

## 11 – Nukleové kyseliny

Nukleové kyseliny hrají v našem těle velice důležitou roli – molekuly DNA **uchovávají** genetickou informaci (využívají k tomu proces zvaný **replikace**) a molekuly RNA zajišťují **vyjádření** této informace (nejprve pomocí přepisu a následně pomocí translace). O jednotlivých procesech se budeme bavit podrobněji v dalších částech této kapitoly.

Nejprve se ale zaměříme na strukturu nukleových kyselin. Základními stavebními jednotkami nukleových kyselin jsou **nukleotidy**. Ty se skládají z **pentosy** (ribosy nebo deoxyribosy), **fosfátu** a **báze** (purinové nebo pyrimidinové).

### 11.1 Vznik nukleotidů

Všechny buňky potřebují pro svou činnost nukleosidy, nukleotidy a jejich deriváty (jak pro replikaci DNA, tak pro syntézu mRNA, rRNA, tRNA...). Jejich příjem potravou je velmi nízký (špatná resorpce ve střevě, především resorpce purinových a pyrimidinových bází je malá), proto je potřeba, aby si je tělo umělo samo syntetizovat.

#### A) Látky potřebné pro syntézu nukleotidů

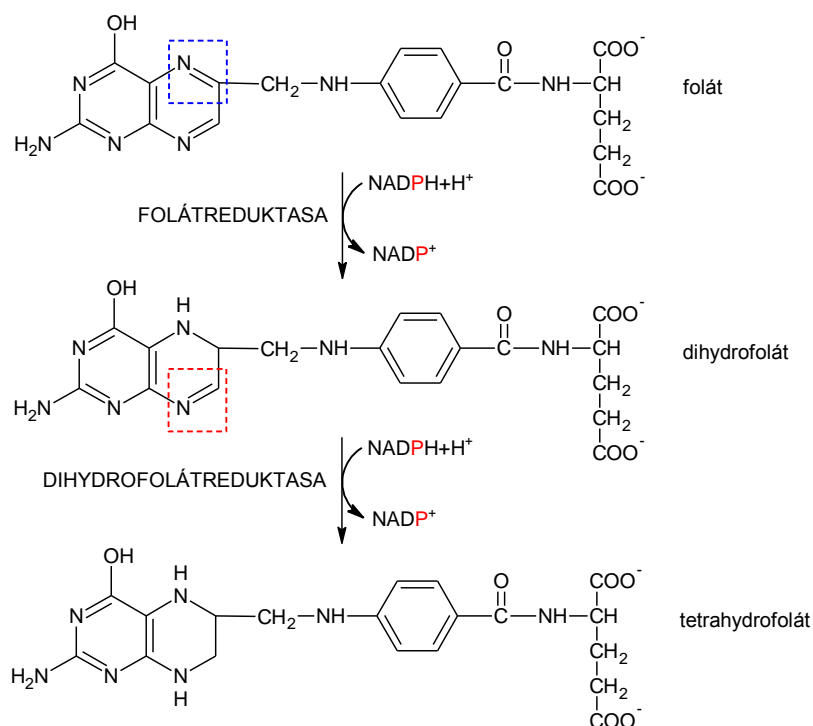
Pro tuto syntézu jsou velmi důležité tři sloučeniny:

- **tetrahydrofolát**
- **glutamin**
- **PRPP – fosforibosyldifosfát**

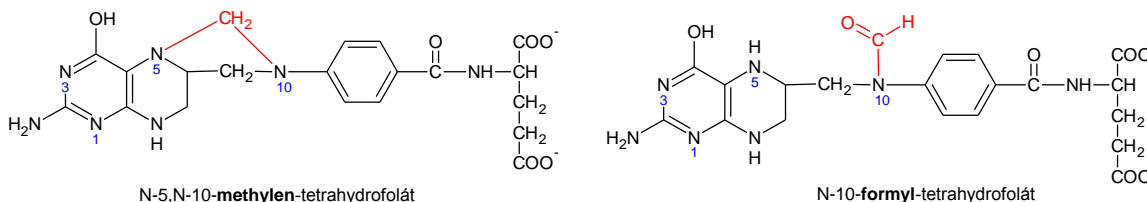
#### Tetrahydrofolát

**Tetrahydrofolát** tělo získává **úpravou kyseliny listové**, která je **esenciální** (je tedy potřeba ji přijímat potravou např. z listové zeleniny, jater, kvasnic a žlutku).

Přijatý folát prochází **dvěma hydrogenacemi**, které zajišťují enzymy **folátreduktasa** a **dihydrofolátreduktasa** (kofaktor  $\text{NADPH} + \text{H}^+$ ). Při reakci dochází k odstranění dvou dvojných vazeb:

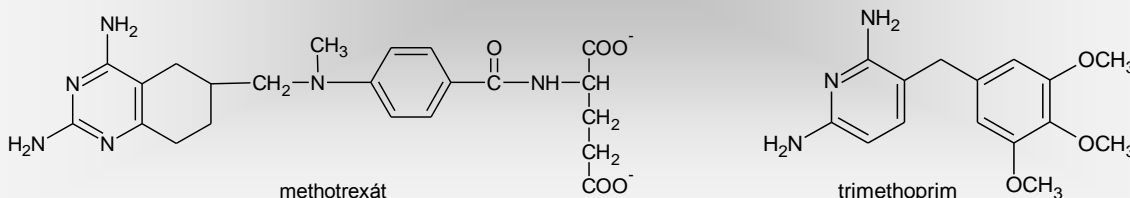


Tetrahydrofolát je **přenašečem jednouhlíkových zbytků** – konkrétně je při syntéze nukleotidů využit k **syntéze thyminu** (přenáší **methylenovou skupinu** –CH<sub>2</sub>–) a při syntéze **purinů** (přenáší **formyl** –CHO):



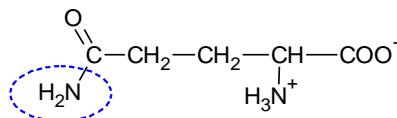
Enzym **(dihydro)folátreduktasa** je velice důležitý pro syntézu tetrahydrofolátu a vznikající tetrahydrofolát je velice důležitý pro syntézu nukleotidů (bez jeho činnosti nevznikají). Nukleotidy jsou zase potřeba pro syntézu DNA, která je jedním z procesů probíhajících v buněčném cyklu (S-fáze). **Některé léky inhibují činnost tohoto enzymu a tím zabraňují množení buněk** – toho se využívá:

- v **protinádorových léčivech (methotrexát)**
- v léčivech **antibakteriálních (trimethoprim; inhibuje bakteriální dihydrofolátreduktasu)**



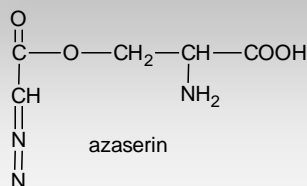
### Glutamin

Glutamin je jednou z AK, o jeho metabolismu bylo pojednáno v kapitole 6. Při syntéze nukleotidů jeho význam tkví v tom, že **odává (tedy je donorem) aminoskupiny** pro puriny i pyrimidiny.



Dělící se buňky potřebují **hodně glutamátu** (aby mohly syntetizovat puriny a pyrimidiny). Přidáním glutaminu do organismu můžeme usnadnit dělení buněk – toho se využívá např. v případě, potřebujeme-li zvýšit počet imunitních buněk. Ovšem přesně opačné činnosti (zamezení příjmu glutamátu) se využívá k zastavení dělení buněk.

Podobného principu využívají některé léčiva, která slouží jako **inhibitory enzymů**, které využívají glutamin (léčiva jsou glutaminu strukturně podobná, obsadí tak aktivní místa enzymů a neumožní glutaminu vstoupit do kostry purinu, či pyrimidinu). Příkladem takové látky je **azaserin**.

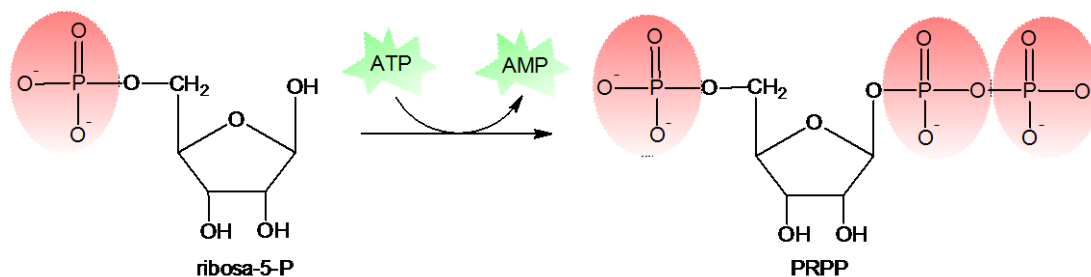


### Fosforibosyldifosfát (PRPP)

PRPP je nezbytný pro syntézu **purinových i pyrimidinových nukleotidů**, ale kromě toho také pro **syntézu NAD<sup>+</sup> a NADP<sup>+</sup>**.

Získáme jej reakcí **ribosa-5-fosfátu** (který jsme získali v pentosovém cyklu) s ATP. ATP předá molekule ribosa-5-P **dva fosfáty** a stane se z něj AMP, ribosa-5-P se přemění na PRPP. O PRPP můžeme říct, že se jedná o **aktivovanou pentosu**.

Reakci katalyzuje enzym **PRPP-synthetasa**.



### B) Syntéza purinů a pyrimidinů

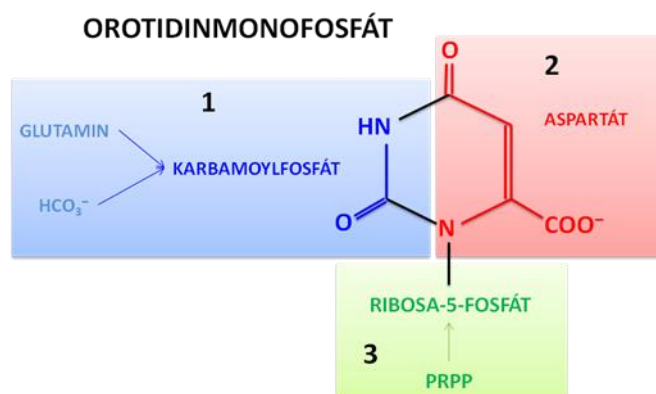
Syntéza purinů a pyrimidinů *probíhá jako puzzle* – do molekuly výsledné báze jsou postupně přidávány kousky z jiných molekul, aby nakonec vytvořily požadovanou strukturu.

**Rozdíl v syntéze** purinů a pyrimidinů **je již v začátku**. Při syntéze purinů je nejprve nasyntetizováno PRPP, na které se následně napojují různé skupiny, které dají základ budoucí bázi, u syntézy pyrimidinů je nejprve vytvořena báze, na kterou se poté naváže ribosa-5-P z PRPP.

Na jednotlivé kroky syntézy se nyní podíváme podrobněji. Není zcela potřebné vědět, jak probíhá syntéza heterocyklických kruhů krok za krokem. **Velmi důležitá** je ale znalost **původu jednotlivých atomů** v jejich molekulách.

### Syntéza pyrimidinů

Původ atomů:



Jednotlivé kroky syntézy pyrimidinů:

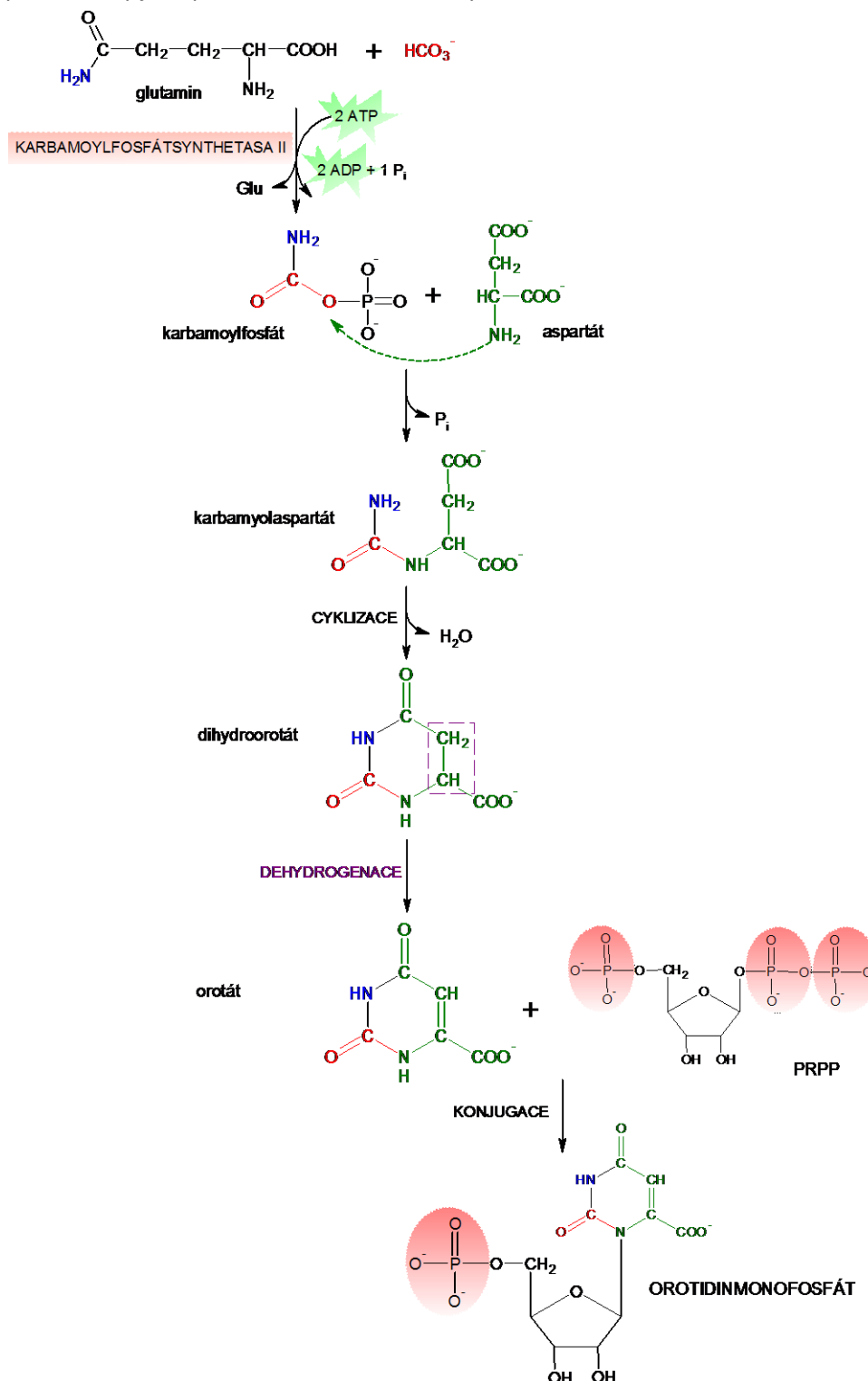
a) V **cytoplasmě** vznikne **karbamoylfosfát** z **glutaminu** (zdroj dusíku) a **HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>**. Reakce je energeticky náročná – pro její průběh je potřeba dodat **2 ATP**.

Reakci katalyzuje enzym **karbamoylfosfátsynthetasa II<sup>1</sup>**, která je **inhibována** pomocí **UTP** („inhibice produktem“) a **aktivována** pomocí **ATP**.

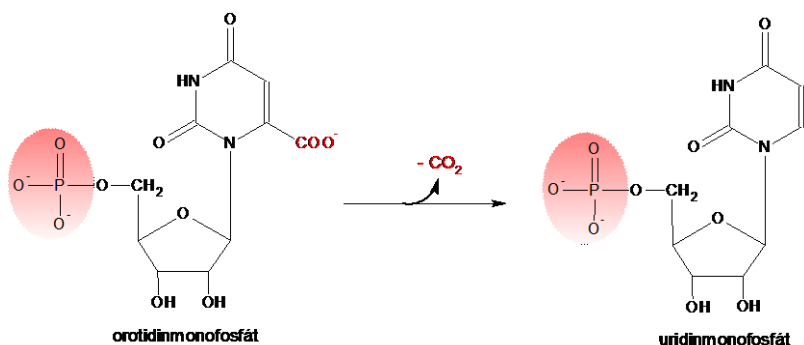
<sup>1</sup> Enzym **karbamoylsynthetasa I** se vyskytuje v **mitochondriích** a účastní se syntézy **močoviny**.

- b) Karbamoylfosfát následně reaguje s **aspartátem** za vzniku **karbamoylaspartátu**.  
 c) Vyloučením vody se uzavře cyklus, který v tom stavu nazýváme **dihydroorotát**.  
 d) Dihydroorotát je potřeba **dehydrogenovat**, aby se vytvořila dvojná vazba, čímž vzniká **orotát**.  
 e) Na orotát se napojí **PRPP**, čímž se vytvoří **orotidinmonofosfát**.  
 f) Orotidinmonofosfát následně podlehně **dekarboxylaci**, čímž se z něj vytvoří **UMP** – **uridinmonofosfát**. Z toho je následně možné vytvořit **UTP**, **CTP** i **dTMP** (bude popsáno dále).

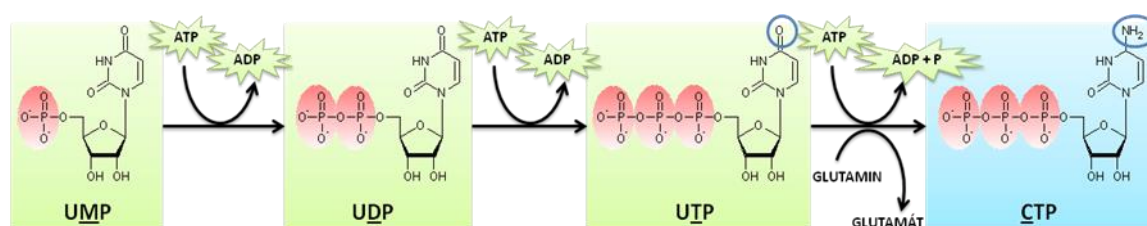
Výše popsané kroky jsou pomocí vzorců znázorněny níže:



Jak bylo zmíněno v bodě f), dekarboxylací orotidinmonofosfátu vzniká **uridinmonofosfát** (UMP).



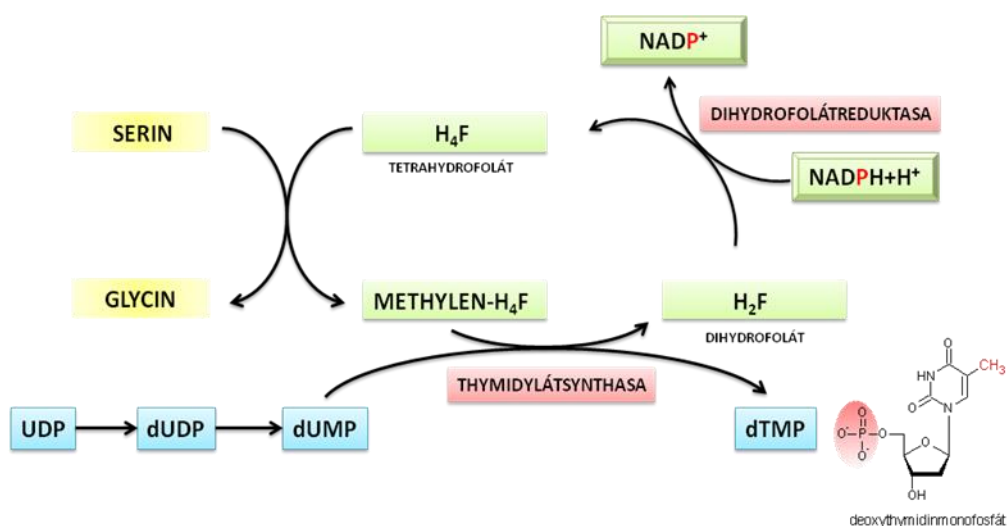
UMP je základ pro další báze – reakcí s dvěma molekulami ATP z něj postupně vzniká UDP a **UTP**. Z UTP je následně možné vytvořit **CTP** (cytidintrifosfát) tím, že na něj přeneseme **-NH<sub>2</sub> skupinu** z **glutaminu** (reakce je opět energeticky náročná a vyžaduje spotřebu dalšího ATP).



Poslední pyrimidinovou bází, kterou jsme ještě nezmínili je **dTMP (deoxythimidinmonofosfát)**. Pro jeho vznik je nutné nejprve vytvořit **methylen-tetrahydrofolát**. Ten získáme reakcí **serinu s tetrahydrofolátem** (serin odevzdá methylenovou skupinu a přemění se na **glycin**). Dále je potřeba odstranit jednu **-OH skupinu** ribosy patřící **UDP**, čímž vznikne **dUMP** (deoxyuridinmonofosfát).

dUMP následně může reagovat s methylen-tetrahydrofolátem za vzniku dTMP. Methylenová skupina **-CH<sub>2</sub>-** se během reakce **redukuje na methylovou skupinu -CH<sub>3</sub>**, tetrahydrofolát se mění na **dihydrofolát** (poskytne vodíky na redukci methylenové skupiny na methylovou). Reakci katalyzuje enzym **THYMYDYLÁTSYNTHASA**.

Dihydrofolát je potřeba následně regenerovat (oxidovat) na tetrahydrofolát. Reakci katalyzuje enzym **DIHYDROFLÁTREDUKTASA** (její název byl již zmíněn při vzniku tetrahydrofolátu z folátu), kofaktorem reakce je **NADPH+H<sup>+</sup>**.



