

Předmět:
KBB/BB1P; KBB/BUBIO

Od DNA k proteinům a regulace genové exprese

Cíl přednášky: seznámit posluchače se základními principy replikace, transkripce, translace a regulace genové exprese

Klíčová slova: DNA, chromozom, replikace, transkripce, translace, ribozom, genová exprese

Obrázky v následující prezentaci jsou převzaty z níže uvedené knihy výlučně k výukovým účelům.

The illustrations in following lecture are taken from Alberts et al. *Molecular Biology of the Cell*, 5th Edition (Garland Science 2008) only and exclusively for the educational purposes.

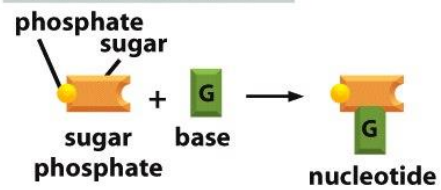
Alberts • Johnson • Lewis • Raff • Roberts •
Walter
Molecular Biology of the Cell
Fifth Edition

Copyright © Garland Science 2008

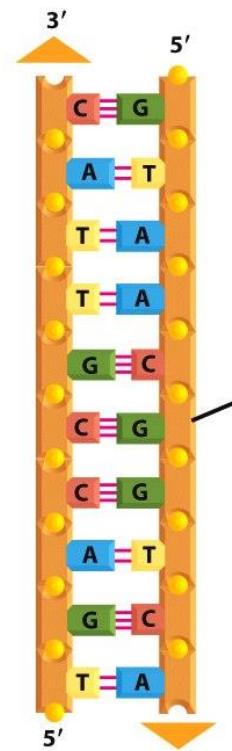
Komplementarita

- adenin (A), guanin (G), cytosin (C), thymin (T), uracil (U)
- párování bází: **C-G, A-T, A-U**
- báze se mohou ve dvoušroubovici párovat pouze za předpokladu, že jsou oba řetězce vůči sobě **antiparalelní**, tzn. že **polarita** jednoho řetězce je **opačná** než u druhého
- jeden řetězec ve dvoušroubovici obsahuje báze přesně v tom pořadí, jak to odpovídá řetězci druhému (aby se vždy adenin spojil s thyminem a cytosin s guaninem): **sekvence nukleotidů v jednom řetězci je přesně komplementární k sekvenci nukleotidů v druhém řetězci**
- v pořadí bází je uložena informace, jež umožňuje dědičnost a nazývá se **genetická informace**

building blocks of DNA



double-stranded DNA

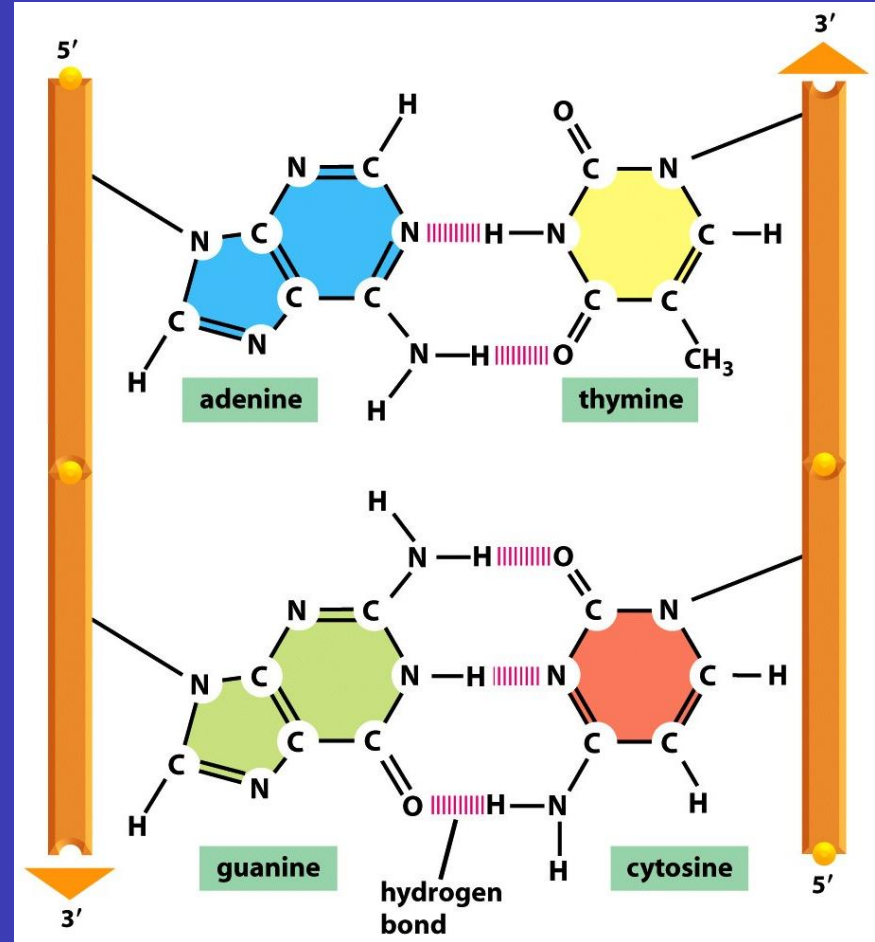
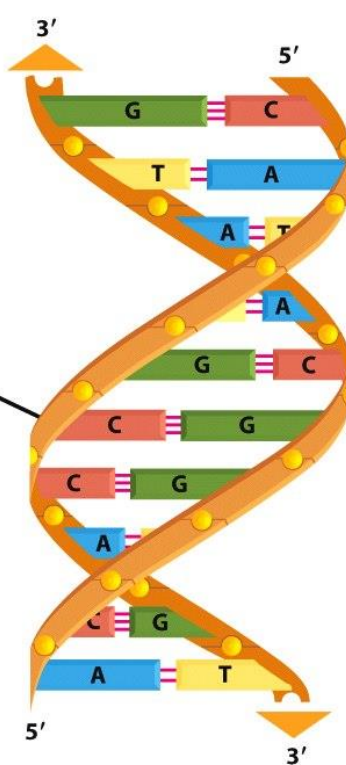


hydrogen-bonded base pairs

DNA strand



DNA double helix

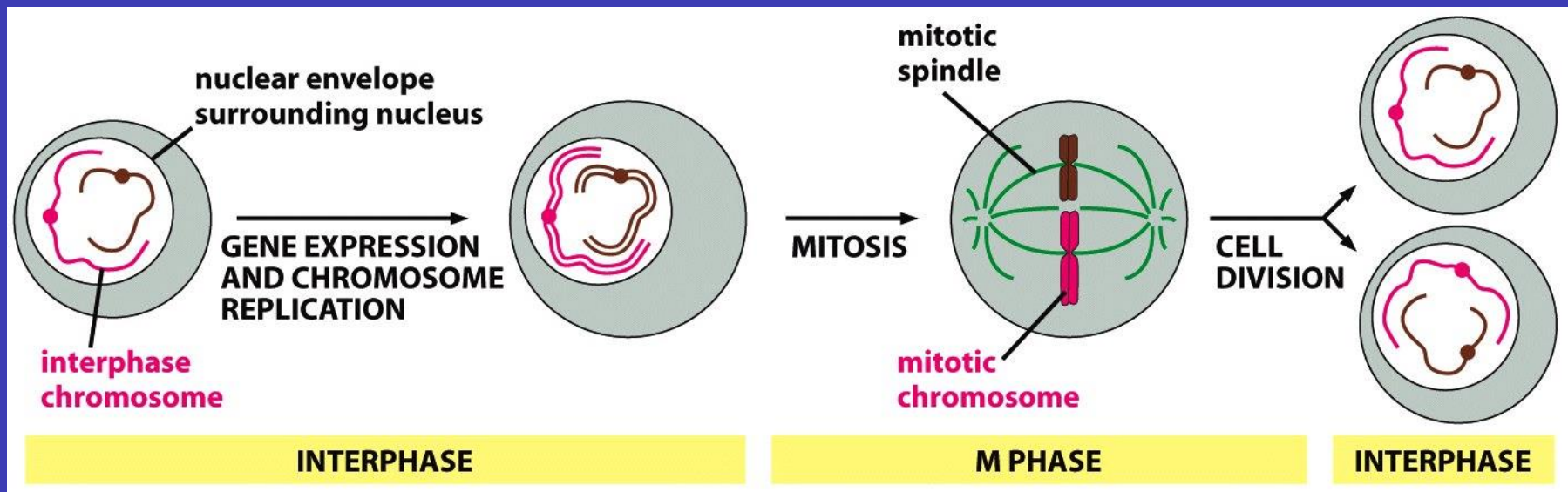


Chromozomy

- jádro typické lidské buňky má průměr *pár mikrometrů*, ale obsahuje DNA o délce *dvou metrů*
- DNA je sbalena do série „klubíček“ a „smyček“, které brání tomu, aby se „zauzlila“ a umožňují zároveň její kontakt s proteiny, nutnými pro transkripci, replikaci a reparaci
- u **bakterií** se nacházejí všechny geny na **jedné kruhové** molekule **DNA**, u **eukaryot** je DNA rozdělena mezi sadu **chromozomů**
- každý **chromozom** se skládá z jedné dlouhé **lineární molekuly DNA**, na níž jsou navázány **proteiny**, které umožňují svinutí vlákna DNA do kompaktnější formy
- komplex DNA a proteinů se nazývá **chromatin**

Chromozomy během buněčného cyklu

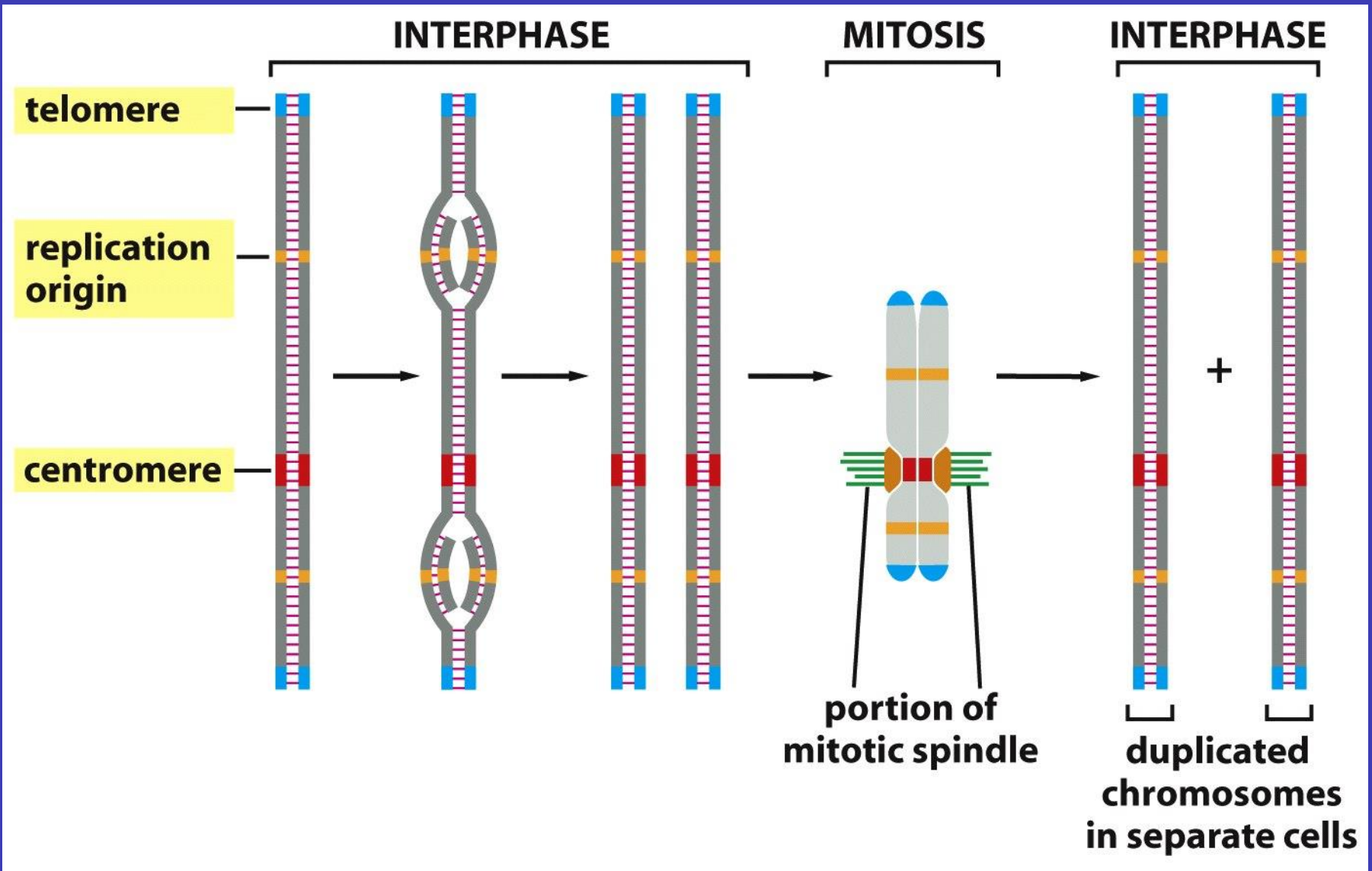
- obvykle (když se buňka nedělí a je v tzv. **interfázi**) jsou chromozomy **rozvolněné** a vypadají jako tenká, vzájemně propletená vlákna, která není snadné rozlišit
- během **mitozy** (buněčného dělení) ovšem chromozomy **kondenzují** a nazývají se **mitotické chromozomy**



