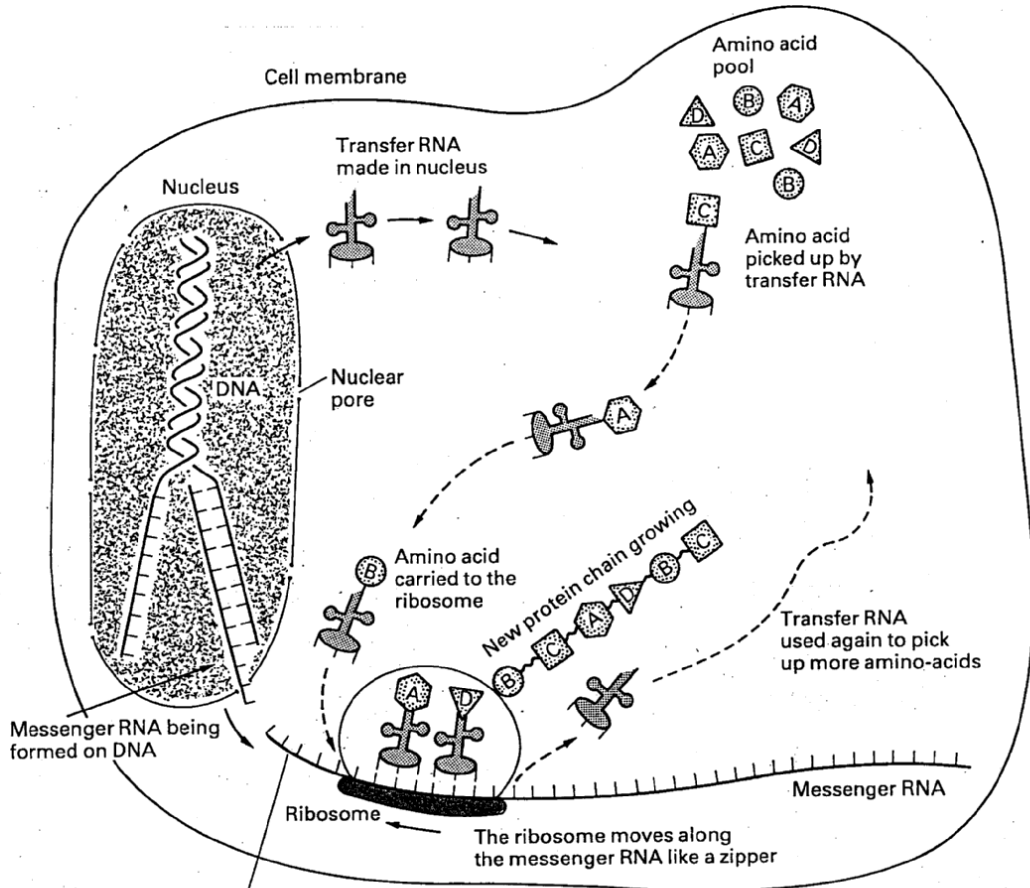


Schéma proteosyntézy

A

aminokyseliny



The structure of the messenger RNA determines in what order the amino acids are joined together to form a particular protein, such as an enzyme

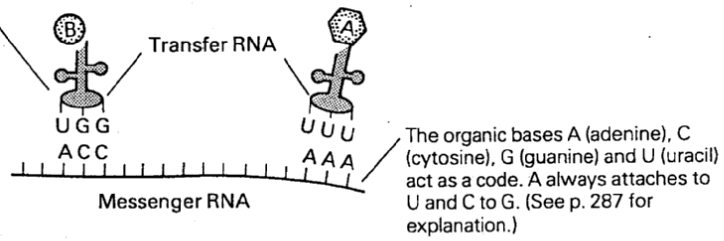
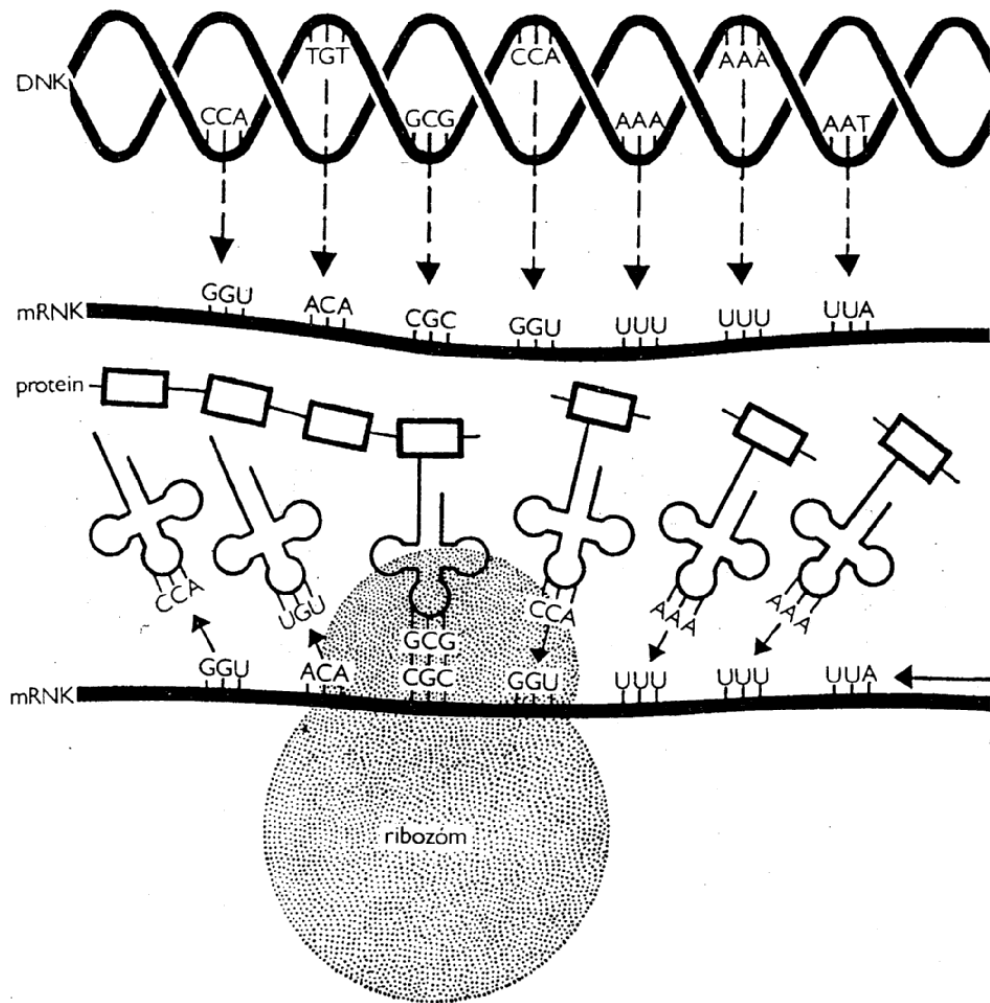


