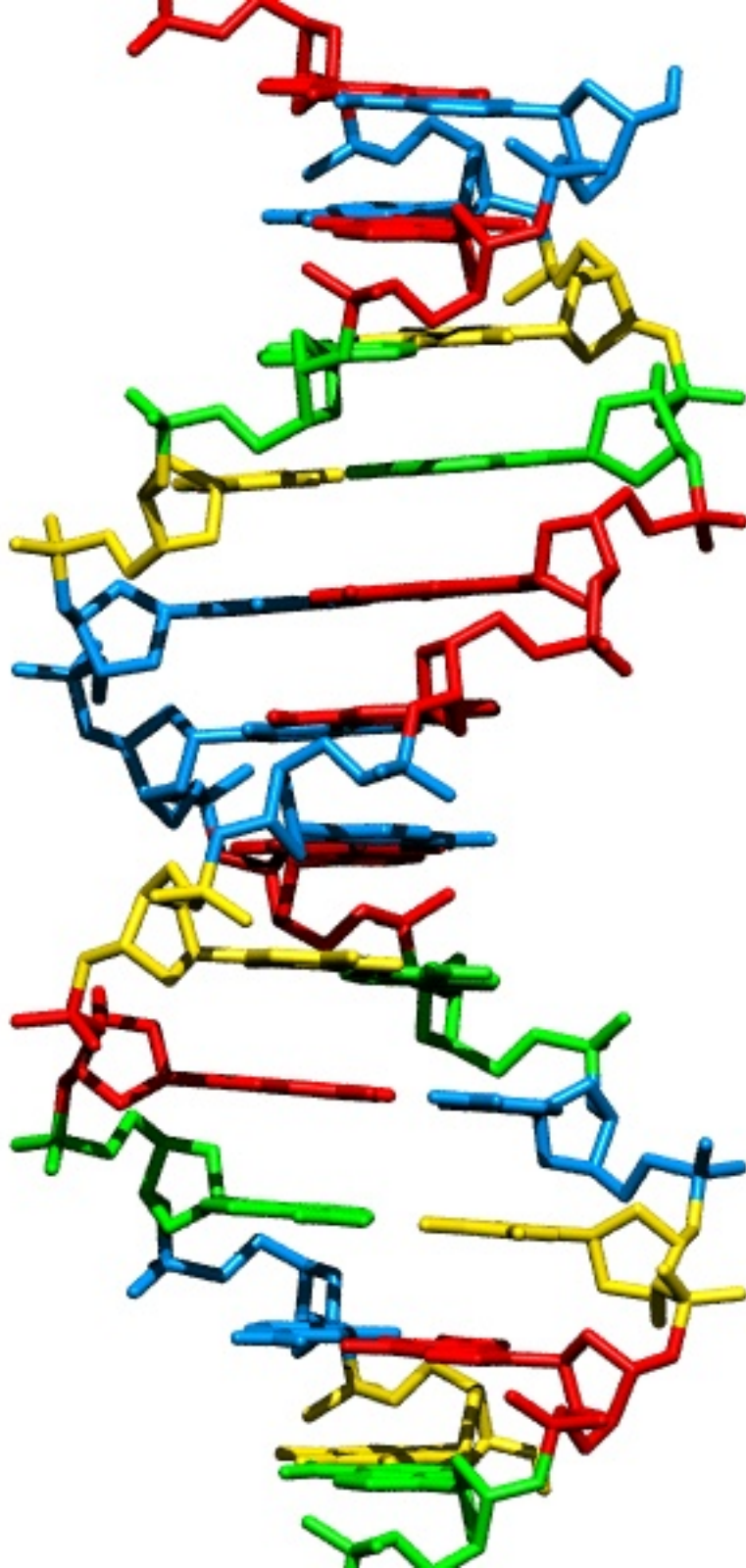


A-PDF MERGER DEMO



7.4 RIBOZÓMOVÁ RNA /rRNA/

proteosyntéza

Ribozómy sú organely, na ktorých prebieha syntéza bielkovín. Skladajú sa z bielkovín a ribozómovej RNA /rRNA/. Ribozómy sa skladajú z dvoch nerovnakých podjednotiek, ktoré v priebehu proteosyntézy môžu asociovať a disociovať /obr. 36/.

30S ribozómová podjednotka; pohľad na model

spredú zozadu zboku

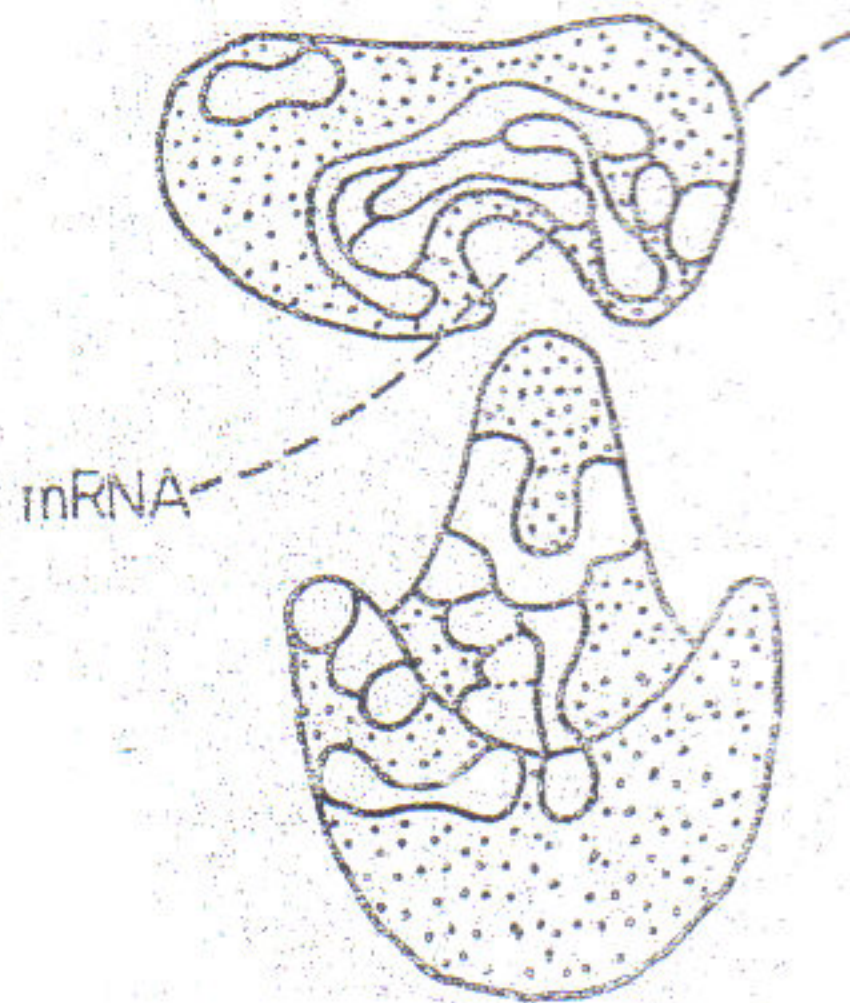


50S ribozómová podjednotka; pohľad na model

spredú zozadu zboku



70S ribozóm
vzájomné uloženie podjednotiek



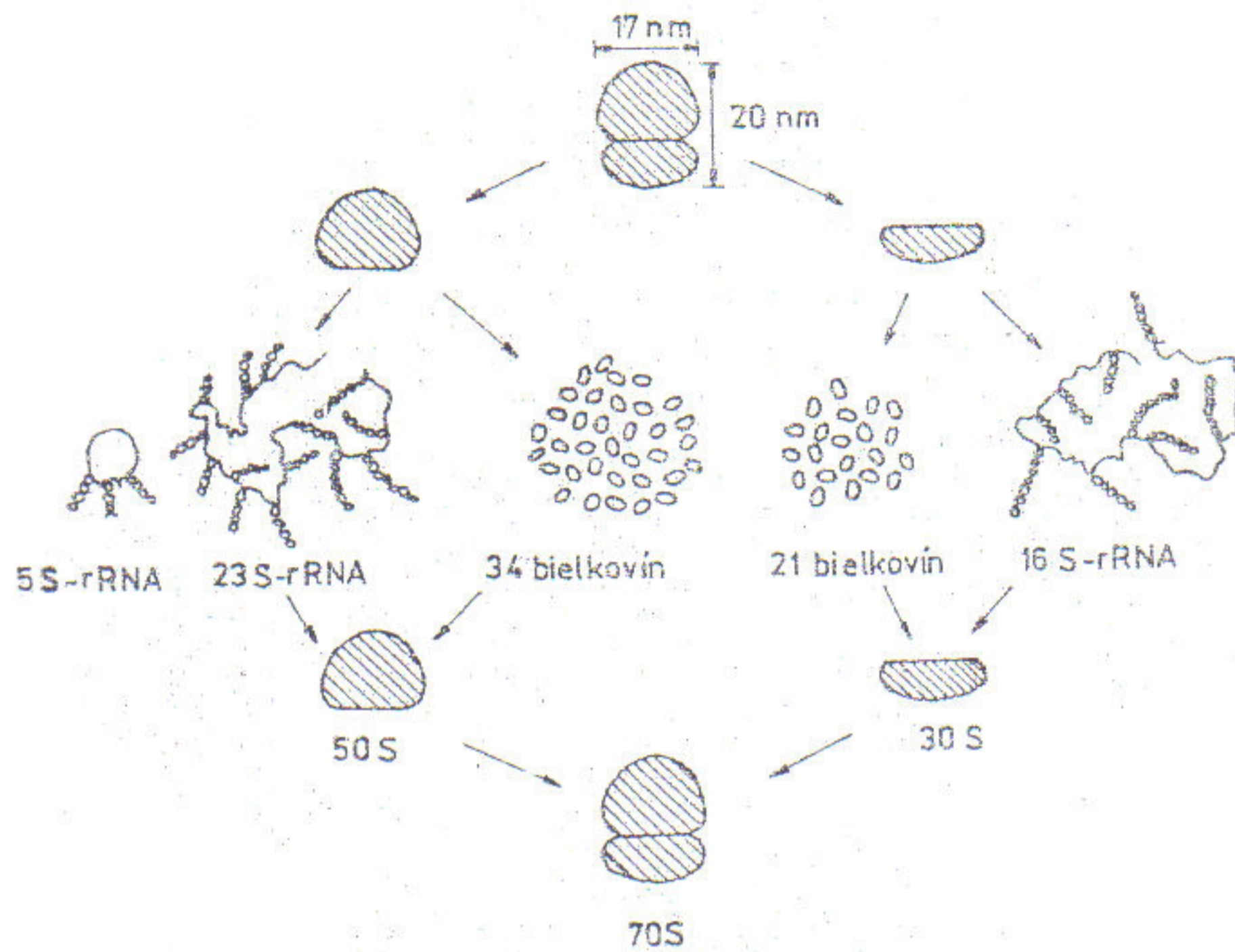
Velikost ribozómov 30S a 50S podjednotky 70S ribozóm
Obr. 36 Architektúra prokaryotických ribozómov

Ribozómová RNA je najbohatšie zastúpená RNA v bunke. Nachádza sa vo forme ľahkej /lr-RNA/ a ťažkej /hr-RNA/ podľa toho, či pochádza z malej /light/ alebo veľkej /heavy/ podjednotky ribozómu. Ribozómy a ich podjednotky sa najčastejšie charakterizujú podľa sedimentačného koeficientu, ktorý závisí od molekulovej hmotnosti i tvaru ribozómov, či ich podjednotiek. Sedimentačný koeficient je úmerný rýchlosti sedimentácie pri centrifugácii a vyjadruje sa v Svedbergoch /1S = 10⁻¹³s/.

Všet V bakteriálnych bunkách, chloroplastoch a mitochondriách sa nachádzajú 70S ribozómy a v eukaryotických bunkách 80S ribozómy. Výstavba oboch typov ribozómov je v podstate rovnaká. Každý ribozóm sa skladá z dvoch podjednotiek:

- 70S obsahuje 30S a 50S podjednotky,
- 80S obsahuje 40S a 60S podjednotky.

30S podjednotka obsahuje 21 rôznych bielkovín /s1 - s21/ a 16S rRNA a 50S podjednotka sa skladá z 34 rôznych bielkovín /L1 - L34/ a 23S rRNA /obr. 37/.



Obr. 37 Zloženie prokaryotických ribozómov

Okrem toho sa v kompletnom ribozóme nachádza 5S RNA, ktorá uplatňuje svoju funkciu na kontaktnom povrchu medzi malou a veľkou podjednotkou ribozómu.

Cytoplazmatické eukaryotické ribozómy obsahujú 18S rRNA v malej podjednotke /40S/ a približne 30 rôznych bielkovín a vo veľkej podjednotke /60S/ 25S alebo 28S rRNA a približne 50 rôznych bielkovín. Okrem toho 5S a 5,8S RNA.

Syntéza všetkých typov ribozómovej RNA prebieha na DNA matrici /rDNA/. Ribozómové RNA sa syntetizujú pomocou RNA polymerázy závislej na DNA /RNA-polymeráza I/ vo forme prekurzorov /pre-rRNA/. To znamená, že primárny transkript rDNA génov má väčšiu molekulovú hmotnosť /najčastejšie 45S/ a podlieha úprave /processingu/.

Primárna štruktúra rRNA dovoľuje ich čiaspôsobné párovanie, čím sa vytvára priestorová sieťová štruktúra, ku ktorej sa pripájajú príslušné bielkoviny. Niektoré úseky rRNA a určité bielkoviny /L7 a L12/ sa aktívne podieľajú na väzbe jednotlivých prvkov proteosyntetického aparátu k ribozómu.

Bakteriálna bunka obsahuje asi 10 000 ribozómov. Jedna bunka pečene obsahuje asi 6 miliónov 80S ribozómov. V eukaryotických bunkách je časť ribozómov voľná a väčšia časť je lokalizovaná na membránach endoplazmatického retikula.

ER ER

7.5 TRANSFEROVÁ RNA /tRNA/

Šesťdesiate roky boli v oblasti molekulárnej genetiky veľmi plodné. R. 1960 Jacob a Monod predpokladali a r. 1961 Brenner, Jacob a Meselson experimentálne dokázali existenciu mRNA.

R. 1958 Crick označil solubilnú frakciu RNA ako adaptorové molekuly, dnes označované ako tRNA /prv sRNA/. Adaptorové preto, lebo sa podieľajú na zaradení aminokyselín do bielkoviny. Samotné aminokyseliny totiž nie sú schopné zoraďovať sa do špecifického sledu a vytvárať polypeptid. Na to potrebujú adaptor. Každá aminokyselina má najmenej jednu tRNA. Úlohou tRNA je prenášať aktivované aminokyseliny k ribozómom a zaistiť ich správne zaradenie podľa príslušnej matrice na mRNA.