Specializované sekvence

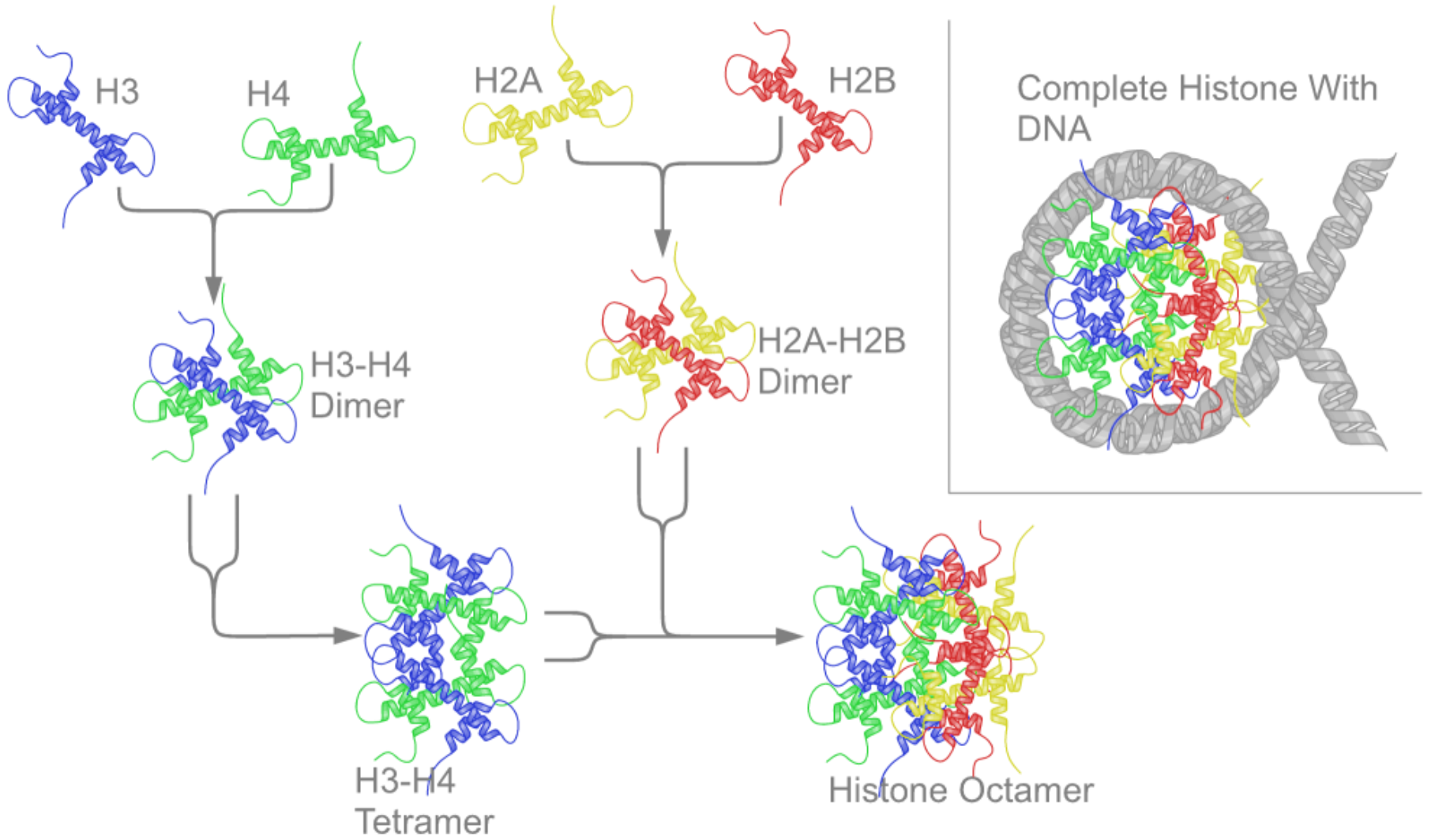
Chromozomy fungují jako samostatné strukturní jednotky a jejich základní funkce (replikace a rozdělení kopií chromozomů do dceřiných buněk) jsou kontrolovány třemi typy specializovaných sekvencí:

- 1. replikační počátky** v nich začíná **duplikace DNA**
- 2. centromery** zajišťující **rozchod replikovaných chromozomů** do dceřiných buněk při buněčném dělení
- 3. telomery** obsahující repetitivní nukleotidové sekvence nacházející se na obou koncích chromozomů, které jednak umožňují **replikaci konců chromozomů** (dokončení syntézy opoždujícího se řetězce) a jednak **chrání DNA** před činností DNA-nukleáz



Nukleozomy

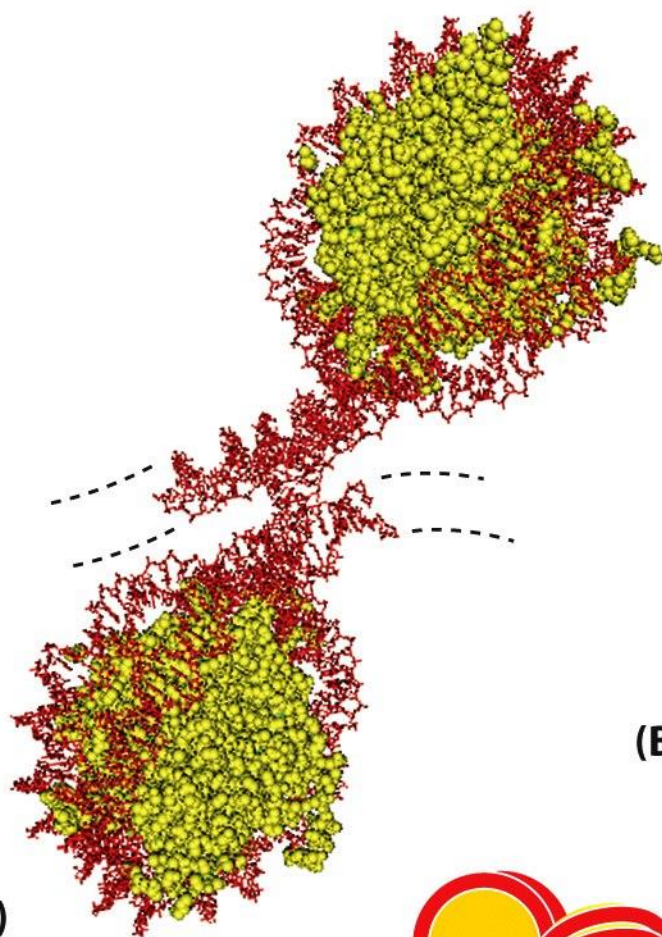
- DNA je kondenzována na **několika úrovních**
- **základní jednotkou kondenzace** chromatinu je **nukleozom**, který je tvořen z proteinů (osmi tzv. **histonů**), kolem nichž se **omotává vlákno DNA**
- histony jsou malé proteiny s vysokým obsahem kladně nabitých aminokyselin (lysin a arginin) – kladný náboj váže záporně nabitou cukr-fosfátovou kostru DNA
- histony patří k evolučně nejvíce konzervovaným proteinům u eukaryot (hrách vs. skot: 2 aminokyseliny)
- omotávání DNA kolem histonů **zkrátí** molekulu DNA asi na **jednu třetinu** původní délky a představuje tak **první stupeň kondenzace DNA** v buňce



Hetero/euchromatin

- nukleozomy jsou těsně přiloženy k sobě a vytvářejí kompaktnější strukturu, tzv. **30-nm vlákno**. Toto vlákno je organizováno do ještě kondenzovanějších struktur
- nejvíce kondenzovaná forma chromatinu (více než 10% interfázního chromatinu) se nazývá **heterochromatin**, který je **nepřístupný transkripci**
- zbytek interfázního chromatinu v různém stupni kondenzace vytváří tzv. **euchromatin**
- oblasti chromozomu, které jsou **přístupné transkripci**, mají rozvolněnou strukturu – říká se jim **aktivní chromatin** a tvoří cca 10% chromatinu v eukaryotické buňce

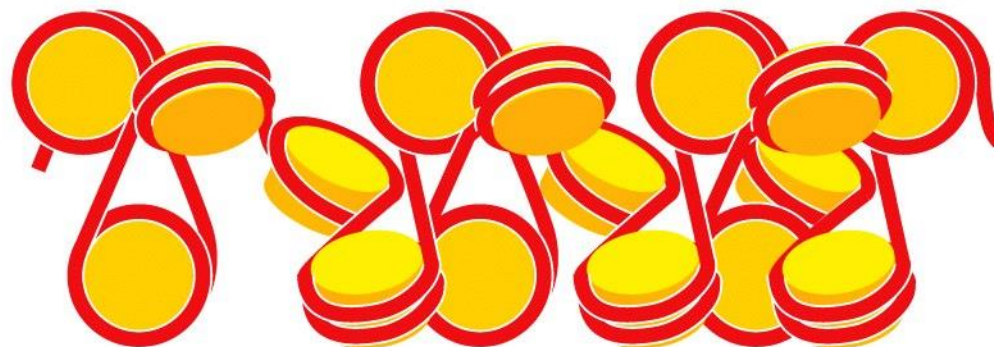
(A)

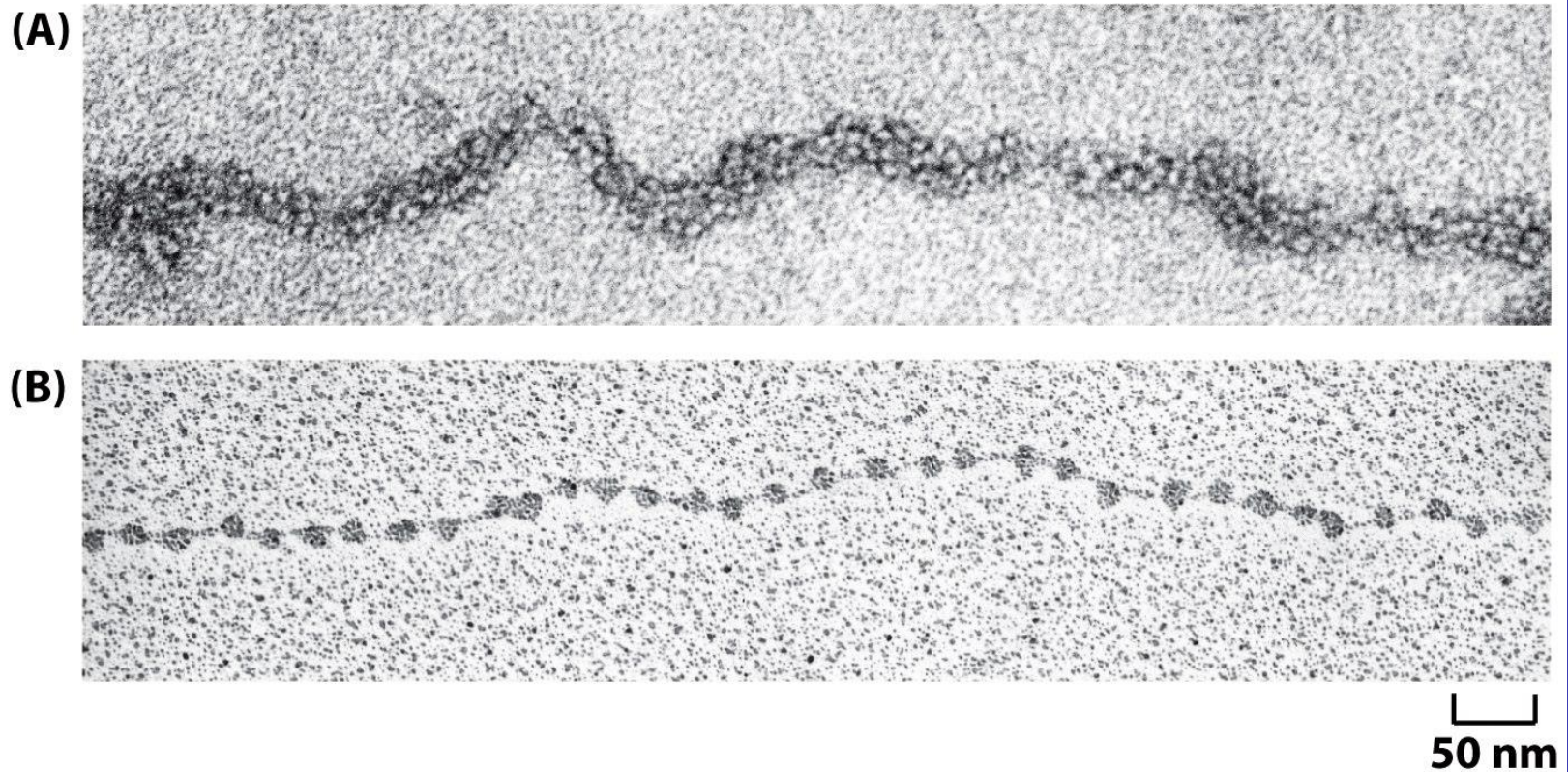


(B)

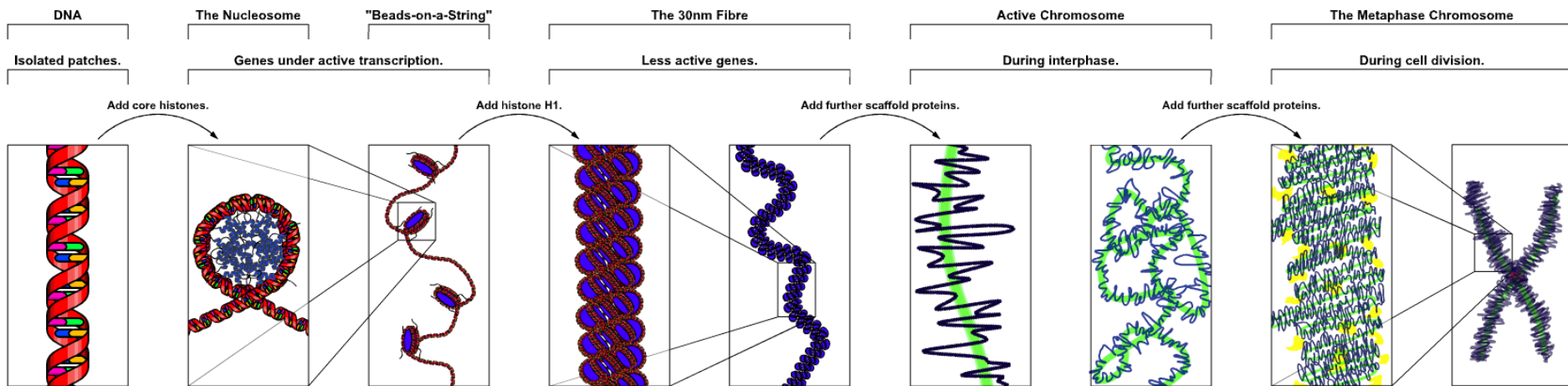


(C)

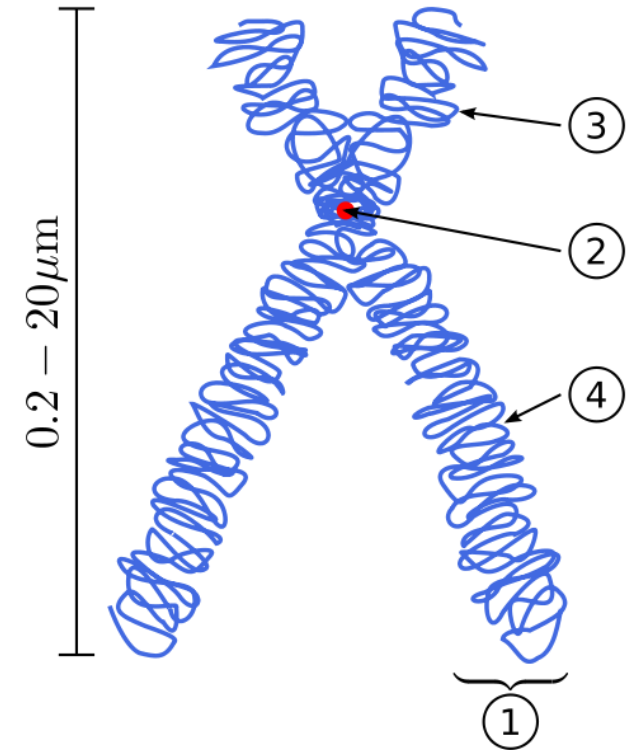




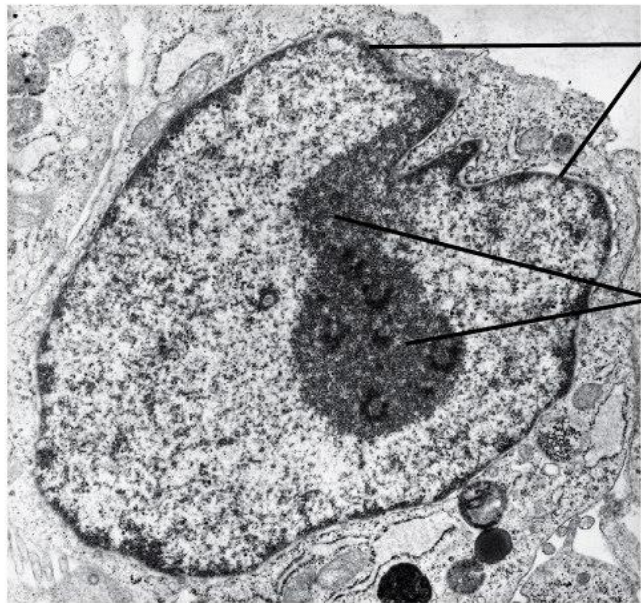
Kondenzovaný chromatin, tzv. **30-nm vlákno** (část A)
a dekondenzovaný chromatin (část B).