Fig. 85. Making proteins



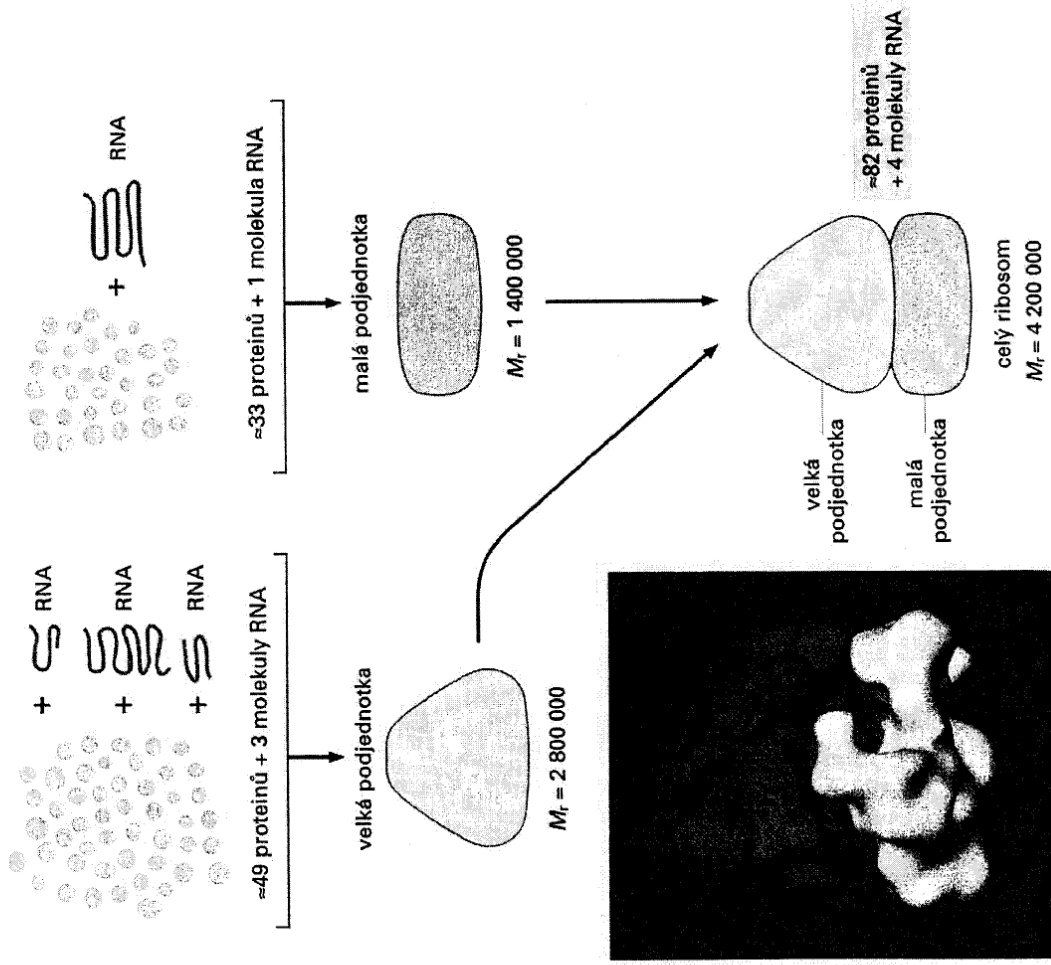
23. Princip transkripce a translace

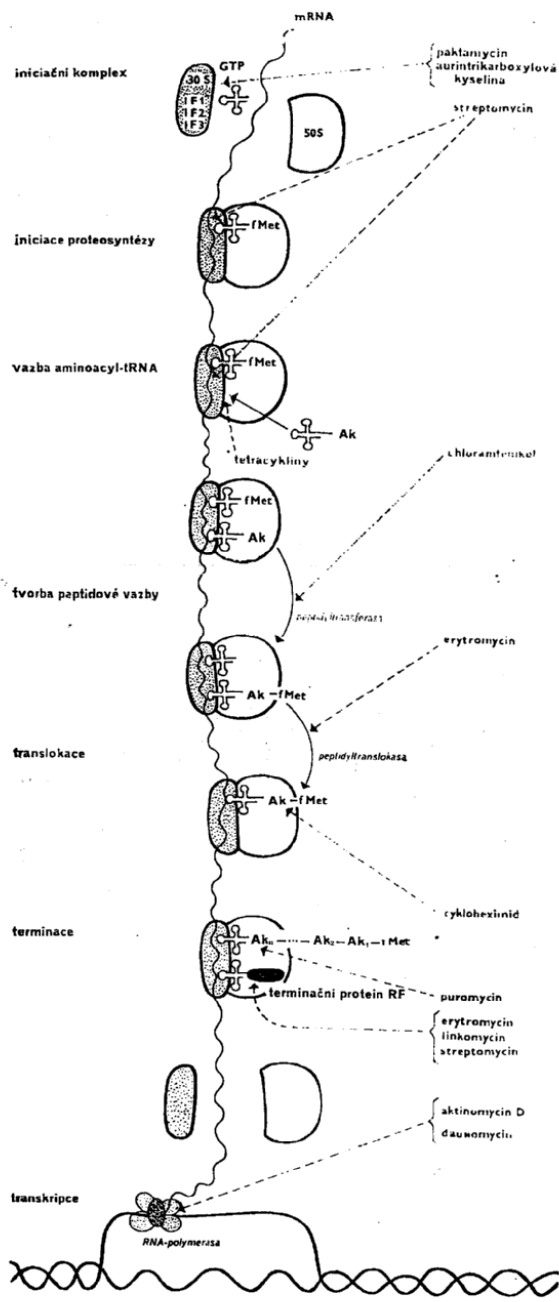
ho a téhož typu bílkoviny v několika desítkách kopií. Komplexní útvar, tvořený molekulou mRNA navázanou na větší množství ribozómů, se nazývá polyzóm.

