

# Zkouška z molekulární genetiky ZS20/21

## Místnost P08

### 1) Podmínky:

- písemný test, 50 otázek, a – d možnosti, více možných odpovědí
- max. 10 lidí na zkoušce (dle aktuálních opatření)
- Délka testu = 60 minut

### 2) Hodnocení:

- otázka kompletní = 2 body, jinak po půl bodu za každou správnou odpověď'
- max 100 bodů, min. počet pro úspěšné absolvování je 50 bodů (50%), známky dle ECTS (Klasifikační stupnice VUT)
- případné opravy nebo zlepšení hodnocení po individuální domluvě
- 

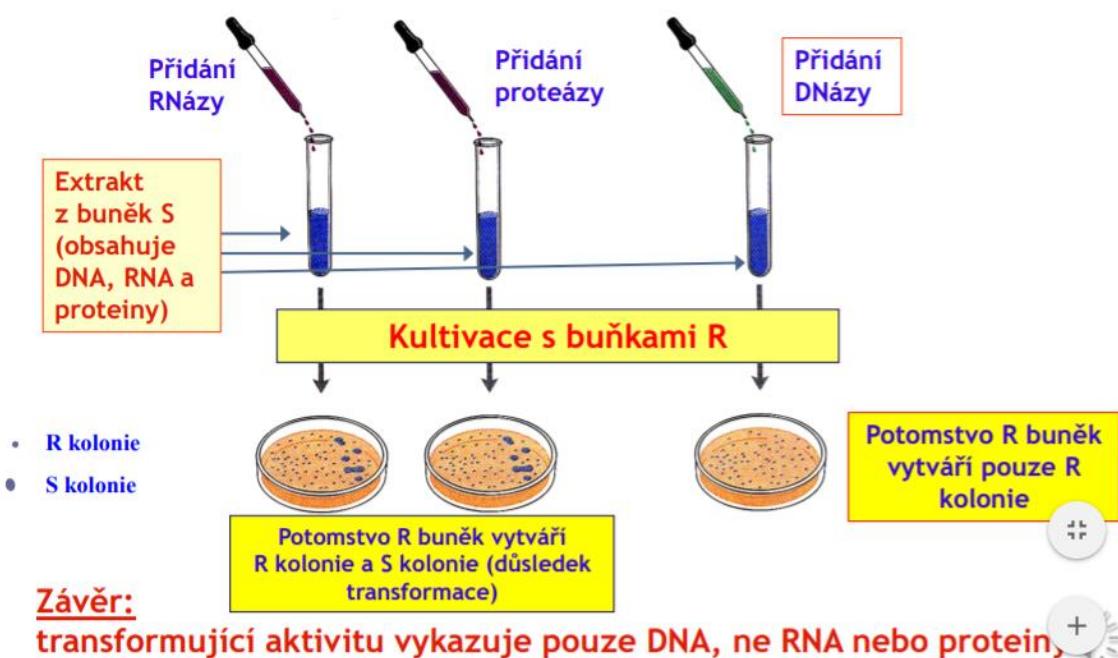
### 3) Předtermíny

- Na Moodle odkaz na exel tabulkou termínů
- Odkaz na tabulku zde
- Zkouška se bude konat v místnosti P08

- 1) V jakém roce a kým byla poprvé popsána nukleová kyselina jako látka
  - 1869 – Miescher izoloval směs látek bohatých na fosfát (**nuklein**) = NK
- 2) V jakém roce a kým byla poprvé popsána struktura molekula DNA?
  - 1953 - model struktury DNA (J. Watson, F. Crick, M. Wilkins)
- 3) Uveďte název akce a rok, na níž byla dohodnuta základní doporučení pro práci s rekombinantní DNA?
  - 1975 - Asilomarská konference-moratorium na práce s rekombinantní DNA
- 4) Přímý důkaz o DNA jako nositelce genetické informace představují?  
**Přímé důkazy:**
  - Transformace u *Streptococcus pneumoniae* – změna virulence
  - Analýza bakteriofága T2 – do bakteriální buňky vstupuje jen DNA, nikoliv proteiny (Hershey–Chase experiment)
  - U viroidů a některých virů je nositelkou genetické informace RNA – experiment s virem TMV

**Virulence** je individuální vlastnost patogenu (např. bakterie či viru), která vyjadřuje stupeň pathogenicity určitého mikrobiálního kmene ve srovnání s ostatními kmény daného druhu. Také se dá říci, že jednotlivé kmény jsou různě virulentní. Virulence se určuje například podle schopnosti mikroba vyvolat onemocnění či v rámci něho usmrtit hostitele. Kmény, které mají tak nízkou virulenci, které téměř nezpůsobují onemocnění, ačkoliv daný druh patogenní je, se nazývají **avirulentní** (a daná vlastnost **avirulence**).

- 5) Pro chemický důkaz DNA jako transformační substance buněk R je typické  
**Důkaz, že chemickou substancí zodpovědnou za transformaci buněk R na S je DNA**  
(O. Avery, C. Mac Leod, M. McCarty 1944)



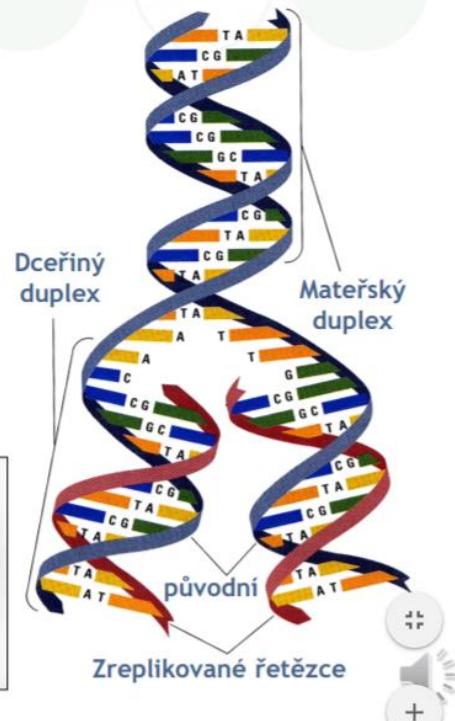
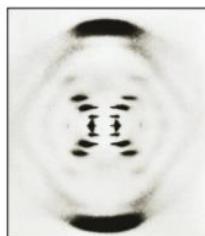
- 6) Vlastnosti modelu struktury DNA umožňují?

# Struktura DNA navržená Watsonem a Crickem (1953)

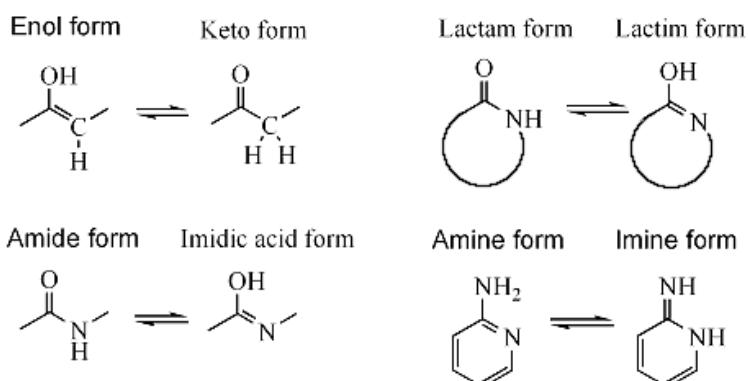
## Vlastnosti navržené struktury DNA umožňují:

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

**Analýza rentgenogramů krystalických preparátů DNA (M.Wilkins, R. Franklinová, R. Gosling)**



**Tautomerie** (též **tautomerismus**) je forma izomerie organických sloučenin, kdy mohou jednotlivé izomery (nazývané zde **tautomery**) snadno přecházet v jiné reakci zvanou **tautomerizace**.<sup>[1][2]</sup> Tato reakce běžně představuje migraci atому vodíku či protonu, doplněná prohozením jednoduché vazby a k ní přiléhající vazby dvojné. Vzhledem k rychlému přechodu jednoho izomera v jiný se tautomery obecně považují za totožnou sloučeninu. Tautomerie je zvláštním případem strukturní izomerie a hráje důležitou roli v nekanonickém párování bází v molekulách DNA a zejména RNA.



7) Strukturní složky nukleových kyselin zahrnují?

## Složení nukleových kyselin

N-glykozidická vazba

### ● Nukleotid

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

### ● Nukleozid = pentóza-<sup>↑</sup> org. báze

### ● Kys. deoxyribonukleová

- kys. fosforečná
- deoxyribóza
- adenin, guanin, cytozin, tymín\*

### ● Kys. ribonukleová

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

\*modifikace bází (metylace, acetylace...)

8) Pro polynukleotidový řetězec DNA platí, že

### Polynukleotidový řetězec

#### ● Významné strukturní rysy:

- 5' - a 3' - konec polynukleotidového řetězce
- Páteř polynukleotidu (pentózafosfátová kostra, cukr-fosfátová kostra)
- Prodlužování (syntéza) polynukleotidového řetězce - **probíhá vždy ve směru 5' - 3'**

9) Přítomnost obrácené repetice v sekvenci DNA navozuje

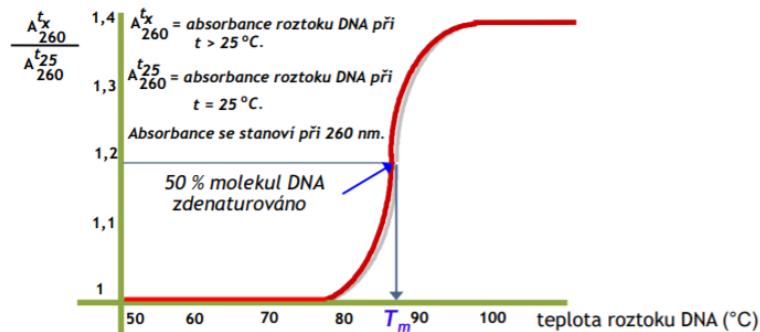
- Potenciál pro vytvoření vlásenky
- Potenciál pro vytvoření vlásenky se smyčkou

10) Denaturace DNA je navozena?

### Denaturace a renaturace dsDNA

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

## Denaturační křivka dsDNA



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

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

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

Další metody stanovení %GC  
Ultracentrifugace v CsCl  
HPLC

### 11) Gen je definován jako

- Gen = Informační a funkční jednotka obsahující genetickou informaci o primární struktuře funkční molekuly translačního produktu (proteinu) nebo funkční molekuly produktu transkripce RNA (tRNA, rRNA, snRNA a dalších RNA) nepodléhajících translaci

### 12) Genetická informace můžeme definovat jako

- Genetická informace = informace primárně obsažená v nukleotidové sekvenci DNA (genomové RNA u RNA-virů)

### 13) Genotyp vs fenotyp

- Genotyp = genetická konstituce organismu reprezentovaná souborem alel (tj. konkrétních variant genů) a sekvencí jeho genomu
- Fenotyp = soubor znaků a vlastností, kterými se v daném prostředí projevuje daný organismus (vyjádření genotypu)

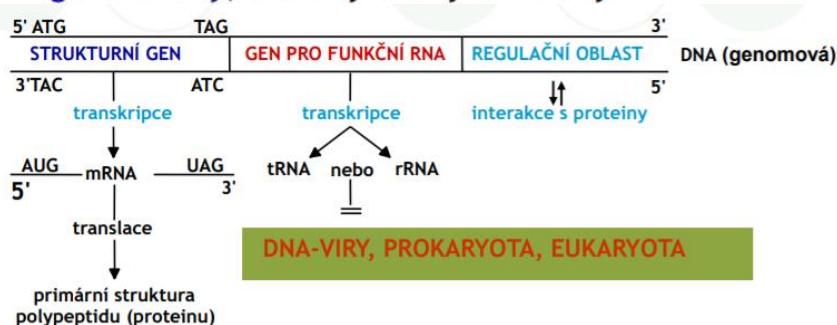
genotyp + prostředí = fenotyp

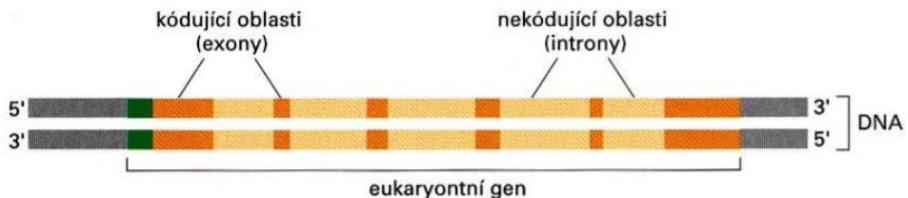
### 14) DNA se typicky přepisuje řetězec?

Antikódující (negativní)

### 15) Strukturální geny u eukaryot typicky obsahují tyto oblasti

- Strukturální geny u eukaryot typicky obsahují tyto oblasti
  - Geny strukturní = přepisují se do molekul mRNA, které se překládají a kódují polypeptid (translační produkt)
    - strukturní gen jednoduchý, neobsahující introny
    - strukturní gen složený, tvořený exony a introny





## 16) Základní vlastnosti genetického kódu

### Základní vlastnosti genetického kódu

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

## 17) Charakteristika živé buněčné soustavy z hlediska přenosu genetické informace

### Živé soustavy

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

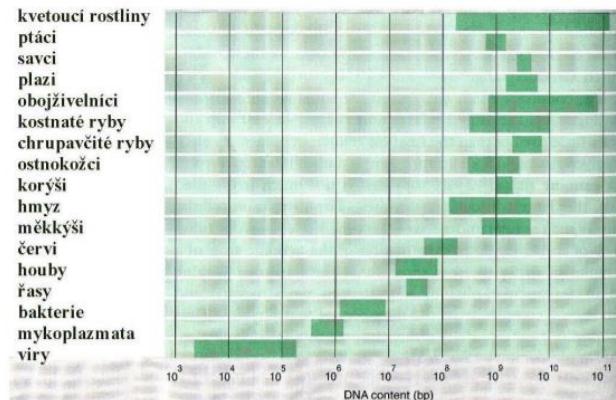
- Bakterie (Bacteria)
- Archaea (Archaea)
- Eukarya (Eukarya)

- buněčné
    - jednobuněčné
    - mnohobuněčné
  - nebuněčné
    - viry
    - viroidy
- DNA  
nebo  
RNA
- Všechny způsoby přenosu genetické informace.  
**Mají všechny složky translačního systému.**  
(aa-tRNA-syntetáz, tRNA, ribozomy)
- Jsou v translaci závislé na hostitelských buňkách.  
Viry = živé soustavy schopné reprodukce v závislosti na translačním systému hostitelských buněk.



## 18) Paradox hodnoty C

# Velikost genomu jednotlivých skupin organismů



Velikost genomu se udává v počtech páru bází:

bp = pár bází  
nt = nukleotid

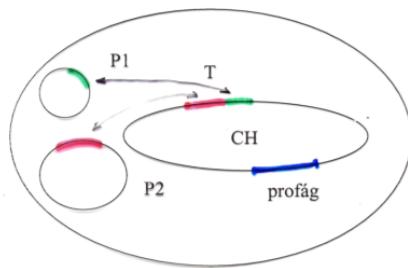
kbp = 1000 bp  
Mbp = 1000 kbp  
Gbp = 1000 Mbp  
1 bp = 660 D  
1 mm DNA = 3 Mbp

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

## 19) Charakteristika prokaryotického genomu Prokaryotický genom

### ● Složky

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



**Nukleoid** je jaderný ekvivalent prokaryotických buněk, tedy něco jako prokaryotické " jádro ". Ve většině případů je tvořen jedinou cirkulární molekulou DNA.

**Plazmid** je malý kruhově stočený úsek DNA, který se nachází volně v cytoplazmě bakterií. Existuje ve více kopiích (10–50), které nesou jeden nebo několik genů. Jejich replikace probíhá nezávisle na hlavním chromozomu.

Plazmidy jsou proměnlivé a *přenáší dědičnou informaci mimo jádro*. Mají schopnost přecházet z buňky do buňky.

### Transpozony

Přesouvání uvnitř genomu i z plazmidu na chromosom, označujeme jako „skákavé geny“. Přesunem tr. se mohou spoustě a vypínat určité geny. Od viru se liší tím, že postrádají reprodukční cyklus, od plazmidu neschopnost samostatné replikace a existence mimo chromosom.

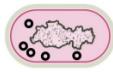
- inzerční sekvence – nejjednodušší typ transpozonusu, nese jen gen pro trasposázu a obráceně orientované sekvence na konci (inverted repeats)
- složené transpozony – alespoň jeden gen navíc oproti IS, (geny pro faktory virulence, pro rezistenci na ATB)

**Genomické ostrovy** jsou úseky v genomu, které daný organizmus získal horizontálním přenosem genů, tzn. jinak než z přímých předků na potomky. Horizontálním přenosem můžou organizmy skokově získávat nové vlastnosti, jenž jsou často adaptivní. Typickým příkladem je přenos plazmidů kódujících geny pro rezistenci vůči antibiotikům mezi nepříbuznými bakteriemi.

**Bakteriofág** zkráceně **fág**, je obecný název pro virus infikující bakterie. Bakteriofágy jsou nejpočetnějším biologickým objektem v biosféře, jejich počet se odhaduje na  $10^{31}$  částic.<sup>[1][2]</sup> Můžeme je najít na všech místech osídlených jejich bakteriálními hostiteli, jako například půda nebo střeva živočichů.

Po infekci bakteriální buňky mohou totiž přejít do latentního, **lyzogenního stavu**, kdy se bakteriofág (resp. už pouze jeho nukleová kyselina) začlení do genetické informace buňky. Fág v tomto stavu se označuje jako tzv. **profág**.

## PROKARYOTA vs. EUKARYOTA



- nukleoid
- volně v cytoplazmě
- -
- plazmidy
- kompaktní
- většina genomu kódující sekvence
- operony
- málo repetitivních sekvencí
- -



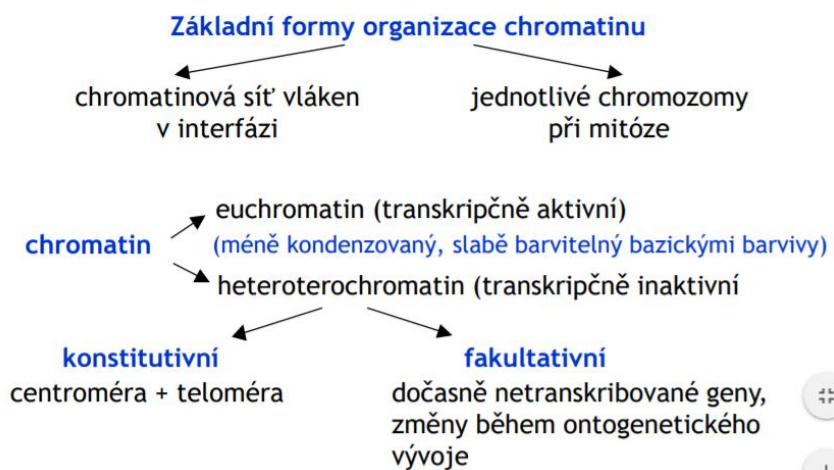
- chromozomy
- v jádře
- introny
- -
- C-value paradox
- většina genomu nekódující sekvence
- -
- velké množství repetitivních sekvencí
- mitochondrie a chloroplasty

### • Prokaryotický genom

- Velmi kompaktní genom s malými mezerami mezi geny
- Většina genomu je obsazena strukturními geny
- **Malá část je tvořena nekódující DNA**
- Operonové uspořádání genů
- Pořadí genů není u prokaryot konzervováno

## 20) Struktura chromatinu

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



## 21) Funkční složky eukaryotických chromozomů

### Funkční složky eukaryotických chromozomů

- **centromera** - zajišťuje segregaci chromozomů do dceřiných buněk při mitóze (meióze)
- **telomera** - koncová oblast - její struktura zajišťuje dokončení replikace lineárního chromozomu

Typické telomerové repetice:

- TTGGGG - Tetrahymena
- TTAGGG - člověk

### ● počátky replikace (ori)

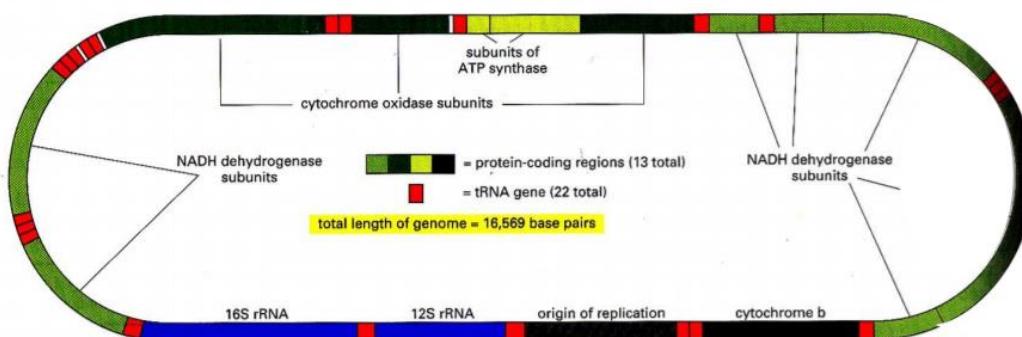
**Mitóza** je typ buněčného dělení, při kterém z jedné mateřské **diploidní** buňky vznikají dvě dceřiné diploidní buňky s identickou genetickou výbavou. Tímto způsobem se dělí somatické buňky, pohlavní dělení je označováno jako **meióza**.

**Meióza** (zrací dělení) je proces redukčního dělení buňky, který probíhá ve dvou po sobě následujících děleních a jehož výsledkem jsou buňky s **haploidním** počtem **chromozomů**. Meiotickým dělením vznikají **pohlavní buňky** (gamety). Význam meiózy spočívá v **náhodném** rozdělení otcovských a mateřských chromozomů do pohlavních buněk a tím umožněné **genetické variabilitě**. Ta je zvýšená mechanizmem **crossing-overu**.

## 22)

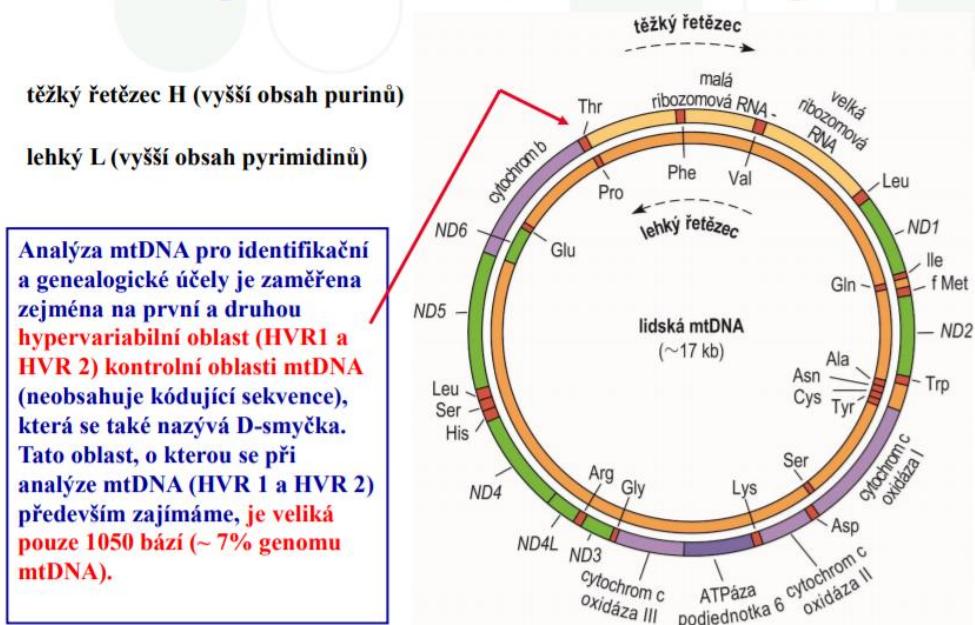
### Charakteristika mitochondriálního genomu člověka

#### Struktura genomu mitochondrií člověka 16 569 pb, 37 genů



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

# Mapa lidského mitochondriálního genomu



Organizmy	Velikost v bp	Struktura	Charakteristika
Buňky více-buněčných živočichů	1,6 až 2,0 × 10 <sup>4</sup>	kružnicová	každý živočišný druh má svůj vlastní typ mtDNA

## Specifické rysy mitochondriového genomu



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

### heteroplasmie

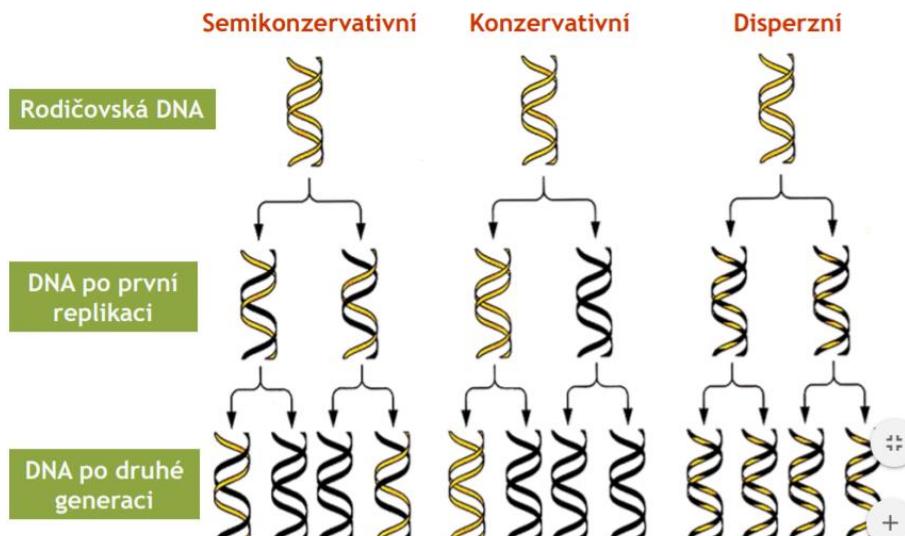
## 23) Charakteristické rysy replikace dvouřetězcové DNA

## Charakteristické rysy replikace dvouřetězcové DNA

1. Probíhá semikonzervativním způsobem
2. Probíhá semidiskontinuálně

**Replikon** = oblast nukleové kyseliny, která se replikuje z jednoho počátku replikace (ori)

## Tři možné způsoby replikace DNA



Při replikaci vzniknou z jedné mateřské molekuly DNA **dvě naprosto stejné dceřiné DNA** – každá s jedním vláknenem z původní DNA, jedná se tedy o **semikonzervativní proces**, kdy nově vzniklá dvoušroubovice má **vždy jedno vlákno původní a druhé vlákno nově syntetizované**.

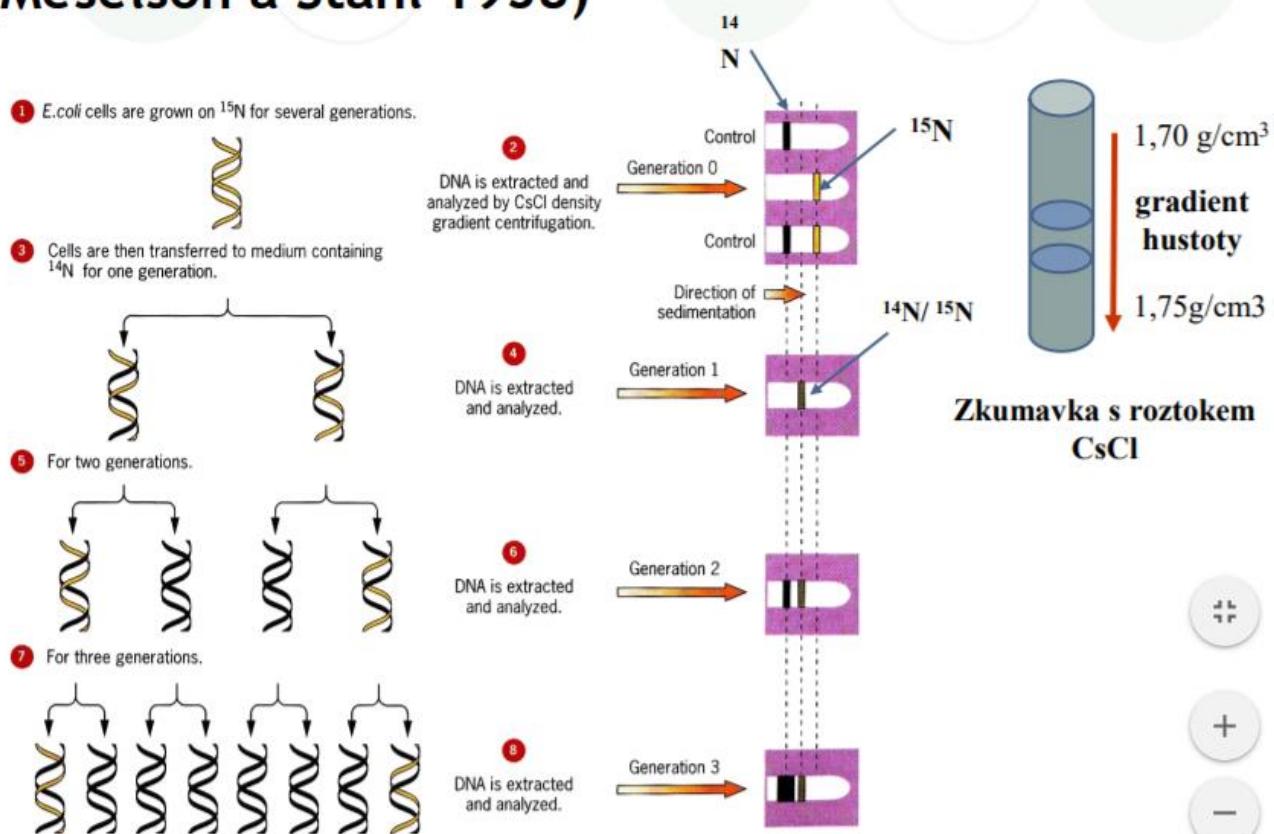
## PRŮBĚH REPLIKACE

1. Během procesu syntézy **DNA** se dvojitý helix enzymaticky rozvíjí (*helikázy*) a vytváří se **replikační vidlice**, do níž se umístí enzymy katalyzující replikaci a proteiny stabilizující rozvinutý helix a přispívající k uvolnění stočené tenze vytvořené replikační aktivitou.
2. Syntéza je **iniciována** na specifických místech (*ori*) podél templátového DNA řetězce (matrice) *RNA primázou* za vzniku krátkého RNA primeru poskytující vhodný 3' konec, od kterého DNA polymeráza III začne syntetizovat komplementární řetězec.
3. **Elongace DNA řetězců** - Protože má helix antiparalelní charakter, syntetizuje *DNA polymeráza III* kontinuálně nový řetězec podle **vedoucího řetězce** ve směru 5' > 3'. Vedoucí řetězec se prodlužuje po směru pohybu replikační vidlice. Podle opačného řetězce, **opožďujícího** se, jsou syntetizovány diskontinuálně komplementární krátké Okazakiho fragmenty (1000 až 2000 nukleotidů), které jsou později spojeny *DNA ligázou* (**semidiskontinuální replikace**) (Kvůli zvláštní replikaci na zpožďujícím se vlákně se také replikace označuje jako semidiskontinuální.).
4. *DNA polymeráza I* odstraňuje RNA primery ve směru 5' > 3' a doplní mezeru mezi Okazakiho fragmenty komplementárně deoxyribonukleotidy syntézou od 3' konců.
5. Okazakiho fragmenty složené jen z deoxyribonukleotidů jsou spojeny se sousedními *DNA ligázou*.
6. Syntéza opožďujícího se řetězce a vedoucího řetězce se děje zároveň působením jednoho holoenzymu *DNA polymerázy III*, která se pohybuje ve směru pohybu replikační vidlice.
7. Replikace prokaryotického chromozomu končí na specifických sekvencích - terminátory replikace (TER), na které se váže protein inhibující aktivitu *helikázy* a tím se zastaví tvorba replikační vidlice.

8. Replikace DNA u eukaryotních organismů je podobná prokaryotům. Je však více složitější, například replikace na koncích lineárních molekul (telomery) tvoří specifický problém, který je řešen RNA obsahujícím enzymem *telomerázou*.

## 24) Důkaz semikonzervativní replikace DNA

### Důkaz semikonzervativní replikace DNA (Meselson a Stahl 1958)



## 25) Enzymy kooperující při replikaci a jejich funkce

### Enzymy kooperující při replikaci a jejich funkce

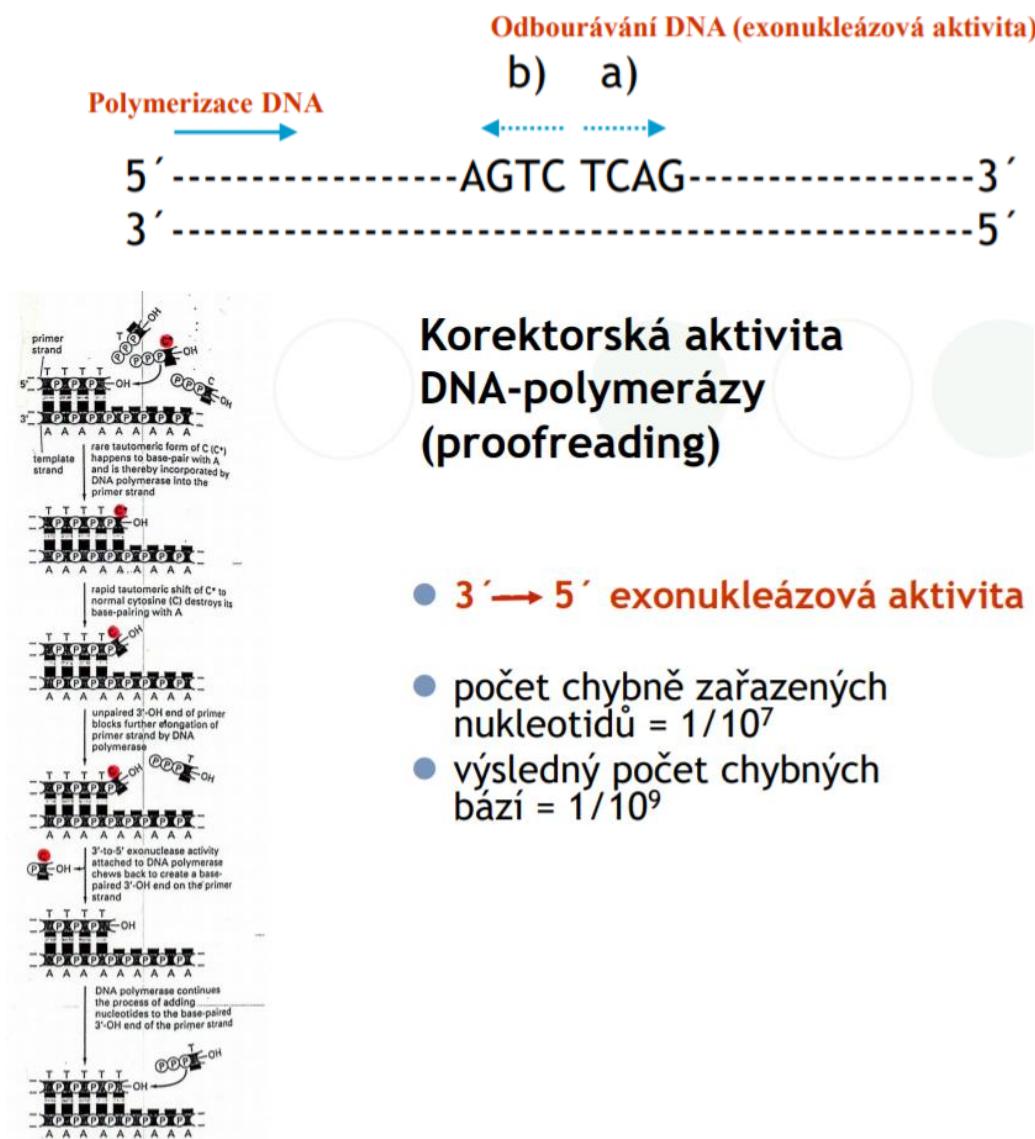
- DNA-polymerázy a DNA-primáza:** katalyzují polymerizaci NTP
- DNA-helikázy, DNA-topoizomerázy:** odstranění helikálního vinutí dsDNA otevření DNA-helixu
- SSB - proteiny:** stabilizace jednořetězců
- Iniciátorové proteiny:** vazbou na ori katalyzují vytvoření replikační vidlice

Počátek replikace = ori  
specifická sekvence na DNA (dnaA box)

# Charakteristika aktivit DNA-polymeráz

- **DNA-dependentní-DNA-polymerázy**

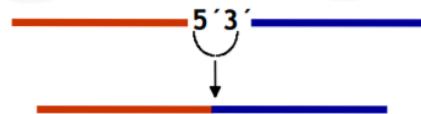
1. Polymerizace nukleotidů ve směru 5' -3'
2. Odštěpování nukleotidů
  - a) 5'-3' exonukleázová aktivita
  - b) 3'-5' exonukleázová aktivita



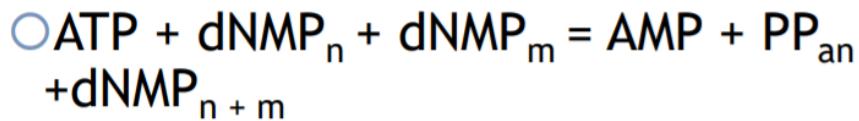
- **3' → 5' exonukleázová aktivita**

- počet chybně zařazených nukleotidů =  $1/10^7$
- výsledný počet chybných bází =  $1/10^9$

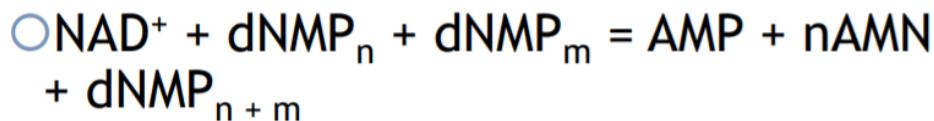
## DNA-ligázy



### ● DNA-ligáza (ATP)



### ● DNA-ligáza (NAD<sup>+</sup>)



DNA ligáza je enzym ze skupiny ligáz, který se účastní replikace DNA (spojování Okazakiho fragmentů, crossing-overu a opravy DNA). Katalyzuje vznik fosfodiesterové vazby v místech, kde došlo k porušení celistvosti vlákna DNA.