- 1 – chromatida
- 2 – centromera
- 3 – krátké rameno
- 4 – dlouhé rameno

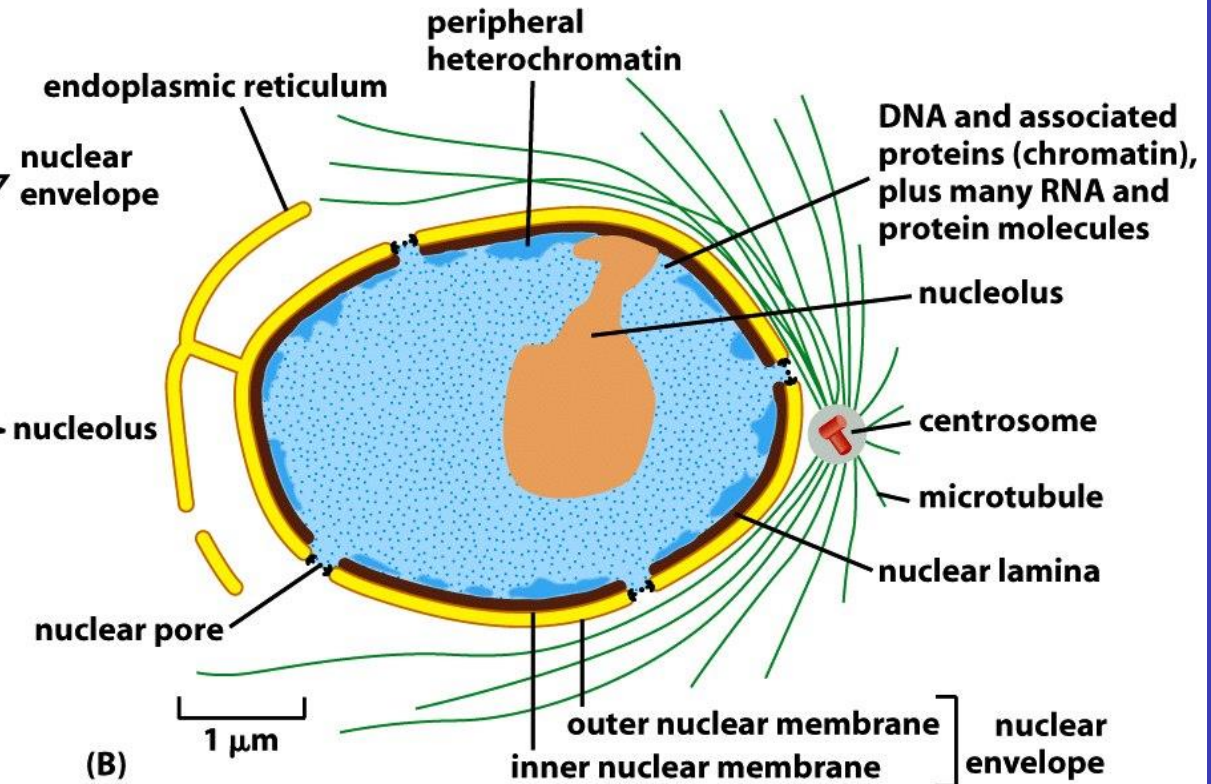


Buněčné jádro



(A)

2 μm

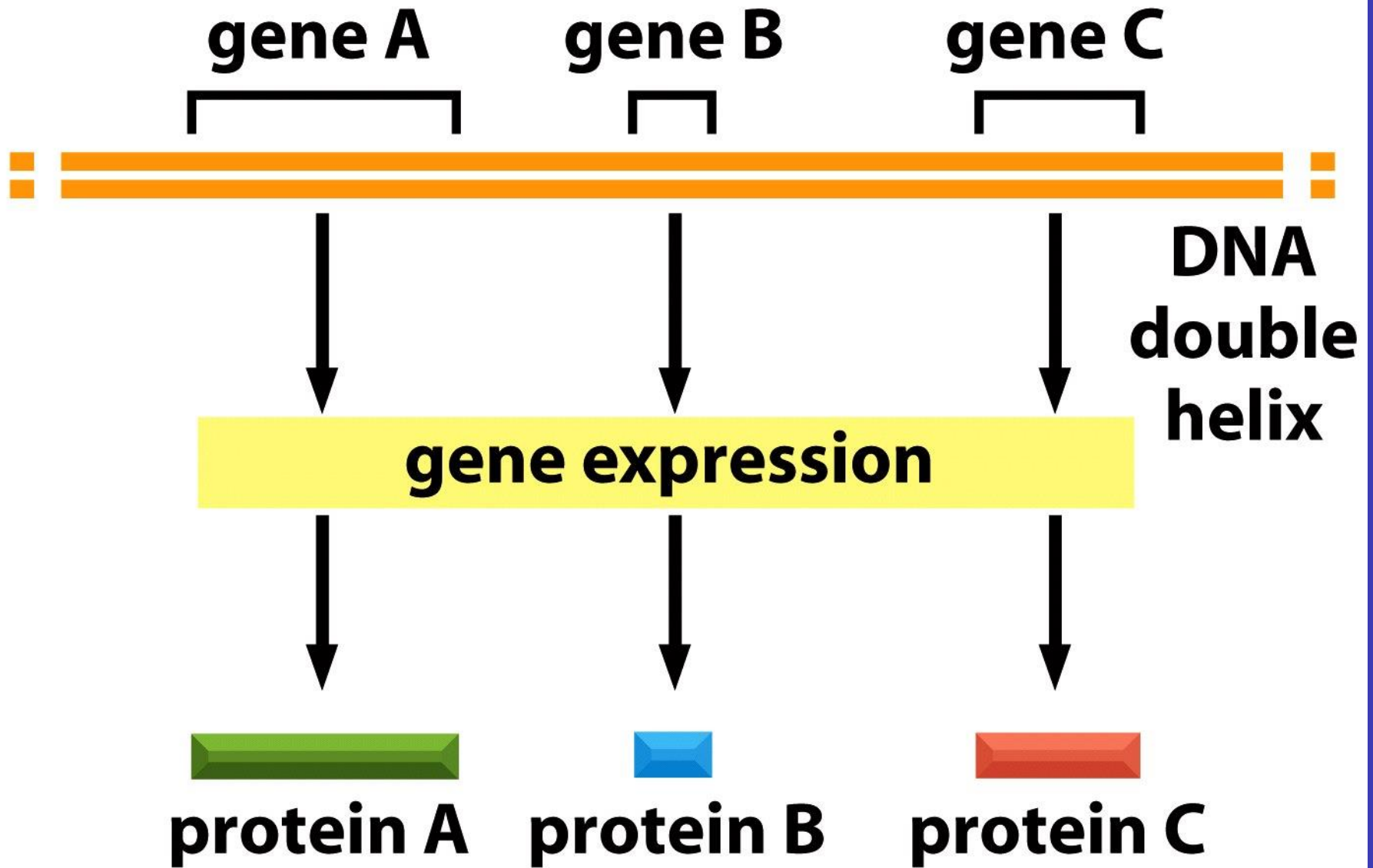


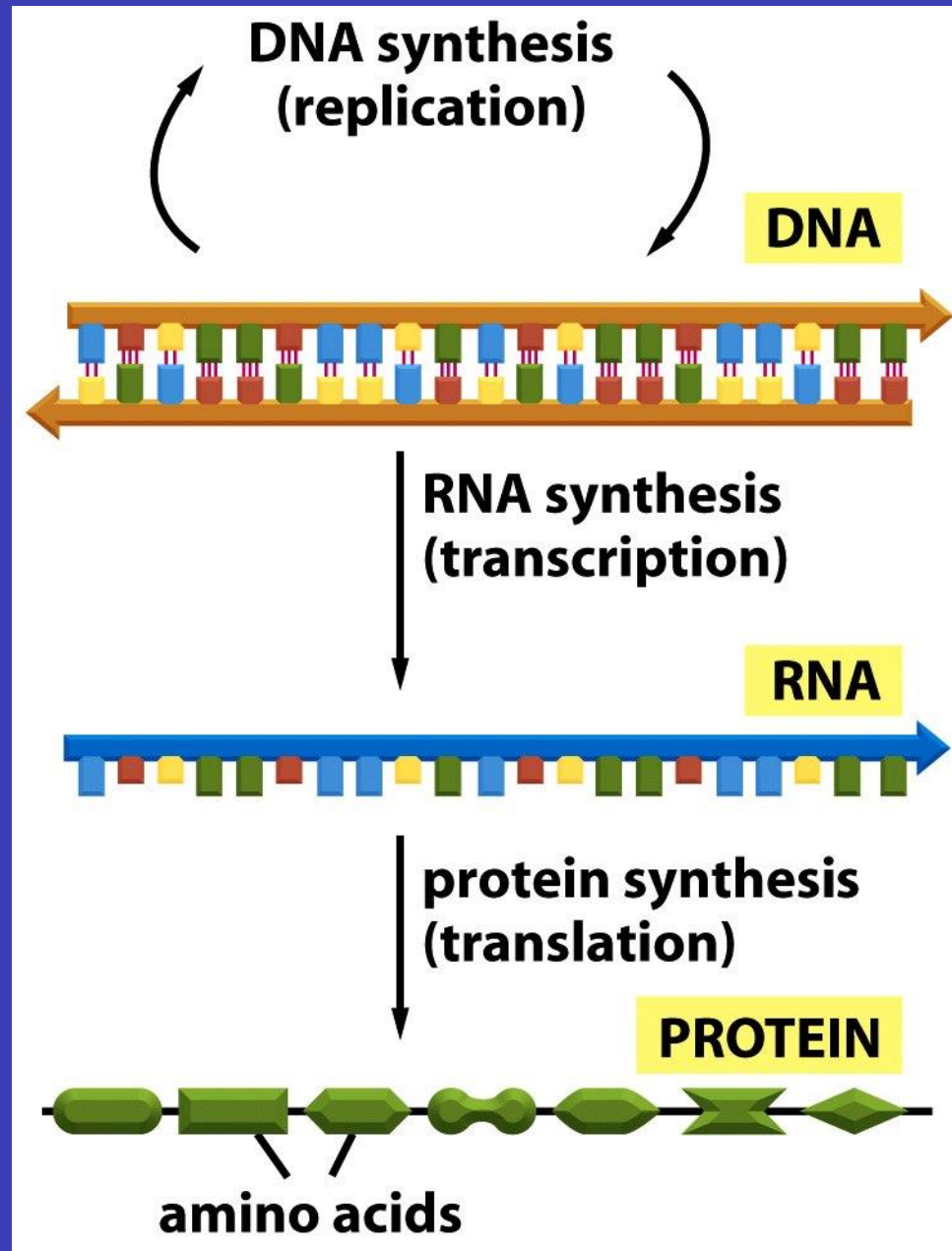
(B)

1 μm

Dědičnost

- buňka **nesyntetizuje proteiny**, které ji tvoří a zároveň obsluhují, **náhodně**, nýbrž dělá to na základě určité informace, jejíž přítomnost je patrná při porovnání buňky s její buňkou dceřinou: **dědičnost jako přenos určité informace z rodičů na děti je zásadní vlastnost života**
- nositeli biologické informace jsou **geny**
- na počátku minulého století bylo zjištěno, že tato informace je uložena v buněčném jádře (v chromozomech) a je dána **sekvencí nukleotidů v DNA**
- v roce 1944 přidání purifikované DNA k bakteriím mělo za následek **dědičnou změnu jejich vlastností**





Gen a genom

- většina **genů** je tvořena poměrně krátkými úseky DNA, které **kódují jednotlivé proteiny**, tzn. že pro překlad do proteinu je využívána jen menší část genu – **kódující oblasti**. Převažující **nekódující oblasti** obsahují úseky DNA, které určují kdy a v jakém množství bude protein syntetizován a tím se podílejí na **regulaci genové exprese**
- kompletní genetická informace organismu se nazývá **genom** (toto slovo se používá i pro DNA, která tuto informaci kóduje). Typická lidská buňka obsahuje DNA o délce přibližně 3 miliardy nukleotidů
- během buněčného dělení musí buňka **zkopírovat celý svůj genom**, aby obě dceřiné buňky nesly stejnou informaci

(A) human chromosome 22 in its mitotic conformation, composed of two DNA molecules, each 48×10^6 nucleotide pairs long



