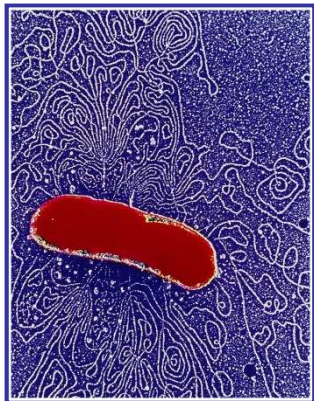


Přednáška kurzu Bi4010, Základy molekulární biologie, 2018/2019

# Genetická informace a struktura nukleových kyselin

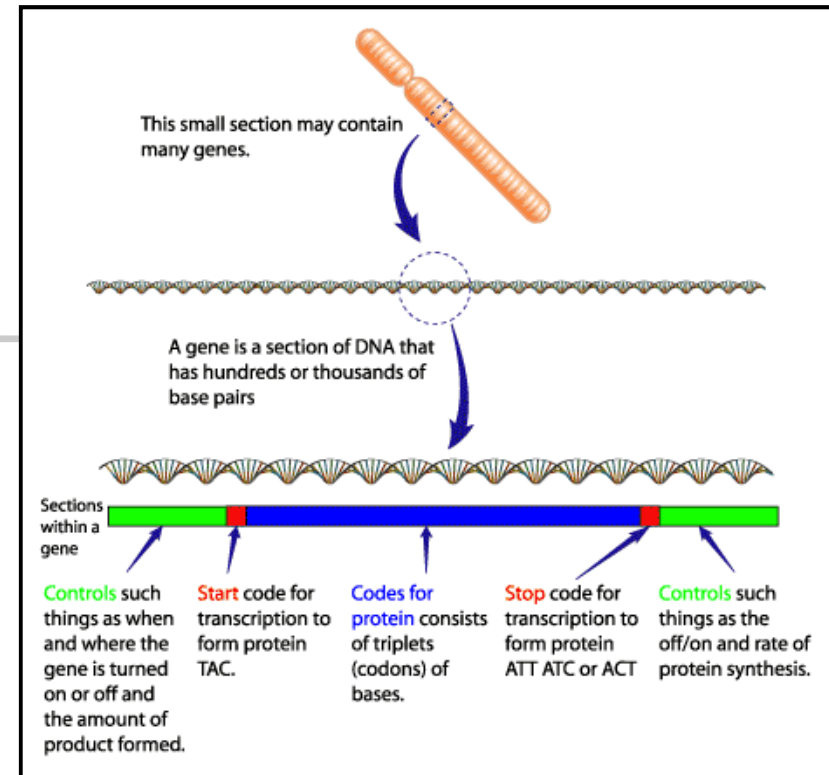


Jan Šmarda

Ústav experimentální biologie PŘF MU

# DNA a geny

- DNA obsahuje genetickou informaci a tak tvoří hmotnou podstatu genů



- gen je nukleotidová sekvence, která je nezbytná pro syntézu funkčního genového produktu (polypeptidu nebo RNA) – nejde jen o kódující sekvenci, zahrnuje i promotory, sestřihová místa, apod.

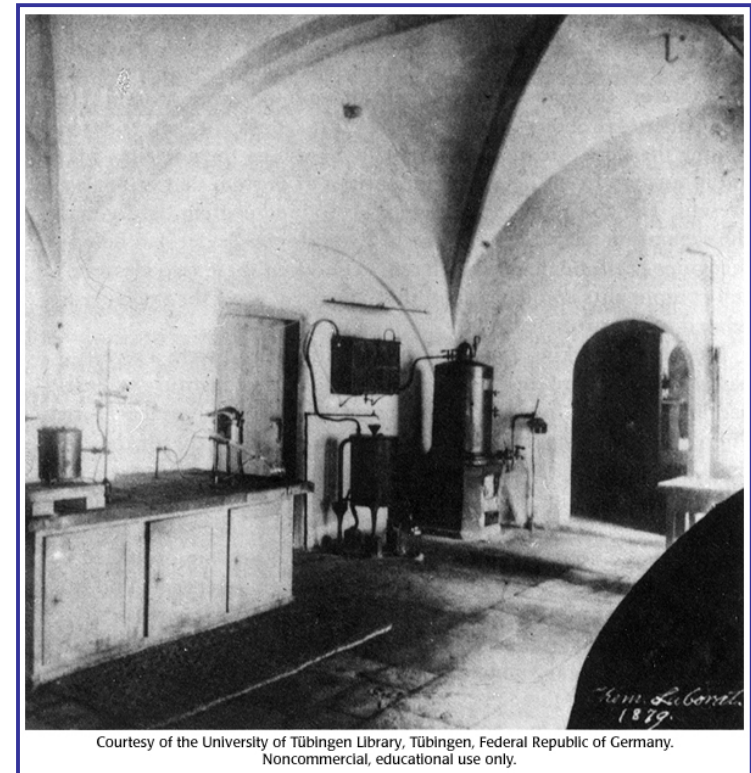
# r. 1868: objev nukleinu



## Johan Friedrich Miescher (1844-1895)

švýcarský přírodovědec a lékař

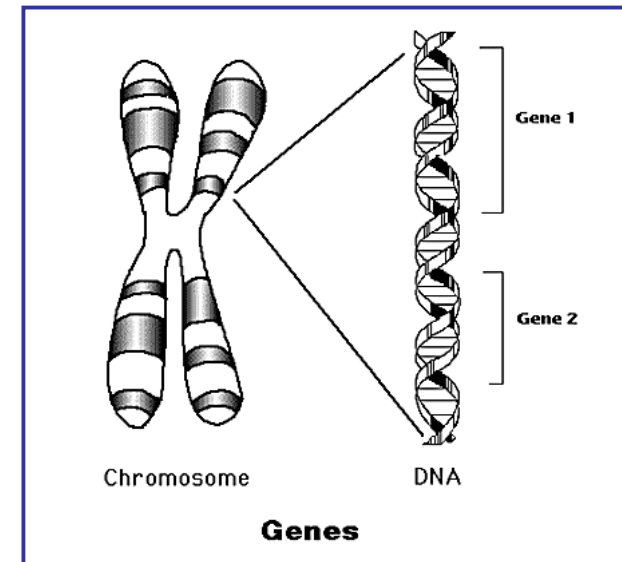
- biochemický přístup: narušuje strukturu buněk a snaží se popsat uvolněné složky
- izoluje leukocyty z hnisu (na obvazech), jaderné proteiny rozkládá pepsinem (proteolytickým enzymem izolovaným ze žaludku prasat)
- v r. 1869 získává kyselou hmotu bohatou na dusík a fosfor, kterou nazval **nuklein**
- jeho výsledky nejsou přijaty k publikaci až do roku 1871
- funkce nukleinu zůstává dlouho nejasná (polynukleotidové řetězce a jejich schopnost uchovávat genetickou informaci jsou objeveny až ve 40. letech 20. stol.)

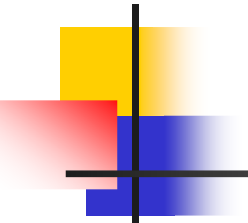


Courtesy of the University of Tübingen Library, Tübingen, Federal Republic of Germany.  
Noncommercial, educational use only.

# Chromozomy a geny

- **geny jsou umístěny na chromozomech**
- chromozomy jsou tvořeny nukleovou kyselinou (DNA) a proteiny
- ve 40. a 50 . letech 20. stol. bylo jednoznačně prokázáno, že genetická informace je uložena v nukleových kyselinách a ne proteinech





# Jaká molekula nese genetickou informaci?

---

Odpověď se hledala obtížně:

- byl znám jen vertikální přenos genů z rodičů na potomstvo (Mendel, Morgan), kdy geny neopouštějí buňky a tím jsou nepřístupné chemické analýze
- pomohl objev horizontálního přenosu genů - *transformace*
- transformace je běžná u bakterií (nikoliv u savců)

# Objev transformace



Frederick Griffith  
(1879-1941)

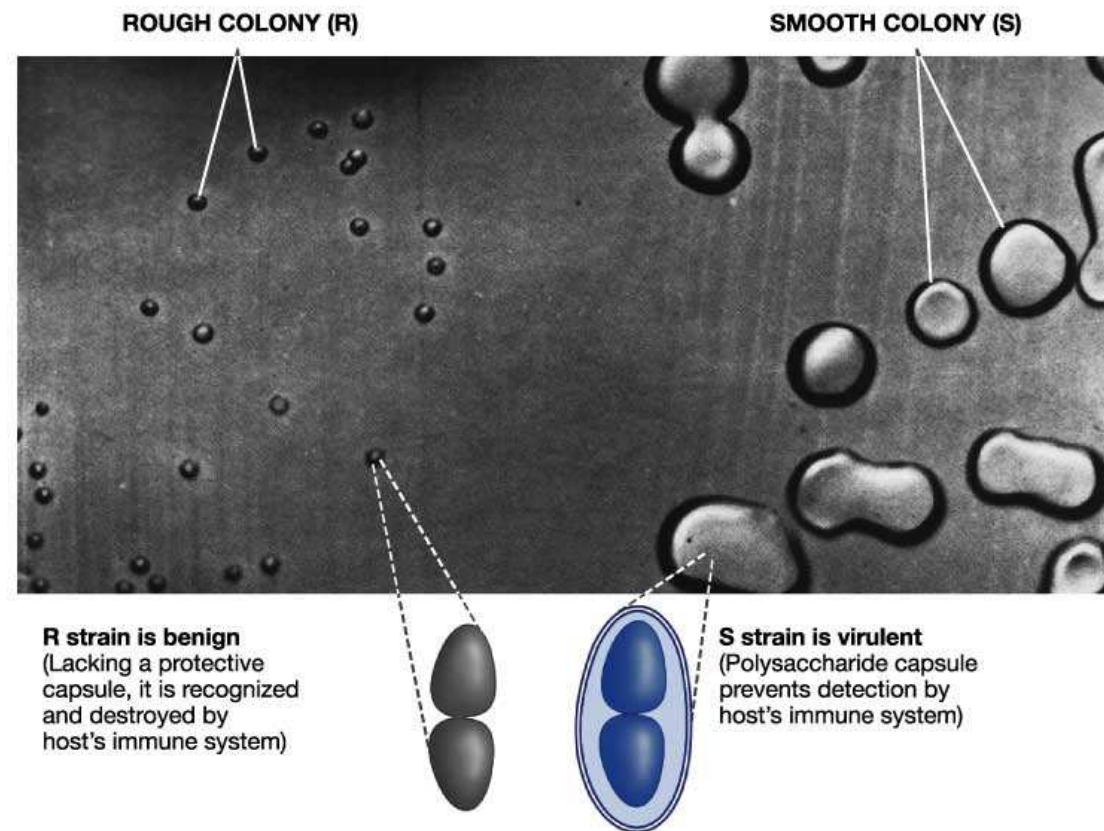
- Frederick Griffith (anglický bakteriolog)
- ve 20. letech 20. století zkoumá bakterii *Streptococcus pneumoniae* (pneumokok)
- návaznost na obrovskou epidemii španělské chřipky v r. 1918, často doprovázenou zápalom plic vyvolaným touto bakterií
- Ministerstvo zdravotnictví požaduje výzkum pneumokoka a vytvoření vakcíny

# Objev transformace

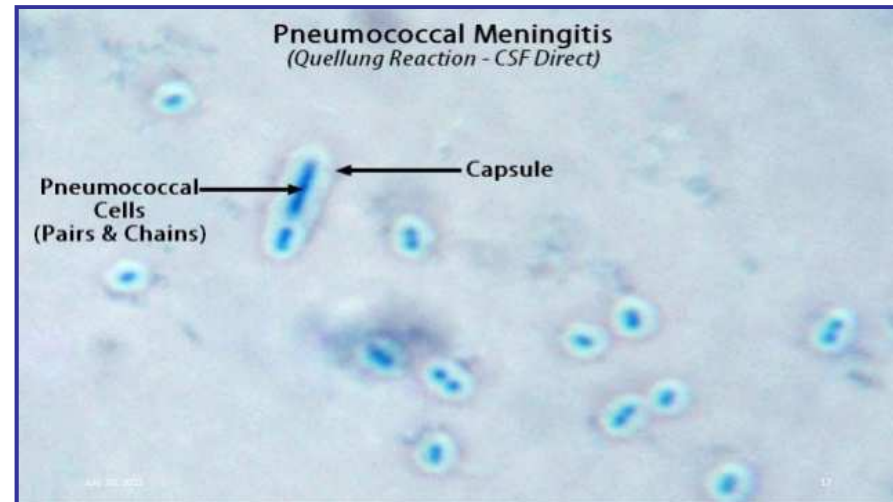
Frederick Griffith (1928):

- existují 2 příbuzné kmeny *Streptococcus pneumoniae*, které se liší morfologicky a stupněm patogenicity
- **kmen R** tvoří drsné kolonie a není letální
- **kmen S** tvoří hladké kolonie, po injekci usmrcuje pokusné myši

There are two strains of *Streptococcus pneumoniae*.



