

"Stem cell is capable of self-renewal and gives rise to a specialized cells"

Typy kmenových buněk

Totipotentní...	dává vznik celému organismu <i>např. zygota; časná blastomera</i>	} pouze v embryu
Pluripotentní...	diferencuje do všech 3 zárodečných listů, ale ne do extraembryonální tkáně <i>např. inner cell mass; ESC; iPSC</i>	
Multipotentní...	diferencuje do různých buněčných typů v rámci určité linie <i>např. hematopoietic stem cell</i>	} existují i v dospělých
Unipotentní...	diferencuje pouze do jednoho buněčného typu <i>např. spermatogonium</i>	

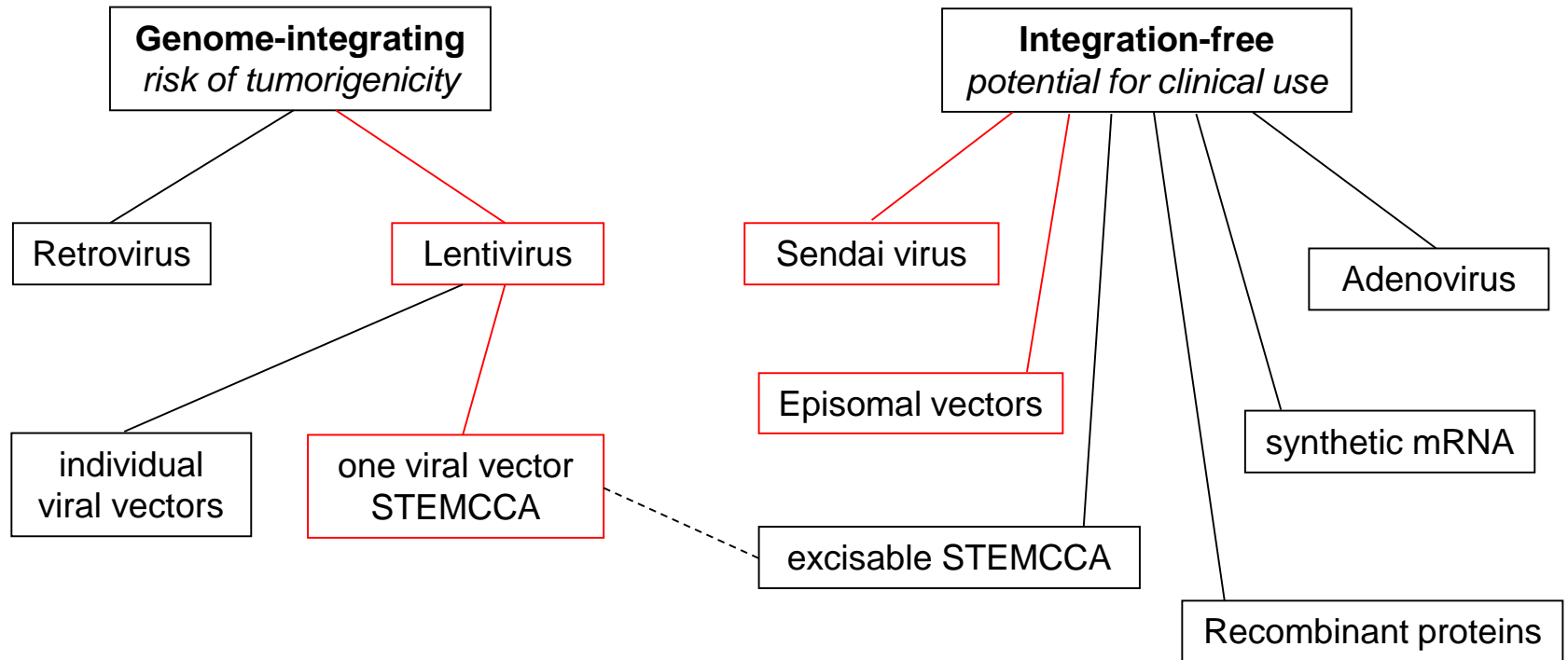
Reset do embryonálního stavu

- diferenciaci probíhá většinou jednosměrně a reprogramace či transdiferenciaci je vzácná (např. některé nádory)

- avšak jádro většiny buněk si zachovává schopnost resetovat se do embryonálního stavu:

- **Nukleární transfer** - jádro somatické buňky je vystaveno faktorům oocyty
1952, Briggs, 1962 Gurdon: transplantace jádra z buňky blastuly do žabích vajíček
1997, Wilmut: ovečka Dolly, první naklonovaný savec
neprovedeno na lidech; je potřeba značné množství oplozených vajíček, neetické
- **Přímá reprogramace** - **indukovaná** overexpresi definovaných transkripčních faktorů
2006, Takahashi a Yamanaka: transformovali myší fibroblasty do pluripotentních buněk vložením 4 genů - Oct3/4, Sox2, Klf-4, c-Myc (OSKM)
2007, Takahashi; Yu: iPSC z lidských fibroblastů

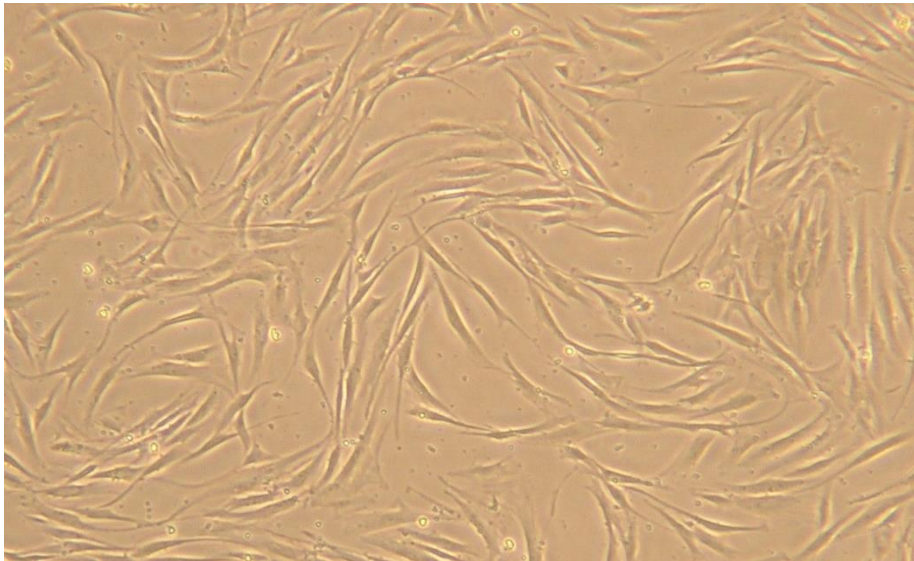
Jak připravit lidské iPSC?



Zdrojové buňky

Libovolná somatická (tělní) buňka

Nejčastěji kožní fibroblast nebo krevní buňka



Fibroblasty



Krevní buňky (mononukleáry)

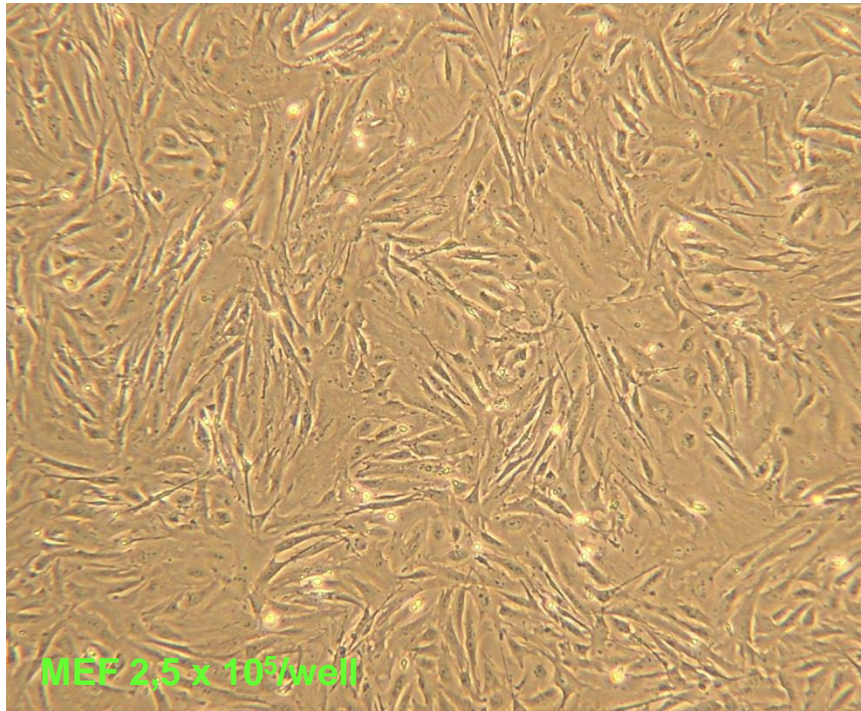
Povrch pro kultivace iPSC

a) MEF feeders (myší embryonální fibroblasty)

iPSCs kultivovány na vrstvě ozářených MEF (50Gy)

MEF zajišťují uchycení iPSC a produkují potřebné růstové faktory pro iPSC

MEFy získávány z myších embryí

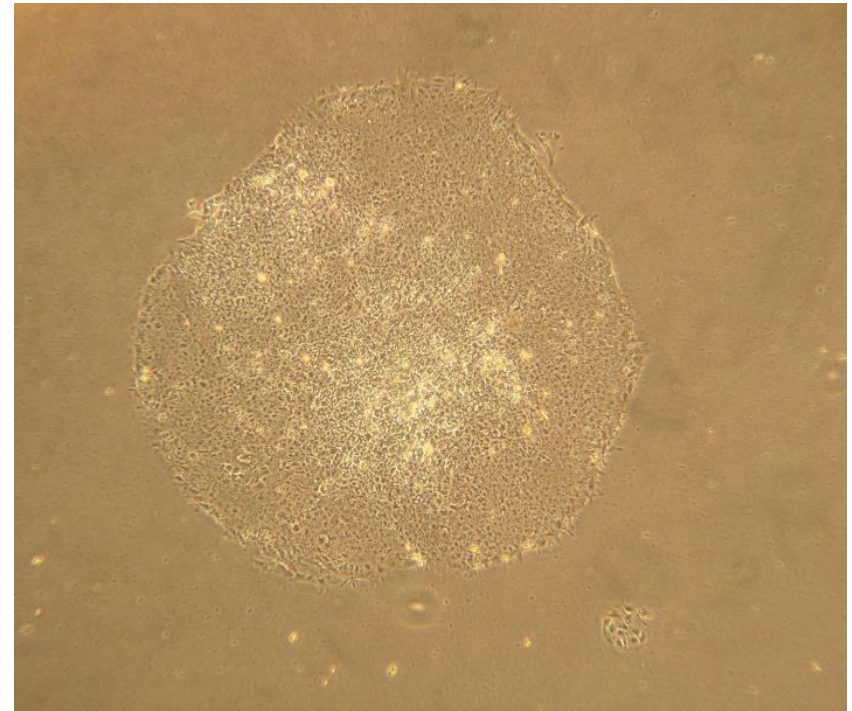


b) Geltrex™ feeder-free system

Kultivační misky pokryty membránovým matrix

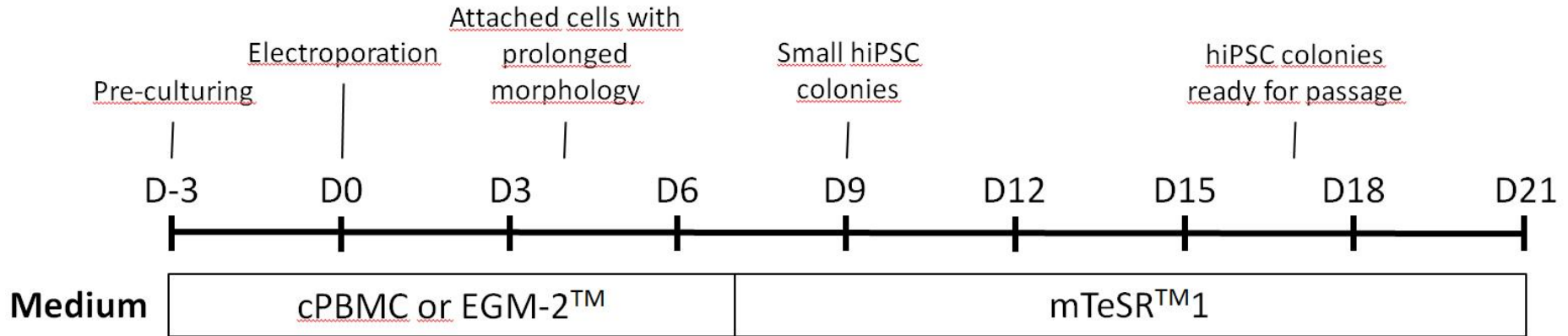
Nepřítomnost xenogenních buněk je vhodnější pro klinické aplikace

Nutné medium, které obsahuje chybějící růstové faktory (mTeSR, E8...)

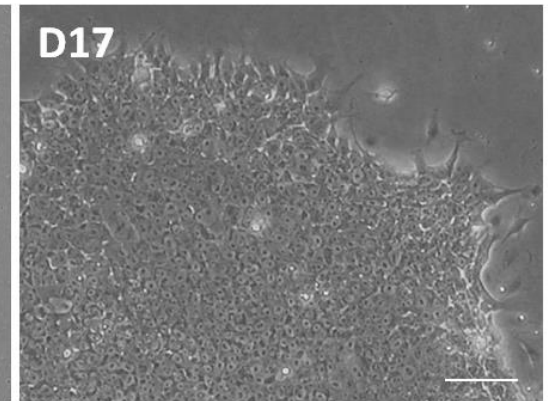
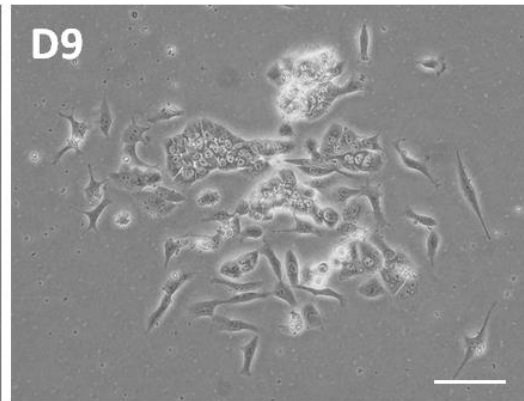
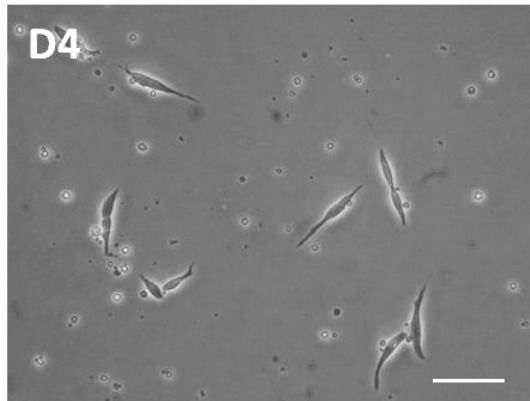


Reprogramming timeline

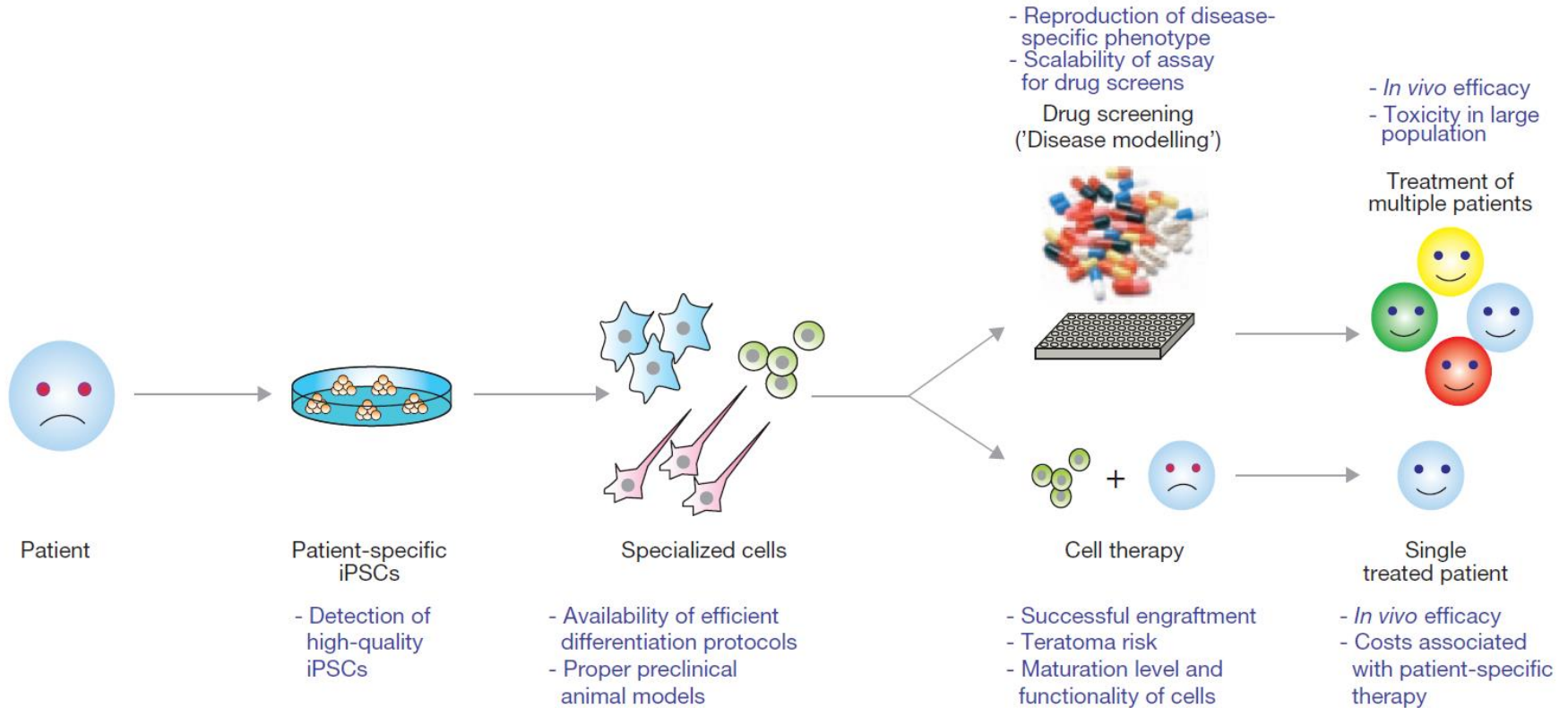
Reprogramace krevních buněk episomálními vektory na Geltrexu



cPBMC: StemPro®-34 SFM + SCF, Flt-3L, IL-3, IL-6

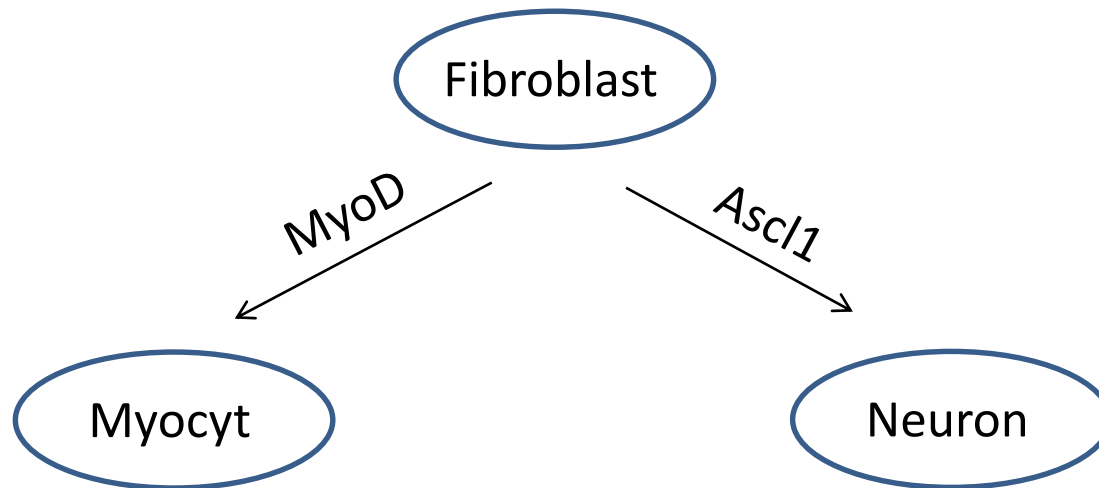


Potenciál iPSC v regenerativní medicíně



Buněčné transdiferenciace

- vydifferentovaná buňka má schopnost, změny na jinou buňky, při použití vhodných transkripčních faktorů
- z kožního fibroblastu lze vytvořit svalový myocyt (1970s) nebo neuron (2000s)
- lze přeskočit mezikrok kmenová buňky



Chimerní organismus



Chiméra

Podle řecké mytologie, hybridní tvor, složený z částí více než jednoho zvířete. Obvykle zobrazován jako lev s hlavou kozy a ocasem z hadí hlavy.

Tvorba chimerních organismů

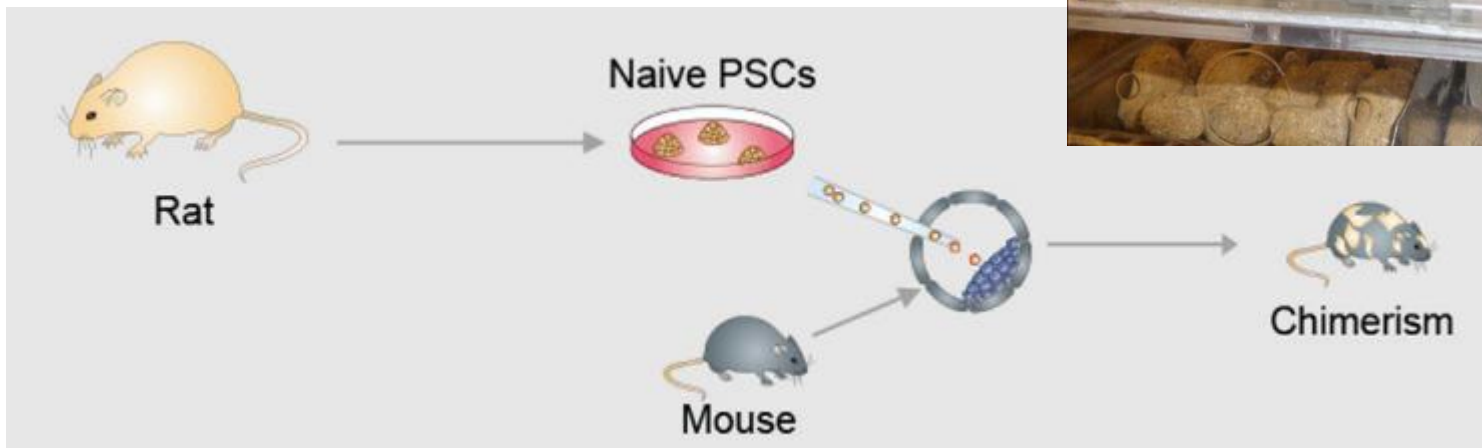
a) vložit orgán jednoho organismu do jiného

- pravděpodobně bude odmítnut imunitním systémem hostitele

b) vložení kmenových buněk jednoho organismu do embrya jiného organismu

- imunitní systém hostitele ještě neexistuje a cizí buňky se naučí tolerovat
- buňky lze směřovat do určitého orgánu tak, že v hostitelském embryu pomocí CRISPR/Cas9 vyřadíme např. geny pro vývoj slinivky a slinivka vyrostе pouze z buněk dárce
- km. buňky dárce ovšem mohou proniknout částečně i do jiných orgánů (mozek, spermie)

"Kryso-myš"

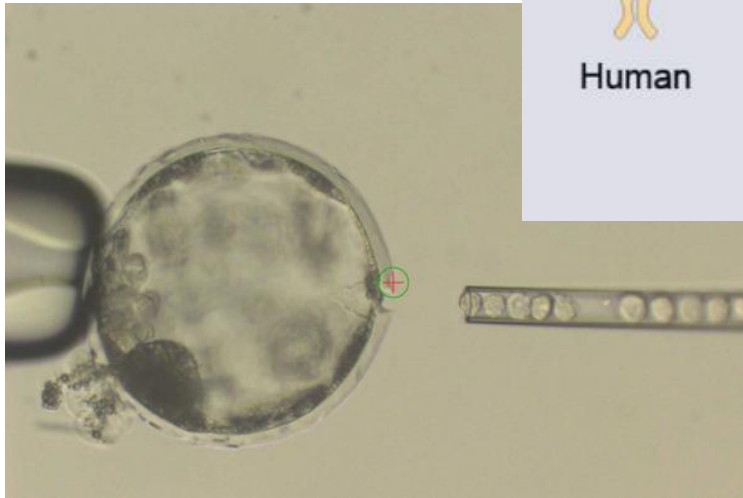


Tvorba chimerních organismů z lidí

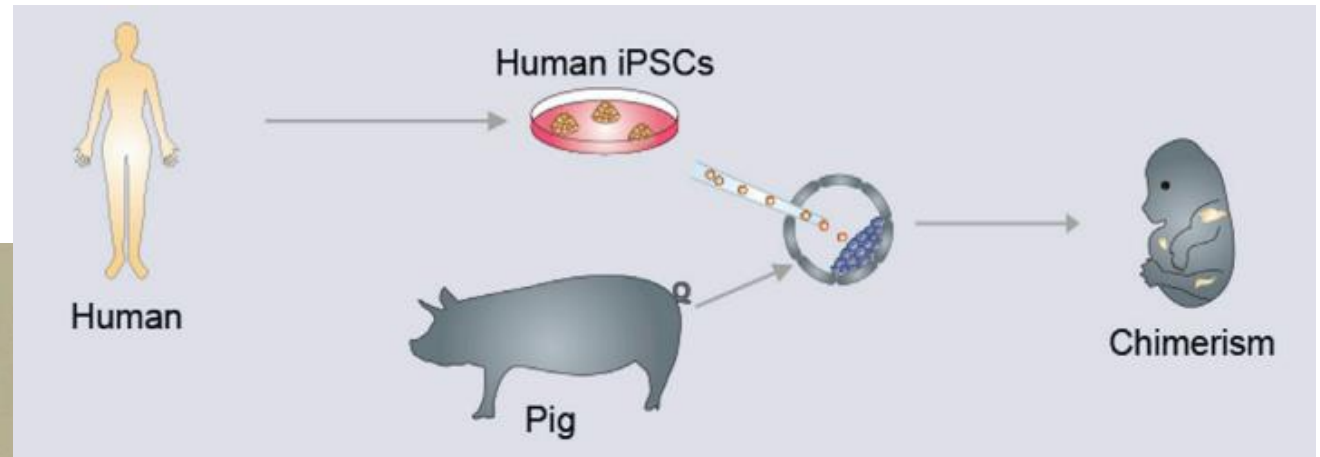
Lidské embryonální buňky mají schopnost integrovat se do embrya jiného druhu a diferencovat tam

Wu et al., Interspecies Chimerism with Mammalian Pluripotent Stem Cells.

- vložili 3-10 buněk lidských hiPSC do prasečího embrya (167 embryí; blastocysta 7dní)
- embrya vložena do děloh bachyní a analyzována po 3-4 týdnech vývoje
- chimerní embrya měla sice zpomalený růst oproti kontrolním prasečím embryím, ale obsahovala v průměru 100 000 lidských buněk



An image of a pig blastocyst being injected with human cells.



Molekulární biologie

11. Apoptóza a imunita

Osnova

1. Apoptoza
2. Vývoj a aktivace T- a B-lymfocytů
3. Imunoglobuliny, exprese BCR a TCR

Hlavní zdroje:

*S. Rosypal, Úvod do molekulární biologie 1-4
Masarykova Universita Brno
ISBN 80-902562*

*M. Muller, Biology of Cells and Organisms
University of Illinois, Chicago*

<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/summer2010/lecturesm10.htm>

The screenshot shows a Microsoft Teams chat window for a meeting titled "FI:VV072 Molekulární biologie". The chat history includes several messages from "Fi:VV072 Molekulární biolo..." with timestamps and status updates like "Nahrávání se zastavilo." and "Nahrávání je připraveno." A message from "Oto Stanko" at 7:4 states "Tak sme sa dostali do hovoru my". A meeting summary card indicates the meeting ended at 11:31 and lists participants: Pavel Šimara, Šimon Ondrejka, Oto Stanko, Michaela Hanajiková, and Ondřej Huvar. A video recording card shows a 19-second clip with the status "Schůzka Nahrál(a): Pavel Šimara". A feedback prompt asks "Jaká byla kvalita hovoru?" with five stars. A notification at the bottom states "Nemůžete odesílat zprávy, protože nejste členem chatu." The Windows taskbar at the bottom shows the date as 12. 5. 2021 and time as 11:37.

Nahrávka bohužel zase jako minule pouze „Nahrávání bylo zastaveno. Nahrávka se ukládá na OneDrive...“

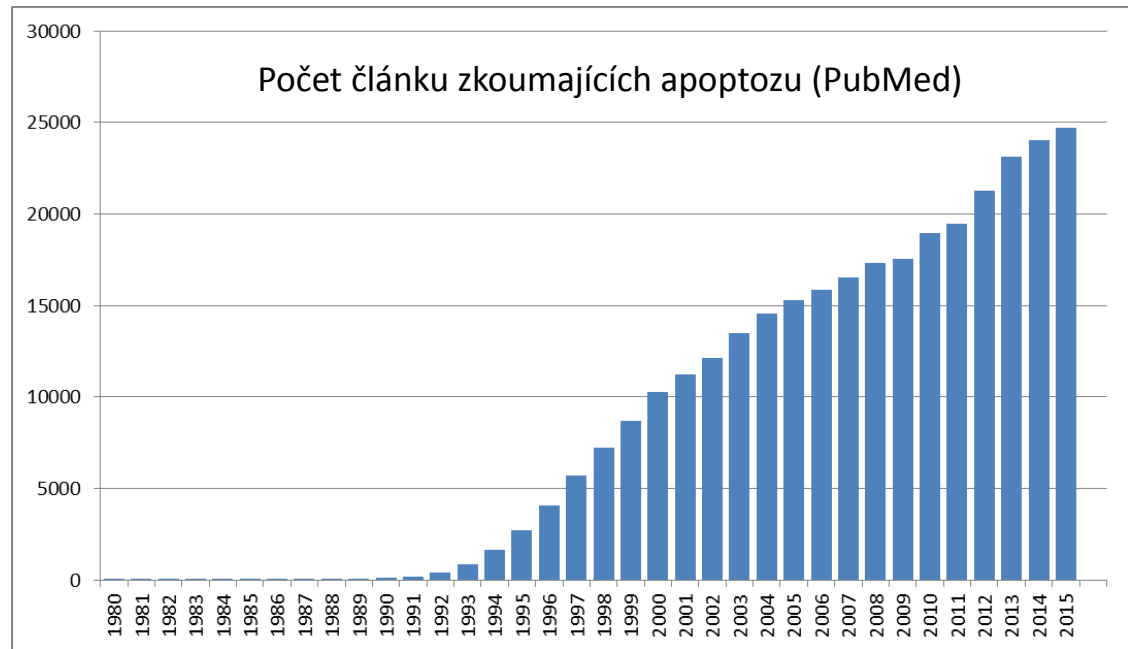
Přestože jsem udělal před zahájením výuky 19s test, který se v pohodě zaznamenal a jde spustit z OneDrive.

Apoptóza

programovaná buněčná smrt

Apoptóza

- koncept apoptozy od 1950s
- intenzivně zkoumána od 1990s
- poruchy apoptozy hrají roli v různých nemocech, zejm. rakovině



Excesivní apoptóza
např. dystrofie



Omezená apoptóza
např. rakovina

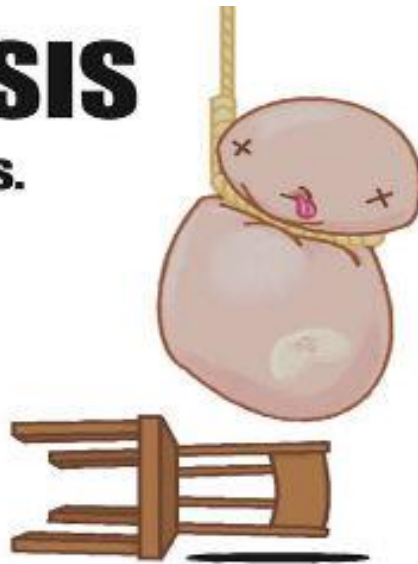
Dystrofie - degenerace tkáně z důvodu nemoci nebo špatné výživy

Apoptóza - buněčná sebevražda

- nezbytná pro vývoj a homeostázi organismu
- pouze u mnohobuněčných organismů
- přísně regulovaný proces (na rozdíl od nekrózy)

- buněčný stres nebo signalizace od jiných buněk stimuluje pro-apoptotické signální dráhy
- tyto dráhy kaskádovitě aktivují proteázy zvané "kaspázy"
- kaspázy způsobují mitochondriální dysfunkci
- apoptotická buňka vykazuje charakteristické změny morfologie

APOPTOSIS
Know the signs.



Buněčný stres/
Signalizace



pro-apoptotické
signální dráhy



Kaspázy

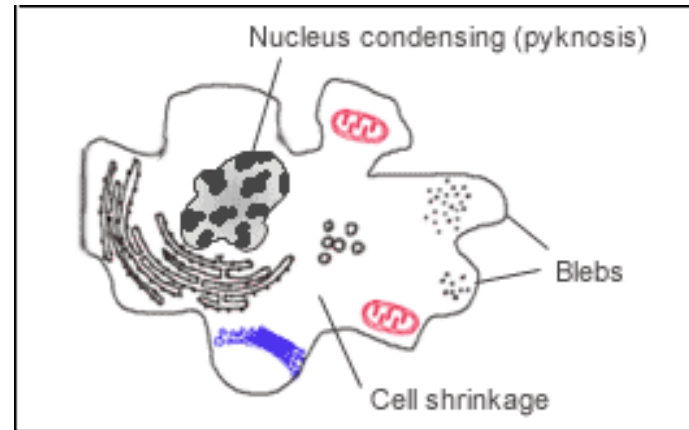


APOPTOZA

Charakteristické morfologické znaky apoptozy

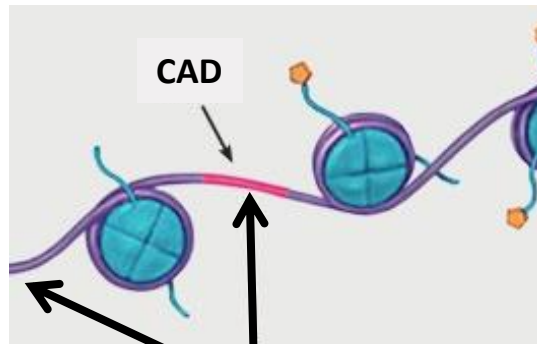
1. Blebbing

- nepravidelné záhyby cytoplazmatické membrány
- smršťování buňky (shrinkage)
- vznikají odpojení cytoskeletu od membrány
- degradace vnitřní struktury buňky
- vznik **apoptotických tělísek**



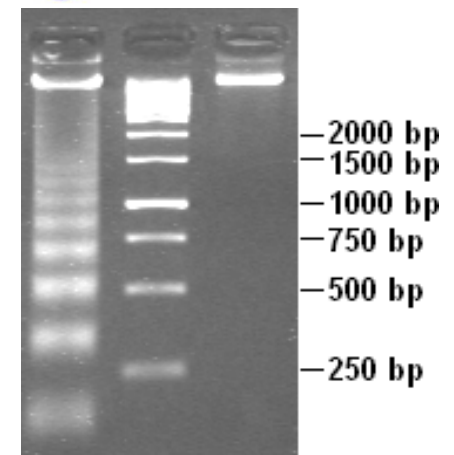
2. Fragmentace jádra

- Kaspáza 3 aktivuje endogenní endonukleázu - enzym CAD (Caspase-Activated DNase)
- štěpí chromatinovou DNA na fragmenty o délce cca 180bp
- na elektroforetickém gelu lze pozorovat 180bp fragmenty DNA a jejich násobky (360, 540...)
- 180bp je zhruba délka rozestupu histonů na DNA



místa štěpení CAD endonukleázou

☹️ žebříček ☺️

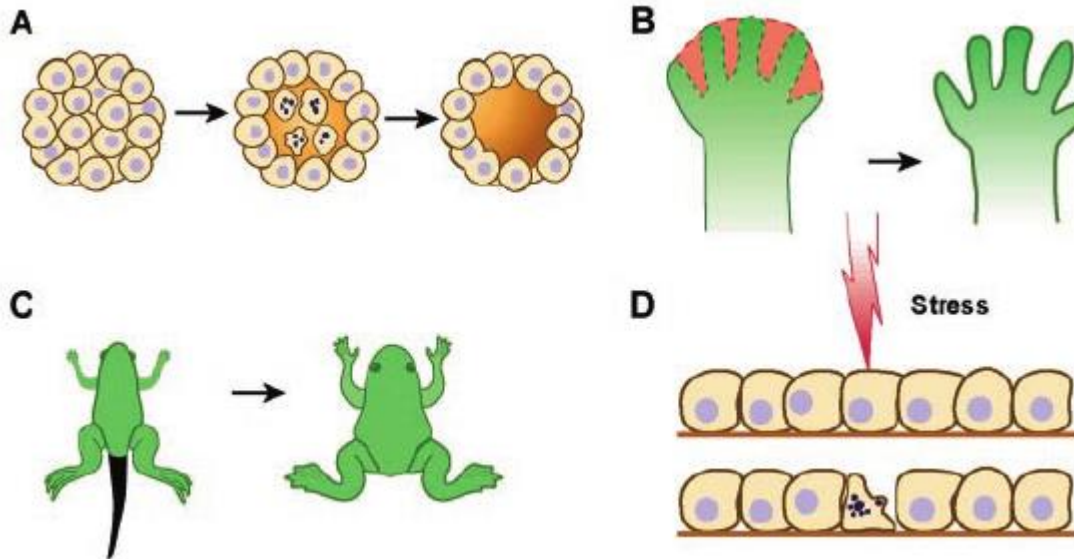


Pyknóza - ireverzibilní kondenzace chromatinu

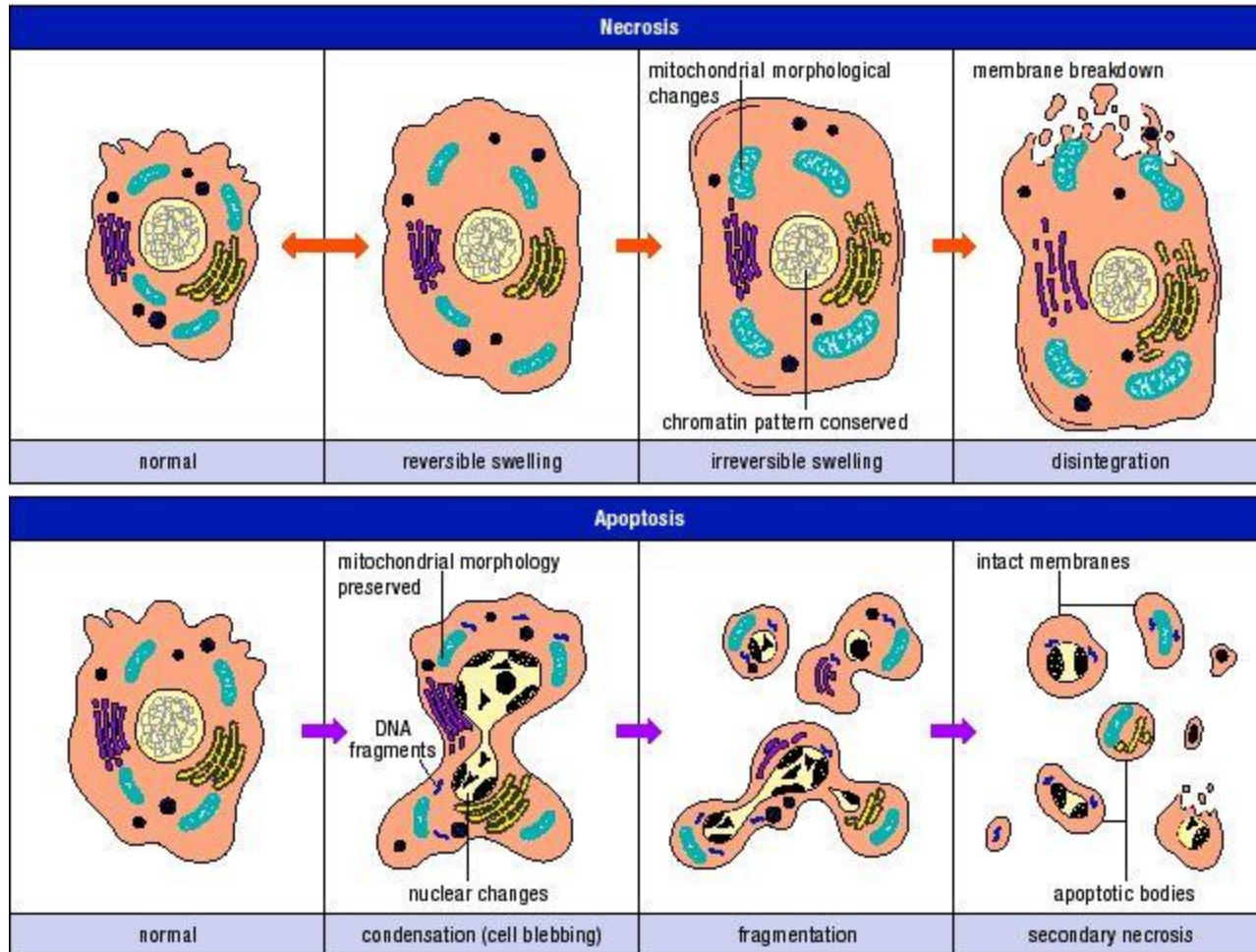
Kdy probíhá apoptóza

Příklady:

- zánik nadbytečných buněk v prenatálním období (u embrya, u plodu)
 - orgány se zakládají jako shluky buněk
 - duté orgány vznikají tak, že vnitřní buňky zaniknou apoptózou (A)
 - diferenciaci lidských prstů (B)
- zánik buněk ve tkáních - např. zánik **červených krvinek** po přibližně 80 dnech
- poškození DNA, které již neumí buňka opravit (D)



Apoptóza vs. Nekróza



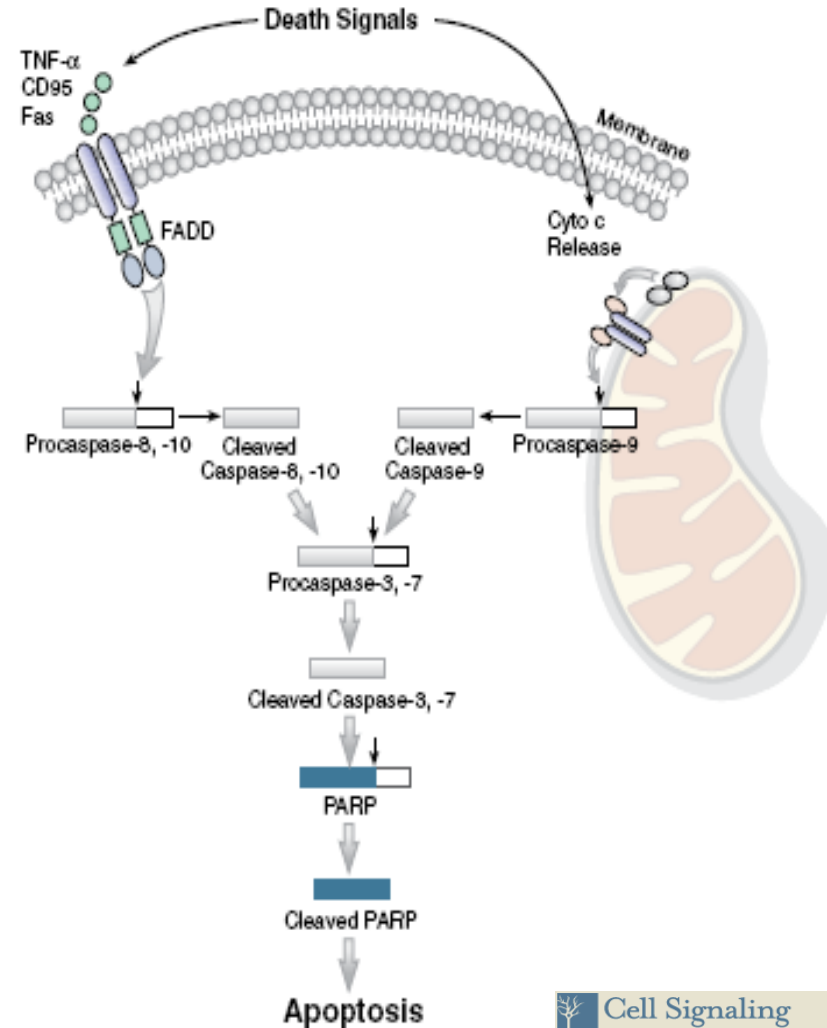
Apoptóza může být indukována dvěma drahami

1. Vnitřní dráha (intrinsic pathway; mitochondriální)

- z důvodu buněčného stresu nebo DNA damage
- uvolnění proteinů (hl. Cytochrom C) z prostoru na membráně mitochondrií





2. Vnější dráha (extrinsic pathway)

- z důvodu vnější signalizace od ostatních buněk
- extracelulární ligandy (hl. TNF- α a Fas) se váží na tzv. death-receptory na povrchu buněk
 - TNF- α produkují aktivované makrofágy
 - Fas ligand produkují T_C lymfocyty



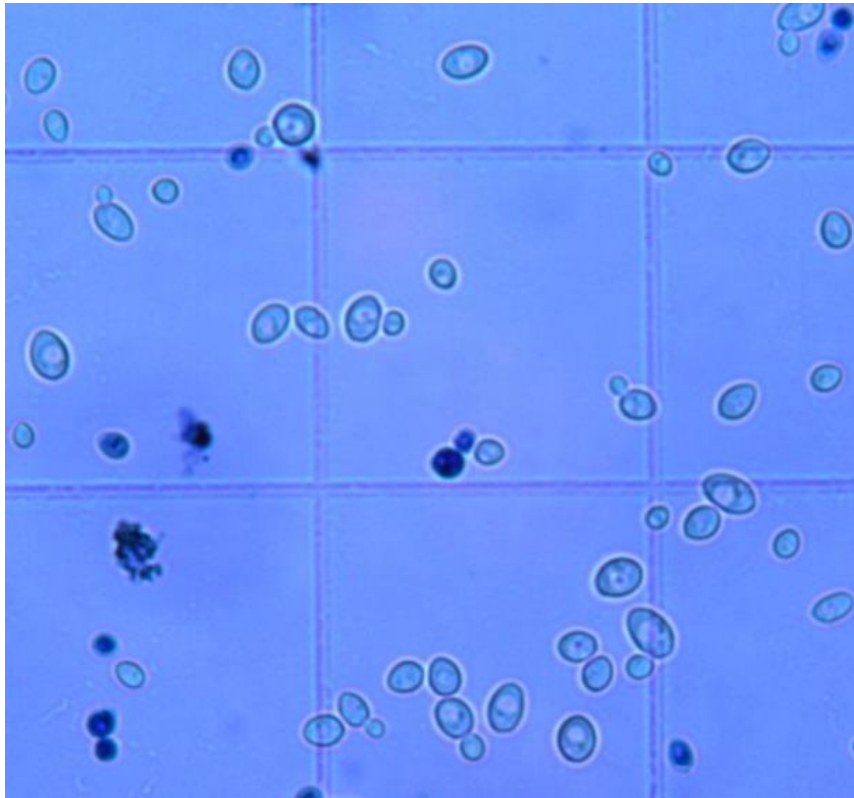
Metody detekce apoptózy

např. při testování léčiv in vitro

	Nic	Lék na leukemii
Zdravé krvinky		
Leukemické krvinky		

1. Barvení buněk trypanovou modří

- proniká a barví pouze mrtvé buňky
- počítání ve světelném mikroskopu na sklíčku s mřížkou
- nerozliší mezi apoptotickou a nekrotickou buňkou

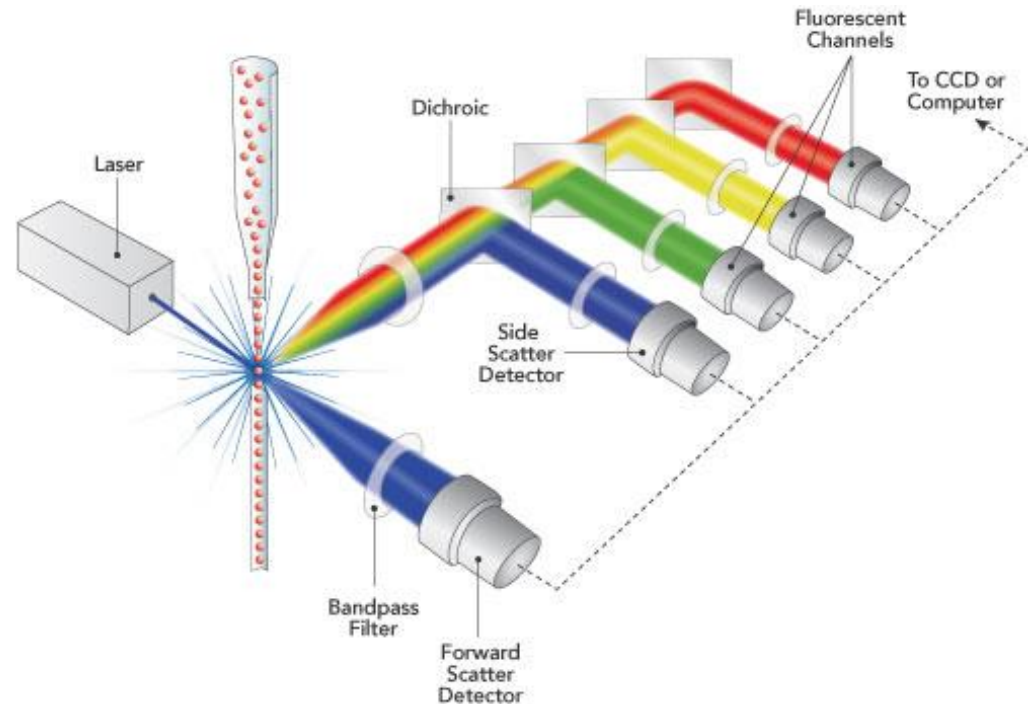
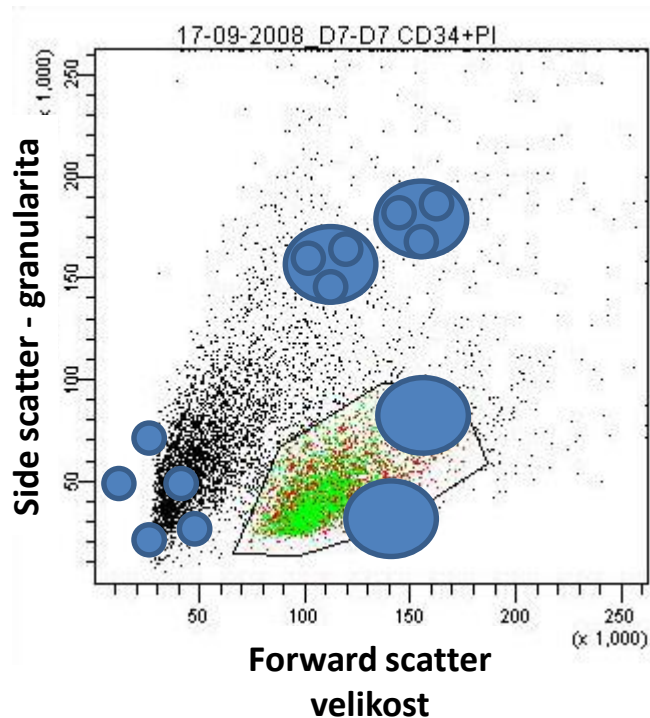


2. Flow cytometrie

Technika pro analýzu velkého množství buněk.

Na buňkách je možné rozlišit

- **velikost** (forward scatter)
- **tvar** (granularitu; side scatter)
- **fluorescenční barvičku** (DNA interkalátor; obdoba trypanové modři)
- expresi **povrchových proteinů** (protilátka proti povrchovým antigenům konjugovaná fluorochromem)
- expresi **intracelulárních proteinů** (buňky nutno usmrtit a permeabilizovat membránu)

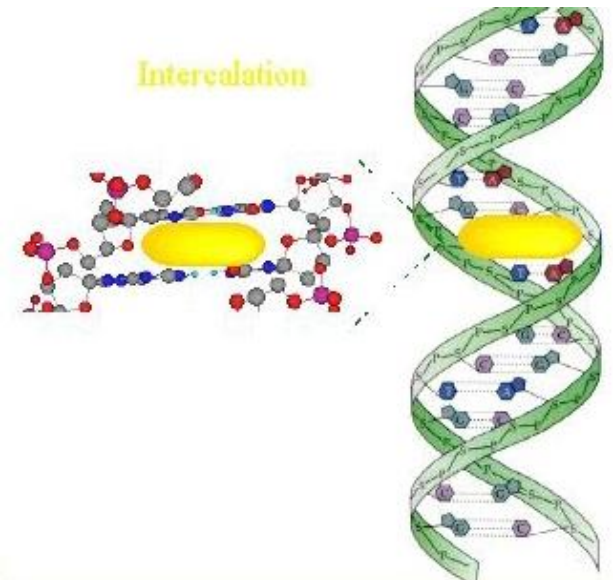
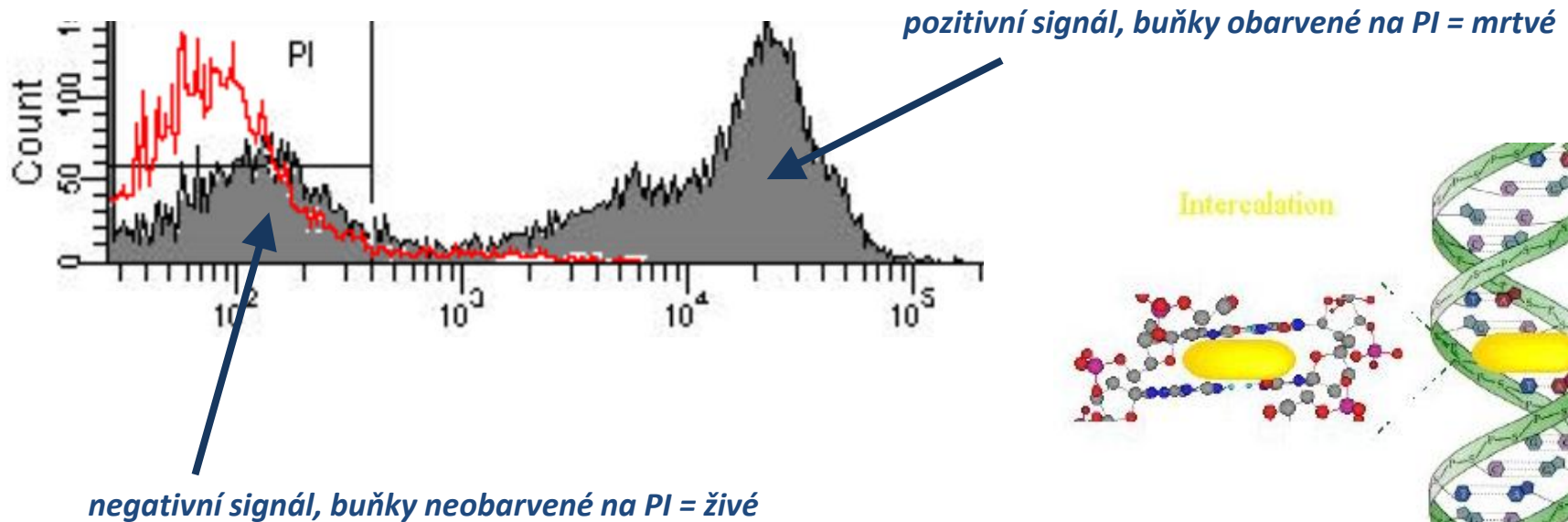


2. Flow cytometrie

Detekce buněčné smrti pomocí DNA interkalátoru (např. propidium jodid PI; nebo DAPI)

- PI je fluorescenční barvička, vážící se na DNA
- podobně jako trypanová modř proniká a barví pouze mrtvé buňky

Histogram barvení propidium jodidem

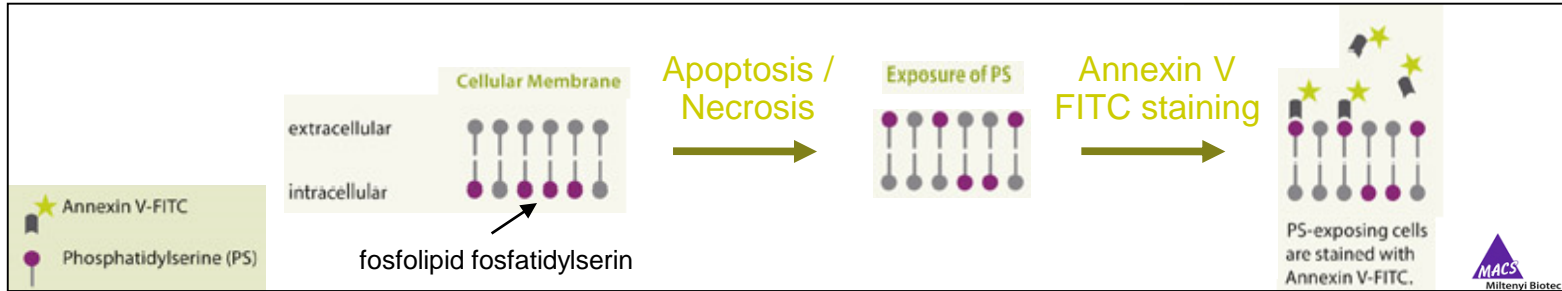


interkalace – vmezeření. I. do DNA – vmezeření určité látky mezi obě vlákna DNA

2. Flow cytometrie

osa x: intenzita fluorescenčního signálu v kanálu FITC (buňky pozitivní na Annexin)

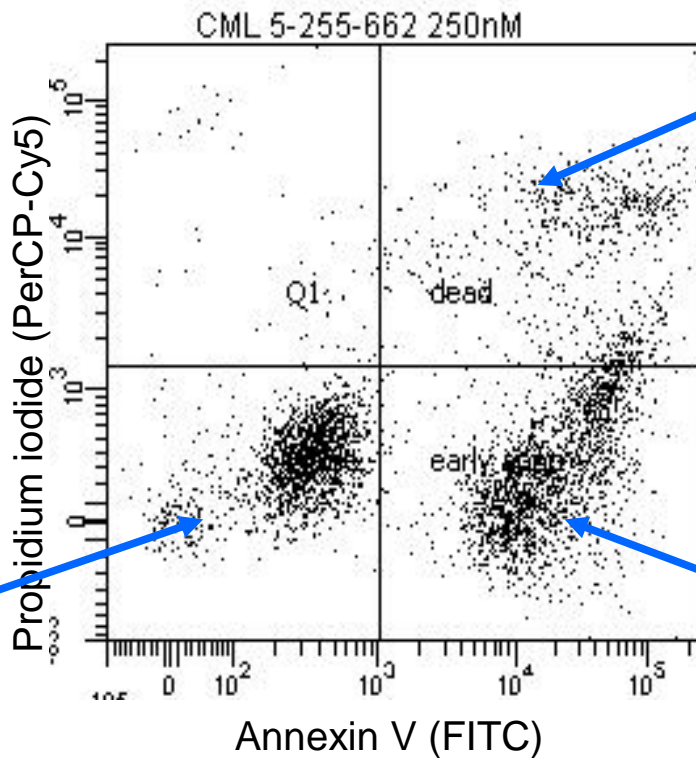
osa y: intenzita fluorescenčního signálu v kanálu PerCP-Cy5 (buňky pozitivní na Propidium jodid)



Annexin+... časná apoptoza

PI+... pozdní apoptoza

Viable cells



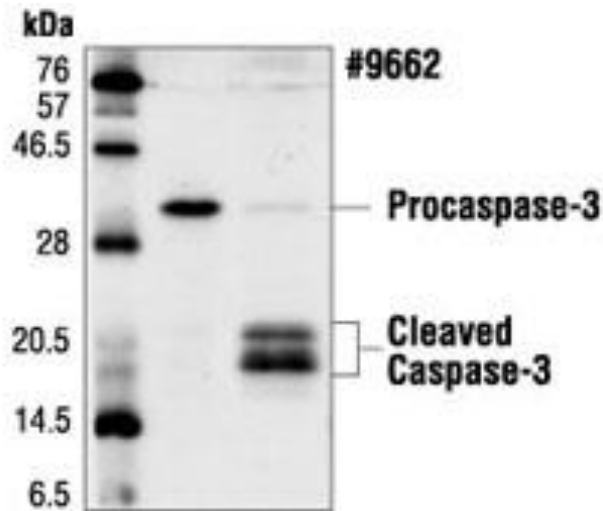
Late apoptotic or necrotic cells

Early apoptotic cells

3. Western blotting

- izolace celkového proteinu z buněk a rozdělení proteinů na polyakrylamidové gelu podle své velikosti.
- inkubace s protilátkou umožní zjistit, zda je daný protein ve vzorku přítomen a v jakém množství (oproti jinému vzorku na téže membráně - semikvantitativní metoda)
- příklady markerů apoptózy:

- proapoptotický protein z rodiny Bcl-2: **BIM**
- štěpení (**pro**)kaspázy
- štěpený protein **PARP**



Živé buňky

Apoptotické buňky

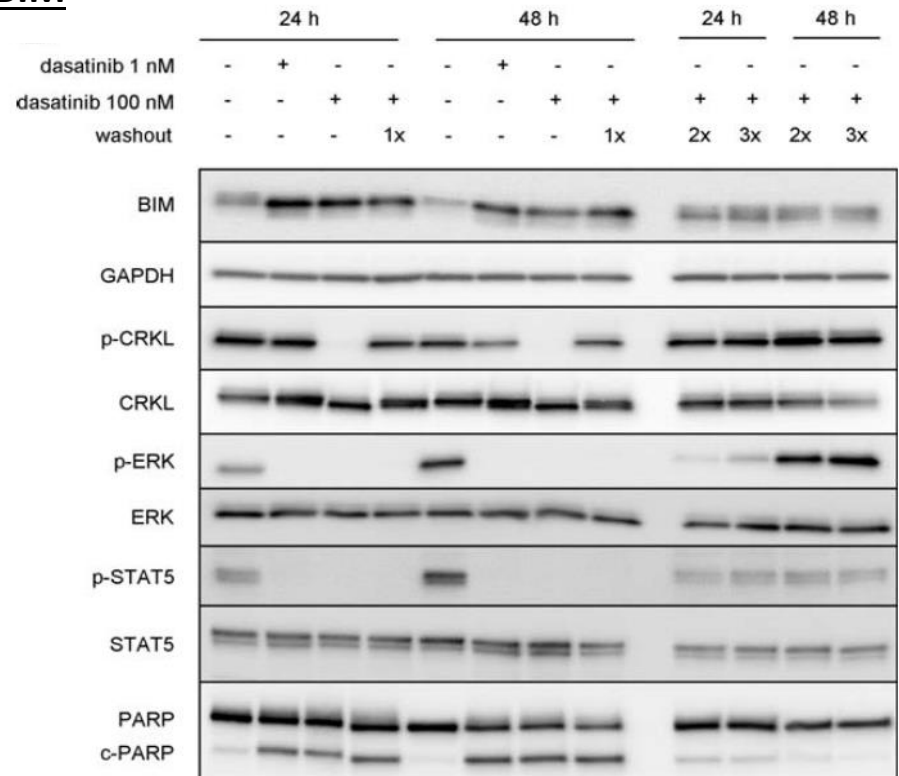


Figure 2. Effect of intermittent high-dose TKI treatment on signaling pathways in the K562 cell line. The cells were exposed to imatinib (A) or dasatinib (B) at a low dose continuously (2.5 μ M imatinib or 1 nM dasatinib), a high dose continuously (32.5 μ M imatinib or 100 nM dasatinib) or a high dose transiently (washout 1 \times , 2 \times , or 3 \times). The cells were then lysed and analyzed by Western blotting. The incubation time was 24 and 48 hr.

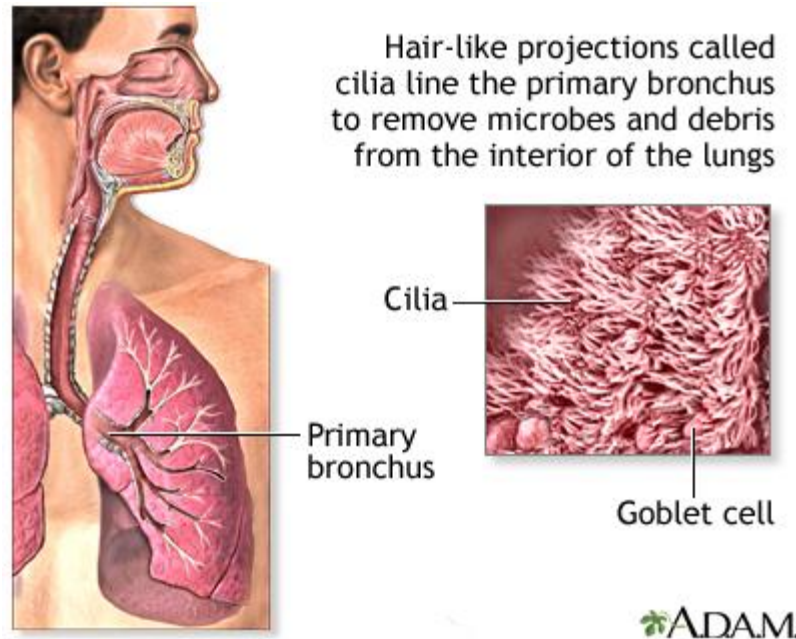
Imunitní systém

Imunitní systém

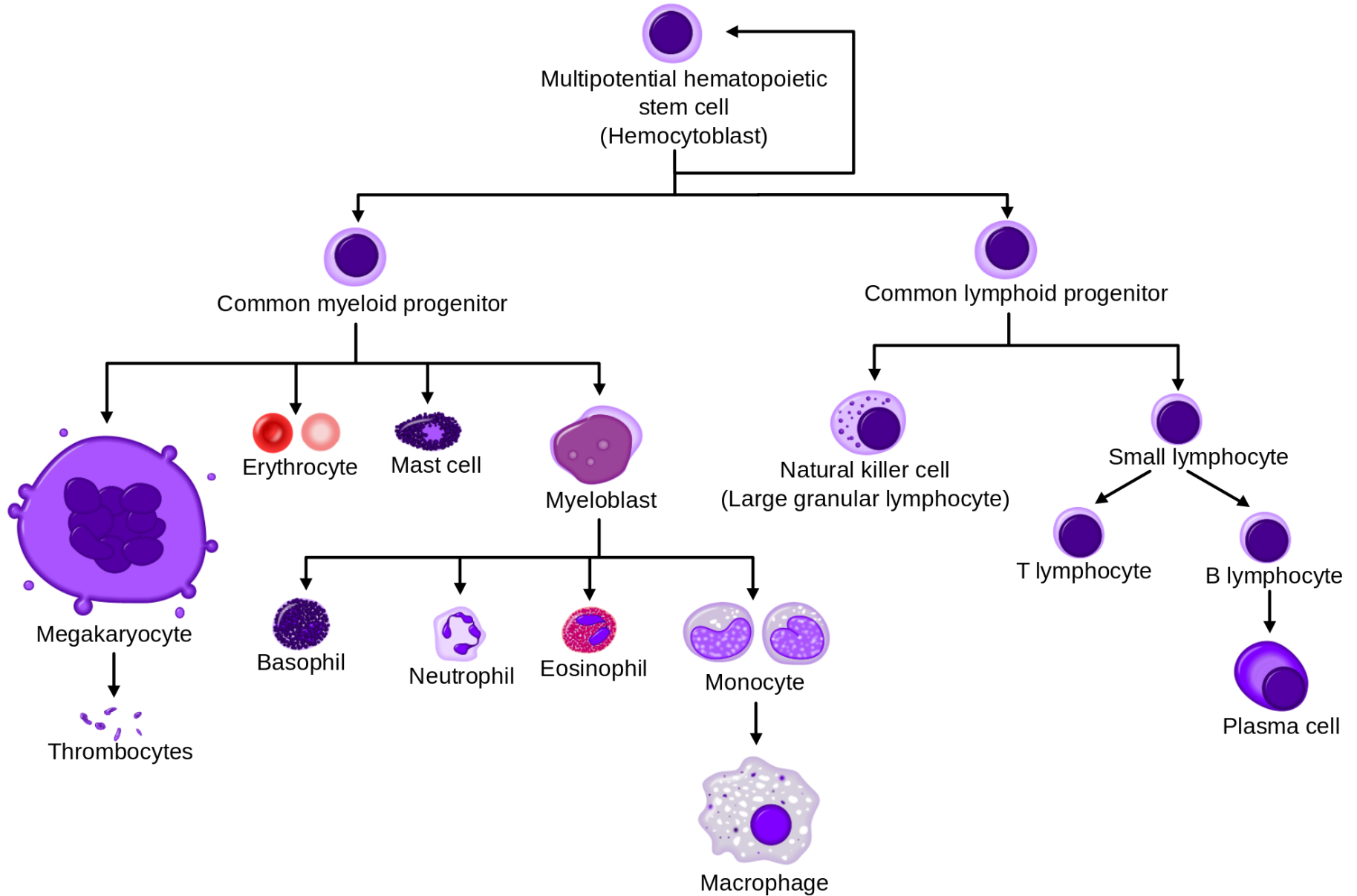
Existuje fyzická, chemická a buněčná obrana proti invazi bakterií a virů

1. linie obrany - fyzická a chemická

- a) kůže: vrstva mrtvých buněk - suchá a s nízkým pH
- b) sliznice: pokryty lysozymem - chemický rozklad bakterií
- c) cilie (řasinky): výběžky buněk, působí jako filtr a aktivně odstraňují patogeny



Hematopoéza (krvetvorba)



Imunitní systém

2. linie obrany - nespecifická imunitní odpověď

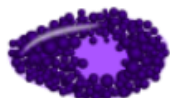
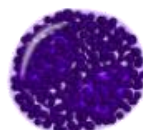
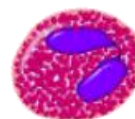
- obecná odpověď na infekci patogenem
- je vyvolán zánět

Granulocyty

a) **Neutrofil** - fagocytuje bakterie a sekretuje lysozym který degraduje bakteriální stěny

b) **Eosinofil** - vylučuje enzymy, které zabíjí parazitické červy

c) **Bazofil** - vylučuje histamin pro podporu zánětu

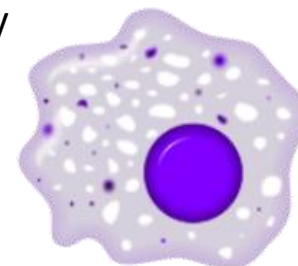


d) **Mastocyt** (mast cell; žírná buňka)

- vylučuje signály pro snížení průtoku krve v místě poranění a histamin
- signály pro zvýšení průtoku krve a propustnosti kapilár v okolí poranění, aby se fagocyty dostaly do místa poranění

e) **Makrofágy** - fagocyty (big eaters) - fagocytují vše

- obsahují MHC (major histocompatibility complex) , který vystavuje antigen
- sekrece cytokinů, které přitahují další makrofágy a neutrofilů
- zvyšují teplotu
- v krvi kolují ve formě monocytů



Antigen: částice rozeznávaná protilátkou, v imunologii se jedná o cizí patogen

Protilátka: částice, která specificky rozeznává antigen a je rozeznávána lymfocyty

MHC-molekuly (proteiny)

- Major histocompatibility complex (hlavní histokompatibilní komplex)
- u lidí zvaný též HLA-komplex (human leukocyte antigen)
- soubor povrchových proteinů - posttranslačně glykozylované proteiny

Syntéza MHC

- během syntézy zachycují peptidy a fragmenty vzniklé odbouráváním cizorodých proteinů (antigenů) a zanořují je do povrchu buňky
- buňka se stává APC (buňkou nabízející antigen)
- antigen je rozeznáván TCR-receptorem T-lymfocytů

Typy MHC

1. MHC I (první třídy)

- vážou peptidy získané po zničení virem infikované či jinak vadné **tělní buňky**
- jsou rozeznávány T_C-lymfocyty, které se aktivují k usmrcení podobných buněk

2. MHC II (druhé třídy)

- vážou peptidové fragmenty z **patogenů** fagocytovaných APC buňkou
- jsou rozeznávány pouze T_H-lymfocyty

Záněť

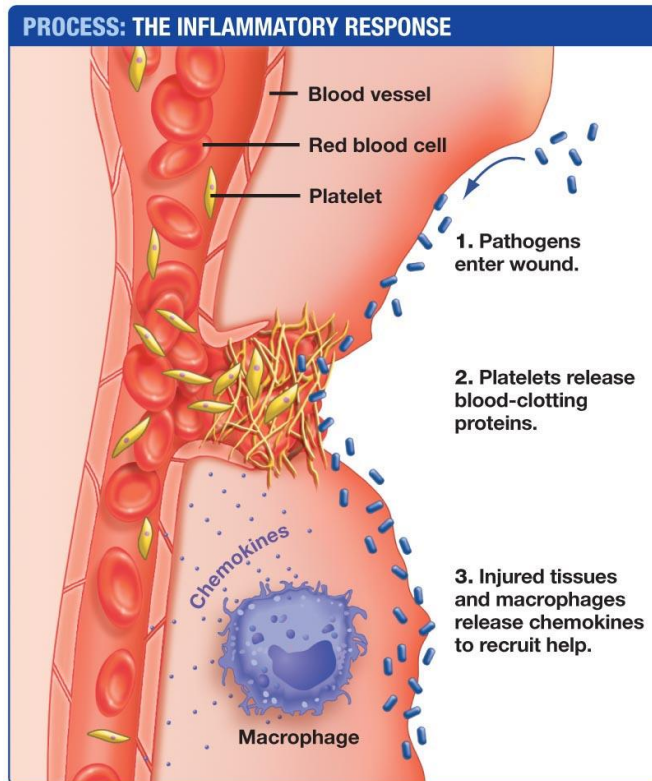
- patogeny vstupují do místa poranění
- **krevní destičky** vylučují srážlivé faktory



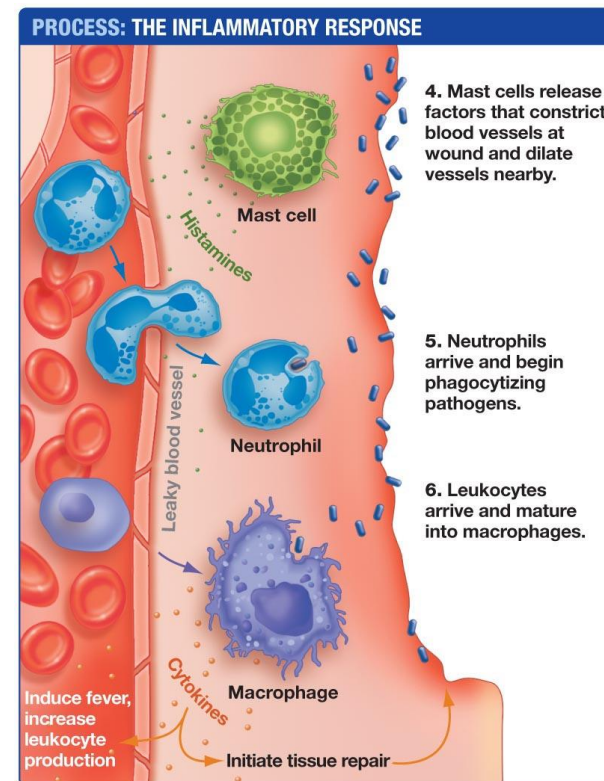
[Video: Záněť](#)

(1) Makrofágy, (2) Neutrofil, (3) Mastocyty

- makrofágy a buňky poraněné tkáně vylučují cytokiny, které přivolávají pomoc
 - změny ve stěnách kapilár umožňují průchod bílých krvinek a tkáňového moku
 - **mastocyty** indukují vazokonstrikci poraněných cév a vazodilataci okolních cév
 - zvýšení teploty



© 2011 Pearson Education, Inc.



© 2011 Pearson Education, Inc.

Tkáňový mok (interstitial fluid): mezibuněčná tekutina v těle mnohobuněčných živočichů. Hlavní složka mimobuněčné tekutiny, do níž se také řadí krevní plazma a míza (lymfa), která se z moku tvoří.

