

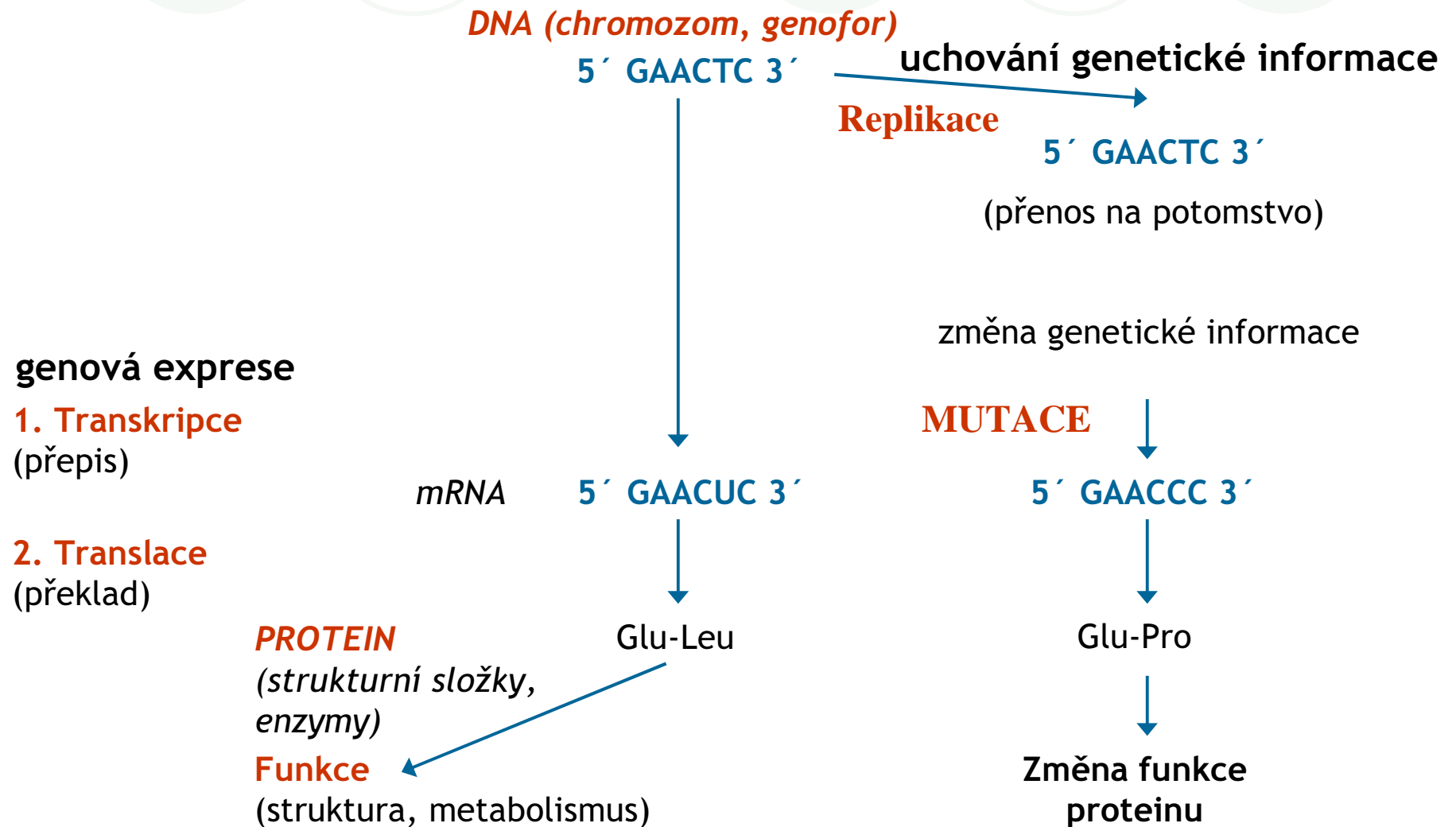
Základní pojmy molekulární genetiky

- genetická informace, gen, genetický kód
- **Struktura a informační obsah genomů**
 - prokaryotický genom
 - eukaryotický genom (jaderný, mitochondriový, chloroplastový)
 - virový genom

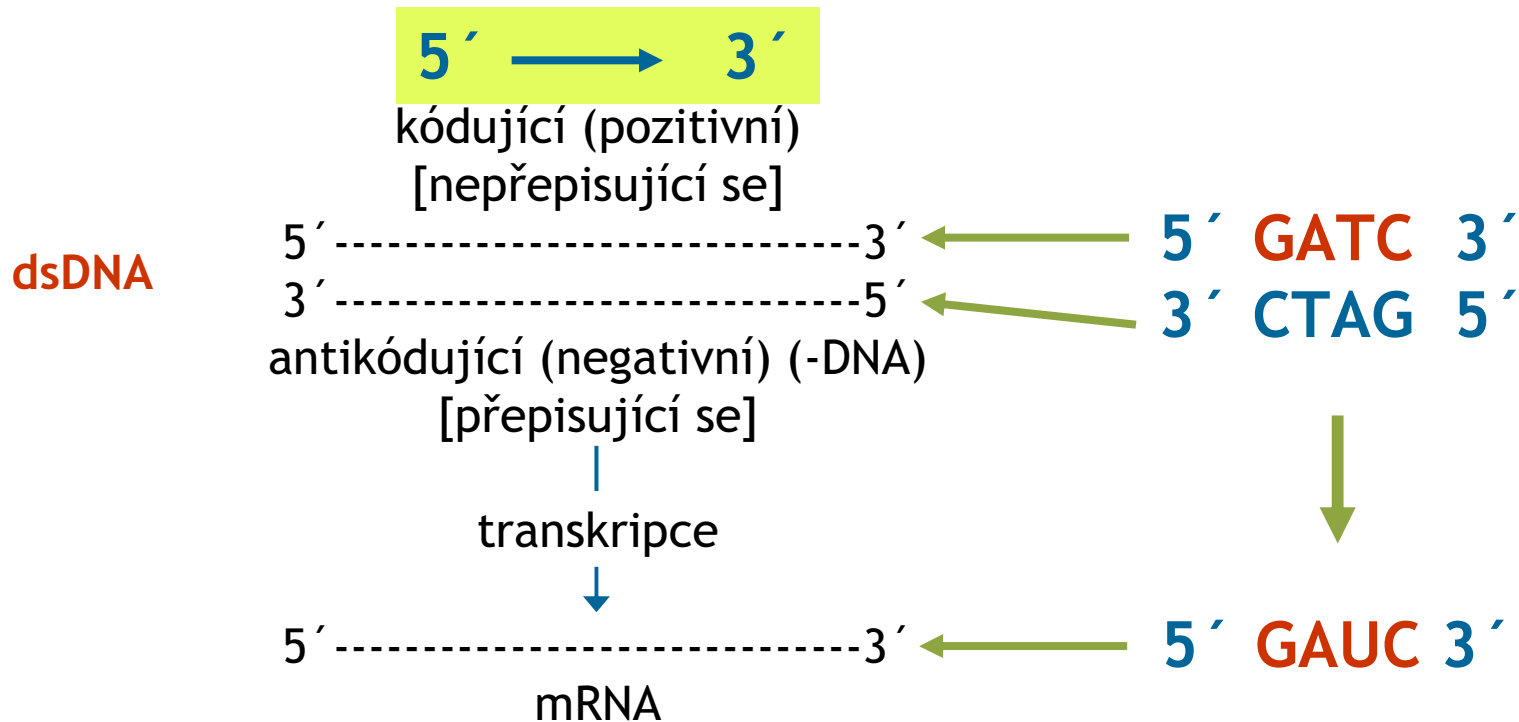
Základní pojmy molekulární genetiky

- **Gen** = Informační a funkční jednotka obsahující genetickou informaci o primární struktuře funkční molekuly translačního produktu (proteinu) nebo funkční molekuly produktů transkripce RNA (tRNA, rRNA, snRNA a **dalších RNA**) nepodléhajících translaci
- **Genetická informace** = informace primárně obsažená v nukleo-tidové sekvenci DNA (genomové RNA u RNA-virů)
- **Genetický kód** = systém pravidel, podle kterých jednotlivé kodony určují na ribozomu zařazení standardních aminokyselin do poly-peptidu
- **Genom** = všechny molekuly DNA (nebo RNA u RNA virů) živé soustavy, které se vyznačují replikací a dědí se na potomstvo
(**Genom = soubor veškeré genetické informace konkrétního organismu**)
(**The total genetic content in one set of chromosomes**)
- **Genotyp** = genetická konstituce organismu reprezentovaná souborem alel (tj. konkrétních variant genů) a sekvencí jeho genomu
- **Fenotyp** = soubor znaků a vlastností, kterými se v daném prostředí projevuje daný organismus (vyjádření genotypu)

Způsoby přenosu genetické informace



Značení řetězců nukleových kyselin podle jejich funkce při přenosu genetické informace



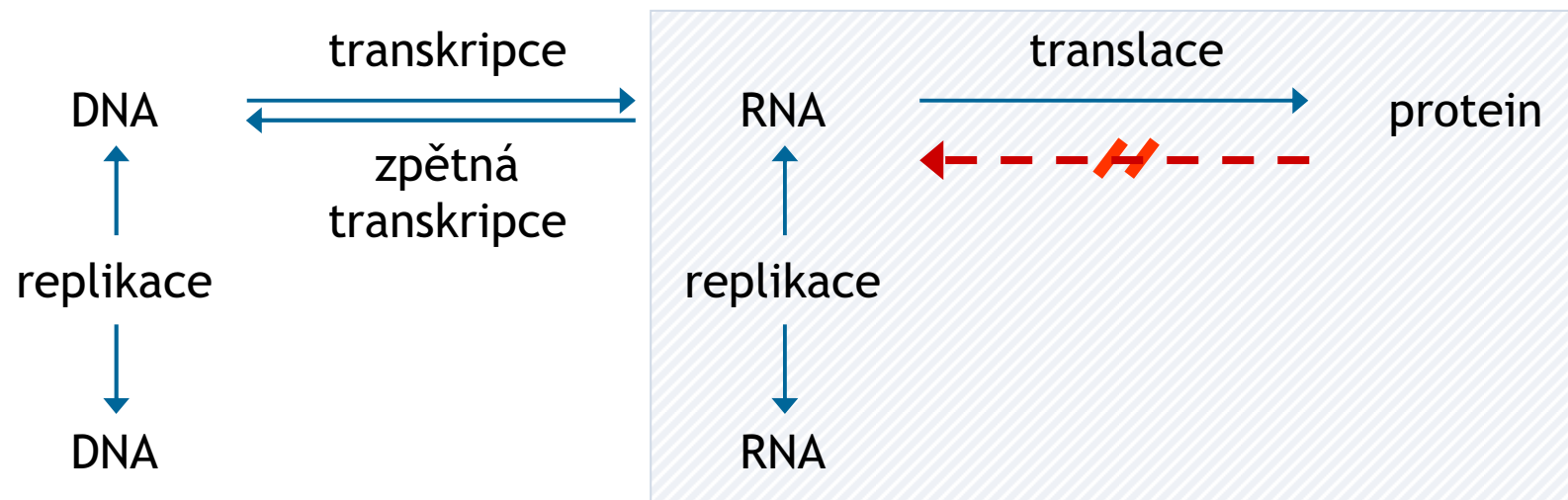
RNA v genomu virů

- pozitivní (+) = překládá se do virových proteinů (plní funkci mRNA)
- negativní (-) = nepřekládá se, slouží k replikaci (regulační funkce)

Ústřední dogma molekulární biologie

přenos genetické informace je možný z NK do NK nebo z NK do proteinu, ale není možný z proteinu do proteinu nebo z proteinu do NK

F.H.C. Crick - 1958



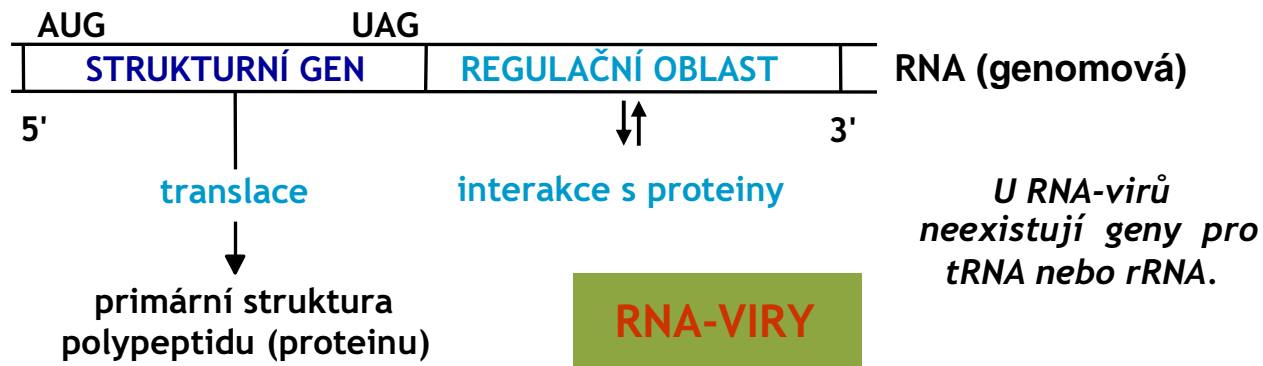
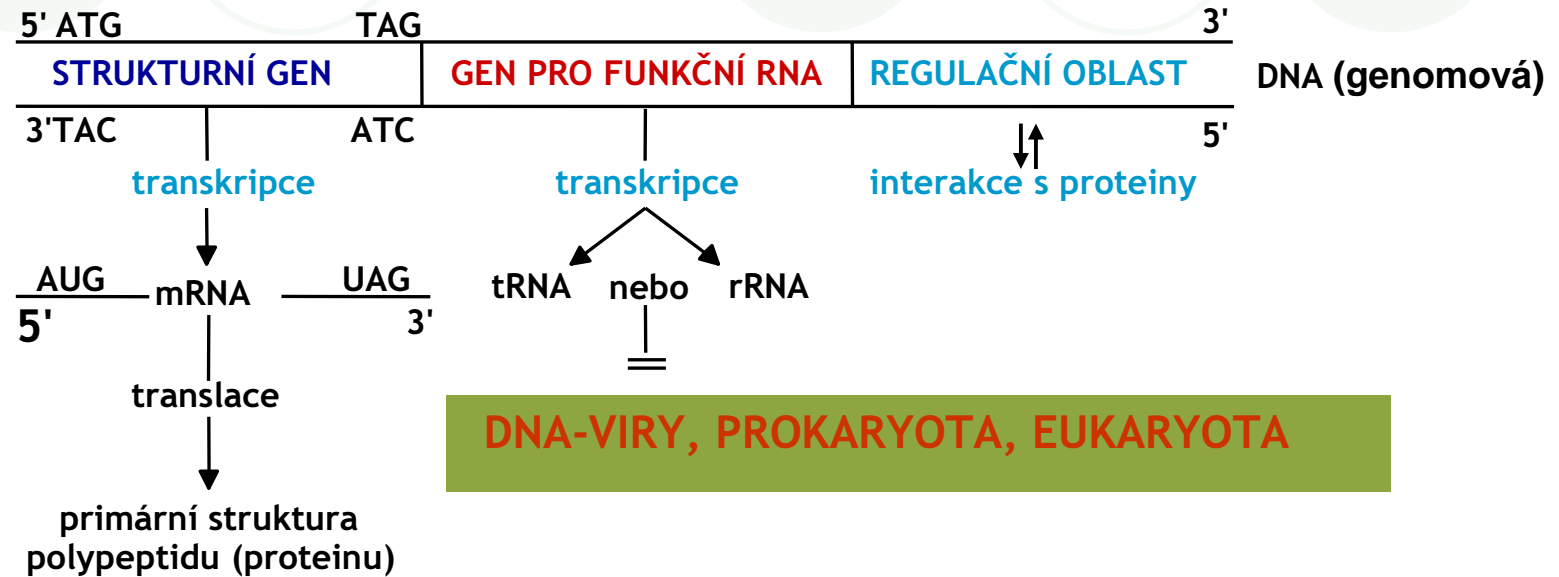
Způsoby vyjádření genetické informace

- informace o primární struktuře proteinů
- informace o primární struktuře RNA (u DNA sekvencí) nebo DNA (u RNA sekvencí)
- informace, určující navázání proteinů na sekvence NK (regulační funkce)

Konkrétní formy genů

- **Geny strukturní** = přepisují se do molekul mRNA, které se překládají kódují polypeptid (translační produkt)
 - strukturní gen jednoduchý, neobsahující introny
 - strukturní gen složený, tvořený exony a introny
- **Geny pro funkční typy RNA** = přepisují se do molekul RNA, které se nepřekládají (tRNA, rRNA, snRNA a dalších funkčních typů)
- **Geny jako regulační oblast** = úsek DNA, na nějž se váže regulační protein/y (nepřepisují se ani nepřekládají)

Vztah mezi geny a jejich produkty



Rozdíl mezi jednoduchým složeným strukturním genem

Rozdíl mezi jednoduchým a složeným strukturním genem spočívá v tom, že složený gen je sestaven z intronů a exonů a jeho primární transkript podléhá sestřihu, kdežto jednoduchý gen neobsahuje ani introny ani exony a jeho primární transkript nepodléhá sestřihu.

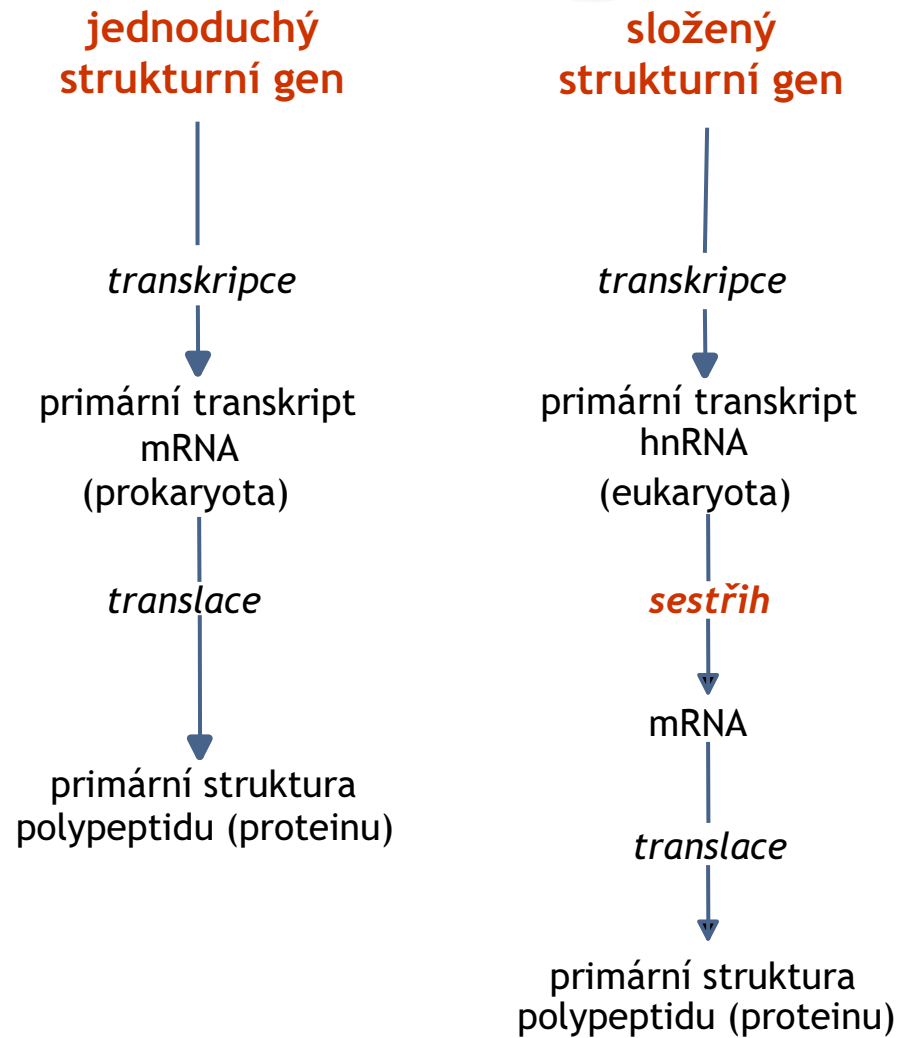
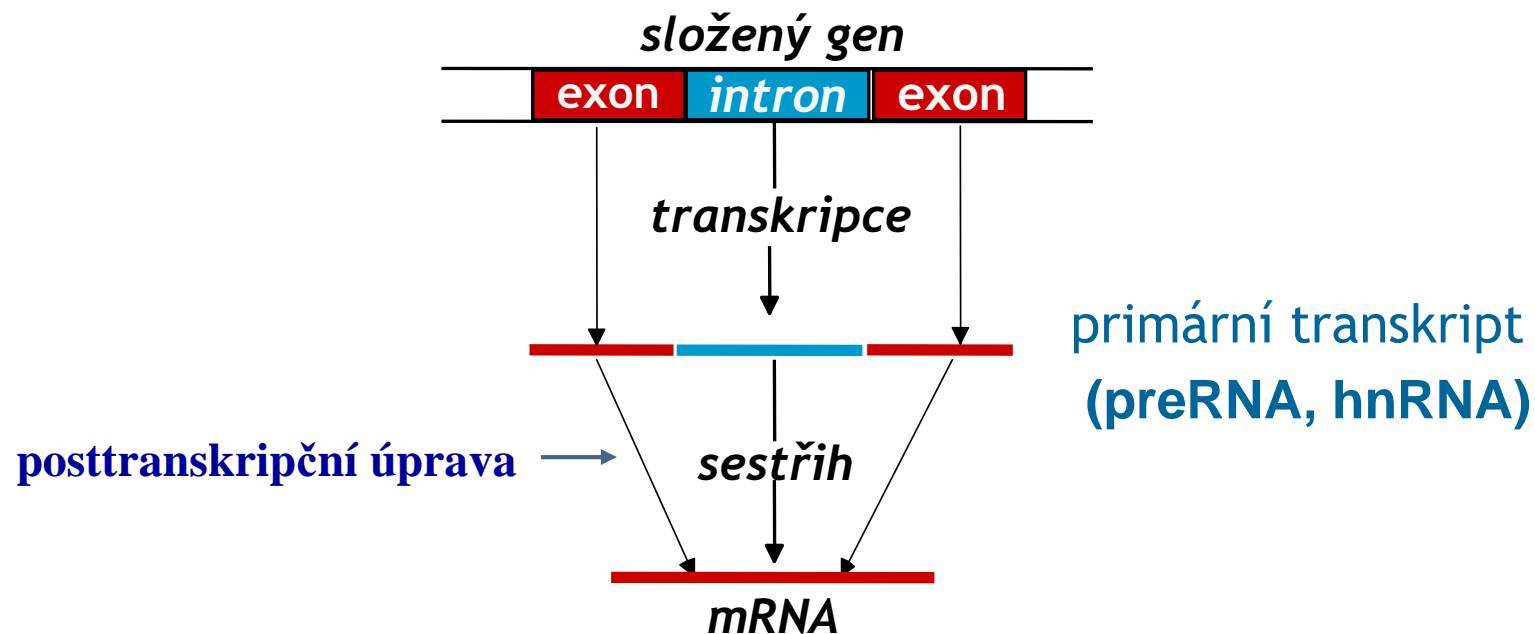
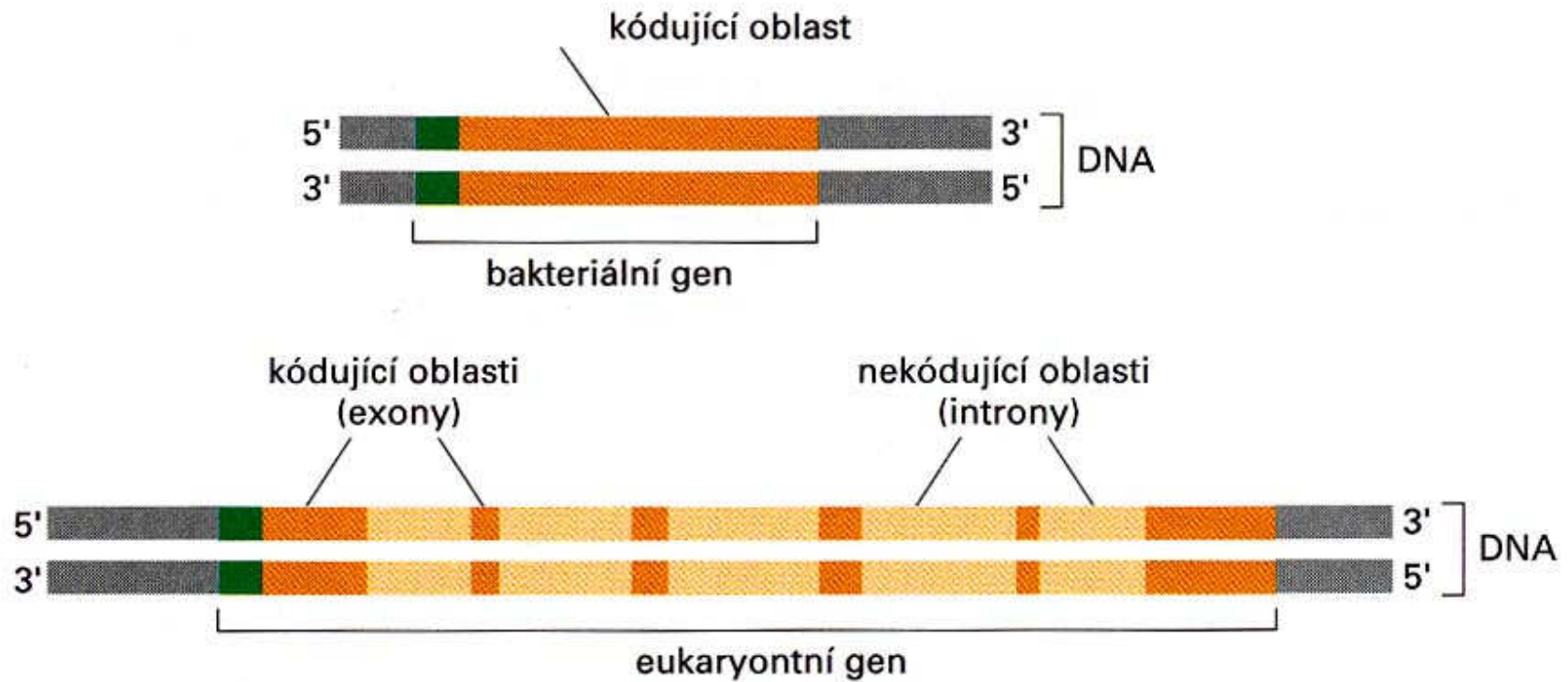


