

LÉKAŘSKÁ BIOLOGIE A GENETIKA

2. díl

Milada Kohoutová
a kolektiv

UČEBNÍ TEXTY
UNIVERZITY KARLOVY

KAROLINUM

Lékařská biologie a genetika

2. díl

Milada Kohoutová a kolektiv

Recenzovali:

prof. MUDr. Radim Brdička, DrSc.

doc. RNDr. Petr Pikálek, CSc.

Autorský kolektiv:

doc. MUDr. Milada Kohoutová, CSc.

doc. MUDr. Drahomíra Křenová, CSc.

MUDr. František Liška, Ph.D.

doc. RNDr. Berta Otová, CSc.

doc. MUDr. Ondřej Šeda, Ph.D.



**Financováno
Evropskou unií**
NextGenerationEU



**Národní
plán
obnovy**



Publikace byla vydána za podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy a Národního plánu obnovy v rámci projektu Transformace pro VŠ na UK (reg. č. NPO_UK_MSMT-16602/2022).

Vydala Univerzita Karlova

Nakladatelství Karolinum

jako učební text pro 1. lékařskou fakultu UK

Praha 2023

Sazba DTP Nakladatelství Karolinum

Vydání první elektronické, odpovídá třetímu tištěnému vydání

© Univerzita Karlova, 2023

© Milada Kohoutová a kolektiv, 2023

Text neprošel jazykovou ani redakční úpravou nakladatelství.

ISBN 978-80-246-5732-5

ISBN 978-80-246-5738-7 (pdf)



Univerzita Karlova

Nakladatelství Karolinum

www.karolinum.cz

ebooks@karolinum.cz

Obsah

Předmluva	7
7. Molekulární genetik (M. Kohoutová)	9
7.1 Úvod do molekulární genetiky	9
7.1.1 Nukleové kyseliny	9
7.1.2 Replikace DNA	12
7.1.3 Geny	14
7.1.4 Expres genetiké informace	15
7.1.4.1 Transkripce	15
7.1.4.2 Translace	18
7.1.5 Mimochromosomální DNA – mitochondriální genom	21
7.2 Regulace genové exprese v mnohobuněčném organismu	22
7.2.1 Regulace na úrovni DNA	23
7.2.2 Regulace na úrovni transkripce	23
7.2.2.1 Transkripční faktory	23
7.2.2.2 Regulace exprese genu extracelulárními signály	25
7.2.2.3 Alternativní transkripce individuálních genů	28
7.2.2.4 Regulace transkripce mitochondriálních genů	29
7.2.2.5 Kaskádová regulace funkce genů	29
7.2.3 Regulace na úrovni translace	30
7.2.4 Epigenetické mechanismy	31
7.3 Lidský genom	32
7.3.1 Jaderný genom	33
7.3.1.1 Geny	33
7.3.1.2 Mimogenová DNA	33
7.3.2 Mitochondriální genom	35
7.4 Analýza nukleových kyselin	35
7.4.1 Množení DNA	35
7.4.1.1 Množení DNA uvnitř hostitelských buněk	36
7.4.1.2 Polymerasová řetězová reakce (PCR)	41
7.4.2 Hybridizace nukleových kyselin	43
7.5 Nestabilita lidského genomu	48
7.5.1 Mutace jako zdroj genetikých variací	48
7.5.2 Rozdělení genových mutací z hlediska změn v sekvenci DNA	48
7.5.3 Rozdělení genových mutací z hlediska účinku na genový produkt	48
7.5.4 Mutace jako příčina onemocnění	50
7.5.5 Mutace v mitochondriálním genomu	50
7.5.6 Mutace jako příčina vzniku polymorfismů nukleových kyselin	50
7.5.6.1 Jednonukleotidové polymorfismy	51
7.5.6.2 Polymorfismus v délce restrikčních fragmentů	51
7.5.6.3 Polymorfismus v počtu tandemových repetit	53
7.5.7 Frekvence mutací	55
7.5.7.1 Detekce frekvence mutací	55

7.5.7.2	Riziko opakování mutací u sourozenců	56
7.5.7.3	Vliv věku rodičů na frekvenci mutací	56
7.6	Mutageny a opravné systémy DNA	57
7.6.1	Vliv mutagenů	57
7.6.2	Opravné systémy DNA	62
7.6.2.1	Syndromy podmíněné poruchami reparačních mechanismů	64
7.7	Molekulární a biochemická podstata dědičných chorob	66
7.7.1	Hemoglobiny a hemoglobinopatie	67
7.7.1.1	Genetická heterogenita hemoglobinů	67
7.7.1.2	Poruchy struktury hemoglobinu	68
7.7.1.3	Poruchy syntézy hemoglobinu, thalasemie	69
7.7.2	Vrozené odchylky metabolismu	70
7.7.3	Receptory a poruchy jejich funkce	73
7.7.4	Poruchy molekulárního transportu	75
7.7.5	Defekt struktury buněk	77
7.7.6	Onemocnění způsobená dynamickými mutacemi	78
7.7.7	Mitochondriální choroby	79
7.7.8	Prionové choroby	79
7.8	Mapování lidského genomu	80
7.8.1	Genetické mapování	80
7.8.2	Fyzické mapování	81
7.8.2.1	Cytogenetický přístup	81
7.8.2.2	Somatická buněčná hybridizace	81
7.8.2.3	Funkční klonování	83
7.8.2.4	Poziční klonování	83
7.8.3	Projekt lidského genomu	86
7.9	Principy molekulární diagnostiky	87
7.9.1	Nepřímá DNA diagnostika	88
7.9.1.1	Využití polymorfismů DNA k nepřímé DNA diagnostice	89
7.9.2	Přímá DNA diagnostika	91
7.9.2.1	Metody detekce mutací	91
7.9.3	Závěr	99
7.10	Genetické manipulace a genová terapie	99
7.10.1	Přenos genu a jeho využití	100
7.10.2	Genová terapie	101
7.10.2.1	Modifikace somatických buněk	102
7.10.2.2	Způsoby vpravení vektoru s cizím genem do buněk	102
7.10.2.3	Blokáda exprese genu	106
7.10.2.4	Příklady pokusů o genovou terapii	106
7.10.2.5	Další aplikace genetických poznatků a technik v terapii	108
7.11	Biologie a genetika prokaryot a nebuněčných forem života	108
7.11.1	Biologie a genetika bakterií	109
7.11.1.1	Buněčná stavba bakterií	109
7.11.1.2	Metabolismus bakterií	115
7.11.1.3	Reprodukce bakterií	115
7.11.1.4	Expresce genů u prokaryot	120
7.11.1.5	Regulace exprese genů u prokaryot	124
7.11.2	Biologie a genetika virů	128
7.11.2.1	Genom virů	129
7.11.2.2	Reprodukce virů	131
8.	Genetika onkogeneze (B. Otová)	133
8.1	Mechanismus vzniku nádorové buňky	133
8.2	Charakteristika nádorového růstu v podmínkách <i>in vivo</i>	135
8.3	Charakteristika nádorového růstu <i>in vitro</i>	135
8.3.1	Normální buňky při kultivaci <i>in vitro</i>	135
8.3.2	Nádorové buňky v podmínkách <i>in vitro</i>	136
8.4	Geny s onkogenním potenciálem – protoonkogeny	137
8.4.1	Rousův sarkom – model pro studium onkogenů	138
8.4.2	Úloha protoonkogenů v regulaci buněčného množení	139

