

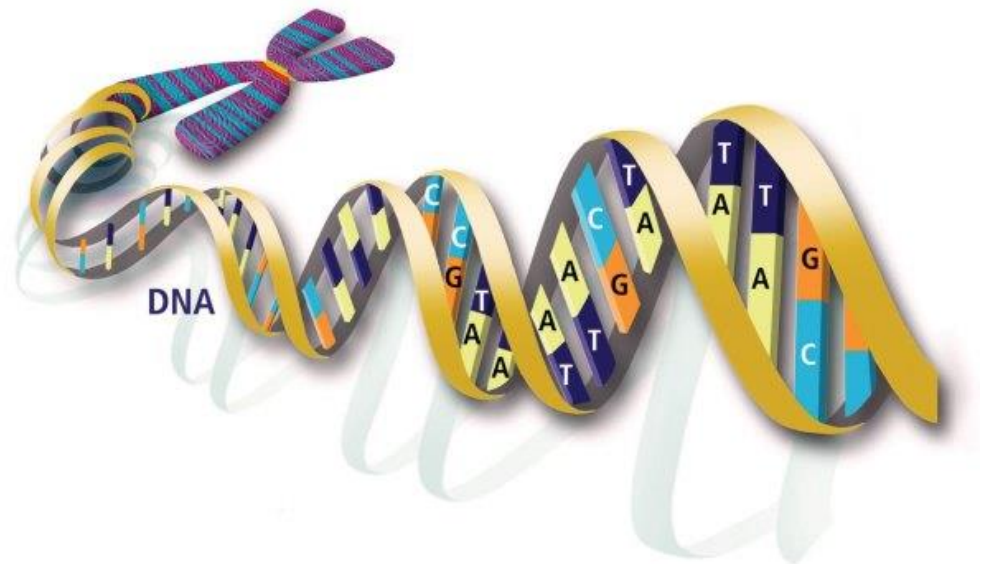
Molekulární biologie pro informatiky - 2

Struktura genomu a genetická informace

Vlastnosti genetického materiálu

Genetický materiál se musí vyznačovat:

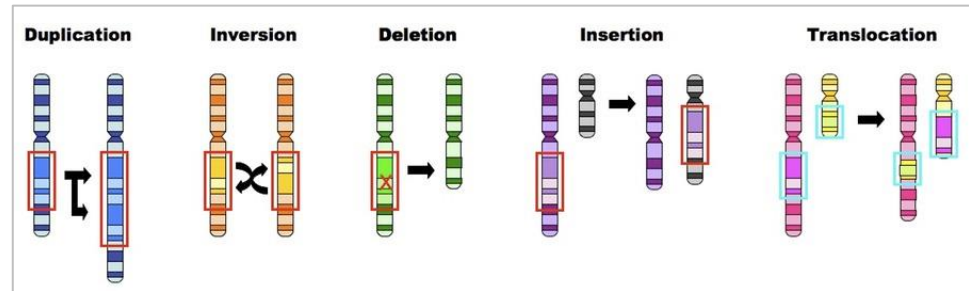
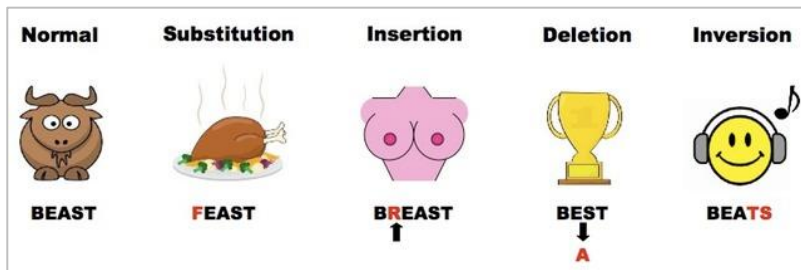
- schopností **uchovat velké množství biologických informací ve stabilní formě**, tyto informace musí mít možnost se mezi jedinci a druhy různit
- schopností **přesně se replikovat**, v rámci mnohobuněčného organismu i při přenosu genetické informace do potomstva
- schopností **kódotovat fenotyp** jedince,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



Zdroje změn v genetický materiálu

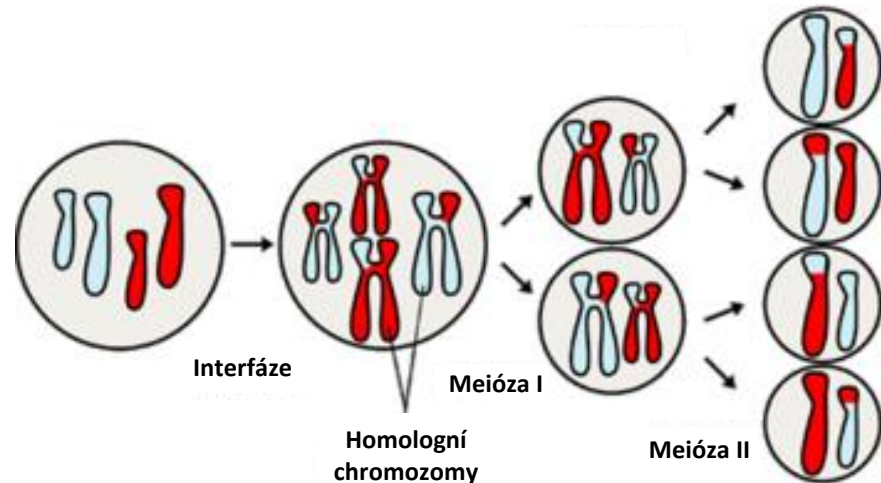
Mutace

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



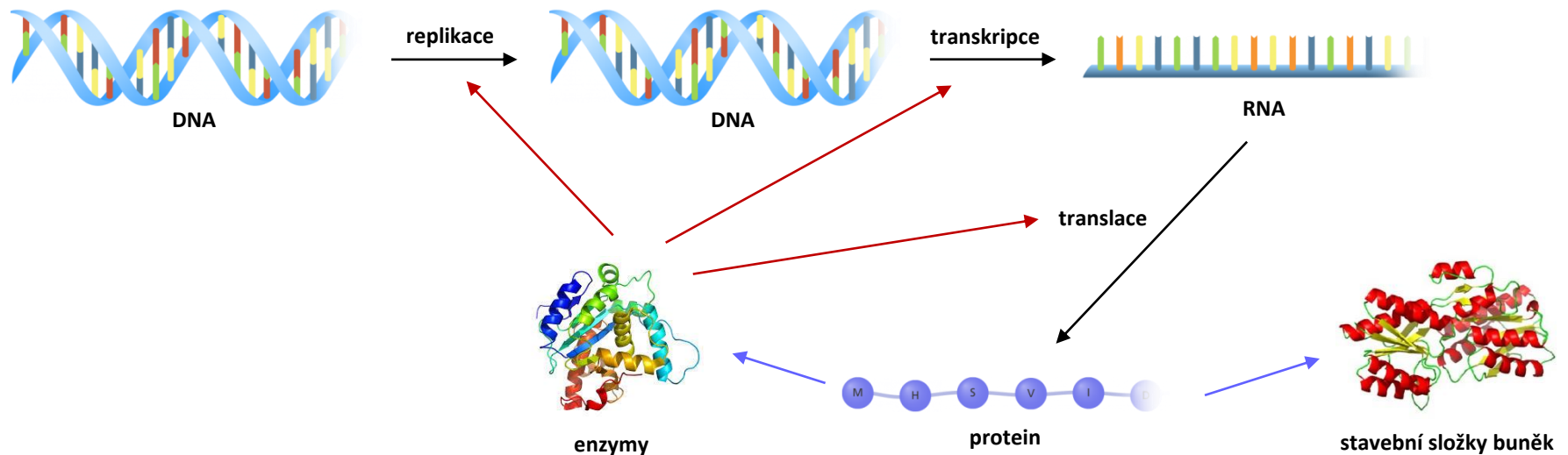
Rekombinace

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



Vzájemná podmíněnost NK a proteinů

- **funkce DNA** - nositelka genetické informace (GI)
 - přenos GI na potomstvo
 - přenos GI na proteiny
- **funkce proteinů** - stavební a katalytické
 - dány jejich primární strukturou
- syntéza DNA a proteinů je závislá na DNA jako nositelce GI, proteinech jako enzimech



Genetická informace

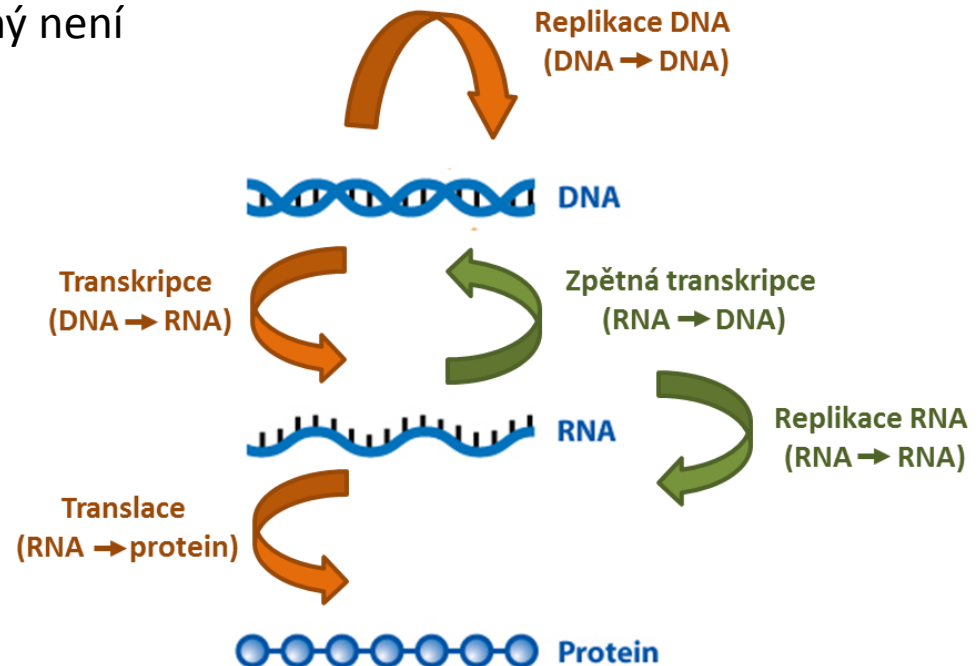
Genetická informace se zapisuje ve formě sekvence nukleotidů