# Objev transformace



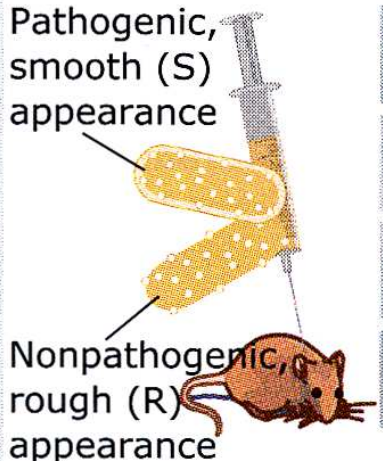




*Streptococcus pneumoniae*:

- **Kmen S:** buňky obklopeny cukerným pláštěm, který usnadňuje únik imunitnímu systému, proto vysoká virulence
- **Kmen R:** buňky postrádají cukerný plášť, jsou méně nebezpečné



# Griffithův experiment

- virulentní hladké bakterie injikuje myším: smrt
- virulentní hladké bakterie zabije teplem a pak provede injekci: přežívají
- injekce směsí zabitých virulentních bakterií s živými nevirulentními: smrt!
- pitva usmrcených myší: obsahují buňky virulentních bakterií S
- neškodné bakterie R se nějak „transformovaly“ na virulentní S

Pneumococcus types	Injection of cells	Result
Pathogenic, smooth (S) appearance 	Living S	Dies 
	Heat-killed S	Lives 
	Living R	Lives 
	Heat-killed S Living R	Dies 

# Závěr Griffithova experimentu

- existuje chemická látka schopná přenášet dědičné instrukce mezi organismy – „genová molekula“
- zdrženlivý Griffith otál s publikací tohoto revolučního závěru
- až v lednu 1928 na nátlak přátel svůj experiment publikuje v neznámém časopise *Journal of Hygiene*
- článek psán v omluvném stylu za otřes, který genetiky způsobuje

VOLUME XXVII JANUARY, 1928 No. 2

## THE SIGNIFICANCE OF PNEUMOCOCCAL TYPES.

By FRED. GRIFFITH, M.B.

(A Medical Officer of the Ministry of Health.)

(From the Ministry's Pathological Laboratory.)

### CONTENTS.

	PAGE
I. OBSERVATIONS ON CLINICAL MATERIAL . . . . .	113
Types in Lobar Pneumonia . . . . .	114
Variety of Types in Sputum from the same Case . . . . .	114
A Rough Virulent Strain . . . . .	117
A Strain agglutinating specifically with two different Group IV Sera . . . . .	110
II. EXPERIMENTAL MODIFICATION . . . . .	120
Attenuation in Culture . . . . .	120
(1) Growth in Immune Serum . . . . .	120
(2) Growth on Solid Media . . . . .	121
(3) Differences between Individual R and S colonies . . . . .	122
Reversion from Rough to Smooth . . . . .	125
A. Origin of the R Strains used . . . . .	125
B. Passage of R II Strains . . . . .	126
C. Massive Dosage with R II . . . . .	129
Inoculation of living R and killed S cultures . . . . .	129
Preliminary Experiments . . . . .	129
Group IV S culture + R I and II . . . . .	132
Type I S culture + R II and I . . . . .	134
Type III S culture + R I and II . . . . .	141
Type II S culture + R I . . . . .	144
Types I and II S cultures + R Group IV . . . . .	146
Inoculation of living and dead R cultures . . . . .	147
III. DISCUSSION . . . . .	148
IV. SUMMARY . . . . .	157

### I. OBSERVATIONS ON CLINICAL MATERIAL.

SINCE communicating my report<sup>1</sup> on the distribution of pneumococcal types in a series of 150 cases of lobar pneumonia occurring in the period from April, 1920 to January, 1922, I have not made any special investigation of this subject. In the course, however, of other inquiries and of the routine examination of sputum during the period from the end of January, 1922, to March, 1927, some further data have been accumulated<sup>2</sup>.

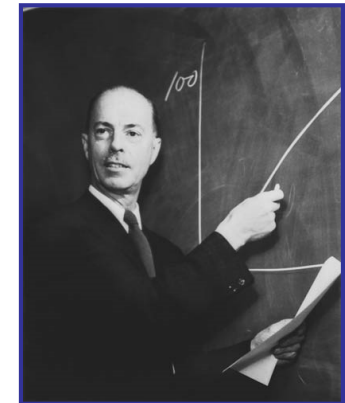
Table I gives the results in two series and, for comparison, those previously published.

<sup>1</sup> Reports on Public Health and Medical Subjects (1922), No. 13.

<sup>2</sup> I owe many thanks to Dr. J. Bell Ferguson, formerly Medical Officer of Health for Smethwick, for sending me many specimens from cases of lobar pneumonia.

# Nositelkou genetické informace je DNA

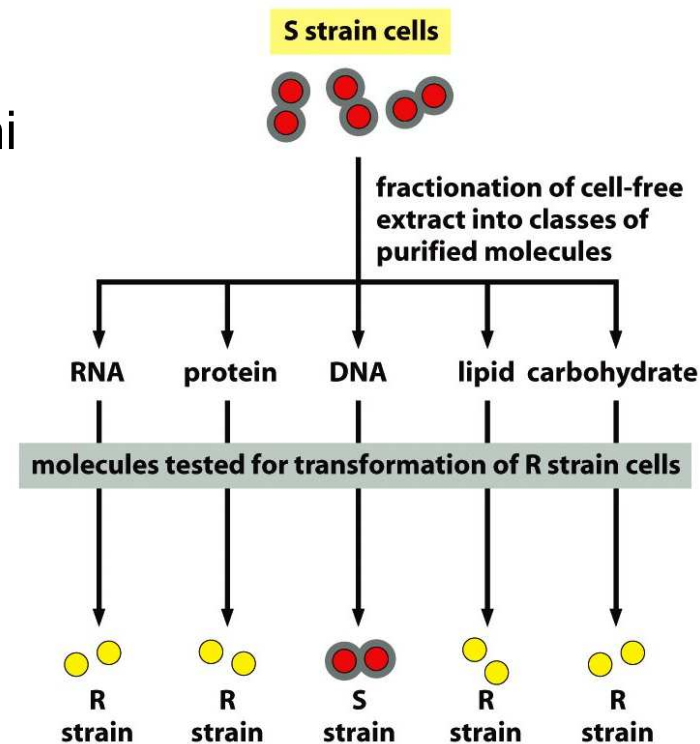
Oswald Avery  
Colin MacLeod  
Maclyn McCarty  
(40. léta 20. století)



- přímý důkaz: potvrzení Griffithova experimentu
- za transformaci bakterií *Streptococcus pneumoniae* zodpovídá DNA
- přidání purifikované **DNA** k bakteriím mění jejich vlastnosti (tvar kolonií, schopnost vyvolat onemocnění, apod.)
- získané vlastnosti se přenášejí do následných generací

# Averyho pokus

- založen na transformaci bakterií R různými frakcemi inaktivovaných bakterií S
- transformaci vyvolává pouze DNA



**CONCLUSION:** The molecule that carries the heritable information is DNA.

STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE  
INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES

INDUCTION OF TRANSFORMATION BY A DESOXYRIBONUCLEIC ACID FRACTION  
ISOLATED FROM PNEUMOCOCCUS TYPE III

By OSWALD T. AVERY, M.D., COLIN M. MACLEOD, M.D., AND  
MACLYN McCARTY,\* M.D.

*(From the Hospital of The Rockefeller Institute for Medical Research)*

PLATE 1

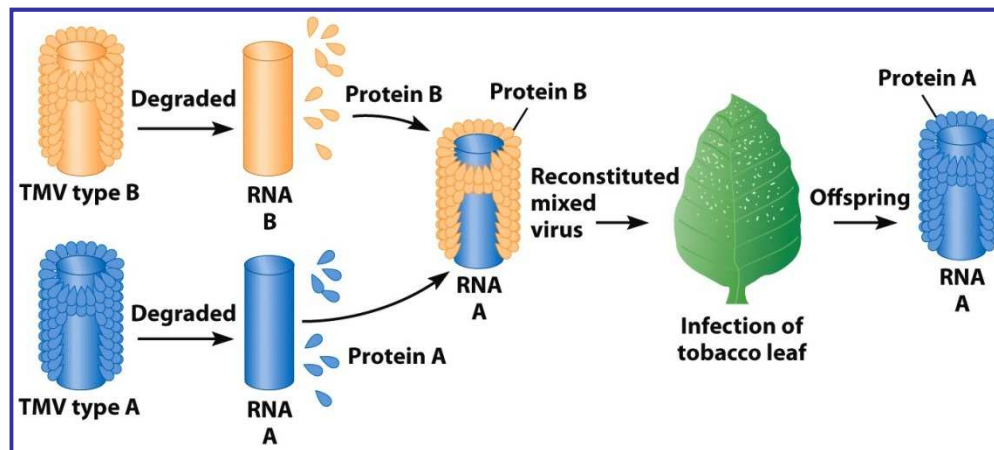
(Received for publication, November 1, 1943)

# Genetickým materiálem viru tabákové mozaiky (TMV) je RNA

některé viry obsahují proteiny a RNA, ale žádnou DNA

důkaz kódující funkce RNA:

- oddělení RNA a proteinů u dvou kmenů TMV (A a B, lišících se chemickým složením proteinových obalů)
- vytvoření virových částic smísením RNA (A) s proteinem (B)
- vznikl životaschopný virus, jehož potomstvo mělo fenotyp A
- po smísení RNA (B) s proteinem (A) vznikl virus s fenotypem B
- závěr: potomstvo virů je genotypově a fenotypově shodné s rodičovským virem, ze kterého pochází RNA

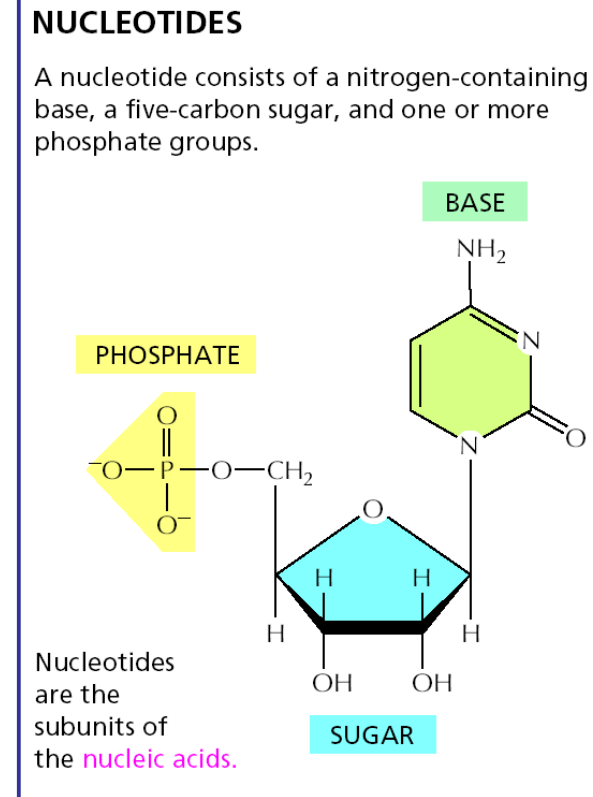


# Struktura nukleových kyselin

- lineární polymery složené z podjednotek - nukleotidů

Nukleotidy mají 3 složky:

- pětiuhlíkový cukr
- dusíkovou bázi
- zbytek kyseliny fosforečné



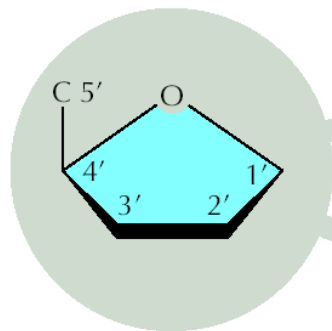
# Cukerné složky nukleotidů

- **ribóza** u ribonukleových kyselin
- **deoxyribóza** u deoxyribonukleové kyseliny
- odlišnost je v přítomnosti/nepřítomnosti hydroxylové skupiny na 2'-uhlíku

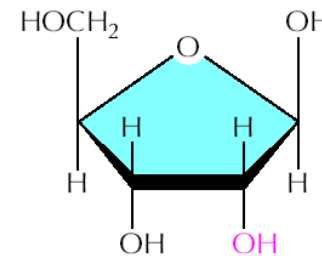
## SUGARS

### PENTOSE

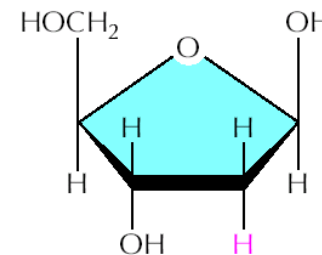
a five-carbon sugar



two kinds are used



$\beta$ -D-ribose  
used in ribonucleic acid

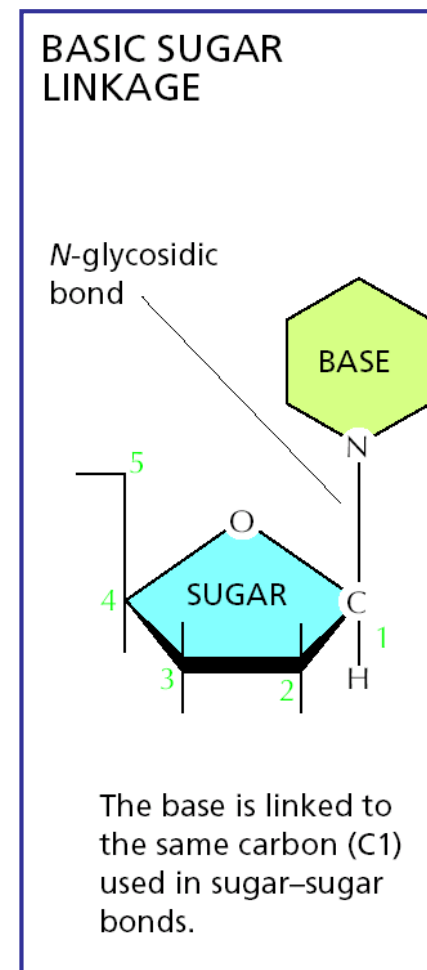


$\beta$ -D-2-deoxyribose  
used in deoxyribonucleic acid

Each numbered carbon on the sugar of a nucleotide is followed by a prime mark; therefore, one speaks of the "5-prime carbon," etc.