Otázky

1. Jaké je pořadí aminokyselin v počáteční oblasti bílkovinného řetězce, která je v mRNA kódována ribonukleotidovým pořadím AUGGU-GCCCUUAGCCGAACGUUGGUGUACA...?
2. Jaké je pořadí aminokyselin v koncové části bílkovinného řetězce, kódované v mRNA ribonukleotidovým pořadím... UUUCUUUAUCA-UCCAAAACGCGGGAUCUAA?

Komponenty eukaryontního ribosomu





INHIBICE SYNTÉZY PROTEINŮ ÚČINKEM ANTIBIOTIK

Syntéza peptidového řetězce může být ovlivněna působením řady antibiotik. I když obecné zásady proteosyntézy popsané v předchozích odstavcích jsou obecně platné, přesto mohou existovat individuální rozdíly mezi jednotlivými druhy buněk (zvláště prokaryontů), které jsou dány buď odchylným složením ribosomů, nebo bílkovinných faktorů, jež se na proteosyntéze podílejí. Tyto rozdíly se proto také projevují v rozdílném účinku různých antibiotik na reakce různých buněk. Kromě toho je třeba počítat s tím, že každý druh buněk má pro daný typ antibiotika různou permeabilitu, což se projeví i v různé citlivosti vůči jednotlivým z nich. Proto by bylo žádoucí, kdyby informace o inhibičních účincích jednotlivých antibiotik mohla být ukázána na buňkách určitého typu. To však ve schematickém podání není možné, a proto pouze na tuto skutečnost upozorňujeme. Stejně tak pokládáme za důležité připomenout, že v některých případech mohou být rozdíly v účinku jednotlivých látek za podmínek *in vitro* a *in vivo*.

Aktinomyciny (zvláště aktinomycin D) působí na úrovni transkripce tím, že se vážou interkalaci na DNA. Vlastní syntézu DNA má proteinů jimi není ovlivněna.

Daunomycin inhibuje syntézu RNA účinkem na RNA-nukleotidyltransferasu, a tím inhibuje proteosyntézu jen nepřímo.

Iniciace proteosyntézy je inhibována pactamycinem a aurintrikarboxylovou kyselinou. V obou případech nastává interference se vznikem iniciačního komplexu.

Chloramfenikol se váže na 50S ribosomální podjednotku a inhibuje syntézu peptidové vazby inhibicí peptidyltransferasy.

Streptomycin (a ostatní aminoglykosidy) se váže na menší ribosomální podjednotku (30S) a interferuje se správným „čtením“ kodonů mRNA. Kromě toho interferuje s terminací syntézy peptidového řetězce.

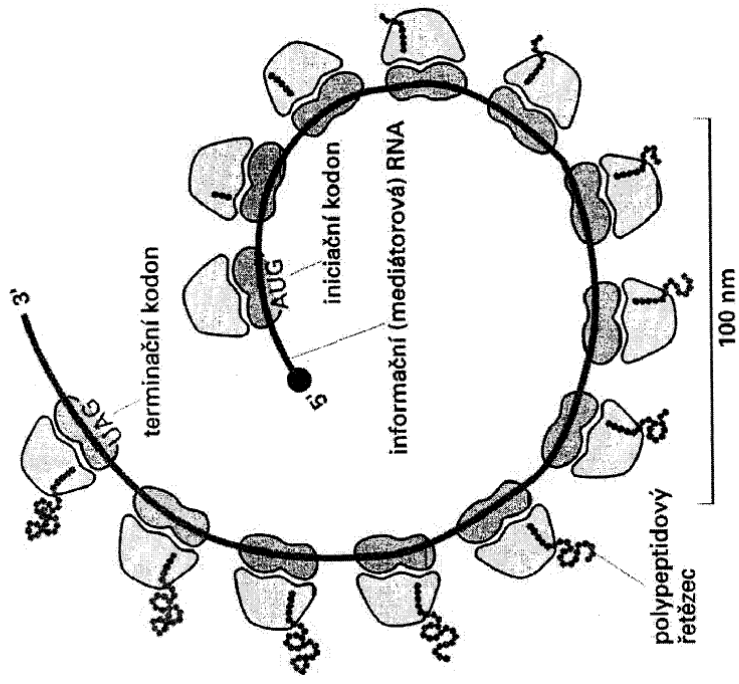
Tetracykliny interferují s vazbou Ak-tRNA^{AK} v místě „A“ větší ribosomální podjednotky.

Erytromycin a oleandomycin interferují s translokací ribosomů.

Cykloheximid se váže na 60S ribosomální podjednotku a interferuje podobně jako předchozí s translokací ribosomů. Užívá se pouze v experimentu.

Puromycin se díky své strukturální podobnosti s tRNA váže v místě „A“ a jako nukleofilní akceptor váže pevně peptid převzatý z peptidyl-tRNA vázaný v místě „P“. Užívá se též pouze v experimentu.

Polyribosom

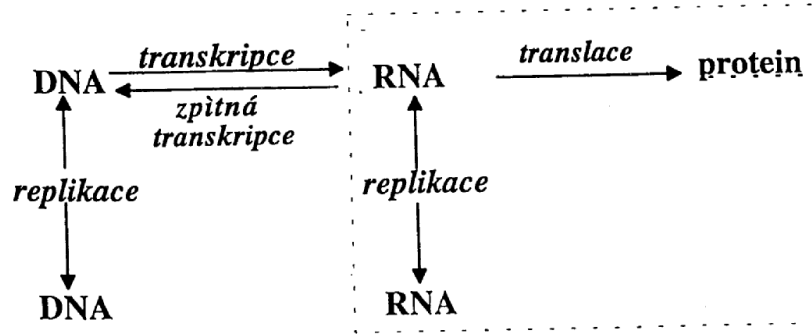


(A)