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

v RNA (RNA viry) pomocí A, U, G, C

Přenos genetické informace

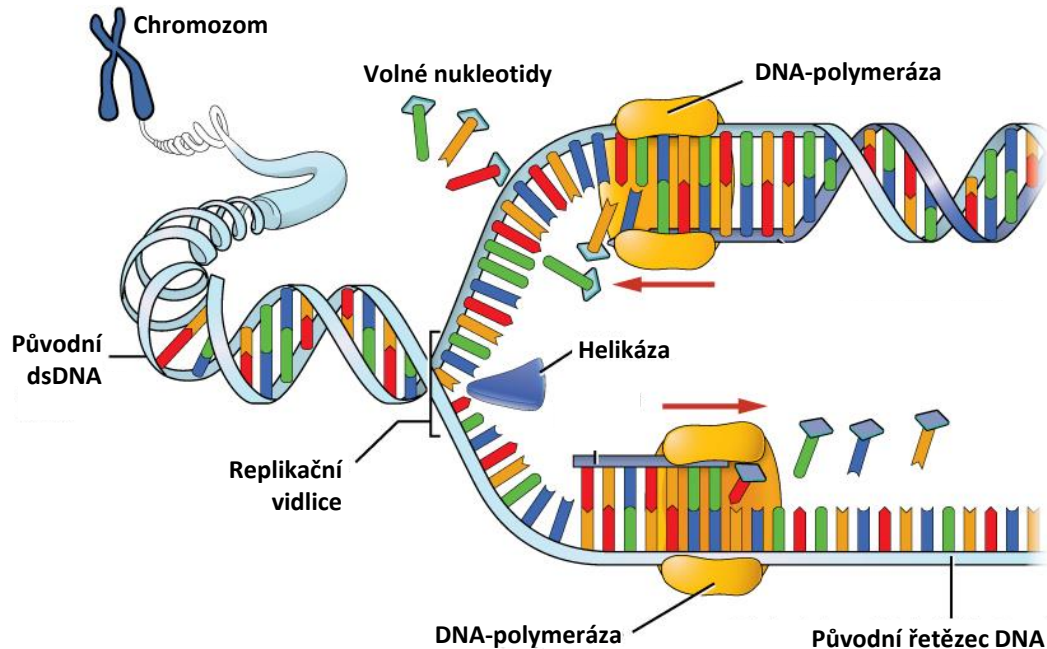
- zformulován v ústředním dogmatu molekulární biologie
- přenos možný z NK do NK nebo z NK do proteinu
- zpětný přenos z proteinu do NK možný není
- replikace
- transkripce
- translace



Replikace

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

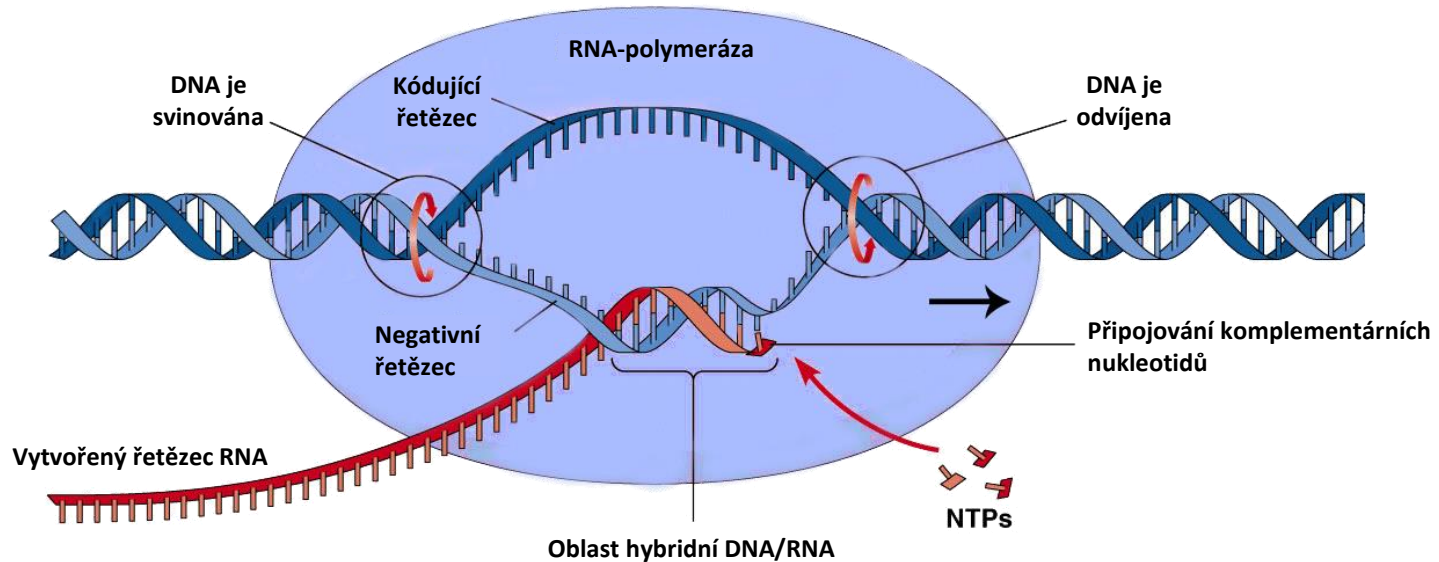
Semikonzervativní způsob replikace dsDNA: po rozpletení dvoušroubovice slouží oba řetězce jako předloha pro syntézu komplementárních řetězců. Ve výsledných molekulách dsDNA je vždy zachován jeden řetězec původní molekuly dsDNA.