# Dusíkaté báze nukleotidů

- připojují se na uhlík 1 cukru kovalentní **N-glykozidickou** vazbou

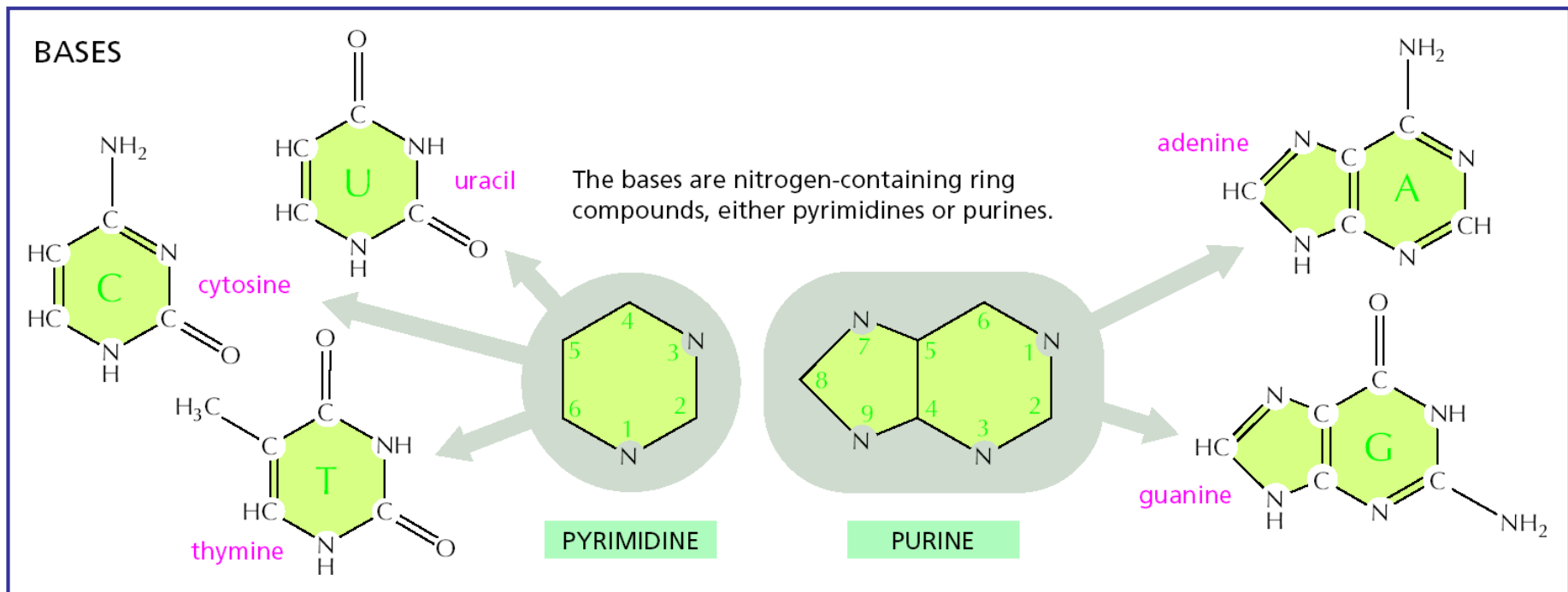




# Dusíkaté báze nukleotidů

dva typy:

- **pyrimidinové** (cytozin, tymin, uracil)
- **purinové** (adenin, guanin)

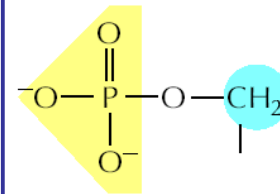


# Součástí nukleotidů je zbytek kyseliny fosforečné

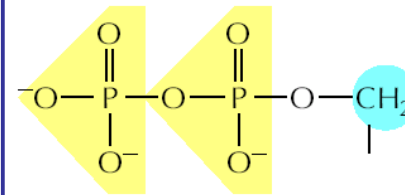
- připojen k uhlíku 5 cukru esterovou vazbou
- poskytuje nukleotidu negativní náboj

## PHOSPHATES

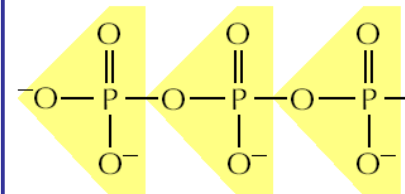
The phosphates are normally joined to the C5 hydroxyl of the ribose or deoxyribose sugar (designated 5'). Mono-, di-, and triphosphates are common.



as in  
AMP



as in  
ADP



as in  
ATP

The phosphate makes a nucleotide negatively charged.

# Nukleosid není totéž co nukleotid

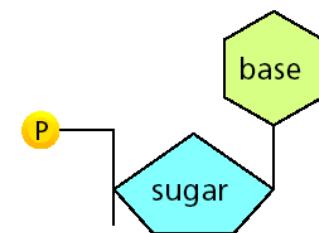
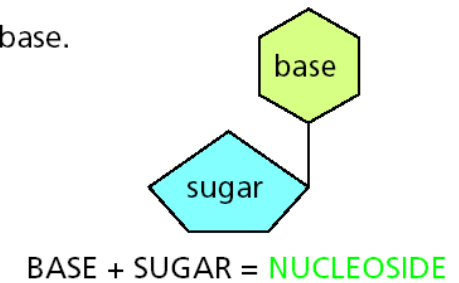
## NOMENCLATURE

A nucleoside or nucleotide is named according to its nitrogenous base.

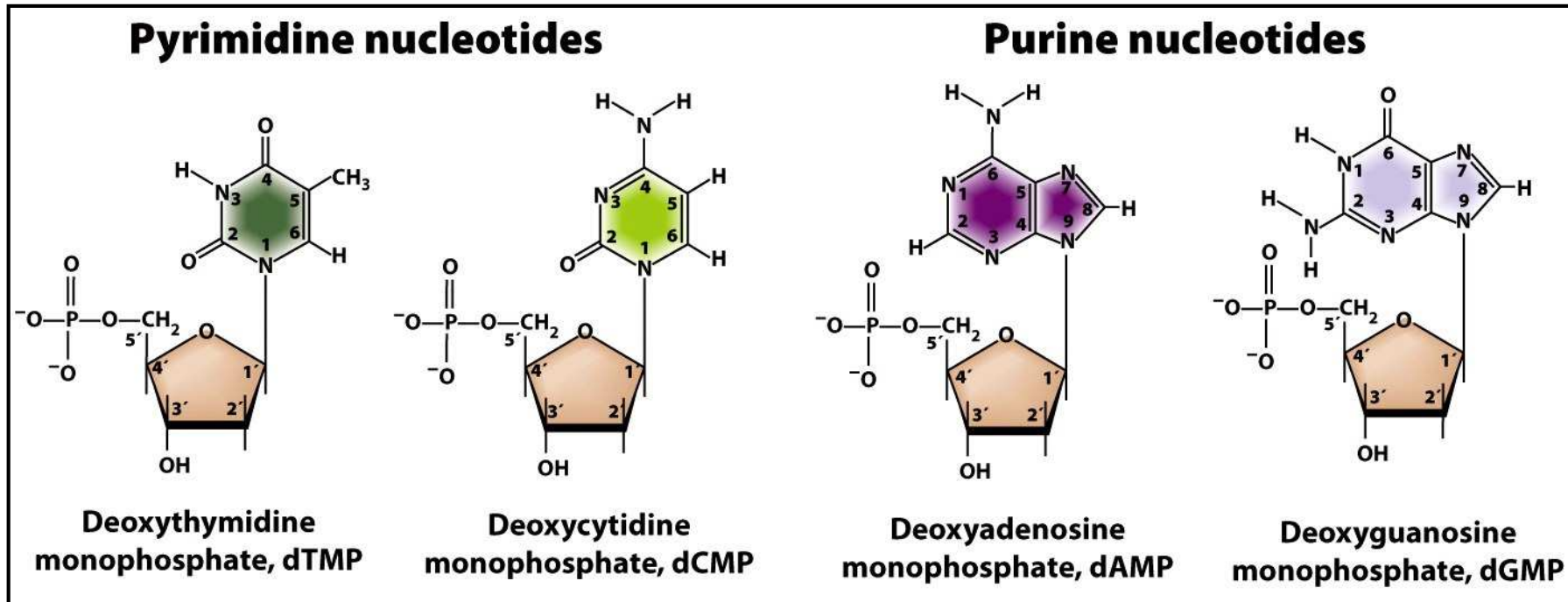
BASE	NUCLEOSIDE	ABBR.
adenine	adenosine	A
guanine	guanosine	G
cytosine	cytidine	C
uracil	uridine	U
thymine	thymidine	T

Single letter abbreviations are used variously as shorthand for (1) the base alone, (2) the nucleoside, or (3) the whole nucleotide—the context will usually make clear which of the three entities is meant. When the context is not sufficient, we will add the terms “base”, “nucleoside”, “nucleotide”, or—as in the examples below—use the full 3-letter nucleotide code.

AMP = adenosine monophosphate  
 dAMP = deoxyadenosine monophosphate  
 UDP = uridine diphosphate  
 ATP = adenosine triphosphate



# Deoxyribonukleotidy

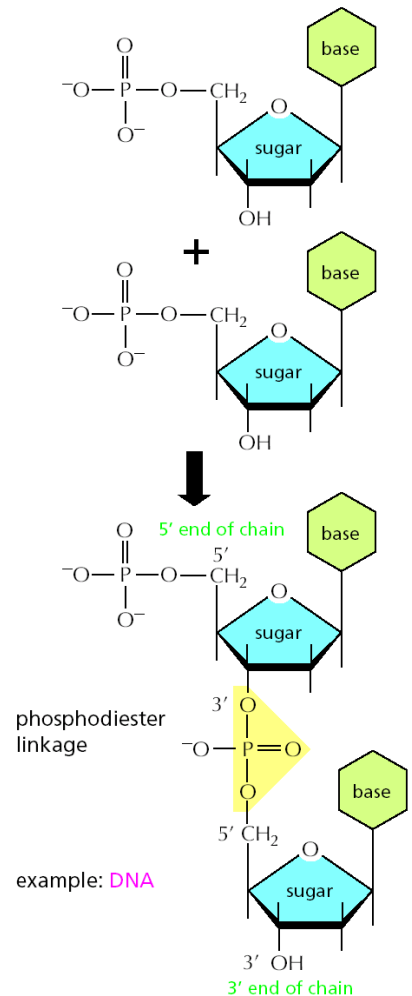


# Polymery nukleotidů tvoří nukleové kyseliny

- zbytek kyseliny fosforečné spojuje sousední cukry nukleotidů kovalentními **fosfodiesterovými vazbami** mezi uhlíky 5' a 3' cukerných jednotek
- pravidelné střídání motivu cukr-fosfát-cukr-fosfát... tvoří **cukr-fosfátovou kostru** řetězců nukleových kyselin
- **řetězce mají chemickou polaritu**: 1 konec obsahuje fosfát (5'-konec), druhý obsahuje hydroxylovou skupinu (3'-konec)

## NUCLEIC ACIDS

Nucleotides are joined together by a **phosphodiester linkage** between 5' and 3' carbon atoms to form nucleic acids. The linear sequence of nucleotides in a nucleic acid chain is commonly abbreviated by a one-letter code, A—G—C—T—T—A—C—A, with the 5' end of the chain at the left.



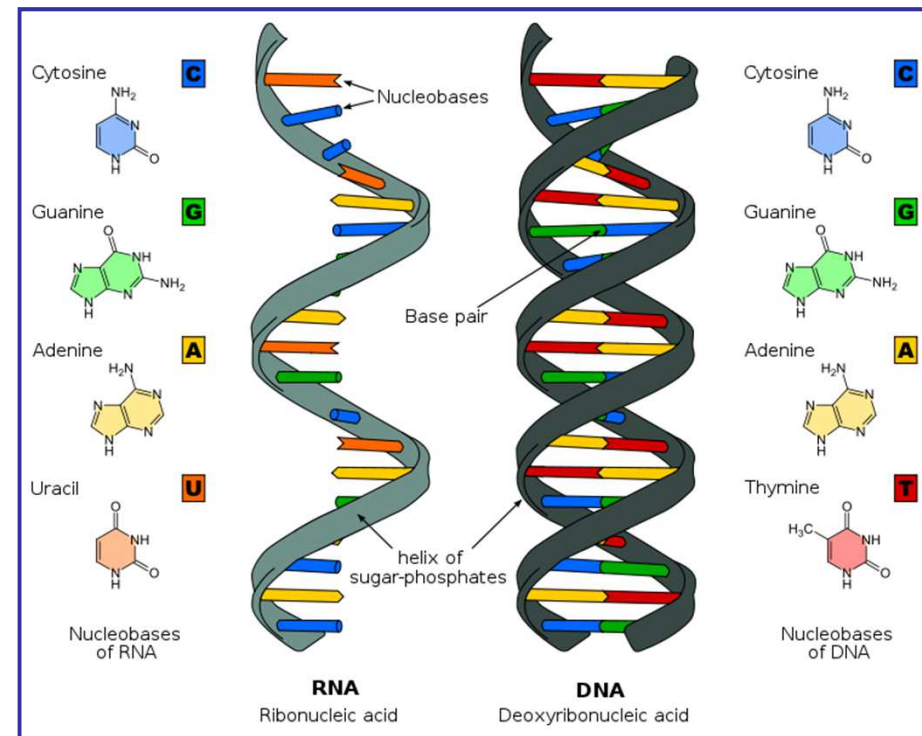
# Dvě varianty nukleových kyselin: DNA a RNA

## DNA

- obvykle dvouvláknová molekula
- vlákna spojena vodíkovými vazbami mezi dvojicemi bází adenin - tymin a guanin - cytozin

