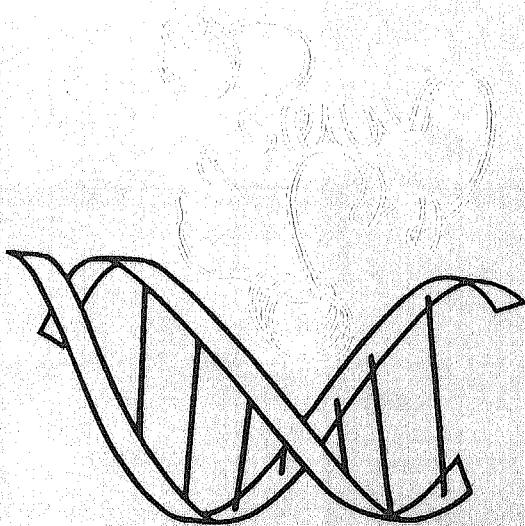


# ÚVOD DO MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE

Stanislav Rosypal



Díl druhý

MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE EUKARYOT

---

BRNO 1999

TŘETÍ INOVOVANÉ VYDÁNÍ

# OBSAH

## DRUHÉHO DÍLU

<i>Celková koncepce třetího vydání učebnice Úvod do molekulární biologie</i> .....	305
<i>Předmluva k druhému dílu třetího vydání</i> .....	307
<b>5. STRUKTURA, REPLIKACE A EXPRESE EUKARYOTICKÉHO GENOMU</b> .....	309
5.1 <i>Struktura eukaryotického genomu</i> .....	311
5.1.1 Fyzikální proměny chromatinu.....	311
5.1.2 Eukaryotická chromozomová (jaderná) DNA.....	322
5.1.3 Mitochondriový genofor.....	326
5.1.4 Chloroplastový genofor.....	331
5.1.5 Zvláštnosti genomu rostlin.....	334
5.2 <i>Replikace eukaryotického genomu</i> .....	335
5.2.1 Zvláštnosti replikace chromozomové (jaderné) dsDNA.....	335
5.2.2 Průběh replikace eukaryotické jaderné dsDNA.....	337
5.2.3 Replikace savčí mitochondriové DNA.....	347
5.3 <i>Transkripce eukaryotického genomu</i> .....	349
5.3.1 Transkripce katalyzovaná RNA-polymerázou II.....	352
5.3.2 Transkripce katalyzovaná RNA-polymerázou I.....	363
5.3.3 Transkripce katalyzovaná RNA-polymerázou III.....	365
5.3.4 Transkripce mitochondriového a chloroplastového genoforu.....	369
5.4 <i>Posttranskripční úpravy</i> .....	371
5.4.1 Modifikace hnRNA.....	371
5.4.2 Sestřih hnRNA.....	375
5.4.3 Posttranskripční úpravy pre-rRNA a pre-tRNA.....	388
5.4.4 Posttranskripční úpravy primárních transkriptů genoforu mitochondrií.....	390
5.4.5 Samosestřih.....	401
5.5 <i>Eukaryotická translace</i> .....	413
5.5.1 Eukaryotické cytoplazmatické ribozomy.....	413
5.5.2 Průběh cytoplazmatické translace.....	415

5.5.3	Translace v mitochondriích a chloroplastech.....	420
5.6	<i>Aktivace exprese eukaryotických genů na úrovni transkripce</i> .....	426
5.6.1	Interakce promotorů se zesilovači transkripce.....	426
5.6.2	Aktivace transkripčních faktorů.....	428
5.6.3	Homeotické proteiny, metylace genů, regulace alternativního sestřihu.....	439
5.7	<i>Molekulární mechanizmy signalizace</i> .....	444
5.7.1	Základní pojmy.....	444
5.7.2	Přehled proteinkináz uplatňujících se v signálních drahách.....	447
5.7.3	Další enzymy uplatňující se v signálních drahách.....	452
5.7.4	Extracelulární signály (signální molekuly) k aktivaci transkripčních faktorů.....	454
5.7.5	Membránové receptory extracelulárních signálů.....	458
5.7.6	Intracelulární receptory extracelulárních signálů.....	466
5.7.7	Přenos extracelulárního signálu přes intracelulární receptor.....	469
5.7.8	Přenos extracelulárního signálu přes membránový receptor.....	471
5.7.9	Regulace buněčného cyklu savčí buňky.....	478
5.7.10	Apoptóza.....	485
5.8	<i>Molekulární podstata získané imunity</i> .....	489
5.8.1	Stručná charakteristika získané imunity.....	489
5.8.2	Imunoglobuliny.....	502
5.8.3	Molekulární podstata tvorby protilátek.....	512
5.8.4	Expresse subgenů kódujících imunoglobuliny v průběhu vývoje B-lymfocytů.....	536
5.8.5	Přeskupování subgenů kódujících proteiny komplexu TCR.CD3 T-lymfocytů a vývoj tymocytů.....	544
5.8.6	Aktivace panenských T-buněk a makrofágů.....	552
5.8.7	Aktivace B-lymfocytů.....	563
6.	<b>LITERATURA K DRUHÉMU DÍLU</b> .....	573
6.1	<i>Základní učebnice</i> .....	573
6.2	<i>Monografie</i> .....	573
6.3	<i>Přehledné články ke kapitole 5</i> .....	574
7.	<b>TERMINOLOGICKÝ REJSTŘÍK K DRUHÉMU DÍLU</b> .....	577
7.1	<i>Česko - anglický</i> .....	577
7.2	<i>Anglický</i> .....	591

# STRUKTURA, REPLIKACE A EXPRESE EUKARYOTICKÉHO GENOMU

*V prvním dílu této učebnice jsme uvedli, že buňky prokaryotického typu, tedy prokaryota, jsou výsledkem evoluce, která probíhala od hypotetického společného předka ve dvou liniích. Jedna z těchto linií vedla k bakteriím a druhá k eukaryotům. Z eukaryotické linie se odvinula další, která vedla k archeím. Tento výsledek, založený na analýze sekvencí genů přepisovaných do 16S-rRNA a 18S-rRNA zhruba u 2 000 různých druhů, je samozřejmě nutno brát v úvahu při klasifikaci organismů založené na jejich evoluci. Konkrétně vede k závěru, že všechny organizmy na Zemi lze v souladu s jejich evolucí rozřadit do hierarchicky nejvyšších taxonů, tzv. domén nebo nadříší. Budeme se držet termínu "doména". Jsou tedy tři domény: Bakterie (Bacteria), archea (Archaea) a eukaryota (Eucaryotes) neboli též eukarya (Eucarya). Archea, ač prokaryotického typu buněk, nesdílejí stejnou evoluční větev jako bakterie, ale větev směřující k eukaryotům. Zachovala si však prokaryotický typ buněk charakteristický tzv. prokaryotickým (proti cytoplazmě neohraničeným) jádrem. Na druhé straně u eukaryot je na rozdíl od bakterií a archeí jádro buněk zřetelně ohraničeno jadernou membránou (eukaryotické jádro).*

*Eukaryota zahrnují organizmy jednobuněčné a vícebuněčné. Jejich buňky jsou stejně jako u bakterií a archeí rozlišeny na jádro, cytoplazmu a plazmatickou membránu. Vytkněme některé jejich základní znaky, kterými se zásadně liší od bakterií a archeí:*

*1. Jádro eukaryotických buněk je tvořeno chromatinem, což je komplex dsDNA, histonů a proteinů nehistonové povahy. Chromozomy obsahují lineární dsDNA. Dělení jádra je mitotické a zajišťuje se jím rozdělení chromozomů do dceřiných buněk.*

*2. Pokud eukaryotické buňky jsou též vybaveny buněčnou stěnou, pak jejím základem je celulóza (u rostlin) a chitin (u hub). Živočišné buňky buněčnou stěnu nemají.*

*3. Všechny eukaryotické buňky obsahují organely, které se v buňkách prokaryotických nevyskytují. Jsou to především **mitochondrie** a v rostlinných buňkách kromě mitochondrií ještě tzv. **plastidy**, z nichž zdůrazňujeme přede-*



vším **chloroplasty**. Mitochondrie a plastidy jsou membránou odděleny od ostatního kompartmentu buňky a obsahují alespoň jednu molekulu kružnicové dsDNA. V mitochondriích probíhá oxidativní fosforylace, kterou se tvoří většina ATP buňky. Chloroplasty jsou plastidy, v nichž probíhá fotosyntéza uskutečňující se za účasti chlorofylu.

4. Z dalších struktur typických pro eukaryotické buňky jsou **endoplazmatické retikulum, Golgiho systém a lyzozomy**.

5. Rozmnožování eukaryot je jednak nepohlavní (u jednobuněčných eukaryot) jednak pohlavní (u vícebuněčných).

6. Buňky vícebuněčných eukaryot jsou zřetelně diferencovány co do struktury, morfologie a fyziologické funkce. K této diferenciaci dochází během ontogenetického vývoje vícebuněčného organismu.

Eukaryota se dělí na:

1. **Rostliny (Plantae)**. Od následujících skupin se liší tím, že jsou opatřeny buněčnou stěnou, chloroplasty a jejich výživa a metabolismus jsou fotoautotrofní. Fotosyntéza na rozdíl od fotosyntézy prokaryotické je oxigenní a uskutečňuje se za účasti chlorofylu v chloroplastech.

2. **Houby (Fungi)**. Liší se od předchozí skupiny tím, že mají buněčnou stěnu složenou z chitinu a jsou heterotrofní (chemoheterotrofní). Z evolučního hlediska se však ukazuje, že pravděpodobně bude třeba oddělit od hub **hlenky (Myxomycota)** jako samostatnou skupinu (viz str. 156, obr. 123).

3. **Živočichové (Animalia)**. Jejich buňky nemají buněčnou stěnu a jsou obaleny jen plazmatickou membránou, neobsahují chloroplasty a jejich výživa a metabolismus jsou heterotrofní (chemoheterotrofní). Jsou jednobuněční (prvoci) a vícebuněční (bezobratlí živočichové a strumatci). U vícebuněčných živočichů se vyvinula nervová soustava, která je základem pro psychickou činnost, zvláště rozvinutou u *Homo sapiens (sapiens)*. Z evolučního hlediska se však ukazuje, že pravděpodobně bude třeba oddělit od ostatních živočichů **prvoky (Protozoa)** jako samostatnou skupinu (str. 156, obr. 123).

U eukaryot probíhají všechny způsoby přenosu genetické informace (replicace, transkripce a translace) jako u bakterií a archeí. To ukazuje na jejich evoluční souvislost, v rámci které osvědčené mechanismy přenosu genetické informace zůstaly zachovány. Na druhé straně však komplikovanost struktury a stavby eukaryotického organismu si vyžádala některé modifikace jednotlivých přenosů genetické informace, aniž však byl narušen jejich základní princip vyjádřený ústředním dogmatem molekulární biologie. Modifikace jednotlivých způsobů přenosu genetické informace jsou především zaměřeny na zajištění přesné diferenciaci buněk během ontogenetického vývoje rostlinného a živočišného organismu. **S tím souvisí i struktura genů, které u eukaryot obsahují většinou introny.**

## 5.1

### STRUKTURA EUKARYOTICKÉHO GENOMU

Geny, z nichž sestává genom eukaryotických organismů, jsou rozděleny do dvou nebo tří buněčných organel:

- ◆ v živočišných buňkách do dvou organel, a to do jádra a mitochondrií;
- ◆ v rostlinných buňkách do tří organel, tj. do jádra, mitochondrií a chloroplastů.

Většina genů je soustředěna v jádře na chromozomech. Každý chromozom obsahuje jednu molekulu dsDNA, která působí ve funkci genoforu. Dále budeme tuto DNA označovat jako **chromozomovou DNA** nebo též **jadernou DNA** (zkr. **nDNA** od angl. nuclear DNA). Geny, které jsou na této DNA lokalizovány, jsou nazývány **jadernými**. Kódují proteiny nebo jsou přepisovány do funkčních RNA, které rozhodujícím způsobem ovlivňují životní funkce eukaryotické buňky.

Do mitochondrií a chloroplastů se soustřeďuje jen malá část genů, které však také významně zasahují do životních funkcí, např. do fotosyntézy v chloroplastech nebo terminálního oxidázového cyklu v mitochondriích. Genoforem je v těchto organelách většinou kružnicová dsDNA. Budeme ji nazývat jako **mitochondriovou (mtDNA)** nebo **chloroplastovou DNA (ctDNA)**.

Zatím jen u mála eukaryot, např. u *Saccharomyces cerevisiae*, byly zjištěny plasmidy.

Hned na začátku této kapitoly je třeba zdůraznit, že eukaryotický chromozom je složitá struktura, jejíž součástí je DNA, která jako jediná v něm plní funkci genoforu. Struktura chromozomu se mění v závislosti na fyzikálním a chemickém stavu chromatinu (jaderná hmota), tj. zda je chromatin ve stavu kondenzovaném nebo dekonzenzovaném. **Kondenzovaným** stavem budeme rozumět *silně zhuštěný stav chromatinu na rozdíl od velmi slabě zhuštěného neboli chromatinu dekonzenzovaného*.

#### 5.1.1

#### Fyzikální proměny chromatinu

**OBECNÁ CHARAKTERISTIKA CHROMATINU.** Je obtížné krátce charakterizovat tak komplikovanou strukturu, jakou je chromatin. Ale pokusíme se její základní strukturní znaky popsat. Předně je to *hmota, která se vyskytuje výlučně v jádře eukaryotické buňky a je složena z dsDNA, histonů a proteinů*

*nehistonové povahy*. Podle intenzity zbarvení bazickými barvivy a stupně kondenzace se rozlišují dva fyzikálně odlišné stavy chromatinu:

- ◆ **euchromatin**, který se barví slabě a je v dekonenzovaném stavu;
- ◆ **heterochromatin**, který se barví silně a představuje kondenzovaný stav chromatinu.

Heterochromatin může být konstitutivní nebo fakultativní. **Konstitutivní heterochromatin** je chromatin nacházející se trvale v heterochromatinovém stavu po celý buněčný cyklus ve všech buňkách a vývojových stadiích organismu. Vyskytuje se obecně v centromerách a telomerách chromozomů. **Fakultativní heterochromatin** přechází v závislosti na ontogenetickém vývoji organismu do euchromatinového stavu a naopak.

S kondenzací chromatinu souvisí i jeho transkripční aktivita. Platí asi obecně, že chromatin, ve kterém právě probíhá transkripce, tedy tzv. **aktivní chromatin**, musí být v dekonenzovaném stavu neboli ve stavu euchromatinu. Ale obecně neplatí, že veškerý euchromatin je transkripčně aktivní. Neplatí to proto, že dosti velká část chromozomové DNA, která se nachází v euchromatinu, nemůže být přepisována, neboť neobsahuje promotory. Avšak na druhé straně v heterochromatinu transkripce probíhat nemůže, neboť je v kondenzovaném stavu. Proto se heterochromatin považuje za **transkripčně neaktivní**.

Kondenzaci a dekonenzaci chromatinu je nutno však chápat dynamicky, což znamená, že není jen na jedné straně dekonenzovaný chromatin a na straně druhé chromatin kondenzovaný. Mezi těmito hraničními stavy chromatinu je řada mezistupňů, takže přesněji řečeno existuje chromatin více nebo méně kondenzovaný (dekonenzovaný). **Chromatin v interfázi** neboli **interfázni chromatin**, tj. chromatin v době, kdy se buňka nedělí, je silně dekonenzován na 10 nm (desetinanometrová)-chromatinová vlákna neboli nukleozomové řetězce, nebo na 30 nm (třicetinanometrová)-chromatinová vlákna (viz dále). Naproti tomu **chromatin v mitotické fázi** je silně kondenzován do mikroskopicky viditelných chromozomů, které můžeme označovat jako **mitotické chromozomy** nebo podle fází mitózy, např. **metafázni chromozomy**.

Můžeme tedy rozeznávat tři základní úrovně kondenzace chromatinu:

1. Chromatin tvořený **10 nm-chromatinovými vlákny (nukleozomové řetězce)**. Tloušťka těchto vláken je přibližně 10 nm. Tato forma chromatinu se získává izolací z jader při nízkých koncentracích KCl.

2. Chromatin tvořený **30 nm-chromatinovými vlákny**, jejichž tloušťka je 30 nm. Získává se izolací z jader při koncentraci 0,15 M KCl.

3. **Mitotické chromozomy**, které představují nejvyšší formu kondenzace chromatinu.

Nejdříve však popíšeme chemické složky chromatinu.

**HISTONY.** Všechny histony mají podobnou strukturu. Střed jejich molekuly je globulární, konce jsou flexibilní a vláknité. Zvláště charakteristickým znakem histonů je *vysoký obsah argininu a lyzinu*. Tyto aminokyseliny se vyskytují především ve flexibilních koncích histonů. Na základě poměru argininu k lyzinu se rozlišuje 5 druhů histonu (v níže uvedených zlomcích je v čitateli uveden počet zbytků lyzinu a ve jmenovateli počet zbytků argininu):

- ◆ histon H1 s poměrem 59/3,
- ◆ histon H2A s poměrem 13/13,
- ◆ histon H2B s poměrem 20/8,
- ◆ histon H3 s poměrem 13/17,
- ◆ histon H4 s poměrem 11/14.

Histony H2A a H2B tvoří stabilní dimery, kdežto histony H3 a H4 se spojují do stabilních tetramerů.

**NEHISTONOVÉ PROTEINY.** K nehistonovým proteinům patří především RNA-polymerázy a další proteiny transkripčního aparátu. Jejich množství je závislé na buněčném typu a fyziologickém stavu buňky. Dále k nehistonovým proteinům patří **HMG-proteiny** neboli **proteiny skupiny vysoké pohyblivosti**, které se *vyznačují vysokou elektroforetickou pohyblivostí*. Jsou to:

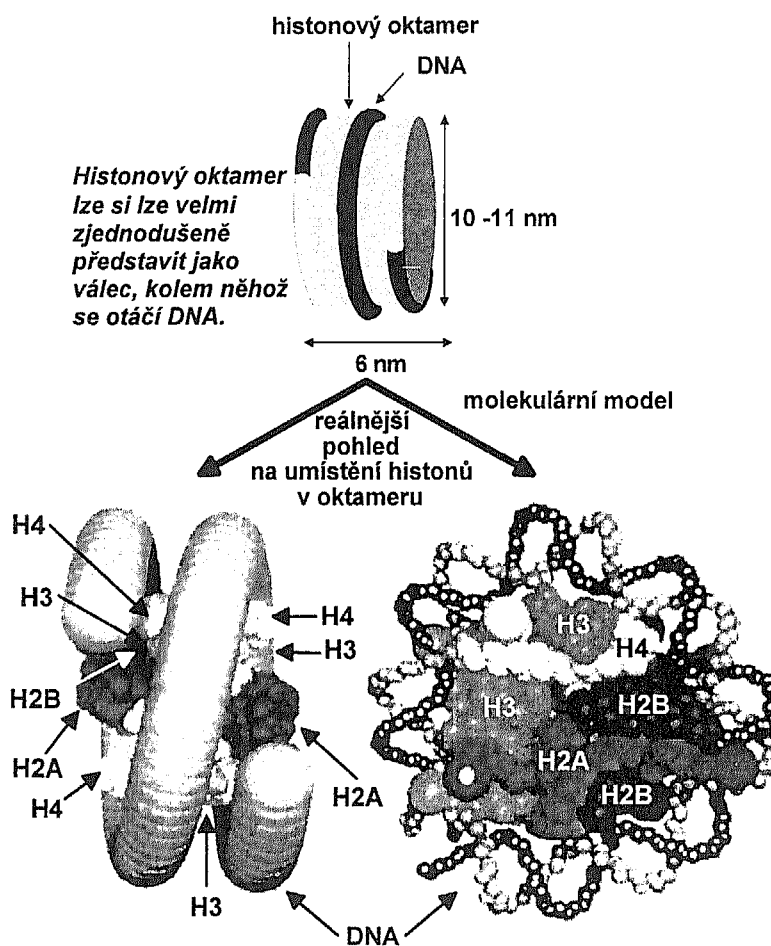
**1. Proteiny HMG1 a HMG2.** Tyto velmi příbuzné proteiny se vážou dobře na DNA, přednostně však *na neobvyklé struktury DNA*, jako je např. křížová struktura aj. Jejich funkce není známa, ale pravděpodobně mají důležitý význam v transkripci a replikaci.

**2. HMG14 a HMG17.** Tyto též malé a velmi příbuzné proteiny se vážou *na jádro nukleozomu*, zvláště v těch oblastech chromatinu, ve kterých probíhá syntéza RNA. Zde HMG14 a HMG17 zaujímají místo, které jinak obsazuje histon H1.

**NUKLEOZOMY.** Nukleozomy jsou *částice chromatinu, které chápeme jako jeho základní jednotky*. Každý nukleozom obsahuje (obr. 196):

- ◆ oktamer histonů (H2A, H2B, H3, H4)<sub>2</sub>,
- ◆ jednu molekulu histonu H1, která není součástí histonového oktameru,
- ◆ úsek DNA o průměrné délce 200 bp, který tvoří dvě otáčky (dva závit) kolem histonového oktameru.

Oktamer histonů tvoří vnitřní část nukleozomu. Každý histon je v něm zastoupen dvakrát. Histon H1 se pojí k nukleozomu z vnější strany a podílí se



Obr. 196  
Schéma složení nukleozomu

na spojování sousedních nukleozomů v nukleozomovém řetězci (viz níže).  
*Kolem histonového oktameru se otáčí dsDNA.*

Histonový oktamer si ve zjednodušené formě představujeme jako válec (nikoli jako kulovitý útvar) o šířce 10 - 11 nm a výšce 6,0 nm. Sestává z těchto složek:

- ◆ histonový tetramer  $(H3)_2 - (H4)_2$ ,
- ◆ dva dimery H2A - H2B.

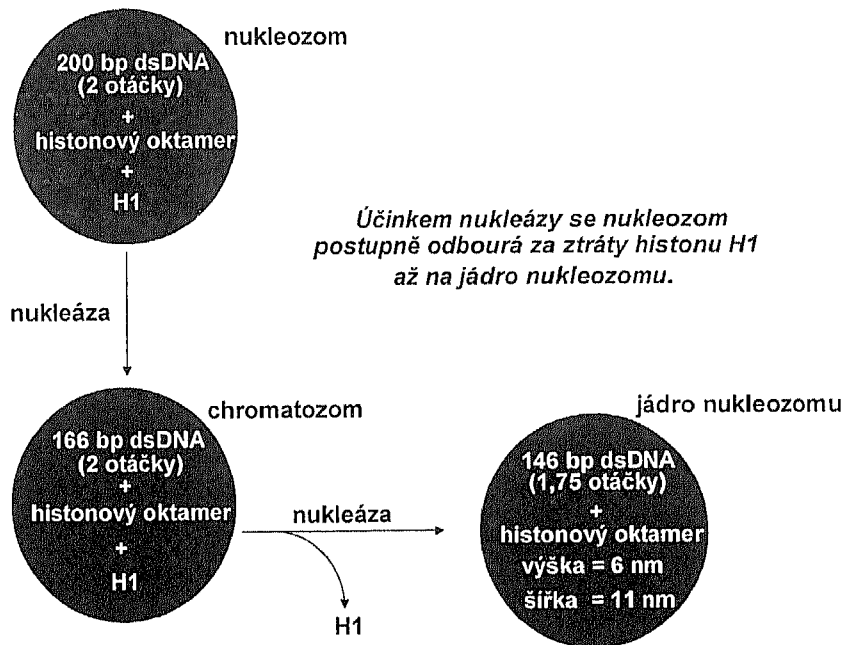
Profil nukleozomu se utváří podle tetrameru  $(H3)_2 - (H4)_2$ , na který se přikládají ze dvou stran dimery H2A - H2B a z vnější strany se připojuje histon

H1. Působením nukleázy se DNA nukleozomu, jejíž průměrná délka byla původně 200 bp, postupně odbourává za uvolnění histonu H1 až na tzv. **jádro nukleozomu** obsahující DNA o délce 146 bp, která tvoří 1,75 otáčky kolem histonového oktameru (obr. 197).

**NUKLEOZOMOVÝ ŘETĚZEC.** Základem eukaryotického chromozomu je 10 nm-chromatinové vlákno neboli nukleozomový řetězec, jehož jednotlivé články tvoří jádra nukleozomu spojená dlouhou lineární molekulou dsDNA, která se táhne od jednoho konce chromozomu ke druhému (obr. 198).

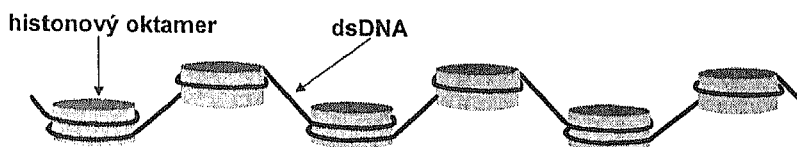
Nukleozomový řetězec je pozorovatelný elektronovým mikroskopem. Jeho tloušťka je v rozmezí 10 až 11 nm a označuje se proto jako **10 nm (desetinanometrové)-chromatinové vlákno**. Úplně dekonduovaný chromatin sestává z takových vláken, která vlastně představují dekonduované a despiralizované chromozomy (což bude zřejmější z dalšího výkladu) v euchromatinu během interfáze, tj. v období, kdy se buňka nedělí.

**ZÁKLAD KONDENZACE CHROMATINU.** Při koncentraci solí vyšší



Obr. 197  
Parametry forem nukleozomu vzniklých účinkem nukleázy

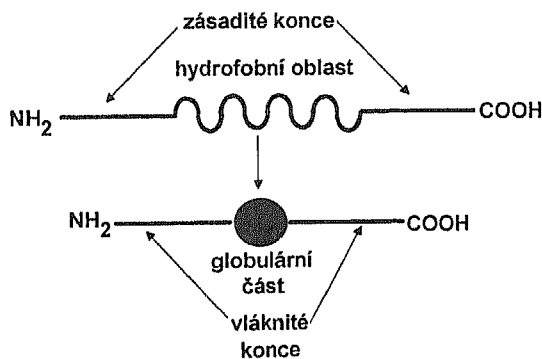
*Nukleozomové řetězce se tvoří při nízkých koncentracích solí (KCl) a za nepřítomnosti histonu H1.*



**Obr. 198**  
**Nukleozomový řetězec**

než je koncentrace, která je potřebná pro tvorbu nukleozomového řetězce, a za přítomnosti histonu H1 se začíná chromatin kondenzovat do vyšších struktur. Histon H1 je protein, jehož střed je globulární a hydrofobní, kdežto C-konec a N- konec jsou vláknité (obr.199). Pomocí těchto konců se v nukleozomu váže na místa, kde dsDNA do nukleozomu vstupuje a na místa, kde z něho vystupuje. Tato místa jsou vazbou histonu H1 chráněna proti účinku nukleáz. *Vazba histonu H1 na nukleozomy je nutnou podmínkou pro kondenzaci chromatinu.* Molekula histonu H1 se totiž v nukleozomu váže globulární částí na specifické místo DNA a vláknitými konci na sousední nukleozomy. Tím umožní, že se sousední nukleozomy mohou těsně k sobě přiložit (obr. 200), což se jeví jako jeden ze základních faktorů navozujících kondenzaci chromatinu do vláken různé tloušťky.

**30 NM-CHROMATINOVÉ VLÁKNO.** Toto vlákno představuje další

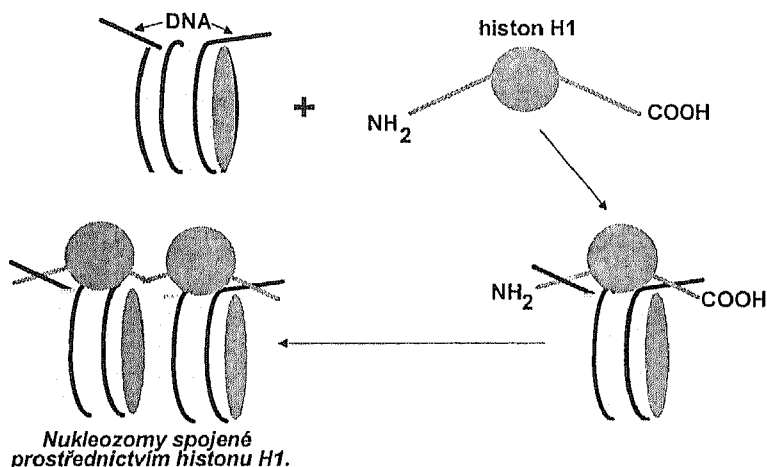


**Obr.199**  
**Schéma molekuly histonu H1**

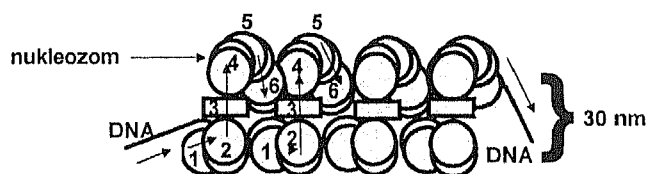
stupeň kondenzace chromatinu. Vzniká za účasti histonu H1, který sdružuje nukleozomy nukleozomového řetězce a spiralizuje je do solenoidové struktury. Jeden závit (otáčka) solenoidu je tvořen šesti nukleozomy. Průměrná tloušťka vlákna je 30 nm (obr. 201).

Pohled shora na 30 nm-chromatinové vlákno ve směru osy, kolem které se otáčejí nukleozomy, by ukázal šestici nukleozomů připadajících na jeden závit a současně též, jaké je rozložení molekul histonu H1 v jedné otáčce (obr. 202).

30 nm-chromatinové vlákno se váže k tzv. **proteinovému lešení**, což je vláknitá struktura složená z proteinů nehistonové povahy. Jedním z těchto proteinů je topoizomeráza II. Dalšími proteiny nehistonové povahy, které se nacházejí v proteinovém lešení, jsou proteiny HMG, dále transkripční faktory, polymerázy aj. (obr. 203).



Obr. 200  
Spojování nukleozomů prostřednictvím histonu H1



*Histon H1 je vynechán.*  
Pro snadnější orientaci jsou nukleozomy prvního a druhého závitů číslovány a šipky ukazují na směr závitů či otáčení.

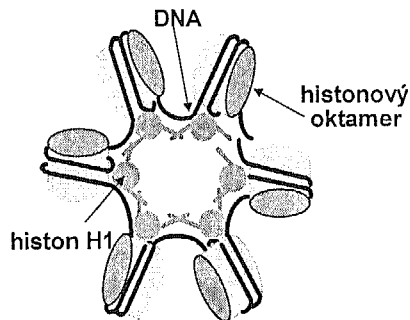
Obr. 201  
30 nm-chromatinové vlákno



K proteinovému lešení se 30 nm-chromatinové vlákno váže ve formě smyček, které se označují jako **chromatinové domény** (obr. 203). V úpatí každé smyčky je jedna molekula topoizomerázy II, která pravděpodobně při transkripci a replikaci mění topologický stav DNA nacházející se ve smyčce. Předpokládá se, že v chromatinových doménách, tedy ve zmíněných smyčkách, probíhá transkripce. Chromatinová doména může mít jednu nebo i více transkripčních jednotek. Kromě toho každá chromatinová doména představuje nezávislý replikon a obsahuje jeden počátek replikace (*ori*). V kapitole, která pojednává o replikaci eukaryotické chromozomové DNA, se dovíme, že DNA v chromozomu představuje soubor mnoha replikonů, čímž je zajištěno, že replikace proběhne v rámci buněčného cyklu. *Oblast na DNA, kterou se chromatinové vlákno váže k proteinovému lešení*, se označuje jako **připojovací oblast pro proteinové lešení**, zkráceně **SAR**. K této oblasti se též váže topoizomeráza II. Je to úsek dlouhý asi 250 - 1 500 kb sestávající ze souvislého sledu A a T.

**MITOTICKÉ CHROMOZOMY.** Kondenzací 30 nm-chromatinových vláken se vytvoří až během mitózy nebo meiózy mikroskopicky viditelné chromozomy. Předpokládá se, že 30 nm-chromatinové vlákno se spiralizací kondenzuje (obr. 204) do 600 - 700 nm-chromatinových vláken, která tvoří strukturu metafázních chromozomů (obr. 205).

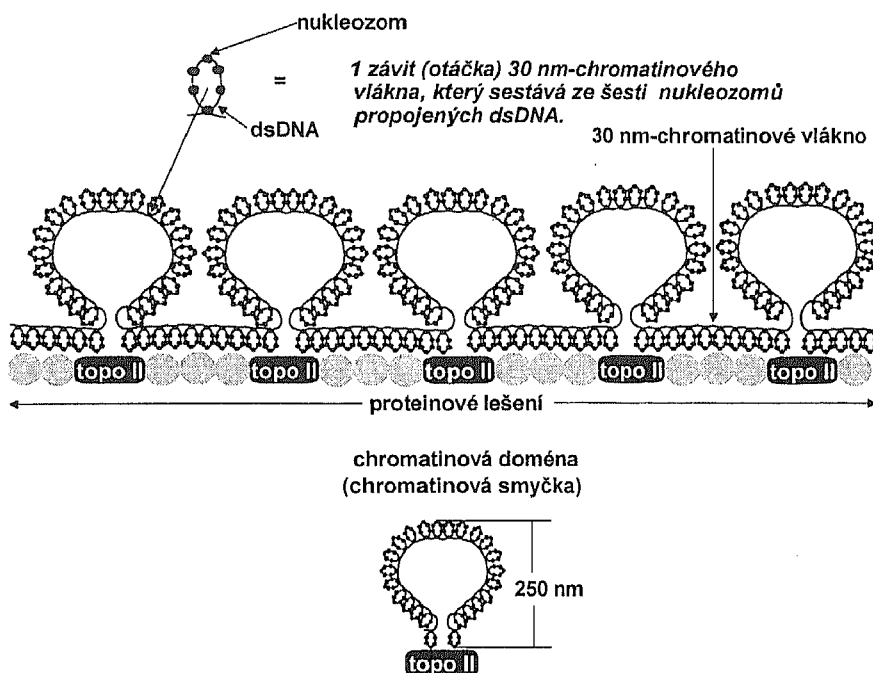
*V mitotických chromozomech je chromatin ve stavu, který představuje nejvyšší stupeň kondenzace a je proto i transkripčně inaktivní.*



*Z obrázku je zřejmé, že molekuly histonu H1 udržují stabilitu šestice nukleozomů připadající na jeden závit (otáčku). Všimněte si též, že DNA tvoří kolem histonových oktamerů solenoid.*

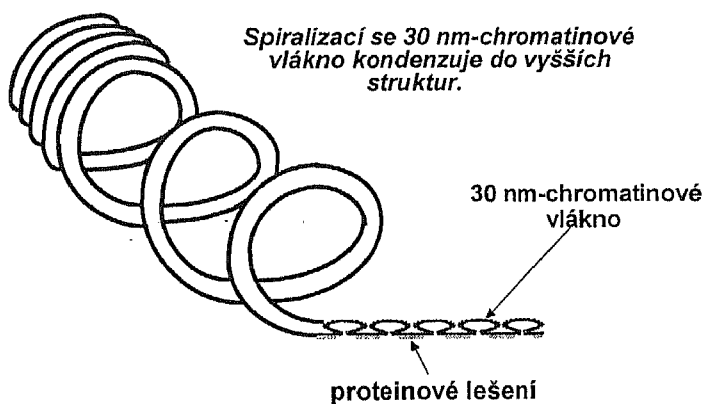
Obr. 202

30 nm-chromatinové vlákno - pohled shora ve směru osy vlákna



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

**Obr. 203**  
Vazba 30 nm-chromatinového vlákna na proteinové lešení, chromatinové domény (smyčky)

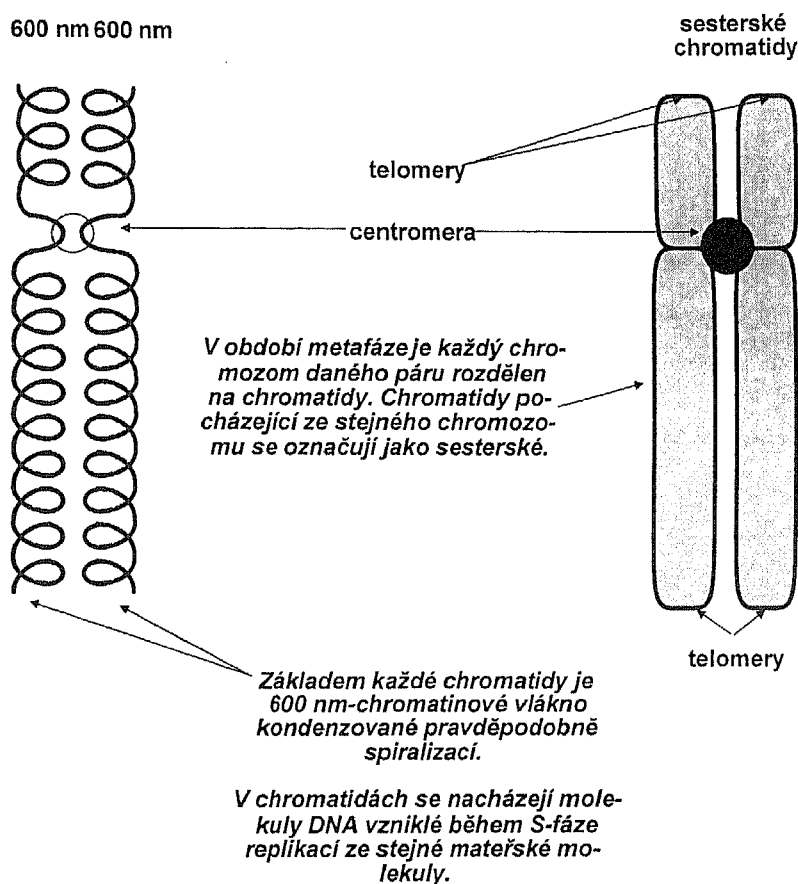


**Obr. 204**  
Kondenzace 30 nm-chromatinového vlákna

**PRUHOVÁNÍ CHROMOZOMŮ.** Jednotlivé chromozomy v karyotypu se mimo jiné rozlišují podle spekter pruhů, které se zviditelní metodami pruhování chromozomů. Existují tyto způsoby pruhování (obr. 206):

**Pruhování G.** Chromozomy se podrobí natrávení trypsinem a pak se barví Giemsovým barvivem, které se váže na DNA. Tmavé pruhy se označují jako **G-pruhy**. Světlé pruhy jsou G-negativní.

**Pruhování Q.** Chromozomy se obarví fluorescenčním barvivem, které se přednostně váže na DNA bohatou páry AT. Fluoreskující pruhy v UV-světle se nazývají **Q-pruhy** a označují stejné chromozomové segmenty jako G-pruhy (ale reverzibilně, opačně).



*V každé chromatidě je jedna molekula lineární dsDNA.*

Obr. 205  
Schematické vyjádření hypotézy o základní struktuře metafázního chromozomu

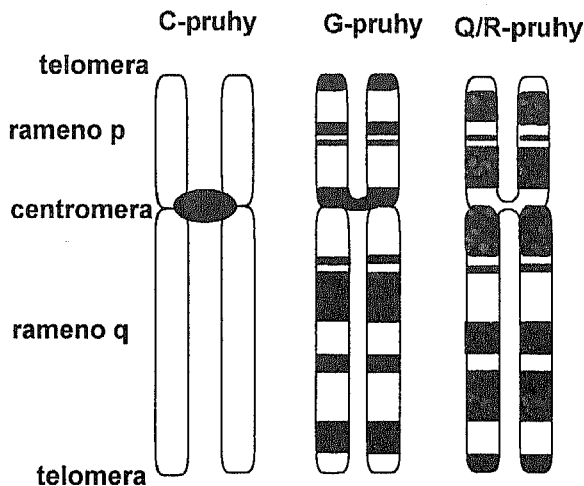
**Pruhování R.** Je v podstatě opakem pruhovacího spektra G. Nejdříve se chromozomy denaturují teplem v roztoku NaCl a pak se barví Giemsovým barvivem. Tepelné denuraci podléhá DNA bohatá na AT-páry. Vzniklé pruhy se nazývají **R-pruhy** a jsou identické s Q-pruhy.

**Pruhování T.** Tím se identifikuje podskupina R-pruhů, která se speciálně soustřeďuje do telomer. Zviditelní se buď působením teploty na chromozomy, dříve než se obarví Giemsovým barvivem, nebo působením kombinace barviva a fluorochromů.

**Pruhování C.** Předpokládá se, že se jimi prokazuje konstitutivní heterochromatin. Nejdříve se chromozomy denaturují v nasyceném roztoku hydroxidu barnatého a pak se barví Giemsovým barvivem.

Pruhy jsou rozmístěny jak v krátkém rameni chromozomu, které se označuje jako **p**, tak i v dlouhém označovaném jako **q**. Pak se číslují v krátkém i dlouhém rameni směrem od centromery, např. p1, p2, p3; q1, q2, q3, q4 atd. Podpruhy se číslují jako p11 (čti jedna-jedna a nikoli jedenáct). Ještě nižší kategorie pruhů se čísluje např. p11.1, p11.2 atd. Centromera se označuje jako **cen** a telomera jako **tel**. Číslování pruhů samozřejmě předchází číslo chromozomu.

**HYPERSENZITIVNÍ MÍSTA.** Ne všechna místa nukleozomového řetězce v chromatinu jsou pokryta nukleozomy. Jsou zde i místa volná bez nukleozomů. Ta jsou pochopitelně velmi citlivá k nukleázám, neboť nejsou chráněna nukleozomy. Označují se jako místa hypersenzitivní k deoxyribonukleáze I (DNAáza I) nebo zkráceně **hypersenzitivní místa**. *Tato místa, jejichž rozsah je*



Obr. 206  
Idealizované pruhování chromozomů

50 - 200 bp, jsou stonásobně citlivější k DNAáze I ve srovnání se sousedními oblastmi. Jsou to místa, která musí být rychle přístupná proteinům (transkripčním faktorům, enzymům) uplatňujícím se při regulaci transkripce. Patří sem promotory a jiné regulační oblasti. Jsou nutnou, ale ne postačující, podmínkou pro transkripci strukturálních genů. Rozlišují se dva typy těchto míst:

- ◆ **konstitutivní, která se trvale vyskytují v chromatinu,**
- ◆ **indukovatelná, která se odkrývají těsně před nebo po aktivaci genu.**

Jak již bylo uvedeno, hypersenzitivní místa nejsou pokryta nukleozomy. Čím jsou tedy chráněna proti účinku nukleáz? Předpokládá se (hypotéza), že na hypersenzitivní místa se vážou regulační proteiny (např. transkripční faktory a jiné nehistonové proteiny), kterými jsou nukleozomy vytěsněny. Těmito proteiny jsou pak hypersenzitivní místa vůči účinku nukleáz dočasně chráněna.

Na obr. 207 je uveden příklad hypersenzitivních míst v palindromatické regulační oblasti (promotor a místo *ori*) pro dvě transkripční jednotky, které se týkají transkripce do rRNA u *Tetrahymena pyriformis*.

### 5.1.2

## Eukaryotická chromozomová (jaderná) DNA

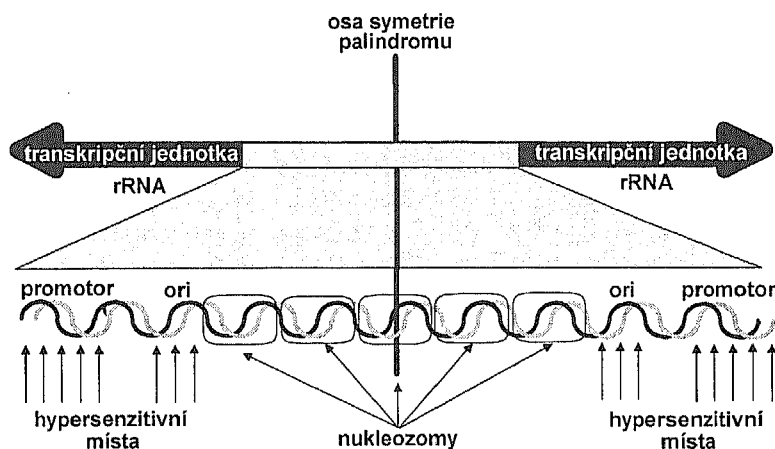
**ROZMĚRY CHROMOZOMOVÉ DNA.** Každý eukaryotický chromozom obsahuje jednu dlouhou lineární molekulu dsDNA. Vyplývá to ze studií DNA chromozomů různých druhů eukaryot. Jestliže sečteme počet párů bází připadajících na DNA v jednotlivých chromozomech haploidní buňky, obdržíme číslo udávající velikost jaderné složky haploidního genomu příslušného eukaryotického druhu (tab. 17).

Z ohromující velikosti lidského a vůbec savčího genomu obsahuje genetickou informaci pouze 10 %. Většina strukturálních genů měří

$$1,0 \times 10^4 \text{ až } 2,0 \times 10^6 \text{ bp,}$$

což je udivující rozdíl proti prokaryotickým genům. Vezmeme-li v úvahu, že pouze 1 000 bp jednoho takového genu kóduje proteiny o průměrné délce, která odpovídá 300 až 400 aminokyselinovým zbytkům, pak značná část musí připadat na nekódující sekvence. Z evolučního hlediska tato skutečnost znamená, že většina savčího genomu byla v evoluci informačně nevyužita a je k dispozici dalším mutačním změnám.

**REPETICE.** Výraznou zvláštností eukaryotické chromozomové DNA je to, že značnou její část tvoří repetice. Jsou to především:



Obr. 207

Hypersenzitivní místa v regulačních oblastech transkripční jednotky přepisované do rRNA u *Tetrahymena pyriformis*

- ◆ krátké tandemové repetice,
- ◆ rozptýlené repetice.

S oběma typy repeticí jste se již seznámili na str. 102-104. U bakterií se nevyskytují (alespoň ne do té míry jako u eukaryot). Je to jedna z charakteristik eukaryotické chromozomové DNA. Další charakteristickou zvláštností eukaryotické jaderné DNA je, že obsahuje též **genové repetice**. Takto se označují repetice, jejichž jednotky mají význam genů. U mnohobuněčných organismů se 25 až 50 % strukturních genů vyskytuje jako jedinečné DNA-sekvence. Zbývající část se vyskytuje ve dvou nebo více kopiích, tedy v genových repeticích. Jsou to:

**1. Genové rodiny.** Genovou rodinu tvoří skupina sekvencně příbuzných genů, které mají společný evoluční původ a stejnou biologickou funkci. V příslušné genové rodině se geny částečně liší v sekvenci a kódují tedy proteiny, které se poněkud liší sekvencemi aminokyselin. Často se jednotlivé geny téže rodiny nevyjadřují současně ve stejném vývojovém stadiu organismu. Příkladem jsou geny kódující polypeptidové řetězce hemoglobinu, které patří do dvou rodin. V jedné rodině jsou geny kódující globiny  $\epsilon$ ,  $G_\gamma$ ,  $A_\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\beta$  a ve druhé  $\zeta$  a dva geny  $\alpha$ . Expresí genů  $\zeta$ ,  $\epsilon$ ,  $G_\gamma$ ,  $A_\gamma$  se uskutečňuje v embryu, genů  $\alpha$ ,  $G_\gamma$ ,  $A_\gamma$  ve fétu a u dospělého jedince se vyjadřují geny kódující řetězce  $\alpha$ ,  $\delta$  a  $\beta$ . Dospělý jedinec pak obsahuje hemoglobiny  $\alpha_2\delta_2$  (hemoglobin HbA<sub>2</sub>) a  $\alpha_2\beta_2$  (hemoglobin HbA).

**Tab. 17**  
**Velikost DNA jaderné složky haploidního genomu u vybraných druhů eukaryot**

Druh	Velikost genomu v počtech párů bází (bp)	Počet chromozomů v haploidním genomu
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$1,34 \times 10^7$	16
<i>Caenorhabditis elegans</i>	$8,0 \times 10^7$	4
<i>Drosophila melanogaster</i>	$1,65 \times 10^8$	4
<i>Xenopus laevis</i>	$3,0 \times 10^9$	18
<i>Mus musculus</i>	$3,0 \times 10^9$	20
<i>Homo sapiens</i>	$3,0 \times 10^9$	23
<i>Zea mays</i>	$5 \times 10^9$	10
<i>Allium cepa</i>	$1,5 \times 10^{10}$	8

V genových rodinách se vyskytují též **pseudogeny**, což jsou *nepřesné kopie strukturních genů, které vznikly asi nepřesnou duplikací nebo mutací, kterou se původně aktivní gen v genové rodině inaktivoval.*

**2. Tandemové genové repetice.** Jsou to *geny nebo skupiny genů opakující se bezprostředně za sebou, tedy v tandemu.* Pokud jednotka repetice představuje skupinu genů, mají geny uvnitř skupiny stejné pořadí, např:

A - B - C - D --- A - B - C - D --- A - B - C - D --- A - B - C - D ---

kde A, B, C, D je označení jednotlivých genů uvnitř genové skupiny. *Nukleotidové sekvence oddělující jednotlivé geny nebo skupiny genů se označují jako mezerníky, které ve výše uvedeném příkladu jsou vyjádřeny pomlčkami.* Tandemovým způsobem se opakují:

- ◆ Geny přepisované do 5S rRNA (četnost repetice 250 u člověka).
- ◆ Geny přepisované do tRNA (četnost repetice 10 až 100 pro jednotlivý druh tRNA u člověka).
- ◆ Geny kódující histony (četnost repetice 20 pro skupinu genů kódujících všech pět histonů u obratlovců).

Biologický význam těchto tandemových genových repeticí spočívá v tom, že jedna kopie každého z uvedených genů by nestačila krýt spotřebu jeho produktů buňkou. V buňce musí být dostatečná zásoba 5S-rRNA a tRNA pro realizaci translace, a také histonů pro syntézu histonového oktameru při replikaci.

**3. Rozptýlené genové repetice.** Takto nazýváme *gen nebo genovou rodinu*, jejichž kopie se vyskytují na různých místech haploidního genomu. Týká se to např. některých genů přepisovaných do tRNA, snRNA aj.

**TELOMERY.** Každý eukaryotický chromozom má tyto funkční složky, které zajišťují jeho biologickou funkci jako celku. Jsou to:

**1. Centromera**, která zajišťuje během mitózy a meiózy segregaci chromozomů do dceřiných buněk. U kvasinek je centromera dlouhá asi 110 bp. Její konce jsou, co se týká sekvencí, značně konzervativní, a sekvence mezi nimi je sestavena z 80 - 90 bp bohatých páry AT. Složitější je u vyšších eukaryot.

**2. Telomera**, kterou je řízeno při replikaci dokončení syntézy dceřiných DNA-řetězců na 3'-koncích matricových DNA-řetězců chromozomu. Mechanismus tohoto procesu při replikaci je vysvětlen na str. 343, obr. 219. 3'-konce DNA v telomerách se vyznačují tandemovými repeticemi, které jsou pro daný druh charakteristické. Jednotky těchto repeticí jsou např.:

TTGGGG neboli  $T_2G_4$  u *Tetrahymena thermophila* a *Glaucoma chattoni*.

TTTTGGGG neboli  $T_4G_4$  u *Euplotes aediculatus* a *Oxytricha nova*.

TTTAGGG neboli  $T_3A_1G_3$  u *Arabidopsis thaliana*.

TGGG neboli  $TG_3$  u *Saccharomyces cerevisiae*.

TTAGGG neboli  $T_2A_1G_3$  u člověka, myši a *Trypanosoma brucei*.

Tyto tandemové repetice mohou být buď pravidelné, tj. opakují se v nich stále stejné jednotky, nebo nepravidelné, tj. jednotky repetice mohou mít různé variace, jejichž opakování nemusí být stejné. Přesto však u všech tandemových repeticí lze pozorovat jeden DNA-řetězec bohatý na G a jemu komplementární bohatý na C. U druhů *Oxytricha* bylo zjištěno, že makronukleární DNA-řetězec (poznámka: u prvků rozlišujeme mikronukleus a makronukleus) bohatý na G se vyskytuje jen na 3'-koncích chromozomové dsDNA a přečnává 12 až 16 nukleotidy za 5'-konce DNA-řetězce, který je mu komplementární a je bohatý na C, např.:





Sekvence analogické repetitivní v telomerách se studují na oligonukleotidech *in vitro*. Bylo zjištěno, že za definovaných podmínek dochází mezi souslednými úseky guaninu neboli **G-motivy** analogickými makronukleární DNA (*Oxytricha*) na 3'-konech k intramolekulárním a intermolekulárním interakcím, které jsme vysvětlili na str. 91 - 93 (obr. 73 a 74).

*Tandemové repetice, které se vyskytují na 3'-konech chromozomové jaderné dsDNA eukaryot* budeme dále nazývat **telomerické konce** nebo též **telomerické sekvence**. Netvoří se replikací, ale jsou syntetizovány enzymem telomerázou (str. 343). Jejich délka je v rozmezí od 38 bp u bičíkovic *Oxytricha* a *Euplotes* až do několika desítek kilobází u savců. Telomerázou je tato délka regulována u každého druhu organismů. **Telomeráza (EC 2.7.7.-)** se definuje jako *specifická DNA-polymeráza, která připojuje telomerické sekvence k 3'- koncům chromozomové DNA*. Tímto přidáváním telomerických sekvencí se vyrovnává ztráta výše uvedených repetitivní na 3'-konech chromozomové DNA, k níž by docházelo za nepřítomnosti telomerázy vlivem nedokončení syntézy dceřiných DNA-řetězců na těchto koncích v S-fázi buněčného cyklu. Proto se telomeráza vyskytuje v rychle se dělících buňkách u jednobuněčných organismů (prvoci, kvasinky). *U savců se nevyskytuje v somatických buňkách, ve kterých v důsledku toho dochází ke zkracování telomerických konců*. Vyskytuje se však v pohlavních buňkách, v embryonálních buňkách a dále také v buňkách odvozených z nádorů (HeLa-buňky).

Délka telomer se zkracuje v závislosti na stáří některých somatických tkání člověka, zachovává se však v zárodečných buňkách. U myši, které mají mnohem kratší rozpětí života než člověk, k takovému zkracování v závislosti na stáří však nedochází. Uvádí se hypotéza, že zkracováním délky telomerických sekvencí je indukován opravný mechanismus DNA, kterým se zastavuje buněčný cyklus. Avšak na druhé straně telomeráza je nutná a potřebná pro to, aby mohlo buněčné dělení proběhnout. Přítomnost telomerázy v rakovinných buňkách člověka tuto hypotézu podporuje. Mohlo by pak zastavení aktivity telomerázy v těchto buňkách vést též k zastavení jejich dělení?

### 5.1.3

## Mitochondriový genofor

### OBEČNÁ CHARAKTERISTIKA MITOCHONDRIOVÉHO GENOFORU.

Mitochondriový genofor je tvořen dsDNA, která může mít tuto konformaci:

- ◆ U vícebuněčných živočichů je to kružnicová dsDNA o rozměrech 16 až 20 kb. Každý živočišný druh má svůj vlastní typ mitochondriového genoforu.
- ◆ U vyšších rostlin je mitochondriový genofor tvořen kružnicovou dsDNA

nebo lineární ssDNA a kolísá ve velikosti v rozmezí 250 kb až 2 000 kb. Její struktura a uspořádání genů je značně variabilní, dokonce u stejného organismu.

- ◆ U jednobuněčné řasy *Chlamydomonas reinhardtii* je mitochondriový genofor tvořen lineární dsDNA, která má délku 40 kb.
- ◆ U prvoků se mitochondriový genom nachází ve formě kružnicové nebo lineární dsDNA (např. u *Tetrahymena pyriformis*, *Paramecium aurelia*), jejíž délka je v rozmezí 30 až 60 kb a liší se podle druhu.
- ◆ Kvasinky mají mitochondriový genofor ve formě kružnicové dsDNA, jejíž velikost je 20 až 100 kb. Rozdíly závisí na druhovém postavení. Některé kvasinky mají mitochondriový genofor tvořený lineární dsDNA.

Celkově lze říci, že konformace, tvar a velikost mitochondriové DNA je značně heterogenní a závisí na fylogenetickém postavení druhu. U všech uvedených skupin organismů se *obvykle v mitochondriích vyskytuje více molekul DNA (5 až 10), což kolísá podle druhu*. Vyšší počet molekul je spíše výjimkou.

Důležité je si povšimnout, že DNA mitochondrií živočichů je poměrně malá a má informační kapacitu kódovat maximálně 36 proteinů. Avšak biochemické reakce, které v mitochondriích probíhají, ukazují na to, že mitochondrie potřebují větší počet proteinů. Tyto proteiny jsou kódovány jadernými geny a jsou dopravovány do mitochondrií z cytoplazmy.

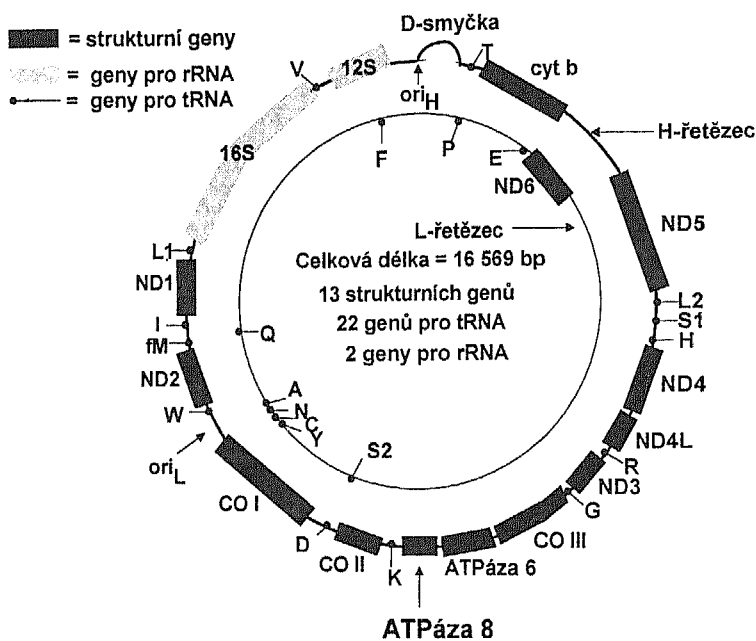
### USPOŘÁDÁNÍ GENŮ NA GENOFORU MITOCHONDRIÍ ČLOVĚKA.

Jako příklad uspořádání genů na mitochondriovém genoforu uvádíme uspořádání genů na mtDNA člověka. Uspořádání genů na mtDNA ostatních savců je podobné. Jeho výrazným znakem je husté obsazení mtDNA geny. To platí jen pro savce, nikoli pro rostliny a jiné organizmy. Z obr. 208 je zřejmé, že mtDNA člověka kóduje:

- ◆ 2 molekuly rRNA, a to 12S-rRNA a 16S-rRNA;
- ◆ 22 molekul tRNA a 13 různých proteinů.

Molekulární druhy tRNA jsou na obr. 208 vyjádřeny mezinárodním symbolem pro aminokyselinu, kterou přenašejí (např. G pro glycin, S pro serin atd.). Nachází-li se více genů na mtDNA pro tutéž tRNA, je u mezinárodního symbolu uvedeno pořadové číslo kopie. *Na mtDNA člověka se vyskytují geny pro všechny tRNA. To platí i pro ostatní savce.* Gen přepisovaný do tRNA<sup>Ser</sup> (gen S) a tRNA<sup>Leu</sup> (gen L) se vyskytuje ve dvou kopiích. Strukturní geny jsou:

- ◆ geny CO I, CO II, CO III, které kódují každý jednu z podjednotek cytochrom c-oxidázy; ostatní podjednotky jsou kódovány jadernými geny;



Obr. 208  
Uspořádání genů na DNA mitochondrií člověka

- ♦ geny ND1 až ND6 kódující podjednotky NADH-dehydrogenázy;
- ♦ geny označené ATPáza 6 a ATPáza 8, které kódují šestou a osmou podjednotku z devíti podjednotek  $H^+$ -transportující ATP-syntázy (EC 3.6.1.34);
- ♦ z osmi podjednotek ubichinon-cytochrom b-reduktázového komplexu toliko podjednotka cyt b je kódována na mtDNA.

Na mtDNA člověka jsou prakticky všechny geny pro realizaci transkripce a translace. Toliko geny pro ribozomové proteiny, DNA- a RNA-polymerázu chybí a jsou ve své funkci nahrazovány jadernými geny. *Mitochondriové geny savců a živočichů vůbec jsou jednoduché, kdežto v mitochondriích hub a rostlin je řada strukturálních genů složených (obsahují introny a exony).* Do jaké míry je mtDNA člověka závislá na genech jaderných chromozomů, uvádí tab. 18. Celková charakteristika obou složek genomu člověka, tj. jaderné složky a mitochondriového genoforu, je uvedena v tab. 19.

**VARIABILITA MITOCHONDRIOVÉ DNA.** Popsali jsme mtDNA člověka. Jí podobná je též mtDNA ostatních savců a pravděpodobně všech obratlovců. Avšak mtDNA ostatních organismů se od ní výrazně liší (tab. 20). Uvedeme jako příklad takové odlišnosti mtDNA bezobratlých a kvasinek:

Tab. 18

## Kooperace jaderných genů s geny na mtDNA lidského genomu

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

Z bezobratlých např. mtDNA *Drosophila melanogaster* měří 20 000 bp a je tedy větší než mtDNA obratlovců. Na druhé straně se obě DNA podobají, co se týče pořadí genů. Rozdíl mezi nimi spočívá v tom, že mtDNA drozofily obsahuje dlouhé úseky bohaté páry AT, jejichž funkce není známa.

DNA mitochondrií kvasinek měří podle druhu 20 000 až 100 000 bp. Obsahuje také úseky bohaté páry AT o neznámé funkci. Kromě toho obsahuje některé geny, které chybí u mtDNA obratlovců. Některé geny mtDNA kvasinek jsou také delší než u obratlovců a obsahují introny (gen COI a cyt b).

Zvláště odlišná od mtDNA živočichů je mtDNA rostlin (tab. 20):

♦ Je mnohem větší (250 až 2 500 kb). Ve velikosti mtDNA se však též významně liší jednotlivé druhy rostlin navzájem, dokonce i uvnitř stejného druhu a možná i ve stejné buňce.

♦ DNA mitochondrií rostlin může svou strukturu měnit. *Tyto změny jsou důsledkem intramolekulární rekombinace.*

Tab. 19

## Celková charakteristika lidského genomu

	Jaderná složka genomu	Mitochondriový genofor
Velikost	$3,0 \times 10^9$ kb	$1,66 \times 10^4$ kb
Počet molekulárních druhů dsDNA, tj. DNA lišících se navzájem v primární struktuře	23 v buňkách XX 24 v buňkách XY všechny jsou lineární	jedna kružnicová molekula dsDNA
Celkový počet molekul dsDNA na buňku	23 v haploidních buňkách 46 v diploidních buňkách	$\sim 10^3$
Sdružené proteiny	histony a nehistonové proteiny	většinou bez proteinů
Genová hustota	1 gen na 40 kb	1 gen na 0,45 kb
Repetitivní DNA	značná část	velmi malá část
Transkripce	většina genů se přepisuje jednotlivě	více genů se přepisuje do jednoho primárního transkriptu
Introny	většina genů	žádný gen
Dědičnost	mendelistická pro sekvence na X a autozomy, otcovská pro sekvence na Y	jen mateřská
Počet genů	65 000 - 80 000	37
Průměrný počet genů na genofor	3000	37
Velikost genu	10 - 15 kb	
Vzdálenost mezi geny	25 - 30 kb	

**Tab. 20**  
**Mitochondriová DNA různých skupin organismů**

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

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

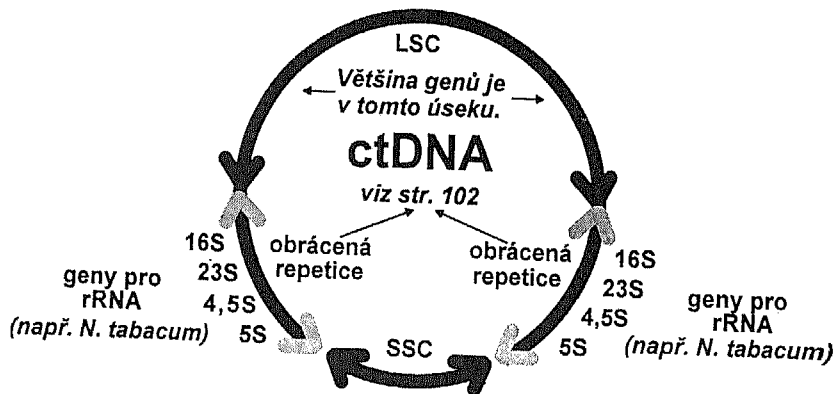
### 5.1.4

## Chloroplastový genofor

**OBEČNÁ CHARAKTERISTIKA GENOFORU CHLOROPLASTŮ.** *Geny, které tvoří genom rostlinné buňky, jsou rozděleny do jádra, mitochondrií a chloroplastů (plastidů). Chloroplastový genofor sestává z dsDNA, která se označuje jako ctDNA a je kružnicová. Její délka je značně variabilní, a to 120 až 210 kb. Přesto, jak ukázalo studium velkého počtu rostlinných druhů různého fylogenetického postavení, se vyznačuje řadou společných znaků, z nichž jsou zejména :*

- ◆ Uspořádání genů na ctDNA je pozoruhodně konstantní.

- ◆ Jsou na ní lokalizovány dvě obrácené repetice, které ji rozdělují na **krátký jednokopiový úsek (SSC-úsek)** a **dlouhý jednokopiový úsek (LSC-úsek)**. U *Nicotiana tabacum* je délka obrácené repetice zhruba 25 kb, délka SSC-úseku 18 kb a LSC-úseku 87 kb. V obrácené repetici jsou umístěny některé geny pro tRNA a geny pro rRNA. Většina genů je v LSC-úseku (obr. 209).
- ◆ Rozdíly ve velikosti ctDNA u různých druhů jsou způsobeny hlavně délkou obrácených repeticí, v nichž se některé geny v různém počtu opakují.
- ◆ Na výstavbě a funkci chloroplastů se podílí asi 1000 různých proteinů. Avšak jen 100 z nich je kódováno strukturálními geny lokalizovanými na ctDNA.
- ◆ Pořadí genů přepisovaných do rRNA se shoduje s jejich pořadím, které bylo stanoveno u bakterií. Kromě toho asi 70 % nukleotidové sekvence rRNA chloroplastů je na stejném místě jako nukleotidová sekvence v rRNA *E. coli*.
- ◆ Geny kódující podjednotky příslušného oligomerního proteinu nejsou organizovány do operonů, jak je tomu u bakterií, ale jsou rozděleny do několika transkripčních jednotek. Např. 14 genů kódujících proteiny fotosystému II je u jednoděložných rostlin rozděleno do šesti transkripčních jednotek, u dvouděložných do sedmi.
- ◆ Většina transkripčních jednotek v chloroplastech je polygenní, přičemž transkripční jednotka sestává z genů, jejichž translační produkty se funkčně navzájem liší.
- ◆ Na rozdíl od mtDNA je ctDNA, co se týče struktury a organizace, značně jednotná. To platí nejen pro jednotlivou rostlinu, ale i pro celý rostlinný druh, ve kterém se ve všech buňkách nachází stejná ctDNA.



Obr. 209  
Schéma organizace genů na chloroplastovém genomu

Tab. 21  
Geny chloroplastů *Nicotiana tabacum*

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

**GENY NA ctDNA.** Nukleotidová sekvence ctDNA druhu *M. polymorpha* je kompletně známa. Rovněž uspořádání genů na ní je podrobně zpracováno a vyjádřeno genetickou mapou. Z těchto genů uvádíme jen některé a rozdělujeme je podle funkce produktů, do kterých jsou přepisovány nebo překládány:

1. **Geny přepisované do rRNA.** Produkty těchto genů jsou 5S-rRNA, 4,5S-rRNA, 16S-rRNA a 23S-rRNA. Vyskytují se v několika repetících.
2. **Geny přepisované do tRNA.** Je jich 30. Jsou tedy přepisovány do 30 molekulárních druhů tRNA (tab. 29, str. 424).
3. **Geny kódující podjednotky RNA-polymerázy.** Jsou to podjednotky  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$  a  $\beta''$ .
4. **Geny kódující ribozomové proteiny.** Je to 8 proteinů ribozomové



podjednotky 50 S a 11 proteinů ribozomové podjednotky 30 S.

**5. Geny kódující proteiny fotosyntézy.** Jsou to především:

- ◆ velká podjednotka ribulóza 1,5-bisfosfátkarboxylázy;
- ◆ proteiny fotosystému I;
- ◆ proteiny fotosystému II;
- ◆ podjednotky ATP-syntázy;
- ◆ podjednotky ND1 až ND6 enzymu NADH-dehydrogenázy.

V tab. 21 jsou uvedeny z hlediska funkcí v transkripci, translaci a fotosyntéze počty genů lokalizovaných na ctDNA *Nicotiana tabacum*.

### 5.1.5

#### Zvláštnosti genomu rostlin

Z molekulárněbiologického hlediska je genom rostlin složitější než genom živočichů. Má jadernou složku (chromozomy), mitochondriovou DNA (mtDNA) a plastidovou DNA (např. ctDNA). Tyto složky rostlinného genomu jsou navzájem závislé a vzájemně kooperují.

Pro jadernou složku genomu vyšších rostlin je charakteristický velký rozdíl v jeho velikosti mezi jednotlivými rody, čeleděmi atd. Tyto rozdíly se vysvětlují rozdílným počtem mnohonásobných repeticí. Např. genom *Zea mays* je asi dvacetkrát větší než genom *Arabidopsis thaliana*. Při tom 80 % sekvencí *Arabidopsis thaliana* je jedinečných, takže na repetice připadá 20 %. U *Zea mays* je jen třetina sekvencí jedinečných, takže ostatní dvě třetiny připadají na repetice.

Mnohé geny rostlin jsou součástí genových rodin (str. 323). Tato skutečnost má svůj význam z hlediska evolučního přežití rostlinného druhu. Jestliže je v genové rodině několik genů, které mají podobnou nebo stejnou funkci a liší se spektrem exprese, mohou rostliny lépe reagovat na změny prostředí. Genovými rodinami získávají tak rostliny na plasticitě, což je pro ně významnou evoluční výhodou.

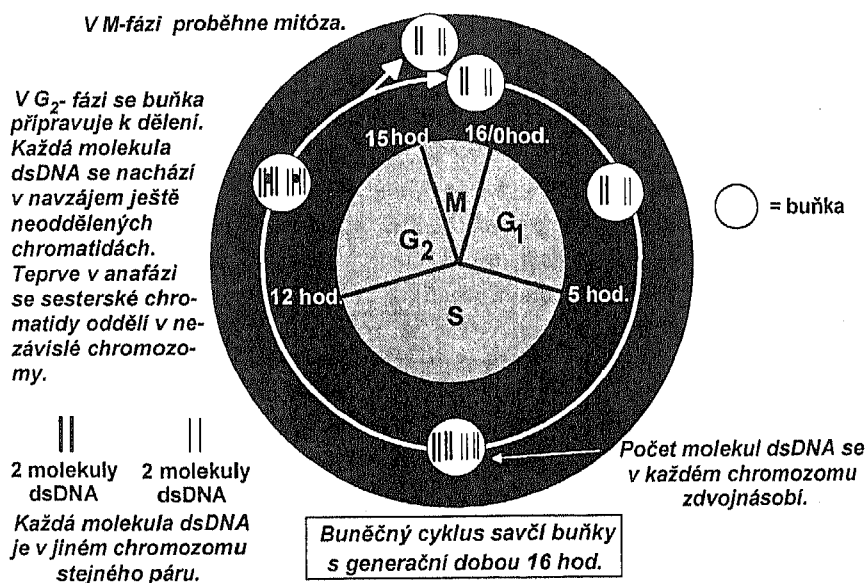
## 5.2 REPLIKACE EUKARYOTICKÉHO GENOMU

### 5.2.1

#### Zvláštnosti replikace chromozomové (jaderné) dsDNA

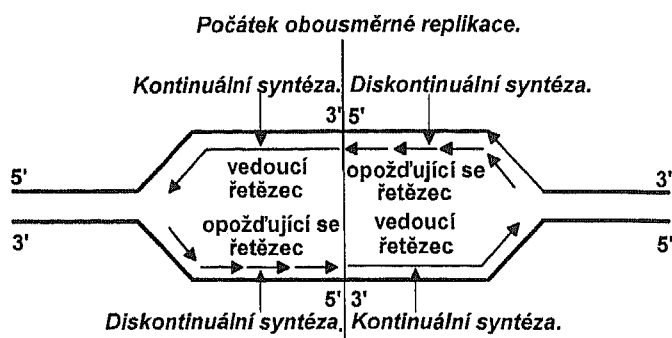
U eukaryotických buněk musíme rozlišovat replikaci DNA, která je součástí jejich jaderných chromozomů a replikaci DNA, která tvoří genofor mitochondrií a chloroplastů. Nejdříve se budeme zabývat replikací chromozomové (jaderné) DNA neboli nDNA. Tato replikace probíhá v podstatných rysech stejně jako u bakterií. Je *semikonzervativní a semidiskontinuální*. Její průběh lze jako u bakterií rozdělit na pochody **iniciace, elongace a terminace replikace**. Dříve však než začneme tyto fáze probírat, připomeneme, že:

1. *Replikace jaderné DNA probíhá jen v určité fázi buněčného cyklu, a to v S-fázi (obr. 210). To je důležitý rozdíl proti bakteriím, kde replikace DNA je zahájena hned po skončení buněčného dělení. Zreplikované molekuly nDNA segregují jako součást chromozomu během mitózy (fáze M buněčného cyklu) do dceřiných buněk. Ve fázi G<sub>1</sub>, která předchází S-fázi, a ve fázi G<sub>2</sub>, která*

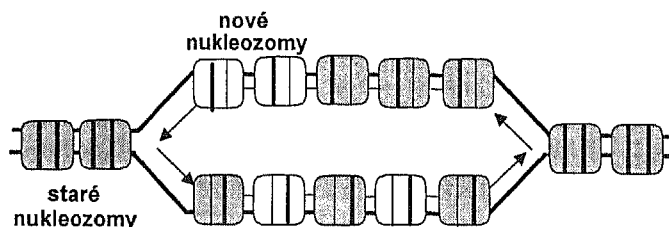


Obr. 210

Zjednodušené schéma buněčného cyklu zdůrazňující počet molekul dsDNA v chromozomech v jeho různých fázích



*Staré a nové nukleozomy se na matricových a podle nich syntetizovaných komplementárních řetězcích rozdělují náhodně.*



**Obr. 211**

**Schéma replikační vidlice eukaryotické jaderné DNA**

následuje po S-fázi, se eukaryotická buňka vyznačuje metabolickou aktivitou, transkripcí a translací, nikoli však replikací.

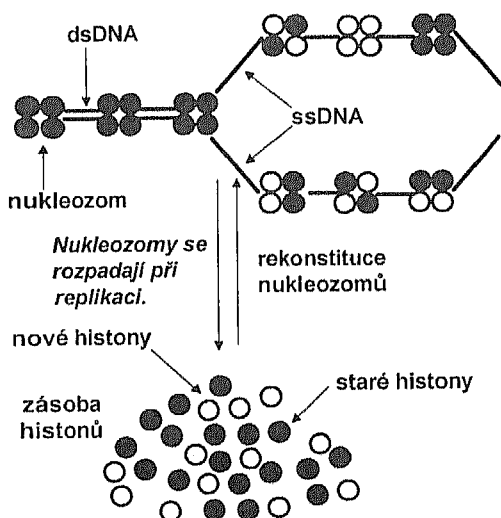
2. Molekula *nDNA* každého chromozomu představuje velký soubor replikonů (chromatinových domén), z nichž každý má jedno místo *ori*. Replikace však neprobíhá současně ve všech replikonech, ale v určitém pořadí, kdy se nejdříve zreplikují části DNA v euchromatinu, kdežto heterochromatinové části se replikují později. Ale do konce S-fáze se zreplikuje celá molekula *nDNA*. Platí však, že každý replikon se zreplikuje jen jedenkrát.

**EUKARYOTICKÉ DNA-POLYMERÁZY.** Bereme-li v úvahu celý genom eukaryotické buňky, pak lze říci, že jeho replikace je katalyzována čtyřmi DNA-polymerázami. Jsou to:

♦ **DNA-polymeráza  $\alpha$** , která v komplexu s DNA-primázou katalyzuje syntézu Okazakiho fragmentů při replikaci *nDNA*, nevyznačuje se 3'→5'-exonukleázovou aktivitou.

- ◆ DNA-polymeráza  $\beta$ , která se uplatňuje v syntéze krátkých řetězců při reparaci DNA.
  - ◆ DNA-polymeráza  $\gamma$ , která katalyzuje syntézu mitochondriové DNA.
  - ◆ DNA-polymeráza  $\delta$ , která katalyzuje syntézu vedoucího řetězce a dokončuje syntézu opožďujícího se řetězce. Vyznačuje se 5'→3'-polymerázovou a 3'→5'-exonukleázovou aktivitou. Váže se na ni tzv. **proliferační buněčný antigen** neboli **PCNA-protein**.
  - ◆ DNA-polymeráza  $\epsilon$ , jejíž funkce není zatím známa.
- Přehledně jsou tyto polymerázy uvedeny v tab. 22.

**REPLIKAČNÍ VIDLICE.** Ještě jednou připomínáme, že replikace eukaryotické jaderné DNA probíhá v chromatinových doménách, z nichž každá představuje replikon. Každý replikon má místo *ori*, v němž replikace replikonu začíná, a to vždy tvorbou replikační vidlice (obr. 211). V replikační vidlici probíhá replikace obousměrně. Předpokládá se, že nukleozomy se v replikační vidlici náhodně rozdělí do obou řetězců, které se současně pokrývají nově syntetizovanými nukleozomy. Zjednodušeně si lze představit rozpad nukleozomů a jejich obnovu podle schématu na obr. 212.



Na obrázku je pro jednoduchost schematického vyjádření nukleozom znázorněn jako tetramer histonů. Ve skutečnosti však jde o oktamer.

Obr. 212  
Představa zdvojení nukleozomů při replikaci eukaryotické chromozomové dsDNA

## 5.2.2

### Průběh replikace eukaryotické jaderné dsDNA

**AKTIVACE INICIACE REPLIKACE.** Jak již bylo uvedeno, je dsDNA jádra eukaryotické buňky souborem lineárně seřazených replikonů. Jako u prokaryot též u eukaryot má každý replikon svůj počátek replikace, který se u nižších eukaryot (kvasinky) skládá z těchto funkčních složek (obr. 213):

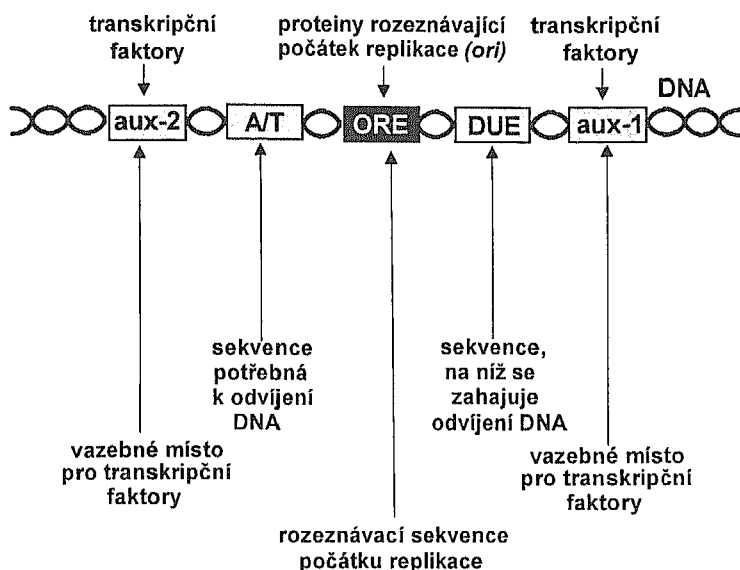
- ◆ rozpoznávací element (sekvence) počátku replikace (zkr. ORE);
- ◆ element (sekvence) pro odvíjení DNA (zkr. DUE);

Tab. 22

## Přehled vlastností a funkcí eukaryotických DNA-polymeráz

Označení u savců	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$	$\epsilon$
Označení u kvasinek	pol1	pol4	polM	pol3	pol2
Umístění	v jádře	v jádře	v mitochondriích	v jádře	v jádře
Počet podjednotek	4	1	2	2	>1
Polymerázová aktivita 5'-3'	+	+	+	+	+
Exonukleázová aktivita 3'-5'	-	-	+	+	+
Primáza	+	-	-	-	-
Sdružené faktory	žádný	žádný	žádný	PCNA	žádný
Procesivita	mírná	nízká	vysoká	vysoká ve sdružení s PCNA	vysoká
Funkce	začátek syntézy Okazakiho fragmentů primery	oprava poškozené DNA	katalýza replikace v mitochondriích	syntéza prodlužujícího se řetězce a dokončení syntézy Okazakiho fragmentů	neznámá

- ◆ **sekvence A/T**, v níž jeden řetězec je bohatý na T a jemu komplementární na A (je potřebná k odvíjení DNA);
- ◆ **pomocné elementy aux-1 a aux-2**, na něž se vážou transkripční faktory.



Obr. 213

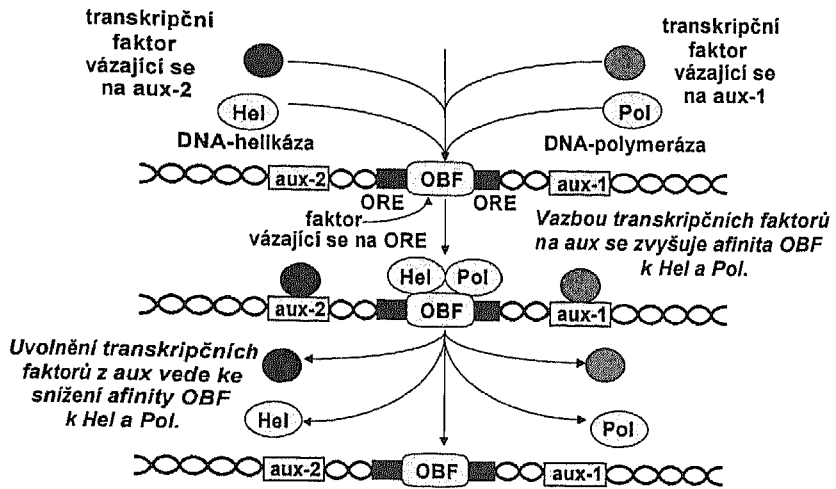
### Funkční elementy počátku replikace *ori* eukaryotické jaderné DNA

K aktivaci iniciace replikace pak u nižších eukaryot (kvasinek) dochází takto (do jaké míry to platí i pro vyšší eukaryota, nelze zatím říci):

Na rozpoznávací sekvenci počátku replikace *ORE* se vážou proteiny, které jsou potřebné k zahájení replikace, neboť se vyznačují helikázovou a DNA-polymerázovou funkcí, a také umožňují vazbu dalších replikačních proteinů, jejichž aktivitu modifikují (tlumí nebo zvyšují). Sekvence *DUE* má ten význam, že právě na ní se začínají odvíjet DNA-řetězce. Po vazbě transkripčních faktorů k sekvencím *aux* dochází k interakcím těchto faktorů s proteiny, které rozeznávají místo *ORE* (např. DNA-polymeráza). Transkripční faktory, které aktivují jeden počátek replikace, nemusí nutně aktivovat druhý. Jejich vztah k proteinům, vázajícím se na místo *ORE*, je schematicky vyjádřen na obr. 214, podle kterého mohou stimulovat vazbu DNA-helikázy a DNA-polymerázy na *ORE* zvýšením afinity **faktoru vázajícího se na *ORE*** neboli **OBF-faktoru** k těmto enzymům nebo snížením jeho afinity k těmto enzymům tím, že se z míst *aux* uvolní. Soubor proteinů zúčastňujících se v místě *ori* iniciace replikace se označuje jako **orizom**.

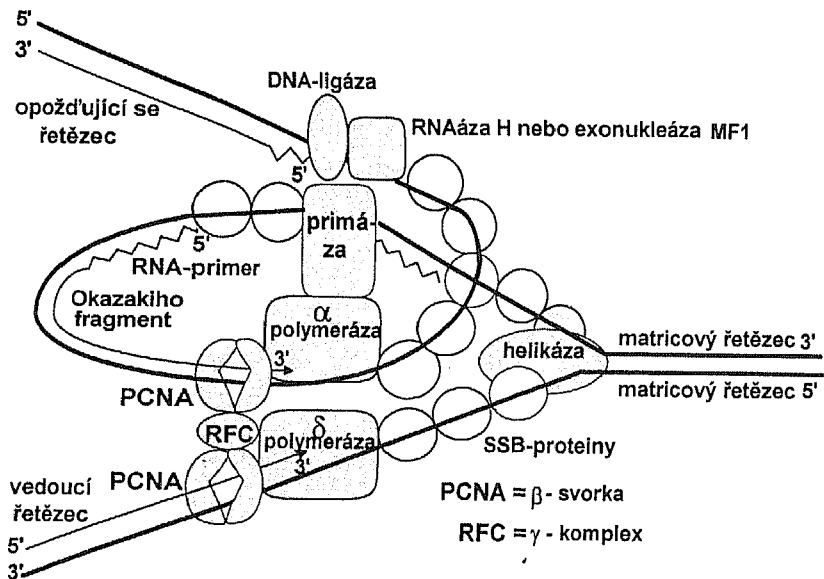
Všechna místa *ori* však nejsou k replikaci aktivována současně.

**ELONGACE DNA-ŘETĚZCŮ.** Globální pohled na mechanismus elongace vedoucího a opoždujícího se řetězce při replikaci chromozomové DNA



Obr. 214

Vliv transkripčních faktorů na zahájení replikace chromozomové DNA u nižších eukaryot



Obr. 215

Globální pohled na elongaci vedoucího a opozďujícího se řetězce v replikační vidlici eukaryotické chromozomové dsDNA

eukaryot je vyjádřen schématem na obr. 215. Z tohoto obrázku je nejdříve zřejmé, že na rozdíl od prokaryot, kde syntéza vedoucího a opožďujícího se řetězce je katalyzována jednou molekulou DNA-polymerázy III, je k tomuto ději u eukaryot zapotřebí dvou DNA-polymeráz:

◆ **DNA-polymeráza  $\alpha$** , která v komplexu s primázou katalyzuje syntézu opožďujícího se řetězce;

◆ **DNA-polymeráza  $\delta$** , která katalyzuje syntézu vedoucího řetězce a dokončuje syntézu opožďujícího se řetězce.

Za podjednotku DNA-polymerázy  $\delta$  se považuje též **PCNA-protein**, který působí jako  $\beta$ -svorka (viz. str. 166, obr. 129) a udržuje syntetizovaný vedoucí a opožďující se řetězec v komplexu s matricovým řetězcem. Podjednotkou DNA-polymerázy  $\delta$  je pravděpodobně i tzv. **replikační faktor C** neboli **RFC-protein** působící jako bakteriální  $\gamma$ -komplex (viz obr. 129).

Na rozdíl od bakteriální replikace (str. 173, obr. 134b), kde primáza působí současně s helikázou v rámci primozomu, tvoří eukaryotická primáza stálý komplex s DNA-polymerázou  $\alpha$ . Tento komplex označovaný jako **pol  $\alpha$ /primáza** katalyzuje syntézu RNA-primerů pro tvorbu Okazakiho fragmentů a má funkci primozomu (str. 173).

Soubor proteinů, které realizují své funkce v elongační fázi replikace DNA, se označuje jako **replizom**. Složení eukaryotického replizomu se však od prokaryotického liší. Tyto odlišnosti jsou uvedeny v tab. 23.

**SYNTÉZA OPOŽDUJÍCÍHO SE ŘETĚZCE.** Na základě studia replikace DNA živočišného viru SV 40 byl vypracován model syntézy opožďujícího se řetězce eukaryotické chromozomové DNA (obr. 216). Když se porovná tento model s modelem syntézy opožďujícího se řetězce u bakterií (obr. 138, str. 181), lze vidět rozdíly v těchto směrech:

1. Komplex pol  $\alpha$ /primáza syntetizuje RNA-primer a polydeoxyribonukleotidovou část Okazakiho fragmentů (ne však celou) a je v dalším kroku vytlačěn proteinem RFC, který je obdobou  $\gamma$ -komplexu bakterií.

2. RFC-protein umožňuje vazbu DNA-polymerázy  $\delta$  na matricový řetězec, na kterém jsou Okazakiho fragmenty. Tato polymeráza se nachází v komplexu s PCNA-proteinem. Za katalytické účasti RNAázy H nebo proteinu MF-1, který má stejnou funkci jako RNAáza H, pak dochází k odstranění primerů exonukleolytickým štěpením z jejich 5'-konců a k dosyntetizování polydeoxyribonukleotidové části Okazakiho fragmentů DNA-polymerázou  $\delta$  (nikoli  $\alpha$ ). Dosyntetizované fragmenty se spojí DNA-ligázou.

Způsob připojení polymerázy  $\delta$  na matricový řetězec s Okazakiho fragmenty a naložení PCNA-proteinu probíhá pravděpodobně jako u bakterií (str.



175-180, obr. 135, 136, 137a, b, c). V každém případě však RFC-protein, PCNA-protein a DNA-polymeráza  $\delta$  zaujmou místa na matricovém řetězci.

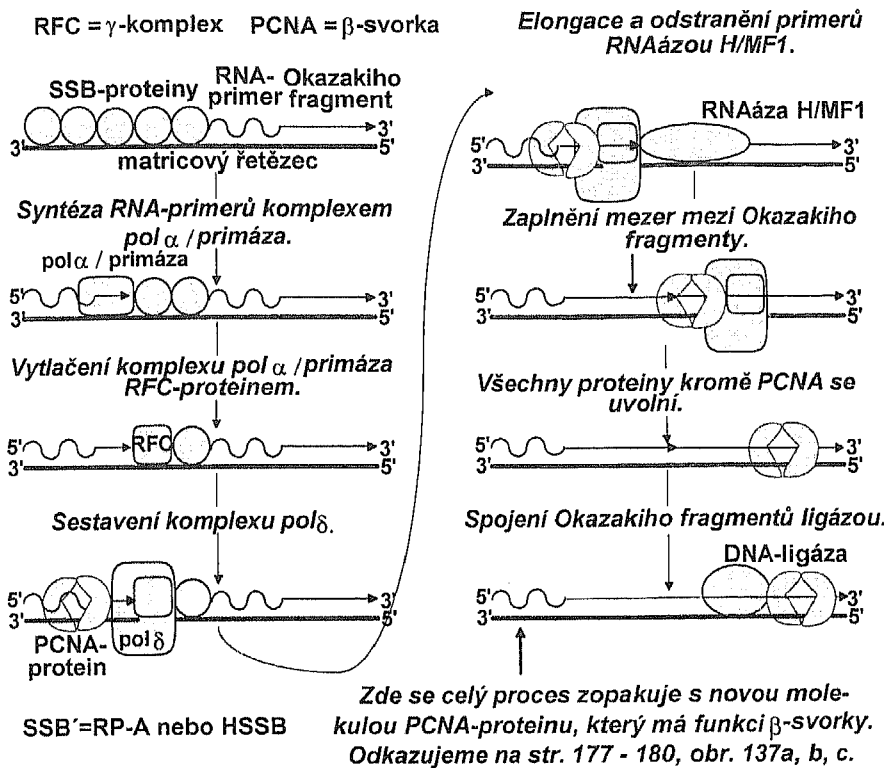
Tab. 23

## Složky bakteriálního a eukaryotického replizomu

Složka replizomu	U bakterií	U eukaryot
Replikativní polymeráza	Holoenzym polIII*	pol $\alpha$ /primáza v komplexu s pol $\delta$
Faktor zvyšující procesivitu replikativní polymerázy	$\beta$ -svorka	PCNA
Faktor nakládající $\beta$ -svorku (PCNA)	$\gamma$ -komplex	RFC
Primáza	jen DNA-primáza (DnaG-protein)	komplex pol $\alpha$ /primáza
Helikáza	DnaB-protein, $n'$ -protein	?
Odstranění primeru	DNA-polymeráza I	exonukléaza MF1
Oprava opožd'ujícího se řetězce	DNA-polymeráza I a DNA-ligáza	Komplex pol $\delta$ /pol $\epsilon$ ? a DNA-ligáza
DNA-topoizomeráza	II (gyráza)	II
Proteiny vázající se na jednořetězcové úseky DNA	SSB-proteiny	replikační protein A (RP-A) nebo lidský SSB (HSSB)

**PROBLÉM ZAKONČENÍ REPLIKACE LINEÁRNÍCH dsDNA.** Při studiu replikace lineárních molekul DNA se setkáváme s problémem nedokončení replikace na 3'-koncích řetězců, které působí jako matricové pro syntézu opožd'ujícího se řetězce. Na těchto koncích nemůže totiž DNA-polymeráza katalyzovat napojování deoxyribonukleotidů, neboť "nemá na co napojovat". Po odstranění RNA-primerů chybí pro napojování 3'-konec. Vysvětluje to obr. 217.

Tento problém neexistuje u bakteriálních molekul dsDNA, neboť jsou kružnicové. Viděli jsme, že např. replikace kružnicového bakteriálního chromozomu končí v bodě, kde se konce replikační vidlice setkají (obr. 126, str. 162). Bakteriální kružnicová dsDNA se zreplikuje celá, aniž by se zkracovala, jak by tomu mohlo být u lineárních molekul. V tom také spočívá biologický význam kružnicových molekul dsDNA.



Obr. 216  
 Syntéza opoždějícího se řetězce v rámci replikace eukaryotické chromozomové DNA

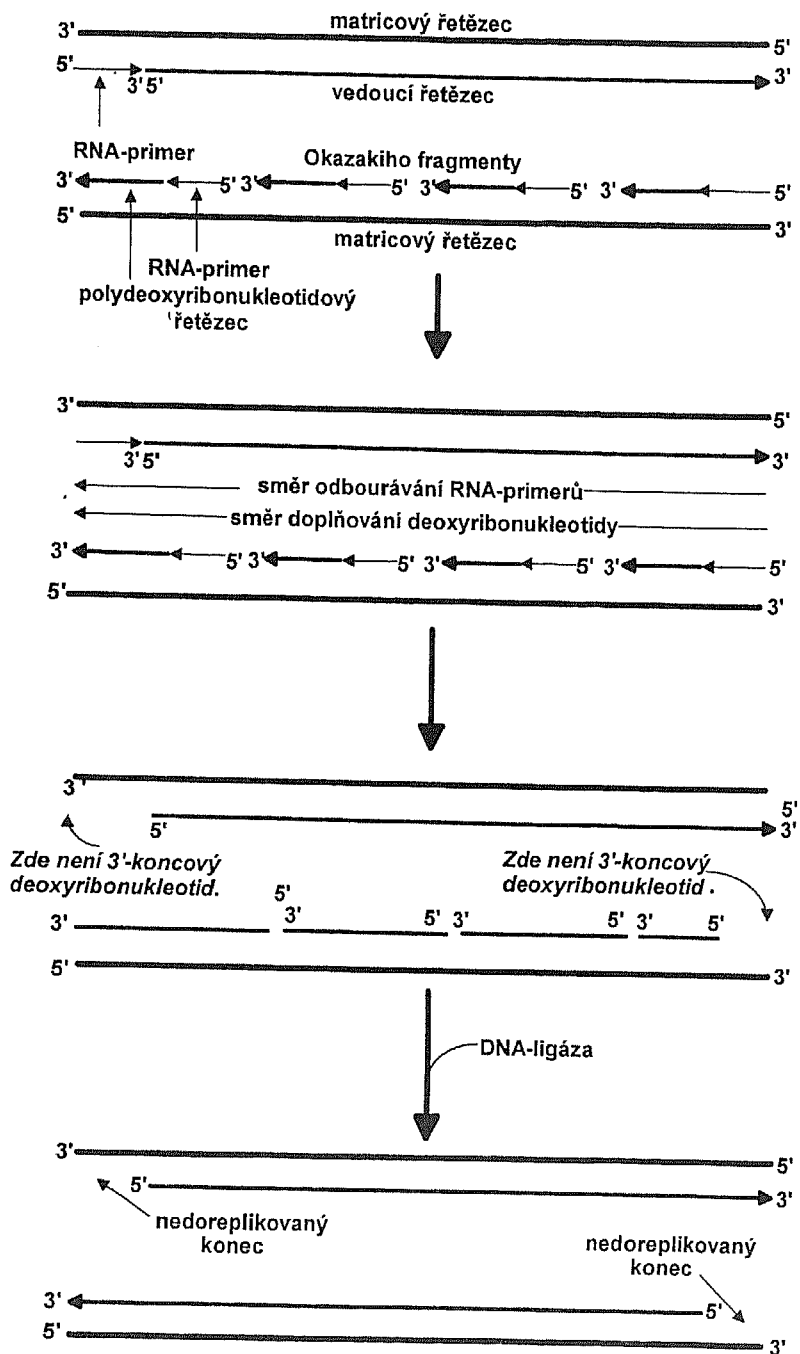
**DOREPLIKOVÁNÍ 3'-KONCŮ MATRICOVÝCH DNA-ŘETĚZCŮ.** Doreplikováním 3'-konečů matricových DNA-řetězců se rozumí dokončení syntézy dceřiných řetězců na nich. Probíhá v telomerách za katalytického účinku enzymu telomerázy (str. 326). **Telomeráza** je enzym, který katalyzuje syntézu telomerických konců (bohatých na G). Pro svůj účinek vyžaduje primer, k němuž přidává polymeraci v obvyklém směru 5' - 3' telomerické repetice. Je to ribonukleoproteinový enzym složený z RNA, která působí jako matrice, a z katalyticky aktivního proteinu.

Nejdříve si představme doreplikování 3'-konce podle obr. 218:

1. Krátká telomerická sekvence na 3'-konečích obou matricových řetězců působí jako primer pro katalytickou činnost telomerázy. Na matricových řetězcích se syntetizuje vedoucí řetězec a Okazakiho fragmenty.

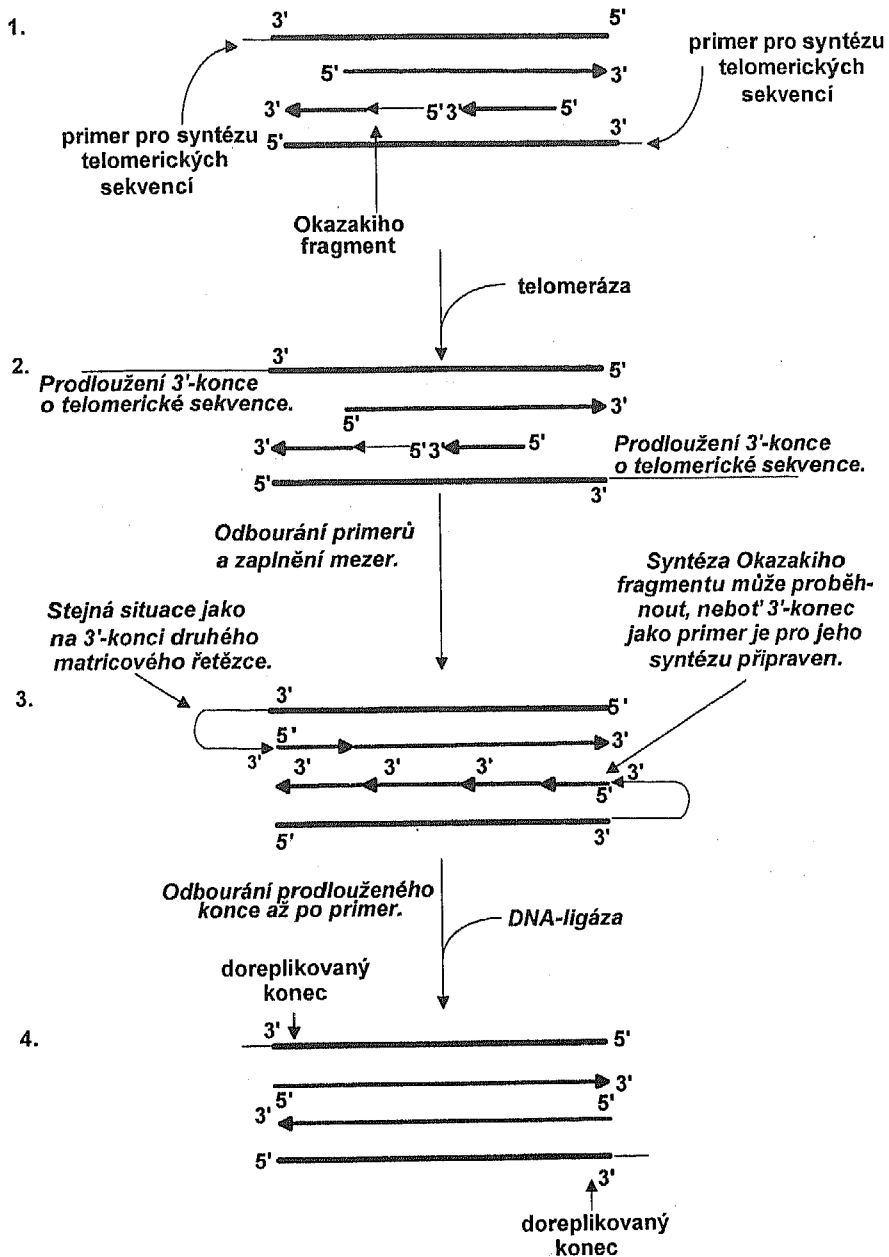
2. Telomeráza přisyntetizuje k primerům postupně tandemovou repetici (telomerické sekvence) a tím 3'-konce matricových řetězců prodlouží.

3. Následuje odbourání primerů a zaplnění mezer podle obr. 216. Na



Obr. 217

Schematické vysvětlení nedoreplikování 3'-konce lineární dsDNA



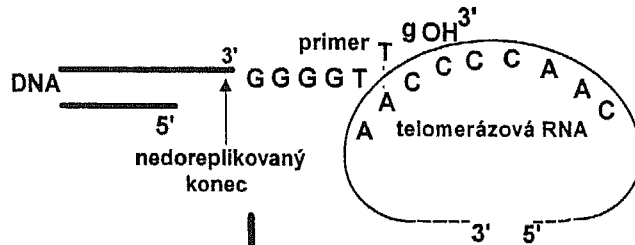
Obr. 218

## Řešení problému doreplikování 3'-konce lineární jaderné dsDNA

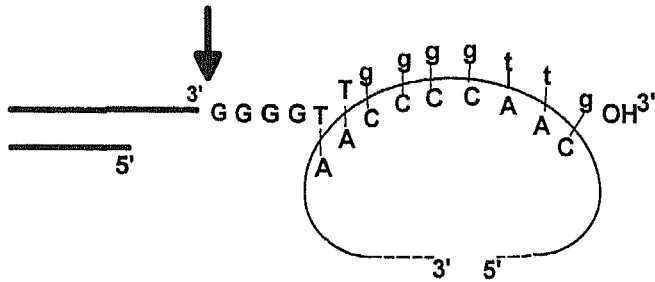
3'-koncích matricových řetězců se může syntetizovat Okazakiho fragment od 3'-konce telomerické sekvence.

4. Všechny Okazakiho fragmenty se spojí DNA-ligázou, telomerické

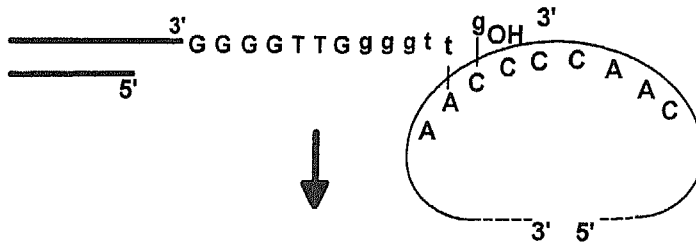
## 1. Vazba telomerázy na telomerický primer (1).



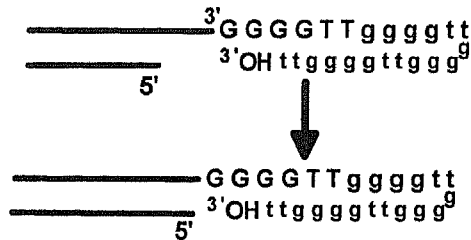
## 2. Prodloužení 3'-konce od primeru (2).



## 3. Translokace telomerázy (2).



## 4. Replikace na 3'-konci matricového řetězce (3, 4).



Nově napojované nukleotidy jsou vyjádřeny malými písmeny.  
V závorkách jsou uvedeny odkazy na části obr. 218.

Obr. 219  
Doreplikování 3'-konce eukaryotické jaderné DNA působením telomerázy

sekvence až po primer se odbourají.

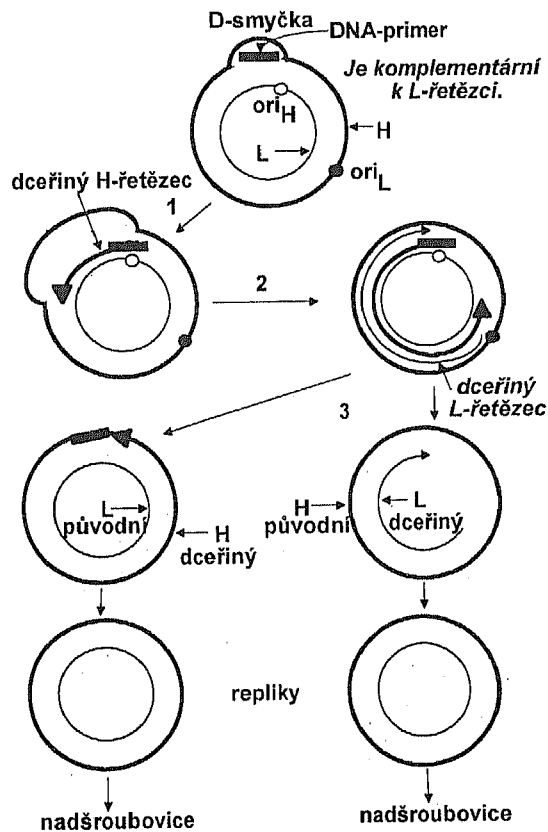
Není jasný však mechanismus zajišťující to, že na 3'-konci zůstane segment působící jako primer pro další replikaci.