$\times 10$

10% of chromosome arm ~ 40 genes



$\times 10$

1% of chromosome containing 4 genes



$\times 10$

one gene of 3.4×10^4 np



regulatory DNA
sequences

exon

intron

gene expression

protein

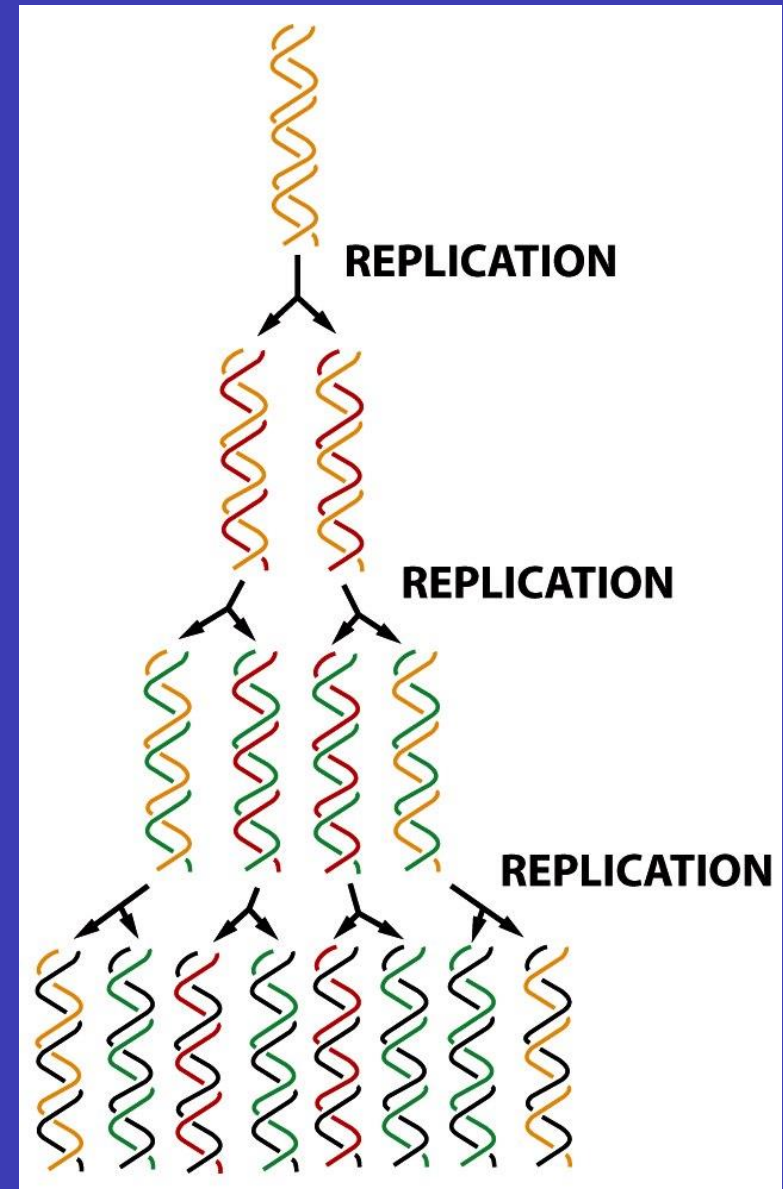


folded protein

Replikace

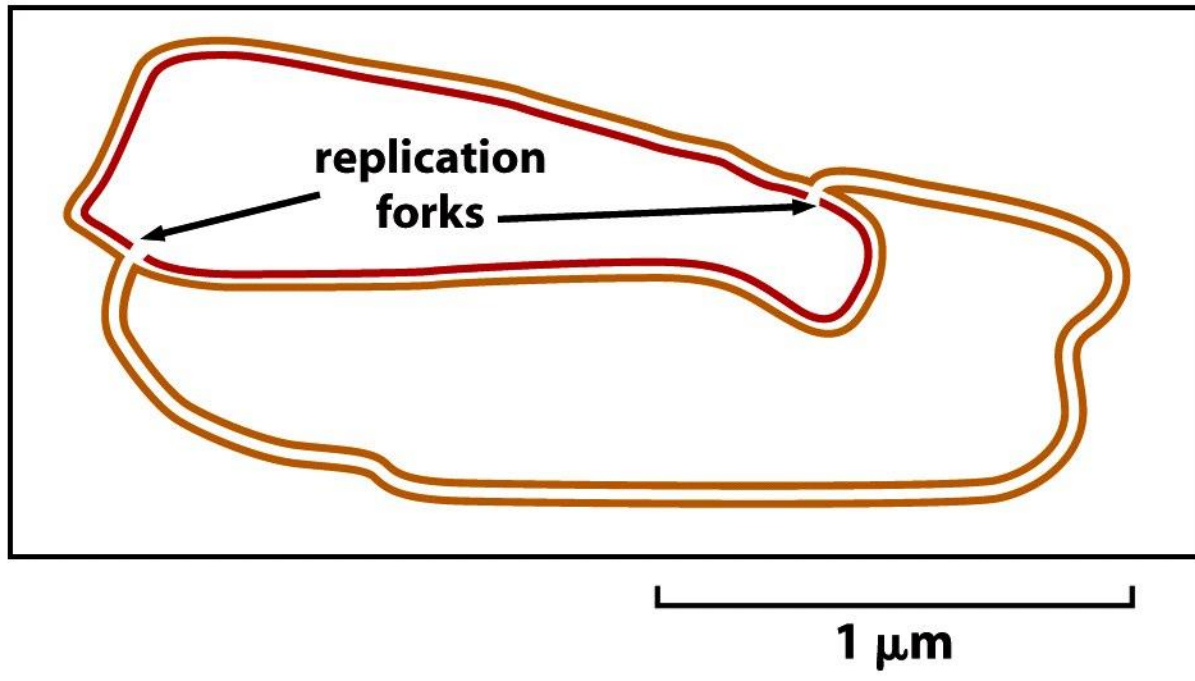
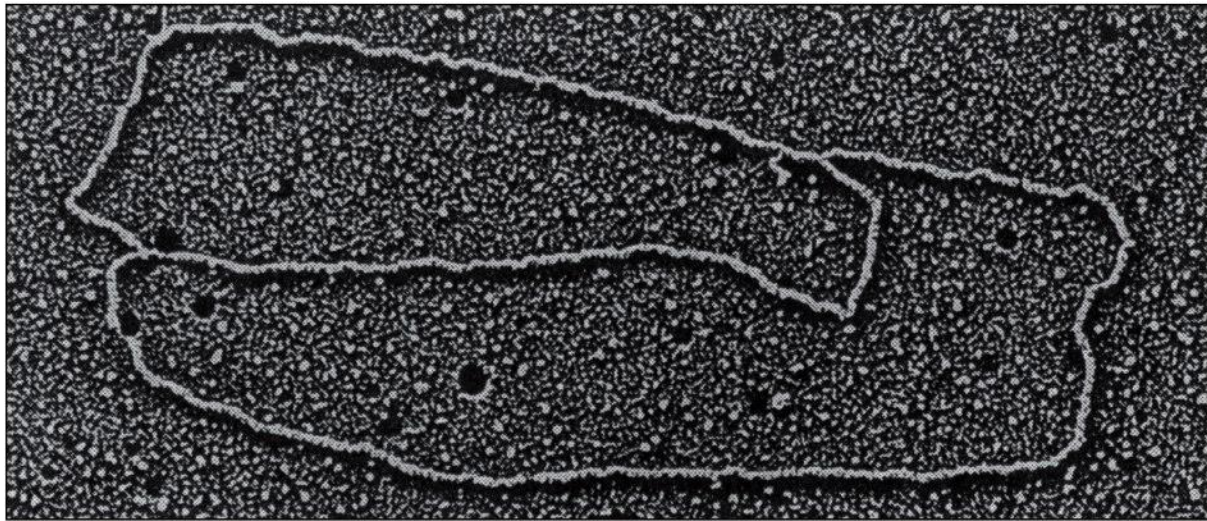
- komplementarita obou vláken umožňuje to, aby každé z nich mohlo sloužit jako předloha (matrice, **templát**) pro syntézu vlákna druhého

- **replikací DNA** vznikají z jedné molekuly DNA dvě molekuly DNA, z jedné dvoušroubovice **dvě identické dvoušroubovice**



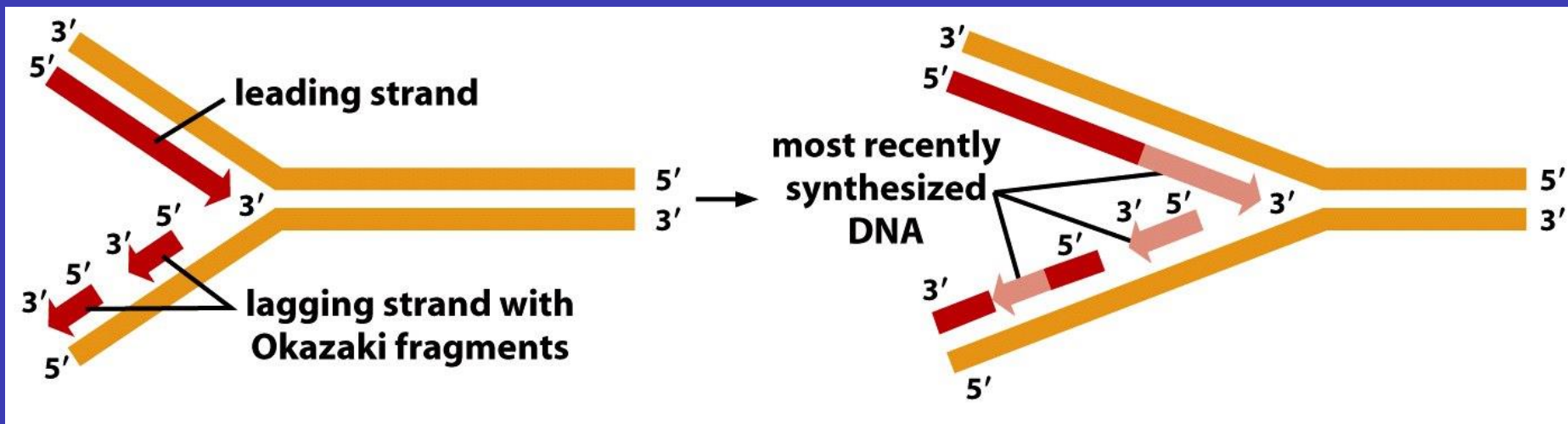
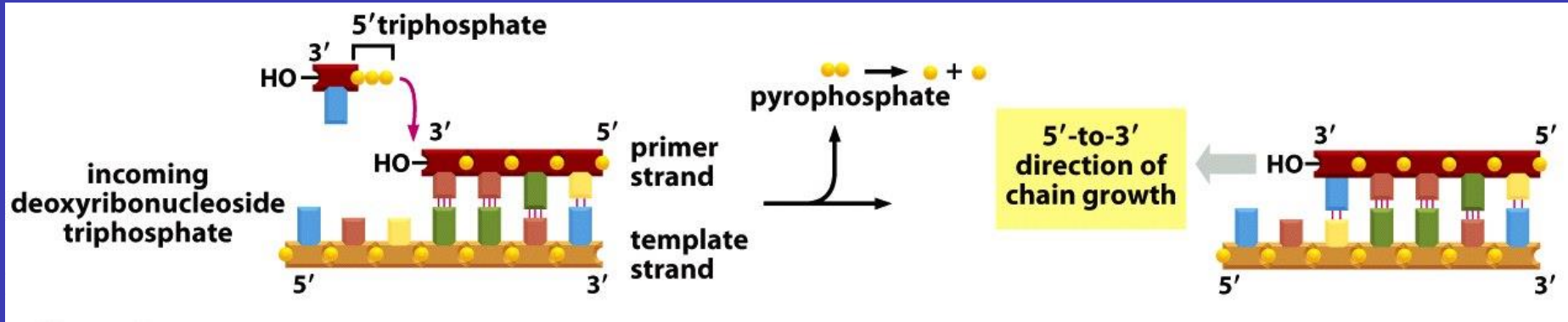
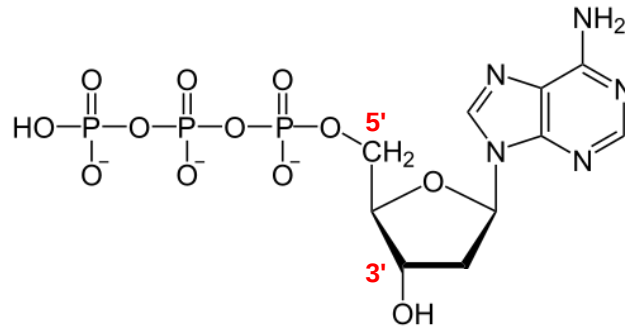
DNA je pasivní molekula

- v určitých místech DNA tvořených specifickými sekvencemi nukleotidů s vysokým obsahem **adeninu** a **thyminu** (jsou navzájem spojeny pouze dvěma vodíkovými můstky, které lze snadno rozpojit) se DNA vlivem iniciačních proteinů, především enzymu **helikázy**, rozdělí na dva řetězce a vznikne tzv. **replikační počátek**
- proteiny replikačního aparátu (např. **DNA-polymeráza**) následně provádějí replikaci DNA v místě které je označováno jako **replikační vidlička**
- DNA je tedy pasivní molekula, kterou „hýbají, obsluhují ji a rozhodují“ o ní proteiny