8.5	Tumor-supresorové geny	142
8.5.1	Retinoblastom	143
8.5.2	Tumor-supresorový gen <i>TP53</i>	144
8.6	Mutátorové geny	145
8.7	Polygenní model vzniku nádorového onemocnění	147
8.8	Hereditární a sporadický výskyt nádorů	147
8.8.1	Karcinom prsu	149
8.8.2	Hereditární adematózní polypóza	150
8.8.3	Li-Fraumeni syndrom	151
8.9	Poradenství, preventivní opatření	151
8.10	Vrozené dispozice vzniku nádorů	152
8.11	Genomický imprinting	153
8.12	Mutagenní faktory vnějšího prostředí a vznik nádorů	154
8.12.1	Chemické látky	154
8.12.2	Fyzikální vlivy	154
8.12.3	Biologické vlivy	155
8.13	Stárnutí organismu a výskyt nádorů	156
8.14	Imunitní systém a nádorová onemocnění	156
8.14.1	Neoantigeny	157
8.14.2	Kvantitativně změněná exprese antigenů u nádorových buněk	157
8.14.3	Diferenční antigeny	158
8.14.4	Protinádorová imunita	158
8.15	Strategie genové terapie maligních nádorů	159
9.	Genetické řízení vývoje organismu (F. Liška)	161
9.1	Východisko a teorie vývoje	161
9.2	Úloha genomu	161
9.3	Základem vývojových procesů je chování buněk	162
9.4	Řízení chování buněk během vývoje	162
9.4.1	Signální kaskády	163
9.4.2	Signální molekuly	163
9.4.3	Úloha transkripčních faktorů	165
9.4.4	Příklady transkripčních faktorů	165
9.4.5	Trvalá modifikace aktivity genomu cílových buněk	165
9.5	Buněčná proliferace	166
9.5.1	Kmenové buňky	166
9.6	Patterning neboli vývoj uspořádanosti	168
9.6.1	Stochastická determinace	169
9.6.2	Patterning pomocí koncentračního gradientu	169
9.6.3	Reakčně – difúzní mechanismus	170
9.6.4	Molekulární hodiny	172
9.6.5	Migrace	173
9.7	Diferenciace	173
9.7.1	Klonování	174
9.7.2	Hierarchická posloupnost diferenciace	174
9.7.3	Buněčná smrt	174
9.8	Hox geny	175
9.9	Určení pohlaví u člověka	176
9.10	Příklady mechanismů vzniku genetických vývojových vad u člověka	179
9.10.1	Achondroplázie – všeho moc škodí (bonus: lekce z mikroevoluce)	179
9.10.2	Klinické syndromy spojené s mutací SHH (Sonic hedgehog)	180
10.	Vrozené vývojové vady (VV), Teratogeneze (D. Křenová)	182
10.1	Typy a popis VV	183
10.2	Dělení vývojových vad podle příčin	183
10.3	Vrozené vady vzniklé na podkladě expozice vlivům prostředí	184
10.3.1	Dělení exogenně vzniklých vývojových vad podle typů teratogenů	185
10.3.2	„Teratogenní expozice“	186
10.3.3	Hodnocení možného teratogenního rizika léků	186
10.3.4	Příklady léků s potencionálně teratogenním účinkem	187
10.3.5	Primární prevence vzniku lékově podložené VV	187

11. Interakce genů a prostředí (ekogenetika, xenogenetika) (O. Šeda)	191
11.1 Nástroje ekogenetiky a ekogenomiky	191
11.2 Farmakogenetika a farmakogenomika	193
11.2.1 Farmakogenetické interakce	193
11.2.2 Metody farmakogenomiky	194
11.3 Amplichip	195
11.3.1 Komplikující faktor - heterogenita	196
11.3.2 Význam experimentálních farmakogenetických modelů	197
11.3.3 Využití farmakogenomiky ve vývoji nových léčiv	199
11.4 Nutrigenetika a nutrigenomika	199
11.4.1 Nutrigenomika a její definice	200
11.4.2 Nástroje nutriční genomiky	200
11.4.3 Nutrigenetické interakce	201
11.4.4 Perspektiva: individualizovaná výživa	202

Předmluva

Vážené studentky, vážení studenti,

druhý díl učebního textu Lékařská biologie a genetika je pokračováním dílu prvního, ve kterém byly popsány základní poznatky formální genetiky, genealogie, buněčného cyklu, jeho regulace a přenosu signálu, buněčného dělení a cytogenetiky. Druhý díl se soustředí na vybranou problematiku molekulární genetiky, onkogenetiky, genetiky vývoje, vrozené vady a teratogenezi a interakci genů a prostředí.

Rychle se rozvíjející obor genetiky přináší stále velké množství poznatků, které nelze studentům předkládat v plné šíři. Soustředili jsme se proto především na poznatky významné z hlediska studia medicíny a budoucí klinické praxe. Studium tohoto oboru vyžaduje především porozumění obecným principům (nikoli mechanické naučení), pochopení souvislostí z různých kapitol a schopnost aplikace poznatků v praxi. Pro úspěšné studium jsou důležité přednášky a praktická cvičení, které upozorňují na významné souvislosti a přinášejí nejnovější poznatky, které není možné, vzhledem k rychlému rozvoji oboru, včlenit do písemných učebních textů.

Doporučená literatura a internetové zdroje informací:

Šeda O., Liška F., Šedová L.: *Aktuální genetika* – <http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/>

Šeda O., Šedová L.: *Genomika v medicíně* – <http://biol.lf1.cuni.cz/extensions/GenomikaMedicine/index.html>

Goetz P. et al.: *Vybrané kapitoly z lékařské biologie II*, Karolinum Praha 2002

Strachan T., Read AP.: *Human Molecular Genetics 3*, 2004

Online Mendelian Inheritance in Man (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM>)

Přejeme vám úspěšné zvládnutí studia biologie a genetiky a využití získaných poznatků v dalších preklinických a klinických oborech medicíny a ve vaší budoucí praxi.

Autoři děkují prof. MUDr. Radimu Brdičkovi, DrSc. a doc. RNDr. Petru Pikálkovi, CSc. za vysoce kvalifikovanou recenzi učebního textu. Poděkování patří také RNDr. Kláře Bobkové, Ph.D. za vyhotovení obrazové dokumentace pro kapitolu Molekulární genetika.

Autoři

7/ Molekulární genetik

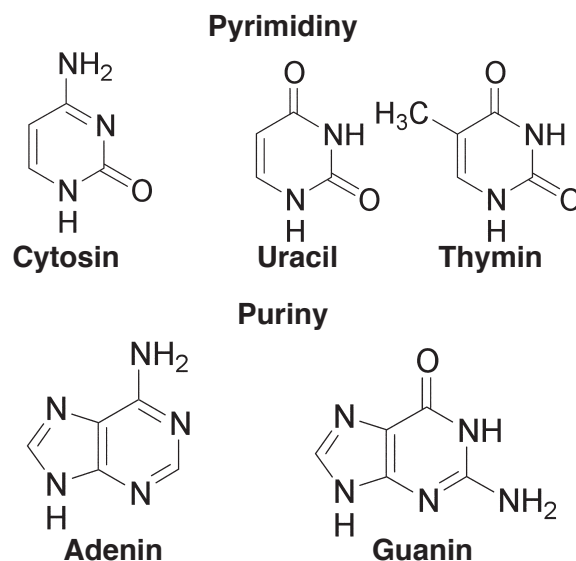
7.1 Úvod do molekulární genetiky

Mezi genetiky převládala poměrně dlouhou dobu domněnka, že hmotným nositelem genetické informace jsou bílkoviny, které pro tuto funkci měly všechny předpoklady jak díky svému vysokému polymorfismu, tak i známému působení. Původně Griffith a později O. T. Avery (1944) a jeho spolupracovníci dokázali, že nositelem genetické informace je deoxyribonukleová kyselina (DNA) úspěšným pokusem transformace (viz Kapitola 7.11). Zásadní význam nukleových kyselin (NK) pro genetiku byl uznán po objevu struktury DNA J. D. Watsonem a F. H. G. Crickem v roce 1953.