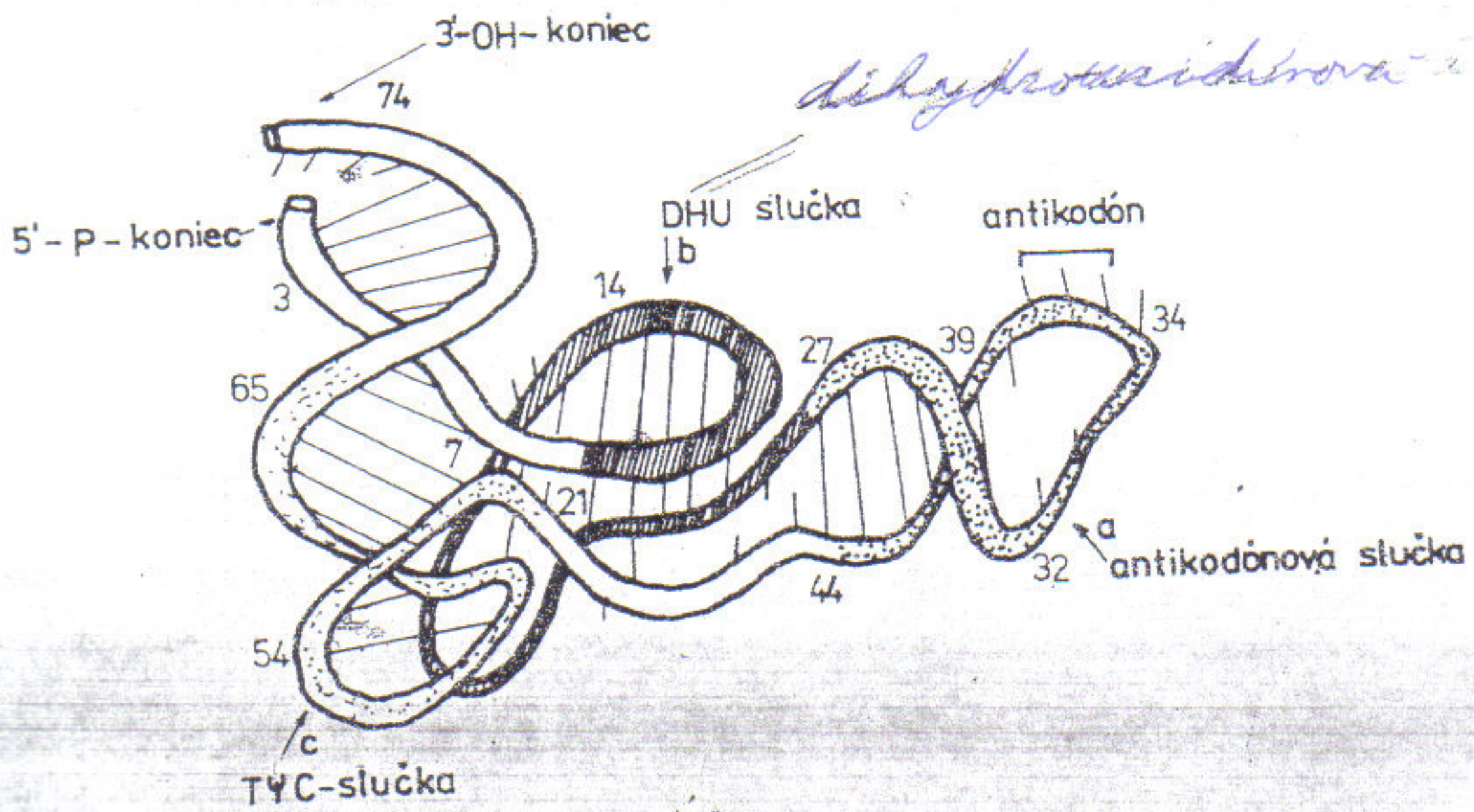
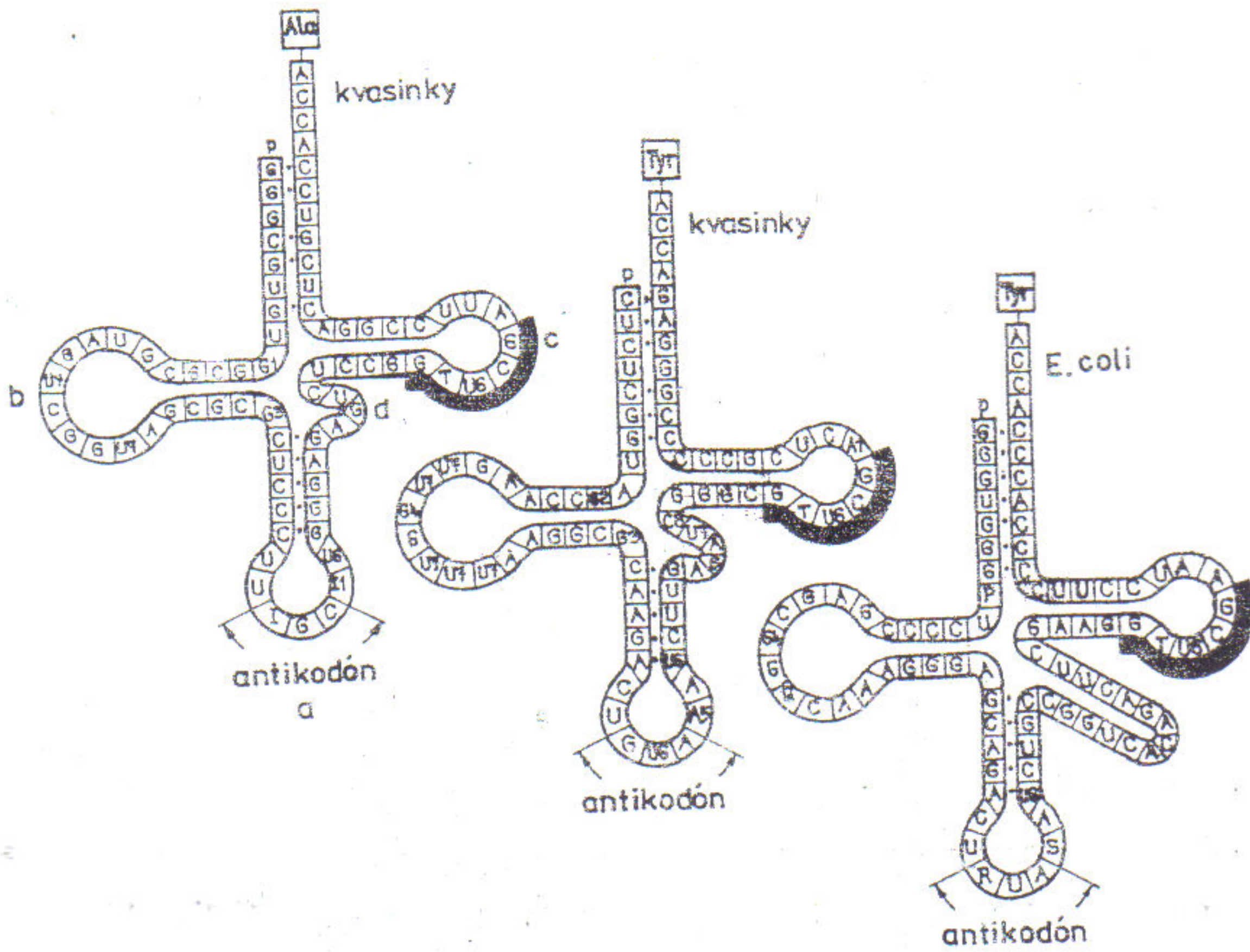
Primárnu štruktúru tRNA tvorí poradie ribonukleotidov, ktoré je dnes známe asi u 20 rôznych tRNA. Transferové RNA sú malé molekuly, ktoré obsahujú 70-80 nukleotidov. Majú niektoré spoločné rysy: = vlastnosti

- 1/ na 3' OH konci majú 4 voľné bázy, z ktorých koncový triplet tvorí sled: CCA
- 2/ na 5' konci majú guanín
- 3/ majú spárované i nespárované úseky
- 4/ nespárované úseky vytvárajú slučky
- 5/ na koncový adenozín sa pripája aminokyselina /na 3' OH skupinu/.

Sekundárnu štruktúru tRNA zabezpečujú vodíkové väzby medzi komplementárnymi úsekmi tRNA a vytvárajú štruktúru tzv. čatelinového listu /obr. 38/. Špecifické úseky sú práve nespárované časti na ohyboch listov. Z nich najdôležitejšia je tzv. antikodónová slučka /antikodón/, ktorá sa podieľa na komplementárnej väzbe ku kodónu, ktoré sú na mRNA. Ďalej je to dihydrouridínová slučka /b/ zodpovedná za väzbu k aktivačnému enzýmu a pseudouridínová slučka /c/, ktorá zodpovedá za väzbu k väčšej podjednotke ribozómu. Niektoré tRNA majú ešte tzv. extra-slučku, ktorá sa nazýva aj variabilná slučka /d/ /obr. 38 - pozri str. 68/. Is u niektorých ribozómov

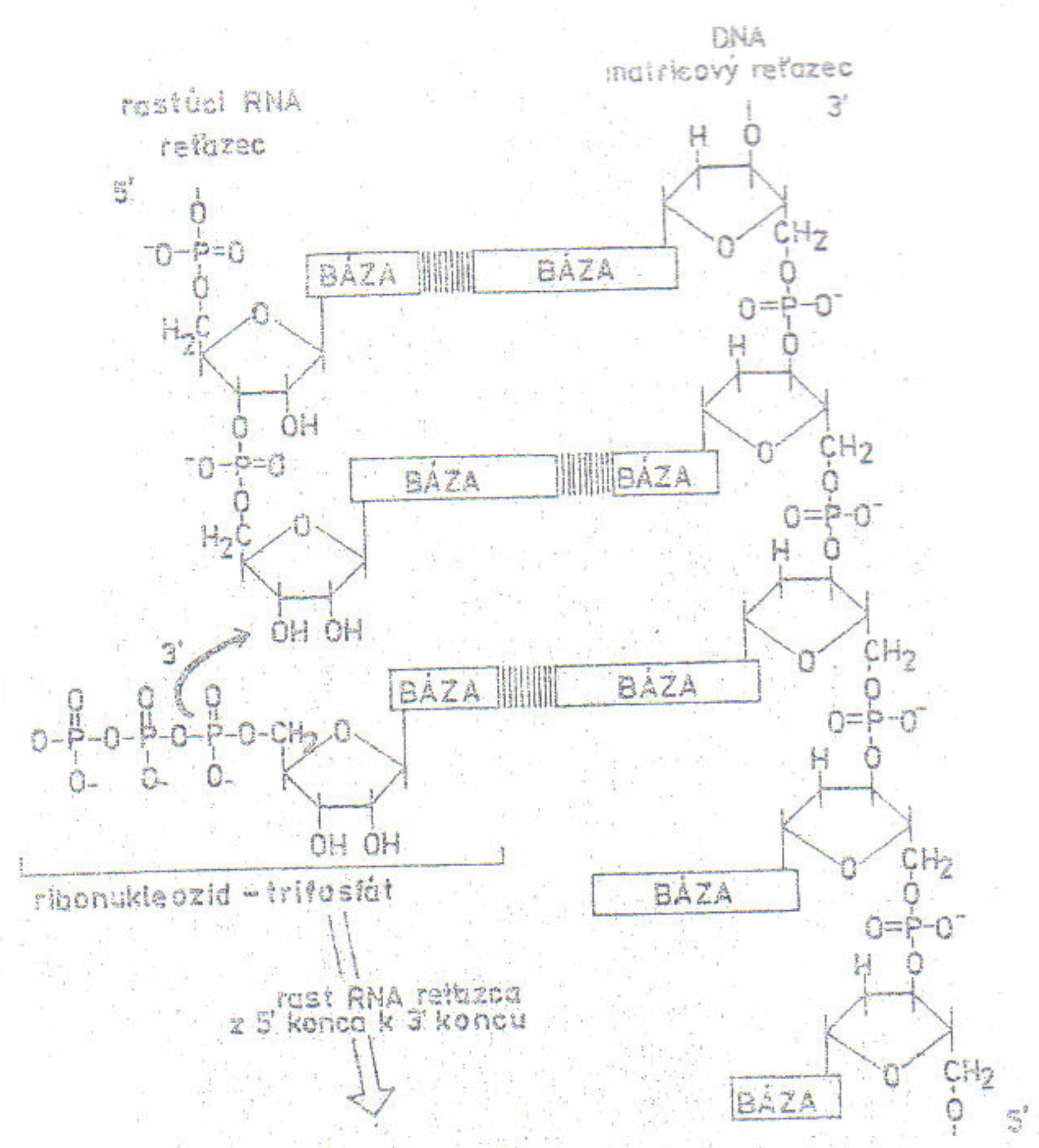
Terciárna štruktúra nie je presne známa. Predpokladá sa, že molekula tRNA sa v priestore orientuje do písmena L, hlavne zásluhou tzv. zvláštnych väzieb.

Syntéza tRNA sa odohráva na matrici DNA /obr. 39 - pozri str. 69/ vo forme prekurzorov. Pri biosyntéze tRNA inkorporujú sa do prekurzorových molekúl /pre-tRNA/ len 4 základné bázy A, U, C a G, ktoré sa modifikujú pôsobením špecifických enzýmov. Niektoré bázy sa modifikujú ešte na rozvinutom reťazci, ale napr. metylované bázy sa tvoria až po vytvorení terciárnej štruktúry tRNA. Preto neprekvapuje, že metylované bázy sa nachádzajú v slučkách /tieto bázy sú prístupné pre enzýmy metylázy lepšie ako spárované bázy/. Tak sa vytvárajú hotové, funkčieschopné molekuly tRNA.



Obr. 38 Štruktúra transferovej RNA /tRNA/ - a/ antikodónová slučka; b/ dihydrouridínová slučka; c/ pseudouridínová slučka

5' → 3'



Obr. 39 Syntéza RNA na matrici DNA

Baktérie majú 40 - 80 génov, ktoré zodpovedajú za syntézu tRNA. Často sú tieto gény usporiadané v určitej oblasti, zvanej cluster /čítaj klastec/ génový zhluk. Pri cicavcoch sa zistilo, že počet génov pre tRNA je menší /asi 30/.