## RNA

- obvykle jednovláknová molekula
- místo tyminu uracil



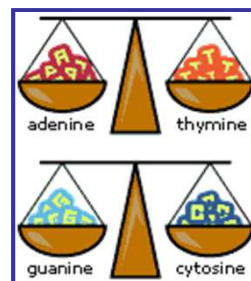
# Objev dvoušroubovice DNA

1953: James Watson a Francis Crick

odvozují strukturu DNA na základě těchto údajů:

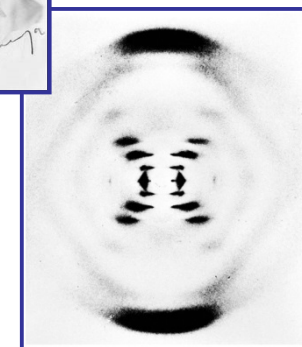
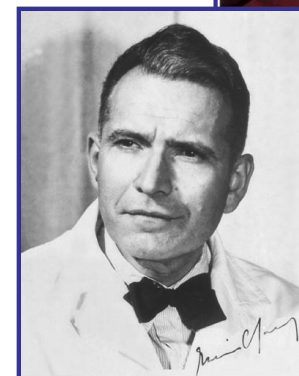
- chemická data: **Erwin Chargaff**

koncentrace thyminu je v organizmech stejná jako koncentrace adeninu a koncentrace cytozinu je vždy stejná jako koncentrace guaninu

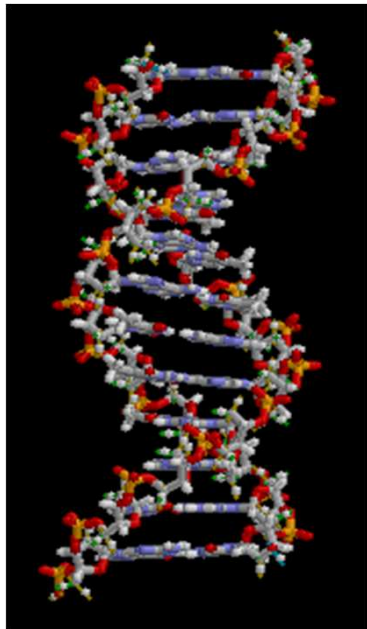
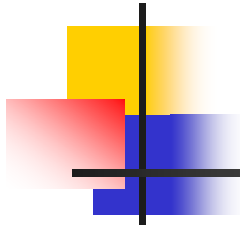


- fyzikální data: **Maurice Wilkins a Rosalind Franklinova**

po vystavení purifikovaných molekul DNA rentgenovému záření, dochází k charakteristickému rozptylu paprsků, které signalizují způsob uspořádání složek DNA do šroubovice



# Objev dvoušroubovice DNA



N A T U R E

No. 4356 April 25, 1953

**MOLECULAR STRUCTURE OF NUCLEIC ACIDS**

**A structure for Deoxyribose Nucleic Acid**

We wish to suggest a structure for the salt of deoxyribose nucleic acid (D.N.A.). This structure has novel features which are of considerable biological interest.

A structure for nucleic acid has already been proposed by Pauling and Corey<sup>1</sup>. They kindly made their manuscript available to us in advance of publication. Their model consists of three intertwined chains, with the phosphates near the fibre axis, and the bases on the outside. In our opinion, this structure is unsatisfactory for two reasons: (1) We believe that the material which gives the X-ray diagrams is the salt, not the free acid. Without the acidic hydrogen atoms it is not clear what forces would hold the structure together, especially as the negatively charged phosphates near the axis will repel each other. (2) Some of the van der Waals distances appear to be too small.

Another three-chain structure has also been suggested by Fraser (in the press). In his model the phosphates are on the outside and the bases on the inside, linked together by hydrogen bonds. This structure as described is rather ill-defined, and for this reason we shall not comment on it.



This figure is purely diagrammatic. The two ribbons symbolize the two phosphate-sugar chains, and the horizontal rods the pairs of bases holding the chains together. The vertical line marks the fibre axis.

We wish to put forward a radically different structure for the salt of deoxyribose nucleic acid. This structure has two helical chains each coiled round the same axis (see diagram). We have made the usual chemical assumptions, namely, that each chain consists of phosphate diester groups joining  $\beta$ -D-deoxyribofuranose residues with 3', 5' linkages. The two chains (but not their bases) are related by a dyad perpendicular to the fibre axis. Both chains follow right-handed helices, but owing to the dyad the sequences of the atoms in the two chains run in opposite directions. Each chain loosely resembles Furberg's<sup>2</sup> model No. 1; that is the bases are on the inside of the helix and the phosphates on the outside. The configuration of the sugar and the atoms near it is close to Furberg's 'standard configuration', the sugar being roughly perpendicular to the attached base.

There is a residue on each chain every 3.4 Å. in the z-direction. We have assumed an angle of 36° between adjacent residues in the same chain, so that the structure repeats after 10 residues on each chain, that is, after 34 Å. The distance of a phosphorus atom from the fibre axis is 10 Å. As the phosphates are on the outside, cations have easy access to them.

The structure is an open one, and its water content is rather high. At lower water contents we would expect the bases to tilt so that the structure could become more compact.

The novel feature of the structure is the manner in which the two chains are held together by the purine and pyrimidine bases. The planes of the bases are perpendicular to the fibre axis. They are joined together in pairs, a single base from one chain being hydrogen-bonded to a single base from the other chain, so that the two lie side by side with identical z-co-ordinates. One of the

pair must be a purine and the other a pyrimidine for bonding to occur. The hydrogen bonds are made as follows: purine position 1 to pyrimidine position 1; purine position 6 to pyrimidine position 6.

If it is assumed that the bases only occur in the structure in the most plausible tautomeric forms (that is, with the keto rather than the enol configurations) it is found that only specific pairs of bases can bond together. These pairs are: adenine (purine) with thymine (pyrimidine), and guanine (purine) with cytosine (pyrimidine).

In other words, if an adenine forms one member of a pair, on either chain, then on these assumptions the other member must be thymine; similarly for guanine and cytosine. The sequence of bases on a single chain does not appear to be restricted in any way. However, if only specific pairs of bases can be formed, it follows that if the sequence of bases on one chain is given, then the sequence on the other chain is automatically determined.

It has been found experimentally<sup>3-4</sup> that the ratio of the amounts of adenine to thymine, and the ratio of guanine to cytosine, are always very close to unity for deoxyribose nucleic acid.

It is probably impossible to build this structure with a ribose sugar in place of the deoxyribose, as the extra oxygen atom would make too close a van der Waals contact.

The previously published X-ray data<sup>5-6</sup> on deoxyribose nucleic acid are insufficient for a rigorous test of our structure. So far as we can tell, it is roughly compatible with the experimental data, but it must be regarded as unproved until it has been checked against more exact results. Some of these are given in the following communications. We were not aware of the details of the results presented there when we devised our structure, which rests mainly though not entirely on published experimental data and stereochemical arguments.

It has not escaped our notice that the specific pairing we have postulated immediately suggests a possible copying mechanism for the genetic material.

Full details of the structure, including the conditions assumed in building it, together with a set of co-ordinates for the atoms, will be published elsewhere.

We are much indebted to Dr. Jerry Donohue for constant advice and criticism, especially on inter-atomic distances. We have also been stimulated by a knowledge of the general nature of the unpublished experimental results and ideas of Dr. M. H. F. Wilkins, Dr. R. E. Franklin and their co-workers at King's College, London. One of us (J. D. W.) has been aided by a fellowship from the National Foundation for Infantile Paralysis.

J. D. Watson  
F. H. C. Crick

Medical Research Council Unit for the Study of the Molecular Structure of Biological Systems, Cavendish Laboratory, Cambridge, April 2.

<sup>1</sup>Pauling, L., and Corey, R. B., *Nature*, 171, 346 (1953); *Proc. U.S. Nat. Acad. Sci.*, 39, 84 (1953).

<sup>2</sup>Furberg, S., *Acta Chem. Scand.*, 6, 634 (1952).

<sup>3</sup>Chargaff, E., for references see Zamenhof, S., Brawerman, G., and Chargaff, E., *Biochim. et Biophys. Acta*, 9, 402 (1952).

<sup>4</sup>Wyatt, G. R., *J. Gen. Physiol.*, 36, 201 (1952).

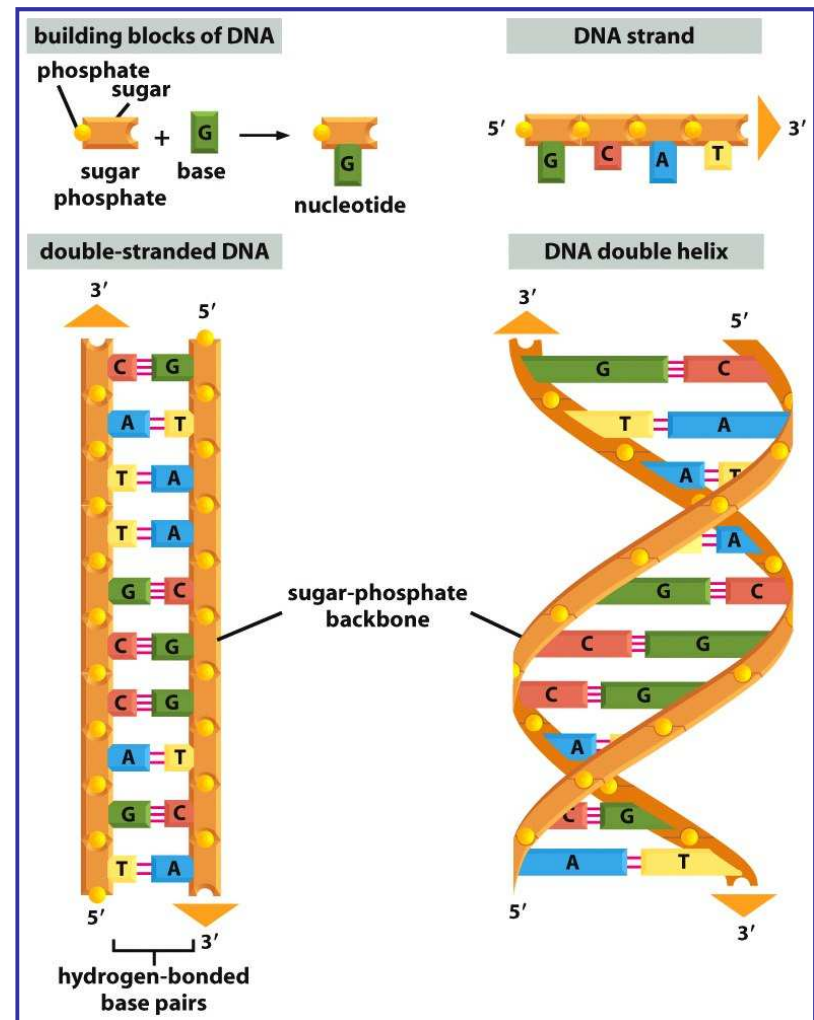
<sup>5</sup>Astbury, W. T., *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 1, Nucleic Acid, 66 (Camb. Univ. Press, 1947).

<sup>6</sup>Wilkins, M. H. F., and Randall, J. T., *Biochim. et Biophys. Acta*, 10, 192 (1953).



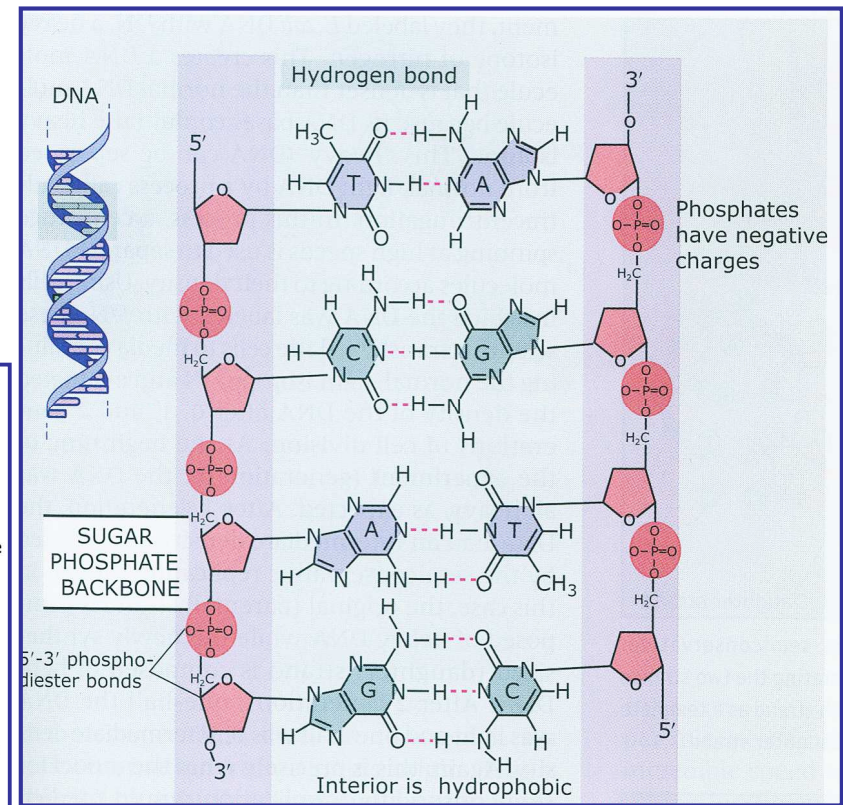
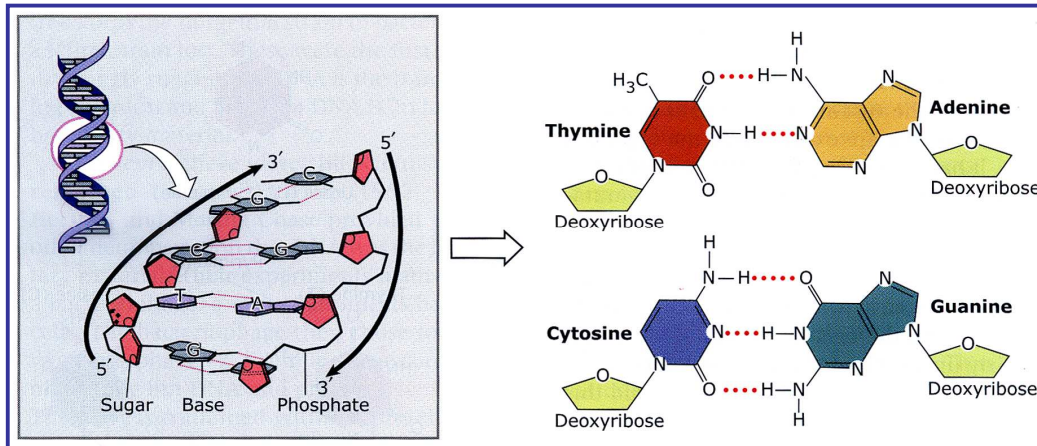
# Trojrozměrná struktura DNA