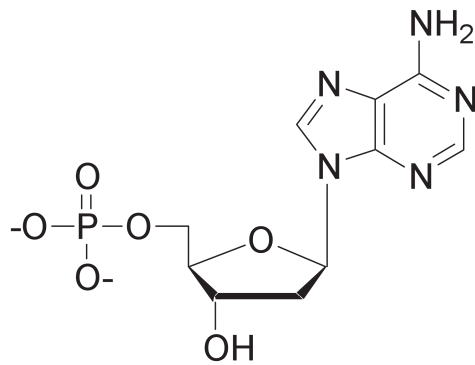
7.1.1 Nukleové kyseliny

Deoxyribonukleotidová kyselina (DNA)

Molekuly DNA se u eukaryot nacházejí v chromosomech jádra a mitochondrií (a chloroplastů u rostlin). DNA je polymer skládající se ze základních jednotek zvaných nukleotidy. Každý nukleotid se skládá ze tří částí: cukerná složka 2'-deoxyribosa (pentosa), purinová nebo pyrimidinová base a zbytek kyseliny fosforečné. Nukleotidy obsahují jednu ze čtyř basí odvozených od pyrimidinu: thymin, cytosin (T, C) nebo purinu: adenin, guanin (A, G). Komplex cukerné složky a base se nazývá nukleosid (Obr. 7.1a, b).



Obr. 7.1a Dusíkaté base

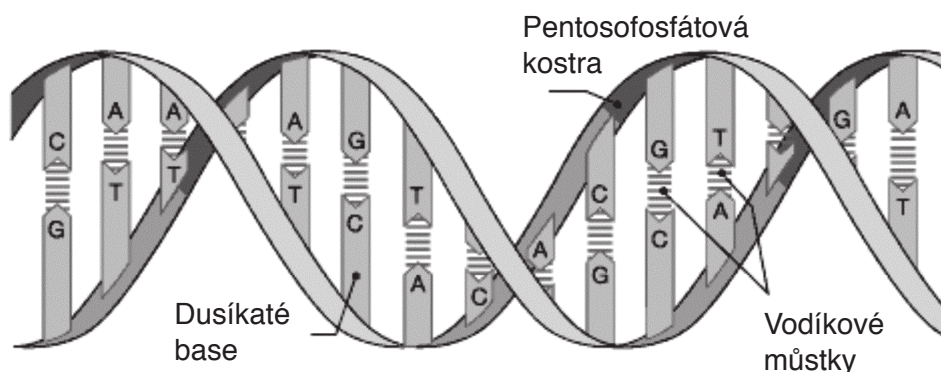


Obr. 7.1b Stavba nukleotidu

Nukleotidy jsou spojovány v polynukleotidový řetězec 3'–5' fosfodiesterickou vazbou, což znamená, že 5' uhlík deoxyribosy je spojen se zbytkem kyseliny trihydrogenfosforečné, která je ve vazbě s 3' uhlíkem pentosy následujícího nukleotidu. Polynukleotidový řetězec DNA má na jednom konci volný 5' trifosfát, označovaný jako 5' konec DNA, na druhém konci je volná 3' hydroxylová skupina, tzv. 3' konec DNA. V zápisech se obvykle uvádí konec 5' nalevo, konec 3' napravo. Lineární pořadí (sekvence) basí v DNA (primární struktura) kóduje genetickou informaci. Tato sekvence se zapisuje ve směru 5' → 3'. Při zápisu sekvence sousedních basí, např. v případě CpG ostrůvků, se vkládá mezi označení basí písmeno p (fosfodiesterová vazba), aby bylo zřejmé, že se jedná o sekvenci basí na stejném vlákně. Zápis CpG tedy znamená, že cytidin je vázán se sousedním guanosem na stejném vlákně DNA, nikoliv vodíkovými můstky s guanosem na komplementárním řetězci DNA.

Molekula DNA může být různě dlouhá. Maximální počet možných různých sekvencí purinů a pyrimidinů v polynukleotidu je 4^n , kde n je počet nukleotidů. Například DNA obsahující 6 basí, může být uspořádána do $4^6 = 4096$ různých sekvencí.

Molekula DNA má charakteristickou třírozměrnou strukturu známou jako dvojitá šroubovice (double helix). Skládá se ze dvou polynukleotidových řetězců, které jsou navzájem vázány vodíkovými můstky mezi purinovými a pyrimidinovými basemi (dsDNA – double stranded DNA). Páteř řetězce DNA tvoří komplex pentosa – fosfát a do centra helixu směřují purinové nebo pyrimidinové base. Mezi oběma řetězci DNA dochází ke komplementárnímu párování purinů s pyrimidiny a tím ke stabilizaci interakce řetězců. Váže se vždy adenin s thyminem dvěma vodíkovými můstky a guanin s cytosinem vytváří tři vodíkové můstky. Řetězce ve dvojitě šroubovici jsou antiparalelní (směr 5' → 3' jednoho řetězce je opačný k druhému řetězci), jen v tomto uspořádání vytvářejí stabilní helix (Obr. 7.2.). Na šroubovici DNA lze rozeznat velký a malý žlábek, které jsou důležité pro interakci s proteiny regulujícími replikaci DNA a expresi genetické informace.



Obr. 7.2 Dvoušroubovice DNA

DNA se vyskytuje v různých formách v závislosti na různých podmínkách. Nejčastěji se vyskytuje B forma, pravotočivá šroubovice (pro představu: točité schody, po kterých při sestupu zahýbáme vpravo). Jinou pravotočivou formou je forma A, která má kompaktnější strukturu. Jsou známy i levotočivé formy (C, D, E, Z) DNA, avšak biologický význam různých forem DNA znám není.

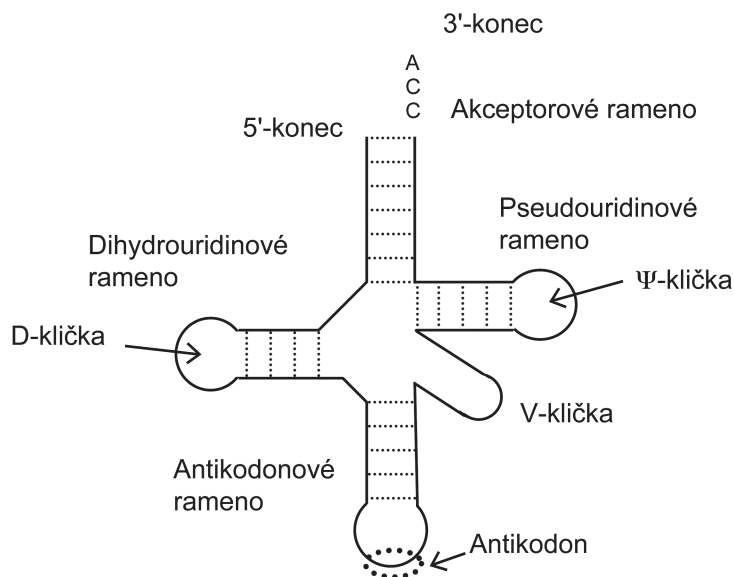
Ribonukleová kyselina (RNA)

Mezi strukturami RNA a DNA existují některé důležité rozdíly. Cukernou složku RNA tvoří ribosa a pyrimidinová base thymin je nahrazena uracilem (U), který se páruje s purinovou basí adeninem. Kromě toho molekula RNA většinou existuje jako jednovláknová struktura, netvoří dvojitou šroubovici. Je však možné, že se vyskytne párování basí mezi komplementárními částmi řetězce RNA a vytvoří se krátké dvouvláknové oblasti (např. u tRNA). V některých typech RNA se vyskytují tzv. minoritní base (např. pseudouridin, dihydrouridin, inosin aj.).