7.6 ĎALŠIE TYPY RNA

7.6.1 MALÉ JADROVÉ RNA /snRNA/

V poslednom čase sa hromadia správy o existencii nízkomolekulárnych RNA v jadre, ktoré sa súhrnne označujú snRNA /small nuclear/.

Nízkomolekulárne jadrové RNA syntetizujú sa na DNA matrici, sú metabolicky stále a obsahujú 100 - 300 nukleotidov. Niektoré existujú vo forme ribonukleoproteínových častíc, iné sú charakteristické pchyblivosťou a prítomnosťou modifikovaných nukleotidov.

V bunke sa nachádza 1 - 2 milióny molekúl snRNA a to takmer výlučne v extranukleolárnej časti jadra. V cytoplazme sa zatiaľ nenašli. Väčšina snRNA je metylovaná. Metylované sú jednak dusíkaté bázy a 2'OH skupina ribózy. Práve spôsobom metylácie sa snRNA líšia od tRNA. Všetky snRNA izolované z rôznych organizmov /HeLa bunky, fibroblasty, chrčok, morská ježovka a i./ sú natívne molekuly a experimentálne sa dokázalo, že sa nejedná o rozpadové produkty vysokomolekulárnych RNA. snRNA teda vznikajú ako primárny transkript, ktorý sa ďalej neštiepi a to pred, v priebehu i po reduplikácii DNA.

Z bunkovej kultúry L buniek izolovali 12 a z ľudských lymfocytov 8 odlišných frakcií snRNA. Presná funkcia jednotlivých frakcií nie je známa. Jednotlivé snRNA sa líšia molekulovou hmotnosťou, primárnou sekvenciou nukleotidov a prítomnosťou metylovaných báz. Niektoré snRNA majú zvýšenú afinitu k histónom a takto môžu odpútať histón z DNA /účasť pri replikácii DNA/. Väčšina snRNA sa syntetizuje pomocou RNA-polymerázy II. Niektoré snRNA sa pravdepodobne zúčastňujú pri zostrihu hnRNA /napr. U1 a U5/.

7.6.2 MALÉ JADIERKOVÉ RNA /snoRNA/

Malé jadierkové RNA /small nucleolar RNA/ syntetizujú sa v jadierku. Počet nukleotidov v známych snoRNA je 200 - 300. Sú menej prebádané ako snRNA. Enzým, ktorý katalyzuje ich syntézu je pravdepodobne RNA-polymeráza II.

7.6.3 MALÉ CYTOPLAZMATICKÉ RNA /scRNA/

Do tejto skupiny /small cytoplasmic RNA/ zaraďujeme predovšetkým tRNA, o ktorých sme už hovorili. Ďalej sem patria 5S-rRNA, ktoré sa väčšinou prepisujú spolu s tRNA enzýmom RNA-polymerázou III. Obsahujú 121 nukleotidov; 5,8S-rRNA obsahuje 158 nukleotidov a syntetizuje sa pomocou RNA-polymerázy I.

7.6.4 CHROMATINOVÁ RNA /cRNA/

Týmto symbolom sa označujú nízkomolekulové RNA viazané na bielkoviny, ktoré sa izolovali z bunkového chromatínu eukaryotických buniek po štiepení pronázou. Môžu pôsobiť ako represory alebo aktivátory génov. Niektorí autori ich pokladajú za rozpadový produkt pri tvorbe tRNA vzhľadom na ich nízky obsah nukleotidov /30 - 40/. Predpokladá sa, že môžu mať úlohu pri rekonštrukcii chromatínu v priebehu bunkového delenia. Je možná aj taká alternatíva, že sú to rozpadové produkty obsahujúce repetitívne sekvencie post-transkripčnej úpravy RNA. Otázka zostáva naďalej otvorená.

7.6.5 tcrRNA /TRANSLATION CONTROL RNA/ a micrRNA /MESSENGER INTERFERING COMPLEMENTARY RNA/

tcrRNA je typ RNA izolovaný z IF - 3 komplexu iniciačných faktorov, ktoré sa podieľajú na proteosyntéze eukaryontných buniek. Experimentálne výsledky podporujú predpoklad, že tcrRNA špecificky inhibujú použitie heterologickej mRNA pre transláciu a takto sú zahrnuté do kontroly iniciácie proteinovej syntézy.

micrRNA uplatňuje sa na úrovni translácie pri prokaryotoch i eukaryotoch; môže sa komplementárne viazať s homologickou mRNA a zúčastňovať sa na regulácii translácie /inhibícia/.

Súhrnne možno povedať, že nízkomolekulové RNA tvoria veľmi rôznorodé skupiny RNA a plnia rozličné dôležité funkcie, z ktorých uvedieme aspoň niektoré:

- zúčastňujú sa na úpravách hnRNA zostrihom,
- podieľajú sa na transporte mRNA z jadra do cytoplazmy,
- pôsobia pri replikácii DNA, *a jej riadení*
- pôsobia ako stimulatory transkripcie,
- podieľajú sa na kontrole translácie,
- zúčastňujú sa na regulácii bunkového delenia.

7.7 POROVNANIE DNA A RNA SYNTÉZY - ml

Záverom možno povedať, že replikácia DNA a syntéza RNA sú podobné v tom zmysle, že sa jedná o matricovú komplementárnu syntézu, kde každý zo štyroch nukleozidtrifosfátov má rovnakú možnosť dosadnúť na koniec primeru /očka/. DNA polymeráza nemá schopnosť začať syntézu, na to využíva primer RNA. Má však korekčnú aktivitu 3' - 5' a môže zle zaradený nukleozidtrifosfát vyštiepiť. RNA polymeráza túto opravnú aktivitu nemá a preto pri tomto enzýme musia presnosť čítania informácie zabezpečiť jej podjednotky.

Ribozómová RNA /rRNA/ je syntetizovaná pomocou RNA-polymerázy I, ktorá je rezistentná voči α -amanitínu jedu, ktorý sa nachádza v hubách /napr. v muchotrávke/. Mediátorovú RNA /mRNA/ syntetizuje RNA-polymeráza II, ktorá je inhibovaná nízkymi koncentráciami α -amanitínu a transferové RNA /tRNA/ sa syntetizujú RNA-polymerázou III, ktorá je inhibovaná vysokými koncentráciami α -amanitínu. Jednotlivé eukaryotické RNA-polymerázy teda ľahko rozlíšime na základe ich citlivosti k α -amanitínu.

Podstatný rozdiel medzi DNA a RNA syntézou spočíva v tom, že DNA-polymerázy sú nešpecifické enzýmy, ktoré k činnosti potrebujú matricu a primer s voľnou 3'-OH skupinou. RNA-polymerázy nepotrebujú primer, sú schopné začať syntézu RNA na matrici DNA /alebo RNA/.

8. MIMOJADROVÁ A MIMOCHROMOZÓMOVÁ GENETICKÁ INFORMÁCIA

"Sídlo" genetickej informácie pri prokaryotoch je chromozóm nachádzajúci sa v cytoplazme a pri eukaryotoch v jadre. Okrem takto lokalizovanej genetickej informácie, ktorá v živých organizmoch prevažuje, nachádzajú sa genetické determinanty aj v mimochromozómových a mimojadrových štruktúrach. Pri eukaryotoch je mimojadrová genetická informácia uložená v plastidoch a mitochondriách, pri prokaryotoch je to informácia obsiahnutá v plazmidoch.

8.1 PLASTIDOVÁ DNA /ptDNA/

Plastidy sú organely rastlinných buniek, ktoré si zachovávajú kontinuitu v priebehu bunkových delení. Obsahujú dvojvláknovú kruhovú DNA, ktorá má vyšší hustotný gradient ako jadrová a dá sa centrifugáciou s CsCl /v céziovom gradiente/ od jadrovej oddeliť. Ďalšou charakteristickou vlastnosťou plastidovej DNA je skutočnosť, že obsahuje len málo, alebo vôbec neobsahuje 5-metylcytozín. To je ďalší markér na rozlíšenie od jadrovej DNA. Pri denaturácii a následnej renaturácii plastidová DNA vytvára dvojreťazcovú štruktúru rýchlejšie ako jadrová /rýchlejšie renaturuje/.

Plastidová DNA sa replikuje semikonzervatívnym spôsobom po pričytení na membránu. Plastidová DNA má podobnú štruktúru s prokaryotickou DNA, čo poukazuje na symbiotický pôvod týchto organel.

Kódovacia kapacita plastidovej DNA je obmedzená a napriek tomu, že plastidy majú vlastný proteosyntetický aparát nedokážu si vyrobiť všetky potrebné bielkoviny. Na ptDNA sú lokalizované gény kódujúce tRNA a gény pre RNA chloroplastových ribozómov, ako aj niektoré štruktúrne gény, napr. pre niektoré enzýmy, ktoré sa zúčastňujú fotosyntézy. /Uveďme si, že informácia pre syntézu malej podjednotky ribulózodifosfátkarboxylázy nesie jadrová DNA a pre veľkú podjednotku ptDNA/. Vzhľadom k uvedenému je jasné, že plastidy /teda aj chloroplasty/ nie sú úplne autonómne organely, ale tzv. semiautonómne a z hľadiska molekulárne-genetických procesov tu ide o jadrovo-plastidovú kooperáciu /chloroplastová DNA sa označuje ctDNA/.

8.2 MITOCHONDRIÁLNA DNA /mtDNA/

podobné ako plastidová

Mitochondrie patria tiež k semiautonómnym organelám bunky, ktoré sa rozmnožujú delením. Obsahujú dvojreťazcovú kruhovú DNA. Veľkosť mtDNA je rôzna a je zaujímavé, že napr. kvasinky majú mtDNA /25 μm/ päťkrát väčšiu ako cicavce /5 μm/. Najväčšie mtDNA sa nachádzajú v rastlinných bunkách, viac ako 60 μm. Mitochondriálna DNA je často superšpiralizovaná, ktorá pomocou zárezov /nikov/ sa môže ľahko dostať do normálnej kruhovej formy. Od jadrovej sa mtDNA líši špecifickým obsahom C-G párov a rýchlosťou renaturácie analogicky ako ptDNA. Rovnako existuje podobnosť replikácie /väzba na membránu/ a podobnosť s vlastnosťami prokaryotickej DNA.

Ešte chceme uviesť, že r. 1981 sa podarilo objasniť úplnú nukleotidovú sekvenciu mtDNA človeka. Ľudský mitochondriálny chromozóm pozostáva z 16 569 párov báz /bp/ a obsahuje 27 génov /gény pre rRNA, tRNA a štruktúrne gény pre enzýmy, ktoré katalyzujú transport elektrónov a oxidačnú fosforyláciu/. Treba zdôrazniť, že mtDNA ako jediná DNA obsahuje gény pre dýchacie enzýmy cytochrómy a oxidázy, a preto jej genetická informácia je pre bunku životne dôležitá.

8.3 PLAZMIDOVÁ DNA /pDNA/

Plazmidy sú mimochromozómové fakultatívne súčasti bakteriálnej bunky, ktoré ako nositeľa genetickej informácie majú dvojreťazcovú kružnicovú molekulu DNA. Jej charakteristickou vlastnosťou je, že je v porovnaní s bakteriálnym chromozómom veľmi malá. Nukleoid /jadrový ekvivalent/ nazývaný aj bakteriálny chromozóm E. coli meria cca 1250 μm / = 4 · 10⁻¹² mg DNA/. Plazmidy, ktoré sa v bakteriálnych bunkách nachádzajú, majú dĺžku od 1 do 70 μm. Ich genetická kapacita je obmedzená. pDNA obsahuje väčšinou len gény pre vlastnú replikáciu a ešte niekoľko málo génov /napr. môžu obsahovať gény pre vlastný prenos do recipientných buniek/.

Plazmidy podmieňujú niektoré dôležité biologické vlastnosti bakteriálnej bunky, napr. rezistenciu voči antibiotikám.

Podľa vlastností poznáme viacej typov plazmidov /napr. faktor fertility = F-faktor, plazmidy prenášajúce rezistenciu označované R, kolicinogénne plazmidy - col a i./.. Všetky majú spoločnú vlastnosť - majú kružnicovú dvojreťazcovú DNA, ktorá sa pri replikácii viaže na membránu. Uvedené plazmidy tvoria skupinu tzv. donorových plazmidov.

ako nosič informácie

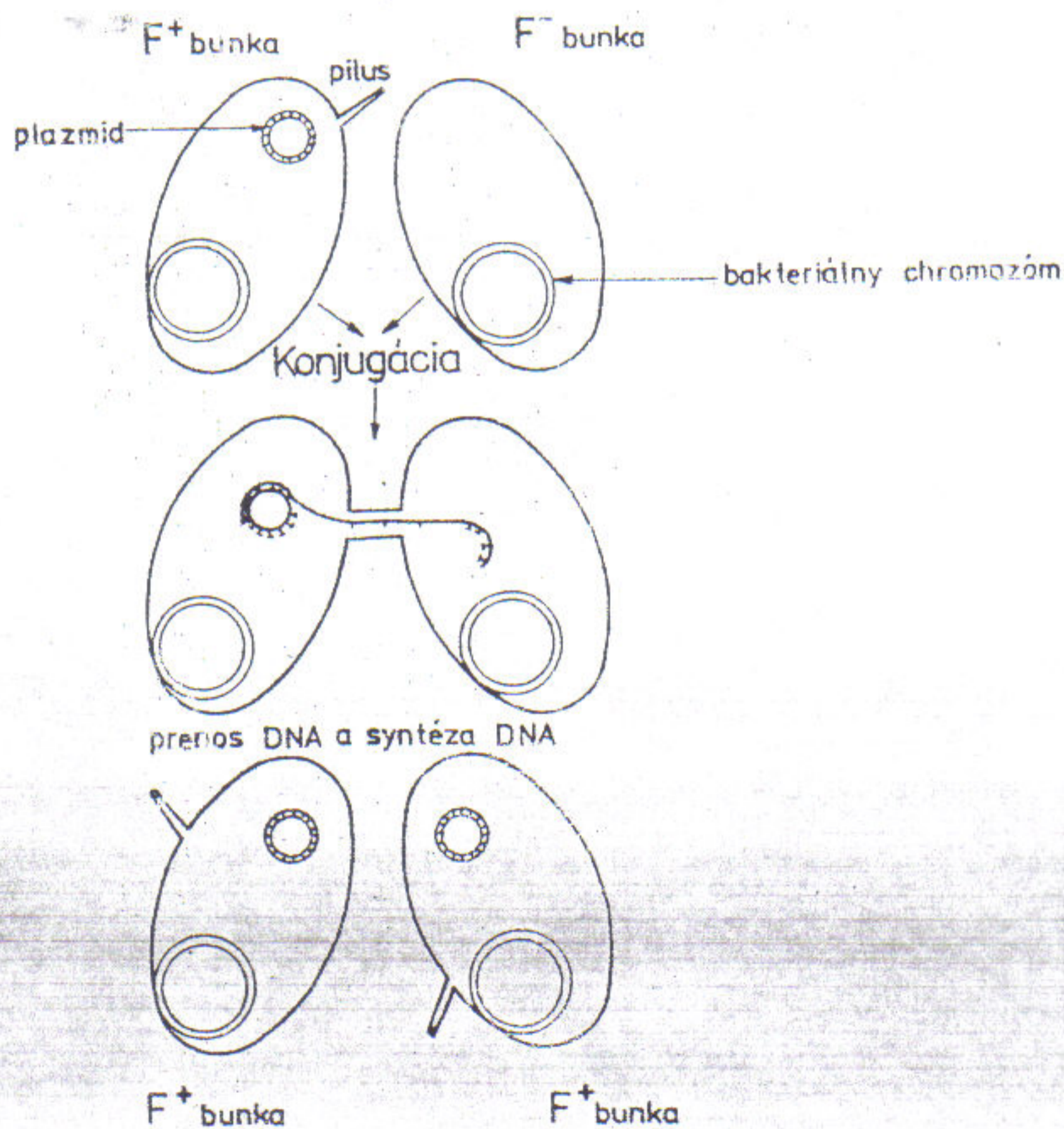
8.3.1 KLASIFIKÁCIA PLAZMIDOV

Plazmidy rozdeľujeme do troch základných skupín: F-plazmidy, R-plazmidy a col-plazmidy. V každej skupine sa môžu nachádzať plazmidy schopné konjugatívneho prenosu, tzv. konjugatívne plazmidy, alebo neschopné takéhoto prenosu, tzv. nekonjugatívne.