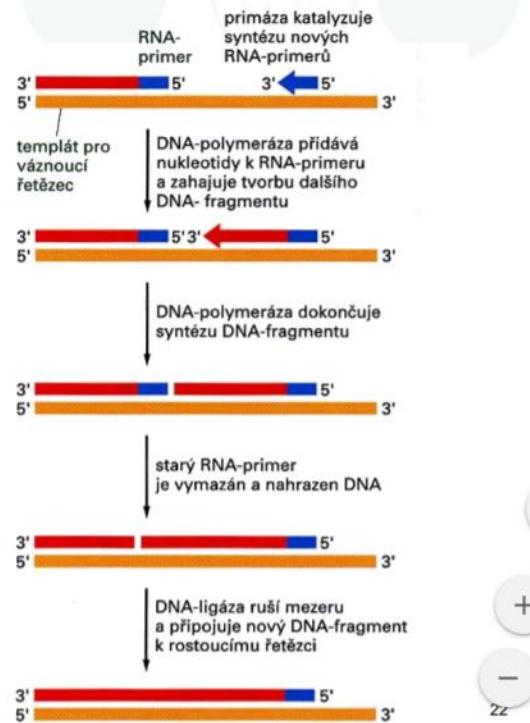
27)

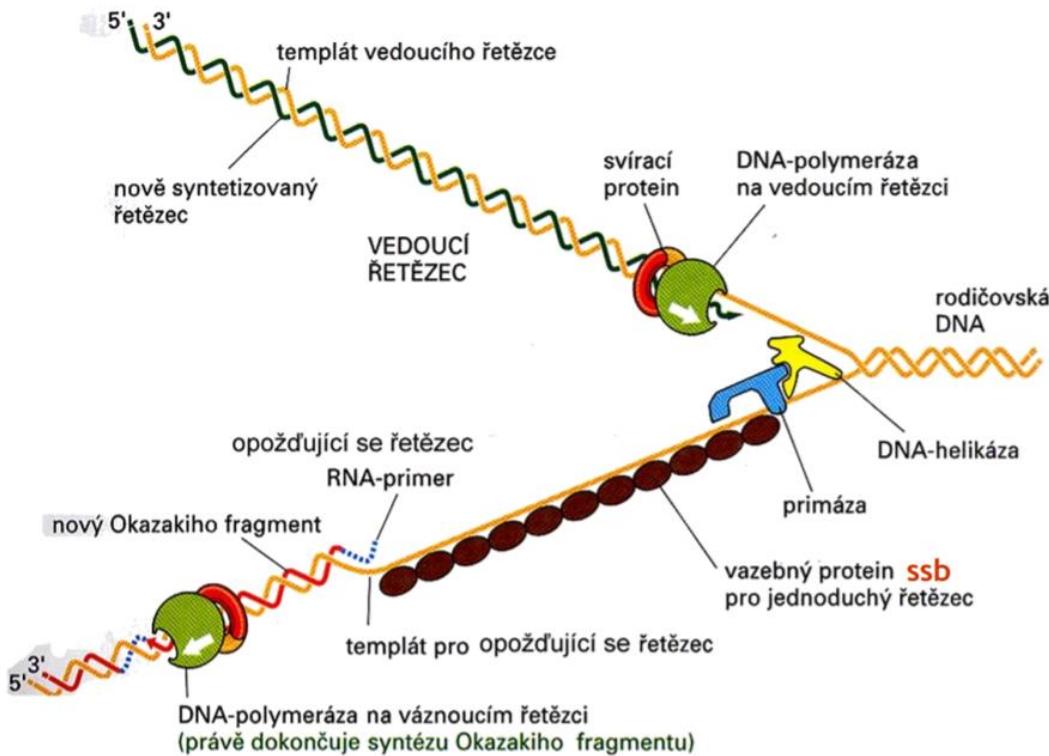
### Okazakiho fragenty

Opožděné úseky vznikající během replikace

### Syntéza Okazakiho fragmentů a proces jejich spojování postupným působením enzymů:

1. DNA-polymerázy
2. Nukleázy (PolI)
3. Ligázy

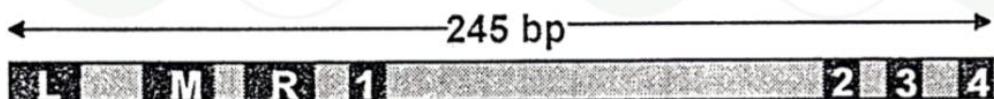




## 28) Replikace u *E. coli*

- Předprimerová fáze v oriC
- Fungování DnaA, DnaB a DnaC při iniciaci replikace v oriC
- Regulace iniciace replikace je řízená metylací

### Struktura počátku replikace (oriC) u *E. coli*

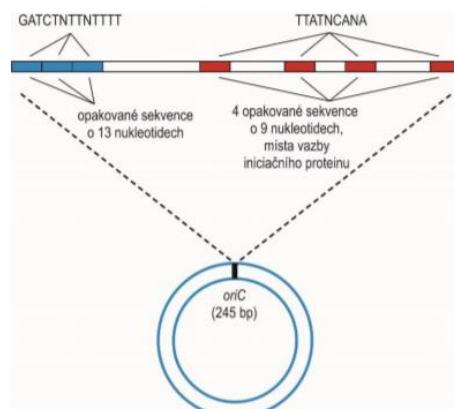


L, M, R jsou 13 bp-sekvence GATCTNTTNTTTT

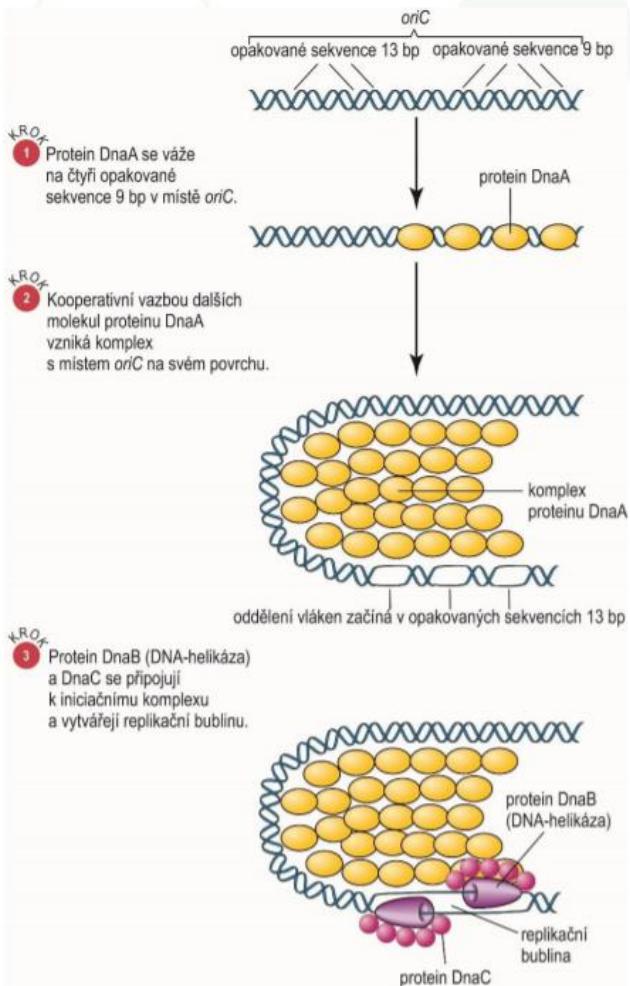
1, 2, 3, 4 jsou 9 pb-sekvence TTATNCANA

= neopakující se sekvence

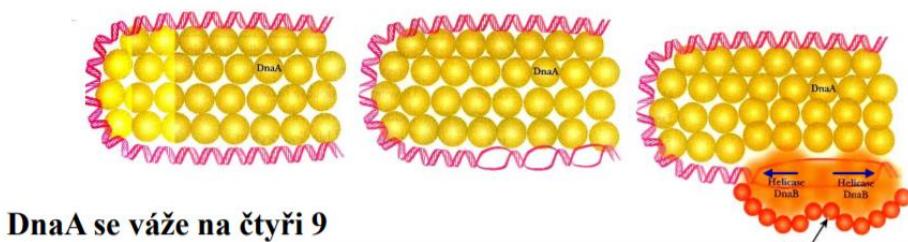
*Minireplikon*



## Předprimerová fáze replikace DNA v oriC u E. coli



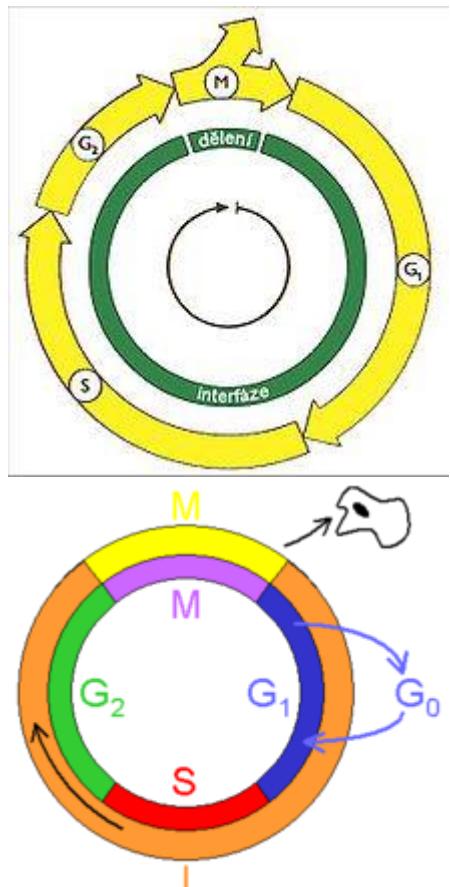
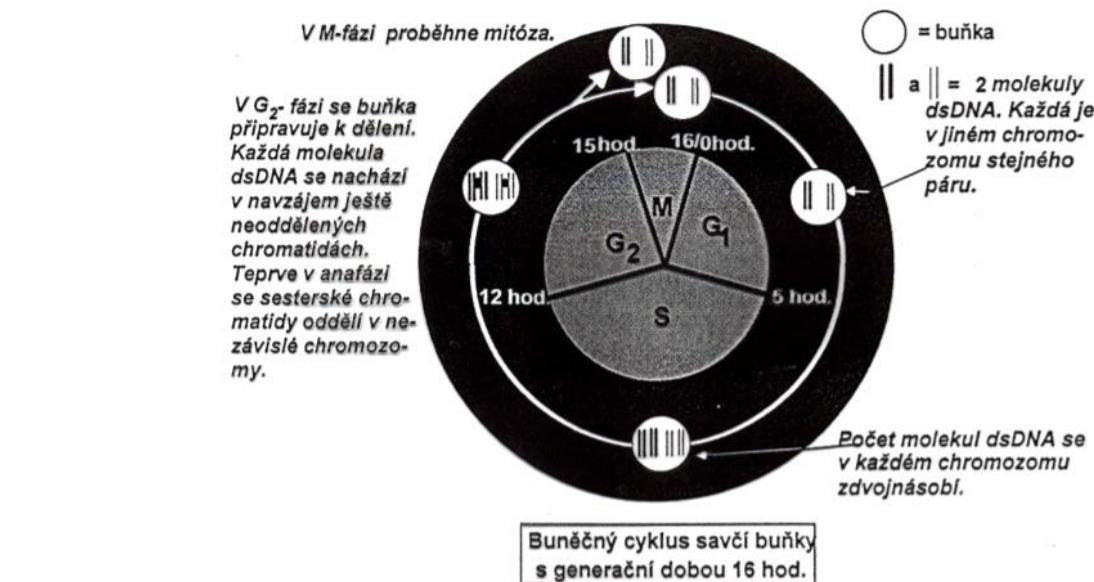
### Fungování proteinů DnaA, DnaB a DnaC při iniciaci replikace v oriC



DNA se ohýbá a začíná se rozmotávat v místě tří 13 bp repetitive – zde se pak vážou DnaB a DnaC, což vede k vytěsnění DnaA a rozmotá se celá oblast bohatá na AT páry. DnaB (helikáza) vytváří dvě replikační vidlice – každou v jednom směru

## 29) Fáze buněčného cyklu

## Zjednodušené schéma buněčného cyklu zdůrazňující počet molekul dsDNA v chromozomech v jeho různých fázích



**Buněčný cyklus** je cyklus, kterým prochází **eukaryotická buňka** od svého vzniku po další dělení. Tedy od dělení po dělení buňky. Doba trvání cyklu se nazývá **generační doba**. Buněčný cyklus se skládá z několika fází přípravných (souborně nazývaných jako **interfáze** – období od konce jedné **mitózy** po začátek druhé) a vlastního **buněčného dělení** (nejčastěji **mitózy**).

Buněčný cyklus lze rozdělit na 4 základní fáze podle "přípravných" procesů v buňce, které mají vztah k rozdělení buňky. Časy zde uvedené jsou pouze orientační a liší se druh od druhu a buňka od buňky:

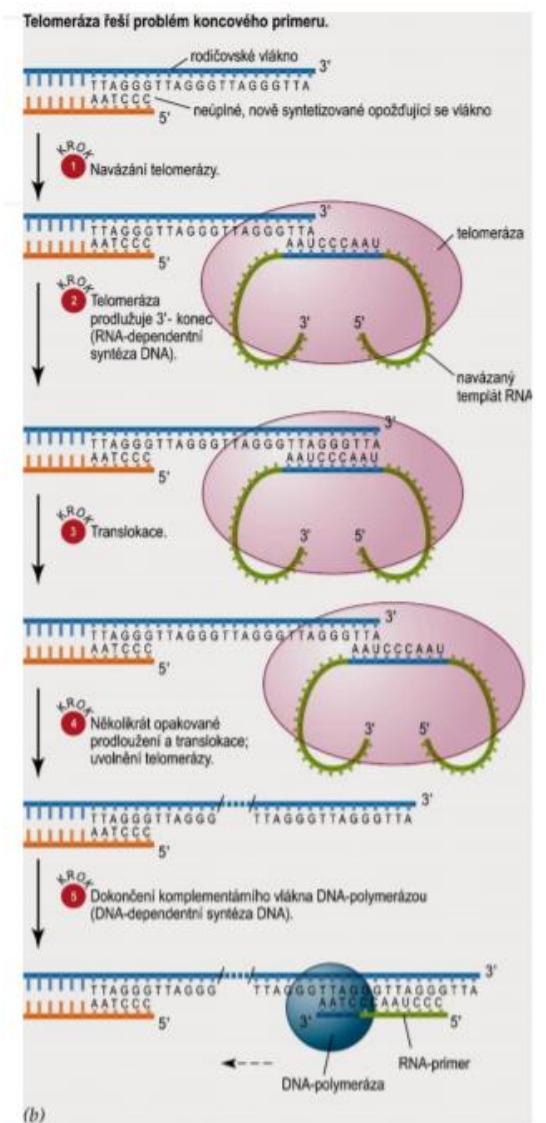
- **G<sub>1</sub> (growth) fáze** (cca 50 % cyklu) – zdvojení buněčné hmoty, buňka roste, tvoří se RNA a proteiny, připravuje se zásoba nukleotidů a enzymů pro replikaci DNA. Hlavní kontrolní uzel
- **S (synthesis) fáze** (cca 30 % cyklu) – DNA se replikuje na dvojnásobné množství, každý chromosom je na konci této fáze zdvojený, buňka je de facto tetraploidní
- **G<sub>2</sub> fáze** (cca 15 % cyklu) – zdvojování organel, tvorba struktur potřebných pro dělení buňky – mitotické vřeténko
- **M (mitosis) fáze** (cca 5 % cyklu) – dělení jádra (karyokineze), dělení buňky (cytokineze), výsledkem jsou dvě buňky o stejném počtu chromozómů (ekvační dělení)

Každá "přípravná" fáze je zakončena kontrolním uzlem, který má za úkol ověřit, je-li buňka připravena na přechod do další fáze. Nejvýznamnějším ze všech je kontrolní uzel v G<sub>1</sub> fázi, který může za určitých okolností uvést buňku do tzv. G<sub>0</sub> fáze, ve které se buňka nepřipravuje na dělení. V G<sub>0</sub> fázi mohou buňky vydržet i desítky let (nervová či svalová buňka obratlovců)

## 30) Funkce telomerázy

Telomeráza je enzymatický komplex, který má aktivitu RNA-dependentní DNA-polymerázy (reverzní transkriptázy). Telomeráza má výjimečnou schopnost prodlužovat sekvence telomer a tím pádem revertovat proces jejich zkracování. Aktivita telomerázy je přísně regulována, fyziologicky nacházíme aktivitu telomerázy v buňkách během embryonálního vývoje, u dospělého jedince pak například v kmenových buňkách krvetvorné kostní dřeně. Za patologických podmínek je telomerázová aktivita zvýšena v nádorových buňkách, což přispívá k jejich neomezenému dělícímu potenciálu.

Prodlužuje při replikaci 3' konec. Řeší problém koncového primeru.



## Telomerová opakování ~ mechanismus pro kontrolu buněčného dělení

- při narození mají v somatických buňkách telomery úplnou délku
  - při každém dělení buňky ztrácí telomera 50-100 nt
  - po mnoha děleních zdědí buňky defektní chromozomy a dochází k zástavě dělení buněk = replicative cell senescence
  - **Mechanismus zajišťuje, že nedochází k nekontrolovanému dělení buněk („measuring stick“)**
    - lidské fibroblasty ve tkáňové kultuře - po 60 děleních buněk dochází k zástavě tvorby telomerázy
    - po vložení genu s aktivní telomerázou se délka telomer udržuje a buňky nestárnou
    - Vnesení genu pro telomerazu do myší prodlouží jejich život o ¼
    - Deregulace exprese telomerázy může vést k onkogenezi
- Další funkce telomerázy*
- Reparace DNA

### 31) Definice transkripce

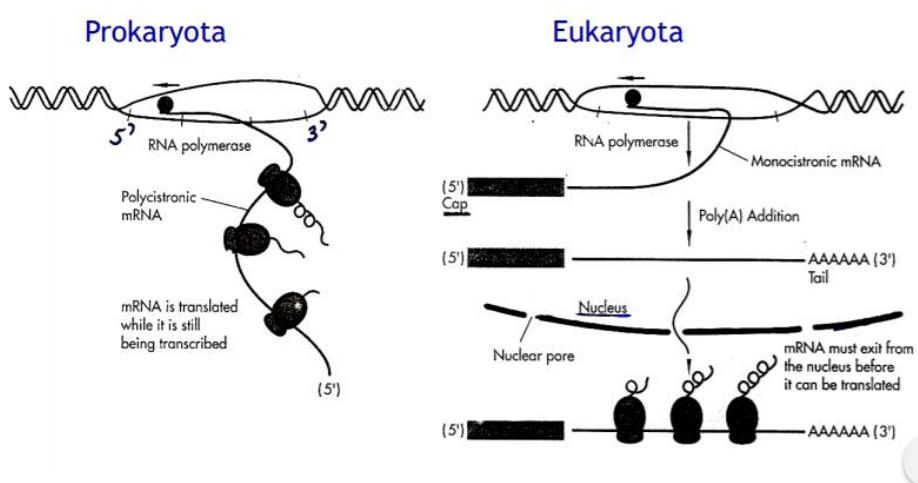
#### Transkripcie

přepis genetické informace z DNA do RNA, při které DNA slouží jako matrice pro syntézu RNA. Reakci katalyzuje RNA-polymeráza (transkriptáza)

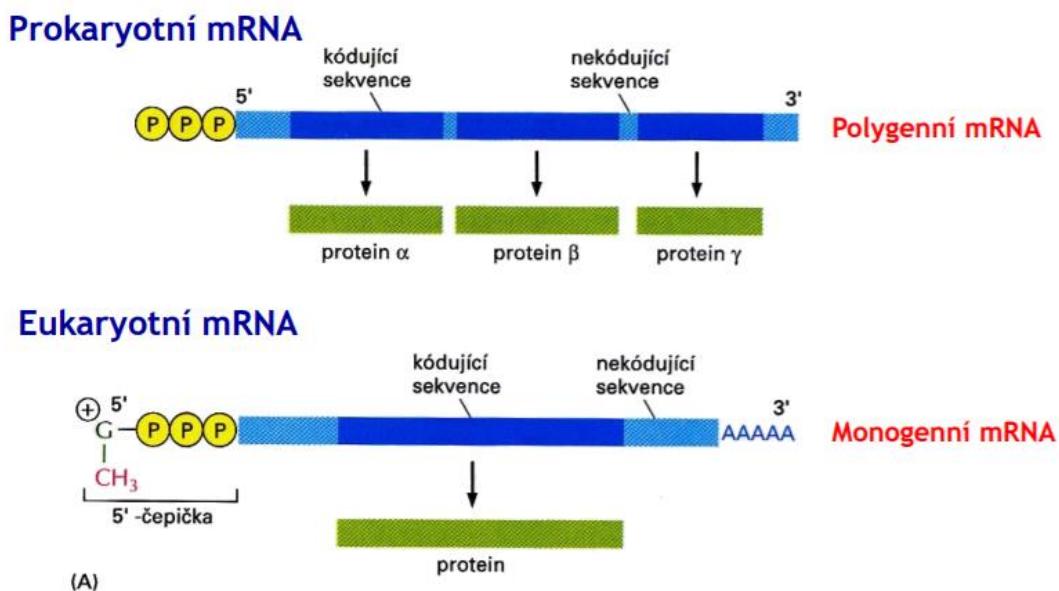
Zpětná transkripce (reverzní transkripce: RT) - přepis genetické informace z RNA do DNA. Reakci katalyzuje zpětná (reverzní) transkriptáza

### 32) Transkripce u prokaryot

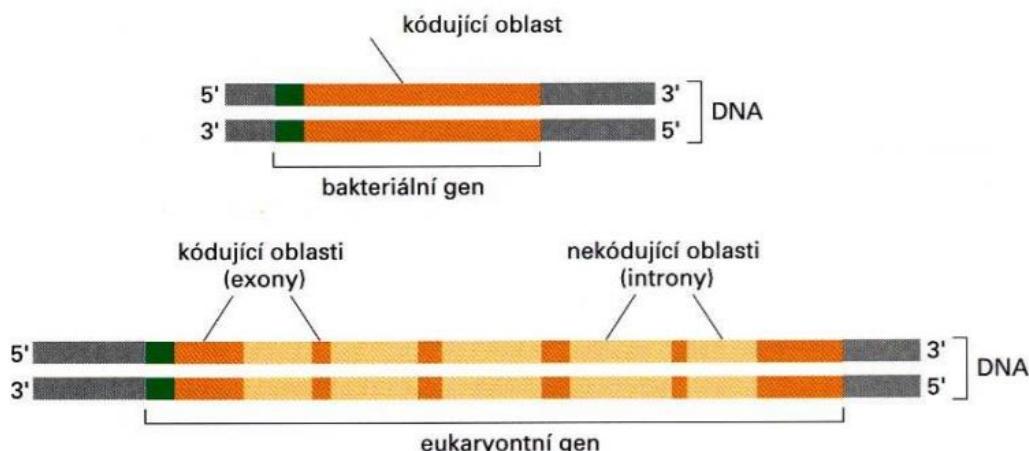
Transkripcie u prokaryot je spřažena s translací, u eukaryot jsou tyto procesy odděleny



# Srovnání prokaryotické a eukaryotické mRNA



## Srovnání prokaryotických (jednoduchých) strukturálních genů s eukaryotickými (složenými) geny



### 33) Enzymy katalyzující transkripcí

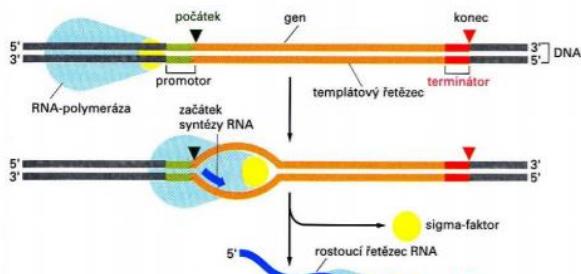
## Enzymy katalyzující transkripcí

- A. DNA-dependentní RNA-polymeráza (RNA-polymeráza, transkriptáza) matricí je řetězec DNA (prokaryota, eukaryota, DNA-viry)
- B. RNA-dependentní DNA-polymeráza (zpětná/reverzní transkriptáza) matricí je řetězec RNA (retroviry, retrotranspozony, retroelementy)

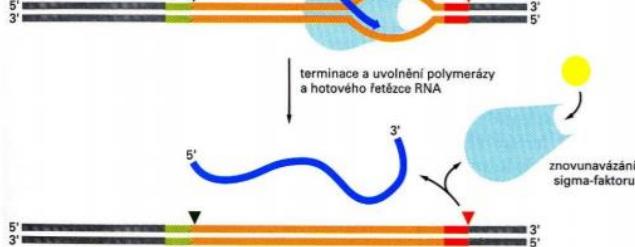
### 34) Iniciační fáze transkripce u prokaryot

# Transkripce bakteriálního genu RNA-polymerázou

## 1. iniciace

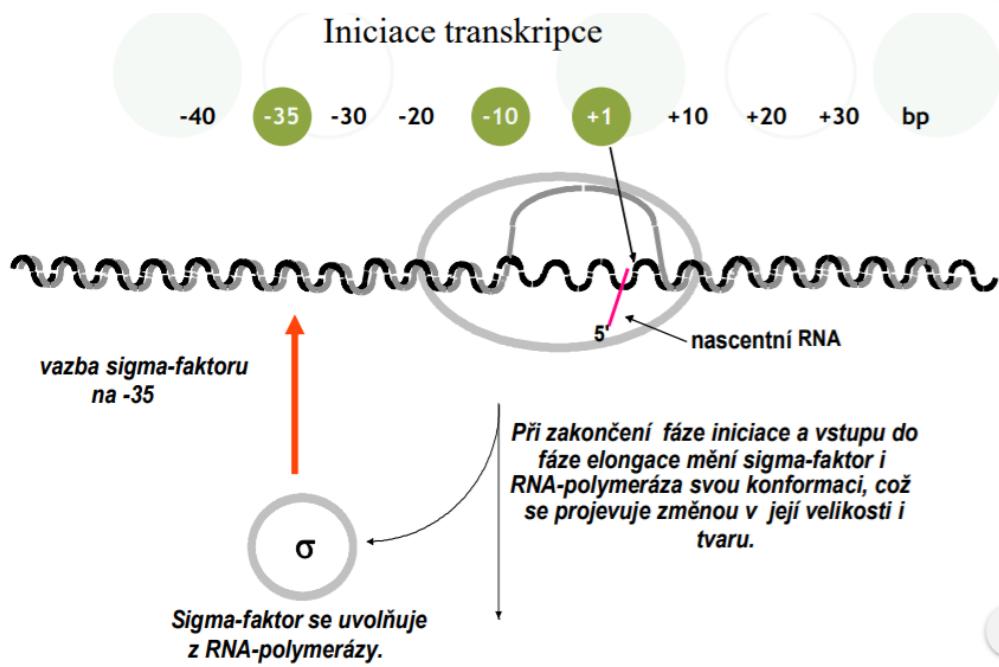


## 2. elongace



## 3. terminace

17



## Transkripce u prokaryot

Transkripce i translace u **prokaryot** probíhá v mnoha ohledech podobně jako u eukaryotních buněk, v mnoha detailech se však liší. Velké rozdíly jsou navíc mezi prokaryotními organismy ze skupiny **Bacteria** (nebo též Eubacteria) a Archaea (u nichž se mnoho z těchto procesů podobá spíše situaci u eukaryot), jako modelový organismus, k němuž se vztahují všechny níže popsané jevy, zde tedy budeme brát **bakterii *E. coli***. Velký rozdíl mezi prokaryotními a eukaryotními organismy je v prostorové a časovém vztahu transkripce a translace, kdy v důsledku absence dvojitě jaderné membrány oddělující tyto dva procesy u bakterií obvykle nedochází k dalšímu zpracování nově vznikající **mRNA** a **ribozomy** nasedají na RNA ještě před dokončením její syntézy.

Transkripce je proces přepisu jednoho řetězce **DNA** do komplementárního řetězce **RNA**. Je katalyzován enzymem **RNA polymerázou**. Probíhá ve směru od 5' konce nové molekuly RNA k jejímu 3' konci a energeticky je poháněn hydrolyzou

makroergní vazby přicházejícího ribonukleosidtrifosfátu. Na rozdíl od eukaryotní transkripcie, kdy je obvykle přepisování pouze jeden gen kódující jediný polypeptid nebo neprekládanou RNA, se může u bakterií přepisovat více genů do jedné polycistronní molekuly RNA. Ty jsou následně postupně translatovány za vzniku několika samostatných polypeptidů (viz [Operonový model](#)).

## RNA polymeráza

---

Transkripcí u bakterií zajišťuje jediná RNA polymeráza (na rozdíl od [eukaryot](#)), skládající se z 5 proteinových podjednotek, nazvaných  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$ ,  $\omega$  a  $\sigma$  (často též nazývaná sigma faktor), přičemž  $\sigma$  podjednotka je přítomna ve dvou kopiích. Sigma podjednotka slouží k rozpoznání promotoru a navázání enzymu k DNA při iniciaci transkripce a krátce po začátku syntézy RNA disociuje.

## Iniciace transkripce

---

Aby mohla být zahájena syntéza RNA, musí dojít k rozpoznání sekvence nazývané promotor upstream od začátku přepisované oblasti. To se u bakterií děje pomocí sigma faktoru. Sigma faktor má u E. coli minimálně sedm známých variant(citace), z nichž nejčastější je  $\sigma^{70}$  neboli RpoD. Ten se uplatňuje při transkripci většiny genů, existují však i sigma faktory rozeznávající jiné sekvence promotoru. Obvykle se jedná o geny podílející se na společné metabolické funkci nebo odpovědi na specifické podmínky prostředí. U bakterií se tak jedná o důležitý prvek regulace genové exprese prostřednictvím syntézy a degradace různých variant sigma faktoru.

Samotný promotor obsahuje dvě vysoce konzervované sekvence rozeznávané sigma faktorem, nazývané konsensus sekvence. Konkrétní sekvence v daném místě promotoru se může mírně lišit od konsensus sekvence, obvykle však platí, že čím více se jí blíží, tím silnější daný promotor je pro daný sigma faktor. Pro  $\sigma^{70}$  se jedná o sekvenci TATAAT v pozici  $-10$  neboli TATA box, neboli Pribnow box, a sekvenci TTGACA v pozici  $-35$ .

Po otevření transkripční bubliny oddelením obou řetězců DNA a syntéze krátkého řetězce (okolo 9 nukleotidů) dochází k disociaci sigma faktoru a dále transkripce pokračuje podobně jako u [eukaryot](#).

**Promotor** (symbol:  $P$ ) je [sekvence DNA](#), na kterou se váže [RNA polymeráza](#) či jiné součásti transkripčního aparátu. Tím se obvykle zahájí [transkripcí](#) konkrétního [genu](#). Obvykle se promotor nachází na začátku tohoto genu, ačkoliv existují i výjimky.<sup>[1]</sup>

U [bakterií](#) se na promotor váže přímo RNA polymeráza, u [eukaryot](#) zřejmě spíše [transkripční faktory](#) (jako je [TATA-binding protein](#)). Obecně však platí, že důležitou součástí promotoru jsou často určité specifické sekvence nukleotidů – například [TATA box](#) (40 % všech genů ho má), [CAAT box](#) (64 % genů ho má). Některé geny však mají dokonce více promotorů. Povaha promotoru a jeho sekvence určují, jak hodně bude probíhat transkripce.

## Terminace transkripce

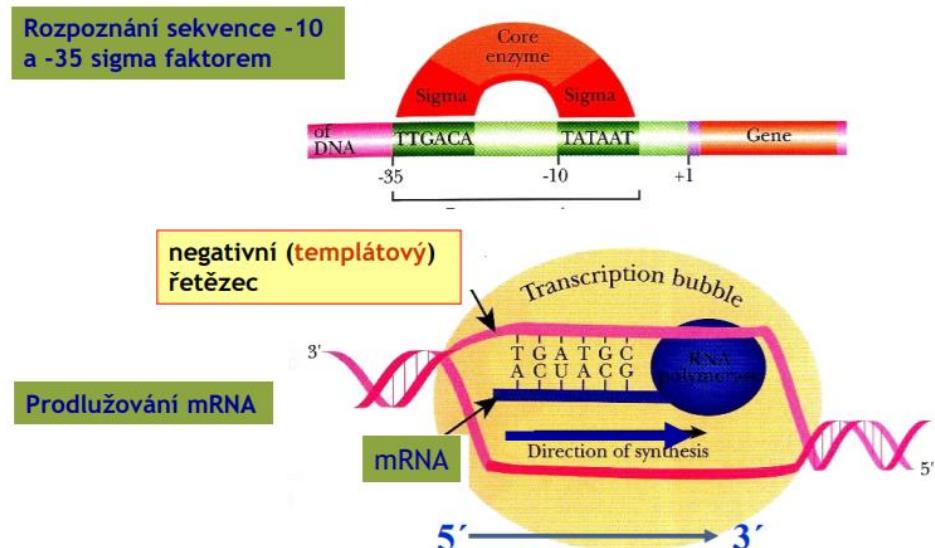
---

Terminaci transkripce u bakterií nejčastěji zajišťuje specifická sekvence v nově syntetizované RNA. Obvykle se jedná o sekvenci bohatou na GC páry obsahující dvě invertované repetice oddělené nerepetitivním úsekem. Tato sekvence je v DNA následována krátkým řetězce opakujících se adeninosinových bází (v RNA podmiňujících polyU sekvenci). Invertované repetice v nově vznikající RNA vzájemně párují a vytvářejí tak strukturu smyčky, což zastavuje postup transkripce. Díky slabé interakci A s U (oproti G a C) následně dochází k disociaci nově vzniklé molekuly RNA.

Jinou možností je u bakterií terminace prostřednictvím proteinu Rho ( $\rho$ ). Ten rozeznává specifickou sekvenci v nově syntetizované RNA a následně se po ní pohybuje směrem ke komplexu RNA polymerázy, kde způsobuje disociaci polymerázy a RNA.