V živých buňkách se vyskytují tři **základní typy RNA** – mRNA (messenger, mediátorová), rRNA (ribosomální) a tRNA (transferová). Všechny vznikají procesem transkripce z DNA. **Mediátorová RNA** vzniká transkripcí genů, které kódují proteiny za účasti enzymu RNA-polymerasy II. mRNA funguje jako templát pro syntézu proteinu v procesu translace. **Transferové RNA** jsou malé molekuly (74–95 nukleotidů), které přenášejí aminokyseliny k proteosyntetickému aparátu buňky. V plošném pohledu mají charakteristickou strukturu trojlístku (Obr. 7.3), která je způsobena párováním basí v komplementárních oblastech řetězce a vytvořením krátkých dvouvláknových úseků. Pro tRNA je příznačný obsah minoritních basí. Na molekule tRNA lze tak rozlišit:

1. akceptorové rameno se sekvencí nukleotidů CCA na 3'konci řetězce, které váže aminokyseliny;
2. rameno obsahující dihydrouracil, neobvyklý pyrimidinový nukleotid – D – klička;
3. antikodonové rameno se sekvencí 3 nukleotidů, které tvoří antikodon zodpovědný za vazbu s kodonem v mRNA;
4. variabilní rameno, které se vyskytuje pouze v některých RNA (V klička) (variabilní je velikost kličky a typ zařazené base);
5. rameno, které obsahuje modifikovaný nukleotid pseudouracil – Psi (Ψ) klička.

Přesnější obrázek molekuly tRNA lze získat zobrazením třídimenzionální (3D) struktury (Obr. 7.4).



Obr. 7.3 Schéma sekundární struktury tRNA



Obr. 7.4 3D struktura tRNA

Ribosomální RNA je spolu s proteiny součástí makromolekulárních struktur zvaných ribosomy. Na ribosomech probíhá proteosyntéza za účasti celého komplexu proteinů a molekul RNA. V lidském genomu je značné množství rRNA genů většinou tandemově uspořádaných ve velkých skupinách.

Kromě základních typů RNA lze v eukaryotických buňkách nalézt i další molekuly RNA: **snRNA** (small nuclear RNA), což je heterogenní soubor malých jaderných molekul RNA, dále **snoRNA** (small nucleolar RNA) – soubor malých molekul RNA v jadérku, **miRNA** (microRNA) a **siRNA** (small interfering RNA). Většina z nich se podílí na procesu realizace genetické informace. Jejich funkce bude postupně objasněna v dalším textu.

7.1.2 Replikace DNA

Replikace je proces odehrávající se v S fázi buněčného cyklu, kterým buňka vytváří kopie DNA před následným rozdělením. DNA je kopírována enzymy, DNA-dependentními-DNA polymerasami, které syntetizují nový řetězec komplementární k původnímu řetězci DNA vždy ve směru 5' → 3'. Replikace je semikonzervativní proces, což znamená, že každá kopie DNA obsahuje jeden řetězec původní a jeden nově syntetizovaný. U eukaryot je DNA syntetizována za účasti pěti DNA-polymeras označovaných řeckými písmeny (α , β , γ , δ , ϵ). Replikace musí být velmi přesná, neboť i malá chyba může způsobit změnu nebo ztrátu důležité genetické informace. To je zajišťováno schopností DNA-polymeras prohle-

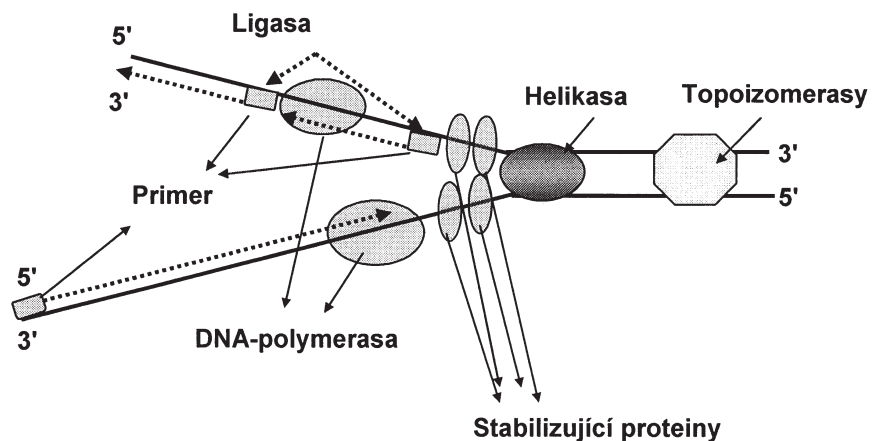
dávat nový řetězec a 3' → 5' exonukleasovou aktivitou odstraňovat špatně zařazené base a nahrazovat je správnými basemi (kontrolní čtení – proofreading).

V průběhu replikace se šroubovice DNA postupně rozvinuje působením enzymů topoisomerasy čímž vznikají úseky jednovláknové DNA přístupné replikaci (oba řetězce slouží jako templáty). Rozvinování začíná v tzv. replikačním začátku (replication origin) a postupuje v obou směrech podél molekuly DNA. Replikační počátky obvykle obsahují sekvence bohaté na páry nukleotidů nesoucích adenin a thymin. Oblast, ve které se DNA rozvinula a probíhá zde syntéza nového vlákna se nazývá **replikační vidlice**. V replikační vidlici probíhají následující děje: enzymy **helikasy** dokončují rozvinování DNA a dochází k separaci obou vláken DNA. Po oddělení vláken se na ně připojují proteiny SSB (single strand binding), které stabilizují jednovláknové struktury a zabraňují opětovnému vytvoření helixu. Na obou vláknech začíná syntéza nového řetězce DNA ve směru 5' → 3'. Vzhledem k tomu, že původní vlákna jsou antiparalelní uplatňuje se na nich mírně odlišný mechanismus replikace. Vlákno, které je syntetizováno podle vlákna s orientací 3' → 5', je replikováno kontinuálně a označováno jako vlákno vedoucí (leading). Druhé vlákno, označované jako opožďující se vlákno (lagging strand), je syntetizované v opačném směru a proto diskontinuálně po úsecích zvaných **Okazakiho fragmenty**. DNA-polymerasy, na rozdíl od RNA-polymerasy, vyžadují 3'-hydroxylový konec předcházejícího nukleotidu k připojení dalšího nukleotidu a nemohou proto zahájit syntézu *de novo*. Proto je proces replikace zahájen enzymem **prima-sou**, což je RNA-polymerasa, která na počátku replikovaného úseku vytvoří krátký úsek RNA (primer). Na jeho 3' konec může DNA-polymerasa připojit první nukleotid.

DNA-polymerasa α syntetizuje opožďující se vlákno a DNA-polymerasa δ vlákno vedoucí. DNA-polymerasa β a ϵ , ale i δ se účastní opravných procesů DNA (excise base nebo nukleotidu) a DNA-polymerasa γ replikuje mitochondriální DNA (mtDNA) a rovněž má schopnost opravovat mtDNA. Konečným krokem je odstranění primerů ribonukleasou. Vzniklá mezera je doplněna působením DNA-polymerasy a Okazakiho fragmenty jsou spojeny působením enzymu DNA-ligasy (Obr. 7.5).