Niektoré plazmidy sa môžu začleniť do chromozómu /tzv. integrovaný stav plazmidu/ a z neho sa opäť vyčleniť. Plazmidy s takými vlastnosťami označujeme ako epizomové.

F - plazmidy

F-plazmidy sú molekuly zodpovedné za "sexualitu" baktérií. Bunky, ktoré majú F-plazmid /syn. F-faktor/ označujeme F^+ . Sú to bunky, ktoré v plazmidovej DNA majú uloženú informáciu - gény pre tvorbu konjugatívnych pilusov tzv. "sex-pilili", pomocou ktorých vytvára F^+ bunka smerom k F^- bunke konjugáčny mostík. Takto F^+ do F^- prenáša F-plazmid prípadne i ďalšie gény. Tento proces nazývame F-dukcia. F-plazmid sa môže integrovať do bakteriálneho chromozómu a opäť sa z neho vyčleniť. F^+ bunky sa svojho F-plazmidu pri konjugácii nezbavujú, lebo do F-buniek preniká kópia F-plazmidu /F-plazmid sa replikuje/ a z F^- bunky stávajú F^+ bunkami /obr. 40/.



Obr. 40 Baktéria s konjugatívnym plazmidom /F-plazmidom/

R - plazmidy

Je to skupina plazmidov, ktorá v hostiteľských bunkách podmieňuje rezistenciu /R/ na antibiotiká, chemoterapeutiká, ióny ťažkých kovov a niektoré druhy žiarenia /napr. UV-žiarenie/. Jeden R-plazmid môže niesť gény rezistencie pre viac antibiotík. Väčšina R-plazmidov je schopná konjugácie s blízkymi i vzdialenejšími druhmi baktérií.

Col - plazmidy

Kolicinogénne /col/ plazmidy podmieňujú tvorbu polypeptidových toxínov - kolicínov, ktorými sú schopné usmrcovať bakteriálne bunky iného druhu. Bunky, ktoré majú col-faktor sú voči vlastným kolicínom imúnne.

8.4 MIERNE /TEMPEROVANÉ/ FÁGY

Pod pojmom temperovaný alebo mierny fág rozumieme takého fága, ktorého DNA sa môže začleniť do chromozómu hostiteľskej bunky. DNA fága začlenená takto sa označuje ako profág. Bunka obsahujúca profága sa nazýva lyzogénna. Tento stav nazývame lyzogénny stav na rozdiel od prípadu, keď sa fág nachádza mimo chromozómu a po napadnutí bunky rozmnoží sa v nej a napokon ju lyzuje - lytický stav.

8.5 VÝZNAM PLAZMIDOV

Plazmidy sú v súčasnosti nepostrádateľným nástrojom v oblasti génového inžinierstva, pri prenose génov do hostiteľských buniek, pretože sú najfrekvencovanejšími vektormi cudzordej DNA. Nároky na plazmidy, ako klonovacie vektory sú nasledovné: mali by byť predovšetkým malé /s nízkou relatívnou molekulovou hmotnosťou/; nekonjugatívne /nemali by sa včleňovať do chromozómu/. Ďalším dôležitým kritériom je, aby boli pod uvoľnenou kontrolou replikácie, a teda pri ich replikácii v hostiteľskej bunke sa vytvoril čo najväčší počet kópií. Ďalej by mali mať aspoň jedno miesto citlivé voči niektorej restriktívnej endonukleáze a napokon mali by niesť jeden alebo viac značkových génov /markérov/, ktoré možno využiť pri selekcii transformantov /buniek, ktoré sa použitými plazmidmi transformovali/.

8.6 TRANSPOZÓNY

Transpozón je taká sekvencia DNA, ktorá je schopná transpozície /premiestnenia/. Transpozóny sa označujú aj ako mobilné elementy, transpozabilné elementy, niekedy tiež tzv. "skáčúce gény" /jumping genes/.

Transpozícia je premiestnenie transpozónu alebo jeho kópie z jedného miesta /donorové miesto/ do iného /cieľové miesto/. Transpozícia môže byť intramolekulárna, ktorá prebieha medzi donorovým miestom transpozónu a cieľovým miestom na tej istej molekule DNA alebo replikónu. Intermolekulárna transpozícia prebieha medzi donorovou molekulou DNA a recipientnou molekulou DNA alebo medzi donorovým replikónom a recipientným replikónom. /Replikón je molekula nukleovej kyseliny, alebo jej časť, ktorá obsahuje počiatočnú replikáciu a je schopná in vivo autonómne sa replikovať./

Transpozóny sa vyskytujú v prokaryotických i eukaryotických organizmoch.

Doteraz najpreštudovanejšie transpozóny rozdeľujeme do troch skupín podľa veľkosti sekvencie na:

- inzerčné sekvencie /IS/, do 2000 párov
- Tn-elementy, niekedy označované aj ako translokóny,
- bakteriofág Mu.

8.6.1 INZERČNÉ SEKVENCIE /IS/

IS predstavujú úseky DNA dlhé do 2000 bázových párov /bp/. Obvykle neobsahujú gény, alebo len veľmi málo /1 - 4/, ktoré sú potrebné na ich translokáciu. Všetky IS majú na koncoch niekoľko nukleotidov /20 - 40/, ktoré vykazujú palindromovú symetriu /inverzné opakovanie = inverted repeat = IR sekvencie/. V bakteriálnom chromozóme je obvyčajne viac kópií IS, napr. E. coli má viac ako 20 IS, F-plazmid len 4. IS-elementy zodpovedajú za integráciu F-plazmidu na rôzne miesta bakteriálneho chromozómu. Fenotypový prejav IS-elementov sa najčastejšie prejavuje v tom, že vloženie do génu v replikóne sa daný gén obvyčajne inaktivuje.

8.6.2 Tn - ELEMENTY

Tn-elementy sú komplexnejšie ako IS-elementy. Obsahujú 2000 - 80 000 bp. Nachádzajú sa v plazmidoch baktérií. Často obsahujú IS-elementy, ktoré Tn-element ohraničujú /40 - 1400 párov nukleotidov/. Tn-elementy obsahujú gény, napr. pre rezistenciu voči antibiotikám, ťažkým kovom a i., ktoré sa prejavujú na fenotype bakteriálnej bunky.

8.6.3 BAKTERIOFÁG Mu

Mu-fág dostal názov od mutátor /schopný spôsobiť mutáciu/. Mu-fág je schopný včleniť sa do ktoréhokolvek miesta genómu bez akejkoľvek selektív-
nosti /výberovosti/ proti IS a Tn je veľký, obsahuje 37 000 bp. Nachádza sa
v E. coli a je schopný spôsobiť lyzogéniu i lýzu bakteriálnych buniek.

9. GENETICKÝ KÓD

9.1 DEFINÍCIA GENETICKÉHO KÓDU

Genetická informácia je zapísaná poradím nukleotidov v nukleových kyselinách, menovite v DNA. Z DNA sa pomocou RNA prenáša na bielkoviny, kde sa prejavuje v poradí /sekvencii/ aminokyselín v polypeptidovom reťazci.

Zápis genetickej informácie je viazaný na 4 symboly /4 hlavné nukleotidy/, kým zápis informácie v bielkovinách 20-timi symbolmi /20 proteínogénnych aminokyselín/. Pri odovzdávaní informácie musí dôjsť k priradeniu prvkov jednej abecedy /reč nukleotidov/ k prvkom druhej abecedy /reč aminokyselín/. Princíp, podľa ktorého sa takéto priradenie deje, nazývame genetický kód.

Genetický kód teda stručne definujeme ako pravidlo, podľa ktorého sa uskutočňuje priradenie nukleotidov k aminokyselinám.

Je len logické, že kódovanie takým spôsobom, pri ktorom by nám 1 nukleotid určil 1 aminokyselinu v bielkovine, nie je možné. Ani dva nukleotidy idúce za sebou /dvojpísmenový kód/ nám nepokryjú požiadavku na kódovanie 20 aminokyselín, lebo môžeme dostať len $4^2 = 16$ dvojíc nukleotidov. Z toho vyplýva, že genetický kód musia tvoriť tri nukleotidy idúce za sebou /triplet/. Ze 4 nukleotidov môžeme zostrojiť $4^3 = 64$ tripletov, ktoré nielen pokrývajú, ale aj presahujú počet tripletov potrebných na kódovanie 20 aminokyselín.

9.2 EXPERIMENTÁLNE RIEŠENIE GENETICKÉHO KÓDU

V rokoch 1959-1961 Cicho a Grunberg-Managová pracovali na syntéze umelých polyribonukleotidov. V in vitro systéme boli schopní "vyrobiť" umelé ribonukleové kyseliny najprv len monotematické, ktoré sa skladali len z jedného typu nukleotidov, neskôr zložené z viac typov nukleotidov. Napríklad nasynthesizedovali reťazec RNA skladajúci sa zo samých uridylových zbytkov, t.j. poly-U-U-U-U-U-./.

Túto poly-U potom r. 1961 Nirenberg a Matthei použili do bezbunkového systému pre proteínovú syntézu, ktorý okrem poly-U obsahoval: ATP, ribozómy, Mg^{2+} a aminokyseliny. Pokus urobili tak, že vždy jednu aminokyselinu radioaktívne označili. Výsledok bol fascinujúci! Poly-U stimulovala len inkorporáciu fenylalanínu do bielkoviny.

Teda kód pre fenylalanín je UUU.

Tento úspech stimuloval prirodzene ďalšie pokusy s rôznymi umelými polyribonukleotidmi.

V tomto systéme syntetizačným enzýmom bola polynukleotidfosforyláza, ktorá je schopná syntetizovať polyribonukleotidy z ribonukleoziddifosfátov /ADP, UDP, CDP a GDP/. Dôležité je, že tento enzým nevyžaduje templát /matricu/.

Napr. syntetizovali poly-C /CCC kóduje prolín/, ďalej poly-A /AAA kóduje lyzín/, ako aj polyribonukleotidy zložené z presného množstva rôznych ribonukleotidov. Ako príklad si uveďme poly U-A, kde U tvorilo 87 % a A 13 %. Pravdepodobnosť pre jednotlivé aminokyseliny bola nasledovná:

$3U = UUU = 0,87 \cdot 0,87 \cdot 0,87 = \text{Phe}$

$2U1A = UUA \text{ alebo } UAU \text{ alebo } AUU = 0,87 \cdot 0,87 \cdot 0,13 = \text{Tyr, Ile}$ *Ileu*

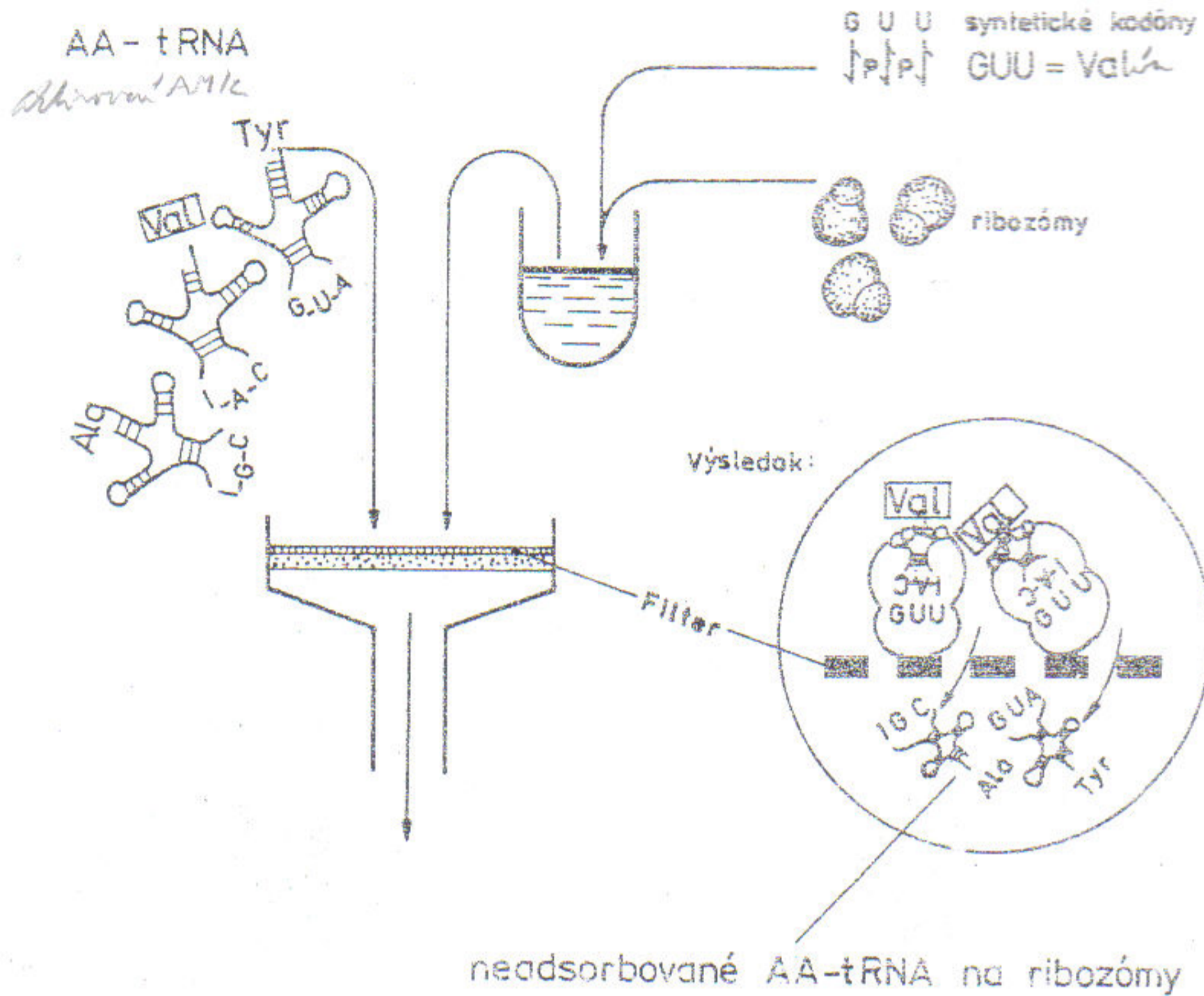
Ak relatívnu frekvenciu sekvencie UUU budeme považovať za 100 %, potom $AUU = UAU = UUA$ bude približne 15 %. Pri UUU sa do bielkoviny zabuduje fenylalanín, pri kodónoch zostavených z 2U1A sú to aminokyseliny tyrozín a isoleucín /Tyr a Ile/.