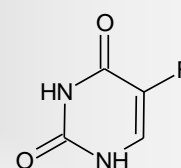
Výše zmíněných kroků syntézy dTMP se účastnily dva enzymy, z nichž oba dva jsou **cílem protinádorové terapie**.

Způsob ovlivnění **dihydrofolátreduktasy** byl popsán již výše – je možné ji inhibovat působením metotrexátu a dalších léčiv (inhibicí enzymu zabráníme regeneraci dihydrofolátu na tetrahydrofolát, čímž zabráníme mj. vzniku dTMP).

O funkci tohoto enzymu se ví již velmi dlouho – **dihydrofolátreduktasa byla prvním enzymem, na který se zaměřila protinádorová terapie**, poprvé byl pro její inhibici použit **aminopterin** (váže se na enzym až 1000x pevněji než folát, čímž enzym vyřadí z funkce jako kompetitivní inhibitor).

Všechny léky, které ovlivňují syntézu purinů a pyrimidinů, poškozují rychle dělící se buňky – to však nejsou pouze buňky nádorové, ale i buňky kostní dřene, GI-traktu a např. i buňky vlasových folikulů.

**Thymidylátsynthasa** je inhibována podáváním **fluorouracilu**. Ten je v organismu přeměněn na **5-fluorodeoxyuridinmonofosfát**, který však nemůže být dále přeměněn na dTMP. Thymidylátsynthasa je jím proto blokována jako **kompetitivním inhibitorem**, což ve výsledku zabrání vzniku dTMP, což se projeví zpomalením (znemožněním) buněčného dělení.



5-fluorouracil

### **Druhý způsob vzniku pyrimidinových nukleotidů šetřícím procesem aneb salvage pathway**

Syntetizovat všechny nukleotidy *de novo* by bylo pro buňku velice energeticky náročné. Proto existuje i druhý, **šetřící**, způsob, který nesyntetizuje nukleotidy zcela *de novo*, ale využívá nukleotidů vzniklých při rozkladu nukleových kyselin.

Lze rozlišit dva kroky *salvage pathway*:

#### **1) Tvorbu nukleosidů**

Molekuly nukleových kyselin jsou rozloženy na nukleotidy, ty na nukleosidy a ty na jednotlivé báze – v případě pyrimidinových bází se jedná o **cytosin, uracil a thymin**.

Jednotlivé báze následně reagují:

- v případě **uracilu a cytosinu** s **ribosa-1-fosfátem** za vzniku **uridinu a cytidinu**
- V případě **thyminu a cytosinu** s **deoxyribosa-1-fosfátem** za vzniku **deoxythymidinu a deoxycytidinu**

#### **2) Tvorbu nukleotidů**

Nově vzniklé nukleosidy následně **reagují s ATP** za vzniku potřebných nukleotidů působením patřičných **kináz**:

- |  |           |
|--|-----------|
| a) cytidin + ATP → <b>CMP</b> + ADP        | } pro RNA |
| b) uridin + ATP → <b>UMP</b> + ADP         |           |
| c) deoxythymidin + ATP → <b>dTMP</b> + ADP | } pro DNA |
| d) deoxycytidin + ATP → <b>dcMP</b> + ADP  |           |

**Salvage pathway** hraje významnou roli především v **extrahepatálních tkáních**.

### **Regulace syntézy pyrimidinů**

Syntéza pyrimidinů je regulována:

#### **a) allostericky**

Allostericky je ovlivňována **karbamoylsynthetasa II** – **inhibicí zajišťuje UTP a purinové nukleotidy; aktivaci zajišťuje PRPP<sup>2</sup>** (tzn. je-li dost PRPP, může probíhat syntéza)

<sup>2</sup> Syntéza samotného PRPP je ale inhibována velice komplikovaným způsobem (jeho popis je nad rámec tohoto textu)

## b) v závislosti na buněčném cyklu

Syntézu pyrimidinových nukleotidů ovlivňuje i to, ve které fázi buněčného cyklu se buňka, ve které syntéza probíhá, nachází.

Syntéza nukleotidů **musí probíhat v S-fázi** (dochází k replikaci DNA). Právě v S-fázi je enzym karbamoylsynthetasa II **méně senzitivní k inhibici pomocí UTP**, ale **více senzitivní k aktivaci pomocí PRPP**

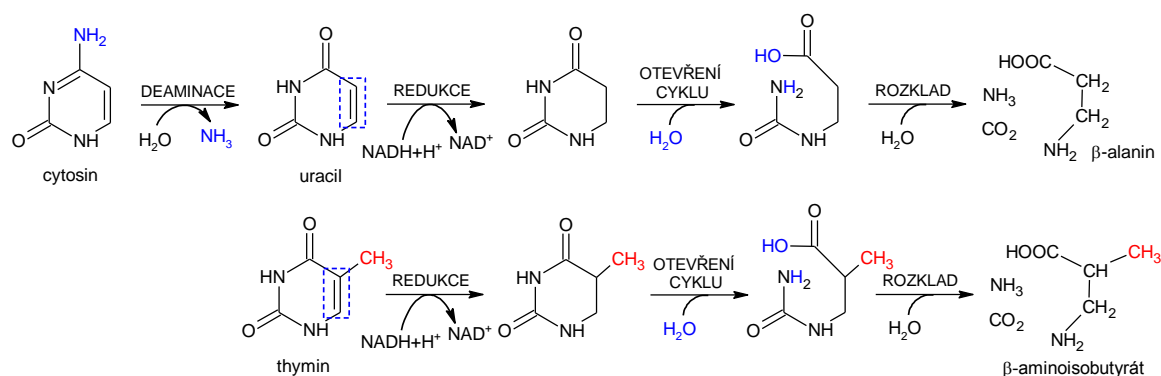
## Odbourávání pyrimidinů

Pyrimidinové báze **jsme schopni v našem těle odbourat** na jednodušší složky, které je možné **vyložit močí**. **Toho nejsme schopni u purinových bází!**

Odbourávání pyrimidinů v sobě zahrnuje:

- odštěpení fosfátu
- odštěpení cukerné složky
- štěpení dusíkaté báze

Štěpení dusíkatých bází probíhá dle následujícího schématu:



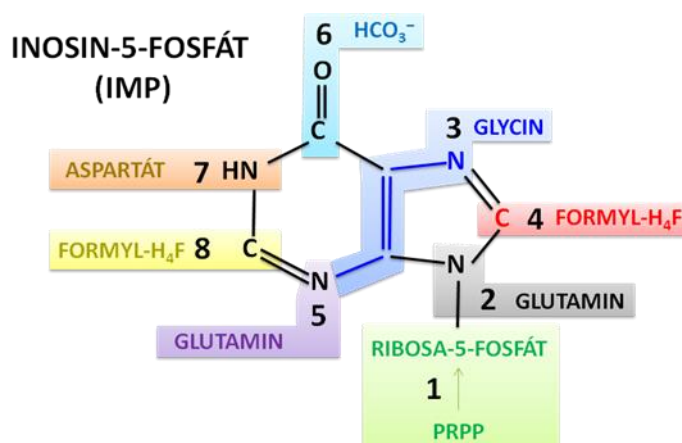
Není zcela nutné znát štěpení kruhu krok za krokem. Zásadní je vědět, že:

- **odbouráním cytosinu a uracilu vzniká amoniak, oxid uhličitý a  $\beta$ -alanin**
- **odbouráním thyminu vzniká amoniak, oxid uhličitý a  $\beta$ -aminoisobutyrát**

Všechny vzniklé metabolity je možné z těla dobře odstranit (oxid uhličitý lze vydýchat, amoniak je upraven v močovinovém cyklu na močovinu a vyloučen močí,  $\beta$ -alanin a  $\beta$ -aminoisobutyrát jsou dobře rozpustné a lze je rovněž vyloučit močí).

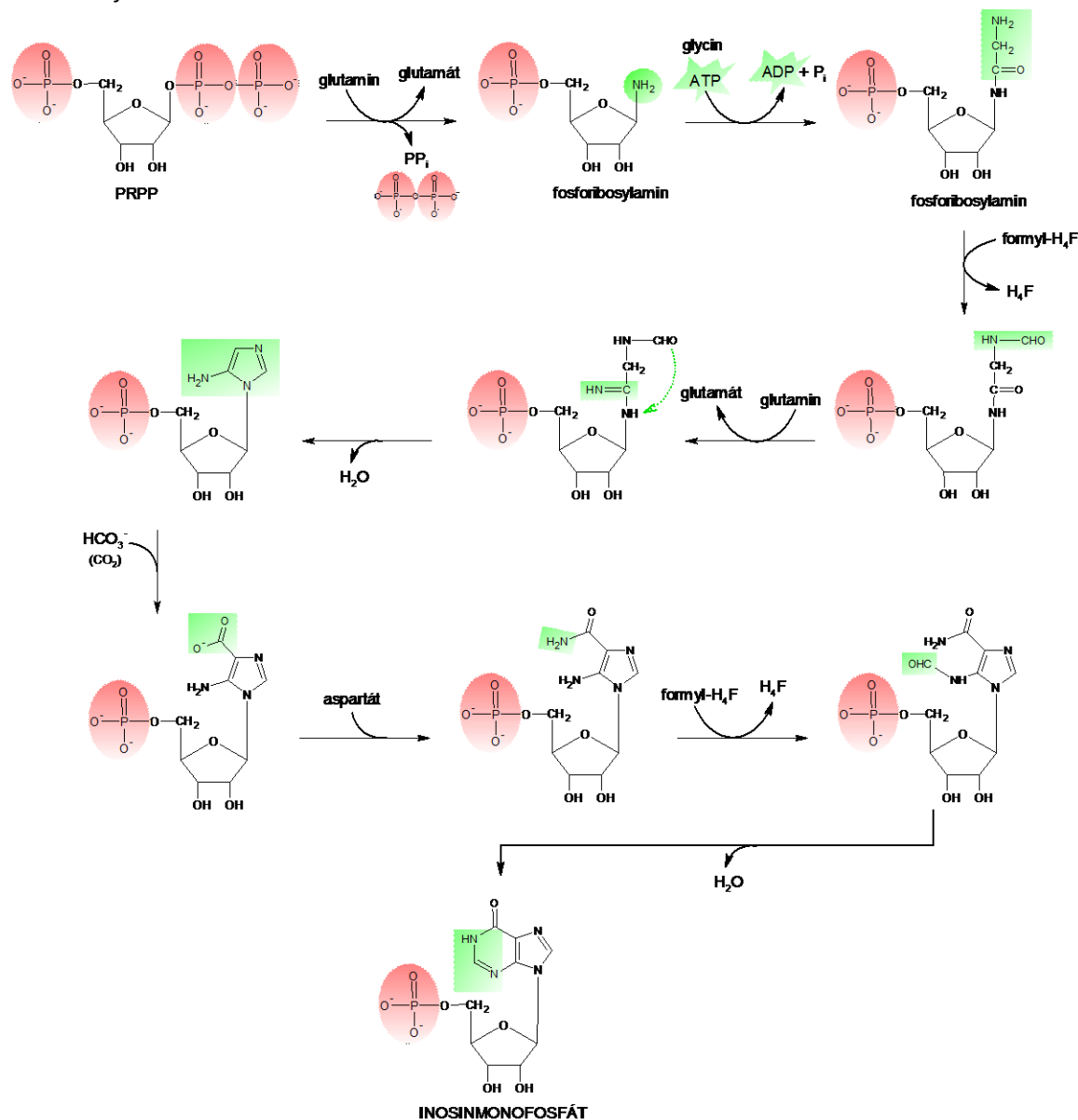
## Syntéza purinů

Původ atomů:



K syntéze purinů dochází **v cytosolu, převážně v jaterních buňkách**. Jednotlivé kroky ještě více připomínají puzzle – na **ribosa-5-fosfát** se napojují jednotlivé atomy vznikající báze. Pouze **glycin** (krok 3) **poskytuje své oba uhlíky a dusík**, všechny ostatní sloučeniny poskytují vždy **jen jeden atom uhlíku nebo dusíku**.

Podrobněji:



Ke schématu: Nově přidaná část je vždy znázorněna zelenou barvou. Schéma je uvedeno spíše pro zajímavost.

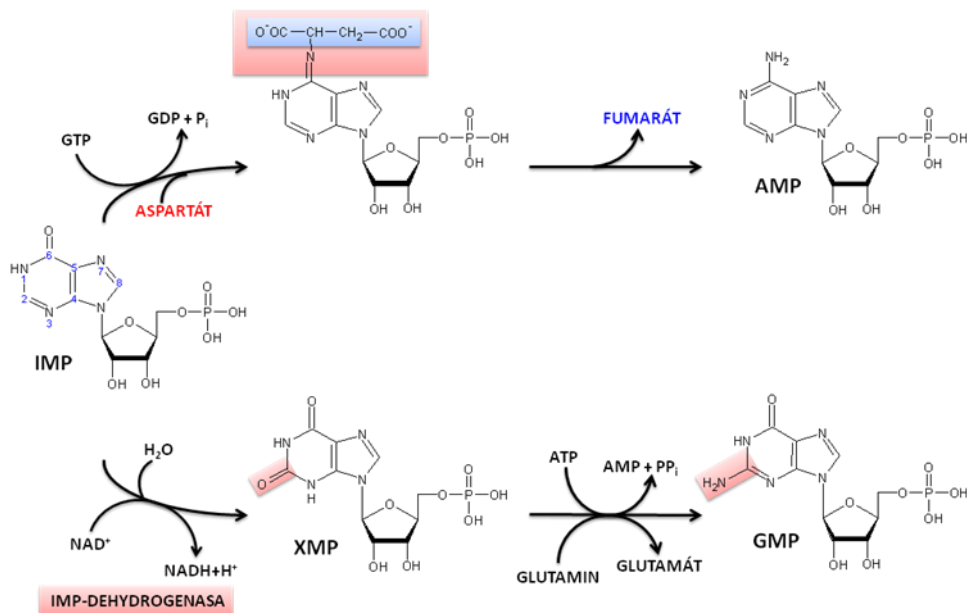
Poznámka: Báze, která se tímto složitým způsobem vytvořila, se nazývá **hypoxanthin** (od ní odvozený nukleotid má však název inosinmonofosfát).

Vzniklý IMP je výchozí látkou pro syntézu ostatních **purinových bází**.

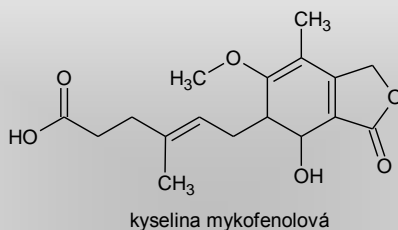
- aminací kyslíku na uhlíku C6 vzniká **adenosinmonofosfát (AMP)**; dusík pochází z **aspartátu** a energii dodává GTP
- oxidací uhlíku C2 vzniká XMP (xanthosinmonofosfát), jehož **aminací** získáme **GMP** (guanosinmonofosfát); dusík pro aminaci pochází z **glutaminu**, energii dodává **ATP**

Výše popsané znázorňuje schéma na následující stránce:



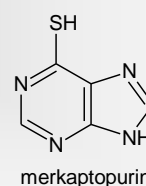


Přeměnu IMP na XMP katalyzuje enzym **IMP-dehydrogenasa**. Tento enzym je možné inhibovat pomocí **kyseliny mykofenolové** – jedná se o **účinný reversibilní inhibitor**, který se používá při **prevenci rejekce transplantátů**. Tím, že ve výsledku inhibuje formu GMP, **potlačuje proliferaci T- i B-lymfocytů**.



Samozřejmě i syntéza purinů je cílem protinádorových léčiv.

- syntézu purinů omezují **inhibitory dihydrofolátreduktasy** (metotrexát...), které zabraňují regeneraci dihydrofolátu
- jelikož i pro syntézu purinů je potřeba **glutamin**, jsou jeho analogy, jako **azaserin**, účinnými inhibitory příslušných enzymů
- strukturně velice podobnou sloučeninou k IMP je **merkaptopurin** – místo kyslíku obsahuje na uhlíku C6 **-SH skupinu**; používá se jako inhibitor přeměny IMP na AMP i GMP



### Druhý způsob vzniku purinových nukleotidů **šetřícím procesem** aneb **salvage pathway**

Stejně jako existovala *salvage pathway* u pyrimidinových nukleotidů, existuje i u nukleotidů purinových a význam má opět především v **extrahepatálních tkáních**.

Reakce obecně probíhají tak, že uvolněné purinové báze (vzniklé při rozkladu nukleových kyselin) reagují s PRPP za vzniku purinnukleotidmonofosfátů a PP<sub>i</sub>:



Tyto reakce katalyzují enzymy zvané **fosforibosyltransferasy**, konkrétně:

- vznik AMP katalyzuje **adeninfosforibosyltransferasa**
- vznik IMP katalyzuje **hypoxanthinfosforibosyltransferasa**

Jejich úkolem je přenést purinovou bázi na PRPP.

**Organismus počítá s tím, že salvage pathway bude probíhat!** Pokud dojde k poškození některé z fosforibosyltransferas, dochází k **hromadění purinů v organismu**, což se projeví jako **Lesh-Nyhanův syndrom**.

Lesh-Nyhanův syndrom je dědičná choroba, při které není možné přeměnit uvolněné purinové báze na nové nukleotidy. Jsou proto odbourávány na **kyselinu močovou**, která se následně také **hromadí v organismu**, což se projeví jako onemocnění **dna**. Postižení jedinci trpí **mentální retardací** a **sebepoškozováním**.

### Vznik nukleosiddifosfátů a nukleosidtrifosfátů

Doposud jsme popsali pouze způsoby vzniku GMP a AMP. Další fosfáty je možné na tyto nukleosidmonofosfáty napojit postupnými reakcemi s **ATP**. Reakce katalyzují příslušné **kinázy**.



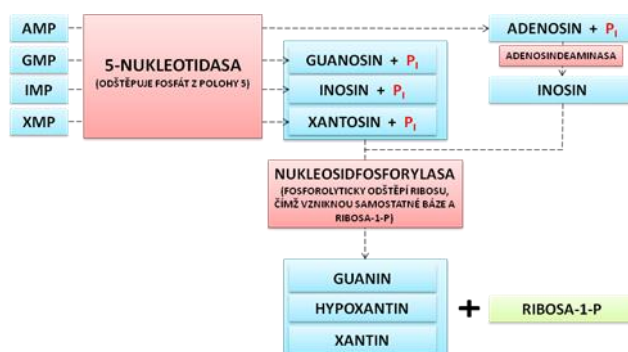
### Regulace syntézy purinových nukleotidů

Existují dva způsoby regulace:

- inhibice enzymu PRPP-glutamylamidotransferasy<sup>3</sup>** pomocí **AMP a GMP** (regulace produkty)
- inhibice přeměny IMP na AMP a IMP na GMP je rovněž inhibována produkty** (AMP inhibuje svou syntézu, GMP inhibuje svou syntézu)

### Odbourávání purinových nukleotidů

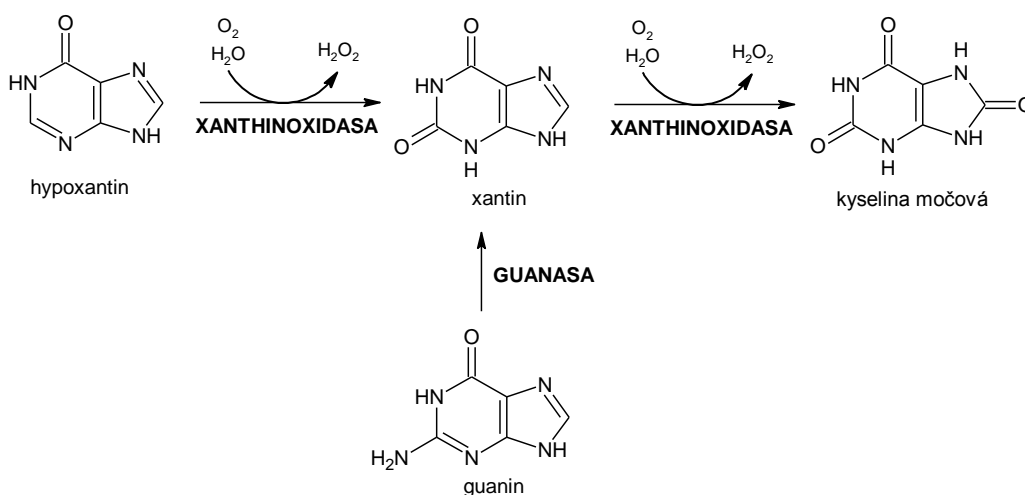
K „odbourávání“ purinových nukleotidů dochází v **játrech**. Z jednotlivých nukleotidů (AMP, GMP, ale i IMP a XMP) jsou odstraněny **fosfáty** (vzniká adenosin, guanosin, inosin a xantosin). Adenosin obsahuje  $-NH_2$  skupinu, kterou je potřeba odstranit a vytvořit z něj **inosin**, ze kterého je pak (stejně jako u **guanosinu a xantosinu**) odstraněna ribosa, čímž vzniknou samostatné báze **hypoxantin, guanin a xantin**.



Zmiňované odstranění aminoskupiny z adenosinu katalyzuje enzym **adenosindeaminasa**. Má-li tělo nedostatek tohoto enzymu, dochází k **hromadění adenosinu**, který je následně přeměňován na AMP, dAMP, ADP... Hromadění těchto produktů **inhibuje enzym ribonukleotid-reduktasu**, který tak nesyntetizuje další nukleotidy, což vede k zatavení syntézy DNA (buňka má jen AMP, ADP... ale nemá již GMP, GDP...). Deficience tohoto enzymu je jednou z příčin **těžkého kombinovaného imunodeficitu (severe combined imunodeficiency dinase – SCID)**.