Schéma posttranskripční úpravy sestřihem

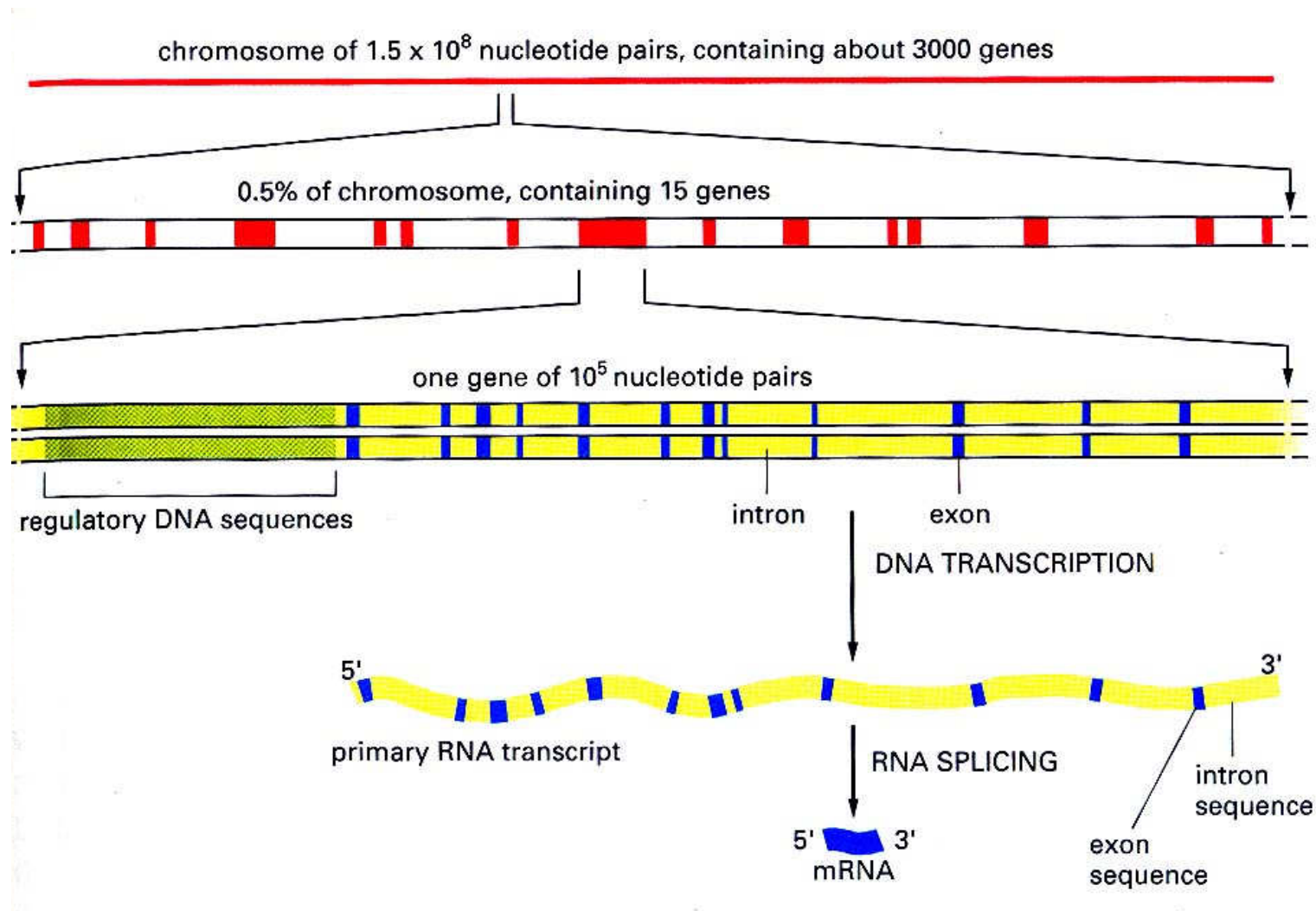


Při sestřihu se z primárního transkriptu vyštěpí
přepis intronu a spojí se přepisy exonů

Srovnání jednoduchého bakteriálního a složeného eukaryontního strukturního genu



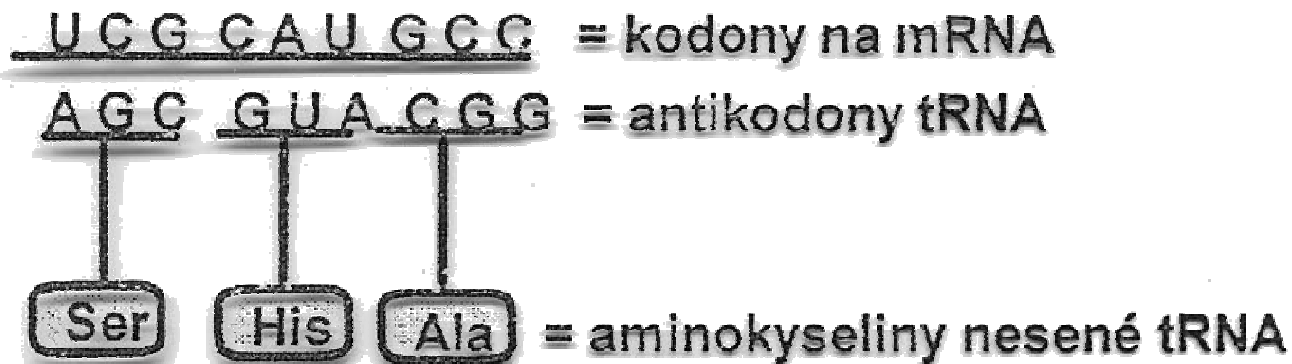
Organizace genů na chromozomu obratlovců a jejich přepis do mRNA



Velikost vybraných genů člověka (v kbp), velikost mRNA a počty intronů

| | Gene Size | mRNA Size | Number of Introns |
|------------------|-------------------|------------------|--------------------------|
| β-Globin | 1.5 | 0.6 | 2 |
| Insulin | 1.7 | 0.4 | 2 |
| Protein kinase C | 11 | 1.4 | 7 |
| Albumin | 25 | 2.1 | 14 |
| Catalase | 34 | 1.6 | 12 |
| LDL receptor | 45 | 5.5 | 17 |
| Factor VIII | 186 | 9 | 25 |
| Thyroglobulin | 300 | 8.7 | 36 |
| Dystrophin* | more than 2000 | 17 | more than 50 |

Překlad genetické informace



Transferová RNA rozeznává svým antikodonem na mRNA kodon pro aminokyselinu, kterou nese. Jinými slovy čte genetickou informaci na mRNA a překládá ji do pořadí aminokyselin v polypeptidovém řetězci.

Standardní genetický kód (na úrovni RNA)

History of the names of the stop codons First, the amber codon was named following experiments in the Benzer's lab at Caltech. In searching for a mutation that would allow a type of phage mutant to grow, Seymour Benzer said that whoever identified the mutation would get to name it after themselves (in some versions of the story, it would be named after the discoverer's mother). The graduate student who isolated the mutation was a young man named Harris Bernstein, whose name "Bernstein" in German means "amber". Thus, the UAG codon, known as a nonsense codon (later known as a stop codon), was named the amber codon. Later, the other two stop codons were called "ochre" (UAA) and "opal" (UGA) (sometimes called, "umber") to maintain the color metaphor. What happened to the graduate student? He became a famous molecular biologist.

Vysvětlivky: (SC) = selenocystein, (PL) = pyrrolyzin, (I) = iniciační kodon

| Kodony | | | | | |
|--------|---------|-----|-----|--------|----|
| 1. | 2. | | | | 3. |
| U | U | C | A | G | |
| | Phe | Ser | Tyr | Cys | U |
| | Phe | Ser | Tyr | Cys | C |
| | Leu | Ser | N | N (SC) | A |
| C | Leu | Pro | His | Arg | U |
| | Leu | Pro | His | Arg | C |
| | Leu | Pro | Gln | Arg | A |
| | Leu | Pro | Gln | Arg | G |
| A | Ile | Thr | Asn | Ser | U |
| | Ile | Thr | Asn | Ser | C |
| | Ile | Thr | Lys | Arg | A |
| | Met (I) | Thr | Lys | Arg | G |
| G | Val | Ala | Asp | Gly | U |
| | Val | Ala | Asp | Gly | C |
| | Val | Ala | Glu | Gly | A |
| | Val | Ala | Glu | Gly | G |

N = nesmyslný kodon, I = iniciační kodon.
 1.2.3 = pořadí nukleotidů v kodonu.
 Kodonové rodiny jsou vyznačeny modře, sady červeně.

Základní vlastnosti genetického kódu

- je **tripletový** (třípísmenový)
- obsahuje **64** kodonů
- je **degenerovaný** - jedna aminokyselina může být kódována více kodony
- 61 kodonů má smysl (kódují aminokyseliny)
- většina kodonů je **synonymních** (tj. odlišné kodony kódují stejnou aminokyselinu)
- synonymní kodony jsou zařazeny do kodonových rodin a dvoukodonových sad
- 3 kodony jsou nesmyslné (stop kodony, terminační kodony): UAA - ochre, UAG - amber, UGA – opal
- 3 kodony jsou bifunkční:
 - UGA - opal = nesmyslný nebo kóduje selenocystein (21 st. aminokyselina)
 - UAG – amber = nesmyslný nebo kóduje pyrrolyzin (22 st. aminokyselina)
 - AUG = působí jako iniciační při translaci nebo kóduje metionin
- je **univerzální**, tj. většina kodonů má stejný smysl ve všech živých soustavách (prokaryota, eukaryota, viry)

Charakteristika standardního genetického kódu

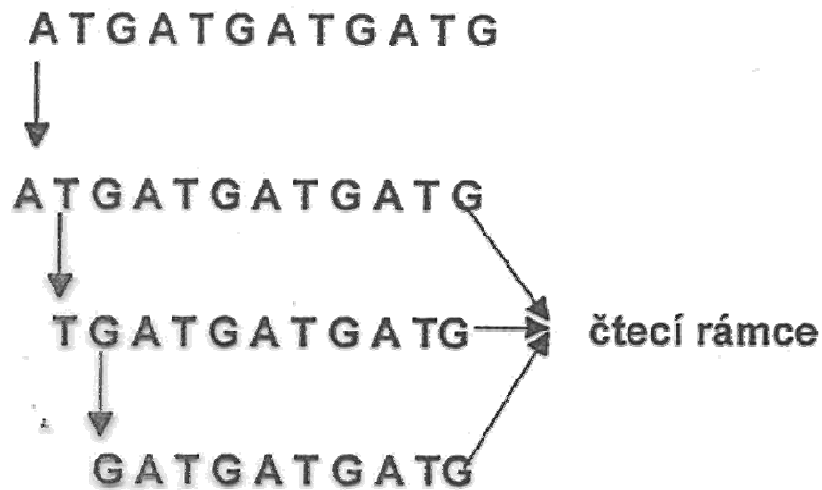
| | | |
|-----------------------------------|-----|-----------|
| 8 kodonových rodin | tj. | 32 kodonů |
| 8 dvoukodonových sad UC | tj. | 16 kodonů |
| 5 dvoukodonových sad AG | tj. | 10 kodonů |
| 1 iniciační a bifunkční kodon AUG | tj. | 1 kodon |
| 3 terminační kodony | tj. | 3 kodony |
| 1 kodon Ile AUA | tj. | 1 kodon |
| 1 kodon Trp UGG | tj. | 1 kodon |

celkem

64 kodonů

Čtení kodonů

Čtení kodonů (tripletů) závisí na tom, u kterého nukleotidu dané sekvence stanovíme počátek čtení.



1. ATG ATG ATG

2. TGA TGA TGA

3. GAT GAT GAT

ORF = open reading frame = otevřený čtecí rámec

dsDNA

5' ATCGTCTTGAAGTGCGTGTTAG 3'
3' TAGCAGAACTTCACGCACAATC 5'

Struktura genomů

- **Prokaryotický genom**
 - chromozom (nukleoid)
 - plazmidy
- **Eukaryotický genom**
 - soubor chromozomů
 - mitochondrie
 - chloroplasty (u rostlin)
 - plazmidy
- + proviry, transpozony

- **nDNA** = jaderná, ds lineární
- **mtDNA** = mitochondriová, ds kružnicová nebo lineární
- **ctDNA** = chloroplastová, ds kružnicová

- **virový genom** = DNA (ds, ss) nebo RNA (ds, ss)

Živé soustavy

Tři domény organizmů (16S RNA a 18S RNA)

- Bakterie (Bacteria)
- Archea (Archea)
- Eukarya (Eukarya)

viry

- buněčné

- jednobuněčné
- mnohobuněčné

- nebuněčné

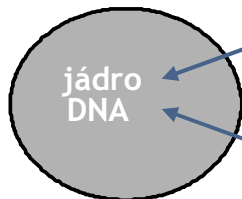
- viry
- viroidy

DNA
nebo
RNA

Všechny způsoby přenosu genetické informace.
Mají všechny složky translačního systému.
(aa-tRNA-syntetázy, tRNA, ribozomy)

Jsou v translaci závislé na hostitelských buňkách.
Viry = živé soustavy schopné reprodukce v závislosti
na translačním systému hostitelských buněk.

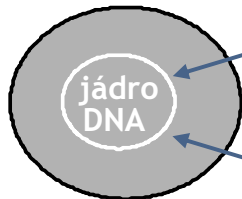
prokaryotický typ buňky



jádro bez jaderné membrány
nedělí se mitoticky

DNA kružnicová (většinou)
nebo lineární

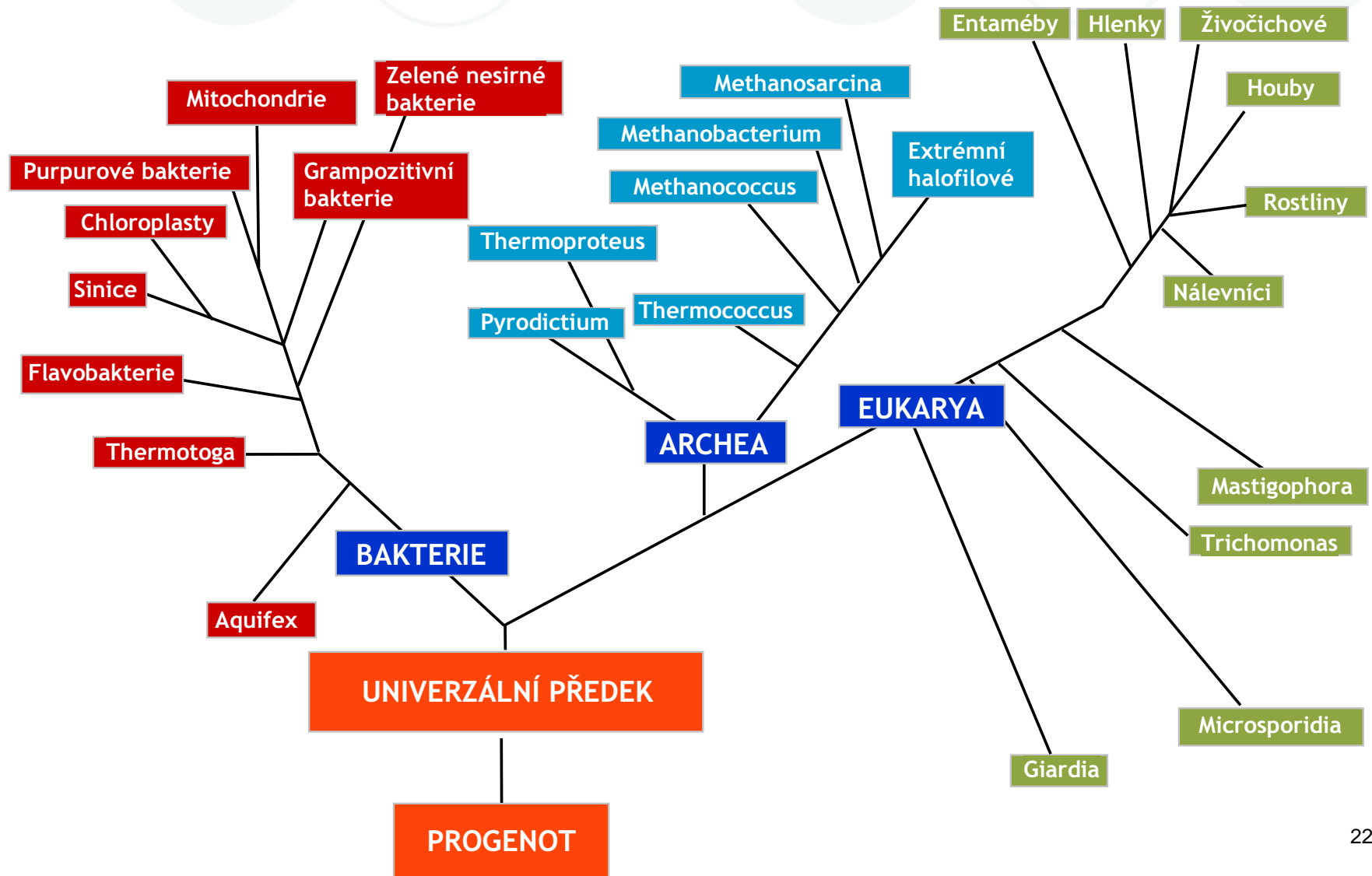
eukaryotický typ buňky



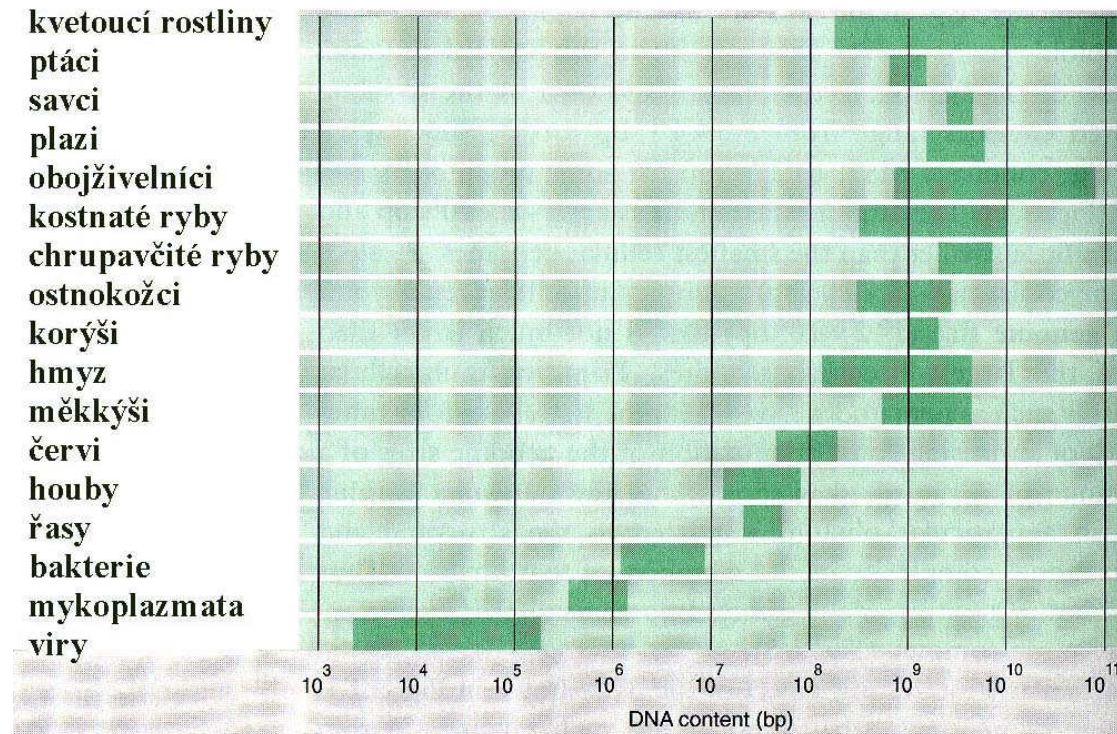
jádro obaleno jadernou membránou
dělí se mitoticky

chromozomy = chromatin (proteiny + DNA)