Imunitní systém

3. linie obrany - specifická imunitní odpověď

- v případě, že první dvě linie obrany nestačí a infekce se šíří

APC buňky (např. makrofágy) vystavují na povrchu cizí antigeny (Antigen Presenting)

T-lymfocyty jsou tímto informovány o typu patogenu

- **Helper T lymfocyty (T_H)** aktivují jiné buňky

- **Cytotoxické T lymfocyty (T_C)** eliminují infikované a nádorové buňky

B lymfocyty a plasmatické buňky produkují protilátky (sekretují do krve nebo umísťují na buňky)

Aktivace T a B lymfocytů

Při styku s antigenem se lymfocyt zmnožuje a vzniká množství klonů se stejným antigenním receptorem

- nazýváme **klonální selekce** - základní koncept imunologie a očkování

Klonální selekcí lymfocytů vznikají dva typy buněk:

a) efektorové: krátká životnost, najdou a zničí patogen

- z B buněk → plasmatické - sekretují protilátky

- z T buněk →

- cytotoxické T lymfocyty

- helper T lymfocyty

b) paměťové: vznikají při primární infekci, nejsou aktivní, ale přetrvávají v těle a při další infekci stejným patogenem jsou rychle reaktivovány k mitóze (imunologická paměť)

Imunitní systém

3. linie obrany - specifická imunitní odpověď

- každý virus a bakterie má unikátní molekulární markery, které jej identifikují
- lymfocyty v těle rozeznávají:
 - vlastní antigeny - ty je nechávají klidnými
 - cizí antigeny - spouští mitotickou aktivitu (dělení)

Fáze:

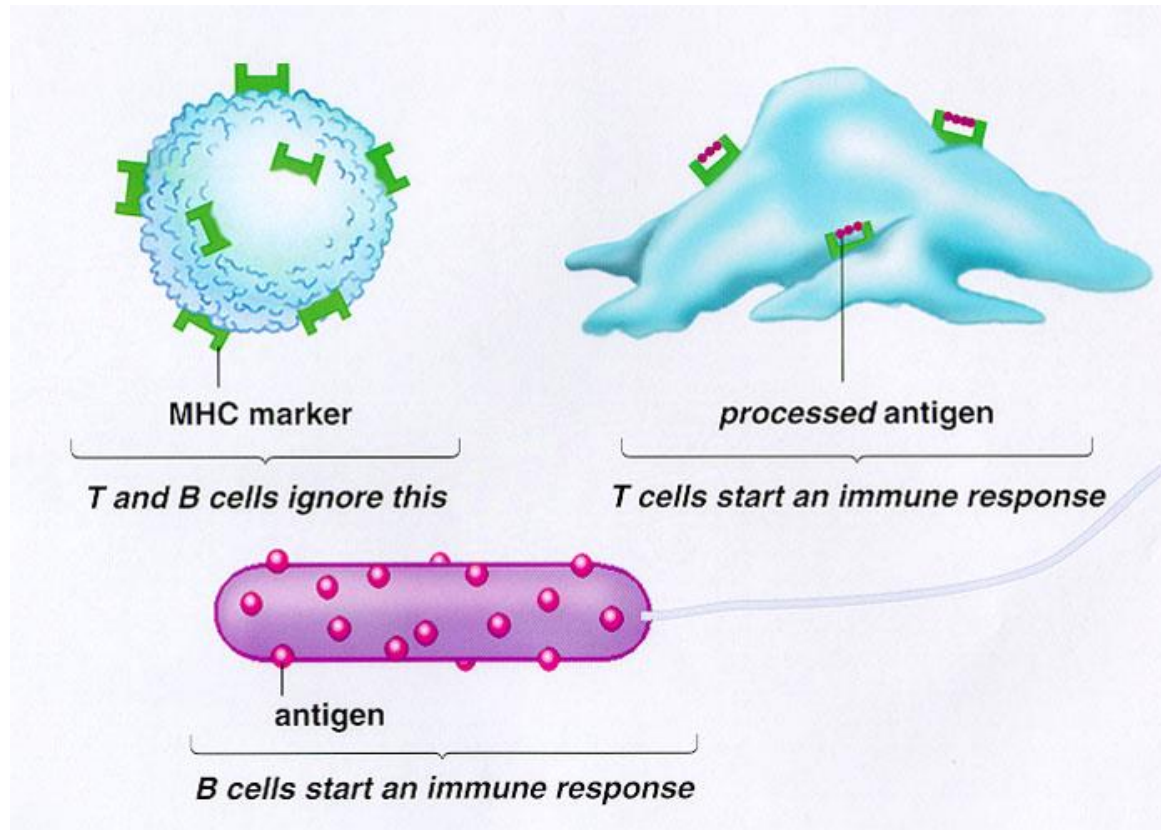
1. Rozeznání specifické cizí částice
2. Opakované buněčné dělení a vytvoření obrovské populace klonů lymfocytů
3. Diferenciace do subpopulací efektorových a paměťových buněk

Imunitní systém

3. linie obrany - specifická imunitní odpověď

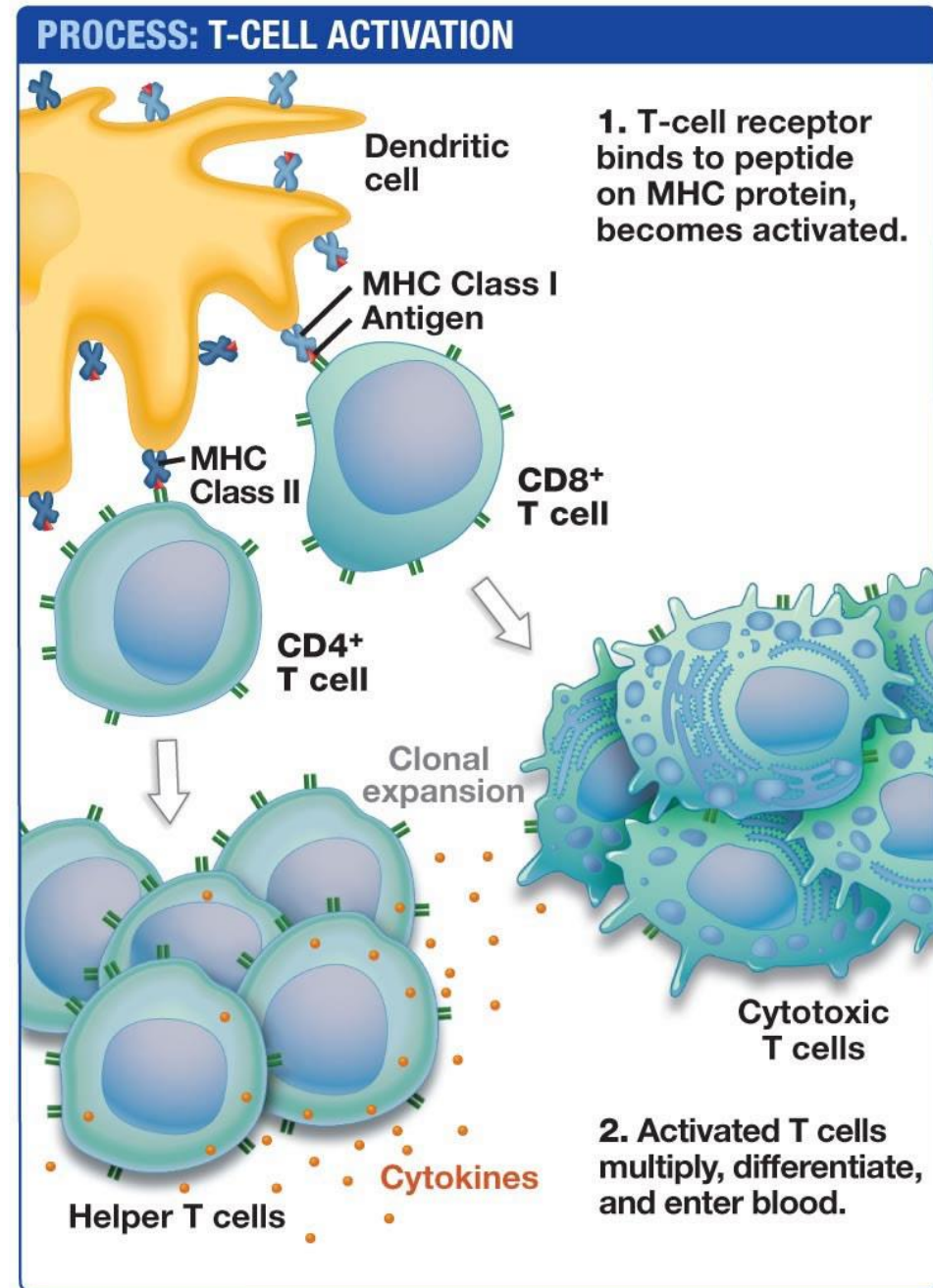
Antigen-prezentující buňka

- známe 3+1 typ APC: **makrofág, B-lymfocyt, dendritická buňka + buňka infikovaná virem**
- vystavují na svém povrchu antigeny
- např. makrofág pohltí bakterii a na svém povrchu vystaví její antigeny
- tyto antigeny jsou ve vazbě s MHC
- antigeny jsou rozeznávány lymfocyty



T-lymfocyty (Thymocytes; T-cells)

- líhnou se v kostní dřeni
- putují nezralé do brzlíku (thymus) kde diferencují a zrají
- v procesu zrání získávají markery CD4 (T-helper cells T_H) a CD8 (Cytotoxic T-cell T_C) a antigenně specifické receptory
- T lymfocyty ignorují buňky s prázdnými MHC antigeny, stejně jako volně plovoucí antigeny
- váží se však na antigeny, vystavené na povrchu APC v MHC komplexu
- vazba indukuje rapidní proliferaci do **efektorových** a **paměťových** buněk s receptorem pro daný antigen



T-lymfocyty (Thymocytes)

1. Efektorové T-helper lymfocyty (CD4)

- sekretují interleukiny → stimulace dalších buněk
- na povrchu mají protein CD4, který se váže na MHC II molekuly

2. Efektorové cytotoxické T lymfocyty (CD8)

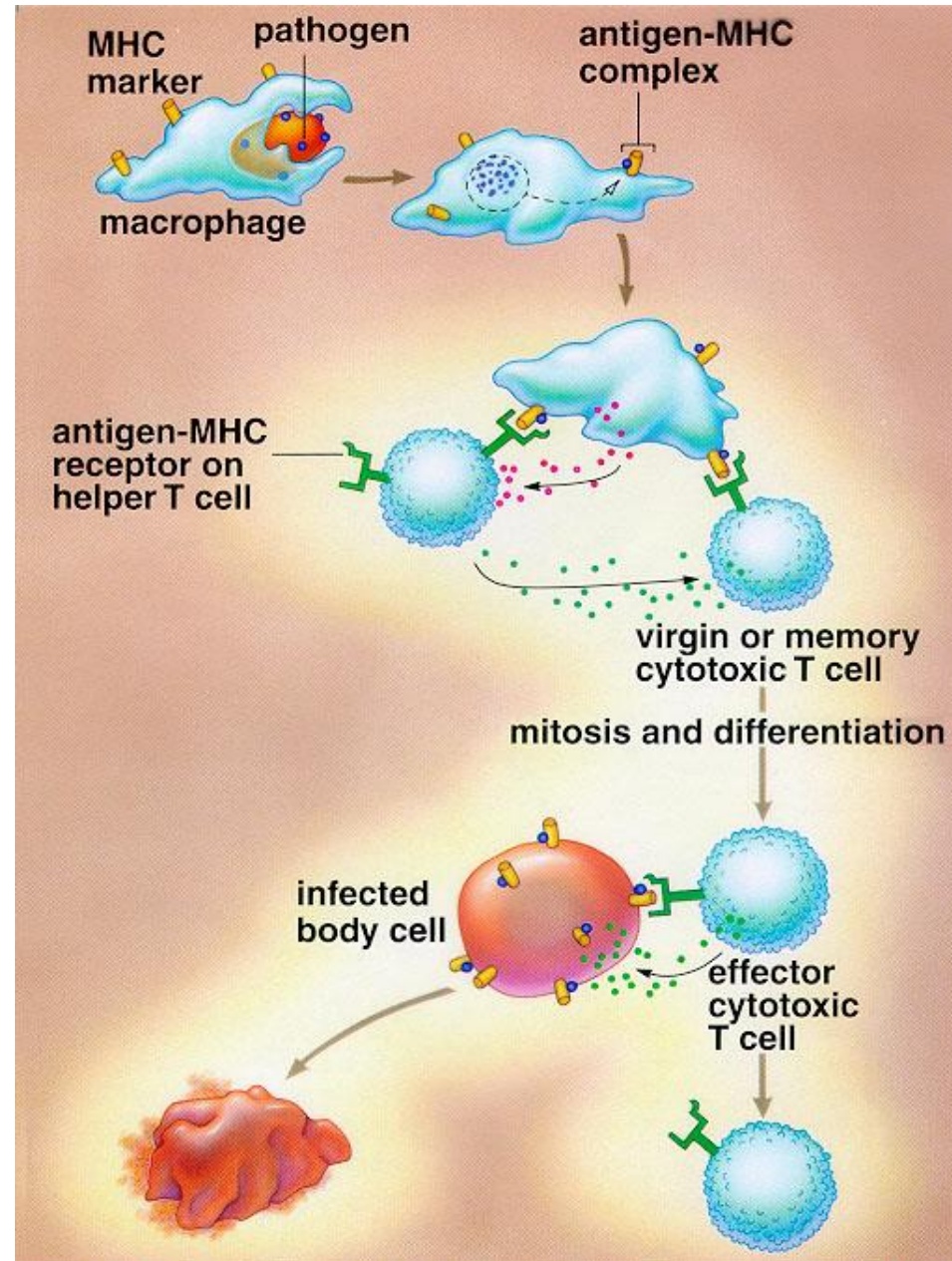
- rozpoznávají infikované či jinak vadné buňky a vyvolávají u nich APOPTOZU:

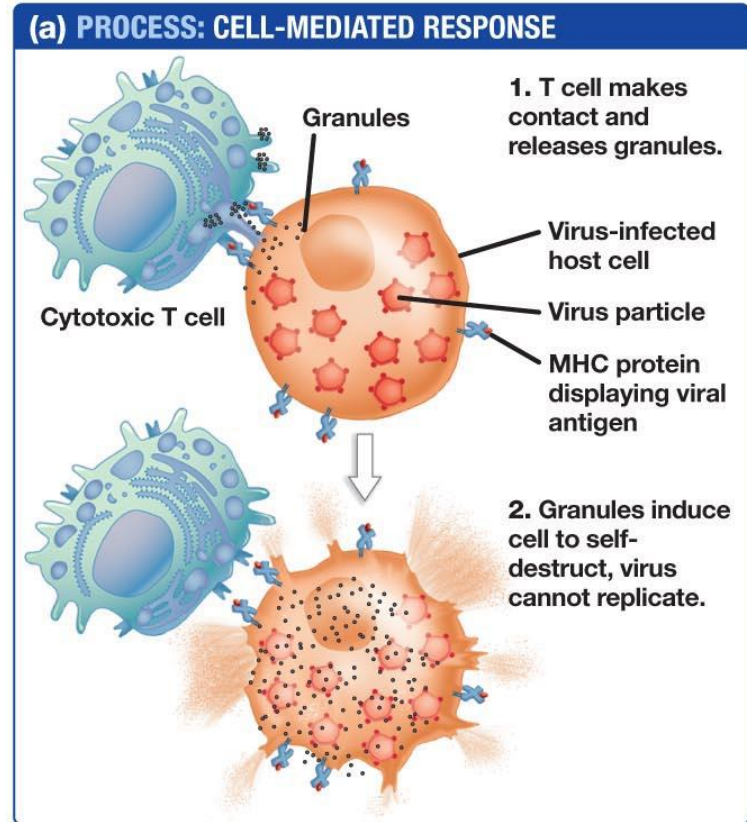
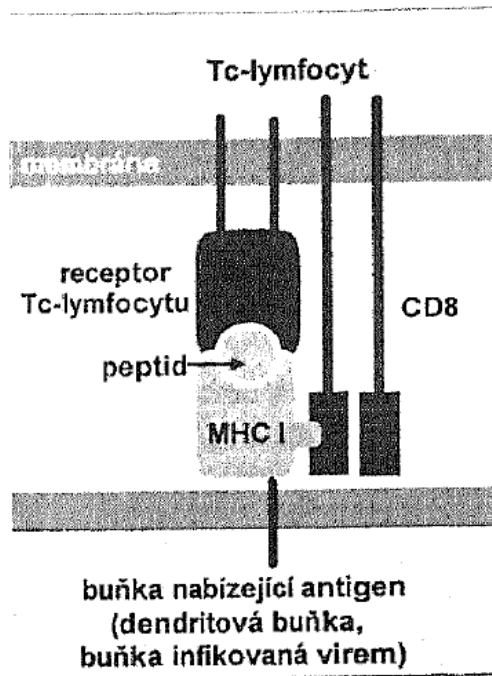
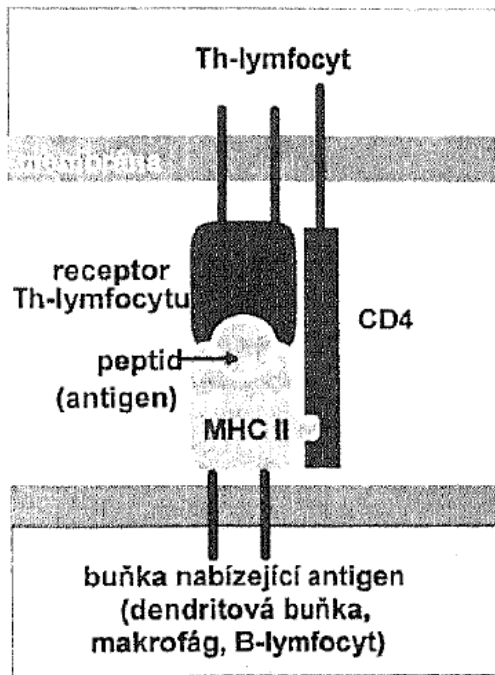
a) uvolnění cytotoxických látek

(perforiny+gramzomy), které pronikají do cytoplasmy a spouští kaspázovou kaskádu

b) exprese povrchového proteinu Fas-ligand, který se váže na Fas-receptor

- na povrchu mají protein CD8, který se váže na MHC I molekuly





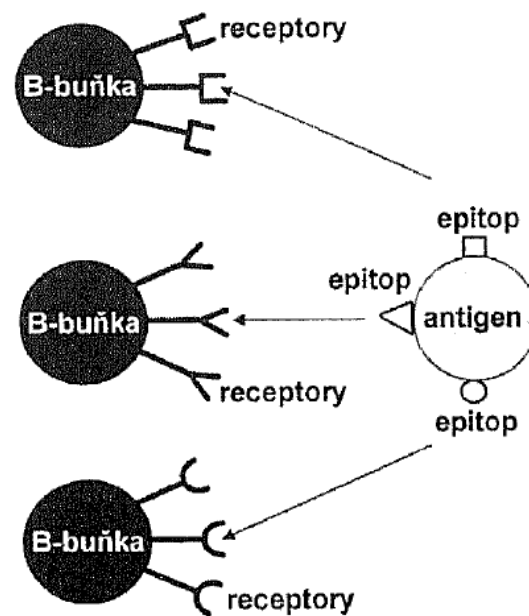
B-lymfocyty

- prekurzory se tvoří v kostní dřeni u dospělých a játrech plodu
- po dozrání syntetizují jeden typ protilátky
- "virgin" B cell produkuje protilátku (imunoglobulin), která se uchytil v membráně

- aby se B-lymfocyt začal dělit potřebuje:
 - kontakt se specifickým antigenem
 - aktivaci od T-helper lymfocytu, který už se s daným antigenem setkal na APC buňce (např. makrofágu)

- Po aktivaci diferencuje B-lymfocyt do efektorové buňky (= **plazmatická buňka**) a **paměťového B-lymfocytu**

- Plazmatická buňka produkuje masivní množství volných protilátek
- volné protilátky označují patogen pro zničení fagocyty a komplementem
- paměťové buňky zůstávají inaktivní během první infekce, ale při druhé infekci se aktivují mnohem rychleji než "virgin" B-lymfocyty
- nejmenší část antigenu schopná reakce s protilátkou nebo receptorem T-lymfocytu se nazývá **antigenní detriminanta** neboli **epitop**

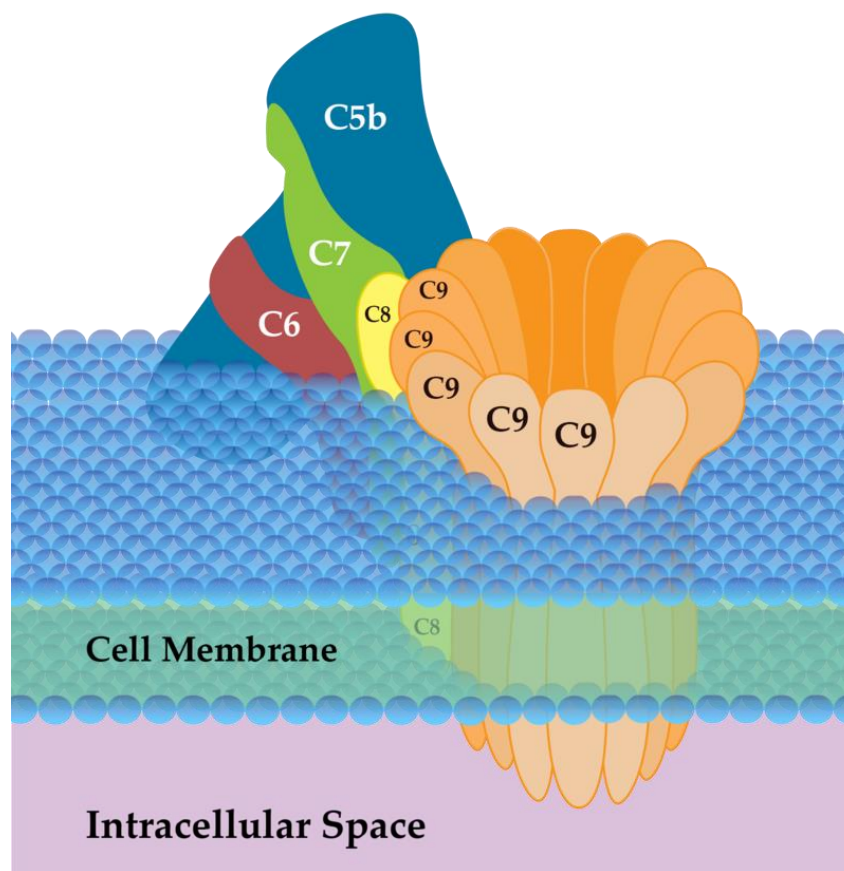


Obr. 320
Vztah antigenních determinantů k jejich receptorům

Komplement

Imunitní mechanismus zvyšující (doplňující, komplementující) účinnost protilátek

- nespecifický a neadaptibilní
- soubor malých proteinů, tvořených v játrech a cirkulujících v krvi
- po aktivaci atakuje membrány patogenů, ve kterých způsobuje póry



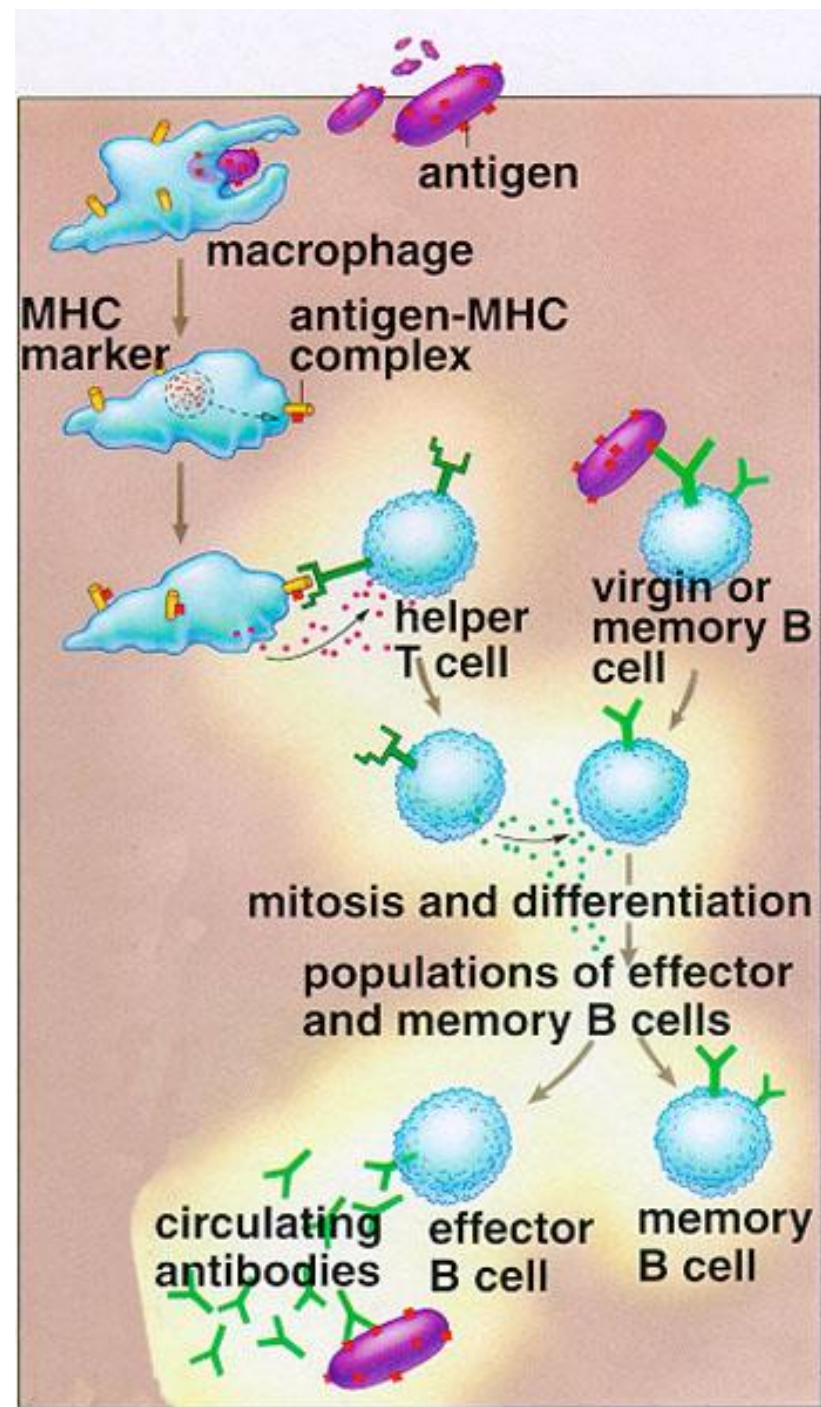
Vlastnosti B-lymfocytů

1. Mají v povrchu receptor zachycující volný antigen. Molekula protilátky (imunoglobulin) vázaná na membránu

2. B-lymfocyt se aktivuje k dělení a diferenciaci na plazmatickou buňku teprve po kontaktu s antigenem. Do té doby je v klidu v G0 fázi. Nutno též potvrzení od TH

Navíc B-cell fungují jako APC. antigen je nabízen T_H -lymfocytům.

Neaktivuje se dokud nedostane "potvrzení" od T helper



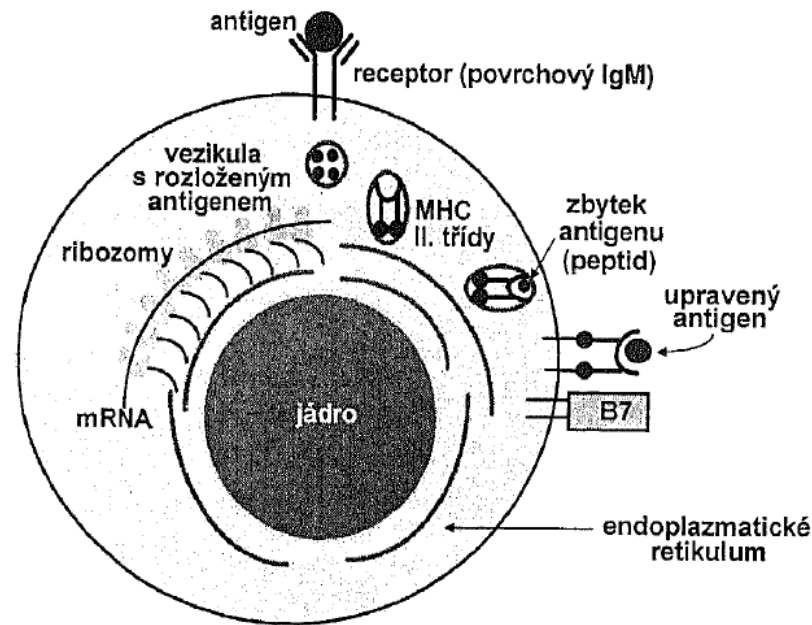
Antigen-presenting cells (APC; buňky nabízející antigen)

na povrchu vystavují antigen, který je rozeznáván T-lymfocyty

Existují 3+1 typy APC buněk:

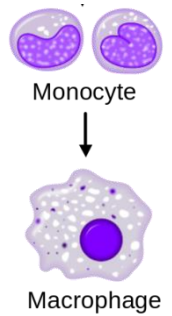
1. B-lymfocyty

- detekuje **volný antigen** pomocí receptoru (povrchový IgM)
- endocytozou se antigen dostává do vezikuly, kde se rozkládá na peptidy
- na ribozomech se syntetizují **MHC II-molekuly**, které migrují do vezikuly a spojí se s peptidy
- komplex MHC II+peptid putuje k povrchu buňky, kde se vystavuje **T_H-lymfocytům**
- B-lymfocyty s antigeny se vyskytují v lymfoidních folikulách lymfatických uzlin



2. Makrofágy

- pohlcují bakterie a odbourávají jejich proteiny a vystavují v komplexu s **MHC II**
- vrozená (nespecifická) imunita
- na povrchu receptory pro různé složky mikrobiálních buněk
- rozptýleny po celém těle
 - lymfatické uzliny, plíce, játra, mozek...
 - mohou být i pohyblivé a přecházet mezi tkáněmi (amébovitý pohyb)
- po vazbě **T_H-lymfocyt** navíc produkuje interferon gamma (INF- γ) a tím se ještě víc aktivuje k pohlcování virů a bakterií
- makrofágy též produkují cytotoxické proteiny
- v krvi se vyskytuje ve formě monocytu



3. Dendritické buňky

- schopné fagocytozy
- komplexy antigenů a **MHC I i MHC II**
- aktivují tedy jak **T_H**- tak i **T_C-lymfocyty**

Podle místa výskytu dělíme:

a) Langerhansovy buňky

- v pokožce a mukózních tkáních
- přijmou antigen a putují do lymfatických uzlin, kde diferencují na dendritické buňky a stimulují T-lymfocyty

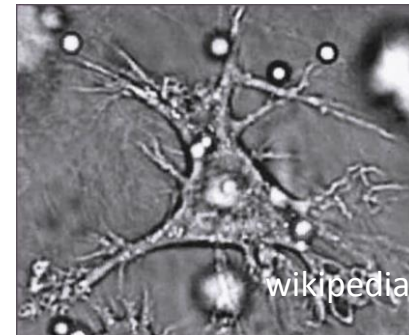
b) Intersticiální dendritické buňky

- osidlují většinu orgánů (srdce, játra, ledviny...)

c) Proplétající se dendritické buňky

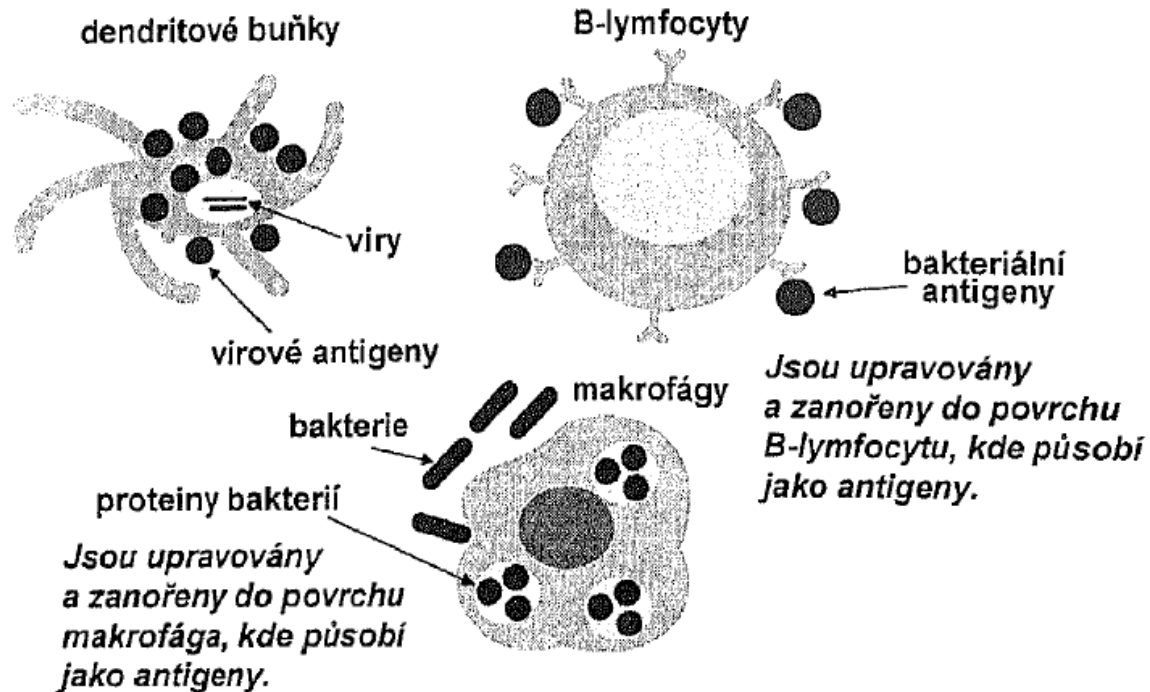
- v sekundárních lymfoidních orgánech spolu s T-lymfocyty

d) Cirkulující dendritické buňky - v krvi (0,1% krevních leukocytů)



(4). Buňky infikované viry

- virus napadne tělní buňku a spustí svou replikaci a transkripci svých proteinů
- virové proteiny mohou být buňkou odbourány a vystaveny na povrchu v komplexu s **MHC I**
- **MHC I + virový antigen** je rozpoznáván **T_C-lymfocyty** a infikovaná buňka je zničena **apoptozou**



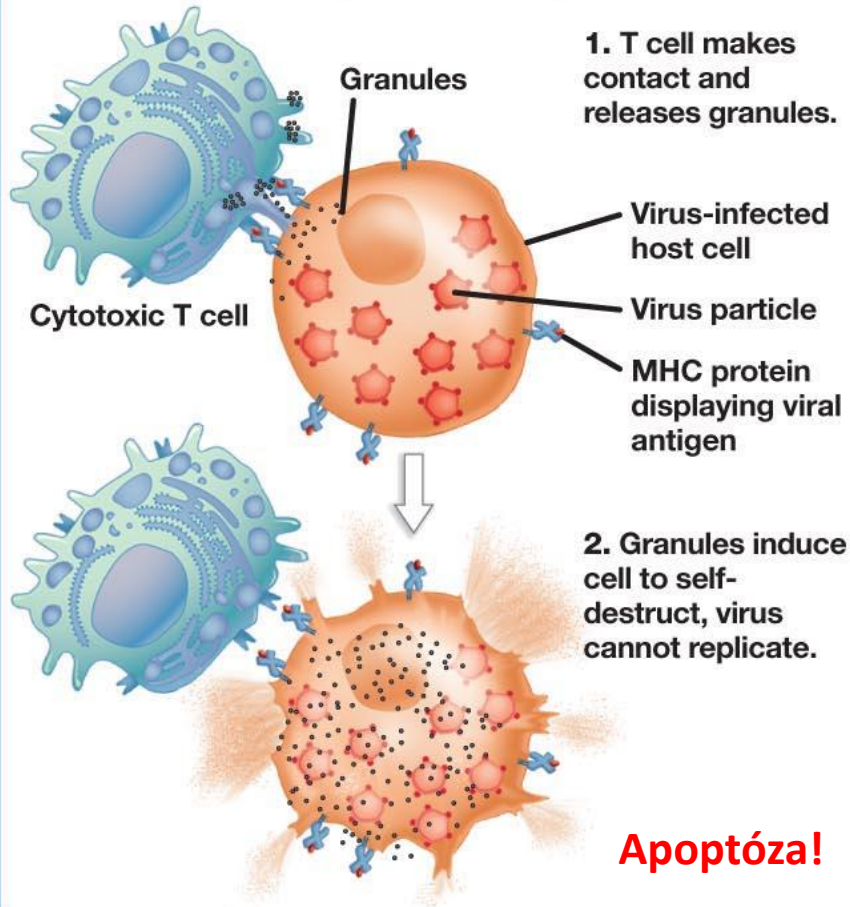
Obr. 322
Buňky nabízející antigen

a) Buněčná imunita

zprostředkovaná T-lymfocyty

- T_C lymfocyty produkují Fas ligand a perforiny + granzymy → APOPTOZA

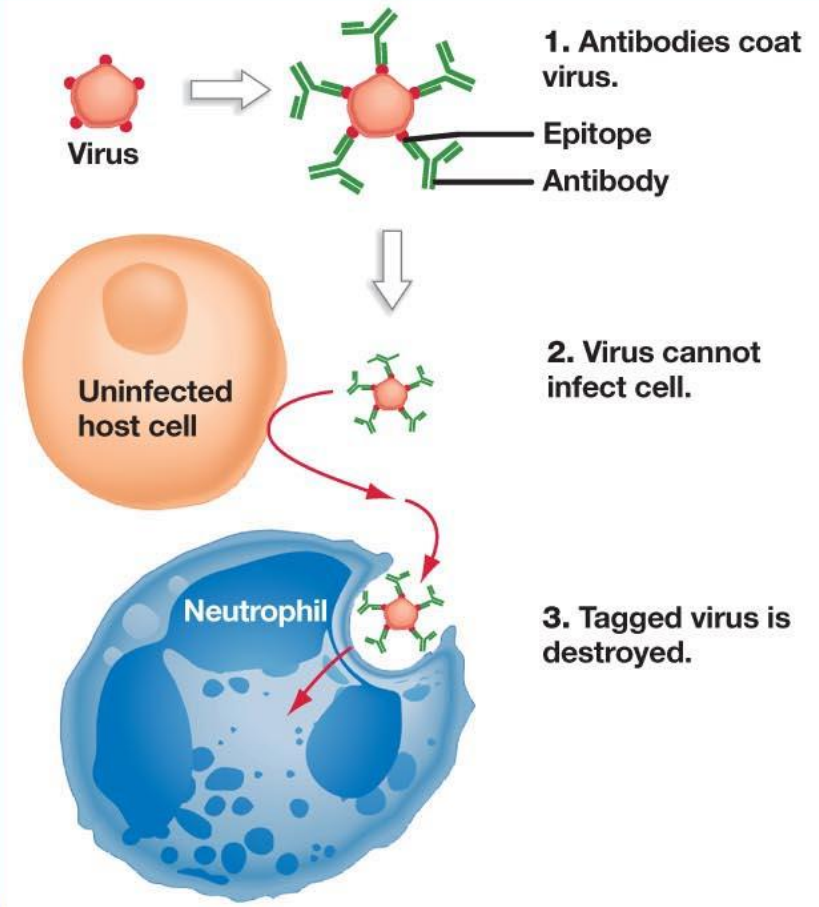
(a) PROCESS: CELL-MEDIATED RESPONSE



b) Humorální imunita

zprostředkovaná specifickými protilátkami
produkovanými B-lymfocyty do tělních tekutin

(b) PROCESS: HUMORAL RESPONSE



Imunoglobuliny (lidské protilátky)

- vyskytují se **vázané** na povrchu B-lymfocytů nebo **volné** (IgM a IgD slouží jako receptor)
- volné protilátky označují patogen pro zničení fagocyty a komplementem
- obecná struktura protilátek je velmi podobná
- největší rozdíly jsou na špičce Fab regionu (antigen-binding site), která je extrémně variabilní
- to umožňuje existenci milionů jemně odlišných verzí protilátek
- klasifikace protilátek je založena na typu Fc fragmentu (těžkého řetězce)

Imunoglobulinové třídy:

1. IgA (2 typy)

- hlavně na sliznicích (trávicí, dýchací..) a ve slinách, mléku...
- zabraňuje kolonizaci patogeny - vysoká denní produkce

2. IgD (1 typ)

- antigenní receptor na B-lymfocytech - BCR (spolu s IgM)
- aktivuje bazofily a mastocyty k produkci antimikrobiálních faktorů

3. IgE (1 typ)

- váže se na alergeny
- aktivuje bazofily a mastocyty k produkci histaminu
- chrání před parazitickými červy

4. IgG (4 typy)

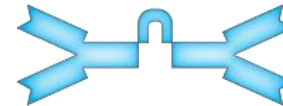
- v krevním séru tvoří až 80% všech imunoglobulinů

5. IgM (1 typ)

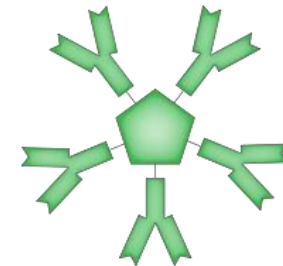
- vázán na membránu B-lymfocytů, kde působí jako receptor pro antigen - BCR
- nejúčinnější ve vazbě virových částic



Monomer
IgD, IgE, IgG



Dimer
IgA



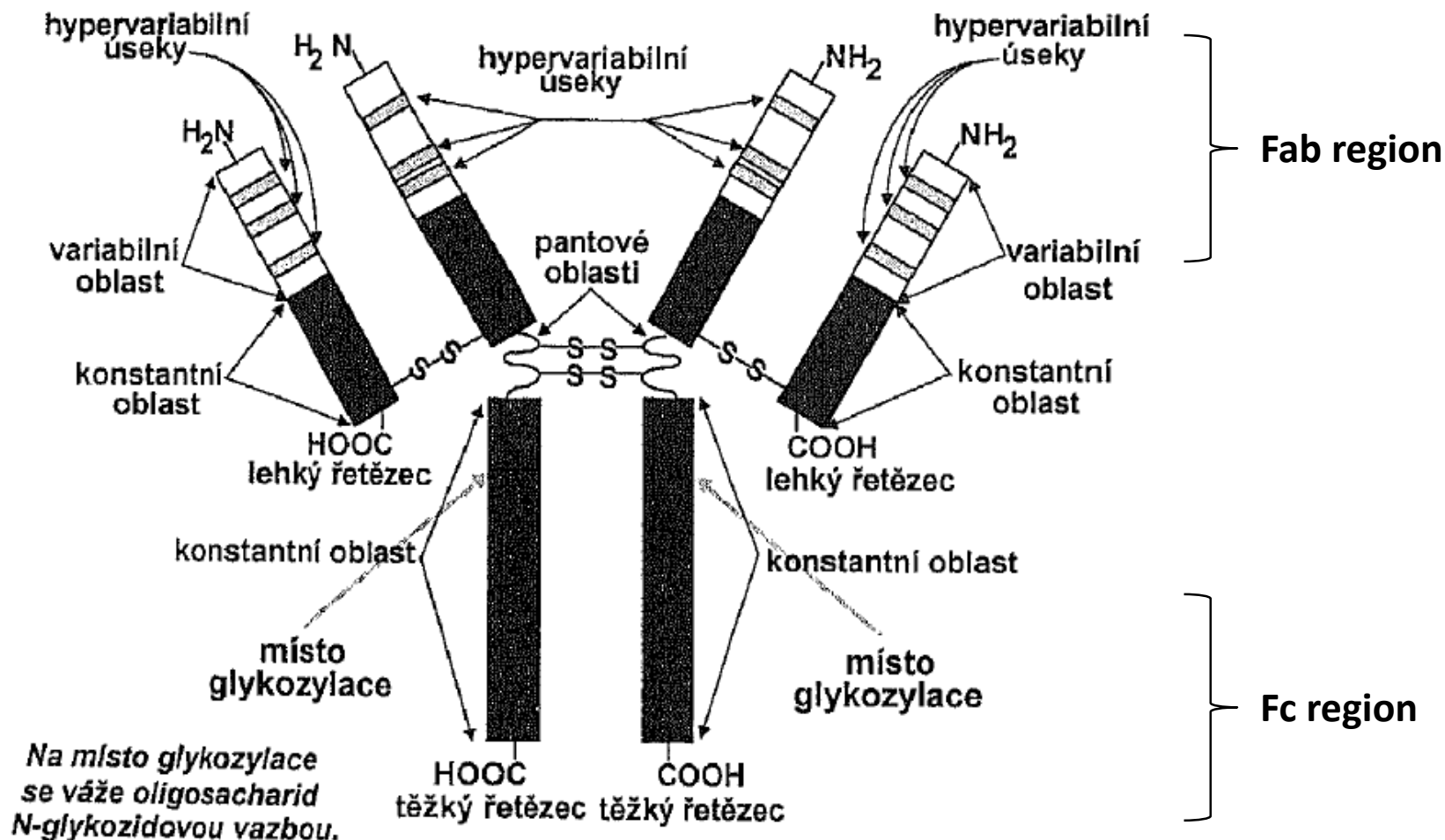
Pentamer
IgM

Imunoglobuliny (produkovány B-lymfocyty)