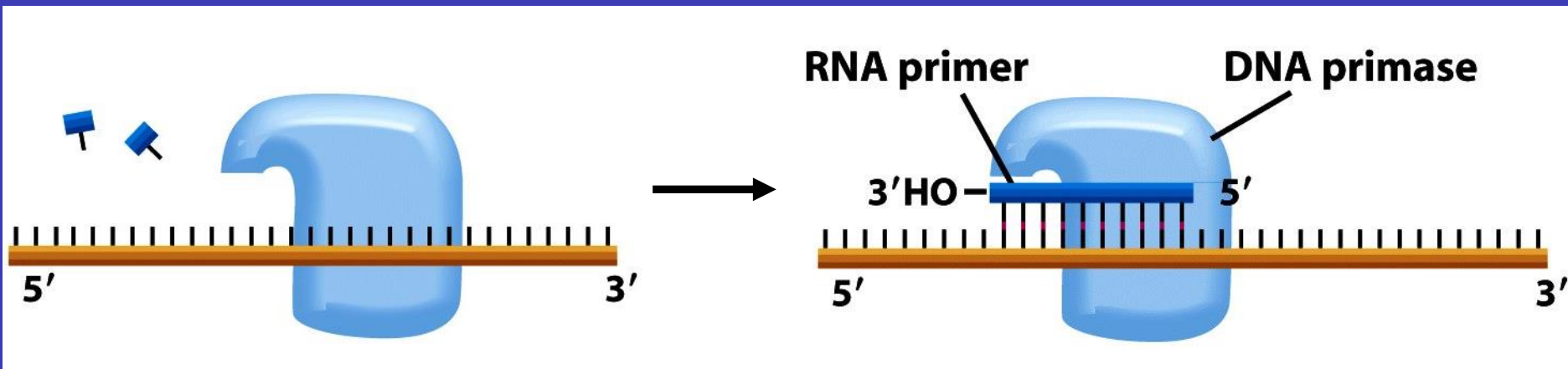


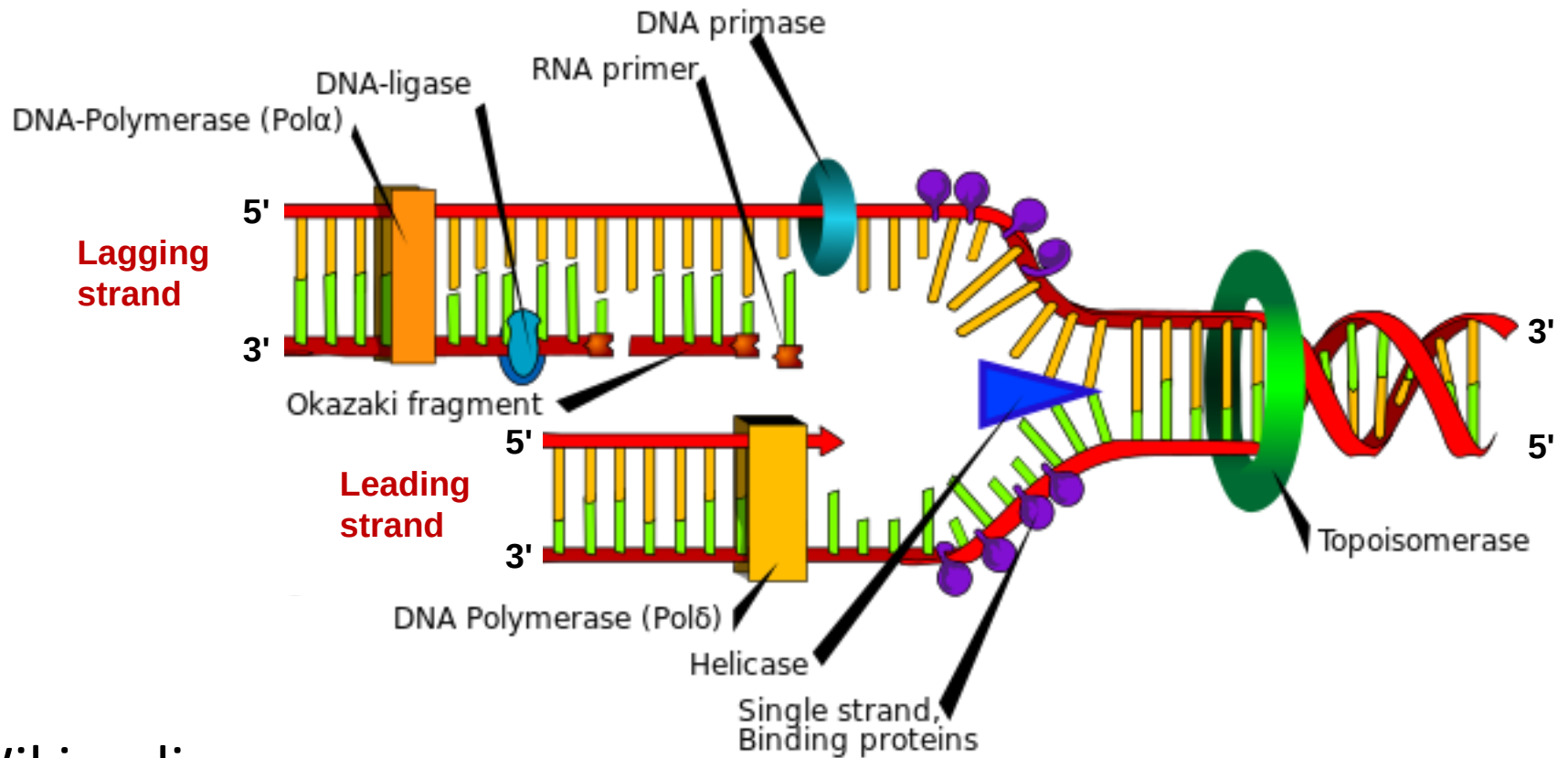
Mechanismus replikace

- nejdůležitějším enzymem replikačního aparátu je **DNA-polymeráza**, která syntetizuje nové vlákno DNA podle původního řetězce – **templátu**
- DNA-polymeráza je schopna přidávat nukleotidy pouze na **3' konec rostoucího vlákna**, čili vlákno syntetizované podle templátu $3' \rightarrow 5'$ roste **kontinuálně**, naopak v opačném směru se tvoří tzv. **Okazakiho fragmenty**, které se následně spojují do souvislého vlákna pomocí enzymu **DNA-ligázy**
- kontinuálně rostoucí vlákno se nazývá **vedoucí** a fragmentárně rostoucí vlákno se nazývá **opoždující**



- DNA-polymeráza také není schopna spojit dva volné nukleotidy, musí vycházet z už existujícího „vlákénka“ které se nazývá **primer**, na který DNA-polymeráza připojuje první nukleotid nově vznikající DNA
- primer je **krátká molekula RNA** syntetizována v oblasti replikačního počátku enzymem **primáza** a po ukončení replikace je **degradován**



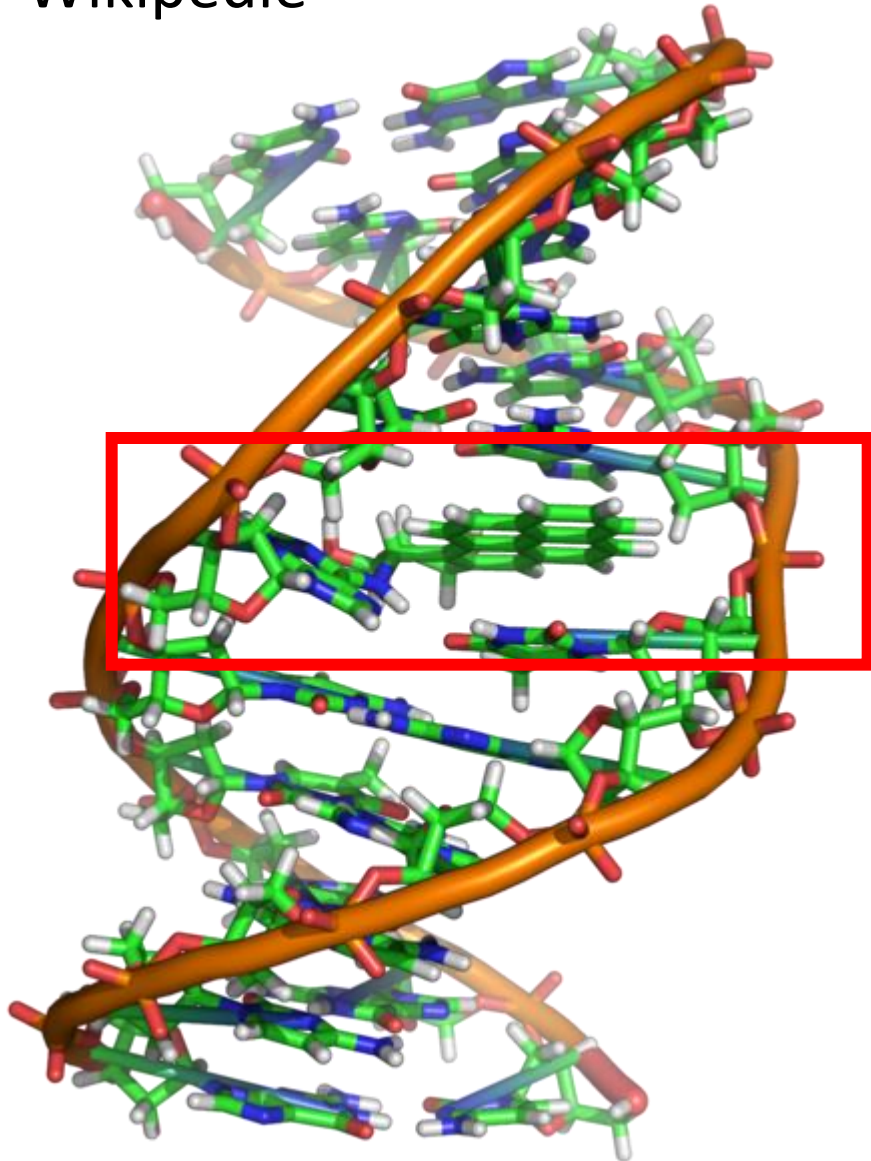


Wikipedie

Oprava chyb a mutace

- DNA-polymeráza vždy před přidáním nového nukleotidu **zkontroluje**, zda se předchozí nukleotid správně páruje – má **sebeopravnou funkci** („proofreading“)
- přesto se dopouští asi jedné chyby na deset milionů zreplikovaných párů, tyto chyby bývají pak opravovány jinými enzymy (stejně jako chyby vzniklé při různém poškozování DNA – např. mutageneze při kouření)
- v případě že k opravě chyby nedojde, může docházet ke vzniku trvalých chyb – **mutací**, které mění genetickou informaci, což může vést v krátké době např. k **rakovině** nebo v dlouhé době k **vývoji nového biologického druhu**

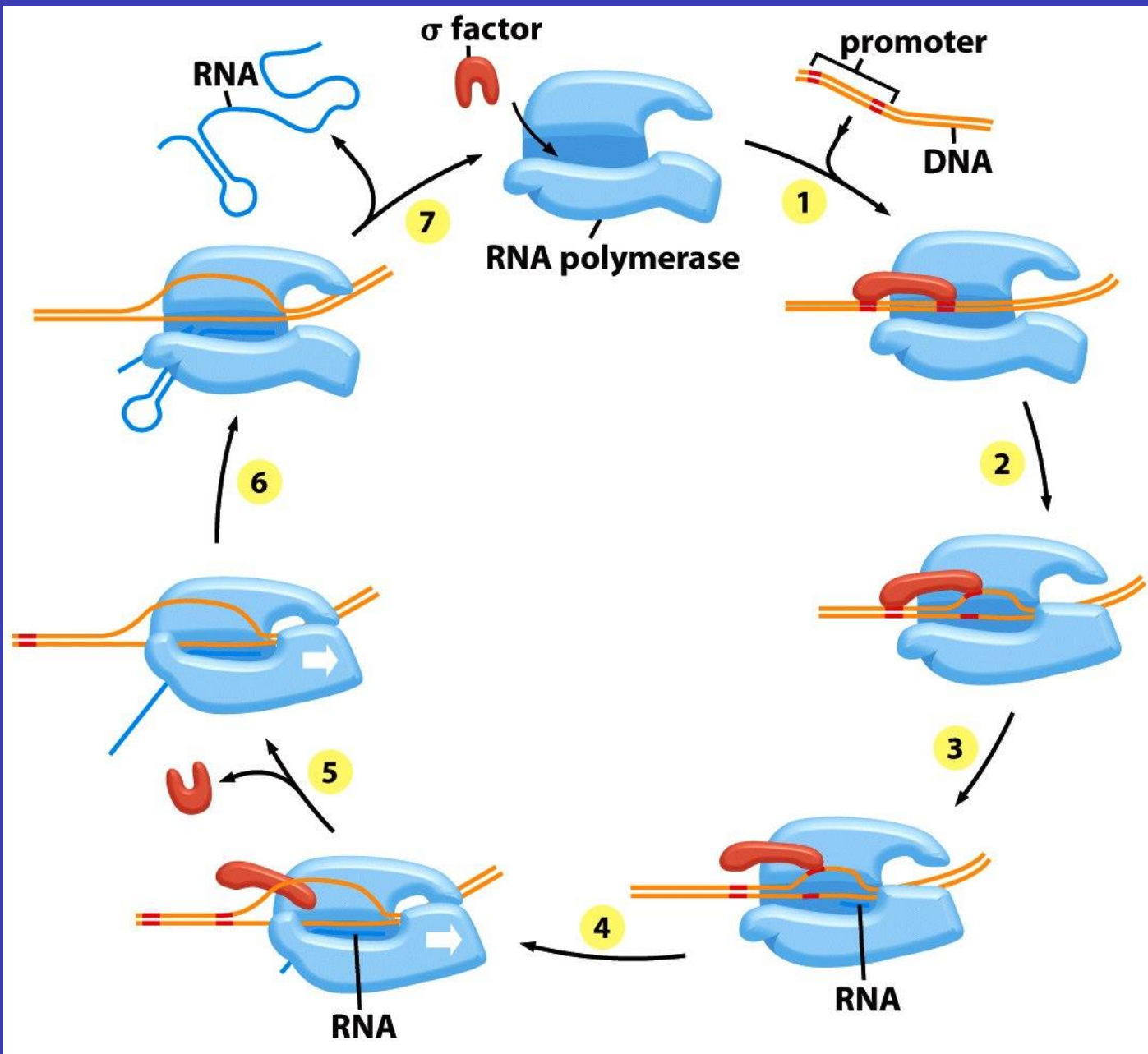
Wikipedie

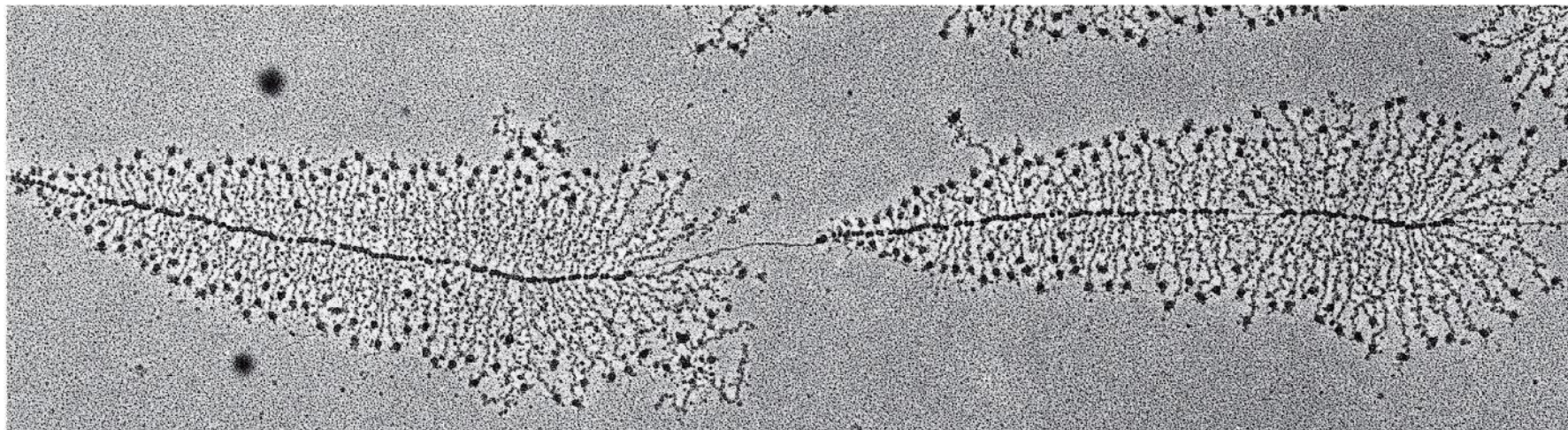


mutagen z cigaretového kouře, benzo[a]pyren, navázaný v molekule DNA

Transkripce

- při transkripci (**přepisu**) se k dané části vlákna DNA (gen, který má být přepisován) syntetizuje komplementární vlákno RNA, tzv. **mediátorová RNA (mRNA)**
- kromě mRNA vznikají také **ribozomální RNA (rRNA)** a **transferová RNA (tRNA)**
- během transkripce (prováděné pomocí **RNA-polymerázy**) se novovznikající RNA odděluje od vlákna DNA a DNA se po přepisu uzavírá zpátky do dvoušroubovice
- RNA-polymeráza **postrádá sebeopravnou funkci** a **nepotřebuje primer**
- transkripce začíná na místě DNA které se nazývá **promotorem** a končí v oblasti **terminátoru**



