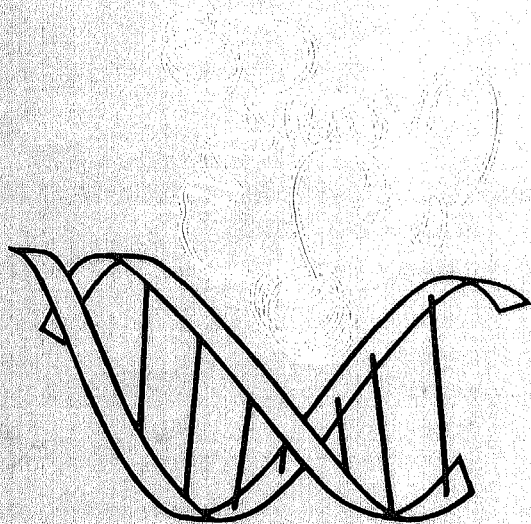


ÚVOD DO MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE

Stanislav Rosypal



Díl první

INFORMAČNÍ MAKROMOLEKULY • MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE PROKARYOT

BRNO 1998

TŘETÍ INOVOVANÉ VYDÁNÍ

OBSAH PRVNÍHO DÍLU

<i>Předmluva k třetímu vydání celé učebnice</i>	5
<i>Předmluva k prvnímu dílu třetího vydání</i>	7
<i>Co je molekulární biologie</i>	8
1. INFORMAČNÍ MAKROMOLEKULY	11
<i>1.1 Proteiny</i>	13
1.1.1 Primární struktura proteinů.....	13
1.1.2 Sekundární struktura proteinů.....	25
1.1.3 Vyšší struktury proteinů.....	27
1.1.4 Biologické funkce proteinů.....	34
1.1.5 Sestavování oligomerních proteinů a nadmolekulárních struktur.....	40
<i>1.2 Nukleové kyseliny</i>	49
1.2.1 Primární struktura nukleových kyselin.....	49
1.2.2 Párování bází mezi DNA-řetězci.....	58
1.2.3 Sekundární struktura DNA.....	66
1.2.4 Terciární struktura DNA.....	93
1.2.5 Organizace nukleotidových sekvencí na DNA izolované ze živých soustav.....	102
1.2.6 Obecná charakteristika struktury ribonukleových kyselin.....	105
<i>1.3 Vazebné interakce proteinů s DNA</i>	113
1.3.1 Obecná charakteristika vazebných interakcí DNA s proteiny.....	113
1.3.2 Sekundární struktura proteinů rozeznávajících regulační oblasti na DNA.....	114
<i>1.4 Genetická informace</i>	123
1.4.1 Vzájemná podmíněnost nukleových kyselin a proteinů.....	123
1.4.2 Genetický kód.....	129
1.4.3 Pojem genu.....	139
1.4.4 Transkripční jednotka.....	145

1.4.5	Genofor, chromozom a genom.....	149
2.	STRUKTURA, REPLIKACE A EXPRESE PROKARYOTICKÉHO GENOMU.....	153
2.1	<i>Struktura prokaryotického genomu.....</i>	157
2.1.1	Prokaryotické jádro.....	157
2.1.2	Plazmidy.....	159
2.2	<i>Replikace bakteriálního genomu.....</i>	161
2.2.1	Replikace bakteriální chromozomové DNA.....	162
2.2.2	Replikace plazmidové DNA.....	180
2.3	<i>Transkripce bakteriálního genomu (Bakteriální transkripce).....</i>	185
2.3.1	Transkripční jednotka bakteriálního genomu.....	186
2.3.2	Průběh transkripce bakteriálního genomu.....	190
2.3.3	Transkripce strukturních genů.....	196
2.3.4	Bakteriální transkripce genů pro rRNA a tRNA.....	198
2.4	<i>Translace bakteriální mRNA (Bakteriální translace).....</i>	201
2.4.1	Transferová RNA (tRNA).....	202
2.4.2	Aktivace aminokyselin.....	206
2.4.3	Aminoacyl-tRNA-syntetázy.....	209
2.4.4	Prokaryotické ribozomy.....	217
2.4.5	Průběh translace v bakteriální buňce.....	220
2.4.6	Posttranslační procesy.....	232
2.5	<i>Regulace exprese bakteriálního genomu.....</i>	235
2.5.1	Enzymová indukce, represe a katabolická represe.....	237
2.5.2	Negativní a pozitivní regulace operonu.....	238
2.5.3	Ostatní způsoby regulace genové exprese u bakterií.....	245
2.6	<i>Replikace, transkripce a translace genomu archeí.....</i>	256
2.6.1	Genom archeí a jeho replikace.....	257
2.6.2	Archeální RNA-polymerázy a iniciace transkripce.....	260
2.6.3	Archeální translace.....	260
2.6.4	Sestřih tRNA u archeí.....	263
2.6.5	Závěr.....	265
3.	LITERATURA K PRVNÍMU DÍLU.....	267
3.1	<i>Terminologické slovníky.....</i>	267
3.2	<i>Základní učebnice.....</i>	268
3.3	<i>Monografie.....</i>	268
3.4	<i>Přehledné články ke kapitole 1.....</i>	269

3.5 Přehledné články ke kapitole 2.....	270
3.6 Původ ilustrací a tabulek.....	272
4. TERMINOLOGICKÝ REJSTŘÍK.....	273
4.1 Česko-anglický.....	273
4.2 Anglický.....	291

Předmluva

k třetímu vydání celé učebnice

Pojetí třetího vydání celé učebnice "Úvod do molekulární biologie", rozvržené do čtyř dílů, zůstává stejné jako u vydání druhého. V jeho předmluvě se uvádí, že učebnice je určena čtenářům a studujícím odborné biologické literatury, kteří chtějí získat v přehledu základní informace o současně molekulární biologii nebo se seznámit se základy tohoto oboru s tím záměrem, aby pak mohli přistoupit k jeho hlubšímu studiu. Bude proto vhodná pro studenty a doktorandy těch fakult, kde je molekulární biologie zahrnuta jako jeden ze základních předmětů do jejich učebního programu, což se týká především fakulty přírodovědecké, lékařské, pedagogické, veterinární, farmaceutické, vysoké školy chemickotechnologické, zemědělské, a také v neposlední řadě zájemců o biologii z řad studentů na gymnáziích a jiných středních školách. Její užitečnost ocení též absolventi, kteří studovali odbornou biologii nebo biochemii nebo biologii v rámci učitelských kombinací v minulých letech a chtějí se seznámit se současným stavem molekulární biologie. Jako zdroj informací může posloužit i vědeckým pracovníkům, jejichž výzkumné projekty souvisí s molekulární biologii.

Při zpracování této učebnice vycházel autor z pedagogických zkušeností, které získal v rámci výuky molekulární biologie přednáškami v tomto oboru již od začátku šedesátých let na přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity, a také později externími přednáškami na fakultě veterinární, farmaceutické a na Vysoké škole zemědělské v Brně. Tyto přednášky byly na základě nové literatury soustavně doplňovány novými poznatky v souladu s aktuálním stavem molekulární biologie.

Učebnice je koncipována jako úvod do molekulární biologie, který by měl být základem pro její další studium. Proto si autor kladl za cíl jednoduchým jazykem popsat a vyložit jen ty děje na molekulární úrovni, které se obecně vyskytují ve všech živých soustavách. A to jsou děje, které se uplatňují při přenosu a změnách genetické informace. Proto hlavním záměrem autora bylo vyložit molekulární mechanismy přenosu genetické informace (replikace, transkripce, translace) a regulace genové exprese v jejich obecnosti a ukázat na způsob jejich realizace u organismů prokaryotických, eukaryotických, a také vi-

vající o informačních makromolekulách. Je to z toho důvodu, že autor chtěl ve stručném přehledu a rekapitulaci shrnout chemické pojmy používané v dalších dílech. Samozřejmě hlubší pochopení těchto pojmů by vyžádalo, aby je čtenář studoval z učebnic biochemie. O nové poznatky se též rozšířila kapitola o replikaci DNA a kapitola pojednávající o translaci. Zvláště je třeba zdůraznit, že na rozdíl od prvního dílu druhého vydání, se ve třetím vydání tohoto dílu u prokaryot rozlišuje bakteriální replikace, transkripce a translace od archeální, která se v řadě aspektů podobá eukaryotické. Je velmi pravděpodobné, že se bude toto rozlišení s přibýváním nových poznatků prohlubovat.

V Brně dne 8. srpna 1998.

Stanislav Rosypal

Co je molekulární biologie?

Molekulární biologie studuje vztah struktury a interakcí biologických makromolekul (biomakromolekul) k funkcím a vlastnostem živých soustav. Mohli bychom také říci, že molekulární biologie zkoumá vztah mezi dvěma úrovněmi živých soustav, tj. vztah mezi fyzikální a chemickou úrovní, kterou představuje struktura a interakce biologických makromolekul a biologickou úrovní, kterou představují funkce a vlastnosti živých soustav. Ve smyslu tohoto vymezení molekulární biologie jako vědního oboru jsou koncipovány renovované světové učebnice molekulární biologie.

Molekulární biologie je věda biologická. Jinak by neměla smysl ani význam (viz Watson et al.: *Molecular Biology of the Gene*, 1987, str. 1157). Velmi pregnantně to v citované učebnici vyjádřil J. D. Watson tvrzením, že "nemůžeme pochopit strukturu a funkci genů, jestliže nechápeme biologii organismů, v nichž se geny nacházejí." Proto také molekulární biologie přistupuje ke studiu vztahu mezi strukturou a interakcemi biologických makromolekul a životními funkcemi z komplexního metodologického hlediska integrujícího hlediska fyzikální, chemická a biologická. Tento přístup označovaný jako **molekulárněbiologický** je příznačný tím, že se v něm operuje biologickými funkcemi (biologické hledisko) interpretovanými (vysvětlovanými) v pojmech vyjadřujících strukturální vlastnosti a interakce biologických makromolekul (fyzikální a chemické hledisko).

V historii molekulární biologie tento přístup poprvé (roce 1953) výrazně uplatnili J. D. Watson a F. H. C. Crick v návrhu modelu molekuly DNA. Na tomto modelu oba autoři vyložili strukturálními, tj. fyzikálními a chemickými vlastnostmi molekuly DNA, její biologickou funkci jako genu. Biologické vlastnosti genu, tj. jeho zdvojení před dělením buňky, vysvětlili semikon-

zervativní replikací DNA, schopnost kódovat genetickou informaci vysvětlili primární strukturou DNA a mutabilitu tautomerními vlastnostmi bází.

To je samozřejmě ideální a modelový příklad. V praxi to vypadá tak, že vědecký pracovník si obvykle více nebo převážně všímá jedné nebo druhé stránky (chemické nebo biologické), což je ovlivněno jeho erudicí. To však vůbec nevadí. Pracovníci obou typů dospívají k cenným výsledkům, které dříve nebo později jsou stejnými nebo jinými vědeckými pracovníky integrovány použitím molekulárněbiologického přístupu. Výsledky této integrace jsou samozřejmě přebírány učebnicemi molekulární biologie.

Autorství názvu "molekulární biologie" se přisuzuje Warrenu Weaverovi a Williamu Thomasovi Astburymu. Oba pravděpodobně použili tohoto názvu nezávisle jeden na druhém. W. Weaver použil názvu molekulární biologie v roce 1938 ve výroční zprávě Rockefellerovy nadace (Annual Report of the Rockefeller Foundation for 1938, str. 203 - 219). V této zprávě chápe molekulární biologii ve smyslu aplikací fyzikálních metod na problémy biologie, tedy pojímá ji spíše jako biofyziku. Přibližně ve stejnou dobu jako Weaver použil v roce 1939 názvu "molekulární biologie" W. T. Astbury a jeho doktorandka Florence Bellová, která ve své dizertaci píše: "Snad nejzávažnějším nedávným výsledkem molekulární biologie je uvědomění si toho, že počátky života jsou úzce spjaty s interakcemi proteinů a nukleových kyselin."

Astbury název "molekulární biologie" první zveřejnil v roce 1946 v časopise Nature; v obsáhlém článku o významu analýzy makromolekul pomocí paprsků X se zmiňuje, že tato analýza sehraje významnou úlohu v molekulární biologii. V přednášce, proslovené dne 28. září 1950 ve Společnosti Harvey Society v New Yorku, Astbury formuloval koncepci molekulární biologie jako vědního oboru a správně vytušil, že podstata základních životních dějů je založena na interakcích mezi nukleovými kyselinami a proteiny, i když vztah nukleových kyselin a proteinů nebyl v té době známý. To byla také jedna z příčin, proč se název "molekulární biologie" v první polovině padesátých let objevoval ještě sporadicky. Přestože jako fyzik používal fyzikálního přístupu ve výzkumu biologických makromolekul, zdůraznil ve své přednášce v roce 1950, že vedle struktury biologických makromolekul musí molekulární biologie nutně studovat jejich genezi a funkci.

K prudkému nástupu molekulární biologie jako nového vědního oboru došlo po zveřejnění teorie proteosyntézy založené na ústředním dogmatu molekulární biologie. S myšlenkovými prvky ústředního dogmatu molekulární biologie přišli A. Boivin a R. Vendrely v roce 1947. V ucelené formě a na základě již průkaznějších experimentálních výsledků teorii proteosyntézy založenou na ústředním dogmatu molekulární biologie zveřejnil v roce 1958 F. H. C. Crick. To je již také doba, kdy se začíná vžívat název "molekulární biologie" pro nový vědní obor. Začátkem šedesátých let splnila již molekulární biologie všechna kritéria, která se kladou na samostatný vědní obor. Jsou to tato kritéria:

◆ 1. Společenskoekonomické uznání molekulární biologie projevující se jednak její institucionalizací (zakládání vědeckovýzkumných a pedagogických ústavů pod tímto názvem), jednak finančním dotováním výzkumu prováděného pod tímto názvem.

◆ 2. Má své vlastní časopisy, které jsou mezinárodního charakteru.

◆ 3. Jsou vydávány učebnice a monografie pod jejím názvem.

◆ 4. Má jednotící teorii, tj. teorii proteosyntézy v organizmech, založenou na ústředním dogmatu molekulární biologie. Z této teorie vyplývá základní koncepce molekulární biologie jako oboru vyznačujícího se specifickým přístupem k řešení biologické problematiky (molekulárněbiologický přístup, viz výše).

Začátkem šedesátých let byly experimentálně potvrzeny základní aspekty teorie proteosyntézy založené na ústředním dogmatu molekulární biologie, což umožnilo, že v roce 1966 mohly úspěšně skončit práce na řešení genetického kódu. V roce 1973 se začíná s genovým inženýrstvím. To už představuje mohutný rozvoj molekulární biologie. Silně se začíná rozvíjet molekulární biologie virů a molekulární biologie eukaryot, a to zejména od druhé poloviny sedmdesátých let do současnosti.

Molekulární biologie převážně řešila, a dosud převážně řeší, problematiku genetickou a v rámci řešení této problematiky se též historicky vyvíjela. Proto se často používá místo názvu "molekulární biologie" názvu "molekulární genetika". To je však zúžený pohled na molekulární biologii. Molekulární genetikou se rozsah molekulární biologie nevyčerpává.

Předmět studia molekulární biologie podle výše uvedeného vymezení na str. 8 je širší než předmět studia molekulární genetiky. Na druhé straně však molekulární genetiku chápeme jako podstatnou součást molekulární biologie, neboť se zabývá funkcí informačních makromolekul (nukleových kyselin a proteinů) při přenosu genetické informace. Popis a výklad dějů zahrnutých do přenosu genetické informace v živých soustavách vyjadřuje molekulární genetika v pojmech, které tvoří základní logickou strukturu molekulární biologie vůbec. Právě tento logický základ molekulární biologie se snažíme v této učebnici objasnit. Jeho znalost je nezbytná pro pochopení dalších oblastí molekulární biologie, jako je molekulární biologie buňky, molekulární virologie, imunologie, onkologie, perspektivně se rozvíjející molekulární neurobiologie, molekulární evoluce, molekulární taxonomie aj.

INFORMAČNÍ MAKROMOLEKULY

◆ *Makromolekuly jsou látky o relativní molekulové hmotnosti sto tisíc až několik milionů daltonových jednotek. K makromolekulám biologického původu, tj. k tzv. biologickým makromolekulám neboli biomakromolekulám, patří:*

- ◆ *proteiny,*
- ◆ *nukleové kyseliny,*
- ◆ *polysacharidy.*

Z nich nezastupitelnou roli při přenosu genetické informace mají informační makromolekuly, což jsou biologické makromolekuly, mezi nimiž dochází v živých soustavách k přenosu genetické informace. Jsou to nukleové kyseliny a proteiny. Schopnost působit jako informační makromolekuly vyplývá z jejich polymerního charakteru. Polymer je makromolekula složená z mnoha kovalentně spojených malých molekul, které jsou stavebními jednotkami polymeru a označují se jako monomery. Tyto stavební jednotky mohou být, co se týče struktury, stejné nebo se mohou lišit. Polymer složený ze stejných monomerů se označuje jako homopolymer (např. škrob nebo glykogen) na rozdíl od heteropolymeru (kopolymeru), což je polymer složený z různých monomerů. Zkráceně se homopolymer vyjadřuje symbolem poly(X), kde "poly" (z řečtiny) je "mnoho" a za X se dosazuje příslušný monomer, např. poly(A) znamená homopolymer, jehož monomery jsou zbytky kys. adenylové. Heteropolymery jsou např. poly(XY), poly(XYZ), jelikož jsou sestaveny z různých monomerů.

Polymery, které tvoří látkovou podstatu živých soustav, označujeme jako biopolymery. Přední místo mezi nimi zaujímají nukleové kyseliny a proteiny. Obojí jsou heteropolymery, což má mimořádný biologický význam, který vyplývá až v souvislosti s výkladem pojmu "genetická informace".

Nukleové kyseliny jsou makromolekulární látky tvořené polynukleotidovými řetězci. Polynukleotid nebo též polynukleotidový řetězec je polymer mononukleotidů spojených navzájem fosfodiesterovými vazbami.

Polynukleotidy jsou dvojího druhu:

- ◆ *a) polyribonukleotidy (zkr. RNA-řetězce), tj. polynukleotidy, jejichž monomery jsou ribonukleotidy,*
- ◆ *b) polydeoxyribonukleotidy (zkr. DNA-řetězce), tj. polynukleotidy, jejichž monomery jsou deoxyribonukleotidy.*

Podle druhu polynukleotidového řetězce se rozlišují dva typy nukleových kyselin:

◆ a) **kyselina ribonukleová** (zkr. **RNA**), kterou tvoří jeden nebo dva komplementární polyribonukleotidové řetězce obsahující v mnohonásobném opakování v různém pořadí tyto ribonukleotidy jako monomery (jsou uvedeny názvy a zkratky názvů):

UMP =	uridylová kyselina (uridin -5'-monofosfát),
CMP =	cytidylová kyselina (cytidin-5'-monofosfát),
AMP =	adenylová kyselina (adenozin-5'-monofosfát),
GMP =	guanylová kyselina (guanozin-5'-monofosfát),

◆ b) **kyselina deoxyribonukleová** (zkr. **DNA**), která sestává z jednoho nebo dvou komplementárních polydeoxyribonukleotidových řetězců, které podobně jako RNA obsahují v mnohonásobném opakování v různém pořadí tyto deoxyribonukleotidy jako monomery:

dTMP =	deoxytymidylová kyselina (2'-deoxytymidin-5'-monofosfát),
dCMP =	deoxycytidylová kyselina (2'-deoxycytidin-5'-monofosfát),
dAMP =	deoxyadenylová kyselina (2'-deoxyadenozin -5'-monofosfát),
dGMP =	deoxyguanylová kyselina (2'-deoxyguanozin-5'-monofosfát).

Proteiny neboli **bílkoviny** jsou biopolymery tvořené jedním nebo více polypeptidovými řetězci. Jako **polypeptidy** (**polypeptidové řetězce**) označujeme polymery aminokyselin spojených navzájem peptidovými vazbami. Z aminokyselin, které tvoří polypeptidové řetězce, mají zásadní význam tzv. **standardní (kódované) aminokyseliny**. Jsou to aminokyseliny, které se zařazují do polypeptidového řetězce během translace na ribozomech. Je jich celkem 21, budeme-li počítat též nedávno zjištěný selenocystein.

Informace, podle níž se v buňce tvoří primární struktura proteinu, je obsažena v pořadí nukleotidů DNA a RNA. Pořadí (sekvence) nukleotidů se podle druhu nukleové kyseliny označuje jako **primární struktura DNA** nebo **RNA**. Podobně pořadí standardních aminokyselin v polypeptidovém řetězci tvoří **primární strukturu proteinů**.

Úsek polynukleotidového řetězce, který se vyznačuje určitým pořadím nukleotidů, se označuje jako **nukleotidová sekvence**. V tomto smyslu se rozeznává **DNA-sekvence** a **RNA-sekvence**. **DNA-sekvence** je úsek polydeoxyribonukleotidového řetězce vyznačujícího se určitým pořadím deoxyribonukleotidů. **RNA-sekvence** pak představuje úsek polyribonukleotidového řetězce vyznačujícího se určitým pořadím ribonukleotidů. Úsek polypeptidového řetězce vyznačující se určitým pořadím aminokyselin se označuje jako **aminokyselinová sekvence**.

Prostorové uspořádání makromolekuly do struktury, která je za daných

pod.
Info
uspo
konj
buň.

turn
ranj
neje
ci, s

maj
na i
vod
ktei
řeti
vla.

pH
látl
rea
kys
pol
nát
ric]

se
dar
náz
jeji
am

podmínek pro ni energeticky nejpříznivější, se označuje jako její **konformace**. Informační makromolekula má v dané konformaci určitý tvar a trojrozměrné uspořádání. I to má v biologii značný význam, neboť tvorba nejrozličnějších konformací, zvláště u proteinů, je základem rozmanitosti struktur a organel buňky (a také struktur virů).

V dalších částech této kapitoly se ve stručnosti rekapituluji jen ty strukturální vlastnosti informačních makromolekul, které mají vztah k tématům probíraným v této učebnici. Pro jejich snazší pochopení se doporučuje prostudovat nejdříve tuto kapitolu, jejíž poslední část, která pojednává o genetické informaci, se zabývá základními pojmy genetiky z hlediska molekulární biologie.

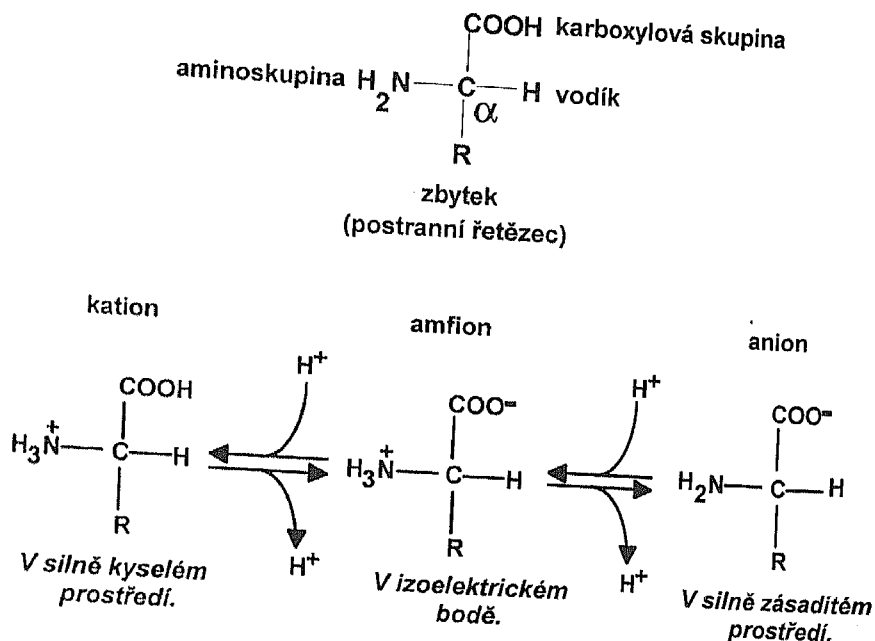
1.1 PROTEINY

1.1.1 Primární struktura proteinů

STANDARDNÍ AMINOKYSELINY. Všechny standardní aminokyseliny mají jednoho společného jmenovatele. Je to **uhlík α** , vyznačující se tím, že se na něj váže aminoskupina $-NH_2$ (u prolinu $-NH-$), karboxylová skupina $-COOH$, vodík a zbytek R neboli postranní (boční) řetězec (obr. 1). Jedině u glycinu, který je achirální, je zbytek R nahrazen vodíkem. Ve zbytku R či postranním řetězci se aminokyseliny navzájem liší. Tento zbytek určuje většinu chemických vlastností aminokyselin.

Molekuly aminokyselin mají **dipolární charakter**, a proto v závislosti na pH prostředí se mohou chovat jako kyseliny nebo zásady (obr. 1). Jsou tedy **látky amfoterní** neboli **amfolyty**. Tak nazýváme látky, jejichž molekuly mohou reagovat jako anionty v silně zásaditém prostředí a jako kationty v silně kyselém prostředí. Hodnota pH roztoku, v němž se amfolyt vyznačuje nulovou pohyblivostí v elektrickém poli neboli hodnota pH, při které má amfolyt nulový náboj (počet kladných a záporných nábojů je stejný), se označuje jako **izoelektrický bod**.

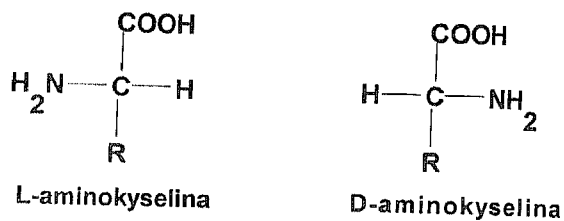
Kromě glycinu jsou všechny aminokyseliny **opticky aktivní**, tj. mohou se vyskytovat ve dvou enantiomerních izomerech (D- a L-řada) (obr. 2). Standardní aminokyseliny přísluší řadě L (obr. 3a a 3b). Na základě triviálních názvů aminokyselin uvedených na obr. 3a a 3b nemůžeme však usuzovat na jejich chemickou strukturu. K tomuto účelu nám poslouží chemické názvosloví aminokyselin uvedených na obr. 4.



Obr. 1
 Obecný vzorec aminokyseliny,
 chování aminokyseliny při různém pH

Velmi často se aminokyseliny klasifikují do těchto čtyř skupin:

1. Aminokyseliny s nepolárním zbytkem. Sem patří všechny aminokyseliny, které mají alkylový postranní řetězec. Jsou **hydrofobní**, tj. vyznačují se velmi nízkou afinitou k molekulám vody a jsou ve vodě méně rozpustné než ostatní aminokyseliny. Patří sem **glycin, alanin, valin, leucin, izoleucin, fenylalanin, tryptofan, metionin a prolin**. Glycin jako nejjednodušší aminokyselina má R-skupinu tvořenou pouze jedním atomem vodíku. Proto bývá též řazen mimo hydrofobní a hydrofilní skupinu do samostatné skupiny. Co se týče prolinu, je třeba mít na zřeteli, že není aminokyselinou, ale α -iminokyselinou, která



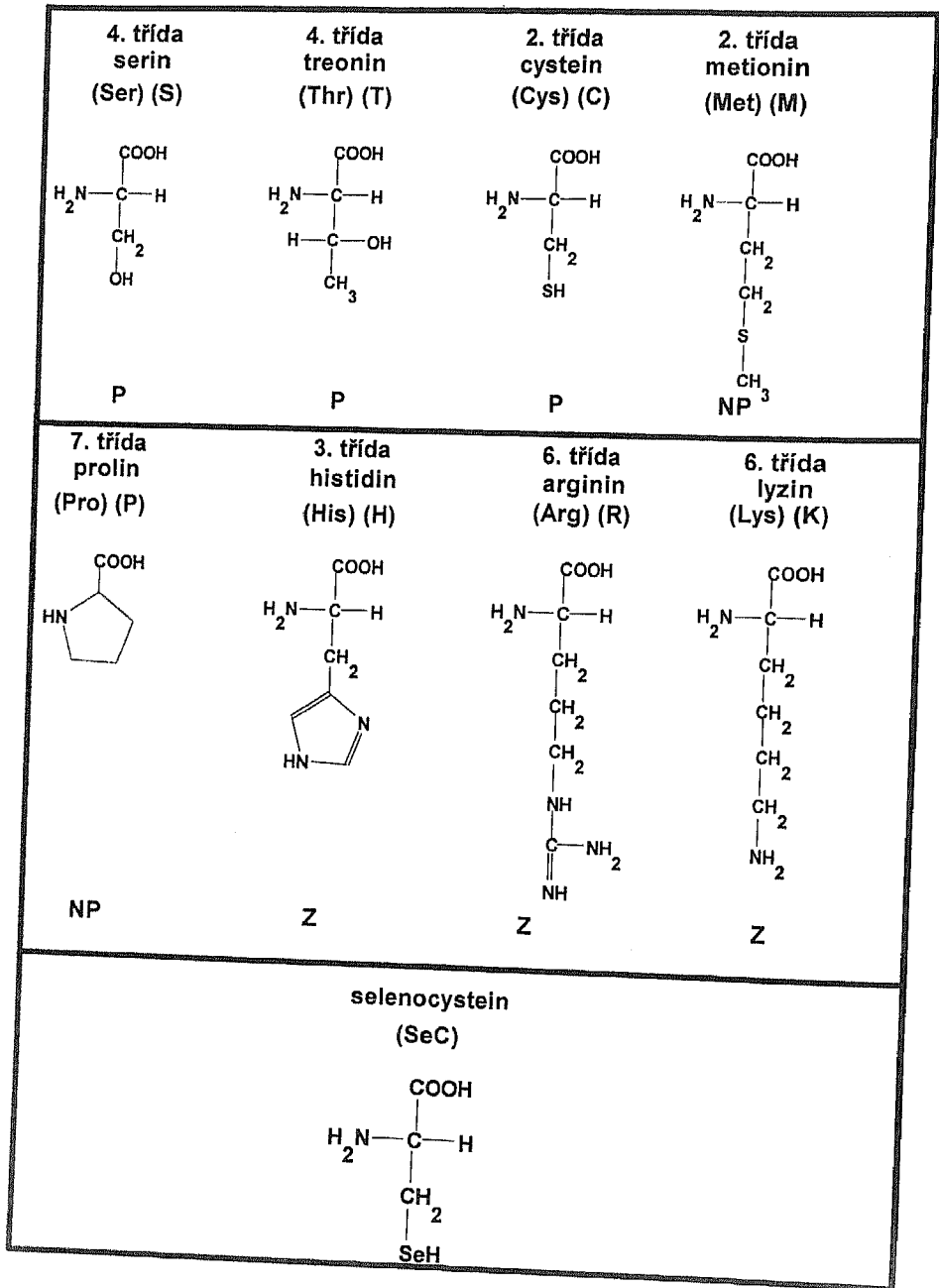
Obr. 2
 Projekční vzorce enantiomerů aminokyselin řady D a L

<p>1. třída glycin (Gly) (G)</p> $\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2 \end{array}$ <p>NP</p>	<p>1. třída alanin (Ala) (A)</p> $\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>NP</p>	<p>1. třída valin (Val) (V)</p> $\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \end{array}$ <p>NP</p>	<p>1. třída leucin (Leu) (L)</p> $\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \end{array}$ <p>NP</p>
<p>1. třída izoleucin (Ile) (I)</p> $\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C} \end{array}$ <p>NP</p>	<p>3. třída fenylalanin (Phe) (F)</p> $\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$ <p>NP</p>	<p>3. třída tyrozin (Tyr) (Y)</p> $\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{OH} \end{array}$ <p>P</p>	<p>3. třída tryptofan (Trp) (W)</p> $\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_8\text{H}_6\text{N} \end{array}$ <p>NP</p>
<p>5. třída asparagová kys. (Asp) (D)</p> $\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$ <p>K</p>	<p>4. třída asparagin (Asn) (N)</p> $\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CONH}_2 \end{array}$ <p>P</p>	<p>5. třída glutamová kys. (Glu) (E)</p> $\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$ <p>K</p>	<p>4. třída glutamin (Gln) (Q)</p> $\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CONH}_2 \end{array}$ <p>P</p>

NP = nepolární zbytek
 P = polární zbytek
 K = kyselý zbytek
 Z = zásaditý zbytek

V závorkách jsou uvedeny mezinárodně používané tří- a jednopísmenové zkratky. U každé aminokyseliny je uvedeno její zařazení do příslušné třídy.

Obr. 3a
 Standardní L-aminokyseliny



Obr. 3b
Standardní L-aminokyseliny

glycín	= α -aminooctová kyselina
alanín	= α -aminopropionová kyselina
valín	= α -aminoizovalerová kyselina
leucín	= α -amino- γ -methylvalerová kyselina
izoleucín	= α -amino- β -methylvalerová kyselina
fenylalanín	= α -amino- β -fenylpropionová kyselina
tyrozin	= α -amino- β -(<i>p</i> -hydroxyfenyl)propionová kyselina
tryptofan	= α -amino- β -(3-indolyl)propionová kyselina
asparagová kyselina	= α -aminojantarová kyselina
asparagin	= β -monoamid kyseliny asparagové
glutamová kyselina	= α -aminoglutarová kyselina
glutamin	= γ -monoamid kyseliny glutamové
serín	= α -amino- β -hydroxypropionová kyselina
treonín	= α -amino- β -hydroxymásečná kyselina
cystein	= α -amino- β -merkaptopropionová kyselina
metionín	= α -amino- γ -methylmerkaptomásečná kyselina
prolín	= pyrrolidin-2-karboxylová kyselina
histidín	= α -amino- β -(4-imidazolyl)propionová kyselina
arginín	= α -amino- δ -guanidinovalerová kyselina
lyzín	= α, ϵ - δ -laminokapronová kyselina

Obr. 4

Chemické názvosloví standardních aminokyselin

se svou NH-skupinou kovalentně zařazuje do polypeptidového řetězce, a proto se tato skupina nezúčastňuje tvorby vodíkových vazeb. Zbytky cysteinu v polypeptidovém řetězci mohou vzájemně reagovat za tvorby disulfidových vazeb, kterými jsou stabilizovány vyšší struktury proteinů.

2. Aminokyseliny s polárním zbytkem. Jsou **hydrofilní**, tj. *mají silnou afinitu k molekulám vody a ve vodě se dobře rozpouštějí. Všechny aminokyseliny, které mají polární zbytek, obsahují skupiny schopné tvořit s molekulami vody vodíkové vazby.* Patří sem **tyrozin, asparagin, glutamin, serin, treonin a cystein**. Amidová skupina asparaginu a glutaminu, hydroxylová skupina tyrozinu, treoninu a serinu jsou dobrými donory vodíku při tvorbě vodíkových vazeb.

3. Aminokyseliny s kyselým zbytkem. *Jsou to aminokyseliny, jejichž R-zbytek obsahuje karboxylovou skupinu.* Patří sem **kyselina asparagová a glutamová**. Karboxylové skupiny R-řetězců jsou méně kyselé než skupina α -COOH, což však postačuje, aby mohly při neutrálním pH existovat ve formě $-\text{COO}^-$.

4. Aminokyseliny se zásaditým zbytkem. Tyto aminokyseliny mají při

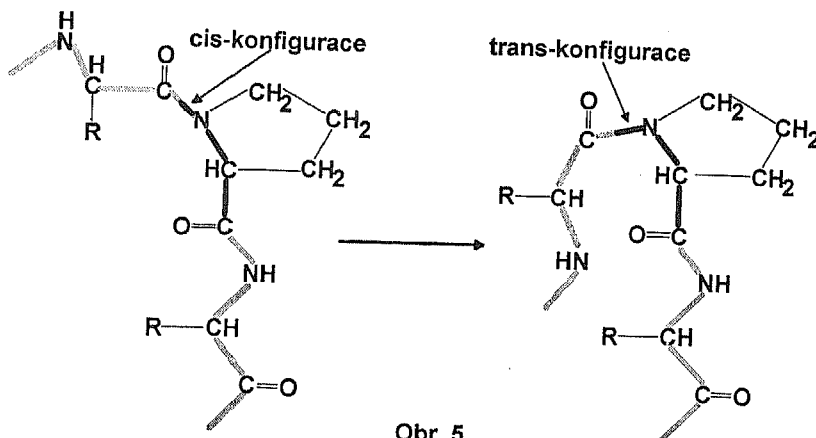
neutrálním pH v R-řetězci kladný náboj. Jsou to **histidin, arginin a lyzin**.

Jiné dělení aminokyselin je založeno na struktuře jejich postranních řetězců do těchto sedmi tříd:

1. třída - **alifatické aminokyseliny** (glycin, alanin, valin, leucin a izoleucin).
2. třída - **síru obsahující aminokyseliny** (cystein a metionin).
3. třída - **aromatické aminokyseliny** (fenylalanin, tyrozin, tryptofan a histidin).
4. třída - **neutrální aminokyseliny** (serin, treonin, asparagin, glutamin).
5. třída - **kyselé aminokyseliny** (kyselina asparagová a glutamová).
6. třída - **zásadité aminokyseliny** (lyzin a arginin).
7. třída - **iminokyselina** (prolin). Atom dusíku prolinu je stericky omezen kruhovou strukturou prolinu a navozuje cis-konfiguraci peptidové vazby mezi prolinem a jeho sousední aminokyselinou v polypeptidovém řetězci (obr. 5). Vlivem specifického enzymu však tato peptidová vazba přechází na energeticky příznivější konfiguraci trans, v níž pyrolidinový kruh prolinu způsobuje ohyb polypeptidového řetězce (bližší vysvětlení viz na str. 23 a 30).

Selenocystein je 21. standardní aminokyselina. Nedávno bylo zjištěno, že se zařazuje při translaci do proteinů, které se označují jako **selenoproteiny**. Selen má podobné vlastnosti jako síra, ale organické sloučeniny obsahující selen jsou mnohem reaktivnější než odpovídající sírné sloučeniny. Pro funkci řady enzymů je jeho přítomnost v těchto enzimech nezbytná. Zatím není zařazen do žádné třídy.

CHEMICKÁ MODIFIKACE STANDARDNÍCH AMINOKYSELIN. Po svém zařazení do polypeptidového řetězce bývají některé aminokyseliny často



Obr. 5
Vliv prolinu na ohyb proteinu

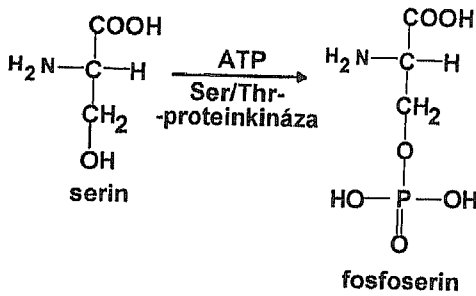
chemicky modifikovány a protein pak nabývá své biologické funkce až po této modifikaci, jejíž uskutečnění závisí na přítomnosti specifických enzymů, které ji katalyzují. Celkem jsou známy tyto chemické modifikace aminokyselin:

- ◆ **1. Fosforylace.** Spočívá v *připojení fosfátové skupiny k hydroxylové skupině serinu nebo tyrozinu a méně často k treoninu*. Protein, v němž byly tyto aminokyseliny fosforylovány, se pak označuje jako **fosfoprotein**. Fosfátová skupina zavádí do molekuly proteinu záporný náboj, což podstatně ovlivňuje elektrostatické chování proteinu (obr. 6).
- ◆ **2. Acetylace.** Spočívá v *zavedení acetylové skupiny do lyzinu* (obr. 6).
- ◆ **3. Metylace.** Spočívá v *zavedení metylové skupiny do lyzinu* (obr. 6). Též histidin se metyluje, a to na **3-methylhistidin** v aktinu.
- ◆ **4. Glykozylace.** Představuje *připojení oligosacharidu nebo heteropolysacharidu k aminové skupině asparaginu, serinu nebo glutaminu*. Proteiny, ve kterých taková modifikace aminokyseliny proběhla, se označují jako **glykoproteiny**. Připojení sacharidu se uskutečňuje některou z těchto vazeb (obr. 7):
 - a) **N-glykozidovou vazbou.** Tento způsob je charakteristický *vazbou oligosacharidu k azinokupině asparaginu*;
 - b) **O-glykozidovou vazbou.** Tento způsob je založen *na vazbě sacharidu k hydroxylové skupině serinu nebo treoninu*.
- ◆ **5. Hydroxylace.** Tato modifikace je známa u prolinu a lyzinu v kolagenu. Hydroxylaci se prolin modifikuje v kolagenu na **3-hydroxyprolin**, 4-hydroxyprolin a lyzin na **5-hydroxylyzin**.

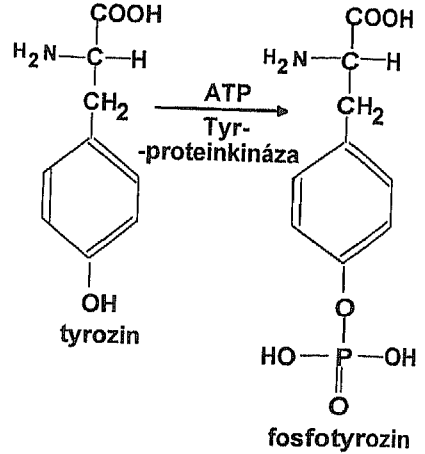
VZNIK PRIMÁRNÍ STRUKTURY PROTEINŮ. Skupina $-NH_2$ na uhlíku α jedné aminokyseliny reaguje se skupinou $-COOH$ na uhlíku α jiné aminokyseliny za vzniku **peptidové vazby** a vyloučení vody (obr. 8).

Jestliže se peptidovou vazbou spojí dvě aminokyseliny, vzniká sloučení, která se označuje jako dipeptid; peptid skládající se ze tří aminokyselin je tripeptid atd. Peptidy, které obsahují méně než deset aminokyselin, se obvykle označují jako **oligopeptidy** na rozdíl od **polypeptidů**, které se skládají z více než deseti aminokyselinových zbytků. Pro každý polypeptidový řetězec je charakteristické, že na uhlíku α je jeden konec řetězce tvořený skupinou $-NH_2$ a druhý skupinou $-COOH$. NH_2 -konec polypeptidu se označuje jako **N-konec polypeptidu**. Zakončení polypeptidu karboxylovou skupinou se označuje jako **C-konec polypeptidu**. Tvorba peptidové vazby je endergonický proces. Peptidová vazba se vyznačuje značnou vazebnou energií. Proto je polypeptidový řetězec velmi stabilní a hydrolyzuje se při teplotách nad $100^\circ C$ za přítomnosti silných kyselin nebo zásad. *Polypeptidový řetězec, který je páteří proteinů, je*

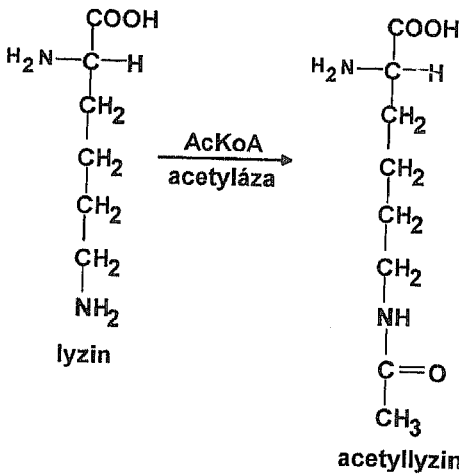
Fosforylace serinu.
Stejně je fosforylován treonin.



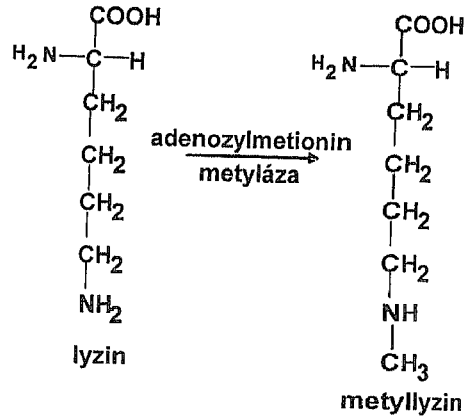
Fosforylace tyrozinu.



Acetylace lyzinu.



Metylace lyzinu.

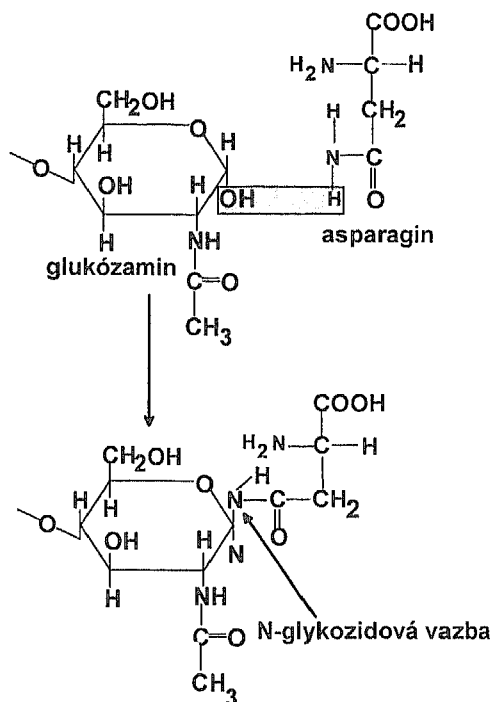


Na tomto obrázku jsou pro názornost uvedeny aminokyseliny jako volné molekuly. Je nutno mít však na zřeteli, že *in vivo* probíhají tyto reakce na aminokyselinových zbytcích jako součástech proteinových molekul. To platí i pro obr. 7.

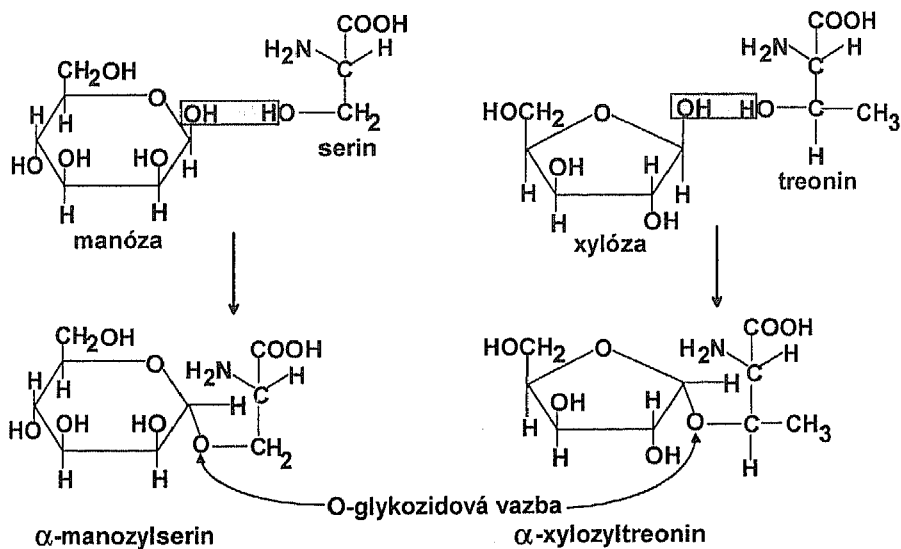
Obr. 6
Fosforylace, acetylace a metylace aminokyselin *in vivo*

makromolekula obsahující nejméně sto aminokyselinových zbytků dvaceti (případně 21, počítáme-li již mezi ně selenocystein) standardních aminokyselin. Některé proteiny obsahují jen jeden polypeptidový řetězec, jiné více. Polypeptidové řetězce většiny proteinů, jejichž struktura je známa, obsahují 100 i více aminokyselinových zbytků.

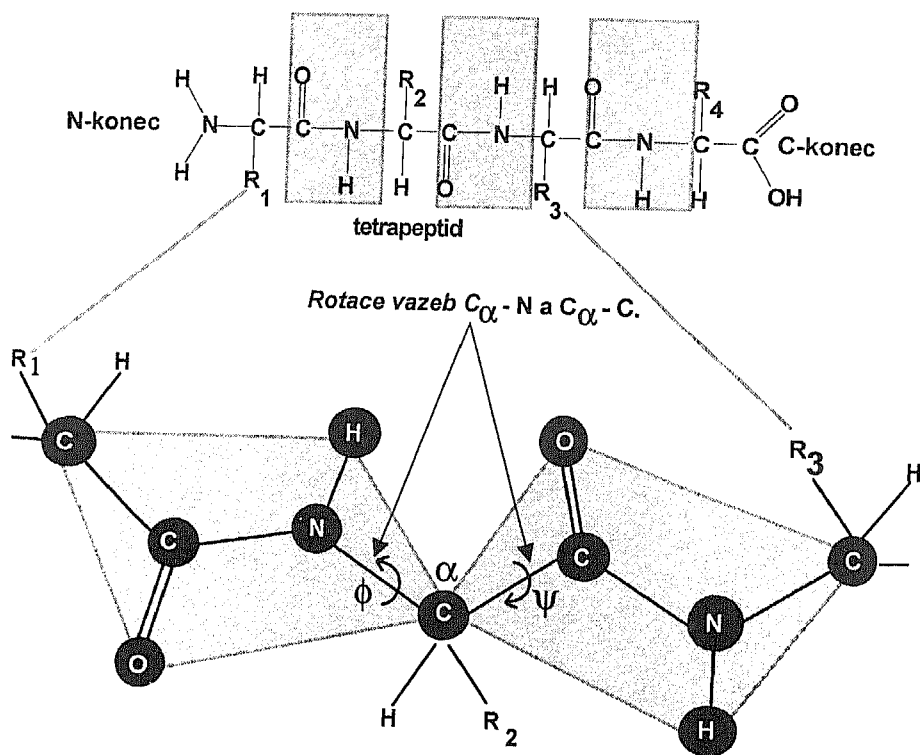
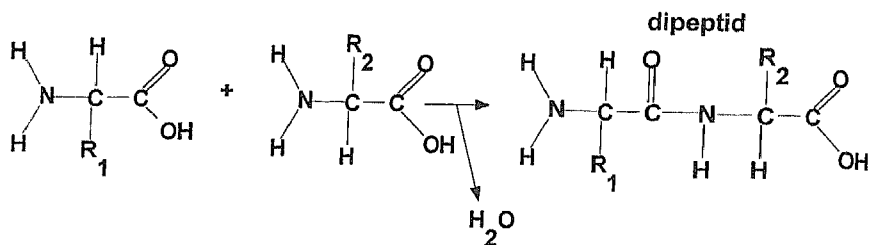
Připojení sacharidu N-glykozidovou vazbou k asparaginu.



Připojení sacharidu O-glykozidovou vazbou k serinu nebo treoninu.



Obr. 7
Schéma glykozylace



Všech 6 atomů, které se podílejí na peptidové vazbě, je koplanárních, tj. jsou ve stejné rovině.

Tato peptidová vazba má konfiguraci trans, tj. atomy O a H jsou na opačných stranách.

Pro úplně natažený polypeptidový řetězec, např. poly(Gly)

$$\phi = -180^{\circ} \text{ a } \psi = +180^{\circ}.$$

Obr. 8

Schéma tvorby primární struktury polypeptidu a konfigurace peptidové vazby

Atomy, které tvoří peptidovou vazbu, leží ve stejné rovině. Vzájemná poloha dvou sousedních rovin je dána velikostí torzních úhlů ϕ , tj. *otáčivostí podle vazby* $C_{\alpha}-N$ a ψ , tj. *otáčivostí podle vazby* $C_{\alpha}-C$.

Vlivem rotace peptidových vazeb $C_{\alpha}-N$ a $C_{\alpha}-C$ jsou možné dvě konfigurace peptidové vazby:

a) cis-konfigurace, což znamená, že *atomy O a H peptidové vazby jsou na stejné straně* (např. je-li $\phi = 0$ a $\psi = +180^{\circ}$ nebo $\phi = +180^{\circ}$ a $\psi = 0$),

b) trans-konfigurace, tj. *atomy O a H peptidové vazby jsou na opačných stranách* (např. je-li $\phi = -139^{\circ}$ a $\psi = +135^{\circ}$).

Energeticky je upřednostňována trans-konfigurace, jelikož vede k menší sterické zábraně aminokyselinových postranních řetězců než konfigurace cis. **Sterickou zábranou** se obecně rozumí *zábrana ve volné rotaci atomu nebo atomových skupin v molekule vlivem jejich velikosti nebo prostorového rozmístění*. Cis-konfigurace peptidové vazby vzniká v sousedství prolinu, jehož iminoskupina je součástí pyrolidinového kruhu (str. 18). Při zařazení do polypeptidového řetězce si vynucuje z důvodů sterické zábrany cis-konfiguraci peptidové vazby.

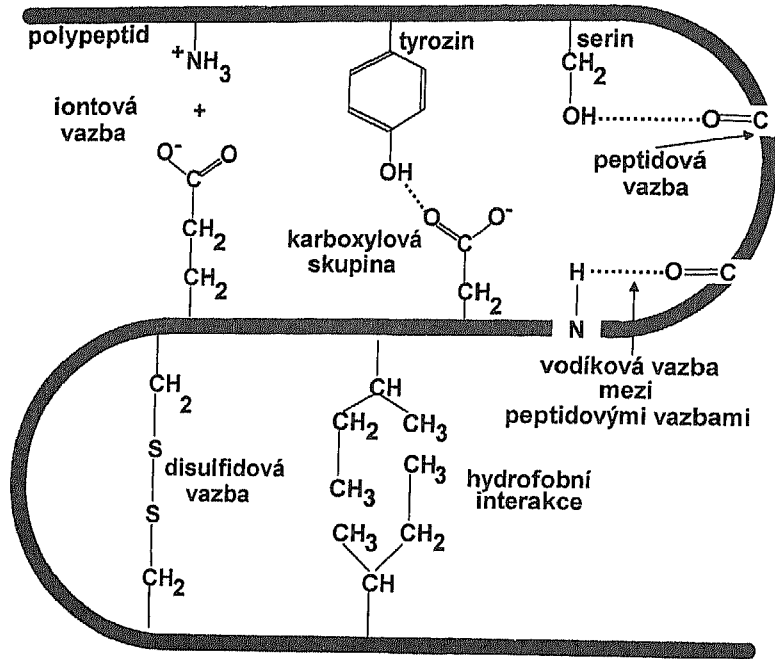
Celkově lze říci, že z důvodů sterické zábrany jsou pro daný postranní řetězec aminokyselinového zbytku jen určité kombinace torzních úhlů možné. *Tyto kombinace mají podstatný vliv na výslednou konformaci proteinové molekuly*.

BIOLOGICKÝ VÝZNAM PRIMÁRNÍ STRUKTURY PROTEINŮ.

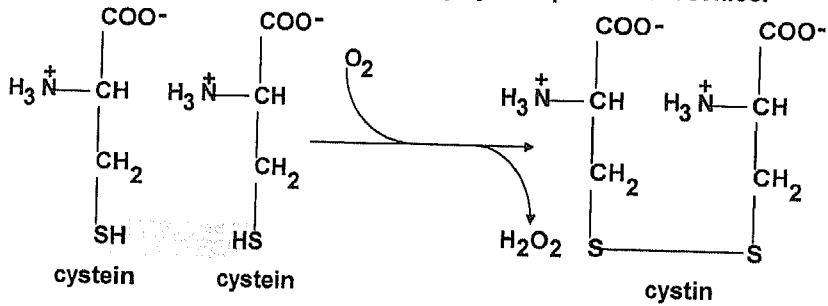
Základ specifičnosti každého proteinu spočívá v primární struktuře jeho polypeptidových řetězců. *Veškerá informace, potřebná pro tvorbu vyšších struktur proteinu a vyjádření jeho biologické funkce, je obsažena v primární struktuře proteinu (v sekvenci jeho aminokyselin). Tato struktura obsahuje informaci, podle které se tvoří sekundární, terciární a kvartérní struktura proteinů, realizuje se jejich nadmolekulární struktura a biologická funkce*. Jak jsou tyto typy struktur determinovány primární strukturou proteinu, je jedna z kardinálních otázek molekulární biologie a biochemie.

NEKOVALENTNÍ VAZBY (INTERAKCE) PROTEINŮ. Schopnost polypeptidových řetězců vytvářet různé typy struktur vyplývá z rozložení atomů nebo atomových skupin schopných tvořit nekovalentní interakce s atomy téhož polypeptidového řetězce nebo jiných řetězců. Jsou to (obr. 9):

- ◆ 1. Iontová vazba (vazba mezi aminoskupinou a karboxylovou skupinou).
- ◆ 2. Vodíková vazba mezi CO-skupinou jedné peptidové vazby a NH-skupinou vazby druhé ve stejném polypeptidovém řetězci nebo mezi různými.



Tvorbu disulfidové vazby si lze představit takto: Jestliže se roztok cysteinu nechá stát při pH 7 a pokojové teplotě za přítomnosti kyslíku, pak se za několik hodin vytvoří krystaly cystinu podle této rovnice:



Obr. 9

Nekovalentní vazby a disulfidová vazba v proteinech a mezi proteiny

- ◆ 3. Vodíková vazba mezi hydroxylovou skupinou tyrozinu a karboxylovou skupinou druhé aminokyseliny.
- ◆ 4. Vodíková vazba mezi hydroxylovou skupinou serinu a CO-skupinou peptidové vazby.
- ◆ 5. Interakce polárních skupin s vodou (hydratace).
- ◆ 6. **Hydrofobní interakce**, t.j. vazebné vztahy mezi hydrofobními skupinami.

Nekovalentní interakce mají na výsledné uspořádání proteinové molekuly značný vliv. Ve vodném prostředí jsou mnohem slabší než vazby kovalentní a jen poněkud silnější, než je energie srážek atomů a molekul při 37 °C. Proto se vodíková vazba velmi rychle vlivem tepelného pohybu molekul v prostředí přeruší. Avšak slabost jednotlivé vodíkové vazby je znásobena velkým počtem těchto vazeb v molekule proteinu, v důsledku kterých se protein stabilizuje do struktur, které za daných podmínek jsou pro něj energeticky nejpříznivější.

Výsledná struktura a konformace proteinové molekuly nezávisí však jen na rozložení atomových skupin schopných tvořit vodíkové vazby, ale také na umístění polárních a nepolárních postranních řetězců aminokyselin. *Nepolární řetězce mají tendenci se tlačit dovnitř proteinové molekuly a vyhnout se tak styku s vodním prostředím proteinu. Naproti tomu polární řetězce se řadí na vnější straně proteinu, kde vchází do nekovalentních interakcí s molekulami vody a jinými polárními molekulami.* Jsou tedy **hydrofilní** na rozdíl od nepolárních molekul, které jsou **hydrofobní**. Seskupování nepolárních postranních řetězců (hydrofobní interakce) směrem dovnitř molekuly proteinu má samozřejmě vliv na její celkový tvar a konformaci.

DISULFIDOVÁ VAZBA. U některých proteinů má vliv na jejich uspořádání do vyšších struktur disulfidová vazba, která se vytvoří mezi zbytky cysteinu uvnitř stejné molekuly proteinu. Tento proces probíhá spontánně, ale pomalu *in vitro* (obr. 9). V buňce proběhne za několik sekund, neboť je v ní katalyzován enzymem **proteindisulfidizomerázou** (zkr. PDI) (EC-5.3.4.1).

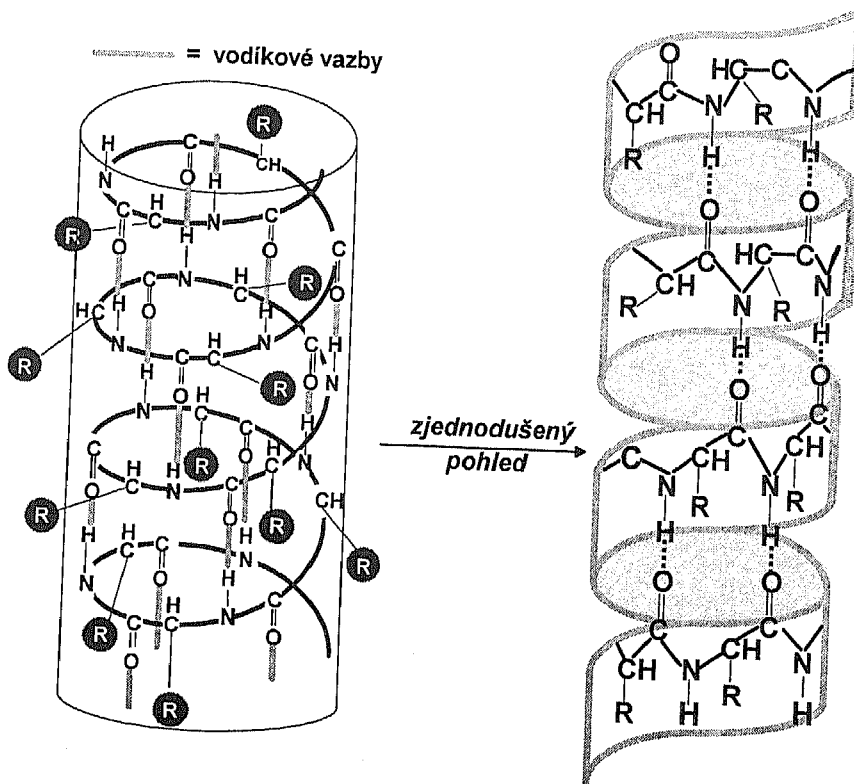
1.1.2

Sekundární struktura proteinů

SBALOVÁNÍ PROTEINŮ. *Proces, kterým se vytváří sekundární a terciární struktura proteinu, se označuje jako sbalování proteinu.* Probíhá vždy na jedné molekule polypeptidového řetězce, který se vlivem nekovalentních interakcí postupně sbaluje ještě během své syntézy na ribozomu do dále uvedených struktur. V podstatě má tento proces dvě fáze:

- ◆ 1. V první fázi se vytváří z flexibilního polypeptidového řetězce sekundární struktura.
- ◆ 2. Ve druhé fázi, která je relativně pomalá, se tvoří terciární struktury. Některé z těchto často spontánních cest k terciární struktuře by byly neproduktivní bez účasti dalších proteinů, které mají vliv na volbu správné konformace a označují se jako chaperony (str. 45).

α -ŠROUBOVICE (α -HELIX). Sekundární strukturou proteinu je uspořádání polypeptidového řetězce do α -šroubovice nebo β -struktury. Sbalování polypeptidu do α -šroubovice je tvorba vodíkových vazeb se vytvoří mezi CO- a NH-skupinami peptidových vazeb stočeného polypeptidového řetězce (obr. 10). Na každý závit (otáčku) v pravotočivé α -šroubovice připadají v průměru dvě vodíkové vazby uspořádané přibližně paralelně. Čím více vodíkových vazeb α -šroubovice obsahuje, tím je širší. Na jednu otáčku 360° připadá průměrně 3,6 zbytků aminokyseliny. Vzdálenost jednoho C_α od druhého je 0,15 nm. Na jeden závit (otáčku) průměrně připadá 0,54 nm, tj. $3,6 \times 0,15$. α -šroubovici lze promítnout pomyslného válce, jehož šířka je 1 nm. Postranní řetězce aminokyselin směřem ven na jeho obvodu a jsou hydrofilní. Ve schématech a modelích proteinů vyšších struktur se α -šroubovice znázorňuje většinou válcem, obvykle ne celá proteinová molekula je typu α -šroubovice. Z celkové struktury proteinu tvořeného jedním polypeptidovým řetězcem zaujímá tvar α -šroubovice



Obr. 10
Schéma α -šroubovice (helixu)

vždy jen jeho určitá část. Myoglobin je zhruba ze 75 % typu α -šroubovice. U fibrilárních proteinů typu α -keratinů (vlasy, nehty atd.) se α -šroubovice vyskytuje nejvíce. Počet aminokyselinových zbytků není u α -šroubovic různých proteinů stejný. Průměrně však připadá na jednu šroubovici 10 aminokyselinových zbytků.

Na tvorbě α -šroubovice se mohou podílet všechny aminokyseliny vyjma prolinu, jelikož tato aminokyselina má místo NH_2 -skupiny iminoskupinu NH , jejíž vodík se během tvorby peptidové vazby odštěpuje a není tedy k dispozici pro tvorbu vodíkové vazby.

β -STRUKTURA. *Uspořádání proteinů do β -struktury spočívá v tom, že jednotlivé úseky o 5 až 10 aminokyselinách téhož nataženého polypeptidového řetězce nebo více polypeptidových řetězců jsou položeny vedle sebe a spojeny vodíkovými vazbami mezi CO- a NH-skupinami peptidových vazeb (obr. 11a). Můžeme si je představit v rovině skládaného listu tak, že zbytky R aminokyselin vyčnívají kolmo k rovině listu. Do takové struktury označované jako β -skládaný list se mohou poskládat dva i více polypeptidových řetězců nebo se může tato struktura vytvořit v rámci stejného polypeptidového řetězce. Orientace poskládaných řetězců pak může být (obr. 11a a 11b):*

- ◆ **paralelní**, tzn. *směr od C-konce k N-konci poskládaných úseků nebo polypeptidových řetězců je stejný;*
- ◆ **antiparalelní**, tzn. *směr od C-konce k N-konci poskládaných úseků nebo polypeptidových řetězců je protichůdný.*

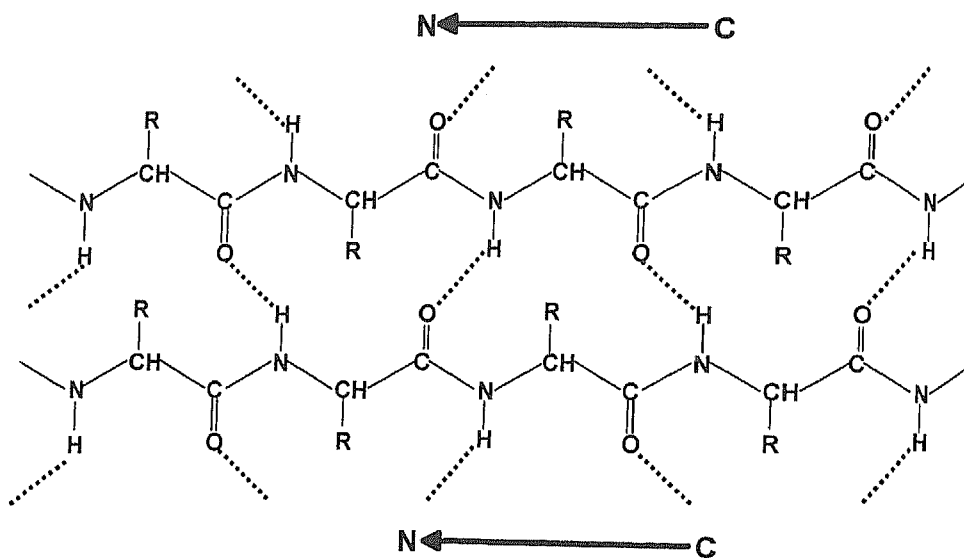
V modelech proteinových molekul se α -šroubovice vyjadřuje válcem a polypeptidové řetězce β -skládaného listu plochými šipkami (obr. 12).

1.1.3

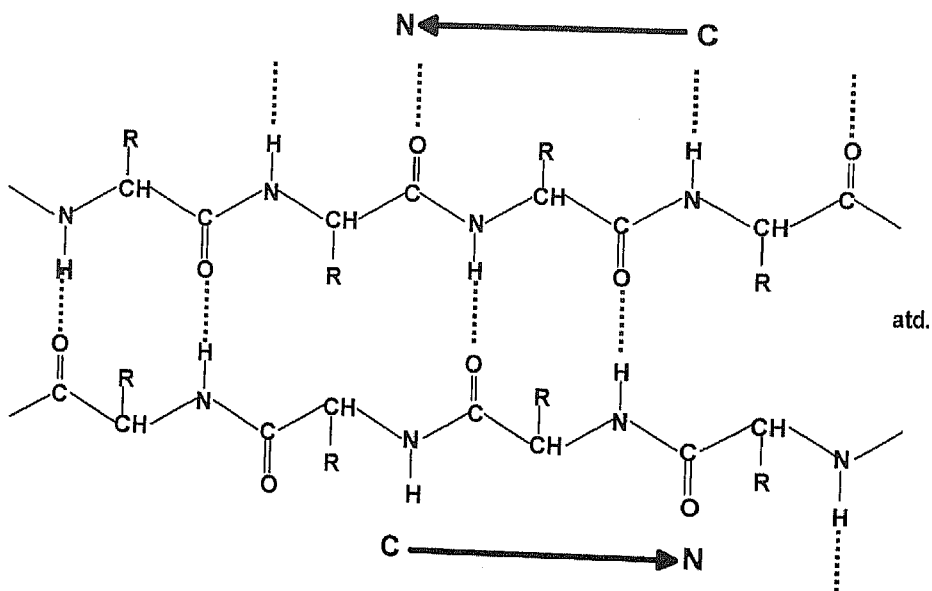
Vyšší struktury proteinů

TERCIÁRNÍ STRUKTURA PROTEINŮ. Takto se označuje prostorové trojrozměrné uspořádání polypeptidového řetězce. Příčinou takového uspořádání proteinu může být tvorba disulfidových můstků (S-S) mezi zbytky cysteinu uvnitř molekuly polypeptidu. Protože jsou tyto zbytky umístěny na stejném polypeptidovém řetězci, řetězec se zkroutí. *Hlavním důvodem pro vytvoření terciární struktury proteinů je však různost chemické povahy aminokyselinových postranních skupin schopných tvořit nekovalentní vazby. Postranní skupiny mají totiž tendenci nabýt energeticky nejvýhodnější interakce s jinými atomovými*

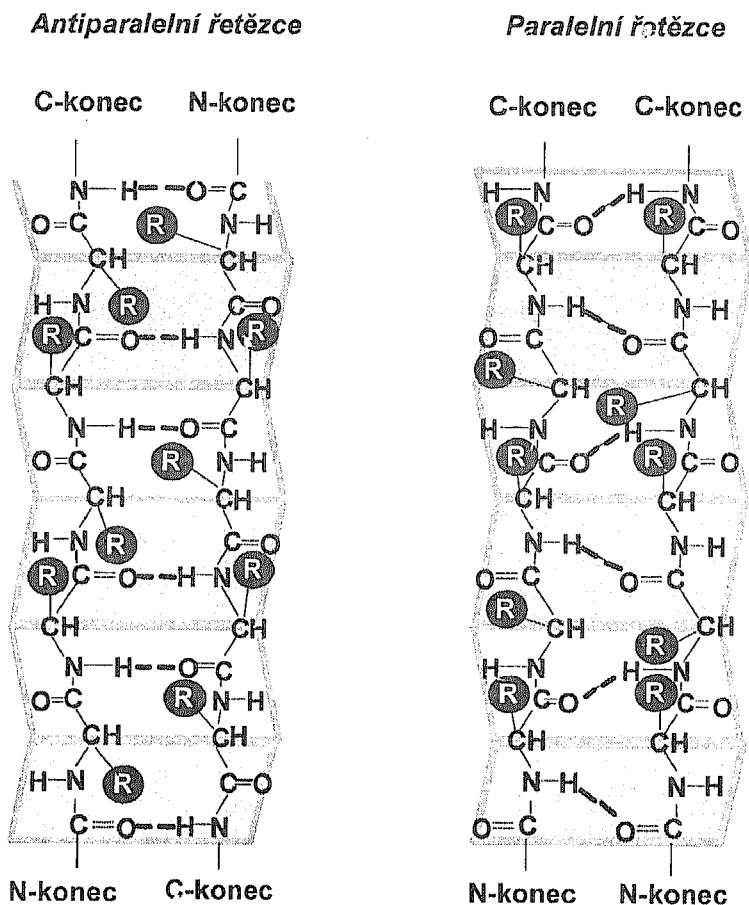
*Paralelní uspořádání polypeptidových řetězců
v β - skládaném listu.*



*Antiparalelní uspořádání polypeptidových řetězců
v β -skládaném listu.*



Obr. 11a
Schéma uspořádání polypeptidových řetězců v β -struktúře.

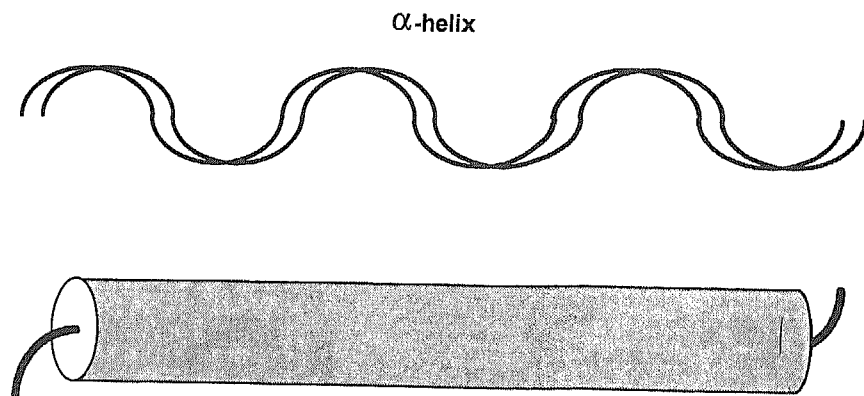
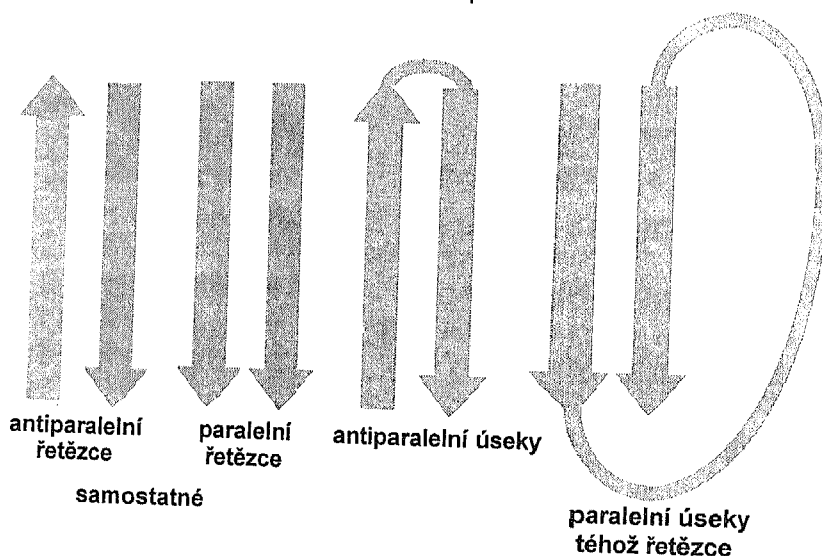


Obr. 11b
Schéma β -skládaného listu

skupinami. Podle terciární struktury se proteiny dělí na:

- ◆ **1. Globulární proteiny**, v nichž se střídají uspořádané α -šroubovice a segmenty typu β -skládaného listu s ostatními segmenty proteinu tak, že výsledkem je kompaktní klubko kulovitého tvaru.
- ◆ **2. Fibrilární proteiny**, v nichž převažují uspořádané segmenty typu α -šroubovice nebo β -skládaného listu.

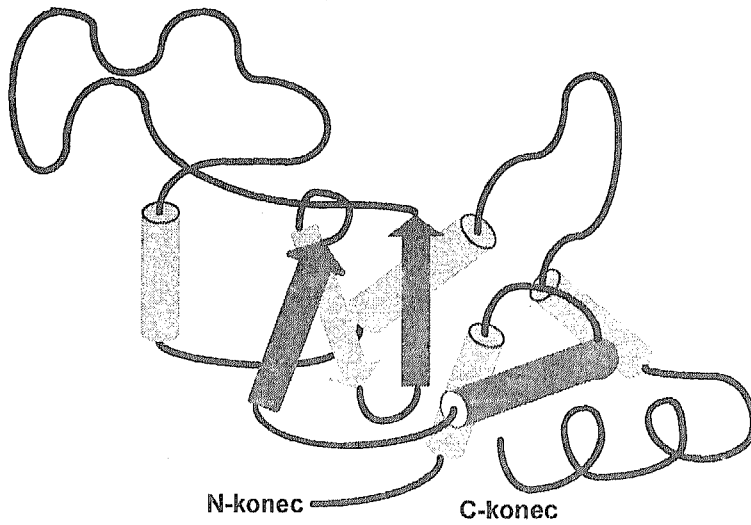
Na obr. 13 je uvedeno schéma molekuly lysozymu v terciární struktuře. Je z něho zřejmé, že obsahuje úseky α -helixů a β -struktur propojených lineárními úseky polypeptidu. Celá molekula je držena pohromadě vodíkovými vazbami a jinými nekovalentními interakcemi.

polypeptidové řetězce v β -strukturách

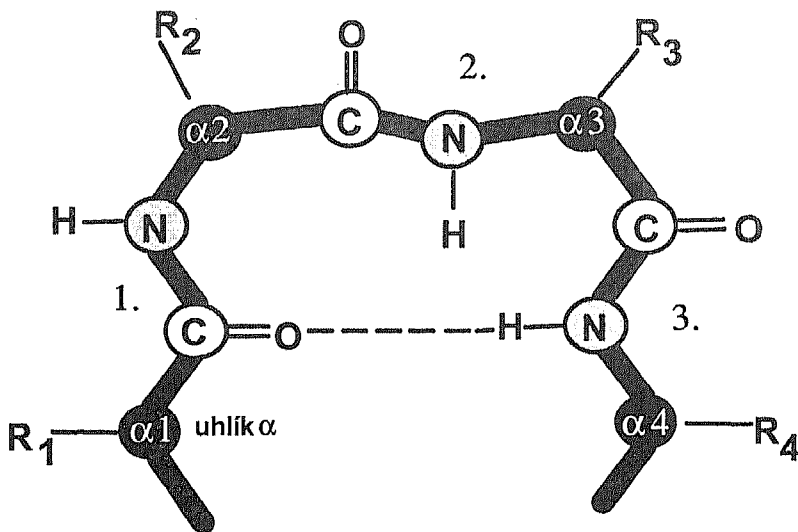
Obr.12

Schematické vyjádření α -helixu a polypeptidových řetězců β -struktur

β -OTÁČKA. Většina proteinů je globulárních. Polypeptidový řetězec musí mít proto schopnost ohybu a tvorby otáček, kterými nabývá kompaktní globulární struktury. V mnoha proteinech byly zjištěny úseky, v nichž polypeptidový řetězec tvoří pevné smyčky vlivem vodíkových vazeb, které se poděl něho tvoří mezi CO-skupinou jedné peptidové vazby a NH-skupinou následující jako třetí od této CO-skupiny. Úsek, v němž k tomuto dochází, se nazývá β -otáčka. Takové struktury jsou poměrně stabilní (obr. 14). Konformace β -otáčky závisí na její aminokyselinové sestavě. V β -otáčkách se často vyskytují aminokyseliny prolin a glycin. Proteiny obsahující prolin se sbalují velmi pomalu, jelikož



Obr. 13
Příklad terciární struktury proteinu - lysozym



Obr. 14
Příklad β -otáčky

peptidová vazba prolinu nebývá hned v polypeptidu ve správné konfiguraci. Vlivem sterické zábrany se nachází nejdříve v cis-konfiguraci. Avšak enzym **peptidylprolylizomeráza** katalyzuje přechod znázorněný na obr. 5, tj. z cis-konfigurace do konfigurace trans, což vede k ohybu polypeptidového řetězce.

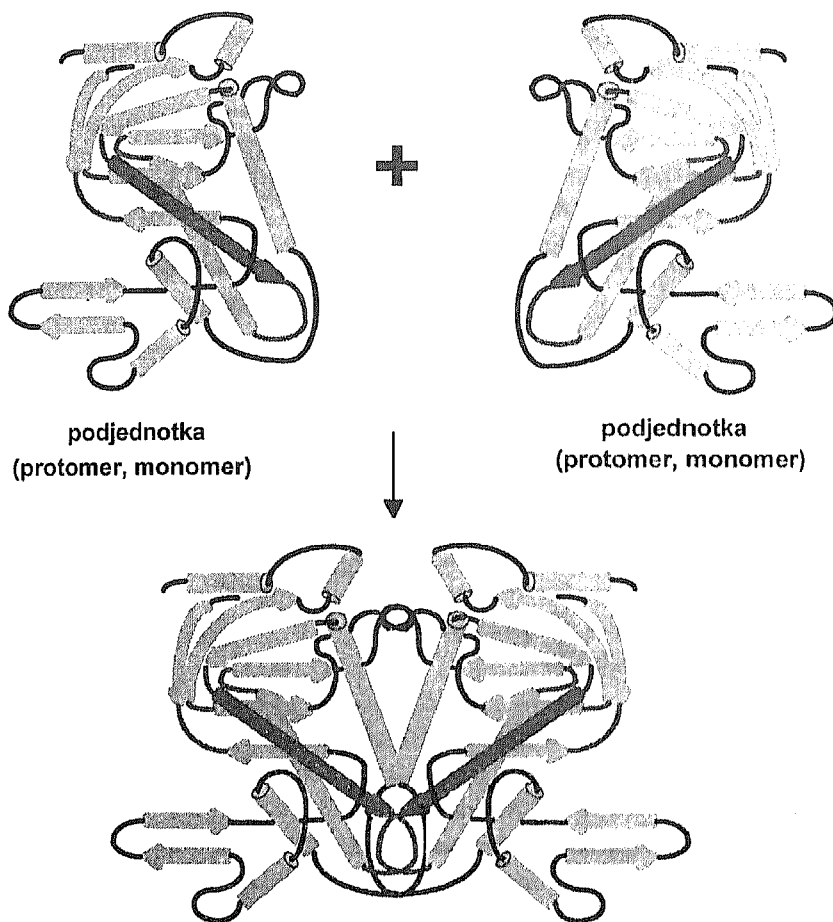
KVARTÉRNÍ STRUKTURA PROTEINŮ. Kvartérní struktura proteinů je způsob uspořádání jednotlivých polypeptidových řetězců v molekule proteinu. Týká se jen **oligomerních proteinů**, tj. proteinů tvořených více než jedním polypeptidovým řetězcem (**dimer** = dva řetězce, **trimer** = 3 řetězce, **tetramer** = 4 řetězce, **pentamer** = 5 řetězců atd.). *Podjednotky*, tj. jednotlivé polypeptidové řetězce oligomerního proteinu, se označují jako **protomery** (jedn. č. **protomer**) nebo též **monomery**. V této souvislosti upozorňujeme na to, že termínu "monomer" se používá ve dvou významech, a to ve významu základní stavební jednotky polymeru nebo ve významu proteinové podjednotky oligomerního proteinu.

Přestože je složen z více polypeptidových řetězců, chová se oligomerní protein v roztoku a v živé soustavě jako jedna molekula vyznačující se určitou biologickou funkcí (obr. 15).

PROTEINOVÉ DOMÉNY. Jako proteinová doména se označuje úsek proteinu, který je charakteristický určitou primární, sekundární a terciární strukturou určující v rámci proteinu specifickou funkci tohoto úseku. *Vzájemné působení domén v proteinové makromolekule je základem její biologické funkce jako celku.* Ukážeme to na příkladě CAP-proteinu. Je to protein, který v komplexu s cAMP aktivuje promotor laktózového operonu *E. coli* k vazbě RNA-polymerázy a tím i k zahájení transkripce (str. 244). Základním předpokladem realizace této jeho funkce je vazba cAMP na CAP-protein, čímž se tento protein aktivuje k vazbě na DNA. V tomto procesu se uplatňují dvě domény CAP-proteinu. Na jednu doménu proteinu CAP se váže cAMP. Touto vazbou se aktivuje druhá doména, kterou se CAP váže k DNA. Kromě toho na doménu pro cAMP se váže ještě druhá molekula stejného proteinu, takže se vytvoří dimer CAP-proteinu, který je teprve aktivní (obr. 16).

DENATURACE A RENATURACE PROTEINU. Obvykle se **denaturací informační makromolekuly** rozumí *vnějším vlivem vyvolaná úplná nebo částečná ztráta její původní konformace, aniž se přitom změní její primární struktura.* Opačný pochod je **renaturace**, tj. *obnova její původní konformace, jakou měla před denaturací.* Protein se denaturuje při neutrálním pH při vysokých teplotách, v kyselém nebo zásaditém prostředí nebo v koncentrovaném roztoku močoviny a jiných látek. *Při denaturaci ztrácí protein svou biolo-*

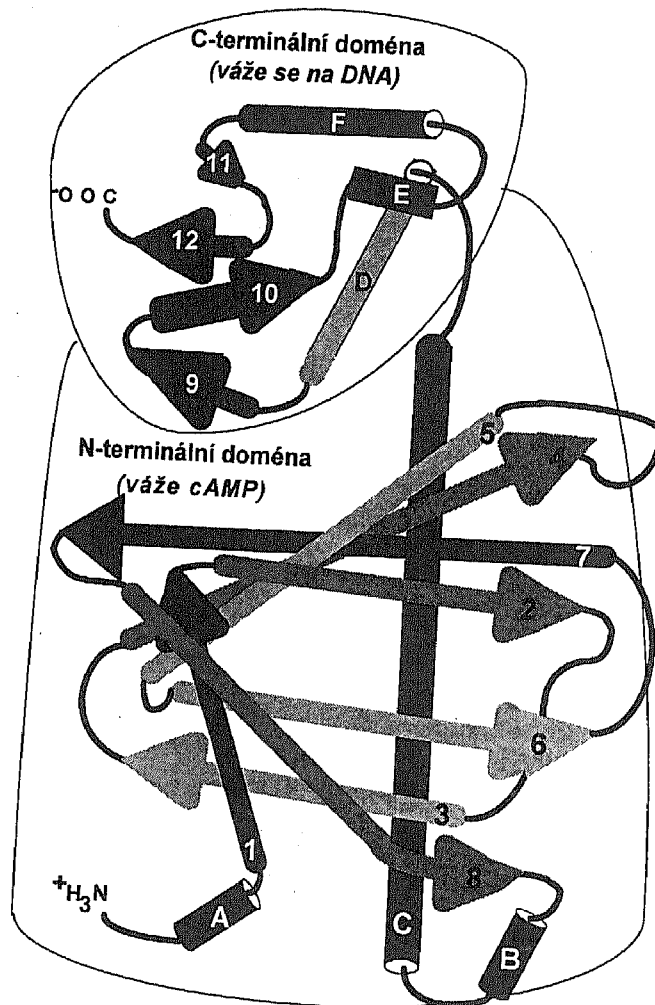
gickou funkci v důsledku ztráty sekundární a terciární struktury, přičemž jeho primární struktura zůstává zachována. Renaturuje se obvykle jen částečně nebo vůbec ne. Aby se obnovila specifická struktura a funkce proteinu, musí se denaturace a renaturace proteinu provést šetrně. Úspěšnost takových pokusů dokazuje, že informace pro tvorbu vyšších struktur proteinu je již dána primární strukturou proteinu. Vzpomeňme si na to, když budeme v dalším textu popisovat, jakým způsobem se z jednotlivých polypeptidových podjednotek sestavuje oligomerní protein a nadmolekulární struktury.



Spojením podjednotek, např. vodíkovými vazbami, vzniká dimer.

Stabilita výsledného proteinu závisí na počtu vodíkových vazeb.

Obr. 15
Schéma vzniku kvartérní struktury proteinu



Obr. 16
Příklad proteinových domén (CAP-protein)

1.1.4 Biologické funkce proteinů

ROZPOZNÁVACÍ FUNKCE PROTEINŮ. V důsledku toho, že se protei -

ny vyznačují schopností tvořit nekovalentní interakce, jak vyplývá z jejich primární struktury, mohou pomocí těchto interakcí rozeznávat nejrůznější molekuly. Termínem **rozpoznávání** rozumíme *proces specifického spojení dvou biologických makromolekul nebo biologické makromolekuly s malou molekulou, který spočívá v nekovalentních interakcích. Především důležité jsou vodíkové vazby*. Rozpoznávání je základem funkce proteinů jako enzymů vázajících substráty, receptorů vázajících hormony, imunoglobulinů vázajících antigeny a také jako stavebních podjednotek při výstavbě buněčných struktur, kde se proteiny musí navzájem pospojovat v souladu s architektonikou stavěné struktury.

Rozpoznávací funkce proteinů není omezena jen na výše vyjmenované případy. Biologicky významné je zvláště rozpoznávání nukleových kyselin proteinů.

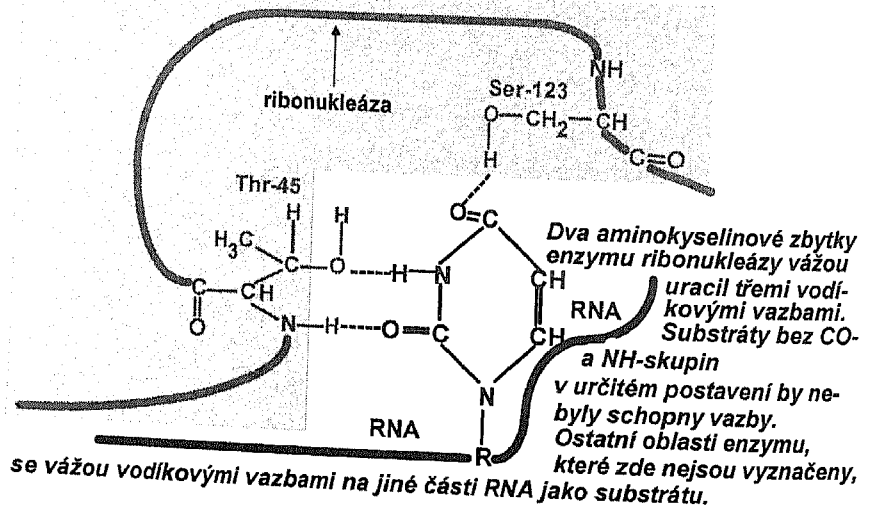
PROTEINY VE FUNKCI ENZYMŮ. Enzymovou funkci proteinů lze považovat za klíčovou, neboť proteiny mají tuto funkci ve všech živých soustavách. Jako **enzymy** se označují *proteiny, které urychlují (katalyzují) chemické reakce v živé soustavě a určují jejich směr a specifčnost*. Specifčností zde rozumíme to, že *každý enzym přeměňuje zcela určité látky. Látky, které se účinkem enzymů mění, se označují jako substráty*. Počet substrátů, mezi něž počítáme i intermediární produkty biochemických reakcí v buňce, je značný. Proto značný je i počet enzymů, kterými jsou tyto substráty přeměňovány. Odhaduje se, že živočišná buňka obsahuje průměrně 4 000 enzymů, z nichž každý katalyzuje jednu chemickou reakci nebo příbuzné chemické reakce. Některé enzymy se nacházejí ve většině buněk, neboť katalyzují syntézu základních produktů buňky, jiné enzymy se nacházejí jen ve specializovaných buňkách (např. jaterní buňky, nervové buňky atd.), v nichž katalyzují specifické biochemické reakce daného orgánu.

Interakce mezi enzymem a molekulami substrátů je vysoce specifická a příslušný enzym působí jen na určité substráty. Podstata této specifčnosti spočívá v trojrozměrné konformaci enzymu. Polypeptidový řetězec nebo řetězec enzymové molekuly jsou vzájemně poskládány takovým způsobem, že se vytvoří v enzymu tzv. **aktivní místo (centrum)**, které má svým tvarem a složením afinitu k určitému substrátu. Aktivní místo enzymu si lze zjednodušeně představit jako zámek, do něhož zapadá zcela určitý klíč (substrát). Sestává ze dvou funkčních oblastí. *Jedna oblast rozeznává a váže substrát a druhá po vazbě substrátu katalyzuje chemickou reakci*. Substrát se váže k enzymu většinou vodíkovými vazbami, van der Waalsovými silami nebo hydrofobními interakcemi. Aminokyseliny, které tvoří aktivní místo, obvykle nejsou v primární struktuře proteinu sousední. *Teprve sbalováním proteinové molekuly do terciární struktury se přiblíží i vzdálené aminokyseliny do postavení, které je stericky*

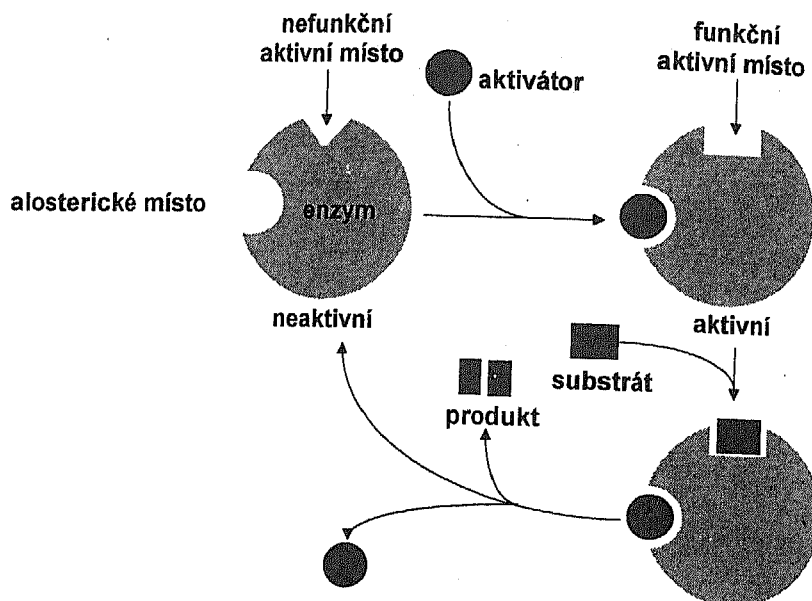
vhodné pro vazbu. Výměny aminokyselin v tomto místě při mutacích vedou pak k tomu, že enzym ztratí svoji katalytickou aktivitu, což se projeví ztrátou příslušné biochemické reakce v organismu.

Vztah substrátu k aktivnímu místu je vysvětlen na obr. 17, kde jako příklad je uvedena RNA jako substrát, která v místě, kde se v ní nachází uracil, má být štěpena enzymem ribonukleázou. Názvy enzymů mají koncovku *-áza*, která se přidává k názvu pro substrát přeměňovaný enzymem (např. již uvedená ribonukleáza) nebo podle povahy chemické reakce (např. dehydrogenáza, tj. enzym dehydrogenující substrát).

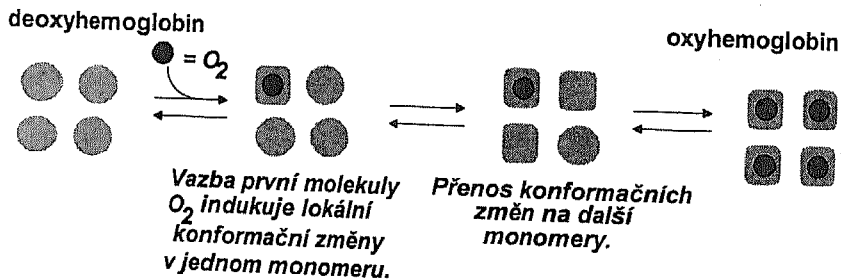
Ne všechny enzymy působí tak, že v aktivním místě molekuly enzymu dochází jednak k vazbě substrátu, jednak též k vlastnímu katalytickému účinku, tj. k přeměně substrátu. Mnohé enzymy potřebují ke katalytickému účinku ještě neproteinovou složku nazývanou jako **kofaktor**. Funkce kofaktorů v enzymových reakcích spočívá v přenosu atomů nebo elektronů z jednoho substrátu na další. *Kofaktor pevně vázaný na proteinovou složku enzymu se označuje jako prostetická skupina.* Příkladem prostetické skupiny je hemin v kataláze nebo peroxidáze. *Je-li kofaktor vázán slabě a může se od proteinové složky enzymu snadno oddělovat (disociovat), označuje se jako koenzym, přičemž proteinová složka enzymu se nazývá apoenzym. Komplex apoenzymu a koenzymu se označuje jako holoenzym.* Apoenzym musí mít specifické vazebné místo jak pro substrát, tak i pro koenzym. *Vazebné místo apoenzymu je však vždy specifické pro zcela určitý substrát, zatímco tentýž koenzym se může vázat na různé apoenzymy. Vlastní katalytickou reakci uskutečňuje koenzym, který obvykle slouží*



Obr. 17
Vazba substrátu enzymem vysvětlená
na štěpení RNA ribonukleázou



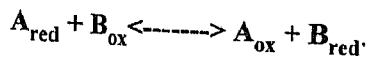
Obr. 18
Vliv aktivátorů na konformaci a aktivitu enzymu



Obr. 19
Změny konformace hemoglobinu při přechodu na oxyhemoglobin

váno 2 000 různých enzymů. Klasifikaci takového rozsahu zde pochopitelně nemůžeme uvádět. Uvedeme jen charakteristiku šesti tříd (EC 1 až 6):

1. **Oxidoreduktázy.** Katalyzují prostřednictvím koenzymů intermolekulární oxidačně redukční přeměny podle schématu:



2. **Transferázy.** Katalyzují pomocí koenzymů přenos skupin z jedné molekuly na druhou podle schématu:



3. Hydrolázy. Katalyzují přenos skupin na molekulu vody jako akceptoru podle schématu (štěpí hydrolyticky vazby vzniklé kondenzací):



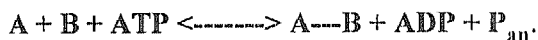
4. Lyázy neboli **syntázy** katalyzují nehydrolytické štěpení nebo tvorbu chemických vazeb podle schématu:



5. Izomerázy. Katalyzují intramolekulární přesuny atomů a jejich skupin, tedy vzájemné přeměny izomerů podle schématu:



6. Ligázy neboli **syntetázy** katalyzují tvorbu energeticky náročných vazeb za současné hydrolyzy ATP podle schématu:



DALŠÍ BIOLOGICKÉ FUNKCE PROTEINŮ. Vedle enzymové funkce mají proteiny v živé soustavě ještě tyto další funkce:

- ◆ 1. Tvoří strukturu základní cytoplazmy, ribozomů a jiných organel.
- ◆ 2. Zajišťují transport látek přes buněčné membrány.
- ◆ 3. Jako regulační proteiny řídí růst a diferenciaci buněk.
- ◆ 4. Ve funkci tzv. kontraktilních proteinů působí při pohybových mechanismech buněčných struktur.
- ◆ 5. Fibrilární elastické proteiny jsou součástí podpůrných pletiv.
- ◆ 6. Uplatňují se jako přenašeči specifických signálů v rámci vnitrobuněčné, mezibuněčné a organismální komunikace.
- ◆ 7. Uplatňují se jako protilátky (imunoglobuliny) v imunitní obraně.
- ◆ 8. Působí jako receptory v membráně buňky.

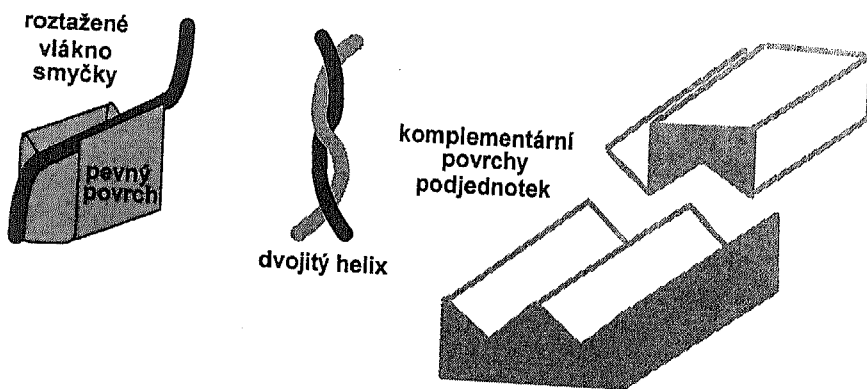
Závěrem lze říci, že všechny životní projevy a vlastnosti živých soustav jsou spojeny s činností proteinů jako výkonných nástrojů buněk. Proto také dědičné chemické defekty ve struktuře proteinů se v živých soustavách projevují negativně.

1.1.5

Sestavování oligomerních proteinů a nadmolekulárních struktur

INTERAKCE PROTEINOVÝCH PODJEDNOTEK. Oligomerní proteiny a nadmolekulární struktury, jako jsou enzymové komplexy, ribozomy, proteinové filameny, membrány aj., se sestavují v buňce spojováním menších podjednotek (polypeptidových řetězců, jejichž terciární struktura je globulární nebo fibrilární) hlavně nekovalentními interakcemi. Vazba mezi podjednotkami vytvářejícími strukturu vyššího typu se uskutečňuje třemi způsoby (obr. 20):

- ◆ 1. Vazbou povrchu jedné podjednotky na roztažené vlákno smyčky druhé podjednotky.
- ◆ 2. Vzájemným ovíjením dvou a více α -helixů, z nichž každý je součástí jiné podjednotky; takovým vzájemným ovíjením se vytváří superhelixy a protofibrily keratinů vlasů a kolagenů kůže.



Obr. 20
Typy vazebných interakcí mezi podjednotkami vytvářejícími nadmolekulární proteinovou strukturu

jako přenašeč funkčních skupin z jednoho substrátu na druhý. Apoenzym určuje výběr substrátu.

Některé funkční skupiny aminokyselinových zbytků, důležité pro reakci, nejsou v aktivním místě v poloze optimální pro katalýzu do té doby, dokud se molekula substrátu nenaváže na enzym. Vazebná afinita k substrátu nutí enzym do konformace, v níž katalytické skupiny nabývají příznivé geometrické polohy za vzniku přechodného aktivního stavu enzym-substrát. Enzymová molekula je v této **aktivní konformaci** nestabilní a má tendenci přejít za nepřítomnosti substrátu do volné formy.

Některé enzymy jsou **alosterické**. Jsou to enzymy, které mají jednak aktivní místo, na které se váže substrát a jednak alosterické místo, ke kterému se váže alosterický efektor. **Alosterické efekторы** jsou malé molekuly, které svou vazbou na alosterické místo proteinové molekuly vedou k tzv. **alosterickému efektu**. **Alosterický efekt** je reverzibilní změna v konformaci proteinu, což znamená, že po uvolnění efektoru nabývá protein své původní konformace; touto konformační změnou se mění interakce proteinu s jinou molekulou. U proteinů, které jsou ve funkci enzymů, způsobují alosterický efekt tzv. **aktivátory**, které vazbou na molekulu enzymu zvyšují aktivitu enzymu. Aktivátor indukuje konformační změnu v terciární struktuře enzymu, která zasahuje až k aktivnímu místu enzymu a usnadní vazbu k substrátu. Po uvolnění z alosterického místa nabývá enzym své původní konformace projevující se snížením aktivity enzymu. *Celkově řečeno, vazbou aktivátorů k alosterickému místu se enzym aktivuje a jejich uvolnění z tohoto místa vede opět k inaktivnímu stavu enzymu* (obr. 18). Alosterický efekt se však nepozoruje jen u proteinů, které mají enzymovou funkci, ale i u proteinů, které mají i jiné biologické funkce (např. hemoglobin). V kapitole, která pojednává o regulaci exprese prokaryotického genomu, se budeme podrobněji zabývat vztahy alosterických efektorů k regulačním proteinům. Příkladem takových proteinů je represor, který po vazbě alosterického efektoru mění svou konformaci a tím i vztah k regulační oblasti na DNA bakterií.

Alosterický efekt se často vyskytuje i u oligomerních proteinů. V molekule hemoglobinu se kyslík nejdříve naváže na jednu podjednotku a způsobí konformační změnu, která se pak rozšíří do dalších tří podjednotek (obr. 19).

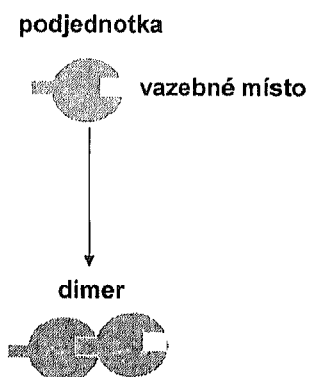
KLASIFIKACE ENZYMŮ. Každý enzym je uveden v katalogu enzymů pod čtyřmístným **EC-číslem (systémové číslo)**. První číslo vyjadřuje příslušnost do jedné ze šesti tříd. Další dvě čísla znamenají podtřídou a skupinu atd. Např. laktátdehydrogenáza má EC-číslo 1.1.1.27, což znamená, že patří do třídy 1 (oxidoreduktázy), podtřídy 1.1 (CH-OH-skupina jako donor elektronů), další podtřídy 1.1.1 (dehydrogenázy, akceptorem H je NAD^+) a konečně zařazení do skupiny 27 ji specifikuje jako laktátdehydrogenázu. Takto je zhruba klasifiko-

- ◆ 3. Spojením komplementárních pevných povrchů dvou různých podjednotek.

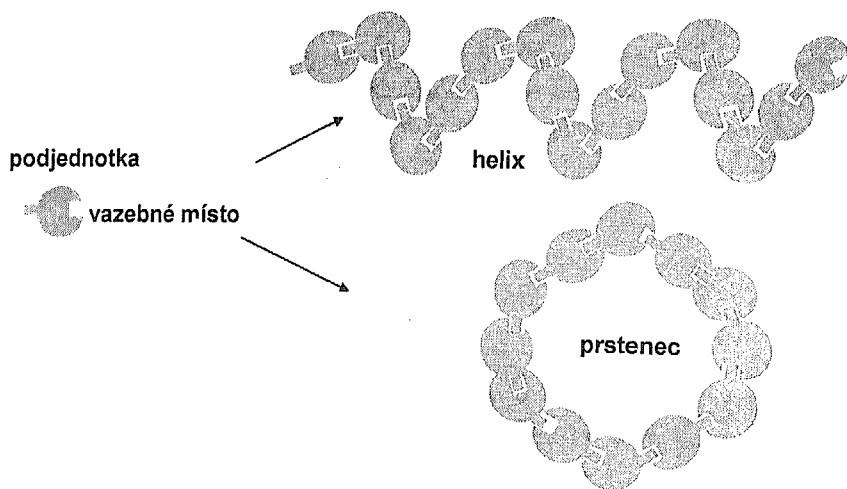
Vzájemnou vazbou dvou podjednotek se obvykle zvýší afinita k třetí podjednotce. Komplex o třech podjednotkách je pak stabilnější než komplex složený ze dvou podjednotek. Jestliže jsou podjednotky navzájem v potřebných poměrech, vytvoří se kompletní výsledná struktura ze všech podjednotek. V realitě vnitřního buněčného prostředí však k tomu dochází asi zřídka, a proto zůstává část podjednotek volná. Tyto podjednotky jsou odbourány proteázami, k čemuž slouží v buňce zvláštní systém, který je popsán dále.

TVORBA DIMERNÍCH PROTEINŮ. Jestliže se globulární podjednotka vyznačuje vazebným místem, které je komplementární k jinému místu vlastního povrchu, mohou se pak spojit molekuly stejného druhu prostřednictvím těchto míst za tvorby dimeru. Mnoho enzymů a jiných proteinů tvoří tímto způsobem dimery (obr. 21). *Dimery mohou pak dále sloužit jako podjednotky k tvorbě ještě vyšších proteinových komplexů a nadmolekulárních struktur.*

TVORBA FILAMENTŮ. Filamenty jsou vláknité proteiny, které se tvoří většinou z podjednotek, jejichž terciární struktura je globulární. Taková podjednotka obsahuje vazebné místo, jež je komplementární ke specifické oblasti jejího vlastního povrchu. To umožňuje, aby se postupně molekuly spojily za tvorby helikálních filamentů nebo prstenců. Příkladem je aktinový filament, jehož helikální strukturu tvoří řada polypeptidových řetězců. Aktinové filamenty jsou hlavními složkami cytoskeletu eukaryotických buněk (obr. 22).



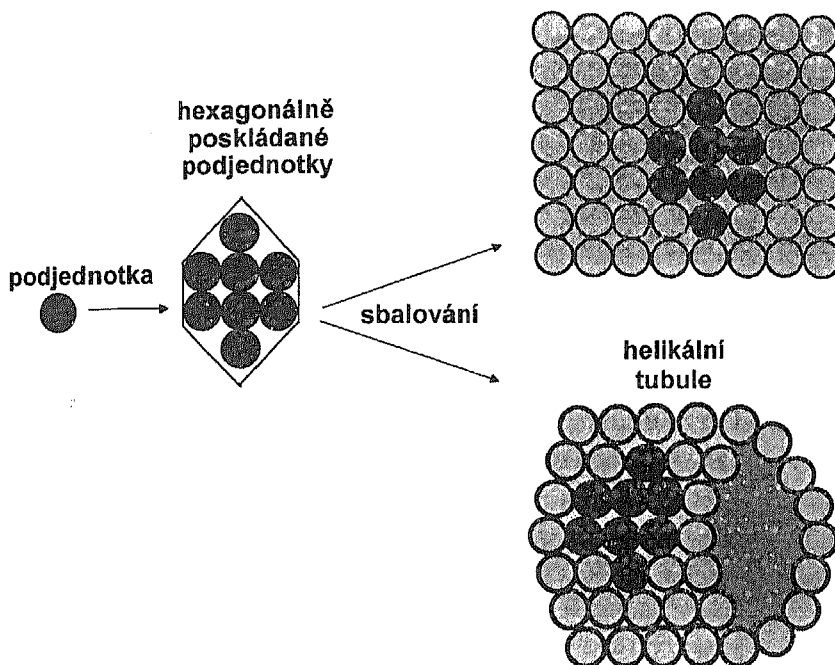
Obr. 21
Tvorba dimeru ze dvou stejných
proteinových podjednotek



Obr. 22
Tvorba helikálních filamentů a prstenců
ze stejných vzájemně se vážajících podjednotek

TVORBA PLÁTOVÝCH A TUBULÁRNÍCH PROTEINOVÝCH STRUKTUR. Některé proteiny se tvoří spojováním podjednotek do plochých struktur, které mají vzhled plátů hexagonální symetrie. Takto jsou utvářeny např. proteiny, které jsou součástí lipidové dvojvrstvy v membránách. Kapsidy některých virů jsou proteinové komplexy tubulárního tvaru (obr. 23).

SAMOSESTAVOVÁNÍ. Většina nadmolekulárních proteinových struktur se sestavuje ze svých monomerů bez jakékoli vnější instrukce. Děje se to procesem **samosestavování**, tj. *spontánním seskupováním proteinových podjednotek (polypeptidových řetězců globulárních nebo fibrilárních) a jejich spojováním nekovalentními interakcemi za vzniku nadmolekulárních proteinových struktur.* Informace pro tvorbu těchto struktur je obsažena v jejich podjednotkách, jelikož za vhodných podmínek se mohou spontánně *in vitro* spojit do příslušné sestavy. Příkladem nadmolekulárních proteinových struktur, které se tvoří procesem samosestavování je tubulární kapsid viru tabákové mozaiky nebo ribozom. Kapsid viru tabákové mozaiky je výsledkem seskupování stejných podjednotek kolem jedné molekuly RNA, kdežto prokaryotický ribozom je sestaven z různých proteinových podjednotek a 3 molekul rRNA. Tyto podjednotky se mohou s molekulami RNA spojit do struktury aktivního ribozomu též *in vitro*. Tento proces samosestavování probíhá tak, že nejdříve se některé proteiny vážou na RNA a teprve tento komplex je rozeznáván dalšími proteiny za tvorby celého ribozomu.

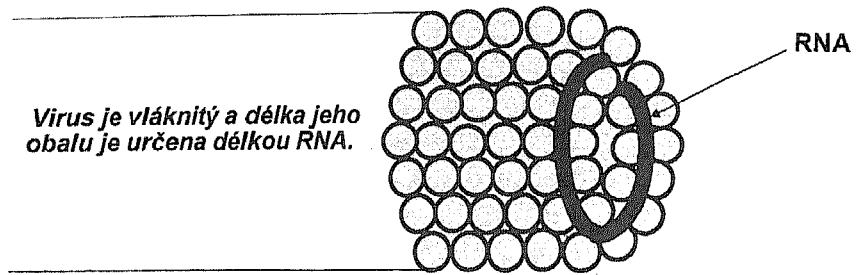


Obr. 23
Tvorba plochých a tubulárních struktur

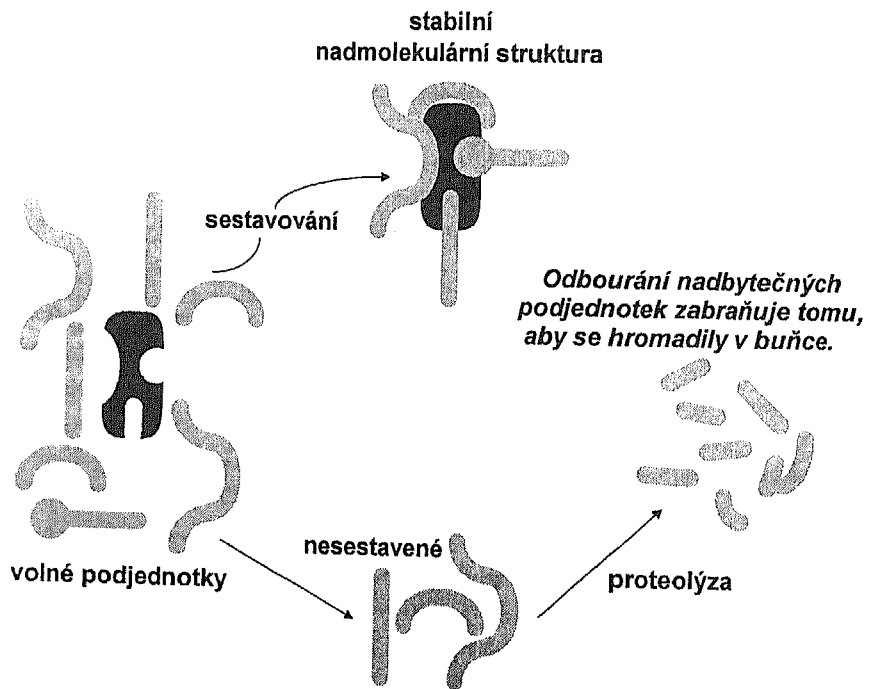
Avšak ne všechny buněčné struktury se tvoří tímto způsobem. To se týká např. mitochondrií, cílí a myofibril. Tyto orgány se nemohou spontánně utvořit ze svých složek, jelikož část informace pro jejich sestavení je obsažena ve specifických enzymech a buněčných proteinech, které působí jako matrice pro jejich sestavování a nezabudovávají se do výsledného produktu. Např. hlavová součást kapsidu některých bakteriálních virů, která se skládá ze stejných proteinových podjednotek, se sestavuje na dočasné matrici z proteinu, který nevchází do konečné sestavy hlavy.

Je dosud záhadou, jakým způsobem je celý proces samosestavování nadmolekulárních struktur regulován. U takových struktur, jako je např. obal viru tabákové mozaiky, se zdá, že velikost obalu je určena délkou RNA, kolem které se obal tvoří (obr. 24).

PROTEAZOMY. Jednou z funkcí intracelulárních proteolytických mechanismů je rozpoznání a odstranění nedokončených proteinových struktur, poškozených struktur nebo špatně sbalených proteinů. Musí být také odbourány



Obr. 24
Schéma nadmolekulární struktury viru tabákové mozaiky



Obr. 25
Tvorba stabilních nadmolekulárních struktur
a odbourání nadbytečných podjednotek

nadbytečné proteiny, jejichž koncentrace se mění v závislosti na stavu buňky (obr. 25). Většina těchto proteinů se dopravuje do velkých proteinových komplexů nazývaných **proteazomy**, které jsou v mnoha kopiích rozptýleny po celé buňce. Každý proteazom se skládá z centrálního válce, vytvořeného z mnoha odlišných proteáz, jejichž aktivní místa směřují do vnitřního prostoru válce. Oba konce válce jsou tvořeny alespoň 10 typy polypeptidů, z nichž některé hydrolyzují ATP. Předpokládá se, že tyto polypeptidy vybírají k odbourání proteiny tak, že jimi naplní vnitřní prostor válce, kde se proteázami rozloží na krátké peptidy, které jsou pak vyloučeny do prostoru mimo válec.

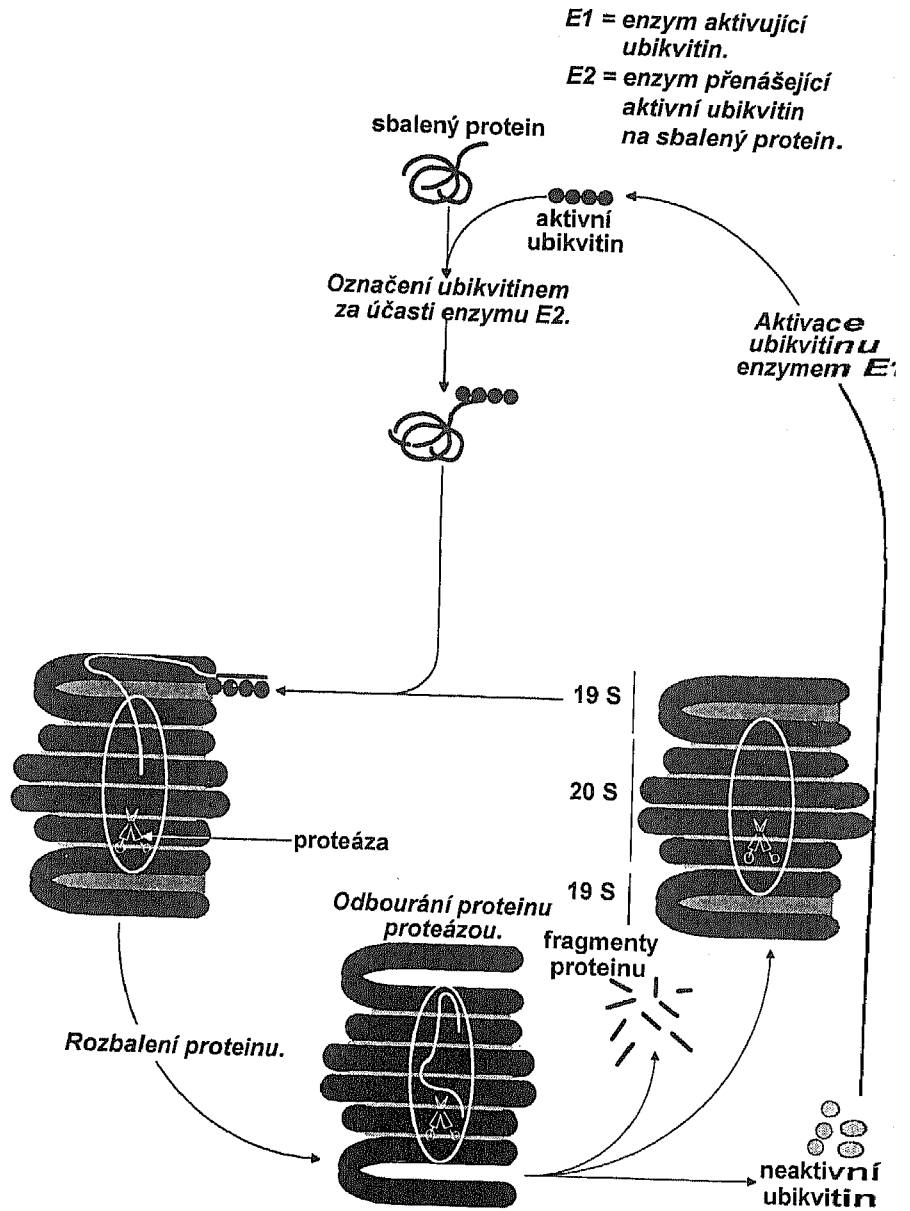
Proteazomy působí na proteiny, které byly specificky pro odbourání označeny tím, že se na ně kovalentně připojil malý protein nazývaný **ubikvitin**. *Tímto proteinem jsou rozeznávány chybně poskládané proteiny nebo neúplně sestavené nadmolekulární proteinové struktury.* Ubikvitin však musí být nejdříve aktivován, což se děje enzymem E1. Druhý enzym, E2, přeneše aktivní ubikvitin na nadbytečný sbalený protein, který je pak dopraven do proteazomu, kde se rozloží proteázami. Schéma cyklu ubikvitinu je uvedeno na obr. 26.

MOLEKULÁRNÍ CHAPERONY (čti ve francouzské výslovnosti "šaprony"). Chaperon je původně francouzské slovo přejaté i s jeho významem *gardé d'armes* do angličtiny. *Molekulární chaperon je protein, kterým je v buňce doprovázeno sbalování polypeptidového řetězce a sestavování podjednotek (monomerů) do oligomerů a nadmolekulárních struktur, a to tím způsobem, že rozeznává povrchy interagujících monomerů a zabraňuje jejich spojování do nefunkčních agregátů.* Chaperon není tedy součástí výsledného oligomeru nebo nadmolekulárního proteinového komplexu.

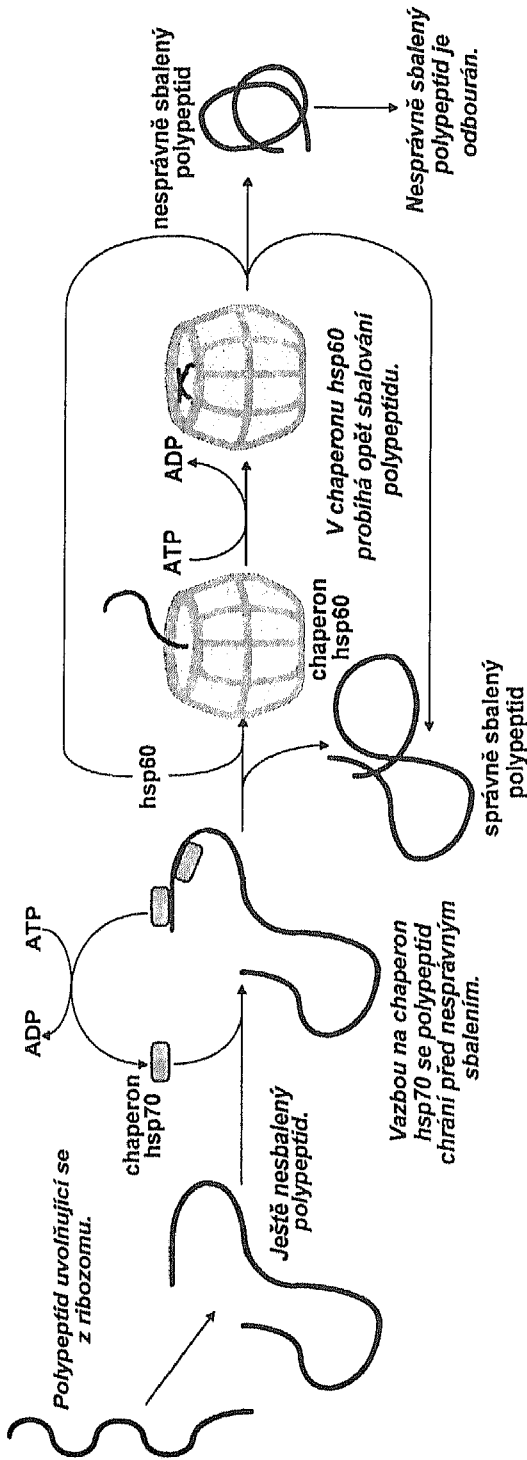
Na obr. 27 je schematicky znázorněn princip, jak chaperony umožňují, aby se protein správně sbalil do příslušné terciární struktury. Uskutečňuje se to např. vazbou chaperonu **hsp70** na hydrofobní oblasti ještě nesbaleného polypeptidového řetězce uvolňovaného z ribozomu. Chaperon se totiž vyznačuje afinitou k hydrofobním úsekům polypeptidů. Touto vazbou se zabrání, aby se sbalovaný polypeptid spojil s jiným nežádoucím polypeptidem nebo úsekem na stejné molekule polypeptidu. Tím se umožní, aby proces sbalování mohl dále pokračovat správnou cestou. Pro působení chaperonu je zapotřebí energie ve formě vazeb ATP.

Na rozdíl od chaperonu **hsp70**, jiný chaperon, **hsp60**, pojme čerstvě syntetizovaný polypeptidový řetězec jako "soudek", aby mu umožnil ve chráněném prostoru ukončit sbalování, kterému pravděpodobně též nějakým způsobem napomáhá. I tento chaperon vyžaduje energii ve formě ATP. Byl zjištěn jak u prokaryot, tak i u eukaryot a elektronmikroskopická studia ukazují, že skutečně má tvar připomínající soudek.

Funkce a výskyt dosud známých chaperonů je stručně shrnut v tab. 1.



Obr. 26
Schéma cyklu ubikvitinu



Obr. 27 Účast chaperonů na procesu sbalování proteinů

Tab. 1

Některé funkce a výskyt chaperonových rodin hsp70, hsp60 a hsp90

Rodina chaperonů	Výskyt v organismu	Funkce
Hsp 70	<i>E. coli</i>	Stabilizuje čerstvě vytvořené proteiny <i>in vivo</i> ; stimuluje exportování proteinů z buňky; napomáhá sestavovat a rozkládat replikační komplexy; reaktivuje RNA-polymerázu inaktivovanou teplem; usnadňuje odbourávání abnormálních proteinů.
Hsp 70	ER <i>S. cerevisiae</i> ER savců	Podporuje translokaci proteinů do ER; váže se na nesestavené nebo špatně poskládané protomery oligomerních proteinů ER.
Hsp 70	Mitochondrie <i>S. cerevisiae</i>	Podporuje translokaci proteinů do mitochondrií a následné jejich sbalování.
Hsp 60	<i>E. coli</i>	Podporuje <i>in vivo</i> sbalování nadprodukováných proteinů a opětné sbalování proteinů <i>in vitro</i> ; zúčastňuje se sestavování fágového virionu; usnadňuje export β -laktamázy; stabilizuje proteiny destabilizované teplem.
Hsp 60	Mitochondrie <i>S. cerevisiae</i> <i>N. crassa</i>	Podporuje sbalování a sestavování čerstvě importovaných proteinů; stabilizuje proteiny určené k opětnému exportu do mezimembránového prostoru; váže mitochondriové proteiny denaturované teplem a brání jejich seskupování (agregaci).
Hsp 60	Chloroplasty rostlin	Je nutný k sestavování ribulózabifosfátcarboxylázy a pravděpodobně jiných proteinů.
Hsp 90	Savci	Váže se na steroidní receptory a stabilizuje vazbu ligandu; inhibuje aktivitu tyrozinkinázy; váže kazeinkinázu II a brání její agregaci.

1.2 NUKLEOVÉ KYSELINY

Poznámka: V této kapitole se popisuje primární struktura deoxyribonukleové a ribonukleové kyseliny. Pak se pokračuje už jen v popisu a výkladu sekundární a terciární struktury kyseliny deoxyribonukleové. Strukturu ribonukleových kyselin popisujeme jen obecně. Popis sekundární a terciární struktury ribonukleových kyselin by bez znalosti jejich funkcí nezapadal vhodně do této kapitoly. Proto se jím zabýváme až v kapitolách, které pojednávají o funkcích ribonukleových kyselin při přenosu genetické informace.

1.2.1

Primární struktura nukleových kyselin

STRUKTURNÍ TYPY NUKLEOVÝCH KYSELIN. V živých soustavách se vyskytují tyto strukturní typy nukleových kyselin:

◆ **1. Lineární molekuly.** Vyskytují se jako:

a) **lineární jednořetězcové molekuly DNA nebo RNA**, tj. *molekuly s volnými konci*;

b) **lineární dvouřetězcové molekuly DNA nebo RNA**, tj. *molekuly sestávající ze dvou řetězců s volnými konci*.

◆ **2. Kružnicové molekuly nukleových kyselin.** Vyskytují se jako:

a) **jednořetězcové kružnicové DNA nebo RNA**, tj. *spojité jednořetězcové molekuly bez volných konců*;

b) **dvouřetězcové kružnicové DNA**, tj. *spojité dvouřetězcové molekuly bez volných konců*.

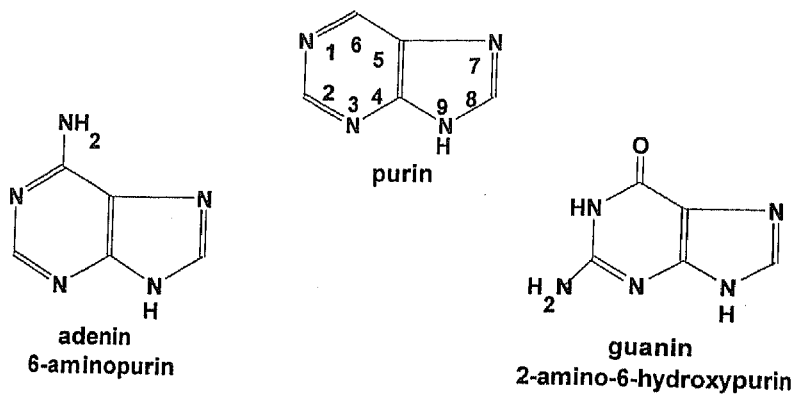
◆ **3. Tří- až čtyřřetězcové molekuly DNA.**

Jednořetězcové molekuly budeme označovat zkratkou **ss** (z angl. single stranded) a dvouřetězcové zkratkou **ds** (z angl. double stranded), tedy **ssRNA**, **ssDNA**, **dsRNA**, **dsDNA**.

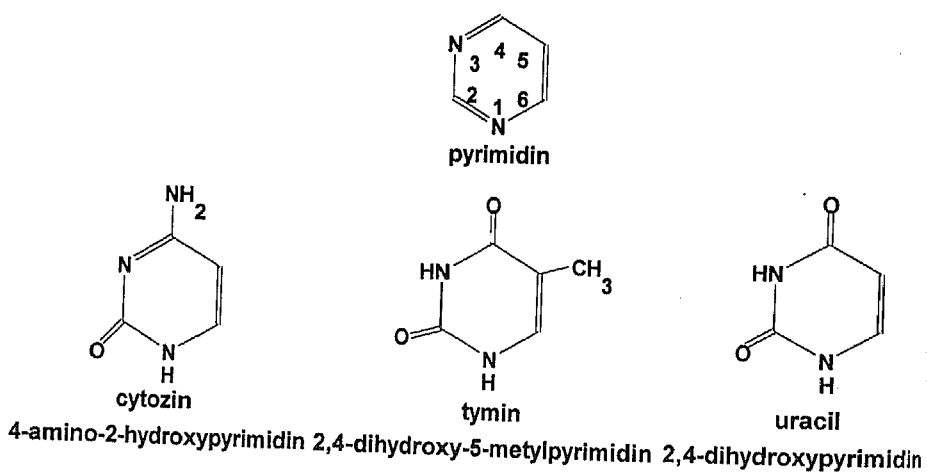
NUKLEOTIDY. Molekula nukleotidu sestává:

◆ z **pětiuhlíkového monosacharidu (pentózy)**, což je buď **2-deoxy-β-D-ribóza**, nebo **β-D-ribóza**,

◆ z **kyseliny trihydrogenfosforečné: H_3PO_4** ,



Obr. 28
Purinové báze



Obr. 29
Pyrimidinové báze

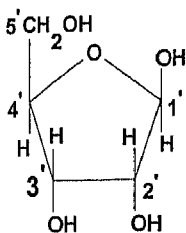
♦ z purinové nebo pyrimidinové báze.

Purinové báze jsou (v závorce je uvedena jejich zkratka):

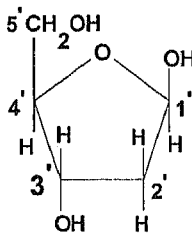
adenin (ade),
guanin (gua).

Pyrimidinové báze jsou:

cytozin (cyt),
tymin (thy),
uracil (ura).



β -D-ribóza
 β -D-ribofuranóza



β -D-2-deoxyribóza
2-deoxy- β -D-ribofuranóza

Obr. 30
Cukerné složky nukleotidů

Nukleotid (zkr. N) je *sloučenina nukleozidu s kyselinou fosforečnou*. Jednotlivé vzorce složek nukleotidů jsou uvedeny na obr. 28, 29, 30. Příklad vzorců pyrimidinového a purinového nukleotidu je na obr. 31. *Nukleotidy obsahující jako monosacharidovou složku ribózu se označují jako ribonukleotidy, kdežto ty, které obsahují deoxyribózu, se nazývají deoxyribonukleotidy.*

Sloučenina vzniklá spojením purinové nebo pyrimidinové báze N-glykosidovou vazbou s ribózou nebo deoxyribózou se označuje jako **nukleozid**. Spojením báze s ribózou vzniká **ribonukleozid**, s deoxyribózou **deoxyribonukleozid**. Uvádíme jejich zkratky a názvy:

1. Deoxyribonukleozidy

dAdo nebo **dA** = deoxyadenozin,

dGuo nebo **dG** = deoxyguanozin,

dCyd nebo **dC** = deoxycytidin,

dThd nebo **dT** = deoxytymidin.

2. Ribonukleozidy

Urd nebo **U** = uridin,

Cyd nebo **C** = cytidin,

Ado nebo **A** = adenzin,

Guo nebo **G** = guanozin.

V textu i v sekvencích budeme však báze a nukleotidy vyjadřovat jejich počátečními písmeny bází.

PROTONACE BÁZÍ. *Protonace bází probíhá v určitém rozsahu hodnot pK_a (poznámka: $pK_a = -\log K$, kde K je disociační konstanta). Ovlivňuje párování bází, na což v konkrétních souvislostech upozorníme. V tab. 2 jsou*

Tab. 2

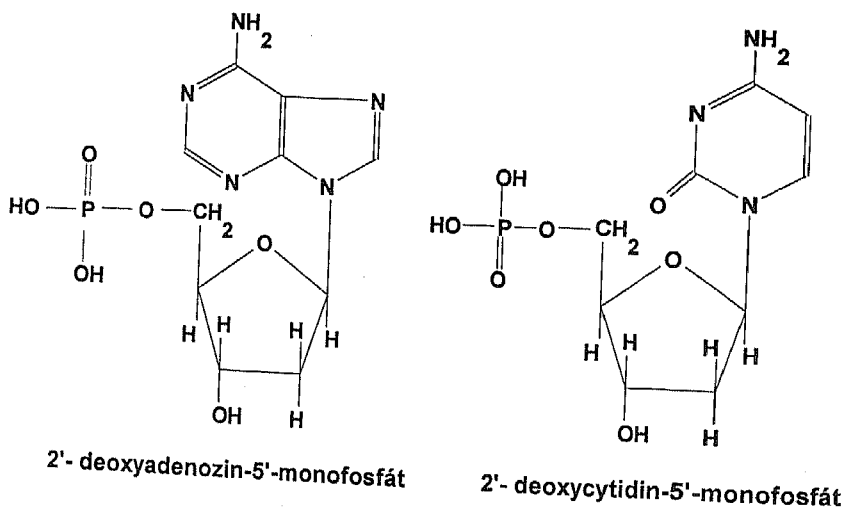
Hodnoty pK_a pro báze v nukleozidech a nukleotidech

Báze	Protonovaný atom dusíku	Nukleozid	3'-nukleotid	5'-nukleotid
Adenin	(N-1)	3,52	3,7	3,88
Cytozin	(N-3)	4,17	4,43	4,56
Guanin	(N-7)	3,3	(3,5)	(3,6)
Guanin	(N-1)	9,42	9,84	10
Tymin	(N-3)	9,93	-	10,47
Uracil	(N-3)	9,38	9,96	10,06

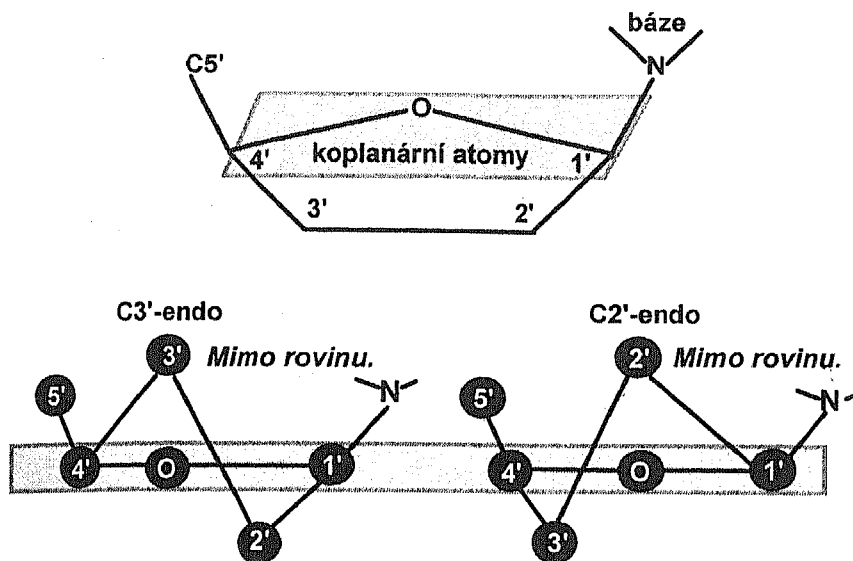
Uvedeny hodnoty pK_a pro báze v nukleozidech a nukleotidech při 20 °C a nulové koncentraci solí. Tyto hodnoty odpovídají

ztrátě protonu při $pK_a > 9$ a přijetí protonu při $pK_a > 5$.

KONFORMACE NUKLEOZIDŮ. Pětičlenný ribofuranózový kruh se vyznačuje tzv. *pseudorotací*, tj. může plynule přecházet v řadu konformací. Ve stavu krystalickém jsou z nich především významné konformace *endo* a *exo*. Cukerná složka nukleozidů se v DNA vyskytuje v konformaci *C3'-endo* nebo *C2'-endo* (obr. 32). Konformace *C3'-endo* znamená, že *C3'* je na téže straně roviny jako atom *C5'* a atom dusíku *N* připojující bázi k ribóze. Konformace *C2'-*



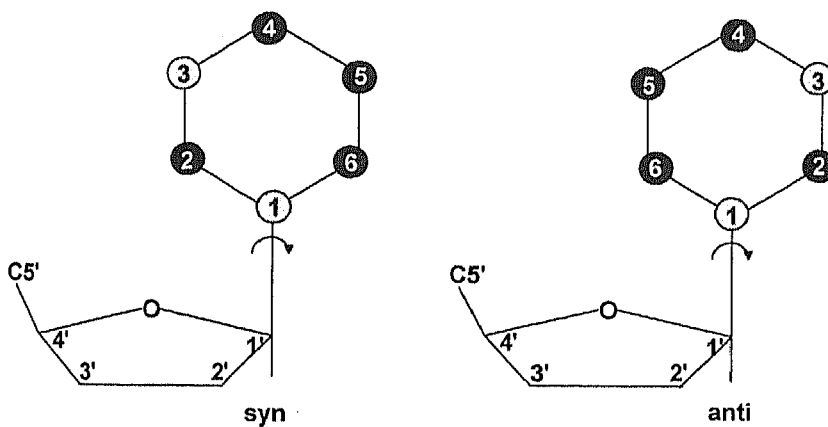
Obr. 31
Příklady dvou nukleotidů



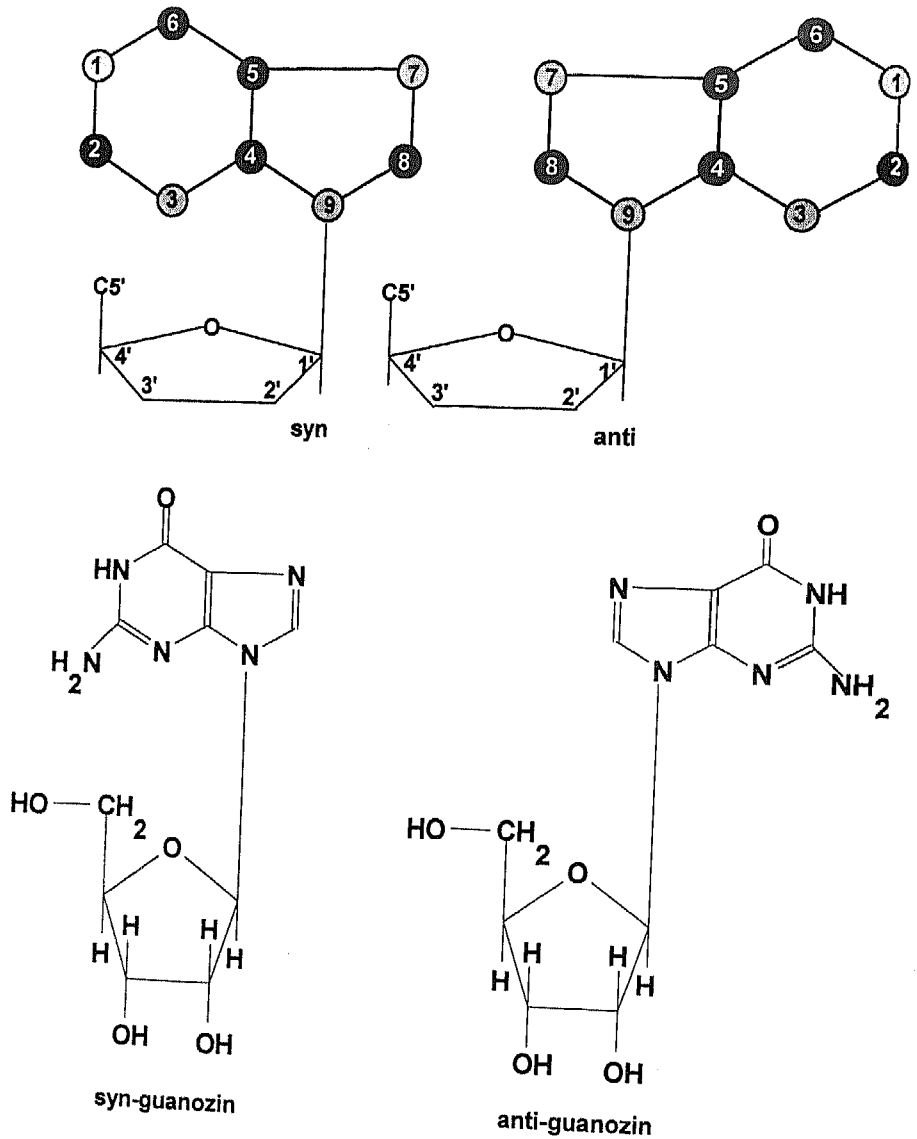
Obr. 32
Endo- konformace nukleozidů

endo pak znamená, že na stejné straně, jako je atom $C5'$ a N , je $C2'$. U obou konformací vybočuje buď atom $C2'$, nebo atom $C3'$ z roviny, která je tvořena atomy O , $C1'$ a $C4'$. Konformace $C2'$ -endo a $C3'$ -endo jsou preferovány, jelikož nekovalentní interakce mezi substituenty ribofuranózového kruhu jsou v těchto konformacích nukleozidů minimální.

KONFORMACE GLYKOZIDOVÉ VAZBY. Na celkovou konformaci nu-



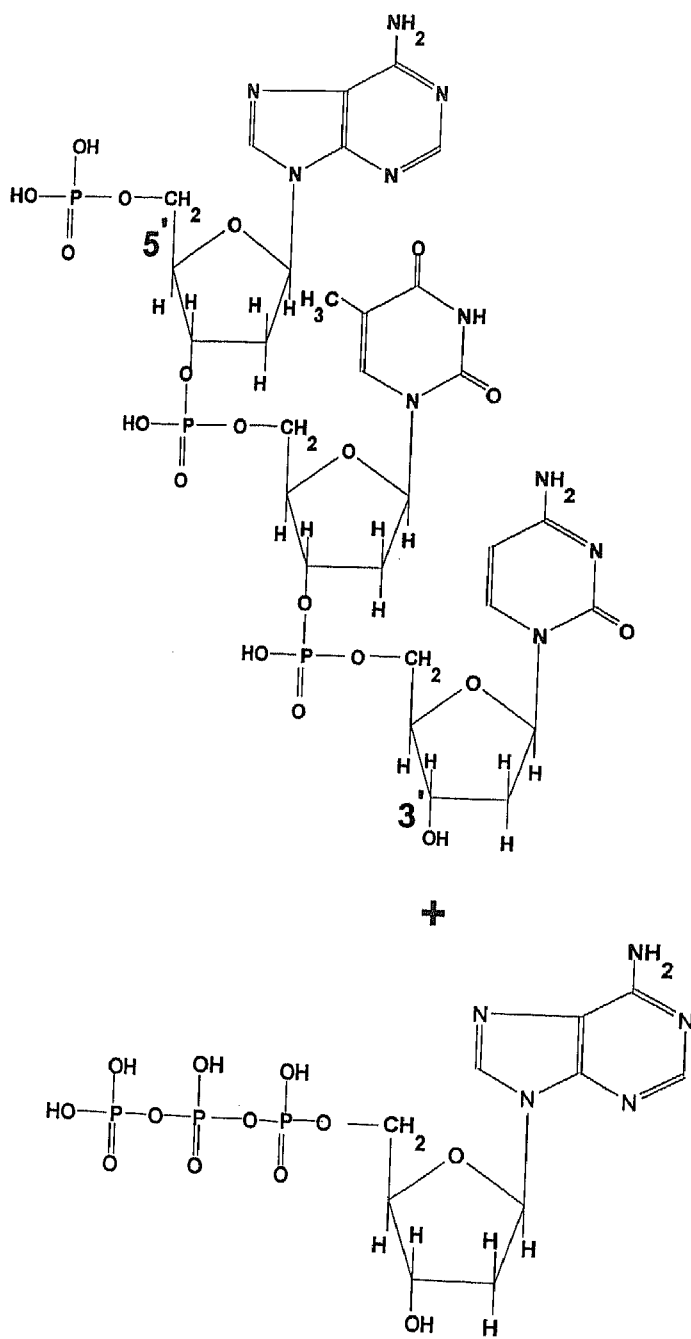
Obr. 33a
Konformace glykozidové vazby u pyrimidinových nukleotidů



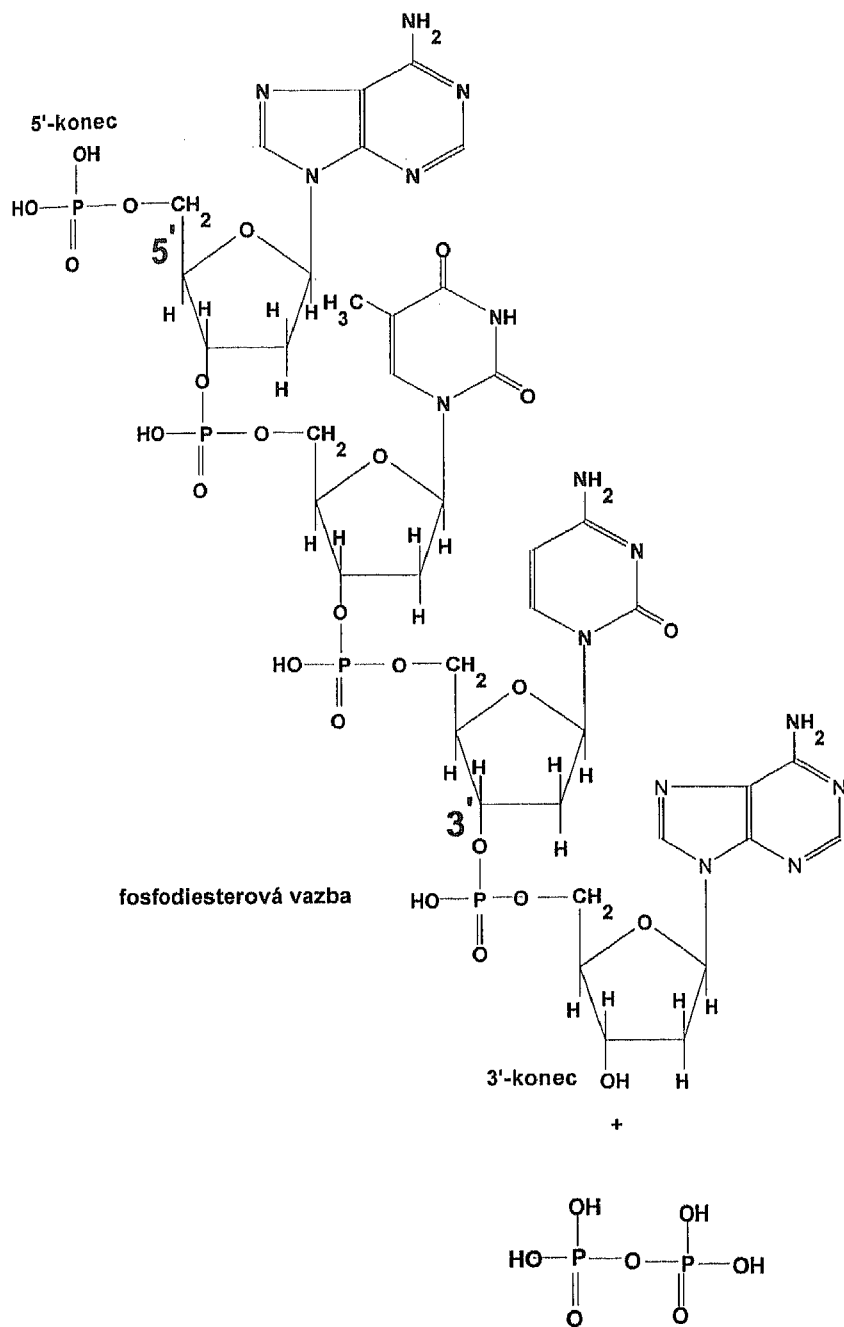
Obr. 33b

Konformace glykozidové vazby u purinových nukleotidů

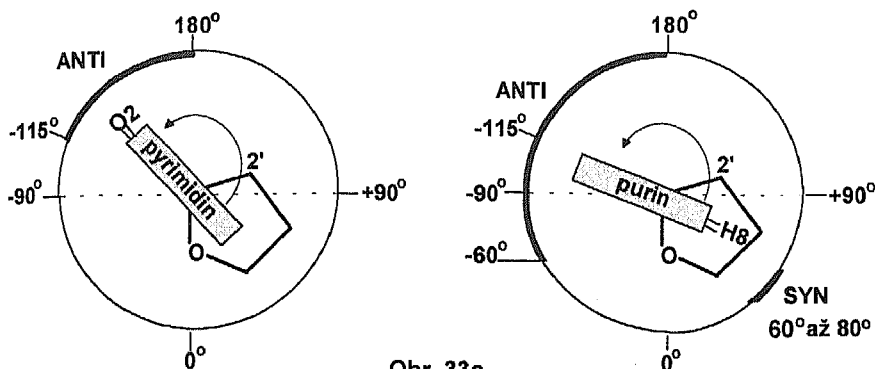
kleových kyselin má též vliv to, zda N-glykozidová vazba mezi bází a pentózou je antiklinální (*anti*) nebo synklinální (*syn*). U nukleotidů totiž je rotace báze kolem glykozidové vazby omezena stericky (sterická zábrana) vodíkovým atomem na uhlíku C2'. V důsledku toho nukleotidy a nukleotidy se vyskytují buď v konformaci *syn*, nebo *anti*. Jestliže atomové skupiny na pozicích 2 a 3 pyrimidinu nebo 1, 2 a 6 purinu leží mimo ribofuranózový kruh, je glykozidová



Obr. 34a
Syntéza polydeoxyribonukleotidového řetězce



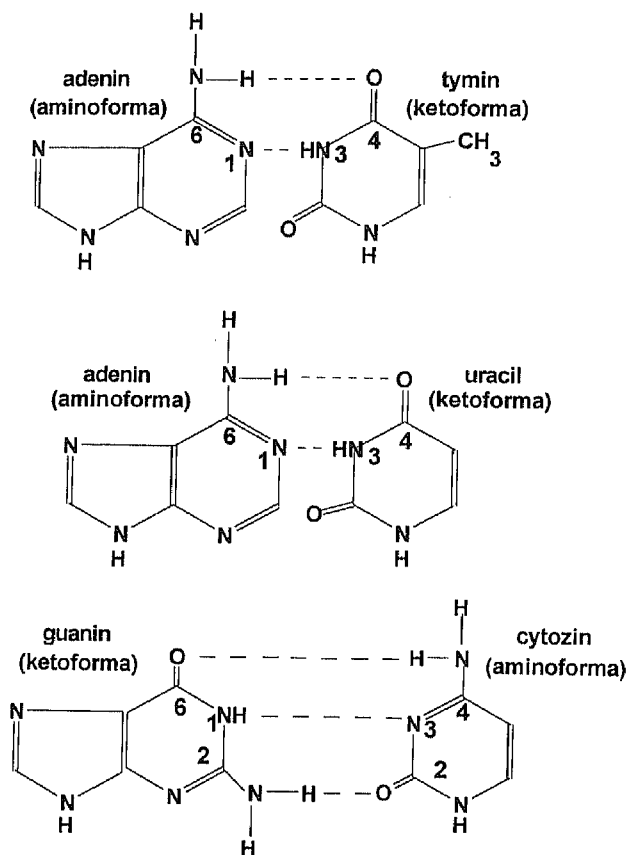
Obr. 34b
 Syntéza polydeoxyribonukleotidového řetězce



Obr. 33c
Konformační rozpětí anti a syn pro glykozidové vazby
u pyrimidinových a purinových nukleozidů

vazba v **konformaci antiklinální** neboli **anti**. Jestliže tyto skupiny leží nad ribofuranózovým kruhem, je konformace glykozidové vazby **synklinální** či **syn** (obr. 33a, 33b, 33c). C3'-endo upřednostňuje antiklinální konformaci, kdežto C2'-endo synklinální. Přibližná poloha báze v konformaci *anti* a *syn* je pro pyrimidinové a purinové nukleozidy znázorněna na obr. 33c. Pyrimidinové nukleozidy zaujmají však užší rozmezí (-115° až +180°) anti-konformací, zatímco purinové se vyznačují širším rozmezím anti-konformací (-60° až 180°). Rozmezí konformací *syn* pro purinové nukleozidy je úzké (+60° až 80°).

POLYNUKLEOTIDOVÝ ŘETĚZEC. V polynukleotidovém řetězci jsou nukleotidy navzájem spojeny **3', 5' - fosfodiesterovou vazbou**, která se tvoří mezi C3'-deoxyribózy (nebo ribózy) jednoho nukleotidu a C5'-deoxyribózy (nebo ribózy) následujícího nukleotidu. V důsledku toho jeden konec řetězce, označovaný jako **3'-konec**, je tvořen OH-skupinou (na C3'-uhlíku) a druhý, označovaný jako **5'-konec**, je tvořen fosfátovou skupinou (na C5'-uhlíku). Každé prodloužení polynukleotidu se děje kondenzační reakcí mezi C3' koncového nukleotidu a C5' nukleozidtrifosfátu. Výsledným produktem této kondenzační reakce je o jeden nukleotid prodloužený (připojený fosfodiesterovou vazbou) polynukleotid s 5'- a 3'- koncem (obr. 34a, 34b). Tímto způsobem prodlužování (syntézy polynukleotidových, tj. polydeoxyribonukleotidových i polyribonukleotidových řetězců) se vyznačují všechny živé soustavy. Z obr. 34a a 34b je také zřejmé, že strukturální osnovou polynukleotidového řetězce jsou zbytky pentózy (ribózy nebo deoxyribózy), které jsou spojeny fosfodiesterovými vazbami. Z této struktury bočně vystupují báze jednotlivých nukleotidů vázající se prostřednictvím atomů N1 u pyrimidinových bází a N9 u purinových bází na C1' pentózy. Tato struktura polynukleotidu se označuje jako **páteř polynukleotidu** nebo též **pentózafosfátová kostra**.



Obr. 35
Watsonovo-Crickovo párování bází

1.2.2

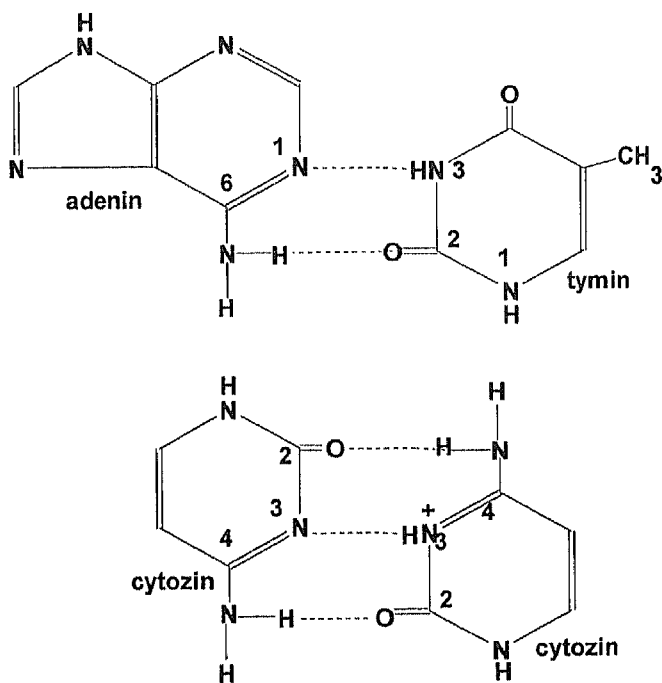
Párování bází mezi DNA-řetězci

Párováním bází se rozumí spojení dvou bází vodíkovými vazbami. Párováním bází mezi dvěma DNA-řetězci, tj. polydeoxyribonukleotidovými řetězci, vzniká dvouřetězcová DNA neboli duplex, mezi třemi DNA-řetězci třířetězcová DNA neboli triplex a mezi čtyřmi DNA-řetězci čtyřřetězcová DNA neboli kvadruplex.

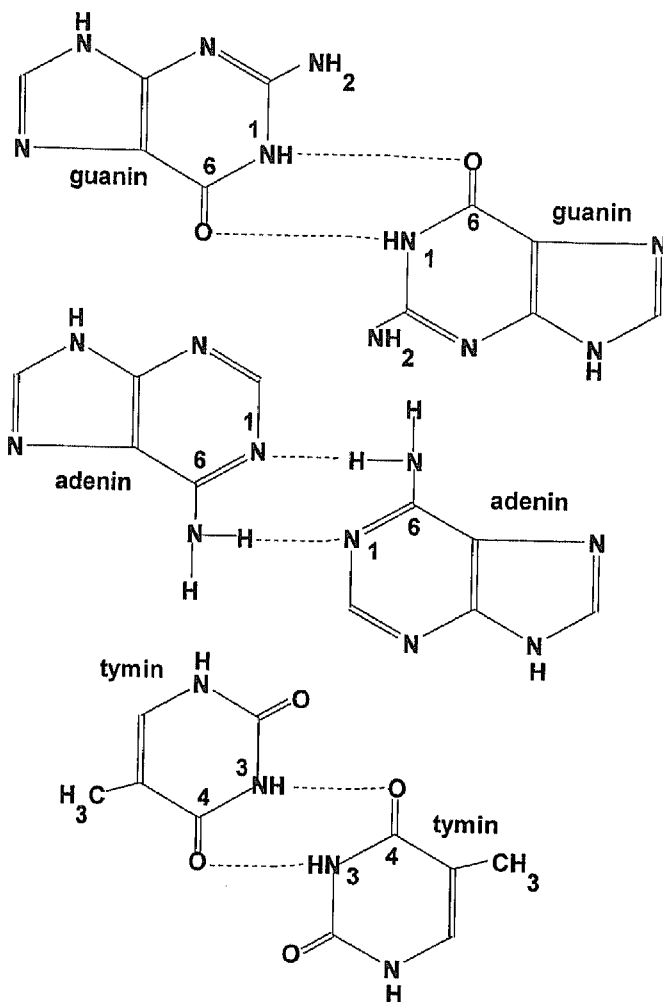
WATSONOVO-CRICKOVO PÁROVÁNÍ BÁZÍ. Podle tohoto pravidla se prostřednictvím vodíkových vazeb adenin (v aminoformě) páruje s thyminem

(v ketoformě) a guanin (v ketoformě) s cytozinem (v aminoformě). Kromě toho v RNA a při interakcích RNA s DNA se adenin (v aminoformě) páruje s uracilem, jestliže uracil je v ketoformě. Mezi adeninem a tymínem (uracilem) se tvoří dvě vodíkové vazby a mezi guaninem a cytozinem tři (obr. 35). Podle tohoto pravidla se mohou párovat i sekvence v jednořetězcové RNA za tvorby její sekundární struktury. Stejným způsobem se mohou vytvořit vztahy mezi dvěma různými polydeoxyribonukleotidovými řetězci, což je charakteristické pro dsDNA s antiparalelními řetězci. **Nukleotidové sekvence, které se spojují Watsonovým-Crickovým způsobem vodíkovými vazbami, se označují jako komplementární. Postavení bází, které umožňuje toto párování, se označuje jako cis-konfigurace páru bází.**

Watsonovo-Crickovo párování bází je základní. Uplatňuje se obecně ve dvouřetězcových DNA, během transkripce při tvorbě RNA na matricovém DNA-řetězci a v dvouřetězcových RNA (např. u reovirů). Při vysvětlování tvorby trojřetězcových a čtyřřetězcových DNA je nutno však uvažovat též jiné možnosti párování bází. V následujících odstavcích je podán jejich informativní přehled. (Poznámka: Všechny další a též předchozí obrázky, které znázorňují párování bází, představují schémata, která mají jen zdůraznit, mezi kterými atomy se v příslušných párech tvoří vodíkové vazby).



Obr. 36a
Obrácené Watsonovo-Crickovo párování bází

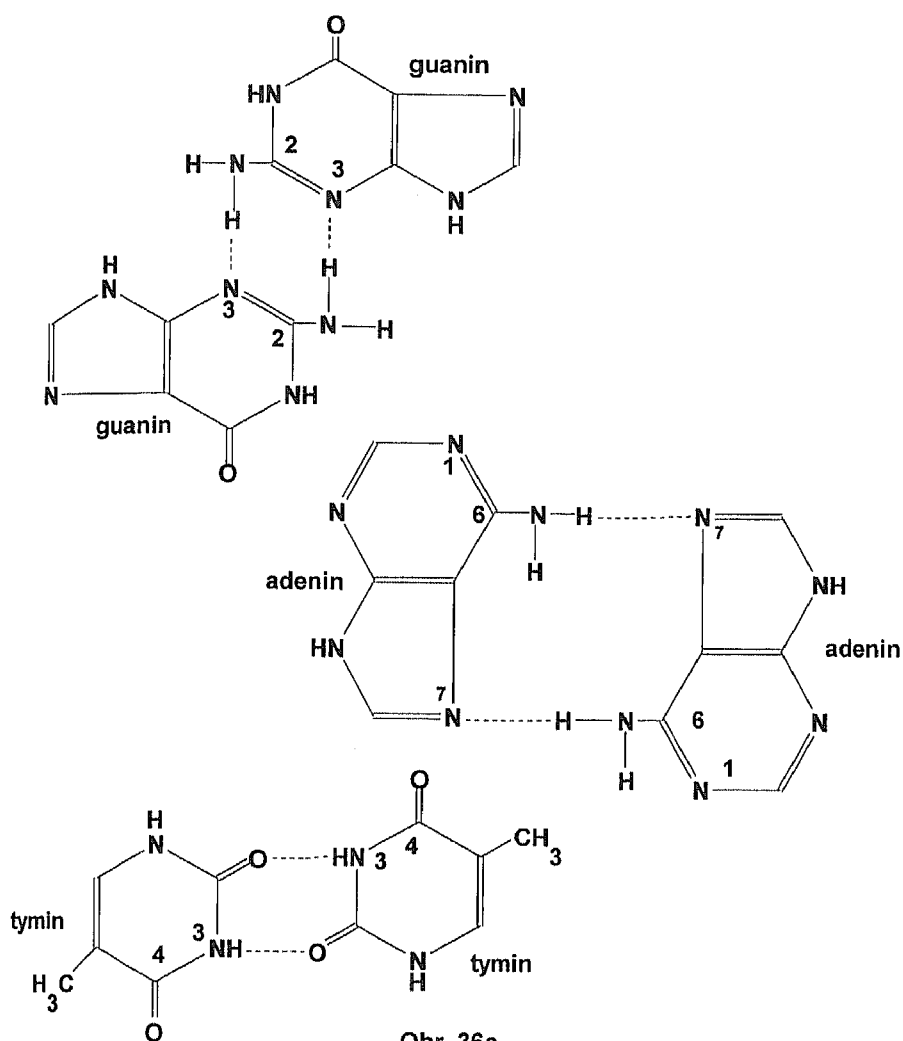


Obr. 36b

Obrácené Watsonovo-Crickovo párování bází

OBRÁCENÉ WATSONOVO-CRICKOVO PÁROVÁNÍ BÁZÍ. Bylo zjištěno, že dvouřetězcová DNA může sestávat též z paralelních DNA-řetězců, které se vyznačují stejnou orientací fosfodiesterových vazeb. V takových DNA se uplatňuje obrácené Watsonovo-Crickovo párování bází, které je charakteristické tím, že báze tvořící v dvoušroubovici pár jsou navzájem v postavení, které je opačné vzhledem k postavení *cis* a označuje se jako **trans-konfigurace páru bází**. Toto postavení umožňuje např., že 6-aminoskupina adeninu se váže na OC2 tyminu místo na OC4 tyminu, jak by tomu bylo v postavení *cis* (obr. 36a).

Obráceným způsobem se tvoří též páry mezi: C - C, G - G, A - A, T - T.

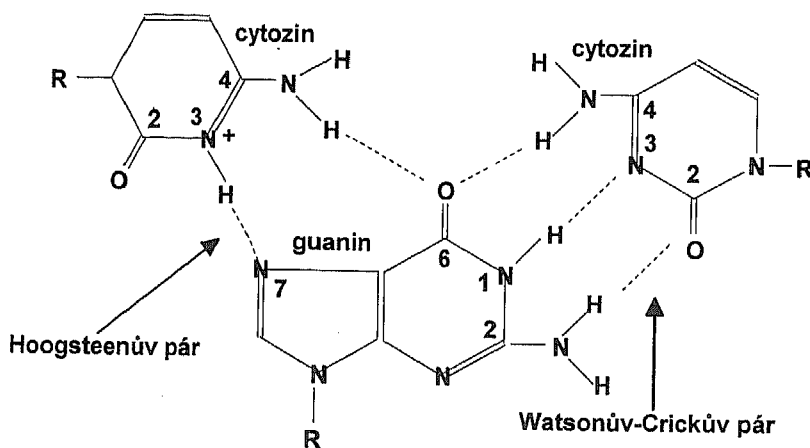
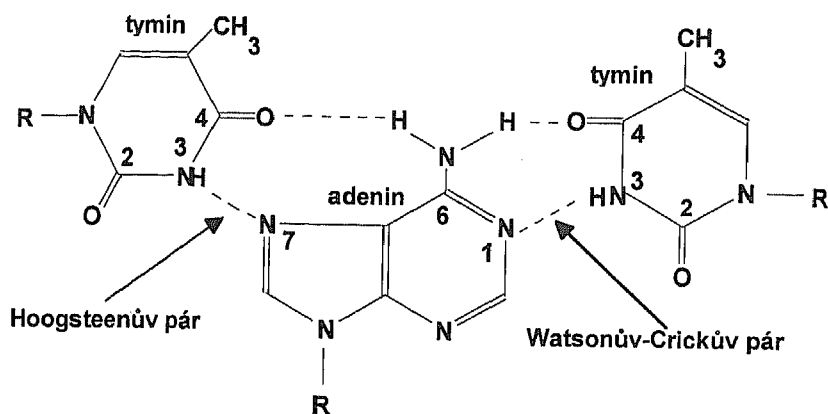


Obr. 36c

Obrácené Watsonovo-Crickovo párování bází

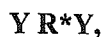
Varianty těchto možných párování jsou uvedeny na obr. 36a, 36b a 36c.

HOOGSTEENOVÉ PÁROVÁNÍ BÁZÍ. Za určitých fyzikálněchemických podmínek se adenin páruje Watsonovým-Crickovým způsobem s tyminem a guanin s cytozinem a současně Hoogsteenovým způsobem, tj. prostřednictvím N7 a N6 tvoří adenin pár s tyminem a guanin prostřednictvím N7 a OC6 s cytozinem. Takto se vytvoří tzv. triády, tj. trojice bází spárovaných tak, že tatáž purinová báze tvoří jednak Hoogsteenův pár s pyrimidinovou bází na jedné straně a Watsonův-Crickův pár s pyrimidinovou bází na straně druhé (obr. 37):



Zde i ve vzorcích uvedených v dalších obrázcích R = zbytek deoxyribózy.

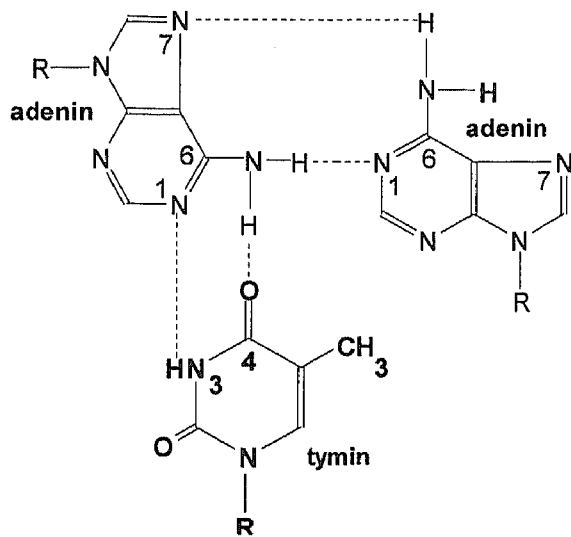
Obr. 37
Hoogsteenovo párování bází



kde Y = pyrimidinová báze, R = purinová báze, $*$ = symbol znamenající obecně odchylku od Watsonova-Crickova párování. V tomto případě je odchylkou Hoogsteenovo párování, které může být typu:



Hoogsteenův pár guanin - cytozin je však stabilní pouze při nízkém pH, jelikož jeden dusík v cytozinu musí být protonován, tj. musí se na něj vázat vodík, aby



Obr. 38

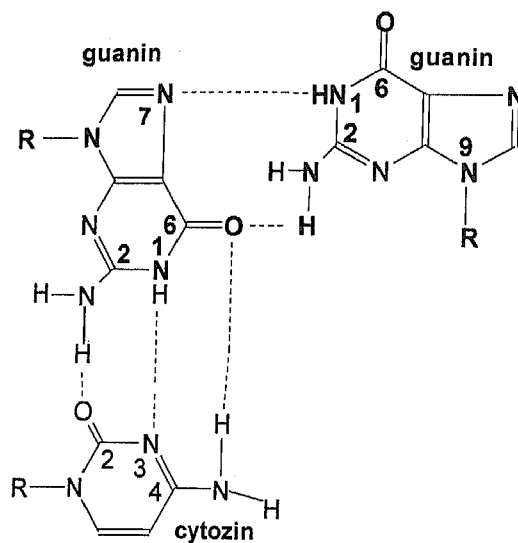
Obrácené Hoogsteenovo párování bází TA*A

se takový pár mohl vytvořit. Střední hodnota pro protonaci je pH 5 nebo o něco kyslejší, než je pH 7 až 8 v buňce. To je také hlavní důvod, proč molekuly dvoušroubovicové DNA obsahují Watsonovy-Crickovy páry a nikoli Hoogsteenovy. Hoogsteenův pár G-C není stabilní při neutrálním pH.

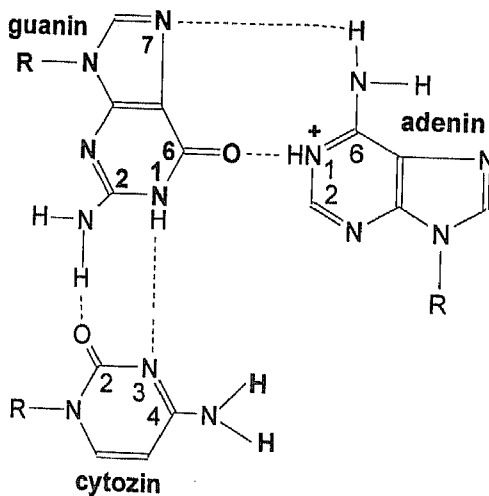
Hoogsteenovo párování bází umožňuje tvorbu trojšroubovicových DNA. Samozřejmě, že i zde *tvorba triády CG*C vyžaduje protonaci N3 cytozinu ve třetím řetězci trojšroubovicové DNA.* Proto tvorba takových trojšroubovic je možná v kyselém prostředí. Na druhé straně TA*T nevyžadují protonaci.

TRIÁDY TYPU YR*R. Párování dvou purinových bází není obvyklé a uskutečňuje se v trojšroubovicových DNA určitého typu (viz dále). Konkrétní formy triád pak jsou (obr. 38, 39, 40): TA*A a CG*G označované jako **obrácené Hoogsteenovo párování bází** a triáda CG*A.

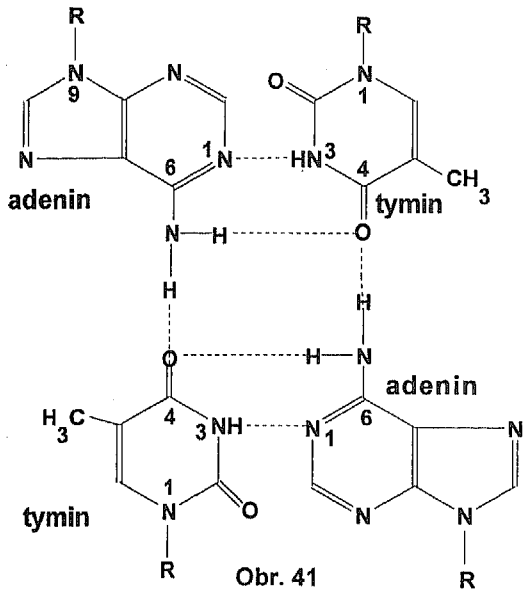
TETRÁDY. *Takto označujeme párování mezi čtyřmi bázemi, které se uskutečňuje mezi molekulami guaninu a cytozinu a mezi molekulami adeninu a tyminu (obr. 41).* Tímto párováním se zatím hypoteticky vysvětluje spojování DNA-řetězců ve čtyřřetězcových DNA vznikajících při rekombinaci. Tetrády se však mohou vytvořit i mezi čtyřmi molekulami guaninu (obr. 42). Tímto párováním se vysvětluje tvorba čtyřřetězcové G4-DNA (obr. 43).



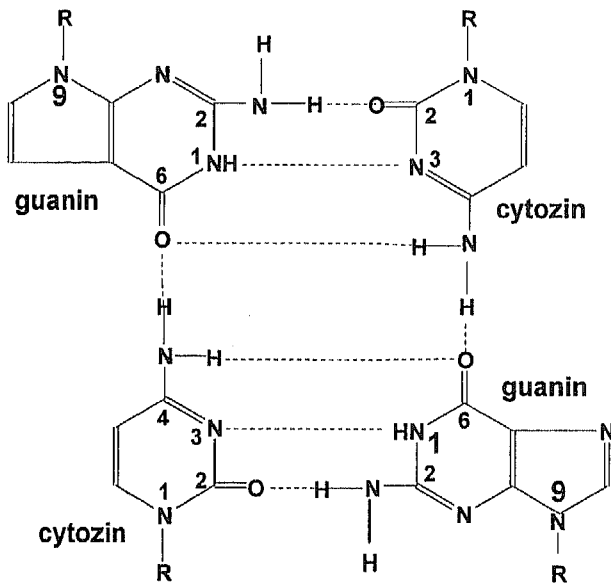
Obr. 39
Obrácené Hoogsteenovo párování bází CG*G



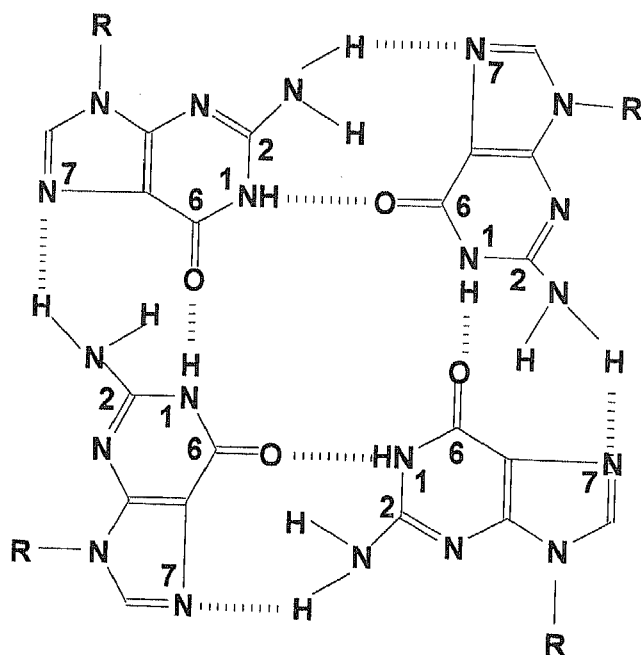
Obr. 40
Párování v triádě cytozin-guanin-adenin



Tetráda vznikající párováním adeninu s tyminem



Tetráda vznikající párováním guaninu s cytozinem



Obr. 43

Tetrády guaninu spojující paralelní řetězce v G4-DNA

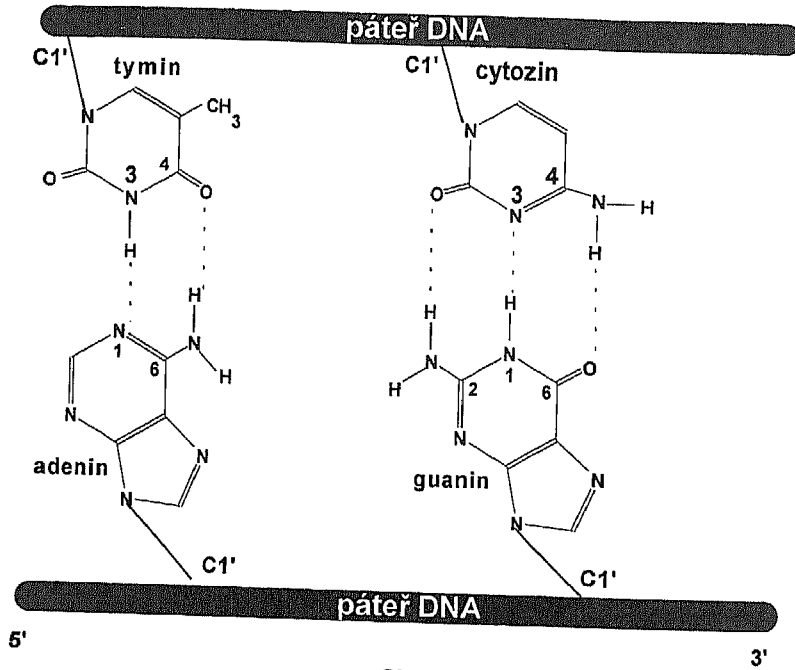
1.2.3

Sekundární struktura DNA

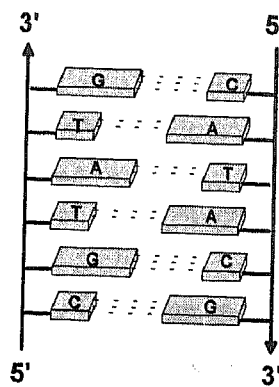
DVOUŠROUBOVICE. Nejčastější podoba sekundární struktury DNA je tzv. **dvoušroubovice**, která má následující charakteristické rysy (obr. 44):

- ◆ 1. Sestává ze dvou polydeoxyribonukleotidových řetězců šroubovicovitě ovíjejících společnou osu neboli **osu dvoušroubovice**.
- ◆ 2. Oba řetězce jsou navzájem **komplementární**, tj. *jejich nukleotidové sekvence jsou ve vztahu, který vyhovuje pravidlu o párování bází* (obr. 45).
- ◆ 3. Na jeden závit dvoušroubovice připadá 10,5 párů bází (10,5 bp), což odpovídá úseku o délce 3,4 nm. Vzdálenost mezi dvěma páry je 0,34 nm. Páry bází se vytvářejí uvnitř dvoušroubovice. Báze jsou tedy orientovány směrem dovnitř dvoušroubovice, kdežto její vnější část *tvorí opornou strukturu dvoušroubovicové DNA* neboli **páteř DNA**.
- ◆ 4. Největší vzdálenost páteře DNA od osy dvoušroubovice je 1 nm.
- ◆ 5. Oba komplementární řetězce jsou **antiparalelní**, tj. *liši se směrem fosfodiesterové vazby*. Upozorňujeme však, že tento jev není omezen jen na DNA.

Báze se vážou na uhlík C1' deoxyribózy (D), jejíž zbytky jsou spojeny
fosfodiesterovými vazbami (- P -).



Obr. 45
Watsonovo-Crickovo párování bází uvnitř dsDNA



Obr. 46
Znázornění planarity bází
uvnitř molekuly dsDNA

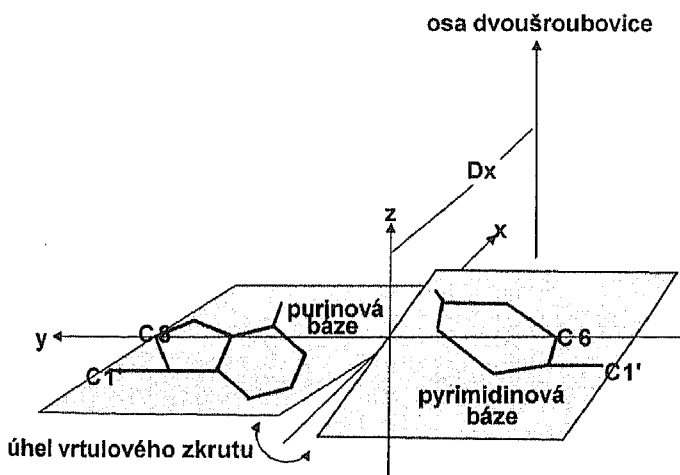
vnitř jednotlivých párů různých poloh, které jsou určeny soustavou souřadnic x, y, z (viz dále). Např. celý pár bází neleží vždy v jedné rovině. Roviny proložené páry bází jsou navzájem poněkud pootočený, takže připomínají listy vrtule. Tato poloha bází uvnitř daného páru se označuje jako **vrtulový zkrut**. Úhel, o který jsou báze daného páru pootočený, se nazývá **úhel vrtulového zkrutu**. O tento úhel jsou posunuty směrem nahoru nebo dolů $C1'$ -atomy, kterými se k páteři DNA vážou báze (obr. 47). Bližší vysvětlení viz na str. 74.

♦ 9. Jelikož páry bází jsou od osy šroubovice posunuty o vzdálenost D_x a spojnice atomů $C1'$ -komplementárních nukleotidů neprochází obvykle osou dvoušroubovice a nebývá na ni kolmá (obr. 47), není vzhled dvoušroubovice hladký, ale vyznačuje se dvěma žlábkami různé šíře a hloubky (obr. 44, 48):

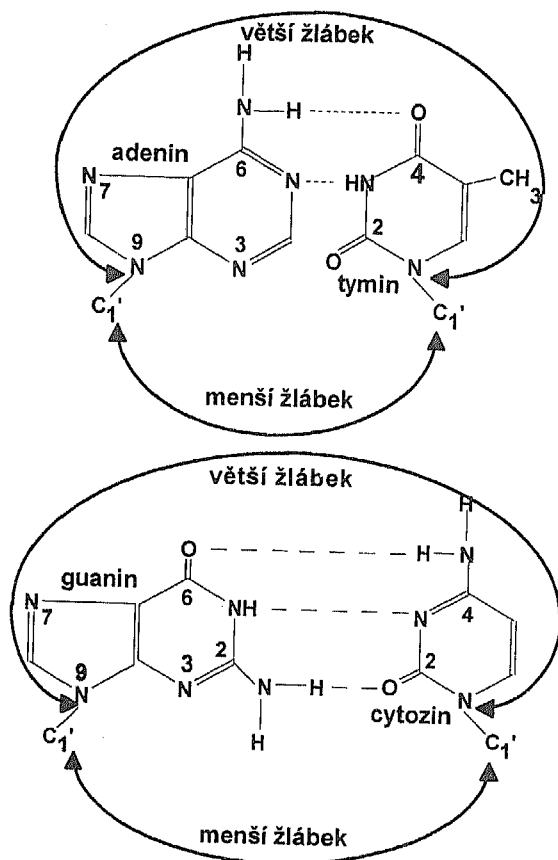
a) **menší žlábek**, který obsahuje *OC2 pyrimidinovou a N9 purinovou stranu páru bází*;

b) **větší žlábek**, který se tvoří na opačné straně a zahrnuje *OC4 pyrimidinovou a OC6-purinovou stranu páru bází*.

Větší žlábek je široký 1,2 nm, menší 0,6 nm. Větší žlábek je hlubší než menší žlábek. Oba žlábků se vyznačují přítomností atomů schopných vytvářet vodíkové vazby s proteiny, větší žlábek ve větší míře než žlábek menší (obr. 48). Konkrétně v menším žlábků N3 adeninu a guaninu a OC2 tyminu a cytozinu mohou být akceptory vodíku a aminoskupina vázaná na C2 guaninu může být donorem vodíku. Na druhé straně ve větším žlábků N7 guaninu a adeninu, OC4 tyminu a OC6 guaninu mohou být potenciálními akceptory vodíku, zatímco aminoskupina vázaná na C6 adeninu a C4 cytozinu může být donorem vodíku, což má značný význam pro interakci DNA s proteiny.



Obr. 47
Vrtulový zkrut

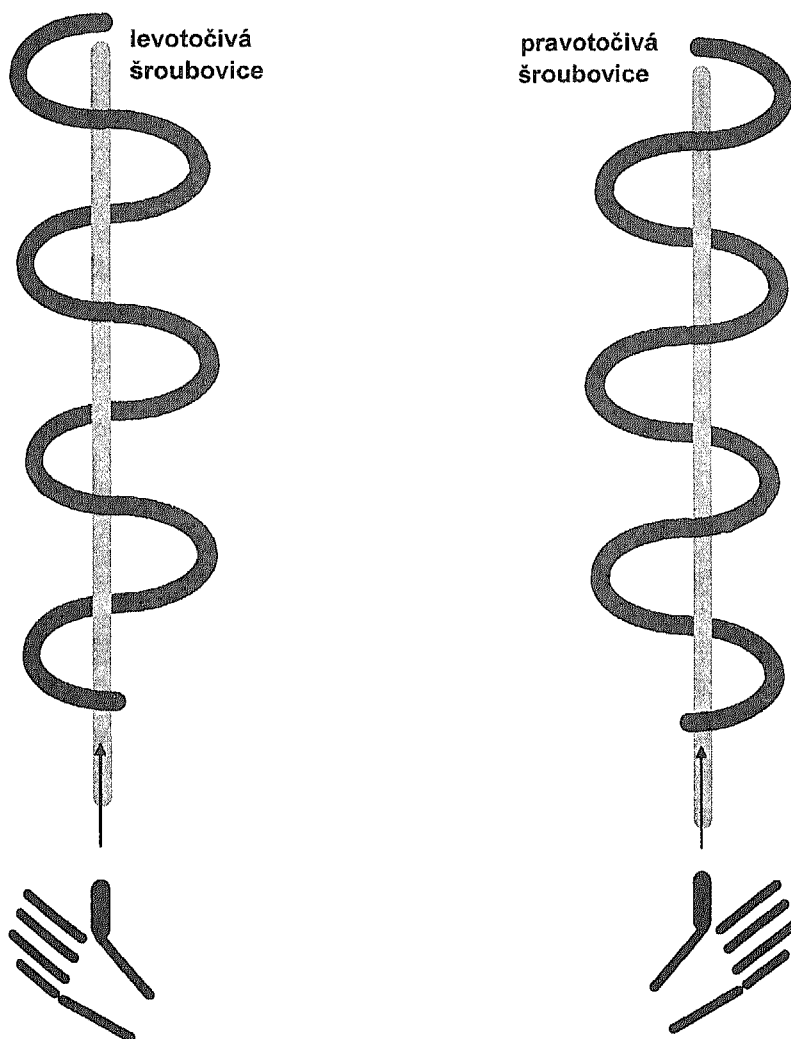


Donory a akceptory vodíku jsou
očíslovány.

Obr. 48
Potenciální donory a akceptory vodíku
ve větším a menším žlábku

◆ 10. **Vinutím řetězců v dvoušroubovici (dvoušroubovicové vinutí)** se rozumí *několikanásobné vzájemné otáčení jednoho DNA-řetězce kolem druhého*; může být pravotočivé nebo levotočivé. Jako **pravotočivou** označujeme **dvoušroubovici** podle pravidla pravé ruky: *Umístíme-li palec pravé ruky ve směru osy dvoušroubovice, ukazují ostatní prsty směr jejího stoupání. Levotočivá dvoušroubovice odpovídá obdobnému pravidlu levé ruky* (obr. 49).

POSUNY JEDNOTLIVÝCH PÁRŮ BÁZÍ. Jak již bylo uvedeno v bodě 8 na str. 69, zaujmají báze navzájem uvnitř dvoušroubovice různé polohy. Vzájemná poloha bází uvnitř daného páru je určena osami x, y, z, které jsou defino-

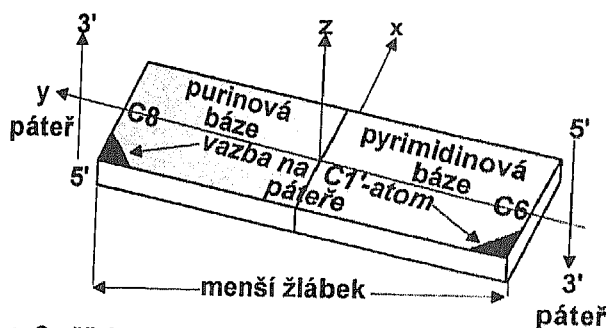


Obr.49
Levotočivé a pravotočivé vinutí šroubovice

vány na obr. 50. Může se změnit např. **vrtulovým zkrutem**, tj. *odklonem od roviny páru bází kolem osy y* (obr. 47).

Kromě této změny polohy bází uvnitř daného páru bází se *vzhledem k ose dvoušroubovice může změnit i umístění celého páru tím, že se horizontálně přemístí*. To se v podstatě děje:

- ♦ **horizontálním posunem (dx)**, tj. *posunem roviny daného páru bází podél osy x o vzdálenost dx směrem k menšímu nebo většímu žlábků* (obr. 51);
- ♦ **horizontálním posunem (dy)**, tj. *posunem roviny příslušného páru bází*



- Osa x** : Směřuje od menšího žlábku k většímu tak, že prochází středem párů bází v rovině vodíkových vazeb.
- Osa y** : Probíhá od páteře 5' - 3' k páteři 3' - 5', je kolmá k ose x , s níž tvoří rovinu, ve které se daný pár nachází. Prochází C6 pyrimidinu a C8 purinu.
- Osa z** : Je kolmá k rovině $x - y$ a protíná ji v průsečíku obou os. Její směr je určen směrem páteře 5' - 3'.

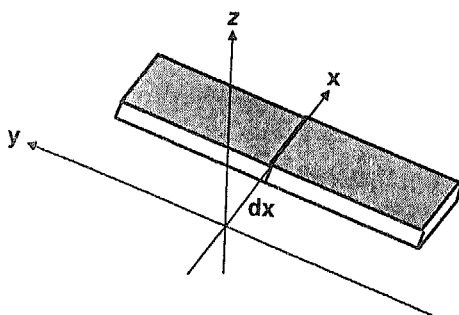
Takto definovaný směr os je kladný.
Záporný směr je definován opačně.

Obr. 50

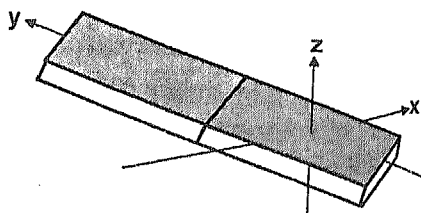
Definice os pro jednotlivé páry bází v dvoušroubovicové DNA

o vzdálenost dy podél osy y směrem k jedné nebo druhé páteři dvoušroubovice (obr. 52).

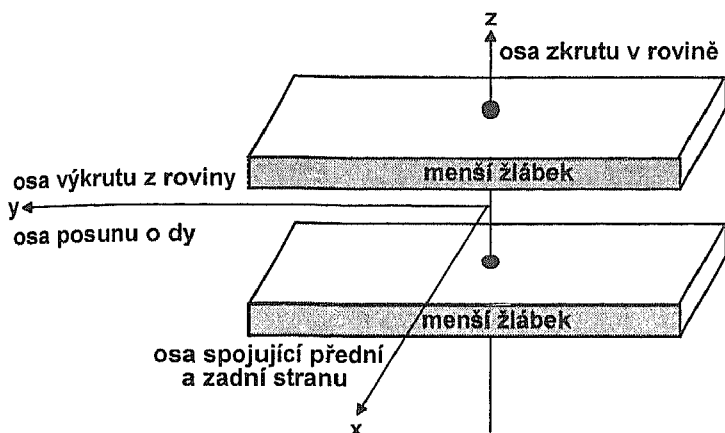
VZÁJEMNÁ POLOHA DVOU SOUSEDNÍCH PÁŘŮ BÁZÍ. Vzájemná poloha dvou sousedních párů bází v dvoušroubovici je určena tzv. lokálními osami dvoušroubovice (obr. 53), které je nutno rozlišovat od globálních parametrů vztahujících se k ose celé dvoušroubovice. Rotaci párů bází se vzájemná poloha dvou sousedních párů bází může změnit dvěma způsoby. Jsou to (obr. 54):



Obr. 51
Horizontální posun (dx)



Obr. 52
Horizontální posun (dy)

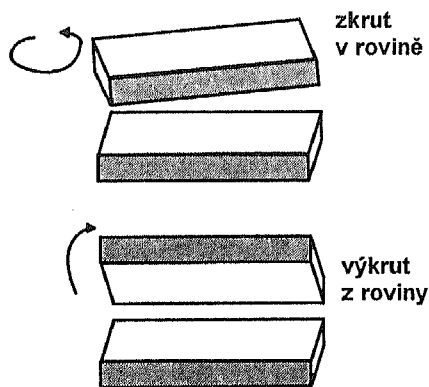


Obr. 53
Lokální soustava souřadnic pro zkrut v rovině,
výkrut z roviny a posun páru bází

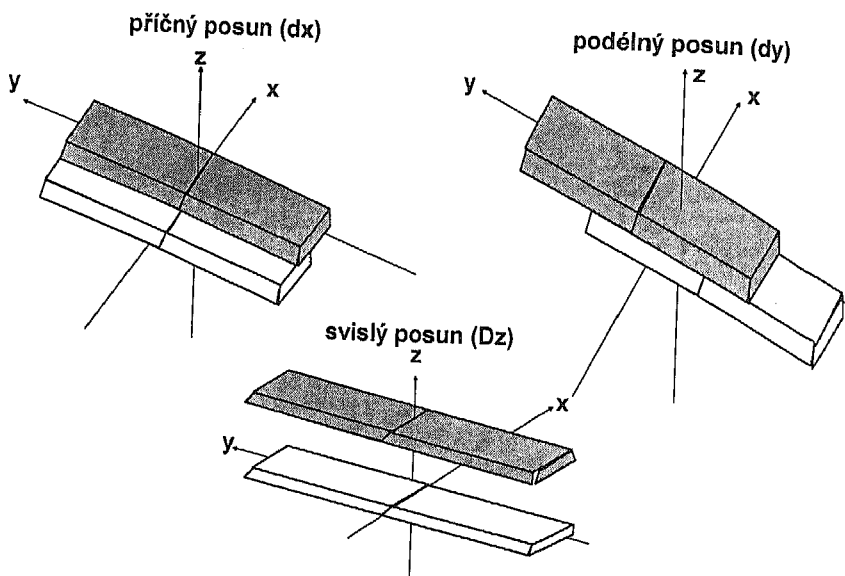
◆ **Zkrut v rovině** odpovídající rotaci dvou sousedních párů bází zaujímajících paralelní roviny kolem lokální osy zkrutu, která probíhá vertikálně přes střed nebo blízko středu kterýchkoli dvou párů bází.

◆ **Výkrut z roviny**, který je vyjádřen rozevřením párů bází kolem osy y . Během rotace kolísají úhly výkrutů z roviny v rozmezí $+20^\circ$ až -10° . Podle konvence je výkrut z roviny **kladný**, otevírají-li se páry bází směrem k menšímu žlábků. V opačném případě je **záporný**.