Použitím rôznych umelých mRNA experimentátori určili tripletety takmer pre všetky aminokyseliny. V týchto tripletoch sa však nevedelo presné poradie báz.

Ďalšie experimenty pomohli r. 1964 a neskôr, rozriešiť aj tento dôležitý molekulárno-genetický problém.

Autori naplánovali pokus tak, že dali do proteín-syntetizujúceho systému izolované tripletety /kodóny/ miesto polyribonukleotidov, ďalej špecifické molekuly tRNA, všetky typy aminokyselín /vždy jednu označenú/ a ribozómy. Keď sa našla správne "prečítaná" väzba aminokyselina-tRNA s tripletom /kodómom/ naviazaným na ribozóm, vytvoril sa komplex, ktorý priestorove bol väčší ako každá zložka zvlášť. Preto cez filter prechádzali len tie súčasti tohto systému, ktoré nepatrili do komplexu /obr. 41/.

Použitie trinukleotidov /ako mRNA/ umožnilo pomerne v krátkom čase stanoviť poradie nukleotidov takmer vo všetkých kodónoch.



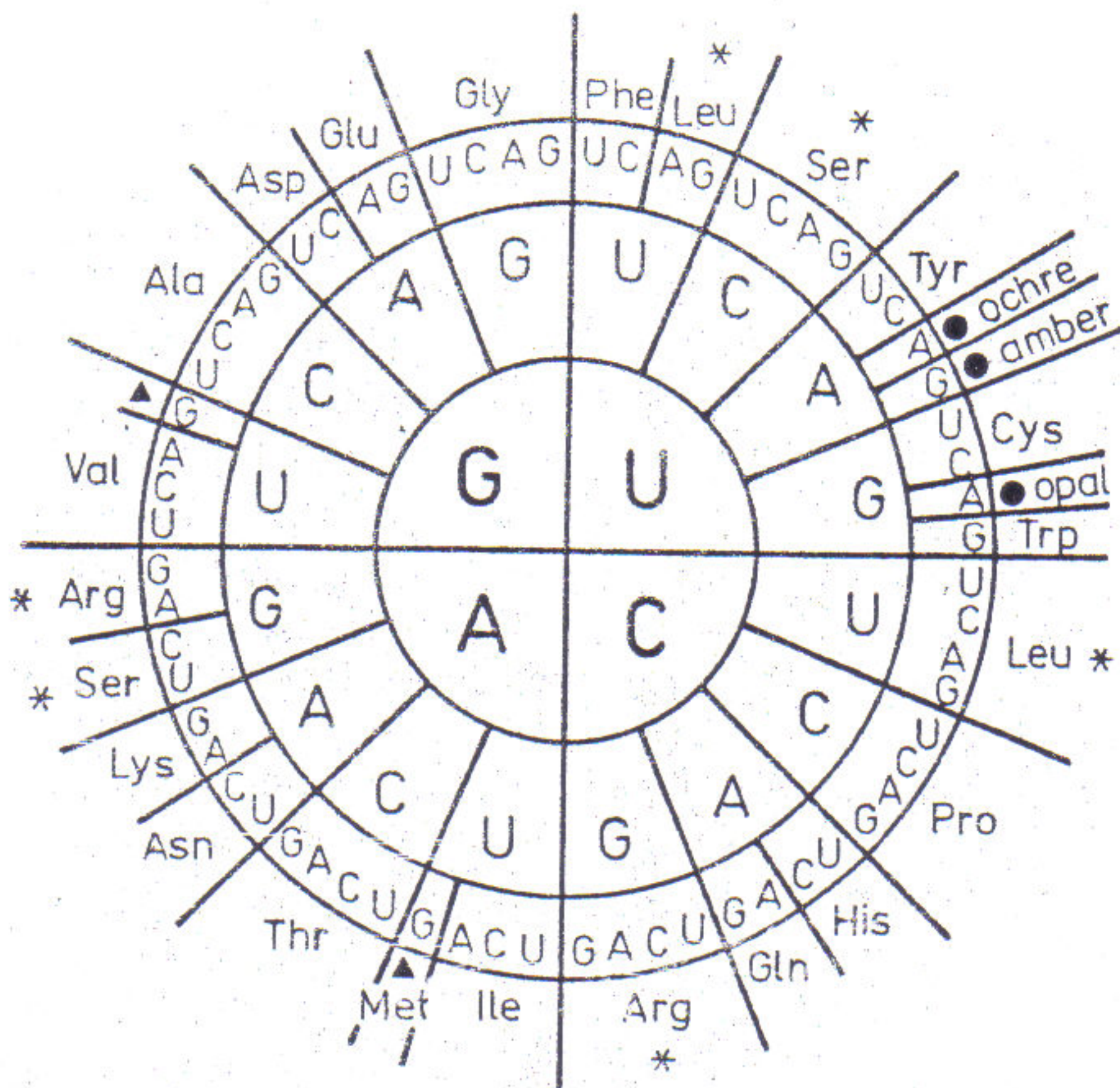
Obr. 41 Schéma experimentálneho riešenia genetického kódu

Výsledky mnohých experimentov umožnili zostrojiť tzv. kódové slnko /obr. 42/, v ktorom 61 zo 64 možných tripletov kóduje aminokyseliny a len 3 sú tzv. kodóny bez zmyslu. Majú triviálne názvy: UAG - amber, UAA - ochre, UGA - opal. Sú signálmi pre ukončenie syntézy bielkoviny, a preto sa nazývajú aj stop-kodóny.

Tabuľka kodónov alebo kódové slnko má pre molekulárnu biológiu obrovský význam. Mnohí autori ju zrovnávajú s periodickou sústavou prvkov v chémii. Nech akokoľvek, rozlúštenie genetického kódu, ktorý bol publikovaný r.1961 Nirenbergom na Biochemickom zjazde v Moskve, bol v každom prípade udalosťou prvoradého významu pre ďalší vývin molekulárnej genetiky.

9.3 VLASTNOSTI GENETICKÉHO KÓDU

Už sme si povedali na začiatku našich úvah o genetickom kóde, že je tripletový, t.j. tri nukleotidy idúce za sebou v mRNA určujú zaradenie jednej aminokyseliny do bielkoviny. Tento fakt sa veľakrát experimentálne potvrdil.



Legenda:

- ▲ štartovacie kodóny
- terminačné kodóny
- * dvakrát sa vyskytujúce kodóny

Obr. 42 Kodónové slnko

Dalšou vlastnosťou genetického kódu je, že je lineárny, číta sa za sebou bez akýchkoľvek znamienok, ktoré by oddeľovali jednotlivé kodóny. Každý nukleotid patrí len jednému tripletu /neskôr si uvedieme niektoré výnimky/. Hovoríme, že genetický kód je neprekrývajúci.

Genetický kód je degenerovaný. Tento pojem v genetickej terminológii má skôr opačný /pozitívny/ význam ako v bežnom slova zmysle. Znamená toľko, že jednu aminokyselinu môže kódovať viac ako jeden kodón. Len metionín a tryptofán sú kódované jedným tripletom /kodónom/.

Degenerácia genetického kódu je zrejmá z kódového slnka /obr. 42/. Dnes túto vlastnosť chápeme ako ochranný mechanizmus, ktorý sa v priebehu evolúcie vytvoril a osvedčil. Ak by sme mali totiž k dispozícii len 20 kodónov

pre 20 aminokyselín, znamenalo by to, že by sa každá zmena nukleotidu musela odraziť v zmene aminokyselinového zloženia bielkoviny, čo by mohlo viesť k syntéze zmenenej, prípadne nefunkčnej bielkoviny. Hoci máme príklady, kedy aj zmena jedného nukleotidu môže zapríčiniť veľké zmeny v organizme /napr. hemoglobín A, hemoglobín S/, musíme na tomto mieste zdôrazniť, že práve degenerácia genetického kódu spôsobuje, že sa vyskytujú zriedkavo.

Skupinu kodónov pre jednu aminokyselinu nazývame kodónová rodina. Je zaujímavé, že väčšina aminokyselín je kódovaná párnym počtom kodónov, tak serín a leucín majú 6 kodónov, glycín a alanín 4 kodóny, kyselina glutamová, tyrozín a histidín 2 kodóny atď.

Pri väčšine kodónov degenerovanosť sa týka tretieho nukleotidu, t.j. na 3'-OH konci kodónu, ktorý je najmenej špecifický. Niekedy sa v tejto polohe vystriedajú všetky bázy /napr. pre Gly a Ala/ alebo záleží len na tom, či je tu purín alebo pyrimidín /kyselina glutamová, kyselina asparágová/. V antikodóne zasa prvý nukleotid /v polohe 5'/, resp. jeho dusíkatá báza sa nazýva wobble báza, kolísavá, a často sa páruje podľa pravidla o kolísavom párovaní báz. Toto pravidlo hovorí, že nukleotidy na 5'-konci antikodónu môžu sa odlišne párovať, ako to uvádza tabuľka 6.

Tabuľka 6.: Kolísavé párovanie báz

Báza v antikodóne tRNA /5'/	Báza v kodóne mRNA /3'/
U	A,G
A	U
C	G
G	C,U
I /inozín/	U,C,A
Ψ /pseudouridín/	A,G, zriedka s U

Z uvedeného vyplýva, že prvé dva nukleotidy kodónu sú vlastne rozhodujúce, a preto sa nazývajú primárne determinanty kódovej špecificity.

Genetický kód je v podstate univerzálny. Univerzálnosť znamená, že tie isté kodóny zaraďujú určité aminokyseliny počnúc od najjednoduchších systémov až po človeka.

Zhrňujúc vyššie uvedené, môžeme povedať, že genetický kód má niektoré základné vlastnosti. Genetický kód je:

- tripletový,
- neprekrývajúci,
- degenerovaný,
- univerzálny,
- lineárny.

10. SYNTÉZA BIELKOVÍN

DNA plní v organizme dve dôležité úlohy:

- svojou schopnosťou samozdvojenia /replikácie/ zabezpečuje prenos genetickej informácie na potomstvo /rozmnožovanie/ a
- zakódovanú genetickú informáciu /v poradí nukleotidov/ odovzdáva prostredníctvom ribonukleových kyselín z jadra do cytoplazmy, kde na ribozómoch odohráva sa proces, ktorý nazývame biosyntéza bielkovín, stručne hovoríme o proteosyntéze.