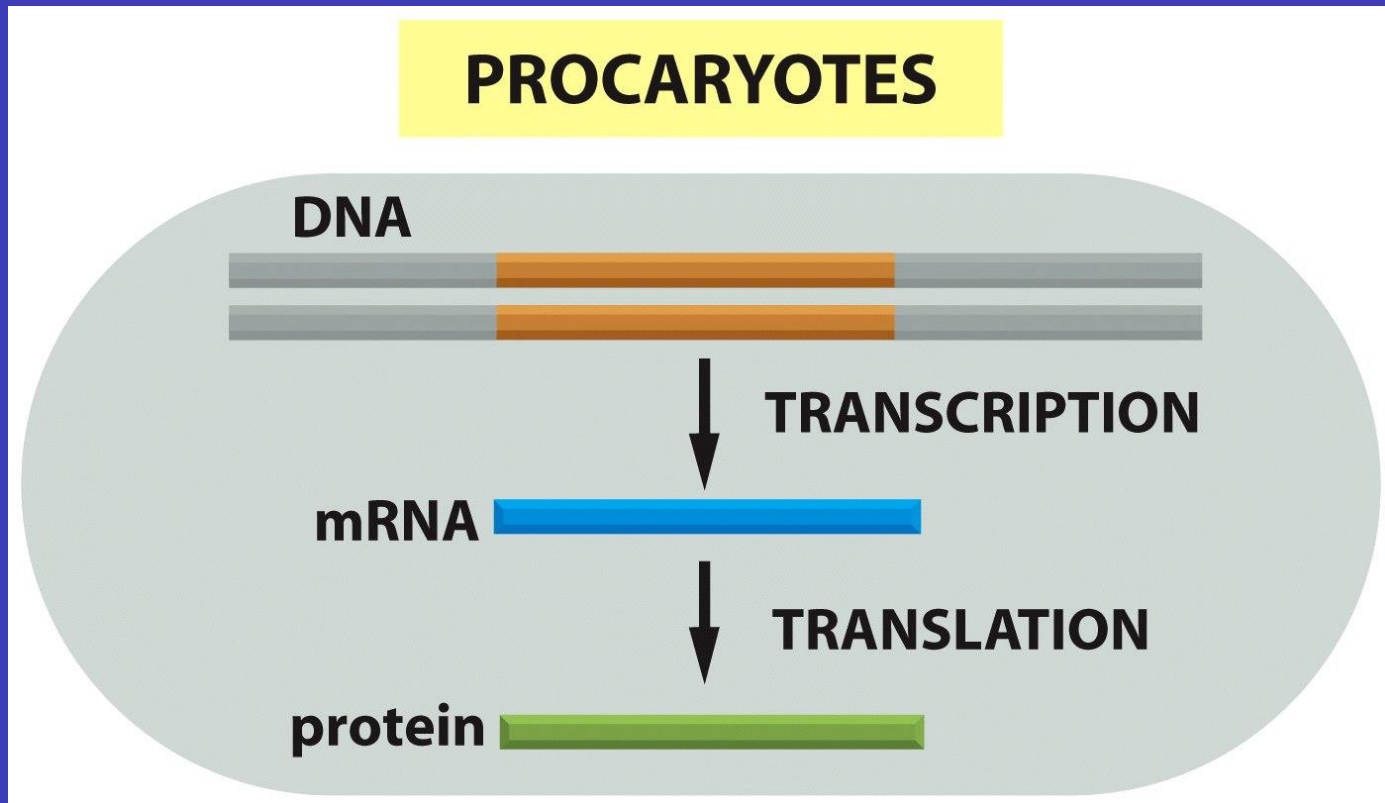


1 μm

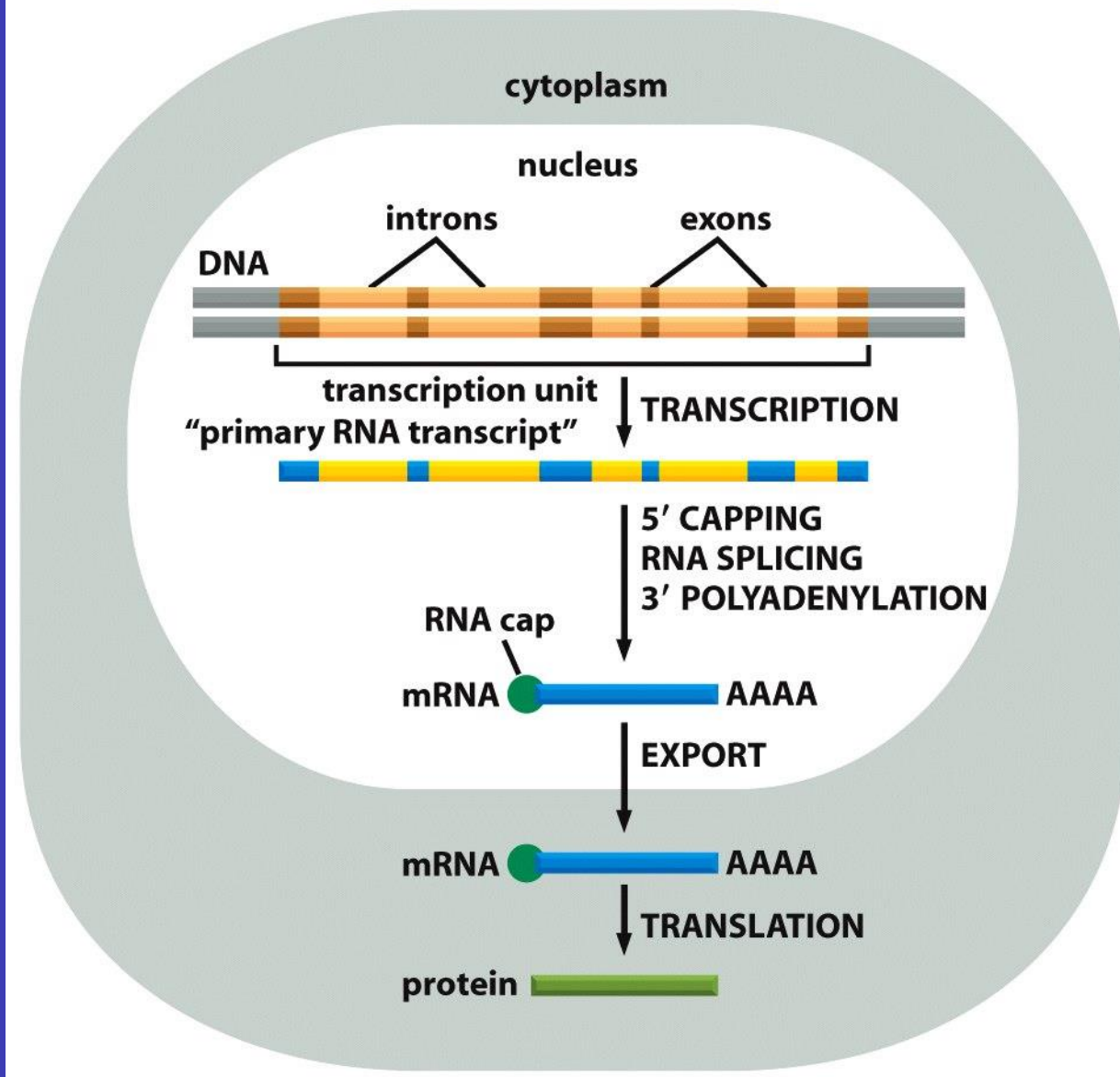
Posttranskripční úpravy

- u eukaryot transkripcí vzniká **primární transkript (hnRNA)**, na jehož **5' konec** je přidána tzv. **čepička** (atypický metylovaný guaninový nukleotid) a na **3' konec** několik stovek nukleotidů dlouhý řetězec adeninů (**polyadenylace**)
- tyto modifikace **stabilizují** molekulu mRNA, napomáhají jejímu **transportu** z jádra do cytoplazmy a poskytují informaci proteosyntetickému aparátu že daná mRNA má oba konce (informace kterou kóduje je **kompletní**)
- primární transkript obsahuje mnoho sekvencí, které nekódují žádný protein (**introny**), po transkripci jsou všechny tyto úseky vystříhány (**sestřih RNA**) a všechny kódující úseky (**exony**) spojeny do jednoho řetězce **mRNA**, který je pak přepraven z jádra do cytoplazmy

- po sestřihu zůstává asi **5% primárního transkriptu**
- ačkoli molekuly mRNA mohou být použity opakovaně, po určité době je každá molekula mRNA v buňce degradována



EUCARYOTES



Translace

- trojice nukleotidů v mRNA odpovídá jedné konkrétní aminokyselině, čili je možné **přeložit (translace)** pořadí nukleotidů v mRNA do pořadí aminokyselin v proteinu
- taková **trojice nukleotidů** v mRNA se nazývá **kodon** – každý kodon určuje tedy jednu aminokyselinu (avšak jedna aminokyselina může být kódována i více kodony)
- pravidla, podle nichž se mRNA překládá do proteinu, se nazývají **genetický kód**

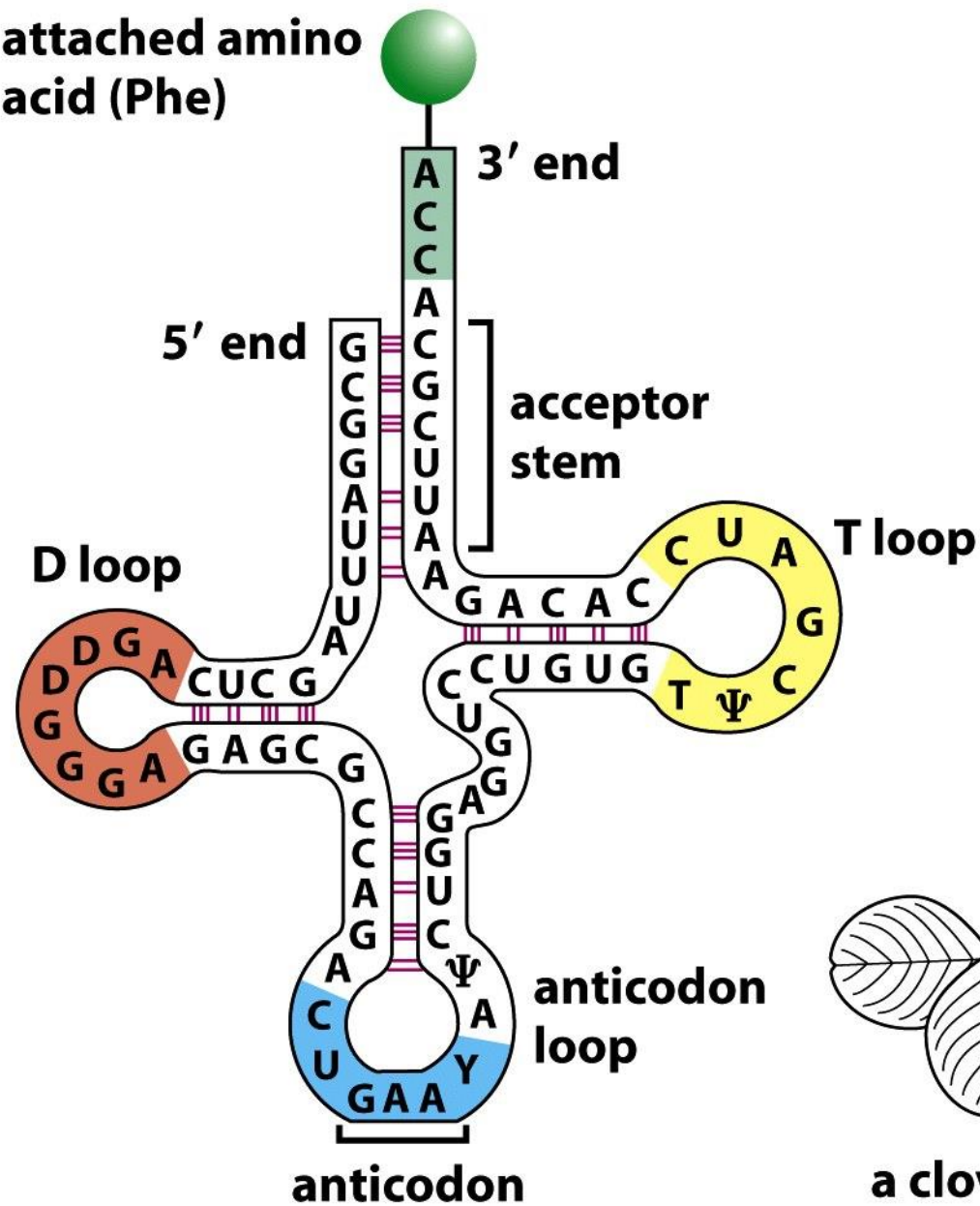
[illegible]

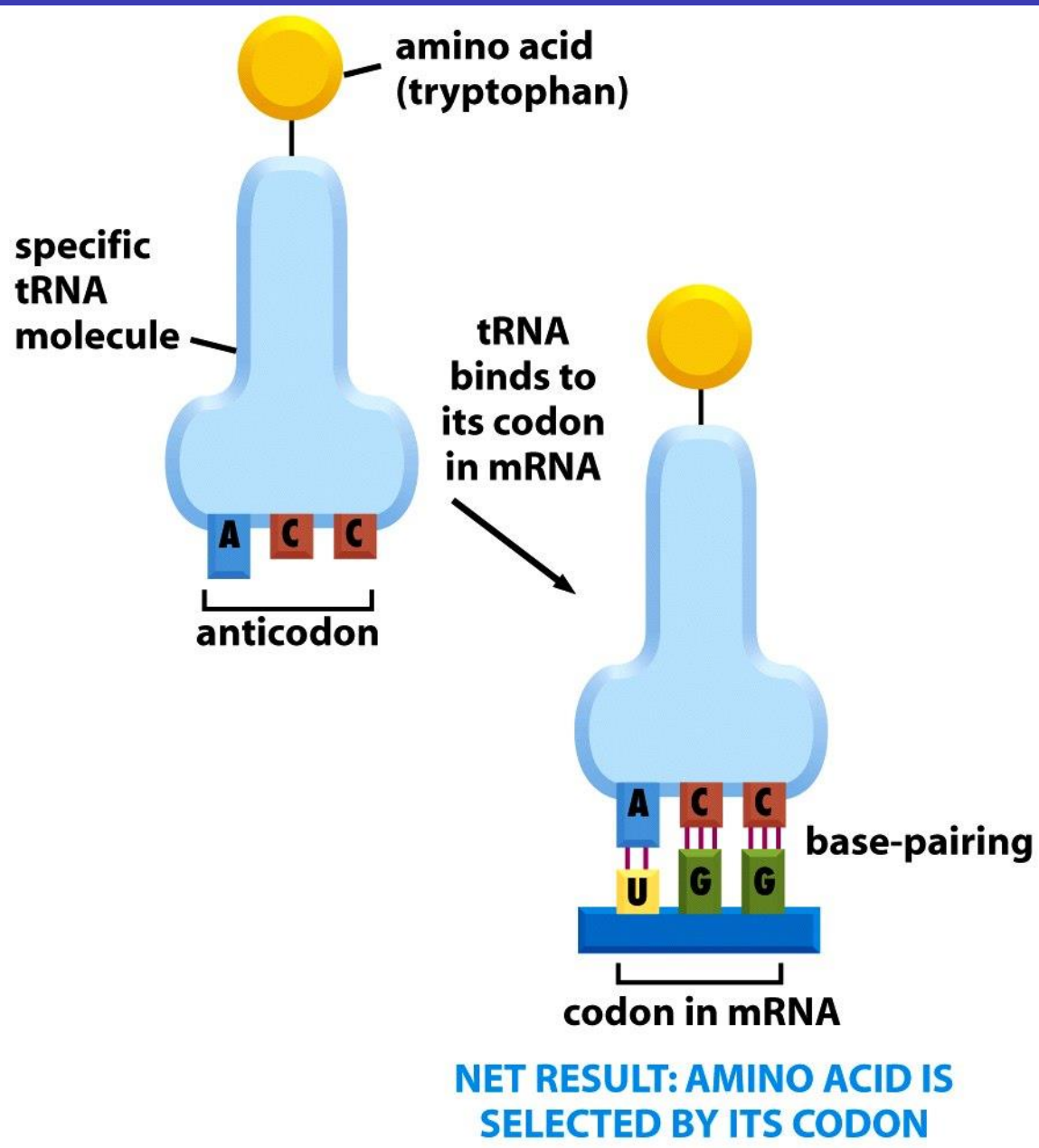
Čtecí rámce a tRNA

- při translaci je nukleotidová sekvence **čtena od 5' konce po trojicích nukleotidů**
- táž mRNA by v principu mohla kódovat tři různé proteiny, protože může být čtena ve třech **čtecích rámcích** (v závislosti na tom, u jakého nukleotidu se začne) – **ve skutečnosti (u eukaryot) jen jeden čtecí rámec kóduje reálný protein**
- princip překladu spočívá v tom, že molekula tzv. **transferové RNA (tRNA)** se na svém jednom konci váže k mRNA (ke kodonu **antikodonem**) a na svém druhém konci nese aminokyselinu, kódovanou daným kodonem, na němž je tRNA navázána