### 35) Elongační fáze transkripce u prokaryot

## Elongační fáze transkripce u prokaryot



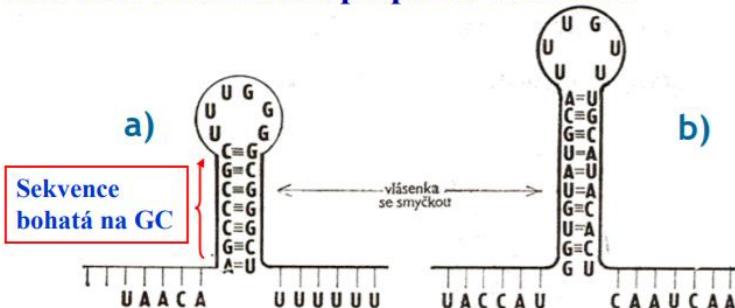
**Shine-Dalgarno (SD) sekvence (5'AGGA3')** – u strukturních genů prokaryot zajišťuje vazbu mRNA k 16S rRNA podjednotky ribosomu

### 36) Terminační fáze transkripce u prokaryot

## Typy terminátorů transkripce u prokaryot

**Faktor Rho** - katalyzuje uvolnění RNA řetězce z -DNA matricového vlákna = terminace transkripce

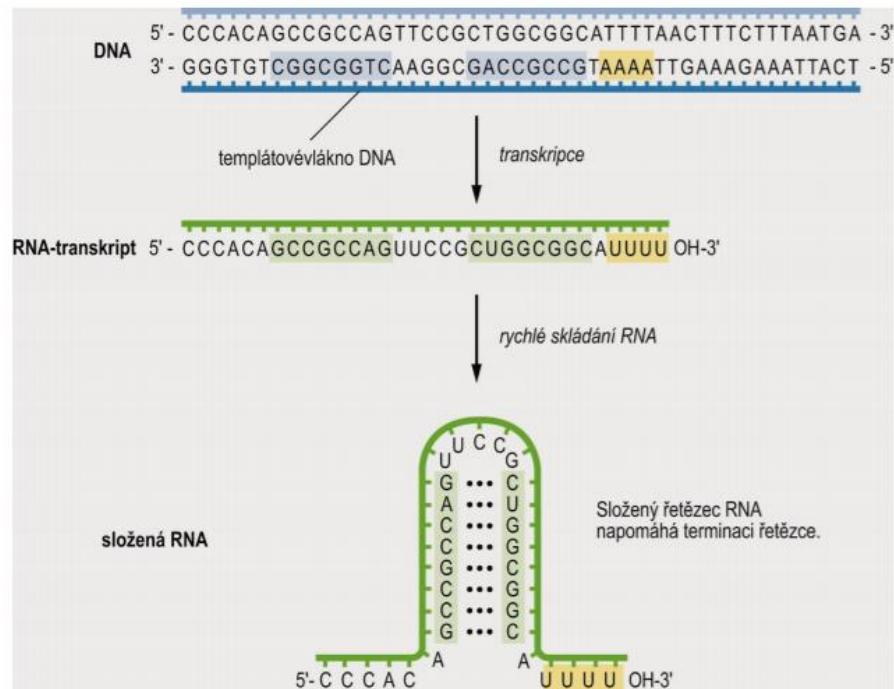
### sekvence terminátorů přepsané do mRNA



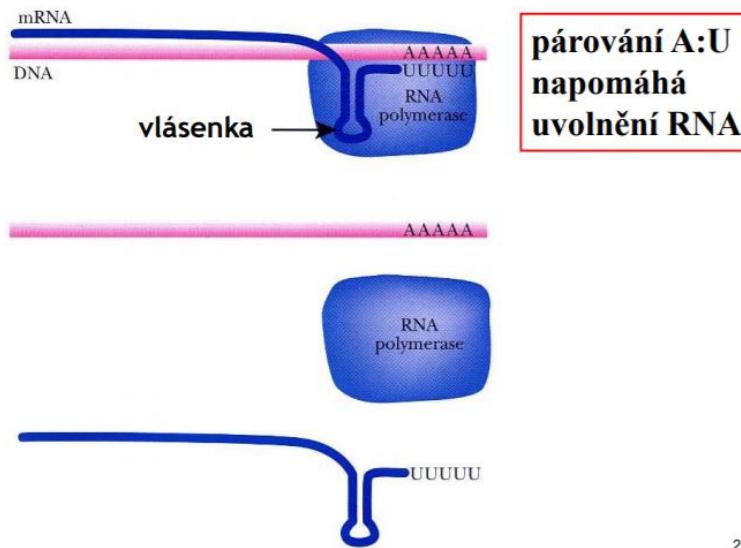
Terminátory: a) nezávislý na rho faktoru b) závislý na rho

Strukturní rozdíly mezi dvěma typy prokaryotických terminátorů (jejich transkriptů)

# Struktura transkripčního terminátoru nezávislého na Rho faktoru

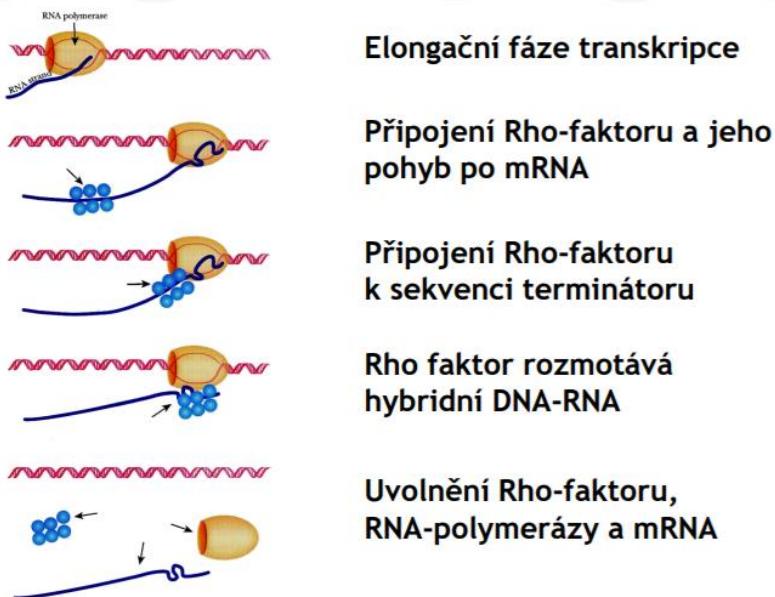


## Terminace transkripce mRNA



25

## Terminace transkripce za účasti Rho faktoru



### 37) Typy RNA polymeráz u eukaryot

#### Eukaryotické DNA-dependentní RNA-polymerázy

Matricí pro syntézu RNA je u všech těchto polymeráz negativní DNA-řetězec. Existují tři druhy těchto RNA-polymeráz:

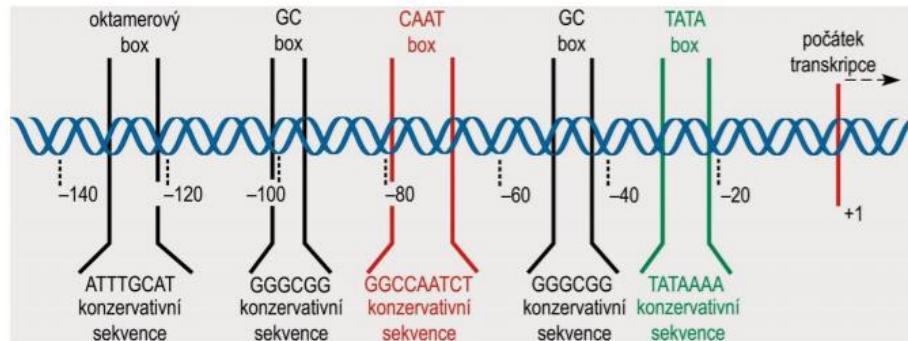
- **RNA-polymeráza I**, která katalyzuje syntézu pre-rRNA. Nachází se v jádru a není citlivá k  $\alpha$ -amanitinu Geny I. třídy
- **RNA-polymeráza II**, která katalyzuje syntézu hnRNA a některých malých rRNA. Je citlivá k  $\alpha$ -amanitinu. Vyskytuje se v karyoplazmě. Sestává přibližně z 10 protomerů, z nichž tři největší jsou homologické s protomery a, B a B' prokaryotické RNA-polymerázy. Protomer B váže volné ribonukleotidy, B' se váže k DNA a  $\alpha$  spojuje protomery navzájem. Ostatní protomery se neliší od protomerů polymeráz I a III. Geny II. třídy
- **RNA-polymeráza III**, která katalyzuje syntézu pre-tRNA, 5S-rRNA a některých malých RNA. Citlivost k  $\alpha$ -amanitinu je druhově specifická. Vyskytuje se v karyoplazmě. Geny III. třídy

Každá z uvedených tří RNA-polymeráz vyžaduje svůj specifický promotor, na který se váže. To je rozdíl proti prokaryotům, která mají jen jeden typ RNA-polymerázy (a jeden typ promotoru)

### 38) Elementy eukaryotického promotoru

## Elementy eukaryotického promotoru (Pol II)

- +1 (startovací nukleotid + Inr-element) - iniciátor
  - TATA-box (Hognessův b.) -34 až -26 - **TATA-box**
  - CAAT-box -75 až -80
  - GC-box -90
  - Oktamer ATTTGCAT
- } Elementy proti směru transkripcie  
} (upstream elements)



### 39) Obecné transkripční faktory

**Transkripční faktory** (TF) jsou **proteiny**, které se spolupodílejí na iniciaci **transkripce** (přepis dědičné informace z genu (z **DNA**) na **RNA**).

Váží se na jednotlivé elementy **promotoru**, čímž usnadňují vazbu příslušné **RNA-polymerázy**. **Prokaryotická RNA-polymeráza** ke své činnosti TF nevyžaduje, transkripce u **eukaryot** je na přítomnosti TF závislá.

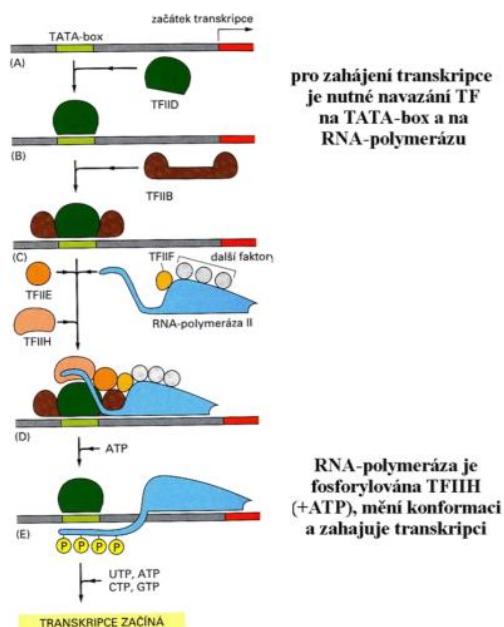
**obecné TF** – výskyt ve všech typech **buněk**

Sekvence DNA, na které se regulační proteiny váží – **kontrolní (responsivní) elementy** :

- **promotor** – část DNA v blízkosti genu (RNA sekvence bazí, které mají specifické vazební body pro RNA-polymerázu), která se podílí na regulaci jeho exprese (např. TATA box, CAT box)
  - *síla promotoru* – schopnost promotoru iniciovat transkripci, spočívá v afinitě oblasti promotoru k RNA-polymeráze. Na síle promotoru závisí frekvence transkripce přilehlého genu. Silné promotory mají sekvence v oblasti -35 a -10 (Pribnow box) shodné s konvenční sekvencí, čímž se od konvenční sekvence odlišují, tím je promotor slabší.
  - **operátor** – regulační oblast na DNA, která leží mezi promotorem a počátkem transkripce. Navázání aktivního represoru na operátor blokuje transkripcii a tím i expresi strukturních genů.
  - **enhancer** – sekvence DNA, která váže aktivační faktory
  - **silencer** – sekvence DNA, která váže inhibiční faktory

K obecným transkripčním faktorům při transkripcii pomocí **RNA polymerázy II** patří zejména proteiny **TFIIA**, **TFIIB**, **TFIIE**, **TFIIF** a **TFIIC**. Tyto se mnohdy účastní přímo na tvorbě **preiniciačního komplexu** (tzn. více či méně interagují s RNA polymerázou).

## Iniciace transkripce eukaryotních genů RNA-polymerázou II za účasti obecných transkripčních faktorů



### 40) Posttranskripční úpravy mRNA

## Posttranskripční úpravy hnRNA

### Úpravy konců

- 5'-konec: připojení čepičky (*angl. cap*)
- 3'-konec: polyadenylace

### Úpravy vnitřní sekvence

- Metylase
- Sestřih
- Editace (redakční úprava)

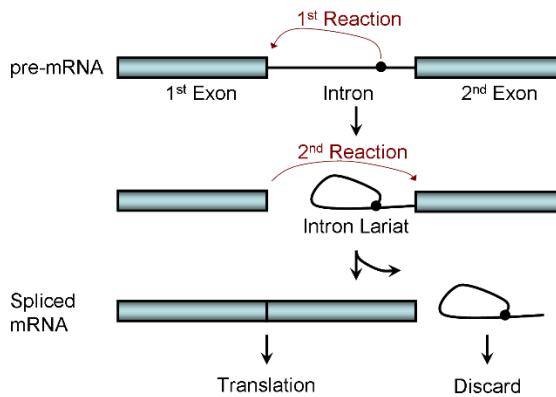
### 41) Sestřih a alternativní sestřih pre-mRNA

**Sestřih (splicing) – proces, při němž jsou odstraňovány introny**

**Intron: nekódující sekvence uvnitř genu**

Sestřih (splicing)

- ve většině genů eukaryot se nacházejí úseky, které neobsahují informaci nutnou pro funkci genového produktu – tzv. **introny** (části řetězce nekódující žádné aminokyseliny)
- naopak úseky nesoucí informaci pro funkci výsledného produktu se nazývají **exony**
- lasovitým stáčením* (pomocí snRNA je vytvořena smyčka, ve které je intron obsažen) primárního transkriptu dochází k **odstřízení intronů** – tzv. **sestřih** → kódující úseky (**exony**) jsou pak enzymaticky pospojovány do finálního řetězce a odstřízené **introny** jsou ihned odbourávány



**Alternativní splicing** (též **alternativní sestřih**) je jev, při němž díky různým variantám **splicingu** z jednoho genu vzniká více **bílkovinných** produktů. Po přepisu DNA v jádře prochází tzv. primární transkript RNA úpravami, v jejichž rámci se dlouhé nekódující úseky (**introny**) vystríhují a ostatní sekvence (tzv. exony) je možné spojit různými způsoby. Z výsledných několika RNA vytvořených od jednoho genu tak mohou být syntetizovány různé izoformy daného proteinu. To je právě způsob existence alternativního splicingu.

## 42) Samosestřih

### Samosestřih

1982: T. R. Cech (26S rRNA Tetrahymena, S. Altman (tRNA E. coli)- 1989 Nobelova cena

#### Autokatalytický proces sestřihu nevyžadující proteiny (*in vitro*)

**RNA schopná samosestřihu = ribozym**

- introny první skupiny v genech přepisovaných do mRNA, tRNA a rRNA (mitochondrie, chloroplasty, nDNA eukaryot, bakteriofágy)  
vyžadují externí G, *in vivo* nutná účast proteinů (maturáza)
- introny druhé skupiny v genech mitochondrií hub a v chloroplastech  
nevýžadují externí G (ale interní A), *in vivo* nutná účast proteinů, podobnost se sestřihem hnRNA

## 43) Význam intronů

## Biologický význam intronů

1. Regulace genové exprese (přítomnost dlouhých intronů zpomaluje transkripci a snižuje množství výsledného transkriptu).
2. Pozůstatek evoluce (různé exony v genu kódují různé funkční domény produktu – geny vznikaly fúzí exonů).
3. Zvýšení rychlosti rekombinace kódujících úseků různých genů – zrychlení procesu evoluce (proteiny / domény).
4. Alternativní sestřih: z jednoho genu více produktů.

*Některé eukaryotické geny neobsahují introny, tj. introny nejsou nezbytné pro normální genovou expresi (klonování cDNA)*

60

### Význam intronů

K čemu jsou tedy zdánlivě zbytečné části DNA potřebné? Svoji roli hrály zejména v počátku evoluce genů, často urychlovaly vznik nových bílkovin pomocí rekombinace exonů. Druhou výhodou je pak možnost tzv. *alternativního sestřihu* – místo vyštěpení jednoho intronu se může stát, že je jeden exon „přeskočen“, takže vyštěpená oblast obsahuje intron, exon a následující intron, na jehož konci je až rozpoznán konec oblasti pro splicing. Takto může vznikat na základě vývojového stadia buňky hned několik různých typů mRNA. Z jednoho genu tak může vznikat několik různých bílkovin. Vše závisí na spojení kódujících sekvencí – **exonů**.

Pokud dojde k mutacím v intronech, převážně v prvních nebo posledních dvou nukleotidech, nemusí dojít k rozpoznání konce nebo začátku intronu spliceosomem, takže může dojít k alternativnímu sestřihu. Například u proteinu [BRCA](#) jsou však známé i mutace 18 nukleotidů před koncem intronu, které způsobují aberantní sestřih.

Je pravděpodobné, že existoval společný předchůdce prokaryot a eukaryot, který introny obsahoval. V rámci evoluce se však jednotlivé skupiny oddělily. Prokaryota se vyznačují velkým počtem dělení. Kratší [genom](#) (tvořený pouze exony) je pro ně tedy výhodou. Dochází tak k urychlení procesu tvorby bílkovin. U eukaryot nedochází k tak častému dělení, a proto si nekódující části genomu zachovala. Větší genom přináší na druhé straně výhodu možné [rekombinace](#), gen složený z intronů a exonů pak má možnost alternativního sestřihu.

## 44) Editace RNA

### Editace RNA

**Editace RNA je jedna z posttranskripčních úprav, která byla zjištěna**

- V mitochondriích trypanozom,
- V mitochondriích *Physarum polycephalum*
- V mitochondriích strunatců,
- V mitochondriích vyšších rostlin
- U genu pro apolipoprotein u savců

## Editace RNA u různých organizmů

Organizmy	Organely	Způsob editace	Typ RNA
Trypanosoma Leischmania Crithidia	mitochondrie	inzerce U, delece U	mRNA
Rostliny	mitochondrie chloroplasty	substituce C za U, U za C substituce C za U	mRNA, rRNA
Savci	jádro	substituce C za U, A za G	mRNA

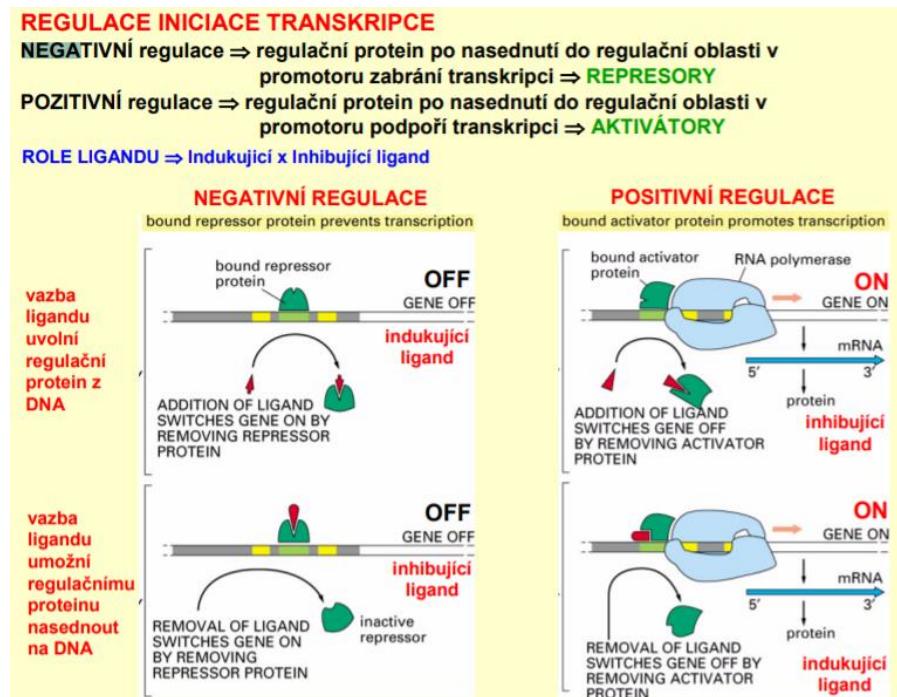
## Proč probíhá editace?

- Editace RNA byla běžná u prapůvodních buněk, u nichž byla řada reakcí katalyzována molekulami RNA a ne proteiny
- Primitivní mechanismus regulace genové exprese

### 45) Negativní a pozitivní regulace alternativního sestřihu

**Negativní genovou regulaci** (tj. „switch off, vypnutí“ genu) zajišťují represory – některé se váží na DNA pouze v nepřítomnosti specifického ligandu, po jeho navázání se promotor stane přístupným RNA-polymeráze. Jiné represory blokují transkripci v přítomnosti ligandu.

**Pozitivní genová regulace** – transkripcie inhibována vazbou ligandu na induktor, ale mnoho induktorů je aktivních jen při vazbě ligandu.



## 46) Biologický význam intronů

### Biologický význam intronů

1. Regulace genové exprese (přítomnost dlouhých intronů zpomaluje transkripci a snižuje množství výsledného transkriptu).
2. Pozůstatek evoluce (různé exony v genu kódují různé funkční domény produktu – geny vznikaly fúzí exonů).
3. Zvýšení rychlosti rekombinace kódujících úseků různých genů – zrychlení procesu evoluce (proteiny / domény).
4. Alternativní sestřih: z jednoho genu více produktů.

*Některé eukaryotické geny neobsahují introny, tj. introny nejsou nezbytné pro normální genovou expresi (klonování cDNA)*

60

## 47) Translace definice

### Translace - překlad genetické informace

#### Složky translačního aparátu:

- mRNA
- 20 standardních aminokyselin (+ SeCys. Pyrrolyzin))
- molekuly tRNA
- aminoacyl-tRNA-syntetázy
- ribozomy
- translační faktory: IF, EF, RF
- ATP, GTP

**Translace** neboli **proteosyntéza** je překlad **nukleotidové** sekvence **mRNA** do sekvence **aminokyselin** **proteinu**. Proces probíhá na **ribosomech** a jednotlivé aminokyseliny jsou zařazovány podle pravidel **genetického kódu**.

Pro translaci jsou zapotřebí:

- **mRNA;**
- **tRNA z cytoplazmy;**
- **enzymy** podmiňující jednotlivé reakce (eIF, **GTP**, **ATP**, **aminokyseliny** atd.).

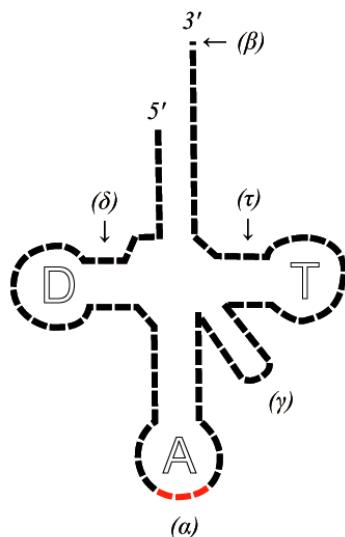
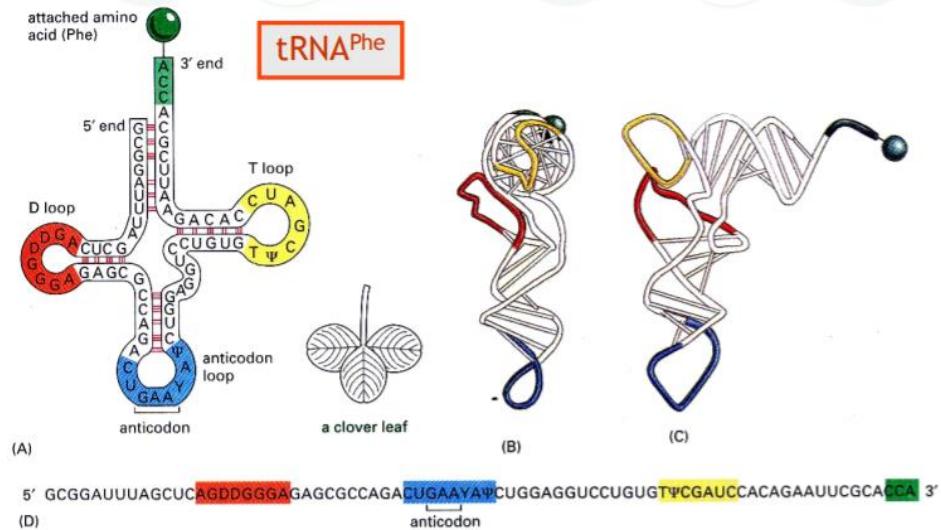
## 48) struktura molekuly tRNA

**tRNA** neboli **transferová RNA** je druh **RNA** v buňce, která se podílí na **proteosyntéze** tím, že připojuje specifickou **aminokyselinu** do rostoucího **polypeptidového** řetězce při **translaci**. Tím dochází k překladu sekvence nukleotidů v nukleových kyselinách do sekvence aminokyselin v proteinech. Každá aminokyselina má minimálně

jednu tRNA. tRNA je složena zhruba z 80 nukleotidů; při posttranskripčních úpravách dochází k modifikaci kolem 17 % bází tRNA.

tRNA má primární strukturu (danou sekvencí nukleotidů), sekundární strukturu (danou interakcemi mezi jednotlivými částmi molekuly tRNA) a tertiární strukturu (což je trojrozměrné uspořádání molekuly tRNA).

## Struktura molekuly tRNA

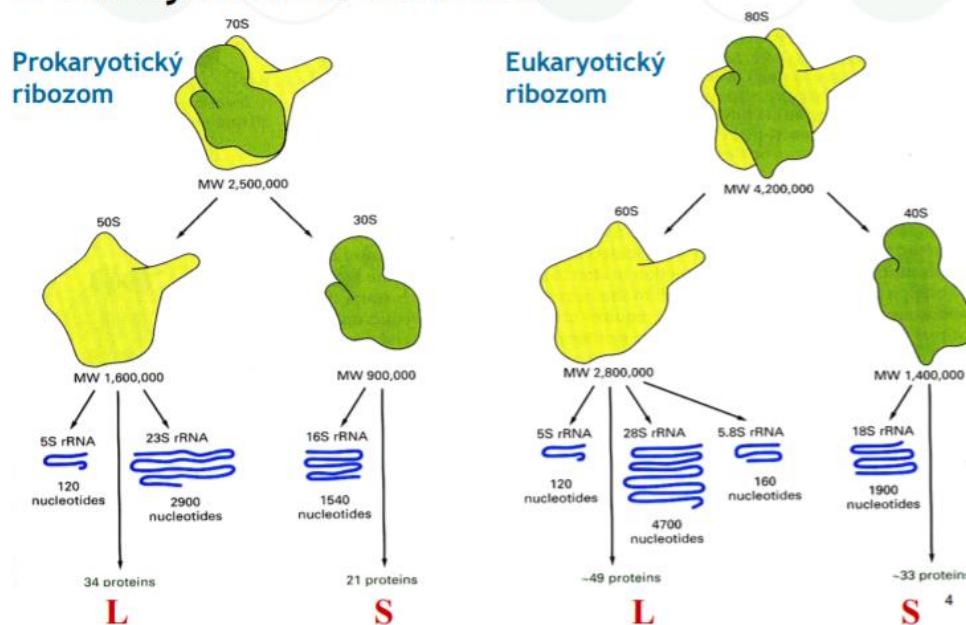


**tRNA:** T - TΨC rameno, D - D rameno, A - antikodonové rameno s červeně vyznačeným antikodonem,  $\gamma$  - extra rameno;  $\beta$  - místo koncové sekvence -CCA. Číslování nukleotidů je od 5' konce po 3' konec

49)

## Pro a eukryotický ribozom

## Srovnání struktury prokaryotického a eukaryotického ribozomu



Ribozom je ribonukleoprotein nacházející se ve vysokých počtech v cytoplazmě všech známých buněk, u eukaryot také na povrchu hrubého endoplazmatického retikula. Jejich funkcí je tvorba proteinů – bílkovin. Probíhá na nich tzv. translace, při níž je z řetězce RNA syntetizován polypeptid.

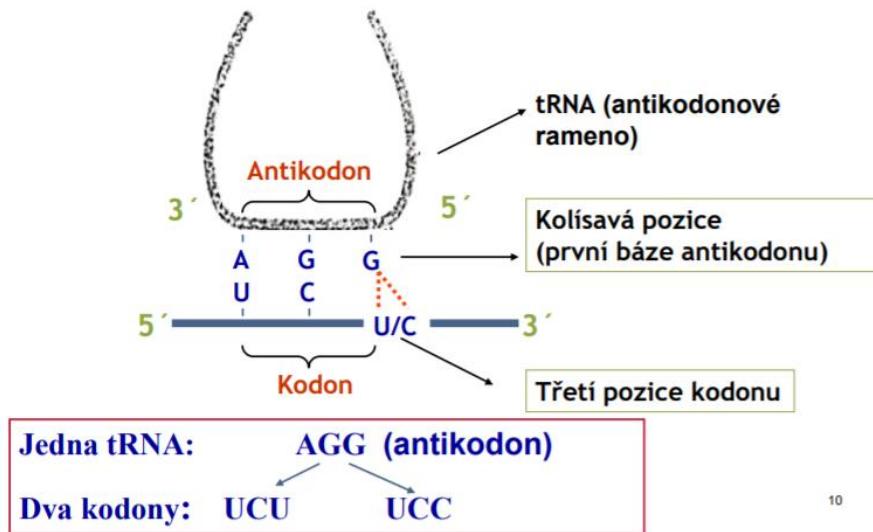
Ribozomy jsou poměrně velké komplexní struktury složeny z rRNA a proteinů. Dělí se na dvě podjednotky, menší a větší. K ribozomu se napojuje mediátorová RNA (mRNA), která obsahuje přepis genetické informace např. z jaderného genomu. Podle pořadí trojic bází v této genetické informaci přichází k ribozomu na základě genetického kódu jednotlivé aminokyseliny napojené na tRNA; tyto aminokyseliny jsou následně díky katalytickým vlastnostem ribozomu spojeny v jeden polypeptid, resp. protein, který pak (někdy po jistých úpravách) vykonává svou funkci v organizmu.

Ribozom se ze dvou třetin skládá z ribonukleové kyseliny (konkrétně tzv. rRNA, tedy ribozomální RNA), jen z jedné třetiny pak z různých proteinů. Všechny organismy mají stavbu ribozomů podobnou. Například základní rozdělení části ribozomu je vždy na dvě části, malou a velkou podjednotku. Přesto však lze zejména mezi prokaryotickým a eukaryotickým ribozomem nalézt určité rozdíly ve stavbě.

Rozdíly mezi ribozomy se velmi často udávají pomocí tzv. sedimentačního koeficientu, tedy veličiny, která udává čas, za který proběhne v ultracentrifuze sedimentace ribozomu. Jednotkou je Svedberg (S), tato jednotka představuje čas  $10^{-13}$  sekundy. Prokaryotický ribozom se na základě těchto veličin označuje jako 70S, eukaryotický je 80S. Také obě podjednotky vykazují určité rozdíly, pokud se srovnávají sedimentační koeficienty eukaryotických a prokaryotických ribozomů. Malá podjednotka prokaryot má koeficient 30S, u eukaryot je tato podjednotka 40S. Velká podjednotka ribozomu je u prokaryot 50S, u eukaryot 60S.

## 50) Kolísavé párování bazí na 5'antikodonu tRNA

## Kolísavé párování bazí na 5' antikodonu tRNA



**Antikodon** je trojice nukleotidů nacházející se v molekule transferové RNA (tRNA), která umožňuje specifické navázání tRNA na komplementární trojici bází (tzv. kodon) na mRNA molekule. Vazba antikodonu na kodon je jedním ze základních principů čtení genetického kódu a je podmínkou správné translace (syntézy proteinů) na ribozomu.

Někdy je antikodon zcela komplementární k dané unikátní sekvenci tří nukleotidů (tripletu) na odpovídajícím kodonu. Velmi často však jeden antikodon rozeznává několik různých tripletů. Tyto triplety se přitom liší na poslední pozici kodonu: příkladem je antikodon AAG<sub>n</sub>, který rozeznává kodony UUU a UUC. Tato třetí pozice je tedy cílem jevu, který se označuje jako wobbling. Mnohdy se na 5' pozici kodonu vyskytují modifikované báze, jako je hypoxantin nebo methylguanin, které mají jiné párovací vlastnosti. Platí, že adenin na antikodonu se může párovat s uracilem, cytosin na antikodonu s guaninem, ale guanin antikodonu se může párovat s cytosinem a uracilem, uracil s adeninem a guaninem a inosin na wobble pozici antikodonu může párovat s cytosinem, adeninem a uracilem (viz tabulka).

Wobble báze antikodonu	Komplementární báze na kodonu
A	U
C	G
G	C, U
U	A, G
I	C, A, U

Poznámka: Adenin se ale téměř na wobble pozici antikodonů nevyskytuje.

## 51) Mimoribozómová etapa translace

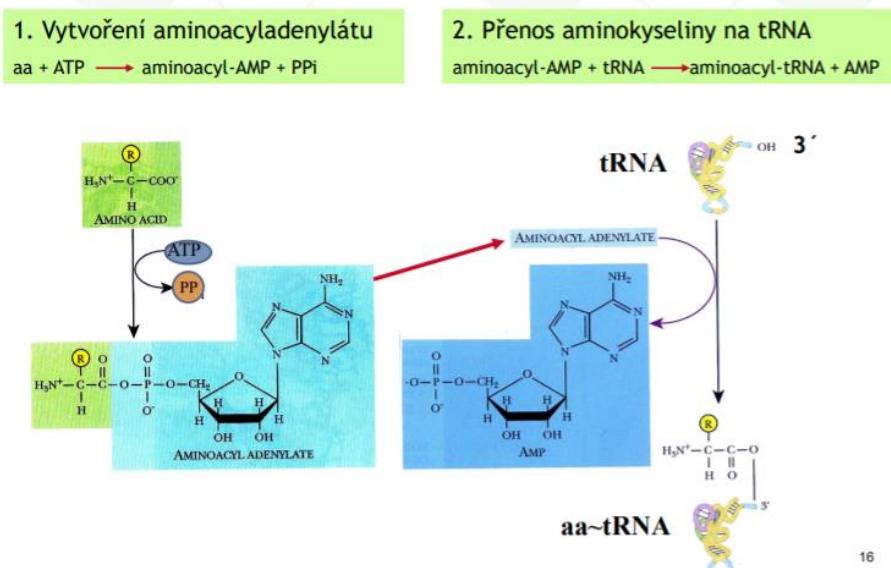
## Translace probíhá ve dvou etapách:

1. mimoribozomové (připojení aminokyseliny k její tRNA pomocí aminoacyl-tRNA-syntetázy)
2. ribozomové (na ribozomech jsou přiřazovány aminokyseliny podle sledu kodonů)

Ribozomová etapa má tři fáze:

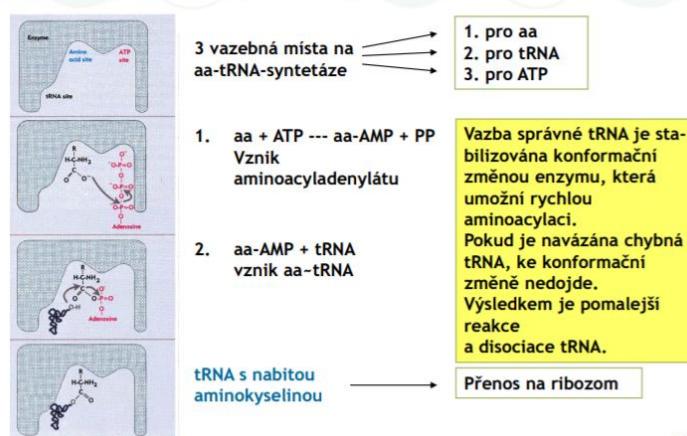
1. Iniciace translace
2. Elongace polypeptidového řetězce
3. Terminace translace

### 1. Mimoribozomová etapa: Nabíjení tRNA aminokyselinou



16

### Vznik aminoacyl-tRNA působením aminoacyl-tRNA-syntetázy



17

## 52) Ribozomová etapa translace

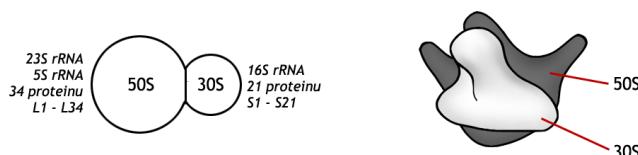
## Ribozomová etapa translace - 3 fáze

1. Iniciace translace – vazba mRNA a první aa-tRNA na ribozom
2. Elongace polypeptidového řetězce – průběžné přiřazování aminokyselin do rostoucího polypeptidového řetězce podle kodonů na mRNA
3. Terminace translace – zakončení syntézy polypeptidového řetězce, odpoutání mRNA z ribozomu a jeho rozpad na podjednotky

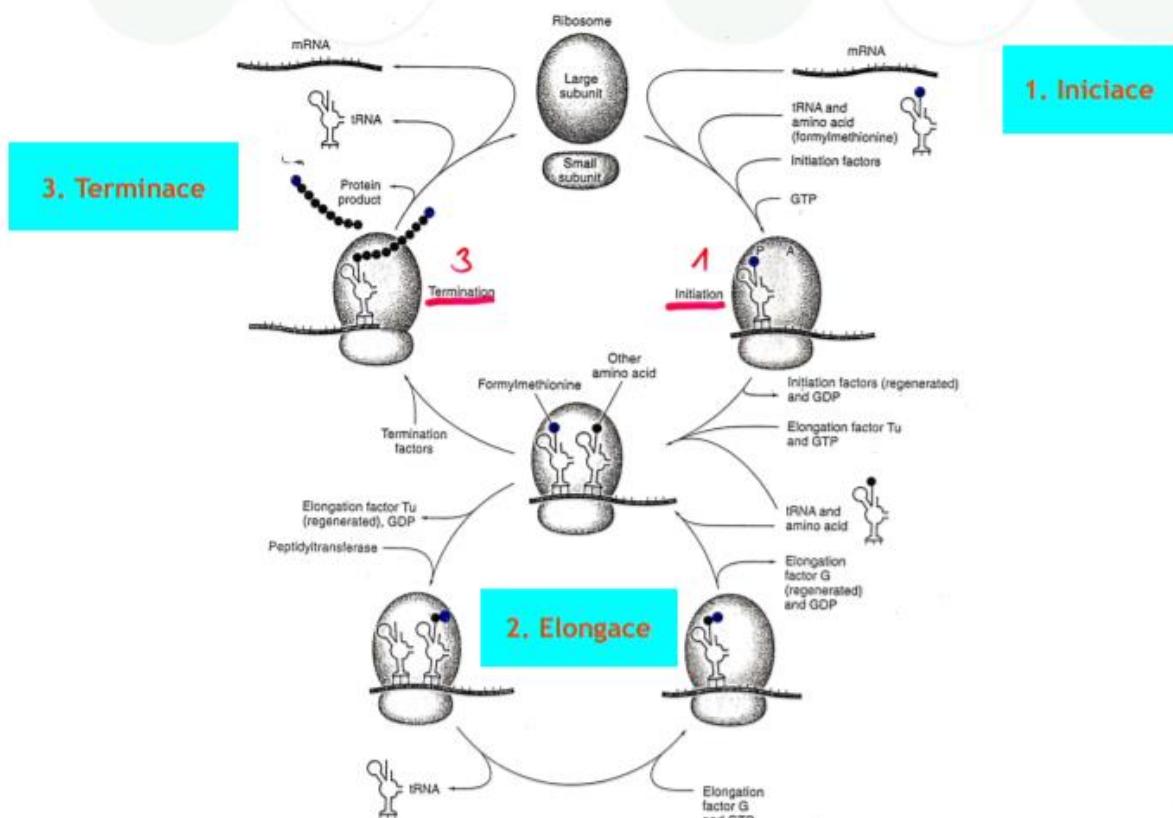
### 53) Translační faktory u prokaryot

IF1, IF2, IF3

Struktura ribozomu



## Tři fáze translace u prokaryot



20

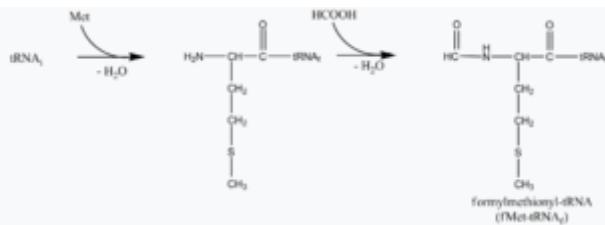
## 1. Iniciace translace

Syntéza peptidového řetězce je u bakterií zahajována vytvořením **iniciačního komplexu**, skládajícího se z podjednotky 30S, mRNA a **iniciační aa-tRNA**, což u bakterií je **N-formylmethionyl-tRNA** (fMet-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>). Tato aa-tRNA se váže na mRNA s iniciačním kodonem AUG (někdy též GUG, čteným jako signál pro Met). Na mRNA byl objeven úsek před iniciačním kodonem (**Shineova–Dalgarnova sekvence**), který je komplementární k 3'-konci 16S rRNA. Asociace mRNA s 16S rRNA přispívá ke správné lokalizaci mRNA na ribosomu.