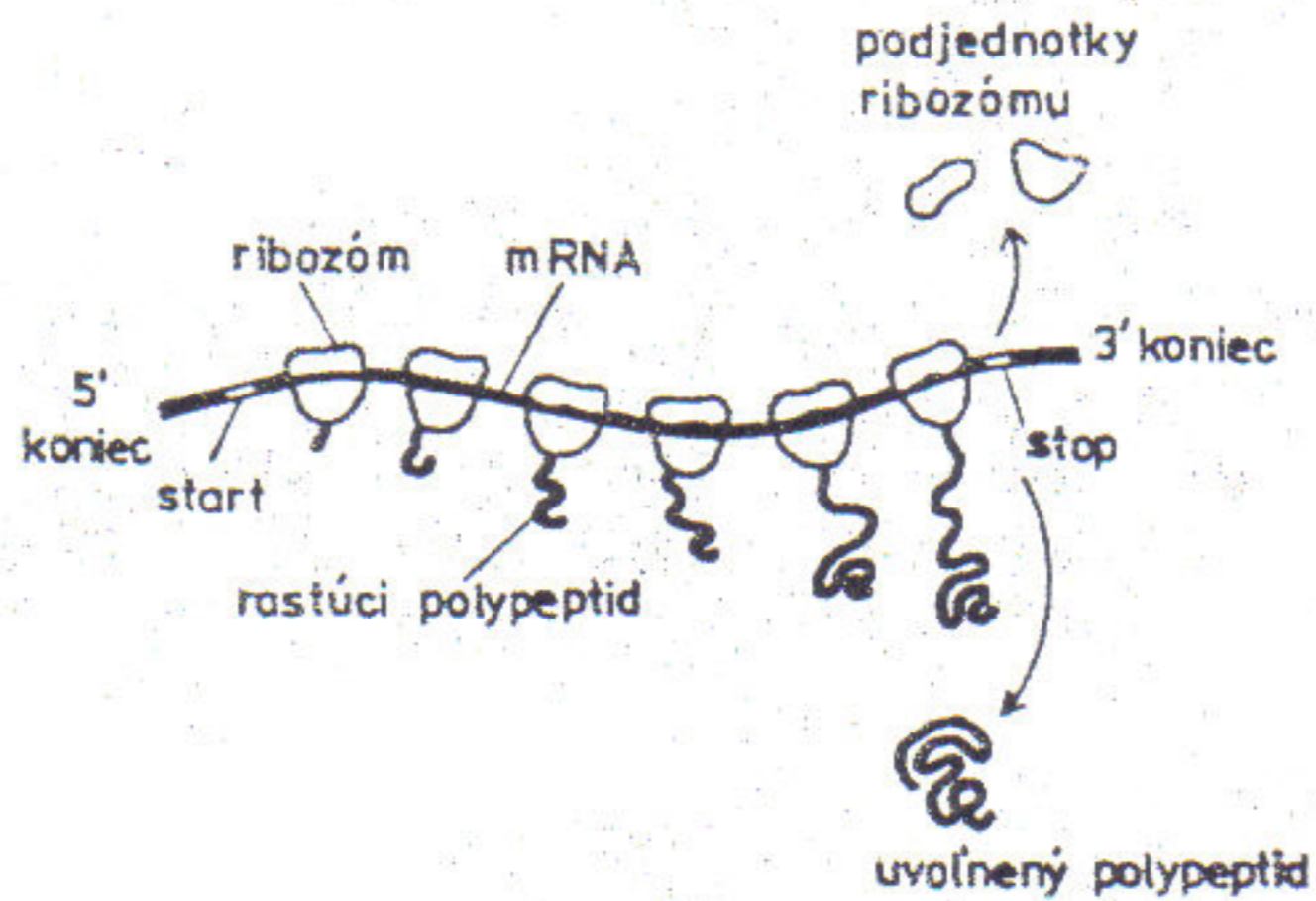
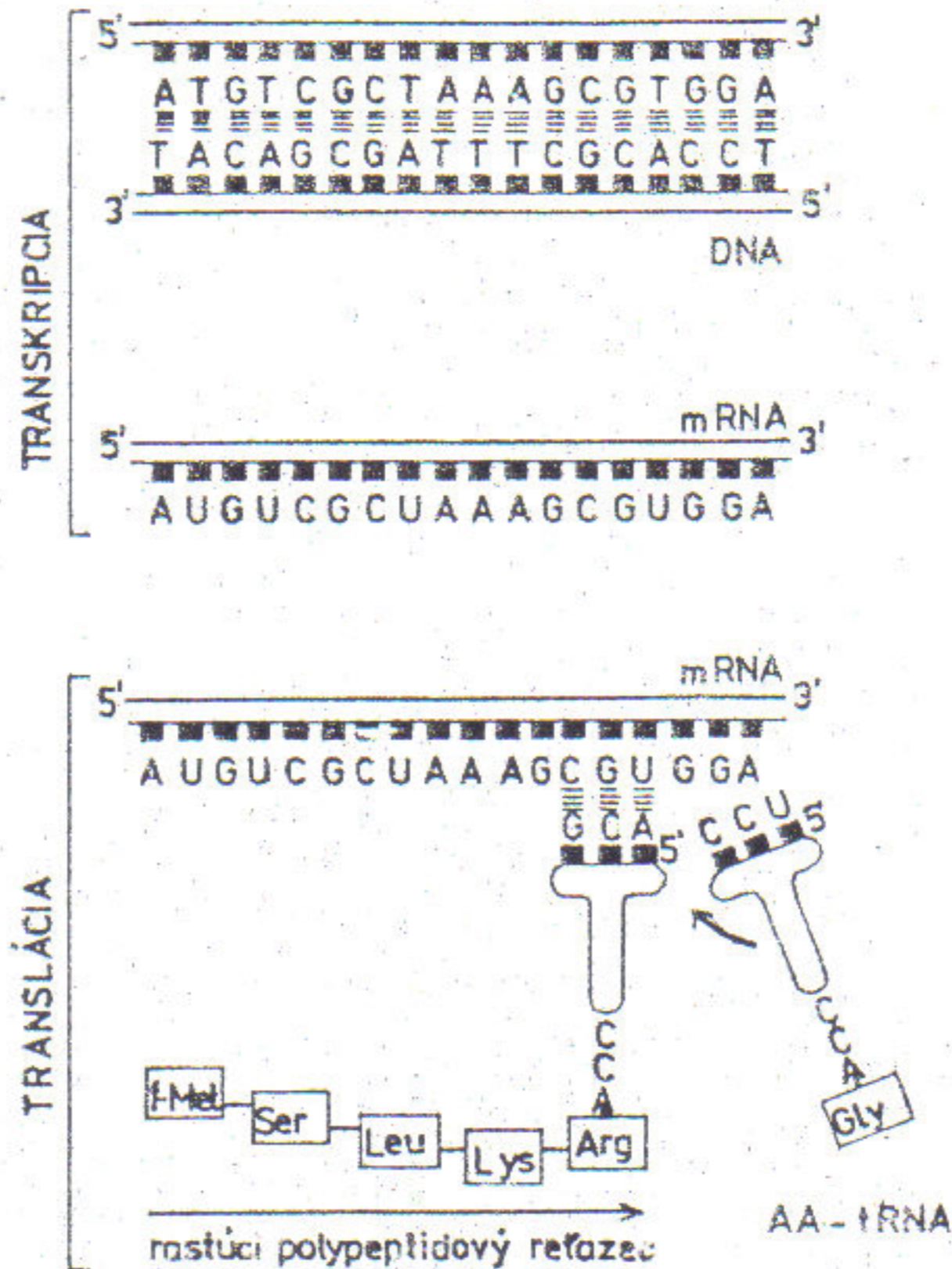
10.1 CHARAKTERISTIKA PROTEOSYNTÉZY

Biosyntéza bielkovín patrí k najkomplikovanejšiemu syntetickým procesom, ktoré katalyzujú biologické systémy. Je unikátna v tom, že 4 väzby bohaté na energiu /ATP a GTP/ spotrebujú sa na syntézu relatívne nízko energetickej väzby, ktorou je peptidová väzba $-CO-NH-$. Túto daň musí zrejme bunka odviešť za vysokú presnosť a ireverzibilnosť reakcií pri translácii. A napokon okrem enzýmov, 7-9 neribozómových rozpustných bielkovinových faktorov sa podieľa na polymerizačných reakciách.

Proces biosyntézy bielkovín sa odohráva na ribozómoch. Zopakujeme si, že prokaryonty majú ribozómy zložené z 30S a 50S podjednotiek, ktoré tvoria 70S ribozómy a eukaryonty majú 80S ribozómy zložené z podjednotiek 40S a 60S. Mitochondrie a plastidy majú ribozómy zhodné s bakteriálnymi /70S/. Vzhľadom k tomu, že najviac poznatkov o proteosyntéze máme z pozorovaní a experimentov pri prokaryotoch /najmä E. coli/, budeme v ďalšom uvažovať o malej podjednotke ako o 30S a veľkej 50S.

Ak hovoríme, že biosyntéza bielkovín je zložitý a mnohostupňový proces, potom musíme hľadať časovú postupnosť odohrávajúcich sa dejov.

V prvom kroku sa musí odohrať prepis genetickej informácie z DNA na mRNA, ktorý nazývame transkripcia; v druhom kroku preklad informácie z mRNA do bielkovín - translácia /obr. 43/.



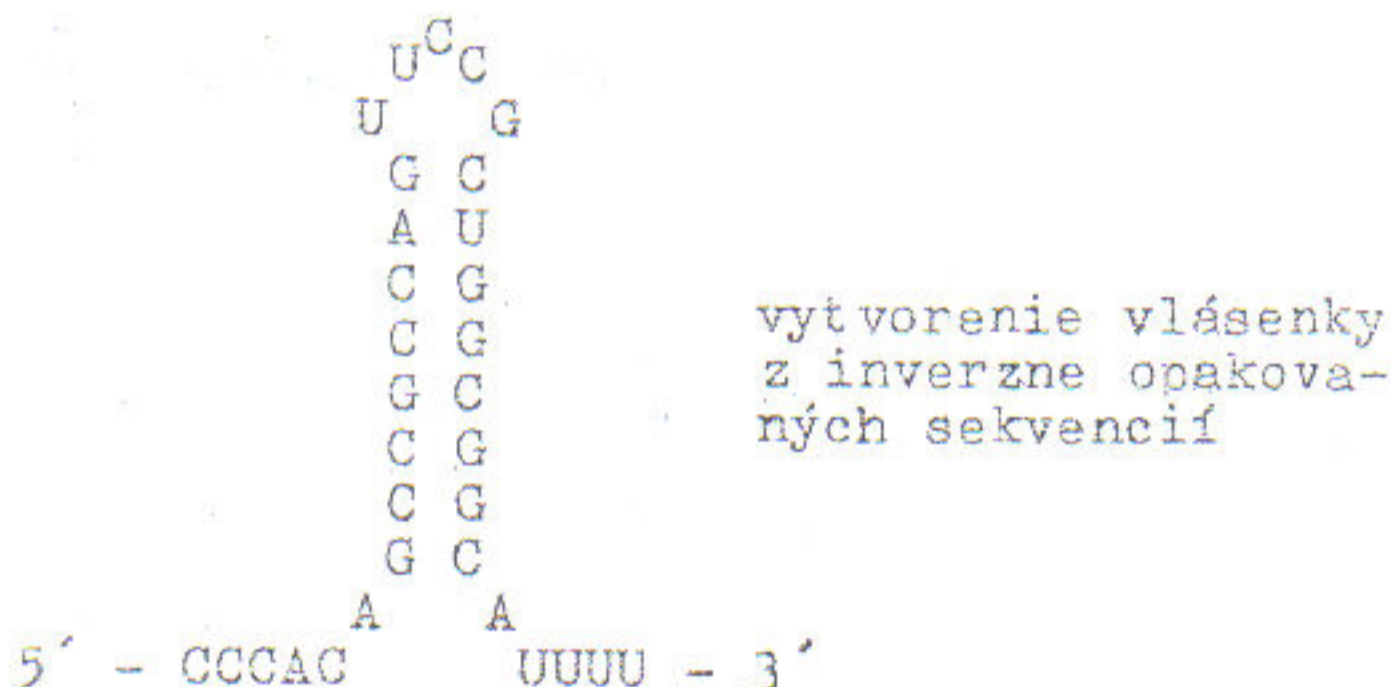
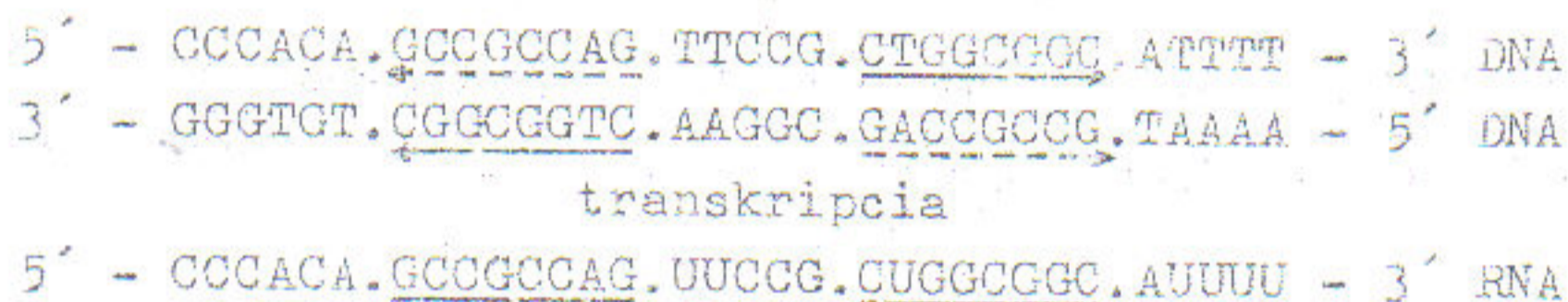
Obr. 43 Proteosyntéza, schéma transkripcie a translácie

10.2 TRANSKRIPCIA

Vzhľadom k tomu, že sa jedná o prepis informácie v rovnakom jazyku /z mRNA či nukleotidov do reči nukleotidov/, nenaráža tento proces na väčšie ťažkosti a je dosť presný. Uplatňuje sa tu princíp komplementarity /A-U, C-G/, ktorý sprevádza všetky dôležité molekulárno-genetické deje.

DNA obsahuje signálne sekvencie pre zachytenie RNA polymerázy - **promotory**. Teoreticky by sa informácia mohla kopírovať z oboch reťazcov, ale tomu tak nie je. Štruktúra promotora automaticky determinuje, ktorý z reťazcov sa bude prepisovať. Faktor σ /sigma/ rozozná začiatok transkripcie a zodpovedá aj za výber reťazca. V promotorových oblastiach boli nájdené špecifické oblasti, napr. rôzne dlhé monotematické úseky alebo sekvencie, bohaté na niektoré bázy; nazývajú sa rozpoznávacie miesta. Tak napr. pri prokaryotoch v oblasti -35 od štartovacieho nukleotidu je tzv. rozpoznávacie miesto bohaté na A-T páry, nazýva sa TATA-box. /Pri eukaryotoch sa nazýva Goldberg-Hognessova sekvencia./ Väzbové miesto pre RNA - polymerázu je približne v oblasti -10 /Pribnowa sekvencia/. Až potom nasleduje štart transkripcie. Oblasť od +1 nukleotidu je transkribovaná /prepísovaná/, ale netranslatovaná /neprekladaná/.

Transkripcia sa odohráva len na jednom z dvoch reťazcov DNA, ktorý má orientáciu 3' → 5'. Tento reťazec sa nazýva kodogénny, v novšej literatúre sa označuje ako mínus reťazec. Syntéza mRNA katalyzovaná enzýmom RNA - polymerázou II má smer 5' → 3'. RNA - polymeráza pomocou faktora ρ /ró/ rozozná terminačný signál a ukončí prepis informácie z DNA.



Obr. 44 Vlásoka RNA ako terminačný signál pre ukončenie transkripcie

Ako terminačný signál neslúži len jeden zo stop-kodónov, ale aj vytvorenie tzv. vlásoky /slučky/ z inverzne opakovaných sekvencií nukleotidov /obr. 44/. Hovoríme, že terminátory sú tvorené autokomplementárnou nukleotidovou sekvenciou, ktoré sa prejavujú tvorbou vlásokových štruktúr. Tieto vlásoky RNA-polymeráza rozoznáva na úrovni sekundárnej štruktúry buď na vlákne DNA alebo najčastejšie na novosyntetizovanej mRNA. Vlásoku tvorí oblasť za stop-kodónom, ktorá sa nazýva neprekladaná. Možno teda povedať, že prekladaná oblasť genetickej informácie je ohraničená iniciačným kodónom a jedným z terminačných kodónov.

Tá časť kodogénneho reťazca DNA, ktorá sa naraz prepisuje, nazýva sa transkripčná jednotka - transkripton. Po splnení funkcie enzým /RNA-polymé-
ráza/ sa z DNA odpúta a DNA sa zrenaturuje.