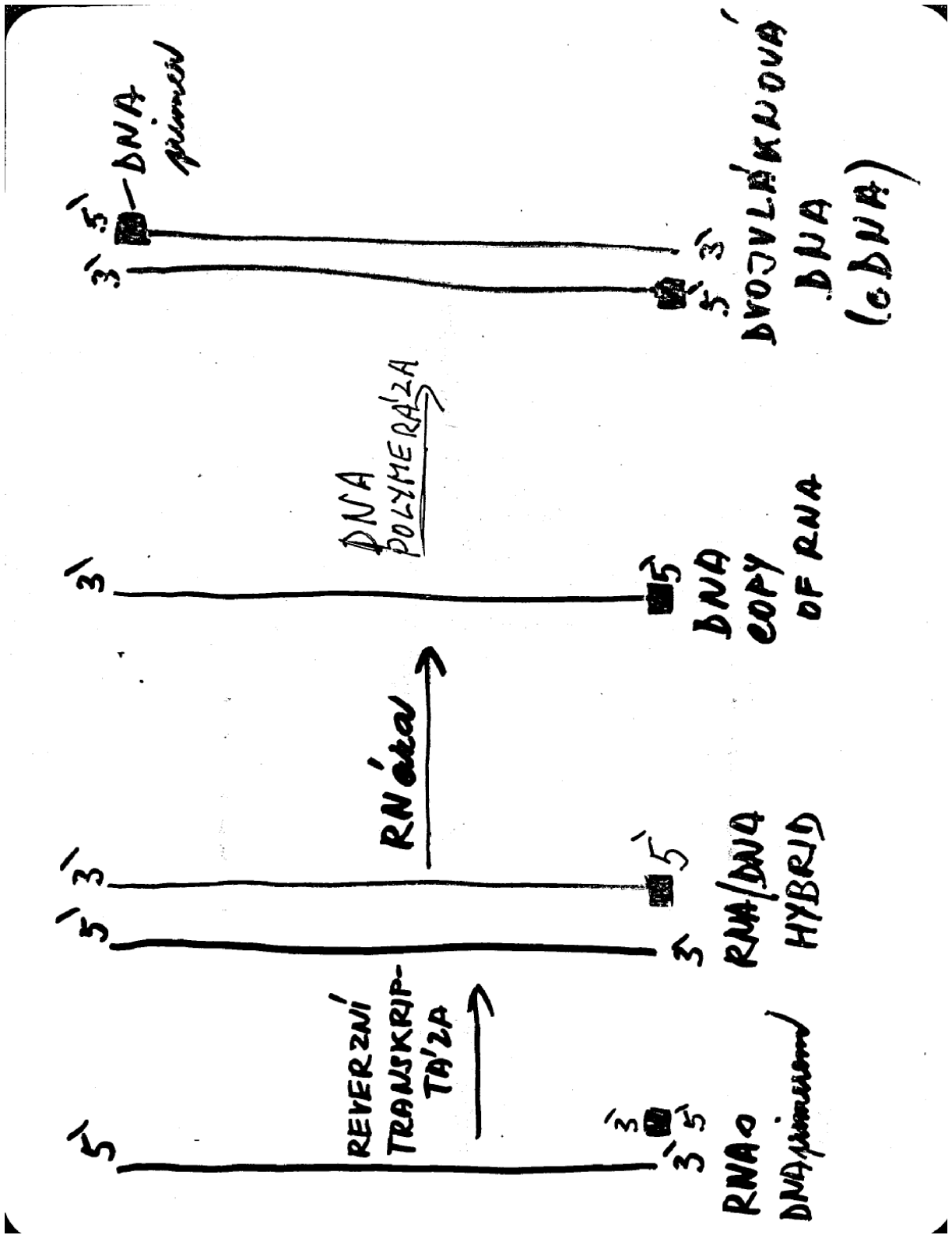
◆ biosyntéza nukleových kyselin a proteinů je závislá na proteinech jako **biokatalyzátorech (enzymech)**;

◆ biosyntéza proteinů a nukleových kyselin je závislá na nukleových kyselinách jako **nositelích genetické informace**.