<sup>3</sup> Tento enzym katalyzuje napojení **prvního dusíku na PRPP**, tedy první krok syntézy purinových nukleotidů

Uvolněné purinové báze **tělo neumí odbourat na jednodušší sloučeniny!** Jediný možný způsob, jak se jich zbavit, je **hydroxylace** na **kyselinu močovou**. Denně jí vznikne okolo **400 – 600 mg** a ve výsledku je vyloučena potem, částečně i močí...

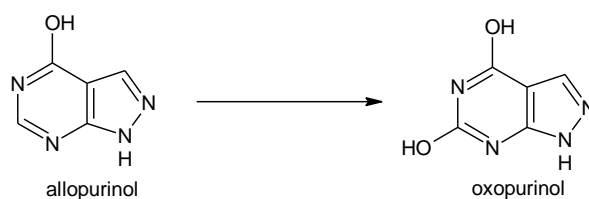


## Dna

Jedná se o onemocnění související s poruchami v **metabolismu purinů**, jehož projevem je **zvýšená produkce kyseliny močové** a **následné ukládání jejích krystalů ve tkáních**. Příčiny vysoké koncentrace kyseliny močové mohou být

- porucha v šetřícím procesu (deficit hypoxanthin-guaninfosforibosyltransferasy (HGPRT) vede k zastavení reakce  $\text{hypoxantin} + \text{PRPP} \rightarrow \text{IMP} + \text{PP}_i$ ; což vede k hromadění hypoxanthinu a jeho přeměně na kyselinu močovou)
- snížená clearance v ledvinách

Jelikož přeměnu hypoxantinu i xantinu na kyselinu močovou katalyzuje enzym **xanthinoxidasa**, je právě tento enzym **cílem léků proti dně**, např. **allopurinolu**. Allopurinol je v těle přeměněn na **oxypurinol**, který je **inhibitorem xanthinoxidasy**.



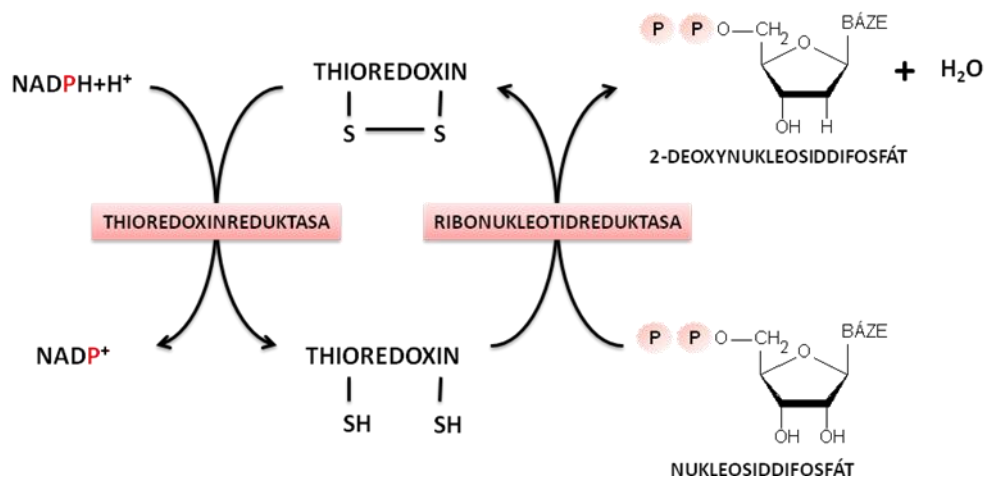
Tím nedochází k přeměně xantinu a hypoxantinu na kyselinu močovou; xantin a hypoxantin jsou rozpustnější a jsou tak snadněji vylučovány z organismu (navíc může hypoxanthin – pokud není porušena funkce HGPRT – vstoupit do *salvage pathway*).

## C) Vznik 2-deoxyribonukleotidů

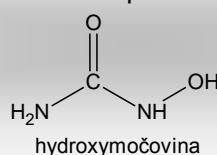
Doposud jsme se bavili především o vzniku nukleotidů (pouze u dTMP jsme se zmínili o tom, že je potřeba odstranit jednu –OH skupinu z ribosy). Na to, jak dochází k tomuto „odstranění“ –OH skupiny se podíváme nyní.

Při vzniku 2-deoxynukleotidů vycházíme z přeměny **nukleosiddifosfátu** na **2-deoxynukleosiddifosfát**. Hydroxylová skupina na druhém uhlíku je **redukována (deoxygenována)** na vodík.

Reakce se účastní **thioredoxin, thioredoxinreduktasa, NADPH+H<sup>+</sup> a ribonukleotidreduktasa**.



Enzym **ribonukleotidreduktasu** inhibuje **hydroxyurea (hydroxymočovina)**. Tím, že ji inhibuje, zabrání syntéze deoxyribonukleotidů, což může pomoci při léčbě některých druhů rakoviny.



## 11.2 Replikace DNA

Replikace znamená **zdvojování**. Jedná se o **semikonzervativní proces**, při kterém dochází k rozpletní dvoušroubovice DNA a každý uvolněný řetězec **slouží jako templát pro syntézu nových komplementárních vláken** (proto mluvíme o semikonzervativním procesu – do každé nové molekuly se vždy dostane část staré). V nových řetězcích se řadí báze podle **principu komplementarity (A-T, C-G)**.

K replikaci DNA dochází **v jádře**.

Obecně můžeme replikaci u eukaryontů i prokaryotů rozlišit do tří fází:

- iniciace**
- elongace**
- spojení a terminace**

Ke zdárnému průběhu potřebujeme řadu látek:

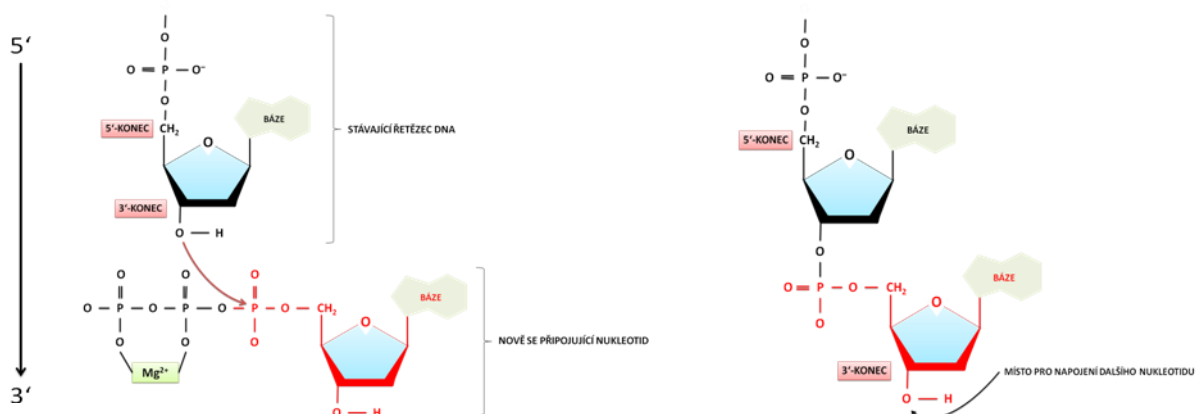
- **deoxynukleotidy** (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- **Mg<sup>2+</sup>**
- **primer RNA**
- **templát DNA** (mateřské vlákno)

A kromě uvedených látek i řadu enzymů:

- **rozplétací enzym** (DNA-helikasa)
- RNA-polymerasa
- DNA-dependentní-DNA-polymerasa
- DNA-ligasa
- ATP-asa
- (topoisomerasa)

Před tím, než se podíváme na celý průběh replikace DNA a vysvětlíme si roli jednotlivých látek a enzymů, zaměříme se na **vlastní reakci syntézy DNA**, tedy na to, **jak přesně dochází ke spojování nukleotidů**.

Do reakce vstupuje již vytvořená DNA (nebo primer RNA), se kterou reaguje dNTP (deoxynukleotidtrifosfát). Při reakci se odštěpí difosfát a dNMP (deoxynukleotidmonofosfát) se na stávající DNA připojí pomocí esterové vazby. **Do reakce vstupuje vždy 3'-konec stávající DNA (primeru), k prodloužení (napojování nových nukleotidů) dochází ve směru 5' → 3'.**



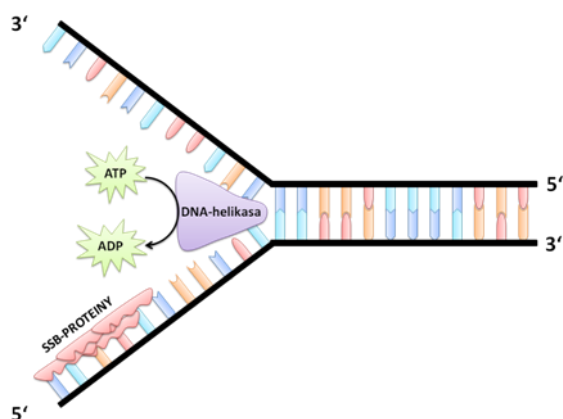
Ke schématu:

Na stávající řetězec DNA (znázorněn pouze poslední nukleotid na 3'-konci; černě) se připojuje nový trinukleotid. Při reakce dojde k odštěpení difosfátu (této reakce se účastní  $Mg^{2+}$  ionty, které difosfát komplexují!) a ke vzdíku fosfodiesterové vazby mezi původním a novým nukleotidem.

Když nyní víme, jak se po chemické stránce napojují nové nukleotidy, může se podívat na to, jak probíhá celá replikace.

### A) Rozpletení řetězce

Replikace probíhá současně na **obou vláknkách DNA**. Dvoušroubovice musí být před zahájením **rozvinuta**, což má za úkol **rozplétací enzym DNA-helikasa**. Její činností vzniká tzv. **replikační vidlice**.



Enzym **ATP-dependentní-DNA-helikasa** za spotřeby ATP rozplétá dvoušroubovici DNA.

**SSB-proteiny** zabraňují reasociaci řetězců.

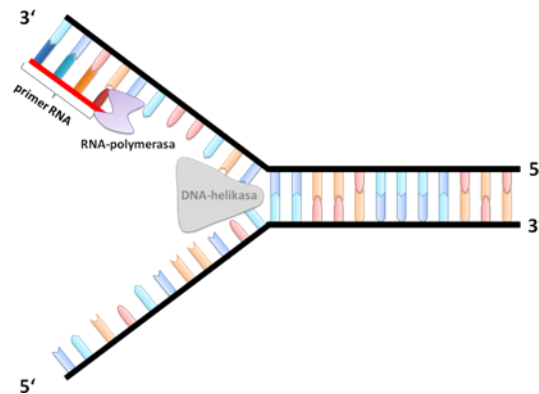
Aby nedošlo ke zpětné **reasociaci řetězců**, napojují se na rozpletenu DNA **ssb-proteiny** (*single strand binding proteins*). Jejich úkolem je stabilizovat jednovláknovou strukturu.

Ještě jednou zopakujeme, že **oba řetězce DNA slouží jako templář pro vznik nové DNA**.

## B) Vznik primeru

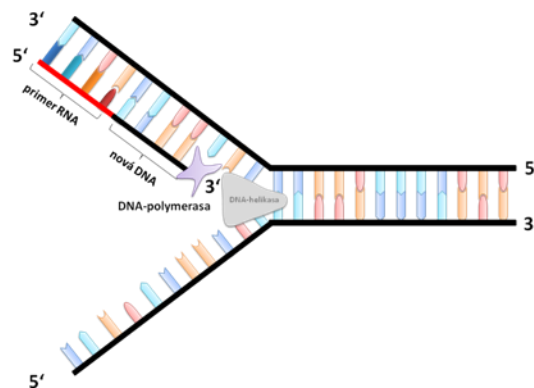
Enzym **DNA-polymerasa**, která katalyzuje napojování nukleotidů, **neumí iniciovat syntézu zcela nových řetězců** („neumí nasednout na rozpletenou DNA a začít přidávat nukleotidy“). Pro svou funkci potřebuje **primer**, který obsahuje **volný 3'-konec**.

Tento primer vytvoří enzym **RNA-polymerasa (primasa)**. Nasedne na rozpletené vlákno DNA a nesyntetizuje cca 10-20 párů bází dlouhý řetězec RNA (**primer**). Syntetizuje ve směru 5'→3', vytvořený primer je komplementární k původní DNA<sup>4</sup>.



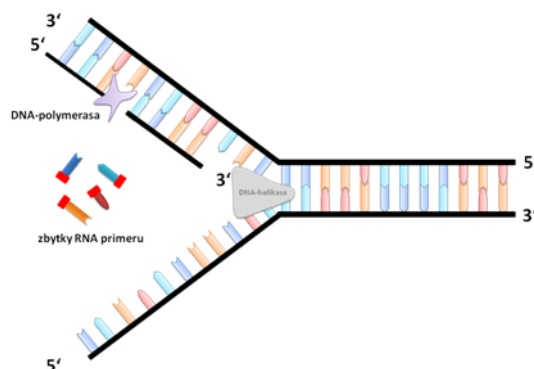
## C) Nástup DNA-polymerasy

Vzniklý primer RNA obsahuje **volný 3'-konec**. Jakmile je dostatečně dlouhý, RNA-polymerasa se od DNA odpojí a na její místo nasedá **DNA-polymerasa**, která syntetizuje komplementární vlákno DNA.



## D) Odbourání primeru

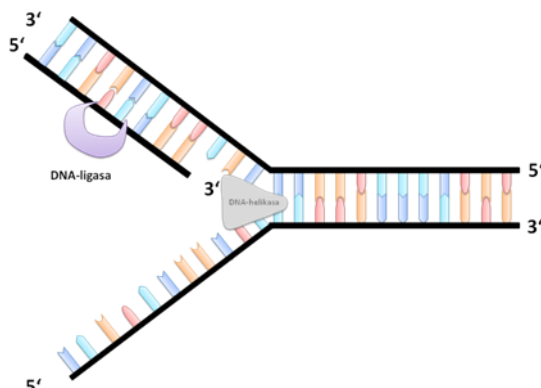
Jakmile je syntetizované vlákno DNA dostatečně dlouhé, **dojde k odbourání primeru pomocí exonukleasy** a volné místo je zaplněno pomocí **DNA-polymerasy**.



<sup>4</sup> Jelikož nyní máme v jednom řetězci i DNA i RNA, mluvíme o tzv. **DNA-RNA hybridu**.

### E) Spojení jednotlivých úseku pomocí DNA-ligasy

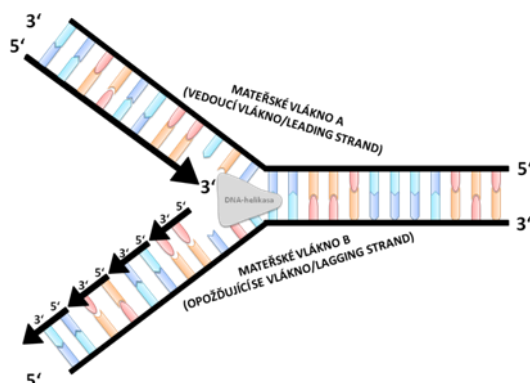
DNA-polymerasa umí napojovat jednotlivé nukleotidy, ale není schopna spojit k sobě dvě části již existující DNA. Tuto úlohu má enzym **DNA-ligasa**.



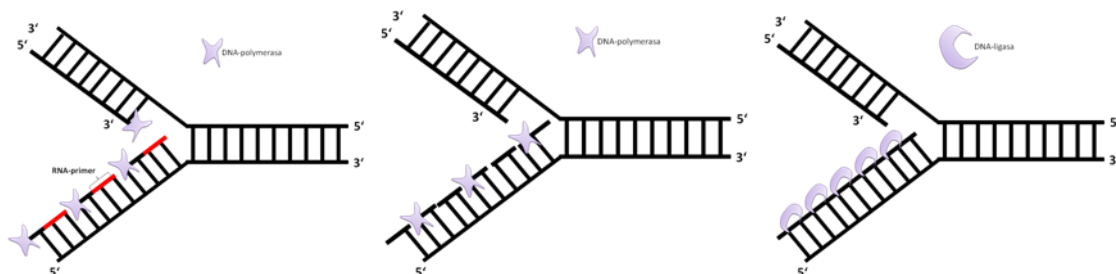
### Okazakiho fragmenty

Syntéza DNA je semikonzervativní, probíhá tedy podél obou řetězců zároveň. Výše popisovaný postup je „bezproblémový“ pouze u **mateřského řetězce, který se syntetizuje od svého 3' konce (nový řetězec tedy vzniká ve směru 5'→3')**; tento mateřský řetězec označujeme jako **vedoucí vlákno (leading strand)** a jeho syntéza je **kontinuální**.

Drobné „problémy“ nastávají v okamžiku, kdy se začne replikovat i druhý řetězec – orientace mateřského vlákna je 5'→3' a nový řetězec by se měl syntetizovat ve směru 3'→5', což není možné, protože reaktivní –OH skupina se nachází na 3'konci. Syntéza na tomto mateřském vlákne, které označujeme jako **opožďující se vlákno** (též **otálející** nebo **laggings strand**), probíhá **diskontinuálně** po menších úsecích zvaných jako Okazakiho fragmenty.



Vznik každého Okazakiho fragmentu probíhá způsobem popsáním v bodech B-E. Nejprve vznikne krátký primer RNA, na ten se napojí nová DNA, primer je odbourán, nahrazen novou DNA a jednotlivé úseky DNA jsou spojeny DNA ligasou.

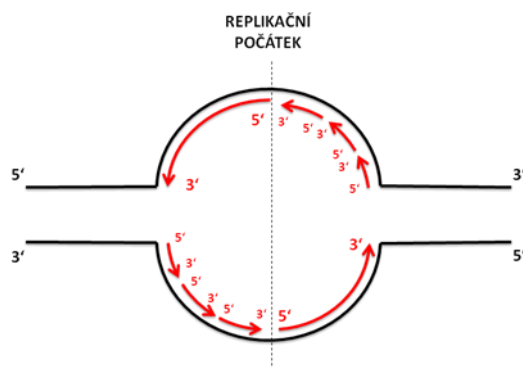


Nyní již známe obecný průběh replikace DNA. Existují však jisté rozdíly v replikaci DNA mezi eukaryonty a prokaryonty, a ve skutečnosti nevzniká pouze „replikační vidlice“ ale „replikační bublina“. O těchto věcech si povíme nyní.

## Rozdíly mezi eukaryonty a prokaryonty

### 1) Rozdíly v iniciaci

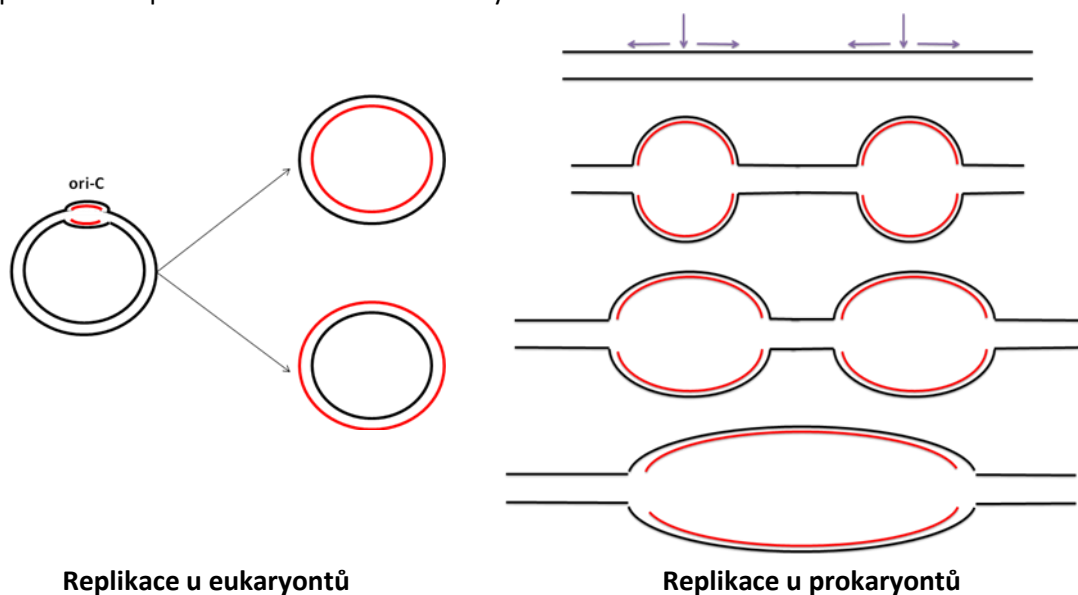
U eukaryontů o prokaryontů dochází ke vzniku **replikačního počátku**, od něj se syntéza nové DNA šíří v obou směrech – tzn. vznikají **dvě replikační vidlice** (=tvoří „replikační bublinu“ nazývanou **replikon**).



U prokaryontů je **jediný replikační počátek, nazývaný ori-C**. Replikace v něm začne a rozbíhá se na oba konce kružnicové molekuly DNA. Jedná se o rychlý proces, který je dokončen zhruba za 40 minut a **je možné, aby začala nová replikace ještě v okamžiku, kdy stará nebyla dokončena**.