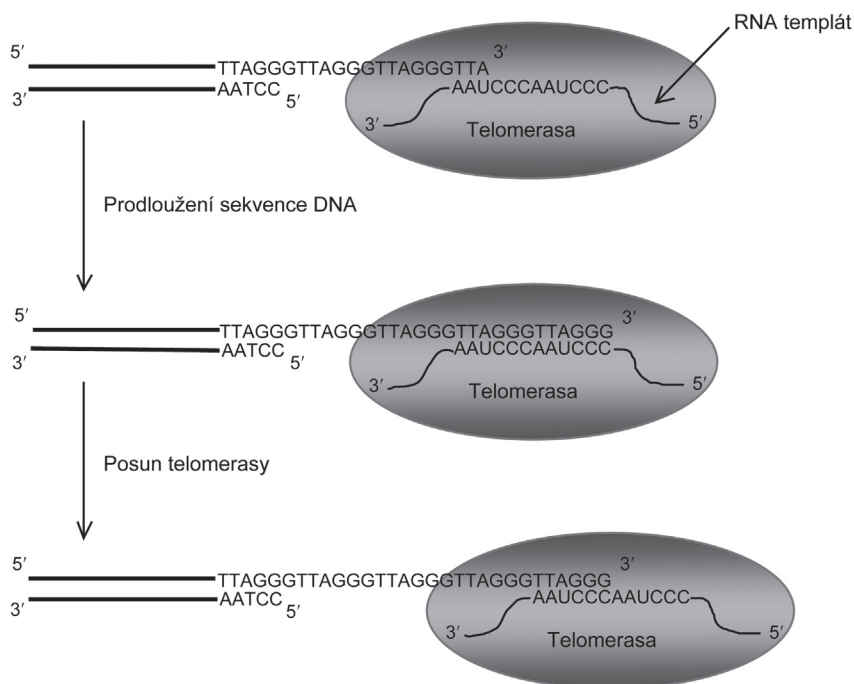
Vzhledem k tomu, že eukaryotické chromosomy jsou velmi dlouhé, probíhá replikace DNA z mnoha začátků. Tvorba replikační vidlice postupuje oběma směry a vytváří replikační bubliny, až se navzájem spojí. DNA replikovaná z jednoho začátku se nazývá **replikon**. Typická savčí buňka může mít 50–100 000 replikonů. Každý replikuje úsek dlouhý 40–200 kb (kilobasi, 1 kb = 1000 basi). Při replikaci lineární DNA eukaryotických chromosomů vzniká na 5' konci opožďujícího se vlákna problém.

**Diskontinuální replikace (opožďující se vlákno)
Okazakiho fragmenty**



Kontinuální replikace (vedoucí vlákno)

Obr. 7.5 Replikace DNA



Obr. 7.6 Funkce telomerasy

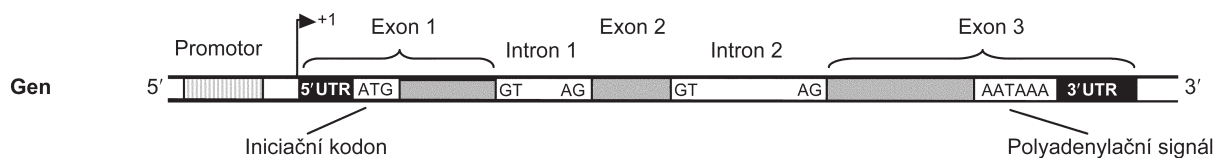
Po odstranění koncového primeru není možno tuto sekvenci na opožďujícím se vlákně doplnit (není zde 3'-hydroxylový konec). Proto se koncový úsek DNA, telomera, zkracuje po každé replikaci. Telomera je specializovaná struktura, která obsahuje DNA a proteiny. DNA se v této oblasti skládá z tandemově uspořádaných repetitivních sekvencí, u člověka je to sekvence 5' TTAGGG 3' (3–20 kb). Kromě toho 3' konec vedoucího vlákna přesahuje svou telomerickou sekvencí 5' konec opožďujícího se vlákna. Zkrácení telomer u diferencovaných buněk (na určitou délku) má za následek buď smrt buňky nebo zástavu replikace. U buněk v embryonálním období řeší problém koncové replikace komplex zvaný **telomerasa**, který kromě proteinů a enzymu (forma reverzní transkriptasy – RNA-dependentní-DNA polymerasa) obsahuje molekulu RNA. Molekula RNA se částečně váže na repetitivní sekvence vedoucího vlákna a slouží jako templát pro rozšíření vedoucího řetězce. Nově rozšířený vedoucí řetězec pak slouží jako templát pro replikaci 5' konce opožďujícího se vlákna. Telomerasa je aktivní především v buňkách v embryonálním období, v postnatálním období pak v některých buňkách maligních (Díl I; Kap. 8) (Obr. 7.6).

7.1.3 Geny

Definice genu prodělala určitý vývoj a není jednoduché ji formulovat. Geny lze definovat jako jednotky genetické informace, jako úseky DNA (RNA u RNA virů), ve kterých část nebo celá sekvence kóduje v konečné fázi exprese specifický protein. Existují však geny, kde konečným produktem není bílkovina, ale nekódující RNA (např. rRNA, tRNA a další).

U vyšších organismů včetně člověka (Obr. 7.7) je kódující informace genu uspořádána do série úseků DNA, které se nazývají **exony**. Exony jsou separovány úseky nekódujících sekvencí, zvaných **introny**. Počet a délka exonů i intronů velmi kolísá, avšak délka intronů je obvykle mnohem větší než délka exonů.

Součástí genu jsou i regulační oblasti, které řídí zahájení nebo zastavení určitého procesu, např. exprese genetické informace. Zde má zásadní význam tzv. **promotor**, úsek DNA, který je uložen směrem k 5' konci vlákna DNA od místa počátku transkripce (užívá se termín proti proudu z angl. upstream, po-



Obr. 7.7 *Eukaryotní gen*

UTR – netranslatovaná oblast

+1 – počátek transkripce

dobně existují sekvence uložené po proudu, z angl. downstream, směrem k 3' konci). Promotor obsahuje specifické, tzv. signální sekvence, které jsou rozpoznávány transkripčními faktory (proteiny) a jejich prostřednictvím RNA-polymerasou. V závislosti na jejich vazbě je následně zahájena (nebo zastavena) transkripce genu. Tyto signální sekvence jsou vysoce konzervované, což znamená, že jsou stejné nebo velmi podobné u různých živočišných druhů. Souvisí to s jejich významnými funkcemi, neboť mutace signálních sekvencí mají pro buňku vážné důsledky a proto jsou z evolučního hlediska řazeny mezi zakázané mutace (mutačně evoluční mechanismy).

Velikost genů je různá, kolísá v rozsahu od méně než 100 párů basí (bp – base pair) až po několik milionů bp. Většina genů je na chromosomech rozložena nerovnoměrně, některé však existují ve skupinách (cluster). Tyto geny jsou si více či méně podobné a vytvářejí tzv. **genové rodiny**. Genové rodiny vznikly v průběhu evoluce mechanismem opakovaných duplikací původního genu a následným rozrůzněním vlivem mutací.

7.1.4 Expres genetické informace

Metabolismus organismů, jejich schopnost růstu a reprodukce se skládají z tisíců biochemických reakcí katalyzovaných enzymy. Každý enzym se skládá z jednoho nebo více polypeptidů. Další polypeptidy se podílejí na struktuře buněk a organismů nebo mají regulační funkci a podílejí se na transportu látek. V počtu genů se organismy významně liší, základní genetické zákonitosti exprese genů jsou ale v principu univerzální, ovšem s odchylkami, které vznikaly a fixovaly se v průběhu milionů let trvajících vývoje druhů.

Genetická informace v DNA je dána sekvencí basí. Proces, kterým se tato informace stává použitelnou pro buňku se nazývá exprese genu. Crick tento proces popsal jako **centrální dogma** přenosu genetické informace ve směru DNA → RNA → protein.

↓
DNA

Toto jednoduché schéma představuje vysoce komplexní proces, který je výsledkem regulačních aktivit celé řady proteinů. Je třeba ho doplnit o možnost **reversní transkripce** – přenosu informace z RNA do DNA, která byla poprvé pozorována u retrovirů. Bylo však zjištěno, že i eukaryotické buňky obsahují sekvence DNA, které kódují enzymy reversní transkriptasy. Reverzní transkripcí zralé mRNA vzniká tzv. cDNA (complementary DNA).