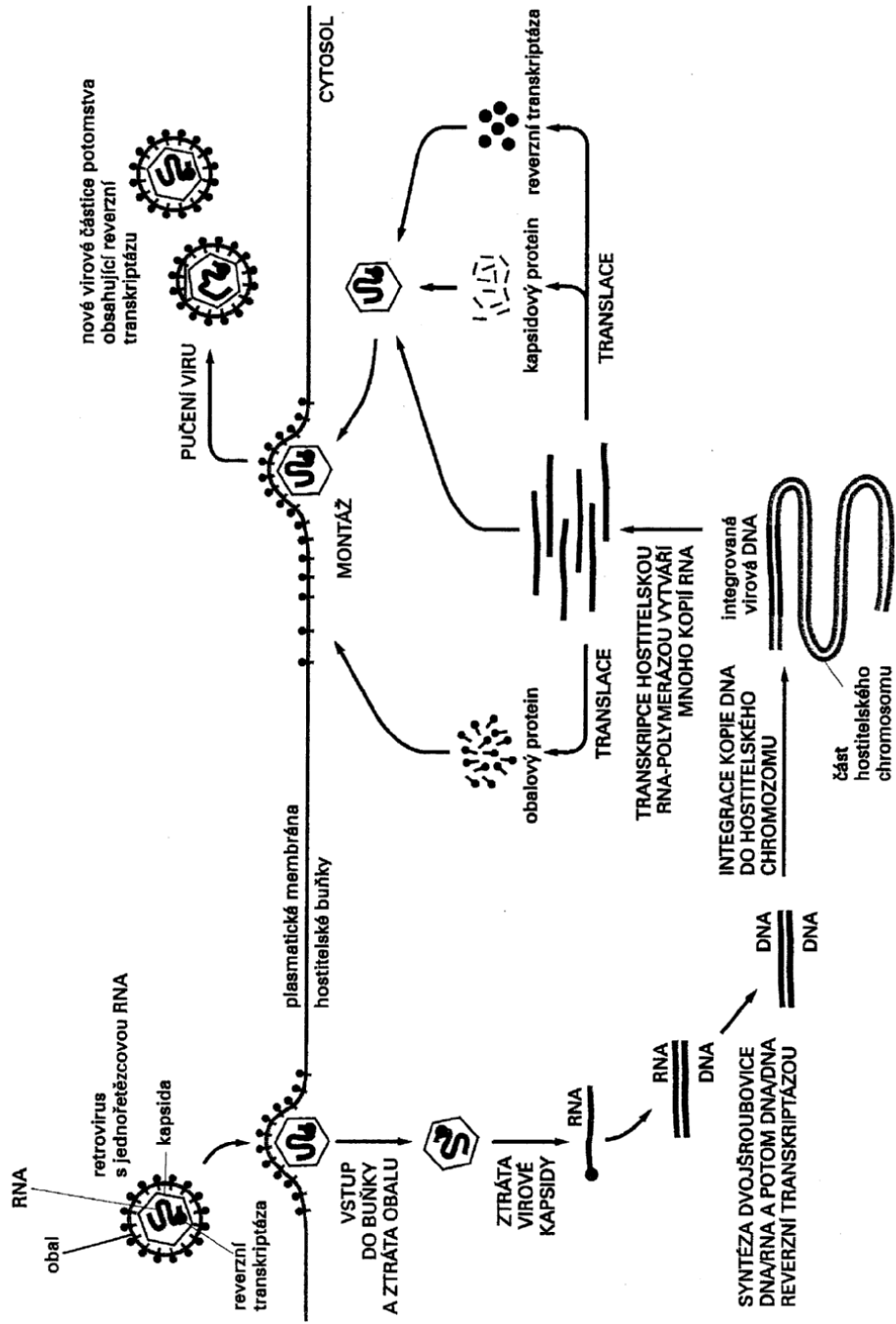


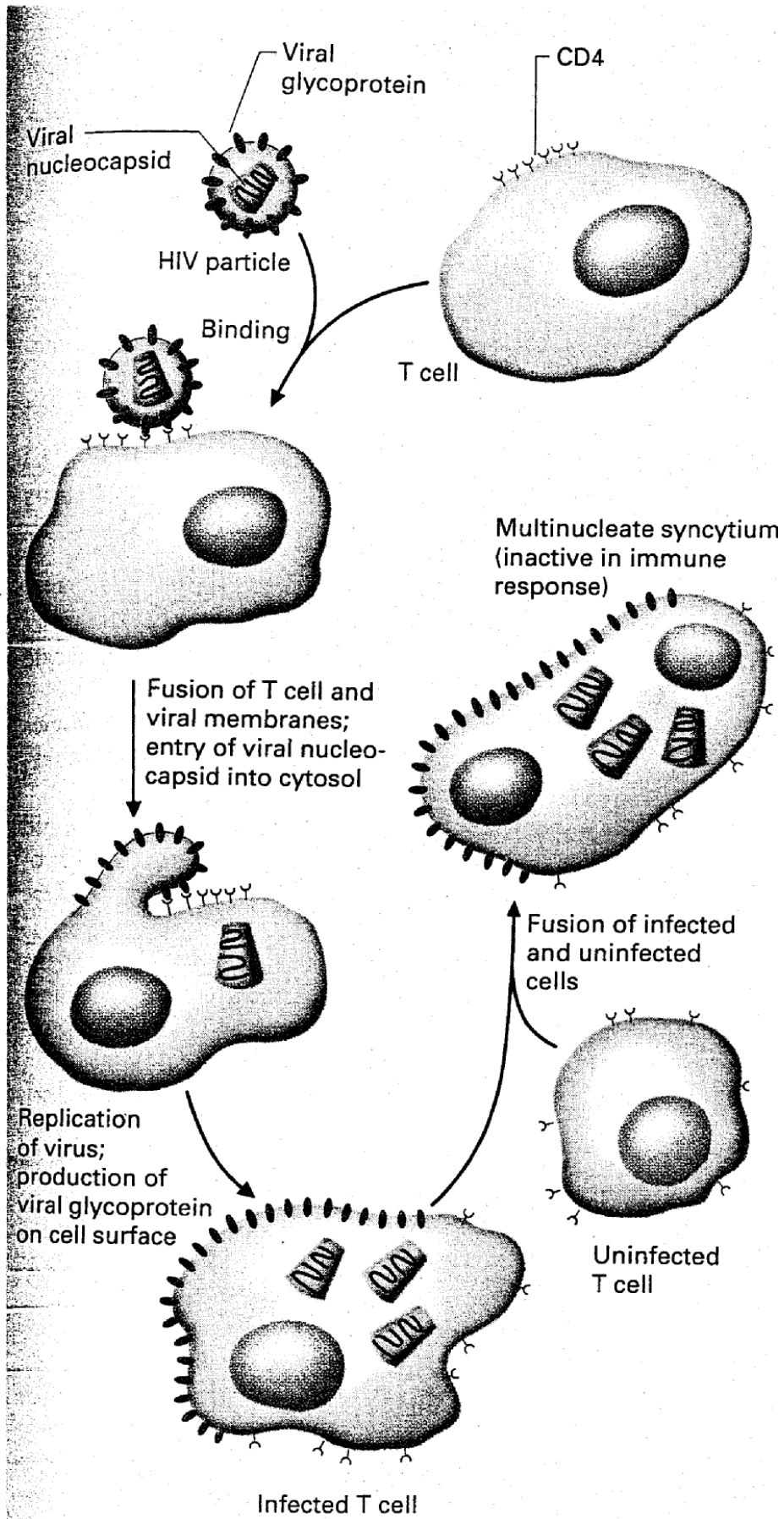
central dogma of molecular biology
DNA is transcribed into RNA
RNA is translated into protein
DNA is replicated into DNA
RNA is replicated into RNA

16. 8. 2019 (1) *Central dogma of molecular biology*



Životní cyklus retroviru





činnosti jiných enzymových řad ve smyslu inhibice a aktivace — probíhají rovněž „logické operace“, kterými je metabolická činnost buňky koordinována do funkčně optimálního stavu. Zatímco ovšem nervové buňky jsou do sítě zapojeny pevně prostřednictvím svých výběžků, po kterých probíhají aktivující nebo inhibující impulsy, pak enzymy jsou spojeny jen nepřímo, méně pevně, prostřednictvím svých produktů, které se pohybují od enzymu k enzymu tepelným pohybem a hledají svůj cíl (toto hledání je často usnadněno vhodnou strukturou, ve které jsou vzájemně spolupracující enzymy soustředěny). Konečný efekt je však podobný, a proto můžeme říci, že enzymy buňky, zodpovědné za její metabolismus, jsou četnými regulačními obvody spojeny v komplikovanou „logickou síť“, analogickou nervovému systému, a že tato „síť“ je to, co buňku funkčně integruje a odlišuje ji od pouhého váčku, naplněného enzymy a substráty.

2. REGULACE SYNTHESY ENZYMŮ

Viděli jsme zatím, že celá řada regulačních mechanismů upravuje metabolickou aktivitu buňky zásahem do činnosti enzymů. Regulace se však může uskutečnit i *kontrolou syntesy enzymu*. Může se tak stát na dvou různých úrovních, zásahem do dvou různých procesů: Regulační proces může proběhnout na úrovni translace, tj. zásahem do proteosyntesy v ribosomálním systému, nebo může proběhnout již na úrovni transkripce, tj. zásahem do syntesy iRNA kódující příslušný enzym.

Nejdříve si všimneme regulací na úrovni transkripce, poněvadž tyto procesy jsou lépe prozkoumány.