Telomeráza působí tak, že se prostřednictvím své RNA-složky komplementárně spojí s primerem na 3'-nedoreplikovaném konci. S RNA se pak komplementárně párují další nukleotidy, např. za vytvoření sekvence **TTGGGG**, jejíž tandemová repetice se pak vytvoří tím, že dochází k několikeré translokaci telomerázy (obr. 219).

### 5.2.3

## Replikace savčí mitochondriové DNA

Jak již bylo uvedeno, část molekuly mtDNA člověka a savců vůbec je



Obr. 220  
Schéma replikace mtDNA savců

tvořena **D-smyčkou**, což je *oblast na molekule mtDNA, v níž se s matricovým řetězcem páruje krátký fragment DNA vytěsňující rodičovský řetězec, který je komplementární s matricovým*. Jako matricový působí ze začátku v mtDNA řetězec L. DNA-fragment měří přibližně 500 až 700 nukleotidů a je jím vytěsňován H-řetězec. D-smyčka se tvoří v úseku, kde se nachází počátek replikace mtDNA, tj. místo *ori<sub>H</sub>*. Pak probíhá replikace v těchto krocích (obr. 220):

1. Replikace začíná za vytěsňování rodičovského H-řetězce nově se syntetizujícím dceřiným H-řetězcem. Začátek této syntézy je zahájen od krátkého DNA-fragmentu, *který působí jako DNA-primer při replikaci mtDNA*.

2. Syntéza dceřiného H-řetězce pokračuje až do 2/3 jeho celkové délky, čímž se uvolní další místo *ori*, tj. *ori<sub>L</sub>*, od kterého začíná syntéza nového dceřiného L-řetězce podle matricového H-řetězce.

3. Postupnou syntézou nových dceřiných řetězců se vytvoří dva replikační produkty přecházející do nadšroubovicové struktury.

## 5.3

## TRANSKRIPCE EUKARYOTICKÉHO GENOMU

Je třeba rozlišovat transkripci jaderné složky eukaryotického genomu od transkripce, která probíhá v mitochondriích a chloroplastech. O všech těchto transkripčních pojednáme odděleně. Nejdříve se budeme zabývat transkripcí jaderných genů, které jsou lokalizovány na chromozomech. Transkripcí těchto genů se tvoří tyto primární transkripty:

**1. Heterogenní jaderná RNA (hnRNA).** *Je to prekurzorová mRNA (pre-mRNA), která vzniká v jádře transkripcí transkripčních jednotek obsahujících strukturální geny.* Jako **prekurzorovou mRNA (pre-mRNA)** označujeme obecně jakýkoli primární transkript obsahující přepisy strukturálních genů a upravovaný do mRNA. Pokud takový primární transkript vzniká v jádře buňky, můžeme jej označit jako hnRNA. Pokud chceme zůstat u termínu "prekurzorová mRNA"- a taková tendence v odborné literatuře je - musí být zřejmé z kontextu, o jakou pre-mRNA jde, zda o pre-mRNA vzniklou transkripcí jaderných strukturálních genů nebo transkripcí strukturálních genů mitochondriové DNA, případně jinou transkripcí.

**2. Prekurzorová ribozomová RNA (pre-rRNA),** *která vzniká jako primární transkript transkripcí transkripčních jednotek, které obsahují geny pro rRNA.* Posttranskripční úpravou se štěpí na funkční druhy rRNA, tj.

a) 5,8S-rRNA, 18S-rRNA a 28S-rRNA u savců,

b) 5,8S-rRNA, 16S-rRNA a 25S-rRNA u vyšších rostlin.

**3. Prekurzorová transferová RNA (pre-tRNA)** *vznikající transkripcí transkripčních jednotek obsahujících geny pro tRNA.* Posttranskripční úpravou se štěpí na různé druhy tRNA.

**4. 5S-rRNA.** *Je to rRNA, která se tvoří transkripcí genů pro 5S-rRNA.*

**5. Malé RNA.** *Tak se označují nízkomolekulární stabilní druhy RNA, jejichž délka je 80 až 300 nukleotidů a vyskytují se v eukaryotických buňkách.* Podle výskytu v jednotlivých kompartmentech eukaryotické buňky se dělí do těchto skupin:

- ◆ **malé jaderné RNA (snRNA),** které se vyskytují v jádře;
- ◆ **malé jadéřkové RNA (snoRNA),** které se vyskytují v jadérku;
- ◆ **malé cytoplazmatické RNA (scRNA),** které se vyskytují v cytoplazmě eukaryotické buňky.

Každá skupina zahrnuje několik druhů těchto RNA. V tab. 24 je uvedena povšechná informace o těchto RNA, s jejichž biologickými funkcemi se seznámíme v příslušných kapitolách.



**Tab. 24**  
**Malé RNA v buňkách člověka**

Označení druhu malé RNA	Výskyt v buňce	Biologická funkce	Enzym katalyzující syntézu malé RNA
U1-snRNA	jádro	řízení sestřihu	RNA-polymeráza II
U2-snRNA	jádro	řízení sestřihu	RNA-polymeráza II
U4-snRNA	jádro	řízení sestřihu	RNA-polymeráza II
U5-snRNA	jádro	řízení sestřihu	RNA-polymeráza II
U6-snRNA	jádro	řízení sestřihu	RNA-polymeráza III
U7-snRNA	jádro	řízení sestřihu histonové pre-mRNA	RNA-polymeráza II
U11-snRNA	jádro	neznámá	RNA-polymeráza II
U12-snRNA	jádro	neznámá	RNA-polymeráza II
7SK-snRNA	jádro	neznámá	RNA-polymeráza III
8-2-snRNA	jádro	posttranskripční úprava pre-tRNA	RNA-polymeráza III
U3-snoRNA	jadérko	posttranskripční úprava pre-tRNA	RNA-polymeráza II
U8-snoRNA	jadérko	neznámá	RNA-polymeráza II
U13-snoRNA RNAR	jadérko	neznámá	RNA-polymeráza II
7-2- snoRNA	jadérko	neznámá	RNA-polymeráza III
7SL-scRNA	cytoplazma	translokace proteinů	RNA-polymeráza III
Y1-5-scRNA	cytoplazma	neznámá	RNA-polymeráza III

**EUARYOTICKÉ DNA-DEPENDENTNÍ RNA-POLYMERÁZY.** Existují tři druhy těchto RNA-polymeráz (co se týče nomenklatury RNA-polymeráz, viz str. 185):

◆ **RNA-polymeráza I**, která katalyzuje syntézu *pre-rRNA*. Vyskytuje se jen v jadérku a není citlivá k  $\alpha$ -amanitinu. Geny, které jsou přepisovány RNA-polymerázou I, se označují jako **geny I. třídy**.

◆ **RNA-polymeráza II**, která katalyzuje syntézu *hnRNA* a *malých rRNA* uvedených v tab. 24. Je citlivá k  $\alpha$ -amanitinu. Vyskytuje se v karyoplazmě. Sestává přibližně z 10 protomerů, z nichž tři největší jsou homologické s protomery  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\beta'$  prokaryotické RNA-polymerázy. Protomer  $\beta$  váže volné ribonukleotidy,  $\beta'$  se váže k DNA a  $\alpha$  spojuje protomery navzájem. Ostatní protomery se neliší od protomerů polymeráz I a III. Geny, které jsou přepisovány RNA-polymerázou II, se označují jako **geny II. třídy**.

◆ **RNA-polymeráza III**, která katalyzuje syntézu *pre-tRNA*, *5S-rRNA* a *malých RNA*, uvedených v tab. 24. Citlivost k  $\alpha$ -amanitinu je druhově specifická. Vyskytuje se v karyoplazmě. Geny, které jsou přepisovány RNA-polymerázou III, se označují jako **geny III. třídy**.

Každá z uvedených tří RNA-polymeráz vyžaduje svůj specifický promotor, na který se váže. *To je rozdíl proti bakteriím, které mají jen jeden typ RNA-polymerázy a jeden typ promotoru.*

V dalším textu se budeme zabývat způsobem transkripce uskutečňované zmíněnými RNA-polymerázami. Text bude rozdělen na kapitoly, které budou pojednávat zvláště:

- ◆ o transkripci genů katalyzované RNA-polymerázou II,
- ◆ o transkripci genů katalyzované RNA-polymerázou I,
- ◆ o transkripci genů katalyzované RNA-polymerázou III.

U všech uvedených transkripcí bude vyložen jen jejich bazální a konstitutivní průběh.

**TRANSKRIPČNÍ AKTIVITA EUKARYOTICKÉ BUŇKY.** Transkripční aktivitou se rozumí rychlost syntézy RNA, která je vyjádřena počtem vytvořených primárních transkriptů za minutu. Podle toho se pak rozeznávají tyto druhy eukaryotické transkripce.

**1. Bazální transkripce.** Účinnost této transkripce je určena toliko bazálními transkripčními faktory, které uvádějí RNA-polymerázu na bazální část promotoru a ke startovacímu nukleotidu, čímž umožňují zahájení transkripce. Transkripční aktivita je zde nízká a odpovídá minimálním požadavkům buňky.

**2. Konstitutivní transkripce.** Tato transkripce probíhá za přítomnosti bazálních transkripčních faktorů a její aktivita se však zvyšuje působením konstitutivních transkripčních faktorů, které určují u každého genu její míru.

Tím se umožní, aby se různé geny přepisovaly při různých rychlostech vyhovujících základním potřebám buňky. Transkripční aktivita konstitutivní transkripce je vyšší než u bazální.

**3. Indukovatelná transkripce.** *Je to transkripce regulovaná indukovatelnými transkripčními faktory, které transkripční aktivitu jednotlivých genů upravují v reakci na vnější prostředí buňky.* U mnohobuněčných organismů má tato regulace transkripce význam v udržování jejich diferencovaného stavu.

**TRANSKRIPČNÍ FAKTORY.** Pro zahájení transkripce příslušné transkripční jednotky je u eukaryot na rozdíl od prokaryot nutná přítomnost transkripčních faktorů. *Transkripční faktory jsou regulační proteiny, které se vážou na regulační oblasti promotoru nebo zesilovače transkripce (str. 426) a většinou pozitivně navozují zahájení transkripce.* Případy negativního působení transkripčních faktorů jsou vzácnější. Ve vztahu k RNA-polymeráze působí transkripční faktory např. tak, že se určitá jejich kombinace naváže na promotor a na ni se pak naváže RNA-polymeráza. Teprve tento komplex je aktivní a RNA-polymeráza v něm zahajuje transkripci.

Transkripční faktory se rozdělují do dvou skupin:

**1. Obecné transkripční faktory,** které se vyskytují ve všech nebo většině eukaryotických buněk a buněčných typech mnohobuněčného organismu. Jsou nezbytné pro zahájení transkripce u všech tří typů eukaryotických promotorů. Patří sem **bazální transkripční faktory**, tj. *faktory určující bazální transkripci* a **konstitutivní transkripční faktory**, tj. *faktory určující konstitutivní transkripci*. Geny, jejichž promotory jsou obsazeny obecnými transkripčními faktory, bývají obvykle provozní. **Provozní** jsou takové **geny**, které jsou vyjádřeny ve všech buňkách, jelikož jsou potřebné pro udržování jejich základních funkcí.

**2. Speciální transkripční faktory,** které se vyskytují v buňkách určitých tkání a v určité době. Zvyšují účinnost transkripce nad bazální hladinu u těch genů, které svou expresí specifikují daný buněčný typ pro produkci určitých proteinů. Uplatňují se proto i při diferenciaci buněk a jsou **indukovatelné**. *Transkripce genů daného buněčného typu je výsledkem kombinace účinků obecných a speciálních transkripčních faktorů.*

### 5.3.1

## Transkripce katalyzovaná RNA-polymerázou II

**PROMOTOR RNA-POLYMERÁZY II.** Promotor RNA-polymerázy II obsahuje krátké sekvence, jež jsou obecně důležité pro jeho funkci a nazývají se **protisměrné elementy promotoru**. Nazývají se tak proto, že jsou umístěny

vzhledem k startovacímu nukleotidu proti směru transkripce. Jsou dvojího typu:

1. Elementy, které se vyskytují u mnoha genů a ovlivňují u nich základní procesy transkripce.

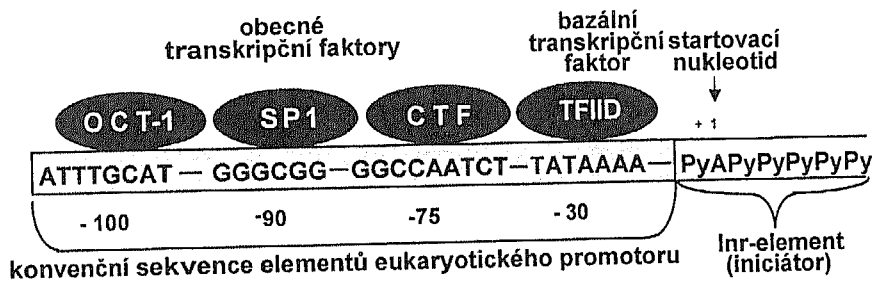
2. Elementy, které se vyskytují jen u genů přepisovaných v buňkách určité tkáně nebo odpovídajících svou expresí na specifický signál. Protisměrnými elementy tohoto typu se zde nebudeme zabývat. Jen si pamatujte, že jsou velmi důležité při diferenciaci buněk, neboť se na ně vážou speciální transkripční faktory aktivující přilehlé geny k tvorbě proteinů potřebných pro diferenciaci na určitý buněčný typ.

Elementy promotoru jsou charakteristické těmito boxy (obr. 221):

1. **TATA - box** neboli též **Hognessův box** (oba termíny budeme používat). Vyskytuje se v konvenční sekvenci:

T A T A A A A.

Je umístěn v rozmezí -34 až -26 od startovacího nukleotidu. Váže se na něj stabilně transkripční faktor *TFIID* za tvorby komplexu, který je specificky rozeznáván *RNA-polymerázou II*. Základním stavebním kamenem transkripčního faktoru *TFIID* je **TBP-protein** neboli **protein vážající se na TATA-box** (obr. 222). Tento protein se vyskytuje u všech eukaryotických organismů. Jeho aminokyselinová sekvence na C-konci je velmi konzervativní. Vnější povrch *TBP* je přístupný interakcím s faktory sdruženými s *TBP* neboli s **TAF-faktory**, které tvoří s *TBP*-proteinem dohromady komplex označovaný jako

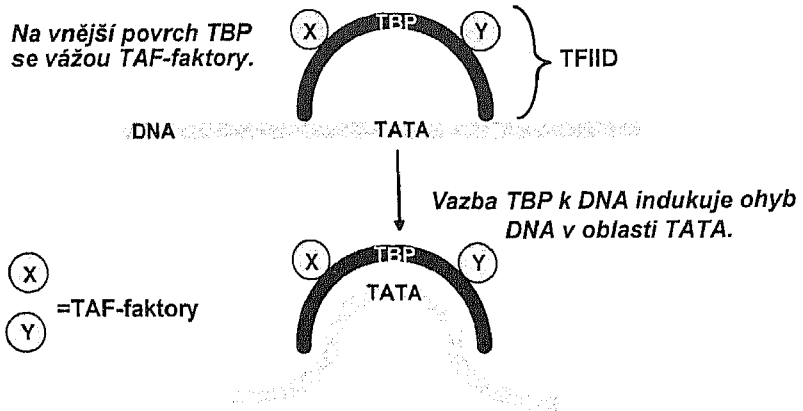


*Promotory různých genů se liší počtem, umístěním a kombinací těchto elementů. Všechny promotory však musí obsahovat jeden nebo více elementů, aby mohly zahájit bazální transkripci.*

*Provozní geny mají jen Inr-element bez TATA-boxu (Hognessův box).*

*Poznámka*  
*Promotory RNA-polymerázy II u některých genů nemají ani TATA-box ani Inr-element. Transkripce těchto genů může začít z různých míst seřazených za sebou.*

Obr. 221  
Struktura promotoru RNA-polymerázy II



Obr. 222  
Vazba TBP na DNA

**transkripční faktor TFIID.** Jeho dvě poloviny se vyznačují pěti krátkými anti-parallelními  $\beta$ -řetězci, které dohromady jsou prohnuty do tvaru sedla přiléhajícího k DNA. Vazbou TBP se DNA silně prohne a její úsek, na který se TBP váže, odpovídá přesně TATA-boxu, který se touto interakcí denaturuje (rozdvíhá). Přitom zřejmě dochází v této oblasti k destrukturalizaci nukleozomu, neboť komplex ohnuté DNA s TFIID obsahuje osm histonů nukleozomu. Jeden TAF-faktor se vyznačuje acetyltransferázovou aktivitou, takže lze předpokládat, že dochází i k acetylaci histonů. Jinak význam TAF-faktorů spočívá v tomto:

- ◆ mohou rozeznat promotory bez TATA-boxu. V tomto smyslu se uplatňují při rozpoznávání promotorů obsahujících jen *Inr*-element nebo **nulových promotorů**, což jsou *promotory bez TATA-boxu a bez Inr-elementu*,
- ◆ působí jako koaktivátory transkripce (str. 432).

TBP-protein vázaný na dsDNA je přístupný i jiným proteinům, které mají C-koncovou aminokyselinovou sekvenci, s níž je schopen reagovat. Je to především RNA-polymeráza II a transkripční faktory TFIIA a TFIIB. Negativní regulační proteiny zabraňují vazbě TFIIA a TFIIB s TBP.

**2. C A A T - box.** Vyskytuje se v konvenční sekvenci

**GGCCAATCT.**

Nachází se mezi nukleotidy -75 až -80. Ovlivňuje účinnost transkripce tím, že se na něj váže **transkripční faktor CTF/NF1**, který zvyšuje sílu promotoru.

**3. GC - box,** jehož konvenční sekvence je

**GGGCGG.**

Nachází se u nukleotidu -90, často v mnoha kopiích a v obou orientacích. Váže

se na něj **transkripční faktor SP1**, což má za následek zvýšení síly promotoru. Tento faktor má dvě funkční domény. Jednou doménou se váže k DNA (vazebná doména) a druhá doména je aktivační. Vazebná doména má motiv tří zinkových prstů (obr. 95, 96, 97, 98, str. 118). SP1 se váže  $\alpha$ -helixem této domény ke GC-boxu, který se nachází ve větším žlábků DNA. Funkce aktivační domény spočívá v tom, že její aminokyselinová sekvence je fosforylována proteinkinázou vázanou na DNA. Touto fosforylací je stimulována tvorba před-iniciačního komplexu. Děje se to tak, že SP1 se dostane do kontaktu s TFIID přes jeden TAF-faktor, což má za následek, že TFIID se umístí přesně na TATA-box.

**4. Oktamer**, na který se váže obecný a konstitutivní **transkripční faktor OCT-1** nebo **OCT-2** (jen v B-lymfocytech, str. 543). Konvenční sekvence oktameru je:

A T T T G C A T.

**5. Startovací nukleotid.** Bývá to obvykle A uvnitř úseku obsahujícího pyrimidinové báze. Tento úsek se označuje jako **iniciátor** nebo většinou zkráceně jako **Inr-element**.

Uvedené elementy promotoru se vyskytují ve většině promotorů RNA-polymerázy II s výjimkou promotorů provozních strukturních genů. Tyto promotory se vyznačují těmito zvláštnostmi:

- ◆ Všechny mají Inr-element.
- ◆ Nemají TATA-box.
- ◆ Nemají jeden startovací nukleotid, ale více těsně spolu sousedících.
- ◆ Obsahují několik GC-boxů a většinou neobsahují CAAT-box.
- ◆ Obsahují dále při vysoké četnosti nemetylované dinukleotidy CpG.

Na uvedené elementy promotoru se vážou obecné transkripční faktory. *Obvykle jeden z nich nebo více (v různých kombinacích) musí být přítomny na promotoru, aby mohl fungovat na hladině bazální transkripce.* Bazální transkripce se rozumí *transkripce řízená promotorem za přítomnosti tolika bazálních transkripčních faktorů*, což jsou **TFIID**, **TFIIA**, **TFFIIB**, **TFIIF**, **TFIIE**, **TFIIH**, **TFIIJ**. Transkripční aktivita bazální transkripce odpovídá minimálním požadavkům buňky.

Na zahájení transkripce mají vliv i tzv. zesilovače transkripce. Ty však probereme na str. 426. V této kapitole pojednáme jen o obecných faktorech, zvláště bazálních, které jsou pro iniciaci eukaryotické transkripce nezbytné.

**TRANSKRIPČNÍ JEDNOTKA ŘÍZENÁ PROMOTOREM RNA - POLYMERÁZY II.** Schéma struktury transkripční jednotky přepisované RNA-poly-

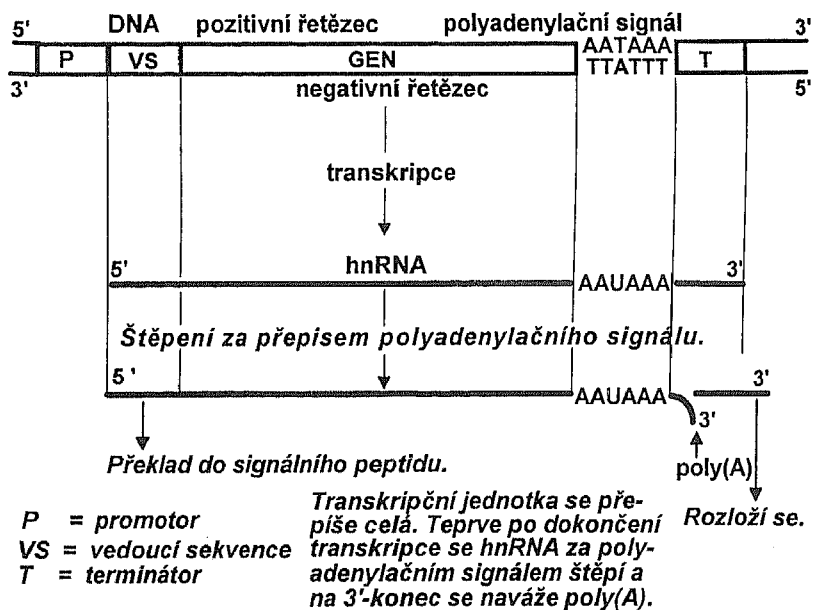
merázou II je uvedeno na obr. 223. Obsahuje obvykle jeden strukturální gen, který je většinou složený (str. 141). Sekvence eukaryotického terminátoru však není známa. Zcela jisté však je, že primární transkript, což je hnRNA, se štěpí, když se vytvoří přepisem negativního DNA-řetězce sekvence A A U A A A, které na pozitivním DNA-řetězci odpovídá sekvence:

A A T A A A,

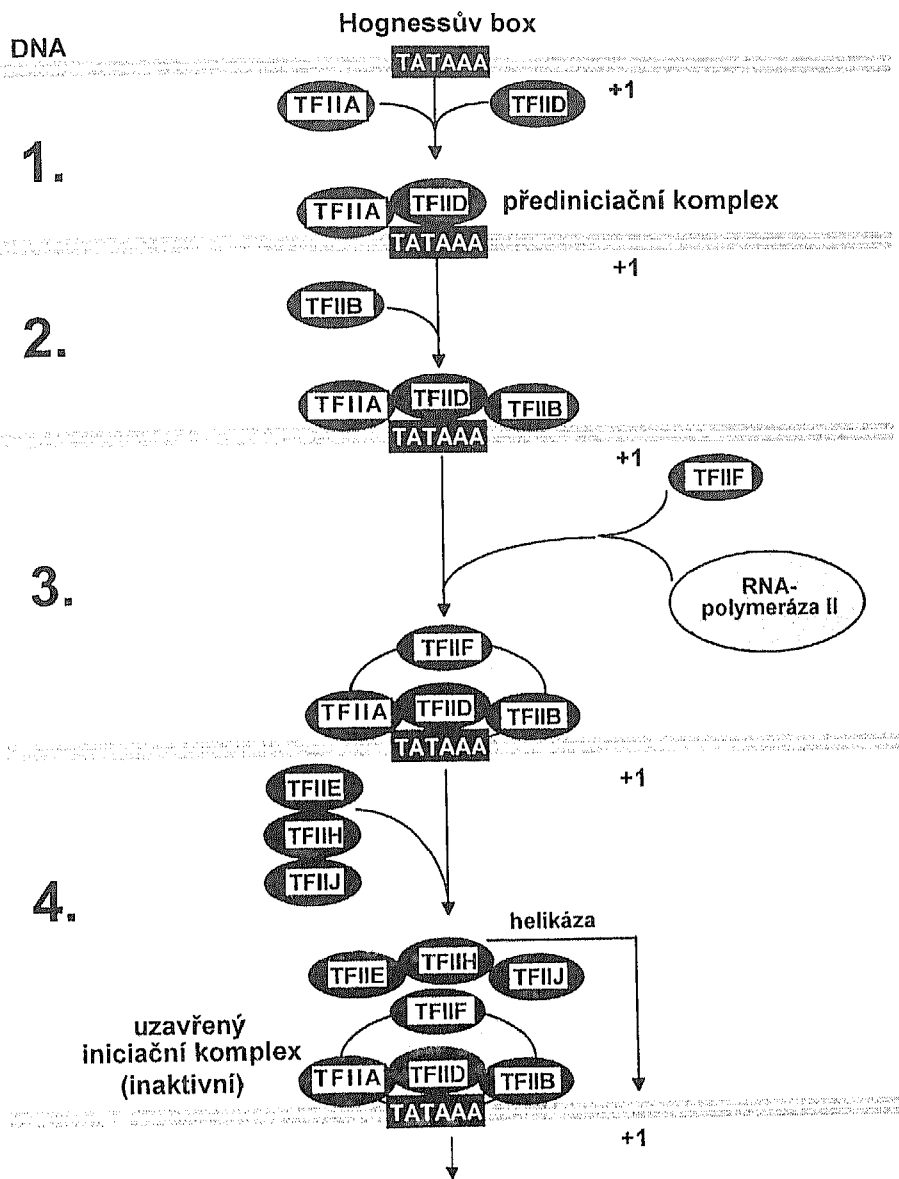
jež se označuje jako **polyadenylační signál**, neboť signalizuje, že po jeho transkripci na negativním DNA-řetězci bude hnRNA za jeho přepisem štěpena a její 3'-konec bude polyadenylován.

**INICIACE TRANSKRIPCE KATALYZOVANÉ RNA-POLYMERÁZOU II Z PROMOTORU OBSAHUJÍCÍHO TATA-BOX A Inr-ELEMENT.** Iniclace transkripce katalyzované RNA-polymerázou II zahrnuje děje, kterými se na TATA-boxu vytvoří aktivní iniciační komplex RNA-polymerázy II a transkripčních faktorů, schopný za přítomnosti volných ribonukleotidů zahájit transkripci. V hrubých rysech ji můžeme rozdělit do těchto etap (obr. 224a, 224b):

1. Transkripce katalyzovaná RNA-polymerázou II začíná vazbou transkripčního faktoru **TFIID** na Hognessův box. Tato vazba je usnadněna faktorem



Obr. 223  
Transkripční jednotka RNA-polymerázy II  
a její primární transkript

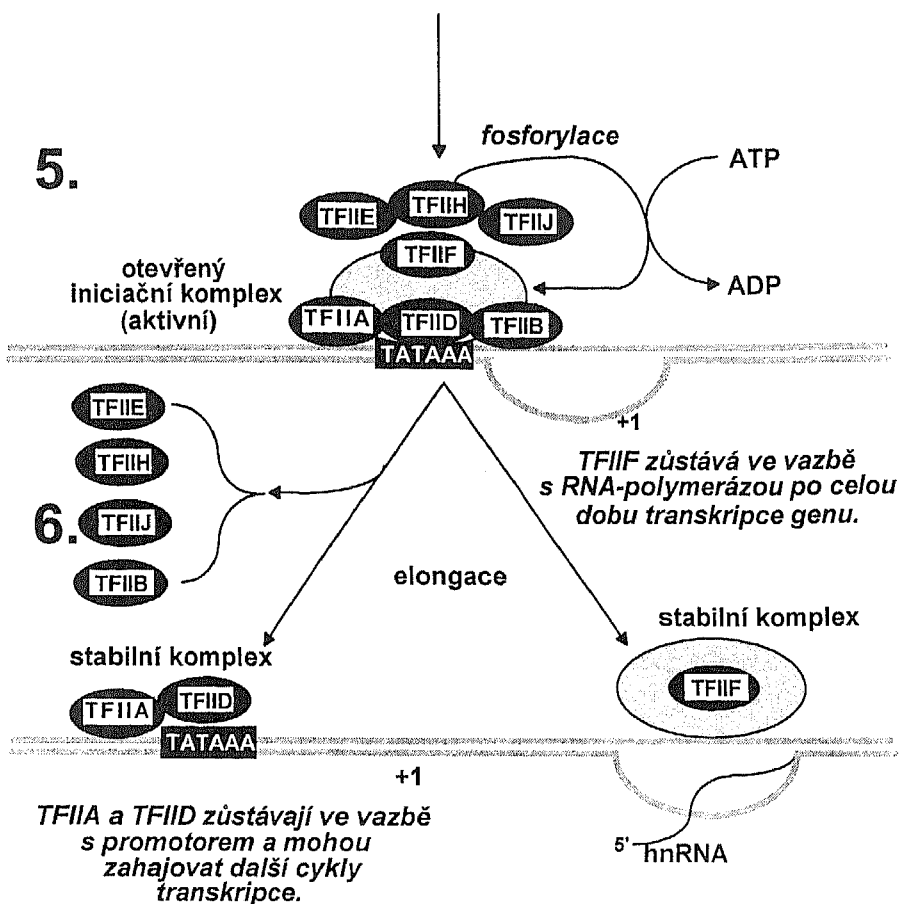


Obr. 224a

## Iniciace transkripce katalyzované RNA-polymerázou II

TFIIA, jehož význam spočívá v tom, že *zabraňuje vazbě faktoru DR1 na TFIID*. Vazba DR1 na TFIID by měla totiž ten důsledek, že TFIID by se pak nemohl navázat na Hognessův box a na transkripční faktor TFIIB. Lze tedy říci, že *DR1 má inhibiční účinek na TFIID, který se ruší faktorem TFIIA* (str. 435).





Obr. 224b  
Pokračování obr. 224a

Komplex *TFIID* s *TFIIA* se označuje jako přediniciační transkripční komplex.

2. K přediniciačnímu komplexu se nejdříve naváže transkripční faktor **TFIIB**, jehož význam spočívá v tom, že je rozeznáván komplexem RNA-polymerázy II s transkripčním faktorem **TFIIF**.

3. Pomocí transkripčního faktoru **TFIIF** se RNA-polymeráza II váže na promotor. Faktor **TFIIF** lze tedy chápat jako transkripční faktor, který je rozeznáván přediniciačním komplexem na promotoru a umožňuje tak umístění RNA-polymerázy II na promotoru.

4. Přediniciační komplex s RNA-polymerázou II se spojí s transkripčními faktory **TFIIE**, **H** a **J** za tvorby uzavřeného iniciačního transkripčního komplexu, který je ještě transkripčně inaktivní.

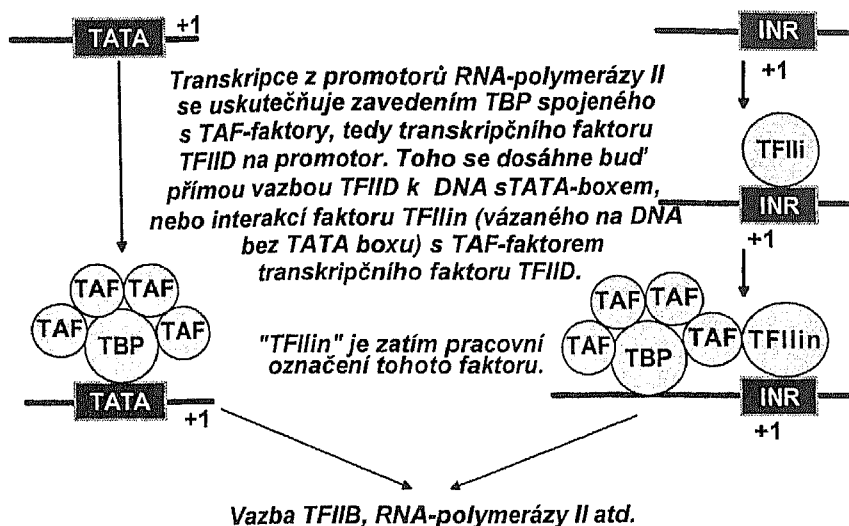
5. Uzavřený iniciační komplex je aktivován k transkripci transkripčním faktorem TFIIF. Tento faktor se vyznačuje helikázovou a proteinkinázovou aktivitou. Obě aktivity (helikázová a fosforylační) jsou pravděpodobně regulovány faktorem TFIIE. Vlivem helikázové aktivity se začne odvíjet DNA-řetězec pro transkripci. Celkově lze říci, že *vlivem helikázové a proteinkinázové aktivity TFIIF přechází uzavřený (inaktivní) iniciační komplex v otevřený iniciační transkripční komplex, který je už aktivní.*

6. Jednou z podjednotek TFIIF je specifická proteinkináza, která přenáší zbytky kyseliny fosforečné na C-konec RNA-polymerázy II. C-konec tohoto enzymu obsahuje v mnohonásobném opakování zbytky serinu, tyrozinu a treoninu. *Fosforylací serinu se RNA-polymeráza aktivuje*, čehož důsledkem je její uvolnění z uzavřeného (inaktivního) iniciačního komplexu. Aktivovaným otevřeným komplexem začíná elongace hnRNA, v níž *RNA-polymeráza II působí bez transkripčních faktorů*. Po skončení iniciace transkripce se z promotoru uvolní všechny transkripční faktory kromě TFIID a TFIIB, které zůstávají pravděpodobně na původním místě.

Význam transkripčních faktorů spočívá hlavně v tom, že *umožňují rozeznání místa, na které se má RNA-polymeráza II navázat a začít transkripci*, a dále v tom, že *uvádějí RNA-polymerázu II do aktivní konformace, ve které může transkripci vůbec uskutečnit*. Dále je nutno si uvědomit, že RNA-polymeráza II není na začátku iniciačního procesu ještě fosforylována a je tedy inaktivní. Teprve účinkem transkripčního faktoru TFIIF se fosforylací aktivuje. Avšak tento transkripční faktor se musí nejdříve navázat na uzavřený iniciační komplex, aby uplatnil svou fosforylační a helikázovou funkci.

Transkripční faktory, které jsme v rámci iniciace transkripce nyní probrali, patří do kategorie těch obecných transkripčních faktorů, které se blíže specifikují jako bazální, neboť navozují bazální transkripci. K zastavení transkripce nebo ke zvýšení účinnosti transkripce nad hladinu bazální může dojít za spoluúčasti speciálních transkripčních faktorů a regulačních oblastí typu zesilovačů transkripce, které budeme podrobněji probírat v kapitole 5.6 pojednávající o aktivaci exprese genů na úrovni transkripce v eukaryotické buňce. V této kapitole se též blíže seznámíte s funkcí a mechanismem účinku transkripčních faktorů.

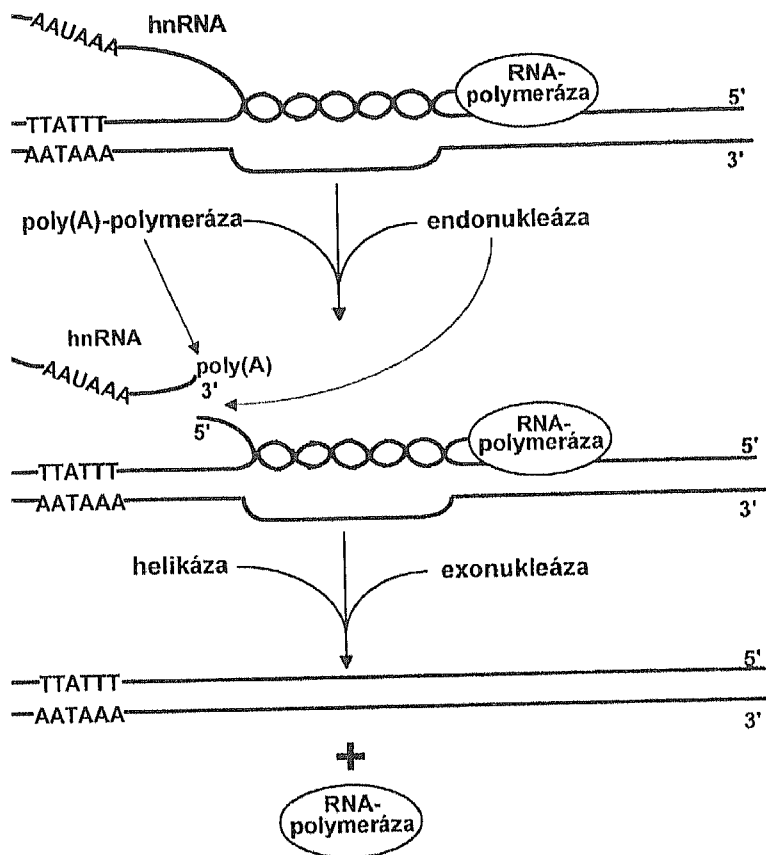
**INICIACE TRANSKRIPCE KATALYZOVANÉ RNA-POLYMERÁZOU II Z PROMOTORU S Inr-ELEMENTEM BEZ TATA-BOXU.** Nakonec je třeba se ještě zmínit o promotorech, u nichž transkripce nezačíná na TATA-boxu, neboť jej nemají. Jsou to promotory provozních strukturních genů. V těchto promotorech začíná transkripce na Inr-elementu, v němž se nachází startovací nukleotid. Na Inr-element se váže nejdříve transkripční faktor "TFIIIn", který je rozeznáván některým TAF-proteinem faktoru TFIID. Pak již může následovat tvorba přediniciačního a iniciačního komplexu. Na obr. 225 se srovnává trans-



Obr. 225  
Transkripce promotorů RNA-polymerázy II neobsahujících TATA-box a promotorů tento box obsahujících

kripce na promotoru s TATA-boxem s transkripcí na promotoru s Inr-elementem bez TATA-boxu.

**TERMINACE TRANSKRIPCE KATALYZOVANÉ RNA - POLYMERÁ - ZOU II.** Na rozdíl od bakterií, kde v transkripční jednotce končí transkripce uvolněním mRNA ze strukturálně definovaného terminátoru, probíhá zakončení transkripce v eukaryotických transkripčních jednotkách docela jinak. *Konec transkripce je u eukaryot signalizován sekvencí AATAAA, která se označuje jako polyadenylační signál, neboť signalizuje, že 10 až 30 nukleotidů za touto sekvencí se hnRNA bude štěpit, a tím se uvolní z DNA (obr. 226). Tento signalizační děj probíhá tak, že se sekvence polyadenylačního signálu na negativním řetězci DNA přepíše do hnRNA, kde je pak specificky rozeznávána komplexem proteinů spojených s endonukleázou, která hnRNA štěpí ve vzdálenosti 10 - 30 nukleotidů za polyadenylačním signálem a uvolňuje tak její 3'-konec. Tento konec je pak polyadenylován za katalytického účinku poly(A)-polymerázy neboli polynukleotidadenyltransferázy (EC 2.7.7.19), která je také součástí uvedeného komplexu proteinů. To jsou však už procesy zahrnuté do posttranskripčních úprav hnRNA, které budou probrány ve zvláštní kapitole, kde se také dovíme, že ještě během uvolňování z DNA se hnRNA pokrývá proteiny prakticky po celé své délce a vytváří s nimi komplex, který se označuje jako částice hnRNP.*

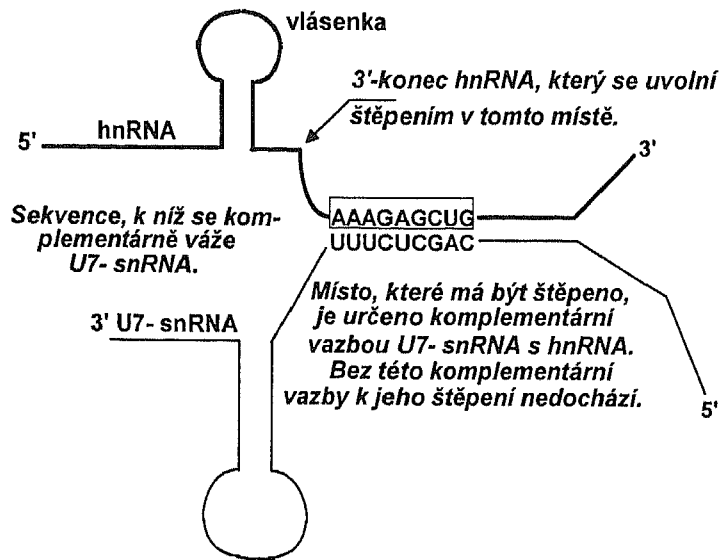


*rázou se odvine zbytek hnRNA, který se pak rozloží exonukleázou a uvolní se RNA-polymeráza II.*

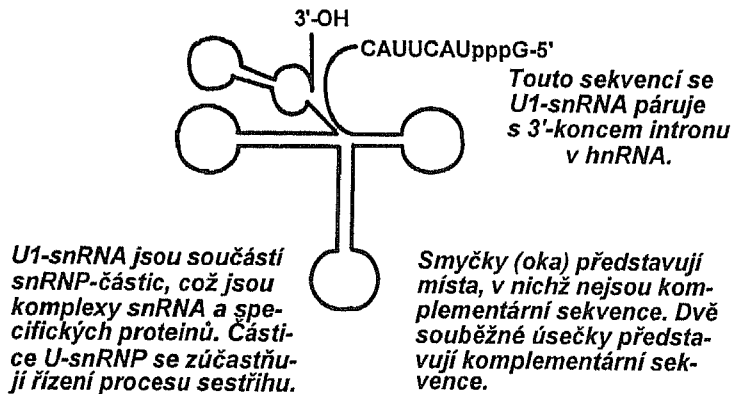
Obr. 226

### Terminace transkripce katalyzované RNA-polymerázou II

Je třeba zvláště zdůraznit, že transkripce do hnRNA končí naštěpením endonukleázou a polyadenylací jejího uvolněného 3'-konce. Dále také polyadenylační signál tím, že je rozeznáván komplexem proteinů obsahujícím endonukleázu a poly(A) polymerázu, určuje přibližně nejen místo, kde se uvolní k polyadenylaci 3'-konec. Toto platí však i výjimky. Např. hnRNA vznikající transkripcí genů kódujících pro histony nemá polyadenylační signál. Taková hnRNA není polyadenylována a její 3'-konec je určen, např. u hnRNA obsahující přepis histonu H3,



Obr. 227  
Terminace transkripce u histonové hnRNA



Obr. 228  
Schéma U1-snRNA jako příklad sekundární struktury malých jaderných RNA

tvorbou vlásenky a rozeznáván U7-snRNA vázající se k této hnRNA prostřednictvím specifických sekvencí (obr. 227).

**MALÉ RNA SYNTETIZOVANÉ RNA-POLYMERÁZOU II. RNA-poly-**

meráza II katalyzuje též transkripci těchto malých RNA do primární struktury (tab. 24): **U1-snRNA**, **U2-snRNA**, **U4-snRNA**, **U5-snRNA**, **U7-snRNA**, **U11-snRNA** a **U12-snRNA**. V jadérku katalyzuje též syntézu **U3-snRNA** (jen u rostlin), **U8-snRNA** a **U13-snRNA**. *U3-snRNA řídí u rostlin posttranskripční úpravu pre-tRNA.*

Každá z těchto RNA se tvoří v samostatném primárním transkriptu obsahujícím přepis jejího genu. Vzhledem k tomu, že má několik navzájem komplementárních sekvencí, vytváří snadno sekundární strukturu (obr. 228).

Malé RNA (U1-snRNA, U2-snRNA, U4-snRNA, U5-snRNA a U6-snRNA) jsou součástí spliceozomu a mají rozhodující význam v řízení sestřihu hnRNA. Vyskytují se převážně v komplexu s proteiny. *Komplexy snRNA s proteiny se označují jako částice snRNP. S jejich funkcí se seznámíte později.*

### 5.3.2

#### Transkripce katalyzovaná RNA-polymerázou I

**PROMOTOR RNA-POLYMERÁZY I.** *RNA polymeráza I přepisuje geny pro 5,8S-rRNA, 18S-rRNA a 28S-rRNA. Promotor této polymerázy sestává ze dvou částí (obr. 230):*

- ◆ **Základní část**, jejíž součástí je startovací nukleotid. Pro transkripci je nezbytná.
- ◆ **Regulační část**, která mnohonásobně zvyšuje účinnost transkripce.

Na obě části se váže **transkripční faktor UBF** neboli **faktor vázající se proti směru transkripce**, který umožňuje vazbu transkripčního faktoru *SL1* na základní částí promotoru.

**Transkripční faktor SL1** neboli **selektivní transkripční faktor** představuje komplex proteinů, z nichž jeden je *TBP* a ostatní jsou *TAF-faktory* (*TAF1*, *TAF110* a *TAF63*), které nejsou příbuzné s *TAF-faktory* komplexu *TFIID*. Jsou však rozeznávány *RNA-polymerázou I*.

*Promotor RNA-polymerázy I však neobsahuje TATA-box. Jak se tedy může vázat TBP na tento promotor? Odpověď spočívá v tom, že právě proteiny TAF, které tvoří s TBP komplex SL1, umožňují vazbu TBP k promotoru bez TATA-boxu.*

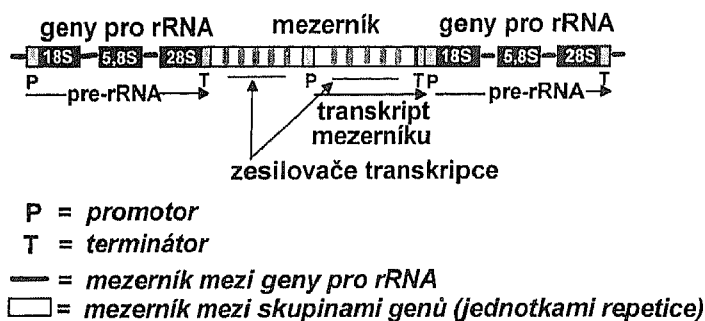
**TRANSKRIPČNÍ JEDNOTKA ŘÍZENÁ PROMOTOREM RNA-POLYMERÁZY I.** *Části eukaryotické chromozomové DNA, na nichž jsou lokalizovány geny přepisované do rRNA, se označují zkratkou rDNA. Výraznou zvlášť-*

ností rDNA je, že je tvořena mnohonásobnými repeticemi dvou transkripčních jednotek, z nichž každá je přepisována RNA-polymerázou I do 45S pre-rRNA (obr. 229). V transkripční jednotce jsou, např. u *Xenopus laevis*, seřazeny geny takto: 18S-rRNA, 5,8S-rRNA a 28S-rRNA. Mezi oběma jednotkami se nachází dlouhý mezerník obsahující regulační oblasti pro transkripci, tj. mezerníkový promotor, zesilovače transkripce a terminátor. Celý úsek mezerníku od promotoru až po terminátor se tedy přepisuje.

### PRŮBĚH TRANSKRIPCE KATALYZOVANÉ RNA-POLYMERÁZOU I.

Zatím jen hypoteticky si lze představit, jak se transkripce katalyzovaná RNA-polymerázou I zahajuje (obr. 230). Předpokládá se, že transkripční faktor TIF-1A a TIF-1C vytvoří komplex s RNA-polymerázou I, v němž ji pak aktivuje. Tento komplex se pak váže na promotor, který je pro tuto vazbu připraven transkripčními faktory SL1 a UBF. Nejdříve se proto podle obr. 230 naváže na obě části promotoru faktor UBF. K transkripci však nedochází, dokud se SL1 nenaváže na základní část. Teprve potom je promotor připraven k přijetí RNA-polymerázy I, neboť *SL1 obsahuje TAF-proteiny, které jsou touto RNA-polymerázou specificky rozeznávány*. Vazba RNA-polymerázy na SL1 pak i umožní její kontakt s promotorem a zahájení transkripce od tohoto promotoru. Vlastní transkripci však uskutečňuje RNA-polymeráza II bez UBF/SL1. Komplex UBF/SL1 zůstává v promotoru a je připraven k přijetí dalších molekul RNA-polymerázy.

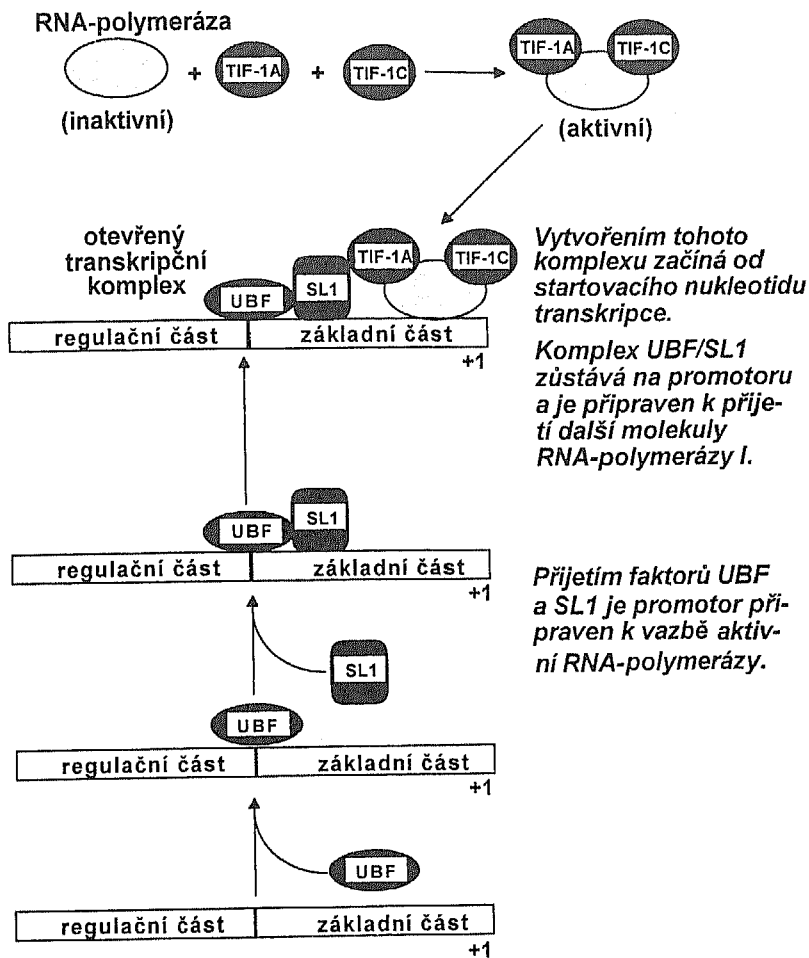
RNA-polymeráza I se váže též na mezerníkové promotory a přepisuje mezerníkové sekvence. Avšak tato transkripce se zastavuje na terminátoru před promotorem transkripční jednotky (obr. 229). Důsledkem toho pravděpodobně je, že se RNA-polymeráza I uvede k promotoru transkripční jednotky a začne



Toto schéma nepodává informace o velikostech genů a mezerníků. Zdůrazňuje se v něm toliko jejich pořadí.

Obr. 229

Transkripční jednotka RNA-polymerázy I a její primární transkript



Obr. 230  
Iniciace transkripce RNA-polymerázou I u savců

zde opět transkripci, jakmile je tento promotor opuštěn předchozí RNA-polymerázou. To znamená, že *mezerníkové promotory pravděpodobně uvádějí volné molekuly RNA-polymerázy I k promotoru transkripční jednotky, kde tyto molekuly zůstanou na terminátoru tak dlouho, dokud se promotor transkripční jednotky neuprázdní od předchozí RNA-polymerázy I.*

### 5.3.3

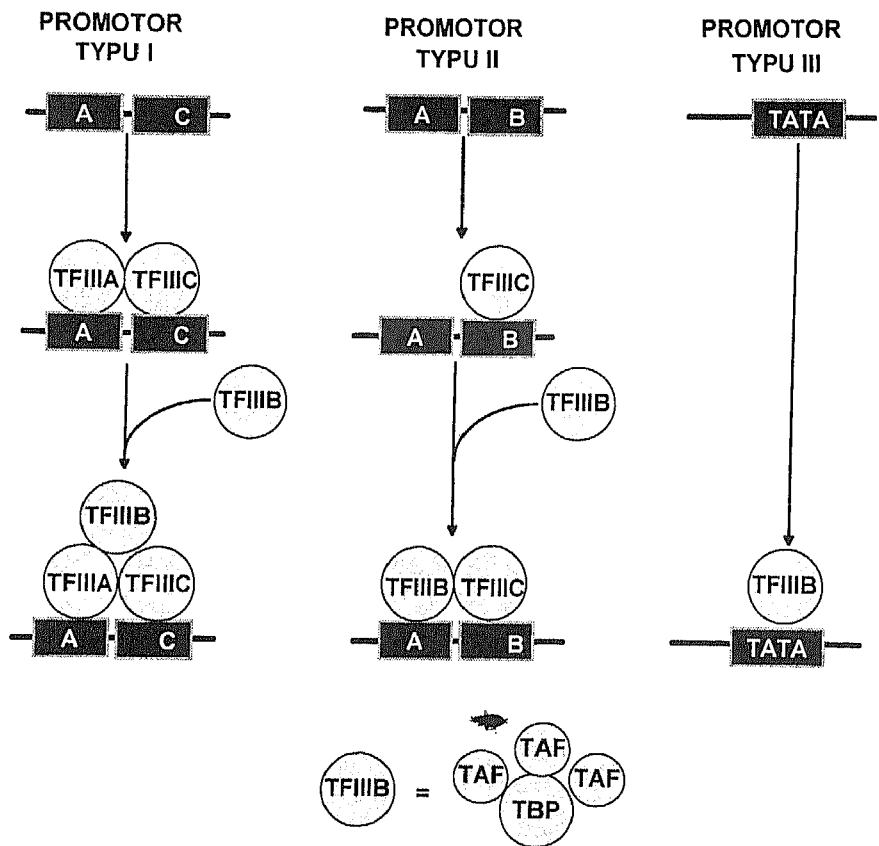
## Transkripce katalyzovaná RNA-polymerázou III



**PROMOTOR A TRANSKRIPČNÍ JEDNOTKA ŘÍZENÁ RNA-POLYMERÁZOU III.** Existují tři typy promotoru RNA-polymerázy III (obr. 231):

◆ **Promotor I. typu** neboli **promotor 5S-rRNA**, který řídí transkripční jednotku pro 5S-rRNA. K umístění RNA-polymerázy III vyžaduje obecné (bazální) transkripční faktory TFIIIA, TFIIB a TFIIC, přičemž faktor TFIIB je komplex TBP-proteinu s TAF-faktory. Nejdříve se však k DNA musí vázat TFIIIA a TFIIC, a teprve na ně se naváže TFIIB, který je pak rozpoznáván RNA-polymerázou III.

◆ **Promotor II. typu** neboli **promotor tRNA/7SL**, který řídí transkripční jednotky pro tRNA a 7SL-snRNA. 7SL-snRNA řídí translokaci proteinů. Na tento promotor se vážou jen faktory TFIIB a TFIIC, přičemž TFIIC se musí navázat první. Faktor TFIIB je pak rozpoznáván RNA-polymerázou III.



Obr. 231  
Transkripce promotorů RNA-polymerázy III

◆ **Promotor III. typu** neboli **promotor U6/7SK**, který řídí transkripční jednotku obsahující geny pro U6- a 7SK-snrRNA. U6-snrRNA je součástí spli- ceozomu, v němž se jako částice U6-snrNP vyskytuje v komplexu s proteiny. Není však zatím známa funkce 7SK-snrRNA. *Promotor III. typu se podobá promotoru RNA-polymerázy II v tom, že obsahuje TATA-box, na který se přímo váže TFIIB.*

Z tohoto přehledu je zřejmé, že RNA-polymeráza III je rozeznávána transkripčním faktorem TFIIB, který ji umísťuje prostřednictvím TBP-proteinu jako složky faktoru TFIIB na promotor. U promotoru III. typu TFIIB interaguje přímo s DNA, kdežto u promotorů I. a II. typu se musí nejdříve navázat na jiné transkripční faktory, které umožní jeho vazbu na promotor.

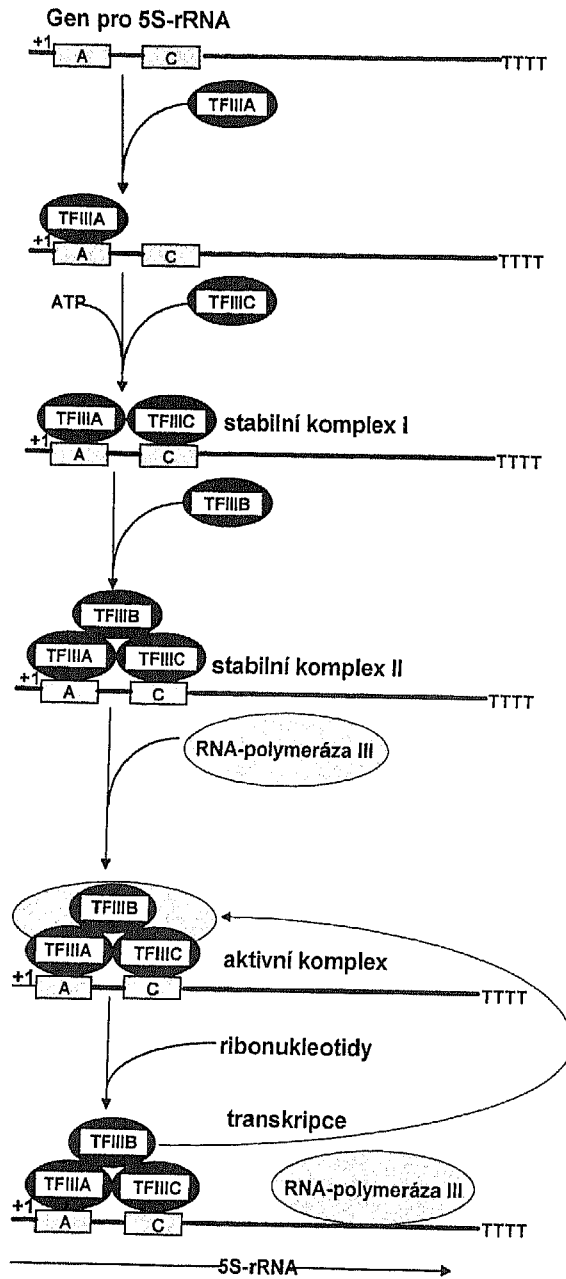
Transkripční jednotky, které jsou řízeny uvedenými třemi typy promotorů (U6/7SK, tRNA/7SL, 5S-rRNA), končí sekvencí **T T T T**. Takové zakončení není u transkripčních jednotek řízených promotory RNA-polymerázy I a II.

**PRŮBĚH TRANSKRIPCE KATALYZOVANÉ RNA-POLYMERÁZOU III.** U transkripční jednotky 5S-rRNA začíná tato transkripce tím, že se na vnitřní regulační část promotoru váže dvěma zinkovými prsty (str. 117) nejdříve transkripční faktor TFIIA. Komplex DNA s tímto faktorem je pak rozeznáván transkripčními faktory TFIIC a TFIIB za postupné tvorby dvou stabilních komplexů I a II. Vazebnou funkci vzhledem k DNA (box A) má TBP, který jako součást transkripčního faktoru TFIIB se váže k tomuto boxu neobsahujícímu Hognessův box. To je umožněno sdružením TBP s faktory TAF<sub>3</sub>170 a TAF<sub>3</sub>70. Komplex II je pak specificky rozeznáván RNA-polymerázou III. Za využívání volných ribonukleozidtrifosfátů pak začne transkripce za tvorby 5S-rRNA (obr. 232).

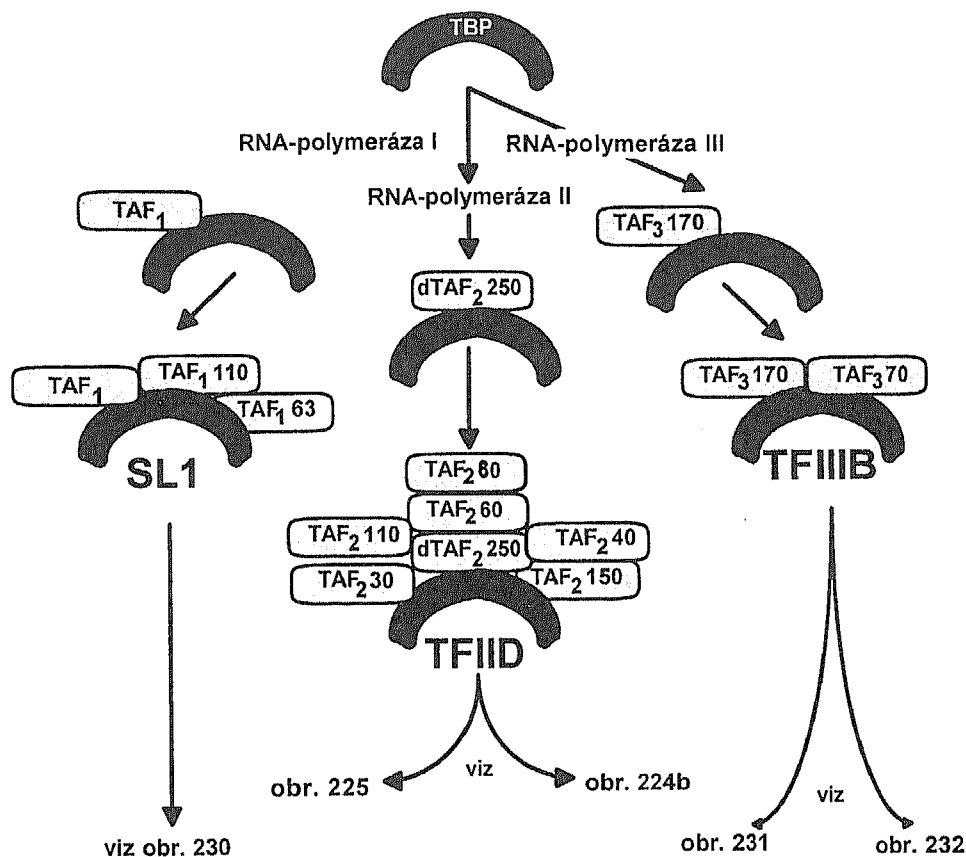
Komplex II může zůstat stabilní několik týdnů a uvádět vždy novou molekulu RNA-polymerázy III na gen pro 5S-rRNA. Po proběhnutí transkripce zůstane stabilní komplex II pevně vázán na vnitřní regulační část a nová molekula RNA-polymerázy III jej může znovu rozeznat a vytvořit nový transkript. *Stabilita transkripčního komplexu je všeobecným znakem transkripčních jednotek, které jsou přepisovány RNA-polymerázou III. Stabilní transkripční komplexy umožňují tvorbu mnoha transkriptů z jednoho genu. Nevyjasněná je však otázka, jak se stabilní komplex z genu nakonec uvolní.*

Podobným způsobem probíhá za účasti faktorů **TFIIB** a **TFIIC** transkripce transkripční jednotky obsahující geny pro tRNA.

**SHRNUTÍ FUNKCE TBP.** Zrekapitulujme si nyní podle obr. 233 poznatky o funkci faktoru TBP, které jsme uvedli v kapitolách 5.3.1, 5.3.2 a 5.3.3.



Obr. 232  
Transkripce RNA-polymerázou III



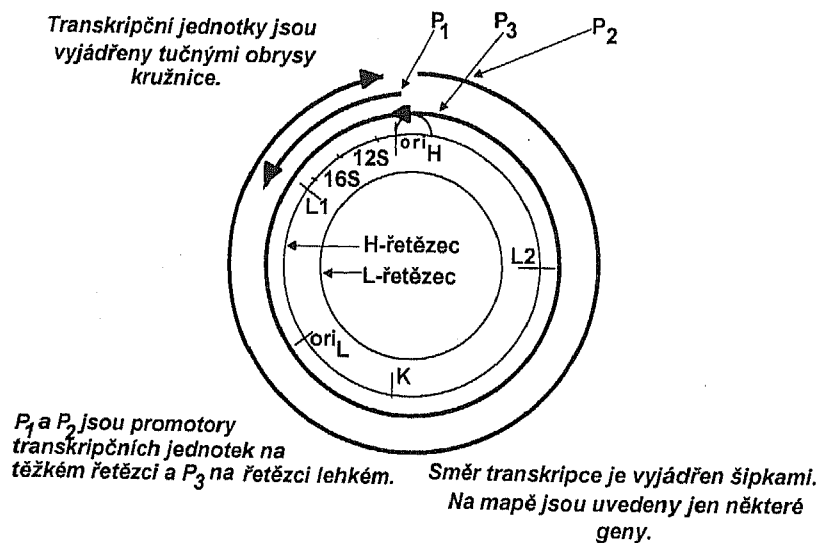
Obr. 233  
Schematické shrnutí funkce TBP

### 5.3.4

## Transkripce mitochondriového a chloroplastového genoforu

**TRANSKRIPCE SAVČÍ mtDNA.** Na mtDNA savců jsou tři transkripční jednotky (obr. 234):

- ◆ Dvě překrývající se transkripční jednotky na H-řetězci, z nichž jedna je řízena promotorem  $P_1$ , která končí za genem pro 16S-rRNA, a druhá promotorem  $P_2$  zahrnující celý H-řetězec.
- ◆ Jedna transkripční jednotka řízená promotorem  $P_3$  na řetězci L a zahrnující celý tento řetězec.



**Obr. 234**  
**Transkripční jednotky a transkripce savčí mtDNA**

Přepisem těchto transkripčních jednotek se vytvoří tři molekuly primárních transkriptů, které podléhají posttranskripční úpravě. Touto úpravou se vytvoří mRNA, funkční molekuly tRNA a rRNA (str. 393, obr. 252).

**TRANSKRIPCE ctDNA.** Promotory transkripčních jednotek obsahujících strukturální geny, které jsou lokalizovány na chloroplastovém genoforu, mají stejnou nebo velmi podobnou strukturu jako bakteriální promotory. Od nich se však strukturálně liší promotory transkripčních jednotek obsahujících geny pro tRNA. O mechanismu transkripce chloroplastového genoforu, probíhajícího asi podobně jako u prokaryot, je však dosud málo ucelených informací.

## 5.4 POSTTRANSKRIPČNÍ ÚPRAVY

V předchozí části bylo vyloženo, jak se tvoří v jádře eukaryotické buňky (rostlinné i živočišné) primární transkripty:

- ◆ hnRNA,
- ◆ pre-rRNA,
- ◆ pre-tRNA,
- ◆ a také primární transkripty vznikající přepisem mitochondriového a chloroplastového genoforu.

První tři primární transkripty představují poměrně velké molekuly, které musí být upraveny do menších molekul, aby mohly být transportovány z jádra do cytoplazmy, kde pak plní svou biologickou funkci. Celkově lze říci, že *molekuly hnRNA se upravují do mRNA, pre-rRNA do rRNA a pre-tRNA do tRNA.*

Zatím známé a nejvýznamnější posttranskripční úpravy primárních transkriptů v eukaryotických buňkách jsou:

- ◆ modifikace hnRNA,
- ◆ sestřih hnRNA,
- ◆ posttranskripční úpravy pre-rRNA a pre-tRNA,
- ◆ posttranskripční úpravy primárních transkriptů v mitochondriích.

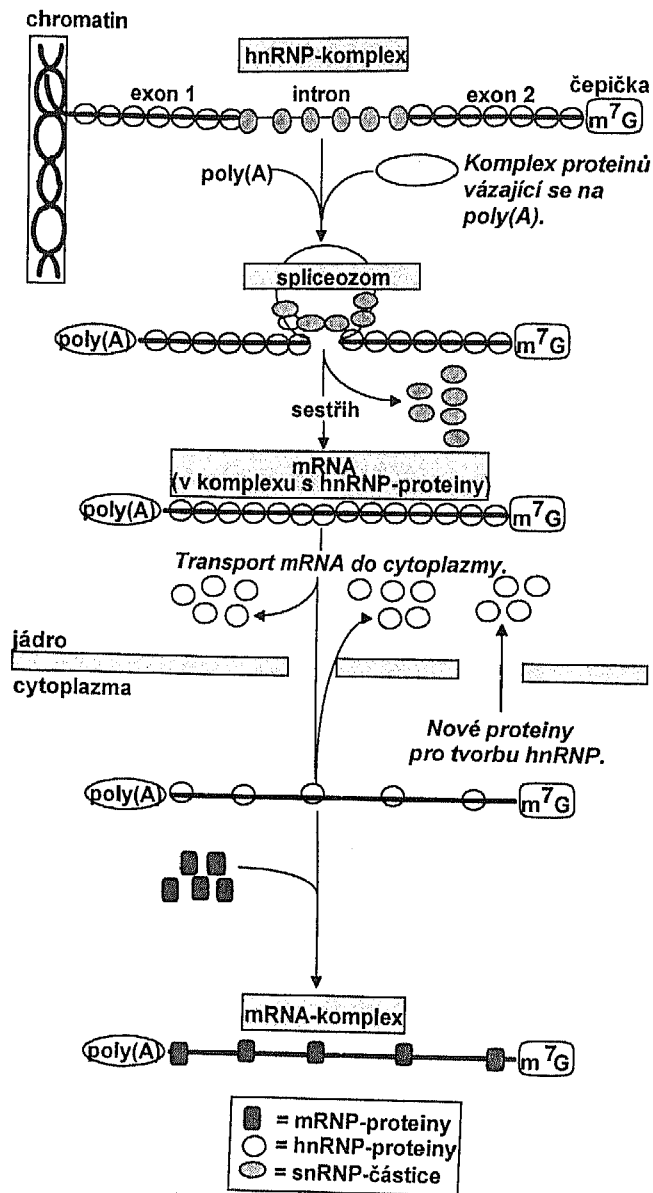
### 5.4.1

#### Modifikace hnRNA

Po transkripci se hnRNA modifikuje. Za **modifikaci hnRNA** budeme považovat *fyzikální nebo chemické změny, které na ní proběhnou po transkripci (kromě sestřihu), aniž ovlivní její primární strukturu, a tedy i genetickou informaci v ní obsaženou.* Jsou to především (obr. 235):

- ◆ tvorba komplexů hnRNA s proteiny,
- ◆ úprava 5'-konce hnRNA tzv. čepičkou,
- ◆ polyadenylace 3'-konce hnRNA.

Jestliže hnRNA obsahuje přepisy intronů, pak podléhá ještě úpravě sestřihem. Ale tato úprava už ovlivňuje primární strukturu hnRNA, nemění však genetickou informaci obsaženou v exonech.



Obr. 235  
Schematický pohled na posttranskripční úpravy hnRNA

**TVORBA hnRNP-KOMPLEXŮ.** Během transkripce se hnRNA v buněném jádře spojuje jednak s hnRNP- proteiny a jednak s částicemi snRNP a tvoří s nimi komplexy nazývané **hnRNP-komplexy**. Proteiny, které se specificky vážou na hnRNA, se označují jako **hnRNP-proteiny**. Na druhé straně protein,

kteřé se specificky vážou k malým jaderným RNA, se označují jako **snRNP-proteiny** a komplexy snRNP-proteinů se snRNA jako **snRNP-částice**. Vazbou těchto částic na introny hnRNA se vytvoří organizovaný komplex, který se označuje jako **spliceozom**. Částice snRNP řídí ve spliceozomu proces sestřihu. Jak je zřejmé z obr. 235, je struktura těchto komplexů velmi dynamická. Jejich složení se během přechodu mediátorové RNA z jádra do cytoplazmy radikálně mění. V jádře se mRNA vyskytuje ještě v komplexu se všemi hnRNP-proteiny, zatímco v cytoplazmě zůstává jen část těchto proteinů na ní dočasně vázána. Tyto proteiny se brzy z mRNA uvolní a přecházejí opět do jádra neboli pendlují mezi jádrem a cytoplazmou. Jsou však nakonec nahrazeny mRNP-proteiny (viz dále).

Je zatím nesnadné říci, jaká je funkce hnRNP-proteinů v uvedených komplexech. Všeobecně se má za to, že ovlivňují konformaci hnRNA a umožňují nebo brzdi interakce sekvencí hnRNA s jinými složkami jádra, které jsou potřebné při úpravách hnRNA. Předpokládá se, že jejich základní funkce spočívá v tom, že *uvádějí hnRNA do stavu přístupného k posttranskripčním úpravám*. Uplatňují se pravděpodobně též při transportu mRNA do cytoplazmy. V cytoplazmě je pak mRNA v komplexu s **mRNP-proteiny**, které se pravděpodobně zúčastňují regulace translace.

**ÚPRAVA 5'-KONCE ČEPIČKOU.** Struktura, kterou se posttranskripčními úpravami modifikuje 5'-konec hnRNA, se označuje jako **čepička** a vyjadřuje se zkratkou **m<sup>7</sup>G** (obr. 236): V této struktuře se koncový 7-metylguanozin váže přes tři fosfátové skupiny ve směru 5' - 5' (nikoli 5' - 3') k mRNA. Metylační guanozinu a bázi N<sub>1</sub> a N<sub>2</sub> vznikají tři typy struktur čepičky, a to:

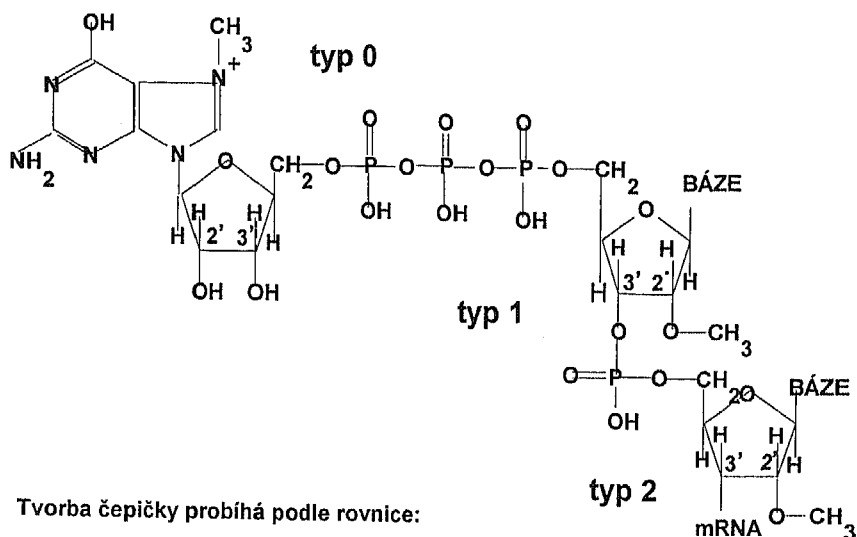
- ◆ **typ 0**, tj. **m<sup>7</sup>G 5' ppp5'N<sub>1</sub>pN<sub>2</sub>p**, tj. metylace jen G,
- ◆ **typ 1**, tj. **m<sup>7</sup>G 5' ppp5'N<sub>1</sub>mpN<sub>2</sub>p**, tj. metylace G a N<sub>1</sub>,
- ◆ **typ 2**, tj. **m<sup>7</sup>G 5' ppp5'N<sub>1</sub>mpN<sub>2</sub>mp**, tj. metylace G, N<sub>1</sub> a N<sub>2</sub>,

kde m = metylová skupina, G = guanozin, N<sub>1</sub> a N<sub>2</sub> = purinový nebo pyrimidinový nukleozid, p = fosfát.

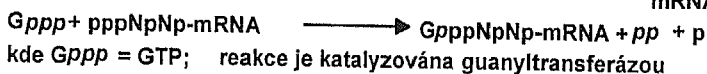
*Skupina m<sup>7</sup>G se vyskytuje jak na 5'-konci hnRNA, tak i na 5'-konci cytoplazmatické mRNA. Význam modifikace 5'-konce hnRNA čepičkou m<sup>7</sup>G spočívá v tom, že se na ni vážou CBP-proteiny zúčastňující se iniciace translace.*

**POLYADENYLACE 3'-KONCE.** HnRNA obsahuje na 3'-konci **poly (A)-konec**, což je *poly(A)-sekvence dlouhá 50 - 250 nukleotidů*. Tato sekvence vzniká polyadenylací zbytků kys. adenylové jako monomerních jednotek a je katalyzována **poly(A)-polymerázou**. Probíhá v těchto krocích (obr. 237):





Tvorba čepičky probíhá podle rovnice:



Obr. 236

### Strukturální vzorec čepičky

**1. Sestavení komplexu.** Před štěpením hnRNA vytvoří alespoň 5 molekul proteinů komplex s hnRNA. Mezi proteiny je faktor rozeznávající sekvenci AAUAAA a poly(A)-polymeráza.

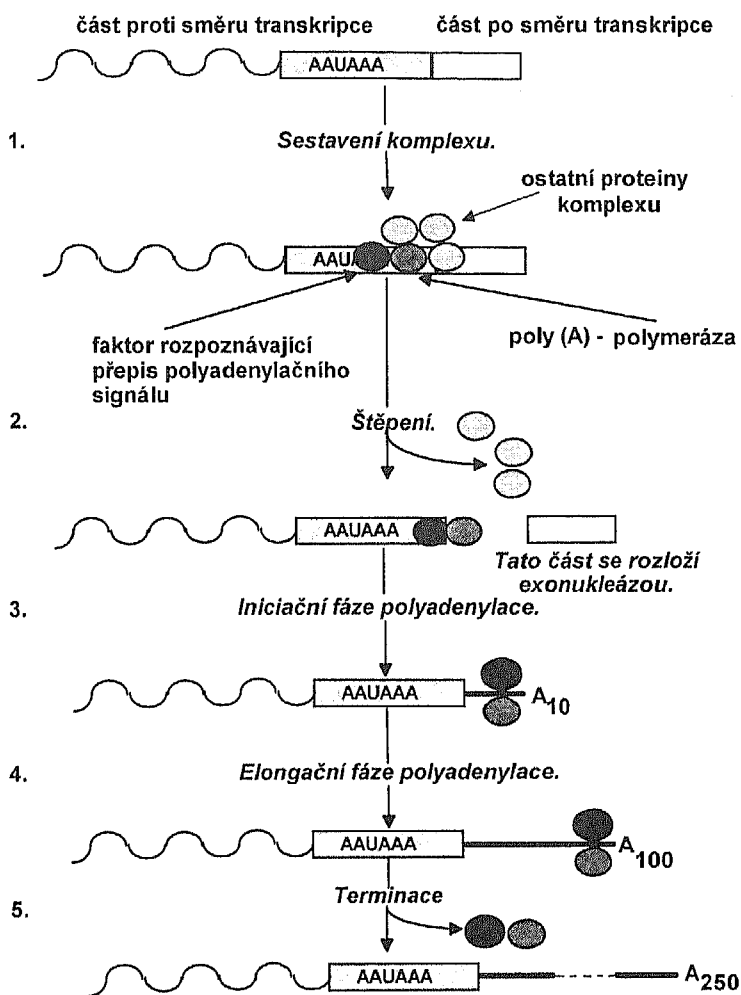
**2. Štěpení.** HnRNA se štěpí blízko polyadenylačního signálu. Část proti směru transkripce se pak rychle odbourává. Část proti směru transkripce zůstane.

**3. Iniciační fáze polyadenylace.** K části proti směru transkripce se postupně přidává až 10 zbytků kys. adenylové, což je katalyzováno poly(A)-polymerázou, která je spojena s rozpoznávacím faktorem vázaným k polyadenylačnímu signálu.

**4. Elongační fáze polyadenylace.** Po deseti přidaných zbytcích kys. adenylové se rozpoznávací faktor může z přepisu polyadenylačního signálu uvolnit. Dále pak už je prodlužování poly(A)-konce nezávislé na přepisu signálu. Rozpoznávací faktor však může být i nadále v kontaktu s poly(A)-polymerázou.

**5. Terminace.** Po přidání asi 250 zbytků kys. adenylové se rozpoznávací faktor uvolní a může se vázat na přepis polyadenylačního signálu další molekuly hnRNA.

Jakou má funkci poly(A)-konec, není zatím známo. Usuzuje se, že má především význam při transportu mRNA z jádra do cytoplazmy. Existují však také důkazy, že se podílí na stabilizaci mRNA v cytoplazmě tím, že zamezuje její odbourávání z 3'-konce.



Obr. 237  
Schéma polyadenylace 3'-konce hnRNA

### 5.4.2 Sestřih hnRNA

**STRUKTURA INTRONU.** Důvod pro sestřih hnRNA spočívá v tom, že hnRNA je primárním transkriptem obsahujícím přepisy intronů a exonů složených strukturních genů. Přepisy intronů se vyznačují určitými sekvencemi, na které se vážou snRNP-částice řídící celý proces sestřihu. Přitom rozhodující pro to, aby sestřih vůbec mohl začít, je primární struktura intronů v jejich přepi-

sech do hnRNA. Proto je nutno se nejdříve s touto strukturou seznámit. Platí pro ni **pravidlo GU-AG**, podle kterého se na 5'-konci přepisu intronu v hnRNA nachází dinukleotid GU a na 3'-konci dinukleotid AG. Spojení v hnRNA mezi 3'-koncem exonu a 5'-koncem intronu se nazývá **5'-místo sestřihu** a podobně spojení mezi 3'-koncem intronu v hnRNA a 5'-koncem exonu se nazývá **3'-místo sestřihu**. Obě místa jsou charakteristická určitými sekvencemi rozeznávanými částicemi U1-snRNP na 5'-místě sestřihu a U5-snRNP na 3'-místě sestřihu. Mezi oběma sekvencemi se blízko 3'-konce intronu vyskytuje sekvence, která je rozeznávána částicí U2-snRNP. Uvnitř této sekvence se nachází **místo větvení**, které tvoří obvykle nukleotid A poskytující při vzniku lasovité RNA skupinu 2'-OH pro 2',5'-fosfodiesterovou vazbu (obr. 238).

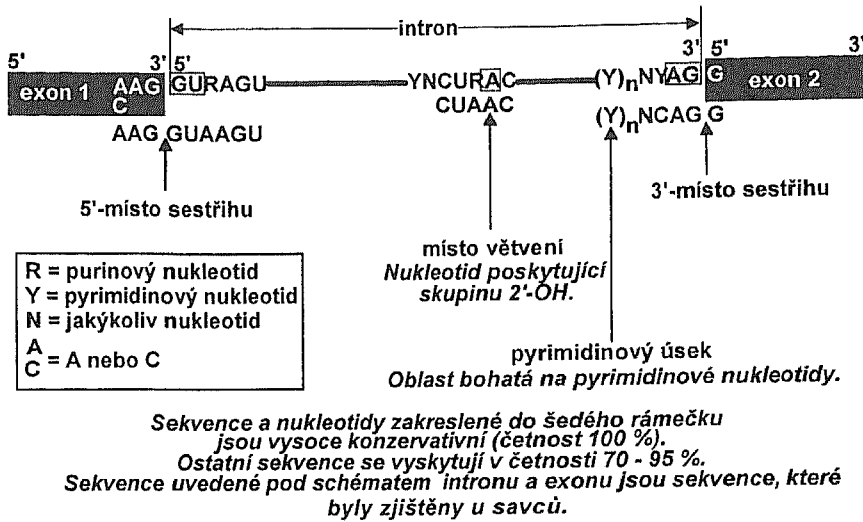
**TRANSESTERIFIKACE.** Základem sestřihu je chemická reakce označovaná jako transesterifikace. Rozumí se tím přeměna jednoho fosfátového esteru v jiný, která probíhá bez hydrolyzy a za nepřítomnosti ATP nebo GTP. Jelikož fosfátový ester se přeměňuje přímo, zůstává energie fosfodiesterové vazby zachována. To také vysvětluje, proč není nutná energie uvolňující se hydrolyzou ATP nebo GTP. Vyštěpení intronu a spojení exonů v hnRNA probíhá ve dvou krocích, které představují jeden transesterifikační cyklus. Jsou to (obr. 239, 240):

**1. První transesterifikace.** Představuje přenos OH-skupiny z intronu na exon. Fosfodiesterová vazba mezi exonem 1 a intronem se štěpí nukleofilním působením skupiny 2'-OH nukleotidu A (místo větvení). Současně se 5'-konec intronu spojí s nukleotidem A za tvorby 2', 5'-fosfodiesterové vazby. Výsledkem této reakce jsou dvě intermediární molekuly RNA: exon 1 a **lasovitá intronexonová RNA sestávající z přepisu intronu uzavírajícího se kovalentně ve tvaru smyčky prostřednictvím 2',5'-fosfodiesterové vazby obvykle s nukleotidem A a od tohoto nukleotidu (místa větvení) je tvořena lineárním řetězcem obsahujícím přepis části intronu a přepis celého exonu 2.**

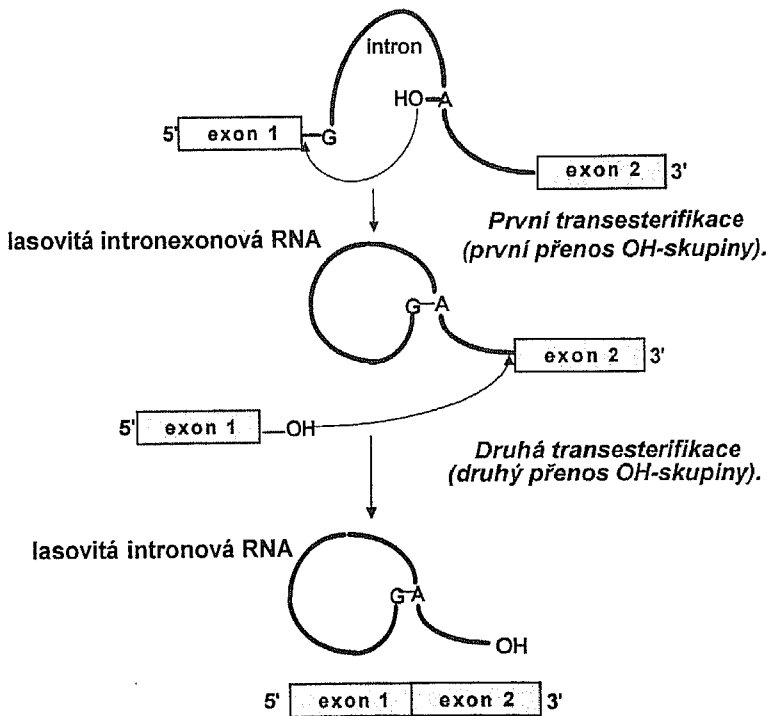
**2. Druhá transesterifikace.** Představuje přenos OH-skupiny z exonu na intron. 3'-místo sestřihu se štěpí skupinou 3'-OH exonu 1 a oba exony se spojí do výsledné mRNA a **lasovité intronové RNA, která obsahuje jen přepis intronu.**

**PRŮBĚH SESTŘIHU.** Celý proces sestřihu probíhá zhruba v těchto fázích (obr. 241):

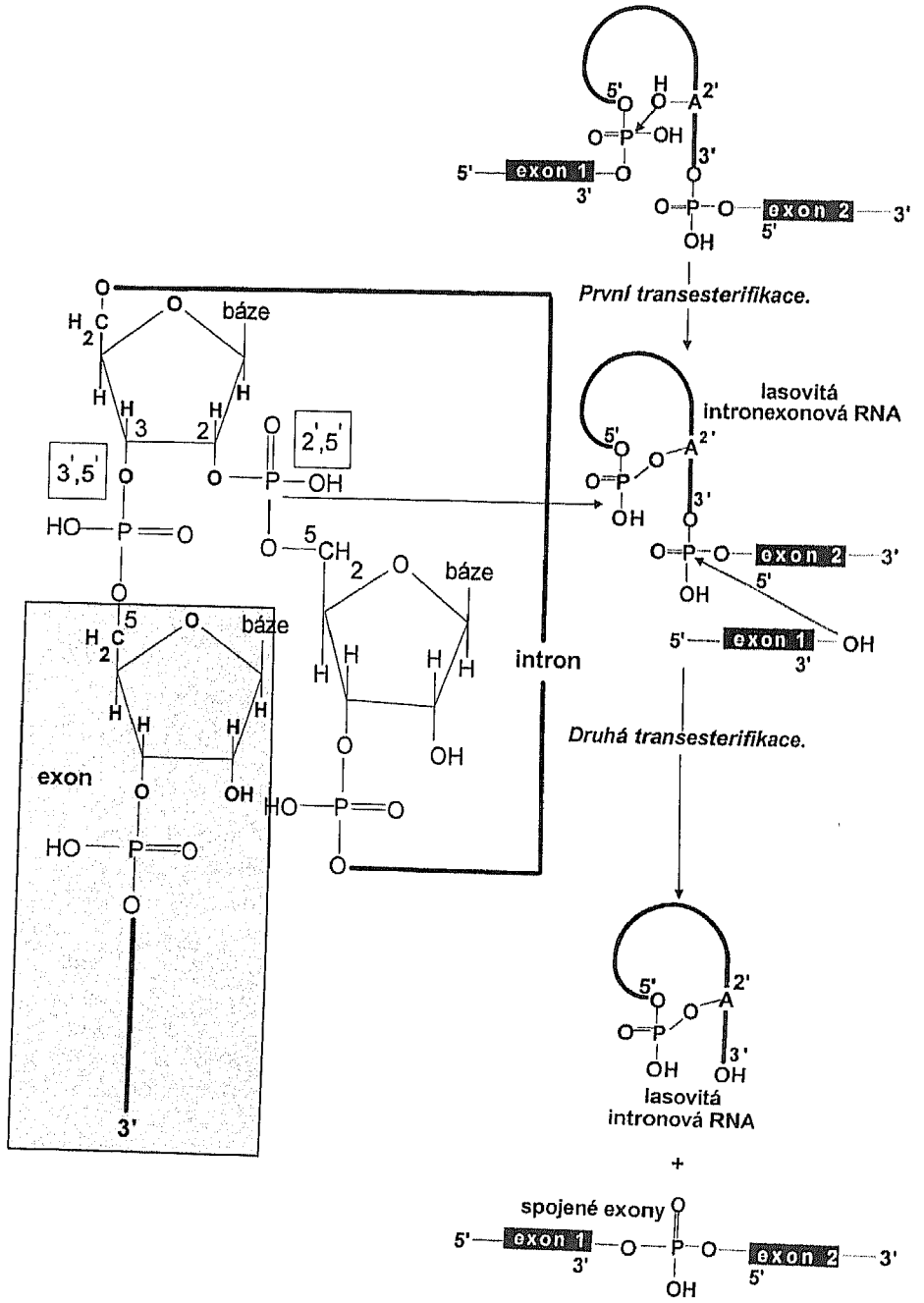
**1. Rozeznání 5'-místa sestřihu a místa větvení.** Dříve než začne probíhat vlastní proces sestřihu a tedy i transesterifikace, musí být přesně rozeznána sekvence kolem míst, ve kterých sestřih bude probíhat, což se uskutečňuje částicemi (obr. 242):



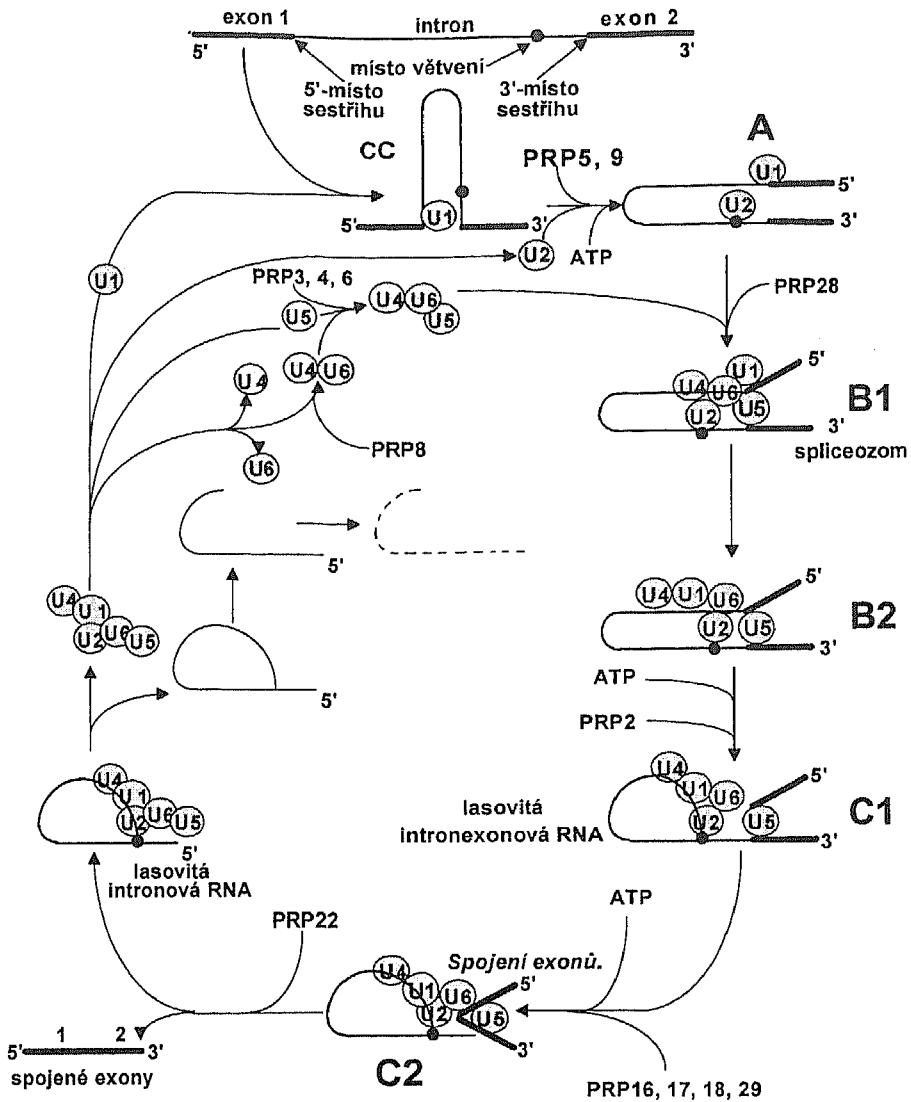
Obr. 238  
Schéma struktury intronu v hnRNA



Obr. 239  
Schéma transesterifikace při sestřihu hnRNA



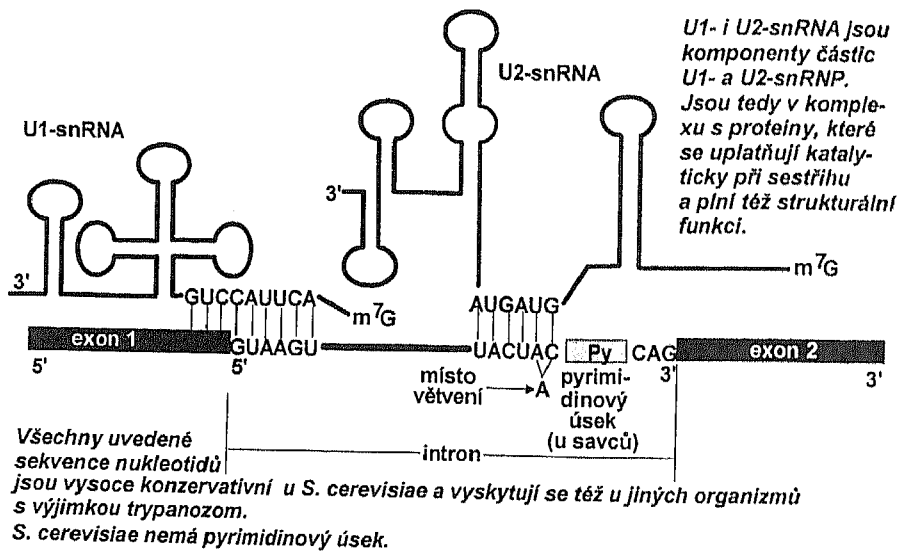
Obr. 240  
Reakce transesterifikace



Obr. 241  
Globální pohled na základní děje zahrnuté do monomolekulárního sestřihu

- ◆ **U1-snRNP**, která rozeznává sekvenci kolem 5'-místa sestřihu;
- ◆ **U2-snRNP**, která rozeznává sekvenci kolem místa větvení.

Rozpoznávání sekvence kolem 5'-místa sestřihu a místa větvení probíhá tak, že se k sekvenci u 5'-místa sestřihu komplementárně váže U1-snRNP prostřednictvím U1-snRNA a k sekvenci u místa větvení U2-snRNP prostřed-



Obr. 242  
Rozeznávání 5'-místa sestřihu a místa větvení malými jadernými U1-snRNA a U2-snRNA

nictvím U2-snRNA (obr. 242). U savců probíhá tento rozpoznávací proces na pyrimidinovém úseku, k němuž se váže U2-snRNA prostřednictvím proteinu U2AF.

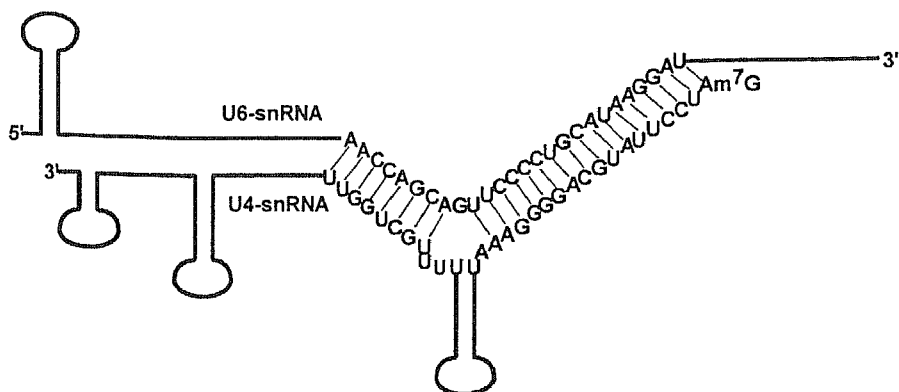
Produkt interakce U1-snRNP s hnRNA, který je podmíněn párováním U1-snRNA se sekvencí u 5'-konce sestřihu, se označuje jako vstupní komplex nebo též zkráceně jako CC-komplex. Komplex složený z hnRNA, U1-snRNP a U2-snRNP se označuje jako A-komplex (obr. 241).

Avšak vazba U2-snRNP k místu větvení předpokládá, že se již před tím na 5'-místo sestřihu navázala U1-snRNP. Pak teprve se váže k místu větvení U2-snRNP, což je řízeno proteiny PRP5 a PRP9 (obr. 241).

**2. Tvorba komplexu U4-U6-U5-snRNP.** Je to komplex, jehož složkami jsou částice U4-snRNP, U6-snRNP a U5-snRNP. Tyto částice se vyskytují samostatně jen krátkodobě. Velmi rychle se spárují nejdříve za tvorby komplexu U4-U6-snRNP (obr. 243), k němuž se připojí částice U5-snRNP za tvorby výsledného komplexu U4-U6-U5-snRNP, jak je to zřejmé z obr. 241. Tvorba těchto komplexů se děje za účasti proteinů PRP3, 4, 6 a 8.

Komplex U4-U6-U5-snRNP a současně s ním A-komplex jsou výchozími produkty pro tvorbu spliceozomu. A-komplex je velmi stabilní. U savců je jeho stabilita způsobena přítomností pomocného faktoru U2AF, který umožňuje vazbu U2-snRNA k pyrimidinovému úseku (kvasinky tento úsek nemají).

**3. Tvorba spliceozomu.** Spliceozom (čti jak se to píše) je organizovaný



Obr. 243

### Párování U4-snRNA s U6-snRNA v komplexu U4-U6-snRNP

komplex katalyzující transesterifikaci při sestřihu *hmRNA*. Spliceozom má čtyři formy, a to B1, B2, C1 a C2, které se postupně tvoří v právě napsaném pořadí. Můžeme je též označovat jako **B1-spliceozom**, **B2-spliceozom**, **C1-spliceozom** a **C2-spliceozom** (obr. 241).

*B1-spliceozom* se vytvoří spojením U4-U6-U5-snRNP s A-komplexem. Sestavení tohoto komplexu se děje za účasti proteinu PRP28. V B1-spliceozomu je od 5'-místa sestřihu oddělena U1-snRNA. U5-snRNA obsadí obě místa sestřihu, což vede k tvorbě **B2-spliceozomu**, v němž (obr. 244):

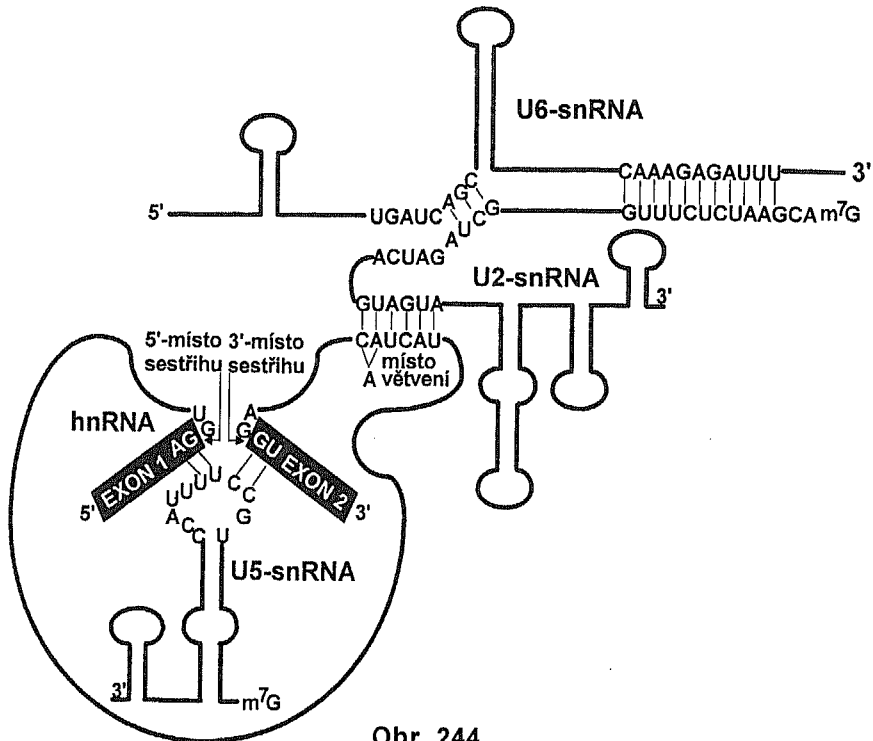
- ◆ Mezi U4- a U6-snRNA se vmezeří U1-snRNA. U5-snRNA se oddělí od U6-snRNA a spáruje se jednak s 3'-koncem exonu 1 a jednak s 5'-koncem exonu 2. Tím se uvede 5'- a 3'-místo sestřihu do těsného kontaktu.
- ◆ U2-snRNA zůstává spárována se sekvencí kolem místa větvení.
- ◆ U6-snRNA je komplementárně spárována s U2-snRNA.

Těmito reakcemi se původní U4-U6-U5-snRNP-komplex přeskupí do komplexu U4-U1-U6-U5-snRNP, v němž U6-snRNA interaguje s U2-snRNA párující se se sekvencí kolem místa větvení. Výsledkem těchto dějů, probíhajících za účasti proteinu PRP2, je **C1-spliceozom**, který je již katalyticky aktivní a uskuteční se v něm první krok transesterifikace, tj. štěpení v 5'-místě sestřihu za uvolnění exonu 1 a vytvoření lasovité intronexonové RNA. Druhý krok transesterifikace probíhá v C2-spliceozomu, jehož katalytická aktivita vyžaduje přítomnost proteinů PRP16, 17, 18 a 29. V druhém kroku dochází ke spojení exonu 1 a 2 za uvolnění lasovité intronové RNA.

Další kroky jsou zřejmé z obr. 241.

Uvedený model sestřihu byl experimentálně prokázán. Spliceozomy existují. Jsou pozorovatelné i elektronovým mikroskopem jako elipsoidní části-





Obr. 244

#### Interakce mezi U2-, U5-, U6-snRNA a hnRNA v B2-spliceozomu

ce, jejichž sedimentační koeficient je přibližně 60S. Považují se za dynamické organely, jež svou složitostí se blíží ribozomům. Jakmile splní svou funkci, rozpadají se na jednotlivé částice U1-, U2-, U4-, U5- a U6-snRNP, přičemž U4- a U6-snRNP se brzy spárují.

**PRP-PROTEINY.** Procesu sestřihu se zúčastňuje asi 100 proteinů. Patří mezi ně proteiny, které se označují jako **proteiny upravující prekurzorovou RNA** neboli zkráceně **PRP-proteiny**. Byly již popsány u *Saccharomyces cerevisiae*. Některé se uplatňují při vazbě snRNP-částic k DNA nebo mají helikázovou funkci, např. při přeskupení U4-, U6-, a U1-snRNA nebo při jejich uvolnění z rozpoznávaných sekvencí. Též u savců byly podobné proteiny zjištěny.