7.1.4.1 Transkripce

Transkripce je proces přepisu informace z DNA do molekuly RNA. Obvykle je přepisováno pouze jedno vlákno DNA, nazývá se pracovní vlákno (antisense strand, templát, nekódující, negativní, –DNA). Komplementární vlákno se nazývá paměťové (sense strand, kódující, pozitivní, +DNA). Oba řetězce však mohou sloužit jako templáty, což znamená, že různé geny mohou být přepisovány z různých řetězců DNA. Syntéza RNA předchází rozvinutí lokálního segmentu DNA nutné pro zpřístupnění pracovního řetězce (transkripční bublina). RNA je syntetizována enzymy zvanými DNA-dependentní-RNA polyme-

rasy jako řetězec komplementární k pracovnímu vláknu DNA. Sekvence basí RNA je shodná se sekvencí basí v paměťovém vláknu DNA s tím rozdílem, že místo thyminu je zařazován uracil (komplementární k adeninu). Transkripce probíhá vždy ve směru 5' → 3' podobně jako replikace DNA. V průběhu tohoto procesu vzniká hybrid RNA – DNA. Výsledkem přepisu je **primární transkript**, který je posléze modifikován do podoby zralých molekul RNA.

Na transkripci se u eukaryot podílejí 3 RNA-polymerasy (I, II, III), mírně se odlišují ve svých funkcích a každá přepisuje specifickou sadu genů. RNA-polymerasa I pracuje v jadérku a transkribuje geny kódující pre-RNA pro ribosomální RNA (rRNA) 18S, 28S, 5.8S.

Enzym RNA-polymerasa II přepisuje geny, které kódují proteiny a určité druhy snRNA. RNA-polymerasa III katalyzuje transkripci sady krátkých genů, které kódují tRNA a 5S rRNA.

Zahájení transkripce genů kódujících proteiny je umožněno vazbou komplexu proteinů, mezi něž náleží transkripční faktory (TF) a RNA-polymerasa II na promotor genu. Transkripční faktory se váží na signální sekvence DNA v promotoru, navádějí RNA-polymerasu II do správné pozice, dochází k její aktivaci a tak je zahájena transkripce. Transkripční faktor se obvykle váže na oblast obsahující sekvenční element DNA zvaný **TATA box**. Jeho název vyplývá z většího počtu T a A v sekvenci dané oblasti (TATAAA). TATA box je signální sekvence umístěná přibližně 25 bp proti proudu (–25 bp) od místa začátku transkripce (což je obvykle nukleotid A v pozici označené jako +1). Jeho funkcí je lokalizovat RNA-polymerasu ve správné pozici na startu transkripce. Připojení RNA-polymerasy k TATA boxu se uskutečňuje pomocí specifických transkripčních faktorů TFIIA, TFIIB a dalších.

Pro stimulaci nebo inhibici transkripce mohou geny využívat i jiné iniciační signální sekvence s podobnou funkcí. Jsou to např. **CCAAT** (nazývaná CAT box – kočičí krabička) box, umístěný v pozici –70 až –80 bp, nebo sekvence bohaté na CG (tzv. **CpG ostrůvky**) lokalizované přibližně 100 bp proti proudu. CG boxy se často vyskytují u genů, které nemají TATA box (např. housekeeping geny – mezi které patří např. geny kódující histony, ribosomální proteiny a další).

Transkripce je ukončena dosud ne zcela jasným mechanismem, vlivem terminačního signálu, který je umístěn na 3' konci za kódující sekvencí genu. V terminaci transkripce hraje úlohu sekvence AAUAAA označovaná jako polyadenylační signál, která podmiňuje štěpení RNA v krátké vzdálenosti za tímto signálem.

Postranskripční úpravy

Transkripci genu kódujícího protein vzniká prekursorová mRNA, tzv. **heterogenní jaderná RNA (hnRNA)** (primární transkript), která obsahuje sekvence exonů i intronů. Musí proto být následně upravena do zralé formy procesy, které jsou označovány jako **posttranskripční úpravy**. Mezi ně patří sestřih a modifikace 5' a 3' konce řetězce.

Sestřih (Splicing)

Sestřih je proces, kterým jsou z pre-mRNA odstraněny nekódující sekvence, introny. Zároveň dochází k spojení exonů, takže ve zralé mRNA je obsažena kontinuální informace pro syntézu proteinu. Sestřih musí být velmi přesný, malá odchylka v napojení exonů může vést k odlišnému čtení genetické informace a tvorbě odlišného proteinu, mnohdy nefunkčního.

Sestřih závisí na přítomnosti konzervovaných signálních sekvencí, uložených na začátku a konci intronu. Ve většině genů jsou na prvních místech 5' konce intronu nukleotidy GT (v mRNA GU) a na posledních dvou místech jeho 3' konce AG (GT – AG pravidlo). Tyto sekvence jsou však součástí větší oblasti signálních sekvencí na obou koncích intronů.

Kompletní signální sekvence 5' konce je 5'AGGTAAGT 3', 3' konce je 5' YYYYYYNCAG 3' (Y = pyrimidin, N = jakýkoliv nukleotid). Kromě toho se ve vzdálenosti 10–40 basí proti proudu od AG 3' konce intronu vyskytuje další signální sekvence, 5'CURAY 3', která je nazývána „větvicí sekvence“ (branchpoint) (R = purin). Sestřih se odehrává ve dvou krocích. Nejdříve se vytvoří smyčka, kdy se 5' konec intronu štěpí a váže na větvicí sekvenci a ve druhém kroku je intron rozštěpen za nukleotidem G v sestřihovém místě 3' a tím vyštěpen.

Sestřih je zprostředkován komplexem molekul RNA a proteinů, který se nazývá **spliceosom**. Spliceosom se skládá z pěti typů snRNA (small nuclear RNA) označovaných U1, 2... (jsou bohaté na uridin) a více než 50 proteinů. Každá snRNA se připojuje na specifický protein a tvoří malé partikule – nukleární ribonukleoproteiny (snRNP – small nuclear ribonucleoprotein). Spliceosom je zodpovědný za vytvoření konformace mRNA vhodné pro sestřih, katalyzuje vystřížení intronů a napojení (ligaci) exonů. Kromě tohoto způsobu existují i jiné mechanismy sestřihu.