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

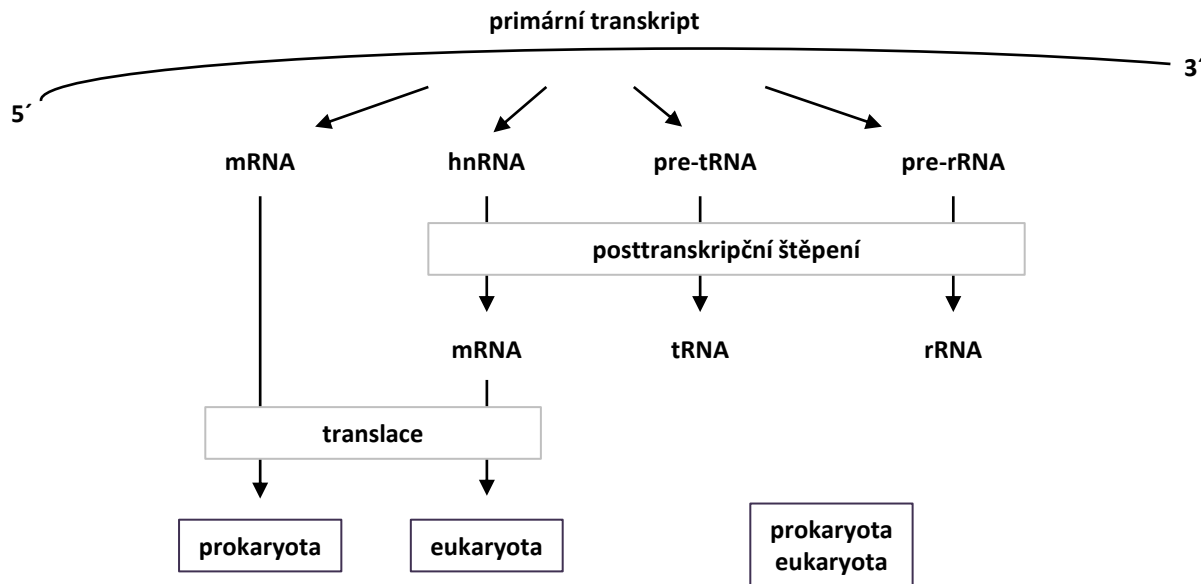
Transkripce

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



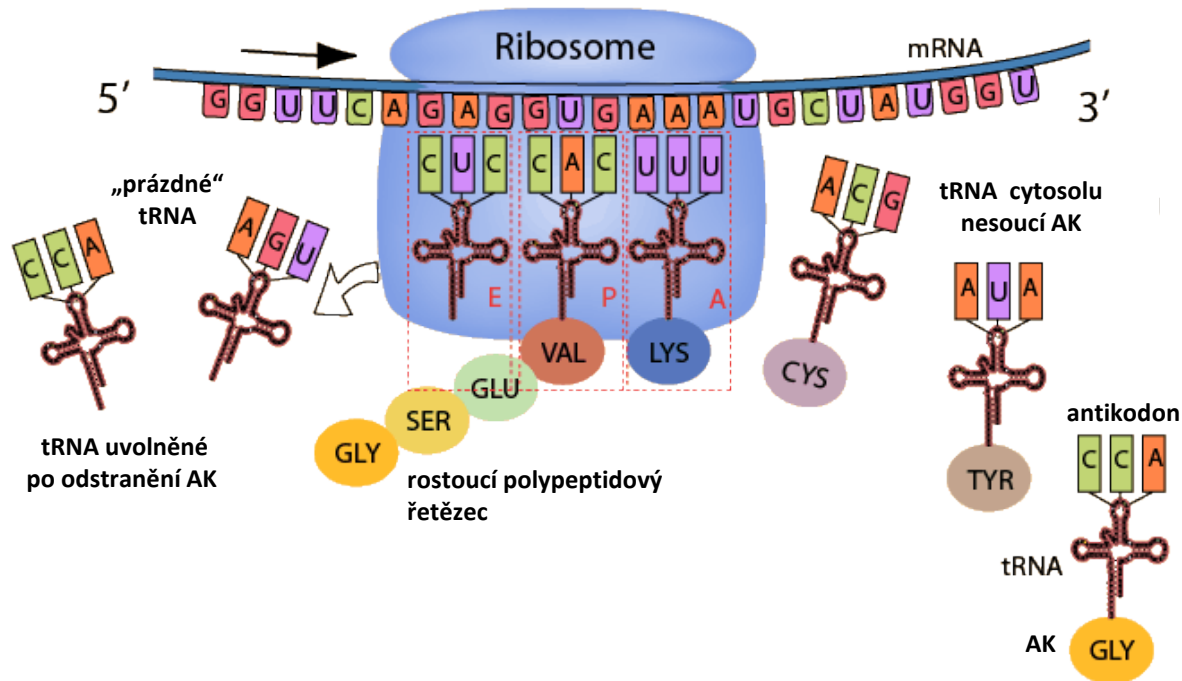
Transkripce

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



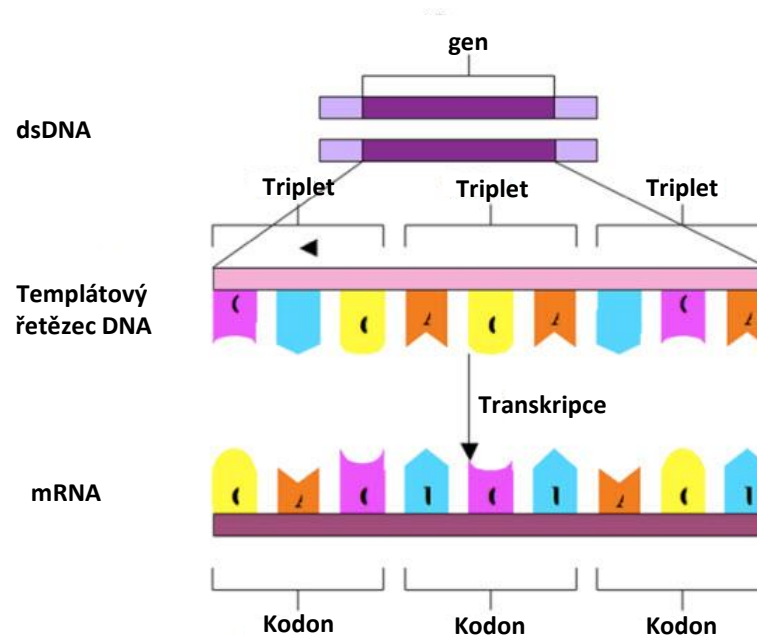
Translace

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



Genetický kód

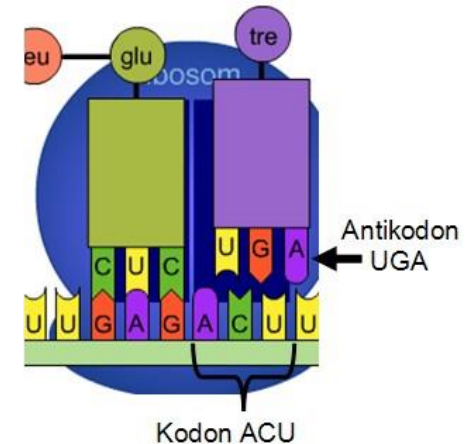
- genetickým kódováním se označuje určení primární struktury proteinu sekvencí DNA podle pravidel genetického kódu, uskutečňuje se translací
- každá AK proteinu je v DNA kódována trojicí nukleotidů, tzv. **tripiletem**



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

Čtení genetického kódu

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



- 3 možnosti způsobu čtení tripletů

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

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

Strukturní gen

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

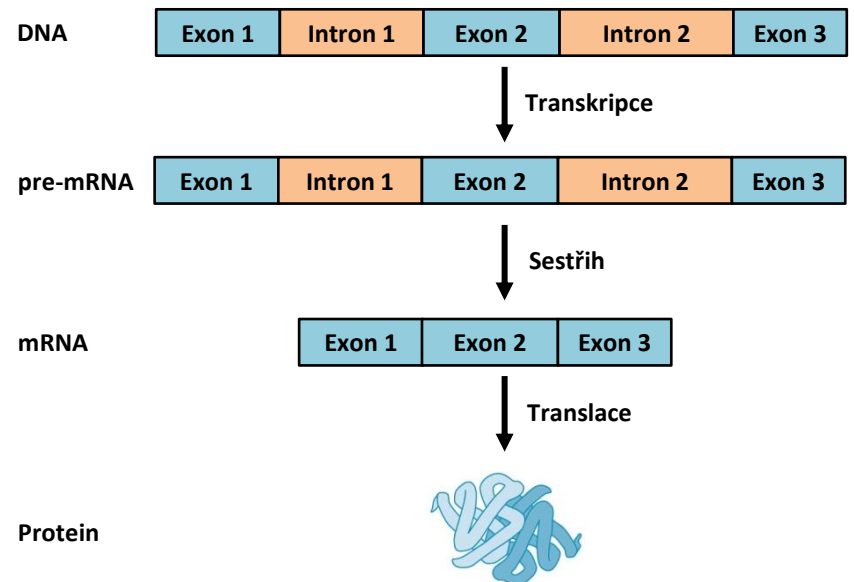
strukturní geny, geny pro funkční RNA, regulační oblasti DNA

Strukturní gen

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

2. Složený strukturní gen

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



Strukturní gen

Sestřih strukturních genů:

1. konstitutivní sestřih

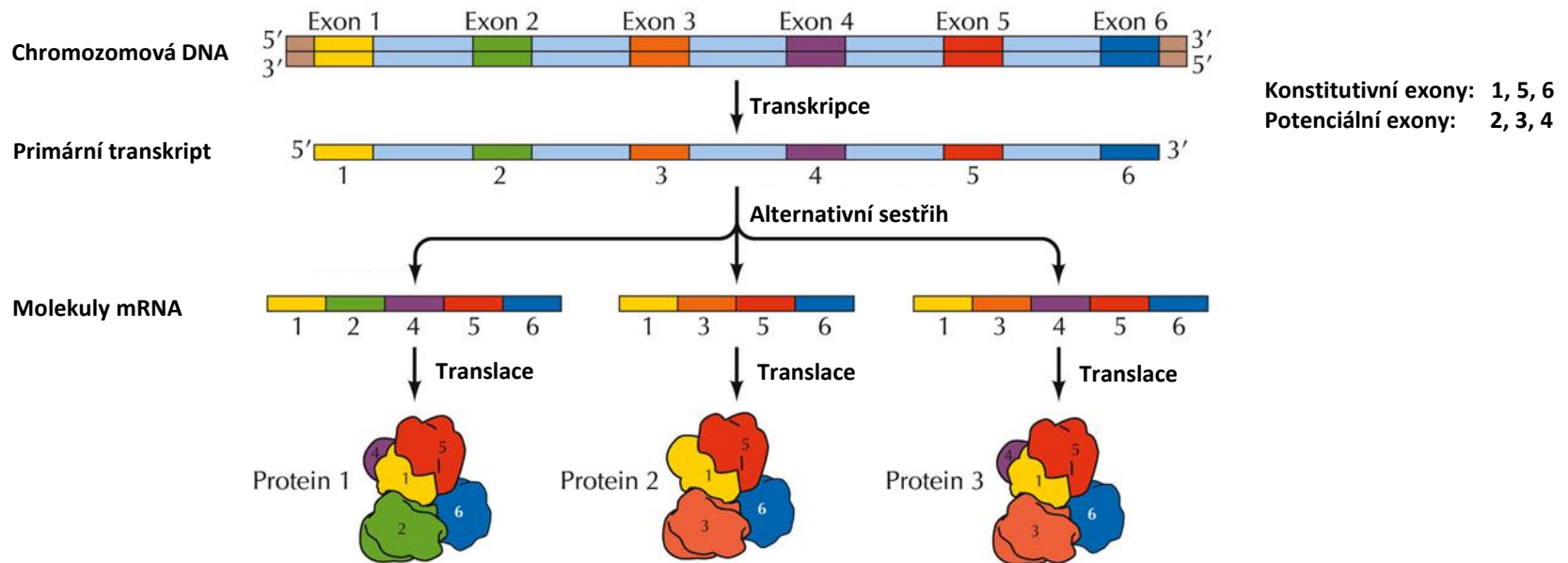
- výsledkem je molekula mRNA vždy o stejné primární struktuře

2. alternativní sestřih

- exon konstitutivní: vždy působí během sestřihu jako exon

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

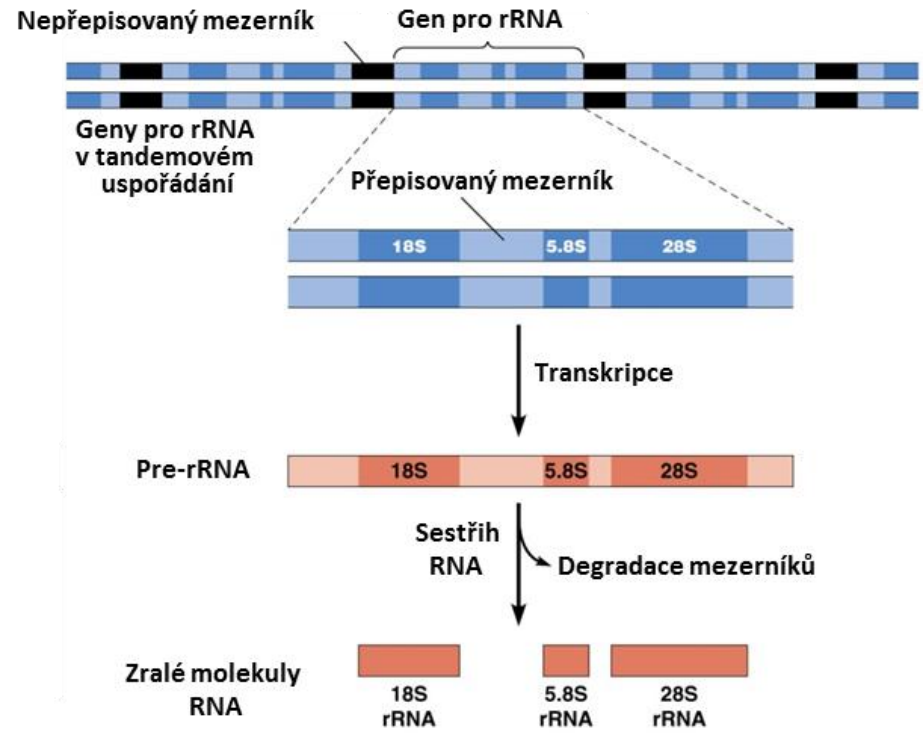
- izoformy jsou funkčně příbuzné proteiny, které se více či méně liší ve své struktuře