**BIMOLEKULÁRNÍ SESTŘIH.** Sestřih, který jsme popsali, je vyložen **monomolekulární**. Tak se označuje *sestřih, který probíhá na stejné molekule*

*primárního transkriptu.* Mediátorová RNA při tomto sestřihu je výsledkem spojení exonů, které se nacházejí na stejné molekule primárního transkriptu. Existuje též **sestřih bimolekulární**, který *probíhá na dvou různých molekulách primárního transkriptu, takže mRNA je zde výsledkem spojení exonů, které se nacházejí na dvou různých molekulách primárního transkriptu.* Každý z těchto primárních transkriptů se týká jiné transkripční jednotky. Tento způsob sestřihu se jeví spíše výjimečný než obecně rozšířený. Byl zjištěn u trypanozom a nematod. U trypanozom bylo zjištěno (obr. 245), že substráty tohoto sestřihu jsou dvě molekuly hnRNA, z nichž jedna nese přepis exonu vedoucí sekvence SL a druhá přepis exonu kódujícího primární strukturu povrchového antigenu VSG. Vedoucí sekvence je dlouhá 39 nukleotidů a je opatřena modifikovanou čepičkou. Má funkci exonu, i když nekóduje primární strukturu proteinu VSG, ale *zachovává se po sestřihu v mRNA.* Označuje se proto jako SL-exon. Za SL-exonem následuje úsek o délce 100 nukleotidů, který lze označit jako součást intronu, jelikož *se po sestřihu v mRNA nezachovává.*

Z obr. 245 je zřejmé, že při sestřihu se vyštěpí introny a spojí se vazbami 2',5' a 3',5' jako u monomolekulárního sestřihu a vytvoří místo lasovité RNA tzv. **větvenou RNA**, *jelikož exony a introny nejsou na stejné molekule RNA.* Mechanismus tohoto sestřihu není však plně objasněn. Zcela určitě se ho zúčastňují U2-snRNP, U4-snRNP, U6-snRNP. U2-snRNP rozeznává místo větvení a páruje se s částí SL-exonu, což je náhradou za rozeznávání 5'-konce intronu.

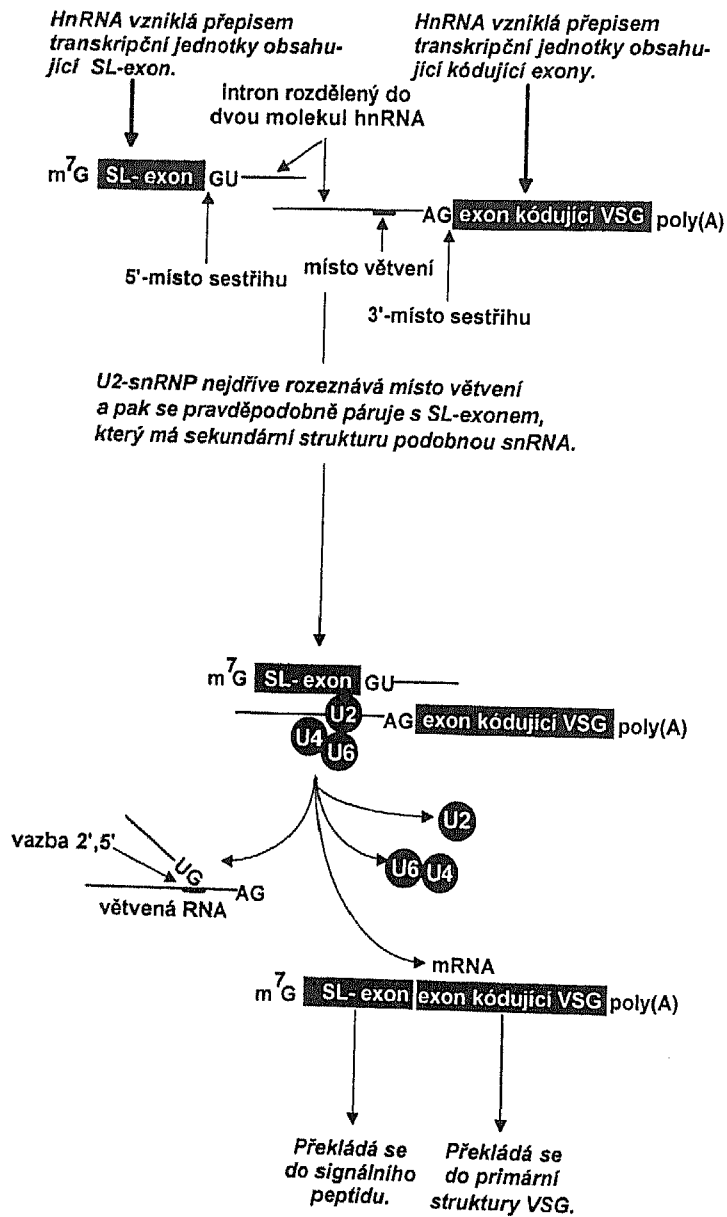
**ALTERNATIVNÍ SESTŘIH.** Alternativní sestřih je obecně popsán na str. 142, obr. 114. Bylo zjištěno, že se děje na těchto typech hnRNA (obr. 246):

1. *HnRNA, které obsahují jeden potenciální exon (mezi dvěma konstitutivními) s jedním 5'- a s jedním 3'-místem sestřihu a žádné introny.* Příkladem je alternativní sestřih hnRNA obsahující přepis genu kódujícího ribozomový protein RLP32 u kvasinek. Sestřihem intronu v hnRNA pro tento protein se uskutečňuje regulace jeho syntézy. Protein je funkčně aktivní, neobsahuje-li příslušný potenciální exon. Za nadbytku proteinu RLP32 je sestřih tohoto exonu inhibován, takže se zastaví tvorba funkčního RLP32. K sestřihu dochází za nedostatku RLP32.

2. *HnRNA obsahující jeden potenciální exon s jedním 5'-místem sestřihu a více 3'-místy.* Příkladem je alternativní sestřih hnRNA obsahující přepis genu kódujícího fibronektin krysy, který má tři 3'-místa sestřihu.

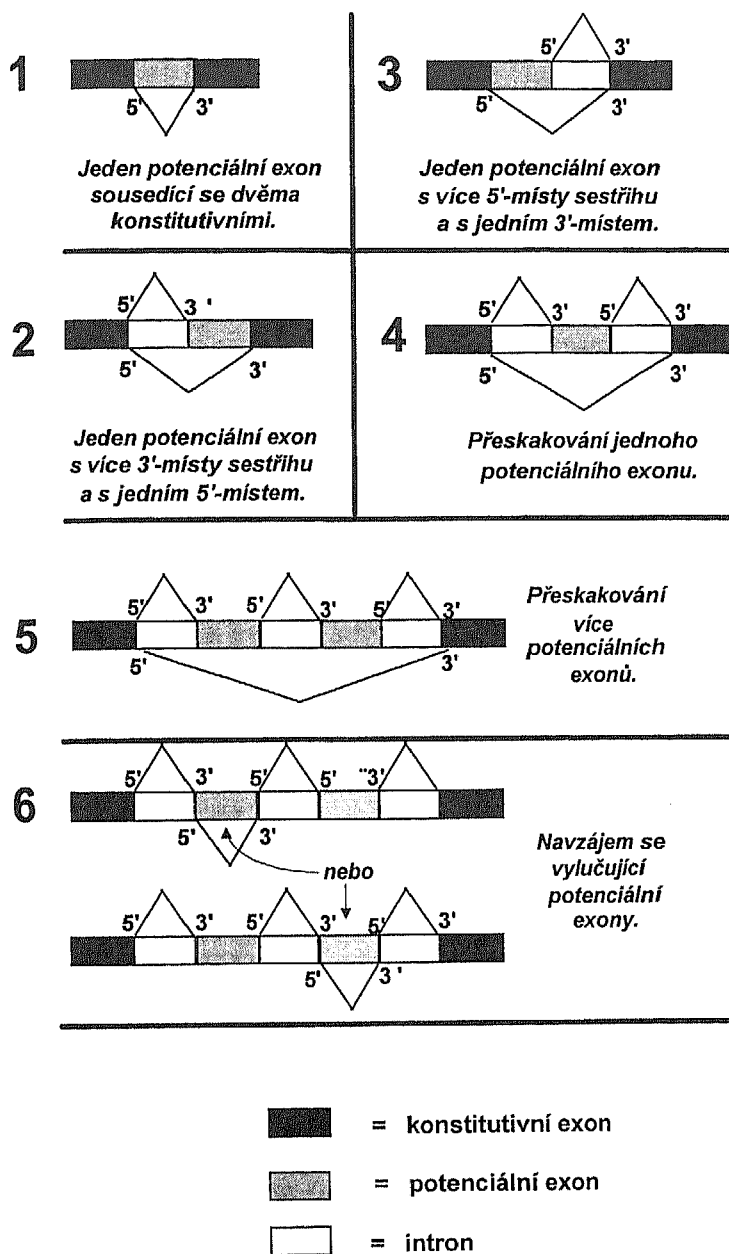
3. *HnRNA obsahující jeden i více potenciálních exonů s jedním 3'-místem sestřihu a více 5'-místy.* Příkladem je hnRNA obsahující přepis genu transformer (tra) u *Drosophila melanogaster*.

4. *HnRNA obsahující jeden přeskakovaný potenciální exon.* Příkladem je hnRNA obsahující přepis genu pro lidský fibronektin.



Obr. 245  
Schéma bimolekulárního sestřihu u trypanozom

5. *HnRNA obsahující více přeskakovaných potenciálních exonů.* Příkladem je hnRNA obsahující přepis genu kódujícího tyrozinproteinofosfatázu



Obr. 246  
Způsoby alternativního sestříhu hnRNA

(protein CD45) v lymfocytech (str. 556, 566). CD45 má tři potenciální exony, které se vyštěpují v T-lymfocytech, kdežto v B-lymfocytech se zachovávají.

6. *HnRNA, která obsahuje navzájem se vylučující potenciální exony.* Příkladem je alternativní sestřih hnRNA obsahující exony genu kódujícího izoformy  $\alpha$ -tropomyozinu hladkého a pruhovaného svalu. V hladkém nebo pruhovaném svalu se dva exony navzájem vylučují (vždy jen jeden exon je přítomen a je jedním z faktorů určujících typ svalu).

**SESTŘIH KOMBINAČNÍCH EXONŮ.** Existují potenciální exony, které tvoří ve složeném genu skupiny, v rámci kterých se v závislosti na ontogenetickém vývoji organismu z hnRNA vyštěpují ve všech možných kombinacích.

*Je-li n počet potenciálních exonů v určitém genu, z nichž každý může být začleněn do mRNA v libovolné kombinaci s jiným nebo s jinými, pak existuje možnost tvorby  $2^n$  mRNA z hnRNA tohoto genu.* Exony, které se mohou takto při sestřihu volně kombinovat, se označují jako **kombinační exony**.

Velmi názorným příkladem sestřihu kombinačních exonů je hnRNA genu kódujícího troponin T kosterního svalu (obr. 247). HnRNA tohoto genu obsahuje pět kombinačních exonů, které se vyštěpují do mRNA v  $2^5$ , tj. 32 kombinacích. Každý kombinační exon má délku 12 až 18 nukleotidů.

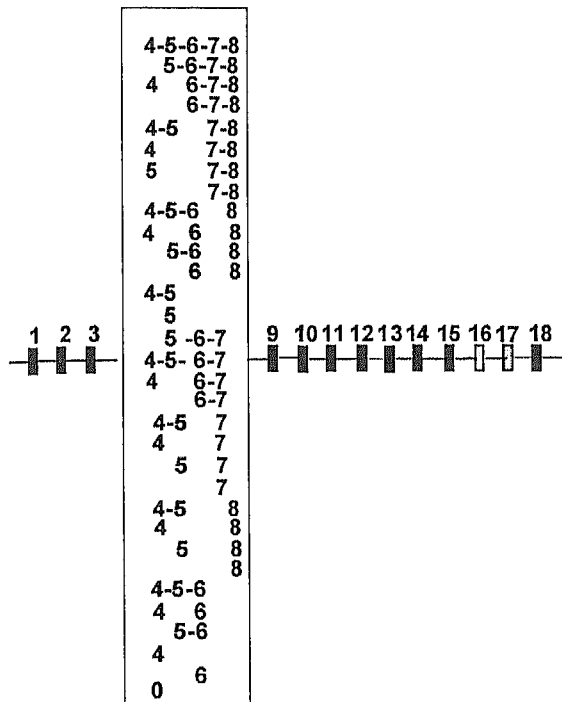
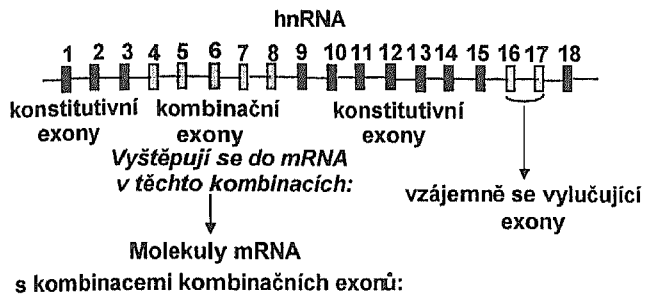
Alternativní sestřih je jedním z faktorů, které určují produkci různých proteinových izoform kódovaných stejným genem při diferenciaci tkání.

**SESTŘIH hnRNA U PŘEKRÝVAJÍCÍCH SE TRANSKRIPČNÍCH JEDNOTEK.** Sestřih molekul hnRNA vzniklých transkripcí překrývajících se transkripčních jednotek může být alternativní nebo konstitutivní. K alternativnímu sestřihu např. dochází, jestliže (obr. 248):

♦ Molekuly hnRNA jsou výsledkem transkripce transkripčních jednotek začínajících stejnými startovacími nukleotidy a končících při různých polyadenylačních signálech. Příkladem je hnRNA s přepisem genu pro kalcitonin a produkt podobný kalcitoninu (CGRP).

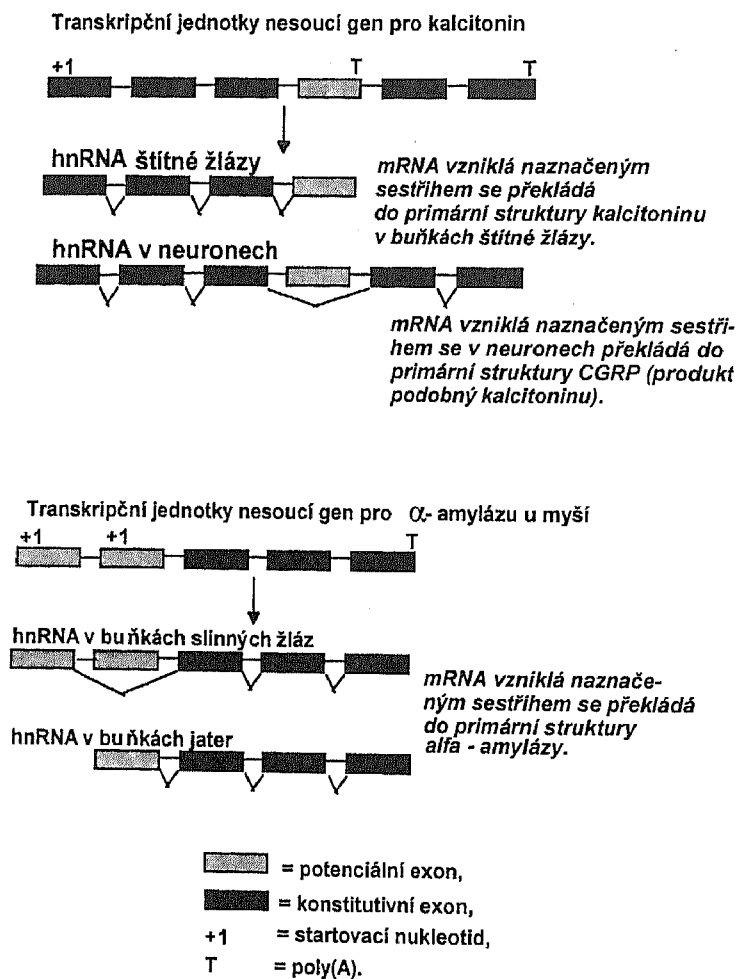
♦ Molekuly hnRNA jsou výsledkem transkripce transkripčních jednotek začínajících různými startovacími nukleotidy a končícími při stejných polyadenylačních signálech. Je to např. hnRNA obsahující přepis genu pro  $\alpha$ -amylázu u myši.

*Konstitutivní sestřih je znám např. v případě, kdy molekuly hnRNA jsou výsledkem transkripce transkripčních jednotek začínajících různými startovacími nukleotidy a končícími při různých polyadenylačních signálech.* Příkladem toho jsou překrývající se transkripční jednotky obsahující gen, který kóduje dihydrofolátreduktázu u myši. Odkazujeme na str. 148, obr. 120.



*Celkem se vytvoří 32 molekul mRNA, které se liší v části kódované kombinačními exony. Tyto kombinace jsou však ve vazbě vždy s jedním z dvojice vzájemně se vylučujících exonů. Proto celkově je možných 64 molekul mRNA lišících se v primární struktuře. Každá z nich se překládá do jedné izoformy troponinu T.*

**Obr. 247**  
Sestřih kombinačních exonů hnRNA obsahující  
přepis genu kódujícího troponin T



Obr. 248

Příklady alternativního sestřihu molekul hnRNA vzniklých transkripcí překrývajících se transkripčních jednotek

### 5.4.3

## Posttranskripční úpravy pre-rRNA a pre-tRNA

**POSTTRANSKRIPČNÍ ÚPRAVA PRE-rRNA.** Pre-rRNA obsahuje přepis genů pro 18S-, 5,8S- a 28S-rRNA. Tyto geny jsou lokalizovány v DNA jádérka, v němž probíhá též jejich transkripce do pre-rRNA. Jejich sedimentač-

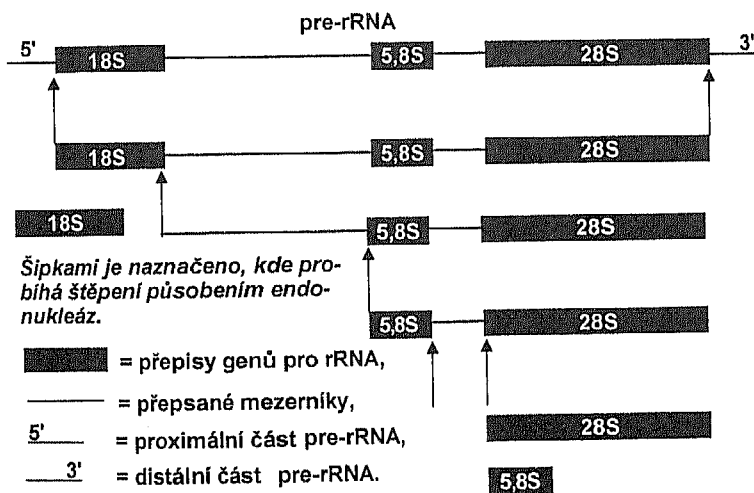
ní koeficient je 45S u myši a 40S u *Xenopus laevis*. Během postranskripčních úprav jsou z pre-rRNA vyštěpeny 18S-rRNA, 5,8S-rRNA a 28S-rRNA a postupně odbourány všechny mezerníky, proximální a distální část (obr. 249).

Přepisy genů v pre-rRNA obsahují též introny a exony, které podléhají sestřihu. *Introny jsou z pre-rRNA vyštěpovány, ale exony na rozdíl od exonů zachovávaných v mRNA po sestřihu hnRNA, se při sestřihu pre-rRNA nespojují.* V ribozomech pak působí jako nespojené RNA, které jsou navzájem drženy prostřednictvím ribozomových proteinů. Sestřih probíhá za účasti částic snRNP. Některé jsou výlučně jadérové, což je především U3-snoRNP obsahující protein nazývaný **fibrilarin**.

Během transkripce a postranskripčních úprav vchází pre-rRNA do komplexu s celou řadou specifických proteinů, z nichž většina je ribozomová a stává se funkční složkou konečného ribozomu. Některé proteiny se spojují s ribozomovou RNA, aniž se stávají složkami ribozomů. Plní však nějaké důležité funkce při transportu ribozomových částic.

Během postranskripčních úprav dochází též k modifikaci pre-rRNA, která spočívá v metylaci nukleotidů, především v části přepisované do 18S-rRNA a 28S-rRNA. Význam této modifikace není známý.

**5S-rRNA.** 5S-rRNA je primární transkript transkripční jednotky obsahující gen pro 5S-rRNA. Geny pro 5S-rRNA jsou lokalizovány v jádře, v němž se vyskytují v mnoha repetitcích. Četnost repetice může být až 25 000.



18S-rRNA, 5,8S-rRNA a 28S-rRNA jsou pak využity ke stavbě ribozomů.

Obr. 249  
 Posttranskripční úprava pre-rRNA



**POSTTRANSKRIPČNÍ ÚPRAVA PRE-tRNA.** Některé jaderné geny pro tRNA u kvasinek, rostlin a savců obsahují introny. Pre-tRNA vznikající transkripční transkripčních jednotek obsahující tyto geny *nemá sekvence pro místa sestřihu*. Její sestřih probíhá za účasti dvou enzymů:

◆ **endonukleázy**, která štěpí obě místa sestřihu za vzniku 2',3'-cyklického fosfátu a 5'-OH-konce;

◆ **RNA-ligázy**.

U kvasinek a vyšších rostlin probíhá sestřih pre-tRNA podle obr. 250:

1. Nejdříve se vytvoří endonukleázou zlom mezi exonem a intronem na obou koncích intronu, přičemž exon 1 je zakončen 2',3'-cyklickým fosfátem.

2. Účinkem cyklické fosfodiesterázy se 2',3'- fosfátové vazby zruší za tvorby 2'-P-konce a 3'-OH-konce exonu 1. 5'-konec exonu 2 se za katalytického účinku kinázy fosforyluje fosfátem z ATP.

3. Působením ligázy se vytvoří mezi exony 2'-fosfomonoester-3',5'-fosfodiesterová vazba. Fosfát, který tvoří spojení mezi exony, pochází z ATP.

U savců probíhá sestřih pre-tRNA zase takto (obr. 251):

1. Fosfodiesterová vazba se štěpí endonukleázou mezi exonem a intronem na obou koncích intronu.

2. U exonu 1 se vytvoří zakončení 2',3'-cyklickým fosfátem katalyzované cyklázou.

3. Ligázou dochází ke spojení exonů. Fosfát, který tvoří spojení mezi exony, pochází z 5'-konce intronu.

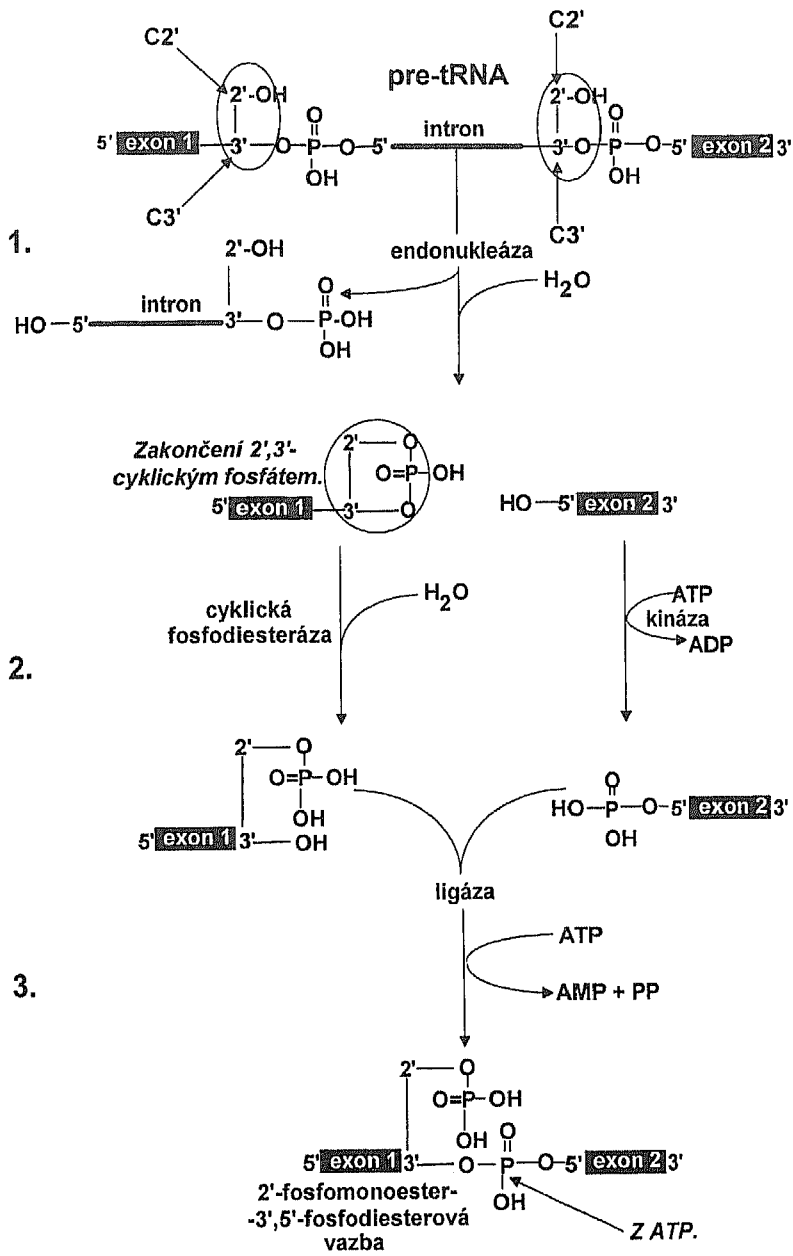
Pro oba způsoby sestřihu je charakteristické, že se při nich tvoří 2',3'-cyklické fosfáty a ATP je vyžadován jako zdroj energie.

#### 5.4.4

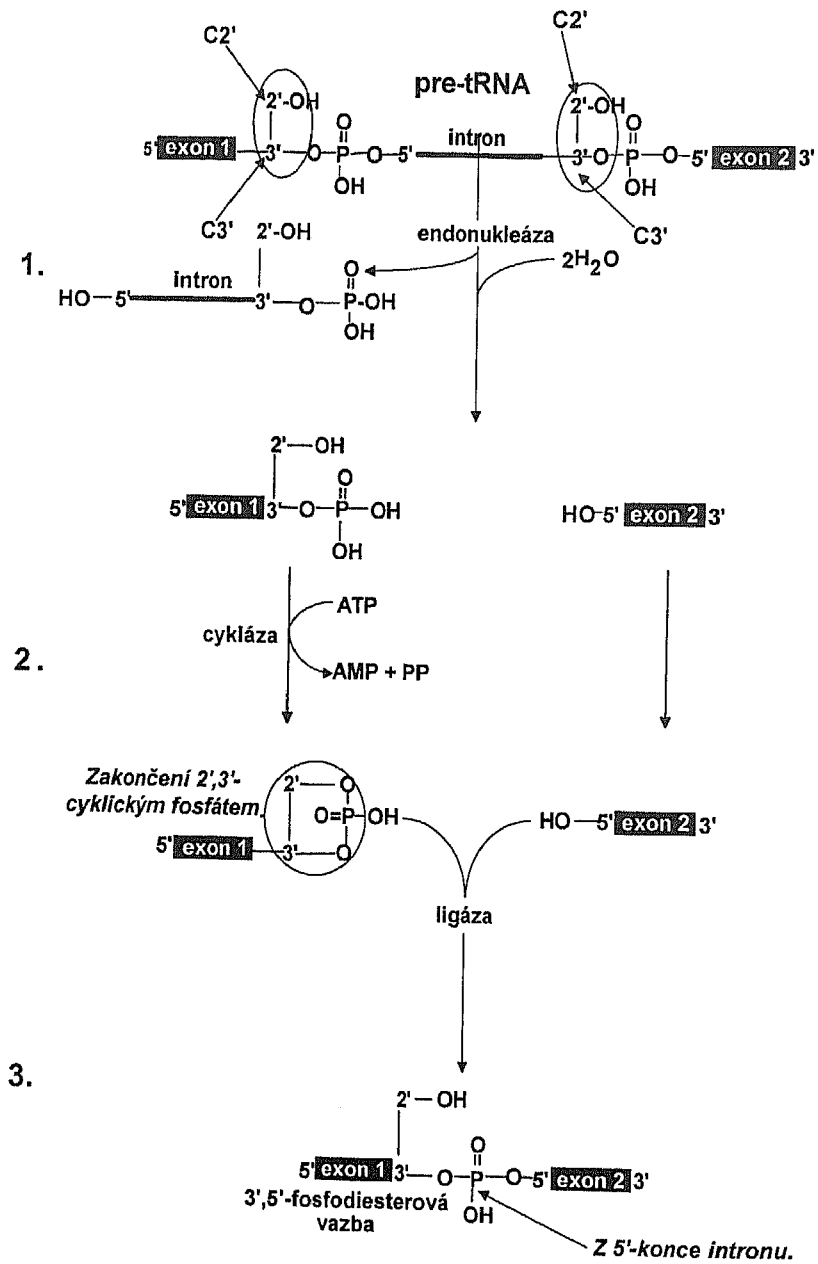
### Posttranskripční úpravy primárních transkriptů genoforu mitochondrií

**ÚPRAVA POLYADENYLACÍ.** Primární transkripty mtDNA u savců nepodléhají úpravě čepičkou a nezačínají vedoucí sekvencí, ale přímo iniciačním kodonem AUG. Končí na 3'-konci nukleotidem obsahujícím uracil nebo adenin, kde se polyadenylují, takže se vytvoří terminační kodon UAA. Proto polyadenylace je nejdůležitější posttranskripční úpravou mitochondriových primárních transkriptů (obr. 252).

Posttranskripčními úpravami naznačenými na obr. 252 se primární



Obr. 250  
Sestřih pre-tRNA u kvasinek a vyšších rostlin



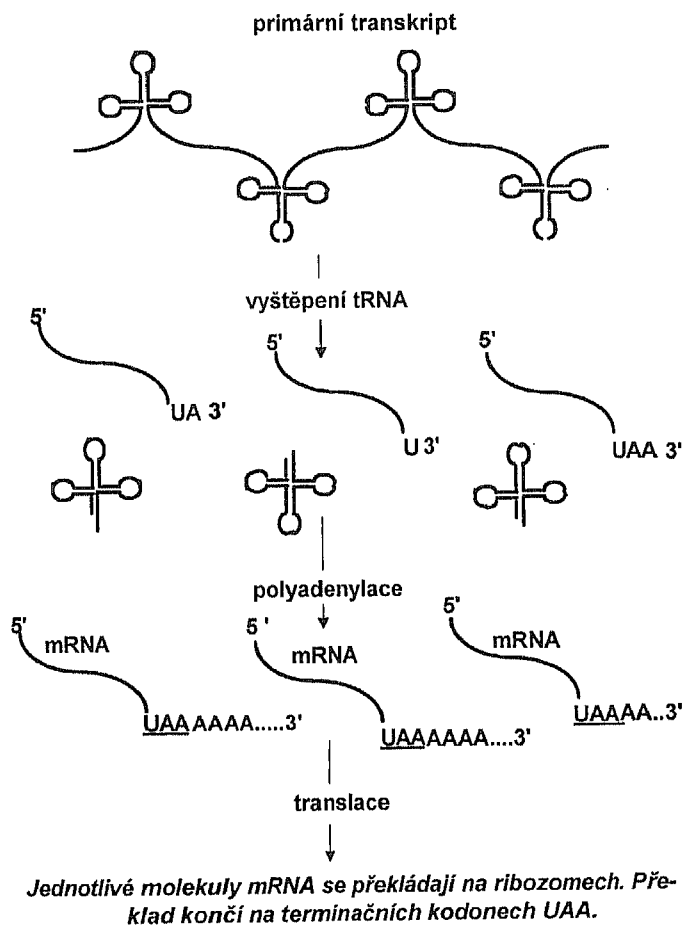
Obr. 251  
Sestřih pre-tRNA u savců

transkript kratší transkripční jednotky (obr. 234), zahrnující jen 12S a 16S-rRNA, štěpí na dvě molekuly rRNA (12S a 16S). Primární transkript, vzniklý přepisem transkripční jednotky zahrnující celý H-řetězec, se rozloží až ke konci přepisu genu pro 16 S-rRNA a další část se štěpí RNAázou P na:

- ◆ 13 molekulárních druhů tRNA,
- ◆ 12 molekul mRNA.

Primární transkript transkripční jednotky zahrnující L-řetězec se štěpí na:

- ◆ 9 molekulárních druhů tRNA;
- ◆ 1 molekulu mRNA obsahující přepis genu pro ND6.



**Obr. 252**  
Schéma posttranskripční úpravy primárních transkriptů mitochondrií

Na rozdíl od savčích mitochondrií se v rostlinných mitochondriích tvoří 18S-rRNA, 26S-rRNA a 5S-rRNA (u savců jen 12S-rRNA a 16S-rRNA).

**SESTŘIH PRIMÁRNÍHO TRANSKRIPTU GENU KÓDUJÍCÍHO APOCYTOCHROM B V MITOCHONDRIÍCH *S. CEREVISIAE*.** Gen kódující apocytochrom b je v mitochondriích *S. cerevisiae* složen ze 6 exonů (**E1, E2, E3, E4, E5, E6**) a 5 intronů (**I1, I2, I3, I4, I5**) (obr. 253). Překrývá se s geny pro maturázu. První gen pro maturázu zahrnuje **E1, I1, E2** a část a intronu **I2**. Druhý gen pro maturázu sestává z **E3, I3, E4** a z části a intronu **I4**. Z primárního transkriptu genu kódujícího apocytochrom b se posttranskripčně vyštěpuje **I1**. Tím se vytvoří čtecí rámec pro mRNA, v níž spojené úseky **E1, E2** a **I2a** se překládají do první maturázy, která katalyzuje vyštěpení celého intronu **I2**, což má za následek, že se oblast překládaná do první maturázy inaktivuje. Pak následuje vyštěpení intronu **I3** a tím spojení úseků **E3, E4** a **I4a**, které se překládají do druhé maturázy vyštěpující intron **I4**. To vede také k inaktivaci úseku překládaného do druhé maturázy. Výsledkem těchto a ještě dalších úprav je mRNA, která se překládá do apocytochromu b. *Maturáza při těchto úpravách působí jako enzym, který vyštěpuje z primárních transkriptů intron, který je součástí genu, který ji kóduje.*

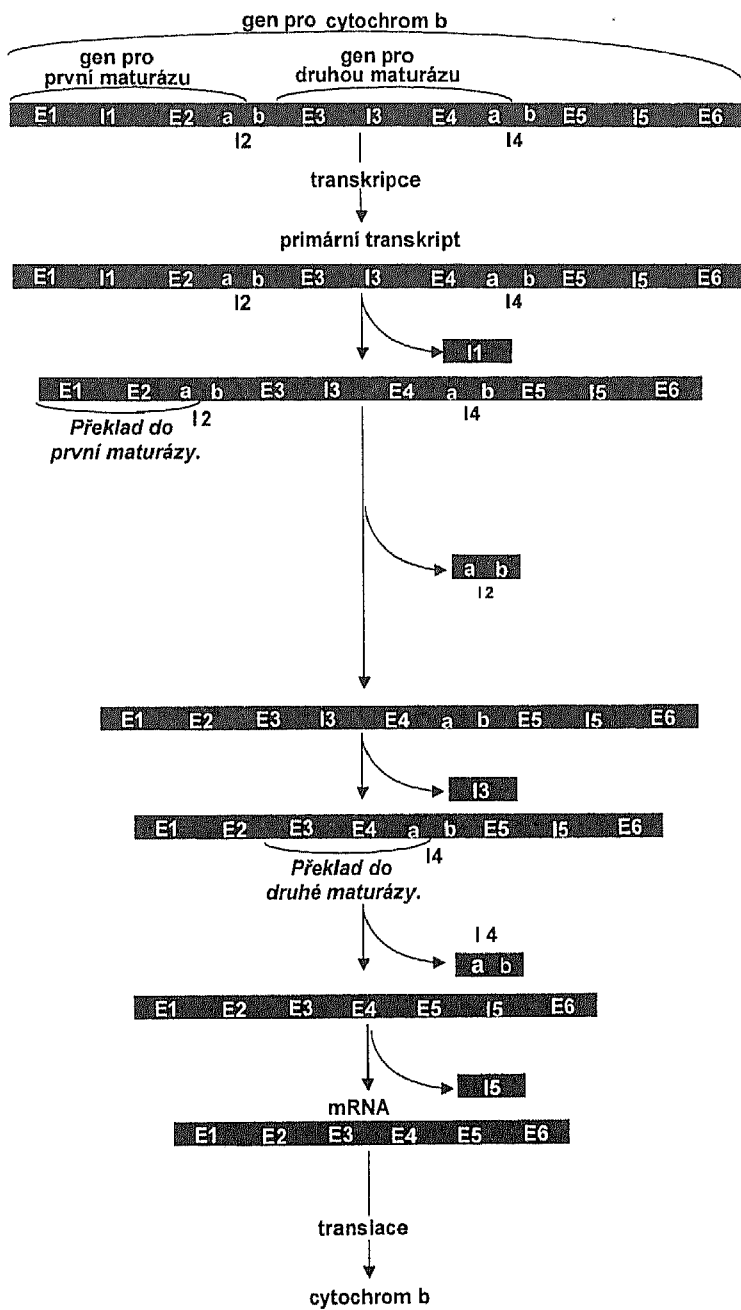
**EDITACE RNA.** Editace RNA je jedna z posttranskripčních úprav, která byla zjištěna:

- ◆ v mitochondriích trypanozom,
- ◆ v mitochondriích *Physarum polycephalum*,
- ◆ v mitochondriích strunatců,
- ◆ v mitochondriích vyšších rostlin,
- ◆ u genu pro apolipoprotein u savců.

Zajímavé a velmi charakteristické pro editaci RNA je to, že vede k tvorbě mRNA překládané do translačního produktu, jehož primární struktura neodpovídá nukleotidové sekvenci genu, kterým je tento produkt kódován. Můžeme tedy editaci RNA definovat jako *posttranskripční úpravu genetické informace obsažené v genu, jejímž výsledkem je editovaná RNA, která však představuje RNA vyznačující se primární strukturou, jejíž informace neodpovídá informaci zapsané v tomto genu.*

*Strukturní geny, které obsahují genetickou informaci podléhající editaci, byly označeny jako kryptogeny.*

Vyložíme nyní tento jev konkrétněji. Předpokládejme, že v nějakém genu je zapsána genetická informace pro jeho translační produkt v této sekvenci:



Obr. 253  
Zjednodušený pohled na sestřih primárního transkriptu genu kódujícího cytochrom b u *S. cerevisiae*

.....A C A C G A C A T A G C .....

Transkripce této informace vznikne hnRNA, jež v tomto úseku má:

....U G U G C U G U A U C G ....

Nyní bychom očekávali, že se podle této informace vytvoří tato sekvence aminokyselin:

.....Cys - Ala - Val - Ser....

Ale nikoli! Zasáhne do toho proces, kterým se v mRNA informace změní tím, že se např. mezi G a U prvního kodonu vloží čtyři U, takže:

....U G U U U U G C U G U A U C G .....

čemuž odpovídá zcela jiný sled aminokyselin:

.....Cys - Phe - Cys - Cys - Ile....

Editace není proces náhodný, ale regulovaný a řízený určitými mechanismy. Z daného genu nevznikají úpravou jejich genetické informace libovolné molekuly mRNA a libovolné proteiny, ale vždy zcela určité. Byly objeveny molekuly RNA dlouhé 50 až 80 nukleotidů, které proces editace řídí. Označují se jako řídicí RNA (zkratka gRNA). Obsahují sekvence, které jsou komplementární k úsekům hnRNA, podléhajícím editaci, párují se tedy s hnRNA. Oblast na mRNA, se kterou se gRNA páruje, se označuje jako kotva. Od této oblasti pak gRNA řídí editaci.

V zásadě existují tyto způsoby editace mRNA (tab. 25):

**inzerční nebo deleční**, kdy smysl informace v mRNA je změněn inzercí nebo delecí nukleotidů;

**substituční**, kdy smysl informace je změněn záměnou nukleotidů (obvykle purinového nukleotidu za purinový nebo pyrimidinového za pyrimidinový).

Tab. 25

**Editace RNA u různých organismů**

Organizmy	Organely	Způsob editace	RNA
<i>Trypanosoma, Leishmania, Crithidia</i>	mitochondrie	inzerce U, delece U	mRNA
Rostliny	mitochondrie chloroplasty	substituce C za U, U za C substituce C za U	mRNA, rRNA
Savci	jádro	substituce C za U, A za G	mRNA

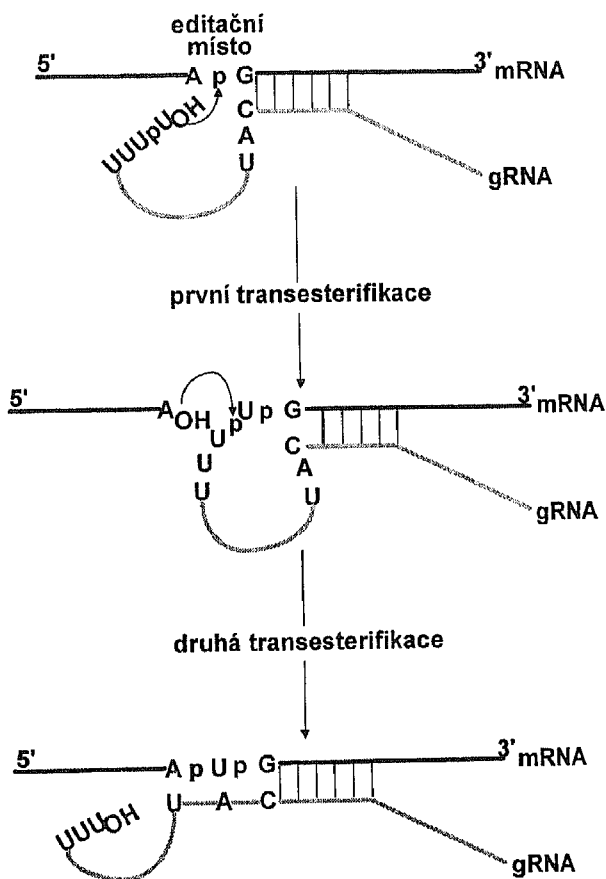
**INZERČNÍ ZPŮSOB EDITACE mRNA PROBÍHAJÍCÍ TRANSESTERIFIKACÍ.** Vysvětlíme toliko inzerční způsob editace, ačkoli deleční existuje

také. Inzerční způsob editace mRNA lze vysvětlit na základě transesterifikačních reakcí podobně jako u sestřihu (obr. 254):

1. gRNA se spáruje s kotvou čili obrazně řečeno "zakotví se". Hydroxyl na 3'-konci gRNA působí jako nukleofil a napadne tedy fosfodiesterovou vazbu v editačním místě; *tak se nazývá oblast kde má proběhnout editace*.

2. Nyní proběhne první transesterifikace, v rámci které se editační místo rozevře. V tomto procesu se uvolní 5'-úsek mRNA, který je na 3'-konci opatřen OH-skupinou a mRNA se spojí s gRNA.

3. OH-skupina na 3'-konci mRNA umožní druhou transesterifikaci tím, že touto OH-skupinou je napadena fosfodiesterová vazba mezi U a U. Výsledkem



Obr. 254

Vysvětlení editace na základě transesterifikačních reakcí



je spojení obou úseků mRNA v editačním místě obsahujícím navíc U, kterým se od tohoto místa mění směrem k 3'-konci mRNA čtecí rámeček.

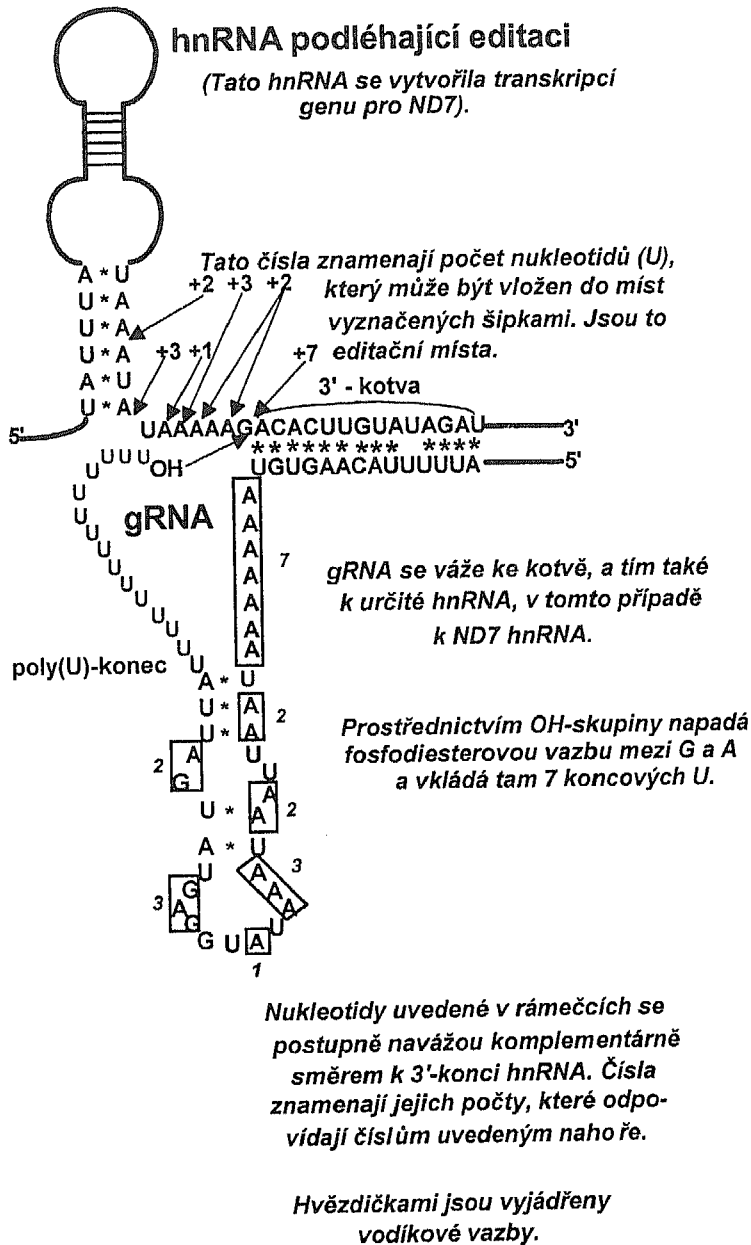
Uvedený způsob editace založený na transesterifikaci může proběhnout na více editačních místech, což je vyjádřeno modelem na obr. 255a a 255b, který se týká 7 NADH-dehydrogenázy (zkratka ND7) *Trypanosoma brucei*.

Nejdříve se gRNA spáruje s kotvou. Po tomto spárování začne probíhat editace tím, že se uskuteční první transesterifikace (obr. 255a), tj. OH-skupina gRNA napadne atom fosforu fosfodiesterové vazby a hnRNA se pak kovalentně spojí s gRNA a zůstává v tomto spojení, dokud nedojde k druhé transesterifikaci, v rámci které OH-skupina 3'-konce hnRNA napadne fosfodiesterovou vazbu mezi sedmi U-nukleotidy, které se již s hnRNA spárovaly, a dalšími, které zůstaly v gRNA ještě nespárovány (obr. 255b). Touto interakcí se gRNA od hnRNA oddělí. Výsledek je, že do hnRNA bylo vloženo 7 U pozměňujících její čtecí rámeček. Pro vložení každého bloku U jsou zapotřebí dva přenosy OH-skupiny (první a druhá transesterifikace), tedy jeden transesterifikační cyklus. Řídící RNA (gRNA) nemá podle obr. 255a dostatek U k párování v editačním místě (potřebných je alespoň 20 U). Proto se předpokládá, že se v gRNA poly(U)-konec během editace prodlužuje.

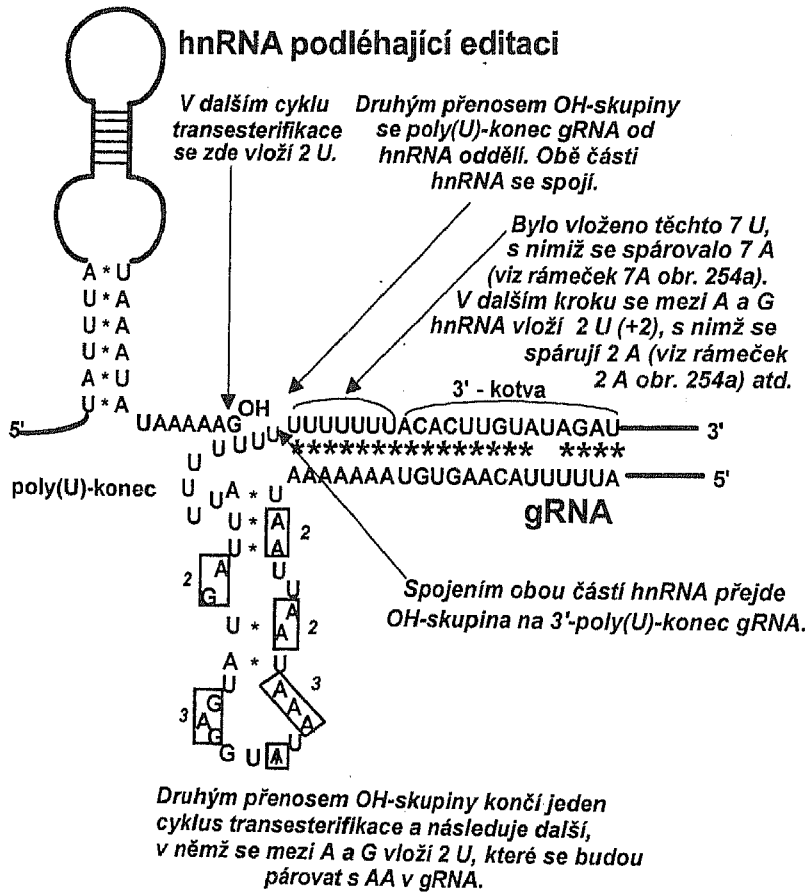
**INZERČNÍ ZPŮSOB EDITACE mRNA VYSVĚTLENÝ NA ZÁKLADĚ ENDONUKLEOLYTICKÉHO ŠTĚPENÍ A LIGACE.** Při tomto způsobu editace se vychází ze znalosti reakcí při sestřihu intronů z pre-tRNA (odkazujeme na obr. 250 a 251). Ve smyslu těchto reakcí může probíhat editace takto (obr. 256):

1. mRNA se naštěpí v editačním místě endonukleázou a uvolněný 3'-konec gRNA se spojí za účasti ligázy s volným pG-koncem mRNA.
2. Následuje další štěpení endonukleázou mRNA za uvolnění 5'-konce pUpG jednoho fragmentu mRNA a 3'-konce  $A_{OH}$  jejího druhého fragmentu. Volné fragmenty mRNA se spojí ligázou a v editačním místě se s nimi spáruje gRNA.

**SUBSTITUČNÍ ZPŮSOB EDITACE mRNA.** Příkladem tohoto způsobu editace je editace, která probíhá na mRNA genu pro apolipoprotein u savců. Gen apo-B kóduje dvě formy apolipoproteinu. V hepatocytech je syntetizována jedna forma a druhá v epitelálních střevních buňkách. Forma tvořená v hepatocytech se označuje jako Apo-B100 a ta, která se tvoří ve střevních buňkách, se označuje jako ApoB-48. Obě formy apolipoproteinu uskutečňují transport lipidů v séru ve formě velkých lipoproteinových komplexů. Avšak pouze protein, který se syntetizuje v hepatocytech, uvolňuje cholesterol do tělních tkání tím, že se váže na lipoproteinový receptor, který se nachází ve všech buňkách (obr. 257).



Obr. 255a  
 Editace inzercí do hnRNA u trypanozom  
 řízená gRNA - první transesterifikace

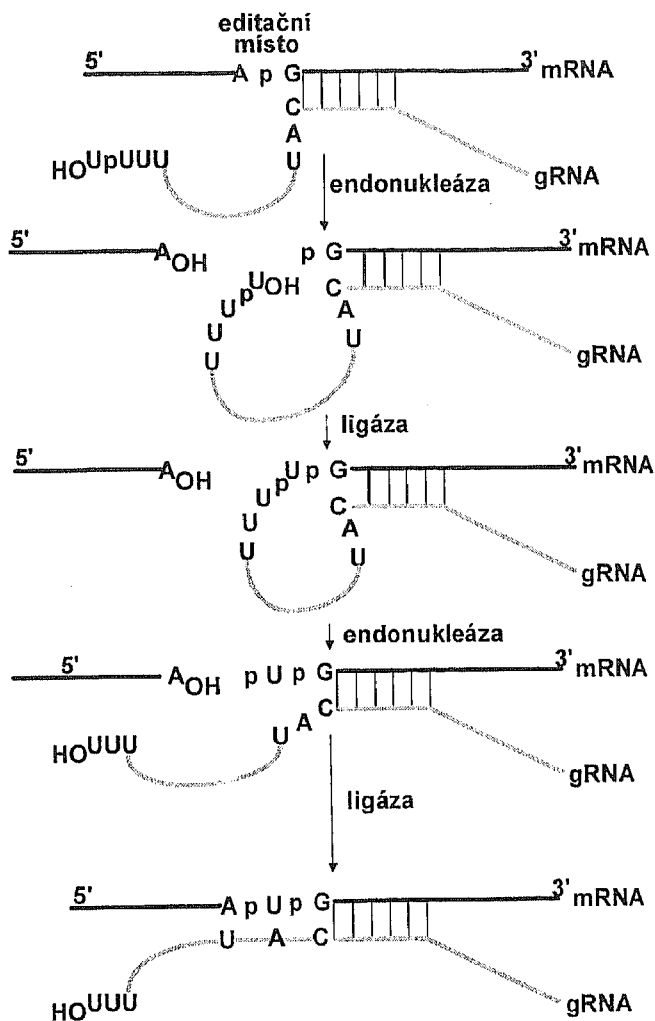


**Obr. 255b**  
**Editace insercí do hnRNA u trypanozom**  
**řízená gRNA - druhá transesterifikace**

Apo100 má dvě funkční domény:

- ◆ N-terminální, která se spojuje s lipidy,
- ◆ C-terminální, která se v buněčných membránách váže na receptory.

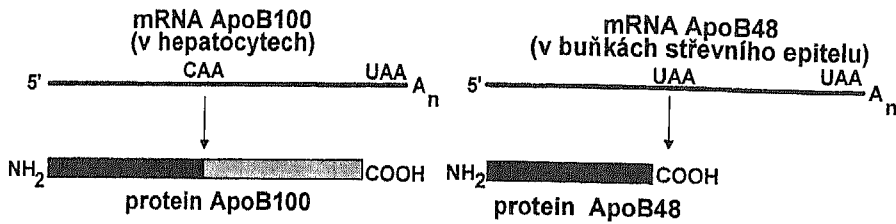
ApoB48 má jen N-terminální doménu a je proto nefunkční. Příčinou této odlišnosti je, že v mRNA pro apoB48 došlo v definovaném místě ke konverzi cytozinu na uracil v kodonu CAA, což vedlo ke vzniku nesmyslného kodonu UAA, a tedy k předčasnému zakončení syntézy apolipoproteinu během translace. Enzym, který v rámci posttranskripčních úprav provádí tuto konverzi C na U, byl izolován. Vyskytuje se i v jiných tkáních a je tedy možné, že uskutečňuje editaci mRNA též pro jiné proteiny. K expresi genu pro apolipoprotein však dochází jen v jaterních a střevních buňkách.



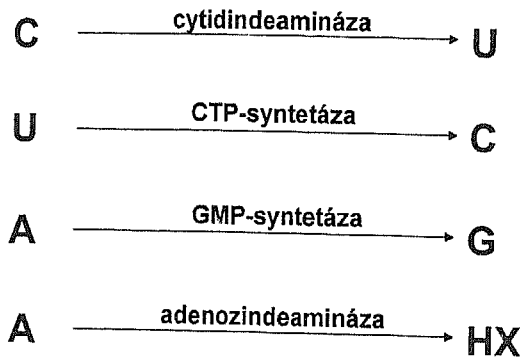
Obr. 256  
Vysvětlení editace mRNA na základě  
endonukleolytického štěpení a ligace

Základem editace probíhající substitucí nukleotidů je tedy jejich konverze, která je enzymaticky katalyzována. Na obr. 258 je uvedeno několik příkladů.

### 5.4.5 Samosestřih



Obr. 257  
Editace mRNA pro apolipoprotein



*HX = hypoxantin jako složka inozinu.*

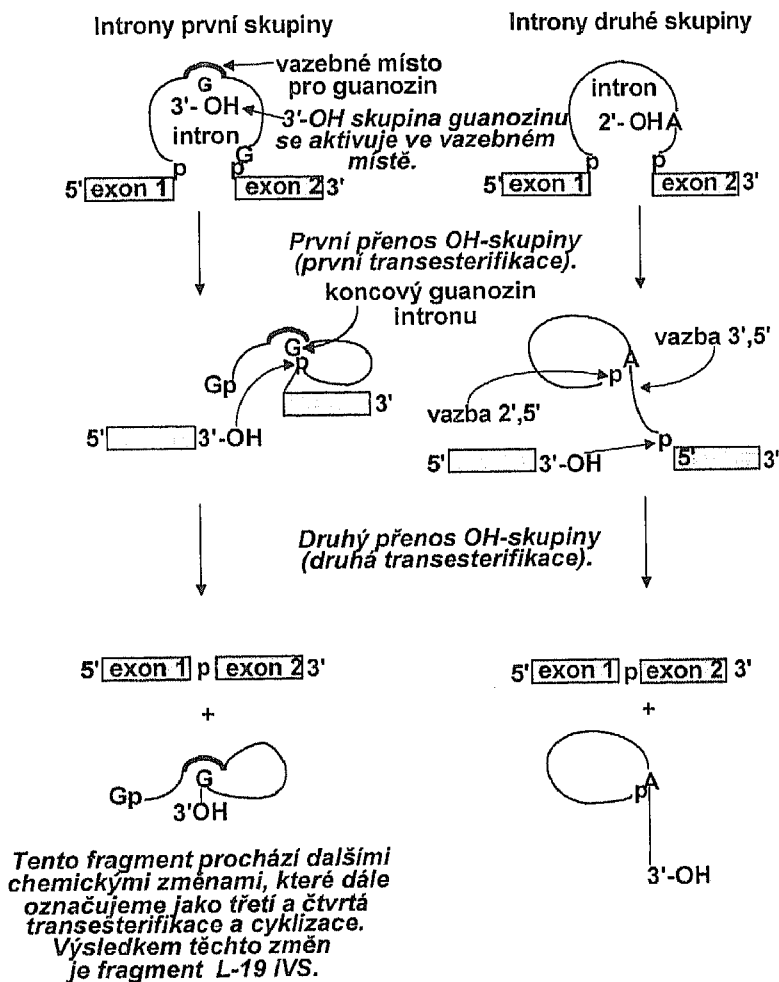
Obr. 258  
Substituce nukleotidů způsobené jejich enzymatickou konverzí

**RIBOZYM.** Jak již bylo vyloženo, probíhá sestřih hnRNA za katalytické a řídicí účasti složitěho a organizovaného ribonukleoproteinového komplexu, který se označuje jako spliceozom. Základem sestřihu jsou transesterifikační reakce, které jsou katalyzovány proteiny spliceozomu. Byly však také izolovány primární transkripty, u nichž proces sestřihu probíhá autokatalyticky, bez přítomnosti proteinů, tedy bez přítomnosti enzymů. *Autokatalytický proces sestřihu, spočívající v transesterifikaci a nevyžadující přítomnost proteinů a enzymů,* byl označen jako **samosestřih**. Procesem samosestřihu se vyznačuje jen RNA, která má vlastnosti ribozymu. Jako **ribozym** se označuje RNA, která katalyzuje štěpení a ligaci RNA-substrátů za nepřítomnosti proteinů. Též intronovou RNA, jestliže se vyznačuje samosestřihem, lze označit za ribozym. Introny, které mají tyto vlastnosti, lze rozdělit do následujících dvou skupin.

**INTRONY PRVNÍ SKUPINY.** Jsou to introny, jejichž samosestřih může

probíhat jen za přítomnosti guanozinu jako kofaktoru, který je primárním donorem OH-skupiny při transesterifikačních reakcích. Primárním transkriptem, který má vlastnosti ribozymu a obsahuje introny první skupiny, je např. pre-rRNA izolovaná z *Tetrahymena*, z mitochondrií některých hub a z chloroplastů některých rostlin. Guanozin nejdříve zaujme vazebné místo v katalytické sekvenci intronu, což vede k aktivaci 3'-hydroxylové skupiny guanozinu, kterou se pak uskutečňují transesterifikační reakce spočívající v prvním a druhém přenosu OH-skupiny guanozinu (obr. 259):

◆ První přenos OH-skupiny (první transesterifikace) probíhá tak, že aktivovaná OH-skupina guanozinu štěpí esterovou vazbu v 5'-místě sestříhu. Při



Obr. 259

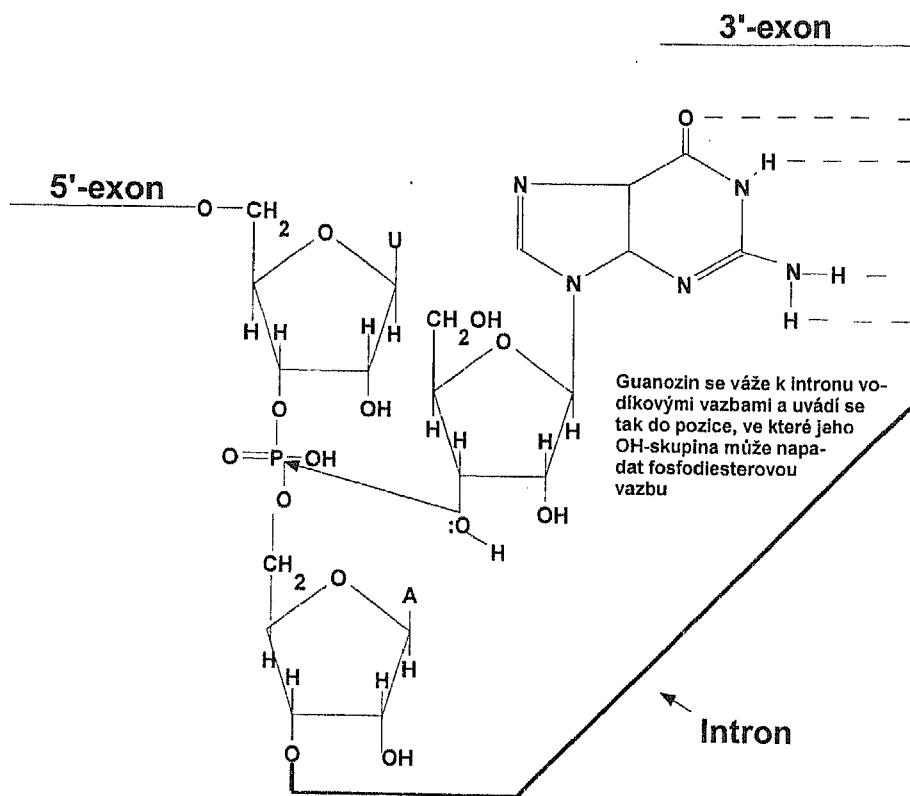
Samosestřih intronů první a druhé skupiny

této reakci se OH-skupina váže k 3'-konci exonu 1 a na koncový fosfát intronu (jeho 5'-konec) se naváže guanozin. Uprázdňené vazebné místo pro guanozin pak zaujme koncový guanozin intronu.

◆ Donorem OH-skupiny pro její **druhý přenos** (druhá transesterifikace) je exon 1 uvolněný při první transesterifikaci. Tato skupina štěpí v 3'-místě sestřihu esterovou vazbu, váže se na koncový guanozin intronu a oba exony se spojí.

Je třeba zdůraznit, že potřebný kofaktor nemusí být GTP, ale guanozin, což znamená, že zde nejde o přísun energie hydrolyzou GTP, která by uvedené reakce poháněla. *Obě transesterifikační reakce probíhají na stejné energetické hladině, přičemž otevřením jedné fosfodiesterové vazby se druhá uzavře.* Jinými slovy:

1. Vzhledem k tomu, že OH-skupina guanozinu je nukleofilní, napadá



Obr. 260  
Zjednodušená představa vazebného místa  
v intronu první skupiny

atom fosforu fosfodiesterové vazby na 5'-místě sestřihu a štěpí ji za současné tvorby fosfodiesterové vazby mezi 5'-koncem intronu a guanozinem.

2. OH-skupina na 3'-konci exonu napadá pak atom fosforu fosfodiesterové vazby na 3'-místě sestřihu, které štěpí za současné tvorby fosfodiesterové vazby mezi oběma exony.

Tyto reakce mohou probíhat za předpokladu, že intron má takovou sekundární a terciární strukturu, která může uvést molekulu guanozinu do takové stereochemické pozice umožňující uskutečnění těchto reakcí. Kromě toho též fosfodiesterové vazby musí být vzhledem k OH-skupině guanozinu a OH-skupině uvolněného exonu ve vhodném stereochemickém postavení. Proto jen ty introny vykazují ribozymovou aktivitu, jejichž sekundární struktura má vlastnosti vazebného místa pro guanozin a umožňuje katalýzu transesterifikačních reakcí. Jen velmi přibližně nám tuto situaci znázorňuje obr. 260.

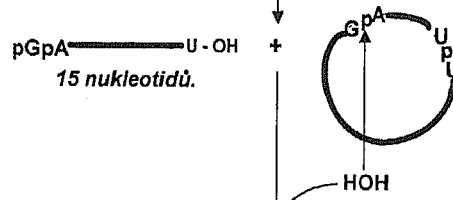
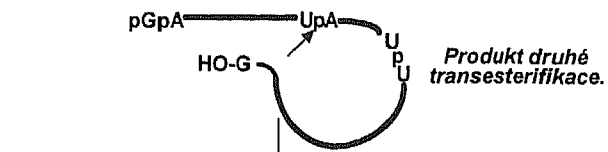
*Vyštěpený intron jako produkt druhého přenosu OH-skupiny neboli produkt druhé transesterifikace je donorem OH-skupiny pro třetí transesterifikaci a je proti výchozímu intronu o 15 + 4, tj. 19 nukleotidů, kratší. Označuje se jako L-19 IVS. Tohoto produktu se používá jako ribozymu v intermolekulárních reakcích (obr. 261).*

**INTRONY DRUHÉ SKUPINY.** Na rozdíl od intronů první skupiny probíhá samosestřih intronů druhé skupiny bez guanozinu jako kofaktoru. Místo kofaktoru využívají tyto introny (k uzavření intronu do lasovité struktury) aktivovanou 2'-hydroxylovou skupinu adenzinu, která se nachází v místě větvení. Další reakce jsou pak stejné jako u intronů první skupiny (obr. 259). Jejich produkty jsou spojené exony a lasovitá RNA. Tvorba lasovité RNA je další znak intronů druhé skupiny, kterým se liší od intronů první skupiny. Primární transkript, který má vlastnosti ribozymu a obsahuje introny druhé skupiny, je např. pre-mRNA mitochondrií některých kvasinek a hub.

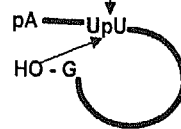
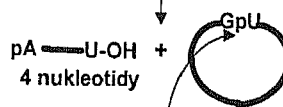
Závěrem, co se týká intronů první i druhé skupiny, je třeba zdůraznit, že jejich samosestřih (bez proteinů) probíhá *in vitro*. Avšak v podmínkách *in vivo* jsou k sestřihu mnoha intronů obou skupin nutné proteiny, které jsou kódovány chromozomovými geny a některé, jako např. maturázy, jsou kódovány introny. Tyto proteiny mnohonásobně zvyšují účinnost sestřihu. Sestřih intronů obou skupin probíhající způsobem samosestřihu je méně efektivní než sestřih probíhající za katalytické účasti proteinů *in vivo*.

**SEKUNDÁRNÍ STRUKTURA INTRONŮ PRVNÍ SKUPINY.** Proč jen introny první a druhé skupiny mohou při sestřihu katalyzovat transesterifikace za nepřítomnosti proteinů? Ukazuje se, že tato jejich vlastnost je podmíněna specifikou jejich sekundární a pravděpodobně i terciární struktury. Schéma



**Třetí transesterifikace a cyklizace.**

hydrolýza

**Čtvrtá transesterifikace a cyklizace.**

hydrolýza  
HOH

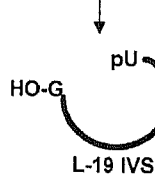


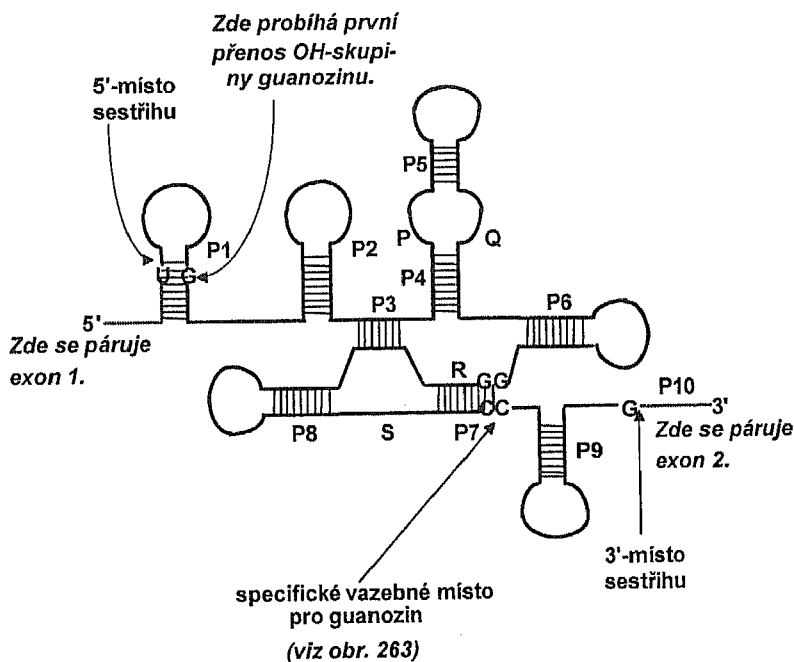
schéma sekundární  
struktury  
(zvětšeno)

Obr. 261  
Vznik L-19 IVS

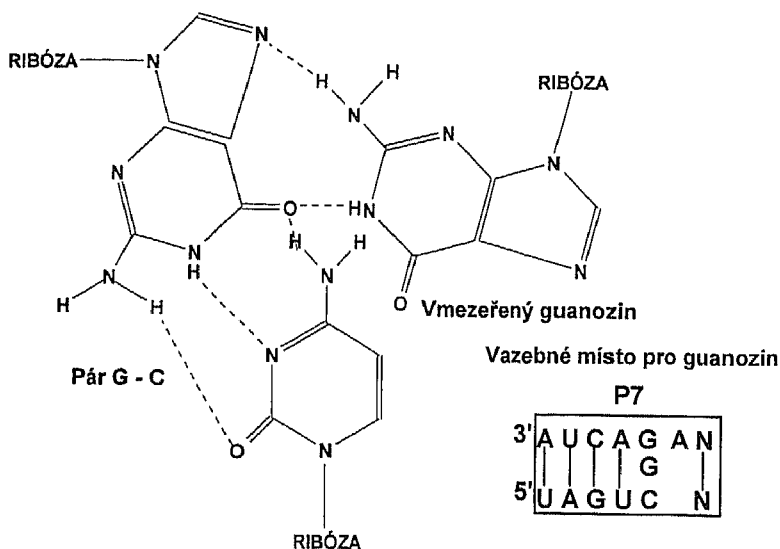
sekundární struktury intronů první skupiny je znázorněno na obr. 262, na němž si nejdříve všimněme úseků na intronu označených jako P1 až P10, z nichž každý má svůj komplementární protějšek, se kterým se páruje. Proto se celý intron vyznačuje vlásenkami zakončenými smyčkami, kde nedochází k párování bází. Úseky P1 až P8 tvoří **katalytické centrum intronu**. V intronech první skupiny se dále vyskytují vždy ve stejném pořadí velmi konzervativní krátké sekvence. Jsou to **5'-P-Q-R-S-3'**.

Uvedené úseky sekundární struktury intronů první skupiny mají tyto funkce (uvedeme jen některé):

- ◆ Na úsek P1 se váže koncový úsek (4 až 7 nukleotidů) exonu 1 u 5'-místa sestřihu. Proto se též nazývá jako **místo vazebné pro 5'-exon** nebo též **vnitřní vedoucí sekvence (zkr. IGS)**. V něm se nachází též pár U - G. V tomto místě je guanozinem napadána fosfodiesterová vazba při prvním přenosu OH-skupiny guanozinu.
- ◆ Na úsek P10 u 3'-místa sestřihu se váže koncový úsek exonu 2.
- ◆ Specifické vazebné místo pro guanozin se nachází v úseku P7 mezi párem G - C (obr. 263).



Obr. 262  
Schéma sekundární struktury intronů první skupiny



Ve vazebném místě pro guanozin je normální pár G - C, k němuž se váže vodíkovými vazbami guanozin. Je však také možné, že guanozin se částečně váže i k hydroxylům ribózy

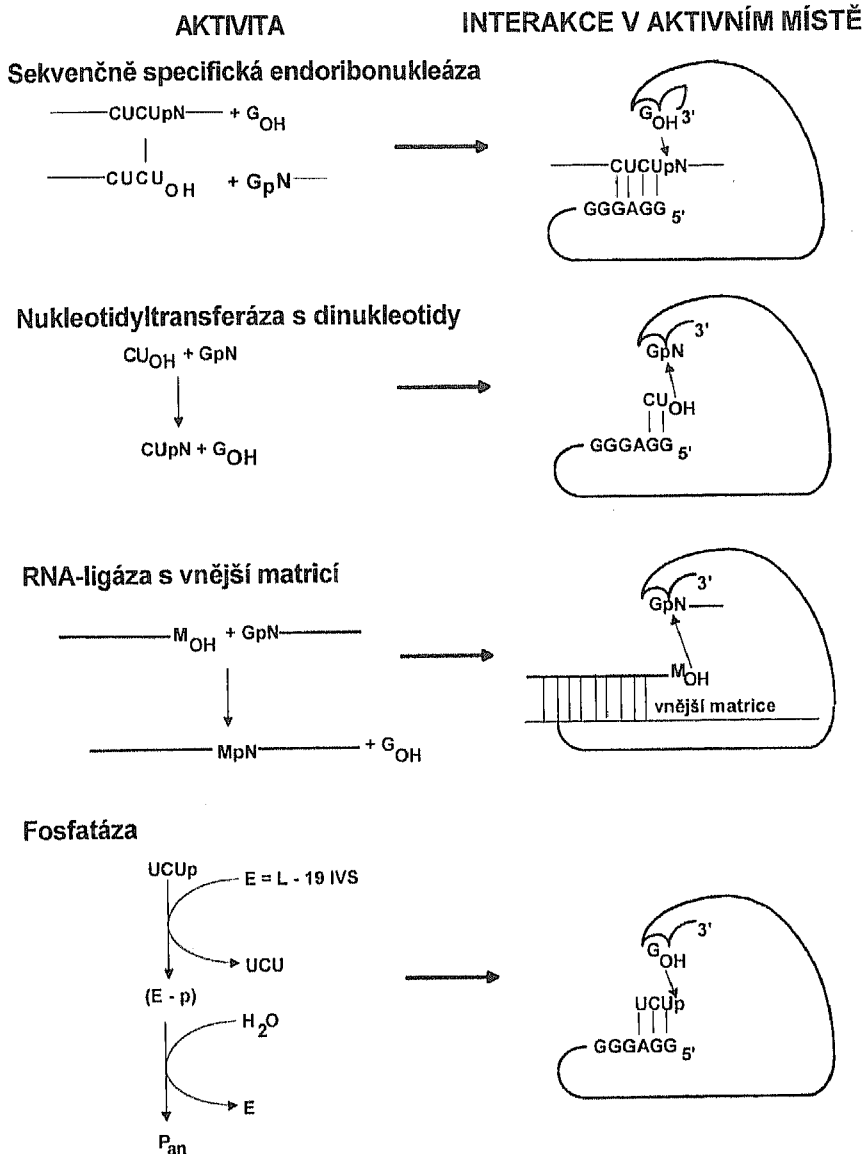
Obr. 263

### Interakce guanozinu v jeho vazebném místě

**RIBOZYMOVÁ AKTIVITA INTRONU L-19 IVS.** Po výkladu, který jsme uvedli, lze již konstatovat, že introny první skupiny se vyznačují katalytickými vlastnostmi. Přesněji řečeno, působí jako ribozymy. Produktu samosestřihu, označeného jako L-19 IVS, se používá v čistém stavu k reakcím *in vitro* a celkově se vyznačuje kromě samosestřihu těmito enzymatickými aktivitami (obr. 264):

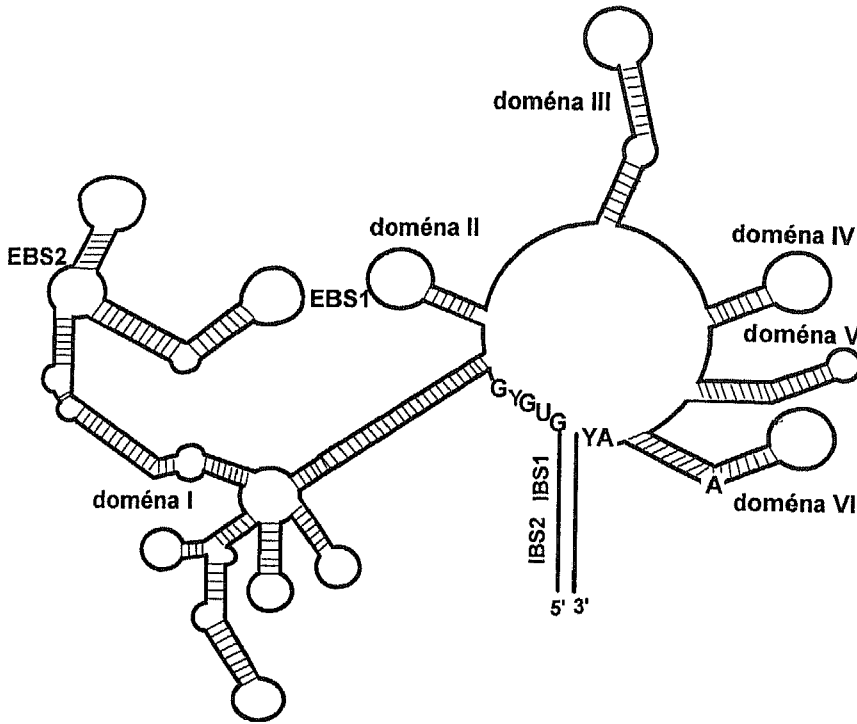
- ◆ působí jako sekvenčně specifická endoribonukleáza;
- ◆ působí u dinukleotidů jako nukleotidyltransferáza;
- ◆ působí jako RNA-ligáza na externích matricích;
- ◆ působí jako fosfatáza.

**STRUKTURA INTRONŮ DRUHÉ SKUPINY.** Předně je nutno zdůraznit podstatný rozdíl proti sekundární struktuře intronů první skupiny. Zajímavým znakem intronů druhé skupiny je, že mají na 5'- místě sestřihu sekvenci GUGYG a na 3'-místě sestřihu sekvenci AY podobně jako introny jaderné hnRNA (obr. 265). Ale na rozdíl od ní mají konzervativní strukturu, která je potřebná pro sestřih a sestává z dvoušroubovicových domén I - VI. Doména I



**Obr. 264**  
**Reakce katalyzované ribozymem L-19 IVS**

obsahuje sekvence, které jsou zahrnuty do seřazování míst sestřihu párujících se s 5'-exonem. Ostatní sekvence domény I interagují s prvními nukleotidy na 3'-konci intronu a 3'-konci exonu. Doména VI je dvoušroubovice obsahující nukleotid A, který působí při tvorbě lasovité RNA. Sekvence domény V jsou nejkonzervativnější a interagují s doménou I za tvorby katalytické oblasti.



Obr. 265  
Sekundární struktura intronů druhé skupiny

Ostatní domény přispívají k vazbě proteinů a nejsou nutné ke katalytické aktivitě *in vitro*. Vazebná místa pro exony jsou umístěna v doméně I a jsou označena jako EBS1 a EBS2. Každé vazebné místo pro exon se páruje s příslušným vazebným místem IBS pro intron v úseku intronu na jeho 5'-konci (v sousedství exonu, 5'-místo sestřihu).

**SHRNUTÍ OBECNÝCH ZNAKŮ INTRONŮ.** Introny lze rozdělit na základě jejich struktury do čtyř skupin. Toliko introny první a druhé skupiny mají aktivní místo pro sestřih a jsou tedy schopny samosestřihu. Následuje charakteristika jednotlivých skupin intronů:

**1. Introny první skupiny.** Jejich výrazným znakem, co se týče sekundární struktury, je centrální oblast vznikající párováním úseků P3, P4, P6 a P7. 5'-místo sestřihu je v úseku P1. Tento úsek sestává u 5'-konce z několika nukleotidů, které se párují s vnitřní řídicí sekvencí IGS nacházející se uvnitř intronu. Všechny introny této skupiny podléhají první a druhé transesterifikaci, přičemž v první transesterifikaci využívají guanozinu k nukleofilnímu napadení

fosfodiesterové vazby. Aktivní místo pro sestřih sestává z vazebného místa pro guanozin a sekvenci potřebných pro sestřih. *Samosestřihu in vitro je schopno mnoho intronů první skupiny. K sestřihu in vivo potřebují však některé introny první skupiny proteiny.* Jedním z nich je maturáza, která je kódována samotným intronem. Jiným proteinem je leucyl-tRNA-syntetáza kódovaná v jádře kvasinek, z něhož je importována do mitochondrií. U *Neurospora crassa* je *in vivo* k sestřihu nutná tyrozyt-tRNA-syntetáza, která tvoří katalyticky aktivní komplex s intronem.

*Introny první skupiny se vyskytují v genech, které jsou přepisovány do mRNA, rRNA a tRNA.* Jsou značně rozšířeny. Vyskytují se v mitochondriové a chloroplastové DNA a v jaderné DNA různých eukaryot, též v DNA bakteriofága T4. Nebyly zatím zjištěny u obratlovců.

Distribuce intronů první skupiny je nepravidelná. Např. některé druhy *Tetrahymena* mají introny první skupiny ve svých genech přepisovaných do ribozomové RNA, zatímco velmi příbuzné druhy nikoli. Tato nepravidelná distribuce napovídá, že introny v různých druzích organismů byly získány nezávisle, a to horizontálním přenosem. Takový přenos byl zjištěn např. u kvasinek a dokazuje, že některé introny se chovají jako mobilní elementy. Blíže se o tomto jevu zmíníme v posledním díle této učebnice.

**2. Introny druhé skupiny.** Základním znakem jejich struktury je šest dvoušroubovicových domén vyčnívajících z centrální kružnice. Introny této skupiny, vyskytující se v mitochondriích hub, obsahují sekvence, které by mohly potenciálně kódovat protein podobný reverzní transkriptáze. Jen některé introny druhé skupiny se vyznačují za extrémních nefyziologických podmínek samosestřihem *in vitro*. Účinnost tohoto samosestřihu je asi desetkrát nižší než u intronů první skupiny. Tento fakt napovídá, že *sestřih těchto intronů probíhající in vivo vyžaduje přítomnost specifických proteinů. Jinak se vyznačují sestřihem probíhajícím ve dvou transesterifikacích bez účasti guanozinu jako kofaktoru.*

Všechny známé introny druhé skupiny byly zjištěny v mitochondriích a chloroplastech. *U chloroplastů tvoří většinu intronů.* Nebyly zjištěny v jádře eukaryotických buněk. Přesto však jejich způsob sestřihu je podobný jadernému, který je řízen spliceozomem.

Jako introny první skupiny též některé introny druhé skupiny jsou mobilní, přenáší se horizontálně.

**3. Introny přepisované ze strukturních genů v jádře do hnRNA.** Sestřih těchto intronů probíhá přes první a druhou transesterifikaci jako u intronů druhé skupiny. Jeho významnou charakteristikou je, že *může probíhat jen za účasti spliceozomu* (obr. 241).

**4. Introny přepisované z jaderné DNA do pre-tRNA.** Pro tyto introny je charakteristický *sestřih, který je katalyzován endonukleázou a ligázou.* (obr.

250, 251). Tyto introny se vyskytují se v pre-tRNA mitochondrií kvasinek, vyšších rostlin a savců. Podobným sestřihem se vyznačuje též archeální tRNA (obr. 195, str. 263).

## 5.5 EUKARYOTICKÁ TRANSLACE

Translace se uskutečňuje u živočichů ve dvou a u rostlin ve třech kompartmentech:

- ◆ u živočichů v cytoplazmě a v mitochondriích,
- ◆ u rostlin v cytoplazmě, mitochondriích a chloroplastech.

S tímto rozdělením translace do různých kompartmentů buňky souvisí i typ ribozomů, na kterých tato translace probíhá.

Cytoplazmatická translace probíhá na ribozomech 80S, které se svým složením od prokaryotických ribozomů liší a *překládá se na nich mRNA, která je odvozena z hnRNA*.

Translace v mitochondriích a chloroplastech se uskutečňuje na ribozomech, jejichž sedimentační koeficient je přibližně stejný jako u prokaryot, tj. 70S. *Je na nich překládána mRNA pocházející v mitochondriích z primárních transkriptů mitochondriového genoforu a v chloroplastech z mRNA vzniklé přepisem chloroplastového genomu*. Na těchto ribozomech probíhá pak translace stejným způsobem jako v prokaryotických buňkách.

Cytoplazmatická translace se vyznačuje některými zvláštnostmi, z nichž zdůrazňujeme především tyto:

1. Počáteční aminokyselinou není N-formylmetionin, ale metionin, který se váže na specifickou iniciační tRNA označovanou jako  $tRNA_i^{Met}$ . Tato tRNA rozpoznává iniciační kodon AUG podobně jako  $tRNA_i^{fMet}$  u bakterií. Na rozdíl od  $tRNA_i^{fMet}$  nepodléhá  $tRNA_i^{Met}$  formylaci *in vivo*, ačkoli *in vitro* může být formylována formylázou z *E. coli*.

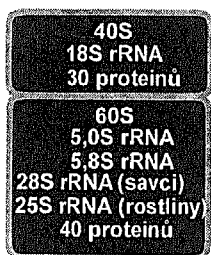
2. Počet iniciačních faktorů potřebných k zahájení translace je u eukaryot vyšší než u bakterií.

Cytoplazmatická translace, dále translace probíhající v mitochondriích a v chloroplastech, se navzájem významně liší výběrem molekulárních druhů transferové RNA potřebných ke čtení genetického kódu. Navíc, genetický kód mitochondrií obratlovců se liší od kódu standardního. V této kapitole probere-me nejdříve translaci cytoplazmatickou a pak teprve translaci, která se uskutečňuje v mitochondriích a chloroplastech.

### 5.5.1

## Eukaryotické cytoplazmatické ribozomy





Sedimentační koeficient  
celého ribozomu je 80S.

Obr. 266  
Složení cytoplazmatického  
ribozomu eukaryot

**CYTOPLAZMATICKÉ RIBOZOMY.** Cytoplazmatické ribozomy buňky se skládají ze dvou podjednotek, které na rozdíl od prokaryotických ribozomů obsahují čtyři molekuly rRNA a 70 proteinů. Sedimentační koeficient eukaryotického ribozomu závisí na fylogenetickém postavení druhu. Většinou však jeho hodnota kolísá kolem 80S. Větší podjednotka má sedimentační koeficient kolem 60S a menší kolem 40S. Chemické složení cytoplazmatických ribozomů je uvedeno na obr. 266.

**VÁZANÉ A VOLNÉ RIBOZOMY.** Kromě ribozomů vyskytujících se volně v cytoplazmě se ostatní ribozomy vážou na endoplazmatické retikulum (ER). Celé ER však není pokryto ribozomy. Ty části, kde jsou ribozomy, se nazývají **drsné ER**, zatímco oblasti bez ribozomů se označují jako **hladké ER**. Rozměry drsného ER souvisejí s množstvím proteinů, které se na ribozomech syntetizují. Na volných ribozomech se zpravidla syntetizují intracelulární proteiny. Extracelulární proteiny, které cirkulují v krevní plazmě, a membránové proteiny se většinou syntetizují na ribozomech drsného retikula.

**SIGNÁLNÍ ROZPOZNÁVACÍ ČÁSTICE.** Všechny extracelulární a membránové proteiny mají vlastnosti preproteinů. Jako **preprotein** se označuje *polypeptid*, jehož N-konec je tvořen **signálním peptidem**, tj. sekvencí 15 až 25 aminokyselin, kterým se váže během své syntézy na ribozomu k **signální rozpoznávací částici**, označované zkratkou **SRP**. Po vazbě na SRP se zastaví další syntéza polypeptidu na ribozomu. Toto zastavení trvá potud, dokud se komplex SRP s ribozomem nenaváže na specifický receptor v membráně ER. Pak může pokračovat translace, při které již signální peptid není nutný a je odštěpen specifickou endoproteázou, která se označuje jako **signaláza** neboli **signální peptidáza (EC 3.4.99.36)**.

Sekvence signálního peptidu je kódována vedoucí sekvencí vyskytující se na začátku eukaryotické transkripční jednotky obsahující strukturní geny. Tato vedoucí sekvence se přepisuje do hnRNA, z níž se překládá na ribozomech 80S do signálního peptidu, který prostřednictvím SRP navozuje spojení endoplazmatického retikula s ribozomem 80S. Jakmile k tomuto spojení dojde, není pak už signální peptid nutný a odstraní se proto signalázou. Translace sekvence za vedoucí sekvencí v hnRNA pak může pokračovat až do dokončení polypeptidu kódovaného příslušným strukturním genem.

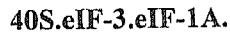
## 5.5.2

## Průběh cytoplazmatické translace

**INICIACE TRANSLACE.** Podobně jako u bakterií zahrnuje iniciace translace u eukaryot zhruba tyto děje (číslování následujících odstavců odpovídá číslování jednotlivých dějů vyjádřených schematicky na obr. 267a, 267b):

1. Nejdříve dochází k disociaci ribozomu 80S na 40S a 60S tím, že se **eIF-3** váže na podjednotku 40S a **eIF-3A** na podjednotku 60S (viz bod 7).

2. Za účasti **eIF-1A**, který se váže na **komplex eIF-3.40S**, se vytvoří **43S-translační komplex**, tj.:



3. Účinkem faktoru **eIF-2B** se na **eIF-2** vymění GDP za GTP (viz bod 8) a komplex **GTP.eIF-2** se spojí s  $Met-tRNA_i^{Met}$  za tvorby **ternárního translačního komplexu**:



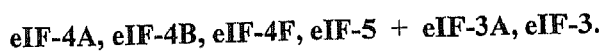
4. Tento proces je řízen faktorem **eIF-2A** a zahrnuje přímou vazbu ternárního komplexu k 43S-translačnímu komplexu za tvorby **komplexu**

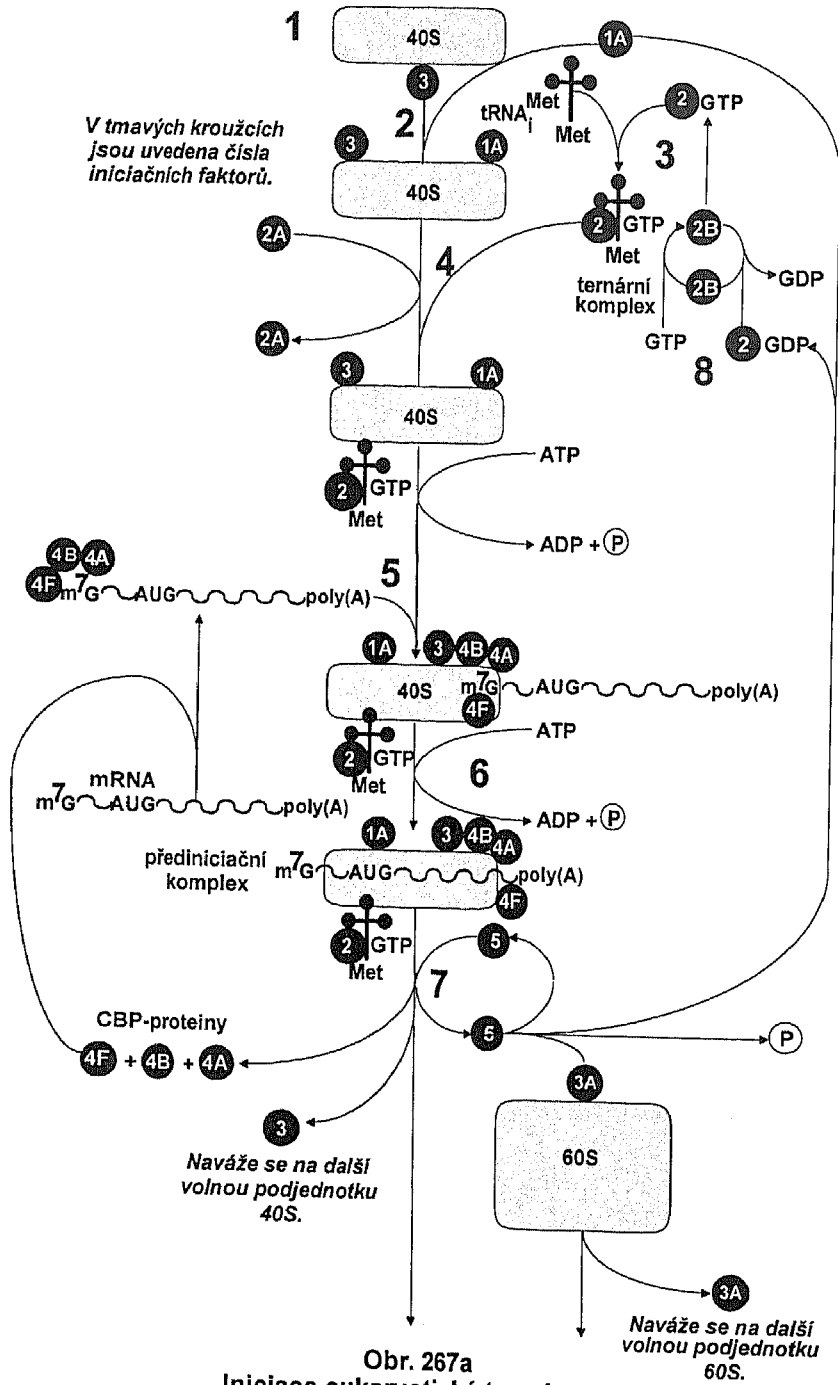


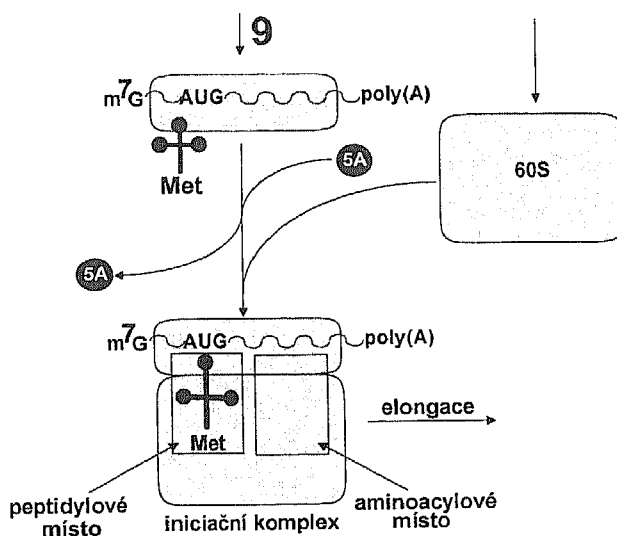
5. Mezitím probíhá rozpoznávání mRNA. Na rozdíl od rozpoznávání mediátorové RNA v prokaryotických buňkách děje se to tak, že **eIF-4F** se *specificky váže na čepičku m<sup>7</sup>G*. Pak se naváže faktor **eIF-4A**, který má funkci helikázy a rozmotává sekundární strukturu mRNA za využívání ATP jako zdroje energie. Tato aktivita **eIF-4A** je silně stimulována faktorem **eIF-4B**. Všechny uvedené tři faktory, označované též jako **CBP-proteiny (proteiny vázající se na čepičku)**, tvoří *komplex s čepičkou a chrání ji před účinkem exomukléáz*.

6. Po vazbě mRNA k podjednotce 40S následuje pohyb této podjednotky s vázanými iniciačními faktory od 5'-konce mRNA směrem k 3'-konci za hledání iniciačního kodonu. Tento obrazně řečeno "vyhledávací proces" je nejasný a je pravděpodobné, že je za hydrolýzy ATP na ADP + P řízen faktory **eIF-4A**, **eIF-4B** a **eIF-4F**. Konečným výsledkem tohoto děje je vznik **přediniciačního komplexu**, v němž je  $Met-tRNA_i^{Met}$  za přítomnosti uvedených faktorů *přesně položena na peptidylové místo proti kodonu AUG a je s ním spojena prostřednictvím svého antikodonu*.

7. Po spárování  $Met-tRNA_i^{Met}$  s iniciačním kodonem se z povrchu ribozomových podjednotek za hydrolýzy GTP působením faktoru **eIF-5** uvolňuje komplex **GDP.eIF-2** (obr. 247a) a faktory (obr. 267a):







Obr. 267b  
Pokračování obr. 267a

8. Komplex GDP. eIF-2 regeneruje na GTP. eIF2 působením faktoru eIF-2B (obr. 267a).

9. Vzhledem k tomu, že se z ribozomových podjednotek uvolnily faktory eIF-3 a eIF-3A, mohou se obě podjednotky opět spojit za tvorby **iniciačního komplexu**, tj. ribozomu 80S, na kterém je Met-tRNA<sup>iMet</sup> spojena v peptidylovém místě s kodonem AUG (obr. 267b). Další aa-tRNA pak vstupuje již do aminoacylového místa podle kodonu v mRNA. Mezi aminoacylem neseným touto tRNA a metioninem Met-tRNA<sup>iMet</sup> se vytvoří první peptidová vazba. V eukaryotických ribozomech vyžaduje tato první vazba, na rozdíl od bakteriálních ribozomů, určitou konformační změnu v peptidylovém místě, která je navozována faktorem eIF-5A (obr. 267b).

V tab. 26 je uveden stručný přehled funkcí iniciačních faktorů (eIF), elongačních faktorů (EF) a terminačních faktorů (RF), které v eukaryotické buňce řídí translaci.

**ELONGACE POLYPEPTIDOVÉHO ŘETĚZCE.** Při elongaci na eukaryotických ribozomech působí elongační faktory EF-1 a EF-2. Stejně jako u bakterií elongační faktor EF-T1 (str. 223) se EF-1 vyskytuje ve dvou formách:

EF-1 $\alpha$ ,

a

EF-1 $\beta\gamma$ .

Tab. 26

## Eukaryotické translační faktory

Názvy použité v této učebnici	Alternativní název	Funkce
eIF-1A	eIF-4C	stimuluje tvorbu 43S- komplexu a váže se na něj
eIF-2	eIF-2	vytváří s Met-tRNA <sub>i</sub> ternární komplex
eIF-2A	eIF-2A	řídí vazbu ternárního komplexu k 43S-komplexu
eIF-2B	eIF-2B	řídí výměnu GDP za GTP
eIF-3	eIF-3	podílí se na disociaci ribozomu, váže se na podjednotku 40S
eIF-3A	eIF-6	podílí se na disociaci ribozomu, váže se na podjednotku 60S
eIF-4F	eIF-4F	rozpoznává čepičku m <sup>7</sup> G a váže se na ni
eIF-4A	eIF-4A	helikáza, stimuluje vazbu mRNA k 40S-přediniciačnímu komplexu
eIF-4B	eIF-4B	stimuluje aktivitu eIF-4A

<b>eIF-5</b>	eIF-5	uvolňuje eIF-faktory z přediniciačního komplexu, a tím umožňuje spojení podjednotek 40S a 60S
<b>eIF-5A</b>	eIF-4D	stimuluje na ribozomu syntézu první peptidové vazby
<b>EF-1<math>\alpha</math></b>	EF-1 $\alpha$	má stejnou funkci jako bakteriální elongační faktor EF-Tu
<b>EF-1<math>\beta\gamma</math></b>	EF-1 $\beta\gamma$	má stejnou funkci jako bakteriální elongační faktor EF-Ts
<b>EF-2</b>	EF-2	má stejnou funkci jako bakteriální elongační faktor EF-G
<b>eRF</b>	RF	rozeznává terminační kodon, stimuluje štěpení peptidyl-tRNA a její uvolnění z ribozomu.

Oba faktory jsou v primární struktuře značně homologické s bakteriálními a shodují se s nimi i ve funkci. EF-1 $\alpha$  odpovídá bakteriálnímu EF-Tu, EF-1 $\beta\gamma$  odpovídá EF-Ts a EF-2 odpovídá EF-G. Z toho důvodu i průběh elongace polypeptidového řetězce probíhá stejně jako u bakterií.

**TERMINACE CYTOPLAZMATICKÉ TRANSLACE.** Na rozdíl od bakterií je v eukaryotických buňkách jen jeden terminační faktor (eRF), který je zahrnut do procesů terminace syntézy polypeptidového řetězce na ribozomu. Je-li tento faktor vázán na GTP, rozeznává terminační kodon za současné hydrolyzy GTP a uvolňuje polypeptidový řetězec a eRF.GDP z ribozomu (tab. 26).

**VÝBĚR ANTIKODONŮ PRO ČTENÍ GENETICKÉHO KÓDU.** K translaci, která probíhá na cytoplazmatických ribozomech eukaryotické buňky, se

používá standardního genetického kódu. K jeho čtení má eukaryotická buňka k dispozici 45 tRNA lišících se antikodony (tab. 27). Tento počet vyhovuje pravidlům o kolísavém párování bází, podle nichž v tomto konkrétním případě:

- ◆ Každá kodonová rodina může být čtena třemi různými tRNA.
- ◆ Sedm dvoukodonových sad (Phe, Tyr, His, Asn, Asp, Cys a Ser) je čteno sedmi tRNA s různými antikodony (na každou sadu připadá jedna).
- ◆ Pět dvoukodonových sad končících na A nebo G (Leu, Gln, Lys, Glu, Arg) je čteno deseti tRNA s různými antikodony (na každou sadu připadají dvě tRNA).
- ◆ Na Ile připadají dvě tRNA s různými antikodony, na Met jedna a na Trp jedna. Nepočítá se s tRNA<sup>Met</sup>, neboť má stejný antikodon jako tRNA<sup>Met</sup>.

### 5.5.3

#### Translace v mitochondriích a chloroplastech

**TRANSLACE V MITOCHONDRIÍCH.** V mitochondriích probíhá translace podobně jako u bakterií. Tato translace se však týká jen těch mRNA, které se tvoří posttranskripčními úpravami primárních transkriptů vzniklých přepisem transkripčních jednotek na mtDNA.

Translace v mitochondriích není autonomní. Některé její složky jsou závislé na proteinech tvořených v cytoplazmě eukaryotické buňky. Mitochondrie mají však všechny molekulární druhy tRNA, které jsou k translaci potřebné, ale *nesyntetizují se v nich aminoacyl-tRNA-syntetázy a ribozomové proteiny. Zde jsou zcela závislé na translaci probíhající v cytoplazmě. V mitochondriích se také netvoří iniciační faktory a elongační faktory.*

Hlavní znaky závislosti translace probíhající v mitochondriích na translaci, která se uskutečňuje v cytoplazmě, jsou uvedeny na obr. 268.

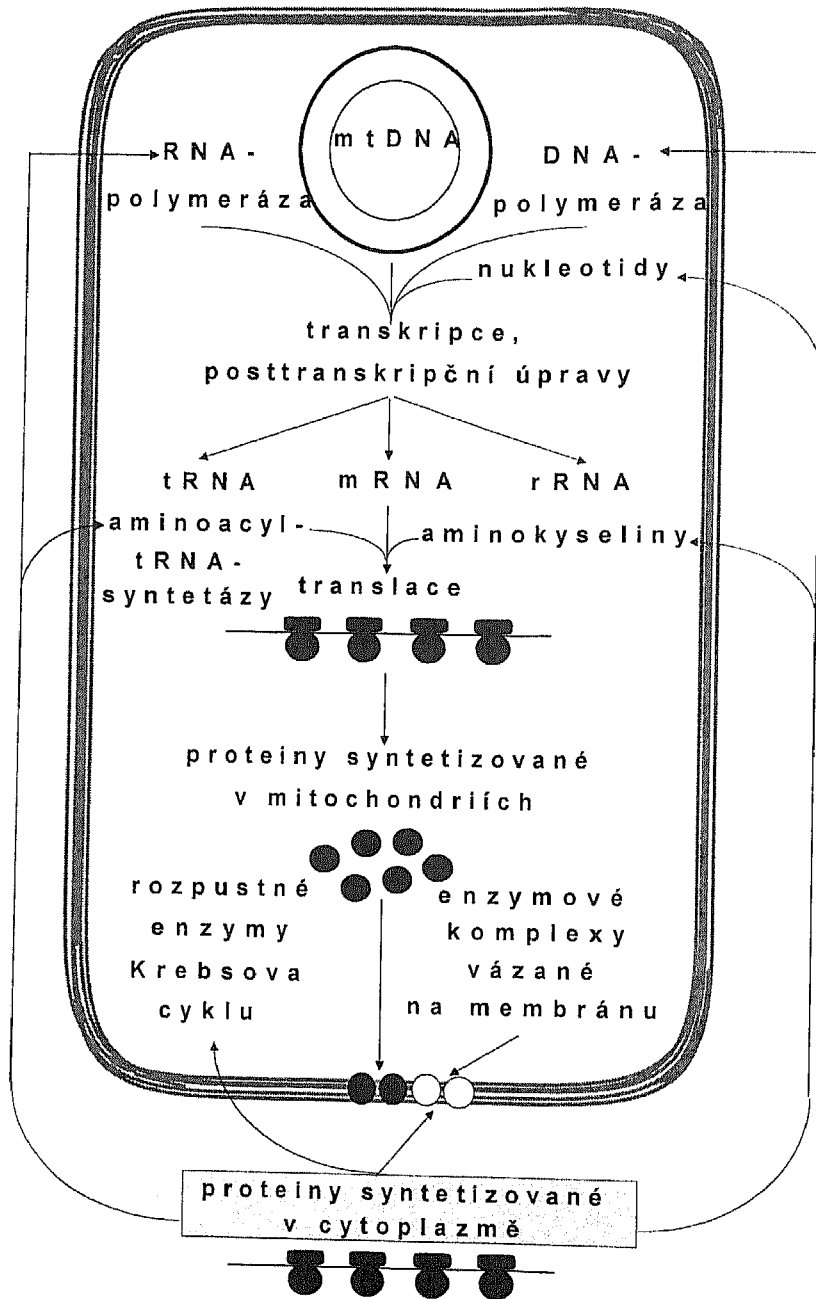
Které translační produkty se tvoří v savčích mitochondriích, můžeme vyčíst z obr. 208. Stejně produkty se tvoří v mitochondriích vyšších rostlin.