U eukaryontů je **replikace složitější**. Jejich chromozomy nejsou tvořeny jedinou kruhovou molekulou, ale dlouhými molekulami DNA, které nemohou být replikovány kontinuálně. Na jedné molekule DNA se tak **vytváří asi 30 000 replikačních počátku**, přičemž celý proces je **prostorově i časově precizně řízen** (např. ne na všech počátcích musí replikace začít ve stejnou dobu). Rychlost replikace je navíc menší (i proto máme více počátků – chceme DNA replikovat rychle).

Replikace DNA probíhá v S-fázi buněčného cyklu.



*Poznámka: Fialové šipky naznačují počátek a směr replikace.*



## 2) Rozdíly v DNA-polymerasách

Enzym DNA-polymerasa je esenciální pro replikaci DNA. U prokaryontů nacházíme její tři typy, u eukaryontů je známo 9 typů. Pro přehlednost je uvedeme v tabulce.

**Tabulka 1 - DNA-polymerasy u prokaryontů**

Polymerasa	Funkce	Exonukleasová aktivita
DNA polymerasa I	odstranění RNA primerů, vyplnění místa po RNA, opravy DNA	5'→3' 3'→5'
DNA polymerasa II	opravy dna	3'→5'
DNA polymerasa III	replikace	3'→5'

*Poznámka: exonukleasová aktivita souvisí se schopností daného typu enzymu opravovat chyby při replikaci – zjistí-li DNA-polymerasa, která má exonukleasovou aktivitu, že byl do nového řetězce zařazen špatný nukleotid, vyštěpí tento nukleotid a nahradí jej správným nukleotidem.*

*Má-li enzym exonukleasovou aktivitu 5'→3', může vyštěpit nukleotid ve směru ve kterém probíhá replikace (tedy rovnou opravit nově vzniklou molekulu).*

*Exonukleasová aktivita 3'→5' se označuje jako **proof-reading** a slouží ke kontrole pořadí nukleotidů.*

**Tabulka 2 - DNA-polymerasy u eukaryontů**

Polymerasa	Funkce	Exonukleasová aktivita
DNA polymerasa $\alpha$	replikace DNA opravy DNA	žádná
DNA polymerasa $\beta$	opravy DNA	žádná
DNA polymerasa $\gamma$	replikace DNA v mitochondriích	3'→5'
DNA polymerasa $\delta$	replikace DNA opravy DNA	3'→5'
DNA polymerasa $\epsilon$	replikace	3'→5'

V eukaryontním jádře jsou neaktivnějšími polymerasami **DNA-polymerasa  $\alpha$**  a  **$\delta$** , v mitochondriích se uplatňuje **DNA-polymerasa  $\gamma$** .

## 3) Rozdíl v délce Okazakiho fragmentů

U prokaryontů mají Okazakiho fragmenty délku **1000 – 2000 bází**.

U eukaryontů mají Okazakiho fragmenty délku cca **200 bází**.

Lze tedy říci, že prokaryonti mají delší Okazakiho fragmenty a mají jich tudíž méně, eukaryonti mají kratší Okazakiho fragmenty a mají jich tudíž více.

## Přehled enzymů účastnících se replikace DNA

Nyní již víme, jak funguje většina enzymů replikace DNA a jaký je rozdíl mezi replikací eukaryontů a prokaryontů. V tabulce na následující stránce je uveden přehled funkce jednotlivých enzymů, které se replikace účastní, přičemž podrobněji bude o funkci některých z nich pojednáno dále.

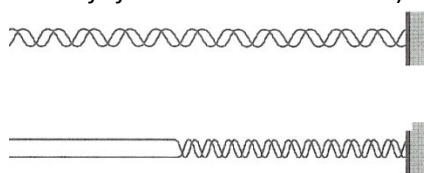
Tabulka 3 - Enzymy podílející se na replikaci DNA

Enzym	Funkce
DNA-helikasa	rozplétá dvoušroubovici
DNA-polymerasa	připojování nukleotidů, opravy DNA
RNA-polymerasa	tvorba primerů
RNA-sy (enzymy odstraňující primer)	hydrolyzují RNA z DNA-RNA hybridů
DNA-ligasa	spojování jednotlivých fragmentů DNA
SSB-proteiny	zabraňují reasociaci vláken DNA
topoisomerasy	uvolňují pnutí vyvolané superstáčením
telomerasy	upravují 3' konce templátových řetězců
sliding clamp (klouzavá svorka)	udržuje DNA polymerasu ve vazbě na DNA

### Topoisomerasy

Název odvozen od „topologie DNA“, tedy od „trojrozměrné struktury DNA“.

Při rozplétání dvojité šroubovice dochází **často k superstáčení** (představme si, že máme smotána dvě lana, uprostřed je chytíme a chceme je rozmotat – jak je od sebe postupně uvolňujeme, smyčky na okrajích jsou stále menší a je jich více na menší délce).



U DNA může být superstáčení:

- **pozitivní** (ve stejném směru jako točení helixu, tedy **doleva**)
- **negativní** (v opačném směru než je točení helixu, tedy **doprava**)

Topoisomerasy mají za úkol superstáčení odstranit. Existují jejich dva typy, každý typ užívá jiný způsob:

#### a) Topoisomerasa I

Je schopná **reversibilně přerušit fosfodiesterovou vazbu v jednořetězci**. Tím umožní otáčení kolem jednoho řetězce a dojde u uvolnění superstočení. Následně katalyzuje zpětné spojení rozštěpení vazby.

**Nevyžaduje ATP** a nacházíme ji u prokaryontů i eukaryontů.

#### b) Topoisomerasa II

Umí **odstranit pnutí**, ale **dokáže jej i vytvořit**. Pracuje tak, že **rozštěpí fosfodiesterovou vazbu na obou řetězcích**, které se tak mohou několikrát „odtočit“ a odstranit tak superstočení.

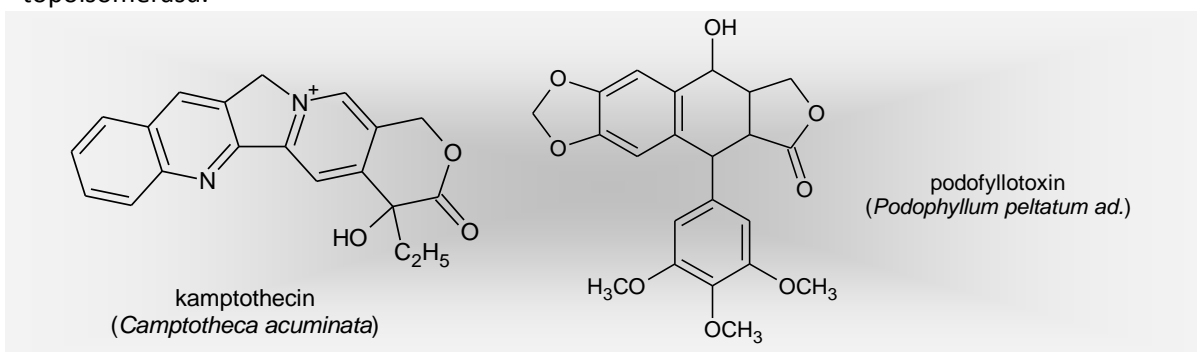
**Pro následné spojení řetězců vyžaduje ATP.**

**Nacházíme ji u prokaryontů** (akorát se jmenuje **DNA-gyrasa**) i u **eukaryontů**, existují jisté rozdíly ve specifitě.

**Inhibitory lidské topoisomerasy** zabraňují replikaci a užívají se proto jako **protinádorová léčiva**. Např. **kamptothecin** (rostlinný produkt), **antracykliny** (př. **daunorubicin**; bakteriální produkty), **podofylotoxiny** (rostlinné produkty).

Jelikož se topoisomerasy nacházejí i u bakterií (prokaryontů) a jelikož mají jinou specifitu je možné inhibovat pouze jejich činnost. **Antibakteriální léky** na bázi **chinolinů (norfloxacin)**

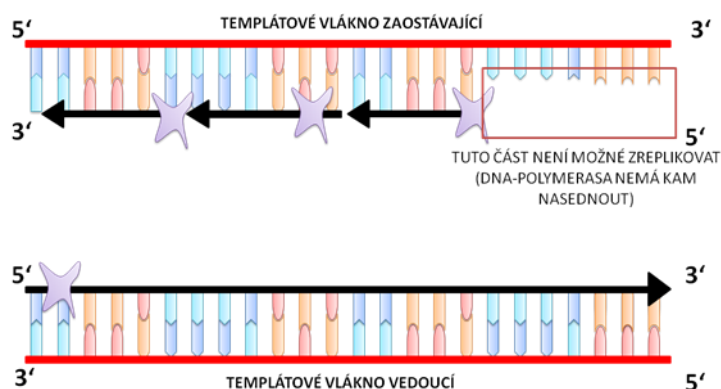
zabraňují dělení bakterií právě tím, že inhibuje DNA-gyrasu a nepůsobí na lidskou topoisomerasu.



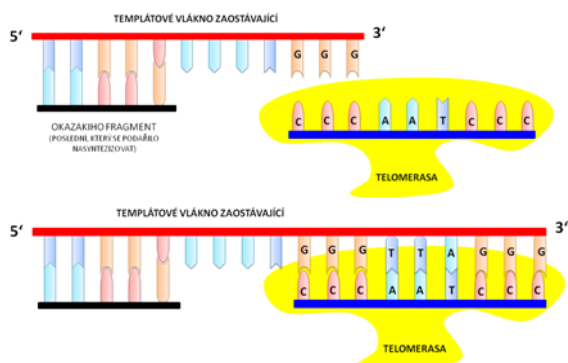
### Telomerasa

Na 3'-konci DNA se nachází zvláštní sekvence DNA – jedná se o **tandemy druhově specifických oligonukleotidů bohatých na G** (u člověka konkrétně TTAGGG, opakováno až 1000x). Jejich funkce je **ochranná** (brání DNA před působením enzymů a umožňují replikaci) a nesou název **telomery**.

Při syntéze opoždujícího se řetězce vyžaduje replikační aparát přítomnost určité délky templátové DNA za sekvenci, která je kopírována – kdyby neexistovaly telomery, zastavila by se syntéza DNA před koncem templátu.

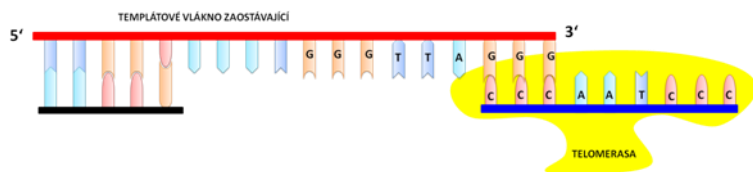


**Enzym telomerasa** dokončí syntézu DNA tím, že dosyntetizuje telomery na templátové vlákno. Jedná se o **enzym ze skupiny reverzních transkriptáz**, který ve své **molekule obsahuje RNA** (tedy i RNA může působit jako enzym!). RNA se napojuje na konec templátové DNA a dle své sekvence dosyntetizuje telomery.



Telomerasa se napojuje na sekvenci GGG nacházející se na konci templátového řetězce.

Telomerasa dosyntetizuje část DNA. Všimněme si, že na konci je opět sekvence GGG.



Celý proces se opakuje dokud není telomera dost dlouhá.

Telomery (a telomerasa) tedy **zabraňují ztrátě genetické informace**, ke které by mohlo při syntéze dojít.

Kromě toho mají telomery význam pro **ochranu DNA** – brání ji před účinkem **DNA-nukleáz**. Můžeme si představit, že tvoří jakousi značku, která říká DNA-nukleázám „toto je naše DNA, neštěpit.“

V poslední době se provádí řada výzkumů, které se zabývají tím, **jak délka telomer koreluje se stářím a replikační kapacitou buňky**:

- buňky získané od mladých jedinců mají delší telomery a podléhají většímu počtu dělení
- některé somatické buňky neobsahují telomerasu – jejich telomery se postupně (při každém dělení) zkracují a jakmile jsou moc krátké, buňka se již dále nemůže dělit
- u starších jedinců je nižší aktivita telomerasy – její aktivita teda pravděpodobně souvisí se stářím organismu
- buňky, které se často dělí (kmenové buňky, zárodečné buňky, *nádorové* buňky) mají vysokou hladinu telomerasy

Telomerasa se tedy studuje nejen kvůli jejímu možnému vlivu na stárnutí, ale i kvůli možnosti **využití v protinádorové terapii** (její inhibitory by mohly zabránit nádorovému bujení).

### Poškození a opravy DNA

Během **jediného dne** vznikají **desetitisíce až miliony** poškození DNA **v jediné buňce**. U dospělého člověka, jehož organismus se skládá cca z  $10^{12}$  buněk, se jedná o  $10^{16}$ – $10^{18}$  chyb, které je potřeba opravit!

Chyby vznikají při replikaci, transkripci i jindy (např. vlivem vnějších faktorů). Příklady poškození, které mohou nastat, uvádí následující tabulka:

**Tabulka 4 - Poškození DNA**

Typ poškození	Příčina
chybějí báze	depurinace (za den až $10^4$ purinů)
změněná báze	ionizační záření, alkylační činidla
nepřesná báze	spontánní deaminace
delece-inzerce	interkalační činidla (akridiny)
formace dimerů	UV záření
zlomy řetězců	ionizační záření, chemikálie (bleomycin)
meziřetězcové vazby	chemické látky (deriváty psoralenu, mitomycin c)
tvorba tautomerů	spontánní a dočasná

Většina buněk má schopnost rozeznat a vystříhnout poškozenou oblast DNA – pro tyto činnosti existují **specifické glykosylasy, exonukleasy a endonukleasy**. Následně pak umí buňky nasyntetizovat opravenou formu pomocí např. **DNA-polymerasy  $\beta$** . Nově opravené úseky jsou následně pospojovány s původními řetězci pomocí **DNA-ligasy**.

Pro opravy různých chyb existují různé postupy:

- **přímá oprava zvratem** (možné jen u bakterií)
- **vystřížení porušené báze** („base excision repair“)

- **vystřížení postiženého nukleotidu** („nucleotide excision repair“)
- **oprava chybného párování** („mismatch repair“)
- **opravy dvojitých zlomů** (homologní rekombinace, nehomoloví spájení konců)
- **prevence inkorporace porušného nukleotidu do DNA (3'→5' proofreading)**

### 11.3 Transkripce DNA (= syntéza RNA)

**Transkripce** (česky *přepis*) je proces tvorby RNA podle matrice DNA.

**Vždy dochází k přepisování jen jednoho řetězce**, který nazýváme **templátový**. Druhý řetězec, který se nepoužívá pro přepis, se označuje jako **kódující**, neboť sekvence jeho bází přesně odpovídá sekvencím bází v **transkriptu** (pouze místo uracilu je thymin).

Př.	5'	GGATC	3'	<b>kódující řetězec DNA</b>
	3'	CCTAG	5'	<b>templátový řetězec DNA</b>
	5'	GGAUC	3'	<b>transkript RNA</b>

Syntéza RNA probíhá stejně **jako replikace ve směru 5'→3'**, jako **templátový řetězec** tedy bude sloužit řetězec s orientací 3'→5'.

Rozdíly mezi replikací a transkripcí uvádí následující tabulka:

**Tabulka 5 - Replikace x transkripce**

	<b>Replikace</b>	<b>Transkripce</b>
<b>Enzymy</b>	DNA-polymerasy	RNA-polymerasy
<b>Kde probíhá</b>	na chromozomech v S-fázi	na vybraném segmentu DNA
<b>Zahájení</b>	vyžaduje primer RNA	nevyžaduje primer
<b>Průběh</b>	kopírována obě vlákna	přepisováno jedno vlákno
<b>Kontrola</b>	proof-reading (DNA-polymerasa zkontroluje, zda správně zařadila nukleotid)	RNA-polymerasa nemá zpětnou vazbu správného zařazení nukleotidu
<b>Nukleotidy</b>	dATP, dGTP, dCTP, dTTP	ATP, GTP, UTP, CTP

### RNA-polymerasa

RNA-polymerasa je enzym zodpovědný za transkripci.

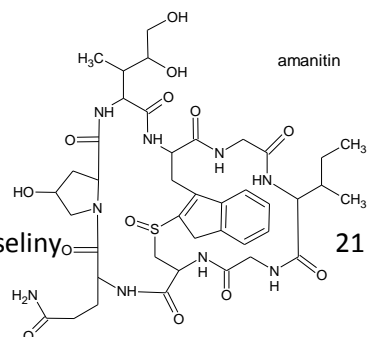
Celý název zní DNA dependentní-RNA-polymerasa, někdy je též označována jako **transkriptasa**.

U prokaryontů se vyskytuje **jediný typ RNA-polymerasy**, která je tvořena **5 podjednotkami** a tzv. **sigma-faktorem**. Tato RNA-polymerasa se podílí na vzniku všech typů RNA.

U eukaryontů jsou známy **4 různé typy RNA-polymerasy**. Mají stejný mechanismus účinku, avšak rozlišují různé promotory (tzn. ví, kam mají na DNA nasednout, aby přepsaly tu její část, kterou mají).

**Tabulka 6 - Eukaryontní RNA-polymerasy**

<b>Typ polymerasy</b>	<b>Transkript (a kde)</b>
<b>RNA-polymerasa I</b>	syntéza <b>rRNA</b> (jadérko)
<b>RNA-polymerasa II</b>	syntéza <b>mRNA</b> (jádru)
<b>RNA-polymerasa III</b>	syntéza <b>tRNA</b> a <b>5S RNA</b> (jádru)
<b>RNA-polymerasa IV</b>	syntéza mitochondriální RNA (mitochondrie)



Inhibitorem eukaryotních typů RNA-polymerasy je látka **amanitin**. Jedná se o přírodní látku, která se nachází např. v muchomůrce. Jedná se o jed.

## Průběh transkripce

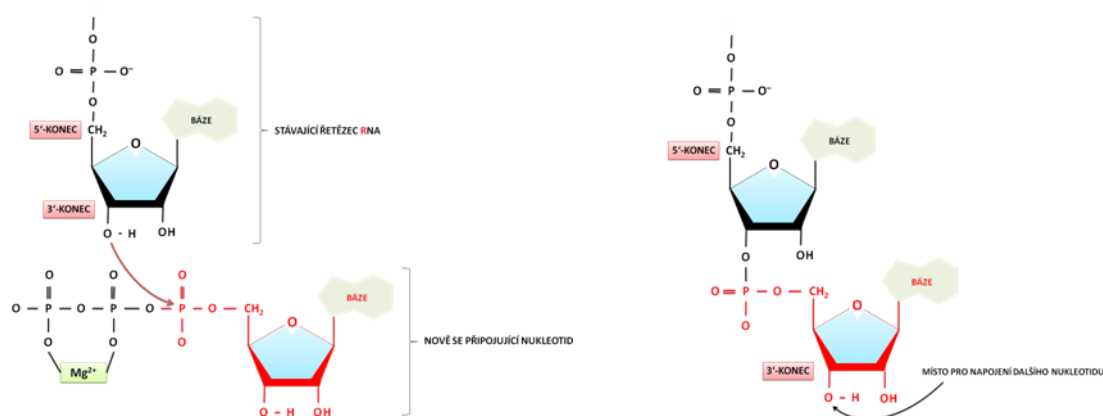
Stejně jako u replikace, můžeme rozlišit tři fáze:

- iniciaci
- elongaci
- terminaci

Pro úspěšný průběh transkripce potřebujeme:

- nukleotidy (ATP, GTP, CTP a UTP)
- $Mg^{2+}$
- **templátové vlákno DNA**
- řadu enzymů (viz dále)

Hlavní enzym, který provádí transkripci je **RNA-polymerasa**. **Nové vlákno syntetizuje ve směru 5' → 3'** (stejně jako DNA-polymerasa). Postupně dochází k vytváření **fosfodiesterových vazeb** mezi jednotlivými nukleotidy, **energii** k tomuto procesu dodává štěpení těchto nukleotidů.



Než se podíváme na vlastní průběh transkripce, uděláme si pořádek v terminologii:

- **promotor**  
Oblast DNA dlouhá asi 40 nukleotidů nacházející se před místem startu od 5' konce (předchází tedy přepisované sekvenci)
- **transkripční jednotka**  
Oblast od promotoru k terminační oblasti.
- **boxy (elementy)**  
Malé sekvence DNA obsažené v oblasti promotoru.
- **cis-působící sekvence**  
Sekvence ležící v blízkosti genu na molekule DNA, která je přepisována.
- **trans-působící faktory**  
Proteinové faktory vážící se na DNA (geny, které řídí jejich syntézu, se nacházejí na jiných chromozomech)
- **primární transkript**  
RNA produkt nesyntetizovaný ve směru 5' → 3' (tedy RNA se všemi introny a exony, nikterak neseštrihaná)

## Rozpoznání templátu a zahájení transkripce

Na začátku replikace musí RNA-polymerasa (*dále RNAP*) najít místo, kde transkripce začne. **Tímto místem je promotor**, kde RNAP vytvoří *stabilní komplex s templářovou DNA*.

V místě promotoru najdeme tzv. **konvenční sekvence**, což jsou **sekvence DNA, které najdeme v oblasti promotoru u velkého množství genů**. Označujeme je jako **boxy** a jsou poněkud odlišné u prokaryotů a eukaryotů:

### A) U prokaryotů nalézáme:

- v pozici cca -10 tzv. **Pribnowův box TATAAT**
- v pozici cca -35 sekvenci **TTGACA**

Tyto sekvence umí rozpoznat  **$\sigma$ -faktor prokaryotické RNAP**.