Ostatní formy genu

Gen pro funkční RNA

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

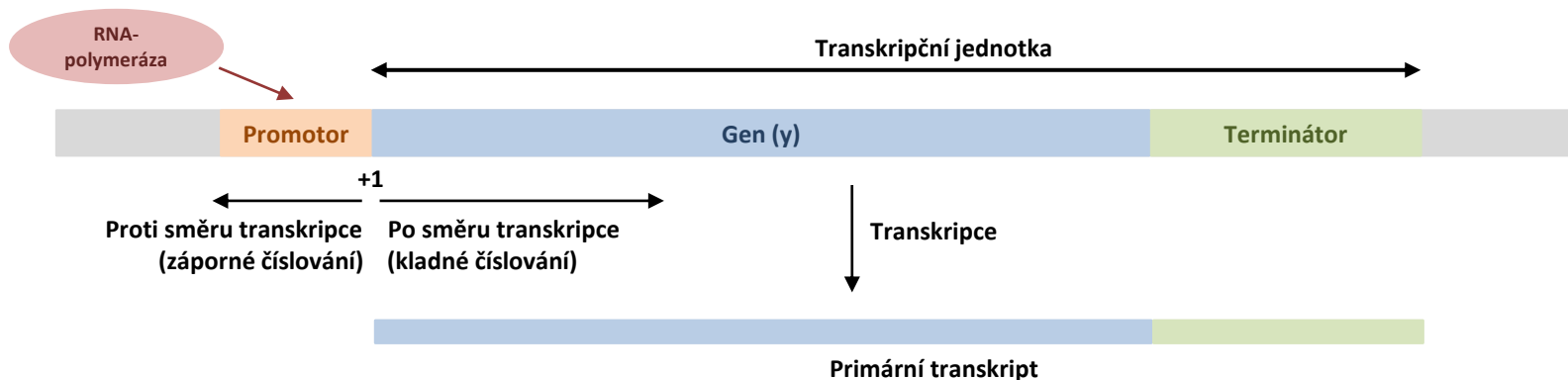


Gen jako regulační oblast

- rozeznávány proteiny signalizujícími zahájení nebo zastavení transkripce, nemají produkt

Transkripční jednotka

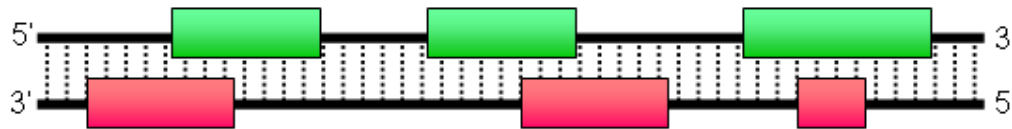
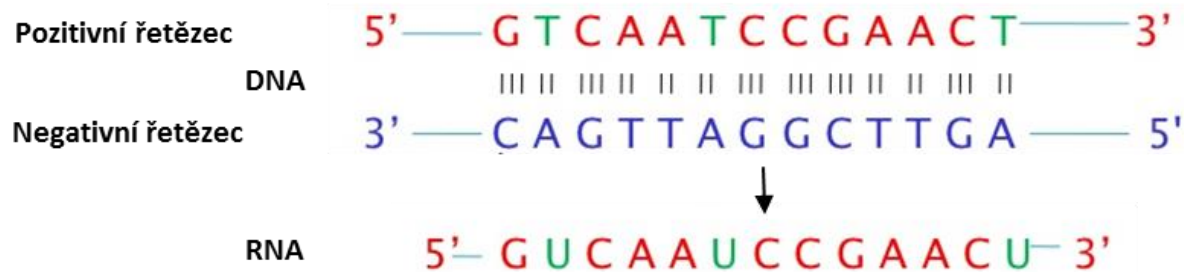
- vymezena startovacím nukleotidem a posledním nukleotidem v terminátoru
- od **startovacího nukleotidu** (+1) začíná přepis transkripční jednotky
- nukleotidy po směru transkripce jsou +2, 3, +4, ..., proti směru transkripce jsou -1, -2, -3, -4, ...
- **promotor** není součástí transkripční jednotky,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



Transkripční jednotka

Pozitivní a negativní řetězce DNA

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



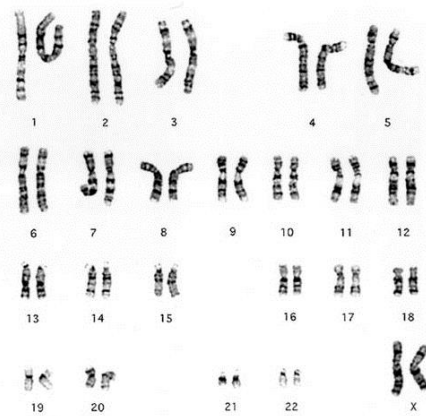
Genofor, genom

Genofor

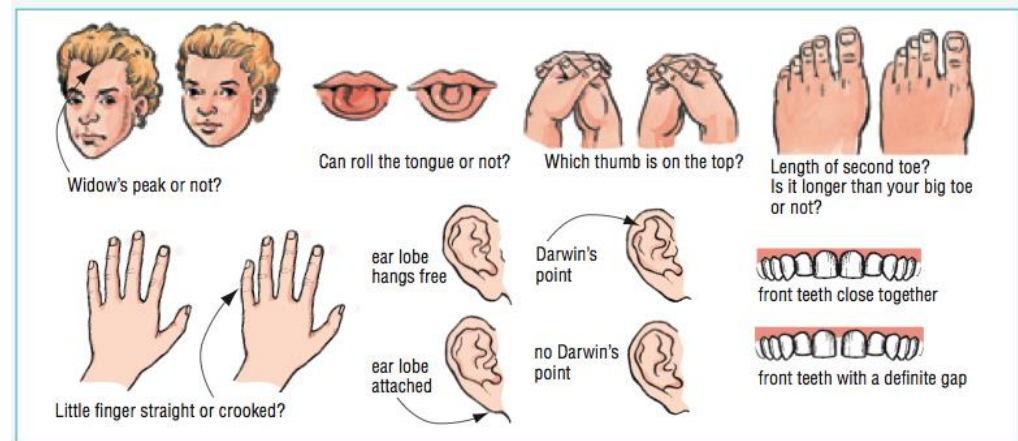
- struktura, která nese geny a je schopná replikace
- genofory obsažené v jádře buňky se nazývají chromozomy
- každý genofor obsahuje soubor genů, vazbová skupina
- homologické genofory se vyznačují stejnými vazbovými skupinami
 - např. chromozomy stejného páru v diploidní eukaryotické buňce

Genom

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

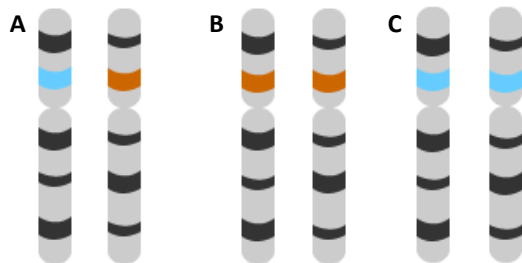




Courtesy of Dr. K. Phelan, Greenwood Genetic Center.
Noncommercial, educational use only.



Alela

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



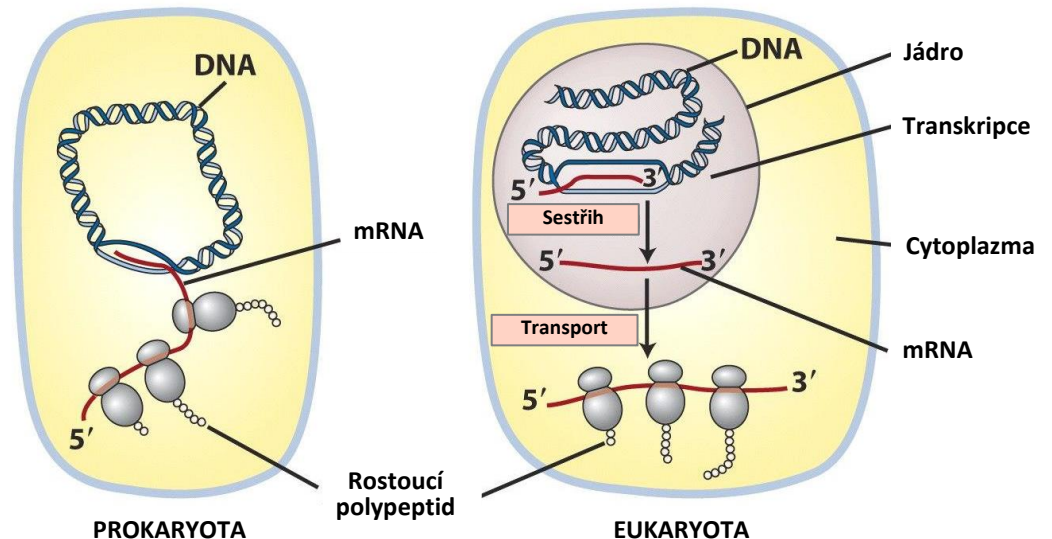
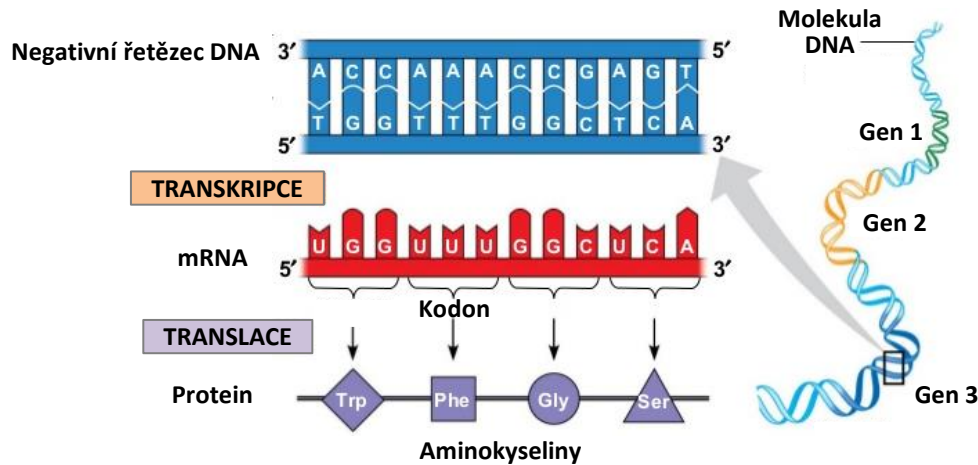
 alela pro hnědé oči (B, dominantní)
 alela pro modré oči (b, recesivní)