Univerzální fylogenetický strom



Velikost genomu jednotlivých skupin organismů



Velikost genomu se udává v počtech párů bází:

bp = pár bází

nt = nukleotid

kbp = 1000 bp

Mbp = 1000 kbp

Gbp = 1000 Mbp

1 bp = 660 D

1 mm DNA = 3 Mbp

Paradox hodnoty C - velikost genomu neodpovídá vývojovému postavení (celkové komplexitě) organismů

Počet genů a velikost genu u zástupců jednotlivých skupin organis- mů

TABLE 4.01

Genome Sizes

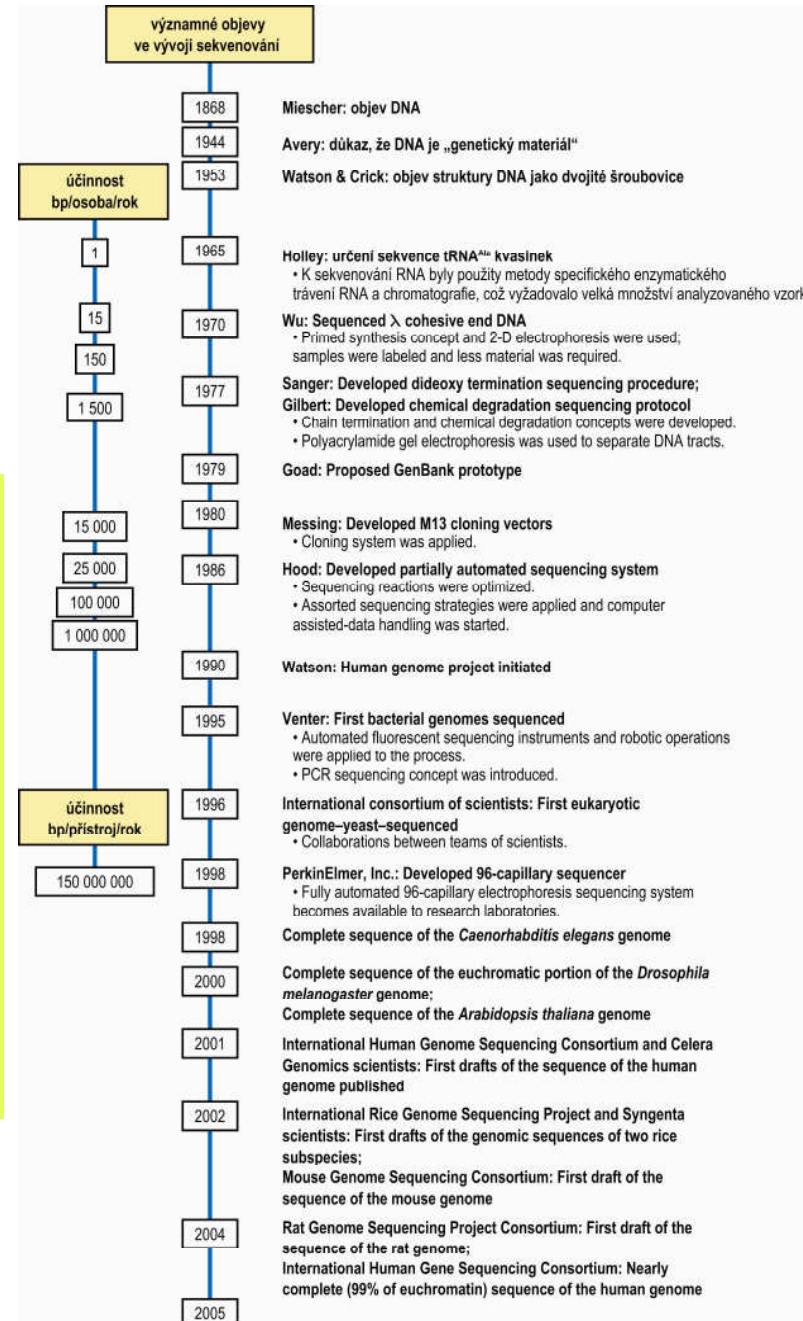
| Organism | Number of Genes | Amount of DNA (bp) | Number of Chromosomes |
|--------------------------------------|-----------------|--------------------|-----------------------|
| <u>Viruses</u> | | | |
| Bacteriophage MS2 | 4 | 3,600 | 1 (ssRNA)* |
| Tobacco Mosaic Virus | 4 | 6,400 | 1 (ssRNA)* |
| ΦX174 bacteriophage | 11 | 5,387 | 1 (ssDNA) |
| Influenza | 12 | 13,500 | 8 (ssRNA) |
| T4 bacteriophage | 200 | 165,000 | 1 |
| Poxvirus | 300 | 187,000 | 1 |
| Bacteriophage G | 680 | 498,000 | 1 |
| <u>Prokaryotes</u> | | | |
| Mitochondrion (human) | 37 | 16,569 | 1 |
| Mitochondrion (<i>Arabidopsis</i>) | 57 | 366,923 | 1 |
| Chloroplast (<i>Arabidopsis</i>) | 128 | 154,478 | 1 |
| <i>Nanoarchaeum equitans</i> | 550 | 490,000 | 1 |
| <i>Mycoplasma genitalium</i> | 480 | 580,000 | 1 |
| <i>Methanococcus</i> | 1,500 | 1.7 Mbp | 1 |
| <i>Escherichia coli</i> | 4,000 | 4.6 Mbp | 1 |
| <i>Myxococcus</i> | 9,000 | 9.5 Mbp | 1 |
| <u>Eukaryotes (haploid genome)</u> | | | |
| <i>Encephalitozoon</i> | 2,000 | 2.5 Mbp | 11 |
| <i>Saccharomyces</i> | 5,700 | 12.5 Mbp | 16 |
| <i>Caenorhabditis</i> | 19,000 | 100 Mbp | 6 |
| <i>Drosophila</i> | 12,000 | 140 Mbp | 5 |
| <i>Homo sapiens</i> | 25,000 | 3,300 Mbp | 23 |
| <i>Arabidopsis</i> | 25,000 | 115 Mbp | 5 |
| <i>Oryza sativa</i> (Rice) | 45,000 | 430 Mbp | 12 |

*ssRNA = single stranded RNA; ssDNA = single stranded DNA; all other genomes consist of double stranded DNA.

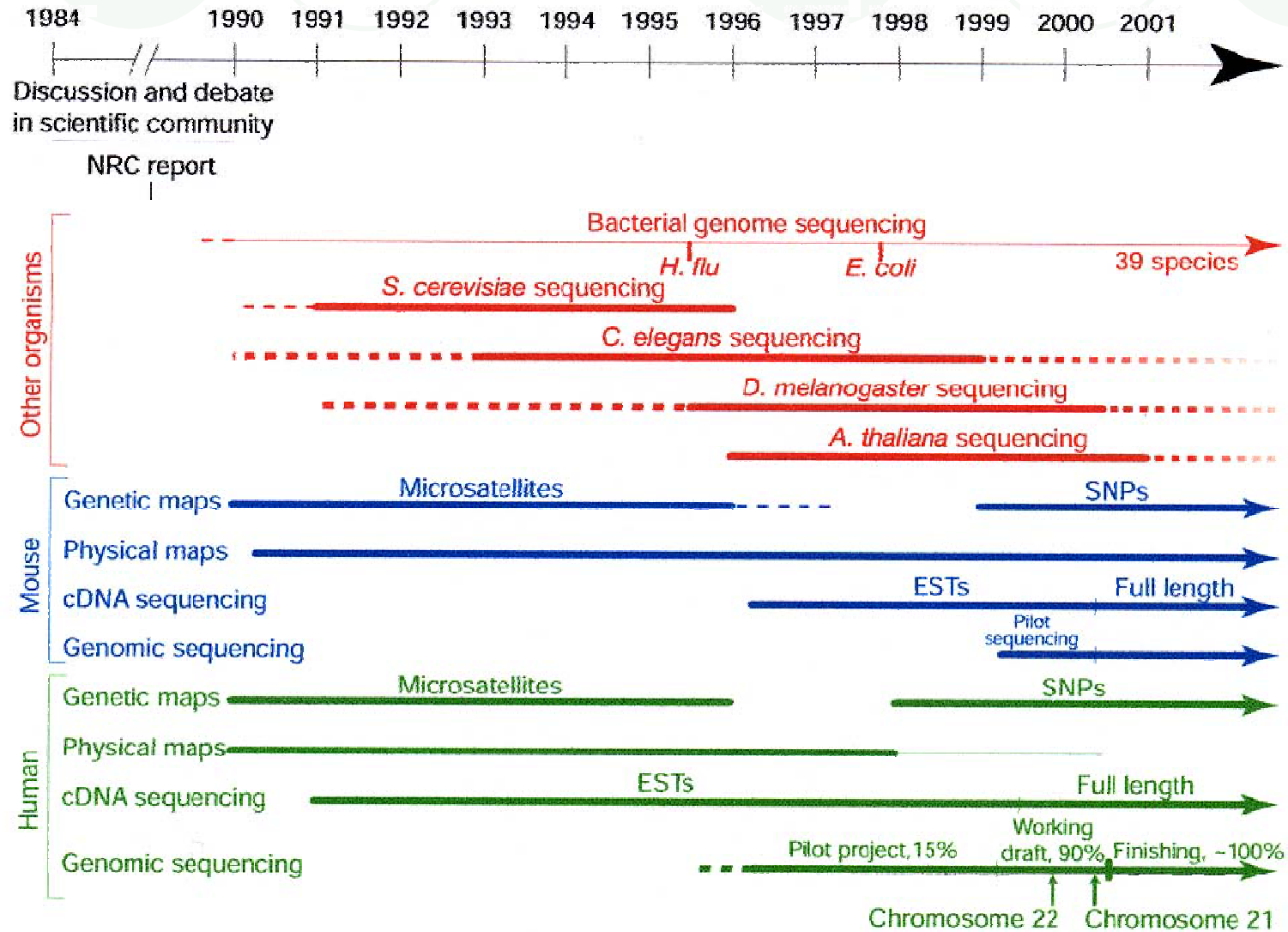
Účinnost sekvenování DNA a historie analýzy DNA

Současnost:

1. Stále vyšší účinnost sekvenování, nižší cena
2. Nové bioinformatické přístupy
3. Aplikace v biomedicíně (zejm. v onkologii)
4. Komerencializace
5. Analýza mikrobiomu

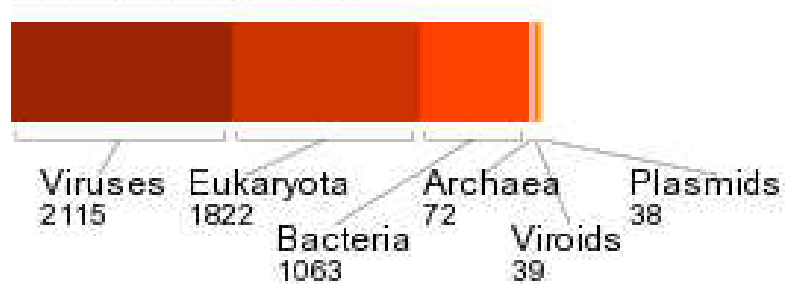


Časový průběh sekvencování genomů

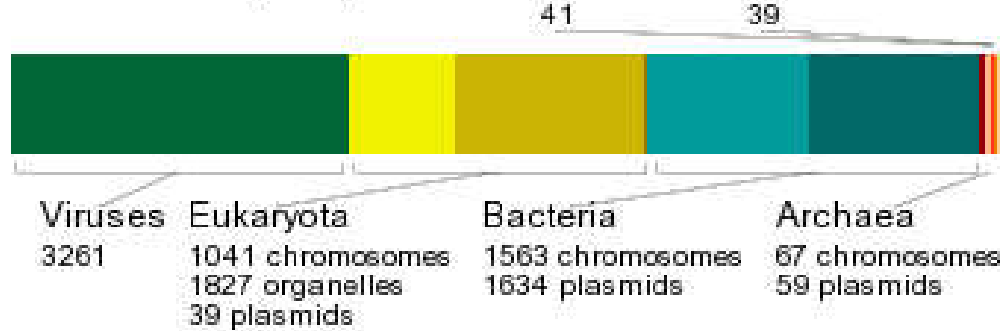


Přehled kompletně sekvenovaných genomů (2008)

Total species (5149)



Total records (9571)



Současný stav

| | | | | |
|------------------------------|----------------------|-------------------------------|--------------------------|------------------------|
| ARCHAEA TOTAL: 453 | Genome: 430 | Transcriptome: 16 | Resequencing: 5 | Uncultured: 81 |
| BACTERIA TOTAL: 19134 | Genome: 18670 | Transcriptome: 17 | Resequencing: 213 | Uncultured: 896 |
| EUKARYA TOTAL: 3181 | Genome: 1734 | EST/Transcriptome: 789 | Resequencing: 510 | Uncultured: 4 |

Projekty sekvenování genomů modelových organismů



Escherichia coli (4.6 Mb) - bakterie, prokaryotický organismus

- známá struktura genomu, regulace a funkce genů
- dobře prostudovány biochemické dráhy



Saccharomyces cerevisiae (14 Mb) - kvasinka, jednobuněčný eukaryotický organismus

- známá struktura genomu, regulací a funkce genů
- probíhá mitóza a meióza
- velký počet dobře definovaných mutant
- vysoká frekvence homologní rekombinace - snadné záměny alel



Caenorhabditis elegans (100 Mb) - jednoduchý mnohobuněčný organismus (hlístice, červ)

- obsahuje 959 buněk, jejichž vývojové linie jsou známy
- detailně prostudovaný nervový systém (302 neuronů a jejich spojení)
- modelový organismus vývojové biologie (procesy diferenciací)

Projekty sekvencování genomů modelových organismů



Drosophila melanogaster (165 Mb) - zástupce hmyzu

- objekt klasické genetiky
- dobře prostudována struktura genů, jejich regulace a funkce
- řada dobře definovaných mutant.



Fugu rubripes (400 Mb) - ryba

- model genomu obratlovců
- nízká proporce repetitivních sekvencí
- vysoká proporce exonů
- relativně krátké geny ve srovnání s lidskými homologními geny (vhodný pro identifikaci lidských kódujících genů)

Projekty sekvencování genomů modelových organismů



Arabidopsis thaliana (100 Mb) - kvetoucí rostlina

- neobvykle malý genom
- nízký počet chromozomů
- nízká proporce repetitivních sekvencí
- vysoký počet semen (10 000) během krátké generační doby



Mus musculus - myš, savec (3000 Mb)

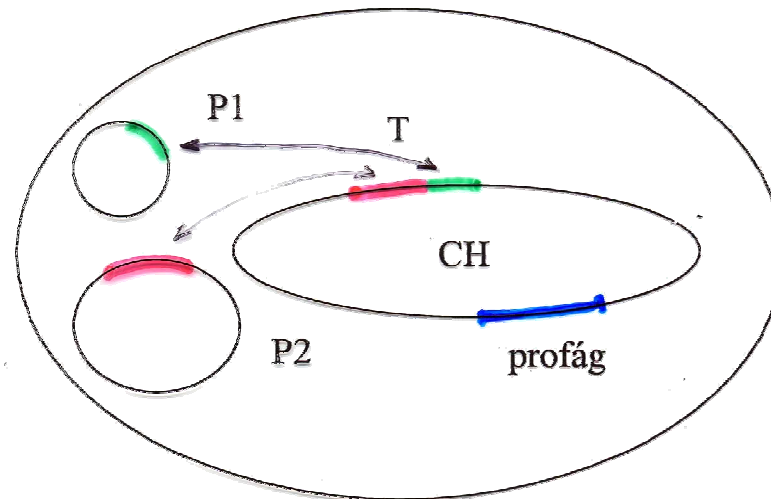
- geneticky nejlépe prostudovaný savec
- vhodný experimentální model pro studium mutací a genetická křížení
- vazba genů podobná jako u člověka
- možnost přípravy transgenních myší s genetickými modifikacemi
- model studia genové exprese a funkce genů.

metagenom = genetický materiál pocházející z prostředí

Prokaryotický genom

- Složky

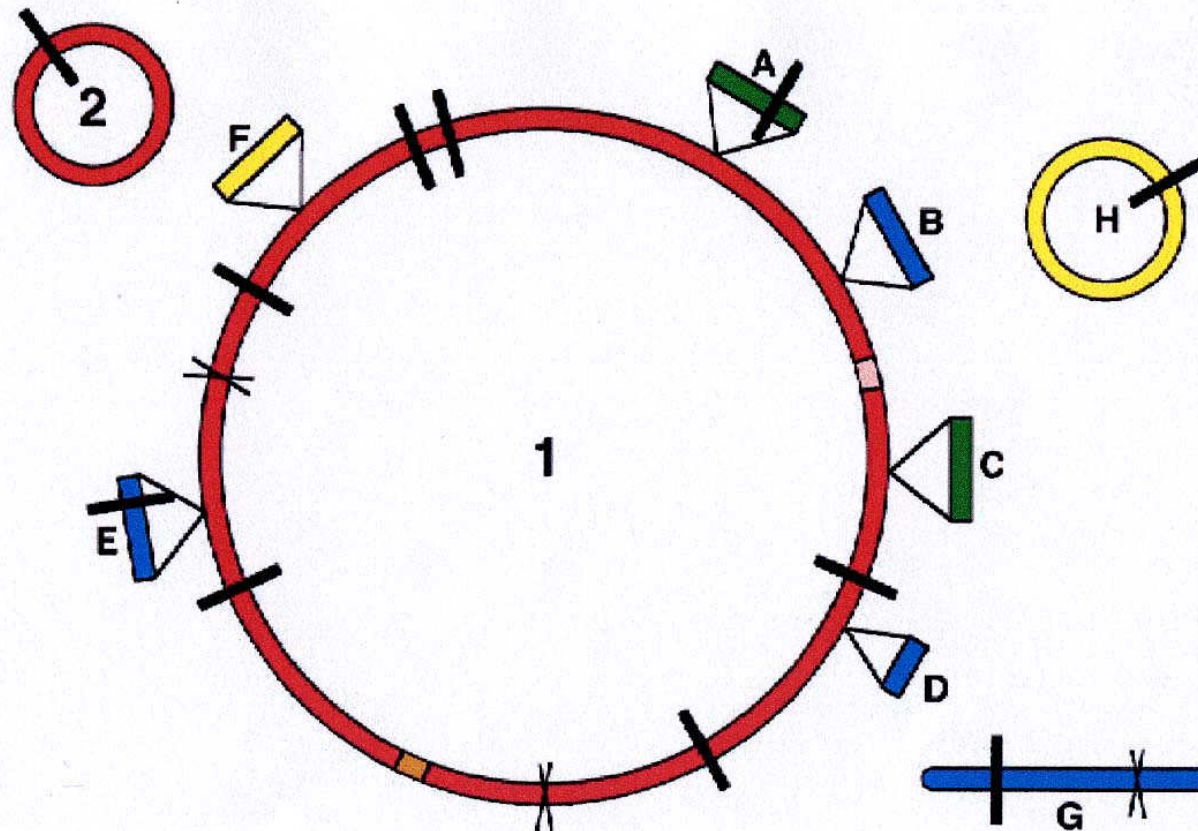
- Bakteriální chromozom (nukleoid)
- Mobilní elementy (Plazmidy, inzerční sekvence, transpozony, genomické ostrovy, integrony aj)
- Bakteriofágy, profágy



STRUKTURA PROKARYOTICKÝCH GENOMŮ

Mozaikový charakter

Vysoká
dynamika
a plasticita



Endochromozomy (1,2)