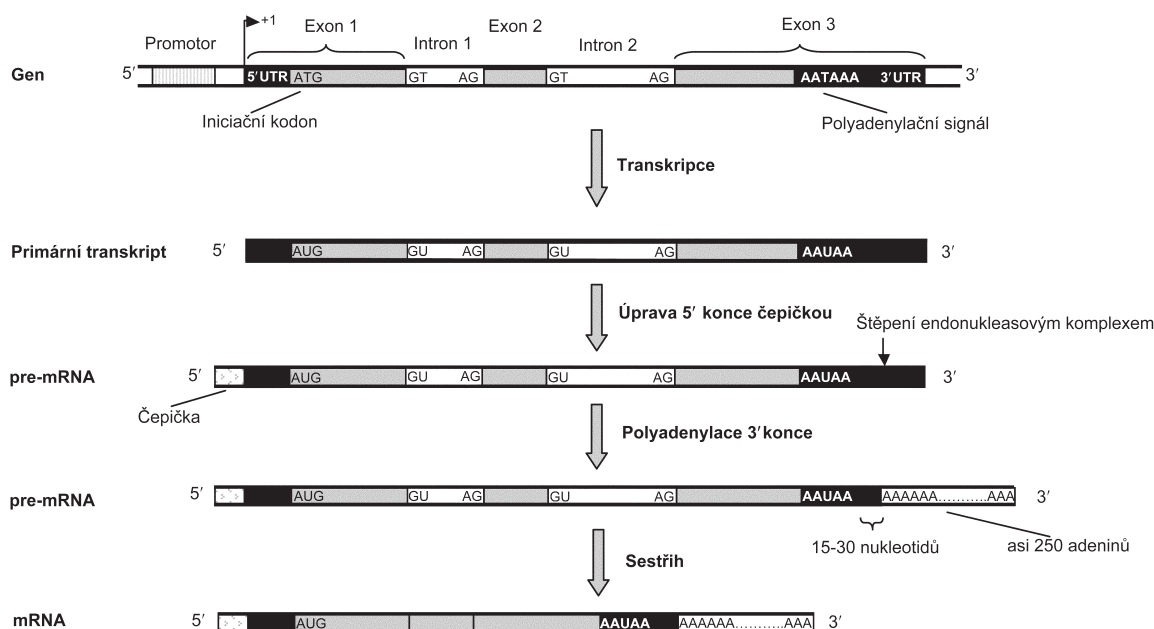
Modifikace 5' konce mRNA

Modifikace 5' konce eukaryotických mRNA spočívá ve vytvoření tzv. čepičky (cap), tj. přidání modifikovaného nukleotidu 7-methylguanosu (m^7G). Nejprve je přidán GTP (guanosin trifosfát) neobvyklou vazbou $5' \rightarrow 5'$ na první nukleotid mRNA a poté je připojena skupina $-CH_3$ na guanin. Čepička chrání mRNA před degradací 5' konce působením exonukleas v cytoplasmě, usnadňuje transport mRNA z jádra do cytoplasmy a zároveň umožňuje rozpoznání startovního místa mRNA v ribosomu.

Modifikace 3' konce mRNA

Většina eukaryotických mRNA je na 3' konci modifikována přidáním sekvence asi 250 adeninů (poly A konec) (Obr. 7.8). Polyadenylace vyžaduje přítomnost signálních sekvencí, mezi něž patří zejména $5'AAUAAA 3'$ v blízkosti 3' konce pre-mRNA. Na tyto sekvence se váží specifické proteiny a vytvoří komplex, který štěpí mRNA ve specifickém místě, které je lokalizováno 15–30 nukleotidů za signální sekvencí po proudu. Poté enzym poly(A)polymerasa připojuje adeniny k 3' konci molekuly. Modifikace pravděpodobně chrání mRNA před enzymatickou degradací kódující sekvence od 3' konce, usnadňuje transport mRNA a translaci.

Zralá upravená mRNA je exportována do cytoplasmy, kde slouží jako templát pro syntézu proteinů. Na rozdíl od rRNA a tRNA je mRNA poměrně nestabilní, přežívá neporušená asi 6 hodin, jen některé mRNA (např. kódující globin) přežívají mnohem déle.



Obr. 7.8 *Transkripce a postranskripční úpravy eukaryotního genu*
 UTR – (Untranslated Region) netranslatovaná oblast na 5 a 3 konci genu
 ■ – kódující sekvence
 +1 – začátek transkripce

Molekula **tRNA** vzniká transkripcí genů, které jsou ve skupinách umístěné na různých místech genomu. Geny pro tRNA existují v mnoha kopiích, což odráží skutečnost, že buňka potřebuje velké množství těchto molekul (u člověka jsou tRNA geny seskupené do 46 genových rodin). Primární transkript, pre-tRNA, je u eukaryotních buněk upraven sestřihem, kdy je odstraněn krátký intron a připojena sekvence CCA na 3' konec řetězce.

rRNA molekuly vznikají transkripcí genů, které existují v mnoha kopiích na krátkých raménkách akrocentrických chromosomů v oblastech nukleolárních organizátorů. Sekvence 28S, 18S a 5,8S jsou uloženy v rámci jedné transkripční jednotky, která existuje v mnoha kopiích separovaných od sebe krátkými nepřepisovanými oblastmi. RNA-polymerasa I transkribuje pouze jednu molekulu pre-rRNA. Primární transkript podléhá štěpení na několika místech a specifickým modifikačním basí za účasti molekul snoRNA. Tím jsou vytvořeny zralé molekuly 18S, 5,8S a 28S rRNA. Primární transkripty jsou u různých eukaryot různě dlouhé, což je dáno přítomností nekódujících sekvencí mezi sekvencemi pro rRNA. Tyto nekódující sekvence se nazývají mezerníky (spacer).

Separátně je transkribována 5S rRNA enzymem RNA-polymerasa III, vzniká transkript o délce 121 basí, který není dále upravován. Geny pro 5S rRNA se nacházejí v různých oblastech genomu.

7.1.4.2 Translace

Translace je proces syntézy proteinů, při němž je využita informace v mRNA k zajištění správného pořadí aminokyselin v proteinu. Zralá mRNA migruje do cytoplasmy a v komplexu s ribosomy a dalšími složkami řídí syntézu polypeptidů. Translatovány jsou pouze centrální části mRNA, na 5' a 3' konci zůstávají úseky, které translaci nepodléhají (5' UTR a 3' UTR – untranslated regions) (Obr. 7.7 a 7.8). Klíčovou úlohu hrají molekuly tRNA, které dopravují aminokyseliny na ribosom a zařazují se na správná místa mRNA, která rozeznávají na principu komplementarity mezi antikodonem tRNA a kodonem mRNA. Před zahájením translace však musí být nejdříve aminokyseliny aktivovány (prostřednictvím ATP) a poté pomocí enzymů (aminoacyl-tRNA syntetasy) připojeny na 3' OH konec odpovídající tRNA. Proces translace se odehrává na ribosomech. Ribosomy se vyskytují ve velkém množství v buněčné cytoplasmě jako volné organely nebo vázané na endoplazmatické retikulum. Každý ribosom se skládá z velké (60S) a malé (40S) podjednotky, celková velikost eukaryotního ribosomu je 80S (Svedbergovy jednotky). Velká podjednotka obsahuje tři typy rRNA: 28S, 5.8S a 5S a přibližně 50 polypeptidů, malá podjednotka obsahuje 18S rRNA a více než 30 proteinů.

Genetický kód

Rozluštění genetického kódu se datuje do r. 1961, kdy bylo pokusy s translací *in vitro* zjištěno, že vždy trojice nukleotidů (triplet) kóduje určitou aminokyselinu (Tab. 7.1).

Tyto triplety se nazývají **kodony**. Čtyři base v DNA a RNA se mohou kombinovat jako $4^3 = 64$ kodonů, které specifikují 20 aminokyselin, z nichž se skládají proteiny. Protože počet kodonů je větší než počet aminokyselin, jsou všechny aminokyseliny s výjimkou methioninu a tryptofanu kódovány více než jedním tripletem. Genetický kód se tedy vyznačuje nadbytečností a tato vlastnost se označuje jako **degenerace** genetického kódu. Kodony, které specifikují stejnou aminokyselinu se nazývají synonymní. Variace mezi synonymními kodony se týkají zejména 3. pozice v tripletu. Degenerace genetického kódu minimalizuje efekt mutací. Rozhodující úlohu mají obvykle první dvě base kodonu. Z 64 kodonů kóduje aminokyseliny 61 kodonů, zbývající 3 kodony, UAG, UGA, UAA, nekódují žádné aminokyseliny, a proto fungují jako signály ukončující translaci. Nazývají se **terminační kodony** nebo **stop kodony**. Proteosyntéza je zahájena v místě **iniciačního kodonu** AUG, který kóduje aminokyselinu methionin. Iniciační kodon je lokalizován v některém z prvních exonů a určuje čtecí rámeček sekvence RNA. Každá sekvence RNA může být čtena třemi soubory kodonů, podle toho, která base je vybrána jako začátek kodonu. Soubor kodonů, který je omezen iniciačním kodonem na začátku a terminačním kodonem na konci se nazývá otevřený čtecí rámeček (ORF – Open Reading Frame).