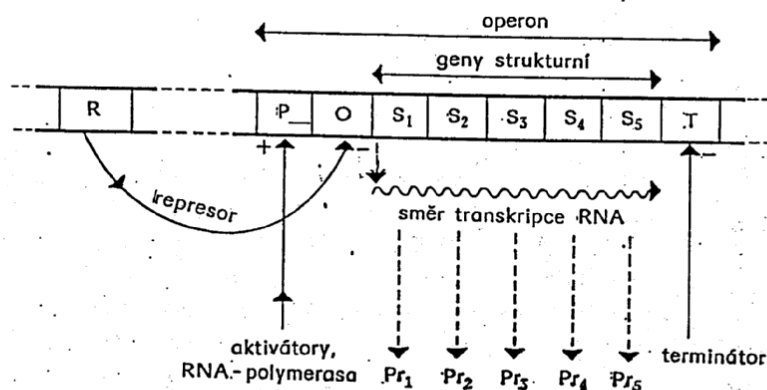
a) Represe a dereprese (indukce)

Princip regulace syntesy enzymů indukci a represí je dnes znám především zásluhou MONODA a JACOBA. Jejich hypotéza byla sice původně vypracována na základě pokusů s bakteriemi, avšak nyní se zdá, že stejný nebo podobný regulační systém mají všechny buňky. Aplikace *Jacob-Monodovy teorie* se ukázala neobyčejně plodná při řešení nejrůznějších problémů souvisejících s regulačními mechanismy, a je dnes proto považována za jeden ze základů moderní biologie, podobně jako je Watsonův-Crickův model DNA základem všech úvah v oblasti molekulární genetiky. Proto se seznámíme aspoň s hlavními rysy této teorie podrobněji.

Regulace syntesy enzymů konečným produktem
(represe v užším slova smyslu)

K biosynthese aminokyseliny tryptofanu je třeba pěti syntetických reakcí, které jsou katalysovány pěti různými enzymy. Rostou-li bakterie v živném prostředí bez tryptofanu, syntetizují nejdříve enzymy, které pak v 5 stupních přeměňují kyselinu

chorismovou v tryptofan. Přidáme-li však do prostředí nadbytek tryptofanu, syntéza zmíněných enzymů se zastaví a sekundárně pak i syntéza tryptofanu. Geny kódující strukturu těchto enzymů jsou na chromosomu seřazeny těsně za sebou. Východí substrát A je zpracováván prvním enzymem řady v látku B, ta druhým enzymem řady v látku C, ta třetím enzymem řady v látku D a konečně ta čtvrtým a pátým enzymem v konečný produkt. Jestliže bylo nasynthesováno dostatek aminokyseliny, jsou všechny čtyři enzymy pro buňku nepotřebné a není pochopitelně ani třeba další syntetizovat.

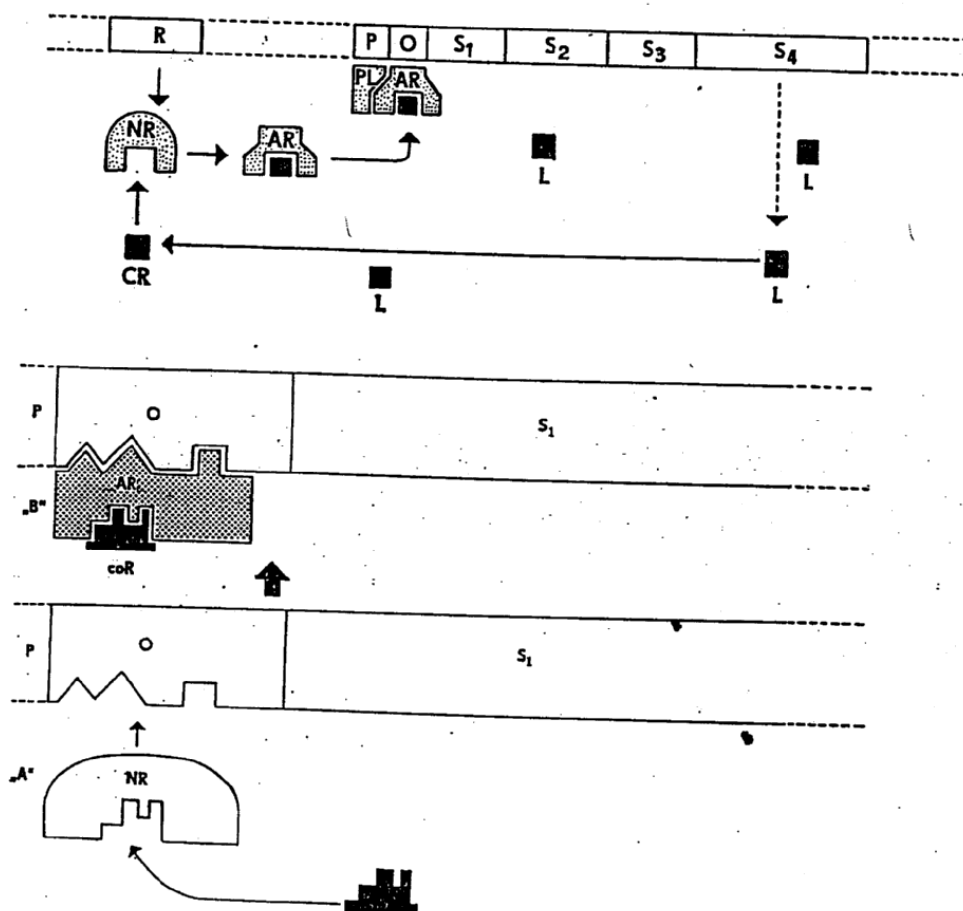


Obr. 241. *Genová regulační jednotka*. S₁—S₅: geny strukturní, kódující funkční skupinu proteinů Pr₁—Pr₅. Gen regulátor R, kódující represor. P — promotor, zde se váže RNA-polymerasa a případné aktivátory transkripce. O — operátor, zde se váže represor. T — terminus, konec operonu, zde končí transkripce vlivem bílkovinného terminátoru, který může být blokován antiterminátorem (tento není na obraze).