Přidatné genetické elementy (A-H)

- Plazmidy (H, F)
- Profágy a defektní profágy (B, D, E, G)
- Genomické ostrovy (A, C)
- IS-elementy, transpozony, integrony (I)

Variabilní složka
genomu – adaptace
na prostředí

TOPOLOGIE PROKARYOTICKÉHO GENOMU

Replikony

CHROMOZOM

- kružnicový
- lineární

PLAZMIDY

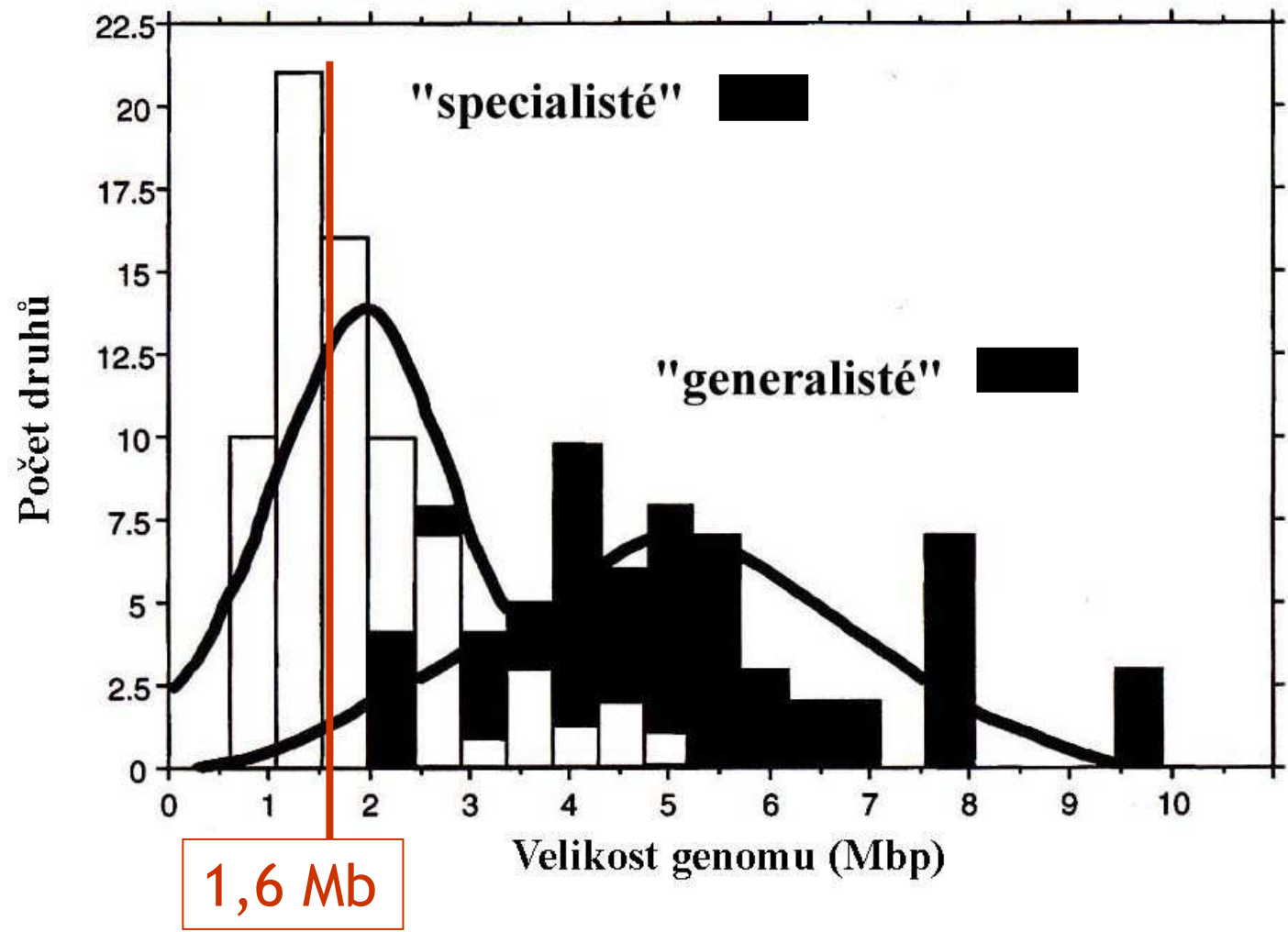
- kružnicové
- lineární

| DRUH | CHROMOZOMY | | PLAZMIDY | |
|----------------------------------|------------------------|------------|-----------------------|------------|
| | KRUŽNICOVÉ | LINEÁRNÍ | KRUŽNICOVÉ | LINEÁRNÍ |
| <i>Escherichia coli</i> | 1 (4,6 Mb) | | několik | |
| <i>Bacillus cereus</i> | 1 (5 Mb) 1 (2,4 Mb) | | 0 několik (2,6 Mb) | |
| <i>Vibrio cholerae</i> | 2 (2,9+1,1 Mb) | | | |
| <i>Borrelia burgdorferi</i> | | 1 (0,9Mb) | 9 (kb) | 12 (kb) |
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 1 (2,8 Mb) | 1 (2,1 Mb) | 2 (0,75 Mb) | |
| <i>Streptomyces lividans</i> | | 1 (8 Mb) | | 1 (50 kb) |

Prokaryota s lineárním chromozomem

- **Streptomyces** (ambofaciens, lividans) 10 Mb
- **Borrelia burgdorferi** (B. hermsii) 0.95 Mb
 - + lineární plazmidy
- **Coxiella burnetii** 2,1 Mb
- **Paracoccus denitrificans** - tři molekuly DNA
 - 2; 1,1; 0,64 Mb, dvě jsou lineární
- **Agrobacterium tumefaciens**
- a řada dalších...

Velikost genomu prokaryot



Genetická organizace prokaryotického genomu

- velmi kompaktní genom s malými mezerami mezi geny
- většina genomu je obsazena strukturními geny
- malá část (10 %) je tvořena nekódující DNA
- operonové uspořádání genů (většinou funkčně příbuzných)
- pořadí genů není u prokaryot konzervováno - důsledek přestaveb genomu a horizontálního přenosu genů

Velikost a genový obsah vybraných prokaryotických genomů

| druh | velikost genomu v párech nukleotidů | předpovězený počet genů |
|--|-------------------------------------|-------------------------|
| Archaea | | |
| <i>Archaeoglobus fulgidus</i> | 2 178 400 | 2 486 |
| <i>Methanosarcina acetivorans</i> | 5 751 492 | 4 721 |
| <i>Nanoarchaeum equitans</i> | 490 885 | 582 |
| <i>Pyrococcus furiosus</i> | 1 908 256 | 2 228 |
| <i>Sulfolobus solfataricus</i> | 2 992 245 | 3 033 |
| <i>Thermoplasma volcanium</i> | 1 584 804 | 1 548 |
| Eubacteria | | |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 4 214 630 | 4 225 |
| <i>Bordetella parapertussis</i> | 4 773 551 | 4 467 |
| <i>Bradyrhizobium japonicum</i> | 9 105 828 | 8 373 |
| <i>Buchnera aphidicola</i> | 615 980 | 550 |
| <i>Chlamydia pneumoniae</i> kmen AR39 | 1 229 853 | 1 167 |
| <i>Escherichia coli</i> kmen K12 MG1655 | 4 639 675 | 4 467 |
| <i>Escherichia coli</i> kmen O157 EDL933 | 5 528 970 | 5 463 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> Rd KW20 | 1 830 138 | 1 789 |
| <i>Legionella pneumophila</i> kmen Paris | 3 503 610 | 3 136 |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> kmen CDC | 4 403 837 | 4 293 |
| <i>Mycobacterium genitalium</i> | 580 076 | 525 |
| <i>Neisseria meningitidis</i> Z2491 | 2 184 406 | 2 208 |
| <i>Pseudomonas syringae</i> kmen DC3000 | 6 397 126 | 5 660 |
| <i>Rickettsia typhi</i> | 1 111 496 | 919 |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | 4 857 432 | 4 622 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> kmen MW2 | 2 820 462 | 2 712 |
| <i>Streptomyces coelicolor</i> | 8 667 507 | 7 912 |
| <i>Ureaplasma parum</i> ATCC 700970 | 751 719 | 653 |
| <i>Yersinia pestis</i> kmen KIM | 4 600 755 | 4 240 |

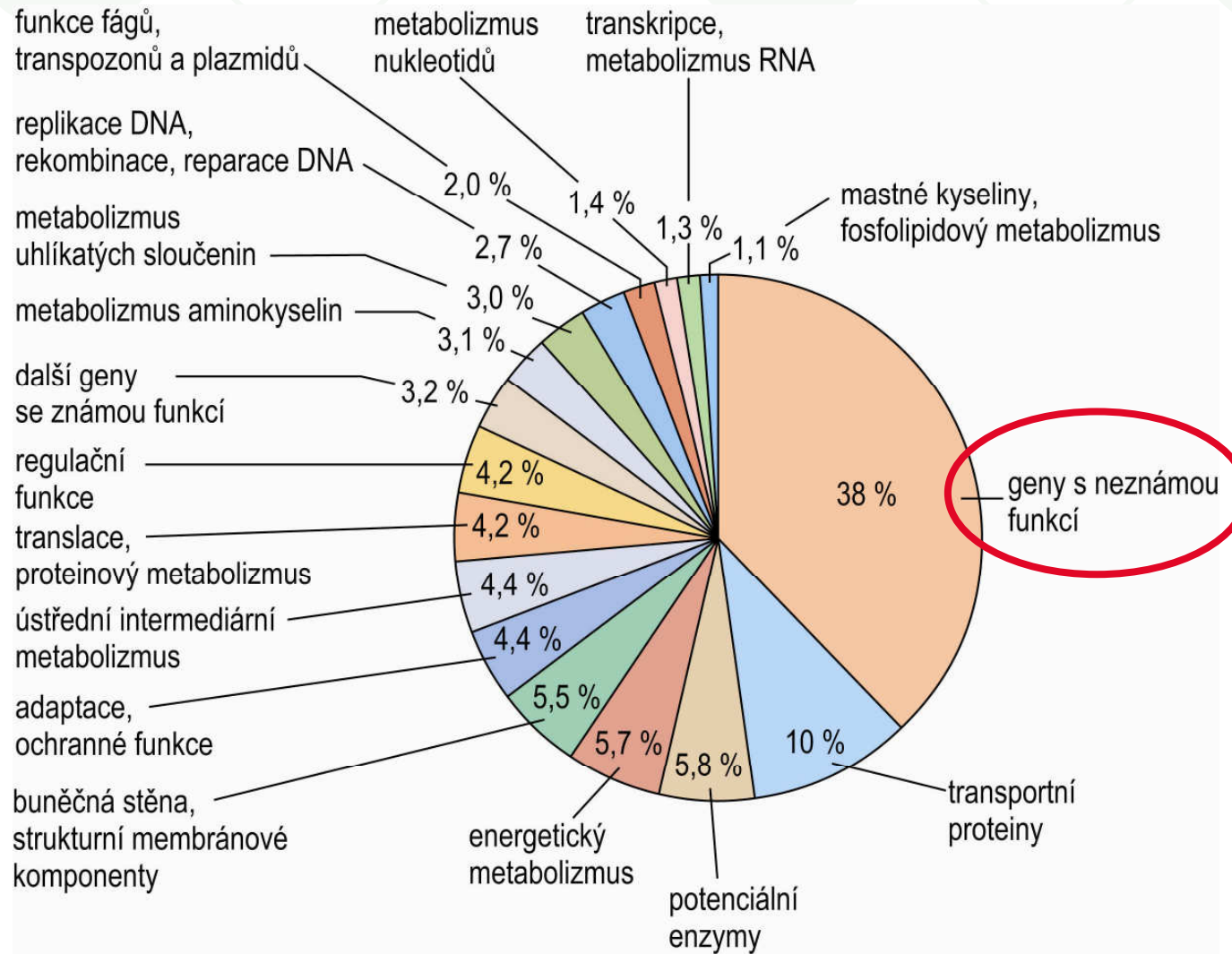
Údaje jsou převzaty z webové stránky NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genomes/>), květen 2008.

Počet genů u prokaryot je proporcionalní velikosti jejich genomu - **paradox hodnoty C u nich neplatí**

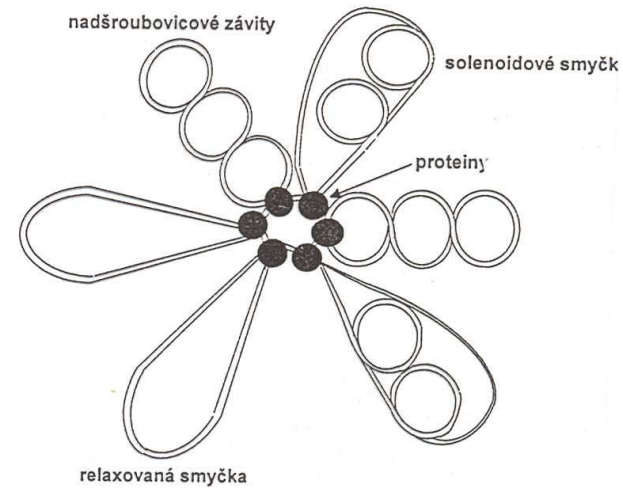
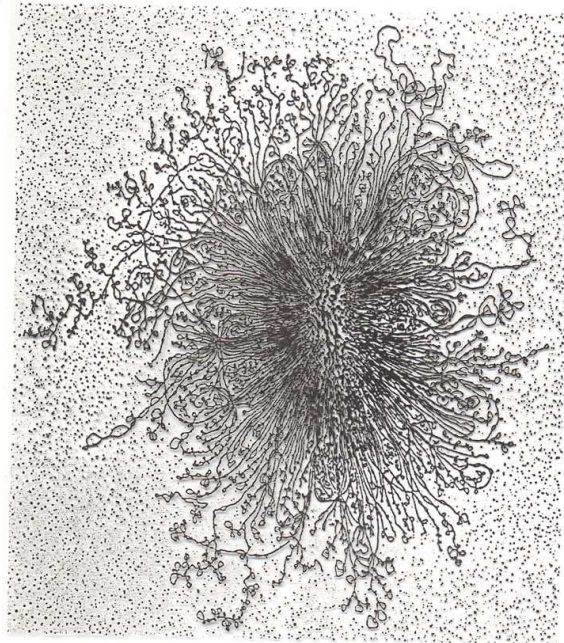
| Organismus | Velikost genomu (Mbp) | Počet ORF |
|------------------------|-----------------------|-----------|
| <i>T. pallidum</i> | 1.14 | 1 040 |
| <i>B. burgdorferi</i> | 1.44 | 1 751 |
| <i>H. pylori</i> | 1.66 | 1 657 |
| <i>A. fulgidus</i> | 2.18 | 2 437 |
| <i>B. subtilis</i> | 4.20 | 4 100 |
| <i>M. tuberculosis</i> | 4.41 | 3 924 |
| <i>E. coli</i> | 4.60 | 4 288 |

1 gen ~ 1 kbp

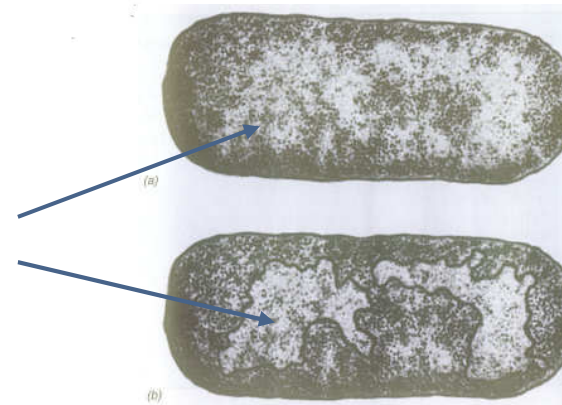
Klasifikace 4288 genů E. coli podle jejich funkce



Struktura chromozomu *E. coli*



Bakteriální nukleoid



HLP, HU-proteiny, enzymy a faktory účastnící se replikace a transkripce

Charakteristika plazmidů

dsDNA - kružnicová nebo lineární, velikost: 1-1000 kb

Základní typy plazmidů:

- kryptické - funkce neznámá
- epizomální - reverzibilní intergace do chromozomu hostitele
- konjugativní - schopné přenosu konjugací
- mobilizovatelné - přenositelné za přítomnosti konjugativního plazmidu

Příklady plazmidů:

- F-plazmidy (fertilní faktor, konjugativní)
 - zodpovědné za konjugaci
- R-plazmidy (R-faktory)
 - zodpovědné za rezistenci k antibiotikům
- kolicinogenní (Col-plazmidy)
 - tvorba proteinů s antibiotickým charakterem (*Enterobacteriaceae*, aj.)
- Ti-plazmidy (tumory indukující)
 - tvorba nádorů u dvouděložných rostlin (*Agrobacterium tumefaciens*)
- plazmidy odbourávající organické sloučeniny (*Pseudomonas*)
- plazmidy podílející se na fixaci vzdušného dusíku (*Rhizobium*).
- Plazmidy používané jako vektory pro přenos DNA (pBR322, pUC)

Eukaryotický typ buněk

- Jádro je ohraničeno od cytoplazmy membránou
- Dělení buněk probíhá mitózou nebo meiózou
- Genetický materiál tvoří chromatin
- Buněčná stěna je odlišná od prokaryotické nebo chybí
- Buňka obsahuje organely: **mitochondrie, chloroplasty**, cytoplazmatické retikulum, Golgiho aparát, lysozomy aj.

Přenosy genetické informace u eukaryot probíhají principiálně stejně jako u prokaryot

Složky eukaryotického genomu

- **jaderný genom** - lineární chromozomy v různém počtu
- **mitochondriový genom** - kružnicové nebo lineární genofory
- **chloroplastový genom** (rostliny) - kružnicové genofory
- **plazmidy** (velmi vzácně) - kružnicové genofory

Chromatin = genetický materiál eukaryotické buňky
30 % NK (DNA + RNA) + 70 % proteinů

Základní formy organizace chromatinu

chromatinová síť vláken
v interfázi

jednotlivé chromozomy
při mitóze

chromatin

euchromatin (transkripčně aktivní)

(méně kondenzovaný, slabě barvitelný bazickými barvivy)

heterochromatin (transkripčně inaktivní)

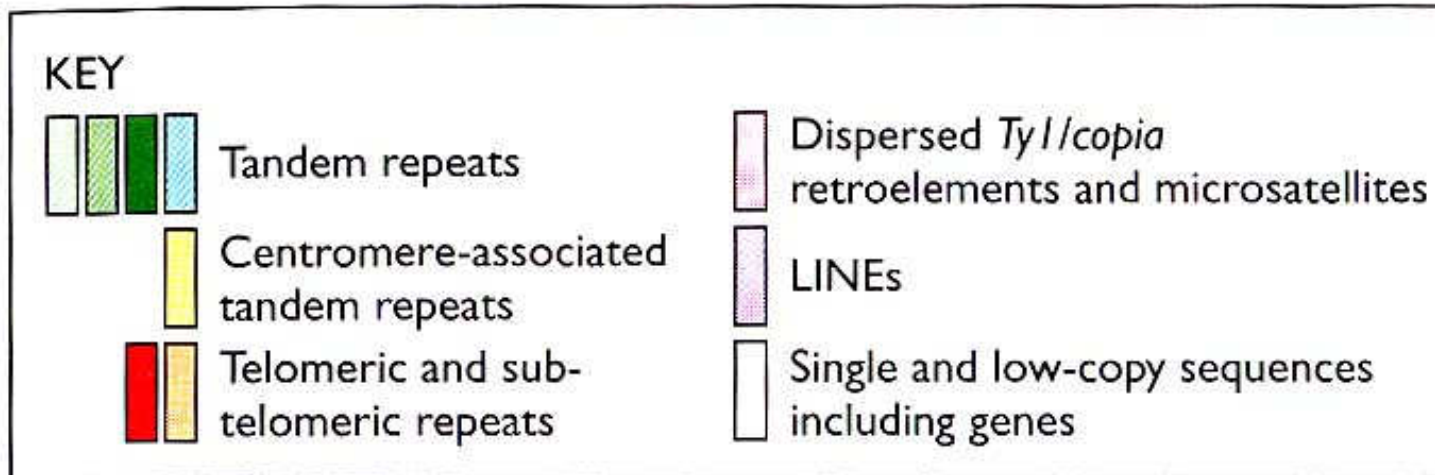
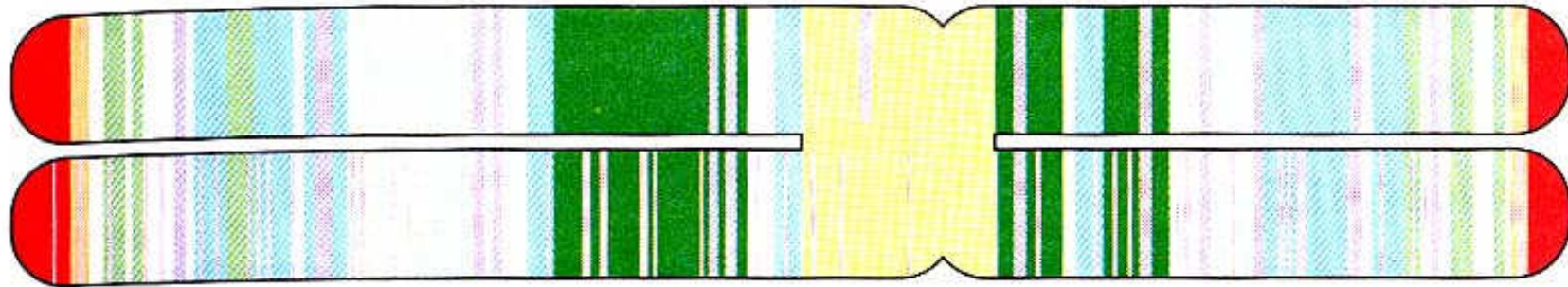
konstitutivní

centroméra + teloméra

fakultativní

dočasně netranskribované geny,
změny během ontogenetického
vývoje

Struktura mitotických chromozomů



Funkční složky eukaryotických chromozomů

- **centromera** - zajišťuje segregaci chromozomů do dceřinných buněk při mitóze (meióze)
- **telomera** - koncová oblast - její struktura zajišťuje dokončení replikace lineárního chromozomu
 - Typické telomerové repetice:
 - TTGGGG - Tetrahymena
 - TTAGGG - člověk
- **počátky replikace (ori)**