Protilátky patří do skupiny glykoproteinů, označovaných jako imunoglobuliny

Molekula imunoglobulinu je složena min. ze 4 polypeptidových řetězců

- 2x těžký (H) řetězec (cca 430 aminokyselin)
- 2x lehký (L) řetězec (cca 214 aminokyselin)



Imunoglobuliny

Konstantní oblast (C)

- relativně neměnná sekvence aminokyselin
- C_H pro těžký a C_L pro lehký řetězec

Variabilní oblast (V)

- úsek, v němž se imunoglobuliny příslušného typu liší
- V_H pro těžký a V_L pro lehký řetězec

Hypervariabilní oblasti

- váží antigen
- značně proměnlivá primární struktura

Pantová (hinge) oblast

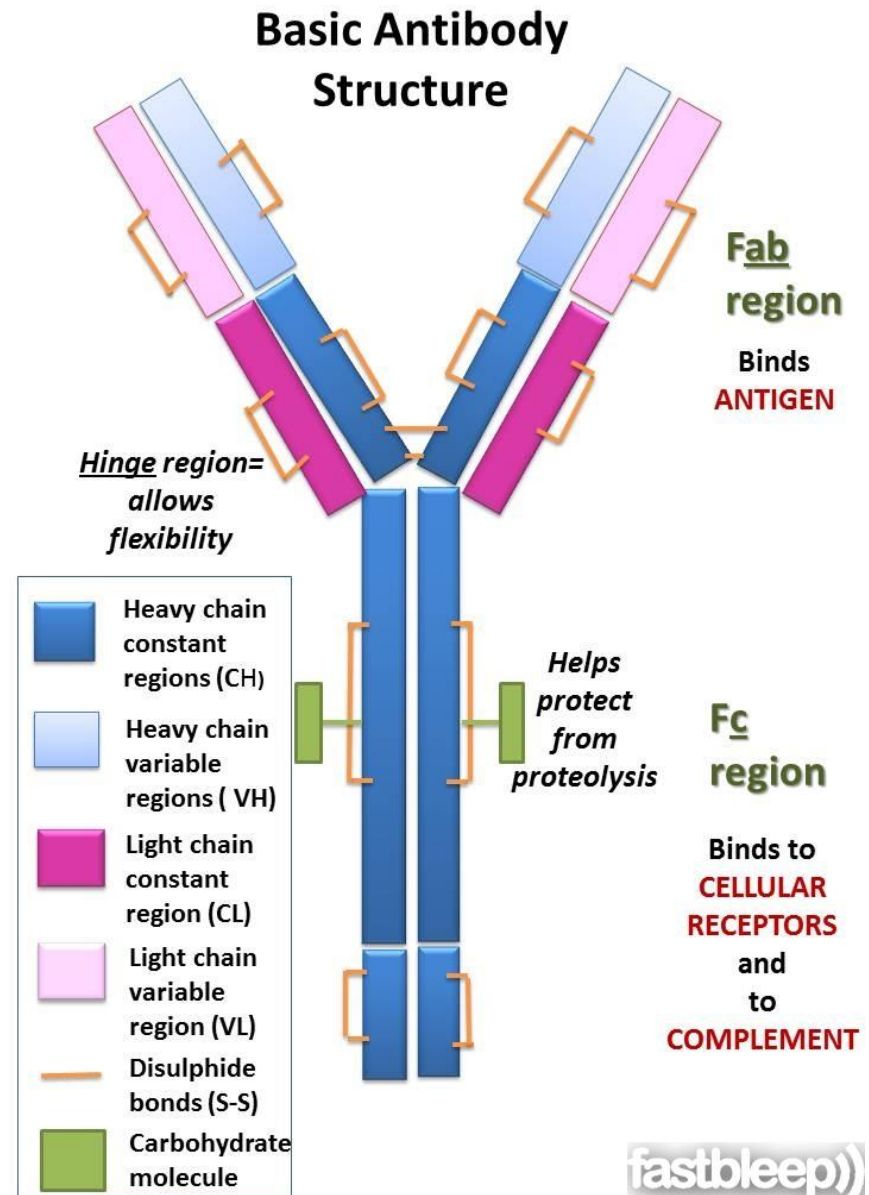
- ohebnost usnadňuje vazbu na antigen

Glykozylace

- připojení sacharidů N-glykozidovou vazbou
- na různých místech těžkého řetězce
- slouží k ochraně před proteolýzou

Domény

- lehký řetězec má 2 domény (C a V)
- těžký řetězec má jednu V a tři nebo čtyři C domény



Klasifikace lehkých a těžkých řetězců

Lehké řetězce

- 2 typy: κ (kappa) a λ (lambda)

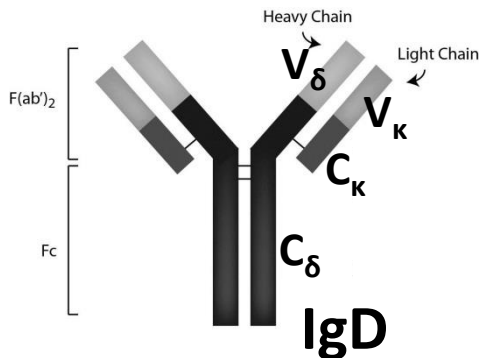
Těžké řetězce

- 5 typů: γ (gamma), α (alfa), μ (mí), δ (delta), ϵ (epsilon)
 - gamma má 4 podtypy a alfa má 2 podtypy

Klasifikace protilátek je založena na typu Fc fragmentu (těžkého řetězce)



indexy lze specifikovat, např. pro IgD:

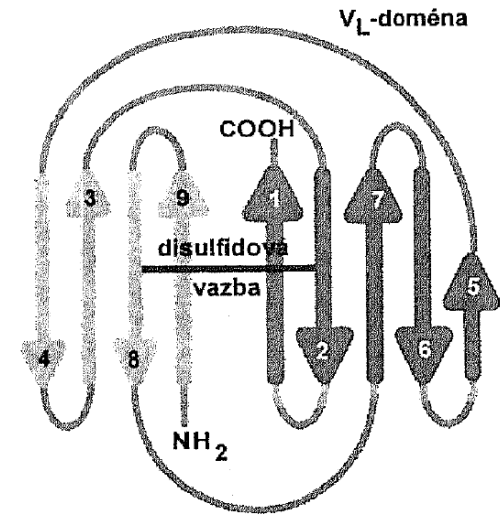


Klasifikace lidských imunoglobulinů

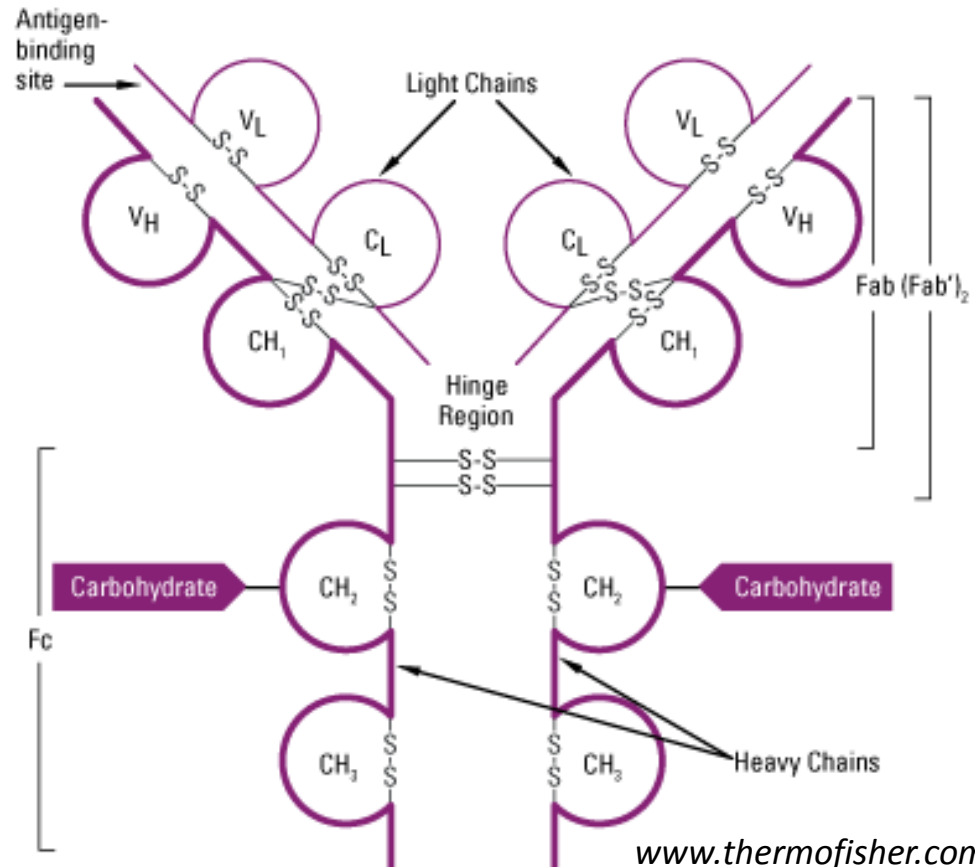
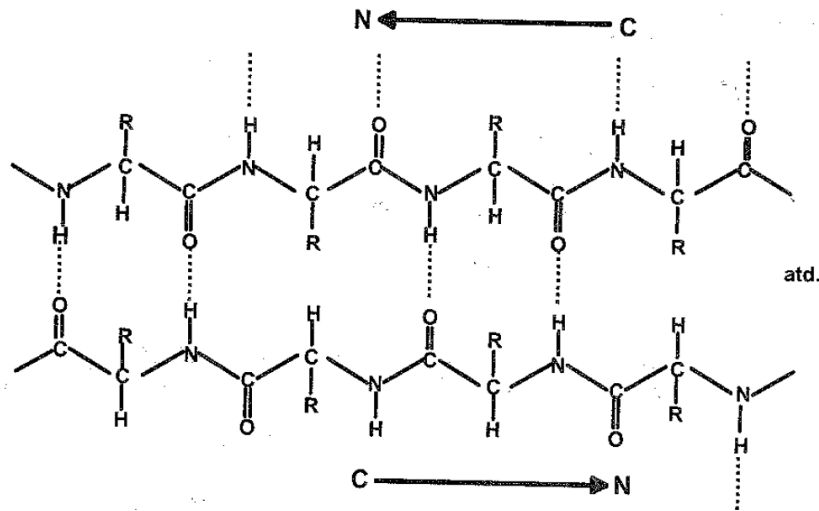
Třída	Podtřída	Lehký řetězec (L)	Těžký řetězec (H)	Celková molekul. hmotnost	Počet lehkých a těžkých řetězců v molekule
IgG	IgG1	κ nebo λ	$\gamma 1$	146 000	L_2H_2
	IgG2		$\gamma 2$	146 000	
	IgG3		$\gamma 3$	165 000	
	IgG4		$\gamma 4$	146 000	
IgA	IgGA1		$\alpha 1$	160 000	L_2H_2 nebo $(L_2H_2)_2$
	IgGA2		$\alpha 2$	160 000	
IgM	IgGM		μ	970 000	$(L_2H_2)_5$
IgD	-		δ	184 000	L_2H_2
IgE	-		ϵ	188 000	L_2H_2

Imunoglobulinové domény

- skládají se z antiparalelních β -skládaných listů spojených smyčkou
- struktura domény stabilizována vodíkovými vazbami (mezi -NH a -CO)
- každá doména je navíc stabilizována disulfidovou vazbou
- antigen se váže na aminokyselinové zbytky (antigen binding site) v hypervariabilních úsecích
- při vazbě antigenu dochází ke změně konformace domény



Antiparalelní uspořádání polypeptidových řetězců v β -skládaném listu.



Molekulární podstata tvorby protilátek

dědí se pouze subgeny (genové segmenty) pro tvorbu imunoglobulinů

VDJ rekombinace (přeskupování genových segmentů)

- proces při kterém T a B lymfocyty náhodně sestavují různé genové segmenty
- k VDJ rekombinaci dochází na DNA buněk v průběhu jejich vývoje, **před kontaktem s antigenem**
- genové segmenty:

(V) ... variable

(D) ... diversity

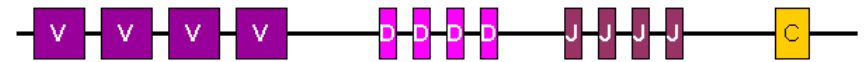
(J) ... joining

Cíl: vytvářet jedinečné antigenní receptory, které společně dokáží rozeznat mnoho druhů antigenních molekul

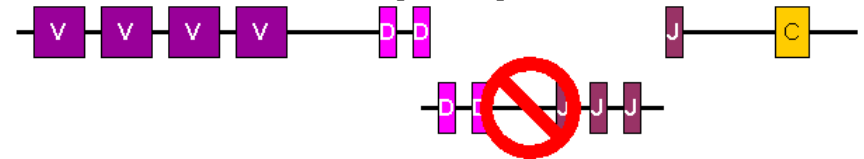
U B-lymfocytů vznikají VDJ rekombinací imunoglobuliny (membránová - BCR - nebo volná forma)

U T-lymfocytů vznikají VDJ rekombinací T-cell receptory (TCR)

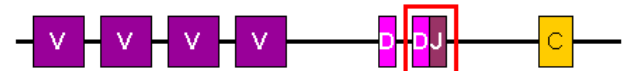
Genes in heavy chain locus



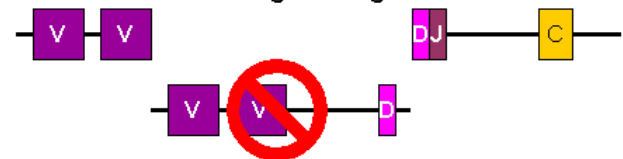
Removal of unwanted D and J gene segment



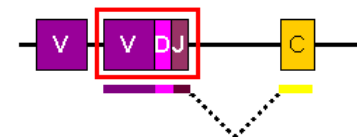
Recombination of D and J exons – DJ recombination



Removal of unwanted V and D gene segment



Recombination of V and DJ exons – VDJ recombination



Antibody transcript will also include constant domain gene

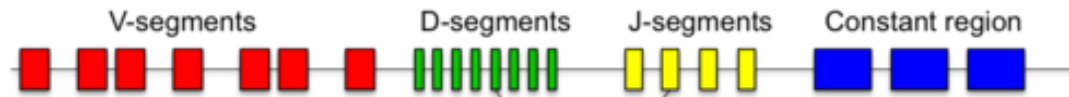
VDJ rekombinace

3 typy genů:

1. pro těžký řetězec: 14. chromosom (5 subtypů za sebou)
2. pro lehký řetězec kappa (κ): 2. chromosom
3. pro lehký řetězec lambda (λ): 22. chromosom

- kombinací vzniklých VDJ přesmykem může být u člověka řádově 10^{13}
- u genů pro lehké řetězce kappa a lambda chybí D segment

Germline configuration:



(1) D to J recombination



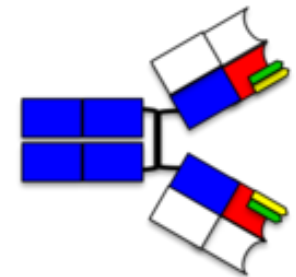
(2) V to DJ recombination



(3) Transcription & splicing

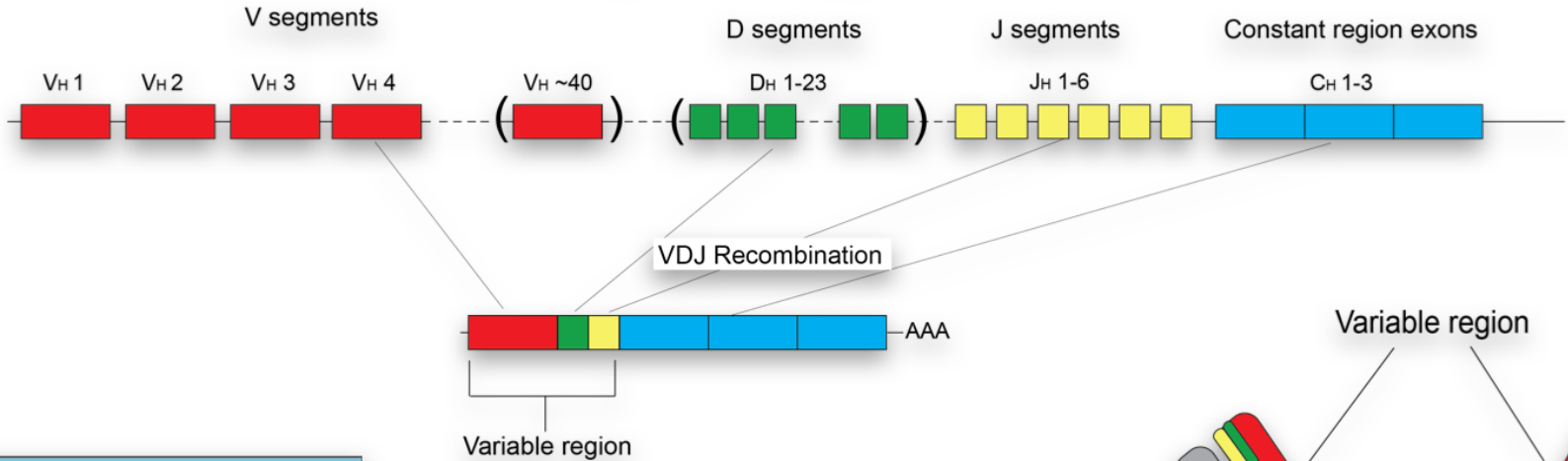


(4) Translation & assembly

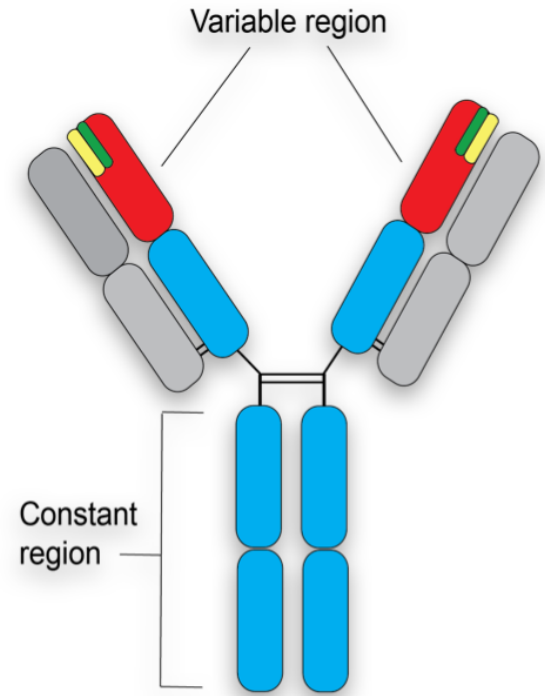
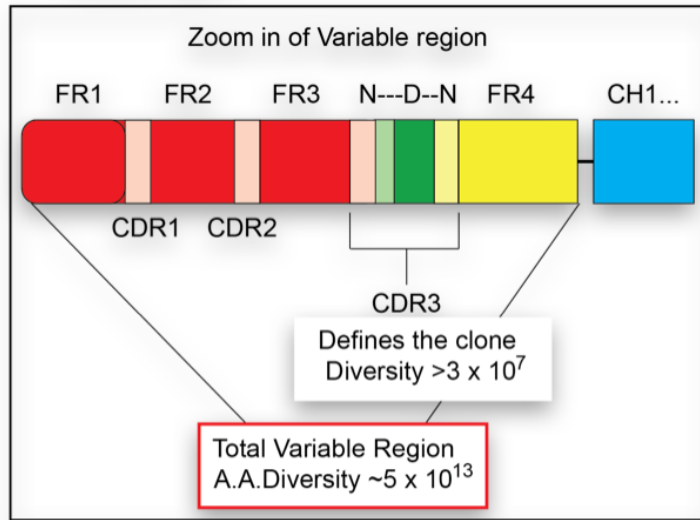


VDJ recombination

Germline configuration of antibody gene locus



Number of functional gene segments in human immunoglobulin loci			
Segment	Light chains		Heavy chain
	κ	λ	H
Variable (V)	34-38	29-33	38-46
Diversity (D)	0	0	23
Joining (J)	5	4-5	6
Constant (C)	1	4-5	9



Mechanismus VDJ rekombinace

probíhá pouze na DNA nezralých lymfocytů

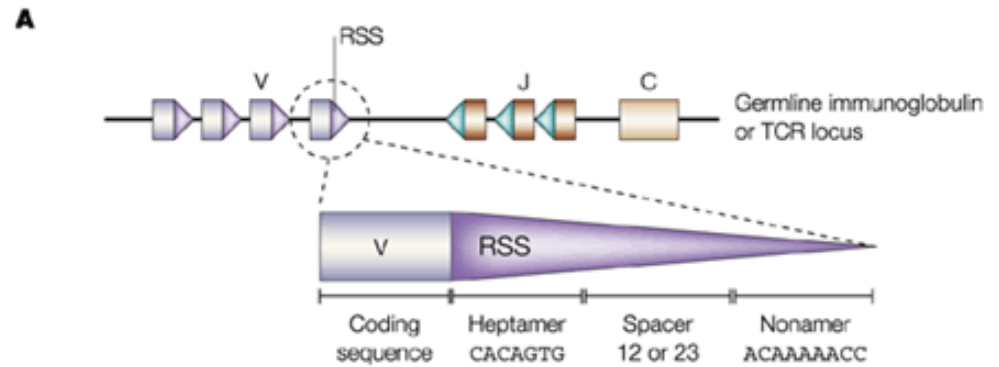
RSS (recombination signal sequence)

- označuje místo sestřihu (vazba RAG)

RAG1/RAG2 (recombination-activating genes)

- enzymy katalyzující rekombinaci

- vazba na RSS



B

a RAG binding and nicking

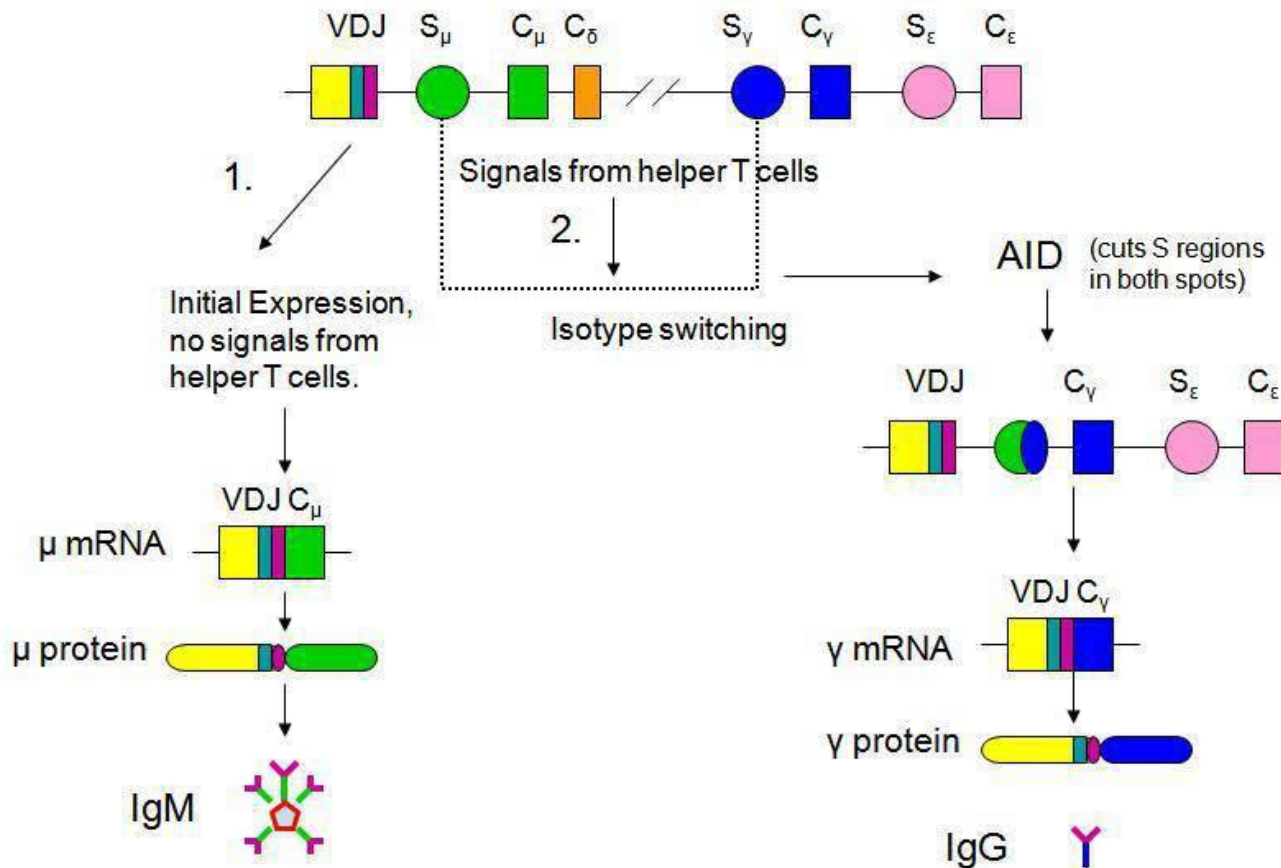
c Hairpin formation and cleavage

b Synapsis

d Hairpin opening and joining

Přesmyk imunoglobulinových tříd

- **IgM a IgD** se tvoří jako první, protože C_μ a C_δ následují na DNA hned za VDJ subgeny
- po VDJ rekombinaci následuje přesmyk tříd z **IgM do IgG, IgE nebo IgA**
- až po stimulaci antigenem v sekundárních lymfoidních orgánech za podpory T_H lymfocytů
- stejný úsek VDJ_H se připojí k subgenu C_γ , C_α nebo C_ϵ za **delece C_μ a C_δ**
- přesmyk tříd je řízen "signály přesmyku - S"

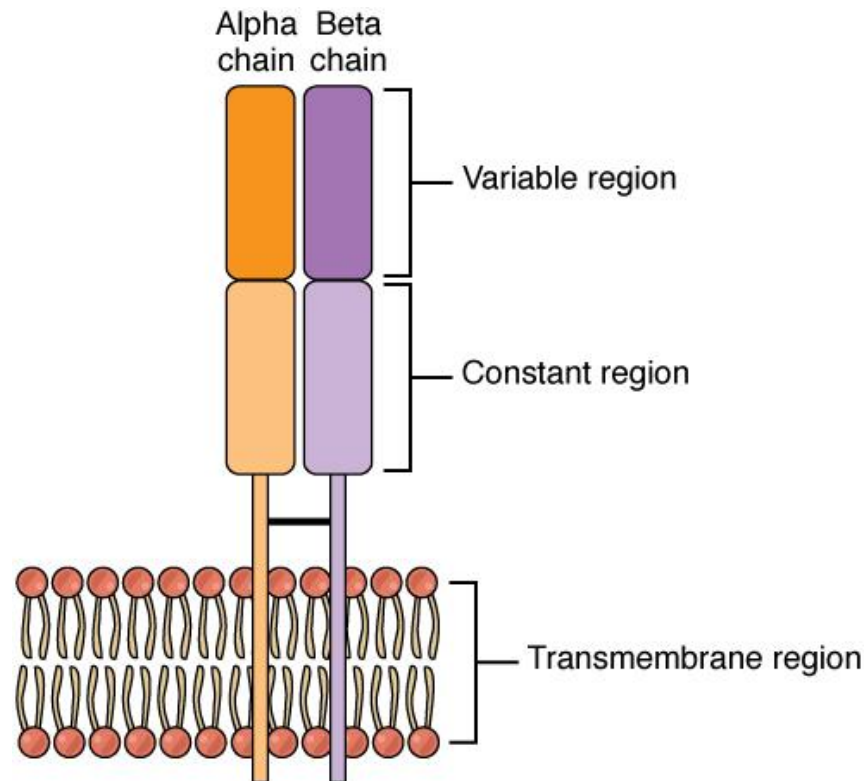


Receptory T lymfocytů (TCR)

- u člověka má 95% T lymfocytů TCR receptor složený z α (alfa) a β (beta) řetězce (cca 5% TCR je z řetězců gama a delta - γ/δ)

- V, D a J segmenty v β řetězcích
- V a J segmenty v α řetězcích

- přeskupování probíhá stejně jako u imunoglobulinů - vznik jedinečných receptorů

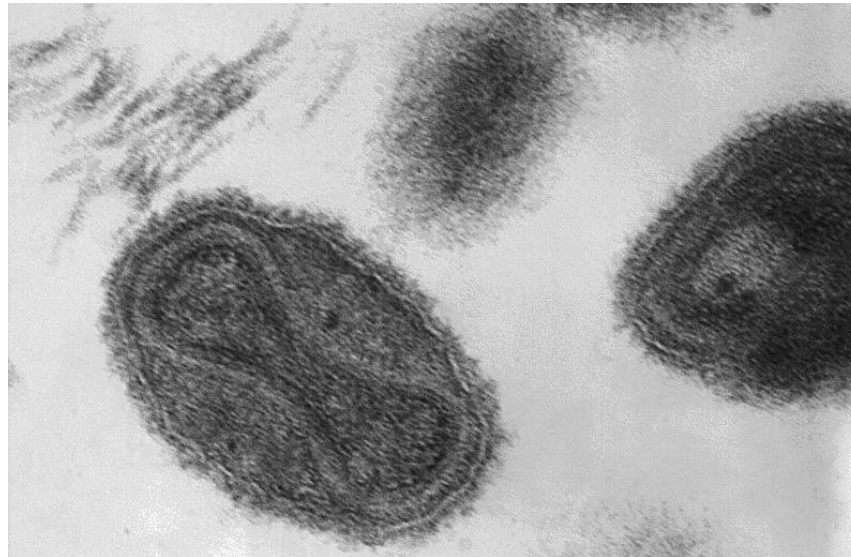
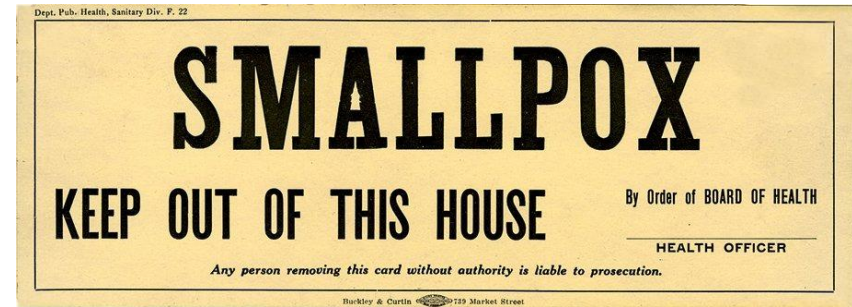


Vakcinace (očkování)

*tvorba paměťových lymfocytů po setkání s antigenem
(větš. oslabený kmen nebo jeho část)*

Pravé neštovice (small pox)

- infekční nemoc způsobená virem *Variola major*
- mortalita 30-35%
- u lidí se pravděpodobně objevila 10 000 let před našim letopočtem
- má na svědomí přibližně 300-500 milionů mrtvých v 20. století
- bývala zodpovědná za asi 1/3 oslepnutí
- v roce **1979** ohlásila WHO úplné **vymýcení pravých neštovic** díky celosvětovému programu očkování
- v 80. letech bylo zastaveno rutinní očkování dětí ve všech zemích (70. léta v Evropě a USA)
- jediné známé vzorky viru zůstávají v laboratořích v Atlantě a v Moskvě

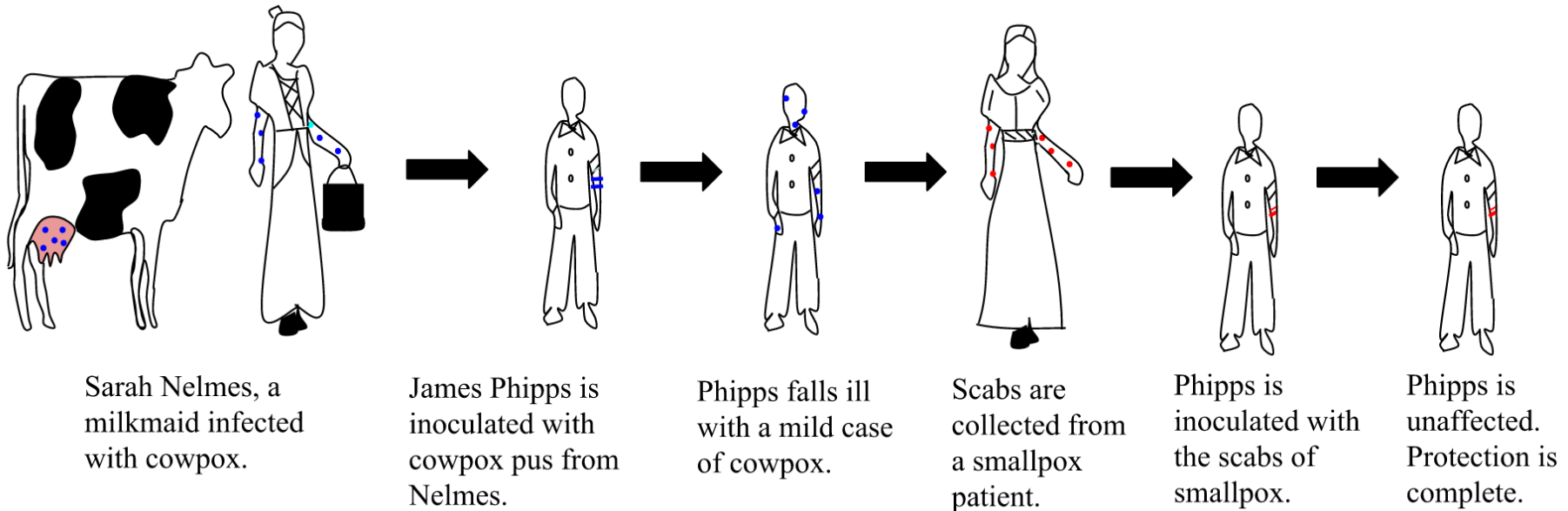


























Snímek viru z elektronového mikroskopu (wikipedia)

Vakcinace (očkování)

Edward Jenner (1749 - 1823)

- doktor z Gloucestershire
- při epidemii pravých neštovic si všiml, že dojičky, které prodělali kravské neštovice neonemocní
- provedl experiment:
 - odebral vzorek kravské neštovice z pacientky Sarah Nelmesové
 - nakazil tímto 8-letého chlapce Jamese Phippse
 - po zotavení nakazil Jamese pravými neštovicemi - neonemocněl
- očkování nepatentoval, aby mohli být léčeni bohatí i chudí



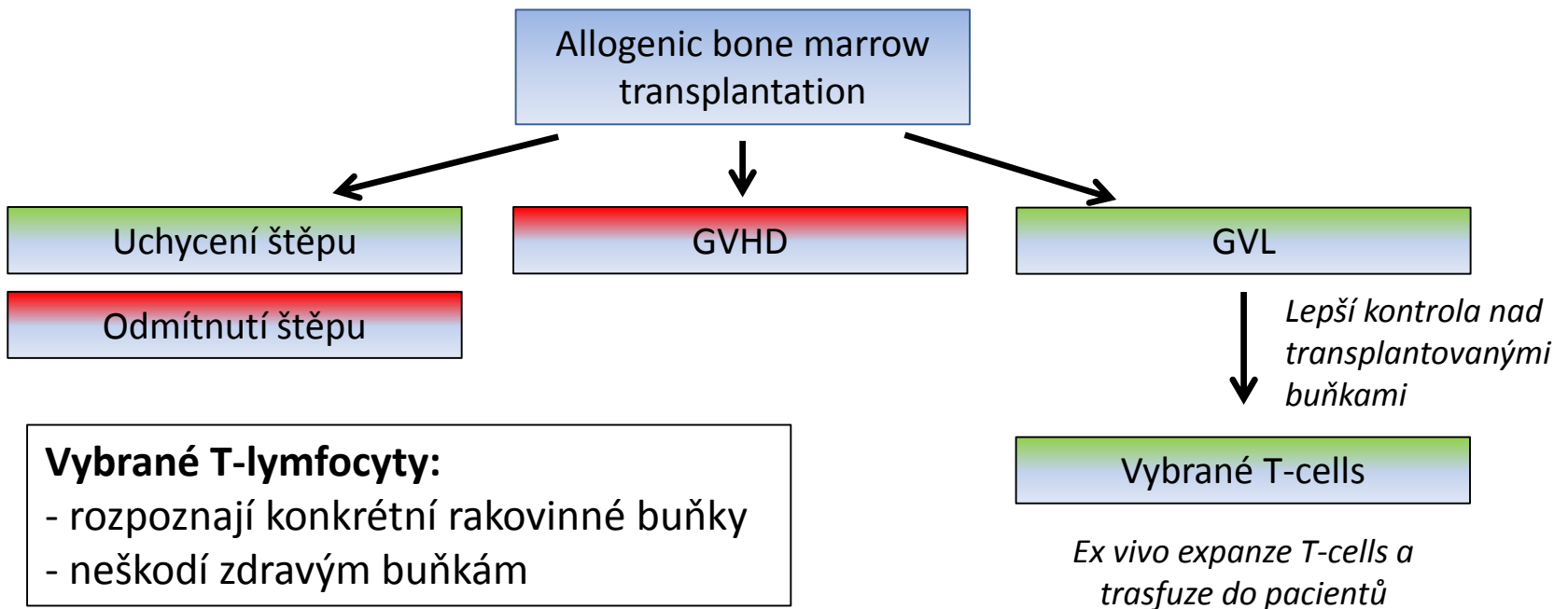
Company	Type	Doses	Storage
 Oxford Uni-AstraZeneca	Viral vector (genetically modified virus)	x2 	 2 to 8°C (6 months)
 Moderna	RNA (part of virus genetic code)	x2 	 -25 to -15°C (7 months)
 Pfizer-BioNTech	RNA	x2 	 -80 to -60°C (6 months)
 Gamaleya (Sputnik V)	Viral vector	x2 	 -18.5°C (liquid form) 2 to 8°C (dry form)
 Sinovac (CoronaVac)	Inactivated virus (weakened virus)	x2 	 2 to 8°C
 Sinopharm	Inactivated virus (weakened virus)	x2 	 2 to 8°C
 Novavax	Protein-based	x2 	 2 to 8°C
 Janssen Johnson & Johnson	Viral vector	x1 	 2 to 8°C (3 months)

Source: UK government, Reuters

Imunoterapie

Vychází ze dvou základních principů (pozorování):

1. Buňky imunitního systému jsou schopny infiltrovat a ničit solidní tumory.
2. Při allogenních transplantacích kostní dřeně docházelo k život ohrožujícímu GVHD, ale též občas k vyléčení leukémie pomocí efektu GVL (graft versus leukemia).



