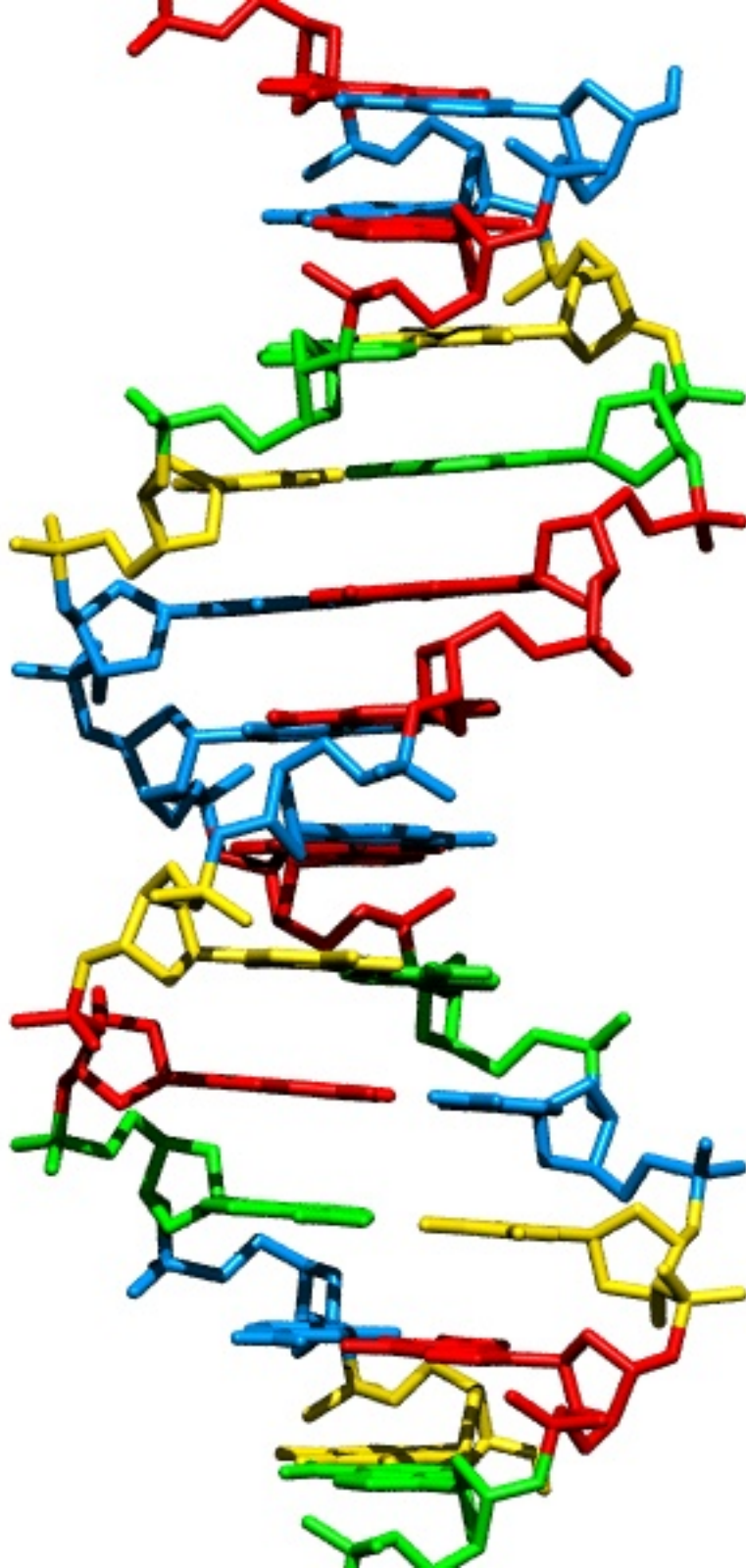


A-PDF MERGER DEMO



Represor je bielkovina, ktorá sa ľahko spája s príslušným efektorom /induktorom alebo represorom/ komplementárnym povrchom. Na komplementárnych povrchoch sa medzi špecifickou časťou represora a efektorom vytvorí slabá väzba, spôsobená Van der Waalsovými silami alebo vodíkovými väzbami. Význam spojenia slabými väzbami spočíva v tom, že represor tak môže reagovať na fyziologickú potrebu bunky a meniť sa z aktívneho stavu na neaktívny a opačne, podľa toho, ako si to situácia vyžaduje.

11.4.2 KONTROLA ČINNOSTI OPERÓNU

Existujú dva spôsoby kontroly činnosti operónu:

- negatívna kontrola, ktorá sa uplatňuje pri enzýmovej indukcii a enzýmovej represii,
- pozitívna kontrola, ktorá sa uplatňuje pri katabolickej represii.

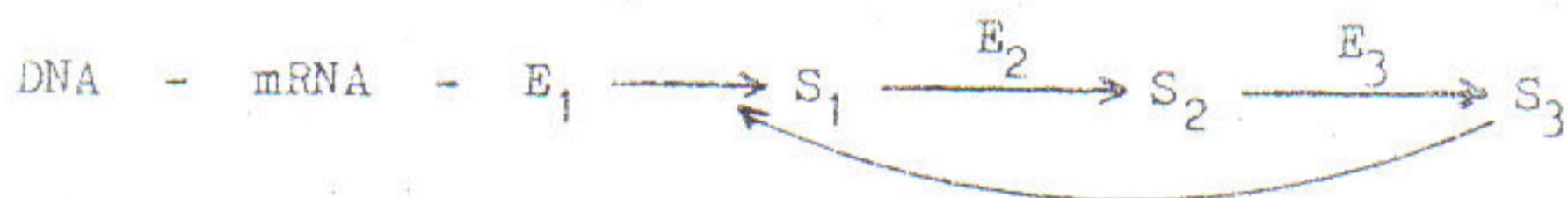
Uvedieme si konkrétne príklady na negatívnu a pozitívnu kontrolu operónu.

11.4.2.1 Negatívna regulácia

11.4.2.1.1 Negatívna spätná väzba

Negatívna spätná väzba je prípad rýchlej regulácie činnosti enzýmov metabolického reťazca konečným produktom. Odohráva sa na úrovni enzýmu, nie transkripcie. Pri nahromadení konečného produktu dochádza k tomu, že tento metabolit reaguje s prvým enzýmom metabolického reťazca a zabrzdí tým tvorbu ďalších produktov.

/E₁, E₂, E₃ = enzýmy; S₁, S₂, S₃ = substráty/



Vysvetlenie uvedeného javu je nasledovné. Enzým, okrem svojho aktívneho centra, ktoré sa nazýva katalytické centrum, má aj tzv. alosterické centrum, ktoré je obyčajne vzdialené od katalytického centra, prípadne je lokalizované na inej podjednotke toho istého enzýmu. Konečný produkt pôsobí ako alosterický efektor, resp. inhibítor /allos = cudzí, lebo nemá sférickú podobnosť so substrátom/.

Alosterický efektor, naviazaný na enzým, mení konformáciu proteínu /obyčajne terciárnu štruktúru/, ktorá spôsobuje, že katalytické centrum je neschopné funkcie a enzým sa tým reverzibilne inaktivuje /obr. 49/. Dôležité je, že alosterický efektor nie je konkurentom substrátu. Na jeden enzým môže pôsobiť viacero alosterických efektorev.

V molekulách, konkrétne v DNA dôležitosť iónových väzieb medzi negatívnymi fosfátovými skupinami a kationmi spočíva v tom, že redukujú elektrostatické odpudzovanie medzi negatívnymi nábojmi cukor-fosfátovej kostry polynukleotidov. Ak nie sú prítomné ióny opačnej polarítity /katióny/ molekula DNA sa denaturuje.

Okrem kovových iónov úlohu katiónov spĺňajú aj polyamíny alebo históny /napr. v eukaryotických chromozómoch/.

2.1.2 VAN DER WAALSOVE SILY

Niekedy sa nazývajú aj van der Waalsove väzby. Patria k najslabším väzbám. Majú energiu 4-8 kJ/mol. /Energia vodíkových a iónových väzieb sa pohybuje v rozmedzí 13-29 KJ./

Všetky molekuly sú schopné tvoriť van der Waalsove väzby. Tieto väzby vznikajú vplyvom nešpecifických príťažlivých síl, ktoré sa prejavujú vtedy, keď sa dva atómy priblížia k sebe. Môžu mať príťažlivý i odpudivý charakter. Účinné sú vtedy, ak integrujúce povrchy sú komplementárne /napr. antigén - antilátka/.

2.1.3 VODÍKOVÁ VÄZBA

Vodíková väzba vzniká medzi kovalentne viazaným atómom vodíka, ktorý nesie kladný náboj a negatívne nabitým kovalentne viazaným atómom akceptora. Biologicky najdôležitejšie vodíkové väzby vznikajú na atómoch vodíka, ktorý je kovalentne viazaný k atómom kyslíka /O - H/, alebo k dusíku /N - H/. Aj akceptorovými atómami sú obyčajne kyslík a dusík.

Vodíkové väzby sú slabšie ako kovalentné /vodíková väzba predstavuje asi 1/20 sily kovalentnej väzby/, ale silnejšie ako van der Waalsove sily, ktoré na rozdiel od vodíkových väzieb sú neusmernené. Vodíkové väzby v porovnaní s van der Waalsovými sú oveľa špecifickejšie, lebo vyžadujú existenciu molekúl s komplementárnymi donorovými vodíkmi na jednej strane a akceptorovými skupinami na druhej strane.

Treba zdôrazniť, že slabé väzby sa v molekulách uplatnia len vtedy, keď sú integrujúce povrchy blízko seba a dostatočne blízko sa dostanú vtedy, keď povrchy molekúl majú komplementárnu štruktúru /obr. 8/.

Príklady niektorých vodíkových väzieb:

Väzba	Približná dĺžka väzby /nm/
O - H ... O	0,270
O - H ... N	0,288
N - H ... O	0,304
N - H ... N	0,310

1. Z HISTÓRIE MOLEKULÁRNEJ GENETIKY

1.1 ČO JE MOLEKULÁRNA GENETIKA

Molekulárna genetika je vedecká disciplína, ktorá sa zaoberá problémami dedičnosti na molekulárnej úrovni. Ak definujeme genetiku ako vedu o prenášaní genetických determinantov pre znaky a vlastnosti z rodičov na potomkov, potom molekulárna genetika má za cieľ odhaliť tajomstvo odovzdávania týchto determinantov. Zaoberá sa teda vzťahmi medzi tými makromolekulami, ktoré sa na procesoch dedenia podieľajú a tento proces zabezpečujú a riadia.

Molekulárna genetika ako neoddeliteľná súčasť molekulárnej biológie skúma vzťahy medzi informačnými biomakromolekulami, nukleovými kyselinami a bielkovinami.

1.2 ZROD MOLEKULÁRNEJ GENETIKY

Hoci za oficiálny rok zrodu tejto disciplíny sa uvádza až rok 1953, kedy Watson a Crick zverejnili známy model dvojzávitnice deoxyribonukleovej kyseliny /symbol DNA/, korene molekulárnej genetiky sú oveľa hlbšie a siahajú hlboko do predchádzajúceho obdobia.

Vedcov od pradávna fascinovala dedičnosť ako jav /podobnosť rodičov a ich potomkov/, ale dedičnosť ako problém sa začal študovať až v 19. storočí.

Druhá polovica 19. storočia priniesla ľudstvu v oblasti prírodovedy tri závažné objavy: 1. r. 1859 sformuloval Darwin teóriu evolúcie, ktorú zahŕňa spis: "O pôvode druhov prírodným výberom"; 2. r. 1865 Mendel v Brnenskom prírodovednom spolku hovoril o výsledkoch svojich pokusov s krížením rôznych foriem hrachu. Jeho práca vyšla pod názvom: "Pokusy s rastlinnými krížencami". Od Mendela pochádza pojem faktor /rozumej dedičný faktor, synonymum dnešného pojmu gén/. A napokon 3. r. 1869 Švajčiar Miescher, ktorý pracoval v laboratóriu profesora Hoppe-Seylera v Tübingene objavil v bunkách hnisu látku bohatú

na fosfor. Pretože pochádzala z jadier odumretých bielych krviniek nazval ju Miescher nukleín /dnes sa nazýva nukleová kyselina/.

Z uvedených prác len Darwinova evolučná teória vzbudila záujem vedcov a vzrušila i ostatnú verejnosť. Mendelove pokusy upadli na určitý čas do zabudnutia /rok 1900 znamenal znovuobjavenie Mendelových zákonov/.

Miescherovmu nukleínu sa tiež nevenovala veľká pozornosť. Nukleín sa stal predmetom skúmania skôr chemikov ako biológov a dlhé roky sa nedával vôbec do súvislosti s dedičnosťou.

Vzhľadom na univerzálny výskyt bielkovín v živých organizmoch, aj pri hľadaní dedičného faktora sa pozornosť vedcov upriamila na túto skupinu látok a preto až do r. 1944 pretrvával názor, že hmotným nositeľom dedičnosti sú bielkoviny.

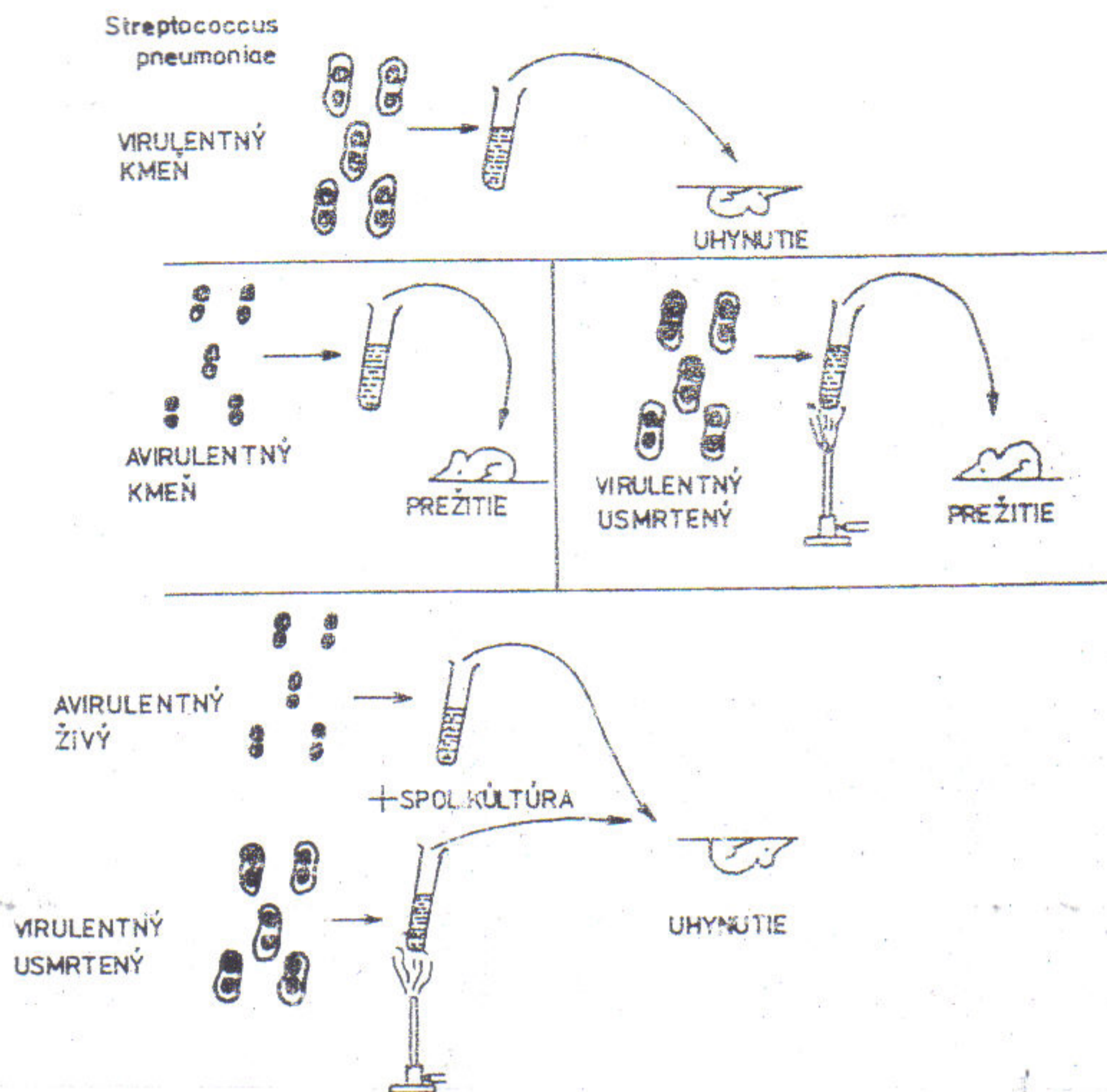
1.3 MODELOVÉ OBJEKTY

Ako sme už uviedli prvý konkrétny pojem jednotky dedičnosti pochádza od Mendela, a to je faktor. Weismann lokalizoval tento faktor do chromozómov a Morgan svojimi pokusmi na drozofile dokázal, že faktorov je v jednom chromozóme viac a sú usporiadané lineárne. Napokon Johannsen dal r. 1903 genetikom krátke slovo gén, ktorým sa pojem faktor nahradil a ktorý sa používa dodnes.

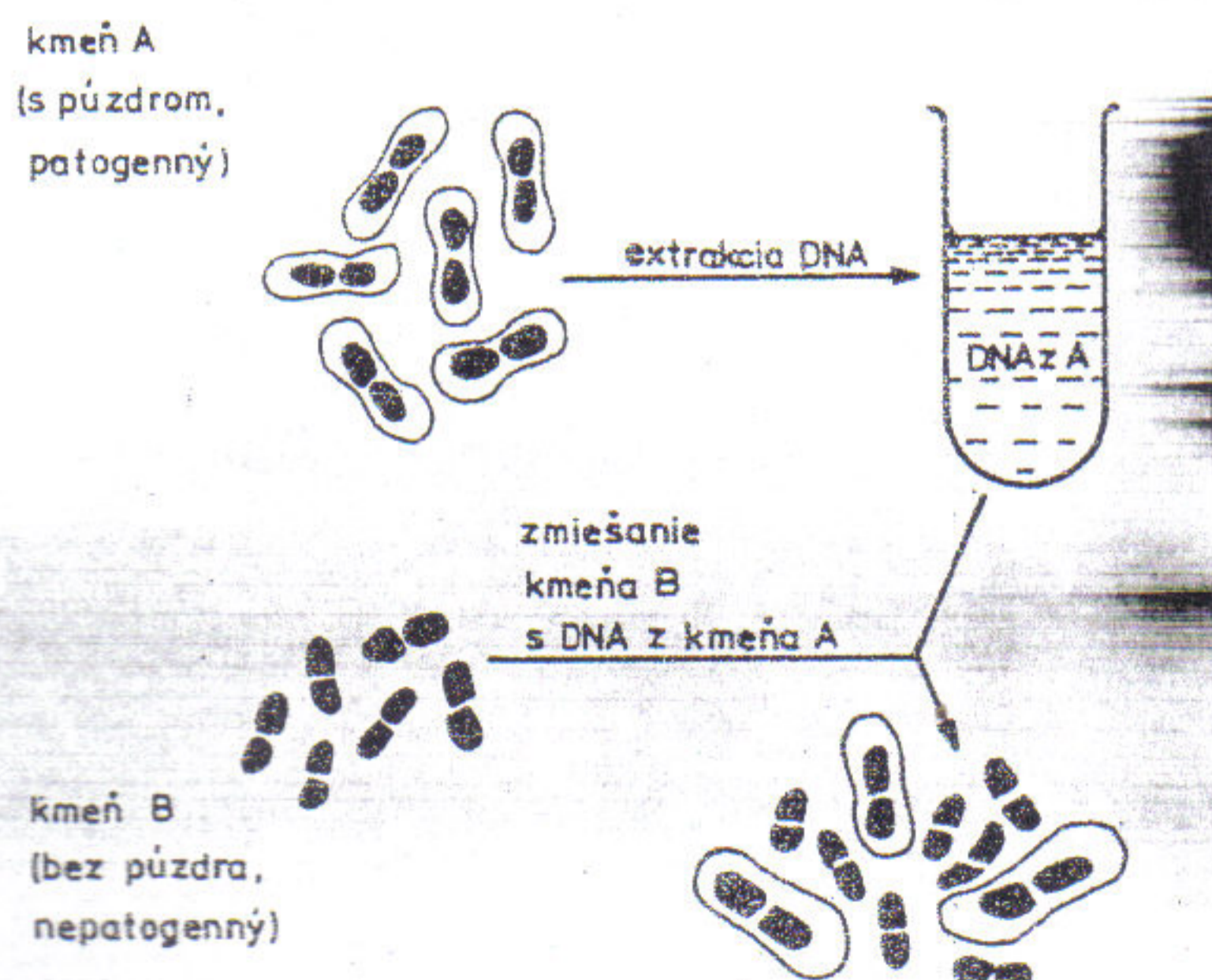
Výsledky experimentov na prelome 19. a 20. storočia sa opierali o hybridologickú a cytologickú analýzu takých modelových objektov, ako boli napr. drozofila /muška ovocná/, hrach a pod. Boli to všetko príliš zložité organizmy pre analýzy na molekulárnej úrovni /obr. 1/. Bolo jasné, že pokrok možno očakávať až vtedy, keď k zložitým modelovým organizmom pribudnú ďalšie, jednoduchšie. Boli to mikroorganizmy: baktérie, vírusy a bakteriofágy.

1.3.1 BAKTÉRIE

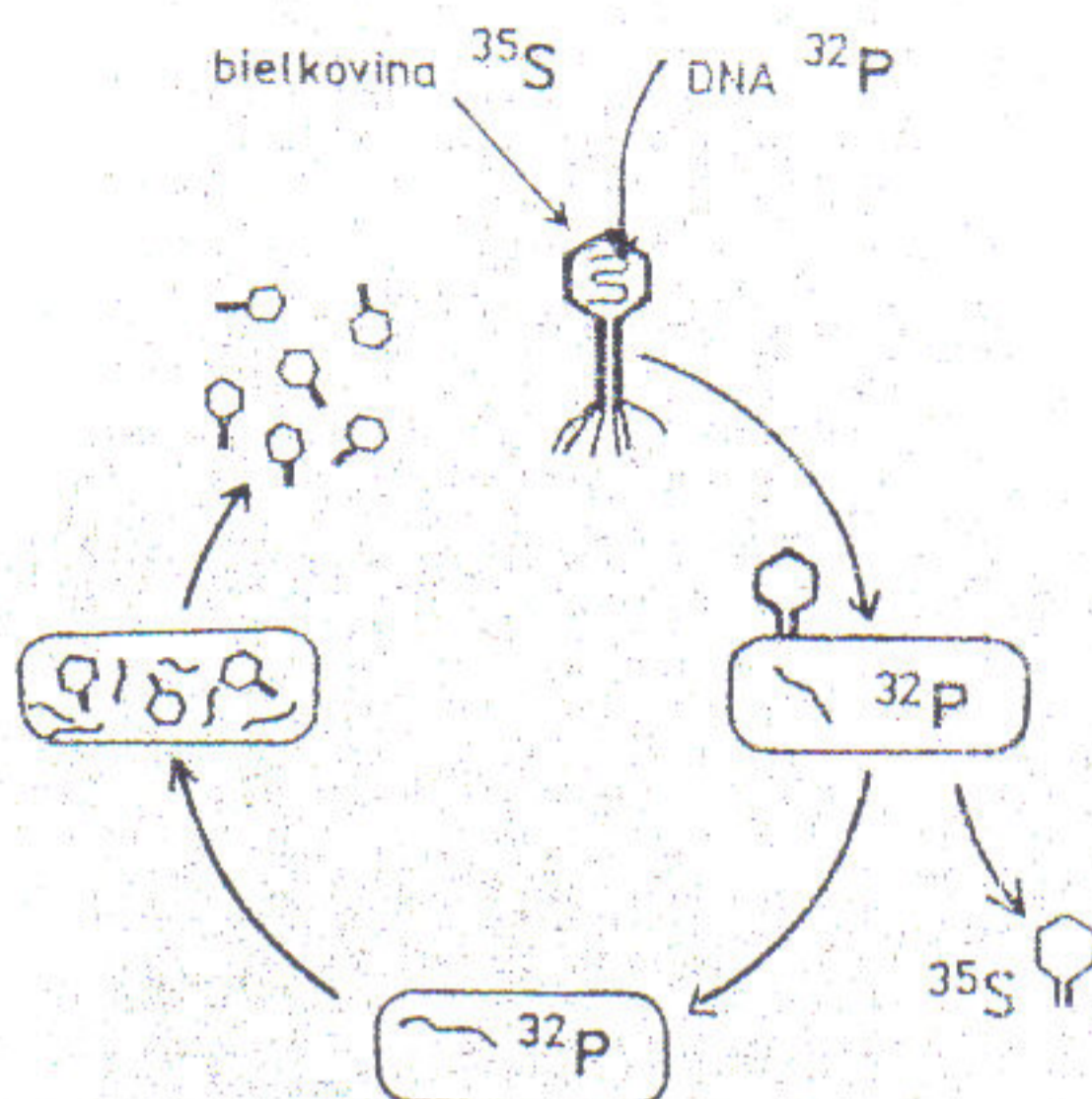
Baktéria predstavuje najjednoduchší jednobunkový organizmus v živej ríši. V molekulárnej genetike najfrekvencovanejší druh používaný ako modelový objekt slúži baktéria *Escherichia coli* /obr. 2/. Tvorí pozdĺžne bunky /dĺžka asi 2 μm , šírka asi 1 μm /, ktoré sú schopné rýchle sa rozmnožovať. Pri teplote 37 °C, ktorá predstavuje optimálnu teplotu pre *E. coli*, je schopná táto baktéria rozmnožiť sa za 20 min. Obsahuje kruhovú dvojreťazcovú deoxyribonukleovú kyselinu /symbol DNA/, ktorá tvorí bakteriálny chromozóm. Má kompletný proteosyntetický systém. Čo do veľkosti je asi 500-krát menšia ako priemerná bunka vyšších organizmov.



Obr. 5 Transformácia bakteriálnych buniek /Griffith, 1928/



Obr. 6 Dôkaz genetickej transformácie /Avery a spol., 1944/



Obr. 7 Dôkaz genetickej úlohy DNA /Hershey a Chaseová, 1956/

znamená to, že DNA musela niesť informáciu aj pre syntézu bielkovín bakter fága /obr. 7/.

Ďalší príklad si môžeme uviesť z ríše rastlinnej. Žlté ohraničené škvrny na listoch tabaku spôsobuje vírus tabakovej mozaiky /VTM/. VTM je vírus ktorý ako nositeľa genetickej informácie má jednoreťazovú ribonukleovú kyselinu /RNA/. Okolo RNA sú pravidelne usporiadané bielkovinové podjednotky /pozri obr. 2/. Podarilo sa oddeliť RNA od bielkovín a infikovať listy tabaku každou zložkou zvlášť. Žlté škvrny vznikli len na tých rastlinách, ktoré boli infikované RNA; bielkovina túto schopnosť nemala. Teda "ochoreli" len tie rastliny, ktoré prišli do styku s nukleovou kyselinou.

To, čo sme si uviedli a mnohé ďalšie experimenty podporované najmä zisteniami chemika Chargaffa, ktorý v rokoch 1949 - 1953 dokázal, že zastúpenie chemických zložiek v DNA je druhovo špecifické, definitívne dokázali genetickú úlohu nukleových kyselín.

Najväčšou námietkou proti genetickej funkcii nukleových kyselín bola tetranukleotidová teória /pravidelné striedanie nukleotidov pozdĺž reťazca nukleovej kyseliny/, podľa ktorej nebolo možné vysvetliť kódovanie, ani princíp genetickej informácie. Ďalej to bola úžasná jednoduchosť pokiaľ ide o chemické zloženie a malá variabilita špecifických prvkov. Ako si však nesť ukážeme, aj štyri typy nukleotidov v nukleových kyselinách /bielkoviny majú 20 typov aminokyselín/ sú schopné zabezpečiť rozmanitosť živej prírody, ktorú obdivujeme na každom kroku.

1.5 FUNKCIA NUKLEOVÝCH KYSELÍN

Aká je teda úloha nukleových kyselín v prírode?

Na základe uvedeného môžeme povedať, že nukleové kyseliny uchovávajú genetickú informáciu, sú teda jej nositeľmi. Genetická informácia je informácia obsiahnutá v nukleotidovej sekvencii.

Genetickú informáciu prenášajú nukleové kyseliny na potomstvo. Tento proces sa nazýva replikácia /zdvojenie/. Replikácia zabezpečuje presné kopírovanie molekuly DNA do dvoch nových identických molekúl DNA /pri RNA vírusoch je to RNA/.

Ďalej nukleové kyseliny prenášajú a kódujú genetickú informáciu, ktorá vyúsťuje do syntézy bielkovín. Tieto procesy nazývame transkripcia a translácia. Sprostredkuje ich najmä druhá skupina nukleových kyselín - ribonukleové kyseliny /RNA/.

Treba tu zdôrazniť, že základné princípy, podľa ktorých uvedené procesy prebiehajú sú jednotné pre všetky organizmy a zabezpečujú sa špecifickým párovaním základných zložiek nukleových kyselín, a to dusíkatých báz. O všetkých týchto procesoch bude podrobnejšie reč v ďalšom texte.

ajú
nfor-

nto
ko-

A ví-

ktorá
rans-
nukleo-

procesy
ým pá-
všet-

2. BIOMAKROMOLEKULY A BIOMOLEKULY

Týmito pojmi označujeme také skupiny chemických zlúčenín, ktoré sa nachádzajú v živých organizmoch.

V živých organizmoch sa nachádzajú tri skupiny biomakromolekúl: bielkoviny, nukleové kyseliny a cukry. Všetky sú charakteristické tým, že sa skladajú z monomerných jednotiek. Z genetického hľadiska prioritný význam majú bielkoviny a nukleové kyseliny, preto týmto dvom kategóriám biologických biomolekúl budeme v ďalšom texte venovať našu pozornosť.

Niektorí autori medzi biomakromolekuly zaraďujú aj tuky. Treba na to mieste upresniť, že tuky /lipidy/ patria medzi biomolekuly, ale nie medzi biomakromolekuly, lebo nespĺňajú kritérium uvedené vyššie.

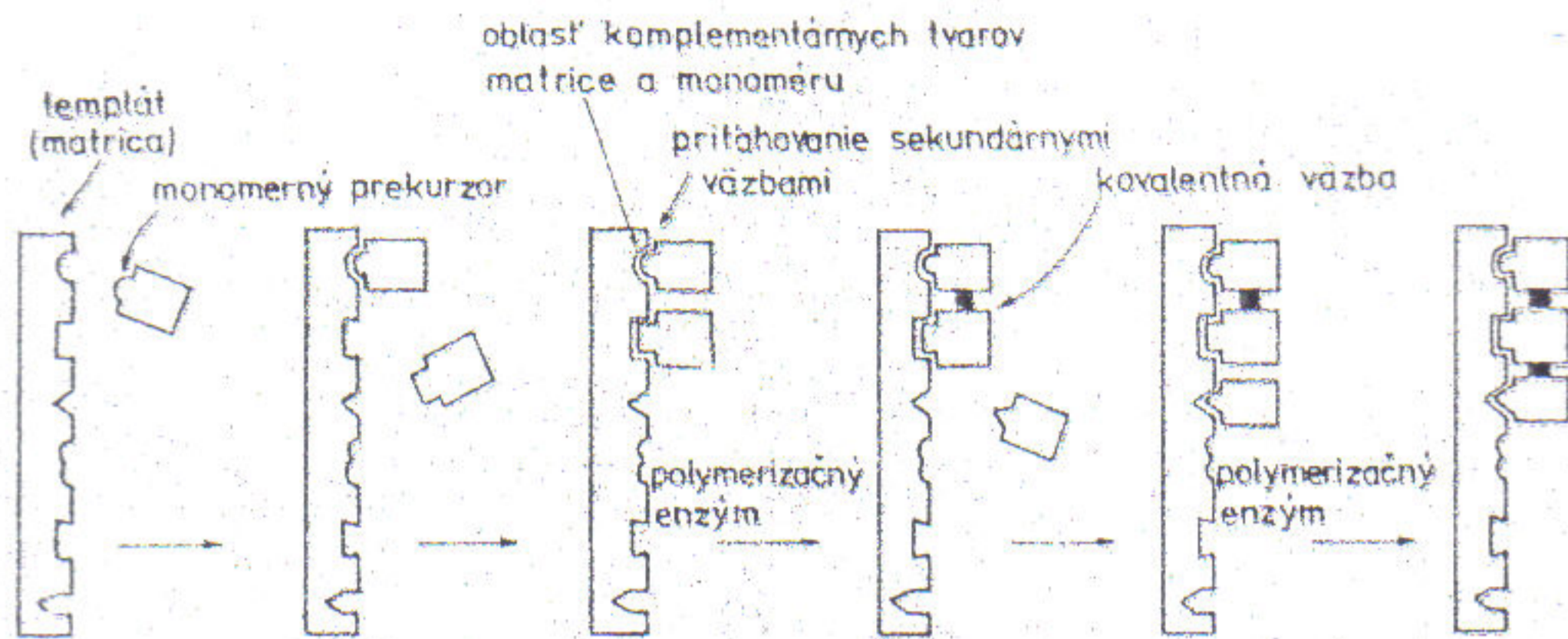
Vzhľadom k tomu, že pri všetkých procesoch odohrávajúcich sa v živých organizmoch dochádza k interakciám rôznych molekúl, biomolekúl a biomakromolekúl, poukážeme si na dôležitosť niektorých slabých väzieb v biologických systémoch.

2.1 VÝZNAM SLABÝCH VÄZIEB PRE BIOMAKROMOLEKULY

Usporiadanie jednotlivých molekúl v živých bunkách regulujú chemické väzby, ktoré sú oveľa slabšie ako väzby kovalentné. Atómy spojené kovalentnými väzbami sú schopné len minimálne reagovať s blízkymi atómami /kovalentná = silná väzba/. Slabé väzby sú dôležité nielen pre určovanie susedstva molekúl, ale tiež pri formovaní flexibilných molekúl akými sú bielkoviny a nukleové kyseliny. Medzi najdôležitejšie slabé väzby patrí: iónová väzba; Vander Waalove sily a vodíková väzba.

2.1.1 IÓNOVÁ VÄZBA

Ako iónovú väzbu označujeme priamu interakciu kladne nabitého iónu /katiónu/ so záporne nabitým iónom /aniónom/. Ako katióny najčastejšie vystupujú kovové prvky. Klasickým príkladom je molekula kuchynskej soli NaCl.



Obr. 8 Schematické znázornenie tvorby polymérnych molekúl na povrchu templátu /matrice/

Uvedené väzby sa uplatňujú medzi purínovými a pyrimidínovými bázami v nukleových kyselinách, ako aj medzi peptidovými skupinami v bielkovinách /C = O NH/.

Stručne môžeme zhrnúť, že vodíkové väzby sú slabé väzby, ktoré vznikajú medzi dvoma elektronegatívnymi prvkami, keď na jednom z nich je naviazaný vodík /elektronozitívny prvok/. Uplatňujú sa v informačných molekulách: bielkovinách a nukleových kyselinách. Pre biologickú funkciu nukleových kyselín je vznik týchto väzieb rozhodujúci a určuje ich flexibilitu.

Na význam slabých väzieb možno poukázať aj pri väzbe bielkovín vo funkcii enzýmov k substrátom. Základom špecifickej interakcie enzýmu so substrátom je jedna až niekoľko sekundárnych /t.j. slabých/ väzieb. Komplexy enzým - substrát sa rýchle tvoria aj rýchle rozpadajú. Keby sa enzýmy viazali k substrátom pevnejšími väzbami, ich účinok by bol oveľa pomalší. Toto nám vysvetľuje skutočnosť, prečo môžu enzýmy pracovať tak rýchle.

3. BIELKOVINY

Mimoriadny význam bielkovín pre všetky živé organizmy viedol ešte r.1838 Holanďana Muldera k myšlienke zaviesť pre bielkoviny medzinárodný názov proteiny /z gréckeho protos = prvý, primárny/.

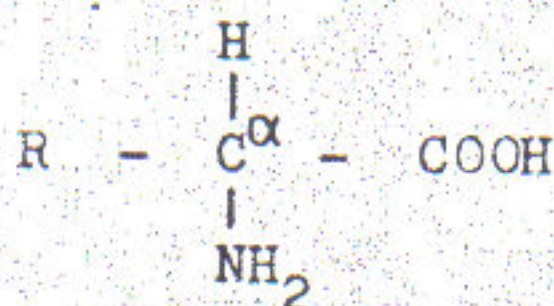
Všeobecnou charakteristikou bielkovín je, že sú to polyméry, ktoré sa skladajú z aminokyselín. Aminokyseliny sú teda základnými stavebnými jednotkami bielkovín.

3.1 AMINOKYSELINY

Ako je všeobecne známe, aminokyseliny sú organické kyseliny, ktoré okrem karboxylovej skupiny /-COOH/ majú ešte amino-skupinu /-NH₂/.

Obe sú spravidla viazané na ten istý uhlík, ktorý sa označuje ako α. Pretože C je štvorväzný, na tretiu valenciu sa obyčajne viaže H a na štvrtú valenciu zbytok molekuly /R = residuum/. Týmto R sa jednotlivé aminokyseliny od seba líšia.

Všeobecný vzorec aminokyselín píšeme takto:



Podľa priestorového usporiadania substituentov okolo asymetrického uhlíka /má 4 rôzne substituenty/ rozoznávame pri každej aminokyseline dve konfigurácie D a L. Je zaujímavé, že v prírode sa nachádzajú väčšinou L-formy a s minimálnymi výnimkami sú to α - aminokyseliny.

V prírode je známych asi 80 aminokyselín. Z nich malá skupina - 20 aminokyselín sa nachádza v bielkovinách a nazývame ich štandardné, alebo proteínogénne. V bielkovinách sa vyskytuje týchto 20 aminokyselín. Uvedieme si najprv triviálny názov, potom trojpísmenový medzinárodný symbol a napokon jednopísmenový kód /podľa IUPAC/.

Tabuľka 1.: Tabuľka štandardných /proteínogénnych/ aminokyselín

Triviálny názov	Symbol	Kód
1. Alanín	Ala	A
2. Arginín	Arg	R
3. Asparagín	Asn	B
4. Cysteín	Cys	C
5. Fenylalanín	Phe	F
6. Glutamín	Gln	Q
7. Glycín	Gly	G
8. Histidín	His	H
9. Izoleucín	Ile	I
10. Kyselina asparágová	Asp	D
11. Kyselina glutamová	Glu	E
12. Leucín	Leu	L
13. Lyzín	Lys	K
14. Metionín	Met	M
15. Prolín	Pro	P
16. Serín	Ser	S
17. Treonín	Thr	T
18. Tryptofan	Trp	W
19. Tyrozín	Tyr	Y
20. Valín	Val	V
Akákoľvek aminokyselina	X	X

Rozdelenie podľa vlastností uvádzame v tabuľke 2.

Tabuľka 2.: Základné rozdelenie štandardných /proteínogénnych/ aminokyselín

Typ aminokyseliny	Názov	Symbol
neutrálne aminokyseliny	glycín	Gly
	alanín	Ala
	valín	Val
	leucín	Leu
	izoleucín	Ile
	serín	Ser
	treonín	Thr
kyslé aminokyseliny	kyselina asparágová	Asp
	kyselina glutamová	Glu
amidy aminokyselín	asparagín	Asn
	glutamín	Gln



Pokračovanie tabuľky 2.

zásadité aminokyseliny	histidín arginín lyzín	His Arg Lys
aromatické aminokyseliny	fenylalanín tyrozín tryptofán	Phe Tyr Trp
sírne aminokyseliny	cysteín metionín	Cys Met
heterocyklické aminokyseliny	prolín	Pro

Ostatných asi 60 aminokyselín v bielkovinách zistených nebolo a vyskytujú sa buď voľne v organizme, alebo ako súčasť iných molekúl /napr. antibiotík/.

3.2 PEPTIDY

V bielkovinách sú aminokyseliny spojené tak, že karboxylová skupina jednej aminokyseliny reaguje s aminoskupinou druhej aminokyseliny za vzniku dipeptidu. Väzba medzi dvomi aminokyselinami, ktorá vznikla vyštípením vody sa nazýva peptidová /CO - NH/. Je to kovalentná, relatívne pevná väzba, stála voči oxidácii i redukcii, ale ľahko sa štiepi hydrolyticky.

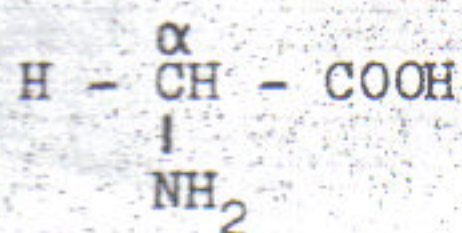
Spojením 3 aminokyselín vzniká tripeptid atď. Do hodnoty spojených 10 aminokyselinových zbytkov hovoríme o oligopeptidoch, nad 10 sú polypeptidy. Každý polypeptidový reťazec je charakteristický tým, že pozostáva z lineárne usporiadaných aminokyselinových zvyškov, ktorý sa začína NH₂-skupinou /N-terminálna aminokyselina/ a končí COOH skupinou /C-terminálna aminokyselina/. Stručne hovoríme o N-konci a C-konci peptidového reťazca. Zápis pomocou troj- písmenových symbolov má vždy smer od N- k C-koncu:

Tyr - Val - His - Leu - Ala - atď.

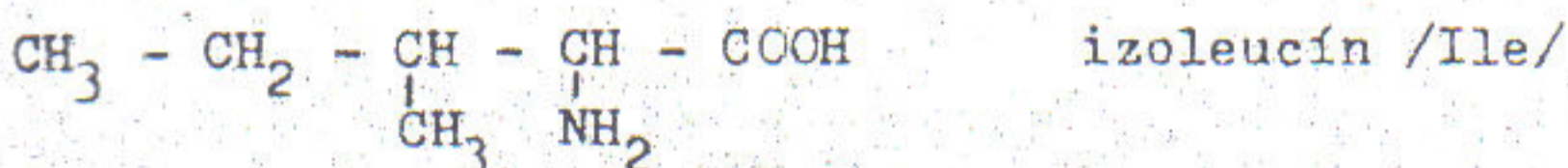
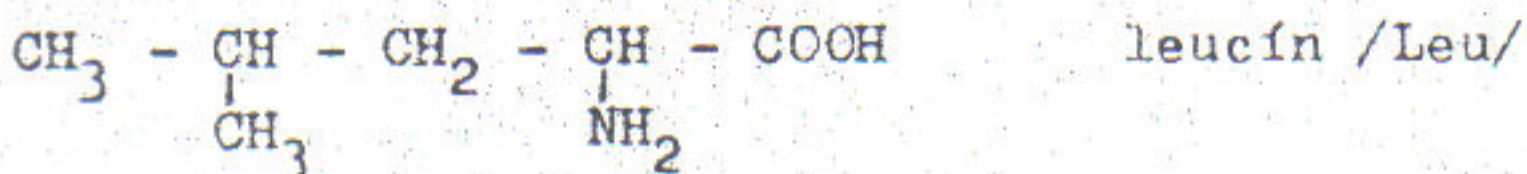
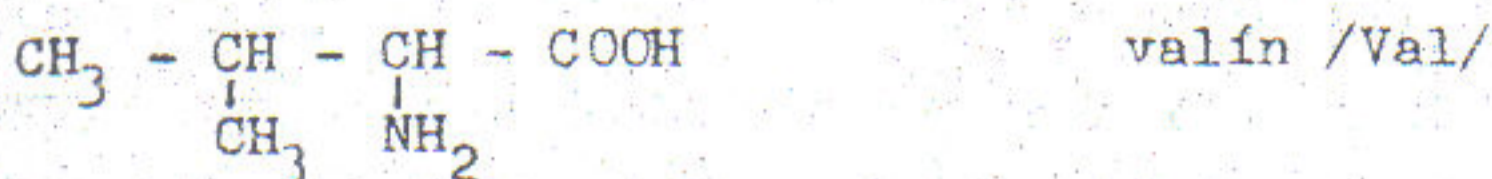
N - koniec

C - koniec

Neutrálne aminokyseliny



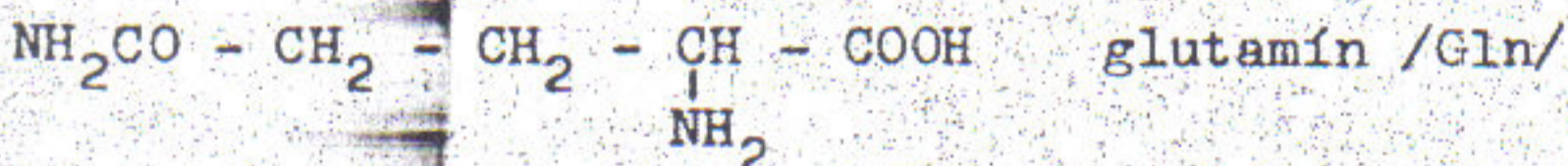
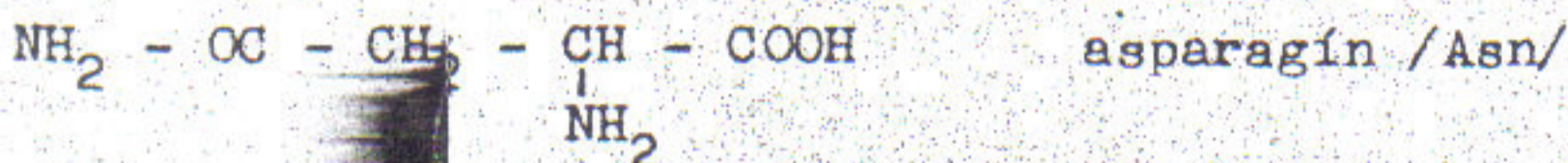
glycín /Gly/



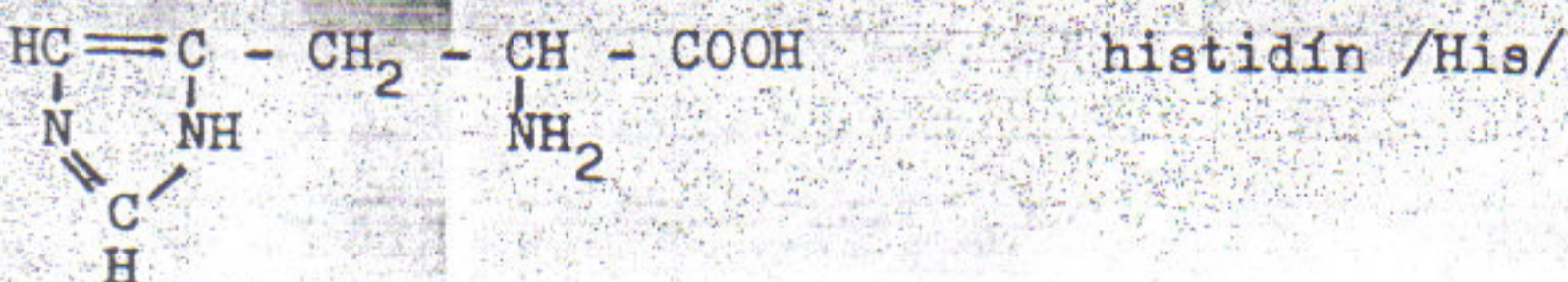
Kyslé aminokyseliny



Amidy aminokyselín



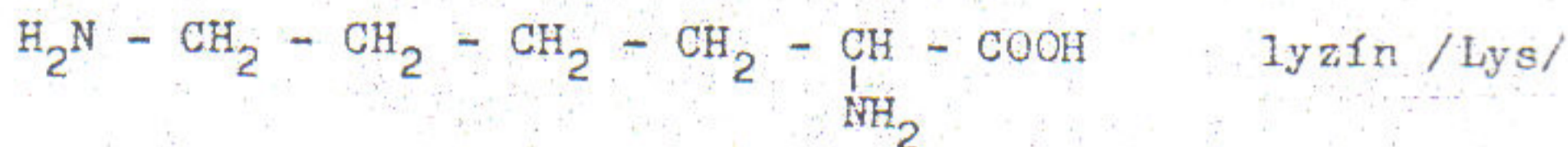
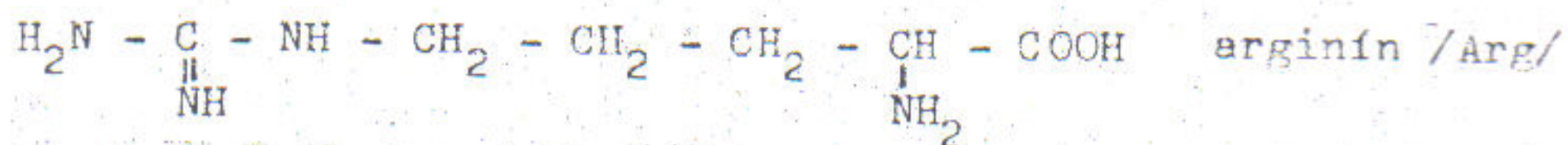
Zásadité aminokyseliny



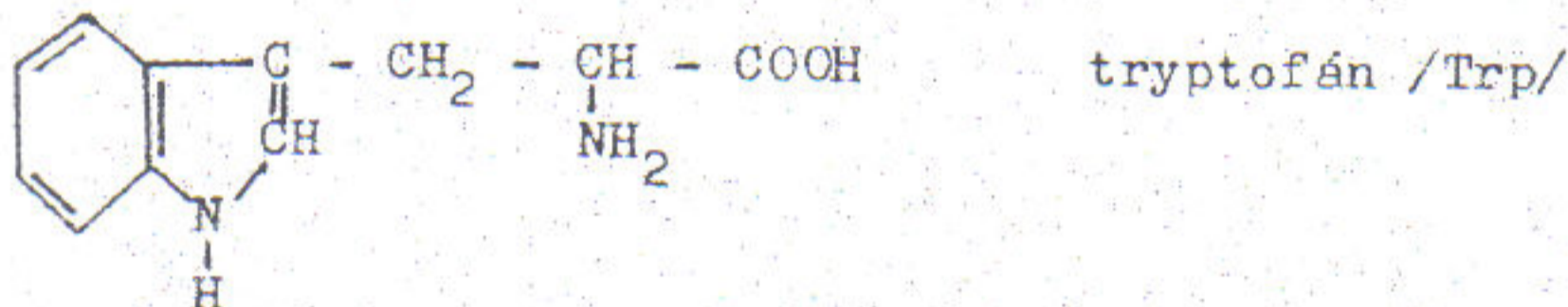
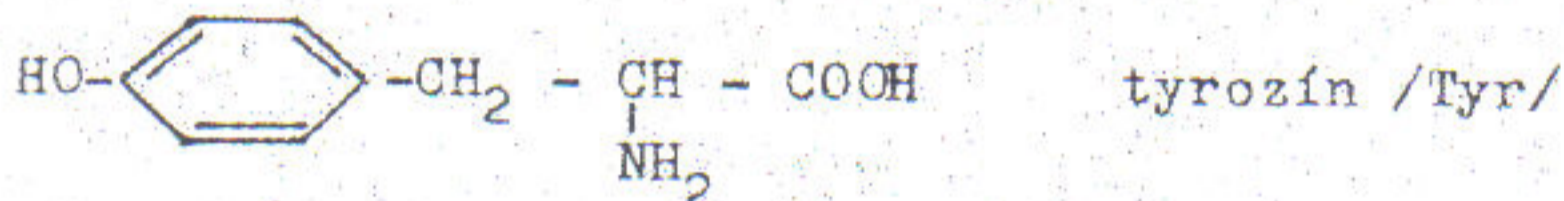
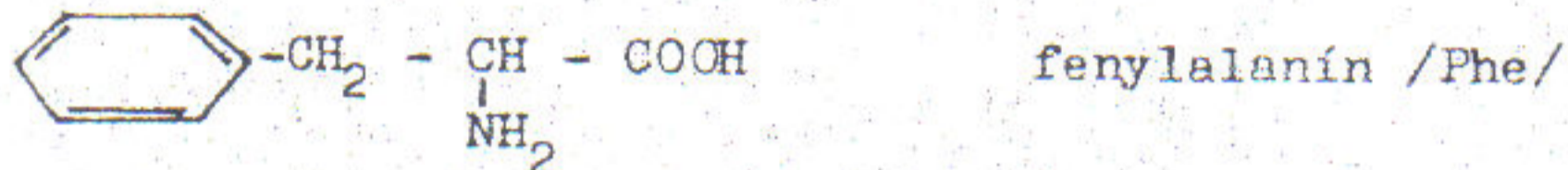
ysky-
nti-

na jed-
iku di-
vody
, stá-

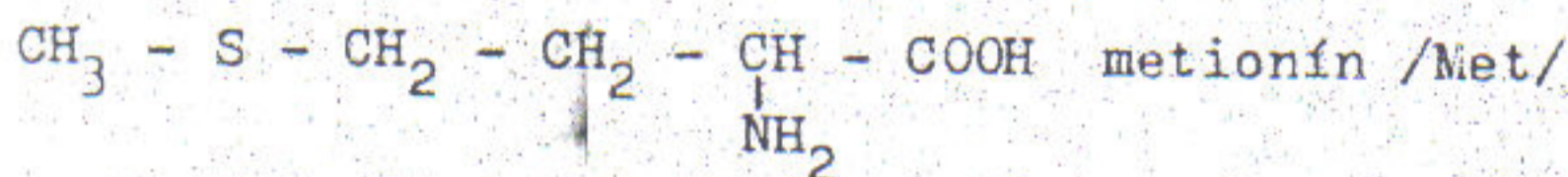
h 10
tidy.
neárne
/N-ter-
na/.
u troj-



Aromatické aminokyseliny



Sírne aminokyseliny



Heterocyklické aminokyseliny



3.3 POLYPEPTIDY /BIELKOVINY/

3.3.1 CHARAKTERISTIKA BIELKOVÍN

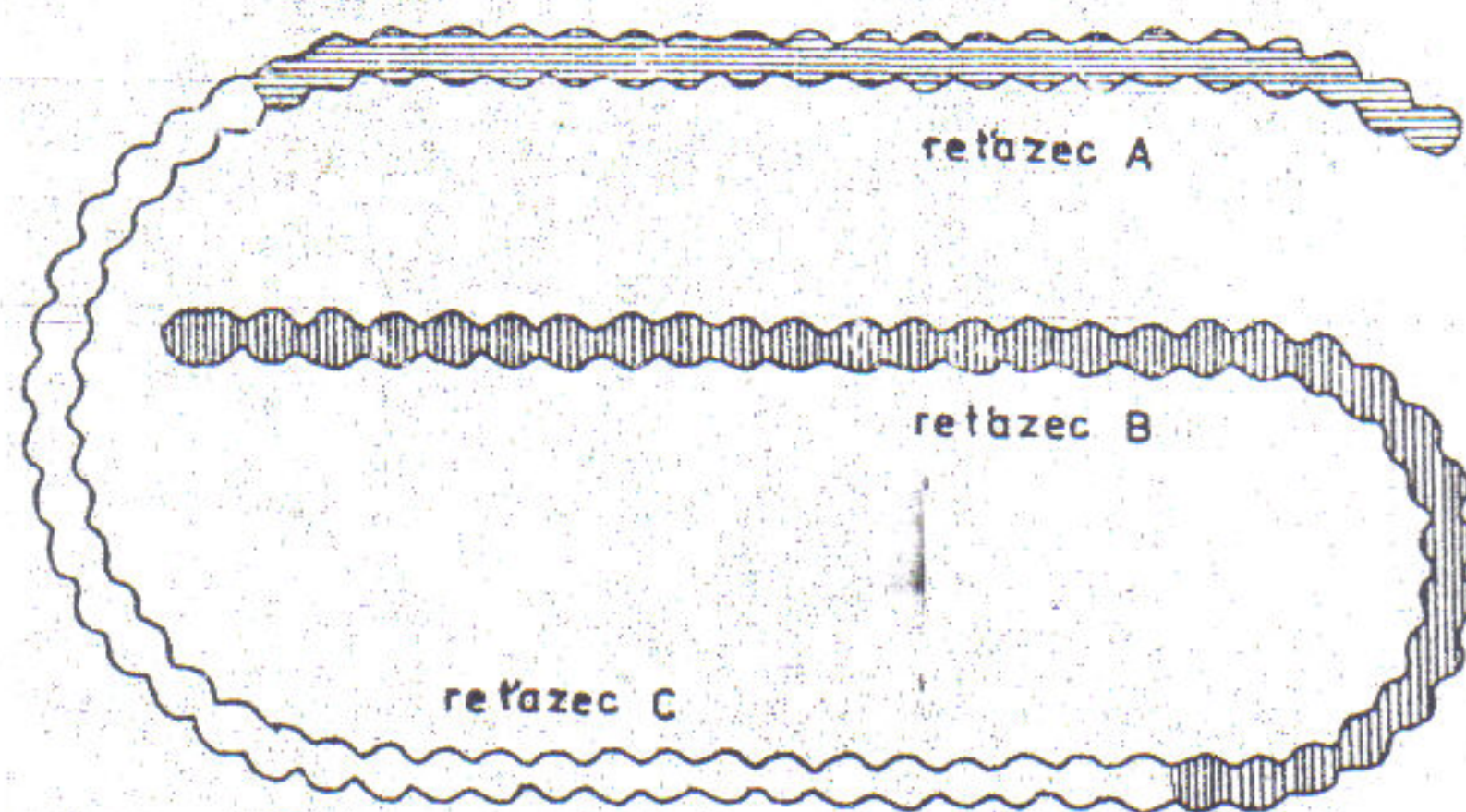
Bielkoviny sa skladajú z jedného alebo viacerých polypeptidových reťazcov. Jednotlivé reťazce obsahujú čo do počtu desiatky a niekedy stovky amin

kyselín dvadsať rôznych typov. Z toho vyplýva, že niektoré aminokyseliny sa budú v reťazci opakovať a niektoré môžu chýbať. Molekuly polypeptidov sú spravidla veľké a preto ich nazývame makromolekuly.

Aminokyseliny nie sú usporiadané v molekule bielkoviny náhodne, ale prísne špecificky /v závislosti od poradia nukleotidov v DNA/. To znamená, že každý druh bielkovín má svoje presné poradie aminokyselín v polypeptidickom reťazci a týmto poradím sa líši od iného druhu bielkovín.

3.3.2 ŠTRUKTÚRA BIELKOVÍN

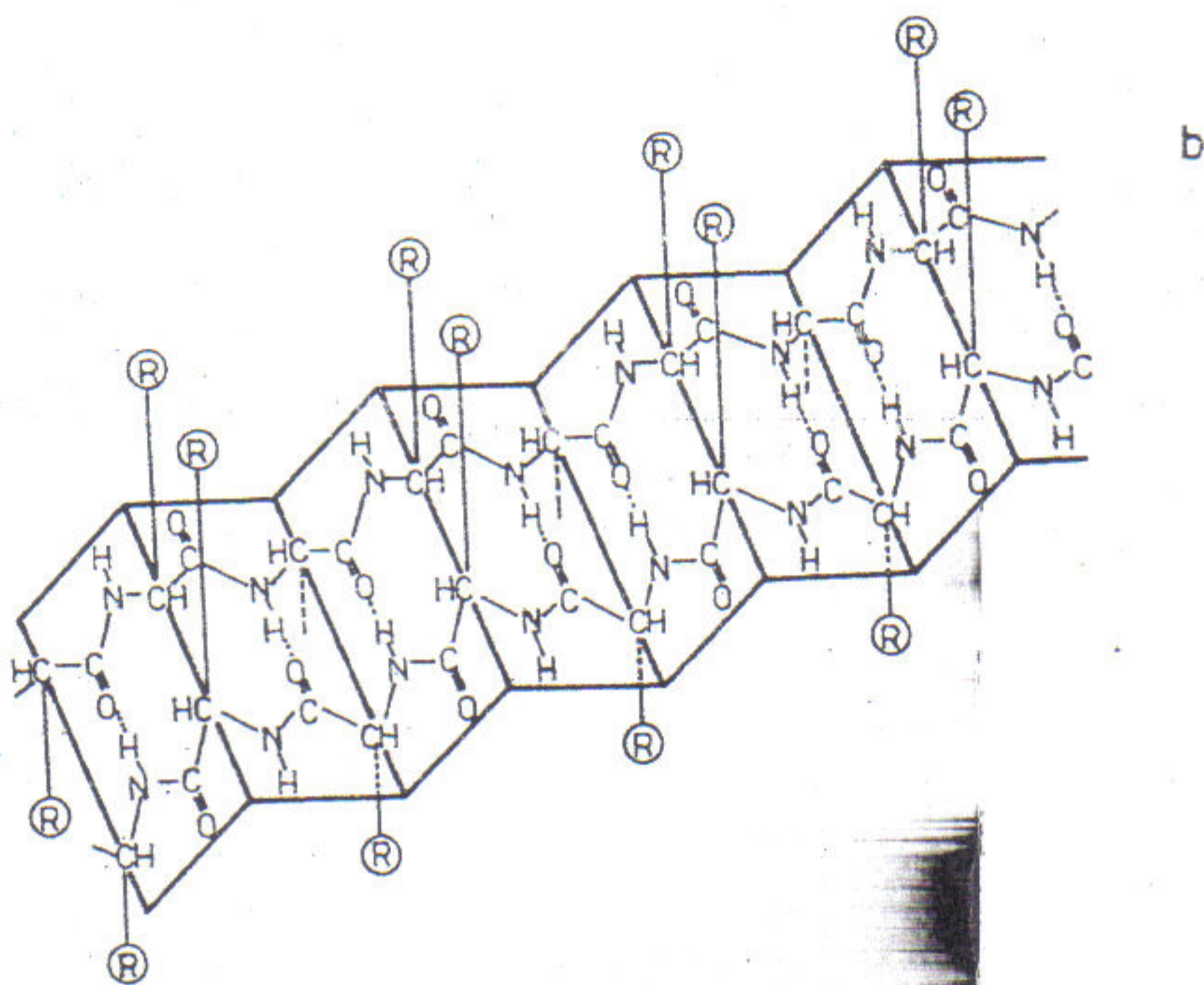
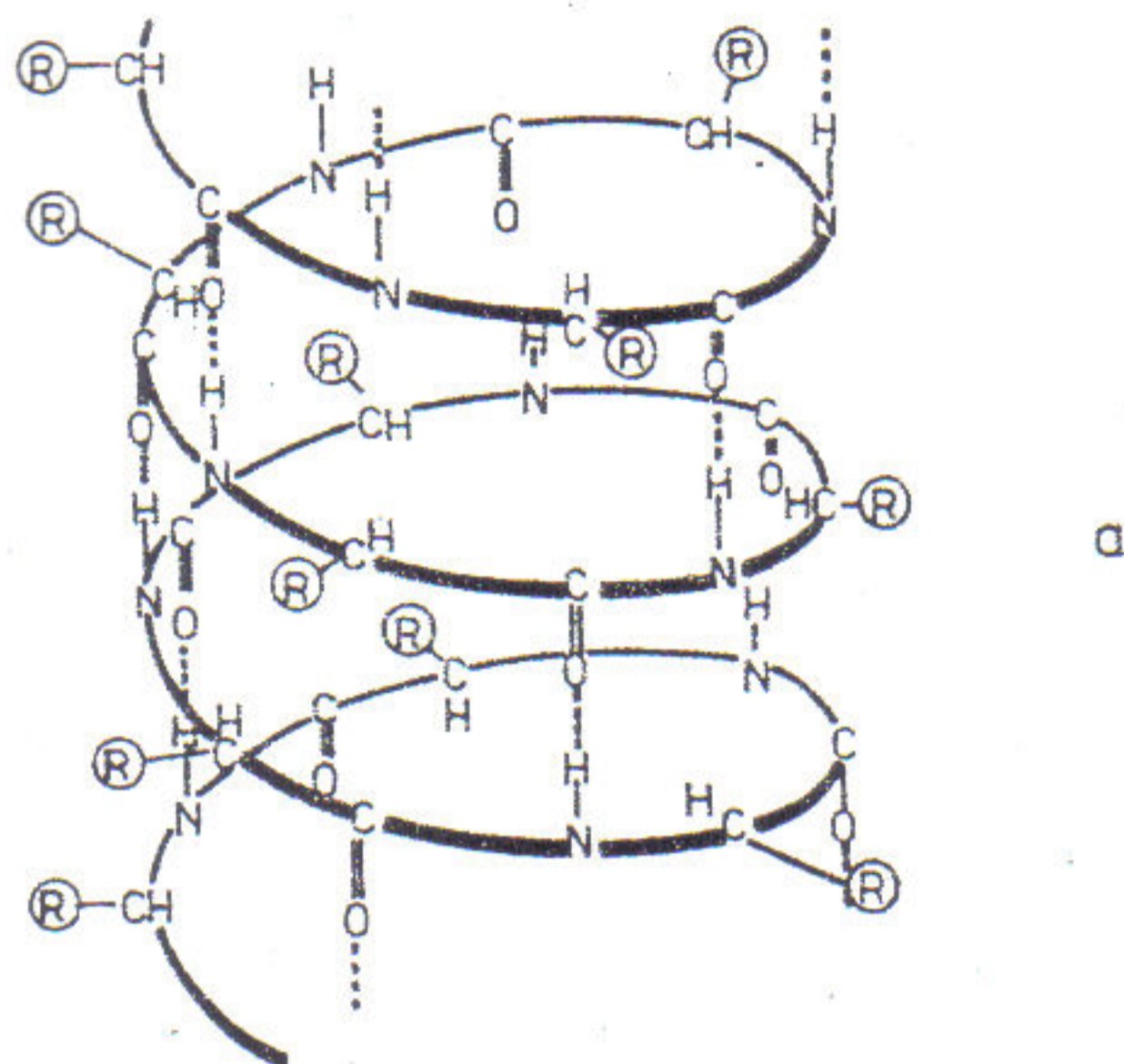
Špecifickosť bielkovín určuje poradie aminokyselín v reťazci. Usporiadanie /sekvencia/ aminokyselinových zvyškov sa označuje ako primárna štruktúra bielkoviny. Fochopiteľne, že aj vyššie typy štruktúr sú závislé na primárnej štruktúre. Prvá úplná sekvencia aminokyselín v bielkovine bola stanovená až r. 1953. Bol to hormón inzulín, ktorého molekula je pomerne malá - obsahuje 51 aminokyselín /A reťazec má 21 a B reťazec 30/ - obr. 9.



Obr. 9 Schéma bielkovinovej molekuly /inzulínu/

Primárnou štruktúrou však zložitosť bielkovinovej molekuly nekončí. Ak poznáme poradie aminokyselín v polypeptidovom reťazci, neznamená to, že poznáme štruktúru molekuly bielkoviny. Polypeptidové reťazce majú totiž okrem poradia aminokyselín aj určité priestorové geometrické usporiadanie, ktorým sa môžu jednotlivé molekuly líšiť. Toto pravidelné geometrické usporiadanie polypeptidického reťazca sa nazýva sekundárna štruktúra. Podieľajú sa na nej okrem iných väzieb aj vodíkové väzby. Buď v rámci jedného polypeptidu - takto sa vytvára α - skrutkovnica / α - helix/, alebo medzi viacerými molekulami polypeptidov, a to je štruktúra, ktorá sa nazýva skladaný list /obr. 10/.

reťaz-
cy amino-



Obr. 10 Sekundárna štruktúra bielkovín: a/ alfa-helix; b/ skladaný list

Terciárna štruktúra sa vytvára tým, že polypeptidový reťazec zaujíma energeticky najvýhodnejšiu konfiguráciu. Vytvára priestorovú štruktúru, na ktorej sa okrem iných typov väzieb podieľajú najmä disulfidové väzby medzi zbytkami cysteínov. Disulfidová väzba je stabilná voči hydrolýze, ale ľahko sa štiepi oxidáciou, resp. redukciou.

Na terciárnej štruktúre sa podieľajú R zvyšky aminokyselín, medzi ktorými môže dôjsť k rôznym interakciám.

Kvartérnu štruktúru majú len bielkoviny, ktoré sa skladajú z viac ako jedného reťazca. Obyčajne ide o usporiadanie monomerných jednotiek /domén = = protomér/ do pravidelného útvaru na základe stereošpecificity ich povrchov a troch typov slabých väzieb resp. interakcií /obr. 12/. Na tejto štruktúre sa podieľajú len slabé väzby, prípadne sú tieto zložité útvary spevňované malými molekulami, ktoré obsahujú kovy /hemoglobín - železo, chlorofyl - horčík a pod./.

Pri tvorbe bielkovinových štruktúr vyššieho rádu /obr. 11/ sa uplatňujú veľmi často vodíkové väzby. A hoci sila tejto väzby predstavuje len asi dvadstatinu sily kovalentnej väzby zohráva nahromadenie vodíkových väzieb podstatnú úlohu pri tvorbe konformácie bielkoviny. Pre biologickú funkciu bielkovín je rozhodujúca ich terciárna a kvartérna štruktúra.



α -helix

Sekundárna štruktúra



zväzky α -helixu



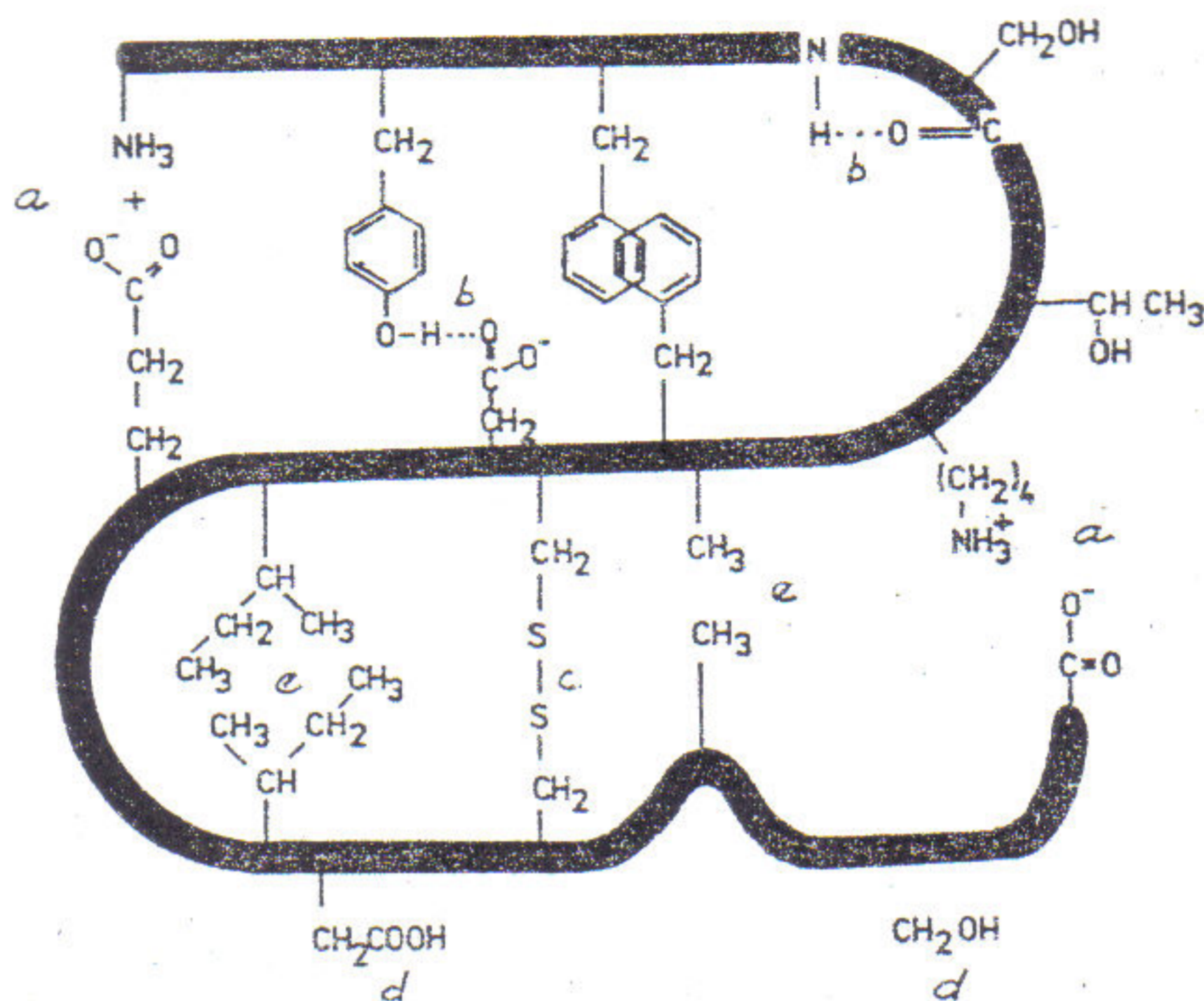
Terciárna štruktúra jednoduchého polypeptidového reťazca



Kvartérna štruktúra viacreťazcovej oligomernej bielkoviny

Obr. 11 Schematické znázornenie α -helixu bielkovinového reťazca; terciárna a kvartérna štruktúra bielkoviny

list
jima e-
, na kto-
zi zby-
ko sa
i ktorý-



Obr. 12 Vázby, ktoré sa uplatňujú pri stabilizácii štruktúry bielkovinového reťazca: a/ iónová väzba, b/ vodíkové väzby, c/ disulfidová väzba, d/ interakcia polárnych skupín, e/ hydrofóbná interakcia

Celkove sa na tvorbe polypeptidového reťazca podieľajú väzby znázornené na obr. 12.

3.3.3 FUNKCIA BIELKOVÍN

Bielkoviny majú /okrem iných/ dve významné biologické funkcie:

- **stavbnú** - tvoria štruktúru bunkových organel /ribozómy, mitochondrie a i./
- **enzymatickú**. Touto enzymatickou aktivitou plnia bielkoviny katalytickú funkciu.

Vidíme, že bielkoviny v dôsledku rozmanitosti štruktúry, ktorú zabezpečuje kombinácia rôznych aminokyselín sú schopné vykonávať mnohostranné funkcie napr. sprostredkovanie reakcií, ich postupnosť, iniciáciu reakcií a ich usmernenie. Bielkoviny sú nositelia biologickej špecifickosti. Zvláštna schopnosť bielkovín spočíva v tom, že vedia rozoznávať molekuly podľa ich formy /molekulárnej štruktúry/ podľa ich stereošpecificity. Táto schopnosť vysvetľuje špecifickosť ich pôsobenia pri katalytickej funkcii, ktorú uskutočňujú ako bielkovinové enzýmy.

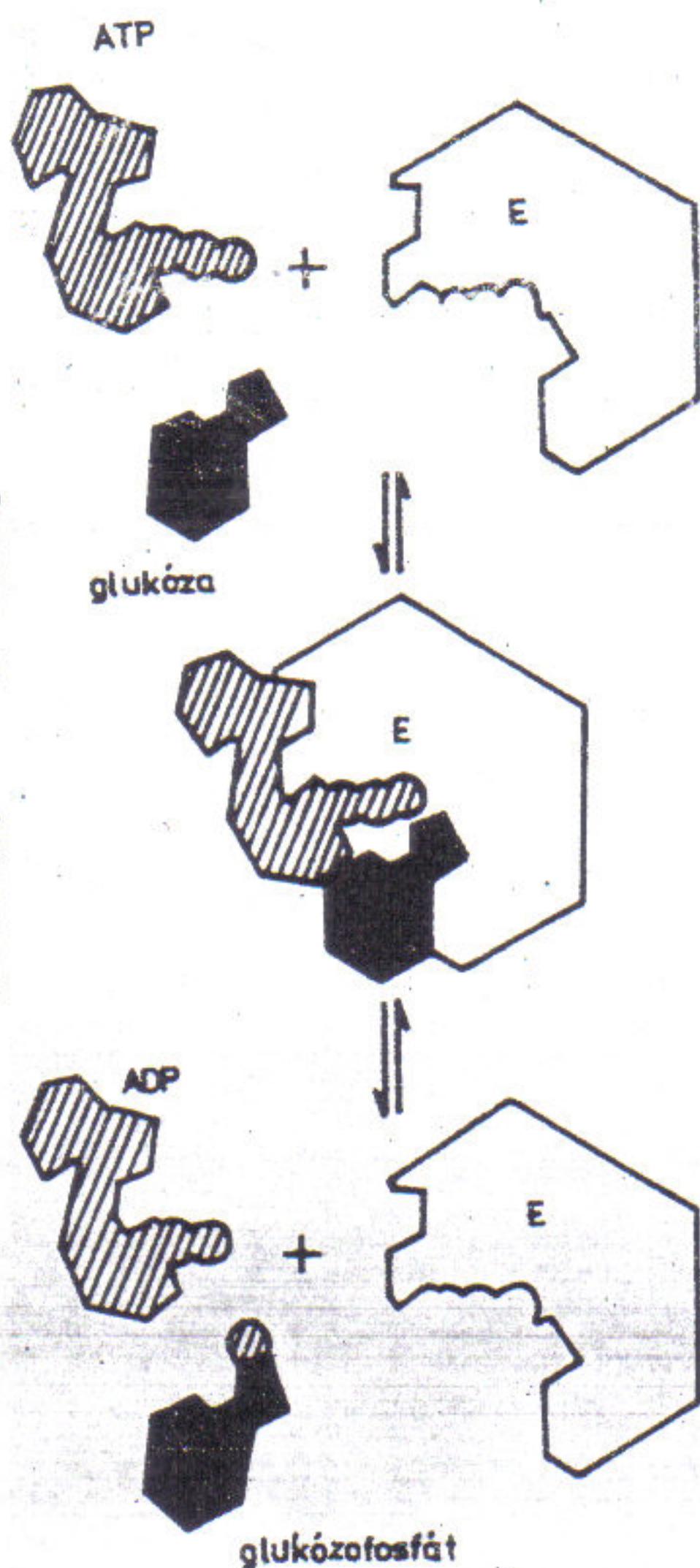
Dá sa vlastne povedať, že bielkoviny sú schopné plniť v organizme akúkoľvek úlohu s výnimkou uchovávanía a prenosu informácie. Pre tento cieľ sú špecializované nukleové kyseliny.

3.3.3.1 Katalytická funkcia bielkovín

Vyčíslit' stavebnú funkciu bielkovín by presahovalo rámec týchto skrípt, preto sa v stručnosti dotkneme aspoň katalytickej funkcie, ktorú plnia bielkoviny vo forme enzýmov.

Každý enzým má na svojej molekule oblasť, kde sa navádzajú reagujúce zložky. Je to tzv. aktívne centrum enzýmu. Reagujúce látky sú vždy postavené v príslušných priestorových vzťahoch. Priblíženie molekúl, ktoré majú spolu reagovať zabezpečuje aktívne centrum enzýmu.

Enzým tvorí často molekulu pozostávajúcu z dvoch zložiek: koenzýmu a apoenzýmu, ktoré spolu dávajú celý enzým nazývaný holoenzým /kompletný enzým/. Koenzým býva nebielkovinovej povahy, napr. nukleotid, ktorý sa dá ľahko oddeliť od bielkovinovej zložky. Jeden typ koenzýmu môže byť súčasťou niekoľkých typov enzýmov. Koenzýmy najčastejšie prenášajú nejaké skupiny /napr. fosfátovú skupinu/ alebo vodík.



Obr. 13 Schéma katalytického účinku enzýmu

ne-

a i./

ezpe-
funk-
ich
schop-
rmy
svet-
ňujú

akú-
T sú

Enzymy tvoria s reagujúcimi zložkami prechodný enzým - substrátový komplex, katalyzujú reakciu a vystupujú z nej v nezmenenej podobe schopné zúčastniť sa na ďalšej reakcii.



Sú enzýmy, ktoré katalyzujú reakcie úzkeho okruhu alebo dokonca len jednej zlúčeniny. V poslednom prípade hovoríme o substrát-špecifickom enzýme. Na druhej strane existujú aj málo špecifické enzýmy, ktoré katalyzujú skupiny podobných substrátov /napr. dehydrogenázy, proteázy/.

Ako príklad katalytickej funkcie enzýmov si uvedieme fosforyláciu glukózy a jej premenu na glukózo-fosfát. Enzým /E/ má dve katalytické centrá /jedno pre adenzín-trifosfát a druhé pre glukózu/. Vhodné vzájomné postavenie substrátov na enzýme umožní priebeh reakcie s malou potrebou aktivačnej energie. Po naviazaní fosfátovej skupiny na glukózu /glukózofosfát/ sa produkty reakcie uvoľnia z enzýmu a tento je schopný viazať ďalšie molekuly. Na obr. 13 je znázornená len malá časť enzýmu v okolí aktívneho centra. V skutočnosti sú enzýmy vo vzťahu k substrátom veľké molekuly, takže reálny pomer tu nie je možné uviesť.

4. NUKLEOVÉ KYSELINY

Nukleové kyseliny patria k tým biomakromolekulám, ktoré majú kľúčové postavenie medzi základnými stavebnými zložkami živej bunky. Obsahujú genetickú informáciu a sú široko "zainteresované" na mechanizmoch, ktoré túto informáciu prenášajú.

4.1 CHEMICKÉ ZLOŽENIE NUKLEOVÝCH KYSELÍN

4.1.1 ZÁKLADNÉ STAVEBNÉ KAMENE DNA A RNA

Nukleové kyseliny sú väčšinou vysokomolekulové zlúčeniny, ktoré sa skladajú z monomerných jednotiek - nukleotidov. Hydrolyzou sa štiepia na organické zásady /dusíkaté bázy/, cukornú zložku /pentózu/ a kyselinu fosforečnú. Podľa typu pentózy rozoznávame dve skupiny nukleových kyselín: deoxyribonukleové kyseliny /symbol DNA/ obsahujú 2-deoxy-D-ribózu a ribonukleové kyseliny /symbol RNA/ obsahujú D-ribózu.

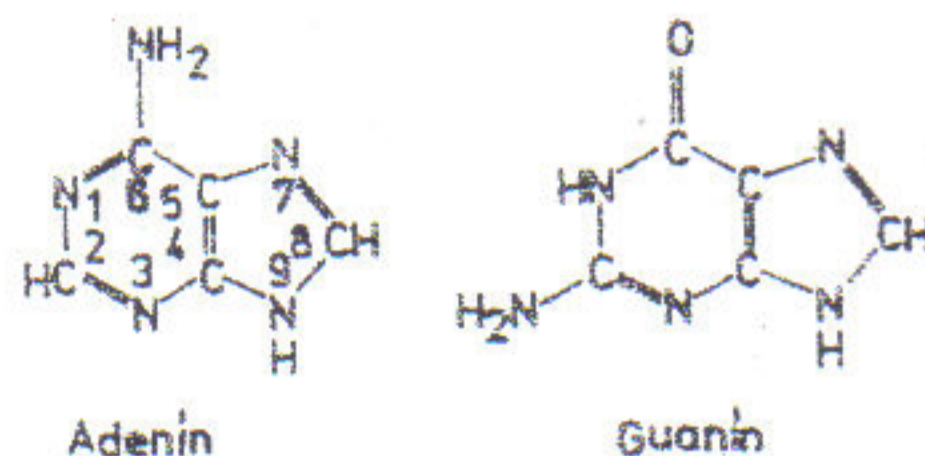
DNA sa skladá z deoxyribonukleotidov, ktoré sa líšia len zastúpením dusíkatých báz, to znamená, že deoxyribonukleotid sa skladá zo zvyšku kyseliny fosforečnej, pentózy deoxyribózy a jednej zo štyroch dusíkatých báz purínového alebo pyrimidínového typu. V DNA sa nachádzajú tieto purínové bázy: adenín /Ade/ a guanín /Gua/. Z pyrimidínových báz sú to: tymín /Thy/ a cytozín /Cyt/.

Stavebnými jednotkami RNA sú štyri typy ribonukleotidov. Ribonukleotid sa skladá obdobne zo zvyšku kyseliny fosforečnej, ďalej obsahuje pentózu ribózu a jednu zo štyroch dusíkatých báz adenín, guanín, cytozín a miesto tymínu má pyrimidínovú bázu uracil /Ura/.

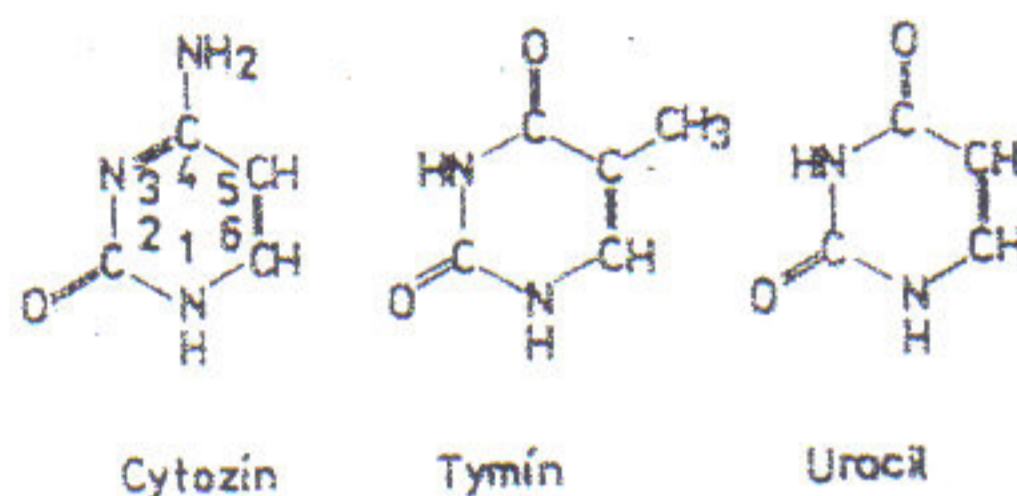
V zátvorkách uvádzame medzinárodné trojpísmenové symboly, ale treba poznamenať, že v literatúre sa často používajú jednopísmenové symboly, ktoré označujú dusíkaté bázy a niekedy i celé nukleotidy, teda zápis je potom nasledovný: adenín /A/, guanín /G/, tymín /T/, cytozín /C/ a uracil /U/. Naj-

novšia nomenklatura odporúča používať trojpísmenové symboly pre bázy a jednopísmenové pre nukleotidy v sekvenciách. Základné stavebné kamene nukleových kyselín sú na obr. 14.

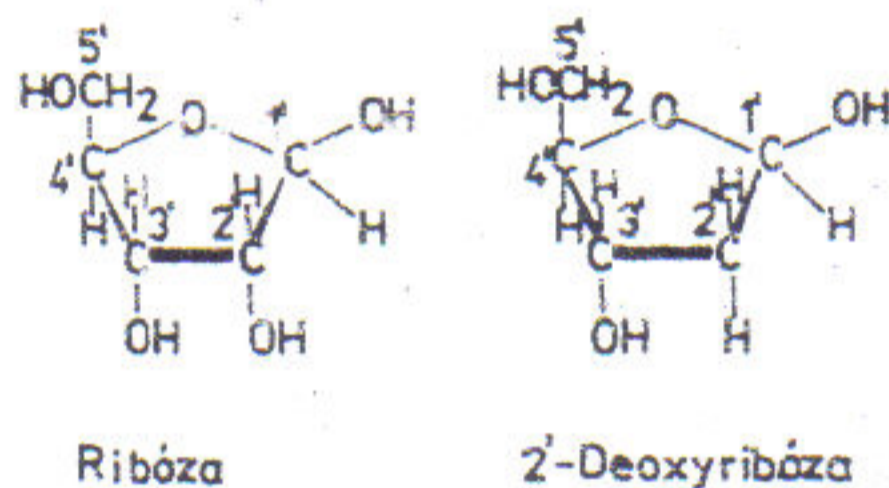
PURÍNY



PYRIMIDÍNY



CUKRY



Obr. 14 Základné stavebné prvky nukleových kyselín

4.1.2 NUKLEOZIDY A NUKLEOTIDY

Väzba medzi zložkami oboch typov nukleových kyselín je rovnaká: dusíkatá báza sa viaže na C-1 atóm pentózy a vytvára nukleozid. Nukleozid teda vzniká spojením bázy a cukru. Väzba sa uskutočňuje z dusíka N-9 purínu alebo N-1 pyrimidínu na C-1 ribózy alebo deoxyribózy. Túto väzbu C-N nazývame N-glykozidickou a pretože sú skupiny OH a H v cukre v polohe β , je táto väzba β -N-glykozidická.

Nukleozidy majú triviálne názvy.

deoxynukleozidy:

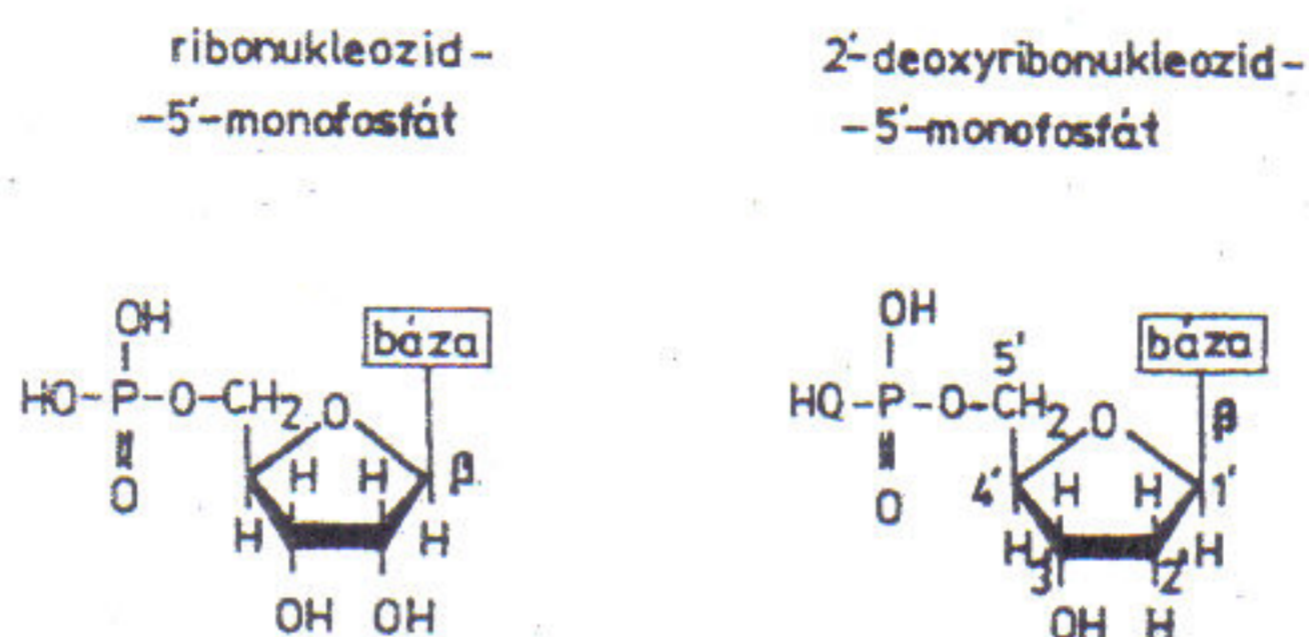
- deoxyadenozín
- deoxyguanozín
- deoxycytidín
- deoxytymidín

ribonukleozidy:

- adenozín
- guanozín
- cytidín
- uridín

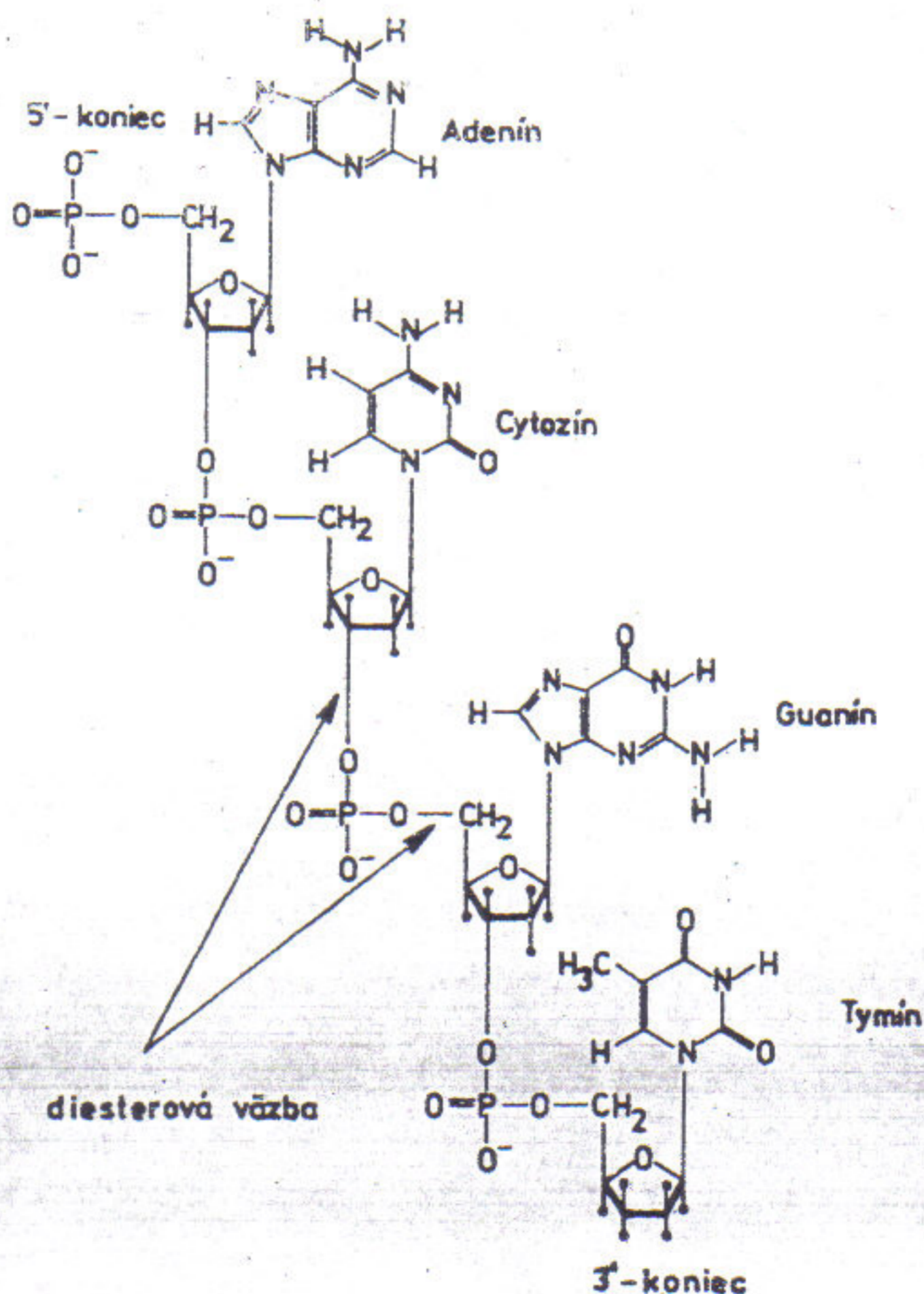
a jed-
kleo-

Nukleozidy v molekule nukleovej kyseliny sú spojené s molekulou kyseliny fosforečnej a vytvárajú **nukleotidy**. Nukleotid je vlastne nukleozid-monofosfát /alebo fosfátový ester nukleozidu/. Štruktúra deoxyribonukleotidu a ribonukleotidu je na obr. 15.



Obr. 15 Štruktúra deoxyribonukleotidu a ribonukleotidu

Nukleozidy v molekule nukleovej kyseliny sú spojené zvyškami kyseliny fosforečnej, ktoré vytvárajú fosfátové mosty. Nukleové kyseliny sú vlastne polynukleotidy. Vázba, ktorá sa pri tomto spojení uplatňuje, sa nazýva fos-



Obr. 16 Časť polynukleotidového reťazca

ika-
Nukleozid
purínu
nazýva-
e táto

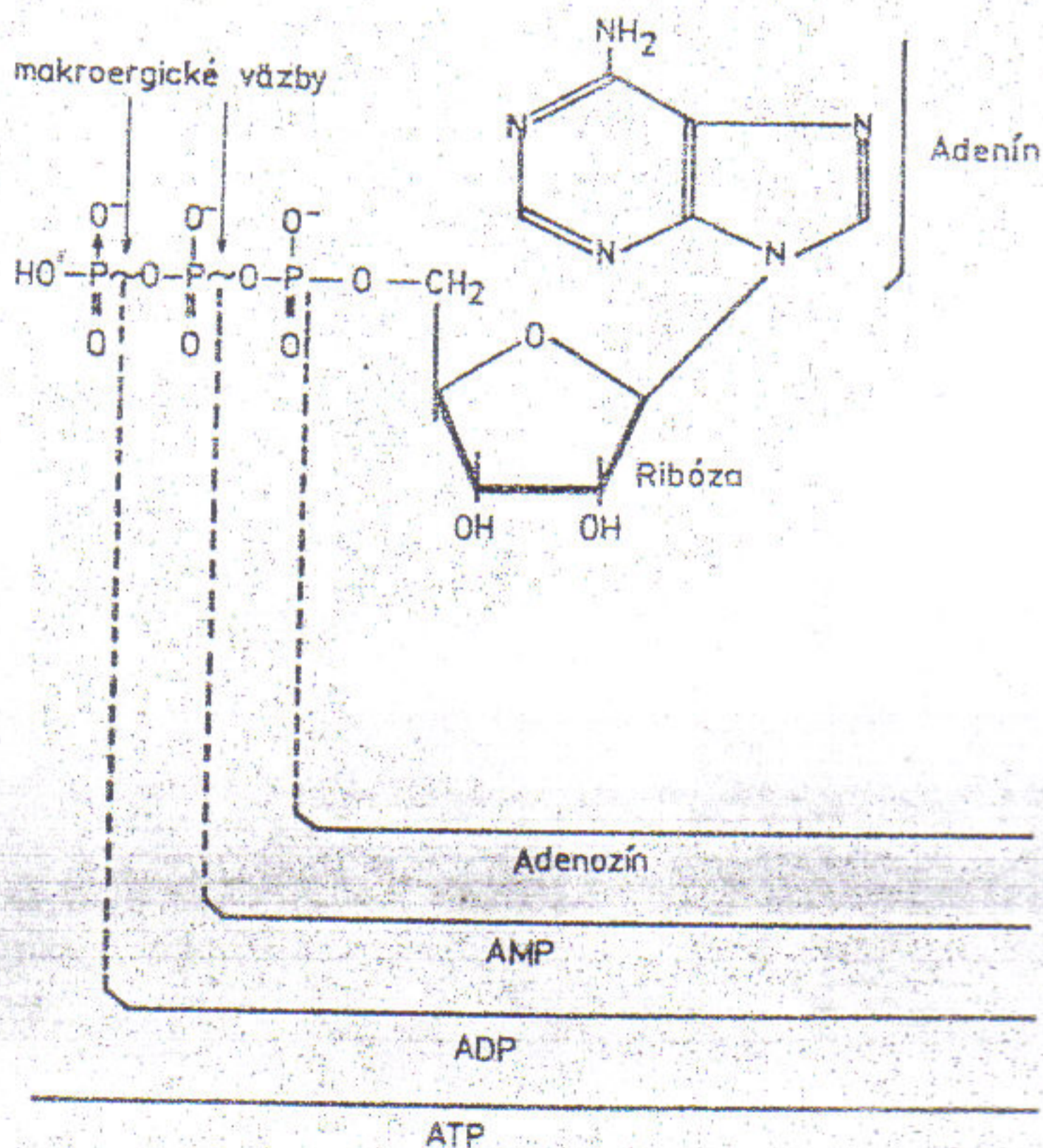
fodiesterová. Realizuje sa tak, že molekula kyseliny fosforečnej reaguje s OH - skupinou na C-5' konci jednej pentózy a zároveň s OH - skupinou na C-3' konci ďalšej pentózy. Týmto 5' - 3' spojením dostáva polynukleotidový reťazec smer, ktorý sa nazýva polarita. Znamená to, že polynukleotidový reťazec má na jednom konci voľnú 3'-OH skupinu a na druhom konci zvyšok kyseliny fosforečnej viazaný na 5'-OH skupinu pentózy /obr. 16/.

Treba zdôrazniť, že polarita polynukleotidových reťazcov má veľký význam pre štruktúru jedno i dvojreťazcových molekúl nukleových kyselín.

Voľné bázy a nukleozidy sa vyskytujú v bunke v malom množstve zvyčajne ako hydrolytické produkty nukleových kyselín. Oproti tomu voľné nukleotidy sa vyskytujú v relatívne vysokej koncentrácii, ako zásobáreň alebo hotovosť /pool/ pre syntézu nukleových kyselín. Nukleotidy sa vyskytujú vo forme nukleozid-5'-monofosfátov /NMP/, nukleozid-5'-difosfátov /NDP/ a nukleozid-5'-trifosfátov /NTP/.

Niektoré nukleozid-5'-trifosfáty okrem toho, že sú stavebnými jednotkami nukleových kyselín, slúžia ako zdroj energie.

Najdôležitejšou "makroergickou zlúčeninou" je adenzíntrifosfát - ATP /obr. 17/. Všeobecne sa nazýva energetická konzerva, lebo obsahuje dve makroergické fosfátové väzby. /Voľná energia hydrolyzy makroergickej väzby je $20 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$./ Menej frekventovanou molekulou /ako zdroj energie/ je GTP. Makroergickou fosfátovou väzbou je aj acylová väzba /pripojenie fosfátovej skupiny/, ktorá sa uplatňuje pri aktivácii aminokyselín v procese biosyntézy bielkovín.



Obr. 17 Molekula adenzíntrifosfátu /ATP/

4.1.3 SYMBOLIKA NUKLEOZIDOV A NUKLEOTIDOV DNA A RNA

Nukleozidy DNA

dA = deoxyadenozín
dG = deoxyguanozín
dT = deoxytymidín
dC = deoxycytidín

Nukleotidy DNA

dAMP = deoxyadenozín-5'-monofosfát
kyselina deoxyadenylová
dGMP = deoxyguanozín-5'-monofosfát
kyselina deoxyguanylová
dTMP = deoxytymidín-5'-monofosfát
kyselina deoxytymidylová
dCMP = deoxycytidín-5'-monofosfát
kyselina deoxycytidylová

Nukleozidy RNA

A = adenzín
G = guanozín
U = uridín
C = cytidín

Nukleotidy RNA

AMP = adenzín-5'-monofosfát /kyselina adenylová/
GMP = guanozín-5'-monofosfát /kyselina guanylová/
UMP = uridín-5'-monofosfát /kyselina uridylová/
CMP = cytidín-5'-monofosfát /kyselina cytidylová/

Okrem uvedenej symboliky stretneme sa v literatúre aj s nasledovným záznamom nukleotidov pre zvyšok kyseliny fosforečnej máme symbol p a pre nukleozid počiatkové písmeno dusíkatej bázy. Ak dáme p vľavo od veľkého písmena, znamená to väzbu na 5'-C hydroxylovej skupine a ak dáme p vpravo, tak na 3'-C hydroxylovej skupine, napr.:

pA = adenzín-5'-monofosfát
Ap = adenzín-3'-monofosfát
pAp = adenzín-5'-3'-difosfát

Obdobnú symboliku používame pre di-, tri- a oligonukleotidy /UpA, pUpA, pUpApC atď./.

Na záver si ešte uvedieme prehľadnú tabuľku základných zložiek nukleových kyselín DNA a RNA.

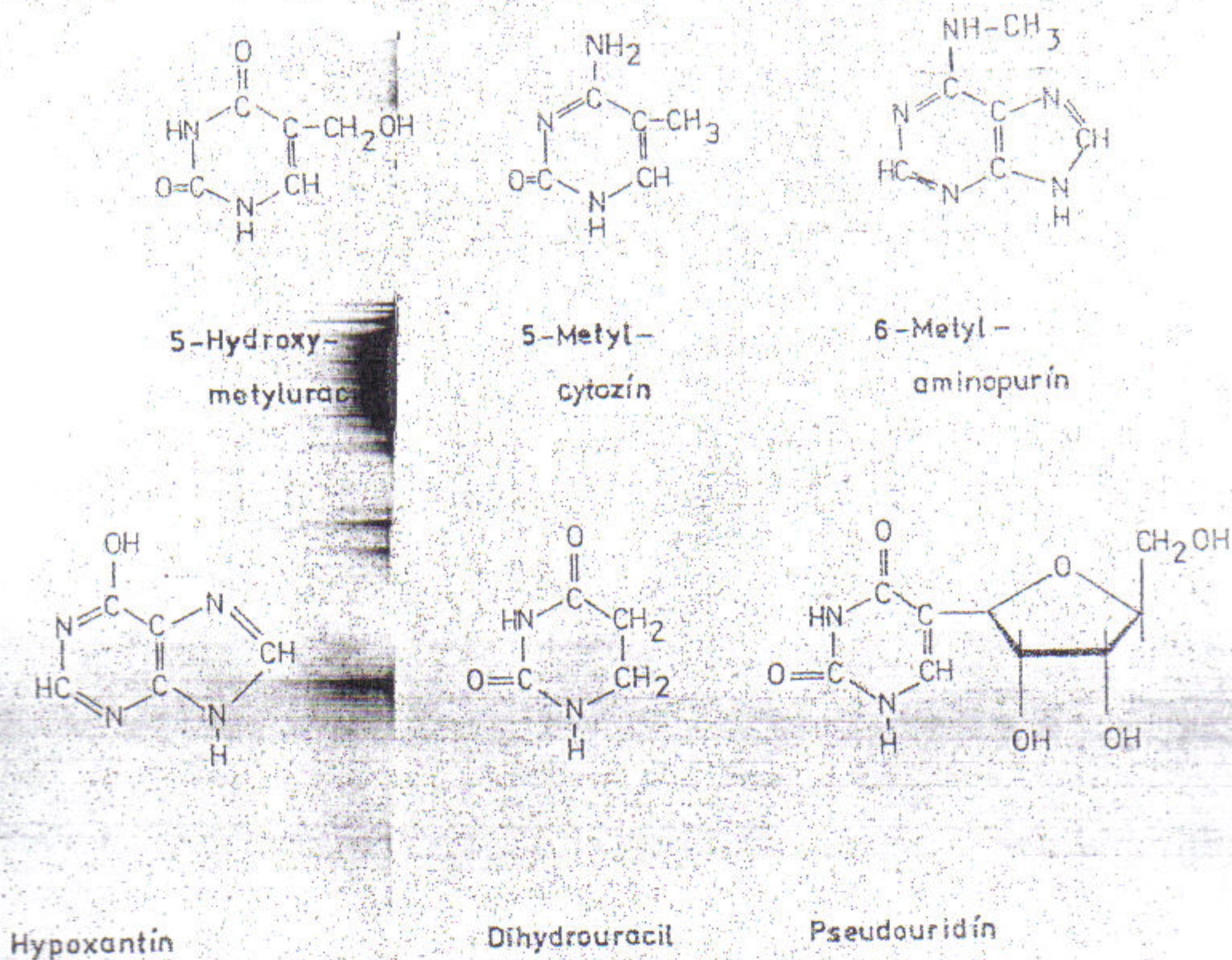
Tabuľka 3.: Chemické zloženie DNA a RNA

Zložky	DNA	RNA
puríny	adenín /A/ guanín /G/	adenín /A/ guanín /G/
pyrimidíny	cytozín /C/ tymín /T/	cytozín /C/ uracil /U/
pentóza	2-deoxyribóza	ribóza
fosfát	fosfát	fosfát

4.1.4 MINORITNÉ BÁZY

V nukleových kyselinách sa okrem uvedených základných báz často nachádzajú aj iné deriváty purínu a pyrimidínu. Nazývame ich minoritné bázy. V DNA sa napr. nachádza metyl-cytozín /MC/, alebo hydroxymetylcytozín /HMC/ namiesto cytozínu. Tieto minoritné bázy buď čiastočne alebo úplne nahrádzajú príslušný analóg /pozri tab. 4/.

Najčastejšie sa minoritné bázy nachádzajú v transferových RNA, napr. 2-aminopurín, 2,6-diaminopurín, 6-metyladenín, 8-azaguanín, hydroxymetyluracil. Ďalej je to pseudouridín, čo je ribonukleotid, v ktorom miesto glykozi-



Obr. 18 Niektoré minoritné bázy nukleových kyselín

dickej väzby /C-N/ je väzba uhliková, a to medzi cukrom a bázou /C-C/. Označuje sa gréckym písmenom psi Ψ . Inozín je zasa nukleotid, ktorý má ako dusíkatú bázu hypoxantín /deaminovaný adenín/. Niektoré minoritné bázy sú na obr. 18.

Zvláštnou vlastnosťou minoritných báz vyskytujúcich sa v antikodóne tRNA je tá skutočnosť, že pokiaľ sa nachádzajú v 3. pozícii, ich párovanie nie je tak prísne ako pri dvoch prvých bázach. Preto sa tieto nukleotidy nazývajú aj "kolísavé" alebo "wobble" nukleotidy.

o nachá-
ázy.

in /HMC/
ahradza-

napr.
metylura-
glykozi-

PH

ŽIVOČÍŠNA BUNKA

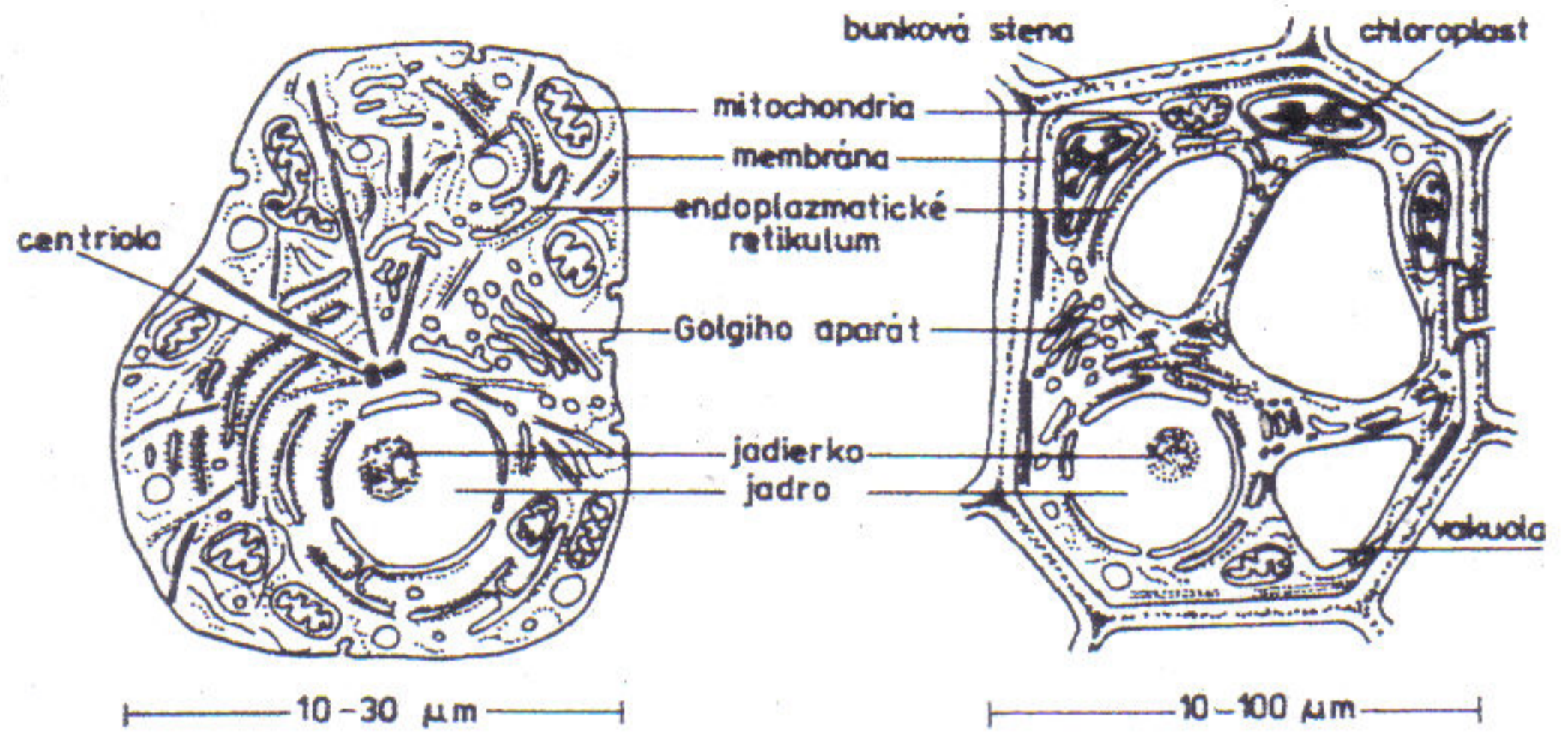
RASTLINNÁ BUNKA

val ju

dcov
do za-

sa
val

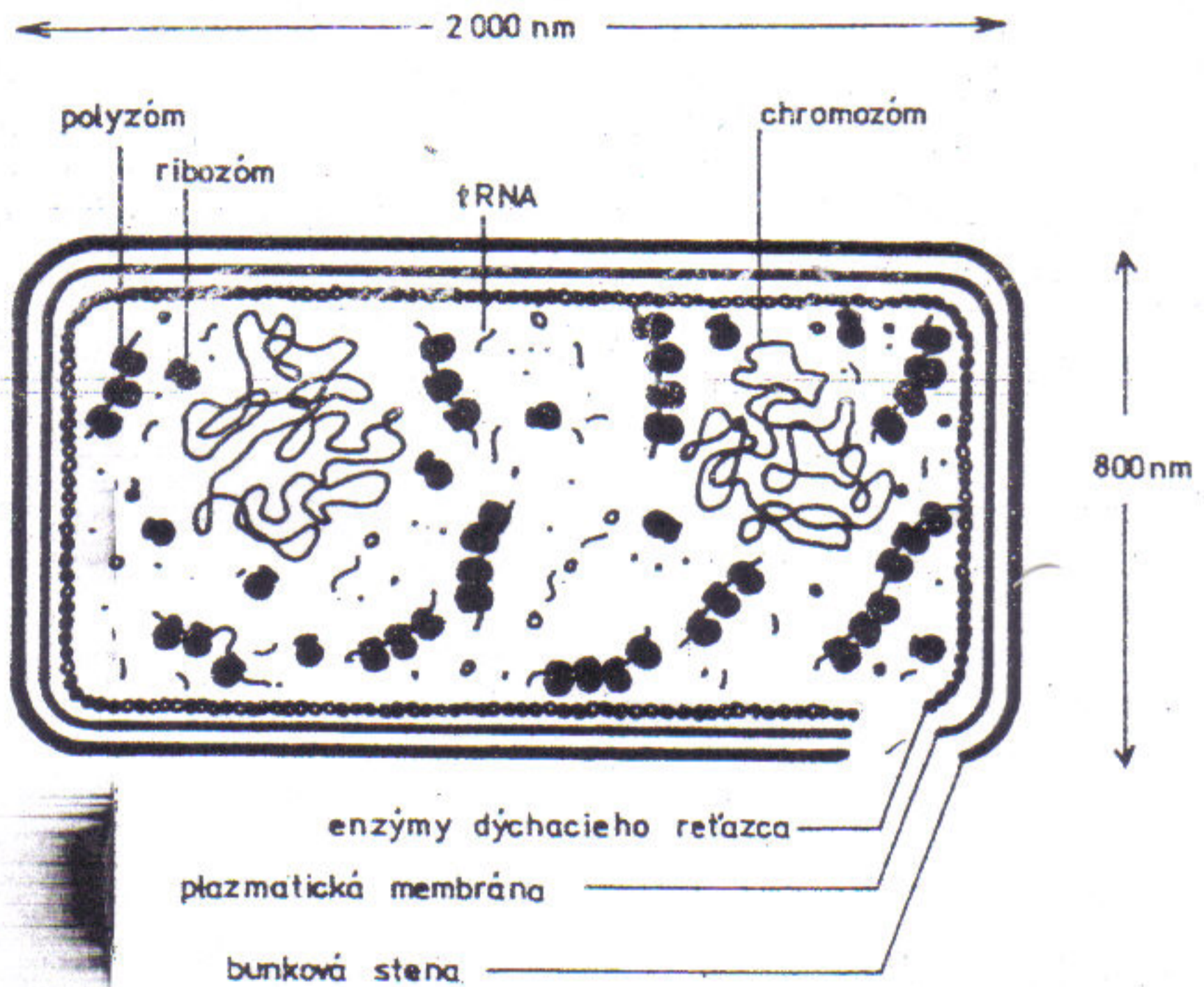
pri
u lá-
nosti



Obr. 1 Schéma živočíšnej a rastlinnej bunky

dza
ozómov
chro-
eneti-
va do-

hybri-
apr.
rga-
ok mož-
šie,



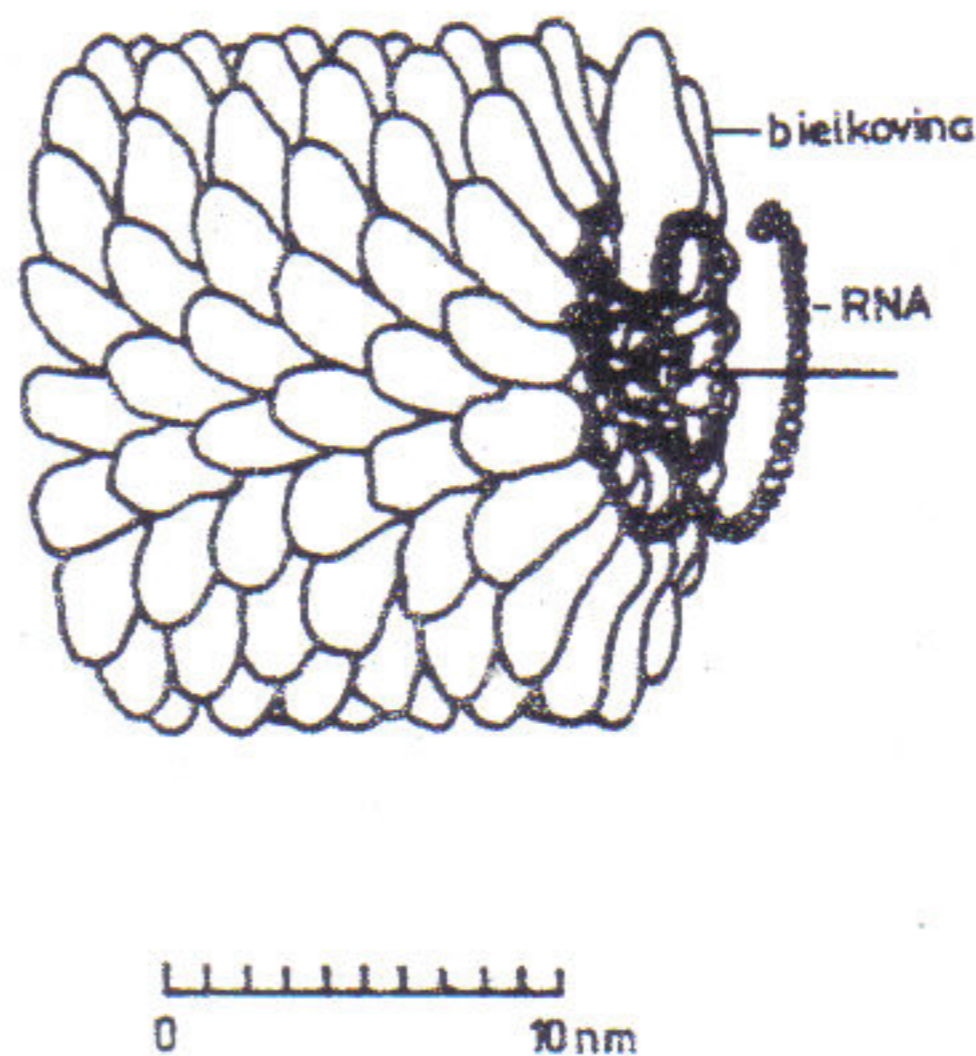
Obr. 2 Schéma bakteriálnej bunky

1.3.2 VÍRUSY

rej rí-
lelový
/dĺžka
teplo-
táto
ribo-
kom-
ako

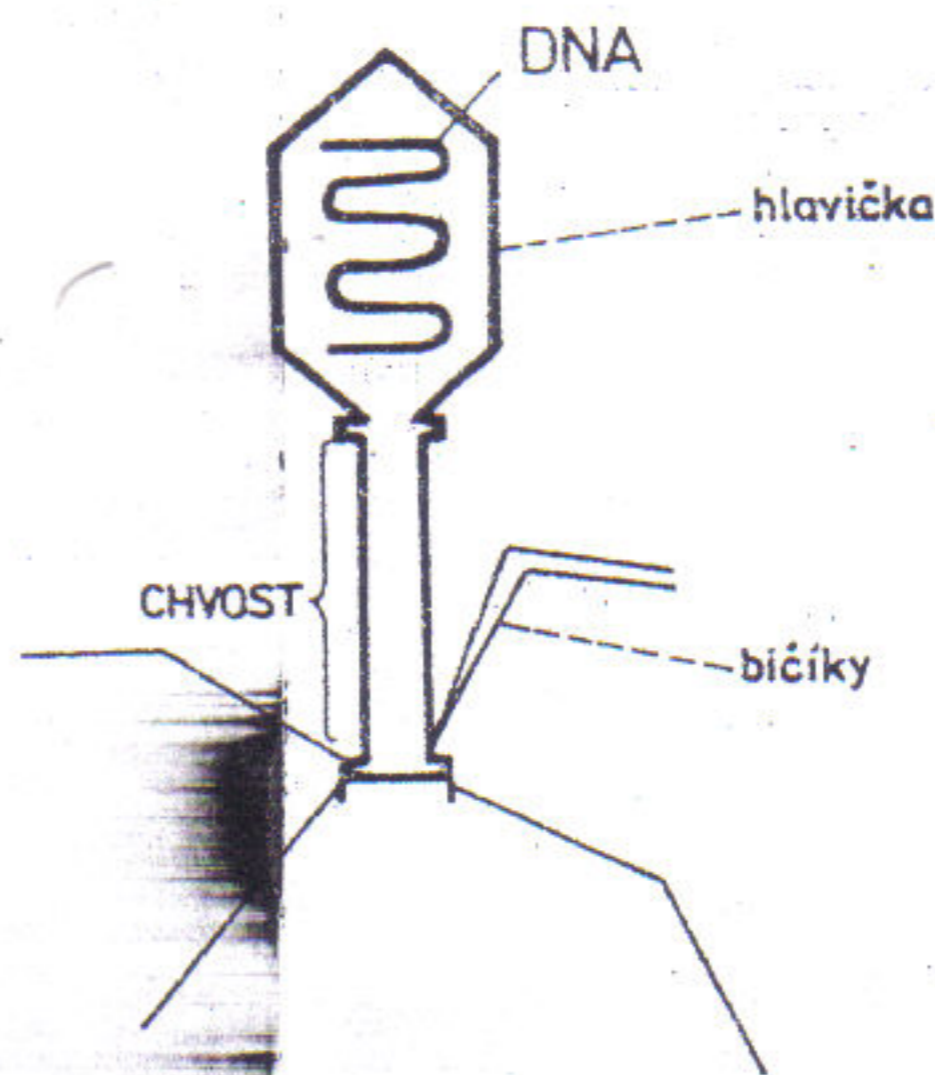
Vírusy sú najjednoduchšie genetické systémy. Pozostávajú z deoxyribo-
nukleovej kyseliny /DNA/ alebo ribonukleovej kyseliny /symbol RNA/ a bielko-
vinového obalu /kapsidu/. Z rastlinných RNA vírusov je to známy vírus taba-
kovej mozaiky /VTM/ /obr. 3/. Aby sa mohli rozmnožovať, musia napadnúť hosti-
teľskú bunku a využiť jej proteosyntetický aparát.





Obr. 3 Vírus tabakovej mozaiky /VTM/

Vírusy baktérií sa nazývajú bakteriofágy. Skladajú sa z nukleovej kyseliny a bielkovinového obalu. Ako reprezentanta si uveďme T 4 fága, ktorého dedičný materiál tvorí DNA /obr. 4/. Napadá, resp. infikuje *E. coli*, v ktorých sa rozmnožuje a napokon ich zničí, t.j. baktéria lyzuje.



Obr. 4 Bakteriofág T 4

1.3.3 EUKARYOTICKÉ MODELOVÉ OBJEKTY

Z eukaryotických modelových objektov, dôležitých pre molekulárno-genetické výskumy uveďme aspoň tie najdôležitejšie: *Drosophila melanogaster* /muška ovocná/, ďalej žaba *Xenopus laevis* a kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, ktoré z nižších eukaryontov nadobúdajú v súčasnosti stále väčší význam.

1.4 EXPERIMENTÁLNE DŮKAZY GENETICKEJ ÚLOHY NUKLEOVÝCH KYSELÍN

Nukleové kyseliny a bielkoviny reprezentujú základné biologické makromolekuly. Súčasne sú aj informačnými molekulami. Zvláštny význam týchto dvoch kategórií biopolymérov spočíva v tom, že na ich existenciu a aktivitu je viazaný život. Spätosť bielkovín s nukleovými kyselinami v živých organizmoch je taká tesná, že sa vôbec nemožno čudovať názoru spred niekoľko desiatok rokov /do r. 1944/, keď sa bielkoviny považovali za vlastný genetický materiál.

Ako sme už povedali, mikroorganizmy ako modelové genetické objekty pomohli rozriešiť aj túto otázku. Uvedieme si najdôležitejšie experimenty smerujúce k dôkazu genetickej úlohy nukleových kyselín.

R. 1928 Griffith a spolupracovníci urobili pokus s baktériou *Streptococcus pneumoniae*. *S. pneumoniae* má dve formy: virulentnú, ktorá tvorí v dôsledku polysacharidového púzdra hladké kolónie, označujeme ich S /smooth = = hladký/ a nevirulentnú, ktorá tvorí kolónie /rough = drsný/ označované R. Experimentátori injikovali pokusným myšiam živé bunky S, myši zahynuli; inej skupine napichali živé R bunky, myši prežili. To bolo všetko podľa očakávania. Keď však napichali pokusným zvieratám teplom usmrtené S a živé R bunky, na veľké prekvapenie časť myší uhynula /obr. 5/. Znamenalo to, že R forma sa zmenila na S. Túto zmenu nazvali t r a n s f o r m á c i a a látku, ktorá tento jav zapríčiňuje t r a n s f o r m a č n é a g e n s /TA/.

Dlho sa nevedelo čo TA je. Až r. 1944 Avery, MacLeod a McCarty vlastne zopakovali pokusy Griffitha, ale v systéme in vitro /obr. 6/. Autori izolovali nukleovú kyselinu z S-kmeňa a túto DNA pridali k R-kmeňu. Účinkom DNA z S-kmeňa sa nevirulentný kmeň R zmenil na virulentný S. To znamená, že došlo ku genetickej zmene, DNA z S-kmeňa niesla informáciu pre syntézu polysacharidového púzdra. Toto bol prevratný objav a zároveň prvý dôkaz genetickej úlohy DNA. Pokus Averyho dokázal, že hmotným nositeľom genetickej informácie nie sú bielkoviny, ale nukleové kyseliny.

V tejto súvislosti treba spomenúť, že DNA ako chemická látka bola známa už pred pokusmi Averyho, dokonca bolo známe aj jej chemické zloženie, ale až Avery so spolupracovníkmi dokázali, že DNA nesie genetickú informáciu.

Pravda, ani tento názor nebol prijatý bez výhrad. Vo vedeckých kruhoch naďalej pretrvávali pochybnosti o genetickom význame DNA /boli námietky, že izolovaná DNA mohla byť kontaminovaná bielkovinami/. Boli potrebné ďalšie dôkazy, preto experimenty pokračovali ďalej.

R. 1952 Hershey a Chaseová urobili pokus s bakteriofágom T2, ktorého DNA selektívne označili rádionuklidom ^{32}P a bielkovinovú časť rádionuklidom ^{35}S . Pri infekcii bakteriálnej bunky bakteriofágom preniká dovnútra bunky len DNA a pretože sa v bakteriálnej bunke bakteriofág rozmnožil a skompletizoval,

v-
cé-
v

ane-
/muš-
ae,