- za fyziologických podmínek pravotočivá dvoušroubovice (B-forma)
- protilehlé řetězce jsou vázány vodíkovými vazbami mezi bázemi
- báze orientovány dovnitř dvoušroubovice, cukr-fosfátová kostra je na její vnější straně
- větší purinová báze se páruje s menší pyrimidinovou
- šroubovici stabilizují vazby nad sebou umístěných aromatických kruhů



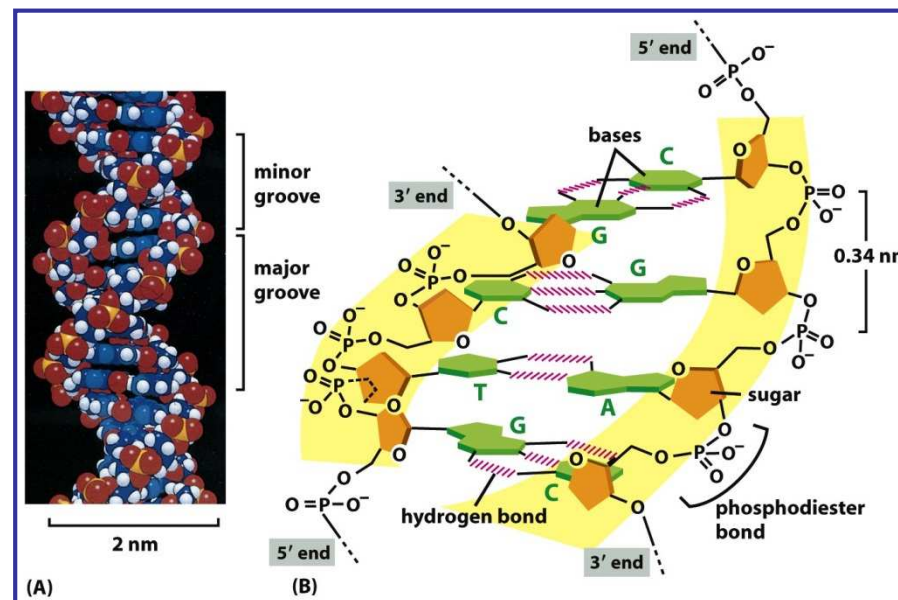
# Trojrozměrná struktura DNA

- adenin se spojuje s thyminem dvěma vodíkovými vazbami
- guanin s cytosinem třemi vodíkovými vazbami



# Trojrozměrná struktura DNA

- báze se uvnitř dvoušroubovice orientují do energeticky nejvýhodnějšího uspořádání
- jedna otáčka šroubovice připadá na 10 párů bází, průměr 1,9 nm
- vinutí vytváří v šroubovici velký a malý žlábek
- obě vlákna dvoušroubovice jsou antiparalelní a plně komplementární





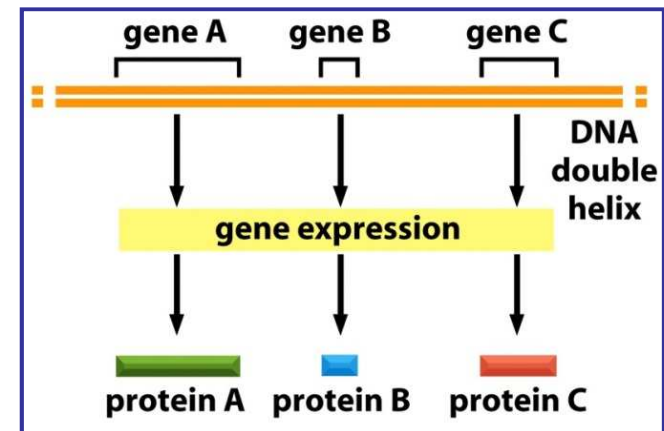
# Alternativní formy DNA

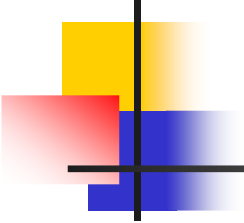
- B-DNA: ve vodných roztocích a běžných koncentracích solí
- A-DNA: rovněž pravotočivá, s 11 pb na otáčku, objevuje se u dehydratovaných vzorků
- Z-DNA: levotočivá, s 12 pb na otáčku, výskyt u dvojšroubovic bohatých na páry GC, funkce v živých systémech nejasná

Feature	B-DNA	A-DNA	Z-DNA
Type of helix	Right-handed	Right-handed	Left-handed
Helical diameter (nm)	2.37	2.55	1.84
Rise per base pair (nm)	0.34	0.29	0.37
Distance per complete turn (pitch) (nm)	3.4	3.2	4.5
Number of base pairs per complete turn	10	11	12
Topology of major groove	Wide, deep	Narrow, deep	Flat
Topology of minor groove	Narrow, shallow	Broad, shallow	Narrow, deep

# Uchování a exprese genetické informace v DNA

- pořadí nukleotidů v obou řetězcích představuje genetickou informaci, která se kopíruje před svým přenosem do dceřiné buňky
- **komplementarita** řetězců umožňuje odvození sekvence nukleotidů jednoho řetězce ze sekvence nukleotidů druhého řetězce – **základ dědičnosti genetické informace**
- odlišnost organismů vyplývá z odlišností v pořadí nukleotidů jejich DNA
- **lineární sekvence nukleotidů** v genech určuje lineární pořadí aminokyselin a trojrozměrnou strukturu proteinů
- **trojrozměrná struktura** proteinů zodpovídá za jejich funkci





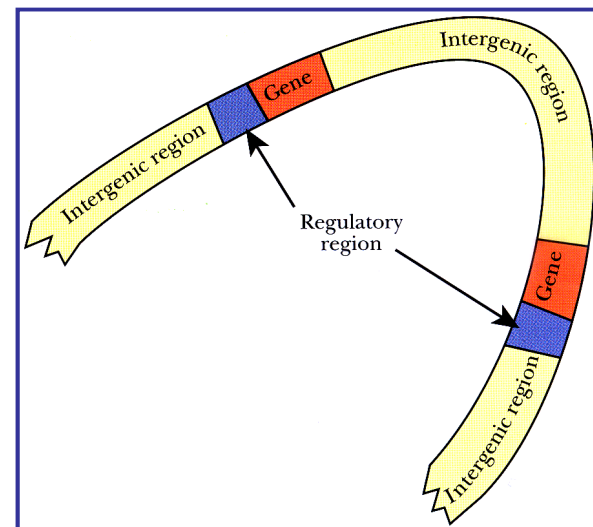
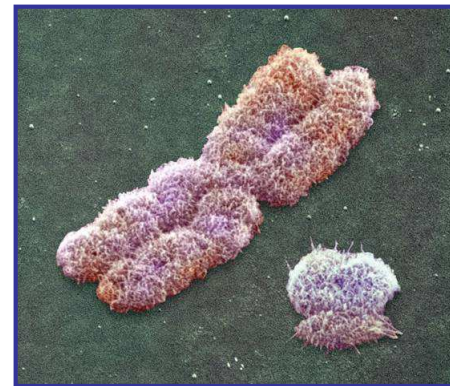
# Struktura DNA vysvětluje kopírování genetické informace

---

- komplementarita vláken dvoušroubovice usnadňuje kopírování a přenos genetické informace
- vodíkové vazby mezi vlákny dvoušroubovice jsou mnohem slabší než kovalentní vazby mezi nukleotidy uvnitř vláken: pomocí určitých enzymů lze dosáhnout oddělení vláken a jejich kopírování do komplementárního vlákna (**replikace DNA**)

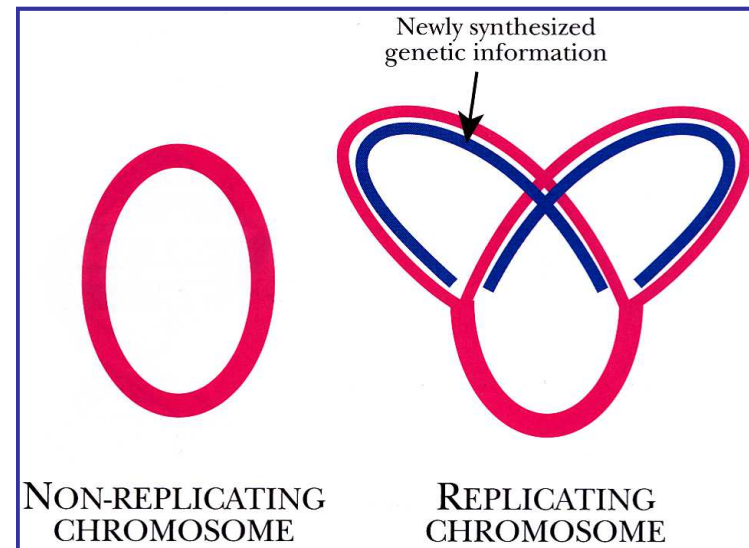
# DNA v chromozomech

- **chromozom** je komplex DNA a proteinů, které pomáhají udržovat jeho strukturu
- na chromozomu jsou v lineárním pořadí uspořádány **geny** oddělené regulačními a mezigenovými úseky



# Chromozomy prokaryot

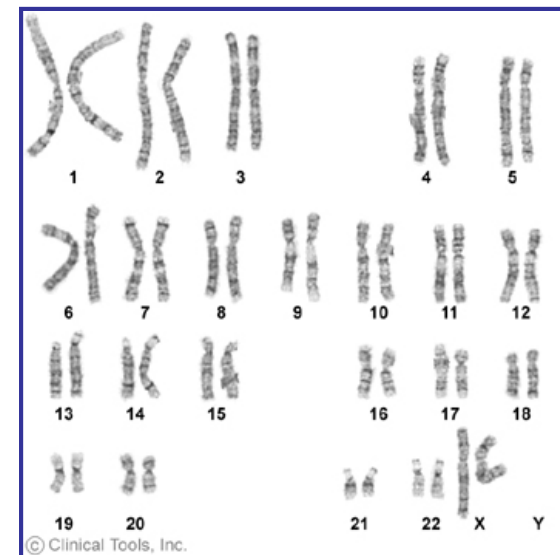
- kružnicové molekuly dvouřetězcové DNA
- nesou většinou několik tisíc genů
- intergenové úseky jsou velmi krátké, úspornost genomu
- skupiny sousedních genů s minimálními mezigenovými úseky (operóny) mohou sdílet jednu regulační oblast
- při replikaci se v určitém místě dvoušroubovice rozvolňuje a replikuje se oběma směry





# Chromozomy vyšších živočichů a rostlin

- komplex lineární molekuly dvouřetězcové DNA a proteinů
- obsahují **centromeru** a koncové **telomery**
- nesou až 50 000 genů
- intergenové úseky jsou rozsáhlé
- eukaryota jsou obvykle diploidní: v každé buňce jsou chromozomové páry (u člověka 46 chromozomů, 23 párů, z toho jeden pár pohlavních chromozomů)
- ve světelném mikroskopu viditelné jen v době buněčného dělení
- **karyotyp**: úplná sada metafázových chromozomů v dané buňce/organismu – základ cytogenetických analýz





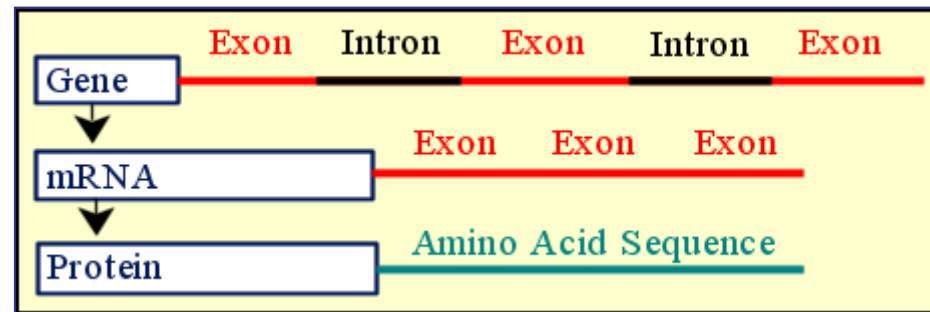
# Sekvenování genomu

---

- úplná sekvence známá např. u mnoha virů, bakterií, kvasinek, octomilky, háďátka, myši, člověka, atd.
  - nalezení dosud neznámých genů
  - odhad počtu všech genů kódujících proteiny
  - odhad funkcí nových genů
  - srovnání mezi druhy – evoluční souvislosti
- velká část genomu vyšších eukaryot nekóduje mRNA
  - v nekódujících oblastech DNA jsou podobné, ale nikoliv identické oblasti
  - vysoká variabilita některých repetitivních sekvencí (specifické pro každého jedince)
  - dříve se nekódující oblasti považovaly za bezúčelnou „junk“ DNA
  - dnes se jim přisuzuje evoluční význam

# Geny eukaryot obsahují introny a exony

- **introny**: nekódující sekvence
- **exony**: kódující sekvence
- evoluční tlak udržuje sekvence exonů u různých jedinců daného druhu ve stejné nebo velmi podobné struktuře
- změny struktury intronů, včetně úplné ztráty, se tolerují: malý funkční význam
- funkce většiny sekvencí intronů není známa – patrně přispívají k variabilitě proteinových struktur (alternativní sestřih), umožňují vazbu regulátorů, podílejí se na regulaci genové exprese





# DNA mitochondrií a chloroplastů

---

- obsahuje geny kódující proteiny související s funkcí těchto organel (ale ne všechny)
- součást genomu daného organismu



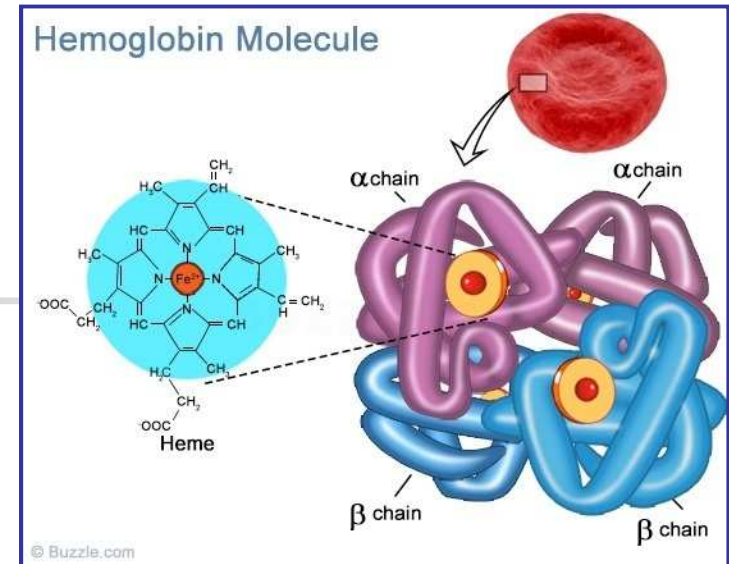
# Solitérní geny a genové rodiny

---

- 25-50% genů mnohobuněčných organismů kódujících proteiny jsou v haploidním genomu zastoupeny pouze 1x: **solitérní geny**
  - např. gen kódující lysozym (enzym, který štěpí polysacharidy buněčné stěny bakterií, složka vaječného bílku, obsažen v slizách)
- **genové rodiny**: geny s velmi podobnou, ale ne zcela identickou strukturou, které kódují příbuzné proteiny (proteinové rodiny)
  - např. rodiny imunoglobulinů nebo kináz mají stovky členů

# Rodiny globinů

- rodina globinových genů kóduje proteiny podílející se na tvorbě hemoglobinu
  - 2 identické polypeptidy  $\beta$ -globinu vytvářejí komplex se dvěma identickými polypeptidy  $\alpha$ -globinu + 4 hemové skupiny
- všechny hemoglobiny přenášejí kyslík v krvi, odlišují se však fyziologickými úkoly
- určité typy globinů se exprimují jen ve vyvíjejícím se plodu – vytvářejí hemoglobin s vyšší afinitou ke kyslíku než hemoglobin dospělých (snadněji získávají kyslík z krevního oběhu matky placentou)
- nižší afinita ke kyslíku je výhodnější u hemoglobinu dospělých organismů, protože usnadňuje jeho uvolnění v tkáních, především svalech, které mají při zátěži velkou spotřebu kyslíku





# Vznik genových rodin: duplikace

---

- různé geny pro  $\beta$ -globin vznikly duplikací původního genu
- během evoluce se v obou genech hromadily náhodné mutace
- mutace výhodné pro funkci přenosu kyslíku se fixovaly
- v oblasti  $\beta$ -globinové rodiny se nacházejí **pseudogeny**
- pseudogeny se podobají původním genům (vznikly rovněž duplikací), ale jsou kvůli mutacím nefunkční
- pseudogeny nejsou škodlivé – pasivně se v genomu udržují



# Tandemově opakované řady identických genů

---

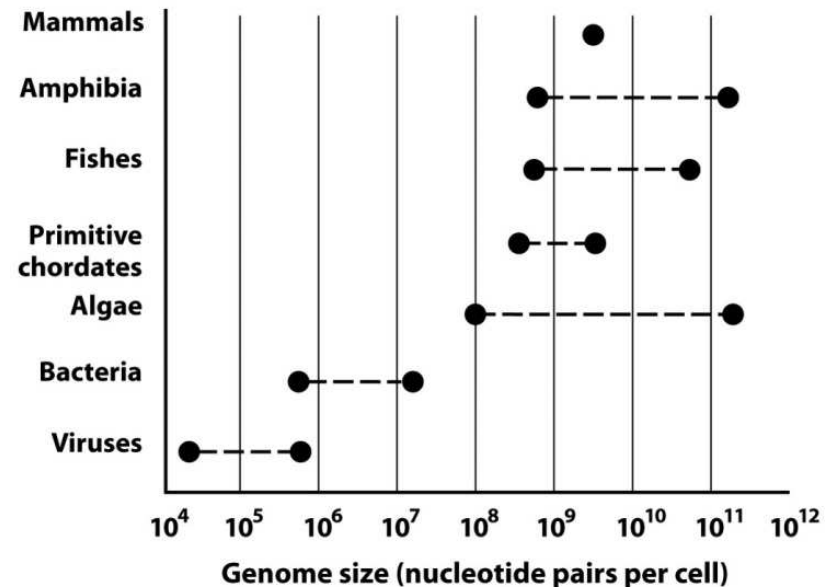
- toto uspořádání mají především geny kódující RNA (např. rRNA nebo RNA fungující při sestřihu), po kterých je v buňce vysoká poptávka
- kódují zcela nebo téměř identické produkty
- geny jsou umístěny v mnohonásobném opakování bezprostředně za sebou





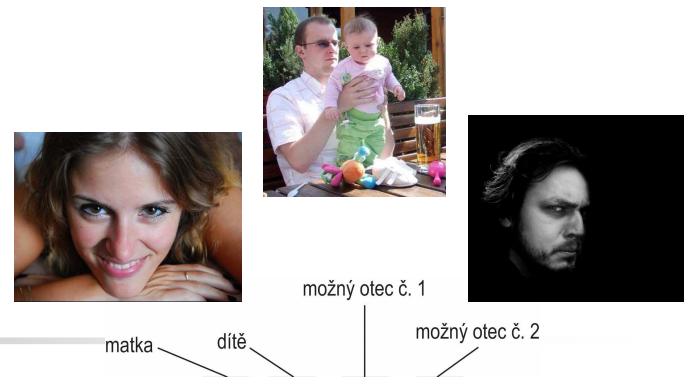
# Velikost genomu a biologická komplexita

- počet genů kódujících proteiny není přímo úměrný biologické komplexitě organismu (*C. elegans* má více genů než octomilka, člověk má jen o tisíc genů více genů než *C. elegans*)
- ze struktury genomu nelze biologickou komplexitu odvozovat přímo
- variabilitě přispívají:
  - alternativní sestřih
  - posttranslační modifikace
  - regulace genové exprese

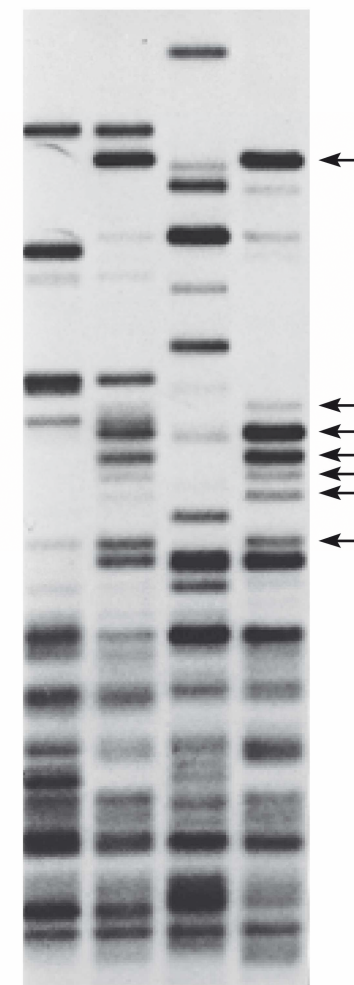




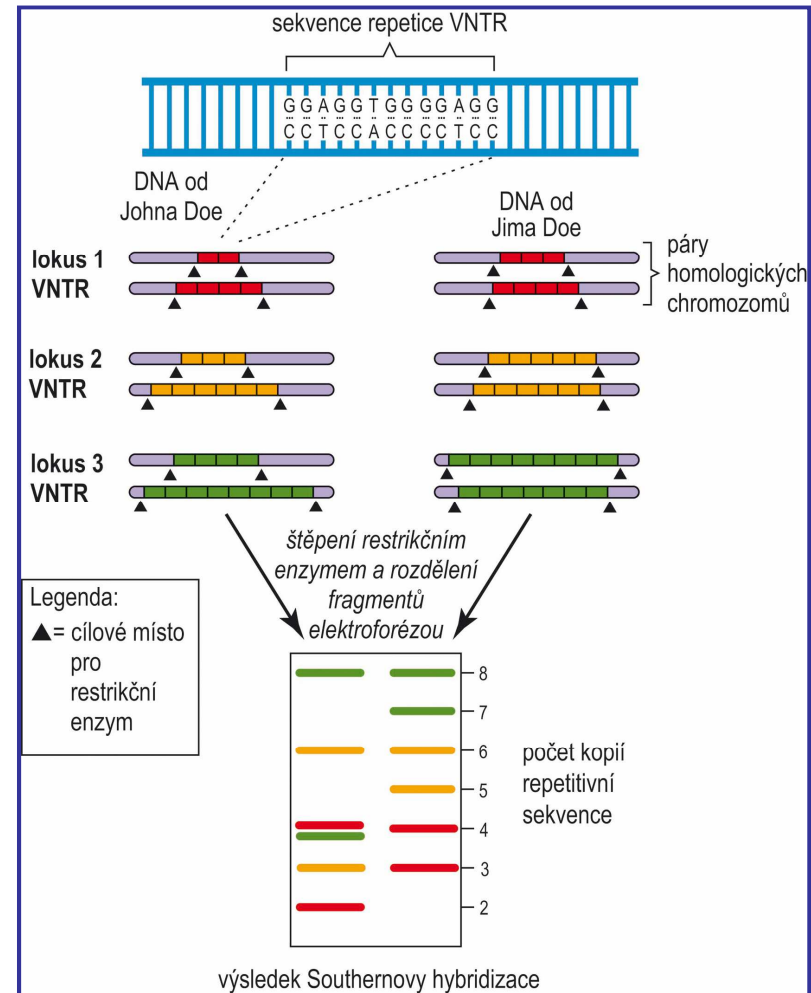
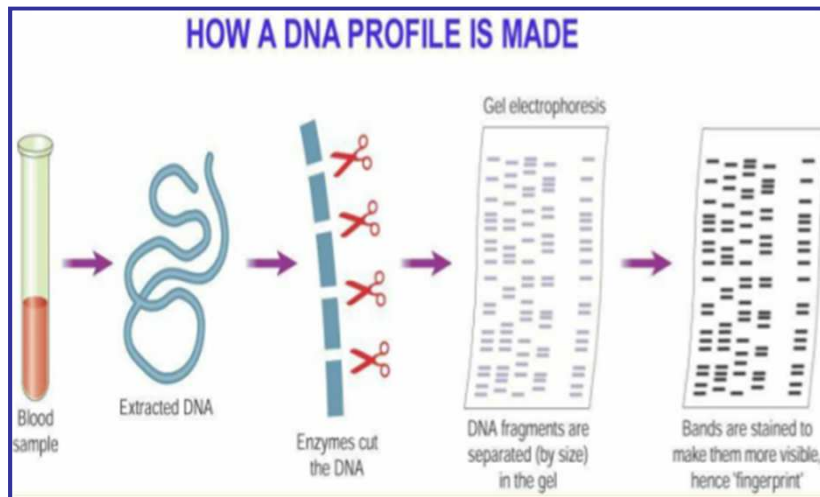
# Forenzní analýza



- pro profilování jsou vhodné dva typy polymorfismu DNA
  - tandemové repetice variabilního počtu (VNTR), minisatelity, opakující se sekvence 10-80 pb
  - krátké tandemové repetice (STR), mikrosatelity, opakující se sekvence o délce 2-10 pb
- počet jejich kopií je vysoce variabilní a proto ideální pro profilování
- v určitých oblastech genomu je počet opakování VNTR a STR snadno detekovatelný (restrikční analýza, PCR, elektroforéza)