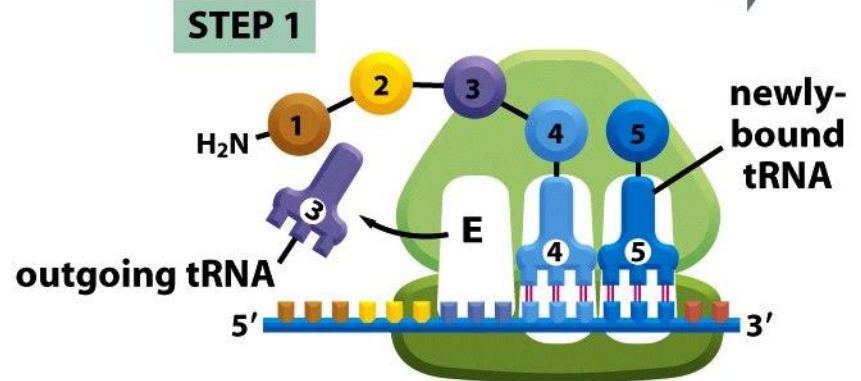
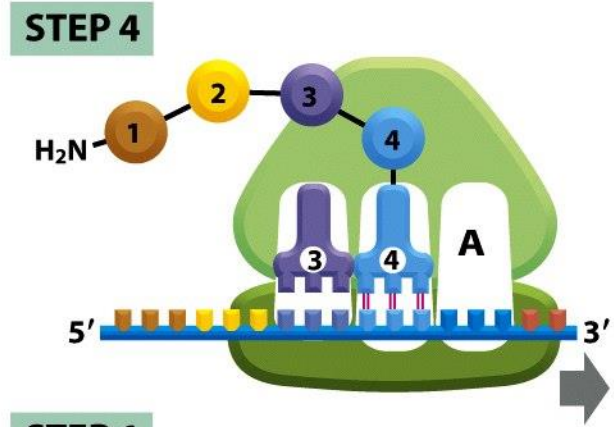
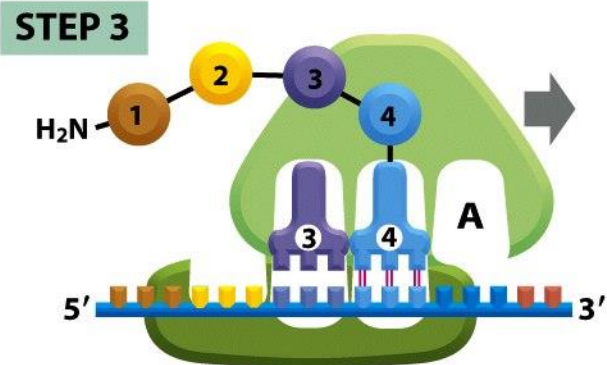
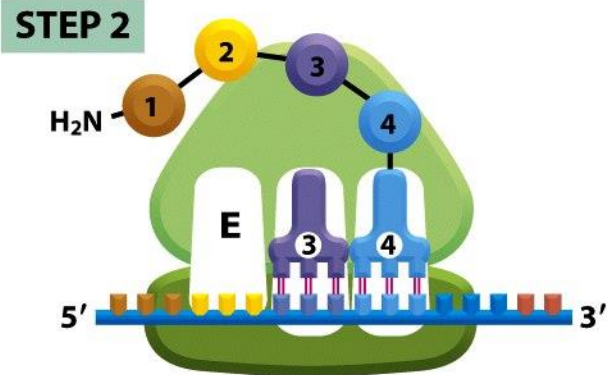
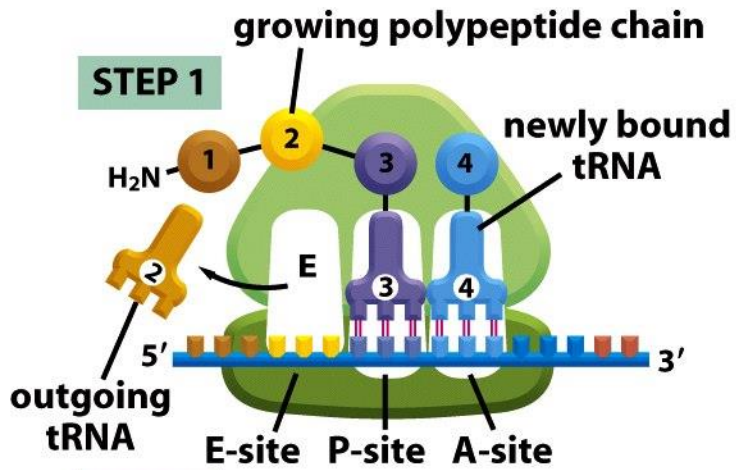
attached amino
acid (Phe)





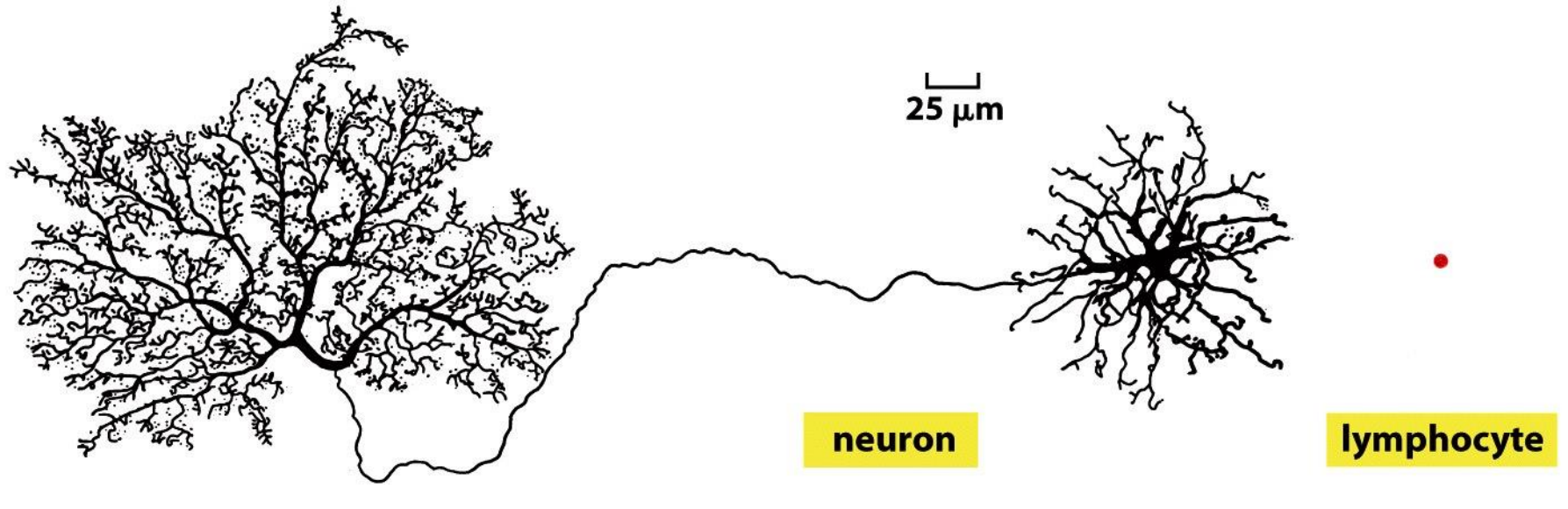
Mechanismus translace

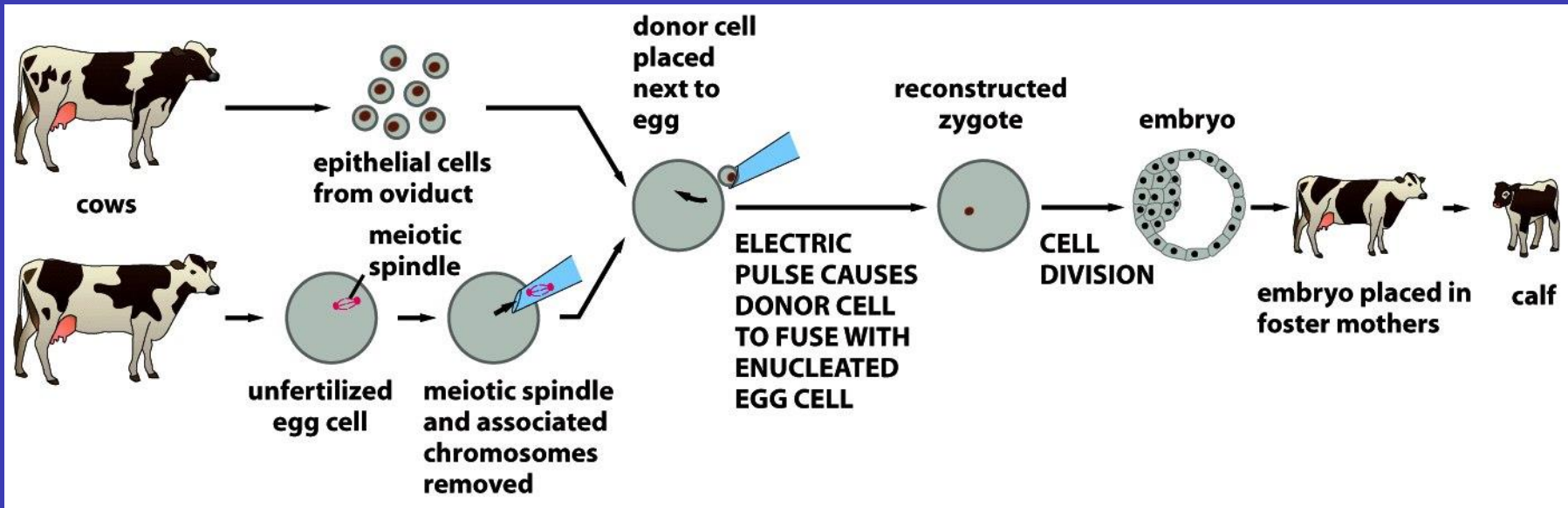
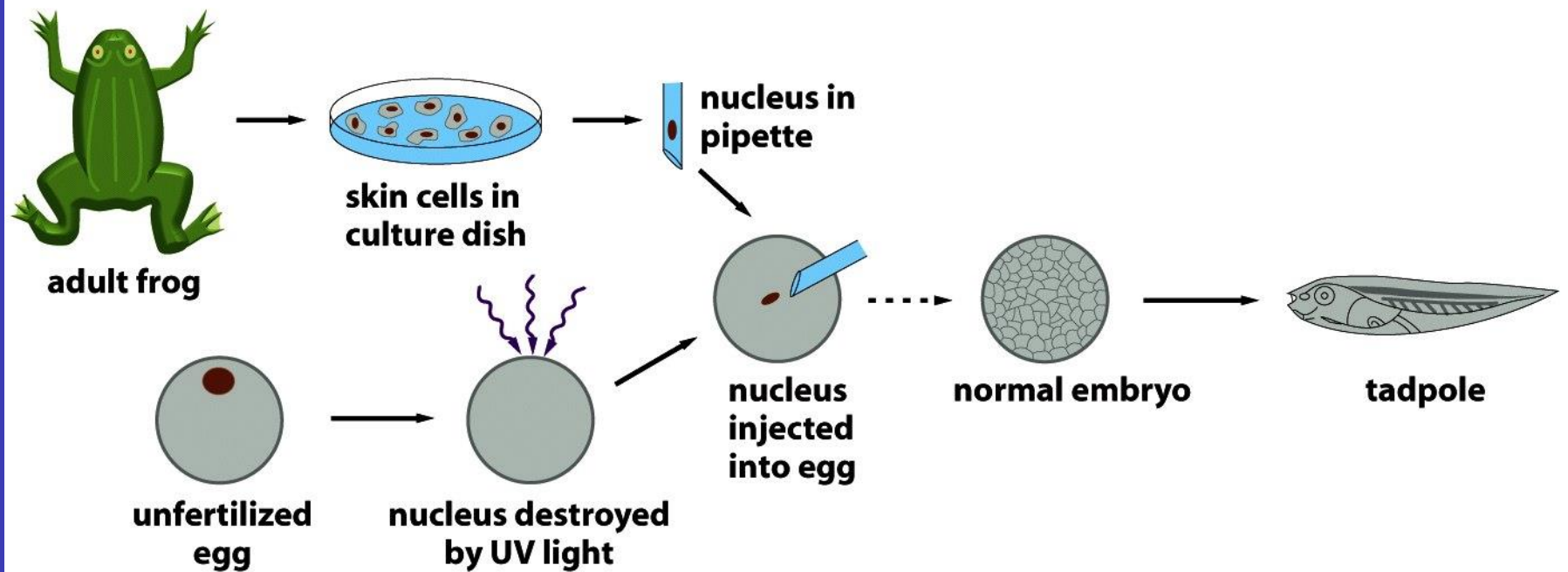
- translace se děje na **ribosomech** či polyribosomech (kdy se na překladu dané mRNA účastní více ribozomů)
- ribozomy jsou složeny z **proteinů** a **ribosomální RNA (rRNA)**, přičemž se dělí do dvou podjednotek
- **malá podjednotka** zodpovídá za **nasednutí tRNA** na kodony mRNA, **velká podjednotka** katalyzuje **vznik peptidové vazby** mezi aminokyselinou na tRNA a zbytkem proteinového řetězce
- translace probíhá v několika základních krocích, vznik peptidové vazby je katalyzován **peptidyltransferázou**
- za navázání správné aminokyseliny na tRNA odpovídají **aminoacyl-tRNA-syntetázy**