Výsledkom transkripcie pri prokaryotoch je multigénová mRNA, ktorá ne-
sie informáciu pre viac bielkovinových reťazcov. Je zložená z niekoľkých sek-
vencií: pre štart translácie, neprekladanú oblasť /sekvenciu/, kodón AUG,
sekvencie pre samotnú transláciu /kódujúce sekvencie/ a pre ukončenie trans-
lácie /terminačné kodóny: UAA, UAG či UGA/ a neprekladanú koncovú oblasť.

Sekvencia pre štart translácie sa opäť skladá z viacerých oblastí: je
to polypurinový úsek niekoľkých nukleotidov pred štartovacím kodónom, tzv.
Shine-Dalgarnova sekvencia, ktorá je obvykle druhovo špecifická a touto sek-
venciou sa komplementárne spája s 16S rRNA malej ribozómovej podjednotky,
potom samotný iniciačný štartovací kodón AUG a napokon nukleotid A alebo G
hneď za AUG.

Výsledkom transkripcie pri eukaryotoch je hn-RNA, ktorá sa až po úpra-
vách mení na zrelú mRNA, ako sme si to popísali v predchádzajúcich kapito-
lách. Eukaryotická mRNA je obvykle monogénová.

10.3 TRANSLÁCIA

Translácia je proces, pri ktorom sa informácia z poradia nukleotidov
prekladá do poradia aminokyselín v bielkovine. Deje sa na princípe komple-
mentarity na základe pravidiel, ktoré určuje genetický kód. Triplet nukleo-
tidov v mRNA /kodón/ určuje zaradenie jednej aminokyseliny pomocou antikodó-
nov jej transferovej RNA.

Pri prokaryotoch /nie však eukaryotoch/ je proces translácie tesne
zviazaný s transkripciou mRNA a začína skôr ako skončí transkripcia. Na ras-
túcu mRNA hneď nasadajú ribozómy a mRNA sa hneď prekladá. Táto mRNA sa spá-
ja s viacerými ribozómami do útvaru, ktorý nazývame polyzóm.

Biosyntéza každej bielkoviny začína metionínom, lebo kodón AUG ako uni-
verzálny iniciačný signál je prvým prekladaným tripletom všetkých mRNA.

Translácia - preklad informácie z mRNA do bielkovín, zahŕňa tieto
kroky:

- aminoacyláciu transferových RNA,
- iniciáciu syntézy peptidového reťazca,
- ^{prodlžovanie} elongáciu peptidového reťazca,
- ^{ukončenie} termináciu a uvoľnenie reťazca z ribozómu.

10.3.1 AMINOACYLÁCIA tRNA

Aminokyseliny, ktoré majú byť zabudované do bielkovinového reťazca nie sú schopné samy prečítať informáciu na mRNA. Preto každá aminokyselina musí prejsť chemickou modifikáciou, presnejšie povedané stereochemickou zmenou, ktorou získava špecifický reliéf, ktorý je schopný spojiť sa s maticou /mRNA/ presným počtom vodíkových väzieb. Chemická modifikácia zahŕňa krok, pri ktorom sa aminokyselina spája jednou kovalentnou väzbou so špecifickou molekulou-adaptorom.

Ako adaptory slúžia transferové RNA. Každá z 20 aminokyselín má svoju tRNA, ktorej štruktúra je špecificky prispôbena pre spojenie s presnou sekvenciou nukleotidov na maticí mRNA /antikodón - kodón/. Vzhľadom na degeneratívnošť genetického kódu predpokladá sa, že transferových RNA je viac ako 20 a nazývajú sa izotransferové RNA. V závislosti od špecifickosti bázovej sekvencie môžu nespárované úseky tRNA vytvárať vodíkové väzby s maticou /mRNA/, ďalej s ribozómovou RNA a s aktívnym centrom enzýmu, ktorý tento proces katalyzuje.

Skôr ako sa uskutoční aminoacylácia tRNA, musí prebehnúť aktivácia aminokyselín. Táto sa deje spojením aminokyseliny s ATP za účasti enzýmu, pričom sa uvoľňuje pyrofosfát a tvorí sa komplex enzým - AA-AMP. /Aj v našej literatúre sa užíva medzinárodný symbol pre aminokyselinu AA = amino acid./

Pre spojenie AA s príslušnou tRNA i pre aktiváciu AA postačuje jediný enzým: aminoacyl-tRNA-syntetáza, nazýva sa aj tRNA-ligáza. V staršej literatúre sa označoval ako aktivačný enzým.

Na enzýme, ktorý tvorí v prvej fáze komplex E-AA-AMP je v dostatočnej blízkosti priestor pre príslušnú tRNA, ktorá musí byť tak orientovaná, aby sa jej 3'-OH koniec mohol spojiť s AA esterickou väzbou, čím vzniká aminoacyl-tRNA. Z uvedeného vyplýva, že špecifická tRNA-syntetáza musí rozoznať príslušnú AA a spojiť ju s príslúchajúcou tRNA. Oba kroky prebiehajú s veľkou presnosťou /obr. 45 - pozri str. 88/.

Aminoacyl-tRNA je veľmi dôležitá molekula pri proteosyntéze. V nej je aminokyselina pripojená svojou karboxylovou skupinou k 3'-OH skupine ribózy koncového nukleotidu tRNA esterickou /vysokoenergetickou/ väzbou, ktorá jej prenecháva AMP. Energia tejto väzby pravdepodobne postačuje na zaradenie aminokyseliny do peptidového reťazca.

Aminoacyl-tRNA-syntetázy sú špecifické enzýmy. Majú rôznu molekulovú hmotnosť 42 000 - 200 000. Niektoré sa skladajú z jedného polypeptidu, iné z dvoch /najčastejšie identických/ alebo štyroch podjednotiek.

Treba tu ešte poznamenať, že určité množstvo aminokyselín viazaných na tRNA je stále k dispozícii rezervisle od toho, či sa pre proteosyntézu využijú alebo nie.

10.3.2 INICIÁCIA SYNTÉZY PEPTIDOVÉHO REŤAZCA

Vlastná biosyntéza bielkovín začína sa čítaním informácie na matrici mRNA. V oblasti tzv. iniciačného signálu pripája sa na mRNA malá podjednotka ribozómu, a potom nasleduje spojenie s molekulou N-formylmetionyl-tRNA /f-Met-tRNA/. f-Met-tRNA je komplex formylovaného metionínu /NH₂ skupina reaguje s formaldehydom, čím sa blokuje a udáva smer syntézy peptidu z N konca k C koncu N ---> C/ s príslušnou tRNA_f. Spojenie 30S podjednotky s mRNA obstaráva 3'-koniec 16S ribozómovej RNA, ktorý rozozná poradie báz komplementárne k začiatku mRNA /oblasť pred iniciačným kodónom = Shine-Dalgarnova sekvencia. Takto sa vytvorí tzv. iniciačný komplex.

Formylácia metionínu sa odohráva pomocou enzýmu formylázy. Zistilo sa, že pri E. coli asi 70 % metionín-tRNA je v N-formylovanej forme. Tento výnimočný komplex pre začiatok proteosyntézy sa líši štruktúrne od normálnej Met-tRNA_M, ktorá slúži pri výstavbe bielkovín vo vnútri reťazca. Po skončení syntézy odštiepuje sa pravdepodobne f-Met z bielkoviny enzýmovo.

Pri formovaní iniciačného komplexu a ďalších reakciách až do vytvorenia kompletného ribozómu pripojením 50S podjednotky, podieľajú sa na tejto fáze proteosyntézy tri bielkovinové tzv. iniciačné faktory. Dnes sa používa jednotné označenie IF-1, IF-2 a IF-3.

Prvý krok k vytvoreniu iniciačného komplexu je spojenie IF-3 a voľnou 30S podjednotkou. Predpokladá sa, že IF-3 rozozná oba štartovacie kodóny /AUG, GUG/. Každý štartovací kodón má svoj IF faktor označujeme ich ako IF-3 alfa a IF-3 beta. Nasledovný krok je pripojenie mRNA na f-Met-tRNA_f pomocou IF-1 a GTP. Pritom sa vytvorí priama väzba medzi f-Met-tRNA_f a GTP pomocou IF-2. Toto je rozhodujúci krok pre tvorbu iniciačného komplexu a centrálnu úlohu má IF-2. Po uvoľnení IF-3 sa GTP hydrolyzuje. Takto sú vytvorené predpoklady pre pripojenie 50S podjednotky, uvoľnenie IF-2 a GDP a pre vlastnú polypeptidovú syntézu - elongáciu, ktorá sa začína výlučne pod vplyvom IF-1.

N-formylmetionyl - tRNA_f sa nachádza hneď v tzv. P mieste /P = peptidylové miesto ribozómu/, vedľa ktorého je tzv. A miesto /aminokyselinové miesto ribozómu/, kam prichádzajú ďalšie komplexy aminokyselín s tRNA. Obidve miesta P i A sa nachádzajú na veľkej podjednotke ribozómu. Každý ribozóm teda poskytuje pre tRNA dve väzbové miesta na mRNA: A - aminoacylové alebo aminokyselinové, nazývané tiež akceptorové a P - peptidylové, bielkovinové, nazývané tiež donorové.

10.3.3 ELONGÁCIA PEPTIDOVÉHO REŤAZCA

Po vytvorení iniciačného komplexu môže sa začať ďalšia fáza proteosyntézy - elongácia. Má tri stupne:

- rozoznanie kodónu na mRNA antikodónom na tRNA,
- spojenie aminoacyl-tRNA vodíkovou väzbou s tripletom na mRNA,
- vytvorenie peptidovej väzby medzi susednými aminokyselinami.

Posledný krok je spojený s uvoľnením deacylovanej tRNA a translokáciou. Pre túto fázu proteosyntézy sú potrebné /okrem ribozómu, mRNA, aminoacyl-tRNA/ ešte molekuly GTP a rozpustné proteíny tzv. elongačné faktory EF.

f-Met-tRNA_f sa pravdepodobne spojí hneď s P miestom a na vedľajší triplet nasadá aminoacyl-tRNA s prislúchajúcim antikodónom na základe princípu komplementarity báz. Takto sa dostávajú dve aminokyseliny do takého priestorového vzťahu, že sa môžu spojiť pomocou enzýmu peptidyltransferázy naviazanej na 50S podjednotke.

Karboxylová skupina f-Met naviazaná na 3'-OH koniec tRNA vstupuje do reakcie s voľnou NH₂-skupinou nasledujúcej aminoacyl-tRNA a výsledkom tejto reakcie je vznik peptidovej väzby - CO - NH -. Vytvorený dipeptid zostáva spojený pomocou karboxylovej skupiny druhej aminokyseliny. Prvá deacylovaná tRNA sa odtrháva, čo vedie k uvoľneniu P-väzbového miesta a mRNA sa posunie o 3 nukleotidy spolu s tRNA, na ktorej je naviazaný dipeptid /dipeptidyl-tRNA/. A - miesto je tým voľné pre ďalšiu špecifickú aminoacyl-tRNA /obr.46/.

Uvedeným mechanizmom sa prečíta celá informácia na matrici mRNA. Čítanie informácie má ten istý smer ako primárna informácia kodogénneho reťazca DNA:

5' A T G C T C G G A 3'	plus reťazec DNA
3' T A C G A G C C T 5'	mínus reťazec DNA /kodogénny/
5' A U G C U C G G A 3'	kodóny v mRNA
3' U A C G A G C C U 5'	antikodóny v tRNA

Na jednom ribozóme sa môže nasyntetizovať jeden polypeptidový reťazec s molekulovou hmotnosťou asi 40 000.