# Genetické rozdíly mezi jednotlivci



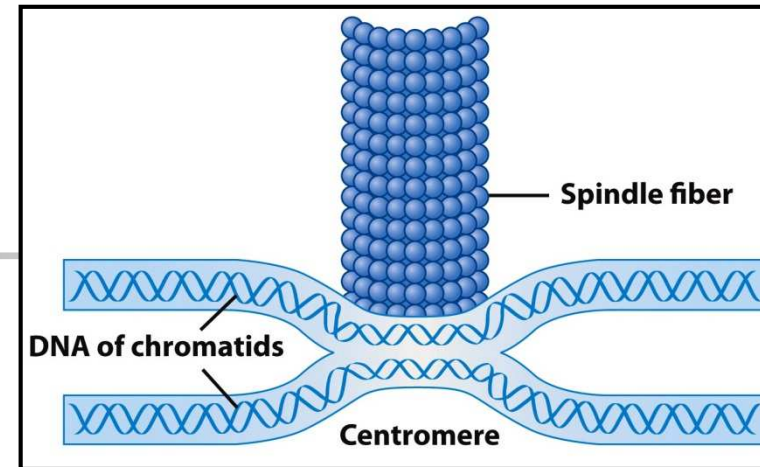
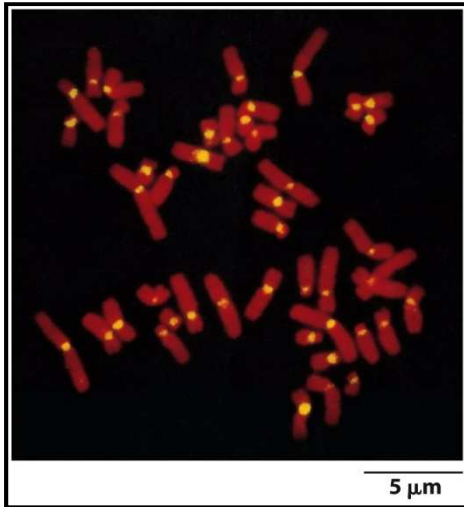


# Strukturní organizace eukaryotických chromozomů

---

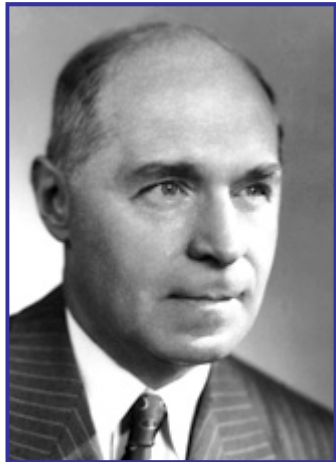
- velikost DNA monohonásobně přesahuje průměr buňky
- DNA se organizovaným způsobem sbaluje do komplexu s proteiny
- speciální části chromozomů tvoří centromery a telomery

# Centromera



- zúžená oblast chromozomu v jeho střední části
- místo vazby mikrotobulů dělicího vřeténka
- nezbytná pro správnou segregaci chromozomů při anafázi mitózy a meiózy
- stejná funkce - podobná struktura u všech chromozomů
- obsahuje nukleotidové sekvence, na které se vážou proteiny (**kinetochory**) zprostředkovávající vazbu vřeténka

# Telomery



(z řečtiny: telos = konec, meros = část)

**Hermann J. Muller, 1938:** první důkaz, že absence přirozených konců chromozomů drozofily (odstraněných rentgenovým zářením) znemožňuje přenos chromozomů do buněk potomstva



**Barbara McClintocková, 1948:** konce přerušených chromozomů jsou lepicí a mají tendenci se spojovat za vzniku fúzních chromozomů; normální konce chromozomů tuto vlastnost nemají

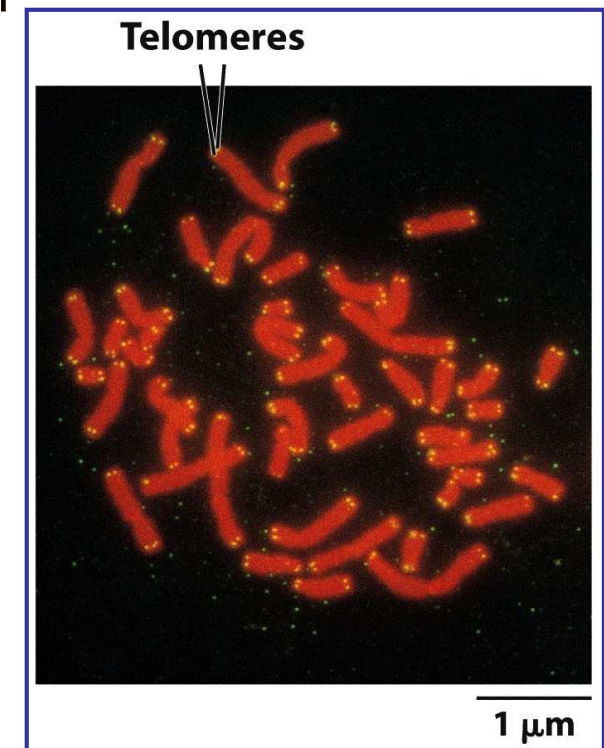


# Hlavní funkce telomer

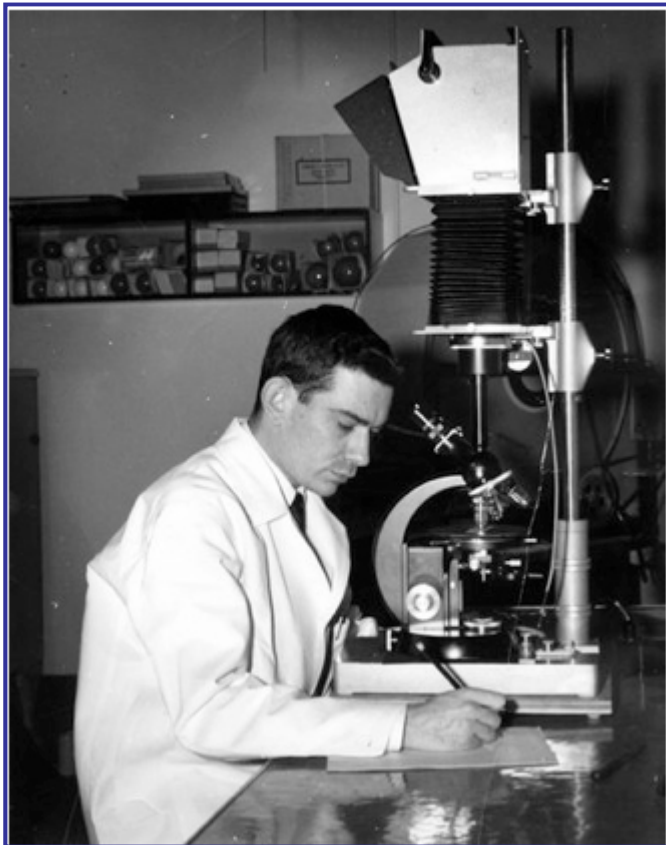
- chrání konce lineárních molekul DNA před deoxyribonukleázami
- brání fúzi konců chromozomů s jinými molekulami DNA
- umožňují úplnou replikaci konců lineárních molekul DNA (spolu s enzymem telomerázou)

## Struktura:

- obsahují krátké opakující se nukleotidové sekvence
- počet opakování sekvencí s věkem klesá
- to neplatí pro embryonální kmenové buňky a buňky nádorové, kde se telomery nezkracují

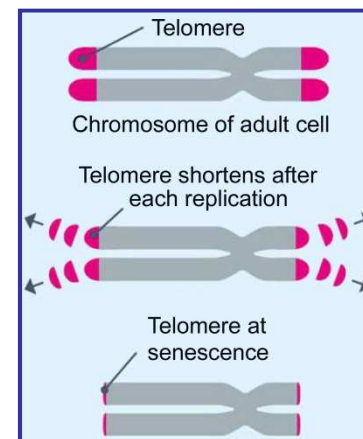


# Hayflickův limit



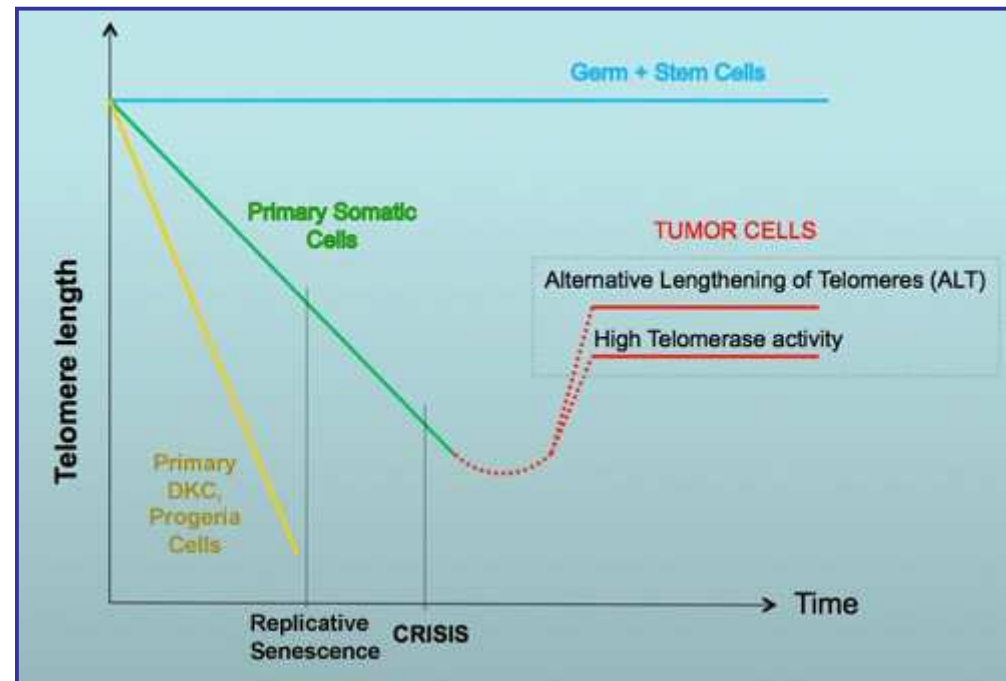
Leonard Hayflick  
(\*1928)

- Leonard Hayflick začátkem 60. let kultivoval lidské buňky *in vitro*
- po 50 – 70 cyklech zdvojování se buňky dělit přestávaly a přecházely do senescence, následně krize a odumíraly
- důsledek kritického zkrácení telomer
- korelace s celkovým stárnutím



# Nádorové buňky dokážou prodloužit život buněk

- ztráta telomer je eliminována
- aktivace telomerázy
- alternativní prodlužování telomer rekombinací (bez účasti telomerázy)





# Proteiny chromatinu

---

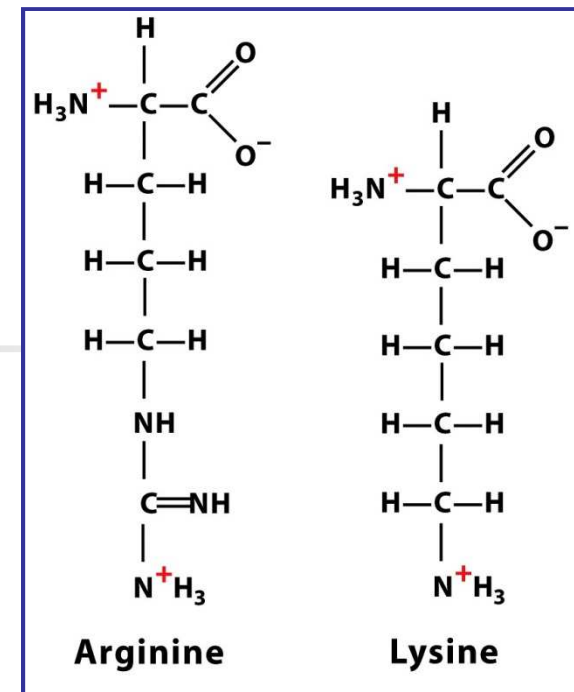
- šetrnou izolací DNA z jader eukaryotických buněk se získá nukleoproteinový komplex - chromatin
- chromatin = komplex **DNA** a **proteinů**

2 typy chromatinových proteinů:

- **bazické** (v neutrálním pH nesou kladný náboj) = **histony**
- **kyselé** (v neutrálním pH nesou záporný náboj) = **nehistonové chromozomové proteiny**

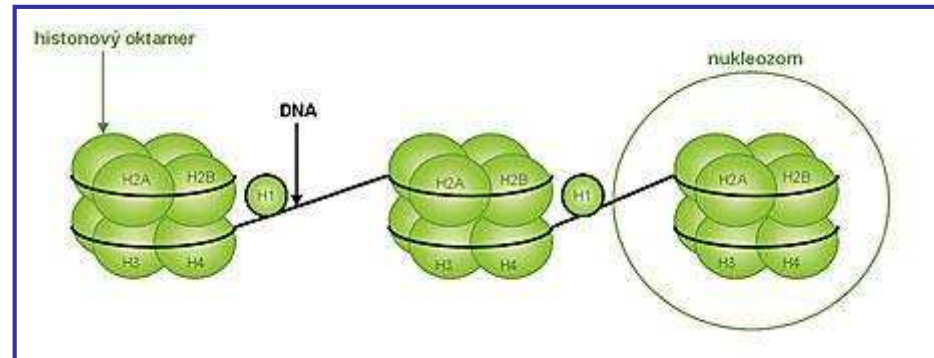
# Histony

- hlavní strukturní úloha v chromatinu
- v buňkách přítomny v množství, které koreluje s množstvím DNA
- hlavní typy histonů: **H1, H2a, H2b, H3, H4**
- v hojné míře zastoupeny bazické aminokyseliny s kladným nábojem **arginin** a **lysin** (20-30% histonových aminokyselin), které interagují s negativním nábojem fosfátových skupin DNA
- vysoce konzervativní struktura histonů, přítomny téměř ve všech buněčných typech



# Složkami nukleozomů jsou čtyři typy histonů

## Nukleozomy



- primární strukturní jednotky chromatinu
- útvary vzniklé interakcí H2a, H2b, H3 a H4 s DNA o velikosti 146 pb
- podíl na správném složení DNA
- interakce mezi histony a DNA usnadňují elektrické náboje (DNA je polyanion, histony jsou díky bazickým aminokyselinám polykationty)
- při replikaci se DNA do nukleozomů sestavuje okamžitě pomocí chaperonů
- posttranslační modifikace histonů (např. acetylace) mohou ovlivnit kompaktnost chromatinu (rozvolnění, aktivace genů)