Poněvadž geny řídící syntézu těchto pěti enzymů leží na chromosomu těsně za sebou, je tím dána možnost, aby činnost všech pěti genů byla současně vyřazena, aby transkripce DNA → RNA byla v celé této oblasti zastavena. A skutečně všechny tyto geny tvoří funkční jednotku, která se od jednoho konce oblasti ke druhému transkribuje jako celek, vzniká jediná molekula informační RNA, která kóduje všech pět enzymových bílkovin. Kromě toho se však současně transkribuje ještě jeden úsek DNA ležící těsně před genem pro první z enzymů a v tomto úseku jsou dva geny, jejichž funkcí je regulovat transkripci uvedených 5 genů. Máme tedy funkční jednotku, část chromosomu, na jejímž začátku jsou dva *geny regulační*, následovány skupinou pěti genů, tzv. *genů strukturních*, tj. genů kódujících bílkoviny. Za geny strukturními je konečně další krátký gen, tzv. *terminátor*, jehož funkcí je v daném místě transkripci ukončit. K ukončení potřebuje spolupráce proteinového terminačního faktoru, tzv. *ró-faktoru*, bez jehož zásahu by transkripce přešla do sousedního operonu. Tento celek se nazývá *operon* a představuje jednotku transkripce, poněvadž jeho transkripcí vzniká jediná molekula informační RNA, kódující všechny

enzymy této funkční skupiny (obr. 241). Zmíněné geny regulační, ležící na začátku operonu, nazýváme *gen promotor** a *gen operátor*.

Gen promotor je úsek, na který nasedá molekula RNA-polymerasy, jejímž úkolem je provést syntézu iRNA, tj. transkripci celého operonu. Předpokládáme, že promotor obsahuje specifickou sekvenci nukleotidů, která je stereochemicky komplementární (tedy padnoucí jako klíč do zámku) k některé části molekuly RNA-polymerasy, takže ta promotor rozpozná, nasedne na něj a začne transkribovat informační RNA. Kdyby nebylo takového rozpoznání počátku operonu, transkripce by probíhala



Obr. 242. Činnost represoru. a) Gen regulátor „R“ produkuje neaktivní represor („NR“), činností genu „S₄“ a enzymu jím kódovaného vzniká látka „L“ (např. aminokyselina), která je současně korepresorem „CR“. Korepresor reaguje s neaktivním represorem, vznikne aktivní represor „AR“, který se váže na operátor „O“. RNA-polymerasa „PL“, vázaná na promotoru, nemůže přes blokováný operátor postoupit ke genům strukturním „S₁–S₄“ a transkribovat je. b) Korepresor způsobí změnu tvaru molekuly bílkovinného neaktivního represoru (NR), takže ten se váže na komplementární strukturu genu operátoru (O).

* řec. *promoteo* = napřed pohybovati, posunovati

zcela chaoticky. V promotoru zasahují regulační faktory mající charakter aktivátorů (viz str. 452).

Jestliže RNA-polymerasa nasedla na promotor, nezaručuje to ještě, že transkripce skutečně proběhne. Závisí to na stavu druhého regulačního genu, genu operátoru, který následuje těsně za promotorem. Jestliže je gen operátor volný, polymerasa pokračuje v transkripci a dosáhne genů strukturních, kódujících bílkovinné enzymy, provede jejich transkripci do mRNA. Jestliže však gen operátor volný není, polymerasa nemůže pokračovat v činnosti a genů strukturních nedosáhne.

Blokáda operátoru je klíčový moment celého regulačního systému a klíčová látka schopná blokovat gen operátor se nazývá *repressor*. Represor je bílkovina schopná rozeznat specifickou nukleotidovou sekvenci genu operátoru a vázat se na něj. Jako každá bílkovina, i represor je kódován dalším regulačním genem, který bývá ve vzdálenějším úseku chromosomu. Tento gen se nazývá *gen regulátor* a je zodpovědný za syntézu uvedeného represoru. Represor se syntetizuje neustále a jeho úkolem je blokovat gen operátor, jestliže je v buňce, v uvedeném příkladě, dostatek syntetizovaného tryptofanu.

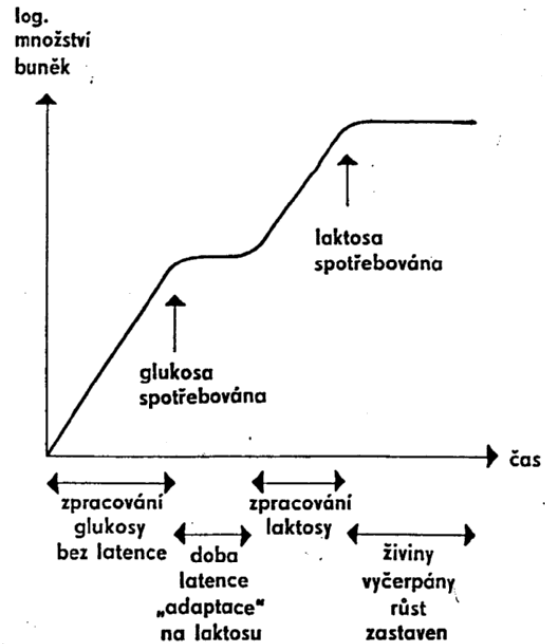
Interakce mezi represorem a tryptofanem je založena na podobných principech jako mechanismus alosterické inhibice, to jest na změně terciární struktury bílkovinné makromolekuly při styku s určitou specifickou látkou, tzv. *korepresorem* (obr. 242). Korepresorem je v případě syntézy tryptofanu sám tryptofan. Tryptofan se váže s represorem a mění jeho terciární strukturu tak, že se aktivuje represor, je schopen rozeznat specifickou sekvenci nukleotidů genu operátoru a vázat se na něj. Výsledkem je zastavení syntézy tryptofanových enzymů. Vazby tryptofanu na represor nebo represoru na operátor nejsou příliš pevné, což je pro funkci regulačního systému výhodou. Jakmile totiž koncentrace regulované látky, tedy tryptofanu, klesne pod určitou hodnotu, uvolní se tato látka (korepresor) z vazby s represorem. Represor se v důsledku toho uvolní z vazby s operátorem a RNA-polymerasa se může přesunout po chromosomu a pokračovat v činnosti, syntéza tryptofanové mRNA a tryptofanových enzymů se obnoví a trvá tak dlouho, dokud tyto enzymy opět nenasyntetizují dostatek tryptofanu (korepresoru), který opět aktivuje represor. Represor pak blokuje operátor a činnost genů strukturních. Tímto mechanismem se koncentrace regulované látky, tedy tryptofanu, udržuje na konstantní a optimální výši.

V buňce je pochopitelně velký počet různých represorů kontrolujících syntézu různých bílkovin, každý z nich musí rozeznávat určitý jiný operátor a mít schopnost reakce se zcela určitým korepresorem.