A - heterozygot Bb, hnědé oči

B - dominantní homozygot BB, hnědé oči

C - recesivní homozygot bb, modré oči

Tok genetické informace v živých soustavách



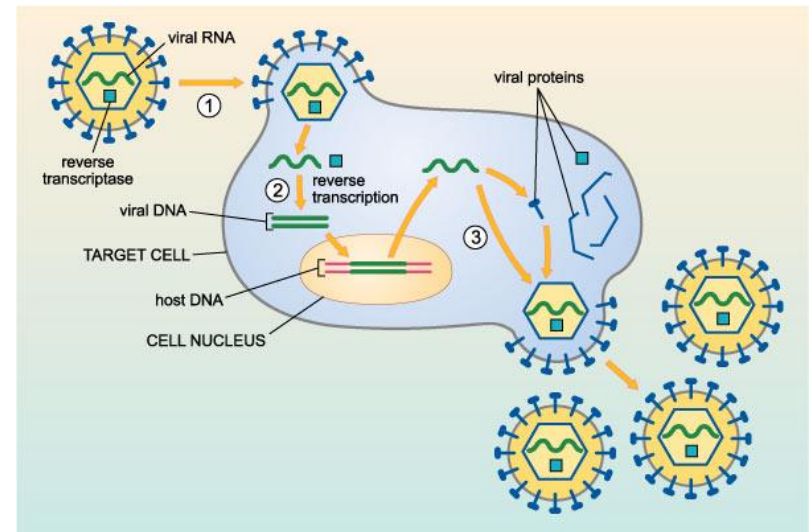
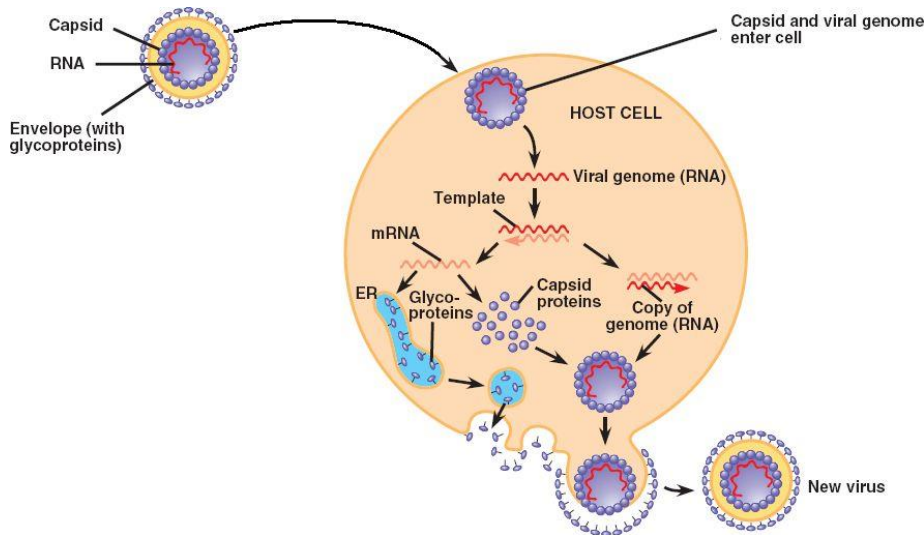
Živé soustavy

1. Buněčné živé soustavy (jednobuněčné a mnohobuněčné organismy)

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

2. Nebuněčné živé soustavy (viry a viroidy)

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



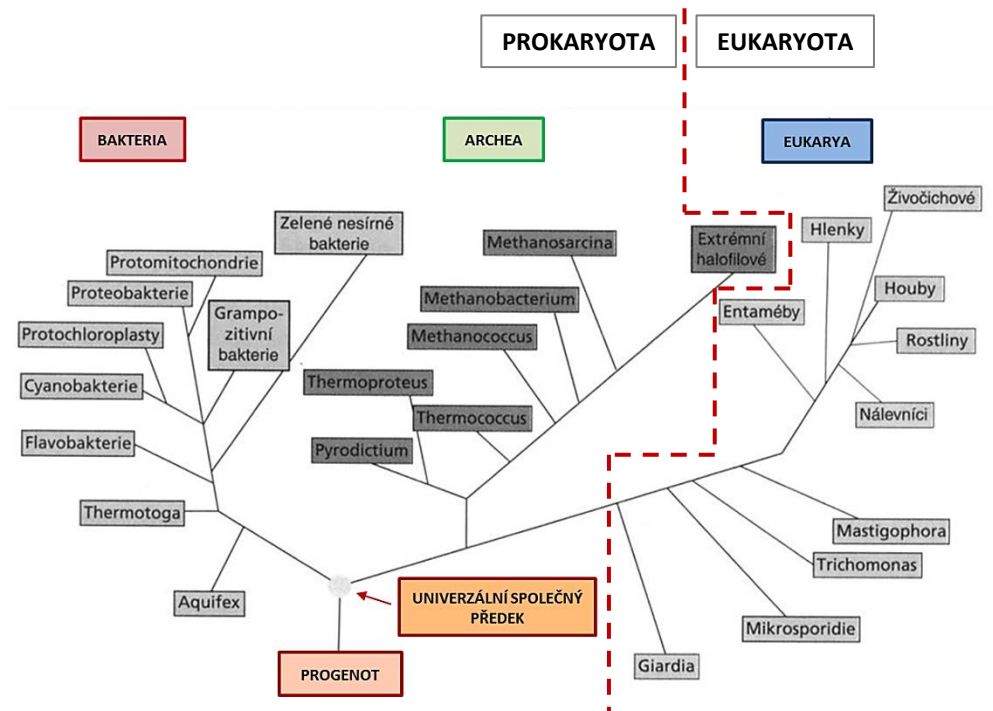
Buněčné živé soustavy

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

Univerzální fylogenetický strom

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

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



Prokaryota

Struktura buňky rozlišena na jádro, cytoplazmu a buněčné obaly

Jádro (nukleoid)

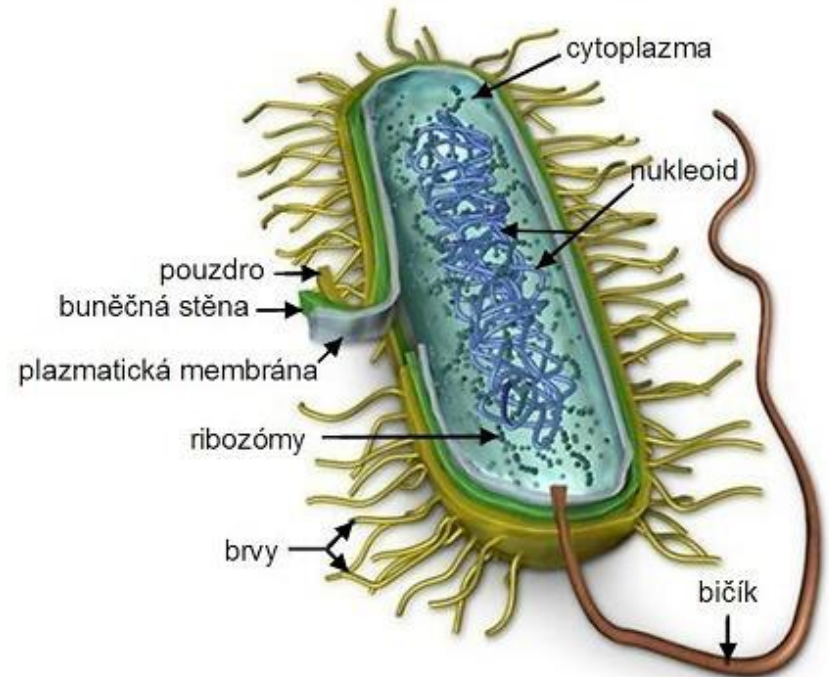
- prokaryotického typu
- není proti cytoplazmě ohraničeno membránou
- nedělí se mitoticky
- vždy obsahuje jednu molekulu dsDNA (chromozom prokaryotické buňky), která je většinou kružnicová

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

Nepohlavní rozmnožování

Ribozomy

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



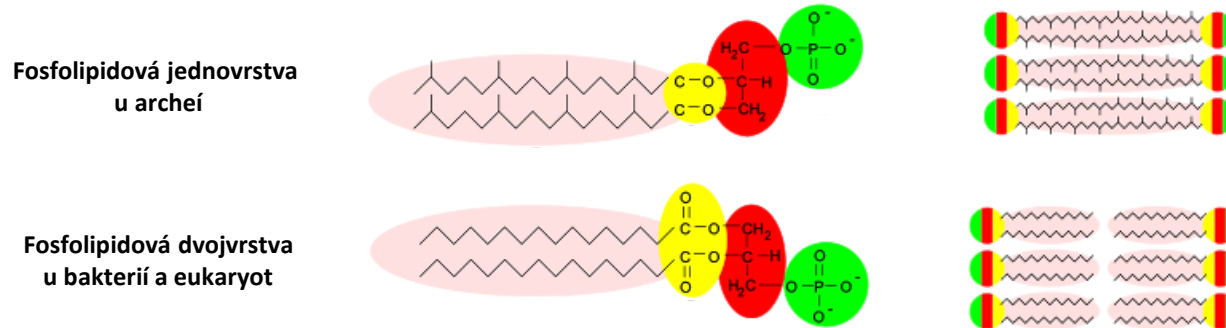
Prokaryota

Bakteria (bakterie a sinice)

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

Archea (archebakterie)

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



Eukaryota

Jednobuněčné i mnohobuněčné organizmy.