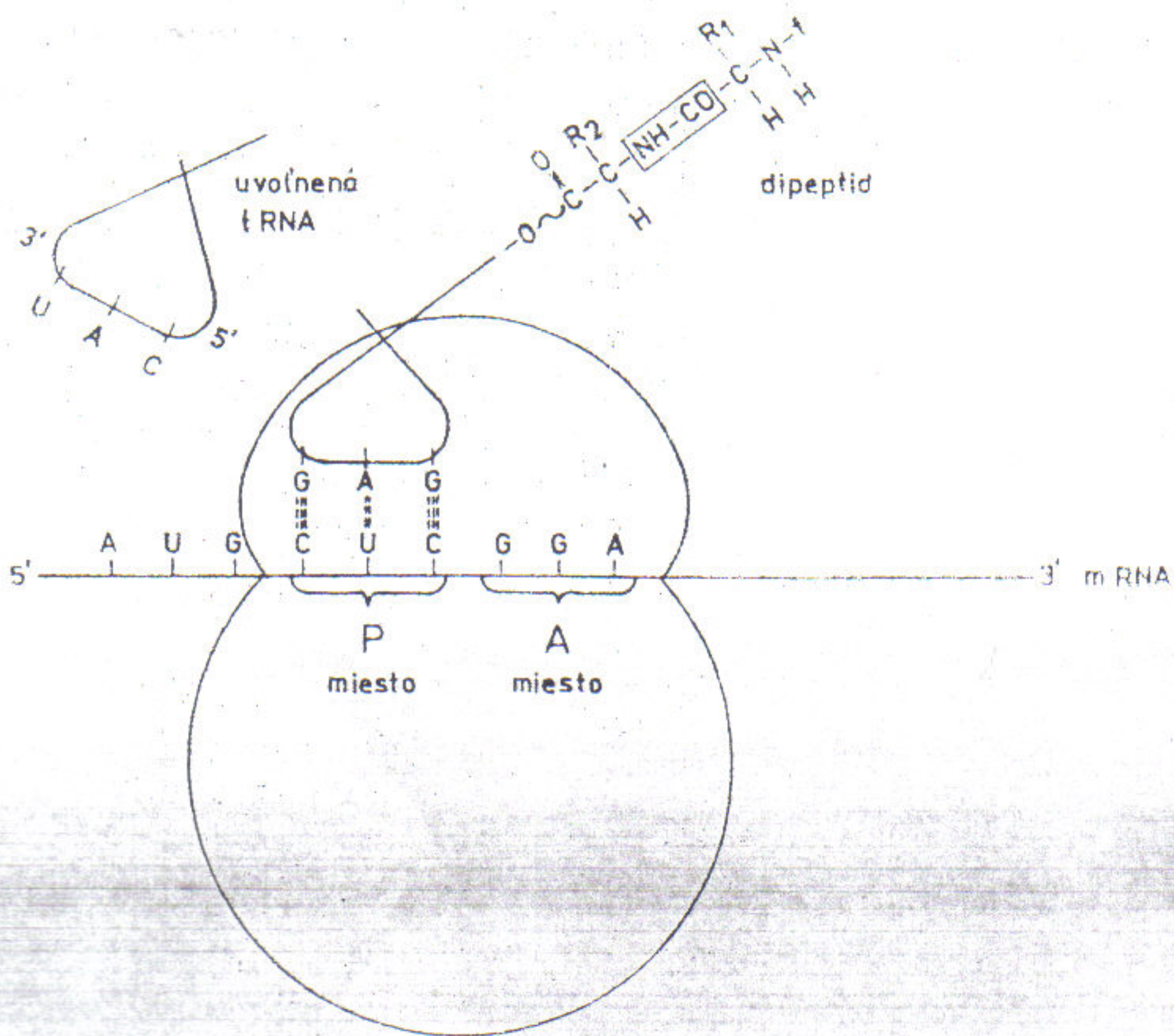
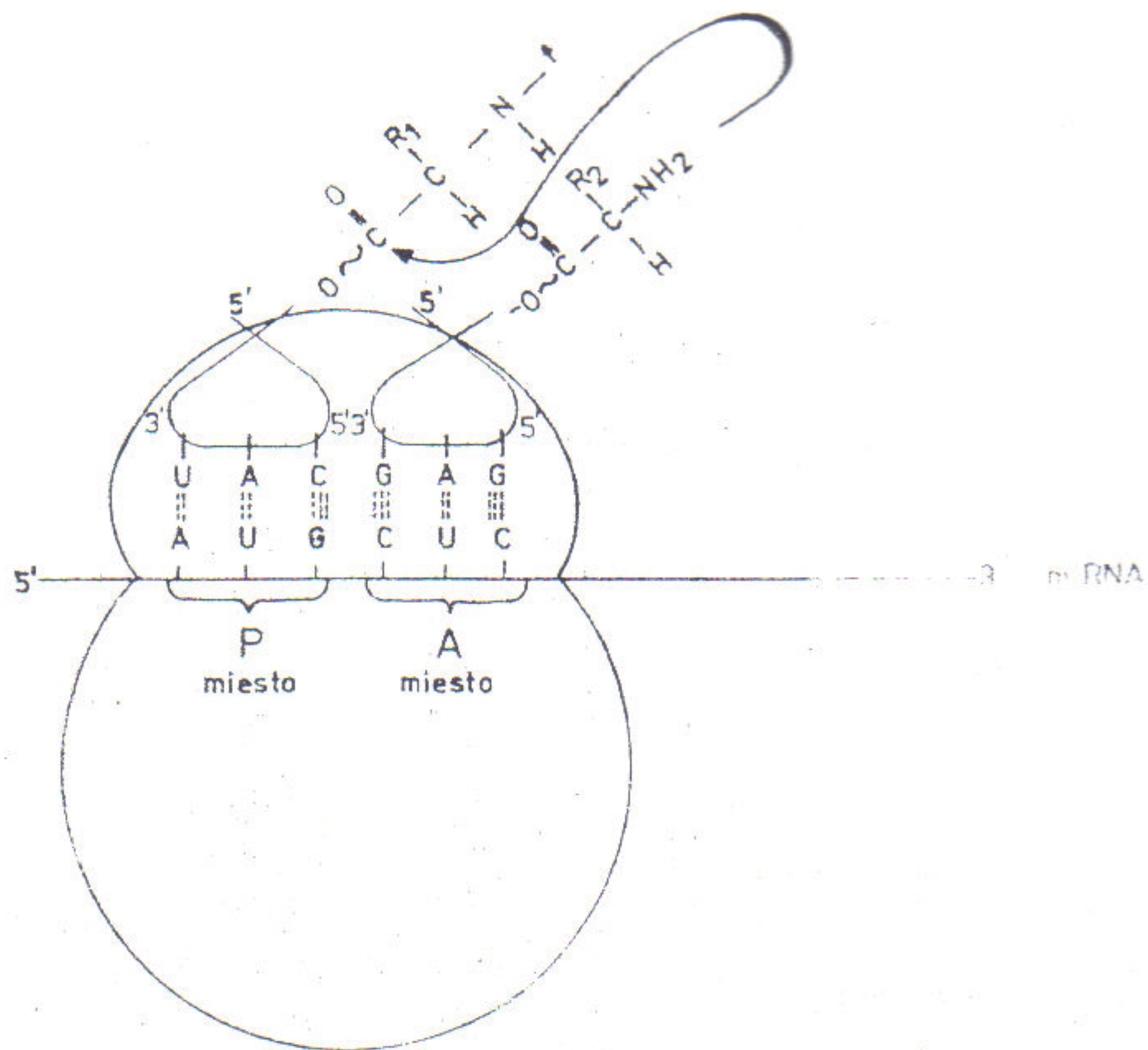
Aj na tomto stupni proteosyntézy pôsobia rozpustné bielkovinové faktory označované ako elongačné faktory EF. Kodón - špecifické spojenie aminoacyl-tRNA na A miesto v ribozóme obstarávajú dva faktory EF-Tu a EF-Ts za spoluúčasti GTP.

Predstava o pôsobení Tu a Ts faktora je nasledovná: pri dosiahnutí matrice mRNA musia aminoacyl-tRNA molekuly na A mieste ribozómu "skúšať", či majú k dispozícii správny kodón k svojmu antikodónu. Činnosť Tu a Ts faktorov spočíva v zabezpečení kodón - špecifickej väzby. Až potom sa vytvára peptidová väzba.

ciou.
l-tRNA/

triplet
komple-
vého
na

do re-
to re-
spo-
ná
unie
l -
r. 46/.
ítanie
DNA:



Obr. 46 Proteosyntéza - tvorba prvého dipeptidu

Reakcia je katalyzovaná tzv. peptidyltransferázovým centrom na 50S podjednotke. Translokácia peptidyl-tRNA z miesta A do miesta P vyžaduje ďalší elongačný faktor EF-G a ďalšiu molekulu GTP.

Predpokladá sa, že translokácia je jav, ktorý možno porovnať s kontrakciou svalu. Podieľajú sa na nej dva proteíny L7 a L12. Uvedené proteíny konformačnou zmenou ribozómu umožňujú posun mRNA a aminoacyl-tRNA. Bielkoviny L7 a L12 sú lokalizované na povrchu 50S podjednotky a spolupôsobia pri hydrolýze GTP, ktorá je nutná pre činnosť EF-G. Každá translokácia si vyžaduje energiu jednej molekuly GTP, ktorá sa získa odštiepením koncového fosfátu.

Uvedená fáza proteosyntézy patrí k rozhodujúcim pre presnosť prenosu genetickej informácie.

10.3.4 TERMINÁCIA A UVOĽNENIE PEPTIDOVÉHO REŤAZCA Z RIBOZÓMU

rychlost je zarazena v min at
Syntetizovaný peptid sa uvoľňuje z ribozómu, keď sa do A miesta dostane jeden z troch terminačných kodónov. Reakciu katalyzujú tzv. terminačné faktory RF-1 a RF-2. RF-1 rozoznáva stop-kodóny UAA a UAG /ochre a amber/ a RF-2 rozoznáva UGA /opal/. Oba terminačné faktory /releasing factors/ sú aktivované pomocou ďalšieho faktora RF-3, ktorý interaguje s GTP. RF-faktory napokon pozmenia špecificitu peptidyltransferázy tak, že katalyzuje hydrolýzu esterickéj väzby medzi peptidom a tRNA v peptidyl-tRNA viazanej v mieste P.

RF-faktory musia teda: rozoznávať terminačný kodón, nasadnúť naň a vytvoriť dočasný komplex s ribozómom a mRNA a napokon uvoľniť nasyntetizovaný polypeptid z P-miesta od poslednej aminoacyl-tRNA.

Zdá sa, že samotné uvoľnenie má na starosti RF-3 za spoluúčasti RF-1 a RF-2. Pre ilustráciu uvádzame, že napr. baktéria E.coli obsahuje 500-700 molekúl z uvedených faktorov v porovnaní s cca 30 000 ribozómami na bunku.

Je pravdepodobné, že sekundárna a terciárna štruktúra polypeptidu determinovaná poradím aminokyselín tvorí sa spontánne už pri samotnej syntéze polypeptidového reťazca, ale najčastejšie musí ešte nasyntetizovaná bielkovina prejsť určitými zmenami /processingom/, kým je z nej funkčná molekula. Niektoré proteíny sa syntetizujú veľmi rýchlo, iné pomalšie. Táto rozdielna rýchlosť syntézy je zapríčinená nukleotidovou sekvenciou ich promotorov.

Rýchlosť syntézy in vitro pri E.coli sa odhaduje približne na 20 aminokyselín za sekundu, t.j. asi 1200 peptidových väzieb za minútu. Pri živočíchoch je rýchlosť približne o polovicu menšia. Z uvedeného vyplýva, že bielkovina priemernej molekulovej hmotnosti sa zosyntetizuje za 20-60 sekúnd. /V tele dospelého človeka sa za deň nasyntetizuje, resp. odbúra približne 250-400 g bielkovín. K proteosyntéze dochádza nepretržite vo všetkých bunkách okrem červených krviniek./

10.4 POSTTRANSLAČNÁ MODIFIKÁCIA /ÚPRAVA/ BIELKOVÍN

Väčšina bielkovín, ktoré sa syntetizujú, nie sú hneď po uvoľnení z ribozómov aktívne a funkčné. Podliehajú modifikáciám, ktoré súhrnne nazývame posttranslačná úprava.

Modifikácie bielkovín zaraďujeme do dvoch skupín:

- proteolytické štiepenie /napr. pri inzulíne vzniká neaktívny prekurzor, ktorý sa skladá z troch reťazcov A - C - B. Až vyštiepením strednej časti C vzniká aktívny inzulín/,
- chemické kovalentné modifikácie, ktoré zahŕňujú metyláciu, acetyláciu, glykozyláciu a fosforyláciu.

Experimentálne sa zistilo, že až 13 z 20 aminokyselín sa môže modifikovať. Donedávna sa usudzovalo, že je to mechanizmus, ktorý sa odohráva výhradne pri eukaryotoch. Dnes to už jednoznačne neplatí.

Možno povedať, že bielkovina, ktorá sa odpútava z mRNA a ribozómu /novosyntetizovaná bielkovina zvaná aj nascentná bielkovina/ predstavuje prekurzor, ktorý sa posttranslačne upravuje - modifikuje. Až modifikované bielkoviny zaujímajú potrebnú priestorovú orientáciu pre splnenie funkcie štruktúrnych bielkovín alebo bielkovín s katalytickou funkciou /to sú enzýmy/.

10.5 ZHRNUTIE

Proteosyntéza je zložitý proces, ktorý sa odohráva na ribozómoch. Ide vlastne o realizáciu genetickej informácie. Základné kroky translácie, pri ktorej sa tvorí nový peptidový reťazec sú v hrubých rysoch zhodné pre prokaryoty i eukaryoty. /Prirodzene, sú však aj špecifické rozdiely medzi prokaryotickou a eukaryotickou proteosyntézou./

Sekvencia aminokyselín v bielkovine je určená sekvenciou kodónov v mRNA, ktoré sa čítajú prostredníctvom antikodónov na molekulách tRNA. Vlastná výstavba bielkoviny z aminokyselín podľa informácie mRNA sa nazýva translácia /preklad/. Pri translácii ide vlastne o preklad informácie zo štvorhláskovej reči /4 rôzne nukleotidy v mRNA/ do dvadsaťhláskovej /20 rôznych aminokyselín v bielkovinách/. Bielkovina je vlastne funkčnou realizáciou genetickej informácie a vlastne reprezentuje funkčný štruktúrny gén.

Bielkoviny sa syntetizujú od N-konca k C-koncu postupným pridávaním aminokyselín k C-koncu rastúceho polypeptidu. Aktívnymi prekurzormi slúžia aminoacyl-tRNA, v ktorých je aminokyselina svojou karboxylovou skupinou pripojená na 3'-OH koniec ribózy tRNA esterickou /vysokoenergetickou/ väzbou.

Úloha aminoacyl-tRNA sa zdá rozhodujúcou pre celý priebeh translácie. Predstavuje nielen sprostredkovateľa, ktorý umožňuje priradiť zodpovedajúce aminokyseliny ku kodónom, ktoré sú v mRNA, ale na základe svojich interakčných schopností predstavuje tiež motor, ktorý zapríčiňuje pohyb mRNA v ribozóme, a to asi mechanizmom alosterických premien. Okrem toho zabezpečuje čítanie mRNA v správnej fáze /čítanie po 3 nukleotidoch/.

Genetický kód je spôsob zápisu genetickej informácie.

Vzťah medzi rečou bielkovín a rečou nukleových kyselín sa nazýva genetické kódovanie. Realizuje sa špecifickou interakciou medzi bázami kodónov v mRNA a bázami antikodónov v tRNA podľa pravidiel o párovaní komplementárnych báz. Kodón v mRNA je trinukleotid, ktorého sekvencia určuje zaradenie jednej aminokyseliny.

Translácia mRNA a postupné spájanie príslušných aminokyselín peptidovou väzbou nastáva na ribozóme. Ribozómy sú univerzálne organely, na ktorých sa syntetizujú nové bielkoviny pri všetkých organizmoch. Pozostávajú z dvoch nerovnakých podjednotiek, ktoré sa skladajú z rRNA a bielkovín.

Translácia začína pripojením malej podjednotky ribozómu k mRNA s pomocou iniciačných faktorov. K iniciačnému kodónu sa pripája tRNA s formylovaným metionínom /f-Met-tRNA_f/ . Pri eukaryotoch sa metionín neformyluje.

V ďalšom kroku sa pripája veľká podjednotka a prečíta sa ďalší triplet; aminokyseliny sa za pomoci elongačných faktorov spoja.

Po prečítaní celej informácie sa za účasti terminačných faktorov /RF/ bielkovina uvoľní z ribozómu a ribozóm sa rozpadá na svoje podjednotky. Novosyntetizovaný polypeptidový reťazec sa ešte modifikuje, čím sa z neho stáva funkčná bielkovina.

I napriek tomu, že základné stupne procesu biosyntézy bielkovín sú známe, objavujú sa stále nové fakty súvisiace s proteosyntézou a ozrejmujúce jednotlivé dielčie kroky tohto zložitého molekulárno-genetického procesu.

10.6 CENTRÁLNA DOGMA MOLEKULÁRNEJ BIOLÓGIE

Už sme si uviedli, že geneticky najvýznamnejšie molekuly sú nukleové kyseliny a bielkoviny. Biosyntéza bielkovín predstavuje proces prenosu genetickej informácie medzi tromi typmi biomakromolekúl a to: deoxyribonukleovou kyselinou /DNA/, ribonukleovou kyselinou /RNA/ a bielkovinou /B/. Smer tohto prenosu postuloval r. 1958 Crick nasledovne:

