

# Molekulární biologie

## – Ústav molekulární farmacie (45-308)

- Mgr. Marie Brázdová, Ph.D. (FAF MU, BFU AVČR)
- Mgr. Daniel Renčiuk, Ph.D., (BFU AVČR)
- Mgr. Denis Šubert, (BFU AVČR)
- PharmDr. Zuzana Soldánová (FAF, MU)
- PharmDr. Jakub Tremel, Ph.D. (FAF, MU)

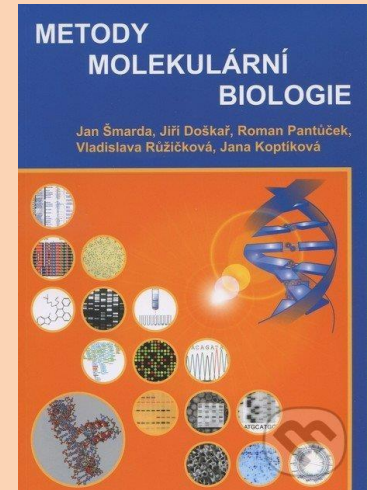
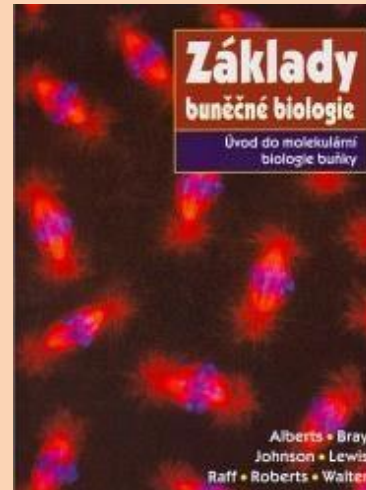
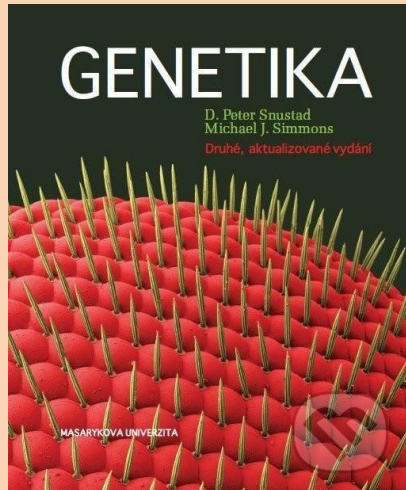
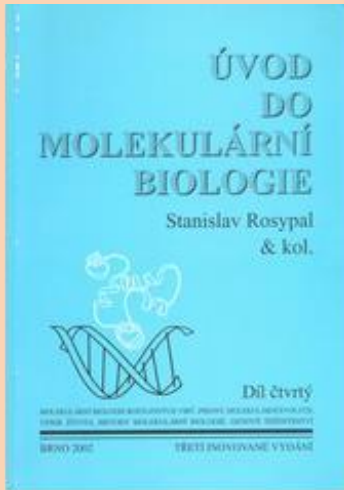
*Interaktivní osnova  
MS Teams*

# Sylabus

- 1) Molekulární biologie a její postavení mezi biologickými vědami, historické mezníky a významné osobnosti, ústřední dogma molekulární biologie.
- 2) Informační makromolekuly, jejich struktura, funkce a vztahy při přenosu genetické informace, genetický kód.
- 3) Struktura prokaryotického genomu, replikace a genová exprese u prokaryot.
- 4) Struktura eukaryotického genomu, replikace a genová exprese u eukaryot.
- 5) Regulace genové exprese, molekulární mechanismy signalizace.
- 6) Interferující RNA.
- 7) Molekulární mechanismy mutagenese, spontánní a indukované mutace a reverze.
- 8) Molekulární základy rekombinace, význam rekombinace v genetice.
- 9) Transpozony, mechanismy transpozice, retroelementy, retroviry. Reparační mechanismy při opravách a odstraňování chyb v genomové DNA.
- 10) Molekulární podstata kancerogeneze, protoonkogeny a onkogeny, nádorové supresorové geny, onkogenní viry.
- 11) Buněčný cyklus
- 12) Apoptóza
- 13) Mechanismy replikace a exprese genů u bakteriálních a živočišných virů.

# Doporučená literatura:

- Rosypal a kol.: – Úvod do molekulární biologie. Brno, 2006 (4. vydání)
- Snustad a kol.: – Genetika. Brno, 2017
- Alberts a kol.: – Základy buněčné biologie : úvod do molekulární biologie buňky. (orig. Molecular biology of the cell)
- Šmarda a kol.: – Metody molekulární biologie. Brno, 2010
- Bartoš a kol.: – Základy molekulární biologie pro farmaceuty, Brno (2012)



# Požadavky ke zkoušce:

- Zkouška se skládá z části písemné části
- Test: min 60% (E), ....90-95% (A)

Zdroj: **MUNI Interaktivní osnova**

**Proteosyntéza: od DNA k proteinu**  
**– NEZkreslená věda II**

[https://www.youtube.com/watch?v=fqWs1aM7BQs&list=PLqmy0o96fQtB0jpkS7qS  
SuDwJl1xNVD12&index=7](https://www.youtube.com/watch?v=fqWs1aM7BQs&list=PLqmy0o96fQtB0jpkS7qS<br/>SuDwJl1xNVD12&index=7)

# Otázky u zkoušky - písemné

- Terminologie (prion, genom, kvadruplex....)
- Párování bází DNA, RNA
- Centrální dogma molekulární biologie
- Hlavní pochody molekulární biologie popis fází, proteinů...
- Typy genů (strukturní geny, regulační geny, geny pro RNA...), operonů, struktura, regulace
- Apoptóza, Buněčný cyklus, Buněčná signalizace (receptory)
- Termíny z onkologie (nádorový supresor,...)
- Mutageneze
- Viry a jejich genomy
- **Schémata**

# Osnova úvodní přednášky

- charakteristika molekulární biologie
- molekulární biologie x biochemie
- historické souvislosti
- živé systémy: typy, vlastnosti
- prokaryotické a eukaryotické buňky
- modelové systémy v molekulární biologii

# Co je molekulární biologie?

- **Molekulární biologie** je vědní disciplína zabývající se studiem buněčných biologických procesů na jejich molekulární úrovni. Podstata některých biologických jevů jako například dědičnosti je odhalitelná pouze studiem jejich molekulární podstaty.
- Molekulární biologie se proto věnuje popisu biologických makromolekul a jejich vzájemným funkčním vztahům. Zvláštní pozornost je především věnována funkci makromolekul podílejících se na dědičnosti organismů, tedy DNA, RNA a proteinům, jejich vzájemné interakci a regulaci jejich funkce (Ve zkratce zjednodušeně: „DNA → RNA → protein“.) Ačkoliv tato oblast molekulární biologie bývá někdy vymezena samostatným termínem molekulární genetika, bývá někdy termín molekulární biologie chápán v užším smyslu, který se s pojmem molekulární genetika kryje. Molekulární biologie integruje ve svém přístupu hlediska biologická, chemická, fyzikální i genetická.
- obor studující **souvislost** mezi **strukturou**/vzájemnými interakcemi biomakromolekul a **chováním**/vlastnostmi živých soustav (buněk/organismů)
- zkoumá vztah mezi **dvěma úrovněmi živých soustav**: mezi úrovní **fyzikální a chemickou** (struktura a funkce biomakromolekul) a **biologickou** (vlastnosti a funkce buněk/organismů)

# Molekulární biologie x Biochemie

- interakcí biomolekul, zvláště informačních biomakromolekul, k funkcím a vlastnostem živých soustav.
- Cílem molekulární biologie je vysvětlit **funkce a vlastnosti živých soustav, vztah mezi** strukturou a interakcemi jejich molekul (makromolekul).
- Tento vztah vysvětluje z komplexního hlediska integrujícího fyzikální, chemické a biologické přístupy.
- Studium **procesů**, které probíhají v živých soustavách **na molekulární úrovni** a jimiž se **realizuje genetická informace**

## – Biochemie

- Biochemie se zabývá **chemickými pochody** v živých organismech. Předmětem studia biochemie **je struktura a funkce** základních stavebních kamenů živé hmoty jako jsou například cukry, tuky,
- bílkoviny, nukleové kyseliny a další biomolekuly.



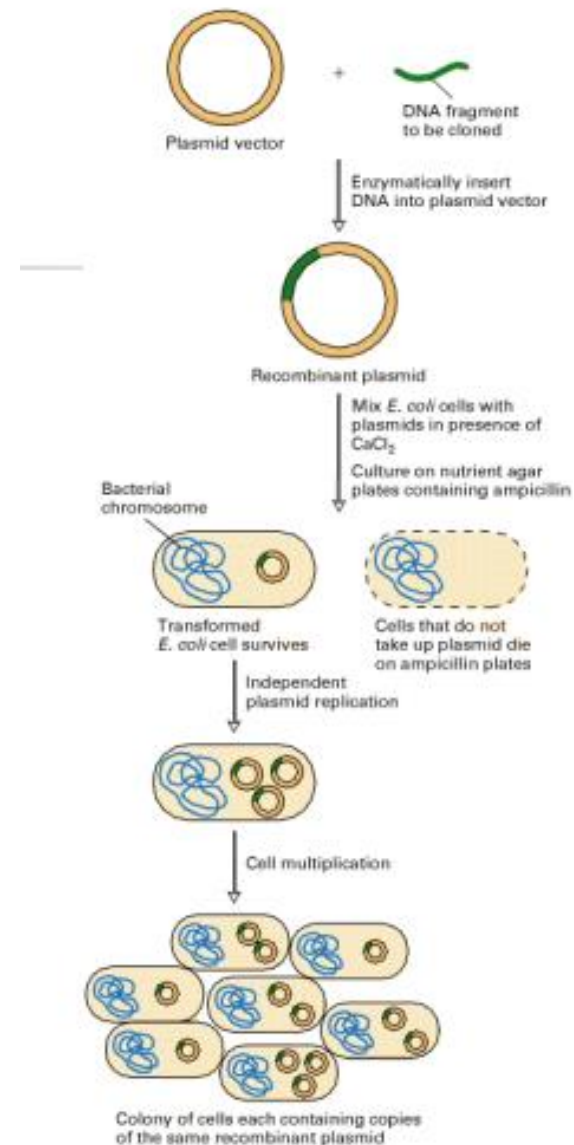
# Molekulární přístupy se uplatňují ve všech **biologických** disciplínách

- původně zaměřeny na **dědičnost** – udržování a expresi genetické informace a její dědičnost (molekulární genetiku)
- současná **orientace** na **společné vlastnosti života na molekulární úrovni**, které platí přes vnější rozmanitost živých tvorů a podstatu nejrozmanitějších procesů probíhajících v buňkách a organismech
- důraz na **praktické aplikace**: biotechnologie, paleontologie, archeologie, evoluce, medicína, antropologie, kriminalistika, určování otcovství, atd.

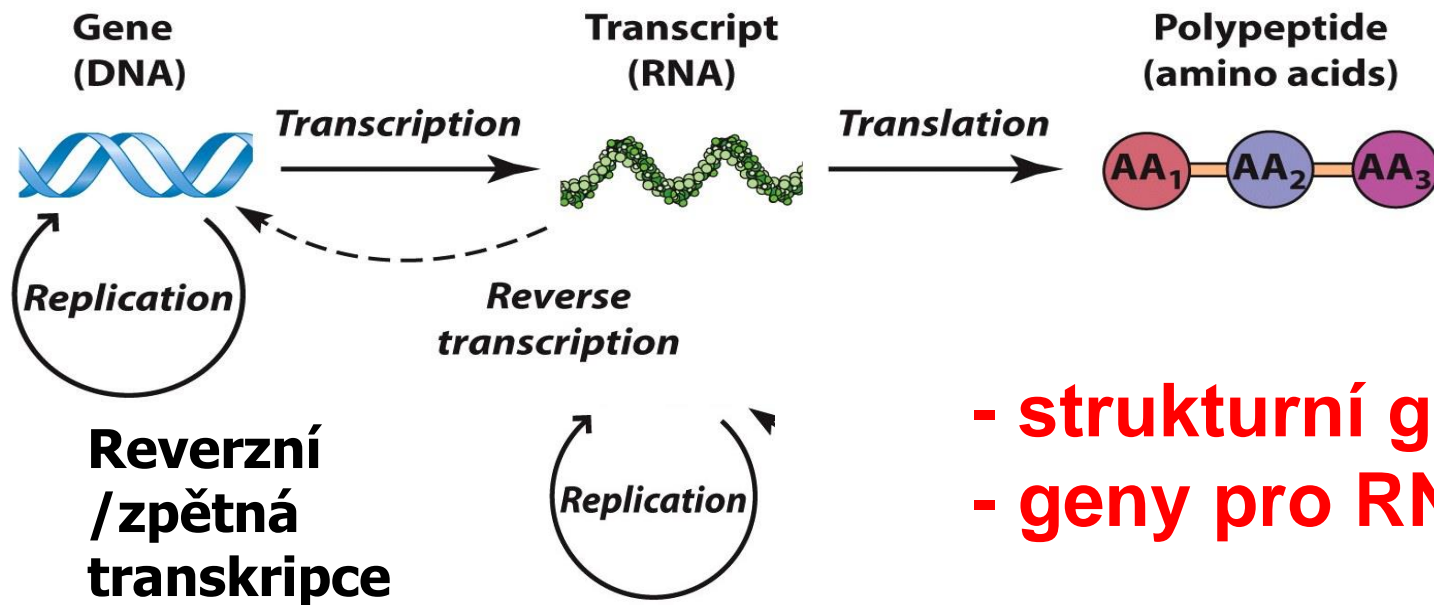
# Něco z historie

- manipulace s genomem, **křížení rostlin a živočichů** se provádí tisíce let, ale genetika jako věda vznikla až v **80. letech 19. století**
- techniky pro studium souvislostí mezi geny a pozorovanými znaky jsou k dispozici jen pár desítek let
- éra **klonování DNA** a cílených zásahů do genetické informace začala v **70. letech 20. století** (Stanford University, UCSF, Genentech) – příprava léků technikami biotechnologie

**Název molekulární biologie** poprvé použili nezávisle na sobě v třicátých letech dvacátého století [Warren Weaver](#) a [William Thomas Astbury](#). V roce [1958 Francis Crick](#) formuloval tzv. **centrální dogma molekulární biologie.**



# Centrální dogma molekulární biologie



- genetická informace se realizuje přenosem z DNA do RNA a do proteinu (tento postulát se označuje jako centrální dogma MB)
- některé viry (např. HIV) používají RNA jako templát pro syntézu DNA **reverzní transkripcí**
- mnoho genů nekóduje polypeptidy, ale molekuly RNA, které v buňce mají důležité úlohy (regulační molekuly RNA, tRNA, rRNA)
- X Epigenetika, priony

# Důležité milníky

**1859** Anglický přírodovědec **Charles Darwin** zveřejnil svoji teorii „O vzniku druhů přírodním výběrem“. Teorie vznikla na základě výzkumů prováděných během jeho dvouleté plavby lodi *Bengle* po souostroví Galapagy. Využil v ní teorii přírodního výběru, kterou formuloval přírodovědec Alfred Russell Wallace.

**1865** Moravský mnich augustiniánského kláštera v Brně, **Johan Gregor Mendel**, zveřejnil výsledky svých pokusů křížení a přenosu znaků dědičnosti u hrachu. Tyto výsledky byly později formulovány jako **Mendelovy zákony dědičnosti**.

**1869** Švýcarský vědec **Friedrich Miescher** poprvé izoloval DNA. Latka, kterou získal z hnisu v obvazech pacientů léčených v nemocnici v německém Tubingenu, pojmenoval jako **nuklein**. Obsahovala velké množství fosforu a později ji našel také ve spermatu lososů.

**1879** Jan Evangelista Purkyně a **Walter Fleming** popsali **buněčné dělení** u živočišných buněk, mitózu, a popsal pohyb chromozomů v jejím průběhu.

**1900** Hugo de Vries, Carl Erich Correns a Erich Tschermak objevili nezávisle na sobě při pokusech na rostlinách pravidla dědičnosti, stejná jako popsal Mendel. Formulovali je jako **Mendelovy zákony dědičnosti**.

**1902** Byla popsána první choroba, která se **dědí** v souladu s Mendelovými zákony. Jednalo se o **alkaptonurii**, autozomálně recesivní onemocnění. V roce 1990 byl lokalizován chromozom, a v roce 1996 gen H60, který poruchu způsobuje.

Walter Sutton popsal proces buněčného dělení, při kterém se tvoří spermie a oocyty, meiózu. Své pozorování provedl na buňkách lučního konika a zjistil, že Mendelovy faktory dědičnosti jsou nesené na chromozomech. Tak vznikla chromozomální teorie dědičnosti.

**1905** Propagátor Mendelových myšlenek, William Bateson, použil v jednom ze svých dopisů slovo **genetika pro studium dědičnosti a dědičných faktorů**. Tento termín se ale začal rozšiřovat až po roce 1909.

**1909** Dánský botanik Wilhelm Johannsen poprvé použil **termín gen (z řeckého genos = narodit se) k popisu Mendelových faktorů dědičnosti. Definoval také rozdíl mezi genotypem a fenotypem**.

**1911** Americký výzkumník Thomas Hunt **Morgan** zjistil, že **faktory dědičnosti, geny, jsou umístěny na chromozómech**. Své pokusy provedl na banánové mušce *Drosophilla melanogaster*. Objevil také genovou vazbu a rekombinaci. V roce 1933 obdržel za své výzkumy Nobelovu cenu.

**1941** George Beadley a Edward Tatum studiem autotrofních mutantů *Neurospora crassa* zjistili, že každý **gen reguluje jedinečný chemický proces**. Formulovali teorii „**jeden gen – jeden enzym**“.

**1943** William Astbury získal difrakční obraz struktury DNA vzniklý na základě působení paprsků X. Zjistil, že DNA má pravidelnou periodickou strukturu.

**1944** Oswald Avery, Colin McLeod a Maclyn MacCarty zjistili na pokusech se *Streptococcus pneumoniae*, že **DNA může přenášet vlastnosti mezi buňkami**. S-formy (smooth) streptokoků nesou povrchový obalový protein a jsou virulentní, naproti tomu R-formy (rough) tento povrchový faktor v důsledku mutace nenesou. S-formy jsou virulentní, R-formy nevirulentní. Myši infikované živými buňkami formy R a současně inaktivovanými buňkami typu S byly přesto nakaženy. Jako faktor, který přenáší virulenci (transformace), byla identifikována **DNA** (DNAza schopnost transformace likvidovala) a zároveň vyloučen protein a **RNA** (proteázy a RNáza na schopnost transformace neměly vliv).

**1944** Barbara McClintock objevila u kukuřice geny, které byly schopny se přemísťovat (**transponovat**) do různých míst na chromozómu, transpozóny. Za svůj objev obdržela v roce 1983 Nobelovu cenu.

**1952** Alfred Hershey a Martha Chase zjistili, že **virová DNA je schopna transformovat buňky**. Proteinový kapsid přitom zůstává vně buňky. Tyto výsledky podpořili teorii Averyho a kol. (1944) o DNA jako transformačním agens.

**1953** James Watson a Francis Crick v proslulém 900 slov obsahujícím článku v časopise *Nature* popsali **strukturu DNA** a vysvětlili její základní biologické funkce. Za svůj objev obdrželi v roce 1962 Nobelovu cenu.

**1955** Joe Hin Tiro definitivně stanovil počet lidských chromozómů na 46. Arthur Kornberg **izoloval enzym DNA polymerázu** u *Escherichia coli*. Nobelova cena mu byla udělena v roce 1959.

**1956** Vernon Ingram popsal molekulární podstatu **srpkovité anémie**, kterou způsobuje bodová mutace vedoucí k záměně valinu za glutamovou kyselinu v 6. pozici b-globinového řetězce. Byla popsána struktura **dvouřetězcové RNA**, která vykazuje řadu odlišných rysů od dříve popsané dsDNA. Na objevu se podíleli Alexander Rich a Leslie Orgel.

**1958** Matthew Meselson a Franklin Stahl zjistili, že k **replikaci** dochází podle tzv. **modelu semikonzervativní replikace DNA**, a že každé rodičovské vlákno je matricí pro jedno nové vlákno dceřiné.

**1959** Bylo zjištěno, že Downův syndrom je způsoben **chromozomální aberací a to trizómií chromozómu č. 21**.

**1961** Banner, Jacobs a Matthew Meselson objevili **mediátorovou RNA**. Byla popsána molekulární podstata metabolického defektu fenylketonurie.

**1966** Marshall Nirenberg, Har Khorana a Severo Ochoa popsali **genetický kód**. Nobelovu cenu pak obdrželi v roce 1968

**1968** Několik výzkumných skupin izolovalo a popsalo první **restrikční endonukleazu, EcoR I z Escherichia coli.**

**1973** Herbert Boyer a Stanley Cohen zkonstruovali **první rekombinantní molekulu DNA** na bázi plasmidu, který označil pUC podle University College San Francisco.

**1973** V bakteriálních buňkách byl naklonován první živočišný gen z DNA žaby *Xenopus laevis*.

**1975** Cesar Milstein a Georges Kohler vyvinuli technologii přípravy hybridomů. Za to obdrželi Nobelovu cenu v roce 1984.

**1975-1977** Byly vyvinuty **metody sekvenování DNA.** Jednu dnes nejpoužívanější vyvinula skupina pod vedením Sangera.

**1976** Byla založena první firma, která se věnovala praktickému využití genového inženýrství – Genentech. Založil ji vědecký pracovník Herbert Boyer a investor Robert Swanson.

**1977** Byl naklonován gen pro první lidský protein do bakterií; jednalo se **gen pro inzulin.** Rekombinantní inzulin se na trhu objevil v roce 1982.

Používal se k léčbě pacientů alergických na prasečí inzulin. Richards Robert a Phil Sharp objevili **introny.**

**1981-1982** Objevily se první vyšší organismy nesoucí naklonovaný cizorodý gen (transgenní organismy), jednalo se o myši *Mus musculus* a banánové mušky *Drosophilla melanogaster*.

**1982** Byla vytvořena databáze GeneBank – [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

**1983** Poprvé byla zmapována poloha genu na lidském chromozomu. Jednalo se o gen, jehož defekt vede k Huntingtonově chorobě.

Byla vyvinuta metoda PCR, za kterou autor, Kary Mullis, obdržel v roce 1993 Nobelovu cenu.

**1986** Metodou pozičního klonování, tedy bez znalosti genového produktu, byla zmapována pozice genu zodpovědného za chronickou granulomatozu.

**1987** Byla připravena **první mapa lidského genomu** s využitím polymorfismu délky restričních fragmentů (RFLP = restriction fragment length polymorphism).

**1989** Byly nalezeny markery pro mapování lidského genomu, tzv. mikrosatelity, dva až čtyři páry bází dlouhé opakující se sekvence, jejichž druh a počet je u každého lidského jedince jedinečný. Jsou použitelné k identifikaci podobně jako otisky prstů.

**1990** Byl zahájen projekt **mapování lidského genomu**, zahájili jej U. S. Department of Energy (měli zájem sledovat vliv záření na lidskou populaci) a National Institute of Health, U.S.A. Byly připraveny uměle bakteriální chromozomy, tzv. BAC vektory, které umožňují klonovat velmi dlouhé úseky DNA.

**1992** Byla připravena druhá mapa lidského genomu, tentokrát na bázi **mikrosatelitů.**

**1994** V USA byl uvolněn ke konzumaci první geneticky manipulovaný organismus (GMO), a to rajčata s deaktivovaným genem pro polygalakturonazu, díky tomu měly plody delší trvanlivost.

**1995** Byly získány kompletní sekvence **mikroorganismů** Haemophilus influenzae (1 830 137 bp) a Mycoplasma genitalis (580 070 bp, 470 genů).

V případě M. genitalis se jedná o **nejmenší genom** pravděpodobně nutný pro existenci buňky jako takové.

**1996** Byla zveřejněna kompletní genetická **mapa myši domácí** (Mus musculus). Byl sekvenován kompletní genom kvasinky Saccharomyces cerevisiae. Byl sekvenován první archaeon Metanococcus jannaschi. 1996 Narodilo se první klonované zvíře – ovce Dolly.

**1997** Byl sekvenován kompletní **genom bakterie Escherichia coli** (4,6 x 10<sup>6</sup> bp, asi 4 000 genů).

**1998** Byla objevena **interference RNA** u háďátka Caenorhabditis elegans. V roce 2006 obdrželi autoři, Andrew Fire a Craig Mello, za tento objev Nobelovu cenu. Soukromá společnost Celera Genomics se rozhodla sekvenovat lidský genom. Byl sekvenován genom původce tuberkulózy, bakterie Mycobacterium tuberculosis (4,4 x 10<sup>6</sup> bp)

**1998** Byl sekvenován **genom háďátka** Caenorhabditis elegans, modelového organismu pro studium embryogeneze.

**1999** Byl sekvenován **lidský chromozóm č. 22**.

**2000** Byl sekvenován genom **banánové mušky Drosophilla melanogaster**. Byla zveřejněna sekvence lidského genomu, projekt stál 3 miliardy dolarů, společnost Celera vystačila s částkou 10x nižší. Informace o lidském genomu lze nalézt na [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

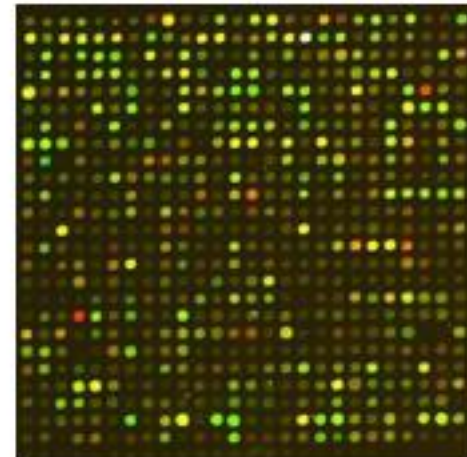
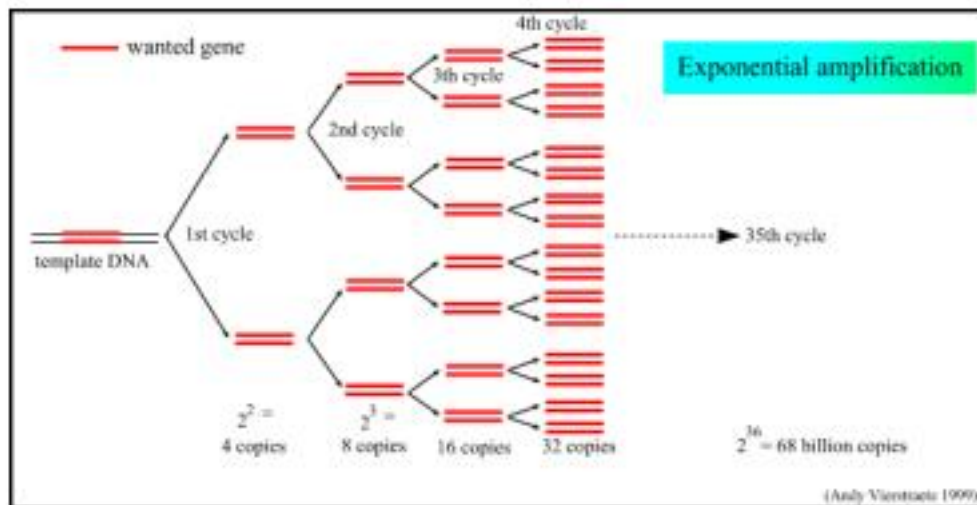
**2004** Ve Velké Británii byla založena banka pro ukládání zárodečných buněk pozemských živočichů ohrožených vyhynutím.

**2010** Chemickou syntézou a metodami genového inženýrství byl připraven genom Mycoplasma genitalium.

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA  
BRNO



- během posledních několika let se výrazně urychluje **hromadění informací o molekulách života**
- **milníky**: objev dvoušroubovice DNA, centrální dogma, restriční endonukleázy, klonování genů, reverzní transkripce, sekvenování DNA, PCR, monoklonální protilátky, microarrays, RNA interference, kmenové buňky, umělé nukleázy, CRISPR/CAS atd...





# 12 milníků současné molekulární biologie a genetiky

1. Mendelovy zákony
2. Geny se nacházejí na chromozomech
3. Geny řídí biochemii
4. Skákající geny – transpozony
5. Genetickým materiálem je DNA
6. DNA je dvoušroubovicí
7. Rozluštění genetického kódu
8. Restrikční enzymy
9. Sekvenování DNA
10. Polymerázová řetězová reakce
11. Přečtení lidského genomu
12. Editace genomů

OD MENDELA PO SOUČASNOST: DVANÁCT MILNÍKŮ GENETIKY

text: Eduard Kejnovský

ilustrace: Pavel Jedlička

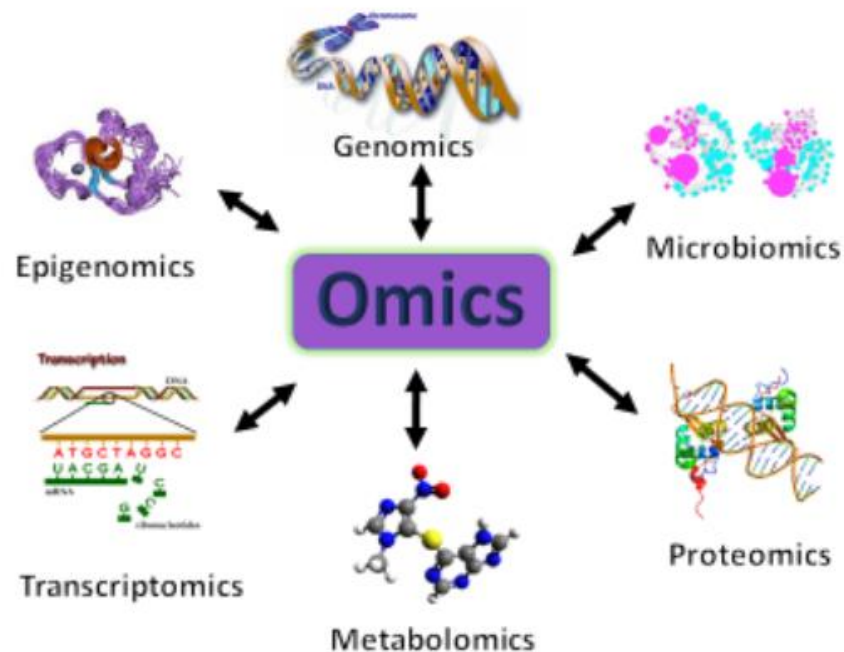
# Význam molekulární biologie

- posunuje **výzkum** na takovou úroveň, která je společná všem živým **systemům** (dále prohlubuje dřívější buněčnou úroveň)
- umožňuje **manipulovat s buňkami** - ovlivňovat jejich vlastnosti žádoucím směrem (lidská a veterinární medicína, biotechnologie, genové inženýrství, zemědělství, atd.)
- přináší nové **možnosti studia příbuznosti druhů**, fylogeneze, evoluce, atd.
- spolu s technikami informačních technologií patří molekulární biologie k **nejprogresivnějším** oborům

současnosti

- Molekulárně biologické znalosti jsou široce využívány v medicině a jsou nezbytné pro genetické inženýrství, jakož i pro jakoukoliv jinou práci s genetickou informací, např. v kriminalistice.
- „Omics Science“

Figure #1: Multi-Omics



- od roku 2003 známe nukleotidovou sekvenci DNA, která tvoří lidský genom (přibližně 20.400 genů, 23 párů chromozomů,  $3 \times 10^9$  párů bází/haploidní stav)
- máme tedy k dispozici veškerou informaci nutnou pro vytvoření a fungování lidské bytosti
- jen 1,5% lidského genomu tvoří geny kódující proteiny, zbytek tvoří oblasti kódující RNA, regulační sekvence, introny
- funkce mnoha lidských genů není dostatečně známa, tím méně je známa úloha nekódujících sekvencí

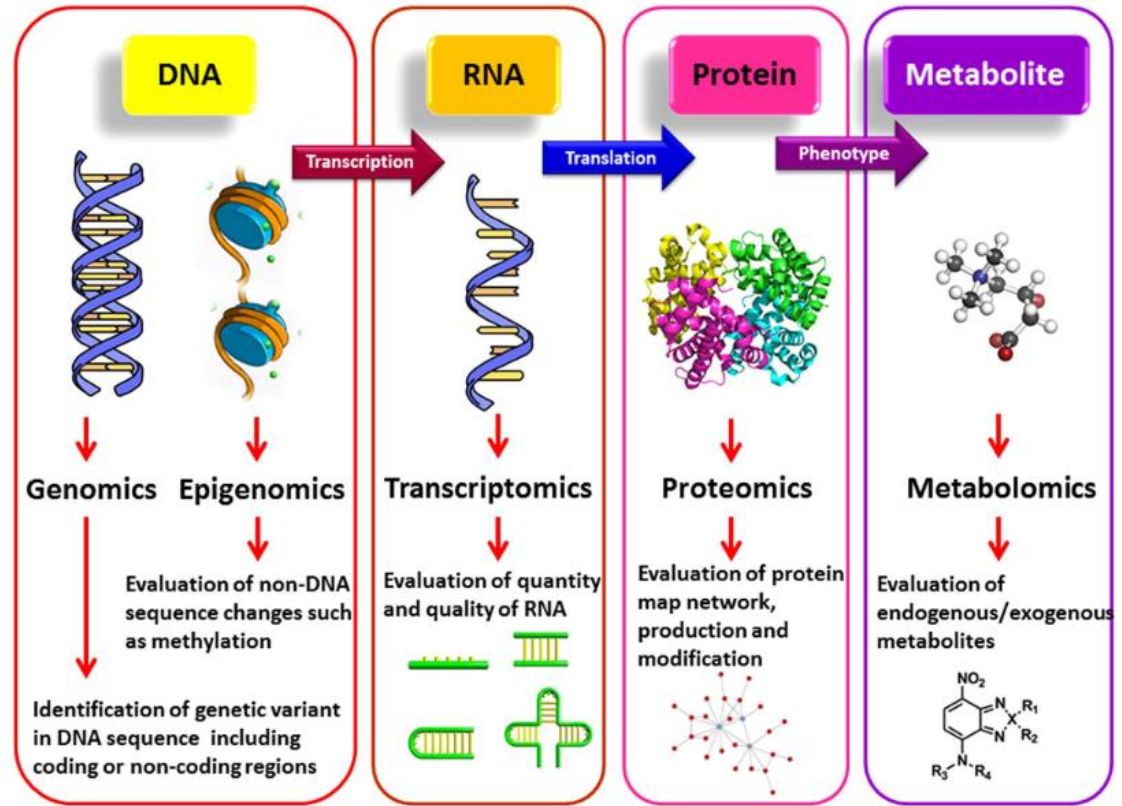
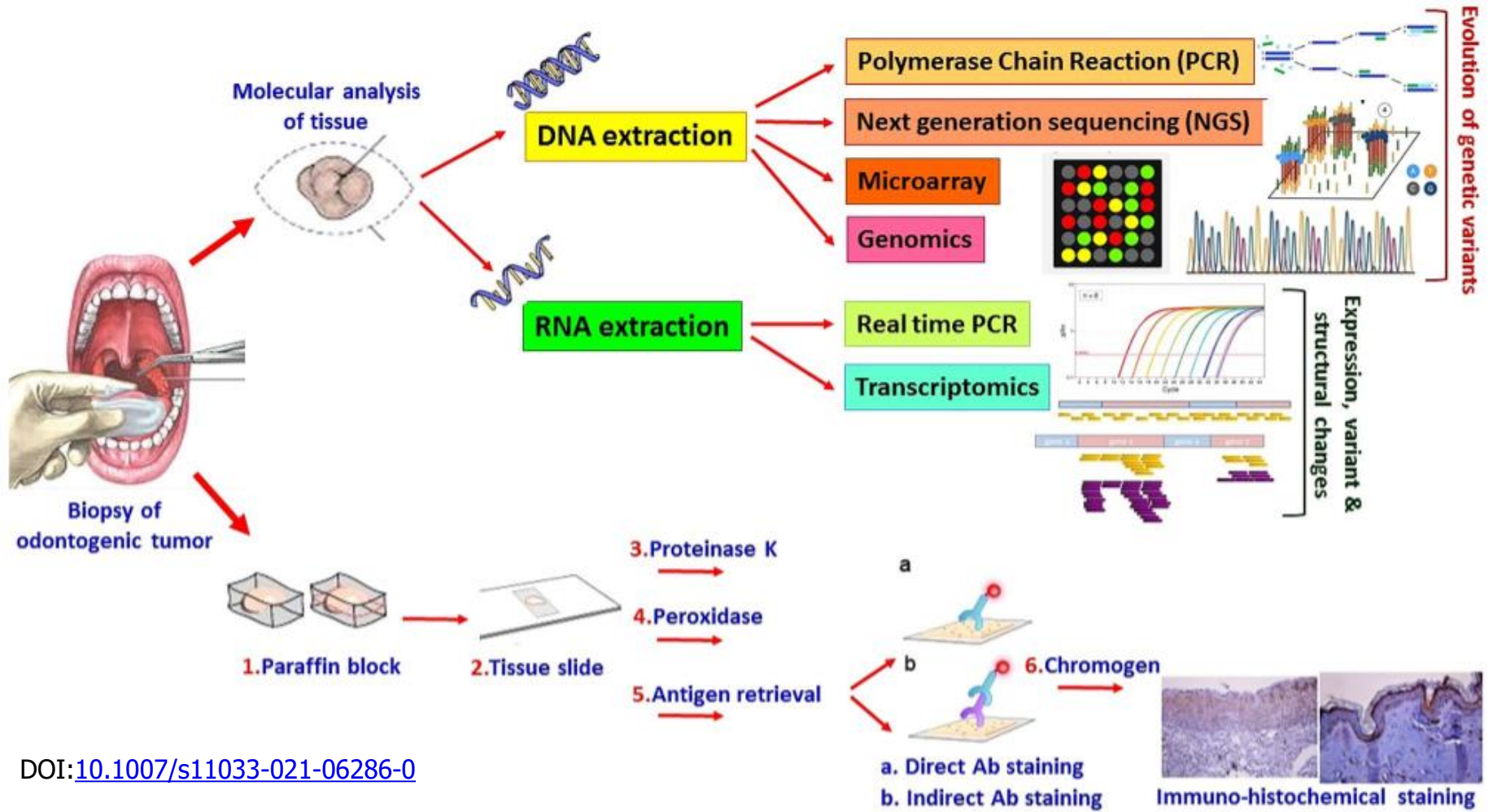


Fig. 1 Different main levels of “-omics” technology for evaluation of comprehensive molecules in cell including genetic variants in DNA sequence (Genomics), non-DNA sequence alternation such as histone modification and methylation (Epigenomics), analysis of expression and structural changes in RNA and variants like splice sites (Tran-

scriptomics), evaluation of expression, modification and net protein interactions (Proteomics) and description of functional metabolites in cell (Metabolomics). The mix of different type of “-omics” technology can help us in diagnose, prognoses and therapeutic approaches of tumors

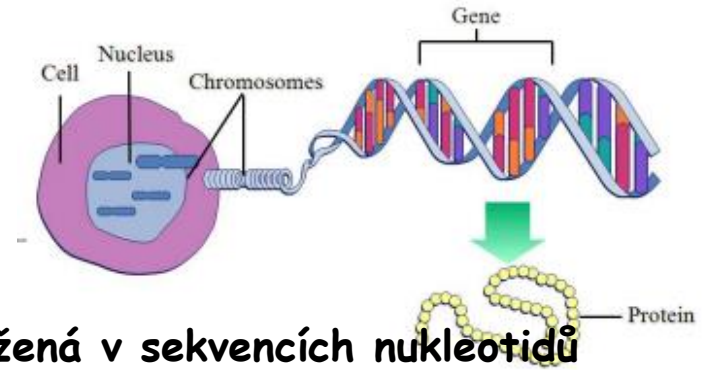
# Současnost - výzvy

- poznání mechanismů řídicích a koordinujících **genovou expresi a jejich vztah ke zdraví člověka** (všechny nemoci mají dědičnou složku, o které spolurozhodují geny)
- **léčba dědičných chorob**: důsledek chybné funkce některých genů přenesených z rodičů na potomstvo - pro pochopení příčiny je třeba pochopit funkce zdravých genů
- **léčba rakoviny**: rovněž důsledek poruch funkce genů, hledání markerů pro včasnou diagnostiku a vhodných cílů pro genovou terapii, hledání nových chemoterapeutik
- **genové inženýrství a biotechnologie pro zemědělství**: zlepšování zdrojů potravy (zvyšování odolnosti k vnějším podmínkám, nemocem)



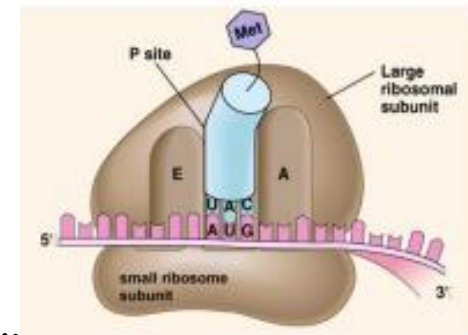
DOI: [10.1007/s11033-021-06286-0](https://doi.org/10.1007/s11033-021-06286-0)

# Terminologie



- **genetická informace:** biologická informace obsažená v sekvencích nukleotidů nukleových kyselin (DNA a RNA)
- **Gen:** jednotka genetické informace určující strukturu určitého proteinu nebo RNA (fyzicky: segment nukleové kyseliny)
  - gen strukturní - nese informaci o primární struktuře jednoho polypeptidového řetězce
  - geny pro funkční RNA (tRNA, rRNA)
  - geny regulační (pro regulační RNA)
- **DNA:** slouží k dlouhodobému skladování genetické informace
- **RNA:** podílí se na mechanismu, kterým se genetická informace vyjadřuje k praktickému použití

# Terminologie



- **genom:** souhrn veškerého genetického materiálu organismu, buňky nebo organely, který se kopíruje a přenáší potomkům (zahrnuje geny i nekódující sekvence)
- **genotyp:** genetická konstituce organismu reprezentovaná souborem alel jeho genomu (vztaženo na jedince daného druhu)
- **fenotyp:** soubor vlastností, kterými se v daném prostředí projevuje genotyp organismu
- **metabolismus:** soubor procesů pro získání energie a stavebních látek nutných pro biosyntézu buněčných složek; podmínka růstu, reprodukce a realizace genetické informace
- **ribozomy:** klíčové složky buněčného aparátu, kterými se tvoří buněčné proteiny podle instrukcí genů
- **Rekombinantní DNA** (uměle syntetizovaná DNA, která vzniká inzercí celého genu nebo jeho určité části do genomu jiného organismu)
- **cDNA (cDNA (complementary cDNA))** je DNA syntetizovaná podle mRNA v reakci katalyzované enzymem reverzní transkriptázou)

**TEST**

**MUNI  
PHARM**

Mnoho dalších praktických aplikací **rekombinantní DNA** se nachází v průmyslu, výrobě potravin, humánní a veterinární medicíně, zemědělství a bioinženýrství.<sup>[4]</sup> Některé konkrétní příklady jsou uvedeny níže.

### Rekombinantní chymosin

Nalezen v syřidle, chymosin je enzym potřebný k výrobě sýra. **Jednalo se o první geneticky modifikovanou potravinářskou přísadu používanou komerčně.** Zpracovatelé tradičně získávali chymosin ze syřidla, což je přípravek odvozený od čtvrtého žaludku telat krmených mlékem. Vědci vytvořili nepatogenní kmen (K-12) o *E-coli* bakterie pro rozsáhlou laboratorní výrobu enzymu. Tento mikrobiologicky vyrobený rekombinantní enzym, strukturně identický s telecím enzymem, stojí méně a je produkován v hojném množství. Dnes se asi 60% tvrdého sýra v USA vyrábí s geneticky upraveným chymosinem. V roce 1990 FDA udělil chymosin "obecně uznáván jako bezpečný" („GRAS) stav na základě údajů prokazujících, že enzym je bezpečný.<sup>[14]</sup>

### Rekombinantní lidský inzulín

Téměř úplně nahradil inzulín získaný ze zvířecích zdrojů (např. Prasat a skotu) pro léčbu inzulín-dependentního cukrovka. Široce se používá řada různých rekombinantních inzulínových přípravků.<sup>[15]</sup> Rekombinantní inzulín se syntetizuje vložením lidského genu pro inzulín *E-coli* nebo kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*)<sup>[16]</sup> který pak produkuje inzulín pro lidské použití.<sup>[17]</sup>

### Rekombinantní lidský růstový hormon (HGH, somatotropin)

Podává se pacientům, jejichž hypofýza generuje nedostatečné množství pro podporu normálního růstu a vývoje. Než byl k dispozici rekombinantní HGH, byl HGH pro terapeutické použití získán z hypofýzy mrtvol. Tato nebezpečná praxe vedla k rozvoji některých pacientů Creutzfeldt – Jakobova choroba. Rekombinantní HGH tento problém odstranil a nyní se používá terapeuticky.<sup>[18]</sup> To bylo také zneužíváno jako droga zvyšující výkon sportovci a dalšími.<sup>[19]</sup>

### Rekombinantní srážení krve faktor VIII

Protein srážení krve, který se podává pacientům s formami hemofilie s poruchami krvácení, kteří nejsou schopni produkovat faktor VIII v množství dostatečném pro podporu normální srážlivosti krve.<sup>[20]</sup> Před vývojem rekombinantního faktoru VIII byl protein získán zpracováním velkého množství lidské krve od více dárců, což s sebou neslo velmi vysoké riziko přenosu infekční choroby přenášené krví, například HIV a hepatitida B.

### Rekombinantní vakcína proti hepatitidě B.

Žloutenka typu B infekce je kontrolována použitím rekombinantní vakcíny proti hepatitidě B, která obsahuje formu povrchového antigenu viru hepatitidy B, který se produkuje v kvasinkových buňkách. Vývoj vakcíny proti rekombinantní podjednotce byl důležitým a nezbytným vývojem, protože virus hepatitidy B, na rozdíl od jiných běžných virů, jako je virus obrny, nelze pěstovat in vitro.



## Diagnóza infekce [HIV](#)

Každá ze tří široce používaných metod pro [diagnostikování infekce HIV](#) byl vyvinut s použitím rekombinantní DNA. Test na protilátky ([ELISA](#) nebo [western blot](#) ) používá k testování přítomnosti rekombinantní protein HIV [protilátky](#) které tělo produkovalo v reakci na infekci HIV. Test DNA hledá přítomnost genetického materiálu HIV pomocí [polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí](#) (RT-PCR). Vývoj testu RT-PCR byl umožněn molekulárním klonováním a sekvenční analýzou genomů HIV

## [Zlatá rýže](#)

Rekombinantní odrůda rýže, která byla vyvinuta tak, aby exprimovala odpovědné enzymy [β-karoten](#) biosyntéza.<sup>[12]</sup> Tato odrůda rýže je příslibem pro snížení výskytu [nedostatek vitamínu A](#), ve světové populaci.<sup>[21]</sup> Zlatá rýže se v současné době nepoužívá, dokud nebude vyřešeno regulační a duševní vlastnictví<sup>[22]</sup> problémy.

## [Plodiny odolné vůči herbicidům](#)

Byly vyvinuty komerční odrůdy důležitých zemědělských plodin (včetně sóji, kukuřice / kukuřice, čiroku, řepky, vojtěšky a bavlny), které obsahují rekombinantní gen, který vede k rezistenci vůči herbicidu [glyfosát](#) (jméno výrobku *Zátah*) a zjednodušuje kontrolu plevelů aplikací glyfosátu.<sup>[23]</sup> Tyto plodiny se běžně komerčně používají v několika zemích.

## [Plodiny odolné proti hmyzu](#)

*Bacillus thuringiensis* je bakterie, která přirozeně produkuje protein ([Bt toxin](#) ) s insekticidními vlastnostmi.<sup>[21]</sup> Bakterie se po mnoho let aplikuje na plodiny jako strategie boje proti hmyzu a tato praxe byla široce přijímána v zemědělství a zahradnictví. Nedávno byly vyvinuty rostliny, které exprimují rekombinantní formu bakteriálního proteinu, který může účinně potlačovat některé hmyzí predátory. Environmentální problémy spojené s jejich používáním [transgenní](#) plodiny nebyly zcela vyřešeny.<sup>[24]</sup>



# Opakování - buněčná biologie

## - živí tvorové jsou složeni z buněk

- variabilita projevů života versus jednota jejich základů
- buněčná struktura založená na obdobných složkách se objevuje u všech forem života
- **Schleiden a Schwann** v 30. letech 19. stol: strukturními jednotkami života jsou buňky



Theodore Schwann (1810-1882)

1. Vše živé je složeno z buněk
2. Buňky jsou nejmenší jednotky živých systémů
3. Buňky vznikají jen z dříve existujících buněk













Matthias Jakob Schleiden (1804-1881)

# Buňky se od sebe mohou podstatně lišit...

- variabilita velikosti a tvarů
- mohou žít volně nebo vázané k matrix nebo jiným buňkám

***Mycoplasma*** je druhově velmi početný rod bakterií představující nejmenší a nejjednodušší prokaryotické buňky vůbec. Vyznačují se tím, že jim chybí buněčná stěna a jejich tvar tak udržuje pouze třívrstevná cytoplasmatická membrána.

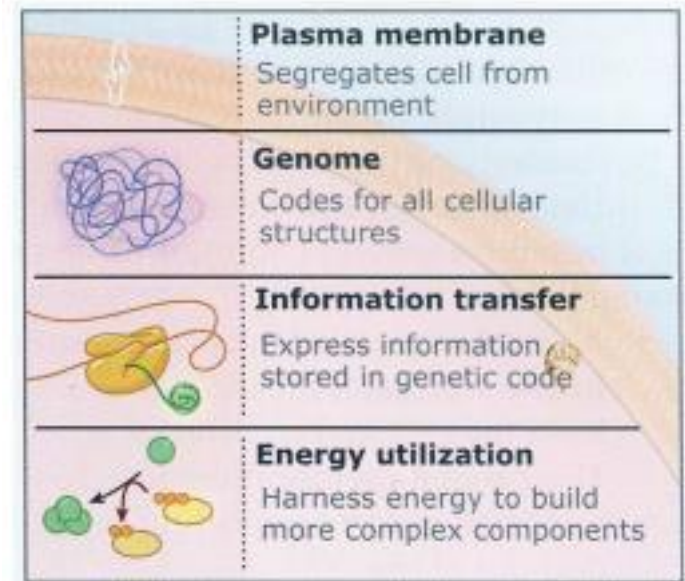
Cell type	Size
  Mycoplasma	0.2 $\mu\text{m}$
  Yeast cell ( <i>S. cerevisiae</i> )	6 $\mu\text{m}$
  Fibroblast	20 $\mu\text{m}$
  Nerve cell	20 $\mu\text{m}$ - 10 cm
  Plant cell	50 $\mu\text{m}$

## ...ale mnoho vlastností sdílejí

- jsou vymezeny od okolního světa odděleny **plazmatickou membránou** (s charakteristickou fosfolipidovou strukturou)
- v plazmatické membráně jsou systémy, které určují **import molekul do buňky a export** z buňky
- buněčné struktury jsou vybudovány **z molekul potravy** s využitím vnitřních systémů přeměny energie
- obsahují **genetický materiál** nesoucí informaci potřebnou pro utváření/obnovu všech buněčných složek
- disponují systémem **genové exprese**, kterým se genetická informace převádí k praktickému využití
- jednotlivé proteiny nebo RNA (definované geny) se po své syntéze mohou spojovat do struktur vyššího řádu

# Minimální požadavky pro existenci živé buňky

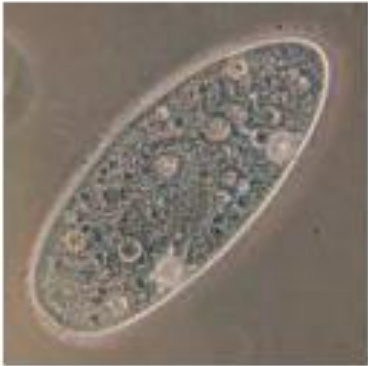
- **plazmatická membrána** (pro vymezení buňky vůči okolí)
- schopnost využití **vnější energie** pro vytvoření buněčných struktur z jednoduchých základních molekul
- přítomnost **genetické informace** definující vlastnosti buňky
- přítomnost systému pro praktické **využití** této informace



# Jednobuněčné organismy

**Jednobuněčný organismus** je takový organismus, který se skládá jen z jedné buňky. Mezi jednobuněčné počítáme bakterie a archea (ačkoliv některé mají sklon k tvorbě plodniček či agregátů, také mnohé sinice jsou spíše mnohobuněčné) a dále mnohá jednobuněčná eukaryota (tzv. protisté) – tedy prvoci, mnohé řasy či houby (např. kvasinky či některé hlenky).

- **nejjednodušší organismy**
- **žijí jako samostatné jednotky**
- **reprodukuje se**
- **přizpůsobují se extrémním podmínkám (aerobní/anaerobní, vysoké/nízké teploty atd.)**



Prvoci  
Paramecium aurelia

# Mnohobuněčné organismy

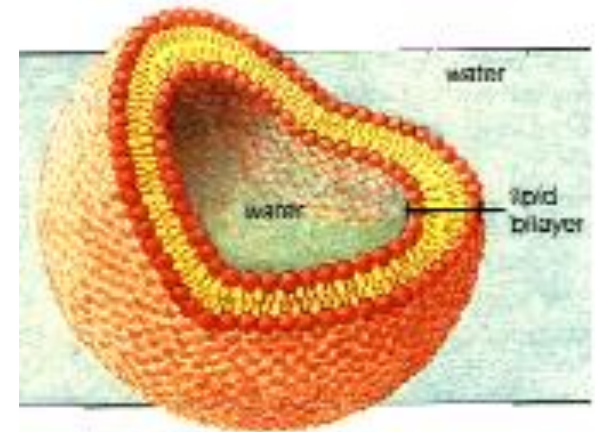
- **specializované buňky**, výsledek **diferenciace buněk** tj. procesu změny exprese genů v buňkách téhož organismu, výsledkem je fenotypové rozrůznění
- strukturní a funkční specializace zajišťuje **dělbou práce** uvnitř organismu (často ztráta dělení a růstu)
- schopnost **komunikace mezi buňkami**, aby zajistili funkci organismu jako celku



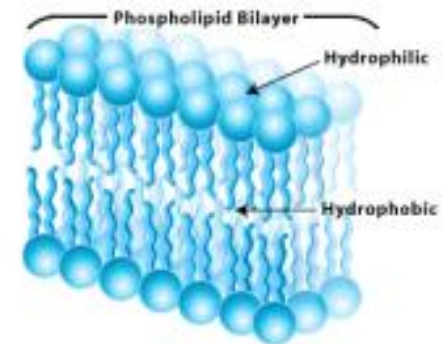
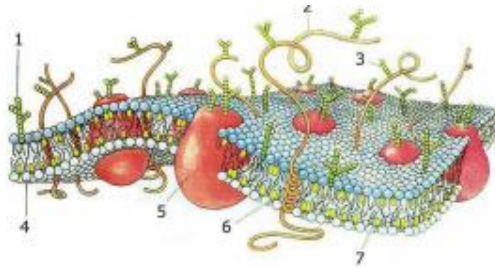
Hlístice *Caenorhabditis elegans* je příkladem dobře známého mnohobuněčného živočicha, každá z jejích 1090 [tělních buněk](#) má svůj osud přesně určen<sup>[1]</sup>

**Mnohobuněčnost** je stav, kdy je [tělo](#) určitého [organismu](#) složeno z většího počtu [buněk](#), které jsou specializované a spolupracují mezi sebou. Mezi **mnohobuněčné organismy** jsou tradičně počítány některé [rostliny](#) (některé [zelené řasy](#), suchozemské rostliny, [ruduchy](#) či [parožnatky](#)), některé [houby](#) a všichni moderně pojatí [živočichové](#). Dále však v určitém smyslu známe mnohobuněčné [chaluhy](#), některé [hlenky](#) a podobně.<sup>[2]</sup> Tendenci k mnohobuněčnosti však je možné najít i u mnohých [prokaryot](#). Je jasné, že mnohobuněčnost vznikla v historii mnohokrát a nezávisle.<sup>[3][4]</sup> Přečnou formu mezi mnohobuněčností a [jednobuněčností](#) představují organizmy vytvářející [kolonie](#). V některých dochází k určité specializaci a spolupráci buněk (některé [řasy](#) a [prvoci](#), například [váleč koulivý](#)). Za rozvojem však mohla stát [pluripotence](#).<sup>[5]</sup> Nutno také dodat, že většina běžných mnohobuněčných organismů ve svém životním cyklu obsahuje i jednobuněčné stádium.<sup>[6]</sup>

# Plazmatická membrána- funkce (autonomie, vodné prostředí, import/export, předávání signálu)



- zajišťuje, že se vodné prostředí odlišuje od vnějšího
- obsahuje proteinové komplexy řídící import a export molekul přes membránu (transportéry)
- disponuje systémy pro předávání signálů mezi vnějším a vnitřním prostředím
- strukturu tvořenou dvojvrstvou různých **fosfolipidů**, do které jsou zanořeny **proteiny a cholesterol**. Jednotlivé složky jsou mezi sebou spojeny pomocí hydrofobních a elektrostatických interakcí.

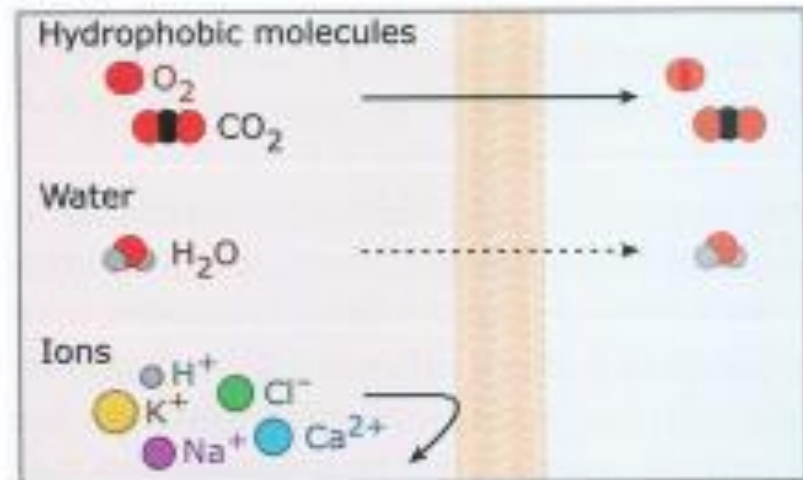
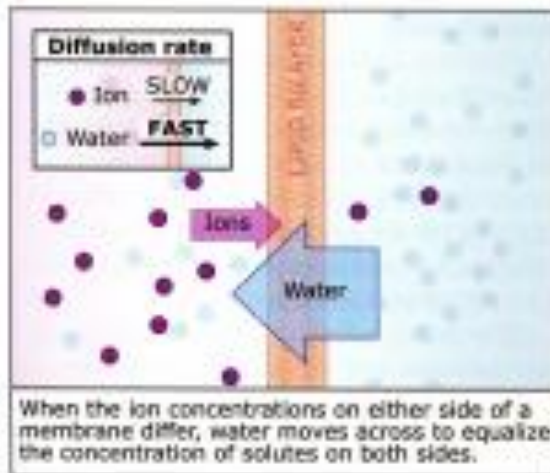


- Na povrchu buňky se může nacházet výraznější vrstvička **glykoproteinů – sacharidy**, které jsou na ně navázány slouží jako „**antény**“ pro signální molekuly vrstvu sacharidů na povrchu buňky označujeme jako **glykokalyx**).

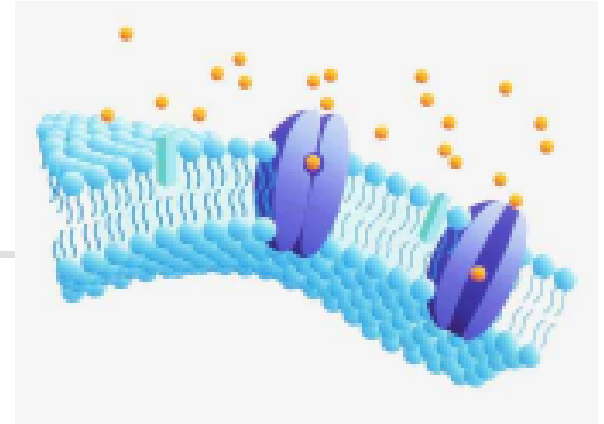


# Plazmatická membrána - propustnost

- membrána není permeabilní pro ionty, malé nabité (hydrofilní) molekuly a velké molekuly
- molekuly vody a hydrofobní molekuly membránou procházejí
- odlišná koncentrace iontů na obou stranách membrány může vytvořit osmotický tlak (pohyb molekul vody přes membránu směrem k prostředí s vyšší koncentrací iontů)
- riziko poškození buňky



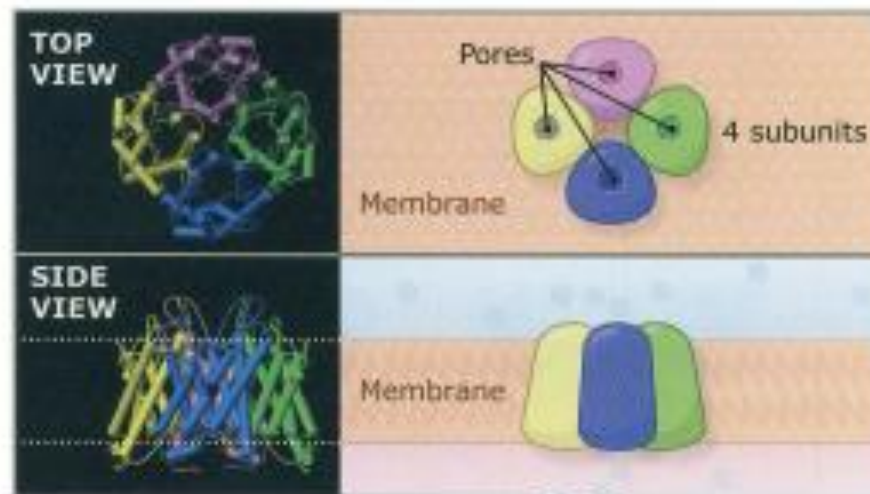
# Buňka si řídí svůj obsah



- regulaci podléhá především nitrobuněčné pH a obsah iontů
- využívá se speciálních membránových přenašečů
- přes membránu musí rovněž projít substráty metabolismu (zdroje energie) a složky zapojené do výstavby buněčných struktur
- nechtěné produkty metabolismu, ionty se přes membránu exportují ven
- pro oba směry platí vysoká selektivita transportu
- schopnost buňky udržovat vnitřní prostředí se nazývá **homeostáze**

# Přechod iontů přes membránu řídí proteinové komplexy

- vytvářejí kanálek v lipidové dvouvrstvě
- vnější povrch kanálkových proteinů je v kontaktu s membránovými lipidy
- vnitřní povrch obklopuje vodné prostředí kanálku
- roztoky iontů a hydrofilní molekuly procházejí kanálkem, aniž by byly v kontaktu s membránovými lipidy

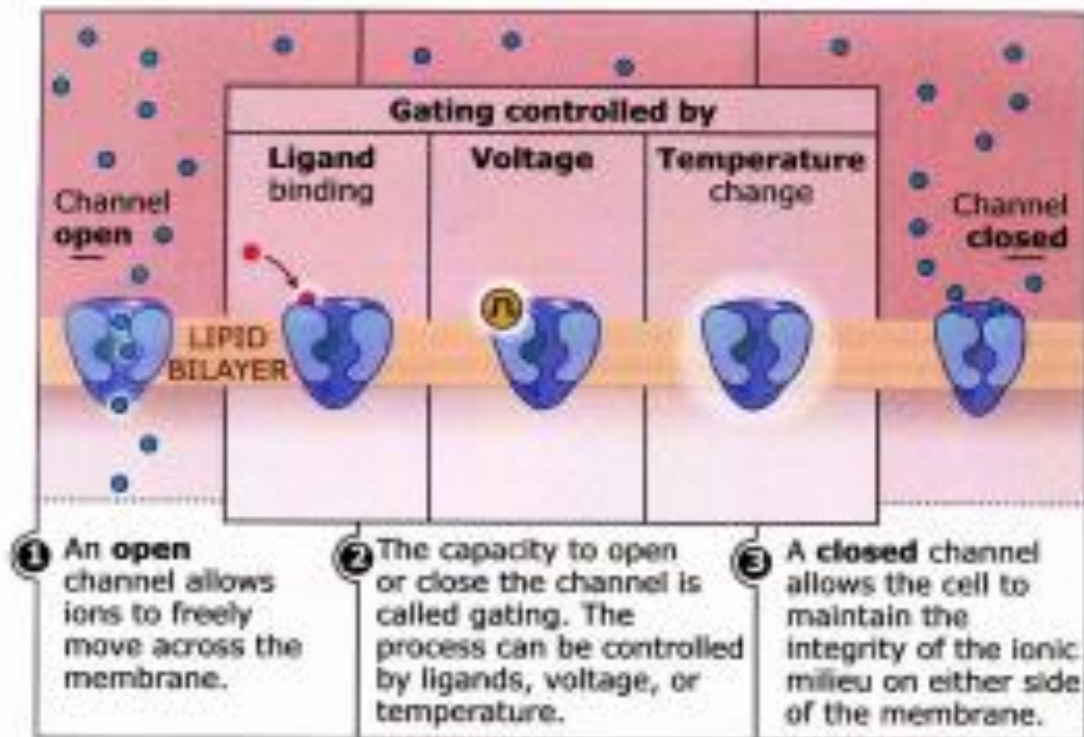


# Iontové kanálky a proteinové přenašeče

- dva mechanismy přenosu **iontů** membránou: **ve směru a proti směru iontového gradient**
- při pohybu iontů z prostředí o vyšší koncentraci do prostředí o nižší koncentraci (**po směru gradientu**) se využívá iontových kanálků (probíhá **bez** spotřeby energie)
- při pohybu iontů **proti** směru gradientu se využívá proteinových přenašečů (probíhá za spotřeby energie)

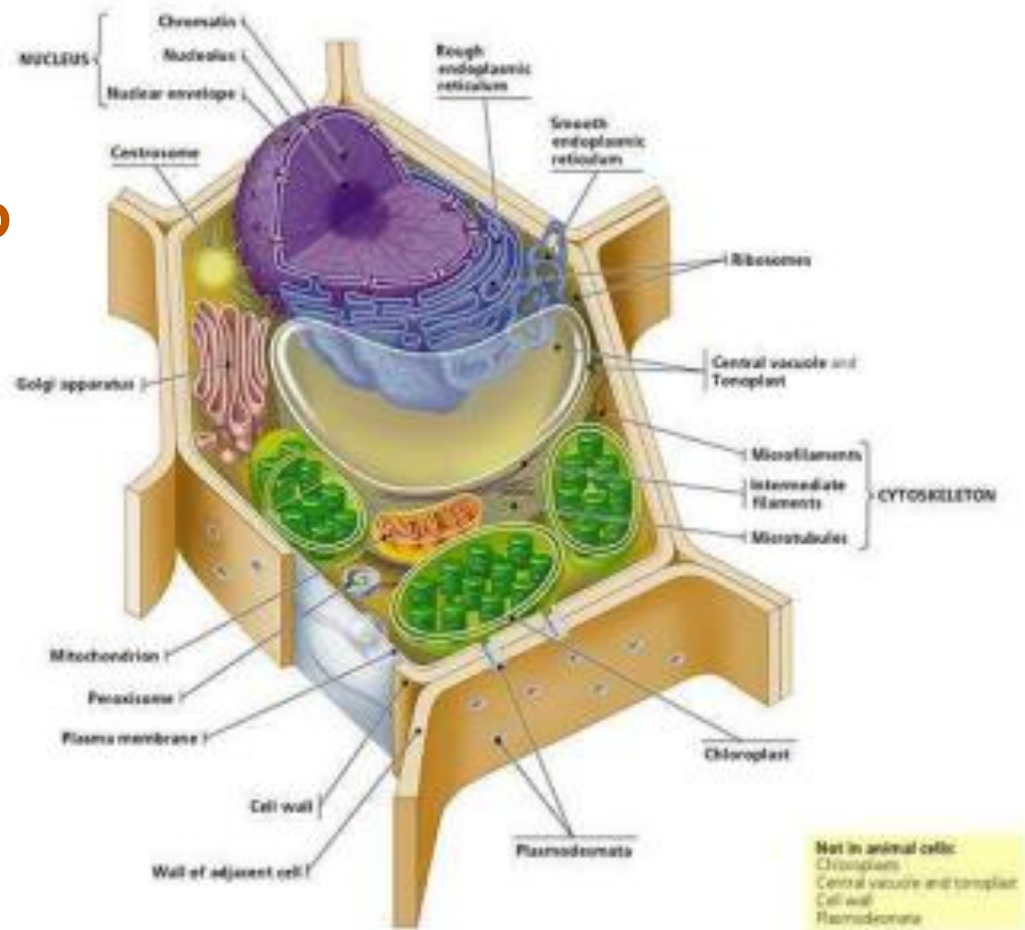
# Ovládání propustnosti iontových kanálků

- nemohou být stále otevřené (koncentrace iontů na obou stranách membrány by se vyrovnaly)
- otevírají se tím, že projdou konformační změnou
- konformační změnu mohou vyvolat různé podněty (např. speciální signální molekuly, elektrické napětí, teplota)



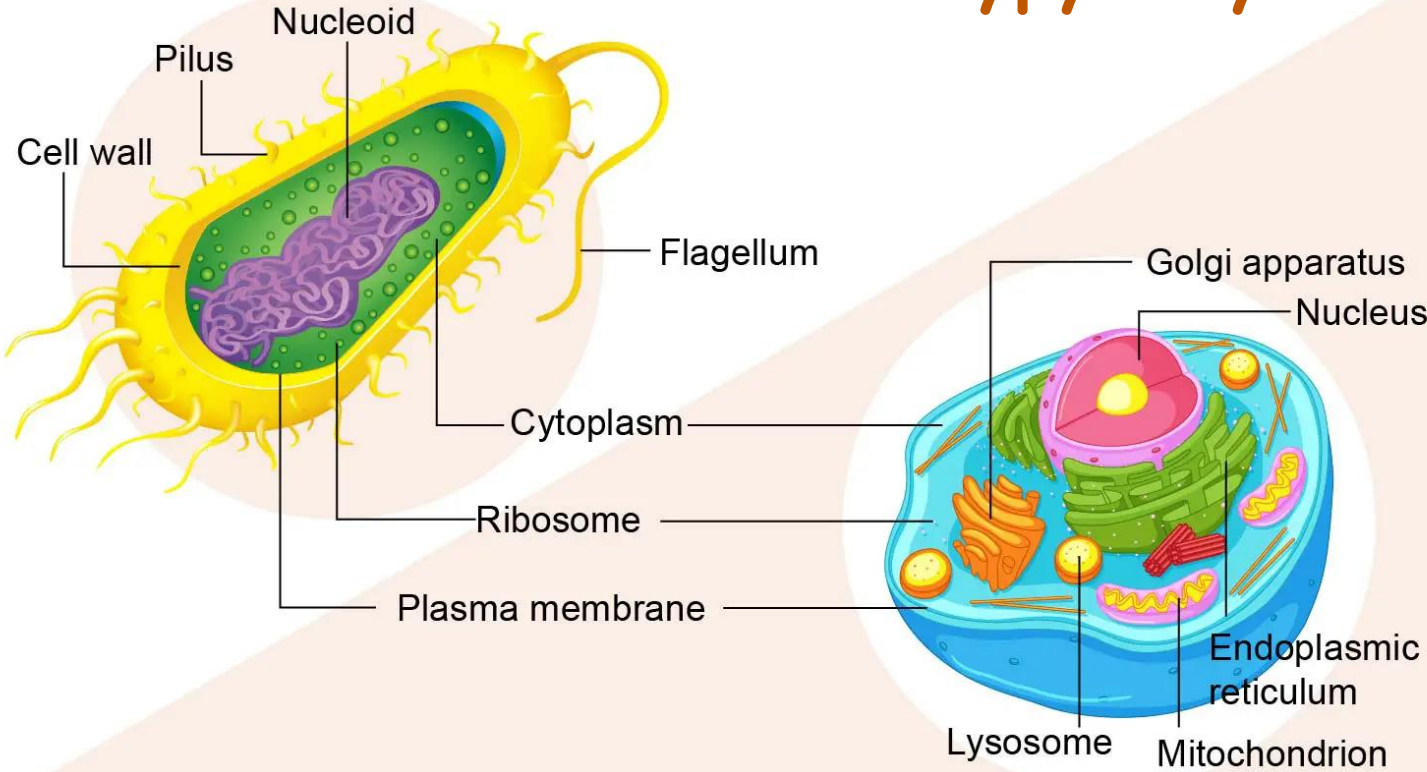
# Buněčná membrána není pevná

- ale slabá, flexibilní a křehká
- mechanickou oporu často poskytuje **buněčná stěna** umístěná vně membrány, která je běžná u **bakteriálních a rostlinných buněk**
- u **živočišných buněk** je **podpírána** strukturami **cytoskeletu**



# PROKARYOTE CELL

# Dva typy živých buněk



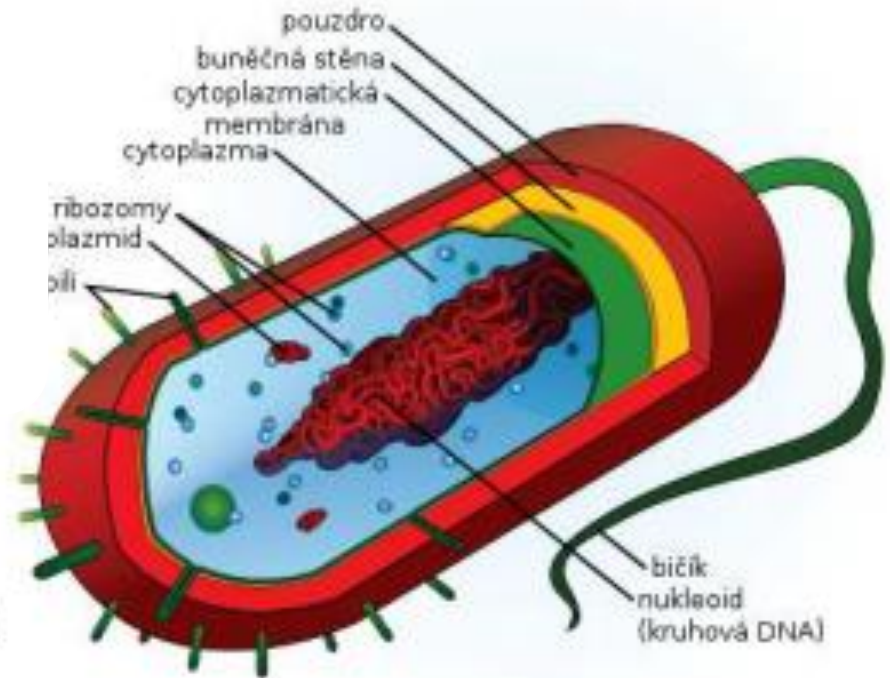
rsscience.com

# EUKARYOTE CELL

- Klasifikace podle vnitřního členění, tzv. **kompartmentalizace** (kompartment = prostor uzavřený membránou)
- **prokaryotická buňka**: jednodušší, tvořena pouze jedním kompartmentem s genetickým materiálem, aparátem a produkty genové exprese
- **eukaryotická buňka**: komplexnější, tvořena alespoň dvěma kompartmenty, jeden z nich obsahuje genetický materiál

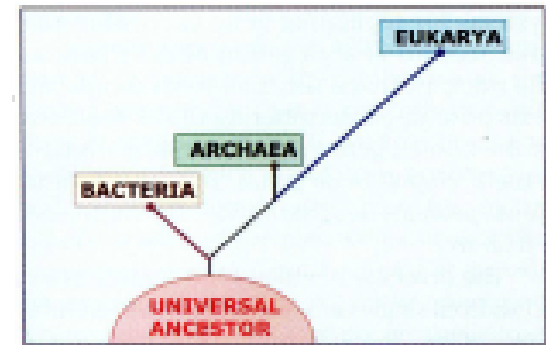
# Prokaryota

- jednobuněčné organismy
- buňky obklopeny membránou
- membrána obklopena buněčnou stěnou poskytující ochranu
- DNA umístěná v cytoplazmě
- obsahuje všechny chemické a strukturální složky nutné pro život
- na jediném chromozomu přítomna veškerá genetická informace





# Dva typy prokaryot: bakterie a archea



- fylogenetický vztah těchto skupin byl stanoven relativně nedávno moderními metodami (především sekvenováním DNA): **archea** představují samostatnou skupinu **prokaryot**
- **archea** mají vzhled a stavbu podobnou jako bakterie: malé jednobuněčné organismy bez vnitřních membrán
- žijí v extrémních podmínkách (vysoké teploty, kyselost, obsah solí)
- **archea** často využívají netypické metabolické dráhy, vykazují chemické odlišnosti ve stavbě buněčné stěny, mají aparát pro genovou expresi, který se více podobá eukaryotům než bakteriím

# Genetický materiál prokaryot



- **nejjednodušší genom** mají bakterie, které nežijí volně, ale uvnitř jiných organismů (**Mycoplasma**)
- hostitel poskytuje látky, které bakterie potřebují, ale nemohou si je vytvořit
- genom obsahuje pouze cca 500 genů, které kódují jen základní strukturní buněčné složky
- genomy **volně žijících bakterií** obsahují alespoň 1500 genů, které kódují kromě strukturních elementů také enzymy a složky vyspělejšího aparátu pro regulaci genové exprese

# Klasifikace bakterií

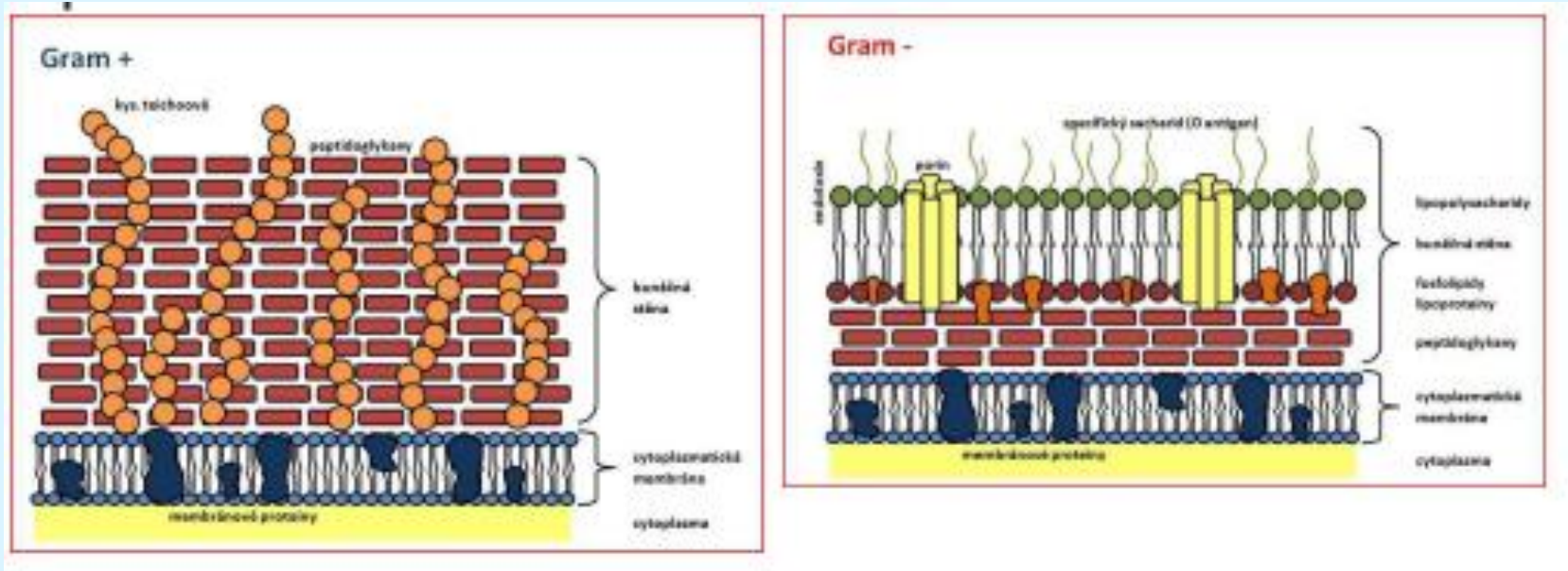


Hans Joachim Gram  
(1853-1938)

2 skupiny, které divergovaly  
cca před 2 miliardami let:

- **Gram-negativní** (např. *E. coli*) a
- **Gram-pozitivní** (např. *B. subtilis*),
- podle toho, jak reagují s Gramovým barvivem
- citlivost dána interakcí barviva s buněčnou stěnou

# Gramovo barvení



G+ bakterie mají plazmatickou membránu obklopenou **buněčnou stěnou** tvořenou proteoglykany a polysacharidy (modré/fialové zbarvení)

G- bakterie mají stěnu zvnějšku obklopenou **lipopolysacharidovou** vrstvou (červené/růžové zbarvení)

# Bakterie - model pro výzkum základních buněčných procesů

- výhody:
- jednobuněčné mikroorganismy, uniformita odpovědi na vnější podněty
- nízký počet genů
- haploidní stav (pouze jedna kopie každého genu)
- možnost kultivace za přísně kontrolovaných podmínek (v definovaném médiu s přesně daným obsahem solí a zdrojem uhlíku)
- vysoká rychlost růstu, generační doba pouze 20 minut
- možnost snadného uskladnění v hluboké mrazničce (-70 °C) na 20 a více let



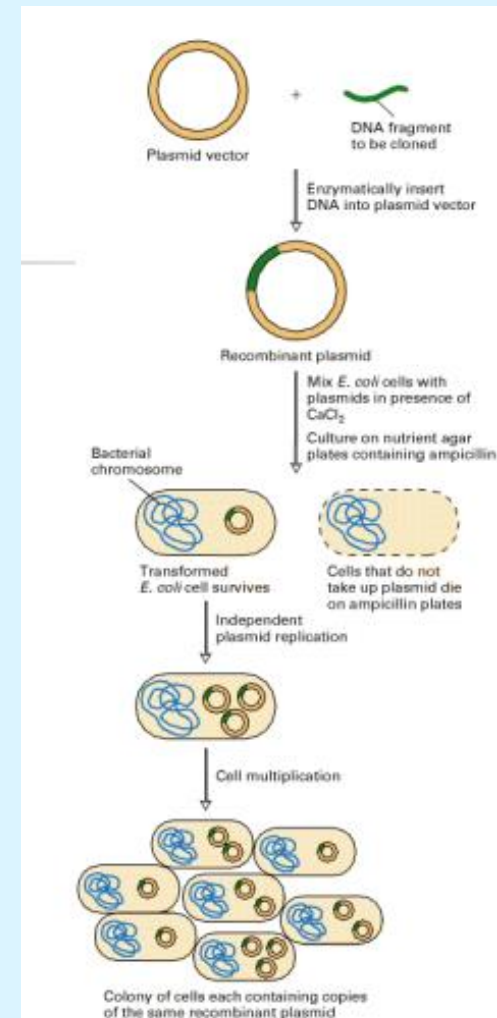
# Modelovou bakterií je *Escherichia coli*

- tyčinkovitá bakterie (velikost 1 x 2,5 mikronu)
- přirozeným prostředím je střevo (colon- proto „coli“)
- patří mezi gram-negativní bakterie



## Rekombinantní lidský [inzulín](#)

Téměř úplně nahradil inzulín získaný ze zvířecích zdrojů (např. Prasat a skotu) pro léčbu inzulín-dependentního [cukrovka](#). Široce se používá řada různých rekombinantních inzulínových přípravků.<sup>[15]</sup> Rekombinantní inzulín se syntetizuje vložením lidského genu pro inzulín *E-coli* nebo kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*)<sup>[16]</sup> který pak produkuje inzulín pro lidské použití.<sup>[17]</sup>



# Kde najdeme bakterie v přírodě?

- téměř všude (60 km vysoko v atmosféře, 11 km pod hladinou oceánu, ve sladké i slané vodě nebo ve splašcích, v půdě, kořenech rostlin nebo v tělech živočichů)
- počet bakterií na zemi je obrovský (množství bakteriálního uhlíku na Zemi odpovídá množství uhlíku rostlinného)
- bakterie pravděpodobně tvoří více než polovinu živé hmoty na Zemi

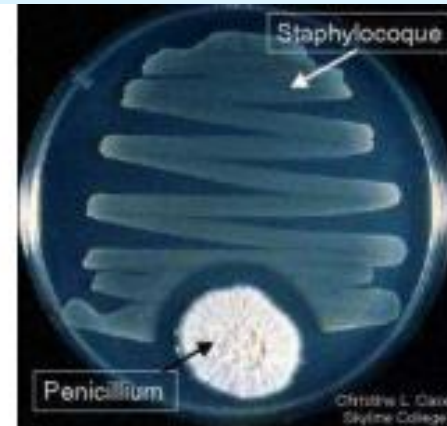
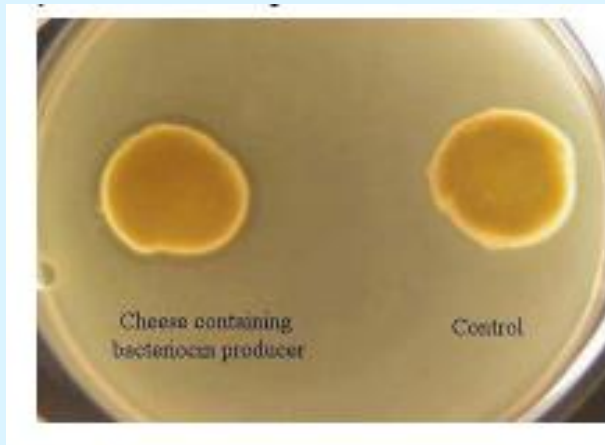
# Prokaryota jsou velmi přizpůsobivá

- jejich životní styl je rozmanitý a může se přizpůsobit i extrémním podmínkám (pH, přítomnost kyslíku, teplota, apod.)
- Klasifikace podle schopnosti růstu v různých **teplotách**:
- mezofilní: nejlépe rostou mezi 25 a 40 °C (sem patří lidské patogeny)
- psychrofilní: nejlépe rostou mezi 15 a 20 °C (ale jsou i takové, které žijí při 0 °C) – oblíbené prostředí – studená voda a půda
- termofilní: nejlépe rostou mezi 50 a 60 °C (některé tolerují i 110 °C)



# Bakterie jsou citlivé k přírodním látkám

- různé bakterie ve stejném prostředí ostře soutěží o zdroje:
- sekrece toxických proteinů, např. **bakteriocinů** - zabíjejí příbuzné bakterie, ale ne kmeny - producenty (využití bakteriocinových plasmidů jako vektorů)



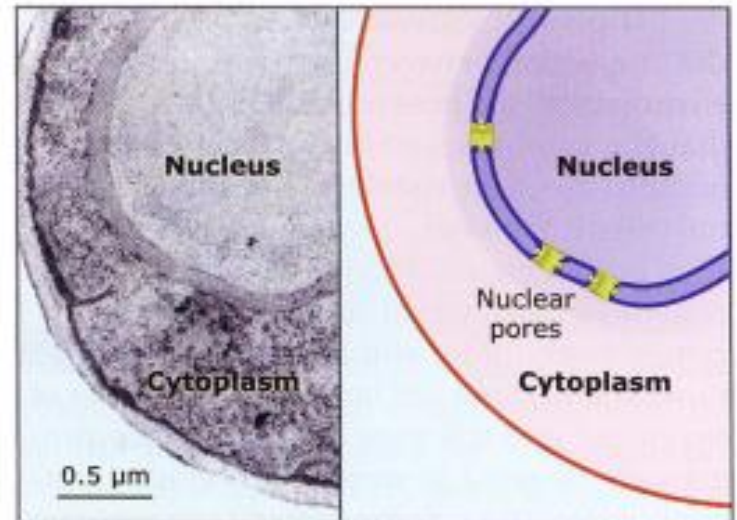
- tvorba **antibiotik** (klinické využití)

# Některé bakterie škodí, jiné jsou u žitečné

- malá část bakterií : původce infekčních nemocí (cholera, tuberkulóza, snět' slezinná, syfilis, kapavka, černý kašel, záškrť, atd.), k jejich vymýcení přispívá hygiena, čistá voda, mýdlo, splachovací záchody a také očkování a antibiotika **je patogenních**
- většina bakterií má **pozitivní význam**: přispívá k rovnováze ekosystému (rozklad odumřelých těl rostlin a živočichů)
- rozklad odpadních produktů činnosti člověka a škodlivin
- vyšší formy života by bez bakterií nepřežily, naopak ano

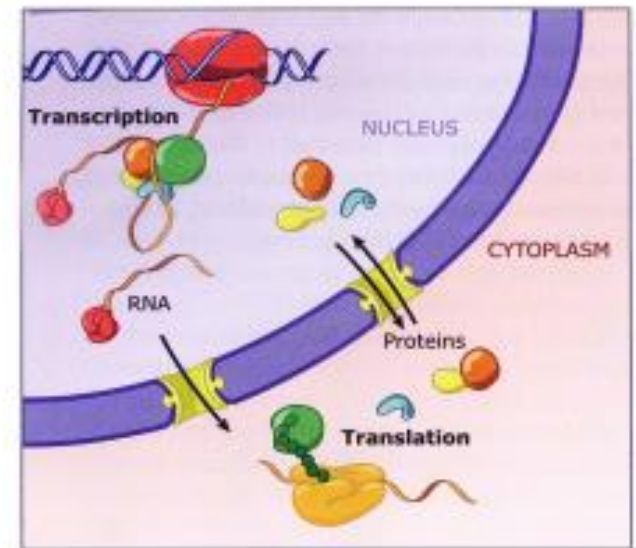
# Eukaryotická buňka obsahuje několik kompartmentů

- zvýšení komplexity buňky - dělba práce na buněčné úrovni  
vnitřní prostor je rozdělen do dvou hlavních oddílů uzavřených **membránou: cytoplasmy a jádra**
- makromolekuly se transportují do a z jádra jadernými póry (tj. proteinovými kanálky)
- póry jsou plně propustné pro menší molekuly, tj. vodné prostředí jádra se neliší od cytoplazmy

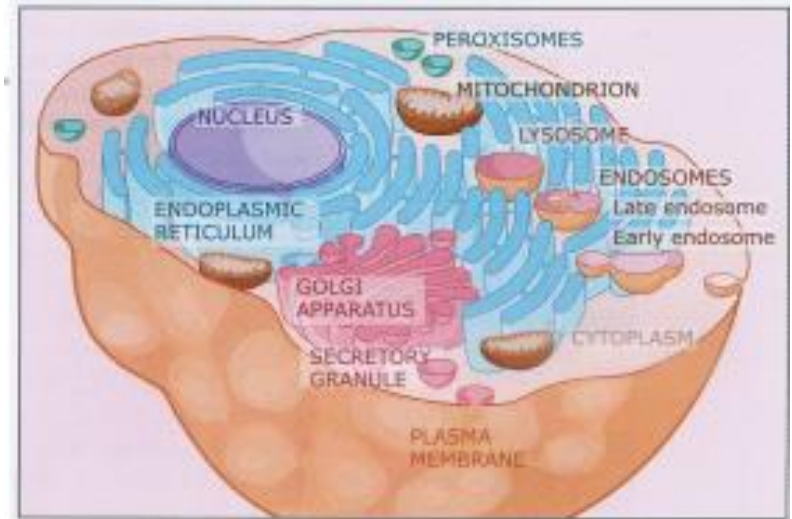


# V jádře je uložen **genetický materiál**

- na rozdíl od prokaryot musí genom eukaryot zajistit **specifikaci** nových strukturních prvků, definovat **umístění proteinů** do správných oddílů, využívat složitějšího mechanismu regulace **genové exprese**
- genetická komplexita eukaryot: nejjednodušší jednobuněčné organismy eukaryot nesou cca 5000 genů, člověk cca **20000** genů kódujících protein (strukturní geny)



# Eukaryotická buňka obsahuje další organely



- obklopeny membránami se stejnými strukturálními rysy jako plazmatická membrána
- **cytoplazma** = organely + cytozol
- **cytozol** je vodné prostředí cytoplazmy, ve kterém se syntetizují proteiny, které buď v cytozolu zůstávají nebo se transportují do organel nebo mimo buňku
- organelové membrány nejsou permeabilní, proto se vnitřní prostředí organel liší od cytozolu (výjimkou je jádro se svými póry)

# Eukaryotická buňka obsahuje další organely

- **endoplazmatické retikulum** – skládání proteinů, sestavování vícepodjednotkových oligomerů
- **Golgiho aparát** – sekrece proteinů a dalšího materiálu mimo buňku
- **lysosomy** – obsahují trávicí enzymy – rozklad molekul
- **mitochondrie** – velikostí, tvarem, obsahem kruhové DNA připomínají bakterie – specializace na získávání energie respirací
- **chloroplasty** – specializovány na fotosyntézu, obsahují chlorofyl a další molekuly nutné pro zachycení světla, obsahují kruhovou DNA podobně jako mitochondrie

# Diverzita eukaryot

- na rozdíl od dvou geneticky distinktních větví prokaryot
- jsou všechny eukaryotické organismy geneticky příbuzné
- pocházejí ze společného předka
- jednobuněčná eukaryota: kvasinky, prvoci
- mnohobuněčná eukaryota: říše rostlin, hub a živočichů

# Dvě hlavní buněčné linie eukaryot

- **somatické a pohlavní**
- u většiny mnohobuněčných je běžná specializace tkání a orgánů
- **pohlavní buňky** jsou součástí reprodukčního systému a podílí se na tvorbě další generace
- **somatické buňky** tvoří tělo, vytvářejí dobré podmínky pro fungování buněk pohlavních, neúčastní se reprodukce



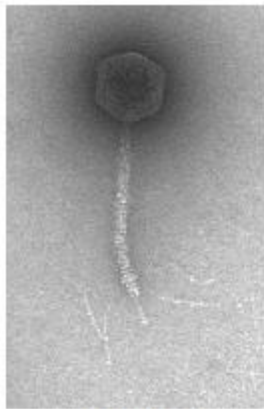
# Rozdíly mezi prokaryotní a eukaryotní buňkou

Charakteristika	Prokaryotní buňka	Eukaryotní buňka
Organismy	bakterie, cyanobakterie	houby, rostliny, živočichové
Velikost buňky	1 – 10 $\mu\text{m}$	10 – 20 $\mu\text{m}$
Oddělené jádro	Ne	Ano
Membránové organely	Ne	Ano
Chromosomy	kružnicová DNA	lineární DNA
Velikost ribozomů	70S	80S
Cytoskelet	Ne	Ano
Buněčné dělení	příčné/podélné	mitóza
DNA	obnažená	spojená s proteiny
Průběh syntézy proteinů	v cytoplazmě	v cytoplazmě a ER
Respirační enzymy	na cytoplazmatické membráně	na vnitřní mitochondriální membráně

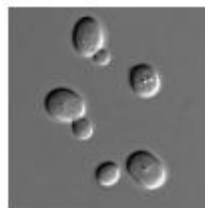
## TEST

# Modelové organismy

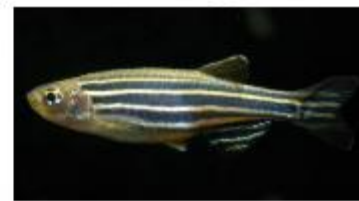
- z praktických důvodů jsou při výzkumu preferovány
- předpokládá se, že získané poznatky budou platit i u jiných organismů, přinejmenším u těch, které jsou modelovým organismům příbuzné
- ne vždy je to pravda, pro lidskou medicínu nebo zemědělství je třeba zkoumat přímo cílové organismy



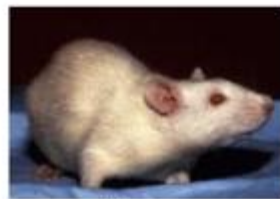
**Phage**  
(*Bacteriophage Lambda*)



**Yeast**  
(*Saccharomyces cerevisiae*)



**Zebrafish**  
(*Danio rerio*)



**Rat**  
(*Rattus norvegicus*)



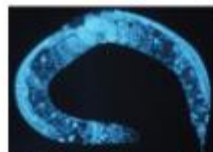
**Mouse**  
(*Mus musculus*)



**Fruitfly**  
(*Drosophila melanogaster*)



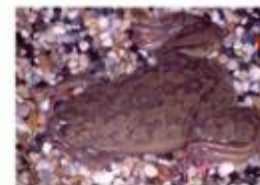
**Bacterium**  
(*Escherichia coli*)



**Nematode**  
(*Caenorhabditis elegans*)



**Sea Urchin**  
(*Strongylocentrotus purpuratus*)



**Frog**  
(*Xenopus laevis*)



**Plant**  
(*Arabidopsis thaliana*)

# Etické aspekty práce se zvířaty

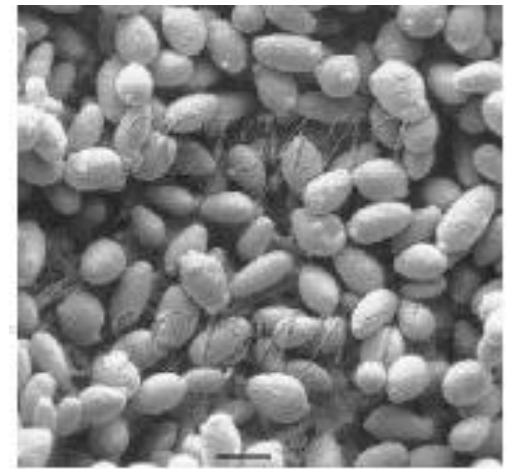
- **Práce se zvířaty je výsada/privilegium, rozhodně ne právo**
  1. Musí být jasný přínos pro společnost, zdravotní či veterinární péči či získání unikátních poznatků, které jinak než za pomoci živých zvířecích modelů získat nelze
  2. Je nutné, aby přínos získaných poznatků jednoznačně převážil případný diskomfort, bolest či utrpení zvířat během experimentů
- **Etický kodex:**
  - pokud to lze, mají se použít organismy z co nejnižších pater fylogenetického stromu - raději bakterie než myši, raději myši než primáti
  - důkladně zvážit počet a zdroj organismů, plánované procedury (minimalizovat bolest a znehybňující prostředky, zajistit vhodnou pooperační péči, právo na euthanasii, ...) – součástí projektů pokusů

# Kvasinky - model jednobuněčných eukaryot

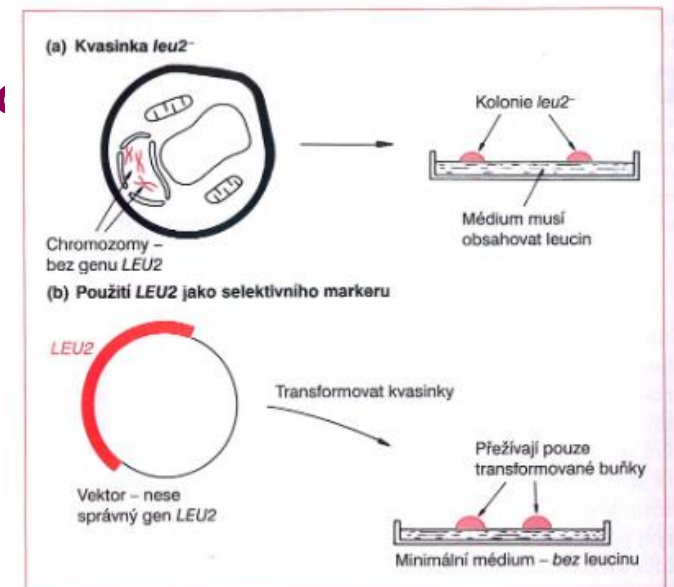
- jednobuněčná eukaryota, podobné výhody jako bakterie
- genom byl sekvenován jako první (u eukaryot) - v r. 1996
- patří mezi houby - obdobná příbuznost živočichům i rostlinám
- střídání diploidní a haploidní fáze, lze pracovat s haploidními kulturami, což usnadňuje genetickou analýzu
- haploidní genom obsahuje jen cca 6000 genů

# Kvasinky

- jen málo genů (cca 5 %) obsahuje **introny**
- rostou v chemicky definovaném médiu, tvoří kolonie na agarových plotnách
- generační doba cca 90 minut
- možnost snadného uchování v zamraženém stavu
- specifikum množení pučením
- model vhodný pro studium funkce genů a buněčného cyklu



**Cizorodé geny, včetně lidských, mohou nahradit poškozený kvasinkový gen, což se hodí při analýze jejich funkce.**



# Hlístice

- *Caenorhabditis elegans* (hád'átko obecné)
- nepatogenní půdní hlístice
- genom má 7x vyšší obsah DNA než kvasinky
- vyšší obsah intronů a nekódujících sekvencí
- velikost 1 mm, tělo složeno z 959 buněk
- popsán vývoj každé z nich z původní zygoty
- model pro studium vývoje, apoptózy, stárnutí
- na tomto modelu poprvé popsána RNA interference



C. elegans



S. Brenner  
(nar. 1927)

# Mouchy



T.H. Morgan  
(1866-1945)

Je považován za jednoho z nejvýznamnějších genetiků historie, neboť prokázal, že [geny](#) jsou umístěny na [chromozómech](#) a na základě tohoto poznatku zformuloval [Morganovy zákony dědičnosti](#).

- *Drosophila melanogaster*:
- životní cyklus 2 týdny
- 14 000 genů
- výzkum buněčné diferenciaci, vývoje
- organismu, buněčných signalizací a chování



- chromozomy jsou nositeli genetické informace
- geny jsou na nich uspořádány lineárně za sebou
- geny jsou také na chromozomech přítomny na určitých místech (tzv. lokusy)
- geny přítomné na stejném chromozomu jsou ve vazbě
- objev polytenních (obřích) chromozomů octomilky obecné
- objev celého karyotypu octomilky obecné

# Zebřička - model pro studium vývoje obratlovců



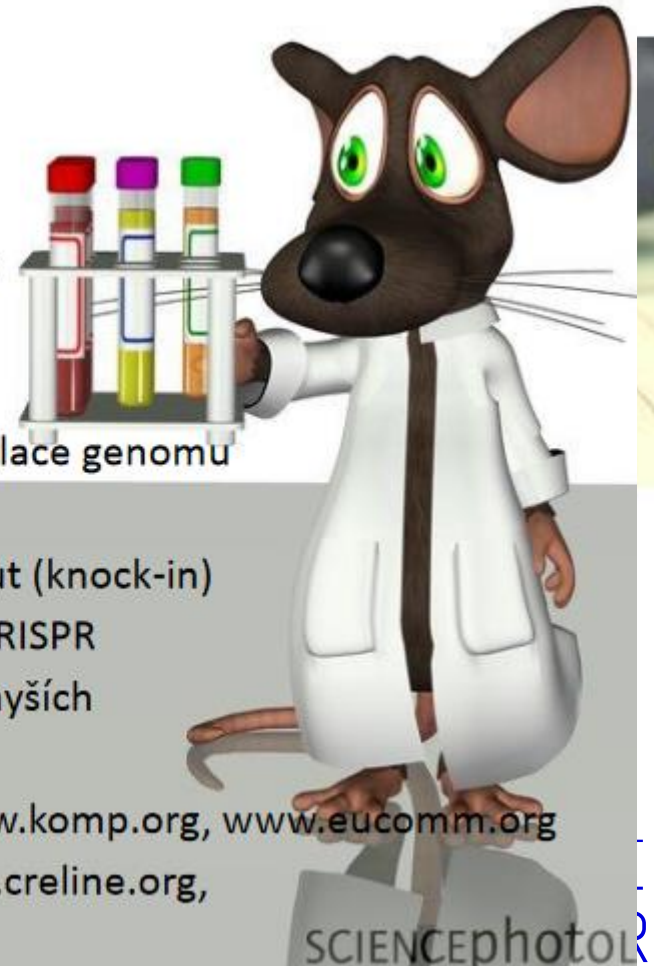
- **Zebřička pruhovaná/Danio pruhované:** malá sladkovodní rybka (2,5 cm)
- oplozená vajíčka se vyvíjejí mimo tělo matky - lze sledovat mikroskopii
- vývoj z vajíčka do dospělého organismu trvá 3 měsíce
- díky průhlednosti lze sledovat vývoj vnitřních orgánů
- snadná mikroinjekce cizorodé DNA do vajíčka
- molekulární genetika vývoje
- 25 chromozomů, 75 % homologie s lidským genomem



# Myš

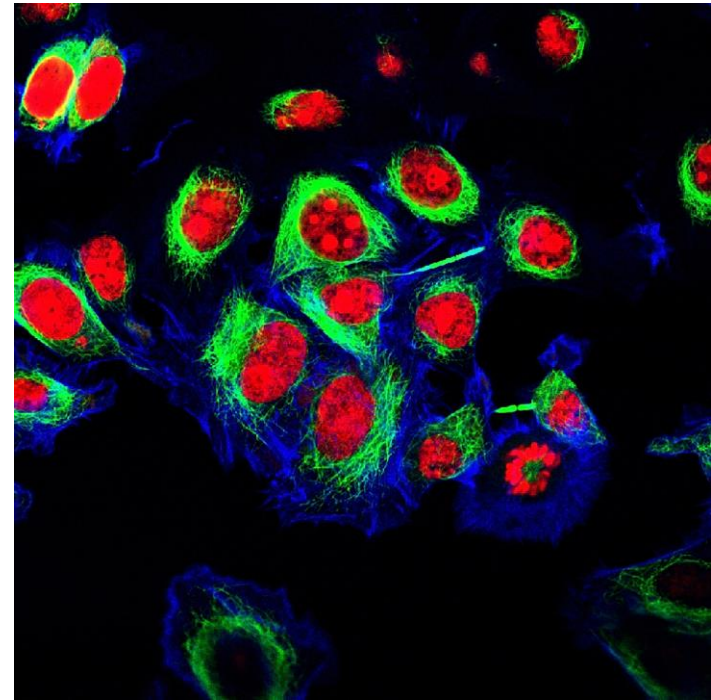
- zástupný model za člověka, kde experimentovat nelze
- žije 1-3 roky, pohlavní zralosti dosahuje po 4 týdnech
- obsahuje 20 chromozomových párů
- méně než 1% myších genů nemá lidského homologa
- **používá se pro studium funkce genů**

- Myš je nejpoužívanější model pro biomedicínský výzkum
- Chov konvenční vs. bariérový chov IVC, SPF, izolátorový chov
- Výborný genetický model – inbrední kmeny, možnost manipulace genomu
  - gene targeting vs. transgeneze
- Klasický vs. kondicionální knock-out (knock-in)
  - Cre/loxP systém, ZNF, TALEN, CRISPR
- Cre linie – test na reportérových myších
  - ROSA26-LacZ, ROSA26-EYFP
- Databáze – [www.jaxmice.org](http://www.jaxmice.org), [www.komp.org](http://www.komp.org), [www.eucomm.org](http://www.eucomm.org)
  - [www.informatics.jax.org](http://www.informatics.jax.org), [www.creline.org](http://www.creline.org), [www.mousephenotype.org](http://www.mousephenotype.org)



# Člověk

- z etických důvodů nelze experimentovat s lidmi
- je však možné kultivovat lidské nebo živočišné buňky v kultuře
- nesmrtelné buněčné linie (např. buňky HeLa) jsou tvořeny buňkami nádorovými
- HeLa buňky jsou buňky odvozené z nádoru děložního čípku Henrietty Lacksové v roce 1951
- buněčné linie jsou vhodným modelem pro mol. biol. studie



# Arabidopsis -model pro rostliny

- mol. biologie rostlin je historicky poněkud opožděná za jinými organismy
- mají často mnoho genů (rýže: 40 000 - 50 000 genů)
- důvod: nemohou se chránit pohybem, proto se geny zajišťující ochranu a přizpůsobování okolí hromadí
  
- výzva současnosti: genetické vylepšení kulturních plodin
- *Arabidopsis thaliana*: strukturní jednoduchost, malý
- genom, 5 párů chromozomů, cca 25 000 genů,
- dozrání rostliny k produkci semen trvá 6-10 týdnů
- lze kultivovat v haploidním stavu - výhoda pro
- genetické analýzy



# Virus

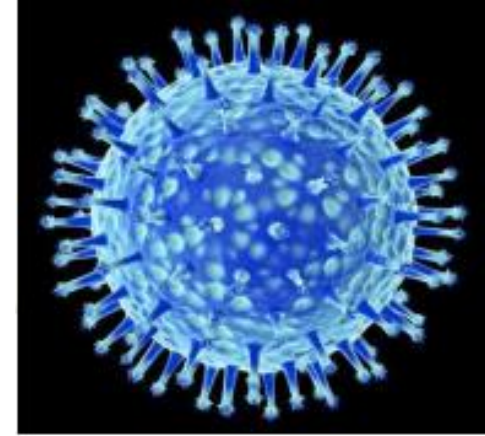
- nemá buněčnou strukturu
- obsahuje vlastní geny obalené proteinovým pláštěm, ale nedovede je sám vyjádřit
- postrádá aparát, který buňkám zajišťuje energii
- buněčný parazit, replikaci a expresi virových genů zajistí infikovaná buňka
- genetická informace viru je uložena v DNA nebo RNA
- je schopen vyvolat onemocnění
- uplatňuje se v genovém inženýrství



# Bakteriální virus = bakteriofág

- infikuje bakteriální buňku, která je přinucena vyrábět nové bakteriofágy, posléze praskne a uvolní novou generaci bakteriofágů
- každý z nových virionů může infikovat další bakterii
- během několika hodin může fágová epidemie zlikvidovat kulturu
- bakterií o počtu několikanásobně převyšujícím lidskou populaci

# Virus člověka



- infikuje lidské buňky původce běžných onemocnění (spalničky, příušnice, plané neštovice, běžné nachlazení a chřipka) i závažných chorob (dětská obrna, Ebola, AIDS)
- infekce málo nebezpečným virem může zajistit **rezistenci** proti příbuznému, ale mnohem nebezpečnějšímu viru
  - virovou infekci nelze léčit; nutná prevence - imunizací
- může přenášet geny z jednoho hostitelského organismu na jiný (význam pro evoluci a genové inženýrství)
- antibiotika nemají smysl při boji s virovou infekcí, mohou jen pomoci s paralelní bakteriální infekcí

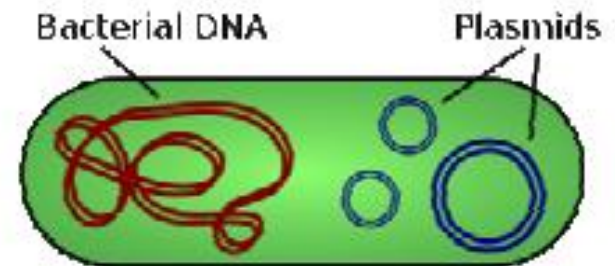
# Podbuněčné genetické elementy

- hojně rozšířené v biosféře
- význam různý: mohou vyvolávat vážná onemocnění nebo jejich existence je téměř nezaznamatelná
- nesou genetickou informaci, ale nedisponují aparátem pro Životní funkce, neexistují mimo hostitelskou buňku
- **viry** jsou z nich nejvyspělejší
- **viroidy a plazmidy**: autonomní molekuly nukleových kyselin, které nemají proteinový obal
- **viroidy** jsou molekuly RNA, které infikují rostliny a přinutí je k produkci nových viroidů uvolňovaných do prostředí

# Podbuněčné genetické elementy

## — plazmidy

- molekuly DNA, které se stabilně udržují uvnitř hostitelské buňky
- mohou přecházet z jedné buňky do druhé pouze pokud mezi nimi dojde k fyzickému kontaktu
- hostitelskou buňku nelikvidují
- hojně využívané v genovém inženýrství





# Podbuněčné genetické elementy

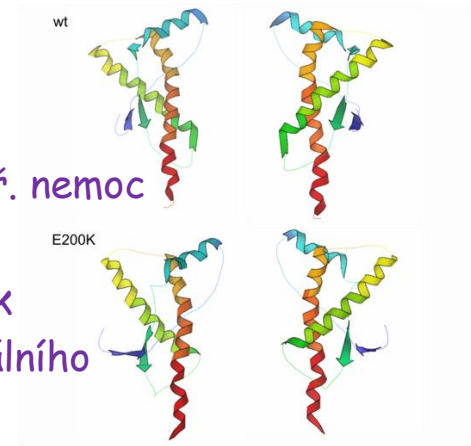
- **transponovatelné elementy (transpozony)**
- molekuly DNA, které se nereplikují jako samostatné jednotky
- pro svou replikaci vyžadují začlenění do jiných molekul DNA, které schopnost samostatné replikace mají
- mají schopnost přeskakovat z jedné hostitelské DNA na jinou

# Podbuněčné genetické elementy

## Priony

infekční molekuly proteinů, neobsahují žádnou nukleovou kyselinu infikují buňky nervového systému zvířat a způsobují vážné nemoci (např. nemoc šílených krav)

představují chybně složenou verzi normálního proteinu nervových buněk když proniknou do buňky, způsobí chybné skládání odpovídajícího normálního proteinu, což buňku usmrtí



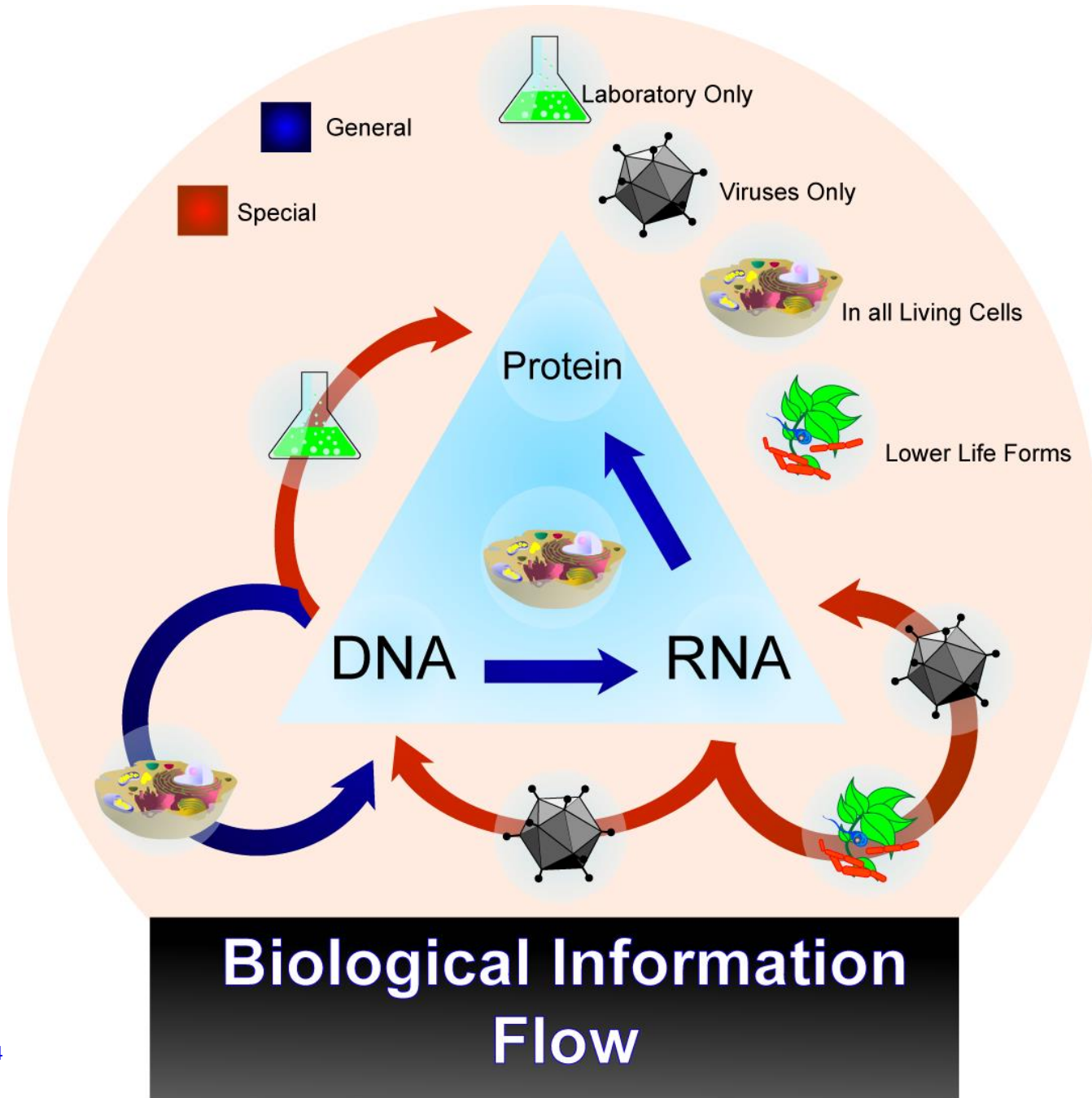
Existuje pro to několik hypotéz.

**VIROVÁ** hypotéza předpokládá účast RNA virů na vzniku transmisivních spongiformních encefalopatií a tím i na vzniku infekčních prionů.

**MULTIKOMPONENTNÍ** hypotéza soudí, že pro vznik infekčních prionů je nutná vazba s polyanionty a lipidy.

**OTRAVA TĚŽKÝMI KOVY** způsobuje vznik infekčních prionů pokud je moc nebo málo mědi v těle, protože pro zdravý prion je potřeba správné množství mědi.

**MB\_1\_2024**



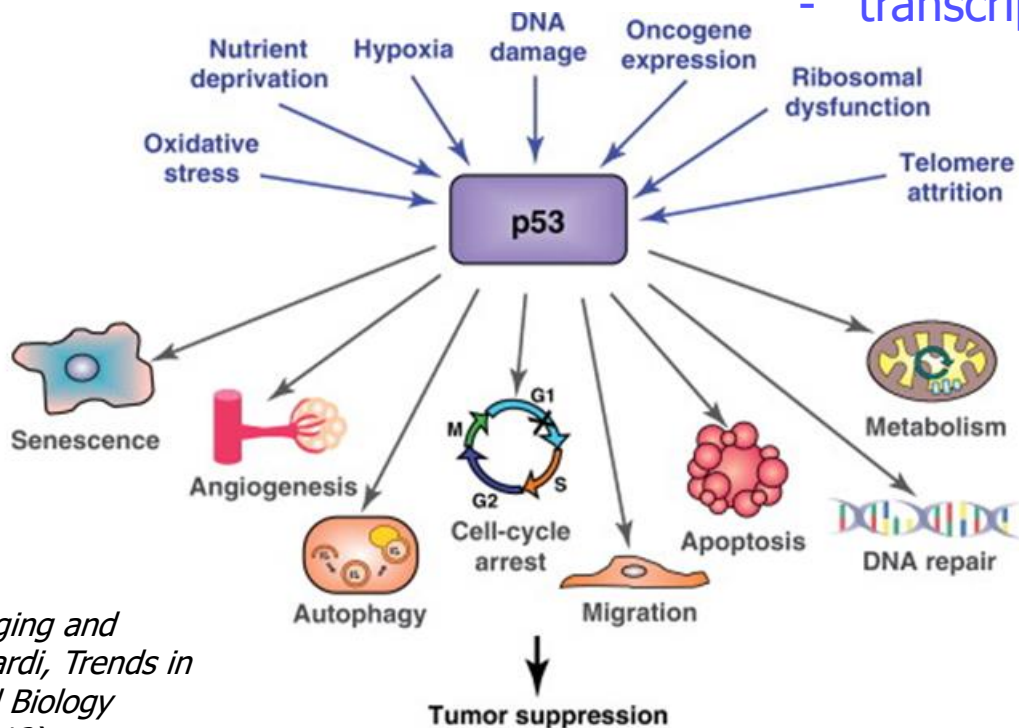
Zdroje:

**Genetika - D. Peter Snustad, Michael J. Simmons, 2017, MU** Druhé české vydání učebnice určené pro všechny stupně vysokoškolského studia .

Přednášky prof. Šmardy, prof. Rozsypala

# p53 tumor suppressor and p53 binding to human genome

- maintaining genomic stability
- transcription-dependent tumor suppression

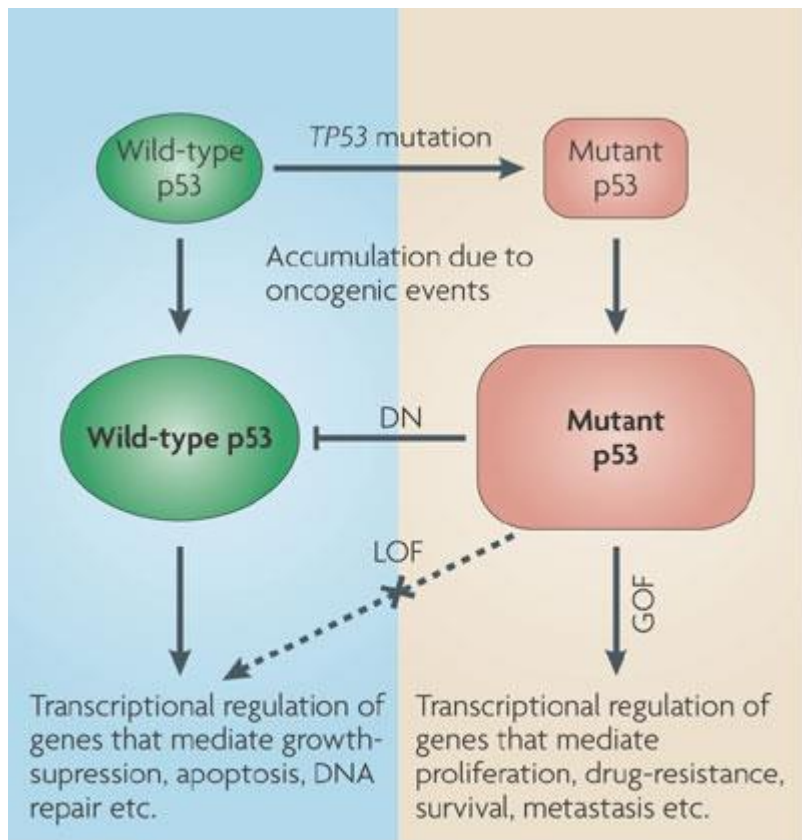


- in response to various inputs, the p53 protein becomes stabilized
- upon stabilization of p53, various transcriptional outputs determined by:
  - the strength of the p53 RE
  - posttranslational modification status of p53
  - specific p53 binding partners
  - the epigenetic landscape of target gene promoter
  - conformation of DNA, non-B DNA structures

*Biegging and Attardi, Trends in Cell Biology (2012)*

*TRENDS in Cell Biology*

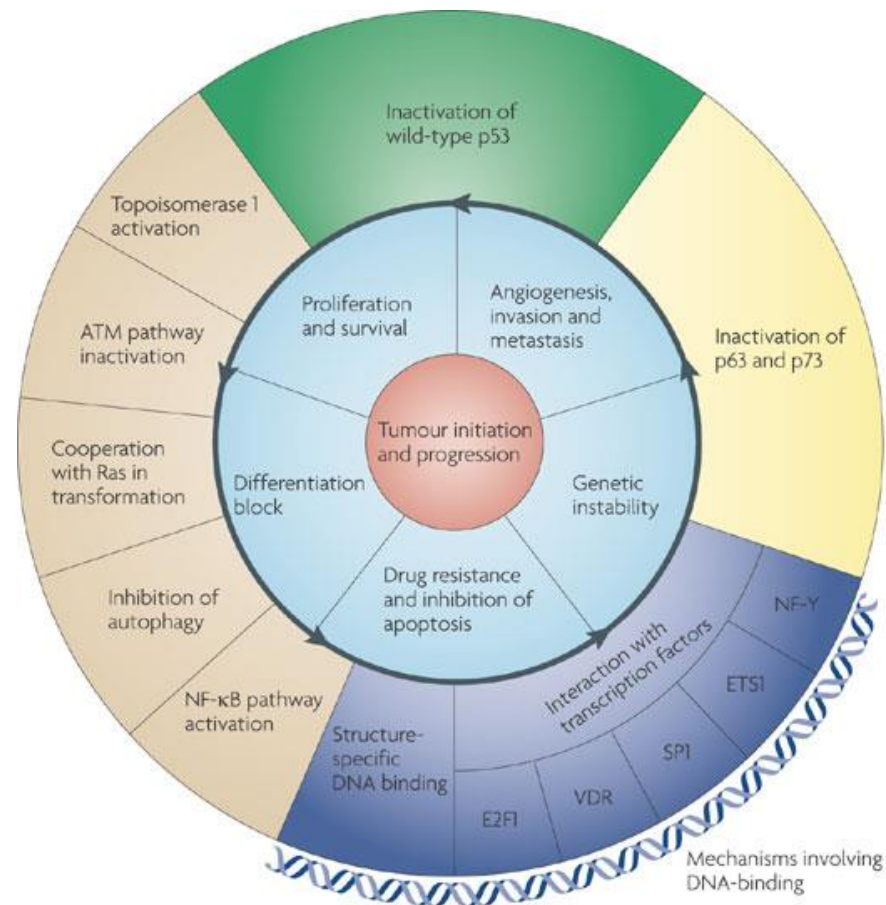
# Selected oncogenic properties of mutant p53 and their underlying mechanisms



Nature Reviews | Cancer

Ran Brosh & Varda Rotter  
*Nature Reviews Cancer* 9, 701-713 (2009)

78 MB\_1\_2024



Nature Reviews | Cancer

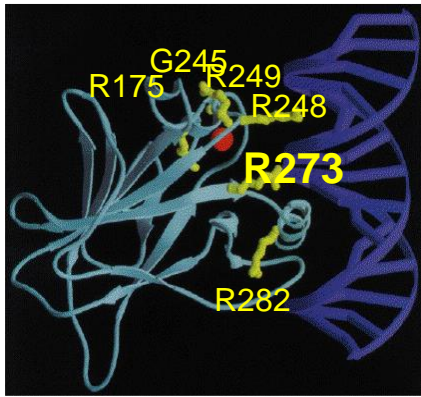
## Structure/sequence motifs in DNA

MAR/SAR elements in DNA (*mutp53CD*, C-terminus)  
 (Muller et al., 1996; Deppert et al., 2000)

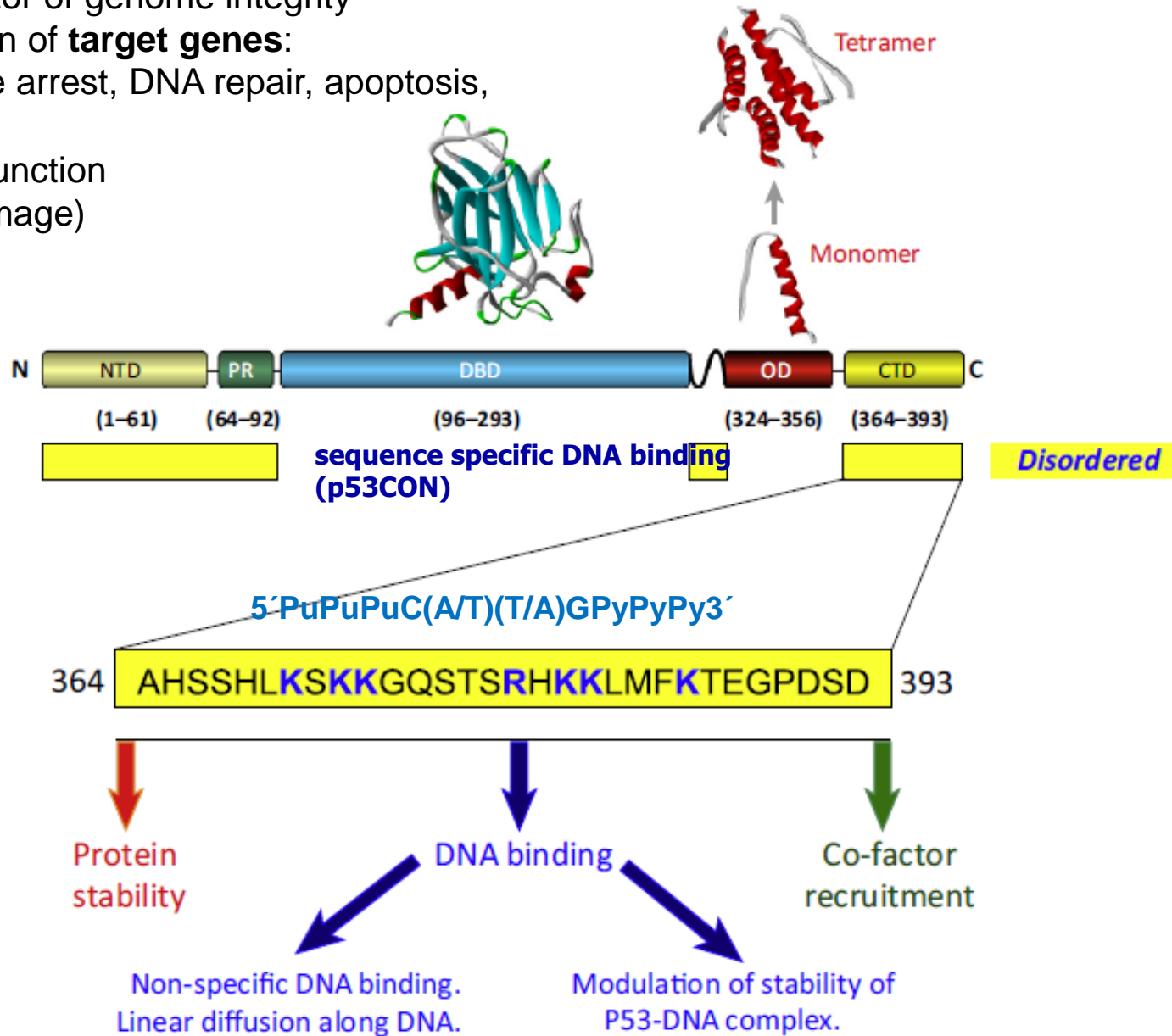
MUMI  
 PHARM

# Tumor suppressor wild type p53

- p53 is a master regulator of genome integrity
- regulates the expression of **target genes**:
  - mediation of cell cycle arrest, DNA repair, apoptosis, metabolic changes
- non- transcriptional function (supression of DNA damage)

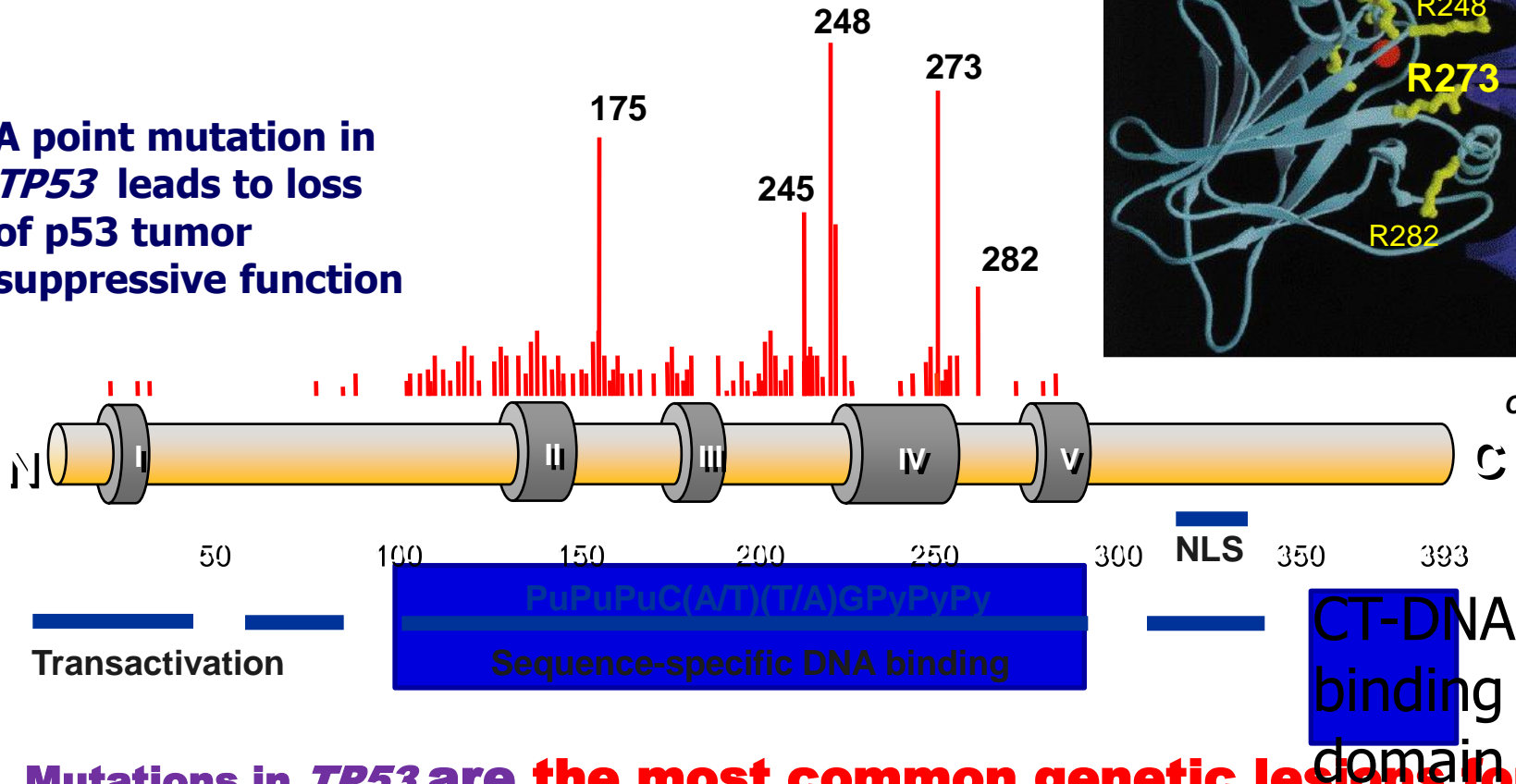


Cho *et al.* 1994 **p53-DBD**



# Oncogenic mutant p53 proteins

A point mutation in *TP53* leads to loss of p53 tumor suppressive function



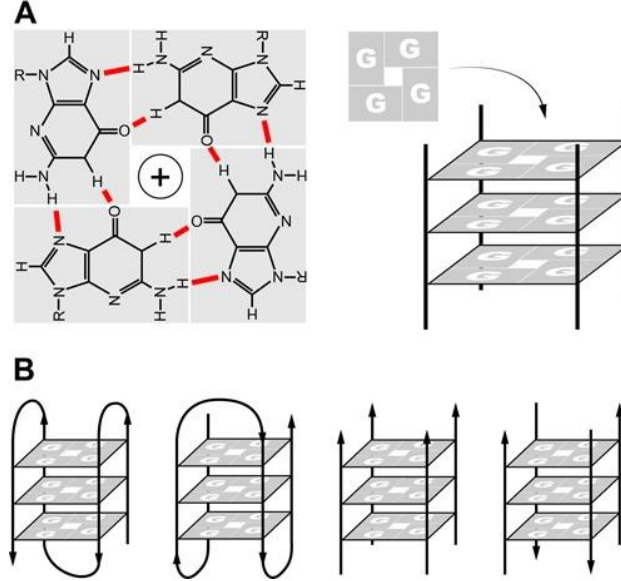
Mutations in *TP53* are **the most common genetic lesions found in cancers**, and **contribute to cancer development, progression, metastasis, and resistance to therapy.**



# Structure of G-quadruplexes

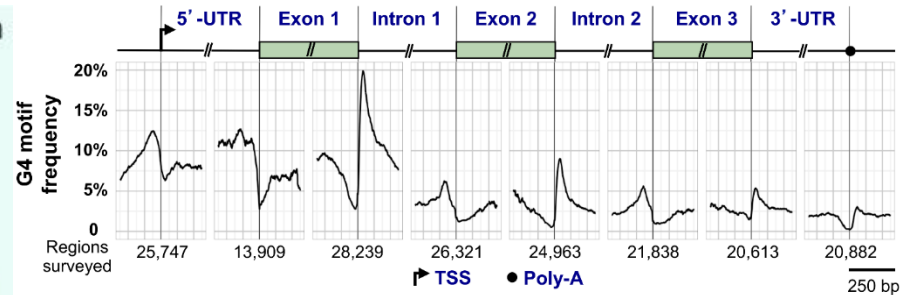
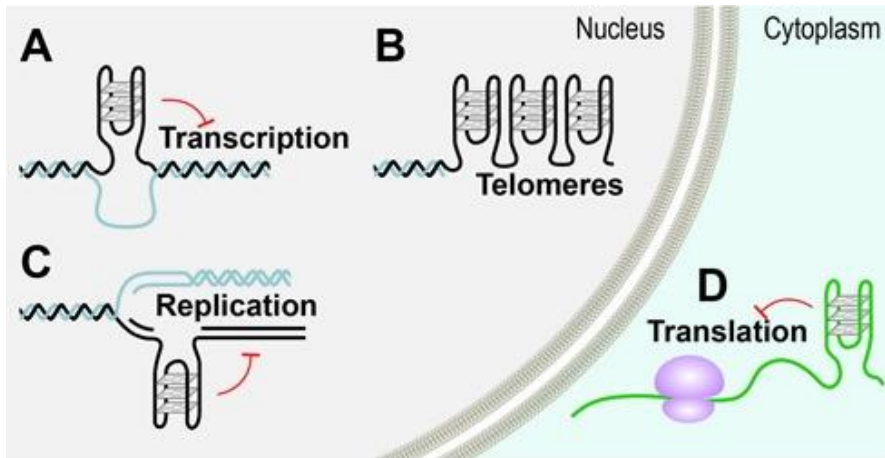
## G-quartets:

- Hoogsteen hydrogen bonds
- Monovalent cations ( $K^+$ ,  $Na^+$ )
- DNA/RNA G-quadruplexes
- intramolecular/intermolecular
- parallel/antiparallel/hybrid



Rhodes and Lipps (2015) *Nucleic Acids Research* 43(18); doi: 10.1093/nar/gkv862

## Possible locations of G-quadruplexes in the genome



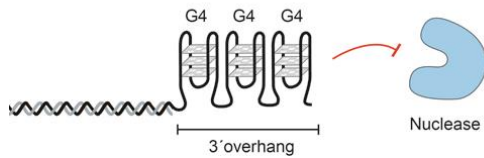
**G4 motifs ( $G_{3+}N_{1-7}G_{3+}N_{1-7}G_{3+}N_{1-7}G_{3+}$ )**

- Gene promoters and 5'-UTRs
- Telomeres (TTAGGG repeat)

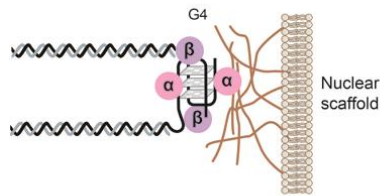
MUNI  
PHARM

# Therapeutic potential of G-quadruplexes and G-quadruplex binding ligands

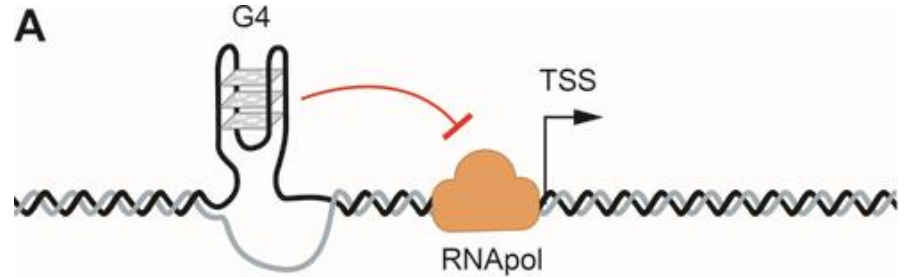
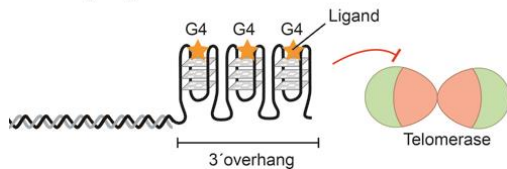
A Protection of telomeres



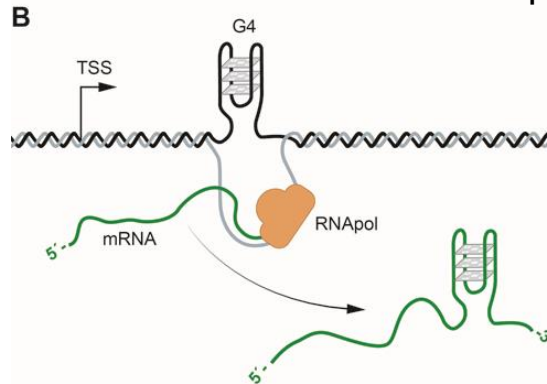
B Organization of ciliate telomeres



C Binding of ligands to telomeric G4

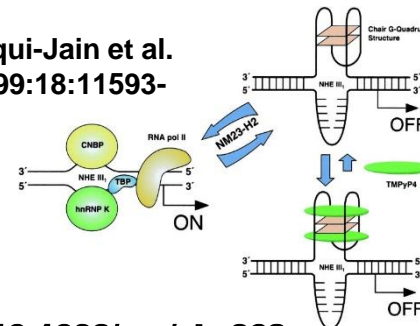


pG4 sequences are present in about **50% of human genes promoters**. G-quadruplex formation could impair initiation of transcription by the RNA polymerase, or if present in the antisense strand inhibit transcription.



Interaction of the G-quadruplex structure with TMPyP4 stabilizes the gene-off form by inhibition of conversion to the single-stranded gene-on forms

Adam Siddiqui-Jain et al.  
PNAS 2002;99:18:11593-11598



MUNI  
PHARM

**(C) Stabilizing of G-quadruplexes by G-quadruplex binding ligands** - impairs telomere repeat synthesis by the telomerase enzyme and lead to telomere shortening

# Popularizace vědy

## NEZkreslená věda

NEZkreslená věda je ojedinělý popularizačně-vzdělávací cyklus Akademie věd České republiky. Krátká animovaná videa tematicky zaměřená na vědu a poznání edukační a zábavnou formou přibližují zajímavé jevy z vědní oblasti (nejen) studentům a pedagogům středních škol.

První 10dílná série NEZkreslené vědy vznikla v roce 2014. Četné pozitivní ohlasy od pedagogů a studentů středních škol a gymnázií byly motivací pro vznik neméně úspěšné série z roku 2015 NEZkreslená věda II.

Naším cílem je, aby videa z cyklu NEZkreslená věda měla smysl, a DVD se nestalo jedním z mnoha uložených ve školní knihovně.

**<https://www.youtube.com/watch?v=GEaZ9ngOuPE>**

Gen

<https://www.youtube.com/watch?v=fqWs1aM7BQs>

protein