Tab. 7.1 Genetický kód

Genetický kód			
$5'UUU3' = \text{Phe}$ UUC = Phe UUA = Leu UUG = Leu	$5'UCU3' = \text{Ser}$ UCC = Ser UCA = Ser UCG = Ser	$5'UAU3' = \text{Tyr}$ UAC = Tyr UAA = stop UAG = stop	$5'UGU3' = \text{Cys}$ UGC = Cys UGA = stop UGG = Trp
$5'CUU3' = \text{Leu}$ CUC = Leu CUA = Leu CUG = Leu	$5'CCU3' = \text{Pro}$ CCC = Pro CCA = Pro CCG = Pro	$5'CAU3' = \text{His}$ CAC = His CAA = Gln CAG = Gln	$5'CGU3' = \text{Arg}$ CGC = Arg CGA = Arg CGG = Arg
$5'AUU3' = \text{Ile}$ AUC = Ile AUA = Ile AUG = Met(start)	$5'ACU3' = \text{Thr}$ ACC = Thr ACA = Thr ACG = Thr	$5'AAU3' = \text{Asn}$ AAC = Asn AAA = Lys AAG = Lys	$5'AGU3' = \text{Ser}$ AGC = Ser AGA = Arg AGG = Arg
$5'GUU3' = \text{Val}$ GUC = Val GUA = Val GUG = Val	$5'GCU3' = \text{Ala}$ GCC = Ala GCA = Ala GCG = Ala	$5'GAU3' = \text{Asp}$ GAC = Asp GAA = Glu GAG = Glu	$5'GGU3' = \text{Gly}$ GGC = Gly GGA = Gly GGG = Gly

Start = start kodon ; stop = stop kodon (terminační kodon, nonsense – kodon)

Genetický kód je považován za **universální**, tzn., že ho stejným způsobem využívají všechny organismy. Z tohoto pravidla však existují výjimky, které se týkají zejména mitochondrií a některých jednobuněčných organismů. Např. v mitochondriích triplet UGA, který je obvykle terminačním kodonem, kóduje tryptofan, AGA a AGG, které obvykle kódují arginin, jsou terminační kodony apod.

Translace se skládá ze 3 fází: iniciace, elongace a terminace (Obr. 7.9).

Iniciace translace

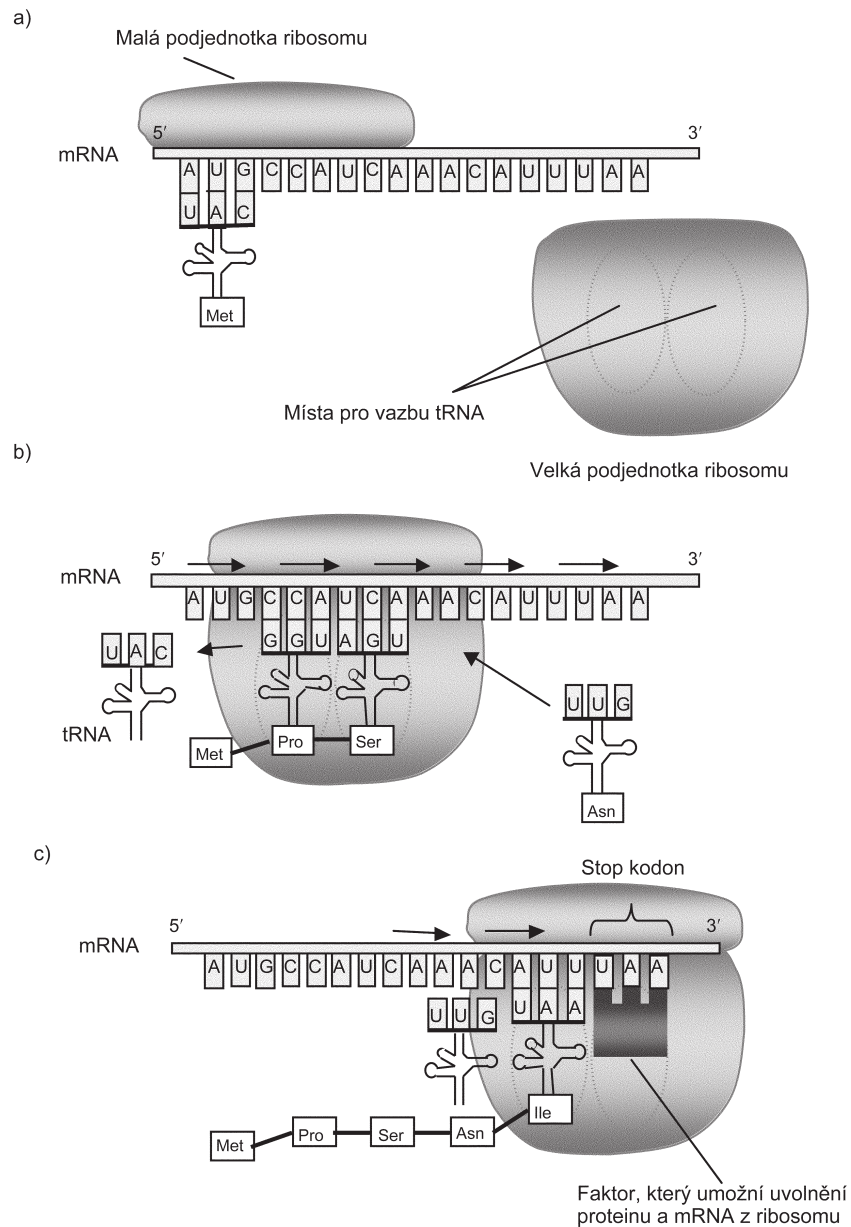
Prvním krokem je vazba malé podjednotky ribosomu na mRNA ve specifickém bodě, uloženém proti proudu od iniciačního tripletu AUG (u eukaryot rozeznává čepičku na 5' konci mRNA).

Iniciační tRNA s navázaným methioninem se váže na triplet AUG. Triplet AUG je rozpoznán jako iniciační v případě, že je obklopen vhodnou iniciační sekvencí. Vše probíhá za účasti iniciačních faktorů, u eukaryot označovaných zkratkou eIF a číslem (eIF1, 2, 3 atd.) a GTP (guanosintrifosfát) jako zdroje energie.

Jakmile je dokončena tvorba iniciačního komplexu dochází k připojení velké podjednotky ribosomu. Kompletní ribosom obsahuje 2 místa pro vazbu tRNA molekul. První místo se nazývá peptidylové místo (P), pro vazbu tRNA nesoucí methionin a vázající se na AUG, druhé místo se nazývá aminoacylové (A) uložené pod druhým kodonem. Molekula mRNA se pohybuje po malé podjednotce až narazí na první triplet AUG.

Elongace

Elongace začíná, když tRNA vstoupí do místa A a páruje se svým antikodonem s druhým kodonem mRNA. Obě místa jsou obsazena, aminokyseliny jsou v těsném kontaktu a mezi nimi dojde k vytvoření peptidické vazby. Tato reakce je katalyzována komplexem enzymů (peptidyltransferasy). Methionin je uvolněn ze své tRNA. Ribosom se pohybuje k dalšímu kodonu mRNA, dipeptid vázaný na druhou tRNA se přesouvá na místo P a místo A se uvolňuje pro další tRNA. Tento postup se opakuje a opět se při něm uplatňuje řada proteinů, zvaných elongační faktory (u eukaryot eEF2, 3...). Iniciační místo je volné pro vazbu dalšího ribosomu, takže vzniká polysom a mRNA je translatována několika ribosomy najednou.



Obr. 7.9 *Translace*
 a) Inicijace
 b) Elongace
 c) Terminace

Terminace

Translace probíhá, dokud do místa A nevstoupí terminační triplet. Místo tRNA vstoupí do tohoto místa protein (releasing factor), který způsobí odpojení polypeptidu z ribosomálního komplexu. Odpojuje se mRNA a ribosom se rozpadá.

Posttranslační úpravy

K tomu, aby se nově syntetizovaný polypeptid stal funkční prochází řadou úprav. Běžnou posttranslační úpravou je odstranění prvního methioninu z N konce polypeptidu. Mezi další patří např. kovalentní