Regulace syntézy enzymů potřebných k využití cukrů a jiných živin. Indukce β -galaktosidasy

Naočkujeme-li bakterie *Escherichia coli* do živného roztoku obsahujícího jako zdroj uhlíku a energie cukr glukosu, bakterie se množí a to ihned po naočkování. Jestliže však jim místo glukosy poskytneme méně obvyklý cukr, laktosu, bakterií zpočátku

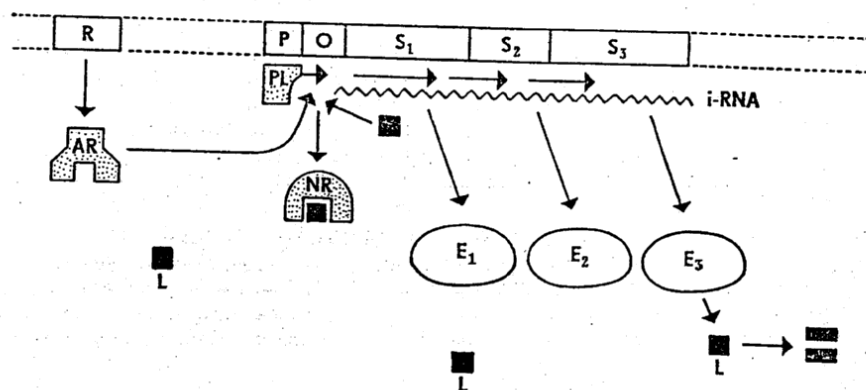
Obr. 243. *Adaptace bakterií na laktosu.* V živném roztoku bylo přítomno omezené, ne zcela dostatečné množství glukosy a laktosy. Naočkované bakterie začaly ihned růst a využívaly glukosu jako zdroje energie a uhlíku. Po vyčerpání glukosy se růst přechodně zastavil. Po nějaké době latence se indukovalo dostatek beta-galaktosidasy a buňky znovu rostly až do vyčerpání laktosy.



po určitou dobu (tzv. latence) nepřibývá, po určité době se však něco změní, bakterie získají schopnost zužitkovávat laktosu a rostou stejně dobře jako s glukosou. Zkomplikujeme-li pokus tak, aby v živném roztoku bylo současně omezené množství každého z obou cukrů, pak růst bakterií probíhá takto (obr. 243): Bakterie se začnou množit ihned po přenesení do uvedeného roztoku a zužitkovávají pouze obvyklejší cukr, glukosu. Jakmile je glukosa vyčerpána, růst se zástaví. Po nějaké době latence však bakterie opět rostou a množí se, a to až do vyčerpání laktosy. Při studiu takového pokusu vznikají dva problémy: první — jak to, že bakterie, které normálně nemají schopnost využít laktosu, této schopnosti po určité době latence nabudou, a za druhé, jak to, že této schopnosti nenabudou v přítomnosti glukosy, avšak teprve po jejím vyčerpání?

Bylo zjištěno, že adaptace na zužitkování glukosy je podmíněna syntésou enzymu β -galaktosidasy, který katalysuje štěpení laktosy na jednodušší cukry, buňkou snáze zpracovatelné. Dále bylo zjištěno, že v normálních podmínkách, tedy v přítomnosti glukosy, buňka β -galaktosidasu neobsahuje, že ji však obsahuje po adaptaci na laktosu. První problém adaptace na laktosu a syntésu β -galaktosidasy lze vysvětlit aplikací represorového mechanismu regulace, podobně jako v předešlém případě regulace syntésy tryptofanu. Represorový systém je v tomto případě podobný předešlému tím, že schopnost represoru blokovat operátor závisí na vazbě s nízkomolekulární látkou, jejíž přítomnosti se má buňka přizpůsobit, v tomto případě s laktosou. Zatímco však v případě tryptofanu byl represor korepresorem (tryptofanem) aktivován, v případě laktosy je represor laktosou inaktivován, takže v přítomnosti laktosy represor ztrácí schopnost vázat se na operátor a v důsledku toho se rozvine syntésa iRNA a enzymů zpracovávajících laktosu (obr. 244).

Poněvadž laktosa tímto mechanismem syntesu enzymů indukuje, nazývá se *induktorem*. Stejného názvu se používá pro jiné nízkomolekulární látky, inaktivující represory a indukující tak syntesu enzymů. Všimněme si, že laktosa je pro buňku substrát, výchozí materiál metabolické aktivity, a působí jako induktor, zatímco tryptofan byl naopak produktem metabolické aktivity a působil jako korepresor. Platí obecně, že *substráty bývají induktory, konečné produkty korepresory*.



Obr. 244. *Indukce enzymu substrátem*. Gen regulátor produkuje aktivní represor („AR“), který by se váže na operátor. Přítomná molekula cukru laktosy (L) se však váže na represor a přemění jej v neaktivní represor („NR“). Operátor je teď volný, RNA-polymerasa „PL“ postoupí z promotoru přes volný operátor na geny strukturální „S₁ — S₃“, transkribuje je, vzniklá i-RNA kóduje enzymy (E₁, E₂, E₃), které zužitkují laktosu.

Enzymy, které podléhají tomuto mechanismu regulace cestou indukce a represe, nazývají se *inducibilní* a *repressibilní*. Naproti tomu druhá skupina enzymů, jejichž syntesa této regulaci nepodléhá, jsou enzymy *konstitutivní*. Konstitutivní enzymy se syntetizují ve stále stejném množství. Enzymová indukce a represe jsou regulační zásahy, které se uskutečňují přímo na genetickém materiálu chromosomu.

Řízení syntesy enzymů pomocí represoru a příslušných efektorů je pro buňku výhodné a ekonomické. Při represii konečným produktem (aminokyselinou) buňka nesyntetizuje zbytečně enzymy, jestliže jejich produktu (aminokyseliny) má dostatek. Při indukci, tj. derepresi induktorem, obvykle některou živinou, cukrem apod., buňka začne syntetizovat enzym, nutný pro zpracování tohoto substrátu, a přestane, jakmile tento substrát zmizí a je nahrazen obvyklejší glukosou. I když při indukci syntesy enzymů se může indukovat enzym, který buňka ani její předkové po mnoho generací nikdy nesyntetizovali, nejde přesto o změnu dědičnosti: Indukovat je možno jen takový enzym, pro který má buňka připraven příslušný strukturální gen.

b) Cyklický adenosinmonofosfát

Vrátíme se k druhé otázce, vyplývající z pokusu o současném působení laktosy a glukosy na množení bakterií, a to k problému, proč se induktivní enzymy