### B) U eukaryotů nalézáme:

- v oblasti promotoru:
  - **TATA box** (pravděpodobně určuje **místo startu**, na které se váží **bazální transkripční faktory**)
  - **CAAT box** } Nacházejí se v pozici – 100 až – 200. Pravděpodobně určují **frekvenci**
  - **GC box** } **startu**. Označujeme je jako **promotorové proximální sekvence**.
- ve vzdálenějších oblastech od místa startu:
  - **specifické regulační sekvence** (též nazývané enhancery a silencery; váží se na ně **specifické transkripční faktory**)

Jak vidíme, je u **eukaryotů situace poněkud složitější**.

Na boxy v promotoru se váže nejprve řada **bazálních transkripčních faktorů**, některé transkripční faktory (**specifické**) se váží mimo ně do tzv. specifických regulačních sekvencí (enhancery, silencery). RNAP je před vlastní transkripcí spojena s bazálními faktory.

Dokud nejsou všechny faktory na svém místě, nemůže transkripce začít!

### Bazální<sup>5</sup> transkripční faktory (eukaryotů)

Před začátkem transkripce se tyto proteiny váží na RNAP a současně jsou již asociovány s promotorovými sekvencemi. Pokud nejsou na promotor navázány, nepozná RNAP<sup>6</sup> místo startu.

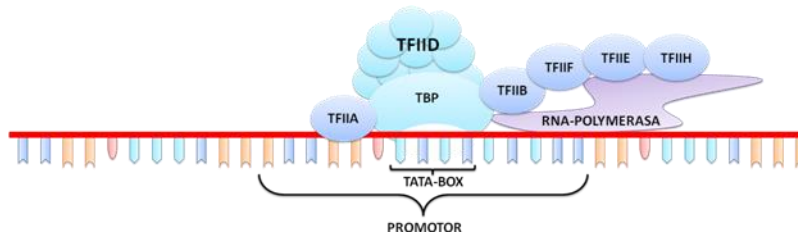
Nejprve se na DNA do oblasti TATA boxu navazuje **TFIID** [*čti té-ef-dva-dé*], což je největší bazální transkripční faktor, který se skládá z 11 podjednotek (jednou z nich je jednotka **TBP – TATA-box binding protein** – která se váže jako první na zmíněný TATA-box, ostatní jednotky se váží na ni).

Po napojení TFIID se napojují další transkripční faktory (TFIIA, TFIIB, TFIIF, TFIIIE, TFIIF)

<sup>5</sup> *Bazální* znamená, že jsou potřebné pro transkripci všech genů.

<sup>6</sup> Nyní se budeme bavit o transkripci kterou katalyzuje RNA-polymerasa II. Proto všechny transkripční faktory (TF) ponesou v názvu i číslo II.



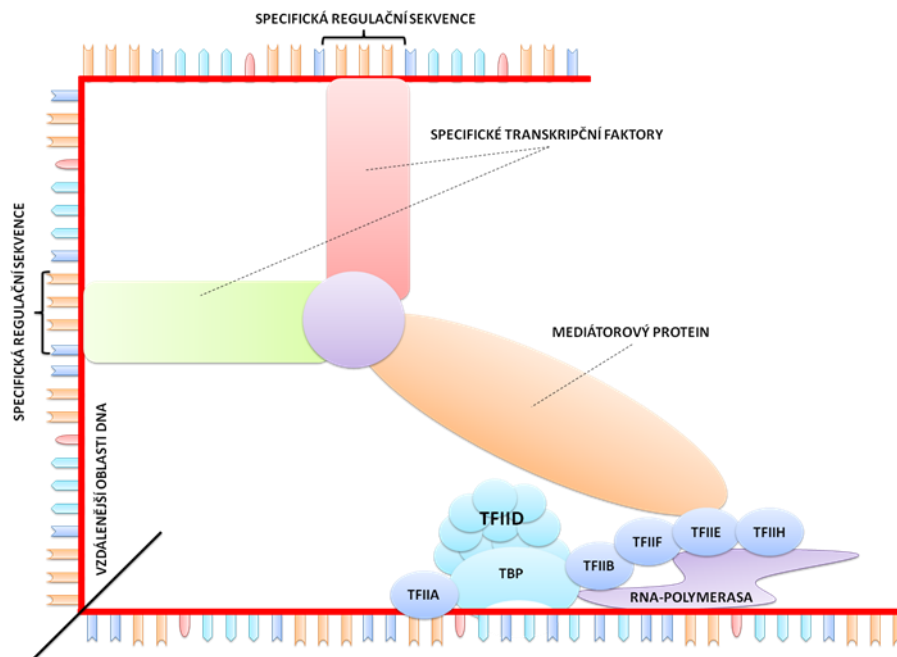


### Specifické regulační proteiny a specifické regulační sekvence

Kromě bazálních transkripčních faktorů existují i **specifické transkripční faktory**. Jedná se rovněž o proteiny, které se však vážou **mimo oblast promotoru**, velmi často do poměrně vzdálených sekvencí DNA.

Specifické regulační faktory působí jako **aktivátory** nebo **represory transkripce** příslušného genu. Po napojení na příslušnou sekvenci DNA se **na ně napojí mediátorový protein** (dříve označován jako koaktivátor nebo korepresor), který je již v **kontaktu s bazálními transkripčními faktory** a může tak transkripci ovlivnit.

Typické geny obsahují na DNA celou řadu **specifických regulačních sekvencí**, kam se tyto **specifické regulační faktory** vážou. Tyto *sekvence* se ve starší literatuře označovaly jako **enhancery**, **silencery** či jako **HRE** (*hormon response element*). Mohou se nacházet „upstream“ nebo „downstream“ od místa počátku transkripce a jak již bylo zmíněno – mohou se nacházet poblíž promotoru, ale i ve velmi vzdálených oblastech.



*Poznámka:*

*Protože se v současnosti využívají jak slova ze staré, tak z nové terminologie, uvádí následující tabulka hlavní rozdíly mezi nimi:*

<b>Terminologie</b>	<b>Pojmy</b>		
<b>Stará</b>	<i>enhancer, silencer, HRE</i>	<i>aktivátor, represor</i>	<i>korepresor, koaktivátor</i>
<b>Nová</b>	<b>regulační sekvence DNA</b>	<b>specifický transkripční faktor (aktivátor, represor)</b>	<b>mediátorový protein</b>

Příčemž:

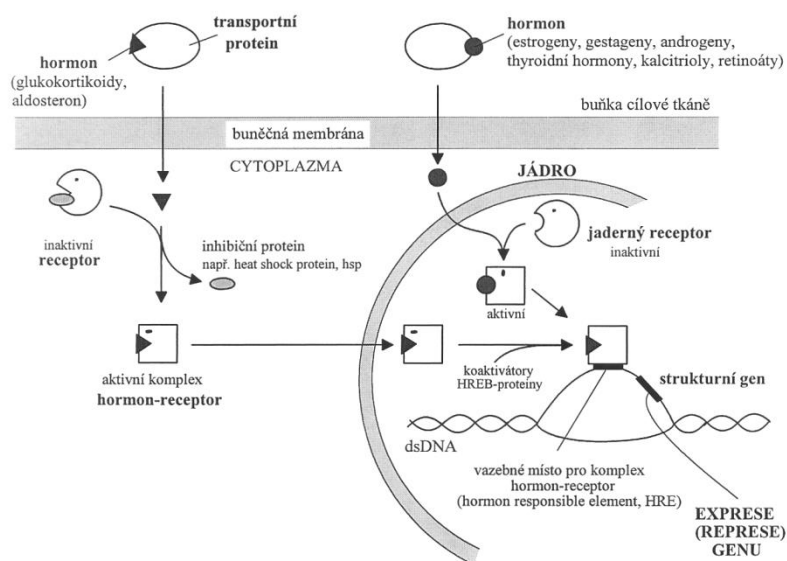
- enhancery: regulační sekvence v DNA, které vážou aktivátory, na které se vážou koaktivátory
- silencery: regulační sekvence v DNA, které vážou represory, na které se vážou korepresory
- HRE: regulační sekvence v DNA, na které se vážou „hormony spojené s intracelulárním receptorem“

**Jako specifické transkripční faktory** mohou sloužit **jaderné receptory proteinů** (jak bylo zmíněno u definice HRE).

Tyto jaderné receptory se nacházejí ve své **neaktivní formě** buď v **jádře**, nebo v **cytoplasmě**, přičemž v neaktivní formě jsou často udržovány pomocí inhibičního proteinu (často tzv. *heat shock proteinu*). Po té, co hormon pronikne do buňky, naváže se specificky na svůj jaderný receptor (vzniká komplex hormon-receptor), čímž dojde ke změně konformace a oddělení inhibičního proteinu. Vznikl-li komplex hormon-receptor v cytoplasmě, je následně translokován do jádra.

V jádře komplex hormon-receptor funguje jako specifický transkripční faktor a váže se na DNA v místě specifické regulační sekvence (=HRE). Na komplex se může samozřejmě navázat i mediátorový protein (koaktivátor/korepresor), díky kterému se komplex dostává do kontaktu s bazálními transkripčními faktory.

Tímto způsobem hormony „vypínají“ nebo „zapínají“ transkripci genů.



Všechny jaderné receptory tvoří **rodinu vzdáleně příbuzných regulačních proteinů**, které jsou zodpovědné za modulaci genové exprese. Existuje jich celá řada typů, na některé z nich se nyní podrobněji podíváme:

### Glukokortikoidový receptor (GR)

Nachází se v cytoplasmě. Po navázání **kortisolu** se změní jeho konformace a na povrchu se vystaví signál pro směřování do jádra. Receptor s hormonem se translokuje do jádra, tam se naváže na glukokortikoid-HRE (GRE) v regulační oblasti genu. Na aktivátorovou oblast receptoru (tzv. transaktivační doména) se váže mediátorový protein a tím vyvolá transkripci příslušných genů a inhibici genů jiných.

Tento receptor je exprimován prakticky ve všech tkáních a genů, které jsou pomocí GR řízeny, je mnoho (některé jsou regulovány pozitivně, jiné negativně). Transkripční aktivita GR závisí i na:

- přítomnosti mediátorových proteinů (koaktivátorů/korepresorů)
- na fosforylaci pomocí kináz
- na rychlosti odbourávání receptoru v komplexu ubikvitin-proteazom

### Receptor thyroïdních hormonů

Tento receptor vytváří dimery s receptorem následujícím (retinoidním). Vzniklé dimery se vážou k thyroïdnímu HRE a ke korepresoru, čímž inhibují transkripci příslušného genu.

**Navázání thyroïdního hormonu** vyvolá konformační změnu v HRE a v korepresoru a dojde k **iniciaci transkripce**.

### Retinoidní receptor (RXR)

Retinoidní receptor RXR tvoří dimer s již zmíněnými receptory thyroïdních hormonů, ale i s dalšími asi 8 jadernými receptory. Každý dimer má jinou vazebnou specifitu k DNA.

RXR (váže na sebe cis-retinovou kyselinu) se podílí na regulaci exprese **řady genů**.

Nyní již víme, že existují bazální a specifické transkripční faktory, a že roli specifických transkripčních faktorů mohou hrát i jaderné receptory pro hormony. Všechny uvedené faktory mají něco společného – jedná se o **bílkoviny, které jsou schopné se vázat na DNA**. Tuto vazbu na DNA jim umožňují určité **strukturní motivy**, které se objevují u většiny z nich:

- helix-smyčka-helix
- helix-otočka-helix
- zinkový prst
- leucinový zip
- ...

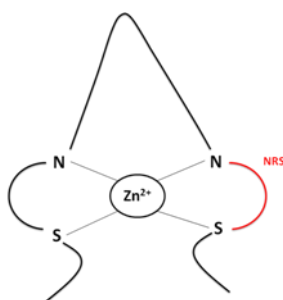
Transkripční faktory jsou poměrně **velké** molekuly, avšak za kontakt s DNA je zodpovědná jen malá část molekuly, reprezentovaná některým výše uvedeným strukturním motivem (nejčastěji kontakt zprostředkovává  **$\alpha$ -helix**). **Zbytek molekuly**, který se neúčastní vazby na DNA, **má za úkol udržovat správnou konformaci vazebného místa**.

K napojení na DNA dochází nejčastěji v oblasti **velkého žlábků (major groove)**.

### Př. Zinkový prst

Zinkový prst se nachází v doménách receptorů pro steroidní hormony. Zinek je ve formě  $Zn^{2+}$  nelatován ve čtyřech pozicích buď **histidinem**, nebo **cysteinem** a je **zodpovědný za udržování terciární struktury domény**.

V okolí  $Zn^{2+}$  se nachází oblast NRS (*nucleotide response signal*), což je  $\alpha$ -helix obsahující sekvenci aminokyselin, která slouží k rozpoznání specifické regulační sekvence v DNA (a tento  $\alpha$ -helix se do DNA následně zanořuje).



### Závěr k části „Rozpoznání templátu a zahájení transkripce“:

Transkripce je zahájena až po té, co jsou navázány všechny transkripční faktory. RNA polymerasa je napojena jak na ně, tak na DNA. DNA se začne rozvíjet a RNAP je sunuta k místu startu, čímž je zahájena transkripce. **Po zahájení se většina transkripčních faktorů oddělí.**

### Elongace

**RNAP** byla v předchozím kroku napojena, nyní se suně po DNA a vytváří k ní komplementární vlákno RNA. Oproti DNA-polymerase **nevyžaduje RNAP primer** a oproti DNA-polymerase má **RNAP rozplétá aktivitu** (rozplétá si DNA).

Stejně jako u replikace i při transkripci dochází k superstáčení, které je povolováno účinkem topoisomeras.

V průběhu elongace by mohlo dojít k tomu, že by některé enzymy (5' exonukleasy) nově syntetizovanou RNA mohly považovat za nepřátelskou a začaly by ji odbourávat. Proto se na 5' konci objevuje **guaninová „čapka“** (vytvoří se fosfoanhydridová vazba mezi 5' koncem RNA a **methylovaným guaninem** a navíc dojde k **metylaci předpoledního nukleotidu**). Na takto vytvořenou čapku nasedají proteiny, které RNA chrání a pomáhají s přesunem přes jaderné póly do cytoplazmy. Tento proces se označuje jako **capping**.

### Terminace

Terminace ukončuje proces elongace. RNA polymerasa při svém sunutí po DNA narazí na **terminační signál** a transkripci přeruší.

U prokaryontů rozlišujeme dva druhy terminace:

- závislou na ρ-faktoru
- nezávislou na ρ-faktoru

U eukaryontů není proces terminace zatím podrobně prozkoumán.

Během replikace dělá RNA-polymerasa jednu chybu na  $10^4$  nukleotidů, protože nemá **proofreading** aktivitu. Chybění této aktivity odráží skutečnost, že transkripce nemusí být tak přesná jako replikace DNA, jelikož RNA **není používána jako trvalá zásobní forma genetické informace**.

## 11.4 Úprava primárních transkriptů

Při transkripci vzniká tzv. **primární transkript**, který je přesnou kopií transkripční jednotky.

Primární transkripty tRNA a rRNA u prokaryontů i eukaryontů jsou **posttranskripčně modifikovány pomocí ribonukleas**.

Avšak primární transkripty pro mRNA:

- jsou u prokaryontů téměř stejné s výslednou mRNA a již primární transkript (který ani není dosyntetizovaný) může sloužit k translaci

- jsou u eukaryontů **rozsáhle posttranskripčně modifikovány**, k některým modifikacím dochází již během transkripce (např. capping)

### Úprava eukaryontní mRNA

Primárním transkriptem vedoucím k mRNA je **hnRNA**. Jedná se o **přepis strukturního genu**, ve kterém se nacházejí **kódující sekvence (exony)**<sup>7</sup>, jež jsou střídány **sekvencemi nekódujícími (introny)**. Nekódující sekvence musí být odstraněny!



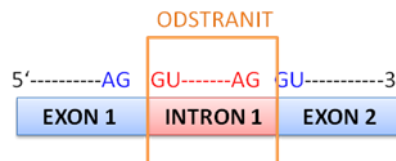
V jádře dochází k následujícím úpravám hnRNA:

- **capping** (viz výše)
- **sestřih** (splicing; viz dále)
- **polyadenylace** (na 3' konec vytvořené RNA se připojí polyA-část, která chrání RNA před účinkem 3' exonukleas)

### Sestřih hnRNA (splicing)

Sestřihu se účastní jaderné enzymové komplexy zvané **splicesomy**. Ty obsahují ve své molekule pět malých RNA (U1, U2, U4, U5, U6), které jsou asociovány s proteiny a tvoří **snRNPs** (*small nuclear ribonucleoprotein particles*).

snRNPs rozpoznávají sekvenci **AGGU**, která určuje hranici mezi exonem a intronem:

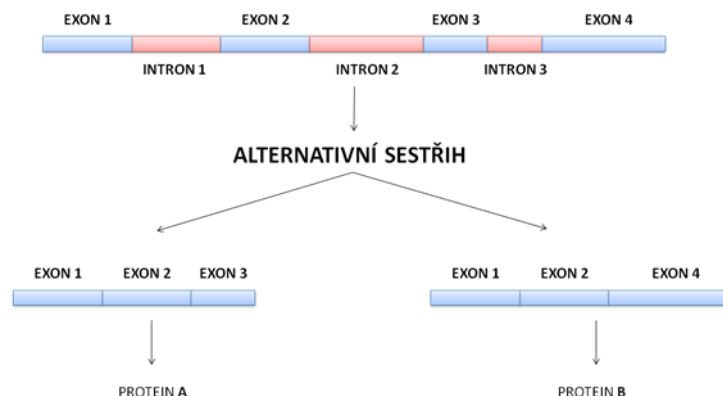


Přesnému mechanismu RNA-splicing se v tomto textu věnovat nebudeme, byl probrán v podzimním semestru v Lékařské chemii.

### Alternativní sestřih

Při **typickém** sestřihu dochází k tomu, že jsou **všechny exony** z hnRNA spojeny dohromady a vzniká mRNA sloužící pro syntézu specifického proteinu.

Při **alternativním** sestřihu dochází k tomu, že **různé skupiny exonů tvoří různé mRNA** vedoucí k syntéze **různých proteinů**:



<sup>7</sup> Pro lepší zapamatování: exony se dostanou ven z jádra (ex) a mohou plnit svou funkci; introny jsou vystřiženy a zůstávají nepoužity v jádře (in).

**Poruchy sestřihu** vedou ke genetickým chorobám, např. k  **$\beta$ -thalasémii**. Jedná se o onemocnění, kdy se  $\beta$ -podjednotka hemoglobinu netvoří v dostatečném množství (dáno tím, že G je na 5' sekvenci sestřihu mutován na A, a proto je transkript sestřižen nesprávně).

### Přeskupování exonů (exon shuffling)

Přítomnost velkého množství intronů v DNA zvyšuje pravděpodobnost genetické rekombinace **mezi exony rozdílných genů**. Mnoho proteinů u současných buněk připomíná **složení** vzniklé ze společných sad kusů proteinů, které se nazývají **proteinové domény**.

Přeskupování exonů je **evoluční proces**, při němž vznikají nové geny (a tím i proteiny) spojením dříve oddělených genů, z nichž každý kódoval jinou proteinovou doménu.

### Syntéza a úprava rRNA a tRNA

Výše popsané děje se týkaly především mRNA. Nyní se ve stručnosti zaměříme na syntézu ostatních druhů RNA.

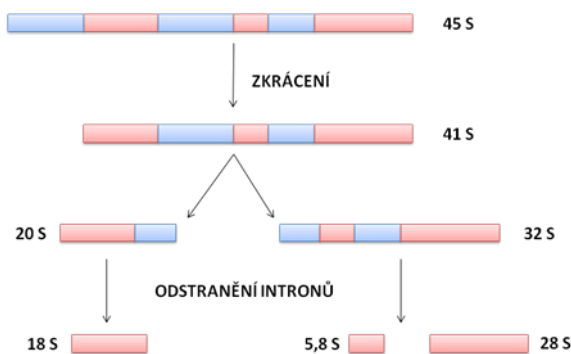
#### Eukaryontní rRNA

Je syntetizována v jadérku i mimo jadérko.

Mimo jadérko je syntetizována **5SRNA** (výše popsaným způsobem transkripce). Po své syntéze putuje do jadérka a připojuje se k ostatní RNA.

V jadérku je podle templátu DNA vytvořena **pre45S-RNA**, která se následně **komplexuje s proteiny a 5S RNA** a vytvoří **ribonukleoproteiny**. Ty jsou následně **methylovány a zkráceny na 41S RNA**, která je rozštěpena na **20S RNA** a **32S RNA**. Z těchto dvou jsou odstraněny introny a vzniká finální **18S RNA, 5,8S RNA a 28S RNA**.

Tyto jsou následně transportovány z jadérka do jádra a z jádra přes jaderné póry do cytoplazmy, kde tvoří **ribozomy**.



#### Eukaryontní tRNA

Je syntetizována v **jadře**.

Nejprve je vytvořena pre-tRNA, ze které jsou následně vystřiženy introny.

Úpravy vzniklé tRNA pak pokračují rozsáhlými modifikacemi bází. např.:

- metylací uracilu na thymin
- dehydrogenací uracilu
- vznikem pseudouridinu
- deaminací adenosinu na inosin
- ...

V závěru je na 3' konec připojena sekvence **CCA** a hotová tRNA je transportována do cytoplazmy.