Imunoterapie

Vybrané T-cells

přirozené klony

umělý receptor

Nevyžaduje MHC (HLA) ko-signalizaci

Specifická přestavba T-Cell Receptoru proti danému antigenu (TCR-CD3 komplex) MHC ko-signalizace

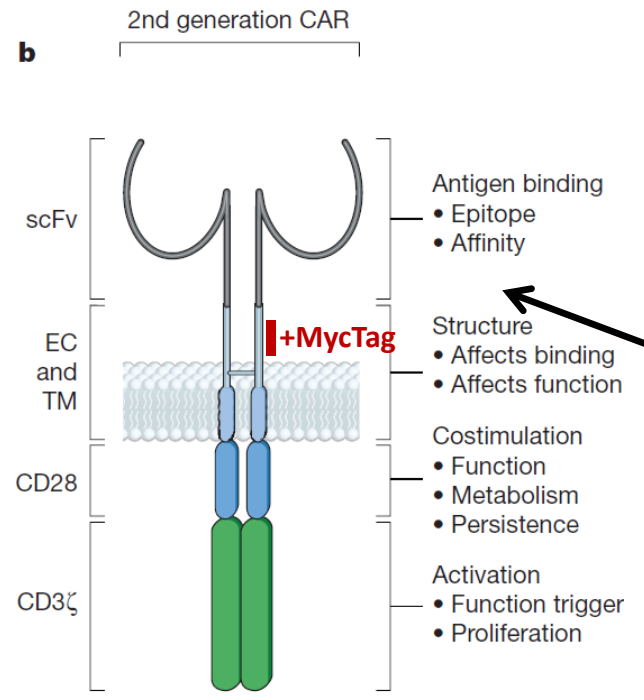
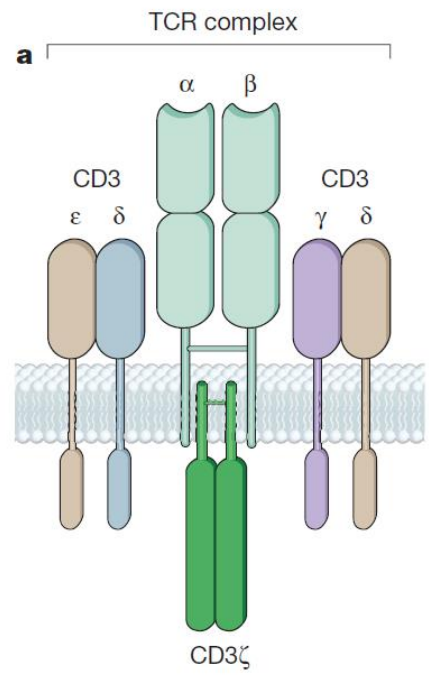
Neobsahuje celý CD3, ale jen jeho část CD3ζ (zeta) řetězec

CAR 1. generace

Přidána ko-stimulační komponenta receptoru (CD28 nebo 4-1BB)

CAR 2. generace

Plná aktivace a expanze

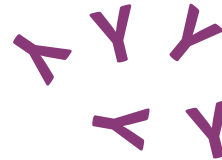
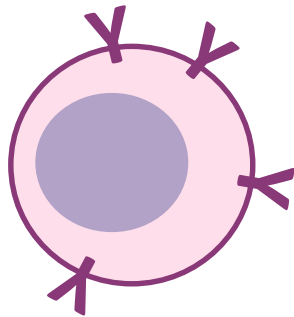


Chimerický Antigenní Receptor

CAR T vs. mAb

Umělý receptor vychází z monoklonální protilátky

- Vysoká hustota CAR na povrchu T lymfocytů vede k vysoké afinitě k antigenům na rakovinných buňkách
- Cytotoxický mechanismus T lymfocytů je účinnější než u volných protilátek
- CAR T-lymfocyty přetrvávají v organismu déle než volné protilátky
 - zvýšený účinek proti relapsu



Milníky ve vývoji CAR-T

1989 Zelig Eshhar

- první CAR (proof-of-principle)
- T cells lze pomocí CAR aktivovat proti vybraným antigenům bez nutnosti MHC-I

2011 Carl June

- CAR proti B-buněčnému antigenu **CD19**
- re-transfuze 3 pacientům s chronickou lymfatickou leukemií
- CART expandovaly 1000x
- eliminace lymfomu
- kompletní a trvalá remise

CAR-T field would not exist as it does today without CD19

Michel Sadelain

- CAR-T druhé generace: přidání ko-stimulační molekuly CD28
- umožnilo přežití CAR-T v těle v řádu měsíců

CAR-T skepticism

"You can't put genes into T cells"

"These modified T cells won't kill cancer in a mouse"

"You can't bring it to the clinic"

CAR-T v klinice



30.8.2017 - FDA schválila první CAR-T produkt (Novartis):

- **Kymriah** (tisagenlecleucel) pro autologní CD19 terapii akutní lymfoblastické leuk.
- pouze pro dětské pacienty
- FDA schválila použití monoklonální protilátky proti IL-6R
- **Actemra** (tocilizumab) proti život-ohrožujícím vedlejším efektům (Roche)



18.10.2017 - FDA schválila druhý CAR-T produkt (Gilead):

- **Yescarta** (axicabtagene ciloleucel) pro autologní CD19 terapii (dospělí)
- pro léčbu non-Hodgkinova lymfomu



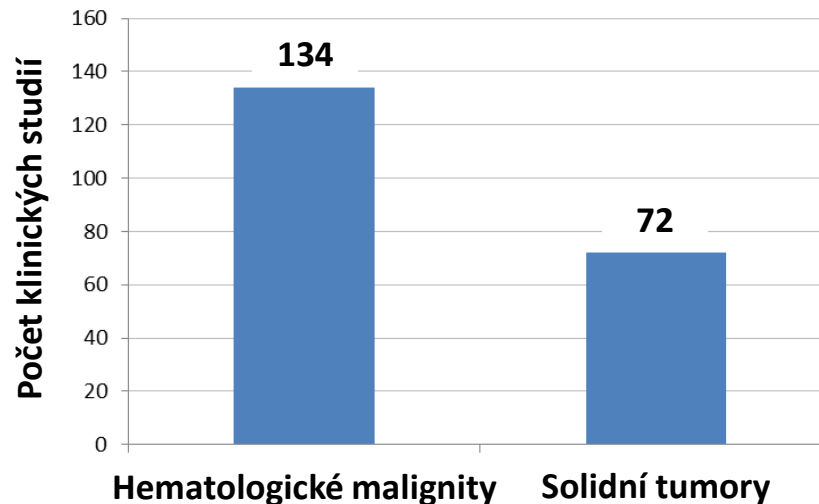
Hematologické malignance vs. solidní tumory

Hematologická onemocnění

- B-buněčné malignity jsou pro obor CAR-T klíčové
- CD19 je unikátní cílový antigen exprimovaný na maligních i zdravých B lymfocytech
- při léčbě dochází k B buněčným aplaziím - klinicky zvládnutelné

Solidní tumory jsou komplikovanější

- často chybí tumor-specifické cílové antigeny
- exprese cílových antigenů též na zdravých a nepostradatelných buňkách
- nedostatečná migrace CAR-T do nádorového stroma



Počty klinických studií na CAR-T v hematologických a solidních tumorech. Převzato z ClinicalTrials.gov 2018

Living drug safety

Side effects

1. Cytokine Release Syndrom (CRS*)

- horečky, orgánová selhání
- příčina: aktivace T-cells
- **je zvýšen zejména IL-6 - snižuje se pomocí Tocilizumabu***

2. Neurotoxicita

- příčina: neznámá

3. Ztráta účinnosti

- příčiny: a) CAR-Ts přestanou expandovat
- b) rakovinné buňky přestanou exprimovat cílový antigen
- c) inhibiční efekt nádorového microenvironmentu

4. On-target, off-tumour aktivace T cells

- útočí na zdravé tkáně, nař. plicní

***CRS - Cytokine release syndrome (cytokinová bouře)**. A serious and in some cases potentially life-threatening toxicity that has been observed after administration of natural and bispecific antibodies and, more recently, following adoptive T cell therapies for cancer. CRS is associated with elevated circulating levels of several cytokines including interleukin-6 (IL-6) and interferon- γ (IFN γ).

* **Tocilizumab (Actemra)** je původně lék na artrózu

Molekulární biologie

12. Molekulární podstata nádorových onemocnění

Osnova

základní vlastnosti nádorové buňky
onkogeny, protoonkogeny, nádorové supresory
dědičné nádory

Hlavní zdroje:

*S. Rosypal, Úvod do molekulární biologie 1-4
Masarykova Universita Brno
ISBN 80-902562*

*B. Staveley, Principles of Cell Biology
Memorial University of Newfoundland
<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CBhome.html>*

Rakovina - Úvod

*Komplexní onemocnění vycházející z poruch buněčného cyklu
Způsobena maligním nádorem*

- v civilizovaném světě je šance na vznik rakoviny zhruba u 50% populace
- druhá nejčastější příčina úmrtí po kardiovaskulárních nemocech
- vývoj rakoviny je postupný proces kumulace změn - vyšší riziko s věkem

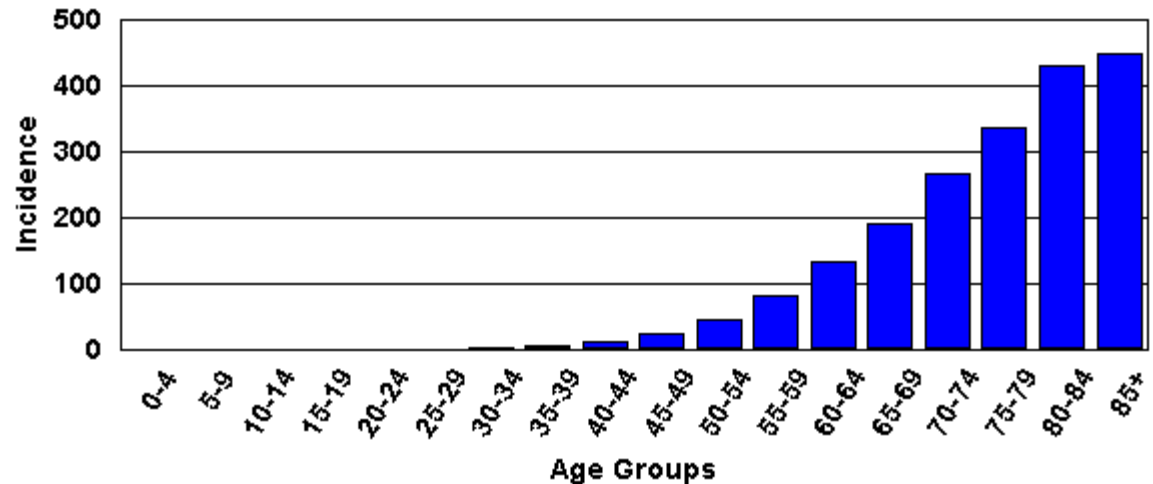
Nádor (tumor, neoplazma, novotvar)

patologický útvar tvořený v tkáni mnohobuněčného organismu, jehož růst se vymkl kontrole. Dělení buněk není omezováno žádným regulačním mechanismem

Kancerogeneze = Karcinogeneze

Proces vzniku a vývoje nádoru

COLON & RECTUM CANCER (Invasive) - INCIDENCE BY AGE CATEGORY
Incidence by Age Category (SEER Table VI-2) 1994-1998
*Incidence means the number of cases per 100,000 population



Rakovina - Úvod

Benigní nádor

- pomalý růst
- podobnost s původní tkání
- ohraničenost
- většinou neohrožují život
- utlačuje okolní tkáň

Maligní nádor

- vysoká proliferace
- změny v morfologii, velikosti a tvaru buněk
- nižší stupeň diferenciacce
- tvorba metastáz

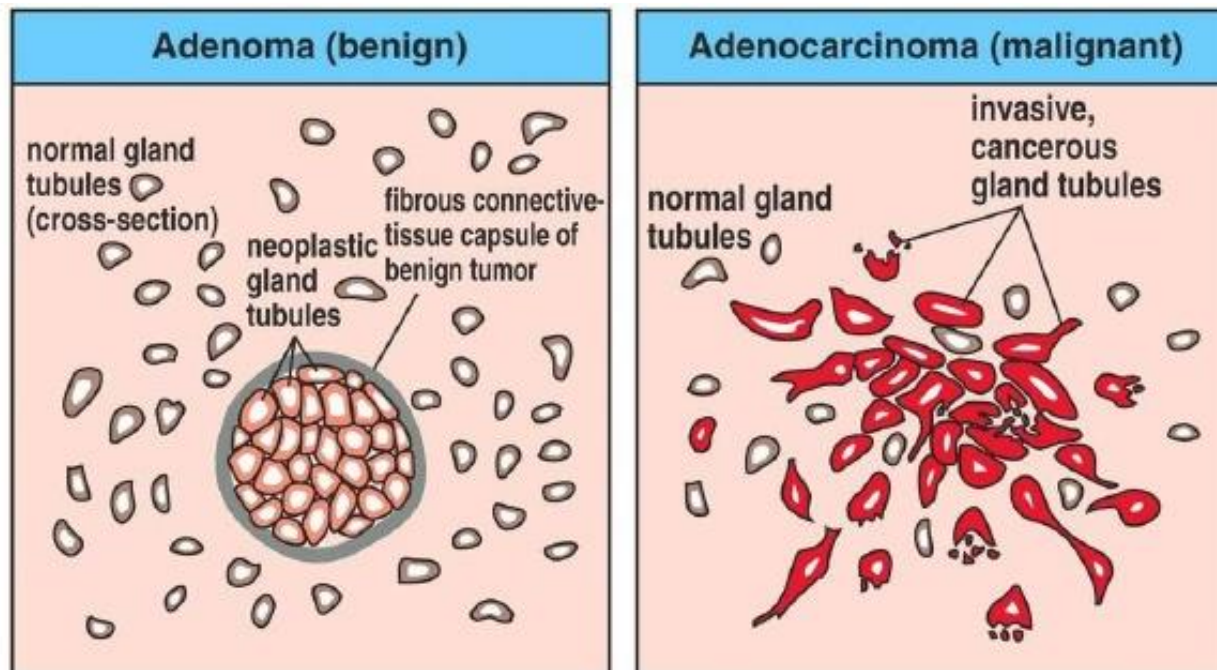


Figure 12-35 The Immune System, 2/e (© Garland Science 2005)

Adenom/Adenokarcinom: nádor vzniklý z epitelu. Nezhoubný nádor se označuje jako adenom, zhoubný jako adenokarcinom.

Rakovina - Úvod

Typy

1. (Adeno) Karcinomy

- z epitheliálních buněk
- 90% všech rakovin
- např. kůže, játra, slinivka, štítná žláza, plíce, prsa, prostata, tlusté střevo, vaječníky, ledviny...

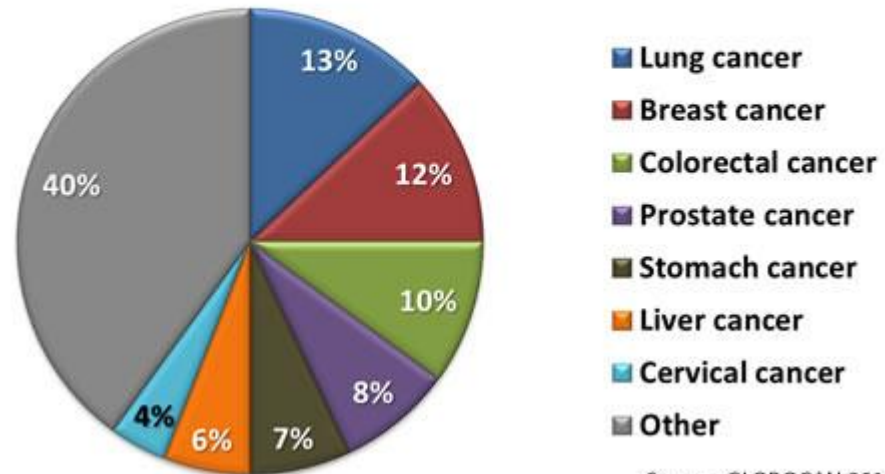
2. Sarkomy

- v podpůrných tkáních
- např. kost, chrupavka, sval...

3. Krevní a lymfatické

- nevyskytují se jako pevné útvary
- lymfomy a leukémie

Most Common Cancers Worldwide in 2012

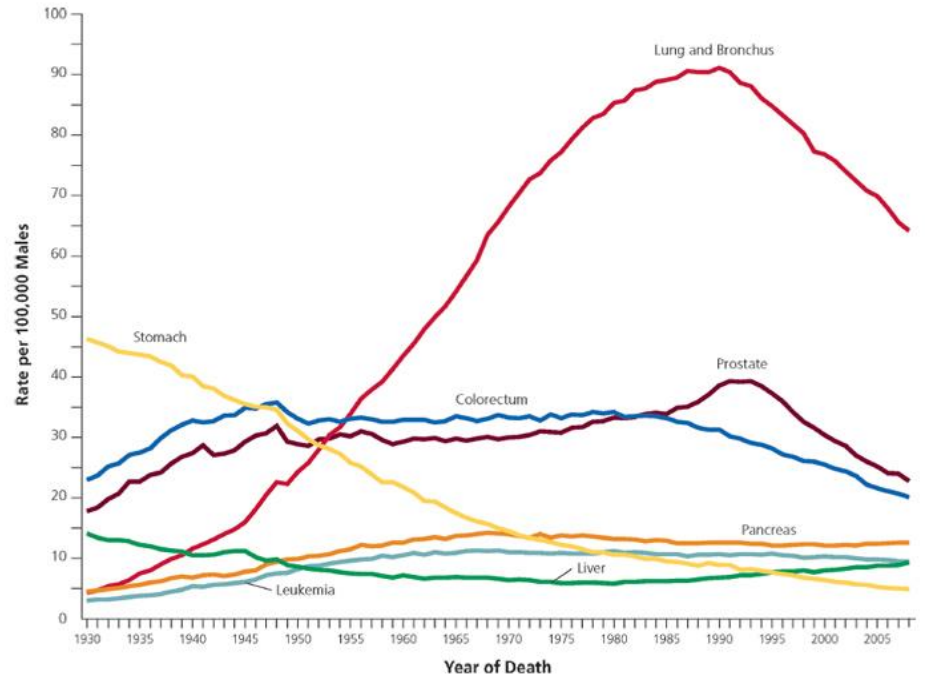
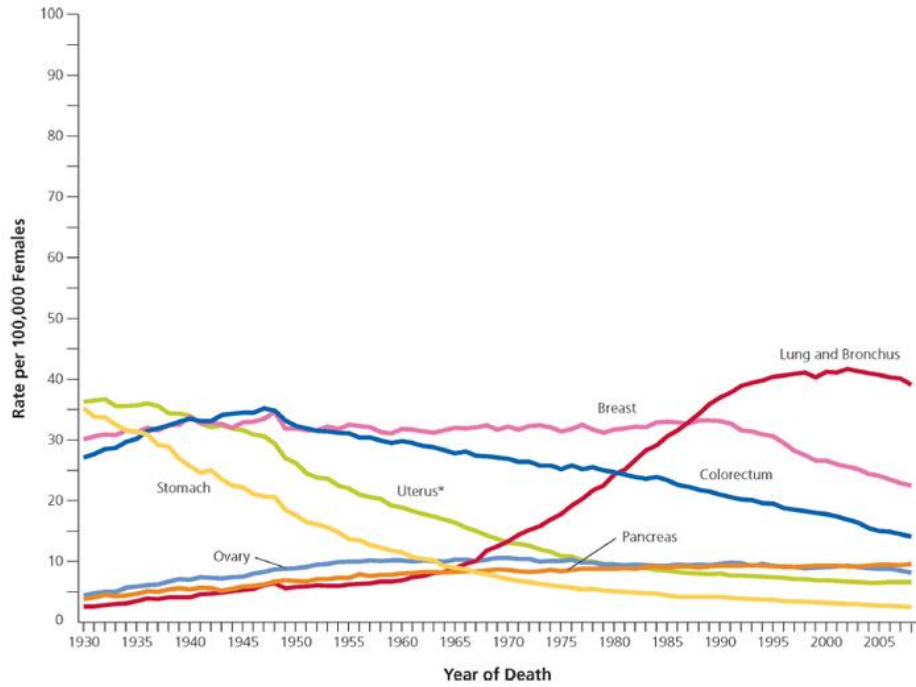


Source: GLOBOCAN 2012

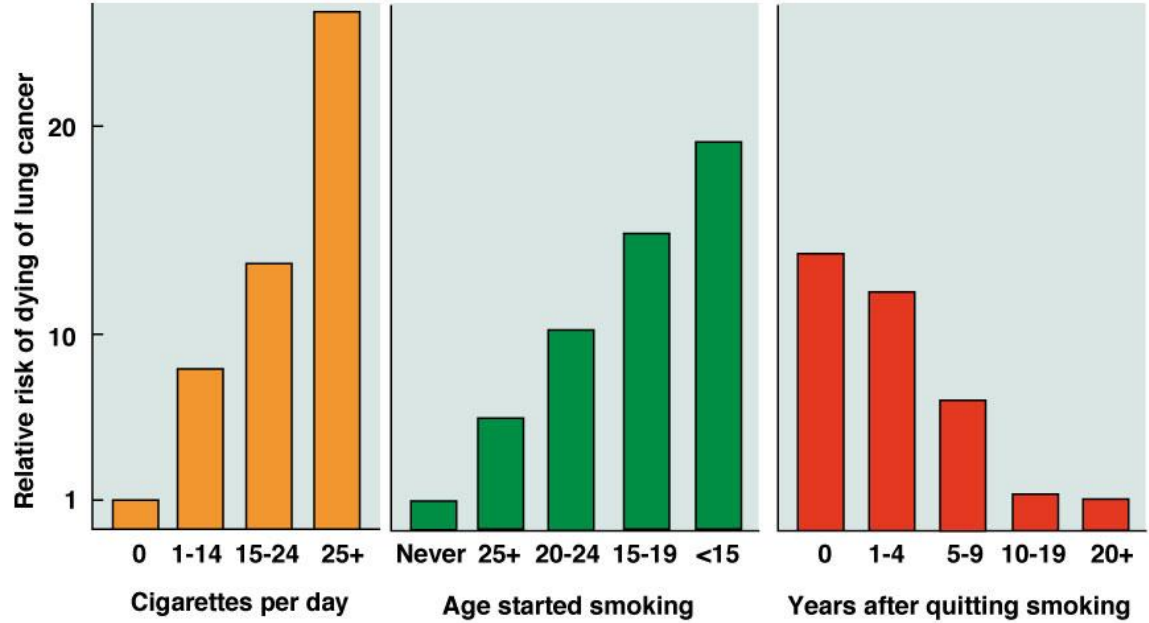
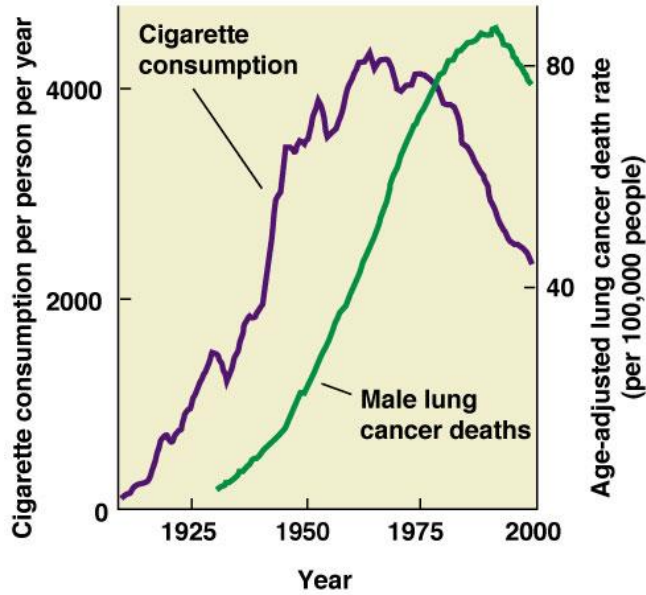
Epitel kryje vnější nebo vnitřní povrchy organismu a má žláзовou funkci. *Fylogeneticky nejstarší typ tkáně. Vzniká ze všech 3 zárodečných listů.*

Endotel - *jednovrstevný dlaždicový epitel (vrstva buněk) vystýlající vnitřní povrch cév a srdce. Mezodermální původ.*

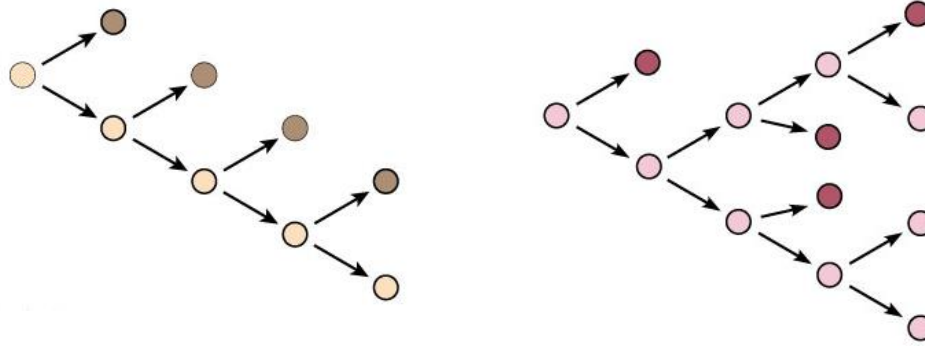
Roční úmrtnost na vybrané typy rakoviny



Cigaretty a rakovina

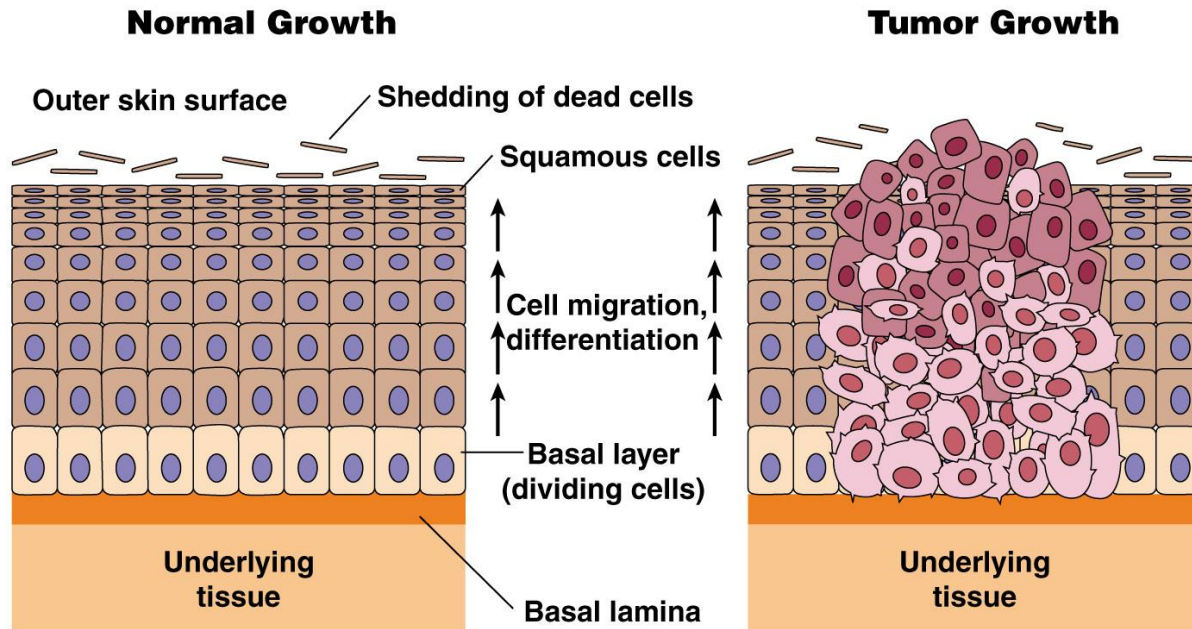


Tumory vznikají nekontrolovaným dělením při ztrátě rovnováhy mezi **proliferací** a **diferenciací**



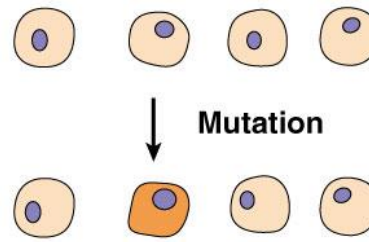
Rakovina kůže

- vrstva epitelálních buněk z bazální vrstvy začne přerůstat okolní buňky a tvoří tumor
- defektní mechanismy kontroly buněčného cyklu

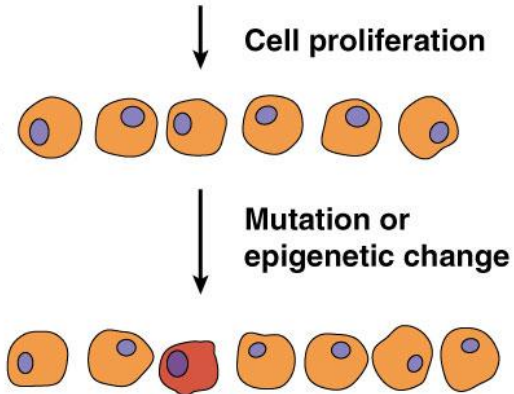


Stádia rakoviny

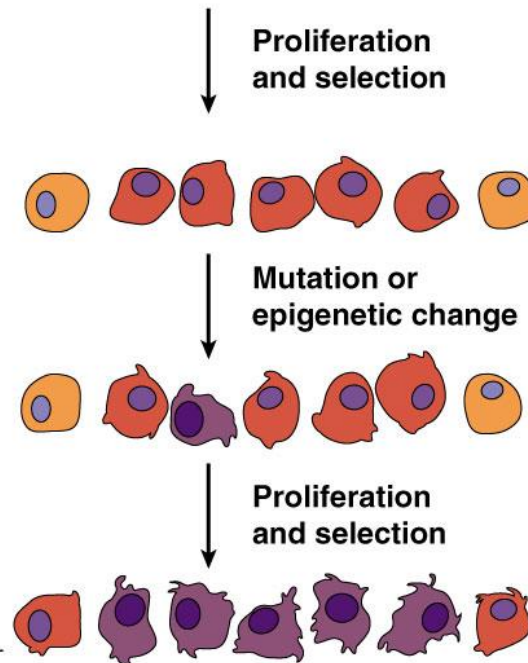
1 Initiation



2 Promotion



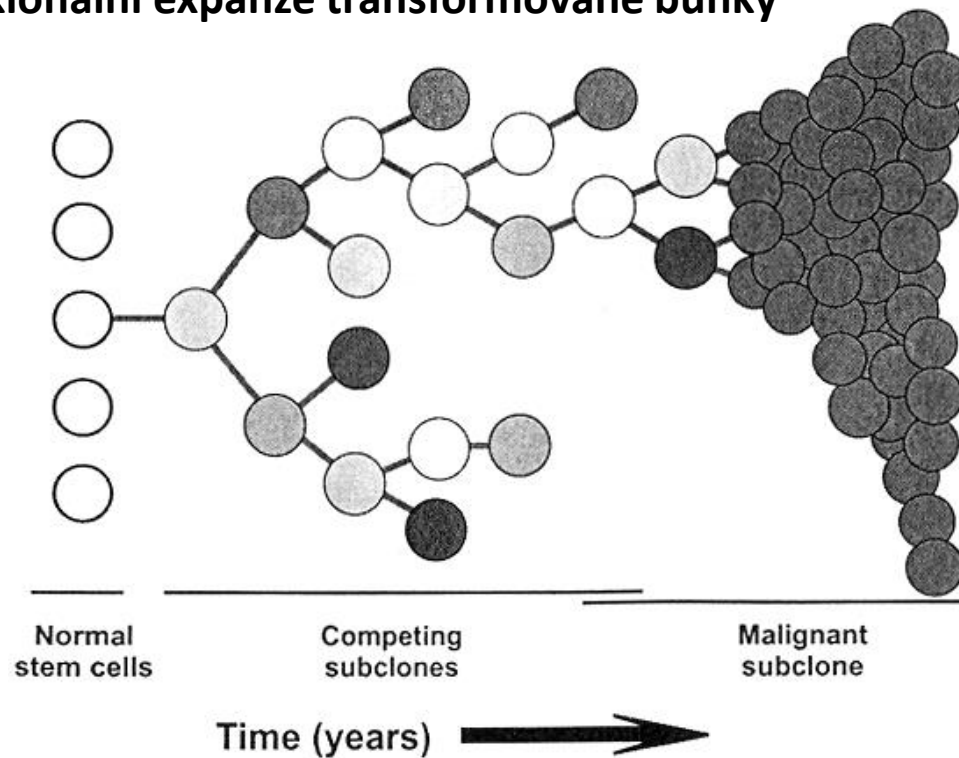
3 Tumor progression



Rakovina není monogenní onemocnění

- Odhadem **4-7 událostí** nezbytných pro nádorovou transformaci buňky
- **Desítky možných genů**, jejichž mutace povede k podpoře vzniku rakoviny

Klonální expanze transformované buňky



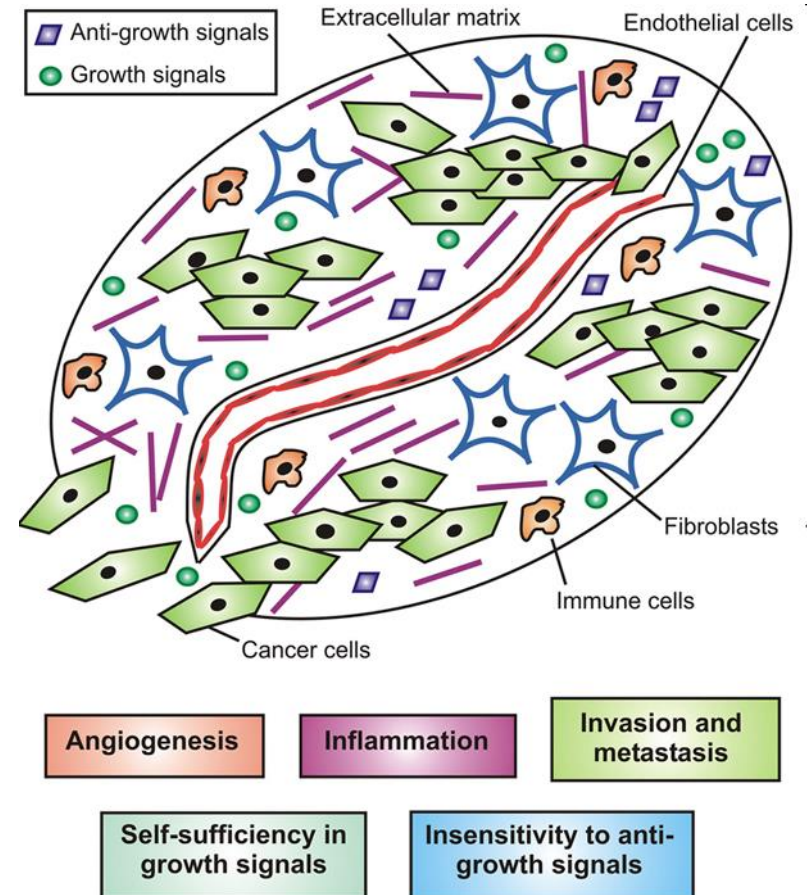
Nádor je komplexní tkáň

1. Nádorové stroma:

- **Podpůrné buňky** – zejm. **Fibroblasty** - udržují tvar, vylučují extracelulární matrix
- Nové **cévní zásobení (endotheliální buňky)** - transport živin a kyslíku, možnost invaze a metastází
- Buňky **imunitního systému** - indukce zánětu

2. Nádorový parenchym:

- Vlastní nádorové buňky
- Heterogenní, k mutacím dochází i během jeho růstu



Obecné vlastnosti nádorové buňky

1. Soběstačnost v produkci růstových signálů
2. Necitlivost k signálům zastavujícím buněčný cyklus
3. Poškození apoptózy
4. Neomezený replikační potenciál
5. Posílení angiogeneze
6. Tvorba metastáz

*Byly porušeny překážky buněčné proliferace
→
Neomezené dělení buňky a její „nesmrtelnost“*

Speciální vlastnosti nádorové buňky při *in vitro* kultivaci

1. Nepotřebují ukotvení

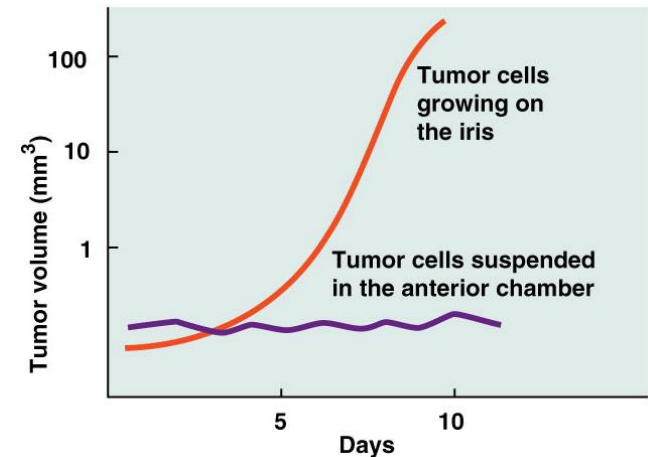
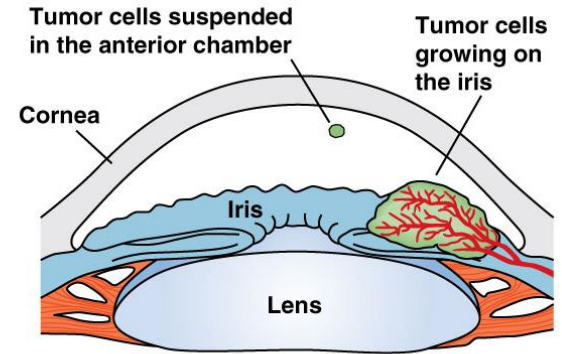
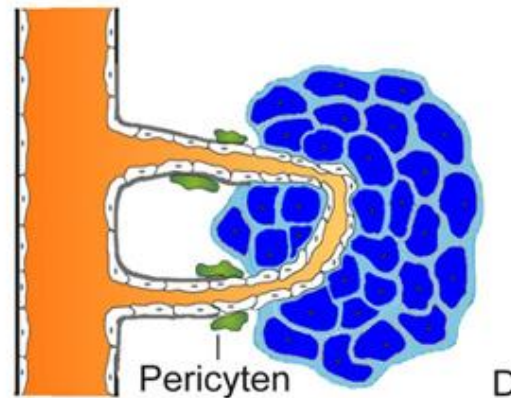
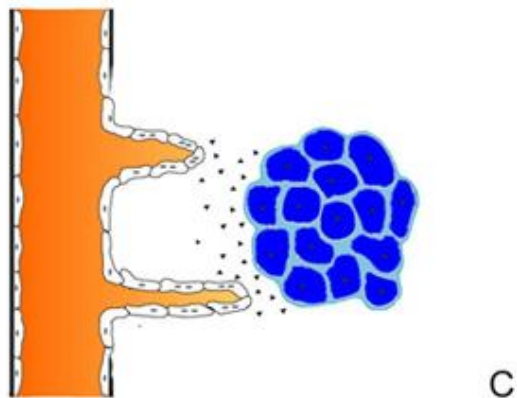
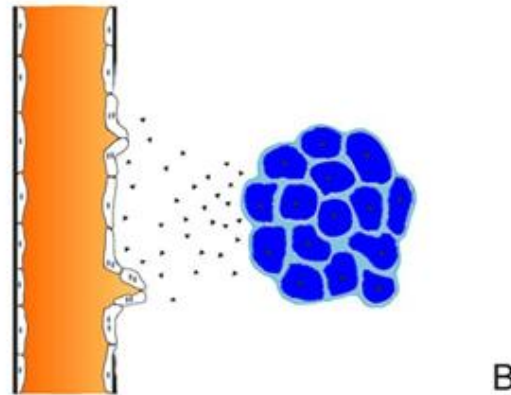
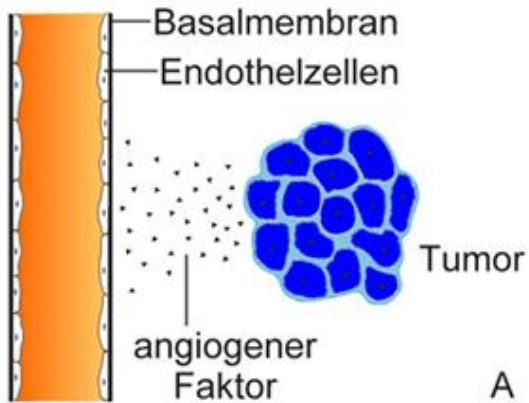
- většina zdravých buněk potřebuje podklad a v kultuře tvoří monolayer
- rakovinné buňky dokážou růst v suspenzi

2. Snížená citlivost ke kontaktním signálům (kontaktní inhibice)

- zdravá buňka se přestane dělit, pokud není místo (v kultuře tvoří pouze monolayer)
- rakovinná buňka se dělí dál a utlačuje okolní tkáň (v kultuře přerůstá do více vrstev, 3D útvary)

Angiogeneze

- tvorba vlastního cévního zásobení
- tumor potřebuje cévní zásobení pro výživu, okysličení a odvod živin, v opačném případě roste pouze max. 1-2 mm
- toto kontroluje vypouštěním směsi angiogenních faktorů (např. VEGF a FGF)



Duhovka (iris) je dobře prokrvená
Cornea - rohovka

Metastáze a invaze

- primární nádory lze odstranit chirurgicky

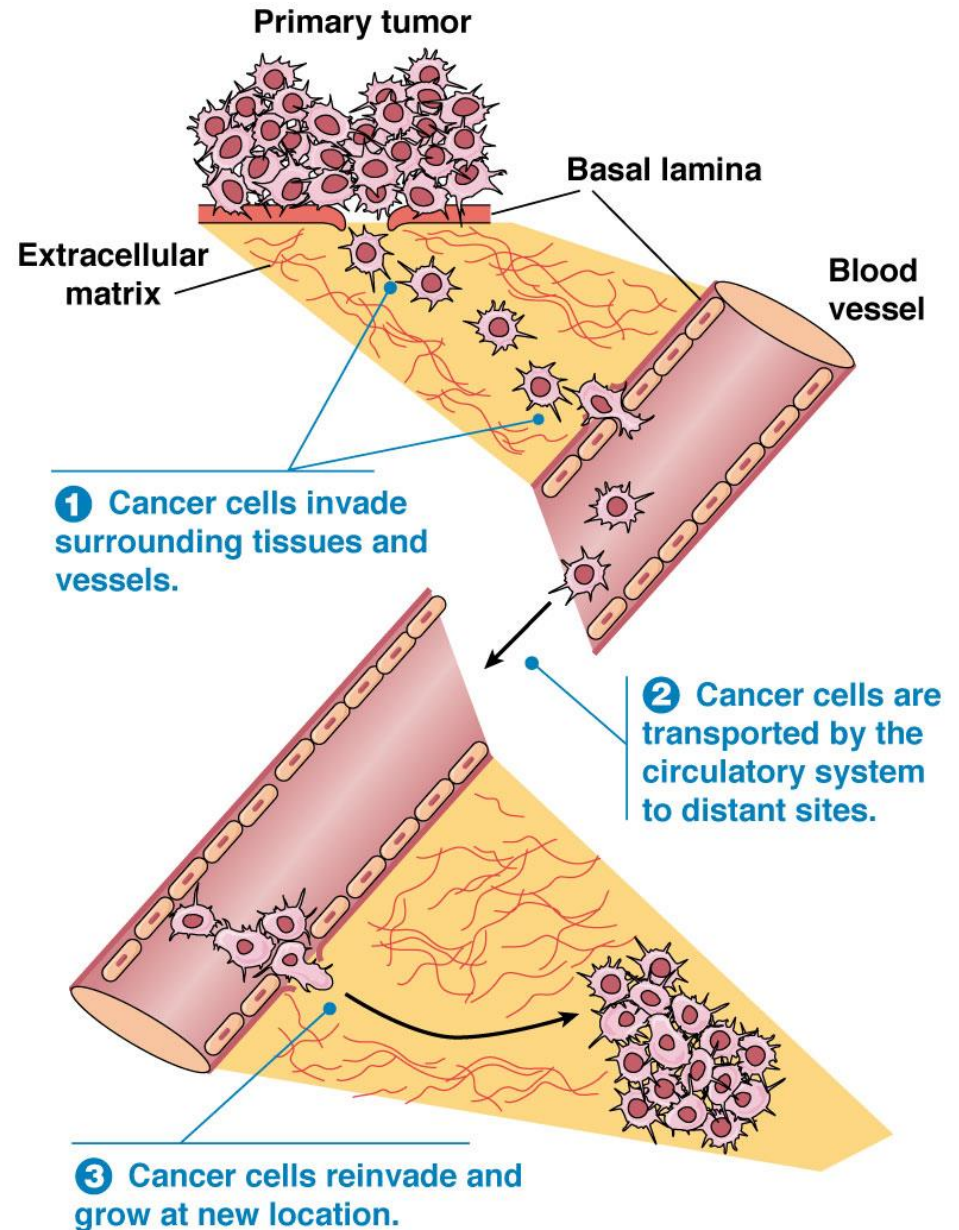
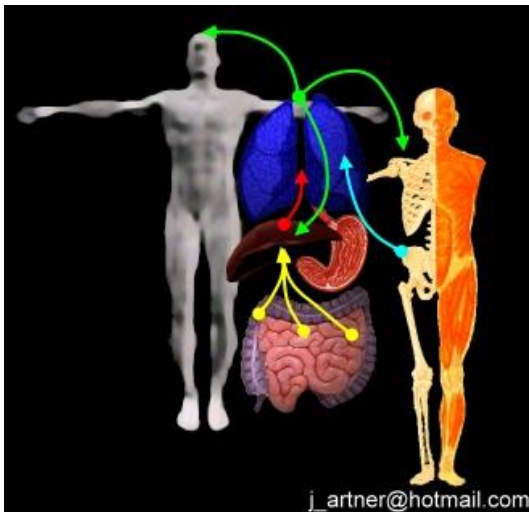
Invaze

migrace a penetrace rakovinných buněk do sousední tkáně

Metastáze

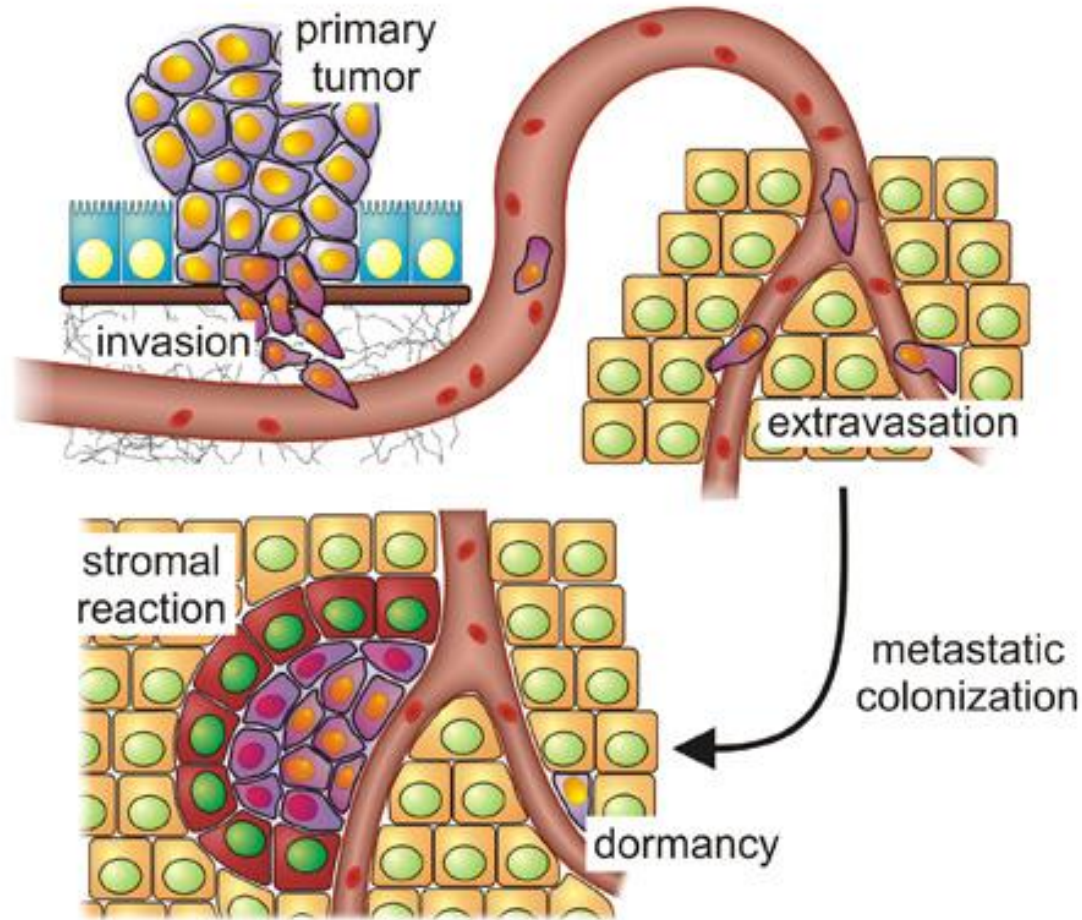
migrace rakovinných buněk krevním oběhem do vzdálených tkání a tvorba sekundárních ložisek

- změny adheze a produkce proteáz, degradujících proteiny bazální laminy



Metastáze a invaze

- rakovinné buňky mohou v sekundárních ložiscích přetrvávat ve stádiu **dormance**, těžko odhalitelné zobrazovacími metodami - relaps onemocnění po letech



Extravasation is the movement of cells from the capillaries to the tissues surrounding them

Neomezený replikační potenciál rakovinných buněk

Telomery

Opakující se sekvence na konci každé chromatidy

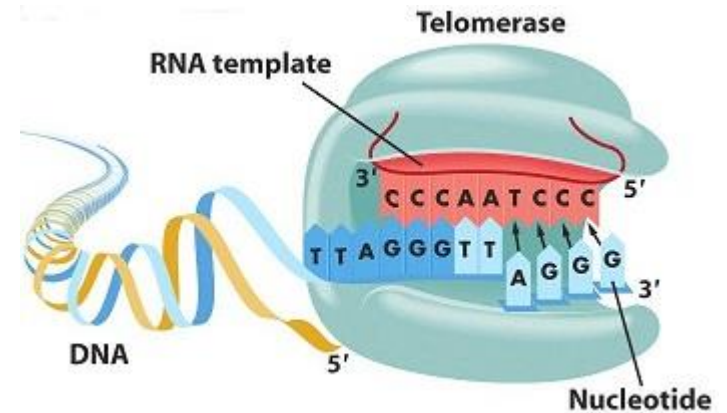
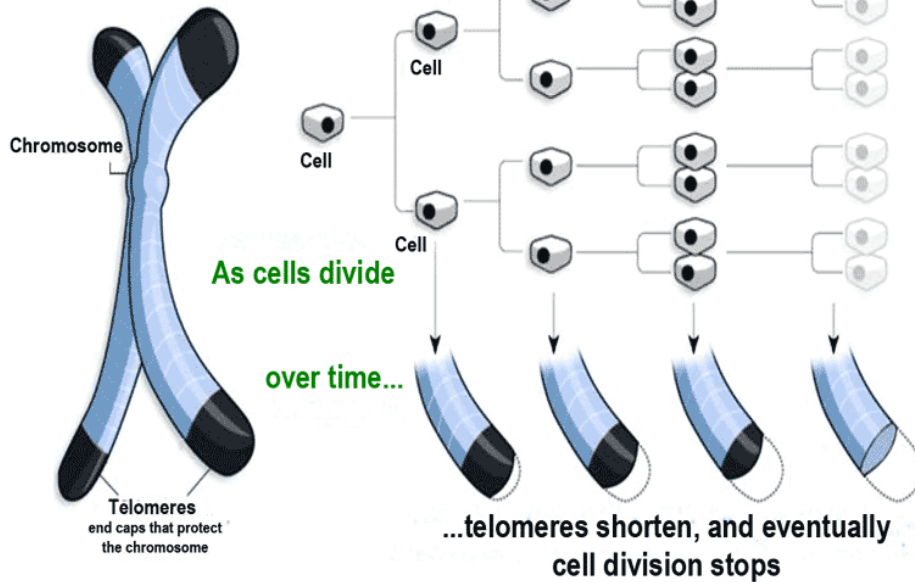
Pro obratlovce: sekvence TTAGGG (opakuje se asi 2500x u lidí)

Při každé replikaci dojde ke zkrácení chromatidy. To může být dorovnáno enzymem telomerázou

U většiny lidských somatických buněk telomeráza není aktivní

Aktivní telomeráza znakem nádorových a kmenových buněk – až 90%

What We Lose With Age



Molekulární podstata rakoviny

Změny v genech, které hrají roli v kontrole buněčného cyklu a opravách DNA

1. Proto-onkogeny

- geny stimulující proliferaci
- při mutacích způsobujících jejich hyperaktivitu je nazýváme **onkogeny**
- "*Gain-of-function*" mutace
- často geny signalizační kaskády růstových faktorů
- např. Ras, Myc...
- aktivace je **dominantní** - stačí porucha v jedné alele pro abnormálně zvýšenou funkci



2. Tumor-supresory

- geny zastavující buněčný cyklus
- při rakovině často nefunkční
- "*Loss-of-function*" mutace
- např. p53, Rb1, BRCA1 a BRCA2...
- aktivace je **recesivní** - nutný defekt v obou alelách pro vyřazení z provozu



Protonkogeny a nádorově supresorové geny kódují proteiny, které se účastní řízení růstu buněk

1. Růstové faktory

- např. PDGF, EGF...

2. Receptory pro růstové faktory

- např. PDGFR, EGFR...

3. Nitrobuněčné přenašeče

- např. Ras, Src...

4. Transkripční faktory

- např. Myc, Fos...

5. Regulátory apoptózy

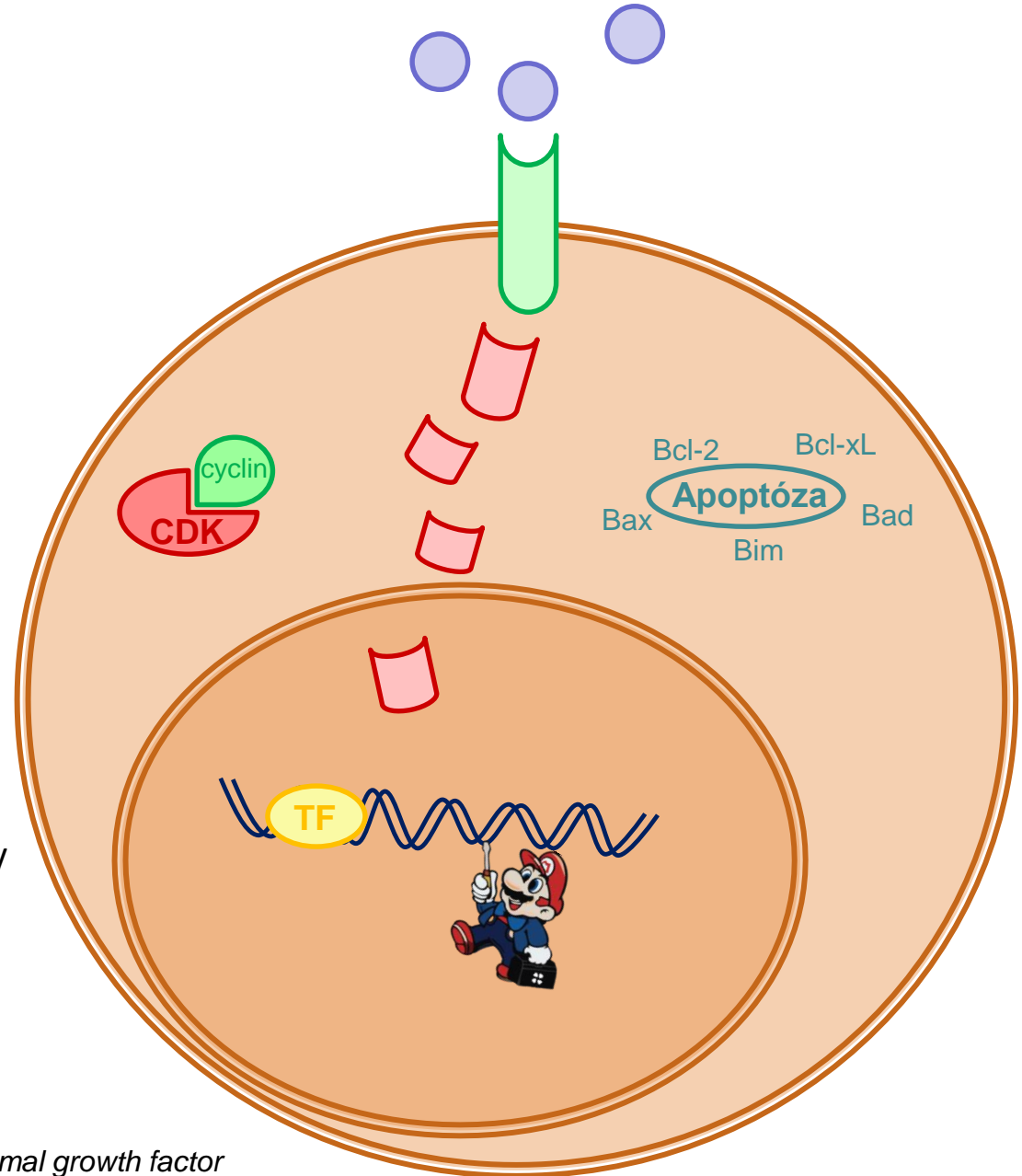
- např. proteinové rodina Bcl2

6. Proteiny řídící buněčný cyklus

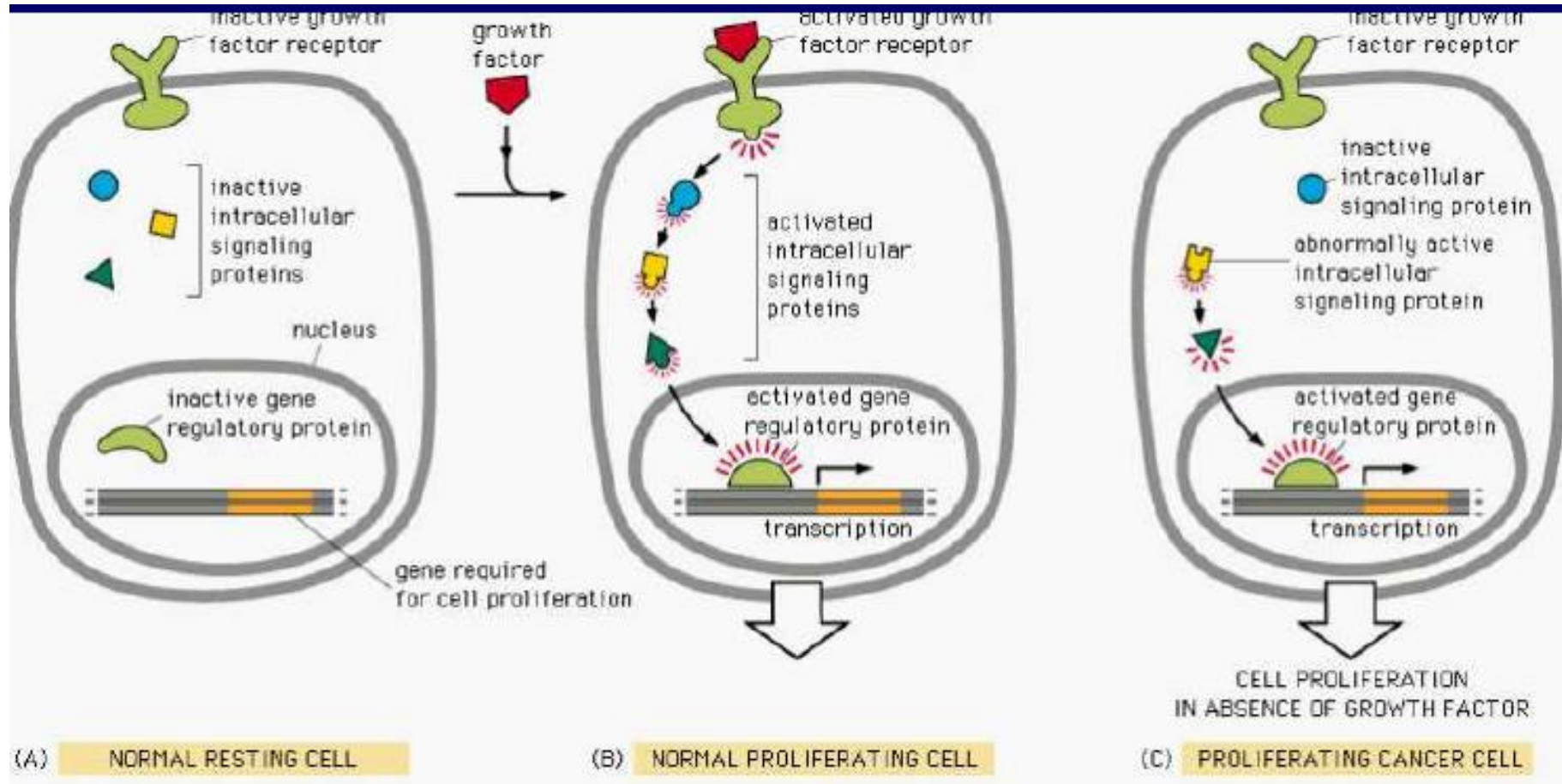
- např. cykliny a cyklin-dependentní kinázy

7. Proteiny zapojené do oprav DNA

- např. BRCA, ATM, ATR, γ H2AX...



Patologická aktivace protoonkogenů



Buněčný cyklus

Interfáze

G1 fáze - období růstu buňky

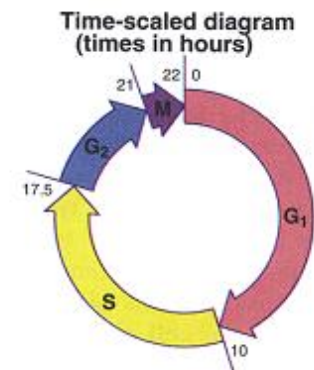
postup fází G1 je řízen dvěma kontrolními body:

- bodem restrikce (kontrola velikosti buňky, vnější signály)
- kontrolním bodem sledujícím stav DNA

S fáze – replikace DNA

G2 fáze – růst buňky, příprava na mitózu

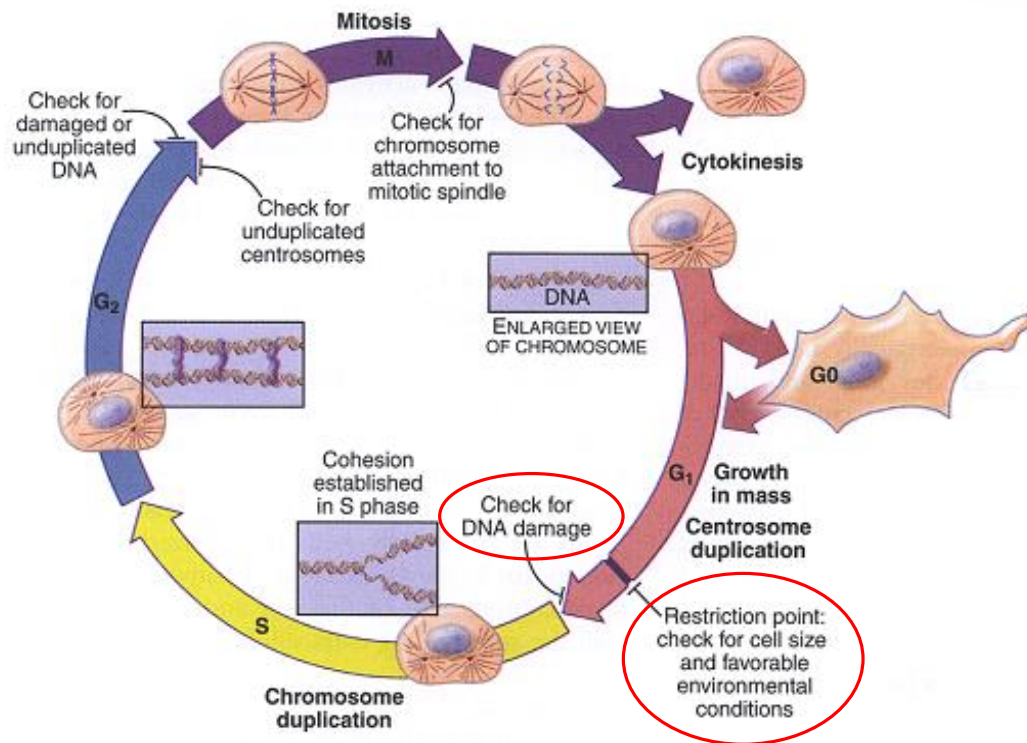
kontrolní bod G2 sledující poškození DNA - kontrola struktury DNA



Mitóza

M kontrolní bod

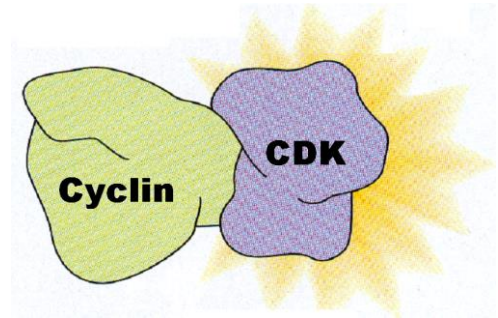
- kontrola sestavení mitotického vřeténka



Řízení buněčného cyklu

CDK- cykliny

heterodimerní protein kinázové komplexy zajišťující fosforylaci proteinů nezbytných pro průběh buněčného cyklu



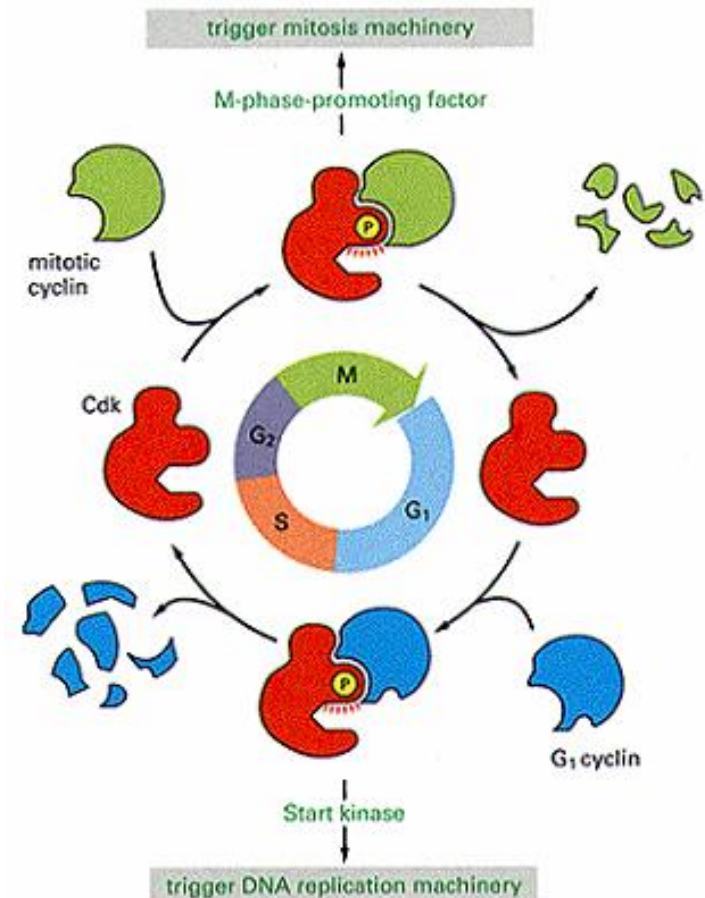
Cykliny

regulační podjednotky komplexu
zapínají kinázovou (fosforylační) aktivitu CDK
- jejich hladiny se během cyklu pravidelně kolísají
ve specifických fázích cyklu podléhají degradaci
proteolýzou

CDK (Cyklin dependentní kinázy)

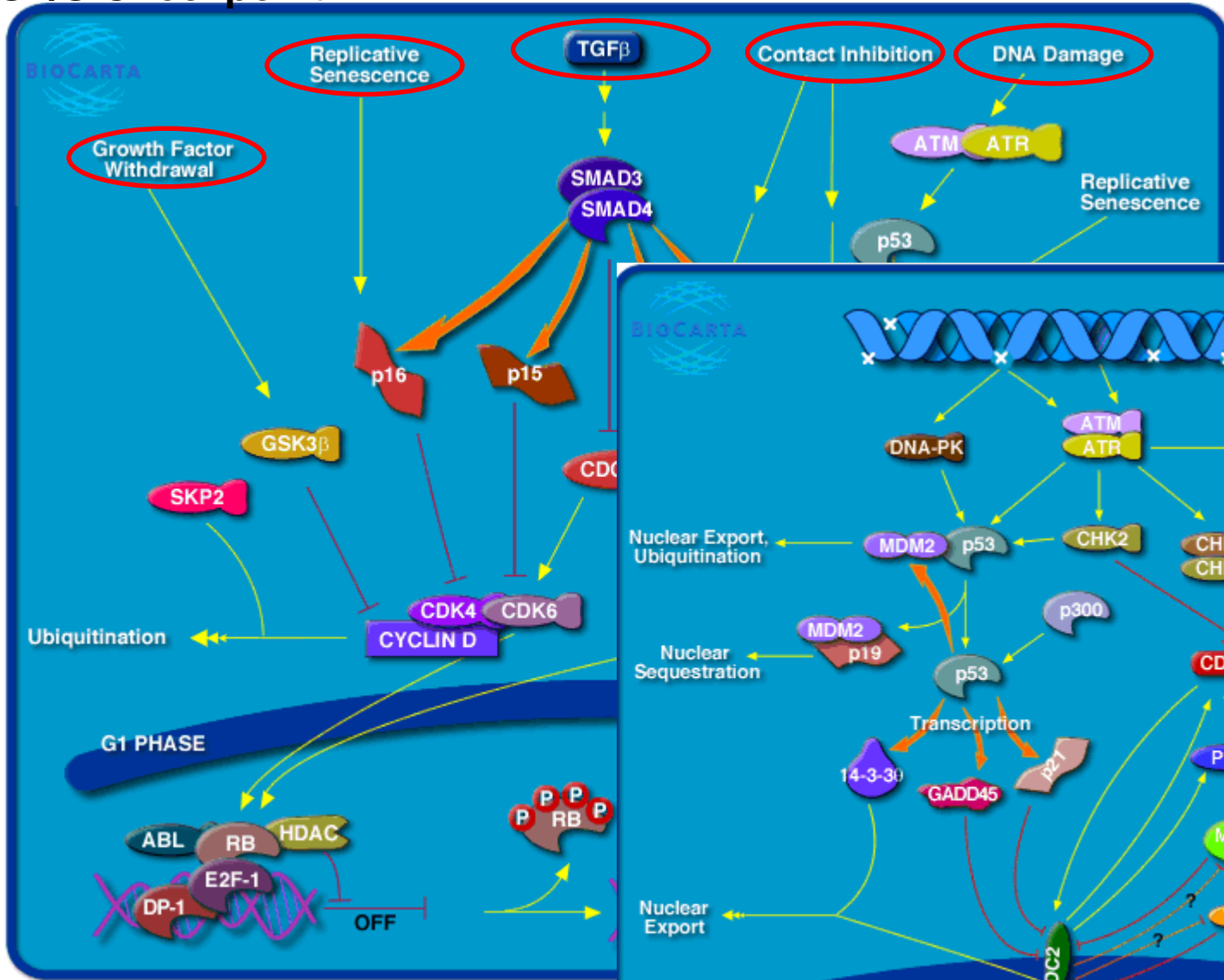
- katalytické podjednotky komplexu
aktivovány ve spojení s cykliny
aktivita (nikoli koncentrace) během cyklu kolísá

Inhibitory CDK

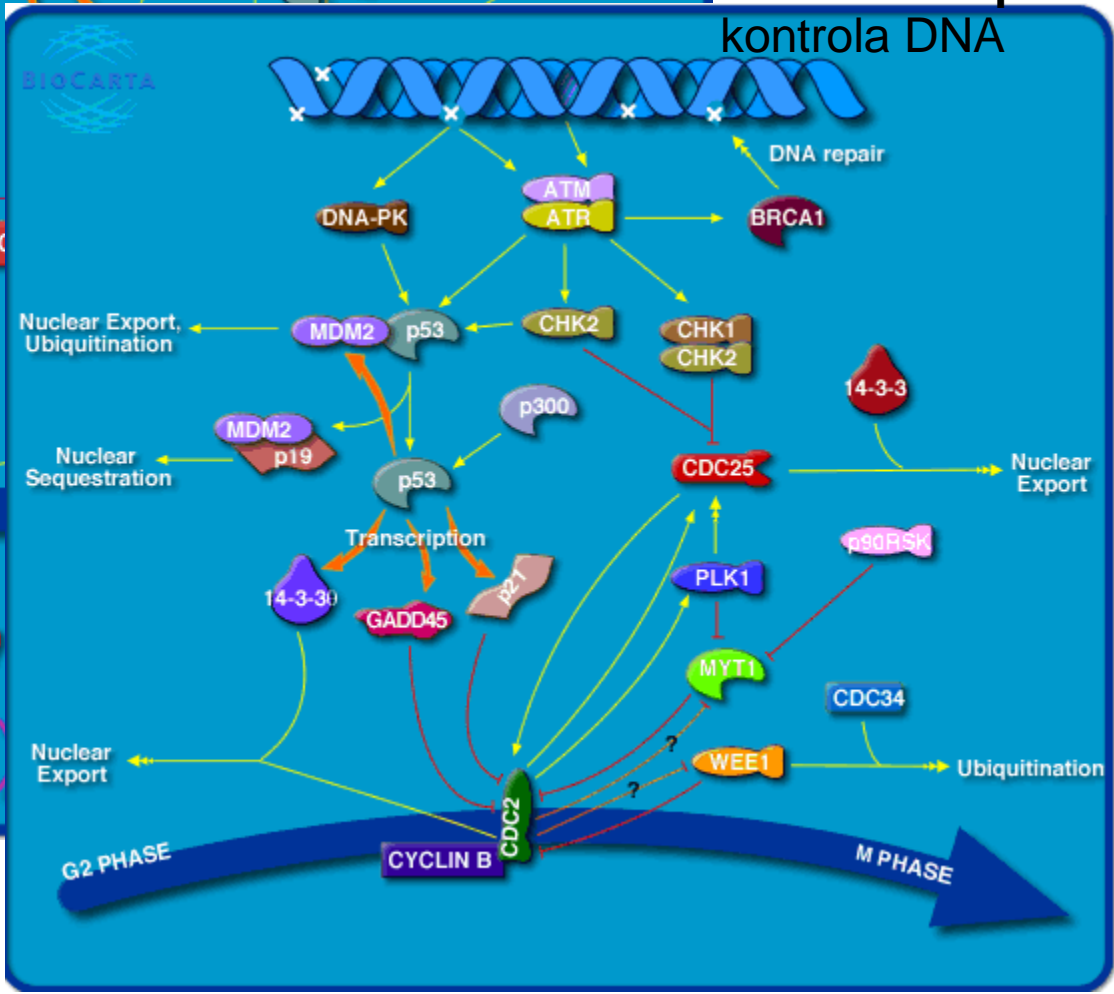


Antiproliferační signálizace (RB inhibuje cyklus v G1 vazbou na E2F)

G1/S Checkpoint

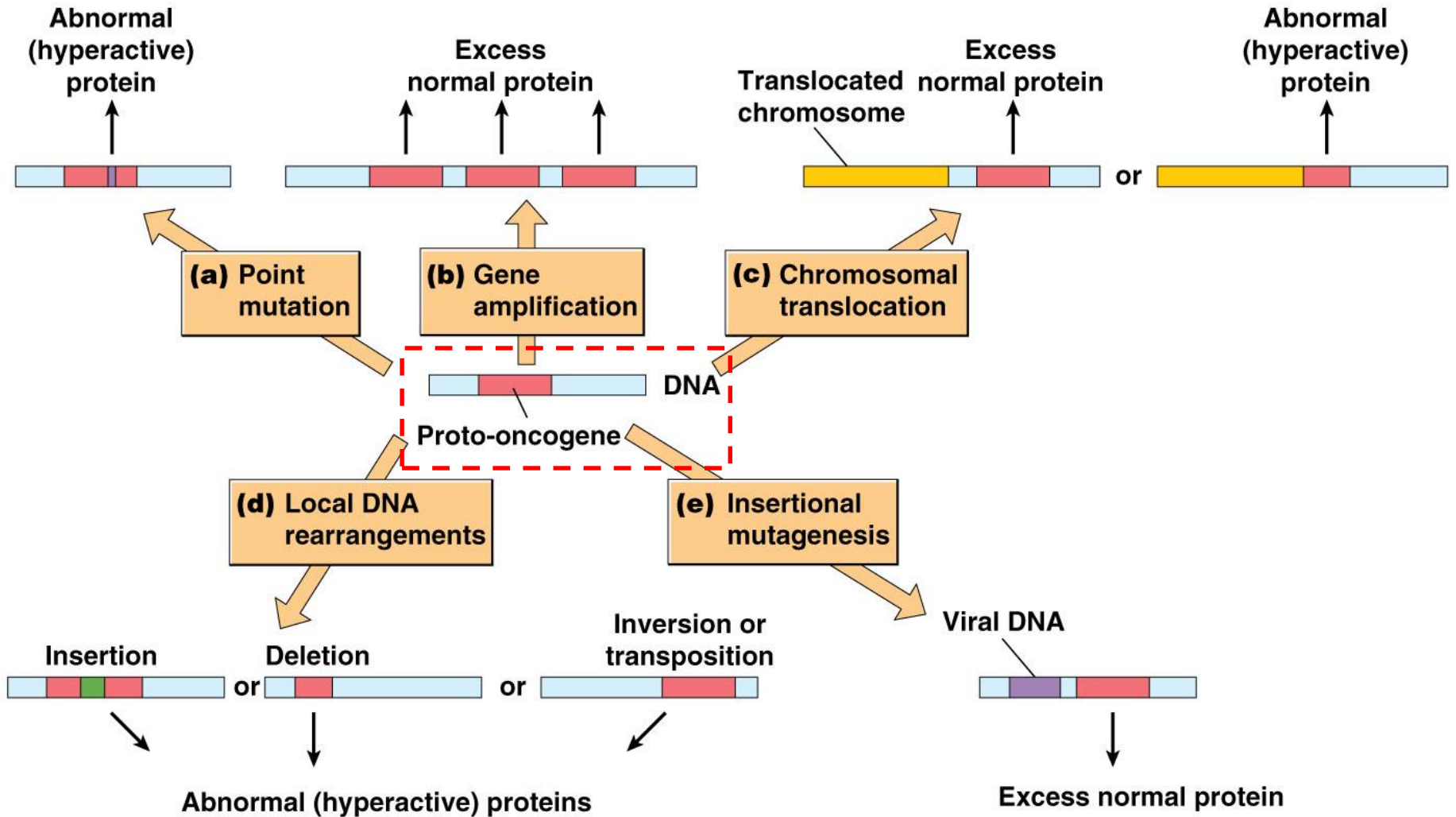


G2/M Checkpoint kontrola DNA

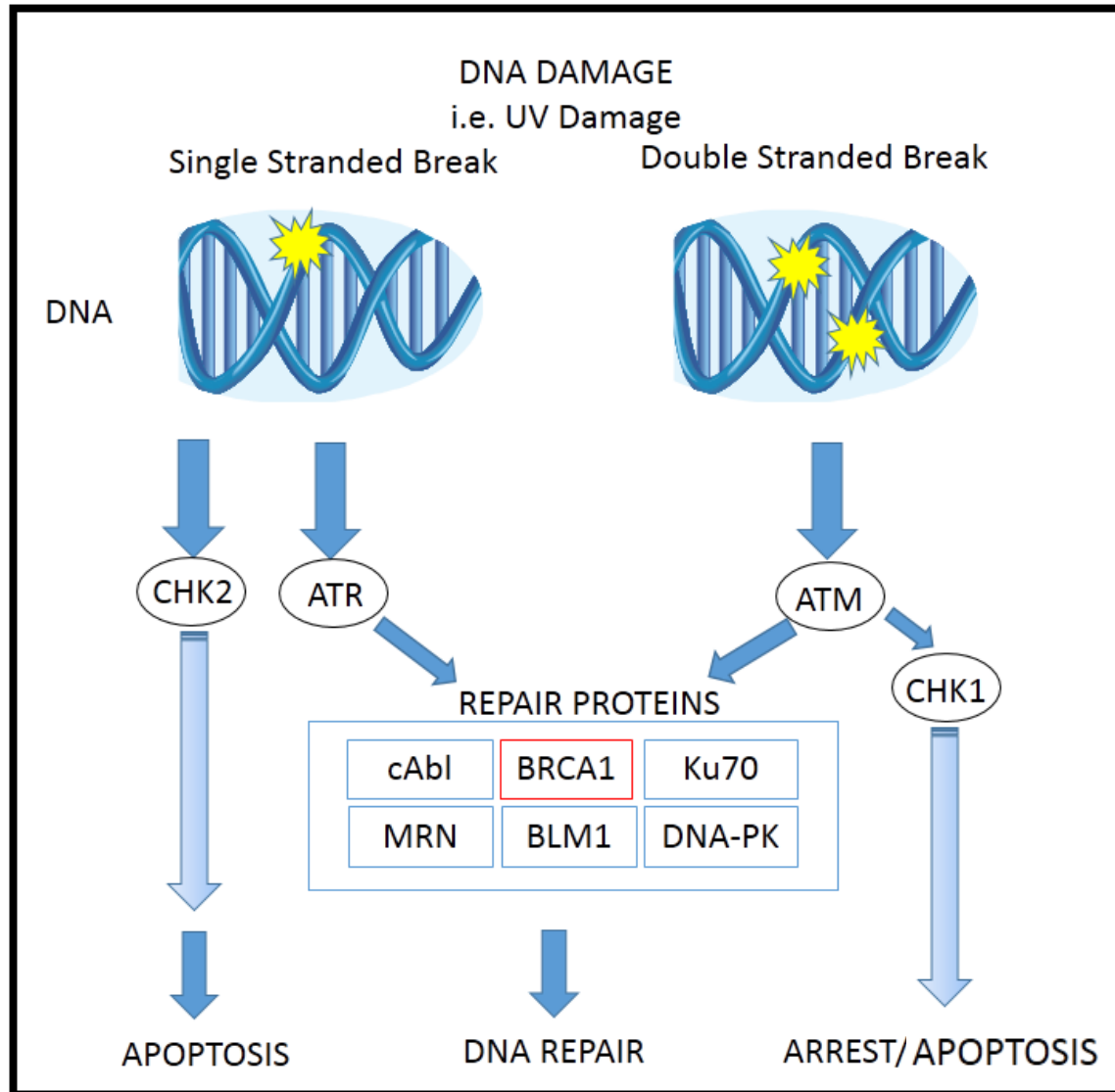


Typy mutací

a) bodová mutace, b) amplifikace genu, c) chromosomální translokace, d) lokální přestavby DNA, e) inzerční mutagenéze



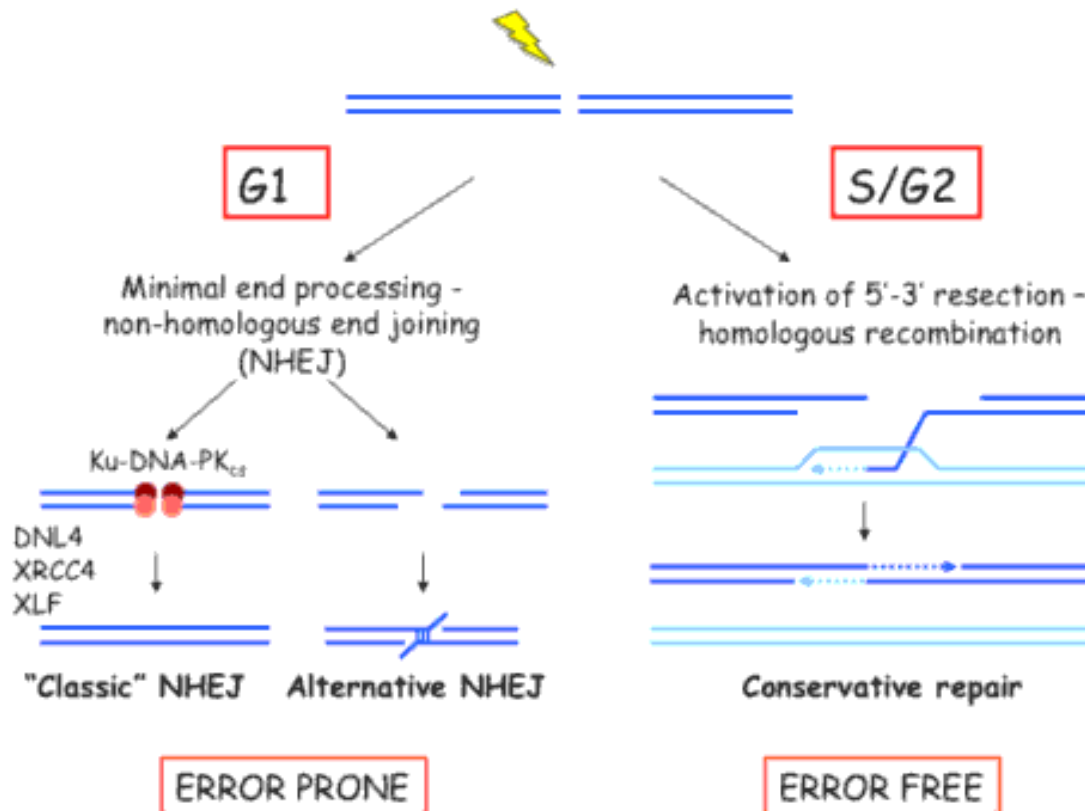
Oprava DNA



Oprava DNA

- **homologní rekombinace (HR)** je přesnější než **nehomologní spojování konců (NHEJ)**, vyžaduje však přítomnost templátové DNA (řetězec sesterské chromatidy se objeví až v S/G2 fázi; méně často slouží jako templát druhý chromozom v G1 - nesesterská chromatida)

Two mechanisms to repair DSBs



Tumor-supresor RB

Retinoblastoma protein (pRB) inhibuje přílišné dělení buněk (proliferaci) zastavením buněčného cyklu

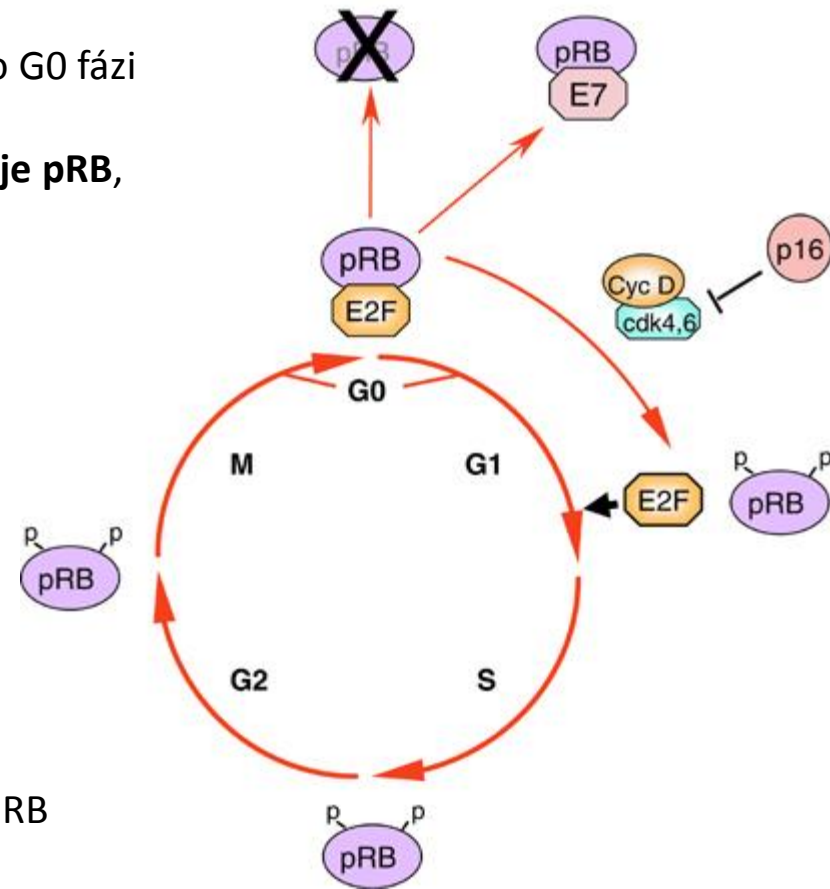
- zabraňuje přechodu do S-fáze buněčného cyklu tím, že váže a inhibuje transkripční faktory E2F rodiny (**E2F podporuje proliferaci**)

- dokud je **Rb vázán na E2F**, buňka zůstává v časně G1 nebo G0 fázi

- v proliferujících buňkách komplex **CycD+CDK4,6 fosforyluje pRB**, čímž uvolňuje E2F → vstup do S-fáze

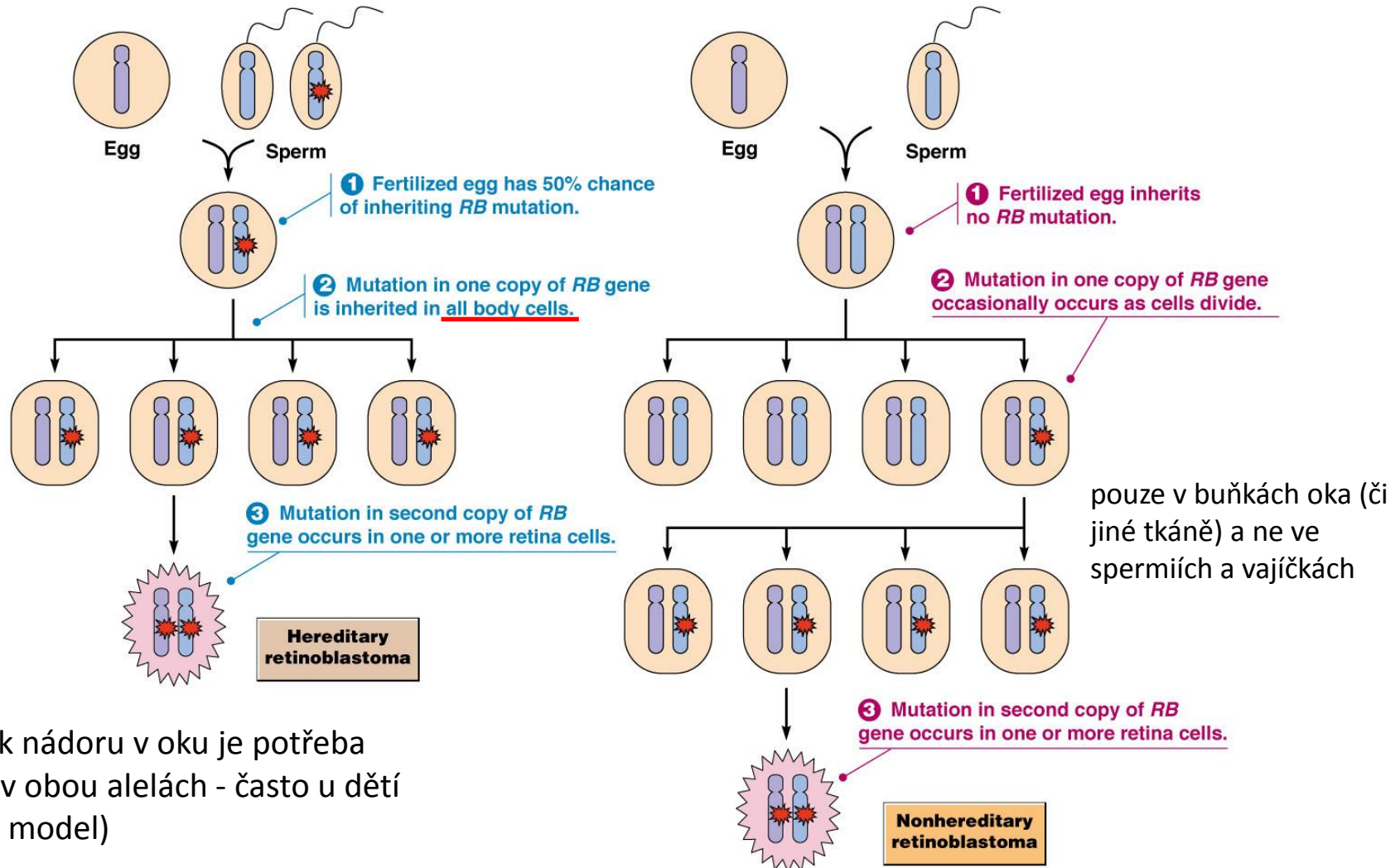
V nádorových buňkách pRB často nefunguje a E2F je stále volný → neregulovaná proliferace

- mutace v RB** genu - neváže se na E2F
- virový protein E7** vyvazuje pRB
- overexprese cyklinu D** nebo CDK 4,6 nebo **ztráta** inhibičního **p16** → nadměrná fosforylace RB



Dědičné typy rakoviny - mutace RB

- mutace v jedné alele se nachází již v pohlavní buňce → ve všech somatických buňkách potomka
- mutace v druhé alele může nastat během života
- nefunkční RB protein byl poprvé popsán v souvislosti s nádorem oka (retinoblastoma), roli hraje v různých typech nádorů



Pro vznik nádoru v oku je potřeba mutace v obou alelách - často u dětí (two-hit model)

Two-hit model

Pro vznik retinoblastomu je potřeba dvou genetických změn

- Na základě srovnání dědičné a sporadické formy retinoblastomu definoval roku 1971 **Alfred Knudson** "two-hit" teorii
- výzkumníci v oboru rakoviny nejprve této teorii nevěnovali pozornost, jelikož dědičná rakovina je velmi vzácná
- tato teorie však stála za **objevem tumor-supresorových genů** ve všech typech rakoviny

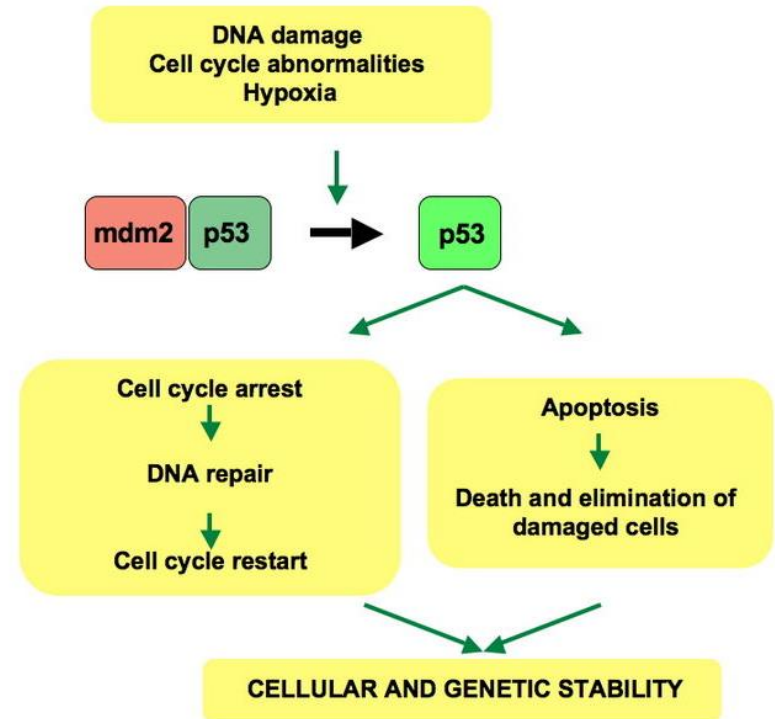
"Very often we learn fundamental things from unusual cases." (A. Knudson)

Naproti tomu u proto-onkogenů stačí mutace pouze v jedné alele (one-hit)

Tumor-supresor p53

The guardian of the genome

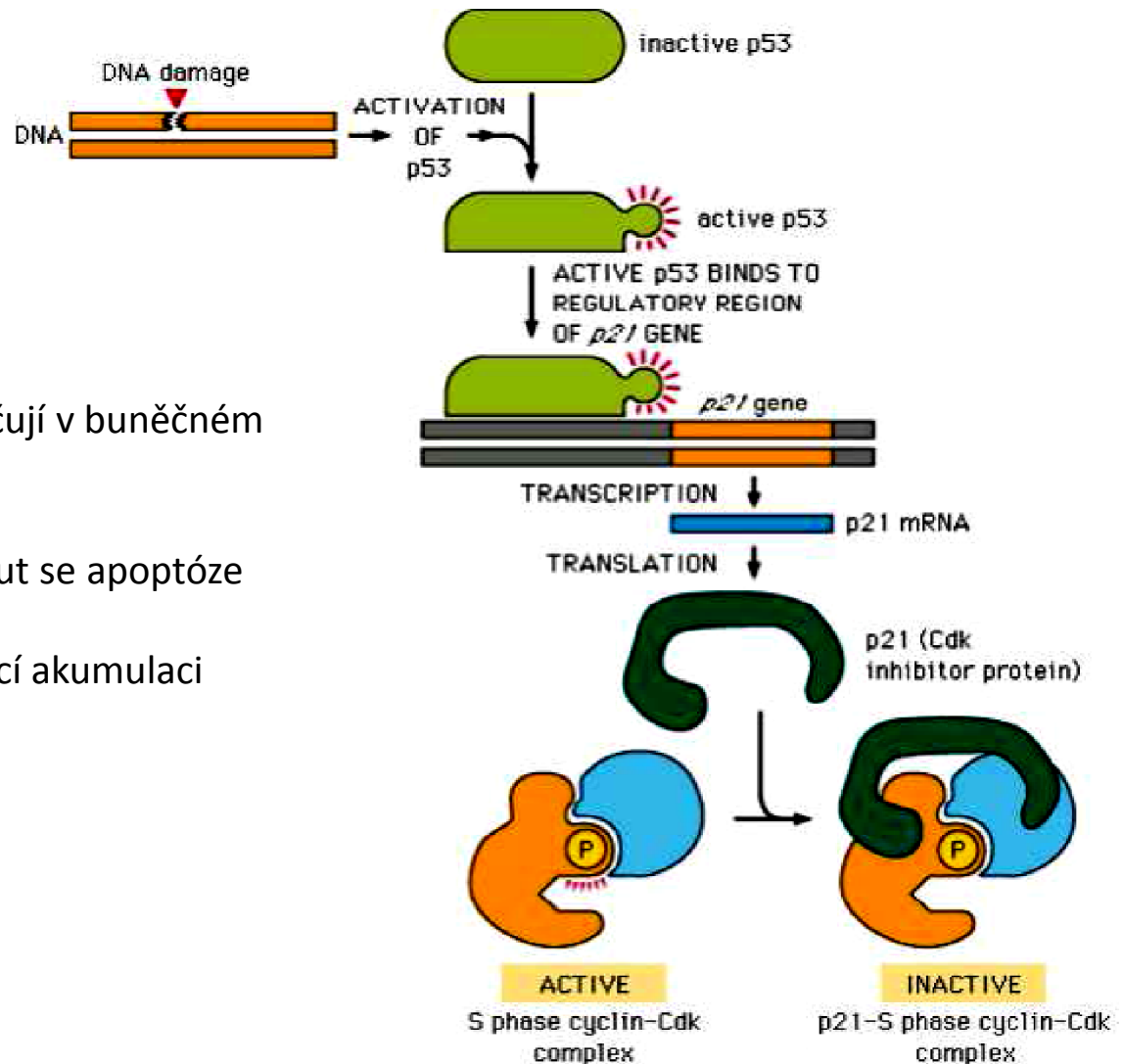
- p53 indukuje transkripci p21, který se váže na CDK2 - inhibuje přechod do S fáze
- vazba s Mdm2 inhibuje jeho aktivitu
- 50% nádorů má mutaci nebo delecii p53
- mutace p53 znamená většinou negativnější prognózu u nádorového onemocnění



Tumor-supresor p53

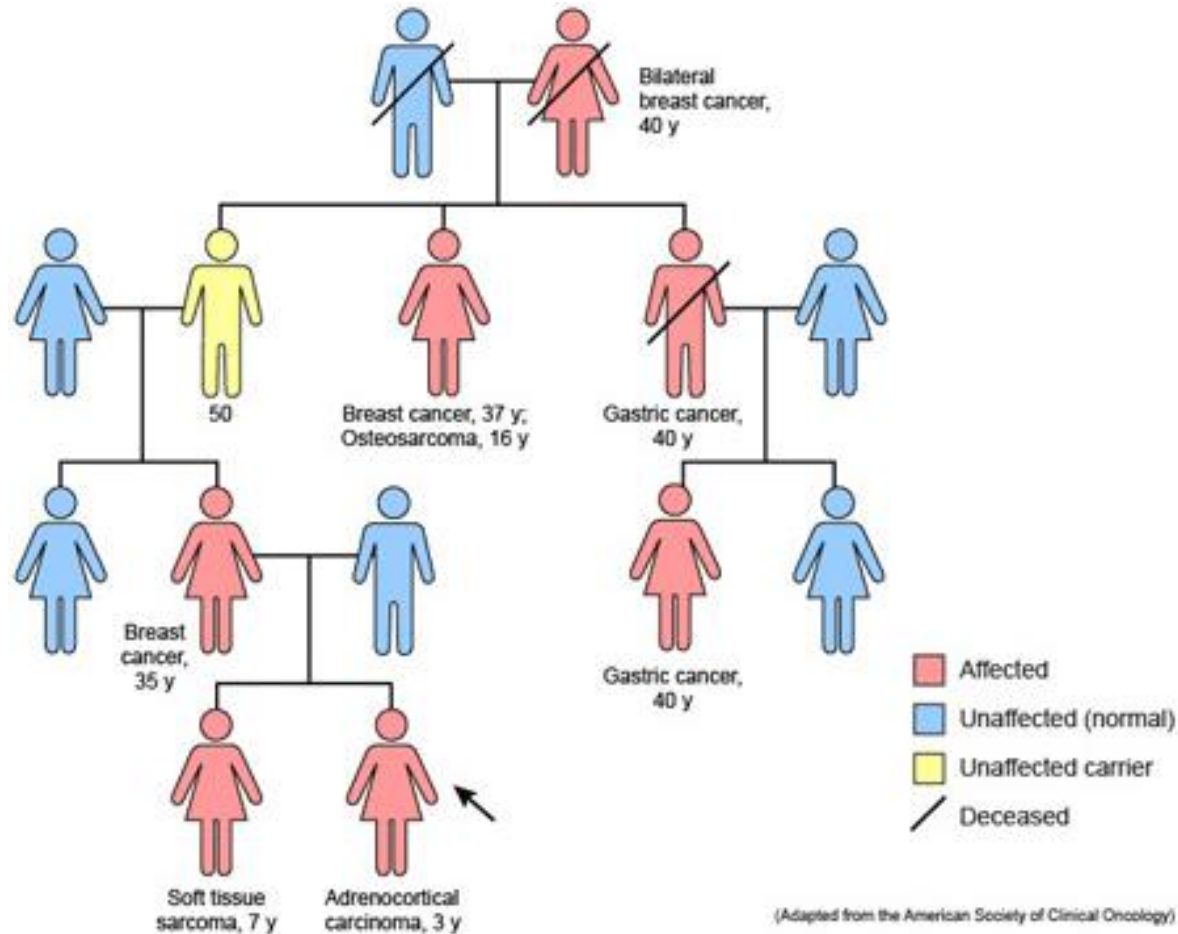
brzda vstupu do S-fáze zástava BC v G1 fázi umožňuje přestávku nutnou k opravám DNA

- 1) poškozené mutované buňky pokračují v buněčném cyklu
- 2) umožní poškozeným buňkám vyhnout se apoptóze
- 3) vznik genetické instability, umožňující akumulaci mutací



Li-Fraumeni syndrom

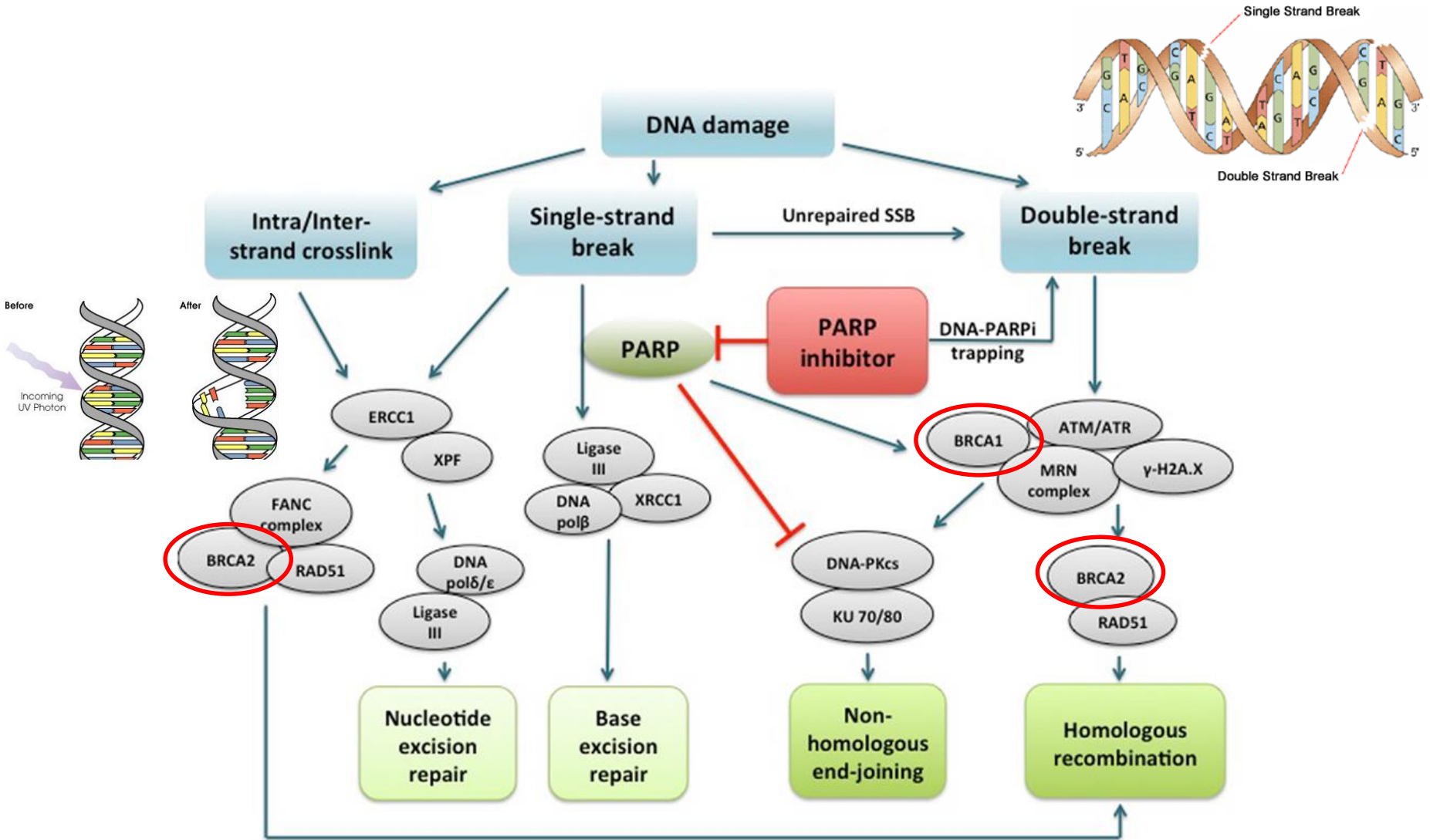
- Dědičné onemocnění
- Mutace nebo delece v 1 alele **genu pro p53** způsobuje dědičnou predispozici k rakovině
- V rodině zvýšený výskyt rakoviny různých tkání a v nízkém věku



Tumor-supresory BRCA1 a BRCA2

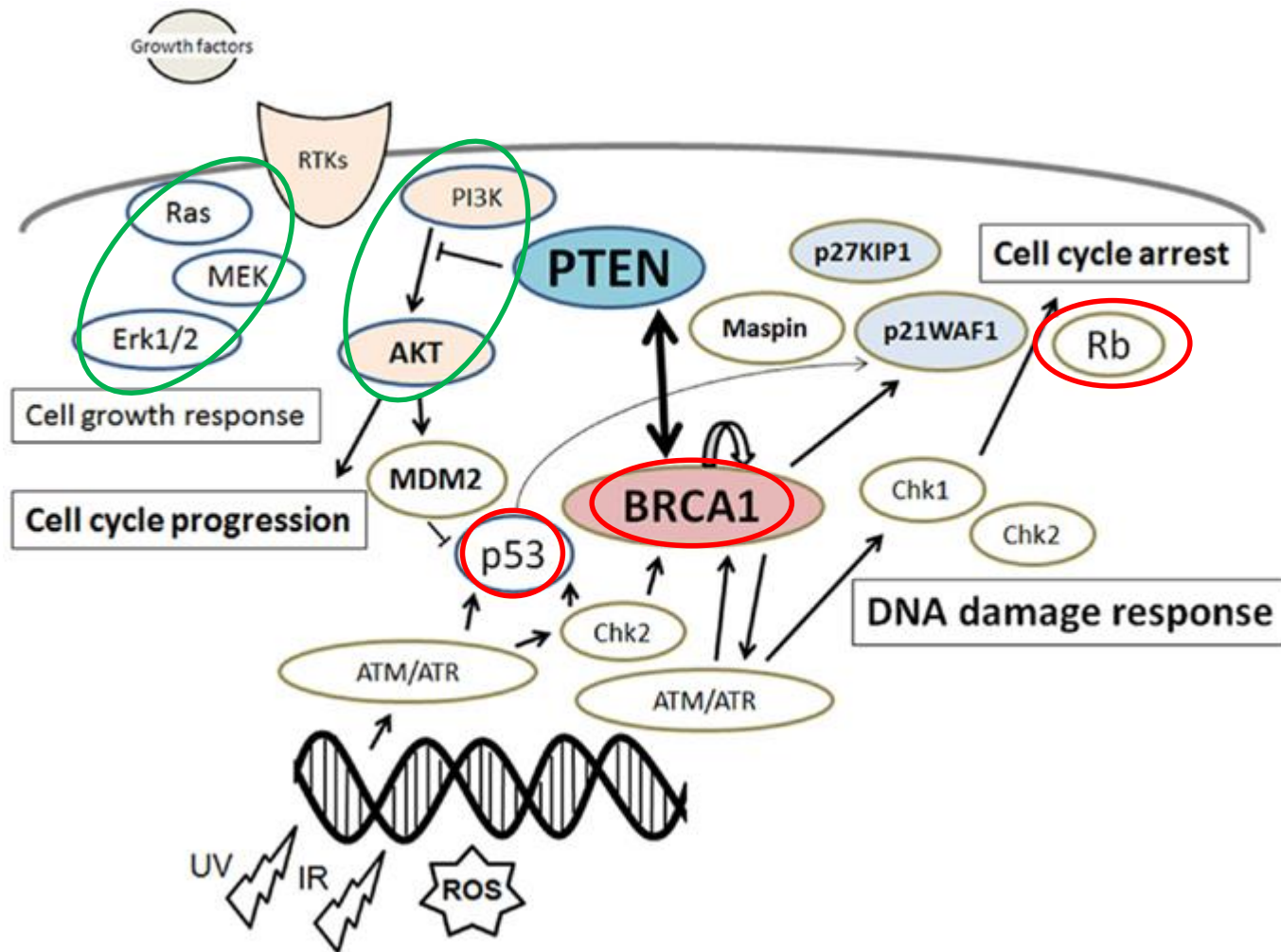
*BR*east *C*ANcer 1 a 2 geny

- pomáhá opravovat poškození DNA, zejména DSBs (dvojlzomy)



Tumor-supresory BRCA1 a BRCA2

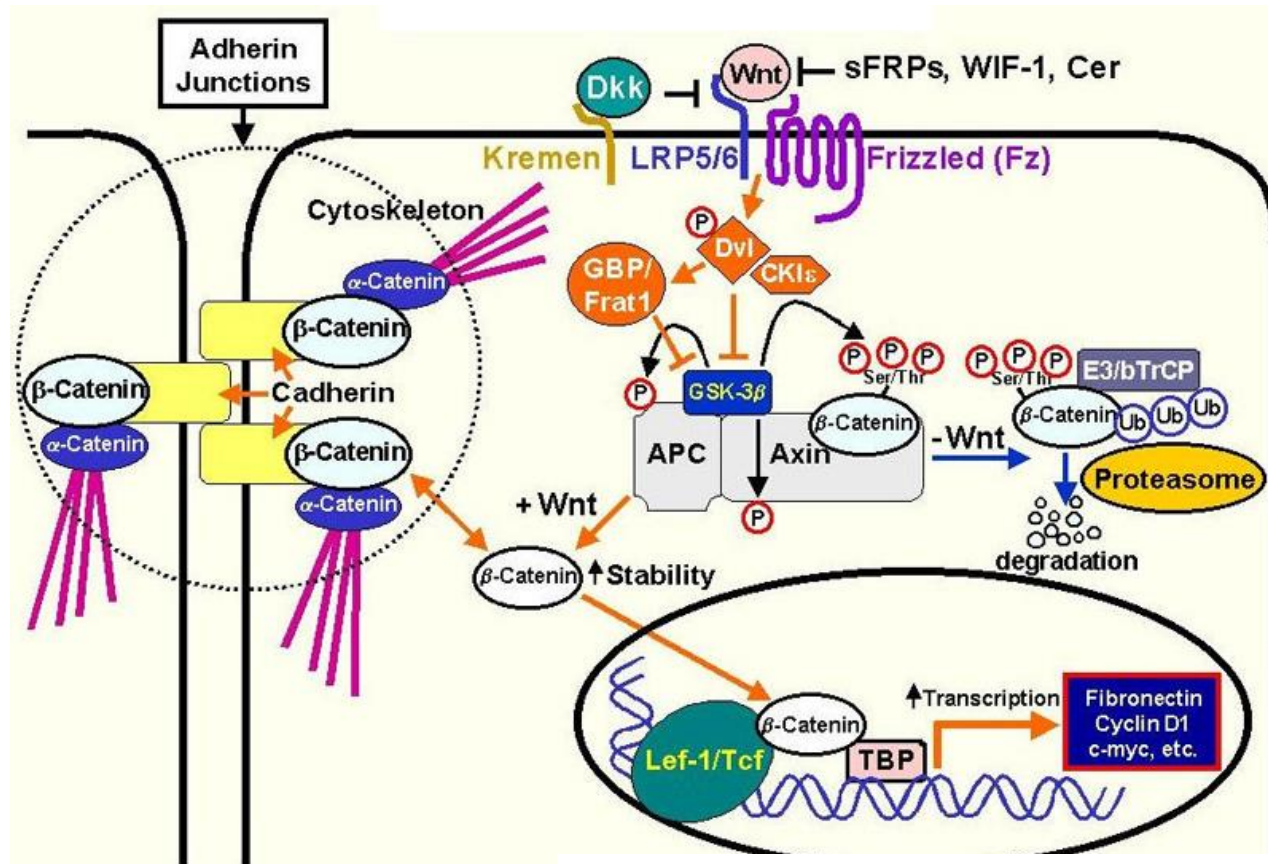
- nebezpečná mutace v BRCA zvyšuje vznik rakoviny prsu a vaječníku (ne všechny mutace jsou nebezpečné)
- Běžně existuje cca 12% šance na vznik rakoviny prsu u žen, při defektním BRCA genu (vybrané mutace) se šance zvyšuje na 60-90%
- Angelina Jolie podstoupila preventivně dvojistou mastektomii, kvůli mutaci v BRCA1 (šance na vznik rakoviny prsu odhadována na 87%). Po operaci redukce na 5% šanci.



Proto-onkogeny - signální dráha Wnt

postupná přeměna zdravé buňky tlustého střeva v nádorovou

1. Ztráta nádorového supresoru **APC** → stabilizace **β-kateninu** → **tvorba polypa**
 - a) změna transkripce (zvýšená transkripce genů podporujících proliferaci: cyclin D, c-myc...)
 - b) zvýšení adheze buněk (β-katenin spojuje E-kadherin a α-katenin)
2. "Gain-of-function" mutace **Ras** → **benigní adenom**
3. "Loss-of-function" mutace **p53** → **karcinom**



Nádory tlustého střeva:

p53 mutace v 70%

APC mutace v 70%

APC je negativní regulátor β-kateninu

Proto-onkogeny - receptory pro růstové faktory (GFR)

1. Konstitutivní aktivita

- vykazují kinázovou aktivitu i bez přítomnosti ligandu

2. Overexprese

- zmnožení počtu receptorů

EGFR

- karcinom prsu, žaludku, kolorekta

Her2

- karcinom prsu

c-Kit

- role v hematopoéze

- fyziologicky exprimován hl. na nezralých krevních progenitorech

- rakovina kůže

Léčba **protilátkami (popř. CAR-T)** nebo **tyrosin-kinázovými inhibitory**

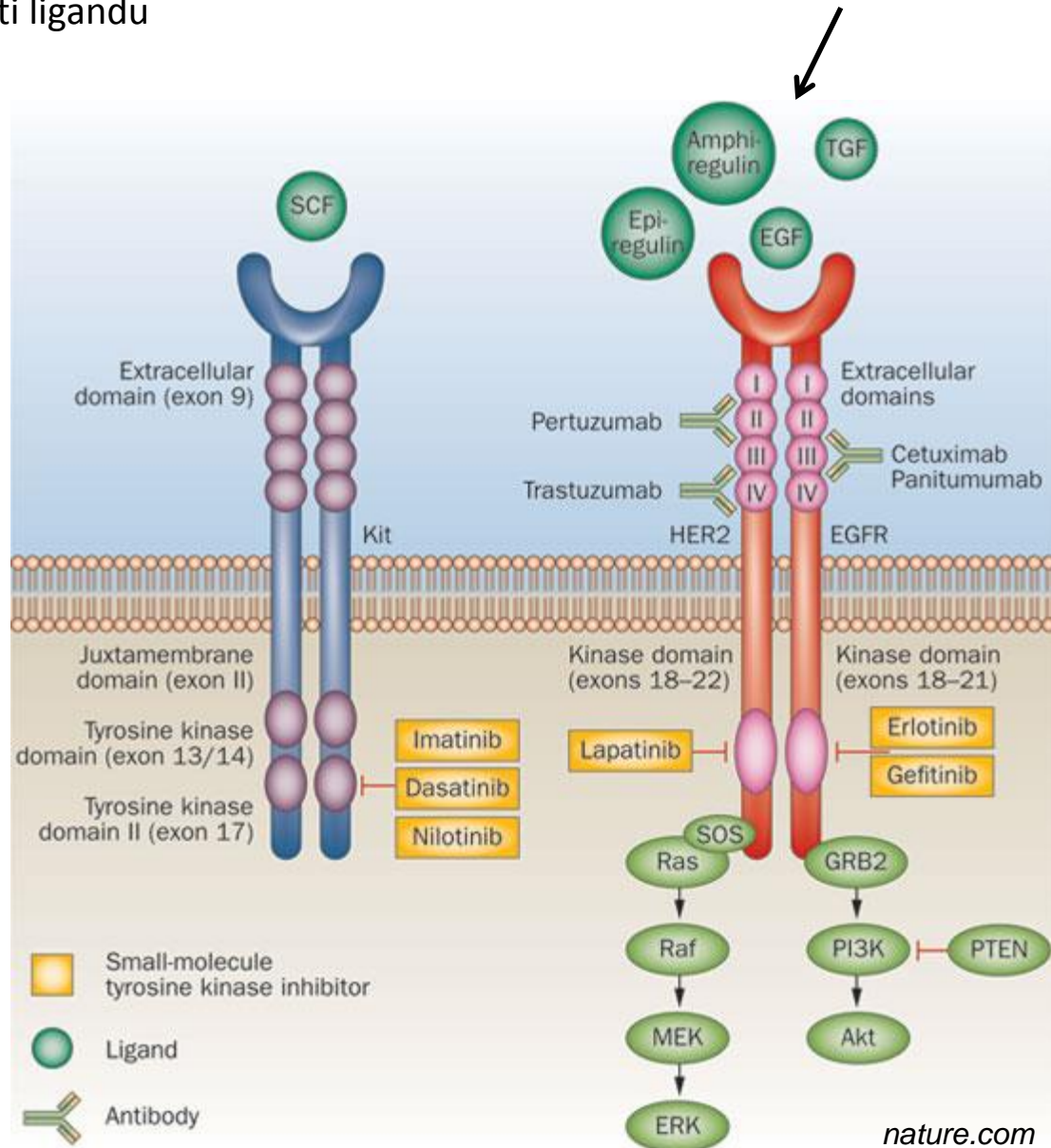
Diagnostika receptorů může predikovat léčebnou odpověď

- *SCF - stem cell factor; steel factor*

- *Trastuzumab = Herceptin*

- *Epidermal growth factor receptor (EGFR; ErbB-1; HER1)*

členové rodiny EGF proteinů



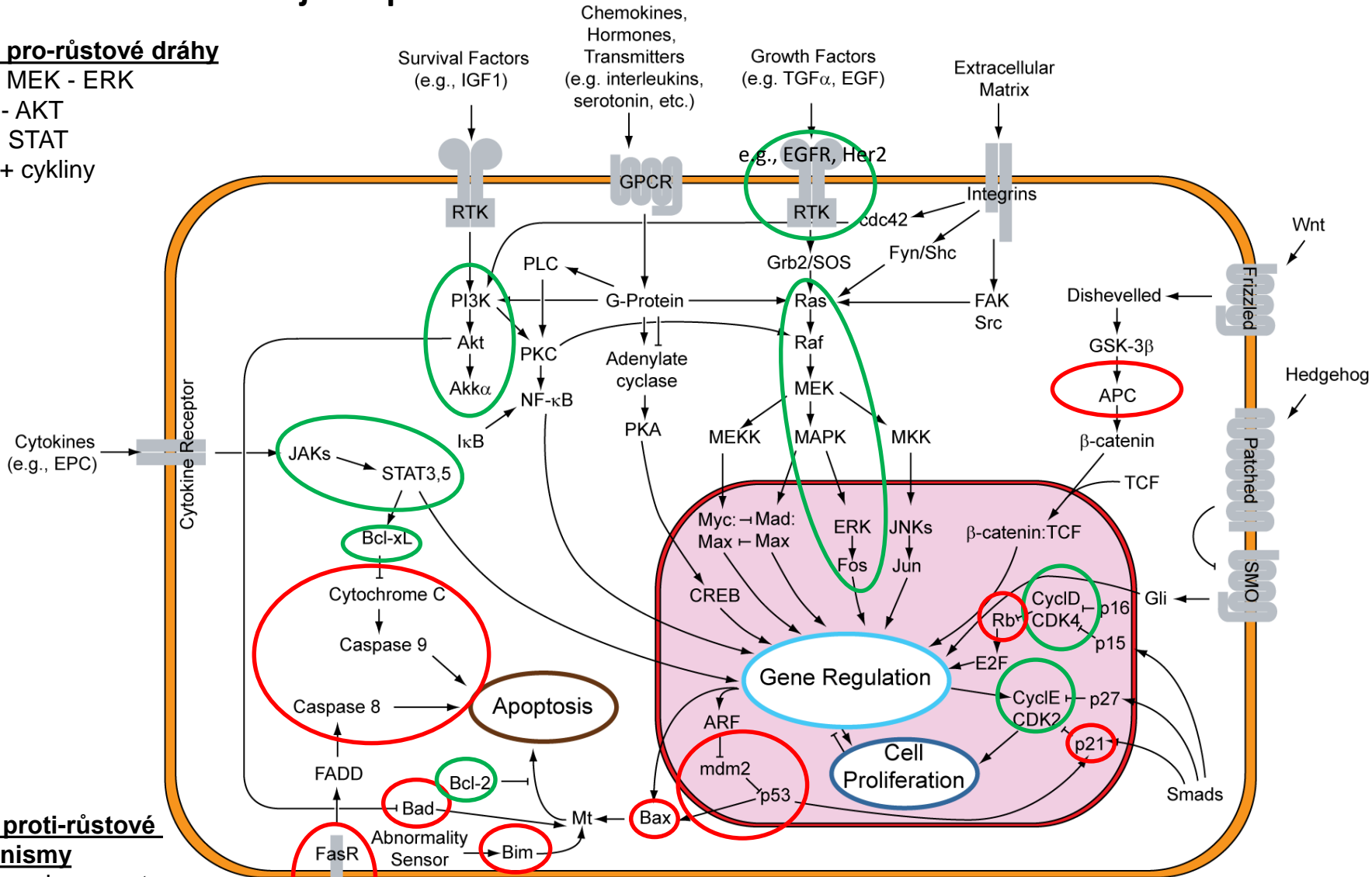
Přehled faktorů kontrolujících proliferaci

Hlavní pro-růstové dráhy

- Ras - MEK - ERK
- PI3K - AKT
- JAK - STAT
- CDK + cykliny

Hlavní proti-růstové mechanismy

- Fas ligand + receptor
- Kaspázy
- Cytochrom C
- p53 a p21
- Retinoblastoma
- APC



BCL2 proteinová rodina

reguluje propustnost vnější mitochondriální membrány a tím řídí apoptozu

a) pro-apoptotické: Bax, Bim, Bad...

b) anti-apoptotické: Bcl-2, Bcl-xL...