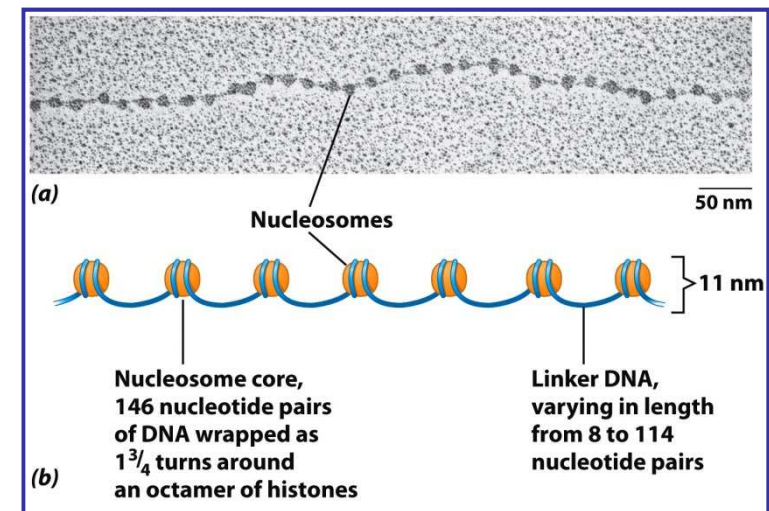
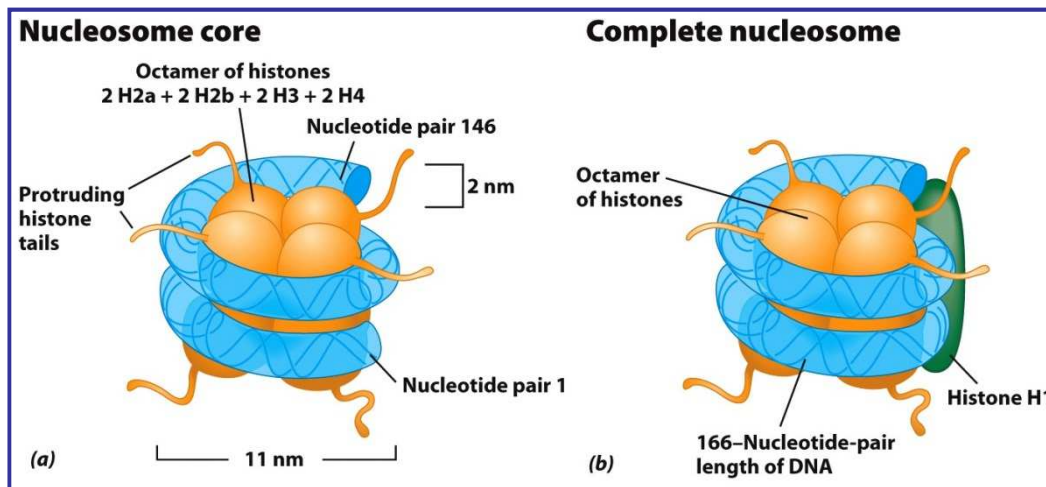
# Nehistonové proteiny chromatinu

---

- různé u různých buněk (i v rámci téhož organismu)
- nepodílí se na uspořádání DNA v chromozomech
- účast na regulaci genové exprese

# Tři úrovně sbalení eukaryotických chromozomů: 1. nukleozom

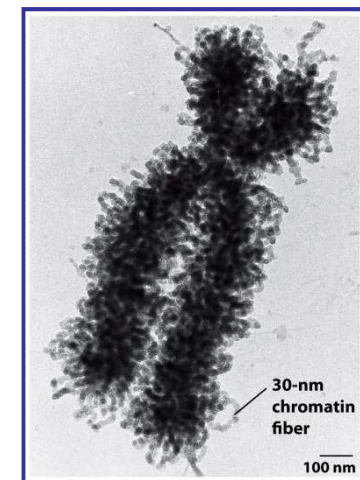
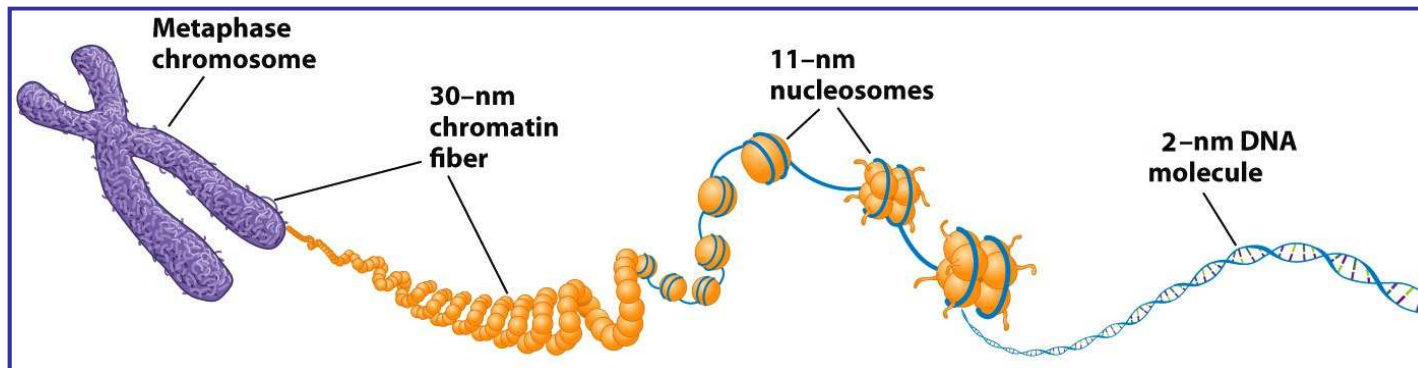
- **jádro nukleozomu** tvoří oktamer histonů  $2 \times (\text{H2a} + \text{H2b} + \text{H3} + \text{H4})$  a nadšroubovicová DNA o velikosti 146 pb
- **úplný nukleozom** je stabilizován histonem H1
- výsledkem je interfázové chromatinové vlákno o průměru **11 nm**





# Tři úrovně sbalení eukaryotických chromozomů: 2. solenoid

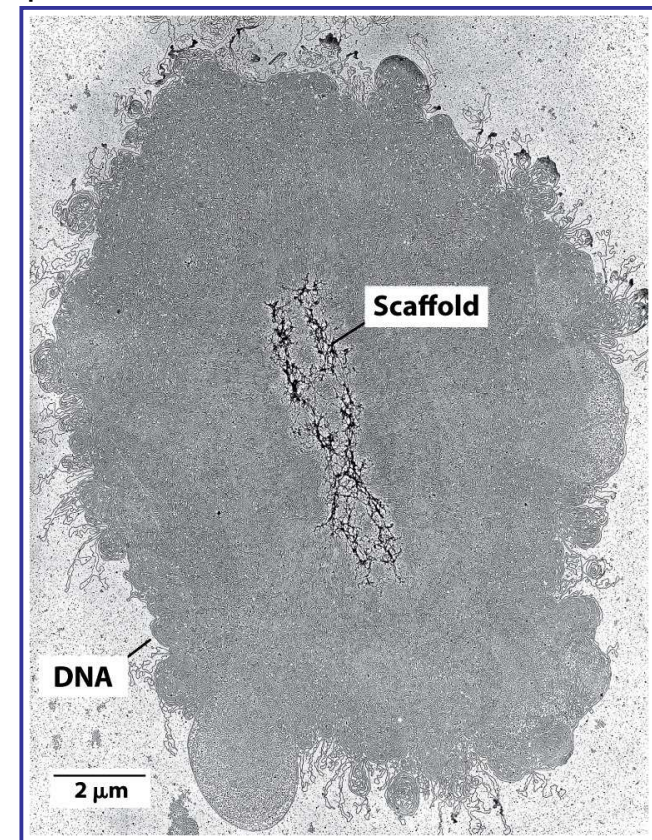
**solenoid** (30 nm chromatinové vlákno) vzniká v důsledku interakcí mezi nukleozomy, způsobující vinutí chromatinového vlákna do velké šroubovice s 6 nukleozomy na jeden závit



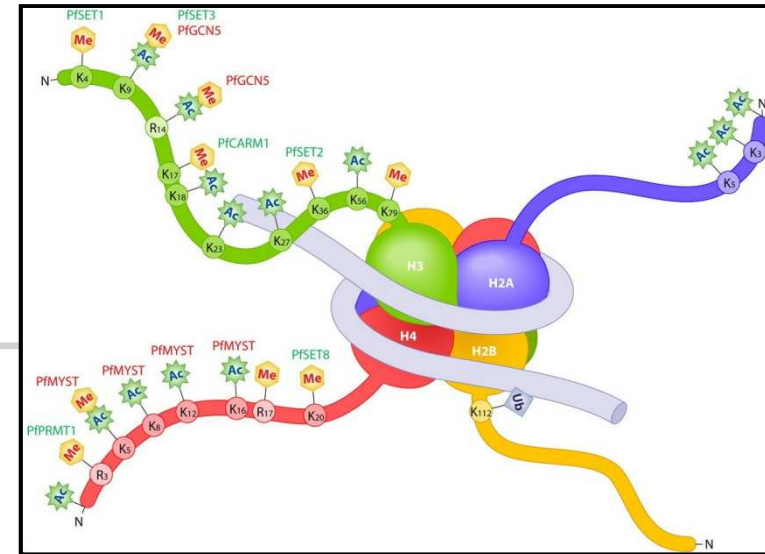
### 3. stáčení 30 nm vlákna do smyček pomocí proteinového lešení ("scaffold")

- proteiny nehistonové povahy (např. proteiny HMG) tvoří **proteinové lešení („scaffold“)**
- lešení napomáhá složení 30 nm vlákna do kondenzovaného stavu
- nejvýraznější kondenzace chromozomů během mitózy

EM: lidský metafázový chromozom po odstranění histonů



# Histonový kód



- N-konce aminokyselinových řetězců histonů jsou volné a přístupné posttranslačním modifikacím
- kombinace těchto modifikací v různých oblastech chromatinu vytvářejí kód, který ovlivňuje funkci chromatinu – hlavně tvorbou a odstraňováním vazebných míst pro specifické proteiny
- ovlivňuje se tak úroveň kondenzace chromatinu (rozhodující pro transkripci, replikaci reparaci DNA)
- kondenzovaný chromatin: **heterochromatin**
- rozvolněný chromatin: **euchromatin**



# Heterochromatin

---

- zůstává ve značně kondenzovaném stavu i v interfázi
- typicky přítomen v oblasti centromery a telomer
- silně barvitelný barvivy vážoucími se na DNA
- transkripčně inaktivní



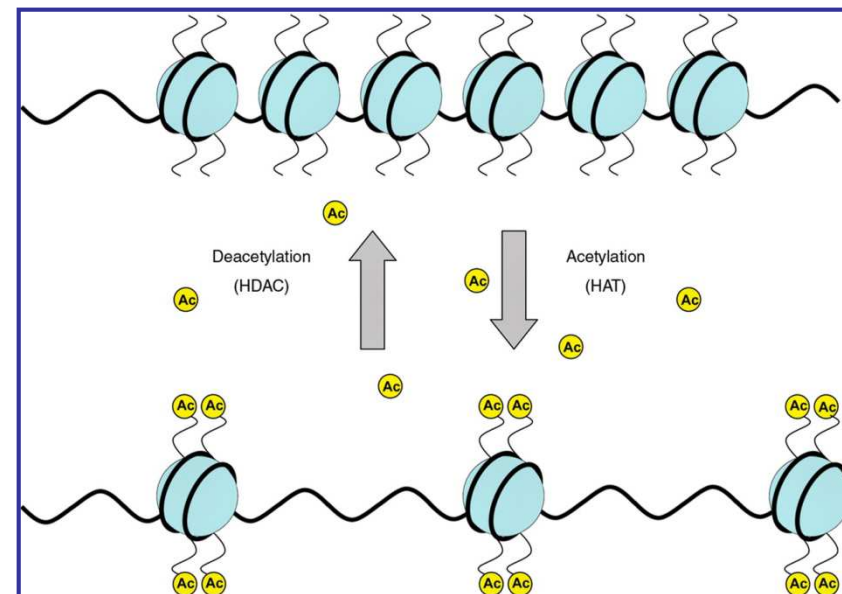
# Euchromatin

---



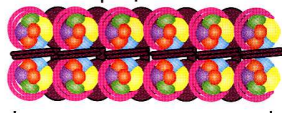
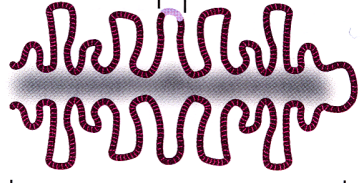
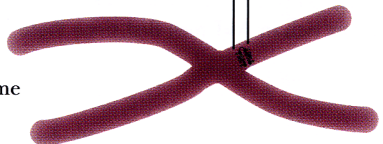
- méně kompaktní v interfázi
- typicky přítomen v aktivně přepisovaných oblastech
- slabě barvitelný barvivy vážoucími se na DNA

# Posttranslační modifikace histonů

- epigenetické mechanismy regulace genové exprese
- fosforylace H1: kondenzace chromozomů – ztížení transkripce
- acetylace histonů nukleozomového jádra: rozvolnění chromozomů – usnadnění transkripce
- zajištěno enzymaticky



# Schéma skládání DNA v chromozomech

NAME	STRUCTURE	SIZE
A DNA helix		2 nm
B 'String with beads'		11 nm
C Nucleosomes		30 nm fiber
D Looped 30nm fibers		30 nm fibers
E Mitotic chromosome		0.8 μm