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

Diferenciace buněk během ontogeneze mnohobuněčných organizmů

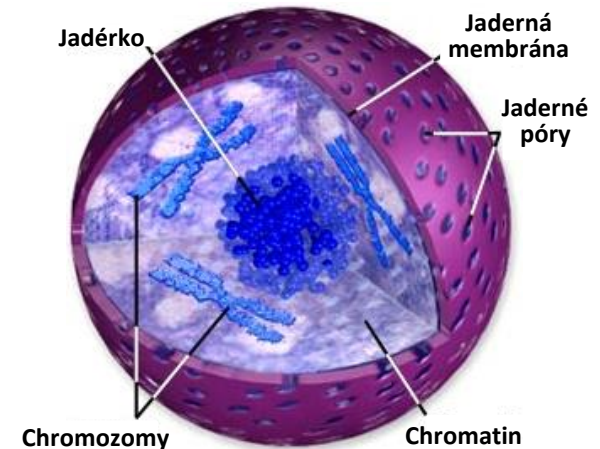
Rozmnožování nepohlavní u jednobuněčných druhů, pohlavní u mnohobuněčných druhů

Metabolismus fotoautorofní u rostlin, chemoheterotrofni u živočichů a hub

Dělení do říší: prvoci, rostliny, houby, živočichové

Jádro

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



Eukaryota

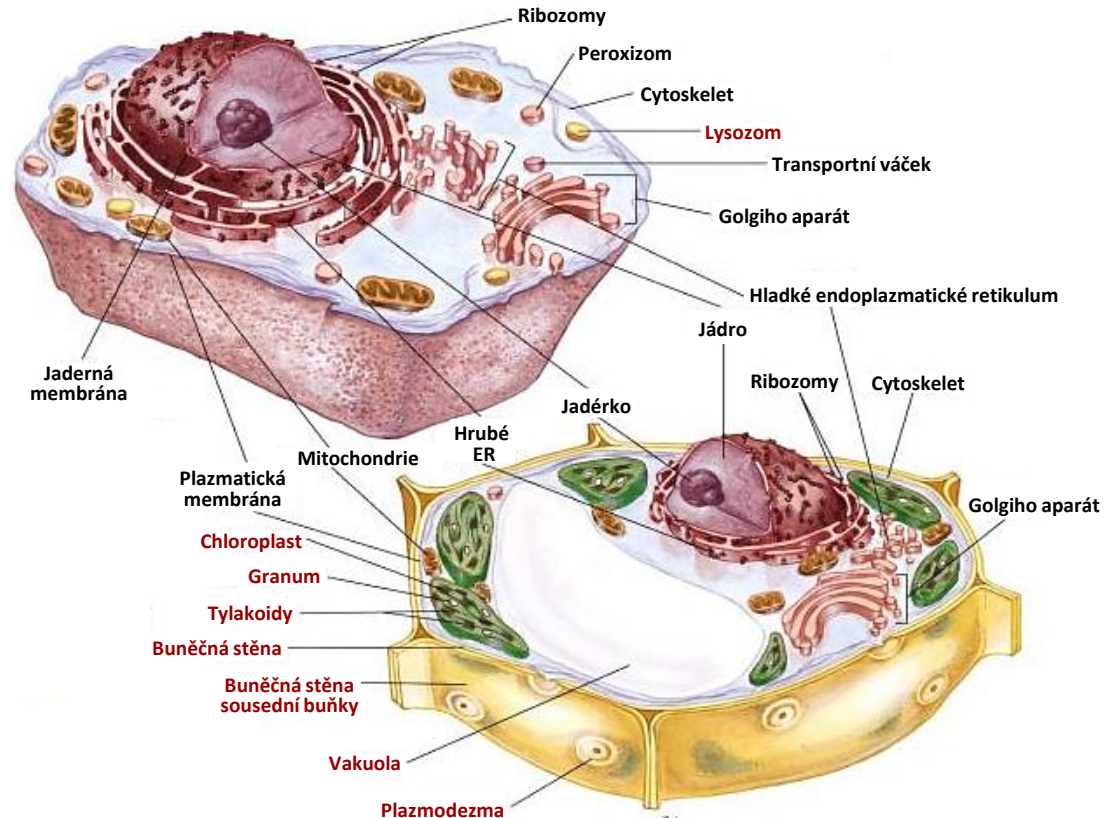
Všechny mechanismy přenosu genetické informace vyjádřené ústředním dogmatem molekulární biologie zachovány jako u prokaryot. Modifikace těchto mechanismů za účelem diferenciacce buněk.

Složené geny s introny.

Při translaci se jako první řadí metionin.

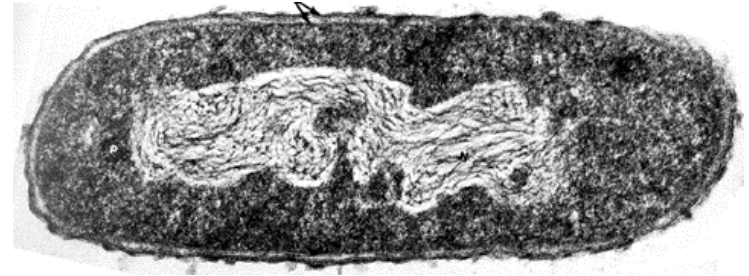
Řada organel, které nejsou přítomny v prokaryotické buňce:

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



Struktura prokaryotického genomu

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



Nukleoid

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

Struktura prokaryotického genomu

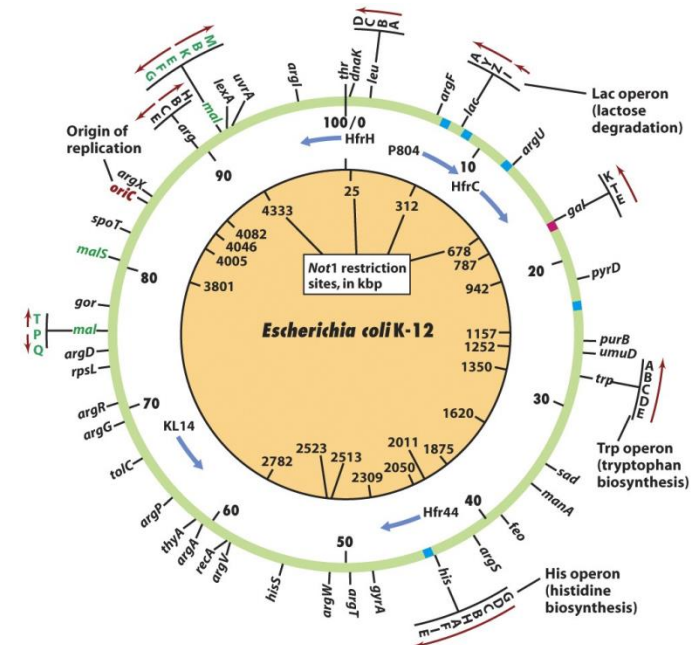
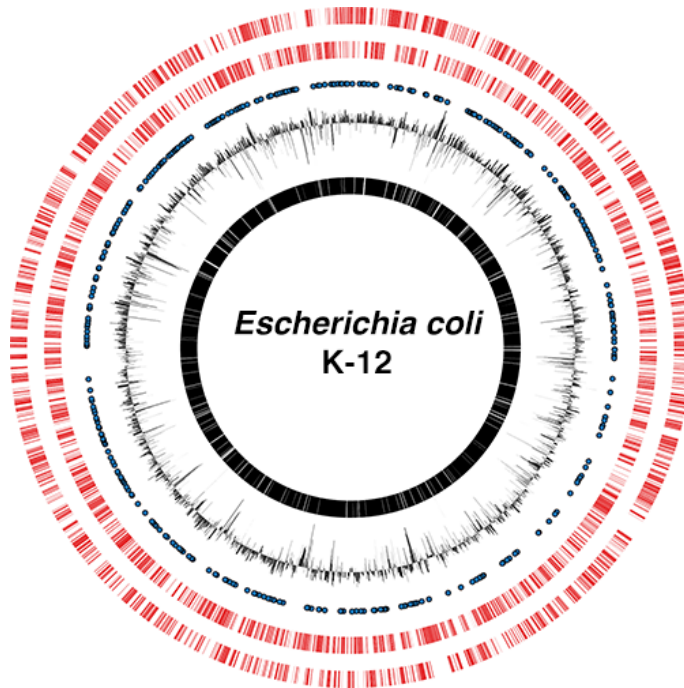
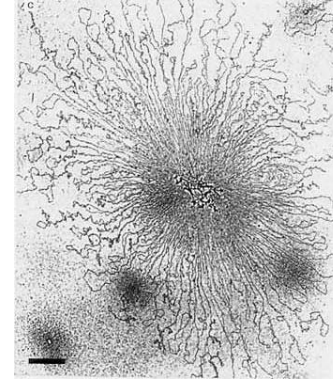
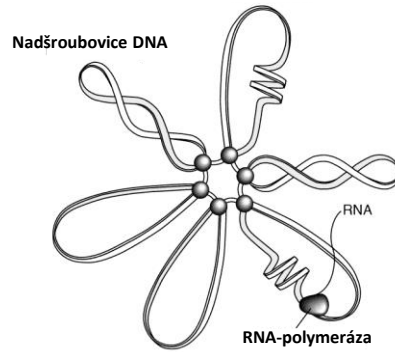
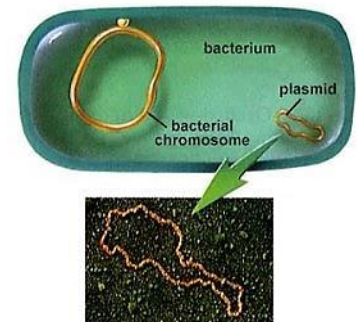


Figure 10-42 Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

Struktura prokaryotického genomu

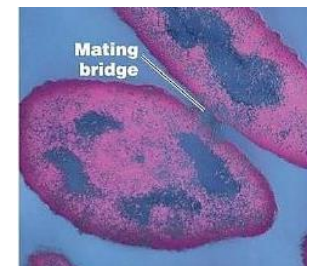
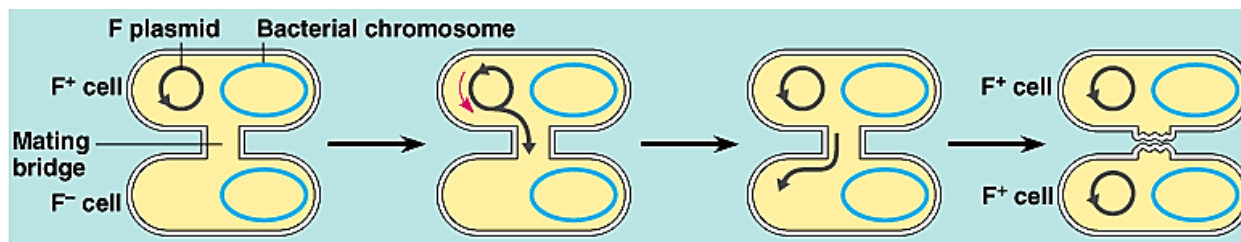
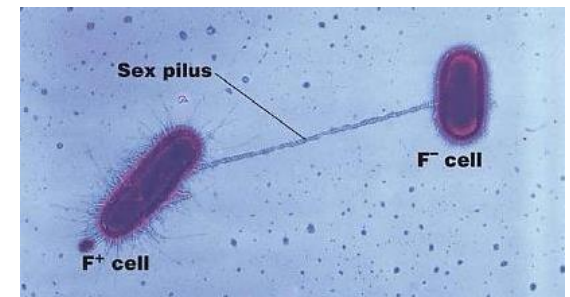
Plazmidy