## 11.5 Syntéza proteinů

Syntéza proteinů je děj, více méně navazují na syntézu mRNA. Probíhá ve všech buňkách, které mají jadernou DNA (tedy např. ne v erythrocytech), konkrétně na **ribosomech** (volných v cytoplasmě nebo vázaných na endoplazmatickém retikulu) a v **mitochondriích**.

Probíhá odlišně u prokaryont a eukaryont:

- u prokaryont probíhá transkripce, úpravy transkriptu i translace na jednom místě a dokonce souběžně
- u eukaryot probíhá translace až po té, co je primární transkript upraven do podoby zralé mRNA, která musí být dopravena do cytoplazmy z jádra (transkripce a translace jsou od sebe tedy časově i prostorově odděleny)

Pro zdárný průběh translace potřebujeme:

- aminokyseliny (pro výstavbu řetězce bílkoviny)
- řadu enzymů
- bílkovinné faktory (pomáhají průběhu syntézy)
- ATP a GTP
- anorganické ionty ( $Mg^{2+}$  a  $K^+$ )

## Genetický kód

Informace o struktuře proteinů je v DNA uchována pomocí tzv. **genetického kódu**.

DNA je složena ze čtyř bází, které vytvářejí **trojice (triplety/kodony)**, podle nichž se do bílkovinného řetězce zařazují kódované aminokyseliny, kterých je 20 (resp. 21).

Celkem existuje **64 kodonů**, z nichž 61 kóduje aminokyseliny a 3 kodony jsou tzv. **STOP-kodony (UAA, UAG, UGA)**.

Obecně o genetickém kódu můžeme říci, že má tyto vlastnosti:

- je **degenerovaný** (jedna aminokyselina může být kódována více než jedním kodonem)
- je **jednoznačný** (jeden kodon vždy specifikuje pouze jednu danou aminokyselinu)
- je **kolísavý** (třetí báze v tripletu může být často změněna; př. UUU i UUC kódují fenylalanin)
- je **téměř universální** (všechny organismy mají stejný genetický kód, až na pár výjimek; např. v lidské mitochondriální mRNA kóduje triplet UGA tryptofan místo STOP-kodonu a triplet AUA kóduje methionin místo leucinu)
- je **nepřekrývající** se (každý kodon je vždy čten jen jedenkrát)
- je **nepřerušovaný** (kodony od sebe nejsou nikterak odděleny, triplety na sebe navazují)

Sekvence bází v mRNA je (*jak bylo řečeno*) rozdělena do kodonů. Startovací kodon **zahajuje čtení úseku**. Pořadí kodonů určuje pořadí, ve kterém se do bílkovinného řetězce připojují jednotlivé AK. **Čtení je dáno čtecím rámcem** (proteosyntetický aparát se jednoznačně napojuje na triplet AUG a dále čte každý triplet tak jak následuje, nemůže přecházet AUG, jeden nukleotid přeskočit a začít číst až po té).

... .. AUG CAC A G U G G A G U U ... ..



Se čtecím rámcem úzce souvisí tematika **mutací**. Mutace jsou výsledkem **poškození** nebo **záměny** nukleotidů v DNA nebo neopravených chyb v průběhu replikace. Mohou se snadno **přepsat do RNA**, což se promítne do struktury proteinu např. tak, že je zařazena nesprávná AK.

Mutace můžeme rozdělit:

1. Bodové<sup>8</sup> (dochází k výměně jedné báze)
  - 1.1. Mírné (mutace neovlivní sekvenci AK v proteinu; např. mutace CGA→CGG je mírná, neboť oba tripletů kódují arginin)
  - 1.2. Měníci smysl (mutace ovlivní sekvenci AK – jedna AK je zaměněna za jinou, což může ve výsledku změnit vlastnosti proteinu; např. CGA→CCA vymění arginin za prolin)
  - 1.3. Nesmyslné (mutace ovlivní ukončení čtení – dojde k předčasnému ukončení řetězce, protože vznikl STOP-kodon; např. CGA→UGA)
2. Inserce (vlození jednoho nebo více nukleotidů)
3. Delece (vypuštění jednoho nebo více nukleotidů)

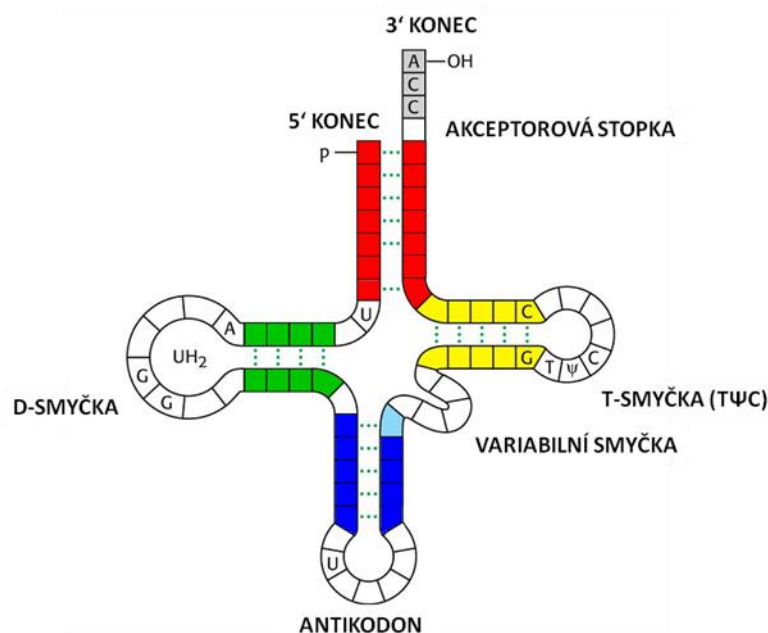
U insercí a delecí záleží na tom, kolik nukleotidů se přidá, resp. ztratí:

- přidají-li se (ztratí-li se) tři nukleotidy nebo více trojic nukleotidů, je **zachován čtecí rámec**, akorát se v proteinu vyskytnou navíc nebo ubudou některé AK
- přidají-li se (ztratí-li se) jeden nebo dva nukleotidy, dochází ke **změně čtecího rámce**, což vede ke vzniku tzv. **zkomolených sekvencí AK**

## tRNA

Každý kodon v mRNA má k sobě kompatibilní **antikodon**, který se nachází v molekule **tRNA**. tRNA slouží jako jakýsi **adaptér** mezi **bázemi v mRNA a aminokyselinami**.

Každá tRNA obsahuje pouze jeden **antikodon** a k danému **antikodonu přísluší vždy jen jedna aminokyselina**, která je navázána na 3' konci příslušné tRNA.



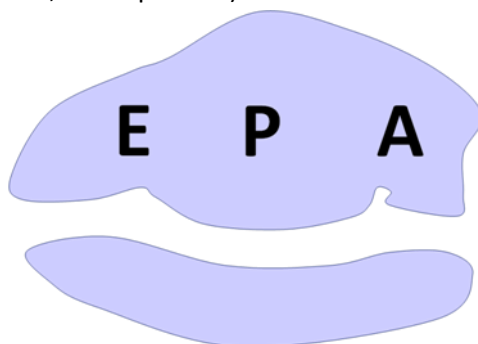
<sup>8</sup> Příkladem bodové mutace mohou být mutace v genech pro hemoglobin – je známo asi 800 strukturálních variant lidského hemoglobinu, většina z nich nevyvolává mutace a Hb plní svou funkci. O některých opačných případech (kdy změněná AK neumožňuje funkci) jsme se bavili v kapitole 2 o hemoglobinu.

## Ribozomy

Ribozomy jsou **ribonukleoproteinové částice** složené z rRNA a proteinů. Skládají se z velké a malé podjednotky, přičemž tyto podjednotky jsou od sebe v inaktivním stavu odděleny a spojují se až při zahájení syntézy.

Na větší z podjednotek můžeme rozlišit **tři vazebná místa**:

- A (pro vazbu aminoacyl-tRNA)
- P (pro vazbu peptidyl-tRNA)
- E (pro vazbu volné tRNA; místo pro exit)



Ribozomy u prokaryotních a eukaryotních organismů se trochu odlišují, zásadní rozdíly vystihuje následující tabulka:

**Tabulka 7 - Eukaryotické vs. prokaryotické ribozomy**

Vlastnost	Prokaryotické organismy	Eukaryotické organismy
<b>Sedimentační konstanty</b>		
kompletní ribozom	70S	80S
menší podjednotka	30S	40S
větší podjednotka	50S	60S
<b>Obsah RNA</b>	65%	50%
RNA-menší podjednotka	16S	18S
RNA-větší podjednotka	5S; 23S	5S; 5,8S; 28S
<b>Umístění v buňce</b>	volně v cytoplasmě nebo vázané na cytoplazmatickou membránu	volně v cytoplasmě nebo vázána na membránu ER

## Průběh translace

Translace je poměrně složitý proces, ve kterém můžeme rozlišit (jako u replikace a transkripce) tři fáze:

1. Iniclace
2. Elongace
3. Terminace

Všechny tři fáze se odehrávají v cytoplasmě ve vazbě na **ribozomy**.

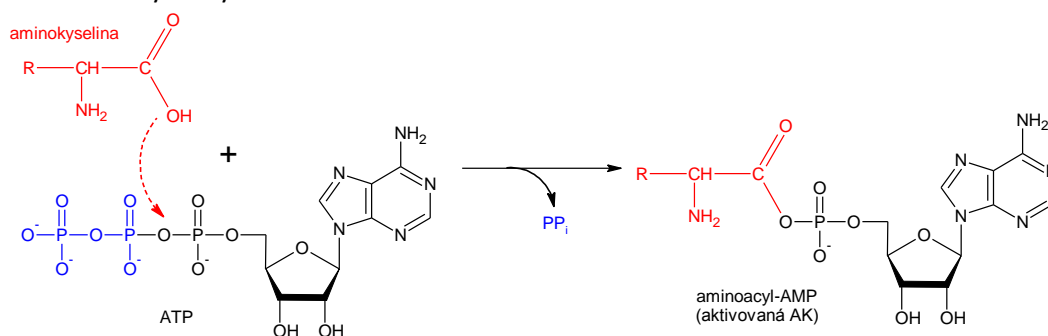
Ještě před proběhnutím těchto tří fází, je ale potřeba, aby byly vytvořeny aminoacyl-tRNA molekuly (tedy molekuly tRNA s navázanou aminokyselinou).

### A) TVORBA AMINOACYL-tRNA

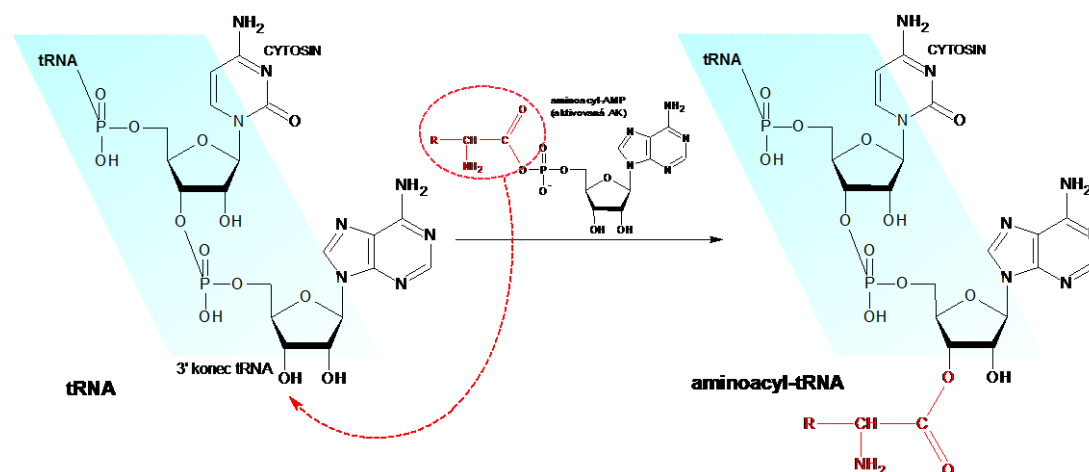
Aminokyselina je nejprve aktivována reakcí s ATP na **aminoacyl-AMP**. Aktivovaná AK je pak přenesena na 2' nebo 3' –OH skupinu ribosy nacházející se na 3' konci tRNA. tRNA s navázanou AK (tzn. aminoacyl-tRNA) označujeme jako **nabitou tRNA** (*charged tRNA*).

Reakci katalyzují specifické enzymy, obecně nazývané **aminoacyl-tRNA syntetasy**.

Aktivace aminokyseliny:



Vazba AK na tRNA:



## B) INICIACE

Ve fázi iniciace se vytváří tzv. **iniciační komplex**. Přesněji dochází k:

- vazbě iniciačních faktorů na menší ribozomální podjednotku
- vazbě iniciačního faktoru eIF2 na nabitou tRNA (eIF2 je předtím potřeba napojit na GTP)
- vazbě iniciačních faktorů na 5' konec mRNA (na „čapku“)
- vazbě tRNA k menší ribozomální podjednotce
- vazbě mRNA k menší ribozomální podjednotce (na které je již připojena tRNA)
- připojení velké ribozomální podjednotky k doposud vytvořenému preiniciačnímu komplexu, odpojení iniciačních faktorů

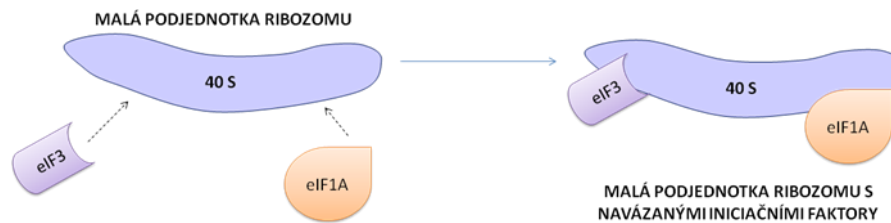
Výše naznačený průběh odpovídá tvorbě iniciačního komplexu u eukaryotů, u prokaryotů se vyskytují jisté odlišnosti:

- Iniciační faktory se neváží na čapku (bod c), protože prokaryoty čapku nemají. Místo toho dochází k vazbě tzv. **Shine-Dalgarnovy sekvence** na 5' konci mRNA k 16S RNA v ribozomu.
- První aminokyselinou v řetězci je **formyl-methionin**
- Iniciační faktory (IFs) jsou pouze 3

Na jednotlivé kroky iniciace u eukaryotů se nyní podíváme podrobněji. Pro úspěšné dokončení tohoto procesu potřebujeme eIFS (*eukaryotní iniciační faktory*), obě podjednotky ribozomů, tRNA<sup>methionin</sup> a mRNA.

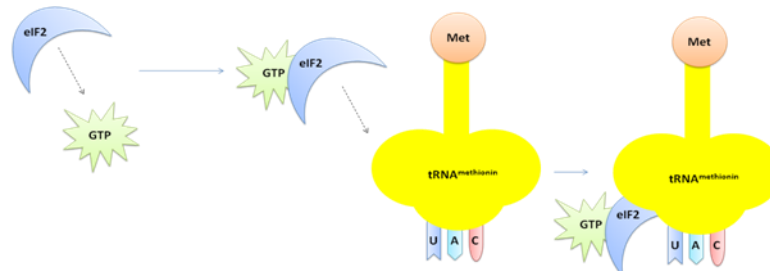
### ADa) Vazba iniciačních faktorů na menší podjednotku

Na menší ribozomální podjednotku (40S) se naváží iniciační faktory eIF3 a eIF1A:



### ADb) Vazba iniciačních faktorů na tRNA<sup>methionin</sup>

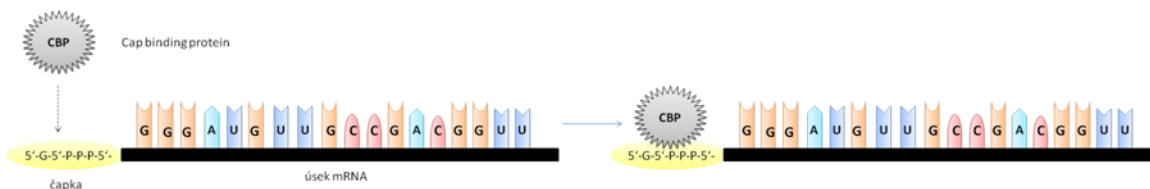
Na tRNA<sup>methionin</sup> se specificky váže faktor eIF2 (váže se pouze na tRNA nesoucí methionin!). Předtím, než se na ni napojí, je potřeba jej aktivovat reakcí s GTP.



Povšimněme si, že tRNA<sup>methionin</sup> má antikodon UAC, komplementární s kodonem AUG pro methionin.

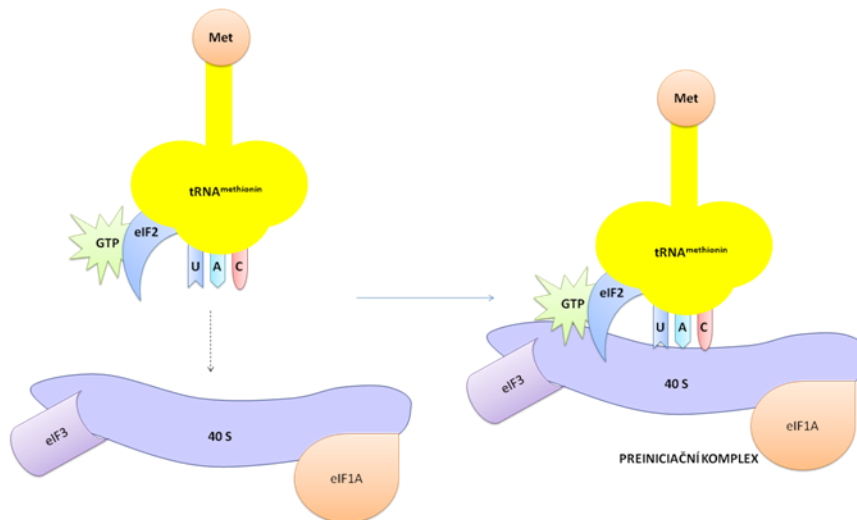
### ADc) Vazba iniciačních faktorů na 5' konec mRNA

Na 5' konec mRNA, který obsahuje čapku, se váže CBP (cap binding protein), jehož součástí je několik dalších iniciačních faktorů.



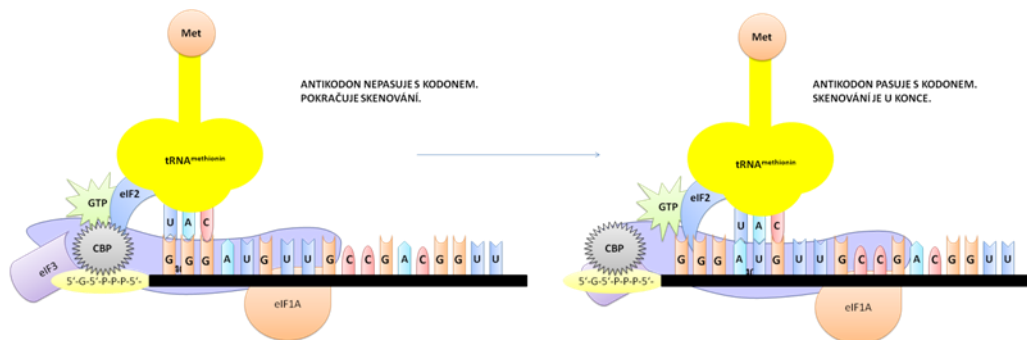
### ADd) Vazba tRNA<sup>methionin</sup> k menší ribozomální podjednotce

tRNA<sup>methionin</sup> spolu s GTP a všemi svými iniciačními faktory se napojí na menší ribozomální podjednotku (na které jsou rovněž navázány iniciační faktory) a vytvoří **preiniciační komplex**.



#### ADe) Vazba mRNA k preiniciačnímu komplexu

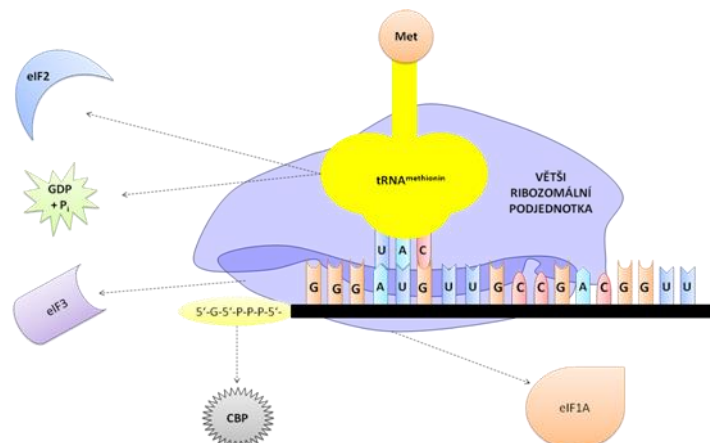
Preiniciační komplex skenuje mRNA od 5' konce tak dlouho, dokud nenarazí na kodon pro methionin.



Při skenování je spotřebováváno ATP, které slouží k rozvíjení vlásenkovité struktury mRNA (mRNA sice netvoří dvoušroubovici, ale občas se může lokálně spojit sama se sebou vodíkovými můstky).

#### ADf) Připojení velké ribozomální podjednotky, uvolnění iniciačních faktorů.

V okamžiku, kdy neiniciační komplex narazí na kodon pro methionin, odpojí se GTP (je hydrolyzováno) a jednotlivé eIF a připojí se větší ribozomální podjednotka, čímž se vytvoří iniciační komplex.



V nově vzniklém iniciačním komplexu se tRNA pro methionin nachází v **místě P větší ribozomální podjednotky**.

### Pár slov na závěr k iniciaci

U eukaryotů má pro zahájení translace velký význam **iniciační faktor eIF2**. Je komplementární pouze s tRNA pro methionin, při elongaci se uplatňují jiné iniciační faktory, které opět pasují jen k tRNA pro určitou aminokyselinu.

Faktor eIF2 je **aktivní v nefosforylované formě** – jeho fosforylace a defosforylace jsou jedním ze způsobů regulace jeho činnosti.

Př1. Nachází-li se v retikulocytech (které syntetizují **globin**) dostatek hemu, tak hem inhibuje kinasu, čímž jí zabrání ve fosforylaci eIF2 a syntéza globinu může probíhat. Pokud v buňce hem není, je kinasa aktivní a eIF2 je fosforylován, tudíž se globin zbytečně nesyntetizuje.

Př2. Fosforylace eIF2 je jedním ze způsobů obrany proti virovým onemocněním (v případě virového onemocnění dojde k aktivaci kinasy, která fosforyluje faktor eIF2 a ten je proto neaktivní, tudíž neprobíhá translace).

### C) ELONGACE

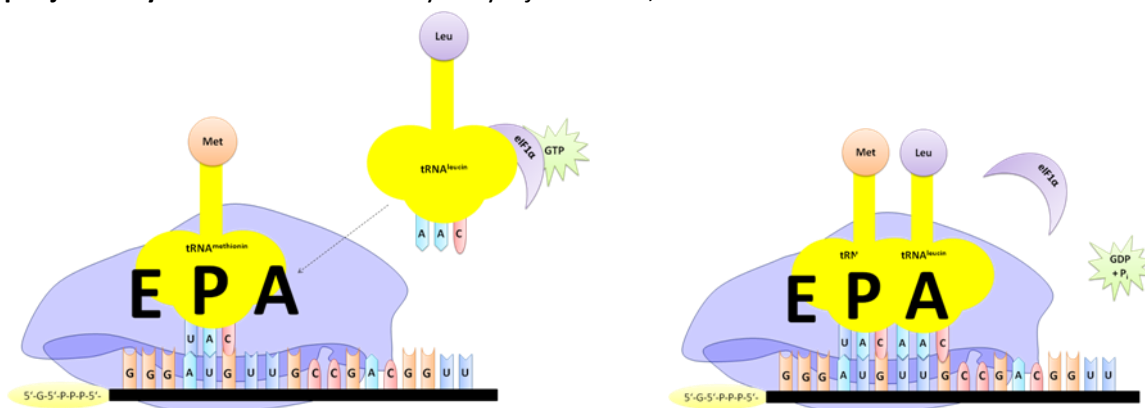
Elongace navazuje na iniciaci. Na iniciačním komplexu je již navázány tRNA<sup>methionin</sup> v místě P větší ribozomální podjednotky.

Aby mohla probíhat elongace, musí se vytvořit tRNA<sup>aminokyselina</sup>, která nese aminokyselinu, jež je kódována v mRNA. V našem případě se jedná o **leucin**, tudíž je potřeba vytvořit tRNA<sup>leucin</sup>.

To v sobě obsahuje již popsané reakce:

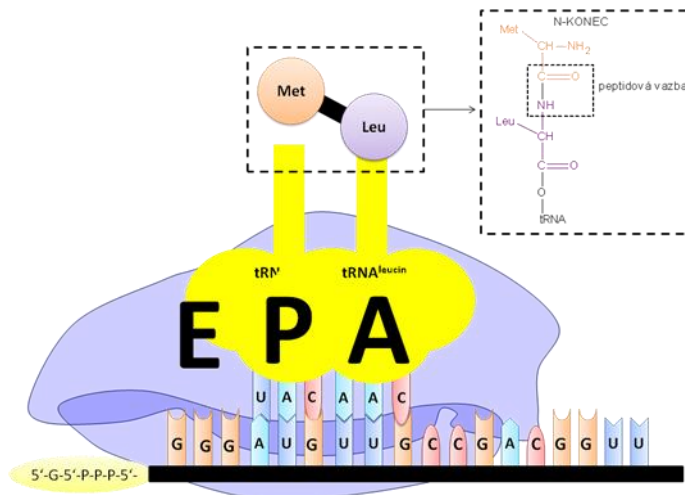
- aktivaci leucinu na leucinyl-AMP (leucinyladenylát)  
 $\text{leucin} + \text{ATP} \rightarrow \text{leucinyl-AMP} + \text{PP}_i$  spotřeba energie: 2 ATP
- tvorba tRNA<sup>leucin</sup>  
 $\text{leucinyl-AMP} + \text{tRNA} \rightarrow \text{tRNA}^{\text{leucin}}$
- vazba GTP a iniciačního faktoru (v tomto případě EF1α) na tRNA<sup>leucin</sup>  
spotřeba energie: 1 ATP

Vzniklá tRNA<sup>leucin</sup> (spolu s GTP a iniciačním faktorem) se váže do **A místa větší ribozomální podjednotky**. Po navázání se GTP hydrolyzuje a oddělí, oddělí se i iniciační faktor.



Následuje vytvoření **peptidové vazby mezi methioninem a leucinem**, které katalyzuje enzym **transpeptidasa**. Ta vytvoří peptidovou vazbu následovně:

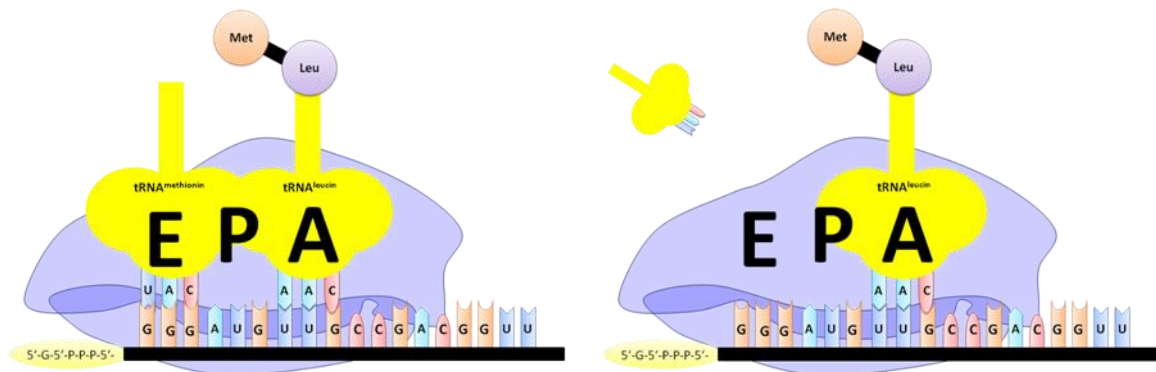
- **odštěpí methionin od tRNA**
- **přenes ho na leucin**
- **vytvoří mezi nimi peptidovou vazbu**



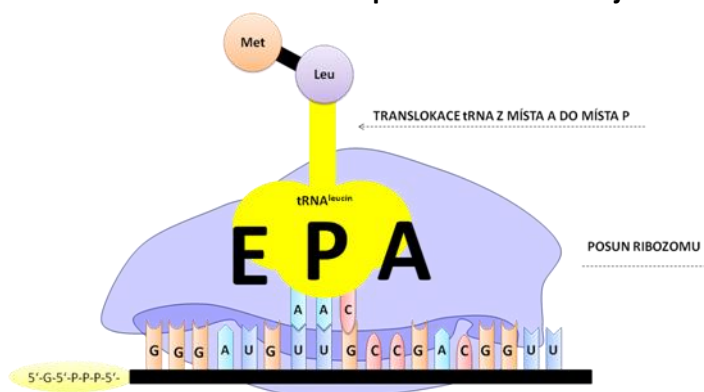
**Methionin** je tedy první AK ve vznikajícím řetězci, důležité je zmínit, že má **volný N-konec**. **Syntéza proteinů tedy začíná od jejich N-konce.**

Po vytvoření peptidové vazby dojde k **uvolnění volné tRNA**, která předtím nesla methionin – **přesune se do místa E** (čímž uvolní místo P) a **odpadne**.

Reakce se účastní EF2 a GTP (po přesunu a odpadnutí se oba uvolní, GTP hydrolyzuje).



Po odpadnutí tRNA, která nesla methionin, dojde k **translokaci tRNA**, na které je navázán nově vzniklý dipeptid **do místa P** a **současně dochází k posunu ribozomu o jeden kodon**.



Následuje vytvoření další tRNA<sup>aminokyselina</sup> (v našem případě tRNA<sup>prolin</sup>), ke které se připojí GTP a příslušný iniciační faktor. Vzniklý komplex tRNA-GTP-iniciační faktor se naváže do místa A, vytvoří se peptidová vazba... atd.

#### D) TERMINACE

Elongace pokračuje tak dlouho, dokud se ribozom nedostane k **terminačnímu kodonu** (ten se octne na místě A větší ribozomální podjednotky). Pro STOP-kodon neexistuje žádná tRNA, která by na sobě nesla příslušný antikodon, proto se k ribozomu napojují **uvolňovací faktory (releasing factors)**.

Vzniklý peptid (protein) je pomocí **peptidyltransferasy** oddělen od tRNA (**hydrolyza**) a následně od ribozomu.

Ribozom disociuje na podjednotky, mRNA se uvolní.

### Energetická bilance

Proces	Reakce	Ekvivalent ATP
Vznik aminoacyl-tRNA	ATP → AMP + PP <sub>i</sub>	2
Vazba aminoacyl-tRNA do místa A	GTP → GDP + Pi	1
Přesun peptidyl-tRNA na místo P	GTP → GDP + Pi	1
<b>CELKEM</b>		<b>4 ATP</b>

Jak vidíme, je na **vznik jedné peptidové vazby potřeba 4 ATP!** Avšak uvědomme si, že další ATP je potřeba pro **iniciaci a syntézu nukleotidů**.

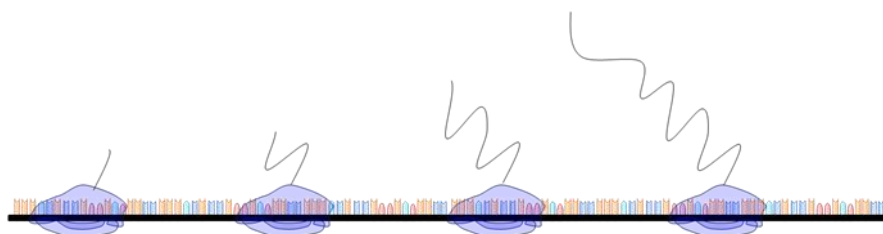
### Rychlost proteosyntézy

Proteosyntéza probíhá:

- u prokaryontů rychlostí cca 100 peptidových vazeb za **sekundu**
- u eukaryontů rychlostí cca 100 peptidových vazeb za **minutu**

Aby se efektivita translace zvýšila, vytvářejí se **polysomy (polyribosomy)**. V podstatě se jedná o to, že na jednu mRNA nasedne ribosom a začne vytvářet protein. Po té, co část vytvoří a dostatečně se posune od místa startu, se na místo startu napojují další ribosom a začne produkovat ten stejný protein a tak dále...

Rozestup mezi jednotlivými ribosomy je asi 80 nukleotidů.



## 11.6 Syntéza proteinů v mitochondriích

Mitochondrie obsahují 2-10 kopií uzavřené kružnicové dvouvláknové DNA, jejíž velikost kolísá v závislosti na druhu (u živočichů má mitDNA cca  $M_r=10^7$ ).

mitDNA kóduje **rRNA, tRNA a mRNA pro několik proteinů**. Proteiny, které jsou v mitochondriích kódovány, jsou jen **nepatrnou frakcí proteinů vnitřní mitochondriální membrány**, avšak **jsou esenciální pro průběh oxidativní fosforylace!!!** (kódují např. část komplexů I, III a IV a ATP-synthasy).

Syntéza proteinů v mitochondriích má podobné rysy jako syntéza u prokaryontů (iniciace pomocí formylmethioninu, citlivost k antibiotikům apod.)

Když už mluvíme o podobnosti s prokaryonty, měli bychom zmínit, že mRNA bakterií je často **polycistronická**, tzn. **jedna molekula mRNA kóduje více proteinů**. Tyto proteiny jsou často



metabolicky spřažené (např. mRNA kóduje 10 proteinů, přičemž všech 10 je potřeba pro syntézu histidinu).

V polycistronické mRNA se nacházejí úseky, které se nepřekládají na začátku, na konci a mezi každým úsekem pro určitou bílkovinu. **S tímto jevem se u eukaryontů nesetkáme.**

### 11.7 Účinky antibiotik na proteosyntézu

Proteosyntéza eukaryontů a prokaryontů je natolik rozdílná, že je možné tyto rozdíly využít při výrobě antibiotik. Některá antibiotika mohou specificky reagovat s proteiny bakteriálních ribozomů, jiná mohou působit na eukaryontní mitochondriální proteosyntézu.

Princip účinku je jasný: zastavená proteosyntéza neumožní bakterii syntetizovat strukturní ani signální proteiny, což brzy vede k jejímu zániku.

Tabulka na následující stránce uvádí některé příklady antibiotik a jejich vliv na proteosyntézu u prokaryontů.

Tabulka 8 - Antibiotika působící na syntézu prokaryontů

Antibiotikum	Účinek
Streptomycin	Váže se k 30S ribozomální podjednotce, inhibuje tvorbu iniciačního komplexu a vyvolá chyby ve čtení mRNA.
Tetracyklin	Váže se k 30S ribozomální podjednotce a inhibuje vazbu aminoacyl-tRNA do místa A
Chloramfenikol	Váže se k 50S ribozomální podjednotce a inhibuje peptidyltransferasu
Erytromycin	Váže se k 50S ribozomální podjednotce a inhibuje translokaci
Puromycin	Obsazuje A-místo ribozomu a vyvolává předčasnou terminaci

### 11.8 Úpravy proteinů

Proteiny během a především po své syntéze procházejí celou řadou různých úprav.

#### A) Skládání proteinů

Během syntézy nejprve prostupuje nově vznikající polypeptidový řetězec skrze ribozom, po té jej však opustí a dostane se do kontaktu s vnějším prostředím. Stává se tak **nechráněným** a nastává jeho **prostorové skládání** (folding).

Tohoto skládání se účastní proteiny **chaperony** (heat shock proteiny) a jeho výsledkem je **vytvoření správné terciární struktury**.

Poruchy ve skládání se projeví jako některé choroby, např. Alzheimerova choroba, BSE, cystická fibróza ad.

#### B) Posttranslační úpravy proteinů a jejich transport

Posttranslační úpravy probíhají především na ER nebo v GA. Obsahují především:

- **odstranění methinového zbytku**
- **změnu délky molekuly** (odštěpení části řetězce)
- **glykosylaci**

Dalšími úpravami, kterými mohou proteiny posttranslačně procházet, jsou např. **acetylace, karboxylace, methylace, prenylace, hydroxylace, sulfatace** ad. Těmto úpravám se však podrobněji věnovat nebudeme.

Na uvedená místa (ER, GA) je potřeba proteiny dopravit. Proto se v této části jedenácté kapitoly budeme věnovat nejen uvedeným úpravám, ale i transportu a třídění proteinů.

### **Transport bílkovin do subcelulárních a extracelulárních prostor (targeting)**

Je-li protein syntetizován na **volném ribozomu**, jedná se o **protein pro vlastní potřebu buňky** (nejčastěji). **Zůstává proto v cytoplazmě**, nebo je **translokován do některé z buněčných organel**.

Je-li protein syntetizován na ribozomu připojenému k ER, jedná se o **protein „určený na export“**. Je transportován do ER, GA, lysozomů, do membrán nebo je sekretován z buňky.

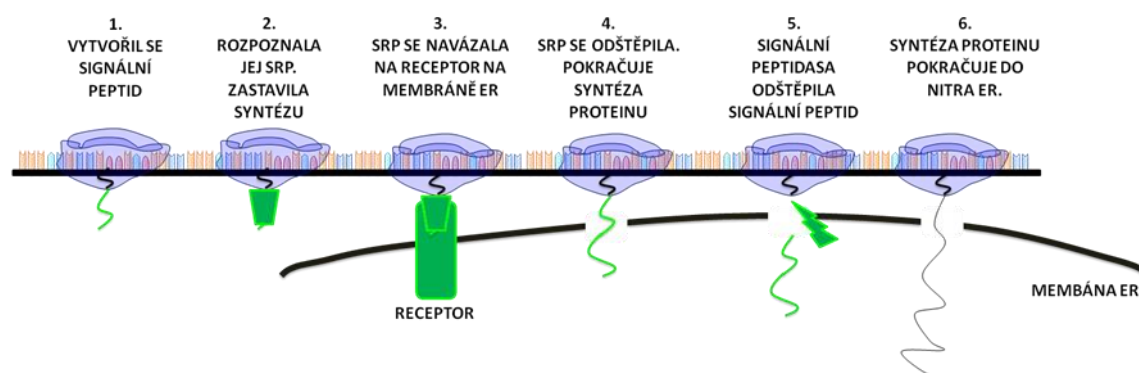
To, že jsou proteiny poslány tam, kam patří, zajišťuje **sekvence AK**, která je jejich součástí (můžeme ji považovat za jakousi adresu).

Nyní se zaměříme na druhý případ, tedy na transport proteinů, které jsou syntetizovány na ribozomech připojených k ER.

Translace těchto proteinů začíná v cytosolu. Syntetizovaný peptid obsahuje na začátku tzv. **vodící sekvenci** (též **signální peptid**), na kterou se naváže SRP (signál rozpoznávající částice; *signal recognizing particle*). SRP se naváže nejen na peptid, ale i na ribozom a dočasně inhibuje syntézu proteinu.

SRP částice dopraví ribozom i s peptidem k membráně ER, kde se naváže na svůj receptor. Po navázání na receptor dojde k **navázání ribozomu na membránu ER**. Následně se SRP uvolní, což umožní pokračování proteosyntézy.

Signální peptid se prodlužuje a proniká dovnitř ER. Zde je odstraněn **signální peptidasou**. Syntéza proteinu pak pokračuje až do konce – při terminaci dochází k jeho uvolnění do ER.



Proteiny, které se výše popsaným způsobem nesyntetizovaly na ER, jsou následně ve formě vesíkůl přenášeny na cis-stranu Golgiho aparátu.

V Golgiho aparátu se nachází **třídící centrum – strukturní rysy proteinů určují, kam bude protein nadále směřován** (tzv. **sorting**):

- některé proteiny zůstanou v GA
- některé proteiny se vrátí do ER
- některé proteiny projdou přes GA až jeho trans-straně, kde jsou odděleny ve formě lysozomů nebo sekrečních váček

Příklady **intracelulárního třídění** (sorting):

Př. 1: Proteinům, které jsou určeny pro lysozomy, jsou označeny **N-vázanými oligosacharidy zakončenými mannosou-6-P**.

Tuto „adresu“ poznají membránové proteiny na GA a ten se pak postará o to, aby byl protein zabudován do klathrinem pokrytého veziklu.

Př. 2: Proteiny, určené pro vrácení se do ER, mají na karboxylovém konci proteinů sekvenci **Lys-Asp-Glu-Leu**.

### Glykosylace proteinů

Glykosylací proteinů (připojením cukerné složky) **vznikají glykoproteiny**. Rozlišujeme dva typy:

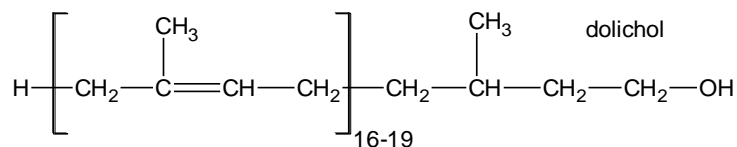
- *N*-glykosidové (oligosacharid se připojuje na amidovou skupinu asparaginu)
- *O*-glykosidové (oligosacharid se připojuje na –OH skupinu serinu nebo threoninu)

Tyto dvě skupiny se od sebe liší jak obsahem sacharidů, tak způsobem vzniku.

### N-glykoproteiny

Nejprve dojde **mimo bílkovinu** k syntéze cukerné složky, která se až po té napojí na –NH<sub>2</sub> skupinu argininu.

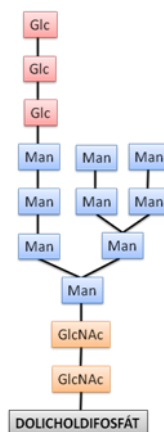
Významnou roli hraje **polyisopren dolichol** (známe jej např. ze syntézy cholesterolu).



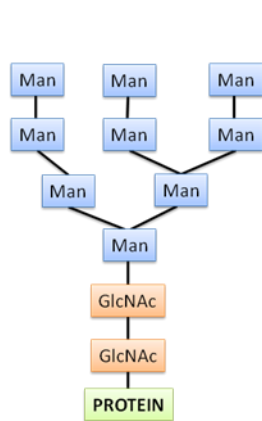
Dolichol se v podobě **dolicholdifosfátu** vyskytuje na membráně ER. Na jeho koncový fosfát se mohou připojovat **aktivované monosacharidy** (UDP-sacharidy), připojování sacharidů katalyzují příslušné **glykosyltransferasy**.

Hotový oligosacharid je pak přenesen na bílkovinu (na již zmíněný asparagin).

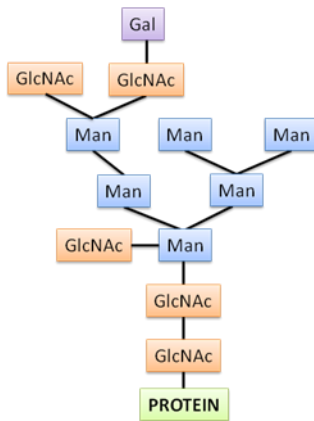
Oligosacharid je složený především z N-acetylglukosaminu, manosy a glukosy (dále pak z galaktosy a N-acetylneuraminové kyseliny). Přesný postup jeho syntézy zde uvádět nebudeme, výsledek vypadá tak, jak je znázorněno na obrázku níže:



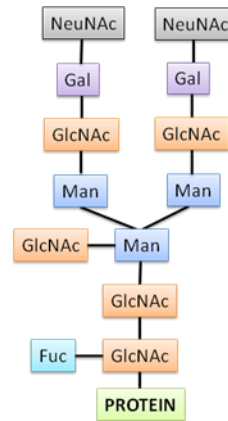
- **vysoce manosový typ**
- **hybridní typ (jednoanténový)**
- **komplexní typ (trojanténový)**



VYSOCEV MANOSOVÝ TYP



HYBRIDNÍ TYP  
(JEDNOANTÉNOVÝ)



KOMPLEXNÍ TYP  
(TŘÍANTÉNOVÝ)

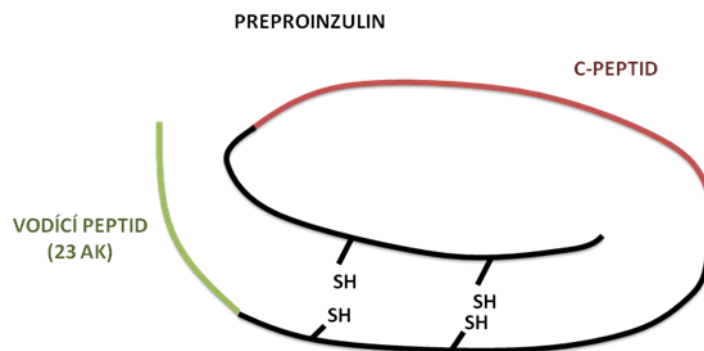
### O-glykoproteiny

Probíhá v ER a v GA. Na –OH skupinu serinu nebo threoninu se rovnou navazují aktivované monosacharidy a na ty se následně napojují další, dokud nevytvoří potřebný oligosacharid.

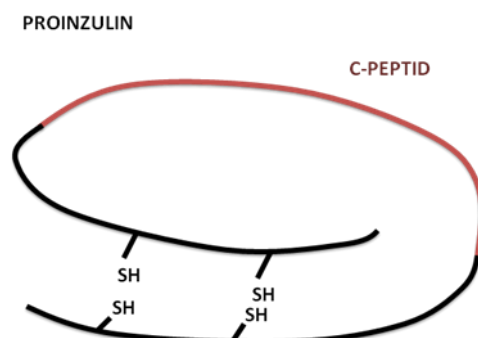
### Úprava proteinů odštěpením části jejich struktury

typickým příkladem jsou proteiny nacházející se v GIT (např. změna pepsinogen → pepsin). My si uvedeme jako příklad **syntézu inzulinu**.

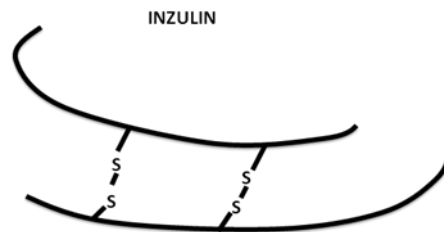
Inzulin ihned po své syntéze vypadá následovně (jedná se o **preproinsulin**):



Z preproinsulinu je odštěpen vodící peptid, čímž vznikne **proinzulin**:



Následně je v GA pomocí **karboxypeptidas** vyštěpen **C-protein** a jsou vytvořeny **disulfidické můstky**. Tím získáme finální podobu inzulínu.



Vzniklý inzulín v GA ukládán do sekrečních granul, která z GA putují k cytoplazmatické membráně. Po stimulaci s membránou fúzí a inzulín se vylévá do extracelulárního prostoru.

## 11.9 Regulace genové exprese

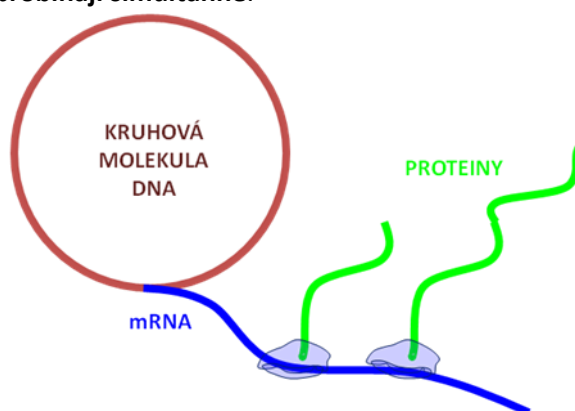
Genová exprese v sobě zahrnuje tvorbu proteinů nebo RNA produktů. Obvykle je v daném čase exprimováno v buňce jen malé množství genů.

Regulace je opět rozdílná u prokaryontů a eukaryontů. Nejprve se zaměříme na regulaci u prokaryontů, pak u eukaryontů.

### Prokaryonti

Prokaryotické organismy obsahují jedinou kružnicovou molekulu DNA, která není nikterak komplexována s proteiny (dokonce jádro není odděleno od cytoplazmy).

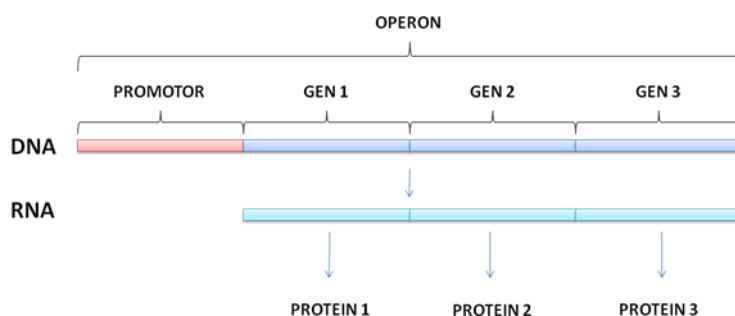
Výše uvedená fakta, spolu s tím, že transkripty mRNA neobsahují introny, umožňují to, že **transkripce i translace probíhají simultánně**.



Regulace genové exprese je tedy (v souvislosti s uvedenými skutečnostmi) **jednodušší než u eukaryontů** a **probíhá především na úrovni regulace transkripce**.

### Operonová teorie

V bakteriální DNA jsou **strukturní geny často sdružovány do skupin**, které nazýváme **operony** (pod pojmem operon rozumíme nejen skupinu genů, ale i promotor, který této skupině předchází).



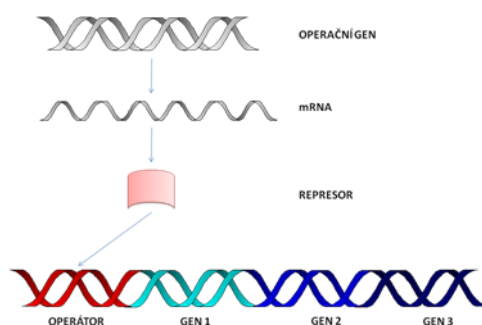
V jedné molekule mRNA z operonu vytvořené se proto vyskytuje informace o více proteinech (říkáme, že je **polycistronická**; viz *dříve*). Jednotlivé úseky pro různé proteiny jsou od sebe odděleny sekvencemi **AGGU**.

Geny jednoho operonu bývají exprimovány současně (jsou všechny zapnuty, nebo všechny vypnuty) a jejich regulace je řízena **jediným promotorem!**

Regulována je především **RNA polymerasa** a to jak **pozitivně** (zvýšení transkripce), tak **negativně** (snížení transkripce).

## Negativní kontrola RNA-polymerasy prokaryont

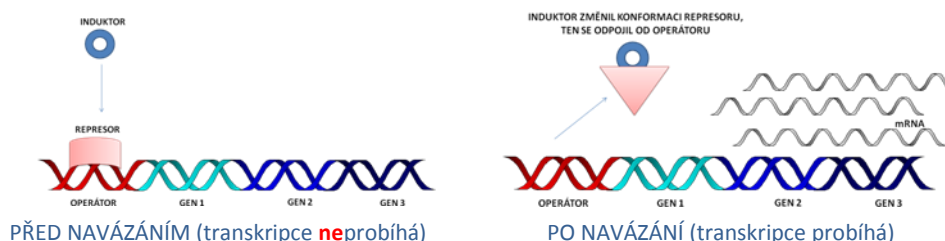
Na regulačním genu je nesyntetizována mRNA a podle ní **repressor**. Represor difunduje k promotoru a váže se v oblasti nazývané **operátor** (nejčastěji se operátor nachází právě v oblasti promotoru). Navázaný repressor pak blokuje vazbu RNA-polymerasy a syntéza mRNA pro určité proteiny neprobíhá.



Činnost **repsoru** je možné kontrolovat dvěma způsoby:

- **indukcí**
- **korepresí**

**Indukce** využívá malou molekulu jménem **induktor** (většinou malá molekula některé z základních živin, či jejich metabolitů). Jeho navázáním na repressor vede ke změně konformace a repressor se tak odpojí od operátoru a **transkripce může začít**.

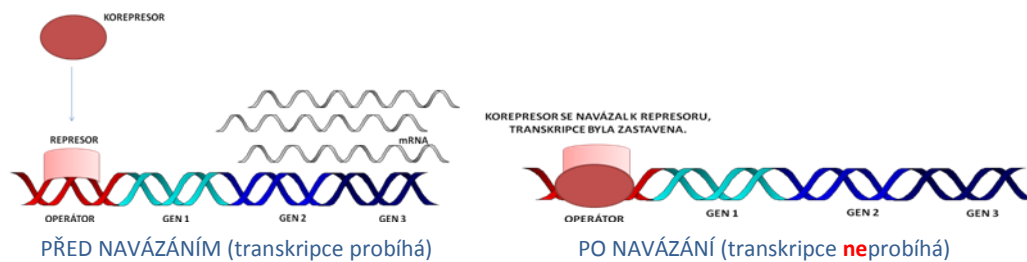


### Příklad indukce: Indukce *lac* operonu laktosou u *E. Coli*

Enzymy pro metabolismus glukosy glykolýzou jsou u *E. Coli* produkovány konstitutivně (tedy pořád). Chybí-li ale glukosa a je-li přidána laktosa, buňky se adaptují a začnou produkovat další enzymy kódované *lac* operonem.

Jako induktor slouží **allolaktosa** (isomer laktosy vznikající spontánně), která se váže na repressor a tím jej inaktivuje. Inaktivace repsoru způsobí, že se RNA-polymerasa může navázat k promotoru a zahájit transkripci, přičemž přepisuje strukturální geny v *lac* operonu a produkuje polycistronickou mRNA, která kóduje enzymy jako  $\beta$ -galaktosidasu, permeasu a transacetylasi. Děj probíhá pouze tehdy, je-li v buňce nedostatek glukosy!

V případě **koreprese** vypadá situace následovně: **i přes to, že je repressor navázaný, dochází k transkripci**. Až **po vazbě korepresoru** (vytvoří se komplex repressor-korepresor) **je transkripce zastaveny**. Korepresory jsou stejně jako induktory malé molekuly pocházející z metabolismu živin.



### Příklad koreprese: koreprese *trp* operonu (syntéza tryptofanu u *E. Coli*)

Geny pro enzymy syntézy tryptofanu (celkem 5 enzymů) jsou soustředěny v *trp* operonu. Tryptofan samotný je **korepresorem** – váže se k inaktivnímu represoru a vytváří komplex represor-tryptofan. Tento komplex inhibuje transkripci operonu.

### Pozitivní kontrola RNA-polymerasy prokaryont

Stimulační (regulační) proteiny pozitivní kontroly se vážou k promotoru a stimulují navázání RNA-polymerasy.

Regulační protein je sám o sobě aktivován na základě přítomnosti nebo nedostatku molekuly určité živiny (nebo jejího metabolitu) v buňce.

### Příklad pozitivní kontroly: vliv přítomnosti glukosy na *lac* operon u *E. Coli*

Transkripce *lac* operonu může být indukována allolaktosou (viz výše) pouze v **nepřítomnosti glukosy**.

**Pokles hladiny glukosy** v buňce **vyvolá zvýšení hladiny cAMP** (není známo proč). cAMP se naváže na svůj receptor v buňce (**CRP** – cAMP-receptor protein). Komplex cAMP-CRP se naváže do regulační oblasti *lac* operonu, stimuluje vazbu RNA polymerasy k promotoru a transkripci genů pro metabolismus laktosy.

**Buňka tedy metabolizuje laktosu, pouze pokud nemá k dispozici glukosu.**

### Atenuace transkripce

Atenuace znamená **předčasné ukončení (přerušeni) transkripce změnou sekundární struktury mRNA**. Dochází k ní v případě, že buňka nepotřebuje produkt transkripce. Součástí operonu je oblast zvaná **atenuátor (zpomalovač)**.

Příklad si uvedeme na *trp* operonu, který vytváří tryptofan:

U prokaryont probíhá transkripce i translace najednou. Představme si, že za RNA-polymerasou, která vytváří mRNA pro proteiny syntézy tryptofanu, se už pohybuje ribozom a vytváří tyto proteiny. Jak se RNA-polymerasa blíží k 5' konci transkriptu, objevuje se mnoho kodonů pro **tryptofan**.

Je-li tryptofanu (a tRNA<sup>tryptofan</sup>) v buňce dostatek, ribozom jej může do vznikajícího proteinu zařazovat bez větších problémů a pohybuje se po mRNA velmi rychle. Avšak tento rychlý pohyb ribozomu vede k tomu, že se na mRNA vytvoří **smyčka**. Tato smyčka dává pokyn RNA-polymerase, že má přestat transkribovat. Transkripce je tak zastavena, protože buňka má tryptofanu dostatek.

Pokud je ale hladina tryptofanu nízká (a tím jsou nízké i hladiny tRNA<sup>tryptofan</sup>), ribozom se pohybuje pomalu a smyčky na mRNA se netvoří – RNA-polymerasa tedy nemá důvod zastavit transkripci a dokončí přepis operonu. Tím pádem dochází k syntéze tryptofanu.



**Úroveň rychlosti transkripce je tedy nastavena podle hladiny tryptofanu v buňce** (při vysoké hladině tryptofanu se operon nadále nepřepisuje, při hladině nízké, kdy je tryptofan potřeba, není jeho transkripce zastavena).

*Poznámka autora: Doufám, že jsem atenuaci pochopil správně, pokud máte jakékoliv pochybnosti, napište mi.*

## Eukaryonti

Rozdíl oproti prokaryotům:

Oproti prokaryotům je DNA organizovaná v nukleosomech, geny je tedy potřebné nejprve dostat do jejich aktivní formy (změna heterochromatinu na euchromatin). Geny nejsou v DNA uspořádány v operonech a dokonce geny, které kódují proteiny účastníci se jedné metabolické dráhy, bývají rozmístěny na rozdílných chromozomech. Z toho vyplývá, že každý gen má svůj vlastní promotor.

Navíc je DNA umístěna v jádře a ribosomy v cytoplazmě, není tedy možné, aby transkripce a translace probíhaly simultánně.

Genovou expresi je možné ovlivňovat na každé úrovni vedoucí od DNA k proteinu:

- na úrovni DNA a chromozomů
- na úrovni transkripce
- na úrovni úpravy transkriptů
- na úrovni iniciace translace

## Ovlivnění genové exprese na úrovni DNA a chromosomů

### Remodelace chromatinu

Jak bylo řečeno, je DNA v jádře umístěna v podobě **chromatinu**. Chromatin může být:

- a) **kondenzovaný** (heterochromatin; geny jsou neaktivní)
- b) **difuzní** (euchromatin; geny jsou aktivní)

Změna stavu chromatinu vede k aktivaci (přeměna heterochromatin → euchromatin) nebo inhibici (přeměna euchromatin → heterochromatin) transkripce.

Tyto změny je možné provádět:

- rozvinutím (stočením) určitého úseku DNA (energii dodává štěpení ATP)
- **kovalentní modifikací histonů** pomocí **acetylace a deacetylace** na ε-aminoskupinách v postraních řetězcích lysinu (např. u histonu H2A, H2B, H3 a H4)

### Methylace DNA

DNA je možné methylovat na jejích **cytosinových zbytcích**, čímž vznikne **5-methylcytosin**.

Methylace probíhá často v oblastech bohatých na GC-sekvence v přítomnosti promotorové oblasti genu (reakci katalyzuje enzym **methylasa** a hovoříme o tzv. **postsyntetické modifikaci DNA**).

Geny, které jsou výše popsaným způsobem methylovány jsou hůře transkribovány.

**Příklad: Geny pro globin** jsou methylovány v neerythroidních buňkách (v těch neprobíhá syntéza hemoglobinu, tak není potřeba aby byly aktivní). Naopak v erythroblastech a retikulocytech (tedy prekursorech erytrocytů, v nichž syntéza hemoglobin probíhá) tyto geny methylovány nejsou.

### Přeskupování genů

Segmenty DNA se mohou v rámci genomu **přeskupovat** a **asociovat s jinými segmenty** (tedy s jinými geny). Toto se odehrává pouze v některých buňkách, např. v **imunoglobulinech**.

### Amplifikace genu

Při genové amplifikaci dochází k tomu, že určitá oblast DNA (určitá oblast chromozomu) podléhá **opakovaným cyklům replikace DNA**. Nově syntetizovaná DNA je vystřižena a tvoří malé, nestabilní chromozomy zvané **double minutes**. Tyto se pak **integrují do jiných chromosomů** a příslušný gen je tak **amplifikován**.

Normální amplifikace je vyvolána chybami při replikaci DNA a při buněčném dělení.

**Příklad:** U pacientů léčených **methotrexátem** (inhibitor (dihydro)folátreduktasy) se vyvinula rezistence na lék – tzn., že přestal být účinný. Příčinou je zvýšení počtu genů pro (dihydro)folátreduktasu v důsledku amplifikace.

### Delece genu

Vzniká jako důsledek mutace, gen je při ní zcela ztracen.

### Regulace genové exprese na úrovni transkripce

**Geny**, jejichž transkripce probíhá konstitutivně, jsou regulovány složkami tzv. **bazálního transkripčního komplexu** (tj. RNA-polymerasou a **bazálními** transkripčními faktory, které se váží k TATA-boxu do oblasti promotoru). Pokud není tento komplex úplný (chybí byť jen jediný transkripční faktor), transkripce neprobíhá.

Expresi genů je dále možné ovlivnit pomocí **specifických transkripčních faktorů**, které se váží mimo promotor. Tyto transkripční faktory mohou transkripci aktivovat nebo inhibovat, samotné transkripční faktory je možné ovlivňovat pomocí fosforylace, defosforylace, cytosiny a dalšími způsoby.

*(Pro více informací viz Transkripce DNA).*

### Regulace genové exprese na úrovni úpravy transkriptů

Do těchto úprav zařazujeme:

- **alternativní sestřih** (jediný gen může produkovat různé proteiny; viz výše)
- **editaci RNA** (viz dále)

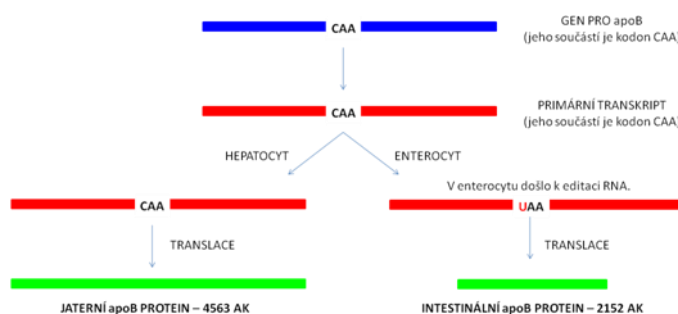
Editací RNA rozumíme její posttranskripční úpravu (primární transkript hnRNA je tedy stále stejný, až po jeho syntéze dojde ke změně). Touto změnou může být **přidání nebo odebrání nukleotidu**, či **záměna bází**.

### Příklad: Syntéza apoB v hepatocytech a enterocytech

Protein, který je syntetizován podle genu apoB je součástí chylomikronů a VLDL.

- v hepatocytech kóduje gen apoB protein, který obsahuje **4563 AK**
- v enterocytech kóduje tentýž gen protein, který obsahuje pouze **2152 AK**

Gen je v obou případech přepsán do primárního transkriptu, avšak v něm dojde **v případě enterocytů k deaminaci cytosinu na uracil** a tím vznikne **STOP-kodon**. Proto je protein kódovaný v enterocyty kratší – tvoří pouze 48% délky proteinu **hepatálního**.



### Regulace genové exprese na úrovni translace

Na úrovni translace je možné ovlivňovat aktivitu eukaryotických iniciačních faktorů (eIF).

#### Příklad: Syntéza globinu v retikulocytech

Faktor eIF2 je aktivní v případě, že je **defosforylovaný**. Je-li v buňce dostatek hemu, je inhibovaná kinasa, která by mohla eIF2 fosforylovat, eIF2 je tak aktivní a syntéza globinu probíhá.

Je-li v buňce přítomno málo hemu, je kinasa aktivní, eIF2 je proto fosforylovaný a je tudíž neaktivní (nedochází k syntéze globinu, protože není hem, který by do něj patřil)