**GENETICKÝ KÓD MITOCHONDRIÍ OBRATLOVCŮ.** V genetickém kódu mitochondrií obratlovců je smysl některých kodonů jiný než v kódu standardním, což je jeden z výsledků evoluce genetického kódu. Kromě toho počet tRNA, které se liší antikodony schopnými číst tento kód se rovná 22, což je zatím nejmenší známý počet druhů tRNA, který může zajistit translaci (tab. 28). K počtu 22 antikodonů tRNA schopných číst genetický kód mitochondrií obrat-

Tab. 27  
Antikodony tRNA používané ke čtení genetického kódu v cytoplazmatických ribozomech eukaryotické buňky

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)	IGA	Tyr (UAU)	GUA
Phe (UUC)		Ser (UCC)		Tyr (UAC)	
Leu (UUA)	UAA	Ser (UCA)	UGA <sup>CGA</sup>	Trm (UAA)	0
Leu (UUG)	CAA	Ser (UCG)		Trp (UAG)	CCA
Leu (CUU)		Pro (CCU)		His (CAU)	Arg (CGU)
Leu (CUC)	IAG	Pro (CCC)	IGG	His (CAC)	Arg (CGC)
Leu (CUA)	UAG	Pro (CCA)	UGG <sup>CGG</sup>	Gln (CAA)	Arg (CGA)
Leu (CUG)	CAG	Pro (CCG)		Gln (CAG)	Arg (CGG)
Ile (AUU)		Thr (ACU)		Asn (AAU)	Ser (AGU)
Ile (AUC)	IAU	Thr (ACC)	IGU	Asn (AAC)	Ser (AGC)
Ile (AUA)	UAU	Thr (ACA)	UGU <sup>CGU</sup>	Lys (AAA)	Arg (AGA)
Met (AUG)	CAU	Thr (ACG)		Lys (AAG)	Arg (AGG)
Val (GUU)		Ala (GCU)		Asp (GAU)	Gly (GGU)
Val (GUC)	IAC	Ala (GCC)	IGC	Asp (GAC)	Gly (GGC)
Val (GUA)	UAC	Ala (GCA)	UGC <sup>CGC</sup>	Glu (GAA)	Gly (GGA)
Val (GUG)	CAC	Ala (GCG)		Glu (GAG)	Gly (GGG)





Obr. 268

Závislost translace probíhající v mitochondriích na translaci, která probíhá v cytoplasmě





lovců dospějeme, vezmeme-li v úvahu tato pravidla o kolísavém párování bází uvedená v tab. 6, str. 135.

1. Obsahuje-li první nukleotid U v antikodonu, může se párovat s třetím nukleotidem kodonu obsahujícím A, U, G, C. Taková tRNA přečte celou kodonovou rodinu.

2. Obsahuje-li první nukleotid modifikované U (např. mcm<sup>5</sup>U) v antikodonu, může se párovat s třetím nukleotidem dvoukodonové sady obsahujícím A nebo G.

3. Obsahuje-li první nukleotid G v antikodonu, může se párovat s třetím nukleotidem dvoukodonové sady obsahujícím U nebo C.

**TRANSLACE V CHLOROPLASTECH.** Translace je podobná bakteriální translaci. Ribozomy jsou 70S. Podjednotka 30S obsahuje 16S rRNA a 24 proteinů. V podjednotce 50S je 23S-rRNA, 4,5S-rRNA, 5S-rRNA a 32 proteinů. Syntéza polypeptidu na ribozomech začíná podobně jako u bakterií N-formylmetioninem. Též translace v chloroplastech se řídí stejným genetickým kódem jako u bakterií, tedy standardním. V chloroplastech se však k jeho čtení používá 30 tRNA, které se liší antikodony, což je umožněno použitím pravidel o kolísavém párování bází (tab. 29):

1. Pět kodonových rodin (Val, Ser, Thr, Arg a Gly) je čteno jako dvoukodonové sady, tedy deseti antikodony a nikoli pěti.

2. Dvě dvoukodonové sady (Leu a Ile-Met) se čtou čtyřmi antikodony a nikoli třemi.

3. Ostatní dvoukodonové sady (Phe, Ile, Tyr, His, Gln, Asn, Lys, Asp, Glu, Cys, Ser a Arg) se čtou každá jedním antikodonem obsahujícím v první pozici G nebo U.

4. Tři kodonové rodiny (Leu, Ala a Pro) a jeden kodon (Trp) se čtou každá jedním antikodonem.

**Poznámka:** Ze stejného důvodu jako v tab. 27 nepočítá se také v tab. 28 a 29 s iniciační tRNA.

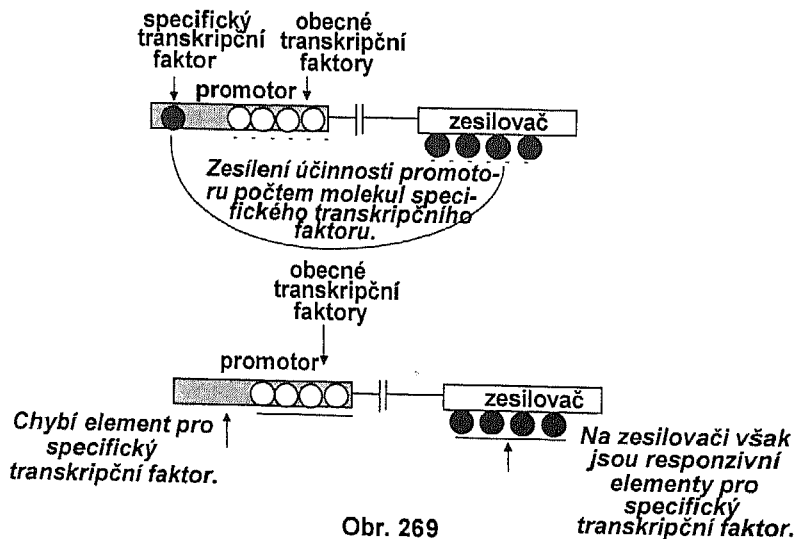
## 5.6 AKTIVACE EXPRESE EUKARYOTICKÝCH GENŮ NA ÚROVNI TRANSKRIPCE

### 5.6.1

#### Interakce promotorů se zesilovači transkripce

**ZESILOVAČE TRANSKRIPCE.** Zesilovače transkripce patří do kategorie *regulačních oblastí, které jsou vzhledem k promotoru v poloze cis (tj. na stejné molekule DNA) a silně zvyšují jeho aktivitu.* Zesilovač transkripce může bezprostředně sousedit s promotorem, může být od něho vzdálen buď proti směru transkripce, nebo po směru transkripce, případně se může nacházet i uvnitř transkripční jednotky. Některé sekvence zesilovače transkripce působí jako **responzivní elementy** neboli **RE-elementy**. Takto nazýváme *krátké DNA-sekvence (6 - 20 nukleotidů) promotorů a zesilovačů transkripce rozeznávané většinou specifickými transkripčními faktory indukovatelnými v diferencujících se buňkách.* Transkripční faktory, které se vážou na responzivní elementy zesilovačů transkripce, zvyšují aktivitu promotorů jedním z těchto dvou způsobů (obr. 269):

1. Zvýšením počtu molekul. To se uskutečňuje tak, že se na responzivní



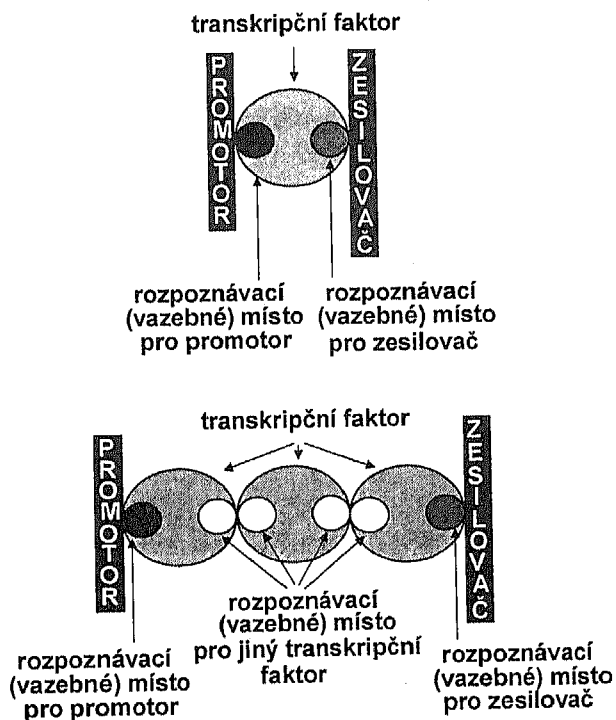
Obr. 269

Vztah zesilovače transkripce k promotoru přes specifický transkripční faktor

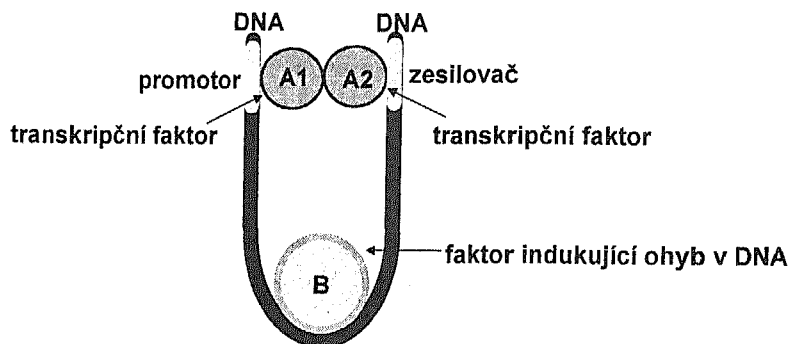
elementy, nacházející se v zesilovači transkripce v několika kopiích a element promotoru, naváže ve více kopiích stejný transkripční faktor. Zvýšení počtu molekul transkripčního faktoru na zesilovači transkripce pak vede ke zvýšení účinnosti transkripce řízené z promotoru.

**2. Vazbou na responzivní elementy zesilovače za současné absence této vazby na promotoru.** Příkladem tohoto způsobu zvýšení účinnosti promotoru jsou zesilovače, které působí v B-lymfocytech a nikoli v kmenových buňkách, z nichž pocházejí B-lymfocyty. Proto teprve až v B-lymfocytech proběhne transkripce strukturálních genů kódujících imunoglobuliny.

**INTERAKCE PROMOTORU SE ZESILOVAČEM TRANSKRIPCE.** Ke zvýšení účinnosti transkripce z příslušného promotoru dochází, i když zesilovač transkripce je od promotoru vzdálen. Nevyřešenou zůstává otázka, jak může zesilovač transkripce ovlivnit promotor z poměrně značné vzdálenosti. Jinými slovy, jakým fyzikálním mechanismem dochází k interakci mezi promotorem a zesilovačem transkripce. Předpokládá se, že tato *interakce se uskutečňuje přes transkripční faktory*, a že jejím výsledkem je uvedení RNA-polymerázy do ak-



Obr. 270  
Vazebná místa transkripčních faktorů a jejich interakce



Obr. 271

### Schéma navození fyzikálního kontaktu promotoru se zesilovačem transkripce

ktivního stavu, v němž může z promotoru zahájit transkripci. Kontakt mezi zesilovačem transkripce a promotorem se pak uskutečňuje některým z těchto způsobů (obr. 270):

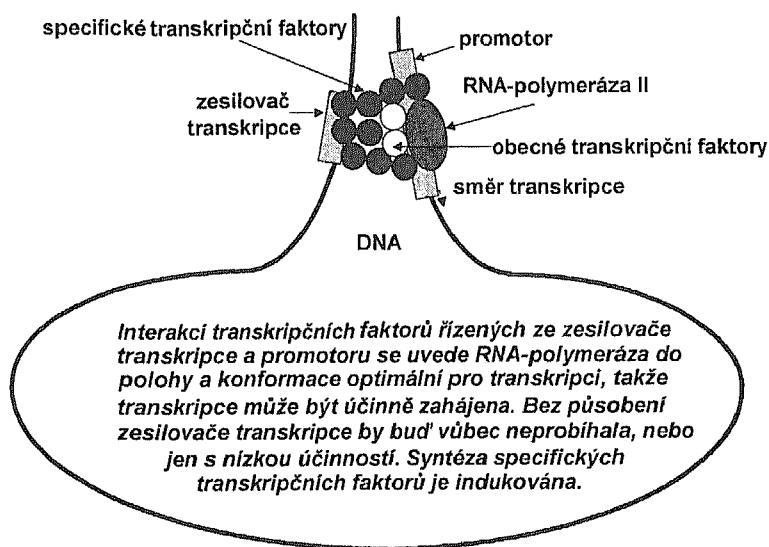
- ◆ Přes transkripční faktor, který má rozpoznávací (vazebné) místo jak pro promotor tak i zesilovač transkripce.
- ◆ Přes transkripční faktory vyznačující se rozpoznávacím (vazebným) místem pro responzivní element zesilovače transkripce a rozpoznávacím (vazebným) místem pro jiný transkripční faktor.
- ◆ Přes transkripční faktory, které mají rozpoznávací (vazebné) místo pro element promotoru a rozpoznávací vazebné místo pro jiný transkripční faktor.
- ◆ Přes transkripční faktory, které mají rozpoznávací místa, jimiž se rozeznávají navzájem.

Přiblížení a kontakt promotoru se zesilovačem transkripce se pak může uskutečnit pomocí proteinů indukujících ohyb DNA (str. 93). Je to znázorněno na jednoduchém příkladě (obr. 271), kde se předpokládají dva interagující faktory mezi promotorem a zesilovačem transkripce, které se navzájem přiblíží pomocí třetího faktoru vyvolávajícího ohyb v příslušném úseku DNA.

Interakcí těchto rozpoznávacích a současně vazebných míst se může vytvořit dosti složitý komplex transkripčních faktorů spojujících zesilovač transkripce s příslušným promotorem, který uvádí molekulu RNA-polymerázy na promotoru do aktivní konformace pro transkripci (obr. 272).

## 5.6.2

### Aktivace transkripčních faktorů



Obr. 272

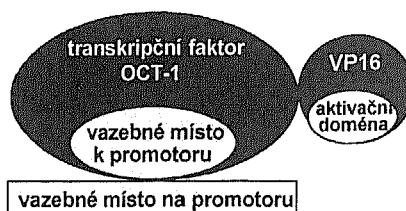
**Uvedení RNA-polymerázy do konformace a polohy optimální pro transkripci interakcí transkripčních faktorů**

**AKTIVAČNÍ DOMÉNA TRANSKRIPČNÍCH FAKTORŮ.** Transkripční faktor má obvykle jedno místo, tzv. *vazebné místo k DNA*, kterým se váže na *responzivní element* a místo, které se označuje jako *aktivační doména*. Tak se označuje *místo aktivace na transkripčním faktoru*. Ve většině případů je aktivační doména oddělena od místa, kterým se transkripční faktor váže k DNA promotoru nebo zesilovači. Aktivačních domén může být na transkripčním faktoru i více než jedna. Transkripční faktor GCN4 kvasinek obsahuje jednu aktivační doménu a jednu, kterou se váže k DNA. Receptor pro glukokortikoid obsahuje dvě aktivační domény kromě místa, kterým se váže k DNA a místa vázajícího hormon.

Existují také transkripční faktory, které nemají vazebné místo pro DNA, ale vyznačují se aktivační doménou. Takové faktory se však vážou k DNA prostřednictvím jiného transkripčního faktoru a aktivační doménou pak indukují transkripci. Např. transaktivátor VP16 viru *Herpes simplex* se váže k transkripčnímu faktoru OCT-1, který se zase váže k virovému promotoru. Avšak aktivace transkripce je indukována aktivační doménou faktoru VP16 (obr. 273).

Aktivační domény transkripčních faktorů nejsou však přísně specifické. Dokazují to tyto příklady: Savčí transkripční faktory, např. receptor pro glukokortikoid, mohou aktivovat geny v kvasinkách, jestliže se vyznačují schopností vázat se k jejich DNA. Transkripční faktor GAL4, který normálně aktivuje transkripci genů v kvasinkách za přítomnosti galaktózy, může aktivovat transk-





Obr. 273

### Aktivace transkripce aktivační doménou VP16 přes transkripční faktor OCT-1

ripci genů v buňkách drozofily, tabáku a savců. Existují tři typy aktivačních domén:

- ◆ **Kyselé domény.** Značná část těchto domén je tvořena kyselými zbytky aminokyselin udílejících doméně silný záporný náboj. Např. aktivační doména receptoru glukokortikoidu má 17 kyselých zbytků aminokyselin, GCN4 jich má 60. Záporně nabitá doména transkripčního faktoru VP16 přitahuje např. úsek TAF II<sub>31</sub>-proteinu obsahující sekvenci kladně nabitých zbytků aminokyselin.
- ◆ **Doména bohatá glutaminem.** Takovou doménou se vyznačuje např. obecný transkripční faktor SP1.
- ◆ **Doména bohatá prolinem.** Je charakteristická např. pro transkripční faktor CTF/NF1.

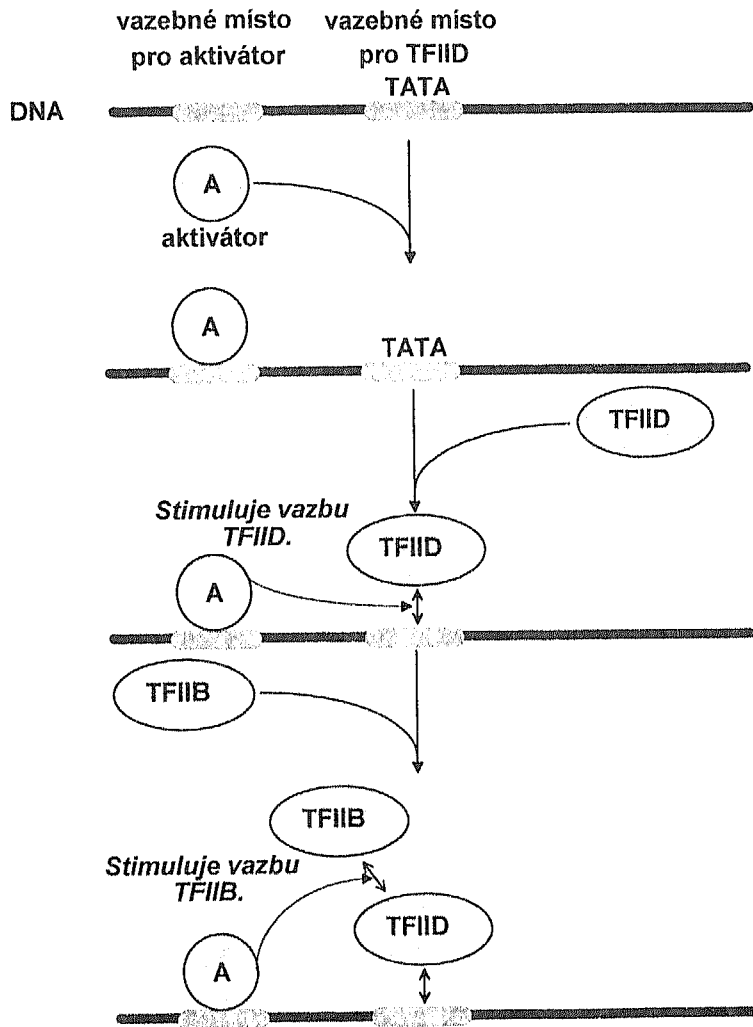
**AKTIVÁTORY INICIACE TRANSKRIPCE.** Již jsme uvedli na str. 352, že iniciace transkripce, která je katalyzována RNA-polymerázou II, je navozována obecnými transkripčními faktory. Z těchto faktorů ty, kterými se sestavuje přediniciační komplex navozující bazální transkripci, se označují jako **bazální transkripční faktory**. Patří mezi ně: **TFIIA, TFIID, TFIIB, TFIIIE, TFIIF.** Bazální transkripce se vyznačuje nízkou účinností. *Účinnost transkripce nad hladinu bazální se zvýší působením transkripčních faktorů označovaných jako **aktivátory iniciace transkripce**.* Aktivátory iniciace transkripce *interagují s bazálními transkripčními faktory při sestavování přediniciačního komplexu a zvyšují jeho účinnost a stabilitu.* Shrňme v tomto smyslu jejich základní vlastnosti:

1. *Aktivátor transkripce může zvýšit rychlost sestavování přediniciačního komplexu stimulací kteréhokoli stupně sestavovacího procesu.* Např. aktivátory, které se vážou na kyselé domény transkripčních faktorů, interagují přímo s faktorem TFIID a stimulují vazbu tohoto faktoru k promotoru. Tím se i zrychlí proces navázání TFIIB na TFIID. Avšak tentýž aktivátor, který urychlil proces navázání TFIID na promotor, může nezávisle interagovat s TFIIB a stimulovat jeho vazbu k TFIID (obr. 274). Transkripční aktivátory tedy mohou stimulovat

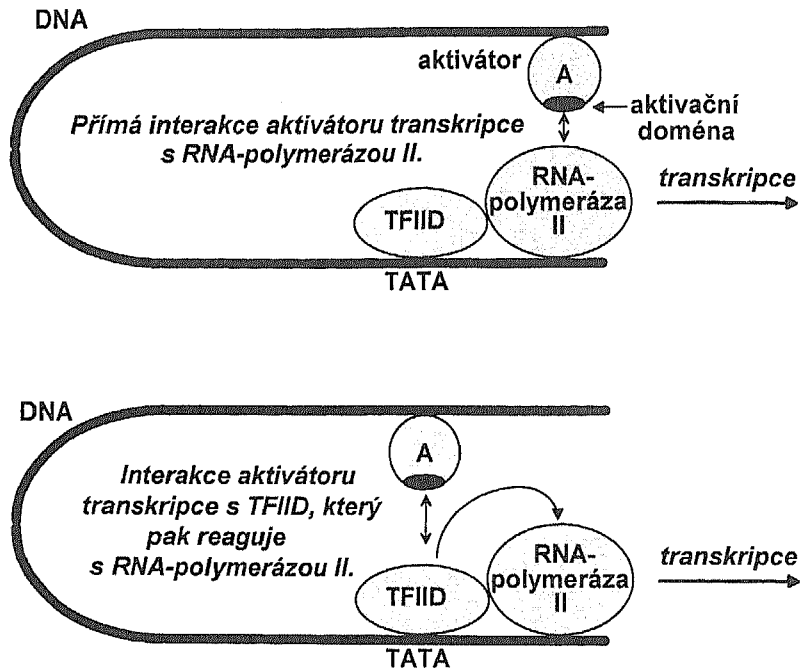
proces sestavování přediniciačního komplexu tak, že nezávisle stimulují vazbu jak TFIID tak i TFIIB.

2. Aktivátory transkripce mohou též stimulovat transkripci po sestavení iniciačního komplexu, což má za následek zvýšenou stabilitu a aktivitu iniciačního komplexu. To se děje tím způsobem, že transkripční aktivátor přímo interaguje svou aktivační doménou s RNA-polymerázou a zvyšuje tak její aktivitu nebo interaguje s jiným transkripčním faktorem, např. s TFIID (obr. 275).

3. Aktivátory transkripce mohou změnit konformaci transkripčního fakto-



Obr. 274  
Vliv aktivátoru na TFIID a TFIIB



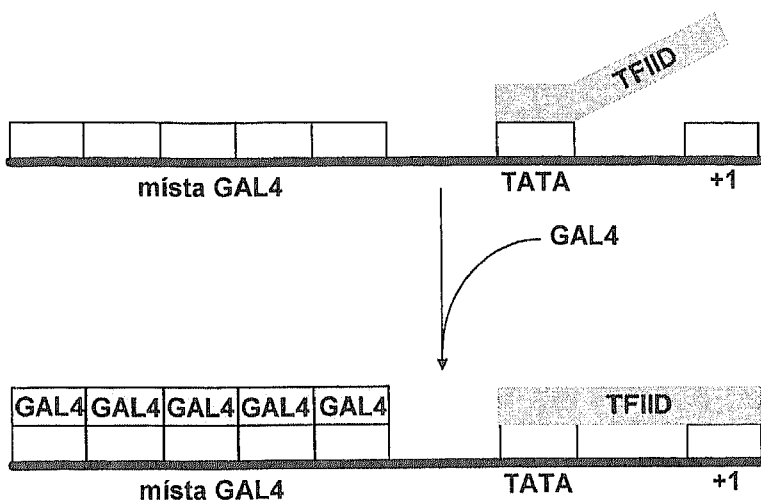
Obr. 275  
Schéma přímé a nepřímé interakce aktivátoru transkripce s RNA-polymerázou II

ru TFIID vázaného na promotor tím, že přímo s TFIID reagují. Např. za nepřítomnosti aktivátoru GAL4 se TFIID váže jen na TATA-box promotoru. Za přítomnosti 5 molekul kyselého transkripčního aktivátoru GAL4 vázaných na pět míst blízko promotoru se změní konformace TFIID v tom směru, že tento faktor pokryje úsek od TATA-boxu až ke startovacímu nukleotidu a může pak proběhnout transkripce (obr. 276).

**KOAKTIVÁTORY TAF.** Ve většině případů aktivátory transkripce interagují s TBP-proteinem transkripčního faktoru TFIID. Pro aktivaci iniciace transkripce je proto tato interakce TBP s aktivátorem rozhodující. V mnoha případech však k aktivaci iniciace transkripce *in vivo* nedochází jen za přítomnosti TBP-proteinu, ale je k ní nutný celý komplex TFIID, tj.

#### TBP + TAF-faktory.

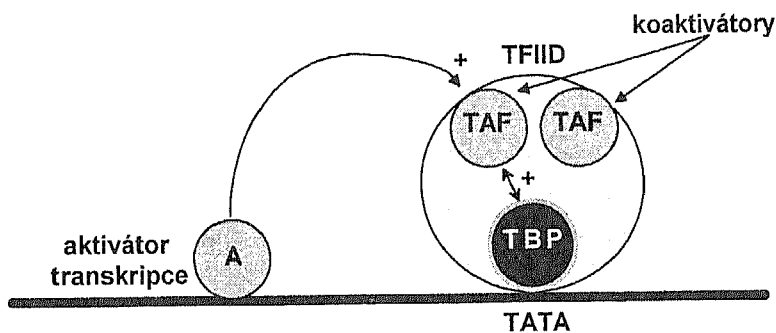
Z tohoto faktu vychází model založený na interakci aktivátorů s TBP přes TAF-faktory. Podle tohoto modelu tyto faktory působí jako koaktivátory, kterými jsou aktivátory spojeny s bazálním transkripčním komplexem (obr. 277). V hrubých rysech koaktivátory TAF působí takto:



Obr. 276  
Schematické znázornění změny konformace TFIID  
pod vlivem transkripčního aktivátoru GAL4

1. Různé typy aktivačních domén mohou interagovat s různými TAF-faktory.

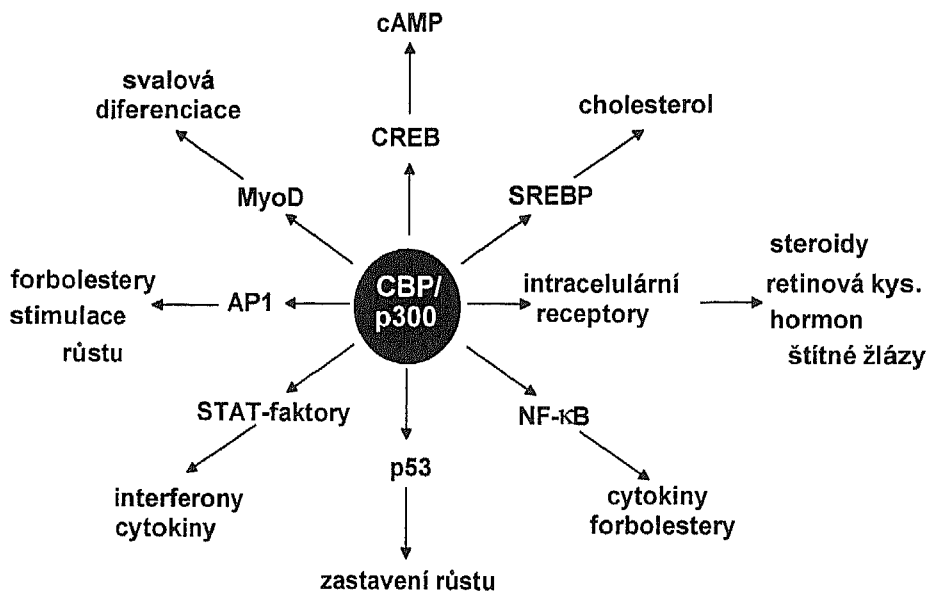
2. V různých tkáních existují různé formy TFIID, které se svým složením, co se týče TAF-faktorů, liší. To má značný význam pro expresi specifických genů buněk příslušné tkáně. Např. TAF<sub>II</sub>105 se syntetizuje jen v B-lymfocytech. Lze tedy uzavřít, že TAF-faktory mají klíčový význam v transkripci jednak tím, že působí jako koaktivátory, kterými se zprostředkuje odpověď na specifické aktivátory transkripce a jednak tím, že regulují vazbu TFIID na promotory.



Obr. 277  
Nepřímá interakce aktivátoru transkripce s TBP  
přes TAF

**KOAKTIVÁTORY CBP a p 300.** CBP- a p300-koaktivátory jsou příbuzné a vyznačují se koaktivační aktivitou vzhledem k široké skupině transkripčních faktorů (obr. 278). Schopností interagovat s tak rozsáhlou skupinou transkripčních faktorů se řadí do centra signálních drah v buňce a mají proto značný význam v aktivaci genů navozené signálními drahami.

**VLIV AKTIVÁTORŮ TRANSKRIPCE NA STRUKTURU CHROMATINU.** Před transkripcí příslušného místa chromozomové DNA musí dojít k tako-



**CREB** = *Transkripční faktor vázající se na responzivní element pro cAMP.*

**SREBP** = *Protein vázající se na responzivní element reagující na sérum.*

**STAT** = *Přenašeč signálu a aktivátor transkripce.*

**NF-κB** = *Transkripční faktor B-lymfocytů.*

**MyoD** = *Transkripční faktor kosterního svalu.*

*Toto schéma bude lépe pochopeno až po prostudování kapitoly pojednávající o signálních drahách.*

Obr. 278

Přehled interakcí koaktivátoru CBP/p300 s transkripčními faktory aktivovanými signálními drahami

vým změnám ve struktuře chromatinu, které umožňují vazbu transkripčních faktorů k DNA. Tyto změny, které jsou vyvolány vazbou specifického transkripčního faktoru, způsobí změny v uspořádání nukleozomů v místě, kde bude probíhat transkripce. V nejjednodušším případě se tak děje podle obr. 279 tím způsobem, že transkripční faktor stimuluje transkripci vazbou na DNA a přemístěním nukleozomů. Tím se připraví podmínky pro navázání transkripčního aktivátoru.

**POZITIVNÍ A NEGATIVNÍ ÚČINEK TRANSKRIPČNÍCH FAKTORŮ NA TRANSKRIPCI.** Většina transkripčních faktorů působí na transkripci pozitivně, tj. stimuluje, aktivuje transkripční jednotky k transkripci. V poslední době však přibývá informací též o negativním účinku transkripčních faktorů, tj. represí transkripce, která může probíhat některým z těchto dvou způsobů:

1. **Přímou represí** spočívající v tom, že *repressor (inhibiční transkripční faktor) přímo zeslabuje aktivitu přediniciačního transkripčního komplexu.*

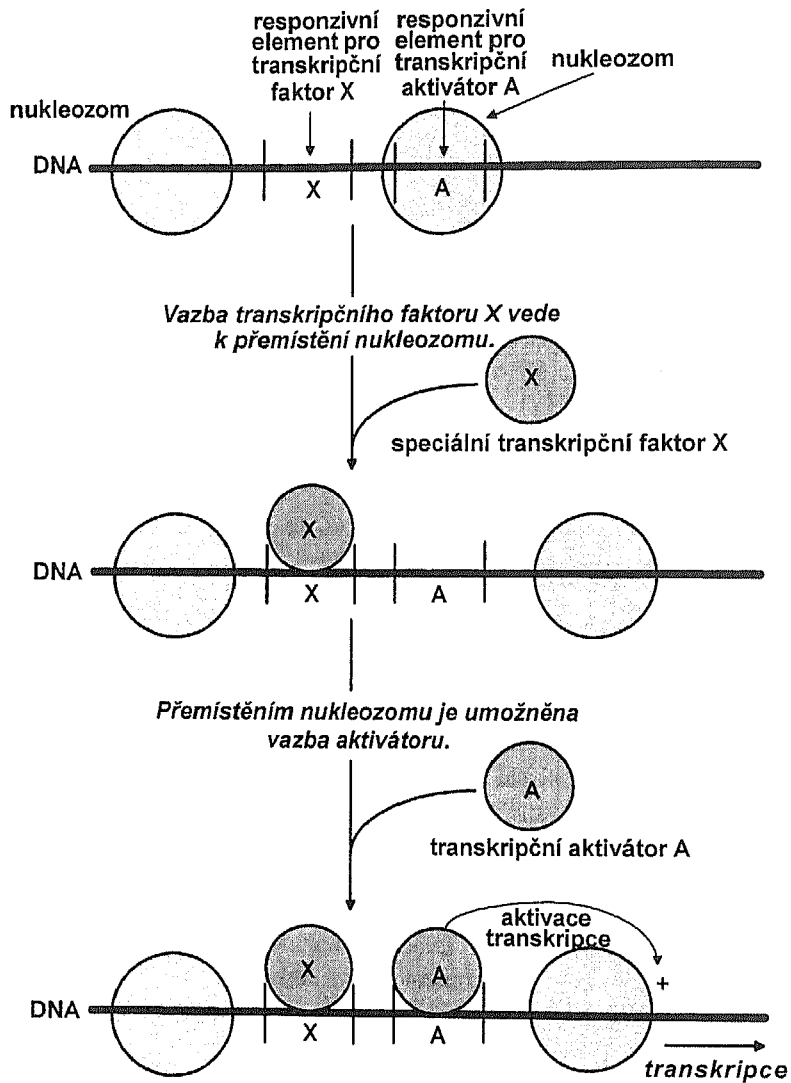
2. **Nepřímou represí**, která spočívá v tom, že *repressor interaguje s aktivátorem v tom smyslu, že blokuje jeho činnost.*

Na základě dosažených výsledků byla již rozpracována řada velmi zajímavých modelů vysvětlujících přímou a nepřímou represí. Z důvodů, že nechceme zabíhat do podrobností, odkazujeme v tomto na speciální literaturu. Přesto jeden příklad uvedeme, a to je vliv Dr1-proteinu na tvorbu přediniciačního komplexu. Tento protein inhibuje sestavování přediniciačního komplexu. Váže se totiž na TBP a brání pak tomu, aby se TFIID navázal na transkripční faktor TFIIB. Je to příklad přímé represe transkripce (obr. 280).

**REGULACE AKTIVITY TRANSKRIPČNÍCH FAKTORŮ.** V mnoha případech se příslušný transkripční faktor nachází nejdříve v inaktivní formě, ve které se nevyznačuje žádným účinkem na transkripci. Teprve přechodem do aktivní formy stimuluje transkripci příslušných genů. Zdá se, že obměňování aktivity transkripčních faktorů je rychlý a pružný prostředek regulace aktivity transkripčních jednotek. Mechanizmy, kterými se uskutečňuje přechod transkripčních faktorů z jejich inaktivního stavu do stavu aktivního, *umožňují přímou vazbu indukčního činitele s aktivovaným transkripčním faktorem* a není k nim zapotřebí složitého mechanismu regulace aktivity jiných transkripčních faktorů. Představují tedy vysoce efektivní prostředek umožňující specifickým signálním drahám indukovat změny v aktivitě transkripčních faktorů v buňce a ovlivňovat tak expresi genů.

Obecně existují tyto čtyři způsoby aktivace transkripčních faktorů v jejich reakci na indukční činitele (obr. 281):

1. **Ligandem navozená konformační změna transkripčního faktoru**

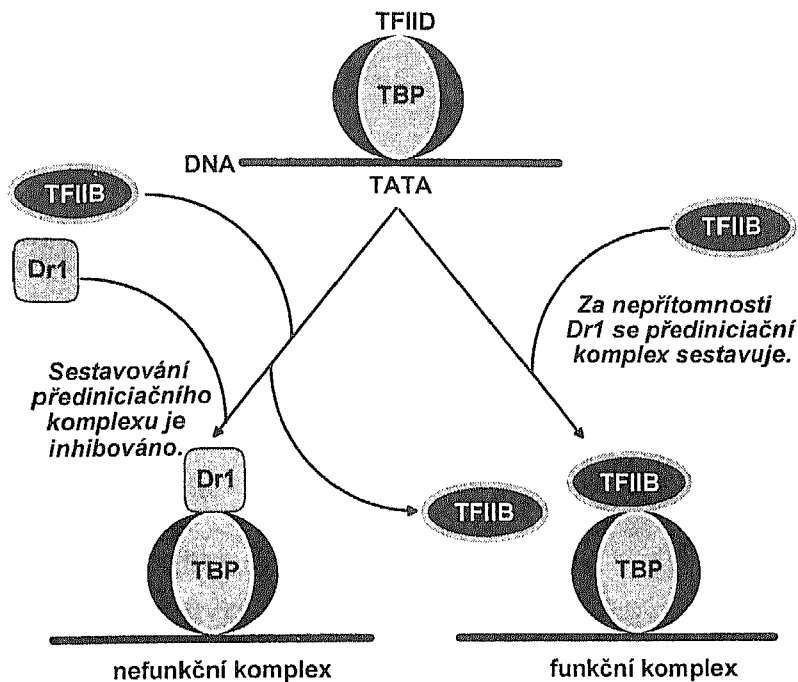


Obr. 279

Schéma jedné z možností otevření chromatinu pro transkripci

do stavu aktivního. Ligand se může vázat na původně inaktivní transkripční faktor a aktivovat ho. Např. původně inaktivní hormonový receptor jako transkripční faktor se aktivuje vazbou steroidního hormonu působícího v tomto případě jako ligand.

2. Konformační přechod transkripčního faktoru do aktivního stavu navozený odstraněním inhibičního proteinu z transkripčního faktoru. Pří-



Obr. 280

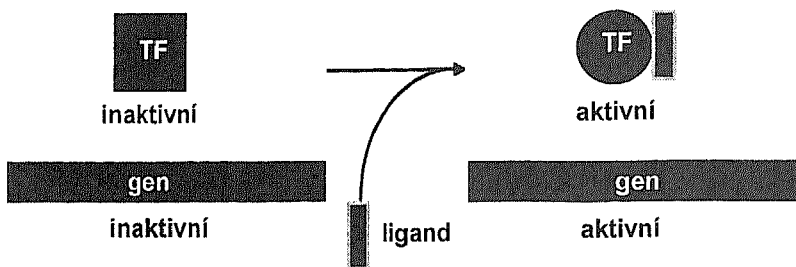
### Inhibiční účinek Dr1-proteinu na sestavování přediniciačního komplexu

kladem je transkripční faktor NF- $\kappa$ B, který aktivuje  $\kappa$ -subgeny v B-lymfocytech, je původně vlivem inhibitoru, který se na něj váže, inaktivní. Avšak uvolněním tohoto inhibitoru se stane aktivním a váže se na svůj responzivní element.

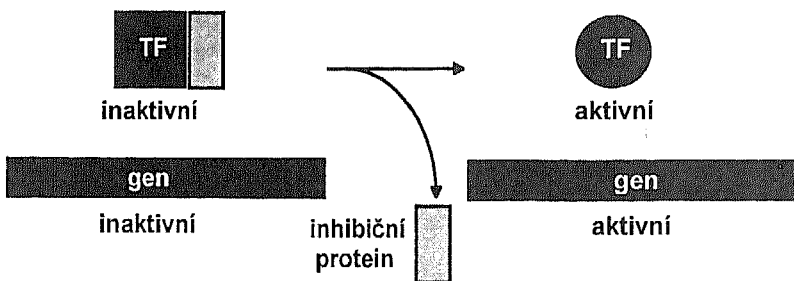
**3. Konformační přechod transkripčního faktoru do aktivního stavu navozený fosforylací.** Inaktivní transkripční faktor se stane aktivním po fosforylaci na hydroxylové skupině serinu, treoninu nebo tyrozinu (obr. 6, str. 20). Fosforylace proteinů, tedy i transkripčních faktorů, je katalyzována **protein-kinázami**, které přenášejí  $\gamma$ -fosfátovou skupinu z jejího donoru (ATP) na aminokyselinový zbytek (serin, treonin nebo tyrozin) jejího akceptoru, což je protein. Odstranění fosfátové skupiny (defosforylace) hydrolýzou z fosforylovaného proteinu je katalyzováno **fosfoproteinofosfatázami** vyznačujícími se specificitou vzhledem k proteinu jako substrátu (obr. 282). Fosforylací se mění biochemické vlastnosti proteinu, dochází ke změně jeho umístění uvnitř buňky, ke zvýšené citlivosti k proteolýze, ke změnám v interakcích s jinými proteiny atd. Defosforylací se navozuje původní stav. Je-li tímto proteinem transkripční faktor, obrážejí se pak tyto změny vyvolané fosforylací nebo defosforylací v jeho interakci s promotorem nebo zesilovačem transkripce. (Poznámka: V některých případech naopak defosforylací se stane transkripční faktor aktivní).



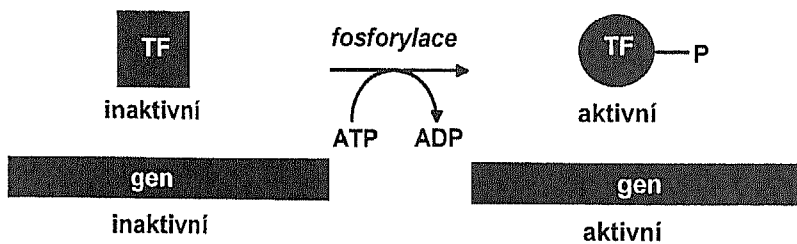
1. Konformační změna transkripčního faktoru způsobená ligandem.



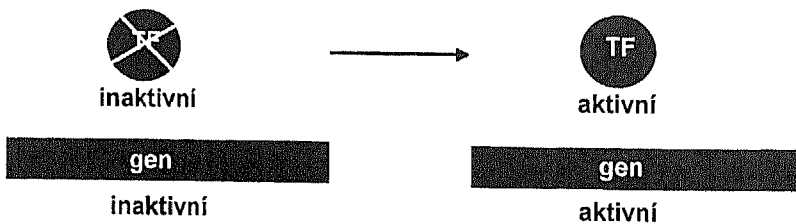
2. Konformační změna transkripčního faktoru způsobená odstraněním inhibičního proteinu.



3. Konformační změna transkripčního faktoru způsobená fosforylací.

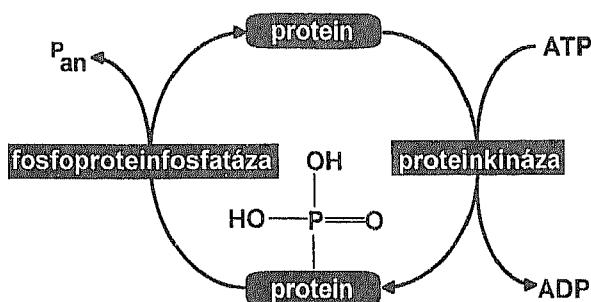


4. Stabilizace aktivní formy transkripčního faktoru proti jeho odbourání.



Obr. 281

Způsoby aktivace transkripčních faktorů navozené indukčním agens



Obr. 282  
Enzymová katalýza fosforylace a defosforylace

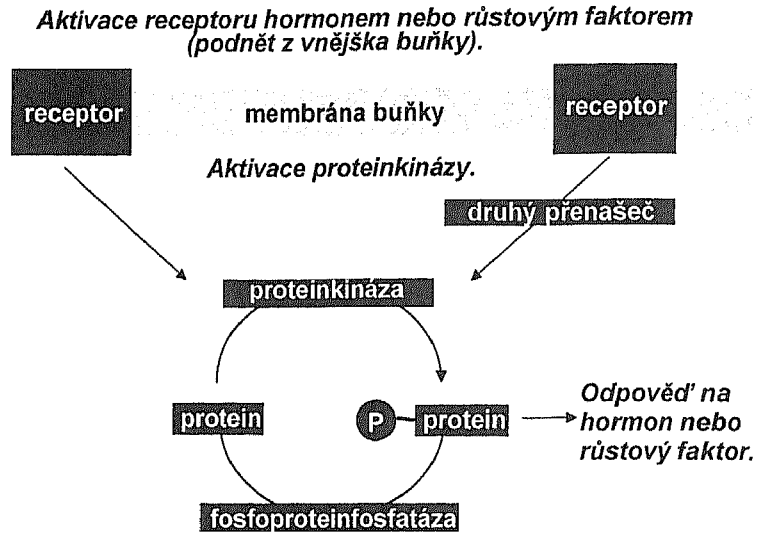
Proteinkinázy jsou však také původně inaktivní a ke katalytickému účinku jsou aktivovány buď přímo, nebo nepřímo. Přímo jsou aktivovány, jestliže jsou složkou receptoru v membráně buňky. V takovém případě ligand (růstový faktor nebo hormon) vázající se na receptor aktivuje proteinkinázu jako složku receptoru. Nepřímý způsob aktivace je vyvolán **druhým přenašečem signálu**, což bývá cAMP, cGMP nebo  $\text{Ca}^{2+}$ -ionty aj. Druhý přenašeč se tvoří ve zvýšené koncentraci po aktivaci receptoru ligandem. Vazbou druhého přenašeče na proteinkinázu dochází k její aktivaci. Aktivace specifické proteinkinázy vede pak k fosforylaci transkripčního faktoru (obr. 283).

**4. Stabilizace aktivní konformace transkripčního faktoru proti jeho odbourání.** Např. transkripční faktor NF- $\kappa$ B je inaktivní v komplexu s I $\kappa$ B. Po vystavení indukčnímu činiteli se I $\kappa$ B fosforyluje a odbourává. Zbýlý NF- $\kappa$ B je pak v aktivní konformaci.

### 5.6.3

#### Homeotické proteiny, metylace genů, regulace alternativního sestřihu

**HOMEOTICKÉ GENY.** U *D. melanogaster* byly zjištěny geny, jejichž mutace podmiňují přeměnu jedné části těla v jinou část (např. tykadla v nohu aj.). Tyto geny byly označeny souhrnně jako **homeotické geny**. Sekvence těchto genů se neomezuje jen na drozofilu, ale vyskytuje se v genech, které se podílejí na regulaci embryonálního vývoje též u jiných živočichů. *Tato konzervativní DNA-sekvence, která je dlouhá asi 180 bp a vyskytuje se v homeotických genech drozofily a jiných živočichů, u nichž se exprimuje především v raných*



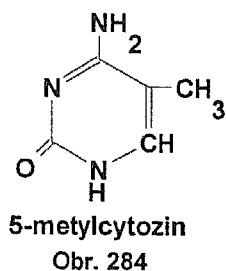
Obr. 283

#### Aktivace proteinkinázy podnětem z vnějška buňky

*fázích embryonálního vývoje*, byla označena jako **homeobox**. Proteiny, tzv. **homeotické proteiny**, které jsou kódovány homeotickými geny, mají jednu společnou funkci: *vážou se na specifické DNA-sekvence a regulují expresi genů na úrovni transkripce. Řada genů, které kódují transkripční faktory, obsahuje homeobox nebo jeho motiv.* Transkripční faktory kódované těmito geny mají strukturu, která je charakteristická pro homeodomény (obr. 94, str. 117). Např. protein kódovaný u drozofily genem *ftz* se váže na sekvenci:

T C A A T T A A A T G A

a stimuluje expresi genu, který tuto sekvenci obsahuje. Produkt jiného genu (*engrailed protein*) se váže ke stejné sekvenci a inhibuje aktivaci navozovanou produktem genu *ftz*. Z toho je zřejmé, že exprese samotného genu *ftz* v buňce aktivuje určité geny, ale nemá žádný účinek za přítomnosti proteinu "engrailed". *Produkty homeotických genů tedy silně ovlivňují vývoj buňky.*



**VLIV METYLACE NA EXPRESI GENŮ.** Bylo zjištěno, že geny, které se v daném vývojovém stadiu mnohobuněčného organismu nevyjadřují, jsou metylovány. Naopak geny, které se aktivně vyjadřují, jsou demetylovány. Je vcelku zřejmé, že metylace a demetylace souvisí s expresí genů. Metyluje se C5 cytozinu (obr. 284). U živočichů se cytozin metyluje

v sekvenci (metylace je označena \*):

-C\*-p-G-

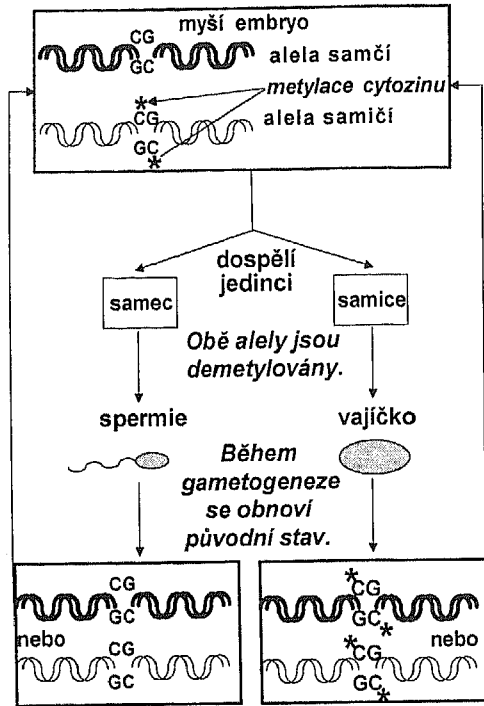
a u rostlin v sekvenci:

-C\*-p-N-p-G-,

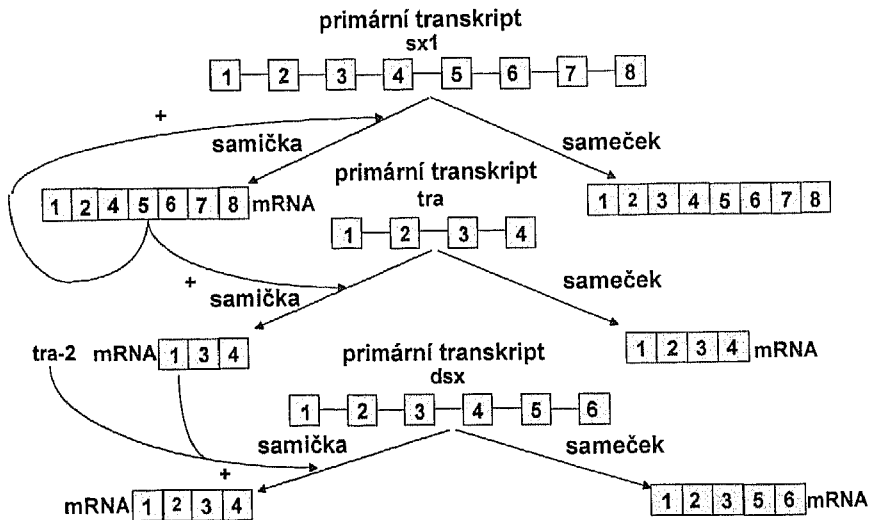
kde N je jakýkoli nukleotid. *Metylace je katalyzována DNA-metylázou. Po první replikaci metylované DNA je přechodně metylován jen matricový řetězec, kdežto jemu komplementární dceřiný metylován není. Molekula DNA, ve které jen jeden řetězec je metylován, se označuje jako hemimetylovaná. DNA-metyláza rozezná brzy metylovaný řetězec a komplementární zmetyluje. V této souvislosti je nutno zdůraznit, že metyláza rozeznává jen hemimetylovanou DNA. To znamená, jestliže se do buňky zavede nemetylovaná DNA, pak již nebude *de novo* v této buňce metylována.*

Tvrzení, že *metylace zastavuje expresi genů a že k jejich expresi je nutná demetylace, lze považovat za obecné pravidlo. Jako každé pravidlo i toto má výjimky; byly zjištěny geny, které se vyjadřují i za podmínek jejich metylace.*

**VTISKOVÁNÍ.** Jev, který se označuje jako vtiskování, je pravděpodobně způsoben metylací. Rozumí se jím změna v expresi genu, která se uskutečňuje během přechodu genu přes spermii nebo vajíčko a má za následek, že samčí a ženské geny mají různou aktivitu u nové lízi organismu. Např. exprese určitých



Obr. 285  
Schéma vtiskování u myši



Obr. 286  
Alternativní sestřih určující pohlaví u *Drosophila melanogaster*

alternativním sestřihem primární transkript sestřihován v různých tkáních různě (str. 383). Molekuly mRNA vznikající takto sestřihem se pak v těchto tkáních překládají do různých translačních produktů. To jinými slovy znamená, že úprava sestřihem je v příslušné tkáni specificky regulována za produkce určitých molekul mRNA. U primárního transkriptu sestřihovaného do mRNA, která se překládá v buňkách štítné žlázy do kalcitoninu a v neuronech do CGRP, *rozhoďuje specifický protein - faktor sestřihu*, který se tvoří jen v neuronech, kde navozuje sestřih do mRNA překládané do CGRP (obr. 248, str. 388).

Obecně lze říci, že *určitý způsob alternativního sestřihu vyžaduje přítomnost specifických faktorů sestřihu*, jejichž mechanismus účinku na primární transkript není znám. U drozofily je alternativním sestřihem určeno pohlaví. Geny *sxl*, *tra* a *dsx*, které se na tomto procesu podílejí, patří každý do jiné transkripční jednotky. Tyto transkripční jednotky se překrývají poskytující každá jeden primární transkript (obr. 286).

Primární transkript genu *sxl* produkuje protein stimulující sestřih jednak své vlastní RNA, což je specifické pro samičky a jednak sestřih primárního transkriptu genu *tra*. Protein produkovaný mRNA primárního transkriptu genu *tra* stimuluje u samiček v závislosti na produktu genu *tra-2* sestřih primárního transkriptu genu *dsx*.

## 5.7 MOLEKULÁRNÍ MECHANIZMY SIGNALIZACE

### 5.7.1 Základní pojmy

Z předchozí kapitoly by mělo vyplynout, že transkripce jako první a základní stupeň genové exprese buňky je závislá na přítomnosti aktivovaných transkripčních faktorů. Mohli bychom obrazně říci, že *transkripce příslušného genu se zapíná, jsou-li pohotové příslušné aktivní transkripční faktory*. V opačném případě se vypíná. Signály k aktivaci transkripčních faktorů jsou extracelulární, na něž navazují intracelulární. Buňka se jeví jako velmi složitý regulační systém, který odpovídá na vnější signály změnami v expresi genů. Tyto změny mohou být na úrovni transkripce, translace, ale i na úrovni posttranslační (str. 152, obr. 122). V této kapitole se budeme zabývat transkripční úrovní, tedy prvním stupněm genové exprese. Ale je třeba, abychom si úvodem v následujícím odstavci ujasnili některé pojmy, které budeme používat.

**SIGNÁL, SIGNÁLNÍ MOLEKULA.** *Fyzikální faktor, kterým se zprostředkuje a předává nějaká zpráva (informace), označujeme jako signál. Tím může být nějaká malá molekula, makromolekula, světlo atd. Malá molekula nebo makromolekula ve funkci signálu se označuje jako signální molekula.*

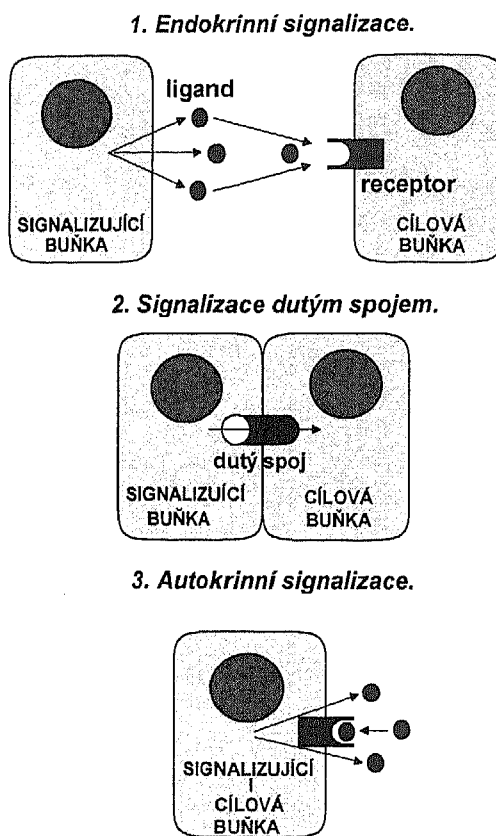
Signální molekuly mohou být:

◆ **Extracelulární**, tj. jejich zdroj (původ) je mimo buňku, která je ve funkci jejich příjemce (cílová buňka). *Reagují s buňkou prostřednictvím molekul, jež se označují jako receptory. Signální molekula vázající se na receptor se označuje jako ligand.*

◆ **Intracelulární**, tj. jejich zdroj je uvnitř buňky.

Mezi extracelulární signální molekuly patří **hormony, růstové faktory a neurotransmitery**. Intracelulárními signálními molekulami jsou **druzí přenašeči signálu** (např. cAMP) a různé složky cesty přenosu signálu (G-proteiny, Ras-protein aj.).

**INTRACELULÁRNÍ SIGNALIZACE.** Některé extracelulární signální molekuly pronikají plazmatickou membránou buňky a reagují s intracelulárními



**Obr. 287**  
**Způsoby extracelulární signalizace**

jící buňky na receptor cílové buňky (extracelulární signalizace) a následně do nitra cílové buňky (intracelulární signalizace) zahrnuje vytváření řetězce signálních molekul, z nichž každá přenáší informaci v pořadí na další molekulu. Extracelulární signální molekula zachycená cílovou buňkou a nazývaná v této souvislosti jako **první přenašeč (posel) signálu** vede často k produkci malých a přechodných signálních molekul uvnitř cílové buňky, které se označují v pořadí jako **druzí přenašeči (poslové) signálu**. Tito pak aktivují nebo mění aktivitu dalších složek signální dráhy (třetích přenašečů signálu atd).

Jedním z důležitých znaků druhých přenašečů signálu je, že zesilují původní signál (extracelulární signál), který by samotný pro aktivaci transkripčního faktoru nestačil. Tento jev se označuje jako **zesílení** neboli **amplifikace signálu**. Znárodnuje ho obr. 288. Zde se ligand (hormon) naváže na receptor, který pak aktivuje enzym (např. adenylátcyklázu). Enzym pak katalyzuje synté-



spočívající v tom, že jedna signalizující složka fosforyluje a aktivuje druhou složku, která pak uskuteční tentýž děj na třetí atd., dokud se nedosáhne nejzazší cílové molekuly jako konečného příjemce signálu. Fosforylační děje jsou katalyzovány proteinkinázami. Jako **proteinkináza** se označuje *enzym katalyzující fosforylaci jedné nebo více hydroxylových nebo fenolických skupin v proteinech, přičemž k fosforylaci využívá ATP jako donor fosfátové skupiny*. Co se týče fosforylace aminokyselin, odkazujeme na obr. 6, str. 20.

Katalýza fosforylace a aktivace proteinkinázy byly vysvětleny na str. 437 - 439, obr. 282 a 283. V dalších odstavcích jsou popsány hlavní skupiny proteinkináz.

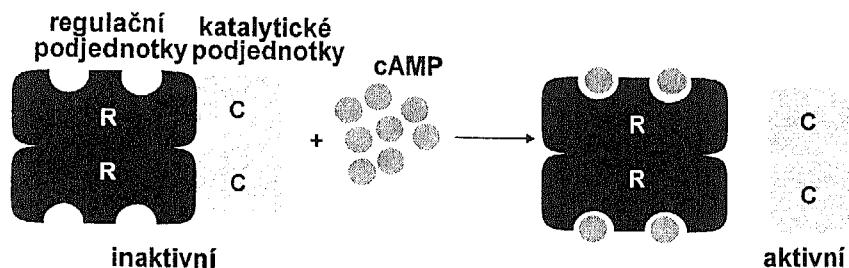
**SERIN/TREONINPROTEINKINÁZY.** Fosforylují v cílových proteinech zbytky serinu nebo treoninu (hydroxyly serylu nebo treonylu). Patří sem:

1. **cAMP-dependentní proteinkináza (zkr. PKA)** neboli **proteinkináza A**. Aktivita této proteinkinázy je regulována cAMP. **Typ I** této proteinkinázy, se kterým se budeme setkávat v této učebnici, je tetramer, v němž dva protomery jsou katalytické (C) a dva regulační (R). Tetramerní protein je však katalyticky inaktivní, jelikož obě katalytické podjednotky C jsou blokovány regulačními R. Vazba čtyř molekul cAMP způsobí, že se regulační protomery oddělí od katalytických, které pak mohou fosforylovat různé proteiny (obr. 289). U **typu II** regulační podjednotky zprostředkovávají spojení s membránou. Toto spojení (zakotvení do membrány) se uskutečňuje přes **zakotvující proteiny proteinkinázy A (zkr. AKAP-proteiny)**, na které se regulační podjednotky vážou.

2. **cGMP-dependentní proteinkináza (zkr. PKG)**. Její aktivita je regulována cGMP. Vyskytuje se v hladkých svalech, srdci, plicích a mozku.

3. **Proteinkinázy C, zkr. PKC**. Je 11 izoforem PKC fosforylujících různé substráty, které se klasifikují do čtyř rodin. Jsou specifické pro určitý typ buněk a rozmístěné do různých jejích částí. Konvenčními enzymy jsou PKC  $\alpha$ ,

proteinkináza závislá na cAMP



Obr. 289

Aktivace proteinkinázy závislé na cAMP

$\beta$  a  $\gamma$ , které jsou vázány na plazmatickou membránu a aktivovány v membráně diacylglycerolem, fosfatidylserinem a  $\text{Ca}^{++}$ -ionty.

4.  **$\text{Ca}^{2+}$ /kaldmodulin-dependentní proteinkináza II** neboli  **$\text{Ca}^{2+}$ -CAM-dependentní proteinkináza II** (EC 2.7.1.123). Je to enzym se širokou specifitou substrátu, kterým může být tryptofanhydroxyláza, glykogensyntáza kosterního svalu, proteiny sdružené s mikrotubuly, iontové kanály a transkripční faktory. Je aktivována ionty  $\text{Ca}^{++}$ . *Katalyzuje v proteinech fosforylaci zbytků serinu a treoninu*. Existují další typy této proteinkinázy (I, III a IV), o kterých v této učebnici nepíšeme. **Kaldmodulin** je *protein vázající 4 ionty  $\text{Ca}^{++}$* . Může aktivovat různé eukaryotické enzymy zahrnující adenylátcyklázu mozku, kinázu lehkých řetězců myozinu atd.

**TYROZINPROTEINKINÁZY.** *Fosforylují v cílových proteinech zbytky tyrozinu (hydroxyl tyrozyly)*. Patří sem:

1. **Receptorové tyrozinproteinkinázy.** Jsou součástí receptorů, a tedy vázané na plazmatickou membránu (str. 462).

2. **Nereceptorové tyrozinproteinkinázy.** Na rozdíl od receptorových proteinkináz nejsou součástí receptorů. Chybí jim transmembránové a extracelulární domény charakteristické pro receptory růstových faktorů. Všechny nereceptorové proteinkinázy, které fosforylují tyrozin, mají sekvenčně homologický úsek o délce zhruba 300 aminokyselin, který podmiňuje vlastní katalytickou aktivitu kinázy. Označuje se jako **kinázová doména**. Jak receptorové tak i nereceptorové proteinkinázy se vyznačují sekvenční podobností v celé kinázové doméně. Nereceptorové tyrozinproteinkinázy se dělí do těchto rodin:

◆ **Proteinkinázy Src-rodiny.** Patří sem tyto tyrozinproteinkinázy: **Blk, Csk, Fgr, Fyn, Hck, Lck, Lyn, Src, Yes, Yrk**. Obsahují domény SH2, SH3 a kinázovou doménu SH1. Myristylací jsou zakotveny do plazmatické membrány. **Myristylací** se rozumí *enzymové zavedení myristylu*, tj.



*do proteinu pomocí koenzymu SCoA*. Myristylované proteiny se vážou na specifické membránové receptory a jsou takto připevněny k plazmatické membráně. Prototypem tyrozinproteinkináz Src-rodiny je **tyrozinproteinkináza pp 60<sup>c-src</sup>**, která je kódována genem *c-src*. Na obr. 290 jsou porovnány receptorové proteinkinázy s nereceptorovými Src-proteinkinázami fosforylujícími tyrozin. Je zřejmé, že:

a) nereceptorové a receptorové tyrozinproteinkinázy mají **SH1-doménu**, což je *vlastní katalytická doména*;

b) nereceptorové Src-kinázy mají ještě **oblasti homologie Src2 a Src3** neboli **domény SH2 a SH3**, které se v receptorových kinázách nevyskytují;

receptory (např. steroidy, oxid dusnatý). Většinou jsou však hydrofilní povahy a zůstávají pak vně buňky a interagují se strukturou buňky nebo s receptory sdruženými s membránou buňky. Touto interakcí změní receptor svou konformaci, kterou je indukována enzymová aktivita uvnitř buňky a řada aktivačních dějů až po aktivaci proteinu (např. transkripčního faktoru) vedoucí k výsledné odpovědi buňky na signál. *Řada spřažených intracelulárních pochodů spuštěných (zapnutých) vazbou extracelulární signální molekuly na receptor a převáděných na cílovou intracelulární molekulu, kterou se realizuje odpověď buňky na extracelulární signál, se označuje jako dráha či cesta přenosu signálu* neboli též **intracelulární signalizace**. V této učebnici se budeme především zabývat jen těmi intracelulárními signalizacemi, v nichž konečným dějem je odevzdání signálu na poslední cílovou (přijímací) molekulu ve funkci transkripčního faktoru, který se přijetím signálu aktivuje k zapnutí transkripce jako konečné odpovědi na extracelulární signál.

**EXTRACELULÁRNÍ SIGNALIZACE.** Jako **extracelulární signalizaci** označujeme *přenos signálu z buňky, která je jeho zdrojem, na receptor cílové buňky, která tento signál přijímá*. Uvedeme některé způsoby tohoto přenosu. Jsou to (obr. 287):

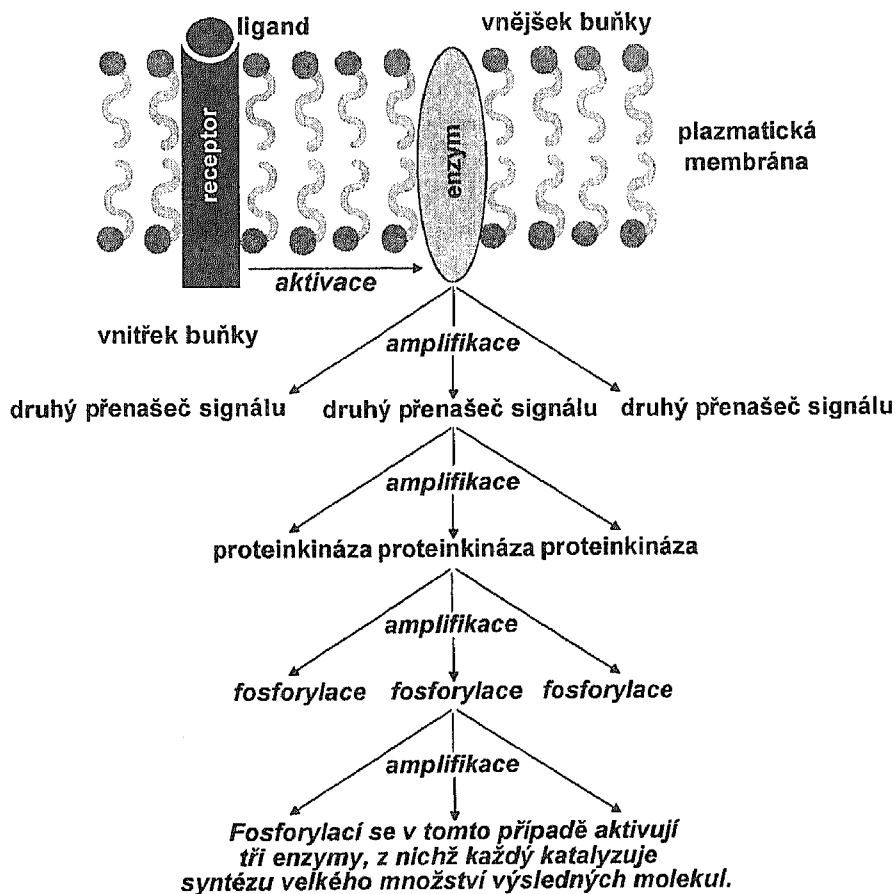
**1. Signalizace endokrinní.** Pro tento způsob signalizace je charakteristická *značná vzdálenost, kterou musí urazit signální molekula* (např. hormon) *od svého zdroje, tj. buňky (signalizující buňka), která signál vysílá, ke svému receptoru v cílové buňce*.

**2. Signalizace dutým spojem.** Zde se vytvoří při těsném kontaktu tubulární struktura mezi signalizující buňkou a cílovou buňkou. V místech, kde se tyto dvě buňky těsně stýkají, jsou proteiny, z nichž se tato tubulární struktura vytváří (obr. 23, str. 43). *Tubulární struktura spojující obě buňky je dutá a označuje se jako dutý spoj*. Tímto spojem prochází ze signalizující buňky do cílové buňky signální molekuly o molekulové hmotnosti menší než 1 200. Jsou to např.  $\text{Ca}^{++}$ -ionty a cAMP. Průchod přes dutý spoj však není pro všechny případy volný. Rychle se uzavírá, jestliže se zvýší koncentrace iontů  $\text{Ca}^{++}$  a  $\text{H}^+$ . Dochází k tomu např., když sousední buňka odumírá.

**3. Signalizace autokrinní.** Je to způsob signalizace, při které *stejná buňka je současně zdrojem signálu i jeho příjemcem*.

Existují ještě další způsoby signalizace, které se však netýkají (nebo to zatím nevíme) signalizace směřující k aktivaci transkripčních faktorů. Znovu zdůrazňujeme, že zde si všímáme jen těch signalizací, o kterých je zatím známo, že nějakým způsobem ovlivňují v konečné fázi aktivitu transkripčních faktorů.

**AMPLIFIKACE SIGNÁLU.** Mechanismus přenosu signálu ze *signalizu-*



Obr.288

## Schéma amplifikace signálu

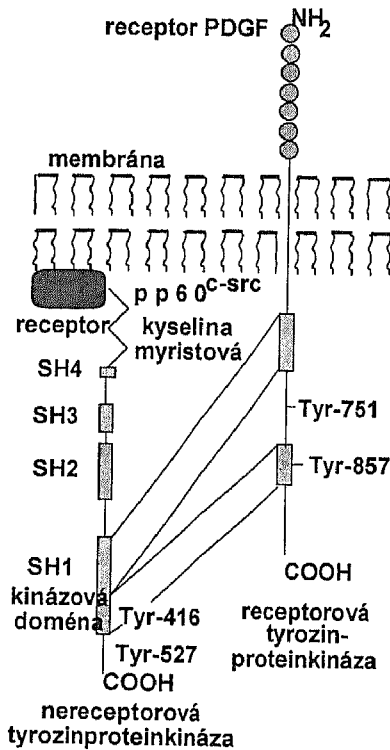
zu molekul druhých přenašečů (např. cAMP). Těmi se pak aktivují proteinkinázy, které zase katalyzují fosforylaci dalších atd. *Na každém kroku se signál zesiluje množstvím produkováných dalších signálních molekul.*

Dříve než přistoupíme k vysvětlování různých způsobů signalizace, je třeba se zmínit alespoň v přehledu v kapitolách 5.7.2 a 5.7.3 o enzymech, které katalyzují jednotlivé stupně signálních drah.

## 5.7.2

## Přehled proteinkináz uplatňujících se v signálních drahách

Přenos signálu se uskutečňuje přes kaskádu postupné enzymové aktivace



Obr. 290  
Schéma receptorových a nereceptorových proteinkináz fosforylujících tyrosin

c) nereceptorové Src-kinázy mají dále navíc **doménu SH4**, což je *konvenční sekvence na aminokyselinovém konci, kterou se vážou na myristovou (tetradekanovou) kyselinu*;

d) *myristylovaná nereceptorová tyrosinproteinkináza*, např. pp 60<sup>c-src</sup>, se váže ke svému receptoru v membráně (to není však receptor pro růstový faktor!!!).

Aktivace Src-tyrosinproteinkináz je regulována podle modelu vysvětleného na pp60<sup>c-src</sup> (obr. 291). Doména SH2 je vazebným místem pro specifické aminokyselinové sekvence obsahující fosforylovaný Tyr-527, tj. tyrosin v místě 527 aminokyselinové sekvence. Takové sekvence jsou součástí kinázové domény. V případě, že se Tyr-527 kinázové domény SH1 fosforyluje, naváže se tato doména na doménu SH2 a aktivní místo kinázy se tím zablokuje. Proto proteinkináza přestane být aktivní. Její aktivita se obnoví např. takto:

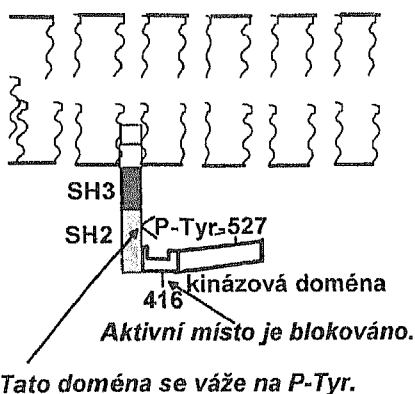
Doménou SH2 se může na Tyr-527 (dále fosforylovaný tyrosin) navázat též protein vyznačující se touto doménou (obr. 291). *Je-li aktivita takového proteinu regulována růstovým faktorem, pak aktivní*

*místo proteinkinázy se odblokuje v závislosti na koncentraci růstového faktoru. Takovým proteinem je GRB2-protein, který se váže doménou SH2 na fosforylovaný tyrosin RTK-receptoru a SH3-doménou na sos-protein (obr. 298, str. 462). Proteiny vyznačující se SH2-doménou, kterou se mohou vázat na fosforylovaný tyrosin RTK-receptoru a současně prostřednictvím SH3 k jinému proteinu, se označují jako adaptorové molekuly neboli též Shc-molekuly.*

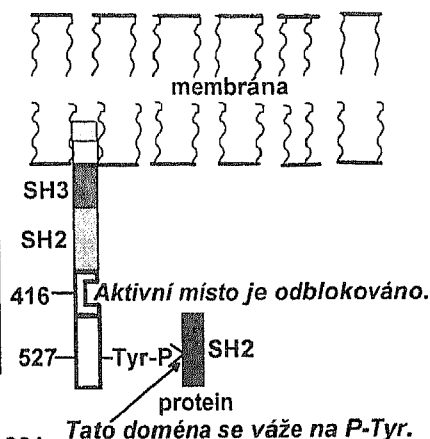
◆ **Proteinkinázy Janusovy rodiny** neboli **Jak-rodiny**. Do této rodiny patří proteinkinázy **Jak1**, **Jak2** a **Jak3**, dále **Tyk2**. Tyto proteinkinázy neobsahují ani SH2- ani SH3-doménu. Obsahují však doménu tyrosinkinázovou nebo podobnou tyrosinkinázové a jsou přímo aktivovány receptory pro interferon (IFN-receptory) a tyto receptory fosforylují, což vede k tomu, že se na fosforylované receptory mohou vázat STAT-proteiny (vysvětlení je na str. 466).

◆ **Proteinkinázy Syk-rodiny**. Patří sem proteinkinázy **Syk** a **ZAP-70**. Nejsou myristylované. Mají dvě SH2-domény.

V normálních buňkách je pp60<sup>c-src</sup> fosforylován na tyrozinu -527 a má velmi nízkou proteinkinázovou aktivitu nebo žádnou.



Protein, který se vyznačuje doménou SH2 se naváže na Tyr-527, a tím umožní odblokování aktivního místa vpp60<sup>c-src</sup>.



Obr. 291

Schéma aktivace nереceptorové proteinkinázy fosforylující tyrozin

Z dalších proteinkináz je třeba se zmínit o Abl-tyrozinproteinkináze, jejíž aktivita v buněčném cyklu je regulována Rb-proteinem.

**PROTEINKINÁZY AKTIVOVANÉ MITOGENY (MAP-PROTEINKINÁZY).** Označují se též jako ERK-proteinkinázy neboli proteinkinázy regulované extracelulárním signálem. Jako mitogeny se označují růstové faktory stimulující buňku k dělení. Tyto proteinkinázy fosforylují cílové proteiny na serinu/reoninu nebo současně na reoninu a tyrozinu. Patří sem:

1. MAPKKK-kinázakinázakinázy. Příkladem je Raf-proteinkináza (EC 2.7.1), která je přímo aktivována Ras.GTP-proteinem fosforylací na serinu a reoninu (obr. 308).

2. MAP-kinázakinázy (zkr. MAPKK, EC 2.7.1-). V sekvenci Thr-Glu-Tyr MAP-kináz (MAPK) katalyzují tyto proteinkinázy současně fosforylací reoninu a tyrozinu. Samy však jsou aktivovány na zbytcích serinu nebo reoninu. Tato aktivace se uskutečňuje MAPKKK-kinázakinázakinázami (např. Raf-proteinkinázou). Příkladem MAPKK je MAP/ERK-proteinkináza (MEK-proteinkináza).

3. MAP-kinázy (zkr. MAPK). Jsou to proteinkinázy aktivované fosforylací MAP-kinázakinázou v sekvenci Thr-Glu-Tyr na zbytcích reoninu a tyrozinu. Po své fosforylací migrují k transkripčním faktorům obsahujícím cílová místa pro fosforylací.

## 5.7.3

**Další enzymy uplatňující se v signálních drahách**

**ADENYLÁTCYKLÁZA (EC 4.6.1.1).** *Katalyzuje uvolnění difosfátu z ATP za tvorby cyklického adenosin-3',5'-monofosfátu (cAMP).*

**GUANYLÁTCYKLÁZA (EC 4.6.1.2).** *Katalyzuje za tvorby cyklického guanosin-3',5'-monofosfátu (cGMP) uvolnění difosfátu z GTP. Rozlišuje se:*

1. **Na plazmatickou membránu vázaná guanylátcykláza.** Je to *monomerní glykoprotein působící jako receptor, jehož ligandem je např. atriový natriuretický faktor (zkr. ANF).* Vazba tohoto ligandu (peptid) na receptor vede k fosforylaci a aktivaci guanylátcyklázy. Vytvořený cGMP ovlivňuje přes PKG vylučování  $\text{Na}^+$  a vody z ledvin a dilataci tepen.

2. **Rozpustná guanylátcykláza.** Je to heterodimer  $\alpha$ - a  $\beta$ -řetězců. Je aktivována vazbou NO na hem, který tvoří její prostetickou skupinu.

**cAMP-NEBO cGMP-FOSFODIESTERÁZA (zkr. PDE, EC 3.1.4.17).** Jsou to *enzymy, které katalyzují hydrolyzu cyklického nukleozid-3'5'-monofosfátu (cAMP nebo cGMP) na příslušný nukleozid-5'-monofosfát.* Jejich aktivita závisí na koncentraci cAMP (cGMP).

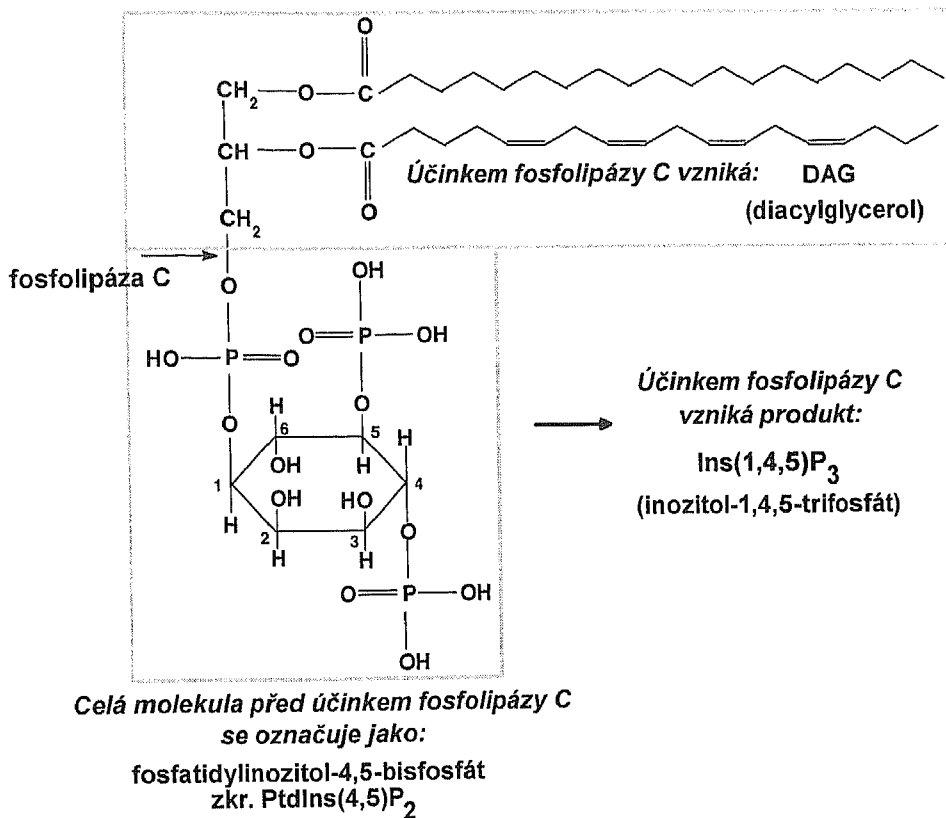
**FOSFOLIPÁZA C (zkr. PLC, EC 3.1.4.11).** Označuje se též jako **1-fosfatidylinozitol-4,5-bisfosfátfosfodiesteráza** a hydrolyzuje (obr. 292):

**fosfatidylinozitol-4,5-bisfosfát** neboli  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  na **inozitol-1,4,5-trifosfát** neboli  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  a **diacylglycerol** neboli DAG.

U savců bylo identifikováno 9 izoform PLC rozdělených do 4 skupin:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ . Z nich PLC ( $\beta$ ) je aktivována receptory spřaženými s  $G_q$ -proteiny. PLC ( $\gamma$ ) je aktivována přes svou SH2-doménu fosforylovanou receptorovou protein-kinázou.

**FOSFOLIPÁZA D (zkr. PLD, EC 3.1.4.4).** Štěpí vazbu mezi atomem fosforu glycerofosfolipidu a kyslíkem dusíkaté báze.

**FOSFATIDYLINOZITOL-3-FOSFATÁZA (zkr. 3-P, EC 3.1.3.64).** Kataly-



Obr. 292

Štěpení fosfatidylinozitol-4,5-bisfosfátu fosfolipázou C na Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> a DAG

zuje hydrolyzu 3-fosfátu z PtdIns(3)P, PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>, PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> za tvorby H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a podle povahy substrátu PtdIns, PtdIns(4)P nebo PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>.

### 1-FOSFATIDYLINOZITOL - 3 - KINÁZA, (zkr. PI (3) K, EC-2.7.1.137).

Existují tři typy tohoto enzymu, které katalyzují tyto fosforylace:

a) Fosfatidylinozitol (zkr. PtdIns) na

fosfatidylinozitol-3-fosfát (zkr. PtdIns(3)P).

b) Fosfatidylinozitol-4-fosfát (PtdIns(4)P) na

fosfatidylinozitol-3,4-bisfosfát (zkr. PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>)

c) Fosfatidylinozitol-4,5-bisfosfát (zkr. PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) na

fosfatidylinozitol-3,4,5-trifosfát (zkr. PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>).

Mimo jiné substráty PI (3) K může též fosforylovat fosfolipázu D (PLD).



## 5.7.4

## Extracelulární signály (signální molekuly) k aktivaci transkripčních faktorů

**HORMONY.** Pro přehled je rozdělíme dle chemické struktury:

**1. Hormony odvozené od aminokyselin.** Společným znakem všech těchto hormonů je rozpustnost ve vodě a jejich schopnost procházet plazmatickou membránou. Patří sem:

◆ **Adrenalin (epinefrin) a noradrenalin (norepinefrin).** Oba jsou produkovány dření nadledvinek a nazýváme je společným názvem **katecholaminy**. Nejvýrazněji ovlivňují oběhovou soustavu a zvyšují intenzitu metabolismu tvorbou tepla v kosterní svalovině.

◆ **Tyroxin.** Je produkován štítnou žlázou. Ovlivňuje zejména metabolismus.

**2. Hormony typu peptidů a proteinů.** Jsou také ve vodě rozpustné. Většinou je jejich uvolňování rychlé a rovněž jejich rozklad v krvi a tkáních je rychlý. Patří sem:

◆ **Inzulin.** Je produkován  $\beta$ -buňkami Langerhansových ostrůvků pankreatu. Reguluje v organismu tvorbu glykogenu, oxidaci glukózy ve tkáních, přeměnu glukózy na mastné kyseliny. Zvyšuje rychlost proliferace buněk a syntézu proteinů.

◆ **Glukagon.** Je vytvářen  $\alpha$ -buňkami Langerhansových ostrůvků pankreatu. Má hyperglykemický účinek. Je antagonistou inzulinu.

◆ **Parathormon.** Je hormonem příštítných tělísek. Je to poměrně jednoduchý polypeptid. Účastní se regulace vápníku v těle a ovlivňuje tubulární resorpci fosfátů v ledvinách.

### *Hormony neurohypofýzy*

◆ **Oxytocin.** Ovlivňuje myoepitelové buňky vystylající mléčnou žlázu a dělohu. Působí při tvorbě mléka a uvolňuje hladkou svalovinu porodních cest.

◆ **Vazopresin (adiuretin).** Vyznačuje se antidiuretickým a vazopresorickým účinkem.

### *Hormony adenohipofýzy (glandotropiny)*

◆ **Tyreotropní hormon.** Podporuje činnost štítné žlázy, zvyšuje uvolňování tyroxinu.

◆ **Adrenokortikotropní hormon (ACTH).** Je nezbytný k udržování normální stavby a funkce nadledvinek.

- ◆ **Somatotropní hormon.** Ovlivňuje intermediární metabolismus, podněcuje proteosyntézu a vyvolává pozitivní dusíkovou bilanci.
- ◆ **Folikulostimulační hormon.** U samců podmiňuje růst varlat a dozrávání spermií, u samic dozrávání Graafových folikulů.
- ◆ **Hormon stimulující intersticiální buňky (luteinizační hormon).** Má vliv na stimulaci sekrece testosteronu u samců a estrogeneru a progesteronu u samic.
- ◆ **Luteotropní hormon (prolaktin).** Jeho hlavním účinkem je stimulace laktace po porodu.
- ◆ **Lipotropin.** Složitý peptid, který je prekurzorem řady nižších peptidů, zejména endorfinů.

**3. Hormony odvozené od uhlovodíku norestranu (steroidní hormony).** Jsou rozpustné v tucích a patří sem zejména:

#### *Hormony pohlavní*

- ◆ **Testosteron.** Je to hormon samčích pohlavních žláz stimulující tvorbu spermií a formování sekundárních pohlavních znaků samců.
- ◆ **Estrogeny.** Jsou to hormony samičích pohlavních žláz ovlivňující růst a vývoj samičích pohlavních orgánů.
- ◆ **Gestageny.** Jsou také hormony samičích pohlavních žláz. Inhibují ovulaci a znemožňují další oplodnění. Nejvýznamnější z nich je **progesteron**.

#### *Hormony kůry nadledvinek*

- ◆ **Glukokortikoidy.** Regulují zejména intermediární metabolismus glycidů. Nejvýznamnější z nich je **kortizol** a **mineralokortikoidy** (např. **aldosteron**, který podporuje výměnu solí a vody v organizmu).

**4. Hormony tkáňové.** Jde o různorodé chemické sloučeniny (deriváty aminokyselin, mastných kyselin a peptidů), které jsou buď odevzdávány různými buňkami do krve, nebo působí v místě svého vzniku. Lze je rozdělit na:

- ◆ **Gastrointestinální hormony** (např. gastrin, sekretin, hepatokinin, cholecystokinin, vilikinin).
  - ◆ **Biogenní aminy** (serotonin, histamin).
  - ◆ **Angiotenziny, kininy, erythropoetin.** Vznikají z plazmatických globulinů působením specifických aminopeptidáz.
  - ◆ **Prostaglandiny.** Jsou to deriváty mastných kyselin s celou řadou účinků.
- Mezi hormony se též řadí:**
- ◆ **Vitamin D.** Tvoří se v kůži vlivem ozáření ultrafialovým světlem. Jeho

prekurzorem je 7-dehydrocholesterol (provitamin D<sub>3</sub>) v kůži. Je-li vystaven ultrafialovému světlu, lyzuje na inaktivní formu (provitamin D<sub>3</sub>), která se aktivuje hydroxylací v játrech a ledvinách na **kalcitriol** (1 $\alpha$ ,25-dihydroxycholecalciferol). Kalcitriol zodpovídá za regulaci příjmu Ca<sup>++</sup>-iontů ve střevech a ovlivňuje metabolismus Ca<sup>++</sup>-iontů v kostech.

◆ **Kyselina retinová.** Vzniká oxidací hydroxylové skupiny retinalu na karboxylovou skupinu. Vazba této molekuly k jejímu receptoru vede ke změně genové exprese. Je jedním z regulátorů embryogeneze.

**CYTOKINY.** Cytokiny jsou *proteiny, které jsou produkovány buňkami a vyznačují se především tím, že se jimi navozuje signalizace k zahájení nebo zastavení proliferace a diferenciaci buněk, jejich přežívání a uskutečňování různých funkcí.* Patří sem např.:

1. **Interleukiny.** Jsou to cytokiny produkované lymfocyty.

2. **Interferony.** Jsou to cytokiny indukující rezistenci buněk k virům.

3. **Nádorové nekrotické faktory.** Sem patří:

◆ **Nádorový nekrotický faktor  $\alpha$**  neboli TNF- $\alpha$ . Ve své aktivní formě je homotrimerem z podjednotek o 157 aminokyselinových zbytcích. Produkují jej makrofágy. Způsobuje nekrózu nádorů a je charakteristický též tím, že inhibuje dělení různých typů buněk.

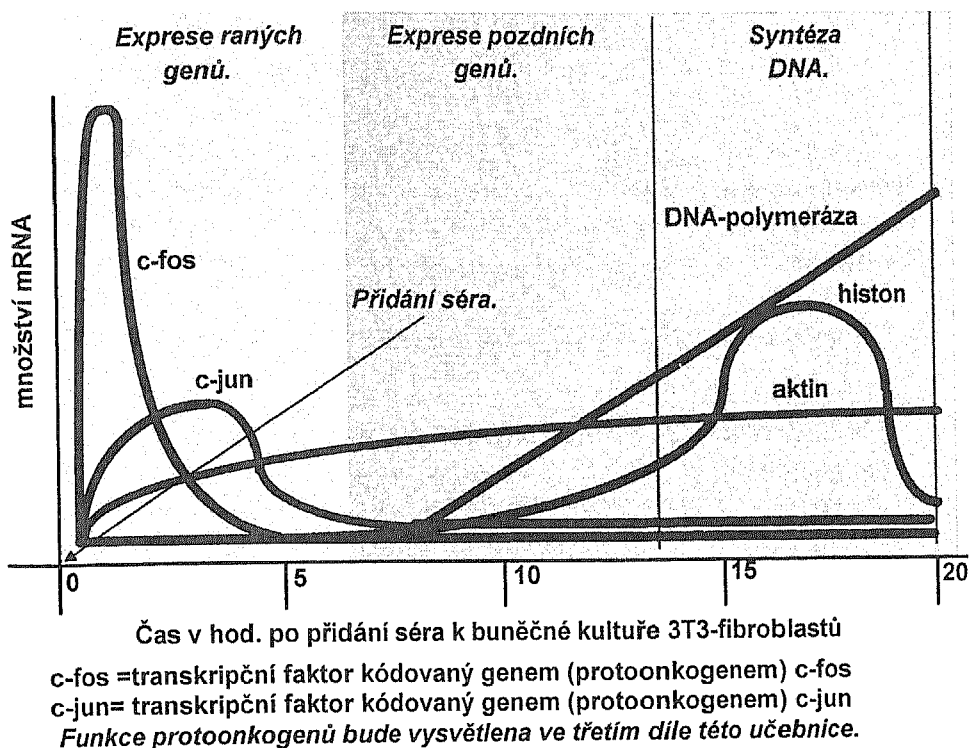
◆ **Nádorový nekrotický faktor  $\beta$**  neboli TNF- $\beta$ . Je příbuzný s předchozím faktorem, s nímž je spřažen i účinkem.

◆ **Nádorový nekrotický faktor  $\gamma$**  neboli TNF- $\gamma$ . Má podobný účinek jako TNF- $\alpha$  a vyznačuje se přímou inhibicí nádorových buněk.

4. **Růstové faktory.** Pokusy s tkáňovými buňkami ukazují, že normální buňky rostou pouze tehdy, když jsou k růstu stimulovány mnoha a rozličnými růstovými faktory. Růstové faktory tedy působí jako **mitogeny**, tj. *stimulují buňky k dělení*. Kromě toho *některé růstové faktory aktivují buňky k diferenciaci*. Přesný počet růstových faktorů zahrnutých do indukce dělení buněk není znám. Uvedeme z nich jen některé:

◆ **Růstový faktor pocházející z trombocytů neboli PDGF.** PDGF je důležitý mitogen epiteliálních buněk. Je to homodimer nebo heterodimer dvou řetězců,  $\alpha$  a  $\beta$ , které jsou příbuzné.  $\beta$ -řetězec je produktem protoonkogenu *c-sis*. Stimuluje endoteliální a epiteliální buňky k proliferaci kolem poraněných míst. Jeho produkce se zastaví, jakmile se tato místa zacelí.

◆ **Epidermální růstový faktor neboli EGF.** Je to protein o 53 aminokyselinách. Ze 40 % je s tímto faktorem homologický růstový faktor TGF $\alpha$ , který je mitogenní podobně jako EGF.



Obr. 293

## Exprese genů v buňkách 3T3 fibroblastů po přidání séra

- ◆ **Inzulinu podobné růstové faktory IGF-1 a IGF-2.** Hlavním zdrojem obou faktorů jsou jaterní buňky. Oba faktory jsou ze 40 % homologické s inzulinem a stimulují proliferaci většiny buněk.
- ◆ **Růstový faktor GM-CSF.** Je to růstový faktor, který stimuluje kolonie granulocytů a makrofágů.
- ◆ **Růstový faktor hepatocytů (GHF).** Stimuluje proliferaci jaterních buněk, keratinocytů aj.

Studium buněčných kultur ukázalo, že po přidání séra obsahujícího růstové faktory dochází v buňkách postupně k expresi asi stovky genů. Vazbou růstového faktoru na receptor se otevře podle povahy růstového faktoru a receptoru některá ze signálních drah směřujících do jádra buňky. Realizací této cesty přenosu signálu se nejdříve vyjadřují tzv. **rané geny** neboli **geny rané fáze exprese**, kterými jsou kódovány transkripční faktory. Potom dochází k expresi **pozdních genů** neboli genů **pozdní fáze exprese** kódujících proteiny cytoskeletu a jiných složek buňky. Nakonec se exprimují geny kódující replikační enzymy, histony aj. (obr. 293).

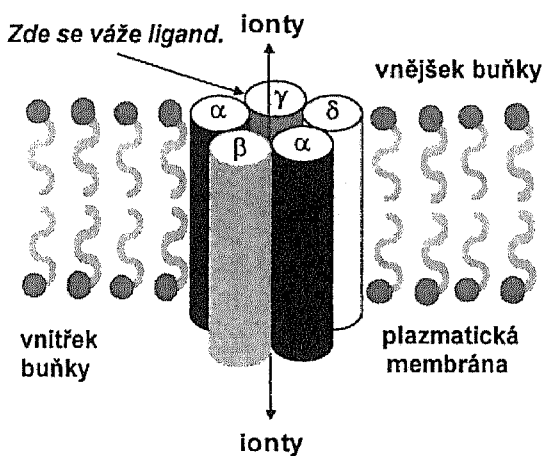
## 5.7.5

## Membránové receptory extracelulárních signálů

Má-li buňka odpovídat na signál, musí mít schopnost rozeznat signální molekulu. Rozeznání signálu se obvykle uskutečňuje **membránovým receptorem**. Tak se označuje *protein umístěný v plazmatické membráně, na který se může vázat signální molekula, která tento protein aktivuje k vyslání signálu do nitra buňky*.

V dalších odstavcích popíšeme základní typy membránových receptorů.

**RECEPTORY SPOJENÉ S IONTOVÝMI KANÁLY.** Jsou to oligomerní proteiny v plazmatické membráně, které tvoří iontový kanál regulovaný ligandem indukujícím otevírání nebo uzavírání kanálu, čímž se zabrání nebo umožní pohyb iontů a jiných malých molekul směrem do buňky nebo z buňky. Iontové kanály se otevírají:



Obr. 294  
Schéma receptoru spojeného  
s iontovým kanálem

kanál umožňující průchod iontů.

- ◆ jako odpověď na vazbu zvláštního ligandu (glutamat a kys  $\gamma$ -aminomáselná),
- ◆ jako odpověď neuronu na ty elektrické změny, které jsou spojeny s akčním potenciálem,
- ◆ jako odpověď na druhé přenašeče v buňce, tj.  $\text{Ca}^{++}$ -ionty, cAMP a  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ .

Na obr. 294 je uveden jeden z příkladů receptorů spojených s iontovými kanály. Vidíme, že je složen z pěti polypeptidů  $\alpha$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , které jsou stočeny do kruhu tak, že dutina uvnitř tvoří ka-

**RECEPTORY SPŘAŽENÉ S G-PROTEINY.** Vazba ligandu na receptory této třídy vede k aktivaci G-proteinu, který pak přenese informaci na další složku signální dráhy. **G-proteiny** jsou proteiny, které se aktivují vazbou GTP a přenášejí signály z receptoru na cílový protein. Nacházejí se v plazmatické

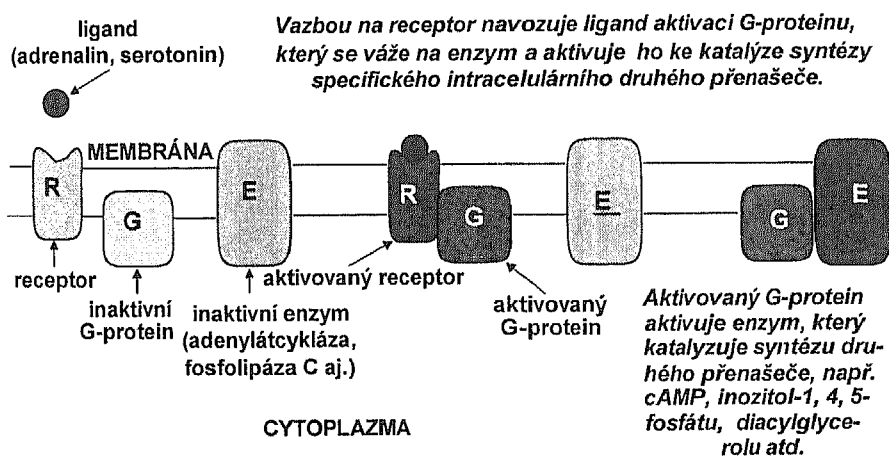
membráně. Ligandy mohou být tyto hormony: serotonin, epinefrin, glukagon, tyrotropin, kalcitonin atd., nikoli však steroidní hormony. V prvním přiblížení si můžeme přenos signálu uskutečňovaný G-proteiny představit podle zjednodušeného schématu na obr. 295.

Aktivovaný enzym, např. adenylátcykláza, katalyzuje syntézu druhého přenašeče signálu, kterým je v tomto případě cAMP. Jeho aktivita může však být pod účinkem různých peptidových hormonů stimulována nebo inhibována. Např. epinefrin, glukagon a ACTH stimulují aktivitu adenylátcyklázy, zatímco prostaglandiny ji inhibují. Receptory, na něž se vážou hormony, které mají inhibiční účinek, interagují s inhibičním G-proteinem neboli  $G_i$ -proteinem, což je protein s inhibičním účinkem. Na druhé straně receptory pro hormony se stimulačním účinkem interagují se stimulačním G-proteinem neboli  $G_s$ -proteinem. Oba proteiny se liší jen podjednotkou  $\alpha$  (obr. 296).

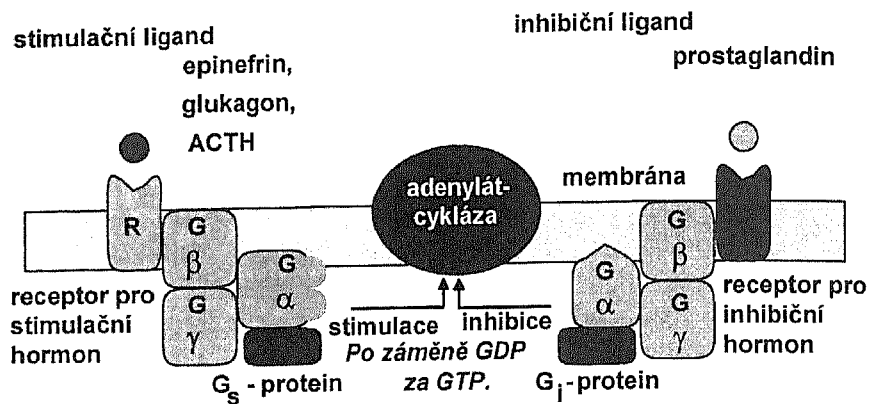
Na obr. 297a je uvedeno schéma receptoru spřaženého s G-proteiny. Tento receptor tvoří polypeptidový řetězec, který obsahuje sedm hydrofobních  $\alpha$ -helixů lokalizovaných v plazmatické membráně. Každý helix sestává z 22-24 aminokyselinových zbytků. Receptor se aktivuje vazbou ligandu.

G-proteiny se rozdělují podle počtu podjednotek, z nichž sestávají, do dvou tříd. Jsou to:

**1. Trimerní G-proteiny.** Tyto G-proteiny se skládají ze tří podjednotek:  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ . Po přijetí signálu z vnějška buňky se G-protein aktivuje na  $\alpha$ -podjednotce. Aktivovaná  $\alpha$ -podjednotka G-proteinu reguluje aktivitu specifických cílových proteinů (adenylátcyklázy, fosfolipázy C, cGMP-dependentní fosfodiesterázy). Průběh konverze G-proteinů ze stavu inaktivního ve stav aktivní a naopak lze podle obr. 297b popsat takto:



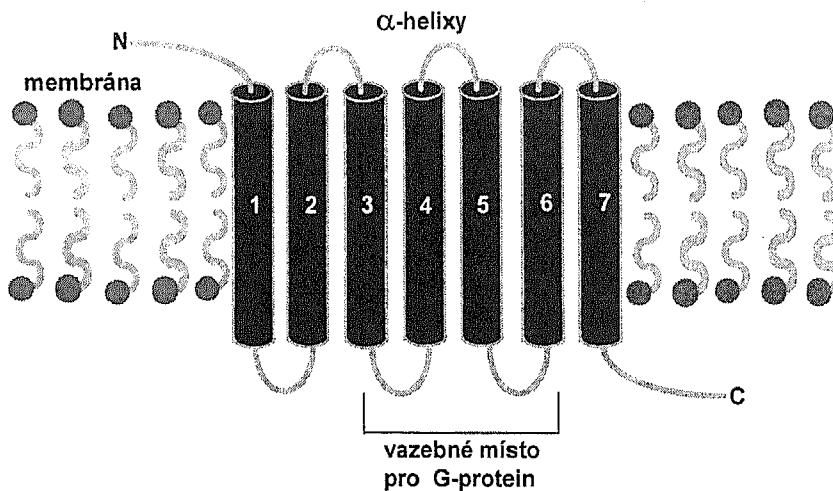
Obr. 295  
Přenos signálu G-proteiny



Obr. 296

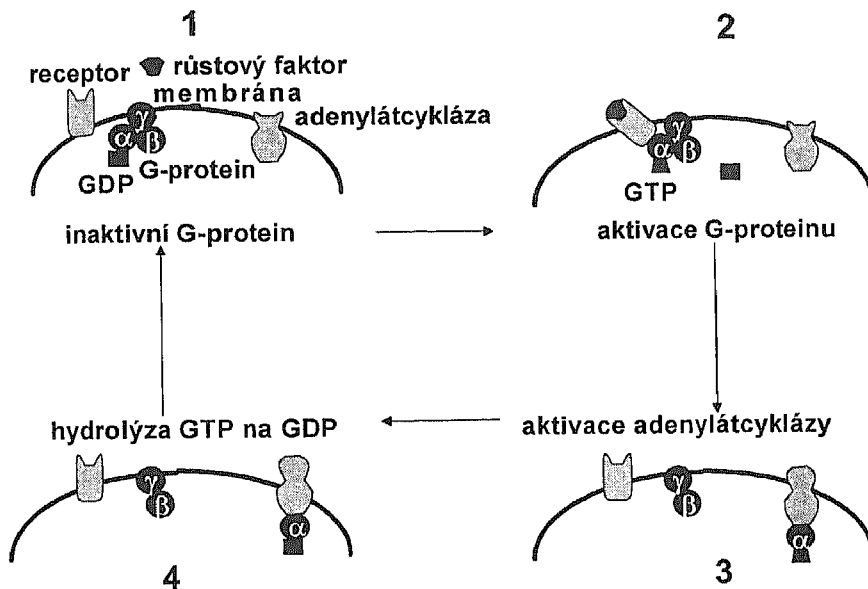
### Účinek $G_s$ -proteinů a $G_i$ -proteinů na aktivitu adenylylcyklázy

1. V inaktivním stavu, tj. kdy se na receptor neváže růstový faktor, se na  $\alpha$ -protomer váže GDP a G-protein nemá žádný kontakt s receptorem.
2. Vazba ligandu na receptor způsobí, že se GDP vymění za GTP, kterým je G-protein aktivován.
3. G-protein pak disociuje a  $\alpha$ -protomer vázaný na GTP (viz první krok) se spojí s adenylylcyklázou, kterou tímto aktivuje.
4. V poslední fázi se vlivem GTP-ázové aktivity  $\alpha$ -protomeru za několik



Obr. 297a

### Schéma receptoru spřaženého s G-proteiny



Obr. 297b  
Schéma konverze trimerního G-proteinu  
ze stavu inaktivního ve stav aktivní

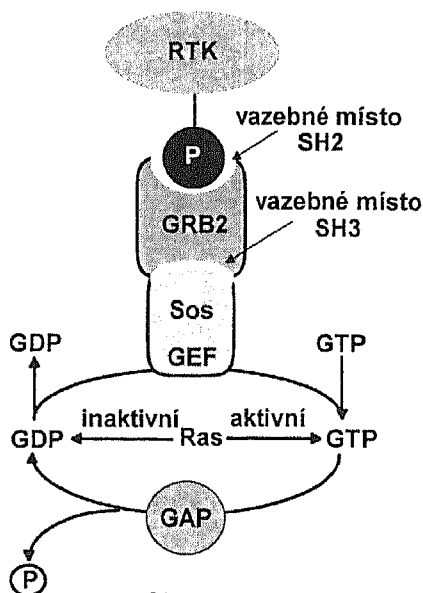
sekund zhydrolyzuje GTP na GDP a spojí se opět s protomery  $\beta$  a  $\gamma$ , což je návrat G-proteinu do inaktivního stavu.

Existuje více než 20 různých typů  $\alpha$ -podjednotek a také mnoho typů  $\beta$ - a  $\gamma$ -podjednotek G-proteinů identifikovaných u savců. Tyto podjednotky mohou potenciálně tvořit několik set kombinací v trimeru ( $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ ) představujícím G-protein. Celkem se třídí do čtyřech rodin, z nichž dvě jsou  $G_s$  a  $G_i$ .

**2. Monomerní G-proteiny.** Jejich molekula sestává jen z jednoho polypeptidu. Všechny proteiny této třídy se vyznačují GTPázovou aktivitou. Jsou inaktivní, váže-li se na ně GDP a aktivní, váže-li se na ně GTP. Do této třídy G-proteinů patří Ras-proteiny, jejichž významným reprezentantem je protein p21<sup>ras</sup>, který je kódován genem *c-ras*. Na tomto Ras-proteinu si vysvětlíme, jakým mechanismem se aktivují monomerní G-proteiny.

Standardní Ras-protein se cyklicky vrací z inaktivní (GDP-vázané) do aktivní (GTP-vázané) formy. Signál k těmto výměnám dává protein GRB2. Tento signál je převzat GRB2- proteinem z aktivního RTK-receptoru (obr. 298), jehož tyrozinproteinkináza se autofosforylovala na tyrozinu. GRB2 (vznačující se specifickou doménou SH2) se může navázat na místo obsahující fosforylovaný tyrozin. Druhou doménou (doména SH3) se váže na Sos-protein, který působí jako faktor vyměňující guaninový nukleotid neboli GEF-faktor, tj. faktor stimulující výměnu GDP za GTP v Ras-proteinu, a tím ten-





Obr. 298

Schéma aktivace a inaktivace Ras-proteinu v závislosti na Sos-proteinu a GAP-proteinu

to protein aktivuje. Přechod z aktivní formy do inaktivní je umožněn proteinem označovaným jako **protein aktivující GTPázu** neboli **GAP-protein**. Přesněji řečeno je to *protein, který aktivuje hydrolyzu GTP vázaného na určitých monomerních proteinech, např. na p21<sup>Ras</sup>*. Tím se Ras-protein inaktivuje (obr. 298). (Některé Ras-proteiny nepotřebují k aktivaci hydrolyzy tento protein).

### TYROZINPROTEINKINÁZOVÉ RECEPTORY (RTK-RECEPTORY).

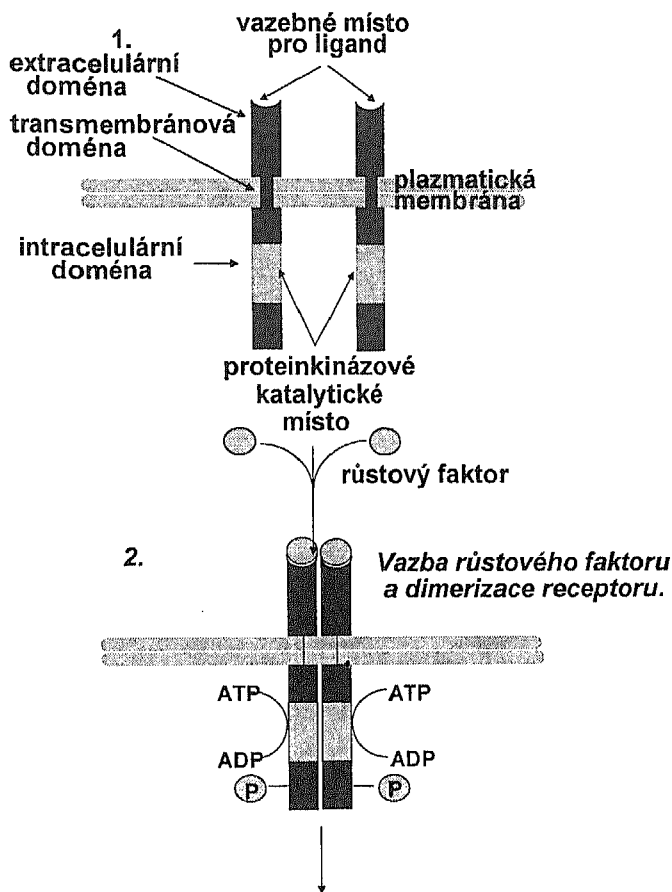
Tyto receptory se vyznačují enzymovou aktivitou tyrozinproteinkinázy, která je regulována jejich ligandy. Každý tyrozinproteinkinázový receptor sestává ze tří domén (obr. 299a):

- ◆ **extracelulární doména**, která je značně glykozylovaná a váže se na ni růstový faktor, např. EGF, PDGF, CSF-1;
- ◆ **transmembránová doména**, která je krátká a hydrofobní;
- ◆ **intracelulární (cytoplazmatická) doména**, která se vyznačuje protein-kinázovou aktivitou.

*Receptor jako celek má alosterické vlastnosti.*

Aktivace RTK-receptoru probíhá v těchto krocích (obr. 299a, 299b):

1. Nejdříve se růstový faktor naváže na vazebné místo v extracelulární části receptoru.



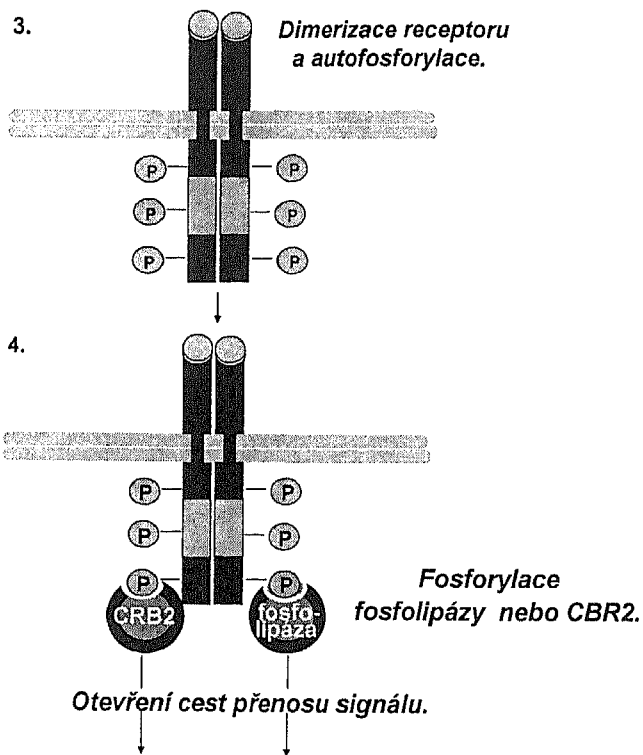
Obr. 299a  
Aktivace tyrozinproteinkinázových receptorů

2. Po vazbě ligandu mění receptor svou konformaci, která se projeví jeho dimerizací, jež je podstatou jeho aktivace.

3. Tyrozinproteinkináza každého monomeru v receptorovém dimeru pak fosforyluje na tyrozinu svého monomerního partnera. Tento jev se označuje jako **autofosforylace**, neboť probíhá autokatalyticky uvnitř téhož dimeru představujícího aktivovaný tyrozinproteinkinázový receptor, který sám je nositelem kinázové aktivity a substrátem pro fosforylaci.

4. Fosforylované zbytky tyrozinu pak působí jako vazebná místa pro různé intracelulární proteiny obsahující SH2-domény. Fosforylace těchto proteinů, mezi něž patří GRB2-protein a fosfolipáza, otevírá cestu např. k přenosu signálu prostřednictvím Ras-proteinu nebo proteinkinázy C.

Celkově bylo popsáno asi 50 RTK-receptorů. Rozdělují se do 14 rodin

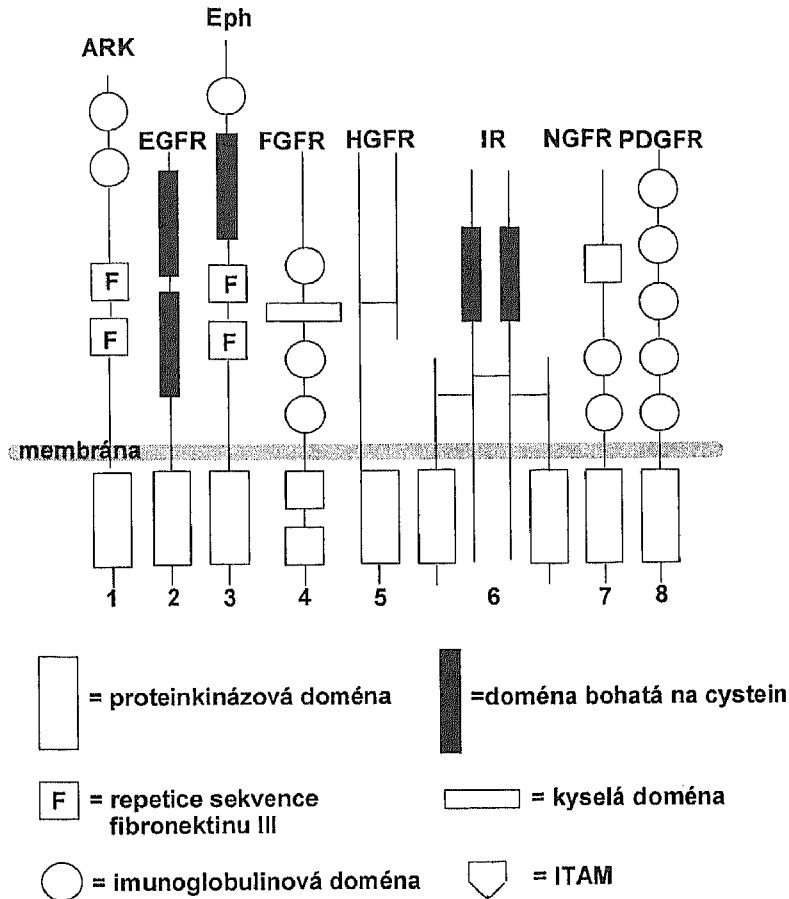


Obr. 299b  
Pokračování obr. 299a

podle strukturálních motivů v extracelulárních doménách. Na obr. 300a jsou pro představu čtenáře uvedena schémata vybraných proteinkinázových receptorů a na obr. 300b je uvedeno schéma imunoglobulinového receptoru jako příkladu receptoru s přidruženou tyrozinproteinkinázovou aktivitou (viz dále).

**RECEPTORY S PŘIDRUŽENOU TYROZINPROTEINKINÁZOVOU AKTIVITOU.** Jsou to *receptory, které sice nemají intracelulární tyrozinproteinkinázovou doménu, ale po vazbě ligandu se dimerizují a aktivují nereceptorové tyrozinproteinkinázy vyskytující se normálně v cytoplazmě nebo vázané na membránu* (str. 449). Jsou to především **receptory pro cytokiny** a **receptory pro antigeny**. Receptory pro antigeny, tedy TCR-receptory a BCR-receptory, probereme zvlášť na obr. 351 a 361. **Cytokinové receptory** se klasifikují do těchto dvou tříd:

**1. Receptory první třídy** zahrnují receptory pro cytokin (erythropoetin, GM-CSF, GHF, interleukiny IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7) a tři obecně se vyskytující receptory gp130,  $\beta c$  a  $\gamma c$ .



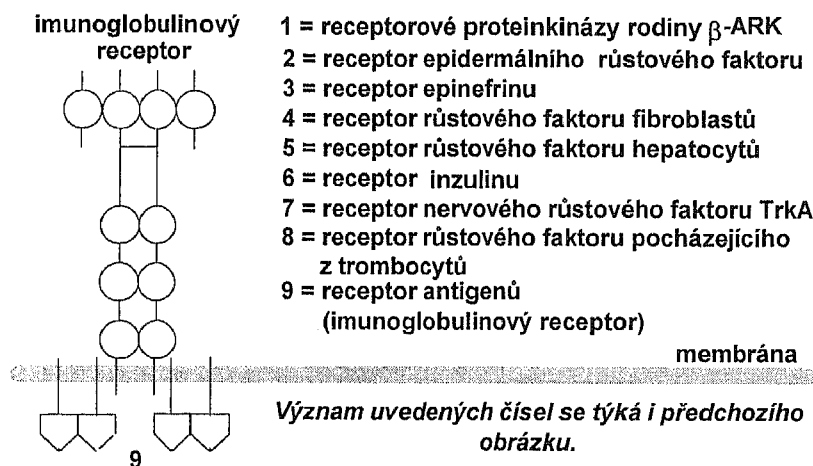
Obr. 300a

Schématu vybraných RTK-receptorů a receptorů s přidruženou tyrozinproteinkinázovou aktivitou

## 2. Receptory druhé třídy zahrnující receptory pro interferony a IL-10.

Ve většině případů jsou tyto receptory monomerní. Teprve vazbou ligandu se indukuje jejich dimerizace. Dimerizované receptory mohou vázat cytoplazmatické tyrozinproteinkinázy, které se pak samy fosforylují (autofosforylace), a také fosforylují receptor. *Mnohé receptory s přidruženou tyrozinproteinkinázovou aktivitou se sdružují s Src-rodinou tyrozinproteinkináz nebo s Jak-tyrozinproteinkinázami* (str. 449, 450). Celkově lze receptory s přidruženou tyrozinproteinkinázovou aktivitou charakterizovat těmito znaky:

- ◆ Na receptory, které byly fosforylovány Src-rodinou tyrozinproteinkináz, se může navázat svou SH2-doménou adaptorová molekula Shc. Tím se dosáhne toho, že přes tuto molekulu se receptor propojí s proteinem GRB2/Sos, neboť



Obr. 300b

Pokračování obr. 300a

adaptorová molekula se s tímto proteinem může spojit. Protein GRB2/Sos je pak výchozí molekulou pro uskutečnění signální dráhy charakteristické kaskádou MAP-kináz (str. 476, obr. 308).

◆ Receptory, které se sdružují s Jak-tyrozinproteinkinázami, jsou aktivovány např. prolaktinem, erythropoetinem, řadou interleukinů a interferonů. Po jejich dimerizaci je fosforylují Jak-tyrozinproteinkinázy. Na fosforylované receptory se pak prostřednictvím své SH2-domény vážou **STAT-proteiny** neboli **přenašeče signálu a aktivátory transkripce** (mají jednu SH2-doménu). STAT-proteiny jsou pak také fosforylovány Jak-proteinkinázami. Kontaktem zbytků Tyr-P s SH2-doménami STAT-proteinů dochází k homo- nebo heterodimerizaci receptorů. Jakmile se pak STAT-proteiny z receptoru uvolní, *přemístí se do jádra buňky, kde přímo aktivují transkripce*. STAT- proteinů bylo zatím zjištěno celkem šest.

◆ Imunoglobulinové receptory (receptory pro antigeny) obsahují **aktivační tyrozinový motiv imunoreceptoru** neboli **ITAM**, který interaguje a aktivuje cytoplazmatickou tyrozinproteinkinázu (str. 564, obr. 375a). Z mnoha nereceptorových tyrozinproteinkináz působí **Lck**, **Fyn** a **Zap** při přenosu signálu z receptoru TCR (receptor T-lymfocytů), kdežto **Blk**, **Lyn**, **Syk** a členové rodiny **Tec** působí při přenosu signálu z BCR-receptoru (receptor B-lymfocytů).

## 5.7.6

### Intracelulární receptory extracelulárních signálů

Jsou to receptory steroidních hormonů, tyroxinu, retinové kyseliny a vitamínu D. Je nutno zdůraznit, že receptory těchto hormonů nejsou součástí membrány buňky, ale *vyskytují se buď v jádře buňky, nebo v cytoplazmě*. Existují tedy dvě skupiny těchto receptorů:

**1. Receptory steroidních hormonů**, tj. receptory pro **estrogeny** (např. estradiol), **gestageny** (např. progesteron), **glukokortikoidy** (např. kortizol), **testosteron**, **ekdyzon** a **mineralokortikoidy**. *Tyto receptory se vyskytují v cytoplazmě.*

**2. Receptory pro tyroxin, vitamin D a retinovou kyselinu.** *Tyto receptory se vyskytují v jádře, kde jsou vázány na chromatin.*

Každý hormonový receptor má několik funkčních domén. Jsou to:

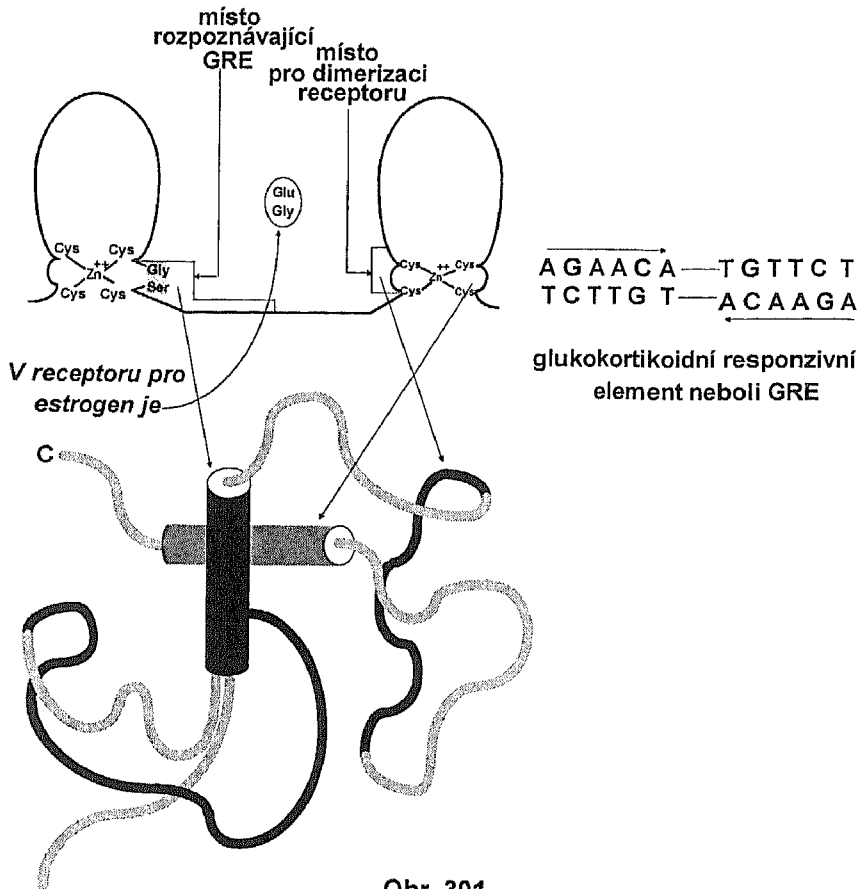
- ◆ **Aktivační doména.** Aktivuje řadu cílových genů tím, že reaguje s jedním TAF-proteinem (TAF30), který je složkou TFIID. Váže se na ni též transkripční faktor TFIIB.
- ◆ **DNA-vazebná doména**, tj. doména, kterou se receptor váže k responzivnímu elementu na DNA.
- ◆ **Doména pro dimerizaci receptoru.** Receptor je totiž plně aktivní, když se dimerizuje s další molekulou receptoru.
- ◆ **Doména pro vazbu hormonu.** Na tuto doménu se váže ligand (hormon).

Domény, kterými se intracelulární receptory hormonů vážou k hormonové responzivní oblasti zesilovačů transkripce nebo promotoru, jsou sestaveny ze dvou zinkových prstů, které mají jiné složení, než jak bylo uvedeno na str. 118, obr. 95 a 96. Jsou předně složeny ze zinkových prstů, z nichž každý se vyznačuje antiparalelní  $\beta$ -strukturou a  $\alpha$ -helixem. *Zinkový ion však není vázán na dva zbytky cysteinu a histidinu, ale na čtyři zbytky cysteinu.* Odlišnosti jsou i v základní sekvenci prstu. Receptor aktivovaný hormonem (glukokortikoid) se váže pomocí dvou aminokyselin prvního prstu na **GRE (glukokortikoidní responzivní element)**, který je součástí zesilovače transkripce. Na druhém prstu je místo, kterým se rozeznává druhá molekula receptoru, s níž receptor aktivovaný hormonem dimerizuje (obr. 301). *Teprve dimer je aktivní.*

Receptor pro estrogen se liší od receptoru pro glukokortikoid hlavně poznávacím místem pro responzivní element. Celkově se receptory hormonů rozdělují na dvě skupiny:

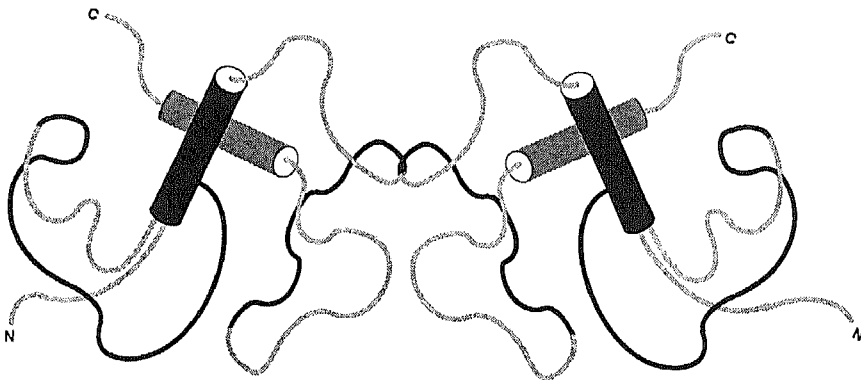
**1. Receptory hormonu tvořící homodimery.** Sem patří receptory pro steroidní hormony (obr. 302).

**2. Receptory hormonu tvořící heterodimery.** Sem patří receptor tyroxinu, vitamínu D a retinové kyseliny. Receptor pro tyroxin tvoří heterodimer s receptorem pro kys. retinovou. Důležitým faktorem aktivace těchto receptorů je fosforylace jako u receptorů steroidních hormonů.



Obr. 301

N Schéma zinkových prstů receptoru pro glukokortikoid



Obr. 302

Zjednodušená představa dimeru receptoru steroidního hormonu

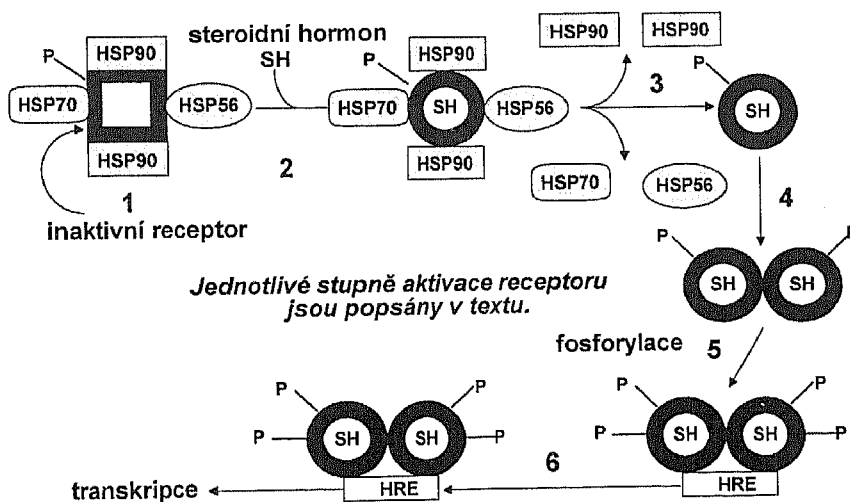
Touto kapitolou končíme s popisem základních složek signálních drah savčí buňky. V dalších kapitolách se zaměříme na výklad signálních drah (signalizací), v rámci kterých jde o přenos signálu k aktivaci transkripčních faktorů (a tím i transkripce) v jádře buňky. Počáteční signál je u těchto drah vždy extracelulární. Intracelulární signalizaci navozuje tím, že buď projde membránovým receptorem, nebo je přímo přijat receptorem intracelulárním.

### 5.7.7

## Přenos extracelulárního signálu přes intracelulární receptor

**AKTIVACE RECEPTORU STEROIDNÍHO HORMONU.** Aktivace receptoru steroidního hormonu probíhá v několika krocích (obr. 303, 304):

1. Receptor je původně neaktivní, jelikož se na něj vážou **proteiny indukovatelné vyšší teplotou**, tj. proteiny HSP 70, HSP 56 a HSP 90. Tyto proteiny inhibují aktivitu receptoru.
2. Receptor se konformačně mění po vazbě hormonu (progesteron, glukokortikoid a jiné steroidní hormony).
3. Vlivem hormonu se uvolní všechny proteiny HSP.
4. Molekuly konformačně změněných receptorů dimerizují.
5. Dimery se vážou k responzivnímu elementu pro receptor steroidního



Obr. 303

Aktivace receptoru steroidního hormonu

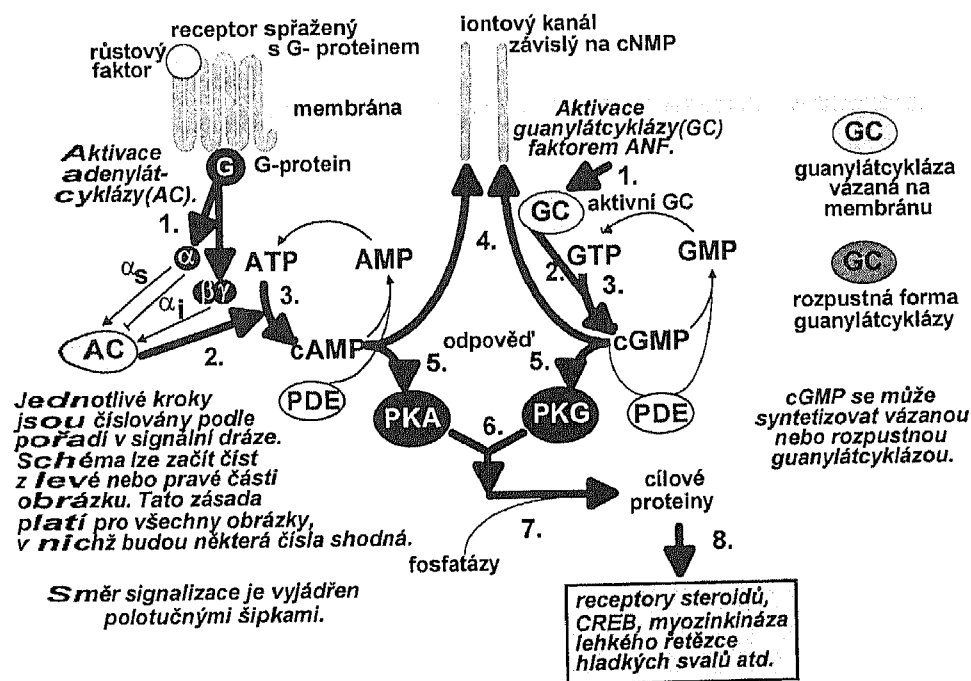


omplex s HSP-proteiny. Na rozdíl od receptorů steroidních hormonů se vyskytují v jádře, kde jsou vázány na DNA. Vazba k DNA je zprostředkována aminokyseliny, které tvoří zinkové prsty. Po vazbě receptoru k hormonu aktivuje vytvořený komplex hormonu s receptorem pozitivně transkripci genů, na jejichž promotory se váže.

## 5.7.8

### Přenos extracelulárního signálu přes membránový receptor

**SIGNALIZACE PROSTŘEDNICTVÍM cAMP A cGMP.** Tato dráha začíná od receptoru spřaženého s G-proteiny a od receptoru tvořeného guanylátcyklázou (některé membránové receptory se totiž vyznačují guanylátcyklázovou aktivitou). Schéma této dráhy je na obr. 305. Ve schématu se předpokládá, že adenylátcykláza je již aktivní a katalyzuje proto syntézu cAMP (str. 459), t.j. jednoho z nejdůležitějších druhů přenašečů. Podobně předpokládáme, že též guanylátcykláza (v rozpustné formě nebo jako receptor) je aktivní a katalyzuje



Obr. 305

Schéma signalizace prostřednictvím cAMP a cGMP

syntézu cGMP. Druhými přenašeči se aktivuje PKA a PKG, kterými jsou fosforylovány a aktivovány substráty (většinou cílové proteiny). Jsou to v případě PKA např.:

- ◆ **Receptory steroidů** působící jako transkripční faktory.
- ◆ **Transkripční faktor CREB**, který se váže na responzivní element CRE promotoru genu *c-fos*.
- ◆ **Myozinkináza lehkého řetězce hladkých svalů (EC 2.7.1.117)**, která katalyzuje fosforylaci lehkého řetězce myozinu.

Aktivace PKG má např. tento důsledek:

1. Stimuluje  $\text{Ca}^{++}$ -iontové kanály k takovým koncentracím  $\text{Ca}^{++}$ , při nichž dochází k uvolnění svalů a k rozšíření cév.
2. Udržuje  $\text{Na}^{+}$ -kanály otevřené, což vede k sekreci  $\text{Na}^{+}$ , vody i k neurologickým účinkům.

Účinek PKA a PKG se zastaví hydrolytickým působením PDE na cAMP a na cGMP (str. 452).

**SIGNALIZACE PROSTŘEDNICTVÍM INOZITOL 1,4,5-TRIFOSFÁTU A DIACYLGLYCEROLU.** Jeden z klíčových přenosů signálu probíhá na plazmatické membráně a zahrnuje rozklad některých lipidů. Zhruba 2 až 8% lipidů eukaryotických plazmatických membrán tvoří lipidy, které obsahují inozitol.

Tato dráha se odvíjí aktivací PLC( $\beta$ ) receptorem spřaženým s  $G_q$ -proteinem a aktivací PLC( $\gamma$ ) RTK-receptorem. Aktivní fosfolipázy PLC( $\beta$ ) a PLC( $\gamma$ ) hydrolyzují  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  na produkty (obr. 292, 306):

- ◆ **inozitol-1,4,5-trifosfát (zkr.  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ),**
- ◆ **diacylglycerol (zkr. DAG).**

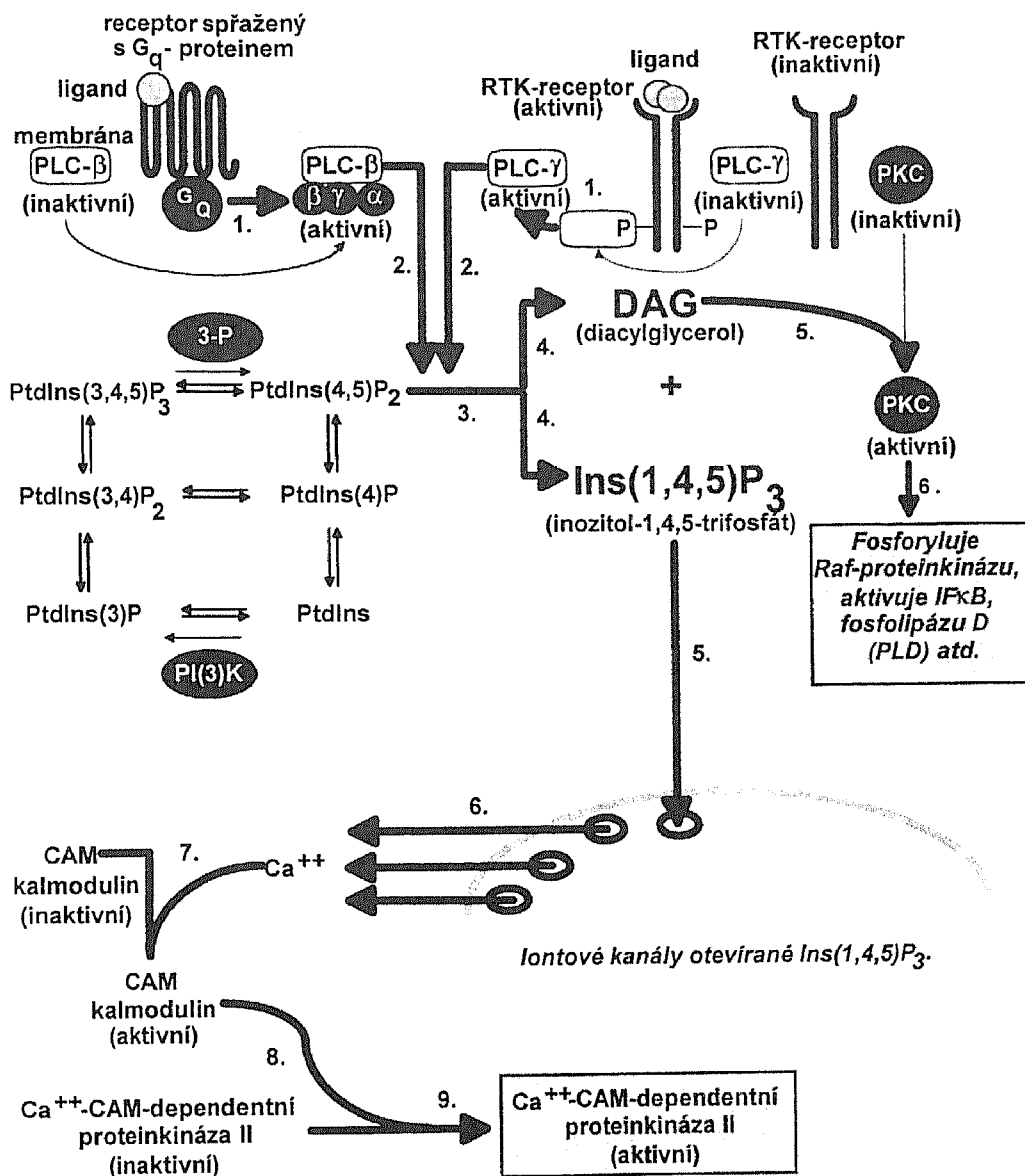
Tím se značně zesílí signál, jelikož jedna aktivovaná molekula PLC vede k produkci mnoha molekul  $\text{InsP}_3$  a DAG. Jejich význam spočívá v tom, že:

1.  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  aktivuje  $\text{Ca}^{++}$ -iontové kanály endoplazmatického retikula k uvolňování iontů  $\text{Ca}^{++}$  z endoplazmatického retikula do cytoplazmy.  $\text{Ca}^{++}$  se také váže na kalmodulin, který pak aktivuje řadu substrátů, zejména  $\text{Ca}^{++}$ /kalmodulin-dependentní proteinkinázu II ( $\text{Ca}^{++}$ -CAM-dependentní proteinkinázu II) (str. 449).

2. DAG aktivuje různé izoformy proteinkinázy C, a také PI(3)K neboli fosfatidylinozitol-3-kinázu.

Produkty fosforylace podléhají podle obr. 306 defosforylaci specifickou fosfatázou označovanou jako 3-P, tj. fosfatidylinozitol-3-fosfatáza (str. 452).

*Reakce fosforylace a defosforylace  $\text{PtdIns}$  se jeví jako cyklus, který je re-*



Obr. 306

Schéma signalizace prostřednictvím inozitol-1,4,5-trifosfátu a diacylglycerolu

gulován aktuální aktivitou fosfolipázy C (PLC), fosfoinozitol-3-kinázy (PI(3)K) a specifických fosfatáz.

Vraťme se však ještě k významu Ca<sup>2+</sup>-iontů. Tyto ionty jsou neobvyklé signální molekuly v tom, že se ani nesyntetizují ani nerozkládají. Signál přichá-

zí z náhlé změny jejich distribuce. Buňky často spotřebovávají značné množství energie pro aktivní odstranění  $\text{Ca}^{++}$ -iontů tím, že využívají v plazmatické membráně pumpy, které udržují gradient (spád) s intracelulární koncentrací  $\text{Ca}^{++}$ -iontů nižší než  $10^{-7}$  mol/l a extracelulární koncentraci v oblasti kolem  $2 \times 10^{-3}$  mol/l. Pumpy v endoplazmatickém retikulu, v sarkoplazmatickém retikulu a v mitochondriích vedou k vyloučení  $\text{Ca}^{++}$ -iontů do intracelulárních rezerv. Signál vznikne tehdy, když cytoplazmatická koncentrace  $\text{Ca}^{++}$  se náhle zvýší, často uvolněním  $\text{Ca}^{++}$  z intracelulárních rezerv, což se obvykle zprostředkuje přítomností  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  vznikajícího rozkladem lipidů v plazmatické membráně, což je děj, který je přísně regulován.

Nejen však aktuální přítomnost  $\text{Ca}^{++}$ -iontů je signalizující! Signalizující je též přítomnost proteinů vázajících tyto ionty. Je to především kalmodulin. Kalmodulin je protein se čtyřmi vazebnými místy pro  $\text{Ca}^{++}$ , který po vazbě těchto iontů aktivuje různé enzymy, především však kalmodulin-dependentní serin/treoninproteinkinázy (str. 449).

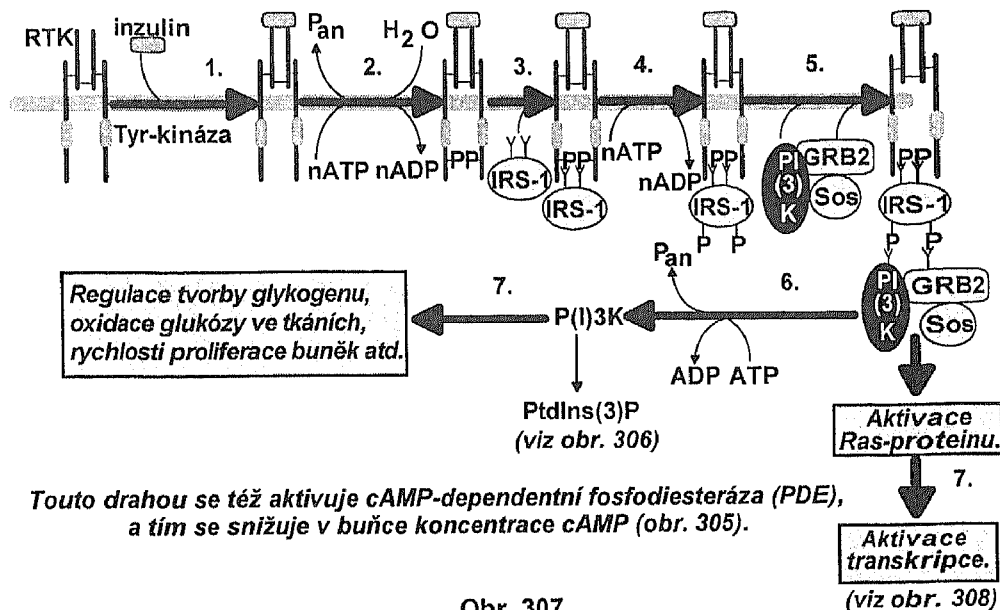
**PŘENOS SIGNÁLU PŘES INZULINOVÝ RECEPTOR.** Receptor inzulinu je tyrozinproteinkinázový (obr. 300a, č. 6). Vazba inzulinu způsobí, že se receptor aktivuje autofosforylací na zbytcích tyrozinu. To má dva důsledky (obr. 307):

1. Aktivovaný receptor fosforyluje buněčné proteiny.
2. Receptor zůstává aktivní, dokud se nedefosforyluje fosfatázou.

Předpokládá se, že fosfatáza katalyzuje defosforylaci proteinů fosforylovaných aktivovaným inzulinovým receptorem. Klíčovou úlohu však má protein označovaný jako **substrát 1 inzulinového receptoru** neboli **protein IRS-1**, který je fosforylován na více místech obsazených tyrozinem. Touto fosforylací se IRS-1 aktivuje, tj. může pak fosfotyrozinovými zbytky reagovat s SH2-doménou GRB2-proteinu, na který je vázán Sos-protein. Jak víme, GRB2 má také SH3-doménu, kterou se váže na Sos-protein. Tím se tento protein aktivuje. To se pak projeví uvolněním GDP z Ras-proteinu, což je monomerní G-protein (str. 461). Na Ras-protein se naváže GTP neboli dojde k aktivaci Ras-proteinu. Tím se vytvoří předpoklad pro fosforylaci Raf-proteinkinázy (MPKKK) a otevření dráhy přes kaskádu MAP-proteinkináz až k aktivaci transkripce (obr. 308).

IRS-1 se však váže také na SH2-doménu enzymu  $\text{PI}(3)\text{K}$ , kterou tím aktivuje k fosforylaci  $\text{PtdIns}$  na  $\text{PtdIns}(3)\text{P}$  (obr. 306).

**SCHÉMA KASKÁDY MAP-PROTEINKINÁZ.** Předpokládejme, že se uskutečnila aktivace tyrozinproteinkinázového receptoru ligandem, např. růstovým faktorem EGF. Na aktivovaný receptor se nyní mohou navázat, a to na fosforylované zbytky tyrozinu, fosfolipáza C ( $\gamma$ ) a GRB2-protein (obr. 299a,



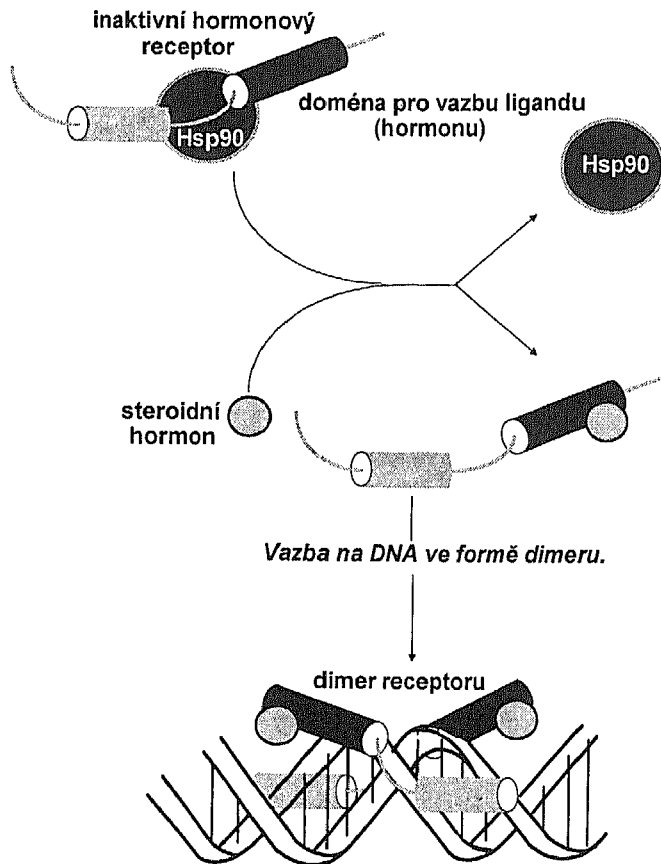
299b, 298). Jak fosfolipáza C, tak i GRB2-protein se tímto způsobem aktivují. To má tyto důsledky:

1. Aktivací fosfolipázy C se otevře signální dráha směřující k tvorbě  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  a DAG (obr. 306).

2. Aktivovaným GRB2-proteinem se aktivuje Ras-protein, jak jsme již popsali u signální dráhy otevřené aktivací inzulínového receptoru (obr. 307, obr. 298). Ras-proteinem se fosforyluje Raf-proteinkináza (MAPKKK), kterou začíná signální dráha označovaná jako **kaskáda MAP-proteinkináz**. Z obr. 308 je zřejmý její průběh. Posledním substrátem fosforylace přes kaskádu proteinkináz jsou transkripční faktory, např. Elk.

Poznámka: Aktivace Raf-proteinkinázy probíhá v plazmatické membráně (normálně je Raf-proteinkináza cytoplazmatický protein), kde pravděpodobně reaguje s jinými proteinkinázami a je fosforylována na nějakou zatím neznámou k membráně přídruženou proteinkinázu. Pak indukuje kaskádu fosforylací.

**SIGNALIZACE PŘES STAT-PROTEINY.** Vysvětlíme tuto signalizaci na příkladu receptoru aktivovaného interferonem  $\text{IFN}\alpha$  (obr. 309). Po vazbě interferonu se receptor fosforyluje Jak1- a Tyk2-tyrozinproteinkinázami (str. 450). Na fosforylovaný receptor se SH2-doménami navážou proteiny  $\text{STAT1}_{\alpha/\beta}$  a  $\text{STAT2}$  a fosforylují se. Oba proteiny se z receptoru uvolní a vytvoří dimer, který se spojí s proteinem p48 za vytvoření aktivního komplexu, který působí



Obr. 304

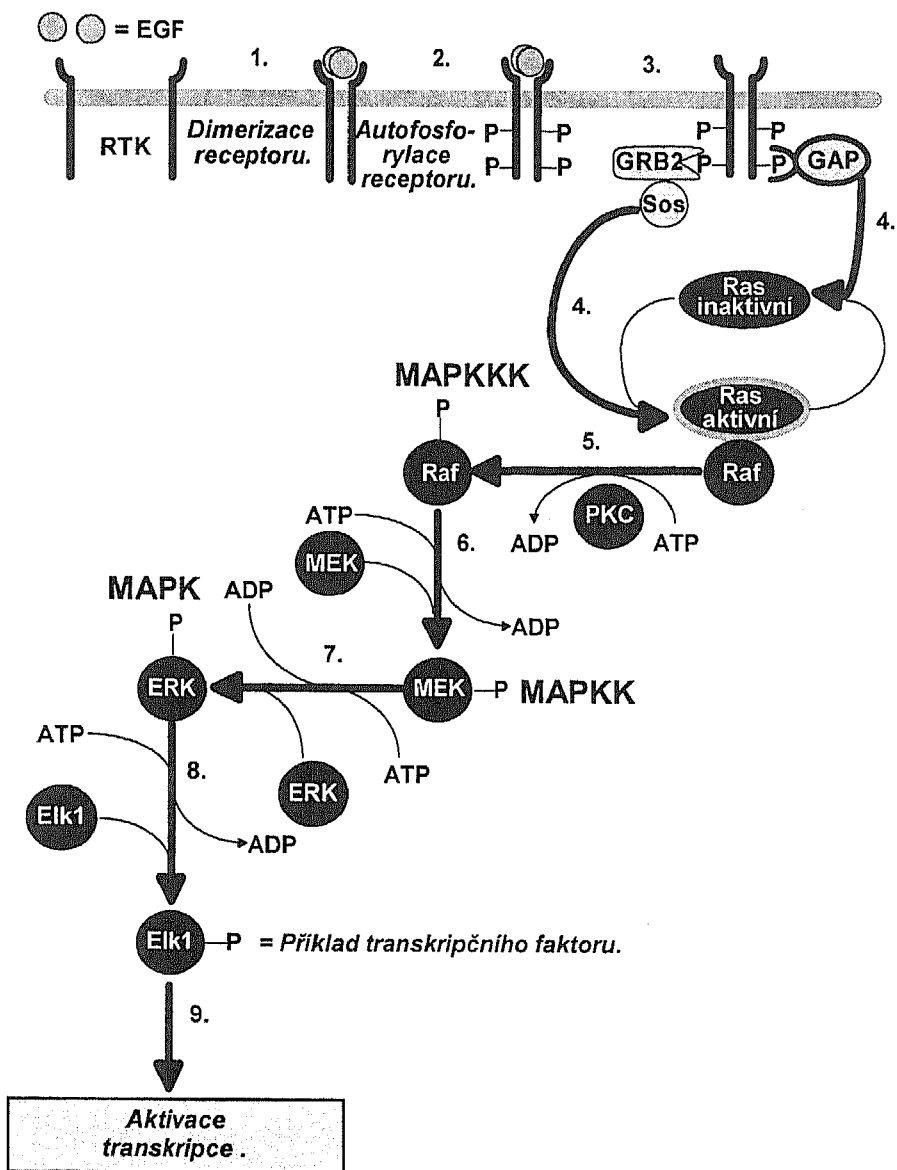
**Aktivace receptoru steroidního hormonu a jeho vazba ve formě dimeru na DNA responzivního elementu**

hormonu (**HRE-responzivní element**). Po vazbě na HRE se dimer komplexu hormon-receptor aktivuje intenzivní fosforylací proteinkinázou.

6. Aktivní dimer komplexu hormon-receptor indukuje transkripci genů přilehlých transkripčních jednotek tím, že urychluje tvorbu přediniciačního komplexu a stabilizuje jej. *Účinek aktivovaných receptorů pro steroidní hormony na přediniciační komplex asi spočívá v jejich přímé interakci se složkami přediniciačního komplexu nebo prostřednictvím koaktivátoru.*

**AKTIVACE RECEPTORU PRO TYROXIN A RETINOVOU KYSELINU.**

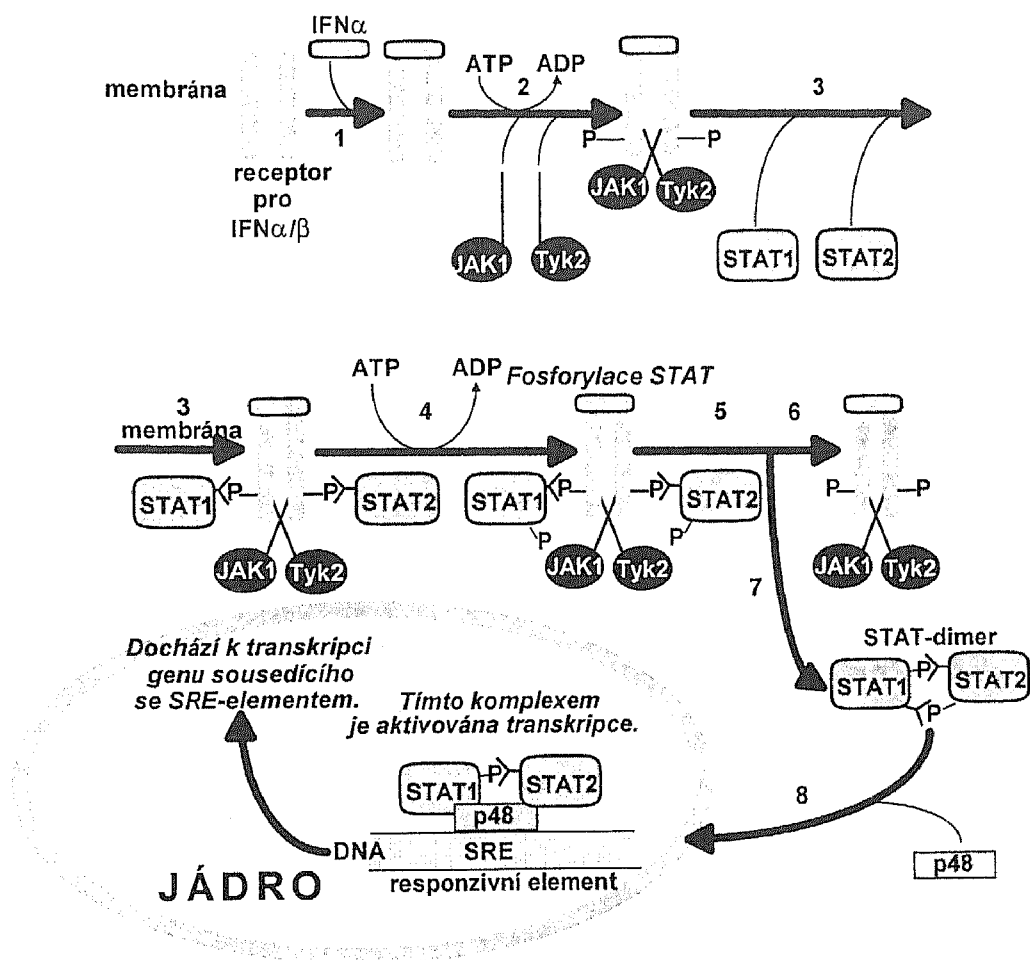
Důležitým faktorem aktivace těchto receptorů je fosforylace jako u receptorů steroidních hormonů. Základem jejich inaktivního stavu však není jejich



Obr. 308  
Schéma kaskády MAP-kináz

jako transkripční faktor vázající se na responzivní element SRE.

SÍŤ SIGNÁLNÍCH DRAH. Mezi signálními drahami existují rozsáhlé



Obr. 309  
Schéma signalizace přes STAT-proteiny neboli dráhy JAK-STAT

interakce, které vedou k tomu, že signální dráhy mohou probíhat paralelně a též se navzájem proplétat, čemuž vyhovuje představa "sítě signálních drah", která je charakteristická těmito vlastnostmi:

1. Stejnými signály mohou být aktivovány různé dráhy v buňce a různé signály mohou mít stejný účinek.
2. Stejný ligand může aktivovat různé receptory nebo různé ligandy mohou aktivovat stejný receptor.
3. Přes stejný receptor mohou být aktivovány dvě paralelní dráhy. Příkla-



dem je aktivace proteinkinázové kaskády MAP-proteinkináz a fosfolipázy C( $\gamma$ ).

4. Jedna dráha se může rozvětvit a interagovat s jinou. Např. proteinkináza A vypíná při vysokých koncentracích cAMP Ras-protein z jeho činnosti (Ras-protein se stane inaktivní). A naopak proteinkináza C, která je závislá na  $\text{Ca}^{++}$ , stimuluje Ras-protein. Navzájem závislé jsou též systémy druhých přenašečů. Např.  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  indukuje transport vápníku z endoplazmatického retikula a DAG kooperuje s vápníkem v aktivaci proteinkinázy C. Na vápníku závislý protein CAM (kalmodulin) reguluje aktivitu  $\text{PI}(3)\text{K}$ -proteinkinázy a adenylátcyklázy, a tím vlastně reguluje koncentraci  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  a cAMP. cAMP může aktivovat iontové kanály a odtud ovlivňovat koncentrace  $\text{Ca}^{++}$ -iontů v buňce atd. (obr. 310).

**DORUČENÍ (ODEVZDÁNÍ) SIGNÁLU A ODPOVĚĎ BUŇKY NA SIGNÁL.** Doručení signálu lze chápat jako *zakočení dané dráhy přenosu signálu na cílový protein, jehož konformační změna vyvolaná přijetím signálu se promítne do odpovědi buňky.*

Řada signalizací končí v jádře. Zde jsou transkripční faktory ovlivňovány specifickými drahami přenosu signálu a v mnohých případech se rozmanitost odpovědi zvýší dosažitelností různých izoformních složek transkripčních faktorů. Během šesti hodin stimulace receptoru se aktivuje přibližně 100 raných genů. Patří mezi ně *c-jun*, *c-fos*, geny kódující transkripční regulátory a strukturní proteiny (fibronektin, aktin). Řada těchto genů je aktivována do odpovědi v rámci signalizace kaskádou MAP-kináz.

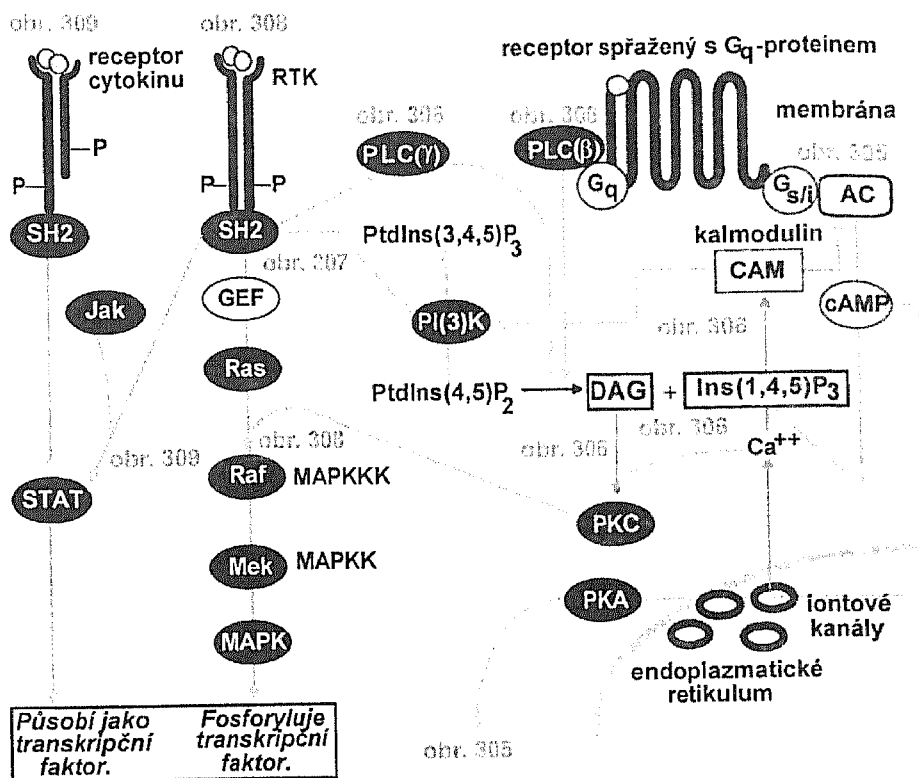
### 5.7.9

## Regulace buněčného cyklu savčí buňky

**REALIZACE PROGRAMU REGULACE BUNĚČNÉHO CYKLU.** S buněčným cyklem jsme se již seznámili na str. 335. Zde se dovíme, že přechody mezi jednotlivými fázemi buněčného cyklu, vstup do další fáze a zakončení předchozí fáze, jsou přísně regulovány a uskutečňují se podle určitého genetického programu. Podle tohoto programu též rozhodování, zda se buňka bude dělit nebo diferencovat, se děje v pozdější  $G_1$ -fázi buněčného cyklu. Důležitými faktory, které zajišťují program regulace buněčného cyklu, jsou:

**1. Cyklin-dependentní-proteinkinázy buněčného dělení neboli CDK-proteinkinázy.** Jsou *katalycky aktivní jen tehdy, když jsou navázány na nějaký cyklin*. Komplexy CDK-proteinkinázy s cyklinem spouštějí různá stadia buněčného cyklu eukaryotické buňky tím, že fosforylují specifické cílové proteiny.

U jednotlivých drah jsou uvedeny odkazy na příslušné obrázky.



1. MAP-kinázová kaskáda je obvykle aktivována signalizací z RTK přes Ras a Raf.
2. Může se spojit přes SH2-doménu STAT-proteínu s drahou Jak-STAT.
3. PLC( $\gamma$ ) se může svou SH2-doménou spojit s aktivovaným RTK-receptorem a hydrolyzovat PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. Stejnou reakci uskutečňuje PLC( $\beta$ ), která se aktivuje receptorem spřaženým s G<sub>q</sub>-proteinem.
4. PKC je aktivována DAG a ionty Ca<sup>++</sup> a může pak fosforylovat protein-kinázu Raf.
5. Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> a cAMP ovlivňují uvolňování iontů Ca<sup>++</sup>, kterými je regulována PI(3)K a AC, a to přes CAM.
6. PKA je aktivována cAMP, jehož syntézu katalyzuje AC aktivovaná receptorem spřaženým s G-proteinem.

Obr. 310  
Schéma příkladu sítě signálních drah

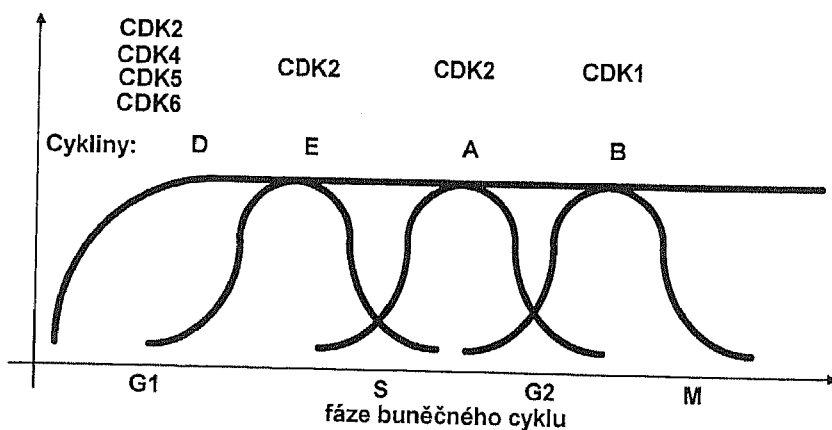
Cykliny jsou tedy proteiny vytvářející komplexy s CDK-proteinkinázami, ve kterých tyto enzymy aktivují a určují jejich substrátovou specificitu, čímž je regulován průchod jednotlivými fázemi buněčného cyklu. Buňky obratlovců obsahují alespoň pět různých CDK-proteinkináz. Z nich CDK2-proteinkináza se vyznačuje při nástupu do mitotické fáze u vyšších eukaryot specifickou funkcí, zatímco jiné CDK působí během G<sub>1</sub>-fáze a S-fáze. K tomu však musí být akti-

vovány vazbou na cykliny. Ve fázi  $G_1$  je v tomto směru k dispozici cyklin D1, D2 a D3, při přechodu z  $G_1$ -fáze do S-fáze cyklin E a později cyklin A a B (obr. 311).

Regulace aktivity CDK je závislá ještě na tom, zda je CDK pro vazbu na cyklin fosforylována. Signály k této fosforylaci (vedle tvorby a odbourávání cyklinu) obdrží z vnějška ve formě růstového faktoru. Fosforylace se může uskutečnit na zbytku treoninu nebo tyrozinu.

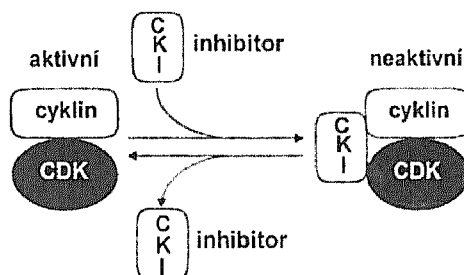
**2. Inhibitory cyklin-dependentních proteinkináz neboli CDK-inhibitory.** Další regulační zásah do průběhu buněčného cyklu jde ze strany inhibitorů CDK-proteinkináz, které se vážou na CDK-proteinkinázu a brzdí její aktivitu. Účinek inhibitorů CDK-proteinkináz je znázorněn na obr. 312. Příkladem CDK-inhibitoru je **protein p21**, který se váže na E/CDK1. Touto vazbou se zabrání vstupu do S-fáze.

Další příklad inhibičního účinku p21 lze uvést v souvislosti s poškozením DNA vlivem UV-světla nebo jinými mutageny. V případě takového poškození dochází k intenzivní syntéze p21, který se váže na všechny CDK a přerušuje tak průběh buněčného cyklu. To pomůže buňce uskutečnit v potřebném čase reparaci poškozené DNA. Inhibiční účinek p21 je navozen nahromaděním transkripčně aktivního proteinu p53, které je vyvoláno poškozením DNA. Protein p53 pak indukuje expresi genu kódujícího p21, který se váže na CDK-proteinkinázy a inhibuje jejich aktivitu (obr. 315).



*Během buněčného cyklu savců vchází různé proteinkinázy CDK2, 4, 5 do interakcí s různými cykliny. Cykliny E, A a B se tvoří k danému času a jsou v závislosti na ubiquitinu odbourávány. Cykliny D1, D2 a D3 zůstávají v průběhu celého cyklu konstantní.*

Obr. 311  
CDK-proteinkinázy v průběhu buněčného cyklu savčích buněk



Obr. 312  
Inhibice aktivity CDK-kinázy CDK-inhibiorem

**REGULACE PŘECHODU Z G<sub>1</sub>-FÁZE DO S-FÁZE U SAVCŮ.** Eukaryotické buňky reagují na extracelulární signály (mitogeny a růstové faktory) tím, že tyto signály procházejí v rámci buněčného cyklu místy, v nichž se rozhoduje o tom, zda postoupí do další fáze buněčného cyklu. Tato místa se označují jako **kontrolní body buněčného cyklu**. Celkově pak signalizaci přechodu savčí buňky z G<sub>1</sub>-fáze do S-fáze buněčného cyklu můžeme shrnout takto (obr. 313):

1. Po mitogenní stimulaci růstovým faktorem se nejdříve v G<sub>1</sub>-fázi indukují cykliny typu D, které se spojují s cyklindependentními proteinkinázami CDK4 a CDK6 za tvorby komplexu **CycD.CDK4/6**. Současně nefosforylovaný **retinoblastomový protein** neboli **pRb-protein** (používá se též názvu **RB-protein**) se váže na heterodimerní transkripční faktor **E2F.DP1** za vzniku komplexu **pRb.E2F.DP1** a *inhibuje jeho aktivitu*.

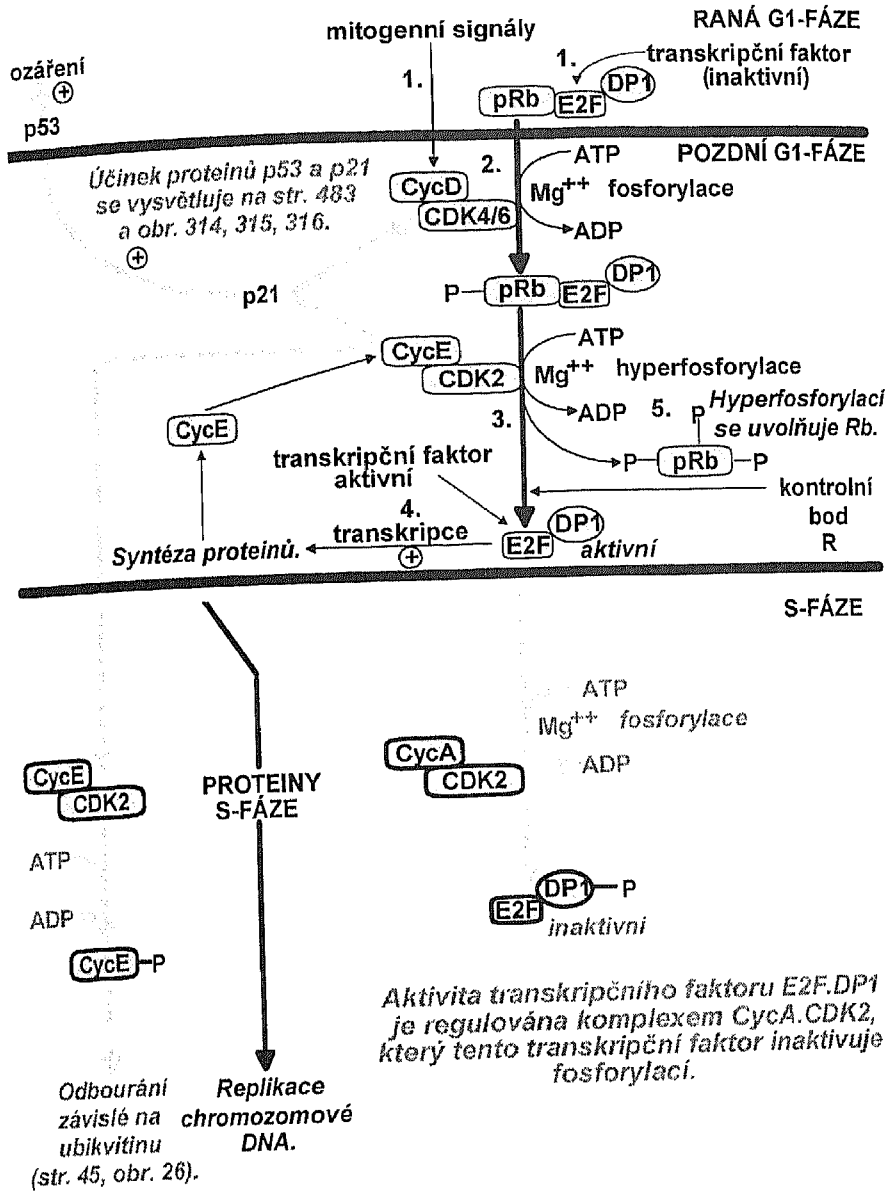
2. V komplexu **pRb.E2F.DP1** se **pRb** slabě fosforyluje **CycD.CDK4/6** (hypofosforylace).

3. Silná fosforylace (hyperfosforylace) **pRb** se uskutečňuje účinkem **CycE.CDK2** a vede v komplexu **pRb.E2F.DP1** k oddělení **E2F.DP1** od **pRb**. Uvolnění **pRb** z komplexu **pRb.E2F.DP1** odpovídá průchodu přes kontrolní body pro přechod z G<sub>1</sub>-fáze závislé na mitogenech a řízené **D-cyklinem** do S-, G<sub>2</sub>- a M-fází, které jsou na mitogenech nezávislé a jsou řízeny **cykliny E, A a B**.

4. **E2F.DP1** pak může aktivovat expresi genů, jejichž translační produkty jsou nutné pro vstup do S-fáze a replikaci chromozomové DNA.

5. **Rb-protein** zůstává v hyperfosforylovaném stavu až do opětového vstupu do G<sub>1</sub>-fáze.

**INTERAKCE RB-PROTEINU S TRANSKRIPČNÍM FAKTOREM E2F-DP1.** Transkripční faktor **E2F.DP1** se váže na jeden z promotorových elementů genů kódujících dihydrofolátreduktázu, tymidinkinázu a DNA-polymerázu  $\alpha$  a podílí se na regulaci syntézy těchto enzymů. Tyto enzymy jsou zahrnuty do bu-



*CycD.CDK4/6 a CycE.CDK2 jsou aktivní jen za nepřítomnosti p21. Jen za této podmínky proběhnou kroky 1, 2, 3, 4 a 5.*

Obr. 313

Schéma regulace replikace chromozomové DNA u savců

něčného cyklu a uplatňují se v S-fázi, kdy probíhá syntéza a replikace DNA. Jeho interakce s promotorem však probíhá jen v případě, že není v komplexu Rb-proteinem a je volný. Tento protein se vyskytuje v jádře v silně fosforylo-

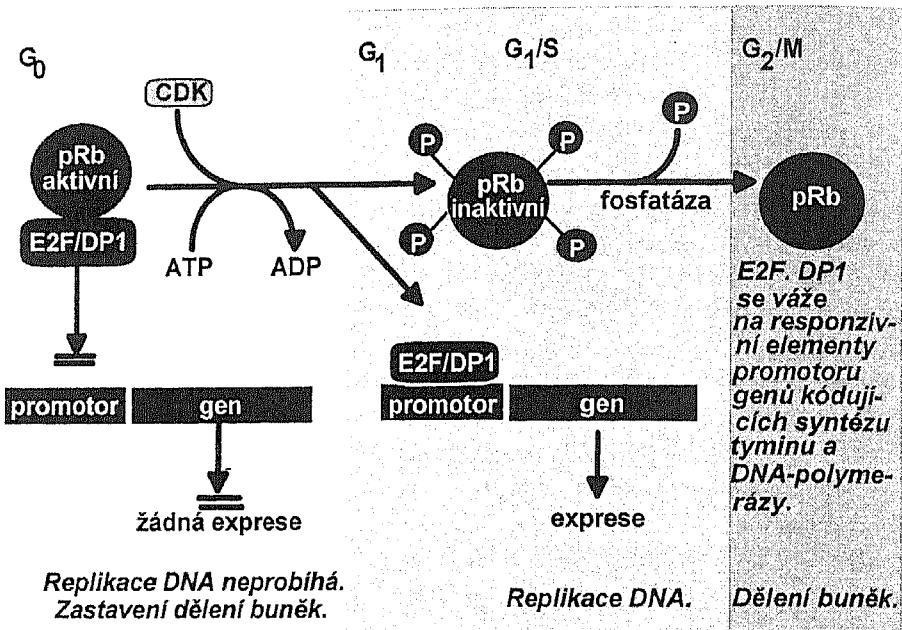
vané nebo slabě fosforylované formě. Defosforylace silně fosforylovaného RB-proteinu navozuje jeho aktivitu. Ve **slabě fosforylované formě (hypofosforylovaná forma) nebo nefosforylované formě** je totiž aktivní, což se projevuje jeho inhibičním účinkem na dělení buněk a replikaci DNA. V **silně fosforylované (hyperfosforylované) formě** je inaktivní a projevuje se pak stimulací buněčného dělení.

Bylo zjištěno, že v klidových buňkách není RB-protein fosforylován nebo jen málo. V tomto aktivním stavu (hypofosforylovaná forma Rb-proteinu) vchází do komplexu s transkripčním faktorem **E2F.DP1** a blokuje expresi genu buněčného cyklu. Když buňky po přidání séra vstupují do buněčného cyklu, inaktivuje se Rb-protein ke konci  $G_1$ - fáze přijetím deseti nebo i více fosfatových skupin, což vede k jeho uvolnění z komplexu s transkripčním faktorem **E2F.DP1**. Uvolněný **E2F.DP1** může pak zahájit transkripci genů, jejichž promotory mají vazebná místa pro tento faktor, a to jsou geny kódující enzymy pro syntézu tyminu a DNA-polymerázy  $\alpha$ . Toto je v rámci buněčného cyklu nutný krok pro vstup buňky do S-fáze. Sledujme jednotlivé kroky regulace tohoto vstupu podle obr. 314, kterým se doplňuje obr. 313:

1. V klidových buňkách či v  $G_0$ -fázi buněčného cyklu vytvoří nefosforylovaný Rb-protein (aktivní forma Rb-proteinu) s **E2F.DP1** komplex a brzdí tím expresi genů, jejichž promotory obsahují vazebná místa pro tento transkripční faktor. Jsou to výše uvedené geny pro dihydrofolátreduktázu, tymidinkinázu a DNA-polymerázu  $\alpha$ . To znamená, že se např. netvoří DNA-polymeráza  $\alpha$  nebo jen velmi málo.

2. Během buněčného cyklu ke konci  $G_1$ -fáze se Rb-protein fosforyluje přijetím několika fosfatů za katalytické účasti CDK2-proteinkinázy. Fosforylací se Rb-protein inaktivuje. Tím umožní vazbu **E2F.DP1** na promotory výše uvedených genů, což vede k jejich expresi, tj. syntetizují se některé enzymy potřebné pro syntézu DNA a její replikaci, např. DNA-polymeráza  $\alpha$ . Později pak během buněčného cyklu v  $G_2$  a M-fázi je Rb-protein specifickou proteinfosfatázou defosforylován. Syntéza uvedených enzymů se opět zastaví.

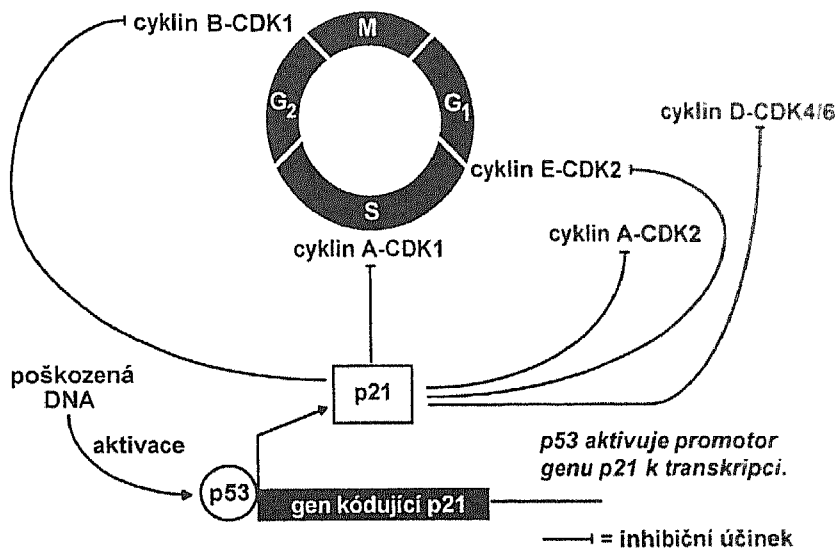
**BIOLOGICKÁ FUNKCE PROTEINU p53 A p21.** Předchozí výklad je nutno doplnit o vysvětlení funkce proteinu p53. Tento protein p53 se nachází ve všech tkáních a jeho funkce je mnohostranná. Především se podílí na regulaci buněčného cyklu tím, že *prostřednictvím p21 brzdí vstup buňky do  $G_1$ -fáze buněčného cyklu*. Normální buňky mají malé množství proteinu p53, které stačí k udržení regulace jejich běžného dělení. Teprve po jeho aktivaci, což bývá poškození DNA rentgenovým zářením nebo UV-zářením nebo jinými faktory, se jeho množství silně zvýší. Zvýšením množství p53 se spustí exprese genu kódujícího protein p21.



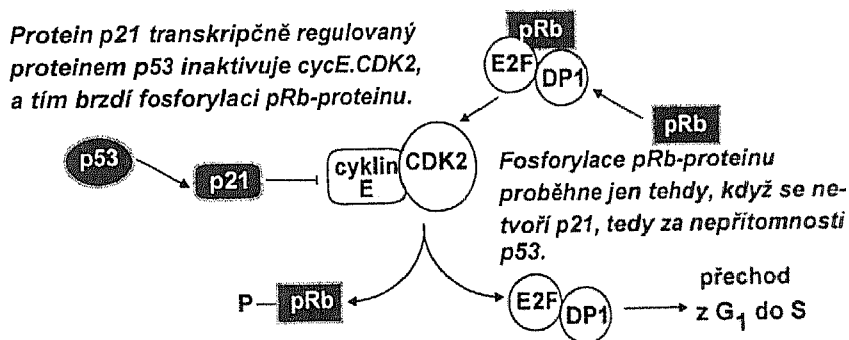
Obr. 314  
Účinek Rb-proteinu na replikaci DNA a dělení buňky

Protein p21 se váže na proteinkinázy CDK4/6 a CDK2 a v G<sub>1</sub>-fázi zastavuje buněčný cyklus (obr. 313). Tím se poskytne čas pro procesy, kterými se opravuje poškození DNA. Je-li však poškození DNA rozsáhlé tak, že enzymy již nemohou opravné procesy zvládnout, dochází k aktivaci proteinu p53, která spočívá v tom, že interakcí p53 s poškozenými úseky na DNA se p53 aktivuje k vazbě na promotory, odkud stimuluje transkripci genu kódujícího p21. Podle toho *protein p53 působí jako transkripční faktor, který se aktivuje poškozením DNA* (obr. 315).

**VZTAHY MEZI PROTEINY p53, p21 A pRb.** Podívejme se závěrem globálně na interakce těchto proteinů, které rozhodujícím způsobem zasahují do průběhu buněčného cyklu. Uvedené proteiny působí v procesu zastavení buněčného cyklu v součinnosti. Fosforylace pRb umožní, aby komplex transkripčního faktoru E2F.DP1 stimuloval transkripci různých genů zahrnutých do syntézy DNA. Protein p21, který je transkripčně regulován proteinem p53, může inaktivovat cyklin E-CDK2 a inhibovat takto fosforylaci pRb, a tím i syntézu enzymů podílejících se katalyticky na pochodech buněčného cyklu (obr. 316).



Obr. 315  
Schéma interakce proteinů p53 a p21



Obr. 316  
Schéma interakcí proteinů p53, p21 a pRb v buněčném cyklu

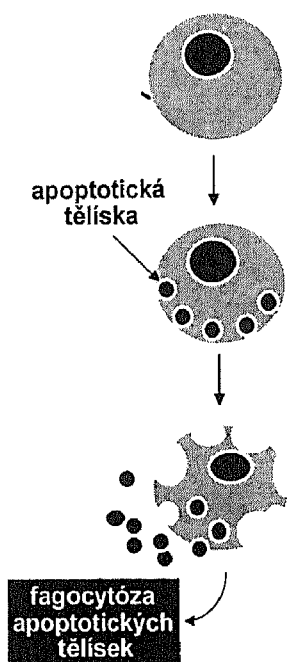
### 5.7.10 Apoptóza

**OBECNÁ CHARAKTERISTIKA APOPTÓZY.** *Apoptóza je způsob, jímž se realizuje programovaná smrt buněk. Programovaná smrt, jak je známa z biologie vyšších organizmů, znamená, že v průběhu ontogenetického vývoje pravi-*



delně část buněk odumírá a je odstraněna fagocytózou. Je to geneticky řízený proces spojený se syntézou, případně aktivací určitých enzymů, který je regulován vnějšími a vnitřními faktory. Hlavními znaky apoptózy jsou (obr. 317):

- ◆ srašťování buněk,
  - ◆ dezintegrace buňky za tvorby apoptotických tělísek, která bývají fagocytována makrofágy,
  - ◆ kondenzace chromozomů,
  - ◆ přítok  $\text{Ca}^{++}$ -iontů do buňky,
  - ◆ odbourávání DNA mezi nukleozomy na fragmenty.
- Apoptóza může být indukována:
- ◆ zvýšením teploty,
  - ◆ poškozením DNA,
  - ◆ glukokortikoidy,
  - ◆ infekcí buněk,
  - ◆ odstraněním růstových faktorů.



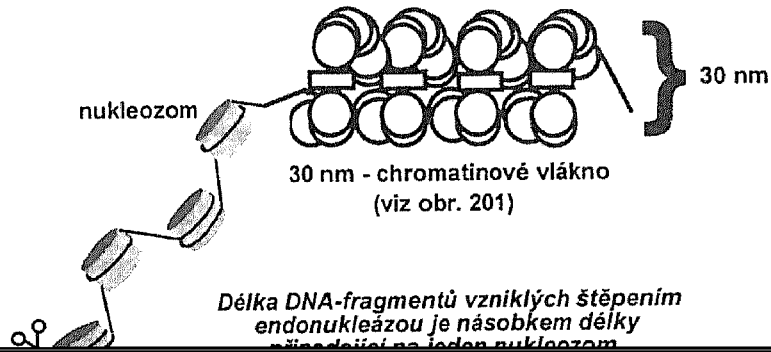
Obr. 317  
Schéma destrukce buňky apoptózou

Čím se liší apoptóza od nekrózy? *Nekróza probíhá za nepříznivých podmínek, zatímco apoptóza je programovaná smrt buňky, která probíhá za normálních fyziologických podmínek*, např. během embryonálního vývoje, kdy dochází k přetváření tkání, a jak již bylo uvedeno, může být indukována. Též dochází k morfologickým změnám. Zdůrazňujeme však, že při nekróze se rozpadá plazmatická a jaderná membrána, kdežto při apoptóze dochází k fragmentaci buňky a ke tvorbě apoptotických tělísek. Během pokročilejších stadií apoptózy dochází k rozkladu DNA mezi nukleozomy patrnému na elektroforetogramu ve formě pruhů (připomínajících žebříček), které jsou tvořeny DNA-fragmenty vyznačujícími se postupně se zvyšující elektroforetickou pohyblivostí (obr. 318).

Velmi charakteristickým zna-

kem apoptózy je, že nová proteosyntéza v apoptotických buňkách vyžaduje neustálé zvyšování koncentrace iontů  $Ca^{2+}$  v cytoplasmě. Tyto ionty se zúčastňují aktivace jedné endonukleázy, kterou je štěpena chromozomová DNA, a kalpainů, které odbourávají složky cytoskeletu a membránové proteiny. Kalpainy jsou cytoplazmatické savčí enzymy, které se podle dalších vlastností liší a třídí se do několika skupin. Jedním z kritérií tohoto třídění je citlivost kalpainů k iontům  $Ca^{2+}$ . V apoptotických buňkách se syntetizují velmi brzy, dříve než jsou na buňkách patrné morfologické změny. Kalpain (EC 3.4.22.17) je definován jako *Ca<sup>2+</sup>-ionty aktivovaný neutrální tiolproteinázový enzym*.

Další skupinou enzymů, které jsou citlivé k iontům  $Ca^{2+}$  a uplatňují se při apoptóze, jsou transglutaminázy.



**KONTROLNÍ BODY APOPTÓZY.** Byly identifikovány dva kontrolní body apoptózy:

**1. Kontrolní bod 1.** Klíčový význam zde má represorový protein zjištěný ve vnitřní mitochondriové a jaderné membráně. Označuje se jako **Bcl2**. Konstitutivní nadprodukce tohoto proteinu zastavuje (blokuje) apoptózu.

**2. Kontrolní bod 2.** Zde klíčovou úlohu sehrává **ICE-protein** neboli **enzym přeměňující interleukin 1 $\beta$** . Označuje se též jako **interleukin-1 $\beta$ -konvertáza EC 3.4.22.36** nebo **ICE-proteáza**. Jeho známou funkcí je *proteolytické štěpení prekursorového interleukinu 1 $\beta$  na biologicky aktivní interleukin 1 $\beta$* .

Shrňme ještě podle tab. 30 hlavní rozdíly mezi apoptózou a nekrózou.

**Tab. 30**

**Vlastnosti apoptotické a nekrotické smrti**

Příčiny	Apoptóza	Nekróza
Ovliněné buňky	jedna	skupiny
Objem buňky	zmenšený	zvětšený
Chromatin	kondenzovaný	fragmentovaný
Lyzozomy	netknuté	abnormální
Mitochondrie	normální	abnormální
Zánětlivá odpověď	není	je
Osud buňky	apoptotická tělíska	lýze
Genová aktivita	vyžadovaná	nevyžadovaná
Štěpení DNA	specifické	náhodné
Intracelulární	zvýšená koncentrace	beze změny
Iontové pumpy	zachovány	ztráta

## 5.8 MOLEKULÁRNÍ PODSTATA ZÍSKANÉ IMUNITY

### 5.8.1

#### Stručná charakteristika získané imunity

Imunita, která vzniká v organizmu jako důsledek působení cizorodé látky (antigenu), se označuje jako **získaná imunita** (syn. **specifická imunita**, **adaptivní imunita**) a zahrnuje tyto složky:

- ◆ humorální imunitu,
- ◆ buněčnou imunitu.

**Humorální imunitou** se rozumí imunita zprostředkovaná specifickými protilátkami produkovánými B-lymfocyty do tělních tekutin (lymfá, krev). Na druhé straně **buněčnou imunitou** se rozumí imunita sprostředkovaná T-lymfocyty. **Obranná reakce**, jejímž důsledkem je dosažení určitého stavu humorální imunity, se označuje jako **humorální imunitní odpověď**. Podobně **obránná reakce**, jejímž důsledkem je dosažení určitého stavu buněčné imunity, se označuje jako **buněčná imunitní odpověď**. Obě reakce, chápány souhrnně, se označují jako **imunitní odpověď**.

Výrazným znakem získané imunity je, že na rozdíl od vrozené imunity je vysoce specifická (např. imunita vůči určitému kmeni bakterie nebo viru). Tato specifčnost spočívá v rozpoznávací reakci mezi imunogenem vpraveným do organizmu a specifickou protilátkou tvořenou organizmem. **Protilátka** je *glykoprotein (označovaný běžně jako imunoglobulin) produkováný jako odpověď organizmu na stimulaci imunogenem. Vyznačuje se schopností reagovat in vitro a in vivo specificky a selektivně s antigenními determinanty imunogenu, který vyvolal její produkci.*

Lze říci, že všechny protilátky se tvoří jako odpověď organizmu na imunogeny. Jako **imunogen** se označuje látka, která *indukuje (vyvolává) humorální a (nebo) buněčnou imunitní odpověď*. Imunogenem je např. úplný antigen (viz dále). **Antigen** obecně je *látka, která reaguje s protilátkou (váže se na protilátku) a s receptorem T-lymfocytů (váže se na TCR-receptor).*

Ve vztahu k imunogenu se rozlišují:

- ◆ **úplný antigen**, tj. *imunogen reagující s protilátkami a receptory na T-lymfocytech;*
- ◆ **neúplný antigen** neboli **hapten** představující *nízkomolekulární látku, která není imunogen, je však schopna reagovat in vitro s protilátkou.*

**Termín "antigen" budeme v dalším textu používat ve smyslu definice "úplného antigenu".**

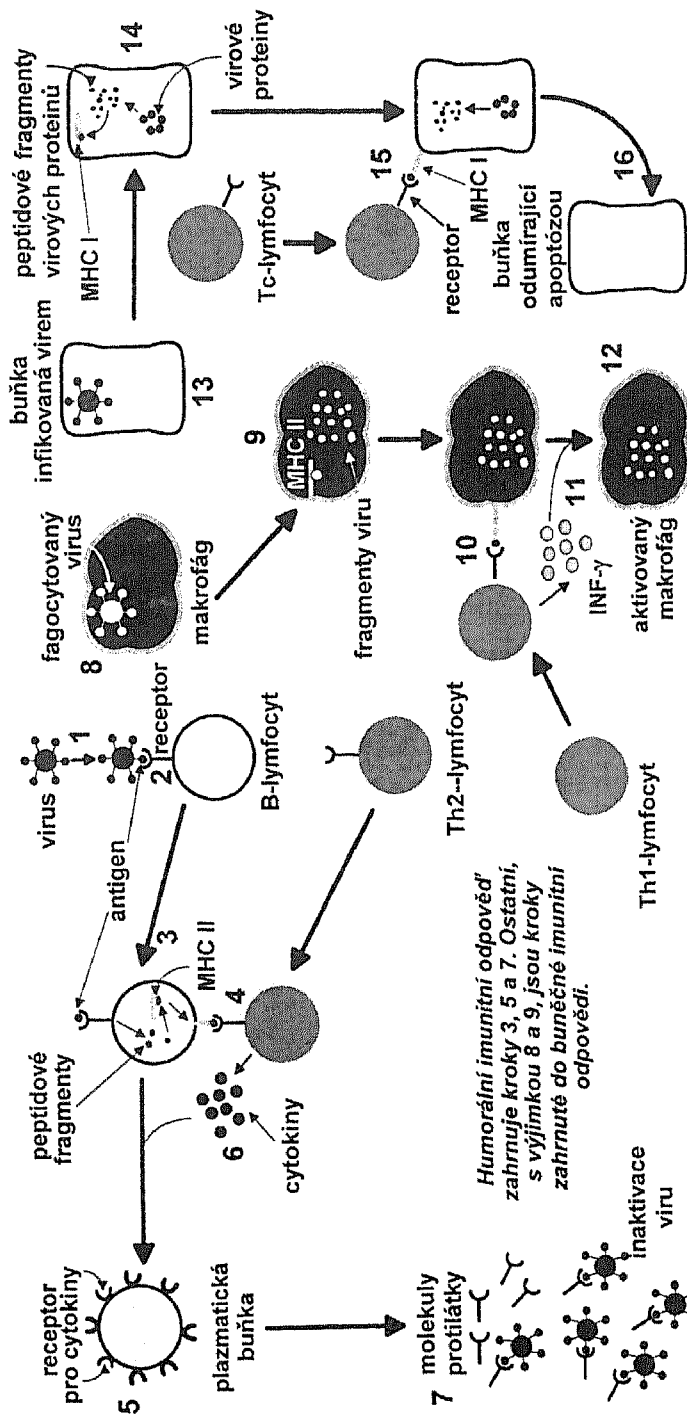
Jako antigeny působí v hostiteli proteinové a polysacharidové složky virů, bakterií a jiných patogenních mikroorganismů. Tvorba protilátek neutralizujících toxické účinky těchto proteinů je nejvýznamnějším činitelem v obraně organismu proti infekci. Člověk, který díky produkci specifické protilátky překonal infekci virem, je pak vůči tomuto viru imunní kratší nebo delší dobu, případně po celý život. Pozoruhodným znakem imunitní odpovědi je to, že zvířata i člověk se mohou stát imunními k mimořádně velkému počtu různých antigenů. Navíc jeden organismus může být imunní k mnoha různým antigenům současně. Odhaduje se, že savčí druh je schopen vytvořit asi  $10^6$  až  $10^{12}$  různých protilátek. Jelikož protilátky jsou proteiny, vzniká otázka, zda B-lymfocyty mají dostatečný počet genů pro kódování tak velkého počtu protilátek. Odpověď na tuto otázku bude dána později.

Aby byla do organismu zavedená látka imunogenní, musí být pro organismus cizorodá (s výjimkou některých autoantigenů). Obvykle by měla mít molekulovou hmotnost alespoň 1 000 a měla by být buď proteinem, nebo polysacharidem.

**GLOBÁLNÍ PŘEDSTAVA ZÍSKANÉ IMUNITY.** Abychom mohli v našem výkladu postoupit dále, vytvoříme si nejdříve povšechnou představu (zatím jen v prvním a hrubém přiblížení) o tom, co se děje s antigenem po jeho zavedení do organismu. Podklad k této představě poskytuje ve zjednodušené formě (podrobnosti budou vysvětlovány postupně v dalším textu) obr. 319, na jehož jednotlivé části odkazujeme čísly v závorkách; tato čísla se shodují s číslováním na tomto obrázku.

Předně je třeba si uvědomit, že antigeny se do organismu dostávají většinou ve formě volných látek (většinou pro organismus cizorodých proteinů) nebo jako složky virů, bakterií a jiných parazitů (1). V sekundárních lymfoidních orgánech (např. lymfatické uzliny) je antigen zachycen protilátkovým receptorem B-lymfocytů (2). Touto vazbou *se zahájí děje směřující k přechodu B-lymfocytu z  $G_0$ - do  $G_1$ -fáze buněčného cyklu, k jeho proliferaci a diferenciaci na plazmatické buňky produkující protilátky.* Tyto děje se označují jako **aktivace B-lymfocytu.**

Antigen, který se navázal na receptor B-lymfocytu, je uvnitř lymfocytu rozložen na peptidové fragmenty (3), sdružen s MHC II-molekulami a v tomto sdružení zanořen do jeho povrchu. Rozeznávají jej pak aktivované Th2-lymfocyty, které se na něj vážou svým receptorem (4). Touto interakcí se B-lymfocyt aktivuje k syntéze receptorů (5) ve svém povrchu pro cytokiny produkované Th2-lymfocyty (6). Cytokiny velmi intenzivně stimulují proliferaci plazmatických buněk, které produkují protilátky, jimiž neutralizují a inaktivují volné



Obr. 319

Globální a zjednodušené schéma humorální a buněčné imunitní odpovědi organismu na antigen

antigeny. Takto jsou eliminovány z organismu i antigeny jako proteinové složky bakterií nebo virů (7).

V lymfatických uzlinách jsou aktivovány též makrofágy, kterými jsou pohlcovány bakterie, viry a jiné antigeny (8). Proteiny virů a bakterií se v makrofágách rozloží do peptidových fragmentů a sdruží s MHC II-molekulami (9). Tento komplex se zanoří do povrchu makrofágů. Antigen v něm je rozeznáván receptory Th1-lymfocytů (10). Touto interakcí jsou Th1-lymfocyty aktivovány k produkci cytokinů, např. interferonu  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) (11), a zvýší se též lytická aktivita makrofága (12).

Jak jsou však zneškodňovány antigeny virů, kterými byly infikovány somatické buňky (13)? Tyto antigeny se podobně jako u B-lymfocytů odbourávají na peptidové fragmenty (14) a zanořují ve sdružení s molekulami MHC I do povrchu infikované buňky a jsou pak rozeznávány receptory Tc-lymfocytů (15). Interakcí receptoru Tc-buněk s peptidovým fragmentem antigenu v povrchu infikovaných buněk se v infikovaných buňkách indukuje apoptóza (programovaná smrt buněk) (16). Proliferace aktivovaných Tc-lymfocytů je stimulována cytokiny Th2-lymfocytů.

Th-lymfocyty jsou k produkci cytokinů, k proliferaci a diferenciaci aktivovány antigenem sdruženým s MHC II-molekulami v povrchu dendritových buněk, makrofágů a B-lymfocytů.

**MHC-MOLEKULY (PROTEINY).** MHC je zkratka pro označení genů hlavního histokompatibilního komplexu neboli MHC -komplexu označovaného u myši jako komplex H-2, u člověka jako HLA-komplex. Molekuly kódované geny MHC-komplexu jsou posttranslačně glykozylované proteiny buněčného povrchu. Jejich význam v buňce, zdůrazňovaný v této učebnici (mají ještě jiný biologický význam), spočívá v tom, že během své syntézy zachycují peptidy a fragmenty vzniklé odbouráváním cizorodých proteinů, tedy antigenů, a zanořují je do povrchu buňky, která se tím stává buňkou nabízející antigen, neboť tento antigen je rozeznáván TCR-receptorem T-lymfocytů. Existují dva druhy MHC-molekul (MHC-proteinů):

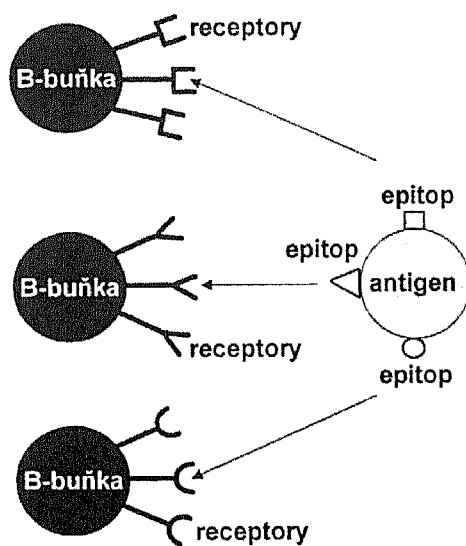
**1. MHC I-molekuly (proteiny) neboli MHC-molekuly (proteiny) první třídy** charakteristické tím, že vážou peptidy vznikající odbouráváním virových a bakteriálních proteinů pocházejících z těch virů a bakterií, kterými byly infikovány buňky hostitele. Virové a bakteriální peptidy sdružené s MHC I-molekulami a zanořené do povrchu infikovaných buněk jsou rozeznávány Tc-lymfocyty, které se aktivují k usmrcení infikovaných buněk vazbou antigenu upraveného ve spojení s MHC I-molekulami do peptidové formy (obr. 319 -14).

**2. MHC II-molekuly (proteiny) neboli MHC-molekuly (proteiny) druhé třídy,** které vážou peptidové fragmenty pocházející z proteinů odbouraných v intracelulárních vezikulách makrofágů a B-lymfocytů. Takové peptidy

mají svůj původ v těch proteinech virů a bakterií, které byly pohlceny makrofágem, případně byly jako antigeny zachyceny receptory B-lymfocytů. Ve spojení s MHC II-molekulami se tyto peptidy, představující upravené antigeny bakterií a virů, zanořují do povrchu makrofágů (obr. 319-10) a B-lymfocytů (obr. 319-3), na nichž *mohou být pak rozeznány jen Th-lymfocyty* (obr. 319-4).

**B-LYMFOCYTY (B-BUŇKY).** B-lymfocyty neboli B-buňky se v dospělém organismu savců tvoří v kostní dřeni a v játrech jejich fětu. Mají ve svém povrchu molekulu imunoglobulinu, která působí jako receptor pro antigen. Vazba antigenu na tento receptor je základní faktor, který v závislosti na dalších faktorech (popsaných dále) umožňuje diferenciaci B-lymfocytu na plazmatické buňky produkující protilátky. Tyto protilátky jsou stejné chemické podstaty jako receptor, na který se antigen navázal. Protilátky nejsou tedy v podstatě nic jiného než rozpustné formy B-lymfocytových receptorů pro antigen. Každý receptor je přísně specifický a rozeznává jen určitý antigen. Antigen ve smyslu imunogenu, tedy úplný antigen, je obvykle velká a komplexní molekula a receptor je schopen rozeznat jen její část. *Nejjednodušší forma nebo nejmenší část antigenu schopná reakce s protilátkou nebo receptorem T-lymfocytu se označuje jako antigenní determinanta neboli epitop* (obr. 320).

Celkově lze tedy říci, že B-lymfocyty se vyznačují těmito vlastnostmi:



Obr. 320  
Vztah antigenních determinantů k jejich receptorům



- ◆ Mají v povrchu receptor zachycující volný antigen (obr. 319-2, 3). *Tento receptor je molekula protilátky (imunoglobulin) vázané na membránu buňky. Označuje se jako B-lymfocytový receptor.*
- ◆ Před interakcí s antigenem se B-lymfocyt nachází ve stadiu klidu. Ve vztahu k buněčnému cyklu je to fáze  $G_0$ . Teprve vazbou antigenu na receptor B-lymfocytu dochází k interakci mezi receptorem (protilátkou) a antigenem, kterou se B-lymfocyt aktivuje k dělení a diferenciaci na plazmatickou buňku produkující do prostředí protilátku.
- ◆ Po vazbě antigenu na B-lymfocytový receptor se upravuje antigen do peptidu, který se sdružuje s MHC II-molekulami a je nabízen k vazbě na TCR-receptor Th2-lymfocytů (obr. 319-4).

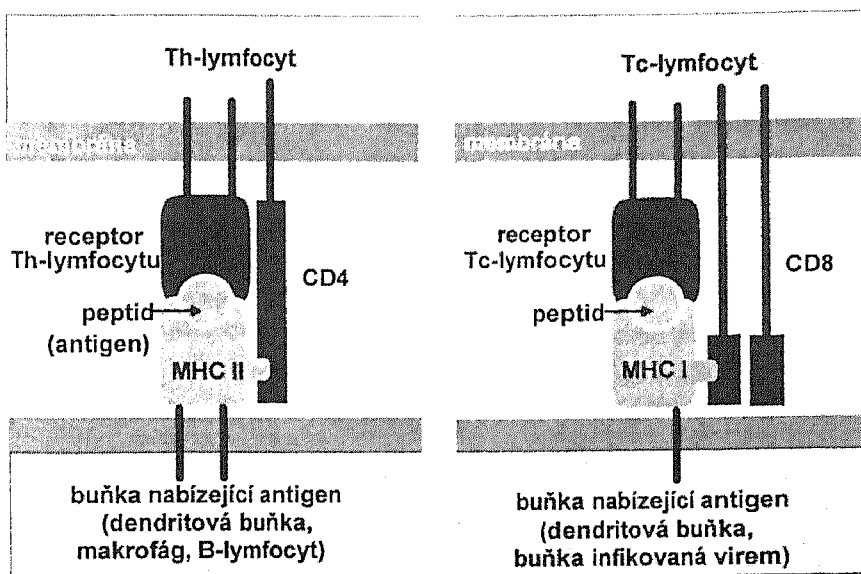
**T-LYMFOCYTY (T-BUŇKY).** Tvoří se v brzlíku (thymus). *Na rozdíl od B-lymfocytů T-lymfocyty nejsou schopny rozeznat volný antigen. Mohou ho rozeznat jen v případě, že je začleněn do komplexu s MHC-molekulou v povrchu buňky nabízející antigen. Tento antigen je stejné povahy jako ten, který se navázal na receptor B-lymfocytu a byl následně upraven B-lymfocylem do peptidové formy. Ve vztahu k MHC-proteinům se rozlišují dva typy výkonných T-lymfocytů (obr. 321):*

1. **Cytotoxické neboli Tc-lymfocyty.** *Rozeznávají do peptidu upravený antigen sdružený s MHC I - molekulami v povrchu buněk, které byly infikovány virem. Rozeznávaný a do peptidu upravený antigen pochází z viru, kterým byla buňka infikována. Po rozeznání tohoto antigenu Tc-lymfocyt rozvine procesy, směřující k usmrcení infikované buňky. Tc-lymfocyty mají též ve svém povrchu protein označovaný jako **CD8-protein**, který se váže na MHC I-molekuly. Tyto molekuly drží do peptidu upravený antigen, což je předpoklad pro jejich adhezi na buňky s tímto antigenem. Tc-lymfocyty se též označují jako **CD8-lymfocyty**.*

2. **Pomocné neboli Th-lymfocyty.** *Rozeznávají antigen upravený do peptidového fragmentu, který je sdružen s MHC II-molekulami. Tento antigen se nachází v povrchu B-lymfocytů, makrofágů a dendritových buněk. Th-lymfocyty mají ve svém povrchu protein označovaný jako **CD4-protein**, který se váže na MHC II-molekuly držící do peptidu upravený antigen, a tím zvyšuje jejich adhezi na buňky, které mají tento antigen. Th-lymfocyty se též označují jako **CD4-lymfocyty**.*

Celkově se Th-lymfocyty dělí na dva konečně diferencované typy buněk, rozlišované podle toho, které buňky jsou jimi aktivovány. Jsou to:

1. **Th1-lymfocyty aktivující makrofágy** (obr. 319-10).
2. **Th2-lymfocyty aktivující B-lymfocyty** (obr. 319-4).

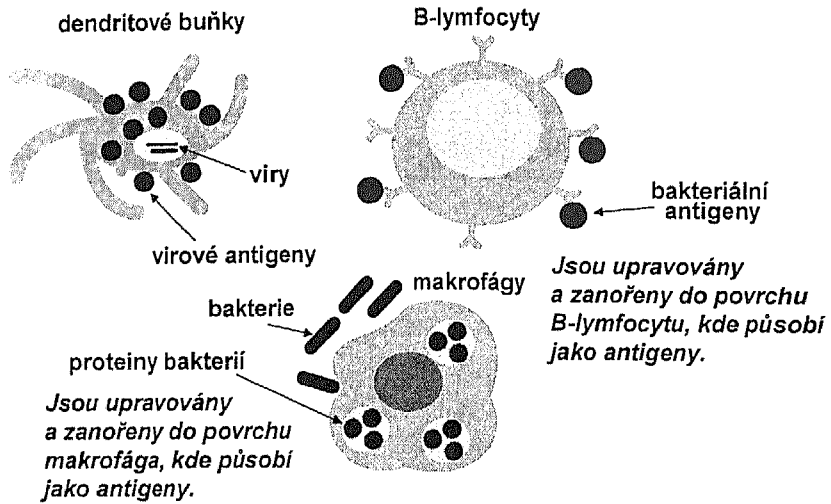


Obr. 321  
Interakce T-lymfocytů s buňkami nabízejícími antigen

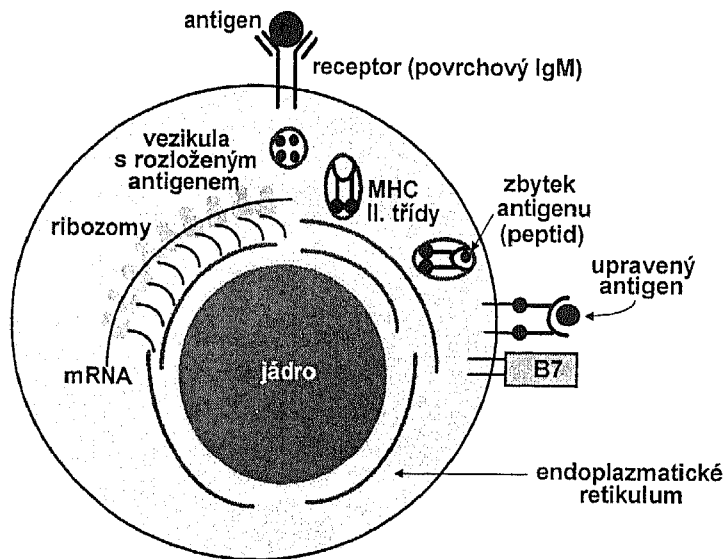
**BUŇKY NABÍZEJÍCÍ ANTIGEN.** Buňky, které obsahují ve svém povrchu upravený antigen (peptid antigenu), který je rozeznáván T-lymfocyty, se označují jako **buňky nabízející antigen**. Čtyři typy buněk nabízejí antigen. Jsou to (obr. 322):

1. **B-lymfocyty.** Úprava antigenu v B-lymfocytech probíhá v následujících krocích (obr. 323):

- ◆ Volný antigen se naváže na receptor B-lymfocytu.
- ◆ Z receptoru procesem endocytózy se antigen dostává do intracelulární vezikuly, kde se rozloží na peptidy.
- ◆ Na ribozomech endoplazmatického retikula se syntetizují **MHC II-molekuly**, které migrují do vezikuly a spojí se s peptidem jako jedním z produktů rozkladu antigenu.
- ◆ MHC II- molekula dopravuje antigen (víme však, že je to peptid antigenu) *k povrchu lymfocytu, kde je pak antigen specificky rozeznáván receptorem Th-lymfocytu* (obr. 321).
- ◆ B-lymfocyty se s upravenými antigeny vyskytují v lymfoidních folikulách lymfatických uzlin.



Obr. 322  
Buňky nabízející antigen



Obr. 323  
Úprava antigenu v B-lymfocytu a jeho rozeznání Th2-lymfocytém

**2. Makrofágy.** Jako v B-lymfocytech je antigen upravován též v makrofágách. Makrofágy se vyskytují ve všech místech lymfatických uzlin, pohlcují bakterie a odbourávají jejich proteiny, které vystavují upravené ve svém povrchu, kde jsou sdruženy s molekulami MHC II. Makrofágy působí v rámci vrozené (nespecifické) imunity. Mají v povrchu receptory pro různé složky mikrobiálních buněk. Patogenní mikroorganismy, které vstoupí do organismu, jsou jimi pohlceny a rozloženy. Ty, které uniknou jejich destruktivnímu účinku, musí být pak rozeznány buňkami působícími v rámci adaptivní imunity, což je umožněno makrofágy tím, že v nich perzistují vstřebané mikroorganismy, jejichž antigeny upravené do peptidové formy vystavují ve sdružení s MHC II-proteiny ve svém povrchu, kde jsou rozeznávány Th1-lymfocyty.

Makrofágy jsou rozptýleny po celém těle. Některé zůstávají v určitých tkáních (plíce, pojivové tkáně, játra, ledviny, mozek). Jiné jsou pohyblivé a amébovitém pohybem přecházejí do různých tkání. Na antigenní peptid ve sdružení s MHC II-molekulami v povrchu makrofága se svým receptorem vážou Th1-lymfocyty. Jedním z důsledků této vazby je produkce interferonu gama (INF- $\gamma$ ), kterým se makrofág aktivuje k pohlcování virů, bakterií atd. Kromě toho aktivované makrofágy produkují cytotoxické proteiny, které jim pomáhají eliminovat řadu patogenních mikroorganismů, buňky infikované viry, nádorové buňky a intracelulární bakterie.

**3. Dendritové buňky.** Dendritové buňky se rovněž vyznačují schopností upravovat antigeny. Virové a upravené antigeny se sdružují v jejich povrchu také s molekulami MHC. Ty dendritové buňky, které se soustředily do lymfatických tkání, syntetizují ve vysokých koncentracích molekuly MHC-I a MHC-II, a také kostimulační molekuly B7. Uvedené vlastnosti je činí mocnými aktivátory Th- a Tc-lymfocytů. K tomu přispívá ještě skutečnost, že na rozdíl od ostatních somatických buněk mohou být infikovány mnoha různými viry. Proto s vysokou účinností poskytují peptidy odvozené z virových proteinů, jak ve sdružení s MHC I- molekulami, které jsou rozpoznávány Tc-lymfocyty (které směřují k diferenciaci na výkonné buňky), tak i ve sdružení s MHC II-molekulami, které jsou rozpoznávány Th-lymfocyty diferencujícími se na výkonné Th1- a Th2-lymfocyty. *Dendritové buňky mohou tedy aktivovat Th- i Tc-lymfocyty, které se ještě nesetkaly s antigenem.*

Dendritové buňky se podle místa svého výskytu v organismu dělí do několika typů. Jsou to:

- ◆ **Langerhansovy buňky**, nacházející se v pokožce a v mukózních tkáních. Langerhansovy buňky nacházející se v pokožce přijímají antigen tím, že jej vstřebávají a pak přenášejí do lymfatických uzlin, kde diferencují na dendritové buňky, které již nevstřebávají antigen, ale stimulují aktivitu T-lymfocytů.
- ◆ **Intersticiální dendritové buňky**, které osídlují většinu orgánů (např. srdce, plíce, játra, ledviny, gastrointestinální ústrojí).

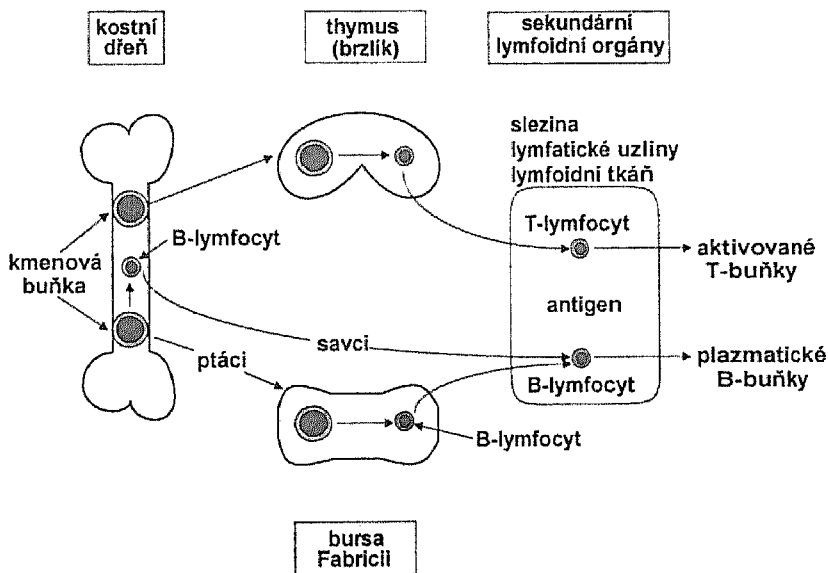
- ◆ **Proplétající se dendritové buňky**, které se vyskytují v sekundárních lymfoidních orgánech v oblastech, kde jsou T-lymfocyty (ve dřeni brzlíku).
- ◆ **Cirkulující dendritové buňky**, které se vyskytují v krvi (kde tvoří 0,1 % krevních leukocytů) a v lymfě.

**4. Buňky infikované viry.** Když virus infikuje hostitelskou buňku, dochází pak následně k replikaci jeho genomu (např. DNA u DNA-virů), který se přepisuje do mRNA překládané do virových proteinů. Tyto proteiny mohou být buňkou odbourány na peptidy, které podobně jako v předcházejících případech se zanoří do membrány *ve sdružení s MHC I-molekulami a jsou vystaveny jako antigen, který je rozeznán Tc-lymfocyty*. Touto interakcí je Tc-lymfocyty indukována v infikovaných buňkách apoptóza (programovaná smrt buněk).

**PRIMÁRNÍ A SEKUNDÁRNÍ IMUNITNÍ ODPOVĚĎ.** *První setkání organismu s příslušným antigenem se označuje jako primární imunitní odpověď*; je charakteristická přeměnou zralých B-lymfocytů na paměťové a výkonné B-buňky označované jako plazmatické buňky a přeměnou T-lymfocytů na paměťové T-buňky, výkonné Th-lymfocyty a Tc-lymfocyty.

- ◆ **Plazmatické buňky.** Produkují (sekretují) protilátky. Jelikož jsou jen krátce žijící, je produkce protilátek jen krátkodobá. Vyznačují se rozsáhlou tvorbou endoplazmatického retikula, jehož vnitřní část je naplněna molekulami imunoglobulinu, který se tvoří translací na ribozomech, kterými je retikulum pokryto.
- ◆ **Paměťové B-buňky.** *Paměťové buňky neprodukují protilátky, uchovávají si však schopnost reagovat na antigen, kterým byly vydifferentovány ze zralých B-lymfocytů a jsou dlouho žijící. V paměťových buňkách probíhá při vysoké četnosti mutace (přibližně  $10^{-3}$ /generaci) projevující se vysokou afinitou k antigenu, který původně vyvolal jejich vznik. Touto mutací se vyznačuje značná část paměťových buněk. Když je organismus znovu vystaven působení stejného antigenu, reagují na něj velmi účinně vysokou produkcí protilátek už jen paměťové buňky. Druhé setkání organismu s antigenem se označuje jako sekundární imunitní odpověď.*
- ◆ **Výkonné Th-lymfocyty.** *Jsou krátce žijící, a proto aktivní jen krátkodobě. Vyznačují se produkcí cytokinů, kterými aktivují a stimulují proliferaci plazmatických buněk.*
- ◆ **Výkonné Tc-lymfocyty.** *Jsou krátce žijící a proto aktivní jen krátkodobě. Vyznačují se toxickým účinkem na buňky infikované viry.*
- ◆ **Paměťové T-buňky.** *Jsou to dlouho žijící buňky, které jsou aktivovány na výkonné Th- a Tc-lymfocyty v rámci sekundární imunitní odpovědi.*

**DIFERENCIACE LYMFOCYTŮ.** Lymfocyty se vyskytují ve velkém množství v krvi, v lymfě a specializovaných lymfoidních orgánech, jako jsou brzlík, lymfatické uzliny, slezina (obr. 324). Lidské tělo obsahuje asi  $2 \times 10^{12}$  lymfocytů, které se vyvíjejí (diferencují) jako všechny ostatní krevní buňky (erytrocyty, trombocyty a granulocyty) z **hematopoetických kmenových buněk**. Tyto buňky se primárně vyskytují ve *fetálních játrech a u dospělých jedinců v kostní dřeni*. B-lymfocyty u savců migrují z kostní dřeni do krve. T-lymfocyty vznikají u všech obratlovců v brzlíku diferenciací prekurzorových buněk, které byly do brzlíku přeneseny z kostní dřeni krevní cestou. *Kostní dřeň, Fabriciova burza a brzlík se označují jako primární lymfoidní orgány, jelikož se v nich lymfocyty tvoří z prekurzorových buněk. Krví jsou z těchto orgánů přenášeny do sekundárních lymfoidních orgánů, což jsou lymfatické uzliny, slezina, Peyerovy plaky. V sekundárních lymfoidních tkáních reagují lymfocyty s antigeny, kterými jsou zralé B-lymfocyty a T-lymfocyty aktivovány k diferenciaci na výkonné buňky. Tak se označují T-lymfocyty a B-lymfocyty, které byly určitým mechanismem aktivovány k uskutečňování specifické funkce v imunitní odpovědi. Zralé B-lymfocyty jsou aktivovány k diferenciaci na výkonné buňky vazbou volného antigenu na jejich receptor, kdežto T-lymfocyty jsou aktivovány antigenem sdruženým s MHC-molekulou v povrchu buněk nabízejících antigen, který se váže na TCR-receptor T-lymfocytů. Ze zralého B-lymfocytu diferencují buňky dvojího typu:*



Obr. 324  
Vývoj B-lymfocytů a T-lymfocytů

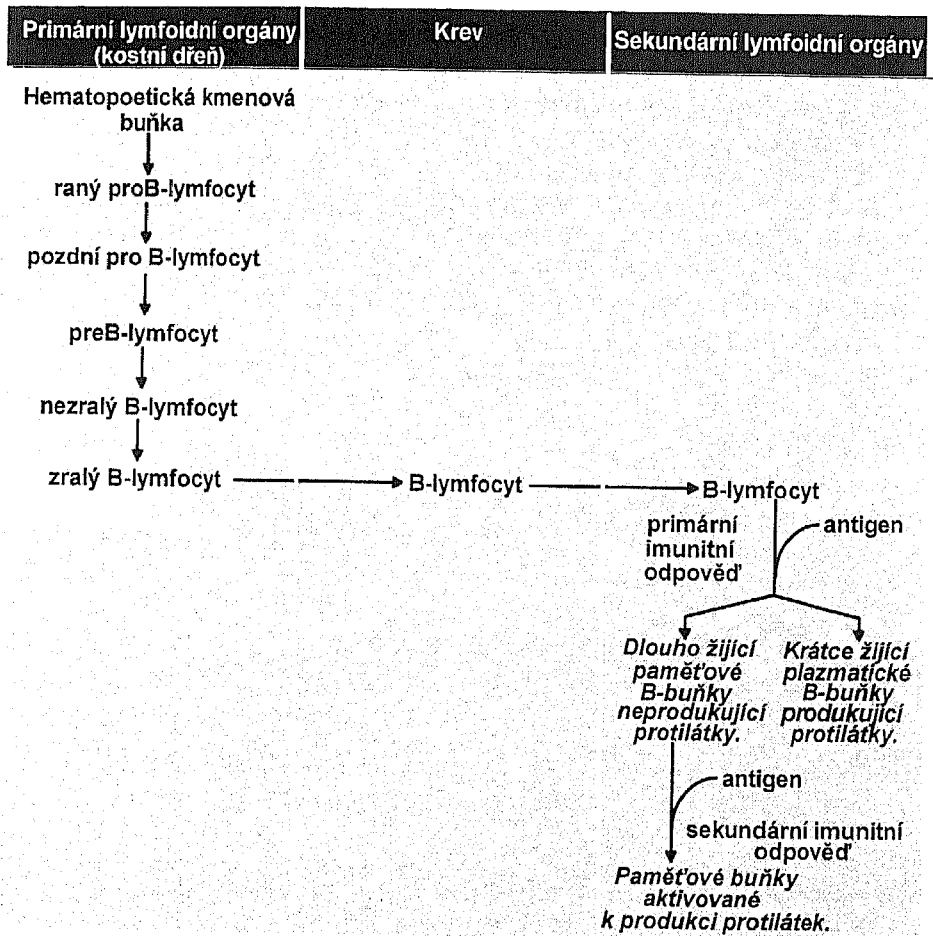
- ◆ plazmatické,
- ◆ paměťové.

Diferenciací T-lymfocytů vznikají:

- ◆ Th-lymfocyty,
- ◆ Tc-lymfocyty,
- ◆ paměťové T-lymfocyty.

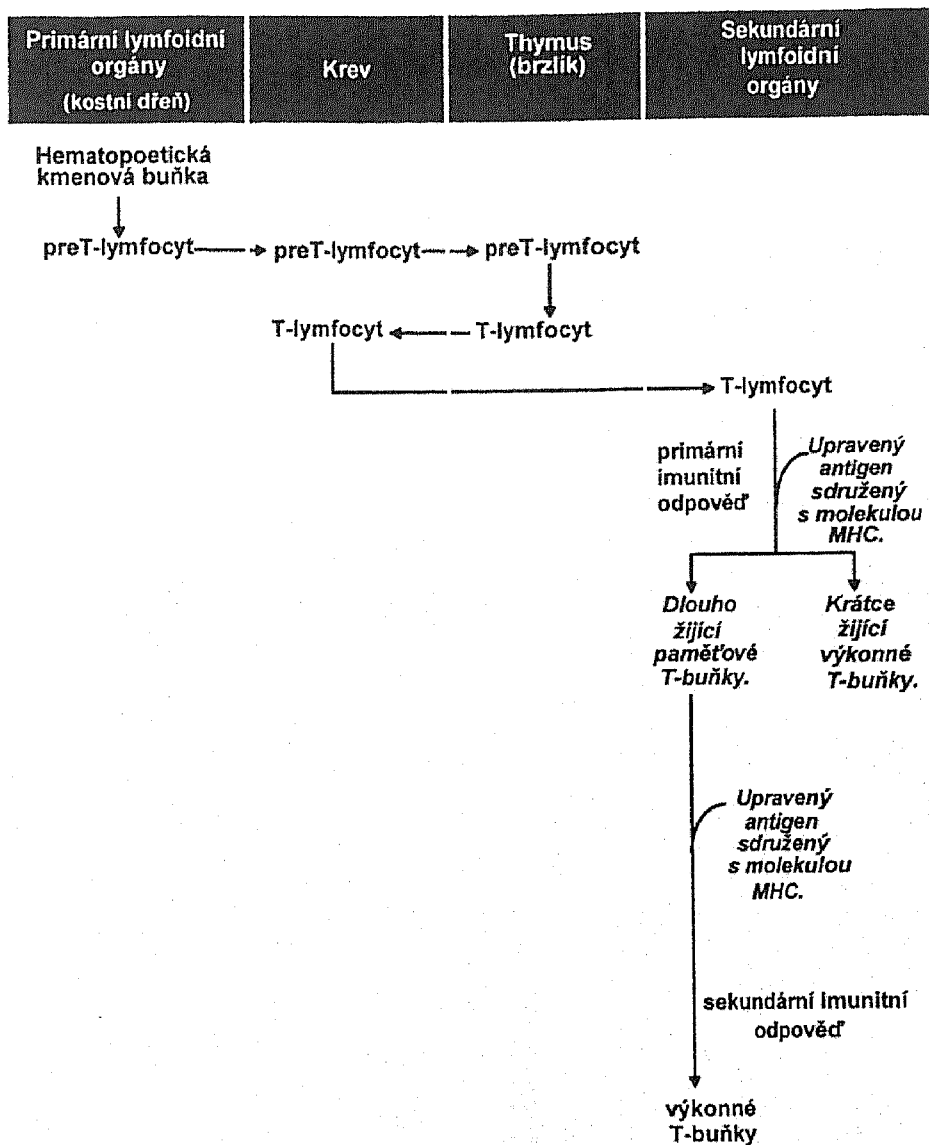
Výkonnými buňkami jsou plazmatické buňky, Th- a Tc-lymfocyty.

Jednotlivé vývojové stupně B-lymfocytů jsou schematicky uvedeny na



Obr. 325

Schéma vývoje B-lymfocytů v savčím organismu



Obr. 326

## Vývoj T-lymfocytů v savčím organismu

obr. 325 a T-lymfocytů na obr. 326. To je také konec kapitoly, ve které byly vyloženy některé základní pojmy z imunologie vztahující se k dalšímu textu, jehož předmětem je výklad molekulárních mechanismů, kterými se uskutečňují vztahy mezi lymfocyty v rámci humorální a buněčné imunitní odpovědi.

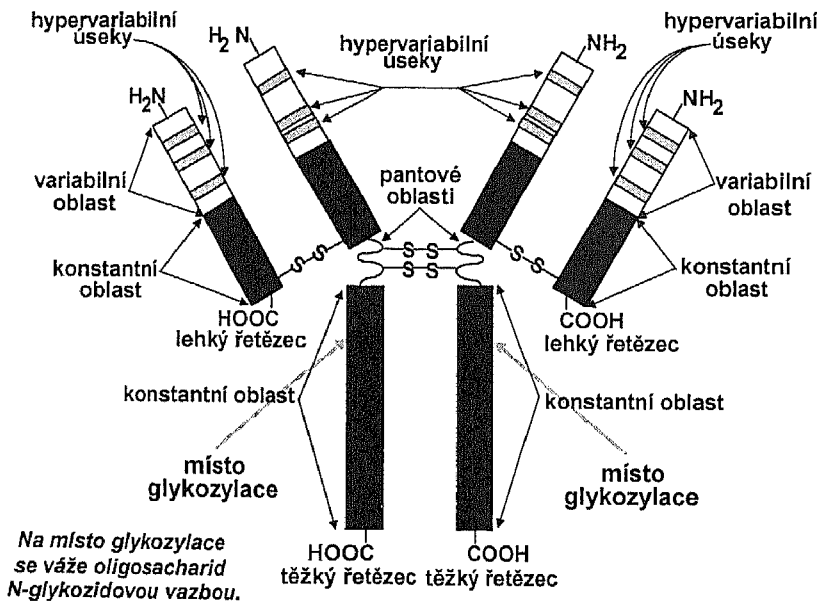


## 5.8.2

## Imunoglobuliny

**MOLEKULÁRNÍ STRUKTURA IMUNOGLOBULINŮ.** *Protilátky patří do skupiny proteinů, které se označují jako imunoglobuliny. Celkově je molekula imunoglobulinu složena minimálně ze čtyř polypeptidových řetězců, a to (obr. 327):*

- ◆ ze dvou **těžkých (H) řetězců** o stejné primární struktuře;
  - ◆ ze dvou **lehkých (L) řetězců**, které mají také stejnou primární strukturu.
- Těžké řetězce obsahují asi 430 aminokyselinových zbytků a lehké asi 214. Molekula imunoglobulinu je držena pohromadě sulfidickými vazbami. Každý řetězec sestává ze dvou základních oblastí:
- ◆ **konstantní oblasti (C)**, tj. úseku vyznačujícího se *relativně neměnnou sekvencí aminokyselin u všech imunoglobulinů příslušného typu těžkého nebo lehkého řetězce*;
  - ◆ **variabilní oblasti (V)**, tj. úseku, kterým se *imunoglobuliny příslušného typu těžkého nebo lehkého řetězce navzájem liší*.



Obr. 327

Schéma molekuly imunoglobulinu

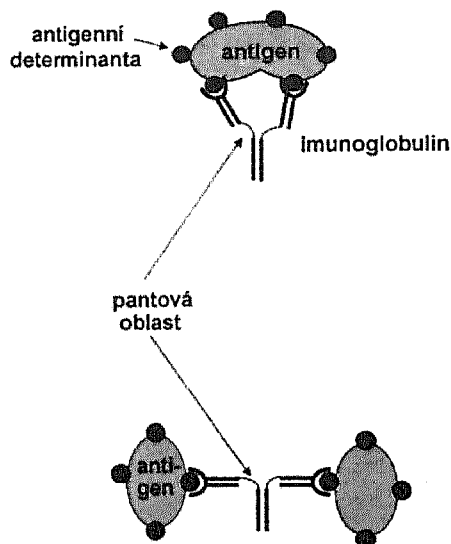
Konstantní oblast těžkého řetězce se označuje jako  $C_H$ , lehkého jako  $C_L$ , kdežto variabilní oblast těžkého řetězce se označuje jako  $V_H$  a lehkého jako  $V_L$ .

Variabilní oblast každého řetězce je, co se týče sekvence aminokyselin, složena ze tří hypervariabilních úseků a čtyř úseků základní struktury. **Hypervariabilní úseky jsou v primární struktuře značně proměnlivé na rozdíl od úseků základní struktury, které jsou proměnlivé méně.** Význam hypervariabilních úseků spočívá především v tom, že tvoří vazebná místa pro antigen ve variabilní oblasti. *Specifita imunoglobulinu vzhledem k antigenu je především podmíněna primární strukturou hypervariabilních úseků, a jelikož se vzhledem k antigenu vyznačují komplementárním povrchem (str. 40), označují se jako oblasti určující komplementaritu (zkr. CDR).*

Část konstantní oblasti těžkého řetězce je flexibilní a označuje se jako **oblast pantová**. Tato oblast usnadňuje vazbu antigenu k imunoglobulinu tím, že mění konformaci imunoglobulinu vzhledem k determinantám na molekule antigenu (obr. 328).

Imunoglobuliny jsou glykozylovány, tj. připojují se na ně sacharidy N-glykozidovou vazbou (str. 19, obr. 7). Glykozylace probíhá na různých místech těžkého řetězce. Na obr. 327 je uvedeno místo glykozylace u imunoglobulinu třídy G. Dále již kromě obr. 333 nebudeme místa glykozylace uvádět.

**KLASIFIKACE LEHKÝCH ŘETĚZCŮ.** Existují dva typy lehkých



Obr. 328

Vliv pantové oblasti na optimální vazbu antigenu k imunoglobulinu

řetězců. Jeden typ se označuje jako  $\kappa$  (**kappa**) a druhý jako  $\lambda$  (**lambda**). *Imunoglobuliny se stejným typem lehkých řetězců mají stejnou konstantní oblast a liší se navzájem ve variabilní oblasti.* Variabilní a konstantní oblast lehkých řetězců se označuje:

$$V_{\kappa}, V_{\lambda}, C_{\kappa}, C_{\lambda},$$

přičemž je nutno mít na zřeteli, že  $V_{\kappa}$  se v řetězci vždy spojuje s  $C_{\kappa}$ , kdežto  $V_{\lambda}$  se spojuje s  $C_{\lambda}$ . Molekulová hmotnost lehkých řetězců je přibližně 23 000.

**KLASIFIKACE TĚŽKÝCH ŘETĚZCŮ.** U člověka je pět základních typů těchto řetězců:

$$\gamma, \alpha, \mu, \delta, \epsilon.$$

*Imunoglobuliny se stejným typem těžkých řetězců mají stejnou konstantní oblast a liší se navzájem ve variabilní oblasti.* Typy  $\gamma$  mají ještě čtyři podtypy:

$$\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3, \gamma_4.$$

Skupina imunoglobulinů typu  $\alpha$  se dělí na dva podtypy:

$$\alpha_1, \alpha_2.$$

**IMUNOGLOBULINOVÉ TŘÍDY.** Jak již bylo uvedeno, imunoglobulin sestává ze dvou lehkých a dvou těžkých řetězců. Podle toho, jaký typ nebo podtyp těžkého řetězce se v molekule imunoglobulinu vyskytuje, zařazujeme imunoglobulin do jedné z pěti tříd neboli **izotypů**, případně podtříd. *Imunoglobulin stejné třídy (izotypu) nebo podtřídy má stejný typ nebo podtyp těžkého řetězce, přičemž lehké řetězce mohou být  $\kappa$  nebo  $\lambda$ .* V sumárním vzorci vyjádříme variabilní a konstantní oblast lehkého a těžkého řetězce

$$V_L C_L V_H C_H,$$

kde indexy L a H lze specifikovat typem nebo podtypem řetězce, např.

$$V_{\lambda} C_{\lambda} V_H C_{\delta},$$

což znamená, že lehký řetězec v imunoglobulinu je typu  $\lambda$  a těžký je typu  $\delta$ , podle něhož patří do třídy IgD.

V tab. 31 jsou uvedeny základní charakteristiky tříd a podtříd lidských imunoglobulinů a v tab. 32 imunoglobulinů myších.

Imunoglobuliny jednotlivých tříd se liší biologickou funkcí a výskytem (např. u člověka):

◆ **Imunoglobulin IgG.** *Vyskytuje se v krevním séru ze všech ostatních tříd v největším množství. Tvoří až 80% všech imunoglobulinů v krevním séru.*

Tab. 31  
Klasifikace lidských imunoglobulinů

Třída	Podtřída	Lehký řetězec (L)	Těžký řetězec (H)	Celková molekul. hmotnost	Počet lehkých a těžkých řetězců v molekule
IgG	IgG1	κ nebo λ	γ1	146 000	L <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
	IgG2		γ2	146 000	
	IgG3		γ3	165 000	
	IgG4		γ4	146 000	
IgA	IgGA1		α1	160 000	L <sub>2</sub> H <sub>2</sub> nebo (L <sub>2</sub> H <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>
	IgGA2		α2	160 000	
IgM	IgGM		μ	970 000	(L <sub>2</sub> H <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>
IgD	-		δ	184 000	L <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
IgE	-	ε	188 000	L <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	

Tab. 32  
Klasifikace myších imunoglobulinů

Třída	Podtřída	Lehký řetězec (L)	Těžký řetězec (H)	Počet lehkých a těžkých řetězců v molekule
IgG	IgG1a	κ nebo λ	γ1	L <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
	IgG2a		γ2a	
	IgG2b		γ2b	
	IgG3		γ3	
IgA	-		α	L <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
IgM	-		μ	
IgD	-		δ	L <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
IgE	-		ε	L <sub>2</sub> H <sub>2</sub>

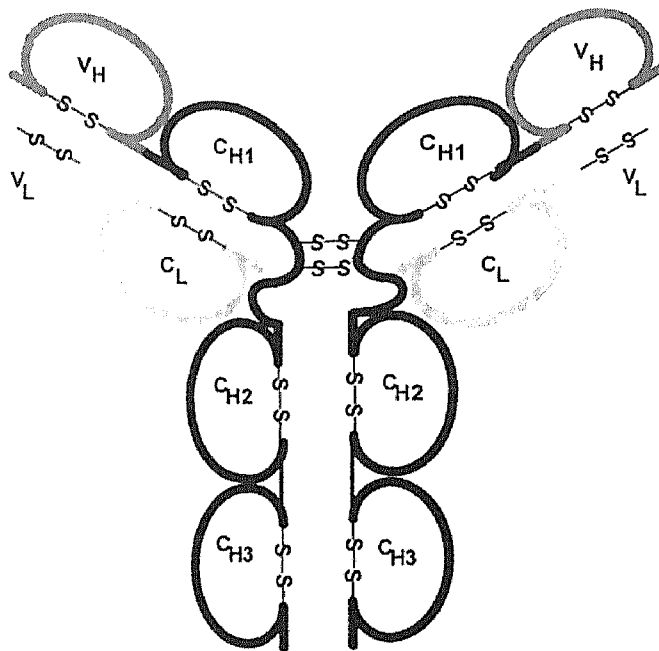
- ◆ **Imunoglobulin IgM.** Tvoří 5 - 10% celkového imunoglobulinu. *Monomerní IgM se v B-lymfocytech váže na membránu, kde působí jako receptor pro antigen. V rámci primární imunitní odpovědi jsou imunoglobuliny třídy IgM produkovány jako první ze všech tříd.* Syntetizuje se též jako první v novorozenci. Díky pentamerní struktuře se vyznačuje 10ti vazebnými místy pro antigen. Avšak vlivem stérické zábrany se na něj může vázat jen 5 větších antigenů současně. Celkově je ze všech tříd nejúčinnější ve vazbě virových částic. Vlivem své velikosti nemůže difundovat, a proto se v mezibuněčných tekutinách vyskytuje v nízkých koncentracích.
- ◆ **Imunoglobulin IgA.** Tvoří jen 10 - 15% celkového sérového imunoglobulinu. *Je však převládajícím imunoglobulinem v sekretech (kolostrum, sliny, slzy, hlen aj.).* V séru se vyskytuje jako monomer, vzácněji jako dimer, trimer nebo tetramer. Sekreční IgA je dimer nebo tetramer. Denní produkce sekrečního IgA je vyšší než kteréhokoli jiného imunoglobulinu. Plazmatické buňky sekretující IgA se soustřeďují na mukózním povrchu membrán, které jsou hlavním vstupním místem pro patogenní mikroorganismy. Sekreční IgA také představuje první obrannou linii proti bakteriím (*Salmonella, Vibrio cholerae, Neisseria gonorrhoeae, virus chřipky aj.*).
- ◆ **Imunoglobulin IgD.** Tvoří 0,2% celkového sérového imunoglobulinu. *Společně s IgM je hlavním membránovým imunoglobulinem v B-lymfocytech.*
- ◆ **Imunoglobulin IgE.** *Je bezprostředním zprostředkovatelem hypersenzitivní reakce projevující se alergickými stavy jako je senná rýma, alergické astma, kopřivka, anafylaktický šok. Kontakt membránového IgE mastocytů s alergenem způsobuje jejich degranulaci, kterou se uvolňuje histamin a jiné látky způsobující alergické reakce. Alergen je neinfekční antigen, který indukuje hypersenzitivní reakce nebo alergické reakce většinou zprostředkované IgE-imunoglobuliny.*

**DOMÉNY IMUNOGLOBULINOVÝCH ŘETĚZCŮ.** U imunoglobulinových řetězců je každá doména stabilizována disulfidovou vazbou. Prostřednictvím této vazby se spojuje proximální a distální část stejné domény za vzniku smyčky (obr. 329). Lehký řetězec se vyznačuje dvěma doménami:

- ◆ doménou  $C_L$ , která tvoří jeho konstantní oblast;
- ◆ doménou  $V_L$ , která tvoří jeho variabilní oblast.

Též každý těžký řetězec má doménu, která tvoří jeho variabilní oblast (doména  $V_H$ ), ale na rozdíl od lehkých řetězců je konstantní oblast tvořena několika doménami, a to:

- ◆ u řetězců  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$  třemi doménami  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ;

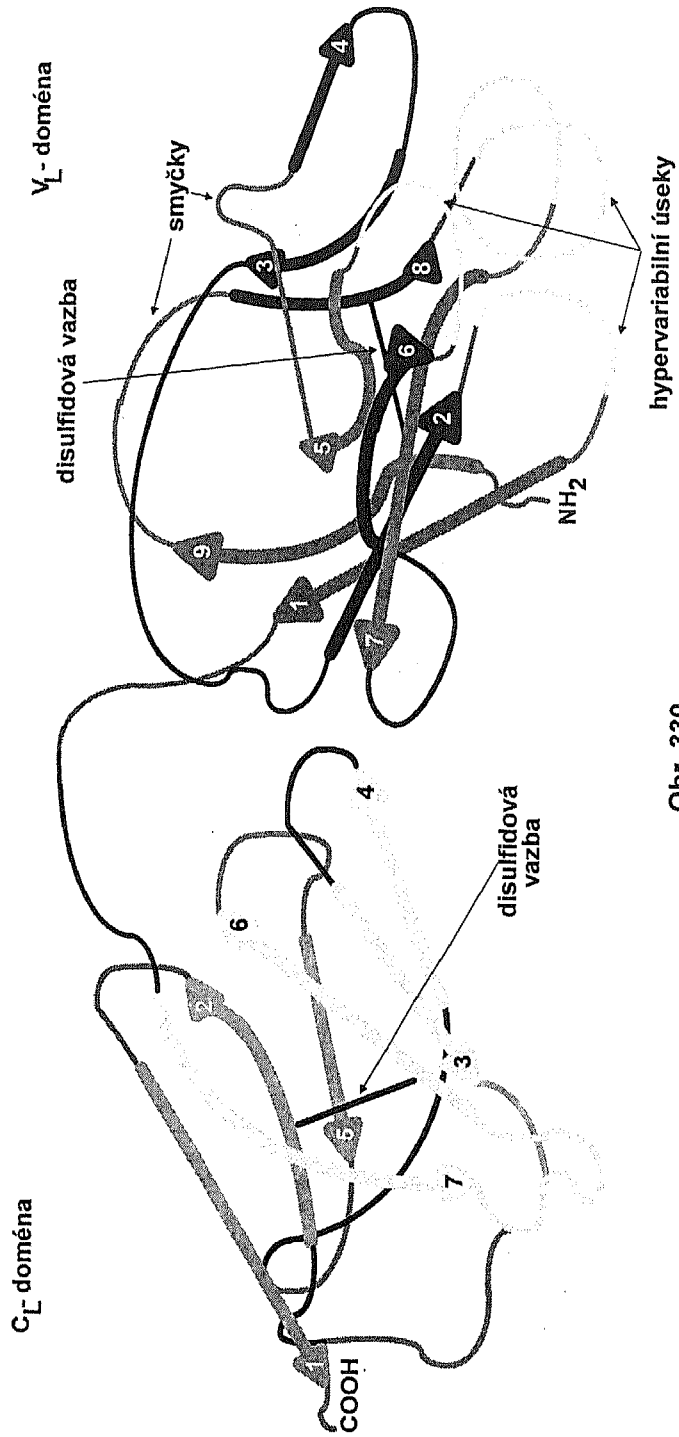


*Imunoglobuliny tříd  
IgD, IgG a IgA  
mají čtyři domény.*

*Imunoglobuliny tříd  
IgM a IgE  
mají pět domén.*

**Obr. 329**  
**Domény imunoglobulinů**

- ◆ u řetězců  $\mu$  a  $\epsilon$  čtyřmi doménami  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$  a  $C_{H4}$ .  
Uvedené domény mohou být symbolicky specifikovány podle typu řetězce, např.  $C_{\delta 1}$ ,  $C_{\delta 2}$ ,  $C_{\delta 3}$  nebo  $C_{\mu 1}$ ,  $C_{\mu 2}$ ,  $C_{\mu 3}$ ,  $C_{\mu 4}$  atd.  
Celkově tedy
- ◆ řetězce  $\kappa$  a  $\lambda$  se vyznačují dvěma doménami ( $V_L$ ,  $C_L$ );
- ◆ řetězce  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$  se vyznačují čtyřmi doménami ( $V_H$ ,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ );
- ◆ řetězce  $\mu$  a  $\epsilon$  se vyznačují pěti doménami ( $V_H$ ,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$  a  $C_{H4}$ ).  
Bereme-li v úvahu lehké a těžké řetězce celé molekuly imunoglobulinu, pak lze říci, že imunoglobuliny tříd:
  - ◆ **IgD, IgG a IgA** mají domény  $V_L$ ,  $C_L$ ,  $V_H$ ,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ;
  - ◆ **IgM a IgE** mají domény  $V_L$ ,  $C_L$ ,  $V_H$ ,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ,  $C_{H4}$ .

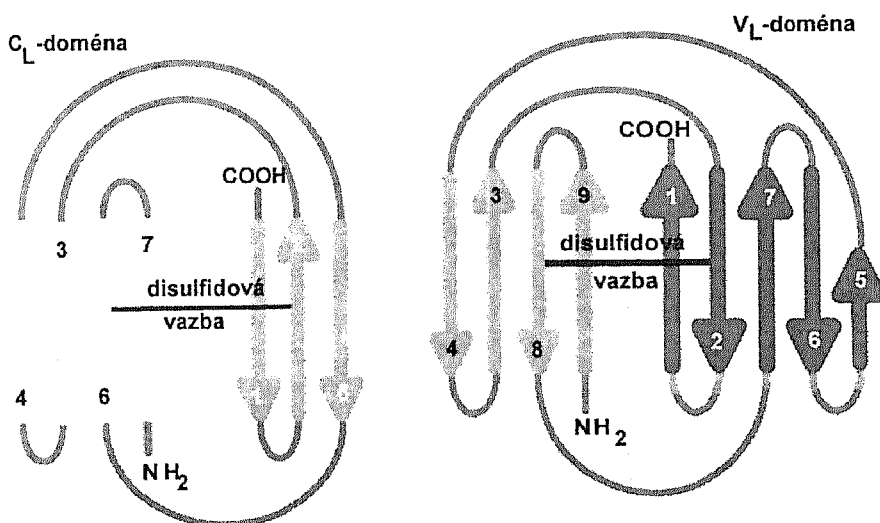


Obr. 330  
Zjednodušené schéma  $C_L$ - a  $V_L$ -domén

**STRUKTURA IMUNOGLOBULINOVÝCH DOMĚN.** Imunoglobulinové domény sestávají z  $\beta$ -skládaných listů (str. 27), které jsou navzájem antiparalelní a jsou spojeny různě dlouhými smyčkami. Na obr. 330 je uveden příklad  $V_L$ - a  $C_L$ -domény. Celá struktura domény je stabilizována vodíkovými vazbami, které přes skupiny  $-NH$  a  $-CO$  spojují sousední řetězce skládaného listu (obr. 11a, str. 28). V řetězcích se střídají hydrofobní a hydrofilní aminokyselinové zbytky, jejichž postranní řetězce jsou seřazeny kolmo k rovině  $\beta$ -skládaného listu tak, že hydrofobní aminokyseliny jsou orientovány dovnitř a hydrofilní vně. Uvnitř domény jsou dva  $\beta$ -skládané listy, které jsou spojeny disulfidovou vazbou. V-doména je o něco delší než doména C a obsahuje o jednu smyčku a o jednu dvojici řetězců více než doména C. Tato smyčka spojuje skládané řetězce (viz též obr. 331) navzájem (vždy jednu dvojici z antiparalelních řetězců). Domény těžkých řetězců mají podobnou strukturu. V reálnějším pohledu si pak molekulu imunoglobulinu můžeme představit podle obr. 332.

*Antigen se váže na aminokyselinové zbytky hypervariabilních úseků, přičemž více aminokyselinových zbytků vázajících se na antigen je v hypervariabilních úsecích ve  $V_H$ -doménách těžkých řetězců. Nejvíce kontaktů s antigenem má CDR3 ve  $V_H$ -doméně. Při kontaktu s antigenem dochází ke změně konformace domény.*

### STRUKTURNÍ ZVLÁŠTNOSTI IMUNOGLOBULINŮ JEDNOTLIVÝCH



Obr. 331

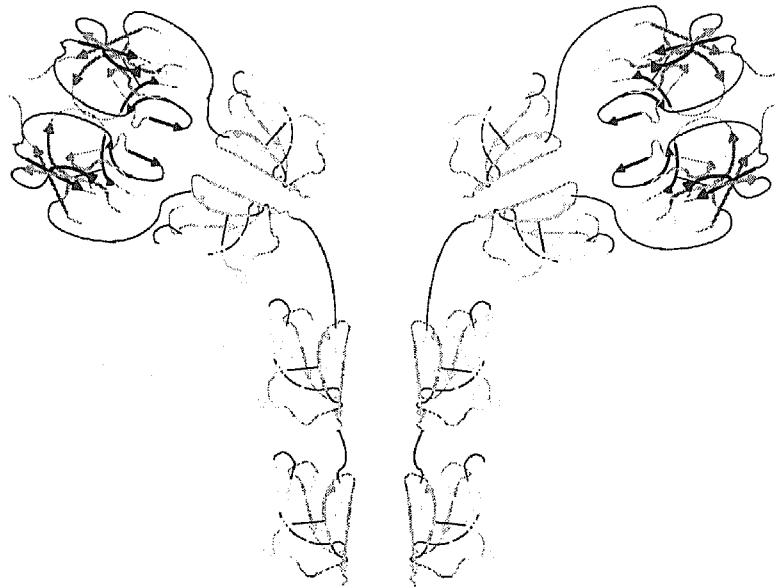
Diagram vztahů mezi  $\beta$ -skládanými listy a smyčkami  
v doménách C a V



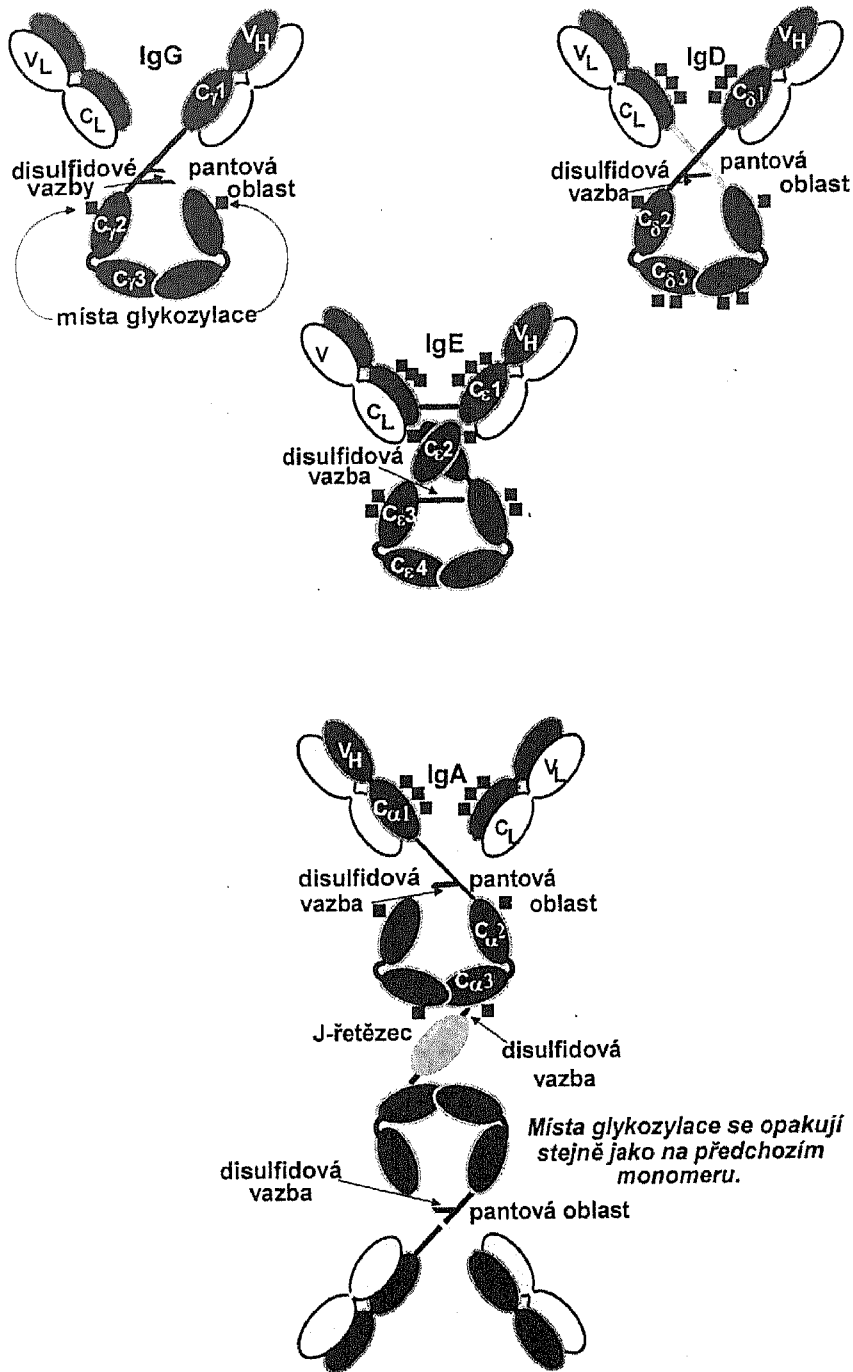
**TŘÍD.** Imunoglobuliny téže třídy jsou charakteristické jedinečnou sekvencí aminokyselin v konstantní oblasti těžkého řetězce, kterou se výrazně liší od imunoglobulinů jiných tříd. *Konstantní oblast těžkého řetězce určuje zařazení imunoglobulinu do dané třídy.* Dále se imunoglobuliny jednotlivých tříd navzájem liší (obr. 333 a 334):

- ◆ počtem a uspořádáním polypeptidových řetězců, které tvoří molekulu imunoglobulinu,
- ◆ počtem disulfidových vazeb,
- ◆ přítomností pantové oblasti,
- ◆ přítomností **J-řetězce** neboli **spojovacího polypeptidu**, tj. *polypeptidového řetězce o jedné doméně spojujícího dva těžké řetězce u třídy IgA a IgM (obr. 335),*
- ◆ počtem a umístěním míst glykozylace.

J-řetězec se dostává do molekuly imunoglobulinu třídy IgA a IgM posttranslačně ještě před jeho sekrecí z buňky. Je zpevněn jednou disulfidovou vazbou. Gen kódující tento řetězec je u člověka lokalizován na chromozomu 4 a u myši na chromozomu 5.

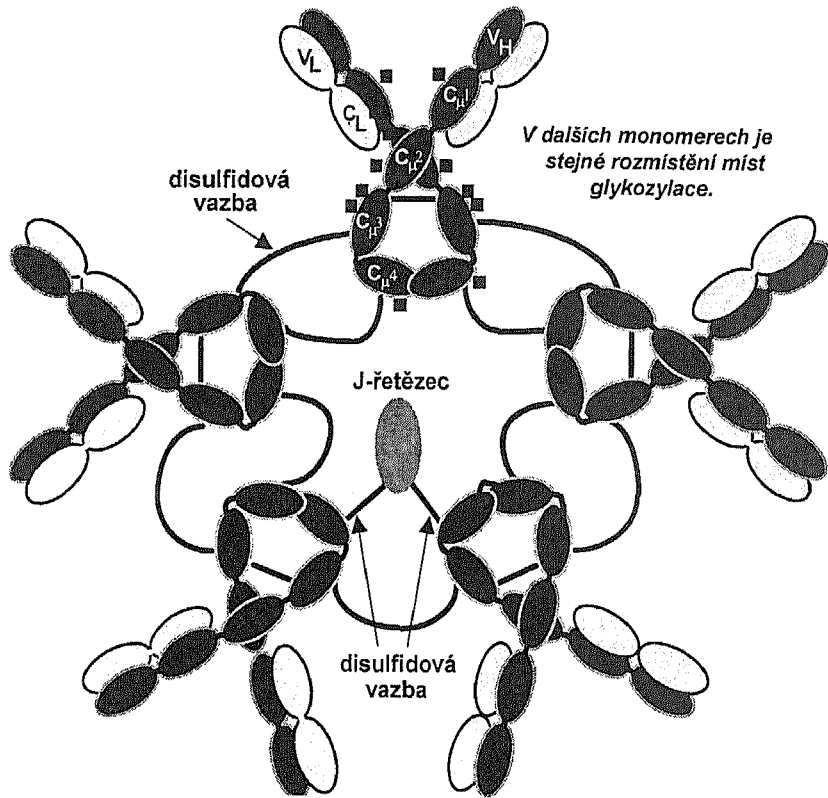


**Obr. 332**  
Pohled na strukturu domén imunoglobulinu



Obr. 333

Schéma molekul imunoglobulinů třídy IgG, IgD, IgE a IgA

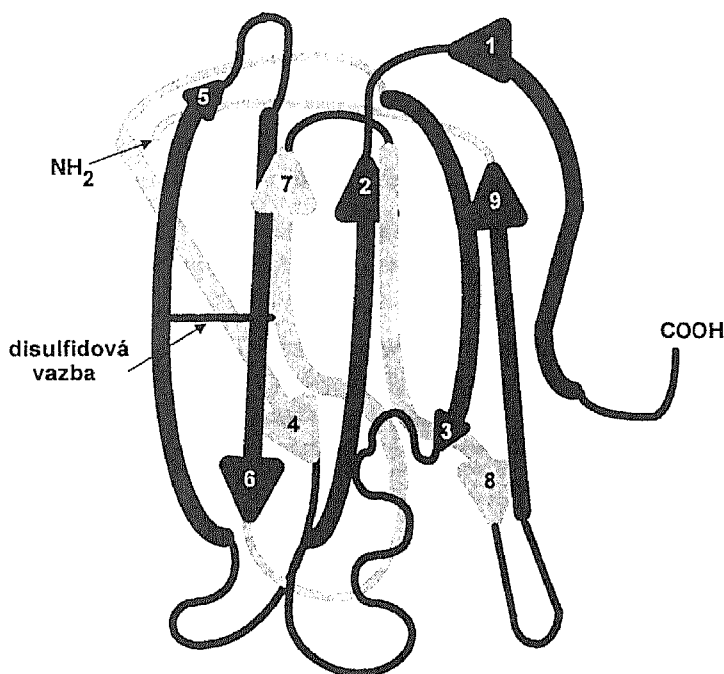


Obr. 334  
Schéma molekuly imunoglobulinu třídy IgM

### 5.8.3

#### Molekulární podstata tvorby protilátek

**STRUKTURNÍ GENY PRO IMUNOGLOBULINY.** Dalo by se předpokládat, že se po rodičích dědí celé geny, které kódují polypeptidové řetězce, jež tvoří molekulu imunoglobulinu. Ale není tomu tak. Dědí se jen segmenty těchto genů, které můžeme nazývat **subgeny** nebo **genovými segmenty**. Avšak žádný z těchto segmentů nepředstavuje ještě funkční gen, neboť není ukončen terminačním kodonem a nekóduje tedy funkční polypeptid. Teprve jejich spojováním se podle vývojového programu organismu vytvoří během diferenciaci B-lymfocytů příslušné geny, jejichž informace je překládána do primární struktury jedné molekuly lehkého nebo těžkého řetězce, neboť první segment na svém 5'-konci pozitivního řetězce obsahuje iniciační kodon a poslední segment na 3'-konci



Obr. 335  
Schéma J-řetězce

kodon terminační. Genové segmenty nejsou tedy hotové funkční geny, ale jejich "stavební složky", z nichž se během diference sestavuje strukturní gen kódující primární strukturu lehkého nebo těžkého řetězce imunoglobulinu. Odkazujeme v této souvislosti na definici strukturního genu uvedenou na str. 140. Vzhledem k tomu, že *tyto segmenty jsou stavebními složkami genu, které se dědí*, označujeme je jako "subgeny". Tomuto termínu dáváme v této učebnici přednost pro jeho jednoslovnost. Jinak se většinou používá termín "genový segment". Výsledný gen představuje vždy určitou kombinaci těchto stavebních složek. Touto kombinací se pak geny pro imunoglobulinové řetězce navzájem liší. *Proces kombinování genových segmentů (subgenů) se uskutečňuje zvláštním mechanismem označovaným jako přeskupování subgenů (genových segmentů)*. Synonymní termín též velmi často používaný je **V(D)JC-rekombinace**.

*Subgeny či genové segmenty, které jsou stavebními jednotkami strukturních genů kódujících imunoglobulinové řetězce (těžké a lehké), budeme označovat jako VDJC-subgeny, jelikož se rozdělují do těchto skupin:*

- ◆ **L-subgeny**, které představují vedoucí sekvenci a kódují signální peptid (str. 414) imunoglobulinového řetězce. Existuje tolik L-subgenů, kolik je V-sub-

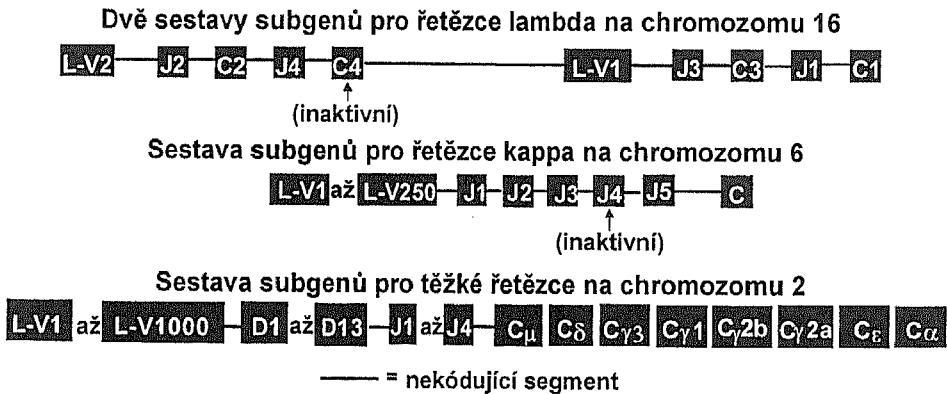
genů (viz dále). Před každým L-subgenem se nachází promotor, který je aktivní až po vytvoření genu kódujícího lehký nebo těžký řetězec.

- ◆ **V-subgeny**, které kódují variabilní oblast imunoglobulinového řetězce (V-domény). Každému V-subgenu předchází L-subgen oddělený od V-subgenu krátkým intronem.
- ◆ **C-subgeny**, které kódují konstantní oblast imunoglobulinového řetězce.
- ◆ **J-subgeny**, z nichž každý kóduje 12 až 21 koncových aminokyselin variabilní oblasti jak u lehkých tak i těžkých řetězců. Úseky kódované J-subgeny sousedí s konstantní oblastí.
- ◆ **D-subgeny**, z nichž každý kóduje zhruba 5 aminokyselin třetího hypervariabilního úseku těžkých řetězců. Podílejí se na kódování jen těžkých řetězců. Na chromozomové DNA sousedí skupina D-subgenů ze strany levé s posledním V-subgenem a z pravé strany s prvním J-subgenem.

Poznámka: V dalším textu nebudeme u každého termínu "subgen" opakovat "VDJC", jelikož z textu bude zřejmé, že jde o tento typ subgenů či genových segmentů.

**SESTAVY SUBGENŮ NA CHROMOZOMOVÉ DNA MYŠÍ.** Imunitní systém myši je nejlépe prostudován. Velmi podobný je imunitní systém člověka. Určité zvláštnosti se vyskytují u ptáků.

U myši tvoří subgeny tři sestavy, které jsou umístěny na třech různých chromozomech. Jsou to (obr. 336):



Číslo přiřazené k jednotlivým písmenům  
představují pořadová čísla subgenů.

Obr. 336

Pořadí subgenů pro imunoglobuliny na chromozomech myši

1. Sestava pro  $\lambda$ -řetězce, která je umístěna na chromozomu 16. Je složena ze dvou  $V_\lambda$ -subgenů, čtyř  $J_\lambda$ -subgenů a čtyř  $C_\lambda$ -subgenů (jeden je neaktivní). Ke každému  $C_\lambda$ -subgenu je v této sestavě již přiřazen určitý  $J_\lambda$ -subgen. To znamená, že dvojice  $J_\lambda C_\lambda$  jsou fixní. Avšak ke kterékoli z nich se může přiřadit kterýkoli  $V_\lambda$ -subgen.

2. Sestava pro  $\kappa$ -řetězce, která je umístěna na chromozomu 6. Je složena asi z 250  $V_\kappa$ -subgenů, pěti  $J_\kappa$ -subgenů (jeden je neaktivní) a jednoho  $C_\kappa$ -subgenu.

3. Sestava na chromozomu 2, která obsahuje 200 až 1000  $V_H$ -subgenů, třináct  $D_H$ -subgenů různé délky, čtyři  $J_H$ -subgeny různé délky a osm  $C_H$ -subgenů, tj.  $C_\mu$ ,  $C_\delta$ ,  $C_{\gamma 1}$ ,  $C_{\gamma 3}$ ,  $C_{\gamma 2b}$ ,  $C_{\gamma 2a}$ ,  $C_\epsilon$  a  $C_\alpha$ - subgen.

**SESTAVY SUBGENŮ NA CHROMOZOMOVÉ DNA ČLOVĚKA.** Sestavy subgenů u člověka jsou lokalizovány do chromozomů 22, 2 a 14 (obr. 337). Všimněte si rozdílů v počtech subgenů jednotlivých typů u člověka a u myši. Podobně jako u myši vyskytují se některé typy subgenů v repeticích, např. čtyři repetice subgenů  $C_\lambda$  na chromozomu 22 aj.

**ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA PŘESKUPOVÁNÍ SUBGENŮ.** Proces přeskupování subgenů probíhá v kostní dřeni při diferenciaci B-lymfocytů, a to za nepřítomnosti antigenu. Je základním zdrojem rozmanitosti protilátek, jelikož zodpovídá za vznik různých kombinací subgenů. Tyto kombinace pak představují geny pro lehké nebo těžké imunoglobulinové řetězce.

**Dvě sestavy subgenů pro řetězce lambda na chromozomu 22**



**Sestava subgenů pro řetězce kappa na chromozomu 2**



**Sestava subgenů pro těžké řetězce na chromozomu 14**



— = nekódující segment      neaktivní

Číslo přiřazená k jednotlivým písmenům představují pořadová čísla subgenů.

Obr. 337

Pořadí subgenů pro imunoglobuliny na chromozomech člověka

Shrňme nyní pravidla, kterými se řídí přeskupování subgenů, abychom tento poměrně složitý proces snadněji pochopili:

1. Geny, které kódují lehké a těžké řetězce imunoglobulinů, se nedědí hotové, ale ve formě svých segmentů - subgenů.

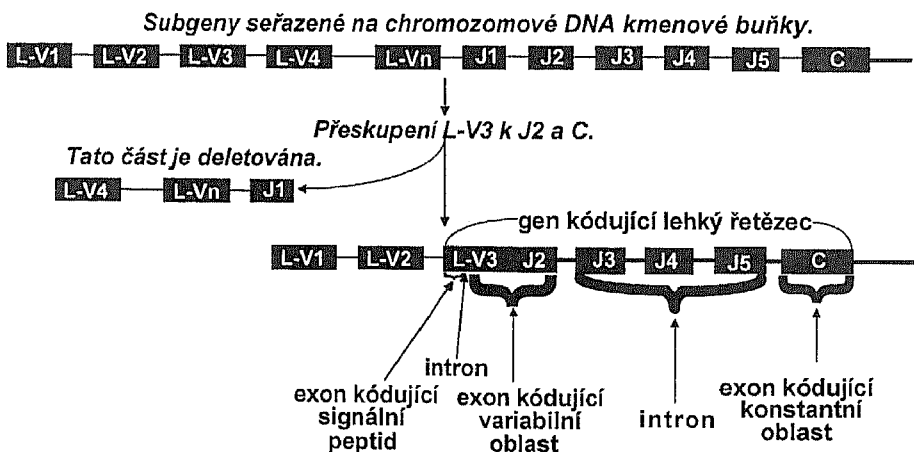
2. Geny kódující lehké a těžké řetězce imunoglobulinů se tvoří podle vývojového programu organismu během diferenciaci B-lymfocytů v *kostní dřeni přeskupováním subgenů do různých kombinací*, které u genů pro těžké řetězce začíná v raných proB-lymfocytech a u genů pro řetězce lehké v malých preB-lymfocytech.

3. *Přeskupování, které vede k tvorbě genů pro lehké řetězce, se děje tak, že se V-subgen spojí s J-subgenem za vyloučení (delece) celého úseku mezi nimi včetně všech V-subgenů a J-subgenů, které do tohoto konkrétního spojení nevcházejí. Zůstává zachována jen sekvence mezi L a V a V a C. Takto se vytvoří gen kódující lehký řetězec*, který má následující strukturu (obr. 338):

### L - VJ - C,

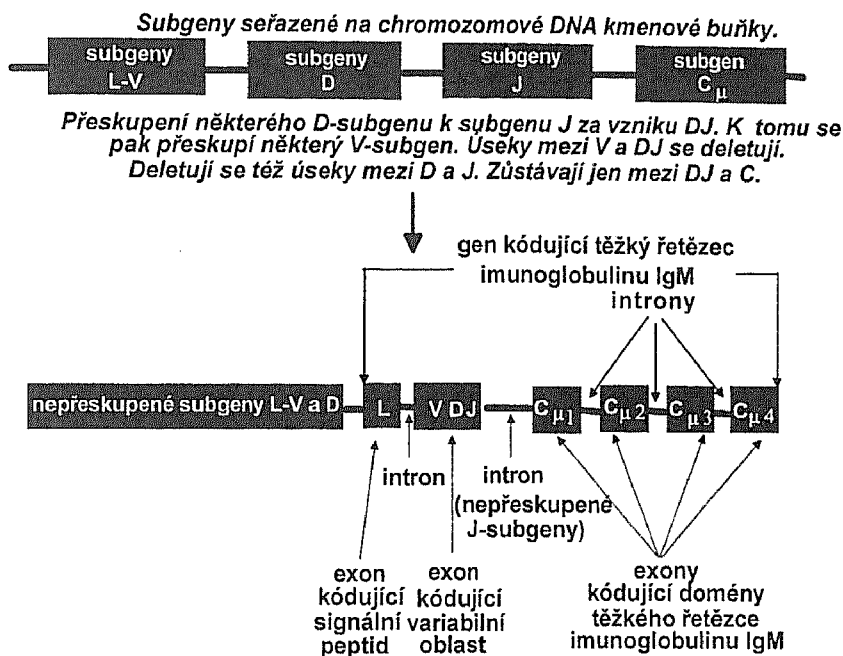
kde L, VJ a C jsou konstitutivní exony, pomlčky jsou introny.

4. Přeskupování, které vede k tvorbě genů pro těžké řetězce, se děje podobně. Rozdíl je však jen v tom, že se *D-subgen spojí nejdříve s J-subgenem a k tomu se pak přiřadí V-subgen za vyloučení (delece) celého úseku mezi nimi včetně všech V-subgenů a D-subgenů, které do tohoto konkrétního spojení nevstoupily. Zůstává zachována jen sekvence mezi L a V a V a C. Takto se vytvoří gen kódující těžký řetězec  $\mu$ . Schematicky lze strukturu tohoto řetězce vyjádřit jako (obr. 339):*



Obr. 338

Schéma vysvětlující přeskupení subgenů vedoucí k tvorbě genu kódujícího lehký řetězec imunoglobulinu



Obr. 339

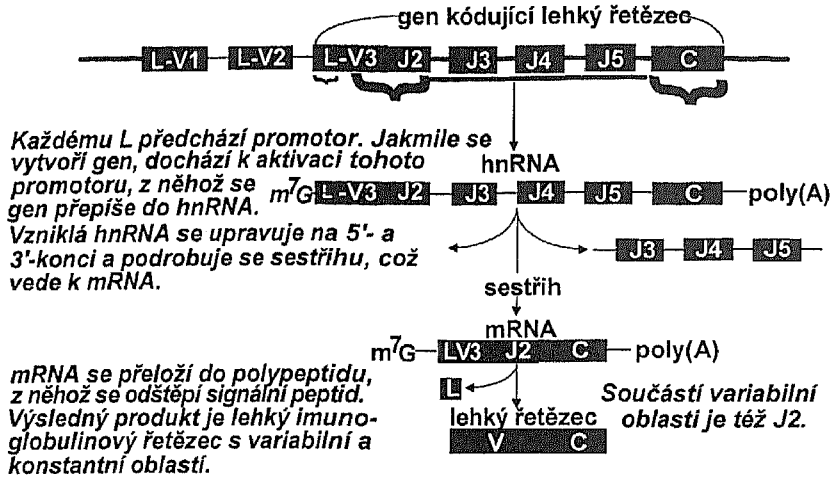
**Schéma vysvětlující přeskupení subgenů vedoucí k tvorbě genu kódujícího těžký řetězec imunoglobulinu IgM**

### L - VDJ - C<sub>μ</sub>

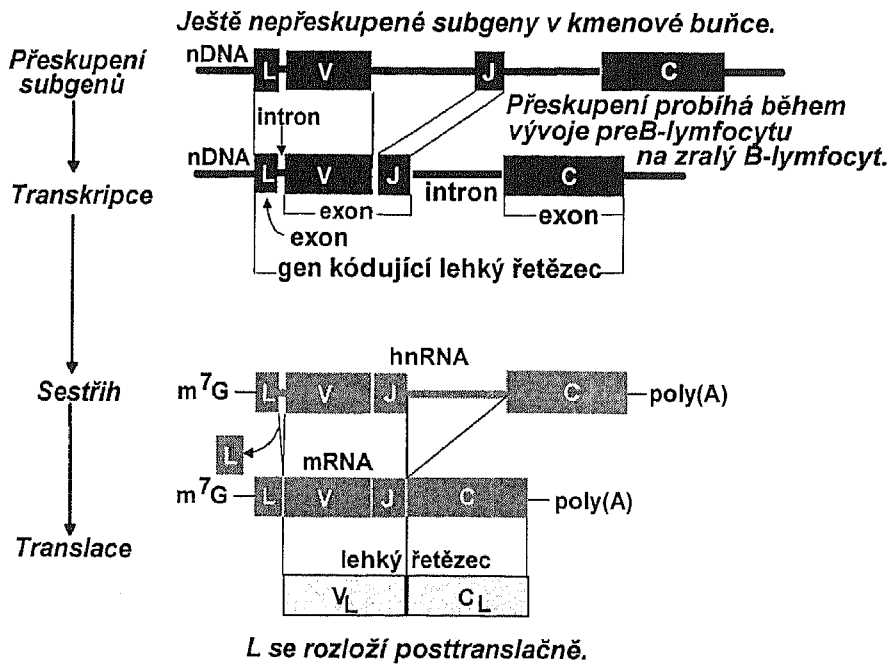
kde L a VDJ jsou konstitutivní exony, pomlčky jsou introny a C<sub>μ</sub> představuje soubor exonů označovaných jako CH1, CH2, CH3 a CH4 a kódujících čtyři domény konstantní oblasti těžkého řetězce μ. Proto se též označují jako C<sub>μ1</sub>, C<sub>μ2</sub>, C<sub>μ3</sub> a C<sub>μ4</sub>. Tuto skutečnost vysvětlujeme na str. 533. Pamatujme si však, že výsledkem přeskupení subgenů kódujících těžké řetězce je gen, který kóduje těžký řetězec μ imunoglobulinu IgM a dále, jak uvidíme, se gen pro tento řetězec přepisuje současně s genem kódujícím těžký řetězec δ imunoglobulinu IgD. Kombinace se subgeny, které kódují konstantní oblasti řetězců γ, ε a α se tvoří až přesmykem, který je popsán na str. 534.

5. Každý B-lymfocyt obsahuje jeden strukturální gen pro lehký řetězec a jeden gen pro řetězec těžký. Oba geny jsou opatřeny aktivním promotorem odkud se přepisují do hnRNA, která podléhá posttranskripčním úpravám na 5'- a 3'-konci a nakonec sestříhu. Výsledná mRNA se překládá do jedné molekuly imunoglobulinového řetězce, který se signálním peptidem váže k endoplazmatickému retikulu. Po uskutečnění tohoto děje se peptid rozloží. Transkripce strukturálního genu kódujícího lehký řetězec a translace jeho mRNA jsou uvedeny na obr. 340.





Obr. 340  
Transkripce a translace genu kódujícího lehký imunoglobulinový řetězec



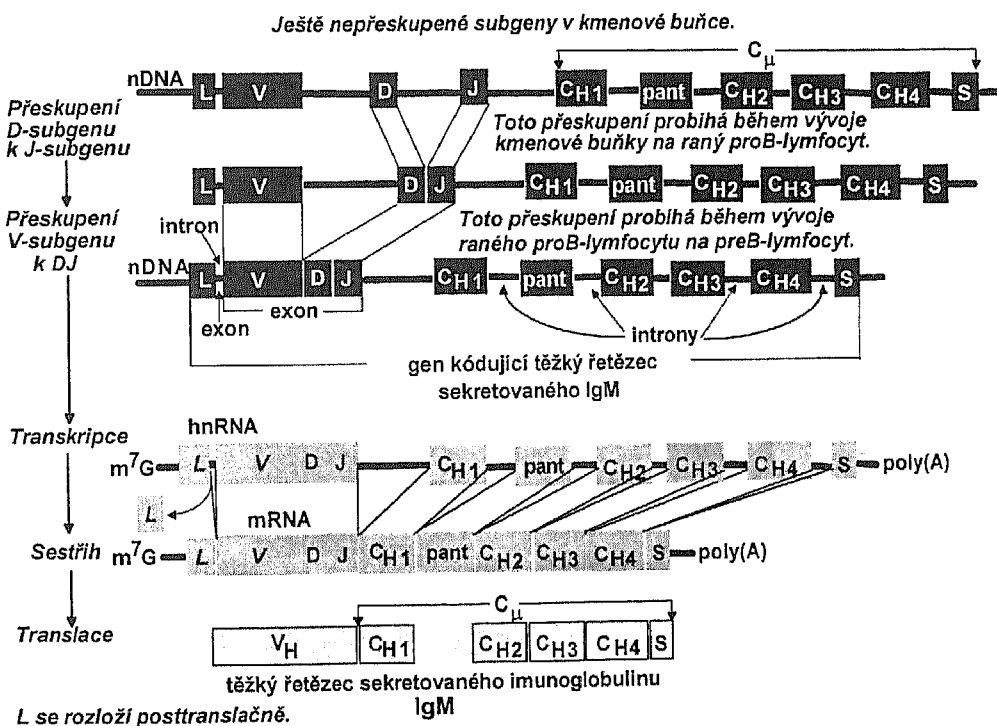
Obr. 341  
Přeskupení subgenů pro lehké řetězce a exprese výsledného genu

Způsob přeskupení subgenů pro lehké a těžké řetězce rekapitulujeme ještě jednou až po výsledný translační produkt na obr. 341 a 342. Na obr. 343 je schematicky vyjádřeno spojení translačních produktů do molekuly imunoglobulinu. Týká se to translačních produktů uvedených na obr. 341 a 342.

**SIGNÁLNÍ SEKVENCE PRO PŘESKUPOVÁNÍ SUBGENŮ.** Přeskupováním subgenů V, D, J a C se vytvoří proti jejich původnímu pořadí (kombinaci) uvedenému na obr. 336 a 337 nové pořadí (nová kombinace). Vznik nové kombinace nukleotidových sekvencí ve vazbové skupině téhož chromozomového páru se označuje jako rekombinace (viz čtvrtý díl, kde rekombinace bude podrobněji probírána). *Přeskupování subgenů V, D, J a C je však zvláštní případ rekombinace* a proto se označuje jako **V(D)JC-rekombinace**.

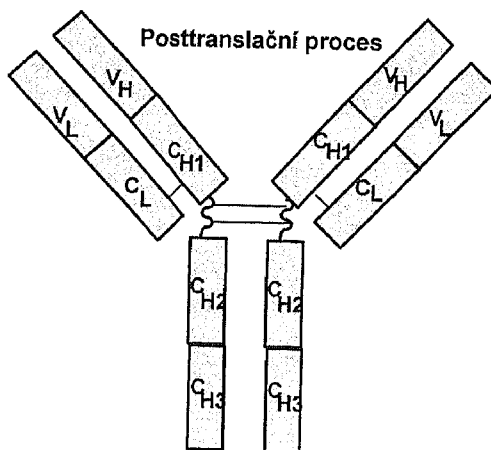
Bylo zjištěno, že existují *určité sekvence, které představují signály pro přeskupování subgenů*. Jsou označovány jako **rekombinační signální sekvence** (zkr. **RSS**). Jsou to obr. 344:

1. Pořadí sedmi nukleotidů neboli heptamer, 5'-C A C A G T G-3', které



Obr. 342

Přeskupení subgenů pro těžké řetězce a exprese výsledného genu na příkladě genu kódujícího těžký řetězec sekretovaného IgM



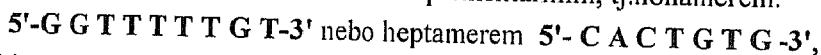
Obr. 343

Spojení translačních produktů uvedených na obr. 341 a 342 do molekuly imunoglobulinu

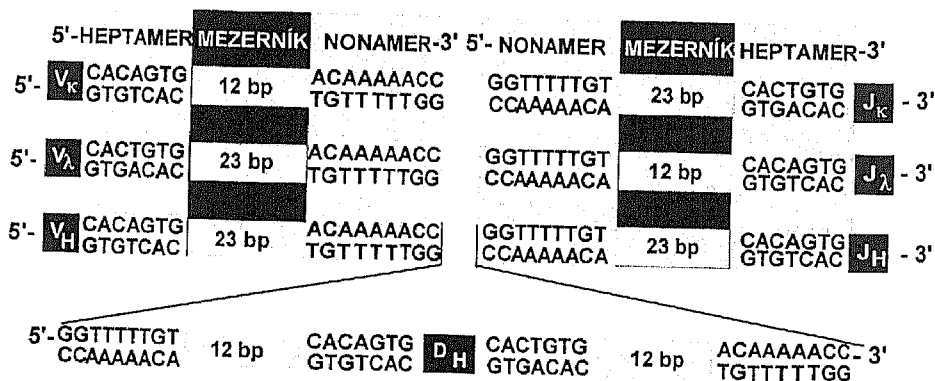
je odděleno 12 nebo 23 bp od pořadí devíti nukleotidů neboli nonameru



2. Konce každé skupiny subgenů (V, J nebo C kromě D) jsou buď vymezeny těmito sekvencemi, nebo k nim komplementárními, tj. nonamerem:



které jsou také odděleny mezerníkem dlouhým 12 nebo 23 bp. *Mezerník o délce 12 bp se označuje jako jednozávitový mezerník, neboť v chromozomové DNA zahrnuje jeden závit (jednu otáčku). Na rozdíl od něho dvouzávitový mezerník má délku 23 bp a zahrnuje v chromozomové DNA dva závity.*



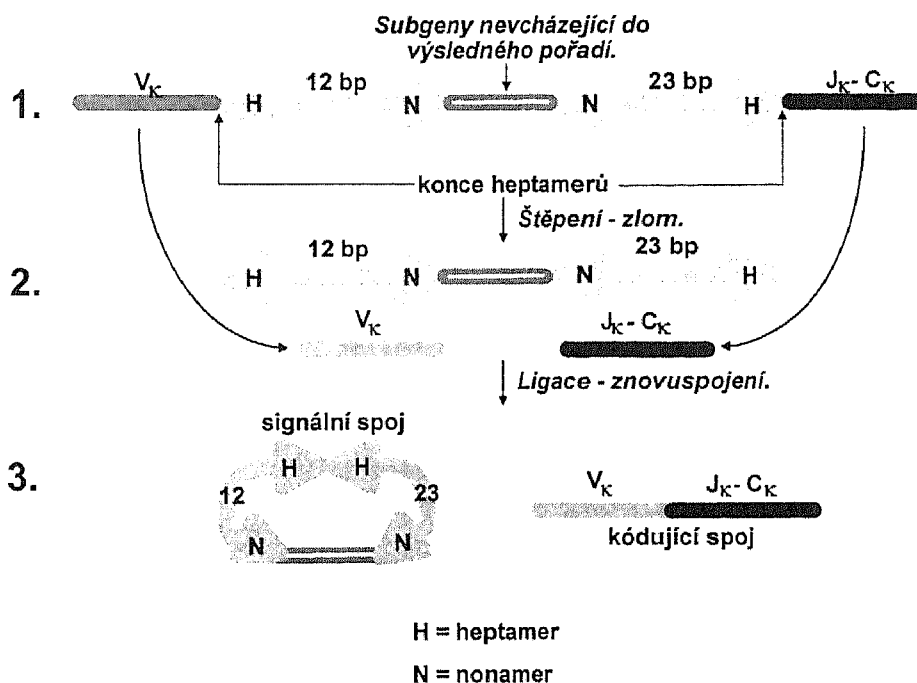
Obr. 344

Rekombinační signální sekvence

3.  $V_{\kappa}$ -signální sekvence obsahuje jeden jednozávitový mezerník, zatímco  $J_{\kappa}$ -signální sekvence dvouzávitový. U  $V_{\lambda}$  tomu opačně, tj.  $V_{\lambda}$ -signální sekvence obsahuje dvouzávitový mezerník a  $J_{\lambda}$ -signální sekvence jednozávitový.  $V_H$ - a  $J_H$ -subgeny mají dvouzávitový mezerník, zatímco  $D_H$ -subgen má po obou stranách mezerník jednozávitový (obr. 344).

4. Platí striktní pravidlo 12/23: *Signální sekvence s jednozávitovým mezerníkem se může spojit se sekvencemi s dvouzávitovým mezerníkem.* Tímto pravidlem se zajistí, že  $V_L$ -subgen se spojí pouze s  $J_L$ -subgenem a nikoli s jiným  $V_L$ -subgenem. Podobně je zajištěno, že  $V_H$ -,  $D_H$ - a  $J_H$ -subgeny se spojují v pořadí V-D-J a stejné subgeny se navzájem nespojují.

**MOLEKULÁRNÍ MECHANIZMUS PŘESKUPOVÁNÍ SUBGENŮ.** *Signální sekvence jsou rozeznávány komplexem proteinů, který se označuje jako rekombinázový komplex.* Zatím jsou známy dva proteiny tohoto komplexu, a to RAG1 a RAG2. Působení tohoto komplexu probíhá v těchto krocích (obr. 345):

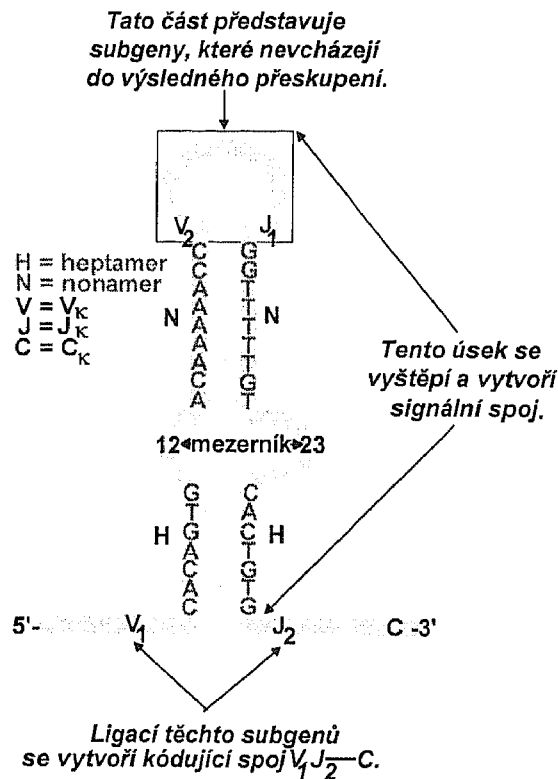


Obr. 345  
Schéma molekulárního mechanismu přeskupování subgenů kódujících imunoglobuliny

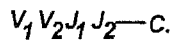
1. Nejdříve se RAG1 naváže na nonamer. Potom se na vzniklý komplex nonameru s RAG1 naváže RAG2. Tento děj lze charakterizovat jako rozpoznání signální rekombinační sekvence, které je nezbytnou podmínkou k uskutečnění synapse mezi 12 bp- a 23 bp-mezeríkem (obr. 346).

2. Štěpení DNA mezi heptamerem signální rekombinační (RSS) a kódující sekvencí vede k deleci segmentu mezi V-subgenem a J-subgenem pro lehké řetězce. Tento segment představuje subgeny, které nejsou pak součástí výsledného přeskupení (viz též obr. 346).

3. Konce vzniklé štěpením, kterými jsou spojeny V- a J-subgeny kódující lehké řetězce a podobně konce spojující V-D a D-J- subgeny kódující těžké



*Pořadí subgenů, u nichž proběhlo toto přeskupení, před přeskupením bylo:*



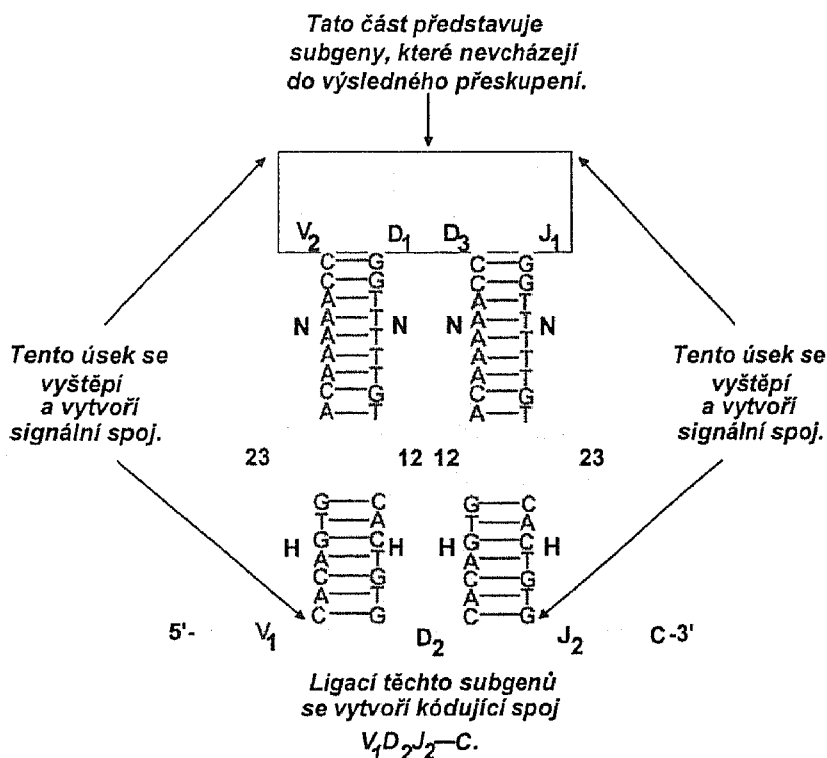
*Je vynechán L-subgen.*

Obr. 346

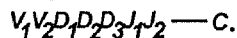
Schéma molekulárního mechanismu přeskupování subgenů kódujících lehké řetězce imunoglobulinů

řetězce, se označují jako **kódující konce**. Podobně *konce signálních sekvencí spojujících subgeny, které nevcházejí do výsledného přeskupení*, se označují jako **signální konce**. Spojením kódujících konců se vytvoří **kódující spoj** a spojením signálních konců **signální spoj** (obr. 345, 346).

U subgenů, které kódují řetězce těžké, probíhá přeskupení za účasti D-subgenů. Vlivem RSS na obou koncích D-subgenů zůstává tento subgen mezi  $V_H$ -subgenem a  $J_H$ -subgenem. Mezerník (12 bp) z obou stran D-subgenů umož-



Pořadí subgenů, u nichž proběhlo toto  
přeskupení, před přeskupením bylo:



Je vynechán L-subgen.

H = heptamer  
N = nonamer

V =  $V_H$   
J =  $J_H$   
C =  $C_H$

Obr. 347

Schéma molekulárního mechanismu přeskupování subgenů  
kódujících těžké řetězce imunoglobulinů

ňuje, že se úseky, které se přeskupují, seřadí paralelně. Vytvoří se však dva signální spoje a jeden kódující (obr. 347).

**ZPŮSOB TVORBY KÓDUJÍCÍCH SPOJŮ.** Způsob tvorby kódujícího spoje vysvětlují obr. 348a, 348b, z nichž je zřejmé, že volné komplementární DNA-řetězce obou subgenů (např. V a J) se spojí kovalentně za tvorby vlásenky. Pak následuje štěpení (viz podrobněji popis na obr. 348a, b). Přechnívajících konce DNA-řetězců každého subgenu pak slouží jako matrice pro komplementární doplňování nukleotidy. Další zaplňování mezery mezi subgeny se může uskutečňovat bez matrice a je katalyzováno enzymem **terminální deoxy-nukleotidyltransferázou**, který se nachází v lymfocytech, v nichž probíhá přeskupování VDJC-subgenů. *Nukleotidy, kterými se tvoří palindromatické oblasti v kódujícím spoji, se označují jako nukleotidy palindromatické neboli P-nukleotidy. Nukleotidy zařazené do kódujícího spoje nukleotidyltransferázou se označují jako N-nukleotidy.*

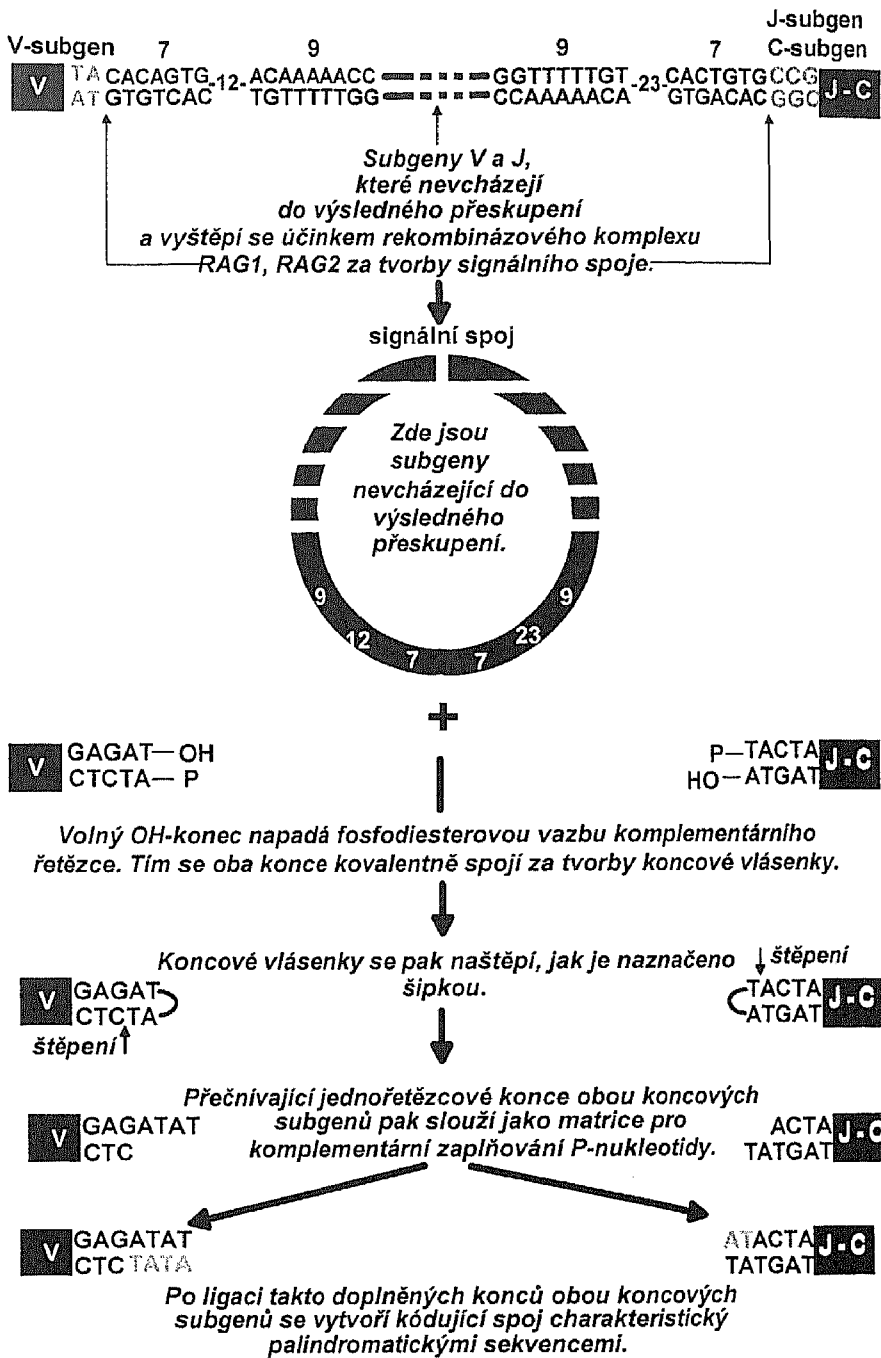
P-nukleotidy vytvářejí kódující spoje u subgenů kódujících lehké a těžké řetězce u myši. Kódující spoje u subgenů kódujících řetězce těžké a některé lehké řetězce u člověka jsou tvořeny P- i N-nukleotidy. U myši se N-nukleotidy v subgenech pro lehké řetězce nevyskytují, jelikož terminální deoxyribonukleotidyltransferáza se u nich tvoří jen krátkou dobu před přeskupováním subgenů kódujících těžké řetězce.

Jelikož zařazování N-nukleotidů do kódujících spojů je náhodné, přispívají N-nukleotidy k variabilitě kódujících spojů a samozřejmě tím i k variabilitě imunoglobulinů. *Na rozdíl od kódujících spojů tohoto typu jsou kódující spoje tvořené jen P-nukleotidy přesné.*

**ZDROJE ROZMANITOSTI PROTILÁTEK.** Vskutku ohromná rozmanitost protilátek má tyto zdroje:

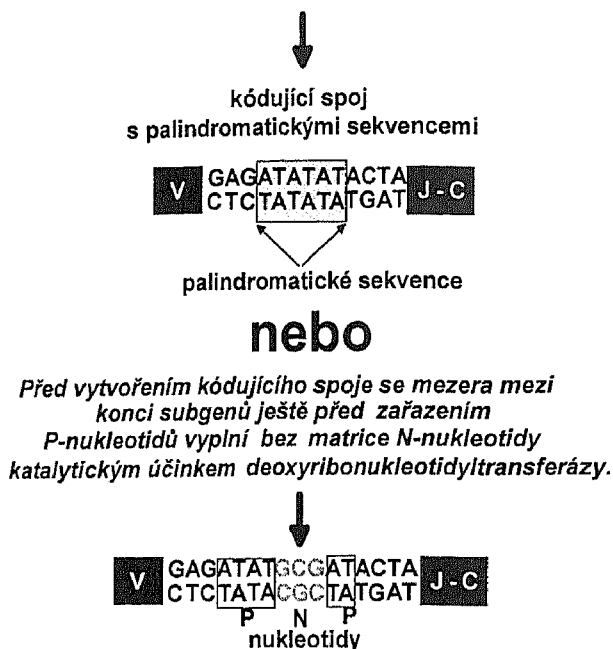
1. *Přeskupování subgenů V, D, J a C je hlavním zdrojem rozmanitosti protilátek.* V tab. 33 je uvedeno, že teoreticky přeskupování subgenů V, J, D a C může vést k tvorbě 3 16 lehkých a 8 262 těžkých řetězců lišících se navzájem ve variabilní oblasti. Prakticky však jejich počet je nižší, jelikož ne všechny subgeny se přeskupují se stejnou četností. Některé se přeskupují častěji, jiné jen zřídka. Kromě toho ne všechny  $V_H$ -oblasti se úspěšně spojí s oblastmi  $V_L$ .

2. *Rozmanitost protilátek, k níž vede přeskupování subgenů, se ještě zvyšuje růzností kódujících spojů, jejímž základem je nepřesnost, s jakou se tyto spoje tvoří.* Jestliže je kódující spoj tvořen P-nukleotidy, pak výsledná nukleotidová sekvence závisí na tom, kde byla vlásenka štěpena (viz obr. 348a). Místo štěpení podmiňuje délku přechnívajících matricového řetězce a samozřejmě tím i to, jaká sekvence nukleotidů se odkryje pro proces komplementárního zaplňo-



Obr. 348a  
Mechanismus vzniku kódovacího a signálního spoje





**Obr. 348b**  
**Pokračování obr. 348a**

vání. Je-li kódující spoj tvořen N- nukleotidy vedle P-nukleotidů, záleží na tom, kolik a které nukleotidy se do kódujícího spoje vloží. Při tvorbě spojů



se může náhodně zařadit až 15 nukleotidů, takže pak úplná variabilní oblast těžkého řetězce je kódována úsekem



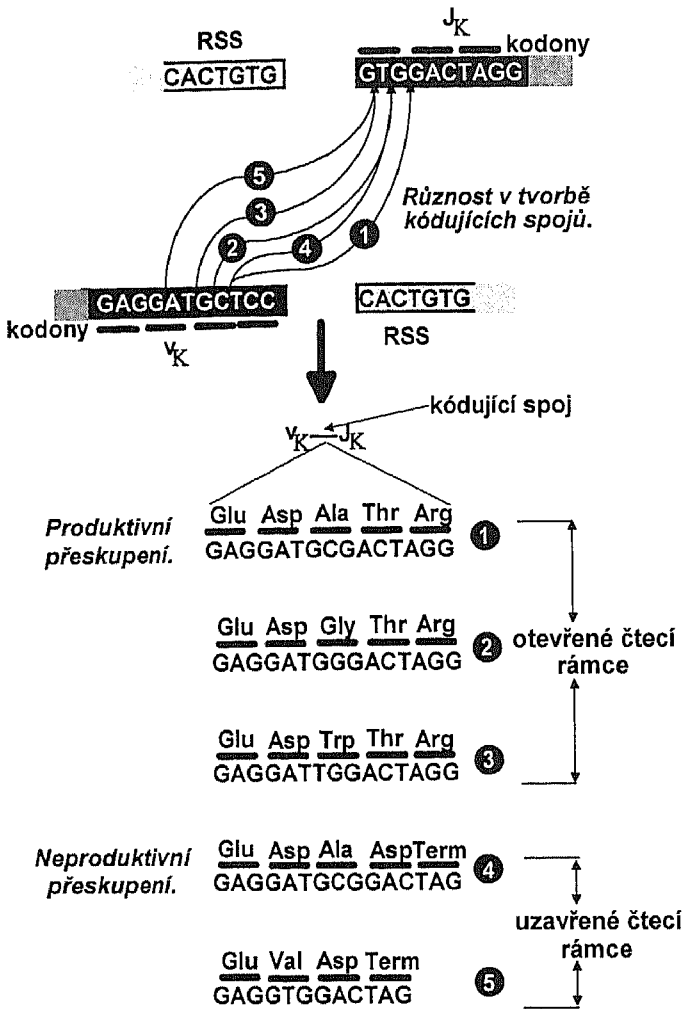
V úseku N, tj. v úseku obsahujícím N-nukleotidy, mohou být pak různé sekvence, tedy i různé kodony projevující se v sekvenci aminokyselin variabilní oblasti.

Zařazování N-nukleotidů do kódujících spojů má však ještě tento důsledek. Přidáním N-nukleotidů se v kódujícím spoji často přeruší čtecí rámec (viz str. 130), což se projeví ztrátou funkce imunoglobulinového řetězce. *Přeskupování subgenů, při kterém dochází k přerušení čtecího rámce v kódujícím spoji, a tím i ke ztrátě aktivity (funkce) imunoglobulinu, se označuje jako neproduktivní přeskupování subgenů.* V opačném případě, tj. *je-li kódující spoj tvořen souvislým čtecím rámcem, takže imunoglobulinový řetězec je zcela funkční (aktivní),* označujeme přeskupení subgenů jako **přeskupení produktivní**. Obr. 349 znázorňuje, jak se projevuje různost kódujících spojů v ami -

Tab. 33

Údaje dokumentující přeskupení subgenů jako zdroj rozmanitosti protilátek

	Počet subgenů kódujících imunoglobuliny v lidském organismu		
	Lehký řetězec		Těžký řetězec
	$\kappa$	$\lambda$	H
V-subgeny	40	29	51
D-subgeny	0	0	27
J-subgeny	5	4	6
Počet kombinací (genů) vzniklých přeskupením subgenů V, J a V, D, J	200	116	8 262
Počet řetězců kódovaných geny vzniklými přeskupením subgenů V, J a V, D a J	200	116	8 262
Celkový počet lehkých řetězců lišících se navzájem ve variabilní oblasti	316		
Celkový počet těžkých řetězců lišících se navzájem ve variabilní oblasti	8 262		
Počet výsledných a ve variabilních oblastech rozdílných molekul imunoglobulinu vzniklých kombinací všech lehkých a těžkých řetězců	$2,6 \times 10^6$		



Obr. 349  
Příklad různosti kódujících spojů při produktivním a neproduktivním přeskupení subgenů

nokyselinové sekvenci variabilní oblasti protilátek při produktivním a neproduktivním přeskupování subgenů.

Podle tohoto obrázku se spojením subgenů (v tomto případě konkrétně subgenů V<sub>κ</sub> a J<sub>κ</sub>) v místech naznačených šipkami 1 až 5 vytvoří kódující spoje o různých čtecích rámcích označených shodně s čísly šipek. Čtecí rámce 4 a 5 s terminačním kodonem jsou výsledkem neproduktivního přeskupení subgenů, kdežto ostatní jsou výsledkem přeskupení produktivního.

3.  
po přesk  
exonech  
hypermu  
ci). Tato  
ných ge  
charakte  
odpověd  
neboť t  
antigenu  
4  
vytvoře  
si o tom  
že ze 3  
se který  
stejně l  
těžkýcl

proti lá  
s jako  
počet  
Někter  
vytvoř

obr. 3  
menta  
nebo  
ka. P  
přesk  
nů, k  
naci.  
přea  
pak  
imu

jako  
že s  
vaz  
Ko

3. *Dalším zdrojem rozmanitosti protilátek jsou mutace, které probíhají až po přeskupení subgenů ve VJ-exonech genů kódujících lehké řetězce a VDJ-exonech kódujících řetězce těžké.* Tyto mutace, označované jako **somatické hypermutace**, probíhají při vysoké rychlosti (kolem  $10^{-3}$  na pár bází za generaci). Tato rychlost je zhruba  $10^6$ -krát vyšší než rychlost spontánních mutací v jiných genech (odtud název hypermutace). Tyto mutace jsou bodové a většinou charakteru nukleotidových substitucí. Antigen, který vyvolal primární imunitní odpověď, působí selektivně na B-lymfocyty, v nichž takové mutace proběhly, neboť tyto B-lymfocyty se fenotypově vyznačují vysokou afinitou k tomuto antigenu.

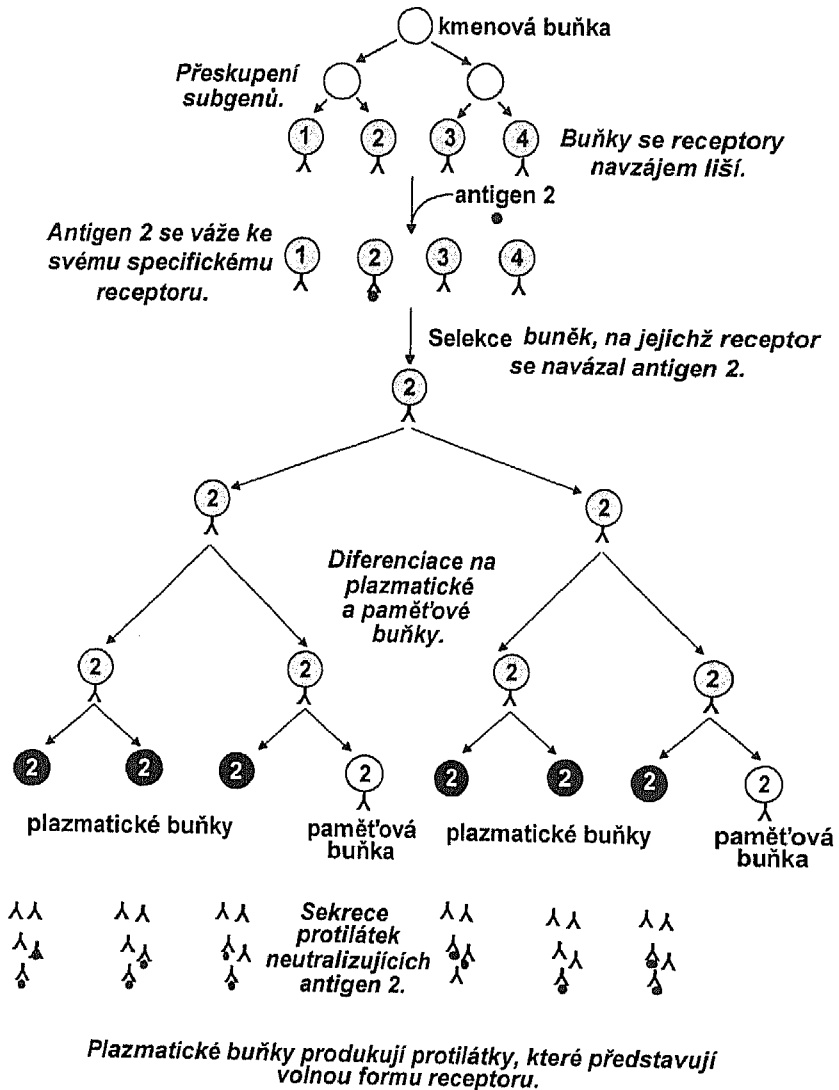
4. *Konečným zdrojem rozmanitosti protilátek je spojování translací vytvořených lehkých a těžkých řetězců do molekuly imunoglobulinu.* Abychom si o tom učinili představu, vraťme se k tab. 33. Jestliže budeme předpokládat, že ze 316 genů kódujících lehké řetězce a z 8 262 genů kódujících řetězce těžké se kterýkoli gen z počtu 316 a kterýkoli z počtu 8 262 může náhodně objevit ve stejné buňce, pak podle tab. 33 kombinací 316 lehkých řetězců a 8 262 řetězců těžkých se potenciálně může v lidském organismu vytvořit minimálně

$$316 \times 8\,262 = 2,6 \times 10^6 \text{ různých imunoglobulinových molekul.}$$

Konečné číslo, které by nám dávalo celkovou představu o rozmanitosti protilátek by bylo mnohem vyšší, kdybychom je vynásobili počtem nepřesností, s jakou se tvoří kódující spoje během produktivního přeskupování subgenů a počtem somatických hypermutací. Tyto počty však nelze přesně odhadnout. Někteří autoři uvádějí, že celkově se potenciálně může v lidském organismu vytvořit až  $10^{11}$  různých protilátek.

**KLONÁLNÍ SELEKCE.** Schematicky je klonální selekce znázorněna na obr. 350. Termín "klonální" pochází původně z představy, která je již experimentálně ověřena, a to že *imunitní systém je složen z milionů skupin buněk neboli klonů, z nichž každý sestává z B-lymfocytů a pochází ze společného předka.* Při diferenciaci kmenové buňky se do příslušného B-lymfocytu vyštěpí po přeskupení VDJC-subgenů sestava subgenů obsahující jednu kombinaci subgenů, která představuje gen kódující lehký řetězec typu  $\kappa$  nebo  $\lambda$  a druhou kombinaci, která představuje gen kódující těžký řetězec  $\mu$ . *Takový B-lymfocyt je pak předkem klonu, v němž všechny buňky obsahují stejný imunoglobulin.* Klony se pak liší kombinacemi subgenů, které se do nich vyštěpily, a tedy i strukturou imunoglobulinů.

Imunoglobulin se zanořuje do membrány B-lymfocytu, kde pak působí jako receptor pro antigen. Jakmile se určitý antigen dostane do organismu, může se navázat jen na svůj receptor, který mají B-buňky zcela určitého klonu. Po vazbě antigenu na receptor dochází k aktivaci buňky, která antigen přijala. Konečným výsledkem této aktivace je proliferace této buňky a v konečné fázi



**Obr. 350**  
**Schematické znázornění klonální selekce B-lymfocytu se specifickou protilátkou**

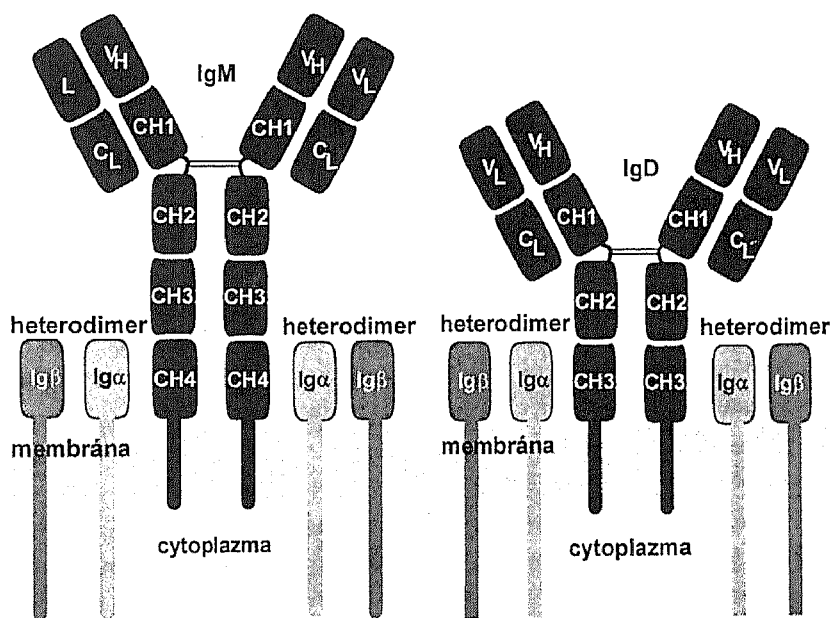
diferenciace na plazmatické buňky produkující do prostředí volné imunoglobuliny (protilátky) strukturálně stejné jako receptor.

Lidský organismus má asi  $10^{12}$  lymfocytů. Tyto buňky pochází asi z  $10^6$  až  $10^8$  lymfocytů s různými receptory pro antigen. Buňka, která se dostala do styku s antigenem tím, že se antigen navázal na její receptor, prolifereje do potomstva čítajícího asi  $10^6$  buněk.

V této souvislosti je nutno též zdůraznit, že exprese imunoglobulinových genů je omezena vždy jen na jednu alelu chromozomového páru. Proto v příslušném B-lymfocyту se vyjádří syntézou imunoglobulinového řetězce jen jedna alela pro těžký řetězec a jedna alela pro řetězec lehký. Tento jev se nazývá **alelická exkluze**. Kromě toho existuje ještě **izotypická exkluze**, což znamená, že v každém klonu B-lymfocytů se syntéza řetězců typu  $\kappa$  a  $\lambda$  vzájemně vylučuje, tj. tvoří se v něm jen jeden typ lehkého řetězce.

**DVĚ FORMY TĚŽE PROTILÁTKY (IMUNOGLOBULINU).** Z předchozího odstavce je tedy zřejmé, že je nutno rozeznávat dvě formy stejné protilátky. Jsou to:

**1. Povrchový neboli transmembránový imunoglobulin.** Tento imunoglobulin je zanořen do membrány B-lymfocyту, kde působí jako receptor pro antigen a označuje se jako **B-lymfocytový receptor** neboli též **BCR-receptor** (obr. 351). Jeho zvláštností je, že jeho konec zanořený do cytoplazmy je velmi krátký. U IgM a IgD má délku 3 aminokyselinových zbytků, u IgA 14, u IgG a IgE 28. Ve všech uvedených případech je však tento konec natolik krátký, že se nemůže spojit s intracelulární signální molekulou (s G-proteinem nebo s tyrozinproteinkinázou). Proto tvoří komplex se dvěma heterodimery **Ig- $\alpha$ /Ig- $\beta$** , kte-



Obr.351

Schéma B-lymfocytového receptoru tvořeného imunoglobulinem IgM a IgD

ré sestávají ze dvou imunoglobulinů **Ig- $\alpha$**  a **Ig- $\beta$**  a jsou v heterodimeru spojeny vzájemně disulfidovou vazbou. Ig- $\alpha$  má cytoplazmatický konec dlouhý 61 a Ig- $\beta$  48 aminokyselinových zbytků. Tato délka je pro interakci se signálními molekulami dostatečně dlouhá. BCR-receptor se tedy funkčně dělí na dvě části:

- ◆ část, na kterou se váže antigen,
- ◆ část (tj. heterodimer Ig- $\alpha$ /Ig- $\beta$ ), kterou se přenáší signál vzbuzený antigenem do cytoplazmy.

**2. Sekretovaný imunoglobulin.** Rozumí se jím imunoglobulin produkovaný plazmatickou buňkou.

*Povrchové imunoglobuliny všech izotypů jsou monomery. Imunoglobuliny třídy IgA polymerizují do dimeru a třídy IgM do pentameru jen v případě, že se nacházejí v sekretované formě. V povrchové formě se imunoglobulin vyznačuje hydrofobní transmembránovou doménou, kterou se zakotvuje do povrchu B-lymfocyту. Tato doména se nevyskytuje v sekretovaných formách imunoglobulinu.*

**TVORBA TĚŽKÝCH ŘETĚZCŮ IMUNOGLOBULINŮ TŘÍDY IgM A IgD.** Subgeny  $V_H$ ,  $D$ ,  $J_H$  se přeskupují v kombinaci se subgenem  $C_\mu$ . Výsledkem je pak gen, který kóduje těžký řetězec  $\mu$ . Proto v kombinaci s lehkým řetězcem  $\kappa$  nebo  $\lambda$  se vytvoří v B-lymfocyту imunoglobulin třídy *IgM, který působí v nezralém B-lymfocyту jako receptor pro antigen* (povrchový IgM). Velmi brzy se v nezralém B-lymfocyту tvoří též povrchový imunoglobulin třídy IgD, který má stejnou variabilní oblast jako před ním vytvořený imunoglobulin IgM, takže oba imunoglobuliny reagují na stejný antigen. Avšak povrchový IgM je první imunoglobulin, který se objevuje v povrchu lymfocytů během jejich diferenciacе v kostní dřeni. *Sekretovaná forma IgM se vytvoří až po stimulaci zralého B-lymfocyту antigenem v sekundárních lymfoidních orgánech.*

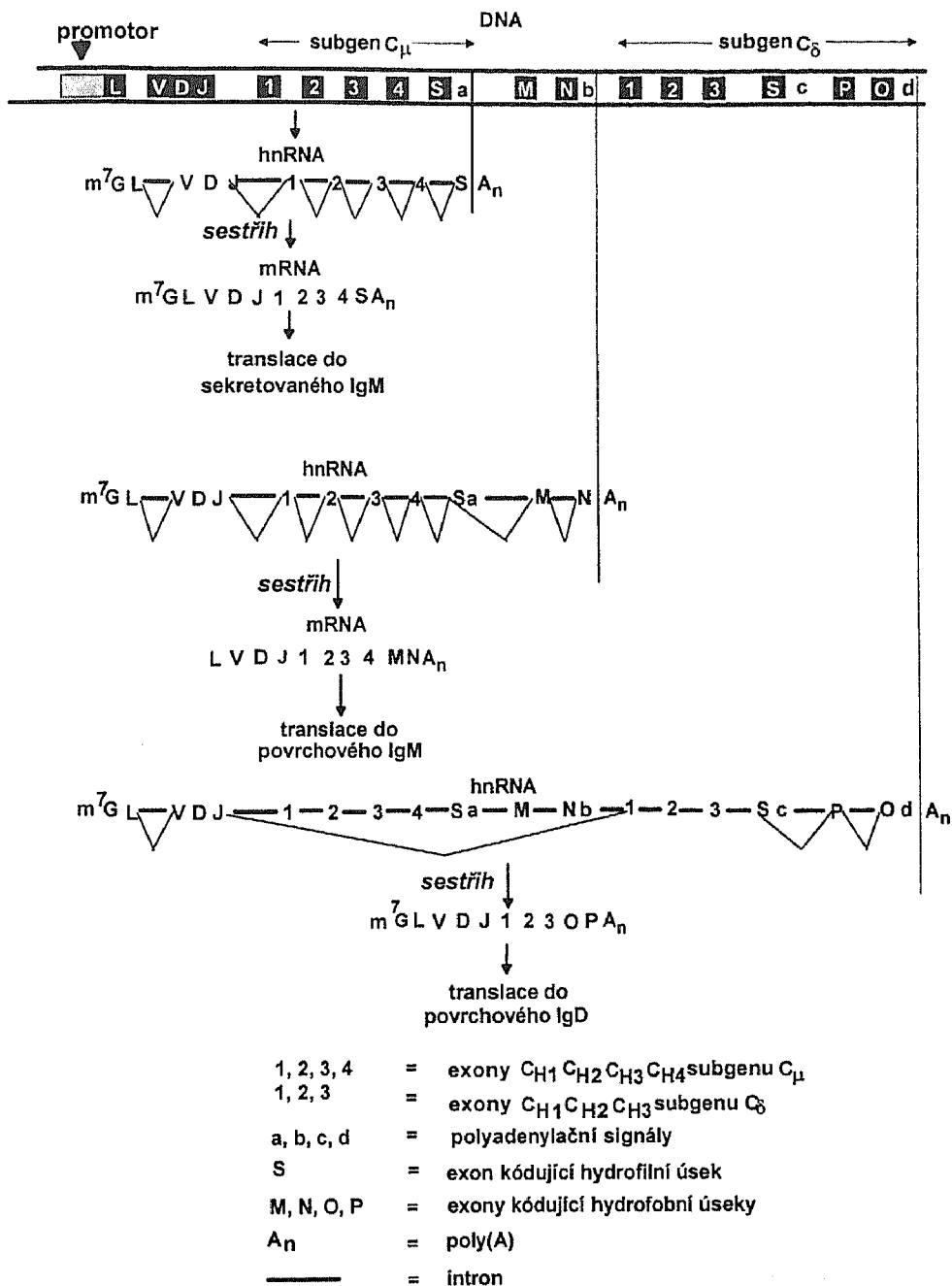
Proč se těžký řetězec imunoglobulinu třídy IgM při diferenciaci B-lymfocytů tvoří jako první a bezprostředně po něm těžký řetězec imunoglobulinu IgD, pochopíme, uvážíme-li tyto zvláštnosti transkripce genů vzniklých přeskupením subgenů  $V_H$ ,  $D$ ,  $J_H$  a  $C_\mu$  a  $C_\delta$  u myši a člověka:

1. V sestavě subgenů kódujících těžké řetězce jsou v pořadí C-subgenů na chromozomu jako první  $C_\mu$ -subgen a  $C_\delta$ -subgen.

2. Geny kódující těžký řetězec  $\mu$  povrchového a sekretovaného IgM a gen kódující těžký řetězec  $\delta$  povrchového IgD se nacházejí v transkripčních jednotkách, které se navzájem překrývají a jsou přepisovány ze společného promotoru a končí při různých polyadenylačních signálech.

Z obr. 352, kde je tato transkripce vyložena, vyplývají následující závěry:

- ◆ Jestliže transkripce skončí těsně za polyadenylačním signálem **b**, vytvoří



Obr. 352

Tvorba těžkého řetězce povrchového a sekretovaného IgM a povrchového IgD



se hnRNA, která se sestřihem upravuje do mRNA překládané do těžkého řetězce povrchového IgM. To, že se tento imunoglobulin uplatňuje jako povrchový (membránový), je podmíněno v koncové karboxylové části (C-konec) domény CH4 sekvencí 40 aminokyselinových zbytků kódované úseky M a N a sestávající z hydrofobní části, z hydrofilní transmembránové a krátké cytoplazmatické části u C-konce.

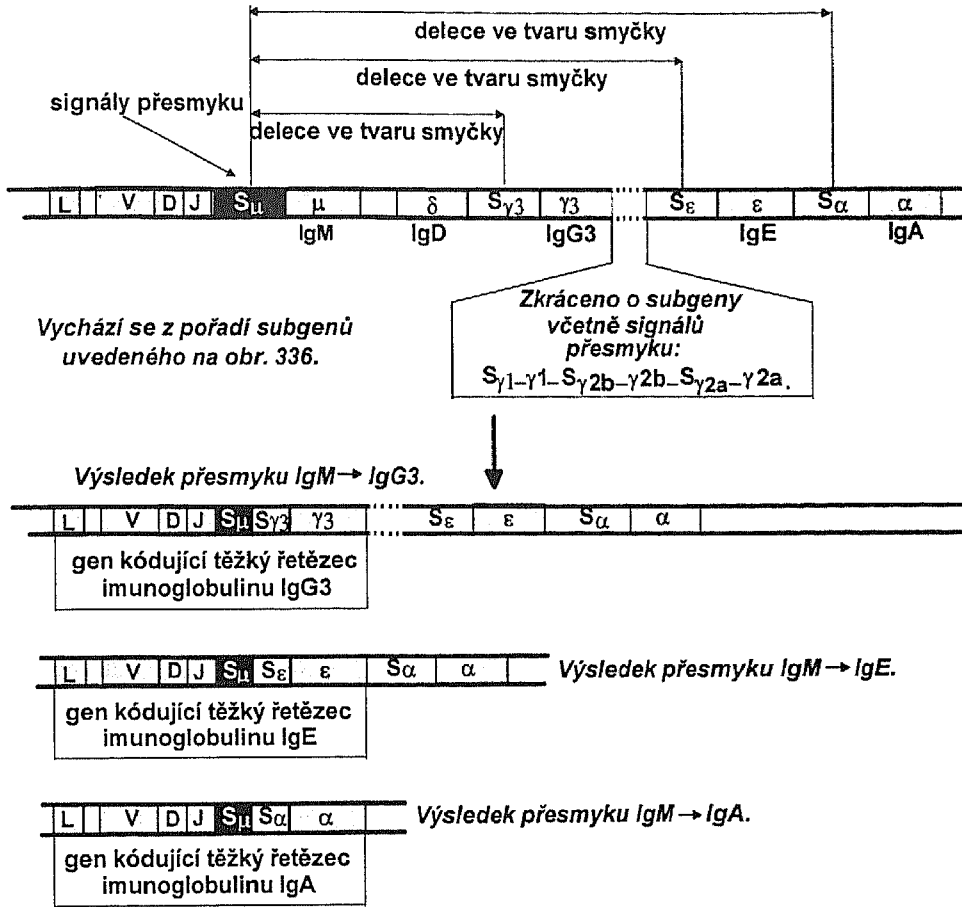
- ◆ Jestliže se transkripce zastavuje u polyadenylačního signálu **a**, vytvoří se hnRNA, která se sestřihuje do mRNA překládané do těžkého řetězce sekretovaného IgM, který má na rozdíl od povrchového IgM na C-konci CH4-domény hydrofilní sekvenci o 20 aminokyselinových zbytcích kódovaných úsekem S.
- ◆ Jestliže transkripce pokračuje až k polyadenylačnímu signálu **d**, vytvoří se hnRNA, která se sestřihem upravuje do mRNA, jež se pak překládá do těžkého řetězce imunoglobulinu třídy IgD, který je povrchový, jelikož neobsahuje hydrofilní sekvenci aminokyselin.
- ◆ Jestliže transkripce skončí u polyadenylačního signálu **e**, vytvoří se primární transkript sestřihovaný do mRNA překládané do sekretovaného IgD.

Všimněte si, že u všech mRNA je zachována skupina exonů  $L\text{-VDJ}_H$  kódujících stejnou variabilní oblast.

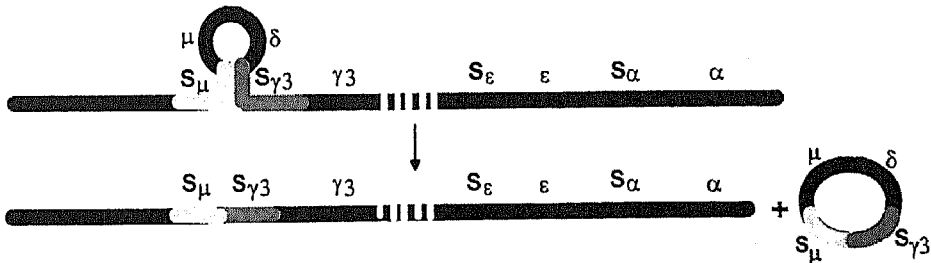
**PŘESMYK IMUNOGLOBULINOVÝCH TŘÍD.** Během vývoje B-lymfocytů dochází nejen k přeskupování subgenů, ale i k **přesmyku tříd** neboli **přesmyku izotypů**. Tímto termínem se označuje v linii B-lymfocytů *přechod imunoglobulinu z jedné třídy do druhé při diferenciaci, který je charakteristický postupným vznikem imunoglobulinů, vyznačujících se stejnou variabilní oblastí těžkého a lehkého řetězce a odlišnou konstantní oblastí*. Jelikož konstantní oblast těžkého řetězce se při tomto přechodu mění, změní se i zařazení imunoglobulinu do příslušné třídy. *Přesmyk tříd probíhá až po skončení procesu přeskupování subgenů kódujících těžký řetězec  $\mu$  povrchového imunoglobulinu IgM, a to až po stimulaci antigenem a nikoli během vývoje B-lymfocytů v kostní dřeni.*

K přesmyku tříd dochází tak, že se stejný exon  $L\text{-VDJ}_H$  může k subgenu  $C_\gamma$ ,  $C_\alpha$  nebo  $C_\epsilon$  připojit za delece celého úseku ve tvaru smyčky mezi  $\text{VDJ}_H$  a C. Do primárního transkriptu se pak prepisují kombinace, které podléhají konstitutivnímu sestřihu a překládají se do řetězců  $\alpha$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  (obr. 353).

Přesmyk tříd je řízen **signály přesmyku (S)**, což jsou regulační oblasti u 5'-konce CH-subgenů typu  $C_\mu$ ,  $C_\gamma$ ,  $C_\epsilon$ ,  $C_\alpha$  (nikoli však  $C_\delta$ ), na které se vážou enzymy katalyzující toto přeskupení. Geny kódující po přesmyku imunoglobulinu IgG, IgE a IgA jsou prepisovány za účasti zesilovačů transkripce.



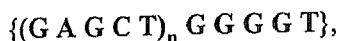
ZNÁZORNĚNÍ ZPŮSOBU PŘESMYKU  
IgM → IgG3



Přesmyk může pokračovat do jiné třídy, např. z IgG3 na IgE nebo IgA.

Obr. 353  
Přesmyk tříd realizovaný na úrovni DNA

Regulační oblast představující signál přesmyku sestává ze 150 repetičí sekvence :



kde  $n$  je 3 až 7. Tyto sekvence se mohou v detailech lišit a označují se písmenem S, které má index podle konstantní oblasti, např.  $S_\mu$ ,  $S_{\gamma_3}$  atd. (obr. 353).

*Subgen  $C_\delta$ , který kóduje konstantní oblast těžkého řetězce imunoglobulinu IgD, nepodléhá přesmyku tříd, neboť mezi ním a subgenem  $C_\mu$  není signál přesmyku.*

### 5.8.4

## Expres subgenů kódujících imunoglobuliny v průběhu vývoje B-lymfocytů

V dospělém organismu člověka i myši probíhá vývoj B-lymfocytů v kostní dřeni a v sekundárních lymfoidních orgánech. Globálně jej lze rozdělit na dvě hlavní fáze (obr. 354):

- ◆ fáze nezávislá na přítomnosti antigenu,
- ◆ fáze na přítomnosti antigenu závislá.

### VÝVOJ B-LYMFOCYTŮ NEZÁVISLÝ NA PŘÍTOMNOSTI ANTIGENU.










V hematopoetických kmenových buňkách, z nichž se v kostní dřeni diferencují B-lymfocyty, neprobíhá ještě přeskupování subgenů. Proto hematopoetické kmenové buňky neprodukují protilátky. To platí též pro všechny somatické buňky, jelikož i ty mají stejné subgeny, které se však nevyjadřují, neboť nejsou přeskupeny.

Předkem všech krevních buněk je pluripotentní hematopoetická kmenová buňka, která se diferencuje na lymfoidní kmenovou buňku a myeloidní kmenovou buňku. Lymfoidní kmenová buňka se diferencuje na:

- ◆ raný progenitorový B-lymfocyt neboli proB-lymfocyt,
- ◆ progenitorový T-lymfocyt neboli proT-lymfocyt, kterým začíná vývoj T-lymfocytů.

Zde se budeme zabývat vývojem B-lymfocytů (ale jen velmi stručně). Jednotlivé diferenační stupně, kterými je charakteristický vývoj B-lymfocytů, jsou v přehledu uvedeny na obr. 354. Nebudeme již opakovat, co je v něm uvedeno. Doplníme jej jen o několik vysvětlujících poznámek:

1. Rekombinázový komplex RAG1 a RAG2 katalyzující přeskupení sub-

	Typ B-lymfocytu	Subgeny H-řetězců	Subgeny L-řetězců	
Vývoj nezávislý na antigenu	Kmenová buňka		<i>Přeskupování ještě neprobíhá.</i>	<i>Přeskupování ještě neprobíhá.</i>
	Raný proB-lymfocyt		<i>Přeskupování D-J.</i>	<i>Přeskupování ještě neprobíhá.</i>
	Pozdní proB-lymfocyt		<i>Přeskupování V-DJ.</i>	<i>Přeskupování ještě neprobíhá.</i>
	Velký preB-lymfocyt		<i>VDJ přeskupeno.</i>	<i>Přeskupování ještě neprobíhá.</i>
	Malý preB-lymfocyt		<i>VDJ přeskupeno.</i>	<i>Přeskupování V-J.</i>
	Nezralý B-lymfocyt		<i>VDJ přeskupeno. Tvoří se povrchový IgM.</i>	<i>VJ přeskupeno.</i>
	Zralý B-lymfocyt (panenská B-buňka)		<i>VDJ přeskupeno. Tvoří se povrchový IgM a IgD.</i>	<i>VJ přeskupeno.</i>
Vývoj závislý na antigenu	Paměťová B-buňka		<i>Přesmyk na C<sub>γ</sub>, C<sub>α</sub> nebo C<sub>ε</sub>. Proto se mohou tvořit i receptory tříd IgG, IgA a IgE.</i>	<i>VJ přeskupeno. Somatická hypermutace.</i>
	Plazmatická buňka		<i>Produkuje protilátky tříd IgM, IgD, IgG, IgA nebo IgE.</i>	<i>VJ přeskupeno. Přesmyk a alternativní sestřih vedou k sekretovaným řetězcům δ, γ, α, nebo ε.</i>

Vývoj v kostní dřeni

Vývoj v sekundárních lymfoidních orgánech

Obr. 354

Přehled vývoje B-lymfocytů z kmenové buňky v kostní dřeni

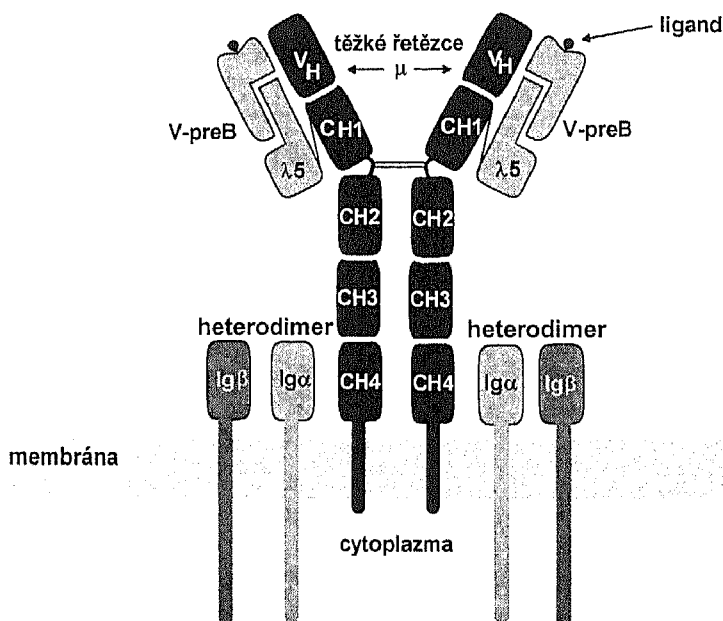
genů se tvoří ve vývojových stádiích proB- až preB-lymfocytů. Terminální deoxyribonukleotidyltransferáza (zkr. TdT) je aktivní jen v proB-lymfocytech. Jelikož aktivita tohoto enzymu se vypíná v preB-lymfocytech, v nichž začíná probíhat přeskupování subgenů kódujících lehké řetězce, nevyskytují se N-nukleotidy v kódujících spojích  $V_L-J_L$  (str. 524).

2. Syntéza těžkého řetězce  $\mu$  probíhající ve velkých preB-lymfocytech je sdružena se syntézou neobvyklého lehkého řetězce označovaného jako **náhražkový lehký řetězec**. Tento řetězec se skládá ze dvou proteinů (obr. 355):

- ◆ proteinu podobného V-sekvenci a nazývaného **V-preB-protein**,
- ◆ proteinu podobného C-sekvenci a nazývaného  **$\lambda 5$ -protein**.

Oba proteiny se navzájem nekovalentně vážou a tvoří dohromady lehký řetězec. Toliko řetězec  $\lambda 5$  se váže kovalentně k CH1-doméně řetězce  $\mu$ . Geny kódující tyto řetězce jsou umístěny zatím v neznámé vzdálenosti od  $\lambda$ -subgenů.

Současně s uvedenými proteiny se ve velkém preB-lymfocytu syntetizuje heterodimer  $Ig\alpha/Ig\beta$ . Komplex náhražkového lehkého řetězce, těžkého řetězce  $\mu$  a heterodimeru  $Ig\alpha/Ig\beta$  zanořený do povrchu velkého preB-lymfocytu, se označuje jako **preB-receptor**. Funkce tohoto receptoru není ještě jasná. Předpokládá se, že se na něj váže nějaký ligand vyskytující se v membráně buněk



Obr. 355  
Schéma preB-receptoru

stromatu. Touto vazbou vzniká signál, kterým se inhibuje proces přeskupování  $V_H$  k  $DJ_H$  v alele kódující druhý těžký řetězec. Jinými slovy (domněnka) je faktorem, který umožňuje nebo způsobuje alelickou exkluzi (str. 531). V každém případě se však ukazuje, že působení preB-receptoru je nezbytnou podmínkou pro vstup do dalšího vývojového stadia B-lymfocytů.

3. PreB-receptor se tvoří jen přechodně. V malých preB-lymfocytech se již nevyskytuje. Těžký řetězec  $\mu$  se však tvoří, jelikož přeskupování subgenů kódujících těžké řetězce již skončilo (gen kódující řetězec  $\mu$  je již kompletní). Řetězec  $\mu$  se nejdříve vyskytuje jen v cytoplazmě a označuje se jako **cytoplazmatický  $\mu$ -řetězec** a stává se složkou receptoru IgM až v nezralém B-lymfocytu, kdy již skončilo přeskupování subgenů kódujících lehké řetězce  $\kappa$  nebo  $\lambda$ . Tento je již v komplexu s heterodimerem Ig $\alpha$ /Ig $\beta$  (obr. 351).

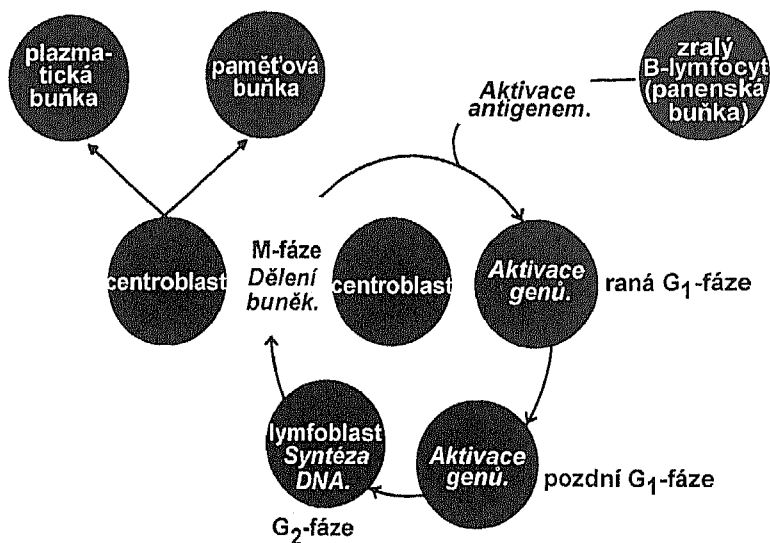
Nezralý B-lymfocyt diferencuje na B-lymfocyt zralý, v němž probíhá syntéza těžkého řetězce  $\delta$  (obr. 352), který v kombinaci s lehkými řetězci  $\kappa$  nebo  $\lambda$  tvoří receptor IgD. Zralý B-lymfocyt má tedy dva receptory pro stejný antigen, a to IgM a IgD.

### VÝVOJ B-LYMFOCYTŮ ZÁVISLÝ NA PŘÍTOMNOSTI ANTIGENU.

Zralé B-lymfocyty přecházejí do sekundárních lymfoidních orgánů. A pokud se ještě neselekaly s antigenem, označují se jako **panenské B-buňky**. V tomto stadiu diferenciaci představují klidové buňky (buňky v  $G_0$ -fázi). Interakcí s antigenem a za přítomnosti určitých cytokinů jsou tyto buňky aktivovány k přechodu z  $G_0$ -fáze do fáze  $G_1$  buněčného cyklu. V S-fázi se přeměňují na **lymfoblasty**, které se vyznačují intenzívní syntézou DNA, RNA a dělením. Lymfoblast se dělí po dobu 3 až 5 dnů zhruba jedenkrát za 6 hod. a poskytuje tak potomstvo o počtu asi 1 000 buněk. Tyto buňky označované jako **centroblasty** diferencují na buňky plazmatické a paměťové (obr. 356). Popíšeme v návaznosti na str. 498 každý typ zvlášť.

◆ **Plazmatické buňky.** Tyto buňky jsou krátce žijící, nemají receptory pro antigen a syntetizují sekretované protilátky, tj. protilátky vylučované do prostředí. Proto diferenciaci centroblastů na plazmatické buňky musí zahrnovat změny v průběhu transkripce a sestřihu mRNA tak, aby se mohla syntetizovat sekretovaná forma těžkého řetězce místo povrchové formy (obr. 352). Nejdříve se vyznačují produkcí (sekrecí) protilátek převážně třídy IgM a v menší míře IgD (tuto vlastnost zdědily po lymfoblastech, které tutéž vlastnost zdědily po zralých B-lymfocytech). Avšak vzhledem k tomu, že v nich dochází k přesmyku tříd, vyznačují se též schopností produkovat protilátky třídy IgA, IgE a IgG. Které faktory však rozhodují o tom, k jaké třídě přesmyk proběhne, a tedy i o tom, do které třídy bude produkováný imunoglobulin patřit?

1. Přesmyk do určité třídy vyžaduje přítomnost určitých cytokinů.



Obr.356

## Vstup klidového B-lymfocytu do buněčného cyklu

2. *Prostředí, v němž se v plazmatických buňkách uskutečňuje přesmyk.* Ve slezině, tonzilách a periferních lymfatických uzlinách je např. preferován přesmyk do třídy IgG. Z toho důvodu se většinou setkáváme s protilátkami této třídy. Avšak vzhledem k tomu, že plazmatické buňky jsou jen krátce žijící, je produkce protilátek jen krátkodobá. Vyznačují se rozsáhlou tvorbou endoplazmatického retikula, jehož vnitřní část je naplněna molekulami imunoglobulinu, který se tvoří translací na ribosomech, kterými je retikulum pokryto.

♦ **Paměťové B-buňky.** *Paměťové buňky neprodukují protilátky, uchovávají si však schopnost reagovat na antigen, kterým byly vydiferencovány z lymfoblastů a jsou dlouhožijící. V paměťových buňkách probíhá při vysoké četnosti mutace (přibližně  $10^{-3}$ /generaci) projevující se vysokou afinitou k antigenu, který původně vyvolal vznik paměťových buněk. Touto mutací se vyznačuje značná část paměťových buněk. A stejně jako v plazmatických buňkách dochází i v paměťových buňkách k přesmyku tříd. Když je organismus znovu vystaven působení stejného antigenu, reagují na něj s vysokou účinností paměťové buňky tak, že se přeměňují na buňky s vysokou produkcí protilátek (viz též str. 528).*

**PRIMÁRNÍ A SEKUNDÁRNÍ IMUNITNÍ ODPOVĚĎ.** Zde doplníme str. 498 o hlubší výklad. *První setkání organismu s příslušným antigenem se označuje jako primární imunitní odpověď. V rámci této odpovědi reagují na antigen zralé B-lymfocyty, na jejichž BCR-receptor tvořený imunoglobulinem třídy*

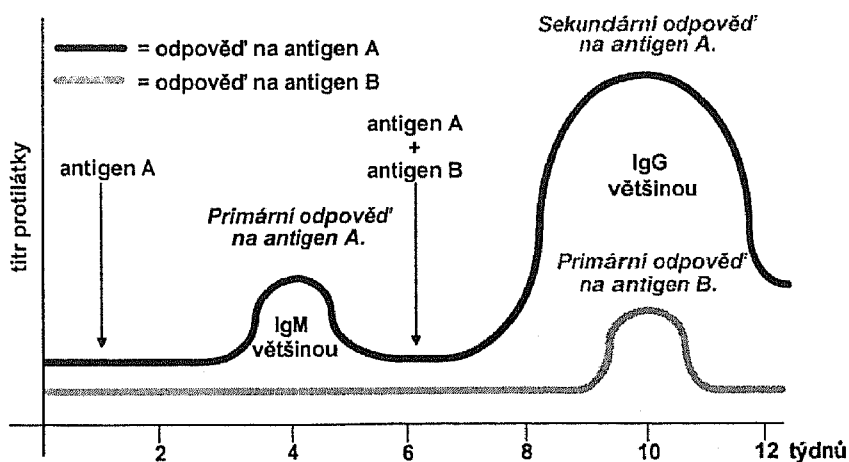
IgM se antigen váže, a tím se zahájí proces aktivace B-lymfocyty, který směřuje k diferenciaci zralého B-lymfocyty na plazmatické a paměťové buňky.

*Druhé setkání organismu s antigenem* se označuje jako **sekundární imunitní odpověď**. V rámci této odpovědi reagují na antigen již jen paměťové buňky, a to převážně intenzivní produkcí imunoglobulinu třídy IgG a v menší míře IgM. Vyznačují se též schopností produkce imunoglobulinu třídy IgA, IgE, IgD. V buňkách, které sekretují tyto protilátky, již dále neprobíhá hypermutace ani přesmyk tříd.

Rozdíl mezi primární a sekundární imunitní odpovědí znázorňuje graf na obr. 357. Jestliže se organismus v čase nula setká s antigenem A, objeví se protilátka proti tomuto antigenu až po určité době. Její titr pak stoupá až k dosažení vrcholu a pak prudce klesá. Když se do organismu později vpraví směs antigenů A + B, odpovídá organismus rychlou produkcí protilátky A, zatímco tvorba protilátky proti antigenu B se uskutečňuje prakticky stejně jako v primární odpovědi na antigen A.

V primární imunitní odpovědi na antigen převažuje produkce imunoglobulinu třídy IgM, kdežto v sekundární imunitní odpovědi převažuje produkce imunoglobulinu IgG.

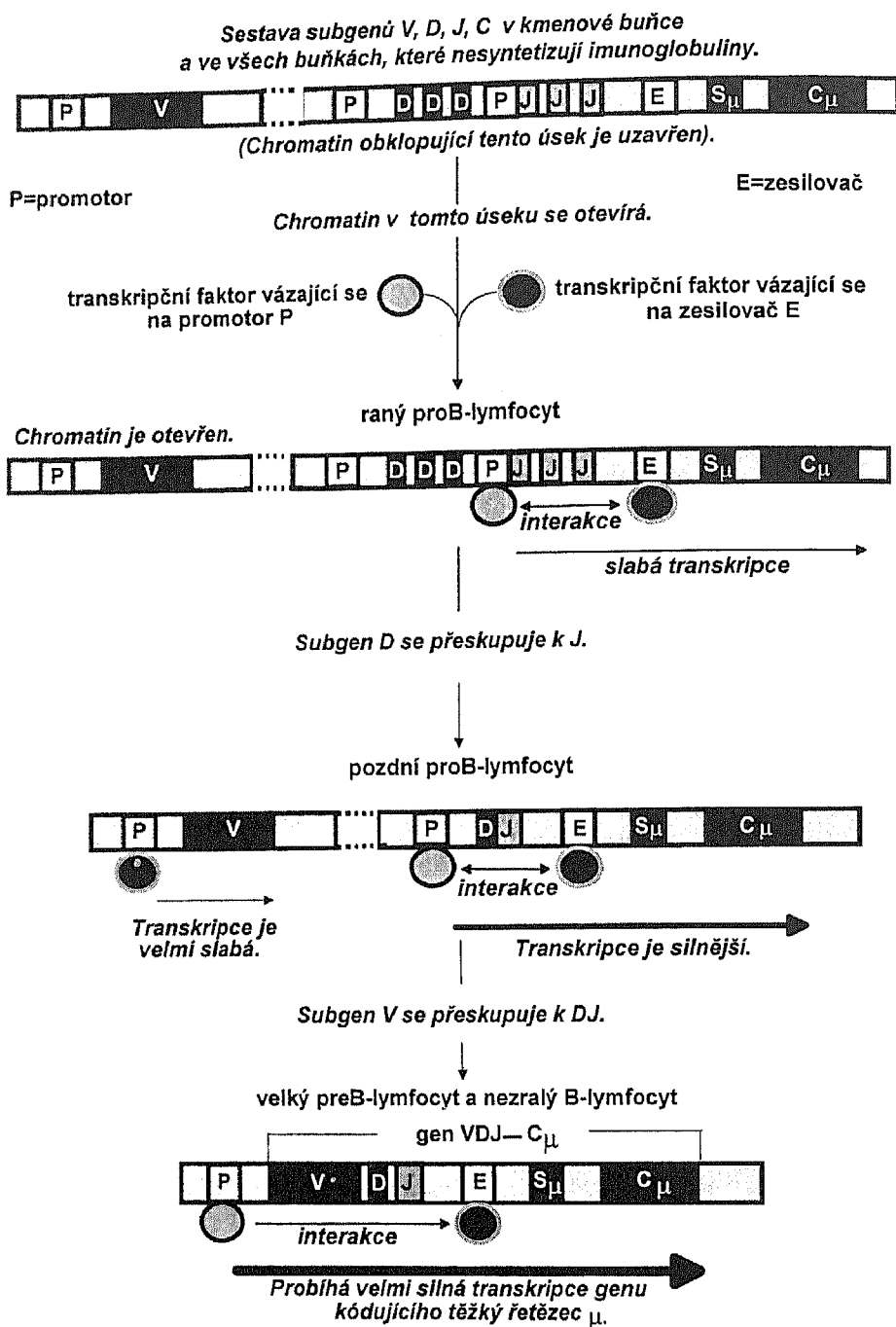
**VLIV PŘESKUPENÍ SUBGENŮ NA TRANSKRIPCI GENŮ KÓDUJÍCÍCH TĚŽKÉ ŘETĚZCE IMUNOGLOBULINŮ.** V kmenových hematopoetických buňkách a vůbec i v ostatních buňkách organismu neprobíhá transkripce subgenů. Chromatin v úsecích na DNA, kde se subgeny nacházejí, je uzavřen (skondenzován). Teprve po otevření chromatinu, tj. jeho dekonduzaci, může



Obr. 357

Grafické znázornění primární a sekundární imunitní odpovědi na antigen

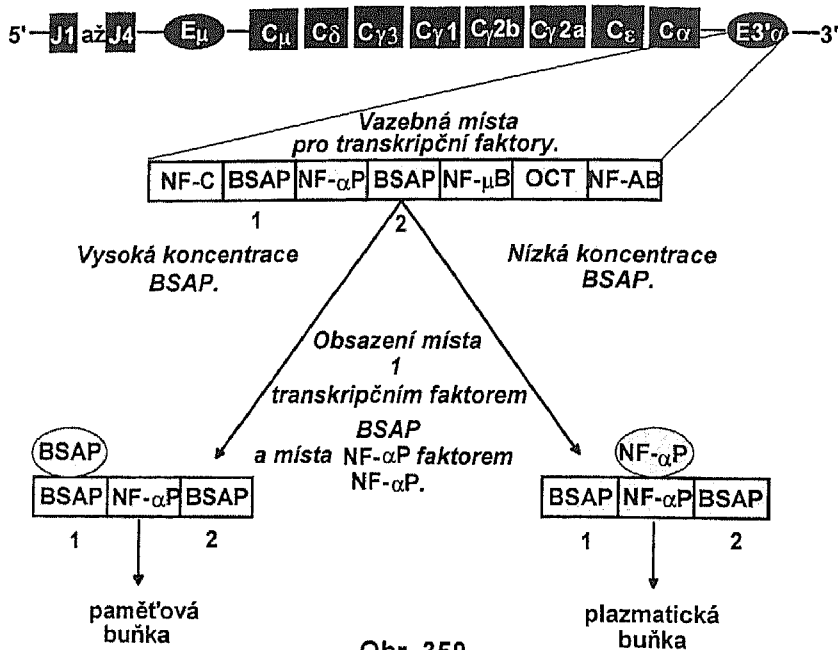




Obr. 358

Vliv přeskupení subgenů V, D, J a C na transkripci genu kódujícího těžký řetězec μ

## Sestava subgenů pro těžké řetězce na chromozomu 2 myši



Obr. 359

## Příklad regulace transkripce genů podílejících se na konečné fázi vývoje B-lymfocytů










těžký řetězec a podněcuje tvorbu paměťových buněk. Jestliže je koncentrace BSAB v buňkách nízká, NF-αP se váže na 3'α. To má za následek, že se zvýší transkripce genu kódujícího těžký řetězec, což vede k tvorbě plazmatických buněk (obr. 359).

**PROTEINY SYNTETIZOVANÉ V B-LYMFOCYTECH A DŮLEŽITÉ PRO JEJICH FUNKCI.** Budeme se s těmito proteiny postupně setkávat a vysvětlovat jejich funkci. V této souvislosti bude nutné vědět, ve které vývojové fázi se příslušný B-lymfocytový protein tvoří. K tomu slouží obr. 360.

## 5.8.5

## Přeskupování subgenů kódujících proteiny komplexu TCR.CD3 T-lymfocytů a vývoj tymocytů

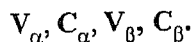
**RECEPTORY T-LYMFOCYTŮ.** Receptory T-lymfocytů, tedy Tc- a Th-

	Typ B-lymfocyту	Proteiny		
Vývoj nezávislý na antigenu	Kmenová buňka		CD 45	Vývoj v kostní dřevě
	Raný proB-lymfocyt		CD 45, RAG1, RAG-2, TdT, $\lambda$ 5, V-preB, MHC II	
	Pozdní proB-lymfocyt		TdT, $\lambda$ 5, V-preB, MHC II, CD 40, CD 45R	
	Velký preB-lymfocyt	preB-receptor 	RAG-1, RAG-2, $\lambda$ 5, V-preB, MHC II, CD 40, CD 45R, $\mu$ R=receptor	
	Malý preB-lymfocyt		MHC II, CD 40, CD 40R, $\mu$	
	Nezralý B-lymfocyt	IgM 	MHC II, CD 40, CD 45R, IgM	
	Zralý B-lymfocyt (panenská B-buňka)	IgD IgM 	MHC II, CD 40, CD 45R, IgM, IgD	
Vývoj závislý na antigenu	Paměťová B-buňka	IgD IgM 	MHC II, CD 40, CD 45R, IgG (IgA, IgE.)	Vývoj v sekundárních lymfoidních orgánech
	Plazmatická buňka		MHC II, CD 40, CD 45R, IgM (IgA, IgE, IgG)	

Obr. 360

Syntéza specifických proteinů B-lymfocytů  
v závislosti na jejich vývoji

-lymfocytů, jsou přísně specifické a podobají se v tomto směru imunoglobulinovým BCR-receptorům. Označují se jako **TCR-receptory** a jsou složeny z řetězců  $\alpha$  a  $\beta$  spojených disulfidovými vazbami. Výsledná struktura je heterodimer, jehož funkce spočívá v rozpoznávání antigenu. Na obou řetězcích heterodimeru  $\alpha/\beta$  se nachází variabilní a konstantní oblast (obr. 361)



Další složení TCR-receptoru je zřejmé z obr. 361. Na variabilní oblast se váže antigen. Pro každý antigen je specifická variabilní oblast.

Celkově lze říci, že TCR-receptor zodpovídá za rozeznání antigenu. *Vazbou antigenu na receptor se zahájí proces aktivace T-lymfocyty, který se vyznačuje signální dráhou popsanou na str. 554. Důležitou úlohu při přenosu signálu mají proteiny CD3, které tvoří s TCR-receptorem komplex označovaný jako komplex TCR-CD3. CD3 představují dva proteinové heterodimery ( $\epsilon$  a  $\delta$ ) a ( $\gamma$  a  $\epsilon$ ). Vyznačují se extracelulární, transmembránovou a intracelulární doménou, která obsahuje motiv ITAM (str. 554), na který se může vázat tyrozinproteinkináza. Součástí komplexu TCR.CD3 jsou též signální molekuly  $\zeta$ , které se taktéž uplatňují při přenosu signálu (viz dále). Další složkou tohoto komplexu je protein CD45 vyznačující se cytoplazmatickou doménou, která má při přenosu signálu tyrozinproteinfosfátázovou funkci ( obr. 368).*

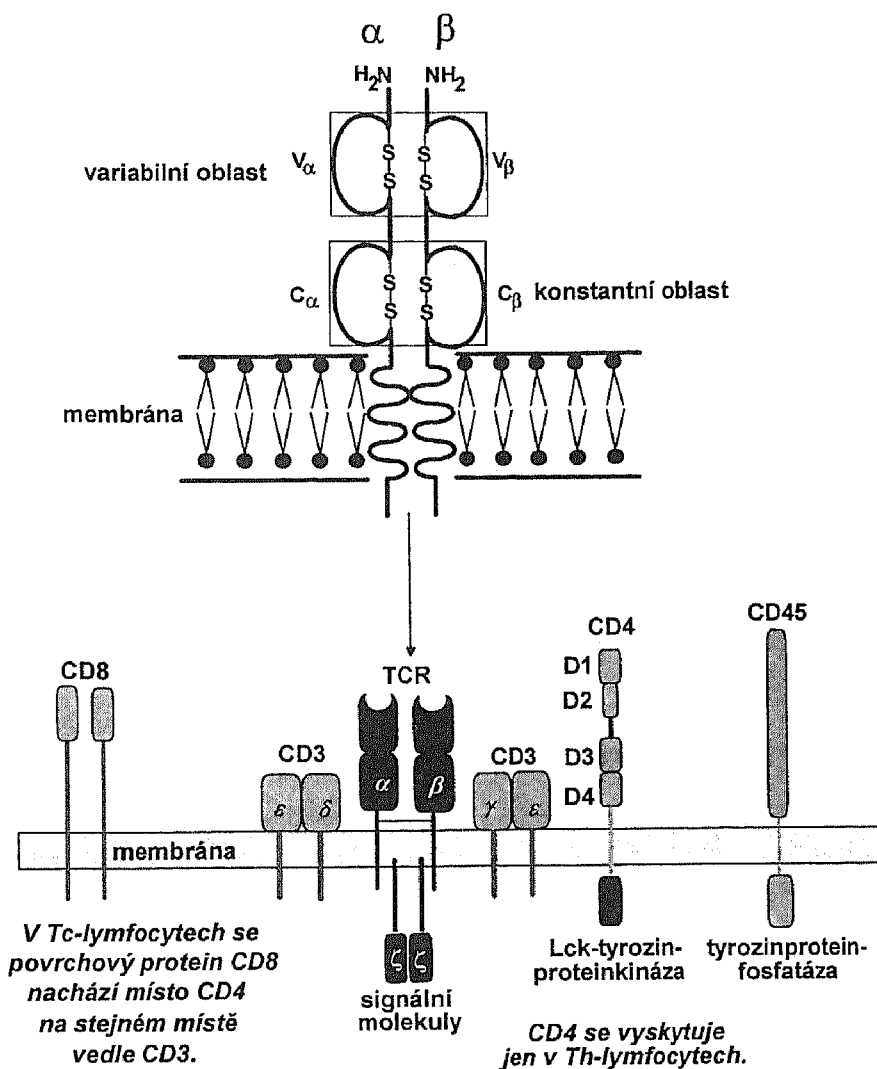
**KORECEPTORY CD4 a CD8.** *Proteiny CD4 a CD8 se v povrchu T-lymfocyty spojují se složkami TCR-receptoru a označují se proto jako CD4- a CD8- koreceptory. CD4 se váže k invariantní části MHC II-proteinu a CD8 se váže k invariantní části MHC I-proteinu.*

CD4 je polypeptidový řetězec sestávající ze čtyř domén (D1, D2, D3, D4) podobných imunoglobulinům. Předpokládá se, že vazebné místo pro MHC II-molekuly zahrnuje domény D1 a D2.

CD8 je heterodimer sestávající z řetězců  $\alpha$  a  $\beta$ , které se podobají variabilní části imunoglobulinů. Oba řetězce jsou kovalentně spojeny disulfidovou vazbou. Váže se slabě k MHC I-molekulám. Svým cytoplazmatickým zakončením se váže také k Lck-proteinkinázám a zvyšuje citlivost T-buněk nesoucích CD8-koreceptor k antigenu nabízenému molekulami MHC I.

Oba koreceptory mají tedy stejné funkce, ačkoli se liší strukturálně.

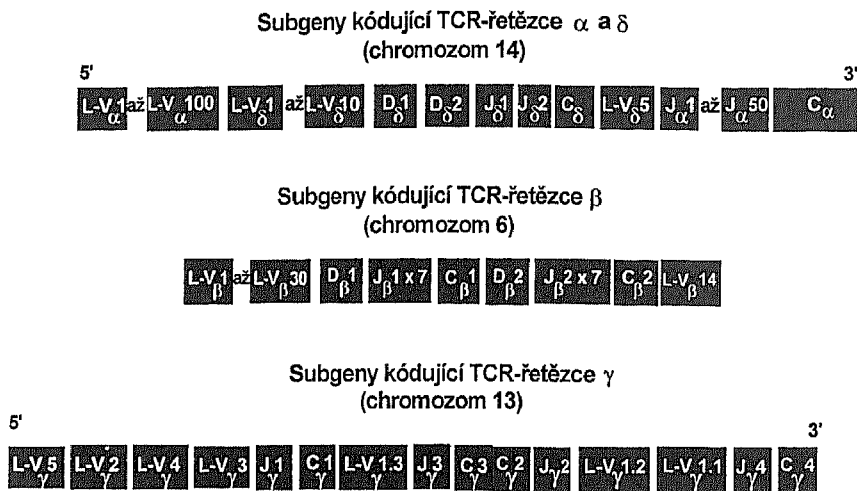
**ORGANIZACE SUBGENŮ KÓDUJÍCÍCH PROTEINY KOMPLEXU TCR.CD3 U MYŠÍ.** Podobně jako B-lymfocyty též T-lymfocyty se podrobují klonální selekci a geny, které kódují proteiny komplexu TCR.CD3 jsou výsledkem přeskupování subgenů. Jsou to subgeny, které kódují řetězce  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  a  $\gamma$ . Primární struktura těchto subgenů je podobná primární struktuře subgenů



Obr. 361  
Struktura TCR-receptoru a znázornění jeho vztahu  
k jiným povrchovým složkám T-lymfocytů

kódujících imunoglobuliny. To je pochopitelné, neboť *T-lymfocyt musí odpovídat receptorem na stejný antigen jako B-lymfocyt*. U myši jsou tyto subgeny umístěny na chromozomech 14, 6 a 13 (obr. 362). Vycházíme-li ze znalostí jejich umístění na chromozomech myši, můžeme stručně říci:

1. Subgeny kódující  $\delta$ -řetězce jsou na chromozomu 14 mezi subgeny V $\alpha$  a



## Poznámky

1. Jednotlivé C-subgeny sestávají z řady exonů a intronů, které nejsou zde uvedeny.
2. Organizace TCR-subgenů člověka je podobná, jen počty subgenů jsou odlišné.
3. J $_{\beta}$ 1 x 7 a J $_{\beta}$ 2 x 7 jsou repetice jednotek J $_{\beta}$ 1 a J $_{\beta}$ 2 s četností 7. Poslední člen obou repeticí je inaktivní.

## Obr. 362

## Pořadí subgenů pro TCR-receptory na chromozomech u myši

J $_{\alpha}$ . Toto umístění rodiny  $\delta$ -subgenů je velmi důležité, neboť při produktivním přeskupení subgenů kódujících  $\alpha$ -řetězce dochází k delecí C $_{\delta}$ -subgenů tak, aby v příslušném T-lymfocyту se současně neexprimoval v TCR-receptoru dimer  $\gamma\delta$ .

2. Na chromozomu 14 je asi 100 V $_{\alpha}$ -, 50 J $_{\alpha}$ -subgenů, jeden C $_{\alpha}$ -subgen a 10 V $_{\delta}$ -subgenů.

3. Na chromozomu 6 jsou řetězce  $\beta$  kódovány 20 - 30 V $_{\beta}$ -subgeny, dvěma repeticemi jednoho D-subgenu, dvěma repeticemi sedmi J-subgenů a dvěma repeticemi jednoho C-subgenu.

4. Na chromozomu 13 jsou řetězce  $\gamma$  kódovány sedmi V $_{\gamma}$ -subgeny a třemi funkčními repeticemi J $_{\gamma}$  - C $_{\gamma}$ .

Co se týče subgenů kódujících proteiny komplexu TCR.CD3 u člověka, odkazujeme na tab. 34, v níž uvádíme jejich počty a umístění na chromozomech.

**PŘESKUPENÍ SUBGENŮ KÓDUJÍCÍCH PROTEINY KOMPLEXU TCR .CD3.** Jako příklad je uvedeno na obr. 362 přeskupení subgenů, které kódují  $\alpha$

Tab. 34

Počet a chromozomové umístění subgenů kódujících proteiny komplexu TCR-CDR u člověka

Subgen	Číslo chromozomu	Počet subgenů			
		V	D	J	C
$\alpha$	14	50		70	1
$\delta$	14	3	3	3	1
$\beta$	7	57	2	13	2
$\gamma$	7	14		5	2
<b>Poznámky</b>					
<p>1. Subgeny kódující <math>\delta</math>-řetězec jsou umístěny mezi subgeny <math>V_\alpha</math> a <math>J_\alpha</math>.</p> <p>2. Existují dvě repetice, z nichž každá obsahuje 1 <math>D_\beta</math>-subgen, 6 nebo 7 <math>J_\beta</math>-subgenů a 1 <math>C_\gamma</math>-subgen.</p> <p>3. Existují též dvě repetice, z nichž každá obsahuje 2 nebo 3 <math>J_\gamma</math>-subgeny a 1 <math>C_\gamma</math>-subgen.</p>					

a  $\beta$ -řetězce TCR-receptoru u myši. Výsledkem tohoto přeskupení je  $\alpha\beta$ -dimer TCR-receptoru těchto organismů. V zásadě lze toto přeskupení charakterizovat takto:

1. Ačkoli B-lymfocyty a T-lymfocyty používají stejných mechanismů pro přeskupení subgenů, subgeny kódující imunoglobuliny se nepřeskupují v T-lymfocytech a subgeny kódující proteiny komplexu TCR.CD3 se naopak nepřeskupují v B-lymfocytech. Je to pravděpodobně způsobeno rekombinázovým systémem fungujícím specificky v B- i T-lymfocytech. Např. bylo zjištěno, že v T-lymfocytech existuje zesilovač transkripce, který v nich potlačuje přeskupení subgenů kódujících  $\kappa$ -řetězce. Na tento zesilovač se váže protein (transkripční faktor), který se syntetizuje jen v T-lymfocytech.

2. U  $\beta$ -řetězců podobně jako u imunoglobulinových těžkých řetězců proběhne nejdříve přeskupení  $D_\beta$  k  $J_\beta$  a pak teprve  $V_\beta$  k  $D_\beta J_\beta$ .

3. Transkripcí přeskupených subgenů se vytvoří primární transkript, který se sestřihuje do mRNA kódující  $\alpha$ - a  $\beta$ -řetězec TCR-receptoru vázaného na membránu buňky.

4. Jelikož se netvoří sekretovaný TCR, neprobíhá zde alternativní sestřih primárního transkriptu, jak je tomu u B-lymfocytů (obr. 352).

5.  $C_\beta$ -subgeny mají stejnou primární strukturu, takže se projevují stejně ve výsledném proteinovém produktu.

začít transkripce, neboť promotory a zesilovače transkripce jsou pak přístupny transkripčním faktorům. Promotory jsou umístěny před každým L-V-subgenem (na obr. 358 nejsou L-subgeny uvedeny, ale odkazujeme na str. 513-514, kde je vysvětlen jejich význam), kdežto *před skupinou D-subgenů je jeden promotor a před skupinou J-subgenů také jeden*. Před každým C-subgenem (přesněji před jeho signálem přesmyku) je zesilovač transkripce E.

Předpokládá se, že transkripční faktory specifické pro B-lymfocyty se vážou k zesilovačům transkripce a indukují otevření chromatinu v oblasti, kde jsou lokalizovány imunoglobulinové subgeny. To pak vede k tomu, že chromatin je přístupný aktivaci transkripce a rekombinázovému komplexu, který řídí přeskupování subgenů (obr. 358).

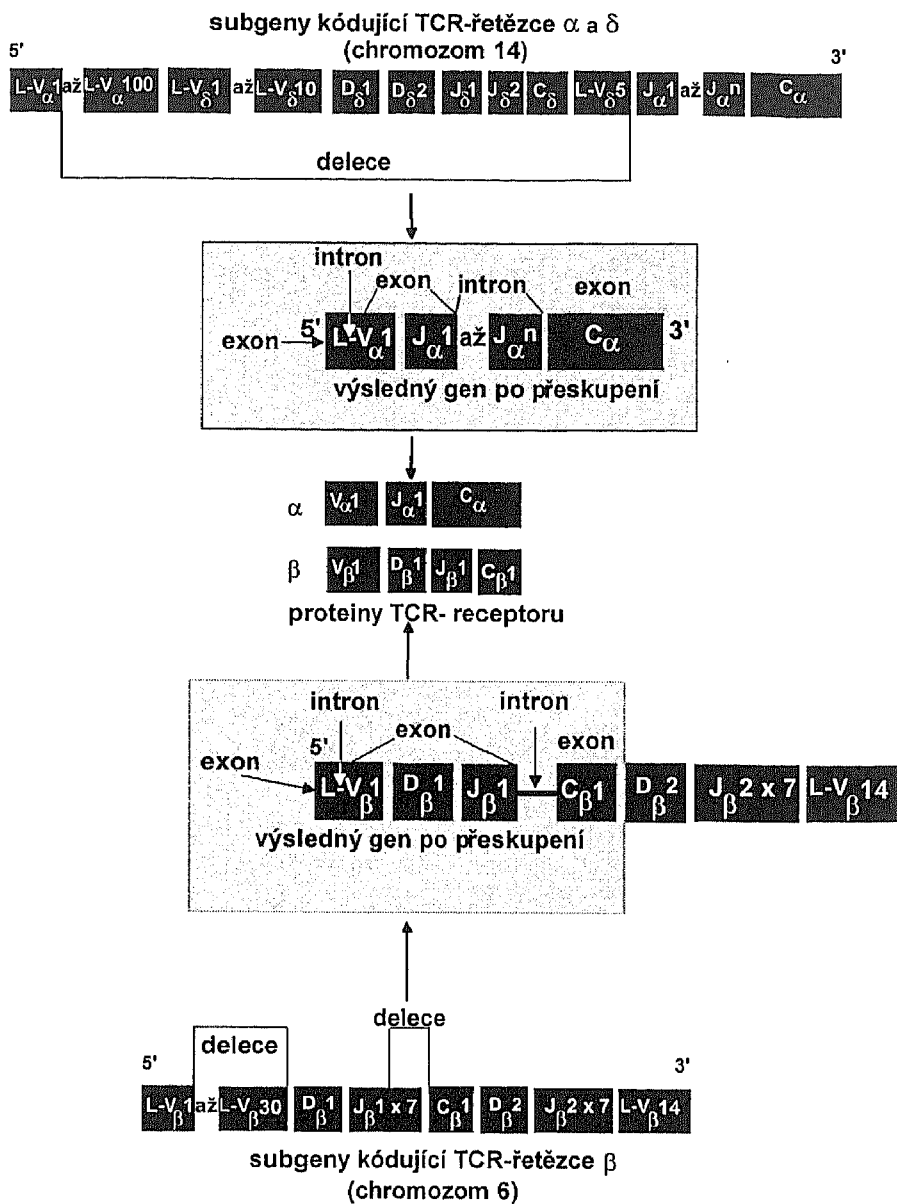
Jakmile se chromatin otevře, probíhá velmi slabá transkripce v úseku vymezeném prvním promotorem a koncem  $C_{\mu}$ -subgenu. Transkripce je velmi slabá proto, že mezi promotorem a zesilovačem transkripce je ještě značná vzdálenost. Teprve po přeskupení D-subgenu k J-subgenu transkripce zesílí, jelikož vzdálenost mezi promotorem a zesilovačem transkripce před  $C_{\mu}$ -subgenem se zkrátí. Přepisuje se rovněž úsek od promotoru posledního  $V_{H}$ -subgenu. K velmi silné transkripci dochází až po přeskupení  $V_{H}$ -subgenu k DJ, tj. po vytvoření genu kódujícího v tomto případě těžký řetězec  $\mu$ .

*Ukazuje se tedy, že transkripce subgenů kódujících imunoglobuliny je řízena přeskupováním subgenů.*

Transkripce genů kódujících imunoglobuliny závisí na přítomnosti speciálního transkripčního faktoru OCT-2, který je potřebný k transkripci genů kódujících těžké řetězce, zatímco NF- $\kappa$ B působí při transkripci genů kódujících řetězce lehké. Faktor OCT-2 reaguje nejen s promotorem, ale také se zesilovačem transkripce E, který však není účinný v kmenových buňkách, jelikož je zde příliš vzdálen od promotorů (asi 100 kb). Teprve po přeskupení subgenů se dostane do dostatečné blízkosti promotoru, takže může s ním interagovat pravděpodobně prostřednictvím OCT-2. Koaktivátorem tohoto transkripčního faktoru je OCA-B, který se tvoří jen v B-lymfocytech.

**REGULACE KONEČNÉ FÁZE VÝVOJE (DIFERENCIACE) B-LYMFOCYTŮ TRANSKRIPČNÍM FAKTOREM BSAP.** Transkripční faktor BSAP se vyskytuje jen v B-lymfocytech a ovlivňuje konečné diferenační děje, které vedou k tvorbě paměťových a plazmatických buněk. Váže se na promotor nebo zesilovače transkripce různých genů specifických pro B-lymfocyty včetně genů kódujících domény  $\lambda 5$  a V-preB náhražkového lehkého řetězce. Kromě toho váže se na místa přesmyku a zabraňuje vazbě jiných transkripčních faktorů. Nachází-li se v buňce ve vysoké koncentraci, blokuje vazbu transkripčního faktoru NF- $\alpha$ P na zesilovač 3' $\alpha$ , a tím vlastně zastavuje transkripci genu pro

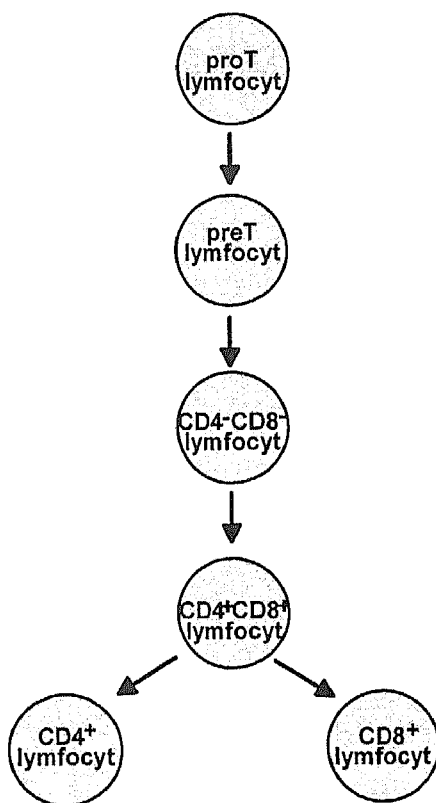




Obr. 363

Příklad přeskupení subgenů kódujících proteiny TCR-receptoru

**VÝVOJ A DIFERENCIACE TYMOCYTŮ.** Jako tymocyty se označují *T-lymfocyty ve stadiích svého vývoje v brzlíku*. Tímto vývojem a diferenciací se pro jeho značnou složitost nemůžeme v této učebnici zabývat. Odkazujeme



Obr. 364  
Vývoj a diferenciace tymocytů

proto na speciální literaturu. Pro pochopení dalšího textu však považujeme za nutné uvést k tomuto vývoji alespoň několik stručných poznámek (obr. 364):

1. Stejně jako u B-lymfocytů je řízen přeskupováním subgenů a transkripcí genů vzniklých z tohoto přeskupování. Začíná ve fetálních játrech a kostní dřeni z progenitorových T-lymfocytů neboli proT-lymfocytů, které se zde diferencují na **preT-lymfocyty**.

2. PreT-lymfocyty vstupují do brzlíku, kde se v prvním stadiu vývoje, který bude probíhat již v brzlíku označují jako **dvojnásobně negativní CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>-lymfocyty**, jelikož *nesyntetizují koreceptory CD4 a CD8, ale vyznačují se syntézou náhražkového preT-receptoru neboli preTCR*.

3. Dvojnásobně negativní CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>-lymfocyty diferencují na **dvojnásobně pozitivní CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-lymfocyty**, které syntetizují jak koreceptor CD4, tak i CD8. Ve svém povrchu mají již komplex TCR-receptoru s proteiny CD3.

4. Zatím ještě neidentifikovaný signál v brzlíku indukuje proliferaci a diferenciaci CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-lymfocytů na **jednoduše pozitivní T-lymfocyty**:

**CD4<sup>+</sup>-lymfocyty**, tj. zralé Th-lymfocyty, které kromě jiných proteinů mají ve svém povrchu TCR-receptor, dimer CD3 a koreceptor CD4;

**CD8<sup>+</sup>-lymfocyty**, tj. zralé Tc-lymfocyty, které kromě jiných proteinů mají ve svém povrchu TCR-receptor, dimer CD3 a koreceptor CD8.

5. Z celkové populace diferencujících se tymocytů dosahuje zhruba 1% stadia zralých T-lymfocytů. 99 % tymocytů umírá apoptózou.

CD4<sup>+</sup>- a CD8<sup>+</sup>-lymfocyty opouštějí brzlík a vstupují jako klidové buňky ve fázi G<sub>0</sub>-buněčného cyklu do krve a pak do lymfy a nazpět. Označují se jako **panenské T-buňky**, což jsou T-lymfocyty, které se ještě nesetkaly s antigem. Jsou dvojího typu (viz přesněji na další straně):

**panenské CD8-buňky a panenské CD4-buňky.**

Oba typy buněk se vyznačují tím, že neustále cirkulují z krve do lymfatických uzlin a nazpět. Odhaduje se, že každá panenská T-buňka cirkuluje z krve do lymfatických uzlin a nazpět jednou za 12 až 24 hod. Jelikož pouze jeden T-lymfocyt z  $10^5$  je pro daný antigen specifický, takové opakované cirkulace zvyšují pak pravděpodobnost, že se panenská T-buňka setká se svým vhodným antigenem. Předpokládá se, že panenské T-buňky přežívají v krvi za nepřítomnosti antigenu 5 až 7 týdnů, možná i více.

### 5.8.6

#### Aktivace panenských T-buněk a makrofágů

**VÝZNAM AKTIVACE PANENSKÝCH T-BUNĚK.** *Panenské T-buňky, které se po aktivaci diferencují na výkonné Th-lymfocyty, se označují jako panenské CD4-buňky, kdežto panenské T-buňky, které se diferencují na výkonné Tc-lymfocyty, se označují jako panenské CD8-buňky.* Aktivace panenských CD4- a CD8-buněk je zásadní a první krok při realizaci adaptivní imunity. Tato aktivace se uskutečňuje za nezbytné účasti buněk nabízejících antigen, jelikož tyto buňky syntetizují molekuly B7, které podmiňují vznik kostimulačního signálu (viz dále). Proto panenské buňky mohou odpovědět na antigen pouze za předpokladu, že buňka nabízející antigen vedle nabídky antigenu má ve svém povrchu molekulu B7, která se váže na protein CD28 sloužící jako její receptor a nachází se v povrchu panenských buněk CD4 a CD8.

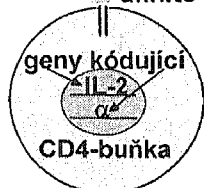
*Existují jen tři typy buněk, které syntetizují B7 a mohou proto účinně nabízet antigen. Jsou to dendritové buňky, makrofágy a B-lymfocyty.*

**AKTIVACE PANENSKÉ CD4-BUŇKY.** Jestliže panenská CD4-buňka rozezná antigen vázaný na MHC-protein buňky nabízející antigen, aktivuje se. To především znamená, že během 48 hod. vstoupí do opakujícího se buněčného cyklu. Aktivací se totiž rozběhnou signální dráhy ženoucí panenskou CD4-buňku jednak do  $G_1$ -fáze buněčného cyklu a jednak k transkripci genů kódujících IL-2 a  $\alpha$ -řetězec receptoru pro IL-2.

Na obr. 365 je tato aktivace a její konečný důsledek popsán. IL-2 je *cytokin stimuluje proliferaci T-lymfocytů. Je produkován T-lymfocyty a vzhledem k nim se vyznačuje autokrinním efektem.* Jeho receptor sestává ze tří podjednotek  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ . V klidových buňkách se syntetizují jen podjednotky  $\beta$  a  $\gamma$ , které slabě vážou IL-2. Aktivace T-lymfocytů v těchto buňkách vede k syntéze podjednotky  $\alpha$ , která se vyznačuje v receptoru vysokou afinitou k IL-2 (obr. 366).

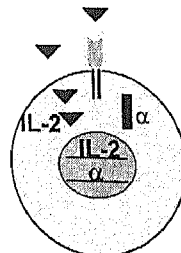
*Panenská CD4-buňka syntetizuje pouze receptor o nízké afinitě k IL-2. Je to receptor, který sestává jen z podjednotek  $\beta$  a  $\gamma$ .*

1 receptor o nízké afinitě k IL-2



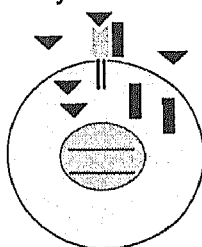
*Aktivované CD4 buňky syntetizují receptor pro IL-2 o vysoké afinitě a sekretují IL-2. Obsahují podjednotku  $\alpha$ .*

2

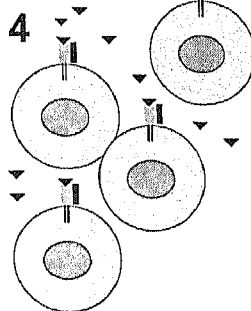


*IL-2 se váže na receptor a indukuje signál k dělení buňky.*

3 receptor o vysoké afinitě

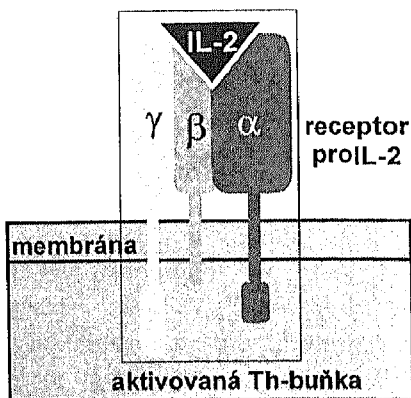


*Intenzivní proliferace aktivovaných Th-lymfocytů.*



Obr. 365

Důsledek aktivace panenské CD4-buňky



Obr. 366

Schéma sestavy receptoru pro IL-2

**SIGNÁL 1 A SIGNÁL 2.** Pouze dendritové buňky, makrofágy a B-lymfocyty nabízejí antigen, který je sdružen s MHC II-molekulami, a jsou schopny dát kostimulační signál potřebný pro úplnou aktivaci panenských CD4-buněk, která vede k jejich proliferaci a diferenciaci. Jako **kostimulační signál** se označuje takový signál, který je potřebný k indukci proliferace T-lymfocytů aktivovaných již antigenem vázaným na TCR-receptor. Abychom to pochopili, je třeba

brát v úvahu, že interakce TCR-receptoru s antigenem (nabízeným B-lymfocytům) sama o sobě nestačí k úplné aktivaci panenských CD4-buněk. Předpokládá se, že panenské CD4-buňky potřebují pro aktivaci a následnou proliferaci a diferenciaci na výkonné T-lymfocyty tyto dva odlišné signály:

- ◆ **Signál 1**, což je počáteční signál, který vzniká interakcí antigenního peptidu (nabízeného B-lymfocytům) s TCR.CD3-komplexem.
- ◆ **Signál 2**, což je následný antigenně nespecifický kostimulační signál vznikající interakcí CD28 a proteinu CTLA-4 na panenské CD4-buňce a s proteinem B7 na buňce nabízející antigen.

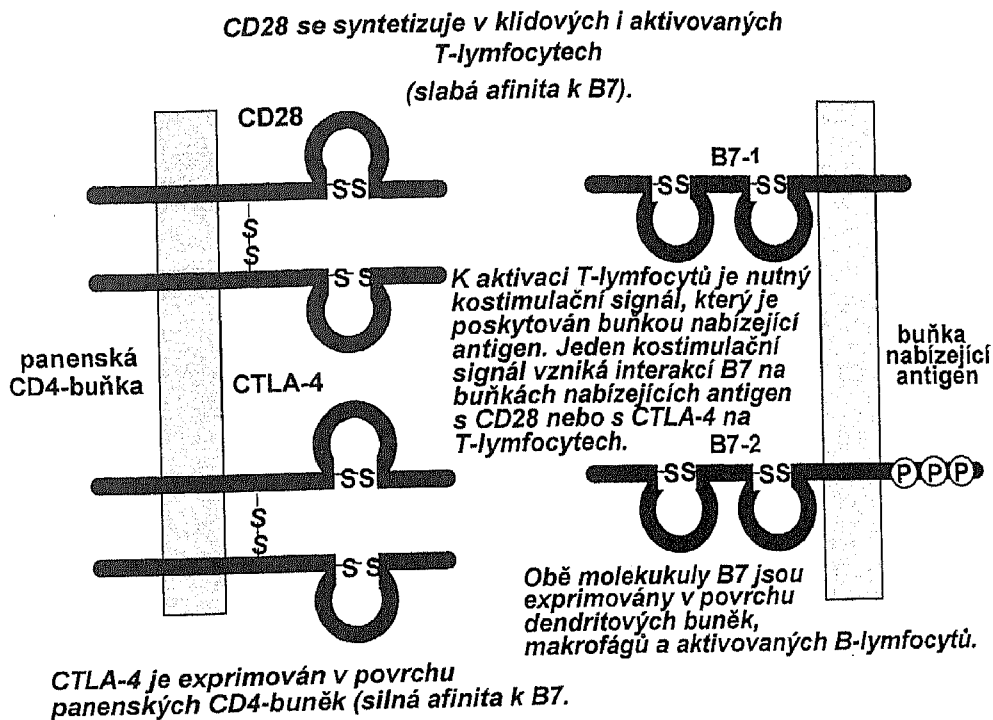
**Molekula B7** patří do skupiny imunoglobulinů vyznačujících se jedinou doménou podobající se V-doméně a jedinou doménou podobající se C-doméně. Existují dvě příbuzné formy B7, a to **B7-1** a **B7-2**. Obě domény mají podobnou organizaci extracelulární domény, ale významně odlišné intracelulární domény. *Obě molekuly B7 jsou syntetizovány dendritovými buňkami, aktivovanými makrofágy a aktivovanými B-lymfocyty.* Ligandy pro B7 jsou **proteiny CD28** a **CTLA-4**, které jsou umístěny jako monomery nebo homodimery na membráně panenských CD4-buněk. Stejně jako B7 patří do skupiny imunoglobulinů. CD28 je syntetizován jak klidovými tak i aktivovanými T-lymfocyty a váže se slabě na B7. Na rozdíl od něho CTLA-4 váže B7 dvacetkrát silněji, ale je exprimován pouze na aktivovaných Th-lymfocytech (obr. 367).

### OTEVŘENÍ SIGNÁLNÍ DRÁHY AKTIVACÍ KOMPLEXU TCR.CD3.

Aktivaci panenské CD4-buňky, kterou jsme výše popsali, se otevírá signální dráha směřující k aktivaci transkripčních faktorů pozitivně navozujících expresi těchto skupin genů:

1. **Geny téměř okamžité exprese** (zhruba během 1/2 hod. po rozeznání antigenu TCR-receptorem). Tyto geny *kódují transkripční faktory Fos, Myc, Jun, NF-AT a NF-κB.*
2. **Geny rané exprese**, které se po rozeznání antigenu exprimují během 1 až 2 hod. Tyto geny *kódují IL-2, IL-2R, IL-3, IL-6, INF-γ a ještě jiné proteiny.*
3. **Geny pozdní exprese**, které se exprimují až po 2 dnech po rozeznání antigenu. Tyto geny *kódují různé adhezní molekuly.*

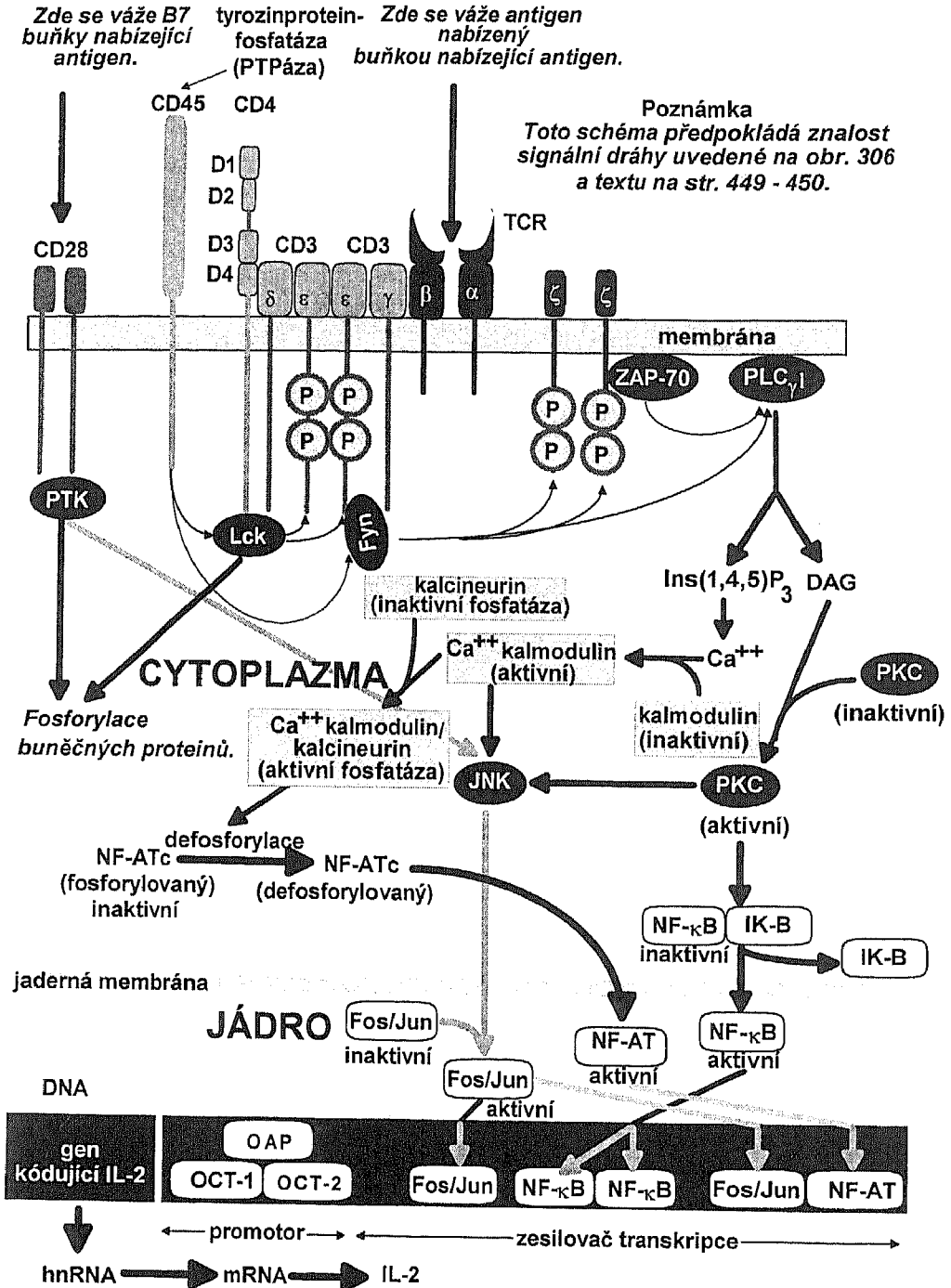
Na str. 546 jsme uvedli, že cytoplazmatické domény každého řetězce proteinu CD3 obsahují sekvenční motiv ITAM, který během přenosu signálu interaguje s tyrozinproteinkinázami. Jsou to proteinkinázy Fyn a Lck. Tyrozinproteinkináza Fyn se sdružuje s podjednotkou  $\epsilon$  proteinu CD3 a proteinkináza Lck s koreceptorem CD4. Proteinkináza ZAP-70 interaguje se signálními molekulami  $\zeta$  (obr. 368). Po vazbě antigenu na TCR-receptor se rozběhnou tyto děje (obr. 368):



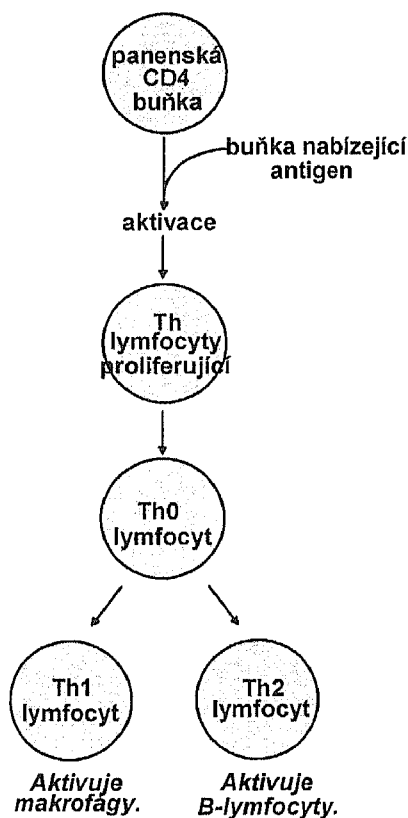
Obr. 367  
Vznik kostimulačního signálu

Aktivuje se CD45. Tato membránová molekula má cytoplazmatický konec vyznačující se dvěma doménami s aktivitou tyrozinproteinfosfatázy, která pravděpodobně katalyzuje defosforylaci zbytků tyrozinu na Lck a Fyn. Předpokládá se, že tímto defosforylačním krokem jsou aktivovány obě tyrozinkinázy, které pak mohou začít fosforylaci řetězců  $\epsilon$  a  $\zeta$  proteinu CD3, fosfolipázy C (PLC $\gamma$ ) a jiných substrátů. Na aktivaci PLC $\gamma$  se též podílí ZAP-70. Tyto děje pak umožní otevřít dráhy vedoucí na jedné straně k DAG a na straně druhé ke kalcineurinu (obr. 306). DAG otevře přes proteinkinázu C (PKC) dráhu směřující k tvorbě aktivního transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B označovaného jako **transkripční faktor aktivovaných T-buněk**. Kalcineurin v komplexu s Ca<sup>++</sup>-kalmulinem (aktivní fosfatáza) defosforyluje inaktivní cytoplazmatickou formu (NF-ATc) transkripčního faktoru NF-AT.

Současně se tvoří kostimulační signál aktivací B7 antigenem vázaným na TCR-receptor. Tento signál vede k aktivaci tyrozinproteinkinázy (PTK) sdružené s cytoplazmatickým koncem proteinu CD28. PTK pak aktivuje fosforylaci proteinkinázu JNK, kterou se aktivuje transkripční faktor Fos/Jun. Na aktivaci JNK-proteinkinázy se též podílí proteinkináza C (PKC). Takto se vytvoří tři aktivní transkripční faktory NF- $\kappa$ B, NF-AT a Fos/Jun, které se vážou na zesilo-



Obr. 368  
Syntéza IL-2 Th-lymfocytu aktivovaná vazbou antigenu na TCR



Obr. 369  
Diferenciace na

lovač transkripce sousedící s promotorem genu kódujícího IL-2, jehož význam jsme vysvětlili na obr. 365.

### VÝKONNÉ TH-LYMFOCYTY.

Sekrecí IL-2 a vazbou tohoto cytokinu na jeho receptor se panenská CD4-buňka indukuje k proliferaci a diferenciaci na **výkonné Th-lymfocyty**. Jsou to dvě subpopulace buněk, a to (obr. 369):

1. **Th1-lymfocyty**, které produkuje IL-3, IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$  a aktivují makrofágy.

2. **Th2-lymfocyty**, které produkuje IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, GM-CSF a aktivují B-lymfocyty.

Oba uvedené typy výkonných Th-lymfocytů mají ve svém povrchu **protein CD 40L**, což je ligand, který se váže na receptor CD40. Tento receptor se nachází v povrchu B-lymfocytů.

*Th1- a Th2-lymfocyty vznikají*



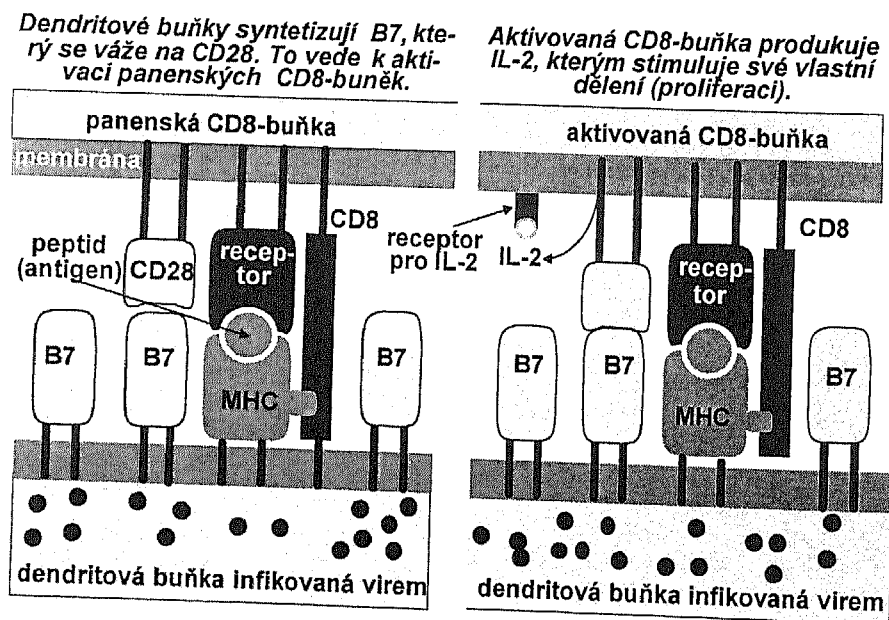
1. Nejdříve proběhne aktivace panenské CD8-buňky k syntéze IL-2 za přítomnosti dendritových buněk. IL-2 pak stimuluje proliferaci a diferenciaci CD8-lymfocytů na výkonné Tc-lymfocyty. Stimulační účinek na dělení a diferenciaci je zesilován syntézou B7-proteinu (obr. 370).

2. Uvedená aktivace CD8-lymfocytů se však dovrší a zesílí za přítomnosti Th2-lymfocytů během zahájení aktivace. V tomto procesu musí však jak panenská CD8-buňka, tak i Th2-lymfocyt rozeznat antigen v povrchu stejné buňky poskytující antigen. Existují dva způsoby, kterými Th2-lymfocyty přispívají k aktivaci CD8-buněk:

- ◆ Buňka nabízející antigen může aktivovat výkonný Th-lymfocyt, který pak zpětně aktivuje buňku nabízející antigen. Aktivovaná buňka nabízející antigen syntetizuje B7, kterým současně stimuluje (kostimuluje) panenskou CD8-buňku k syntéze IL-2 a receptoru pro IL-2 (obr. 371).
- ◆ IL-2 požadovaný k proliferaci a diferenciaci CD8-buněk může dodat panenská CD4-buňka aktivovaná buňkou nabízející antigen (obr. 372).

### INDUKCE APOPTÓZY V CÍLOVÝCH BUŇKÁCH Tc-LYMFOCYTY.

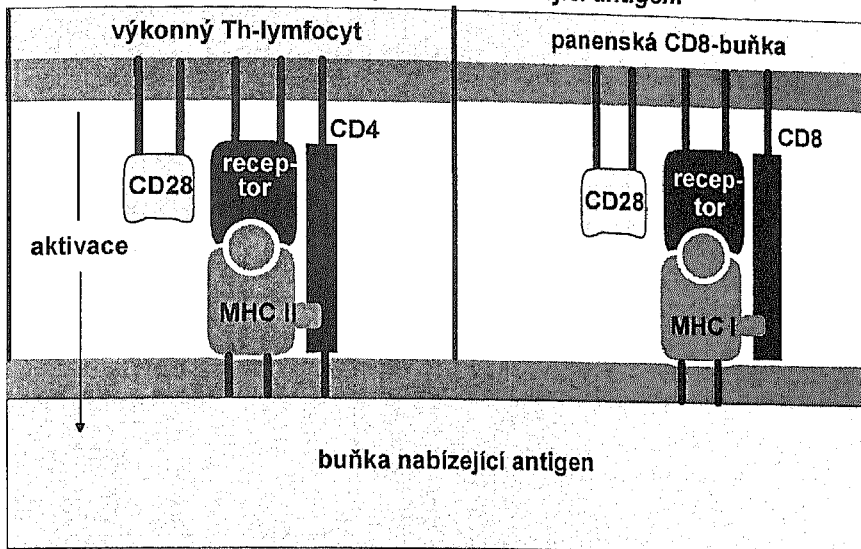
Výkonné Tc-lymfocyty zabíjejí buňky tím, že v nich indukují program pro realizaci apoptózy. Smíchají-li se Tc-lymfocyty *in vitro* s cílovými buňkami, což



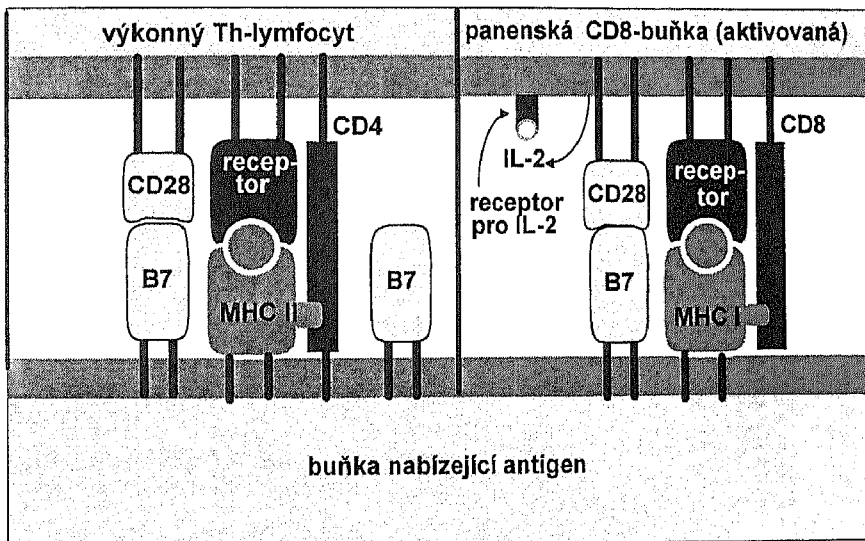
Obr. 370

Přímá aktivace prekurzorových CD8-lymfocytů dendritovými buňkami infikovanými virem

*Buňka nabízející antigen aktivuje výkonný Th-lymfocyt, který naopak zpětně aktivuje buňku nabízející antigen.*



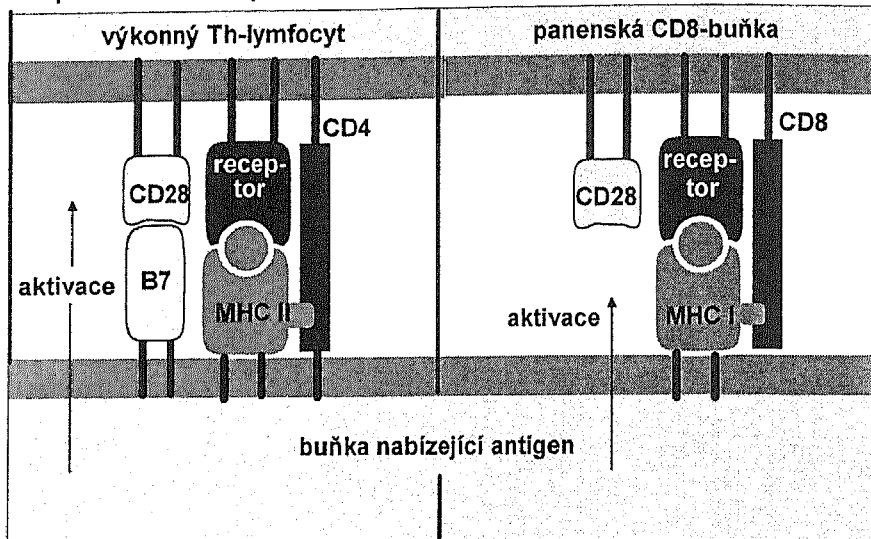
*Aktivovaná buňka nabízející antigen syntetizuje protein B7, kterým kostimuluje panenskou CD8-buňku k syntéze IL-2 a receptoru pro IL-2.*



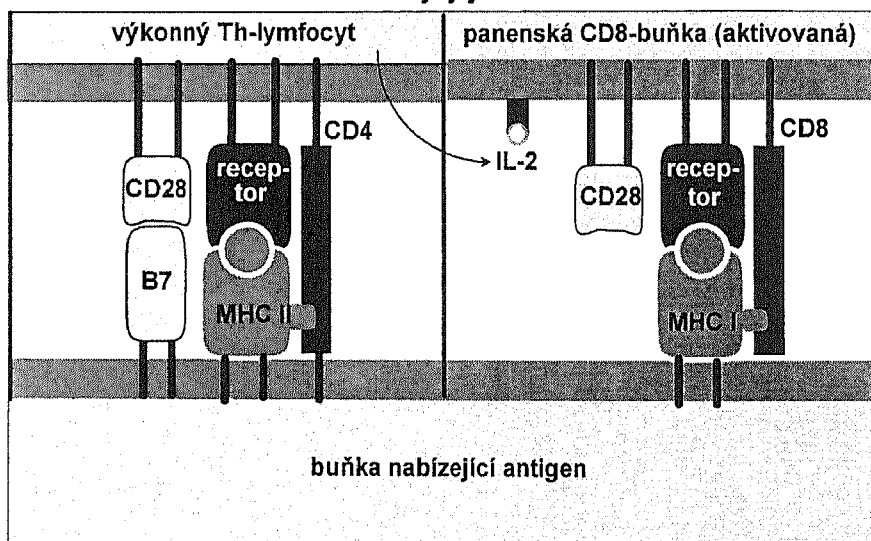
Obr. 371

**Aktivace panenských CD8-buněk za přítomnosti výkonných Th-lymfocytů**

*Buňka nabízející antigen aktivuje Th-lymfocyty  
k produkci IL-2 a panenské CD8-buňky k syntéze receptorů pro IL-2.*



*Aktivovaný Th-lymfocyt syntetizuje IL-2, který  
se váže na receptor pro IL-2 aktivované CD8-buňky  
a stimuluje její dělení.*

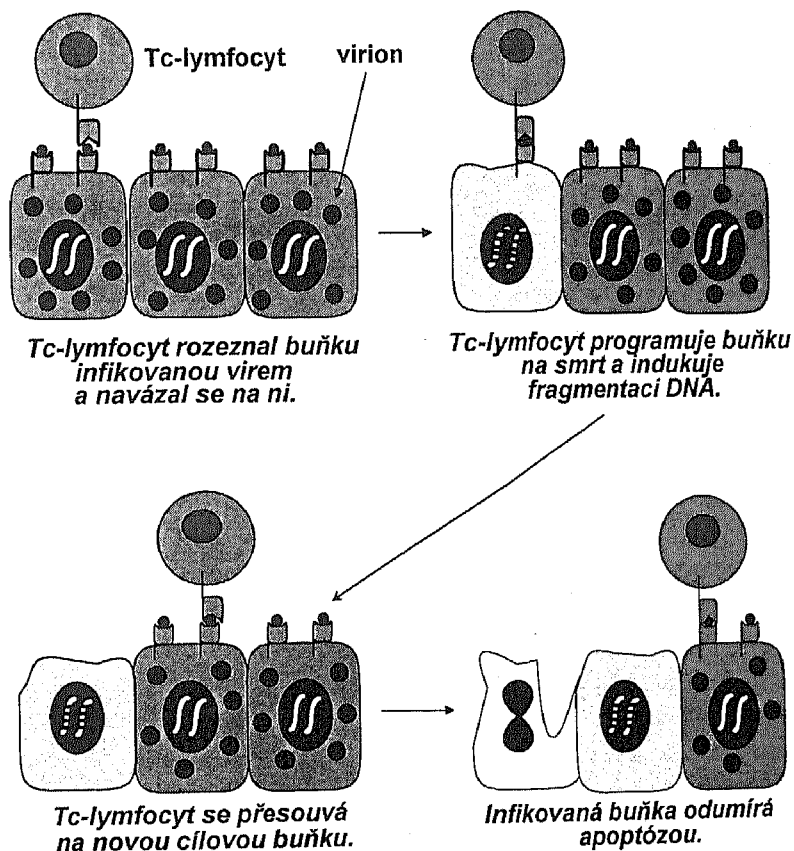


Obr. 372

Aktivace prekurzorových CD8-lymfocytů za přítomnosti  
výkonných Th-lymfocytů

jsou buňky, v jejichž povrchu rozeznávají Tc-lymfocyty antigen viru, kterým byly tyto buňky infikovány, indukují v nich program k apoptóze. Cílové (infikované) buňky pak během 5 minut zahynou, ačkoli jinak smrt infikované buňky se dostavuje až po několika hodinách. Hned po smíchání buněk se bude DNA intenzivně odbourávat a potom se bude ztrácet též celistvost membrány. Krátká doba požadovaná Tc-buňkami k naprogramování cílové buňky ke smrti zahrnuje pravděpodobně aktivaci výkonných molekul předem v cílové buňce vytvořených a uvolněných prostřednictvím Tc-buňky z nějaké endogenní apoptotické dráhy uvnitř cílové buňky. Indukce apoptózy v cílových buňkách Tc-lymfocyty je schematicky vysvětlena na obr. 373.

Tc-lymfocyty nejdříve rozpoznávají antigen v povrchu cílových buněk a potom uvolňují sekreční granula obsahující dvě skupiny proteinů označovaných jako **cytotoxiny**, které jsou syntetizovány toliko v Tc-lymfocytech. Jsou to:



Obr. 373

Indukce programované smrti (apoptóza) buňky infikované virem vyvolaná Tc-lymfocytem

- ◆ **perforiny**, které *polymerizují za tvorby pórů v membráně cílové buňky*;
- ◆ **granzymy** neboli **fragmentiny**, které *se vyznačují aktivitou serinproteáz (patří do stejné kategorie jako trypsin a chymotrypsin) a v cílových buňkách indukují apoptózu*.

Sekreční granula se vyskytují v mnoha typech buněk (např. v neuronech, buňkách pankreatu atd.). Ve všech těchto buňkách se obsah granul rychle uvolňuje po stimulaci vyvolané fúzi membrány granula s cytoplazmatickou membránou. Podobné uvolnění cytotoxinů z Tc-lymfocytů proběhne téměř bezprostředně po jejich vazbě na receptor cílové buňky. To umožňuje Tc-lymfocytům působit velmi rychle na své cílové buňky a naprogramovat je na lyzi.

Fragmentiny pravděpodobně indukují apoptózu ve všech cílových buňkách a perforiny umožňují tuto jejich aktivitu tím, že vytvářejí v membráně díry, kterými vcházejí fragmentiny dovnitř cílové buňky.

Tc-lymfocyty usmrcují všechny infikované cílové buňky s velkou přesností projevující se tím, že od apoptózy jsou ušetřeny jen sousední normální (neinfikované) buňky.

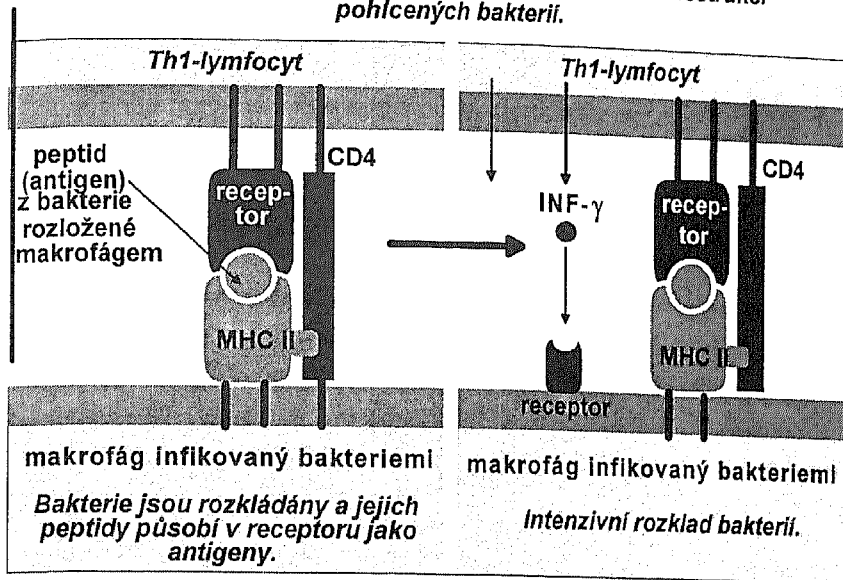
Poznámka: Kromě indukce apoptózy fragmentiny existuje ještě další mechanismus, a to nezávislý, kterým se v cílových (infikovaných) buňkách indukuje apoptóza. V povrchu Tc-lymfocytů je totiž proteinová molekula označovaná jako Fas, která představuje ligand vázající se na tzv. Fas-receptor nacházející se v povrchu cílových buněk. Předpokládá se, že touto vazbou se Fas-receptor aktivuje k indukci apoptózy v cílových buňkách.

**AKTIVACE MAKROFÁGŮ.** Makrofágy mohou rozeznat a pohlcovat extracelulární bakterie, rozložit je na peptidy, které zanořují do svého povrchu a nabízejí Th1-lymfocytům. Tyto pak indukují u makrofágů antibakteriální procesy, což je vlastní výsledek aktivace makrofágů. Teprve po této aktivaci se zintenzivní v makrofágách proces rozkladu bakterií. Aktivace probíhá tak, že peptid (antigen) bakterie, sdružený v povrchu makrofága s MHC II-proteiny, je rozeznán Th1-lymfocitem, který je vazbou antigenu indukován k syntéze INF- $\gamma$  a ligandu CD40 (obr. 374).