Karcinogeny

Faktory, které způsobují nebo napomáhají karcinogenezi

International Agency for Research on Cancer (IARC) založena WHO následující klasifikace kancerogenů:

Group 1 carcinogens

Carcinogenic to humans. 120 agents, including:

- alcoholic drinks
- asbestos
- diesel engine exhaust emissions
- indoor tanning
- tobacco
- x-rays

Group 2A

Probably carcinogenic to humans. 82 agents, including:

- red meat
- indoor emissions from wood-burning stoves
- glyphosate
- shiftwork that involves circadian disruption
- petroleum refining (occupational exposures in)
- frying - emissions from high temperature

Group 2B

Possibly carcinogenic to humans. 311 agents, including:

- dry cleaning (occupational exposures in)
- firefighting (occupational exposures in)
- aloe vera
- bracken fern
- ginkgo biloba extract
- lead

Karcinogeny

1. Fyzikální karcinogeny

Zvýšený výskyt karcinomů a leukemií u:

- přeživších po výbuchu atomové elektrárny v Černobylu
- přeživších po útocích atomovou bombou na Hiroshimu a Nagasaki
- horníků uranových dolů



vliv UV záření na vznik nádorů kůže

- UV paprsky excitují pyrimidinové báze DNA, které pak reagují navzájem a vytváří pyrimidinové dimery
- faktor podporující vznik a vývoj nádorů -defekty genů jejichž produkty působí jako nádorové supresory, např nefunkční p53

2. Chemické karcinogeny

Anorganické karcinogeny:

azbest, chrom (6+)

Organické karcinogeny:

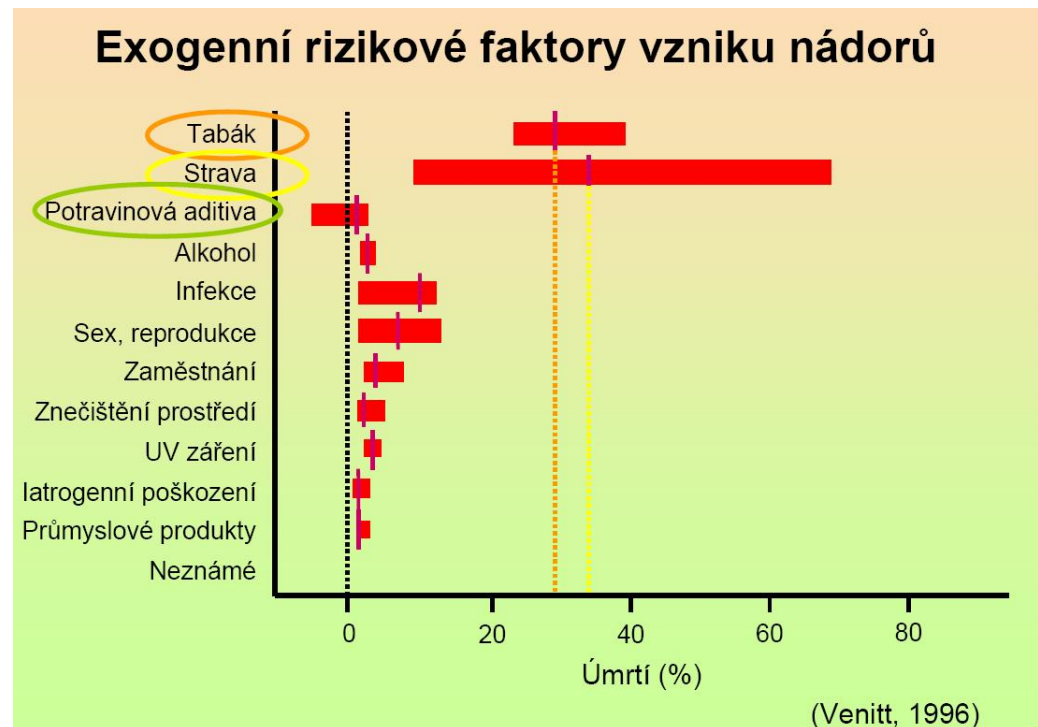
- Polychlorované bifenyly (barvy/laky)
- Dioxiny (produkty spalování organických látek)
- Benzen (rozpouštědla, motorové splodiny)

Léčiva:

- Chemoterapeutika
- Imunosupresiva
- Antibiotika (např. Chloramphenicol je potencionální karcinogen)

Strava:

- heterocyklické aminy
vznikají v potravinách nevhodnou úpravou
např. smažení
- nitrosaminy
vznikají v těle z dusičnanů přidávaných
např. do uzenin

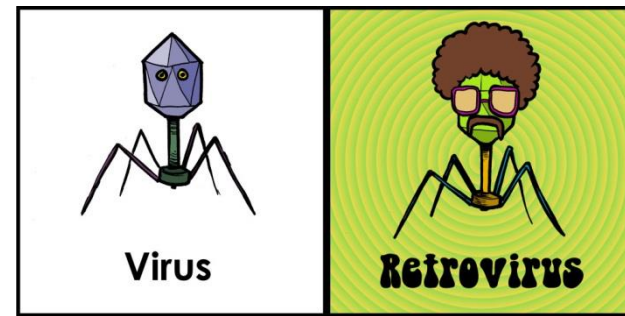


3. Biologické karcinogeny: onkogenní (nádorové) viry

a) Retroviry (RNA viry):

Jednořetězcová RNA – využívá reverzní transkripcie

- obsahují ve svém genomu onkogen (akutně transformující viry)
- nebo aktivují protoonkogen, vedle kterého se integrovaly (pomalu transformující)



Oncoviry

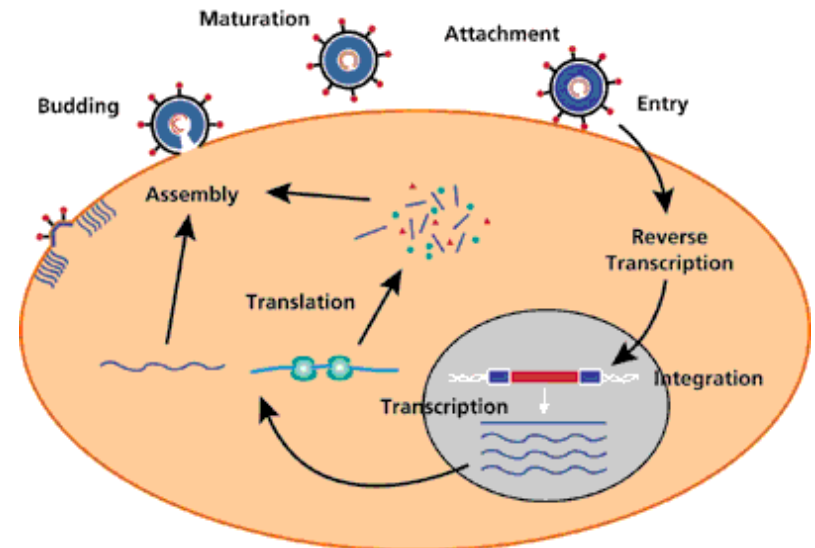
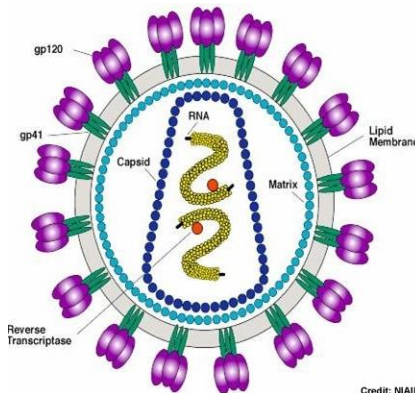
lidský lymfotropní virus typu I (HTLV-1)

- T-leukemie (lymfom) dospělých (ATLL), doba latence asi 30 let
- vysoká proliferační aktivita napadených buněk, větší pravděpodobnost mutací

Lentiviry

viry HIV-1 a HIV-2

nádory spojené s jejich infekcí - lymfomy a sarkomy



3. Biologické karcinogeny: onkogenní (nádorové) viry

b) DNA nádorové viry

- neobsahují onkogeny, ale kódují proteiny, které interagují s tumor-supresory hostitelské buňky
- tlačí hostitelskou buňku do S fáze → zrychlení buněčného cyklu

Inaktivace p53 patří ke klíčovým událostem při transformaci buňky DNA viry

Virus hepatitidy B (HBV)

- chronická infekce - integrace do chromozomu
- hepatocelulární karcinom (HCC) – až 20-30 let po infekci

Herpes viry - EB (Epstein Barrové virus)

- v jádře buňky v epizomálním stavu (extrachromosomální)
- Lymfomy a karcinomy

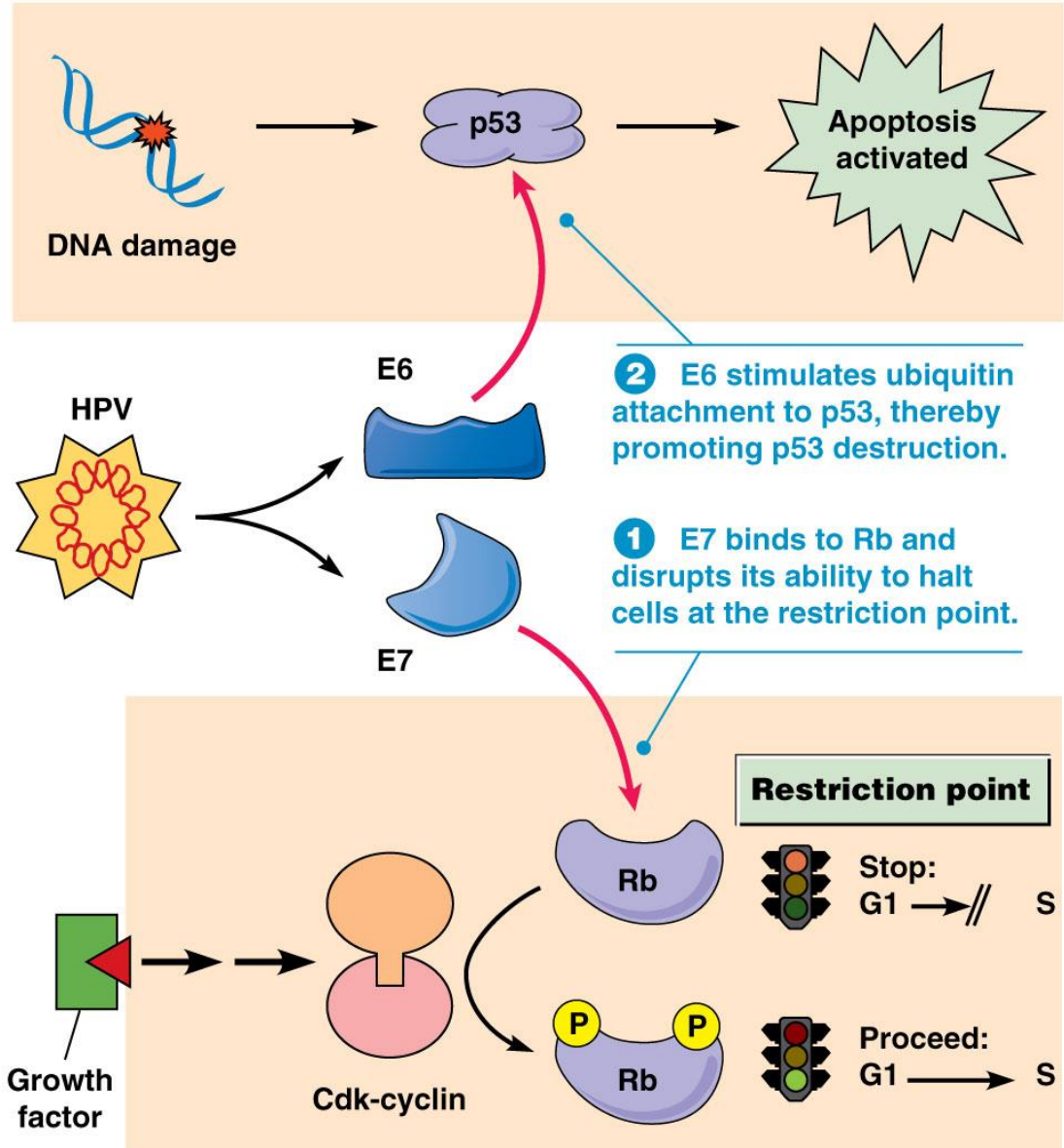
Papilomaviry (HPV xx)

- způsobuje rakovinu děložního čípku
- v benigních nádorech – ve formě episomů, v maligních integrace do genomu
- popsáno asi 100 odlišných typů papilomavirů - dělí se na „high-risk“ a „low-risk“ typy podle prognózy

Lidský papiloma virus ovlivňuje RB a p53

- virus produkuje **proteiny**,
které inhibují tumorsupresory:

- E6 → p53
- E7 → RB



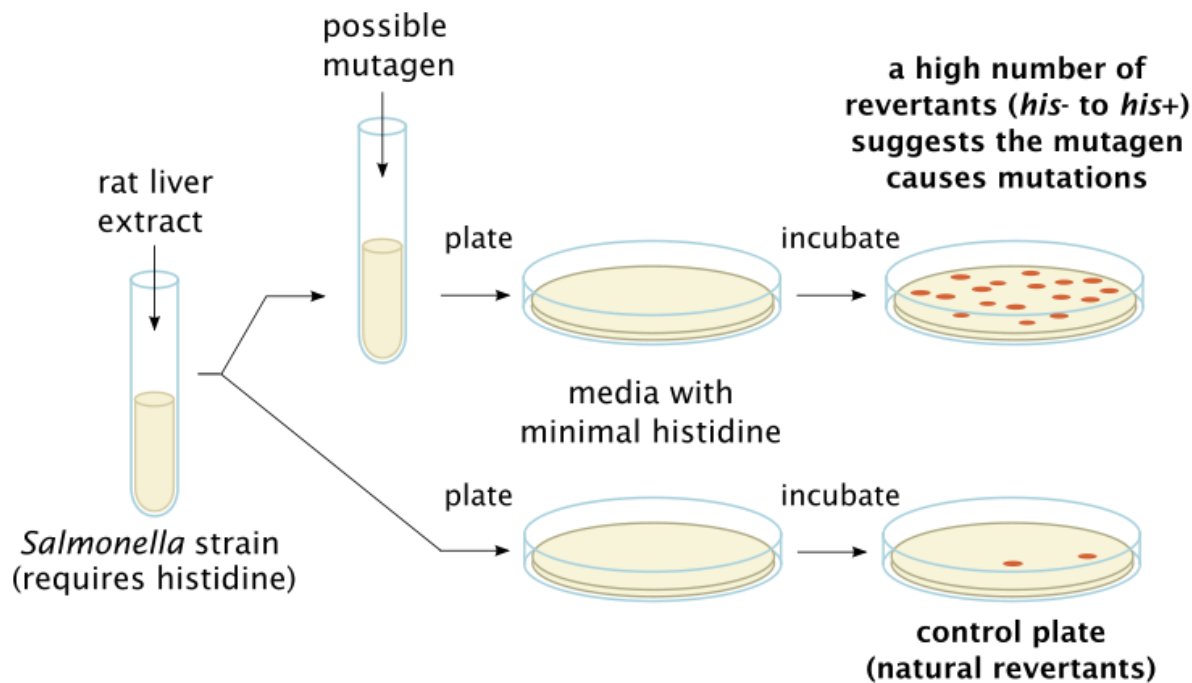
Amesův test

Základní test na stanovení mutagenního potenciálu chemických sloučenin

- rakovina bývá spjata s mutacemi, proto látky způsobující mutace jsou pravděpodobně též karcinogenní
- testování na myších je časově náročné (2-3 roky) a nákladné
- roku 1970 vynalezl **Bruce Ames** jednoduchý test na určení mutagenicity



Bruce Ames



- bakterie *Salmonella typhimurium*
- auxotrofní mutant

- vyžadují histidin pro růst, ale neumí jej syntetizovat kvůli mutaci v genu pro jeho syntézu

- přirozeně se vyskytnou mutace a vyskočí kolonie s funkčním genem pro histidin

- čím karcinogennější látka - tím více mutací - více kolonií

- např. benzo[a]pyren, není sám o sobě mutagenní ale metabolity ano

Pět pilířů léčby rakoviny

1. Chirurgie

2. Chemoterapie

3. Ozařování

4. Cílená terapie

5. Imunoterapie

Léčba rakoviny

Konvenční chemoterapeutika

cíl proliferující buňky, nespecifická, vždy stejné % proliferujících buněk

Cíle:

- poškodit DNA nádoru
- zástava proliferace
- apoptóza indukci p53 nebo masivní damage (p53 nezávislé)

nádor více náchylný na obecné pro-apoptotické stimuly (genotox. látky, mitot. jedy, antimetabolity)

Nevýhody: ohromné vedlejší účinky (likvidace zdravých tkání - může vést až ke vzniku sekundární rakoviny)

Cílená terapie

selektivní pro nádorové buňky (specifické pro určitý buněčný proces), nízká toxicita k zdravým b.

Nevýhody:

- není 100% specifická pro danou molekulu
- cílová molekula větš. plní i fyziologickou funkci (částečná výjimka fúzní gen)
- nutná identifikace molekulární podstaty - individualizovaná medicína (tailored medicine)

V onkologii cytostatická chemoterapie = podávání léků s cytotoxickým účinkem (syntetické či z rostlin/plísní)

cytostatikum: látka tlumící růst a rozmnožování buněk zejm. nádorových tkání

Mechanismy působení konvenčních cytostatik

1. Alkylační látky

- atakují negativní náboj DNA a způsobují zlomy v DNA - zabraňují replikaci
- mohou indukovat vznik sekundárních leukemií

- *Chlorambucil (lymfomy, CLL)*
- *Cyklofosfamid - nejpoužívanější*
- *Busulfan - předtransplantační myeloablace, CML*
- *Cisplatina - DNA damage, interkalace, aktivní intracelulárně, nefrotoxicita*

2. Antimetabolity

- zasahují do syntézy nukleových kyselin
- cílí hlavně na proliferující buňky

- *Metotrexát - blok syntézy purinu inhibicí dihydrofolátreduktázy (osteosarkom)*
- *Fludarabin - blok purinů - substituce adenosinu - fragmentace DNA, (AML, CLL)*
- *5-fluoruracil - integrace do RNA*
- *Hydroxyurea - blok ribonukleotidreduktázy, inhibice pyrimidinu, CML*

Mechanismy působení konvenčních cytostatik

3. Protinádorová antibiotika*

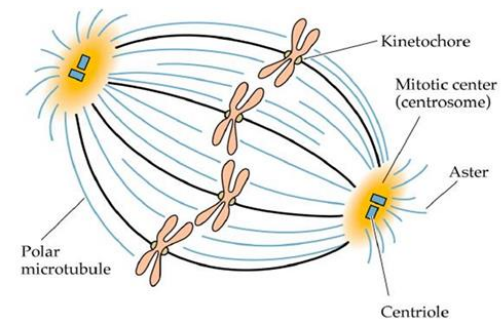
- *Doxorubicin*
 - *interkaluje mezi řetězce DNA*
 - *indukuje vznik volných radikálů*
 - *blokuje topoizomerázu II*



4. Rostlinné alkaloidy

blokují tvorbu vřeténka vazbou na mikrotubuly

- *Vinca alkaloidy (z Vinca rosea; barvínek růžový) - depolymerizace mikrotubulů - rozpad vřeténka, Kamptotecin - blok topoizomerázy I*
- *Taxány - (jehličí tisu - Taxus), Paklitaxel - blok depolymerizace mikrotubulů (karcinom prsu, vaječníku)*



**protinádorová antibiotika v tomto kontextu neoznačují antibakteriální látky
topoizomeráza: rozmotává DNA při replikaci*

Cílená terapie - příklady

Tyrozín kinázové inhibitory (TKIs)

- obsazení ATP vazebného místa
- vysoká strukturní variabilita umožňuje specifickou vazbu
- nevedou k úplnému vyléčení :(
 - *Gefitinib* - karc. plic, ledvin, solidní tumory
 - *Erlotinib* - karc. vaječníku
 - *Imatinib, Dasatinib, Nilotinib* - léčba CML

Farnezyltransferázové inhibitory (FTIs)

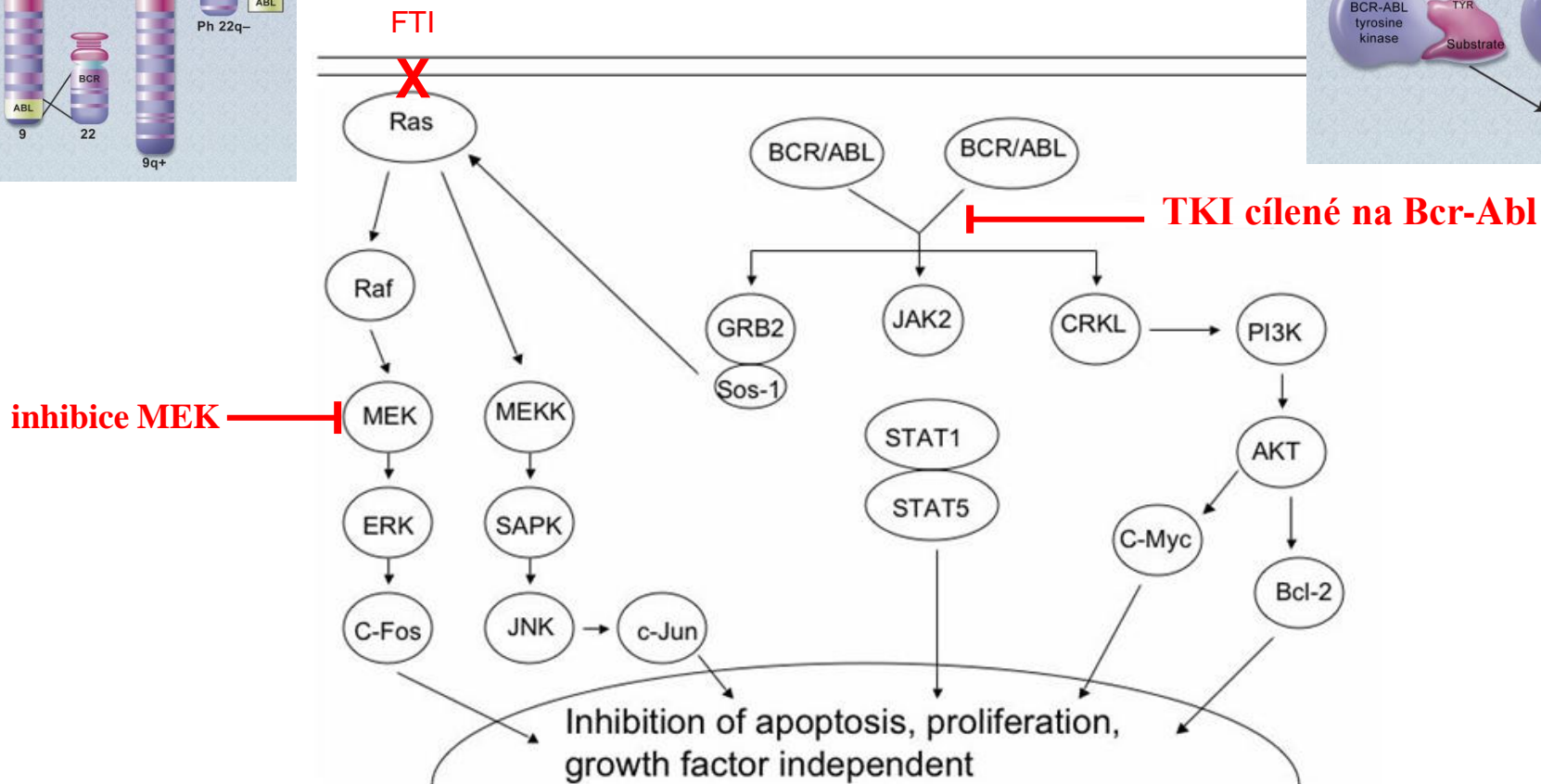
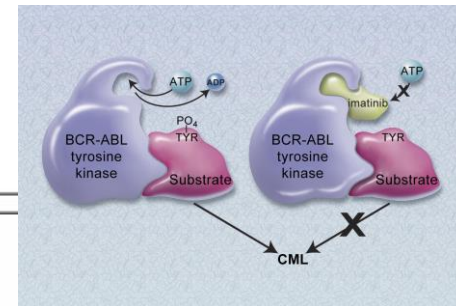
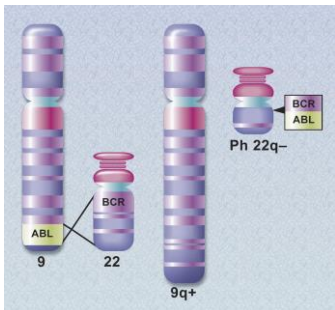
inhibice funkce Ras (trvale zapnutý v nádorech)

- *Lonafarnib, Tipifarnib, BMS-214662*

Cílená terapie Chronické Myeloidní Leukemie (CML)

Over-exprese tyrozinkinázy Bcr-Abl v CML způsobuje:

- cytokin-independentní přežití a růst buňky, prokázána onkogenní adikce
- chrání buňku před apoptózou v odpovědi na růstové faktory nebo poškození DNA *



Quiescentní kmenová buňka zodpovědná za relaps

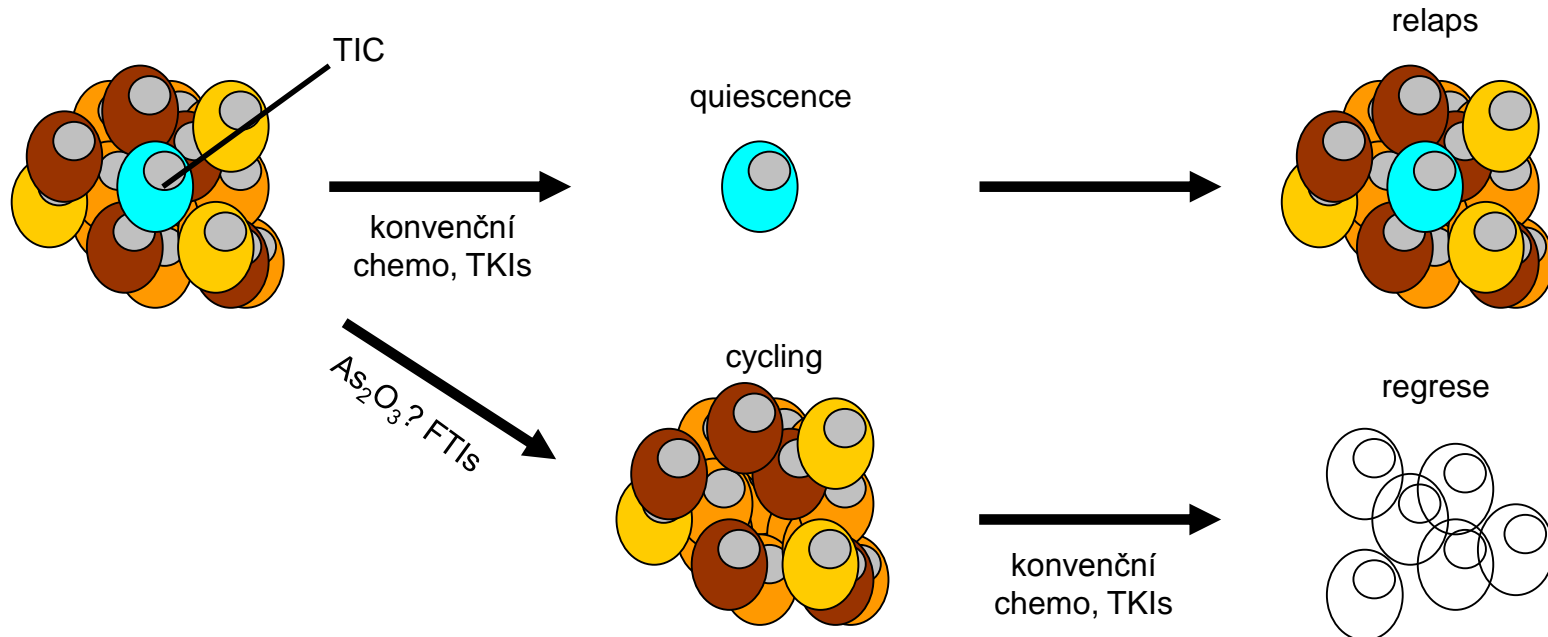
Indukce vstupu quiescentní kmenové buňky do b. cyklu

V kombinaci s konvenční chemoterapií

Oxid arsenitý (As_2O_3 , arsenic trioxide, 1865 Fowler solution)

- reversibilně snižuje expresi PML proteinu (growth arrest skrze represi mTOR) → indukuje LIC buňky ke vstupu do cell cycle, bez vyvolání apoptózy
- léčba PML a CML

cílení na quiescentní leukemické buňky může být užitečnější než na proliferující b.

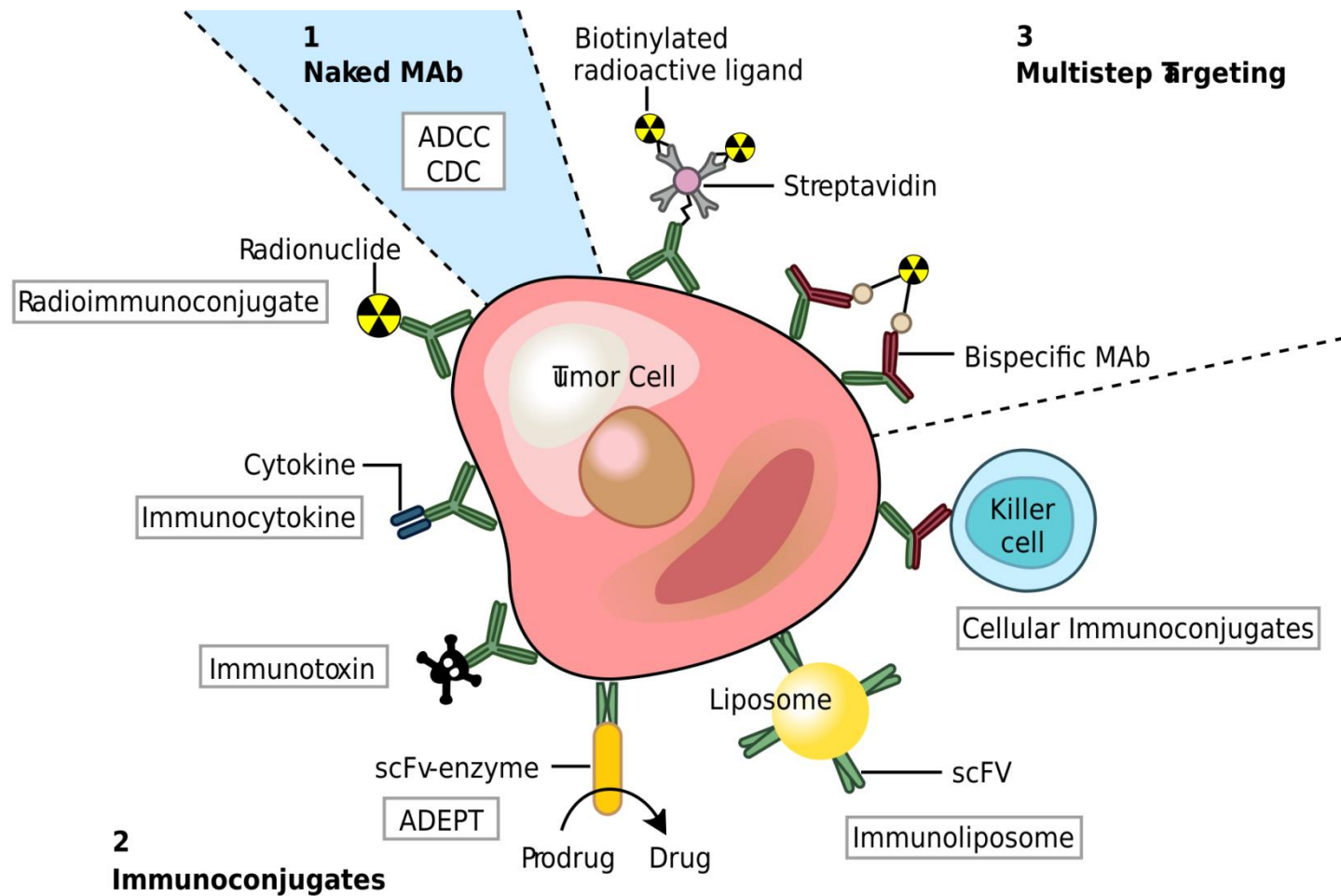


Imunoterapie

Monoklonální protilátky

- specifické protilátky (Ab) proti vybraným antigenům na povrchu buněk

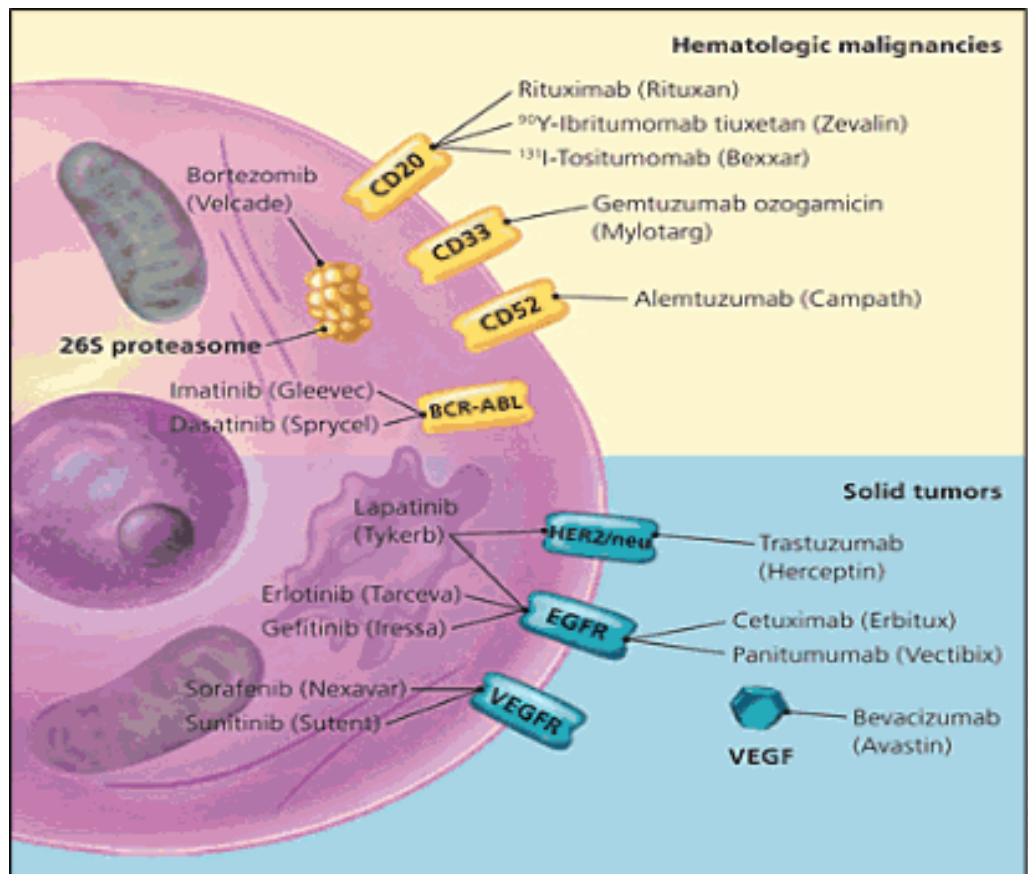
- a) **Naked:** po navázání mohou blokovat daný receptor, nebo aktivovat buňky imunitního systému
- b) **Konjugované:** s toxinem, radioizotopem, cytokinem



Imunoterapie

Monoklonální protilátky

- *Herceptin - anti-HER-2 (rak prsu 30% amplifikace genu pro receptor HER-2)*
- *Rituximab - anti-CD20, maligní B-lymfomy, B-lymf. CLL, folikulární lymfom*
- *Gemtuzimab - anti-CD33 (na větš. leuk. b.), AML, konjugace s ATB colcheamicinem*
- *Cetuximab - anti-EGFR, konjugace s toxinem, internalizace do buňky, kolorektální karc.*



Dalším příkladem imunoterapie jsou CAR T (viz. lekce 11). Monoklonální protilátky nejsou volné ale na povrchu CAR T-lymfocytů.

Vybrané mutace v nádorových onemocněních:

Ras	- 25% všech nádorů
aktiv telomeráza	- 90% nádorů
K-Ras	- 80% karcinom pankreatu
p53	- nejčastěji inaktivovaný v nádorech - různé nádory, Li-Fraumeni
p16	- melanom
Rb	- retinoblastom
t(8;14) aktiv Myc	- B-cell CLL, ALL, Burkittův lymfom
N-Myc amplif.	- 30% neuroblastom
β-katenin (WNT)	- kolorektální karcinom (mutovaný katenin necitlivý k APC, transkripce genů cc)
TGF-β, SMAD4	- rezistence k antiprolif signálům
Fas receptor	- nádor
Bax	- nádory trávicího traktu a leukemie
Bcl-2 translokace	- folikulární lymfom
loss chr10, inakt PTEN	- glioblastom
zisk chr7, dupl MET	- karcinom ledvin
t(9;22) Bcr-Abl	- CML, ALL (30%), vzácně AML
transl. RAR	- akutní PML
autocrinní TGF	- sarkom
autocrinní PDGF	- glioblastom
overexpr EGFR/ERBB	- karcinom prsu, žaludku, kolorekta
overexpr HER2	- karcinom prsu (predikce - herceptin Ab proti receptoru HER2)
PML/RARA	- váže histondeacetylázy, které znemožní transkripci ATRA cílových genů

Markery: CD19, CD20, CD30, CD33, CD52, CD90