Regulace genů

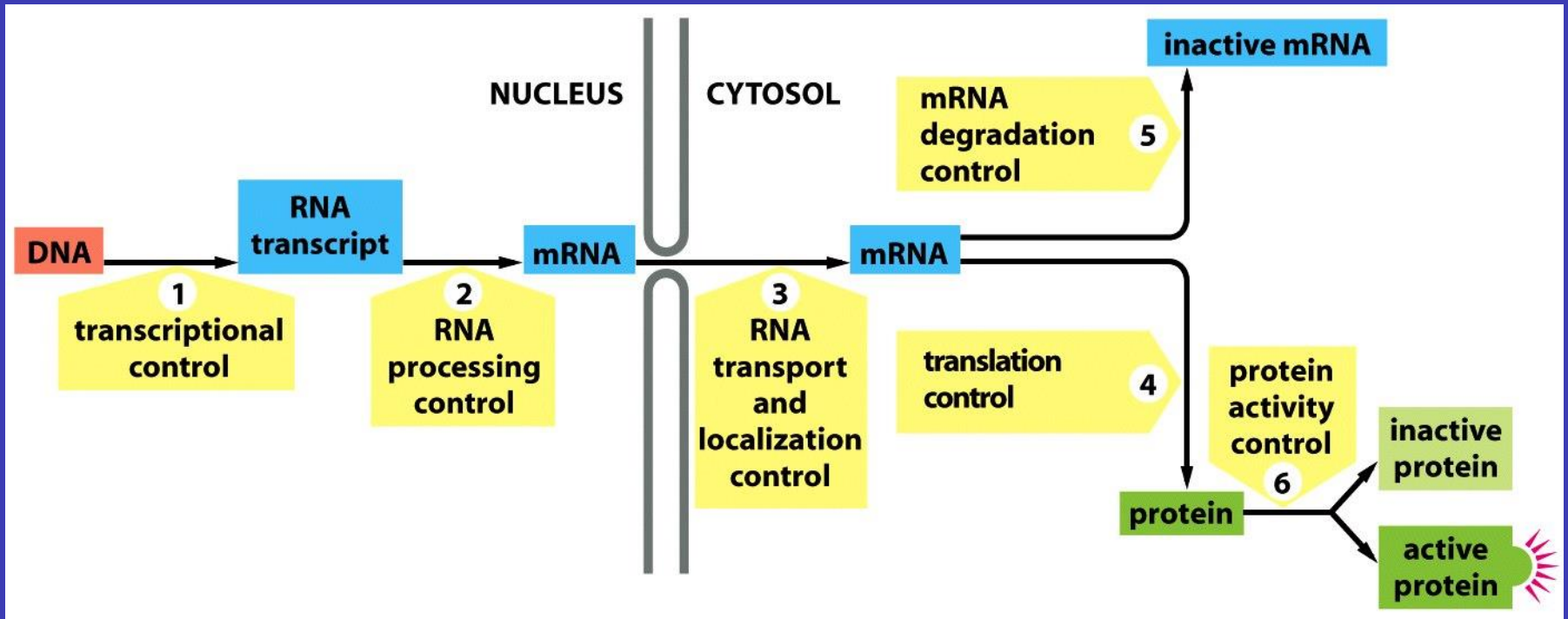
- **diferenciace buněk** v rámci mnohobuněčného organismu (rozličné typy buněk jsou specializované na vykonávání různých funkcí) je způsobena tím, že **buňky se stejným genomem** (např. nervová buňka a bílá krvinka jednoho jedince) **exprimují různé geny**
- důkaz, že běžná buňka mnohobuněčného organismu obsahuje celou DNA (všechny geny), byl podán pomocí vytvoření celého jedince z jádra takové buňky, pokud bylo přidáno do neoplodněného vajíčka. Kdyby v jádře běžné buňky nebyly všechny geny, nikdy by z jejího jádra nemohl vyrůst celý nový organismus





Regulace genové exprese

- genovou expresi lze regulovat na několika různých úrovních, a to:
 - zapnout/vypnout transkripci
 - umožnit/znemožnit zpracování primárního transkriptu do mRNA
 - kontrola transportu a degradace mRNA
 - regulace translace
 - regulace proteinové aktivity (už syntetizovaný protein může být zapnut/vypnut změnou konformace apod.)
- nejčastěji probíhá regulace v kroku 1, čili **na úrovni transkripce**

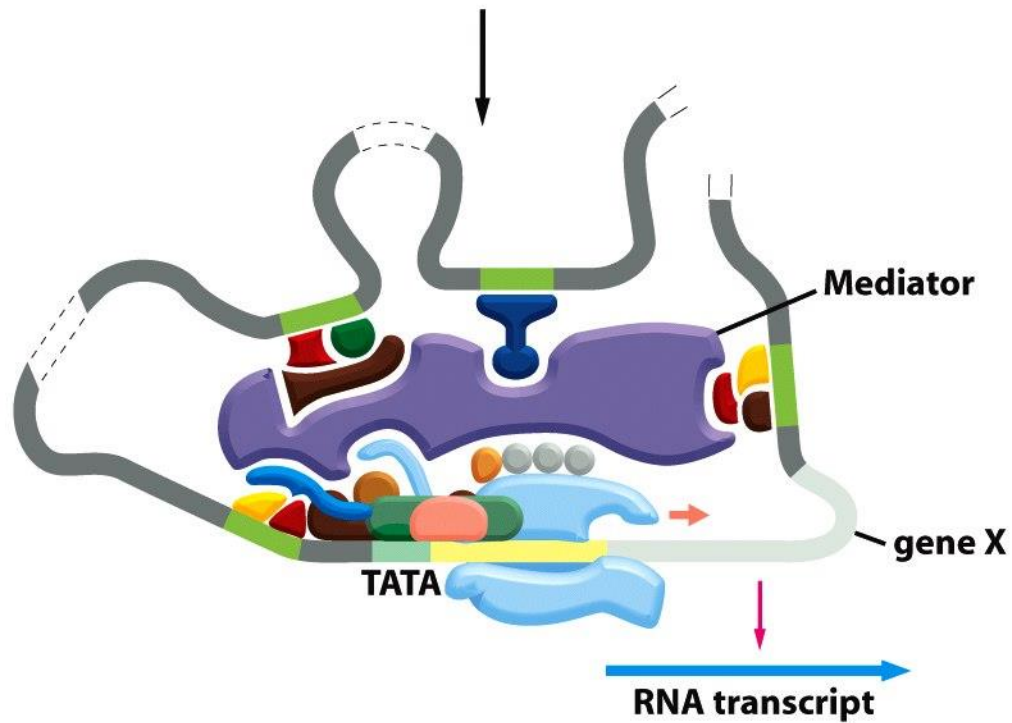
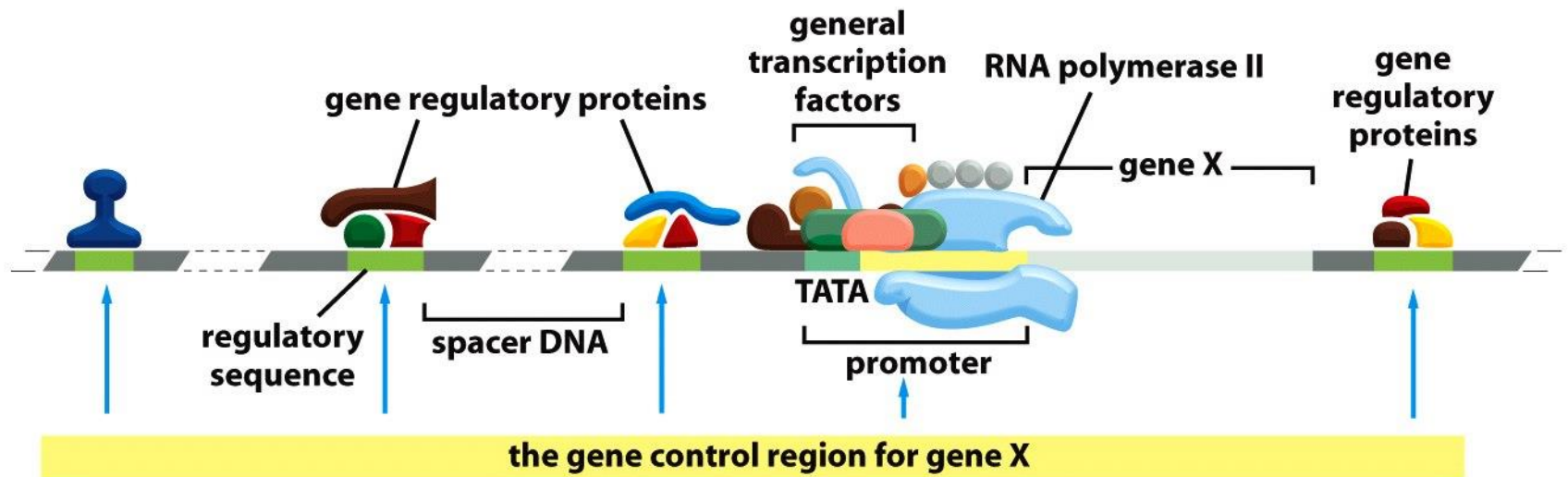


Aktivátory a represory transkripce

- v genech existují tzv. **regulační sekvence**, které umožňují **zapínat/vypínat transkripci** těchto genů
- regulační sekvence jsou rozpoznávány **regulačními proteiny**, které se vážou na DNA, a tak spouštějí/vypínají transkripci daného genu
- interakce protein-DNA je tvořena nekovalentními vazbami a patří mezi nejpevnější a nejspecifičtější v biologii
- regulační proteiny se dělí na **aktivátory** (po vazbě do DNA **spouštějí transkripci**) a **represory** (po vazbě do DNA **potlačují transkripci**)
- aktivátory se většinou vážou v blízkosti promotoru a umožňují RNA-polymeráze iniciovat transkripci

Regulace transkripce u eukaryot

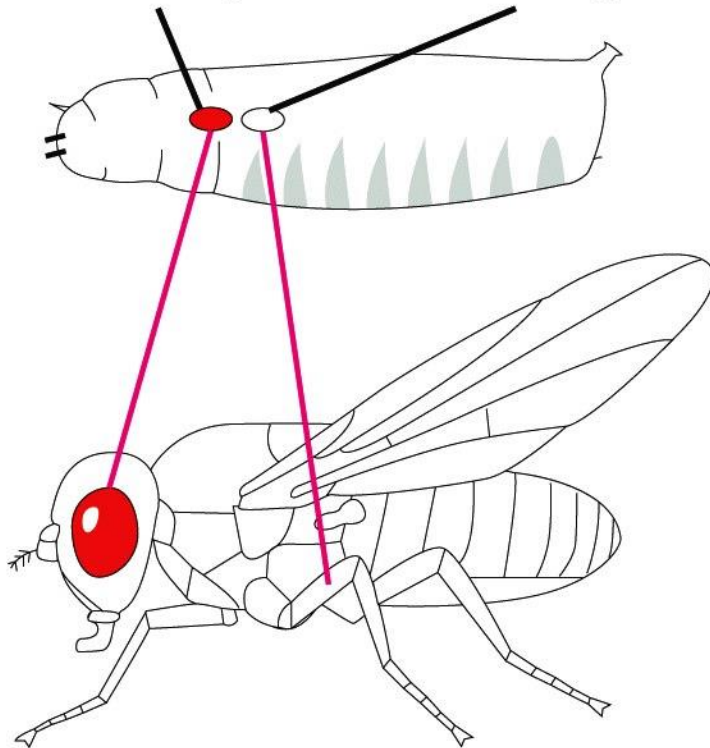
- u eukaryot RNA-polymeráza nedokáže zahájit transkripci sama a vyžaduje přítomnost **transkripčních faktorů**, které se **vážou na promotor** spolu s ní a umožňují transkripci
- represory a aktivátory mohou být vázány i několik tisíc nukleotidů daleko od genu který regulují (přiblíží se mu tak, že DNA se stočí do smyčky) a na jeden gen jich bývá více
- eukaryota obsahují 3 RNA-polymerázy: první a třetí typ přepisují tRNA, rRNA a tzv. malé RNA, které neslouží jako templát pro translaci – **jenom RNA-polymeráza II přepisuje mRNA a umožňuje tak expresi proteinů**



Co zmůže jeden regulační protein

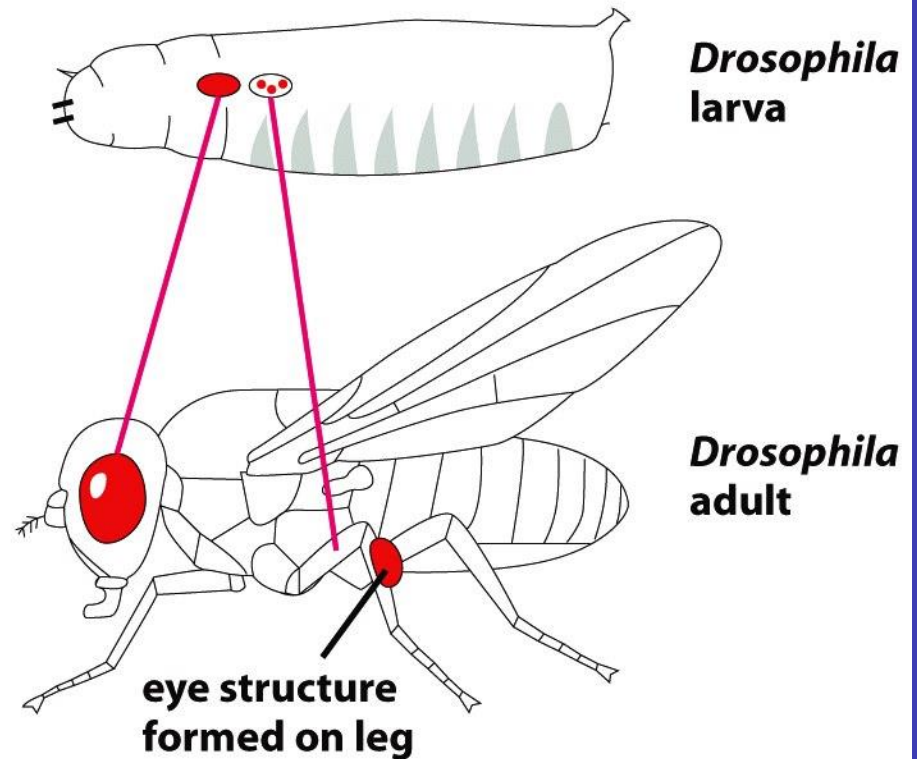
group of cells
that give rise to
an adult eye

group of cells
that give rise to
an adult leg



normal fly

(red shows cells expressing *Ey* gene)



fly with *Ey* gene artificially
expressed in leg precursor cells