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



Konjugativní plazmidy

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



Struktura eukaryotického genomu

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

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

Chromatin

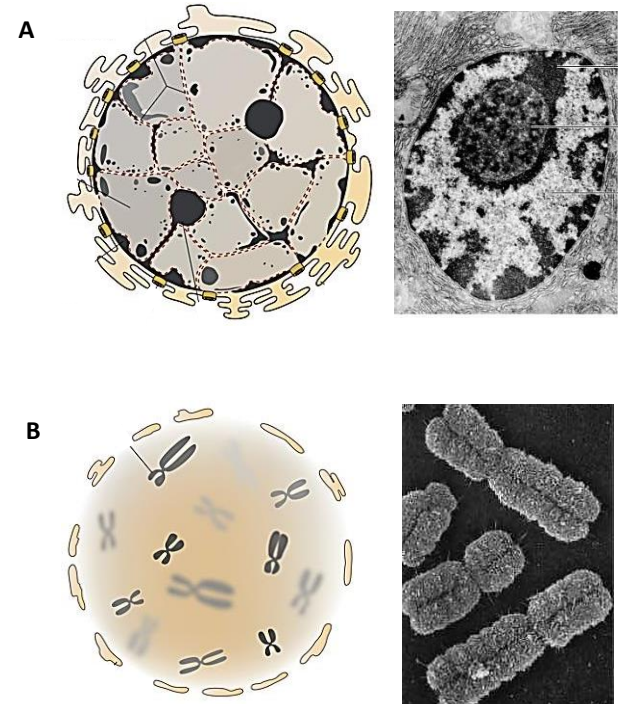
- hmota v eukaryotickém jádře složena z dsDNA, histonů a proteinů nehistonové povahy

(i) euchromatin - dekonenzovaný, přístupný transkripci

(ii) heterochromatin

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

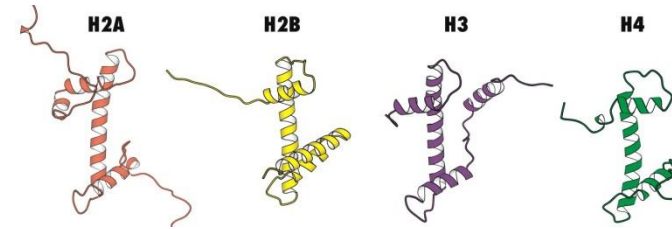
- interfázní chromatin (**A**) - silně dekonenzovaný, 10-30 nm chromatinová vlákna
- mitotické chromozomy (**B**) - nejvyšší forma kondenzace chromatinu



Chromatin

Histony

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

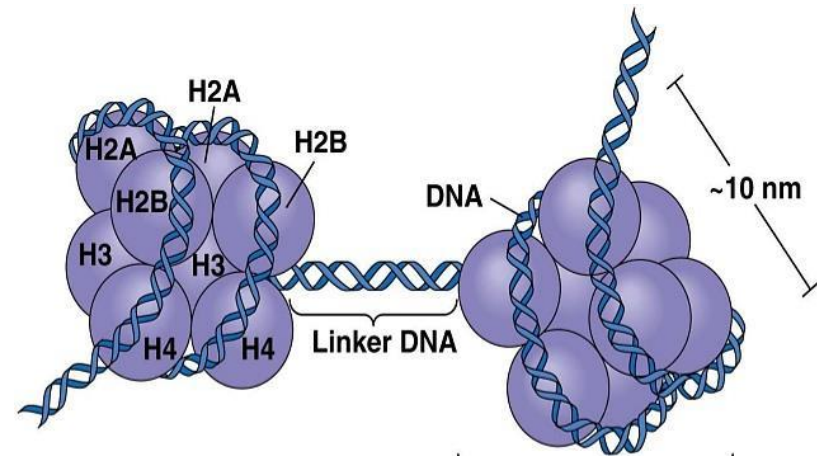


Proteiny nehistonové povahy

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

Nukleozom

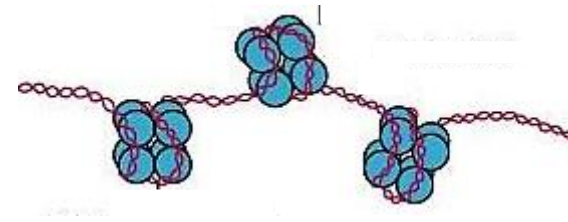
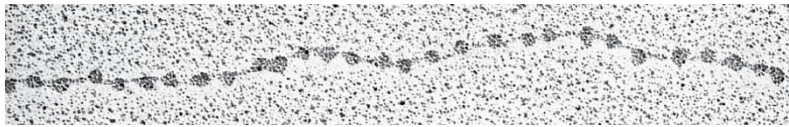
- základní jednotka chromatinu
- oktamer histonů - tetramer $(H3)_2 - (H4)_2$
 - dva dimery H2A - H2B
- úsek DNA o délce 146 bp (1,75 otáčky)
- šířka 10-11 nm, výška 6 nm
- molekula H1 není součástí oktameru, spojuje sousední nukleozomy v řetězci



Chromatin

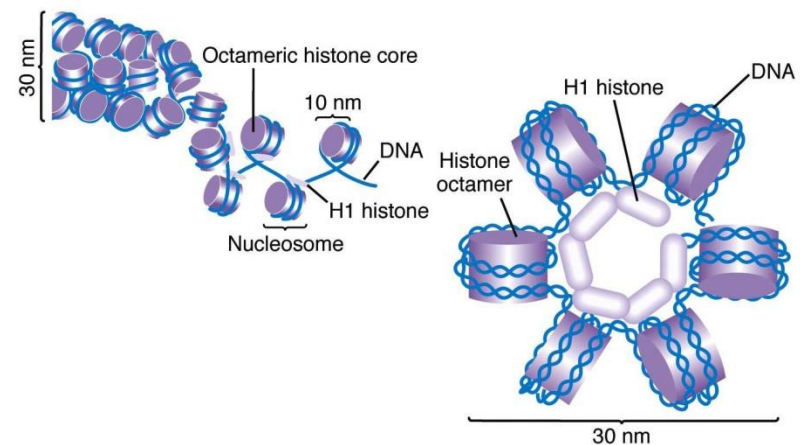
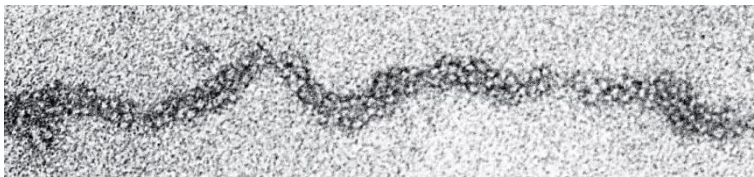
Nukleozomový řetězec (10-nm chromatinové vlákno)

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



30-nm chromatinové vlákno

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



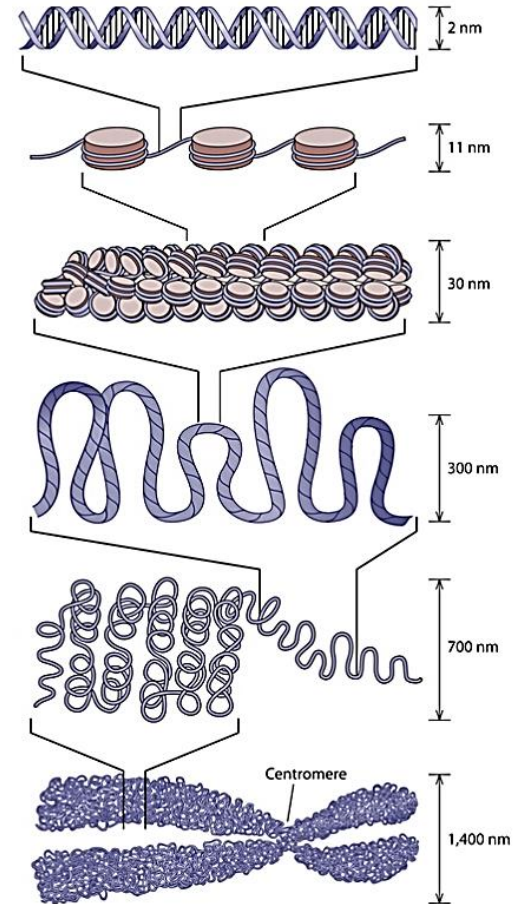
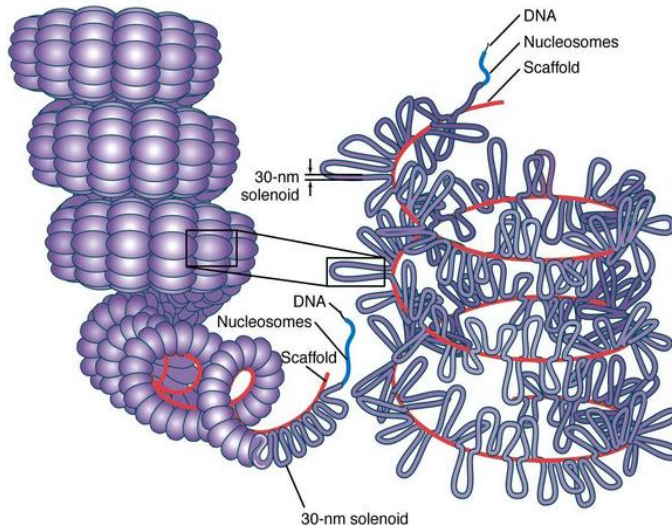
Chromatin