Tyto proměnné veličiny prakticky stačí k popisu poloh sousedních párů bází během jejich rotace. Další veličiny charakterizují polohy sousedních párů bází při jejich přemístění. Jsou to (obr. 55):



Obr. 54
Zkrut a výkrut z roviny



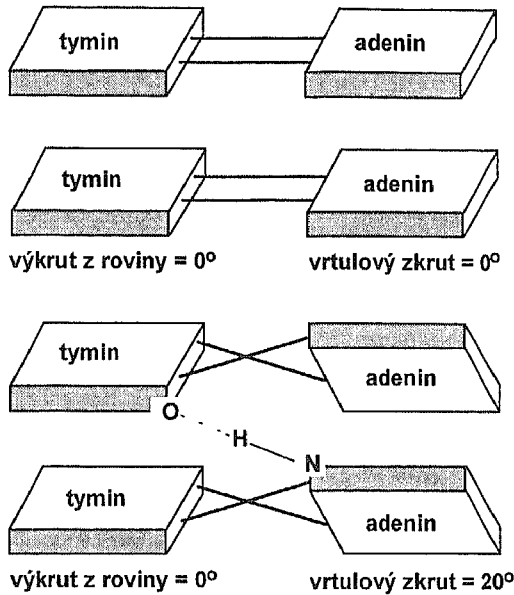
Obr. 55
Posuny v sousedních párech bází

- ◆ **svislý posun (Dz)**, tj. vzájemný posun rovin dvou sousedních párů bází nad nebo pod rovinou párování ve směru osy z, přičemž roviny párů bází jsou paralelní;
- ◆ **příčný posun (Dx)**, tj. vzájemný posun rovin dvou sousedních párů bází o vzdálenost Dx ve směru osy x;
- ◆ **podélný posun (Dy)**, tj. vzájemný posun rovin dvou sousedních párů bází o vzdálenost Dy podél osy y směrem ke žlábkům.

Poznámka: Používají se symboly Dx a Dy , aby se odlišily od symbolů dx a dy používaných při charakterizaci posunů jednotlivých párů bází (str. 71).

Posun párů bází se považuje za **záporný**, uskutečňuje-li se nalevo od níže položeného páru bází za předpokladu, že náš pohled je upřen na okraje menšího žlábků. Běžné hodnoty posunu jsou +0,3 až -0,2 nm.

O VÝZNAMU VRTULOVÉHO ZKRUTU. Vrtulový zkrut je veličina, která charakterizuje vzájemnou polohu bází ve stejném páru. Proto nebyl uvažován v předchozím odstavci. Vrtulový zkrut zřejmě narušuje vodíkové vazby, kterými jsou obě komplementární báze téhož páru spojeny. Za předpokladu, že není příliš velký, stačí vodíkové vazby obě komplementární báze spárovat. Obecně má vrtulový zkrut tendenci být vyšší v úsecích, kde dvoušroubovice obsahuje většinou AT-páry. Jeho hodnota je na těchto úsecích v rozmezí 15 -

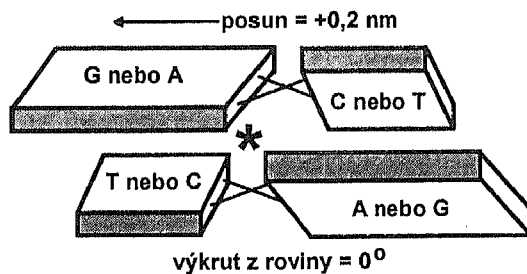


Vlivem vrtulového zkrutu se -NH a O dostanou do vzdáleností umožňující vznik vodíkové vazby, která zvyšuje vrtulový zkrut. Vrtulový zkrut však nemá vliv na výkrot z roviny.

Obr. 56

Účinky vrtulového zkrutu v párech AT

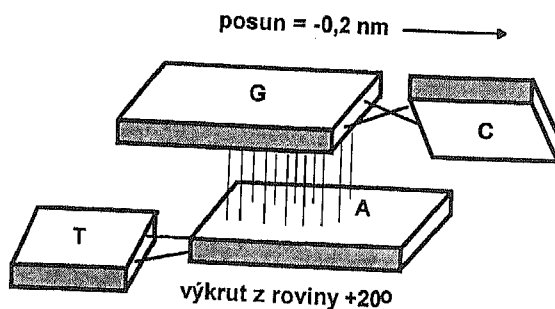
25° . Na úsecích obsahujících GC-páry je nižší; je zde v rozmezí $5^\circ - 15^\circ$. Ke zvýšení vrtulového zkrutu mezi sousedními páry AT přispívá křížové spojení vodíkovou vazbou mezi -NH adeninu a OC4 tymínu (obr. 56). Tato vodíková vazba pravděpodobně zvyšuje vrtulový zkrut. Zjistilo se, že DNA, která obsahuje jen páry AT, má na rozdíl od jiných sekvencí značný vrtulový zkrut ($20^\circ -$



*Vyznačuje-li se pár bází vrtulovým zkrutem, je nutný kladný posun k vyhnutí se sterické srážce purinových bází v místě**

Obr. 57

Účinek vrtulového zkrutu na podélný posun páru bází



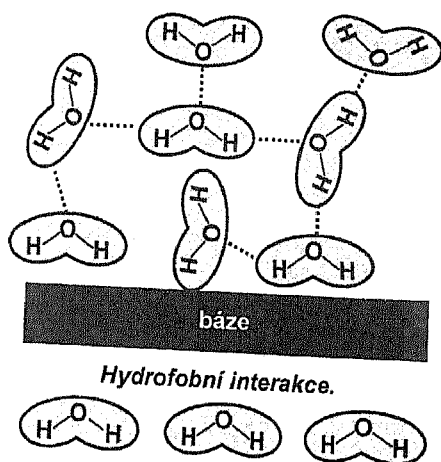
Záporný posun je způsoben elektrostatickými interakcemi mezi překrývajícími se povrchy dvou purinů.

Obr. 58

Posun páru bází způsobený elektrostatickými interakcemi mezi povrchy purinových bází

-30°). V jiných sekvencích je vrtulový zkrut 10° až 20°. Z obr. 56 je též zřejmé, že vrtulový zkrut zde nevede k výkrutu z roviny, neboť v tomto případě má výkrut z roviny hodnotu 0°, ačkoli vrtulový zkrut je 20°. Všimněme si však, že obě vychýlené roviny zůstávají přitom paralelní, takže výkrut z roviny musí být nulový.

Na obr. 57 se uvádí příklad podélného posunu (Dy), který je nutný k to-



Obr. 59

Schematické znázornění hydrofobního účinku báze

mu, aby nedošlo k příliš těsnému kontaktu obou purinových bází. Tento kontakt by nepředstavoval problém, kdyby nepůsobil vrtulový zkrut. Ten by totiž vedl ke sterické srážce mezi oběma velkými purinovými bázemi, které se v tomto případě zabrání podélným posunem o +0,2 nm.

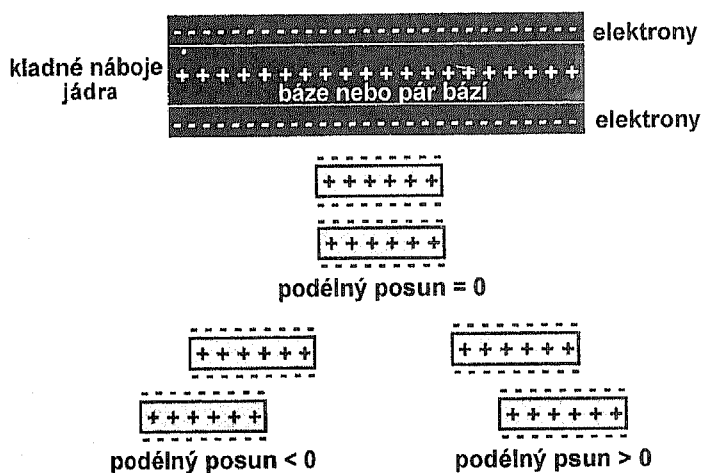
Na obr. 58 je znázorněn posun páru purinových bází o -0,2 nm. Purinové báze se zde posouvají po horním povrchu jiné purinové báze. V tomto případě je výkrut z roviny +20°, jelikož malé pyrimidinové báze musí být vzhledem k velkým purinovým bázím v každém řetězci odkloněny o +20°, aby se zachoval vrtulový zkrut +20°. Podélným posu-

nem se dosáhne toho, že se obě purinové báze překrývají částí svých povrchů. Takové skládání či vrstvení jedné báze na druhou je udržováno *interakcemi typu van der Waalsových sil, případně jinými elektrostatickými interakcemi*. Zejména hydrofobní interakce vedou k překryvu kterýchkoli dvou bází. Působí stejnou silou u všech bází a přispívají tak ke zvýšení vrtulového zkrutu. Kromě toho páry AT a GC se vyznačují parciálním elektrickým nábojem, který je rozptýlen po jejich plochém povrchu.

VRSTVENÍ BÁZÍ. *Vrstvením bází rozumíme jejich uspořádání v paralelních rovinách v určitém úhlu k ose dvoušroubovice.* O tomto jevu jsme se již několikrát zmínili. Nyní vysvětlíme, které interakce mezi páry bází jej způsobují. Jsou to zhruba tyto tři druhy interakcí:

♦ **1. Hydrofobní interakce.** Lze říci, že páry bází mají tendenci vrstvit se navzájem, aby se vyloučil jejich kontakt s molekulami vody, jak jsme již výše naznačili. To se uskutečňuje hydrofobními účinky bází, kterými se narušují vodíkové vazby $\text{H} \cdots \text{O}$ mezi molekulami vody (obr. 59). Těsný kontakt sousedních párů bází pak způsobuje, že se vyloučí molekuly vody mezi nimi. Proto je optimální vrstvení bází takové, že se jedna báze vrství těsně na druhou za vyloučení molekul vody.

♦ **2. Distribuce elektrických nábojů v bázi nebo v párech bází.** Horní a spodní povrch báze nebo páru bází se vyznačuje slabým elektrickým nábojem. Jak je z obr. 60 zřejmé, elektrony, které se uplatňují mezi atomy kterékoli báze, leží nad hlavní částí kruhu nebo pod ním. Kladný náboj jader atomů (uhlík,



Obr. 60

Rozložení elektrických nábojů v bázi nebo páru bází

Tab. 3
Průměrné parametry A-, B- a Z-konformací dsDNA

	Charakteristika dvoušroubovice		
	Konformace A	Konformace B	Konformace Z
Vinutí	pravotočivé	pravotočivé	levotočivé
Celkový tvar	krátká a široká	dlouhá a tenká	podlouhá a tenká
Umístění osy dvoušroubovice	přes větší žlábek	přes páry bází	přes menší žlábek
Větší žlábek šířka hloubka	velmi úzký a hluboký 0,27 nm 1,35 nm	široký a hluboký 1,17 nm 0,88 nm	zploštělý na povrchu 0,88 nm 0,37 nm
Menší žlábek šířka hloubka	velmi široký a mělký 1,1 nm 0,28 nm	úzký a hluboký 0,57 nm 0,75 nm	velmi úzký a hluboký 0,2 nm 1,38 nm
Zvýšení na pár bází	~ 0,23 nm	~ 0,34 nm	~ 0,38 nm
Zvýšení na jeden závit (otáčku)	~ 2,5 nm	~ 3,4 nm	~ 4, 6 nm
Počet párů bází na jeden závit	~ 11	~ 10,5	~ 12
Konformace glykozidové vazby	anti	anti	anti u C syn u G
Konformace deoxyribózy	C3'-endo	C2'-endo	C2'-endo u dC C3'-endo u dG

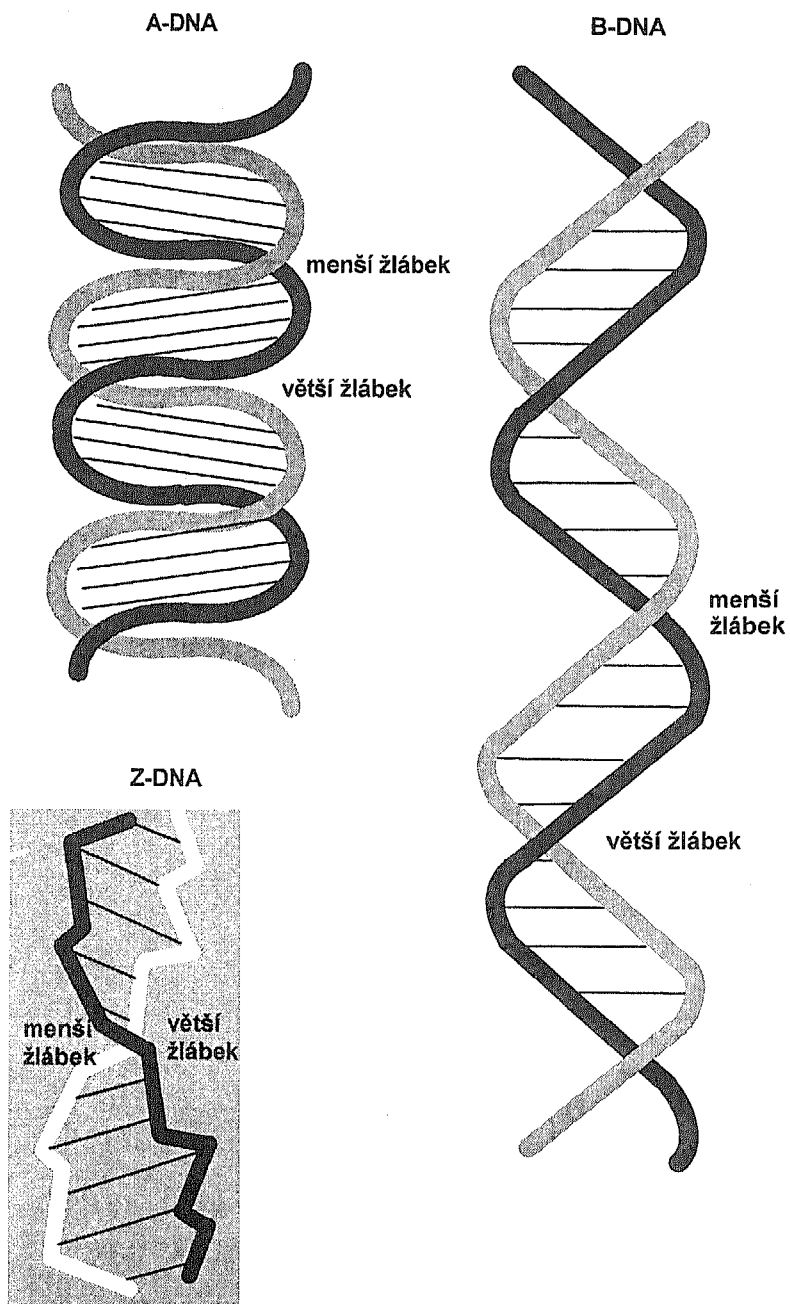
párů bází kolem osy dvoušroubovice připomíná točité schodiště, v němž jednotlivé schody by představovaly páry bází. Obr. 63 schematicky znázorňuje rotaci párů bází v A-DNA. Tento obrázek Vám pomůže představit si, jak se promítá právě v A-DNA výkret z roviny a posun páru bází do jejich polohy při otáčení. Důležitý je obr. 64, ve kterém je znázorněno umístění os v dvoušroubovicích A-DNA, B-DNA a Z-DNA. Molekulární model DNA v konformaci A je uve-

dusík, kyslík), které tvoří molekulu báze, leží blízko středu kruhu. Když dvě báze nebo dva páry bází se dostanou do kontaktu svými spodními a horními povrchy, musí se navzájem do určité míry svými zápornými náboji odpuzovat. Ideálního vertikálního vrstvení dvou párů bází se dosáhne při posunu páru bází rovném nule. Zde docházíme na první pohled k určitému rozporu s tím, co bylo řečeno výše, a to že úplné vrstvení bází je vhodné z toho důvodu, že při něm dochází k vyloučení molekul vody mezi bázemi. Nyní však vidíme, že se jeví jako velmi nepříznivé, když ho uvažujeme v souvislosti se silným odpuzováním záporných nábojů mezi páry bází s úplným vrstvením. Kdyby nebyly přítomny molekuly vody, dva sousední páry bází by se odpuzovaly jako severní póly dvou magnetů. Obecně páry bází v DNA se navzájem posouvají zleva doprava a naopak, aby unikly tomuto odpuzování. Proto páry bází musí mít záporný nebo kladný posun. V obou případech odpuzování záporných nábojů se zmenší tím, že se zvětší vzdálenost mezi páry bází a pak může nastat určité přitahování kladných a záporných nábojů mezi jádry jednoho páru bází a elektrony druhého (obr. 60).

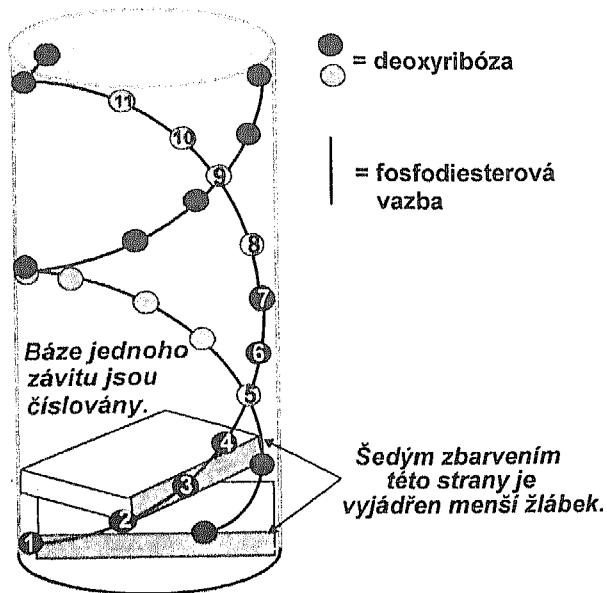
Je tedy zřejmé, že uvedený účinek nábojů na povrchu bází je přesně opačný vzhledem k hydrofobnímu účinku, pokud se týká vrstvení sousedních párů bází. Který z obou účinků je však silnější? To závisí na množství vody, která obklopuje báze. *U DNA s vysokou relativní vlhkostí převládne hydrofobní účinek. Účinek nábojů převládá u DNA s nižší relativní vlhkostí. Proto v konformaci B se DNA (str. 83) vyznačuje podélným posunem párů bází blízkým nule, kdežto DNA v konformaci A, u níž jsou hydrofobní síly slabší, se vyznačuje záporným podélným posunem a DNA v konformaci C posunem kladným. V konformaci C, které nabývá při nízké relativní vlhkosti a vysokých koncentracích solí, má 9,3 nukleotidů na jednu otáčku.*

Závěrem je třeba zdůraznit, že všechny uvedené interakce je nutno uvažovat vcelku, v jejich souvislosti. Všechny také ovlivňují konformaci DNA. Klíčové postavení má však vrtulový zkrut, který určuje za daných podmínek možné konformace DNA a posun páru bází.

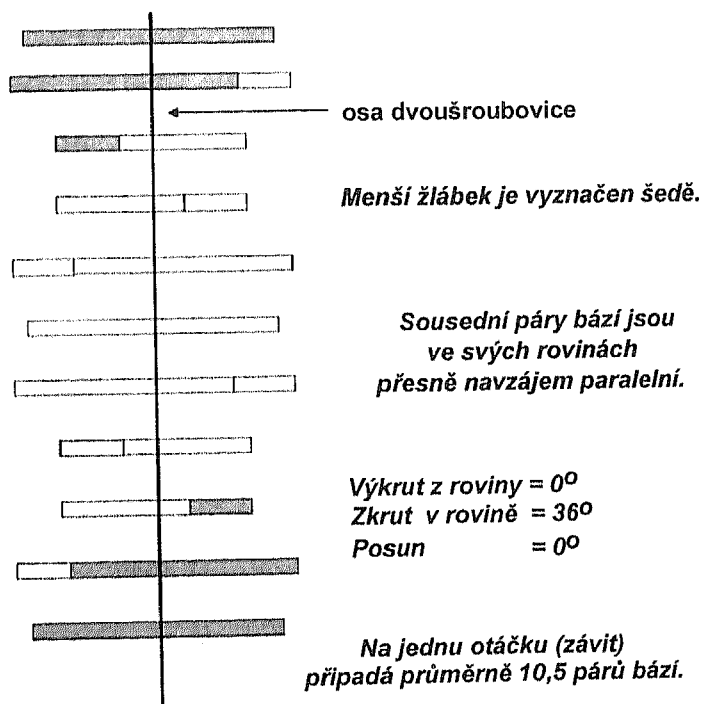
DNA-KONFORMACE A a B. V závislosti především na nukleotidové sekvenci, obsahu vody a iontové síle též DNA, podobně jako proteiny, nabývá za daných podmínek takové konformace, která je v daných podmínkách pro ni energeticky nejvýhodnější. Základní druhy konformace DNA jsou **A, B a Z**. DNA v konformaci **A a B** je *pravotočivá*, kdežto v konformaci **Z** *levočivá*. Rozdíly uvádí tab. 3 a obr. 61, 62, a 63. Doporučujeme prostudovat všechny uvedené obrázky včetně tab. 3, neboť jsou v nich základní údaje, co se týče jednotlivých konformací DNA, které nejsou uvedeny v textu. Obr. 61 poskytuje základní schéma všech tří konformací. Na obr. 62 je promítnuta B-DNA do pomyslného válce a je i zdůrazněna rotace párů bází rovinnými zkruty. Otáčení



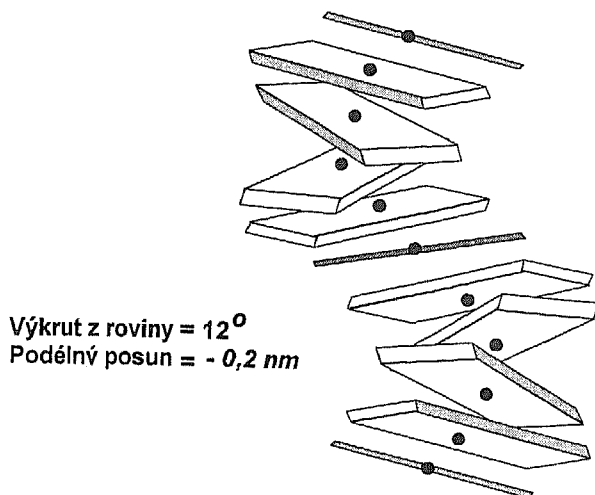
Obr. 61
Tři konformace DNA



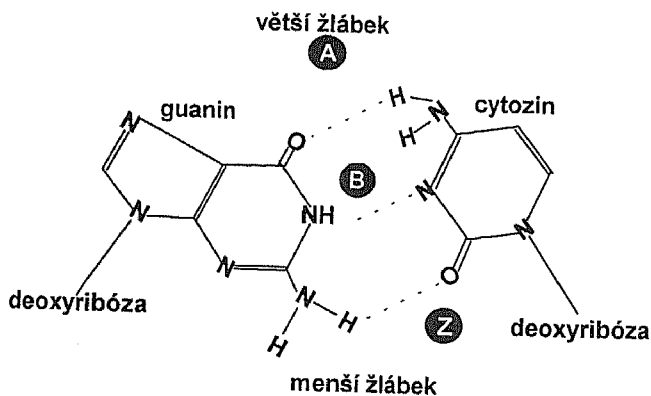
Pohled zpředu ze strany menšího žláčku.



Obr. 62
Pohled na otáčení párů bází v dvoušroubovici B-DNA

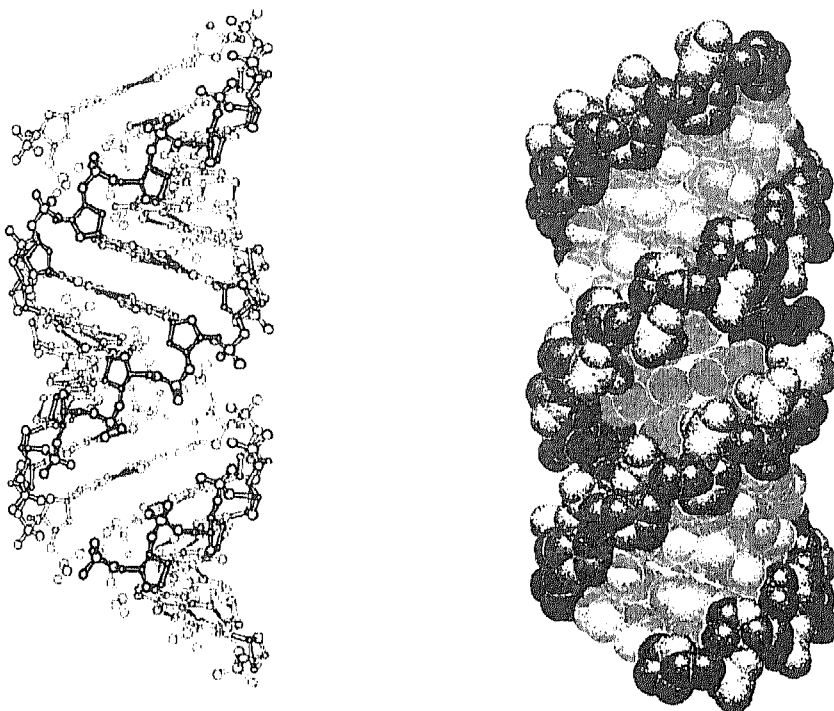


Obr. 63
Pohled na otáčení párů bází ve dvoušroubovicové A-DNA



Obr. 64
Umístění os DNA v konformaci A, B, Z

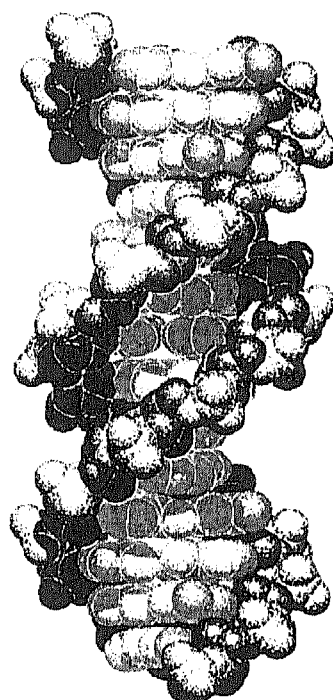
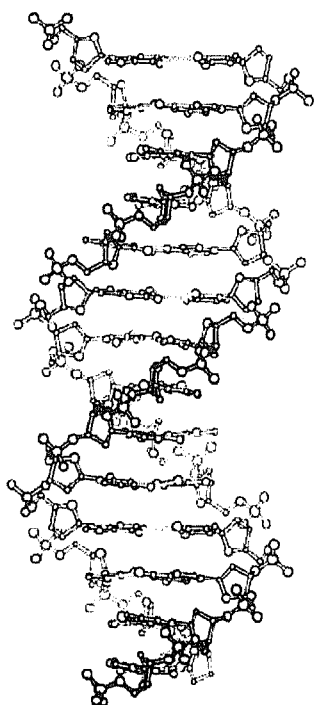
den na obr. 65, v konformaci B na obr. 66 a v konformaci Z na obr. 67. Nyní budeme pokračovat v popisu jednotlivých konformací DNA. B-DNA je stabilní při relativní vlhkosti 95 %. Je to dvoušroubovice, kterou popsali Watson a Crick v roce 1953. Především stránky obsahují její popis. Při relativní vlhkosti kolem 75 % je DNA v konformaci A. Zdůrazníme jen některé rozdíly, jinak odkazujeme na tab. 3. U B-DNA je větší žlábek hluboký a široký, kdežto menší žlábek je hluboký a úzký. A-DNA má větší žlábek úzký a velmi hluboký a men-



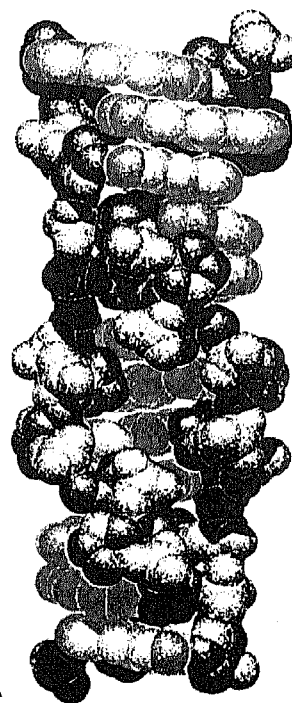
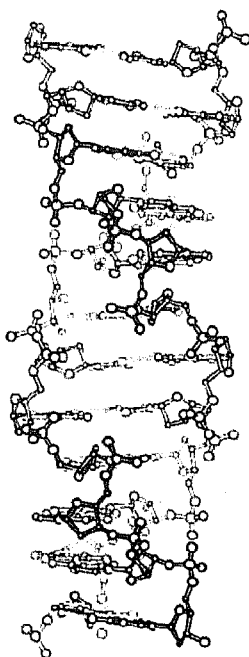
Obr. 65
Molekulární model A-DNA

ší je široký a mělký. Co se týče celkového tvaru molekuly, A-DNA je molekula krátká a plochá, B-DNA je tenší a vyšší. Osa dvoušroubovice u B-DNA prochází páry bází, u A-DNA prochází větším žlábkem. B-DNA se vyznačuje konformací C2'-endo a A-DNA konformací C3'-endo. Konformace glykozidových vazeb v A- i B-DNA je *anti* jak u purinových, tak i pyrimidinových nukleotidů. Pyrimidinové nukleotidy preferují v B- i A-DNA konformaci *anti* z toho důvodu, že v této konformaci u nich dochází k odstranění sterické zábrany, která vzniká, jestliže se nacházejí v konformaci *syn*. Všimněte si však v tab. 3 dalších parametrů, které charakterizují jednotlivé konformace dvoušroubovicové DNA.

Při vysoké relativní vlhkosti je B-DNA stabilizována molekulami vody téměř u každého atomu schopného vytvářet s nimi vodíkové vazby. Takto se vytvoří kolem dvoušroubovice vodní obal. Po odstranění molekul vody (*dehydrataci*) přechází B-forma na A-formu. Jaký je biologický význam konformací A a B? B-konformace je základní. Vyskytuje se ve všech prokaryotických a eukaryotických buňkách a také v DNA-virech. Do jaké míry jsou rozšířeny v živých soustavách ostatní konformace DNA, není zatím známo. A-DNA se vyskytuje ve sporách bacilů.

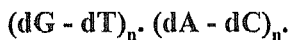


Obr. 66
Molekulární model B-DNA



Obr. 67
Molekulární model Z-DNA

DNA-KONFORMACE Z. Z-DNA je, co se týče celkového tvaru, podlouhlá. Je to levotočivá dvoušroubovice, jejíž osa prochází menším žlábkem, který je však velmi úzký a hluboký, kdežto větší žlábek je plochý. *Konformace glykozidových vazeb je v Z-DNA u cytozinu anti a u guaninu syn* (tab. 3). Konformace *syn* u cytozinu není možná z důvodu sterické srážky jeho O2-atomu s ribofuranózovým kruhem. Název Z pochází z toho, že konformace *anti-syn* se podél osy dvoušroubovice pravidelně střídají a způsobují lokální obrat DNA-řetězce, což má za následek klikatost a levotočivost páteře DNA. Konformace nukleozidů je C2'-endo u dC a C3'-endo u dG. Z-DNA se vyznačuje zkrutem v rovině $-50,6^\circ$ pro GC s posunem $-0,11$ nm. Avšak pro CG je zkrut v rovině -9° s posunem $0,54$ nm (tab. 3), což jsou pro osu posunu krajní hodnoty, které jsou neslučitelné s pravotočivou dvoušroubovicí B-DNA, u níž je zkrut v rovině 36° a posun $0,04$ nm. Na druhé straně ve svém celku vyhovují tyto extrémní hodnoty levotočivé dvoušroubovici typu Z. Bylo to i experimentálně potvrzeno na dvoušroubovicových polymerech



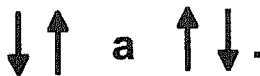
Výsledkem těchto změn je, že menší žlábek Z-DNA je tak hluboký, že obsahuje v podstatě osu dvoušroubovice, zatímco větší žlábek Z-DNA má vypouklý povrch s odkrytým C5 cytozinu a N7 a C8 guaninu (obr. 67).

Z-konformace byla poprvé pozorována u syntetického oligomeru

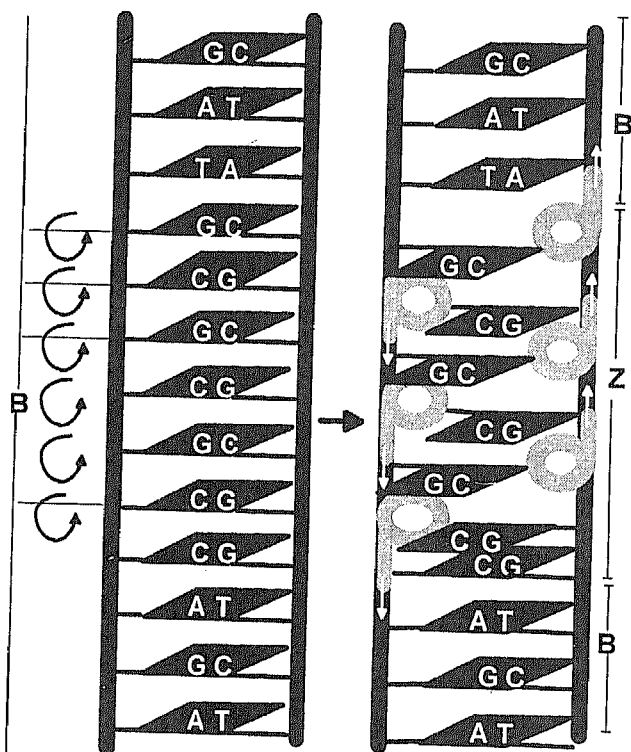


ve vodném roztoku s $2,5$ M NaCl. *Purinový kruh v N-glykozidových vazbách tohoto kopolymeru se vyskytoval v konformaci syn, kdežto pyrimidinový kruh byl v konformaci anti.* Sekvence střídajících se purinů-pyrimidinů byla pak klíčem k pochopení strukturálních zvláštností Z-DNA. Jestliže B-DNA obsahuje úseky, v nichž se za sebou střídají páry GC, pak při vysokém obsahu solí dochází na takových úsecích k přechodu z B - DNA na Z - DNA. *Při tomto přechodu se mění konformace glykozidové vazby z anti na syn u guaninu, zatímco konformace anti zůstává u cytozinu* (obr. 68).

Segmenty levotočivé Z-DNA mohou existovat vedle segmentů pravotočivé B-DNA. Bylo to experimentálně potvrzeno *in vivo* i *in vitro*. V takových molekulách B-DNA je pak orientace antiparalelních řetězců v segmentech B-DNA opačná vzhledem k antiparalelním řetězcům v Z-DNA, tj.



Přechodná oblast mezi takovými dvěma úseky se označuje jako spoj B-Z a je dlouhý 3 bp. Konformační změna dvoušroubovicových pravotočivých úseků na levotočivé se označuje jako přechod B - Z. Přesný mechanismus těchto změn není známý.



Segment o šesti párech bází B-DNA přechází v Z-DNA, jak je naznačeno černými šipkami. Základem tohoto přechodu je rotace purinových kruhů deoxyguanozinu za konformační změny glykozidové vazby z anti na syn, aniž se mění konformace glykozidových vazeb v deoxycytidinu. Střídání konformace syn-anti způsobuje klikatost (cikcak) páteře Z-DNA a její levotočivost.

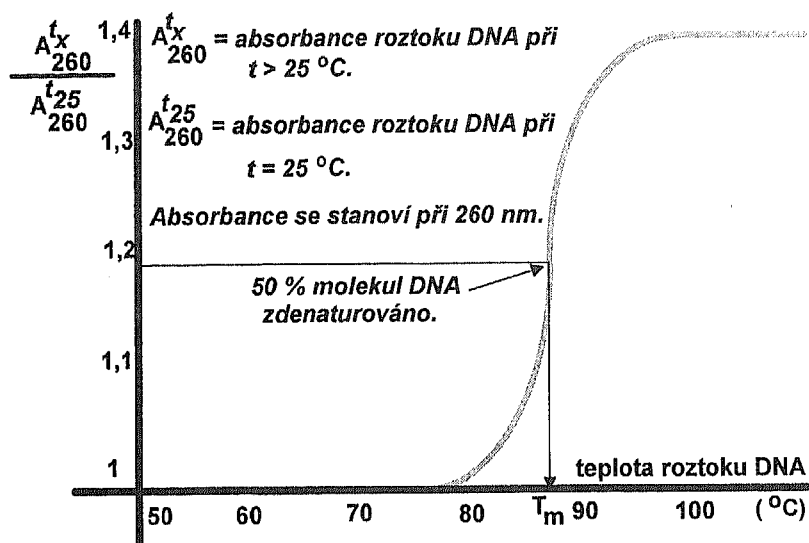
Obr. 68

Schematické znázornění přechodu úseku B-DNA v Z-DNA

Řada experimentálních údajů nasvědčuje, že Z-DNA se pravděpodobně uplatňuje v rekombinačních dějích, v regulaci genové exprese a v interakcích DNA-DNA, DNA-RNA a DNA-protein.

DENATURACE DVOUŠROBOVICOVÉ DNA. Při zvýšené teplotě se přerušují vodíkové vazby, kterými jsou k sobě poutány komplementární DNA-řetězce. *Přechod dvoušroubovicové struktury v samostatné polynukleotidové řetězce se nazývá denaturace DNA.* K denaturaci DNA dochází též i působením jiných vlivů (např. za alkalických podmínek). Zde budeme uvažovat denaturaci DNA vlivem vyšších teplot. Teplota, při které dochází k denaturaci DNA závisí na obsahu guaninu a cytozinu v DNA. *Čím více obsahuje GC-párů, tím vyšší*

teploty je zapotřebí k její denaturaci. Rozmezí denaturačních teplot je zhruba 30 - 100 °C. Denuraci DNA provází hyperchromní efekt, tj. dochází ke zvýšení absorpance ultrafialového světla. Hyperchromní efekt je způsoben rozpadem dvouřetězcových molekul DNA na molekuly jednořetězcové, které absorbují UV-zářeni silněji než molekuly dvouřetězcové. Závislost absorpance UV-světla o vlnové délce 260 nm roztoku dvoušroubovicové DNA na teplotě má tvar sigmoidální křivky (obr. 69). Teplota, při níž zdenaturovalo 50 % dvoušroubovicových molekul DNA, se označuje jako *teplota tání* a vyjadřuje se symbolem T_m . Tato teplota odpovídá inflexnímu bodu denaturační křivky. Teplota tání je lineárně závislá na procentuálním obsahu guaninu a cytozinu dvouřetězcové DNA, neboť čím více obsahuje DNA párů GC, tím vyšší teploty k její denuraci je třeba.



V definovaném roztoku např. platí, že

$$T_m = 69,3 + 0,41 (GC).$$

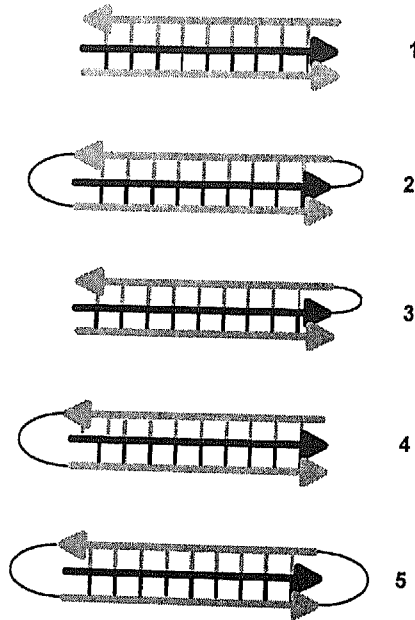
Odtud

$$GC = \frac{T_m - 69,3}{0,41}.$$

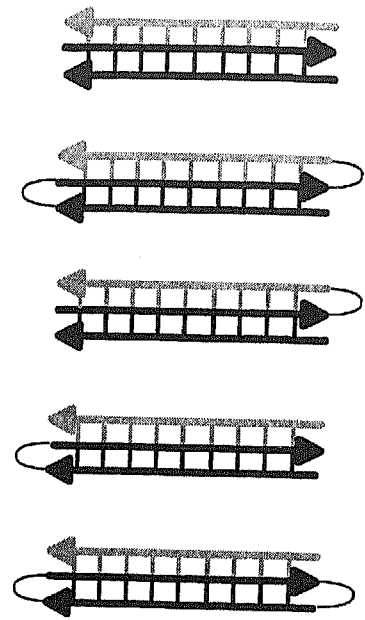
GC = molární podíl guaninu a cytozinu v DNA
 a 0,41 jsou empiricky stanovené koeficienty;
 pro poly(AT) $T_m = 69,3$.

Obr. 69
 Denaturační křivka

Párování typu YR*Y



Párování typu YR*R



1. Intermolekulární triplexy sestávající ze tří nezávislých oligonukleotidových řetězců.

2. Intramolekulární triplexy charakteristické dvěma smyčkami.

3. Intermolekulární triplexy tvořené jedním DNA-řetězcem ohýbajícím se do vlásenkové dvojité struktury na komplementárních úsecích a druhým DNA-řetězcem, který se na tuto strukturu váže Hoogsteenovým párováním.

4. Intermolekulární triplexy podobné předchozím, od nichž se liší tím, že vlásenka obsahuje homopurinový nebo homopyrimidinový oligonukleotid párující se v triplexu Hoogsteenovým a Watsonovým-Crickovým způsobem.

5. Intermolekulární triplex obsahující místo vlásenkové struktury krátký kružnicový oligonukleotid.

purinový řetězec

pyrimidinový řetězec

Watsonovo-Crickovo párování



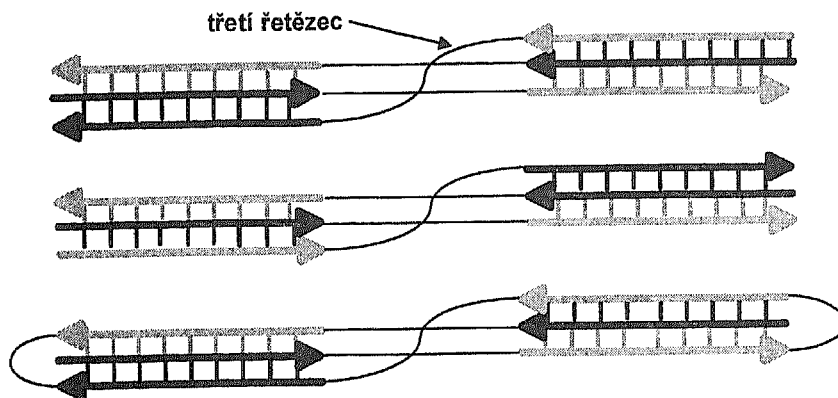
Hoogsteenovo párování



Obr. 71

Typy intra- a intermolekulárních trojšroubovic (triplexů)

Třetí řetězec obsahuje homopurinové a homopyrimidinové úseky, které tvoří Hoogsteenovy vodíkové vazby s puriny alternativních řetězců cílové dvoušroubovice.



Obr. 72
Typy alternativních intramolekulárních a intermolekulárních triplexů vznikající přesunem třetího řetězce

mopolymeru poly (dA). V kopolymerech se mohou střídát všechny purinové a pyrimidinové báze. Trojšroubovicové DNA byly syntetizovány *in vitro*. Trojšroubovicová DNA, tzv. **H-DNA** (obr. 70) byla zjištěna též *in vivo*, a to uvnitř sekvence $d(A-G)_{16}$ rekombinantního plazmidu *pEJ4*. Polovina zbytků cytozinu této DNA je protonována. To znamená, že přechod uvedené sekvence plazmidu do trojšroubovicové struktury H-DNA probíhá v kyselém prostředí a za podmínek, že tato sekvence je v záporném nadšroubovicovém stavu.

G4-DNA. G4-DNA je čtyřřetězcová DNA neboli kvadruplex. Je charakteristická tím, že všechny její řetězce mají vysoký obsah guaninu a mohou mít paralelní nebo antiparalelní orientaci. Guanozinové zbytky v paralelních řetězcích mají konformaci *syn*, zatímco v antiparalelních konformaci *anti*. Ke spojení paralelních řetězců v kvadruplexu dochází tetrádami mezi zbytky guanozinu jednotlivých řetězců. G4-DNA byla dokázána v telomerických sekvencích trypanozom (viz kapitolu o struktuře eukaryotického genomu). Sekvence analogické této DNA nacházející se v telomerách byly studovány na oligonukleotidech *in vitro*. Bylo zjištěno, že za definovaných podmínek dochází mezi souvislými úseky guaninu neboli **G-motivy**, které se podobají makronukleární DNA *prvoků Oxytricha*, na 3'-koncích oligonukleotidů k těmto interakcím (obr. 73, 74):

♦ **Intramolekulární interakce.** Těmito interakcemi se vytváří vlásenka vlivem párování mezi guaniny (obr. 73). Párování guaninů ve vlásence při těchto interakcích lze vysvětlit obráceným Watsonovým-Crickovým párováním bází podle obr. 36b nebo podle obr. 36c.

RENATURACE DVOUŠROBOVICOVÉ DNA. Pochod, který je opačný denaturaci, se označuje jako **renaturace**, tj. *obnovení původní dvoušroubovicové struktury z řetězců uvolněných denaturací*. Renaturace se provádí pozvolným snižováním teploty roztoku obsahujícího denaturovanou DNA. Renaturovat lze i roztoky směsi DNA z různých zdrojů. Při této renaturaci dochází ke spojování sekvenčně příbuzných polynukleotidových řetězců. Tento proces se nazývá **hybridizace molekul DNA** a rozumí se jím *proces spojování částečně nebo úplně komplementárních řetězců pocházejících z různých molekul dsDNA za vzniku hybridních molekul DNA*. *Pravděpodobnost tvorby hybridních molekul DNA je tím vyšší, čím více se shodují hybridizované molekuly v sekvencích neboli čím vyšší je jejich sekvenční homologie*. Stupeň homologie je různý. Zcela homologické nukleové kyseliny se vyznačují stejnou nukleotidovou sekvencí, a tím i stejným obsahem guaninu a cytozinu (viz výše). Avšak obecně neplatí, že nukleové kyseliny o stejném obsahu guaninu a cytozinu musí být sekvenčně homologické. Např. následující sekvence 1) a 2):

1) 5'.....A G A G A G A G A G.....3'
3'.....T C T C T C T C T C T C.....5'

2) 5'.....A A A A A A G G G G G G.....3'
3'.....T T T T T T C C C C C C.....5'

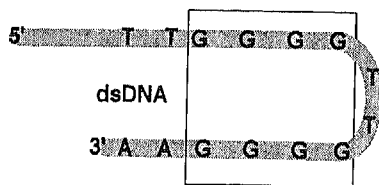
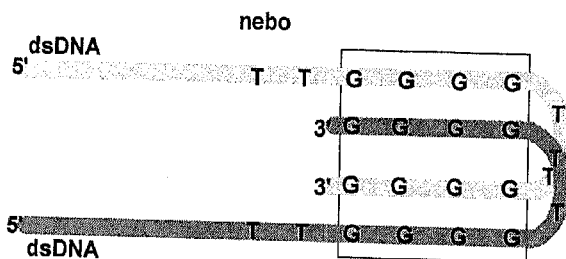
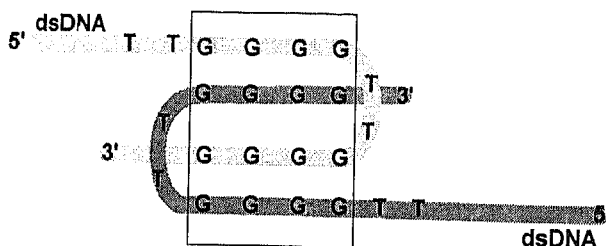
mají stejný obsah GC (guanin + cytozin), ale v sekvenci se podstatně liší.

TROJŠROBOVICOVÁ DNA (DNA-TRIPLEX). Jeden z příkladů takové struktury nacházíme v úsecích dvouřetězcové DNA, v nichž jeden řetězec obsahuje úsek kolem 30 purinových nukleotidů (polypurinový řetězec) a jemu komplementární řetězec obsahuje pyrimidinové nukleotidy (polypyrimidinový řetězec). Jsou to např. dvouřetězcové úseky:

poly(dA)/poly(U), poly(dA)/poly(dT), poly(dAG)/poly(dCT).

V záporných nadšroubovicových závitech při nižším pH se polypyrimidinový řetězec sbaluje nazpět a umístí se ve větším žlábků, kde se Hoogsteenovým způsobem páruje s polypurinovým řetězcem za tvorby trojšroubovicového úseku (obr. 70). Toto je příklad intramolekulárního triplexu, kterým se vyznačuje tzv. H-DNA (viz dále). Není to však jediný typ triplexu. Celkově lze říci, že struktura trojšroubovic je několikerého typu:

◆ 1. Může sestávat ze dvou pyrimidinových a jednoho purinového řetězce (párování bází je typu C G*C nebo T A*T) nebo ze dvou purinových a jednoho pyrimidinového řetězce (párování bází je typu Y R*R).

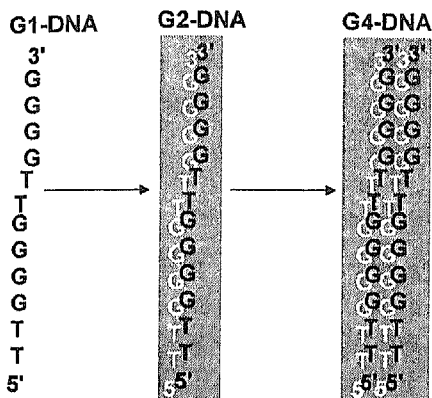
Intramolekulární interakce G-motivů v telomerických sekvencích.**Intermolekulární interakce G-motivů v telomerických sekvencích.**

Obr. 73

Schéma G4-DNA s antiparalelními řetězci

♦ **Intermolekulární interakce.** Tyto se uskutečňují spojením dvou vlásenkových struktur, kterými se vytvářejí *čtyřřetězcové úseky DNA* neboli **G-kvartety**. Orientace fosfodiesterových vazeb v G-kvartetu může být antiparalelní, což je situace znázorněná na obr. 73 nebo paralelní (obr. 74). Některá zjištění ukazují, že v telomerických sekvencích na 3'-koncích makronukleární DNA existují čtyřřetězcové úseky též *in vivo* u rodu *Oxytricha*. Helixy v G4-DNA (G-kvartet), v níž *všechny řetězce jsou paralelní, jsou pravotočivé a všechny nukleotidy jsou v konformaci 2'-endo, a co se týče glykozidové vazby v konformaci anti*. Párování guaninů mezi paralelními řetězci je uvedeno na obr. 43.

PARALELNĚ DVOUŘETĚZCOVÁ DEOXYRIBONUKLEOVÁ KYSELINA. Paralelně dvouřetězcová deoxyribonukleová kyselina se vyznačuje v *obou*



DNA se souvislými motivy guaninu se označuje jako G-DNA. Může být jednořetězcová (G1-DNA), dvouřetězcová (G2-DNA) až čtyřřetězcová (G4-DNA). G4-DNA s paralelním uspořádáním řetězců se *in vitro* může vytvořit z G1-DNA.

Obr. 74
G4-DNA s paralelními řetězci

komplementárních řetězcích stejnou orientací fosfodiesterových vazeb. Párování bází v ní probíhá podle obr. 36b, 36c. Za fyziologických podmínek je stabilní, a proto se uvažuje o jejím biologickém významu. Ten však zatím není jasný, ale je možné, že tato forma DNA se uplatňuje v rekombinačních dějích.

OHNUTÁ DNA. DNA není tuhá lineární struktura, ale dochází k jejímu ohybu na různých místech, a to ze dvou důvodů:

- ◆ 1. Vlivem specifických proteinů, které se na ni vážou.
- ◆ 2. Některé DNA mají inherentní schopnost k ohýbání. Jsou to takové, které obsahují souvislé úseky sestavené z bloků dT - dA neboli poly (dT)-poly (dA). Ohnutá DNA se vyskytuje zvláště na počátku replikace DNA.

1.2.4

Terciární struktura DNA

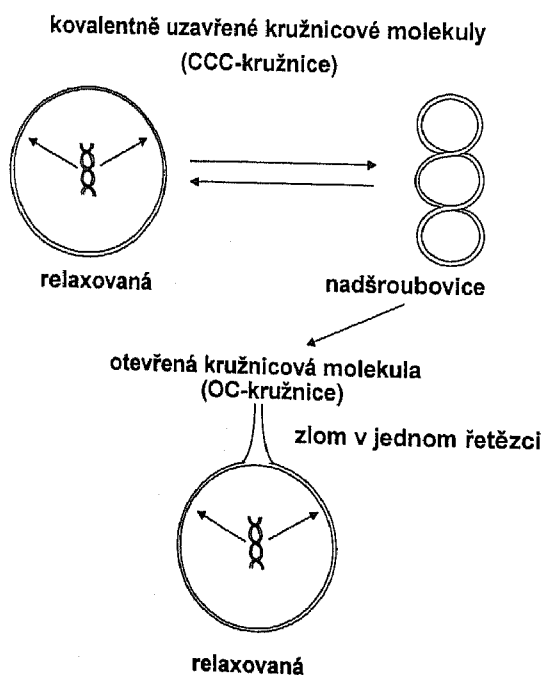
NADŠROUBOVICE. Zavede-li se do dvoušroubovicové DNA další vinutí, vytvoří se její terciární struktura, která se označuje jako **nadšroubovice** neboli **superhelix**. *Vinutí, kterým vzniká z dvoušroubovicové DNA její nadšroubovice, budeme označovat jako nadšroubovicové vinutí. Nadšroubovice je tedy DNA vyznačující se nadšroubovicovým vinutím. DNA nevyznačující se*

nadšroubovicovým vinutím má jen primární a sekundární strukturu a označuje se jako **relaxovaná**, jestliže vznikla zrušením nadšroubovicového vinutí. Nadšroubovice se může vytvořit jak z lineární, tak i z kružnicové dsDNA. Kružnicová molekula dsDNA se proto vyskytuje jako (obr. 75):

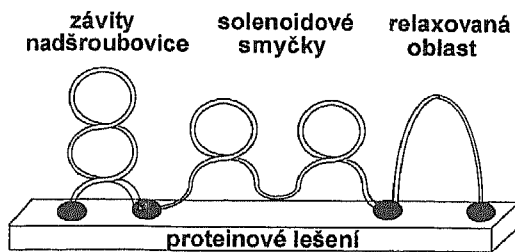
- ◆ a) **kovalentně uzavřená kružnice** (zkr. CCC), což je dsDNA, která nemá volné konce ani zlom (tj. přerušení fosfodiesterové vazby) v řetězcích; může se vyskytovat v nadšroubovicové nebo relaxované formě;
- ◆ b) **otevřená kružnice** (zkr. OC), která představuje relaxovanou dvoušroubovicovou kružnicovou DNA se zlomem alespoň v jednom z řetězců.

Lineární molekula DNA může přejít do nadšroubovicové konformace, jsou-li oba její konce připevněny k nějakému substrátu, jako např. eukaryotická DNA, která se v chromozomu váže k proteinovému lešení. Nadšroubovicové závitě v lineární DNA mají tvar solenoidových smyček. Samozřejmě i tato DNA může přecházet do relaxovaného stavu (obr. 76).

NADŠROUBOVICOVÉ VINUTÍ. Předpokládejme, že nadšroubovice v B-konformaci je v relaxovaném stavu. Z toho stavu může přejít do nadšroubovicové formy dvojím způsobem (obr. 77):



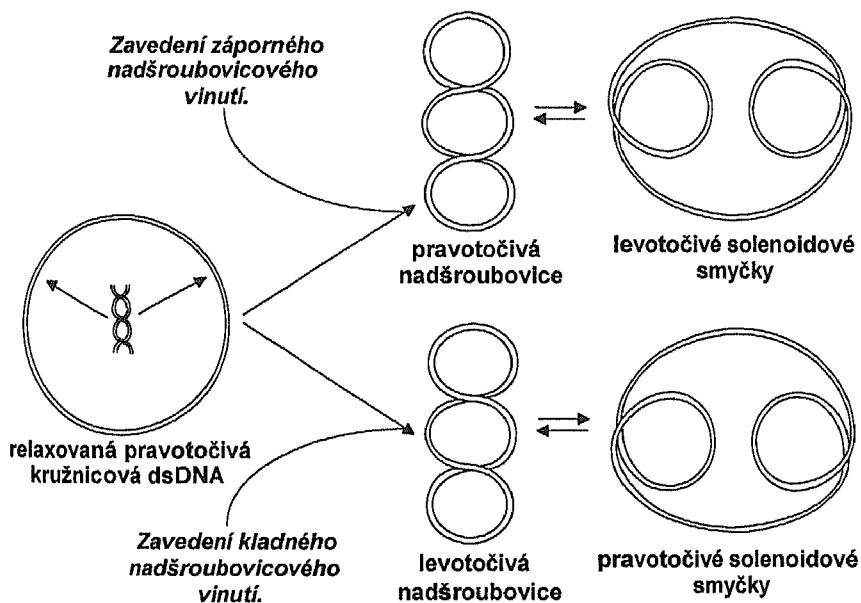
Obr. 75
Konformace dvouřetězcových
kružnicových molekul DNA



Eukaryotická DNA, která je lineární a dvouřetězcová, se váže k proteinovému lešení. Tvoří se v ní závity nadšroubovice, solenoidové smyčky a také relaxované oblasti.

Obr. 76
Nadšroubovicové a relaxované oblasti
v lineární dvouřetězcové DNA

♦ 1. Záporným nadšroubovicovým vinutím, které se uskuteční odvíjením řetězců spojených vodíkovými vazbami a vede ke snížení počtu dvoušroubovicových závitů, jelikož odvíjením se počet vodíkových vazeb mezi řetězci sníží. Odvíjení vyvolá v dvoušroubovici pnutí, které se uvolní vytvořením nadšroubovicových závitů. Závity nadšroubovice, které se vytvořily záporným vinutím, se



Obr. 77
Přechod relaxované DNA do nadšroubovicové

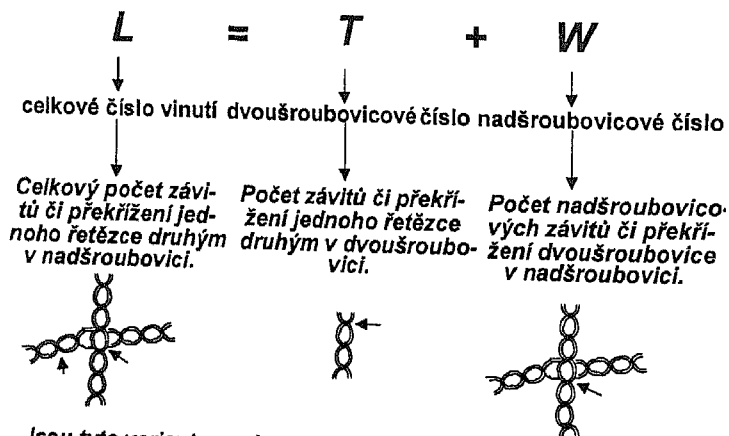
označují jako **nadšroubovicové závitů záporné**. Snížení počtu závitů v dvoušroubovici, které je jen dočasné, je tedy kompenzováno tvorbou závitů nadšroubovicových. Z relaxované kružnicové B-dsDNA, která je pravotočivá, vzniká takto pravotočivá nadšroubovice nebo kružnicová B-dsDNA s levotočivými solenoidovými smyčkami. Obě formy dsDNA jsou také topologicky ekvivalentní a může jedna v druhou přecházet.

◆ **2. Kladným nadšroubovicovým vinutím**, které se uskuteční *svinováním řetězců spojených vodíkovými vazbami a vede ke zvýšení počtu dvoušroubovicových závitů*. I zde dochází k pnutí, které se uvolní tvorbou nadšroubovicových závitů za vzniku levotočivé nadšroubovice nebo kružnicové B-dsDNA s pravotočivými solenoidovými závitů. Obě formy dsDNA jsou topologicky ekvivalentní. Závitů nadšroubovice, které se vytvořily kladným vinutím, se označují též jako **závitů nadšroubovicové kladné**.

U levotočivé relaxované dvoušroubovice vede záporné vinutí k levotočivé nadšroubovici a k pravotočivým solenoidovým smyčkám, zatímco kladné vinutí vede k pravotočivé nadšroubovici a k levotočivým solenoidovým smyčkám.

Nadšroubovice, která vzniká záporným nadšroubovicovým vinutím, se označuje jako **záporná nadšroubovice** na rozdíl od **kladné nadšroubovice**, která vzniká vinutím kladným.

TOPOLOGICKÉ PARAMETRY NADŠROUBOVICE. Parametry charakterizující nadšroubovici jsou (obr. 78):



Jsou tyto varianty po dosazení do uvedené rovnice:

$$42 = 42 + 0 = \text{relaxovaná molekula,}$$

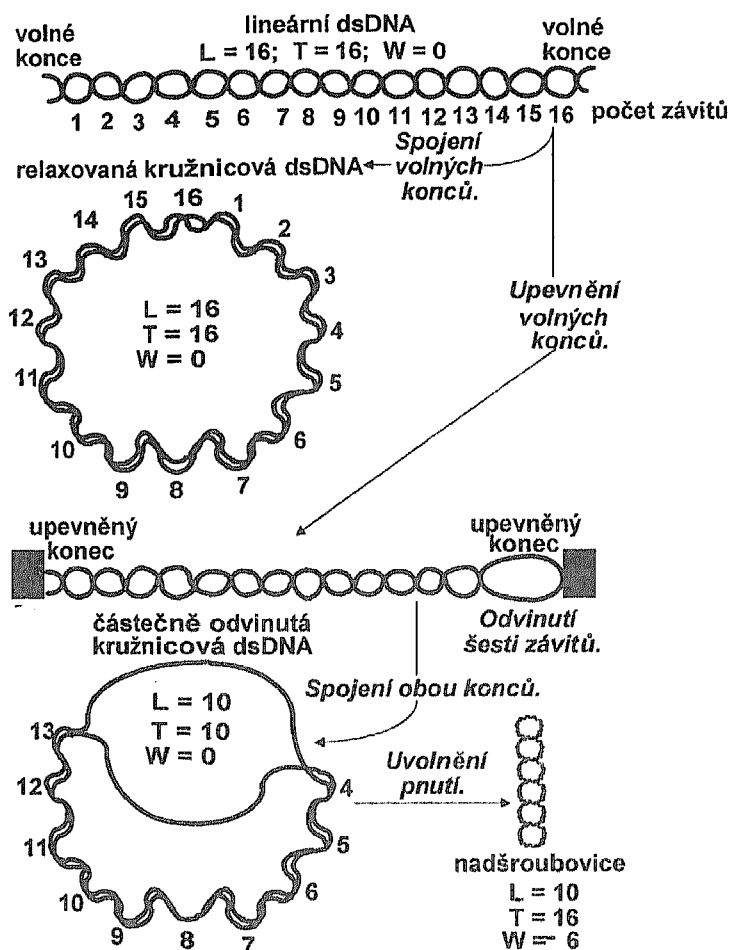
$$36 = 42 - 6 = \text{záporná nadšroubovice,}$$

$$48 = 42 + 6 = \text{kladná nadšroubovice.}$$

Obr. 78
Parametry nadšroubovice

- ◆ a) celkové číslo vinutí L ,
- ◆ b) dvoušroubovicové číslo T ,
- ◆ c) nadšroubovicové číslo W .

Dvoušroubovicové číslo T a celkové číslo vinutí L jsou kladná čísla pro pravotočivou dvoušroubovici, zatímco W je záporné číslo, jestliže vyjadřuje počet záporných nadšroubovicových závitů, anebo kladné číslo, vyjadřuje-li počet kladných nadšroubovicových závitů. Jako příklad vysvětlující vyčíslení parametrů nadšroubovice je na obr. 79 schematicky znázorněna následující úvaha, kterou můžeme konkrétně doprovázet manipulací s tenkými gumovými hadičkami poměrně vhodně napodobujícími dvoušroubovici i nadšroubovici.



Obr. 79

Vysvětlení vztahu mezi veličinami L , T a W

Začneme s lineární dvoušroubovicí, pro kterou pochopitelně platí, že

$$L = T.$$

Jestliže volné konce lineární dvoušroubovice spojíme, obdržíme relaxovanou kružnicovou dsDNA, pro kterou platí též výše uvedený vztah. Upevníme-li však původně volné konce lineární dvoušroubovicové DNA, můžeme z ní ubírat nebo k ní přidávat závit. Na obr. 79 je uveden příklad s ubíráním šesti závitů. Toho dosáhneme záporným nadšroubovicovým vinutím, tj. odvinováním (rušením vodíkových vazeb v párech bází) dvoušroubovice. Důsledkem toho je, že dvoušroubovicové číslo T je o šest závitů nižší a o stejný počet závitů je nižší celkové číslo vinutí L . To je však jen velmi přechodný stav, jelikož proces odvinování dvoušroubovicových závitů zavádí do odvinované dvoušroubovicové DNA pnutí (napětí v torzi), které se uvolní přechodem dvoušroubovice do nadšroubovice, tedy vytvořením šesti nadšroubovicových závitů, *kterými je kompenzován dočasný úbytek šesti dvoušroubovicových závitů*. Proces odvinování se nemůže uskutečňovat neomezeně, jelikož *dvoušroubovice DNA má tendenci zachovávat B-konformaci, pro kterou je charakteristické, že na jeden dvoušroubovicový závit připadá asi 10,5 párů bází. Nelze tedy počet dvoušroubovicových závitů libovolně měnit*. V realitě to znamená, že změny v DNA vyvolané pnutím se rozšíří po celé molekule, aniž se dvoušroubovicové vinutí sníží. Jak nyní dosadíme do rovnice

$$L = T + W ?$$

Za T nebudeme dosazovat číslo 10, ale 16, což je v důsledku tendence zachování původní struktury v B-konformaci. Vytvořilo se však 6 nadšroubovicových závitů, které mají zápornou hodnotu, jelikož vznikly odvinováním dvoušroubovicové DNA. Do výše uvedené rovnice tedy konkrétně dosadíme:

$$10 = 16 - 6.$$

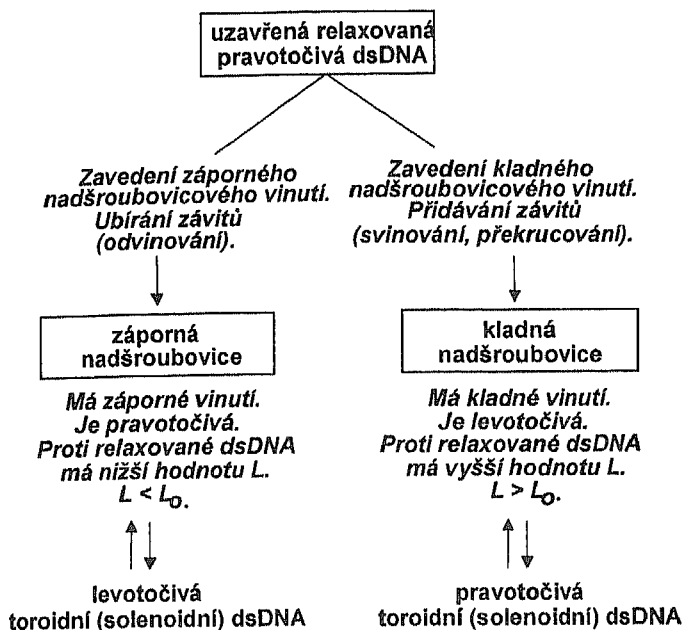
Toto vyčíslení rovnice vyjadřuje, že *celkové číslo vinutí se proti částečně a přechodně odvinuté kružnicové DNA nezměnilo, zachoval se původní počet dvoušroubovicových závitů a vytvořilo se šest závitů nadšroubovicových*.

Pro případ, kdy budeme u stejné molekuly DNA uvažovat kladné nadšroubovicové vinutí, tj. její svinování (překrucování) za dosažení šesti dvoušroubovicových závitů navíc proti 16, bychom do uvedené rovnice dosadili:

$$22 = 16 + 6.$$

Celkové číslo vinutí L se zde rovná tomu, které platí pro částečně svinutou kružnicovou dsDNA.

Prakticky při hodnocení stupně relaxace molekuly DNA nebo míry jejího nadšroubovicového vinutí se porovnává její celkové číslo vinutí L s celkovým číslem vinutí L_0 pro DNA úplně relaxovanou za daných podmínek, což v našich předchozích úvahách byla relaxovaná DNA před svinováním a odvinováním (obr. 79). Potom platí, že *L je nižší než L_0 u záporné nadšroubovice a u kladné nadšroubovice je vyšší* (obr. 80). *Molekuly DNA, které se od relaxované DNA*



Obr. 80

Přechod relaxované uzavřené dsDNA do nadšroubovice nebo toroidní (solenoidní) dsDNA

(a také navzájem) liší celkovým číslem vinutí, se označují jako **topologické izomery DNA**.

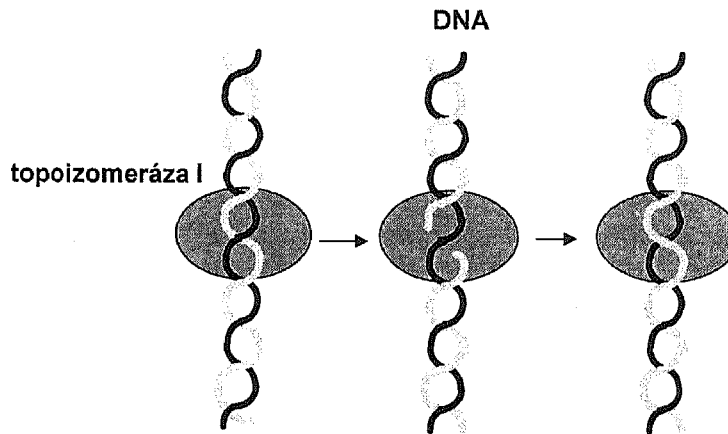
TOPOIZOMERÁZY. Topoizomerázy jsou enzymy, které *katalyzují změny v celkovém čísle vinutí dsDNA*. Jejich charakteristika a účinek na vinutí nadšroubovice jsou uvedeny v tab. 4. Existují dva typy těchto enzymů:

- ◆ **1. Topoizomerázy I.** Přemísťují jeden neporušený řetězec přes zlom protilehlého řetězce v dvoušroubovici (obr. 81).
- ◆ **2. Topoizomerázy II.** Přemísťují neporušenou dsDNA přes zlomy obou řetězců protilehlé dvoušroubovice (obr. 82).

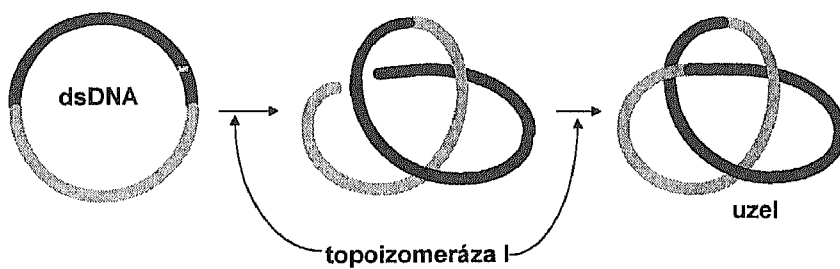
Topoizomerázy mohou relaxovat kladnou i zápornou nadšroubovici, což je důležité při transkripci nebo replikaci. Kromě toho vedou k tvorbě uzlů a katenanů. Vlivem topoizomerázy I může jednořetězcová kružnicová DNA přejít do konformace nazývané **uzel**, tj. *struktura, která vznikla provlečením naštěpených konců jednořetězcové kružnicové DNA*. Tento pochod se nazývá **zauzlení** (obr. 83). *Vzájemným provlečením dvou nebo více dvouřetězcových kružnicových molekul DNA katalyzovaným topoizomerázou II vzniká katenan*. Pochod se označuje jako **katenace** (obr. 83).

Tab. 4
Základní vlastnosti DNA-topoizomeráz

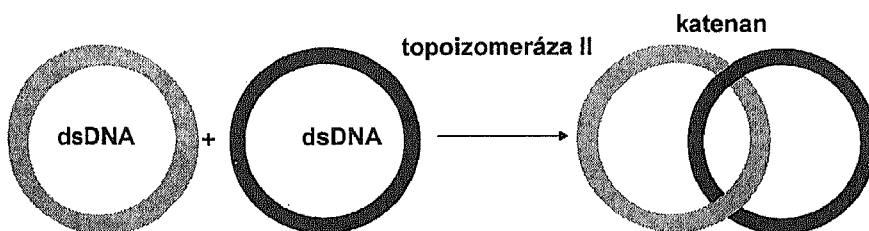
Enzym	Vliv na L	Činnost
Prokaryotická topoizomeráza I	zvyšuje L	relaxuje zápornou nadšroubovici
Prokaryotická topoizomeráza II	snižuje L zvyšuje L	navozuje záporné vinutí v závislosti na ATP relaxuje zápornou nadšroubovici nezávisle na ATP
Eukaryotická topoizomeráza I	zvyšuje L snižuje L	relaxuje zápornou nadšroubovici relaxuje kladnou nadšroubovici
Eukaryotická topoizomeráza II	zvyšuje L snižuje L	relaxuje zápornou nadšroubovici relaxuje kladnou nadšroubovici



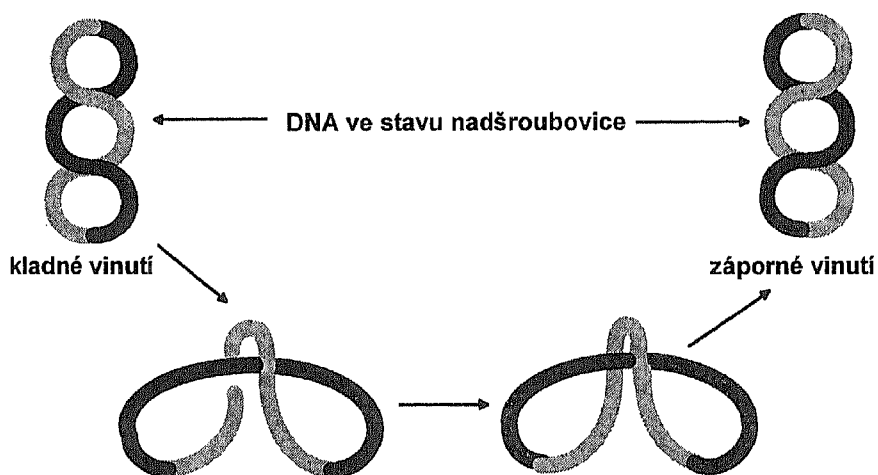
Obr. 81
Účinek topoizomerázy I



Obr. 82
Katenace



Obr. 83
Zauzlení



Obr. 84

Převedení kladného vinutí nadšroubovice na záporné účinkem bakteriální gyrázy

Na obr. 84 se vysvětluje, jak konkrétně jedna z topoizomeráz II označovaná jako **DNA-gyráza** převeďe v bakteriální DNA kladné vinutí na záporné.

1.2.5

Organizace nukleotidových sekvencí na DNA izolované ze živých soustav

Nukleotidové sekvence DNA jsou buď jedinečné, nebo repetitivní. Pod pojmem **jedinečná DNA-sequence** se rozumí sekvence, která se v haploidním genomu příslušného druhu organismu vyskytuje pouze jedenkrát. Z valné části odpovídají jedinečné sekvence strukturním genům (viz kapitolu o genetickém kódu). Jako **repetitivní sekvence** nebo **repetice** se označuje DNA-sequence, která se v haploidním genomu mnohonásobně opakuje. Je to např. v centromere chromozomu 2 *D. melanogaster* opakování krátké sekvence ATAAT, tedy:

ATAATATAATATAATATAATATAATATAATATAATATAAT....

Opakovaná sekvence se označuje jako **jednotka repetice**. Její délka je vyjádřena počtem nukleotidů, které ji tvoří. Počet jednotek dané repetice v haploidním genomu buňky se označuje jako **četnost repetice**. Repetice jsou zvláště charakteristické pro DNA izolovanou z jader eukaryotických organismů. V následujících odstavcích jsou popsány jednotlivé typy.

TANDEMOVÉ REPETICE. Jako tandemová se označuje taková repetice, v níž se určitá jednotka opakuje v tandemu, tj. bezprostředně za sebou. Délka jednotek je většinou 5 až 10 bp, ale u obratlovců a rostlin je 20 až 200 bp. Četnost těchto repeticí je 10^6 až 10^7 . Tvoří průměrně 5 až 15 % DNA haploidního genomu eukaryot a jsou označovány též jako "vysoce opakující se sekvence". Vyskytují se téměř výhradně v heterochromatinové oblasti centromery a do RNA se nepřepisují.

OBRÁCENÉ REPETICE. Jako obrácená repetice se označuje nukleotidová sekvence opakovaná na stejném DNA-řetězci ve své komplementární podobě a na komplementárním DNA-řetězci v protisměru. Příklad:

5'.....ATGC.....GCAT.....3'
3'.....TACG.....CGTA.....5'

Jestliže jsou obrácené repetice přilehlé, tj. bezprostředně spolu sousedí, označují se jako **palindrom**. Příklad:

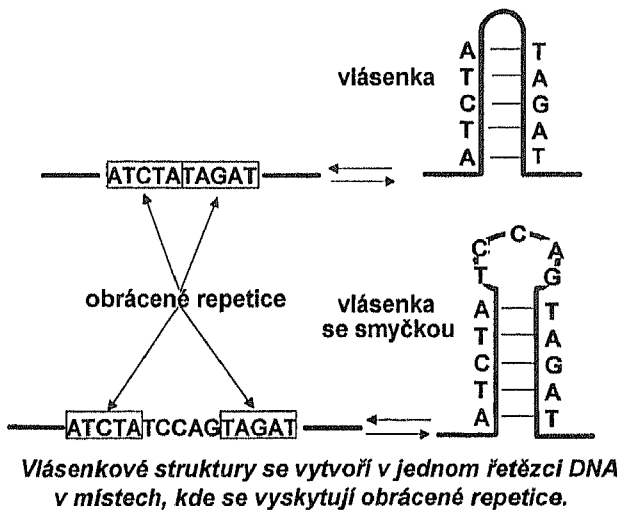
5'..... ATGC|GCAT.....3'
 3'..... TACG|CGTA.....5'

Výskyt obrácených repeticí vede k tvorbě vlásenek a křížových struktur. **Vlásenka** je dvoušroubovicová struktura vzniklá párováním komplementárních nukleotidových sekvencí na téže DNA- nebo RNA-řetězci. Jestliže obě komplementární sekvence na téže řetězci spolu nesousedí, tvoří se vlásenka se smyčkou v DNA (obr. 85). **Křížová struktura** vzniká spárováním obrácených repeticí na obou komplementárních řetězcích dsDNA (obr. 86).

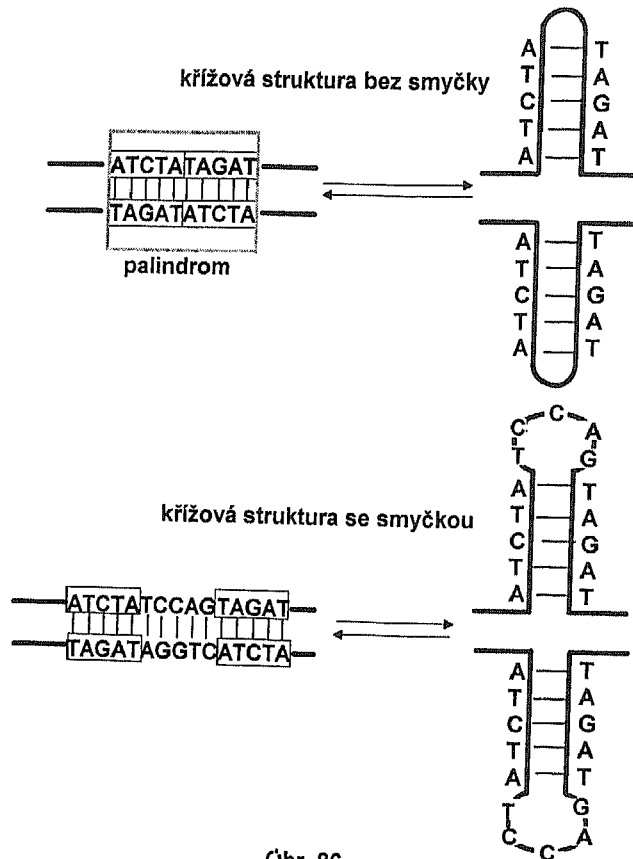
PŘÍMÁ REPETICE. Tou se rozumí sekvence opakovaná ve stejném směru na téže DNA-řetězci, např.:

5'.....ATGC.....ATGC.....3'
 3'.....TACG.....TACG.....5'

DLOUHÁ KONCOVÁ REPETICE NEBOLI LTR-SEKVENCE. Je to dlouhá přímá repetice na obou koncích téhož DNA-řetězce, přičemž konce každé sekvence LTR jsou navzájem ve vztahu obrácených repeticí:



Obr. 85
 Schéma vlásenkových struktur DNA



Óbr. 86
Schéma křížových struktur DNA

5'-ATGC.....GCAT.....ATGC.....GCAT-3'
3'-TACG.....CGTA.....TACG.....GCAT-5'

Sekvence LTR jsou podtrženy a tečkami jsou vyjádřeny jedinečné sekvence.

ROZPTÝLENÉ REPETICE. Jsou to DNA-sekvence, jejichž jednotlivé kopie se vyskytují na různých místech haploidního genomu. Všechny mají vlastnosti transpozonů, jejichž přemístěné kopie se vyskytují na různých místech DNA (o transpozonech se píše ve čtvrtém dílu této učebnice). Co do délky se rozlišují:

a) **krátké rozptýlené repetice**, které jsou dlouhé přibližně 300 bp. Patří sem např. sekvence Alu (viz kapitola o genomu eukaryot),

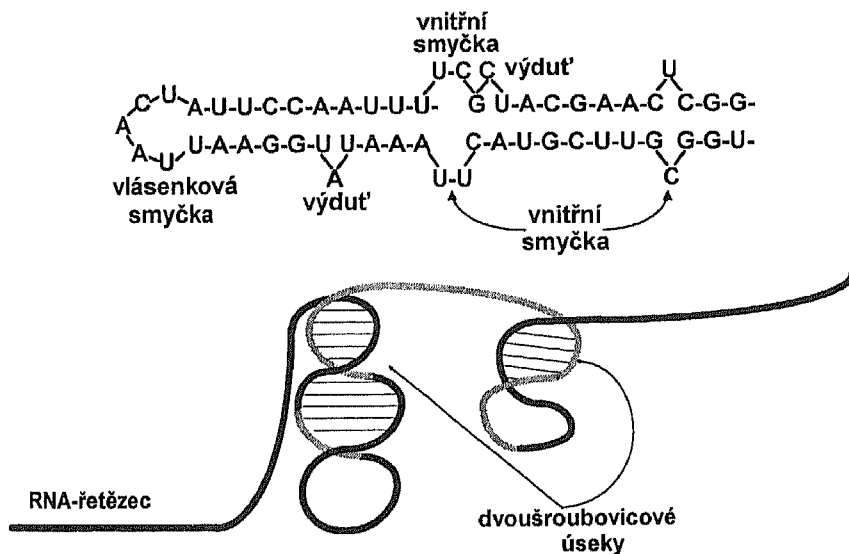
b) **dlouhé rozptýlené repetice**, jejichž délka je větší než 300 bp.

1.2.6 Obecná charakteristika struktury ribonukleových kyselin

STRUKTURNÍ PRVKY SEKUNDÁRNÍ STRUKTURY RNA. Ribonukleová kyselina se vyznačuje mnohem větší strukturální rozmanitostí než DNA. Tato strukturální rozmanitost je silně spjata se specifickými funkcemi různých funkčních typů RNA. Každá RNA určitého funkčního typu se vyznačuje strukturálními zvláštnostmi přizpůsobenými ke specifické funkci, kterou RNA v buňce vykonává. V těchto zvláštnostech se však uplatňují v různé míře a v různých kombinacích některé základní strukturální prvky, které jsou zachyceny ve schématu na obr. 87. Jsou to především:

♦ **Vlásenková smyčka v RNA.** Vzniká tak, že se RNA-řetězec spojí v komplementárních úsecích Watsonovým-Crickovým způsobem za vzniku nespárovaného úseku ve formě smyčky. Za smyčkou následuje spárovaný úsek, který jsme již v předchozí stati označili jako vlásenku (obr. 85). Smyčky se rozlišují podle počtu bází, které je tvoří. V některých RNA má většina smyček čtyři nespárované báze, což jsou tzv. čtyřbázové smyčky. Smyčky sestávající ze tří nespárovaných bází se označují jako třibázové smyčky.

Ve smyčkách, např. čtyřbázových, se vyskytují též neobvyklé vodíkové



Obr. 87
Strukturální prvky sekundární struktury RNA

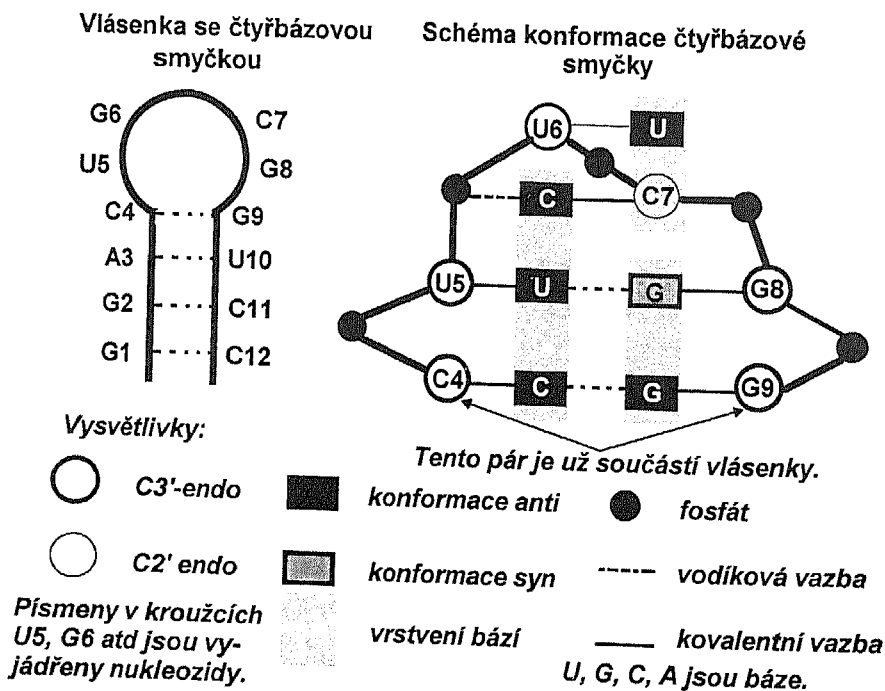
vazby mezi bázemi. Např. smyčka sestavená z UUCG má Watsonův-Crickův kolísavý pár U5-G8 (obr. 91b), který smyčku uzavírá (obr. 88). Další zvláštností této smyčky je, že C7 se váže vodíkovou vazbou ke kyslíku fosfátového zbytku páteře smyčky. Oběma vazbami, a také vrstvením bází (str. 77) se smyčka stabilizuje. Toliko U6 netvoří vodíkovou vazbu. Všimněte si také různých konformací glykozidových vazeb a nukleozidů! U G8 je např. na rozdíl od G9 konformace *syn* a C7 má jako jediný v této sestavě konformaci *C2'-endo*. Tyto rozdíly jsou příčinou prudké otáčky páru U5-G8 do tvaru smyčky.

◆ **Výdutí.** Tato struktura se tvoří v případech, kdy je na jedné straně duplexu přebytečné množství nukleotidů, které pak nemají komplementární protějšek. Výdutě tvořené jedním nebo více nukleotidy mají na strukturu RNA tento vliv:

1. Narušují vrstvení bází v duplexu.
2. Indukují ohyb RNA.
3. Snižují stabilitu duplexu.

◆ **Vnitřní smyčky.** Vznikají v případech, kdy chybí v daném dvouřetězcovém úseku Watsonovo-Crickovo párování. Mohou zahrnovat jeden nebo dvě pyrimidinové báze nebo páry purin-purin, pyrimidin-pyrimidin.

◆ **Dvoušroubovicové oblasti RNA.** Molekuly RNA vytvářejí v různých ú-

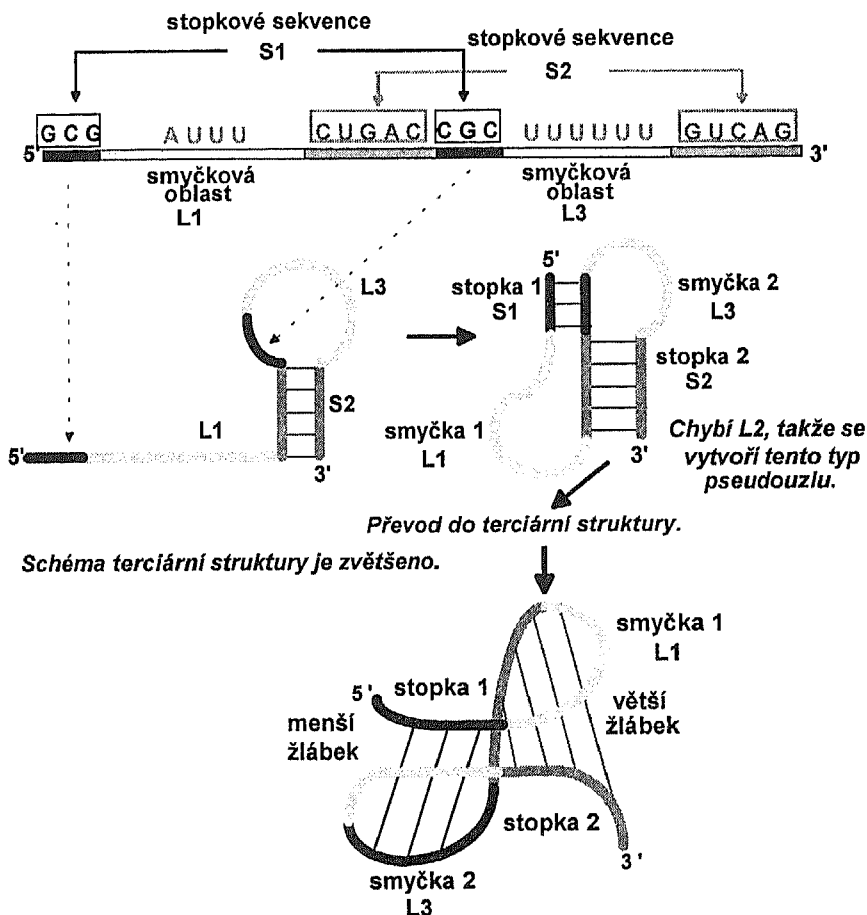


Obr. 88
Čtyřbázová smyčka

secích dvoušroubovicové struktury, jejichž základem je většinou párování bází *Watsonovým-Crickovým způsobem*.

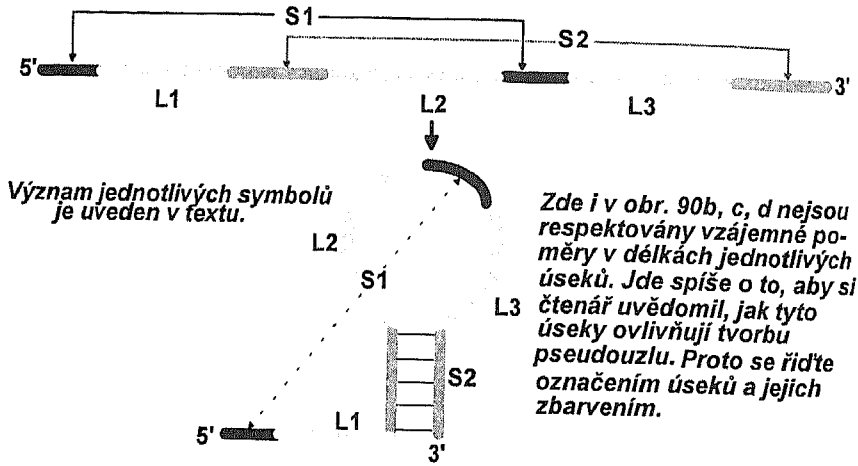
PSEUDOZULY. Pseudouzly jsou příkladem strukturních prvků terciární struktury RNA. Vznikají *Watsonovým-Crickovým způsobem párování bází mezi některým úsekem vnitřní smyčky nebo smyčky ve vlásence a komplementárním jednořetězcovým úsekem, který se nachází mimo smyčku vlásenkou a vnitřní* (obr. 89). Pseudouzlel je vždy vymezen sekvencemi umožňujícími vytvořit dvě stopky (dvě komplementární sekvence pro stopku S1 a dvě pro stopku S2) a smyčkovými oblastmi (tj. sekvence tvořící smyčky L1, L2 a L3).

U zevšeobecněného pseudouzlu na obr. 90a jsou znázorněny všechny tři smyčkové oblasti (L1, L2, L3). *Jestliže jedna z těchto oblastí chybí, vznikají*



Obr. 89

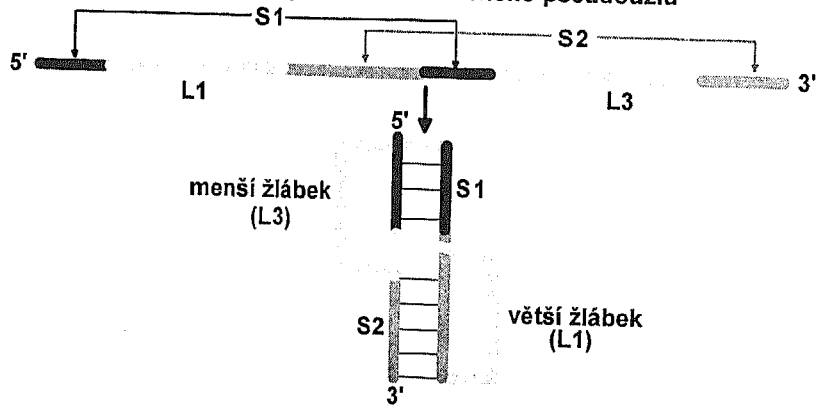
Znázornění tvorby pseudouzlu a jeho převedení do terciární struktury



Význam jednotlivých symbolů je uveden v textu.

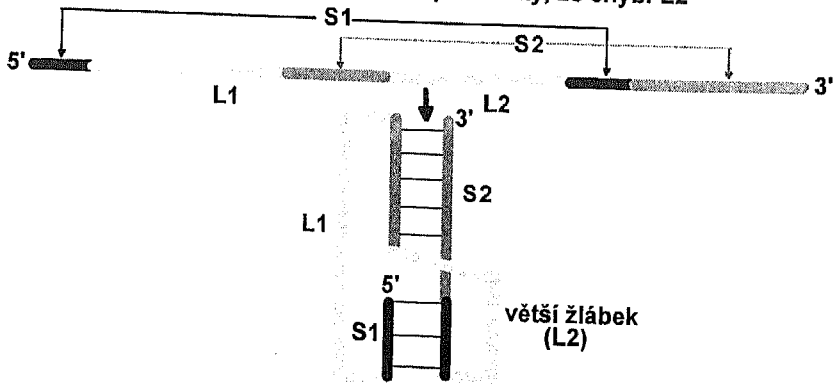
Zde i v obr. 90b, c, d nejsou respektovány vzájemné poměry v délkách jednotlivých úseků. Jde spíše o to, aby si čtenář uvědomil, jak tyto úseky ovlivňují tvorbu pseudouzlu. Proto se řídíte označením úseků a jejich zbarvením.

Obr. 90a
Vznik a popis zevšeobecněného pseudouzlu



Obr. 90b

Vznik pseudouzlu za podmínky, že chybí L2



Obr. 90c

Vznik pseudouzlu za podmínky, že chybí L3

různé typy pseudouzlů. V takovém případě párující se smyčková oblast přiléhá k jiné stopce a umožní pak, aby nastalo souosé vrstvení dvou stopek. Takto vznikají např. následující tři typy pseudouzlů:

- ◆ pseudouzel bez smyčkové oblasti L2 (obr. 90b),
- ◆ pseudouzel bez smyčkové oblasti L3 (obr. 90c),
- ◆ pseudouzel bez smyčkové oblasti L1 (obr. 90d).

Obě výsledné smyčky pokrývají menší a větší žlábek úseku podobného dvoušroubovici (jedna kříží v úseku podobném dvoušroubovici menší žlábek a druhá větší).

Poznámka: Při odvozování struktury jednotlivých typů pseudouzlů vycházejte ze struktury uvedené před šipkou na obr. 90b, 90c a 90d, resp. si pomáhejte schématem na obr. 89.

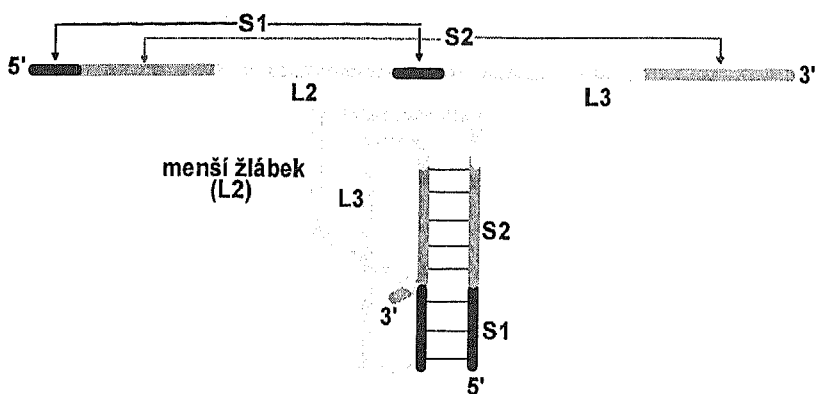
Všechny uvedené typy pseudouzlů jsou **pseudouzly typu H**, tj. *pseudouzly odvozené z vlásenkové smyčky*. Existují též **pseudouzly typu B**, tj. *odvozené z výdutě* a **pseudouzly typu I**, tj. *odvozené z vnitřní smyčky*.

Znalost pseudouzlů je důležitá pro pochopení terciární struktury RNA.

PÁROVÁNÍ BÁZÍ V SEKUNDÁRNÍCH STRUKTURÁCH RNA A V INTERAKCÍCH MEZI RNA ŘETĚZCI. V sekundárních strukturách RNA, jejichž strukturní prvky jsme právě popsali, a také mezi RNA-řetězci při různých molekulárních dějích v buňce, se kromě běžného Watsonova-Crickova párování bází uplatňují též různé odchylky od tohoto párování. Popíšeme jen ty, které byly prokázány na krystalických strukturách kvasinkové tRNA^{Phe} nebo ve čtyřbázových smyčkách (teoreticky jsou však možné i další způsoby párování bází, které zde však neuvádíme). Jsou to:

- ◆ obrácené Watsonovo-Crickovo párování guaninu s cytozinem a obrácené Hoogsteenovo párování adeninu s cytozinem (obr. 91a);
- ◆ obrácené kolísavé párování guaninu s uracilem a adeninu s cytozinem (obr. 91b);
- ◆ párování adeninu s adeninem a guaninu s guaninem (obr. 91c);
- ◆ párování adeninu s guaninem (obr. 91d);
- ◆ párování uracilu s cytozinem (91e).

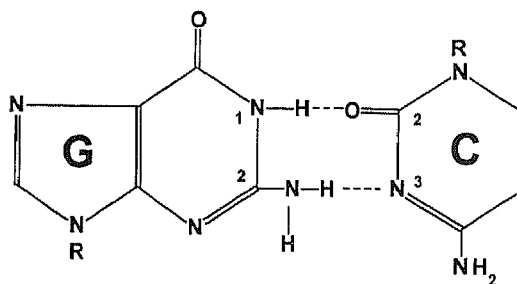
Poznámka: Obrácené kolísavé párování bází je "obrácené" vzhledem ke kolísavému párování, které bude vysvětleno až v kapitole pojednávající o genetickém kódu, jelikož se uplatňuje v interakcích mRNA s tRNA.



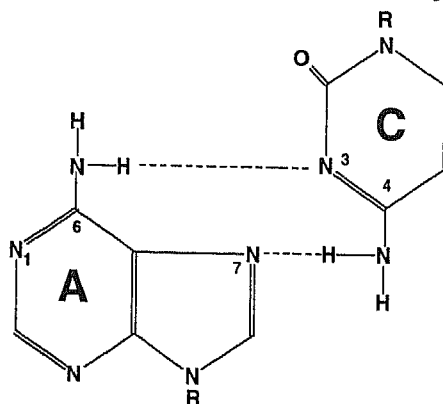
Obr. 90d

Vznik pseudouzlu za podmínky, že chybí smyčková oblast L1

Obrácené Watsonovo-Crickovo párování guaninu s cytozinem.



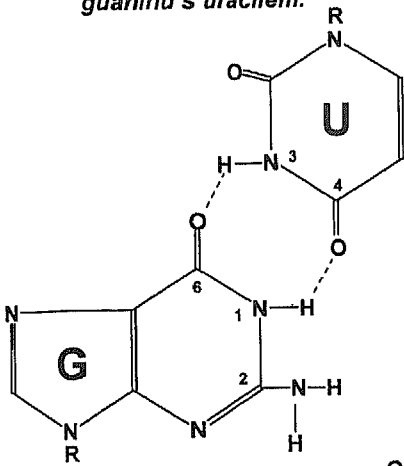
Obrácené Hoogsteenovo párování adeninu s cytozinem.



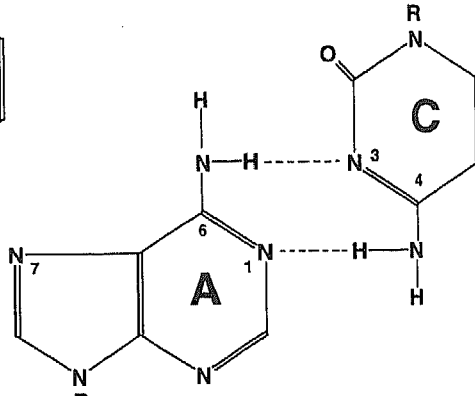
Obr. 91a

Odchylky od Watsonova-Crickova párování bází
v RNA se sekundární strukturou

*Obrácené kolísavé párování
guaninu s uracilem.*

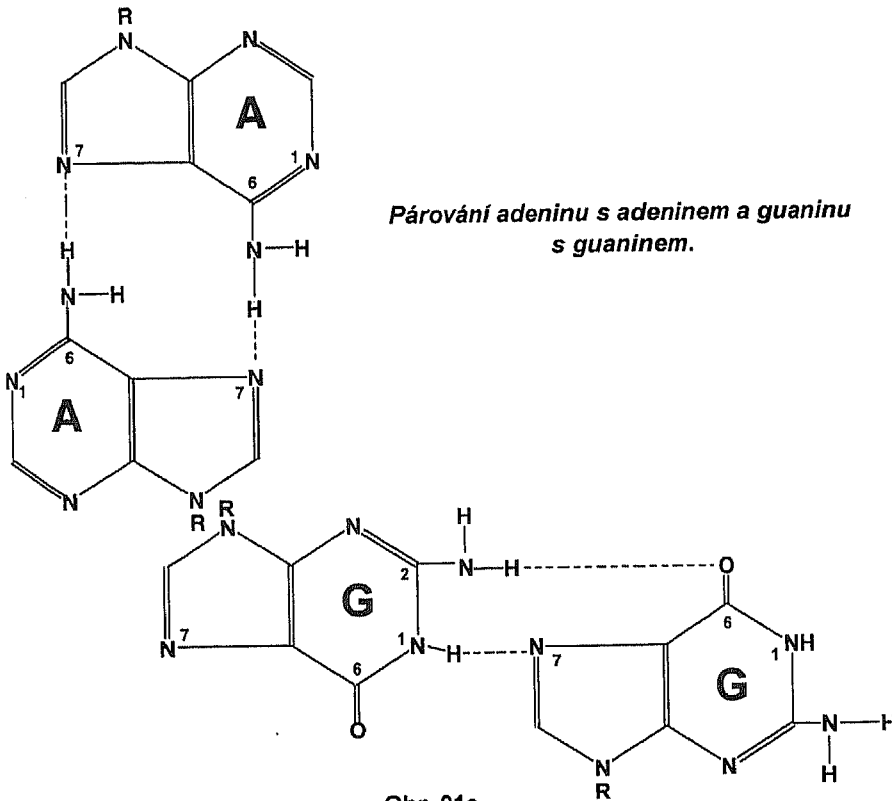


*Obrácené kolísavé párování
adeninu s cytozinem.*



Obr. 91b

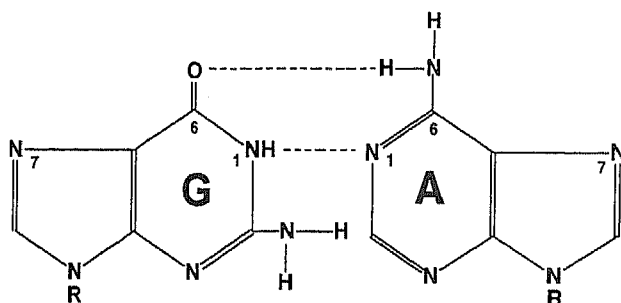
Odchyly od Watsonova-Crickova párování bází
v RNA se sekundární strukturou a mezi RNA-řetězci



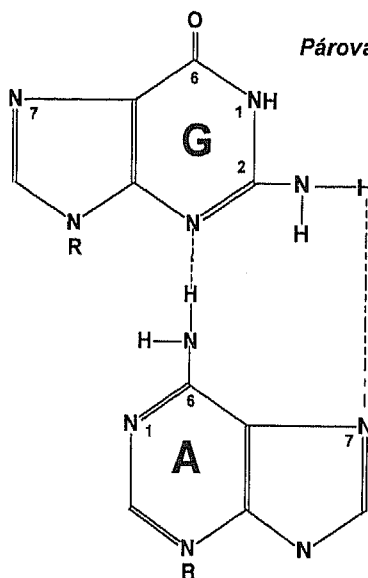
*Párování adeninu s adeninem a guaninu
s guaninem.*

Obr. 91c

Odchyly od Watsonova-Crickova párování bází
v RNA se sekundární strukturou a mezi RNA-řetězci



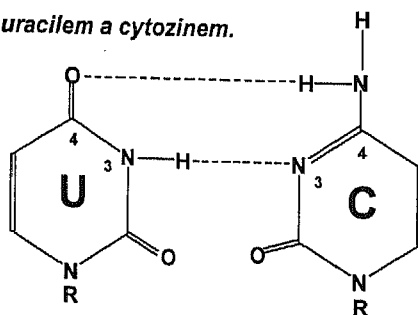
Párování bází mezi guaninem a adeninem.



Obr. 91d

Odchyly od Watsonova-Crickova párování bází
v RNA se sekundární strukturou a mezi RNA-řetězci

Párování bází mezi uracilem a cytozinem.



Obr. 91e

Odchyly od Watsonova-Crickova párování bází
v RNA se sekundární strukturou a mezi RNA-řetězci

1.3 VAZEBNÉ INTERAKCE PROTEINŮ S DNA

1.3.1 Obecná charakteristika vazebných interakcí DNA s proteiny

VÝZNAM α -HELIXŮ (α -ŠROUBOVIC). V přenosu genetické informace významnou úlohu sehrává vazba proteinů na specifické úseky DNA, což jsou hlavně tzv. regulační oblasti, tj. promotory, operátory atd. Jakmile se totiž určitý specifický protein naváže na regulační oblast, aktivuje nebo zastaví se molekulární děj, který je touto oblastí řízen. Např. jestliže se protein označovaný jako represor naváže na regulační oblast, která má funkci operátoru (což je jedna z regulačních oblastí u prokaryot), zastaví se transkripce genů, které s ní sousedí. Po uvolnění represoru z operátoru se opět zahájí transkripce těchto genů. Avšak aby k transkripci došlo, je často nutná ještě řada dalších proteinů, tzv. transkripčních faktorů, vázajících se na specifická místa DNA. A nesmíme též zapomenout na enzymy, které procesy transkripce a replikace DNA katalyzují. I ty se vážou k regulačním oblastem na DNA. Jakým způsobem však specifický protein, např. transkripční faktor, enzym, represor aj. "pozná místo, ke kterému se má navázat?" Jinými slovy, jaká je molekulární podstata rozpoznávání specifických míst na DNA, např. regulačních oblastí, proteiny? *Většina dobře charakterizovaných proteinů, schopných se vázat na DNA, využívá k vazbě na DNA interakcí α -helixů s větším žlábkem. Zřejmě tvar a rozměry α -helixů umožňují, že dobře zapadají do většího žlábkem. Řada údajů nasvědčuje tomu, že oblasti proteinů kolem rozpoznávacích helixů napomáhají též k tomu, jak se má ve žlábkem α -helix umístit.* Významnou roli zde sehrávají nukleotidy a jejich sekvence ve vazebném místě pro protein a tomu odpovídající vhodná sekvence aminokyselin v místě, kterým se protein váže k DNA.

INTERAKCE PROTEINŮ S BÁZEMI DNA. Jsou to především:

- ◆ přímé vodíkové vazby mezi aminokyselinami proteinu a bázemi;
- ◆ příležitostné vodíkové vazby mezi polypeptidovou kóstrou a bázemi;
- ◆ vodíkové vazby zprostředkované molekulami vody;
- ◆ hydrofobní interakce.

Přestože k některým interakcím též dochází v menším žlábků (např. N-terminální rameno homeodomény), je větší žlábek nejlépe rozeznávaným místem. Tato skutečnost není překvapující, jelikož *větší žlábek je vzhledem ke své velikosti přístupnější a poskytuje více možností pro tvorbu vodíkových vazeb a hydrofobních kontaktů než žlábek menší*. Neexistuje však strohá korespondence mezi bázemi a aminokyselinami, na něž se báze vážou. Některé báze tvoří vodíkové vazby s různými aminokyselinami, což se vysvětluje tím, že *do značné míry sekundární struktura proteinu určuje, které aminokyseliny se budou s bázemi vázat*. Celkově platí, že

- ◆ guanin má značný význam při tvorbě vodíkových vazeb mezi bázemi a aminokyselinami (obr. 92);
- ◆ některé aminokyseliny u příbuzných rozpoznávacích proteinů se zúčastňují rozpoznávání stejným způsobem. Např. glutamin na začátku rozpoznávacího helixu tvoří vodíkové vazby s adeninem a asparagin na konci tvoří vazbu s páteří DNA.

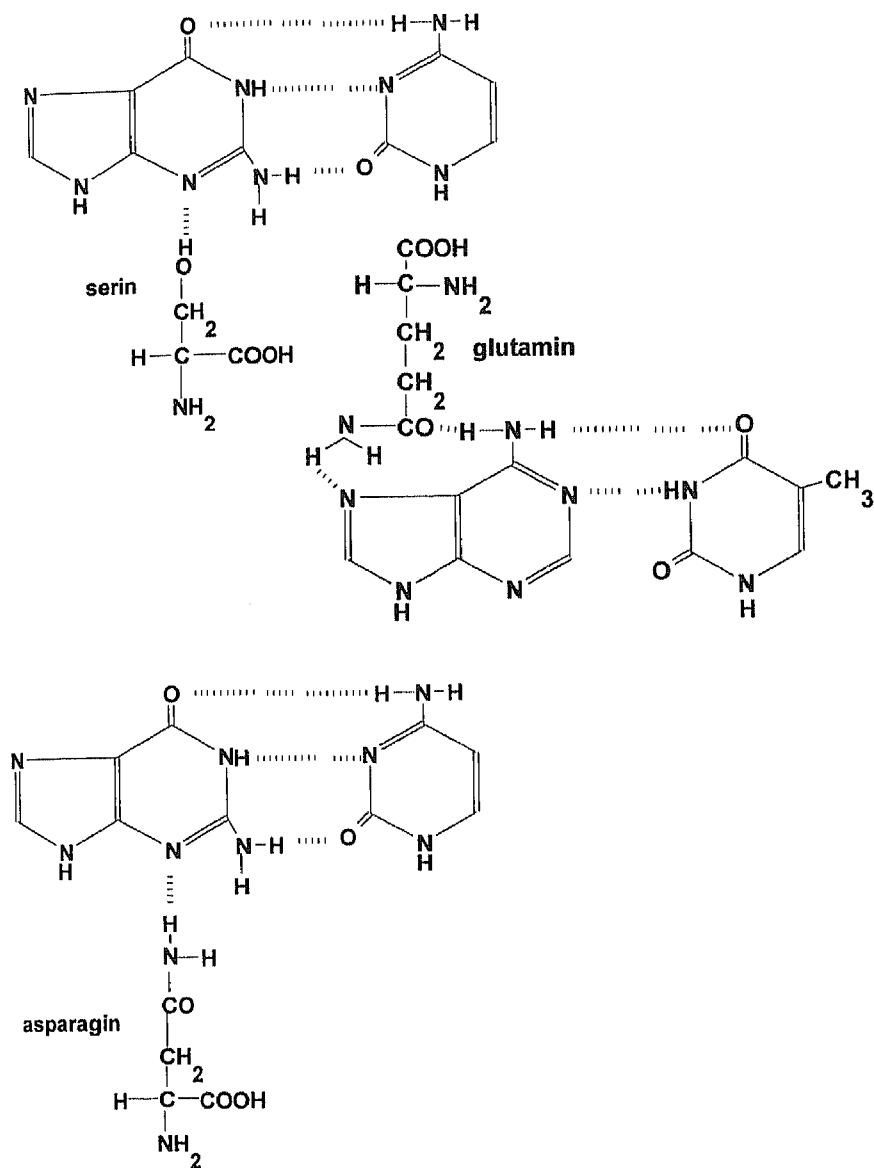
VAZBY S PÁTEŘÍ DNA. Polovina vodíkových vazeb zahrnutých do kontaktů proteinů s DNA se týká interakcí s páteří DNA. *K jejich tvorbě se většinou využívá kyslíku fosfodiesterových vazeb*. Význam těchto vazeb spočívá v tom, že *se jimi upravuje pozice rozpoznávacího proteinu vzhledem k bázím*.

1.3.2

Sekundární struktura proteinů rozeznávajících regulační oblasti na DNA

Celkově lze říci, že úseky proteinů, kterými jsou rozeznávány regulační oblasti na DNA, se vyznačují sekundární strukturou, pomocí které vhodně zapadají do většího žlábků v regulačních oblastech (jsou k nim komplementární svým povrchem), v nichž se prostřednictvím vodíkových vazeb vážou na některé báze. Tyto úseky proteinů jsou poměrně krátké a zaujímají pouze malou část jejich molekuly. *Komplex obecných znaků primární a sekundární struktury, případně i vyšších struktur proteinů, kterými je charakteristický určitý úsek proteinů, se označuje jako motiv*. Skupina proteinů vázajících se na příslušnou regulační oblast je charakteristická společným motivem, který se označuje jako **motiv vázající se na DNA**. Podle těchto motivů rozeznáváme pak následující skupiny proteinů:

- ◆ proteiny s motivem helix-otáčka-helix;



Obr. 92

Interakce některých aminokyselin se spárovaným guaninem a adeninem

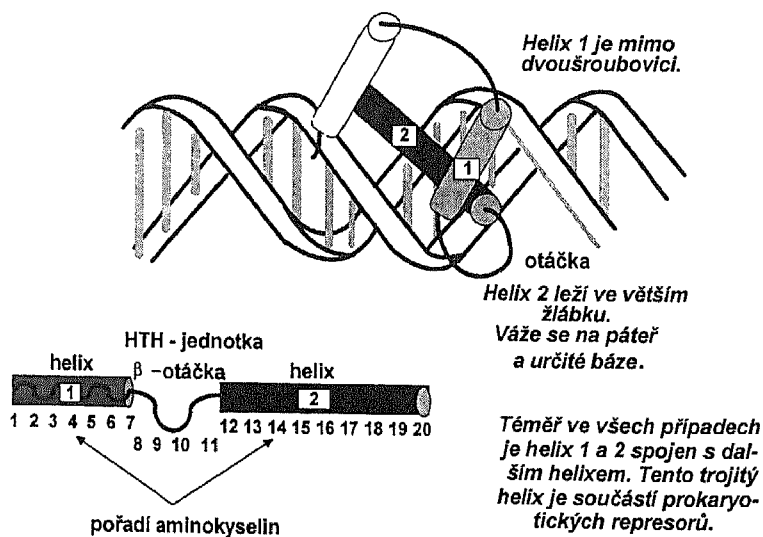
- ◆ proteiny s motivem homeodomén;
- ◆ proteiny s motivem zinkových prstů;
- ◆ proteiny s motivem leucinového zipu.

PROTEINY S MOTIVEM HELIX-OTÁČKA-HELIX. *Protein s motivem helix-otáčka-helix má dva α -helixy, mezi nimiž je jedna β -otáčka.*

První helix (1) sestává ze sedmi aminokyselin, druhý (2) z devíti a β -otáčka mezi nimi ze čtyř. Tato sestava se též označuje jako **HTH-jednotka**, která bývá v komplexu s dalšími helixy téže proteinové molekuly, *avšak ve vztahu k DNA má rozpoznávací funkci.* V takovém komplexu má též jiné označení, než jaké uvádíme zde. Např.

- ◆ v komplexu helixů represoru fága λ odpovídá helix 1 helixu 2 a helix 2 helixu 3,
- ◆ represor operátoru β -galaktozidázy má shodné označení helixů, které uvádíme zde,
- ◆ aktivátor CAP má pro helix 1 označení E a pro helix 2 označení F.

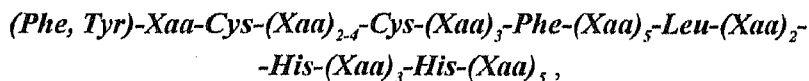
Helix 1 je položen napříč většího žlábků a helix 2 je k němu přibližně kolmo a rozeznává ve žlábků cílové nukleotidové sekvence, a proto se označuje jako **rozpoznávací helix**. Aminokyseliny tvořící HTH-jednotku nebývají stejné v různých proteinech vázajících se na DNA. Avšak téměř standardně aminokyselinou 9 je glycin a aminokyselinou 5 je obvykle alanin. V místech 4, 8, 10, 16 a 18 bývají aminokyseliny hydrofobní (obr. 93).



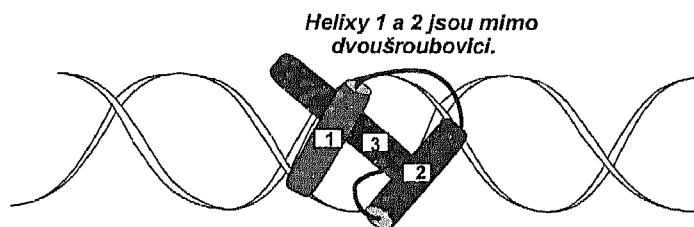
Obr. 93
Schéma motivu helix-otáčka-helix

PROTEINY S MOTIVEM HOMEODOMÉN. *Motivy homeodomén se vyskytují v proteinech, které jsou kódovány homeotickými geny (viz kapitolu pojednávající o regulaci exprese eukaryotického genomu). Prostřednictvím homeodomén jsou rozeznávány specifické sekvence na DNA působící jako regulační oblasti. Homeodoména obsahuje HTH-jednotku a sestává ze tří helixů (helixy 1, 2, 3). Helix 3 je k oběma (1 a 2) položen kolmo. Kontakty s DNA jsou zprostředkovány helixem 3, který zapadá do většího žlábků. Strana helixu 3, která je vystavena proti většímu žlábků, obsahuje boční řetězce aminokyselin, které reagují pomocí vodíkových vazeb s bázemi a kyslíkem fosfodiesterových vazeb. Helixy 1 a 2, které jsou položeny napříč žlábků, jsou od DNA vzdálenější (obr. 94). V helixu 1 se obecně vyskytují za sebou na stejném místě aminokyseliny leucin, fenylalanin a kys. glutamová, v helixu 3 tryptofan, fenylalanin a lyzin. Homeodoménou se vyznačuje např. transkripční faktor OCT-2 a produkty homeotických genů *ftz* a *ubx*, které se podílejí na morfogenezi a diferenciaci u drozofily.*

PROTEINY S MOTIVEM ZINKOVÝCH PRSTŮ. Motiv proteinů označovaný jako **zinkový prst** je charakteristický dvěma až devíti tandemovými repetitivními sekvencemi sestávajícími přibližně z třiceti aminokyselin (29 až 31):



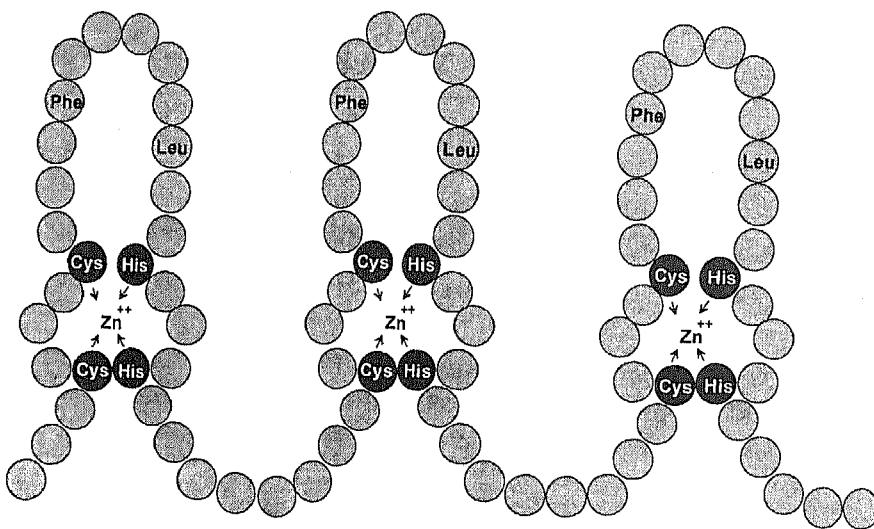
kde Xaa je zastoupeno libovolnou aminokyselinou. Tato sekvence je složena do tvaru smyčky (připomínající prst) a držena v tomto tvaru iontem zinku, na který



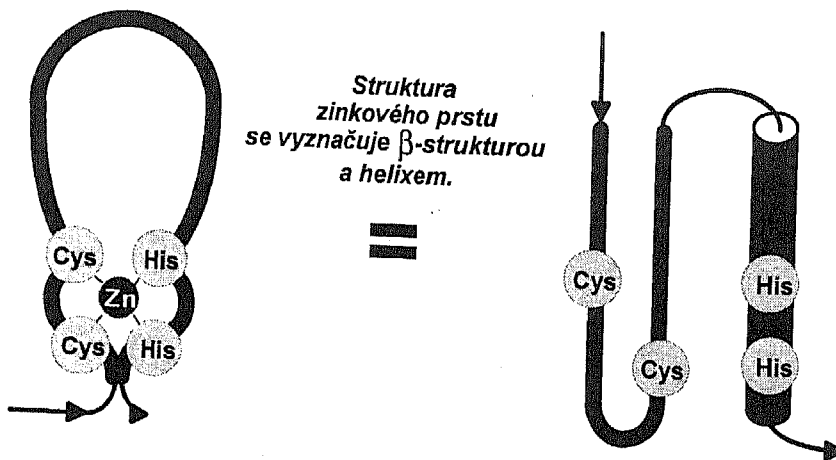
*Helix 3 leží ve větším žlábků.
Váže se na páteř a určité báze.*

Obr. 94
Schéma vazby homeodomény na DNA

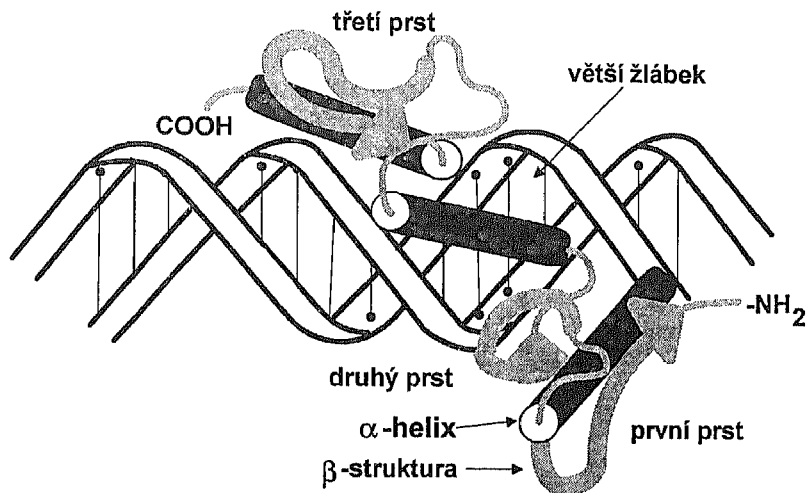
se vážou dva zbytky cysteinu a histidinu (obr. 95). Každý prst obsahuje antiparalelní β -strukturu a jeden α -helix, kterým se ve větším žlábkku váže na DNA (obr. 96). Vodíkové vazby se v tomto případě tvoří prostřednictvím tří aminokyselin s dvěma páry bází, což jsou vždy páry GC. Rozložení zinkových prstů ve větším žlábkku DNA je znázorněno na obr. 97. Ze schématu na obr. 98 je zřejmé, mezi kterými aminokyselinami zinkových prstů a bázemi ve větším žlábkku se



Obr. 95
Schéma tří zinkových prstů

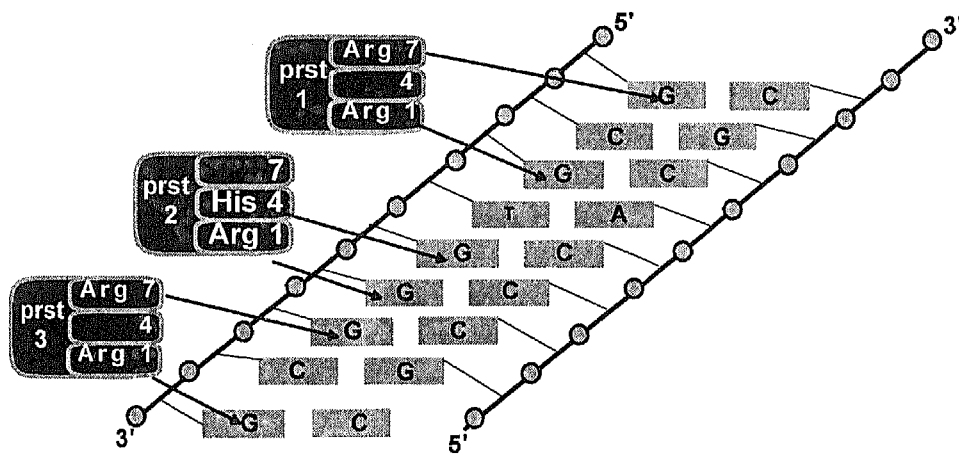


Obr. 96
Schéma struktury zinkového prstu



Obr. 97
Schéma interakce zinkových prstů s DNA

tvorí vodíkové vazby. Zinkové prsty 1 a 3 rozeznávají báze v sekvenci GCG tím, že zbytky argininu 1 a 7 vytvoří vodíkové vazby s guaninem. Žádný zinkový prst nerozeznává cytozin. Prstem 2 je guanin v sekvenci TGG rozeznáván prostřednictvím histidinu a argininu. Všechny tři prsty dohromady rozeznávají tedy sekvenci GCGTGGGCG.



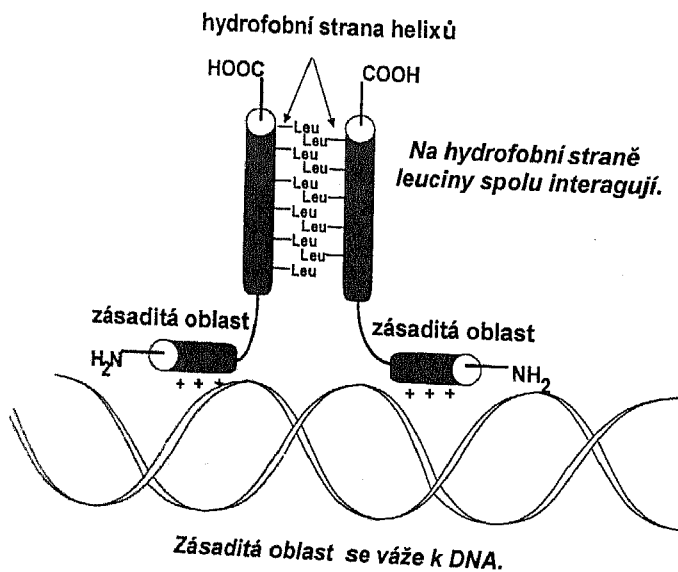
Obr. 98
Schéma rozpoznávání sekvencí zinkovými prsty ve větším žlábků

Počet zinkových prstů Cys₂ His₂ je u různých transkripčních faktorů rozdílný. Nejvyšší dosud zjištěný počet zinkových prstů je u transkripčního faktoru Xfin, který se tvoří v embryu žáby *Xenopus*. U člověka faktor TDF, který reguluje vývoj testes, má 13 zinkových prstů.

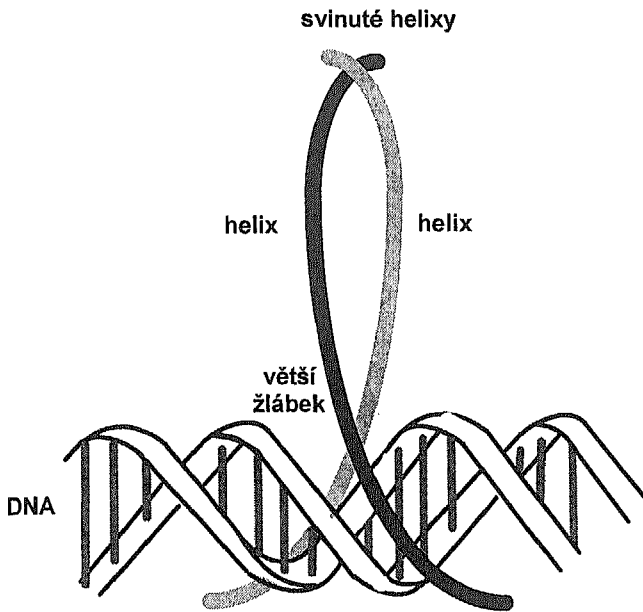
PROTEINY S MOTIVEM LEUCINOVÉHO bZIPU. Motiv proteinu nazývaný **leucinový bZIP** je oblast sestávající ze dvou α -helixů o třiceti aminokyselinových zbytcích s pravidelným opakováním zbytků leucinu. Oba helixy nemusí být v bZIPu zcela identické. Takto spojené helixy tvoří tedy dimer, v němž se vážou navzájem pomocí hydrofobních interakcí leucinů, které se vzájemně prolínají. Izobutylové řetězce jednoho helixu zapadají mezi leucinové řetězce druhého helixu jako zip. Další dva α -helixy, které jsou zásadité, se vážou na DNA; odtud název **bZIP** (basic zip = zásaditý zip) (obr. 99).

V prvním přiblížení si lze helixy v dimeru zipu představit podle obr. 99 jako by byly položeny vedle sebe. Ve skutečnosti se však oba α -helixy navzájem levotočivě ovíjejí a tvoří tak konformaci nazývanou **svinutý helix** (obr. 100). Leucinové zbytky jsou obráceny dovnitř dimeru. Na jednu otáčku helixu připadá 3,5 leucinových zbytků. Ze svinutého helixu bZIPu vyčnívají jednoduché helixy, které zapadají do většího žlábků DNA. Zde se vyznačují třemi druhy interakcí (100):

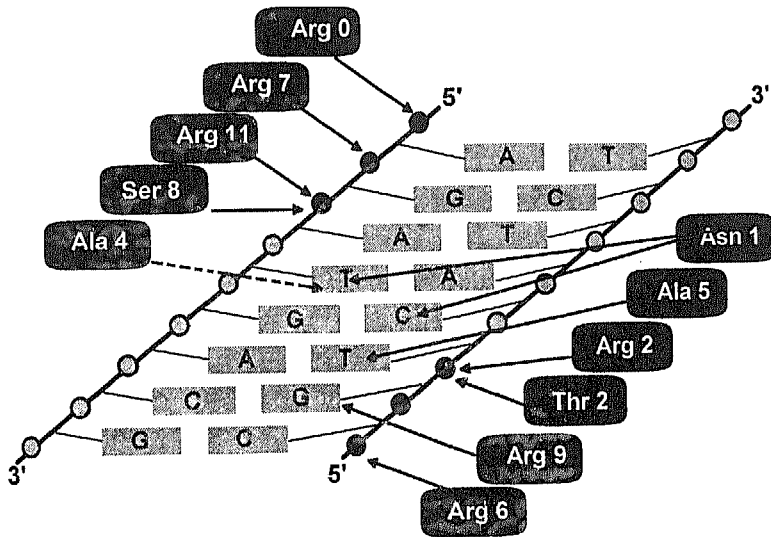
- ◆ Pozitivně nabitě aminokyselinové zbytky na obou stranách žlábků (např.



Obr. 99
Schéma vzniku leucinového zipu s DNA



Obr. 100
Schéma svinuté helixy a jeho vložení do většního žlábeku



Obr.101
Schéma svinuté helixy s bázemi ve větším žlábeku

Arg 0, 7 a 11 na levé straně a Arg 2, 6 a 9 na straně pravé interagují s negativně nabitými fosfáty páteře DNA).

- ◆ Hydrofobními interakcemi (např. Ala 4 tvoří hydrofobní kontakt s T, zatímco Asn 1 s T a C atd.).
- ◆ Tvoří vodíkové vazby s komplementárními sekvencemi TGAC (na jednom DNA-řetězci) a GTCA (na druhém DNA-řetězci).

Oba helixy, které jsou drženy pohromadě leucinovým zipem, si lze tedy představit jako písmeno Y se zásaditými úseky v ramenech obepínajících DNA z obou stran jako kleště (obr. 100). Oblasti, na které se vážou proteiny vyznačující se motivem leucinového zipu, jsou obvykle palindromového typu, což umožňuje, že se oba proteiny dimeru (svinutý helix) mohou symetricky vložit do dvou větších žlábků, mezi nimiž se nachází menší žlábek.

Motivy typu leucinového zipu se vyznačují např. transkripční faktory kódované protoonkogeny c-myc, c-fos a c-jun. Leucinový zip umožňuje dimerizaci stejných nebo různých proteinů s různými aktivitami a funkcemi, což vede ke kombinaci transkripčních faktorů. Např. transkripční faktor Jun se jako homodimer váže k rozpoznávací sekvenci TGAGCAG, na kterou se však neváže transkripční faktor Fos samotný, ale váže se k ní jako dimer s Jun. Tento heterodimer zvýší účinnost transkripce až třicetinásobně.

1.4 GENETICKÁ INFORMACE

1.4.1 Vzájemná podmíněnost nukleových kyselin a proteinů

JAKÉ DRUHY INFORMACÍ JSOU OBSAŽENY V NUKLEOTIDOVÝCH SEKVENCÍCH? Nukleotidová sekvence představuje v určitých funkčních typech nukleových kyselin v živé soustavě konkrétní formu zápisu určité genetické informace, která se v DNA-řetězcích zapisuje pomocí čtyř deoxyribonukleotidů:

A, T, G, C

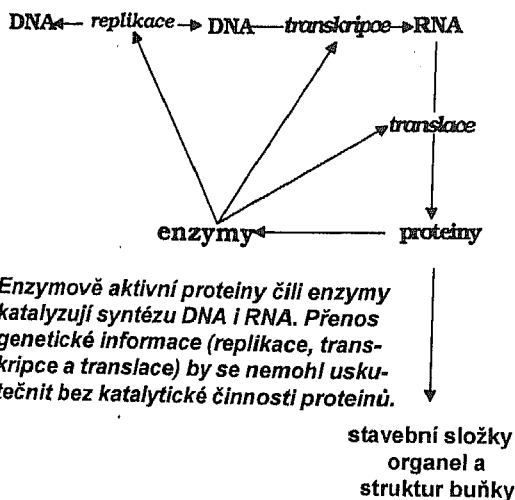
a v RNA-řetězcích pomocí čtyř ribonukleotidů:

A, U, G, C.

Lze tedy říci, že *genetická informace se zapisuje v organizmu ve formě sekvence nukleotidů* a obecně se chápe jako *informace, která je primárně obsažena v nukleotidové sekvenci*. Primárně proto, že jinde taková informace není. Genetickou se nazývá proto, že se dědí. Je to obvykle informace o primární struktuře polypeptidů, primární struktuře určité DNA nebo RNA. To znamená, že v nukleotidových sekvencích mohou být obsaženy konkrétně tyto informace:

- ◆ v DNA- nebo RNA-sekvenci může být obsažena *informace o primární struktuře proteinu*,
- ◆ DNA-sekvence může také obsahovat *informaci o primární struktuře biologicky funkční RNA (tRNA, rRNA aj.)*,
- ◆ RNA-sekvence může obsahovat *informaci o primární struktuře DNA*,
- ◆ DNA- i RNA-sekvence mohou také obsahovat *informace o vazbě specifických proteinů k těmto sekvencím*. Taková vazba dává signál k zahájení nebo zastavení transkripce.

VZÁJEMNÁ PODMÍNĚNOST PROTEINŮ A NUKLEOVÝCH KYSE -

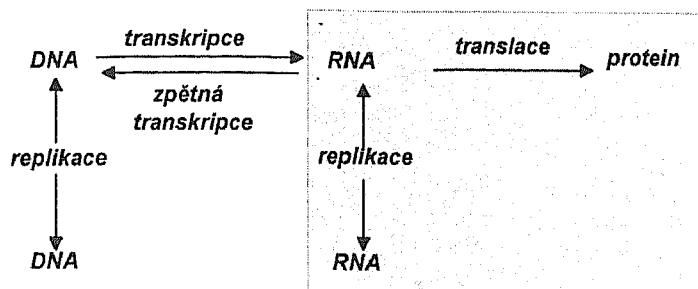


Obr.102
Schéma funkčních vztahů mezi nukleovými kyselinami a proteiny

LIN V ŽIVÉ SOUSTAVĚ. Proteiny a nukleové kyseliny jsou základní složky všech živých soustav. Jejich důležitost pro živé soustavy vyplývá z toho, že se mezi nimi vyvinuly vztahy, kterými jsou zajišťovány základní funkce živých soustav, a to přeměna látek a energie (metabolismus) a reprodukce. *Význam nukleových kyselin v těchto vztazích spočívá v tom, že zajišťují přesný přenos genetické informace z rodičů na potomstvo a její přenos na proteiny.* Genetická informace se potomstvím dědí jen prostřednictvím nukleových kyselin. Podle ní se tvoří primární struktura proteinů, které mají v živých soustavách základní funkce, z nichž především jsou to **funkce stavební** a **funkce katalytická**. Obě jsou určeny primární strukturou proteinů. *Jako biokatalyzátory ve funkci enzymů působí proteiny katalyticky jednak na svou vlastní syntézu, jednak na syntézu nukleových kyselin.* Celkově lze říci, že v živé soustavě (obr. 102):

- ◆ biosyntéza nukleových kyselin a proteinů je závislá na proteinech jako **biokatalyzátorech (enzymech)**;
- ◆ biosyntéza proteinů a nukleových kyselin je závislá na nukleových kyselinách jako **nositelích genetické informace**.

Mezi proteiny a nukleovými kyselinami je tedy v buňce cyklický vztah. Proteiny vystupují v buňce jako stavební složky organel nebo jako enzymy a mají ještě další funkce, o kterých jsme se již zmínili. *Ve funkci enzymů řídí katalyticky jednak svou vlastní syntézu, jednak syntézu nukleových kyselin. Syntéza obou (proteinů i nukleových kyselin) se děje podle informace obsažené v nukleových kyselinách.*



Šipkou je znázorněn směr přenosu genetické informace.
 U všech eukaryotických organismů a DNA-virů
 probíhá přenos genetické informace v plném rozsahu.
 U RNA-virů probíhá jen v rozsahu vyznačeném obdélníkem.

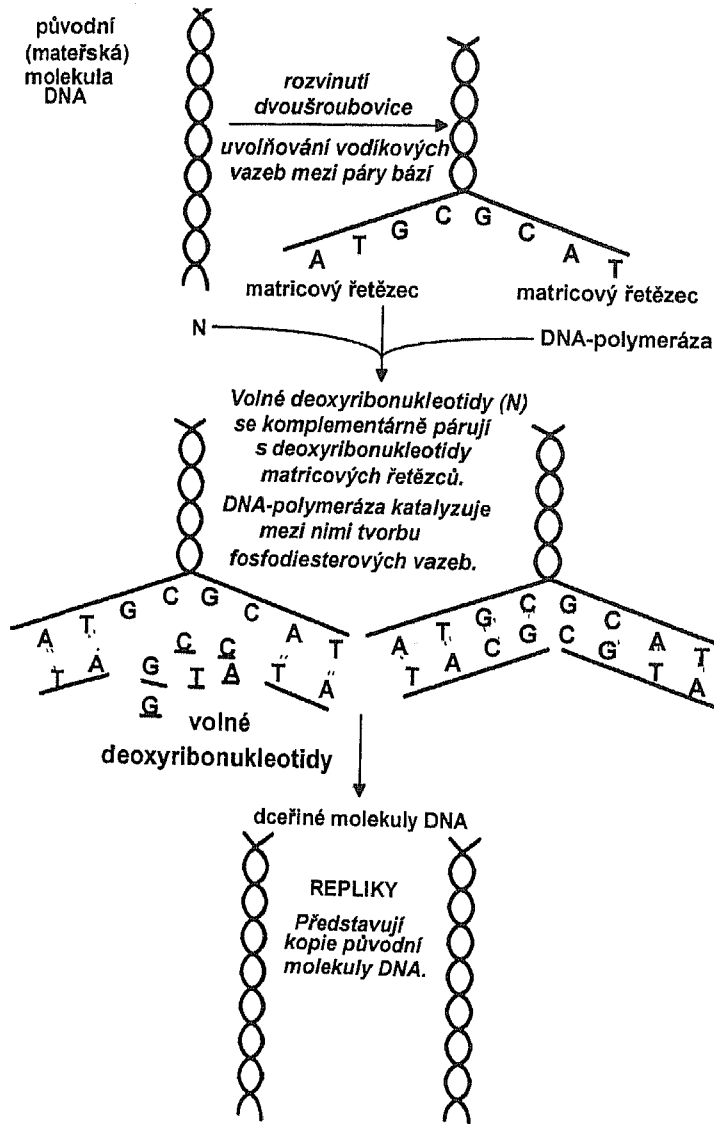
Obr. 103

Schéma ústředního dogmatu molekulární biologie

PŘENOS GENETICKÉ INFORMACE. Proces přenosu genetické informace je zformulován v **ústředním dogmatu molekulární biologie**, což je postulát, podle kterého je možný přenos genetické informace z nukleové kyseliny do nukleové kyseliny nebo z nukleové kyseliny do proteinu, ale její zpětný přenos z proteinu do nukleové kyseliny možný není. (Poznámka: Toto je formulace, jak ji zveřejnil Crick v roce 1957 - 1958. Předpokládá se v ní zpětný přenos genetické informace z RNA do DNA. Objevem zpětné transkriptázy nebylo tedy toto dogma vyvráceno, neboť Crick předpokládal jednosměrný přenos genetické informace jen z nukleových kyselin do proteinů a obousměrný mezi nukleovými kyselinami) (obr.103).

Ústřední dogma molekulární biologie zásadně odmítá přenos genetické informace z proteinu do proteinu, z proteinu do DNA a z proteinu do RNA. Takový přenos genetické informace experimentálně nebyl prokázán. Na rozdíl od toho jsou stále přesnějšími postupy prokazovány tyto způsoby přenosu genetické informace:

◆ **1. Replikace**, tj. tvorba kopií molekul nukleových kyselin zajišťující přenos genetické informace z DNA do DNA nebo z RNA do RNA. Při replikaci se genetická informace přenáší z jedné molekuly nukleové kyseliny do jiné molekuly stejného typu. Kopie molekuly nukleové kyseliny vzniká replikací se označuje jako **replika**. Replikace dvouřetězcové DNA probíhá **semikonzervativním způsobem**, pro který je charakteristické, že se molekula DNA rozplétá a oba její řetězce slouží jako matrice pro syntézu komplementárních řetězců, takže v obou výsledných molekulách DNA se zachová jeden řetězec z výchozí molekuly. Tento způsob replikace dsDNA zajišťuje, že dceřiné molekuly DNA



Obr. 104
Schéma semikonzervativní replikace DNA

zachovávají stejnou genetickou informaci jako původní (mateřská) molekula, neboť se při něm nemění primární struktura replikující se molekuly. Vodíkové vazby mezi oběma matricovými řetězci se však nejdříve přeruší, a teprve potom probíhá podle nich replikace. Na uvolněné matricové řetězce se vážou podle pravidla o párování bází volné nukleotidy a spojují se fosfodiesterovými vazbami za katalytického účinku DNA-polymerázy. Matricový nebo též templátový způsob syntézy má zásadní biologický význam. Jeho základem je vždy **matrice**

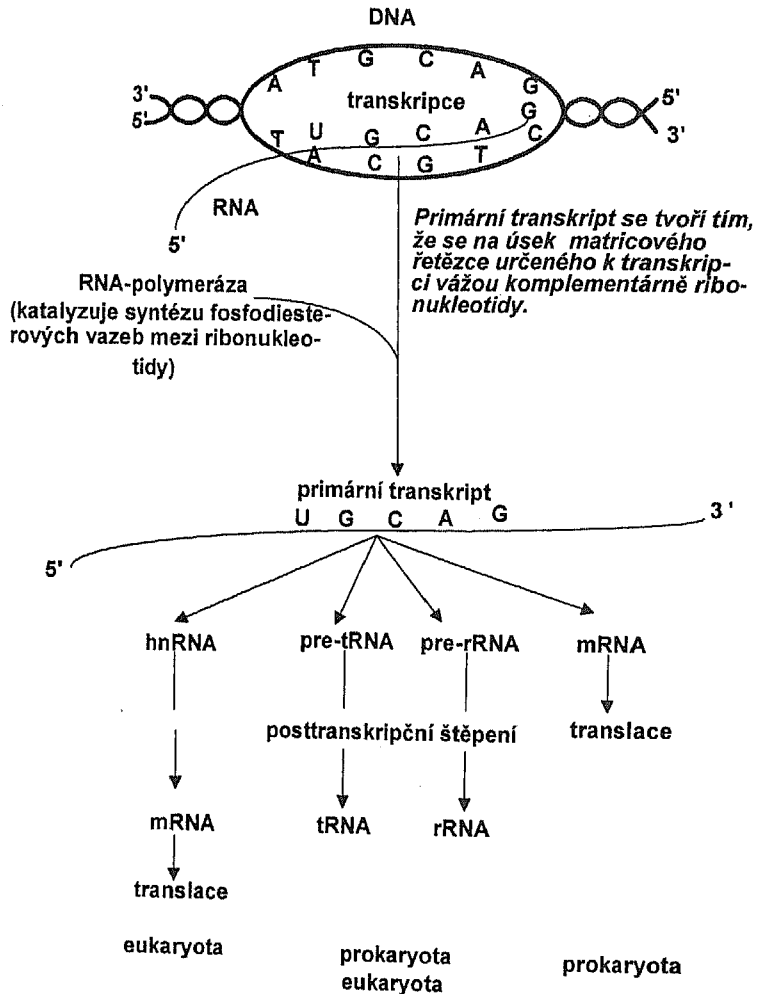
(templát), tj. makromolekula, podle které se komplementárně syntetizují jiné makromolekuly. Taková syntéza na matici umožňuje, že obsah přenášené genetické informace zůstává nezměněn (obr. 104).

Na matricovém způsobu syntézy je založena i **replikace jednořetězcové RNA**, která tvoří genom RNA-virů. Tato RNA slouží jako matrice pro syntézu komplementární RNA, jež pak přechodně tvoří s matricovou RNA dvouřetězcovou molekulu. Jednotlivé RNA-řetězce se však z dvouřetězcové molekuly uvolní a jsou matricemi pro další, což se mnohokrát opakuje za tvorby nových molekul RNA. Fosfodiesterové vazby mezi ribonukleotidy jsou katalyzovány enzymem **RNA-replikázou**.

♦ **2. Transkripce**, tj. přepisování genetické informace z DNA do RNA. Opačný pochod, tj. přepisování genetické informace z RNA do DNA, se označuje jako **zpětná transkripce**. Transkripcí (a také zpětnou transkripcí) se genetická informace převádí z formy zápisu v nukleotidové sekvenci určitého typu do formy zápisu v nukleotidové sekvenci jiného typu, tj. z DNA-sekvence do RNA-sekvence nebo z RNA-sekvence do DNA-sekvence. Obě sekvence jsou navzájem komplementární. *Transkripcí vzniklá sekvence se označuje jako transkript*. Rozlišuje se **RNA-transkript**, který je komplementární matricové DNA-sekvenci a **DNA-transkript**, který je komplementární RNA-sekvenci při zpětné transkripci. RNA-transkript může po svém vzniku podléhat různým chemickým modifikacím. Proto je nutno rozlišovat tzv. **primární transkript představující bezprostřední produkt transkripce** od transkriptu, který byl po transkripci modifikován. *Chemické modifikace primárních RNA-transkriptů se označují jako posttranskripční úpravy*. Jedna z nejdůležitějších úprav primárního RNA-transkriptu je jeho štěpení, kterým vznikají molekuly rRNA, tRNA (u prokaryot a eukaryot) a u eukaryot také mRNA. Základní strategie, podle které se uskutečňuje transkripce u prokaryot a eukaryot, je uvedena na obr. 105. U DNA-virů závisí strategie transkripce na typu jejich hostitelských buněk, tj. v zásadě na tom, zda probíhá v buňce prokaryotické nebo eukaryotické.

♦ **3. Translace**, tj. překládání genetické informace z RNA do primární struktury proteinu. Translací se vlastně genetická informace zapsaná v jednom jazyku (v jazyku primární struktury nukleové kyseliny) překládá podle určitého kódu (genetický kód) do jiného jazyka (jazyk primární struktury proteinu). *Nukleotidová sekvence, která obsahuje informaci o primární struktuře proteinu, se nazývá kódující nukleotidová sekvence*.

REPLIKON. *In vivo* je semikonzervativní replikace DNA řízena. To znamená, že v daném čase proběhne od určitého místa až k místu, kde přesně skončí. Touto vlastností *in vivo* se vyznačují jen ty molekuly DNA, které mají charakter replikonu. *Takto se označuje molekula nukleové kyseliny nebo část*



Primární transkript působí jako mRNA toliko u prokaryot. U eukaryot se mRNA většinou vytvoří štěpením primárního transkriptu (sestříhem). Všechny funkční RNA, které nepodléhají translaci, vznikají štěpením primárního transkriptu.

Proces štěpení primárního transkriptu jako součásti posttranskripční úpravy sestříhem bude upřesněn až na str. 141 a 199.

Obr. 105

Základní strategie transkripce u prokaryot a eukaryot

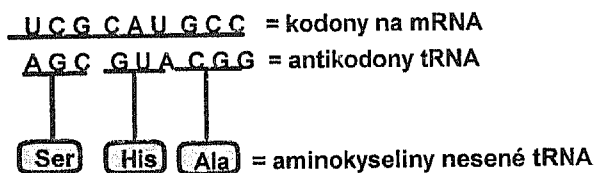
této molekuly, která obsahuje počátek replikace. Počátkem replikace se rozumí specifická nukleotidová sekvence, na které začíná replikace a která je rozeznávána specifickým komplexem replikačních proteinů, tj. souborem proteinů řídících replikaci replikonu. Představíme si to asi tak, že na počátek replikace

se navážou specifické proteiny včetně DNA-polymerázy, kterými je replikace DNA zahájena a řízena až k jejímu zakončení. Celý tento proces bude konkrétně zohledněn v kapitolách pojednávajících o replikaci prokaryotické a eukaryotické DNA.

1.4.2 Genetický kód

Překlad na ribozomu se děje podle určitého kódu, v němž každá aminokyselina v polypeptidovém řetězci je vyjádřena či kódována trojicí nukleotidů označovanou jako **triplet**. Termínem kódování se v molekulární biologii rozumí určování primární struktury polypeptidu nukleotidovou sekvencí podle pravidel genetického kódu, které se uskutečňuje translací. Je to tedy **genetické kódování**. Základní jednotkou genetického kódu je **kodon**, tj. pořadí tří nukleotidů kódující v polypeptidu určitou aminokyselinu nebo signalizující začátek, případně konec jeho syntézy na ribozomu. **Genetický kód** je pak systém pravidel, podle kterých jednotlivé kodony určují zařazení standardních aminokyselin do polypeptidu.

ČTENÍ GENETICKÉHO KÓDU. Čtení genetického kódu probíhá na ribozomech. Je to proces, který je součástí translace a spočívá v jednosměrném rozeznávání kodonů v mRNA antikodony tRNA. **Antikodonem** se rozumí specifický triplet, jehož prostřednictvím se tRNA přechodně váže ke komplementárnímu kodonu na mRNA. Rozeznávání kodonů na mRNA se děje přechodnou vazbou antikodonů tRNA k nim, přičemž každá tRNA je obsazena zcela určitou aminokyselinou (obr. 106). Přitom se genetický kód čte postupně po tripletech. Čtení tripletů pak závisí na tom, kterým nukleotidem začíná čtení. Jedna ze tří možností způsobu čtení tripletů v nukleotidové sekvenci založená na pevně



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.

Obr. 106

Čtení genetického kódu a překlad genetické informace do aminokyselinové sekvence polypeptidu

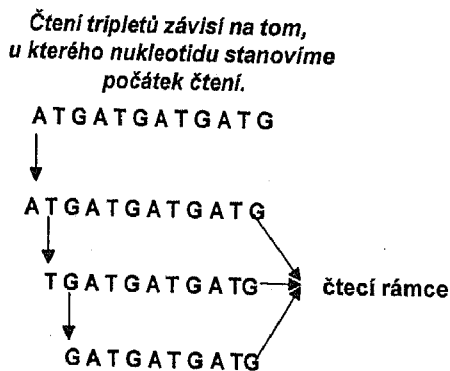
stanoveném počátku tohoto čtení se označuje jako **čtecí rámec** (obr. 107).

Rozlišují se dva typy čtecích rámců:

- ◆ **otevřený čtecí rámec**, tj. *čtecí rámec vymezený iniciačním a terminačním kodonem tak, že může kódovat souvislý a dostatečně dlouhý polypeptidový řetězec,*
- ◆ **uzavřený čtecí rámec**, tj. *čtecí rámec přerušovaný terminačními kodony tak, že nemůže kódovat souvislý a dostatečně dlouhý polypeptidový řetězec.*

ZÁKLADNÍ VLASTNOSTI GENETICKÉHO KÓDU. Lze je shrnout do těchto bodů (tab. 5):

- ◆ 1. Genetický kód je **tripleťový (třípísmenový)**, tj. *každá aminokyselina je kódována trojicí nukleotidů v nukleové kyselině neboli tripletem.*
- ◆ 2. Je sestaven ze 64 kodonů.
- ◆ 3. Je degenerovaný. **Degenerací genetického kódu** se rozumí *kódování jednotlivých aminokyselin několika různými kodony.* Neexistuje nedegenerovaný kód, tj. že každá aminokyselina by byla kódována jen jedním kodonem. Takový kód by sestával z 21 kodonů a alespoň z jednoho nesmyslného kodonu.
- ◆ 4. Z celkového počtu kodonů kóduje aminokyseliny pouze 61 kodonů. *Schopnost kodonu kódovat určitou aminokyselinu se označuje jako smysl kodonu.*
- ◆ 5. Většina kodonů je synonymních. Jako **synonymní** se označují *odlišné kodony stejného smyslu.*
- ◆ 6. Většina kodonů, které mají smysl, je rozdělena do kodonových rodin a dvoukodonových sad. **Kodonová rodina** je *skupina čtyř synonymních kodonů,*



Obr. 107

Způsoby čtení genetického kódu

kteří se liší jen nukleotidem ve třetí pozici a kódují stejnou aminokyselinu. Dvoukodonová sada jsou dva synonymní kodony končící ve třetí pozici jeden na A a druhý na G nebo jeden na U a druhý na C.

♦ 7. Některé kodony jsou nesmyslné. To znamená, že nekódují žádnou aminokyselinu. Jsou to :

UAA nazývaný *ochre*,

UAG nazývaný *amber*.

Tab. 5
Standardní genetický kód

Kodony					
První nukleotid	Druhý nukleotid				Třetí nukleotid
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	N	N nebo Secys	A
	Leu	Ser	N	Trp	G
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 nebo 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

Kodonové rodiny jsou vyznačeny polotučně; N = nesmyslný kodon; I = iniciační kodon; Secys = kodon pro selenocystein.

Funkce těchto kodonů spočívá v tom, že *signalizují zakončení syntézy polypeptidu na ribozomu*. Proto se též označují jako **terminační**.

◆ 8. Kodon UGA nazývaný též **opal** je bifunkční. Jedna jeho funkce spočívá v tom, že *může vystupovat jako nesmyslný (terminační)* a druhá v tom, že *může kódovat aminokyselinu selenocystein, která má svou vlastní tRNA*. Ve většině případů působí jako **kodon pro selenocystein**. Tato aminokyselina se na ribozomu zařazuje do polypeptidového řetězce.

◆ 9. Kodon AUG je také bifunkční. *Může kódovat aminokyselinu metionin nebo signalizovat začátek syntézy polypeptidového řetězce na ribozomu, tedy působit jako kodon iniciační*. Jestliže se nachází na začátku nukleotidové sekvence kódující primární strukturu polypeptidového řetězce, váže se na něj antikodonem UAC tzv. **iniciační tRNA** přenášející u bakterií aminokyselinu *N-formylmetionin* a u eukaryot metionin, takže u bakterií začíná syntéza polypeptidového řetězce na ribozomu formylmetioninem a u eukaryot metioninem. Jestliže se kodon AUG nachází v nukleotidové sekvenci kódující primární strukturu polypeptidového řetězce v intervalu mezi iniciačním a terminačním kodonem, pak se na něj váže tRNA také s antikodonem UAC, která jak u prokaryot, tak i eukaryot přenáší aminokyselinu metionin.

◆ 10. *Naprostá většina kodonů je univerzální, což znamená, že má u všech živých soustav smysl stejný, jak je uvedeno v tab. 5*. Tato vlastnost genetického kódu se označuje jako **univerzalita genetického kódu**. U některých organismů mají však některé kodony jiný smysl, a proto musíme rozlišovat standardní genetický kód a kódy lišící se od tohoto standardu. **Standardním** nazýváme kód, který je používán v plném znění většinou organismů. Většina jeho kodonů je univerzální, jelikož je používána ve stejném smyslu i organismy, u nichž některé jeho kodony mají smysl jiný. Celkově tedy standardní genetický kód obsahuje:

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 (z toho 1 bifunkční)	tj.	3 kodony
1 kodon Ile AUA	tj.	1 kodon
1 kodon Trp UGG	tj.	1 kodon

Celkem		64 kodonů

UGA JAKO SELENOCYSTEINOVÝ KODON. Jedna z pozoruhodných vlastností genetického kódování je inkorporace selenocysteinu (Secys) do proteinů jak u prokaryot, tak i u obratlovců. Secys se označuje jako **21. standardní aminokyselina**. Vyskytuje se v aktivním místě několika enzymů, do kterého se vkládá specifickou tRNA tím, že se její antikodon páruje s UGA, který je také terminačním kodonem. Selenocystein se nachází v polypeptidových řetězcích glycinreduktázy, formiátdehydrogenázy a hydrogenázy bakterií a v glutathionperoxidáze savců atd. Enzymy obsahující selenocystein nebyly nalezeny u rostlin.

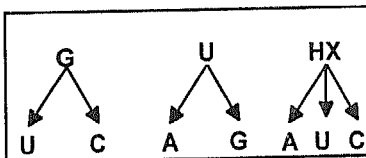
PÁROVÁNÍ KODON - ANTIKODON. *Pravidlo párování bází, podle kterého se adenin páruje s tyminem nebo s uracilem a guanin toliko s cytozinem, se obvykle nazývá Watsonovo-Crickovo.* Striktním uplatněním tohoto pravidla bychom dospěli k počtu 61 molekulárních druhů tRNA schopných číst 61 kodonů majících smysl (včetně iniciační tRNA), budeme-li počítat se třemi terminačními kodony (vynecháme-li selenocystein). K takovému párování však často nedochází mezi třetím nukleotidem kodonu a prvním nukleotidem antikodonu. Zde se uplatňují **pravidla kolísavého párování bází**, která teoreticky vedou k redukci počtu molekulárních druhů tRNA na 31 schopných číst 61 kodonů majících smysl + 1 iniciační (neuvažujeme-li selenocystein). Tato pravidla byla navržena Crickem v roce 1966. Lze je zformulovat schematicky podle obr. 108. Během dalších let do současnosti se ukázalo, že je nutno tato pravidla rozšířit o další možnosti párování bází na 5'-konci antikodonu. Týká se to zvláště uracilu a také chemicky modifikovaných bází, které byly zjištěny na 5'-konci antikodonu v tRNA některých organismů (obr. 109).

Současný stav kolísavého párování bází je uveden v tab. 6. Páry bází, jež

Obsahuje-li první nukleotid antikodonu guanin, může se párovat s třetím nukleotidem kodonu obsahujícím uracil nebo cytozin, obsahuje-li uracil, může se párovat s adeninem nebo guaninem třetího nukleotidu a obsahuje-li hypoxantin, pak se může párovat s adeninem, uracilem nebo cytozinem třetího nukleotidu kodonu.

První nukleotid antikodonu (5'-konec antikodonu):

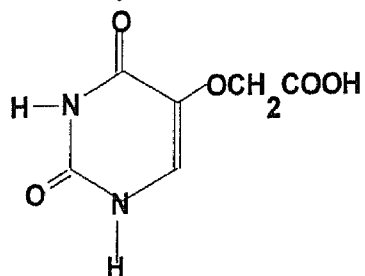
Třetí nukleotid kodonu (3'-konec kodonu):



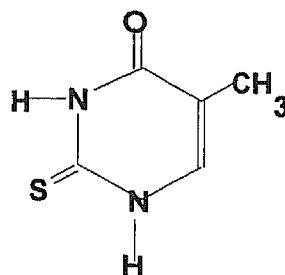
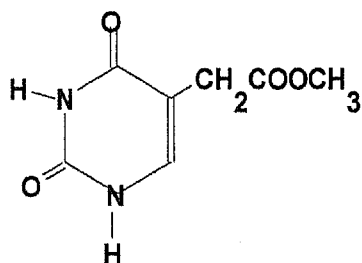
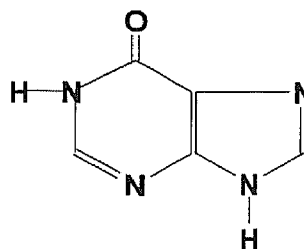
Obr. 108

Pravidla kolísavého párování bází podle Cricka

uracil-5-oxyoctová kyselina

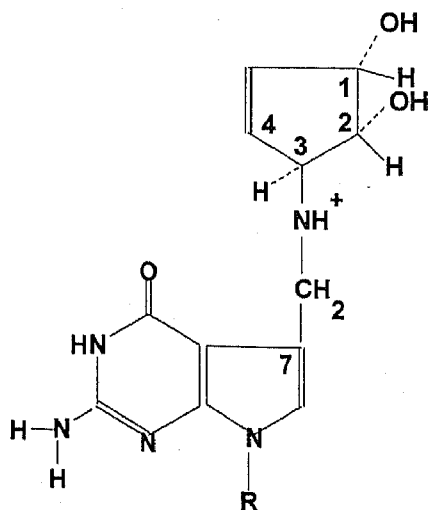


5-metyl-2-tiouracil

5-metoxycarbonylmethyluracil
mylester uracil-5-octové kyselinyhypoxantin
6-hydroxypurin

kveozin

7-((1S,2R,3S)-dihydroxy-4-cyklopenten-3-yl)aminometyl-7-deazaguanozin



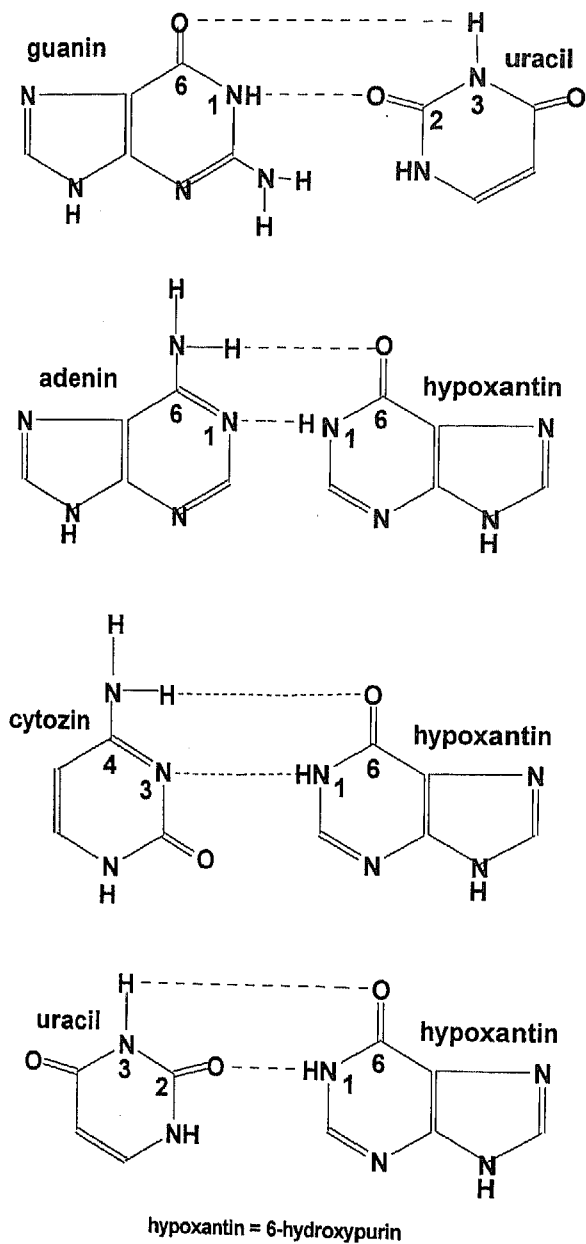
Obr. 109

Neobvyklé báze vyskytující se v prvním nukleotidu
(na 5'-místě) antikodonu

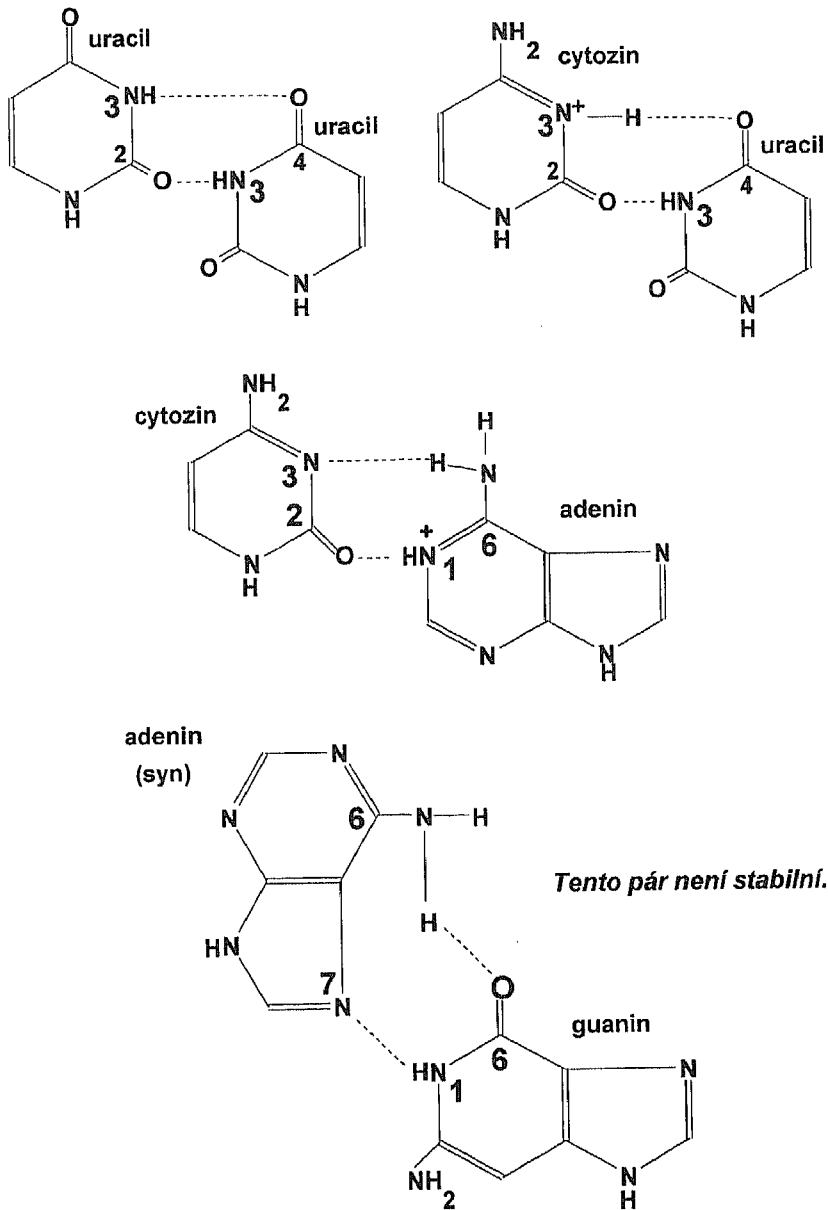
Tab. 6

Současný stav pravidel kolísavého párování bází

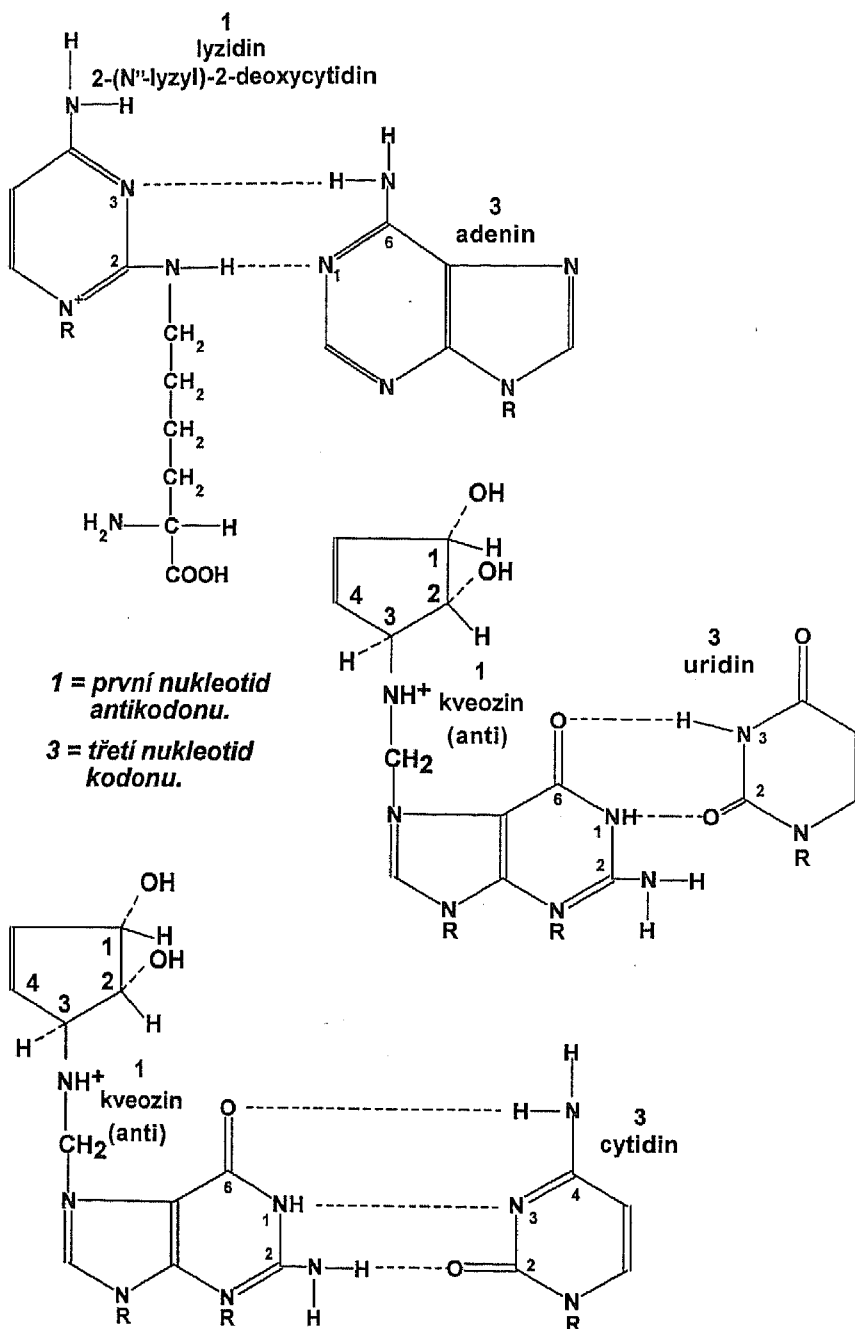
První nukleotid antikodonu	Třetí nukleotid kodonu	Možnost čtení	Organismy
U	U, C, A, G	Kodonové rodiny	Mitochondrie, Mycoplasma, chloroplasty
xo ⁵ U	U, A, G	Kodonové rodiny (Ser UCN, Val, Thr, Ala)	Bakterie
cmnm ⁵ U, mcm ⁵ U	A, G	Dvoukodonové sady	Mitochondrie, bakterie, eukaryota
xm ⁵ S ² U	A, (G)	Dvoukodonové sady	Bakterie, eukaryota
G	U, C	Dvoukodonové sady	Všechny
G	U, C	Kodonové rodiny	Bakterie
Q	U, C	Dvoukodonové sady	Bakterie, eukaryota
Hyp	U, C, A	Arg CGN	Bakterie
Hyp	U, C, A	Kodonové rodiny kromě Gly GGN	Eukaryota
A	U, C, (A), G	Thr ACU, Arg CGN	Mycoplasma, mitochondrie
C	G	Všude	Všechny
L	A	Ile AUA	Bakterie, rostlinné mitochondrie
<p>Vysvětlení zkratk chemicky modifikovaných nukleozidů xo⁵U = derivát 5-hydroxyuridinu (5-metoxyuridin, 5-karboxymetoxyuridin) mcm⁵U = 5-metoxykarbonylmetyluridin cmnm⁵U = 5-karboxymetylaminometyluridin xm⁵S²U = 5-metyl-2-tiouridin Q = kveozin, L = lyzidin</p>			



Obr. 110a
 Odchylky od Watsonova-Crickova způsobu párování bází
 při kolísavém párování



Obr. 110b
 Odchyly od Watsonova-Crickova způsobu párování bází
 při kolísavém párování



Obr. 110c

Odchytky od Watsonova-Crickova způsobu párování bází při kolísavém párování

se při užití pravidel kolísavého párování odchylují od Watsonových-Crickových, jsou chemicky vyjádřeny na obr. 110a, 110b, 110c. Celkově lze říci, že podle pravidel kolísání v párování bází se u skupin organismů uvedených v tab. 6 redukuje počet druhů tRNA čtoucích genetický kód. U gramnegativních bakterií přečte genetický kód 40 molekulárních druhů transferové RNA, u eukaryot 45, v chloroplastech 30, v mitochondriích obratlovců 22.

GENETICKÝ KÓD MITOCHONDRÍÍ. *Genetický kód rostlinných mitochondrií se neliší od standardního kódu. Avšak mitochondrie obratlovců, bezobratlých živočichů a hub se vyznačují odchylkami od tohoto kódu (tab. 7). Též genetický kód mitochondrií obratlovců vykazuje některé odchylky, které jsou podrobněji vyloženy v textu o translaci v mitochondriích a chloroplastech.*

Tab. 7

Odchylky v genetickém kódu mitochondrií obratlovců, bezobratlých živočichů a hub od genetického kódu standardního

standardní kód	UGA Trm	AUA Ile	AAA Lys	AGR Arg	CUN Leu	UAA Trm
obratlovcí	<i>Trp</i>	<i>Met</i>	<i>Lys</i>	<i>Trm</i>	<i>Leu</i>	<i>Trm</i>
členovci	<i>Trp</i>	<i>Met</i>	<i>Lys</i>	<i>Ser</i>	<i>Leu</i>	<i>Trm</i>
ostnokožci	<i>Trp</i>	<i>Ile</i>	<i>Asn</i>	<i>Ser</i>	<i>Leu</i>	<i>Trm</i>
měkkýši	<i>Trp</i>	<i>Met</i>	<i>Lys</i>	<i>Ser</i>	<i>Leu</i>	<i>Trm</i>
hlístice	<i>Trp</i>	<i>Met</i>	-	<i>Ser</i>	<i>Leu</i>	<i>Trm</i>
ploštěnci	<i>Trp</i>	<i>Ile</i>	<i>Asn</i>	<i>Ser</i>	<i>Leu</i>	<i>Tyr</i>
nezmaři	<i>Trp</i>	-	-	<i>Arg</i>	-	<i>Trm</i>
kvasinky	<i>Trp</i>	<i>Met</i>	<i>Lys</i>	<i>Arg</i>	<i>Thr</i>	<i>Trm</i>
Aspergillus	<i>Trp</i>	<i>Ile</i>	<i>Lys</i>	<i>Arg</i>	<i>Leu</i>	<i>Trm</i>
prvoci	<i>Trp</i>	<i>Ile</i>	<i>Lys</i>	<i>Arg</i>	<i>Leu</i>	<i>Trm</i>

N = A, C, G nebo U
R = A nebo G

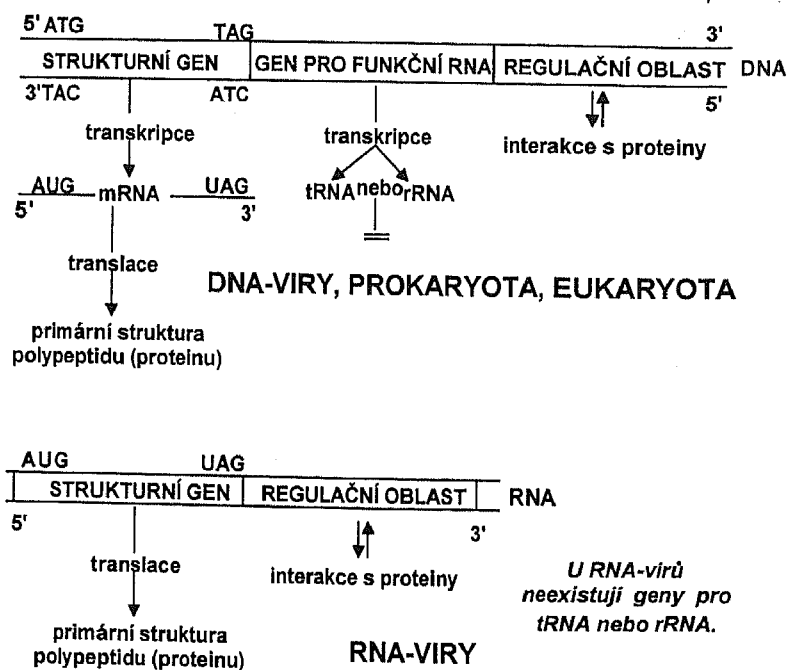
1.4.3

Pojem genu

Gen se chápe jako jednotka genetické informace nebo jako základní funk-

ční *genetická jednotka*. Jako jednotka informační a funkční se jeví v tom, že obsahuje genetickou informaci o primární struktuře buď funkční molekuly translačního produktu (polypeptidu, proteinu), nebo funkční molekuly produktu transkripce (tRNA, rRNA aj.), který nepodléhá translaci. Definici genu však pochopíme snadněji, když vyložíme následující konkrétní formy genu (obr. 111).

STRUKTURNÍ GEN. Strukturním genem je úsek DNA-řetězce (u DNA-virů, prokaryot a eukaryot) nebo RNA-řetězce (jen u RNA-virů), jehož informace se vyjadřuje v primární struktuře polypeptidu (proteinu) jako translačního produktu. Jinými slovy kóduje primární strukturu polypeptidu (proteinu) jako translačního produktu. **Translační produkt** je vždy molekula polypeptidu vytvořená na ribozomu translací mRNA-sequence vymezené iniciačním a terminačním kodonem. Na iniciačním kodonu translace mRNA sekvence, obsahující informaci o primární struktuře polypeptidu, začíná a na terminačním kodonu končí. U DNA-virů, prokaryot a eukaryot se strukturní gen přepisuje do primárního transkriptu a vyjadřuje se v mediátorové RNA, která se na ribozomu překládá do primární struktury polypeptidu.



Obr. 111
Vztah mezi geny a jejich produkty

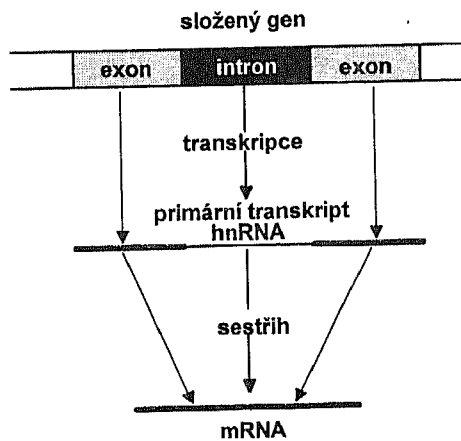
U RNA-virů se strukturální geny překládají buď přímo, nebo nepřímo prostřednictvím jejich komplementárních řetězců vzniklých replikací.

Existují dva druhy strukturálních genů:

♦ **1. Složené strukturální geny** neboli **geny přerušené introny**. Charakteristickou vlastností složeného genu je to, že *se skládá z exonů a intronů, a že jeho primární transkript podléhá posttranskripční úpravě sestřihem*. Celý složený gen, všechny jeho introny a exony se přepíše do jedné molekuly primárního transkriptu, ze kterého se pak vyštěpí přepisy intronů a přepisy exonů se spojí. Výsledkem takového štěpení je mRNA, která se překládá na ribozomu. *Vyštěpení přepisů intronů z primárního transkriptu a spojení přepisů exonů se označuje jako posttranskripční úprava sestřihem* neboli zkráceně **sestřih**. **Introny** pak nazýváme takové *DNA-sekvence složeného genu, jejichž přepisy se při posttranskripční úpravě sestřihem z primárního transkriptu vyštěpí a nepřecházejí tedy do výsledné mRNA*. Naproti tomu **exony** se při této úpravě *nevyštěpí, ale spojují a přecházejí do výsledné mRNA* (obr. 112).

♦ **2. Jednoduché strukturální geny** neboli **geny nepřerušené introny**. *Jednoduchý gen není složen ze sekvencí, které by měly charakter intronů a exonů*. Přepíše se celý do primárního transkriptu, který *nepodléhá posttranskripční úpravě sestřihem* (obr. 113).

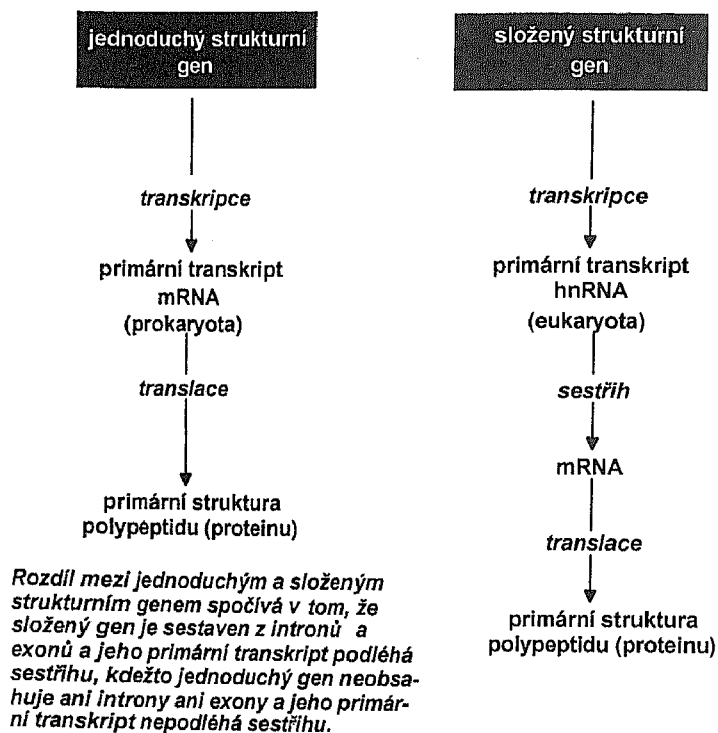
Sestřih, který probíhá na primárním transkriptu složených strukturálních genů, je buď konstitutivní, nebo alternativní. *Jestliže výsledkem sestřihu primárního transkriptu je molekula mRNA vždy o stejné primární struktuře, ozna-*



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

Obr. 112

Schéma posttranskripční úpravy sestřihem



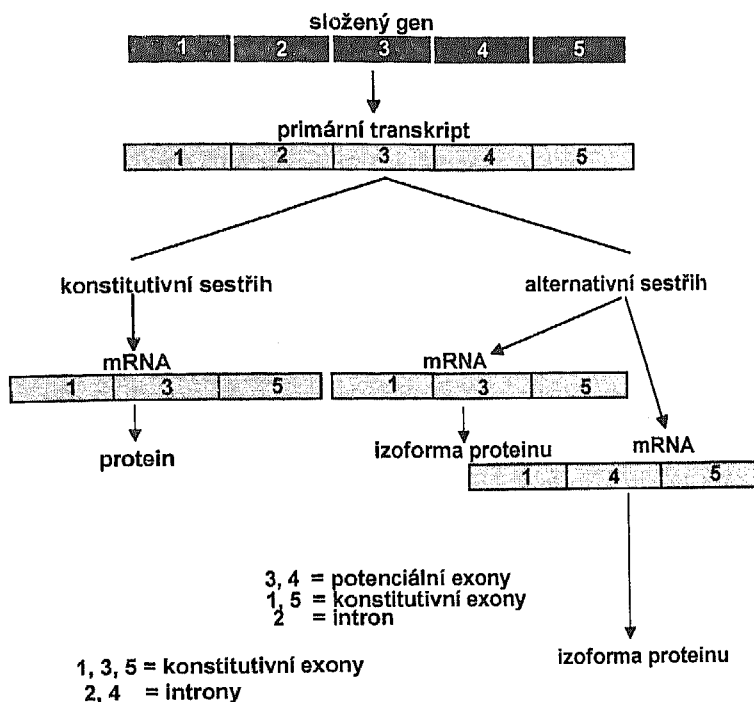
Obr. 113
Rozdíl mezi jednoduchým a složeným strukturálním genem

čuje se takový sestřih jako konstitutivní. Samozřejmě, že i polypeptid vytvořený překladem takové mRNA se vyznačuje stejnou primární strukturou. Jinak je tomu při sestřihu alternativním, jehož výsledkem je více molekul mRNA, které se navzájem liší v primární struktuře. Při tomto sestřihu se některé exony chovají konstitutivně, jiné v určitých případech mají charakter intronů nebo exonů. Genetická informace jednoho genu se takto může vyjádřit ve více translačních produktech lišících se více nebo méně v primární struktuře (obr. 114).

Pojem intronu a exonu je tedy relativní a vztahuje se na konkrétní případ. Úsek, který v jednom případě má funkci intronu, může mít v jiném případě funkci exonu a naopak. Celkově se rozeznávají dva typy exonů:

- ◆ **konstitutivní exon**, tj. DNA sekvence složeného strukturálního genu působící při všech posttranskripčních úpravách sestřihem jako exon,
- ◆ **potenciální exon**, tj. DNA-sequence složeného strukturálního genu působící při některých posttranskripčních úpravách jako exon, v jiných jako intron.

Takto se ukazuje, že genetická informace obsažená ve složených struk-



Obr. 114
Příklad konstitutivního a alternativního sestřihu

turních genech, jejichž primární transkripty podléhají alternativnímu sestřihu, se vyjadřuje v translačních produktech lišících se v primární struktuře. Jinými slovy, jeden složený strukturní gen může kódovat více izoforem určitého proteinu. *Izoformy daného proteinu jsou funkčně příbuzné proteiny, které se navzájem liší více nebo méně v primární struktuře.* Konkrétně tedy:

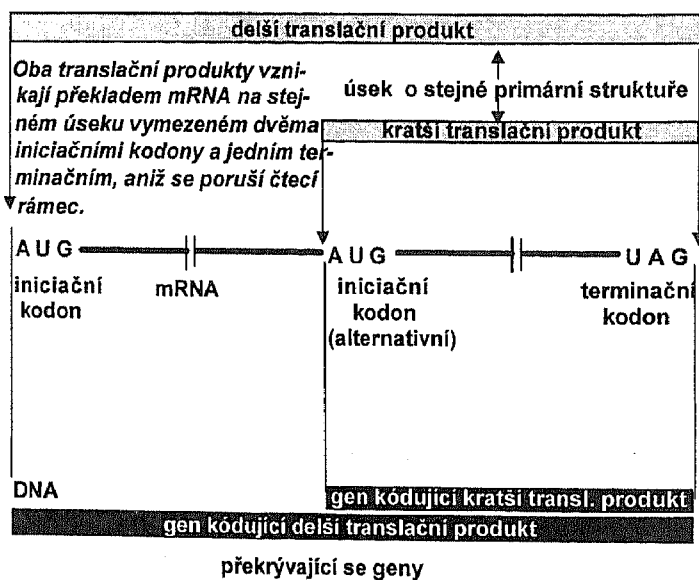
1. *Jestliže složený strukturní gen obsahuje potenciální exony, pak kóduje primární strukturu více izoforem téhož proteinu.*
2. *Jestliže složený strukturní gen obsahuje jen konstitutivní exony, pak kóduje jen jeden typ proteinu podobně jako jednoduchý gen.*

GEN PRO FUNKČNÍ RNA. Tím se rozumí úsek DNA-řetězce přepisovaný do primární struktury tRNA nebo rRNA, případně dalších druhů RNA, které nejsou určeny k translaci. Obvykle je několik genů pro tRNA a rRNA přepisováno do jedné molekuly primárního transkriptu, který se posttranskripčně štěpí na jednotlivé funkční typy RNA (tRNA nebo rRNA). *Mediátorová RNA není produktem těchto genů, neboť je určena k translaci.* Geny pro funkční RNA se nevyskytují u virů.

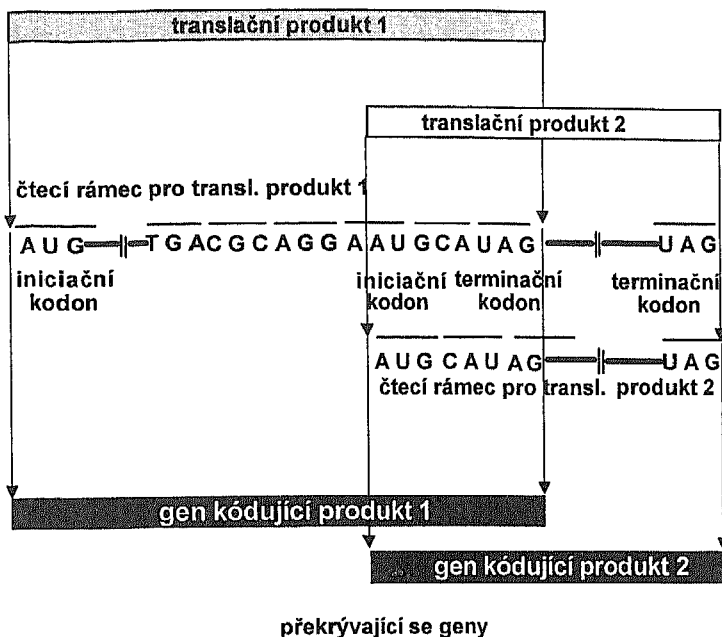
GEN JAKO REGULAČNÍ OBLAST. Je to úsek na DNA (u DNA-virů, prokaryot a eukaryot) nebo RNA (u RNA-virů) plnící regulační funkci, který je rozeznáván specifickým proteinem signalizujícím zahájení nebo zastavení transkripce. Zatímco strukturální geny a geny pro RNA mají produkt (polypeptid nebo RNA určenou k translaci), regulační oblasti ho nemají. Každá regulační oblast však obsahuje informaci, která určuje, že se na ni bude vázat určitý protein; např. represor se váže na operátor jako regulační oblast a zastavuje transkripci.

PŘEKRÝVAJÍCÍ SE GENY. Tak se označují strukturální geny v daném úseku DNA, jejichž počátek nebo konec je lokalizován do jiných strukturálních genů. Toto překrývání, např. u prokaryot, se uskutečňuje v těchto formách:

- ◆ 1. **Ve formě překrývání stejných otevřených čtecích rámců.** Tyto rámce začínají např. různými iniciačními kodony a končí stejným terminačním kodonem. Takto např. mohou vzniknout dva translační produkty, jeden kratší a druhý delší. Překrývající se úseky DNA-řetězců představují různé geny, neboť poskytují dva různé a dostatečně dlouhé souvislé translační produkty (obr. 115).
- ◆ 2. **Ve formě překrývání různých otevřených čtecích rámců.** V tomto případě se dva geny překrývají v určité sekvenci, která je čtena v obou genech



Obr. 115
Překrývání genů ve formě stejných čtecích rámců



Obr. 116
Překrývání genů ve formě různých čtecích rámců

různým způsobem. Překrývající se sekvence je ohraničena terminačním kodonem prvního genu a iniciačním kodonem genu druhého (obr. 116).

U eukaryot a eukaryotických virů se překrývání strukturních genů uskutečňuje formou překrývání transkripčních jednotek (str. 147).

1.4.4

Transkripční jednotka

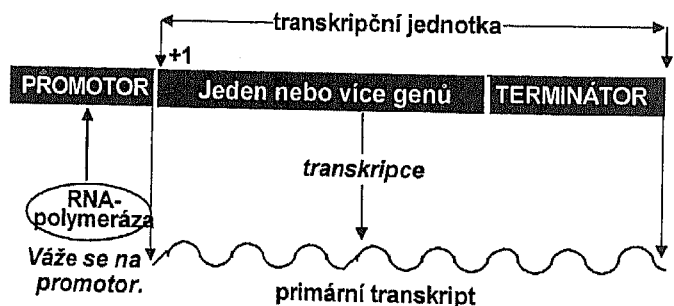
POJEM TRANSKRIPČNÍ JEDNOTKY. Strukturní geny a geny pro funkční RNA jsou u DNA-virů, prokaryot a eukaryot lokalizovány na úsecích, které se označují jako transkripční jednotky. Každá transkripční jednotka je vymezena tzv. startovacím nukleotidem a posledním nukleotidem v terminátoru. Startovací nukleotid je nukleotid na DNA-sekvenci, od kterého začíná přepisování transkripční jednotky a označuje se jako +1. Nukleotidy číslované od startovacího nukleotidu doprava po směru transkripce se označují znaménkem + a doleva od startovacího nukleotidu proti směru transkripce se označují znaménkem -, tedy např.: -3 -2 -1 +1 +2 +3.

Transkripce probíhá od startovacího nukleotidu doprava až po terminá-

tor včetně, což je regulační oblast, na níž končí přepisování transkripční jednotky. Terminátor je tedy součástí transkripční jednotky. Druhá regulační oblast, která souvisí s transkripční jednotkou, není však její součástí, je promotor. **Promotor** je regulační oblast, na kterou se váže RNA-polymeráza, případně jiné proteiny, podmiňující zahájení transkripce. Nejdříve se RNA-polymeráza musí navázat na promotor, odkud pak směřuje k terminátoru. Při tomto pohybu katalyzuje syntézu fosfodiesterových vazeb mezi ribonukleotidy, které se postupně řadí komplementárně k matricovému DNA-řetězci.

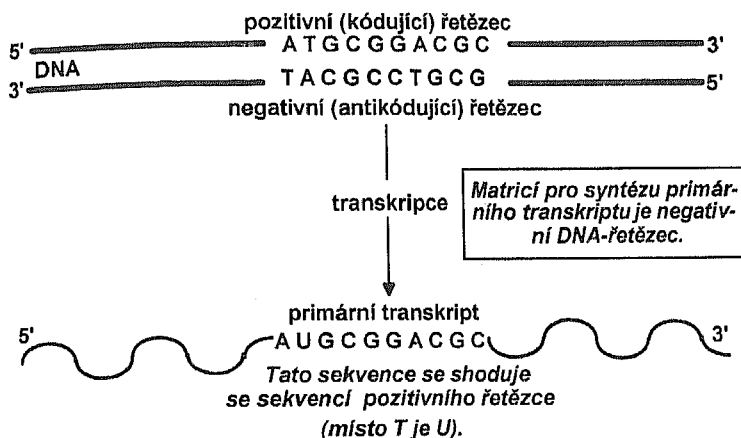
Transkripce strukturálních genů a genů pro funkční RNA se tedy uskutečňuje v transkripčních jednotkách a je řízena promotory. Transkripční jednotka může obsahovat jeden nebo více genů a přepisuje se do jedné molekuly primárního transkriptu, který pak obsahuje přepis tolika genů, z kolika se transkripční jednotka skládá. Základní schéma struktury transkripční jednotky je uvedeno na obr. 117.

POZITIVNÍ A NEGATIVNÍ DNA-ŘETĚZEC. V části dvouřetězcové DNA, kde právě probíhá transkripce, se obvykle nepřepisují oba protilehlé komplementární DNA-řetězce. Přepisuje se jen jeden. *DNA-řetězec, který slouží jako matrice (templát) pro syntézu RNA, se označuje jako negativní nebo též antikódující.* Druhý řetězec dvoušroubovicové DNA, který má stejnou sekvenci nukleotidů jako RNA syntetizovaná na negativním řetězci, se nazývá **pozitivní** nebo též **kódující** (obr. 118). Doporučuji používat termíny "pozitivní" a "negativní" řetězec pro jejich jednoduchost a také proto, že se snadno bude



Jedna transkripční jednotka produkuje jednu molekulu primárního transkriptu obsahujícího přepisy tolika genů, z kolika se transkripční jednotka skládá.

Obr. 117
Základní schéma transkripční jednotky



Obr. 118
Pozitivní (kódující) a negativní (antikódující) DNA-řetězec

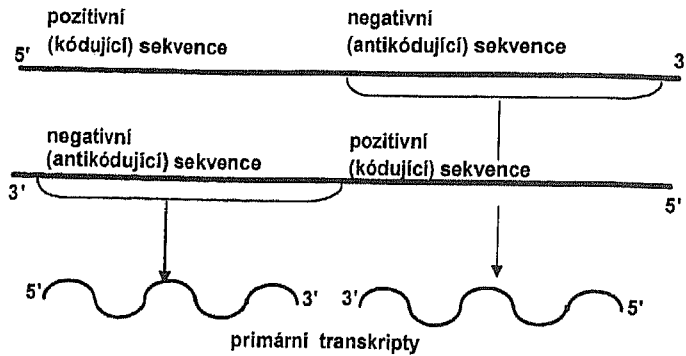
pamatovat, že DNA-řetězec, který se přepisuje do RNA, je negativní. Nedoporučuji používat termíny "sense-řetězec" a "antisense-řetězec", poněvadž se často jejich smysl i v odborné literatuře zaměňuje, což vede k nedorozumění.

Negativní (antikódující) DNA-řetězec se přepisuje směrem od svého 3'-konce k 5'-konci. Podle něho se syntetizující RNA-řetězec prodlužuje od svého 5'-konce k 3'-konci, neboť RNA-polymerázy napojují podobně jako DNA-polymerázy ribonukleozid-5'-trifosfáty jejich fosfátovou skupinou vázanou na C5' ribózy k 3'-konci rostoucího polyribonukleotidového řetězce. Proto se primární transkript z dvouřetězcové DNA odvíjí 5'-koncem.

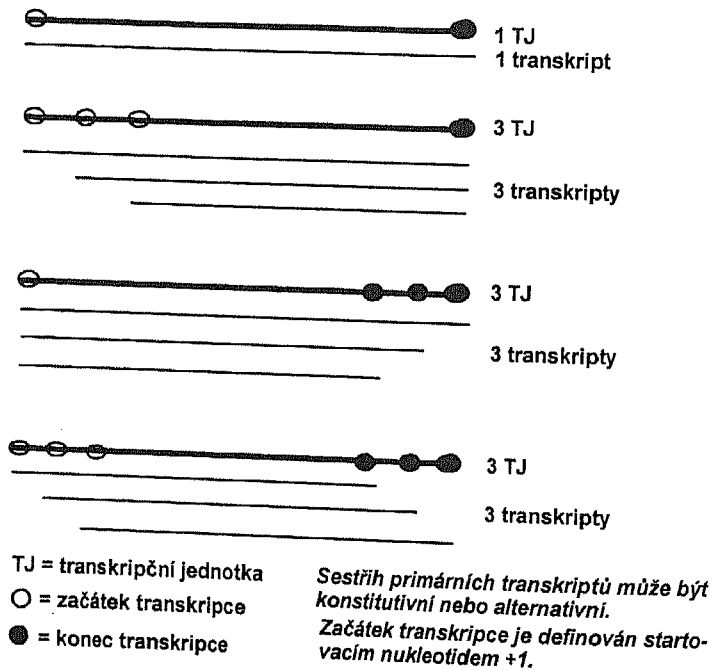
Pokud hovoříme o pozitivním a negativním DNA-řetězci, nemáme na mysli, že ve všech případech celý jeden řetězec dvouřetězcové DNA je pozitivní a druhý negativní. V mnoha dvouřetězcových DNA se na stejném řetězci střídají pozitivní a negativní úseky. V těchto případech však je proti pozitivnímu úseku řetězce vždy položen negativní (obr. 119). Případy, kdy je proti negativnímu úseku v dvouřetězcové DNA položen opět negativní, který je mu komplementární, jsou zatím výjimečné.

PŘEKRÝVAJÍCÍ SE TRANSKRIPČNÍ JEDNOTKY. Na chromozomové DNA jsou transkripční jednotky uspořádány lineárně za sebou. Avšak u eukaryot se velmi často vyskytují překrývající se transkripční jednotky. Tím se rozumí *jednotky, jejichž začátek nebo konec je lokalizován do jiné transkripční jednotky*. Bylo zjištěno, že na témže úseku DNA se mohou vyskytovat tyto způsoby překrývání transkripčních jednotek (obr. 120):

- ◆ *transkripční jednotky s různým začátkem a stejným koncem;*



Obr. 119
Střídání pozitivních (kódujících) a negativních (antikódujících) úseků na téže DNA-řetězci



Obr. 120
Příklady některých způsobů překrývání transkripčních jednotek u eukaryot

- ◆ *transkripční jednotky se stejným začátkem a různými konci;*
- ◆ *transkripční jednotky s různými začátky a konci.*

Každá transkripční jednotka produkuje jednu molekulu primárního transkriptu. Proto podle počtu molekul primárního transkriptu vznikajících na témže úseku DNA lze usuzovat na počet transkripčních jednotek v tomto úseku. Molekuly primárních transkriptů pak podléhají sestřihu buď konstitutivnímu, nebo alternativnímu. Toto zařízení umožňuje buňce získávat ze stejného úseku DNA značné množství proteinových izoform.

1.4.5

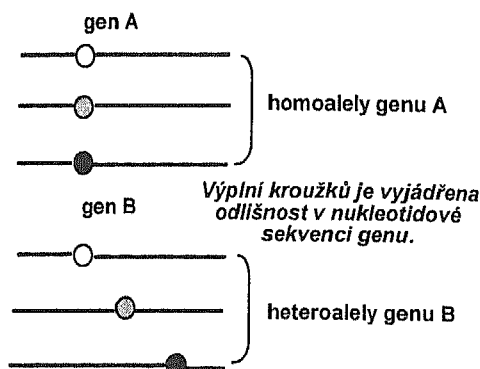
Genofor, chromozom a genom

GENOFOR A CHROMOZOM. Geny jsou na DNA (u DNA-virů, prokaryot a eukaryot) nebo na RNA (u RNA-virů) seřazeny za sebou. *Strukturu nesoucí geny seřazené za sebou (bez ohledu na to, zda je DNA nebo RNA), schopnou replikace, budeme označovat jako genofor.* U prokaryot, eukaryot a DNA-virů jsou genofory tvořené jen DNA, u RNA-virů jsou tvořeny RNA. *Genofory obsažené v jádře buňky se označují jako chromozomy.* U virů doporučujeme používat jen termín genofor nebo genom (viz dále).

Pro každý konkrétní genofor je charakteristické určité seřazení genů, které se označuje jako vazbová skupina. Vazbová skupina je tedy soubor genů, jejichž uspořádání je charakteristické pro daný genofor. Na genoforu je vždy určitá vazbová skupina, v níž každý gen zaujímá u organismů příslušného druhu stejné místo. *Genofory se stejnými vazbovými skupinami se označují jako homologické. Genofory neshodující se ve vazbových skupinách se označují jako nehomologické.* Příkladem homologických genoforů jsou chromozomy stejného páru v diploidní eukaryotické buňce. *V homologických chromozomech má příslušný gen, byť se nachází v různých alelických formách, stejné umístění.*

Od homologie týkající se pořadí genů ve vazbových skupinách je nutno odlišovat **sekvenční homologii**, tj. shodu v nukleotidových sekvencích. *Nukleotidové sekvence jsou homologické tehdy, jestliže jsou stejné; v opačném případě jsou nehomologické.* Samozřejmě, že homologie může být různého stupně.

POJEM ALELY. Geny kódující určitý polypeptidový řetězec nebo přepisované do určitého typu RNA nemusí mít nutně ve všech případech stejnou nukleotidovou sekvenci, ačkoli je v nich obsažena informace o stejném funkčním produktu. Proto se rozeznávají různé varianty téhož genu. Např. gen kódující α -globin je obecně gen, který obsahuje informaci o primární struktuře



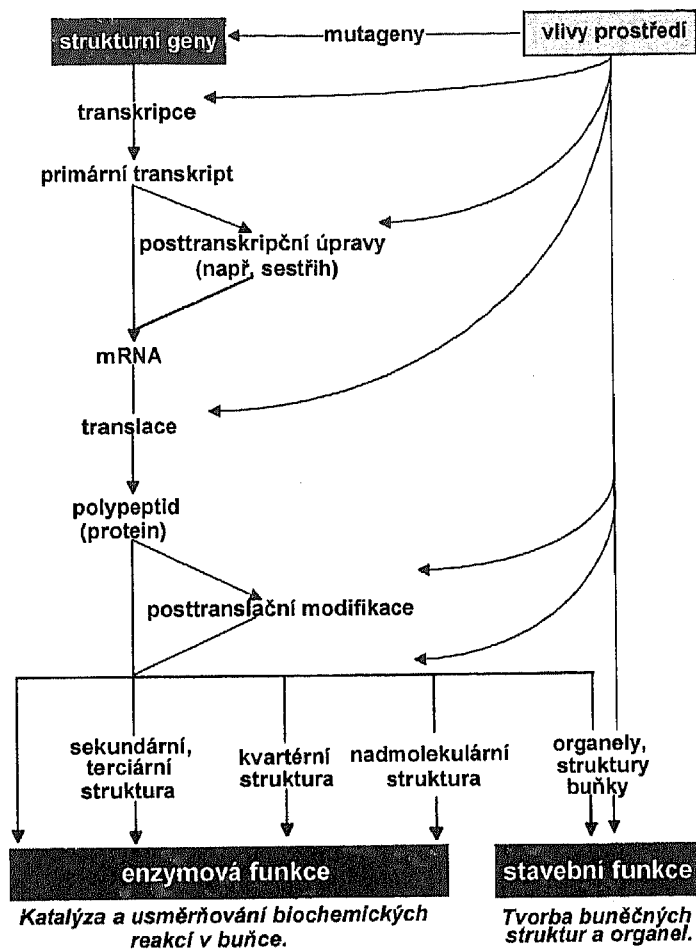
Obr. 121

Homoalely a heteroalely

α -globinu. U jedinců stejného druhu se vyskytuje v různých variantách, které se nepatrně nebo v některých případech i více navzájem v nukleotidové sekvenci liší. Všechny tyto varianty obsahují genetickou informaci (byť je zapsána pozměněnými nukleotidovými sekvencemi) o primární struktuře proteinu označovaného jako α -globin (plníci v molekule hemoglobinu určitou funkci). *Obecně označujeme varianty stejného genu, které se v nukleotidové sekvenci navzájem částečně liší, jako alely. Alely, které se navzájem liší ve stejném místě jedním nebo více nukleotidy, se označují jako homoalely. Alely, které se navzájem liší jedním nebo více nukleotidy ve více místech, se označují jako heteroalely* (obr. 121).

Rozdíly v nukleotidových sekvencích u alel stejného genu se v různém stupni promítají do biologické funkce proteinu kódovaného tímto genem. Není totiž jedno, ve kterém místě genu se alely navzájem liší a jakého rozsahu tyto odlišnosti jsou. Některé změny v nukleotidových sekvencích alel způsobují, že jimi kódovaný protein je biologicky nefunkční, neaktivní. Na druhé straně existují alely stejného genu, u nichž změny v nukleotidových sekvencích neovlivnily buď vůbec, nebo alespoň ne výrazně funkci polypeptidu, který kódují. *Kódují-li v chromozomovém páru diploidního organismu obě párové alely nefunkční polypeptidový řetězec, říkáme, že jsou recesivní. Jestliže jedna párová alela kóduje funkční polypeptidový řetězec a druhá nefunkční, pak alela kódující funkční polypeptidový řetězec může funkčně nahradit alelu s nefunkčním polypeptidovým řetězcem. Taková alela je vzhledem k recesivní alele dominantní.* Většinou se kryje s **alelou standardní**, tj. s alelou, která v přírodní populaci **převládá**. Dominance však může být různého stupně, což závisí na tom, jaká je nukleotidová sekvence alel.

GENOM, GENOTYP, FENOTYP. *Souhrn všech genů buňky nebo viru*



Prostředí může ovlivnit stupeň (míru) exprese strukturních genů na všech stupních procesu přenosu genetické informace včetně její realizace v primární struktuře proteinů.

Genetická informace ve strukturních genech se však tím nemění.

Může se změnit toliko zásahem mutagenů.

Vlivy prostředí (vyjádřeno šipkami) jen zastavují, zpomalují nebo urychlují expresi genů.

Obr. 122

Schematické znázornění vlivu prostředí na expresi strukturních genů

označujeme jako **genom**. Buněčný genom bývá rozdělen do různých organel (jádro, mitochondrie, chloroplasty). Lze pak rozlišovat jadernou, mitochondriovou nebo chloroplastovou složku buněčného genomu. Některé geny jsou lokalizovány na chromozomech v jádře buňky, jiné v mitochondriích, chloroplastech a u prokaryot na plazmidech. *Uspořádání genů v genomu označujeme jako strukturu a organizaci genomu.*

Od genomu je třeba odlišovat genotyp. Tento pojem se vztahuje na jedince daného druhu. Dva jedinci téhož druhu mají stejný genom, který je charakteristický pro tento druh, ale liší se sestavou či konstitucí alel. *Genetická konstituce (sestava) alel organismu se označuje jako jeho genotyp. Soubor znaků a vlastností, kterými se v daném prostředí genotyp organismu projevuje, se označuje jako jeho fenotyp.* Utváření fenotypu je určeno potenciálně genotypem a závisí též na podmínkách prostředí, ve kterém organismus žije. Může být tímto prostředím tlumeno, zastaveno, stimulováno nebo různým způsobem modifikováno. Těmito vlivy prostředí se však nemění genotyp, ale fenotyp, neboť *genetická informace obsažená v genotypu zůstává zachována a fenotyp se podle ní utváří v závislosti na vlivech vnějšího prostředí organismu.*

EXPRESI GENU. *Expresi genu rozumíme:*

- ◆ *u strukturního genu vyjádření jeho genetické informace v primární struktuře a funkci polypeptidu (proteinu),*
- ◆ *u genu pro funkční RNA vyjádření jeho genetické informace v primární struktuře a funkci RNA neurčené k translaci,*
- ◆ *u regulační oblasti vyjádření její genetické informace ve schopnosti interagovat s určitými proteiny.*

Expresi genu je třeba chápat jako proces, který je schematicky znázorněn u strukturního genu na obr. 122. Expresi genů pro funkční RNA je jednodušší. Probíhá až po posttranskripční úpravy, v rámci kterých dochází ke štěpení primárního transkriptu, který nese přepisy informace pro několik transferových RNA nebo ribozomových RNA. Molekuly tRNA nebo rRNA uvolněné tímto štěpením plní ihned svou funkci.

2

STRUKTURA, REPLIKACE A EXPRESE PROKARYOTICKÉHO GENOMU

Všechny živé soustavy lze na základě jejich strukturální a organizační složitosti rozdělit do dvou skupin. Rozlišujeme pak:

- ◆ **buněčné živé soustavy** (jednobuněčné a mnohobuněčné organizmy),
- ◆ **nebuněčné živé soustavy** (viry a viroidy).

Kromě výrazných strukturálních a morfologických rozdílů mezi oběma skupinami existuje zásadní rozdíl mezi nimi v tom, že buněčné živé soustavy, ať už jednobuněčné nebo mnohobuněčné, jsou organizmy, které se na rozdíl od nebuněčných živých soustav vyznačují všemi základními životními funkcemi a jsou schopny realizace všech toků genetické informace (replikace, transkripce a translace). Zejména je nutno zdůraznit, že obsahují všechny složky translačního systému, tj. aminoacyl-tRNA-syntetázy, tRNA a ribozomy, a mohou proto překlád genetické informace do primární struktury proteinů realizovat samostatně (autonomně). Nebuněčné živé soustavy (viry) jsou v přenosech genetické informace na rozdíl od buněčných živých soustav v různé míře závislé na hostitelských buňkách, v nichž probíhá jejich reprodukce. V translaci jsou na nich závislé úplně, neboť nemají žádnou ze složek translačního systému. Překlad genetické informace do virových proteinů je uskutečňován translačním systémem hostitelské buňky. Na virovém genoforu nejsou geny pro rRNA a tRNA, a také ne strukturální geny kódující ribozomové proteiny! Syntéza nových virových proteinů, k níž dochází po infekci hostitelské buňky, je zcela závislá na translačním systému hostitelské buňky. V tom je molekulární podstata intracelulárního parazitizmu, kterým je virus charakteristický. Můžeme proto viry chápat jako nukleoproteinové částice vyznačující se schopností infikovat své hostitelské buňky a v nich se reprodukovat v závislosti na jejich translačním systému.

Co se týče buněčných soustav, rozlišují se podle povahy vnitřní struktury dva typy buněk, z nichž mohou být organizmy složeny. Jsou to:

- ◆ **1. Prokaryotický typ buněk.** Organizmy, které se vyznačují tímto typem buněk, se označují jako **prokaryotické** nebo též **prokaryota**.

◆ **2. Eukaryotický typ buněk.** Organismy vyznačující se tímto typem buněk (viz druhý díl učebnice) se označují jako **eukaryotické** nebo též **eukaryota**.

Struktura prokaryotických buněk je rozlišena na jádro, cytoplazmu a cytoplazmatickou membránu. Základním znakem prokaryotických buněk je to, že jejich buněčné jádro, které vždy obsahuje dsDNA, není proti cytoplazmě ohraničeno membránou a nedělí se mitoticky. Buněčné jádro vyznačující se takovými vlastnostmi se označuje jako **jádro prokaryotické** neboli **nukleoid**. Obvykle obsahuje jednu molekulu dsDNA, která představuje chromozom prokaryotické buňky. U většiny prokaryot je kružnicová (jen u některých prokaryot byla prokázána lineární dsDNA, viz str. 300). Rozmnožování prokaryotických buněk je nepohlavní a realizují se v nich všechny způsoby přenosu genetické informace, tj. replikace DNA, její transkripce a translace mRNA.

Prokaryotické buňky neobsahují ani mitochondrie ani chloroplasty. Ribozomy prokaryotických buněk obsahují tyto druhy rRNA: 5S-, 16S- a 23S-rRNA.

Sedimentační koeficient prokaryotických ribozomů je 70 S.

Všechny buněčné živé soustavy se klasifikují do tří domén. Jako doména se označuje hierarchicky nejvyšší taxon (bezprostředně nižší taxon pod doménou je říše). Prokaryotickým typem buněk se vyznačují tyto dvě domény organizmů:

1. Bacteria (bakterie) - původní název Eubacteria (eubakterie), které mají tyto společné znaky (též sinice se řadí mezi bakterie):

- ◆ Bakteriální 16S-rRNA obsahuje sekvence specifické jen pro bakterie a sekvence, které jsou podobné eukaryální 18S-rRNA a archeální 16S-rRNA.
 - ◆ Většina bakterií, s výjimkou skupiny označované jako mykoplazmata, má buněčnou stěnu. Její základní složkou je peptidoglykan neboli murein.
 - ◆ Lipidy cytoplazmatické membrány bakterií se vyznačují esterovou vazbou mezi glycerolem a vyššími mastnými kyselinami.
 - ◆ Při syntéze polypeptidového řetězce se v bakteriích jako první aminokyselina zařazuje N-formylmetionin.
 - ◆ Co do způsobu výživy jsou bakterie autotrofní (fotoautotrofní nebo chemoautotrofní) nebo heterotrofní (fotoheterotrofní nebo chemoheterotrofní). Pokud jsou fotoautotrofní, pak uskutečňují fotosyntézu anoxigenního typu (neuvolňují molekulární kyslík při fotosyntéze). Toliko sinice uskutečňují fotosyntézu oxigenního typu (uvolňují molekulární kyslík při fotosyntéze).
- ◆ **2. Archaea (archea) - původní název Archaeobacteria (archebakterie), které se liší od bakterií v těchto znacích:**
- ◆ Archeální 16S-rRNA se vyznačuje sekvencemi, které jsou specifické jen

pro *archaea*, a také sekvencemi, které jsou podobné bakteriální 16S-rRNA a eukaryální 18S-rRNA.

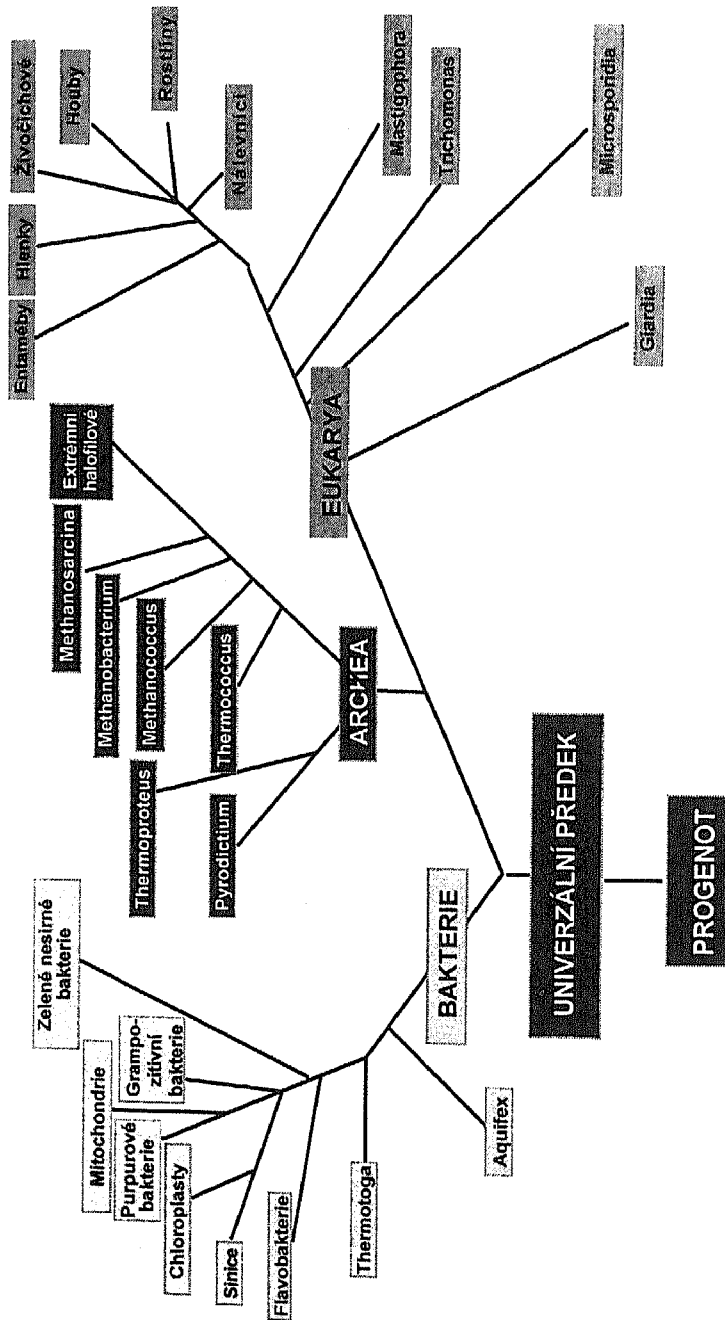
- ◆ Základní složkou buněčné stěny archeí je pseudopeptidoglykan neboli pseudomurein.
- ◆ Vazba mezi glycerolem a vyššími mastnými kyselinami v cytoplazmatické membráně archeí je éterová. Diéterové lipidy tvoří dvouvrstevnou membránu, zatímco tetraéterové představují v cytoplazmatické membráně spojení dvou lipidových vrstev v jednu.
- ◆ Geny přepisované do tRNA a rRNA archeí obsahují introny.
- ◆ Archeální translace se vyznačuje jak prvky bakteriální translace tak i ještě nevyvinutými, rudimentárními prvky translace eukaryální.

Organismy jednobuněčné a mnohobuněčné, jejichž typ buněk je eukaryotický, tedy eukaryota, se zařazují do třetí domény nazývané jako **Eucarya (eukarya)**. Jejich všeobecnou charakteristiku podáme ve druhém díle této učebnice, který je věnován molekulární biologii eukaryot.

Prokaryotické a eukaryotické buňky se vyvinuly z hypotetického **univerzálního předka**, jemuž logicky musela předcházet ještě jednodušší živá soustava označovaná jako **progenot**, jejíž vznik se datuje do období mezi 3,8 až 4, 2 x 10⁹ let před současnou dobou. Od univerzálního předka se odvinuly základní evoluční větve (linie) organismů vyjádřené **univerzálním fylogenetickým stromem** zkonstruovaným na základě srovnávání sekvencí nukleotidů 16S-rRNA u prokaryot a 18S-rRNA u eukaryot (v předchozích vydáních této učebnice jsme již na něj upozorňovali). Jsou to tyto evoluční linie (obr. 123):

- ◆ linie směřující k bakteriím,
- ◆ linie, která se rozvětvila na další dvě, a to na jednu směřující k archeím a druhou směřující k eukaryím.

Archaea, ačkoli prokaryotického typu buněk, jsou evolučně blíže k eukaryím zahrnujícím organismy eukaryotického typu buněk. V systému organizmů založeném na těchto evolučních liniích se proto organismy netřídí na Prokaryota a Eukaryota, ale na uvedené tři domény. Vzdáváme se tedy termínů "prokaryota, prokaryotický, eukaryota, eukaryotický"? Nikoli. Je to z cytologického hlediska označení dvou základních typů buněk (viz výše). Všechny organismy, jejichž buňky jsou eukaryotického typu, se zahrnují do domény eukaryí, zatímco buňky prokaryotického typu jsou rozděleny do dvou domén: bakterie a *archaea*. Organismy obou domén mají společnou tuto vlastnost: **Jsou to buňky prokaryotického typu**. Avšak některé složky mechanismů replikace, transkripce a translace se u archeí podobají spíše eukaryálním než bakteriálním. Proto je nutno v rámci replikace a exprese prokaryotického genomu rozeznávat jeho bakteriální a archeální variantu (odkazujeme na str. 256 - 265).



Obr. 123
Univerzální fylogenetický strom

2.1

STRUKTURA PROKARYOTICKÉHO GENOMU

Genom prokaryotické buňky neboli prokaryotický genom je nejlépe prostudován u bakteriálních buněk. U většiny bakteriálních buněk se soustřeďuje do funkčního ekvivalentu jádra označovaného jako **nukleoid**, které je *reprezentováno jediným genoforem - molekulou dsDNA - představujícím prokaryotický chromozom*. U řady druhů jsou některé geny lokalizovány na plasmidech, takže pak u těchto druhů se genom skládá ze dvou složek:

- ◆ **prokaryotického jádra (nukleoidu),**
- ◆ **plazmidů.**

Prokaryotický chromozom tvoří většinou kružnicová molekula dsDNA, na níž jsou umístěny všechny pro život prokaryotické buňky nepostradatelné geny. Jsou to především strukturní geny kódující proteiny zajišťující životní funkce buňky, a dále geny přepisované do tRNA a rRNA, jež jsou nezbytnou složkou translačního systému prokaryotické buňky. Na druhé straně **plazmidy** jsou *mimochromozomové genofoxy, na nichž jsou lokalizovány geny, které může prokaryotická buňka postrádat.*

2.1.1

Prokaryotické jádro

NUKLEOID. *Je to jádro prokaryotické buňky, které však na rozdíl od jádra buňky eukaryotické není proti cytoplazmě ohraničeno membránou. Je nejlépe prostudováno u bakteriálního druhu *Escherichia coli* K12. Nukleoidy byly z *E. coli* izolovány jako kompaktní částice a bylo zjištěno, že hmota nukleoidu je tvořena proteiny a DNA. Tyto proteiny jsou u bakterií dvojího typu (u archeí jsou v tomto směru odlišnosti, viz str. 257):*

- ◆ **proteiny podobné histonům** neboli **HLP-proteiny** podobající se v primární struktuře a molekulové hmotnosti histonu H2A.
- ◆ **proteiny nehistonové povahy.**

Nukleoid se nenachází v buňce volně, ale pojí se na více místech k cytoplazmatické membráně. Jedním z těchto míst je oblast **oriC** neboli *počátek replikace chromozomové DNA u E. coli.*

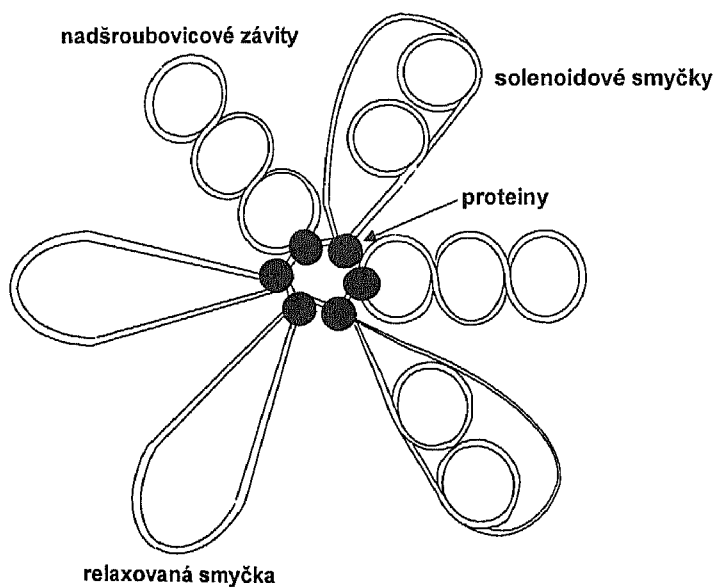
PROKARYOTICKÝ CHROMOZOM. Prokaryotický chromozom je slož-

kou nukleoidu a je tvořen většinou kružnicovou dsDNA (viz též str. 300), jejíž molekulová hmotnost u *Escherichia coli* je zhruba $3,0 \times 10^9$, tloušťka 2 nm a délka 1 360 μm (=1,36 mm). Obsahuje $4,6 \times 10^6$ nukleotidových párů. Není ještě zcela jasné, jakým způsobem je tato DNA v nukleoidu poskládána. Všechna známá fakta však nasvědčují tomu, že se nachází v nukleoidu v konformaci, jejímž základem je nadšroubovice rozdělená do 45 smyček, které se mohou vyskytovat v různých konformačních stavech (obr. 124a):

- ◆ ve stavu relaxovaném,
- ◆ ve stavu nadšroubovice,
- ◆ ve stavu solenoidových smyček.

Celá struktura je držena pohromadě proteiny. Smyčky v relaxovaném stavu jsou přístupny transkripci a replikaci.

Jak již bylo uvedeno, prokaryotický chromozom na obr. 124a je znázorněn v nadšroubovicové (superhelikální) konformaci. Mohou relaxovat nejen jeho jednotlivé smyčky, ale také celá struktura, takže pak přejde úplně do tvaru



Zde je znázorněno jen šest smyček. Ve skutečnosti chromozom *E. coli* sestává ze 45 smyček.

Obr. 124a
Smyčky na kružnicové dsDNA představující chromozom *Escherichia coli*

kružnice. V tomto tvaru se obvykle formálně znázorňuje, ale je nutno vždy mít na zřeteli, že skutečnosti *in vivo* se blíží nejvíce znázornění uvedené na obr. 124a. *Na prokaryotickém chromozomu jsou lokalizovány všechny geny potřebné pro životní funkce a činnost prokaryotické buňky.* Prokaryotický chromozom je replikon (*má jeden počátek replikace*). Na obr. 124b je ve zjednodušené formě uvedena genetická mapa chromozomu *E. coli*.

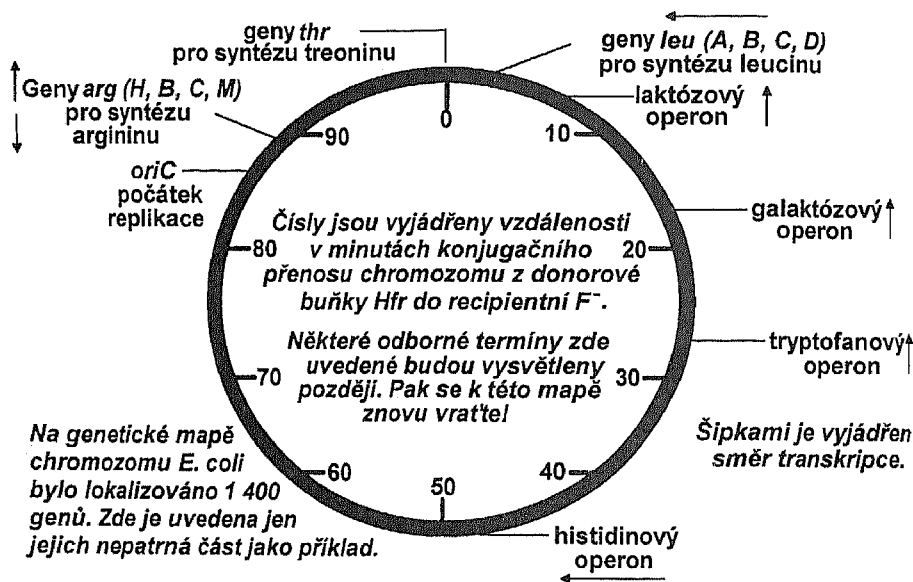
2.1.2 Plazmidy

ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA PLAZMIDŮ. Řada prokaryotických druhů, hlavně bakteriálních, obsahuje v buňkách plazmidy, na kterých jsou lokalizovány geny, které nejsou nezbytné pro životní funkce buňky. *Plazmidy jsou tvořeny kružnicovou dsDNA. Každý plazmid je replikon, neboť obsahuje jedno místo ori.* Dále je na plazmidu místo (lokus Inc), kterým se připojuje plazmid na membránu buňky. Enzymy potřebné k replikaci plazmidu jsou kódovány buď chromozomovými, nebo plazmidovými geny. Jedním z těchto enzymů je DNA-polymeráza, katalyzující replikaci plazmidové DNA, a druhým je specifická endonukleáza, štěpící v místě *ori* jeden plazmidový polynukleotidový řetězec.

KONJUGATIVNÍ A NEKONJUGATIVNÍ PLAZMIDY BAKTERIÍ. Bakteriální plazmidy, které se vyznačují schopností vlastního přenosu z donorové buňky do recipientní konjugací, jsou **plazmidy konjugativní**. Jako **donorová buňka** se v souvislosti s konjugací označuje buňka, která poskytuje genom nebo část genomu (v tomto případě je to plazmid) k přenosu do **recipientní buňky**, tj. do buňky, která genom nebo jeho část (v tomto případě plazmid) přijímá z buňky donorové. Způsob tohoto přenosu je různý. Jedním z nich je **konjugace**, kterou se rozumí přenos genomu nebo jeho části (v tomto případě plazmidu) z buňky donorové do recipientní uskutečňující se spojením těchto buněk.

Plazmidy, které nemají schopnost vlastního přenosu z donorové buňky do recipientní, se označují jako nekonjugativní.

Pro všechny konjugativní plazmidy je společné to, že jsou na nich umístěny geny, které podmiňují přenos plazmidu z donorové buňky do recipientní. Tyto geny se označují jako **transferové** a ovlivňují fenotyp buňky tím, že kódují syntézu vláken označovaných jako **pilusy**, pomocí nichž se donorové buňky spojují s recipientními. Konjugační proces totiž začíná interakcí pilusů se specifickými receptory proteinové povahy v povrchu recipientních buněk. Při této interakci se vytvoří otvor v donorové a recipientní buňce v místě, kde k této interakci došlo. Tímto otvorem pak prochází plazmid z donorové buňky do



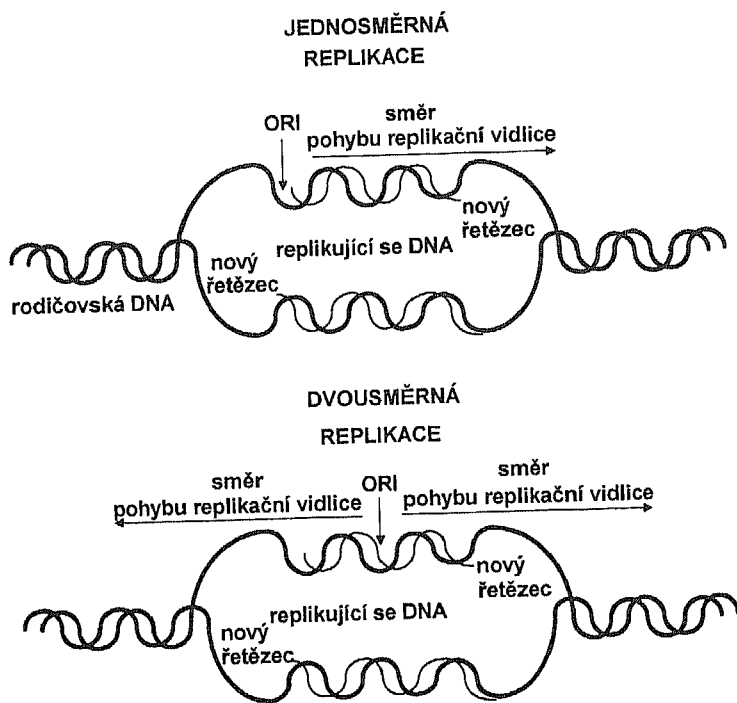
Obr. 124b
Zjednodušená genetická mapa chromozomu *Escherichia coli*

recipientní, a to tak, že současně dochází k replikaci přenášeného plazmidu, během níž jedna kopie plazmidu zůstává v donorové buňce a druhá přechází do recipientní. Příkladem konjugativního plazmidu je **F-plazmid**, který navozuje konjugaci u *E. coli* K12. Je složen z kružnicové dsDNA, jejíž molekulová hmotnost je 62×10^6 . Délka tohoto plazmidu je 30,8 až 31,7 μm . V jedné donorové buňce je několik kopií tohoto plazmidu.

Vedle F-plazmidu existuje celá řada dalších bakteriálních plazmidů, konjugativních i nekonjugativních. Jsou to např. **R-plazmidy**. Na těchto plazmidech jsou geny, které se ve fenotypu bakteriální buňky projevují její rezistencí k jednomu nebo více antibiotikům. Např. rezistence k penicilinu a ampicilinu vzniká vlivem působení β -laktamázy na tato antibiotika, která jsou inaktivována hydrolytickým účinkem tohoto enzymu kódovaného geny na plazmidu.

2.2 REPLIKACE BAKTERIÁLNÍHO GENOMU

Jelikož genom mnoha bakteriálních druhů je složen z chromozomu a plazmidů, pojednáme v této kapitole o replikaci obou těchto složek. Obě složky mají vlastnosti replikonů. Replikace začíná v každém replikonu od místa *ori*, kde se vytvoří nejdříve tzv. **replikační vidlice**. Replikační vidlicí se rozumí místo v dsDNA, kde dochází k rozestupu komplementárních DNA-řetězců vlivem přerušení vodíkových vazeb mezi nimi. Tak se vlastně v dsDNA vytvoří prostor potřebný k tomu, aby se v něm mohly umístit proteiny a enzymy katalyzující replikaci. Replikační vidlice se pak pohybuje směrem, kterým replikace probíhá. Jestliže se replikační vidlice pohybuje od počátku replikace jedním směrem, jde o **replikaci jednosměrnou**. Pohybuje-li se v obou směrech od počátku, jde o **replikaci dvousměrnou**. To platí jak pro lineární, tak pro kružnicové dsDNA (obr. 125). Při dvousměrné replikaci se replikační vidlice kružnicové dsDNA pohybují každá v opačném směru, dokud nesplynou v místě



Obr. 125
Možné směry replikace dsDNA

proti počátku replikace. *Replikace bakteriální dsDNA je dvousměrná* (obr. 126) a probíhá ve třech fázích:

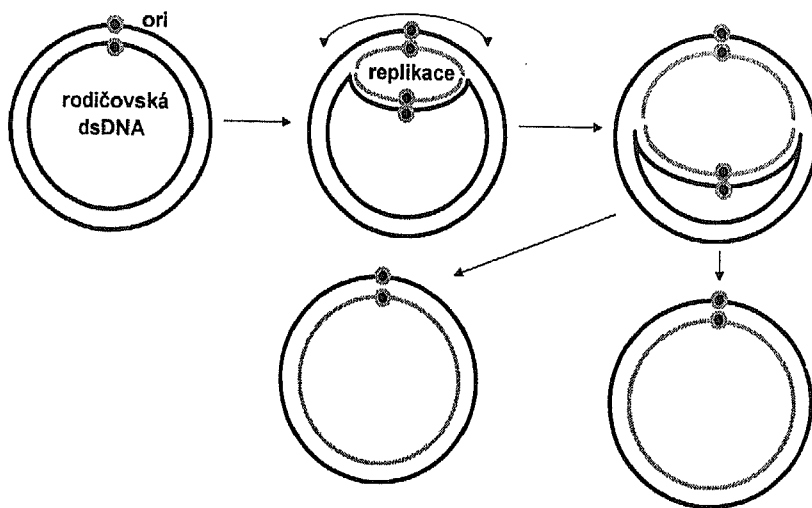
- ◆ **1. Iniciační replikace.** Tím se rozumí *pochody, kterými se replikace zahajuje*. Tyto pochody probíhají v místě *ori* (počátek replikace) a zahrnují rozeznání tohoto místa replikačními proteiny a vytvoření replikační vidlice.
- ◆ **2. Elongace DNA-řetězců.** Tato fáze replikace je charakteristická *postupným připojováním deoxyribonukleozid-5'-monofosfátů k 3'-konci nascentního DNA-řetězce na řetězci matricovém. Nascentním se obecně rozumí biopolymer ve stavu své syntézy.*
- ◆ **3. Terminace replikace.** *Tato fáze sestává z pochodů zakončujících replikaci příslušného replikonu.*

Všechny uvedené fáze replikace jsou enzymaticky řízeny a podílí se na nich též řada specifických proteinů. *Proteiny (včetně enzymaticky funkčních), které se podílejí na řízení replikace, se označují jako proteiny replikační.*

2.2.1

Replikace bakteriální chromozomové DNA

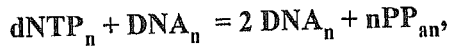
Na replikaci bakteriální chromozomové dsDNA se svým katalytickým účinkem podílí řada enzymů, jejichž stručnou charakteristiku je třeba podat ještě dříve, než přistoupíme k výkladu jednotlivých fází replikace. Jsou to: DNA-polymerázy, DNA-ligáza, DNA-primáza, DNA-gyráza a DNA-helikáza.



Obr. 126

Dvousměrná replikace bakteriální kružnicové chromozomové dsDNA

DNA-POLYMERÁZY. DNA-polymerázy je *společný název pro enzymy, které katalyzují syntézu DNA z deoxyribonukleozidfosfátů za přítomnosti DNA-nebo RNA-primeru* (viz dále). Jsou to **nukleotidyltransferázy** (str. 38) řízené DNA, neboť nutnou podmínkou pro jimi katalyzovanou syntézu nového DNA-řetězce je DNA jako matrice (str. 126). Z toho důvodu se doporučuje je nazývat jako **DNA-řízené -DNA-polymerázy (EC 2.7.7.7)**. Termín DNA-polymerázy je však také přípustný. Používá se též termín **DNA-dependentní-DNA-polymerázy**. Katalyzují obecně reakci:



kde N = A, T, G nebo C. Pro všechny DNA-polymerázy (a také RNA-polymerázy) je charakteristické, že polymerizace, kterou katalyzují, se uskutečňuje ve směru 5'→3'. To znamená konkrétně, že polynukleotidový řetězec prodlužují na jeho 3'-konci tím způsobem, že na 3'-OH-skupinu tohoto konce napojují vždy 5'-monofosfáty, které odnímají z nukleozid-5'-trifosfátů (obr. 127).

DNA-polymerázy mají ještě další společnou vlastnost:

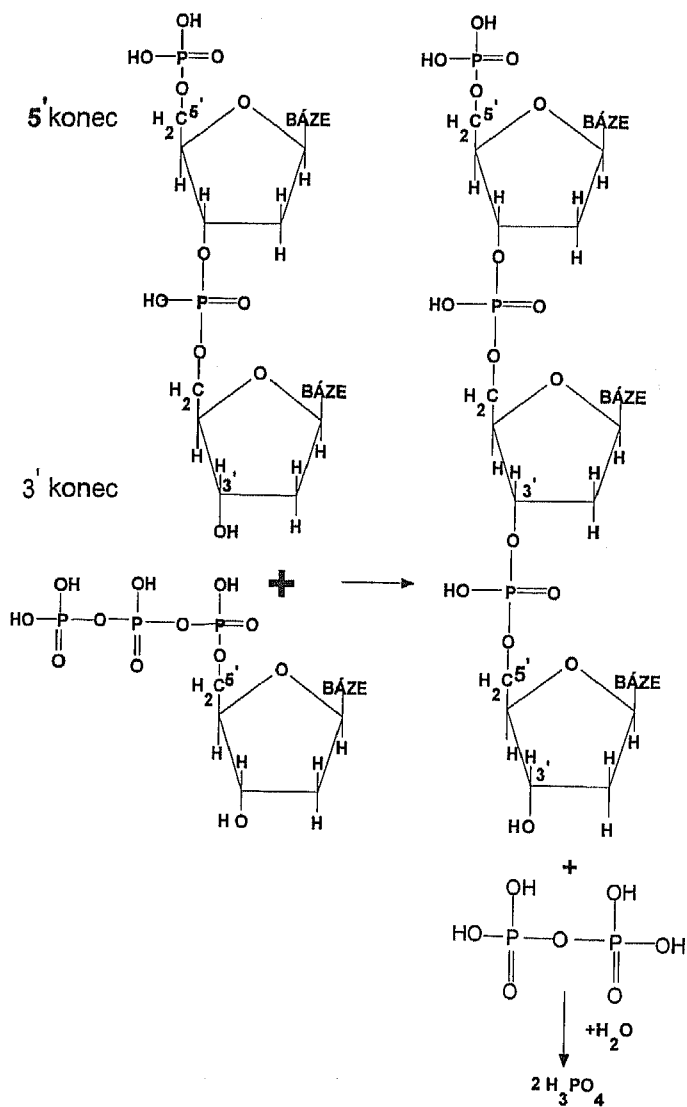
Katalyzují polymeraci (polymerizaci), která musí začít vždy od nějakého krátkého oligonukleotidu, od jehož 3'-konce syntézu zahájí. *Krátký oligonukleotid poskytující 3'-konec pro zahájení syntézy polynukleotidového řetězce se označuje jako primer*. Primerem může být oligodeoxyribonukleotid (**DNA-primer**) nebo oligoribonukleotid (**RNA-primer**). U bakterií (zde i v dalším textu se opíráme o výsledky výzkumů provedených na *E. coli*) se rozlišují tři druhy DNA-polymeráz:

♦ **1. DNA-polymeráza I neboli Kornbergův enzym.** Její molekulová hmotnost je 109 000 a je složena jen z jednoho globulárně poskládaného polypeptidového řetězce. Polymeruje asi 600 nukleotidů za minutu. V jedné buňce *E. coli* se vyskytuje až 400 molekul tohoto enzymu. K polymerizaci potřebuje DNA-primer. Kromě polymerační aktivity se vyznačuje 5'-3' a 3'-5'-exonukleázovou aktivitou, což znamená, že katalyzuje odštěpování deoxyribonukleotidů směrem od 5' konce k 3'-konci DNA-řetězce a naopak směrem od 3'-konce k 5'-konci. V této souvislosti upozorníme na rozdíl mezi exonukleázami a endonukleázami. **Nukleázy (EC 3.1)** jsou obecně enzymy, které hydrolyzují fosfodiesterové vazby v polynukleotidových řetězcích. Dělí se na:

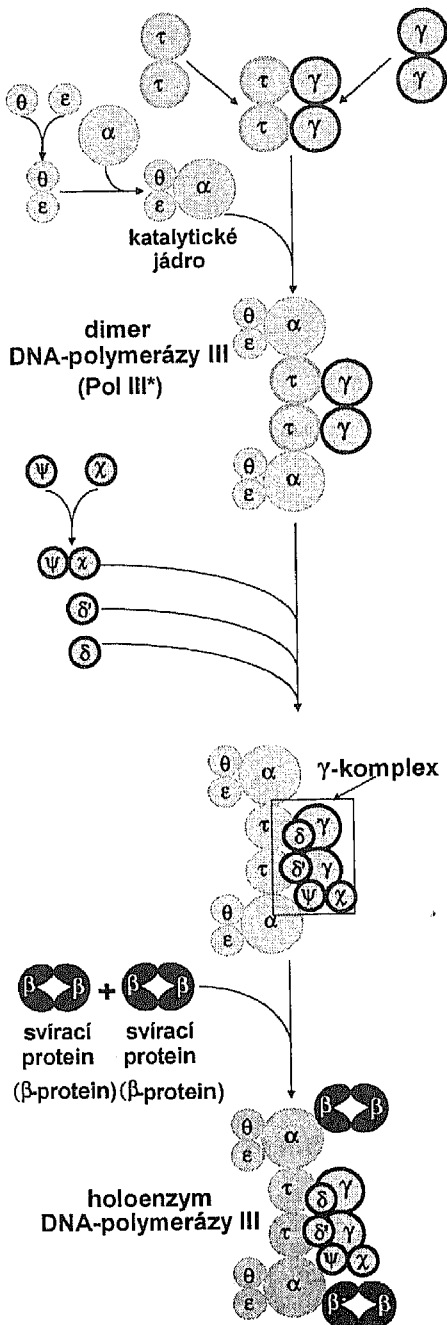
a) **exonukleázy**, které hydrolyzují fosfodiesterové vazby na koncích polynukleotidových řetězců a odštěpují tedy nukleotidy z 5'-konce nebo 3'-konce polynukleotidového řetězce,

b) **endonukleázy**, které štěpí fosfodiesterové vazby uvnitř polynukleotidového řetězce.

Co do strukturální podobnosti s jinými DNA-polymerázami řadí se DNA-polymeráza I do DNA-polymerázové rodiny A (str. 258). Katalyzuje replikaci DNA v mezerách, které zůstaly mezi Okazakiho fragmenty a odstraňuje RNA-primery 5'-exonukleázovou aktivitou.



Obr. 127
 Syntéza polynukleotidového řetězce ve směru 5' → 3' katalyzovaná
 DNA- a RNA-polymerázami



Obr. 128
Sestavování holoenzymu
DNA-polymerázy III

◆ **2. DNA-polymeráza II.** Má molekulovou hmotnost 90 000. Sestává z jednoho monomeru. Kromě polymerační má také 5'-3' a 3'-5'-exonukleázovou aktivitu. Patří do DNA-polymerázové rodiny B (str. 258).

◆ **3. DNA-polymeráza III.** Tato polymeráza má molekulovou hmotnost zhruba 900 000. Úplná molekula této polymerázy je oligomerní protein sestávající z několika různých monomerů lišících se v primární struktuře. Z nich některé se vyskytují ve dvou kopiích. Průběh sestavování tohoto oligomeru je znázorněn na obr. 128. Jednotlivé monomery, které vcházejí do této sestavy jsou:

α -monomer, který katalyzuje polymeraci. Monomer α se vyznačuje již slabou polymerační aktivitou o rychlosti polymerace 8 nukleotidů/s. Nemá však exonukleázovou aktivitu;

ϵ -monomer vyznačující se 5'-3'-exonukleázovou aktivitou;

θ -monomer, který stimuluje účinek ϵ -exonukleáz;

γ -monomer váže ATP;

δ -monomer se váže na β ;

δ' -monomer stimuluje účinek monomeru β ;

χ -monomer, na který se vážou proteiny SSB;

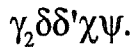
ψ -monomer tvoří most mezi χ a γ .

Z monomerů θ , ϵ a α se sestavuje **katalytické jádro polymerázy**, které se již vyznačuje slabou polymerační aktivitou. Spojením dvou katalytických jader se prostřednictvím monomerů τ vytvoří dimer DNA-

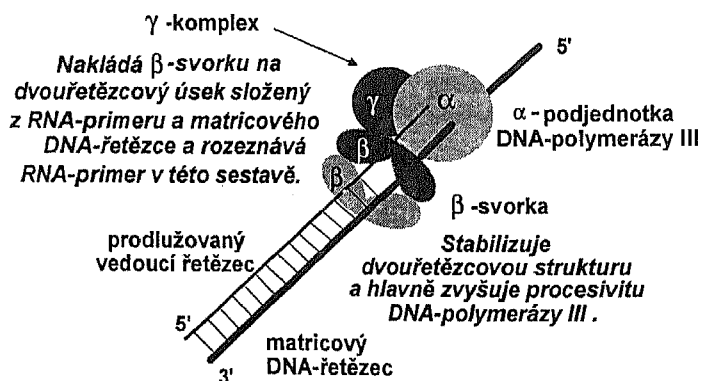
polymerázy III označovaný též jako **PolIII***. Proti jednomu katalytickému jádru má vyšší procesivitu. **Procesivitou polymerázy** se rozumí *síla takového spojení polymerázy s matricovým řetězcem, které umožňuje polymeraci katalyzovanou polymerázou. Čím je toto spojení silnější, tím vyšší je procesivita polymerázy neboli tím více monomerů je na matricovém řetězci polymerizováno.* Katalytické jádro polymeruje při rychlosti 20 nukleotidů/s a je procesivní pro 11 nukleotidů.

Úplné enzymové aktivity a vysoké procesivity dosahuje teprve dimer polymerázy III ve spojení s proteinem nazývaným **β -svorka**. β -svorka zvyšuje *mnohonásobně procesivitu dimeru PolIII* tím, že jej váže k DNA.* Je sestavena ze dvou stejných monomerů β , které při katalytickém procesu, uskutečňovaném DNA-polymerázou III, *obepínají (svírají) dvouřetězcové úseky tvořené replikující se DNA a RNA-primerem a tyto úseky stabilizují* (obr. 129). Je tvaru prstence obepínajícího prostor, jehož průměr je dostatečně velký, aby jím mohla procházet dsDNA. Tento prostor je obklopen 12 α -helixy a z vnějšku souvislou vrstvou β -struktur. Všechny 12 helixů má stejný sklon a jsou položeny napříč páteře DNA.

β -svorka nazývaná též jako **posuvná svorka** se *posouvá za katalytickým jádrem a drží pohromadě syntetizovaný DNA-řetězec s matricovým.* Sama se však na DNA nemůže naložit. Tuto práci vykonává **γ -komplex**, který *hydrolyzuje ATP a nakládá β -svorky na DNA v místech, kde se nachází RNA-primery, jež rozeznává.* Složení γ -komplexu je následující:



Úplná molekula DNA-polymerázy III, tedy holoenzym obsahující všechny monomery včetně β -svorky, se vyznačuje vysokou procesivitou a enzymovou

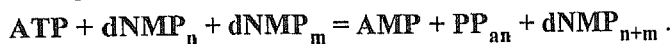


Obr. 129
 β -svorka

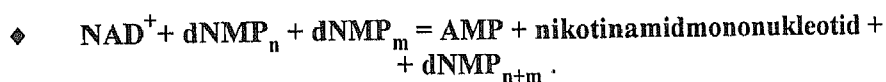
aktivitou. Polymeruje 500 nukleotidů/s a je procesivní pro celou replikující se molekulu DNA.

DNA-LIGÁZA (POLYDEOXYRIBONUKLEOTIDSYNTETÁZA). Je to enzym *katalyzující ligaci polynukleotidů, tj. vytvoření fosfodiesterové vazby mezi 5'-koncem a 3'-koncem polynukleotidových řetězců nebo jejich fragmentů.* Ligáza se uplatňuje při replikaci DNA během spojování Okazakiho fragmentů do souvislého polynukleotidového řetězce. Jsou dva druhy tohoto enzymu:

- ◆ 1. DNA-ligáza (ATP), EC 6.5.1.1, která katalyzuje tuto reakci:



- ◆ 2. DNA-ligáza (NAD^+), EC 6.5.1.2, která katalyzuje reakci:



DNA-PRIMÁZA (DNA-ŘÍZENÁ RNA-POLYMERÁZA, EC 2.7.7.-). Používá se též názvu **DNA-dependentní RNA-polymeráza EC 2.7.7.-.** Je to enzym, který *katalyzuje ve spojení s primozomem (str. 173) syntézu RNA-primeru, tj. oligoribonukleotidu, od jehož 3'-konce se syntetizuje krátký polydeoxyribonukleotid označovaný jako Okazakiho fragment.*

DNA-HELIKÁZY. Tyto enzymy katalyzují odvíjení komplementárních polynukleotidových řetězců tvořících dvouřetězcovou DNA. Jejich katalytický účinek spočívá v tom, že ruší vodíkové vazby, které drží pohromadě dvoušroubovicovou DNA. Tato aktivita je spřažena s hydrolyzou nukleozid-5'-trifosfátů. Energii, která se uvolní touto hydrolyzou, využije helikáza k odvíjecí reakci, jejíž mechanismus účinku však není znám. Existuje několik typů bakteriálních helikáz. Jsou to: helikázy I, II, III, IV, Rep-protein, n'-protein, DnaB-protein, RecBCD-enzym a UvrAB-komplex. Z nich při replikaci chromozomové DNA *E. coli* se uplatňuje **DnaB-protein** a **n'-protein**. *Odvíjejí ve směru 5'-3' DNA-řetězec, na kterém probíhá syntéza Okazakiho fragmentů. DnaB-protein aktivuje též primázu ke katalytickému účinku.*

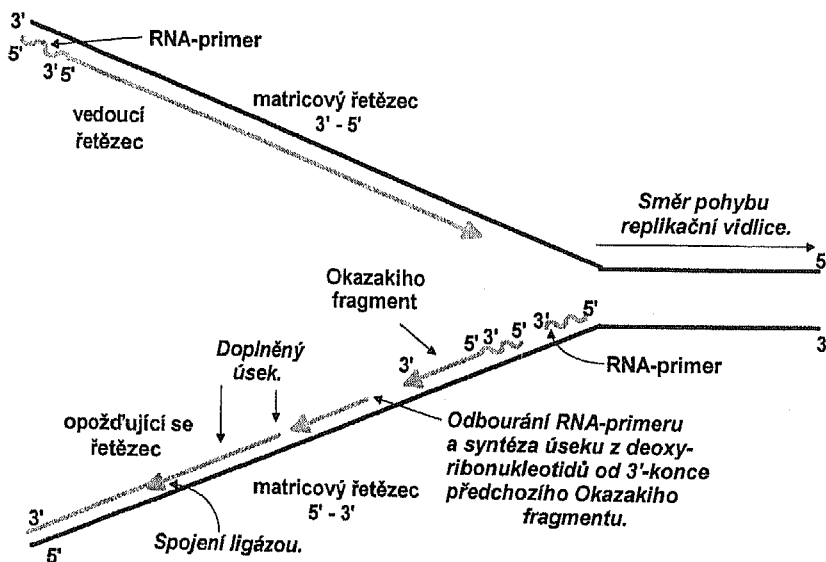
DNA-GYRÁZA. Během semikonzervativní replikace se tvoří před replikační vidlicí kladné nadšroubovicové závity. Gyráza je převádí na záporné. DNA-gyráza je topoizomeráza typu II. V závislosti na tom, jak rychle se tvoří kladné nadšroubovicové závity a jak rychle jsou převáděny do záporných závitů, může gyráza zabraňovat hromadění kladných nadšroubovicových závitů nebo udržovat daný segment DNA ve stavu záporného vinutí (např. při separaci komplementárních řetězců, viz str. 101).

Replikace bakteriální chromozomové dsDNA se dále zúčastňuje řada proteinů, o kterých budeme hovořit až v souvislosti s jejich konkrétní funkcí.

SEMIDISKONTINUÁLNÍ SYNTÉZA dsDNA PŘI REPLIKACI. Syntéza nových DNA-řetězců při replikaci je **semidiskontinuální**, což je způsob syntézy v replikační vidlici spočívající v tom, že jeden řetězec se syntetizuje na matricovém řetězci kontinuálně (postupně a souvisle až do konce) a druhý diskontinuálně (přerušovaně). **Kontinuální syntézou DNA-řetězce** se rozumí proces postupného připojování nukleozid-5'-monofosfátů k 3'-OH-konci nascentního DNA-řetězce za vytváření souvislého řetězce podél matricového. **Diskontinuální syntéza DNA-řetězce** probíhá podél matricového v replikační vidlici přes Okazakiho fragmenty. Každý **Okazakiho fragment** je krátký polydeoxyribonukleotid syntetizovaný na matricovém řetězci ve směru 5'-3' od 3'-konce RNA-primeru. Řetězec syntetizovaný kontinuálně se označuje jako **DNA-řetězec vedoucí**, kdežto řetězec syntetizovaný diskontinuálně prostřednictvím Okazakiho fragmentů se označuje jako **DNA-řetězec opožďující se**.

Semidiskontinuální způsob syntézy DNA-řetězců při replikaci dsDNA je rozšířen jak u prokaryotických, tak i u eukaryotických organismů. Abychom ho dobře pochopili, shrneme některé jeho rysy (obr. 130):

- ◆ 1. Kontinuální syntéza DNA-řetězce čili syntéza vedoucího řetězce se děje na matricovém řetězci, jehož směr fosfodiesterových vazeb je 3'-5'.

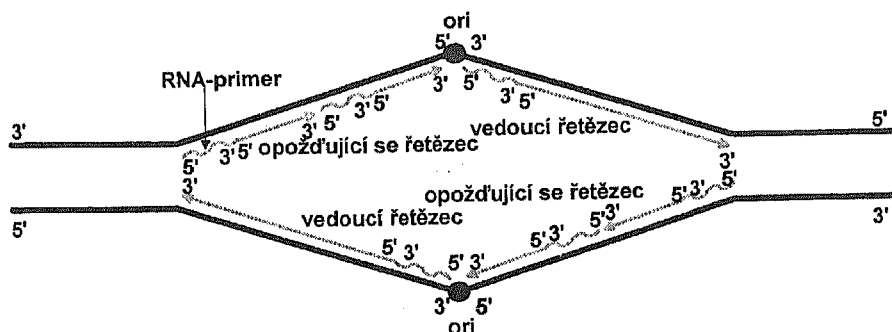


Obr. 130
Základní rysy semidiskontinuální syntézy nových DNA-řetězců při replikaci chromozomové dsDNA bakterií

- ◆ 2. Vedoucí řetězec se prodlužuje *po směru pohybu replikační vidlice*.
- ◆ 3. Diskontinuální syntéza DNA-řetězce, tj. syntéza opoždujícího se řetězce se děje na matricovém řetězci, jehož směr fosfodiesterových vazeb je 5'-3'.
- ◆ 4. Okazakiho fragmenty, přes které se syntetizuje opoždující se řetězec, se prodlužují *proti směru pohybu replikační vidlice*. Délka Okazakiho fragmentů je 1000 až 2000 nukleotidů.
- ◆ 5. Syntéza vedoucího řetězce probíhá od 3'-konce jednoho RNA-primeru, který se vytvoří v místě *ori*.
- 6. Syntéza každého Okazakiho fragmentu vyžaduje vlastní RNA-primer, od jehož 3'-konce syntéza fragmentu začíná.
- ◆ 7. RNA-primery Okazakiho fragmentů se odbourají ve směru 5'-3' (od 5'-konců) a vzniklé mezery se doplní komplementárně k matricovému řetězci deoxyribonukleotidy tak, že se každý Okazakiho fragment ve vzniklé mezeře začne prodlužovat syntézou od 3'-konců.
- ◆ 8. Zbývající části Okazakiho fragmentů sestávající už jen z deoxyribonukleotidů se pak spojí do souvislého řetězce DNA-ligázou.
- ◆ 9. Proces syntézy Okazakiho fragmentů a současně syntézy vedoucího řetězce se uskutečňuje katalytickým působením jedné molekuly holoenzymu DNA-polymerázy III, která se pohybuje ve směru pohybu replikační vidlice.

DVOUSMĚRNÁ REPLIKACE BAKTERIÁLNÍHO CHROMOZOMU.

Bylo již uvedeno, že replikace bakteriálního chromozomu probíhá v obou směrech od místa *ori*. Syntézu vedoucího a opoždujícího se řetězce si také můžeme konkrétně představit v obou replikačních vidlicích pohybujících se od místa *ori*. Při takové syntéze se vedoucí a opoždující se řetězec tvoří v obou



Obr. 131
Syntéza vedoucího a opoždujícího se řetězce
při replikaci bakteriálního chromozomu

replikačních vidlicích podle charakteristik uvedených v předchozím odstavci (obr. 131).

STRUKTURA POČÁTKU REPLIKACE. Počátek replikace u *E. coli* se označuje jako *oriC*. Jeho délka je 245 bp a sestává (obr. 132):

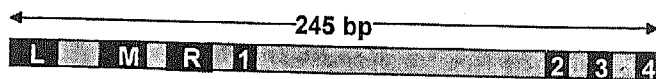
- ◆ z pravé strany ze tří opakujících se sekvencí o 9 bp;
- ◆ z levé strany ze tří opakujících se sekvencí o 13 bp a jedné o 9bp.

9 bp-sekvence jsou označeny jako 1, 2, 3, 4, kdežto 13 bp-sekvence jako L, M, R. Mezi uvedenými sekvencemi jsou sekvence jedinečné, které se neopakují.

INICIACE REPLIKACE. Iniclace replikace musí být velmi specifický proces, když počátek replikace na bakteriálním chromozomu je jen jeden a iniciace replikace se uskutečňuje jen jednou za generační dobu, a to na sekvenci o 245 bp, která musí být rozeznána mezi $4,6 \times 10^6$ bp. Obr. 133 znázorňuje tři fáze iniciace replikace:

◆ 1. Nejdříve je proteiny DnaA rozeznán počátek replikace (*oriC*). To se děje vazbou ATP k DnaA-proteinům, které se touto vazbou aktivují. Aktivované DnaA-proteiny se pak vážou na 9 bp-sekvence, což je vlastní rozpoznávací proces. Interagují též mezi sebou za tvorby shluku o 10 až 20 proteinech. Tyto interakce jsou kooperativní a mají za následek, že se *oriC* ovine kolem vytvořeného shluku DnaA-proteinů. Tvorba tohoto shluku a rozpoznání 9 bp-sekvencí vyžaduje energii, která je dodávána hydrolýzou ATP na ADP + P_{an}. Jelikož sekvence *oriC* jsou bohaté na páry AT, dochází snadno vazbou proteinů DnaA na ně k jejich denaturaci, tj. k uvolnění vodíkových vazeb mezi komplementárními bázemi, čímž se *oriC* otevře. **DnaA-proteiny** mají tedy dvojí funkci: *rozeznávají oriC a převádějí jej do otevřené formy.*

◆ 2. Po otevření počátku replikace se vážou z obou protilehlých stran na uvolněné DNA-řetězce počátku replikace celkem dvě molekuly **DnaB-proteinu**

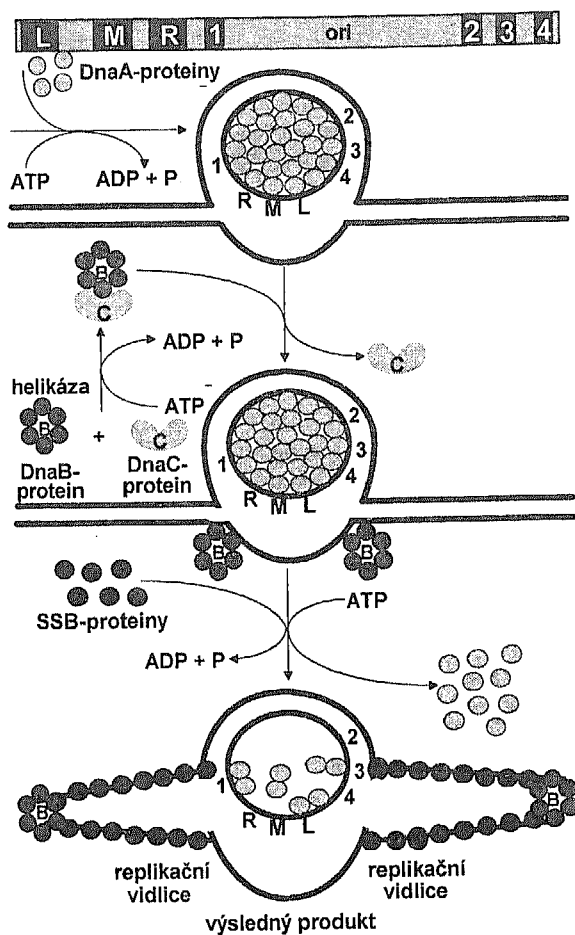


L, M, R jsou 13 bp-sekvence GATCTNTTNTTTT

1, 2, 3, 4 jsou 9 bp-sekvence TTATNCANA

■ = neopakující se sekvence

Obr. 132
Schéma struktury *oriC* *E. coli*



Obr. 133

Iniciace replikace na *oriC* chromozomu *E. coli*

(helikáza). To se děje za účasti proteinu DnaC, který vytvoří s DnaB komplex a rozeznává DnaA-proteiny a nějakým způsobem umožňuje transport DnaB do počátku replikace. K transportu jedné molekuly DnaB-proteinu do počátku replikace je pravděpodobně zapotřebí energie z jedné molekuly ATP.

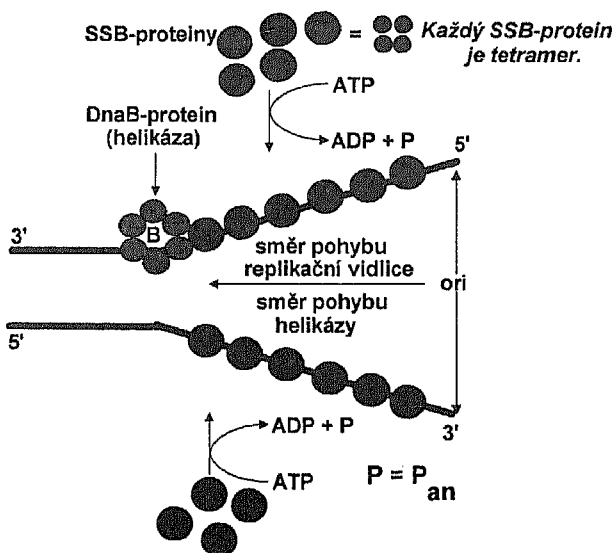
♦ 3. Helikázy umístěné v počátku replikace začnou odvíjet ve směru 5'-3' DNA-řetězec za tvorby replikačních vidlic. Na vznikající jednořetězcové oblasti v replikačních vidlicích se vážou SSB-proteiny neboli proteiny vážající se na jednořetězcové úseky DNA. Tyto proteiny jsou tetramerní o molekulové hmotnosti 74 000 a jejich funkce spočívá v tom, že udržují matricové řetězce v nataženém stavu, brání tvorbě vodíkových vazeb mezi nimi a tím také obnově dvouřetězcového stavu molekuly.

Výsledným produktem iniciace replikace je chromozom, který má replikační vidlice v počátku replikace opatřené proteinem DnaB v konformaci, v níž může uskutečňovat helikázovou aktivitu ve fázi elongace. Tato fáze je poměrně složitá a proto dříve, než ji budeme vysvětlovat, zformulujeme otázky, na které se budeme snažit odpovědět:

- ◆ Jak se syntetizuje současně vedoucí řetězec a Okazakiho fragmenty?
- ◆ Jak se z Okazakiho fragmentů vytvoří souvislý DNA-řetězec neobsahující už RNA-primery?

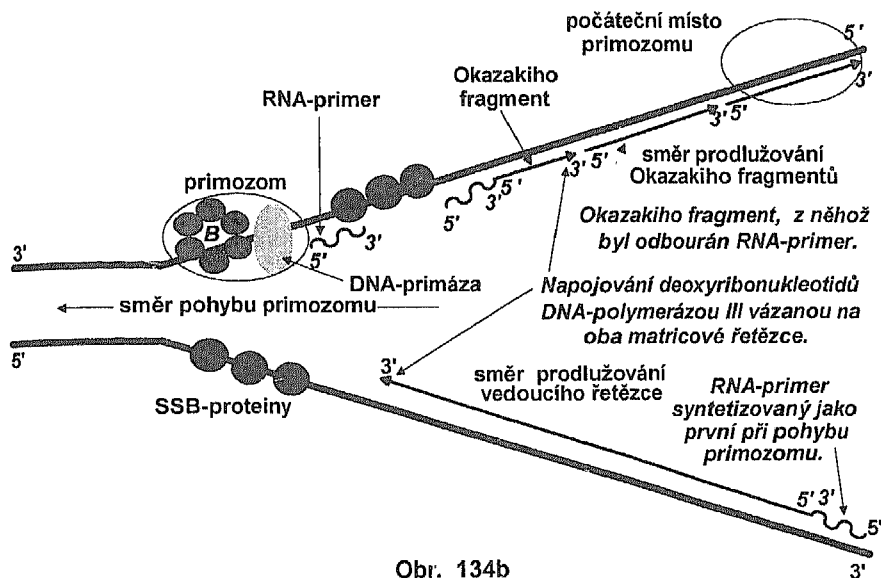
SYNTÉZA VEDOUcíHO ŘETĚZCE A OKAZAKIHO FRAGMENTŮ.
Sledujme tuto syntézu podle obr. 134:

- ◆ 1. Během celé fáze elongace se replikační vidlice pohybují v obou směrech od místa *ori*. Tento děj je navozován helikázou (DnaB-protein), která odvíjí ve směru 5'-3' matricový řetězec, na kterém probíhá diskontinuální syntéza. Odvinuté DNA-řetězce se pokrývají SSB-proteiny (tento proces vyžaduje přísun molekul ATP) (obr. 134a).
- ◆ 2. *Syntéza jak vedoucího, tak i opožd'ujícího se řetězce vyžaduje nezbytně přítomnost RNA-primeru.* Pro vedoucí řetězec je to jen jeden primer, který se syntetizuje v počátku replikace. Další primer již není nutný, neboť řetězec vedoucí se syntetizuje kontinuálně od začátku až do konce. U opožd'ujícího se řetězce se každý Okazakiho fragment syntetizuje od 3'-konce RNA-primeru.



Obr. 134a

Syntéza vedoucího řetězce a Okazakiho fragmentů



Obr. 134b
Syntéza vedoucího řetězce a Okazakiho fragmentů

Počet RNA-primerů se proto rovná počtu syntetizovaných Okazakiho fragmentů (obr. 134b).

◆ 3. RNA-primery jsou syntetizovány DNA-primázou (**DnaG-protein**), která je k této syntéze aktivována helikázou (**DnaB-proteinem**). DNA-primáza je vázána na helikázu a při pohybu replikační vidlice syntetizuje fragmenty RNA o délce 11 nukleotidů. Komplex primázy s helikázou *DnaB*, schopný případně ještě v kooperaci s dalšími proteiny katalyzovat syntézu RNA-primeru na DNA-řetězci, který slouží jako matricový pro syntézu opožděujícího se řetězce, se označuje jako **primozom**. Je třeba upozornit na to, že primozom *E. coli*, který zde popisujeme, je poměrně jednoduchý. Sestává z helikázy a DNA-primázy (obr. 134b). U bakteriálních virů sestává ještě z dalších proteinů. Celkem se rozeznávají dva typy primozomů:

a) **primozom typu *oriC***, který se tvoří v replikonech obsahujících jako počátek replikace *oriC*, což se týká druhu *E. coli*;

b) **primozom typu ϕX** , který se tvoří v replikonech, v nichž počátek replikace současně slouží jako specifické místo pro sestavování primozomu neboli **místo pas**. Tento primozom je sestaven ze šesti proteinů: **PriA-protein** (protein n' vyznačující se helikázovou aktivitou 3'-5'), **PriB-protein**, **PriC-protein** (protein n''), **DnaT-protein** (protein i), **DnaB-protein** (helikáza) a **DnaG-protein** (DNA-primáza). Primozom typu ϕX se tvoří např. při replikaci DNA fága ϕX 174.

Primozom se pohybuje ve směru pohybu replikační vidlice, tedy (jak uvidíme dále) proti směru prodlužování Okazakiho fragmentů.

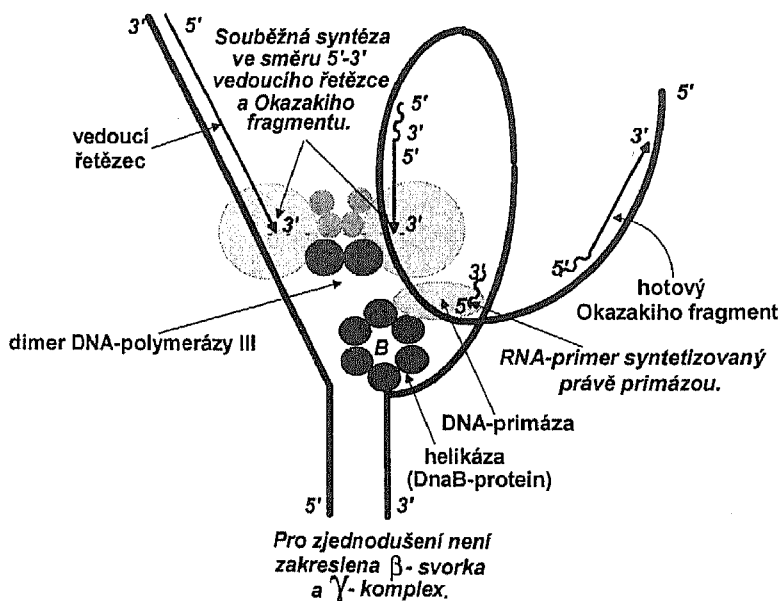
◆ 4. Na 3'-OH-konec každého primeru se za katalytické účasti DNA-polymerázy III napojují deoxyribonukleozid-5'-trifosfáty za uvolnění PP, což se děje (obr. 134b):

a) na matricovém řetězci 5'-3' za postupné tvorby Okazakiho fragmentu dlouhého asi 1 000 až 2 000 deoxyribonukleotidů,

b) na matricovém řetězci 3'-5' za tvorby kontinuálně syntetizovaného vedoucího řetězce od 3'-OH-konce jen jednoho RNA-primeru.

◆ 5. Nastává však paradoxní situace. DNA-polymeráza III jako dimerní molekula (dvě katalytická jádra) se pohybuje ve směru replikační vidlice. Těž vedoucí řetězec se prodlužuje v tomto směru. Na druhé straně však *Okazakiho fragmenty se prodlužují proti směru pohybu replikační vidlice a tedy i DNA-polymerázy* (obr. 134b). Tento paradox vysvětlujeme v dalším odstavci.

KOORDINACE SYNTÉZY VEDOUČÍHO ŘETĚZCE SE SYNTÉZOU OKAZAKIHO FRAGMENTŮ VE SMĚRU POHYBU REPLIKAČNÍ VIDLICE. Původně se předpokládalo, že matricový řetězec, na kterém se syntetizují Okazakiho fragmenty, vytvoří smyčku kolem ramene DNA-polymerázy III, které se posouvá po této matrici, a tak umožní souběžné prodlužování Okazakiho fragmentů a vedoucího řetězce stejnou dimerní molekulou DNA-polymerázy III, jednak ve směru 5' - 3' a jednak ve směru pohybu replikační vidlice (obr. 134c).



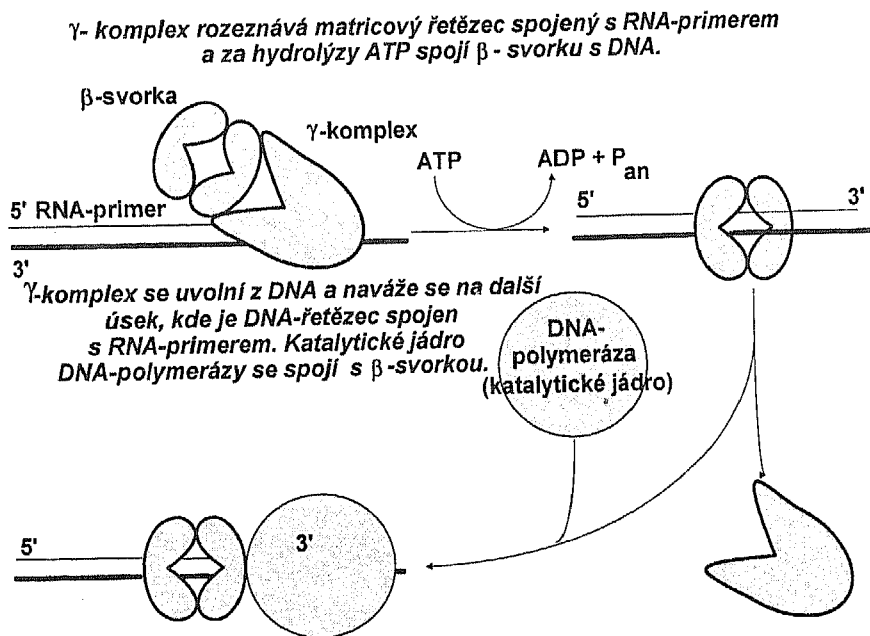
Obr. 134c

Syntéza vedoucího řetězce a Okazakiho fragmentů

Tím se i vcelku názorně vysvětlovalo, proč pro syntézu Okazakiho fragmentů už musí být připraveny 3'-konce ve formě RNA-primerů a jak současně na obou matricových řetězcích může probíhat syntéza Okazakiho fragmentů a vedoucího řetězce. Existence γ -komplexu a posuvné svorky vede však k představě, že syntéza vedoucího a opoždujícího se řetězce může být koordinována ve stejném směru podle modelu vysvětleného na obr. 137a, b, c. Shrňme proto nejdříve, co víme o γ -komplexu a posuvné svorce:

◆ 1. DNA-řetězce obsazené RNA-primery jsou specificky rozeznávány γ -komplexem DNA-polymerázy III. Tento komplex je DNA-dependentní ATPáza, která přednostně rozeznává DNA nesoucí RNA-primer a nakládá na ni posuvnou β -svorku, která stabilizuje prodlužující se dvouřetězcové úseky a zvyšuje procesivitu DNA-polymerázy III. Na opoždujícím se DNA-řetězci se na každém Okazakiho fragmentu nachází β -svorka, jejíž spojení s DNA-řetězcem je velmi pevné. Na vedoucím řetězci je jeden RNA-primer, a proto se na něj váže jen jedna molekula β -svorky. Nevadí, když opět zdůrazníme, že vlivem β -svorky se stává dimer DNA-polymerázy III vysoce procesivní, tj. udržuje ji ve spojení s matricovým a syntetizovaným řetězcem až do konce replikace.

◆ 2. Proces naložení β -svorky na matricový řetězec se děje podle obr. 135. Po pozorném přečtení tohoto obrázku vidíme, že se γ -komplex po naložení β -svorky na DNA z tohoto procesu uvolní a β -svorka se spojí s jádrem DNA-



Obr. 135

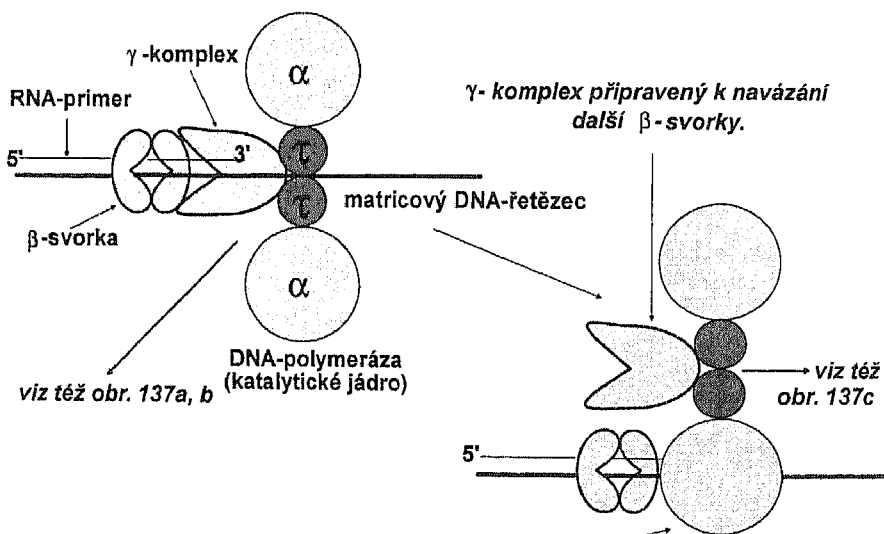
Schéma procesu naložení β -svorky na DNA pomocí γ -komplexu

polymerázy III, kterým je katalyzována syntéza Okazakiho fragmentu a vedoucího řetězce.

◆ 3. γ -komplex však není volný, jak nás v prvním přiblížení informuje obr. 135, který má zdůraznit jen funkci γ -komplexu a β -svorky. Při procesu nakládání β -svorky na matricový řetězec a přijetí nové molekuly β -svorky je γ -komplex stále vázán na podjednotky τ DNA-polymerázy III. V procesu nakládání β -svorky se holoenzym DNA-polymerázy III váže k matricovému řetězci prostřednictvím podjednotek τ . Po naložení na DNA se β -svorka spojí s jádrem DNA-polymerázy III, kterým je katalyzována syntéza Okazakiho fragmentu. Na podjednotky τ se pak prostřednictvím γ -komplexu může navázat další β -svorka a celý proces nakládání se může s ní zopakovat. Při tomto procesu se pokaždé na zlomek sekundy jádro DNA-polymerázy III uvolňuje z matricového řetězce a opět s ním spojí u dalšího primeru, na který bude naložena nová β -svorka a zahájena pak syntéza dalšího Okazakiho fragmentu (obr. 136).

Holoenzym DNA-polymerázy III obsahuje dvě katalytická jádra vázaná na dimer podjednotky τ .

γ -komplex reaguje s C-konci β -svorky a orientuje ji směrem k primeru.

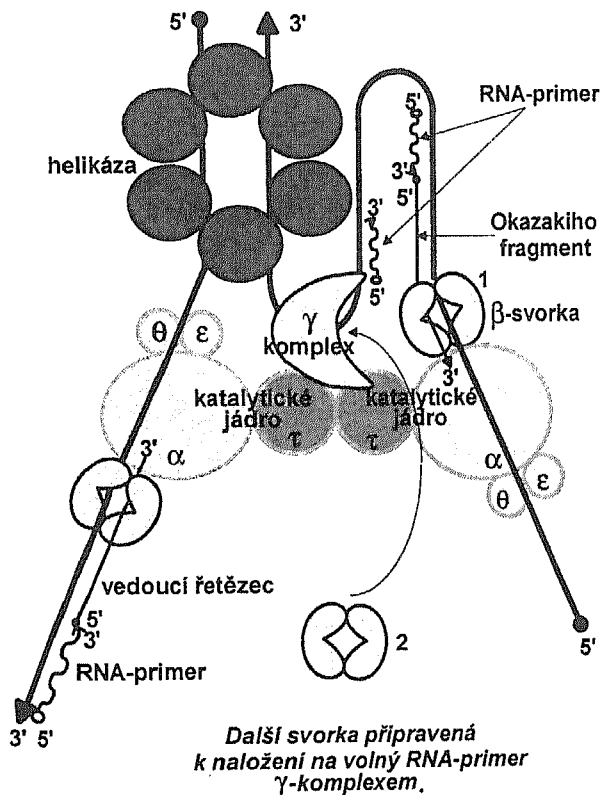


Katalytické jádro reaguje se stejnými C-konci na β -svorce jako γ -komplex. Proto může zaujmout místo původně obsazené γ -komplexe, jakmile skončí proces naložení β -svorky. V holoenzymu je γ -komplex spojen s DNA prostřednictvím jádra přes podjednotky τ .

Obr. 136
Interakce γ -komplexu s β -svorkou a s katalytickým jádrem DNA-polymerázy III

PROCESIVITA DNA-POLYMERÁZY III V REPLIKAČNÍ VIDLICI.

Každý Okazakiho fragment je dlouhý asi 1 až 2 kb. Za sekundu se vytvoří 1 kb, takže syntéza jednoho Okazakiho fragmentu trvá asi jednu až dvě sekundy. To znamená, že polymeráza musí rychle zahájit syntézu u dalšího RNA-primeru. Vzhledem k tomu, že je v buňce jen 10 až 20 molekul holoenzymu DNA-poly-



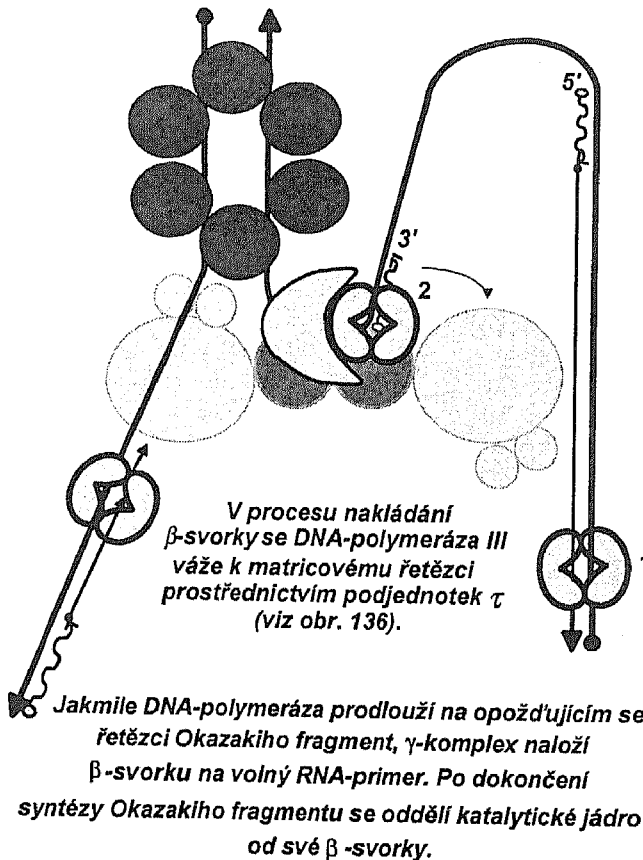
Struktura holoenzymu je umístěna na začátku replikační vidlice tak, že na každém matricovém řetězci je jedno katalytické jádro. γ-komplex je vzhledem k oběma katalytickým jádrům položen asymetricky tak, aby směřoval k opožďujícímu se řetězci a mohl na něj opakovaně nakládat β-svorky k zahájení procesivního prodlužování Okazakiho fragmentů. Tento obrázek znázorňuje situaci, v níž se prodlužuje Okazakiho fragment a γ-komplex je připraven naložit další β-svorku na volný RNA-primer.

Obr. 137a

Schéma modelu vysvětlujícího procesivitu holoenzymu DNA-polymerázy III v replikační vidlici

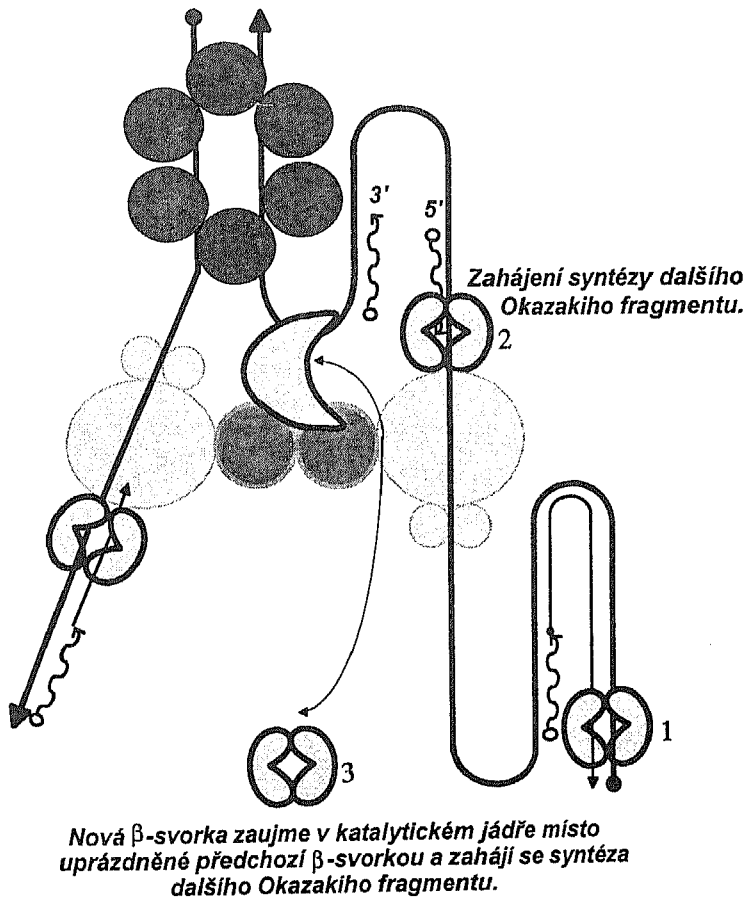
merázy III, nepředpokládá se, že by syntéza každého dalšího Okazakiho fragmentu na matricovém řetězci byla zahájena novou molekulou tohoto enzymu. Vychází se ze zjištění, že během syntézy Okazakiho fragmentu na matricovém řetězci je PolIII* spojena s β -svorkou a předpokládá se, že po dokončení této syntézy se z DNA rychle uvolní (rychlostí menší než za 1 sekundu), přičemž zanechává za sebou β -svorku. Po svém uvolnění z DNA se pak PolIII* okamžitě spojí s novou β -svorkou na jiném místě obsazeném RNA-primerem. Jinými slovy, na matricovém řetězci, na kterém se syntetizují Okazakiho fragmenty, "skáče" PolIII* mezi dvěma β -svorkami, tj. mezi tou, která je na konci Okazakiho fragmentu, jehož syntéza skončila, a tou, která byla naložena na nový RNA-primer.

Tato představa se velmi dobře shoduje s celkovou strukturou holoenzymu DNA-polymerázy III a je znázorněna schematicky na obr. 137a, kde je holoen-



Obr. 137b
Schéma modelu vysvětlujícího procesivitu holoenzymu DNA-polymerázy III v replikační vidlici

zym umístěn do pohybující se replikační vidlice. Každé katalytické jádro DNA-polymerázy III je znázorněno ve spojení s β -svorkou, která je potřebná pro procesivní elongaci obou řetězců. Obr.137b ukazuje, jak γ -komplex nakládá β -svorku do místa obsazeného RNA-primerem, a že při tomto procesu se současně dokončuje syntéza jednoho Okazakiho fragmentu. Uvolnění katalytického jádra polymerázy z β -svorky vede k uprázdňení jeho vazebného místa pro β -svorku. Tento děj předpokládá logicky spojení jádra s novou β -svorkou na dalším RNA-primeru (obr. 137c). Katalytické jádro uvolněné z β -svorky se posune k nové β -svorce naložené na volný RNA-primer γ -komplexem, aby zahájilo prodlužování dalšího Okazakiho fragmentu. Celý cyklus proběhne během jedné až dvou sekund. Je nutno ještě poznamenat, že v bakteriální buňce je dostatek molekul β -svorky, aby tento proces mohl kontinuálně probíhat.



Obr. 137c
Schéma modelu vysvětlujícího procesivitu holoenzymu DNA-polymerázy III v replikační vidlici

TVORBA SOUVISLÉHO ŘETĚZCE Z OKAZAKIHO FRAGMENTŮ. Nakonec musí být z Okazakiho fragmentů odstraněny všechny RNA-primery a výsledné DNA-fragmentsy spojeny do souvislého řetězce. Tento proces katalyzuje DNA-polymeráza I, která postupuje za DNA-polymerázou III a postupně odbourává z 5'-konců RNA-primery a napojuje na 3'-konce předchozích Okazakiho fragmentů komplementárně k matricovému řetězci deoxyribonukleotidy. Takto doplněné fragmenty se pak spojí DNA-ligázou (obr. 138).

TERMINACE REPLIKACE BAKTERIÁLNÍHO CHROMOZOMU. *Replikace bakteriálního chromozomu (E. coli jako základní model) končí na specifických sekvencích, které se označují jako terminátory replikace neboli místa ter. Na ně se váže specifický protein zvaný Tus-protein, který inhibuje aktivitu DnaB-proteinu (helikázy), což zastavuje tvorbu replikační vidlice.*

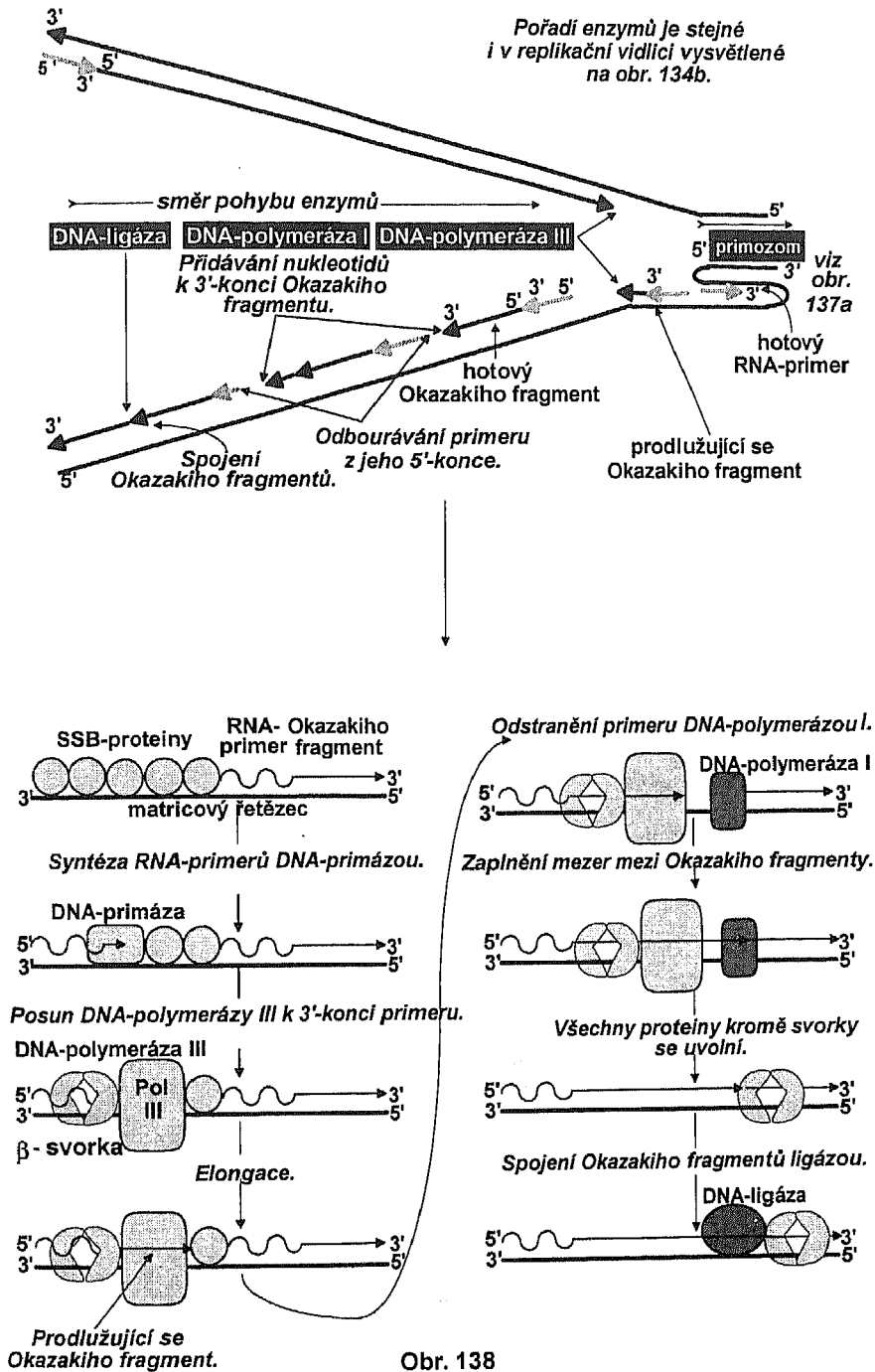
2.2.2

Replikace plazmidové DNA

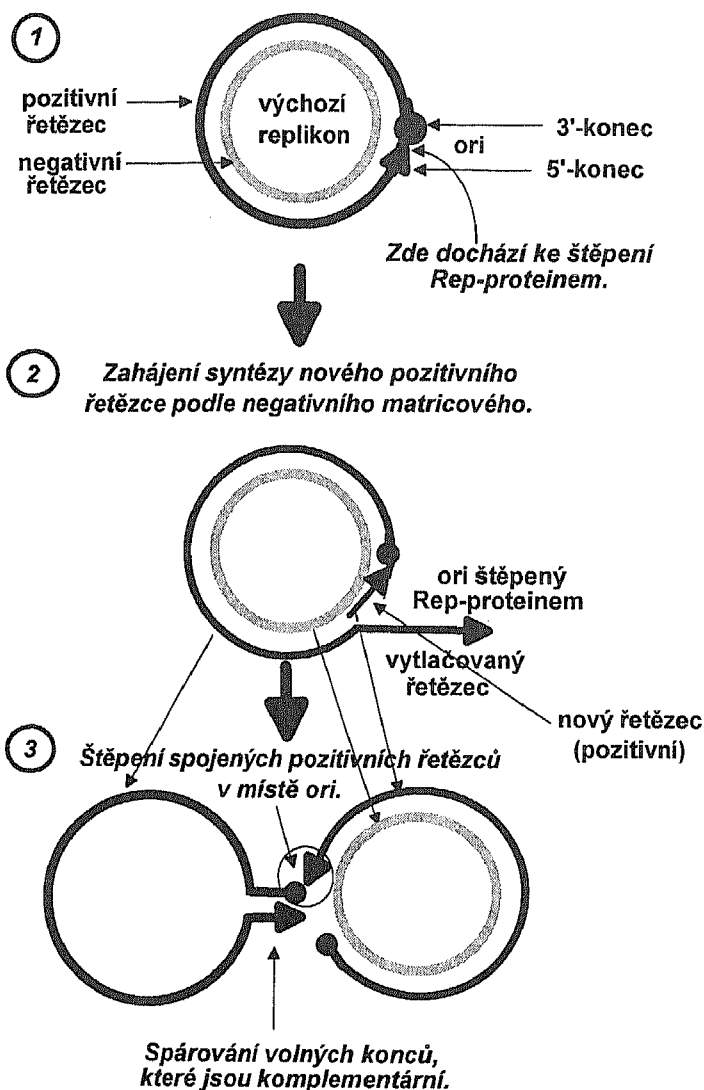
Plazmidy jsou replikony kružnicového typu, ale značně menších rozměrů než je bakteriální chromozom. Zatímco obvod bakteriálního chromozomu měří přibližně 1 mm, je obvod např. F-plazmidu 31 až 32 μm . Principiálně se však jejich replikace neliší od replikace chromozomu. *Je semikonzervativní, semidis-kontinuální a většinou dvousměrná.*

REPLIKACE PLAZMIDŮ OTÁČIVOU KRUŽNICÍ. Malé kružnicové replikony, mezi něž patří plazmidy a některé genofory virů, se často replikují způsobem, který se nazývá replikace otáčivou kružnicí, neboť jejím znakem je, že *replikační vidlice postupuje jedním směrem po kružnici. Kružnice otáčivá* znamená v přeneseném slova smyslu *model vyjadřující způsob replikace malých kružnicových molekul, podle kterého replikační vidlice opakovaně postupuje po kružnicové matici.* Zhruba probíhá takto (obr. 139a, b):

- ◆ 1. Replikace začíná na plazmidu v počátku replikace *ori*.
- ◆ 2. Dále budeme rozlišovat v molekule plazmidu pozitivní (+) a negativní (-) DNA-řetězec. Pozitivní DNA-řetězec v počátku replikace *ori* je nejdříve rozeznán **Rep-proteinem**, který *hydrolyzuje v tomto místě jednu fosfodiesterovou vazbu*. Tím se uvolní 5'-konec pozitivního řetězce, který je pak z kružnice vytlačován 3'-konce nově syntetizovaného řetězce, který se polymerací začíná prodlužovat (což je příčinou vytlačování).
- ◆ 3. Rep-protein hydrolyzuje dále ještě jednu fosfodiesterovou vazbu, a to v terminačním úseku replikace, tj. v místě *ori*, v němž je spojen vytlačený ma-



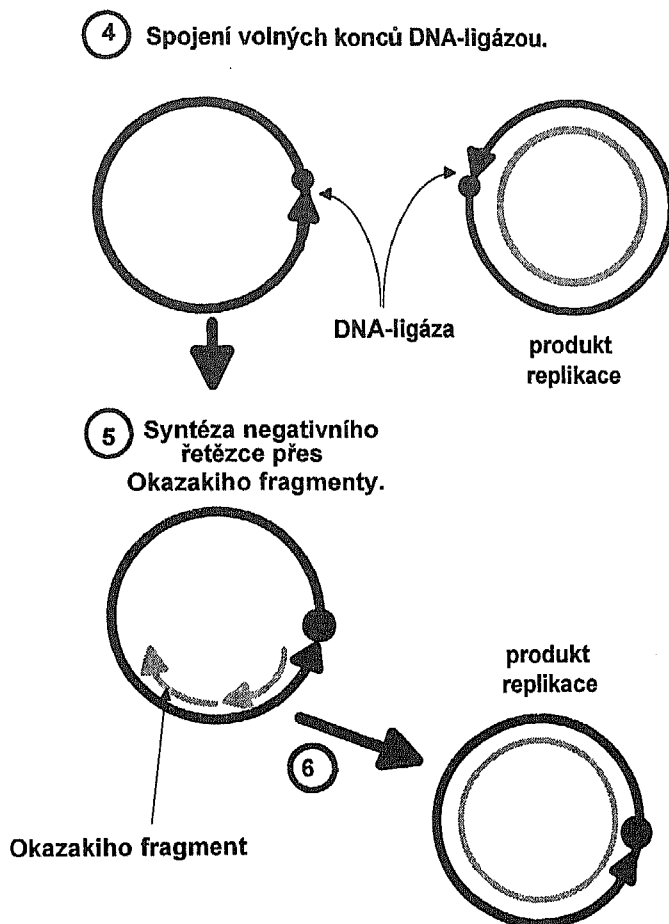
Obr. 138
 Syntéza opožďujícího se řetězce



Obr. 139a
Replikace plazmidů otáčivou kružnicí

trícový pozitivní řetězec s pozitivním řetězcem, který se syntetizoval podle negativního matricového řetězce.

◆ 4. Volné konce pozitivního řetězce se vyznačují komplementaritou. Proto se spárují a spojí katalytickým účinkem DNA-ligázy, která též spojí volné kon-

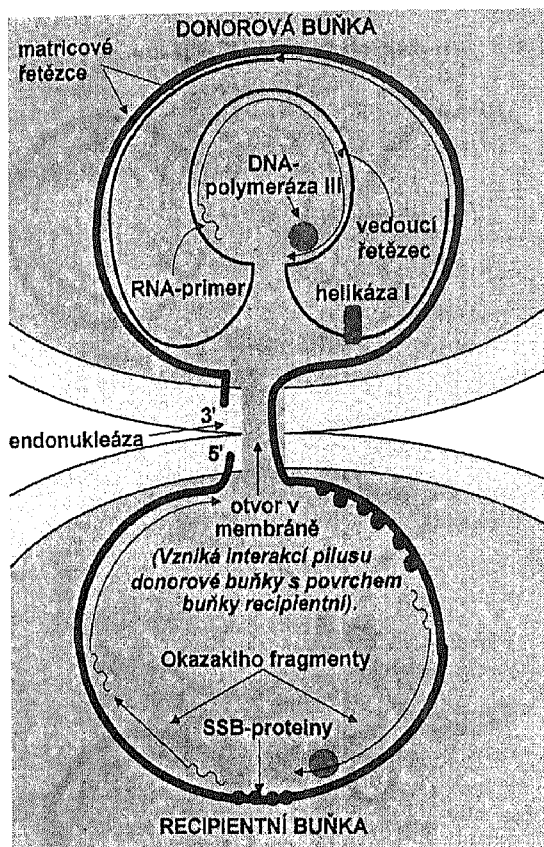


Obr. 139b
Replikace plazmidů otáčivou kružnicí

ce řetězce, který se syntetizoval podle matricového negativního řetězce. Výsledkem této fáze replikace je jedna nová molekula plazmidu (jeden produkt replikace) a pozitivní kružnicový DNA-řetězec (to je ten, který byl vytlačen). Nová molekula plazmidu může být zahrnuta do nového cyklu replikace.

- ◆ 5. Od místa *ori* pozitivního (vytlačovaného) řetězce začne syntéza opoždujícího se řetězce přes Okazakiho fragmenty pomocí proteinů buňky.
- ◆ 6. Vzniklá molekula plazmidu, kde matricí byl pozitivní řetězec, může pak vstoupit do dalšího replikačního cyklu.

REPLIKACE KONJUGATIVNÍCH PLAZMIDŮ BĚHEM KONJUGACE.
Replikace konjugativních plazmidů může být vyvolána spojením donorových



Obr. 140
Replikace konjugativních plazmidů
během konjugace

buněk s recipientními. Signálem pro vstup plazmidové DNA do recipientní buňky je interakce pilusu donorové buňky obsahující plazmid s povrchem recipientní buňky, po níž dochází k aktivaci specifické endonukleázy, kterou se štěpí místo *ori* na plazmidu. Tím se uvolní 5'-konec jednoho řetězce, kterým tento řetězec vchází do recipientní buňky. Protože se tento konec uvolňuje po naštěpení endonukleázou v místě *ori* vždy na stejné sekvenci nukleotidů, je počátek, kterým vstupuje řetězec plazmidové DNA do recipientní buňky, vždy stejný. Nepřenesený řetězec v donorové buňce je matricí pro syntézu komplementárního vedoucího řetězce, který se syntetizuje kontinuálně. Podle řetězce vytěšňovaného z kružnice do recipientní buňky se syntetizuje diskontinuálně přes Okazakiho fragmenty opožďující se řetězec, jehož replikaci katalyzuje DNA-polymeráza III recipientní buňky (obr. 140). V recipientní buňce se potom další replikací vytvoří více kopií téhož plazmidu (obr. 140).

2.3

**TRANSKRIPCE BAKTERIÁLNÍHO GENOMU
(Bakteriální transkripce)**

Hlavní biologický význam všech způsobů replikace, s nimiž jsme se seznámili, spočívá v tom, že zajišťují přenos genetické informace z mateřské molekuly DNA do dceřiné. Jak dokonalý, důmyslný a současně složitý je enzymový mechanismus, kterým se replikace zajišťuje již u organismů v evoluci nejníže postavených, jako jsou bakterie! Samozřejmě, že tento přenos genetické informace z rodičovských organismů na potomstvo musí být přesný a pokud možno bezchybný, aby v potomstvu zůstala zachována genetická informace pro realizaci biologických funkcí. Neméně dokonalý je též molekulární mechanismus, kterým je zajišťována realizace genetické informace, jejímž prvním stupněm je transkripce.

U bakterií dochází k transkripci genetické informace z DNA (chromozomové a plázmidové) do RNA. Tuto transkripci katalyzuje enzym **DNA-řízená RNA-polymeráza (EC 2.7.7.6)** neboli **DNA-řízená RNA-nukleotidyltransferáza**. Další užívaný název je **DNA-dependentní RNA-polymeráza**. Běžně se však používá názvu **RNA-polymeráza** nebo **transkriptáza**. Od DNA-primázy, která též působí jako DNA-řízená RNA-polymeráza, se liší v tomto: *DNA-primáza katalyzuje při replikaci syntézu krátkých fragmentů RNA v závislosti na primozomu, kdežto RNA-polymeráza katalyzuje při transkripci na matricovém DNA-řetězci syntézu dlouhých primárních transkriptů a váže se na promotor*. Jsou to primární transkripty:

- ◆ **1. Mediátorová ribonukleová kyselina (zkr. mRNA).** Tato kyselina nese přepis genetické informace obsažené ve strukturních genech a slouží jako matrice pro syntézu polypeptidového řetězce na ribozomu. U bakterií se tvoří jako primární transkript, který nepodléhá již posttranskripční úpravě sestřihem.
- ◆ **2. Prekurzorová ribozomová ribonukleová kyselina (zkr. pre-rRNA).** Je to primární transkript genů pro rRNA, který se *posttranskripčně upravuje na různé funkční typy ribozomové ribonukleové kyseliny RNA (zkr. rRNA)*.
- ◆ **3. Prekurzorová transferová ribonukleová kyselina (zkr. pre-tRNA).** Představuje primární transkript genů pro tRNA, který se *posttranskripčně upravuje na různé funkční typy transferové ribonukleové kyseliny (zkr. tRNA)*.

Podle primárních transkriptů rozlišujeme tyto transkripční jednotky:

- a) transkripční jednotky obsahující strukturní geny,
- b) transkripční jednotky obsahující geny pro rRNA,
- c) transkripční jednotky obsahující geny pro tRNA.

Na rozdíl od eukaryot *stejná bakteriální RNA-polymeráza katalyzuje transkripci ve všech uvedených typech transkripčních jednotek a syntézu všech uvedených typů primárních transkriptů*. Všechny typy transkripčních jednotek mají též principiálně stejnou strukturu. Sestávají z promotoru, za kterým následuje obvykle více genů a terminátor. *Primární transkript obsahuje většinou přepisy více genů*. Je tedy polygenní (často se též používá místo termínu "polygenní" termín "polycistronní").

Transkripce každé transkripční jednotky probíhá obecně ve třech fázích:

- ◆ **Iniciace transkripce**, tj. *sled dějů zahrnující navázání RNA-polymerázy na promotor a zahájení syntézy RNA-řetězce*.
- ◆ **Elongace RNA-řetězce**. Tato fáze je charakteristická *postupným připojováním nukleozid-5'-monofosfátů k 3'-konci RNA-řetězce při jeho polymerizaci na matricovém řetězci*.
- ◆ **Terminace transkripce**, tj. *zakočení transkripce transkripční jednotky zahrnující procesy zastavení elongace DNA-řetězce na terminátoru a jeho uvolnění z matricového řetězce*.

2.3.1

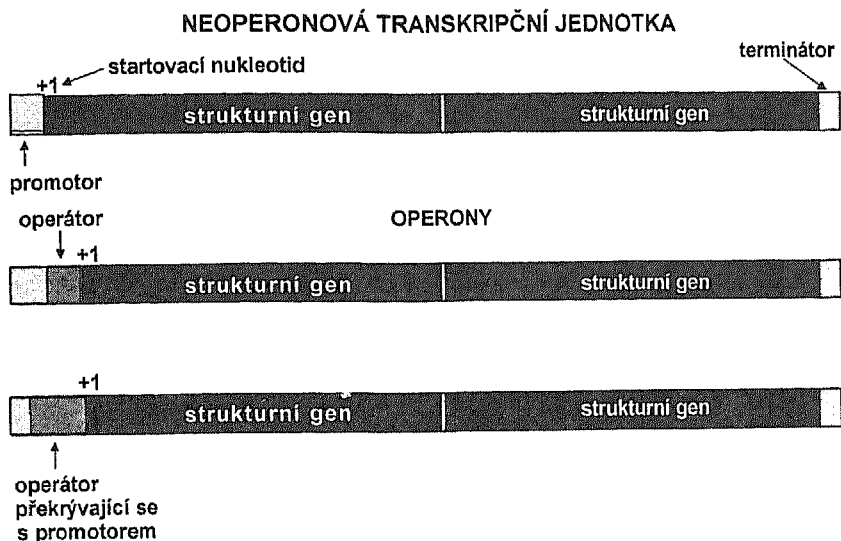
Transkripční jednotka bakteriálního genomu

NEOPERONOVÉ TRANSKRIPČNÍ JEDNOTKY A OPERONY. Transkripční jednotky bakteriálního genomu jsou dvojího typu (obr. 141):

- ◆ **operony**,
- ◆ **neoperonové transkripční jednotky**.

Základní funkční elementy obou těchto typů transkripčních jednotek jsou promotor, startovací nukleotid, přepisované geny a terminátor. Operony se liší od neoperonových transkripčních jednotek v tom, že se mezi jejich promotorem a startovacím nukleotidem nachází regulační oblast označovaná jako operátor. Transkripční jednotky obsahující operátor se označují jako operony. **Operon** je *tedy transkripční jednotka, která je řízena promotorem a operátorem*. **Operátor** je *regulační oblast na DNA, na kterou se váže protein, který se označuje jako represor*. *Po vazbě aktivního represoru na operátor se transkripce v transkripční jednotce zastaví*. Operátor jako regulační oblast v té funkci, že se na ni váže aktivní represor, se může též překrývat do větší nebo menší míry s promotorem. I v takovém případě po vazbě represoru na operátor bude docházet k zastavení transkripce.

Neoperonová transkripční jednotka je řízena jen promotorem.



Obr. 141
Základní schéma transkripčních jednotek bakteriálního genomu

BAKTERIÁLNÍ PROMOTOR. Bakteriální promotor obsahuje tyto hlavní sekvence (obr. 142):

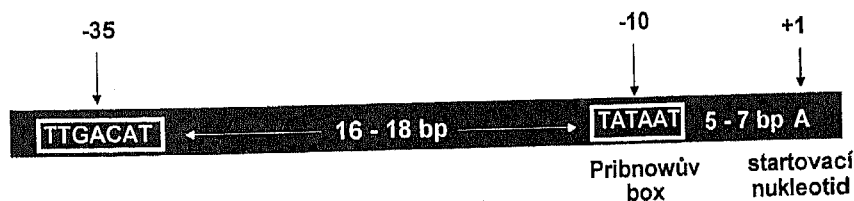
- ◆ 1. Sekvenci soustředěnou kolem nukleotidu -35, jejíž konvenční sestava je:

5' TTGACAT 3'.

Takové sekvence, které se obecně mezi srovnávanými nukleotidovými sekvencemi o stejné funkci vyskytují nejčastěji, budeme nazývat jako **sekvence konvenční**. Od konvenční sekvence se tedy sekvence promotorů jednotlivých druhů mohou lišit a nemusí být s nimi zcela homologické. Ale některé nukleotidy se ve všech sekvencích vyskytují stabilně.

- ◆ 2. Sekvenci, která se nachází kolem nukleotidu -10 a označuje se jako **Pribnowův box**, jehož konvenční sestava je:

5' TATAAT 3'.



Box je obvykle krátká nukleotidová sekvence o stejné funkci vyskytující se v různých obměnách na stejném místě v regulační oblasti.

Celkově lze říci, že promotory jednotlivých transkripčních jednotek bakteriálního chromozomu jsou si do jisté míry podobné, ale nejsou totožné. Jejich podobnost v nukleotidových sekvencích zajišťuje jejich afinitu k jediné RNA-polymeráze, zatímco rozdíly mezi nimi rozhodují o míře této afinity, tj. tzv. síle promotorů. Silný bakteriální promotor se vyznačuje vysokou frekvencí iniciace transkripce na rozdíl od slabého bakteriálního promotoru vyznačujícího se vzhledem k standardnímu promotoru nízkou frekvencí iniciace transkripce. Promotor je tím silnější, čím více se Pribnowův box a sekvence kolem nukleotidu -35 blíží konvenčním sekvencím. Proto také mutace, které oddalují sekvenci promotoru od jeho konvenční sekvence, snižují jeho sílu.

BAKTERIÁLNÍ RNA-POLYMERÁZA. Tato RNA-polymeráza rozeznává promotory všech transkripčních jednotek. Ve formě úplného enzymu (holoenzymu) sestává bakteriální RNA-polymeráza z těchto podjednotek:

2 α o molekulové hmotnosti 40 000 každá;

1 β o molekulové hmotnosti 155 000;

1 β' o molekulové hmotnosti 160 000;

1 σ o molekulové hmotnosti 85 000.

RNA-polymerázu o této struktuře má většina bakterií. Jednotlivé podjednotky, které jsme uvedli, mají následující funkce:

- ◆ Podjednotky α udržují stabilitu skladby celé molekuly polymerázy.
- ◆ Podjednotka β podmiňuje vazbu ribonukleotidů na polymerázu.
- ◆ Podjednotka β' podmiňuje spojení RNA-polymerázy s matricovým DNA-řetězcem, tedy s negativním.
- ◆ Podjednotka σ označovaná též jako faktor σ (sigma-faktor) podmiňuje vazbu RNA-polymerázy k promotoru. Nevyznačuje se katalytickou funkcí, ale zajišťuje, aby se RNA-polymeráza vázala jen na promotor a na žádnou jinou sekvenci. Bez tohoto faktoru sice RNA-polymeráza katalyzuje syntézu RNA na matricovém DNA-řetězci, ale nezačíná ji na specifickém místě. Teprve za přítomnosti σ -faktoru začíná syntéza RNA od promotoru. Lze tedy σ -faktor definovat jako podjednotku RNA-polymerázy podmiňující její specifickou vazbu na promotor.

TYPY BAKTERIÁLNÍCH TERMINÁTORŮ TRANSKRIPCE. Terminátory transkripce jsou u bakterií dvojího typu:

◆ **1. Terminátory nezávislé na ró-faktoru**, tj. terminátory, na kterých končí transkripce bez účasti ró-faktoru.

◆ **2. Terminátory na ró-faktoru závislé**, tj. terminátory, na nichž transkripce může skončit jen za přítomnosti ró-faktoru.

Ró-faktor je protein, který na terminátorech na něm závislých katalyzuje uvolnění dokončeného RNA-řetězce z matricového (negativního) DNA-řetězce a zakončuje tak transkripci.

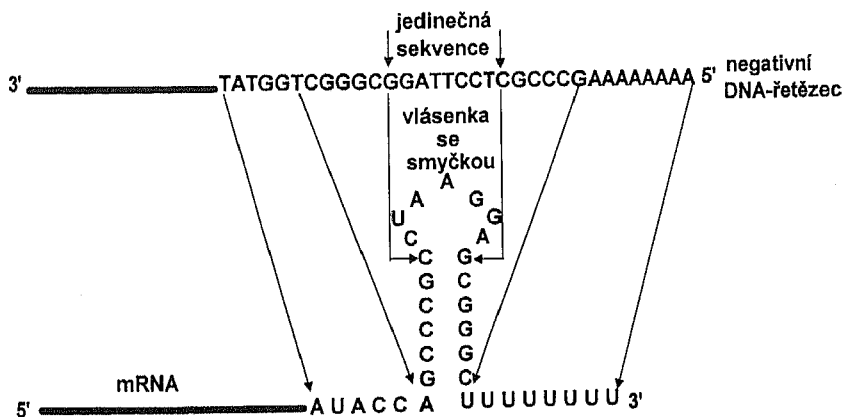
Dříve než začneme s popisem struktury těchto terminátorů, je nutno si uvědomit, že *terminátor se celý přepíše do RNA, která se pak z něho uvolní* (popíšeme tento děj o něco dále). Nyní si všimněme jen strukturních vlastností terminátorů na ró-faktoru nezávislých (obr. 143):

1. Před místem, na kterém se uvolňuje RNA-řetězec z DNA, je sekvence, která má komplementární protějšek na stejném DNA-řetězci. Obě navzájem komplementární sekvence jsou přerušeny jinou sekvencí označenou jako jedinečná sekvence.

2. Konec terminátoru na negativním řetězci, na kterém se uvolňuje RNA, je tvořen osmi A, které se přepisují do RNA na odpovídající počet U.

Transkripční celého terminátoru se vytvoří RNA vyznačující se vlásenkovou strukturou vlivem komplementárních sekvencí a smyčkou ve vlásence vzniklou vlivem jedinečné sekvence, a koncem z osmi U.

Terminátory na ró-faktoru závislé mají podobnou strukturu. Základní rozdíl mezi oběma typy terminátorů však spočívá v tom, že terminátory závislé na ró-faktoru nekončí sekvencí AAAAAAAAA přepisovanou v mRNA do UUUUUUUU, ale jinou sekvencí, např. GTTAGAA přepisovanou v mRNA do CAAUCUU.



Obr. 143

Struktura terminátorů nezávislých na ró-faktoru a jejich přepis do mRNA

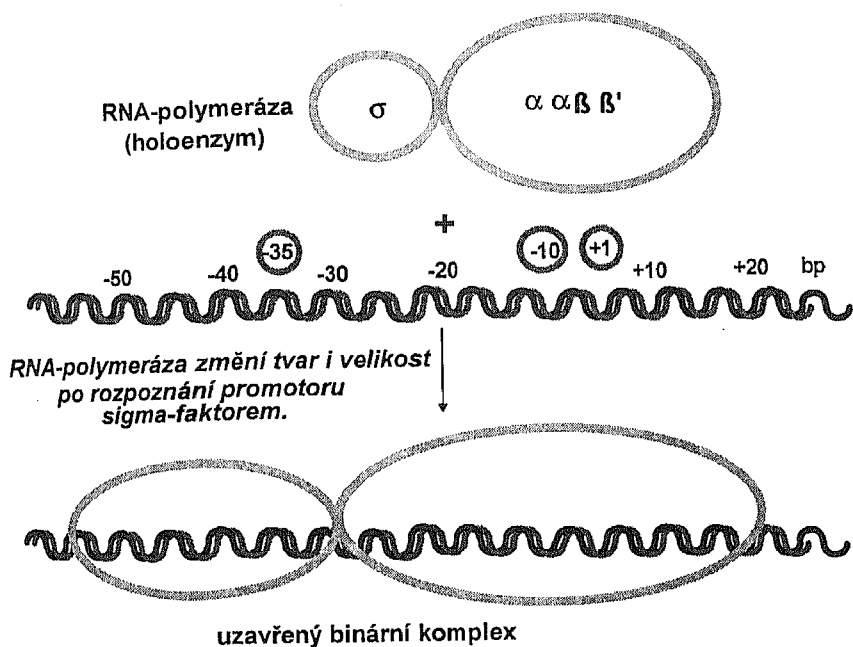
Význam sekvence UUUUUUUU spočívá v tom, že představuje signál pro uvolnění RNA-polymerázy a mRNA z negativního DNA-řetězce. Tato sekvence se nevyskytuje u terminátorů na ró-faktoru závislých a proto k uvolnění RNA-polymerázy a mRNA je na těchto terminátorech zapotřebí ró-faktoru.

2.3.2

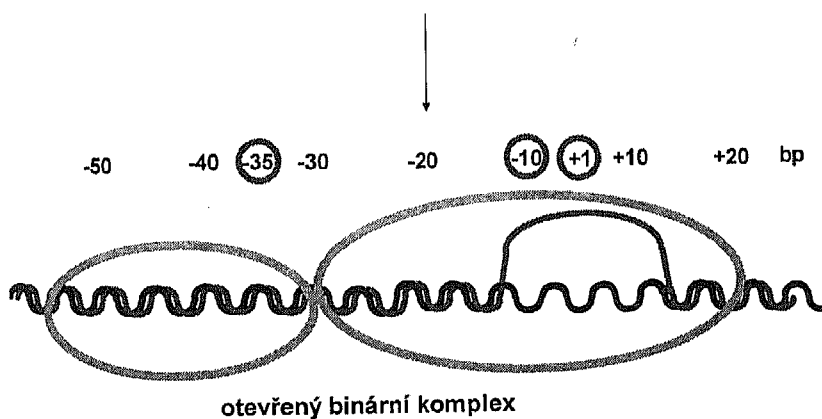
Průběh transkripce bakteriálního genomu

INICIACE TRANSKRIPCE. Sled dějů, které jsou zahrnuty do iniciace transkripce, lze povšechně popsat takto (obr. 144a, b, c, d):

- ◆ 1. Nejdříve se RNA-polymeráza prostřednictvím sigma-faktoru naváže na promotorovou sekvenci -35 a na Pribnowův box (obr. 144a). Tato vazba je velmi specifická, jelikož určuje, že RNA-polymeráza začne transkripci té transkripční jednotky, k jejímuž promotoru se navázala. Výsledkem tohoto procesu je tvorba tzv. **uzavřeného transkripčního binárního komplexu**, tj. *komplexu složeného z holoenzymu RNA-polymerázy a promotorové oblasti dsDNA, jejíž řetězce ještě nejsou rozvinuty*. RNA-polymeráza mění v tomto komplexu svou konformaci, což se projevuje ve změně jejího tvaru a délky. Celý enzym pokrývá úsek promotoru a transkripční jednotky v rozsahu -50 až +20 bp. Sigma-faktor se váže na sekvenci -35 a k Pribnowovu boxu prostřednictvím některých aminokyselin, které se nacházejí v části jeho molekuly, v níž se tvoří sekundární struktura typu α -helixu (obr. 145). Se kterým řetězcem má však RNA-polymeráza více kontaktů, s pozitivním nebo negativním nebo s oběma stejně? *Více kontaktů má s s pozitivním řetězcem*. To znamená, že se na tento řetězec i pevněji váže (obr. 146).
- ◆ 2. Zatímco funkce sekvence -35 je rozpoznávací (je rozpoznávána toliko sigma-faktorem), spočívá funkce Pribnowova boxu v tom, že *přeměňuje uzavřený binární komplex na otevřený*. V Pribnowově boxu se totiž uvolní vazby mezi pozitivním a negativním řetězcem a DNA se zde rozvine. Také však v otevřeném binárním komplexu zachovává RNA-polymeráza stejný tvar a velikost jako v komplexu uzavřeném a pokrývá též úsek DNA ve stejném rozsahu (obr. 144b).
- ◆ 3. RNA-polymeráza zůstává stále na stejném místě, ale od startovacího nukleotidu již začíná katalyzovat první reakci za tvorby fosfodiesterové vazby mezi dvěma ribonukleotidy. Přitom se ještě nemění její tvar a velikost. *Produktem reakce je dinukleotid, což je již začátek syntézy RNA*. S tímto dinukleotidem tvoří RNA-polymeráza tzv. **otevřený transkripční ternární komplex**, jehož složkami tedy jsou DNA, RNA-polymeráza a počáteční fragment RNA složený ze dvou ribonukleotidů (obr. 144c).



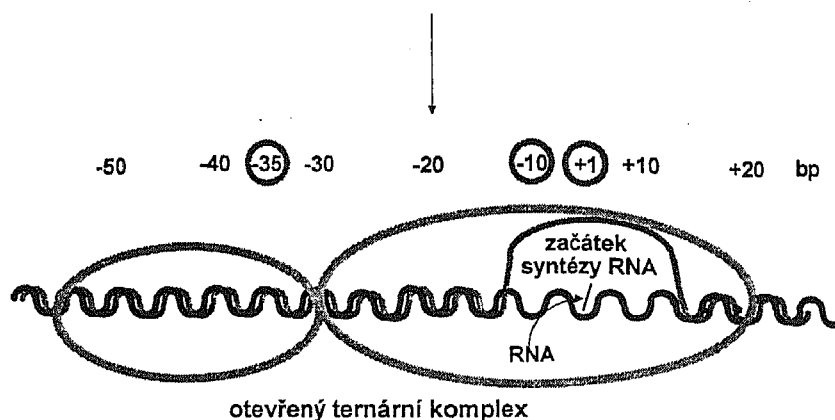
Obr. 144a
Iniciace transkripce



Obr. 144b
Iniciace transkripce

V otevřeném binárním komplexu je DNA rozvinuta v úseku 11 až 17 bp. Tato místní denaturace způsobí pnutí v oblasti mezi -35 a -10, k čemuž ještě přispívá ohýbání DNA kolem molekuly RNA-polymerázy.

ELONGACE RNA-ŘETĚZCE. Za startovacím nukleotidem pokračuje



Obr. 144c
Iniciace transkripce

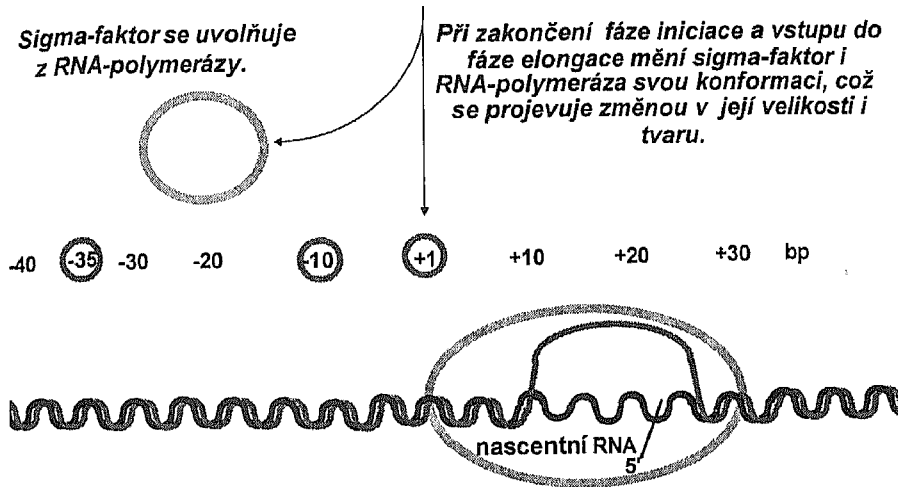
syntéza RNA a její prodlužování. Tuto polymeraci katalyzuje RNA-polymeráza bez sigma-faktoru, který se z ní uvolnil, jakmile se vytvořil počáteční fragment RNA (obr. 144d).

RNA-polymeráza se posunuje po DNA a přepisuje asi 40 nukleotidů za sekundu. Oblast, ve které je DNA v otevřeném ternárním komplexu rozvinuta do polynukleotidových řetězců, je dlouhá přibližně 18 bp. Hybrid RNA-DNA je dlouhý 2 až 3 bp (původně se předpokládalo 12 bp). Je tedy značně krátký a přechodný. Jako **hybrid RNA-DNA** se označuje *dvoušroubovice, která sestává z DNA-řetězce a RNA-řetězce a vzniká přechodně při transkripci*. Stabilněji se RNA váže až ke svému vazebnému místu na molekule RNA-polymerázy.

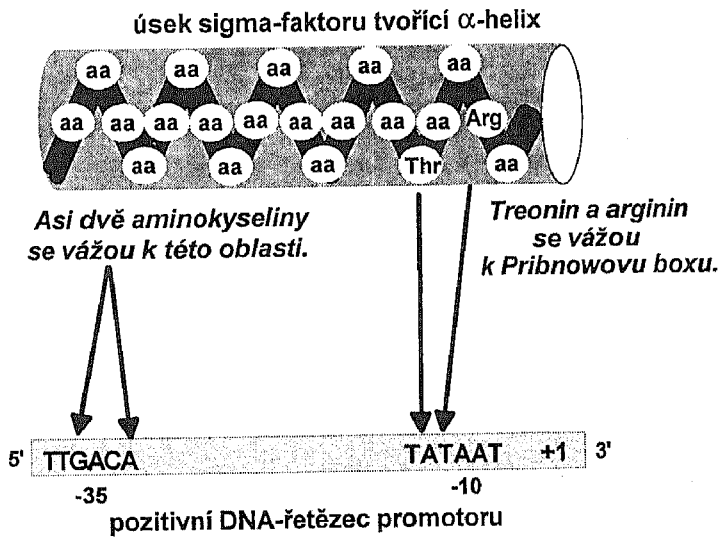
Při pohybu RNA-polymerázy během elongační fáze se v místě styku proximální části RNA-polymerázy s DNA dvoušroubovice DNA rozplétá a tam, kde se RNA-polymeráza stýká distální částí s DNA, se opět obnovuje dvoušroubovicová struktura DNA. *RNA-polymeráza se pohybuje ve směru od 3'-konce negativního DNA-řetězce k jeho 5'-konci. Syntéza RNA-probíhá ve směru 5'-3' a v tomto směru se RNA též prodlužuje*. Samozřejmě, že při svém posunu dopředu RNA-polymeráza mění topologický stav přepisované DNA. *Před místem odvinování zavádí do DNA kladné nadšroubovicové vinutí a za místem svinování DNA-řetězců nadšroubovicové vinutí záporné*. Celkový pohled na elongační fázi transkripce je uveden na obr. 147.

VÝMĚNY SIGMA-FAKTORU A NusA -PROTEINU PŘI TRANSKRIPCI

Jak bylo již několikrát uvedeno, RNA-polymeráza během transkripce prochází stavem, kdy je na ni vázán sigma-faktor. V tomto stavu se váže na promotor. Jakmile se z ní sigma-faktor uvolní, naváže se na ni protein NusA a s tímto proteinem dorazí až k terminátoru. Když se z terminátoru uvolní, je opět nahra-

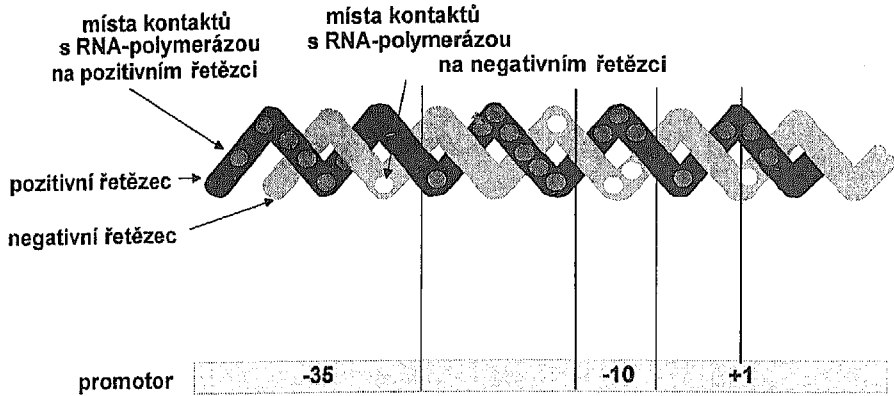


Obr. 144d
Iniciace transkripce



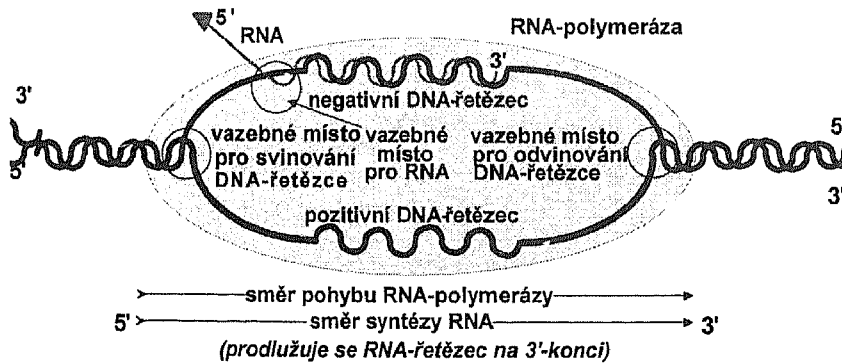
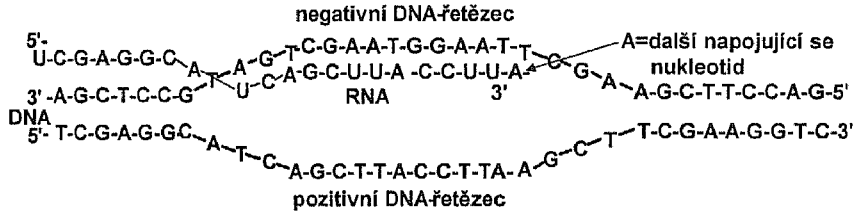
Obr. 145
Vazba sigma-faktoru na promotor

zen sigma-faktorem, kterým je pak zahájen další proces iniciace transkripce. *Sigma-faktorem je tedy navozena iniciace transkripce, kdežto NusA-proteinem její terminace.* Vzájemná výměna sigma-faktoru s proteinem NusA je schematicky znázorněna na obr. 148.



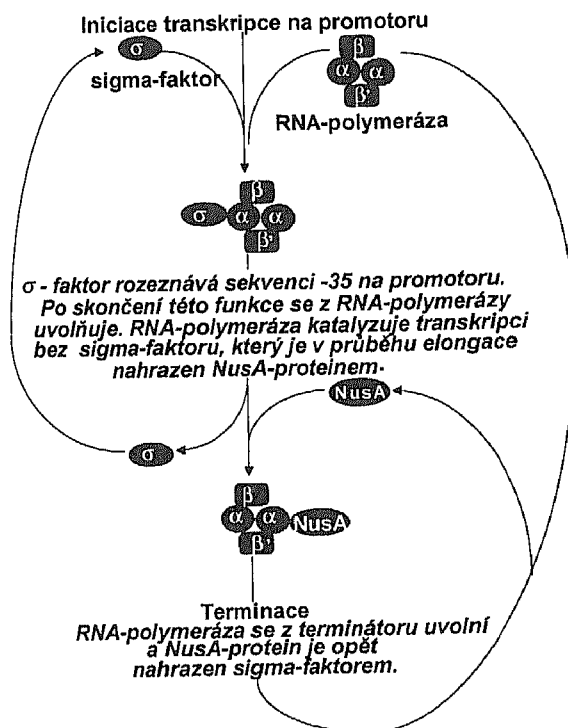
Obr. 146

Kontakty RNA-polymerázy s DNA a zvláště s úsekem, ve kterém se nachází promotor



Obr. 147

Celkový pohled na elongační fázi prokaryotické transkripce



Obr. 148
Vzájemné výměny sigma-faktoru a NusA-proteinu na RNA-polymeráze

TERMINACE TRANSKRIPCE NEZÁVISLÁ NA R ϕ -FAKTORU. Terminace transkripce, která se uskutečňuje na terminátorech, zahrnuje obecně tyto děje:

- ◆ zastavení pohybu RNA-polymerázy,
- ◆ uvolnění hotové RNA,
- ◆ uvolnění RNA-polymerázy z DNA.

Transkripční terminátor se v RNA vytvoří vlásenka, na kterou se pravděpodobně naváže po zastavení svého pohybu na výše uvedených sekvencích RNA-polymeráza, která stačí ještě uvedené sekvence přepsat do UUUUUUUU. Hybrid RNA-DNA není na těchto sekvencích stabilní a rozpadne se na volnou RNA a DNA. Z RNA-polymerázy se uvolní NusA-protein a je nahrazen sigma-faktorem.

TERMINACE TRANSKRIPCE ZÁVISLÁ NA R ϕ -FAKTORU. R ϕ -faktor je protein o molekulové hmotnosti 46 000. Je však aktivní ve formě hexameru. Váže se během transkripce na 5'-konec mRNA, pravděpodobně na některou

specifickou sekvencí a pohybuje se směrem k terminátoru transkripční jednotky. Mezitím se po negativním DNA-řetězci též posouvá RNA-polymeráza přepisující jej do mRNA. Jakmile dorazí k terminátoru, zastaví na krátký časový interval svůj pohyb. *Rychlost pohybu RNA-polymerázy po negativním DNA-řetězci a pohybu ró-faktoru musí být natolik zkoordinována, aby mohlo dojít ke kontaktu ró-faktoru s RNA-polymerázou na terminátoru, kde je ró-faktor rozpoznáván NusA-proteinem, který je, jak již víme, přechodnou součástí RNA-polymerázy. Ró - faktor katalyzuje po vazbě na tento protein odvíjení mRNA z DNA-řetězce a uvolnění RNA-polymerázy.* K tomu je zapotřebí ATP, který je hydrolyzován ró-faktorem vyznačujícím se aktivitou ATP-ázy.

2.3.3

Transkripce strukturních genů

STRUKTURNÍ ZVLÁŠTNOSTI TRANSKRIPČNÍ JEDNOTKY OBSAHUJÍCÍ STRUKTURNÍ GENY. Bakteriální transkripční jednotka obsahující strukturní geny se liší od ostatních transkripčních jednotek v tom, že *mezi promotorem a prvním strukturním genem za startovacím nukleotidem má tzv. vedoucí sekvenci.* U operonů se tato sekvence nachází hned za operátorem.

Biologický význam vedoucí sekvence spočívá v tom, že se v ní nachází tzv. **Shineova-Dalgarnova sekvence**, která se přepisuje z negativního DNA-řetězce do 5'-konce mRNA jako:

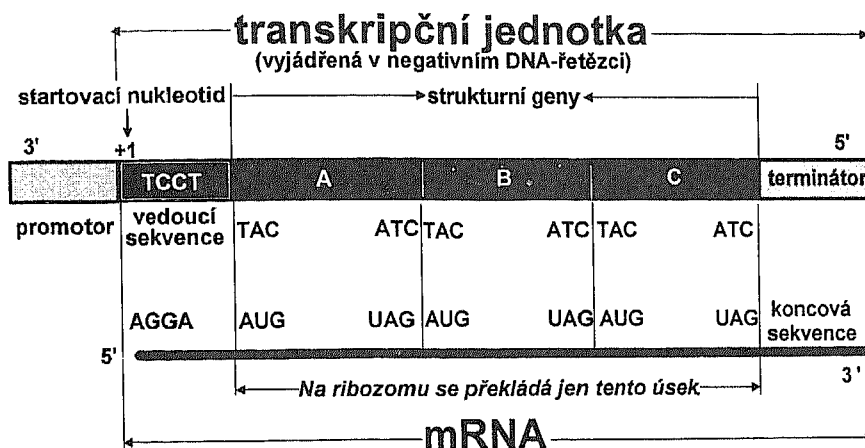
5' A G G A 3'.

Touto sekvencí se pak mRNA váže k sekvenci **3' U C C U 5'** nacházející se na 3'-konci 16 S-rRNA ribozomové podjednotky 30S.

BAKTERIÁLNÍ MEDIÁTOROVÁ RNA. *Transkripcí transkripční jednotky obsahující strukturní geny vzniká RNA označovaná jako mediátorová (zkr. mRNA).* U bakterií ji mediátorovou činí to, že obsahuje přepis Shineovy-Dalgarnovy sekvence, kterou se může vázat k ribozomům a na nich být překládána do primární struktury proteinů. *Primární transkripty vznikající přepisem transkripčních jednotek, které nemají Shineovu -Dalgarnovu sekvenci, se nemožnou vázat k ribozomům, a proto se nepřekládají. Působí jako rRNA nebo tRNA.*

Primárním transkriptem transkripční jednotky obsahující strukturní geny je tedy u bakterií mRNA vyznačující se ještě těmito strukturními vlastnostmi (obr. 149):

- ◆ 1. Obsahuje na 5'-konci přepis vedoucí sekvence, která se nepřekládá.
- ◆ 2. Za vedoucí sekvencí obsahuje přepisy strukturních genů, z nichž každý



Úseky obsazené geny A, B, C jsou mnohonásobně delší než ostatní.
Schéma upozorňuje jen na složení transkripční jednotky a mRNA.
Neupozorňuje na délku jednotlivých úseků.

Obr. 149

Schéma bakteriální mRNA a transkripční jednotky
obsahující strukturální geny

se překládá do primární struktury jedné molekuly polypeptidového řetězce. Každý strukturální gen je vymezen iniciačním a terminačním kodonem.

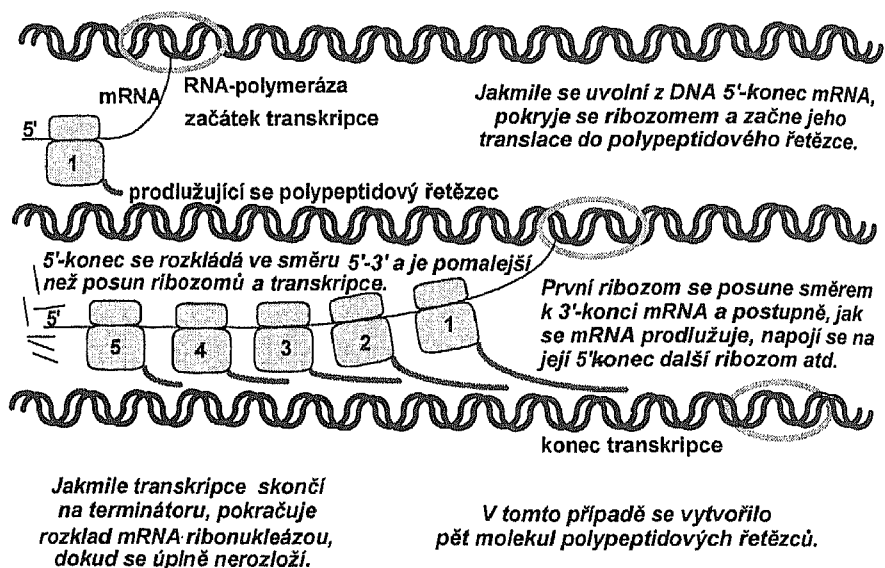
- ◆ 3. Na 3'-konci obsahuje přepis terminátoru končící osmi U. Tento přepis se označuje jako **koncová sekvence** a nepřekládá se.
- ◆ 4. Je multigenní (polycistronní). Obsahuje přepisy několika genů.

Bakteriální mRNA se posttranskripčně neupravuje. Slouží bezprostředně jako matrice pro tvorbu primární struktury polypeptidu.

Životnost molekul bakteriální mRNA je krátká; poločas života je u většiny bakteriálních mRNA jen několik minut. Velmi brzy poté, co se syntetizují, se rozkládají. Rozklad mRNA je tak rychlý, že z celkové RNA v kterémkoli čase jen 3% jsou molekuly mRNA. Rozklad se děje ve směru 5'-3' katalytickým účinkem ribonukleázy. Vůči rozkladu jsou chráněny jen části mRNA pokryté ribozomy.

SOUVISLOST TRANSKRIPCE DO mRNA S JEJÍ TRANSLACÍ. Transkripce je u prokaryot bezprostředně spřažena s translací. To znamená konkrétně, že současně s transkripcí mRNA probíhá translace téže molekuly mRNA a polypeptidový řetězec se tedy začne syntetizovat ještě před dokončením transkripce (obr. 150).

Při 37 °C se mRNA prodlouží o 40 nukleotidů za sekundu, což odpovídá prodloužení polypeptidového řetězce o 13 aminokyselin. U některých



Obr.150
Spřažení transkripce s translací

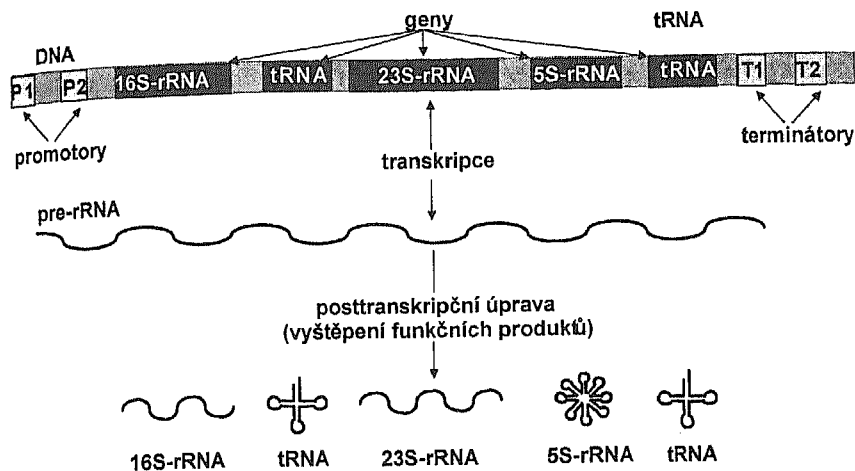
transkripčních jednotek připadá až 15 iniciací transkripce za minutu, takže se vytvoří 15 molekul mRNA, z nichž každá je pokryta 30 ribozomy. Na každé se tedy vytvoří 30 polypeptidových řetězců. Spřažení transkripce s translací u bakterií je tedy velmi efektivní proces syntézy proteinů. Několik ribozomů spojených jednou molekulou mRNA se označuje jako **polyribosom**.

2.3.4

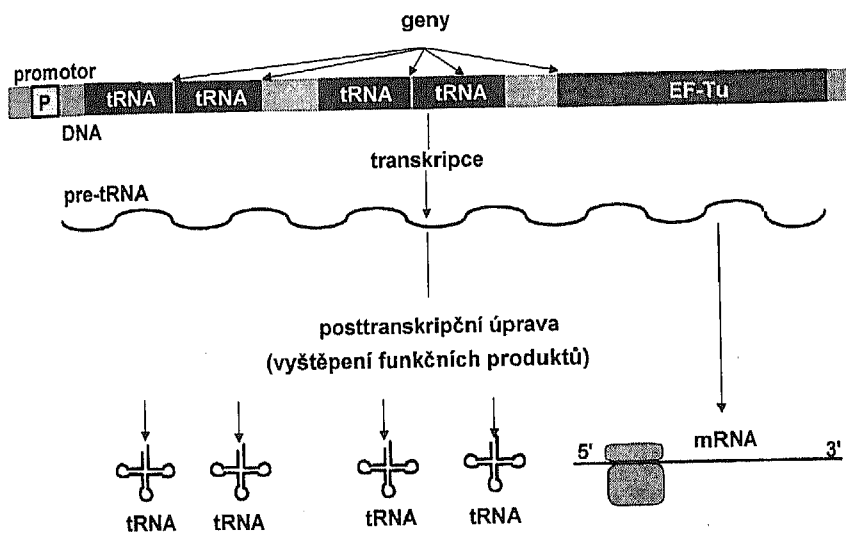
Bakteriální transkripce genů pro rRNA a tRNA

TRANSKRIPCE GENŮ PRO rRNA. Geny, které jsou prepisovány do příslušné rRNA u bakterií, se nacházejí na chromozomu v pěti až devíti kopiích. Tento počet genů pro rRNA se vyvinul zřejmě z toho důvodu, že rychle rostoucí buňky spotřebují značné množství rRNA. Na chromozomu jsou geny pro rRNA seřazeny do skupin; každá skupina genů pro rRNA se prepisuje jako transkripční jednotka. U *E. coli* K12 jsou geny v transkripční jednotce seřazeny, jak je uvedeno na obr. 151. Na chromozomu se nachází sedm takových transkripčních jednotek. Mezi některými geny jsou vmezeřeny geny pro tRNA. Každá transkripční jednotka má dva promotory P1 a P2 a dva terminátory T1 a T2. Promotor P1 je pravděpodobně hlavní.

Každá transkripční jednotka se nejdříve prepisuje do pre-rRNA, která má



Obr. 151
Transkripce transkripční jednotky pro rRNA



Obr. 152
Transkripce transkripční jednotky pro tRNA

sedimentační koeficient 30S (30S-pre-rRNA) a posttranskripčně se štěpí na sekvence odpovídající 5S-rRNA, 16S-rRNA a 23S-rRNA. Vyštěpení sekvencí představujících jednotlivé typy rRNA se uskutečňuje RNAázou III. Sekvence představující tRNA jsou vyštěpeny jinými enzymy. Každá sekvence odpovídající rRNA a tRNA vytváří sekundární strukturu vlivem intramolekulárního párování bází (obr. 151).

TRANSKRIPCE GENŮ PRO tRNA. U *E. coli* byly zjištěny dvě multi-genní transkripční jednotky obsahující geny pro tRNA. Pro obě je charakteristické, že obsahují jen jeden promotor, a že poslední gen je strukturní, např. gen pro elongační faktor EF-Tu. Celá transkripční jednotka se přepíše do pre-tRNA, která vytváří v místech přepisu jednotlivých genů sekundární strukturu charakteristickou pro tRNA. Úsek odpovídající přepisu genu kódujícího EF-Tu má funkci mRNA, neboť obsahuje na 5'-konci Shineovu-Dalgarnovu sekvenci, kterou se připojuje k ribozomu (obr. 152).

2.4 TRANSLACE BAKTERIÁLNÍ mRNA (Bakteriální translace)

Nezbytnou podmínkou exprese strukturních genů je translace mRNA, která u bakterií je primárním transkriptem těchto genů. Výchozími látkami pro translaci je 20 standardních aminokyselin + selenocystein, jimiž je cytoplazma zásobena. Na ribozomech se z nich tvoří za účasti tRNA polypeptidové řetězce podle informace obsažené v mRNA. K translaci musí být však aminokyseliny chemicky aktivovány. To se děje procesem, který se označuje jako **aktivace aminokyselin**. Tento proces je katalyzován **aminoacyl-tRNA-syntetázami** a jeho výslednými produkty jsou **aminoacyl-tRNA (aa~tRNA)**, tj. tRNA, na které je chemicky aktivní aminokyselina vázána ve formě svého aminoacylu. Proces jejich dopravy na ribozomy je řízen iniciačními a elongačními faktory. Dříve než přistoupíme k popisu průběhu vlastní translace, je nutno vyložit:

- ♦ strukturu tRNA,
- ♦ aktivaci aminokyselin,
- ♦ strukturu a složení prokaryotických ribozomů.

Podobně jako replikaci a transkripci, lze i proces **bakteriální translace** rozdělit do tří fází:

- ♦ **1. Iniciace translace**, tj. zahájení translace zahrnující sled dějů, jejichž výsledkem je iniciační komplex. **Iniciační komplex** sestává z ribozomu 70S, molekuly mRNA a iniciační tRNA. **Iniciační tRNA** se rozumí tRNA vstupující při translaci jako první do peptidylového místa na ribozomu a vázající se antikodonem na iniciační kodon mRNA. Proteiny, které se podílejí na řízení translace, se označují jako **iniciační faktory**.
- ♦ **2. Elongace polypeptidového řetězce**, tj. prodlužování polypeptidového řetězce polykondenzací aminokyselin na ribozomu podle informace v mRNA. Na řízení tohoto procesu se podílejí dva chemicky různé proteiny, které se nazývají **elongační faktory**.
- ♦ **3. Terminace translace**, tj. děje zahrnuté do procesu zakončení syntézy polypeptidového řetězce na ribozomu, které je signalizováno terminačním kodonem, a uvolnění polypeptidového řetězce jako konečného translačního produktu z ribozomu. Terminace translace je řízena proteiny, které se označují jako **terminační faktory**.

Translace je konečný proces přenosu genetické informace z genu do proteinu, v němž se tato informace realizuje ve formě překladu do primární struktury polypeptidového řetězce (proteinu).

2.4.1

Transferová RNA (tRNA)

PRIMÁRNÍ STRUKTURA tRNA. Každá tRNA obsahuje přibližně 74 až 95 nukleotidů a má molekulovou hmotnost kolem 80 000. Její 3'-konec sestává ze sekvence CCA. Na 5'-konci je obvykle zbytek guanylové kyseliny. Mezi nukleozidy, které tvoří primární strukturu tRNA, je několik s neobvyklými bázemi (obr. 153):

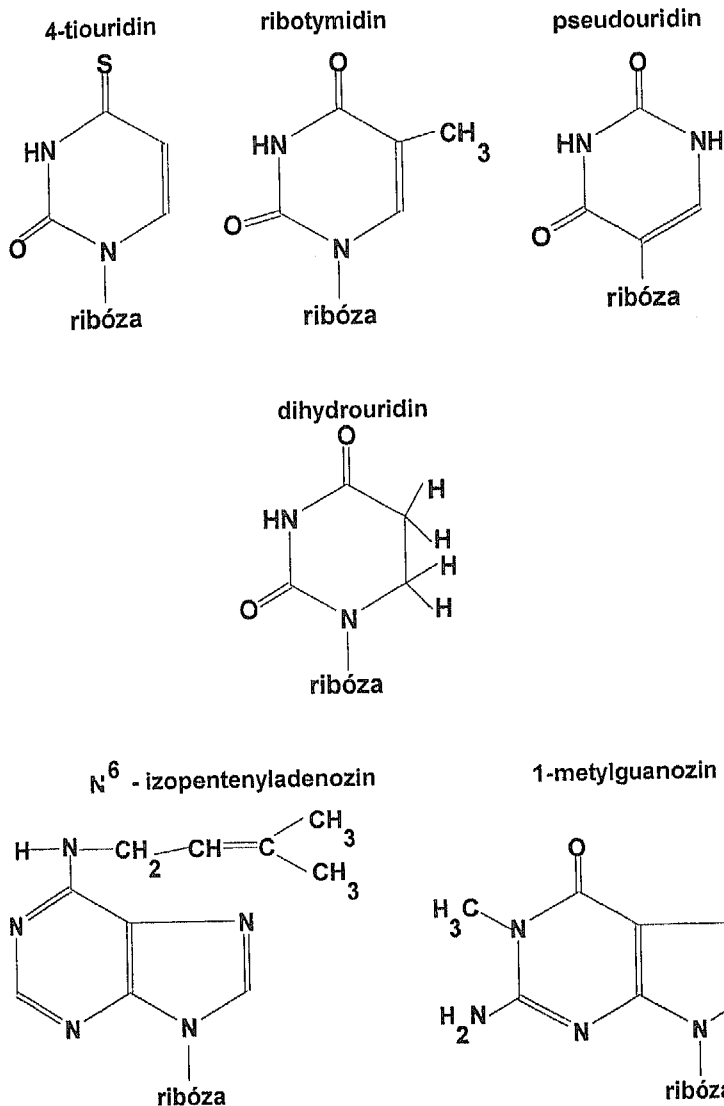
ψ	=	pseudouridin,
I	=	inozin,
i ⁶ A	=	N ⁶ -izopentenyladenozin,
T	=	ribotymidin,
S ⁴ U	=	4-tiouridin,
m ¹ G	=	1-metylguanozin,
DHU nebo D	=	dihydrouridin.

Tyto neobvyklé nukleozidy vznikají enzymovou modifikací již vytvořeného polynukleotidu. *Nezařazují se do něho při transkripci.* Vyskytují se ve všech molekulách tRNA a nejsou v nich rozděleny náhodně. Např. dihydrouridin se vyskytuje jen v D-rameni, pseudouridin v pseudouridinovém rameni atd. Jaká je funkce modifikovaných bází v tRNA? Je jisté, že mají pozitivní vliv na přesnost syntézy proteinů a v některých případech též na přesnost navázání aminokyseliny k tRNA. Některé ovlivňují párování bází (str. 134, 138).

Svou primární strukturou se jednotlivé druhy tRNA navzájem liší a označují se indexem podle aminokyseliny, jejíž přenos uskutečňují. Transferová RNA přenášející do ribozomů alanin se označuje jako tRNA^{Ala}, tRNA přenášející leucin se označuje jako tRNA^{Leu} atd. Jestliže je na tyto tRNA navázána aminokyselina ve formě aminoacylu, označují se jako Ala~tRNA^{Ala} atd.

Vzhledem k tomu, že genetický kód je degenerovaný, může existovat více tRNA pro jednu aminokyselinu. Proto buňka má více molekulárních druhů tRNA pro jednu aminokyselinu. *Ty molekulární druhy tRNA, které se liší navzájem antikodony a jsou acylovány stejnou aminokyselinou,* se označují jako **izoakceptorové tRNA.**

SEKUNDÁRNÍ STRUKTURA tRNA. Většina bází polynukleotidového řetězce, které tvoří primární strukturu tRNA, je komplementární, a proto se pá-



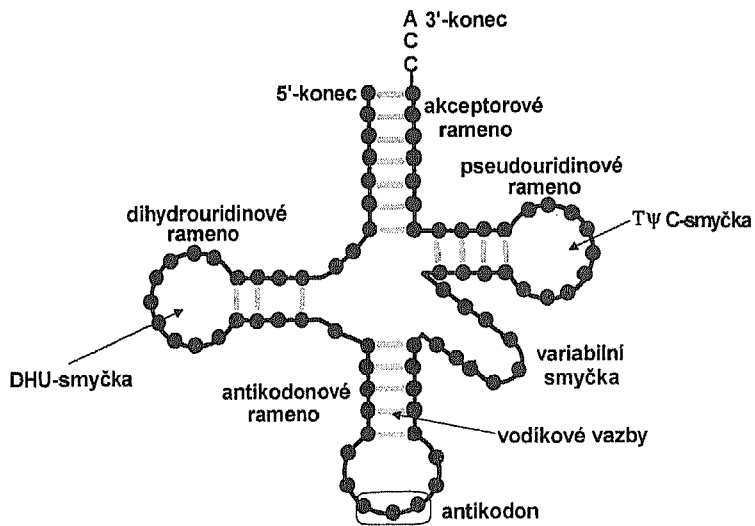
Báze ostatních neobvyklých nukleozidů vyskytujících se v tRNA jsou uvedeny na obr. 109.

Obr. 153

Neobvyklé nukleozidy vyskytující se v tRNA

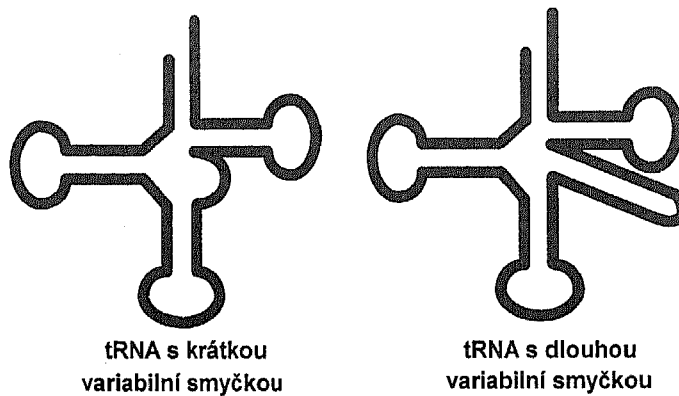
ruje, takže polynukleotidový řetězec se splétá do sekundární struktury tvaru jetelového lístku. V tomto tvaru sestává ze čtyř hlavních ramen (obr. 154):

♦ **Akceptorové rameno.** Toto rameno tvoří 5'-konec a 3'-konec tRNA. 3'-konec sestává ze sekvence: 3'A - C - C 5', na jejíž 2'-OH nebo 3'-OH skupinu adenzinu se váže aminokyselina.



Obr. 154
Schéma sekundární struktury tRNA

- ◆ Pseudouridinové (TψC) rameno se smyčkou. Toto rameno obsahuje triplet s pseudouridem.
- ◆ Dihydrouridinové rameno (rameno DHU neboli D-rameno) se smyčkou. Obsahuje dihydrouridin.
- ◆ Antikononové rameno se smyčkou. Rameno obsahující antikodon.

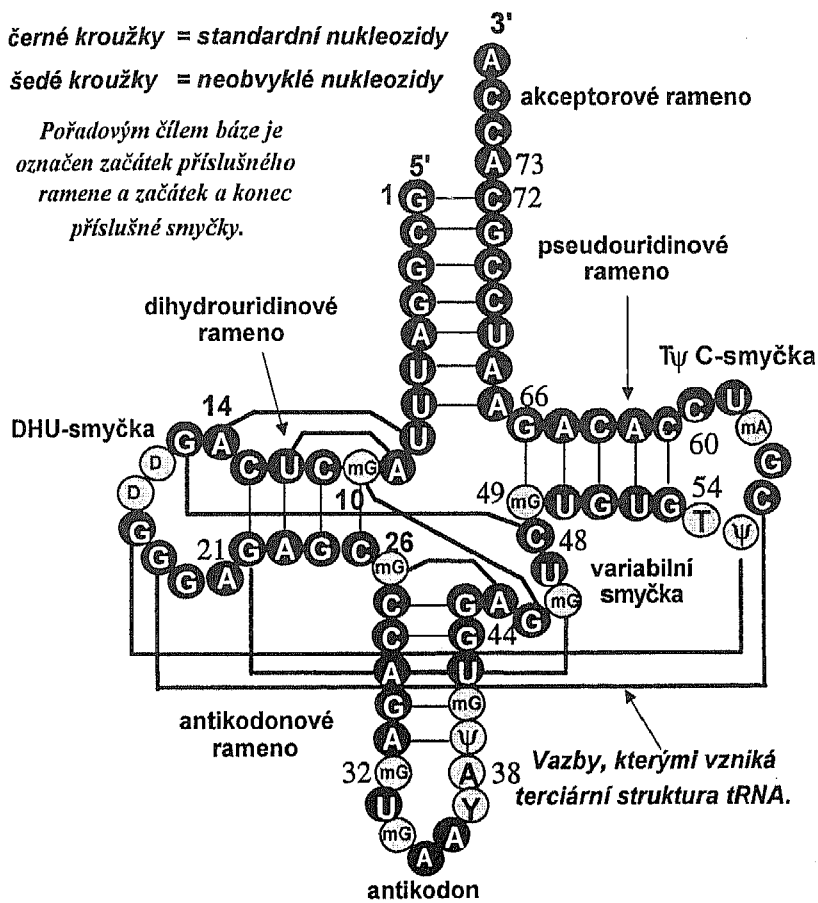


Obr. 155
Schéma tRNA patřících do různých tříd

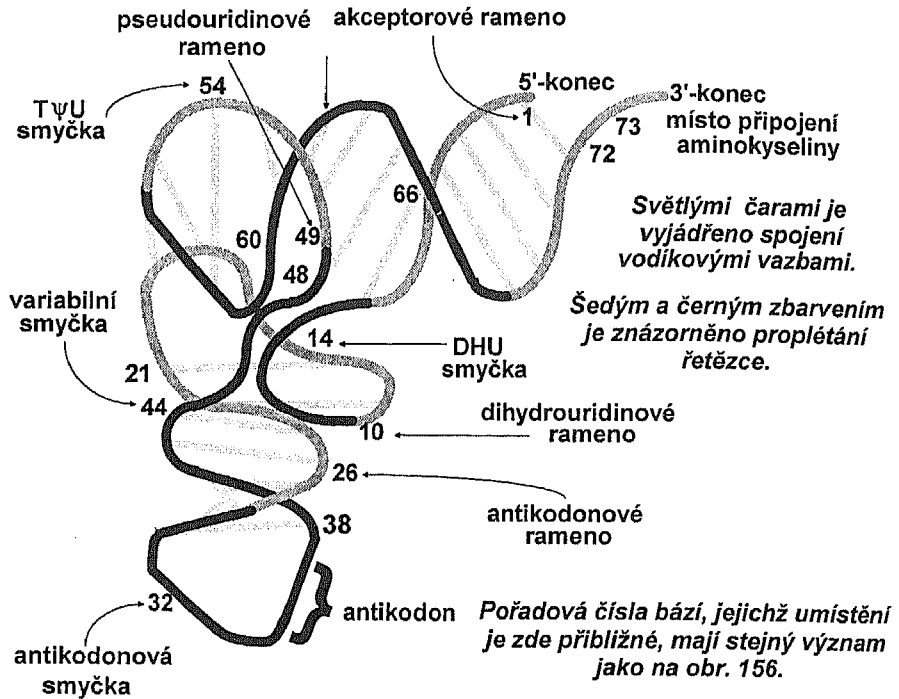
Kromě těchto hlavních ramen má tRNA ještě tzv. **variabilní smyčku**. Podle délky této smyčky se tRNA dělí do dvou tříd (obr. 155):

- ◆ tRNA první třídy, které mají krátkou variabilní smyčku o 3 až 5 nukleozidech;
- ◆ tRNA druhé třídy, které mají dlouhou variabilní smyčku o 13 až 21 nukleozidech; do této třídy patří 75 % tRNA.

TERCIÁRNÍ STRUKTURA tRNA. Tato struktura tRNA je podmíněna existencí **terciárních interakcí**, tj. *vodíkových vazeb bází DHU-smyčky s bázemi pseudouridinové a variabilní smyčky* (obr. 156). Vlivem těchto vazeb se



Obr. 156
Terciární interakce v tRNA^{Phe}



Obr. 157
Schéma terciární struktury tRNA

molekula tRNA sbalí do tvaru typického pro její terciární strukturu. Na obr. 157 můžeme vidět, které úseky terciární struktury tRNA odpovídají jednotlivým ramenům její sekundární struktury. *Své biologické funkce uskutečňuje tRNA teprve v terciární struktuře.* Ale pro jednoduchost znázornění ji v dalších schématech budeme vyjadřovat ve struktuře sekundární.

2.4.2

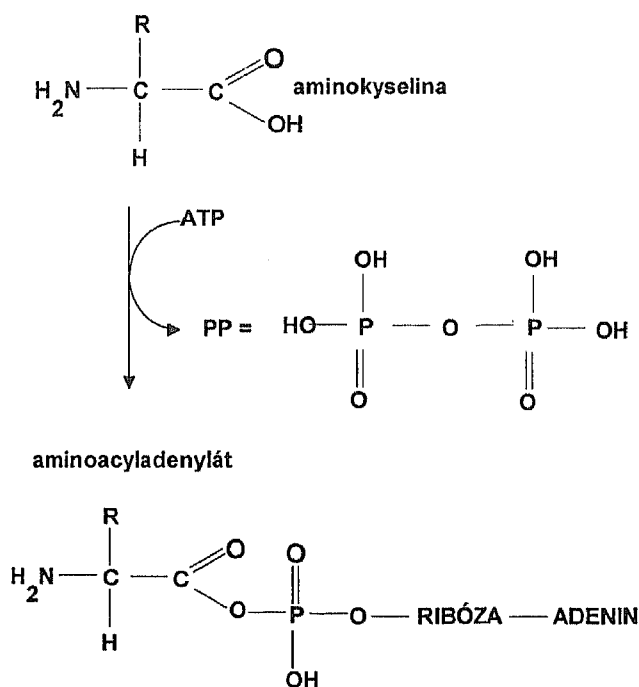
Aktivace aminokyselin

Aktivace aminokyselin (aminokyselinu označujeme obecně zkratkou aa) probíhá ve dvou krocích :

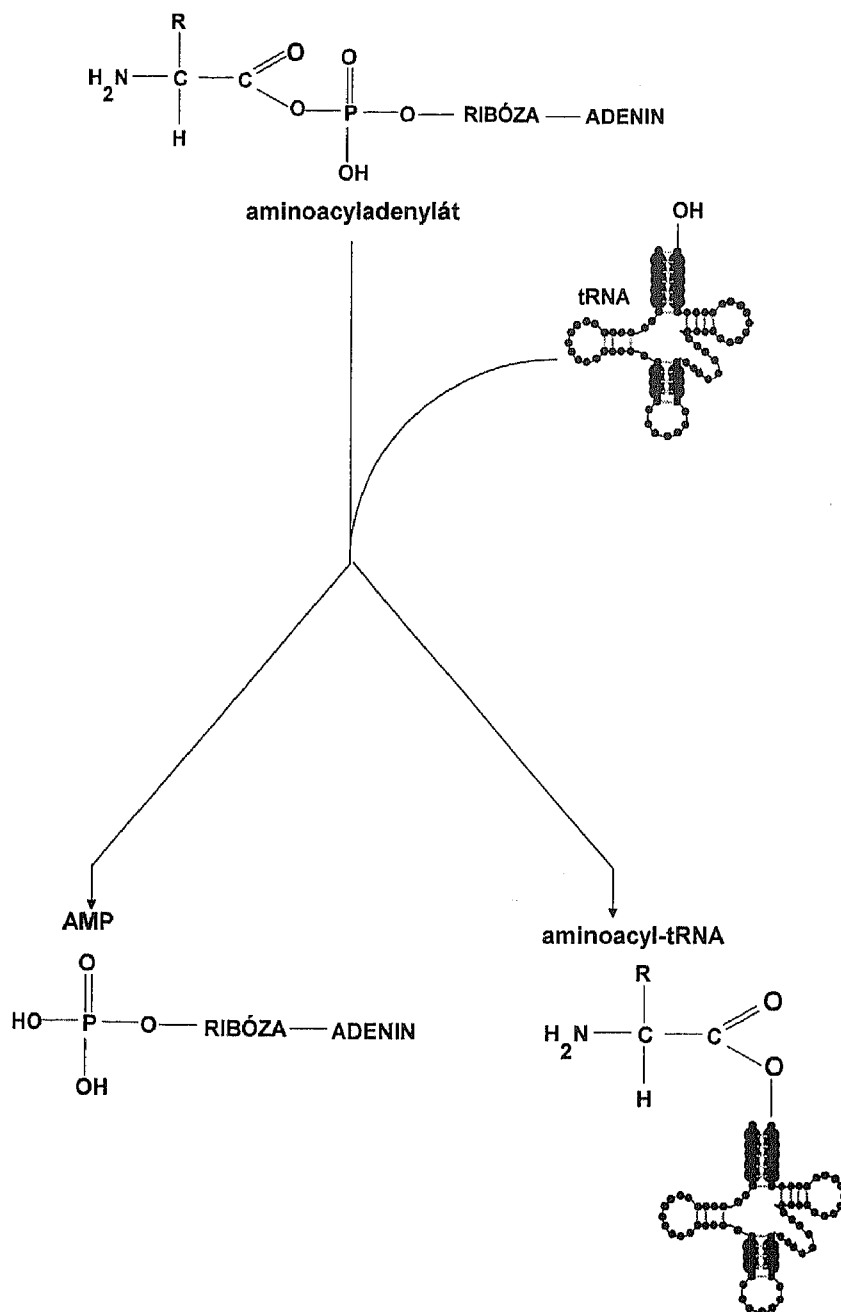


Reakce jsou katalyzovány stejnou molekulou aminoacyl-tRNA-syntetázy. **Aminoacyl-tRNA-syntetázy** neboli **aminoacyl-tRNA-ligázy (EC 6:1.1.)** jsou *enzymy, které katalyzují esterifikaci aminokyselin s příslušnými tRNA*. Výsledným produktem první reakce je **aa~AMP** neboli **aminoacyladenylát**. Je to přechodný produkt aktivace aminokyselin vzniklý reakcí karboxylové skupiny aminokyseliny a ATP za účasti aminoacyl-tRNA-syntetázy (obr. 158a). V aminoacyladenylátu je AMP navázán makroergickou vazbou na aminokyselinový zbytek. Aminoacyladenylát se váže na aminoacyl-tRNA-syntetázu, dokud se nesrazí s molekulou tRNA, která je pro tuto aminoacyl-tRNA-syntetázu specifická. V druhém kroku pak aminoacyl-tRNA-syntetáza přenesne aminokyselinu na koncový zbytek adenylové kyseliny tRNA a vytvoří se **aminoacyl-tRNA** neboli **aa~tRNA** (obr. 158b, 158c).

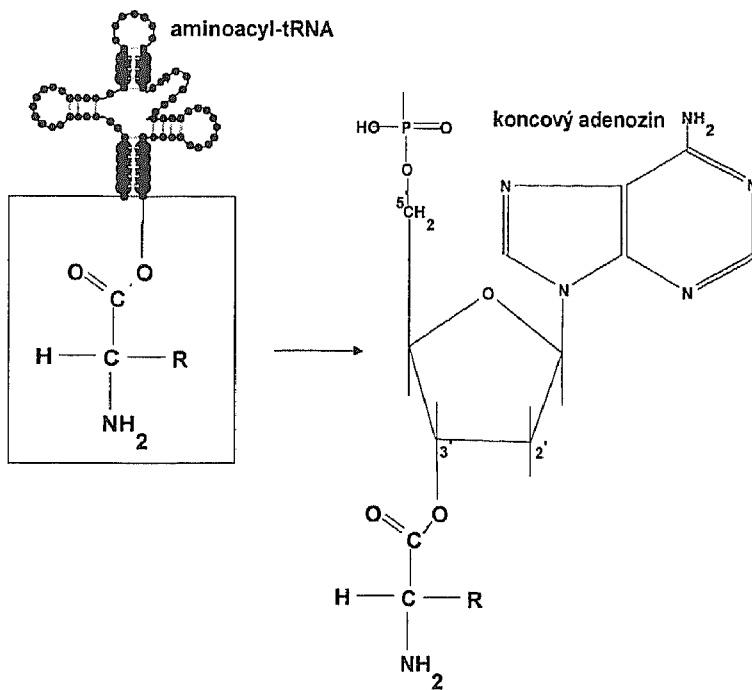
Aminoacyl-tRNA jsou tedy tRNA, na jejichž 3'OH-konec nebo 2'OH-konec je estericky vázána aminokyselina. Na 3'-konci tRNA jsou na ribóze dvě hydroxylové skupiny (2'OH a 3'OH), které mohou být esterifikovány aminokyselinou. Bylo zjištěno, že u některých tRNA se esterifikuje 2'OH, zatímco u jiných 3'OH. V každém případě se mezi aminokyselinou a tRNA vytvoří makroergická vazba. To je vlastně výsledek aktivace. Aktivovaná aminokyselina se pak přenáší pomocí tRNA do ribozomů, v nichž potom může reagovat tvorbou peptidové vazby s koncovou aminokyselinou polypeptidu.



Obr.158a
První krok aktivace aminokyselin



Obr. 158b
Druhý krok aktivace aminokyselin



Obr. 158c
Vazba aminoacylu na 3'-konec tRNA

2.4.3

Aminoacyl-tRNA-syntetázy

OBECNÁ CHARAKTERISTIKA AMINOACYL-tRNA-SYNTETÁZ. Tyto syntetázy představují rozmanitou skupinu proteinů. Jejich molekulová hmotnost je v rozmezí 40 000 až 100 000. Vyznačují se velmi nízkým stupněm homologie v primární struktuře a obsahují několik konzervativních sekvencí. Vznikly velmi brzy v evoluci a vyvíjely se v kontaktu s tRNA. Co do počtu a charakteru podjednotek mohou být:

- ◆ monomerní (sestávají buď z podjednotky α , nebo β), tj. α nebo β ;
- ◆ dimerní (sestávají buď ze dvou podjednotek α , nebo β), tj. α_2 nebo β_2 ;
- ◆ tetramerní (sestávají ze dvou podjednotek α a dvou podjednotek β nebo jen ze čtyř podjednotek α), tj. $\alpha_2\beta_2$ nebo α_4 .

Všechny aminoacyl-tRNA-syntetázy se navzájem v primární struktuře

podstatně liší. Přesto však pro tytéž aminoacyl-tRNA-syntetázy je značný úsek primární struktury konzervativní. Např. u glutamyl-tRNA-syntetázy bakterií je primární struktura v 70 % homologická s primární strukturou syntetázy savců. To svědčí o tom, že aminoacyl-tRNA-syntetázy patří mezi evolučně nejstarší enzymy a jejich vývoj je úzce spjat s vývojem genetického kódu.

Každá aminoacyl-tRNA-syntetáza je specifická jen pro jednu aminokyselinu. Existuje 20 specifických aminoacyl-tRNA-syntetáz, z nichž každá aktivuje jednu z dvaceti standardních aminokyselin (co se týče selenocysteinu a jeho tRNA, viz str. 227). Musí se proto specificky vázat jednak na příslušnou aminokyselinu a jednak na tRNA pro tuto aminokyselinu. Tato dvě vazebná místa musíme chápat v korelaci, např. vazebné místo pro alanin je v korelaci s vazebným místem pro tRNA^{Ala}, vazebné místo pro leucin je v korelaci s vazebným místem pro tRNA^{Leu} atd.

Zatímco tedy každá aminoacyl-tRNA-syntetáza si ze souboru dvaceti standardních aminokyselin vybere svou a jedinou aminokyselinu, není tomu tak, co se týče výběru tRNA. V jakém vztahu je pak příslušná aminoacyl-tRNA-syntetáza k molekulárním druhům tRNA přenášejícím stejnou aminokyselinu? Odpověď je, že na *tutéž aminoacyl-tRNA-syntetázu se mohou vázat tzv. příbuzné tRNA, tj. tRNA, které přenášejí stejnou aminokyselinu a jsou, co se týče primární struktury, značně homologické a mají i afinitu ke stejnému vazebnému místu na aminoacyl-tRNA-syntetáze. Proto příbuzné tRNA jsou rozeznávány stejnou aminoacyl-tRNA-syntetázou.*

VAZEBNÁ ROZPOZNÁVACÍ MÍSTA AMINOACYL-tRNA-SYNTETÁZ.

Na molekule aa-tRNA-syntetázy jsou tedy tři rozpoznávací vazebná místa:

- ◆ vazebné místo pro ATP,
- ◆ vazebné místo, které je specifické a rozpoznává jen jednu z dvaceti standardních aminokyselin,
- ◆ vazebné místo pro tRNA, rozeznávající příbuzné tRNA přenášející stejnou aminokyselinu.

Díky těmto vazebným místům může proběhnout aktivace aminokyselin. Naproti tomu každá tRNA má dvě specifická vazebná místa:

- ◆ rozpoznávací místo pro aminoacyl-tRNA-syntetázu,
- ◆ antikodon, kterým se váže ke kodonu.

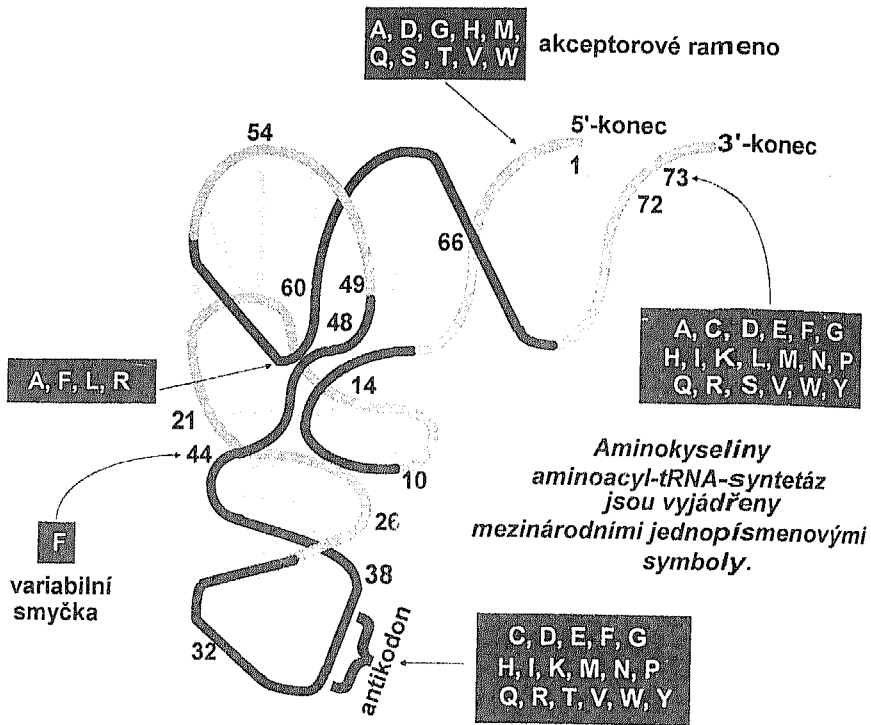
Rozpoznávací reakce mezi aminoacyl-tRNA-syntetázou a příbuznou tRNA je mimořádně přesná. Mutace měnící v tRNA jen jeden nukleotid způsobí, že daná tRNA nebude aminoacyl-tRNA-syntetázou rozeznávána. Tyto mutace se týkají především akceptorového a antikodonového ramene.

Tab. 8
Klasifikace aminoacyl-tRNA-syntetáz

První třída (acylace na C2')		Druhá třída (acylace na C3')	
Specificita pro aminokyselinu	Počet podjednotek	Specificita pro aminokyselinu	Počet podjednotek
Arg	monomerní	Ala	tetramerní
Cys	monomerní	Asn	dimerní
Gln	monomerní	Asp	dimerní
Glu	monomerní	Gly	tetramerní ($\alpha_2\beta_2$)
Ile	monomerní	His	dimerní
Leu	monomerní	Lys	dimerní
Met	dimerní	Phe	tetramerní ($\alpha_2\beta_2$)
Trp	dimerní	Pro	dimerní
Tyr	dimerní	Ser	dimerní
Val	monomerní	Thr	dimerní

HYPOTÉZA O EXISTENCI DRUHÉHO GENETICKÉHO KÓDU. Jakým způsobem však rozpozná aminoacyl-tRNA-syntetáza transferovou RNA nesoucí příslušnou aminokyselinu? Dochází k tomu jen na některých místech tRNA, především na akceptorovém a antikodonovém rameni (ukazuje se, že zvláště antikodon představuje důležitou oblast pro rozeznání příslušné aminoacyl-tRNA-syntetázy) a dále v místě 73. Mezi bázemi tRNA v těchto místech a určitými aminokyselinami v aminoacyl-tRNA-syntetáze dochází k vzájemnému rozpoznávání (tvorbou vodíkových vazeb). Zjišťuje se, že určité aminokyseliny příslušné aminoacyl-tRNA-syntetázy jsou určitými páry bází rozeznávány v akceptorovém rameni a v pozici 73 blízko 3'-konce tRNA (obr. 159). *Nukleotidy akceptorového ramene a v místě 73 rozeznávané aminokyselinami příslušné aminoacyl-tRNA-syntetázy* byly označeny jako **parakodony**. Povede to ke konstrukci druhého genetického kódu, přesněji řečeno epigenetického kódu?

KLASIFIKACE AMINOACYL-tRNA-SYNTETÁZ. Všechny aminoacyl-tRNA-syntetázy se klasifikují do dvou tříd, které se liší v některých konzervativních sekvencích. Dále se liší podle toho, zda acylují na akceptorovém místě 2'-OH nebo 3'-OH-skupinu koncového adenosinu tRNA (tab. 8). Mezi oběma třídami jsou však ještě další významné rozdíly. Je to především vazba tRNA na aminoacyl-tRNA - syntetázu a struktura vazebné domény pro ATP. Reprezen-

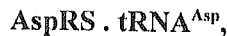


Obr. 159
Interakce aminoacyl-tRNA-syntetáz s tRNA

tantem aminoacyl-tRNA-syntetáz pro první třídu je ternární komplex:

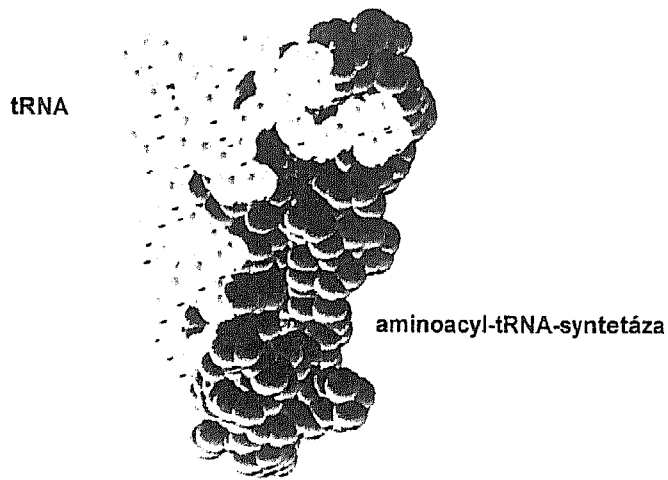


a pro druhou třídu binární komplex:

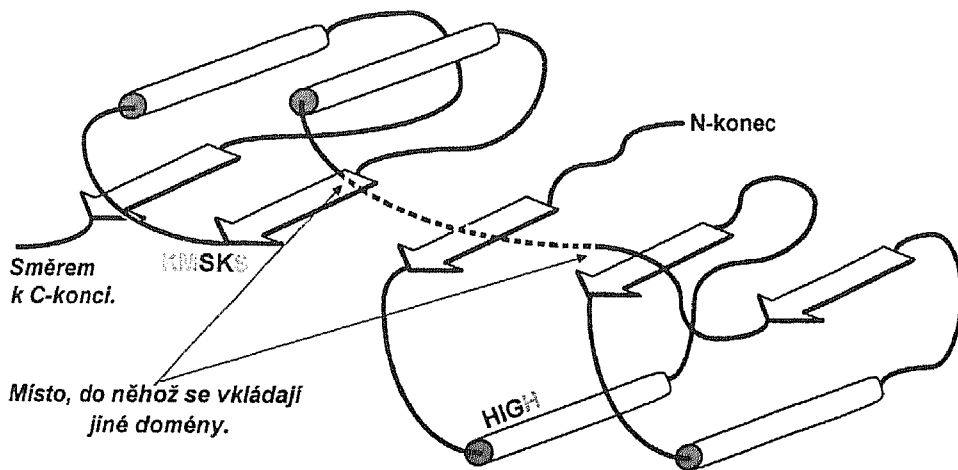


kde **GlnRS** je aminoacyl-tRNA-syntetáza pro glutamin, **AspRS** je aminoacyl-tRNA-syntetáza pro kyselinu asparagovou. Tyto komplexy se vytvoří vazbou aa-tRNA a ATP k aminoacyl-tRNA-syntetáze. GlnRS i AspRS mají doménu, na kterou se vážou všechny tři substráty (ATP, aminokyselina a adenosin akceptorového ramene). Liší se však ve struktuře této domény.

AMINOACYL-tRNA-SYNTETÁZY PRVNÍ TŘÍDY. Je-li Gln-tRNA^{Gln} situována proti GlnRS, pak GlnRS váže Gln-tRNA^{Gln} tak, že akceptorové rameno směřuje doprava, přičemž GlnRS rozeznává Gln-tRNA^{Gln} ze strany menšího žlábků akceptorového ramene a antikodonová smyčka se váže na protilehlý konec GlnRS (obr. 160).



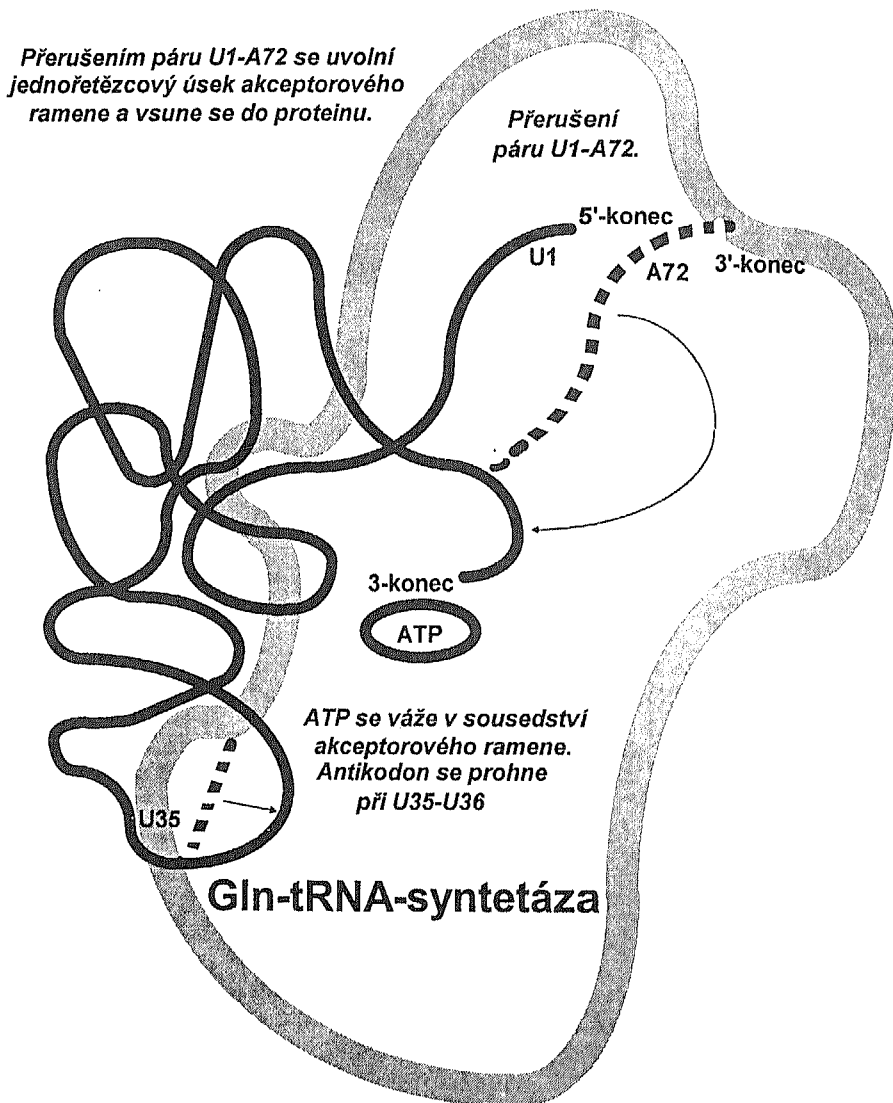
Obr. 160
Komplex GlnRs -RNA^{Gln} jako reprezentant
aminoacyl-tRNA-synthetáz 1. třídy



KMSKS
 HIGH } Aminokyselinové sekvenční motivy. Úplně konzervativní
 aminokyselinové zbytky jsou vysázeny polotučně. Ostatní
 aminokyselinové zbytky jsou konvenční.

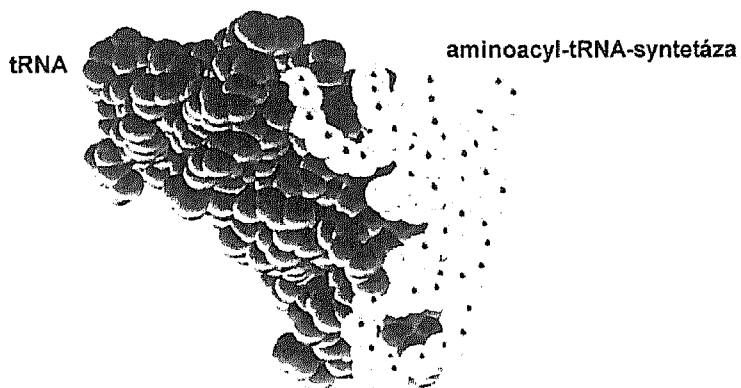
Obr. 161
Schéma sekundární struktury vazebné domény pro ATP
u aminoacyl-tRNA-synthetáz 1. třídy

Vazebná doména této třídy aminoacyl-tRNA-syntetáz se skládá z pěti paralelních β -skládaných listů. V ternárním komplexu GlnRS.tRNA^{Gln}. ATP se ATP váže k první polovině β -skládaného listu, glutamin a akceptorové rameno tRNA se vážou ke druhé. Aktivní místo domény je N-konec. Dále je tato vazebná doména charakteristická dvěma sekvenčními motivy (obr. 161):

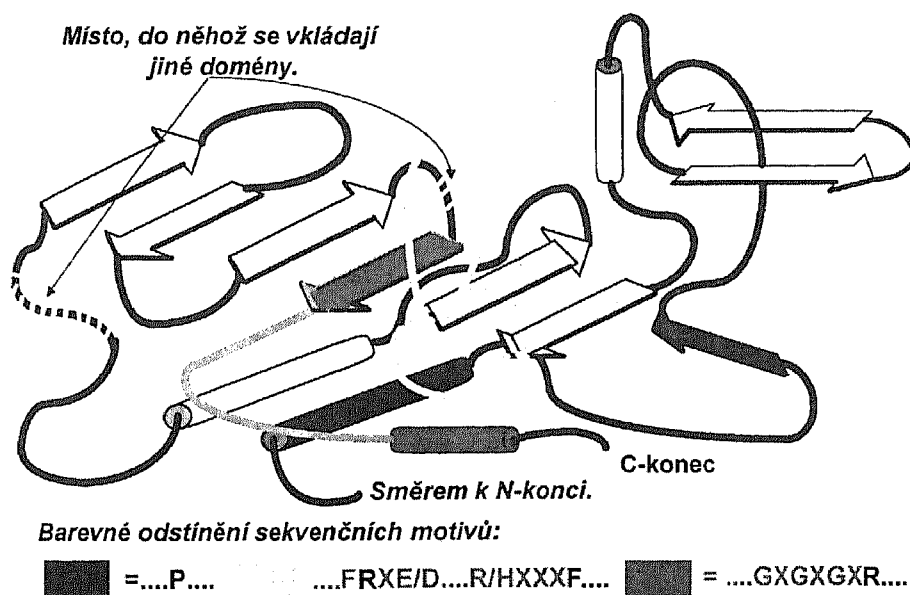


Obr. 162

Znázornění vazby tRNA na aminoacyl-tRNA-syntetázy 1. třídy



Obr. 163
Komplex AspRs -RNA^{Asp} jako reprezentant
aminoacyl-tRNA-syntetáz 2. třídy

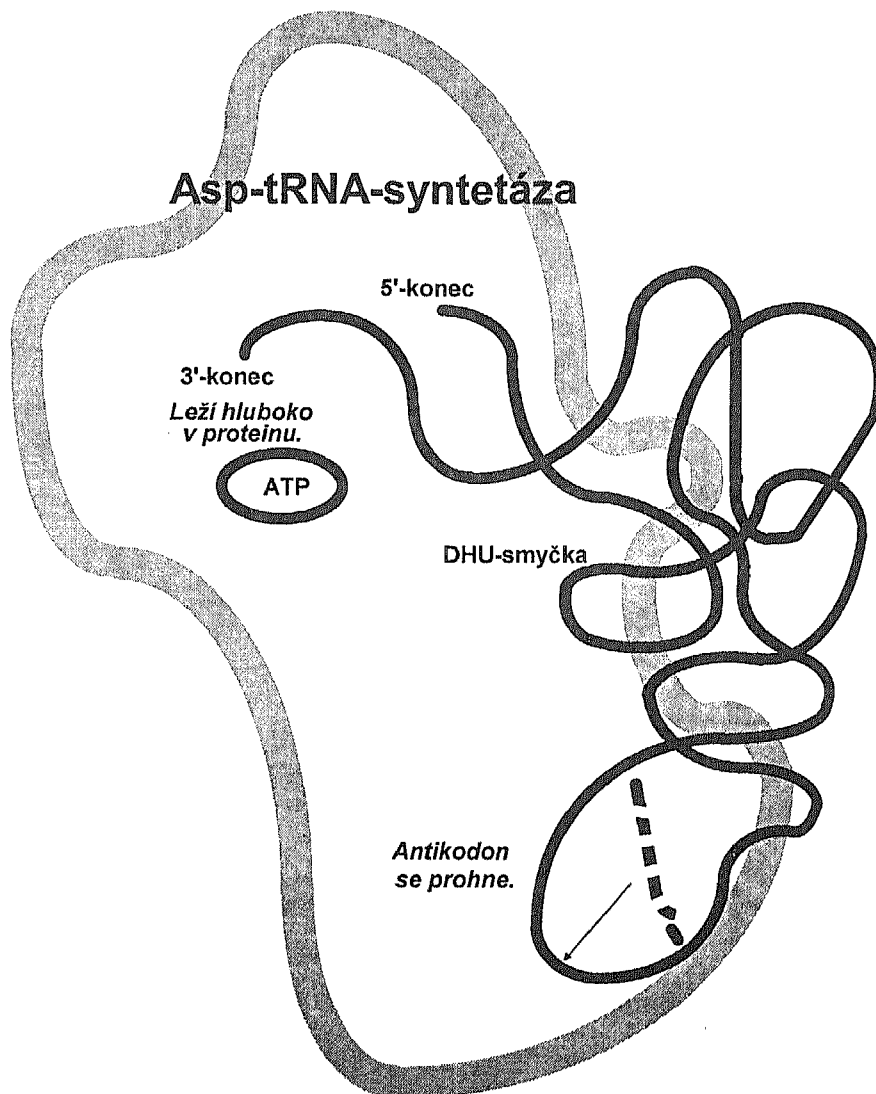


Obr. 164
Schéma sekundární struktury vazebné domény pro ATP
u aminoacyl-tRNA-syntetáz 2. třídy

- ◆ **KMSKS**, v níž je druhý lyzin potřebný k aktivaci aminokyseliny,
- ◆ **HIGH**, v níž oba histidiny napomáhají vazbě ATP.

Kontakty aminoacyl-tRNA-syntetázy 1. třídy s tRNA vedou však ve dvou směrech ke změně konformace tRNA (obr. 162):

- ◆ 1. Báze U35 a U36 jsou vytlačovány z tRNA do proteinu.



Obr. 165
Znázornění vazby tRNA na
aminoacyl-tRNA-syntetázy 2. třídy

- ◆ 2. Konec akceptorového ramene se značně prohýbá, což vede k tomu, že se naruší párování mezi U1 a A72. Jednořetězcový úsek ramene se pak vsune do hluboké kapsy aminoacyl-tRNA-syntetázového proteinu, v níž se také nachází vazebné místo pro ATP.

AMINOACYL-tRNA-SYNTETÁZY DRUHÉ TŘÍDY. Je-li Asp-tRNA^{Asp} situována proti AspRS, pak AspRS váže Asp-tRNA^{Asp} tak, že akceptorové rameno směřuje doleva. AspRS rozeznává Asp-tRNA^{Asp} ze strany většího žlábků akceptorového ramene (obr. 163). Vazebná doména, na kterou se váže ATP, aminokyselina a adenosin akceptorového ramene tRNA, sestává ze šesti anti-paralelních β -skládaných listů (obr. 164).

Aktivní místo domény je C-konec (obr. 164). Z obr. 165 je zřejmé, že aminoacyl-tRNA-syntetázy této třídy rozeznávají variabilní smyčku a větší žlábek akceptorového ramene, které zůstává ve své pravidelné helikální konformaci. ATP se pravděpodobně váže blízko koncového adenosinu. Na svém druhém konci se vazebné místo těsně váže s antikodonovou smyčkou, která prochází konformační změnou umožňující těsný kontakt antikodonu s aminoacyl-tRNA-syntetázou.

2.4.4

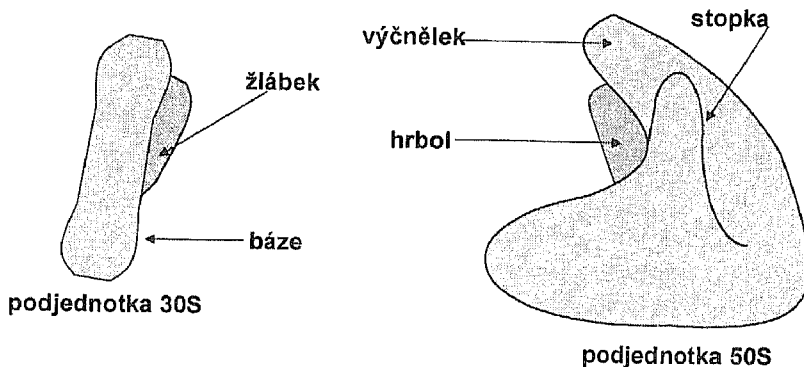
Prokaryotické ribozomy

SLOŽENÍ A MORFOLOGIE PROKARYOTICKÝCH RIBOZOMŮ. Prokaryotické ribozomy mají sedimentační koeficient 70S. Skládají se z těchto podjednotek: podjednotky 30S a podjednotky 50S.

Morfologie podjednotek je vyjádřena schematicky na obr. 166. Spojením obou podjednotek teprve vzniká ribozom, na kterém může probíhat syntéza polypeptidového řetězce. Na obr. 167 je uvedena současná představa morfologie ribozomu 70S a představa, kterým místem prochází mRNA (je to v podjednotce 30S). Co se týče výstupu polypeptidového řetězce z ribozomu, není jasné, kterými místy v ribozomu polypeptidový řetězec před výstupem prochází.

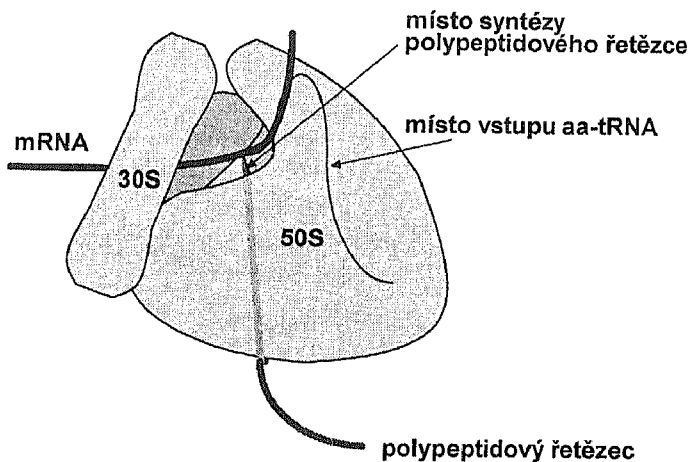
Na obr. 168 je schematicky vyjádřeno chemické složení ribozomu 70S.

VAZEBNÁ MÍSTA NA RIBOZOMU. Na ribozomu je několik vazebných míst, která se uplatňují při syntéze polypeptidového řetězce. Některá z nich, jejichž význam pro syntézu polypeptidového řetězce je zvláště důležitý, blíže popíšeme. Jsou to (obr. 169):

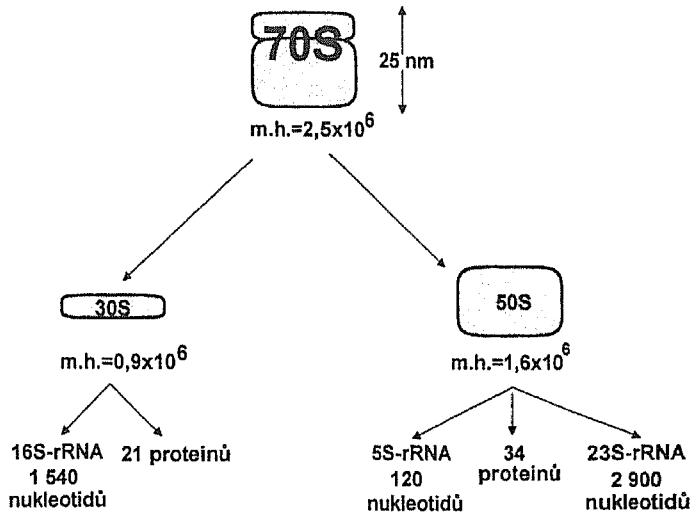


Obr. 166
Současná představa morfologie podjednotek ribozomu

- ◆ **Vazebné místo pro mRNA.** Je umístěno na podjednotce 30S a zahrnuje proteiny S6, S11, S15 a S18 a 3'-konec 16S-rRNA.
- ◆ **Aminoacylové místo neboli A-místo.** Jeho složkou je 16S-rRNA a proteiny L1, L5, L7, L12, L30 a L33 podjednotky 50S. Nachází se tedy z části na podjednotce 30S a z větší části na podjednotce 50S. *Do tohoto místa vstupují a vážou se na ně při translaci aa-tRNA.*
- ◆ **Peptidylové místo neboli P-místo.** Nachází se částečně na podjednotce 30S a z větší části na podjednotce 50S. Zahrnuje proteiny L7, L12, L14, L18,



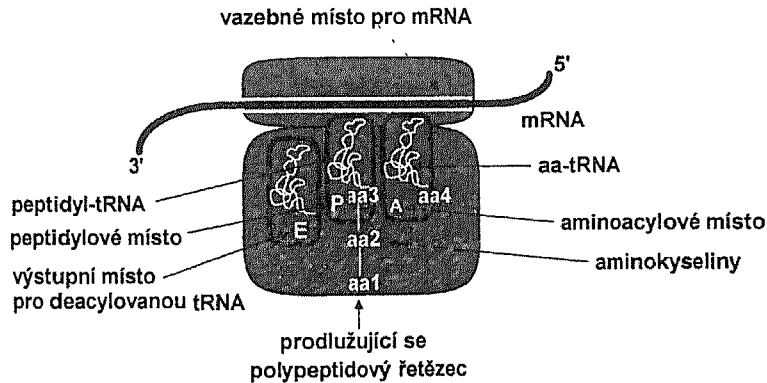
Obr. 167
Schéma ribozomu 70S



Obr. 168
Složení a skladba prokaryotického ribozomu

L24 a L33. Na toto místo se váže **peptidylová tRNA** (zkr. **peptidyl-tRNA**), tj. *tRNA*, k jejímuž 3'-konci je estericky vázán nascentní polypeptidový řetězec syntetizovaný tak, že se postupně prodlužuje o jednu aminokyselinu.

♦ **Výstupní místo pro deacylovanou tRNA neboli E-místo.** Transferová RNA, která již při translaci odevzdala svou aminokyselinu, o kterou se prodlou-



Obr. 169
Schematické znázornění vazebných míst
na prokaryotickém ribozomu

žil syntetizovaný polypeptidový řetězec, se váže na výstupní místo, které se nachází za peptidylovým místem.

◆ **Peptidyltransferázové místo.** Je to místo vyznačující se katalytickou aktivitou peptidyltransferázy katalyzující tvorbu peptidových vazeb. Složení a struktura tohoto místa však zatím nebyly identifikovány a definovány.

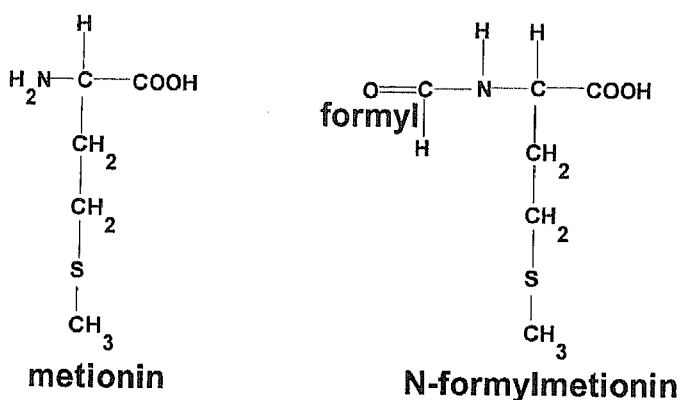
Dále jsou na ribozomu vazebná místa pro iniciační a elongační faktory.

2.4.5

Průběh translace v bakteriální buňce

INICIACE TRANSLACE. První aminokyselina, která se zařazuje do polypeptidového řetězce při jeho syntéze na ribozomu 70S, je **formylmetionin**, který se odvozuje z metioninu formylací jeho aminoskupiny (obr. 170). Tato *formylace je katalyzována transformylázou*. Po zařazení do polypeptidového řetězce se pak formylmetionin deformyluje za vzniku metioninu. *Deformylace je katalyzována deformylázou* a dochází k ní až po vytvoření polypeptidu obsahujícího 15 - 30 aminokyselinových zbytků. Proto asi 50 % různých polypeptidů vytvořených na ribozomu 70S má na začátku aminokyselinový zbytek metioninu. Ostatních 50 % polypeptidů má na začátku zbytek jiné aminokyseliny, a to té, která následuje bezprostředně za metioninem, což může být kterákoliv. Je tedy zřejmé, že *metionin se asi u 50 % polypeptidů odbourává procesem, který je katalyzován aminopeptidázou*.

K formylaci metioninu dochází až po připojení metioninu k tRNA. Existu-



Obr. 170
Metionin a N-formylmetionin

jí dva typy tRNA, které přenášejí metionin. Jsou to $tRNA^{Met}$ a $tRNA^{fMet}$. Obě mají stejný antikodon, kterým se vážou na kodon 5'-AUG-3'. V primární struktuře se však liší. Po vazbě metioninu na tyto RNA se vytvoří:

- ◆ **metionyl~tRNA^{Met} čili Met~tRNA^{Met},**
- ◆ **metionyl~tRNA^{fMet}, která je formylována na formylmetionyl~tRNA^{fMet} neboli fMet~tRNA^{fMet}.**

Jestliže se kodon AUG nachází na začátku přepisu strukturního genu, tedy jestliže působí jako iniciační, váže se na něj fMet~tRNA^{fMet}. Jestliže se vyskytuje kdekoli na jiném místě a nikoli na začátku přepisu strukturního genu, váže se na něj během elongační fáze translace Met~tRNA^{Met}. Na druhé straně zařazení fMet~tRNA^{fMet} na kodon AUG během iniciace translace řídí iniciační faktor IF2. Zařazení Met~tRNA^{Met} na kodon AUG řídí elongační faktor EF-Tu.

Celkově iniciaci bakteriální translace řídí tři iniciační faktory **IF1**, **IF2** a **IF3**. Iniciace translace probíhá za účinku těchto faktorů v následujících krocích (obr.171):

- ◆ 1. Nejdříve disociuje ribozom 70S na své podjednotky 30S a 50S. Na podjednotku 30S se váže iniciační faktor **IF3** a vytvoří s ní komplex

30S.IF3.

Vytvořením tohoto komplexu se zabrání opětovnému spojení obou ribozomových podjednotek.

- ◆ 2. Iniciační faktor **IF2** se specificky váže s fMet~tRNA^{fMet} a vytvoří s ní **binární translační komplex**

fMet~tRNA^{fMet}. IF2.

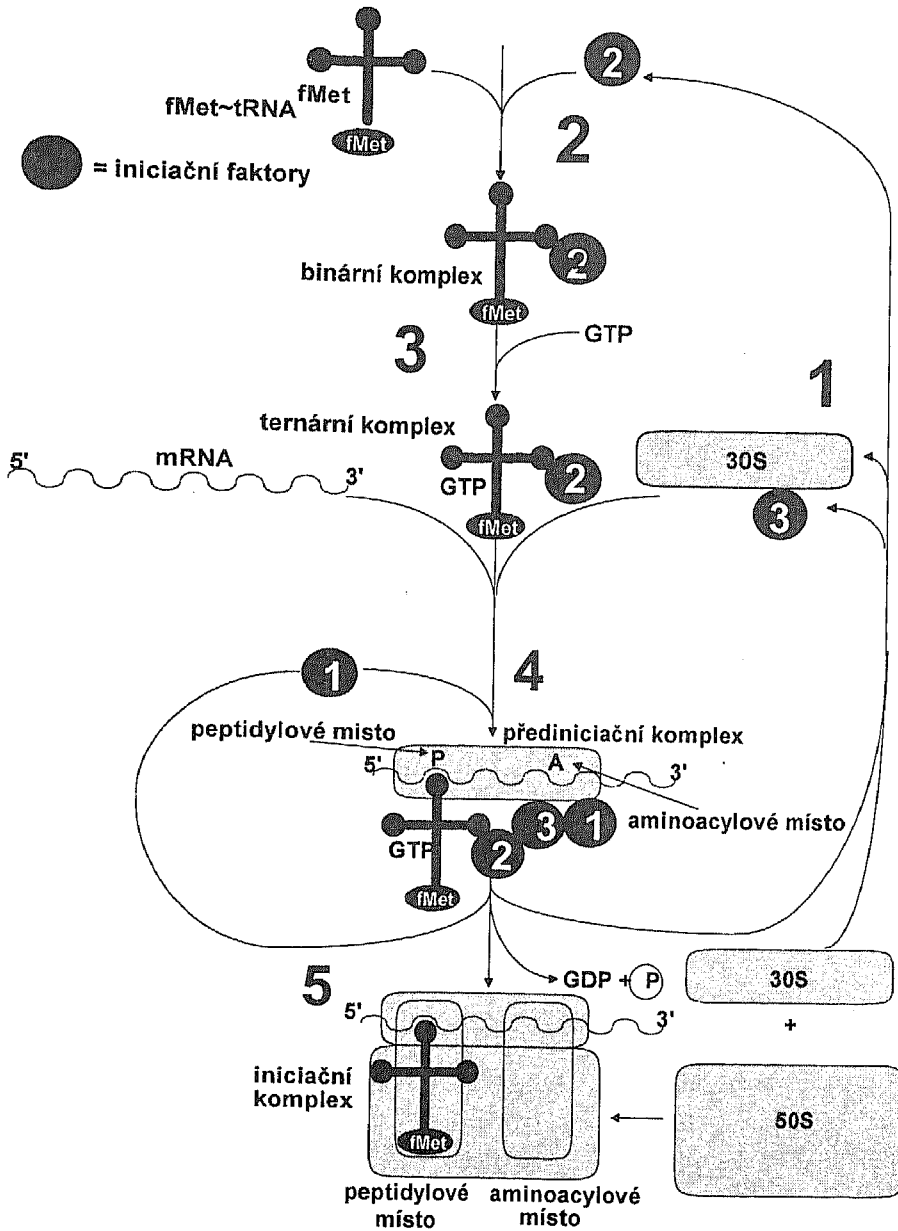
- ◆ 3. V binárním komplexu působí iniciační faktor IF2 jako G-protein a váže proto GTP. Tak se vytvoří **ternární translační komplex**

fMet~tRNA^{fMet}. IF2. GTP.

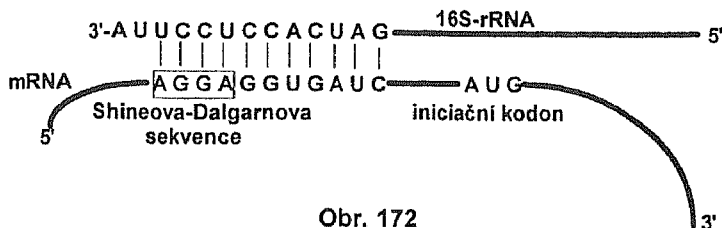
- ◆ 4. Nyní dochází k rozhodujícímu rozpoznávacímu procesu: Faktor IF3, který je součástí komplexu 30S.IF3, umožňuje, že se ternární komplex naváže na ribozomovou podjednotku 30S (kde je rozeznáván faktorem IF2) a mRNA se naváže pomocí Shineovy-Dalgarnovy sekvence na 3'-konec 16S-rRNA ribozomové podjednotky 30S (obr. 172). Shineova-Dalgarnova sekvence je v takové vzdálenosti od kodonu AUG, že se tento kodon může umístit nad peptidylové místo podjednotky 30S. S kodonem AUG se spáruje svým antikodonem fMet~tRNA^{fMet}. Takto se vytvoří **přediniciační komplex**:

mRNA. 30S.IF3.fMet~tRNA^{fMet}. IF2. GTP.IF1,

k němuž patří ještě iniciační faktor **IF1**. Úloha tohoto faktoru není jasná, ale má se za to, že zvyšuje afinitu podjednotky 30S k iniciačním faktorům a stabilizuje přediniciační komplex. Na podjednotku 30S se váže v průběhu tvorby předinici-



Obr. 171
Iniciace translace v bakteriální buňce



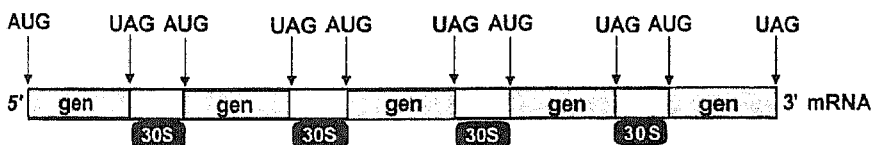
Obr. 172
Vazba mRNA na 16S-rRNA

ačního komplexu. Všimněme si, že $fMet-tRNA^{Met}$ je již v přediniciačním komplexu vázána na kodon AUG nad peptidylovým místem. V této souvislosti zdůrazňujeme, že její inkorporace do přediniciačního komplexu byla řízena interakcí mezi faktorem IF2 a IF3. Proto žádná jiná aa-tRNA se do tohoto komplexu nemůže začlenit.

◆ 5. Přediniciační komplex se destabilizuje uvolněním faktoru IF1 a GTPázovou aktivitou faktoru IF2, který působí jako G-protein a stane se inaktivní hydrolyzou GTP na GDP + P. Důsledkem těchto procesů je, že se uvolní všechny iniciační faktory a podjednotka 30S se pak opět může spojit s podjednotkou 50S. Toliko $fMet-tRNA^{Met}$ zůstává spojena s kodonem AUG v peptidylovém místě. Tento komplex ribozomu 70S, v němž je $fMet-tRNA^{Met}$ v peptidylovém místě umístěna, se označuje jako komplex iniciační. Jím přechází translace do fáze elongace polypeptidového řetězce.

Jelikož bakteriální mRNA je většinou polygenní, iniciace translace se opakuje před každým přepisem strukturního genu. Opakování iniciace je umožněno tím, že mezi prepisy genů se nacházejí mezigenové sekvence neboli mezerníky, které se nepřekládají, ale obsahují vazebná místa pro tvorbu přediniciačního komplexu, především Shineovu-Dalgarnovu sekvenci (obr. 173).

ELONGACE POLYPEPTIDOVÉHO ŘETĚZCE. V bakteriální buňce řídí elongaci elongační faktory EF-T a EF-G. EF-T se vyskytuje ve dvou formách:



Během odvíjení mRNA z DNA se přediniciační komplex vytváří též v mezigenových sekvencích, v nichž se nachází Shineova-Dalgarnova sekvence. Proto může být zahájena další iniciace translace.

Obr. 173
Iniciace translace na polygenní mRNA

EF-Tu a **EF-Ts**. Elongace se děje v těchto krocích (obr. 174):

- ◆ 1. Nejdříve se vytvoří **binární translační komplex**

EF-Tu.GTP,

který se spojí s aa-tRNA za vzniku **ternárního translačního komplexu**

EF-Tu.GTP. aa-tRNA.

Binární komplex se váže ke všem aa-tRNA s výjimkou fMet-tRNA^{fMet}. Proto kodon AUG bude čten jako metionin a nikoli jako formylmetionin.

- ◆ 2. Ternární komplex řídí pak navázání aa-tRNA do A-místa ribozomu 70S v závislosti na kodonu v tomto místě. Po správném spárování s tímto kodonem nějaký zatím nedefinovaný signál způsobí hydrolyzu GTP na GDP + P, což vede k uvolnění EF-Tu a GDP a umístění aa-tRNA do A-místa. V této souvislosti je třeba zdůraznit, že *aminoacylovým místem musí projít všechny aa-tRNA kromě fMet-tRNA^{fMet}, která se přímo umísťuje do peptidylového místa v rámci iniciace translace.* V procesu umístění do aminoacylového místa prochází aa-tRNA dvěma stavy:

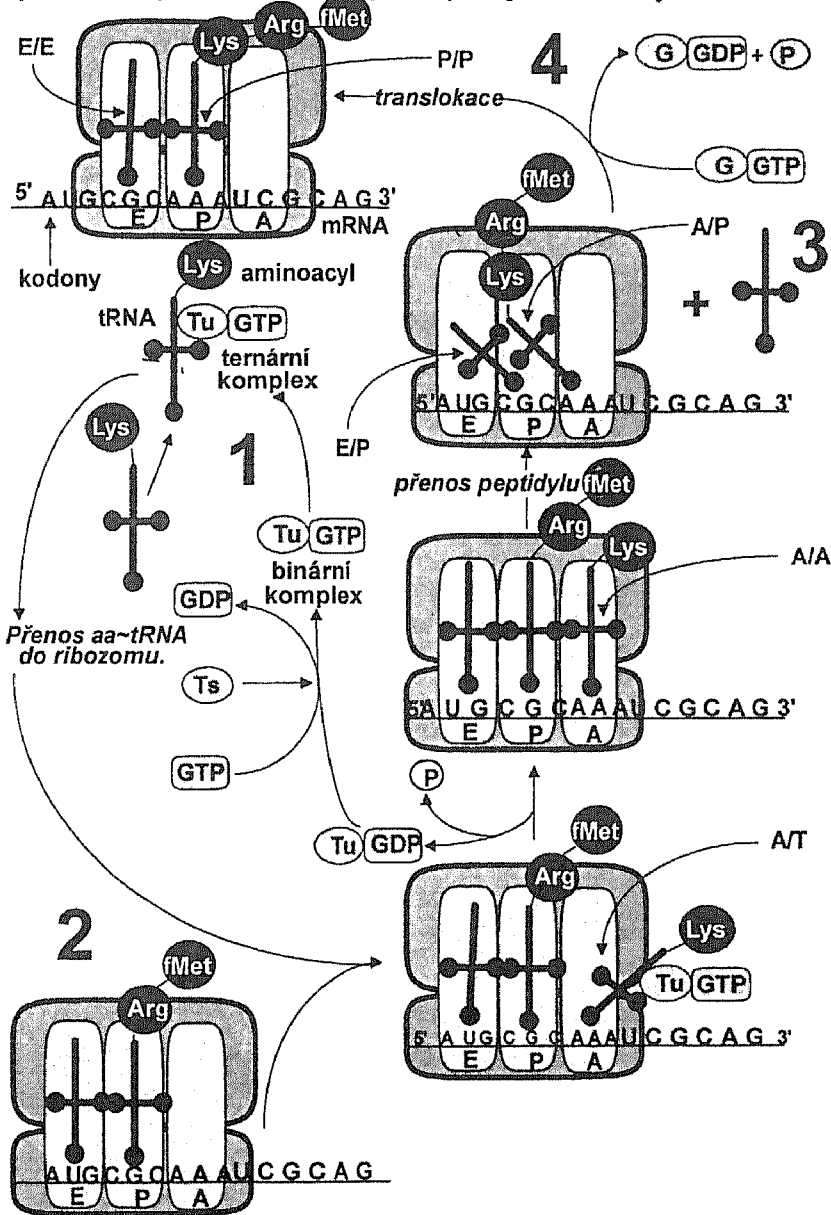
a) **stav A/T**, ve kterém se váže na antikodon a nukleotidy 16S-rRNA,

b) **stav A/A**, ve kterém je úplně umístěna v aminoacylovém místě a váže se zde na nukleotidy 23S-rRNA.

- ◆ 3. Existence aa-tRNA v A-místě je velmi krátkodobá, pokud je P-místo obsazeno fMet-tRNA nebo peptidyl-tRNA. Vlivem peptidyltransferázového místa velké podjednotky se vytvoří velmi rychle peptidová vazba mezi první aminokyselinou peptidyl-tRNA a aminokyselinou aa-tRNA. V této reakci je karboxyl aktivované esterové vazby aa-tRNA nebo peptidyl-tRNA v P-místě napaden α -aminoskupinou aa-tRNA nacházející se v A-místě. To vede k přenosu peptidylu z tRNA v P-místě na aa-tRNA v A-místě. *Reakce mezi peptidylem a aa-tRNA probíhá v peptidylovém místě, přičemž aa-tRNA je v aminoacylovém místě držena antikodonem a v peptidylovém místě nukleotidy 23S-rRNA.* Tento její stav se označuje jako **stav A/P**. *Původní peptidyl-tRNA je částečně vytěsněna do E-místa. Je však ještě držena antikodonem v P-místě.* Tento stav peptidyl-tRNA se nazývá **stav E/P**. *Důsledkem těchto dějů je, že se rostoucí polypeptidový řetězec prodlouží o jednu aminokyselinu ještě bez translokace ribozomu a z E-místa se vytěsní předchozí deacylovaná tRNA.*

- ◆ 4. Teprve v následujícím kroku dochází k translokaci, která se uskutečňuje faktorem EF-G v závislosti na GTP. Ribozom se posune o tři nukleotidy, tedy o jeden kodon směrem k 3'-konci mRNA, takže do A-místa se dostane nový kodon. To také znamená, že antikodony neacylovaných tRNA a nové peptidyl-tRNA jsou posunuty a umísťují neacylovanou tRNA plně do E-místa, což je **stav E/E neacylované transferové RNA**, a novou peptidyl-tRNA plně do P-místa, což je její **stav P/P**. *Posun ribozomu vždy o jeden kodon podél mRNA po*

Celý cyklus se opakuje s tímto ribozomem.
Výsledkem je prodloužení polypeptidu opět o jednu aminokyselinu.



Obr. 174
Cyklus elongace polypeptidového řetězce

každém prodloužení polypeptidového řetězce vždy o jednu aminokyselinu se označuje jako **translokace ribozomu**.

Schopnost katalyzovat syntézu peptidových vazeb je inherentní vlastností velké ribozomové podjednotky. Peptidyltransferázové katalytické centrum je pravděpodobně malé a jeho katalytická aktivita je závislá na umístění obou molekul tRNA v peptidylovém a aminoacylovém místě. Tyto molekuly jsou navzájem vzdálené 0,2 - 1,0 nm. Složky peptidyltransferázového centra nebyly dosud identifikovány, ale zdá se, že je tvořeno více proteiny a katalytického účinku se zúčastňuje též 23S-rRNA. Možná, že za vlastní katalytický účinek zodpovídá 23S-rRNA.

Ještě je třeba se zmínit o úloze elongačního faktoru EF-Ts v procesu elongace polypeptidového řetězce. Tento faktor je tvořen jedním polypeptidovým řetězcem a katalyzuje výměnu GDP za GTP v binárním komplexu těmito reakcemi:



TERMINACE TRANSLACE. Ukončení syntézy polypeptidového řetězce na ribozomu probíhá, jsou-li splněny tyto podmínky:

- ◆ přítomnost terminačního kodonu,
- ◆ přítomnost terminačních faktorů.

Bakterie mají tři různé **terminační faktory**, a to **RF1**, **RF2** a **RF3**. Terminační faktor RF1 rozeznává kodon UAA a UAG, kdežto RF2 rozeznává UAA a UGA. RF3, na který se váže GTP, stimuluje účinek faktorů RF1 a RF2. Celkově lze říci, že za spoluúčasti těchto faktorů se z karboxylového konce polypeptidového řetězce uvolní tRNA, čímž se zastaví jeho prodlužování. To má za následek i uvolnění jak polypeptidového řetězce, tak i ribozomu, který se pak rozloží na své podjednotky.

RYCHLOST A PŘESNOST SYNTÉZY POLYPEPTIDOVÉHO ŘETĚZCE. Jednotlivé děje elongace polypeptidového řetězce musí probíhat podle hesla "co možná nejrychleji" a "co možná nejpřesněji".

V buňkách *E. coli* se prodlužuje polypeptidový řetězec při rychlosti 10 až 20 aminokyselin za sekundu. Avšak zatímco se jeden ribozom zabývá syntézou, další se už naváže na mRNA. Na jedné molekule mRNA může být obvykle 10 až 15 ribozomů a v některých případech až 30. Vzpomeňte si v této souvislosti na polyribozomy (str. 198).

Dochází však také k chybnému zařazení aminokyselin. Na 10 000 poly-

merizačních kroků připadá asi pět takových chyb. To je překvapivě málo. Nesprávně zařazené aa-tRNA jsou z ribozomu odstraňovány v rozmezí mezi vytvořením ternárního komplexu a rozkladem Tu.GTP na Tu.GDP.

VÝBĚR ANTIKODONŮ KE ČTENÍ GENETICKÉHO KÓDU V BAKTERIÁLNÍ BUŇCE. K translaci, která probíhá na ribozomech bakteriální buňky, se používá standardního genetického kódu. K jeho čtení má bakteriální buňka *E. coli* k dispozici 40 antikodonů, tj. 40 různých tRNA (tab. 9). Tento počet vyhovuje pravidlům o kolísavém párování bází, podle nichž:

- ◆ Pět kodonových rodin (Leu, Ser, Pro, Thr, Gly) je čteno tRNA se třemi různými antikodony (každá je čtena třemi).
- ◆ Každá ze tří kodonových rodin (Val, Ala, Arg) je čtena dvěma tRNA opatřenými různými antikodony.
- ◆ Sedm dvoukodonových sad končících na U nebo C (Phe, Tyr, His, Asn, Asp, Cys, Ser) je čteno sedmi tRNA s různými antikodony (na každou sadu připadá jedna).
- ◆ Každá ze tří sad končících na A nebo G (Leu, Gln, Arg) může být čtena dvěma tRNA s různými antikodony (na každou sadu připadají dvě).
- ◆ Dvě dvoukodonové sady končící na A nebo G (Lys a Glu) jsou každá čtena jednou tRNA.
- ◆ Ile čtou dvě tRNA s různými antikodony, Met jedna a Trp také jedna. Antikodon pro Ile má v první pozici lyzidin (L) nebo kveozin (Q).

To platí i pro ostatní gramnegativní bakterie, nikoliv však jednoznačně pro bakterie grampozitivní a bakterie bez buněčné stěny (mykoplazmata).

Grampozitivní bakterie využívají ke čtení genetického kódu 33 druhů tRNA lišících se navzájem antikodony (tab. 10) a mykoplazmata 28 (tab. 11).

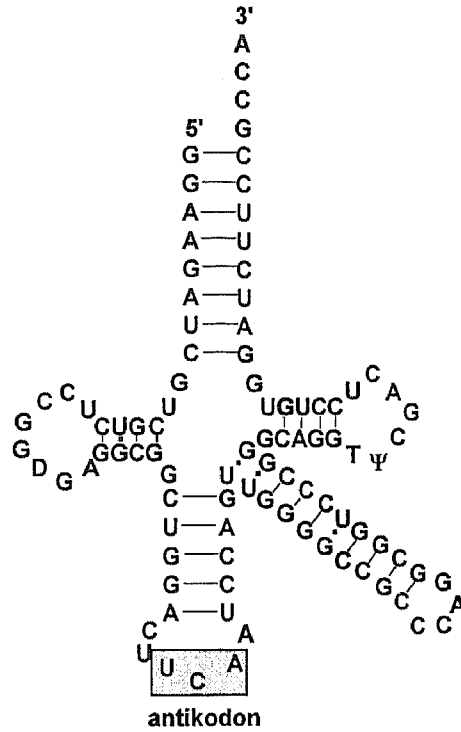
SELENOPROTEINY. *Selenoproteiny jsou proteiny obsahující selenocystein.* Existuje speciální tRNA, kterou se selenocystein přenáší do ribozomu, kde se pak zařazuje do primární struktury proteinu. Je to tRNA^{Sec}, která má antikodon, jímž přečte kodon UGA. Další zvláštností této tRNA je její neobvykle dlouhá variabilní smyčka (obr. 175). Vzniká transkripce genu *selC*. Pomocí seryl-tRNA-syntetázy je na ni nejdříve přenesen serin, který je pak na seryl-tRNA^{Sec} přeměněn selenocysteinsyntázou přes aminoakrylyl-tRNA^{Sec} na selenocysteyl-tRNA^{Sec}. Specifický elongační faktor SELB přenáší selenocysteyl-tRNA^{Sec} do ribozomu. V ribozomech je tento elongační faktor rozeznáván sekvencí ve vlásence mRNA nesoucí informaci pro selenoprotein. Tato vlásenka umožňuje to, že kodon UGA je čten selenocysteyl-tRNA^{Sec} jako selenocystein. Je

Tab. 9
Antikodony tRNA používané ke čtení genetického kódu v ribozomech gramnegativních bakterií

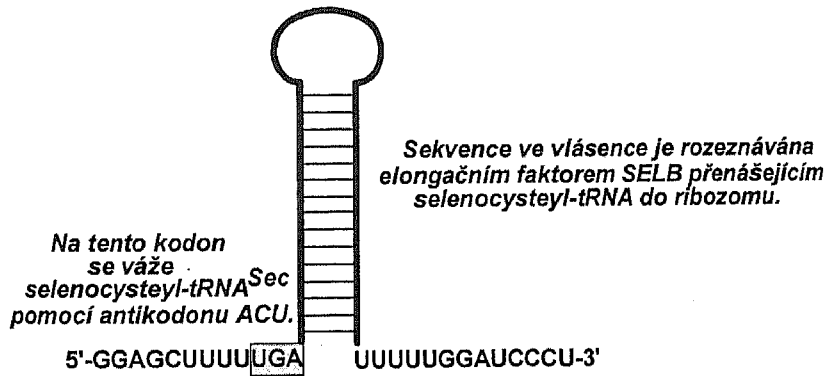
aminokyselina kodon (5'XXX3')	aminokyselina antikodon (5'XXX3')	aminokyselina kodon (5'XXX3')	aminokyselina antikodon (5'XXX3')	aminokyselina kodon (5'XXX3')	aminokyselina antikodon (5'XXX3')
Phe (UUU)	GAA	Ser (UCU)	GGA	Tyr (UAU)	Cys (UGU)
Phe (UUC)		Ser (UCC)		Tyr (UAC)	Cys (UGC)
Leu (UUA)	UAA	Ser (UCA)	UGA	Trm (UAA)	Trm (UGA)
Leu (UUG)	CAA	Ser (UCG)	CGA	Trm (UAG)	Trp (UGG)
Leu (CUU)		Pro (CCU)	GGG	His (CAU)	Arg (CGU)
Leu (CUC)	GAG	Pro (CCC)		His (CAC)	Arg (CGC)
Leu (CUA)		Pro (CCA)	UGG	Gln (CAA)	Arg (CGA)
Leu (CUG)	UAG	Pro (CCG)	CGG	Gln (CAG)	Arg (CGG)
Ile (AUU)	GAU	Thr (ACU)	GGU	Asn (AAU)	Ser (AGU)
Ile (AUC)		Thr (ACC)		Asn (AAC)	Ser (AGC)
Ile (AUA)	LAU	Thr (ACA)	UGU	Lys (AAA)	Arg (AGA)
Met (AUG)	CAU	Thr (ACG)	CGU	Lys (AAG)	Arg (AGG)
Val (GUU)	GAC	Ala (GCU)	GCC	Asp (GAU)	Gly (GGU)
Val (GUC)		Ala (GCC)		Asp (GAC)	Gly (GGC)
Val (GUA)		Ala (GCA)	UGC	Glu (GAA)	Gly (GGA)
Val (GUG)	UAC	Ala (GCG)		Glu (GAG)	Gly (GGG)
					UCC
					CCC

Tab. 10
Antikodony tRNA používané ke čtení genetického kódu v ribozomech grampozitivních bakterií

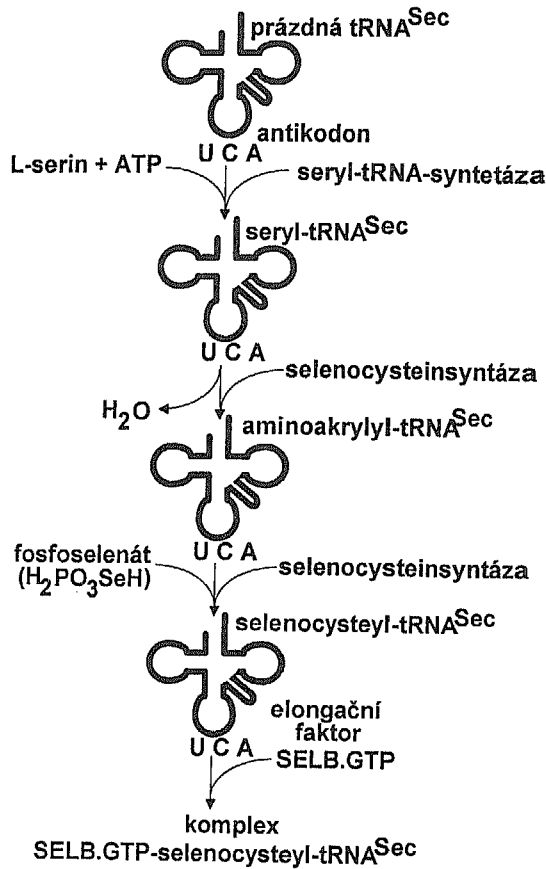
aminokyselina kodon (5'XXX3')	aminokyselina antikodon (5'XXX3')	aminokyselina kodon (5'XXX3')	aminokyselina antikodon (5'XXX3')	aminokyselina kodon (5'XXX3')	aminokyselina antikodon (5'XXX3')
Phe (UUU)	GAA	Ser (UCU)	GGA	Tyr (UAU)	GUA
Phe (UUC)		Ser (UCC)		Tyr (UAC)	
Leu (UUA)	CAA	Ser (UCA)	NGA	Trm (UAA)	0
Leu (UUG)		Ser (UCG)		Trp (UAG)	0
Leu (CUU)	GAG	Pro (CCU)	GGG	His (CAU)	GUG
Leu (CUC)		Pro (CCC)		His (CAC)	
Leu (CUA)	UAG	Pro (CCA)	CGG	Gln (CAA)	
Leu (CUG)	CAG	Pro (CCG)		Gln (CAG)	CUG
Ile (AUU)	GAU	Thr (ACU)	GGU	Asn (AAU)	GUU
Ile (AUC)		Thr (ACC)		Asn (AAC)	
Ile (AUA)	-	Thr (ACA)	UGU	Lys (AAA)	CUU
Met (AUG)	CAU	Thr (ACG)	CGU	Lys (AAG)	
Val (GUU)	GAC	Ala (GCU)	GGC	Asp (GAU)	GUC
Val (GUC)		Ala (GCC)		Asp (GAC)	
Val (GUA)		Ala (GCA)	CGC	Glu (GAA)	
Val (GUG)	CAC	Ala (GCG)		Glu (GAG)	CUC
				Ser (AGU)	GCU
				Ser (AGC)	
				Arg (AGA)	-
				Arg (AGG)	CCU
				Gly (GGU)	GCC
				Gly (GGC)	
				Gly (GGA)	
				Gly (GGG)	CCC



Obr.175
tRNA^{Sec}



Obr. 176
Schéma sekundární struktury mRNA překládané do
formiátdehydrogenázy *E. coli*



Elongační faktor SELB je na ribozomu rozeznán sekvencí ve smyčce na vlásence mRNA. Na začátku této vlásenky je kodon UGA, který je čten antikodonem selenocysteyl-tRNA.

Obr. 177

Proces zařazení selenocysteinu do ribozomu

nutno zdůraznit, že kdyby na mRNA neexistovala sekvence pro rozeznání elongačního faktoru SELB, nemohla by se selenocysteyl-tRNA navázat na mRNA (a ribozom) a kodon UGA by byl čten jako terminační (obr. 176, 177).

2.4.6

Posttranslační procesy

Translací končí přenos genetické informace ze strukturního genu tím, že

se pod jejím vlivem vytvoří primární struktura proteinu (polypeptidového řetězce). Veškeré další procesy, které se budou odehrávat na polypeptidovém řetězci, budou záviset na jeho primární struktuře, která rozhoduje o tom, jaké budou jeho chemické vlastnosti, jaká bude jeho sekundární a terciární struktura a do jaké kvartérní struktury a nadmolekulárních sestav bude vcházet. Všechny tyto struktury se vytvářejí *za daných podmínek prostředí v buňce pod vlivem primární struktury proteinu, kterou jsou rozhodujícím způsobem určeny. Jelikož procesy, kterými se vytvářejí tyto struktury proteinů, probíhají až po translaci nebo v průběhu syntézy polypeptidového řetězce, označujeme je jako procesy posttranslační.*

Celkově se do posttranslačních procesů zahrnují:

- ◆ kotranslační úpravy polypeptidových řetězců,
- ◆ posttranslační úpravy polypeptidových řetězců,
- ◆ samosestavování.

Tyto procesy probíhají obecně nejen v prokaryotických, ale také v eukaryotických buňkách.

KOTRANSLAČNÍ ÚPRAVY. Ještě během syntézy polypeptidových řetězců dochází v mnohých případech ke změnám v jejich struktuře a organizaci. Tyto změny se označují jako **kotranslační úpravy**, tj. *úpravy nascentního, ještě se prodlužujícího polypeptidového řetězce*. Jsou to:

- ◆ **1. Deformylace.** Týká se odstranění formylové skupiny z N-terminálního metioninu polypeptidového řetězce. Tato reakce se uskutečňuje v bakteriálních buňkách, v chloroplastech a v mitochondriích. *Enzym katalyzující odstranění formylové skupiny z formylmetioninu na N-konci polypeptidového řetězce se označuje jako deformyláza.*
- ◆ **2. Odštěpení aminokyselin.** U prokaryot i eukaryot se N-terminální metionin, popřípadě též jiné aminokyseliny, odštěpují z volného N-konce polypeptidu **aminopeptidázou**.
- ◆ **3. Chemická modifikace aminokyselin polypeptidu.** Zbytky R některých aminokyselin se často po začlenění do rostoucího polypeptidového řetězce chemicky mění. Například některé zbytky prolinu a lyzinu jsou hydroxylovány, takže se vytvoří hydroxyprolin a hydroxylyzin. Jiné aminokyseliny, např. serin, treonin a tyrozin, mohou být fosforylovány (str. 19).
- ◆ **4. Tvorba disulfidových vazeb.** Proti sobě položené sulfhydrylové skupiny mohou být oxidovány za tvorby disulfidových vazeb. K tomu dochází při vytváření terciární struktury polypeptidového řetězce (str. 24, obr. 9).
- ◆ **5. Připojení cukerných zbytků.** Během syntézy polypeptidového řetěz-

ce mohou být k některým aminokyselinám připojeny enzymaticky některé cukry za vzniku **glykoproteinů** (str. 19).

◆ **6. Vytváření sekundární a terciární struktury.** Polypeptidové řetězce vytvářejí spontánně sekundární a terciární strukturu většinou před dokončením své syntézy nebo až po uvolnění z ribozomů (str. 25 a 27).

POSTTRANSLAČNÍ ÚPRAVY. *Posttranslační úprava je chemická modifikace translačního produktu, kterou vzniká funkční polypeptidový řetězec.* Některé úpravy, které jsme popsali jako kotranslační, se mohou uskutečnit až po translaci. Řada úprav je však typicky posttranslační. Jsou to:

◆ **1. Vyštěpení peptidů.** V některých polypeptidech se po translaci vyštěpují větší úseky za tvorby aktivní molekuly funkčního polypeptidu.

◆ **2. Tvorba kvartérní struktury.** Mnohé polypeptidy se po translaci spojují vodíkovými vazbami a jinými nekovalentními interakcemi za vzniku kvartérní struktury (str. 32).

◆ **3. Přidání prostetických skupin.** Prostetické skupiny enzymů a jiných proteinů se připojují k polypeptidovým řetězcům až po uvolnění polypeptidových řetězců z ribozomů. Připojení může být spontánní nebo katalyzované enzymově (str. 36).

◆ **4. Sestavování oligomerních proteinů a nadmolekulárních struktur.** S tímto procesem jsme se již seznámili v kapitole o informačních makromolekulách. Zde bychom chtěli zdůraznit, že sekvence aminokyselin polypeptidových řetězců, z nichž se skládají nadmolekulární systémy, má dvě úrovně informace. *Na jedné úrovni tato sekvence určuje trojrozměrnou konformaci jednotlivých polypeptidových řetězců, tj. jejich terciární strukturu. Na druhé úrovni každý polypeptidový řetězec obsahuje ve své terciární konformaci jedno nebo více rozpoznávacích míst, na které se vážou ve specifickém geometrickém vztahu sousední polypeptidové podjednotky za tvorby charakteristické oligomerní a nadmolekulární struktury.* Nevalentní interakce mezi rozpoznávacími místy dvou sousedních podjednotek se vyznačují velmi vysokým stupněm specificity a přesností komplementarity. Jsou většinou podmíněny vodíkovými vazbami a vyznačují se vysokým stupněm stability, která je zase podmíněna hydrofobními interakcemi (str. 40).

2.5 REGULACE EXPRESE BAKTERIÁLNÍHO GENOMU

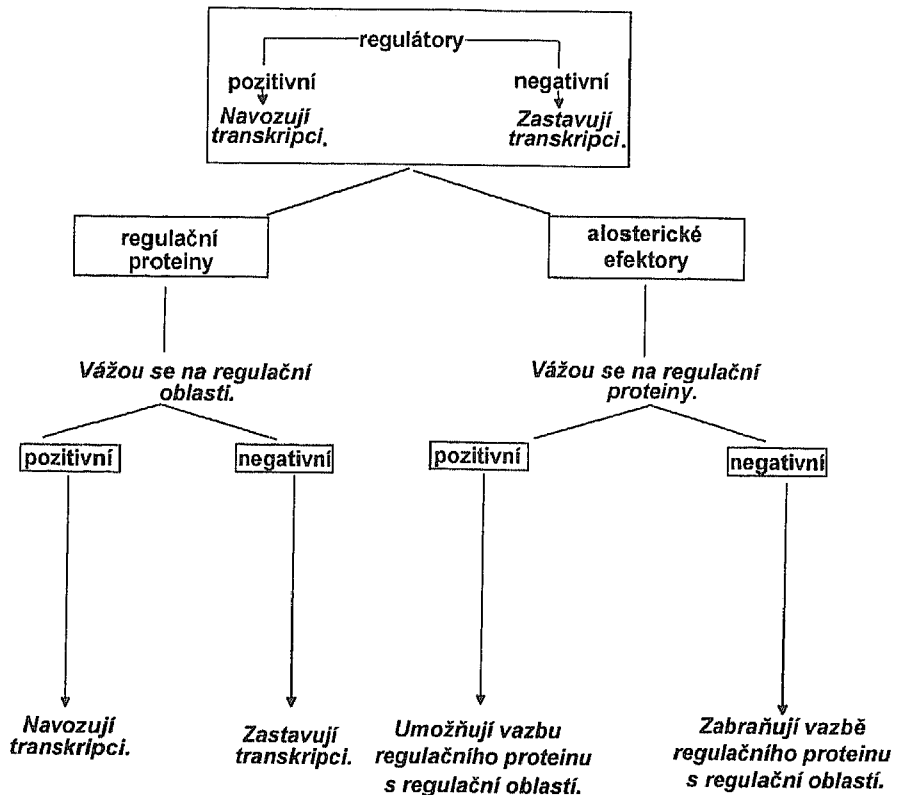
Expresce genu je regulována, řízena, a to na úrovni transkripce, posttranskripčních úprav, translace a posttranslačních úprav. Regulace na nižší úrovni se promítá vždy do vyšších úrovní v této hierarchii:

transkripce → posttranskripční úpravy → translace →
→ posttranslační úpravy.

Regulace genové exprese u bakterií nejčastěji působí na úrovni transkripce. Je nutno připomenout, že bakterie přepisují všechny své geny jediným typem RNA-polymerázy. Přesto dovedou transkripci celé řady genů zapínat a vypínat podle potřeby. Obvykle žijí v rychle se měnícím prostředí, a proto musí soubor svých enzymů rychle přizpůsobovat aktuální fyziologické situaci. Prakticky nikdy nepotřebují všechny proteiny, které jsou schopny vytvářet. Velmi efektivně regulují množství vyráběných proteinů. Například enzymy zúčastněné ve spotřebě a využívání laktózy se syntetizují většinou jen za přítomnosti laktózy (jde-li o enzymy indukovatelné). Nahromadí-li se dostatečné množství určité aminokyseliny, zastaví její další syntézu tím, že vypnou syntézu příslušných enzymů.

Signál k zahájení a zastavení transkripce regulovaného genu přichází zpravidla ve formě nějaké malé molekuly, která je často substrátem nebo produktem enzymu, který je regulovaným genem kódován. Taková molekula je však příliš malá na to, aby mohla rozpoznat příslušný promotor od jiného promotoru a selektivně vypnout nebo zapnout transkripci příslušného genu nebo genů. A často k tomu nemá ani chemické předpoklady. Proto její působení na promotor je zprostředkováno proteinem, který má nejméně dvě specifická vazebná místa. Jedním je schopen rozlišit promotor regulovaného genu od všech ostatních oblastí chromozomu a druhým rozpozná příslušný efektor mezi jinými malými molekulami, s nimiž se setkává.

Proteiny podílející se na regulaci transkripce nazýváme regulační proteiny. Většinou se vážou na regulační oblasti, např. promotor. Nízkomolekulární látka, která svou vazbou na regulační protein mění jeho konformaci, a tím i afinitu k příslušné regulační oblasti v DNA, patří mezi alosterické efekторы (str. 37). Zde se však nebudeme zabývat alosterickými efektory, které mění konformaci enzymů, ale těmi, které mění konformaci regulačních proteinů. Alosterické efekторы tohoto typu a regulační proteiny jsou regulátory. Jako regulátor označujeme jakoukoliv látku, která se podílí na regulaci molekulárního



Obr. 178
Klasifikace regulátorů

děje (transkripce, translace aj.). Regulátor může být **pozitivní**, tj. *navozuje transkripci, translaci nebo jiný řízený proces v buňce*, nebo **negativní**, tj. *zastavující tyto procesy*.

Interakce efektoru s regulačním proteinem vede k alosterickému efektu. Obvykle se změna konformace regulačního proteinu po interakci s efektořem týká zániku nebo naopak vytvoření vazebného místa pro regulační oblast. Podle toho se ve vztahu k regulačním proteinům rozlišují dva typy alosterických efektorů (obr. 178):

- ◆ a) **negativní alosterický efektor**, tj. *efektor zabraňující vazbě regulačního proteinu s regulační oblastí*,
- ◆ b) **pozitivní alosterický efektor**, tj. *efektor umožňující vazbu regulačního proteinu s regulační oblastí*.

Podobně rozlišujeme regulační proteiny na:

- ◆ a) **negativní regulační proteiny**, tj. *regulační proteiny, jejichž vazba na regulační oblast zabraňuje RNA-polymeráze přepis transkripční jednotky,*
- ◆ b) **pozitivní regulační proteiny**, tj. *regulační proteiny, jejichž vazba na regulační oblast umožňuje RNA-polymeráze přepis transkripční jednotky. Obecně proteiny (bez ohledu na mechanismus účinku), které působí jako pozitivní regulátory, označujeme jako aktivátory transkripce.*

2.5.1

Enzymová indukce, represe a katabolická represe

ENZYMOVÁ INDUKCE. Regulace syntézy proteinů je nejlépe prostudována u proteinů s enzymovou funkcí. Týká se však i proteinů s neenzymovou funkcí. Proto např. enzymová indukce a represe je vlastně obecně indukcí a represí syntézy proteinů, která je demonstrována na proteinech s funkcí enzymovou. **Enzymová indukce je syntéza enzymů vyvolaná induktorem.** Tento způsob regulace se týká jen těch enzymů, které jsou indukovatelné. Jako **indukovatelné** se označují **enzymy, jejichž syntéza je vyvolána induktorem.** Od těchto enzymů je třeba odlišovat **konstitutivní enzymy, jejichž syntéza nezávisí na přítomnosti induktoru a tvoří se v buňce v konstantním množství. Induktor je specifický substrát (látko, molekula), který vyvolává syntézu příslušného indukovatelného enzymu.**

Klasickým příkladem indukovatelného enzymu je β -galaktozidáza *E. coli*. Induktorem tohoto enzymu je laktóza. Proto se tento enzym v buňkách netvoří, jsou-li v prostředí, které obsahuje jako jediný zdroj uhlíku glukózu. Takové buňky obsahují jen asi 5 molekul β -galaktozidázy. Jestliže se však přenesou do prostředí, které obsahuje jako jediný zdroj uhlíku laktózu, začnou za 1 až 2 minuty syntetizovat β -galaktozidázu ve velkém množství (až 5 000 molekul na buňku). Indukovaná β -galaktozidáza hydrolyzuje laktózu na produkty, které buňky využívají jako zdroj uhlíku a energie. Jestliže se indukované buňky přenesou do čerstvého prostředí, které obsahuje glukózu, nikoli však laktózu, β -galaktozidáza se přestane syntetizovat a počet molekul β -galaktozidázy se rychle sníží opět na velmi nízké množství.

Je třeba ještě poznamenat, že přidá-li se do prostředí s buňkami *E. coli* laktóza, pak se indukuje syntéza nejen β -galaktozidázy, ale též dvou dalších enzymů lac-operonu: β -galaktozidpermeázy a β -galaktozidacetyltransferázy.

ENZYMOVÁ REPRESA. Tento typ regulace se týká obvykle enzymů biosyntetických drah. Spočívá v tom, že *syntéza těchto enzymů je potlačována*

specifickým metabolitem dané biosyntetické dráhy, obvykle konečným metabolitem, který když se nahromadí do kritického množství v buňce, zastavuje syntézu všech enzymů této dráhy. Enzymová represe tedy představuje potlačení syntézy jednoho nebo několika enzymů dané metabolické dráhy specifickým metabolitem. Syntéza těchto enzymů se opět obnoví, jakmile koncentrace metabolitu klesne pod kritickou hodnotu. Příkladem tohoto způsobu regulace je syntéza histidinu v buňkách *E. coli*. Jestliže se histidin nahromadí v buňkách do kritického množství, zastaví se tvorba enzymů, které katalyzují jeho syntézu; obnoví se, klesne-li jeho hladina v buňkách pod kritické množství. *Metabolit (obvykle konečný) zastávající syntézu enzymů dané biosyntetické dráhy se označuje jako korepresor.*

Obvykle jsou při enzymové represi reprimovány všechny enzymy příslušné dráhy; např. při syntéze histidinu všechny enzymy, které katalyzují syntézu histidinu.

KATABOLICKÁ REPRESA. *Při katabolické represi potlačuje (reprimuje) substrát syntézu indukovatelných enzymů i za přítomnosti induktoru. Glukózou se např. potlačuje syntéza β -galaktozidázy i za přítomnosti laktózy jako induktoru. Tento enzym je indukován laktózou jen za nepřítomnosti glukózy. Vlivem glukózy se jeho syntéza zastavuje, i když je v prostředí přítomna laktóza jako induktor. Za takových podmínek se využívá jako zdroj energie a uhlíku glukóza, kdežto laktóza zůstává nedotčena.*

2.5.2

Negativní a pozitivní regulace operonu

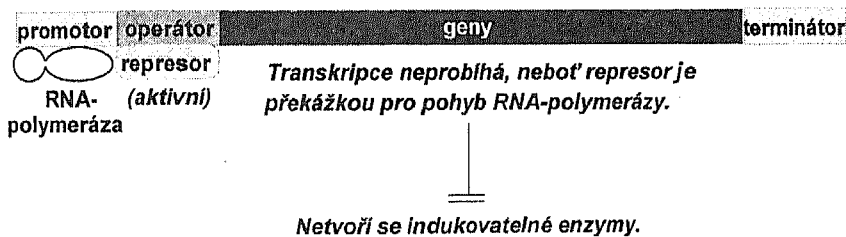
POJEM OPERON. Uvedené způsoby regulace biosyntézy proteinů (enzymů) probíhají a jsou řízeny transkripčními jednotkami typu operonů. Rozhodující funkční složkou operonů je **operátor**, což je *regulační oblast, na které se váže represor. Represor je negativní regulační protein kódovaný regulačním genem.* Vazbou represoru na operátor se zastaví transkripce operonu. Jako **regulační gen** se označuje *strukturní gen kódující polypeptid s regulační funkcí (v tomto případě represor).* Operátor reaguje s represorem nekovalentními interakcemi. *Jestliže se represor spojí s operátorem, zastaví se transkripce všech strukturních genů daného operonu.* V takovém případě se transkripce zastavuje proto, že represor vázaný na operátor brání vazbě RNA-polymerázy na promotor nebo zabraňuje jejímu pohybu od promotoru ke strukturním genům. Vazba represoru k operátoru i vazba induktoru nebo korepresoru k represoru je podmíněna slabými nekovalentními interakcemi.

Represor reaguje snadno s příslušným induktorem nebo korepresorem. Při těchto reakcích dochází ke konformačním změnám represoru (alosterický efekt). *Vazbou induktoru nabývá konformace, při níž je inaktivní (neváže se na operátor). Vazbou korepresoru naopak nabývá konformace, při níž je aktivní a váže se na operátor.* Vazba mezi represorem a korepresorem nebo represorem a induktorem se rychle tvoří a opět narušuje, což vede k tomu, že represor přechází snadno podle fyziologické potřeby z aktivního stavu do inaktivního a naopak.

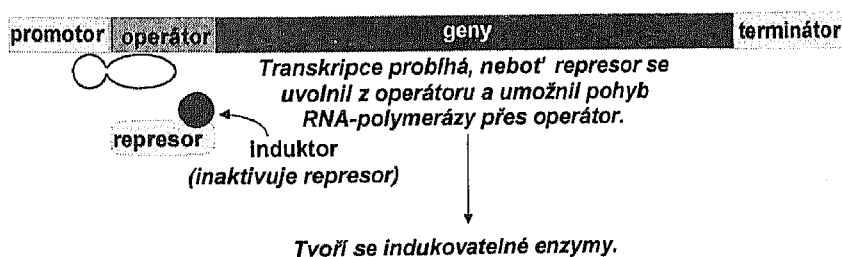
NEGATIVNÍ REGULACE OPERONU. Funkce operonu může být regulována negativně nebo pozitivně. Negativní regulace operonu je podstatou enzymové indukce a represe. *Spočívá v tom, že vazbou aktivního represoru na operátor se transkripce operonu zastaví a jeho uvolněním z operátoru se opět navozuje.* Aktivní forma represoru se vytvoří:

- ◆ a) uvolněním induktoru z represoru; proto se za nepřítomnosti induktoru transkripce zastaví (obr. 179);
- ◆ b) spojením represoru s korepresorem, tj. s konečným metabolitem (např. s histidinem); transkripce se pak zastaví za přítomnosti korepresoru (obr. 180).

UVOLNĚNÍ INDUKTORU Z REPRESORU (INDUKTOR NEPŘÍTOMEN)

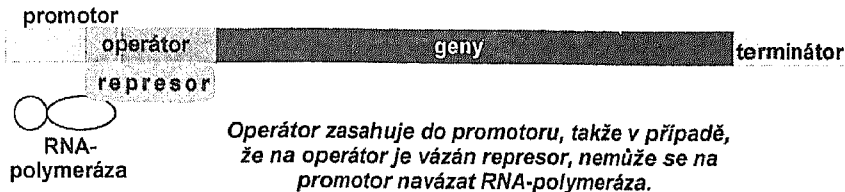


SPOJENÍ INDUKTORU S REPRESOREM



Obr. 179

Negativní regulace operonu v rámci enzymové indukce

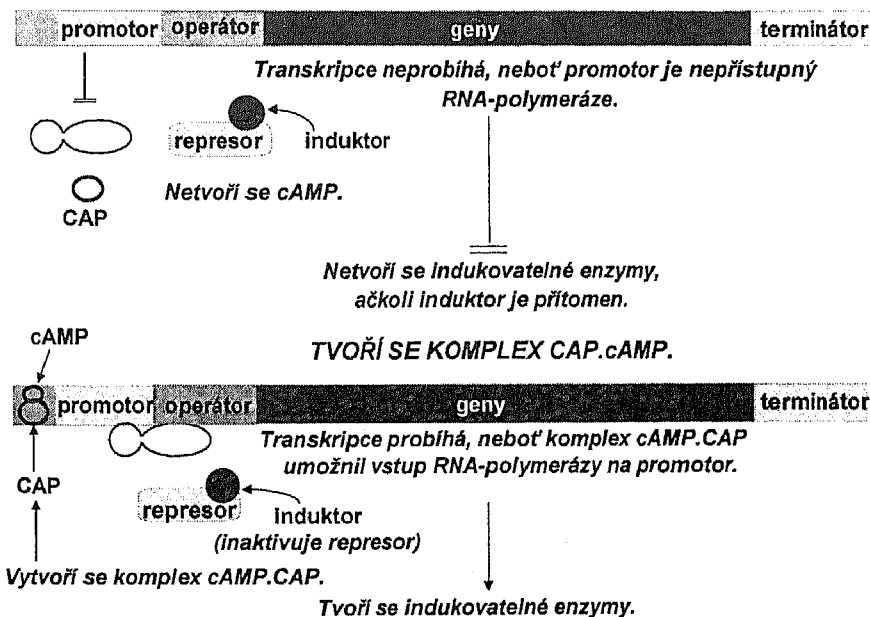


Obr. 181
Překrývání operátoru s promotorem

POZITIVNÍ REGULACE OPERONU. Pozitivní regulace operonu je podstatou katabolické represe a spočívá v tom, že vazbou CAP (který tvoří komplex s cAMP) na promotor se za přítomnosti induktoru transkripce operonu navozuje a jeho uvolněním z promotoru (za nepřítomnosti cAMP) zastavuje. Pozitivní regulační protein, který se v komplexu s cAMP váže na promotor a umožňuje za přítomnosti induktoru transkripci, se označuje jako **katabolický aktivační protein** (zkr. CAP). Je zřejmé, že cAMP zde působí jako pozitivní alosterický efektor a CAP jako pozitivní regulační protein (obr. 182).

Účinek glukózy na transkripci není přímý, nýbrž probíhá přes produkty jejího rozkladu (katabolity), které snižují intracelulární množství cyklického AMP (cAMP). Proto v přesnějším slova smyslu představuje *katabolická repre-*

NETVOŘÍ SE KOMPLEX CAP.cAMP.



Obr. 182
Pozitivní regulace operonu

Tab. 12
Vztahy mezi induktorem, korepresorem, represorem a cAMP.CAP

Induktor	=	negativní alosterický efektor	=	pozitivní regulátor
Korepresor	=	pozitivní alosterický efektor	=	negativní regulátor
Represor	=	negativní regulační protein	=	negativní regulátor
CAP	=	pozitivní regulační protein	=	pozitivní regulátor
cAMP	=	pozitivní alosterický efektor	=	pozitivní regulátor

se snížení syntézy indukovatelných enzymů katabolity některých substrátů prostřednictvím snížené syntézy cAMP.

Cyklický AMP působí tím, že se váže k CAP, což je dimerní molekula. Když se CAP spojí s cAMP, naváže se na specifická místa v blízkosti promotoru a zvýší pak jeho afinitu k RNA-polymeráze. Katabolity glukózy však inhibují syntézu cAMP, a proto v takovém případě se komplex cAMP s CAP vytvořit nemůže, takže promotor je RNA-polymeráze nepřístupný a transkripce nemůže začít (obr. 182).

Závěrem se pokusme charakterizovat vztahy mezi induktorem, korepresorem, represorem a cAMP.CAP podle tab. 12.

LAKTÓZOVÝ OPERON *E. COLI*. Laktózový operon *E. coli* je příkladem operonu, který je regulován negativně i pozitivně. Negativní regulace se uskutečňuje represorem, který je kódován regulačním genem označovaným písmenem *i*. Transkripční jednotka laktózového operonu je řízena jedním promotorem (*p*) a operátorem (*o*), který se částečně překrývá s promotorem. Dále tato transkripční jednotka obsahuje tyto strukturální geny (obr. 183):

- ◆ gen *z* kódující β -galaktozidázu (EC 3.2.1.23) neboli β -D-galaktozid-galaktohydrolázu, která hydrolyzuje glykozidovou vazbu v β -galaktozidech;
- ◆ gen *y* kódující β -galaktozidpermeázu;
- ◆ gen *a* kódující galaktozidacetyltransferázu (EC 2.3.1.18) neboli galaktozid-O-acetyltransferázu, která katalyzuje acetylaci β -D-galaktozidu na 6-acetyl- β -D-galaktozid.

Tyto enzymy jsou indukovatelné. Indukují se laktózou, která se účinkem β -galaktozidázy štěpí na glukózu a galaktózu. Bezprostředním induktorem však není laktóza, ale alolaktóza neboli β -D-galaktopyranozyl-(1 \rightarrow 6)-D-glukopyranóza, která vzniká za účasti β -galaktozidázy ještě před hydrolyzou laktózy

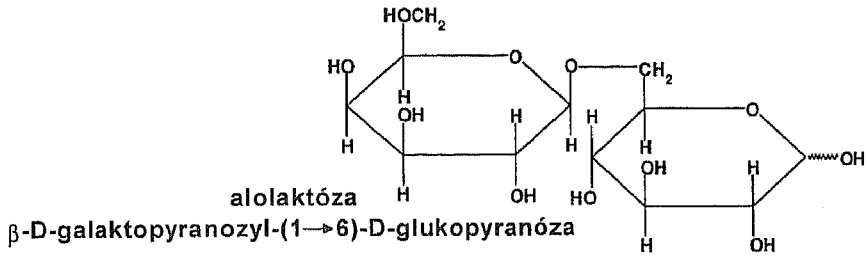
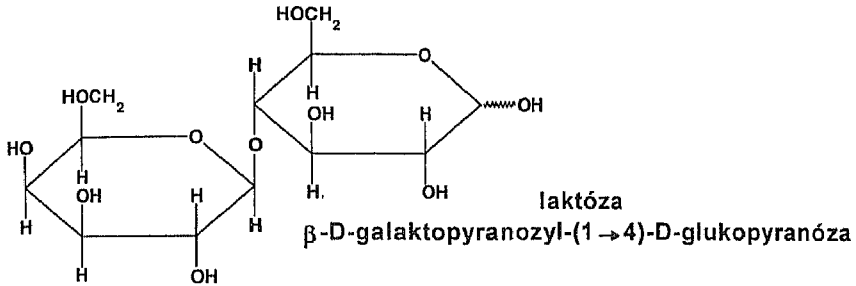


β -galaktozidáza

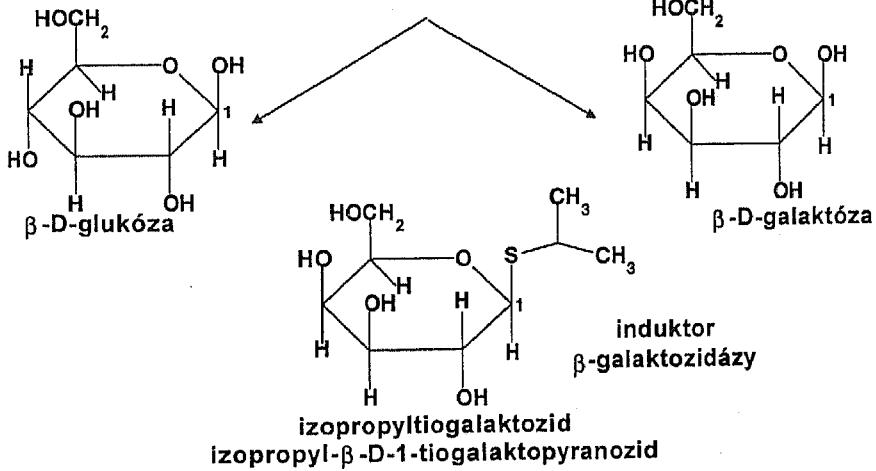
galaktozidacetyltransferáza

β -galaktozidpermeáza

Všechny enzymy jsou indukovatelné laktózou (alolaktózou).



Produkty hydrolýzy laktózy
 β -galaktozidázou.



Obr. 183
Laktózový operon *E. coli*

na glukózu a galaktózu a je permanentně produkována v malém množství přeměnou laktózy. Alolaktóza se spojuje s represorem a inaktivuje ho. Jako induktor se také používá izopropyltiogalaktózid (IPTG) neboli izopropyl- β -D-1-tiogalaktopyranozid, který přímo reaguje s represorem.

Represor laktózového operonu je protein, který má molekulovou hmotnost 152 000. Skládá se ze čtyř stejných protomerů o molekul. hmotnosti 38 000. Každý protomer má dvě domény:

- ◆ doména, kterou se represor specificky váže k operátoru;
- ◆ doména, na kterou se váže induktor (alolaktóza, IPTG).

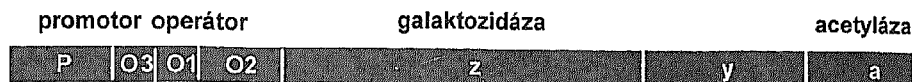
Operátor laktózového operonu sestává ze tří podjednotek: O1, O2, O3. Nejsilněji se váže na podjednotku O1, méně na podjednotku O2 a nejslaběji na O3. Podjednotka O1 je hlavní a další jsou tzv. vedlejší.

Pro účinnou vazbu represoru je v operátorové podjednotce nutná sekvence operátoru, která má palindromatický charakter. Na každou polovinu operátorové podjednotky se váže jeden protomer, takže operátorová podjednotka je obsazena dimerem represoru. Polypeptidové řetězce, které jsou v dimeru podjednotkami, se vyznačují motivem helix-otáčka-helix, na který se váže ještě třetí α -helix. *Rozpoznávacím je helix 2, který se vkládá do většího žlábků, ve kterém boční řetězce aminokyselin (arginin, glutamin, serin a tyrozin) α -helixu 2 tvoří vodíkové vazby s bázemi operátorové podjednotky.* Další dva α -helixy leží napříč rozpoznávacího helixu a stabilizují kontakt represoru s operátorem (obr. 184).

Represor je však tetramer, který se současně váže na dvě operátorové podjednotky (na každou jeden dimer), a to na O1 a jednu vedlejší (O2 nebo O3), takže sekvence mezi oběma podjednotkami vytvoří smyčku, v níž je uzavřena RNA-polymeráza, která takto nemůže opustit promotor. To má za následek zastavení transkripce (obr. 185).

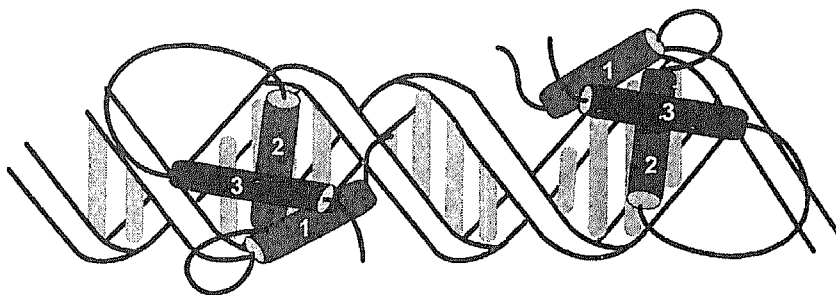
Jak již bylo uvedeno, glukóza snižuje v buňkách *E. coli* hladinu cyklického AMP, a tím potlačuje transkripci laktózového operonu. K transkripci laktózového operonu je celkově zapotřebí komplexu cAMP. CAP a laktózy jako induktoru. Za přítomnosti glukózy transkripce laktózového operonu neprobíhá ani za přítomnosti induktoru neboť glukóza inhibuje syntézu cAMP. *K úplné expresi laktózového operonu je tedy nutné jednak odstranění represoru z operátoru, jednak stimulační účinek komplexu CAP.cAMP na promotor.* Z toho je zřejmé, že laktózový operon je regulován pozitivně i negativně.

CAP-protein (obr. 16) se v aktivní formě skládá ze dvou identických protomerů (monomerů), z nichž každý váže jednu molekulu cAMP. Tato vazba způsobí strukturální změnu CAP-proteinu, který se pak může specificky vázat na úsek DNA těsně před promotorem. To vede k silnému ohýbání DNA v místě, kde se stýká s dimerem CAP. Toto ohnutí DNA je nutné, jelikož pak umožňuje



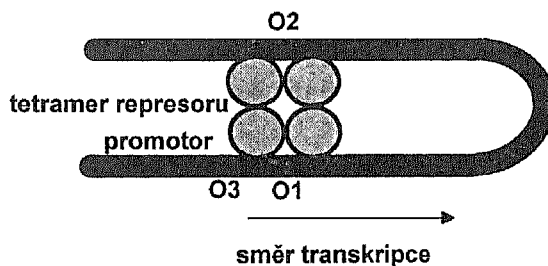
Šipkami je zvýrazněný přibližný palindrom.
Podobnost v palindromu se snižuje ve sledu:
O1 > O2 > O3.

O1: A A T T G T G A G C G | G A T A A C A A T T
T T A A C A C T C G C | C T A T T G T T A A



Obr. 184

Vazba dimeru represoru laktózového operonu na palindromickou sekvenci operátorové podjednotky O1



Obr. 185

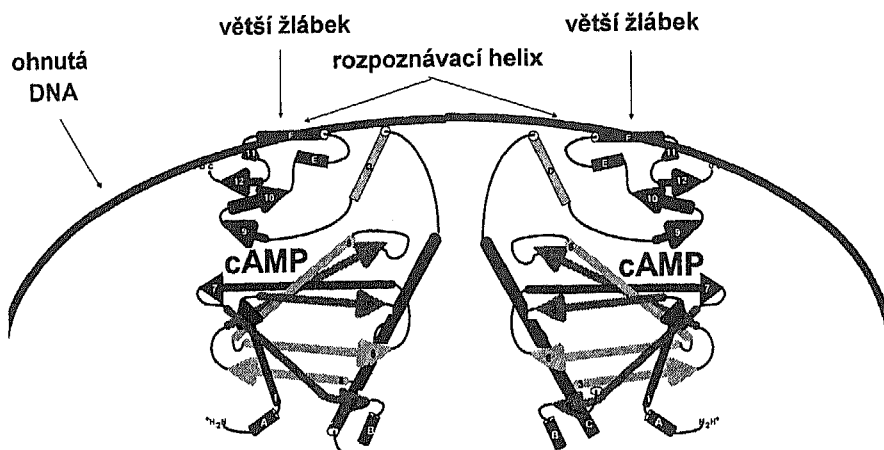
Vytvoření DNA-smyčky mezi dvěma podjednotkami operátoru

i vazbu RNA-polymemarázy k promotoru (obr. 186).

Poznámka: Někdy mají různé operony stejný regulační gen. *Skupina různých operonů se stejným regulačním genem se pak nazývá regulon.*

2.5.3

Ostatní způsoby regulace genové exprese u bakterií



Obr. 186

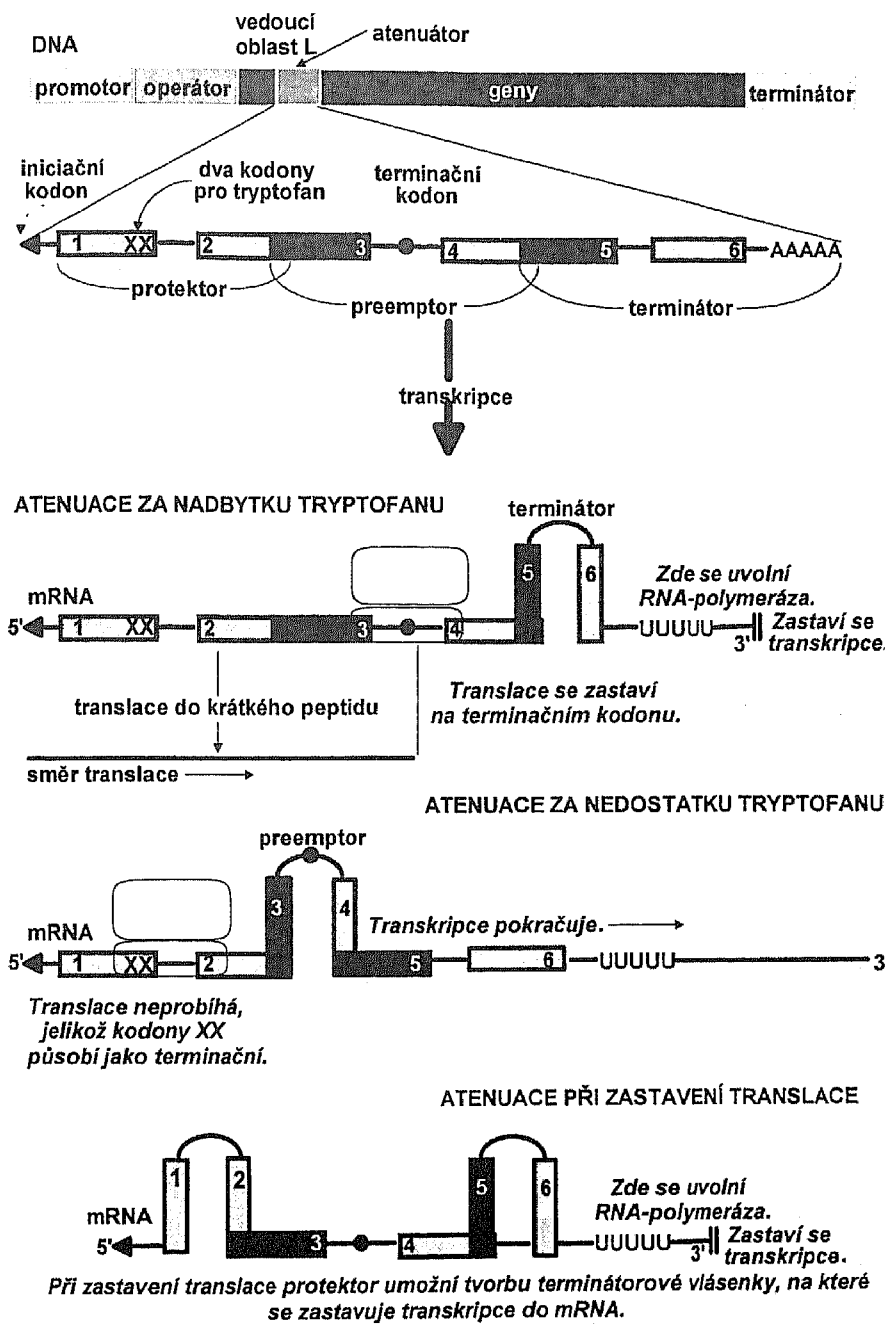
Ohýbání promotorové DNA vlivem vazby CAP-proteinu

ATENUACE. Atenuace je způsob regulace transkripce operonu podmíněný přítomností atenuátoru. Atenuátor je oblast ve vedoucí DNA-sequenci, která obsahuje specifický úsek působící jako předčasný terminátor transkripce některých operonů.

V tryptofanovém operonu je atenuátor tvořen šesti obrácenými repetice-mi 1, 2, 3, 4, 5, 6, u nichž dvojice 1 a 2, 3 a 4, 5 a 6 jsou navzájem komplementární a mohou se proto v mRNA spárovat do vlásenek tří typů (obr. 187):

- ◆ 1. Vlášenska vzniklá spojením obrácených repeticí 5 a 6 za nadbytku tryptofanu. Tato vlášenska má funkci terminátoru transkripce, neboť se v jejím primárním transkriptu za nadbytku tryptofanu zastavuje pohyb RNA-polymerázy.
- ◆ 2. Vlášenska, která se vytvoří spojením obrácených repeticí 3 a 4 za nedostatku tryptofanu v prostředí; její funkce spočívá v tom, že zabraňuje vytváření terminátorové vlásenky. Označuje se jako **preemptor**. Z dalšího textu vyplývá, že preemptor je vlášenska inhibující v primárním transkriptu atenuátoru vytvoření terminátorové vlásenky.
- ◆ 3. Vlášenska vytvořená spojením obrácených repeticí 1 a 2, která umožňuje vznik terminátorové vlásenky za podmínek, že se translace zastaví. Označuje se jako **protektor**. Přesněji řečeno protektor je vlášenska umožňující v primárním transkriptu atenuátoru vytvoření terminátorové vlásenky.

Pro pochopení atenuace je nutno si nejdříve uvědomit bezprostřední sou-



Obr. 187
Schéma atenuace

vislost transkripce s translací, která je pro bakterie charakteristická. To znamená, že transkripční vznikající mRNA se hned, jakmile se začne z DNA odvíjet, pokrývá ribozomy, na nichž se překládá do primární struktury polypeptidu. Při tomto procesu stále probíhá syntéza mRNA, která se RNA-polymerázou u 3'-konce prodlužuje až do zastavení na terminátoru. Terminátor se přepíše do koncové mRNA, v níž se vytvoří vlásenka, která pak zastaví další posun RNA-polymerázy (str. 195). Princip atenuace v podstatě spočívá v tom, že některé operony mají kromě terminátoru, který je na konci transkripční jednotky, ještě další terminátor, který se nachází ve vedoucí sekvenci a slouží k regulaci transkripce. Jak tento způsob "funguje" vysvětlíme konkrétně na operonu, který obsahuje geny pro syntézu tryptofanu (obr. 187).

V případě, že je v buňce nadbytek tryptofanu, vážou se Trp~ tRNA^{Trp} na kodony UGG (dva kodony pro tryptofan), které se nacházejí v atenuátorové sekvenci 1. Jelikož součástí atenuátoru je iniciační kodon, překládá se část vedoucí sekvence do peptidu až po terminační kodon UAG, který je také součástí atenuátoru (velmi důležité pro další pochopení). Na tomto kodonu se zastaví pohyb ribozomu. Průchodem přes atenuátorové sekvence 2 a 3 zabráňuje ribozom v mRNA, aby se vytvořila preemtorová vlásenka, ale může se vytvořit terminátorová vlásenka, na které RNA-polymeráza ukončí transkripci, neboť sekvence 5 a 6 pro její tvorbu jsou k dispozici. To má za následek, že není dále k dispozici mRNA obsahující přepisy genů pro syntézu tryptofanu.

Za nedostatku tryptofanu nemůže translace vedoucí RNA-sekvence do peptidu pokračovat, neboť na kodony UGG se neváže žádná Trp- tRNA^{Trp}. Tyto kodony pak působí jako terminační. Přesněji bychom řekli, že *čím nižší je koncentrace tryptofanu v buňce, tím nižší bude koncentrace molekul Trp-tRNA^{Trp}, a tím bude i ubývat pravděpodobnosti vazby těchto molekul na kodony pro tryptofan* (upozorňujeme, že spotřeba těchto molekul je vysoká, neboť se musí obsadit dva kodony pro tryptofan). Ribozom proto zůstává na atenuátorové sekvenci 1 a 2, což vede k tvorbě preemtorové vlásenky v mRNA. Tato vlásenka brzdí vytvoření terminátorové vlásenky (to proto, že sekvence pro její tvorbu není volná). Proto RNA-polymeráza může pokračovat v transkripci operonu až k terminátoru, kterým končí transkripční jednotka. (Poznámka: Nezapomeňte, že 5'-konec mRNA je za ribozomem a její 3'-konec je před ribozomem po směru transkripce a proto transkripce může pokračovat). Důsledkem tohoto procesu je, že se tvoří mRNA pro syntézu tryptofanu.

Je tedy zřejmé, že při atenuaci je transkripce řízena alternativní tvorbou terminátorové vlásenky ve vedoucí sekvenci mRNA. Tato vlásenka se netvoří za nedostatku tryptofanu, a proto RNA-polymeráza pokračuje v transkripci až do konce, tj. k terminátoru na konci operonu.

Můžeme si také představit, že se translace zastaví uměle, např. tím, že se inhibuje proces vazby aa-tRNA na ribozom. V takovém případě se tvoří protektorová vlásenka (preemtorová se nemůže vytvořit, jelikož části její sekvence

bylo využito pro tvorbu protektorové vlásenky). Tvorba terminátorové vlásenky však není inhibována. Transkripce se zastaví a tryptofan se netvoří.

PROTEINY INDUKOVATELNÉ TEPLEM. Zvýšením teploty ze 30 °C na 42° - 45 °C dochází v *E. coli* k syntéze asi 20 různých proteinů při silně zvýšené rychlosti. Po návratu na výchozí teplotu 30 °C však rychlost syntézy klesne na původní hodnotu. *Proteiny, jejichž syntéza je indukovatelná vyššími teplotami, se označují jako proteiny indukovatelné teplem (zkr. Hsp-proteiny nebo HSP-proteiny).* Příčina této syntézy spočívá ve stupňující se syntéze sigma-faktoru označovaného jako **sigma-32** (σ^{32}), tj. *sigma faktoru o molekul. hmotnosti 32 000.* Tento faktor se váže na molekule RNA-polymerázy na stejné místo jako standardní faktor sigma-70. Pomocí faktoru sigma-32 rozeznává pak RNA-polymeráza promotory pro geny kódující proteiny indukovatelné teplem. Tyto promotory mají jinou sekvenci než promotory, na které se standardně váže **sigma-70.** Z toho důvodu se sigma-70 na ně neváže nebo jen velmi slabě, a jsou tedy pro RNA-polymerázu uváděnou faktorem sigma-70 uzavřeny. Stejně se neváže sigma-32 na standardní promotor. Promotor faktoru sigma-32 má na rozdíl od standardního promotoru na obr. 142 (str. 187) tuto strukturu:

- ◆ sekvence -35: **C C T T G A A,**
- ◆ Pribnowův box: **C A T T T A,**
- ◆ vzdálenost mezi oběma sekvencemi je **13 - 15 bp.**

Zvýšená syntéza faktoru sigma-32 má tyto důsledky:

- ◆ aktivaci genu *rpoH*, který kóduje faktor sigma-32,
- ◆ zvýšení intenzity translace mRNA pro faktor sigma-32.

Jestliže je jen jedna z těchto dvou reakcí zastavena, je reakce na zvýšenou teplotu slabší nebo vůbec chybí. To prakticky znemožní bakteriální buňce přežít při zvýšené teplotě. Jestliže, například vlivem delece genu *rpoH*, chybí úplně faktor sigma-32, jsou tyto zvýšené teploty pro *E. coli* smrtelné.

Faktor sigma-32 však podléhá autoregulaci zpětnou vazbou. Aktivuje totiž geny kódující proteiny indukovatelné teplem, dokud se v buňce nenahromadí do kritického množství. Jakmile je ho dosaženo, váže se protein indukovatelný teplem na sigma-32 a blokuje tak jeho navázání na RNA-polymerázu. To má za následek, že se zastaví syntéza faktoru sigma-32, a tím i příslušného proteinu indukovatelného teplem. Má to i ten důsledek, že se zastaví odbourávání faktoru sigma-32 (obr. 188).

Některé proteiny indukovatelné teplem tvoří podjednotky chaperonů. Jsou to např. proteiny **DnaK (Hsp70), DnaJ a CrpE,** které dohromady tvoří funkční chaperonovou jednotku stimulující sbalování polypeptidů. Podobně

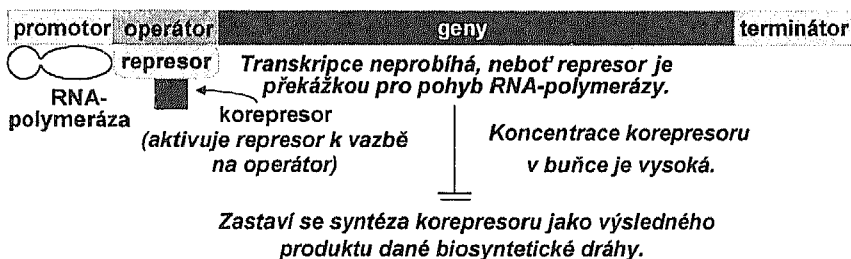
Naproti tomu inaktivní forma represoru se vytvoří takto:

- ◆ a) spojením induktoru s represorem; to vede k zahájení transkripce strukturálních genů operonu (obr. 179);
- ◆ b) uvolněním korepresoru z represoru; to vede též k zahájení transkripce strukturálních genů operonu (obr. 180).

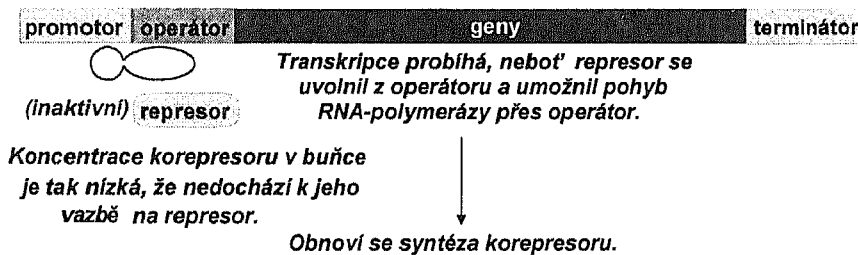
Nyní již můžeme přesněji definovat **induktor**. Je to *negativní alosterický efektor vyvolávající syntézu příslušného indukovatelného enzymu (enzymů)*; jeho spojení s represorem způsobuje, že represor přechází do konformace zabráňující jeho vazbě s operátorem. *Působí jako pozitivní regulátor*, neboť navozuje transkripci operonu. **Korepresor je metabolit dané dráhy působící jako pozitivní alosterický efektor, jehož spojení s represorem způsobuje, že represor přechází do konformace, v níž se může vázat na operátor**. Je však negativním regulátorem, neboť zastavuje transkripci operonu. *Enzymy, jejichž syntéza může být potlačena korepresorem, se označují jako reprimovatelné*.

Operátor se může s promotorem částečně překrývat. V takovém případě vazba represoru na operátor způsobí, že se RNA-polymeráza neváže na promotor (obr. 181). *Nepřekrývá-li se s promotorem, pak vazba represoru na operátor brání pohybu RNA-polymerázy k strukturálním genům operonu* (obr. 180).

SPOJENÍ KOREPRESORU S REPRESOREM

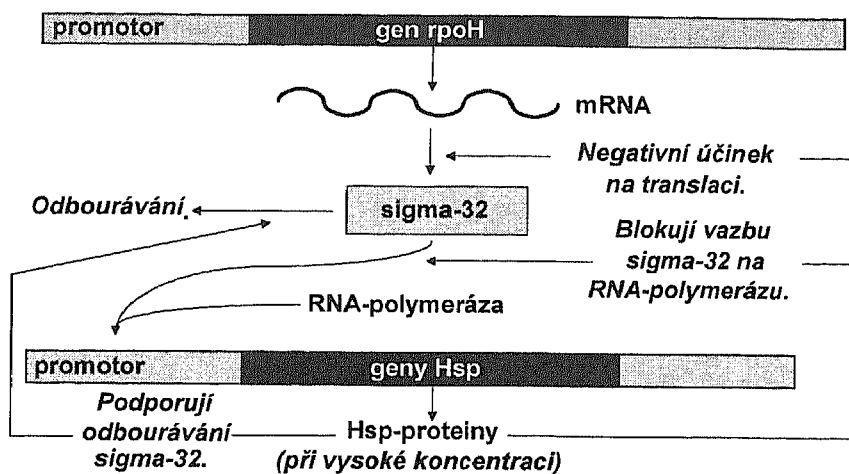


UVOLNĚNÍ KOREPRESORU Z REPRESORU



Obr. 180

Negativní regulace operonu v rámci enzymové represe

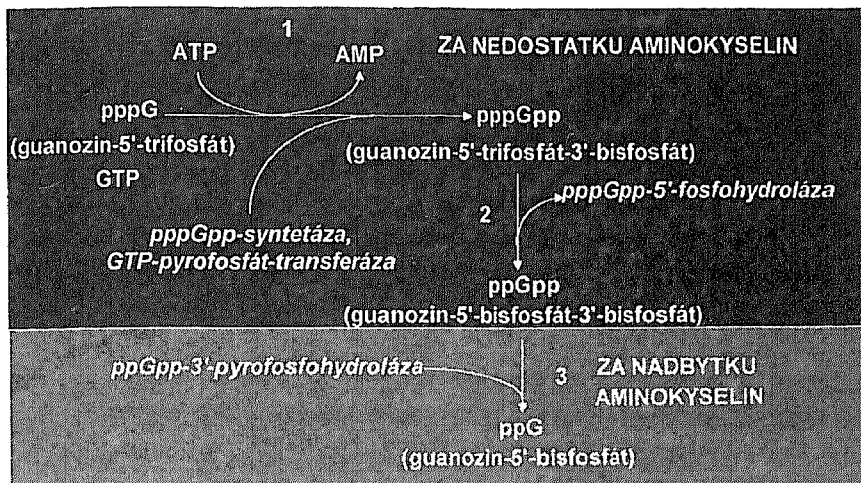


Obr. 188
Autoregulace syntézy faktoru sigma-32

funkční chaperonovou jednotku tvoří proteiny GroEl a GroEs (Hsp10). I tento chaperon podporuje sbalování polypeptidů.

REGULACE EXPRESE GENŮ PRO rRNA A tRNA. Tvorba ribozomů je úzce spjata s rychlostí dělení bakteriální buňky. V rychle rostoucích kulturách bakterií se tvoří mnoho ribozomů, které nakonec tvoří více než jednu třetinu bakteriální hmoty. Se snížením rychlosti dělení se snižuje i rychlost tvorby ribozomů. *Syntéza rRNA a tRNA se vypíná za nedostatku aminokyselin v prostředí, ve kterém se bakterie množí, zatímco syntéza mRNA probíhá dále alespoň částečně.* Tato odpověď na nedostatek aminokyselin se označuje jako **striktní regulace**. Bylo zjištěno, že syntéza rRNA v rámci této regulace závisí na množství ppGpp (guanozin-5'-bisfosfát-3'-bisfosfát). Nadbytkem ppGpp se zastaví syntéza rRNA, kdežto snížením jeho koncentrace se opět navozuje rychlá syntéza rRNA. Je pravděpodobné, že ppGpp působí přímo na RNA-polymerázu, která za jeho přítomnosti ztrácí afinitu k promotoru P1 a k promotoru odpovídajícího genu pro tRNA. ppGpp se syntetizuje takto (obr. 189):

- ◆ 1. Za nedostatku aminokyselin je pppGpp-syntetáza aktivní a přenáší zbytek kys. fosforečné z ATP na 3' OH-skupinu ribózy GTP.
- ◆ 2. Vzniklý pppGpp se pak přeměňuje na ppGpp působením enzymu pppGpp-5'-fosfohydrolázy. To vede k zastavení syntézy rRNA a tRNA.
- ◆ 3. Za nadbytku aminokyselin se ppGpp rychle přeměňuje na ppG (působením ppGpp-3'-pyrofosfohydrolázy). To má za následek obnovení syntézy ribozomové i transferové RNA.



Obr. 189
Syntéza ppGpp

ALTERNATIVNÍ SIGMA-FAKTORY. Seznámili jsme se již s faktorem σ^{70} , který reaguje s promotorem o konvenční sekvenci popsané na obr.142 (str. 187), (viz též str. 190). *Většina promotorů reaguje s RNA-polymerázou obsahující sigma-70.* Existují však sigma-faktory, které reagují na sekvence, jež se poněkud liší od konvenční sekvence boxů kolem nukleotidu -35 a -10. Je to již výše popsáný faktor sigma-32 a kromě tohoto ještě faktory:

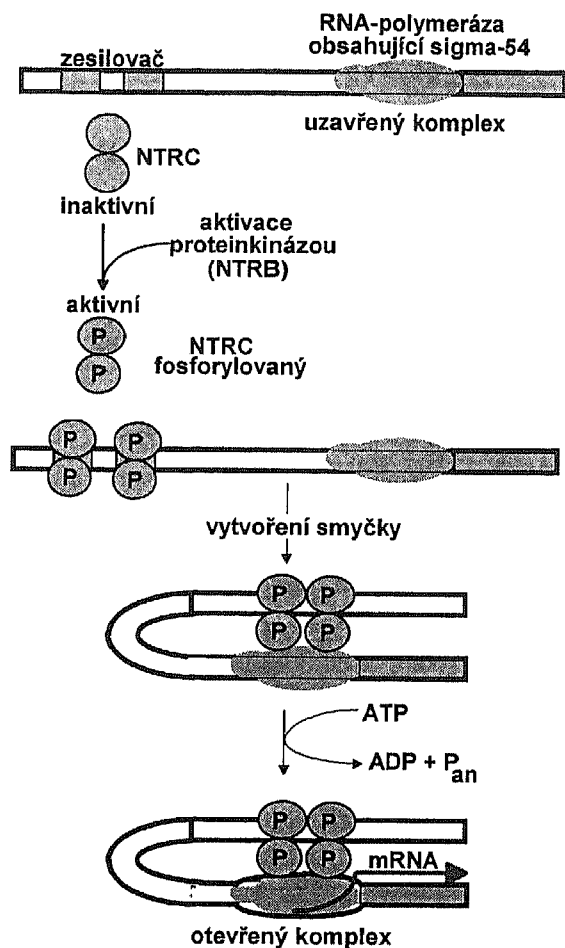
- ◆ **Sigma-28** rozeznávající box -35 se sekvencí C T A A A a Pribnowův box se sekvencí G C C G A T A A. RNA-polymeráza s tímto faktorem přepisuje operony obsahující geny kódující proteiny bičíku.
- ◆ **Sigma-54.** Tento však rozeznává box -35 se sekvencí C T G G N A a Pribnowův box se sekvencí T T G C A. RNA-polymeráza obsahující tento faktor přepisuje operony obsahující geny pro metabolismus dusíku.

Grampozitivní bakterie *Bacillus subtilis* má geny pro několik dodatečných sigma-faktorů, které se vyjadřují ve specifickém sledu v závislosti na průběhu sporulace. Tyto sigma-faktory rozeznávají promotory operonů obsahujících geny, jejichž exprese je požadována v daném časovém intervalu sporulace.

ZESILOVAČE TRANSKRIPCE. Operony, které jsou přepisovány RNA-polymerázou obsahující sigma-54, jsou regulovány aktivátory, které se vážou do místa vzdáleného -80 až 160 bp od startovacího nukleotidu. Dokonce tyto aktivátory aktivují transkripci z míst, která jsou vzdálena až 1 kb od startovací-

ho nukleotidu. Tato místa mají význam **zesilovačů transkripce**. Takto se označují *regulační oblasti, které jsou vzhledem k promotoru v poloze cis (tj. na stejné molekule DNA) a silně zvyšují jeho účinnost*. Zesilovač transkripce může sousedit s promotorem, ale většinou bývá od promotoru vzdálen.

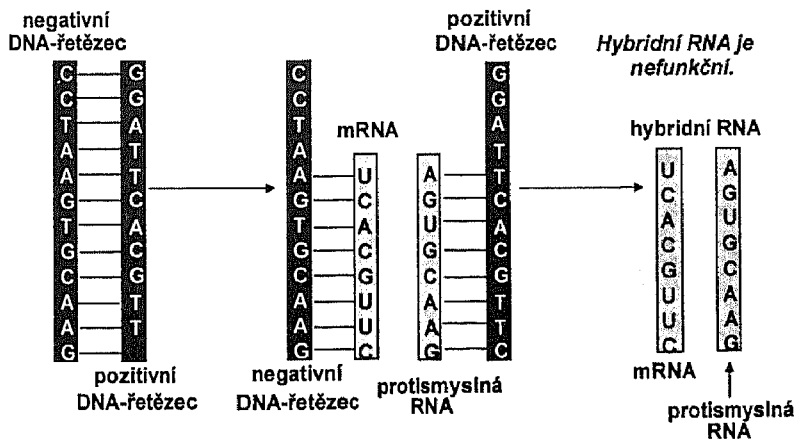
Aktivátor, který se váže na zesilovač transkripce genu *glnA*, což je gen kódující glutaminyntetázu, stimuluje transkripci tohoto genu, která je katalyzována RNA-polymerázou obsahující sigma-54. Aktivátor se nazývá **dusíkový regulační protein C** (používaná zkratka je NTRC). Glutaminyntetáza katalyzuje syntézu glutaminu z kyseliny glutamové a amoniaku. RNA-polymeráza obsahující sigma-54 rozeznává promotor genu *glnA* a před aktivací aktivátorem NTRC vytvoří s promotorem uzavřený komplex. Nemůže však vytvořit otevře-



Obr. 190
Stimulace transkripce aktivátorem NTRC

ný komplex, dokud neobdrží signál od NTRC, který je regulován proteinkinázou (enzym fosforylující protein, viz II. díl) označovanou jako NTRB. V reakcích na nízké koncentrace glutaminu fosforyluje NTRB dimer NTRC, který se váže na dvě místa zesilovače transkripce (obr. 190). Fosforylovaný NTRC vázaný na zesilovač interaguje s RNA-polymerázou za tvorby smyčky v DNA promotoru. RNA - polymeráza je potom stimulována ATPázovou aktivitou NTRC k rozvinutí matricových řetězců za tvorby otevřeného komplexu, což je nutnou podmínkou k zahájení transkripce. Předpokládá se, že energie k rozvinutí DNA-řetězců je dodávána hydrolýzou ATP. To je rozdíl proti RNA-polymeráze obsahující sigma-70, která nevyžaduje k tvorbě otevřeného komplexu hydrolýzu ATP.

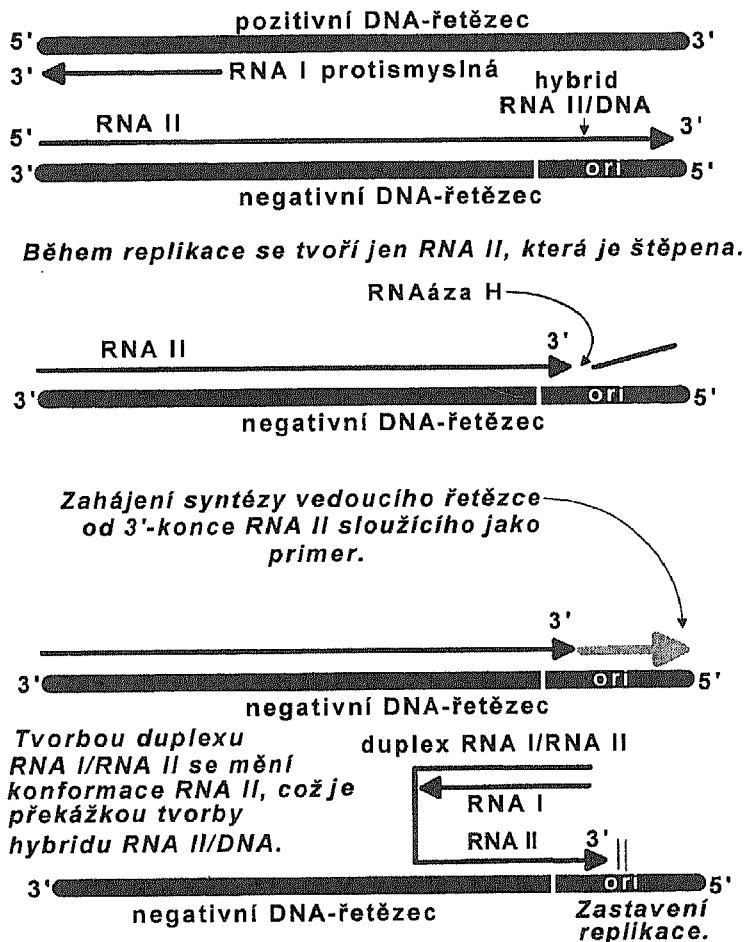
PROTISMYSLNÁ RNA. Obvykle každý RNA-transkript má určitý smysl, který se uplatňuje v jeho funkci, např. jako mRNA, rRNA, tRNA atd. Vyjádření smyslu některých transkriptů u bakterií je zablokováno tím, že se na ně komplementárně naváže jiný RNA-transkript (obr. 191). Takové *RNA-transkripty, které se komplementárně vážou na jiné RNA a tím inhibují (blokují) jejich funkci*, byly nazvány **protismyslné RNA**. Vznik protismyslné RNA si můžeme podle obr. 191 představit tak, že se syntetizuje na pozitivním DNA-řetězci proti RNA, která se tvoří na řetězci negativním. Obě RNA jsou komplementární a proto se spárují za tvorby funkčně neaktivního duplexu. Protismyslná RNA je u bakterií jedním z prostředků regulace produkce RNA-transkriptů některých genů. Např. na transpozonu *E. coli* je gen kódující transponázu, tj. enzym, který katalyzuje transpozici tohoto transpozonu. Mediátorová RNA překládaná do transponázy může být hybridizována RNA, která je vůči ní protismyslná, tj. ob-



Obr. 191
Blokování mRNA protismyslnou RNA

sahuje sekvence, jež se komplementárně vážou k iniciačnímu kodonu a k Shineově-Dalgarnově sekvenci na mRNA pro transpozon. Tím samozřejmě zastaví její translaci. Jelikož promotor, z něhož se přepisuje protismyslná RNA je silnější než promotor, z něhož se přepisuje mRNA pro transponázu, je produkce této mRNA silně omezena. Kdyby tomu tak nebylo, docházelo by k časté transpozici, což by mohlo mít negativní účinek v těch případech, kdy se transpozon umísťuje v aktivním strukturním genu.

Jiný příklad regulace prostřednictvím protismyslné RNA se týká regulace replikace plazmidu ColE1. Tento plazmid se nachází v buňkách *E. coli* ve 20 kopiích. Toto množství kopií je regulováno takto (obr. 192):



Obr. 192

Regulace replikace plazmidu Col E1 protismyslnou RNA

V místě *ori* se nejdříve musí vytvořit RNA-primer pro replikaci. Ten vzniká transkripcí úseku DNA před místem *ori* dlouhého 550 nukleotidů. RNA, která touto transkripcí vzniká, se označuje jako RNA II a prodlužuje se až do celého místa *ori*. Pro pochopení dalšího textu označme vzniklý RNA-transkript vázaný na matricový řetězec v místě *ori* jako hybrid RNA II/DNA. RNA tohoto hybridu podléhá štěpení RNAázou H na specifickém místě u 3'-konce. Takto se připraví RNA-primer s 3'-koncem, od kterého pak začíná syntéza vedoucího řetězce.

Tvorba hybridu RNA II/DNA se zastaví, když se vytvoří RNA I, která je dlouhá 108 nukleotidů a je komplementární ke stejně dlouhému úseku na 5'-konci RNA II. RNA I vzniká transkripcí pozitivního DNA-řetězce, který je protilehlý úseku negativního DNA-řetězce, na němž začíná transkripce RNA II.

RNA I je protismyslná a váže se komplementárně k úseku na 5'-konci RNA II. Vytvoří se tak duplex RNA I/RNA II, kterým se pozmění konformace hybridu RNA II/DNA, a tím i zabrání štěpení RNAázou H. To vede pak k zastavení replikace v místě *ori*. Duplex RNA I/RNA II je ještě stabilizován proteinem Rom. Tím se zvýší účinnost hybridu RNA I/RNA II.

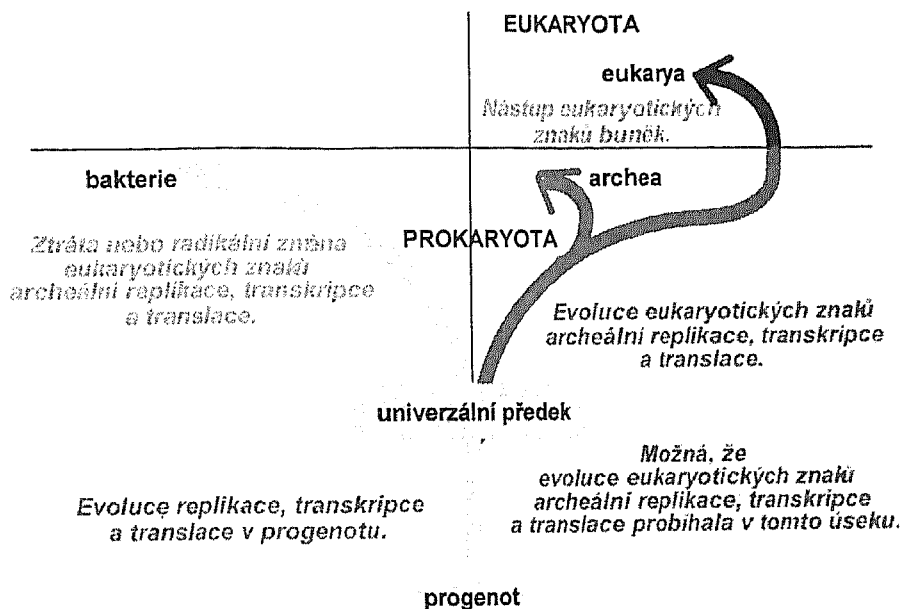
2.6

REPLIKACE, TRANSKRIPCE A TRANSLACE
GENOMU ARCHEÍ

Univerzální fylogenetický strom uvedený na obr. 123 byl zkonstruován na základě srovnávání sekvencí 16S-rRNA u 2 000 různých organismů. Sekvence 16S-rRNA jsou totiž výborným indikátorem evolučních vztahů mezi organismy, neboť tato molekula jako složka ribozomů je důležitým translačním faktorem. Je spjata s evolucí translace a jako taková patří mezi nejstarší biologické makromolekuly. Je funkčně konstantní a vyskytuje se ve všech organismech (u eukaryot jí odpovídá 18S-rRNA). Vyznačuje se konzervativními sekvencemi na všech stupních evoluce. Ale jelikož počet různých sekvencí tak velké molekuly, jako je rRNA, je vysoký (1 500 nukleotidů), podobnost mezi dvěma srovnávanými sekvencemi vždy ukazuje na jejich fylogenetickou příbuznost. Podobné sekvence ukazují na společný původ neboli kořen srovnávaných organismů. Na druhé straně rozdílné sekvence rozdělily srovnávané organismy do tří domén (bakterie, archea a eukarya).

Pro pochopení dalšího textu doplníme obr. 123 schématem na obr. 193. Vertikální část souřadnic na tomto obrázku vyjadřuje oddělení evoluční linie bakterií od evoluční linie směřující k archeím a eukaryím. Horizontální část představuje rozdělení na prokaryota a eukaryota. Toto rozdělení je cytologické, jelikož je především založeno na struktuře buňky. *Poslední společný předek všech živých organismů* se označuje jako **univerzální předek (předchůdce)**. Jemu předcházela hypotetický (logicky nutný) prapředek, označovaný jako **progenot**, charakteristický *rychlými a základními evolučními změnami v replikaci, transkripci a translaci*. Evoluce transkripce a translace probíhala až do vzniku univerzálního předka. Do té doby se již vyvinula DNA s pořadím genů seskupených do operonů, jak je známe u bakterií v současné době. Eukaryotické znaky replikace, transkripce a translace u archeí vznikaly buď v průběhu evoluce od univerzálního předka k době divergence na archea a eukarya, nebo během evoluce od progenota k univerzálnímu předku a v bakteriích pak vymizely nebo se zásadně změnily. Rozlišení ve znacích buněčné struktury, o které se opíráme při klasifikaci organismů na prokaryota a eukaryota, se objevilo až v pozdější době evoluce eukaryí (nad horizontální částí souřadnic obr. 193).

Rozdělení organismů na prokaryota a eukaryota spočívá na jejich fenotypu (především na typu buněk), kdežto jejich klasifikace na bakterie, archea a eukarya se zakládá na jejich evoluci od univerzálního předka. Proto v této souvislosti nevádí, zopakujeme-li znovu, že *názvy bakterie (Bacteria), archea (Archaea) a eukarya (Eucarya) jsou názvy domén v systému organismů, kdežto termíny prokaryota a eukaryota jsou cytologické a vztahují se k typu buněk*. Avšak na základě molekulárně biologických vlastností jsou archea evolučně



Obr. 193
Doplňkový výklad univerzálního fylogenetického stromu
znázorněného na obr. 123

blíže k eukaryím. (Poznámka: Termíny "eukarya" a "eukaryota" budeme často zaměňovat podle kontextu. Avšak k nedorozumění nemůže dojít, neboť *všechny organismy s eukaryotickým typem buněk se zahrnují do domény Eucarya*). Ve kterých molekulárně biologických aspektech se prokaryotické organismy podobají bakteriím a ve kterých eukaryotickým organismům, se zabýváme v této kapitole. (Poznámka: Jelikož v následujících kapitolách se operuje pojmy a znalostmi týkajícími se eukaryotické replikace, transkripce a translace, které zde nevysvětlujeme, doporučujeme, aby se čtenář k těmto kapitolám ještě vrátil po prostudování druhého dílu této učebnice, kde je eukaryotická replikace, transkripce a translace vyložena).

2.6.1

Genom archeí a jeho replikace

ARCHEÁLNÍ NUKLEOZOMY. Strukturálně se genom archeí podobá bakteriálnímu. Sestává z chromozomu a plazmidů (u některých druhů). Chromozom je kružnicový a proti cytoplazmě není ohraničený membránou. *Buňky*

archeí jsou tedy prokaryotického typu (str. 153 - 154). Geny na tomto genomu jsou organizovány do operonů. V některých operonech je pořadí genů stejné jako u bakterií a muselo existovat už v době, kdy univerzální předek divergoval na bakteriální a archeální evoluční linii. Ačkoli archea nemají jadernou membránu, obsahují histony, které kondenzují jejich chromozomovou DNA do struktur podobných nukleozomům. Je známo, že histony, z nichž jsou složeny nukleozomy eukaryotických buněk, se nevyskytují jako monomery, ale jako heterodimery (H2A + H2B) a (H3 + H4), kde uvedenými symboly jsou označeny jednotlivé histony ve stavu monomerů. Na rozdíl od toho *archeální histony tvoří homodimery i heterodimery* a jelikož poměr těchto dimerů se *in vivo* mění v závislosti na podmínkách růstu, lze předpokládat, že *homodimery a heterodimery přispívají různě ke kondenzaci DNA*.

U některých druhů archeí byly identifikovány geny kódující histony. Bylo zjištěno, že *Methanothermus fervidus* má dva geny kódující histony, *Methanobacterium thermoautotrophicum* a *Methanobacterium formicum* tři, *Methanococcus jannaschii* pět, z nichž dva jsou umístěny na plazmidu. *Střed archeálních nukleozomů je tvořen podobně jako v eukaryotickém typu buněk histonovým tetramerem (H3 + H4)₂*.

DNA - POLYMERÁZY A OSTATNÍ REPLIKAČNÍ PROTEINY. Abychom pochopili zařazení DNA-polymeráz archeí v celkovém systému DNA-polymeráz, je třeba zmínit se o klasifikaci DNA-polymeráz. Tyto polymerázy se klasifikují na základě strukturální podobnosti do tří rodin:

- ◆ **1. Rodina A.** Sem patří bakteriální DNA-polymeráza I a DNA-polymeráza γ mitochondrií kvasinek.
- ◆ **2. Rodina B.** Tato rodina zahrnuje DNA-polymerázy vyšších eukaryí, DNA-polymerázy I, II a III kvasinek, bakteriální DNA-polymerázu II a archeální DNA-polymerázy.
- ◆ **3. Rodina C.** Zahrnuje bakteriální DNA-polymerázu III.

Všechny dosud studované DNA-polymerázy archeí jsou podobné eukaryotickým a patří do rodiny B. Co se týče eukaryotických a archeálních replikačních proteinů, lze celkově říci, že (tab. 13):

- ◆ *Všechny eukaryotické a archeální replikační proteiny se vyznačují podobností v primární struktuře.*
- ◆ *Žádný bakteriální replikační protein se nepodobá v primární struktuře ani eukaryotickým ani archeálním replikačním proteinům s výjimkou těch, které jsou v tab. 13 vysázeny polotučně.*
- ◆ *Mnohé bakteriální, eukaryální a archeální replikační proteiny plní při replikaci stejné funkce, ačkoli se v primární struktuře nelyžnačují podobností.*

Tab. 13
Podobnosti v primární struktuře replikačních proteinů
bakterií, archeí a eukaryí

Bakterie	Eukarya	Archea
DnaA-proteiny	ORC-proteiny 1 - 6 <i>Jsou to proteiny rozeznávající počátek replikace.</i>	Protein podobný ORC-proteinu. <i>Je kódovaný plazmidem.</i>
SSB-proteiny	RPA-protein; 3 podjednotky	?
DnaG-protein (primáza)	DNA-polymeráza α ; rodina B	DNA-polymeráza rodiny B <i>Mnoho specificky archeálních sekvencí.</i>
γ -komplex	RFC-komplex homologický s γ -komplexem	Archeální protein RFC-1 a protein RFC-3
β -svorka	PCNA-protein	Archeální PCNA-protein
DNA-polymeráza III (katalytické jádro) <i>Je to DNA-polymeráza rodiny C.</i>	DNA-polymeráza α , ϵ , δ <i>Jsou to DNA-polymerázy rodiny B.</i>	DNA-polymeráza rodiny B <i>Mnoho specificky archeálních sekvencí.</i>
DNA-ligáza (NAD-dependentní)	DNA-ligáza (ATP-dependentní)	DNA-ligáza (ATP-dependentní).
DNA-polymeráza I (DNA-polymeráza rodiny A)	Ribonukleáza H	Ribonukleáza H
<p><i>Proteiny uvedené ve stejném řádku tabulky mají stejnou funkci v replikaci DNA. Polotučné vysázení názvů replikačních proteinů znamená, že tyto proteiny se vyznačují nejen stejnou funkcí, ale i vzájemnou homologií v primární struktuře.</i></p>		

Poněkud překvapuje, že replikační proteiny bakterií vzhledem k archeím a eukaryotům se nevyznačují podobností v primární struktuře. Tuto skutečnost

lze zatím hypoteticky vyložit následujícími alternativními (vzájemně se nevylučujícími) možnostmi:

- ◆ 1. Většina replikačních proteinů plnicích v univerzálním předku určité funkce při replikaci se během evoluce v jednotlivých liniích postupně měnila, až přestala být navzájem homologická.
- ◆ 2. Univerzální předek se vyznačoval replikačním mechanismem jak bakteriálního, tak i archeálního-eukaryotického typu. Různé složky tohoto systému se však v bakteriální a archeální-eukaryotické evoluční linii po divergenci těchto linií ztratily.
- ◆ 3. Do jedné nebo druhé linie mohly být zahrnuty nové (nehomologické) proteiny a nahradit složky z univerzálního předka.

2.6.2

Archeální RNA-polymerázy a iniciace transkripce

ARCHEÁLNÍ RNA-POLYMERÁZY. Archeální RNA-polymerázy obsahují 8 až 13 protomerů, které se více podobají v primární struktuře eukaryálním RNA-polymerázám než bakteriálním. Není zde zachována sestava $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ typická pro bakterie. *TATA-box* byl prokázán u nukleotidu -27, což je značná podobnost s eukaryoty. Neexistuje však zatím důkaz pro typy struktur promotoru specifické pro transkripci do rRNA a tRNA, jak je tomu u eukaryot.

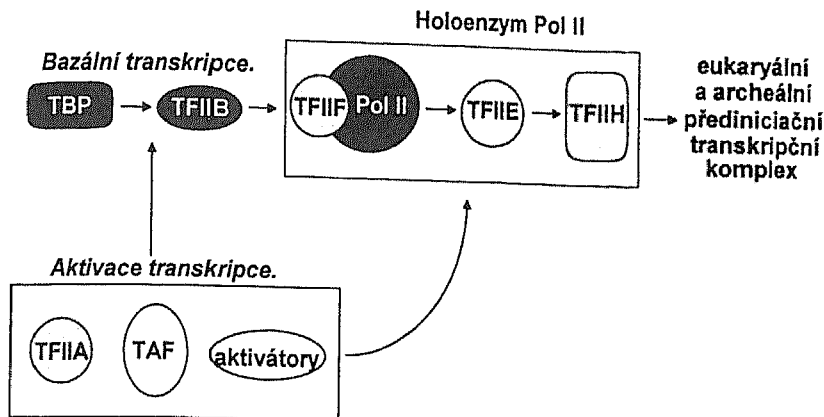
TRANSKRIPČNÍ FAKTORY. Archea obsahují homology eukaryotických transkripčních faktorů **TBP** a **TFIIB**. (Poznámka: TBP-protein je složkou transkripčního faktoru TFIID v eukaryotických buňkách, viz II. díl). Tyto faktory za spolupůsobení RNA-polymerázy navozují a řídí u archeí bazální iniciaci transkripce a pravděpodobně tvorbu přediniciačního komplexu, která je znázorněna na obr. 194.

Využívání TBP archeální RNA-polymerázou a všemi třemi eukaryotickými RNA-polymerázami ukazuje na to, že tento protein je evolučně nejstarší transkripční faktor. *Musel existovat již v předku, z něhož divergovala archeální a eukaryální evoluční linie.*

2.6.3

Archeální translace

Archea využívají, podobně jako bakterie, Shineovu-Dalgarnovu sekvenci



Černé zbarvení = transkripční faktory vyskytující se v archeích a eukaryích.
 Šedé zbarvení = transkripční faktory vyskytující se jen v eukaryích.
 Bílé zbarvení = pravděpodobný výskyt.

Obr. 194

Srovnání tvorby transkripčního přediniciačního komplexu u archeí a eukaryí

k identifikaci iniciačního kodonu AUG. Pozoruhodné však je, že iniciační faktory používané archeí jsou v primární struktuře homologické s těmi eukaryotickými iniciačními faktory, které řídí proces vyhledávání iniciačního kodonu na 40S-ribosomové podjednotce eukaryot.

U *M. jannaschii* bylo identifikováno 11 genů kódujících 11 iniciačních faktorů, z nichž 10 je v primární struktuře homologických s eukaryotickými iniciačními faktory. Označení těchto genů v sekvencovaném genomu tohoto archea a označení eukaryotických iniciačních faktorů, s nimiž jsou iniciační faktory kódované geny *M. jannaschii* homologické, je uvedeno v tab. 14. V téže tabulce je uvedena v analogii s příslušným eukaryotickým iniciačním faktorem předpokládaná funkce archeálního iniciačního faktoru.

Co se týče elongačních faktorů, jak ukazuje analýza sekvencí *M. jannaschii*, mají archea tři:

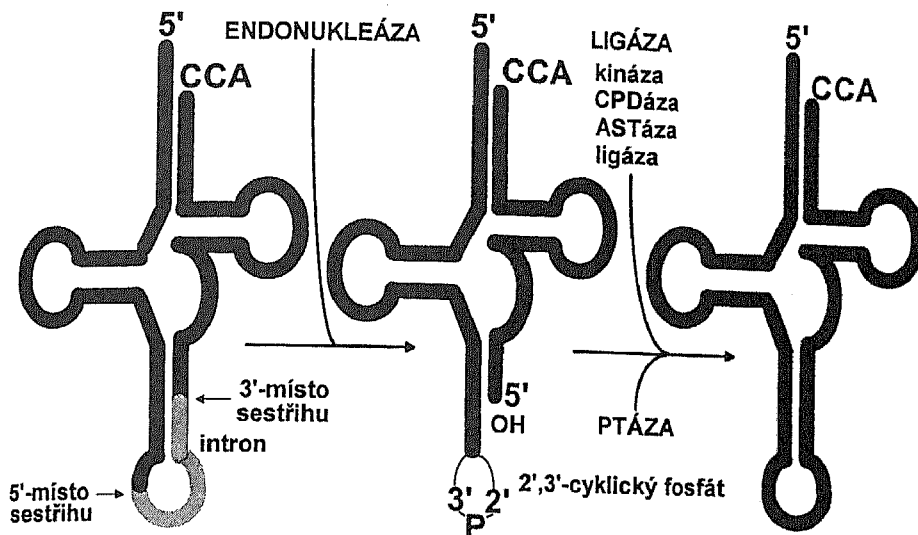
- ♦ **1. Elongační faktor EF-1 α** , který je podobný eukaryálnímu elongačnímu faktoru EF-1a. Tento faktor zodpovídá za umístění aa-tRNA do A-místa na ribozomu.
- ♦ **2. Elongační faktor EF-2**, který je také podobný eukaryálnímu. Katalyzuje translokaci ribozomu během elongace polypeptidového řetězce.
- ♦ **3. Elongační faktor EF-Tu**. Umísťuje selenocysteinyl-tRNA^{Sec} do aminoacylového místa ribozomu a vkládá na kodon UGA selenocystein (str. 227).

Tab. 14

Translační iniciační faktory kódované geny *M. jannaschii* homologické s eukaryotickými

Označení genu kódujícího translační iniciační faktor	Homologický translační iniciační faktor eukaryotických buněk	Předpokládaná funkce
O445	eIF1A	<i>Zabraňuje spojení malé ribozomové podjednotky s velkou tím, že se váže na malou podjednotku.</i>
O117	eIF2 (α -podjednotka)	<i>Tvoří ternární komplex s Met-tRNA^{Met}.</i>
O097	eIF2 (β -podjednotka)	
1261	eIF2 (γ -podjednotka)	
1574	eIF4A	Aktivita RNA-helikázy závislé na ATP.
1505	eIF4A	"
O669	eIF4A	"
1228	eIF5	<i>Stimuluje hydrolyzu GTP na faktoru eIF2, když už je iniciační kodon správně zařazen.</i>
O454	eIF2B α -podjednotka	Vyměňuje GDP za GTP.
O122	eIF2B δ -podjednotka	
O262	IF2 (bakteriální)	<i>Tvoří ternární komplex s fMet-tRNA^{fMet} a GTP.</i>

Archea obsahují všechny molekulární druhy tRNA. U *M. jannaschii* bylo však zjištěno, že obsahuje pouze 16 z 20 aminoacyl-tRNA-syntetáz. Chybějí syntetázy pro asparagin, cystein, glutamin a lyzin. Tvorba *Gln-tRNA^{Gln}* a *Asn-tRNA^{Asn}* probíhá v halofilních archeích po aminoacylaci *tRNA^{Gln}* a *tRNA^{Asn}* na *Glu-tRNA^{Gln}* a *Asp-tRNA^{Asn}*, která je katalyzována glutamyl-tRNA-syntetázou a asparagyl-tRNA-syntetázou. Potom následuje konverze glutamové



Obr. 195

Schéma sestřihu intronu v tRNA archeí

kys. na glutamin a asparagové kyseliny na asparagin. Pravděpodobně stejným způsobem probíhá tvorba *Cys-tRNA^{Cys}*. Při tomto způsobu je *tRNA^{Cys}* nejdříve aminoacylována seryl-*tRNA*-syntetázou na seryl-*tRNA^{Cys}* a seryl je pak modifikován na cysteyl. Tvorba *Lys-tRNA^{Lys}* není jasná.

Ke čtení genetického kódu používají halobakterie, které představují velmi významnou skupinu archeí, celkem 40 molekulárních druhů tRNA lišících se antikodony (tab. 15).

Archea obsahují také malé množství selenoproteinů. Zařazení selenocysteinu do proteinu se děje stejně jako na str. 227, 231, 232.

2.6.4

Sestřih tRNA u archeí

ARCHEÁLNÍ INTRONY. V archeích se nevyskytují introny ani první ani druhé skupiny, které budou popsány v druhém díle této učebnice. Archeální primární transkripty strukturálních genů také neobsahují introny. Na druhé straně byly však u archeí popsány introny v 16S a 23S rRNA, a také v tRNA. Tyto introny se v určitém směru až překvapivě podobají intronům tRNA, která se tvoří v jádře eukaryot (viz též II. díl). Jsou obecně krátké (14 až 106 nukleotidů) a většinou se vyskytují na stejném místě tRNA jako u eukaryot, což naznačuje, že mají společný původ.

Tab. 15
Antikodony tRNA používané ke čtení genetického kódu v ribozomech halobakterií (archea)

aminokyselina kodon (5'XXX3')	aminokyselina antikodon (5'XXX3')	aminokyselina kodon (5'XXX3')	aminokyselina antikodon (5'XXX3')	aminokyselina kodon (5'XXX3')	aminokyselina antikodon (5'XXX3')
Phe (UUU)	GAA	Ser (UCU)	GGA	Tyr (UAU)	GUA
Phe (UUC)		Ser (UCC)		Tyr (UAC)	
Leu (UUA)	UAA	Ser (UCA)		Trm (UAA)	0
Leu (UUG)	CAA	Ser (UCG)	CGA	Trm (UAG)	0
Leu (CUU)	GAG	Pro (CCU)	GGG	His (CAU)	GUG
Leu (CUC)		Pro (CCC)		His (CAC)	
Leu (CUA)	UAG	Pro (CCA)	UGG	Gln (CAA)	
Leu (CUG)	NAG	Pro (CCG)	CGG	Gln (CAG)	CUG
Ile (AUU)	GAU	Thr (ACU)	GGU	Asn (AAU)	GUU
Ile (AUC)		Thr (ACC)		Asn (AAC)	
Ile (AUA)	NAU	Thr (ACA)		Lys (AAA)	UUU
Met (AUG)	CAU	Thr (ACG)	CGU	Lys (AAG)	CUU
Val (GUU)	GAC	Ala (GCU)	GGC	Asp (GAU)	
Val (GUC)		Ala (GCC)		Asp (GAC)	GUC
Val (GUA)		Ala (GCA)	UGC	Glu (GAA)	UUC
Val (GUG)	CAC	Ala (GCG)	CGC	Glu (GAG)	CUC
				Gly (GGU)	GCC
				Gly (GGC)	
				Gly (GGA)	UCC
				Gly (GGG)	CCC

SESTŘIH ARCHEÁLNÍCH INTRONŮ. Sestřih archeálních intronů tRNA probíhá podobně jako u eukaryot. Ve druhém díle je mechanismus tohoto sestřihu podrobně vyložen. Endonukleázou jsou štěpena místa sestřihu za vzniku **konců 5'-OH a 2, 3-cyklického fosfátu**. Vzniklé molekuly tRNA jsou pak upravovány ligázou, která se vyznačuje těmito čtyřmi aktivitami (obr. 195):

- ◆ **kinázovou**, kterou se fosforyluje 5'-OH konec za využití GTP;
- ◆ **cyklickofosfodiesterázovou (CPDáza)**, kterou se otevírá 2',3'-cyklický fosfát dávající vznik 2'-fosfátu;
- ◆ **adenylátsyntetázovou (ASTáza)**, kterou se adenyluje 3'-konec tRNA a aktivuje ligáza za využití ATP;
- ◆ **ligázovou**, kterou se spojí oba konce molekuly tRNA;
- ◆ **2'-fosfotransferázovou (PTáza)**, kterou se odstraní 2'-fosfát ve spojení sestřihu za vzniku vazby 3'-5'.

ARCHEÁLNÍ ENDONUKLEÁZA SESTŘIHU. Liší se svou sestavou od kvasinkové v těchto směrech:

Je homodimerem z podjednotek o molekulové hmotnosti

37 000,

zatímco endonukleáza kvasinek je heterodimer podjednotek o molekul. hmotnosti

54 000, 44 000, 34 000 a 15 000.

Jedna podjednotka homodimeru archeální endonukleázy štěpí 5'-místo sestřihu, druhá 3'-místo.

2.6.5

Závěr

Závěrem o fylogenetických vztazích bakterie - archea - eukarya lze říci:

- ◆ 1. Archeální replikace a transkripce má mnohem více společného s eukaryotickou replikací a transkripcí než s bakteriální.
- ◆ 2. Sestřih intronů v tRNA archeí je velmi podobný a lze říci příbuzný se sestřihem intronů v eukaryotické tRNA.
- ◆ 3. Translace archeí se vyznačuje jak prvky bakteriální translace, tak i prvky translace eukaryotické.
- ◆ 4. Metabolismus archeí je mnohem příbuznější (samozřejmě i podobnější) metabolismu bakterií než metabolismu eukaryot.

- ◆ 5. Genom archeí a struktura buněk jsou prokaryotického typu.
- ◆ 6. Z evolučního hlediska archea divergovala z univerzálního předka do evoluční linie směřující k evoluci eukaryot. Ze společného předka si zachovala prokaryotický typ buňky. Prvky replikace, transkripce a translace charakteristické pro eukaryota získávala archea pravděpodobně ještě před divergencí této evoluční linie na archeální a eukaryální. Mohly však být již přítomny v univerzálním předku.

4

TERMINOLOGICKÝ REJSTŘÍK

4.1

ČESKO-ANGLICKÝ

Rejstřík obsahuje odborné termíny (většinou z oboru molekulární biologie), které byly použity v textu tohoto dílu učebnice. Jsou vysázeny polotučným písmem jako hesla rejstříku. Za termínem ve stejném řádku následují jeho synonyma (případně zkratky termínů), která jsou vysázena obyčejným písmem. V závorce za každým českým termínem jsou uvedeny jeho anglické ekvivalenty.

V rejstříku se odkazuje jen na stránky (čísla za závorkami), kde jsou hledané termíny definovány nebo podrobněji vyloženy. Na těchto stránkách jsou polotučně vysázeny. Velmi snadno též zjistíte, se kterým termínem je synonymní termín, který jste četli v nějakém článku. Příklad: V literatuře jste našli termín "nukleoid". V rejstříku zjistíte, že tento termín je synonymní s termínem "prokaryotické jádro". Pod heslem "jádro prokaryotické" pak naleznete odkaz na str. 154 a 157, kde je tento termín definován a vysvětlen a současně se seznámíte i s jeho anglickými ekvivalenty.

V rejstříku jsou termíny seřazeny abecedně podle substantiv (v jednotném čísle, pokud nebylo nutné použít čísla množného). Je-li substantivum specifikováno přívlástkem, pak přívlástek následuje vždy za substantivem, a to nejdříve přívlástek neshodný a teprve po něm přívlástek shodný. Před každým termínem je uvedeno jeho pořadové číslo, čehož důvod je vysvětlen na str. 291.

Je třeba upozornit na to, že zde použité české termíny nejsou vždy přesným překladem termínů anglických. Týká se to obvykle případů, kdy doslovný překlad by působil v češtině nepřirozeně.

A

1. aa~AMP = aminoacyladenylát
2. aa~tRNA = aminoacyl~tRNA
3. aa~tRNA-syntetáza = aminoacyl~tRNA-syntetáza
4. acetylace (acetylation) 19, 20
5. adenin (adenine) 50
6. adenzin (adenosine) 51
7. A-DNA = DNA-konformace A
8. aktivace aminokyselin (amino acid activation, activation of amino acids) 201, 206
9. aktivátor enzymu alosterický (allosteric activator of enzyme) 37
10. aktivátor transkripce (transcription activator, activator of transcription) 237
11. alanin (alanine) 14, 15, 17, 18
12. alela (allele) 150
13. alela dominantní (dominant allele) 150
14. alela recesivní (recessive allele) 150
15. alela standardní (wild allele) 150
16. alolaktóza (allolactose) 242

17. **amfolyt** = amfoterní látka
18. **aminoacyladenylát**, aa~AMP (aminoacyl adenylate, aa~AMP) 207
19. **aminoacyl-tRNA**, aa~tRNA (aminoacyl~tRNA, aa~tRNA) 201, 207
20. **aminoacyl-tRNA-syntetáza**, aa~tRNA-syntetáza (aminoacyl~tRNA synthetase, aa~tRNA-synthetase) 201, 207, 209
21. **aminoacyl-tRNA-syntetázy 1. třídy** (class I aminoacyl~tRNA synthetases) 212
22. **aminoacyl-tRNA-syntetázy 2. třídy** (class II aminoacyl~tRNA synthetases) 217
23. **aminokyselina chirální** = opticky aktivní aminokyselina
24. **aminokyselina kódovaná** = aminokyselina standardní
25. **aminokyselina opticky aktivní**, chirální aminokyselina (amino acid optically active, chiral amino acid) 13
26. **aminokyselina standardní**, kódovaná aminokyselina (standard amino acid, coded amino acid) 12, 13, 14
27. **aminopeptidáza** (aminopeptidase) 220
28. **A-místo** = aminoacylové místo
29. **antikodon** (anticodon) 129
30. **antiparalelizmus** (antiparallelism, antiparallel orientation) 67
31. **apoenzym** (apoenzyme) 36
32. **arginin** (arginine) 16, 17, 18
33. **Archaea**, Archaeobacteria (Archaea, Archaeobacteria) 154
34. **Archaeobacteria** = Archaea
35. **archea**, archebakterie (archaea, archaeobacteria) 154, 256
36. **Archaeobacteria** (Archaeobacteria) 154
37. **archebakterie** = archea
38. **asparagin** (asparagine) 15, 17, 18
39. **atenuace** (attenuation) 246
40. **atenuátor** (attenuator) 246

B

41. **Bacteria**, Eubacteria (Bacteria, Eubacteria) 154
42. **bakterie**, eubakterie (bacteria, eubacteria) 154
43. **báze** (base) 50
44. **báze purinové** (purine bases) 50
45. **báze pyrimidinové** (pyrimidine bases) 50
46. **B-DNA** = DNA-konformace B
47. **bílkovina** = protein
48. **biokatalyzátor** (biocatalyst, biocatalyzer) 124
49. **biologie molekulární** (molecular biology) 8
50. **biomakromolekula** = biologická makromolekula
51. **biopolymer** (biopolymer) 11
52. **biopolymer nascentní** (nascent biopolymer) 162
53. **bod izoelektrický** (isoelectric point) 13
54. **box** (box) 188
55. **box Pribnowův** (Pribnow box) 187
56. **buňka donorová** (donor cell) 159
57. **buňka recipientní** (recipient cell) 159
58. **bZIP leucinový** (leucine zipper, leucine bZIP) 120

C

59. **CAP** = katabolický aktivační protein

60. CCC = kovalentně uzavřená kružnice
61. centrum enzymu aktivní = aktivní místo enzymu
62. cis-konfigurace páru bází (cis-configuration of base pairs) 59
63. cis-konfigurace vazby peptidové (cis-configuration of peptide bond, cis-configuration of peptide linkage) 23
64. C-konec polypeptidu (polypeptide C-terminus) 19
65. cystein (cysteine) 16, 17, 18
66. cytidin (cytidine) 51
67. cytozin (cytosine) 50

Č

68. četnost repetice (repetition frequency) 102
69. číslo dvoušroubovicové (twisting number) 97
70. číslo nadšroubovicové (writhing number) 97
71. číslo vinutí celkové (linking number) 97
72. čtení kódu genetického (reading of the genetic code) 129

D

73. D-aminokyselina (D-amino acid) 13, 14
74. deformyláza (deformylase) 220, 233
75. degenerace kódu genetického (degeneracy of the genetic code) 130
76. délka repetice (repeat length) 102
77. denaturace DNA (DNA denaturation) 86
78. denaturace makromolekuly informační (denaturation of informational macromolecule) 32
79. denaturace proteinu (protein denaturation) 32
80. deoxyadenozin (deoxyadenosine) 51
81. deoxycytidin (deoxycytidine) 51
82. deoxyguanozin (deoxyguanosine) 51
83. deoxyribonukleotid (deoxyribonucleotide) 51
84. deoxyribonukleozid (deoxyribonucleoside) 51
85. deoxyribóza (deoxyribose) 49, 51
86. deoxytymidin (deoxythymidine) 51
87. DHU-rameno = dihydrouridinové rameno se smýčkou
88. DHU-smyčka = dihydrouridinová smyčka
89. dihydrouridin (dihydrouridine) 202
90. DNA = deoxyribonukleová kyselina
91. DnaA-protein (DnaA protein) 170
92. DnaB-protein (DnaB protein) 167, 170, 173
93. DnaC-protein (DnaC protein) 171
94. DNA čtyřřetězcová = čtyřřetězcová deoxyribonukleová kyselina
95. DNA-dependentní RNA-polymeráza EC 2.7.7.6 = RNA-polymeráza
96. DNA-dependentní RNA-polymeráza EC 2.7.7. = DNA-primáza
97. DNA-dvoušroubovice (DNA double helix, duplex DNA) 66
98. DNA-dvoušroubovice levotočivá (left-handed double helix) 70
99. DNA-dvoušroubovice pravotočivá (right-handed double helix) 70
100. DnaG-protein (DnaG protein) 173
101. DNA-gyráza (DNA gyrase) 101, 167
102. DNA-helikázy (DNA helicases) 167
103. DNA hybridní = hybridní molekula DNA
104. DNA-konformace A, A-DNA (A-DNA conformation, A-DNA) 78, 79

105. **DNA-konformace B**, B-DNA (B-DNA conformation, B-DNA) 78, 79
106. **DNA-konformace Z**, Z-DNA (Z-DNA conformation, Z-DNA) 78, 79, 85
107. **DNA-kvadruplex** = čtyřřetězcová deoxyribonukleová kyselina
108. **DNA-ligáza**, polydeoxyribonukleotidsyntetáza (DNA ligase, polydeoxyribonukleotide syntetase) 167
109. **DNA-ligáza (ATP)** (DNA ligase (ATP)) 167
110. **DNA-ligáza (NAD⁺)** (DNA ligase (NAD⁺)) 167
111. **DNA ohnutá** = ohnutá deoxyribonukleová kyselina
112. **DNA-polymeráza I**, Kornbergův enzym (DNA polymerase I, Kornberg enzyme) 163
113. **DNA-polymeráza II** (DNA polymerase II) 165
114. **DNA-polymeráza III** (DNA polymerase III) 165
115. **DNA-polymerázy**, DNA-řízené DNA-polymerázy EC 2.7.7.7, nukleotidyltransferázy řízené DNA, DNA-dependentní DNA-polymerázy (DNA-directed DNA polymerases EC 2.7.7.7, DNA-directed nucleotidyltransferases, DNA-dependent DNA polymerases) 163
116. **DNA-polymerázy DNA-dependentní** = DNA-polymerázy
117. **DNA-polymerázy DNA-řízené EC 2.7.7.7** = DNA-polymerázy
118. **DNA-primáza**, DNA-řízená RNA-polymeráza EC 2.7.7.-, DNA-dependentní RNA-polymeráza EC 2.7.7.-, DNA-řízená RNA-nukleotidyltransferáza EC 2.7.7.- (DNA primase, DNA-directed RNA polymerase EC 2.7.7.-, DNA-dependent RNA polymerase EC 2.7.7.-, DNA-directed RNA nucleotidyltransferase EC 2.7.7.-) 167
119. **DNA-primer** (DNA primer) 163
120. **DNA relaxovaná** (relaxed DNA) 94
121. **DNA-řetězce antiparalelní** (antiparallel DNA strands) 66
122. **DNA-řetězce komplementární** (complementary DNA strands) 66
123. **DNA-řetězec** = polydeoxyribonukleotid
124. **DNA-řetězec antikódující** = negativní DNA-řetězec
125. **DNA-řetězec kódující** = pozitivní DNA-řetězec
126. **DNA-řetězec negativní**, DNA-řetězec antikódující (minus DNA strand, anticoding DNA-strand) 146
127. **DNA-řetězec opožďující se** (lagging DNA strand) 168
128. **DNA-řetězec pozitivní**, kódující DNA-řetězec (plus DNA strand, coding DNA strand) 146
129. **DNA-řetězec vedoucí** (leading DNA strand) 168
130. **DNA-řízená RNA-nukleotidyltransferáza EC 2.7.7.6** = RNA-polymeráza
131. **DNA-řízená RNA-nukleotidyltransferáza EC 2.7.7.-** = DNA-primáza
132. **DNA-řízená RNA polymeráza EC 2.7.7.6** = RNA-polymeráza, bakteriální RNA-polymeráza
133. **DNA-řízená RNA polymeráza EC 2.7.7.-** = DNA-primáza
134. **DNA-sekvence** (DNA sequence) 12
135. **DNA-sekvence jedinečná** (unique DNA sequence) 102
136. **DNA-transkript** (DNA transcript) 127
137. **DNA-triplex** = třířetězcová deoxyribonukleová kyselina
138. **DNA-triplex intermolekulární** = DNA-trojšroubovice intermolekulární
139. **DNA-triplex intramolekulární** = DNA-trojšroubovice intramolekulární
140. **DNA-trojšroubovice** = třířetězcová deoxyribonukleová kyselina
141. **DNA-trojšroubovice intermolekulární**, DNA-triplex intermolekulární (intermolecular DNA triplex) 89
142. **DNA-trojšroubovice intramolekulární**, DNA-triplex intramolekulární (intramolecular DNA triplex) 89
143. **dogma molekulární biologie ústřední** (central dogma of molecular biology) 125
144. **doména** (domain) 154
145. **doména proteinová** (protein domain) 32
146. **D-rameno** = dihydrouridinové rameno se smyčkou

- 147. **D-ribóza** (D-ribose) 49, 51
- 148. **dsDNA** = dvouřetězcová deoxyribonukleová kyselina
- 149. **D-smyčka** = dihydrouridinová smyčka
- 150. **dsRNA** = dvouřetězcová ribonukleová kyselina

E

- 151. **efekt alosterický** (allosteric effect) 37
- 152. **efekt hyperchromní** (hyperchromic effect) 87
- 153. **efektor alosterický** (allosteric effector) 37
- 154. **efektor alosterický negativní** (negative allosteric effector) 236
- 155. **efektor alosterický pozitivní** (positive allosteric effector) 236
- 156. **elongace DNA-řetězce** (elongation of DNA chain) 162
- 157. **elongace RNA-řetězce** (elongation of RNA chain) 186, 191
- 158. **elongace řetězce polypeptidového** (elongation of polypeptide chain) 201
- 159. **E-místo** = výstupní místo
- 160. **endonukleáza sestřihu archeální** (archaeal splicing endonuclease) 265
- 161. **endonukleázy** (endonucleases) 163
- 162. **enzym** (enzyme) 35
- 163. **enzym alosterický** (allosteric enzyme) 37
- 164. **enzym indukovatelný** (inducible enzyme) 237
- 165. **enzym konstitutivní** (constitutive enzyme) 237
- 166. **enzym Kornbergův** = DNA-polymeráza I
- 167. **Eubacteria** (Eubacteria) 154
- 168. **Eubacteria** = Bacteria
- 169. **eubakterie** = bakterie
- 170. **Eucarya, eukarya** (Eucarya, eucarya) 154
- 171. **eukarya** = Eucarya
- 172. **eukaryota** (eucaryotes) 154
- 173. **exon** (exon) 141
- 174. **exon konstitutivní** (constitutive exon) 142
- 175. **exon potenciální** (potential exon) 142
- 176. **exonukleázy** (exonucleases) 163
- 177. **exprese genu** (gene expression) 152

F

- 178. **σ -faktor, sigma-faktor** (σ -factor, sigma factor) 188, 249
- 179. **faktor elongační EF-G** (elongation factor EF-G) 225
- 180. **faktor elongační EF-T** (elongation factor EF-T) 225
- 181. **faktor elongační EF-Ts** (elongation factor EF-Ts) 225
- 182. **faktor elongační EF-Tu** (elongation factor EF-Tu) 225
- 183. **faktor elongační SELB** (SELB elongation factor) 227, 231
- 184. **faktor iniciační IF1** (initiation factor IF1) 221, 222
- 185. **faktor iniciační IF2** (initiation factor IF2) 221, 222
- 186. **faktor iniciační IF3** (initiation factor IF3) 221, 222
- 187. **faktor terminační, uvolňovací faktor, RF-faktor** (termination factor, release factor) 201
- 188. **faktor terminační RF1** (termination factor RF1) 226
- 189. **faktor terminační RF2** (termination factor RF2) 226
- 190. **faktor terminační RF3** (termination factor RF3) 226
- 191. **faktor uvolňovací** = terminační faktor

192. **σ -faktory alternativní**, alternativní sigma-faktory (alternative σ -factors, alternative sigma factors) 251
193. **faktory elongační archeální** (archaeal elongation factors) 261
194. **faktory elongační bakteriální** (bacterial elongation factors) 225
195. **faktory iniciační archeální** (archaeal initiation factors) 262
196. **faktory iniciační bakteriální**, IF-faktory (bacterial initiation factors, IF factors) 201
197. **faktory transkripční archeální** (archaeal transcription factors) 260
198. **fenotyp** (phenotype) 152
199. **fenylalanin** (phenylalanine) 14, 15, 17, 18
200. **N-formylmethionin** (N-formylmethionine) 220
201. **formylmethionyl-tRNA^{Met}** (formylmethionyl ~ tRNA^{Met}) 221
202. **fosfoprotein** (phosphoprotein) 19
203. **fosforylace** (phosphorylation) 19, 20
204. **F-plazmid** (F plasmid) 160
205. **fragment Okazakiho** (Okazaki fragment) 167
206. **funkce proteinů biologická** (biological function of proteins) 34, 39
207. **funkce proteinů enzymová** (enzymatic function of proteins) 35
208. **funkce proteinů katalytická** (catalytic function of proteins) 35, 124
209. **funkce proteinů rozpoznávací** (recognition function of proteins) 34
210. **funkce proteinů stavební** (structural function of proteins) 124

G

211. **β -galaktozidáza** (β -galaktosidase) 237, 242
212. **β -galaktozidacetyltransferáza** (β -galaktoside acetyltransferase) 237, 242
213. **β -galaktozidpermeáza** (β -galaktoside permease) 237, 242
214. **G4-DNA** = čtyřřetězcová deoxyribonukleová kyselina
215. **gen** (gene) 139
216. **gen jako regulační oblast** (gene as a regulation region) 144
217. **gen pro funkční RNA** (gene transcribed into functional RNA) 143
218. **gen regulační** (regulator gene, regulatory gene) 238
219. **gen strukturní** (structural gene) 140
220. **gen strukturní bez intronů** = jednoduchý strukturní gen
221. **gen strukturní jednoduchý**, gen strukturní nepřerušovaný introny, strukturní gen bez intronů (uninterrupted structural gene, intronless structural gene) 141
222. **gen strukturní nepřerušovaný introny** = jednoduchý strukturní gen
223. **gen strukturní přerušovaný introny** = složený strukturní gen
224. **gen strukturní s introny** = složený strukturní gen
225. **gen strukturní složený**, strukturní gen přerušovaný introny, strukturní gen s introny (interrupted structural gene, mosaic structural gene, split structural gene) 141
226. **genetika molekulární** (molecular genetics) 9
227. **genofor** (genophore) 149
228. **genofory homologické** (homologous genophores) 149
229. **genofory nehomologické** (nonhomologous genophores) 149
230. **genom** (genome) 152
231. **genotyp** (genotype) 152
232. **geny překrývající se** (overlapping genes) 144
233. **glutamin** (glutamine) 15, 17, 18
234. **glycin** (glycine) 14, 15, 17, 18
235. **glykoprotein** (glycoprotein) 19
236. **glykozylace** (glycosylation) 19, 21

- 237. **G-motiv** (G motif) 91
- 238. **guanin** (guanine) 50
- 239. **guanozin** (guanosine) 51

H

- 240. **α -helix** = α -šroubovice
- 241. **helix rozpoznávací** (recognition helix) 116
- 242. **heteroalely** (heteroalleles) 150
- 243. **heteropolymer**, kopolymer (heteropolymer, copolymer) 11
- 244. **histidin** (histidine) 16, 17, 18
- 245. **HLP-protein** = protein podobný histonům
- 246. **holoenzym** (holoenzyme) 36
- 247. **homeodoména** (homeodomain) 117
- 248. **homoalely** (homoalleles) 150
- 249. **homologie sekvenční** (sequence homology) 88, 149
- 250. **homopolymer** (homopolymer) 11
- 251. **HSP-protein** = protein indukovatelný teplem
- 252. **Hsp-protein** = protein indukovatelný teplem
- 253. **HTH-jednotka** (HTH-unit) 116
- 254. **hybrid RNA-DNA** (RNA-DNA hybrid) 192
- 255. **hybridizace molekul DNA** (hybridization of DNA molecules) 88
- 256. **hydrolázy** (hydrolases) 39
- 257. **hydroxylace** (hydroxylation) 19
- 258. **3-hydroxyprolin** (3-hydroxyproline) 19
- 259. **4-hydroxyprolin** (4-hydroxyproline) 19
- 260. **5-hydroxyprolin** (5-hydroxyproline) 19
- 261. **hypoxantin** (hypoxanthine) 134

CH

- 262. **chaperon hsp 60** (chaperone Hsp 60) 45, 48
- 263. **chaperon hsp70** (chaperone Hsp 70) 45, 48
- 264. **chaperon molekulární** (molecular chaperone) 45
- 265. **chromozom** (chromosome) 149
- 266. **chromozom prokaryotický** (procaryotic chromosome) 157

I

- 267. **IF-faktory** = bakteriální iniciační faktory
- 268. **indukce enzymová** (enzyme induction) 237
- 269. **induktor** (inducer) 237, 240
- 270. **informace genetická** (genetic information) 123
- 271. **iniciace replikace** (initiation of replication) 162, 170
- 272. **iniciace transkripce** (initiation of transcription) 186
- 273. **iniciace translace** (initiation of translation) 201
- 274. **inozin** (inosine) 202
- 275. **interakce hydrofobní** (hydrophobic interactions) 24, 77
- 276. **interakce proteinů nekovalentní** (noncovalent interactions) 23
- 277. **intron** (intron) 141
- 278. **intron archeální** (archaeal intron) 263
- 279. **izoforma proteinu** (protein isoform) 143

280. **izoleucin** (isoleucine) 14, 15, 17, 18
 281. **izomerázy** (isomerases) 39
 282. **izomery DNA topologické** (topological isomers of DNA) 99
 283. **N⁶-izopentenyladenozin** (N⁶-isopentenyladenosine) 202
 284. **izopropyl-β-tiogalaktozid, IPTG** (isopropyl β-thiogalactoside, IPTG) 224

J

285. **jádro DNA-polymerázy III katalytické** (catalytic core of DNA polymerase III) 165
 286. **jádro prokaryotické, nukleoid** (nucleoid) 154, 157
 287. **jednotka genomu bakteriálního transkripční** (transcription unit of bacterial genome) 186
 288. **jednotka repetice** (repeating unit) 102
 289. **jednotka transkripční** (transcription unit) 145
 290. **jednotka transkripční neoperonová** (nonoperon transcription unit) 186
 291. **jednotky transkripční překrývající se** (overlapping transcription units, complex transcription unit) 147

K

292. **katenace** (catenating, catenation) 99
 293. **katenan** (catenane, catenated circles) 99
 294. **kód genetický** (genetic code) 129
 295. **kód standardní genetický** (universal genetic code) 132
 296. **kód tripletový genetický, třípísmenový kód** (triplet code) 130
 297. **kodon** (codon) 131
 298. **kodon amber** (amber codon) 131
 299. **kodon iniciační** (initiation codon) 132
 300. **kodon nesmyslný** (nonsense codon) 131
 301. **kodon ochre** (ochre codon) 131
 302. **kodon opal** (opal codon) 132
 303. **kodon pro selenocystein** (codon coding for selenocysteine) 132
 304. **kodon terminanční** (termination codon, stop codon) 132
 305. **kodony synonymní** (synonymous codons) 130
 306. **kodony univerzální** (universal codons) 132
 307. **kódování genetické** (genetic coding) 129
 308. **koenzym** (coenzyme) 36
 309. **kofaktor** (cofactor) 36
 310. **γ-komplex** (γ complex) 166, 175, 178
 311. **komplex iniciační** (initiation complex) 201, 223
 312. **komplex přediniciační** (preinitiation complex) 221
 313. **komplex transkripční binární otevřený** (binary open transcription complex) 190
 314. **komplex transkripční binární uzavřený** (binary closed transcription complex) 190
 315. **komplex transkripční ternární otevřený** (open ternary transcription complex) 190
 316. **komplex translační binární** (binary translation complex) 221, 222, 224
 317. **komplex translační ternární** (ternary translation complex) 221, 222
 318. **3'-konec** (three prime (3') end, three prime (3') carbon atom end, three prime (3') terminus) 55
 319. **5'-konec** (five prime (5') end, five prime (5') carbon atom end, five prime (5') terminus) 55
 320. **konformace** (conformation) 13
 321. **konformace anti** = antiklinální konformace glykozidové vazby
 322. **konformace C2'-endo** (C-two prime (2')-endo conformation) 53
 323. **konformace C3'-endo** (C-three prime (3')-endo conformation) 52

324. **konformace enzymu aktivní** (active conformation of an enzyme) 37
325. **konformace vazby glykozidové** (conformation of glycosidic bond) 53
326. **konformace vazby glykozidové antiklinální**, konformace anti (anticlinal conformation of glycosidic bond, anti conformation) 55
327. **konformace vazby glykozidové synklinální**, konformace syn (synclinal conformation of glycosidic bond, syn conformation) 55
328. **konformace nukleozidů** (conformation of nucleosides) 52
329. **konformace syn** = synklinální konformace glykozidové vazby
330. **konjugace** (conjugation) 159
331. **kopolymer** = heteropolymer
332. **korepresor** (corepressor) 238, 240
333. **kostra pentózafosfátová** = páteř polynukleotidu
334. **kružnice kovalentně uzavřená**, CCC (covalently closed circle) 94
335. **kružnice otáčivá** (rolling circle) 180
336. **kružnice otevřená**, OC (open circle) 94
337. **kveozin** (queosine) 134
338. **kyselina adenylová**, AMP (adenylic acid, AMP) 12
339. **kyselina asparagová** (aspartic acid) 15, 17, 18
340. **kyselina cytidylová**, CMP (cytidylic acid, CMP) 12
341. **kyselina deoxyadenylová**, dAMP (deoxyadenylic acid, dAMP) 12
342. **kyselina deoxycytidylová**, dCMP (deoxycytidylic acid, dCMP) 12
343. **kyselina deoxyguanylová**, dGMP (deoxyguanylic acid, dGMP) 12
344. **kyselina deoxyribonukleová**, DNA (deoxyribonucleic acid, DNA) 12
345. **kyselina deoxyribonukleová čtyřřetězcová**, čtyřřetězcová DNA, DNA-kvadruplex, G-4 DNA (four-stranded DNA, DNA quadruplex, G4-DNA) 49, 91
346. **kyselina deoxyribonukleová dvouřetězcová**, dsDNA (double-stranded deoxyribonucleic acid, dsDNA) 49
347. **kyselina deoxyribonukleová dvouřetězcová kružnicová** (circular double-stranded deoxyribonucleic acid) 49
348. **kyselina deoxyribonukleová dvouřetězcová lineární** (linear double-stranded deoxyribonucleic acid) 49
349. **kyselina deoxyribonukleová dvouřetězcová paralelně** (parallel double-stranded DNA) 92
350. **kyselina deoxyribonukleová jednořetězcová**, ssDNA (single-stranded deoxyribonucleic acid, ssDNA) 49
351. **kyselina deoxyribonukleová jednořetězcová kružnicová** (circular single-stranded deoxyribonucleic acid) 49
352. **kyselina deoxyribonukleová jednořetězcová lineární** (linear single-stranded deoxyribonucleic acid) 49
353. **kyselina deoxyribonukleová ohnutá**, ohnutá DNA (bent DNA, curved DNA) 93
354. **kyselina deoxyribonukleová třířetězcová**, DNA-trojšroubovice, DNA-triplex (three-stranded DNA, DNA triplex, triple helical DNA) 49, 88
355. **kyselina deoxytymidylová**, dTMP (deoxythymidylic acid) 12
356. **kyselina glutamová** (glutamic acid) 15, 17, 18
357. **kyselina guanylová**, GMP (guanylic acid, GMP) 12
358. **kyselina nukleová** (nucleic acid) 11, 349
359. **kyselina ribonukleová**, RNA (ribonucleic acid, RNA) 12
360. **kyselina ribonukleová dvouřetězcová**, dsRNA (double-stranded ribonucleic acid, dsRNA) 49
361. **kyselina ribonukleová dvouřetězcová lineární** (double-stranded linear ribonucleic acid) 49
362. **kyselina ribonukleová jednořetězcová**, ssRNA (single-stranded ribonucleic acid, ssRNA) 49

363. **kyselina ribonukleová jednořetězcová kružnicová** (circular single-stranded ribonucleic acid) 49
364. **kyselina ribonukleová jednořetězcová lineární** (linear ribonucleic acid) 49
365. **kyselina ribonukleová mediátorová**, mRNA (messenger ribonucleic acid, mRNA) 185
366. **kyselina ribonukleová protismyslná** (antisense ribonucleic acid) 253
367. **kyselina ribonukleová ribozomová**, rRNA (ribosomal ribonucleic acid, rRNA) 185, 198, 219
368. **kyselina ribonukleová ribozomová prekurzorová**, pre-rRNA (precursor ribosomal ribonucleic acid, pre-ribosomal RNA, pre-rRNA) 185
369. **kyselina ribonukleová transferová**, tRNA (transfer ribonucleic acid) 185, 200, 202
370. **kyselina ribonukleová transferová iniciační**, iniciační tRNA (initiator transfer ribonucleic acid) 132, 201
371. **kyselina ribonukleová transferová izoakceptorová**, izoakceptorová tRNA (isoacceptor transfer ribonucleic acid, isoacceptor tRNA) 202
372. **kyselina ribonukleová transferová peptidylová**, peptidyl~tRNA, peptidylová tRNA (peptidyl transfer ribonucleic acid, peptidyl~tRNA) 219
373. **kyselina ribonukleová transferová prekurzorová**, pre-tRNA (precursor transfer ribonucleic acid, pre-tRNA) 185
374. **kyselina uridylová**, UMP (uridylic acid, UMP) 12
375. **kyseliny ribonukleové transferové příbuzné**, tRNA příbuzné (cognate transfer ribonucleic acid, cognate tRNA) 210

L

376. **L-aminokyselina** (L-amino acid) 13, 14
377. **látka amfoterní**, amfolyt (amphoteric substance, ampholyte) 13
378. **leucin** (leucine) 14, 15, 17, 18
379. **ligázy**, syntetázy (ligases, synthetases) 39
380. **β -list skládaný** = β -struktura
381. **LTR-sekvence** = dlouhá koncová repetice
382. **lyázy**, syntázy (lyases, synthases) 39
383. **lyzidin** (lysidine) 138
384. **lyzin** (lysine) 16, 17, 18

M

385. **makromolekula** (macromolecule) 11
386. **makromolekula biologická**, biomakromolekula (biomacromolecule) 11
387. **makromolekula informační** (informational macromolecule) 11
388. **matrice**, templát (matrix, template) 126
389. **metionin** (methionine) 14, 16, 17, 18
390. **metionyl~tRNA^{Met}** (methionyl~tRNA^{Met}) 221
391. **5-metoxycarbonylmetylracil** (5-methoxycarbonylmethyluracil) 134
392. **metylace** (methylation) 19, 20
393. **1-metylguanozin** (1-methylguanosine) 202
394. **3-methylhistidin** (3-methylhistidine) 19
395. **5-metyl-2-tiouracil** (5-methyl-2-thiouracil) 134
396. **mezerník**, mezigenová sekvence (spacer, intergenic sequence) 223
397. **místo aminoacylové**, A-místo (aminoacyl site, A site) 218
398. **místo enzymu aktivní**, aktivní centrum enzymu (enzyme active site) 35
399. **místo pas** = místo pro sestavování prímozomu
400. **místo peptidylové**, P-místo (peptidyl site, P site) 218

- 401. místo peptidyltransferázové (peptidyl transferase site) 220
- 402. místo pro mRNA vazebné (mRNA binding site) 218
- 403. místo pro sestavování primozomu, místo pas (primosome assembly site, pas site) 173
- 404. místo ter = terminátor replikace
- 405. místo výstupní, E-místo (exit site) 219
- 406. molekula DNA hybridní, hybridní DNA (hybrid DNA molecule, hybrid DNA) 88
- 407. molekula hydrofilní (hydrophilic molecule) 25
- 408. molekula hydrofobní (hydrophobic molecule) 25
- 409. monomer = protomer
- 410. motiv (motif) 114
- 411. motiv bZIPu leucinového (leucine b zipper motif) 120
- 412. motiv helix-otáčka-helix (helix-turn-helix motif) 116
- 413. motiv homeodomén (homeodomain motif) 117
- 414. motiv na DNA se vázající (DNA-binding motif) 114
- 415. motiv prstů zinkových (zinc finger motif) 117
- 416. mRNA = mediátorová ribonukleová kyselina
- 417. mRNA bakteriální = bakteriální mediátorová RNA

N

- 418. nadšroubovice, superhelix (superhelix, supercoil) 93
- 419. nadšroubovice kladná (positive supercoil) 96
- 420. nadšroubovice levotočivá (left-handed superhelix) 96
- 421. nadšroubovice pravotočivá (right-handed superhelix) 96
- 422. nadšroubovice záporná (negative supercoil) 96
- 423. N-konec polypeptidu (polypeptide N-terminus) 19
- 424. NTRC-protein = dusíkový regulační protein C
- 425. nukleázy (nucleases) 163
- 426. nukleoid = prokaryotické jádro
- 427. nukleotid (nucleotide) 49, 51
- 428. nukleotid startovací (starting nucleotide) 145
- 429. nukleotidyltransferázy DNA řízené = DNA-polymerázy
- 430. nukleozid (nucleoside) 51
- 431. nukleozom archeální (archaeal nucleosome) 257
- 432. NusA-protein (NusA protein) 192

O

- 433. OC = otevřená kružnice
- 434. oligonukleotidy triplex tvořící = TFO-oligonukleotidy
- 435. oligopeptid (oligopeptide) 19
- 436. operátor (operator) 186, 238
- 437. operon (operon) 186, 238
- 438. operon laktóзовý (lactose operon) 242
- 439. osa dvoušroubovice (helix axis) 66
- 440. osy dvoušroubovice lokální (local helix axes) 72
- 441. β-otáčka (β-turn) 30
- 442. oxidoreduktázy (oxidoreductases) 38

P

- 443. palindrom (palindrome) 102

- 444. **parakodon** (paracodon) 211
- 445. **parametry globální** (global parameters) 72
- 446. **párování bází** (base pairing) 58
- 447. **párování bází Hoogsteenovo** (Hoogsteen base-pairing) 61
- 448. **párování bází Hoogsteenovo obrácené** (reverse Hoogsteen base-pairing) 63, 109, 110
- 449. **párování bází kolísavé** (wobble pairing) 133
- 450. **párování bází kolísavé obrácené** (reverse wobble base-pairing) 109, 111
- 451. **párování bází Watsonovo-Crickovo** (Watson-Crick base-pairing) 58
- 452. **párování bází Watsonovo-Crickovo obrácené** (reverse Watson-Crick base-pairing, trans-Watson-Crick base-pairing) 60, 109, 110
- 453. **párování kodon-antikodon** (codon-anticodon base-pairing) 133
- 454. **páteř DNA** (DNA backbone) 66
- 455. **páteř polynukleotidu, pentózafosfátová kostra** (polynucleotide backbone) 55
- 456. **PDIáza** = proteindisulfidizomeráza E C 5.3.4.1,
- 457. **pentózafosfátová kostra** = páteř polynukleotidu
- 458. **peptidyl-tRNA** = peptidylová transferová ribonukleová kyselina
- 459. **peptidylová tRNA** = peptidylová transferová ribonukleová kyselina
- 460. **pilus** (pilus) 159
- 461. **plazmid** (plasmid) 157, 159
- 462. **plazmid konjugativní** (conjugative plasmid) 159
- 463. **plazmid nekonjugativní** (nonconjugative plasmid) 159
- 464. **P-místo** = peptidylové místo
- 465. **počátek replikace** (replication origin) 128
- 466. **polydeoxyribonukleotid, DNA-řetězec** (polydeoxyribonucleotide, DNA strand) 11
- 467. **polydeoxyribonukleotidsyntetáza** = DNA-ligáza
- 468. **polymer** (polymer) 11
- 469. **polynukleotid, polynukleotidový řetězec** (polynucleotide, polynucleotide chain) 11, 55
- 470. **polypeptid, polypeptidový řetězec** (polypeptide chain) 12, 19
- 471. **polyribonukleotid, RNA-řetězec** (polyribonucleotide, RNA strand) 11
- 472. **polyribosom** (polyribosome, polysome) 198
- 473. **polysacharid** (polysaccharide) 11
- 474. **posun (dx) horizontální** (displacement (dx)) 71
- 475. **posun (Dx) příčný** (shift (Dx)) 74
- 476. **posun (dy) horizontální** (displacement (dy)) 71
- 477. **posun (Dy) podélný** (slide (Dy)) 74
- 478. **posun (Dz) svislý** (rise (Dz)) 74
- 479. **pravidla párování bází kolísavého** (wobble base-pairing rules) 133
- 480. **pravidlo Chargaffovo** (Chargaff's rule) 67
- 481. **pravidlo párování bází Watsonovo-Crickovo** (Watson-Crick base-pairing rule) 58, 133
- 482. **preemptor** (preemptor) 246
- 483. **pre-rRNA** = prekurzorová ribozomová ribonukleová kyselina
- 484. **pre-tRNA** = prekurzorová transferová ribonukleová kyselina
- 485. **primer** (primer) 163
- 486. **primozom** (primosome) 173
- 487. **primozom typu fX** (fX primosome) 173
- 488. **primozom typu oriC** (oriC primosome) 173
- 489. **proces posttranslační** (post-translational process) 232, 233
- 490. **procesivita DNA-polymerázy III** (DNA polymerase III processivity) 177
- 491. **procesivita polymerázy** (polymerase processivity) 166
- 492. **produkt translační** (translation product) 140
- 493. **progenot** (progenot) 155, 256
- 494. **prokaryota** (procaryotes) 153

495. **prolin** (proline) 14, 16, 17, 18
496. **promotor** (promoter) 146
497. **promotor bakteriální** (bacterial promoter) 187
498. **promotor bakteriální silný** (strong bacterial promoter) 188
499. **promotor bakteriální slabý** (weak bacterial promoter) 188
500. **proteazom** (proteasome) 43
501. **protein**, bílkovina (protein) 11, 12, 13
502. **protein aktivací katabolický**, CAP (catabolite activator protein, CAP) 241
503. **protein C regulační dusíkový**, NTRC-protein (nitrogen regulatory protein C, NTRC-protein) 252
504. **protein fibrilární** (fibrillary protein) 29
505. **protein globulární** (globular protein) 29
506. **protein histonům podobný**, HLP-protein (histone like protein, HLP protein) 157
507. **protein oligomerní** (oligomeric protein) 32
508. **protein regulační** (regulatory protein) 235
509. **protein regulační negativní** (negative regulatory protein) 236, 237
510. **protein regulační pozitivní** (positive regulatory protein) 236, 237
511. **protein replikační** (replication protein) 128
512. **protein s motivem helix-otáčka-helix** (helix-turn-helix protein) 116
513. **protein s motivem homeodomén** (homeodomain protein) 117
514. **protein s motivem leucinového zipu** (leucine zipper protein) 120
515. **protein s motivem zinkových prstů** (zinc finger protein) 117
516. **protein teplem indukovatelný**, HSP-protein, Hsp-protein (heat-shock protein, HSP-protein, Hsp-protein) 249
517. **protein vázající jednořetězcový úsek DNA** = SSB-protein
518. **proteindisulfidizomeráza E C 5.3.4.1**, PDIáza (protein disulfide isomerase, rearrangase) 25
519. **proteiny archeální replikační** (archaeal replication proteins) 258
520. **protektor** (protector) 246
521. **protomer**, monomer (protomer, monomer) 11, 32
522. **protonace bází** (protonation of bases) 51
523. **prst zinkový** (zinc finger) 117
524. **předek univerzální** (universal ancestor) 155, 256
525. **pseudorotace** (pseudorotation) 52
526. **pseudouridin** (pseudouridine) 202
527. **pseudouzlel** (pseudoknot) 107
528. **pseudouzlel typu B** (B-type pseudoknot) 109
529. **pseudouzlel typu H** (H-type pseudoknot) 109
530. **pseudouzlel typu I** (I-type pseudoknot) 109
531. **purin** (purine) 50
532. **pyrimidin** (pyrimidine) 50

R

533. **rámeček čtecí** (reading frame) 130
534. **rámeček čtecí otevřený** (open reading frame) 130
535. **rámeček čtecí uzavřený** (closed reading frame) 130
536. **rameno akceptorové** (acceptor arm) 203
537. **rameno antikodonové** (anticodon arm) 204
538. **rameno se smyčkou dihydrouridinové**, DHU-rameno, D-rameno (dihydrouridine arm) 204
539. **rameno se smyčkou pseudouridinové**, TψC-rameno (pseudouridine arm, TψC-arm) 204
540. **regulace operonu negativní** (negative control of operon) 239
541. **regulace operonu pozitivní** (positive control of operon) 241

542. **regulace striktní** (stringent control) 250
543. **regulátor** (regulator) 236
544. **regulátor negativní** (negative regulator) 236
545. **regulátor pozitivní** (positive regulator) 236
546. **regulon** (regulon) 245
547. **renaturace DNA** (DNA renaturation) 88
548. **renaturace makromolekuly informační** (renaturation of informational macromolecule) 32
549. **renaturace proteinu** (protein renaturation) 32
550. **repetice**, repetitivní sekvence (DNA repeat, repetitive DNA sequence, repetitious DNA) 102
551. **repetice koncová dlouhá**, sekvence LTR, LTR-sekvence (long terminal repeat, LTR sequence) 103
552. **repetice obrácená** (inverted repeat) 102
553. **repetice přímá** (direct repeat) 103
554. **repetice rozptýlená** (interspersed repeat, interspersed sequence) 104
555. **repetice rozptýlená dlouhá** (long interspersed repeat, long-period interspersion) 104
556. **repetice rozptýlená krátká** (short interspersed repeat, short-period interspersion) 104
557. **repetice tandemová** (tandem repeat) 102
558. **replika** (replica) 125
559. **replikace** (replication) 125
560. **replikace dvousměrná** (bidirectional replication) 161
561. **replikace jednořetězcové RNA**, replikace ssRNA (replication of single stranded RNA) 127
562. **replikace jednosměrná** (unidirectional replication) 161
563. **replikace semikonzervativní** (semiconservative replication) 125, 126
564. **replikace ssRNA** = replikace jednořetězcové RNA
565. **replikon** (replicon) 127
566. **Rep-protein** (Rep protein) 180
567. **represe enzymová** (enzyme repression) 237
568. **represe katabolická** (catabolite repression) 238
569. **represor** (repressor) 186, 238
570. **RF-faktor** = terminační faktor
571. **ribonukleotid** (ribonucleotide) 51
572. **ribonukleozid** (ribonucleoside) 51
573. **ribotymidin** (ribothymidine) 202
574. **ribóza** (ribose) 49, 51
575. **ribozom** (ribosome) 218
576. **ribozom prokaryotický** (procaryotic ribosome) 217
577. **RNA** = ribonukleová kyselina
578. **RNA dvoušroubovicová oblast** (double helix RNA region) 106
579. **RNA mediátorová bakteriální**, bakteriální mRNA (bacterial messenger RNA, bacterial mRNA) 196
580. **RNA-nukleotidyltransferáza DNA-řízená EC 2.7.7.6** = RNA-polymeráza
581. **RNA-polymeráza**, DNA-řízená RNA polymeráza EC 2.7.7.6, DNA-řízená RNA-nukleotidyltransferáza EC 2.7.7.6, DNA-dependentní RNA-polymeráza EC 2.7.7.6, transkriptáza (RNA polymerase, DNA-directed RNA polymerase EC 2.7.7.6, DNA-directed RNA nucleotidyltransferase EC 2.7.7.6, DNA-dependent RNA polymerase EC 2.7.7.6, transcriptase) 185
582. **RNA-polymeráza archeální** (archaeal RNA polymerase) 260
583. **RNA-polymeráza bakteriální**, DNA-řízená RNA-polymeráza EC 2.7.7.6 (bacterial RNA polymerase, DNA-directed RNA polymerase EC 2.7.7.6) 188
584. **RNA-polymeráza DNA-dependentní EC 2.7.7.6** = RNA-polymeráza
585. **RNA-polymeráza DNA-řízená EC 2.7.7.6** = RNA-polymeráza
586. **RNA-primer** (RNA primer) 163
587. **RNA-replikáza** (RNA replicase) 127

- 588. **RNA-řetězec** = polyribonukleotid
- 589. **RNA-sekvence** (RNA sequence) 12
- 590. **RNA-transkript** (RNA transcript) 127
- 591. **rodina kodonová** (codon family) 130
- 592. **rodiny DNA-polymeráz**, (families of DNA polymerases) 258
- 593. **ró-faktor** (rho factor) 189
- 594. **rozpoznávání** (recognition) 35
- 595. **R-plazmid** (R plasmid) 160
- 596. **rRNA** = ribozomová ribonukleová kyselina

Ř

- 597. **řetězec polynukleotidový** = polynukleotid
- 598. **řetězec polypeptidový** = polypeptid
- 599. **řetězec postranní** = zbytek R

S

- 600. **sada dvoukodonová** (two-codon set) 131
- 601. **samosestavování** (self-assembly) 42
- 602. **sbalování proteinu** (folding) 25
- 603. **sekvence aminokyselinová** (amino acid sequence) 12
- 604. **sekvence koncová**, terminátorová sekvence (termination sequence, termination site, terminator sequence) 197
- 605. **sekvence konvenční** (consensus sequence, canonical sequence) 187
- 606. **sekvence LTR** = dlouhá koncová repetice
- 607. **sekvence mezigenová** = mezerík
- 608. **sekvence nukleotidová** (nucleotide sequence) 12
- 609. **sekvence nukleotidová kódující** (nucleotide coding sequence) 127
- 610. **sekvence nukleotidová komplementární** (complementary nucleotide sequence) 59
- 611. **sekvence repetitivní** = repetice
- 612. **sekvence Shineova-Dalgarnova** (Shine-Dalgarno sequence) 196
- 613. **sekvence terminátorová** = koncová sekvence
- 614. **sekvence vedoucí** (leader sequence, leader) 196
- 615. **selenocystein** (selenocysteine) 16, 18
- 616. **selenocysteinsyntáza** (selenocysteine synthase) 227, 232
- 617. **selenoprotein** (selenoprotein) 227
- 618. **serin** (serine) 16, 17, 18
- 619. **sestřih** = posttranskripční úprava sestřihem
- 620. **sestřih alternativní** (alternative splicing) 142
- 621. **sestřih intronů archeálních** (splicing of archeal introns) 265
- 622. **sestřih konstitutivní** (constitutive splicing) 142
- 623. **sigma-faktor** = σ -faktor
- 624. **sigma faktory alternativní** = alternativní σ -faktory
- 625. **síla promotoru** (strength of promoter) 188
- 626. **skupina prostetická** (prosthetic group) 36
- 627. **skupina vazbová** (linkage group) 149
- 628. **smyčka dihydrouridinová**, DHU-smyčka, D-smyčka (dihydrouridine loop, DHU-loop, D-loop) 204
- 629. **smyčka pseudouridinová**, T ψ C-smyčka (pseudouridine loop, T ψ C-loop) 204
- 630. **smyčka variabilní** (variable loop, extra loop) 204

631. **smyčka vlásenková v RNA** (hairpin loop in RNA) 105
 632. **smyčka vlásenková čtyřbázová** (tetra-loop) 105
 633. **smyčka vlásenková třibázová** (tri-loop) 105
 634. **smyčka vnitřní** (internal loop) 106
 635. **smysl kodonu** (sense of the codon) 130
 636. **SSB-protein**, protein vázající jednořetězcový úsek DNA (single-stranded DNA-binding protein, SSB protein) 171
 637. **ssDNA** = jednořetězcová deoxyribonukleová kyselina
 638. **ssRNA** = jednořetězcová ribonukleová kyselina
 639. **strom fylogenetický univerzální** (universal phylogenetic tree) 155, 257
 640. **β -struktura**, **β -skládaný list** (β -pleated sheet) 27
 641. **β -struktura antiparalelní** (antiparallel β -sheet) 27
 642. **struktura DNA primární** (DNA primary structure) 12, 49
 643. **struktura DNA sekundární** (DNA secondary structure) 66
 644. **struktura DNA terciární** (DNA tertiary structure) 93
 645. **struktura křížová** (cruciform structure) 103
 646. **β -struktura paralelní** (parallel β -sheet) 27
 647. **struktura proteinů kvartérní** (protein quarternary structure) 32
 648. **struktura proteinů primární** (protein primary structure) 12, 19
 649. **struktura proteinů sekundární** (protein secondary structure) 25
 650. **struktura proteinů terciární** (protein tertiary structure) 27
 651. **struktura RNA primární** (RNA primary structure) 12, 13
 652. **struktura tRNA primární** (tRNA primary structure) 202
 653. **struktura tRNA sekundární** (tRNA secondary structure) 202
 654. **struktura tRNA terciární** (tRNA tertiary structure) 205
 655. **superhelix** = nadšroubovice
 656. **β -svorka**, **posuvná svorka** (β clamp, sliding clamp) 166, 175, 178
 657. **svorka posuvná** = β -svorka
 658. **syntázy** = lyázy
 659. **syntetázy** = ligázy
 660. **syntéza DNA-řetězce diskontinuální** (discontinuous synthesis of DNA strand) 168
 661. **substrát** (substrate) 35
 662. **syntéza DNA-řetězce kontinuální** (continuous synthesis of DNA strand) 168
 663. **syntéza DNA-řetězce semidiskontinuální** (semidiscontinuous synthesis of DNA) 168
 664. **syntéza ve směru 5' \rightarrow 3'** (five prime to three prime (5' \rightarrow 3') synthesis) 163

Š

665. **α -šroubovice**, **α -helix** (α -helix) 26, 113

T

666. **T ψ C-rameno** = pseudouridinové rameno se smyčkou
 667. **T ψ C-smyčka** = pseudouridinová smyčka
 668. **templát** = matrice
 669. **teplota tání** (melting temperature) 87
 670. **terminace replikace** (termination of replication) 162
 671. **terminace transkripce** (termination of transcription) 186
 672. **terminace transkripce na ró-faktoru nezávislá** (rho factor-independent termination) 195
 673. **terminace transkripce na ró-faktoru závislá** (rho factor-dependent termination) 195
 674. **terminace translace** (termination of translation) 201

675. **terminátor** (terminator) 145
676. **terminátor na ró-faktoru nezávislý** (rho factor-independent terminator) 189
677. **terminátor na ró-faktoru závislý** (rho factor-dependent terminator) 189
678. **terminátor replikace**, místo ter (replication terminator, ter site) 180
679. **tetráda** (tetrad) 63
680. **TFO-oligonukleotidy**, oligonukleotidy tvořící triplex (triplex forming oligonucleotides) 89
681. **4-thiouridin** (4-thiouridine) 202
682. **topoizomeráza** (topoisomerase) 99
683. **topoizomeráza I** (topoisomerase I) 99
684. **topoizomeráza II** (topoisomerase II) 99
685. **transferázy** (transferases) 38
686. **transformyláza** (transformylase) 220
687. **trans-konfigurace párů bází** (trans configuration of base pairs) 60
688. **trans-konfigurace vazby peptidové** (trans configuration of peptide bond) 23
689. **transkripce** (transcription) 127
690. **transkripce archeální** (archaeal transcription) 260
691. **transkripce bakteriální** (bacterial transcription) 185
692. **transkripce zpětná** (reverse transcription) 127
693. **transkript** (transcript) 127
694. **transkript primární** (primary transcript) 127
695. **transkriptáza** = RNA-polymeráza
696. **translace** (translation) 127
697. **translace archeální** (archaeal translation) 260
698. **translace bakteriální** (bacterial translation) 201
699. **translokace ribozomu** (ribosome translocation) 226
700. **treonin** (threonine) 16, 17, 18
701. **triáda** (triad) 61, 63
702. **triplet** (triplet) 129, 130
703. **tRNA** = transferová ribonukleová kyselina
704. **tRNA^{Sec}** (tRNA^{Sec}) 227, 231
705. **tRNA iniciační** = iniciační transferová ribonukleová kyselina
706. **tRNA izoakceptorová** = izoakceptorová transferová ribonukleová kyselina
707. **tRNA příbuzné** = příbuzné transferové ribonukleové kyseliny
708. **tryptofan** (tryptophan) 14, 15, 17, 18
709. **Tus-protein** (Tus protein) 180
710. **tymin** (thymine) 50
711. **tyrozin** (tyrosine) 15, 17, 18

U

712. **ubikvitin** (ubiquitin) 45, 46
713. **úhel zkrutu** (angle of propeller twist) 69
714. **uhlík alfa** (carbon alfa) 13
715. **univerzalita kódu genetického** (universality of the genetic code) 132
716. **úprava kotranslační** (cotranslational modification, cotranslational processing) 233
717. **úprava posttranskripční** (post-transcriptional modification, post-translational processing) 127
718. **úprava posttranslační** (post-translational modification, post-translational processing) 234
719. **úprava sestřihem posttranskripční**, sestřih (post-transcriptional processing by splicing, splicing) 141
720. **uracil** (uracil) 50
721. **uridin** (uridine) 51
722. **uzel** (knot) 99

V

723. **valin** (valine) 14, 15, 17, 18
724. **vazba disulfidová** (disulfide bond, disulfide bridge, disulfide link) 25
725. **vazba fosfodiesterová** (phosphodiester bond) 55
726. **vazba N-glykozidová** (N-glycosidic bond) 19, 21
727. **vazba O-glykozidová** (O-glycosidic bond) 19, 21
728. **vazba peptidová** (peptide bond) 19
729. **vidlice replikační** (replication fork) 161
730. **vinutí dvoušroubovicové** (twisting) 70
731. **vinutí nadšroubovicové** (supercoiling, writhing) 93, 94
732. **vinutí nadšroubovicové kladné** (positive supercoiling) 96
733. **vinutí nadšroubovicové záporné** (negative supercoiling) 95
734. **vlásenka** (hairpin structure) 103
735. **vlásenka se smýčkou v DNA** (hairpin loop in DNA) 103
736. **vrstvení bází** (base stacking) 77
737. **výdut'** (bulge) 106
738. **výkrut z roviny** (roll) 73
739. **výkrut z roviny kladný** (positive roll) 73
740. **výkrut z roviny záporný** (negative roll) 73

Z

741. **zábrana sterická** (steric hindrance) 23
742. **zauzlení** (knotting) 99
743. **závity nadšroubovicové kladné** (positive superhelical turns) 96
744. **závity nadšroubovicové záporné** (negative superhelical turns) 96
745. **zbytek R**, **postranní řetězec** (residue R) 13
746. **Z-DNA** = DNA-konformace Z
747. **zesilovač transkripce** (enhancer) 251, 252
748. **zkrut v rovině** (twist) 73
749. **zkrut vrtulový** (propeller twist) 69, 71

Ž

750. **žlábek menší** (minor groove) 69
751. **žlábek větší** (major groove) 69

DOPLŇUJÍCÍ POZNÁMKA

Tab. 16

Velikost chromozomu některých druhů bakterií a archeí

Druh	Stručná charakteristika	Velikost chromozomu vyjádřená počtem párů bází
Bakterie		
<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Bakterie bez buněčné stěny. Možný původce negonoroické uretritidy.</i>	0,58 x 10 ⁶
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Nemá buněčnou stěnu, způsobuje mírné katary dýchacích cest a také pneumonii.</i>	0,78 x 10 ⁶
<i>Borrelia burgdorferi</i>	<i>Patří mezi spirochéty, způsobuje lymskou chorobu. Bakteriální druh, jehož chromozomem je lineární dsDNA.</i>	0,95 x 10 ⁶
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Způsobuje chronickou gastritidu</i>	1,67 x 10 ⁶
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Způsobuje meningitidu u dětí, chronickou bronchitidu, pneumonii aj.</i>	1,83 x 10 ⁶
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	<i>Anoxigenní fotoorganotrofní organizmus.</i>	4,0 x 10 ⁶
<i>Escherichia coli</i>	<i>Vyskytuje se jako normální flora v tlustém střevě savců.</i>	4,6 x 10 ⁶
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Půdní bakterie.</i>	5,0 x 10 ⁶
Archea		
<i>Methanococcus jannaschii</i>	<i>Archeum produkující metan. Je vysoce termofilní. Roste při 90 °C.</i>	1,66 x 10 ⁶
<i>Thermococcus celer</i>	<i>Extrémně termofilní archeum rostoucí ještě při 93°C. Je obligátně anaerobní chemoorganotrof využívající síru jako akceptor elektronů.</i>	1,9 x 10 ⁶
<i>Haloferax mediterranei</i>	<i>Roste v prostředí s vysokým obsahem solí.</i>	2,9 x 10 ⁶

Kromě *Borrelia burgdorferi* má chromozom ve formě lineární dsDNA též *Streptomyces lividans*, takže je pravděpodobné, že tento typ chromozomu bude dokázán u více bakteriálních druhů.

U druhů *Escherichia coli* K-12, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Methanococcus jannaschii*, *Mycoplasma genitalium* a *Mycoplasma pneumoniae* je známa sekvence celého chromozomu. Předpokládá se, že do konce tohoto tisíciletí bude známa sekvence chromozomu všech významných bakteriálních patogenů.

**Učebnice pokračuje druhým dílem
věnovaným
molekulární biologii eukaryot.**