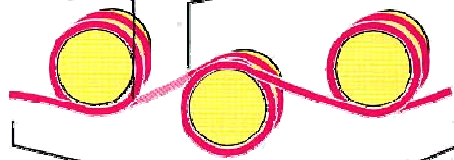
Úrovně kondenzace chromatinu

krátký úsek dvojšroubovice DNA



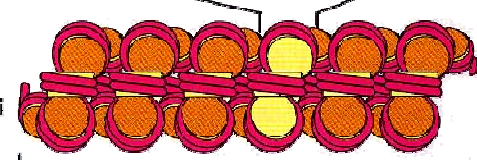
2 nm

„korálková“ forma chromatinu



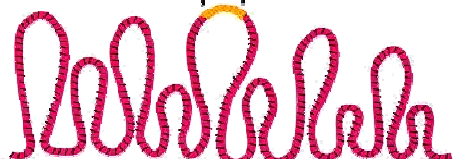
11 nm

30-nm chromatinové vlákno s poskládanými nukleosomy



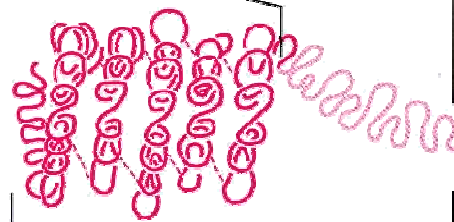
30 nm

úsek chromosomu v rozvinuté formě



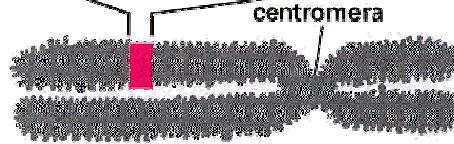
300 nm

kondenzovaný úsek chromosomu

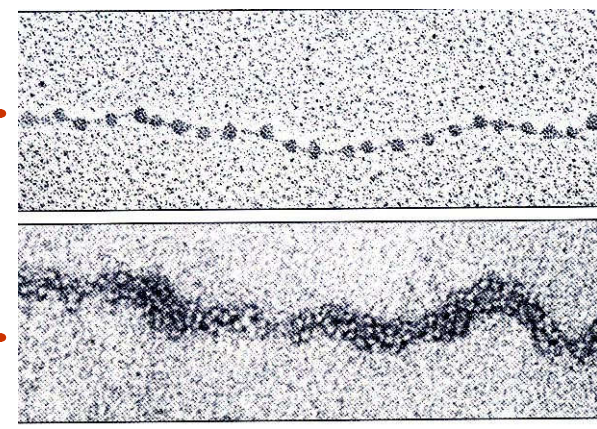


700 nm

úplný mitotický chromosom



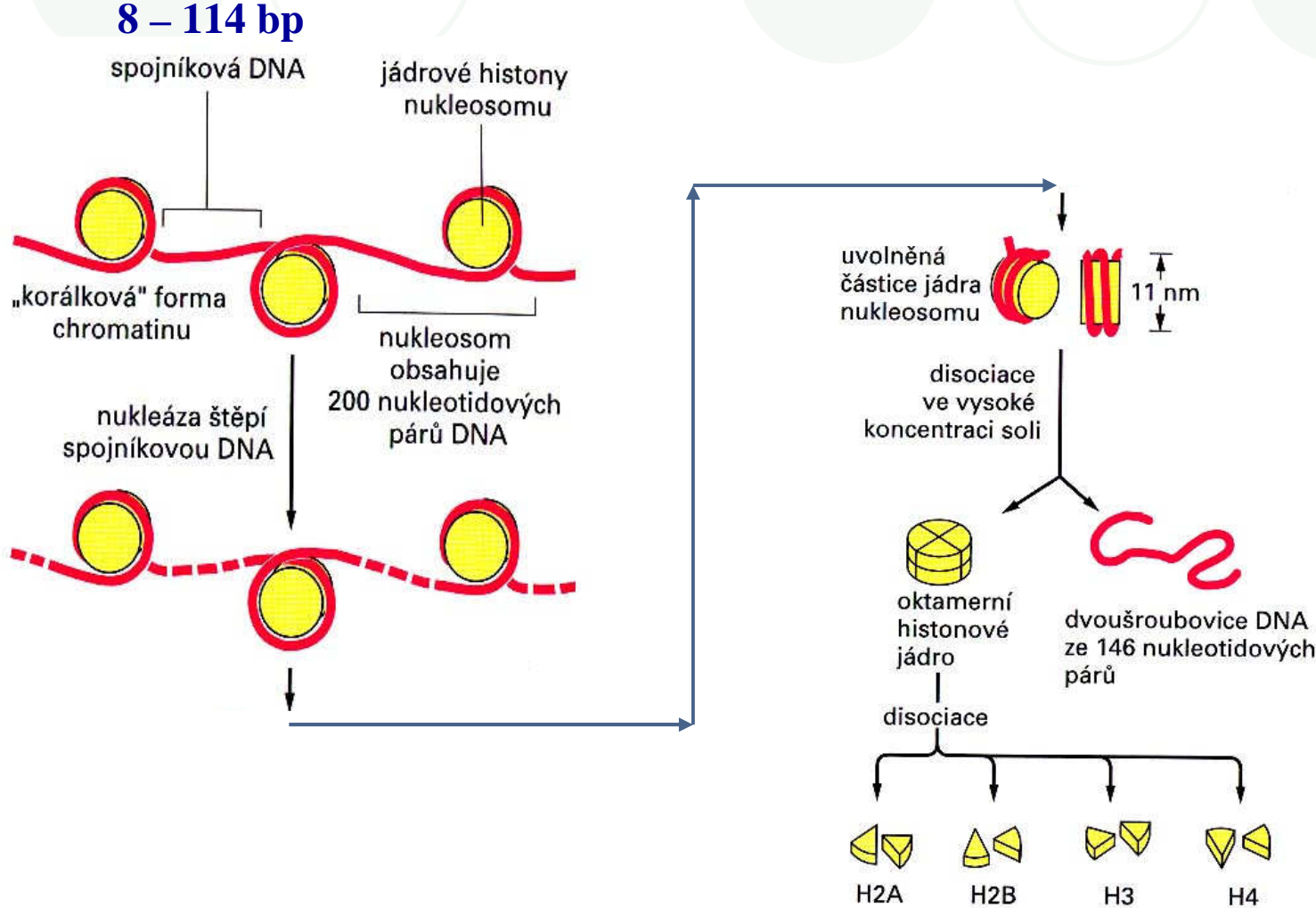
1400 nm

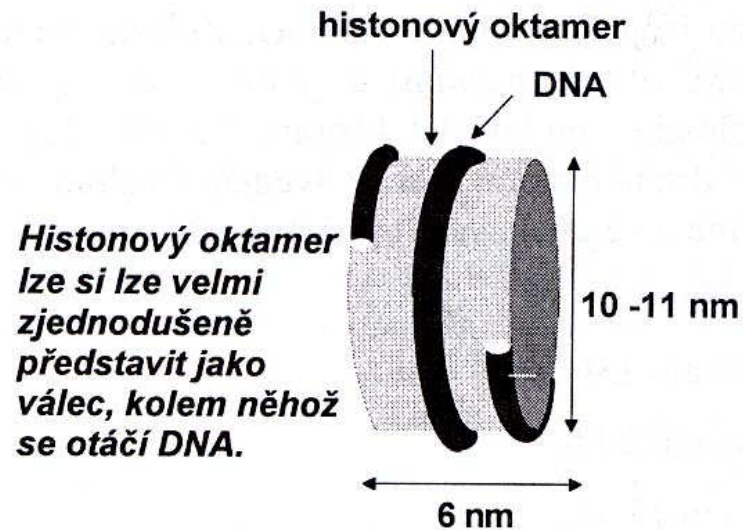


Výsledek:

Každá molekula DNA je zabalena do mitotického chromozomu tak, že je 50 000krát kratší než v rozvinuté formě

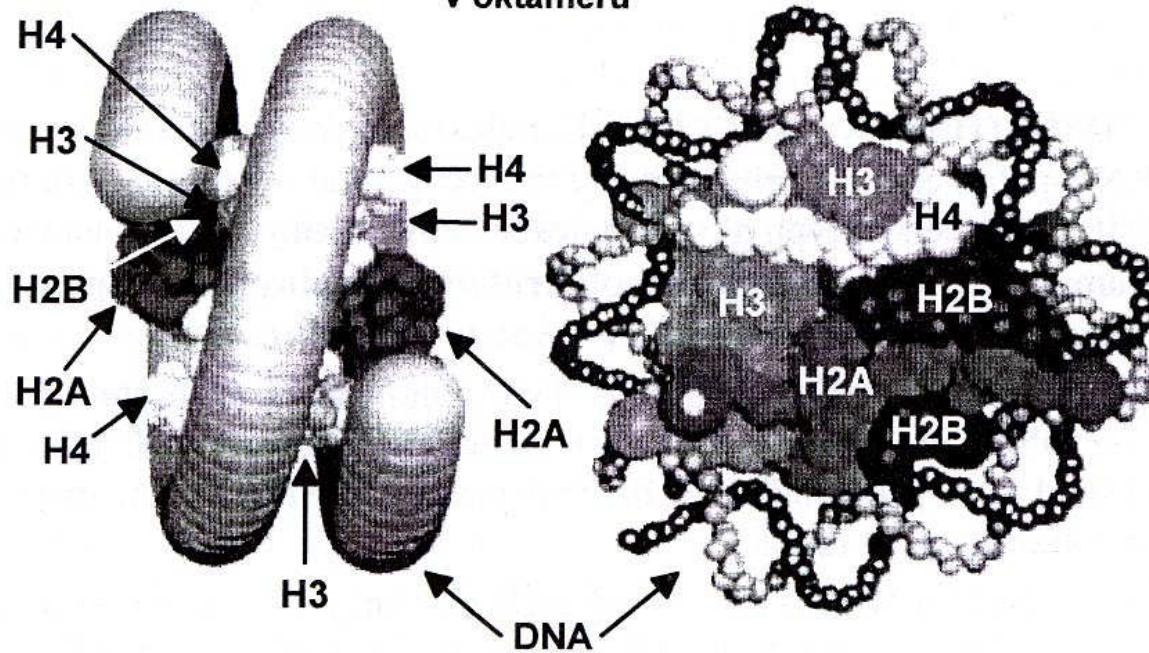
Nukleozómová struktura DNA



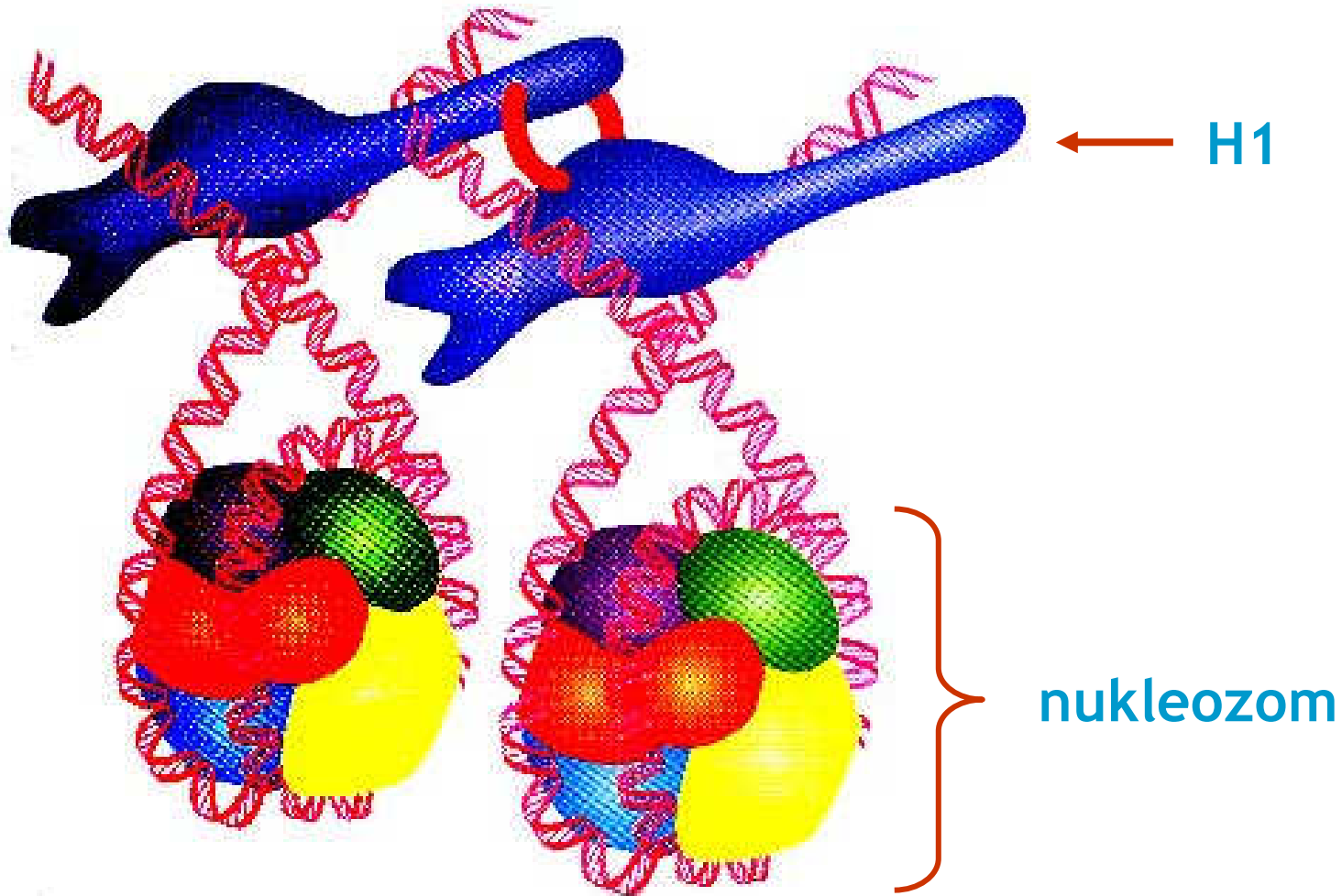


reálnější pohled na umístění histonů v oktameru

molekulární model

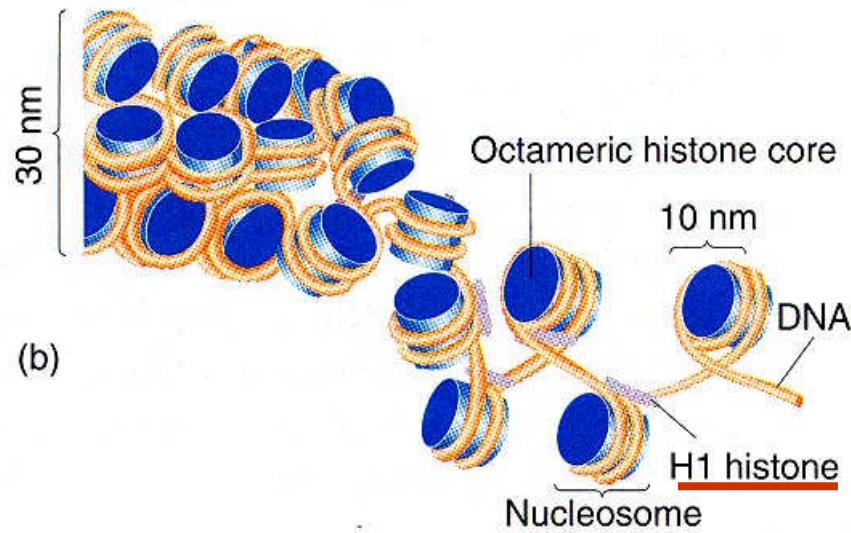


Funkce histonu H1 při spojování nukleozomů

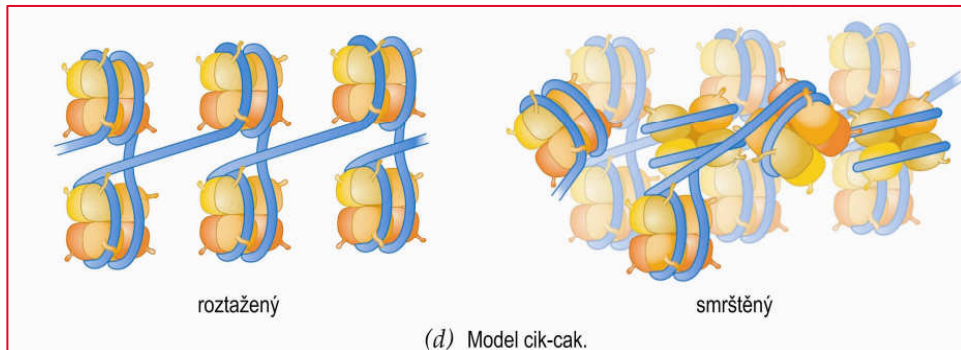
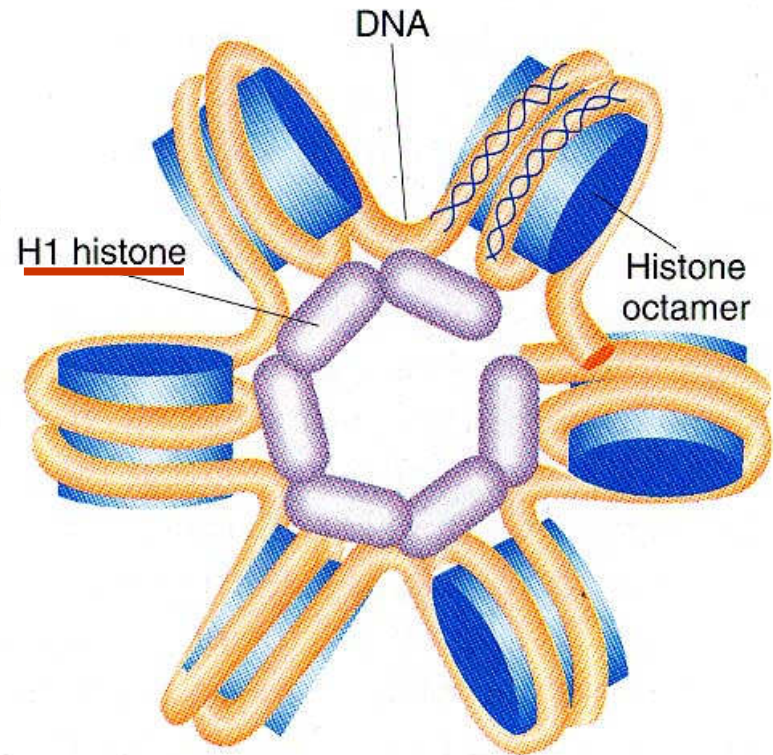


Molekulární struktura eukaryotického chromozomu

30 nm vlákno - solenoidová struktura



Závit solenoidu tvořený 6 nukleozomy



Proteiny chromatinu

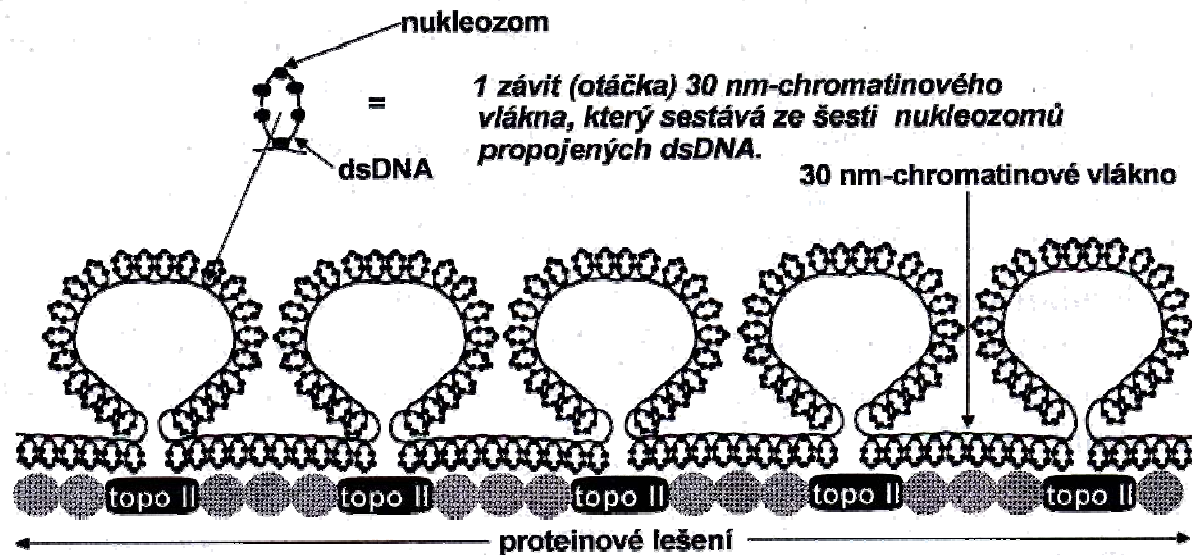
A. Histony

- Bázické proteiny obsahující vysokou proporci argininu a lyzinu (20-30%). U některých organismů jsou ve spermiích přítomny protaminy, které jsou bohaté na arginin.
- Histony jsou velmi konzervativní (zejména H3 a H4). U bakterií se vyskytují toliko HLP, u archeí se nacházejí histony, které jsou jen částečně homologní s H3 a H4.