Iniciační komplex se tvoří tak, že na podjednotku 30S se nejdříve navážou proteinové iniciační faktory IF1, IF2 a IF3. Připojení GTP k IF2 umožní vazbu tohoto komplexu s mRNA a iniciační Met-tRNA. Vznikne iniciační komplex 30S.mRNA.IF1.IF2.fMet-tRNA.GTP. K němu se pak naváže ribosomální podjednotka 50S. Současně se uvolní faktory IF1, IF2, IF3 a hydrolyzuje se GTP na GDP a fosfát.

fMet-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> obsadí na ribosomu tzv. **peptidylové místo P**. Další, **aminokyselinové místo A**, je určeno k vazbě další aa-tRNA, odpovídající kodonu následujícímu za AUG.

Methionin je formylován **transformylasou** za účasti N<sup>10</sup>-formyltetrahydrolistové kyseliny a to až po navázání aminokyseliny na iniciační tRNA<sub>f</sub> Met-tRNA<sub>m</sub>, zařazující methionin dovnitř peptidového řetězce, je poznávána též kodonem AUG, při translaci se váže na aminokyselinové místo ribosomu a není formylována. Popsaná modifikace iniciační Met-tRNA není známa u eukaryot.



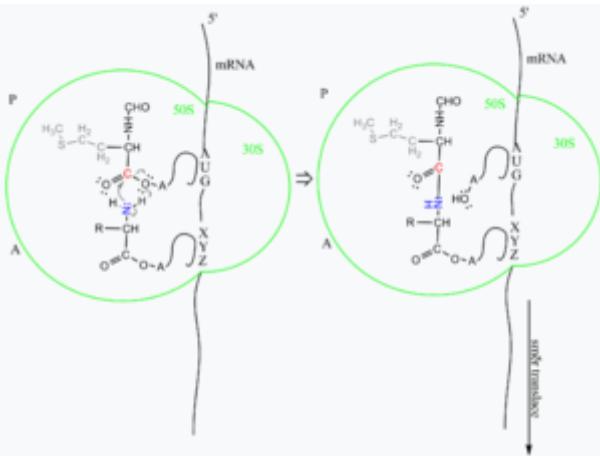
## 2. Elongace peptidu

Prodlužování syntézovaného peptidu probíhá ve třech krocích:

**1. fáze: Navázání další aa-tRNA na aminoacylové místo ribosomu.** Tato aminoacyl-tRNA je vybrána kodonem nacházejícím se v tomto místě. Na ribosom je dopravena v komplexu s proteinovým elongačním faktorem EF-Tu, vázajícím GTP. Při předání aa-tRNA se GTP hydrolyzuje a EF-Tu se uvolní z ribosomu. Na EF-Tu.GDP se připojí elongační faktor EF-Ts a změní konformaci komplexu natolik, že se GDP uvolní. Regenerovaný EF-Tu může po vazbě s novým GTP vstoupit do dalšího cyklu. EF-Tu nereaguje s f-Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>. Proto se tato aa-tRNA nenavazuje na aminoacylové místo. EF-Tu však váže Met-tRNA a zajišťuje tak zařazení methioninu dovnitř řetězce.

Při hydrolyze GTP a uvolňování EF-Tu-GDP z ribosomu se konformace faktoru mění v blízkosti právě navázané aa-tRNA natolik, že jen aa-tRNA pevně a přesně vázaná na antikodon a aminoacylové místo se neuvolní. Pokud je omylem zařazena nesprávná aa-tRNA se slabšími vazbami, je v této fázi translace opět uvolněna. Faktor EF-Tu udává rychlosť (krok) celé translaci.

Protein EF-Tu patří do velké a fylogeneticky staré rodiny proteinů G, které jsou mimo jiné součástí mechanismu hormonální regulace.

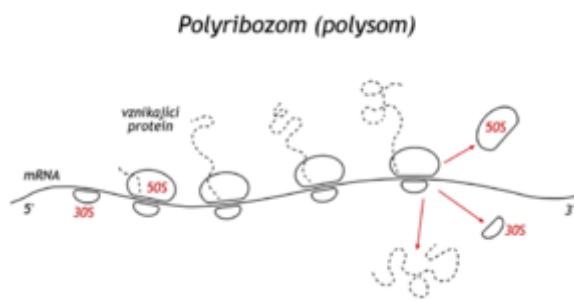


Translace (elongace peptidu)

**2.fáze: Tvorba peptidové vazby (transpeptidace).** Vznik peptidové vazby je katalyzován **peptidyltransferasou**, která je součástí podjednotky 50S. V podstatě jde o nukleofilní ataku skupiny dusíku 2-NH<sub>2</sub> skupiny připojované aminokyseliny (aa-tRNA na místě A) na karboxylový uhlík f-Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> nebo peptidyl-tRNA, nacházející se na místě P. Mezi zúčastněnými aminokyselinami se vytvoří peptidová vazba a zároveň se rozštěpí esterová vazba mezi aminokyselinou a tRNA na místě P. Na místě A tak vznikne peptidyl-tRNA. Jinak řečeno, peptidyl se přenese z předchozí tRNA na skupinu NH<sub>2</sub> následující aa-tRNA, čímž se řetězec prodlouží o jednu aminokyselinu. Z toho vyplývá, že **peptidový řetězec roste od N-konce k C-konci**.

**3.fáze: Translokace** je pochod, při kterém se volná tRNA z peptidylového místa uvolní a mRNA se posune o 3 nukleotidy (o jeden kodon), takže peptidyl-tRNA se dostane z místa A na místo P. K posunu je třeba elongační faktor EF-G s navázaným GTP, který patří mezi zmíněné proteiny G jako EF-Tu. Hydrolýzou GTP se EF-G z ribosomu uvolní. Na volné místo A se může navázat další aa-tRNA a cyklus se opakuje. Tímto způsobem se mRNA posunuje po ribosomu, z něhož se zároveň odvíjí rostoucí polypeptidový řetězec.

### 3. Terminace translace

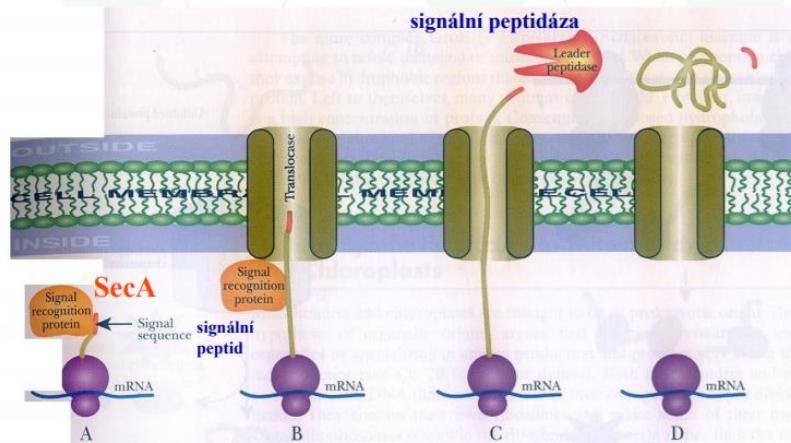


Polyribozom

Ribosom se během syntézy polypeptidu posune k **terminátoru**, tj. kodonu, signalizujícímu ukončení translace. Je to kodon UAG, UAA nebo UGA. Žádný z nich nekóduje zařazení nějaké aminokyseliny do peptidu, tyto kodony rozpozná některý z proteinových **uvolňovacích terminačních faktorů (releasing factors)**. Faktor RF1 pozná UAA a UAG, RF2 pak UGA a UAA. Po navázání faktoru na ribosom se peptidyl-tRNA přesune z místa A na místo P. Specifita peptidyltransferasy se změní natolik, že přepojí peptidyl na molekulu vody místo na 2-NH<sub>2</sub> další aa-tRNA. Jinak řečeno, hotový peptid se hydrolyticky uvolní od poslední tRNA. Uvolní se tRNA a mRNA a ribosom se rozpadne na podjednotky 50S a 30S. Iniciační faktor IF3 se ihned naváže na 30S a tak zabrání reasociaci ribosomu, který by byl nefunkční, neboť neobsahuje mRNA. Jednotlivé složky se mohou účastnit tvorby nového iniciačního komplexu a zahájit nový cyklus. Na jediné mRNA je simultánně navázáno několik ribosomů, které po řetězci mRNA postupují v určitém odstupu a na každém z nich probíhá syntéza jednoho peptidu. Celý útvar se nazývá **polyribosom**, též **polysom**. Tímto způsobem se mRNA využívá velmi efektivně.

## 54) Kotranslační export proteinů u bakterií

### Kotranslační export proteinů u bakterií



**Kotranslační translokace** je proces přesunu komplexu překládajícího mRNA z volné cytoplasmy na membránu drsného endoplasmatického retikula (ER) a následného směrování syntetizovaného polypeptidu skrze membránu endoplasmatického retikula. Tímto procesem prochází prakticky všechny proteiny, které jsou sekretovány do mezibuněčného prostoru klasickou cestou sekrece, jsou ukotveny na cytoplasmatické membráně, případně jsou určeny pro vnější stranu cytoplasmatické membrány nebo obsah endoplasmatického retikula, Golgiho komplexu, endozomu, lysozomu a dalších složek endomembránového systému.

**Endoplazmatické retikulum (ER)** je soustava vzájemně propojených miniaturních membránových cisteren a kanálků, která se nachází v cytoplazmě drtivé většiny eukaryotních buněk. Napojuje se na buněčné jádro a obvykle i na Golgiho aparát.

- Endoplazmatické retikulum zvětšuje vnitřní povrch buňky, což má velký význam pro metabolické procesy. Rozlišujeme
- drsné (nebo hrubé) ER, na jehož vnějším povrchu jsou přisedlé ribozomy, a
  - hladké ER bez přisedlých ribozomů.

Drsná část endoplazmatického retikula se specializuje na syntézu některých bílkovin a procesy s tím související, jako je skládání těchto proteinů a jejich oligomerizace či navěšování jistých cukerných zbytků na tyto bílkoviny. V drsném ER také probíhá rozklad špatně sbalených či poškozených bílkovin – mechanismus za to zodpovědný se označuje jako ER-asociovaná degradace proteinů.<sup>[1]</sup>

V hladkém endoplazmatickém retikulu se odehrávají zcela odlišné procesy – odstraňování toxicických (odpadních) látek, některé části metabolismu lipidů a metabolismu hemu. Dále se mohou z hladkého ER regulovaně uvolňovat vápenaté ionty.<sup>[1]</sup>

Translace proteinů určených k sekreci začíná v cytosolu na volných proteinech, dokud se nenasyntetizuje N-koncová signální sekvence. Syntéza probíhá dokud není signální sekvence rozeznána signál rozeznávající částicí (SRP), která se naváže na signální sekvenci a pozastaví syntézu proteinů v elongační fázi, dokud nedojde k připojení na membránu endoplazmatického retikula<sup>[1]</sup> (nebo na cytoplazmatickou membránu v případě bakterií). Endoplazmatické retikulum je rozeznáno vazbou mezi SRP a SRP receptorem, který je připojený na translokon (specifický membránový kanál) Sec61, který je homologní s bakteriálním translokonem SecY, který navádí SRP na bakteriální membránu.<sup>[2]</sup> Pokud se v sekvenci rostoucího polypeptidu objeví kotvící sekvence, dojde k přerušení translokace, a protein je ukotvený do membrány a vzniká transmembránový protein, jinak projde celý dovnitř lumen endoplazmatického retikula.

### **Signální peptid**

Signální peptid (nebo také signální či vedoucí sekvence nebo peptid) zodpovědný za kotranslační translokaci nově tvořeného proteinu je malý peptid s délkou kolem 5-30 aminokyselinových zbytků, který je umístěn na N-konci proteinů. Jádro signálního peptidu tvoří dlouhý úsek hydrofóbních aminokyselin, které mají tendenci vytvářet alfa-helix. Kromě toho má řada signálních peptidů krátký úsek pozitivně nabitéch aminokyselin, které pomáhají určit správnou topologii vkládaného proteinu: translokon zajišťuje, aby byl vložen signální peptid tak, že pozitivně nabité aminokyseliny směřují dovnitř buňky.<sup>[3]</sup> Na konci signálního peptidu je v typickém případě sekvence rozeznávaná a štěpena signální proteázou.

### **Signál rozeznávající částice**

Signál rozpoznávající částice (SRP, signal recognition particle) rozeznávající signální peptid je velký komplex složený z RNA a bílkovin, jedná se tedy o ribonukleoprotein. Jeho velikost je 325 kilodaltonů a zahrnuje 7SL RNA o délce 300 nukleotidů a šest různých polypeptidů.

## **55) Posttranslační procesy**

# **Posttranslační procesy**

### **1. Kotranslační úpravy**

- \* deformylace
- \* odštěpení aminokyselin z N-konce aminopeptidázou
- \* chemické modifikace aminokyselin (hydroxylace, fosforylace, acetylace, aj.).
- \* tvorba disulfidových můstků - vznik terciární struktury
- \* připojení cukerných zbytků (oligosacharidů) - glykozylace, vznik glykoproteinů
- \* vznik sekundární a terciární struktury

### **2. Posttranslační úpravy**

- \* vyštěpení peptidů (proinsulin > insulin)
- \* tvorba kvarterní struktury (spojování protomerů do aktivních oligomerů)
- \* přidání prostetických skupin, koenzymů apod. (hemoglobin)
- \* posttranslační štěpení polyproteinů (polypeptidový prekursor > peptidy, např. ACTH)
- \* proteinový sestřih (vyštěpení IVPS - intervening protein sequence), vytvoření nové peptidové vazby

### **3. Sestavování oligomerních proteinů a nadmolekulárních struktur**

(nekovalentní interakce mezi rozpoznávacími místy polypeptidových řetězců)

- \* tvorba organel (membrány aj)
- účast chaperonů a chaperoninů při sestavování struktur

### **4. Samosestavování (spontánní seskupení proteinových podjednotek)**

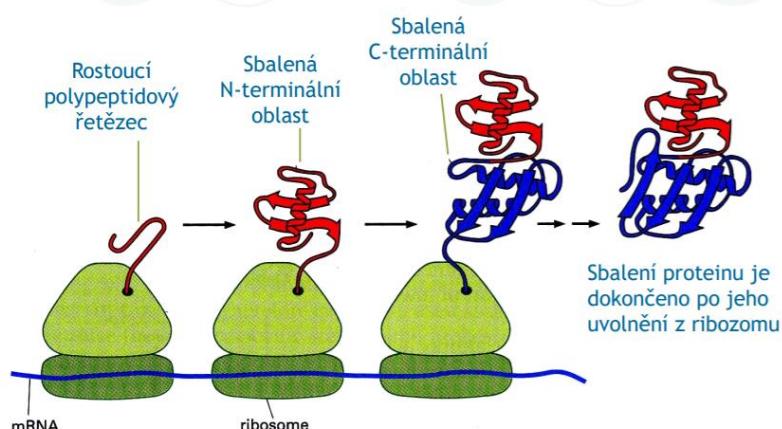
- \* ribozomy
- \* morfogeneze virů (sestavení virových kapsidů)

## **56) Sbalování proteinů a chaperony**

## Průběh vzniku funkčního proteinu

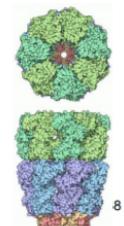


### Kotranslační sbalování proteinu



## Molekulární chaperony/chaperoniny

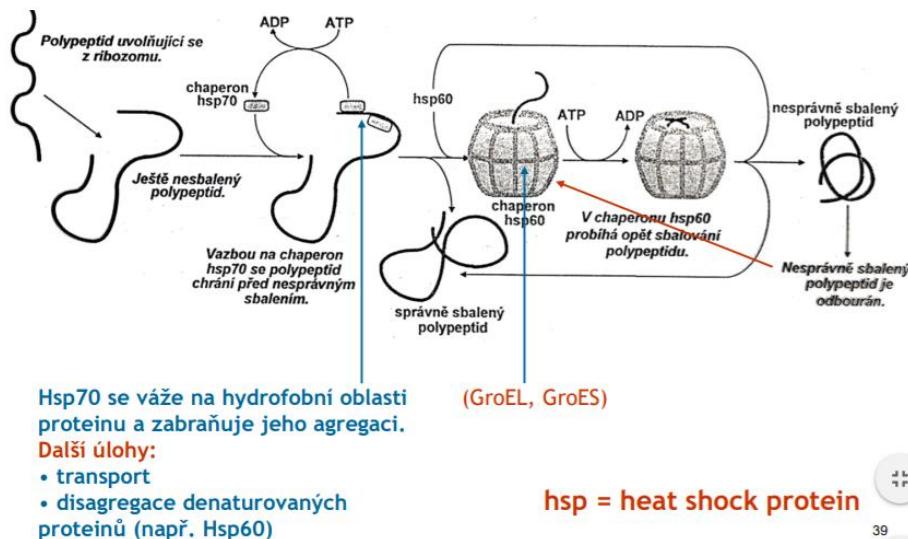
- speciální skupina proteinů podílejících se na sbalování polypeptidů (**zabraňují chybnému sbalování**)
- **hlavní rodiny chaperonů:** proteiny hsp60 a hsp70
  - **hsp70:** rozpoznávají krátké úseky polypeptidu tvořené hydrofobními aminokyselinami **během** jeho syntézy na ribozomu
  - **Hsp60 (GroE; Hsp60/Hsp10):** vytvářejí soudkovité struktury, v nichž se upravují **kompletně nasyntetizované** proteiny



Syntéza chaperonů nastává při buněčném stresu jako např. změnách teploty, chladu, vlivem detergens, změnou pH, iontové síly, účinkem toxických látek a snad i některých potravin. Syntézou chaperonů se tedy buňka brání denaturačním účinkům stresových faktorů.

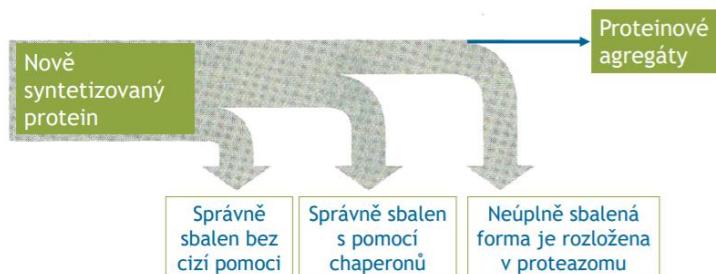
Sbalování umožňuje polypeptidovému řetězci zaujmout biologicky aktivní strukturu.

## Účast chaperonů na procesu sbalování proteinů

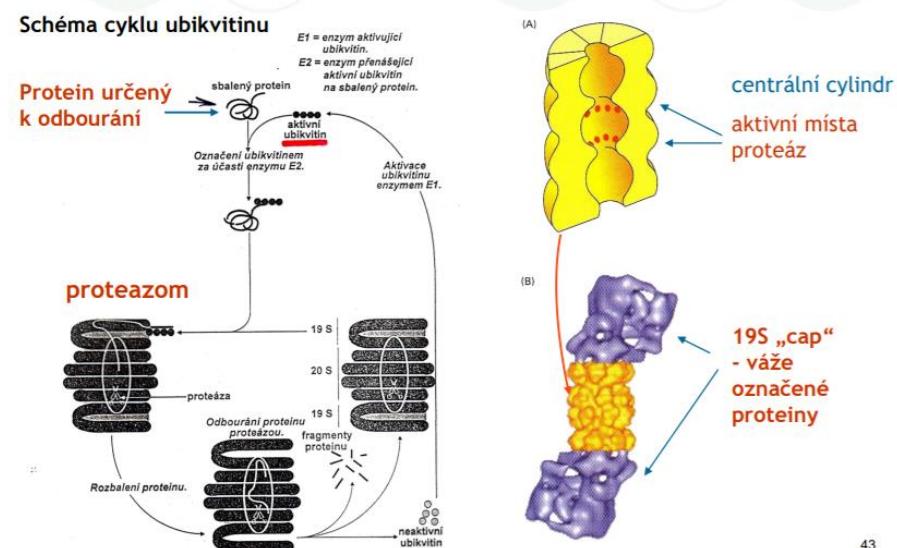


## 57) Odbourávání proteinů u eukaryot

Buněčné mechanismy monitorující kvalitu proteinů po translaci



### Odbourávání proteinů v proteazomech (eukaryota)



Prostřednictvím proteazomů jsou také degradovány defektní proteiny, které se buňce nepodařilo syntetizovat správně (asi 30% všech nativních proteinů v buňce) a jejichž likvidace probíhá ihned během translace nebo krátce po ní<sup>11</sup>. Jsou-li nově syntetizované defektní proteiny umístěny v endoplazmatickém retikulu (ER) – a zde jde především o proteiny špatně poskládané do terciárních struktur – podléhají procesu, v němž proteazomy spolupracují s ER a který se nazývá **ERAD** (endoplasmic reticulum-associated degradation). Během ERADu je nesprávně poskládaný protein nejprve označen specifickým kódem (jedná se o glykany), pak je transportován přes membránu ER do cytozolu a degradován přilehlými proteazomy<sup>12</sup>.

58)

## Regulace genové exprese

### Regulace (kontrola) genové exprese

**Mechanismy, zajišťující expresi genů ve správnou dobu a na správném místě (časoprostorová regulace).**

**Odpovědi na signály z prostředí nebo signály z jiných buněk, tkání a orgánů**

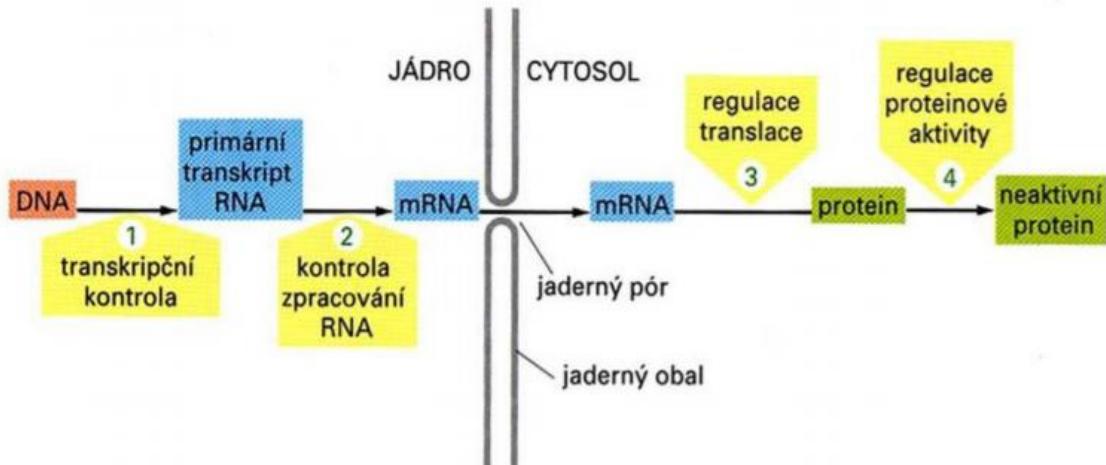
### Roviny kontroly genové exprese

1. Kde a jak často je daný gen transkribován (**transkripční kontrola**)
2. Jak je primární transkript sestřížen (**kontrola posttranskripční - sestřihová**)
3. Výběr RNA, které budou transportovány z jádra do cytoplazmy (**kontrola transportu RNA**)
4. Výběr mRNA, které budou překládány na ribozomech (**translační kontrola**)
5. Selektivní destabilizace určitých mRNA v cytoplazmě (**degradace mRNA**)
6. Selektivní aktivace, inaktivace a kompartmentizace specifických proteinů poté, co byly nasynthetizovány (**kontrola proteinové aktivity - posttranslační kontrola, transport**)

59)

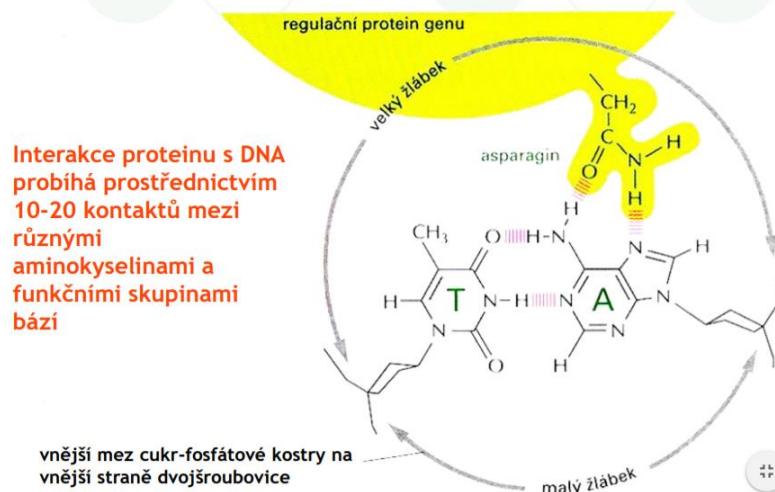
## Úrovně kontroly exprese genů u eukaryot

# Úrovně kontroly exprese genů u eukaryot

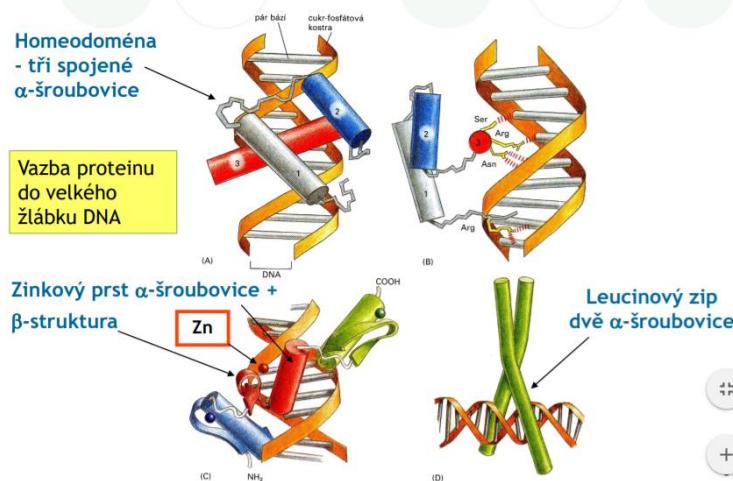


## 60) Vazba regulačního proteinu a DNA-vazebné motivy proteinů

### Vazba regulačního proteinu na DNA



### DNA-vazebné motivy proteinů (DBD domény)



## DNA-vázající doména (DNA-binding domain, DBD)

- váže se na specifické sekvence DNA, tzv. **responzivní elementy** (enhancer, [promotor](#)) sousedící s regulovanými geny

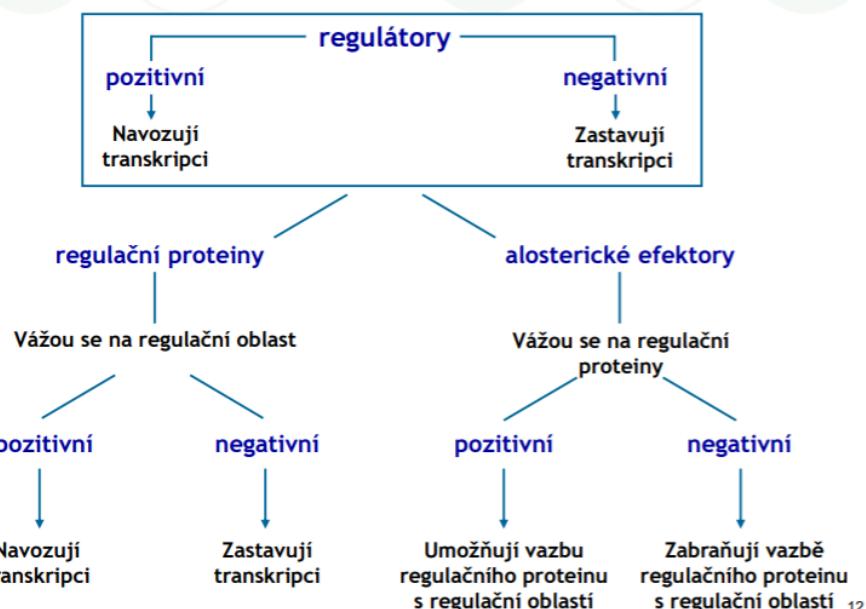
Přímo na operátor nebo jeho interakcí s metabolickými katabolickými produkty - Regulace.

Motivy:

- Homeodoména - 3 alfa šroubovice
- Zinkový prst - alfa šroubovice + beta struktura
- Leucinový zip - 2 alfa šroubovice

## 61) Klasifikace regulátorů

### Klasifikace regulátorů



## 62) Princip pozitivní a negativní regulace transkripce

### Negativní a pozitivní kontrola transkripce regulace

#### Negativní kontrola

Aktivní regulační protein vypíná transkripcí

Regulační protein = transkripční represor

Promotor je funkční po odstranění represoru

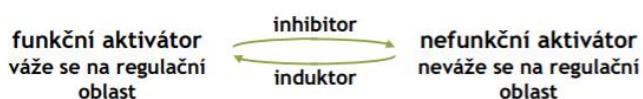


#### Pozitivní kontrola

Aktivní regulační protein zapíná transkripcí

Regulační protein = aktivátor transkripce

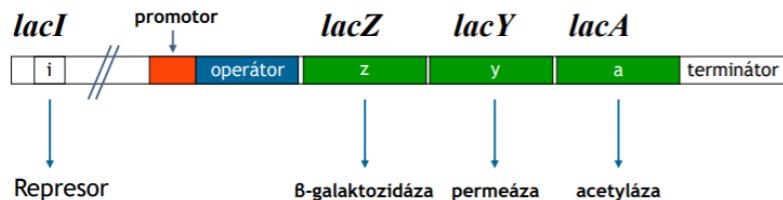
Promotor je funkční pouze po aktivaci, která umožní zahájit transkripcí



## 63) Laktozový operon *Escherichia coli*

## Příklad regulovatelného operonu

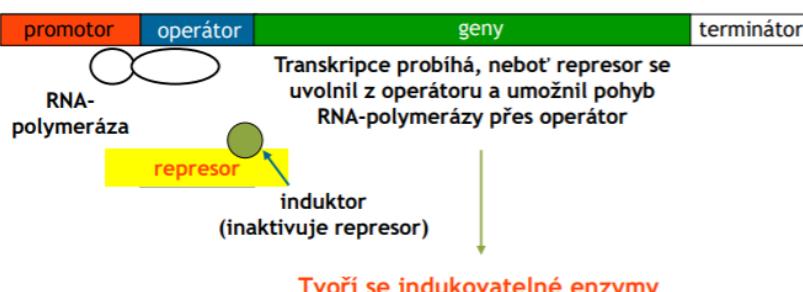
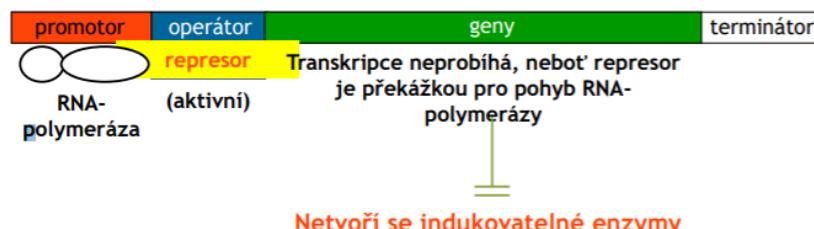
### Laktozový operon *Escherichia coli*



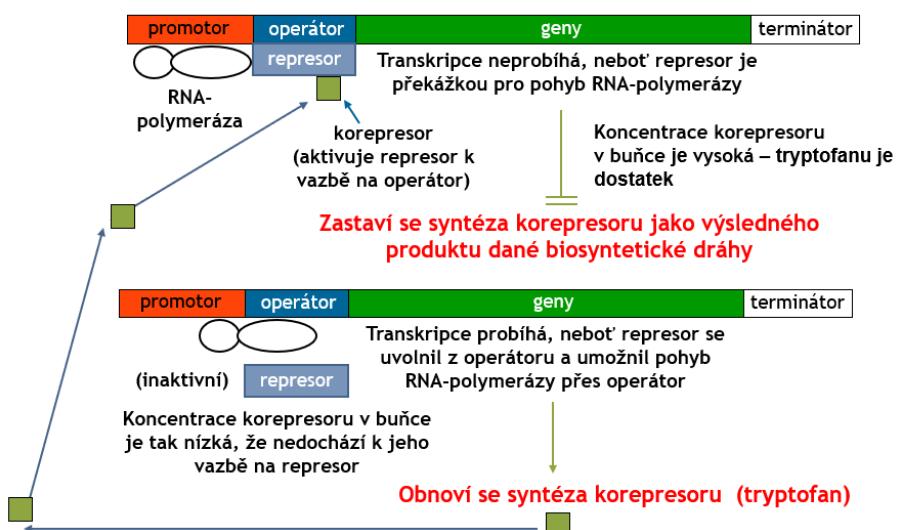
Všechny enzymy jsou indukovatelné laktózou (alolaktózou)

β-galaktozidáza konvertuje laktózu na alolaktózu, která působí jako induktor

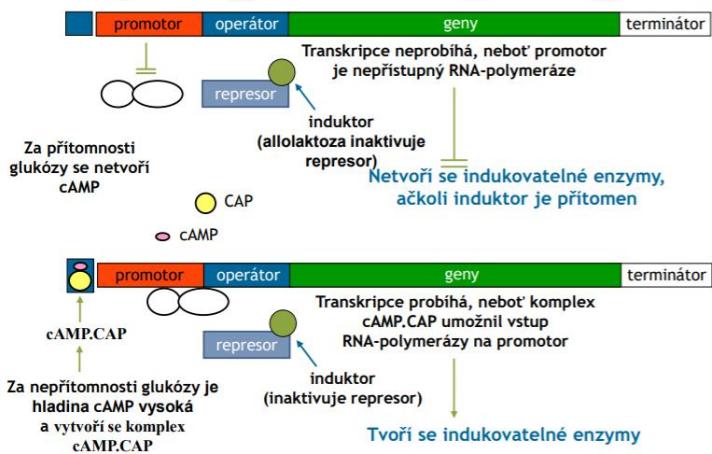
### Negativní regulace laktózového operonu v rámci enzymové indukce



### Negativní regulace operonu (např. tryptofanového) v rámci enzymové represe

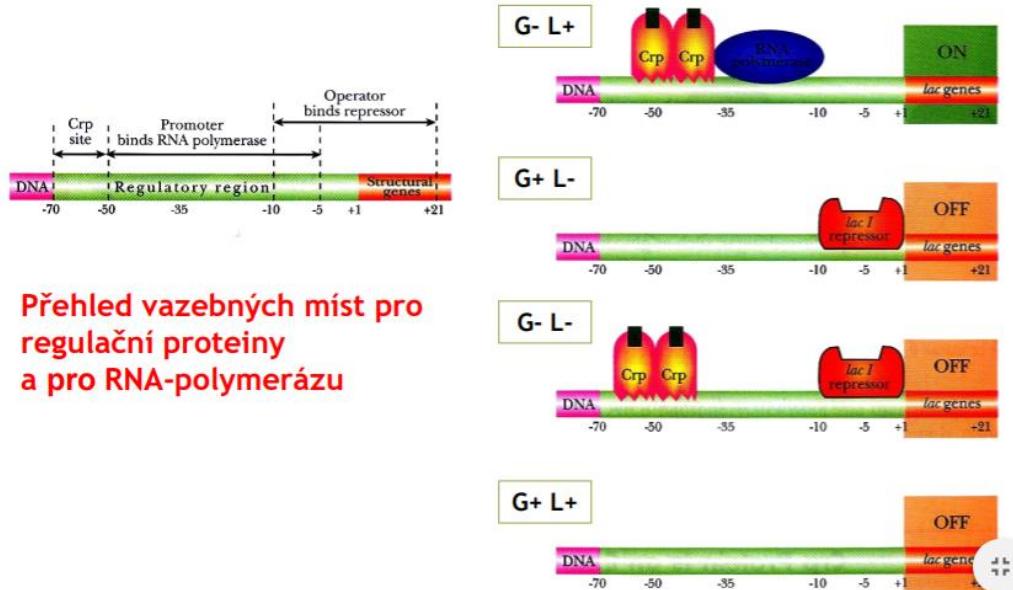


## Pozitivní regulace operonu



18

## Regulace laktózového operonu



## Vztahy mezi induktorem, korepresorem, represorem a cAMP.CAP

**Induktor** = negativní alosterický efektor = pozitivní regulátor

**Korepresor** = pozitivní alosterický efektor = negativní regulátor

**Repressor** = negativní regulační protein = negativní regulátor

**CAP** = pozitivní regulační protein = pozitivní regulátor

**cAMP** = pozitivní alosterický efektor = pozitivní regulátor

Laktózový operon kóduje geny, co jsou schopné metabolizovat glukózu a získat z ní laktózu.

**Málo glukózy, laktóza dostupná** – zapnutí celého mechanismu, exprimovány geny pro metabolismus laktózy, transkripce zapnuta. **Dost glukózy, není laktóza** – stále probíhá exprese laktózového represoru, co se váže na operátor, transkripce vypnuta. **Ani glukóza, ani laktóza** – průšer, zexprimuje se laktózový represor, transkripce neprobíhá. **Obojího dostatek** – vazba CAP a cAMP (pozitivní regulátory) blokuje transkripci a ta neprobíhá.