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

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

600-nm chromatinové vlákno

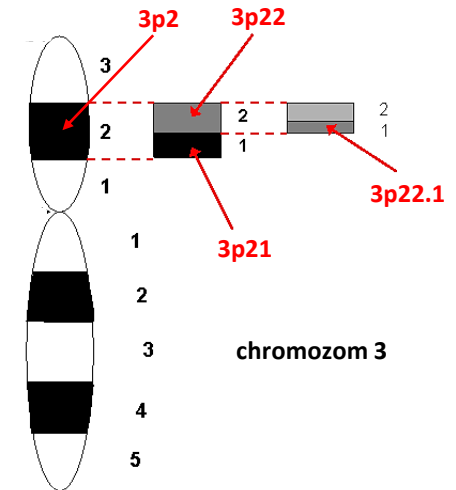
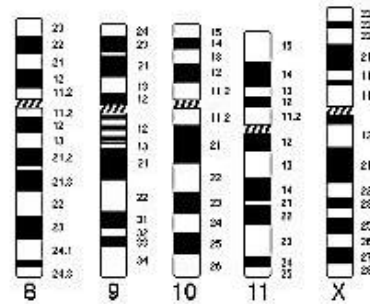
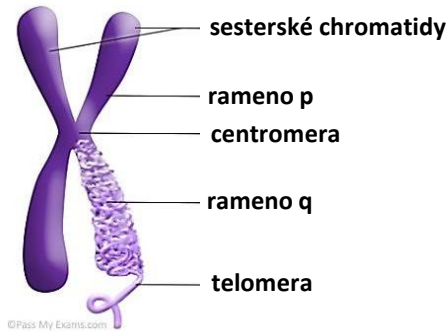
- 30-nm chromatinové vlákno navázané na proteinové lešení spiralizací dále kondenzuje v 600-nm vlákno
- struktur metafázních chromozomů
- viditelné pomocí světelného mikroskopu
- nejvyšší stupeň kondenzace chromatinu, transkripčně inaktivní



Chromozom

Mitotické chromozomy

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



Pruhování chromozomů

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

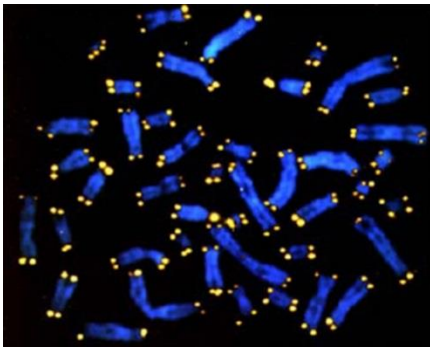
Chromozom

Centromera

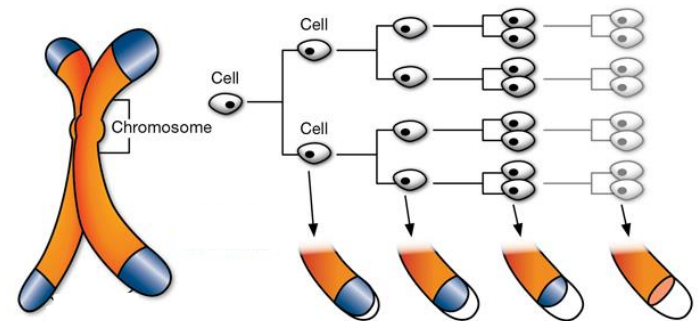
- zajišťuje během buněčného dělení segregaci chromozomů do dceřiných buněk

Telomera

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



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



Jaderná DNA

Velikost jaderného genomu

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

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

Genové repetice

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

1. tandemové genové repetice

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

2. rozptýlené genové repetice

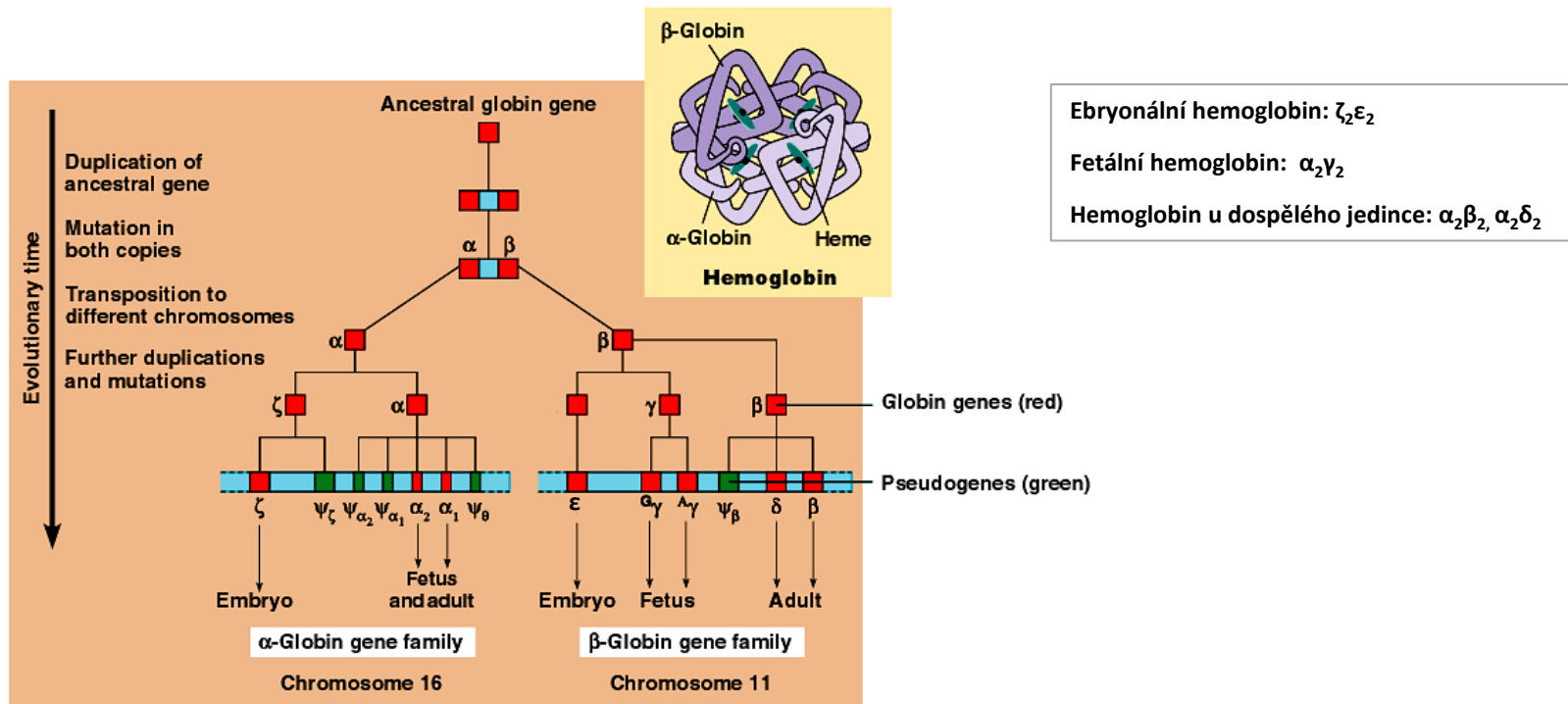
- gen nebo skupina genů s kopiemi na různých místech haploidního genomu
- např. některé geny pro tRNA, snRNA, aj.

Jaderná DNA

Genové repetice

3. genové rodiny

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



Lidský genom

Celková velikost ~3.200.000.000 bp

Počet genů ~ 20.500 (odhad před sekvenací 150.000)

Odlišnosti v rámci druhu Homo sapiens ~ 0,1 %

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

26 % z celkové sekvence genomu přepisováno do RNA

1,5 % sekvencí kóduje proteiny nebo funkční RNA

Lidský karyotyp

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

A – 1, 2, 3

B – 4, 5

C – 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, X

D – 13, 14, 15

E – 16, 17, 18

F – 19, 20

G – 21, 22, Y

velké metacentrické

velké submetacentrické

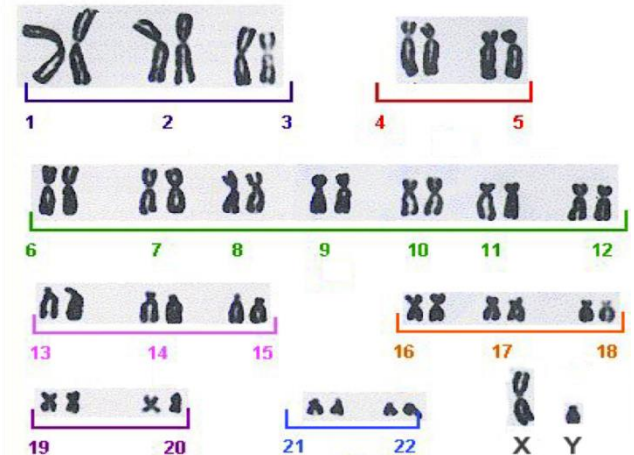
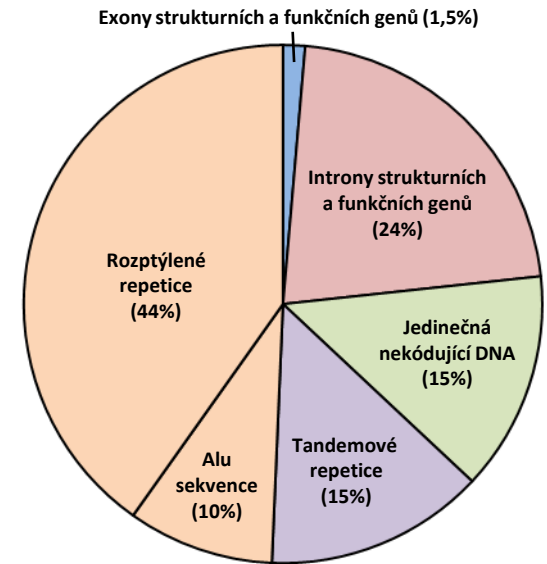
střední submetacentrické

střední akrocentrické

malé submetacentrické

malé metacentrické

malé akrocentrické



Zvídavé otázky

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