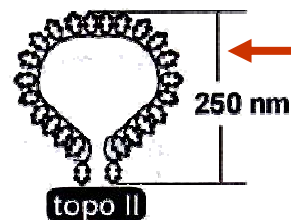
B. Proteiny nehistonové povahy

- proteiny s enzymovými funkcemi, zajišťující replikaci a transkripci (polymerázy, ligázy aj) a enzymy modifikující histony při remodelaci chromatinu (acetyltransferázy, metylázy aj) - regulace genové exprese
- HMG-proteiny (high mobility group), navozující změny chromatinu během transkripce

Struktura 30 nm chromatinového vlákna



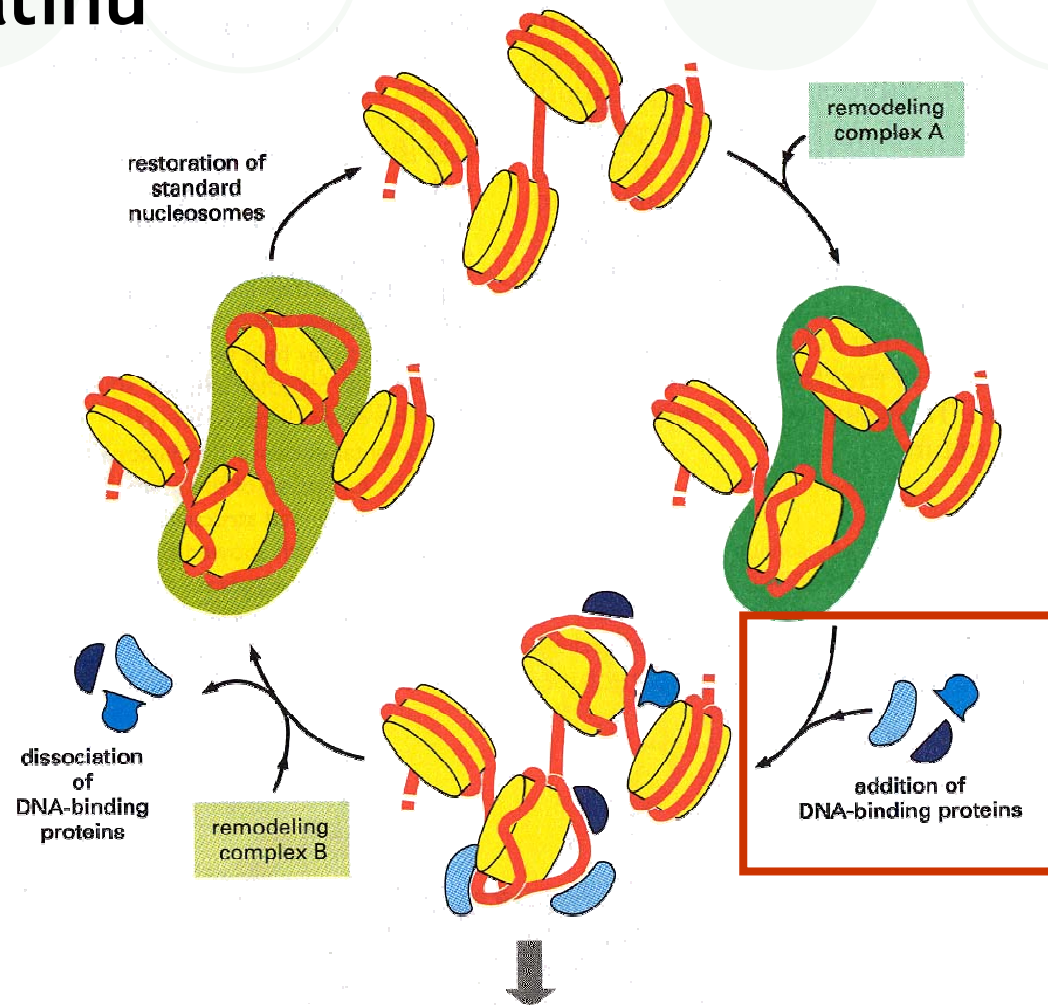
chromatinová doména
(chromatinová smyčka)



replikace
transkripce

*Tento obrázek je idealizujícím schématem.
Chromatinové domény nejsou stejně velké.
Jejich délka je 60 - 150 kb.*

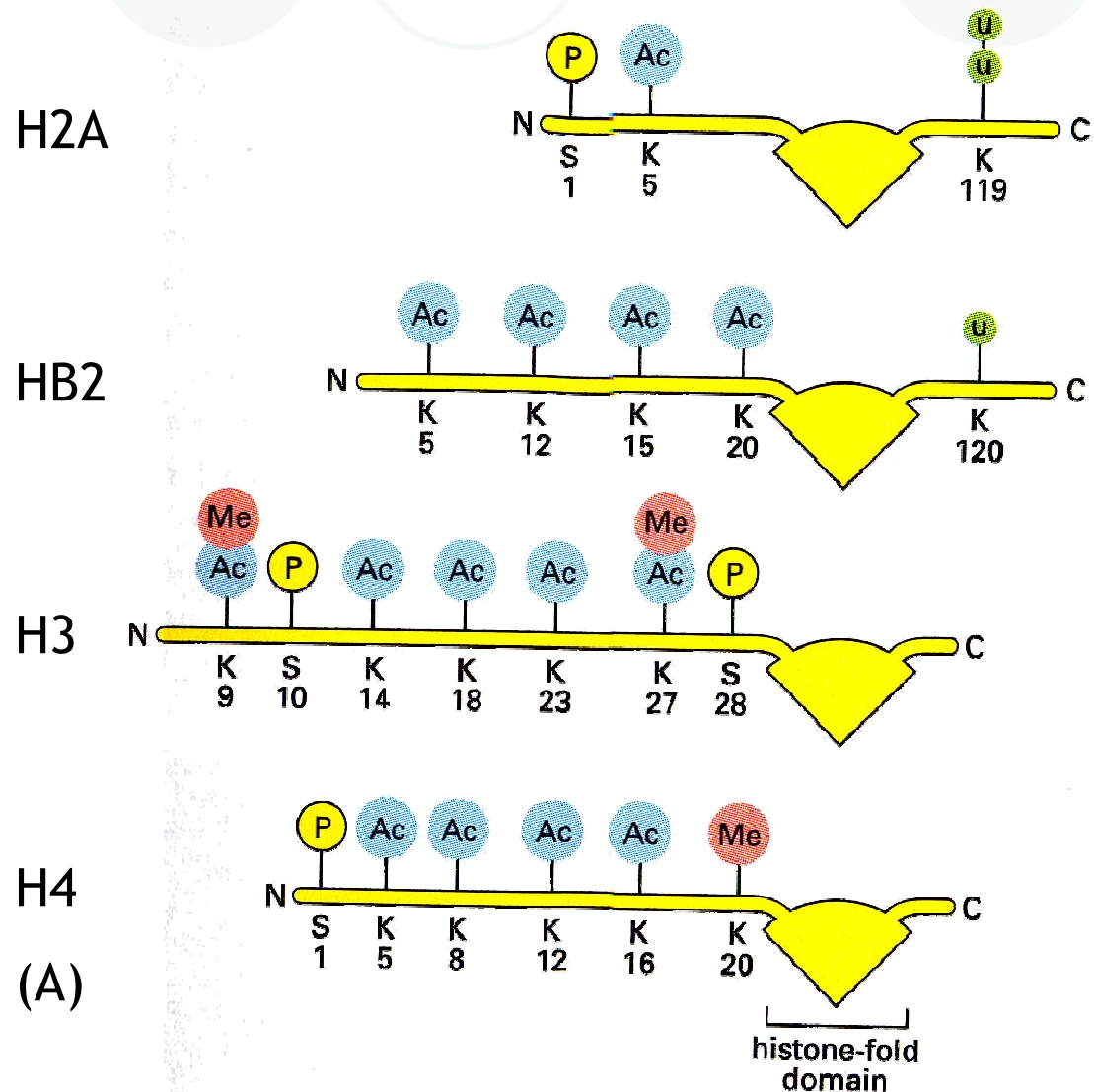
Modely přetváření nukleozomové struktury chromatinu



Chromatin remodelující komplexy - dočasné změny struktury chromatinu

Genová exprese, replikace DNA a další procesy vyžadující přístupnost DNA uložené v nukleozomech

Kovalentní modifikace histonů



Ac = acetyl (lyzin)

Me = metyl (lyzin)

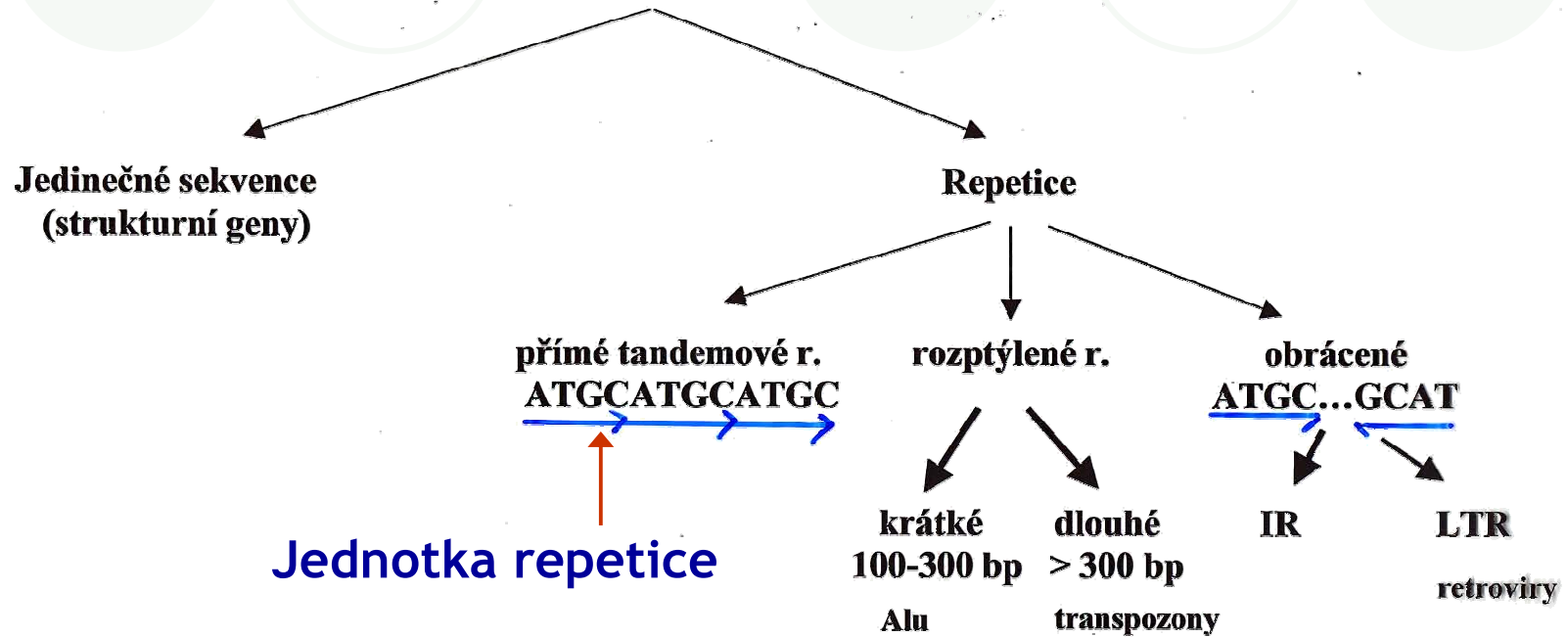
P = fosfát (serin)

u = ubiquitin

„Histonový kód“

- změna struktury chromatinu (de/kondenzace)
- exprese genů
- umlčení genů

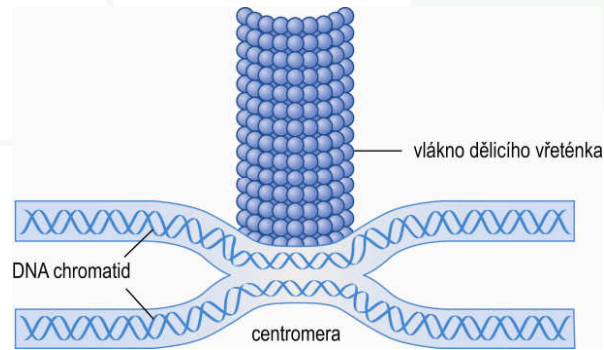
Sekvence eukaryotického genomu



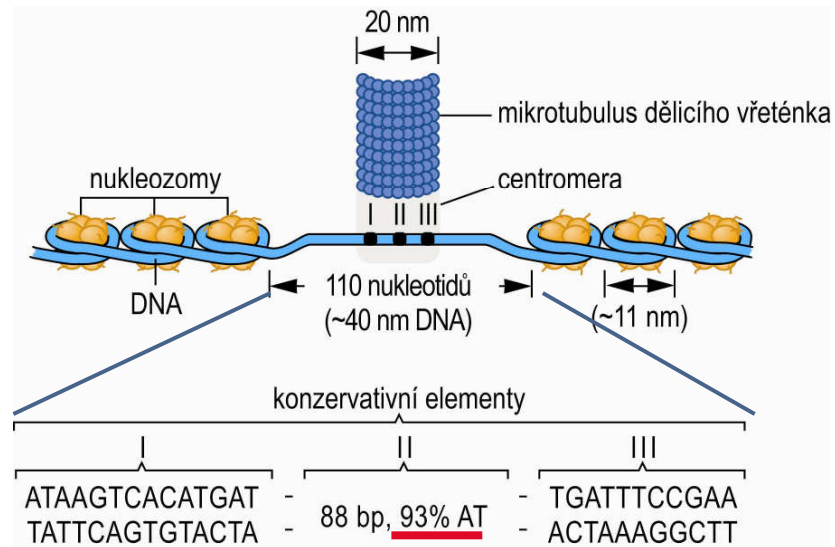
IR (inverted repeat) $\begin{matrix} \text{ATGC} & \text{-----} & \text{GCAT} \\ \text{TACG} & \text{-----} & \text{CGTA} \end{matrix}$ Obrácená (koncová) repeticce

LTR (Long Terminal Repeat): $\begin{matrix} \text{GTATG} & \text{-----} & \text{CATAC} & \text{-----} & \text{GTATG} & \text{-----} & \text{CATAC} \\ \text{CATAC} & \text{-----} & \text{GTATG} & \text{-----} & \text{CATAC} & \text{-----} & \text{GTATG} \end{matrix}$ Dlouhá koncová repeticce

Model struktury centromery metafázního chromozomu

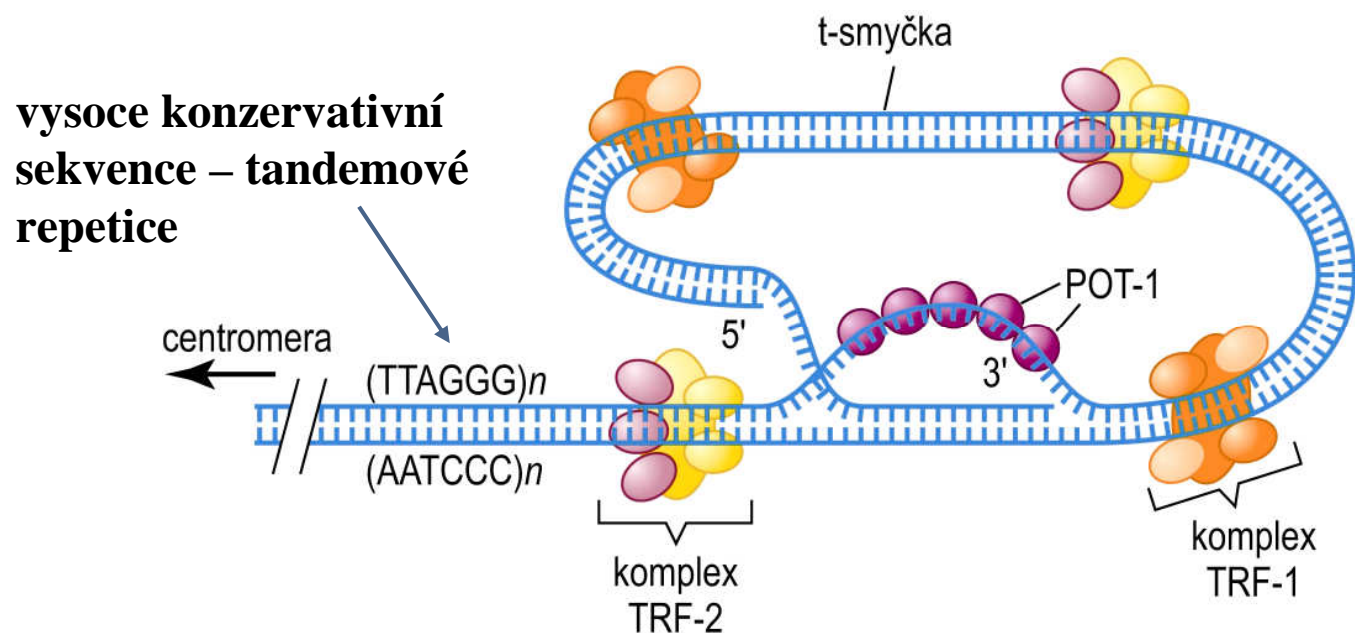


Konzervativní struktury centromer u kvasinky



vazba specifických proteinů

Model lidské telomery stabilizované tvorbou t-smyčky



Specifita struktury telomery:

- zabraňuje odbourávání konců chromozomů DNázami
- brání spojování (fúzí) konců různých chromozomů
- umožňuje replikaci lineárních chromozomů

Typy genů na eukaryotické jaderné DNA

- Jedinečné geny (1 kopie, většina strukturních genů)
- Tandemové repetice (geny pro rRNA, geny pro histony)
- Genové rodiny (skupiny příbuzných genů - geny pro globin, aktin aj.)
- Pseudogeny (inaktivní kopie genů)
- Rozptýlené genové repetice (kopie genů nebo genových rodin rozptýlené po genomu - geny pro tRNA, snRNA aj.)
- Orfany (orphans) = URF = ORF s neznámou funkcí, bez homologie ke známým genům
- *Orfony (ojediněle se vyskytující kopie genů)*
- *Mezerníky - sekvence oddělující geny nebo skupiny genů*
 - a) *přepisované*
 - b) *nepřepisované*

Projekt analýzy lidského genomu Human Genome Project (HGP)

- 1985 - první úvahy
- 1987 - první finanční zdroje
- 1990 - oficiální zahájení **Dept. Energy, NIH, HUGO**

Cíle dílčích etap:

1. Konstrukce genetické mapy s vysokým rozlišením
2. Konstrukce fyzikálních map různého typu
3. Úplná sekvence genomu **stanovena v roce 2003 (2001-
publikace v Nature a Science)**

○ identifikovat a lokalizovat geny v genomu člověka

Součást projektu:

- stanovit rozdíly v genetické výbavě jedinců
- Rozvoj metodologie analýzy genomu (mapování genů, sestavování sekvencí)
- jak rozdíly v genetické výbavě predisponují jedince k chorobám
- Bioinformatika (sběr a zpracování dat)
- Analýza genomu modelových organismů

Projekt diverzity lidského genomu (Human Genome Diversity Project)

- **Studium genetických variací v etnických skupinách**
 1. Původ člověka, migrace prehistorických populací, sociální struktura populací.
 2. Adaptace a choroby. Náchylnost populací k chorobám (hypertenze, thalasemie, srpkovitá anemie aj).
 3. Forezní antropologie. Variabilita DNA markerů, spolehlivost DNA-fingerprintů, identifikace jedinců.

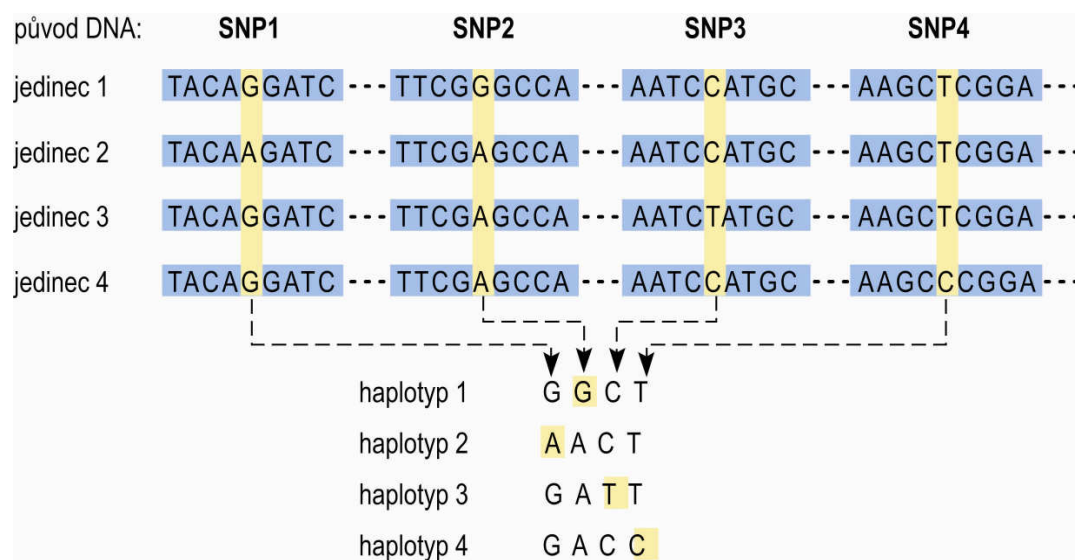
Matt Ridley: Genom – Životopis lidského druhu v třidvaceti kapitolách. Portál, Praha 2001.

Lidský mezinárodní projekt HapMap

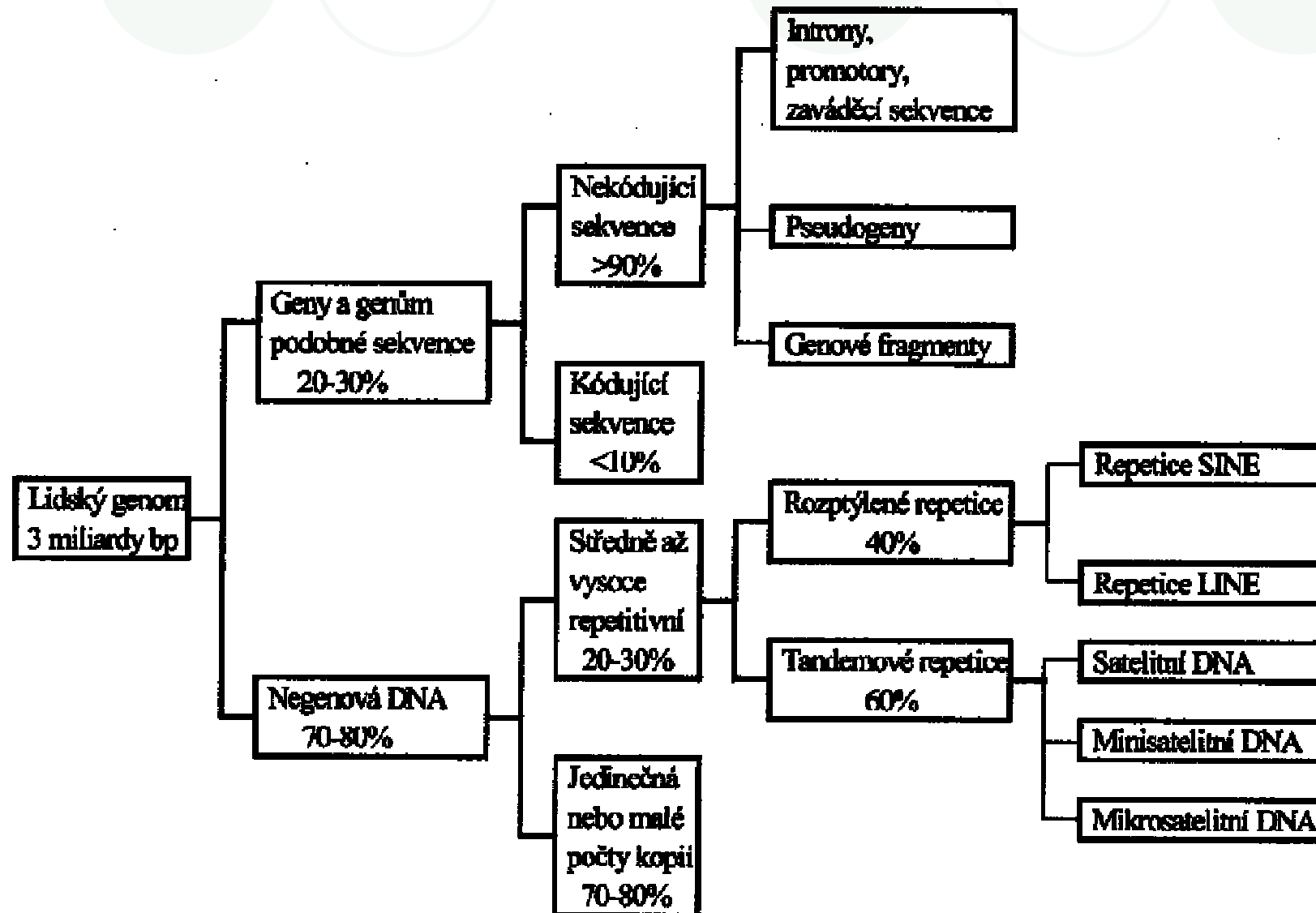
Cíl projektu: identifikovat a mapovat SNP („snips“, single-nucleotide polymorphisms) v různých populacích, zjistit jejich asociaci s geny zodpovědnými za choroby a tím stanovit rizika vzniku chorob (270 národů ze čtyř větví lidstva - Američanů, původem evropských bělochů, Číňanů, Japonců a Yoruby ze západní Afriky)

Drobné změny v lidském genomu: jednonukleotidové polymorfismy = SNP - záměny nukleotidů v četnosti 1 : 2 000

Haplotyp: skupina vázaných SNP v určité oblasti chromozomu využívaných jako markery (jsou vázány k určitým genům – asociace s geny zodpovědnými např. za choroby)



Typy DNA-sekvencí v lidském genomu

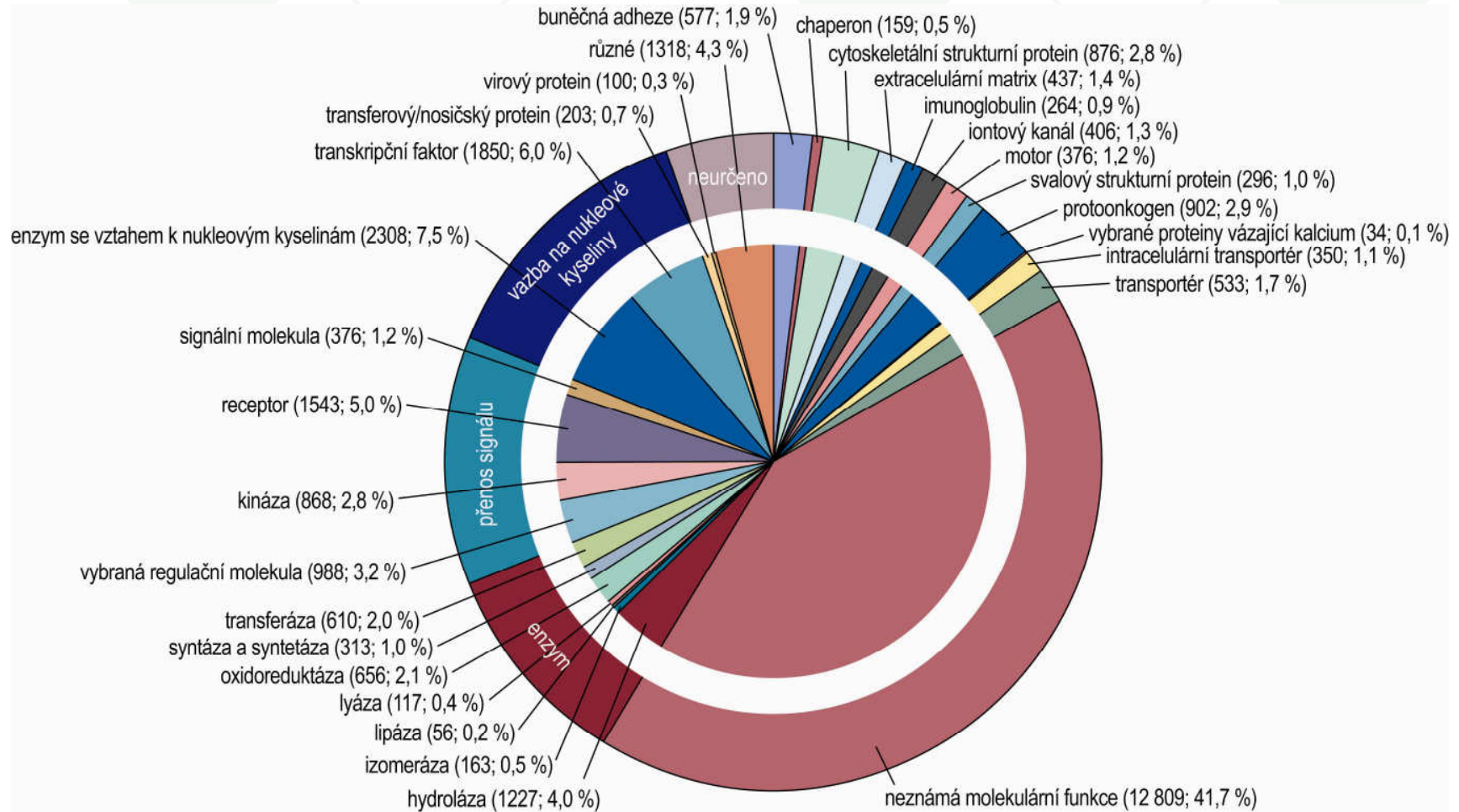


Statistické údaje o lidském genomu

| | |
|--|----------------------|
| Celková velikost genomu | 3289 Mb |
| Chromozomy | |
| - největší | 279 Mb |
| - nejmenší | 45 Mb |
| X | 163 Mb |
| Y | 51 Mb |
| Frakce CpG | 41 % |
| Počet ostrovů CpG | 28 890 |
| Část genomu kódující proteiny | 1,50 % |
| Část genomu, která je transkribována | 33 % |
| Počet dosud identifikovaných genů | 26 500 |
| Celkový počet předpovězených genů | 22 287 (2008) |
| Střední hustota genů | 9-14 genů/Mb |
| Průměrná velikost genu | 27 kb |
| Největší gen | 2,4 Mb (DMD) |
| Průměrná velikost transkriptu | 1340 bp |

Současný odhad
18 000-20 000

Funkční klasifikace genů předpovězených z analýzy sekvence lidského genomu



Genom organel: chloroplastů a mitochondrií

Table 14-2 The Size of Organelle Genomes*

| Type of DNA | Size (thousands of nucleotide pairs) |
|--|---|
| Chloroplast DNA | |
| Higher plants | 120–200 |
| <i>Chlamydomonas</i> (green alga) | 180 |
| Mitochondrial DNA | |
| Animals (including flatworms, insects, and mammals) | 16–19 |
| Higher plants | 150–2500 |
| Fungi | |
| <i>Schizosaccharomyces pombe</i> (fission yeast) | 17 |
| <i>Aspergillus nidulans</i> | 32 |
| <i>Neurospora crassa</i> | 60 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (budding yeast) | 78 |
| <i>Chlamydomonas</i> (green alga) | 16 (linear molecule) |
| Protozoa | |
| <i>Trypanosoma brucei</i> | 22 |
| <i>Paramecium</i> | 40 (linear molecule) |

*These genomes are circular DNA molecules unless indicated otherwise.

Počet kopií DNA v organelách: mtDNA: 5-50, ctDNA = 20-80

► **Tab. 16.2**

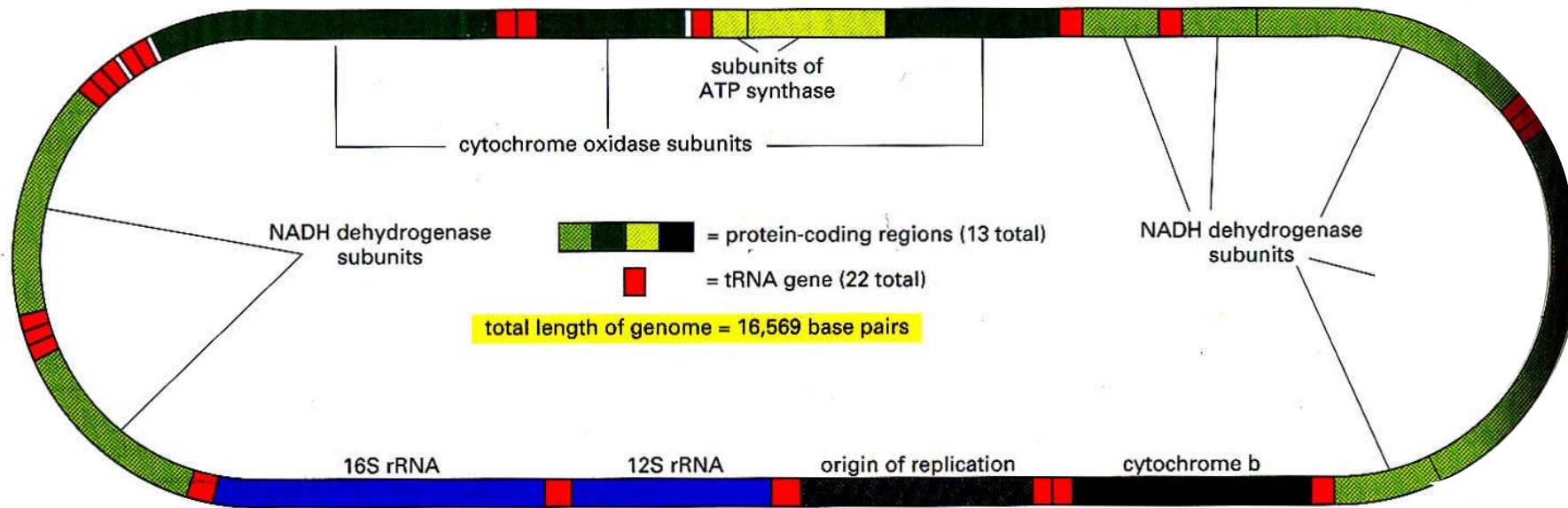
Velikost a genový obsah vybraných mitochondriálních a chloroplastových genomů

| druh | triviální označení | velikost genomu v párech nukleotidů | předpovězený počet genů |
|------------------------------------|------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| <u>mitochondriální genomy</u> | | | |
| <i>Apis mellifera</i> | včela | 16 343 | 13 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | huseníček | 366 924 | 57 |
| <i>Caenorhabditis elegans</i> | háďátko | 13 794 | 12 |
| <i>Candida glabrata</i> | kvasinka (infekční) | 20 063 | 37 |
| <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> | zelená řasa | 15 758 | 25 |
| <i>Drosophila melanogaster</i> | octomilka | 19 517 | 37 |
| <i>Danio rerio</i> | dánio pruhované | 16 596 | 37 |
| <i>Homo sapiens</i> | člověk | 16 571 | 37 |
| <i>Mus musculus</i> | myš | 16 299 | 37 |
| <i>Oryza sativa</i> | rýže | 491 515 | 96 |
| <i>Plasmodium falciparum</i> | prvok, původce malárie | 5 967 | 3 |
| <i>Rattus norvegicus</i> | potkan | 16 313 | 37 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | pekařská kvasinka | 85 779 | 43 |
| <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> | kukuřice | 569 630 | 218 |
| <u>chloroplastové genomy</u> | | | |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | huseníček | 154 478 | 129 |
| <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> | zelená řasa | 203 828 | 109 |
| <i>Marchantia polymorpha</i> | játrovka | 121 024 | 134 |
| <i>Oryza sativa</i> | rýže | 134 525 | 159 |
| <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> | kukuřice | 140 384 | 158 |

Údaje jsou převzaty z webové stránky NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genomes/>) k 15. květnu 2008.

Struktura genomu mitochondrií člověka

16 569 pb, 37 genů

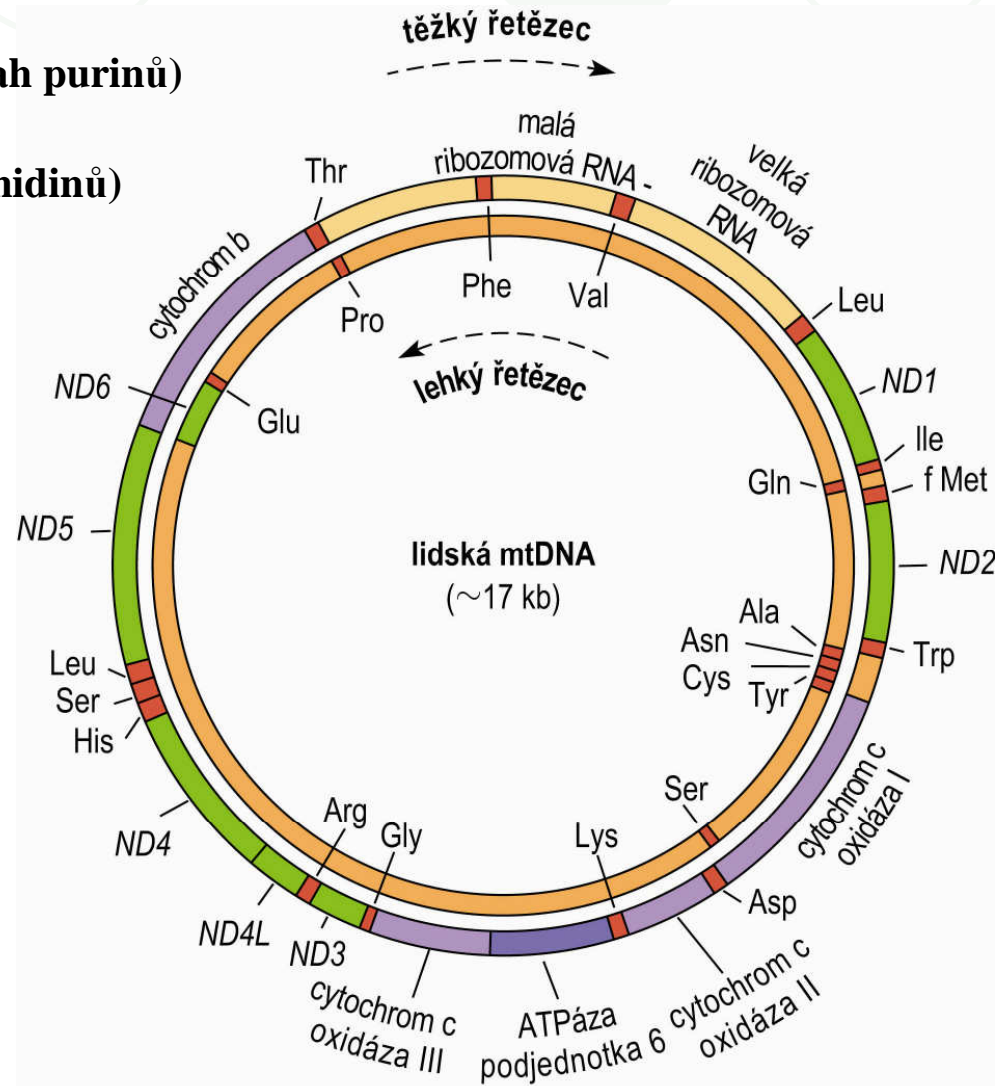


Funkce mitochondrií: tvorba ATP oxidací cukrů a mastných kyselin
mtDNA kóduje: rRNA (12S a 16S), 22 tRNA, cytochrom c-oxidázy, cytochrom b, ATP-syntetázu

Mapa lidského mitochondriálního genomu

těžký řetězec H (vyšší obsah purinů)

lehký řetězec L (vyšší obsah pyrimidinů)



Mitochondriová DNA různých skupin organismů

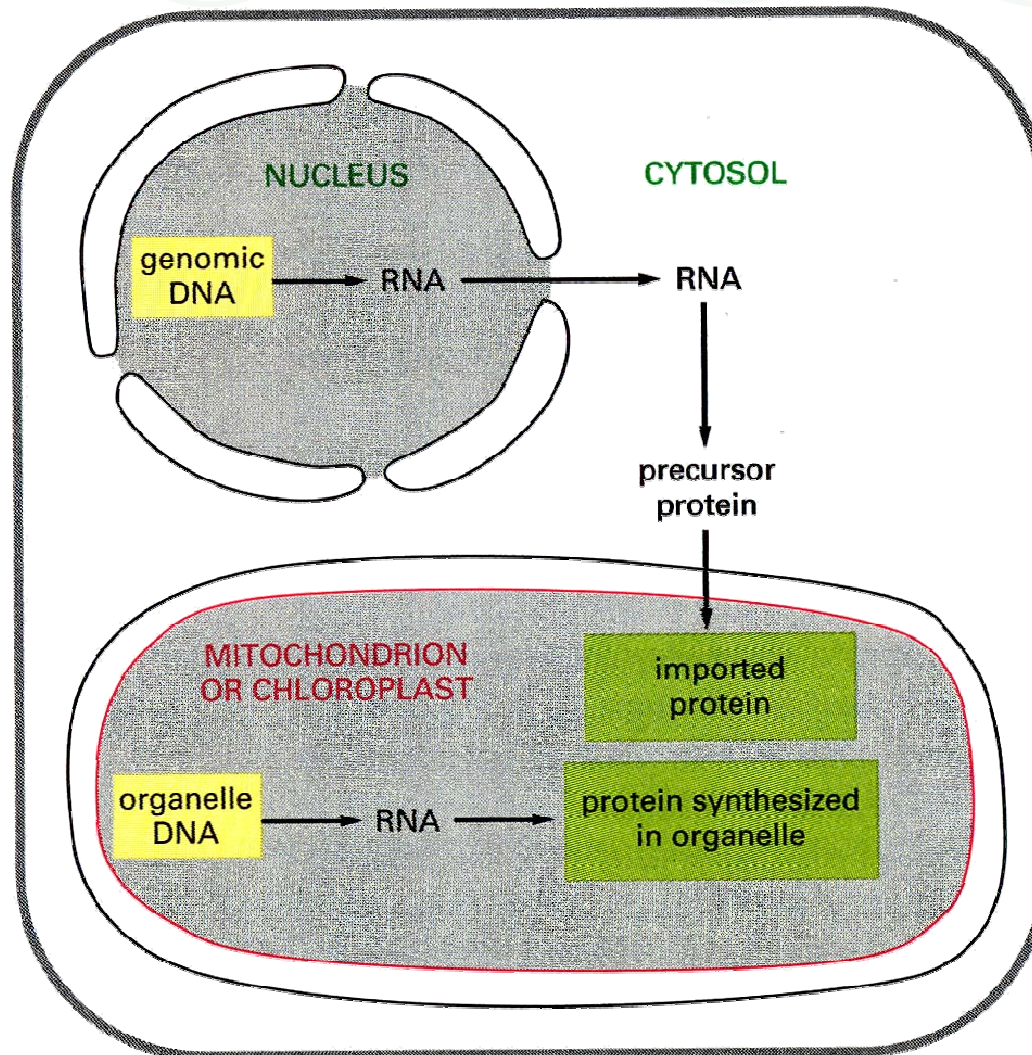
| Organizmy | Velikost v bp | Struktura | Charakteristika |
|---------------------------------------|--|--------------------------------|--|
| Buňky více-buněčných živočichů | 1,6 až 2,0 x 10 ⁴ | kružnicová | každý živočišný druh má svůj vlastní typ mtDNA |
| Buňky vyšších rostlin | 2,5 x 10 ⁵ až 2,0 x 10 ⁶ | kružnicová nebo lineární | pozoruhodná variabilita ve velikosti, struktuře a genetické organizaci nejen mezi druhy, ale také u stejného organismu, a tedy i ve stejné buňce |
| Prvoci | 3,0 x 10 ⁴ až 6,0 x 10 ⁴ | kružnicová nebo lineární | rozdíly mezi druhy |
| Kvasinky | 2,0 x 10 ⁴ až 1,0 x 10 ⁵ | kružnicová | jednotná uvnitř stejného druhu, ale rozdíly mezi druhy |

- ◆ Velmi charakteristické pro mtDNA vyšších rostlin jsou úseky, které se podobají DNA chloroplastů.

Specifické rysy mitochondriového genomu

1. Geny jsou uspořádány velmi hustě, téměř celá sekvence je tvořena strukturálními geny nebo se přepisuje do rRNA a tRNA
 2. K translaci je využíváno jen 22 tRNA, které jsou schopny díky kolísavému párování bazí přečíst všechny kodony
 3. Genetický kód používaný v mitochondriích (některých organismů) se liší od standardního genetického kódu. 4 ze 64 kodonů mají jiný smysl (zřejmě v důsledku malého počtu proteinů kódovaných v mitochondriích byly tyto změny během evoluce tolerovány)
- pro zajištění fungování mitochondrií je vyžadováno 90 genů lokalizovaných v jaderném genomu
 - mitochondriové geny se dědí nemendelisticky (matroklinně, cytoplazmatická dědičnost) - studium lidských populací
 - podléhá rychleji mutacím (10-100x častěji než jaderný genom, reparační procesy omezené)

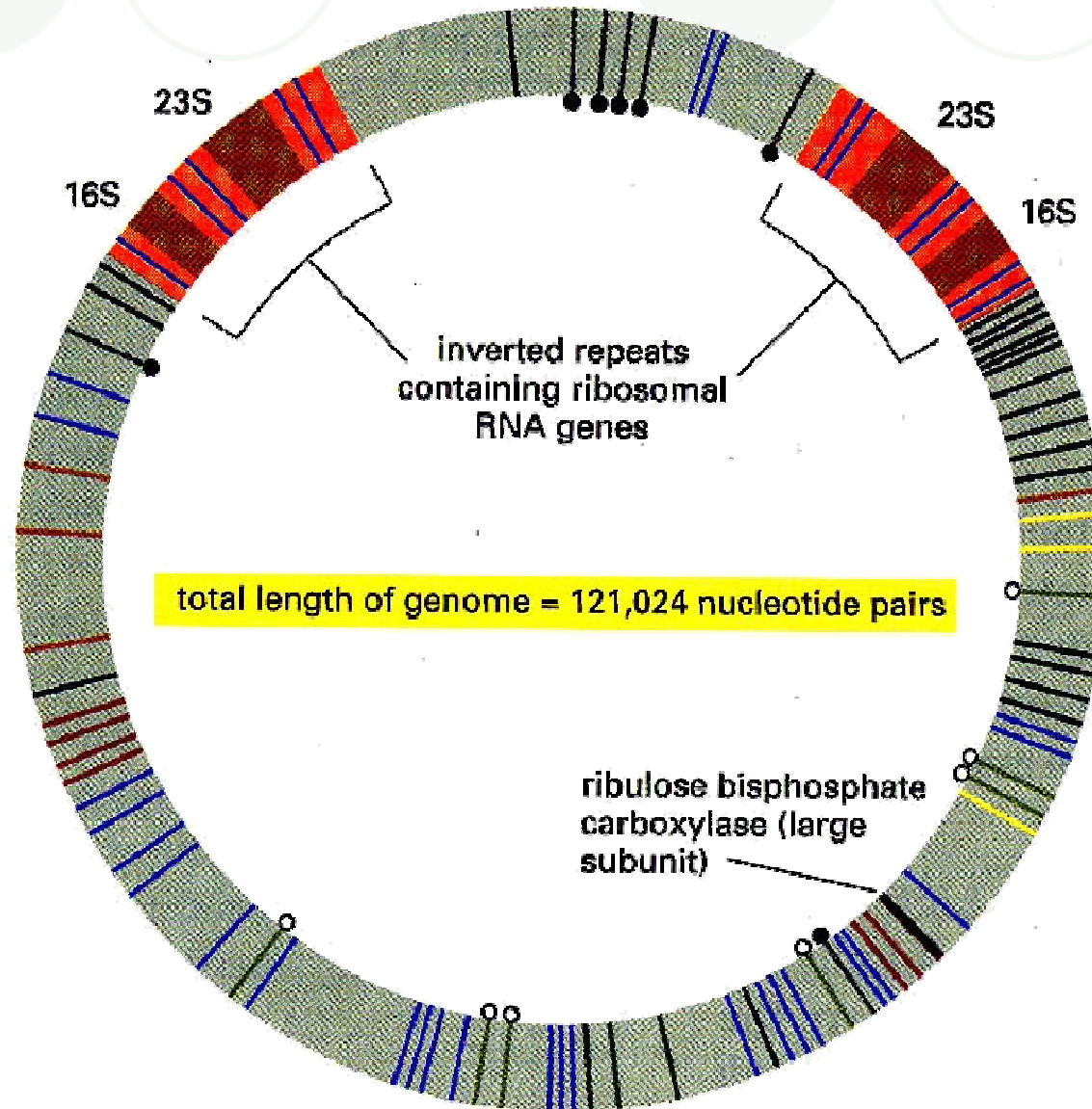
Většina proteinů v organelách je kódovaná jaderným genomem



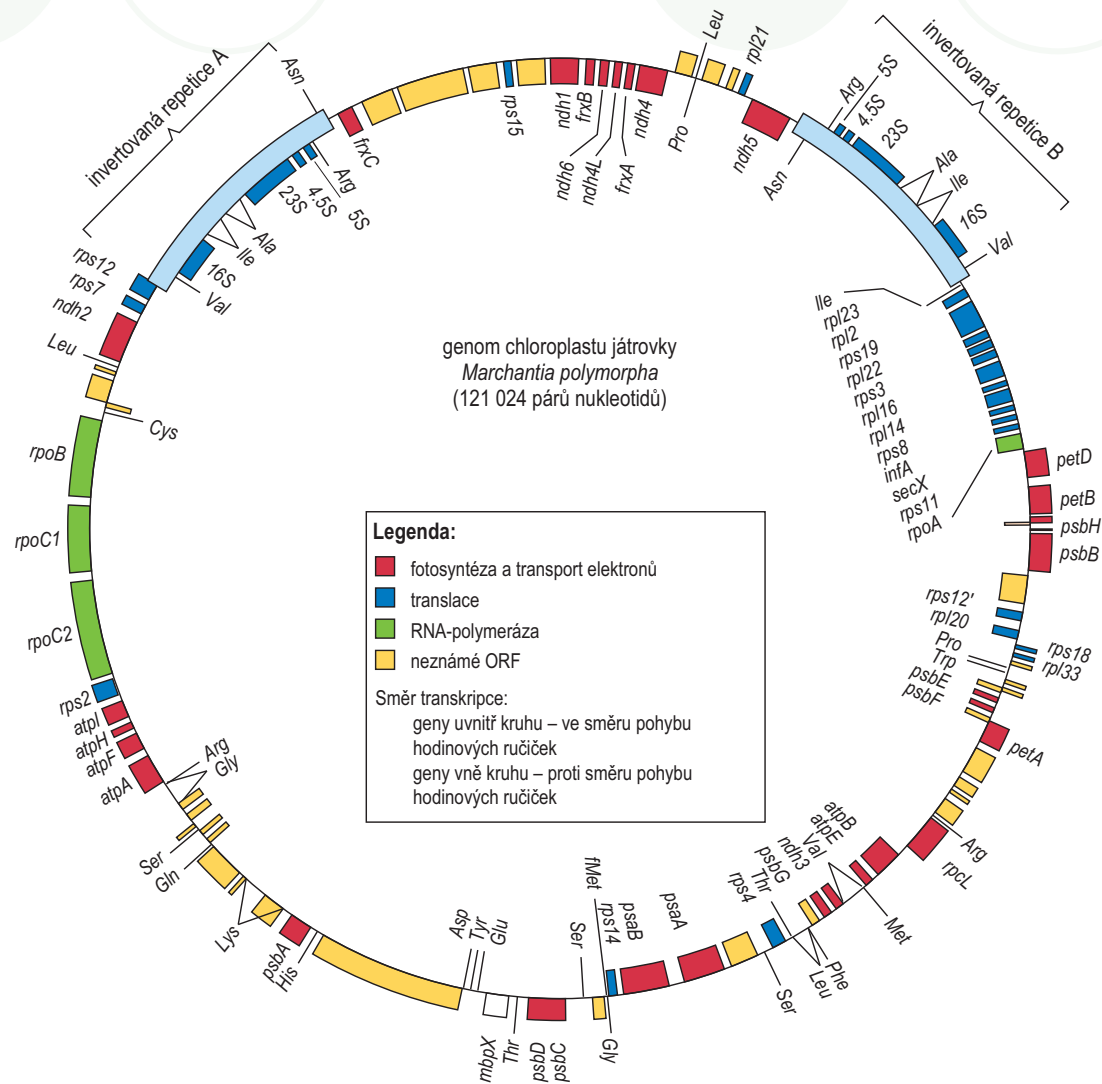
Kooperace jaderných genů s geny na mtDNA lidského genomu

| Funkční produkt | Podjednotky (protomery) funkčního produktu | |
|--|--|--|
| | určené geny lokalizovanými na mtDNA | určené geny lokalizovanými v jádře buňky |
| NADH-dehydrogenáza | 7 podjednotek | >41 podjednotek |
| Sukcinát CoQ-oxidoreduktáza | 0 podjednotek | 4 podjednotky |
| Komplex cytochromu b-c1 | 1 podjednotka | 10 podjednotek |
| Cytochrom c-oxidáza | 3 podjednotky | 10 podjednotek |
| H ⁺ -transportující ATP-syntáza | 2 podjednotky | 14 podjednotek |
| rRNA mitochondrií | 2 | 0 |
| tRNA mitochondrií | 22 | 0 |
| mRNA mitochondrií | 13 | 0 |
| DNA- a RNA-polymerázy | 0 | všechny |
| Ribozomové proteiny | 0 | ~70 |

Genom chloroplastů



Genetická organizace genomu chloroplastu



Geny chloroplastů *Nicotiana tabacum*

| Funkce | Počet genů |
|---|------------|
| Transkripce | |
| RNA-polymeráza | 4 |
| Translace | |
| rRNA | 4 |
| tRNA | 30 |
| Ribozomové proteiny | 21 |
| Fotosyntéza | |
| Fixace CO ₂ | 1 |
| Fotosystém I | 5 |
| Fotosystém II | 14 |
| Cytochromový komplex b/f | 5 |
| H ⁺ transportující ATP-syntáza | 6 |
| Jiné funkce | |
| NAD(P)H-dehydrogenázový komplex | 11 |
| Clp-proteáza | 1 |
| Acetyl-KoA-karboxyláza (EC 6.4.1.2) | 1 |
| Membrána plastidu | 1 |
| Maturázy (str. 394) | 1 |
| Otevřené čtecí rámce kódující více než 29 aminokyseliny | 30 |

Geny chloroplastů jsou podobné genům cyanobakterií

Původ mitochondrií a chloroplastů (**endosymbiotická teorie**)

- **MITOCHONDRIE**

- chemoorganotrofní prokaryotické buňky s aerobní respirací (protomitochondrie)



améboidní anaerobní předchůdci eukaryotických buněk

- **CHLOROPLASTY**

- fotolitotrofní prokaryotické buňky (fotosyntetizující protochloroplasty)

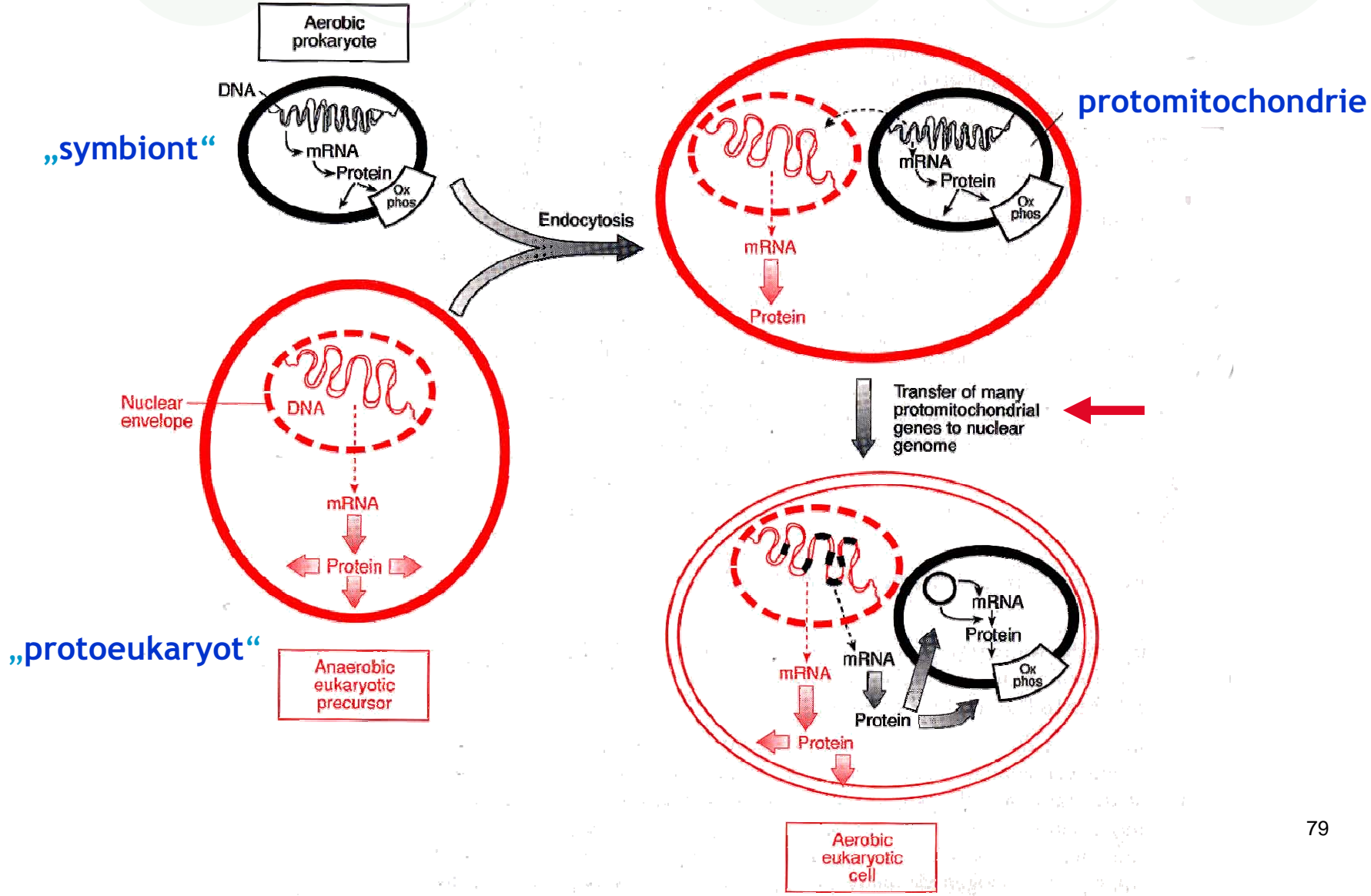


améboidní předchůdci eukaryotických buněk

- **Nepřímé důkazy:**

- přehrádečné dělení mitochondrií
- konformace DNA (kružnicová forma)
- translační aparát podobný prokaryotům
 - podobnost sedimentačních koeficientů ribozomů
 - podobnost sekvencí mt-rRNA s rRNA bakterie *E. coli*

Původ mitochondrií

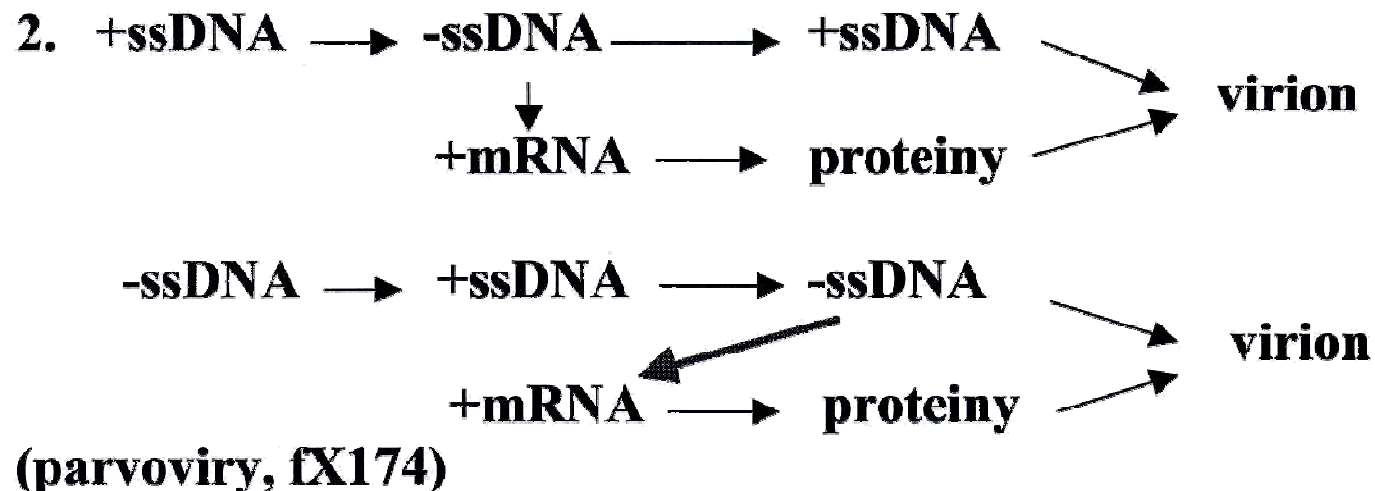
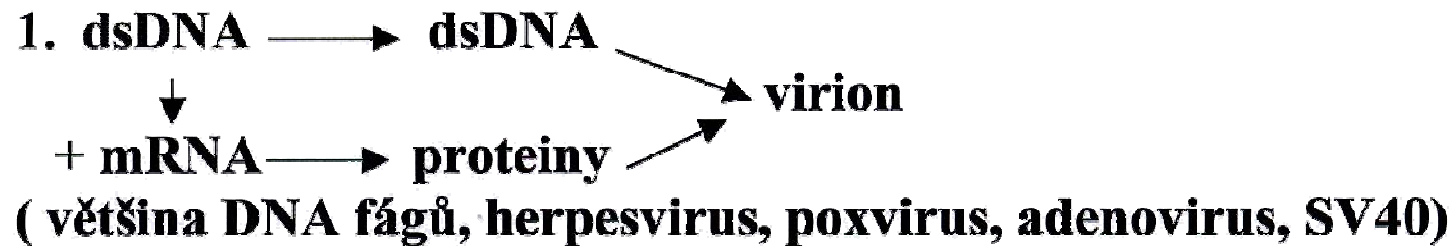


Genom virů

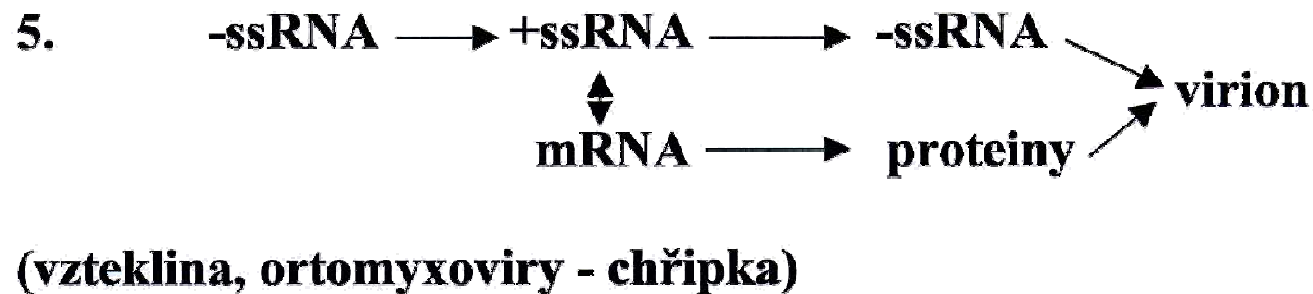
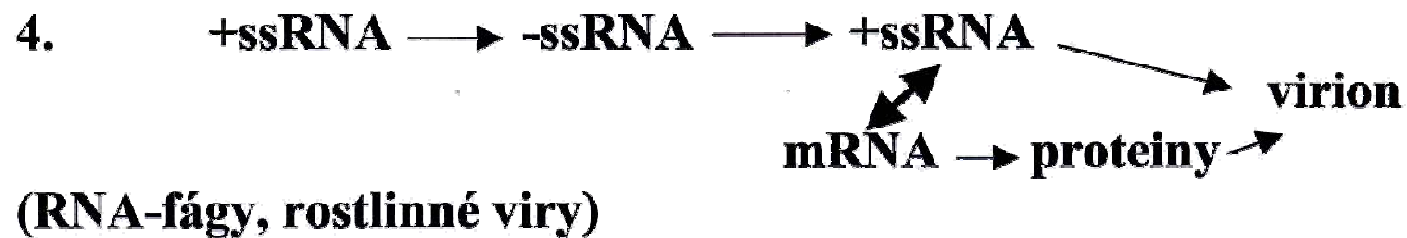
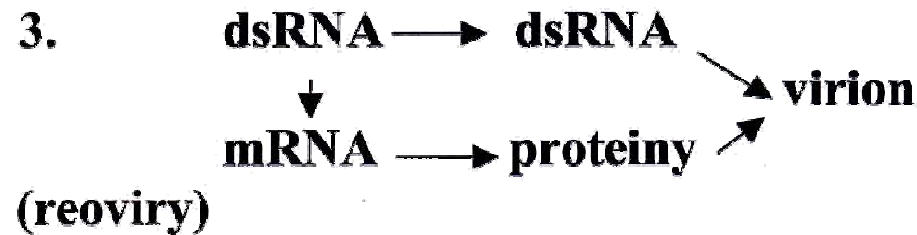
- Viry
 - Prokaryotické (bakteriofágy)
 - DNA
 - RNA
 - Eukaryotické
 - živočišné DNA/RNA
 - rostlinné DNA/RNA
 - houbové DNA/RNA
- **Typy genomové NK**
 - **ssDNA - lineární nebo kužnicová**
 - **dsDNA - lineární nebo kružnicová**
 - **ssRNA - lineární**
 - **dsRNA - lineární**

Segmentovaný genom

Rozdělení virů podle typu genomu



Rozdělení virů podle typu genomu



Retroviry (HIV)