64)

## Regulace translační kontroly

### Regulace na úrovni RNA - translační kontrola

- Kontrola rychlosti degradace mRNA vazbou proteinů
- Úprava mRNA do translatovatelné podoby
- Kontrola translace mRNA regulačními proteiny
  - pozitivní nebo negativní působení
- Regulace translace prostřednictvím antisense RNA
- RNA interference
- mikroRNA (miRNA)

Regulační protein → DNA - - - regulace transkripce  
Regulační protein → RNA - - - regulace translace

65) Regulace translace zprostředkovaná protismyslnou mRNA (antisense RNA)

Působení regulačních proteinů na stabilitu molekul mRNA  
(ovlivnění rychlosti degradace mRNA ribonukleázami)



**Principy ovlivnění stability mRNA po vazbě regulačního proteinu:**

1. Protein po vazbě na mRNA přímo ovlivňuje citlivost k ribonukleázám
2. Protein po vazbě na mRNA zesiluje nebo zeslabuje její vazbu na ribozom, což ovlivňuje rychlosť její translace a nepřímo poločas její degradace (vazba mRNA na ribozom ji chrání před degradací)

Poločas rozpadu molekul mRNA u *E. coli* = 2-3 min

66)

## Mechanismus RNA interference (RNAi)

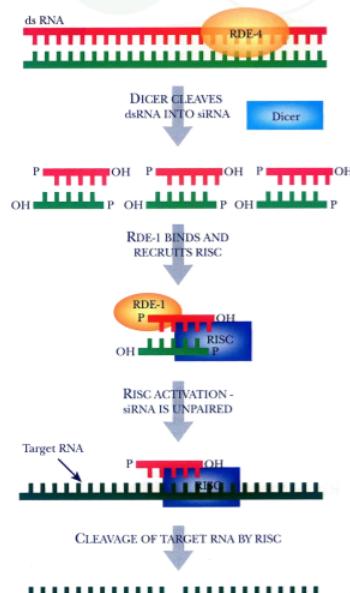
**RNA interference (RNAi)** = mechanismus umlčování genů, které je indukováno přítomností dvouřetězcové RNA (dsRNA)

- je sekvenčně specifická, dochází k degradaci jak dsRNA tak ssRNA (především mRNA), které jsou homologické s dsRNA, která odpověď vyvolala
- mechanismus patrně vznikl jako obrana proti virům (ssRNA a dsRNA virům) a transpozonům - v průběhu pomnožování virů vznikají replikativní intermediáty (dsRNA), které jsou signálem pro antivirovou odpověď buňky
- RNAi je vyvolána plně komplementární dsRNA o délce alespoň 21-23 bp, delší dsRNA jsou nejdříve štěpeny na fragmenty o délce 21-28 bp nukleázou „**Dicer**“ - tyto fragmenty RNA se označují jako **siRNA (short interfering RNA, silencing RNA)** a jsou vázány proteiny komplexu **RISC (RNA-induced silencing complex)**
- RISC komplex rozmotá a separuje řetězce siRNA, následně se páruje s cílovou RNA a degraduje ssRNA (mRNA), jejichž sekvence je stejná jako u siRNA.
- nukleázová aktivita RISC komplexu (označovaná jako „**Slicer**“) - degraduje cílovou RNA.

Mechanismy podobné RNAi umlčují transkripci cílových genů změnou struktury chromatinu a navozením methylace DNA

30

## Mechanismus RNA interference



Rozpoznání dsRNA specifickými proteiny

**Dicer** rozštědí dsRNA na **siRNA** o délce 21-23 bp s jedno- až dvoubázovými přesahy

**siRNA = short interfering RNA**

na siRNA se váže další protein, který umožní vazbu a aktivaci RISC komplexu

**RISC = RNA-induced silencing complex**

RISC komplex odděluje řetězce siRNA

RISC se váže na cílovou RNA a štěpi ji  
**Slicer** = nukleázová aktivita RISC komplexu

RNA interference je proces, při kterém interferují (párují se) **nekódující molekuly RNA** s cílovými úseky **mRNA**, což má za následek **zabránění genové exprese** těchto mRNA. Zkráceně se takovýto proces nazývá též RNAi. Řadíme ho mezi **posttranskripcní mechanismy genové exprese**. Většina eukaryotických organismů je schopna RNA interference, poprvé byl tento proces prostudován u hlístice *C. elegans*.

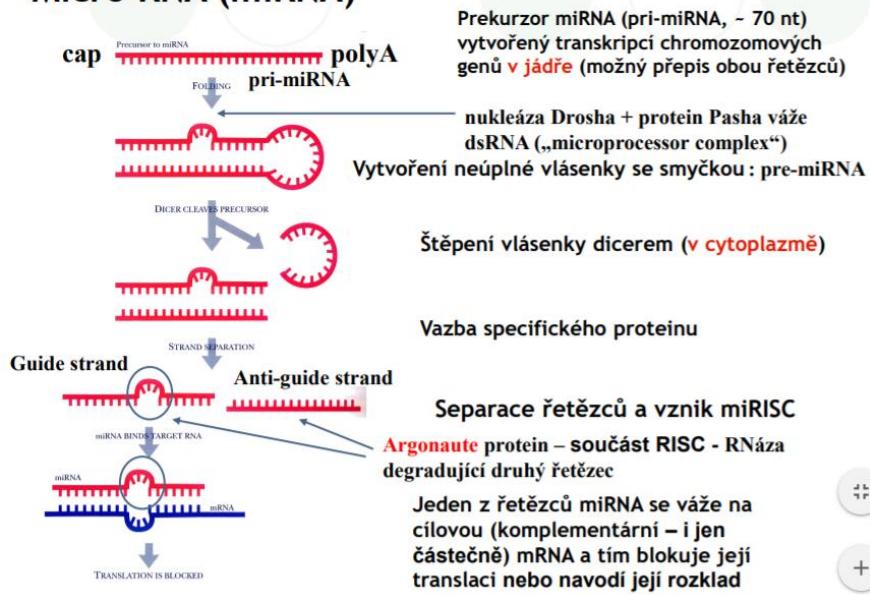
67)

## Průběh vzniku a působení miRNA

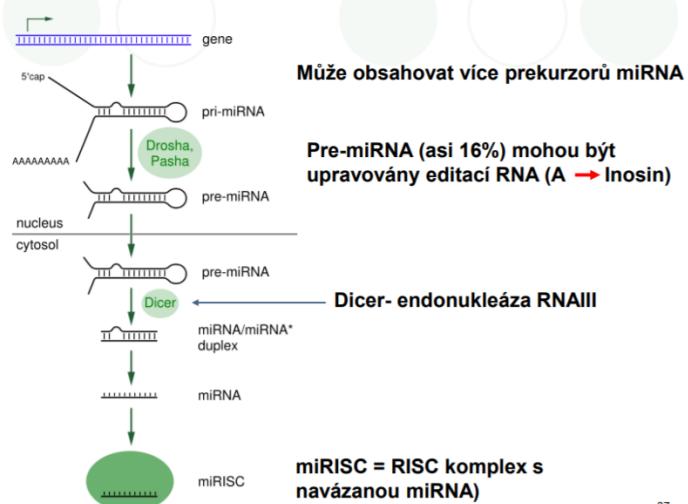
## microRNA (miRNA)

- **microRNA (miRNA)** - krátké jednořetězcové molekuly RNA o délce 21-23 nt, které regulují expresi genů blokováním translace mRNA (příp. indukují její degradaci podobně jako u siRNA) - vážou se především na 3'-nepřekládanou oblast (u rostlin na kódující oblasti mRNA nebo 5' - nepřekládané oblasti)
- Jsou vytvářeny geny *mir*, které jsou transkribovány, ale nepřekládají se. **Geny bývají v intronech nebo exonech nebo polycistronických jednotkách, z nichž jsou upravovány jednotlivé miRNA.** Byla zjištěna u červů, hmyzu, savců a rostlin, objevena poprvé u *Caenorhabditis elegans* v r. 1990 (small temporal RNA, stRNA), kde řídila časovou posloupnost vývoje během přeměny larvy v imago.
- Řada miRNA se účastní regulace vývoje, cílem působení jsou mRNA kódující transkripční faktory regulující expresi dalších genů, některé miRNA mají vztah k buněčnému dělení a rakovině. **U člověka až několik tisíc genů.**

### Micro RNA (miRNA)



### Průběh vzniku a působení miRNA



37

Gen -> pri-miRNA -(Drosha, Pasha)-> pre-miRNA -(dicer)-> miRNA/miRNA duplex -> miRNA -> miRISC (RISC complex s navazanou miRNA)

### Úloha miRNA v medicíně

V lidském genomu je zhruba 5 000 genů pro miRNA, které ovlivňují více než 60% genů

- Jedna miRNA se může vázat na stovky sekvencí v mRNA,
- Určitá mRNA může být regulována mnoha různými miRNA
- V různých buněčných typech a tkáních jsou různé sady miRNA

#### Poruchy ve fungování miRNA vedou k vážným chorobám

- rakovina (možnosti diagnostiky různých forem) – diagnostika a prognostika (např. kolorektální karcinom) na základě profilování miRNA (miRNA jako biomarkery)

- kardiovaskulární a nervové choroby
- miRNA jsou testovány jako léky

(vztah k různým chorobám: alkoholismus, obezita, diabetes aj).

## 68) Transkripční aktivita eukaryotické buňky

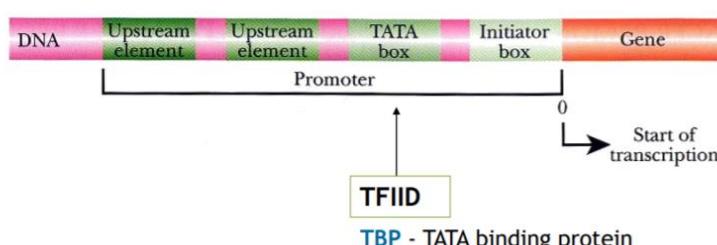
### Transkripční aktivita eukaryotické buňky

1. **Bazální transkripce** - za účasti bazálních TF, minimální úroveň transkripce
2. **Konstitutivní transkripce** - za účasti bazálních a konstitutivních TF, umožňujících odlišnou rychlosť transkripce různých genů  
Obecné TF = bazální + konstitutivní → aktivují provozní geny
3. **Indukovaná transkripce** - transkripce regulovaná indukovatelnými specifickými TF, jejichž aktivita je ovlivněna podněty z vnějšího prostředí.

Specifické TF = buněčně a časově specifické regulační proteiny

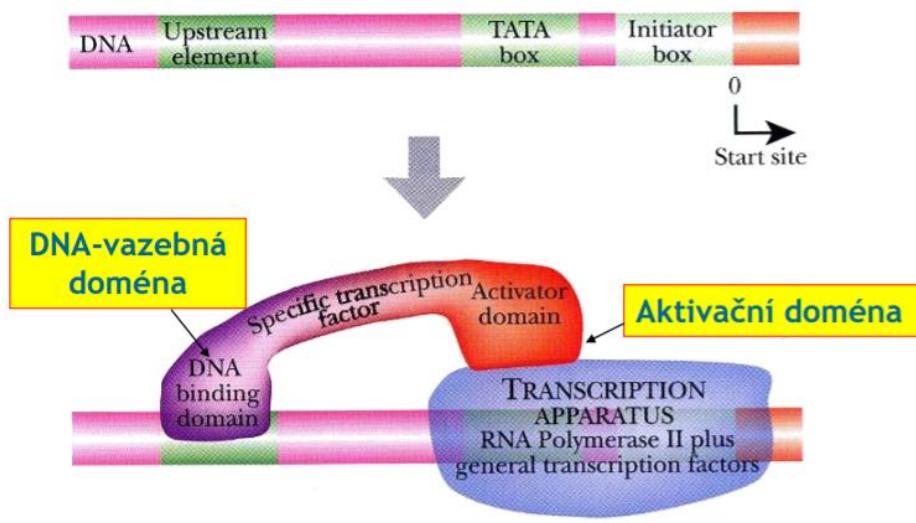
## 69) Složky eukaryotického promotoru pro RNA-polymerázu II

### Složky eukaryotického promotoru pro RNA-polymerázu II



## 70) Vzájemné interakce transkripčních faktorů u eukaryot

### Vzájemné interakce transkripčních faktorů



**Hybridní proteiny: aktivační doména + DNA-vazebná doména**

- DNA-vazebná doména se váže na Upstream element
- Aktivační doména se váže na transkripční aparát (RNA polymeráza II + obecné transkripční faktory)

## 71) Způsoby aktivace transkripčních faktorů

### Způsoby aktivace transkripčních faktorů

- fosforylace TF specifickými proteinkinázami
- vazba ligandu (signálu, např. hormonu)
- odstranění inhibitoru

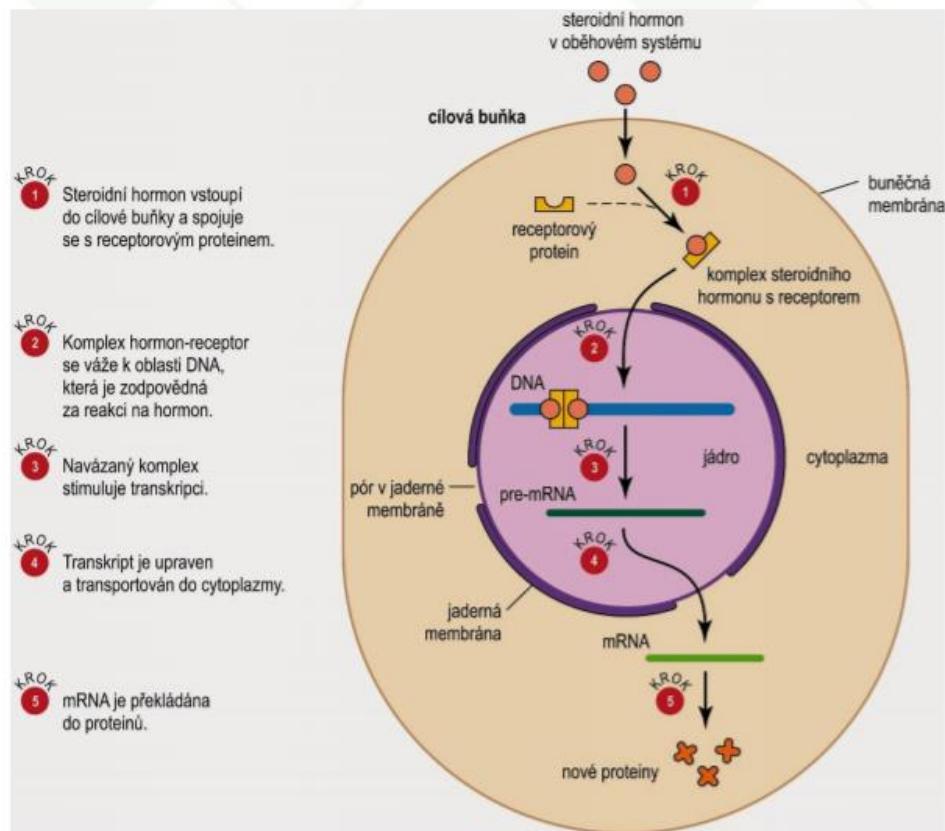
→ vazba TF na DNA, interakce TF s dalším TF  
→ indukce transkripce

### Specifická aktivace genů

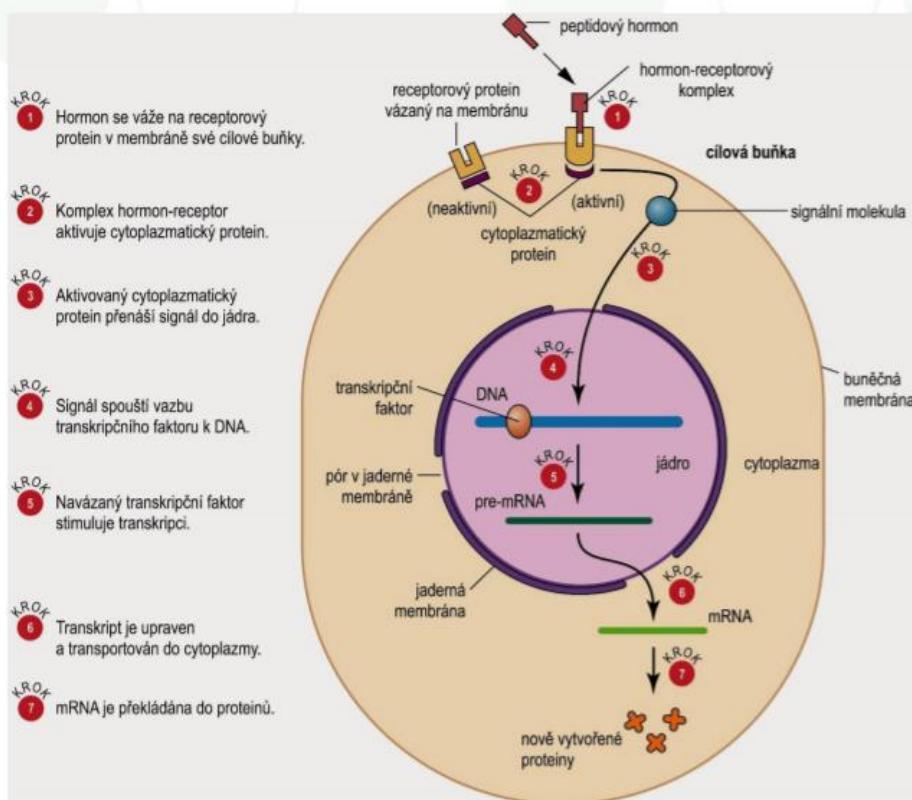
- aktivace specifického TF v buňkách určité tkáně po působení signálu
- indukce tvorby specifického TF v určité tkáni po aktivaci jeho genu působením signálu

## 72) Regulace genové exprese hormony

# Regulace genové exprese steroidními hormony



# Regulace genové exprese peptidovými hormony



## 73) Definice mutace

### Mutace

= dědičná změna genotypu, jejíž molekulární podstatou je změna primární struktury nukleové kyseliny (nukleotidová substituce, delece, inzerce nebo inverze)

Změny ve fenotypu organismů mohou mít i další příčiny

Epigenetika studuje změny v genové expresi (a tedy obvykle i ve fenotypu), které nejsou způsobeny změnou nukleotidové sekvence DNA.

## 74) Klasifikace mutací

### Klasifikace mutací

#### 1. Podle úrovně, na níž působí

- a) Genové (bodové) mutace – změna bází nebo sekvence bází na úrovni genu
- b) Chromozomové mutace – změna sekvence na úrovni chromozomu
- c) Genomové mutace – změna počtu chromozomů (plazmidů)

#### 2. Podle typu zasažené buňky

- a) Genetické (gametické) mutace – vznikají v gametech, přenášejí se na potomstvo
- b) Somatické mutace – vznikají v somatických buňkách

#### 3. Podle vlivu na životoschopnost organismu

- a) Vitální mutace – slučitelné s přežitím organismu
- b) Letální mutace – neslučitelné s přežitím organismu
- c) Podmíněně (kondicionálně) letální mutace – slučitelné s přežitím za určitých podmínek (ts, sus - supresorenzitivní x supresorové mutace)

#### 4. Podle stupně fenotypového projevu (u diploidních organismů)

- a) Dominantní mutace – projevují se plně i v heterozygotním stavu
- b) Recesívní mutace – projevuje se plně v homozygotním stavu, projev je maskován dominantní alelou (recessivní mutaci obvykle vzniká nefunkční produkt)
  - neúplné (leaky) mutace: funkce genu se částečně zachovává
  - nulová (null) mutace: úplná ztráta funkce genu (často delece genu nebo jeho části)
  - posunová mutace: mění se čtecí rámec (obvykle delece nebo inzerce)
  - polární mutace: mutace ovlivňující expresi sousedních genů (např. v operonech)

#### 5. Podle vzniku

- a) Spontánní mutace – vzniká bez zjevné vnější příčiny
- b) Indukovaná mutace – vzniká po vystavení organismu/buněk mutagenům



- heterozygot – jedinec, který mutaci zdědil pouze od jednoho z rodičů
- homozygot – jedinec, který stejnou mutaci zdědil od obou rodičů

## 75) Molekulární základ mutací

## Molekulární základ mutací

Substituce - záměna původní báze (ssNA) nebo páru bází (dsNA)

\* transice: pur → pur, pyr → pyr

\* transverze: pur → pyr, pyr → pur

--- kodon s pozměněným smyslem (aa 1 → aa 2)

--- nesmyslný kodon (aa → stop)

nukleotidová synonymní substituce

(nemění se smysl kodonu) → tichá mutace

nukleotidová neutrální substituce

(mění se aa, ne však funkce proteinu) → tichá mutace

Delece - ztráta jednoho nebo více nukleotidů

Inzerce - vložení jednoho nebo více nukleotidů

} **Posunové mutace**

Přestavby genomu

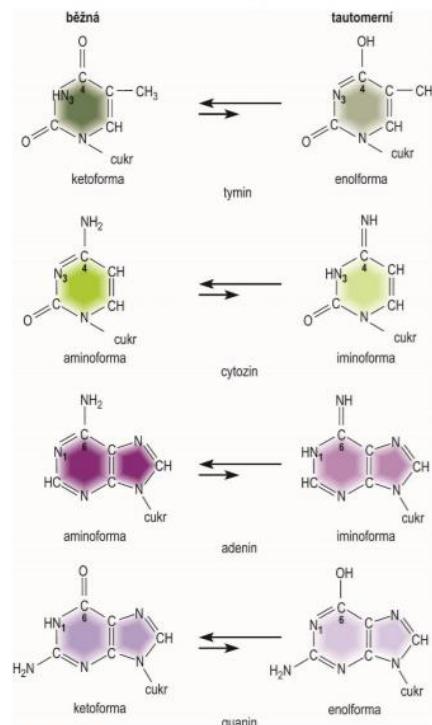
- duplikace (amplifikace)

- inverze

- rozsáhledjší delece

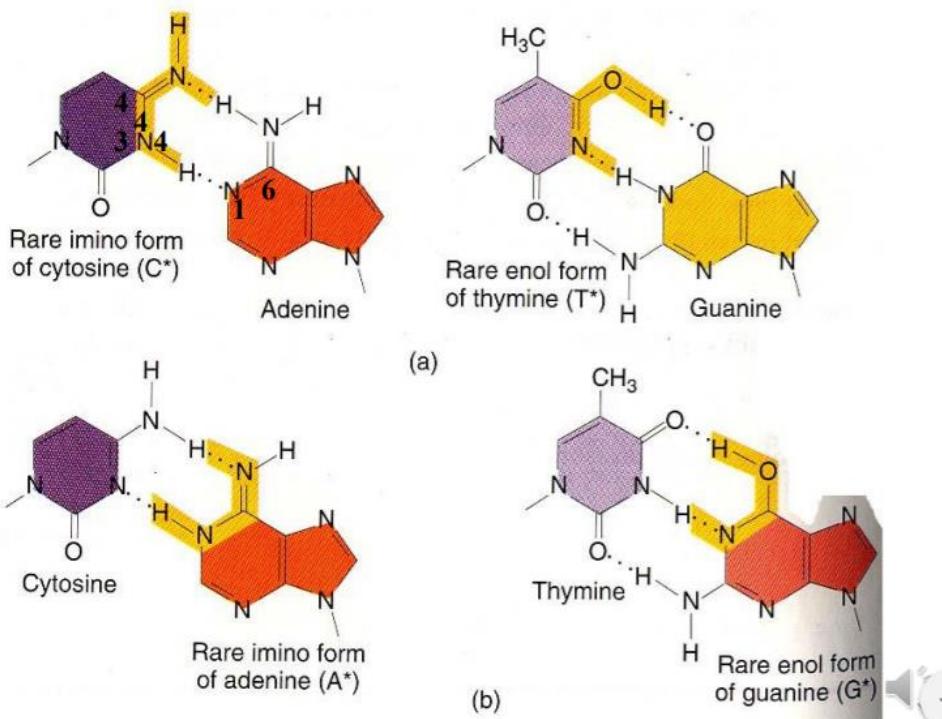
Transpozice

## 76) párování bází v nestabilních tautomerních formách Tautomerní formy bází v DNA



Tautomerie = migrace atomu vodíku či protonu, doplněná prohozením jednoduché vazby a k ní přiléhající vazby dvejné

## Vznik spontánních mutací - substituce párování bází v nestabilních tautomerních formách



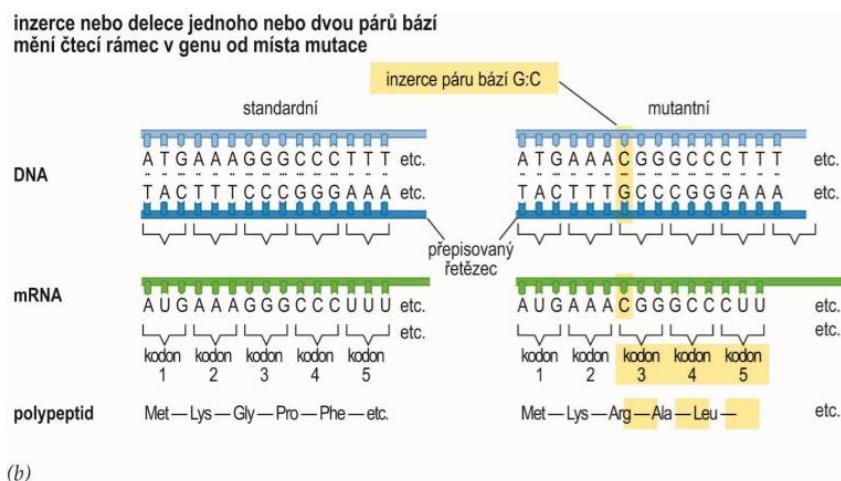
Vazby dvoušroubovice nejsou statické, mohou se měnit. Tautomerie – změna struktury bazí. Vodík přechází do jiných izoforem. Mohou se párovat báze, co by spolu nemohly ve standartní formě nemohly.

- Vzácná imino forma Cytosinu se páruje s Adeninem
- Vzácná imino forma Adeninu se páruje s Cytosinem
- Vzácná enol forma Tyminu se páruje s Guaninem
- Vzácná enol forma Guaninu se páruje s Tyminem

Imino – C, A  
Enol – G, T

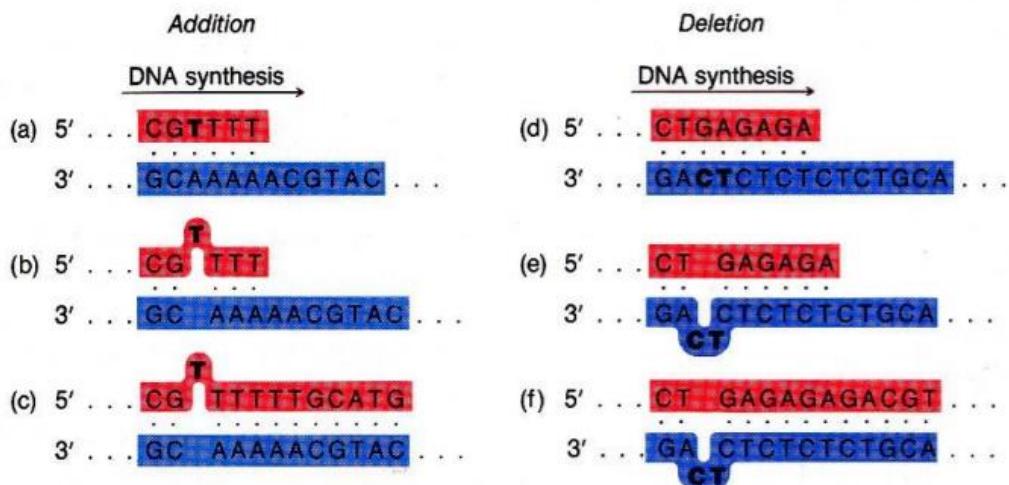
### 77) Posunová mutace

#### Posunová mutace vede k posunu čtecího rámce



## 78) Vznik delecí a inzercí

Vznik inzercí a delecí - horká místa (Hot-spots) - oblasti repeticí

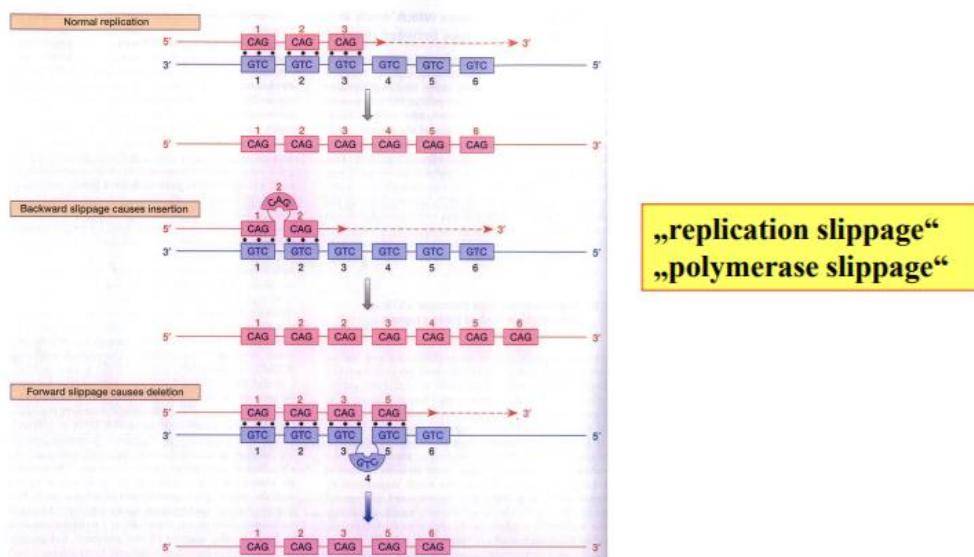


**Figure 19-4** A simplified version of the Streisinger model for frameshift formation. (a) to (c) During DNA synthesis, the newly synthesized strand slips, looping out one or several bases. This loop is stabilized by the pairing afforded by the repetitive-sequence unit (the A bases, in this case). An addition of one base pair, A-T, will result at the next round of replication in this example. (d) to (f) If instead of the newly synthesized strand, the template strand slips, then a deletion results. Here the repeating unit is a CT dinucleotide. After slippage, a deletion of two base pairs (C-G and T-A) would result at the next round of replication.

**Hot Spots** – nejčastější výskyt delecí, inzercí, jsou to oblasti repeticí. Přesmyk na mateřském vlákně, v následující generaci přidání sekvence. A obráceně – tedy oblasti ztrát. Abnormální počet těchto repetic může vést k závažným chorobám. Viz níže (Huntington – postupná demence, ztráta řeči...).

Nebo vznikají skouzáváním řetězců při replikaci (slippage)

Vznik inzercí a delecí „sklouzaváním“ řetězců při replikaci



**Expanze trinukleotidů: dědičné neurologické choroby, např.  
Huntingtonova choroba, expanze trinukleotidu CAG**

- 79) Expanze trinukleotidů  
Způsobuje dědičné neurologické choroby - Huntingtonova choroba, expanze trinukleotidu CAG
- 80) Klasifikace chemomutagenů

### Chemomutageny

**A. analogy bází** ----- po inkorporaci do DNA během replikace se vlivem tautomerie mohou párovat s různými bázemi

**5-BROMURACIL (BU) - analog tyminu**

A-BU (ketoforma) $\rightleftharpoons$ BU (enolforma)-G

AT $\rightleftharpoons$  GC

(8-azaguanin, 5-azacytidin, 5-joddeoxyuridin)

**B. látky chemicky modifikující báze** ----- změny v párování (působí i na DNA, která se nereplikuje)

\* kyselina dusitá - deaminace C na U .... GC $\rightarrow$ AT  
 -" A na H .... AT $\rightarrow$ GC  
 -" G na X .... GC $\rightarrow$ AT

\* hydrogensiřičtan - deaminace C na U .... GC $\rightarrow$ AT

\* hydroxylamin - NH<sub>2</sub> $\rightarrow$ /NHOH ..... GC $\rightarrow$ AT (AT $\rightarrow$ GC)

\* alkylační látky - (alkylsulfáty, N-nitrózosloučeniny)

- dimethylsulfát

- etylmetansulfonát

- nitrozoguanidin

alkylované báze se nepárují nebo vytvářejí chybné páry bazí, případně meziřetězcové křížové vazby

\* interkalační látky ----- posunové mutace

akridiny

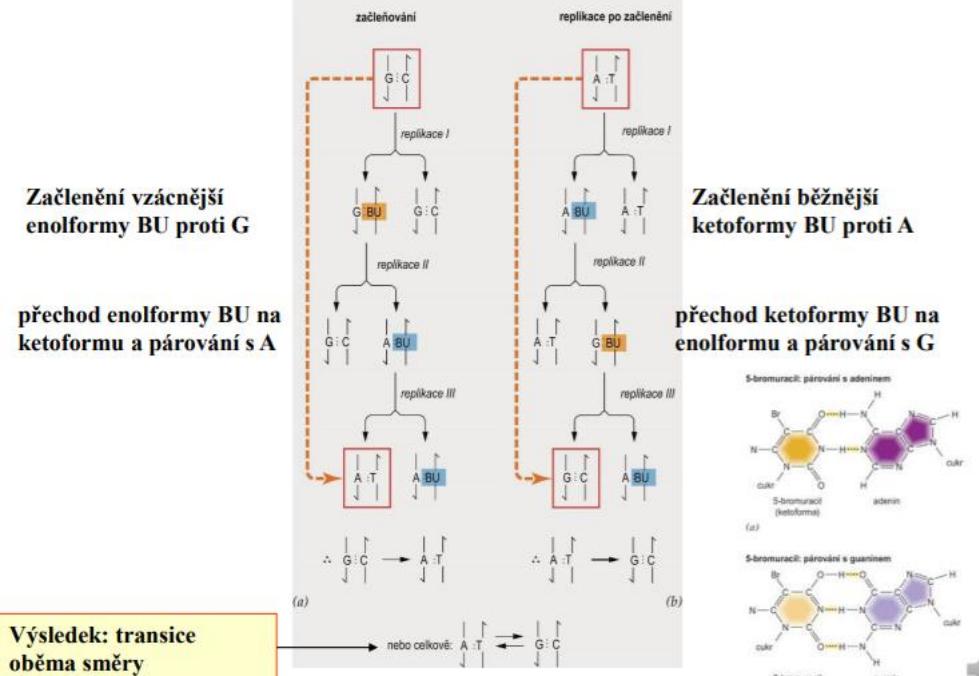
etidiumbromid

psoraleny (furokumariny)

## 81) Mutageneze pomocí 5-BU

### Mutageneze pomocí 5-BU

účinek enolformy 5-bromuracilu během:



Působení jako chemomutagenu. Pokud se začlení ve vzácnější formě – páruje se s G, transice G na A, běžnější ketoforma – páruje se s A a navozuje tranzice A na G. Vhodný chemomutagen pro zjišťování různých mutací.

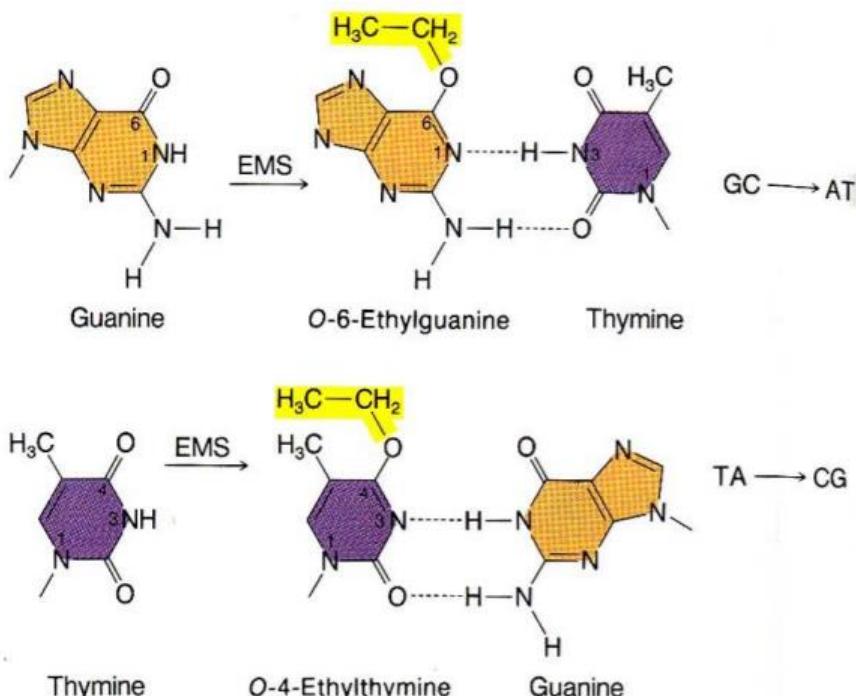
**Tranzice** patří mezi substituce, tedy **bodové mutace** kdy dochází k záměně jednoho nukleotidu za jiný. V případě tranzice jde konkrétně o záměnu purinové báze za purinovou nebo pyrimidinové za pyrimidinovou. Opakem je transverze.

**Transverze** patří mezi substituce, tedy **bodové mutace** kdy dochází k záměně jednoho nukleotidu za jiný. V případě transverze jde konkrétně o záměnu purinové báze za pyrimidinovou nebo pyrimidinové za purinovou. Opakem je tranzice.

82)

## Mutageneze pomocí působení alkylačních činidel

Působení alkylačních činidel (EMS = ethyl methansulfát)



Vnáší alkyllovou skupinu (iperit, alkylsulfáty – ethylmethylsulfát) – tranzice, tranzverze. Přenos ethylové skupiny – změna v párování bazí.

Alkyllové báze se nepárují nebo vytvářejí chybné páry bazí, případně meziřetězcové křížové vazby

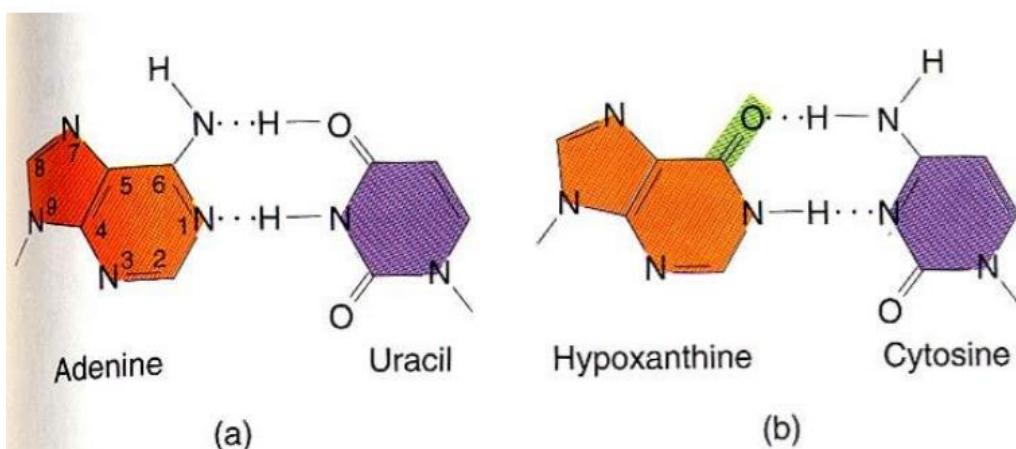
Dimethylsulfát  
Etylmetansulfonát  
Nitrozoguanidin

83)

## Oxidativní deaminace bází vyvolaná kyselinou dusitou

## Oxidativní deaminace bází vyvolaná kyselinou dusitou

cytozin → uracil (T), adenin → hypoxantin (G)



Působí na replikující i nereplikující molekulu DNA, silný mutagen. Modifikace vodíkových vazeb, převádí aminokyseliny na ketoskupiny.

84)

### Supresorová mutace

#### Supresorová mutace

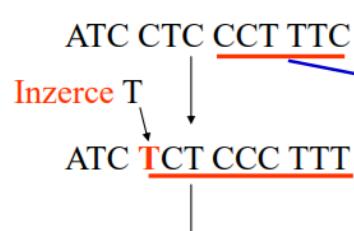
**Definice:** mutace, která částečně nebo úplně ruší účinek jiné mutace (tzv. supresorsenzitivní mutace)

- a) intragenová: vzniká uvnitř téhož genu
- b) intergenová: vzniká v jiném genu

**Na rozdíl od reverzí mutace proběhne v jiném místě DNA**

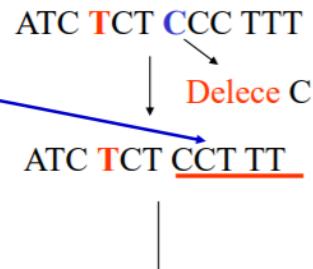
#### Intragenová supresorová mutace (I)

##### Supresorsenzitivní mutace



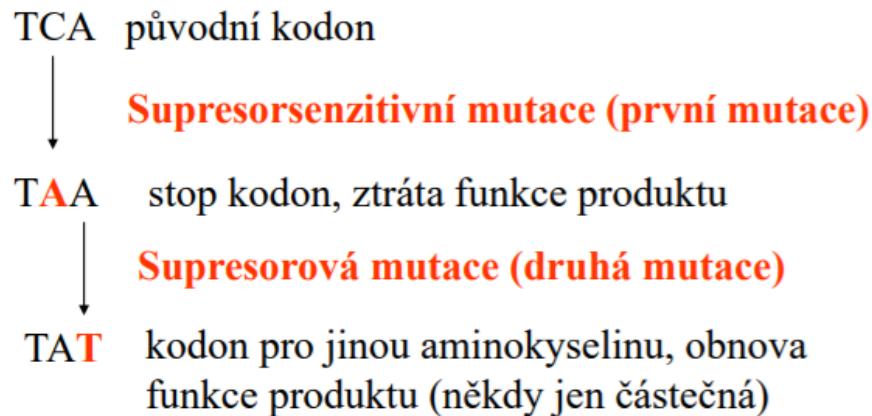
Posunová mutace  
(posun čtecího rámce)

##### Supresorová mutace



Obnova původního  
čtecího rámce

## Intragenová supresorová mutace (II)



### Intergenová supresorová mutace

nemění se mutovaný gen, ale je ovlivněn způsob, jímž je překládána jeho mRNA

vlastní mutace = supresorsenzitivní (*su<sup>s</sup>*)

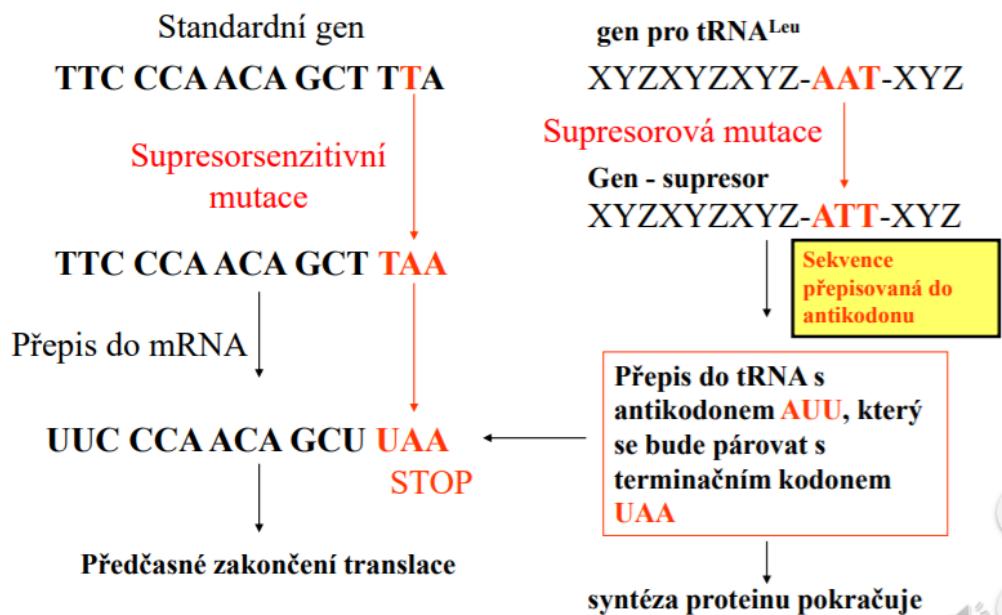
- změna určitého kodonu na kodon nesmyslný nebo kodon s pozměněným smyslem

supresorová mutace = mutace v genu pro tRNA, kterou vzniká tRNA s pozměněným kodonem

**gen supresor** = mutantní alela genu pro tRNA (*sup-*)

**Kmen obsahující supresor** = supresorpozitivní *Su<sup>+</sup>*  
**neobsahující -"-** = supresornegativní *Su<sup>-</sup>*

Intergenová supresorová mutace v genu pro tRNA



## Amesův test na mutagenitu

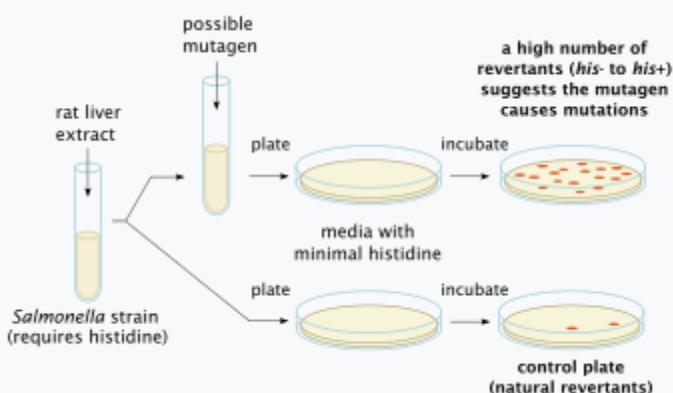
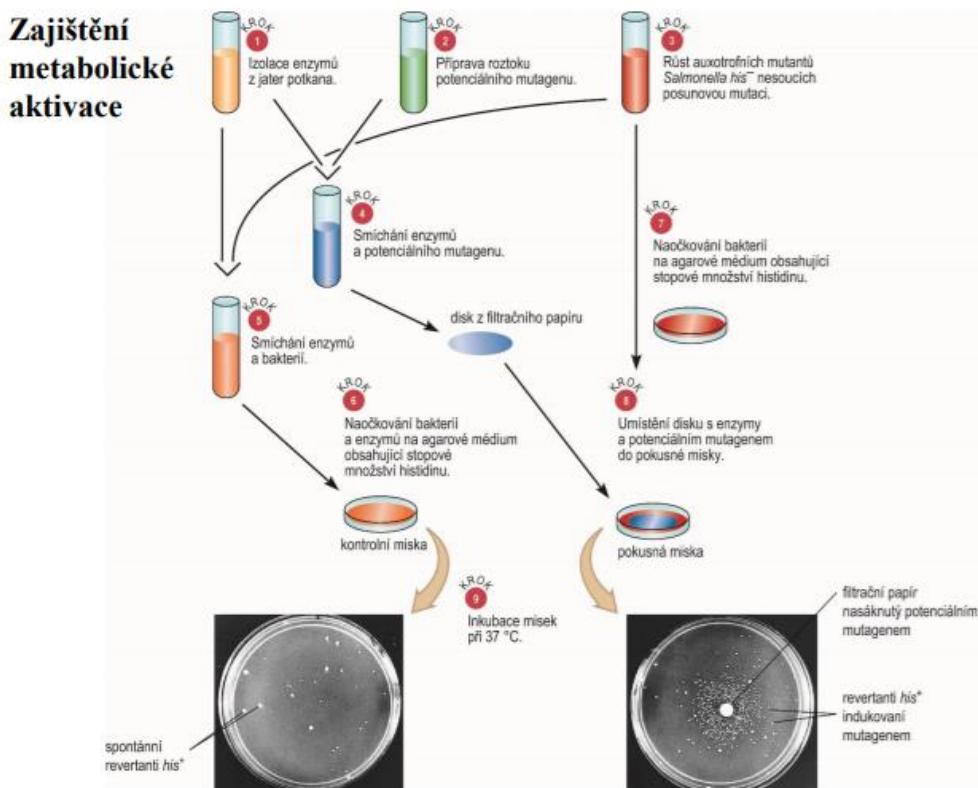


Schéma provedení Amesova testu

**Amesův test** se používá pro zjišťování **mutagenní aktivity** látek a pomáhá odhalit i typ mutací, jež určitá látka vyvolává.

Amesův test využívá speciálních auxotrofních kmenů **bakterie *Salmonella typhimurium***. Tyto kmeny nesou různé **mutace genu pro syntézu histidinu** (jde o bodové mutace i o mutace s posunem čtecího rámce). Mohou proto růst jen na kultivačním médiu, které obsahuje přídavek této **aminokyseliny** (odtud označení **auxotrofní kmeny**). Kromě toho testovací bakteriální kmeny obsahují i další poruchy, např. poruchy v metabolismu **lipopolysacharidů**, které usnadňují prostup testovaných látek bakteriální stěnou, nebo mutace v genech pro **reparační mechanismy**.

Látka, jejíž mutagenicitu se má prověřit, se přidá do kultivačního média s malým množstvím histidinu. Použité bakteriální kmeny na tomto médiu mohou růst jen krátkou dobu, dokud histidin nevyčerpají. Pokud však v některé bakterii dojde ke zpětné mutaci a obnoví se v ní syntéza histidinu, vytvoří se po kultivaci kolonie. Současně s testovanou látkou se může přidat i enzymový extrakt z krysích jater, který některé testované látky, jež by samy o sobě mutagenní nebyly, konverteje na mutagenní metabolity.

Amesův test je jedním z nejpoužívanějších testů mutagenicity. Používá se i pro odhad kancerogenity chemických látek pro savce, byť korelace mezi mutagenicitou a kancerogenitou není úplná.

## 86) Genetický aparát pro reparaci DNA

# REPARACE MUTAČNĚ POŠKOZENÉ DNA

- A. **Přímé reparace**
  - 1. fotoreaktivace
  - 2. dealkylace
- B. **Nepřímé reaparace**
  - 1. Excizní reparace
    - bázová
    - nukleotidová
    - řízená metylací
  - 2. rekombinační /postreplikační/
  - 3. reaparace kroslinků
- C. **Inducibilní reparace**
  - 1. SOS-odpověď
  - 2. adaptivní odpovědi
    - na alkylační poškození
    - na environmentální stres

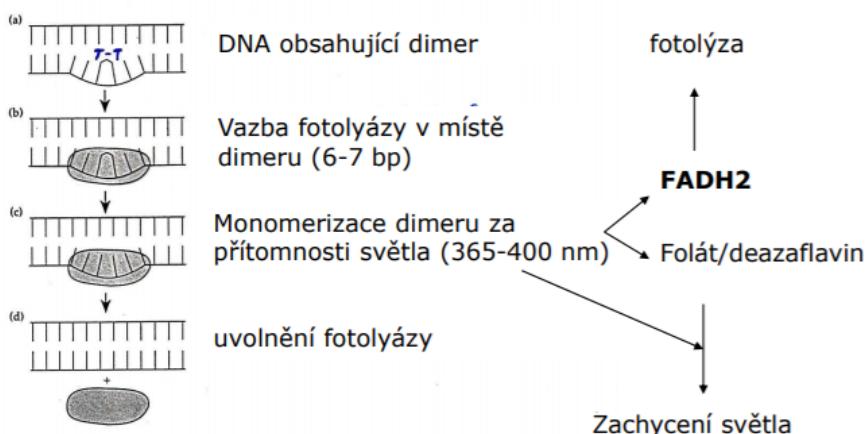
### Genetický aparát pro reparaci DNA

- velmi konzervativní
- asi 100 genů
- distinktní dráhy, které se mohou prolínat

## 87) Fotoreaktivace

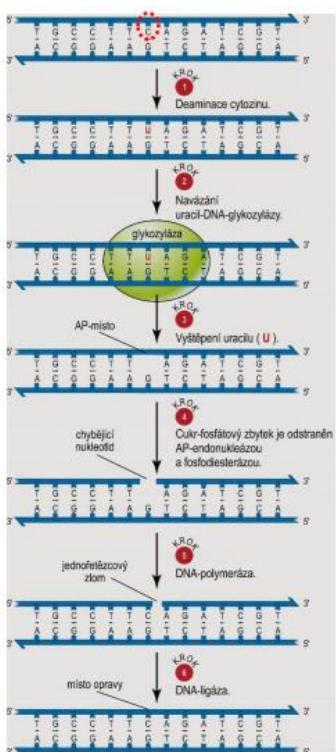
# FOTOREAKTIVACE

= proces enzymatické opravy (fotolyáza) mutací vzniklých účinkem UV záření na buňky.  
Viditelným světlem je aktivován fotoreaktivace enzym, který vyštěpuje thyminový dimer z molekuly DNA



## 88) Bázová excizní oprava

### Bázová excizní oprava



1. Abnormální báze v DNA

2. Rozpoznání specifickou glykozylázou

3. Vyštěpení abnormální báze

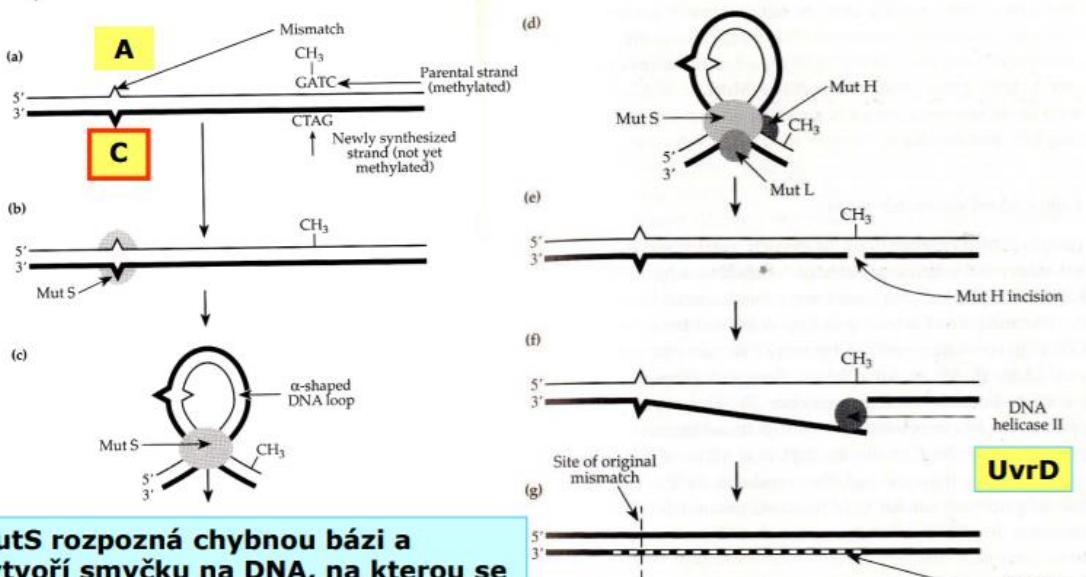
4. Odstranění cukrnofosfátového zbytku

5. Zacenění mezery



## 89) Reparace řízená metylací

### REPARACE ŘÍZENÁ METYLACÍ (REPARACE NA DLOUHOVZDÁLENOST, mismatch repair)



DNA polymeráza

UvrD

A-C → A-T

DNA helikáza

Repair synthesis

UvrD

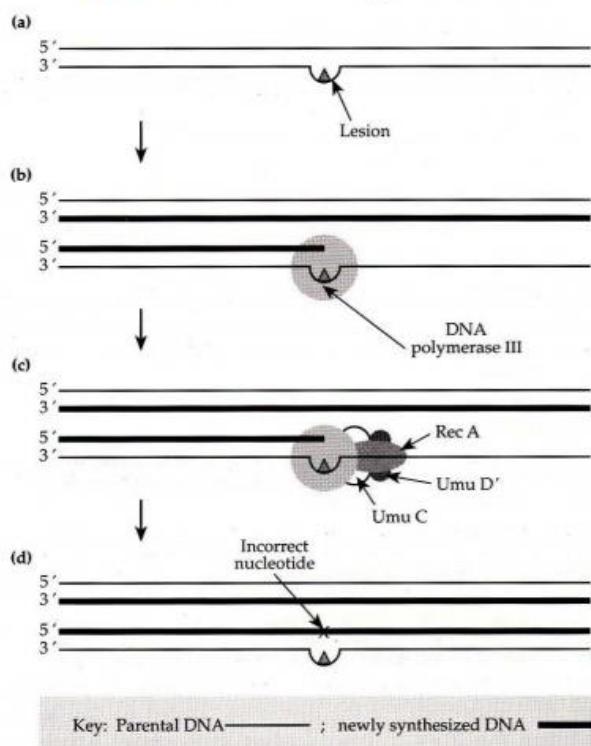
DNA helikáza

# SOS-ODPOVĚĎ

geny *din* = *damage induced, SOS-genes* (31 genů u *E. coli*)

- 1. Indukce SOS mutageneze – vznik adaptivních mutací (mutageneze adaptivní fáze)
- 2. Excizní reparace dlouhých úseků
- 3. Zvýšená schopnost reparace ds zlomů
- 4. Indukce profágů (lambda, P22, f80)
- 5. Indukce tvorby kolicinů
- 6. Zmírnění restrikce
- 7. Inhibice buněčného dělení

## SOS-MUTAGENEZE (ERROR-PRONE = CHYBY NAVOZUJÍCÍ) - POSLEDNÍ ZÁCHRANA



**umu** = UV-indukovaná mutageneze

DNA-polIII vytváří komplex s proteiny UmuC, UmuD a RecA, čímž dochází k inhibici opravy čtení

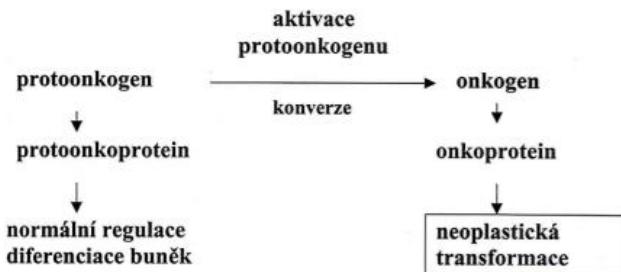
UmuD se působením RecA mění na UmuD', reakce je však pomalejší než štěpení LexA a proto je přednostně indukována standardní SOS-odpověď - ke štěpení UmuD dochází až při vysoké hladině RecA

## 91) Nukleotidová excizní reparace

- Vazba UvrA2B1 a disociace UvrA (SOS)

- Vytvoření preinicizního komplexu
- Vytvoření incizního komplexu štěpení cukr-fosfátové kostry (vazba UvrC)
- Vyštěpení krátkého oligonukleotidu
- Resyntéza chybějícího úseku DNA
- Spojení mezery DNA-ligázou

## 92) Onkogeny



### Klasifikace protoonkogenů podle funkce jejich produktů

- *protoonkogeny kódující:*

  1. Růstové faktory
  2. Receptory růstových faktorů
  3. Proteinkinázy
  4. Produkty podobné G-proteinům
  5. Transkripční faktory

- Umístění protoonkoproteinů v buňkách
- cytoplasmatická membrána
  - cytoplazma
  - jádro
  - sekrece mimo buňku

### Způsoby aktivace protoonkogenů:

- mutacemi
- amplifikací
- translokací
- promotorem viru (c-onc x v-onc)

### Obecné rysy onkoproteinů

- vytváří se v buňce, kde se normálně netvoří
- vytváří se v nadměrném množství
- vytváří se ve formě, která není regulovatelná

### Porucha regulace buněčného cyklu

**Onkogen je gen, který způsobuje rakovinné bujení.** V případě buněčných onkogenů dochází k poškození přirozeného, správně fungujícího protoonkogenu následkem určité mutace či jeho nesprávné exprese.

## 93) Tumor supresorové geny

### Nádorové supresorové geny

#### Nádorové supresorové geny (antionkogeny)

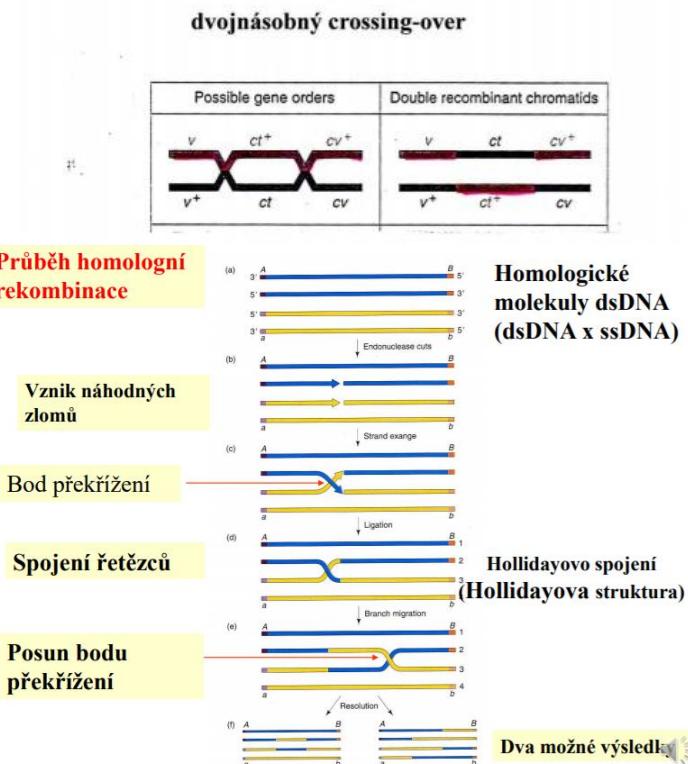
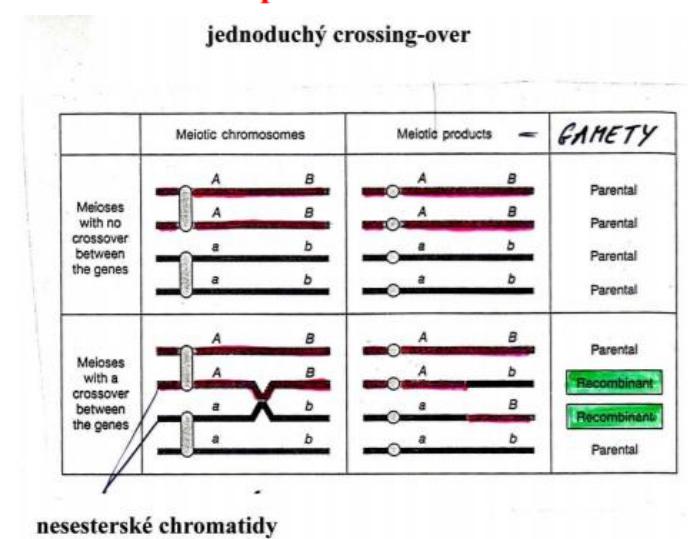
- kódují proteiny, které proliferaci buněk potlačují
- mutace v nich vznikají v zárodečných buňkách a dědí se
- mutace vedou k familiálním formám nádoru

#### Protein p53 - strážce genomu

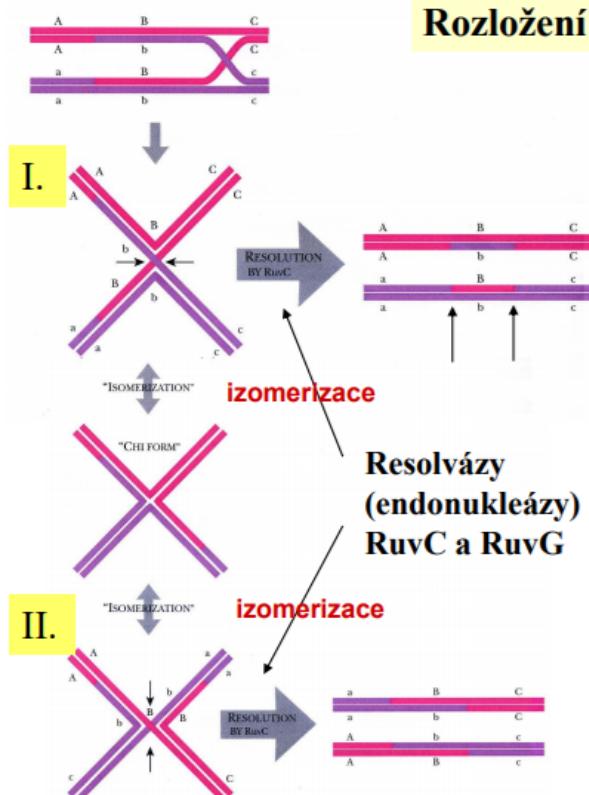
- koordinovaně zastavuje dělení buněk
- aktivuje se vazbou na poškozenou DNA
- stimuluje reparaci DNA
- působí jako aktivní TF genů. i.e. produkty brzdí dělení buněk
- stimuluje apoptózu (programovaná buněčná smrt)

**Rekombinace - proces vzniku nové kombinace genů**

- obecná (homologická, RecA-závislá) – vyžaduje dlouhé úseky DNA s vysokým stupněm sekvenční homologie
- místně-specifická, nehomologická, (ilegitimní) – probíhá mezi molekulami DNA, které obsahují jen krátké specifické sekvence rozpoznávané místně-specifickými rekombinázami, nikoliv RecA-proteinem



## Hollidayovo spojení

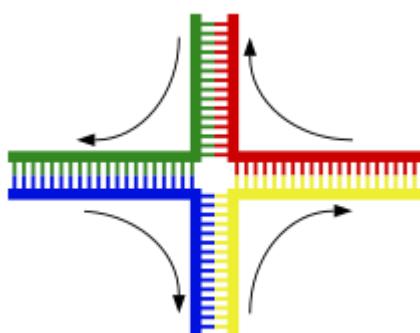


## Rozložení Hollidayova spojení

**I. regenerace původních molekul DNA obsahujících pouze krátkou heteroduplexní oblast**

Konformace I a II se sekvencemi neliší

**II. vytvoření hybridních molekul DNA obsahujících krátkou heteroduplexní oblast a zaměněné krajní úseky**



Hollidayův spoj (schéma); každé vlákno je znázorněno jinou barvou

**Hollidayův spoj (Hollidayova struktura)** je způsob propojení čtyř vláken [DNA](#), který typicky vzniká v průběhu [genetické rekombinace](#). Je pojmenován podle britského biologa [Robina Hollidaye](#) (\*1932), který navrhl model pro vzájemnou (reciprokovou) výměnu vláken při rekombinaci (crossing-overu). V rámci takové výměny dochází nejprve k několika zlomům a opětovným propojením, načež vzniká čtyřvláknová struktura známá právě jako Hollidayův spoj. Později se sice zjistilo, že rekombinace probíhá poněkud odlišně, než si Holliday představoval, ale Hollidayova struktura tyto změny přežila.<sup>[1][2]</sup>

Existence Hollidayova spoje je vždy pouze dočasná. Typicky k jeho vzniku dochází při [meiotické rekombinaci](#) (tzv. crossing-overu), jež je typická pro zrání [pohlavních buněk](#) živočichů. Dnes se předpokládá následující průběh: nejprve dojde k [dvouvláknovému zlomu](#) na jedné z [dvouvláknových molekul DNA](#). Enzym, který to umožňuje (u [kvasinek Spo11](#)), zůstává pevně navázán na koncích těchto zlomů. Následně speciální [nukleáza](#) zkrátí [5' konce](#) obou fragmentů, což má za následek vznik přesahujících 3' konců. Jeden z 3' konců invaduje do druhého (dosud neporušeného) dvouvláknna a jeden z řetězců je vytlačen k druhému volnému 3' konci. Následně dochází k dosyntetizování předtím odstraněných 3' konců a k sérii ligací. Vzniká čtyřvláknová struktura známá jako Hollidayův spoj. Konečně musí přijít nějaký enzym, který provede sérii dalších střihu a ligací, címž Hollidayova struktura zanikne a vznikají dvě dvouvláknna – ale s vyměněnými vlákny.<sup>[3]</sup>

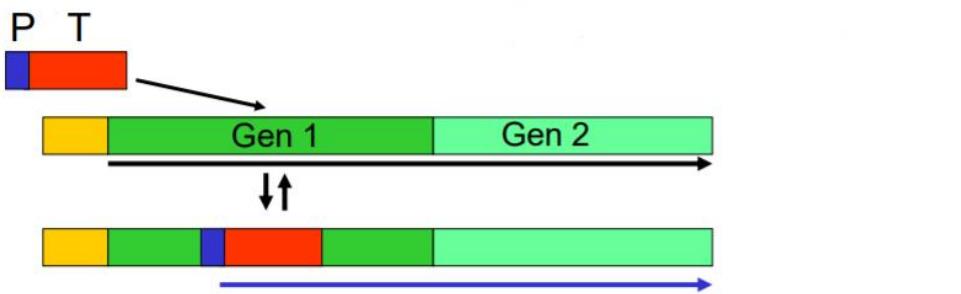
## Základní typy transpozonů a jejich klasifikace

## Transpozony - mobilní genetické elementy

- Tvoří pravidelnou součást genomu prokaryot i eukaryot (až 50% genomu)
- Navozují mutace genů (inzerční inaktivace, polární mutace, změny exprese genů)
- Jsou zodpovědné za přestavby chromozomů nebo plazmidů (tvoří "přenosné" úseky homologie, podmiňující homologní rekombinace, interakce mezi složkami genomu)
- Přenášejí nové znaky (např. AntR, onkogeny) mezi organismy (horizontální přenos genů)

### Specifické rysy transpozice:

- cílová místa nejsou homologická s místy donorovými
- obvykle dochází k duplikaci přenášené sekvence, tj. transpozon zůstává i v původním donorovém místě
- v místě inzerce se zdvojují ve stejném směru sekvence DNA - transpozon je na obou koncích ohraničen přímými repeticemi, což je důsledek mechanismu transpozice
- po inzerci transpozonus do cílového místa dochází k inaktivaci genů, po excizi transpozonus se funkce obnovuje.



## Základní typy transpozonů a jejich klasifikace

### DNA-transpozony

- **Transpozony „cut and paste“** (prokaryota a eukaryota) – vyčlení se z původního místa a začleňují se do nového
- **Replikativní transpozony** (prokaryota) – během transpozice se replikují (jedna kopie zůstává v původním místě, druhá se objeví v novém místě)
  - **Konjugativní transpozony** (bakterie) – horizontální přenos

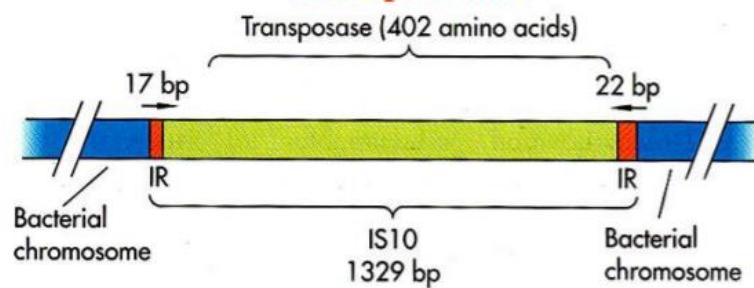
**Retrotranspozony** (eukaryota) – **během transpozice se transkripcí sekvence transpozoru vytváří RNA**, která se převádí reverzní transkripcí na DNA, která se pak začleňuje do nového místa

- **retroviry,**
- **retrovirům podobné elementy, retropozony**
- **retronky** (bakterie)

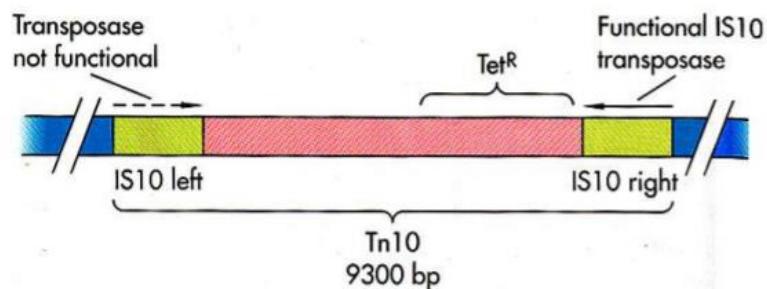
### 97) Struktura mobilních elementů bakterií

#### Struktura mobilních elementů bakterií

##### Inzerční sekvence (IS)      transponáza



##### Složené transpozony (Tn)



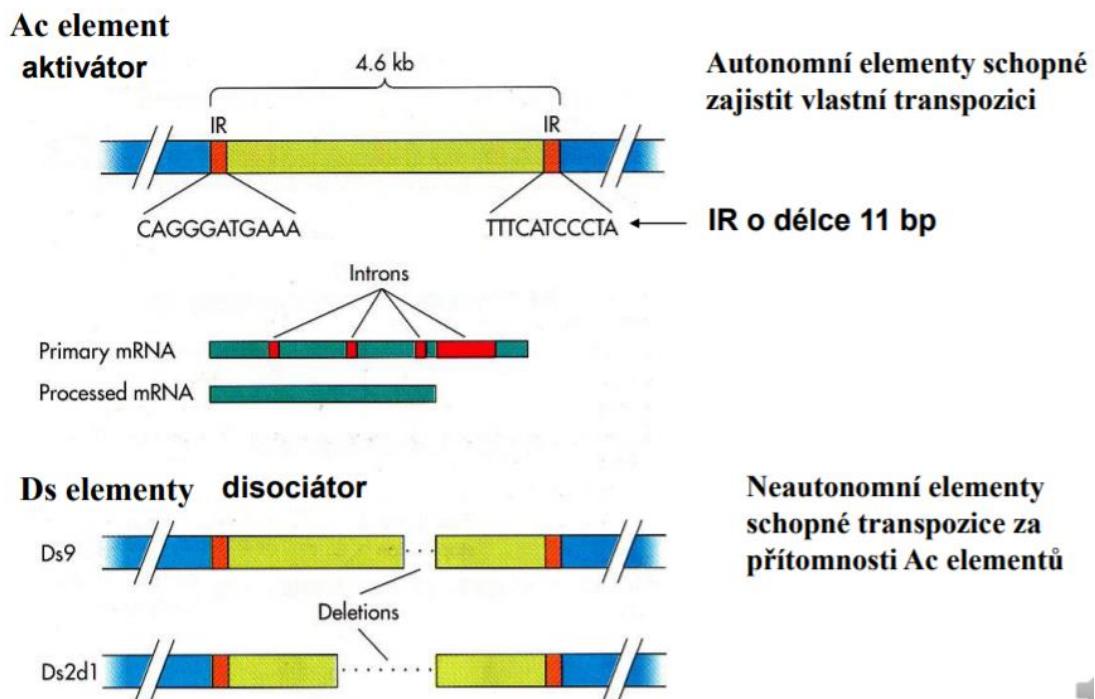
### 98) Ac/Ds system u kukuřice

## Transpozony u kukuřice

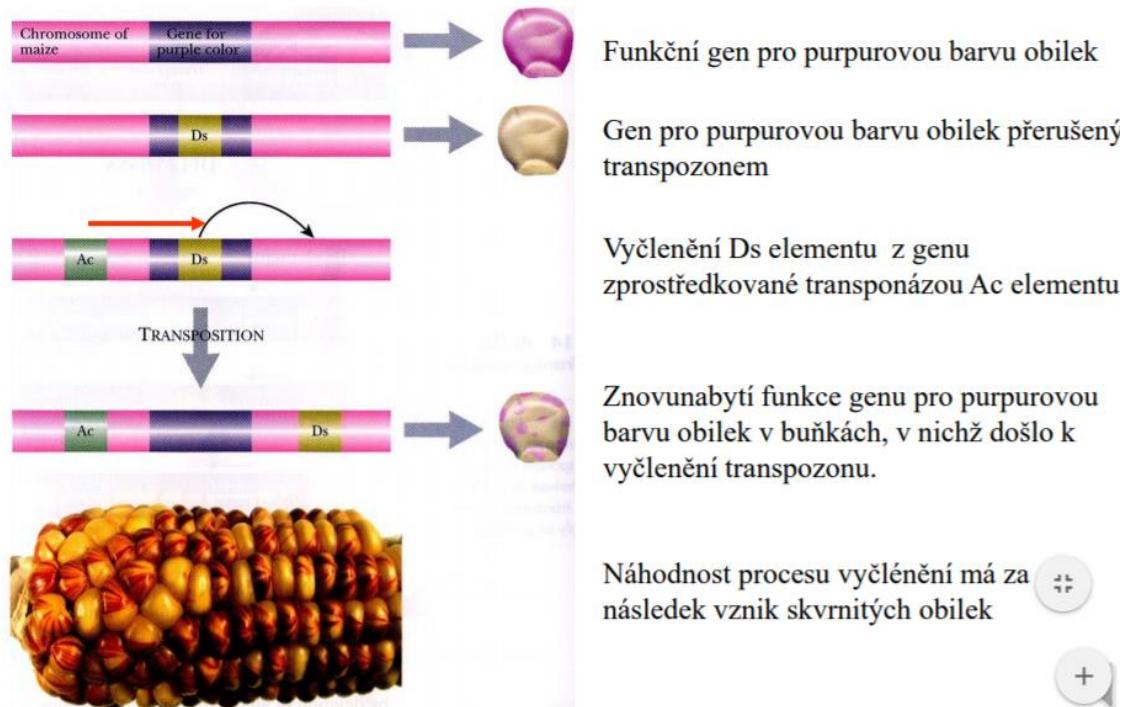


**Figure 21-42** Mosaicism through transposon mutagenesis in corn. These seeds represent genotypes in which a transposon has inserted into a gene that produces anthocyanin. Therefore, the cells of these seeds are predominantly lacking anthocyanin and are yellow; let us call the genotype  $A^T A^T$ . However, during development, the transposon can occasionally exit from the gene, forming a revertant cell of genotype  $A A^T$ . Cell division will result in a clone of revertant cells and hence a patch of pigmented cells. The three different rows represent corn lines in which the transposon exits early (large spots), late (small spots), or in between (intermediate spots).

## Mobilní elementy u kukuřice (Ac/Ds) (Elementy B. McClintockové)

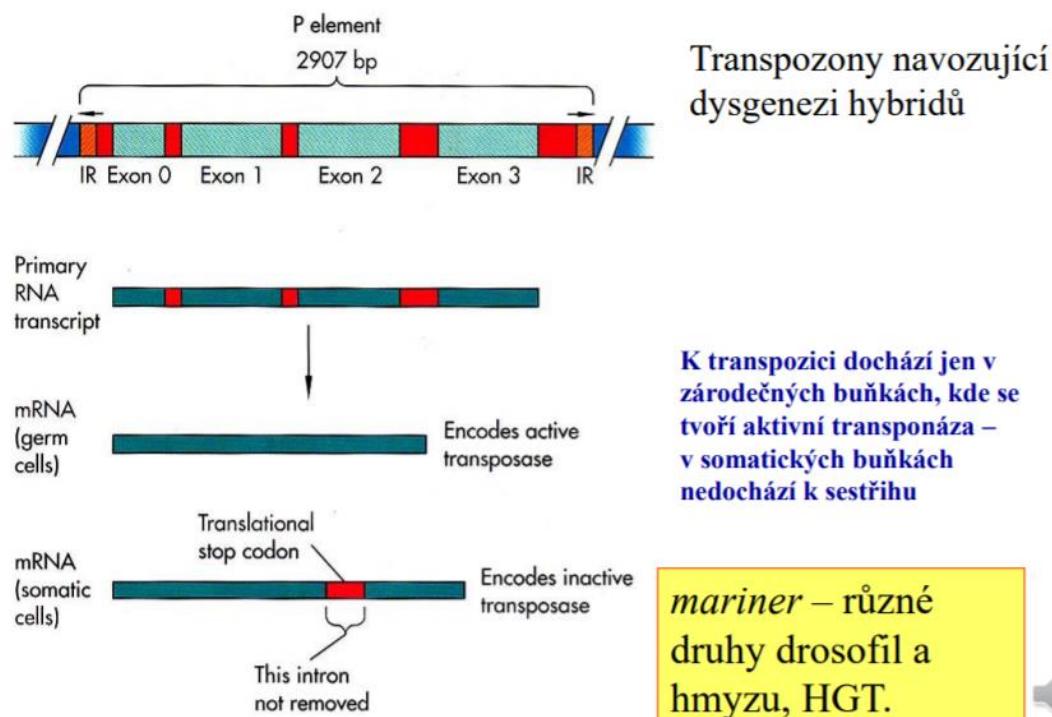


## Transpozice Ds elementu u kukuřice



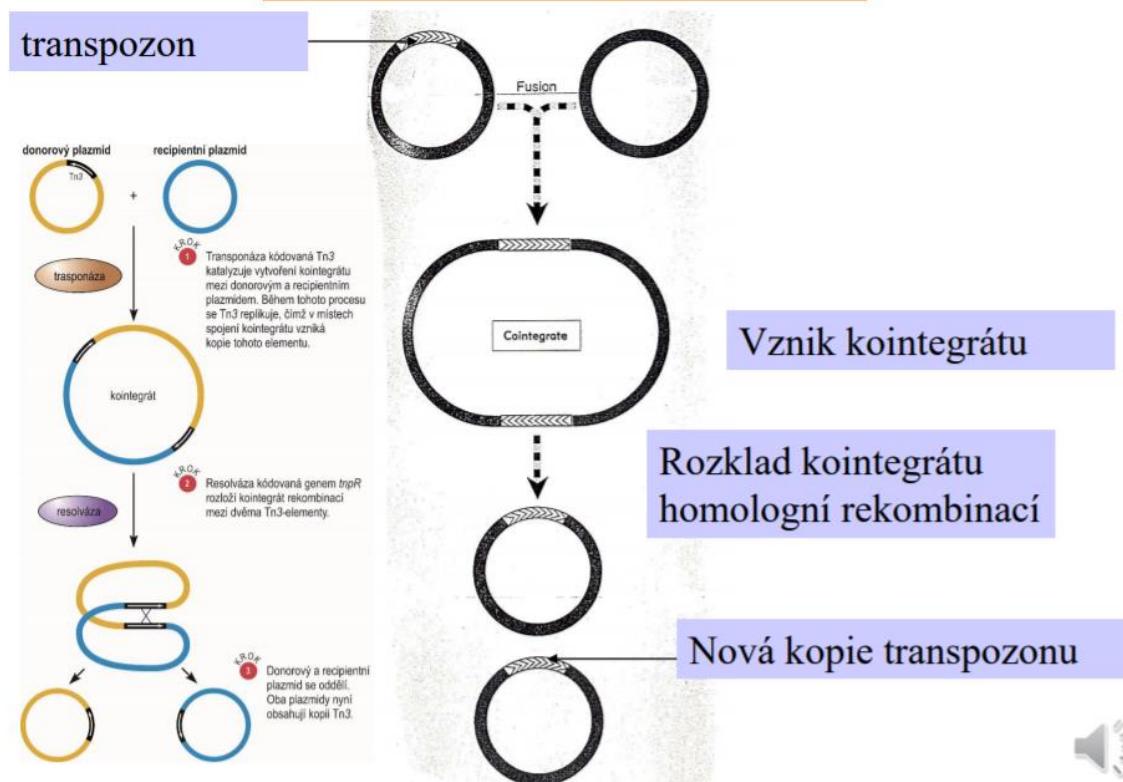
### 99) Mobilní elementy *Drosophila melanogaster*

#### Mobilní elementy *Drosophila melanogaster* - P elementy



### 100) Mechanismus replikativní transpozice

## Replikativní transpozice Tn3



Transponáza kódovaná **Tn3** katalyzuje **vytvoření kointegrátu** mezi donorovým a recipientním plazmidem. Během tohoto procesu se **Tn3** replikuje, čímž v místech spojení kointegrátu vzniká kopie tohoto elementu.

Resolváza kódovaná genem *trpR* **rozloží kointegrát** rekombinací mezi dvěma Tn3-elementy.

**Donorový a recipientní plazmid se oddělí.** Oba plazmidy nyní obsahují kopii **Tn3**.



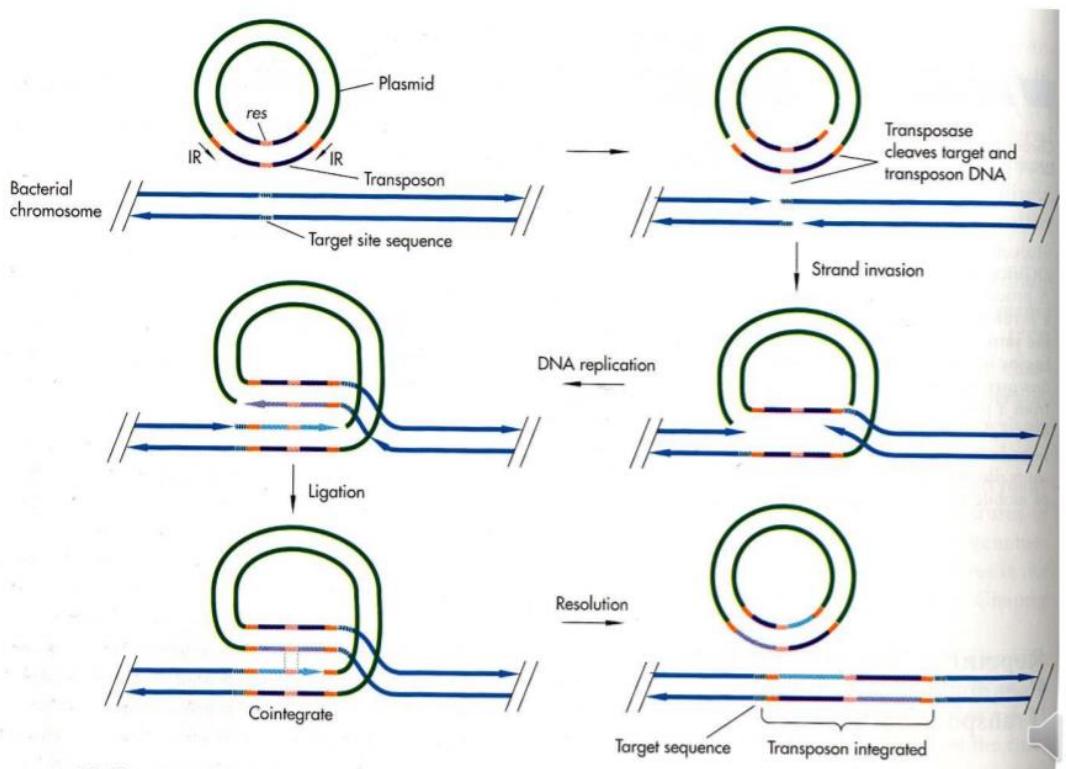
Schéma tyčinkovité bakterie, červeně „bakteriální chromozom“

a modré plazmidy

**Plazmid** (též plasmid) je malá, většinou kruhová molekula DNA schopná replikace, která se přirozeně vyskytuje v cytoplazmě některých bakterií, archebakterií, méně obvykle i u eukaryot. Jedna bakteriální buňka může (v laboratorních podmínkách) obsahovat až několik stovek či vzácně až 3 000 molekul plazmidů.<sup>111</sup> Jeden plazmid má velikost v rozmezí cca 1 000–200 000 párů bází.<sup>111</sup>

Plazmidy obyčejně dosahují přibližně 1–5 % množství DNA ve srovnání s bakteriálním chromozomem. Mohou v sobě kódovat různé doplňující vlastnosti, které ovšem mohou být pro daný organismus velice důležité. Navíc se tyto vlastnosti snadno mohou šířit mezi jednotlivými bakteriemi – uplatňují se totiž při jednom typu horizontální výměny genetické informace, nazývaném konjugace.

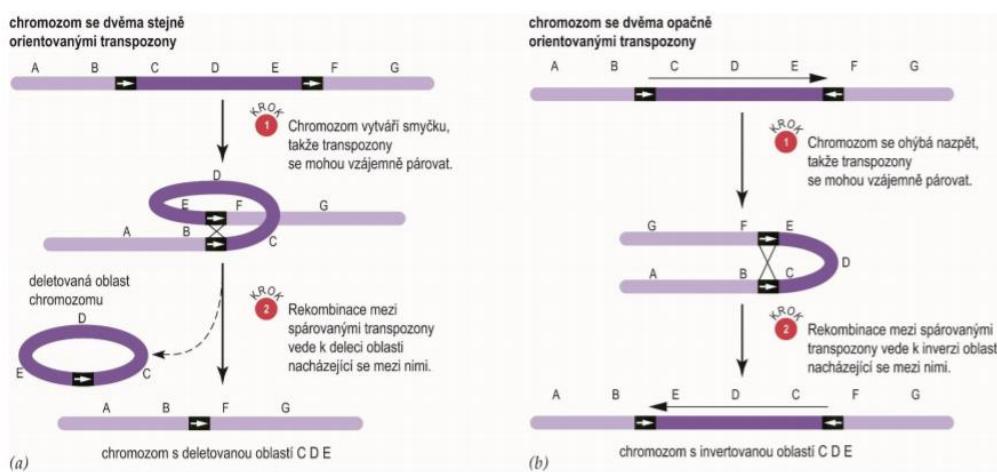
## Mechanismus replikativní transpozice



### 101) ektopické intrachromozomové výměny

#### Chromozomová přeskupení navozená transpozony (ektopické intrachromozomové výměny)

→ = transpozon



- **Chromozom se dvěma stejně orientovanými transpozony**
  - Chromozom vytváří **smyčku** (transpozony se mohou vzájemně párovat)
  - Rekombinace mezi spárovanými transpozony vede k **deleci** oblasti nacházející se mezi nimi
- **Chromozom se dvěma opačně orientovanými transpozony**
  - Chromozom se **ohýbá nazpět** (mohou se párovat)
  - Rekombinace mezi transpozony vede k **inverzi** oblasti nacházející se mezi nimi

## 102) Typy Retroelementy

### RETROELEMENTY



#### 1. NEVIROVÉ RETROELEMENTY (LTR, reverzní transkriptáza, integráza)

##### A. Retrotranspozony (obsahuji LTR)

- \* Ty-elementy u kvasinek (6,3 kb)
- \* Copia-elementy u drozofily (5 kb)

##### B. Retropozony (bez LTR)

- \* krátké sekvence SINE (short interspersed element) - <500 bp,  $10^5$  kopí - odvozeny z genů pro malé RNA, včetně tRNA (pseudogeny)
- \* dlouhé sekvence LINE (long interspersed element) - 6,5 kb, 20 000 - 50 000 kopí u savců

##### C. Retrosekvence (cDNA geny) (bez LTR, reverzní transkriptázy a integrázy)

reverzní transkripty strukturních genů - upravené přepisy bez intronů, s poly(A)

- \* Retrogeny - funkční retrosekvence kódující identický protein jako původní gen
- \* Retropseudogeny - nefunkční formy genů
  - Alu- sekvence (z 7SL RNA, 300 bp, u člověka 500 000 x)

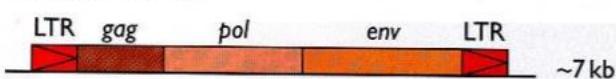


#### 2. VIROVÉ RETROELEMENTY virus HIV

## 103) Struktura retroelementů

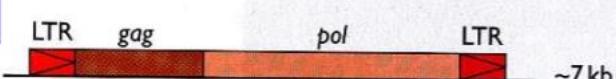
### Srovnání struktury čtyř typů retroelementů

(A) Retrovirus      gag = proteiny virové částice; pol = reverzní transkriptáza/integráza  
env = proteiny lipidového obalu



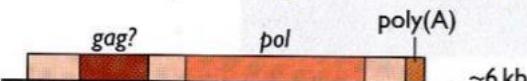
#### (B) Ty1/copia retrotransponzony

**endogenní retroviry**

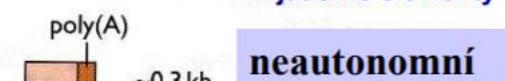


pol  
↓  
RT

#### (C) LINE Long interspersed nuclear elements nemají LTR

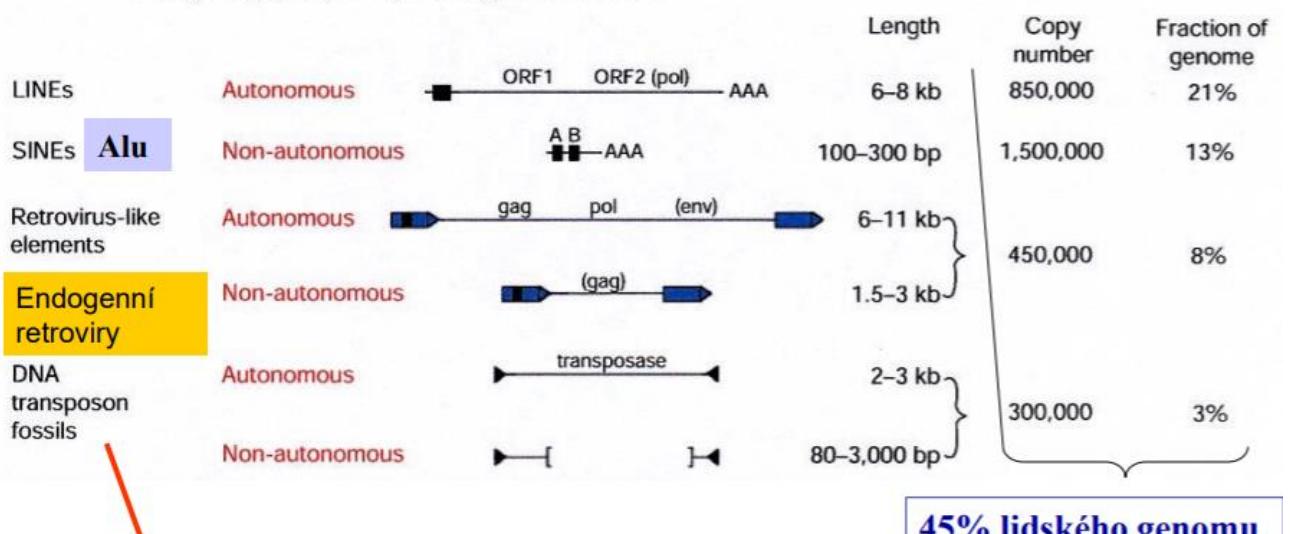


#### (D) SINE Short interspersed nuclear elements Krátké rozptýlené jaderné elementy



## 104) Význam transpozonů v evoluci genomů

#### 4 třídy rozptýlených repeticí v genomu člověka



Inaktivní nejméně 50 milionů let

#### Repetitivní DNA – genetické haraburdí, junk DNA, selfish DNA

Vztah mezi transpozony a hostiteli se vyvíjí, vzájemně se přizpůsobují. Pěkně to vystihuje pravidlo „3K“: konflikt – kompromis – kooperace. Na počátku, když nový typ transpozonu vstoupí horizontálním genovým přenosem do nového druhu, dojde mezi ním a jeho hostitelem k určitému konfliktu. Transpozon způsobí hostiteli něco jako genomový šok, začne se v něm nekontrolovaně množit. Po nějaké době si ale hostitel vytvoří obranné mechanismy, které agresivní transpozon umlčí (viz rámeček na s. 558). V další fázi uzavřou hostitel a transpozon určitý smír (fáze kompromisu). Někdy dokonce transpozony samy začnou regulovat svoji aktivitu, aby tolík neškodily. Nakonec pak mohou i kooperovat, a to tak, že některé z nich hostitel může využít pro své funkce. Mluví se o domestikaci transpozonů.

Dnes je tedy nepochybně, že transpozony nejsou jen parazitické elementy v našich genomech. Podstatně zvyšují evoluční potenciál svých hostitelů. Pomáhají nám přežít a adaptovat se na měnící se podmínky.

105)

#### Definice genového inženýrství

### Genové inženýrství

**Genové inženýrství** se zabývá vytvářením pozměněných či nových genů a jejich zaváděním do organismů s cílem rekonstruovat jejich genetickou výbavu.

Metodickým základem genového inženýrství jsou manipulace s DNA *in vitro* (zejména klonování genů a jejich cílené úpravy). Cílené změny v genetické informaci lze provádět také *in vivo*.

# Využití genového inženýrství

- Základní výzkum: studium struktury a funkce genů a genomů
- Praktické aplikace:
  - Příprava látek významných v lékařství, zemědělství a průmyslu
  - vnášení cizorodých genů do nepříbuzných organizmů a získávání produktů ve velkém množství - překonání reprodukčních barier
  - Příprava látek s novými vlastnostmi pozměňováním stávajících nebo vytvářením nových genů - enzymy, protilátky, vakcíny aj.
  - Pozměňování a zlepšování vlastností organismů
    - příprava mikroorganismů pro biotechnologie,
    - zvyšování výnosů kulturních rostlin a užitkovosti hosp. zvířat (odolnost vůči chorobám, škůdcům nebo zevním vlivům, produkce cizích látek v tělech rostlin a zvířat)
  - Genová terapie - léčba genetických chorob

## 106) Podmínky pro cílenou manipulaci s DNA

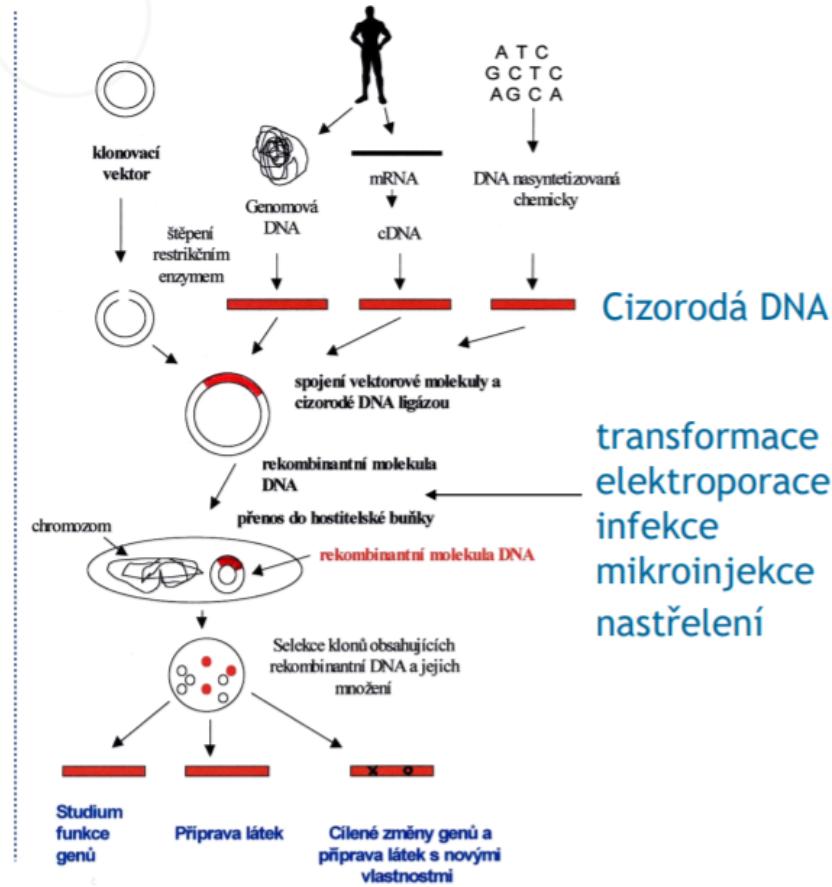
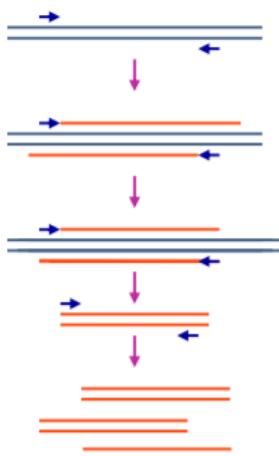
### Objevy, které umožnily cíleně manipulovat s DNA

- restrikční endonukleázy a další enzymy
  - rozštěpení DNA v přesně definovaném místě
  - spojení dvou cizorodých DNA (DNA z různých organismů)
  - syntéza DNA ve zkoumavce
- sekvenování DNA
  - stanovení molekulární struktury genu
- klonování genů
  - zavedení genu do nepříbuzných organismů
  - (překonání mezidruhových barier)
  - pomnožení genu do neomezeného množství
  - cílené zavádění mutací do genu
  - studium projevu pozměněných genů (mutace → funkce)

## 107) Schéma klonování genů pomocí vektorů

# Klonování genů pomocí vektorů

## Klonování genů pomocí PCR



- Spojení vektorové molekuly a cizorodé DNA ligázou
- Přenos do hostitelské buňky
- Selekce klonů obsahujících rekombinantní DNA a jejich množení

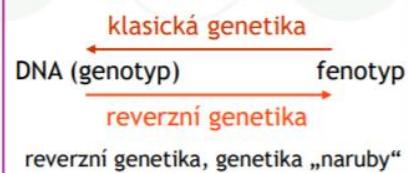
**Klonování DNA** (též **molekulární klonování**) je laboratorní metoda spočívající v namnožení určitého úseku DNA za pomoci enzymatických systémů živých buněk. Je to několikafázový proces, který zahrnuje tři základní kroky:<sup>111</sup>

1. **příprava rekombinantního vektoru.** Není možné použít pouze sekvenci, kterou chceme namnožit. Je třeba totiž zajistit, aby zahrnovala i sekvence důležité pro replikaci, a zamezit, aby došlo k rozložení DNA pomocí nukleáz. Tzv. vektor je DNA, která má tyto vlastnosti a je schopna proniknout do buňky. Jako vektor se používají plazmidy, bakteriofágová DNA, umělé bakteriální chromozomy (BACs) či kosmidy.
2. **přenos takto připravených molekul (vektorů) do buněk.** To se dělá různými způsoby, např. biologicky (pomocí adenovirů či retrovirů), případně chemicky (pomocí látek které vyvolají endocytózu dovnitř buňky) či konečně u prokaryotických buněk tzv. fyzikálně (tepelným šokem či elektroporací). Hostitelskou buňkou bývají bakterie (*Escherichia coli*), kvasinky nebo bakteriofágy.
3. **selekce klonů obsahujících rekombinantní DNA a následně analýza klonované DNA.**

## 108) Mutageneze *in vitro*

# Mutageneze in vitro

site-directed mutagenesis  
místně cílená (řízená) mutageneze  
lokalizovaná mutageneze



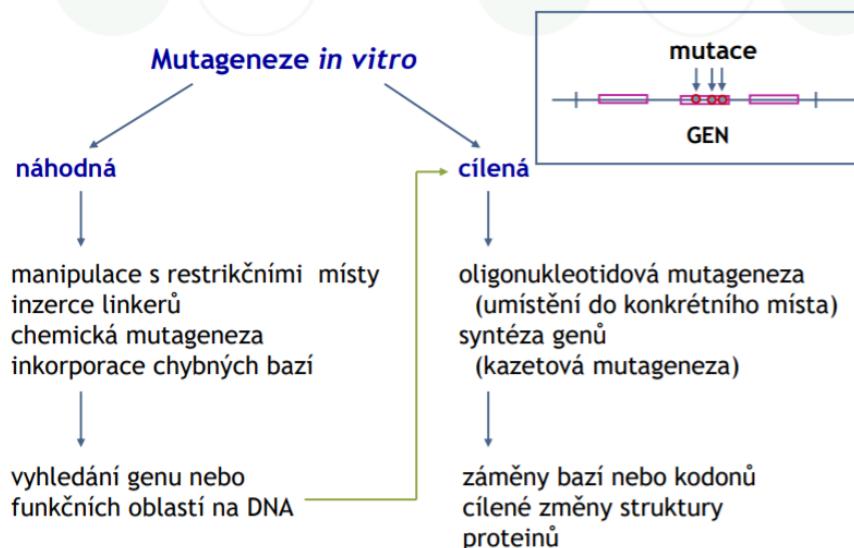
**Mutace se vnášejí do izolované DNA (= *in vitro*)**

typy mutací: substituce, delece, inzerce

**Cíle: analýza vztahu mezi strukturou a funkcí NK**

- Objasnění funkce genů a regulačních oblastí
- Cílení změny aminokyselin v proteinech
- Příprava proteinů s novými vlastnostmi (proteinové inženýrství)
- Příprava transgenních organismů

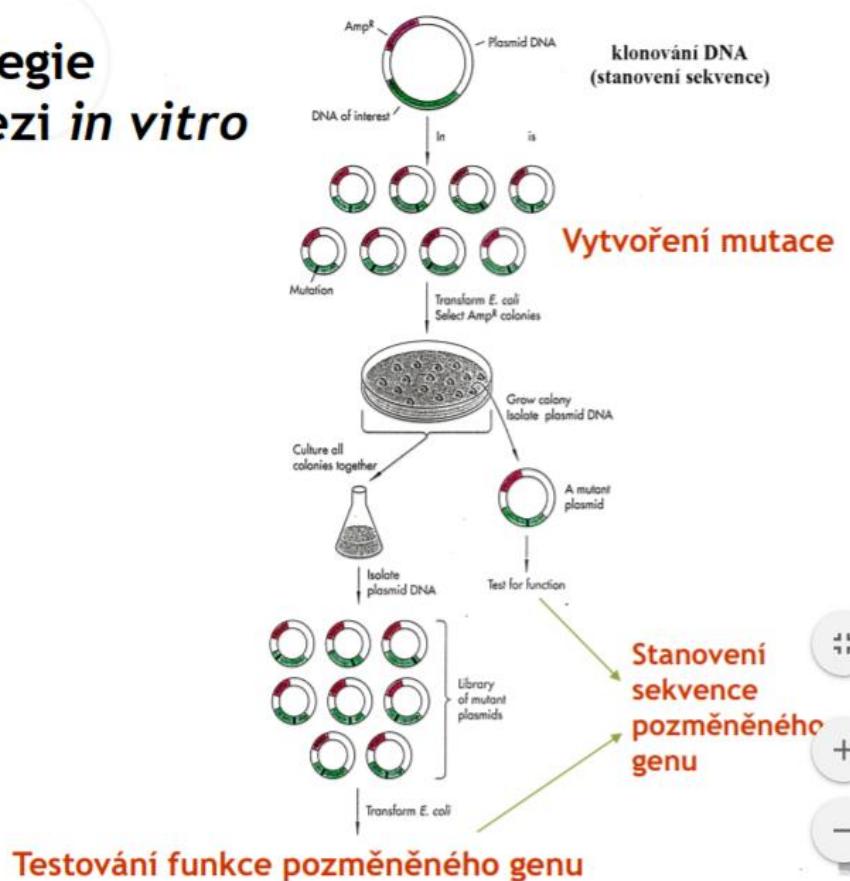
## Mutageneze in vitro



# Způsoby používané při mutagenezi *in vitro*

1. Manipulace s restrikčními místy a enzymatické úpravy DNA
2. Oligonukleotidová mutageneze (extenze primeru)
3. Chemická mutageneze
4. Kazetová mutageneze
5. Metody založené na PCR
6. Mutageneze pomocí supresorových tRNA

## Obecná strategie při mutagenezi *in vitro*

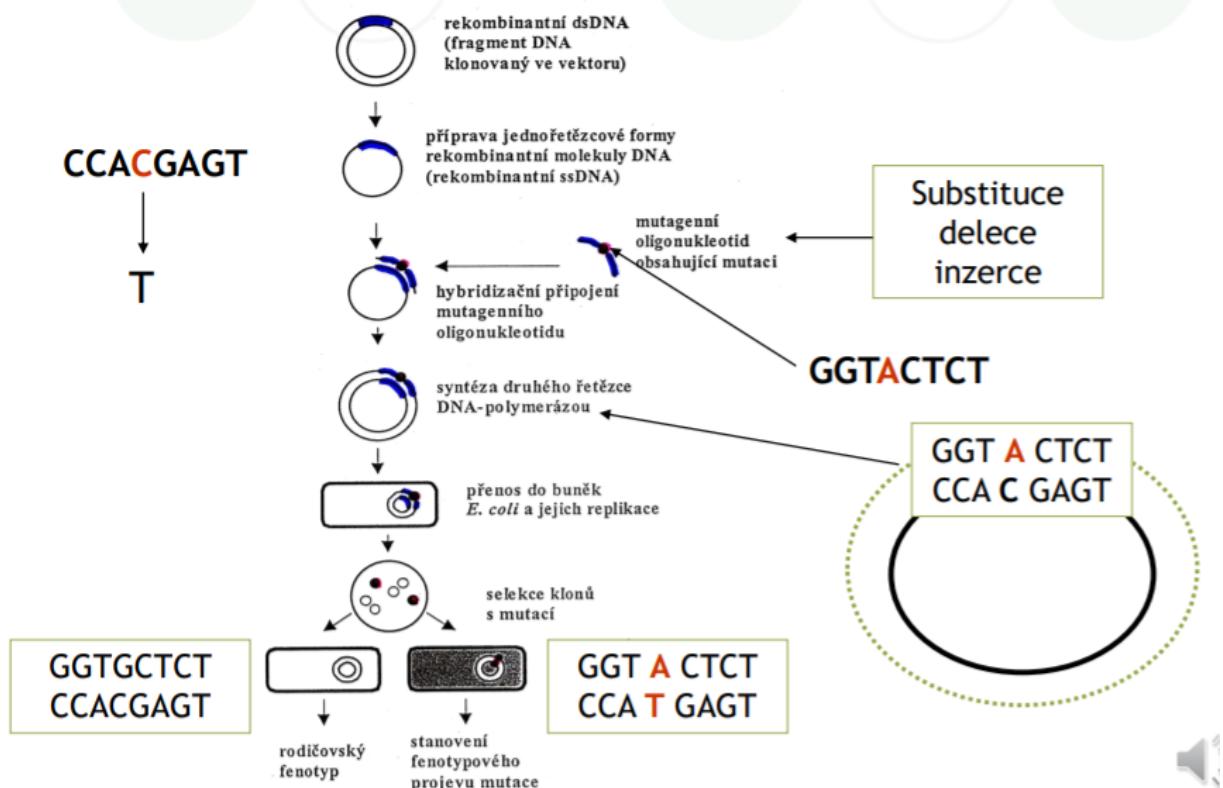


Mutace (substituce, delece, inzerce) se vnášejí do izolované DNA.

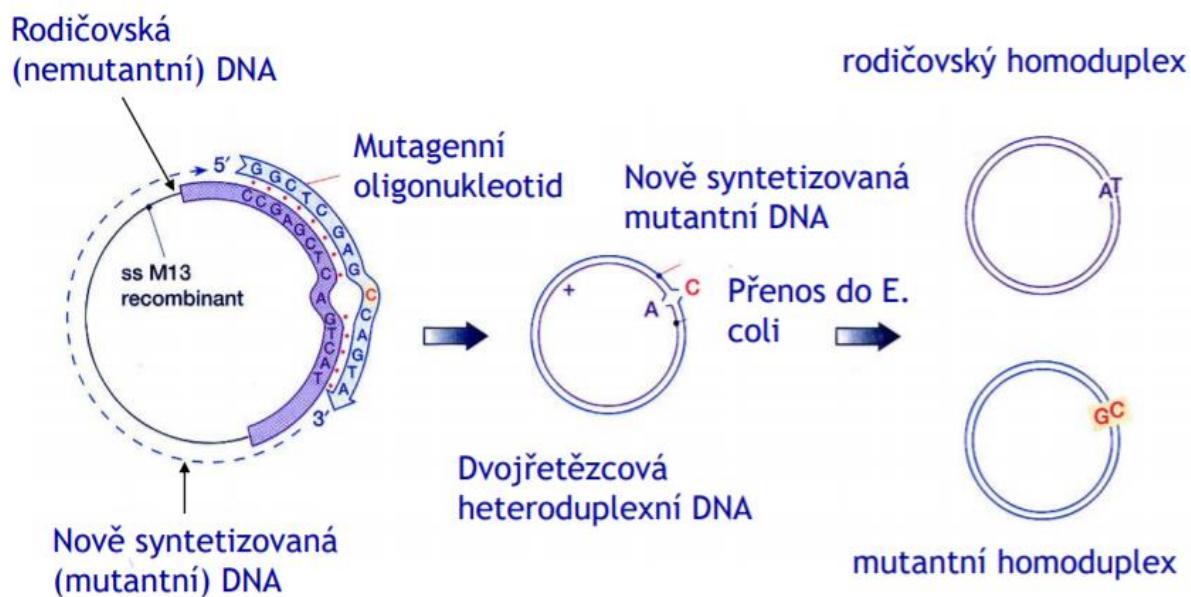
- Náhodná
- Cílená

## 109) Mutageneze pomocí mutantních oligonukleotidů

# Mutageneze pomocí mutantních oligonukleotidů



## Mutageneze pomocí mutagenních oligonukleotidů

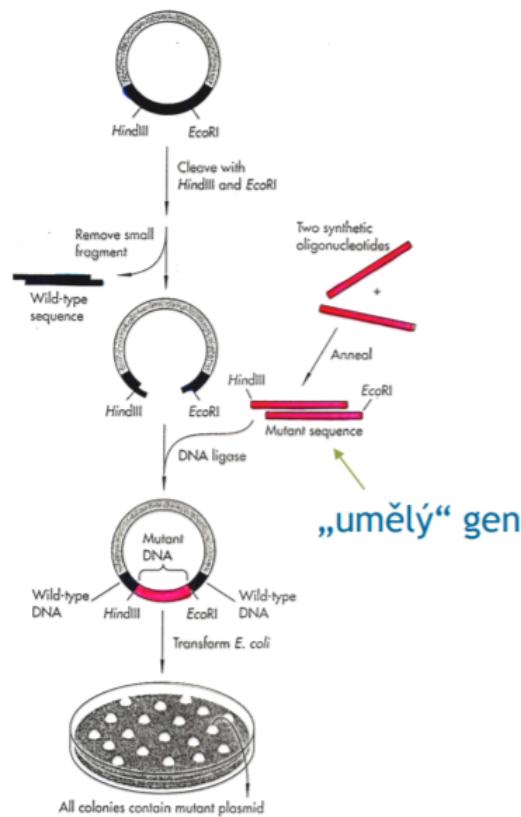


Dvouřetězcová DNA se předělá na jednořetězcovou k ní se přidá zmutovaný oligonukleotid a vznikne opět dvouřetězcová DNA. Ta se přenese do *E. Coli* pro replikaci a poté selektujeme klony.

(Rekombinantní dsDNA -> příprava jednořetězcové formy -> hybridizační připojení mutagenního oligonukleotidu -> syntéza druhého řetězce DNA-polymerázou -> přenos do buněk *E. coli* a jejich replikace -> selekce klonů s mutací)

## 110) Kazetová mutace

### Kazetová mutace



Plazmid se rozštěpí a fragment se odejme - vzniknou lepivé konce na které se přidá zmutovaná sekvence. Nakonec se plazmid začlení do e. coli a selektujeme.

## 111) Editace genomů

### Editace genomů

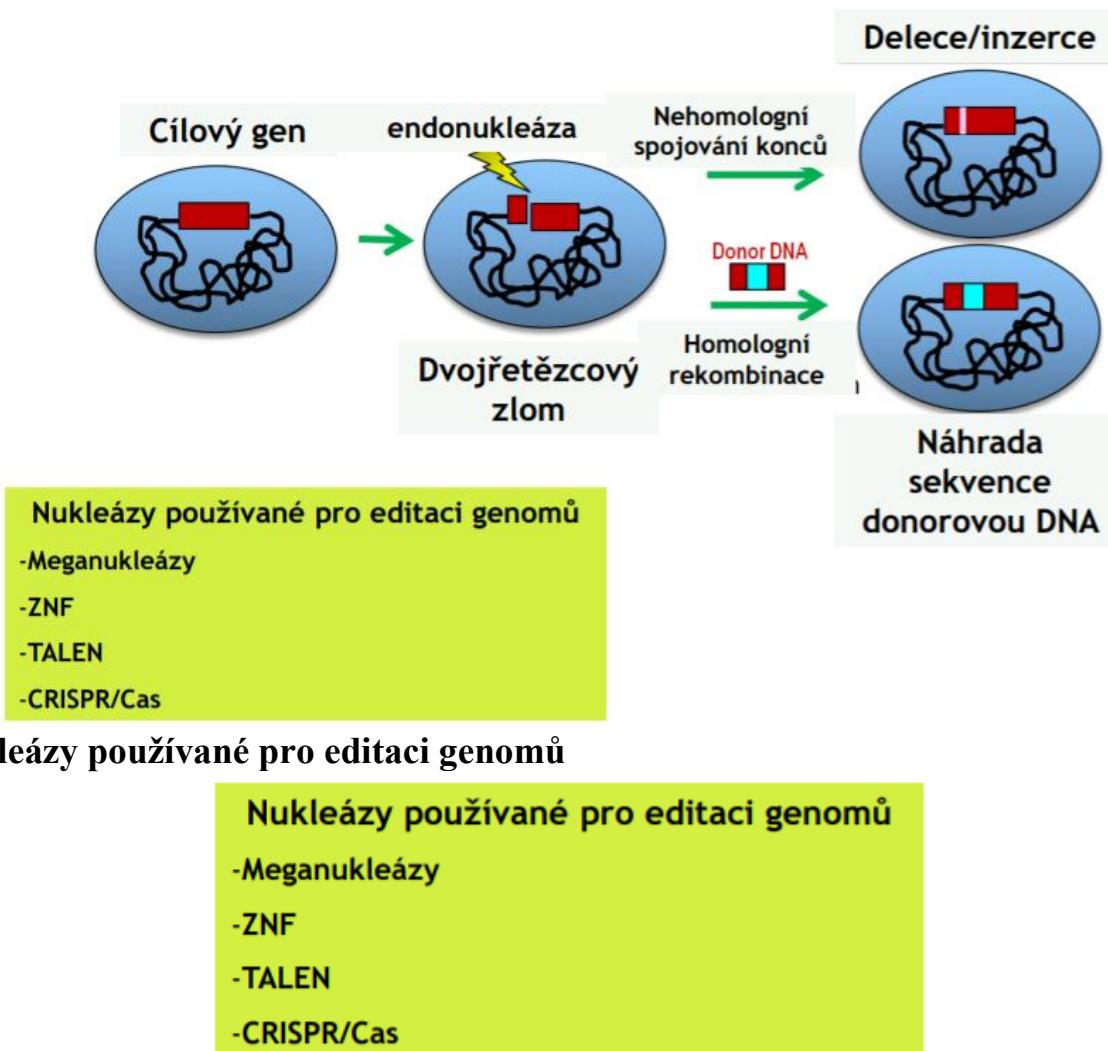
#### Genome editing, or genome editing with engineered nucleases (GEEN)

Postupy genového inženýrství, při nichž se do vybraného místa v cílové DNA pomocí uměle připravených nukleáz (tzv. molekulárních nůžek) vnáší inzerce, delece a nebo se stávající sekvence nahrazuje za jiné (nahrada alel).

**Tyto nukleázy vytvářejí na určených místech genomu dvouřetězcové zlomy (DSBs: double-stranded breaks), čímž vyvolávají přirozené endogenní buněčné procesy vedoucí k reparaci zlomů:**

- Homologní rekombinací (HR) HDR = homology directed recombination
- Nehomologní spojování volných konců (NHEJ: nonhomologous end-joining)

## Editace genomů (chromosome engineering)



### 112) Nukleázy používané pro editaci genomů

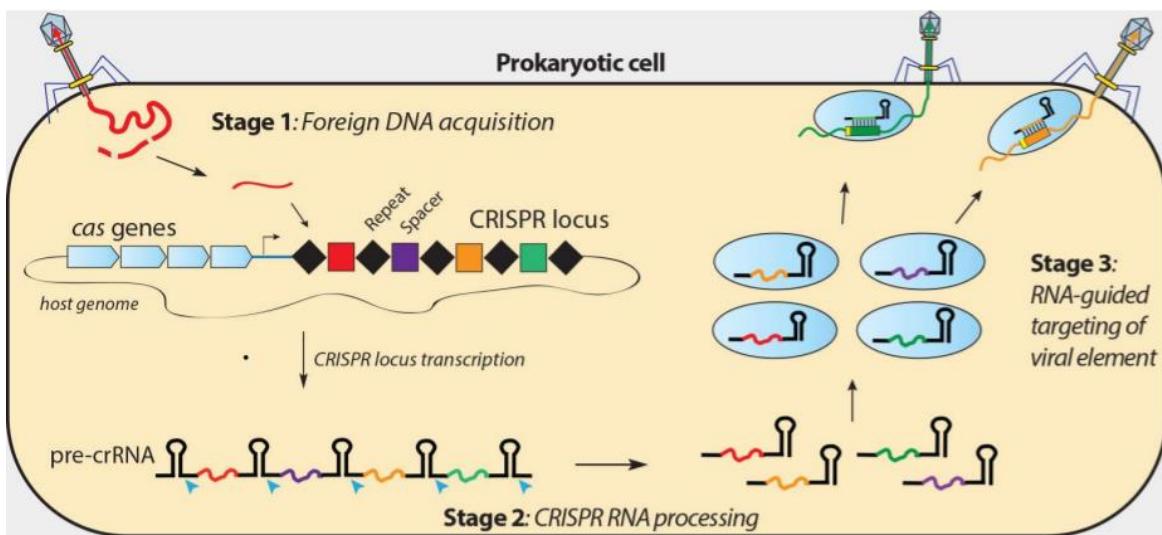
**Nukleázy používané pro editaci genomů**

- Meganukleázy
- ZNF
- TALEN
- CRISPR/Cas

### 113) CRISPR-Cas9 systém

## CRISPR-Cas9 systém

- **Nobelova cena 2020 - Doudna J., Charpentier E.** - "for the development of a method for genome editing"
- **CRISPR** (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) – clustery pravidelně rozmištěných krátkých palindromických repetic
- **Cas** – CRISPR-associated system (Cas9 – endonukleázová a helikázová aktivita)
- **Genetické nůžky** – systém umožnuje precizní editaci cílové DNA pomocí vytvoření DSBs v molekule DNA a využívá reparační mechanizmy buňky k napravě těchto zlomů
  - *Naváděcí RNA (gRNA)* – komplementární k cílové sekvenci na DNA
  - *Cas9 protein* – iniciuje zlomy na DNA
- Inkorporace do buněk nejčastěji transfekcí pomocí plazmidů

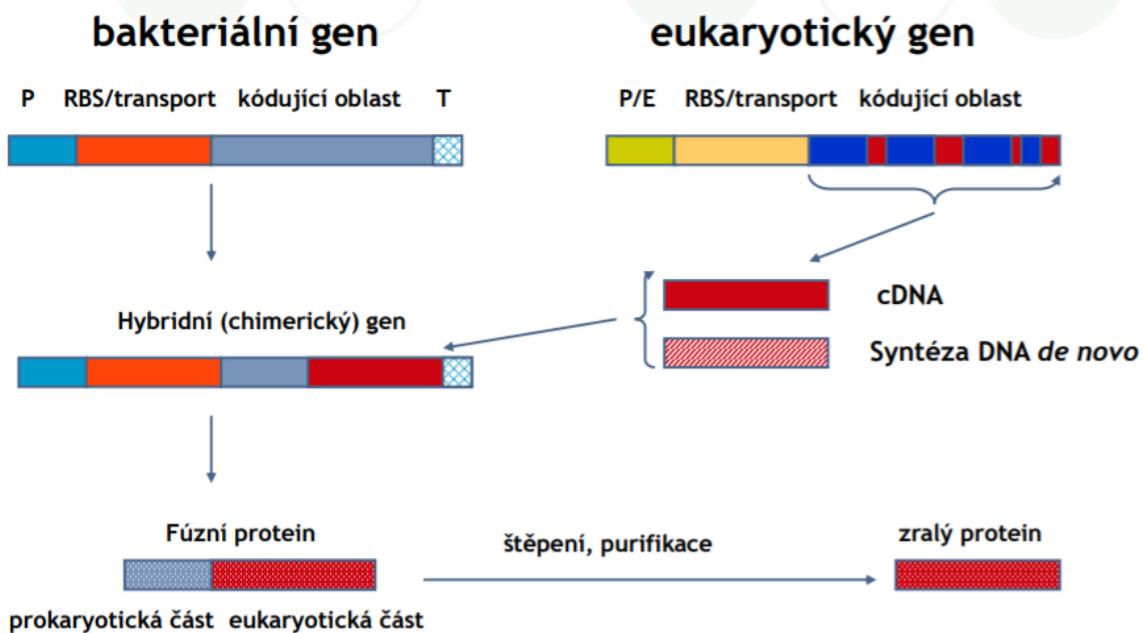


## Výhody

- Velmi přesné editace sekvencí dle gRNA – lze využít několik najednou
- Mutace v genech pro Cas = vypínání / zapínání genů
- Modelové organismy a buňky (zárodečné i somatické, kmenové buňky...)
- Biomedicína (léčba dědičných onemocnění, personifikovaná medicína, onkologie...)

## 114) Zajištění exprese cizorodých genů

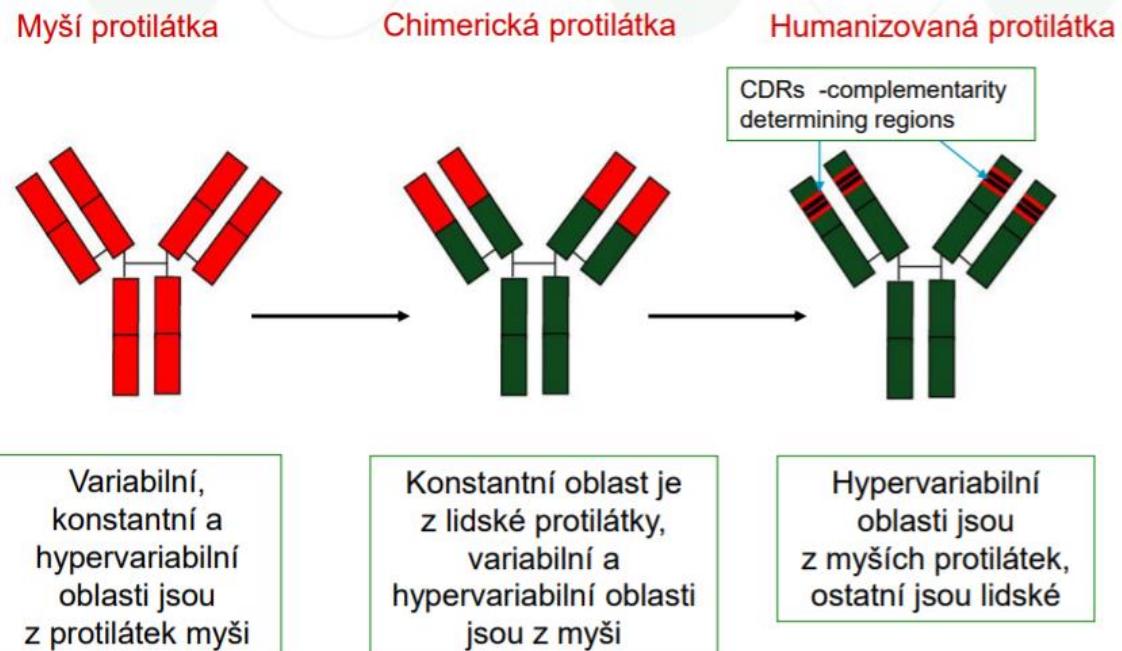
### Zajištění exprese cizorodých genů



Prokaryotický a eukaryotický gen se pomocí syntézy převede na **hybridní gen**, který je po sestřihu převeden na **fúzní protein** (obsahující prokaryotickou a eukaryotickou část) a poté štěpením nebo purifikací získáme **zralý protein**.

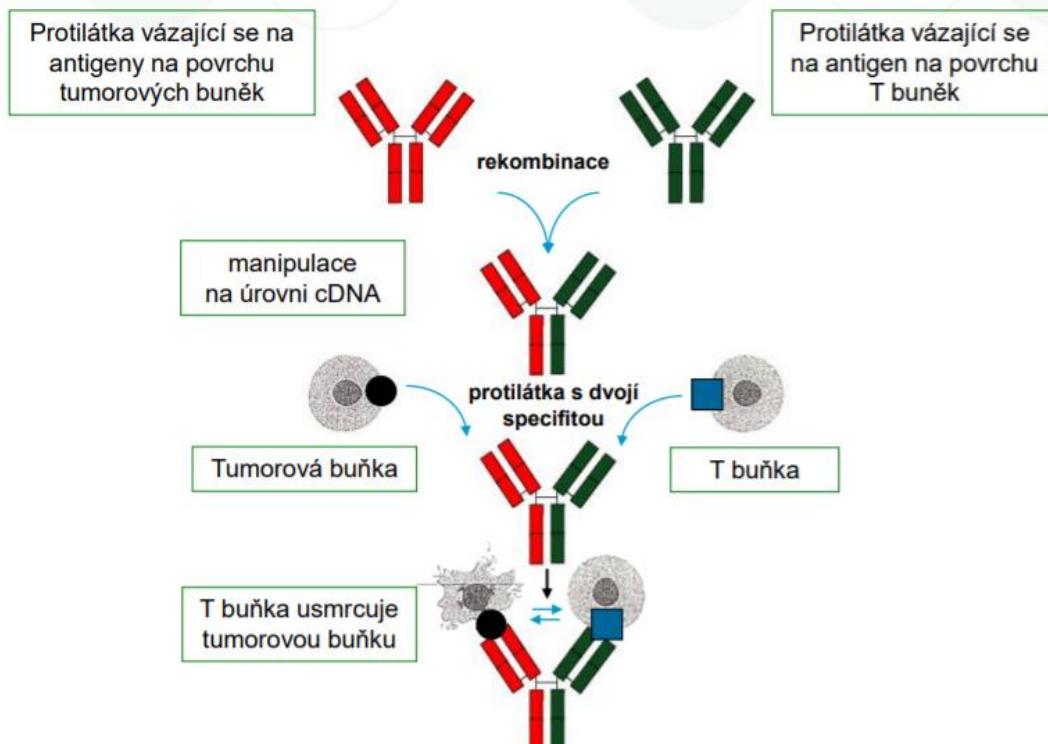
## 115) Příprava humanizovaných protilátek

# Příprava humanizovaných protilátek



## 116) Protilátka s dvojí specifitou

### Protilátka s dvojí specifitou



## 117) Využití genového inženýrství u rostlin

# Využití genového inženýrství u rostlin

## A. Potraviny a krmiva

- Ovlivňování agronomických vlastností
  - Rezistence k herbicidům
  - Rezistence k patogenům (hmyzu, virům, plísňím apod.)
  - Tolerance ke stresům (vodní stres – sucho, mráz; osmotický stres – zasolení půd)
- Modifikace posklizňových vlastností
  - Prodloužení skladovatelnosti
  - Zpomalení zrání a navození rezistence k skládkovým chorobám
  - Vylepšování nutriční hodnoty a chuti

## Využití genového inženýrství u rostlin

## B. Produkce sekundárních metabolitů

- Studium a přenos genů pro klíčové enzymy biosyntetických druh
- Farmakologické přípravky

## C. Technické plodiny

- Produkce škrobu a olejů pro průmyslové využití
- Biodegradovatelné plasty

## D. Fytoremediace

### 118) Transgenní rostliny

## Transgenní rostliny

### A. Rezistence k virům

- Zavedení genu pro plášťový protein VTM do Ti-plazmidu, přenos do tabáku, rajčat
- Vakcína je multivalentní, působí na jiné virózy

### B. Rezistence k hmyzím škůdcům

- Vnesení genu pro endotoxin z **Bacillus thuringiensis** působícího na hmyzí škůdce (BT-rostliny: kukuřice, tabák, brambor, aj.)
- Nepřímý způsob – naklonování genu pro tvorbu toxinu do bakterií kolonizujících rostliny (listy, kořeny) – např. *Pseudomonas fluorescens*

### C. Rezistence k herbicidům

- Např. glyfotátu (nejpoužívanější neselektivní herbicid) inhibuje enzymy tvorby esenciálních aminokyselin
  1. Vnesení genu pro tvorbu cílového enzymu (větší množství zajistí odolnost rostlin)
  2. Vnesení genu pro tvorbu pozměněného (méně citlivého) enzymu
  3. Vnesení genu pro tvorbu enzymu, který inaktivuje herbicid

# Transgenní rostliny

## D. Vylepšení nutričních hodnot plodů a semen nebo rostlinných produktů využívaných průmyslově

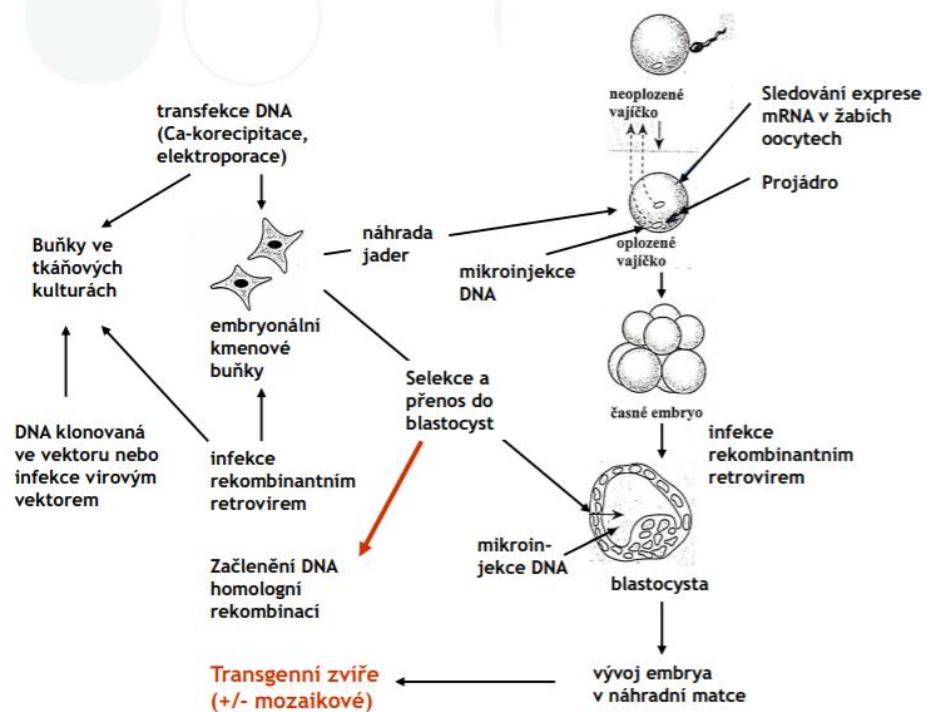
- Rajče FlavrSavr fy Calgene – transgen: antisense mRNA genu pro polygalakturonidasu – prodloužená konzumní zralost
- Rýže – vhodná pro alergiky
- Řepka – olej ze semen obsahující zvýšený podíl kys. Laurové (mýdla a detergenty)
- Řepka – olej ze semen bohatý na myristát (kosmetika) nebo kys. eruková (mazadla a výroba nylonu)
- Arabidopsis a řepka – tvorba biodegradovatelných polymerů v chloroplastech využitelných jako plasty (polyhydroxybutyrát, polymery podobné polyesteru ve vláknech bavlníku)

## E. Produkce vakcín rostlinami („jedlé vakcíny“)

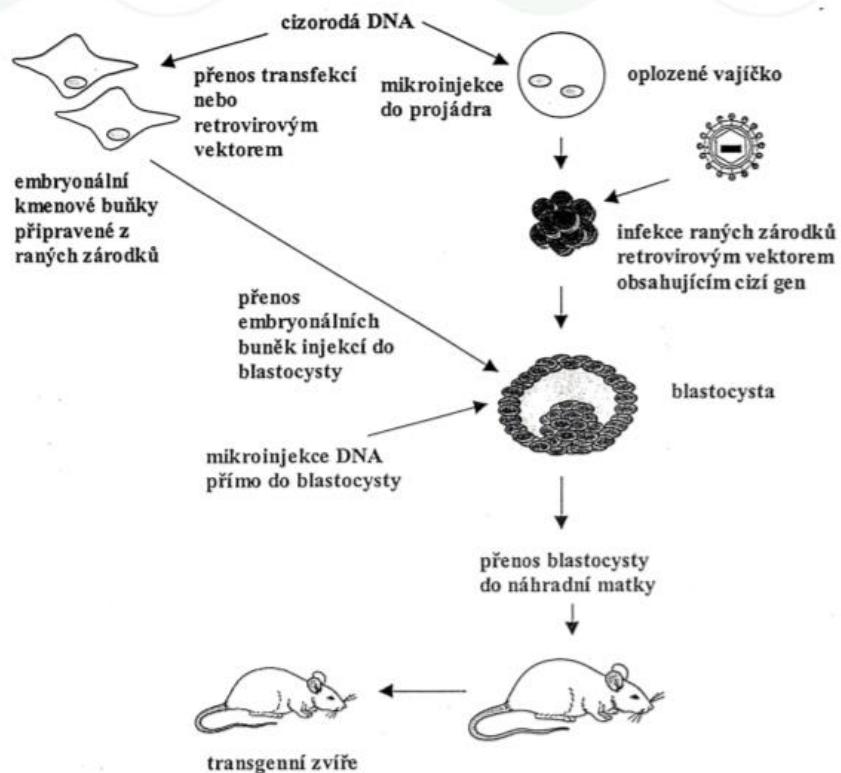
- Syrová zelenina obsahující antigen (vakcínu), který indukuje tvorbu imunoglobulinů mukózního imunitního systému v zažívacím traktu
  - Povrchový antigen viru hepatitidy B
  - Podjednotka B toxinu cholery

## 119) Příprava transgenních savců

### Způsoby přenosu cizích genů do savčích buněk



## Příprava transgenních savců



# Příprava transgenních savců

- přenos genů do buněk, které musí být schopny dát vznik celému jedinci
- využití zárodečných buněk (x rostliny – somatické buňky)
- je potřeba mít vhodný systém selekce
- celá řada možností jak připravit transgenní myš

V praxi se používají především 2:

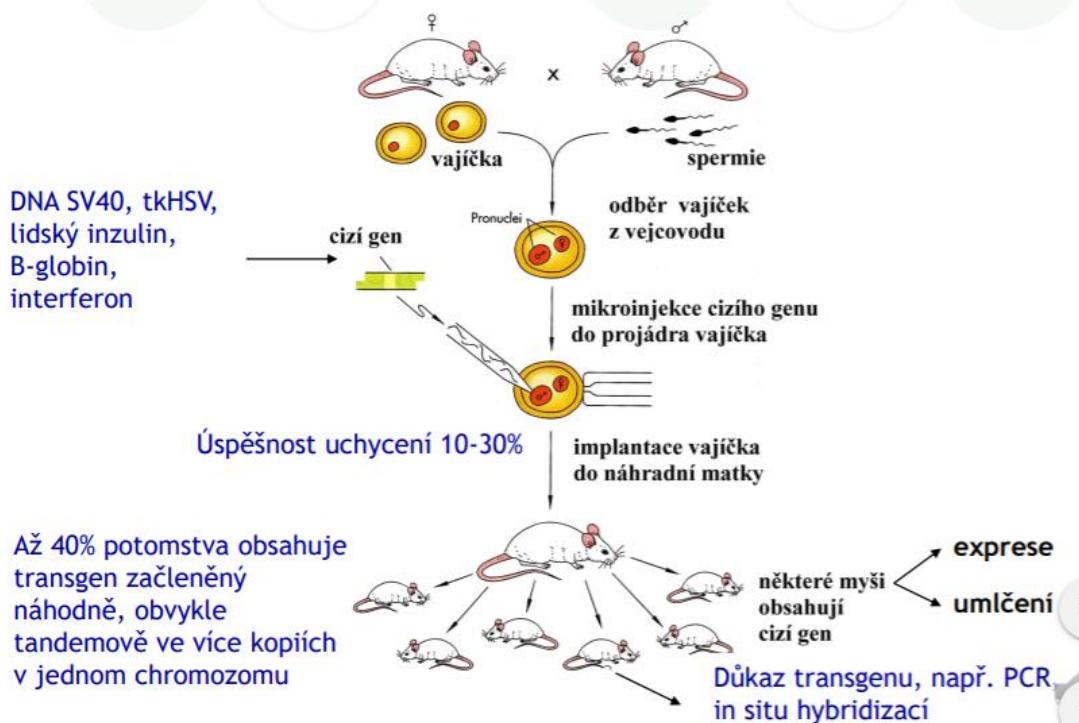
a) přímá mikroinjekce cizorodé DNA pro prvojádra oplozeného vajíčka

- obvykle samčí prvojádro – větší a blíže povrchu
- přenos do pseudopregnantní samice (hormony, kopulace se steril. samečkem)

b) genové manipulace s ESC a injekce do blastocysty

- přesné (cílené) modifikace genomu – lze provádět selekci in vitro (HR)
- přenos zpět do blastocysty a poté do náhradní matky

## Vytváření transgenních myší mikroinjekcí cizího genu do oplozeného vajíčka



# Příklady transgenních živočichů

- Zvířata (myši, drůbež, hospodářská zvířata, ryby) obsahující gen pro růstový hormon – rychlejší růst, změna vlastností produktů
- Přežvýkavci obsahující ve střevě GMO-mikroorganismy, které redukují toxicitu některých rostlin (rozšíření potenciálu krmiv)
- Drůbež s pozměněnými trávicími schopnostmi (celulóza, lignin, tuky)
- Drůbež se zvýšeným obsahem lysozymu ve vejcích (využití v průmyslu a farmakologii)
- Ovce s vylepšenou srstí
- **Myši s pozměněnými nebo inaktivovanými geny**
  - studium lidských genetických poruch:
  - neurodegenerativní, imunitní, hormonální choroby,
  - vliv faktorů na organismus faktorů (např. léků, mutagenů)
  - studium poruch paměti
- Zvířata jako dárci orgánů pro transplantace (xenotransplantáty)
  - orgány s pozměněnými antigeními vlastnostmi vhodné pro člověka
- **Zvířata produkovající cizorodé látky v mléce, moči, krvi nebo tkáních (animal farming: zvířata jako bioreaktory)**

## 120) Zvířata jako bioreaktory

### Zvířata jako bioreaktory: „animal farming“



## 121) Genové terapie

## Možné způsoby léčby genetických onemocnění

1. **Úprava diety - karenční terapie** (galaktosemie, fenylketonurie)
2. **Substituční terapie** (hemofilie, diabetes, nanismus)
3. **Genová terapie** (kauzální léčba)
  - vnesení funkčního genu (funkční alely) do genomu
  - cílená záměna poškozeného genu homologní rekombinací
  - cílené usmrcování geneticky pozměněných buněk
  - cílená inhibice exprese genů zodpovědných za genetickou poruchu

## Genové terapie

- Léčba genetických chorob
  - dědičných
  - nádorových
- Podle typu buněk, do nichž jsou geny vneseny:
  - A. genová terapie zárodečných buněk
  - B. genová terapie somatických buněk
- Podle způsobu přenosu genů:
  - A. genová terapie in vitro (ex vivo)
  - B. genová terapie in vivo

122) Vlastnosti buněk vhodných jako vektory pro zavádění genů do organismu

## Vlastnosti buněk vhodných jako vektory pro zavádění genů do organismu

1. Snadné získání buněk z těla
  2. Snadná kultivace v kulturách in vitro
  3. Odolnost k manipulacím spojeným se zaváděním genů
  4. Schopnost navrácení buněk do organismu, kde se musí pomnožovat přetrvávat po dostatečně dlouhou dobu
- 
- Kmenové buňky kostní dřeně
  - Kožní fibroblasty
  - Hepatocyty
  - Myelocyty

### 123) Viry jako vektory

#### Viry jako vektory

nejpoužívanější v GT, velmi dobře infikují lidské buňky. Asi 70% pokusů s GT

- **Onkoretroviry:** transgen začleňují do chromozomu do dělících se buněk - výhoda při léčbě nádorů (např. nádory mozku). Riziko inzerční inaktivace endogenů
- **Adenoviry:** infikují nedělící se buňky, DNA zůstává jako epizom v jádře. Jsou bezpečné, ale exprese je krátkodobá. Problém je imunogenicita. Uplatnění tam, kde je nutná vysoká exprese během krátké doby, např při léčbě rakoviny pro zabítí buněk.
- **Adenoasociované viry AAVs:** Nepatogenní, schopné infekce jen s využitím adenovirů jako pomocných virů k replikaci. Integrují DNA do chromozomu na specifické místo, umožňující dlouhodobou expresi bez rizika inzerční mutageneze.
- **Lentiviry:** HIV (retrovirus) – infikují nedělící se buňky. Do chromozomu se integrují náhodně - dlouhodobá exprese. Nutnost odstranění virových genů a zachování schopnosti infikovat nedělící se buňky.
- **Herpes simplex viry:** Mají tropii pro CNS, v latentní infekci jsou epizomální, tj. dlouhodobě exprimují transgen a šíří jej do okolní synaptické sítě. Hlavní úloha: přenos genů do neuronů pro léčbu nervových chorob (Parkinsonova ch.) a tumory CNS.

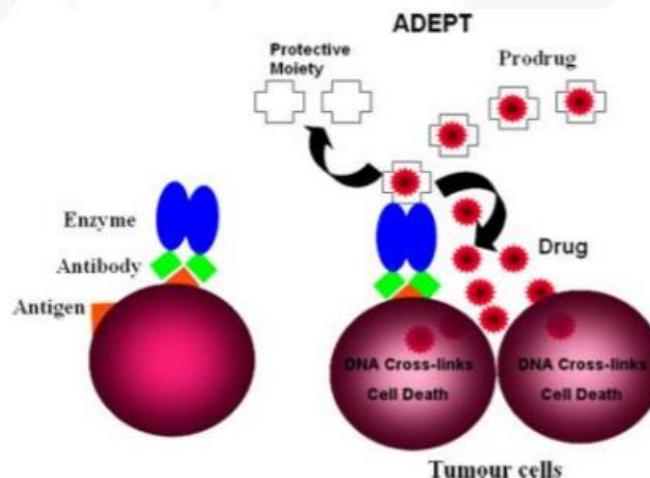
### 124) Příklady léčby nádorů pomocí genové terapie

## Příklady léčby nádorů pomocí genové terapie

Typ nádoru	Změněné buňky	Použitá strategie genové terapie
Vaječník	Nádorové buňky	Intraperitoneální injekce retrovirů nebo adenovirů s genem p53 nebo BRCA1 – obnova kontroly buněčného cyklu
Vaječník	Nádorové buňky	Injekce adenoviru s scFv protilátkou proti onkoproteinu ErbB2. Snaha o inaktivaci růstového signálu
Maligní melanom	Tumor-infiltrující lymfocyty (TILs)	Extrakce TILs z tumoru a jejich pomnožení. Infekce TILs retrovirem s genem pro nekrotický faktor, který pak působí na okolní buňky v nádoru
Různé nádory	Nádorové buňky	Transfekce nádorových buněk retrovirem exprimujícím povrchový antigen (HLA-B7) nebo cytokin (IL-12), což by mělo zvýšit imunogenicitu tumoru, takže jej imunitní systém snáze zničí
prostata	Dendritické buňky	Na autologní dendritické buňky se působí tumorovým antigenem nebo cDNA exprimující antigen aby zahájily imunitní odpověď vůči tumoru
Maligní gliom (mozek)	Nádorové buňky	Injekce retrovíru s TK do tumoru. Jsou infikovány jen rostoucí buňky. Je přidán gancyklovir, který TK-pozitivní buňky (tj. tumorové) mění na toxin a jsou tak samy selektivně usmrcovaný

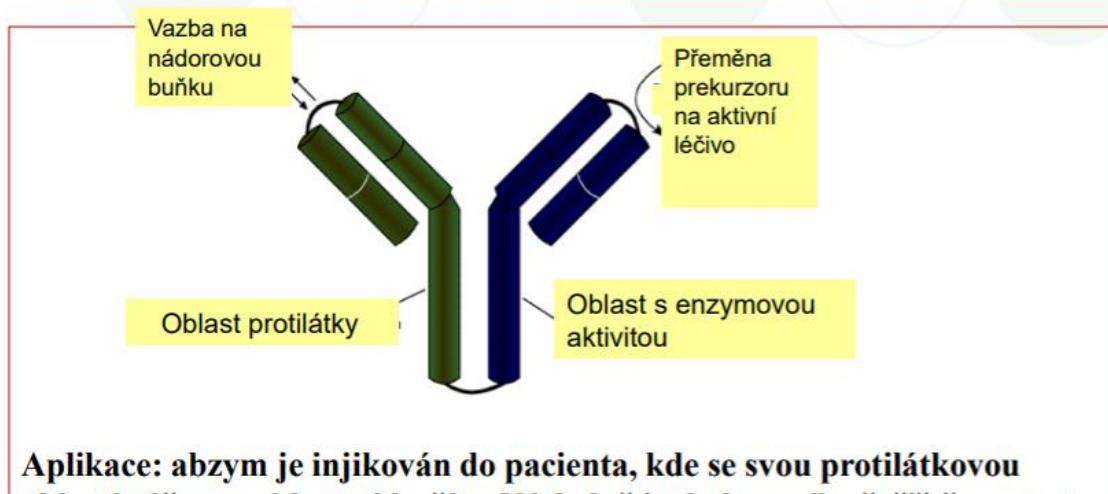
### 125) Abzymy

#### Princip Antibody-Directed Abzyme Prodrug Therapy Antibody-Directed Abzyme Prodrug Therapy (ADEPT)



Protilátku (abzym) dopraví enzym k receptorům na nádorových buňkách, kde enzym konvertuje netoxický prekurzor (prodrug) na látku, která účinně nádorové buňky usmrcuje. Tím je omezen toxickej účinek na normální buňky.

## Struktura abzymu pro destrukci nádorových buněk



**Aplikace:** abzym je injikován do pacienta, kde se svou protilátkovou oblastí váže na nádorové buňky. Následně je do krevního řečiště vpraven prekurzor léčiva, který je enzymovou aktivitou abzymu konvertován na aktivní léčivo. To působí jen na nádorovou buňku, na níž je abzym navázán. Tím jsou selektivně destruovány jen nádorové buňky a nikoliv normální buňky, na něž se abzym neváže.

63

### 126) Postupy genové terapie nádorů

#### Genová terapie nádorů

1. Dodání genu: obnova funkce nádorových supresorových genů
2. Inaktivace genu: zábrana exprese aktivovaného onkogenu
3. Genetická manipulace: vyvolání apoptózy nádorových buněk
4. Modifikace nádorové buňky tak, aby byla více antigenní a byla zničena imunitním systémem
5. Modifikace dendritických buněk ke zvýšení nádorově-specifické imunitní odpovědi
6. Použití geneticky upravených onkolytických virů selektivně usmrcujících nádorové buňky
7. **Genetická modifikace nádorových buněk zajišťující konverzi netoxického prekurzoru na toxicní produkt**