Prvním důsledkem aktivace je syntéza receptoru pro TNF- $\gamma$  v povrchu makrofágů, syntéza receptoru pro CD40 a dále pak přeměna makrofága na mocnou antibakteriální výkonnou buňku. Kontaktem s makrofágem jako buňkou nabízející antigen se pak aktivuje Th1-lymfocyt ještě k produkci dalších cytokinů. Celkově Th1-buňka produkuje:

- ◆ **Interferon  $\gamma$**  neboli **IFN- $\gamma$** , kterým je makrofág aktivován k destrukci pohlcených bakterií.
- ◆ **Interleukin IL-2**, který indukuje CD4-lymfocyty k proliferaci.

*Th1-lymfocyt je aktivován vázaným antigenem (peptid) k produkci  $\text{INF-}\gamma$ , kterým je makrofág aktivován k destrukci pohlcených bakterií.*



Obr. 374  
Aktivace makrofágů Th1-lymfocyty

- ◆ Interleukin IL-3 a GM-CSF. Oba indukují v kostní dřeni diferenciaci makrofágů z kmenové buňky.
- ◆ MCF a MIF. Makrofágový chemkinový faktor (MCF) signalizuje migraci makrofágů do míst infekce, kdežto makrofágový faktor inhibice migrace (MIF) zastavuje migraci v místech infekce.

### 5.8.7

#### Aktivace B-lymfocytů

**DVA ZPŮSOBY AKTIVACE B-LYMFOCYTŮ.** Panenské neboli klidové B-lymfocyty se nedělí, tj. jsou ve fázi  $G_0$  buněčného cyklu. Aktivace B-lymfocytu je proces, kterým je klidový zralý B-lymfocyt poháněn z  $G_0$ -fáze přes fázi  $G_1$  buněčného cyklu do S-fáze a odtud do M-fáze, ve které se dělí a diferencuje (obr. 356). Celý proces aktivace od klidového B-lymfocytu až po jeho dělení si proto musíme představit jako přenos signálu od antigenem aktivovaného BCR-receptoru k aktivaci genů, jejichž translační produkty řídí proliferaci B-lymfocytu a jeho diferenciaci na plazmatické a paměťové buňky.

Podle povahy antigenu se rozlišují dva rozdílné způsoby aktivace B-lymfocyty, tj. aktivace závislá na Th2-lymfocytech a aktivace na Th2-lymfocytech nezávislá. *Antigen, který aktivuje B-lymfocyt za nezbytné kooperace B-lymfocyty s Th2-lymfocytem*, se označuje jako **antigen závislý na brzlíku** neboli **TD-antigen**. Na druhé straně *antigen, který aktivuje B-lymfocyt bez nutné přítomnosti Th2-lymfocyty*, se označuje jako **antigen nezávislý na brzlíku** neboli **TI-antigen**. Mezi TD-antigeny patří proteiny, komplexy haptenu s jejich nosiči, erythrocyty aj. TI-antigeny zahrnují polysacharidy, které obsahují opakující se epitopy a lipopolysacharidy gramnegativních bakterií; indukují syntézu IgM bez kooperace s Th2-lymfocyty. Myší TI-antigeny se dělí na:

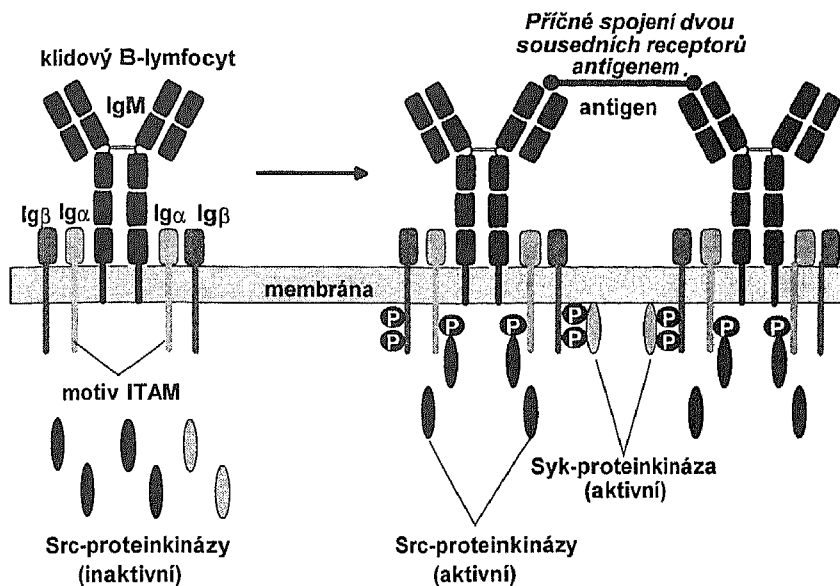
- ◆ **TI-1-antigeny**, např. lipopolysacharidové složky buněčné stěny bakterií,
- ◆ **TI-2-antigeny**, např. polymerní proteiny (flagelin), kapsulární polysacharidy.

Většina TI-1-antigenů jsou polyklonálními mitogeny. To znamená, že *aktivují B-lymfocyty k dělení bez ohledu na jejich antigenní specifitu*. Některé TI-1-antigeny stimulují při vysokých koncentracích asi u jedné třetiny B-lymfocytů proliferaci a sekreci protilátky. Mechanismus toho však zatím nebyl objasněn. Jestliže jsou B-buňky vystaveny nízkým koncentracím TI-1-antigenu, pak pouze ty B-buňky se aktivují, které se vyznačují specifíčností vzhledem k epitopům antigenu. Tyto antigeny mohou stimulovat produkci protilátek u myší, kterým byl odstraněn brzlík. Představitelem TI-1-antigenů je lipopolysacharid buněčné stěny gramnegativních bakterií. Při nízkých koncentracích stimuluje produkci specifických protilátek. Při vysokých koncentracích působí jako mitogen (viz výše).

TI-2-antigeny aktivují panenské B-buňky rozsáhlou příčnou vazbou na jejich imunoglobulinový receptor (viz níže). K jejich proliferaci a přesmyku do jiných tříd než je IgM jsou však zapotřebí cytokiny Th2-lymfocytů, aniž by docházelo k jejich kontaktu s B-buňkami.

Humorální odpověď na TI-antigeny se od humorální odpovědi na TD-antigeny liší především v tom, že je slabší, netvoří se při ní paměťové buňky, IgM je převažující sekretovanou protilátkou a nedochází k přesmyku tříd.

**AKTIVACE PANENSKÝCH B-BUNĚK NEZÁVISLÁ NA TH2-LYMFOCYTECH.** Podstata aktivace B-lymfocytů TI-antigenem je vysvětlena schematicky na obr. 375a a 375b. V souvislosti s tímto vysvětlením doporučujeme podívat se ještě na obr. 351, kde je vysvětlena struktura heterodimeru  $Ig\alpha/Ig\beta$ . Cytoplazmatický konec tohoto heterodimeru obsahuje motiv o 18 aminokyselinových zbytcích, který se označuje jako **aktivační tyrozinový motiv imunoreceptoru** neboli **ITAM-motiv**. Tento motiv se sdružuje s *Src-rodinou tyrozin-proteinkináz*. V klidových B-lymfocytech je však pouze malé procento BCR-



*Příčné spojení receptorů antigenem vede k tomu, že dochází k seskupení receptorů a ke sdružení motivů ITAM s některou Src-proteinkinázou, která fosforyluje ITAM na tyrozinu. Dvojnásobně fosforylovaný ITAM je rozeznáván Syk-proteinkinázou, která se tím aktivuje.*

Obr. 375a

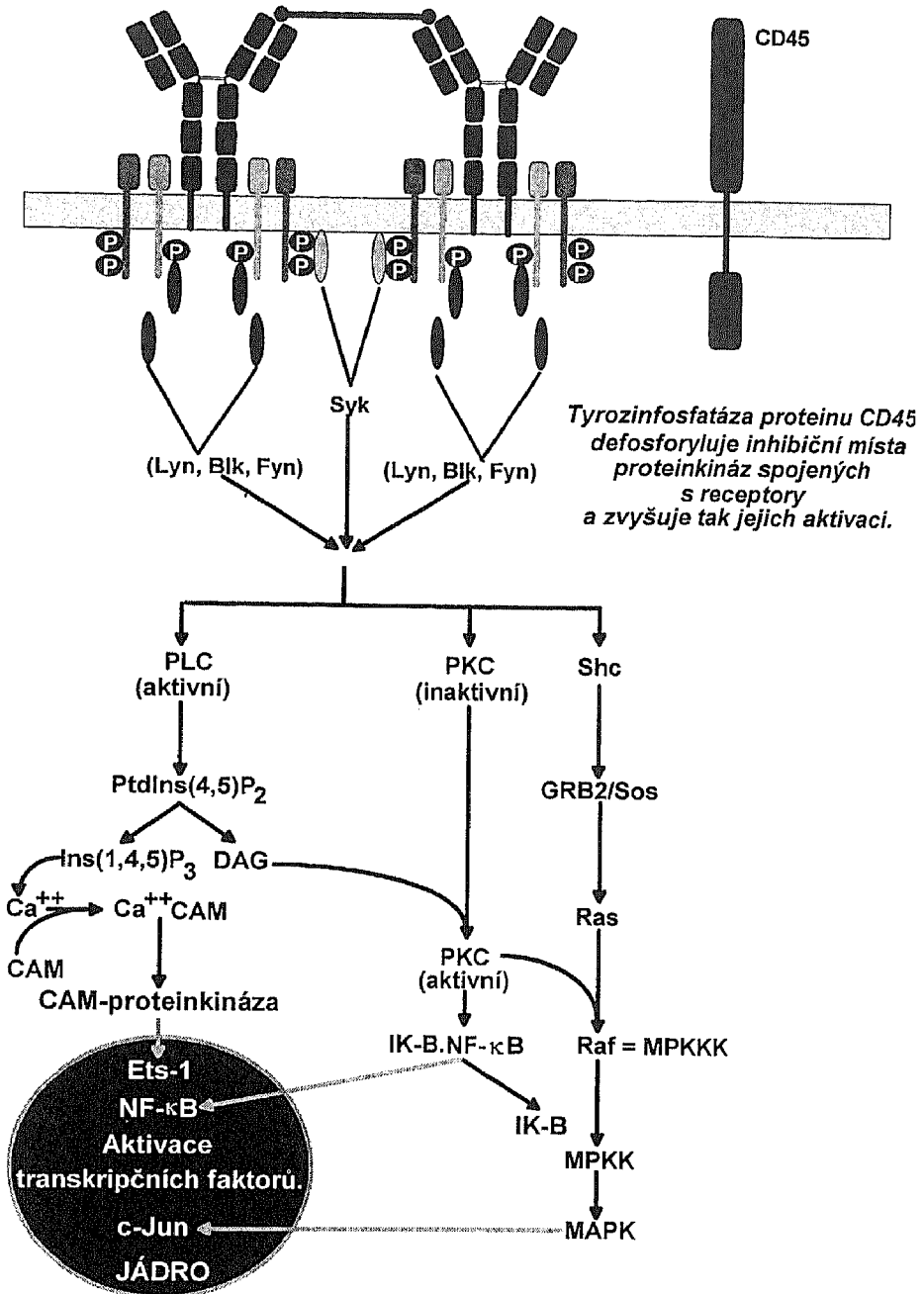
### Přenos signálu v B-buňce po vazbě antigenu na BCR-receptor

receptoru spojeno s tyrozinproteinkinázami, neboť tyto jsou v nich inaktivní. Teprve antigenní stimulace B-lymfocytů způsobí, že se tyrozinproteinkinázy spojí s heterodimerem Ig $\alpha$ /Ig $\beta$  a aktivují v něm k fosforylaci tyrozinové zbytky. Antigen se příčně váže na dva sousední receptory, čímž je spojívá a aktivuje motiv ITAM k reakci s tyrozinproteinkinázami (Lyn, Blk nebo Fyn) (viz blíže vysvětlení na obr. 375a). ITAM fosforylovaný na tyrozinu, je rozeznáván tyrozinproteinkinázou, která se tímto aktivuje a předává signál na další signální molekulu. *Fosforylace zbytků tyrozinu v motivu ITAM představuje tedy první krok v kaskádě přenosu signálu vzbuzeného vazbou antigenu k BCR-receptoru.*

Proteinkinázy spojené s receptorem se aktivují fosforylací na tzv. **aktivačním místě**, ale inhibují se fosforylací na tzv. **inhibičním místě**. K jejich aktivaci je proto nutná defosforylace na inhibičním místě a fosforylace na místě aktivačním. *Defosforylace inhibičního místa je zprostředkována membránovým proteinem, který se označuje jako CD45-protein. Tento protein má na svém cytoplazmatickém konci tyrozin-specifickou fosfatázu, pomocí níž odstraňuje inhibiční fosfáty z proteinkináz vázaných na receptor (obr. 375b).*

Na fosforylaci Src-proteinkináz navazují pak signální dráhy, jejichž konečným signálem jsou aktivovány transkripční faktory a těmi jsou pak aktivo-





Obr. 375b  
Pokračování obr. 375a

vány geny kódující proteiny potřebné k dělení a proliferaci B-lymfocyty a také geny, které kódují imunoglobuliny produkované v rozpustné formě do extracelulárního prostředí.

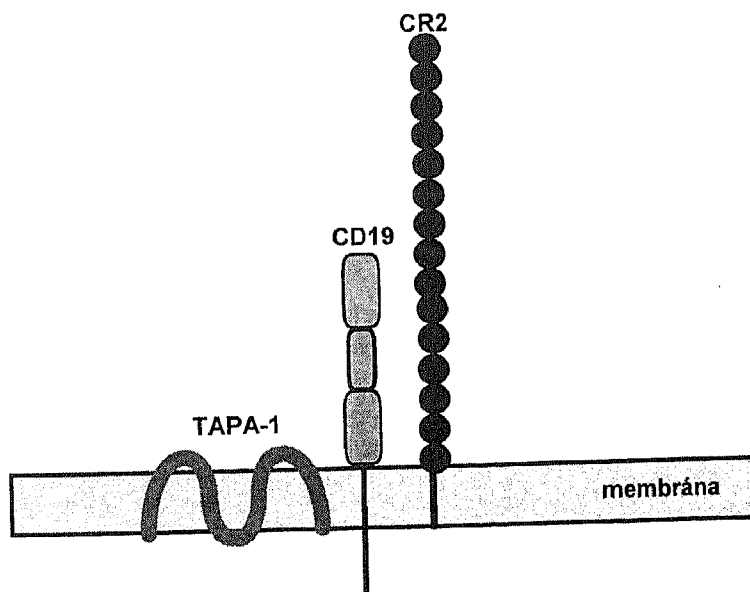
**ZESÍLENÍ AKTIVACE B-BUNĚK KORECEPTOREM. B-lymfocytový koreceptor zesiluje aktivační děje (signální dráhy) vzbuzené receptory spojenými příčně antigenem. Co se týče struktury, je to komplex těchto tří proteinů (obr. 376):**

- ◆ **C19 -proteinu**, jehož extracelulární část je imunoglobulinová,
- ◆ **CR2-proteinu**, který působí jako receptor,
- ◆ **TAPA1-proteinu** neboli **CD81**, jehož funkce není známa.

Jak je zřejmé z obr. 377, CR2-protein se naváže na antigen, který byl zachycen BCR-receptorem tvořeným povrchovým IgM. Tím se umožní, že se jednak koreceptor příčně spojí s BCR-receptorem a jednak se navodí interakce CD19 s herodimerem  $Ig\alpha/Ig\beta$ .

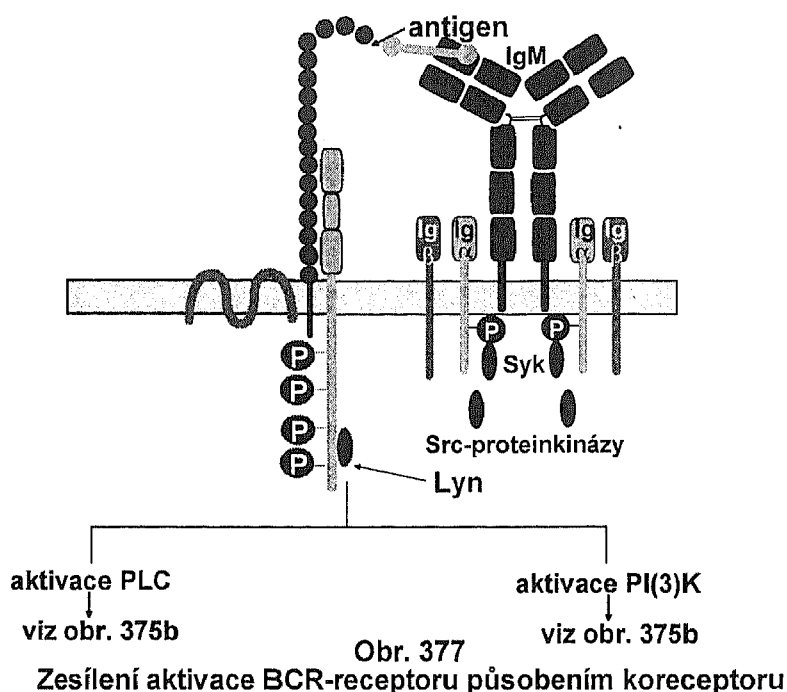
Cesta přenosu signálu se pak realizuje takto:

1. CD19-protein obsahuje v dlouhém cytoplazmatickém zakončení 6 tyrozinových zbytků, které se po vazbě antigenu na CR2 fosforylují.



Obr. 376

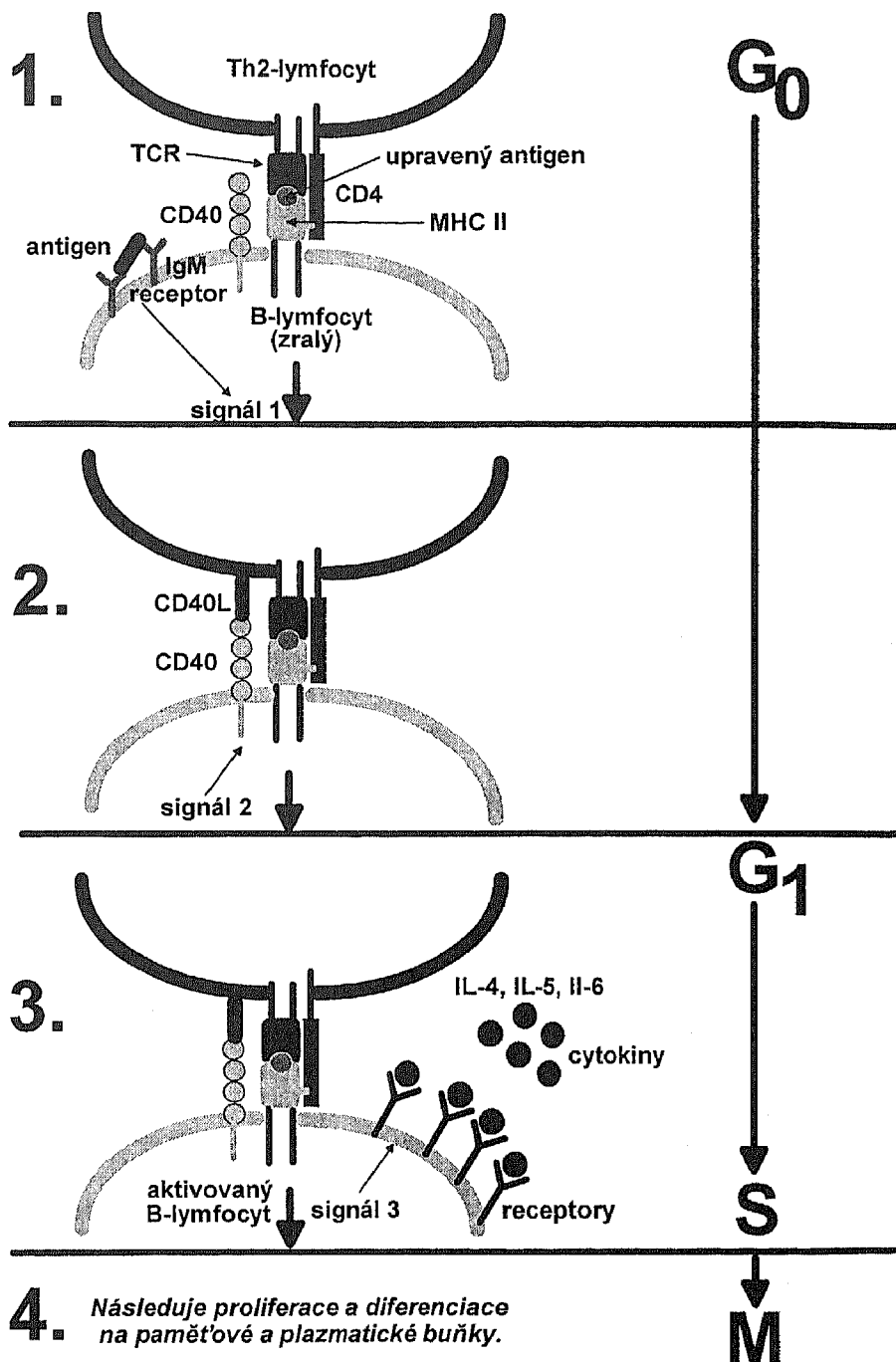
Schéma struktury BCR-koreceptoru



2. K fosforylovanému CR2 se váže Lyn-proteinkináza, která se touto vazbou aktivuje.
3. Aktivní Lyn-proteinkináza pak spouští signální dráhy uvedené na obr. 375b.

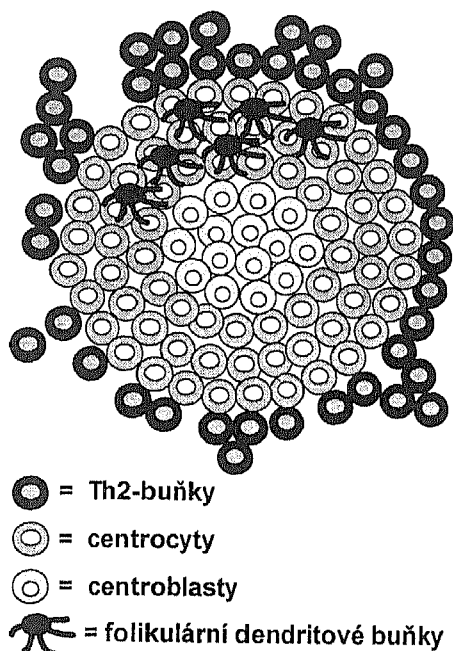
**AKTIVACE ZRALÝCH B-LYMFOCYTŮ ZÁVISLÁ NA TH2-LYMFOCYTECH.** Jde o aktivaci antigenem závislým na brzlíku (str. 564). Lze ji rozdělit do těchto fází znázorněných na obr. 378:

1. Zralé B-lymfocyty mají receptory z imunoglobulinu IgM a IgD (obr. 351). Na receptory IgM se přičně naváže antigen, jak bylo uvedeno na obr. 375a. *Touto vazbou se indukuje signál 1 k úpravě antigenu do peptidu* (obr. 323), ke sdružení upraveného antigenu s MHC II-molekulami a k syntéze receptoru CD40. Upravený antigen ve sdružení s molekulami MHC II je zanořen do membrány B-lymfocytu a rozeznán Th2-lymfocytém.
2. Vazbou antigenu na TCR-receptor se aktivuje Th2-lymfocyt k syntéze ligandu CD40L. *Interakcí CD40L s CD40-receptorem vzniká signál 2, tj. signál k následujícímu ději.*
3. B-lymfocyt syntetizuje receptory pro různé cytokiny. *Vazbou cytokinů produkovaných Th2-lymfocytém na jejich receptory v povrchu B-lymfocytů*



Obr. 378

Průběh aktivace panenského B-lymfocytu navozené Th2-lymfocyttem



Obr. 379  
Schéma germinálního centra

vzniká signál 3 k proliferaci B-lymfocytů a k jejich diferenciaci na plazmatické a paměťové buňky.

**CENTROCYTY.** Místa v lymfatických uzlinách, která jsou hojně obsazena centroblasty (str. 539) se označují jako **germinální centra** (obr. 379). Centroblasty se v nich vyznačují intenzivní proliferací a rychlým dělením, ale postupným zráním se přestávají dělit a přeměňují se v nedělící se buňky označované jako **centrocyty**. Centroblasty prodělávají hypermutace (str. 529) a centrocyty vznikající z hypermutovaných centroblastů se vyznačují schopností syntézy receptorů se zvýšenou aktivitou pro daný antigen.

Centrocyty přicházejí v primárních folikulech do kontaktu s hustou sítí **folikulárních dendritových buněk**. Původ těchto buněk není jasný. Je

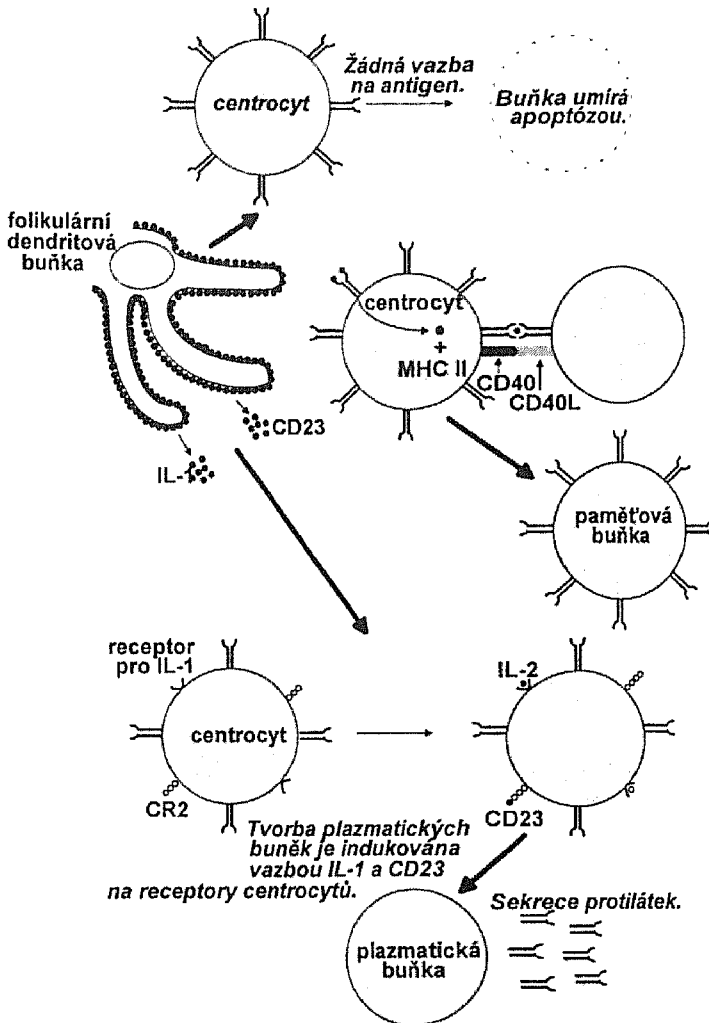
však jisté, že nejsou příbuzné s dendritovými buňkami, kterými jsou aktivovány prekurzorové T-lymfocyty. Podobají se jim morfologicky především v tom, že se vyznačují větvením buňky (obr. 322). Jejich specifické vlastnosti však jsou:

1. Zachovat po dlouhou dobu antigeny v celistvém stavu na svém povrchu.

2. Syntetizovat povrchovou molekulu **CD23**, která je ligandem pro **CR2**, což je složka koreceptoru uvedeného na obr. 376.

Nedělící se centrocyty reagují jen s folikulárními dendritovými buňkami, které vystavují na svém povrchu antigen současně s CD23. Centrocyty, jejichž receptory již nemohou vázat antigen, umírají apoptózou. Centrocyty s receptory, které vážou antigen, jsou indukovány k expresi genu *bcl-1* a přežívají. *Tento gen kóduje protein zabraňující apoptóze*. Proto, čím vyšší afinitou receptoru se centrocyty k antigenu vyznačují, tím lépe obstojí centrocyt v soutěži s ostatními centrocyty, a co se týče vazby na antigen, bude mít lepší šanci na přežití. Vazba komplexu koreceptoru **CR2.CD19** k povrchové molekule **CD23** folikulárních dendritových buněk zesiluje signál z komplexu antigen/receptor.

**TVORBA PLAZMTICKÝCH BUNĚK.** Předpokládá se, že tvorba plaz-



Obr. 380

Schéma hypotézy vysvětlující diferenciaci centrocytů na paměťové a plazmatické buňky

matických buněk je indukována IL-1 a CD23, které jsou produkovány folikulárními dendritovými buňkami. CD23 se nachází v membráně a je uvolňován v rozpustné formě, ve které působí na sousední centrocyty. Je ligandem pro CR2 na B-lymfocyty. Interakce proteinu CD23 v membránové nebo rozpustné formě s CR2 na B-lymfocyty za spolupůsobení IL-1 indukuje centrocyt k diferenciaci na plazmatickou buňku (obr. 380).

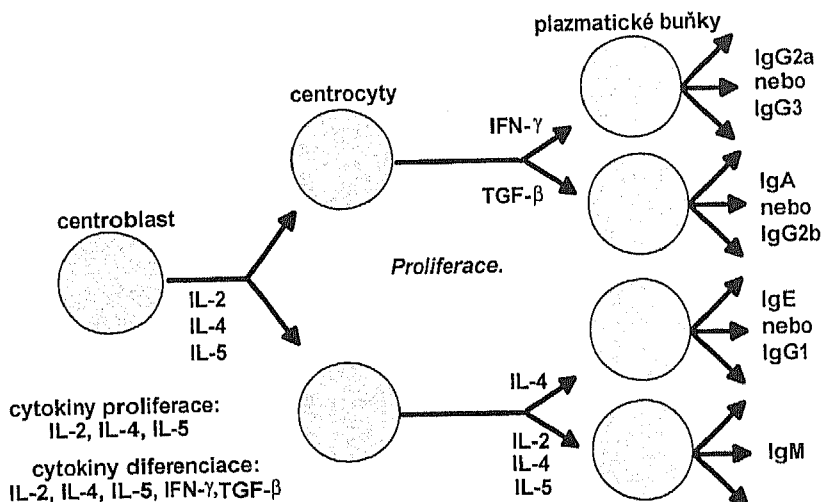
Plazmatické buňky nemají povrchový imunoglobulin. Na druhé straně však imunoglobulin syntetizují a sekretují. Diferenciace zralých B-lymfocytů na

plazmatické buňky musí proto zahrnovat změnu v transkripci (obr. 352). Kromě toho rychlost transkripce genů kódujících těžké a lehké řetězce je vyšší v plazmatických buňkách než ve zralých B-lymfocytech.

**TVORBA PAMĚŤOVÝCH BUNĚK.** Paměťové buňky se z centrocytů tvoří také. Předpokládá se, že centrocyt váže a upravuje antigen uvolněný z folikulárních dendritových buněk (obr. 381). Upravený antigen je pak nabízen ve sdružení s MHC II-molekulami Th-lymfocytům, které jsou takto aktivovány a stimulovány k syntéze CD40L, který se váže na CD40 centrocytu. *Touto interakcí vzniká signál nutný k tvorbě paměťových buněk.* Na rozdíl od panenských B-buněk, které syntetizují pouze IgM a IgD, paměťové B-buňky syntetizují IgG, IgA a IgE. Kromě toho množství IgD je v paměťových buňkách značně sníženo. Některé paměťové buňky syntetizují jen jeden izotyp, zatímco jiné syntetizují dva (IgM + IgG), (IgM + IgA) nebo (IgM + IgE). Příčina toho není známa.

**VÝZNAM CYTOKINŮ PŘI AKTIVACI A DIFERENCIACI B-LYMFOCYTŮ.** Cytokiny produkované Th-lymfocyty ovlivňují u B-lymfocytů jednak proliferaci a jednak přesmyk tříd během diference na plazmatické buňky. Na základě těchto funkcí se rozlišují (obr. 381):

- ◆ **cytokiny proliferace**, které stimulují proliferaci (dělení) centroblastů;
- ◆ **cytokiny diference**, které stimulují diference centrocytů na plazmatické buňky.



Obr. 381  
Vliv cytokinů na proliferaci a diference centrocytů

# 7

## TERMINOLOGICKÝ REJSTŘÍK K DRUHÉMU DÍLU

### 7.1

#### 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 v závorce jeho ekvivalenty v anglickém jazyce, které jsou vysázeny obyčejným písmem. Před každým termínem (heslem) je uvedeno jeho pořadové číslo, čehož důvod je vysvětlen na str. 591.

V rejstříku jsou termíny seřazeny abecedně podle substantiv (v jednotném čísle, pokud nebylo nutné použít čísla množného). Za každým heslem (termínem) je odkaz jen na stránky (čísla na konci hesla), kde jsou hledané termíny definovány nebo podrobněji vyloženy. Na těchto stránkách jsou polotučně vysázeny. Je-li substantivum specifikováno přívlastkem, pak přívlastek neshodný následuje vždy za substantivem, a teprve po něm přívlastek shodný. Příklad: V literatuře jste našli termín "nepřímá represe transkripce". V rejstříku pod "represe transkripce nepřímá" najdete odkaz na stránku v textu (str. 435), kde se pojem tímto termínem označený vysvětluje.

Snadno též zjistíte, se kterým termínem je termín, který jste četli v nějakém článku, synonymní. Např. zjistíte, co znamená termín "izotyp". V rejstříku zjistíte, že tento termín je synonymní s termínem "třída imunoglobulinová". Pod tímto heslem pak naleznete odkaz na str. 504, kde jsou oba termíny definovány a uvedeny jako synonymní.

V odborné literatuře se budete často setkávat se zkratkami termínů. Je zvykem používat anglické zkratky i u českých ekvivalentů anglických termínů. Budete proto chtít vědět, co příslušná zkratka znamená. Např., co znamená zkratka "RFC"? V rejstříku najdete, že RFC je zkratkou anglického "replication factor C", což odpovídá českému vyjádření "faktor C replikační". Pod tímto heslem najdete odkaz na str. 341, kde je definován "replikační faktor C" a současně uvedeno, že tento termín je synonymní s termínem "RFC-protein". Ke stejnému výsledku byste dospěli, kdybyste začali hledat v rejstříku od termínu "protein RFC". V této souvislosti upozorňujeme, že v textu učebnice označujeme protein, faktor, molekulu atd. tak, že nejdříve píšeme označení (symbol) s pomlčkou, a pak teprve substantivum, např. RFC-protein, PCNA-protein atd. V rejstříku z důvodů abecedního řazení a přehlednosti píšeme nejdříve substantivum a pak označení (symbol), tedy protein RFC, protein PCNA atd.

Nakonec 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 v češtině působil nepřirozeně.

#### A

1. ACTH (zkr. adrenocorticotropic hormone) = hormon adrenokortikotropní 454
2. adenosindeamináza (adenosine deaminase) 402
3. adenosin-3',5'-monofosfát cyklický (cyclic adenosine 3',5'-monophosphate) 452

4. adenylátcykláza EC 4.6.1.1 (adenylate cyclase) 452
5. adiuretin (adiuretin) = vazopresin 454
6. adrenalin (adrenaline) 454
7. AKAP (zkr. A-kinase anchor protein) = protein A proteinkinázový zakotvující 488
8. aktivace B-lymfocytů (B lymphocyte activation) 490, 563



9. **aktivace faktorů transkripčních** (activation of transcription factors) 428
10. **aktivace makrofágů** (macrophage activation) 562
11. **aktivace T-buněk panenských** (T naive cell activation) 552
12. **aktivátor iniciace transkripcce eukaryotické** (activator of eucaryotic initiation of transcription) 430
13. **aktivita transkripce** (transcriptional activity) 351
14. **aldosteron** (aldosterone) 455
15. **alergen** (allergen) 506
16. **amplifikace signálu** (signal amplification) = zesílení signálu 446
17. **angiotenzin** (angiotensin) 455
18. **Animalia** = Živočichové 310
19. **antigen** (antigen) 337, 489
20. **antigen buněčný jaderný proliferace** (proliferating cell nuclear antigen) 337, 341
21. **antigen na brzlíku nezávislý** (thymus independent antigen) 564
22. **antigen na brzlíku závislý** (thymus dependent antigen) 564
23. **antigen neúplný** (incomplete antigen) 489
24. **antigen TD** (zkr. thymus dependent antigen) = antigen na brzlíku závislý 564
25. **antigen TI** (zkr. thymus independent antigen) = antigen na brzlíku nezávislý 564
26. **antigen TI-1** (TI-1-antigen) 564
27. **antigen TI-2** (TI-2-antigen) 564
28. **antigen úplný** (complete antigen) 489
29. **apoptóza** (apoptosis) 485, 558
30. **autofosforylace** (autophosphorylation) 463
- B**
31. **BCR** (zkr. B cell receptor) = receptor B lymfocytový 494, 531
32. **bod apoptózy kontrolní** (check point in the apoptosis) 488
33. **bod 1 apoptózy kontrolní** (check point 1 in the apoptosis) 488
34. **bod 2 apoptózy kontrolní** (check point 2 in the apoptosis) 488
35. **bod cyklu buněčného kontrolní** (check point in the division cell cycle) 481
36. **box CAAT** (CAAT box) 354
37. **box GC** (GC box) 354
38. **box Hognessův** (Hogness' box) 353
39. **box TATA** (TATA box) = box Hognessův 353
40. **buňka antigen nabízející** (antigen presenting cell) 495
41. **buňka B** (B cell) = lymfocyt B 493, 552
42. **buňka B paměťová** (memory B cell) 498, 540
43. **buňka B panenská** (naive B cell) 539
44. **buňka CD4 panenská** (naive CD4 cell) 551, 552
45. **buňka CD8 panenská** (naive CD8 cell) 551, 552
46. **buňka dendritová** (dendritic cell) 497, 552
47. **buňka dendritová cirkulující** (circulating dendritic cell) 498
48. **buňka dendritová folikulární** (follicular dendritic cell) 570
49. **buňka dendritová intersticiální** (interstitial dendritic cell) 497
50. **buňka hematopoetická kmenová** (hematopoietic stem cell) 499, 536
51. **buňka hematopoetická kmenová pluripotentní** (pluripotent hematopoietic stem cell) 536
52. **buňka Langerhansova** (Langerhans cell) 497
53. **buňka lymfoidní kmenová** (lymphoid stem cell) 536
54. **buňka myeloidní kmenová** (myeloid stem cell) 536
55. **buňka plazmatická** (plasma cell) 498, 539
56. **buňka T** (T cell) = lymfocyt T 494
57. **buňka T panenská** (naive T cell) 551
58. **buňka T paměťová** (memory T cell) 498
59. **buňka Tc** (Tc cell) = lymfocyt Tc cytotoxický 494
60. **buňka Th** (Th cell) = lymfocyt Th pomocný 494
61. **buňka Th0** (Th0 cell) = lymfocyt Th0, 557
62. **buňka Th1** (Th1 cell) = lymfocyt Th1, 494, 557
63. **buňka Th2** (Th2 cell) = lymfocyt Th2, 494, 557
64. **buňka výkonná** (effector cell) 499
65. **buňky dendritové proplétající se** (interdigitating dendritic cells) 498
- C**
66. **cAMP** (zkr. cyclic adenosine 3',5'-monophosphate) = adenosin-3',5'-monofosfát cyklický 452
67. **CBP** (zkr. cap binding protein) = protein na čepičku se vážící 415
68. **CC** (zkr. commitment complex) = komplex vstupní 380
69. **CDK** (zkr. cyclin-dependent protein kinase) = proteinkináza cyklin dependentní 478
70. **CDR** (zkr. complementarity determining region) = oblast imunoglobulinu komplementarity určující 503
71. **CD81** (CD81 protein) = protein TAPAI, 567
72. **cen** (zkr. centromere) = centromera 325
73. **centroblast** (centroblast) 539
74. **centrocyt** (centrocyte) 570
75. **centromera** (centromere) 325
76. **centrum germinální** (germinal centre) 570
77. **centrum intronu katalytické** (intron catalytic centre, intron active site) 407
78. **cesta přenosu signálu** (signal pathway, signal transduction, signalling) = dráha přenosu signálu 445
79. **cesta přenosu signálu** (signal pathway, signal transduction, signalling) = signalizace intracelulární 445
80. **CREB** (zkr. cyclic AMP response element binding protein) = faktor transkripční na responzivní element pro cAMP se vážící 434
81. **ctDNA** (zkr. chloroplast DNA) = DNA chloroplastová 331, 332
82. **CTF** (zkr. CAAT-box-binding transcription factor) = faktor transkripční na CAAT-box se vážící 353, 354
83. **cyklin** (cyclin) 479
84. **cytidindeamináza** (cytidine deaminase) 402
85. **cytokin** (cytokine) 566
86. **cytokin IFN- $\gamma$**  (IFN- $\gamma$  cytokine) 562

## Č

87. část J (J piece) = polypeptid spojovací 510  
 88. část promotoru RNA-polymerázy I regulační (upstream promoter control element of RNA polymerase I) 363  
 89. část promotoru RNA-polymerázy I základní (upstream promoter core element of RNA polymerase I) 363  
 90. částice rozpoznávací signální (signal recognition particle) 414  
 91. částice snRNP (snRNP particle) 373, 363  
 92. částice SRP (signal recognition particle) = částice rozpoznávací signální 414  
 93. čepička (cap) 373

## D

94. DAG (zkr. diacylglycerol) = diacylglycerol 452, 472  
 95. deoxyribonukleotidyltransferáza (deoxyribonucleotidyl transferase)  
 96. deoxyribonukleotidyltransferáza terminální EC 2.7.7.31 (terminal deoxyribonucleotidyl transferase) 524  
 97. determinanta antigenní (antigenic determinant) 493  
 98. diacylglycerol (diacylglycerol) 452, 472  
 99. DNA chloroplastová (chloroplast DNA) = kyselina deoxyribonukleová chloroplastová 311, 331, 332  
 100. DNA chromozomová eukaryotická (eucaryotic chromosomal DNA) = DNA jaderná 311  
 101. DNA hemimetylovaná (hemimethylated DNA) 441  
 102. DNA jaderná (nuclear DNA) = kyselina deoxyribonukleová jaderná eukaryotická 311, 322  
 103. DNA-metyláza (DNA methylase) 441  
 104. DNA mitochondriová (mitochondrial DNA) = kyselina deoxyribonukleová mitochondriová 311, 328  
 105. DNA-polymeráza  $\alpha$  (DNA polymerase  $\alpha$ ) 336, 341  
 106. DNA-polymeráza  $\beta$  (DNA polymerase  $\beta$ ) 337  
 107. DNA-polymeráza  $\gamma$  (DNA polymerase  $\gamma$ ) 337  
 108. DNA-polymeráza  $\delta$  (DNA polymerase  $\delta$ ) 337, 341  
 109. DNA-polymeráza  $\epsilon$  (DNA polymerase  $\epsilon$ ) 337  
 110. DNA-polymeráza eukaryotická (eucaryotic DNA polymerase) 336  
 111. doména aktivační (activation domain) 467  
 112. doména  $C_L$  ( $C_L$  domain) = doména  $C_L$  řetězce imunoglobulinového 506  
 113. doména  $C_L$  řetězce imunoglobulinového ( $C_L$  immunoglobulin domain) 506  
 114. doména faktoru transkripčního glutaminem bohatá (glutamine-rich domain in the transcription factor) 429, 430  
 115. doména faktoru transkripčního kyselá (acidic domain in the transcription factor) 429, 430  
 116. doména faktoru transkripčního prolinem bohatá (proline-rich domain in the transcription factor) 429, 430  
 117. doména chromatinová (chromatin domain, chromatin loop) 318  
 118. doména kinázová (kinase domain) 449

119. doména pro dimerizaci receptoru (receptor dimerization domain) 467  
 120. doména pro DNA vazebná (DNA binding domain) 467  
 121. doména pro vazbu hormonu (hormone binding domain) 467  
 122. doména receptoru RTK cytoplazmatická (cytoplasmic RTK receptor domain) = doména receptoru intracelulární 462  
 123. doména receptoru RTK extracelulární (extracellular RTK receptor domain) 462  
 124. doména receptoru RTK intracelulární (intracellular RTK receptor domain) 462  
 125. doména receptoru RTK transmembránová (transmembrane RTK receptor domain) 462  
 126. doména řetězce imunoglobulinového (immunoglobulin domain) 506  
 127. doména SH1 (SH1 domain) 449  
 128. doména SH2 (SH2 domain) 449  
 129. doména SH3 (SH3 domain) 449  
 130. doména SH4 (SH4 domain) 450  
 131. doména  $V_L$  ( $V_L$  domain) = doména  $V_L$  řetězce imunoglobulinového 506  
 132. doména  $V_L$  řetězce imunoglobulinového ( $V_L$  immunoglobulin domain) 506  
 133. doručení signálu (signal delivery) 478  
 134. dráha Jak-STAT (Jak-STAT pathway) = signalizace přes STAT proteiny 475  
 135. dráha přenosu signálu (signal pathway, signal transduction, signalling) = signalizace intracelulární 445  
 136. DUE (zkr. DNA unwinding element) = element pro odvíjení DNA 337

## E

137. editace RNA (RNA editing) 394  
 138. editace RNA deleční (deletional RNA editing) 396  
 139. editace RNA inzerční (insertional RNA editing) 396  
 140. editace RNA substituční (substitutional RNA editing) 396  
 141. EGF (zkr. epidermal growth factor) = faktor růstový epidermální 456  
 142. element aux 1 pomocný (auxiliary element 1) 338  
 143. element aux 2 pomocný (auxiliary element 2) 338  
 144. element DUE (DUE element) = element pro odvíjení DNA 337  
 145. element glukokortikoidní responzivní (glucocorticoid responsive element) 467  
 146. element GRE (GRE element) = element glukokortikoidní responzivní 467  
 147. element HRE (HRE element) = element responzivní hormonový 470  
 148. element Inr (Inr element) = iniciátor 355  
 149. element ORE (ORE element) = element počátek replikace rozpoznávající 337  
 150. element počátek replikace rozpoznávající (origin recognition element) 337  
 151. element pro odvíjení DNA (DNA unwinding element) 337

152. **element promotoru protisměrný** (upstream promoter element) 352
153. **element RE** (RE element) = element rezpozivní 426
154. **element rezpozivní** (responsive element) 426
155. **element rezpozivní hormonový** (hormone responsive element) 470
156. **elongace polypeptidového řetězce eukaryotická** (eucaryotic polypeptide chain elongation) 417
157. **enzym interleukin 1 $\beta$  přeměňující** (interleukin 1 $\beta$  converting enzyme) 488
158. **epinefrin** (epinephrine) = adrenalin 454
159. **epitop** (epitope) = determinanta antigenní 493
160. **ER drsné** (rough ER) = retikulum endoplazmatické drsné 414
161. **ER hladké** (smooth ER) = retikulum endoplazmatické hladké 414
162. **ERK** (zkr. extracellular signal-regulated protein kinase) = proteinkináza signálem extracelulárním regulovaná 451
163. **erythropoetin** (erythropoietin) 455, 467
164. **estrogen** (estrogen) 455
165. **euchromatin** (euchromatin) 312
166. **exkluze alelická** (allelic exclusion) 531
167. **exkluze izotypická** (isotypic exclusion) 531
168. **exon kombinační** (combinational exon) 386
169. **exonukleáza MF1** (exonuclease MF1) 340, 341
170. **exony spojené** (joint exons) 405
- F**
171. **faktor aktivovaných T- buněk transkripční jaderný** (nuclear transcription factor of activated T cells) 555, 556
172. **faktor C replikační** (replication factor C) 341
173. **faktor EGF** (EGF factor) = faktor růstový epidermální 456
174. **faktor elongační eukaryotický** (eucaryotic elongation factor) 417
175. **faktor GEF** (GEF factor) = faktor nukleotid guaninový vyměňující 461
176. **faktor guaninový nukleotid vyměňující** (guanine nucleotide exchange factor) 461
177. **faktor hepatocytů růstový** (hepatocyte growth factor) 457
178. **faktor chemokinový makrofágový** (macrophage chemokine factor) 563
179. **faktor inhibice migrace makrofágový** (macrophage migration inhibition factor) 563
180. **faktor MCF** (MCF factor) = faktor chemokinový makrofágový 563
181. **faktor MIF** (MIF factor) = faktor inhibice migrace makrofágový 563
182. **faktor na ORE se vázající** (ORE binding factor) 339
183. **faktor nádorový nekrotický  $\alpha$**  (tumour necrosis factor  $\alpha$ ) 456
184. **faktor nádorový nekrotický  $\beta$**  (tumour necrosis factor  $\beta$ ) 456
185. **faktor nádorový nekrotický  $\gamma$**  (tumour necrosis factor  $\gamma$ ) 456
186. **faktor natriuretický** (natriuretic factor) 452
187. **faktor OBF** (OBF factor) = faktor na ORE se vázající 339
188. **faktor pomocný U2AF** (U2AF auxiliary factor) 380
189. **faktor růstový** (growth factor) 444, 456
190. **faktor růstový EGF** (EGF growth factor) = faktor růstový epidermální 456
191. **faktor růstový epidermální** (epidermal growth factor) 456
192. **faktor růstový GM-CSF** (GM-CSF growth factor) = faktor růstový kolonie granulocytů a makrofágů stimulující 457, 563
193. **faktor růstový IGF 1** (growth factor IGF 1) = faktor růstový 1 inzulínu podobný 457
194. **faktor růstový IGF 2** (growth factor IGF 2) = faktor růstový 2 inzulínu podobný 457
195. **faktor růstový 1 inzulínu podobný** (insulin like growth factor 1) 457
196. **faktor růstový 2 inzulínu podobný** (insulin like growth factor 2) 457
197. **faktor růstový kolonie granulocytů a makrofágů stimulující** (granulocyte and macrophage colony stimulating factor) 457, 563
198. **faktor růstový PDGF** (PDGF factor) 456
199. **faktor růstový z trombocytů pocházející** (platelet derived growth factor) 456
200. **faktor s TBP sdružený** (TBP-associated factor) 353
201. **faktor s TBP sdružený** (TATA box-associated protein) = koaktivátor TAF 432
202. **faktor sestřihu** (splicing factor) 443
203. **faktor TAF** (TAF factor) = faktor s TBP sdružený 353
204. **faktor TNF- $\alpha$**  (TNF  $\alpha$  factor) = faktor nádorový nekrotický  $\alpha$  456
205. **faktor TNF- $\beta$**  (TNF  $\beta$  factor) = faktor nádorový nekrotický  $\beta$  456
206. **faktor TNF- $\gamma$**  (TNF  $\gamma$  factor) = faktor nádorový nekrotický  $\gamma$  456
207. **faktor transkripční** (transcription factor) 352
208. **faktor transkripční bazální** (basal transcription factor) 352, 430
209. **faktor transkripční CREB** (CREB transcription factor) = faktor transkripční na rezpozivní element pro cAMP se vázající 434
210. **faktor transkripční CTF** (CTF transcription factor) = faktor transkripční na CAAT-box se vázající 353, 354
211. **faktor transkripční E2F.DP1** (E2F.DP1 transcription factor) 481, 483
212. **faktor transkripční konstitutivní** (constitutive transcription factor) 352
213. **faktor transkripční MyoD** (MyoD transcription factor) 434
214. **faktor transkripční na CAAT-box se vázající** (CAAT-box-binding transcription factor) 353, 354
215. **faktor transkripční 1 na oktamer se vázající** (octamer binding transcription factor 1) 355

216. **faktor transkripční 2 na oktamer se vázající** (octamer binding transcription factor 2) 355, 543
217. **faktor transkripční na responzivní element pro cAMP se vázající** (cyclic AMP response element binding protein) 434
218. **faktor transkripční NF-AT** (NF-AT transcription factor) = faktor aktivovaných T- buněk transkripční jaderný 555, 556
219. **faktor transkripční NF-κB** (NF-κB transcription factor) 434
220. **faktor transkripční obecný** (general transcription factor) 352
221. **faktor transkripční OCT-1** (OCT- 1 transcription factor) = faktor transkripční 1 na oktamer se vázající 355
222. **faktor transkripční OCT-2** (OCT- 2 transcription factor) = faktor transkripční 2 na oktamer se vázající 355, 543
223. **faktor transkripční proti směru transkripce se vázající** (upstream binding factor) 363
224. **faktor transkripční selektivní** (selectivity transcription factor) 363
225. **faktor transkripční SL1** (SL1 transcription factor) = faktor transkripční selektivní 363
226. **faktor transkripční SPI** (SPI transcription factor) 355
227. **faktor transkripční speciální** (special transcription factor) 352
228. **faktor transkripční TFIID** (TFIID transcription factor) 354, 355
229. **faktor transkripční TFIIF** (TFIIF transcription factor) 355
230. **faktor transkripční UBF** (UBF transcription factor) = faktor transkripční proti směru transkripce se vázající 363
231. **faktory translační eukaryotické** (eucaryotic translation factors) 415, 416, 417, 418, 419
232. **faktory translační eukaryotické elongační** (eucaryotic translation elongation factors) 417
233. **faktory translační eukaryotické iniciační** (eucaryotic translation initiation factors) 415, 416
234. **fibrilarin** (fibrillarlin) 389
235. **fosfatidylinozitol** (phosphatidylinositol) 453
236. **fosfatidylinozitol-3,4-bisfosfát** (phosphatidylinositol -3,4-bisphosphate) 453
237. **fosfatidylinozitol-4,5-bisfosfát** (phosphatidylinositol -4,5-bisphosphate) 452
238. **fosfatidylinozitol-3-fosfát** (phosphatidylinositol -3-phosphate) 453
239. **fosfatidylinozitol-4-fosfát** (phosphatidylinositol -4-phosphate) 453
240. **fosfatidylinozitol-3,4,5-trifosfát** (phosphatidylinositol -3,4,5-trisphosphate) 453
241. **fosfatidylinozitol-3-fosfatáza** (phosphatidylinositol-3-phosphatase EC 3.1.3.64) 452
242. **1-fosfatidylinozitol-4,5-bisfosfátfosfodiesteráza** EC 3.1.4.11 (1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase) 452
243. **1-fosfatidylinozitol-3-kináza** EC 2.7.1.137 (1-phosphatidylinositol-3-kinase) 453
244. **fosfodiesteráza cAMP** EC 3.1.4.17 (cyclic AMP phosphodiesterase) 452
245. **fosfodiesteráza cGMP** EC 3.1.4.17 (cyclic GMP phosphodiesterase) 452
246. **fosfolipáza C (α)** (phospholipase C (α)) 452
247. **fosfolipáza C (β)** (phospholipase C (β)) 452
248. **fosfolipáza C (γ)** (phospholipase C (γ)) 452
249. **fosfolipáza C** EC 3.1.4.11 (1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase) =1-fosfatidylinozitol-4,5-bisfosfátfosfodiesteráza EC 3.1.4.11, 452
250. **fosfolipáza D** EC 3.1.4.4 (phospholipase D) 452
251. **fosfoproteinfosfatáza** EC 3.1.16 (phosphoprotein phosphatase) 437
252. **fragmentin** (fragmentin) 562
253. **Fungi** = Houby 310
- G**
254. **GAP** (zkr. GTPase activating protein) = protein GTPázu aktivující 462
255. **GEF** (zkr. guanine nucleotide exchange factor) = faktor guaninový nukleotid vyměňující 461
256. **gen homeotický** (homeotic gene) 439
257. **gen jaderný** (nuclear gene) 311
258. **gen provozní** (house keeping gene) 352
259. **gen řetězce imunoglobulinový lehký kódující** (gene coding for light immunoglobulin chain) 516
260. **gen řetězce imunoglobulinový těžký kódující** (gene coding for heavy immunoglobulin chain) 516
261. **gen třídy I** (class I. gene) 351
262. **gen třídy II** (class II. gene) 351
263. **gen třídy III** (class III. gene) 351
264. **genofor chloroplastový** (chloroplast genophore) 331
265. **genofor mitochondriový** (mitochondrial genophore) 326
266. **gestagen** (gestagen) 455
267. **glukagon** (glucagon) 454
268. **glukokortikoid** (glucocorticoid) 455
269. **granzym** (granzym) = fragmentin 562
270. **GRB2** (zkr. growth factor receptor- bound protein) = protein na receptor růstového faktoru vázaný 450
271. **GRE** (glucocorticoid responsive element) = element glukokortikoidní responzivní 467
272. **gRNA** (zkr. guide RNA) = kyselina ribonukleová řídící 396
273. **guanozin-3',5'-monofosfát cyklický** (cyclic guanosine -3',5'-monophosphate) 452
274. **guanylátacykláza** EC 4.6.1.2 (guanylate cyclase) 452
275. **guanylátacykláza na plazmatickou membránu vázaná** (membrane-bound guanylate cyclase) 452
276. **guanylátacykláza rozpustná** (soluble guanylate cyclase) 452
- H**
277. **haptén** (haptén) = antigen neúplný 489
278. **heterochromatin** (heterochromatin) 312
279. **heterochromatin fakultativní** (facultative heterochromatin) 312

280. **heterochromatin konstitutivní** (constitutive heterochromatin) 312
281. **HGF** (zkr. hepatocyte growth factor) = faktor hepatocytů růstový 457
282. **histamin** (histamine) 455
283. **histon** (histone) 311, 313
284. **HLA** (zkr. human leucocyte-associated antigen) = komplex HLA 492
285. **Hlenky** (Myxomycota) 310
286. **hnRNA** (zkr. heterogenous nuclear ribonucleic acid) = kyselina ribonukleová jaderná heterogenní 349
287. **homeobox** (homeobox) 440
288. **hormon** (hormone) 444, 454
289. **hormon adrenokortikotropní** (adrenocorticotropic hormone) 454
290. **hormon folikulizační** (follicle-stimulating hormone) 455
291. **hormon gastrointestinální** (gastrointestinal hormone) 455
292. **hormon intersticiální buňky stimulační** (interstitial cell-stimulating hormone) = hormon luteinizační 455
293. **hormon luteinizační** (luteinizing hormone) 455
294. **hormon luteotropní** (luteotropic hormone) 455
295. **hormon somatotropní** (somatotropic hormone) 455
296. **hormon steroidní** (steroid hormone) 455
297. **hormon tyreotropní** (thyrotropic hormone) 454
298. **Houby** (Fungi) 310
299. **HRE** (zkr. hormone responsive element) = element responzivní hormonový 470
300. **hypermutace somatická** (somatic hypermutation) 529
- CH**
301. **chloroplast** (chloroplast) 310
302. **chromatin** (chromatin) 311
303. **chromatin dekonzenzovaný** (decondensed chromatin) 311
304. **chromatin interfázní** (interphasic chromatin) = chromatin v interfázi 312
305. **chromatin kondenzovaný** (condensed chromatin) 311
306. **chromatin transkripčně aktivní** (transcriptionally active chromatin) 312
307. **chromatin transkripčně neaktivní** (transcriptionally inactive chromatin) 312
308. **chromatin v interfázi** (mitotic chromatin) = chromatin ve fázi mitotické 312
309. **chromatin ve fázi mitotické** (mitotic chromatin) 312
310. **chromozom metafázní** (metaphasic chromosome) 312
311. **chromozom mitotický** (mitotic chromosome) 312, 318
- I**
312. **ICE** (zkr. interleukin 1 $\beta$  converting enzyme) = enzym interleukin 1 $\beta$  přeměňující 488
313. **IFN $\gamma$**  (zkr.  $\gamma$  interferon) = interferon  $\gamma$  562
314. **Ig** (zkr. immunoglobulin) = imunoglobulin 502
315. **IGF1** (zkr. insulin like growth factor 1) = faktor růstový 1 inzulinu podobný 457
316. **IGF2** (zkr. insulin like growth factor 2) = faktor růstový 2 inzulinu podobný 457
317. **IGS** (zkr. internal guiding sequence) = sekvence vedoucí vnitřní 407
318. **IL** (zkr. interleukin) = interleukin 456
319. **imunita adaptivní** (adaptive immunity) = imunita získaná 489
320. **imunita buněčná** (cell mediated immunity) 489
321. **imunita humorální** (humoral immunity) 489
322. **imunita specifická** (specific immunity) = imunita získaná 489
323. **imunita získaná** (acquired immunity) 489
324. **imunogen** (immunogen) 489
325. **imunoglobulin** (immunoglobulin) 502
326. **imunoglobulin IgA** (immunoglobulin IgA) = třída imunoglobulinová IgA 506
327. **imunoglobulin IgD** (immunoglobulin IgD) = třída imunoglobulinová IgD 506
328. **imunoglobulin IgE** (immunoglobulin IgE) = třída imunoglobulinová IgE 506
329. **imunoglobulin IgG** (immunoglobulin IgG) = třída imunoglobulinová IgG 504
330. **imunoglobulin IgM** (immunoglobulin IgM) = třída imunoglobulinová IgM 506
331. **imunoglobulin povrchový** (surface immunoglobulin) 531
332. **imunoglobulin sekretovaný** (secreted immunoglobulin) 532
333. **imunoglobulin transmembránový** (transmembrane immunoglobulin) = imunoglobulin povrchový 531
334. **inhibitor CDK** (CDK inhibitor) = inhibitor protein-kinázy cyklin dependentní 480
335. **inhibitor proteinkinázy cyklin dependentní** (cyclin dependent protein kinase inhibitor) 480
336. **iniciace translace eukaryotické** (initiation of eucaryotic translation) 415
337. **iniciátor** (initiator) 355
338. **inozitol-1,4,5-trifosfát** (inositol-1,4,5-trisphosphate) 452, 472
339. **Ins (1,4,5) P<sub>3</sub>** (zkr. inositol-1,4,5-trisphosphate) = inozitol-1,4,5-trifosfát 452, 472
340. **interferon  $\gamma$**  ( $\gamma$  interferon) 562
341. **interleukin** (interleukin) 456
342. **interleukin 1 $\beta$  konvertáza** (interleukin 1 $\beta$  convertase) = enzym interleukin 1 $\beta$  přeměňující 488
343. **interleukin 1 $\beta$ -proteáza** (interleukin 1 $\beta$  protease) = enzym interleukin 1 $\beta$  přeměňující 488
344. **interleukin IL-2** (interleukin 2) 562
345. **interleukin IL-3** (interleukin 3) 563
346. **intron L-19 IVS** (L-19 IVS intron) 405
347. **intron skupiny druhé** (group II intron) 403, 405, 411
348. **intron skupiny první** (group I intron) 402, 405, 410
349. **inzulin** (insulin) 454
350. **IRS-1** (zkr. insulin receptor substrate 1) = substrát 1 receptoru inzulinového 474

351. **ITAM** (zkr. immunoreceptor tyrosine-based activation motif) = motiv imunoreceptoru tyrozinový aktivizační 466, 564  
 352. **izotyp** (isotype) = třída imunoglobulinová 504

## J

353. **jádro nukleozomu** (nucleosome core) 315  
 354. **jednotka transkripční RNA-polymerázou I řízená** (transcription unit directed by RNA polymerase I promoter) 363  
 355. **jednotka transkripční RNA-polymerázou II řízená** (transcription unit directed by RNA polymerase II promoter) 355  
 356. **jednotka transkripční RNA-polymerázou III řízená** (transcription unit directed by RNA polymerase III promoter) 366

## K

357. **kalcitriol** (calcitriol) 456  
 358. **kalmodulin** (calmodulin) 449  
 359. **kalpain EC 3.4.22.17** (calpain) 487  
 360. **kaskáda proteinkináz MAP** (MAP kinase cascade) 474, 475  
 361. **katecholamin** (catecholamine) 454  
 362. **kinin** (kinin) 455  
 363. **koaktivátor** (co-activator) 432  
 364. **koaktivátor CBP** (CBP co-activator) 434  
 365. **koaktivátor p300** (p300 co-activator) 434  
 366. **koaktivátor TAF** (TAF co-activator) = faktor s TBP sdružený 353, 432  
 367. **komplex A** (A complex) 380  
 368. **komplex B1** (B1 complex) = spliceozom B1, 381  
 369. **komplex B2** (B2 complex) = spliceozom B2, 381  
 370. **komplex CC** (CC complex) = komplex vstupní 380  
 371. **komplex C1** (C1 complex) = spliceozom C1, 381  
 372. **komplex C2** (C2 complex) = spliceozom C2, 381  
 373. **komplex  $\gamma$  eukaryotický** (eucaryotic  $\gamma$  complex) = faktor C replikační 341  
 374. **komplex H-2** (H2-complex) 492  
 375. **komplex histokompatibilní hlavní** (major histocompatibility complex) 492  
 376. **komplex HLA** (HLA complex) 492  
 377. **komplex hnRNP** (hnRNP complex) 372  
 378. **komplex MHC** (MHC complex) = komplex histokompatibilní hlavní 492  
 379. **komplex pol alfa/primáza** (pol  $\alpha$ /primase complex) 340  
 380. **komplex rekombinázový** (recombinase complex) 521  
 381. **komplex 43 S** (43 S complex) 415, 416  
 382. **komplex TCR-CD3** (TCR.CD3 complex) 546  
 383. **komplex ternární eukaryotický** (eucaryotic ternary complex) 415, 416  
 384. **komplex transkripční iniciační otevřený eukaryotický** (open eucaryotic initiation transcriptional complex) 358, 359  
 385. **komplex transkripční iniciační uzavřený eukaryotický** (closed eucaryotic initiation transcriptional complex) 357, 358  
 386. **komplex transkripční přediniciační eukaryotický** (eucaryotic preinitiation transcriptional complex) 357  
 387. **komplex translační iniciační eukaryotický** (eucaryotic initiation translational complex) 417  
 388. **komplex translační přediniciační eukaryotický** (eucaryotic preinitiation translational complex) 415  
 389. **komplex vstupní** (commitment complex) 380  
 390. **konec kódující** (coding end) 523  
 391. **konec signální** (signal end) 523  
 392. **konec telomerický** (telomeric end) 326  
 393. **koreceptor** (co-receptor) 546  
 394. **koreceptor B-lymfocytový** (B lymphocyte co-receptor, B cell co-receptor) 567  
 395. **koreceptor CD4** (CD4 co-receptor) 546  
 396. **koreceptor CD8** (CD8 co-receptor) 546  
 397. **kortizol** (cortisol) 455  
 398. **kotva** (anchor) 396  
 399. **kryptogen** (cryptogene) 394  
 400. **kyselina deoxyribonukleová chloroplastová** (chloroplast deoxyribonucleic acid) 311, 331, 332  
 401. **kyselina deoxyribonukleová chromozomová eukaryotická** (eucaryotic chromosomal deoxyribonucleic acid) 311, 322  
 402. **kyselina deoxyribonukleová jaderná eukaryotická** (eucaryotic nuclear deoxyribonucleic acid) 311, 322  
 403. **kyselina deoxyribonukleová mitochondriová** (mitochondrial deoxyribonucleic acid) 311, 328  
 404. **kyselina retinová** (retinoic acid) 455  
 405. **kyselina ribonukleová editovaná** (edited ribonucleic acid) 394  
 406. **kyselina ribonukleová jaderná heterogenní** (heterogeneous nuclear ribonucleic acid) 349  
 407. **kyselina ribonukleová intronxonová lasovitá** (lariat intronxon ribonucleic acid) 376  
 408. **kyselina ribonukleová intronová lasovitá** (lariat intron ribonucleic acid) 376  
 409. **kyselina ribonukleová malá** (small ribonucleic acid) 349  
 410. **kyselina ribonukleová malá cytoplazmatická** (small cytoplasmic ribonucleic acid) 349  
 411. **kyselina ribonukleová malá jadéřková** (small nuclear ribonucleic acid) 349  
 412. **kyselina ribonukleová malá jaderná** (small nuclear ribonucleic acid) 349  
 413. **kyselina ribonukleová mediátorová prekurzorová** (precursor messenger ribonucleic acid) 349  
 414. **kyselina ribonukleová ribozomová prekurzorová eukaryotická** (eucaryotic precursor ribosomal ribonucleic acid) 349  
 415. **kyselina ribonukleová řídicí** (guide ribonucleic acid) 396  
 416. **kyselina ribonukleová transferová prekurzorová eukaryotická** (eucaryotic precursor transfer ribonucleic acid) 349  
 417. **kyselina ribonukleová větvená** (branched ribonucleic acid) 383

## L

418. lešení proteinové (protein scaffold) 317  
 419. L-19 IVS (L-19 IVS) 405  
 420. ligand (ligand) 444  
 421. lipotropin (lipotropin) 455  
 422. lymfoblast (lymphoblast) 539  
 423. lymfocyt B (lymphocyte B) 493, 495, 552  
 424. lymfocyt B nezralý (immature B lymphocyte) 537  
 425. lymfocyt B progenitorový raný (early progenitor B lymphocyte) 536  
 426. lymfocyt B zralý (mature B lymphocyte) 537  
 427. lymfocyt CD4 (CD4 lymphocyte) = lymfocyt Th 494  
 428. lymfocyt CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>dvojnásobně negativní (CD4<sup>+</sup>-CD8<sup>+</sup>double-negative lymphocyte) 551  
 429. lymfocyt CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>dvojnásobně pozitivní (CD4<sup>+</sup>-CD8<sup>+</sup>double-positive lymphocyte) 551  
 430. lymfocyt CD8 (CD8 lymphocyte) = lymfocyt T cytotoxický 494  
 431. lymfocyt CD8 (CD8 lymphocyte) = lymfocyt Tc 494  
 432. lymfocyt CD8<sup>+</sup> (CD8<sup>+</sup>lymphocyte) 551  
 433. lymfocyt CD4<sup>+</sup> jednoduše pozitivní (CD4<sup>+</sup>single positive lymphocyte) 551  
 434. lymfocyt CD8<sup>+</sup> jednoduše pozitivní (CD8<sup>+</sup>single positive lymphocyte) 551  
 435. lymfocyt preB malý (small preB lymphocyte) 537  
 436. lymfocyt preB velký (large preB lymphocyte) 537  
 437. lymfocyt preT (preT lymphocyte) 551  
 438. lymfocyt proB pozdní (late proB lymphocyte) 537  
 439. lymfocyt proB raný (early proB lymphocyte) 537  
 440. lymfocyt proT (proT lymphocyte) = lymfocyt T progenitorový 536  
 441. lymfocyt T (T lymphocyte) 494  
 442. lymfocyt T cytotoxický (cytotoxic T lymphocyte) 494  
 443. lymfocyt T pomocný (helper T lymphocyte) 494  
 444. lymfocyt T progenitorový (progenitor T lymphocyte) 536  
 445. lymfocyt Tc (Tc lymphocyte) = lymfocyt T cytotoxický 494  
 446. lymfocyt Tc výkonný (effector Tc lymphocyte) 498  
 447. lymfocyt Th (Th lymphocyte) = lymfocyt T pomocný 494  
 448. lymfocyt Th výkonný (effector Th lymphocyte) 498  
 449. lymfocyt Th0 (Th0 lymphocyte) 557  
 450. lymfocyt Th1 (Th1 lymphocyte) 494, 557  
 451. lymfocyt Th2 (Th2 lymphocyte) 494, 557

## M

452. makrofág (macrophage) 497, 552  
 453. MAPK (zkr. mitogen-activated protein kinase) = proteinkináza MAPK 451  
 454. MAPKK (zkr. mitogen-activated protein kinase kinase) = proteinkináza MAPKK 451  
 455. MAPKKK (zkr. mitogen-activated protein kinase kinase kinase) = proteinkináza MAPKKK 451  
 456. maturáza (maturase) 394  
 457. MCF (zkr. macrophage chemokine factor) = faktor chemokinový makrofágový 563

458. metylace (methylation) 440  
 459. mezerník dvouzávitový (two turn spacer) 520  
 460. mezerník jednozávitový (one turn spacer) 520  
 461. MHC (zkr. major histocompatibility complex) = komplex histokompatibilní hlavní 492  
 462. MIF (zkr. macrophage migration inhibition factor) = faktor inhibice migrace makrofágový 563  
 463. mineralokortikoid (mineralocorticoid) 455  
 464. místo editační (editing site) 397  
 465. místo hypersenzitivní (hypersensitive site) 321  
 466. místo hypersenzitivní indukovatelné (inducible hypersensitive site) 322  
 467. místo hypersenzitivní konstitutivní (constitutive hypersensitive site) 322  
 468. místo pro 5'-exon vazebné (5'exon binding site) = sekvence vedoucí vnitřní 407  
 469. místo pro guanozin rozpoznávací (guanosine recognition site) 407  
 470. místo pro primer vazebné (primer binding site) 407  
 471. místo sestřihu 3' (3'-splice site) 376  
 472. místo sestřihu 5' (5'-splice site) 376  
 473. místo vazebné pro 5'-exon (5'exon-binding site) 407  
 474. místo vazebné pro guanozin (guanosine-binding site) 407  
 475. místo větvení (branch site) 376  
 476. mitogen (mitogen) 451, 456  
 477. mitochondrie (mitochondrion) 309  
 478. modifikace hnRNA (hnRNA modification) 371  
 479. molekula adaptorová (adaptor molecule) 450, 465  
 480. molekula B7 (B7 molecule) 554, 555  
 481. molekula CD23 (CD23 molecule) 570  
 482. molekula komplexu histokompatibilního hlavního (molecule of major histocompatibility complex) 492  
 483. molekula MHC (MHC molecule) = molekula komplexu histokompatibilního hlavního 492  
 484. molekula MHC I (class I MHC molecule) = molekula MHC třídy první 492  
 485. molekula MHC II (class II MHC molecule) = molekula MHC třídy druhé 492  
 486. molekula MHC třídy druhé (class II MHC molecule) 492  
 487. molekula MHC třídy první (class I MHC molecule) 492  
 488. molekula Shc (Shc molecule) = molekula adaptorová 450, 465  
 489. molekula signální (signalling molecule) 444  
 490. molekula signální extracelulární (extracellular signalling molecule) 444  
 491. molekula signální intracelulární (intracellular signalling molecule) 444  
 492. motiv imunoreceptoru tyrozinový aktivační (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) 564  
 493. mtDNA (zkr. mitochondrial deoxyribonucleic acid) = kyselina deoxyribonukleová mitochondriová 311, 328

## N

494. nDNA (zkr. nuclear deoxyribonucleic acid DNA) =

- kyselina deoxyribonukleová jaderná eukaryotická 311, 322
495. **neurotransmiter** (neurotransmitter) 444
496. **noradrenalin** (noradrenaline) 454
497. **norepinefrin** (norepinephrine) = noradrenalin 454
498. **nukleotid N** (N nucleotide) 524
499. **nukleotid P** (P nucleotide) = nukleotid palindromatický 524
500. **nukleotid palindromatický** (palindromic nucleotide) 524
501. **nukleozid -3',5'-monofosfát cyklický** (cyclic nucleoside-3',5'-monophosphate) 452
502. **nukleozom** (nucleosome) 313
- O**
503. **OBF** (zkr. ORE binding factor) = faktor na ORE se vázající 339
504. **oblast C** (C region) = oblast imunoglobulinu konstantní 502
505. **oblast CDR** (CDR region) = oblast imunoglobulinu komplementaritu určující 503
506. **oblast homologie Src2** (Src2 homology domain, Src2 homology region) = doména SH2, 449
507. **oblast homologie Src3** (Src3 homology domain, Src3 homology region) = doména SH3, 449
508. **oblast imunoglobulinu komplementaritu určující** (complementarity determining region) 503
509. **oblast imunoglobulinu konstantní** (constant region) 502
510. **oblast imunoglobulinu pantová** (hinge region) 503
511. **oblast imunoglobulinu variabilní** (variable region) 502
512. **oblast pro proteinové lešení připojovací** (scaffold attachment region) 318
513. **oblast V** (V region) = oblast imunoglobulinu variabilní 502
514. **OCT-1** (zkr. octamer binding transcription factor 1) = faktor transkripční OCT-1 na oktamer se vázající 355
515. **OCT-2** (zkr. octamer binding transcription factor 2) = faktor transkripční OCT-2 na oktamer se vázající 355, 543
516. **odevzdání signálu** (signal delivery) = doručení signálu 478
517. **odpověď imunitní** (immune response) 489
518. **odpověď imunitní buněčná** (cell mediated immune response) 489
519. **odpověď imunitní humorální** (humoral immune response) 489
520. **odpověď imunitní primární** (primary immune response) 498, 540
521. **odpověď imunitní sekundární** (secondary immune response) 498, 540, 541
522. **oktamer histonový** (histone octamer, histone core) 314
523. **ORE** (zkr. origin recognition element) = element počátek replikace rozpoznávající 337
524. **orgán lymfoidní primární** (primary lymphoid organ) 499
525. **orgán lymfoidní sekundární** (secondary lymphoid organ) 499
526. **orizom** (orisome) 339
527. **oxytocin** (oxytocin) 454
- P**
528. **parathormon** (parathormone) 454
529. **PCNA** (zkr. proliferating cell nuclear antigen) = antigen buněčný jaderný proliferanční 337, 341
530. **PDGF** (zkr. platelet derived growth factor) = faktor růstový z trombocytů pocházející 456
531. **peptid signální** (signal peptide) 414
532. **peptidáza signální EC 3.4.99.36** (signal peptidase) 414
533. **perforin** (perforin) 562
534. **PI(3)K** (1-phosphatidylinositol 3-kinase) = 1-fosfatidylinositol-3-kináza EC 2.7.1.137, 453
535. **PKA** (zkr. protein kinase A) = proteinkináza A 448
536. **PKC** (zkr. protein kinase C) = proteinkináza C 448
537. **PKC ( $\alpha$ )** = proteinkináza C ( $\alpha$ ) 448
538. **PKC ( $\beta$ )** = proteinkináza C ( $\beta$ ) 449
539. **PKC ( $\gamma$ )** = proteinkináza C ( $\gamma$ ) 449
540. **PKG** (zkr. cyclic GMP-dependent protein kinase) = proteinkináza cGMP-dependentní 448
541. **Plantae** (Rostliny) 310
542. **plastid** (plastid) 309
543. **PLC** (zkr. phospholipase C) = fosfolipáza C EC 3.1.4.11, 452
544. **PLC ( $\alpha$ )** (zkr. phospholipase C ( $\alpha$ )) = fosfolipáza C ( $\alpha$ ), 452
545. **PLC ( $\beta$ )** (zkr. phospholipase C ( $\beta$ )) = fosfolipáza C ( $\beta$ ), 452
546. **PLC ( $\gamma$ )** (zkr. phospholipase C ( $\gamma$ )) = fosfolipáza C ( $\gamma$ ), 452
547. **PLD** (zkr. phospholipase D) = fosfolipáza D EC 3.1.4.4, 452
548. **polyadenylace** (polyadenylation) 373, 390
549. **poly(A)-konec** (poly(A) tail) 373
550. **poly(A)-polymeráza** (poly (A) polymerase) = polynukleotidadenyltransferáza EC 2.7.7.19, 360, 373
551. **polynukleotidadenyltransferáza** (polynucleotide adenyltransferase EC 2.7.7.19) 360
552. **polypeptid spojovací** (joining polypeptide) 510
553. **posel signálu druhý** (second signal messenger) = přenašeč signálu druhý 439, 446, 447
554. **posel signálu první** (first signal messenger) = přenašeč signálu první 446
555. **pravidlo 12/23** (12/23 rule) 521
556. **pravidlo GU-AG** (GU/AG rule) 376
557. **pRb** (zkr. retinoblastoma protein) = protein retinoblastomový 481, 484
558. **pre-mRNA** (zkr. eucaryotic precursor messenger ribonucleic acid) = kyselina ribonukleová mediátorová prekurzorová eukaryotická 349
559. **preprotein** (preprotein) 414
560. **pre-tRNA** (zkr. precursor transfer ribonucleic acid) = kyselina ribonukleová transferová prekurzorová 349
561. **progesteron** (progesterone) 455



562. **prolaktin** (prolactin) = hormon luteotropní 455  
 563. **promotor nulový** (null promoter) 354  
 564. **promotor RNA-polymerázy I** (RNA polymerase I promoter) 363  
 565. **promotor RNA-polymerázy II** (RNA polymerase II promoter) 352  
 566. **promotor RNA-polymerázy III** (RNA polymerase III promoter) 366  
 567. **promotor třídy I. RNA-polymerázy III** (RNA polymerase III class I promoter) = promotor typu I. RNA polymerázy III 366  
 568. **promotor třídy II. RNA-polymerázy III** (RNA polymerase III class II promoter) = promotor typu II. RNA polymerázy III 366  
 569. **promotor třídy III. RNA-polymerázy III** (RNA polymerase III class III promoter) = promotor typu III. RNA polymerázy III 367  
 570. **promotor typu I. RNA-polymerázy III** (RNA polymerase III type I promoter) 366  
 571. **promotor typu II. RNA-polymerázy III** (RNA polymerase III type II promoter) 366  
 572. **promotor typu III. RNA-polymerázy III** (RNA polymerase III type III promoter) 367  
 573. **promotor 5S-rRNA** (5S rRNA promoter) = promotor typu I. RNA-polymerázy III 366  
 574. **promotor tRNA/7SL** (tRNA/7SL promoter) = promotor typu II. RNA-polymerázy III 366  
 575. **promotor U6/7SK** (U6/7SK promoter) = promotor typu III. RNA-polymerázy III 367  
 576. **prostaglandin** (prostaglandin) 455  
 577. **proteáza ICE** (ICE protease) = enzym interleukin 1 $\beta$  přeměňující, 488  
 578. **protein A** **proteinkinázový zakotvující** (A-kinase anchor protein) 448  
 579. **protein AKAP** (zkr. A-kinase anchor protein) = protein proteinkinázy A zakotvující 448  
 580. **protein B7** (B7 protein) = molekula B7, 554, 555  
 581. **protein C19** (C19 protein) 567  
 582. **protein CBP** (CBP protein) = protein na čepičku se vázající 415  
 583. **protein CD4** (CD4 protein) 494  
 584. **protein CD8** (CD8 protein) 494  
 585. **protein CD23** (CD23 protein) 570  
 586. **protein CD28** (CD28 protein) 554  
 587. **protein CD40L** (CD40L protein) 557  
 588. **protein CD45** (CD45 protein) 546, 565  
 589. **protein CD81** (CD81 protein) = protein TAPA-1, 567  
 590. **protein CR2** (CR2 protein) 567, 570  
 591. **protein CTLA-4** (protein CTLA-4) 554  
 592. **protein G** (G protein) 458  
 593. **protein G<sub>i</sub>** (G<sub>i</sub> protein) = protein G inhibiční 459  
 594. **protein G<sub>s</sub>** (G<sub>s</sub> protein) = protein G stimulační 459  
 595. **protein G inhibiční** (inhibitory G protein) 459  
 596. **protein G monomerní** (monomeric G protein) 461  
 597. **protein G stimulační** (stimulatory G protein) 459  
 598. **protein G trimerní** (trimeric G protein) 459  
 599. **protein GAP** (GAP protein) = protein GTPázu aktivující 462  
 600. **protein GRB2** (GRB2 protein) = protein na receptor růstového faktoru vázaný 450  
 601. **protein GTPázu aktivující** (GTPase activating protein) 462  
 602. **protein HMG** (HMG protein) = protein skupiny vysoké pohyblivosti 313  
 603. **protein hnRNP** (hnRNP protein) 372  
 604. **protein homeotický** (homeotic protein) 440  
 605. **protein ICE** (ICE protein) = enzym interleukin 1 $\beta$  přeměňující 488  
 606. **protein komplex histokompatibilního hlavního** (protein of major histocompatibility complex) = molekula komplexu histokompatibilního hlavního 492  
 607. **protein  $\lambda$ 5** ( $\lambda$ 5 protein) 538  
 608. **protein MHC** (MHC protein) = molekula MHC 492  
 609. **protein MHC** (MHC protein) = protein komplexu histokompatibilního hlavního 492  
 610. **protein MHC I** (MHC I protein) = protein MHC třídy první 492  
 611. **protein MHC II** (MHC II protein) = protein MHC třídy druhé 492  
 612. **protein MHC třídy první** (class I MHC protein) 492  
 613. **protein MHC třídy druhé** (class II MHC protein) 492  
 614. **protein mRNP** (mRNP protein) 373  
 615. **protein na čepičku se vázající** (cap binding protein) 415  
 616. **protein na receptor růstového faktoru vázaný** (growth factor receptor-bound protein) 450  
 617. **protein na sérum responzivní element se vázající** (serum responsive element binding protein) 434  
 618. **protein na TATA-box se vázající** (TATA box binding - protein) 353  
 619. **protein nehistonový** (nonhistone protein) 311, 313  
 620. **protein p21** (p21 protein) 480, 483, 484, 485  
 621. **protein p53** (p53 protein) 483, 484  
 622. **protein PCNA** (PCNA protein) = antigen buněčný jaderný proliferační 337, 341  
 623. **protein pRb** (pRb protein) = protein retinoblastomový 481, 484  
 624. **protein pre-mRNA upravující** (pre-mRNA processing protein) 379, 382  
 625. **protein PRP** (pre-mRNA processing protein) = protein pre-mRNA upravující 379, 382  
 626. **protein RAG 1** (RAG 1 protein) 521  
 627. **protein RAG 2** (RAG 2 protein) 521  
 628. **protein Ras** (Ras protein) 461  
 629. **protein RB** (RB-protein) = protein retinoblastomový 481, 484  
 630. **protein retinoblastomový** (retinoblastoma protein) 481, 484  
 631. **protein RFC** (RFC protein) = faktor C replikační 341  
 632. **protein skupiny vysoké pohyblivosti** (high mobility group protein) 313  
 633. **protein snRNP** (snRNP protein) 373  
 634. **protein Sos** (Sos-protein) 461  
 635. **protein SREB** (SREB protein) = protein na sérum responzivní element se vázající 434

636. **protein STAT** (STAT protein) = přenašeč signálu a aktivátor transkripce 434, 466
637. **protein TAPA-1** (TAPA-1 protein) 567
638. **protein TBP** (TBP protein) = protein na TATA-box se vážající 353
639. **protein V-preB** (V-preB protein) 538
640. **proteinkináza** (protein kinase) 437, 448
641. **proteinkináza A** (protein kinase A) = proteinkináza cAMP-dependentní 448
642. **proteinkináza C** (protein kinase C) 448
643. **proteinkináza C( $\alpha$ )** (protein kinase C( $\alpha$ )) 448
644. **proteinkináza C( $\beta$ )** (protein kinase C( $\beta$ )) 449
645. **proteinkináza C( $\gamma$ )** (protein kinase C( $\gamma$ )) 449
646. **proteinkináza cAMP-dependentní** (cyclic AMP-dependent protein kinase) 448
647. **proteinkináza CDK** (CDK protein kinase) = proteinkináza cyklin-dependentní 478
648. **proteinkináza cGMP-dependentní** (cyclic GMP-dependent protein kinase) 448
649. **proteinkináza cyklin-dependentní** (cyclin-dependent protein kinase) 478
650. **proteinkináza ERK** (ERK protein kinase) = proteinkináza signálem extracelulárním regulovaná 451
651. **proteinkináza II Ca<sup>2+</sup>/CAM-dependentní** (Ca<sup>2+</sup> - CAM-dependent protein kinase II) = proteinkináza II Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin-dependentní EC 2.7.1.123, 449
652. **proteinkináza II Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin-dependentní EC 2.7.1.123** (Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II) 449
653. **proteinkináza MAPK** (MAPK kinase) = proteinkináza mitogenem aktivovaná 451
654. **proteinkináza MAPKK** EC 2.7.1. (MAPKK kinase) = proteinkináza kináza mitogenem aktivovaná 451
655. **proteinkináza MAPKKK** (MAPKKK kinase kinase) = proteinkináza kináza kináza mitogenem aktivovaná 451
656. **proteinkináza MAP/ERK** (MAP/ERK protein kinase) = proteinkináza MAPKK 451
657. **proteinkináza MEK** (MEK protein kinase) = proteinkináza MAP/ERK 451
658. **proteinkináza mitogenem aktivovaná** (mitogen-activated protein kinase) 451
659. **proteinkináza nereceptorová** (nonreceptor protein kinase) 449
660. **proteinkináza Raf** (Raf protein kinase) = proteinkináza MAPKKK 451
661. **proteinkináza receptorová** (receptor protein kinase) 449
662. **proteinkináza rodiny Jak** (Janus protein kinase) = proteinkináza rodiny Janusovy 450
663. **proteinkináza rodiny Janusovy** (tyrosine kinase of the Janus family) 450
664. **proteinkináza Src-rodiny** (tyrosine kinase of the Src family) 449
665. **proteinkináza Syk-rodiny** (tyrosine kinase of the Syk family) 450
666. **proteinkináza kináza mitogenem aktivovaná** (mitogen-activated protein kinase kinase) = proteinkináza MEK 451
667. **proteinkináza kináza kináza mitogenem aktivovaná** (mitogen-activated protein kinase kinase kinase) = proteinkináza Raf 451
668. **proteinkinázy ERK** (ERK-protein kinases) = proteinkinázy signálem extracelulárním regulované 451
669. **proteinkinázy MAP** (MAP kinases) = proteinkinázy mitogenem aktivované 451
670. **proteinkinázy mitogenem aktivované** (mitogen-activated protein kinases) 451
671. **proteinkinázy signálem extracelulárním regulované** (extracellular signal-regulated protein kinases) = proteinkinázy MAP 451
672. **protilátka** (antibody) 489
673. **Protozoa** = Prvoci 310
674. **PRP** (zkr. pre-mRNA processing protein) = protein pre-mRNA upravující 379, 382
675. **pruh C** (C band) 321
676. **pruh G** (G band) 320
677. **pruh Q** (Q band) 320
678. **pruh Q/R** (Q/R band) 321
679. **pruh R** (R band) 321
680. **pruhování C** (C banding) 321
681. **pruhování G** (G banding) 320
682. **pruhování chromozomu** (chromosome banding) 320
683. **pruhování Q** (Q banding) 320
684. **pruhování R** (R banding) 321
685. **pruhování T** (T banding) 321
686. **Prvoci** (Protozoa) 310
687. **přenašeč signálu a aktivátor transkripce** (signal transducer and activator of transcription) 434, 466
688. **přenašeč signálu druhý** (second signal transducer) 439, 444, 446
689. **přenašeč signálu první** (first signal transducer) 446
690. **přenos OH-skupiny druhý** (second OH group transfer) = transesterifikace druhá 376, 397, 403, 404
691. **přenos OH-skupiny první** (first OH group transfer) = transesterifikace první 376, 397, 403
692. **přeskupování segmentů genových** (gene segment rearrangement) = přeskupování subgenů 513
693. **přeskupování subgenů** (subgene rearrangement) 513, 519
694. **přeskupování subgenů neproduktivní** (nonproductive subgene rearrangement) 526
695. **přeskupování subgenů produktivní** (productive subgene rearrangement) 526
696. **přesmyk izotypů** (class switching) = přesmyk tříd 534
697. **přesmyk tříd** (class switching) 534
698. **pseudogen** (pseudogene) 324
699. **PtdIns** (zkr. phosphatidylinositol) = fosfatidylinositol 453
700. **PtdIns(3)P** (zkr. phosphatidylinositol -3-phosphate) = fosfatidylinositol-3-fosfát 453
701. **PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>** (zkr. phosphatidylinositol -3,4-bisphosphate) = fosfatidylinositol-3,4-bisfosfát 453

702. **PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>** (zkr. phosphatidylinositol -3,4,5- trisphosphate) = fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát 453
703. **PtdIns(4)P** (zkr. phosphatidylinositol -4-phosphate) = fosfatidylinositol-4-fosfát 453
704. **PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>** (zkr. phosphatidylinositol -4,5-bisphosphate) = fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát 452
- R**
705. **rameno p chromozomové** (chromosome arm p) 321
706. **rameno q chromozomové** (chromosome arm q) 321
707. **rDNA** (rDNA) 363
708. **RE** (zkr. responsive element) = responzivní element 426
709. **receptor** (receptor) 444
710. **receptor BCR** (BCR receptor) = receptor B-lymfocytový 494, 531
711. **receptor B-lymfocytový** (B-lymphocyte receptor) 494, 531
712. **receptor cytokinový** (cytokine receptor) 464
713. **receptor cytokinový třídy druhé** (class II cytokine receptor) 465
714. **receptor cytokinový třídy první** (class I cytokine receptor) 464
715. **receptor hormonu steroidního** (steroid hormone receptor) 467
716. **receptor kyseliny retinové** (retinoic acid receptor) 467
717. **receptor membránový** (membrane receptor) 458
718. **receptor preB** (preB receptor) 538
719. **receptor preT náhražkový** (surrogate preT receptor) 551
720. **receptor preTCR** (preTCR receptor) = receptor preT náhražkový 551
721. **receptor pro antigen** (receptor binding antigen) 464
722. **receptor pro cytokin** (cytokine receptor) = receptor cytokinový 464
723. **receptor RTK** (RTK receptor) = receptor tyrozinproteinkinázový 462
724. **receptor s aktivitou tyrozinproteinkinázovou přidruženou** (receptor with associated kinase activity) 464
725. **receptor s G-proteinem spřažený** (G-protein-coupled receptor) 458
726. **receptor TCR** (TCR receptor) = receptor T-lymfocytový 546
727. **receptor T-lymfocytový** (T lymphocyte receptor) 546
728. **receptor tyroxinu** (thyroxine receptor) 467
729. **receptor tyrozinproteinkinázový** (tyrosine protein kinase receptor) 462
730. **receptor vitamínu D** (vitamin D receptor) 467
731. **rekombinace V(D)JC** (V(D)JC recombination) = přeskupování subgenů 513, 519
732. **repetice genová** (gene repeat) 323
733. **repetice genová rozptýlená** (dispersed gene repeat) 325
734. **repetice genová tandemová** (tandem gene repeat) 324
735. **replizom** (replisome) 341
736. **represe transkripcce nepřímá** (indirect repression of transcription) 435
737. **represe transkripcce přímá** (direct repression of transcription) 435
738. **retikulum endoplazmatické** (endoplasmic reticulum) 310, 414
739. **retikulum endoplazmatické drsné** (rough endoplasmic reticulum) 414
740. **retikulum endoplazmatické hladké** (smooth endoplasmic reticulum) 414
741. **RFC** (zkr. replication factor C) = faktor C replikační 341
742. **ribonukleáza H EC 3.1.26.4** (ribonuclease H) 340, 341
743. **ribozom cytoplazmatický eukaryotický** (eucaryotic cytoplasmic ribosome) 413, 414
744. **ribozom vázaný** (ribosome bound to endoplasmic reticulum) 414
745. **ribozom volný** (free ribosome) 414
746. **ribozym** (ribozyme) 402
747. **RNA editovaná** (edited RNA) = kyselina ribonukleová editovaná 394
748. **RNA intronexonová lasovitá** (intronexon lariat RNA) = kyselina ribonukleová intronexonová lasovitá 376
749. **RNA intronová lasovitá** (intron lariat RNA) = kyselina ribonukleová intronová lasovitá 376
750. **RNA-ligáza** (RNA ligase) 390
751. **RNA malá** (small RNA) = kyselina ribonukleová malá 349
752. **RNA malá cytoplazmatická** (small cytoplasmic RNA) = kyselina ribonukleová malá cytoplazmatická 349
753. **RNA malá jadéřková** (small nucleolar RNA) = kyselina ribonukleová malá jadéřková 349
754. **RNA malá jaderná** (nuclear RNA) = kyselina ribonukleová malá jaderná 349
755. **RNA-polymeráza I** (RNA-polymerase I) 350, 351
756. **RNA-polymeráza II** (RNA-polymerase II) 350, 351
757. **RNA-polymeráza III** (RNA-polymerase III) 351
758. **RNA-polymeráza DNA-dependntní eukaryotická** (eucaryotic DNA-dependent RNA polymerase) 350
759. **RNA řidič** (guide RNA) = kyselina ribonukleová řidič 396
760. **RNA větvená** (branched RNA) = kyselina ribonukleová větvená 383
761. **RNAáza H** (RNAase H) = ribonukleáza H 340, 341
762. **rodina genová** (gene family) 323
763. **Rostliny** (Plantae) 310
764. **RSS** (zkr. recombination signal sequence) = sekvence rekombinační signální 519
765. **RTK** (zkr. tyrosine protein kinase receptor) = receptor tyrozinproteinkinázový 462
- Ř**
766. **řetězec H** (H chain) = řetězec imunoglobulinový

- těžký 502
767. řetězec imunoglobulinový lehký (immunoglobulin light chain) 502
768. řetězec  $\kappa$  imunoglobulinový lehký (immunoglobulin light chain  $\kappa$ ) 504
769. řetězec  $\lambda$  imunoglobulinový lehký (immunoglobulin light chain  $\lambda$ ) 504
770. řetězec imunoglobulinový lehký náhražkový (immunoglobulin surrogate light chain) 538
771. řetězec imunoglobulinový těžký (immunoglobulin heavy chain) 502
772. řetězec  $\alpha$  imunoglobulinový těžký (immunoglobulin heavy chain  $\alpha$ ) 504
773. řetězec  $\gamma$  imunoglobulinový těžký (immunoglobulin heavy chain  $\gamma$ ) 504
774. řetězec  $\delta$  imunoglobulinový těžký (immunoglobulin heavy chain  $\delta$ ) 504
775. řetězec  $\epsilon$  imunoglobulinový těžký (immunoglobulin heavy chain  $\epsilon$ ) 504
776. řetězec  $\mu$  imunoglobulinový těžký (immunoglobulin heavy chain  $\mu$ ) 504
777. řetězec  $\mu$  imunoglobulinový těžký cytoplazmatický (cytoplasmic immunoglobulin heavy chain  $\mu$ ) 539
778. řetězec J (J chain) = polypeptid spojovací 510
779. řetězec L (L chain) = řetězec imunoglobulinový lehký 502
780. řetězec nukleozomový (nucleosome chain) 312, 315
- S
781. samosestřih (self-splicing) 401, 402
782. SAR (zkr. scaffold attachment region) = oblast pro proteinové lešení připojovací 318
783. scRNA (zkr. small cytoplasmic ribonucleic acid) = kyselina ribonukleová malá cytoplazmatická 349
784. segment genový (gene segment) = subgen 512
785. segment genový C (C gene segment) = subgen C 514
786. segment genový D (D gene segment) = subgen D 514
787. segment genový J (J gene segment) = subgen J 514
788. segment genový L (L gene segment) = subgen L 513
789. segment genový V (V gene segment) = subgen V 514
790. sekvence A/T (A/T sequence) 338
791. sekvence dvouzátvitová signální (two-turn signal sequence) = mezerník dvouzátvitový 520
792. sekvence jednozátvitová signální (one-turn signal sequence) = mezerník jednozátvitový 520
793. sekvence pro odvíjení DNA (DNA unwinding sequence) = element pro odvíjení DNA 337
794. sekvence rekombinační signální (recombination signal sequence) 519
795. sekvence telomerická (telomeric sequence) = konec telomerický 326
796. sekvence vedoucí vnitřní (internal leading sequence) 407
797. selekce klonální (clonal selection) 529
798. serin/treoninproteinkináza (serine/threonine protein kinase) 448
799. serotonin (serotonin) 455
800. sestřih bimolekulární (trans-splicing) 382, 383
801. sestřih monomolekulární (cis-splicing) 382
802. signál (signal) 444
803. signál 1 (signal 1) 553, 554
804. signál 2 (signal 2) = signál kostimulační 553
805. signál kostimulační (co-stimulatory signal) 553
806. signál polyadenylační (polyadenylation signal) 356, 360
807. signál přesmyku (class switching signal) 534
808. signaláza (signalase) = peptidáza signální 414
809. signalizace extracelulární (extracellular signalling) 444, 445
810. signalizace extracelulární autokrinní (extracellular autocrine signalling) 445
811. signalizace extracelulární endokrinní (extracellular endocrine signalling) 445
812. signalizace intracelulární (intracellular signalling) 445
813. signalizace přes STAT-proteiny (Jak-STAT pathway) 475
814. signalizace spojem dutým (signalling through gap junction) 445
815. sítě drah signálních (network of signal pathways) 476
816. SL1 (zkr. selectivity transcription factor) = faktor transkripční selektivní 363
817. smyčka D (displacement loop) 348
818. snoRNA (zkr. small nucleolar ribonucleic acid) = kyselina ribonukleová malá jadéřková 349
819. snRNA (zkr. small nuclear ribonucleic acid) = kyselina ribonukleová malá jaderná 349
820. Sos (zkr. son of sevenless protein) = protein Sos 461
821. spliceozom (spliceosome) 373, 380
822. spliceozom B1 (B1 spliceosome) 381
823. spliceozom B2 (B2 spliceosome) 381
824. spliceozom C1 (C1 spliceosome) 381
825. spliceozom C2 (C2 spliceosome) 381
826. spoj dutý (gap junction) 445
827. spoj kódující (coding joint) 523
828. spoj signální (signal joint) 523
829. SREB (zkr. serum responsive element binding protein) = protein na sérum responzivní element se vážající 434
830. SRP (zkr. signal recognition particle) = částice rozpoznávací signální 414
831. STAT (zkr. signal transducer and activator of transcription) = přenašeč signálu a aktivátor transkripce 434, 466
832. subgen (subgene) 512
833. subgen C (C subgene) 514
834. subgen D (D subgene) 514
835. subgen J (J subgene) 514
836. subgen L (L subgene) 513
837. subgen V (V subgene) 514
838. substrát I receptoru inzulinového (insulin receptor substrate 1) 474

839. svorka  $\beta$  eukaryotická (eucaryotic  $\beta$  clamp) = antigen buněčný jaderný proliferace 337, 341

## T

840. TAF (zkr. TBP - associated factor) = faktor s TBP sdružený 353

841. TATA-box (TATA box, Hogness' box) 353

842. TATA-box (Hogness' box) = Hognessův box 353

843. TBP (zkr. TATA box - binding protein) = protein na TATA-box se vážající 353

844. TCR (zkr. T lymphocyte receptor) = receptor T lymfocytový 546

845. telomera (telomere) 325

846. telomeraza (telomerase) 326, 343

847. terminace translace cytoplazmatické eukaryotické (termination of eucaryotic cytoplasmic translation) 419

848. testosteron (testosterone) 455

849. TNF- $\alpha$  (zkr. tumour necrosis factor  $\alpha$ ) = faktor nádorový nekrotický  $\alpha$  456

850. TNF- $\beta$  (zkr. tumour necrosis factor  $\beta$ ) = faktor nádorový nekrotický  $\beta$  456

851. TNF- $\gamma$  (zkr. tumour necrosis factor  $\gamma$ ) = faktor nádorový nekrotický  $\gamma$  456

852. transesterifikace (transesterification) 376

853. transesterifikace čtvrtá (fourth transesterification) 406

854. transesterifikace druhá (second transesterification) 376, 397, 403, 404

855. transesterifikace první (first transesterification) 376, 397, 403

856. transesterifikace třetí (third transesterification) 406

857. transkripce bazální (basal transcription) 351

858. transkripce genomu eukaryotického (eucaryotic genome transcription) 349

859. transkripce indukovatelná (inducible transcription) 352

860. transkripce konstitutivní (constitutive transcription) 351

861. translace cytoplazmatická eukaryotická (eucaryotic cytoplasmic translation) 415

862. translace eukaryotická (eucaryotic translation) 413

863. translace v chloroplastech (chloroplast translation) 425

864. translace v mitochondriích (mitochondrial translation) 420

865. třída imunoglobulinová (immunoglobulin class) 504

866. třída imunoglobulinová IgA (immunoglobulin class IgA) 506

867. třída imunoglobulinová IgD (immunoglobulin class IgD) 506

868. třída imunoglobulinová IgE (immunoglobulin class IgE) 506

869. třída imunoglobulinová IgG (immunoglobulin class IgG) 504

870. třída imunoglobulinová IgM (immunoglobulin class IgM) 506

871. tymocyt (thymocyte) 550

872. tyroxin (thyroxine) 454

873. tyrozinproteinkináza (tyrosine protein kinase) 449

874. tyrozinproteinkináza nereceptorová (nonreceptor tyrosine protein kinase) 449

875. tyrozinproteinkináza receptorová (receptor tyrosine protein kinase) 449

## U

876. UBF (zkr. upstream binding factor) = faktor transkripční proti směru transkripce se vážící 363

877. úprava 3'-konce hnRNA (3'-end hnRNA processing) = polyadenylace 373, 390

878. úprava 5'-konce hnRNA (capping) 373

879. úprava pre-rRNA posttranskripční eukaryotická (eucaryotic posttranscriptional processing of pre-rRNA) 388

880. úprava pre-tRNA posttranskripční eukaryotická (eucaryotic posttranscriptional processing of pre-tRNA) 390

881. úprava posttranskripční eukaryotická (eucaryotic posttranscriptional processing) 371

882. úprava posttranskripční hnRNA (posttranscriptional processing of hnRNA) 371

883. úsek hypervariabilní (hypervariable region) 503

884. úsek jednokopiový dlouhý (large single copy region) 332

885. úsek jednokopiový krátký (small single copy region) 332

886. úsek LSC (large single copy region) = úsek jednokopiový dlouhý 332

887. úsek SSC (small single copy region) = úsek jednokopiový krátký 332

888. úsek struktury základní (framework region) 503

## V

889. vazopresin (vasopressin) 454

890. vitamín D (vitamin D) 455

891. vlákno chromatinové 10 nm (10 nm chromatin fiber) = řetězec nukleozomový 312, 315

892. vlákno chromatinové 30 nm (30 nm chromatin fiber) 312

893. vtiskování (imprinting) 441

## Z

894. zesílení signálu (signal amplification) 446

895. zesilovač transkripce eukaryotický (eucaryotic enhancer) 426

## Ž

896. Živočichové (Animalia) 310